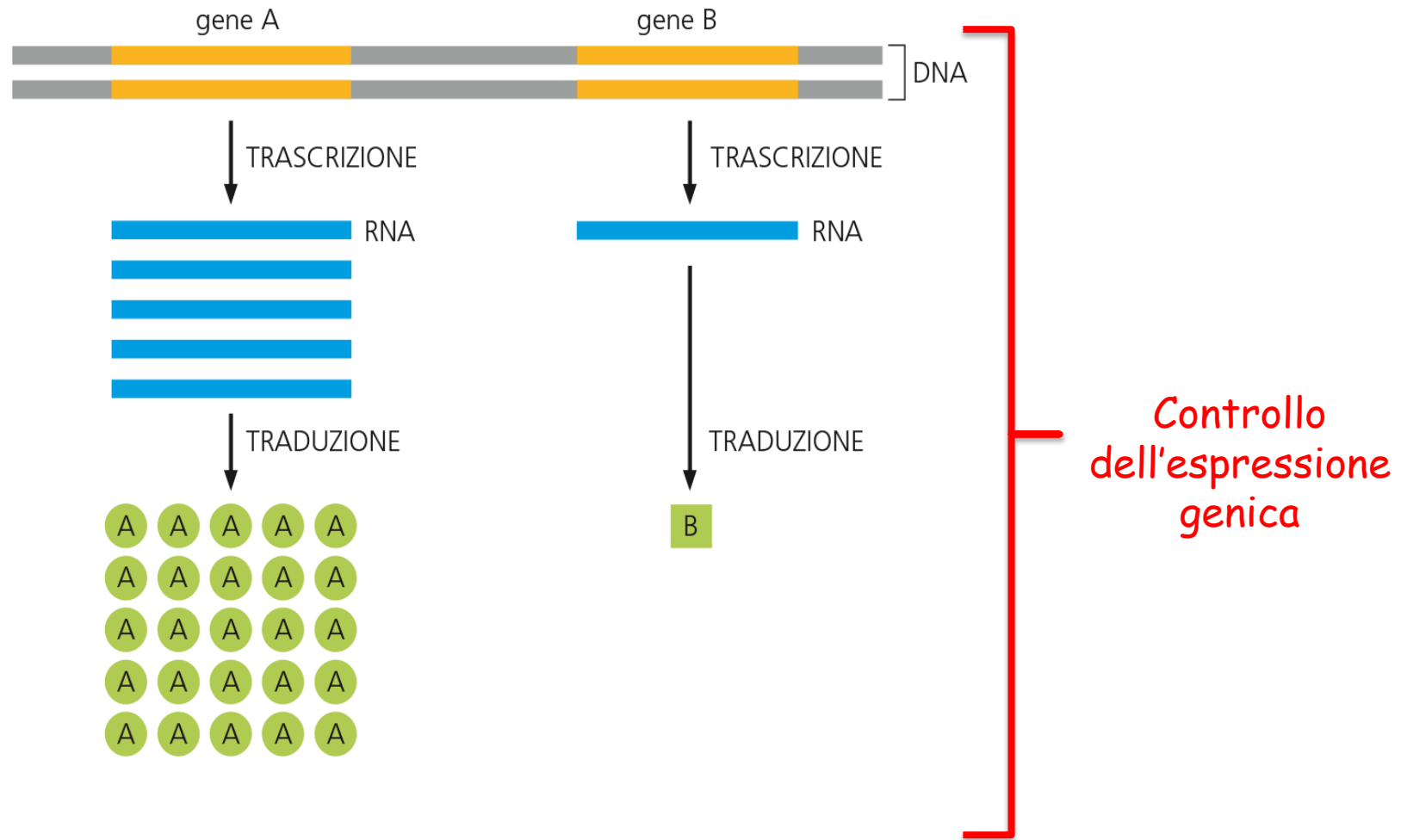
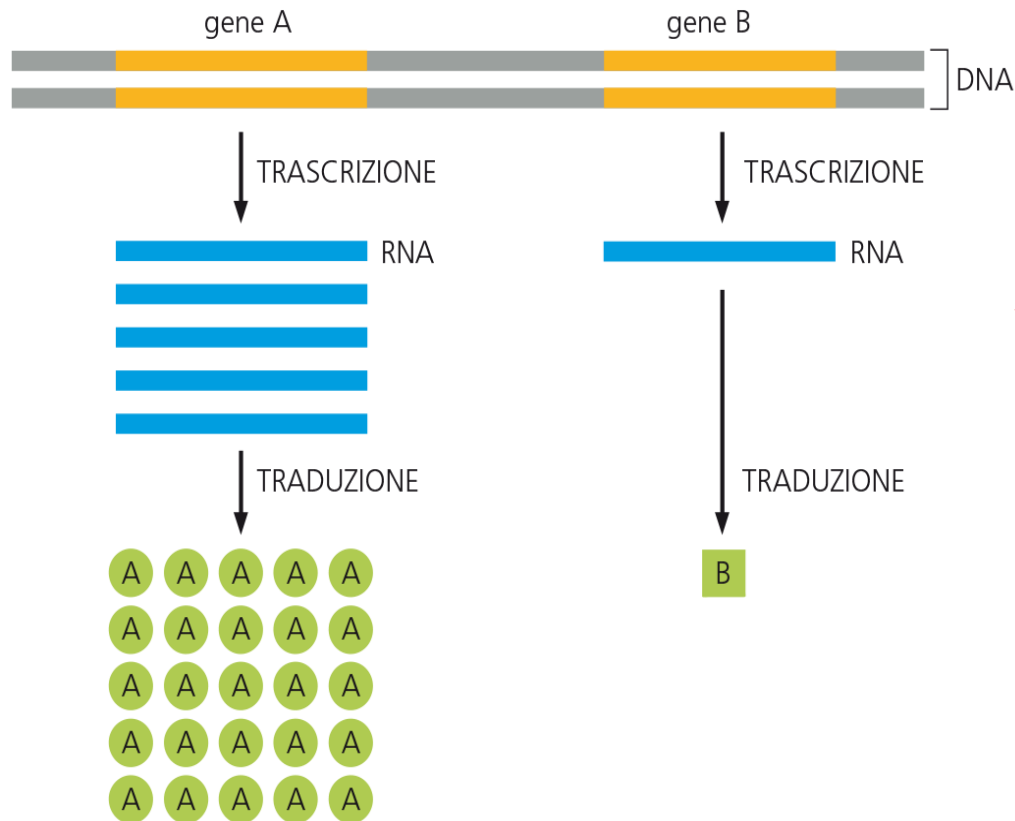


I geni presenti sul DNA sono espressi con diversa efficienza



I geni presenti sul DNA sono espressi con diversa efficienza



La quantità di mRNA del gene A e B può essere valutata mediante **Real-Time PCR**

Analisi della quantità di uno specifico RNA messaggero
nella cellula



Quanto è stato trascritto quel gene?

Analisi dell'espressione genica



L'informazione codificata nella sequenza delle basi del DNA viene trasferita nelle molecole di RNA.

L'informazione contenuta nelle molecole di RNA passa nelle proteine.



Il ciclo riproduttivo dei retrovirus richiede l'aggiunta di una tappa: la trascrizione inversa.

L'informazione contenuta nelle proteine non viene mai trasferita negli acidi nucleici.

