



# PCR

Polymerase Chain  
Reaction

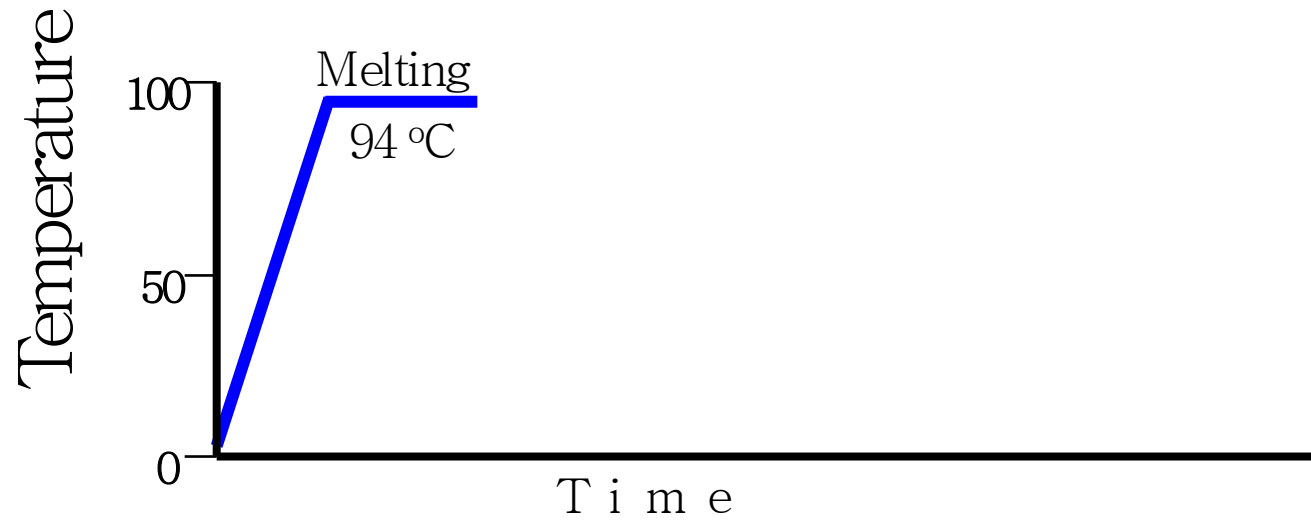
# PCR

- Tecnica della reazione a catena della DNA polimerasi o PCR (Polymerase Chain Reaction)
- Introdotta da Kary B. Mullis alla metà degli anni '80 ha rivoluzionato la genetica molecolare.
- Consente di ottenere un enorme numero di copie di specifiche sequenze di DNA senza ricorrere al clonaggio.
- Permette l'amplificazione di una regione specifica di DNA. La PCR sfrutta alcune peculiarità della duplicazione del DNA ad opera della DNA polimerasi:
  - A) DNA stampo a doppio filamento.
  - B) Piccolo DNA innesco per iniziare la sintesi.
  - C) Sintesi del DNA in direzione 5' ->3'.

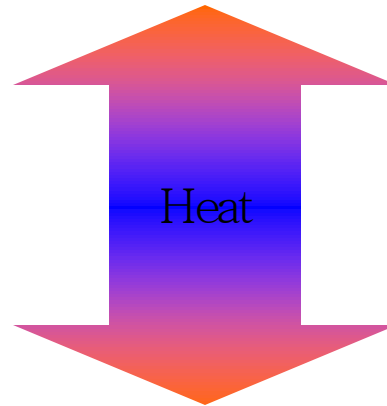
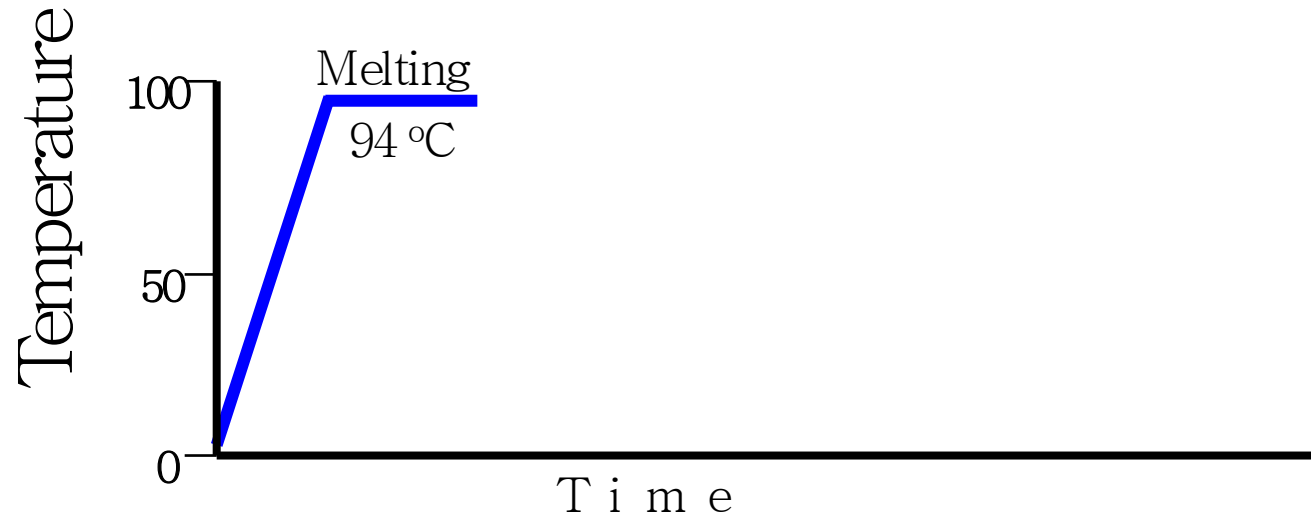
## Impieghi della PCR

- Strategie di clonaggio molecolare;
- Analisi dell'espressione genica (RT-PCR);
- Analisi di medicina legale quando si isolano minuscoli campioni di DNA dalla scena di un crimine;
- Test diagnostici di malattie genetiche;
- Diagnosi di infezioni virali o batteriche (HIV, Epatite C, *Mycobacterium tuberculosis*).

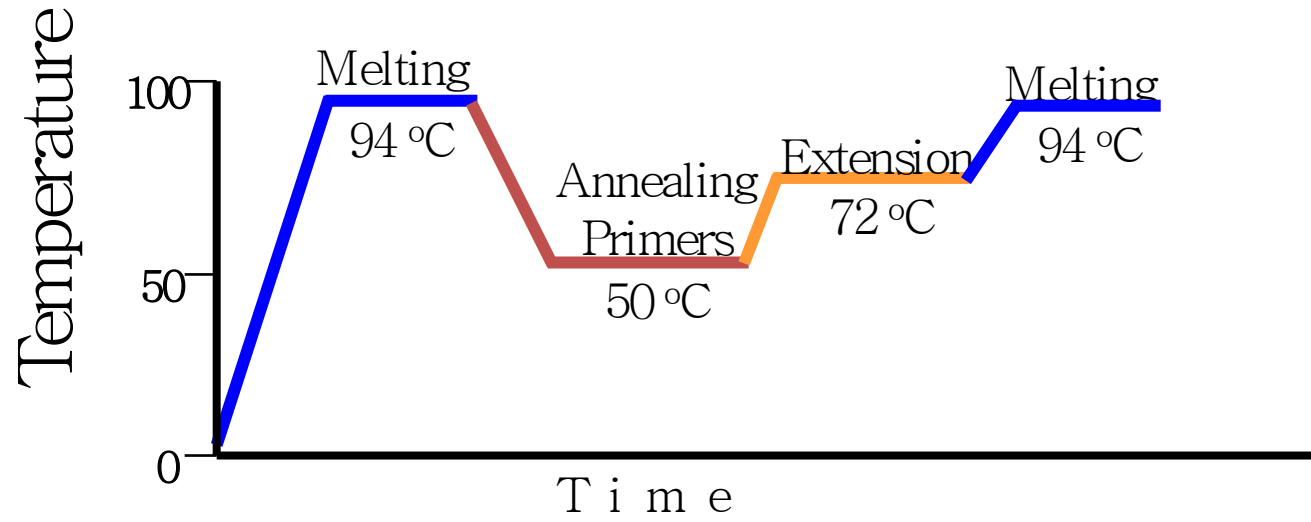
# PCR



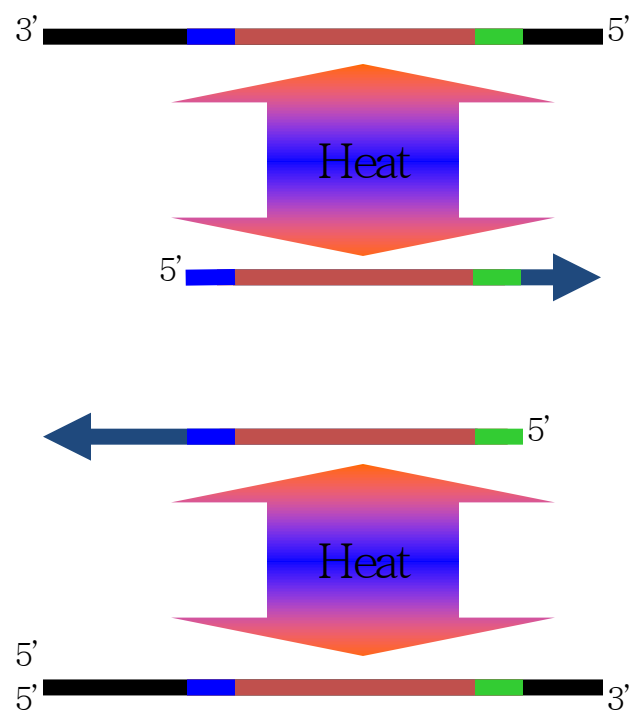
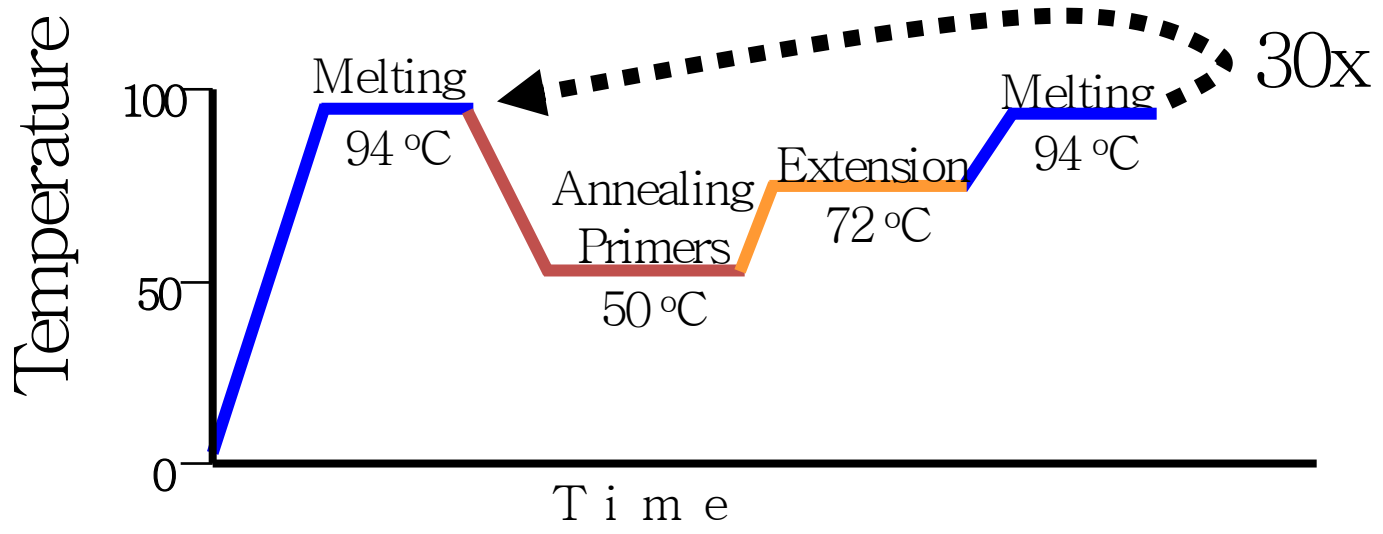
# PCR



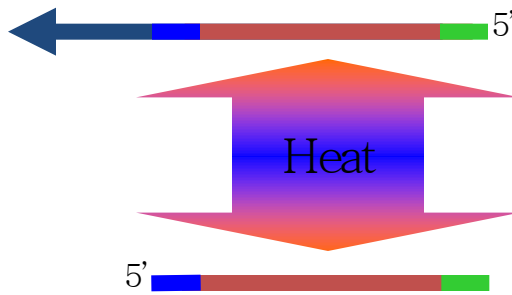
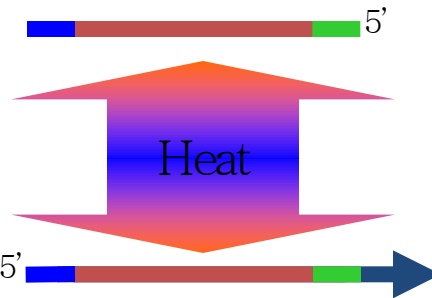
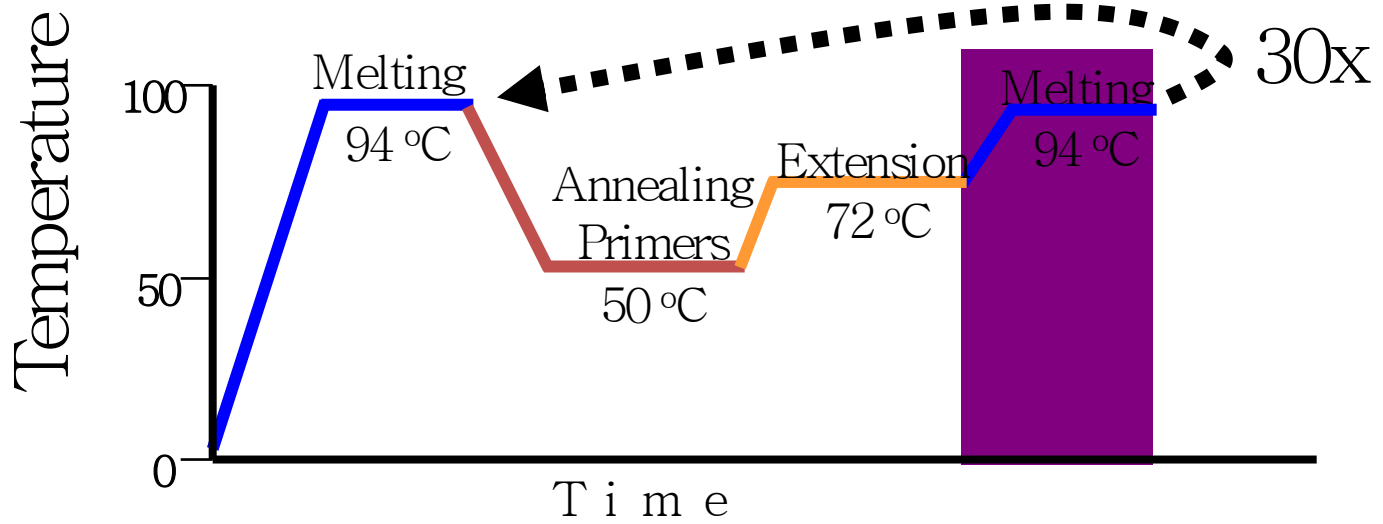
# PCR



# PCR

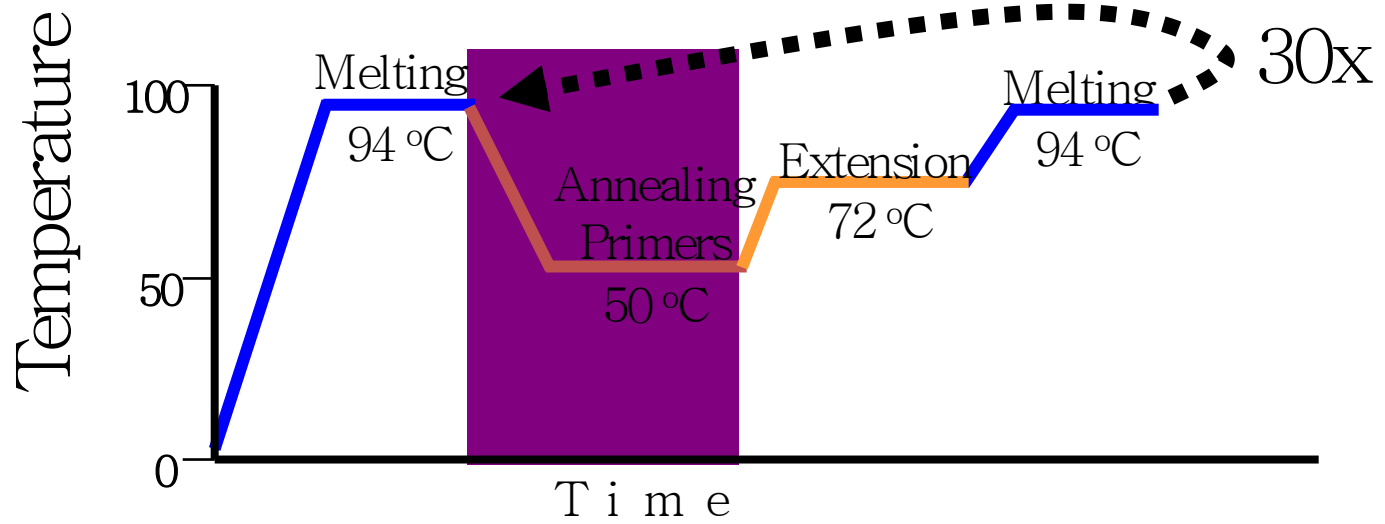


# PCR

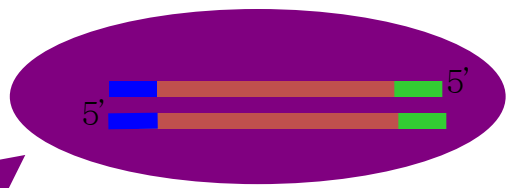
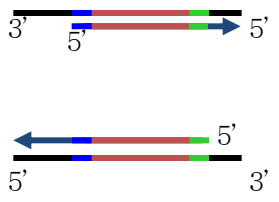
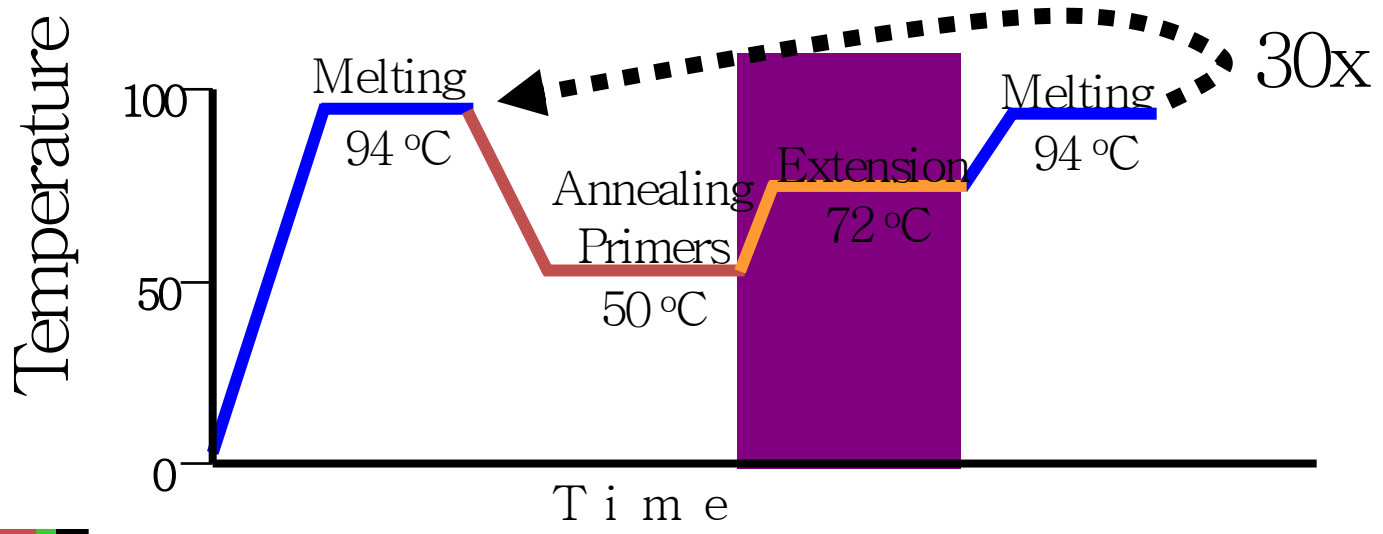




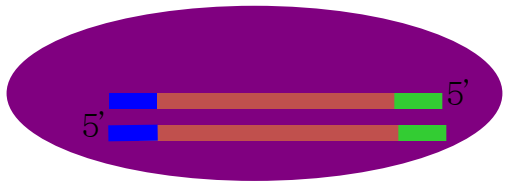
# PCR



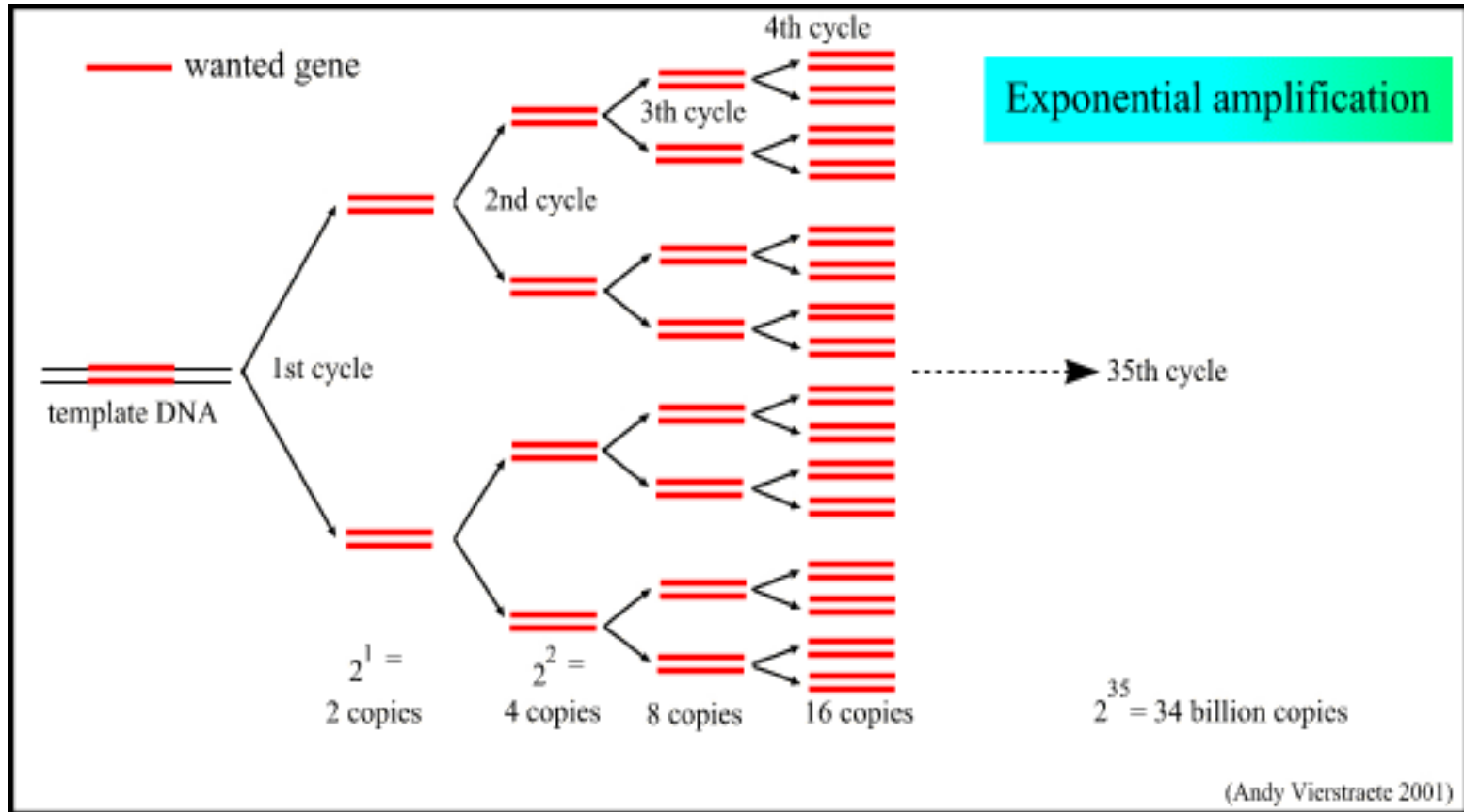
# PCR



Fragments of defined length



Dopo  $n$  cicli il miscuglio di reazione contiene un numero massimo teorico di molecole di DNA a doppia elica pari a  $2^n$ . (Crescita esponenziale)



# Miscela di reazione



- Tampone
- Eccesso dei 4 nucleotidi precursori (dNTP)
- 2 primers di circa 20 basi
- DNA a doppio filamento contenente la sequenza da amplificare
- *Taq* Polimerasi

## Vantaggi dalla *Taq* Polimerasi

- 1) L'enzima può essere aggiunto una sola volta all'inizio della reazione e rimane attivo per 30-40 cicli di PCR.
- 2) E' possibile automatizzare la PCR utilizzando apparecchi termostatici ciclici.
- 3) La *Taq* polimerasi (da *Thermophylus Aquaticus*) aumenta la specificità e la sensibilità della PCR; è in grado di lavorare entro un ampio range di temperature (da 37°C a 95°C).

