

Capitolo 1

Introduzione alla PCR

La tecnologia della PCR ha rivoluzionato l'attività dei laboratori di ricerca e di diagnostica trovando applicazioni ed impieghi in svariati campi della medicina e della biologia. Infatti, viene utilizzata di *routine* non solo nei laboratori di genetica, biochimica, microbiologia, biologia molecolare e virologia, ma anche in medicina forense, in oncologia in botanica ed in zoologia, coprendo tutto il ventaglio delle discipline che hanno in qualche modo a che fare con le scienze della vita.

Questo testo si propone di fornire le basi teoriche della reazione di PCR e delle sue varianti (es. RT-PCR, PCR quantitativa, PCR isoterma) a quanti si occupano, nella loro attività di laboratorio, di metodi basati sull'amplificazione degli acidi nucleici. Si descrivono inoltre le principali applicazioni utilizzate per il sequenziamento e lo studio del polimorfismo genetico e le procedure di purificazione e di clonaggio indispensabili per analisi più approfondite dei prodotti di amplificazione.

1.1. Il principio della reazione a catena della polimerasi

La PCR è una tecnica che consente di ottenere rapidamente milioni di molecole identiche di DNA a partire da quantità estremamente ridotte dell'acido nucleico. Infatti la PCR è una reazione di amplificazione *in vitro* di uno specifico frammento di DNA per mezzo di una DNA polimerasi.

Un prerequisito indispensabile al realizzarsi della reazione è la conoscenza delle sequenze alle estremità della regione bersaglio. Infatti, nella reazione sono coinvolti due oligonucleotidi a singolo filamento (*primer*) complementari uno all'estremità 3' e l'altro all'estremità 5' del segmento di DNA che si vuole amplificare, che costituiscono gli elementi di innesco dell'attività della DNA polimerasi.

Altri elementi coinvolti nella reazione sono i desossiribonucleotidi e il $MgCl_2$: i primi sono necessari per la sintesi delle nuove eliche ed il secondo rappresenta il cofattore indispensabile alla DNA polimerasi.

La reazione prevede il succedersi di cicli di amplificazione durante i quali si alternano tre diverse temperature (Figura 1.1) che rendono possibile rispettivamente:

- 1) la **denaturazione** della doppia elica del DNA stampo in due singole eliche (alla temperatura di 95 °C);
- 2) l'**appaiamento** degli inneschi oligonucleotidici alle sequenze di DNA a singola elica ad essi complementari e localizzati alle estremità del frammento bersaglio (ad una temperatura in genere compresa tra i 50 ed i 70 °C)
- 3) l'**estensione** degli inneschi mediante aggiunta di nucleotidi nella direzione 5'-3' ad opera della DNA polimerasi che porta alla sintesi di una nuova elica complementare al DNA stampo (ad una temperatura compresa tra i 68 e i 72 °C)

Il numero di nuove molecole di DNA aumenta al succedersi di ogni ciclo. Infatti, durante il primo ciclo da un singola molecola di DNA si ottengono due molecole, ciascuna costituita da un'elica "vecchia" che ha fatto da stampo alla sintesi dell'elica "nuova"; al secondo ciclo ciascuna delle due molecole si denatura, i quattro filamenti di DNA che si ottengono fanno da stampo per l'attività della DNA polimerasi ed alla fine le molecole di DNA diventano quattro. Il processo di amplificazione procede in questo modo di ciclo in ciclo (Figura 1.2). In teoria quindi ad ogni ciclo il numero di copie della sequenza bersaglio aumenta in maniera esponenziale, di fatto, il numero di copie si duplica ad ogni ciclo fino al raggiungimento di un plateau (vedi paragrafo 1.2.5).

Figura 1.1. Rappresentazione schematica di un ciclo di amplificazione PCR.