2. RT-PCR

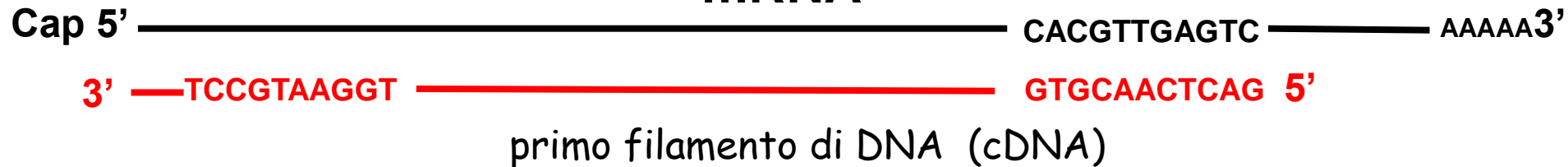
(Reverse Transcription- Polymerase Chain Reaction)



RT-PCR

(Reverse Transcription- Polymerase Chain Reaction)

mRNA



Ottenuto con l'azione della **trascrittasi inversa**, a 42°.

A questo punto si elimina l'mRNA.
Rimane il singolo filamento di cDNA

RT-PCR

(Reverse Transcription- Polymerase Chain Reaction)



Si lega il primer

A questo punto si avvia la PCR che,
in un primo ciclo, sintetizza il secondo filamento di DNA

RT-PCR

(Reverse Transcription- Polymerase Chain Reaction)



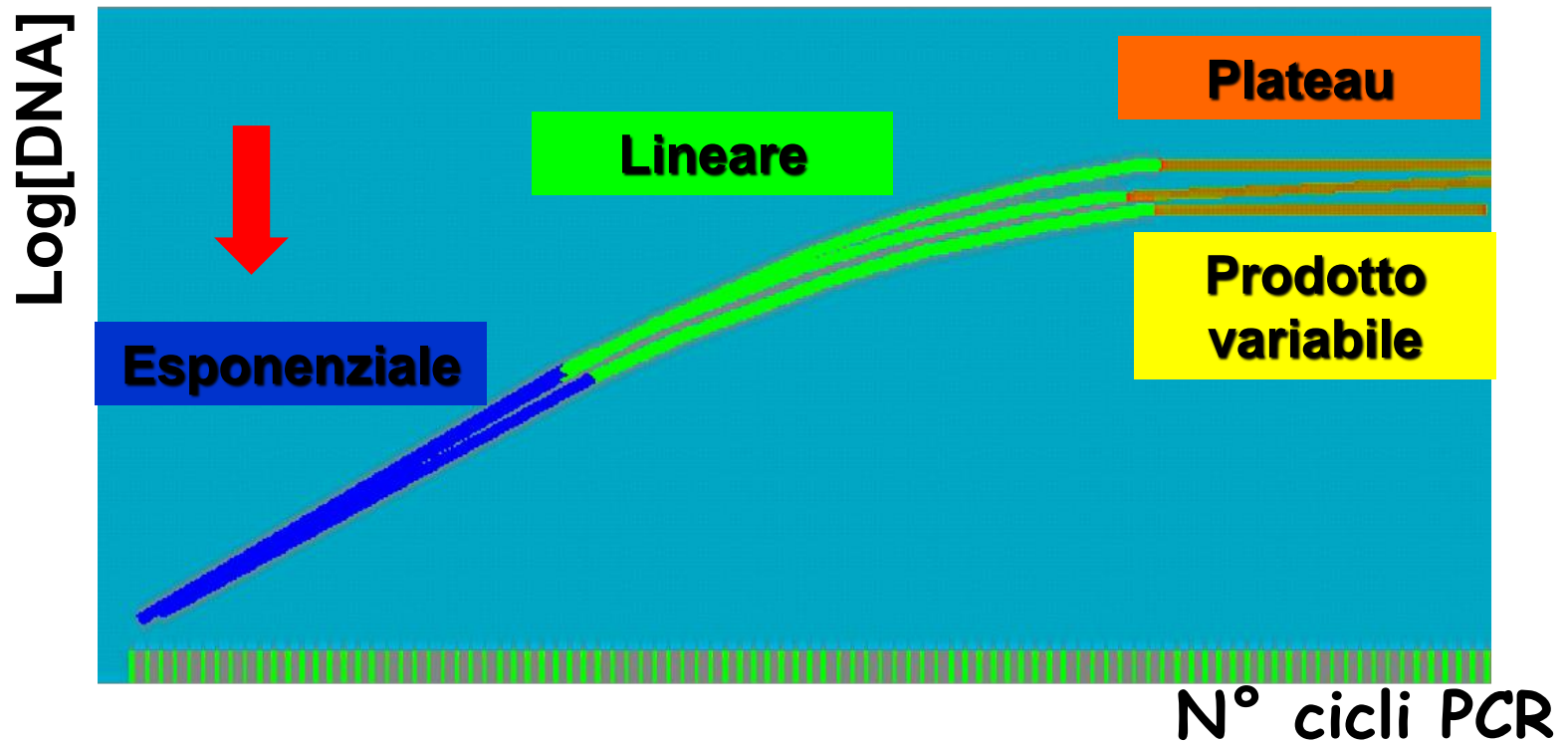
primo filamento di DNA

Da questo momento la PCR procede normalmente,
partendo da un doppio filamento di DNA.

.....non abbiamo una misura quantitativa di
uno specifico mRNA

Per avere una PCR quantitativa

Utilizzare i dati ottenuti durante la fase esponenziale in cui la quantità del prodotto di PCR è proporzionale al template iniziale



RT-PCR convenzionale

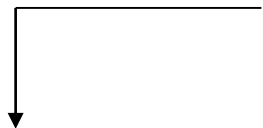
Reverse transcription



PCR reaction

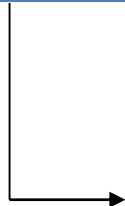


Gel electrophoresis



Si ottiene un'analisi qualitativa

DNA sequencing



Manual or automated analysis

Real-time RT-PCR

Reverse transcription



Si ottiene un'analisi quantitativa



PCR reaction

Perché Real-Time PCR?

Misura l'amplificazione dell'mRNA iniziale in **tempo reale** durante la fase esponenziale della PCR, quando cioè l'efficienza di amplificazione non è influenzata dalle variabili di reazione, permettendo di ottenere risultati molto più accurati rispetto alla PCR tradizionale "end point"

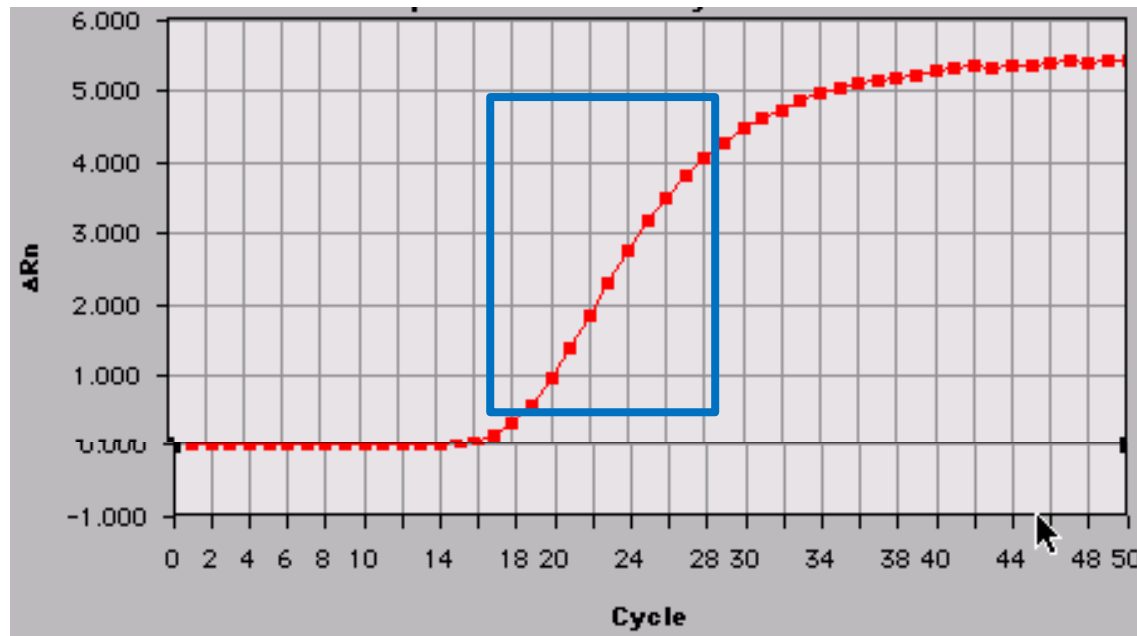


Questo è reso possibile mediante il rilevamento, di una fluorescenza, che è proporzionale al prodotto di PCR