**Tuttavia...** non possiede un sistema di "correzione di bozze" e può incorporare un nucleotide errato ogni  $2 \times 10^4$  nucleotidi.



SPECTROLINKER  
XL-1500 UV CROSSLINKER

SPECTRONICS  
CORPORATION

Mettler  
Mettler

Mettler  
Mettler

Mettler  
Mettler

Mettler  
Mettler

Mettler  
Mettler

## Fasi della PCR

- ❖ Denaturazione (*melting*): a 94°C (1' – 2');
- ❖ Appaiamento (*annealing*): > 50°C, < 70°C (1' – 2'); la temperatura di appaiamento dipende dalla composizione in basi dei *primers*,  
$$4(G + C) + 2(A + T) = T_{\text{appaiamento}}$$
- ❖ Estensione: 72°C (1' – 2'); i tempi dipendono dalla lunghezza dello stampo.

## ***Vantaggi della PCR***

1. E' più veloce rispetto al clonaggio tramite vettori
2. E' sufficiente una piccola quantità di DNA
3. E' una tecnica altamente selettiva e sensibile (DNA non purificato)

## ***Svantaggi della PCR***

1. Per sintetizzare i primers bisogna conoscere le sequenze alle estremità del frammento di interesse
2. Si può impiegare solo per amplificare frammenti corti (no *proofreading*)\*
3. Problema dei falsi positivi (*mismatch* dei primers e contaminazioni di DNA)§

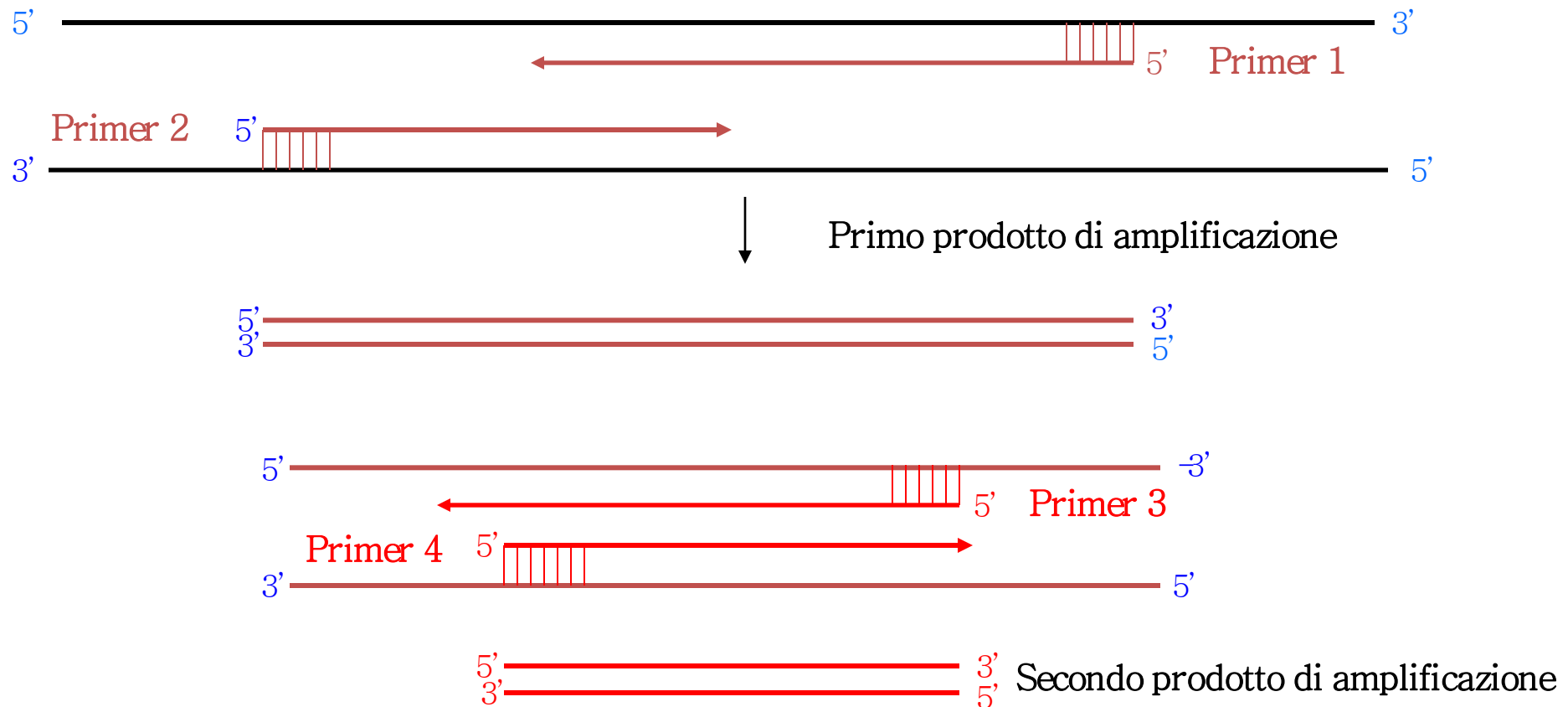
Polimerasi "Hot start" e "nested" PCR

- \* Si possono usare al posto della *Taq* polimerasi altre polimerasi, come la polimerasi *Pfu* da *Pyrococcus furiosus*. In questo caso le inserzioni sbagliate che si verificano di rado durante la polimerizzazione, sono rapidamente escisse dall'attività esonucleasica 3' → 5' di quest'enzima.
- § E' importante la selezione dei primers, che possibilmente devono avere le seguenti caratteristiche:
  1. Dimensioni > od = ai 18 – 20 nucleotidi per avere alta specificità;
  2. Evitare l'utilizzo di primers con sequenze polipuriniche o polimirimidiniche;
  3. Evitare la complementarietà tra i 2 primers;
  4. Evitare primers che possono formare strutture secondarie;
  5. Le sequenze dei primers possono anche includere regioni utili per le applicazioni successive; es. siti di restrizione.

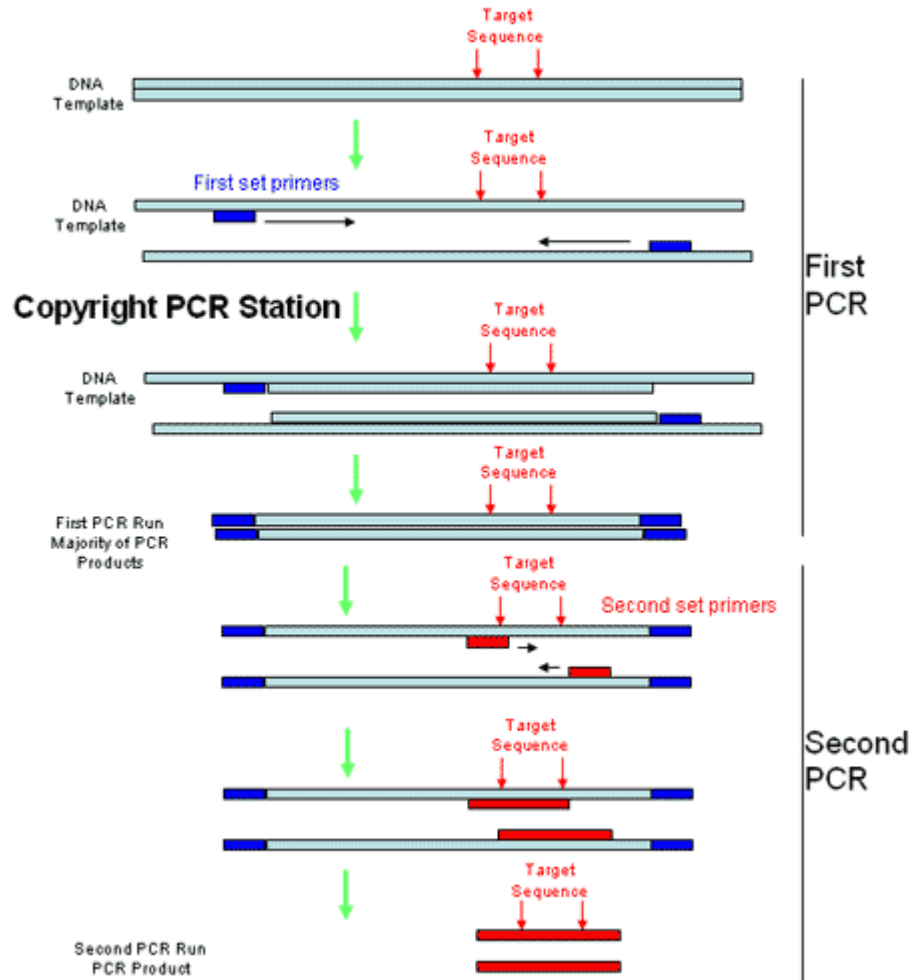


# *Nested PCR*

La nested PCR è una variante della tecnica di PCR che consiste nell'utilizzo di due coppie di primers, una esterna che genera un normale prodotto di PCR ed una coppia di primers all'interno del prodotto amplificato: se il prodotto di amplificazione fosse aspecifico la seconda PCR non andrebbe a buon fine.



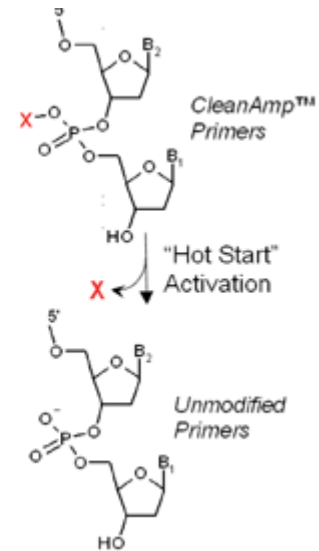
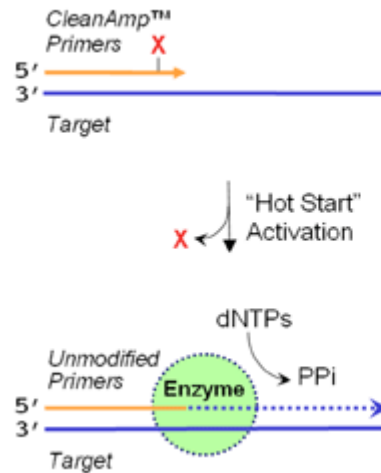
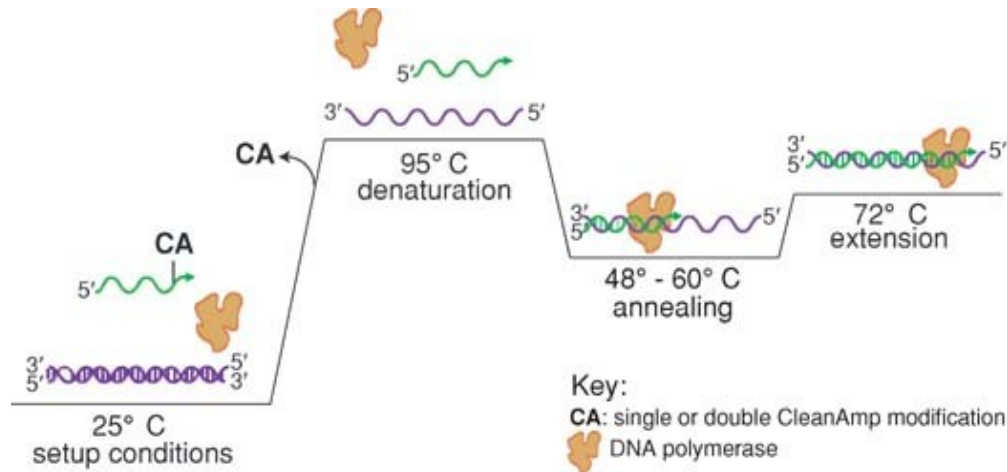
# *Nested PCR*

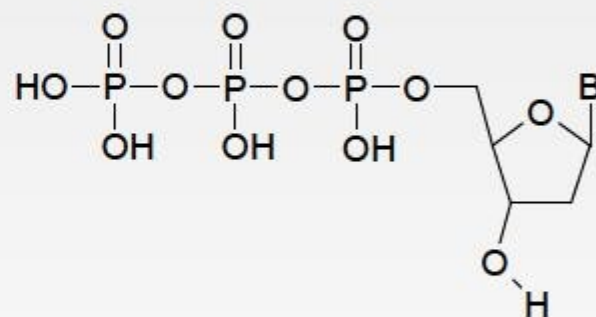
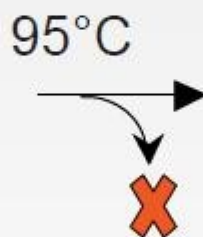
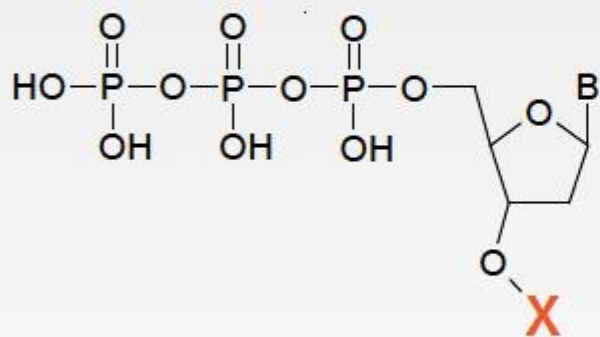
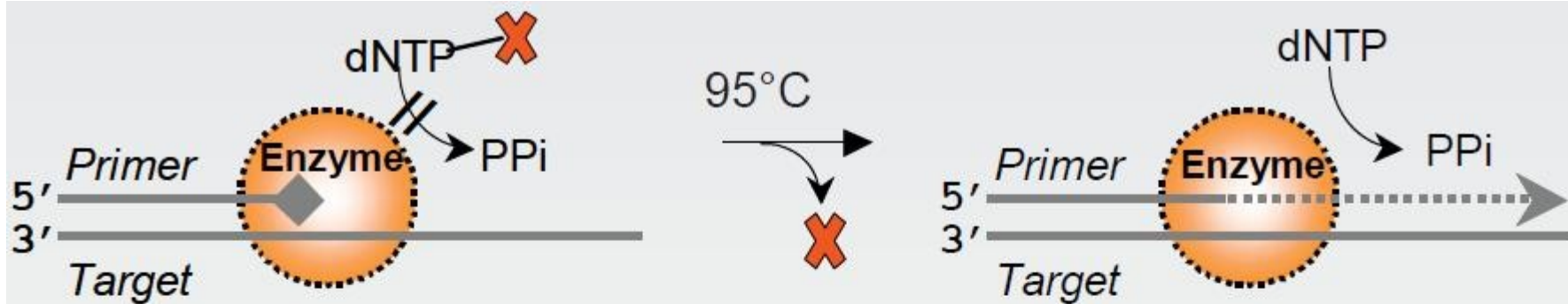


# Hot Start PCR

- Un problema comune con la PCR è la formazione di prodotti non-specifici, specialmente di dimeri dei primers. Questi prodotti indesiderati non solo interferiscono con la generazione degli ampliconi desiderati, ma oscurano anche le analisi che fanno seguito alla reazione.
- I metodi di hot start PCR forniscono una soluzione a questa mancanza di specificità riducendo od eliminando la formazione di prodotti non specifici prima del ciclo ad alta temperatura.
- I metodi attuali di hot start PCR hanno come bersaglio la polimerasi attraverso il silenziamento della sua attività prima del passaggio iniziale di denaturazione, usando più comunemente od anticorpi bloccanti o la modificazione chimica. Altrimenti sono state sviluppate metodiche chiamate di sequestro dei primers in cui una proteina ricombinante si lega ai primers a basse temperature rendendoli non disponibili per l'estensione da parte della polimerasi. Ad alte temperature la proteina è danturata e quindi si dissocia dai primers.

# Hot Start PCR

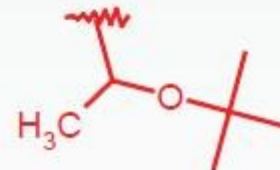




**X = Thermolabile protecting group:**



3'-THF  
(3'-tetrahydrofuranyl)



3'-TBE  
(3'-tert-butoxy-ethoxy)

# RT- PCR

(Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction)

Il DNA da amplificare deriva dalla retrotrascrizione dell'mRNA

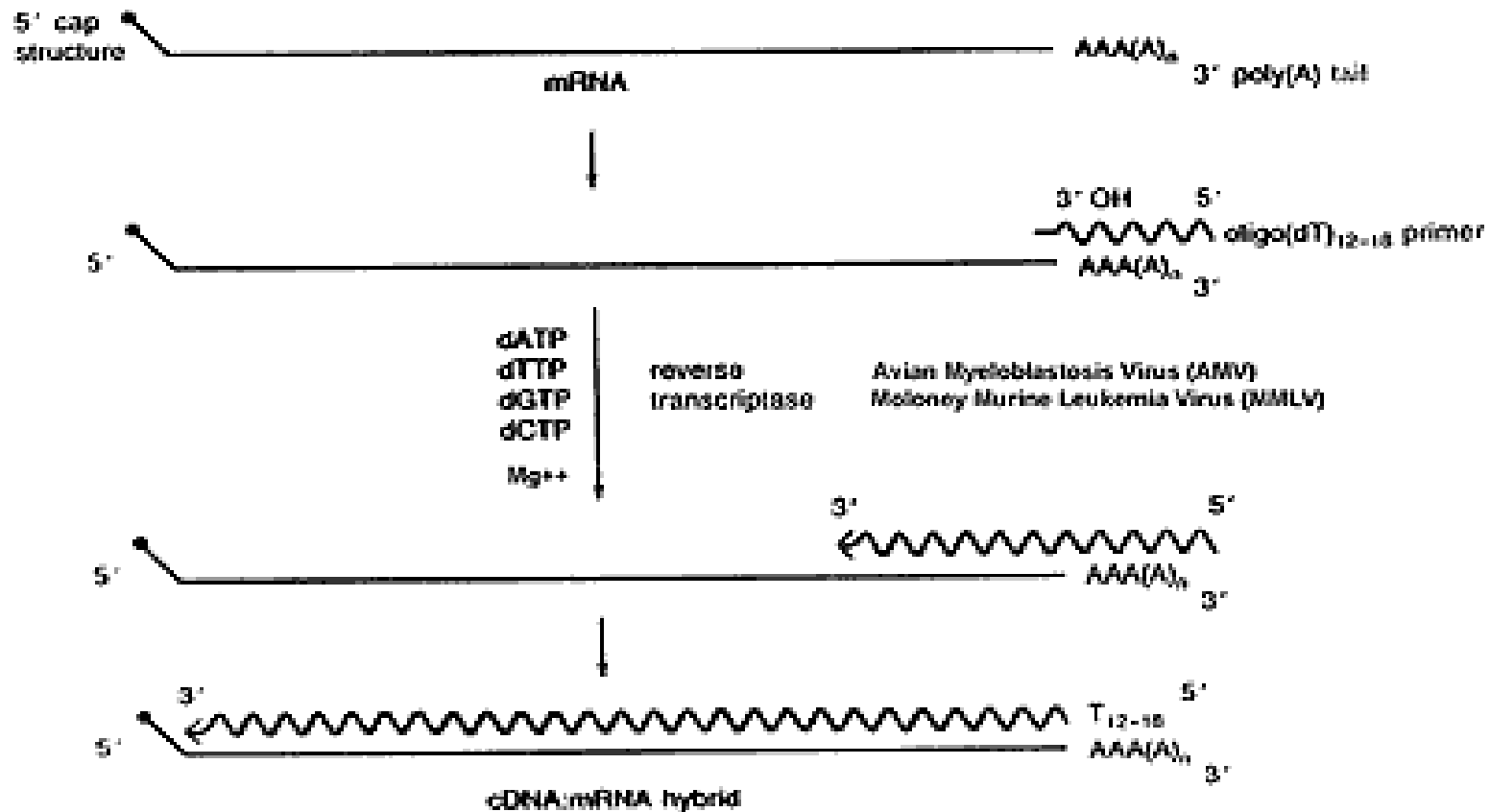
## **RICHIEDE:**

1. Un tampone
2. Una RT DNA polimerasi (di origine retrovirale)
3. Miscela di mRNA contenente la sequenza da amplificare
4. Primer oligo dT o oligomeri random

- ❖ cDNA
- ❖ I 4 dNTP
- ❖ 2 primers
- ❖ Una DNA polimerasi termoresistente

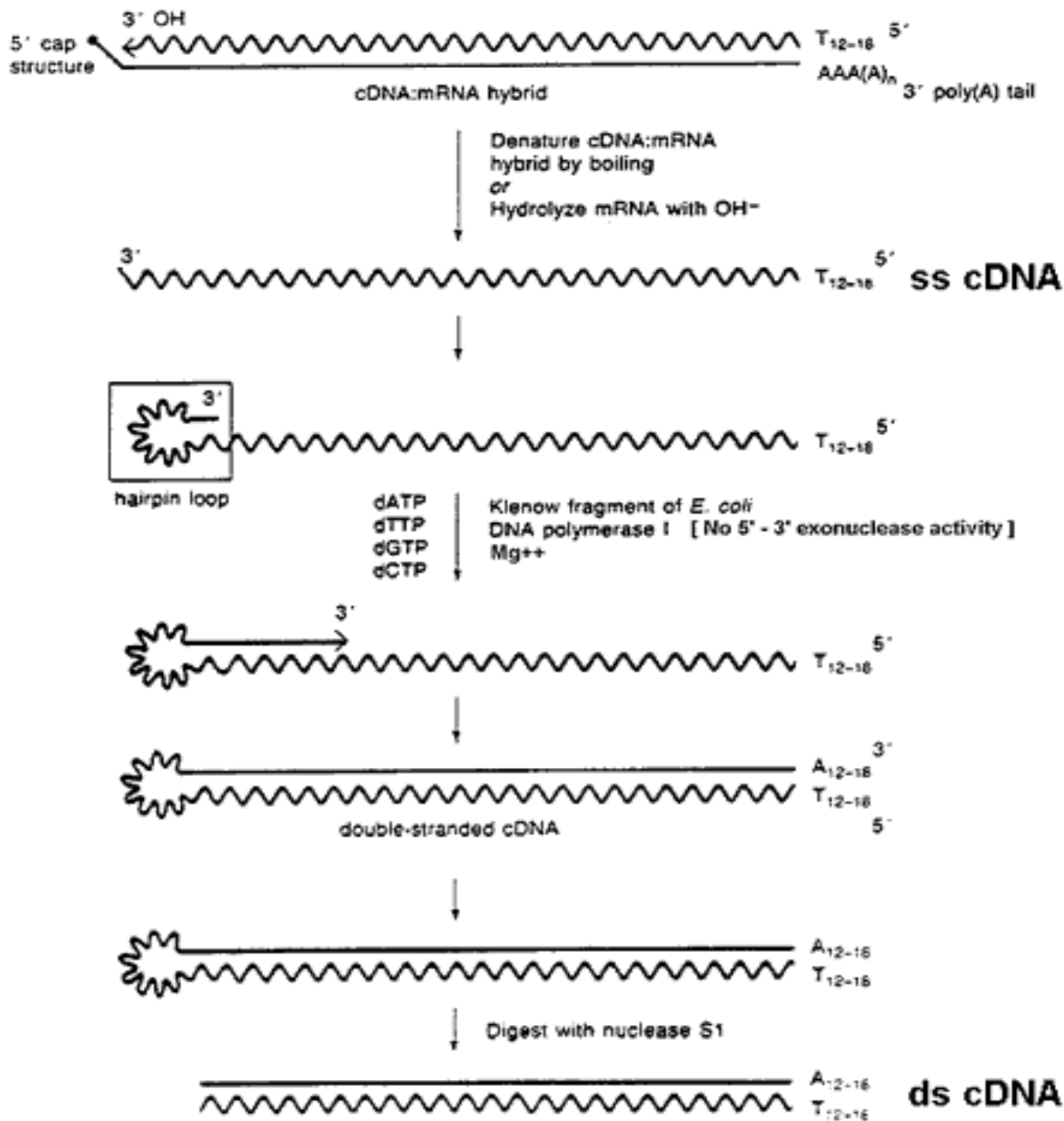
# Sintesi del cDNA

## Traditional cDNA synthesis



Synthesis of the first strand of cDNA using an oligo(dT) primer and reverse transcriptase.