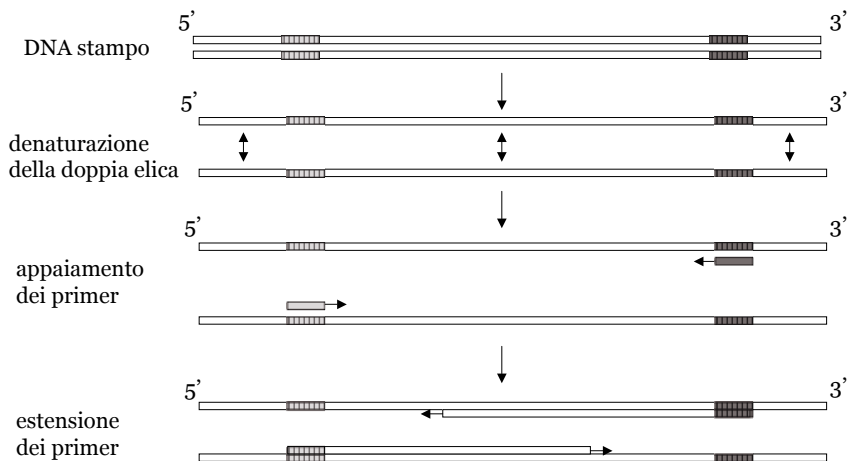
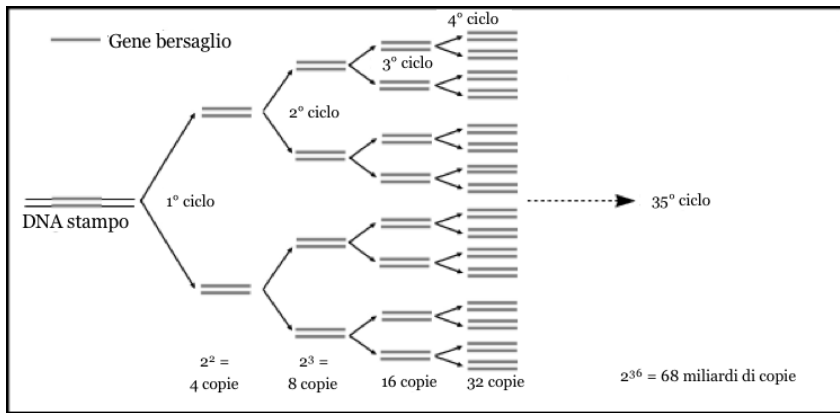


Figura 1.2. Rappresentazione schematica del processo di amplificazione PCR.



1.1.1. Evoluzione della tecnica di PCR

La tecnica messa a punto da Mullis e collaboratori nel 1986 rappresentò una rivoluzione nel campo della biologia molecolare, ma aveva ancora tanti limiti. Inizialmente, nella reazione veniva utilizzato il frammento di Klenow della DNA polimerasi I di *Escherichia coli*. Tuttavia, questo enzima non è stabile alle alte temperature e viene inattivato durante la fase di denaturazione di ciascun ciclo PCR. Era pertanto necessario aggiungerne una nuova aliquota prima della fase di estensione, che veniva effettuata ad una temperatura di 37 °C. Tutto ciò rendeva la tecnica laboriosa e costosa e aumentava la probabilità di avere prodotti di reazione aspecifici.

Nel 1988 fu isolata una DNA polimerasi termostabile prodotta dal batterio termoresistente *Thermus aquaticus* (**Taq DNA Polimerasi**). L'uso di questa polimerasi ha consentito di effettuare la fase di estensione a 72 °C aumentando la resa e la specificità dei prodotti di reazione e soprattutto ha reso possibile l'automazione del processo.

Le potenzialità della tecnica sono ancora aumentate nel corso del tempo grazie alla identificazione e commercializzazione di prodotti che hanno consentito di superare i limiti di attività della Taq DNA polimerasi, con l'aggiunta ad esempio della capacità di *proof-reading*, che consente la correzione di errori di lettura durante l'amplificazione.

Rimanevano tuttavia ancora particolarmente laboriose le analisi finalizzate a valutare la specificità e la riproducibilità dei prodotti di reazione. In quanto era sempre necessario ricorrere a tecniche di *blotting* e ibridazione o di sequenziamento. Nel 1991 Holland e collaboratori hanno messo a punto un metodo che consente di analizzare i prodotti

di amplificazione durante la loro sintesi. Questo metodo sfrutta l'attività 5'-3' esonucleasica della *Taq* DNA polimerasi e prevede l'aggiunta alla miscela di reazione PCR di una sonda marcata complementare alla sequenza bersaglio. Durante la fase di allungamento della reazione, l'attività esonucleasica della DNA polimerasi determina la degradazione della sonda legata alla sequenza in esame. I frammenti marcati di sonda così rilasciati possono essere discriminati dalle sonde oligonucleotidiche ancora integre.

Dal 1991 ad oggi sono stati individuati differenti tipi di tecniche PCR che consentono la rilevazione in tempo reale dei prodotti di amplificazione, detta appunto *Real Time PCR* (vedi paragrafo 2.4).