RT-PCR quantitativa

- Rilevamento della fluorescenza associata all'amplificazione durante la fase esponenziale
- Il prodotto di PCR non viene analizzato mediante elettroforesi
- Analisi del prodotto di fluorescenza tramite computer

Incremento di
fluorescenza



Cicli di PCR

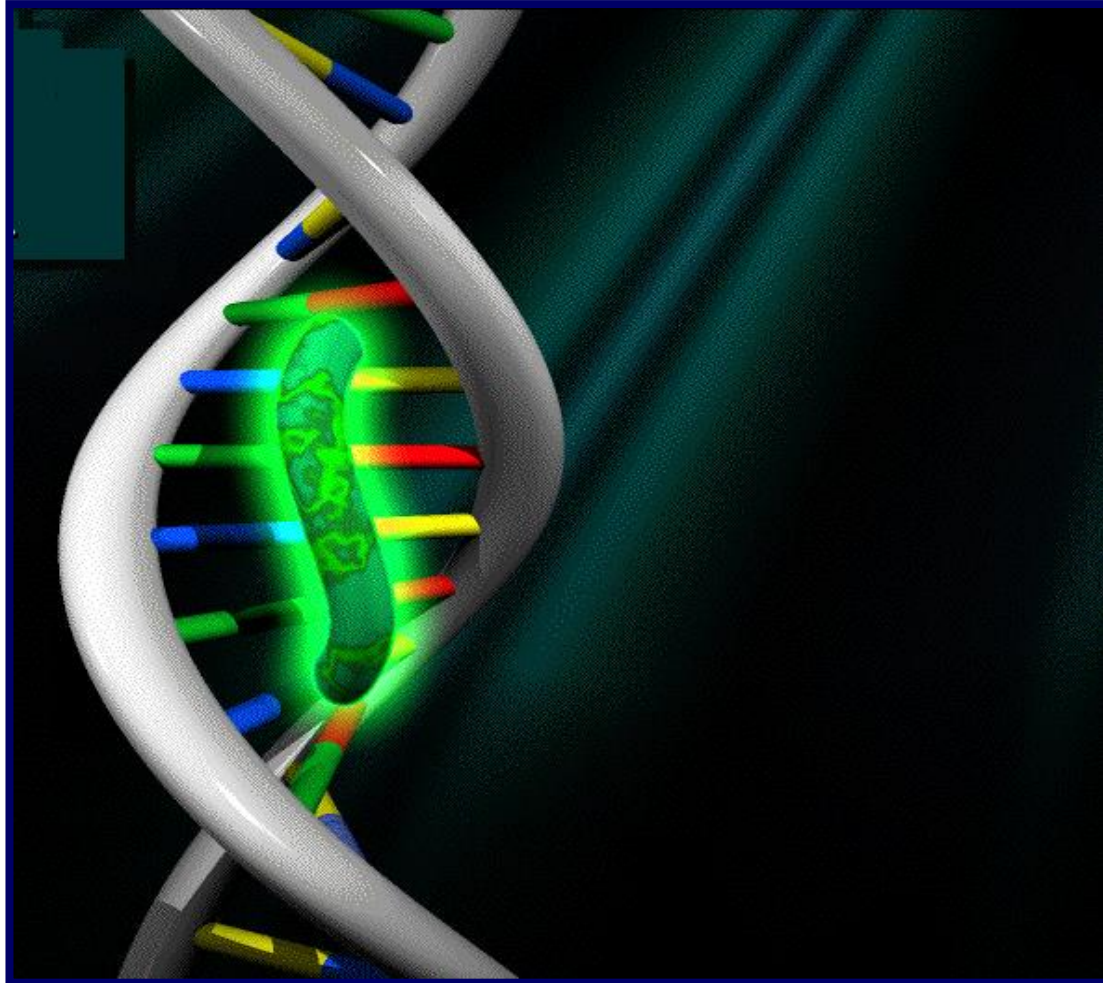
Sonde fluorescenti in Real-Time PCR

La fluorescenza che si genera durante la PCR puo' essere dovuta a:

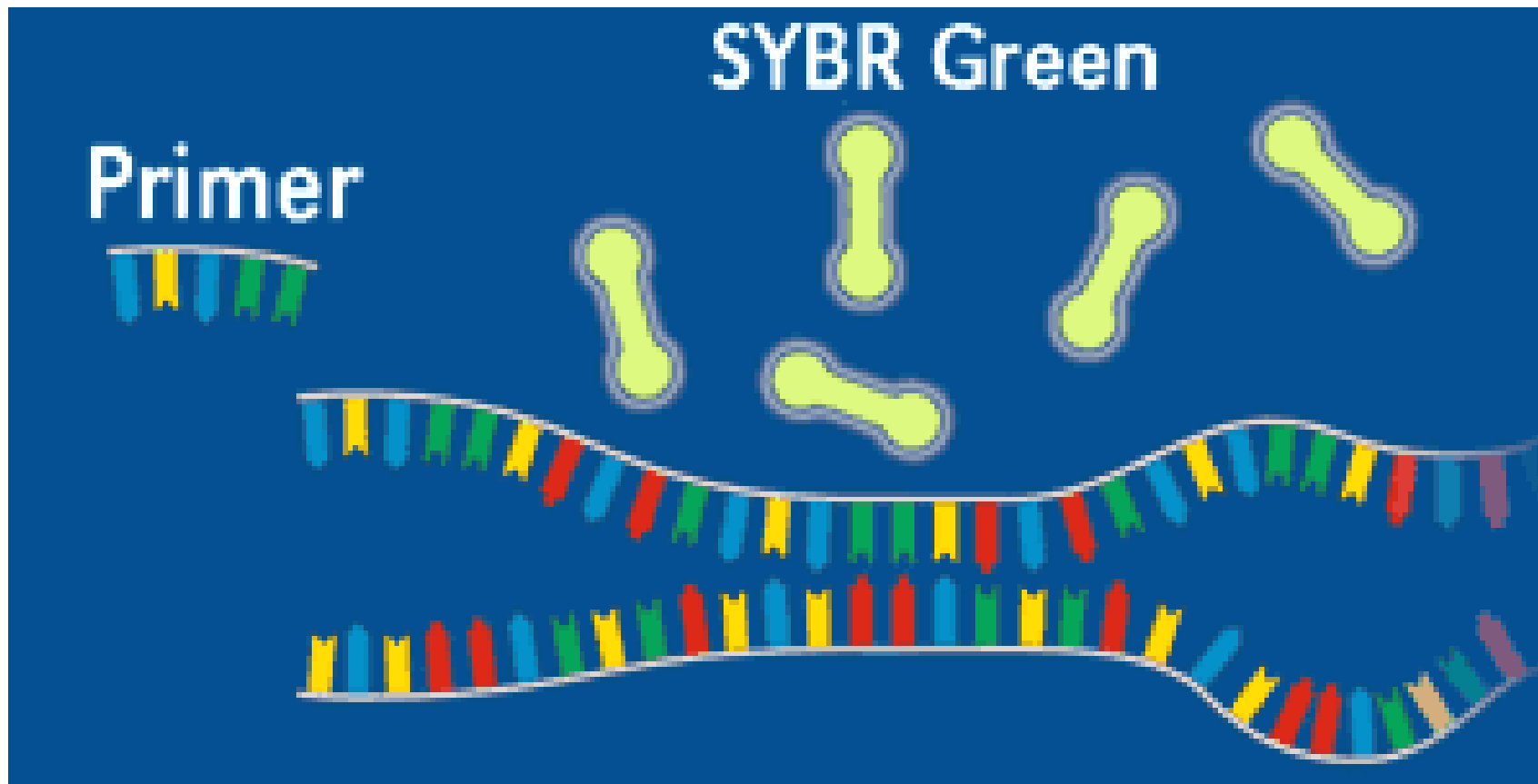
1. coloranti fluorescenti che si intercalano nella doppia elica di DNA
2. al legame di sonde fluorescenti specifiche per il prodotto di PCR