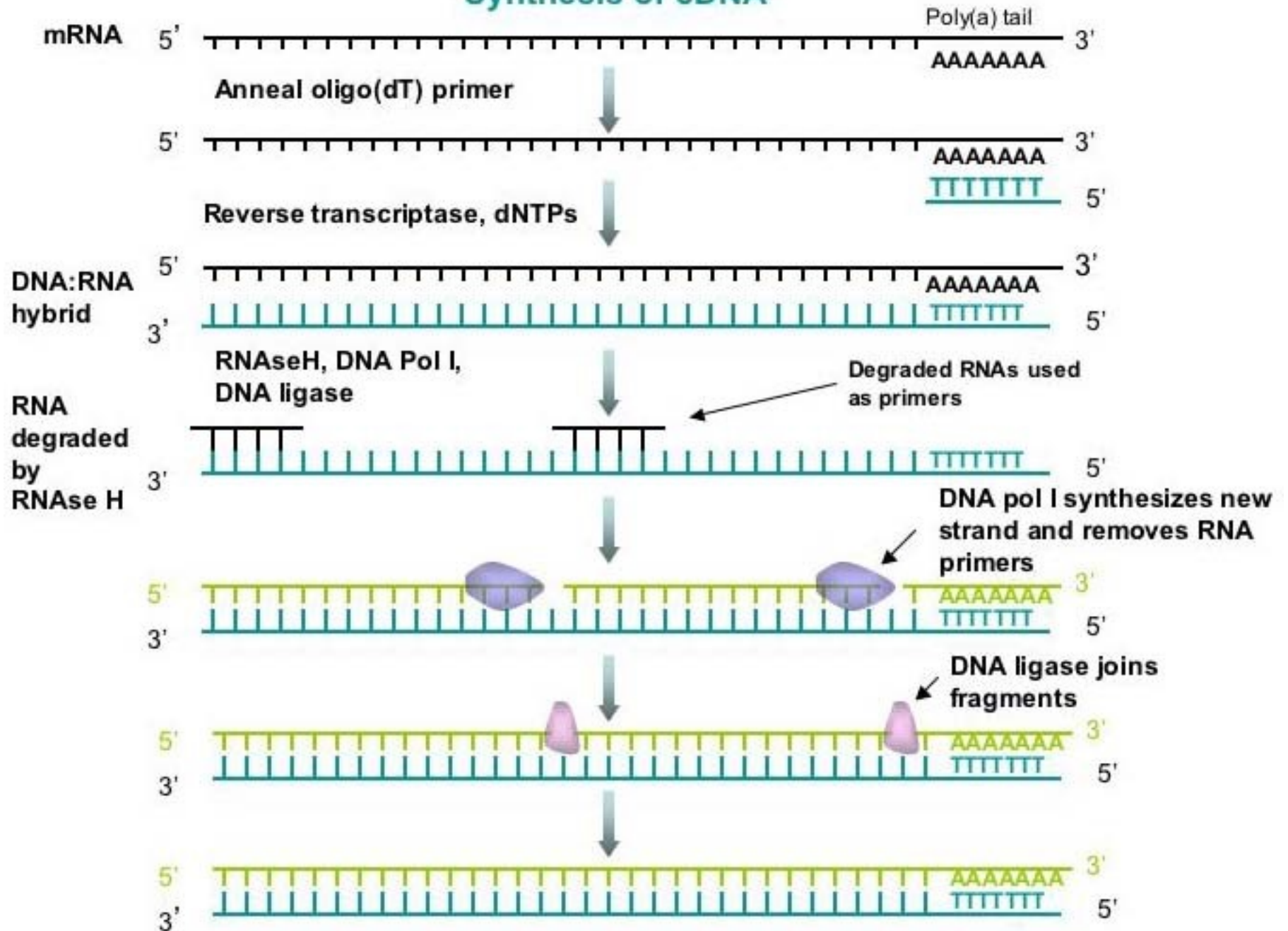
## Traditional cDNA synthesis



Synthesis of double-stranded cDNA by the self-priming method.



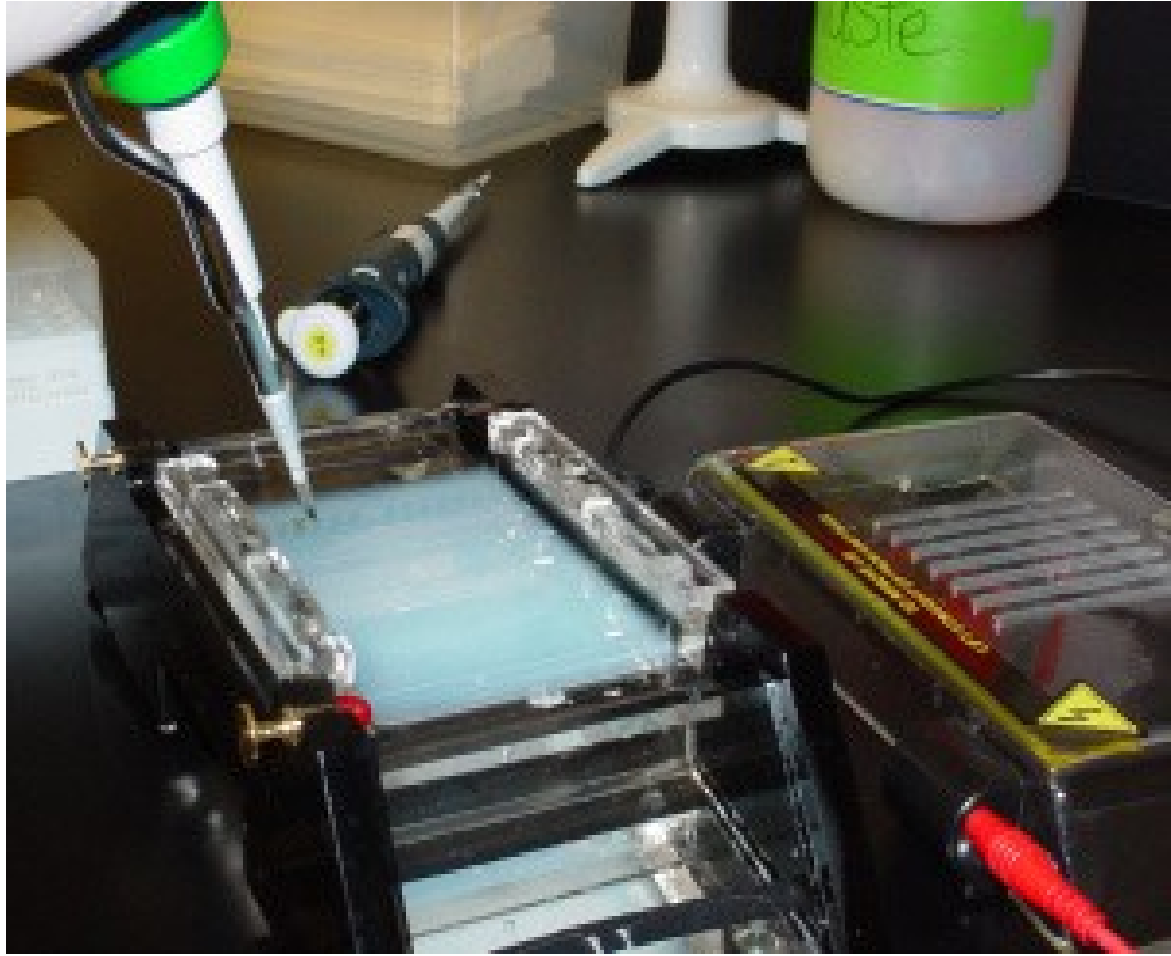
# Synthesis of cDNA



# Analisi post-PCR

- Eventuale purificazione dei prodotti della PCR;
- Separazione mediante elettroforesi dei prodotti della PCR e visualizzazione;
- Clonaggio dei prodotti della PCR;
- Rilevazioni di mutazioni puntiformi negli amplificati;
- Sequenziamento dei prodotti della PCR.

- L'elettroforesi su gel dei prodotti della PCR è il metodo standard per analizzarne la qualità e l'efficacia della reazione. I prodotti della PCR arrivano ad un massimo di lunghezza di 10 kb, ma la maggior parte delle amplificazioni sono nel range di 1 kb od al di sotto. Per prodotti di 400 – 1000 basi l'elettroforesi su gel di agarosio è certamente indicata. L'elettroforesi rivela la dimensione della banda del prodotto, che è confrontata con il risultato presunto. L'elettroforesi mostra anche quanto di questa banda è stata prodotta, e rivela la presenza o l'assenza di prodotti di amplificazione non desiderati.
- Idealmente, l'elettroforesi produce un'intensa banda singola di dimensione corretta, come viene determinato dal confronto con markers di dimensione che sono stati corsi nello stesso gel.



# Campioni biologici per PCR

- Sangue
- Saliva
- Urine
- Sperma
- Striscio vaginale
  - Capelli
- Cellule amniotiche
  - Villi coriali
- Fibroblasti di biopsie
  - Osteoclasti

# *IMPIEGHI DELLA PCR*

## ❖ Diagnosi infezioni batteriche e virali

Diagnosi HIV, Diagnosi della Tubercolosi

## ❖ Diagnosi cliniche di malattie causate da mutazioni

## ❖ Controllo efficacia terapie anti-cancro

## ❖ Determinazione del sesso

## ❖ Medicina legale

## ❖ Ricerca di base

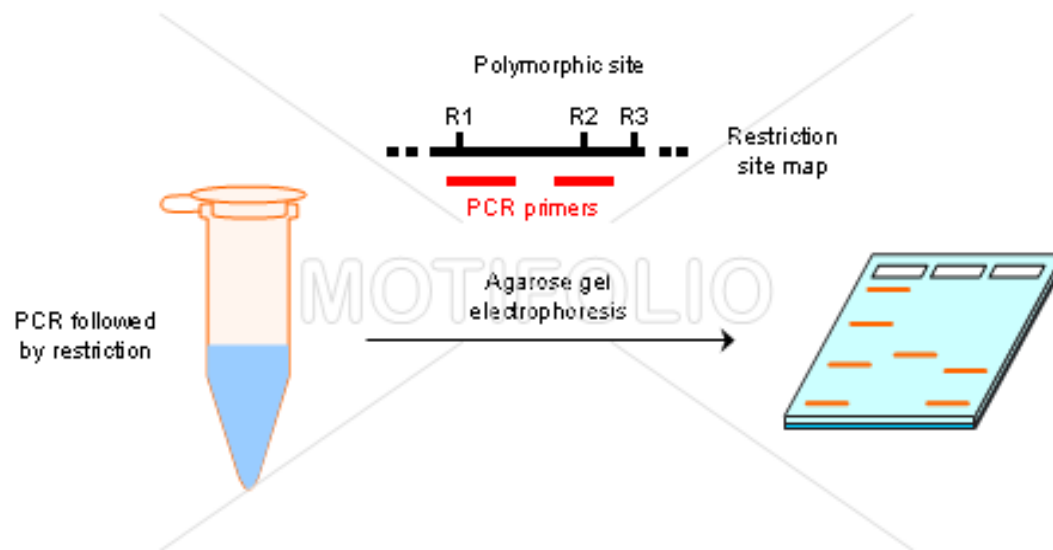
- Frammenti da inserire in un vettore

- Sonde per screening di librerie genomiche o di cDNA

## *PCR-RFLP*

The polymorphism results from a single nucleotide difference that provides a recognition site for a restriction enzyme in one allelic form and not the other. A polymorphism of this type can be rapidly detected by (1) amplifying the region around the polymorphic site from each sample, (2) subjecting the amplified material to the appropriate restriction enzyme for a brief period of digestion, and (3) distinguishing the undigested PCR product from the smaller digested fragments by gel electrophoresis. By choosing primers that are relatively equidistant to and sufficiently far from the polymorphic site, one can easily resolve allelic forms on agarose or polyacrylamide gels.

## Methods for scoring an RFLP – PCR





**FIGURE 2**

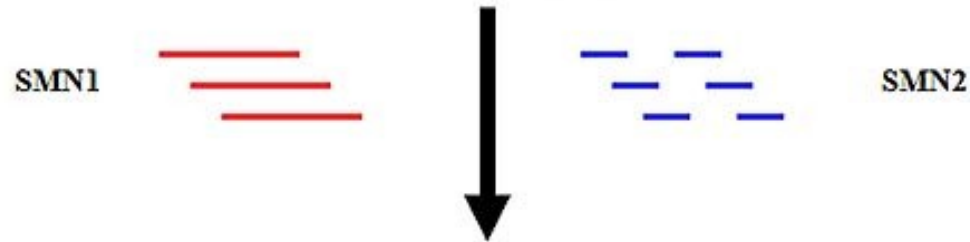
## Test genetico

Amplificazione  
mediante PCR  
per la ricerca di  
delezione omozigote  
dei geni *SMN*  
(*atrofia muscolare  
spinale autosomica  
recessiva*)

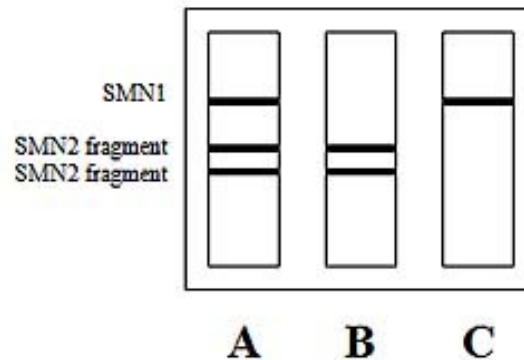
**PCR amplification of exons 7 and 8 of the centromeric and telomeric *SMN* gene copies on chromosome 5**



**Digest amplified products with Restriction Enzymes (*Dra*I or *Dde*I)**



**Gel electrophoresis to distinguish *SMN1* (undigested) and *SMN2* (digested) exons**

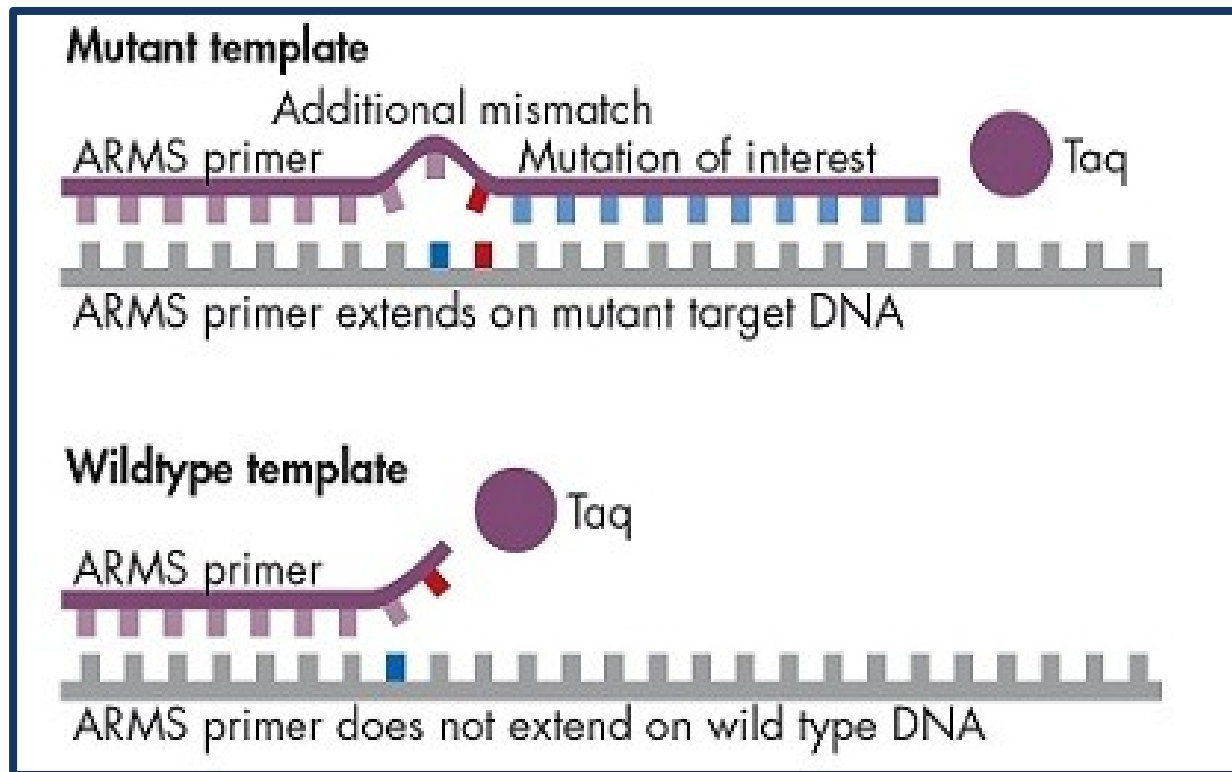


**A= Normal**  
**B= Affected (SMA patient)**  
**C= Normal with centromeric deletion**

# PCR-ARMS (Amplification Refractory Mutation System)

- La metodica identifica sostituzioni nucleotidiche, piccole delezioni od inserzioni.
- La tecnica consiste nell'amplificazione del DNA mediante PCR utilizzando oligonucleotidi complementari alla sequenza normale ed a quella mutata. Si eseguono, quindi, due amplificazioni per ogni campione, una con i primers normali e l'altra con i primers mutati. In presenza di un omozigote per la mutazione l'amplificazione avverrà solo con i primers mutati e viceversa. Nei soggetti eterozigoti per la mutazione, il loro DNA sarà amplificato con entrambi i primers.
- La tecnica può rilevare una singola copia dell'allele mutato in presenza di 40 copie dell'allele normale.

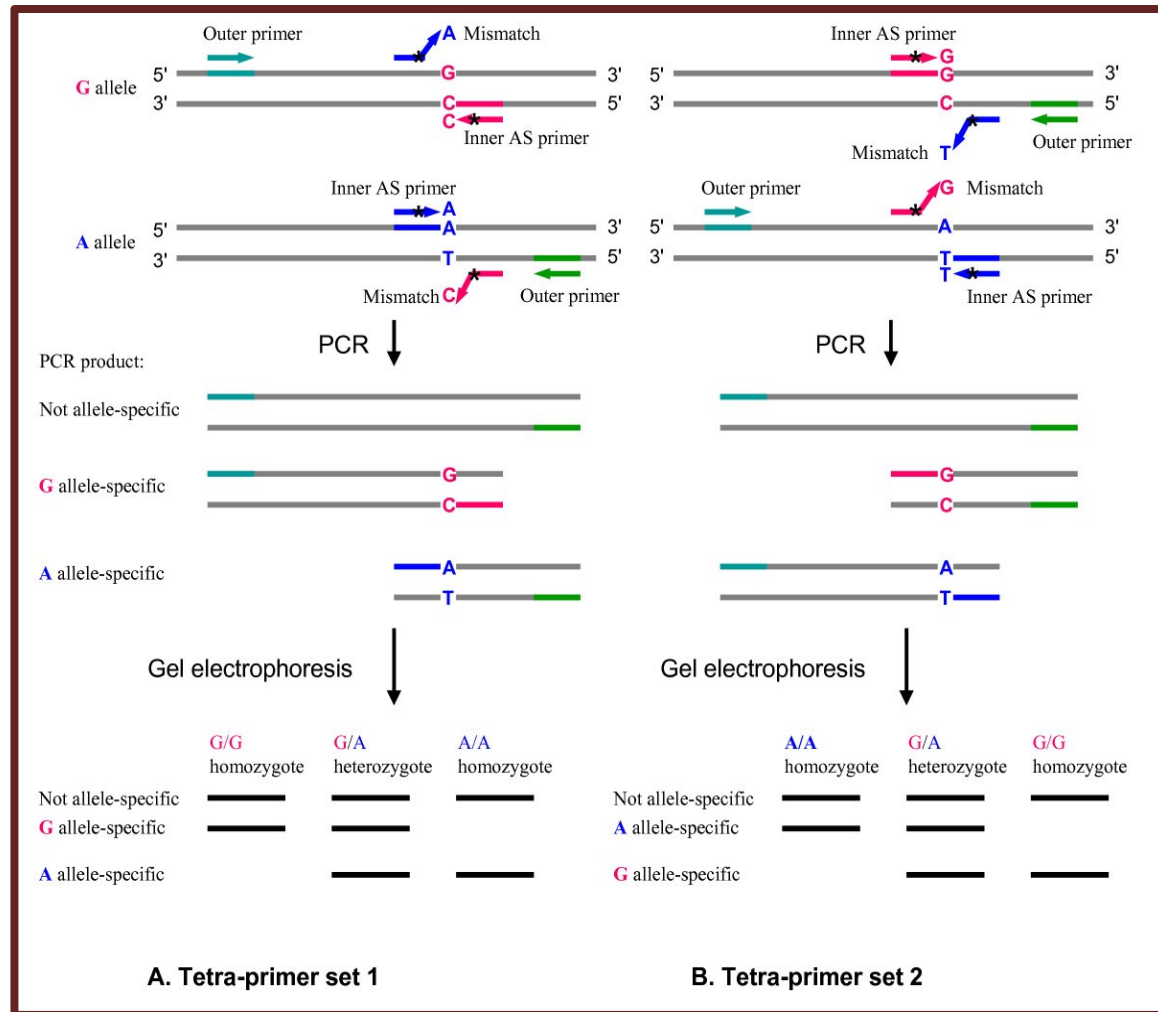
# PCR-ARMS (Amplification Refractory Mutation System)



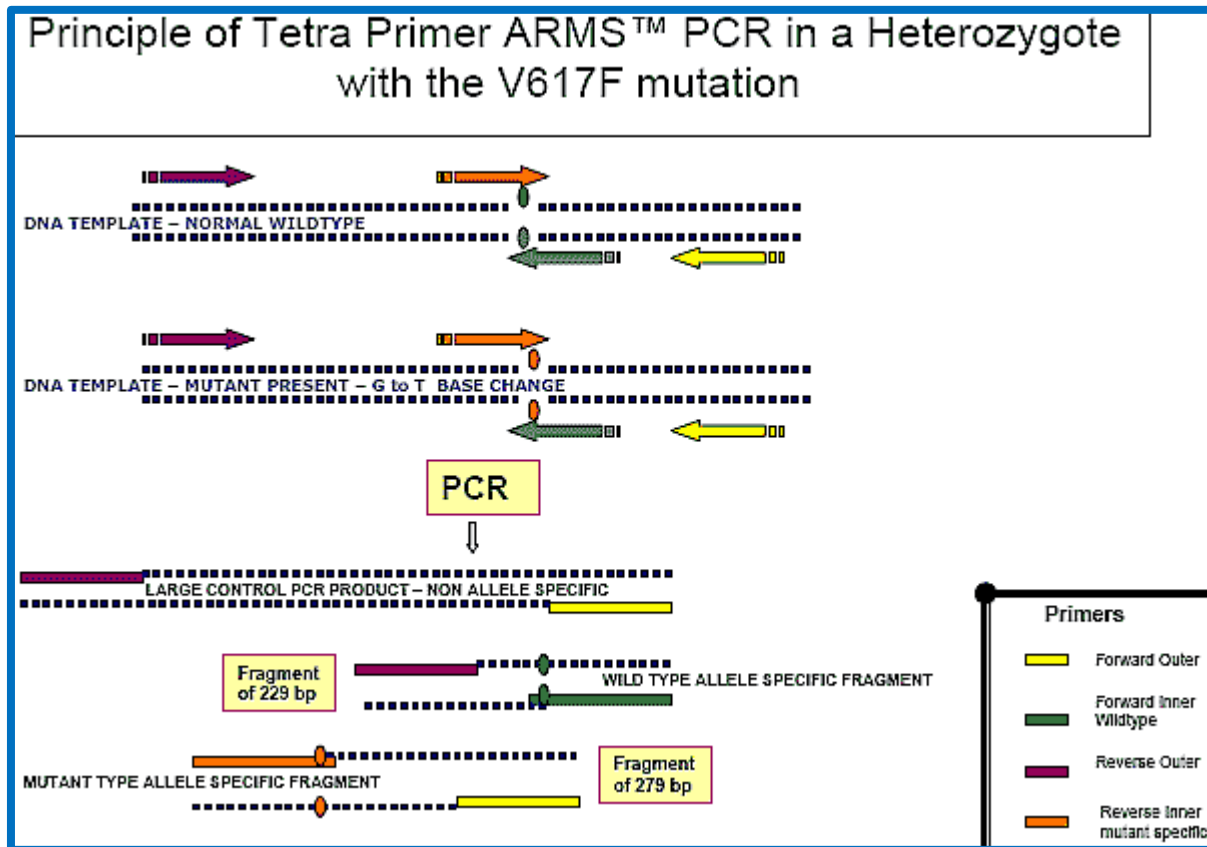
# PCR-ARMS (Amplification Refractory Mutation System)

- Una variante della tecnica è rappresentata dalla “ARMS multipla” che utilizza più primers mutati in un’unica reazione.
- Questa tecnica consente di studiare un soggetto per più mutazioni ed è utilizzata correntemente per l’analisi molecolare della  $\beta$ -talassemia e della fibrosi cistica.
- “Tetra-primer PCR-ARMS” adotta i principi del metodo della PCR con 4 primers.