1.2. Fattori da tenere in considerazione nel mettere a punto una reazione di PCR

1.2.1. Denaturazione del DNA

Il primo *step* nella reazione di PCR consiste nella denaturazione del DNA stampo a doppia elica. In questa fase occorre ottimizzare due parametri essenziali:

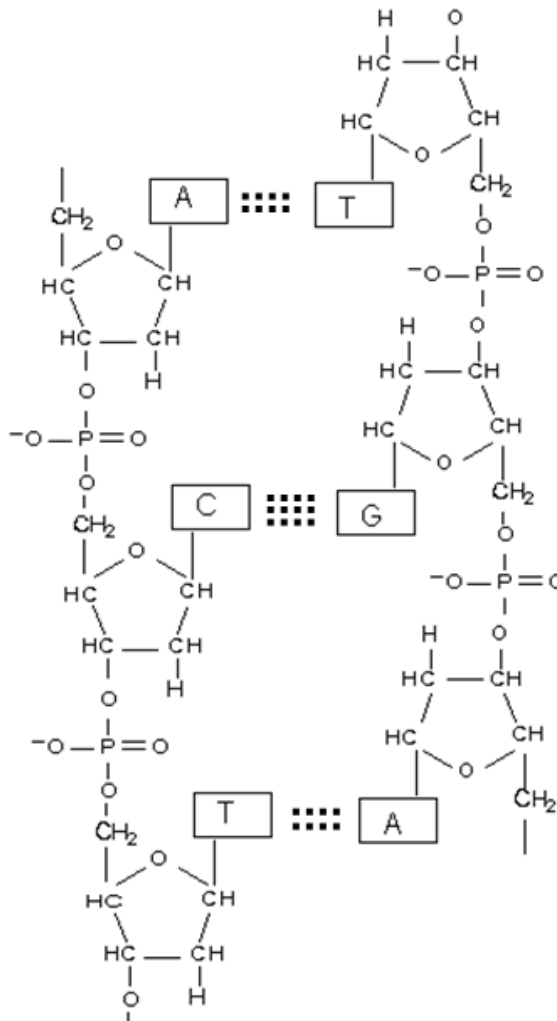
- 1) la denaturazione ottimale del DNA stampo su cui si effettua la PCR;
- 2) il mantenimento delle attività della *Taq* DNA polimerasi.

1) Normalmente il DNA si trova nella classica conformazione a doppio filamento in cui i due filamenti (***strands***) del DNA sono tenuti assieme dai legami a ponte di idrogeno formati tra le basi azotate complementari (**A:T; G:C**) (Figura 1.3). Il DNA deve essere portato ad una condizione di singola elica (***single-stranded***) in modo che successivamente si verifichi l'appaiamento (***annealing***) alle molecole di primer (anch'esse a singolo filamento). Per fare ciò la soluzione contenente il DNA viene portata ad una temperatura al di sopra della sua "temperatura di fusione (***T_m***)" (***melting temperature***), nella quale i legami ad idrogeno, non più stabili, permettono la separazione tra i due singoli filamenti del DNA. Nel tampone di reazione in cui viene normalmente effettuata la reazione di PCR la temperatura di fusione è solitamente compresa tra 92 e 96 °C e la denaturazione viene favorita dalla presenza di concentrazioni saline relativamente alte (circa **150mM NaCl**). Spesso la temperatura di fusione viene anche chiamata "temperatura di denaturazione", anche se dal punto di vista chimico-fisico sono due concetti diversi.

2) La *Taq* DNA polimerasi ha solitamente una emivita di **30 min a 95 °C**. Questo fatto limita il numero di cicli della PCR ed il tempo di

denaturazione del primo step. Infatti considerando una incubazione di 1 min a 95 °C per ogni ciclo di PCR il numero di cicli effettuabili non può essere superiore a 30-35. Diminuendo il tempo di denaturazione a 15-30 sec i cicli di PCR possono solitamente essere aumentati fino a 45. È inoltre possibile ridurre la temperatura di denaturazione dopo i primi 10 cicli di PCR. Ad esempio per ampliconi di lunghezza inferiore a 3 Kbp si può effettuare la denaturazione a 88 °C (per frammenti di DNA amplificati con meno del 50% di contenuto in G+C).

Figura 1.3. La struttura della doppia elica del DNA con tratteggiati i legami a ponte d'idrogeno. A, T, G, C, indicano le basi azotate adenina, timina, guanina e citosina.



1.2.2. Appaiamento dei primer (*annealing*)

Questo secondo *step* consiste nella programmazione della temperatura e del tempo di appaiamento dei primer. La temperatura di annealing (**T_a**) dei primer dipende dal loro contenuto in G+C e dalla loro lunghezza e quindi dalla temperatura di fusione tra primer e la sua elica complementare sul DNA stampo. Considerando primer di lunghezza media di 20 basi una formula empirica spesso utilizzata per il calcolo della T_m è la seguente:

$$T_m = [4(G + C) + 2(A + T)] \text{ } ^\circ\text{C}.$$

Dove G, C, A e T indicano il numero di nucleotidi contenenti le basi azotate guanina, citosina, adenina o timina. Nel caso che i due primer abbiano T_m diverse generalmente si considera quello con la T_m più bassa.