Sonde fluorescenti utilizzate in Real-Time PCR

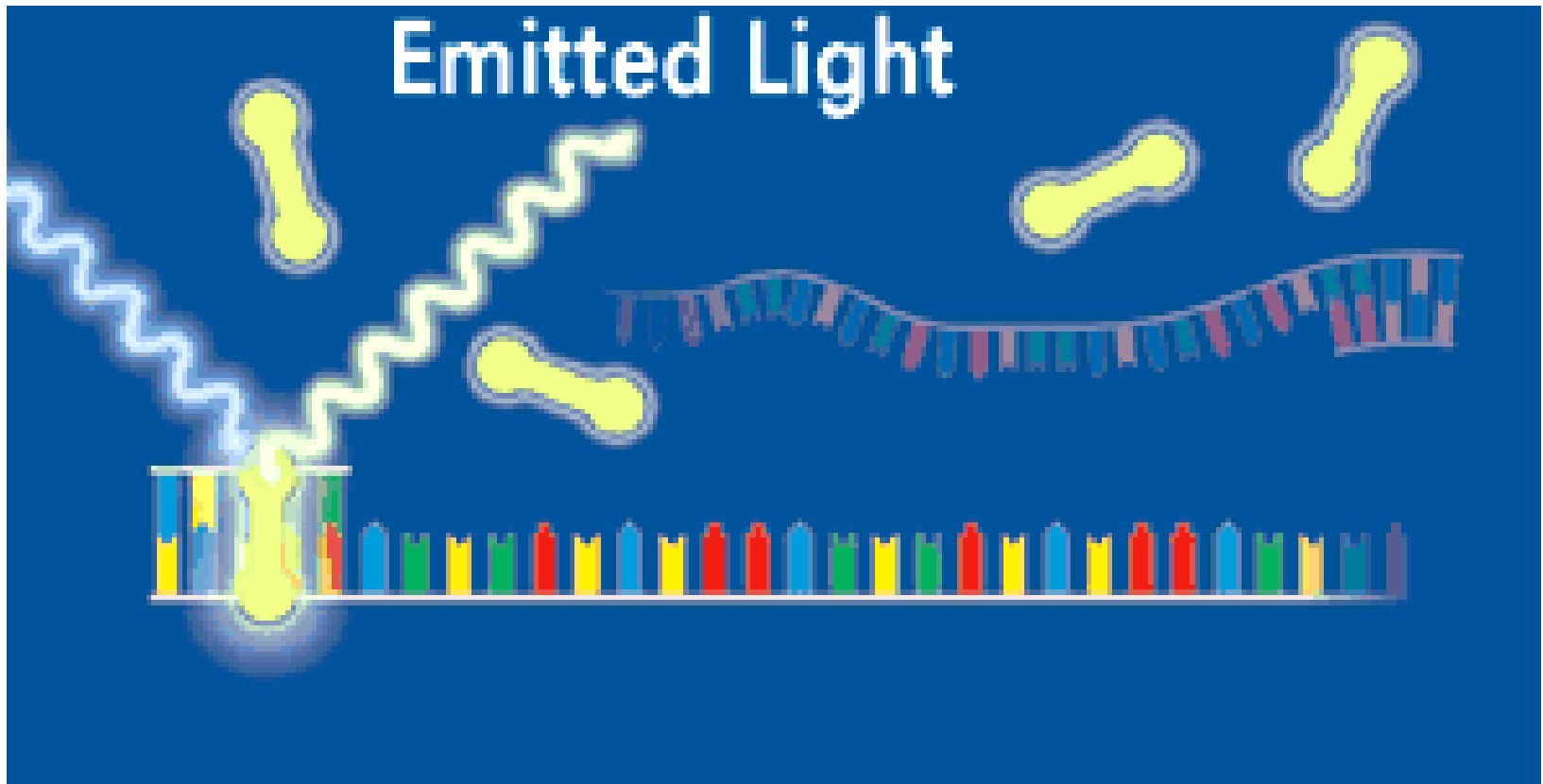
Sybr Green: molecola fluorescente non specifica che si intercala nell'elica del DNA



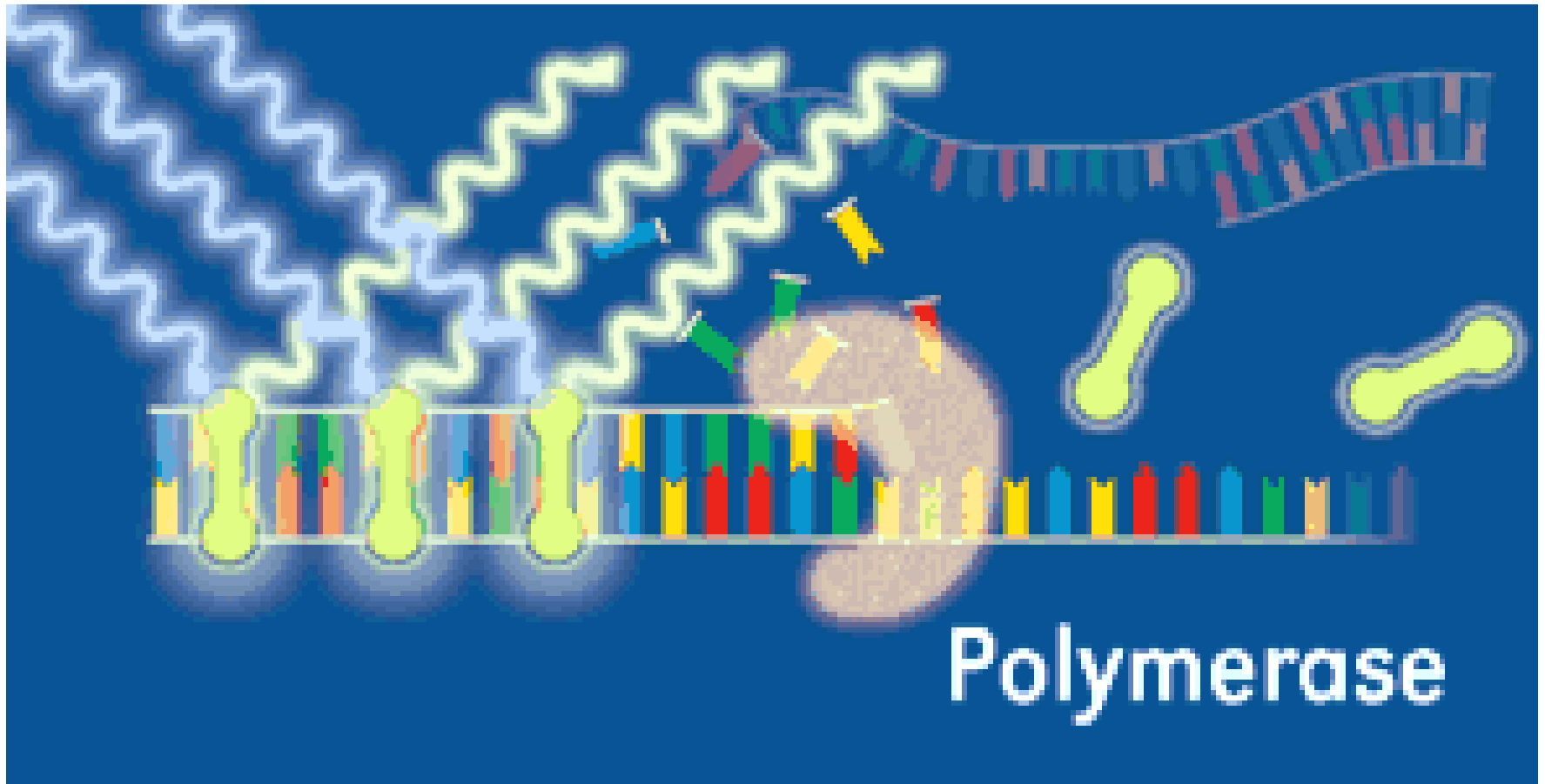
All'inizio del processo di amplificazione, la miscela di reazione contiene DNA denaturato, primers e la molecola fluorescente non legata