# PCR-ARMS (Amplification Refractory Mutation System)



# PCR-ARMS (Amplification Refractory Mutation System)



# PCR-SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism)

- Questa tecnica può rilevare mutazioni singole nei geni, come conseguenza dell'alterata mobilità conformazionale dei singoli filamenti di DNA (entro un gel di elettroforesi) che hanno la mutazione rispetto ai singoli filamenti “wild-type” che non hanno la mutazione.
- Sono preparati dei primers per amplificare mediante PCR la sequenza del gene coinvolto in una patologia. Si amplifica la regione mutata e la stessa regione “wild-type”. I due filamenti del prodotto della PCR del “wild-type” migreranno differentemente rispetto ai due filamenti del prodotto della PCR del mutante in un gel di poliacrilammide in condizioni non denaturanti.

# PCR-SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism)

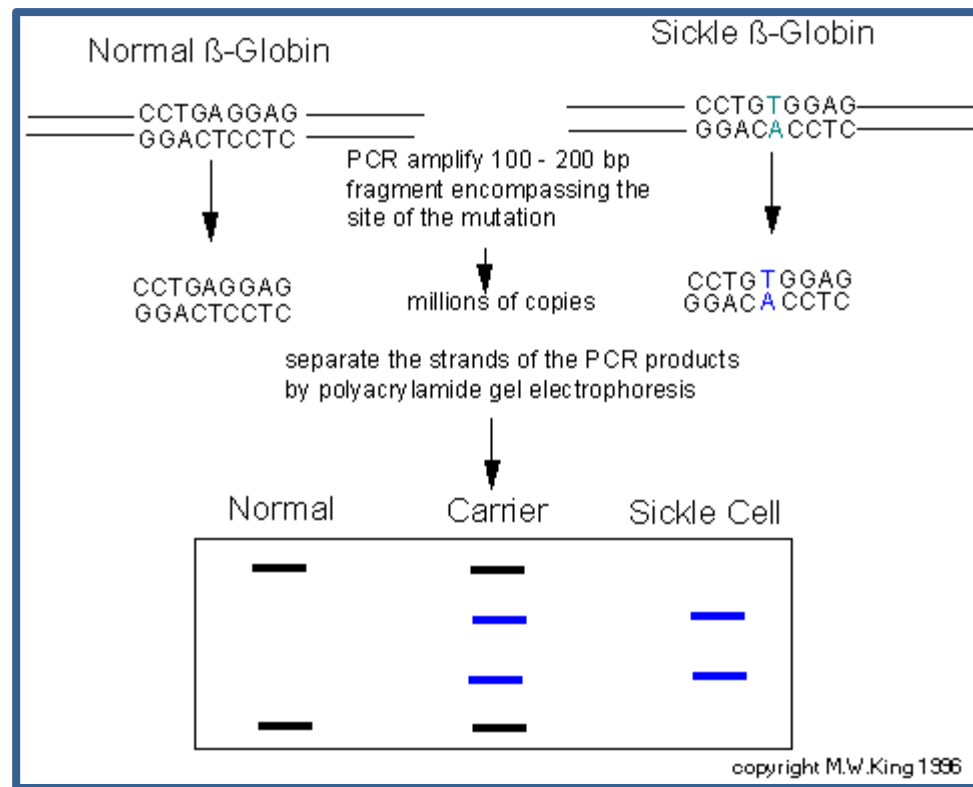
- Il cambiamento di una singola base può causare un cambiamento conformazionale nella molecola di DNA a singolo filamento che può essere facilmente rivelata mediante l'elettroforesi.
- **Procedura**: amplificazione mediante PCR della regione d'interesse ("wild-type" e mutato) → denaturazione con calore e formammide dei prodotti della PCR, seguita da un rapido raffreddamento per prevenire il ri-appaiamento dei filamenti → elettroforesi su gel di poliacrilammide in condizioni non denaturanti.



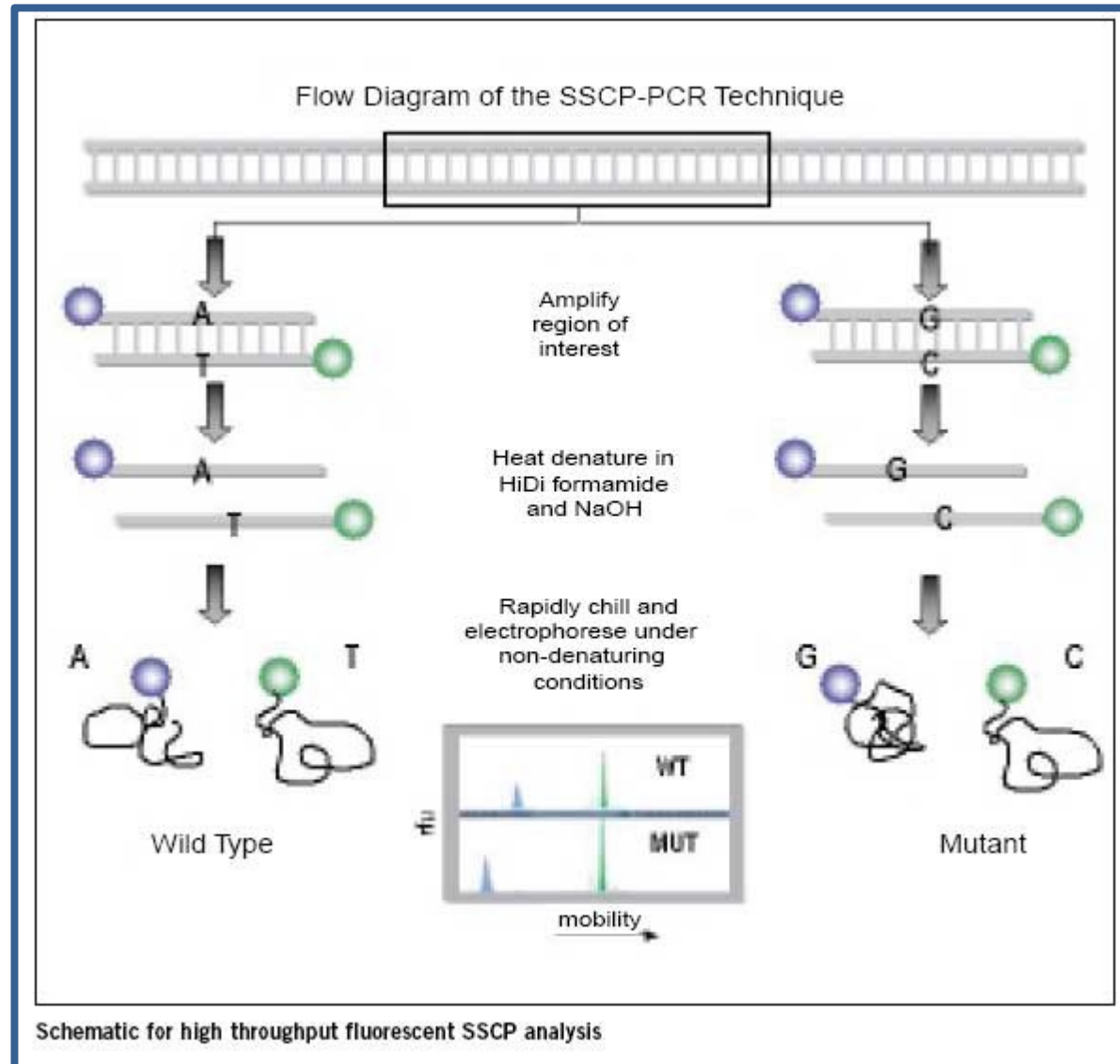
# PCR-SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism)

- **Visualizzazione delle bande:** a) uso di una molecola intercalante (bromuro di etidio o SYBR green II); b) colorazione con nitrato d'argento; c) mediante autoradiografia se durante la PCR gli ampliconi sono stati radiomarcanti utilizzando o primers radiomarcanti o dNTP radiomarcanti; d) mediante fluorescenza se i primers sono marcati con fluorofori.
- Gli individui che sono omozigoti “wild-type” per il locus genico che viene analizzato mostreranno due bande distinte nel gel, così come gli individui che sono omozigoti mutanti. Tuttavia, come conseguenza del cambiamento nucleotidico, i prodotti di PCR dei mutanti migreranno con una diversa mobilità. Gli individui che sono eterozigoti mostreranno un “pattern” di quattro bande.

# PCR-SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism)



# PCR-SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism)



# PCR-SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism)

- L'analisi PCR-SSCP è tecnicamente facile e può essere usata per fare lo “screening” di un grande numero di campioni.
- Diversi parametri influenzano la sensibilità dell'analisi PCR-SSCP, e tra questi: a) il tipo di mutazione; b) la dimensione del frammento di DNA; c) il contenuto di G e C del frammento; d) la percentuale di poliacrilammide del gel; e) la dimensione del gel e la differenza di potenziale applicata; f) la temperatura del gel durante l'elettroforesi; g) la concentrazione del DAN; h) il tempo di corsa dell'elettroforesi; i) la composizione del tampone, includendo la forza ionica ed il pH; l) la presenza di altre sostanze, come glicerolo o saccarosio, nel tampone.

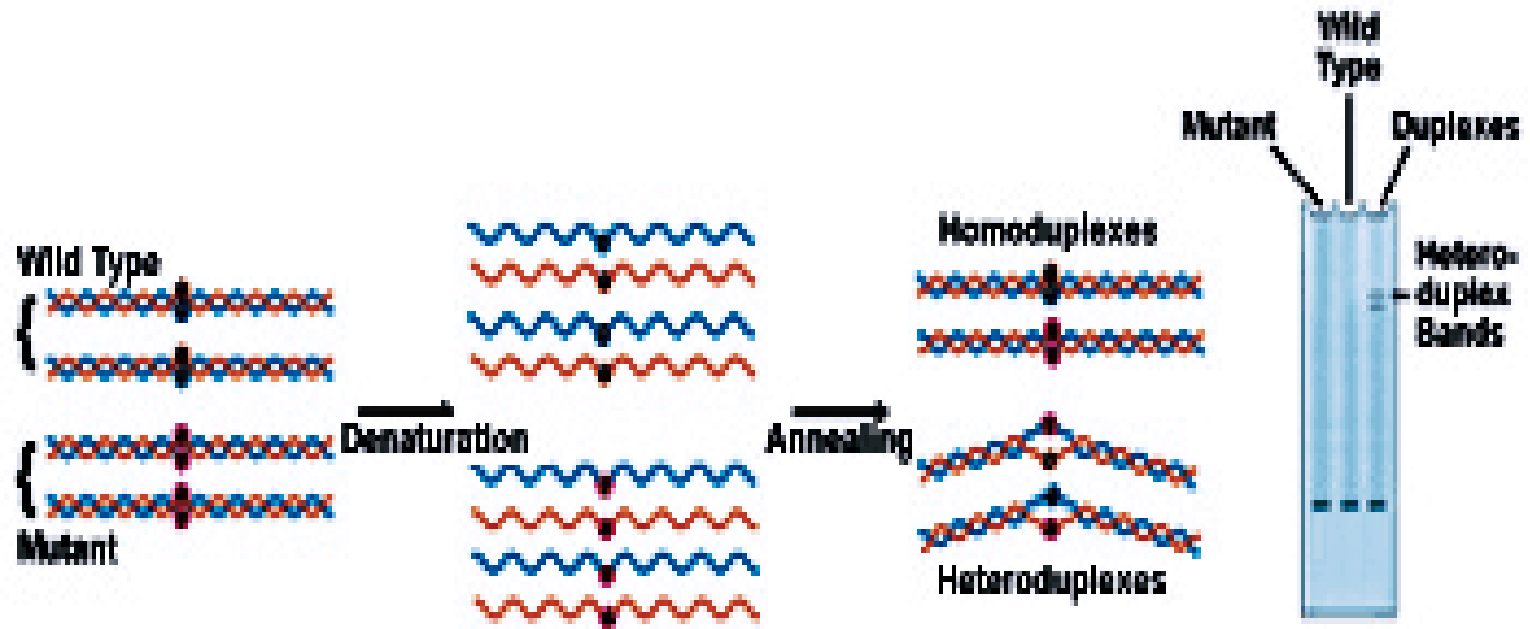
# PCR-HAD (HeteroDuplex Analysis)

- Il metodo è basato sulla formazione di eteroduplex dopo aver miscelato DNA “wild-type” e mutato amplificati mediante PCR. Il frammento di DNA in esame è soggetto a denaturazione seguita da rinaturazione.
- Se una mutazione è presente in uno dei due alleli, si formeranno 4 specie distinte di DNA a doppio filamento: a) omoduplex di DNA “wild-type” (wt/wt); b) omoduplex di DNA mutato (mt/mt) e due diversi eteroduplex (wt/mt).
- Gli omoduplex migrano più velocemente degli eteroduplex nel gel.
- La formazione degli eteroduplex e la loro stabilità dipende dal tipo di mutazione nel frammento di DNA.

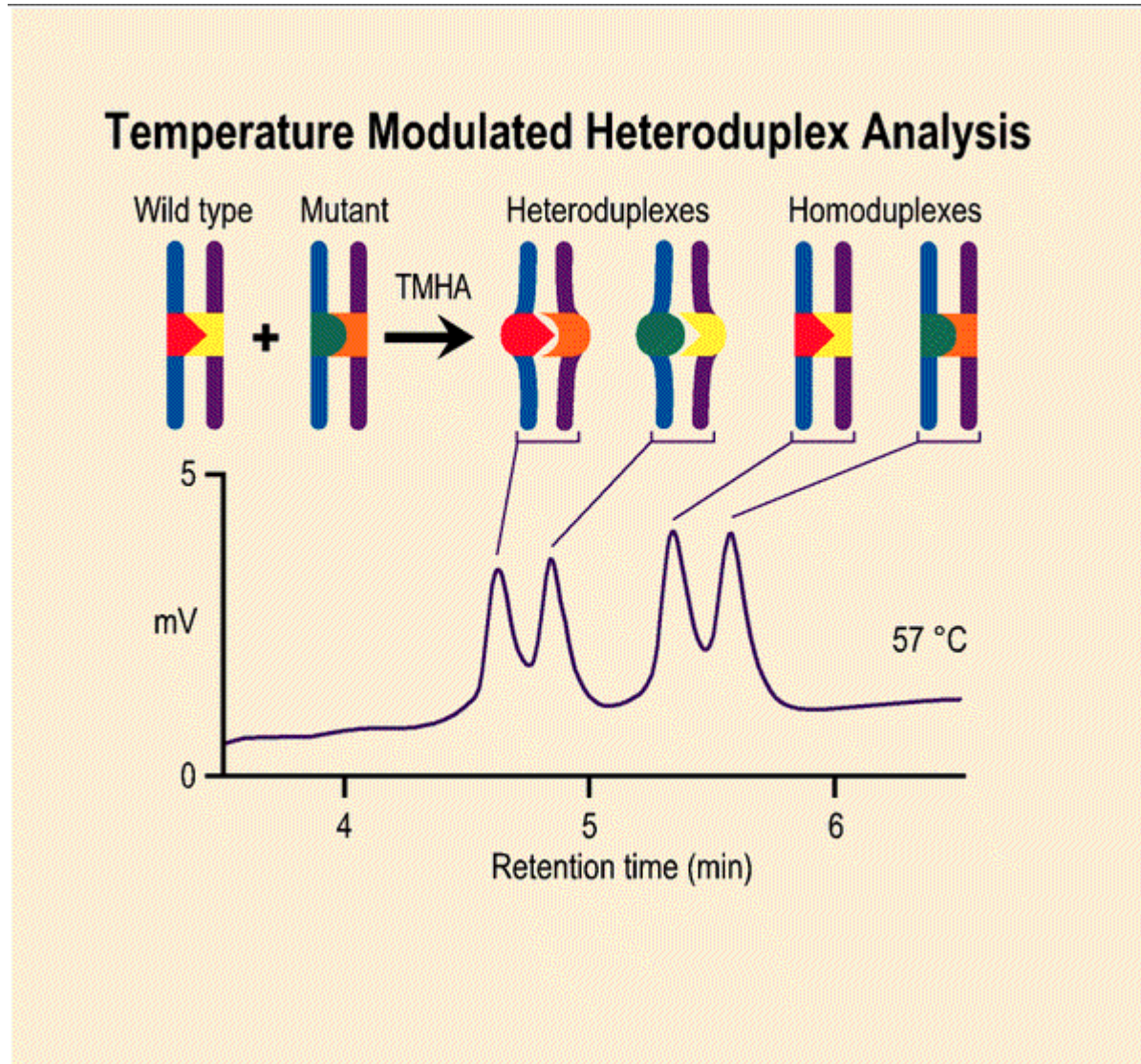
# PCR-HAD (HeteroDuplex Analysis)

- Grandi inserzioni o delezioni ( $> 3\text{bp}$ ) producono eteroduplex molto stabili.
- Al contrario, eteroduplex che coinvolgono la sostituzione di una singola base sono meno stabili e più sensibili alle variazioni delle condizioni ambientali.
- Tuttavia, l'analisi eteroduplex permette una rapida rilevazione di mutazioni singole, ed è stata usata con successo nella diagnosi di anemia a cellule falciforme, della fibrosi

# PCR-HAD (HeteroDuplex Analysis)



# PCR-HAD (HeteroDuplex Analysis)





# PCR-DGGE (Denaturation Gradient Gel Electrophoresis)

- La metodica è basata sul principio che una singola sostituzione nucleotidica può far variare la temperatura di denaturazione di un segmento di DNA.
- Il DNA amplificato “wild-type” e mutante è separato su di un gel di poliacrilammide che contiene concentrazioni crescenti di un agente denaturante (formammide ed urea).
- Quando i due filamenti del DNA iniziano a dissociarsi si ha una riduzione della velocità di migrazione rispetto alla molecola di dsDNA. Come detto sopra, la presenza di mutazioni modifica le proprietà di “melting” del DNA rispetto al DNA “wild-type”. Pertanto, i due tipi di molecole si dissociano in punti diversi del gradiente denaturante, e saranno distinguibili in base alla diversa mobilità elettroforetica.

# PCR-DGGE (Denaturation Gradient Gel Electrophoresis)

- L'analisi PCR-DGGE è estremamente rapida, ha un'efficienza del 100% , non necessita di radioattività ed è adatta ad analisi diagnostiche quando basti analizzare frammenti di DNA di 500-600 bp.
- Per visualizzare le bande nel gel si usa un agente intercalante (bromuro di etidio o SYBR green).

