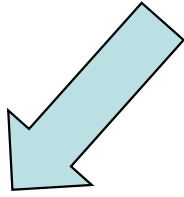
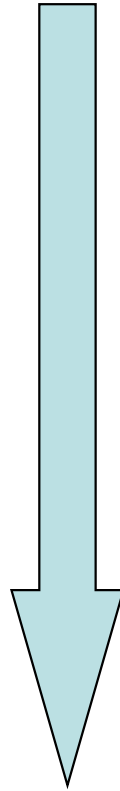


Diagnosi

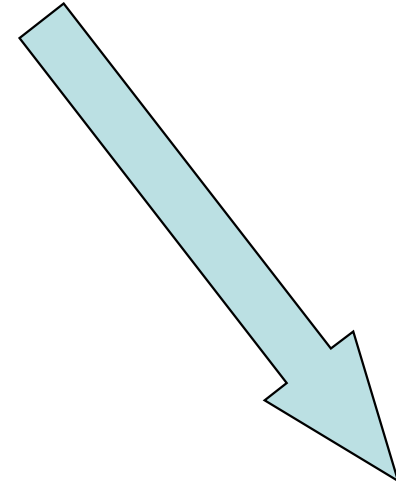


Test biologici

- Microbiologici (isolamento/osservazioni m.o.)
- Saggio biologico (virus)



Test sierologici



Test molecolari

Test biologici

Pro

Mediamente Attendibili

Mediamente Sensibili

Indispensabili per studi di patogenicità e individuazione agente eziologico (POSTULATI DI KOCH)

Contro

Non sempre specifici

Necessità di strutture e spazi adeguati

Risultati in tempi lunghi

Test sierologici

Pro / Contro

Media attendibilità

Assolutamente specifici

Mediamente sensibili

Di facile esecuzione

Test molecolari

Pro / Contro

Altamente specifici

Possibilità di diagnosi multiple e contemporanee

Altissima sensibilità (femtogrammi di DNA)

L'esecuzione richiede personale altamente qualificato- Costi elevati

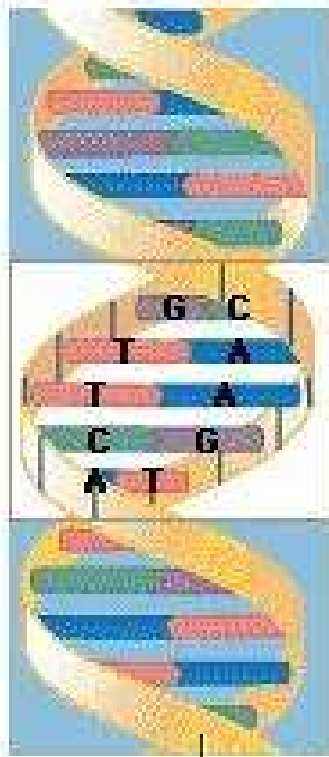
DIAGNOSI



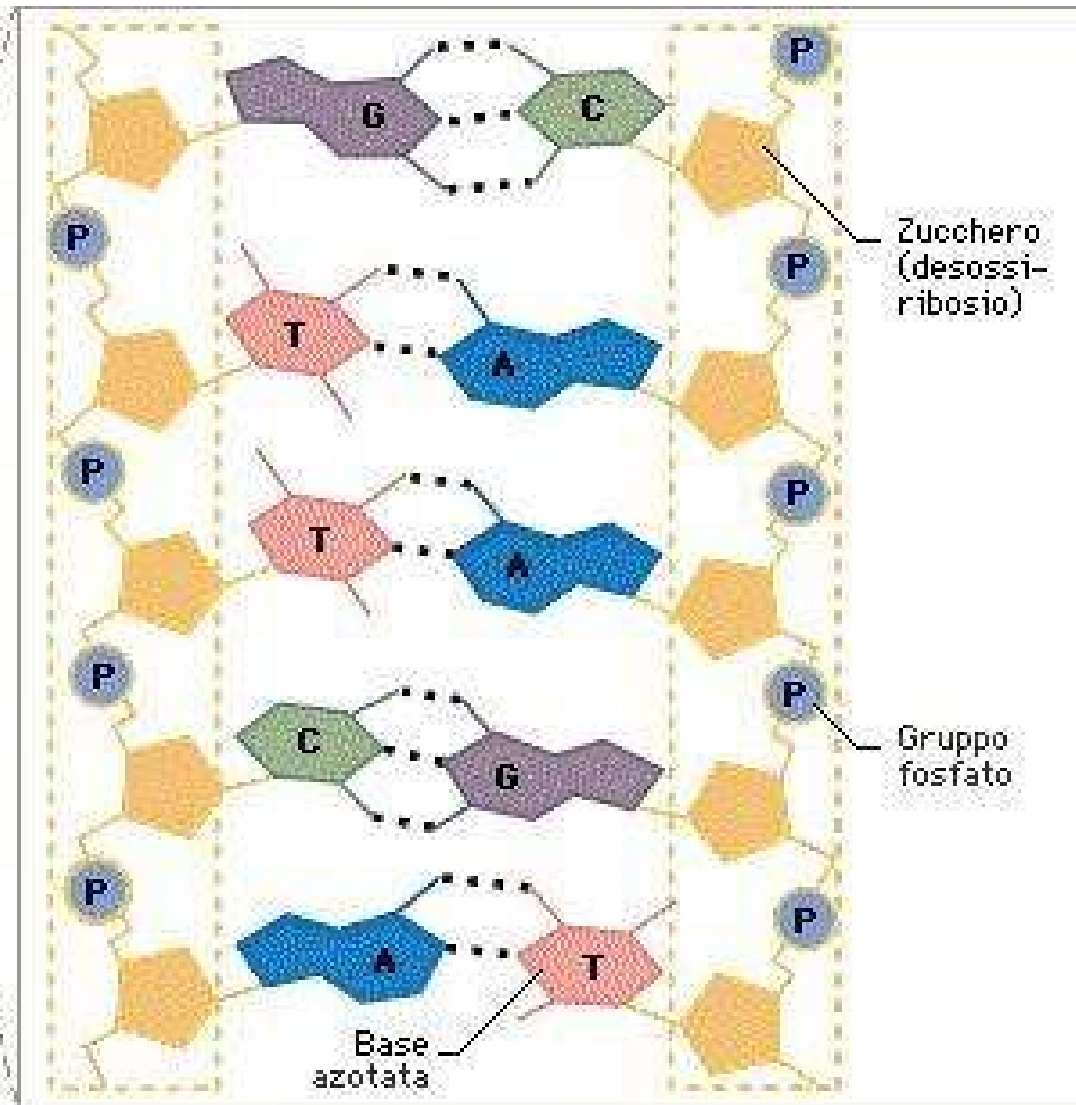
MOLECOLARE

Struttura a doppia elica degli acidi nucleici

Modello a doppia elica del DNA



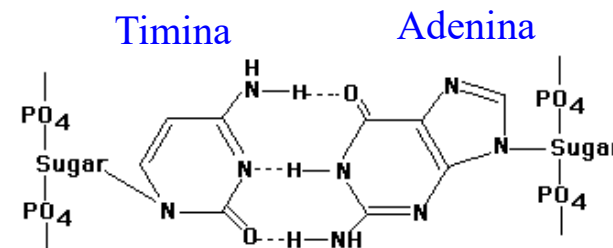
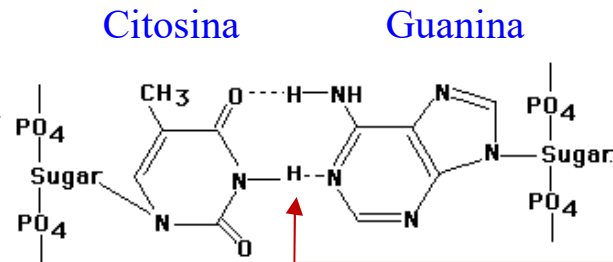
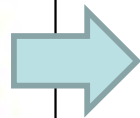
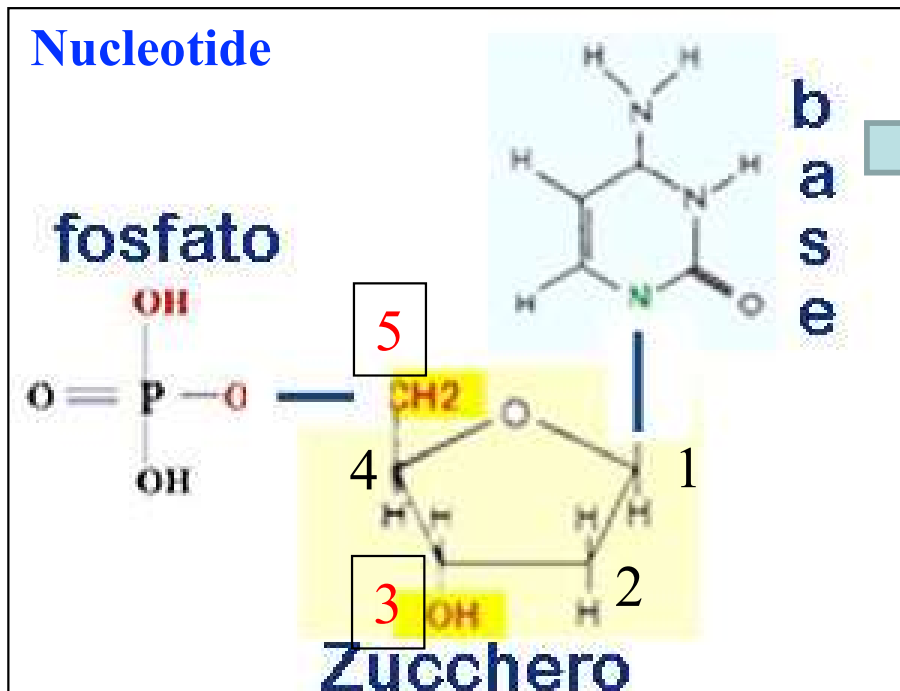
La struttura portante è costituita dalle molecole di zucchero alternate ai gruppi fosfato



Composizione acidi nucleici

Le **basi azotate** sono quattro: adenina, guanina, citosa e timina mentre nell'RNA, al posto della timina, è presente l'uracile.

Tutti i **nucleotidi** sono costituiti da tre componenti fondamentali: un gruppo fosfato, zucchero pentoso, il deossiribosio nel DNA mentre è il ribosio nel RNA, e una base azotata che si lega al deossiribosio con legame N-glicosidico.



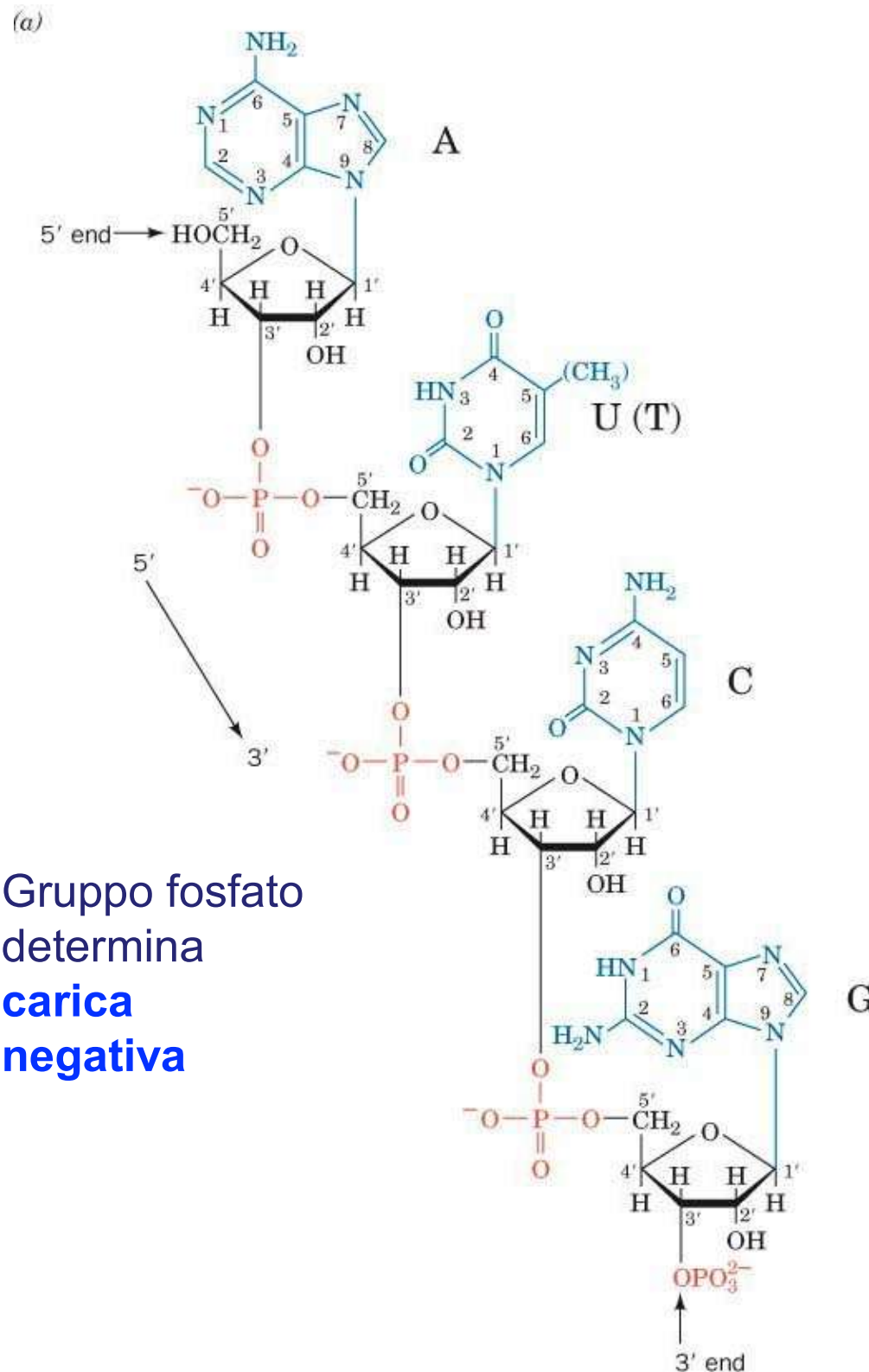
Uracile

La formazione di **legami idrogeno** A-T e C-G determina la struttura a doppia elica del DNA

La **struttura laterale** del DNA è composta da unità ripetute ed alternate di gruppi fosfato zucchero **pentoso** (a cinque **atomi di carbonio**) che si lega ai **fosfati** adiacenti attraverso **legami fosfodiesterici** presso il **terzo ed il quinto** carbonio; in pratica, ogni molecola di fosfato forma un ponte molecolare collegando, attraverso legami fosfodiesterici, il carbonio in posizione 3' di una molecola di deossiribosio con quello in posizione 5' dello zucchero successivo.

Il legame **zucchero-fosfato** conferisce al filamento di DNA una direzione (5' – 3')

Gruppo fosfato determina **carica negativa**



Tecniche di diagnosi molecolare

Metodi indiretti

Ibridazione molecolare

In fase liquida

In fase mista : solida/liquida

□ Reazione a catena della polimerasi
(PCR)

➤ Dot blot

✓ PCR convenzionale

✓ Nested PCR

✓ Multiplex PCR

✓ RFLP

✓ PCR in tempo reale

La PCR convenzionale

reazione a catena della polimerasi (*Polymerase Chain Reaction*): è IL metodo diagnosi molecolare per eccellenza

Sintesi in vitro di frammenti di acidi nucleici noti

Obiettivo :

Individuare il patogeno mediante individuazione del suo DNA

Presupposto:

Conoscenza pregressa della sequenza genica da cercare

Metodo:

Ibridazione di sequenze note , primers, che si ibridano con il DNA del patogeno (DNA «target») in modo altamente specifico

Fasi della diagnosi molecolare mediante PCR

Si distinguono tre fasi:

- 1 Estrazione e purificazione del DNA** (dell'intera pianta o del patogeno isolato in purezza)
- 2 Amplificazione** (o sintesi) in termociclatore (PCR)
- 3 Visualizzazione** del prodotto di sintesi **su gel** di agarosio (elettroforesi)

1) ESTRAZIONE ACIDI NUCLEICI

- totali (pianta+patogeno)
a partire dal campione infetto



- del patogeno in coltura pura



2) AMPLIFICAZIONE

Fasi fondamentali della PCR

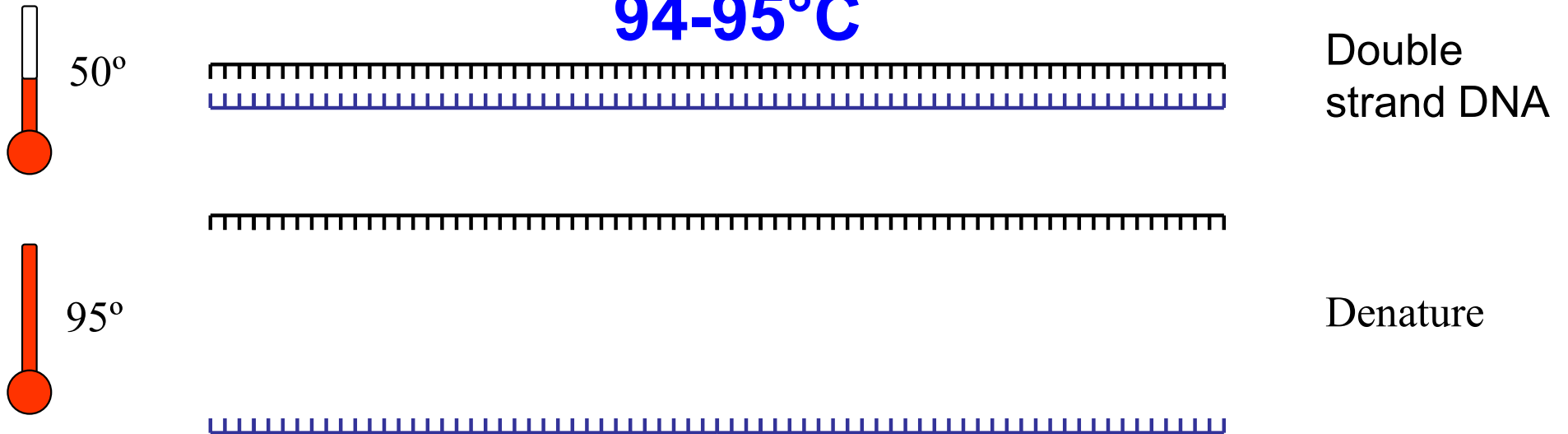
2 a) Denaturazione

2 b) Annidamento dei primer (Annealing)

2 c) Polimerizzazione del nuovo filamento (Extension)

AMPLIFICAZIONE : fase di denaturazione

94-95°C

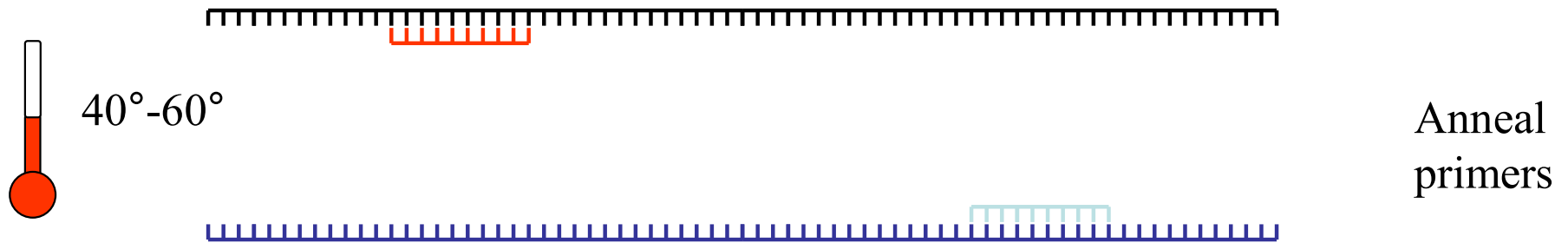


La denaturazione determina l'apertura del DNA a doppia elica ed avviene piuttosto rapidamente. Il più delle volte la temperatura utilizzata è di 94°C per 15-30 secondi ma alcune **variabili** possono richiedere un aggiustamento di tali valori:

- **volume** di reazione
- **lunghezza e quantità** di DNA target
- **contenuto in GC** (sono più stabili, per ogni punto % si aumenta di 0,4 °C)

Si consiglia la **denaturazione iniziale** a **95°C per 2 minuti** prima dei cicli di PCR per denaturare completamente il DNA.