Dopo l'annealing dei primers, si legano poche molecole fluorescenti alla doppia elica.



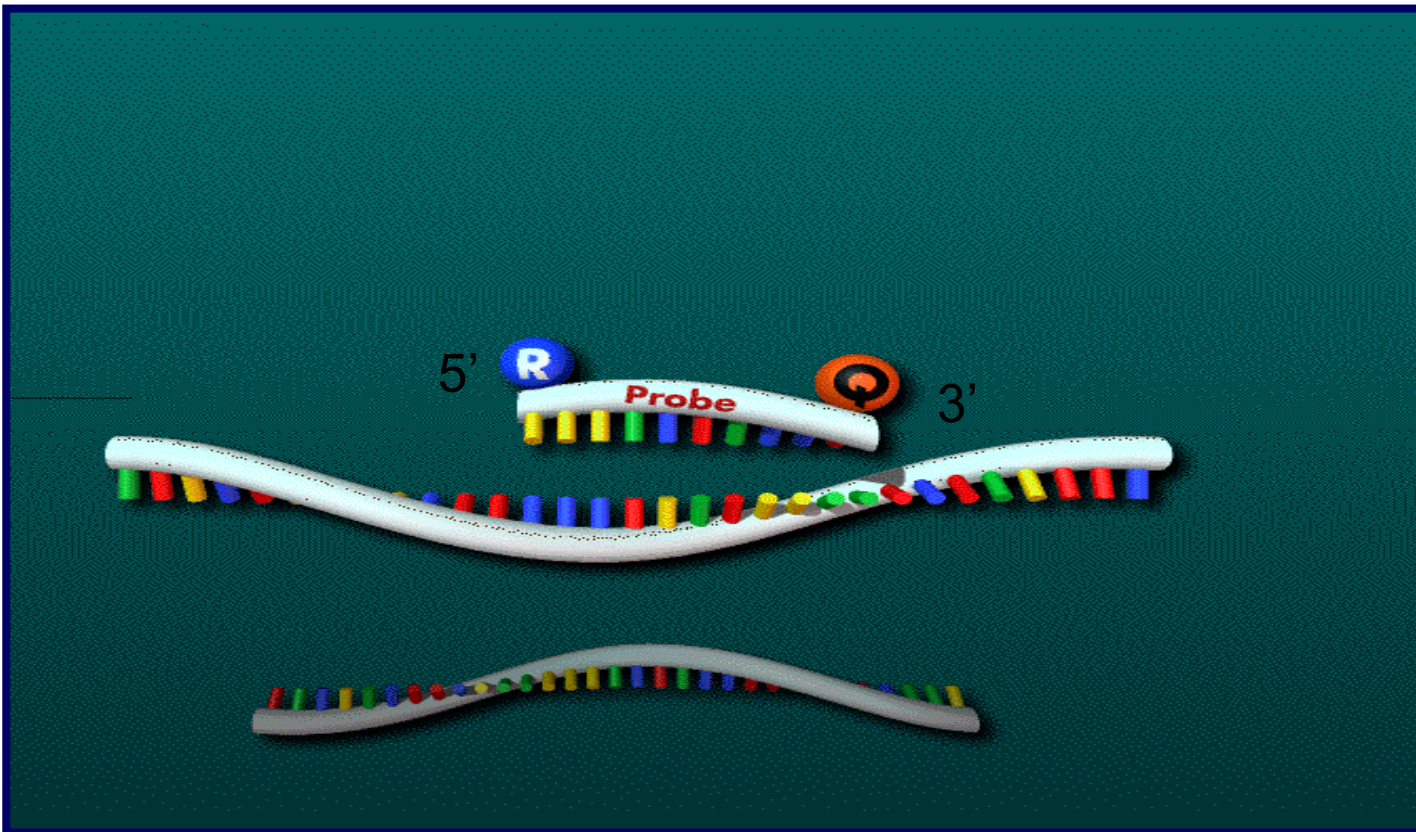
Durante l'elongazione si verifica un aumento di fluorescenza che corrisponde all' aumento del numero di copie dell'amplicone



Sonde fluorescenti utilizzate in Real-Time PCR

Sonda TaqMan

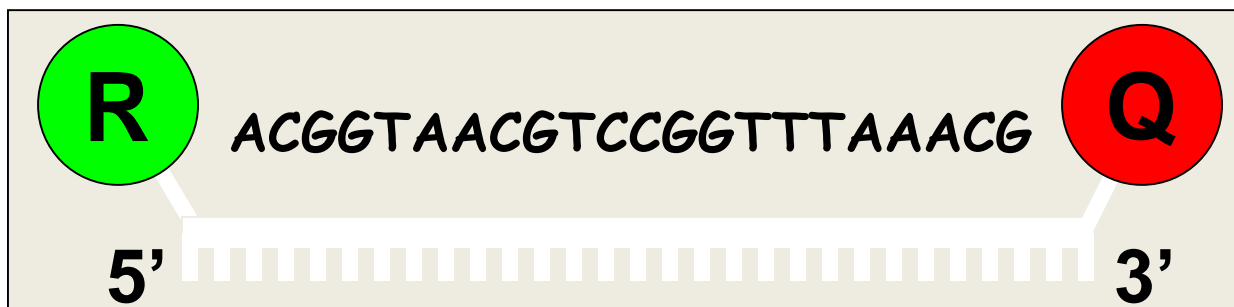
Presenta all'estremità 5' un fluoroforo "Reporter" ed all'estremità 3' una molecola "Quencher"