# PCR-DGGE (Denaturation Gradient Gel Electrophoresis)

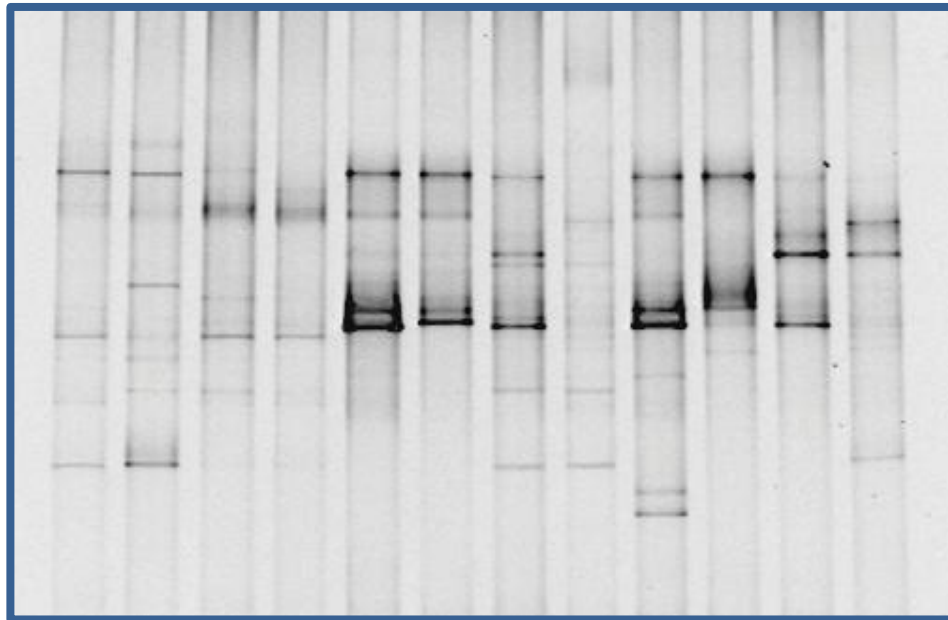
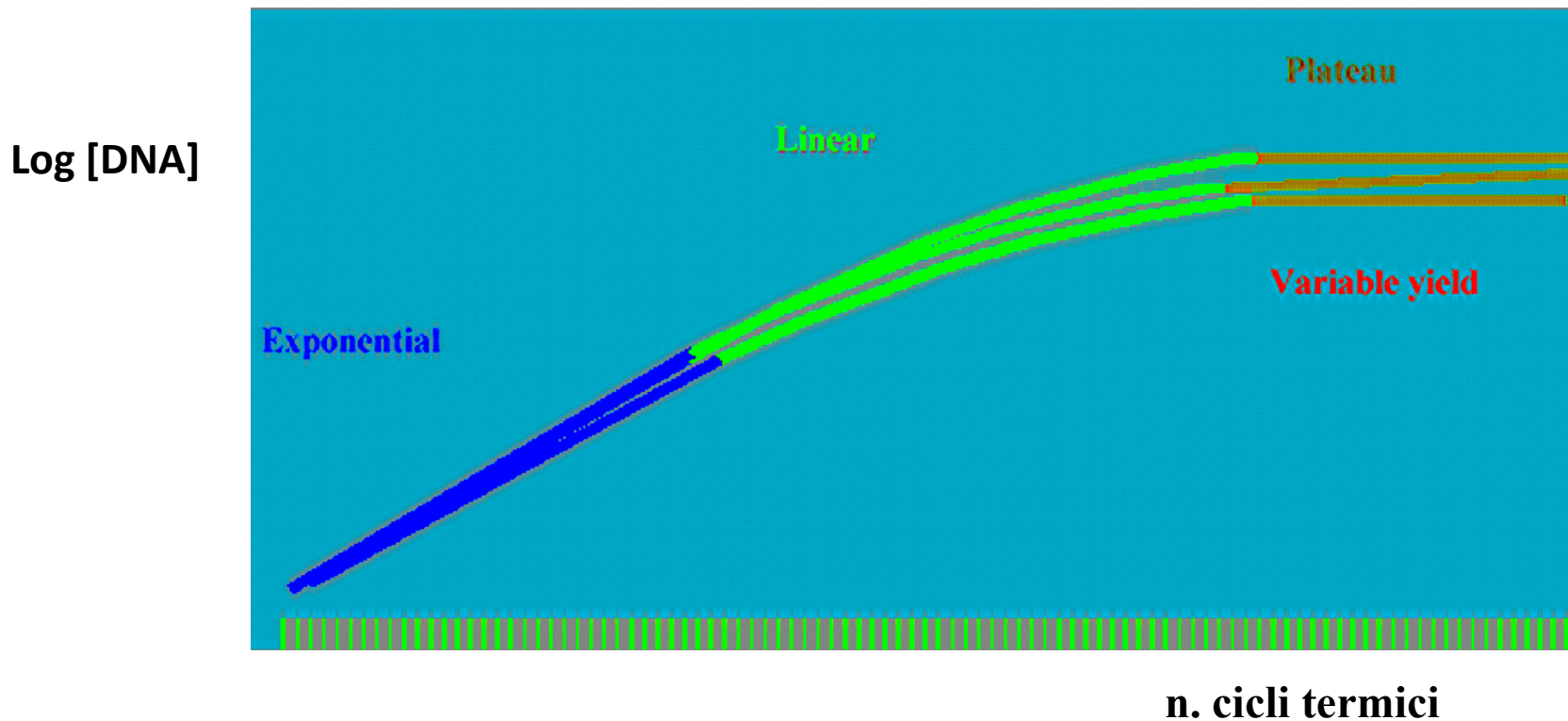


Immagine negativa di un gel DGGE colorato con bromuro d'etidio

# Resa della PCR

Resa teorica:  $2^n$   $P = (2)^n T$  Il prodotto (**P**) incrementa esponenzialmente con il numero di cicli di PCR (**n**).

Il prodotto di PCR dipende anche da **T**, ovvero il numero di copie di template di partenza.



# Resa della PCR

Resa effettiva: **effetto plateau**

❑ Il processo di duplicazione non procede “all’infinito”, esso è limitato da:

**Quantità dei primers**

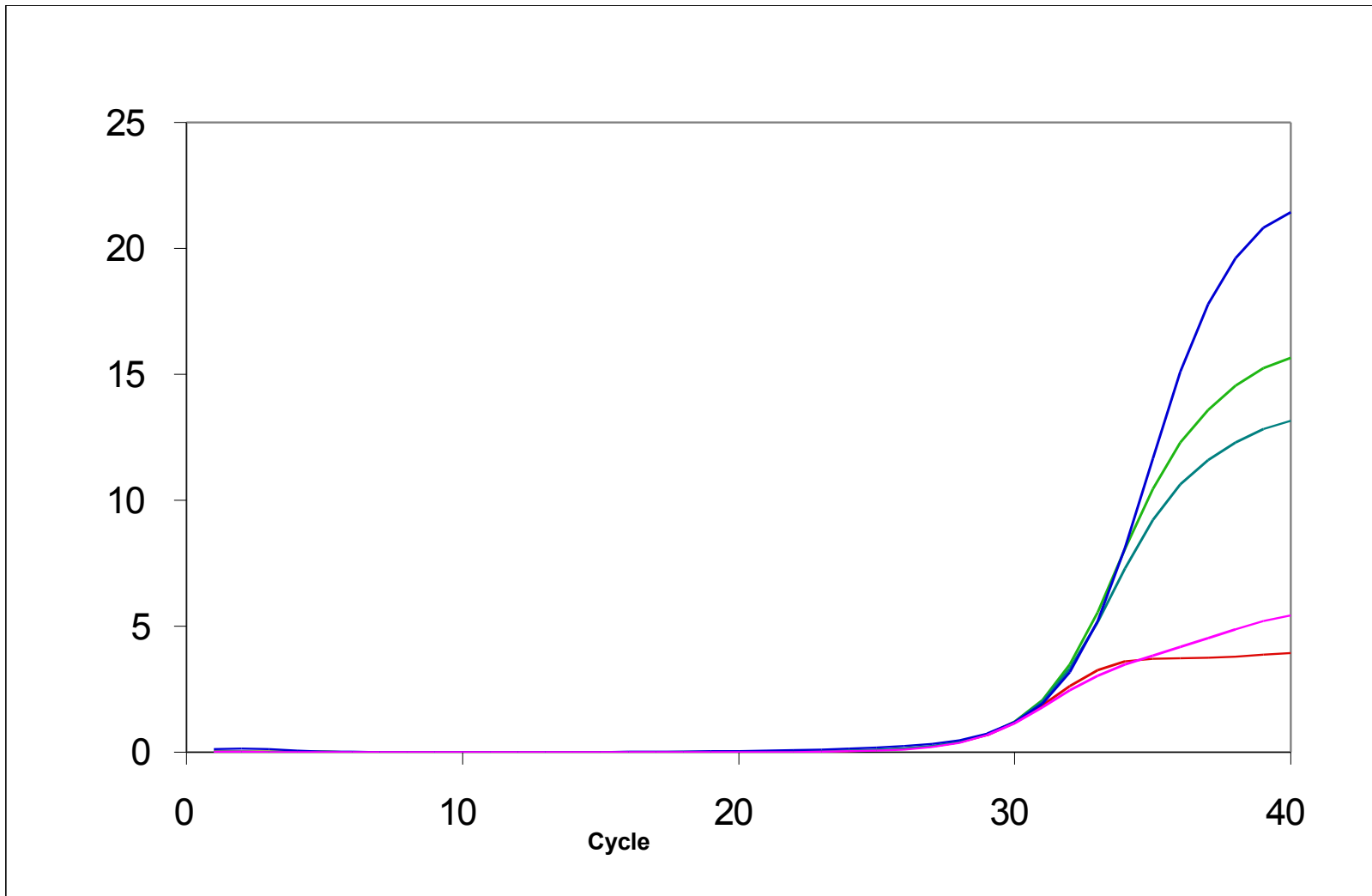
**Attività della Taq polimerasi**

**Reannealing dei filamenti**

❑ Raggiunto il plateau non si osserva più un incremento nei prodotti

# Il plateau non dipende da T

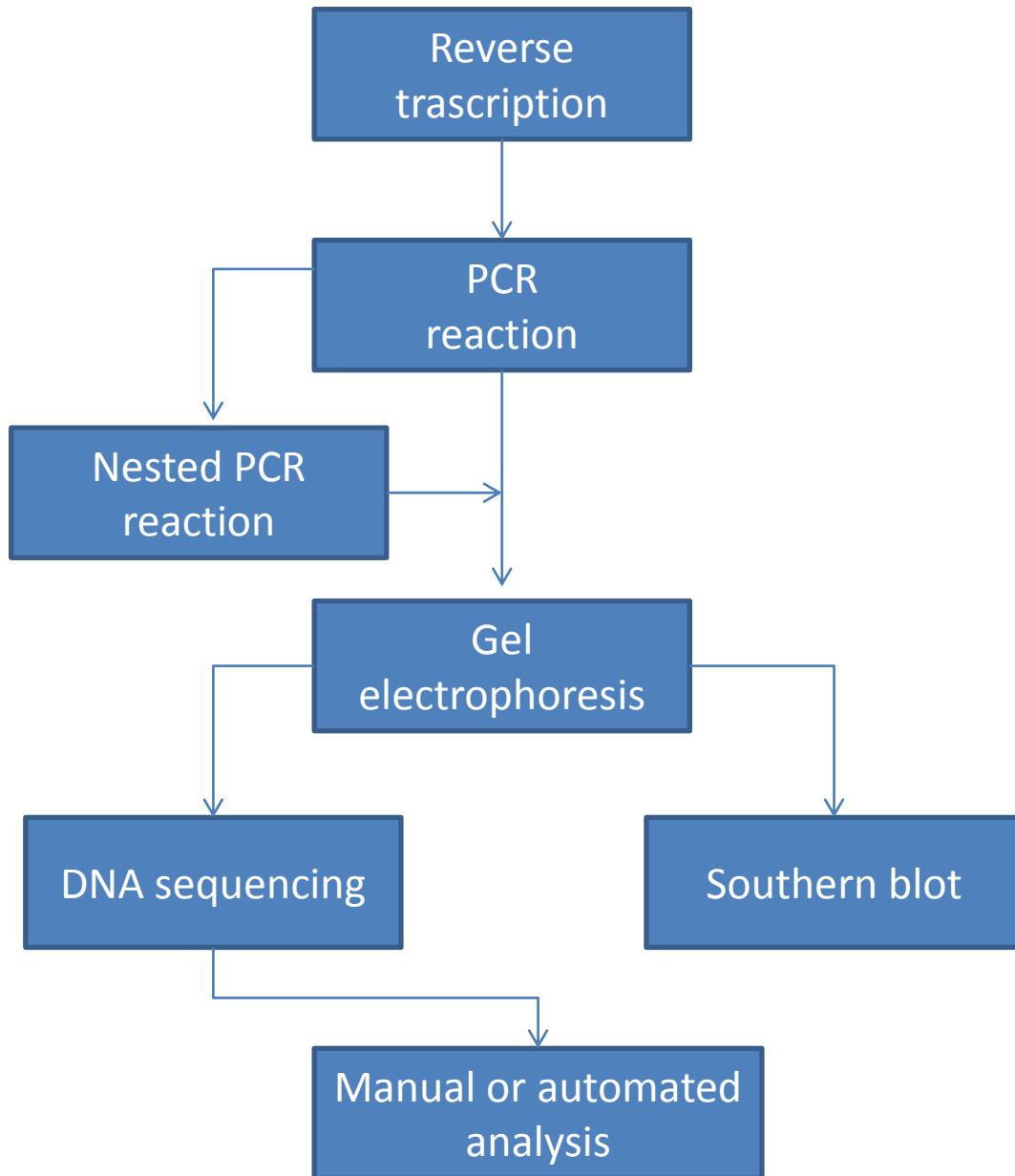
**Anche se la quantità iniziale di template è la medesima, il plateau è raggiunto in tempi diversi ed in cicli diversi.**



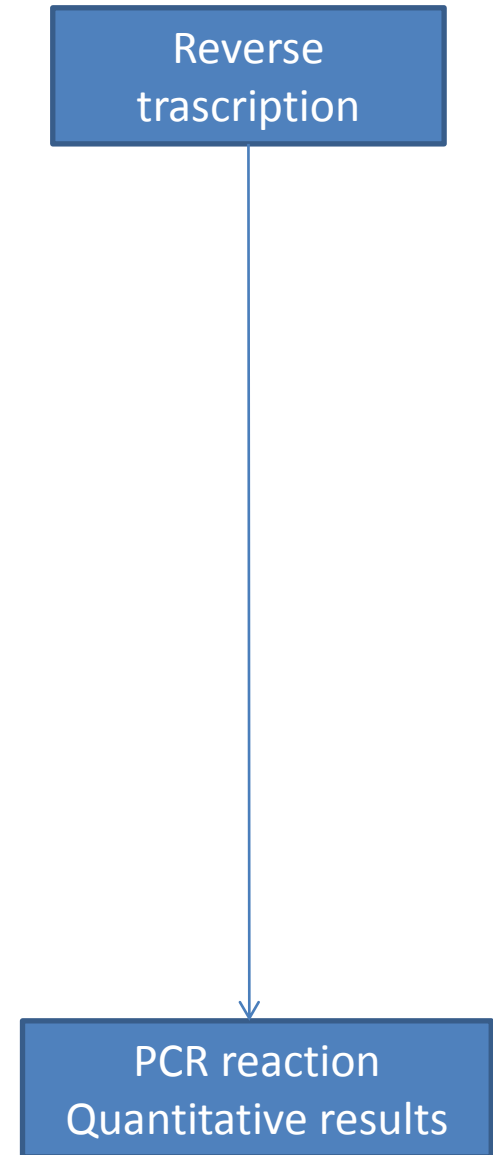
# Soluzioni per PCR quantitativa

- Utilizzare i dati ottenuti durante la fase esponenziale il prodotto di PCR è proporzionale al template iniziale
- Questo è reso possibile mediante il rilevamento, di una fluorescenza, che è proporzionale al prodotto di PCR
- La fluorescenza, durante ogni ciclo di amplificazione, può essere rilevata utilizzando uno strumento quantitativo ma anche dei marcatori fluorescenti il cui accumulo segue la stessa cinetica della reazione di PCR

## RT-PCR convenzionale



## Real-time RT-PCR





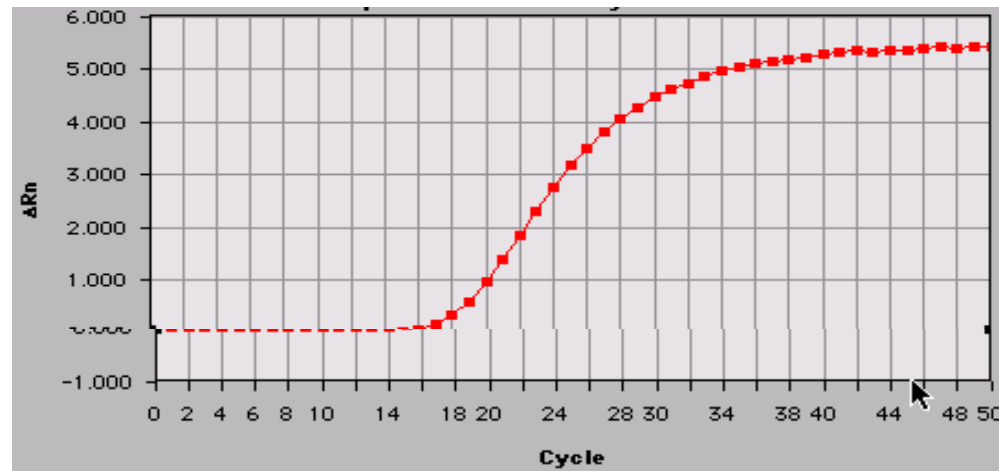
# Perché Real-Time?

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

# RT-PCR quantitativa

- Rilevamento della fluorescenza associata all'amplificazione
- Il prodotto di PCR non viene analizzato su gel di agarosio
- Analisi del prodotto di fluorescenza tramite computer

Incremento di  
fluorescenza

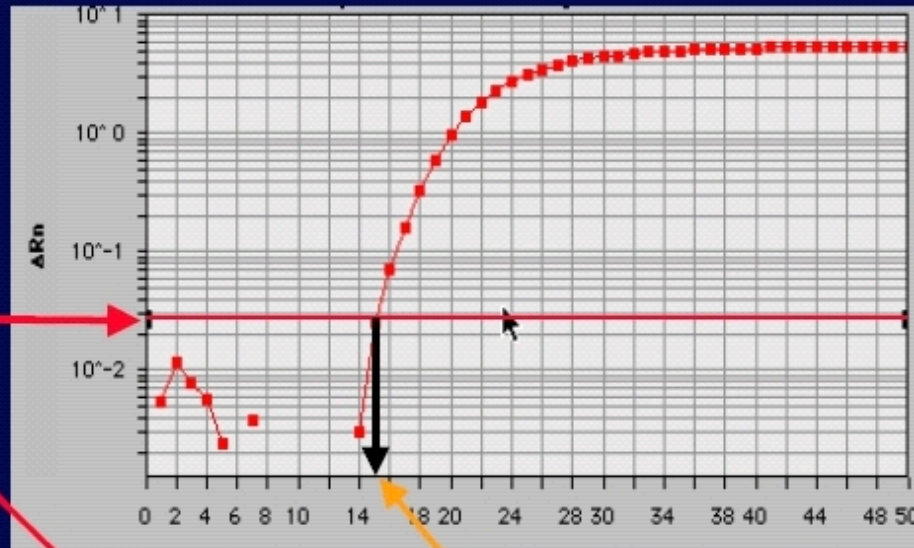


Cicli di PCR

# Analisi tramite software

Increasing  
fluorescence

**Threshold  
(10sd)**



Baseline

**$C_T$  (cycle threshold)**

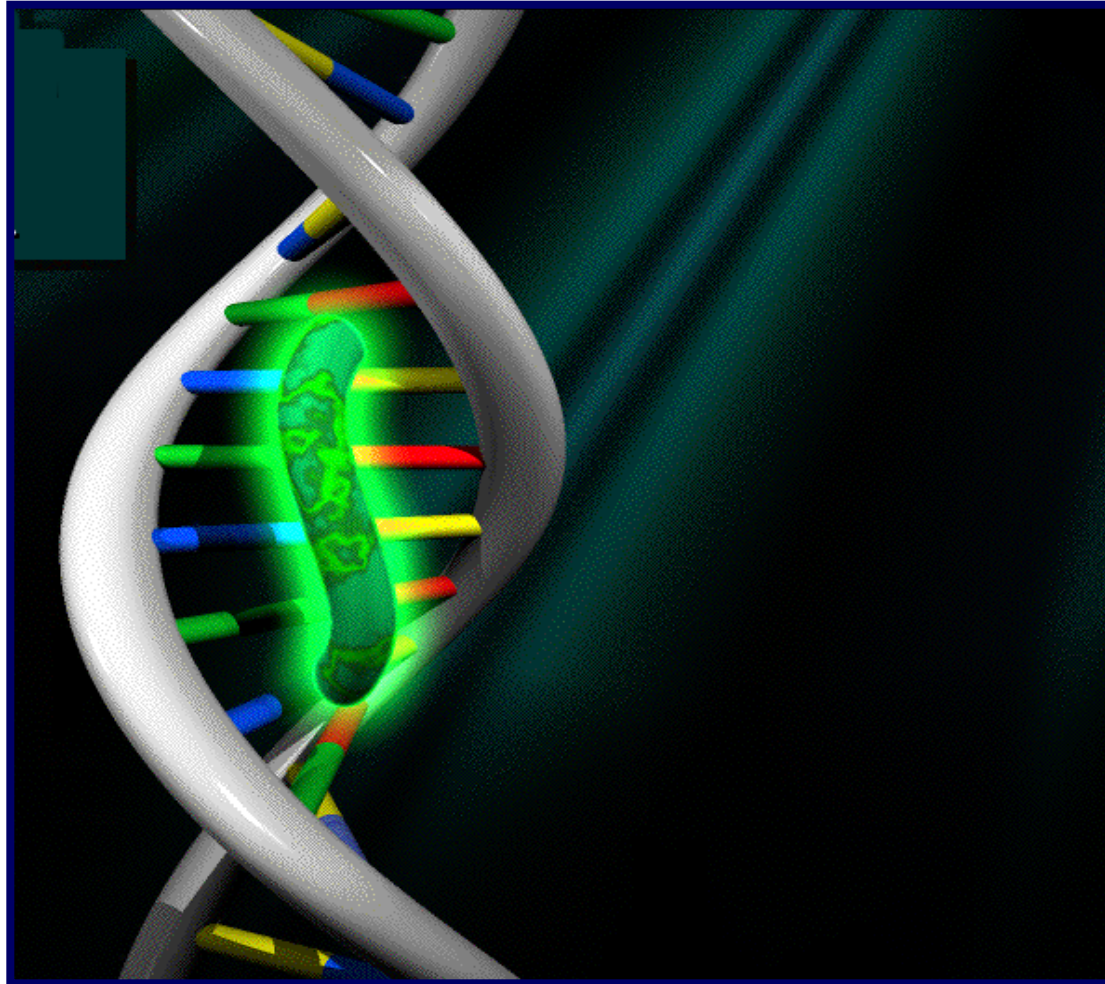
Log plot

## **Chimiche fluorescenti per PCR Real-Time**

- La fluorescenza si genera durante la PCR per effetto di diverse possibili reazioni chimiche.**
- Le chimiche principali sono basate sia sul legame di coloranti fluorescenti che si intercalano nella doppia elica di DNA, come il SYBR Green, sia sull'ibridazione di sonde specifiche.**

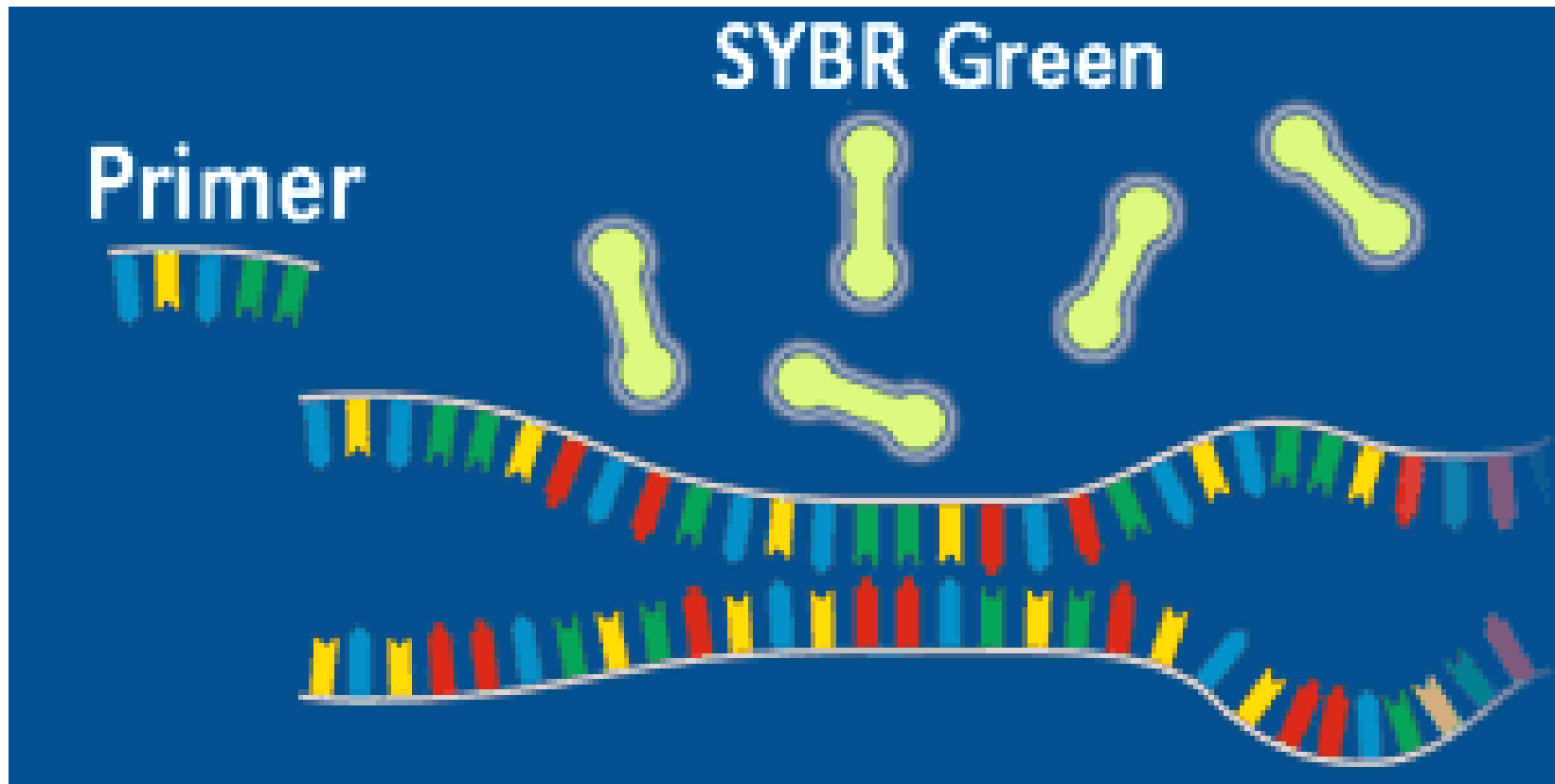
# SYBR green

- Utilizza una molecola fluorescente non specifica che si lega al solco minore del DNA.