AMPLIFICAZIONE : fase di appaiamento (annealing) 40-60°C



Successivamente la temperatura viene abbassata fino a 40-60 °C circa al fine di permettere il **legame dei primer** alle regioni loro complementari del DNA.

La temperatura da utilizzare, e la sua durata, devono essere scelti considerando due aspetti opposti:

$$T_{\text{annealing}} = T_{\text{melting}} - 5^{\circ}\text{C}$$

Una temperatura più elevata, infatti, aumenta la **specificità** della reazione ma ne può pregiudicare l'efficienza poiché favorisce la separazione dei primer dal bersaglio (il valore della temperatura a cui si ha il 50% di transizione tra stato a doppia ed a singola elica viene detto **temperatura di melting** o di fusione)

OligoEvaluator™

[Technical Help](#)

Analysis
Resuspension
Dilution

Enter No. of Sequences to be Analyzed: ▼ + Add Sequence

1. Sequence (5' to 3')

Type: DNA ▼ *Only Linear
Length: bp
+ Add Mod

AAACTCTGTCGTGCTGGGGATA

Base Annotations:
 DNA = A, T, G, C or [dA], [dT], [dG], [dC]
 Base Degeneracies = B, D, H, K, M, N, R, S, V, W, Y or [dB], [dD], [dH], [dK], [dM], [dN], [dR], [dS], [dV], [dW], [dY]
 LNA@ = [+A], [+T], [+G], [+C]
 Phosphorothioated (S-Oligo) DNA Base = prefix the base with an asterisk "*" (e.g. *A, *G)
 DNA Sequence with RNA Base = place the RNA base within brackets [rX]
 RNA = A, C, G, U or [rA], [rG], [rC], [rU] (begin sequence with an "r" as the prefix followed by the sequence, e.g. rACGU, or select Type as RNA)
 Phosphorothioated RNA = *A, *G, *C, *U
 2'-Methyl RNA = [mA], [mG], [mC], [mU]
 Phosphorothioated 2'-O-Methyl RNA = [mA]*, [mG]*, [mC]*, [mU]*. Use [rX] for standard RNA and [dX] for standard DNA bases.
 RNA Sequence with DNA Base = place the DNA base within brackets [dX]

Reset
Calculate

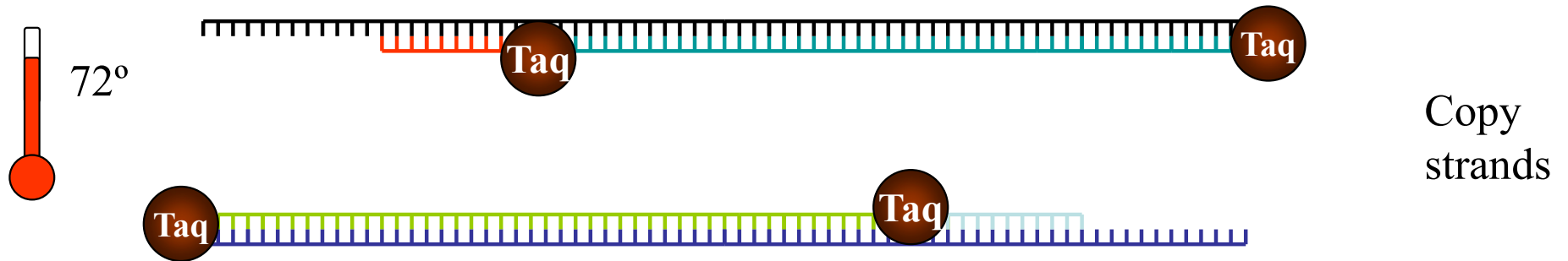
1. Analysis Results

Sequence: 5' AAACTCTGTCGTGCTGGGGATA 3'

Base Count	Molecular Weight	Extinction Coefficient	Oligo Type	µg/OD at 260 nm	Length (bp)	Tm (°C)	GC%	GC Clamp	Run Length (bp)	Secondary Structure	Primer Dimer	BLAST
A = 5, U = 0, G = 7, C = 4, T = 6, I = 0, Total = 22	6790.5	214.3	No Mod	31.7	22	66.8	50.0	2	4	None	No	Sequence

Back
Export

AMPLIFICAZIONE : fase di polimerizzazione (extension) 72°C



Infine la temperatura viene alzata fino a 72 °C (temperature ottimale per la TAQ polimerasi) per la polimerizzazione del nuovo filamento utilizzando come stampo il filamento singolo di DNA

La durata di tale fase varia in funzione della lunghezza del frammento da amplificare (1000 basi al minuto).

ACGTTACCGGAATTCCGGTCACGGAACATGCCC
TGCAATGGCCTTAAGGCCAGTGCCTTGTACGGG

DNA stampo

ACGTTACCGGAATTCCGGTCACGGAACATGCCC

TGCAATGGCCTTAAGGCCAGTGCCTTGTACGGG

Denaturazione
T=95°C

ACGTTACCGGAATTCCGGTCACGGAACATGCCC
GGCCTTAA

Primers

ACGGAACA

TGCAATGGCCTTAAGGCCAGTGCCTTGTACGGG

Appaiamento
T=50/65°C

**Estensione
T=72°C**

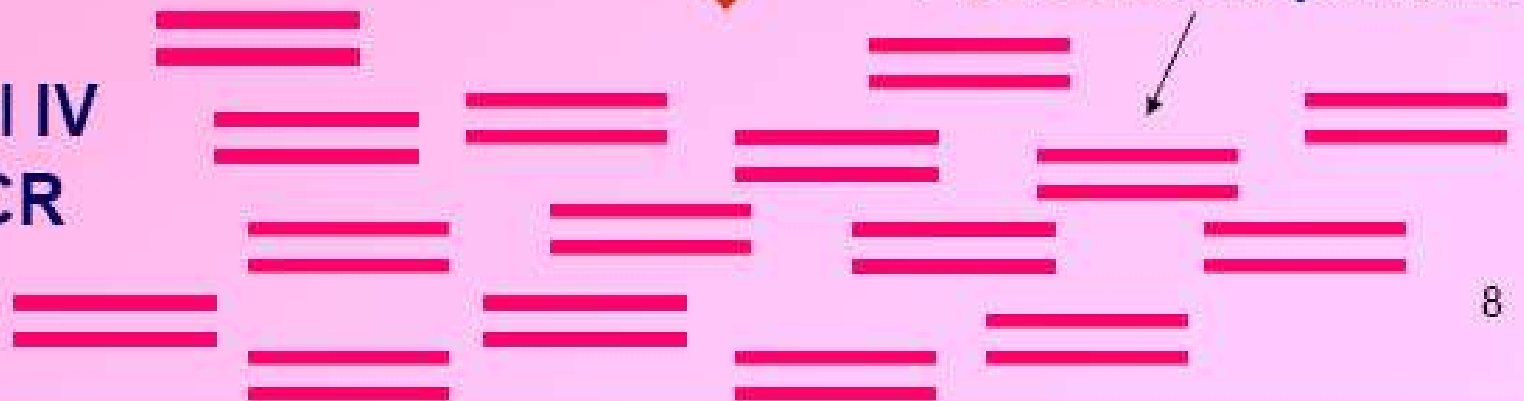


**Prodotto del I
ciclo di PCR**

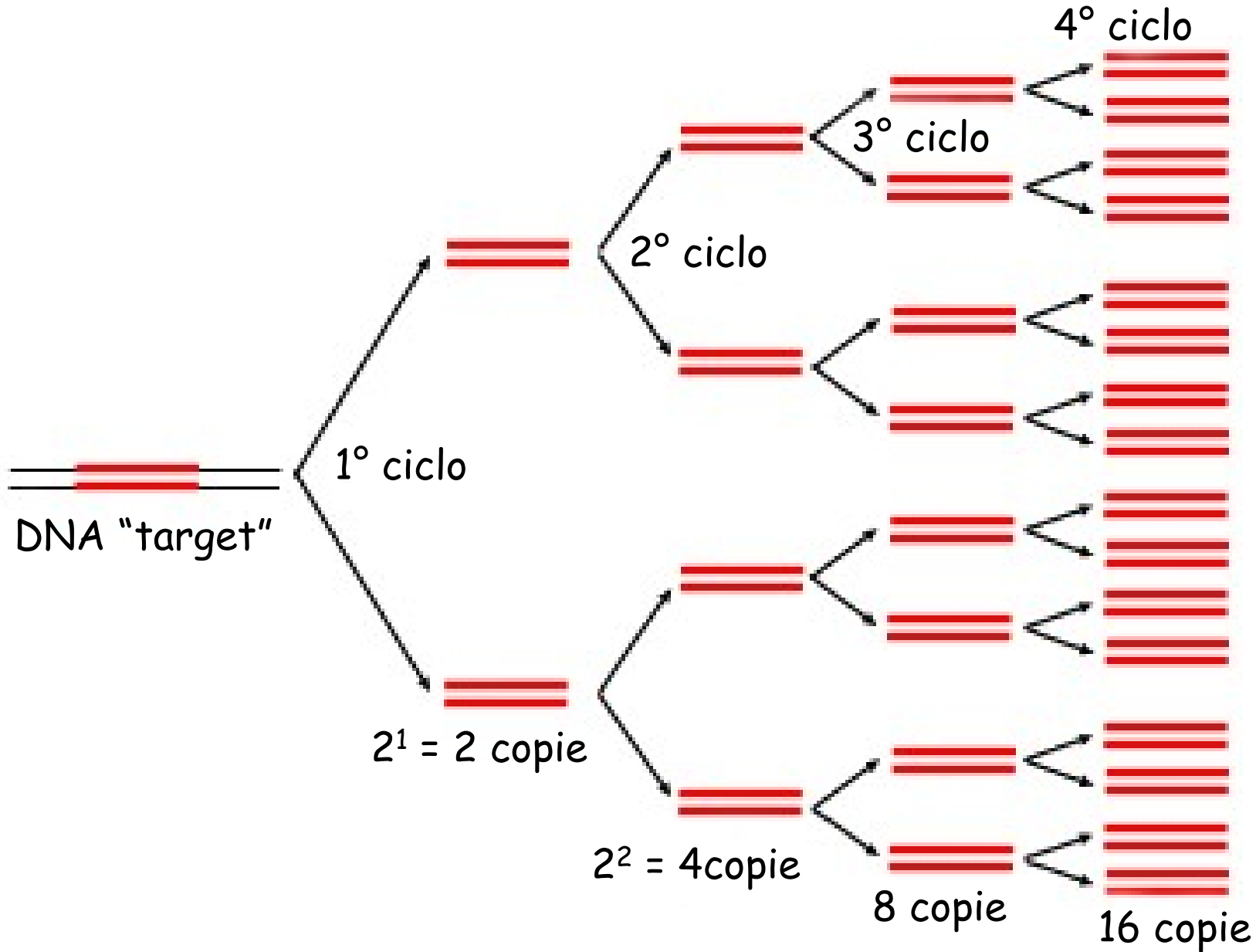


**Prodotti del IV
ciclo di PCR**

Prodotti di amplificazione

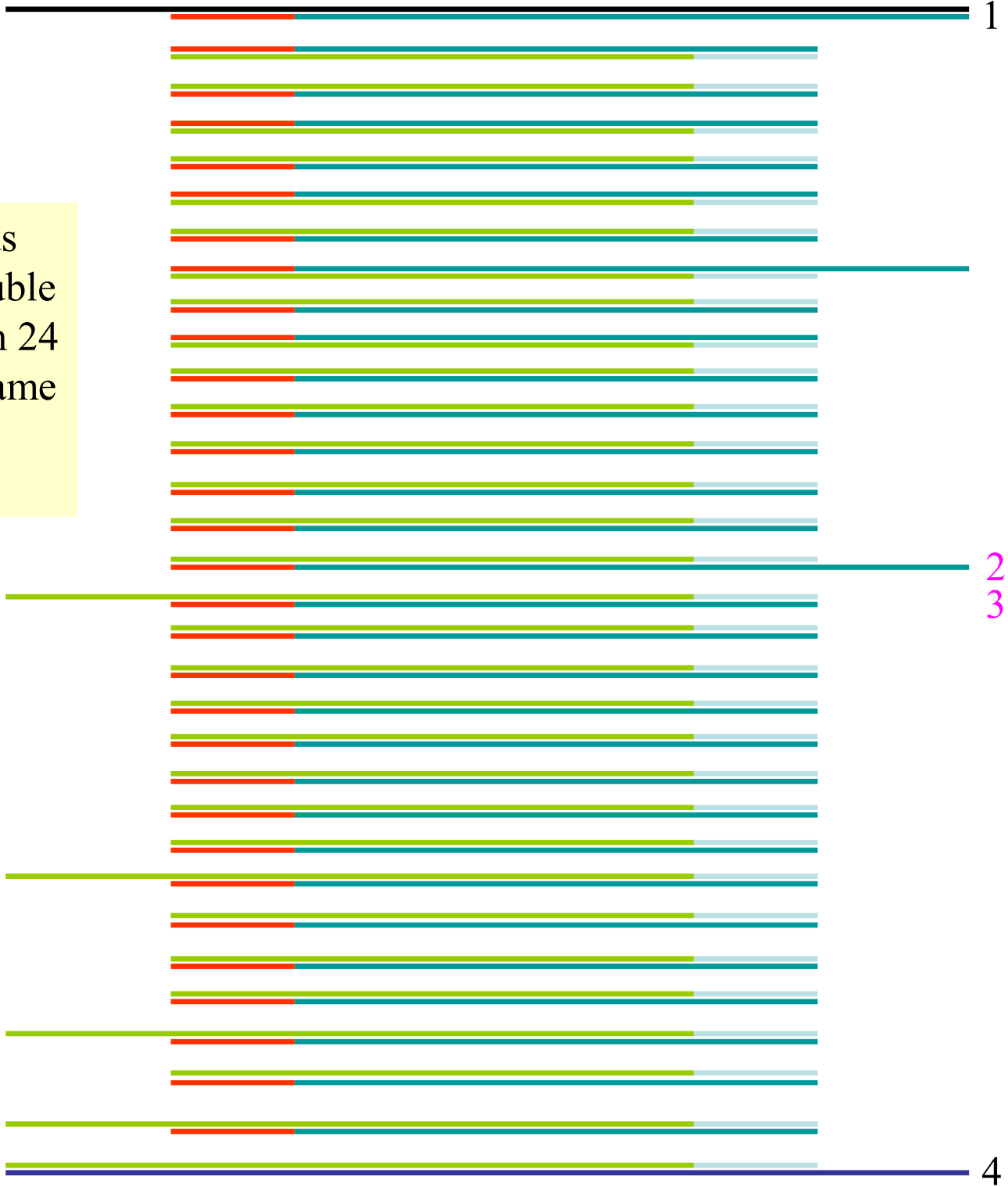


Amplificazione esponenziale



.....➔ 35 cicli
 $2^{35} = 34$ miliardi

After 5 rounds
there are 32 double
strands of which 24
(75%) are same
size



AMPLIFICAZIONE

Componenti fondamentali della PCR

- 1) Tampone (buffer)
- 2) Primer (inneschi)
- 3) Nucleotidi fosforilati (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- 4) *Taq* DNA Polimerasi (*Thermophilus aquaticus*)
- 5) DNA bersaglio ("target")
- 6) Termociclatori automatici e termostabili



Primer

La scelta dei *primer* (oligonucleotidi sintetici) da utilizzare costituisce un aspetto essenziale per la buona riuscita della PCR.

E' necessario che i primer abbiano una perfetta omologia di sequenza con le estremità dell'acido nucleico bersaglio.