Reporter-Quencher

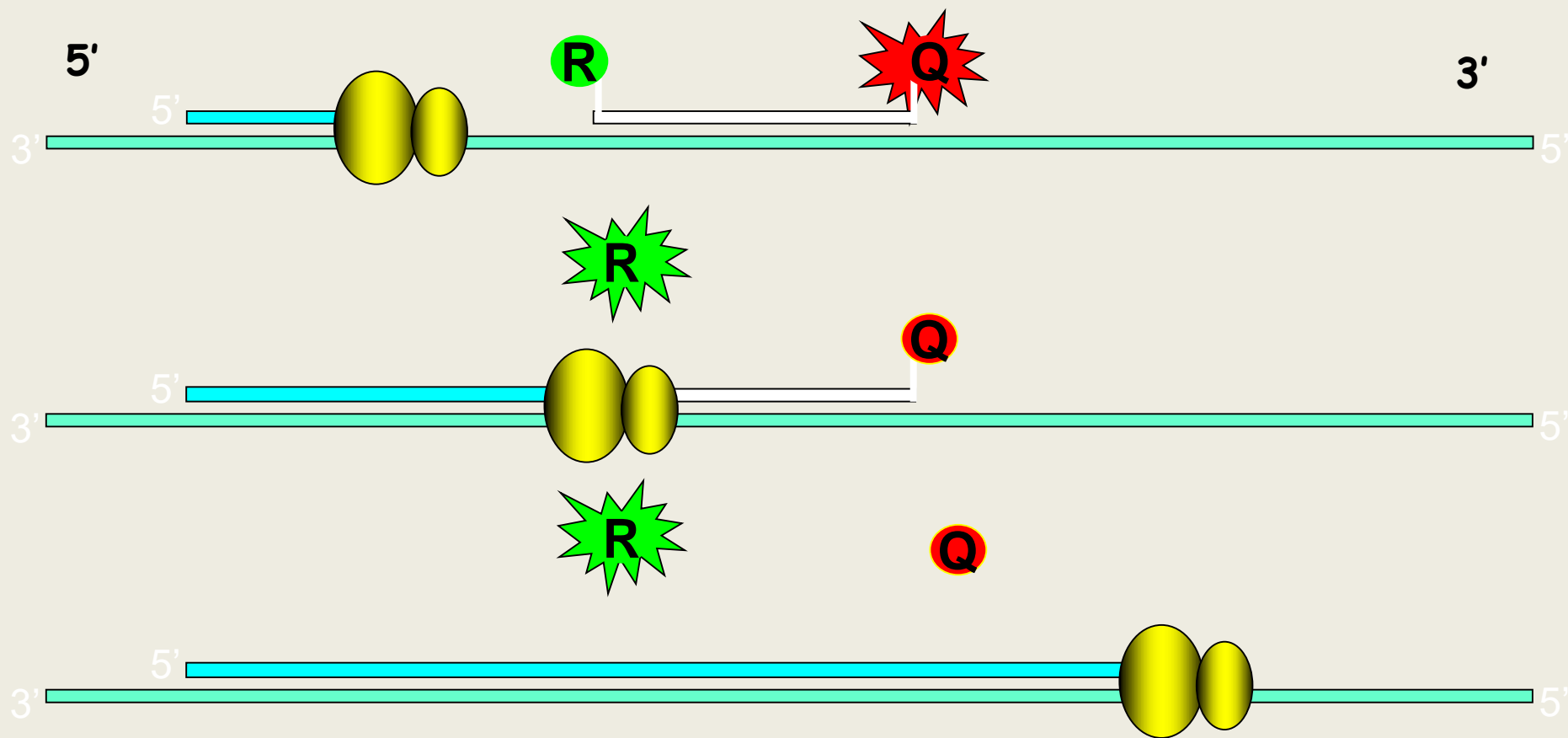
5' REPORTER (R): fluorocromo ad alta energia che emette fluorescenza

3' QUENCHER (Q): fluorocromo a bassa energia che spegne la fluorescenza del reporter



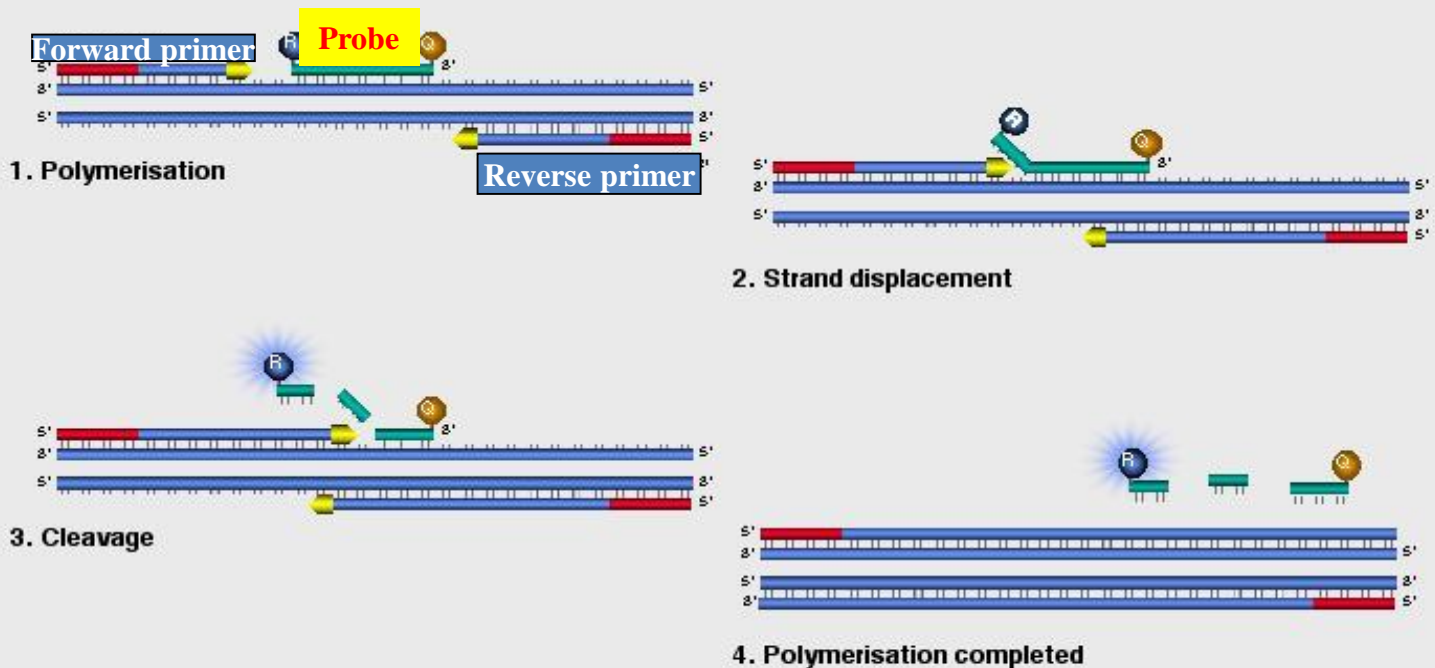
Se R e Q si trovano vicini, Q spegne l'effetto di R, cioè R non è fluorescente