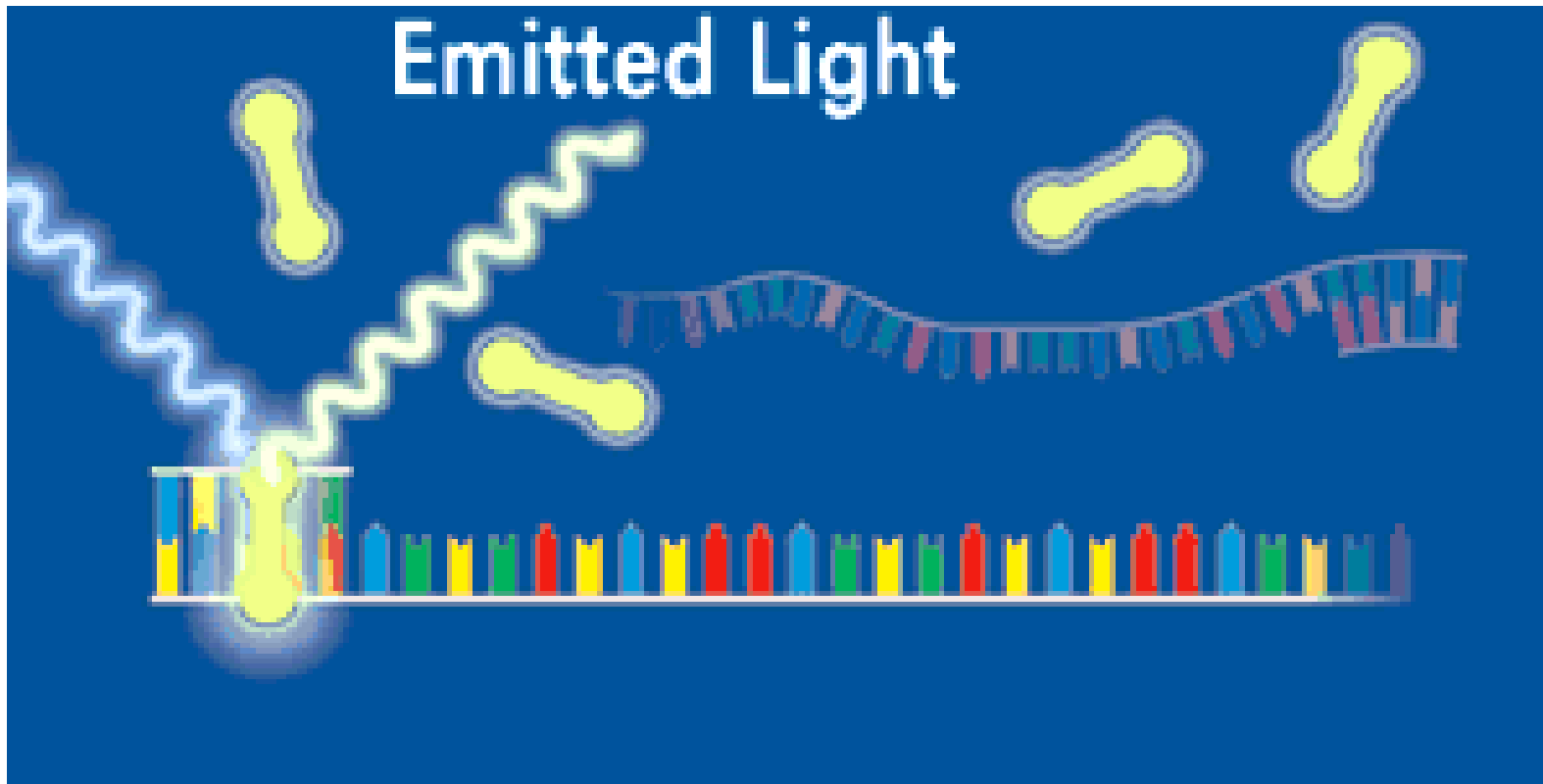
# SYBR green

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



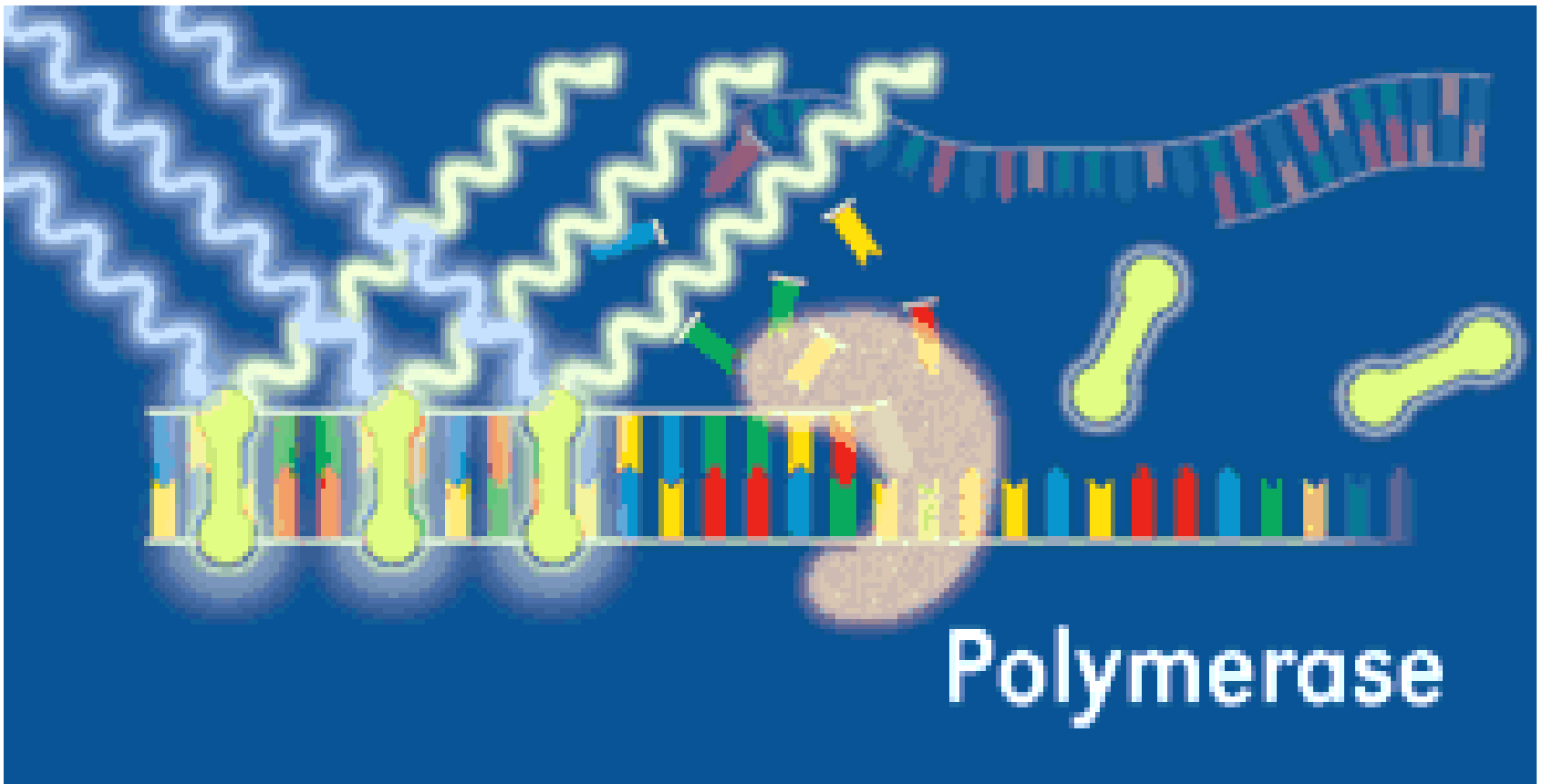
# SYBR green

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



# SYBR green

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





# SYBR green

## Metodica semplice

Possono essere utilizzati primers in uso in qualitativa.

## Non costosa

## Non-specifica

- La molecola fluorescente si lega **random** a tutte le doppie eliche, includendo i dimeri di primers.
- È necessario ottimizzare la metodica per evitare la formazione di prodotti aspecifici.

❑ La Real-Time PCR si può realizzare mediante l'impiego di:

❖ coloranti intercalanti ( es. SYBR green), che si legano in maniera aspecifica a tutto il DNA.

❖ sonde ad ibridazione, specifiche per il frammento di interesse, marcate con molecole fluorescenti.

❑ Esistono diversi tipi di sonde:

**Dual-labeled** (come le sonde TaqMan)

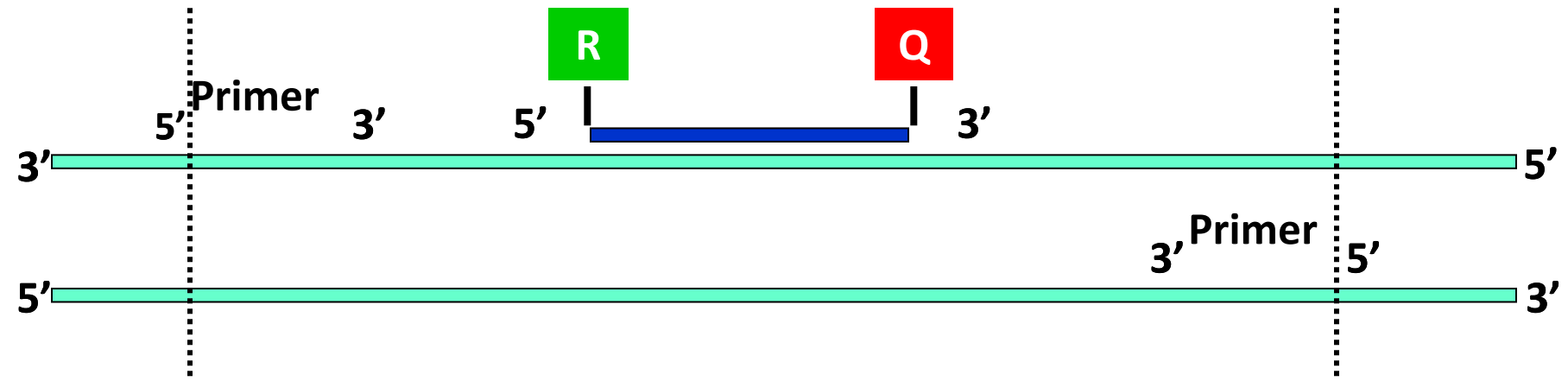
**Molecular beacons**

**Scorpion**

**Sonde FRET** (Fluorescence Resonance Energy Transfer)

# Sonda TaqMan

- La sonda di tipo TaqMan è un oligonucleotide che, come i primers della PCR, viene disegnato per essere complementare alla sequenza bersaglio da amplificare.



**La sonda è disegnata in modo da ibridarsi all'interno del frammento amplificato nella reazione di PCR**

## Primer & probe design guidelines

### Primers

### Probe

%GC in the range 30–80%

no runs of more than 3 consecutive G's

Primer Express  $T_M$  of 58–60 °C

Primer Express  $T_M$  of 68–70 °C

forward & reverse primers are as close as possible to (but not overlapping) the probe

no G on 5' end

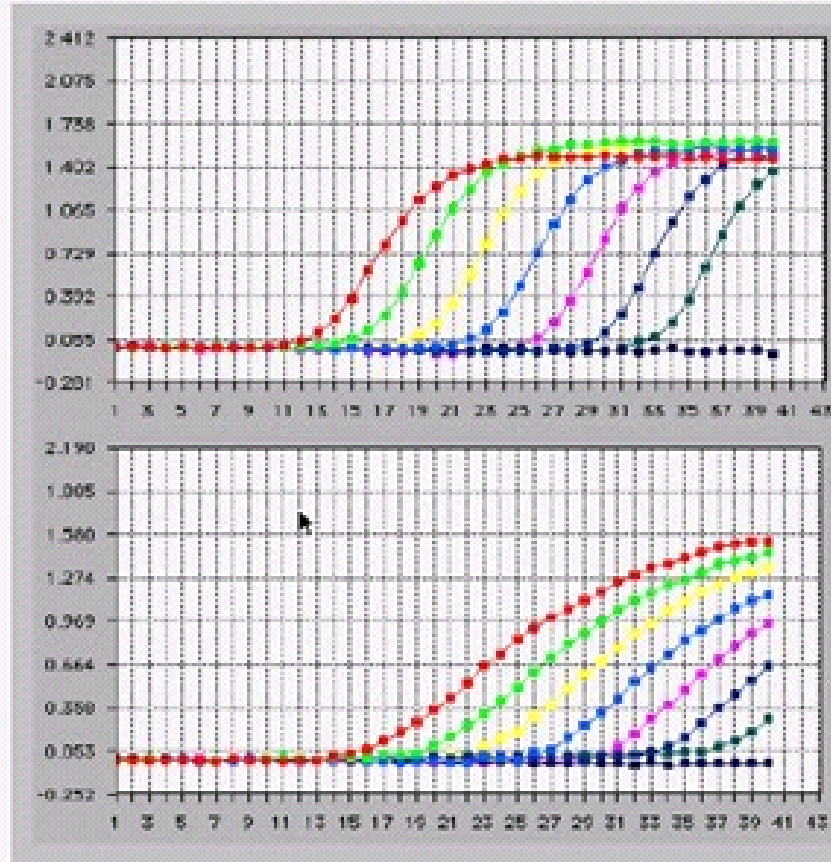
5 nucleotides at the 3' end have only 1 or 2 G + Cs

Select probe from strand with more C's than G's

Amplicon length less than 150 base pairs

# Dimensioni dell'amplicone

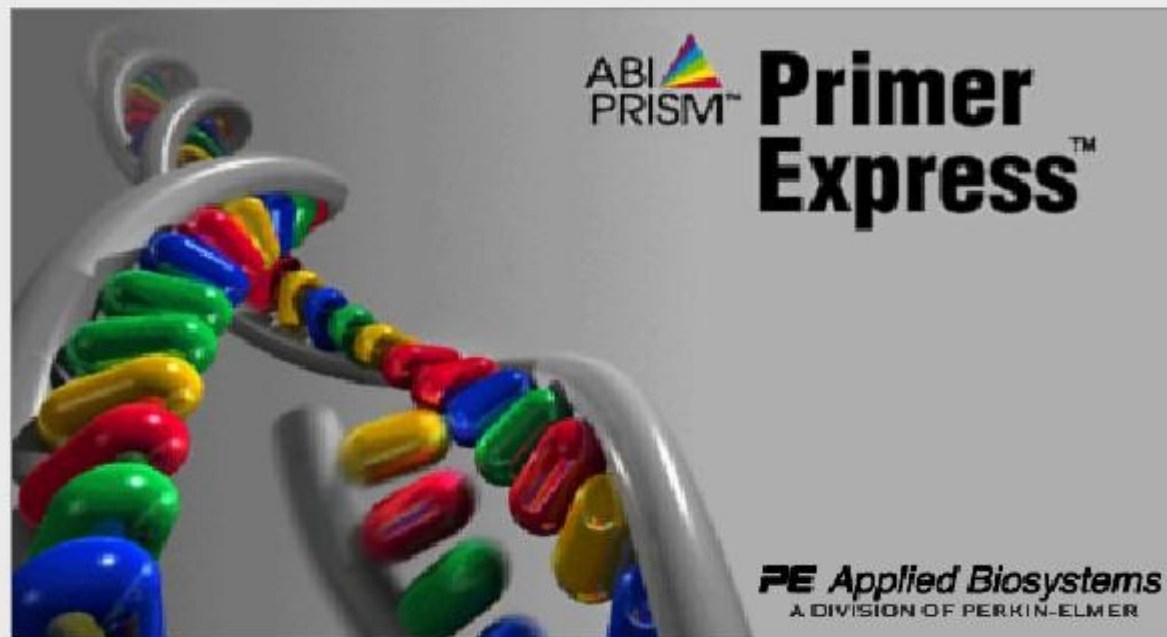
200 bp product



500 bp product

(amplification efficiency is lower and unpredictable for each amplicon design)

## Software for TaqMan<sup>®</sup> primer and probe design guidelines



**TaqMan Probe #1**

Sequence Params Rxn Cond Primers Map Recipe Results

File Name **Amelo X Sequence** Import DNA File... Help

Length **793 bp.** Selection **455** to **455**  Double Stranded

```

GCACCACCAA ATCATCCCCG TGCTGTCCCA ACAGCACCCC CCGACTCACA 300
CGTGGT Forward GGC ACGACAGGGT TGTCGTGGGG GGCTGAGTGT

CCCTGCAGCC TCATCACCCAC ATCCAGTGG TGCCAGCTCA GCAGCCCGTG 350
GGGACGTCGG AGTAGTGGTG TAGGGTCACC ACGGTCGAGT CGTCGGGCAC

ATCCccage aaccaatgat gcccgttCCT GGCCAACACT CCATGACTCC 400
TAGGGggtea ttaattacta cgggcaaaGGA CCGGTTGTGA GGTACTGAGG

Probe

AATCCAACAC CACCCGCCCC ACCTCCCTCC GCGReverse CCTACC 450
TTAGGTTGTG GTGGTCGGTT TGGAGGGAGG CGGGCGGGTC GTCGGGATGG

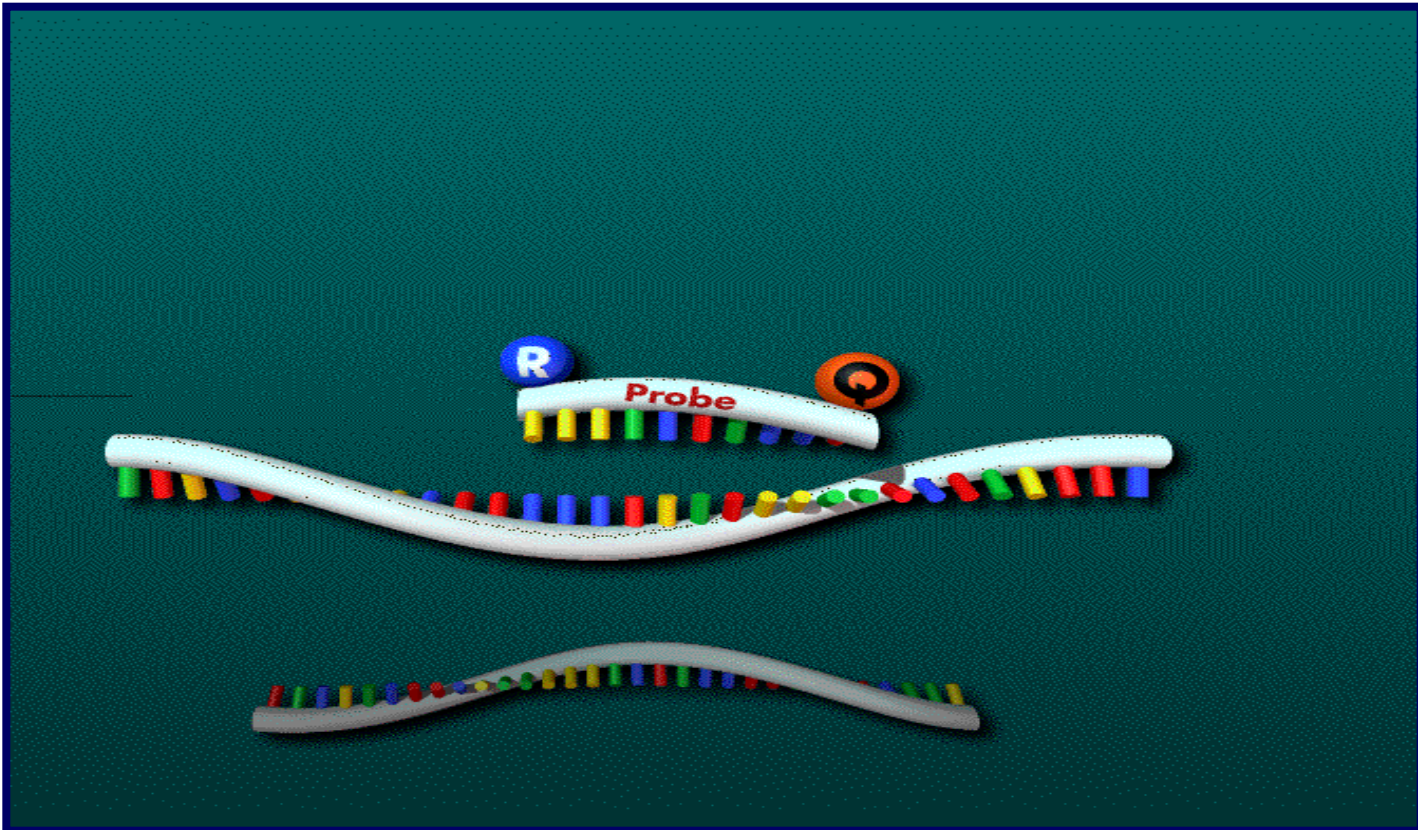
AGCCCCAGCC TGTTACGCCA CAGCCTCACC AGCCCATGCA GCCCCAGCCA 500
TCGGGGTCGG ACAAGTCGGT GTCGGAGTGG TCGGGTACGT CGGGGTCGGT

```

A total of 39 primer pairs found. To examine primer pairs, click the 'Primers' tab.