Essi, infatti, devono potersi ibridare in maniera specifica ed efficiente alla sequenza d'interesse, evitando ibridazioni aspecifiche.

Presupposto essenziale è la conoscenza della sequenza del DNA target

PRIMER : permettono di identificare una sequenza specifica in una miscela di molecole di acido nucleico grazie all'IBRIDAZIONE con la sequenza complementare che viene individuata in un pool di acidi nucleici del campione

La molecola IBRIDA risultante dall'appaiamento fra acidi nucleici monocatenari attraverso la formazione di legami idrogeno è una MOLECOLA STABILE

La formazione dell'ibrido è ALTAMENTE SPECIFICA

La specificità del primer è maggiore quanto più lunga è la molecola ibrida.

Un PRIMER di 16 NUCLEOTIDI è sufficientemente lungo per garantire una ELEVATA SPECIFICITA'

Una lunghezza di 16 NUCLEOTIDI è sufficiente per garantire una ELEVATA SPECIFICITA'

C'è una possibilità di $1/4$ che **una** delle basi A,G,C,T possa ibridarsi in una precisa posizione su una molecola di acido nucleico ;

ma nel caso fossero **due** basi la possibilità di ibridarsi è di $1/4^2$ (= $1/16$)

nel caso fossero **tre** basi la possibilità di ibridarsi è di $1/4^3$ (= $1/64$)

nel caso fossero **sedici** basi la possibilità di ibridarsi è di $1/4^{16}$ (= $1/4 \times 10^9$)

C'E UNA POSSIBILITA' SU 4 MILIARDI CHE UNA SEQUENZA DI 16 NUCLEOTIDI OCCUPI UNA DETERMINATA POSIZIONE NELLA MOLECOLA DI ACIDO NUCLEICO

LA PCR È UN METODO ALTAMENTE SPECIFICO

LA PCR È UN METODO ALTAMENTE SENSIBILE

Amplificazione esponenziale del DNA target



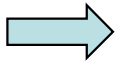
Incremento esponenziale dei prodotti di Amplificazione

Numero del ciclo	N° copie del prodotto	Numero del ciclo	N° copie del prodotto
0	1	11	2048
1	2	12	4096
2	4	13	8192
3	8	14	16384
4	16	15	32768
5	32	16	65536
5	64	17	131072
7	128	18	262144
8	256	19	524288
9	512	20	1048576
10	1024		

Fasi della diagnosi molecolare mediante PCR

Si distinguono tre fasi:

- 1 Estrazione e purificazione del DNA l'RNA per rimuovere gli inibenti
- 2 Amplificazione in termociclatore (PCR)
- 3 Visualizzazione del prodotto di sintesi su gel di agarosio (elettroforesi)

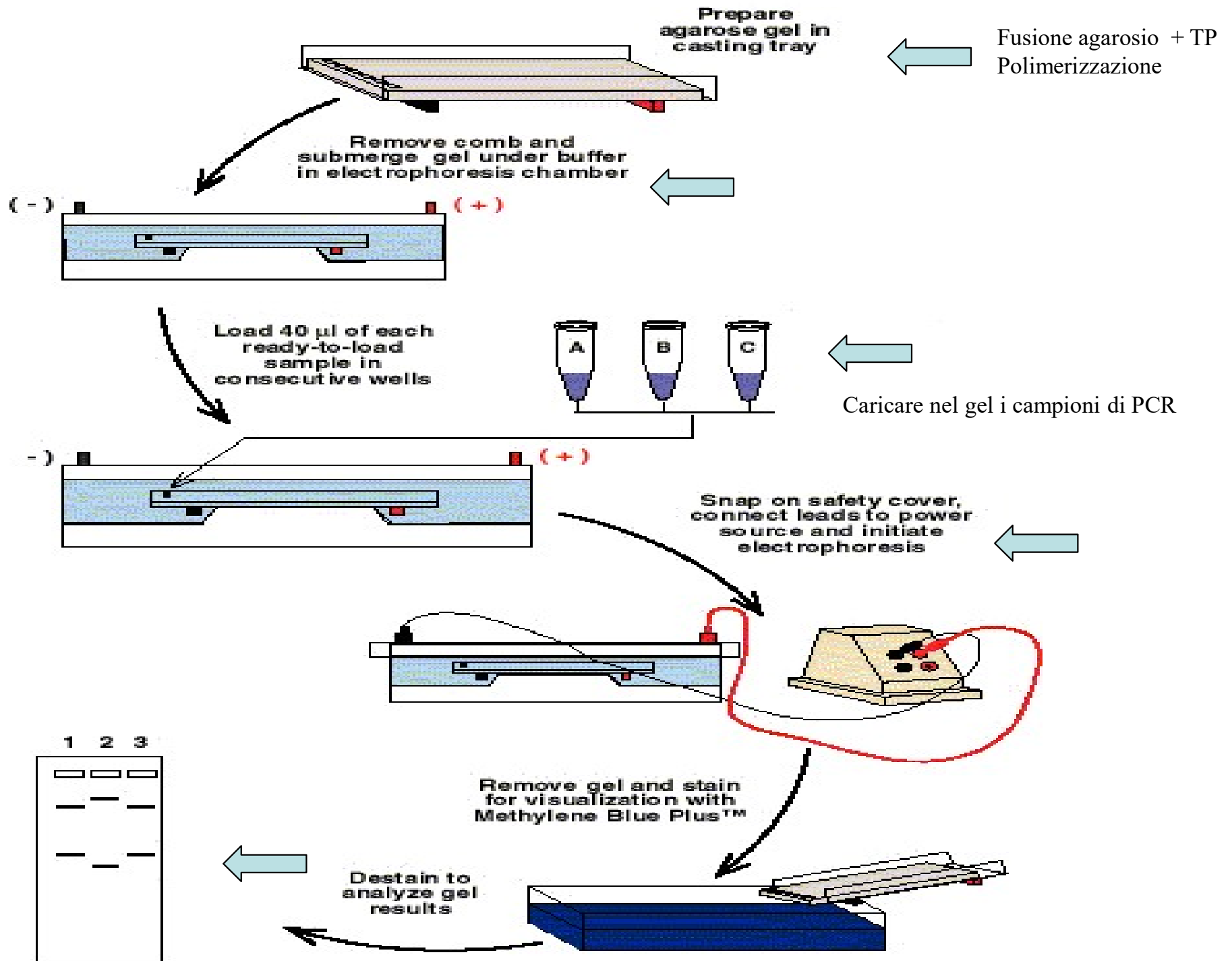


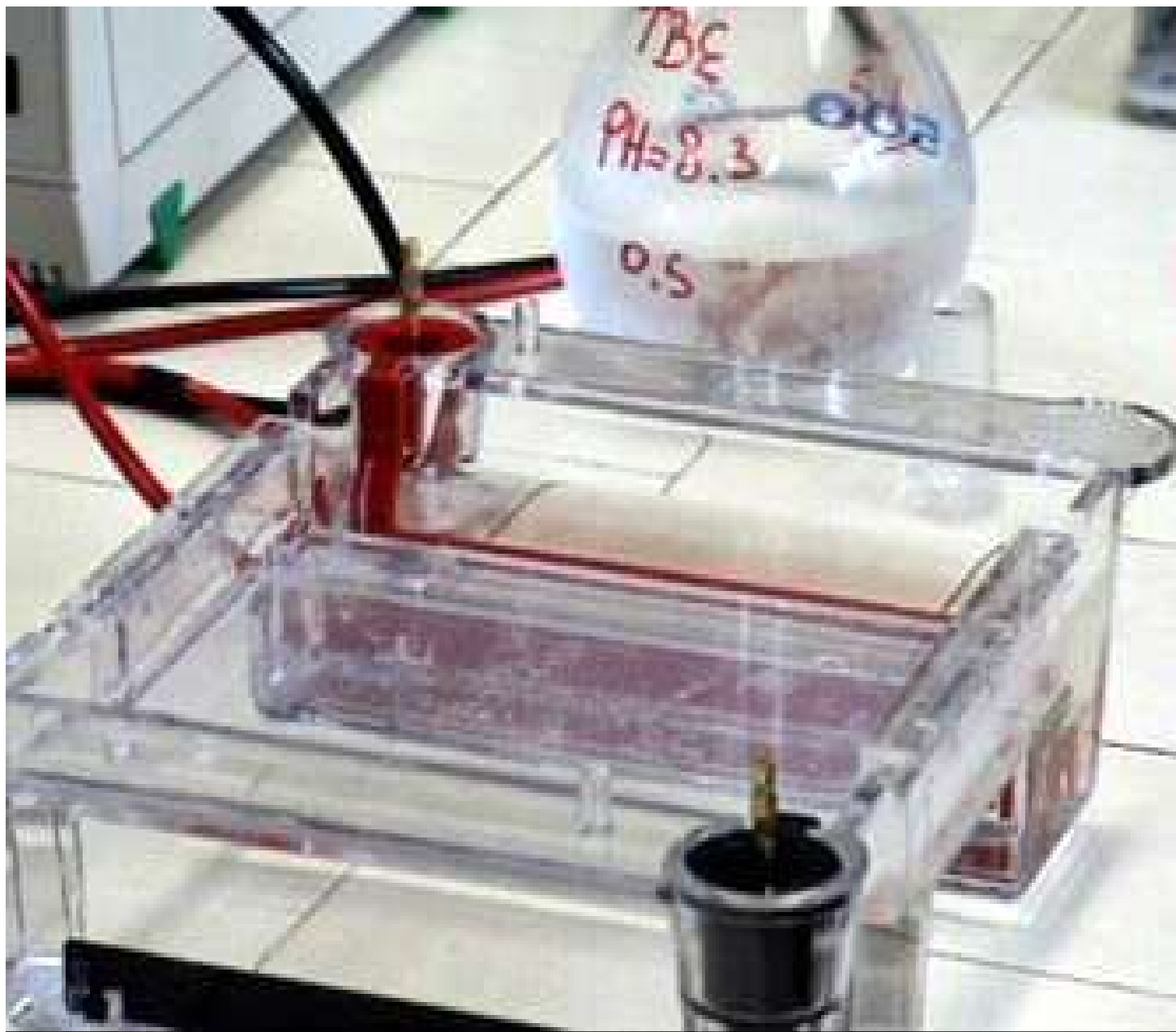
Elettroforesi

Separazione di frammenti di acido nucleico, in funzione del **peso molecolare**.

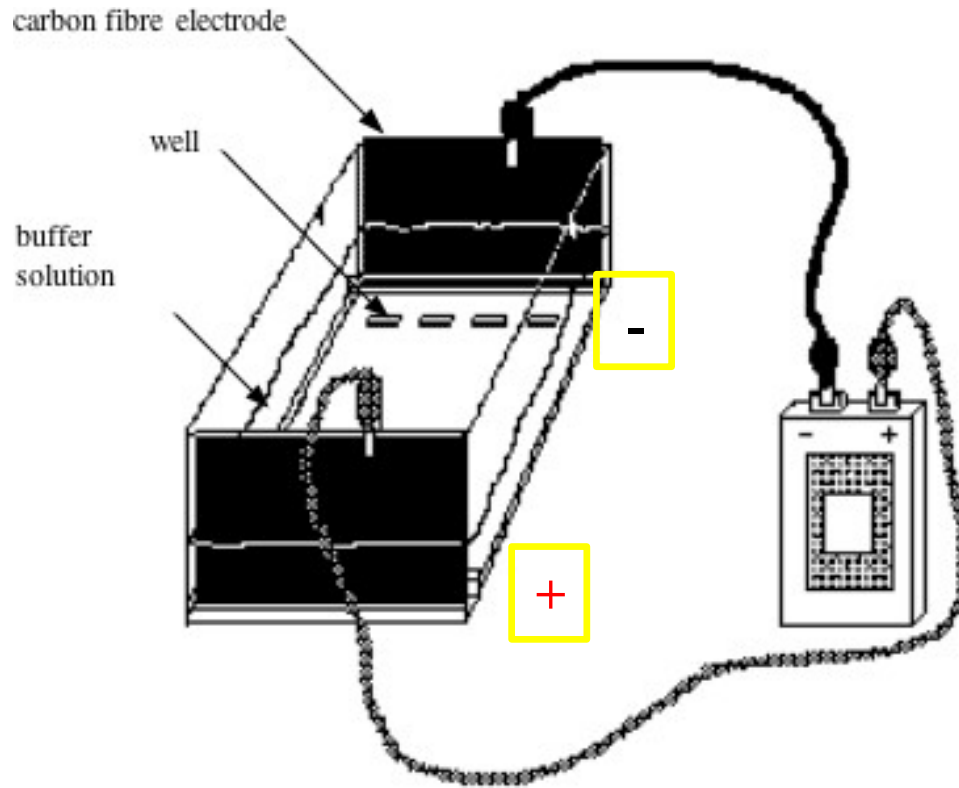
Il principio di base è quello di un **setaccio molecolare** attraverso il quale frammenti di molecole di DNA vengono fatti passare mediante un campo elettrico.

Frammenti di DNA, **carichi negativamente** per i residui di fosfato, in un campo elettrico tendono ad andare verso il polo positivo





Elettroforesi

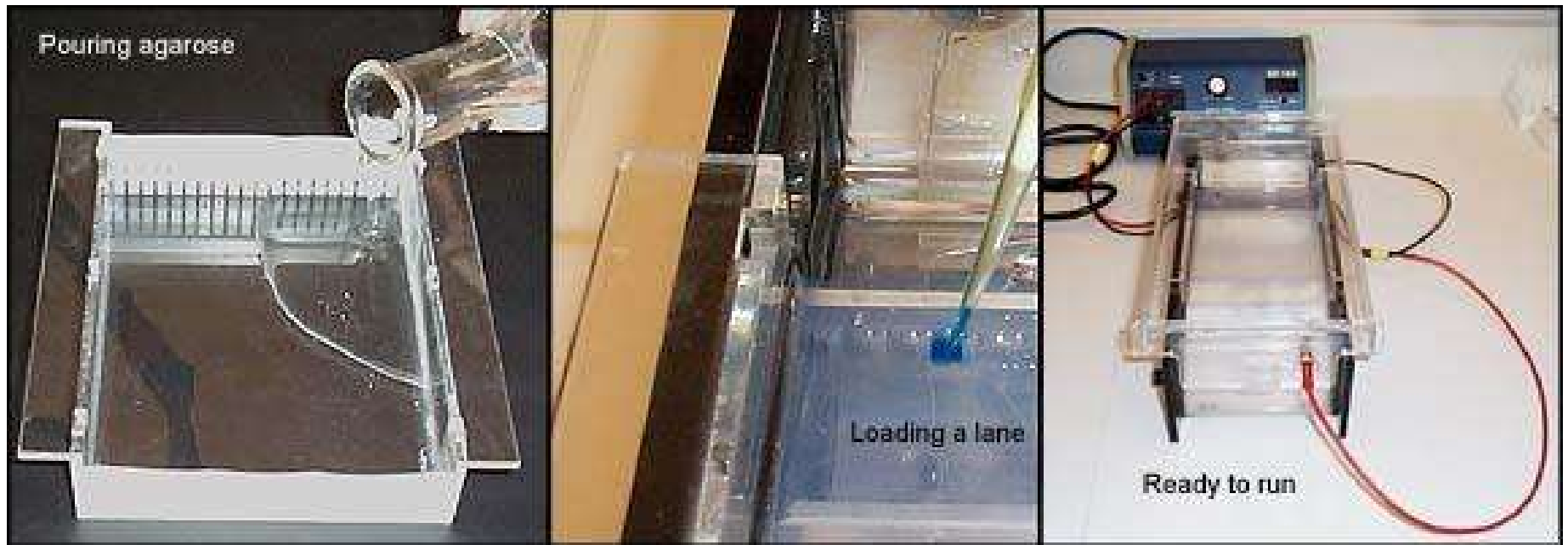


Reagenti necessari

- Agarosio (>100 bp)
- Tampone elettroforetico (TAE o TBE)
- Colorazione con intercalante "SYBR safe"
- Loading buffer
- Marker
- Transilluminatore UV

L'**agarosio** è un polisaccaride che forma un gel con pori variabili tra 100 e 300 nm di diametro a seconda della sua concentrazione. E' quindi la percentuale di agarosio che determina la gamma dei frammenti di DNA separabili - **concentrazione 1-2.5%:** maggiore è la dimensione del DNA minore sarà la concentrazione di agarosio da utilizzare (=maglia del polimero più larga).





Per visualizzare le bande elettroforetiche, viene aggiunta alla preparazione del gel una quantità di **intercalante** del DNA che se esposto a luce UV emette fluorescenza (SYBR-Safe).

Il gel viene quindi posto in apposita vaschetta elettroforetica. Dopo la loro polimerizzazione viene riempita del **tampone di corsa (TBE, TAE)**.

Tris-borato o Tris-acetato

Il Tris contenuto nel tampone è un sale molto usato nei laboratori. Tampona tra pH7 e pH8, un range in cui il DNA si mantiene molto bene. L'EDTA, invece, è un chelante che sequestra ioni Mg^{2+} presenti in soluzione e che vengono utilizzati da enzimi che degradano il DNA (DNAsi).

Prima di caricare il gel si aggiunge al campione un colorante con velocità di migrazione nota in modo da seguire l'andamento dell'elettroforesi. Tale colorante è chiamato **Loading buffer**.

Sul gel si riserva un pozzetto in cui verrà messo il **marker**. Questo è composto da una miscela di frammenti lineari di DNA i quali migrano nel gel con dimensioni note.