Solitamente si utilizza come temperatura di annealing la T_m-5 °C anche se spesso l'utilizzo diretto della stessa T_m può portare ad avere ottime rese nella reazione di PCR.

Nel mettere a punto le reazioni di PCR si possono seguire essenzialmente due tipi di criteri riguardo alla T_a:

- 1) T_a **costante** durante i cicli;
- 2) T_a che **diminuisce** ciclo dopo ciclo (***touch-down***)

Nella gran parte delle reazioni la T_a rimane costante per tutta la durata della reazione e non si effettuano variazioni lungo i cicli. La strategia di reazione *touch-down* permette di rendere i primi cicli di PCR estremamente “**stringenti**”, cioè tali da promuovere l'amplificazione solo di frammenti specifici rendendo instabili eventuali annealing dei primer a sequenze di DNA non perfettamente complementari. In effetti una T_a troppo bassa porta all'annealing dei primer a sequenze non esattamente complementari e quindi all'amplificazione di frammenti non specifici, mentre una T_a troppo alta può ridurre la resa in quanto solo una frazione delle molecole del primer riesce ad innescare la polimerizzazione a causa dell'elevata instabilità del loro appaiamento con il DNA stampo.

Il tempo di annealing infine non deve essere troppo lungo (in modo da sfavorire appaiamenti a stampi con bassa complementarità). Di solito si utilizzano tempi dell'ordine di 30 sec o meno.

1.2.3. Estensione dei primer (*elongation*)

Il terzo *step* della reazione di PCR è legato alla programmazione della temperatura e del tempo di estensione dei primer.

La temperatura utilizzata è solitamente compresa tra **68 e 72 °C**.

La *Taq* DNA polimerasi ha un'attività specifica a 37 °C molto simile a quella del frammento di Klenow della DNA polimerasi I di *E. coli*. Tuttavia l'attività della *Taq* DNA polimerasi ha il suo massimo a circa 70 °C e l'estensione dei primer avviene ad una velocità di circa 100 basi/sec. Generalmente 1 min è sufficiente per amplificare con una buona resa stampi lunghi circa 1 Kbp. Il tempo di estensione viene quindi calibrato sulla lunghezza dello stampo da amplificare tenendo conto che una preparazione di *Taq* DNA polimerasi, a causa della sua processività non alta, solitamente non amplifica con buona resa frammenti di DNA di lunghezza superiore a 3 Kbp. In alcuni casi (soprattutto per l'amplificazione di stampi oltre le 3 Kbp) può essere conveniente incrementare il tempo di estensione ciclo dopo ciclo per andare incontro alla diminuzione della concentrazione di *Taq* DNA polimerasi (o altre DNA polimerasi termostabili) attiva.

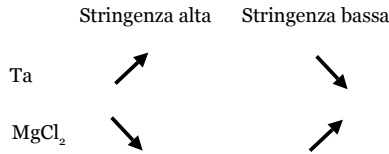
1.2.4. Tampone di reazione

Un tampone di reazione (buffer) standard contiene:

- 10-50mM Tris-HCl pH 8.3,
- fino a 50mM KCl,
- **1.5mM o più di $MgCl_2$** ,
- 0.2 – 1 μ M di ciascun primer,
- 200 μ M di ciascun deossiribonucleotide (dNTP),
- gelatina o BSA (siero albumina bovina) fino a 100 μ g/ml,
- in alcuni casi vengono aggiunti detergenti non ionici come Tween-20, Nonidet P-40 o Triton X-100 (0.05-0.10% v/v).

Il tampone di reazione viene sempre fornito insieme all'enzima. In alcuni casi il produttore della *Taq* DNA polimerasi mette in commercio sia tamponi di reazione contenenti $MgCl_2$ sia privi di esso. Nel caso si debba mettere a punto una PCR è di norma preferibile avere a disposizione il tampone di reazione privo di $MgCl_2$, ed aggiungere il sale separatamente. Infatti la concentrazione degli ioni ha due ruoli: da un lato è un cofattore essenziale per la *Taq* DNA polimerasi per il caricamento dei nucleotidi, dall'altro la concentrazione di **Mg^{2+} influenza l'appaiamento dei primer** allo stampo. Maggiore è la concentrazione di $MgCl_2$ minore è la specificità dell'appaiamento. La variazione delle concentrazioni di $MgCl_2$ gioca quindi un ruolo simile (ma opposto) a quello della temperatura di annealing e spesso la messa a punto di un'elevata (o bassa) **stringenza** (specificità) nella PCR è basata tanto sulla Ta quanto sulla concentrazione di $MgCl_2$. Uno schema riassuntivo sull'influenza della temperatura e del cloruro di magnesio sulla stringenza della reazione di PCR è presentato in Figura 1.4.