Real-Time PCR: attività 5'→3' esonucleasica della DNA polimerasi



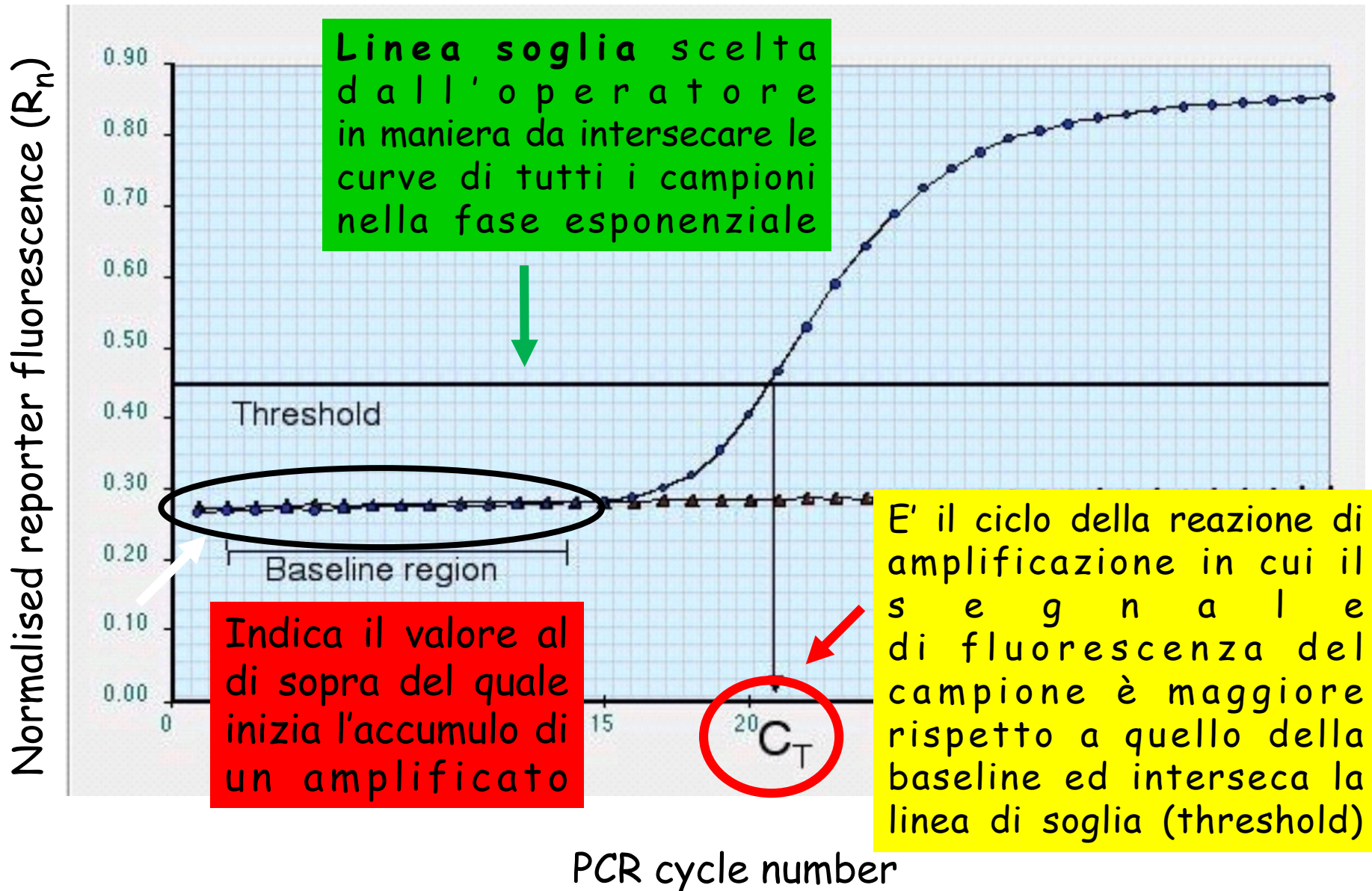
L'aumento di fluorescenza del Reporter è direttamente proporzionale al numero di molecole generate

Fluorogenic 5' nuclease assay (TaqMan® chemistry)