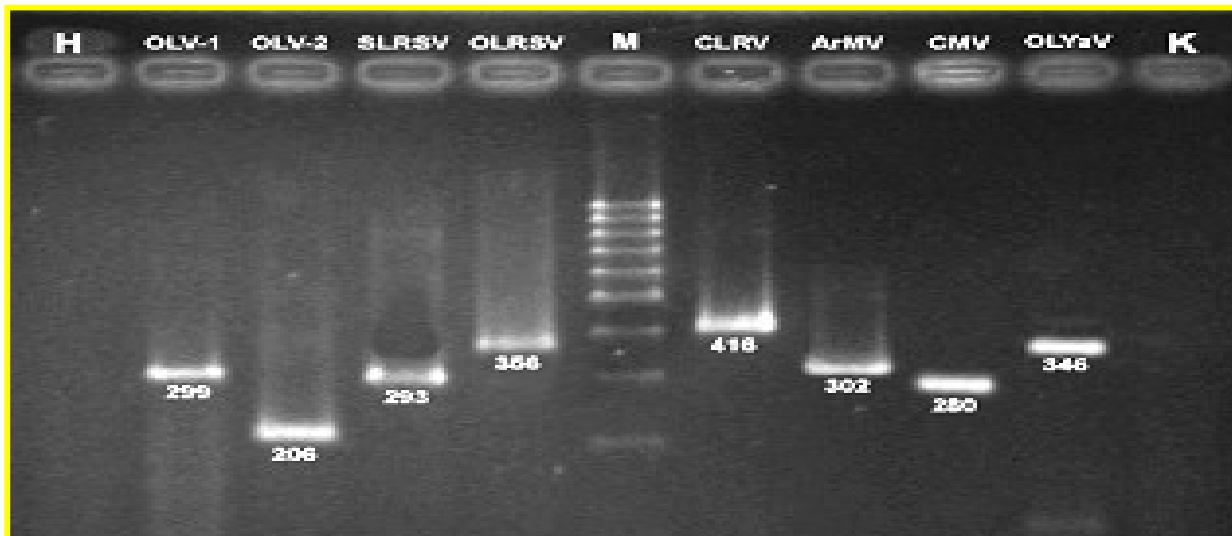
Nella corsa elettroforetica, si deve applicare una **differenza di potenziale** proporzionale alla distanza tra gli elettrodi. Si applica un **voltaggio** di **3-5V/cm** (calcolato come distanza tra i due elettrodi).

Se fosse maggiore si rischierebbe di scaldare il tampone di corsa e quindi di danneggiare il DNA.

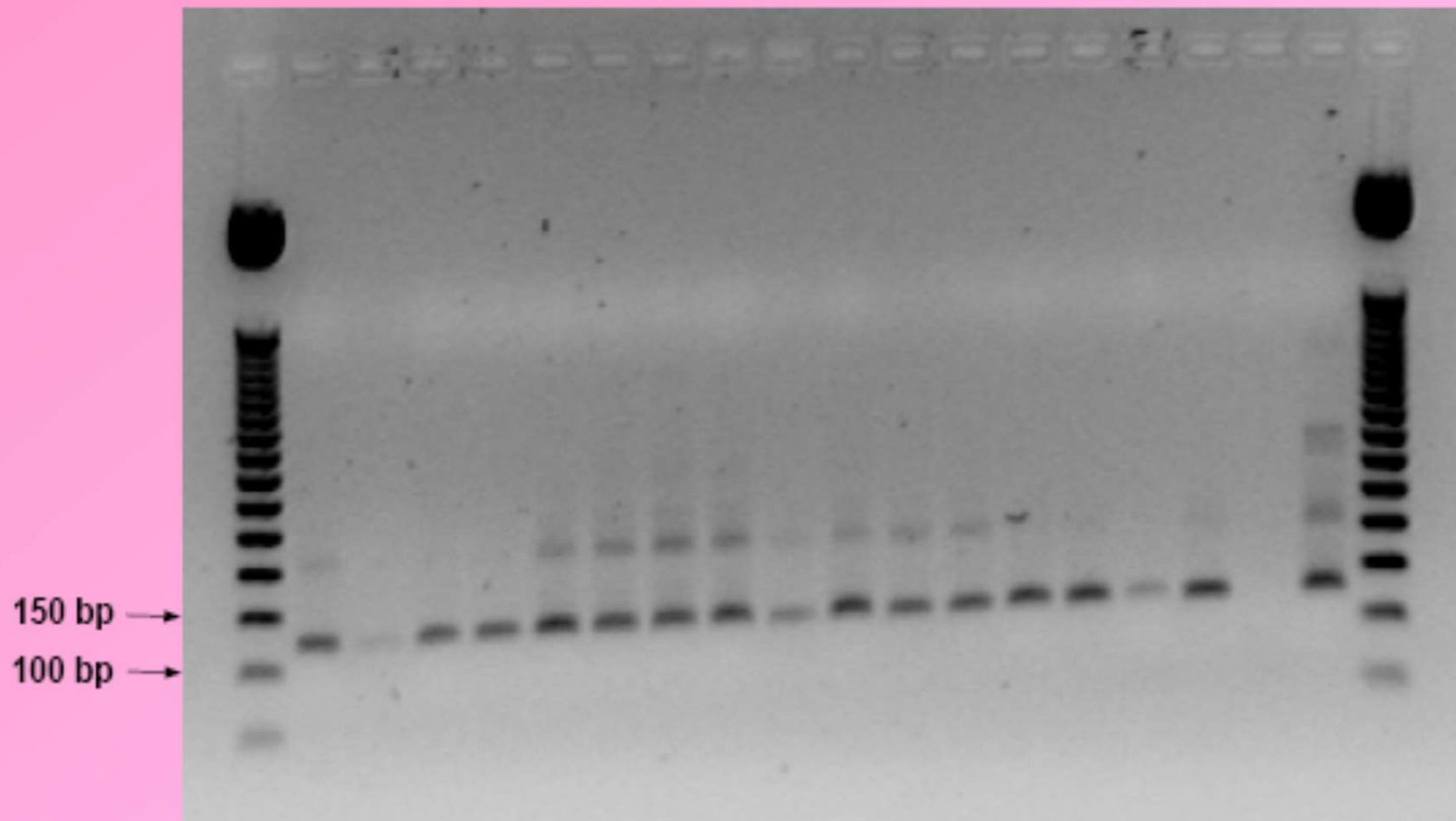
Elettroforesi su gel di agarosio

1. Caricamento di campioni amplificati su gel di agarosio
2. Separazione degli ampliconi mediante corsa elettroforetica

3. Visualizzazione dei prodotti di amplificazione (con apparato fotografico gel-doc o transilluminatore UV)

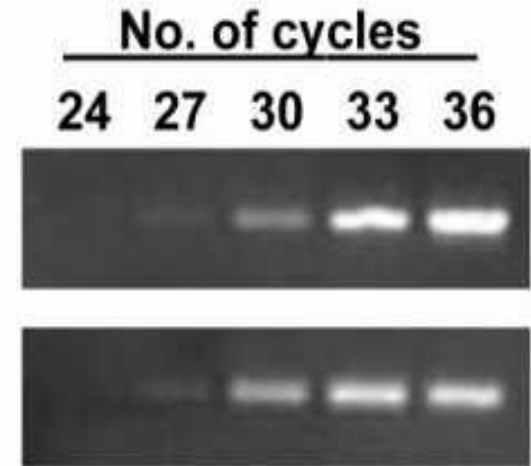
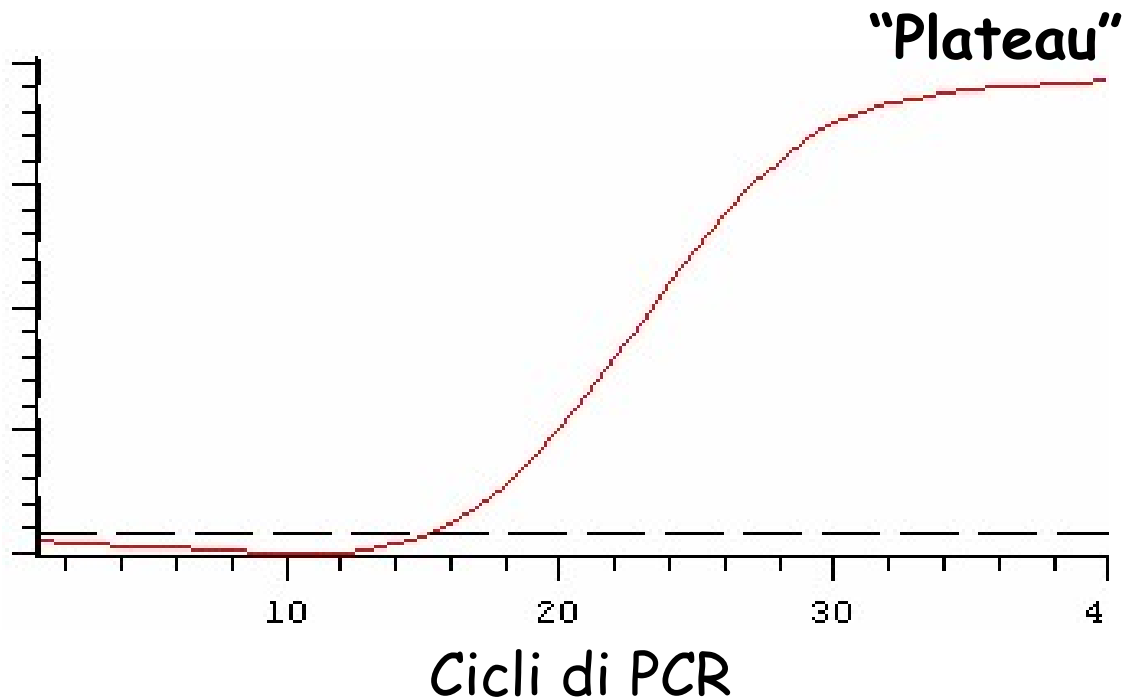


Elettroforesi su gel di agarosio



La velocità di migrazione dei prodotti di amplificazione è inversamente proporzionale alla loro grandezza ed ha come riferimento marker molecolari a peso molecolare noto.

Visualizzazione del prodotto di sintesi su gel di agarosio (elettroforesi)



Effetto "plateau":

Esaurimento Taq

Accumulo dei prodotti

Tecniche di PCR

□ Reazione a catena della polimerasi (PCR)

✓ PCR convenzionale

→ ✓ Nested PCR

✓ Multiplex PCR

✓ RFLP

✓ PCR in tempo reale

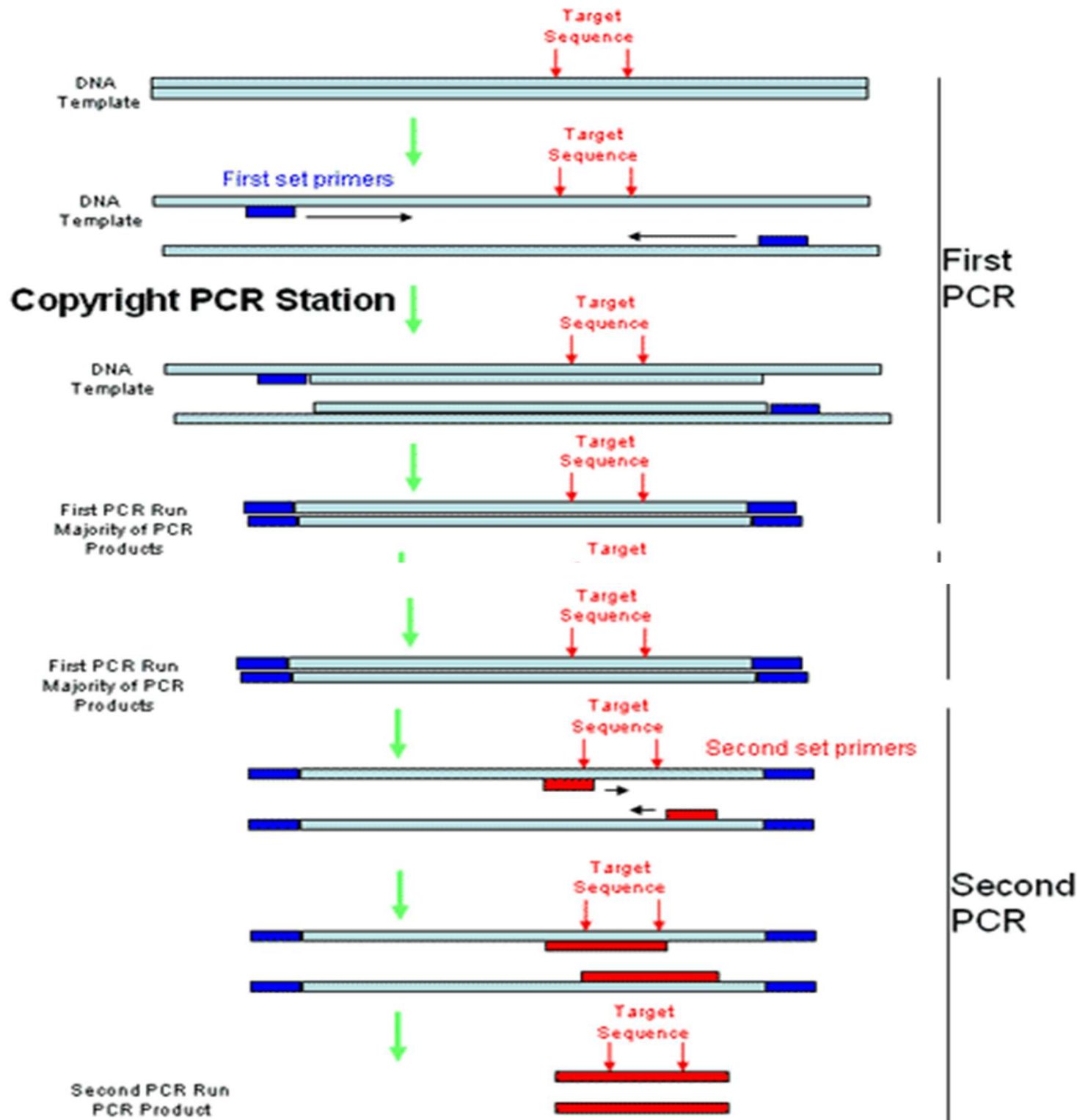
nested-PCR

Essa consiste nell'effettuazione di un DOPPIO CICLO DI AMPLIFICAZIONE;

il secondo turno di PCR (nested PCR) viene eseguito UTILIZZANDO, COME TEMPLATO, L'AMPLICONE ottenuto dalla precedente reazione di PCR.

Il secondo ciclo è avviato da una seconda coppia di primers in posizione più interna.

Presenta elevata sensibilità.



Tecniche di PCR

□ Reazione a catena della polimerasi (PCR)

- ✓ PCR convenzionale

- ✓ Nested PCR

—————→ ✓ Multiplex PCR

- ✓ RFLP

- ✓ PCR in tempo reale

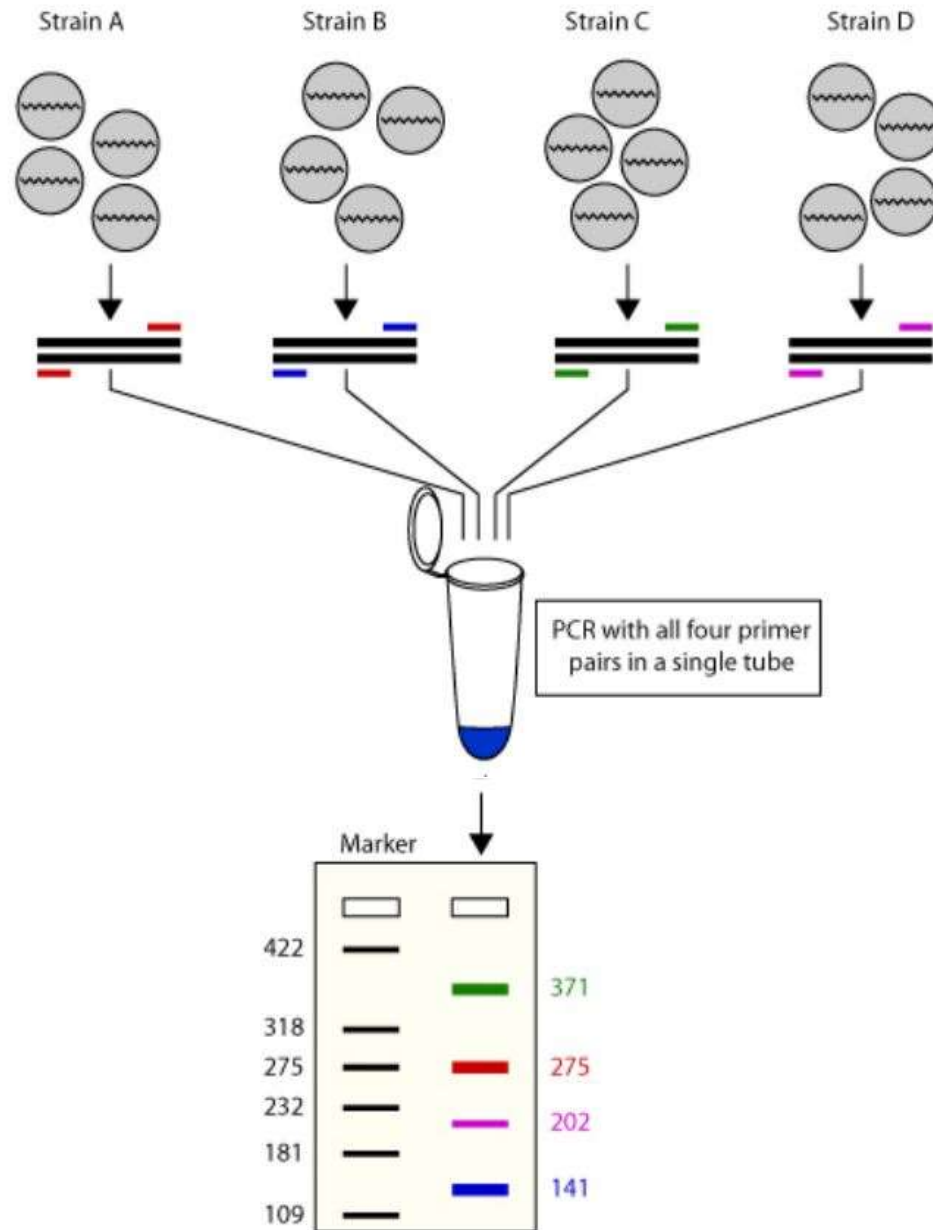
Multiplex - PCR

Utilizza due o più coppie di primers nella stessa miscela.