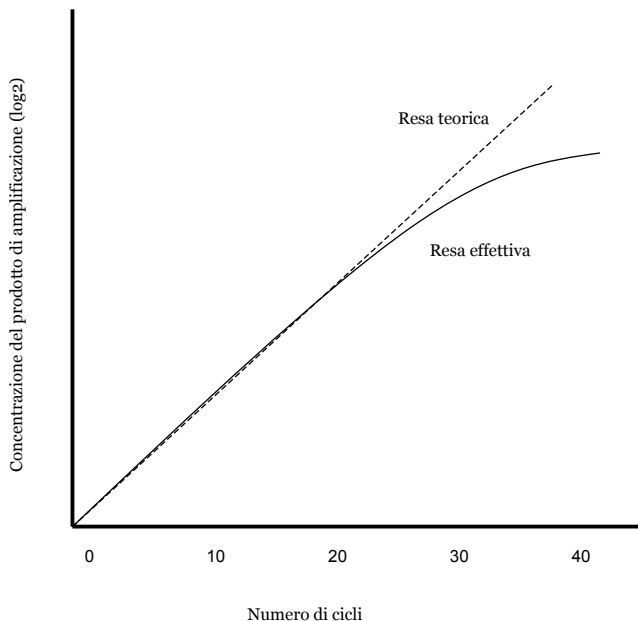
Figura 1.4. Effetto del cloruro di magnesio ($MgCl_2$) e della temperatura di annealing (T_a) sulla stringenza (specificità) di una reazione di PCR. Le frecce in alto e in basso indicano rispettivamente un aumento o una diminuzione della T_a e del $MgCl_2$.



1.2.5. Numero di cicli

Il numero di cicli di amplificazione necessari ad ottenere una banda visibile su gel di agarosio dipende in gran parte dalla concentrazione di DNA iniziale. Tuttavia l'effetto del numero dei cicli non è proporzionale a causa della presenza del cosiddetto “**effetto plateau**” in cui nelle fasi tardive dell'amplificazione il tasso di accumulo di prodotto diminuisce a causa di numerosi fattori tra cui la degradazione dei reagenti (dNTPs, DNA polimerasi, vedi paragrafo 1.2.1), inibizione da parte del pirofosfato accumulato (inibizione da prodotto) (Figura 1.5). In generale il numero di cicli è compreso tra 30 e 45.

Figura 1.5. “Effetto Plateau” della reazione di PCR causato dalla degradazione dei reagenti e dall'accumulo di prodotti.



1.2.6. Additivi vari

Nel caso di sequenze da amplificare ricche in G+C può rendersi talvolta necessario aggiungere alla miscela di reazione delle molecole in grado di **favorire la denaturazione** della doppia elica del DNA. Le molecole più frequentemente utilizzate (in una concentrazione fino al 10% (w/v o v/v)) sono:

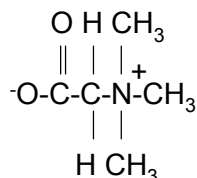
- dimetilsolfossido (DMSO)
- dimetilformamide (DMF)
- urea
- formammide
- glicerolo
- BSA (sieroalbumina bovina)
- PEG (polietilenglicole)

Nella miscela di reazione questi additivi abbassano la T_m del DNA, oppure diminuiscono l'effetto di inibitori presenti nel DNA stampo (come ad esempio i composti fenolici, oppure i metalli pesanti presenti nel DNA estratto da suolo, feci o sangue). Va comunque notato che alcuni degli additivi (ad esempio il DMSO) in alta concentrazione (10%) abbassano l'attività della *Taq* DNA polimerasi fino al 50%. Occorre quindi di solito effettuare dei dosaggi a concentrazioni diverse per ottimizzare la resa della reazione di PCR. In altri casi gli additivi possono essere utili per **l'amplificazione di lunghe sequenze**.

Tra gli additivi più comunemente utilizzati vi sono il **DMSO** e la **betaina** (Figura 1.6) che possono aumentare la specificità della reazione. Ad esempio l'aggiunta di combinazioni di betaina 1M e DMSO 5% o della sola betaina 1M è in grado di **ridurre notevolmente il numero di bande aspecifiche** presenti nella miscela di reazione. Alcuni ricercatori suggeriscono addirittura di inserire comunque nella miscela di reazione betaina 1M. Tuttavia le modificazioni di specificità e della PCR dovute all'alterata stringenza indotta dalla betaina non possono essere previste a priori e si rende spesso necessario determinare empiricamente mediante delle prove con concentrazioni crescenti di betaina la concentrazione ottimale.