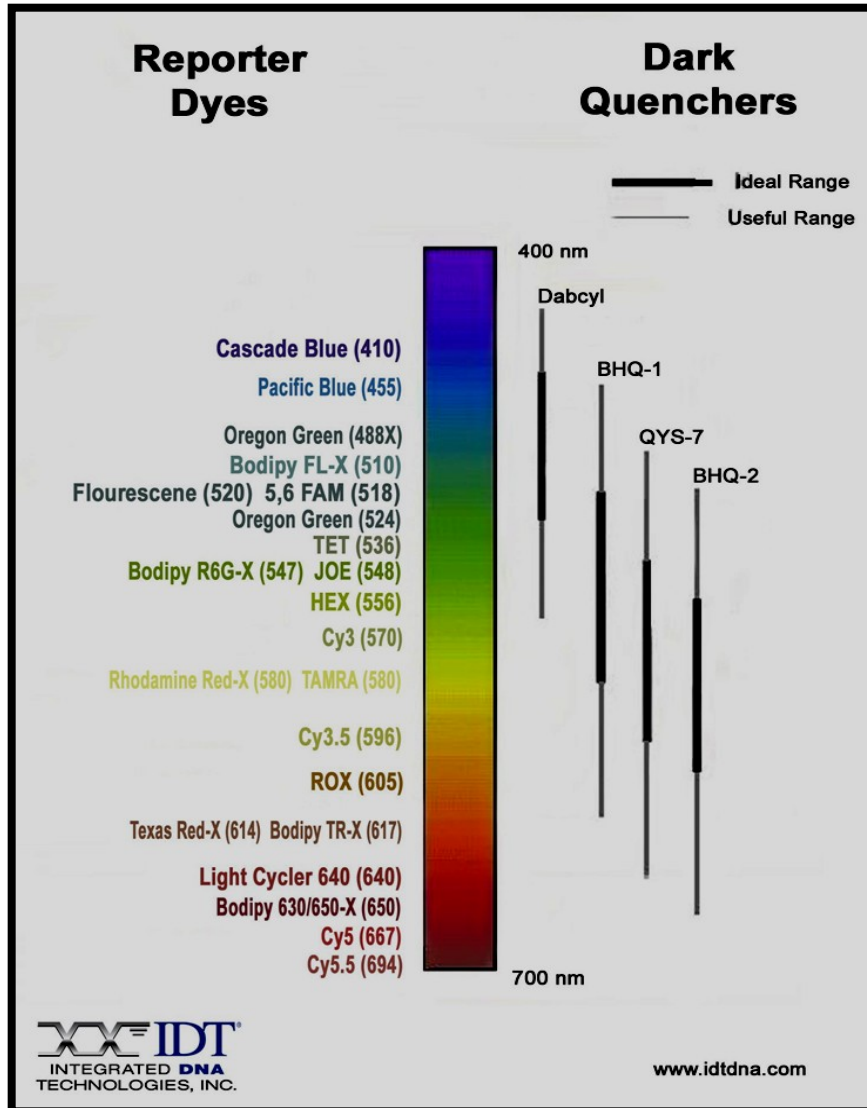
# Sonda TaqMan

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





# Reporter-Quencher



Dye	Quencher
5,6 FAM	BHQ-1/TAMRA
HEX/JOE	BHQ-2
Texas Red/ROX	BHQ-2
Cy5/Quasar670	BHQ-2 o (-3)

6-carbossifluoresceina

6-carbossitetrametilrodamina

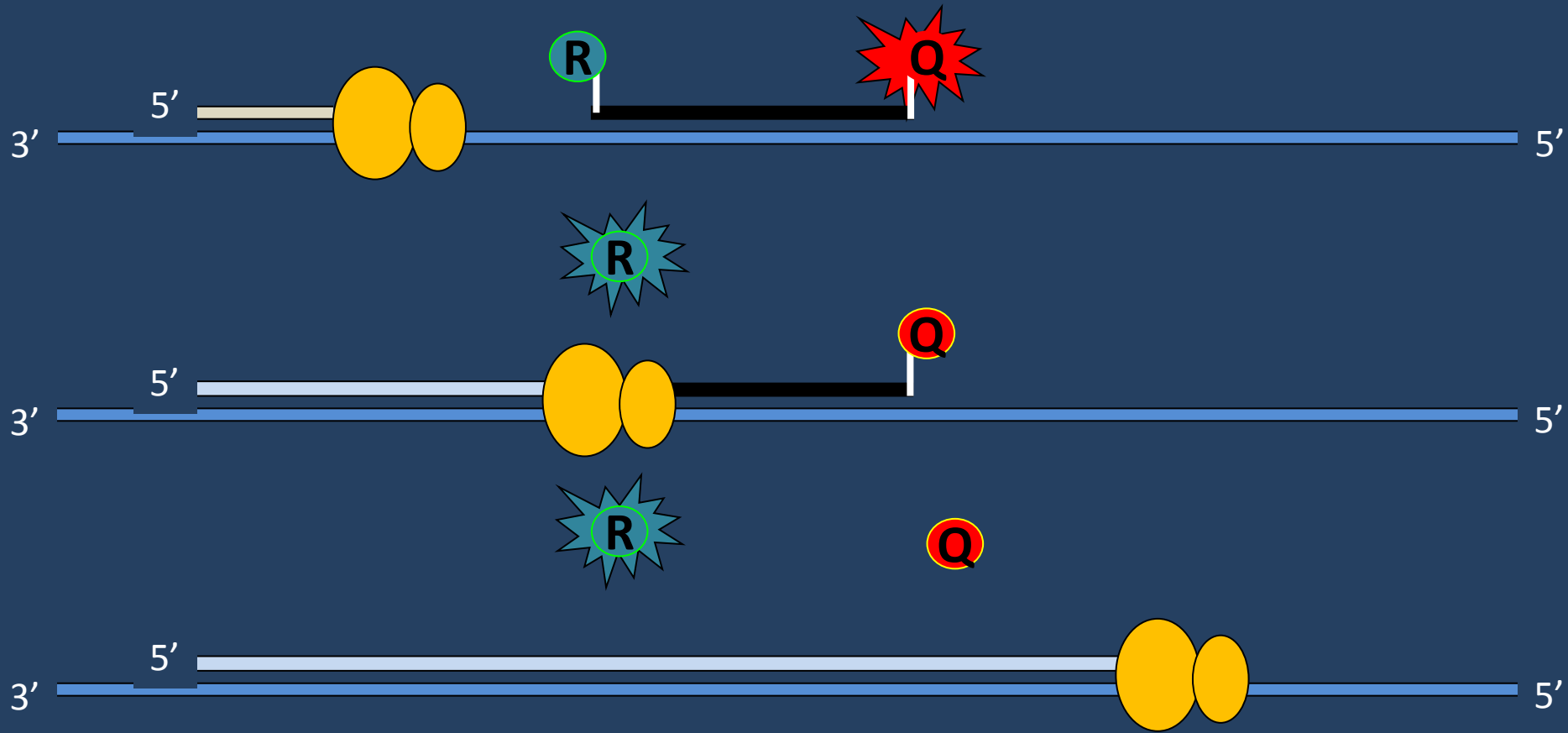
# Reporter-Quencher

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

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

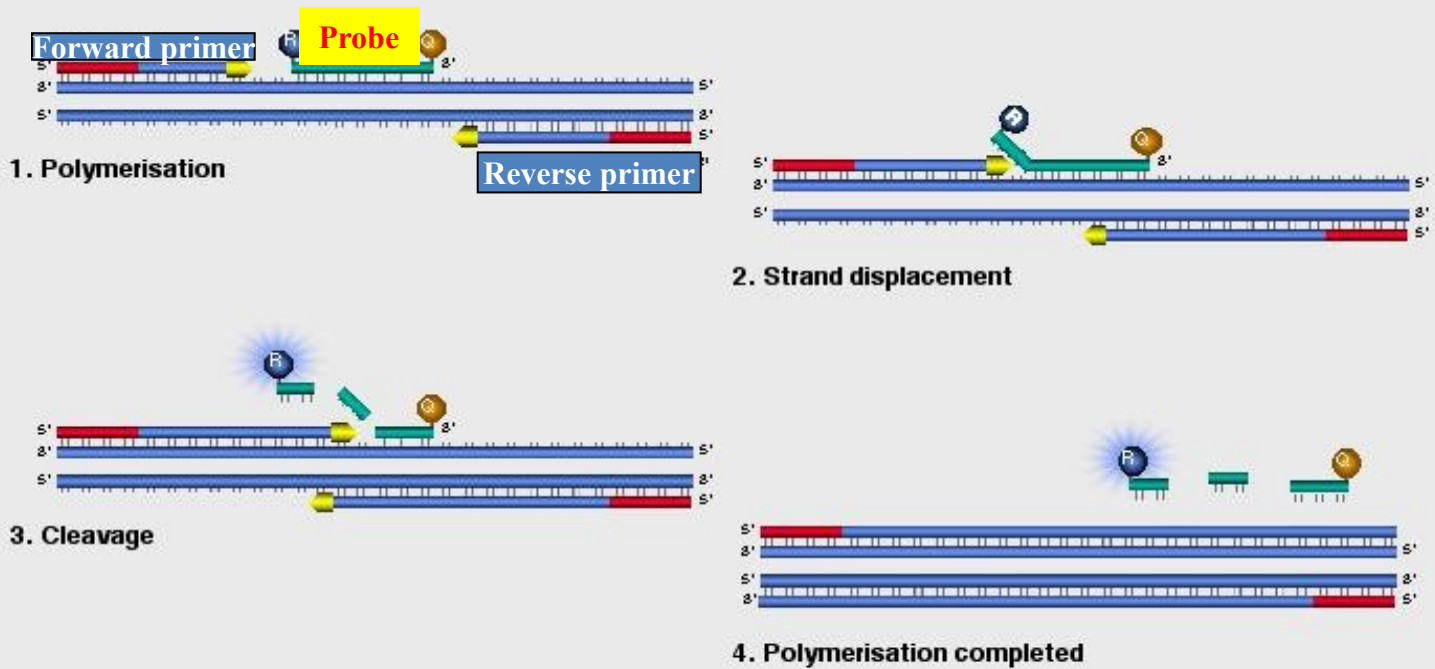
**Se R e Q si trovano vicini, Q spegne l'effetto di R perchè i fotoni di R vengono assorbiti da Q**

# Real-Time PCR: attività 5'>3' esonucleasica



# L'aumento di fluorescenza del Reporter è direttamente proporzionale al numero di ampliconi generati

## Fluorogenic 5' nuclease assay (TaqMan<sup>®</sup> chemistry)



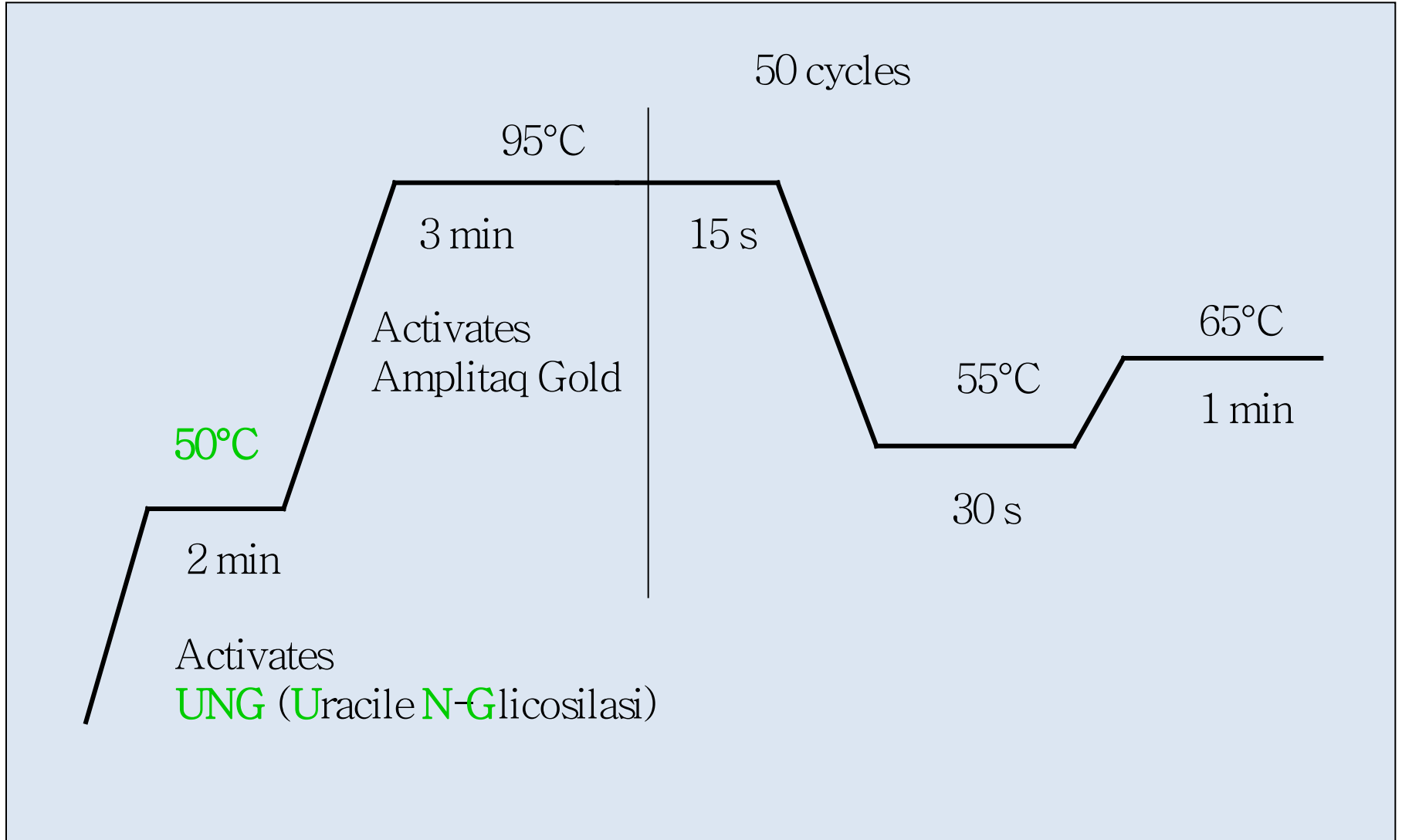
R = Reporter  
Q = Quencher

# Real-time PCR: reagenti

## ❑ COMPONENTI DELLA REAZIONE:

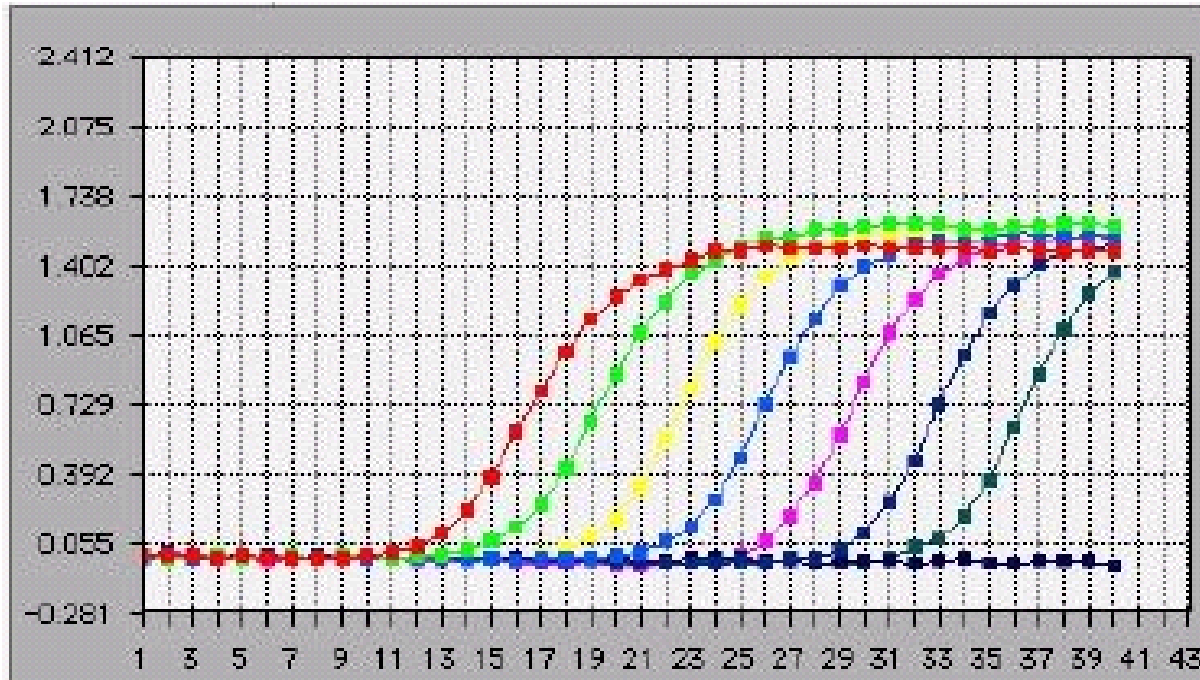
- 1) DNA target
- 2) DNA polimerasi
- 3) Due oligonucleotidi
- 4) dNTPs
- 5) **Probe fluorescente**

# Run Real-Time thermal cycle



# Curve di amplificazione

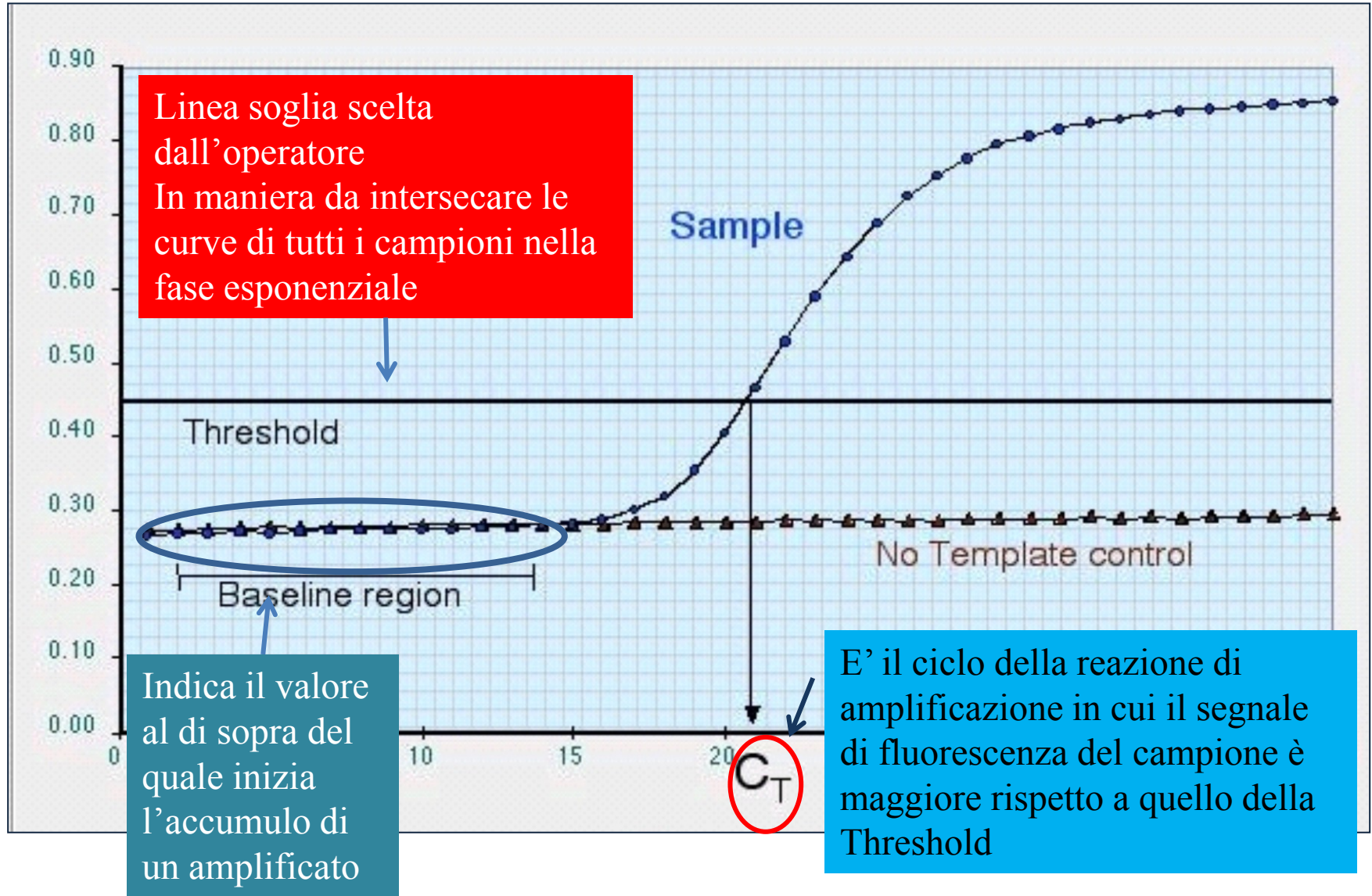
Fluorescenza



Cicli di amplificazione

Per ogni campione si ottiene una curva di amplificazione il cui  $C_T$  (=Threshold Cycle) è inversamente proporzionale alla quantità di template iniziale

# Plot di amplificazione





# Quantificazione

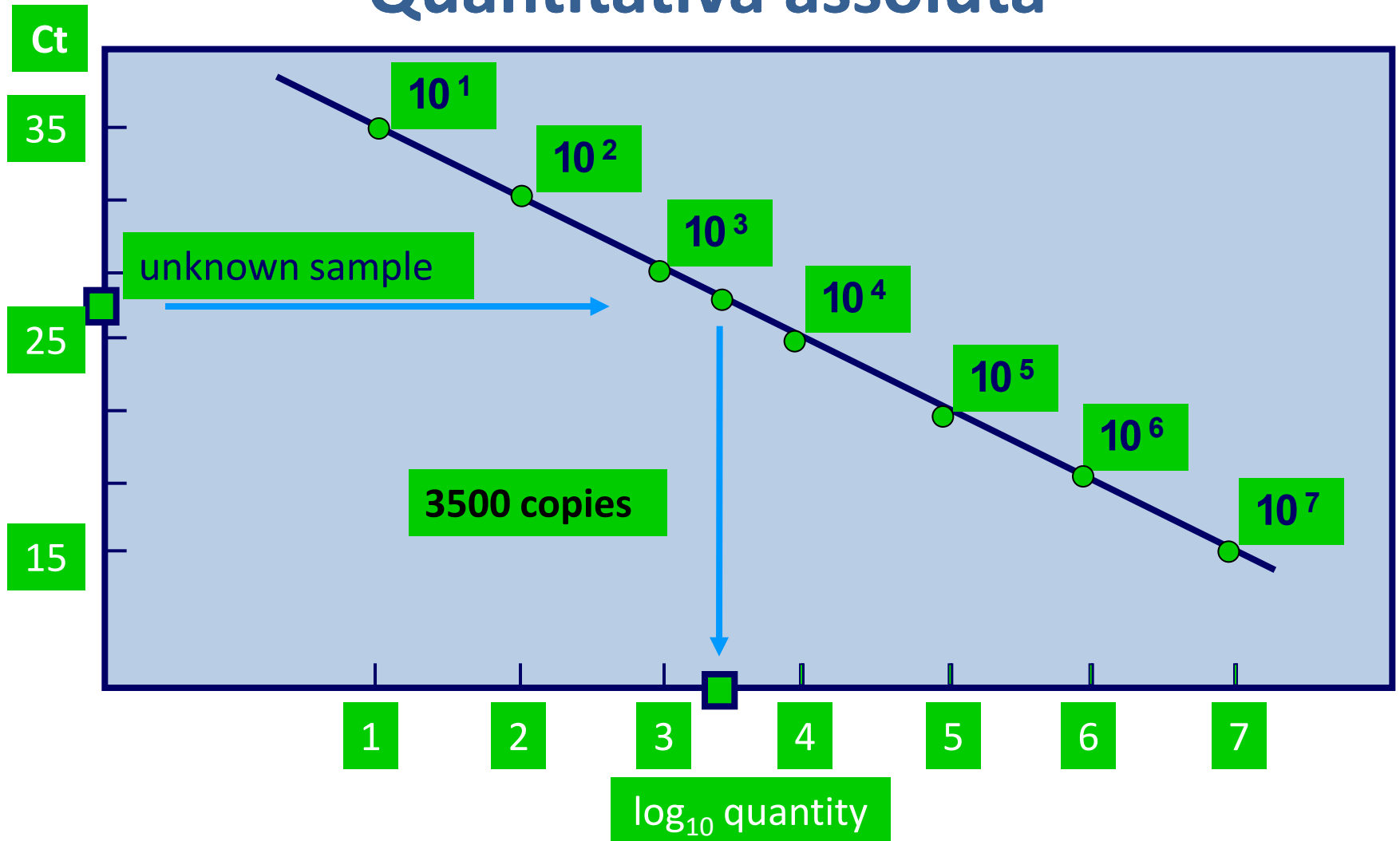
❑ **ASSOLUTA** i campioni sono quantificati in modo assoluto