Utile per la diagnosi di più patogeni contemporaneamente presenti nello stesso campione

Es. infezioni miste di virus

Multiplex - PCR



Tecniche di PCR

□ Reazione a catena della polimerasi (PCR)

- ✓ PCR convenzionale

- ✓ Nested PCR

- ✓ Multiplex PCR

- ✓ RFLP

- ✓ PCR in tempo reale

RFLP

(Restriction Fragment Length Polymorphism)

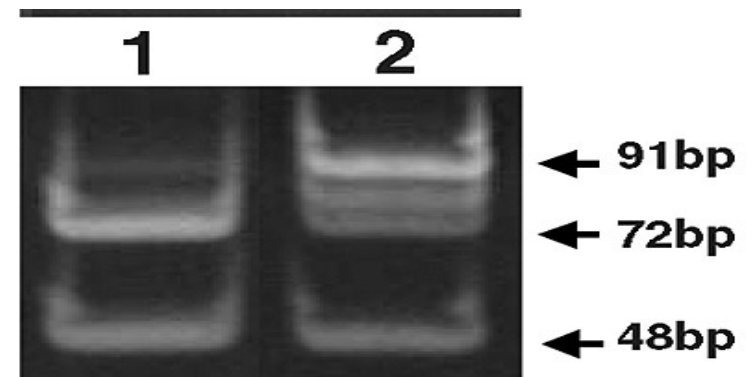
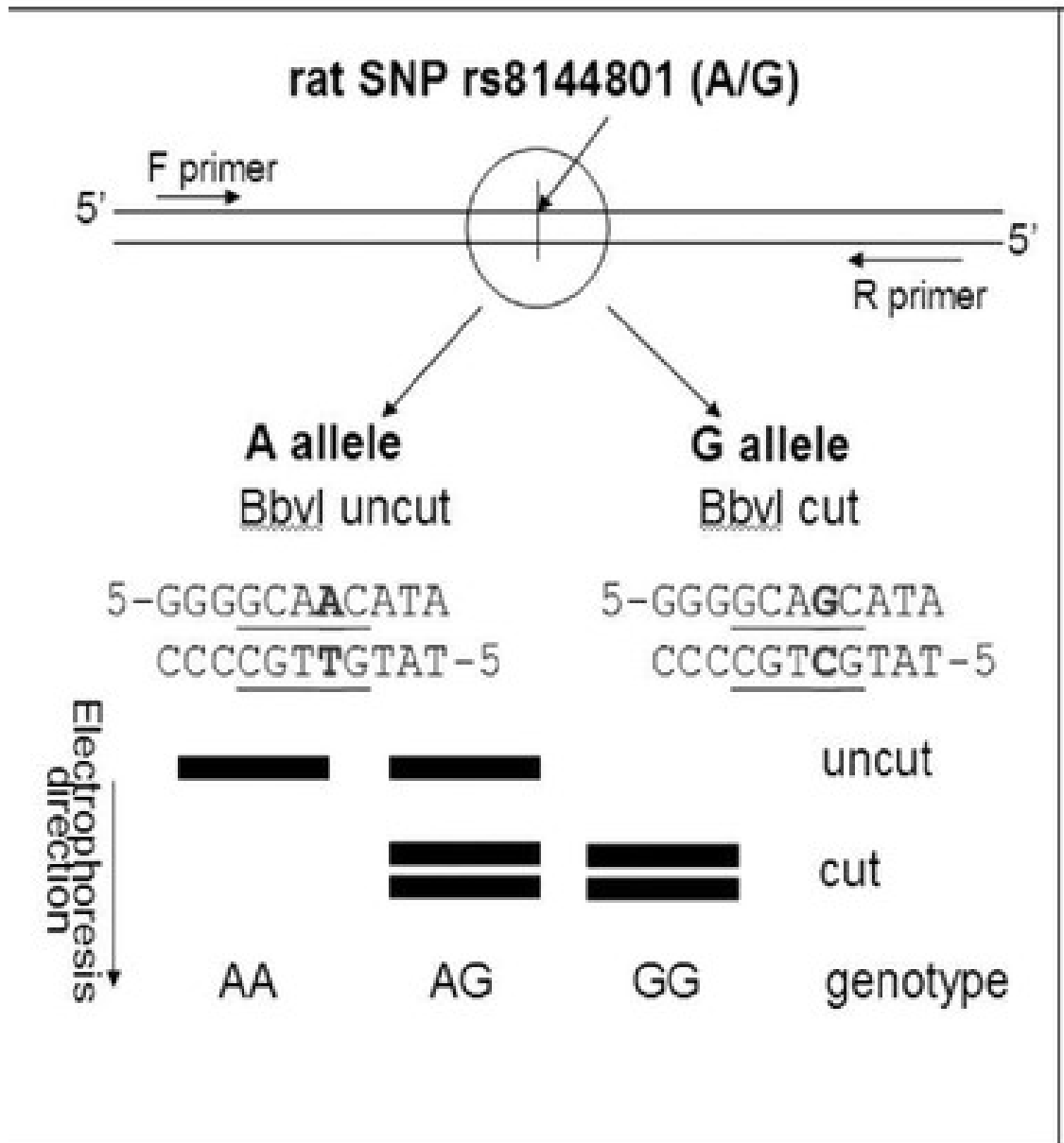
Tecnica in cui la PCR è seguita dalla digestione enzimatica degli amplimeri

Se ci sono differenze fra le sequenze amplificate (es. ceppi diversi di un patogeno) e quindi fra i siti di restrizione tagliati dalle endonucleasi

si otterranno bande di digestione di dimensione diversa e quindi diversi profili di restrizione

Consente di evidenziare, seppur in maniera indiretta, la presenza di differenze fra le sequenze amplificate

DALLA DIGESTIONE DEL DNA AMPLIFICATO CON LA PCR E SUCCESSIVA MIGRAZIONE DEGLI AMPLIMERI DIGERITI SI OTTENGONO BANDE DIVERSE = DIVERSI PROFILI DI DIGESTIONE



RFLP

(Restriction Fragment Length Polymorphism)

Se all'amplificazione di un frammento genico si aggiunge l'analisi del polimorfismo della lunghezza dei frammenti di restrizione (RFLP),

ecco che l'informazione si completa **individuando differenze della sequenza genica amplificata**, che in alcuni casi possono consentire di differenziare fra **le specie** o i ceppi dei patogeni.

Tecniche di PCR

□ Reazione a catena della polimerasi (PCR)

- ✓ PCR convenzionale
- ✓ Nested PCR
- ✓ Multiplex PCR
- ✓ RFLP

→ ✓ PCR in tempo reale

Tecniche di PCR in tempo reale

□ **Permettono il rilevamento in tempo reale degli ampliconi attraverso un segnale fluorescente**

□ **Sfruttando l'uso contemporaneo di PRIMERS E SONDE complementari alla sequenza target da amplificare**

Primer : avviano la SINTESI selettiva della molecola bersaglio

SONDE : RILEVANO la sequenza complementare mediante il MARCATORE cui sono legate

Sonda : breve sequenza complementare al DNA bersaglio marcata con isotopo radioattivo (^{32}P) o DIG

L'ibridazione molecolare

Riconoscimento specifico fra sequenze complementari che genera la molecola IBRIDA o RICOMBINANTE fra sequenze di diversa origine:

Ibridi DNA-DNA < RNA-RNA < DNA-RNA

ACIDO NUCLEICO bersaglio (target)/ sonda

ACIDO NUCLEICO bersaglio (target)/ primer

Sonda : breve sequenza complementare al DNA bersaglio
marcata con isotopo radioattivo (^{32}P) o DIG

Primer : breve sequenza complementare al DNA bersaglio
innesca la sintesi in vitro del DNA (PCR)

Tecniche di PCR in tempo reale

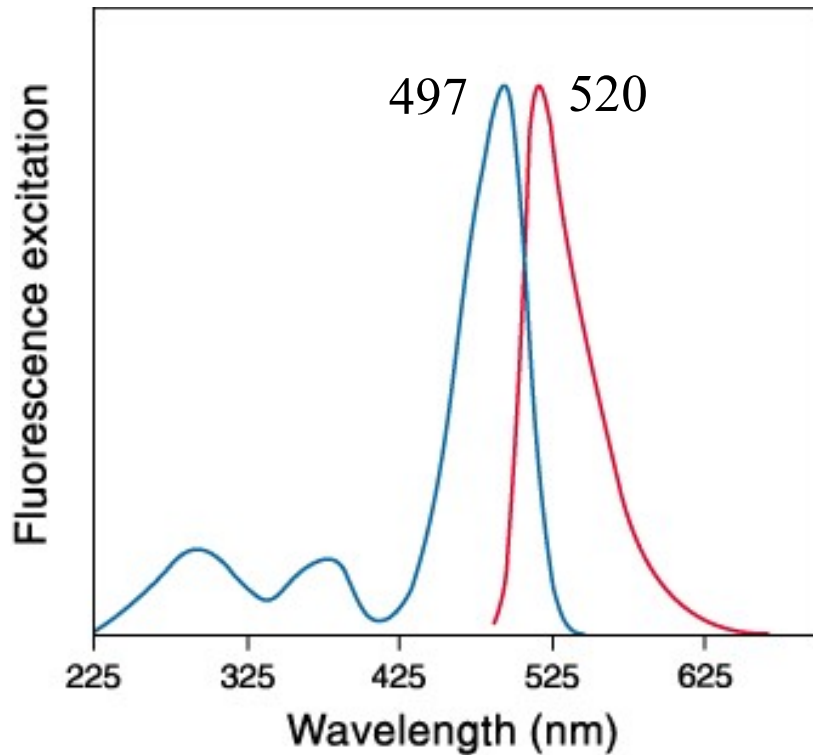
- ❑ **Permettono il rilevamento in tempo reale degli ampliconi attraverso un segnale fluorescente**

- ❑ **Non specifiche (molecole fluorescenti che si legano al DNA)**
 - ✓ **SYBR Green**

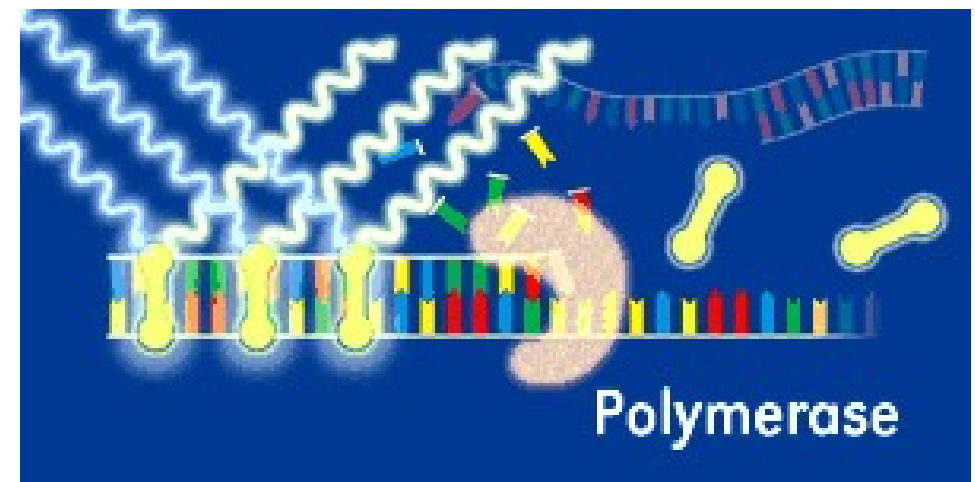
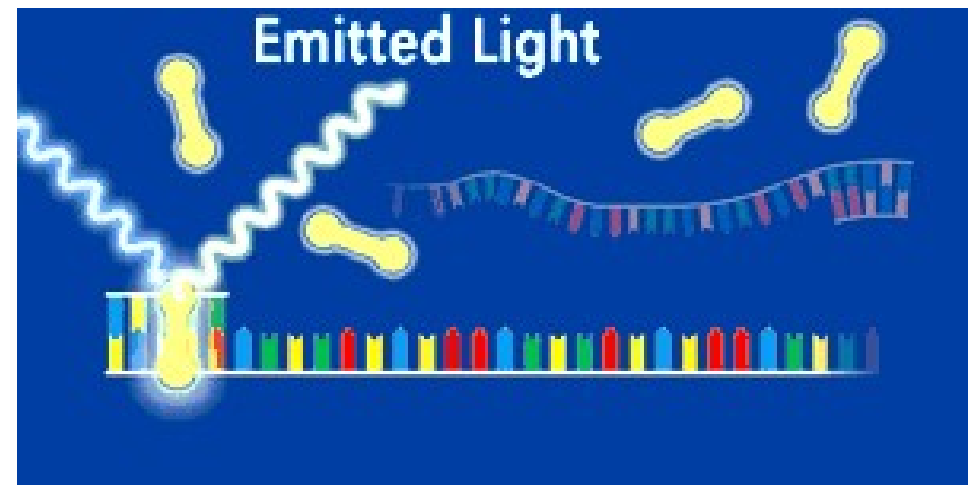
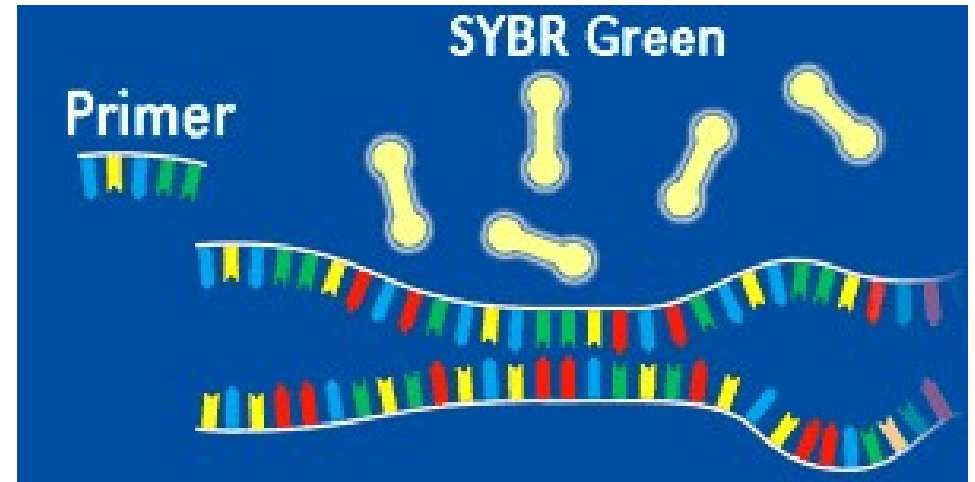
- ❑ **Specifiche (sonde molecolari, fluorofori, quenchers)**
 - ✓ **Taq Man**
 - ✓ **Molecular beacons**
 - ✓ **Scorpion-PCR**
 - ✓ **ecc. ecc.**

SYBR Green

Intercalante fluorescente affine al dsDNA



Assorbe luce blu (497) emette luce verde (520)



Rilievo del risultato: un lettore spettrofotometrico, accoppiato al termociclatore rileva e misura, in tempo reale, la presenza del segnale fluorimetrico.

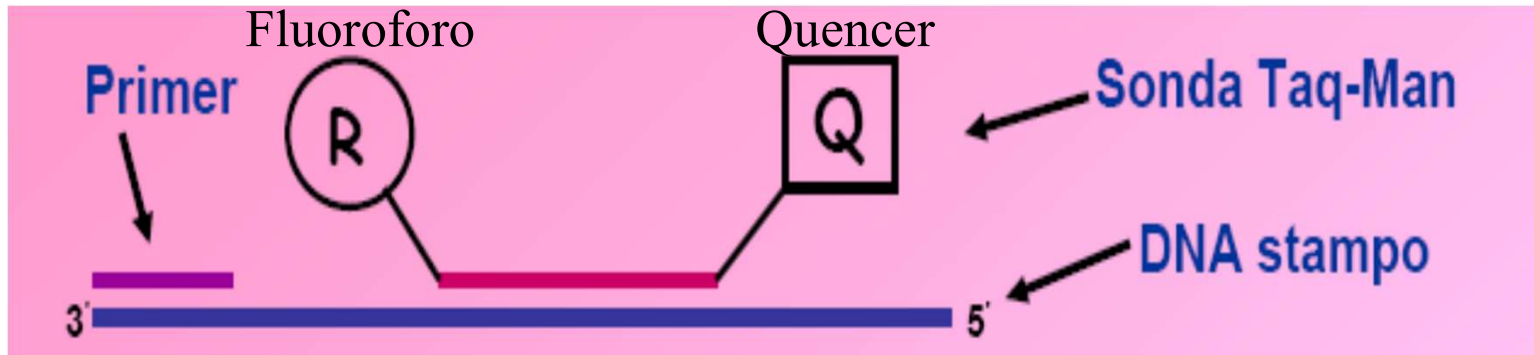
L'utilizzo di questa tecnica presenta numerosi vantaggi, fra i quali la rapidità del saggio e la possibilità di rilevare con precisione il risultato

Tecniche di PCR in tempo reale

- ❑ **Permettono il rilevamento in tempo reale degli ampliconi attraverso un segnale fluorescente**

- ❑ **Non specifiche** (molecole fluorescenti che si legano al DNA)
 - ✓ **SYBR Green**