Infine, occorre citare il **polietilenglicole (PEG)** che può essere utilizzato per amplificare **DNA in concentrazione molto bassa** in

Figura 1.6. Struttura molecolare della betaina (*N,N,N*-trimetilglicina).



quanto promuove l'associazione macromolecolare tra DNA e DNA polimerasi attraverso l'esclusione del solvente.

1.3. Disegno dei primer

Per il disegno dei primer e delle coppie di primer spesso vengono utilizzati dei programmi appositi sia installabili sul proprio computer sia accessibili gratuitamente via web. Un elenco (non esaustivo!) di programmi utilizzabili come servizio web è il seguente:

- **Primer3** URL: http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi oppure <http://frodo.wi.mit.edu/>
- **GeneFisher** URL: <http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/genefisher2/>
- **Oligonucleotide calculator** URL: <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligo.html>

L'interfaccia web di Primer3 prevede una maschera in cui si incolla la sequenza sulla quale si desidera disegnare la coppia di primer (Figura 1.7) ed una serie di opzioni relative alla lunghezza che devono avere i primer e la regione amplificata, la Tm dei primer da disegnare e eventuali restri-

Figura 1.7. Screen-shot sulla maschera principale dell'interfaccia web del software Primer3.

Primer3 Input SCGI_VERSIION - Mozilla Firefox

Primer3: WWW primer tool

pick primers from a DNA sequence

disclaimer
cautions
bug? suggestions?
Questions?

Paste source sequence below (5'->3', string of ACGTNacgtn -- other letters treated as N -- numbers and blanks ignored). FASTA format ok. Please N-out undesirable sequence (vector, ALUs, LINEs, etc.) or use a Mispinning Library (repeat library): NONE

Pick left primer or use left primer below
 Pick hybridization probe (internal oligo) or use oligo below.
 Pick right primer or use right primer below (5'->3' on opposite strand)

Pick Primers Reset Form

Sequence Id. A string to identify your output

Targets: E.g. 50,2 requires primers to surround the 2 bases at positions 50 and 51. Or mark the source sequence with [and] e.g. ATCT[CCCC]TCAT. means that primers must flank the central CCCC

Excluded Region: E.g. 401,7 68,3 forbids selection of primers in the 7 bases starting at 401 and the 3 bases at 68. Or mark the source sequence with < and >; e.g. ...ATCT<CCCC>TCAT. forbids primers in the central CCCC

Product Size Min: 100 Opt: 200 Max: 1000

Number To Return: 5 Max 3' Stability: 9.0

Max Mispinning: 12.00 Pair Max Mispinning: 24.00

Pick Primers Reset Form

General Primer Picking Conditions

Completato

zioni o zone particolari della sequenza sulle quali si vuole concentrare il disegno dei primer ottimali (Figura 1.8). Una volta impostate si avvia la ricerca ed il programma fornirà una prima coppia di primer ottimale più una serie di altre coppie alternative che l'utente può scegliere a seconda delle necessità. Coppie di primer possono comunque anche essere disegnate a mano seguendo i parametri descritti sotto. Si deve ovviamente tener conto di disegnare un primo primer (**primer forward**) sull'elica senso del DNA e l'altro (**primer reverse**) sull'elica opposta (antisense) in modo da avere i due terminali 3' dei primer a delimitare il segmento da amplificare (Figura 1.9). Il programma GeneFisher è particolarmente utile per disegnare primer degenerati (vedi paragrafo 1.3.3). Il software Oligonucleotide calculator permette di calcolare diverse proprietà degli oligonucleotidi quali il contenuto in GC, l'assorbanza della soluzione a 260 nm, la temperatura di melting a differenti concentrazioni di sali, le costanti termodinamiche e la presenza di complementarietà.

Figura 1.8. Screen-shot sulla maschera di selezione delle opzioni per la ricerca dei primer dell'interfaccia web del software Primer3.