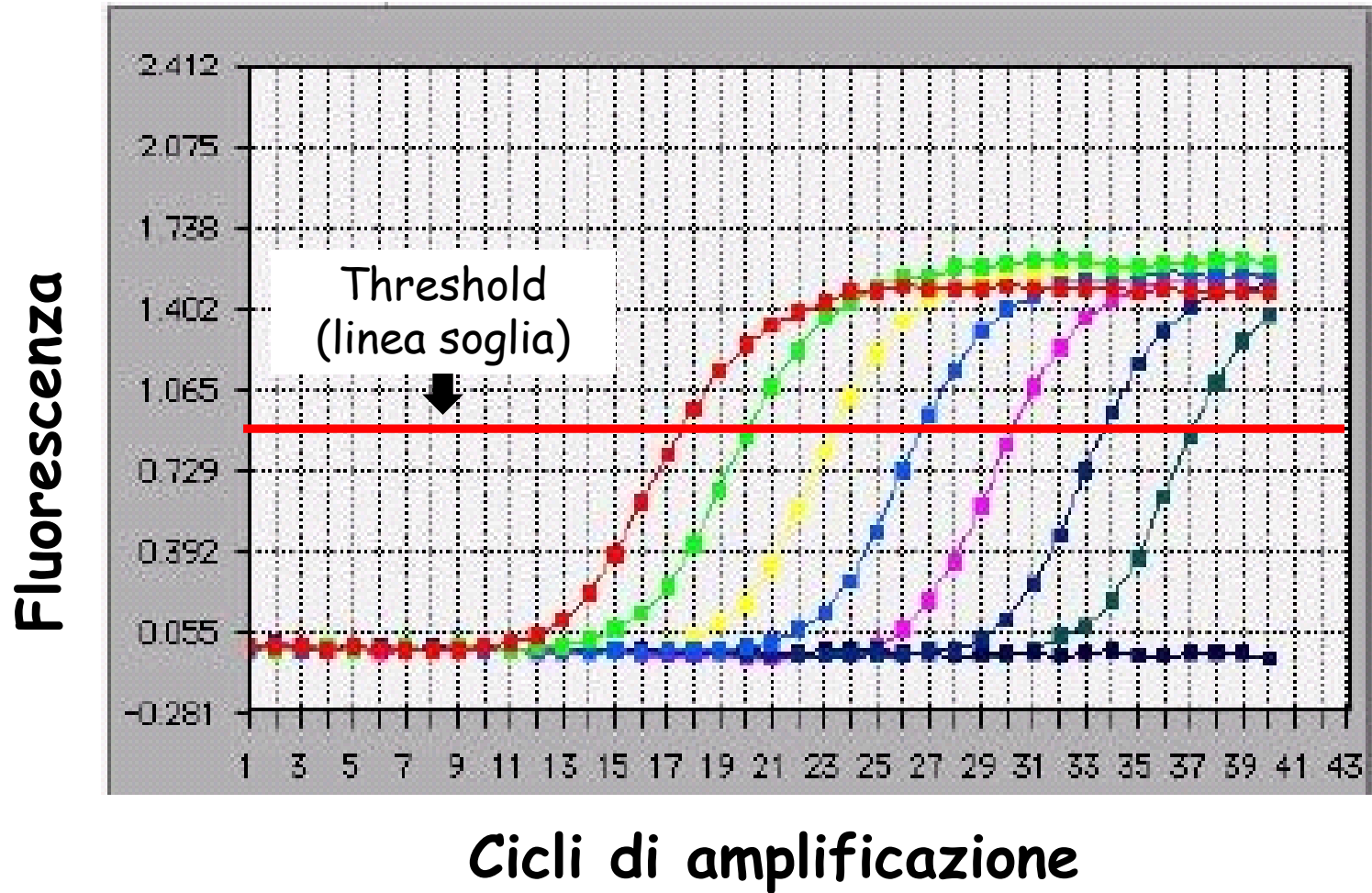


R = Reporter
Q = Quencher

Plot di amplificazione



Curve di amplificazione



Quantificazione

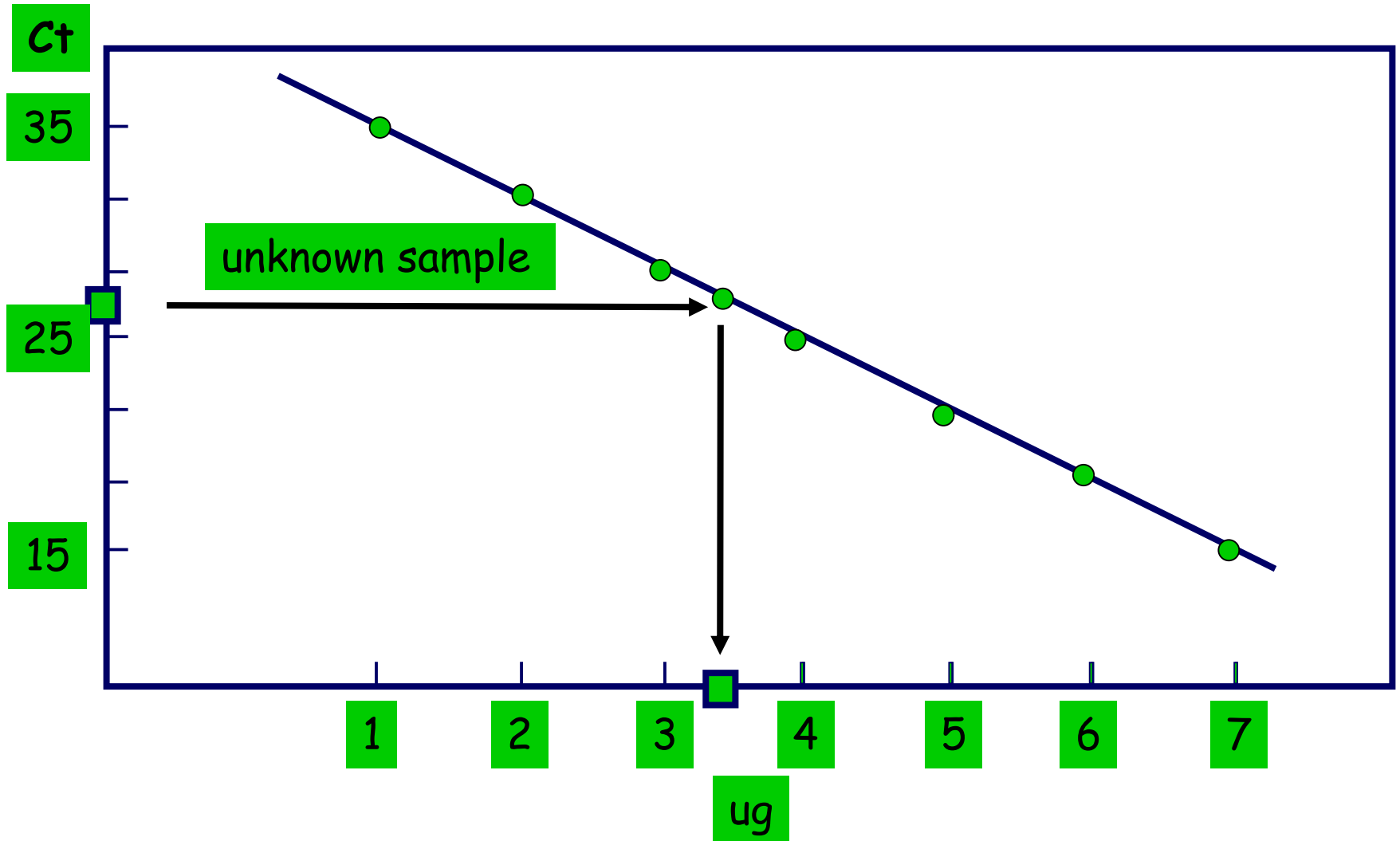
ASSOLUTA: i campioni sono quantificati in modo assoluto, si arriva a sapere la concentrazione dell'amplificato)

❖ Necessita di standard di cui si conosce la concentrazione assoluta (utilizzo di una curva standard)

RELATIVA: la quantificazione viene effettuata paragonando i C_T

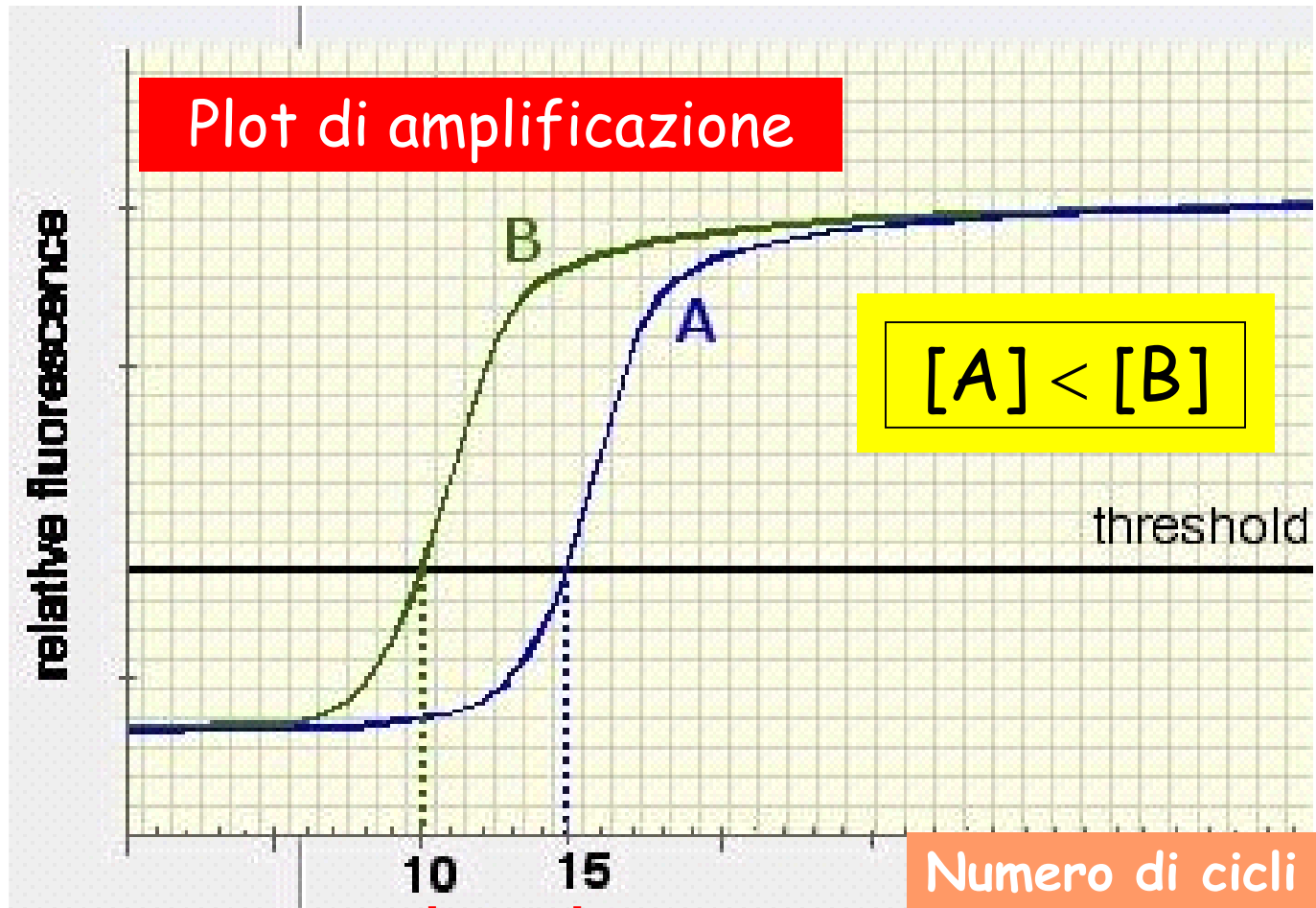
❖ Necessita di controlli endogeni (non si utilizza una curva standard)

Quantificazione assoluta



Il valore così ottenuto viene normalizzato rispetto a quello di un gene espresso di cui si conosce la concentrazione

Quantificazione relativa



ΔC_T

La concentrazione dell'RNA all'inizio della reazione è uguale in A e B