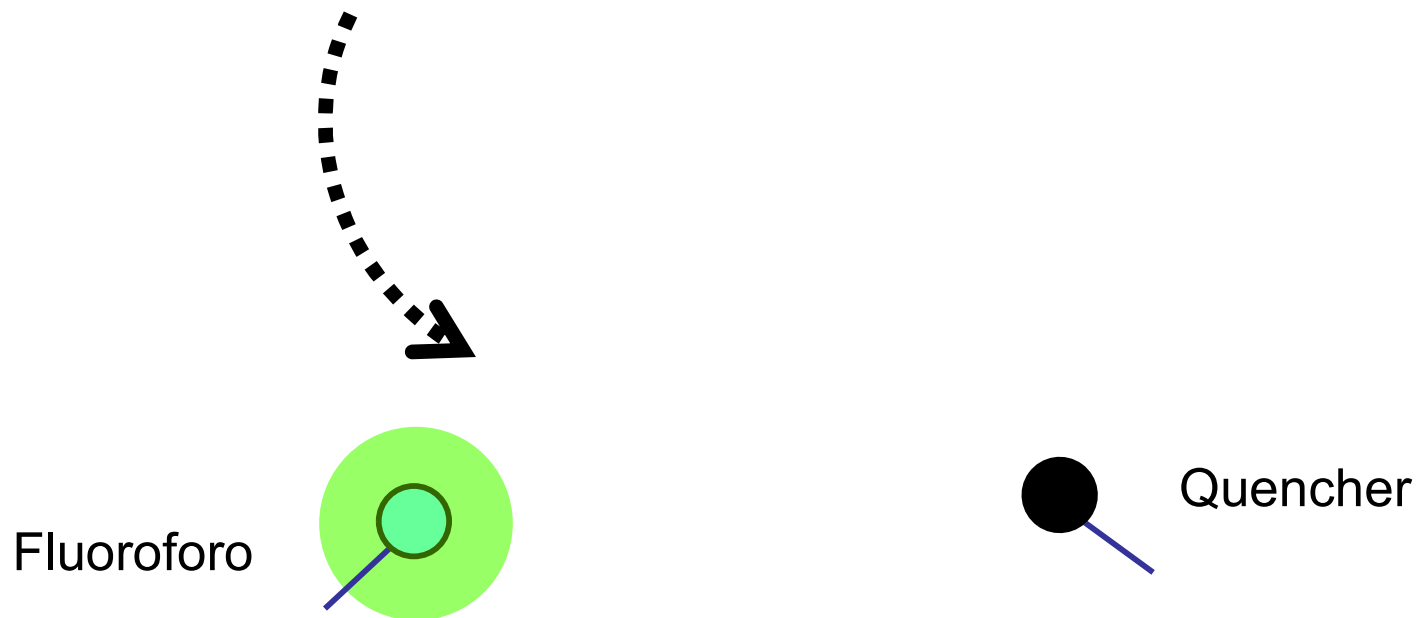
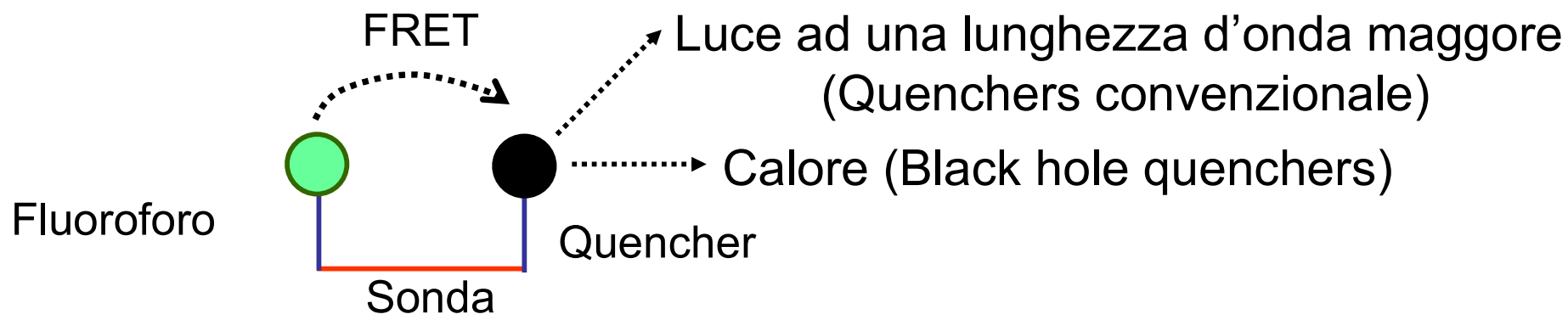
- ❑ **Specifiche** (sonde molecolari, fluorofori, quenchers)
 - ✓ **Taq Man**
 - ✓ **Molecular beacons**
 - ✓ **Scorpion-PCR**
 - ✓ **ecc. ecc.**

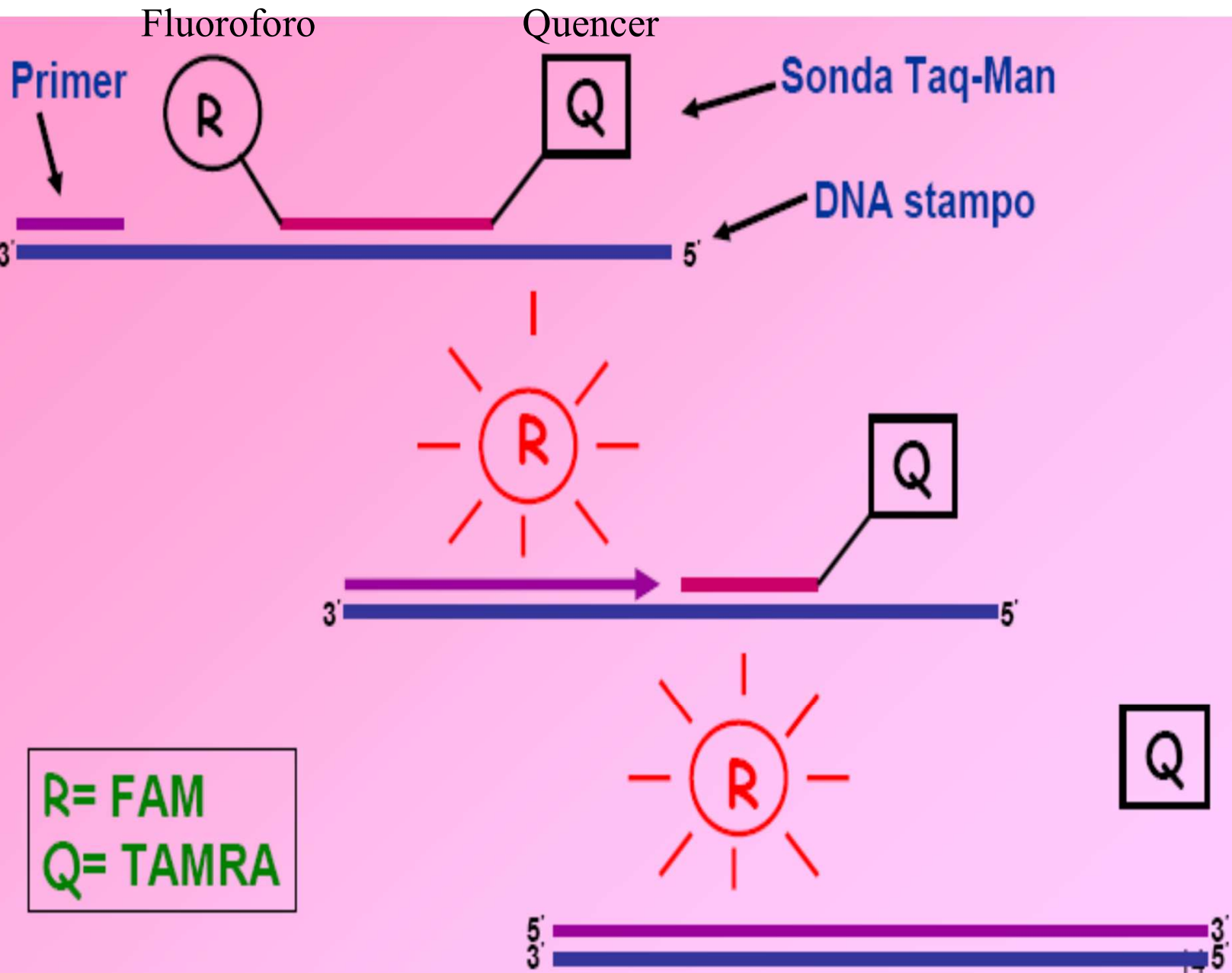


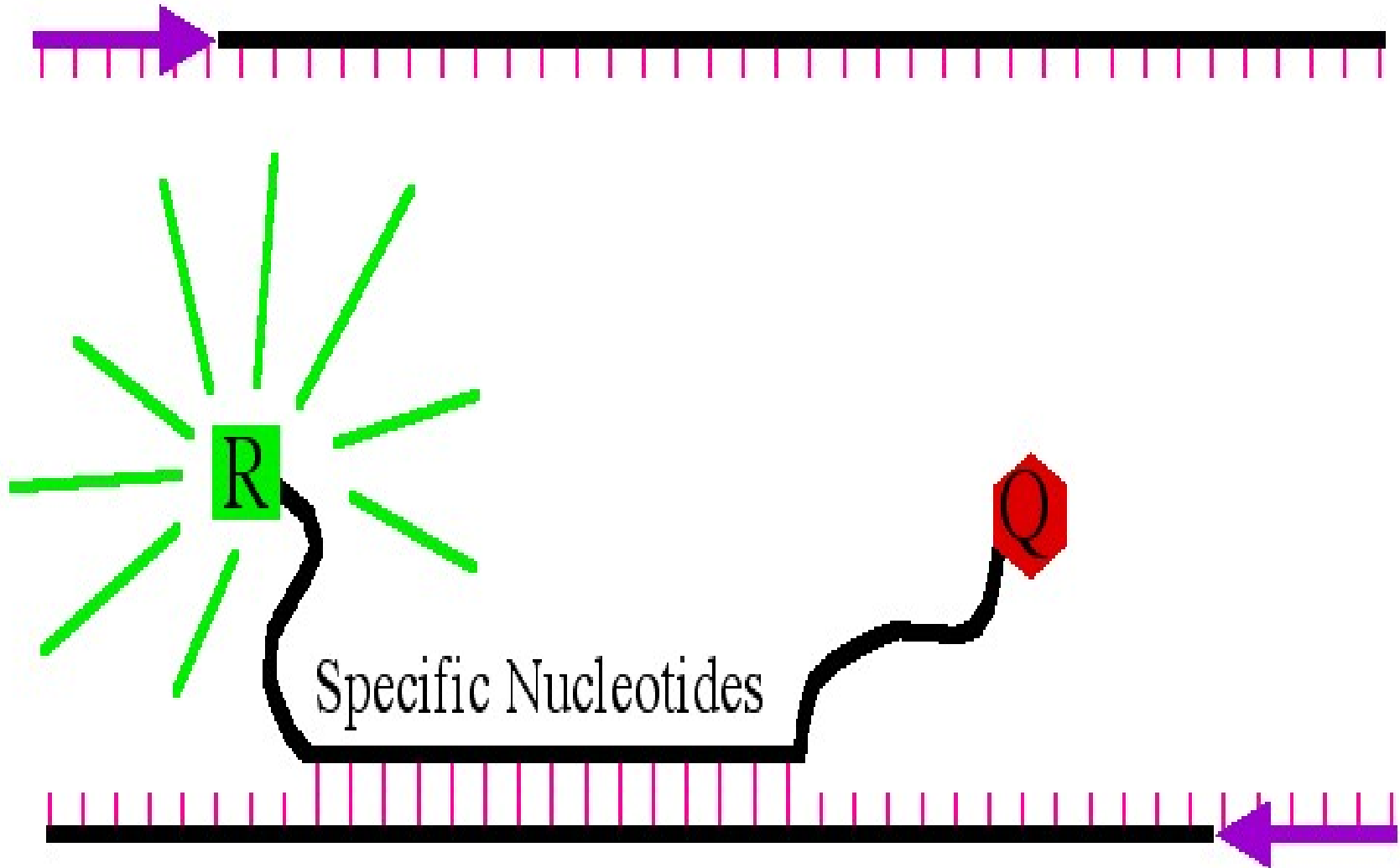
FRET : Fluorescence Resonance Energy Transfer

Trasferimento energetico di risonanza di fluorescenza : interazione dipendente dalla distanza fra gli stati elettronici eccitati di due molecole fluorescenti :

il donatore (Fluoroforo o Reporter) trasferisce energia all'accettore (Quencer) senza emissione di un fotone)

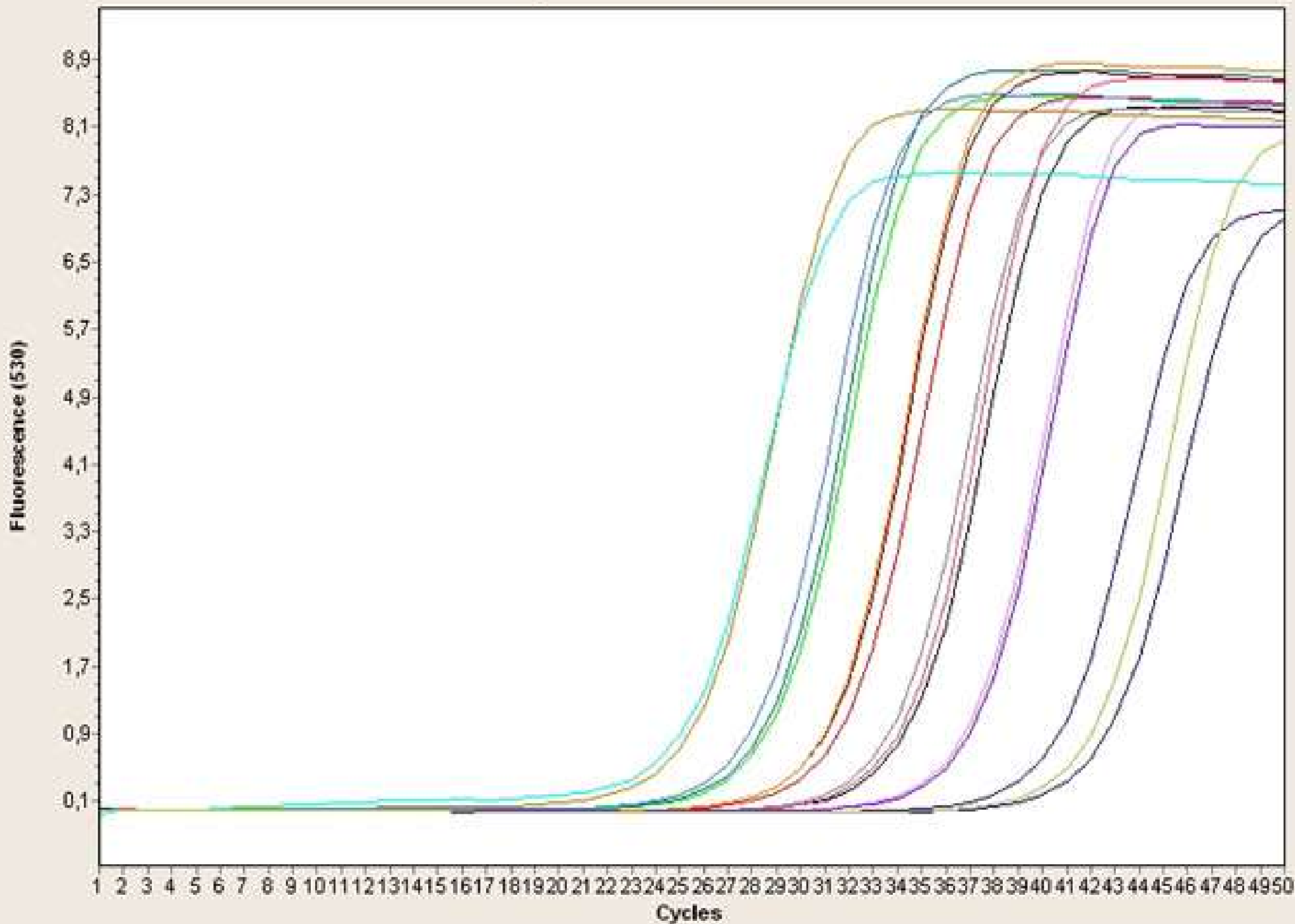








Amplification Curves



- **Elevata specificità**
- **Elevata sensibilità**
- **Rapidità di esecuzione**
- **Ridotta possibilità di contaminazione post PCR**
- ***È quantitativa***

La Real-Time PCR consente l'analisi in tempo reale dell'amplificazione, attraverso l'accumulo dei prodotti di PCR e la loro quantificazione mediante la misura continua del segnale di fluorescenza emesso dalla Sonda/fluoroforo impiegati.

GRAFICO DI AMPLIFICAZIONE DELLA REAL TIME PCR

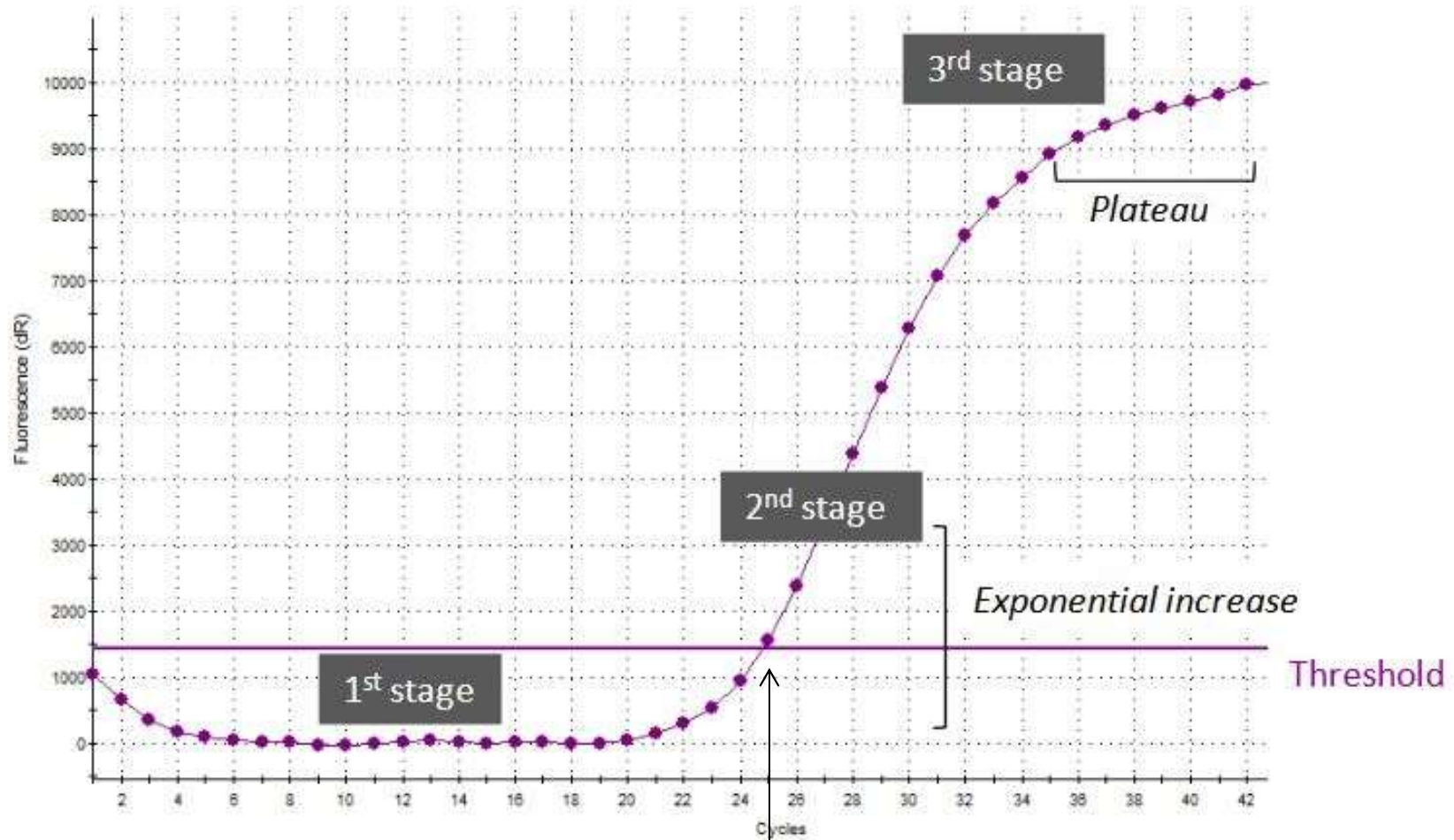


Figure 1. Real time PCR amplification plot showing the three phases.