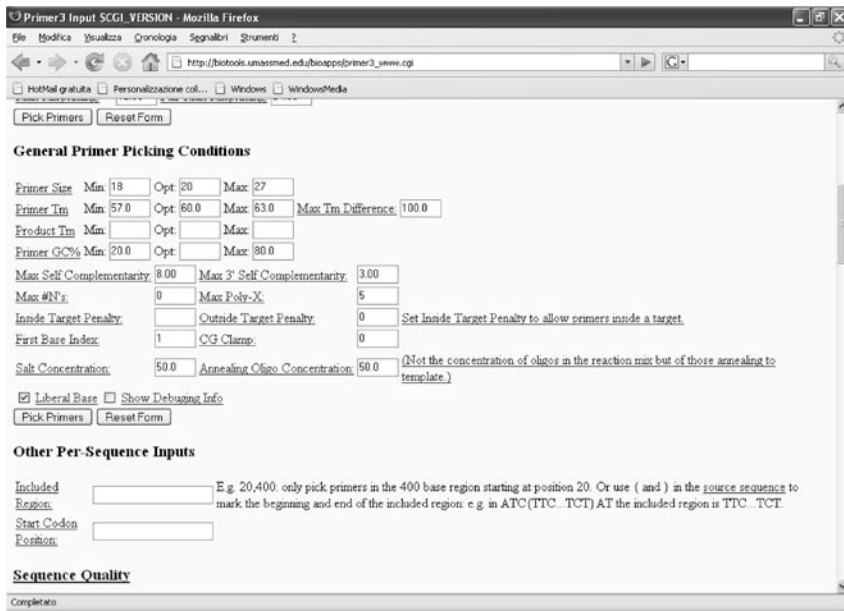
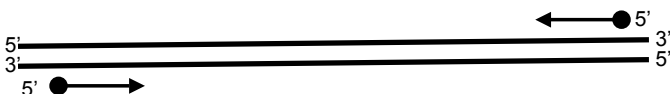


Figura 1.9. La complementarietà dei primer forward e reverse (freccie a destra e a sinistra) alle due eliche del DNA (senso e antisense).



1.3.2. Lunghezza dei primer

La lunghezza ottimale di un primer dipende sia dal suo contenuto in A+T, sufficientemente basso da poter avere T_m (e quindi T_a) superiori a 50°C , sia dalla composizione nucleotidica della sua sequenza in modo che la probabilità di avere siti di annealing diversi da quello voluto sia estremamente bassa (alta specificità). A questo proposito si può far notare che la probabilità di trovare una singola base (A, G, C o T) in una sequenza casuale di DNA è $1/4$ (cioè 4^{-1}); su un dinucleotide sarà il prodotto delle singole probabilità cioè $4^{-1} \times 4^{-1} = 4^{-2}$. Per un oligonucleotide di 16 basi sarà perciò 4^{-16} (**=1/4 294 967 296**) che corrisponde alla dimensione di un genoma di un eucariote complesso medio (come *Homo sapiens* o il *Zea mays*) ed è 1000 volte più grande del genoma di *E. coli*. Di conseguenza un oligonucleotide con **almeno 17 o più basi** sarà estremamente specifico e primer di questa lunghezza sono comunemente utilizzati per l'amplificazione PCR sia nei procarioti sia negli eucarioti con genomi complessi. Il limite superiore per la lunghezza di un primer è dettato dalla sua T_m . Un primer troppo lungo avrà una T_m così alta che anche temperatura alte ($70\text{--}72^\circ\text{C}$ di annealing) durante i cicli di PCR non sono sufficienti a limitare i casi di annealing a siti aspecifici dovuti alla stabilità di legami non complementari (*mismatch pairing*). Solitamente quindi la lunghezza di un primer non supera le **30-35 basi**. Nei programmi più comuni di disegno di primer citati sopra la lunghezza di *default* è definita in **20 basi**.

1.3.3. Primer degenerati

I primer degenerati sono primer la cui sequenza non è determinata univocamente, ma contiene una o più posizioni in cui possono essere presenti più nucleotidi in miscela. Ad esempio, la sequenza sottostante di un primer di 20 basi:



significa che il primer disegnato contiene delle posizioni ("degenerazioni" indicate con Y e N) che contengono in miscela le basi T + C (Y) o A + G + C + T (N). Le degenerazioni ovviamente riducono la specificità del primer aumentando le possibilità di appaiamento.

A cosa servono i primer degenerati?

I primer degenerati possono essere utilizzati per amplificare sequenze di DNA (ignote) da un organismo utilizzando per il disegno del primer la sequenza nota (omologa) proveniente da un altro organismo o dallo stesso organismo. In alcuni casi si possono usare i primer degenerati

per amplificare un gruppo di geni ortologhi da un gruppo omogeneo di organismi (per esempio il 16SrDNA dagli eubatteri, oppure il gene *nifH* dai batteri azotofissatori, ovvero il gene per la citocromo ossidasi dal genoma mitocondriale degli artropodi) per analisi evolutive o di popolazione. Una PCR con primer degenerati viene infatti a volte chiamata “PCR evolutiva”.

Come si disegnano i primer degenerati?

Per disegnare un primer degenerato si parte dall’allineamento multiplo delle sequenze note evolutivamente correlate alla sequenza da amplificare. Dall’allineamento si ricava una sequenza consenso in cui sono indicate le zone più o meno conservate. Sulle regioni più conservate della sequenza consenso verranno infine disegnati i primer. Nelle Figure 1.10 e 1.11 sono riportati gli screen-shot dell’interfaccia del software GeneFisher).