Ciclo soglia:
in cui la fluorescenza raggiunge il valore
soglia di crescita esponenziale della
fluorescenza (e della sintesi degli ampliconi)

GRAFICI DIVERSI IN FUNZIONE DELLA DILUIZIONE DEL CAMPIONE

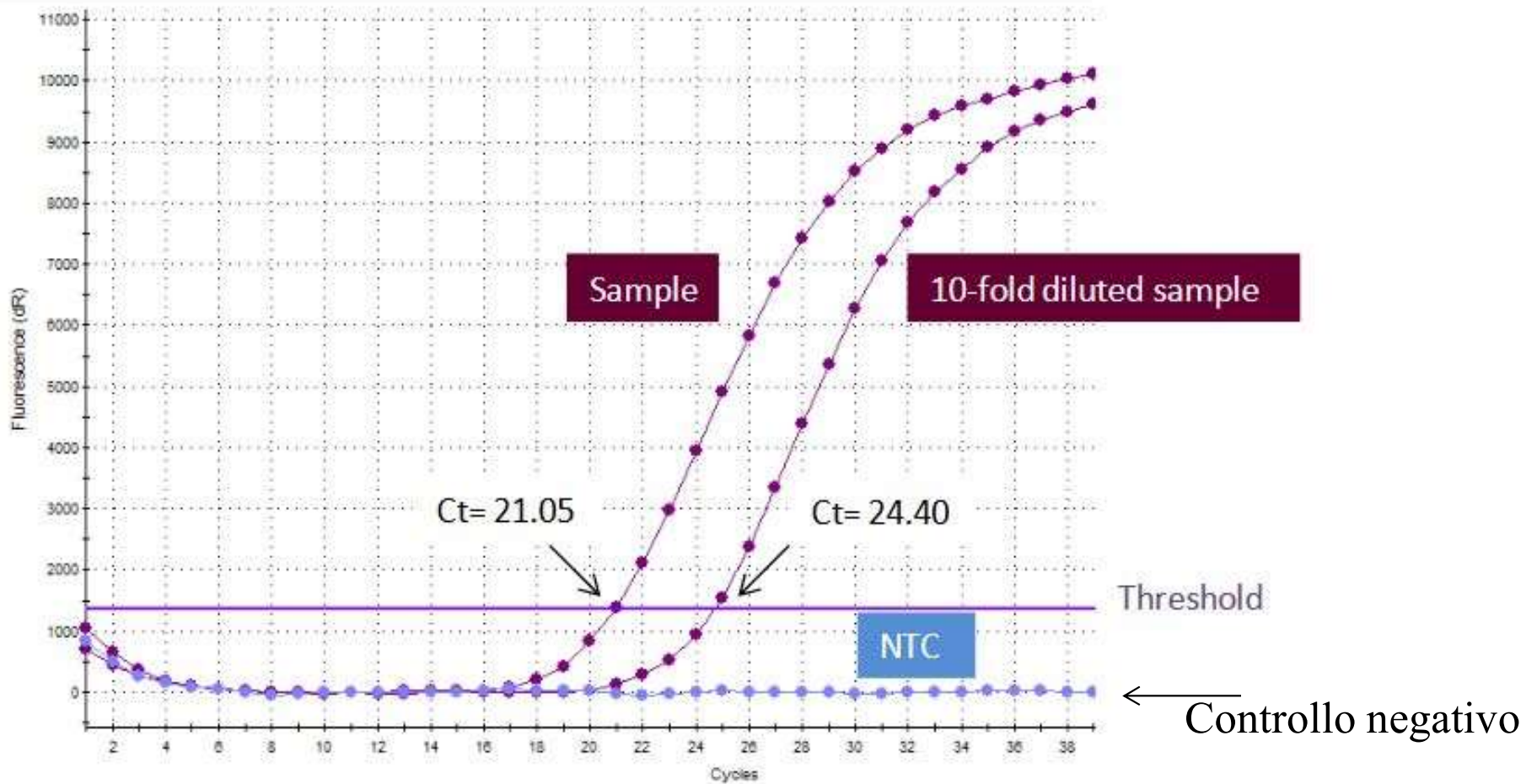
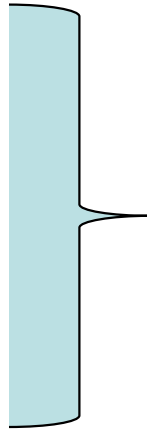


Figure 2. Amplification plot in which a diluted sample crosses the threshold line later than the non-diluted sample. Note that the NTC (non template control) does not reach the threshold because it contains no initial template DNA to amplify.

REAGENTI NECESSARI PER REAL TIME PCR TAQ MAN

Taq polimerasi
Tampono per Taq polimerasi
dNTPs

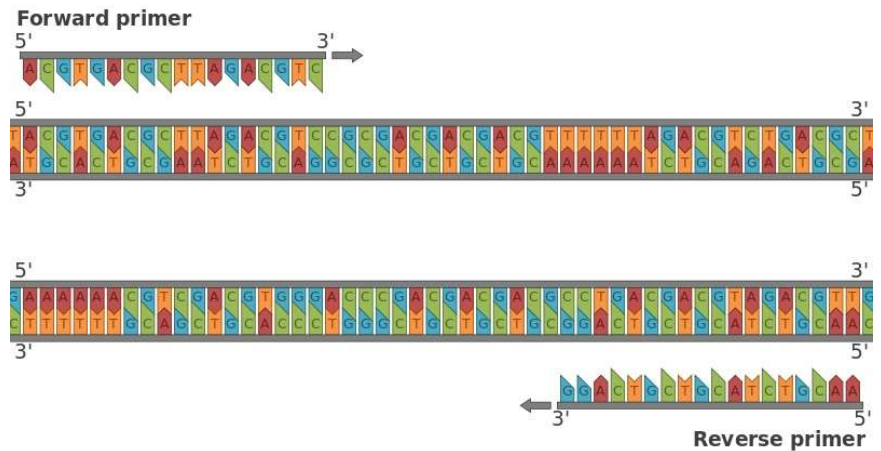


• Taq Man MIX

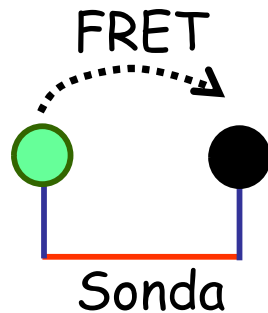
• Primers

Forward (FW)

Reverse (Rev)



• Sonda (probe)



• DNA stampo (template) estratto dal campione)

VIDEO SU REAL TIME PCR

https://www.youtube.com/watch?v=TkCBcL_xUUs

Esperimento di Real time

Obiettivi:

- scegliere la migliore fra due coppie di primers (**1f/3R; 2f/3R**)
 - scegliere la **temperatura di annealing** migliore

Experiment Summary

Experiment Name	: ClavatumDetection13dec2012
Experiment Type	: Quantitation - Standard Curve
File Name	: ClavatumDetection13dec2012.eds
Date Modified	: Thu Dec 13 17:40:21 CST 2012
Run Started	: Thu Dec 13 17:40:34 CST 2012
Run Finished	: Thu Dec 13 18:47:30 CST 2012
Run Duration	: 66 minutes 55 seconds
User	:
Number of Wells Used	: 24
Number of Wells with Results	: 24
Date Printed	: Dec 14, 2012

Plate Layout

	60.5		61		61.5		62		62.5		63	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1.605 U Target 1 FAM-NFQ-MGB Ct: 28.6	1.605b U Target 1 FAM-NFQ-MGB Ct: 28.37	1.61 U Target 1 FAM-NFQ-MGB Ct: 28.47	1.61b U Target 1 FAM-NFQ-MGB Ct: 28.6	1.615 U Target 1 FAM-NFQ-MGB Ct: 28.62	1.615b U Target 1 FAM-NFQ-MGB Ct: 28.69	1.62 U Target 1 FAM-NFQ-MGB Ct: 28.91	1.62b U Target 1 FAM-NFQ-MGB Ct: 28.95	1.625 U Target 1 FAM-NFQ-MGB Ct: 29.71	1.625b U Target 1 FAM-NFQ-MGB Ct: 29.68	1.63 U Target 1 FAM-NFQ-MGB Ct: 30.99	1.63b U Target 1 FAM-NFQ-MGB Ct: 30.85
B	2.605 U Target 1 FAM-NFQ-MGB Ct: 23.2	2.605b U Target 1 FAM-NFQ-MGB Ct: 23.16	2.61 U Target 1 FAM-NFQ-MGB Ct: 23.12	2.61b U Target 1 FAM-NFQ-MGB Ct: 23.26	2.615 U Target 1 FAM-NFQ-MGB Ct: 23.11	2.615b U Target 1 FAM-NFQ-MGB Ct: 23.12	2.62 U Target 1 FAM-NFQ-MGB Ct: 23.16	2.62b U Target 1 FAM-NFQ-MGB Ct: 23.16	2.625 U Target 1 FAM-NFQ-MGB Ct: 23.43	2.625b U Target 1 FAM-NFQ-MGB Ct: 23.35	2.63 U Target 1 FAM-NFQ-MGB Ct: 23.76	2.63b U Target 1 FAM-NFQ-MGB Ct: 23.79

1f/3r
2f/3r

Temperature gradient : 60.5 a 63 °C, $\Delta = 0,5$.

95 °C 10'
95 °C 15''
Varie temperature del range

} 40 cicli

Plate Layout Quale è la condizione ideale ?

	60.5		61		61.5		62		62.5		63		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	1.605 U Target 1 FAM-NFQ-MGB Ct: 28.6	1.605b U Target 1 FAM-NFQ-MGB Ct: 28.37	1.61 U Target 1 FAM-NFQ-MGB Ct: 28.47	1.61b U Target 1 FAM-NFQ-MGB Ct: 28.6	1.615 U Target 1 FAM-NFQ-MGB Ct: 28.62	1.615b U Target 1 FAM-NFQ-MGB Ct: 28.69	1.62 U Target 1 FAM-NFQ-MGB Ct: 28.91	1.62b U Target 1 FAM-NFQ-MGB Ct: 28.95	1.625 U Target 1 FAM-NFQ-MGB Ct: 29.71	1.625b U Target 1 FAM-NFQ-MGB Ct: 29.68	1.63 U Target 1 FAM-NFQ-MGB Ct: 30.99	1.63b U Target 1 FAM-NFQ-MGB Ct: 30.85	1f/3r
B	2.605 U Target 1 FAM-NFQ-MGB Ct: 23.2	2.605b U Target 1 FAM-NFQ-MGB Ct: 23.16	2.61 U Target 1 FAM-NFQ-MGB Ct: 23.12	2.61b U Target 1 FAM-NFQ-MGB Ct: 23.26	2.615 U Target 1 FAM-NFQ-MGB Ct: 23.11	2.615b U Target 1 FAM-NFQ-MGB Ct: 23.12	2.62 U Target 1 FAM-NFQ-MGB Ct: 23.16	2.62b U Target 1 FAM-NFQ-MGB Ct: 23.16	2.625 U Target 1 FAM-NFQ-MGB Ct: 23.43	2.625b U Target 1 FAM-NFQ-MGB Ct: 23.35	2.63 U Target 1 FAM-NFQ-MGB Ct: 23.76	2.63b U Target 1 FAM-NFQ-MGB Ct: 23.79	2f/3r

Temperature gradient : 60.5 a 63 °C, $\Delta = 0,5$.

95 °C 10'

95 °C 15''