Figura 1.10. Screen-shot sulla maschera principale del programma GeneFisher utilizzato per disegnare primer degenerati.



1.3.4. Contenuto in G+C e sequenze ripetute

- **G+C** Il contenuto in G+C determina la T_m , quindi occorre evitare sia valori troppo bassi (bassa T_m) sia valori troppo alti (alta T_m). Solitamente il contenuto in G+C si aggira tra il **40 e il 60%**. Si

Figura 1.11. Screen-shot sull'allineamento multiplo prodotto dal software GeneFisher su alcune sequenze di DNA di esempio con indicato il consenso (Consensus).

genefisher2 - calculate Alignment - Mozilla Firefox

File Modifica Visualizza Cronologia Segnalibri Strumenti ?

http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/cgi-bin/genefisher2_toConsensus

HotMail gratuita Personalizzazione coll... Windows WindowsMedia

GeneFisher2 - Consensus calculation

Your Job ID:
bibiserv_1188224070_27605

RESULT

Your Sequence Type is nucleicAcidSequence

Set parameters for consensus calculation:
noise threshold [%]
maximum threshold [%]

Consensus	nnnnnnnnnnwTcRbzryyGrryshaaxxxxvdxThbwwCAnvCryyAbdshkCTkannGabywCvezGyywnnnnyh
G 14269533_68-370	ATGTCTTCAGTTTTCGGAGCAGGATGCACGGACGTGTCCAGCAGAGCCATGGGCTGT---GCCACCTCGGGCTGTAACT
G 15148841 G B AF399740.1 AF39	-----GATTCATGCGAGGACCTCAAGGCCAATTTTA---CACTGTCAGTCTCTAG---GCTTCTCAAGTC-----CA
G 15148843 G B AF399741.1 AF39	-----AATCGGATGCGATCACAGAAGAGATCATTTC---ACATTCAAGTCTAGCTGAGACAGAAAGCTT---TC

The Aug 9 09:49:12 2007

Completato

preferisce in alcuni casi, per aumentare la specificità dell'amplificazione, disegnare primer in cui le ultime basi al terminale 3' abbiano G o C (il terminale 3' è quello che porta all'innescio effettivo della polimerizzazione).

- **Sequenze ripetute** La presenza di regioni a bassa complessità, cioè di sequenze ripetute (sia di singoli nucleotidi sia di regioni di- o tri-nucleotidiche) all'interno di un primer deve essere evitata in quanto può portare ad uno slittamento dell'appaiamento o all'annealing su siti aspecifici (occorre ricordare che i genomi eucarioti sono ricchi di sequenze a bassa complessità) e quindi all'amplificazione di prodotti aspecifici.

1.3.5. Strutture secondarie e formazione di dimeri

La presenza di strutture secondarie intramolecolari o intermolecolari può determinare una diminuzione della resa di amplificazione o addirittura un'assenza di amplificazione. Le strutture secondarie infatti competono per l'annealing del primer con lo stampo sulla sequenza di DNA bersaglio, diminuendo drasticamente la concentrazione effettiva di primer disponibile per la reazione di amplificazione. Le strutture secondarie si possono

Figura 1.12. Struttura ad hairpin di un possibile primer.



Figura 1.13. Struttura di un self dimer ottenuto dall'appaiamento tra due molecole dello stesso primer.

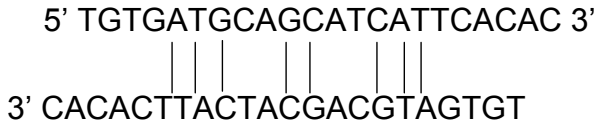
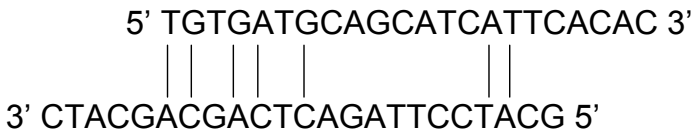


Figura 1.14. Struttura di un cross dimer ottenuto dall'appaiamento tra due molecole di primer diversi.



classificare come “hairpin” (forcine), “self dimer” (autodimeri) e “cross dimer” (dimeri crociati):

- **Hairpin** Le strutture ad hairpin si formano per l'interazione intramolecolare tra i nucleotidi del singolo primer (Figura 1.12). Gli hairpin al terminale 3' sono i meno tollerati in quanto sequestrano direttamente il residuo ossidrilico necessario alla polimerizzazione.
- **Self dimer** si formano per l'interazione intermolecolare tra due molecole di primer dello stesso tipo nei punti in cui il primer è omologo a se stesso.
- **Cross dimer** si formano tra due molecole di primer di tipo diverso nelle regioni di omologia di sequenza.