Varie temperature del range

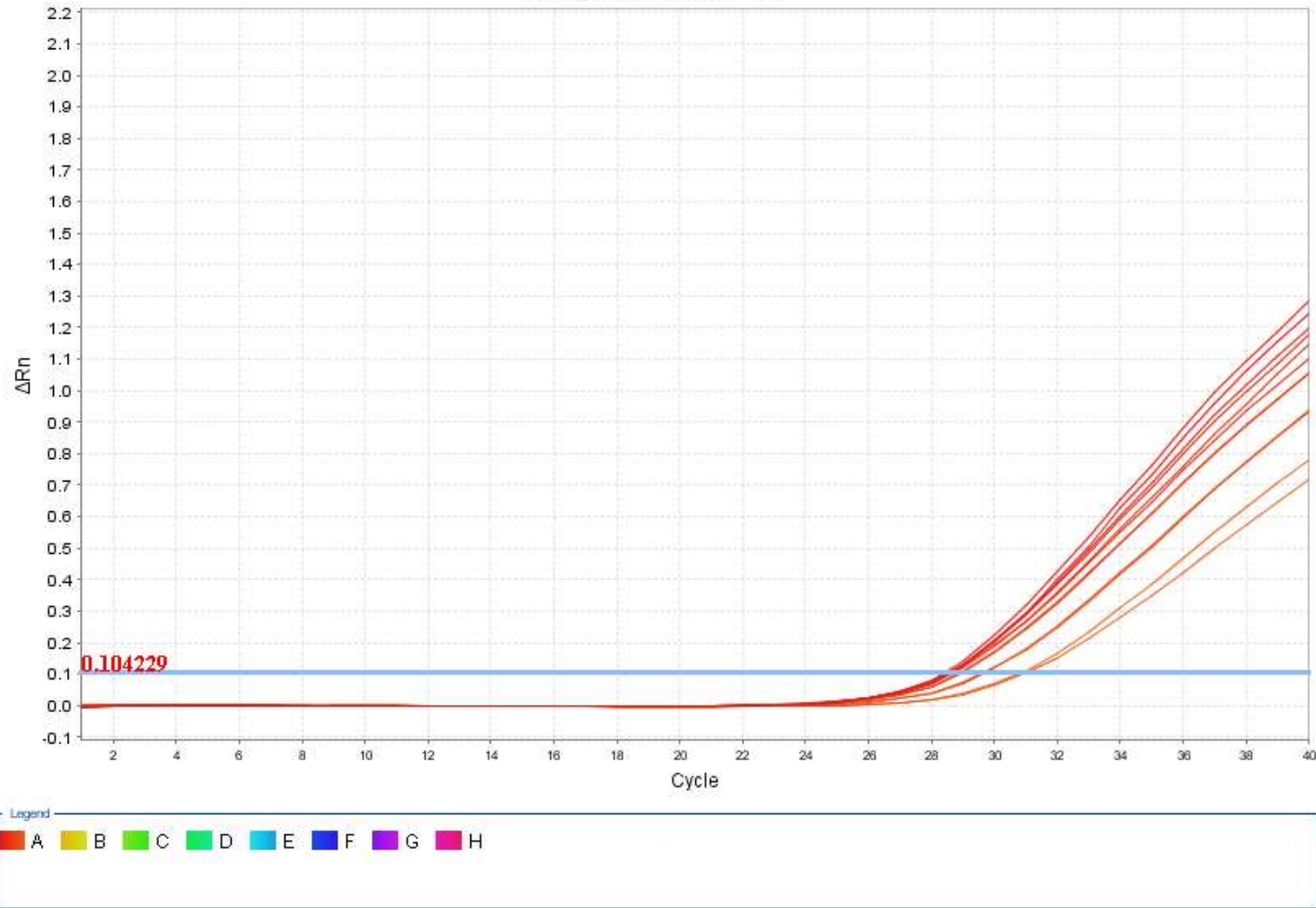
} 40 cicli

Campione 1° fila

Amplification Plot

PRIMERS 1f/3r

Amplification Plot



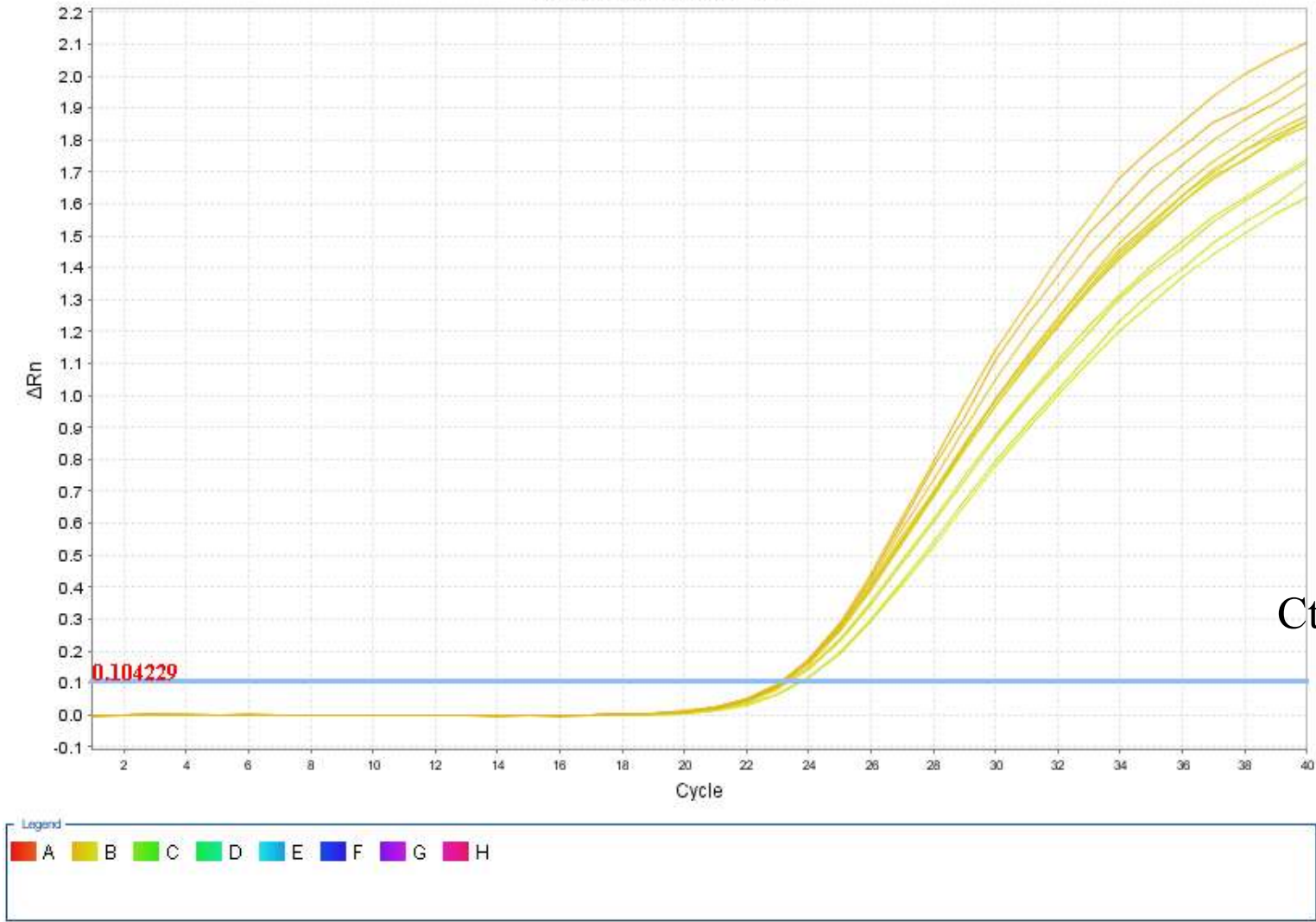
Ct: da 28 a 31

Valore Rn value : fluorescenza del SYBR Green/ fluorescenza passiva di riferimento per ogni reazione. Delta Rn: valore dato dall' Rn di ogni reazione meno l' Rn di base generato dallo strumento.

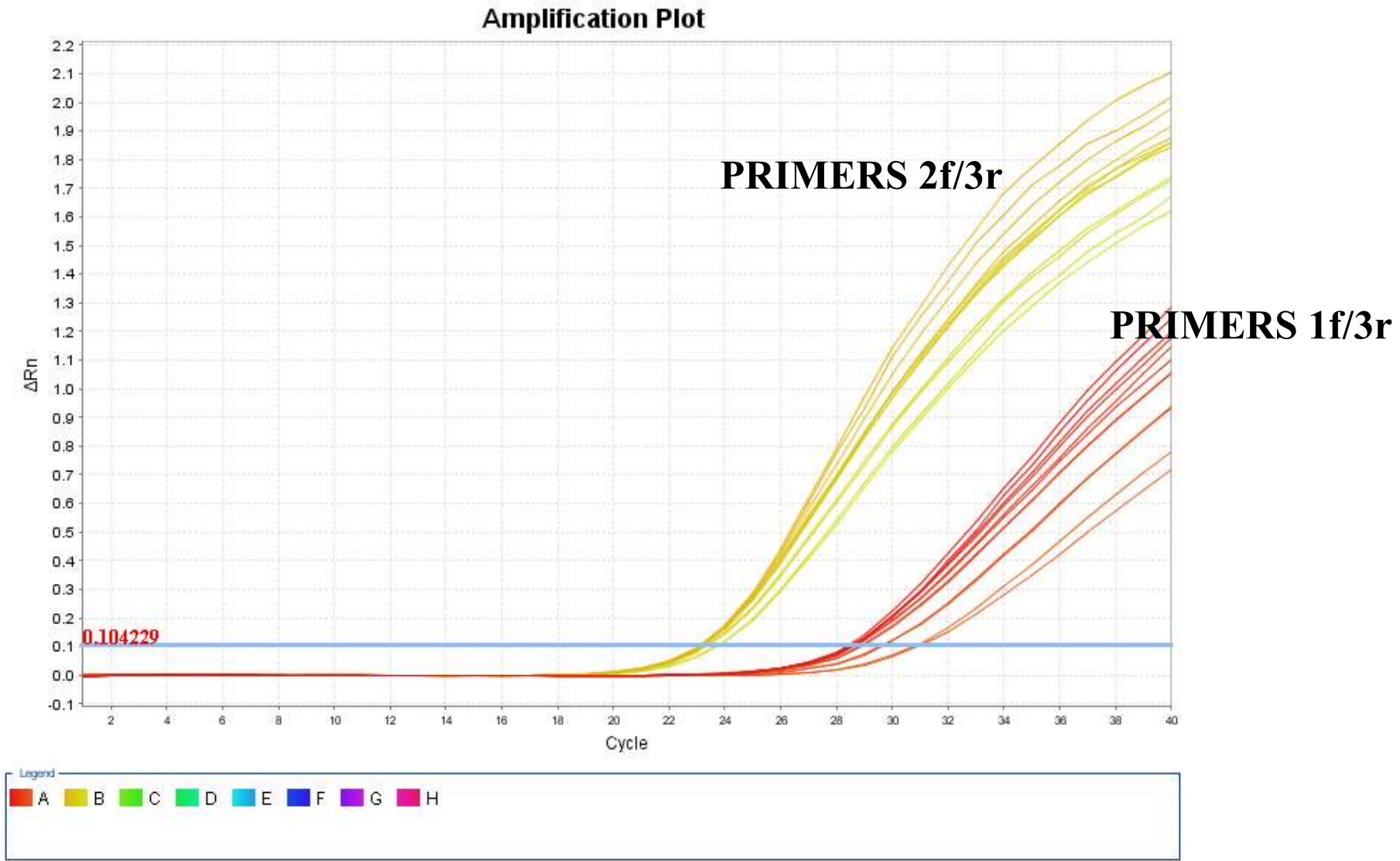
Amplification Plot

PRIMERS 2f/3r

Amplification Plot



Amplification Plot



Vantaggi della Real Time PCR

- Semplificazione delle procedure di **visualizzazione del risultato**: la presenza di amplimero (patogeno) è rivelata dall'emissione di fluorescenza (rilievo visivo o con fluorimetro del termociclatore)
- **Identificazione multipla di diversi patogeni sullo stesso campione (uso di fluorofori e quencer diversi)**
- **Quantificazione del patogeno** (curve di taratura del Ct alle diverse concentrazioni della molecola bersaglio) patogeno
- Automazione della reazione

Analisi molecolare



Figure 2: The portable Smart Cycler TD. Real-time PCR assays can be conducted at remote/field locations using the Smart Cycler. The Smart Cycler processing block has 16 independently-controlled reaction sites (I-CORE modules) allowing different cycling parameters to be run simultaneously.

METODI MOLECOLARI (PCR)

criticità

- *Costi*
- *Strumentazione specialistica*
- *Personale altamente specializzato*
- *Standardizzazione dei metodi*

Tecniche di diagnosi molecolare

Metodi indiretti

Ibridazione molecolare

In fase liquida

□ Reazione a catena della polimerasi (PCR)

- ✓ PCR convenzionale
- ✓ PCR in tempo reale

In fase mista : solida/liquida

- Dot blot
- Northern blot (RNA)
- Southern blot (DNA)

Ibridazione molecolare in fase mista

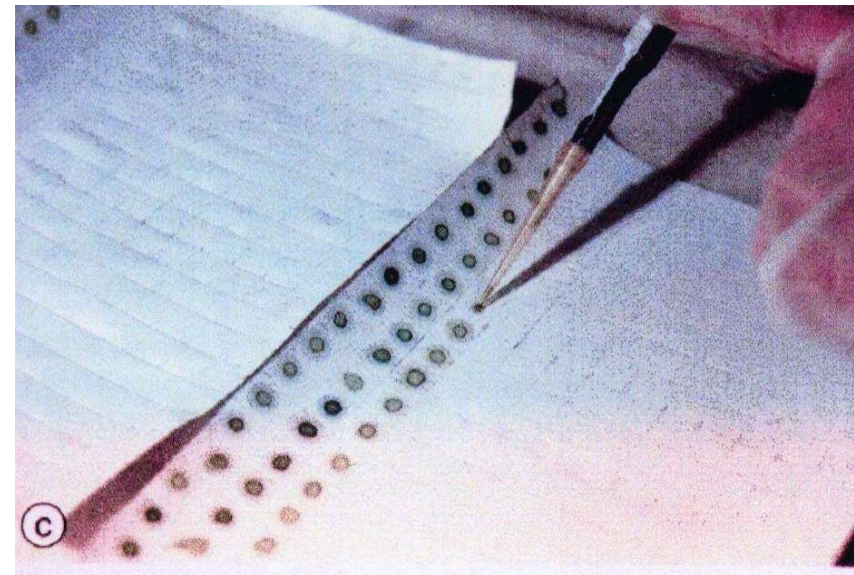
Macerazione dei tessuti in soluzione alcalina (NaOH, EDTA)

Dot Blot

Ibridazione a macchia

Sensibilità: 1 pg target / ml di succo

Trasferimento di piccole aliquote su membrana di nylon o nitrocellulosa e fissaggio mediante esposizione a luce UV

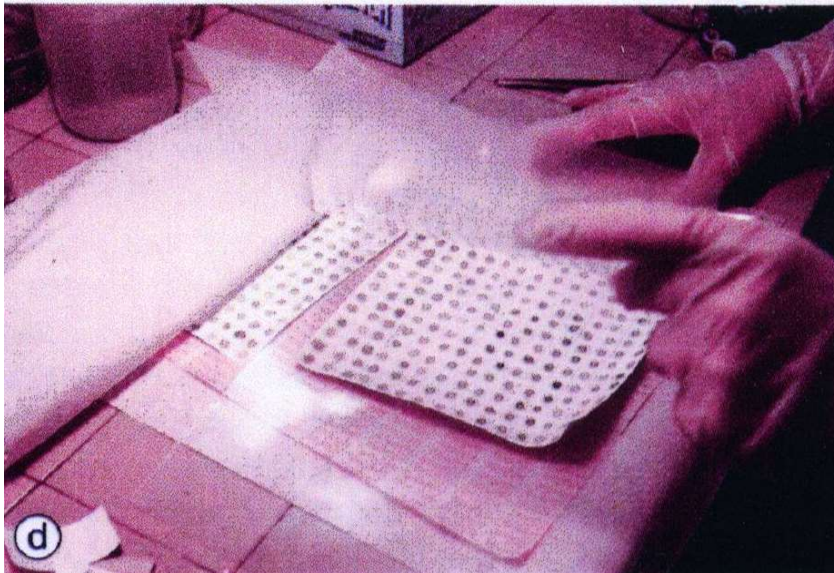




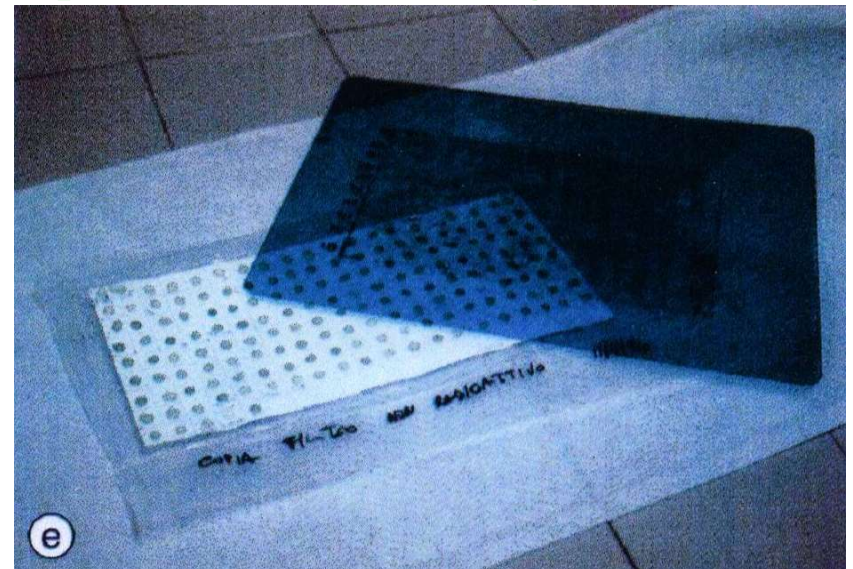
- Ibridazione (overnight)
 - ✓ Sonda marcata (^{32}P o DIG)
 - ✓ Soluzione di ibridazione

- Concetto di stringenza
 - ✓ Temperatura (65°C)
 - ✓ Concentrazione salina
 - ✓ Formammide

Lavaggi

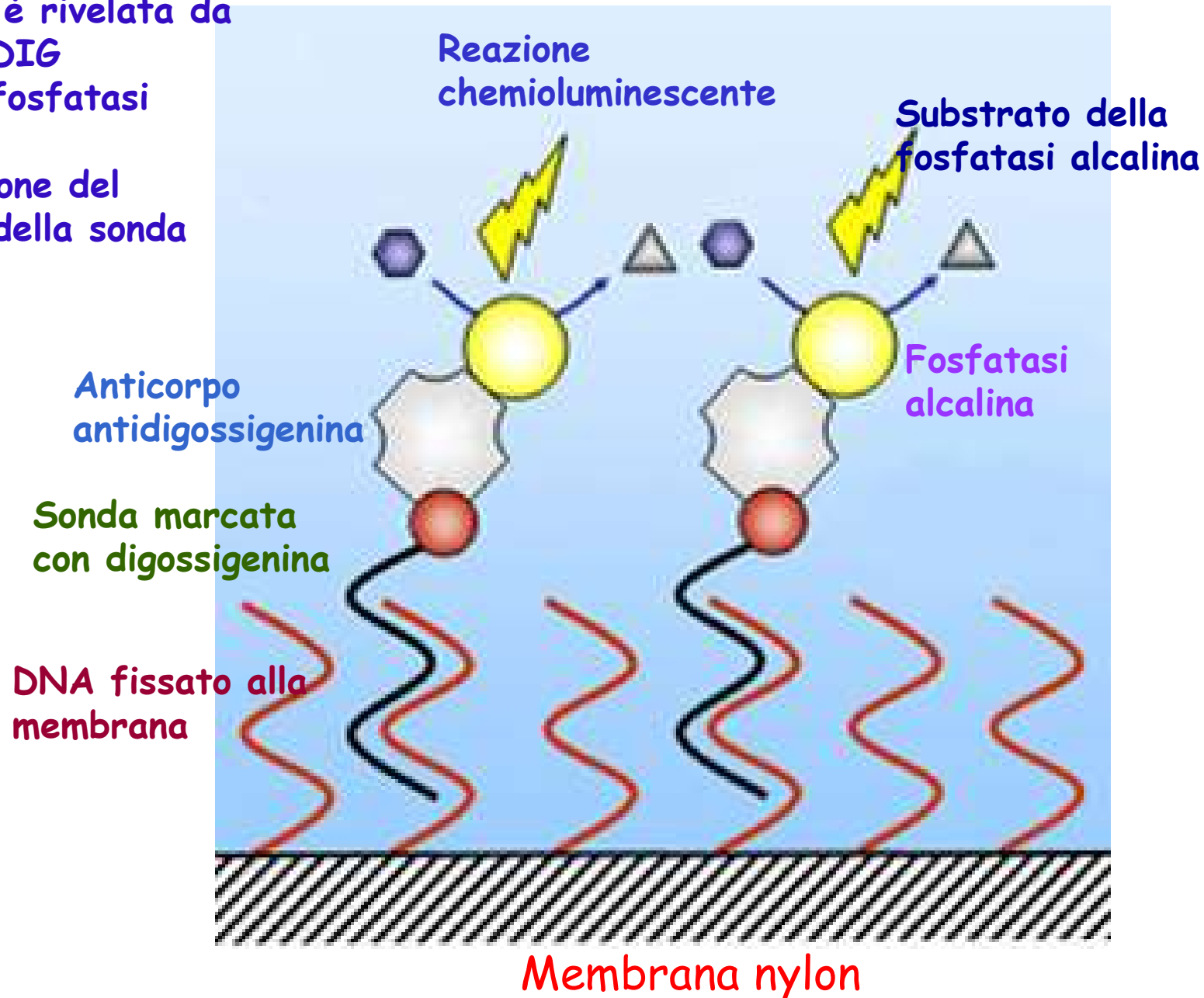


Esposizione a lastra fotografica



Sonde fredde : marcate con Digossigenina

La presenza della DIG è rivelata da un ANTICORPO ANTIDIG CONIUGATO con una fosfatasi alcalina che determina colorazione del substrato in presenza della sonda (= del target)



Ibridazione molecolare in fase mista

Dot Blot

Ibridazione a macchia

Usi della tecnica .

Applicazioni massali :

- Certificazione sanitaria del materiale di propagazione
- Screening di insetti vettori per la ricerca di sequenze virali

Vantaggi della tecnica .

- velocità ed economicità
- possibilità di usare contemporaneamente molte sonde (fino a 6) per la ricerca di multipla di virus