- ❖ Necessita di “standard” di cui si conosce la concentrazione assoluta (utilizzo di una “standard curve”)
- ❖ Per tutti gli “unknowns” devono essere saggiate identiche quantità di campioni

❑ **RELATIVA** la quantificazione viene effettuata paragonando i  $C_T$

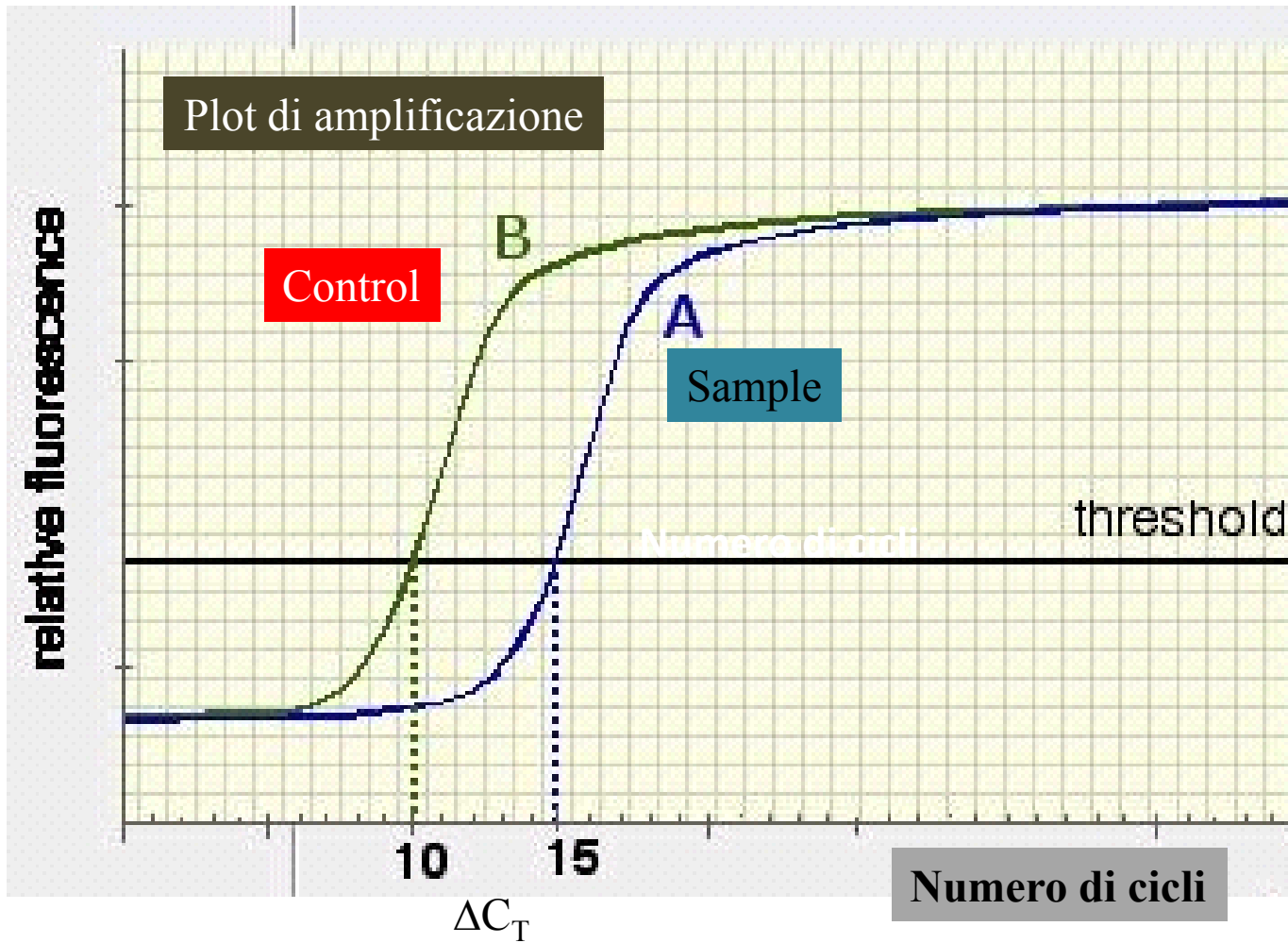
- ❖ Necessita di controlli endogeni (non si utilizza una “standard curve”)
- ❖ Gli “unknowns” vengono “quantificati” paragonando il loro  $\Delta C_T$  con quello del controllo endogeno ( $\beta$ -actina, GAPDH).

# Quantitativa assoluta



Il valore così ottenuto viene normalizzato rispetto a quello di un gene espresso costitutivamente ( $\beta$ -actina, GAPDH, ecc.)

# Quantificazione relativa



# Quantificazione relativa: analisi dei dati

- Normalizzare il target con un controllo endogeno (r) espresso costitutivamente ( $\Delta C_T$ )
- Comparare ciascun  $\Delta C_T$  così ottenuto con il  $\Delta C_T$  di un trattamento di controllo anche detto “calibratore” (cb) ( $\Delta\Delta C_T$ )

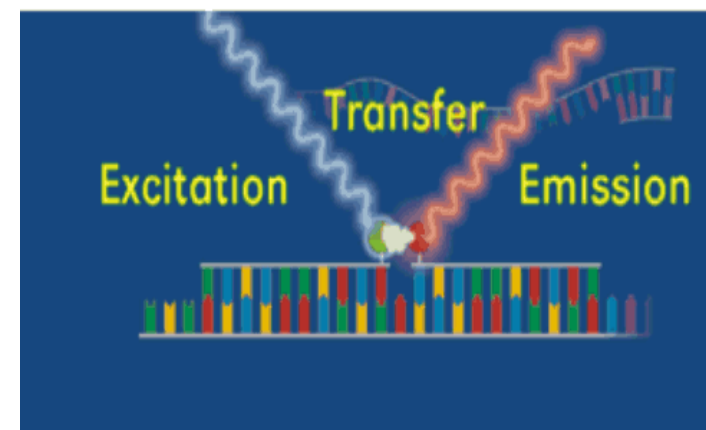
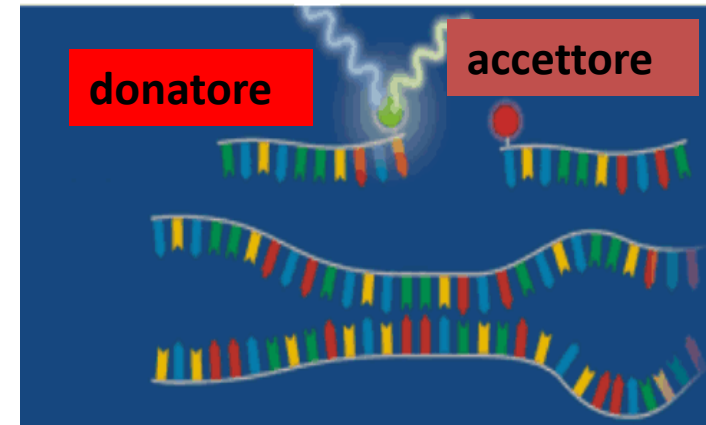
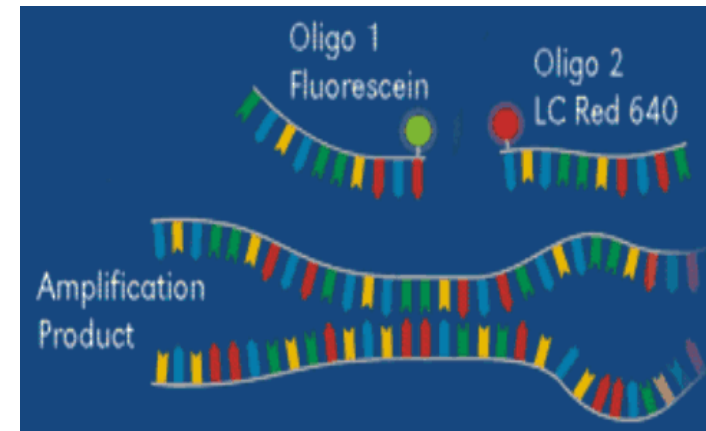
$$2^{- (\Delta C_{T,r} - \Delta C_{T,cb})} = 2^{- \Delta\Delta C_T}$$

- Il valore così ottenuto permette di determinare la concentrazione relativa del target

# Sonde FRET

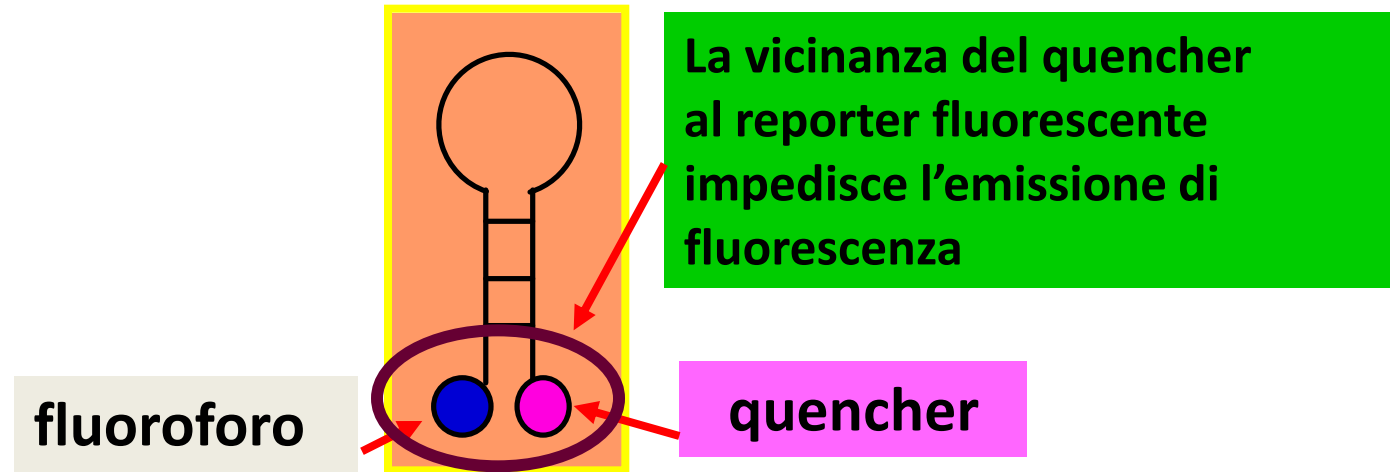
## (Fluorescence Resonance Energy Transfer)

- ❑ Simili alle sonde TaqMan perché si legano al DNA bersaglio e vengono idrolizzate, ci sono però **due sonde** ognuna marcata con un solo fluorocromo (accettore e donatore).
- ❑ Quando le sonde non sono legate alle sequenze target il segnale fluorescente proveniente dall'accettore non è rilevato.
- ❑ Durante lo step di annealing della PCR, entrambe le sonde FRET ibridizzano alle sequenze target: ciò avvicina il fluoroforo donatore all'accettore permettendo il trasferimento di energia tra i due fluorofori e la produzione di un segnale fluorescente da parte dell'accettore che viene rilevato.



# Molecular Beacons

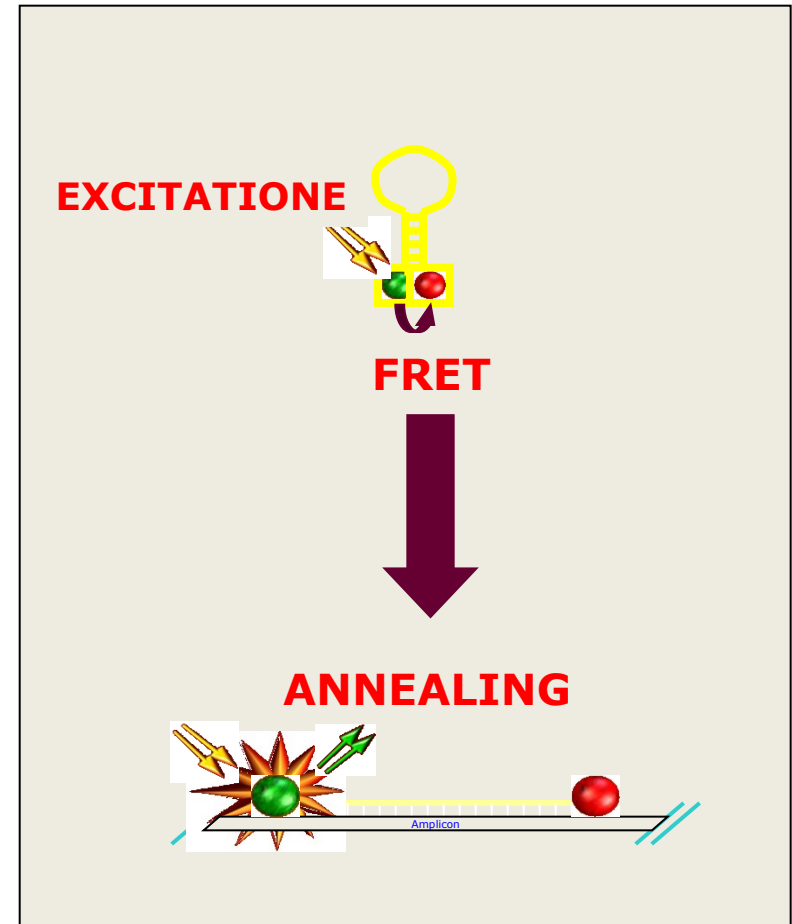
- I "molecular beacons" contengono un fluoroforo e un quencher non fluorescente alle estremità opposte di un oligonucleotide, che sono disegnate in modo da essere complementari tra loro formando una struttura stem-loop.



- Il loop è complementare ad una sequenza all'interno del prodotto amplificato.

# Molecular Beacons

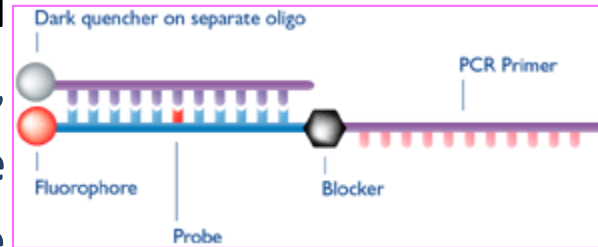
- Durante lo step di annealing della PCR, la sonda ibridizza alla sua sequenza target: ciò separa il colorante fluorescente dal reporter, producendo un segnale fluorescente.
- La quantità di fluorescenza prodotta ad ogni ciclo, o dopo la PCR, dipende dalla quantità di prodotto specifico in quel dato momento.



A differenza delle sonde TaqMan, le molecular beacons non vengono distrutte durante la reazione di amplificazione per cui possono reibridizzarsi durante il successivo ciclo

# Probes : Scorpions

La progettazione delle scorpion probes è simile a quella delle molecular probes, con la differenza che al 3' terminale del probe **vi** è una sequenza, PCR primer, che è specifica per l'estensione del target.



Questa sequenza è legata al 5' terminale di un primer per mezzo di un "blocker".

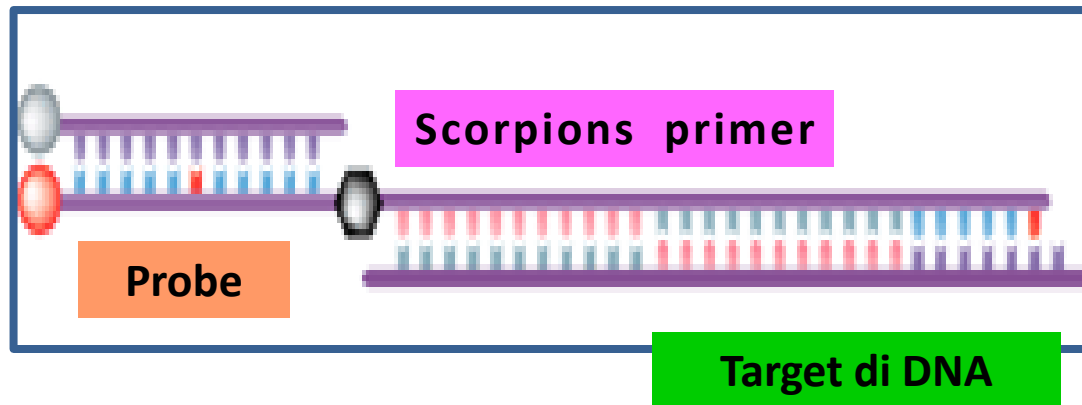
.



# Probes : Scorpions

## Step 1

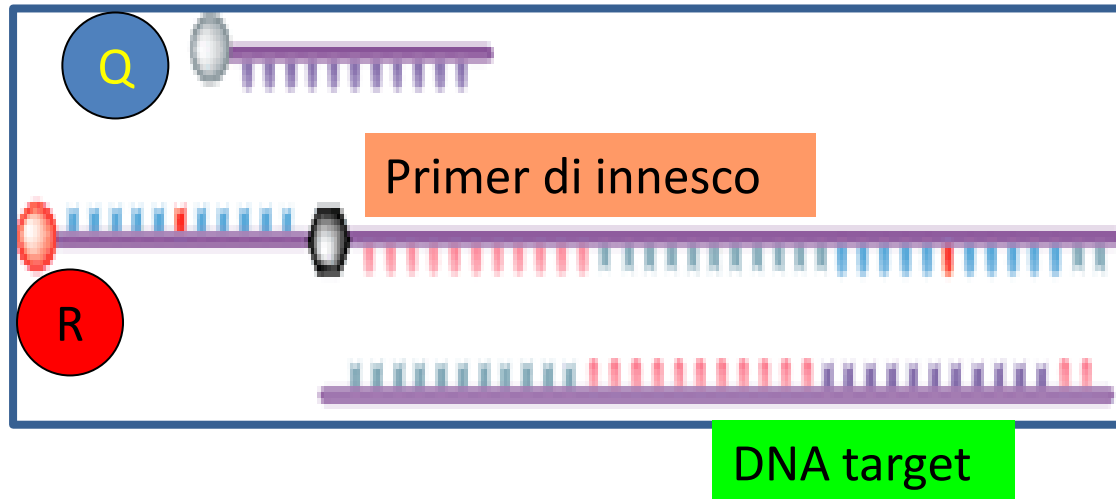
Lo Scorpions primer è esteso su un target di DNA



## Step 2

# Probes : Scorpions

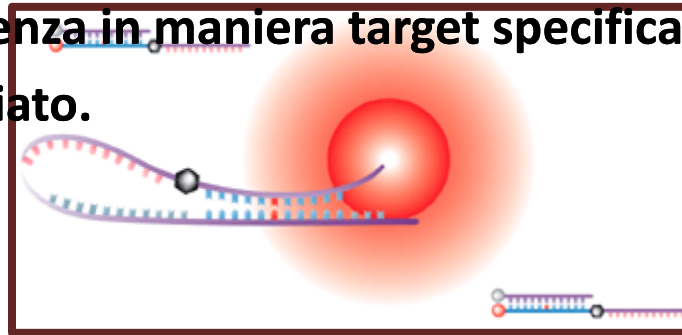
Durante il processo di denaturazione si verifica l'allontanamento del quencher dal reporter e del primer di innescio dal DNA target



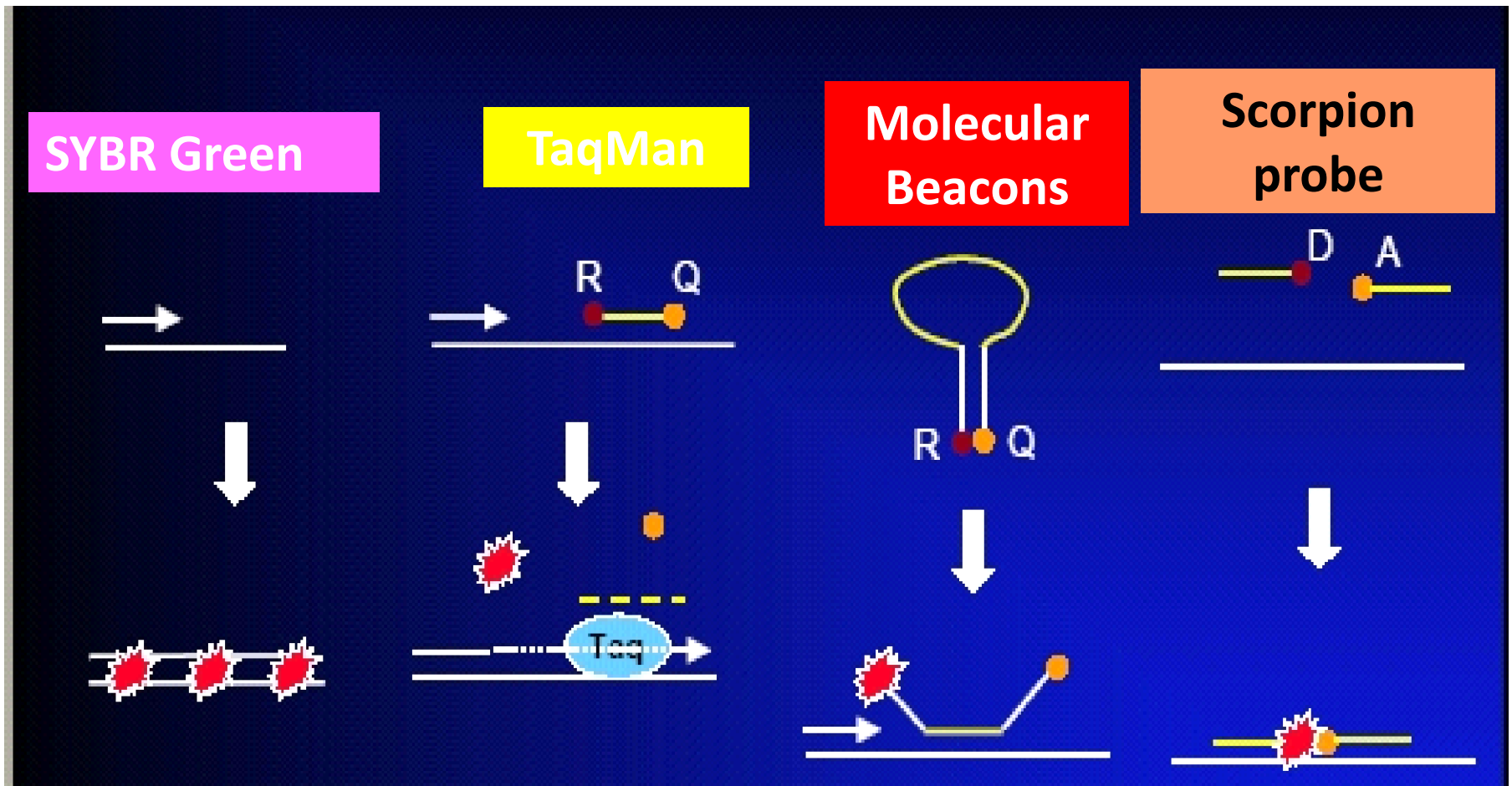
# Probes : Scorpions

## Step 3

Raffreddandosi lo Scorpion esteso subisce un riarrangiamento interno ed emette fluorescenza in maniera target specifica. Un primer non esteso viene quenziato.



# Riassumendo: Metodi di rilevamento della fluorescenza



# Real-Time PCR: applicazioni

- **Quantificazione virale**
  - **Quantificazione dell'espressione genica**
  - **Efficacia della terapia farmacologica**
  - **Misura dei danni al DNA**
  - **Controllo di qualità e validazione dei saggi**
  - **Detenzione dei patogeni**
  - **Controllo degli OGM**
  - **Genotyping**
  - **MRD**

# **MRD (Minimal Residual Disease):**

❑ Quota residua di cellule neoplastiche non eradicata dalla terapia di induzione della remissione o dalle successive misure terapeutiche.

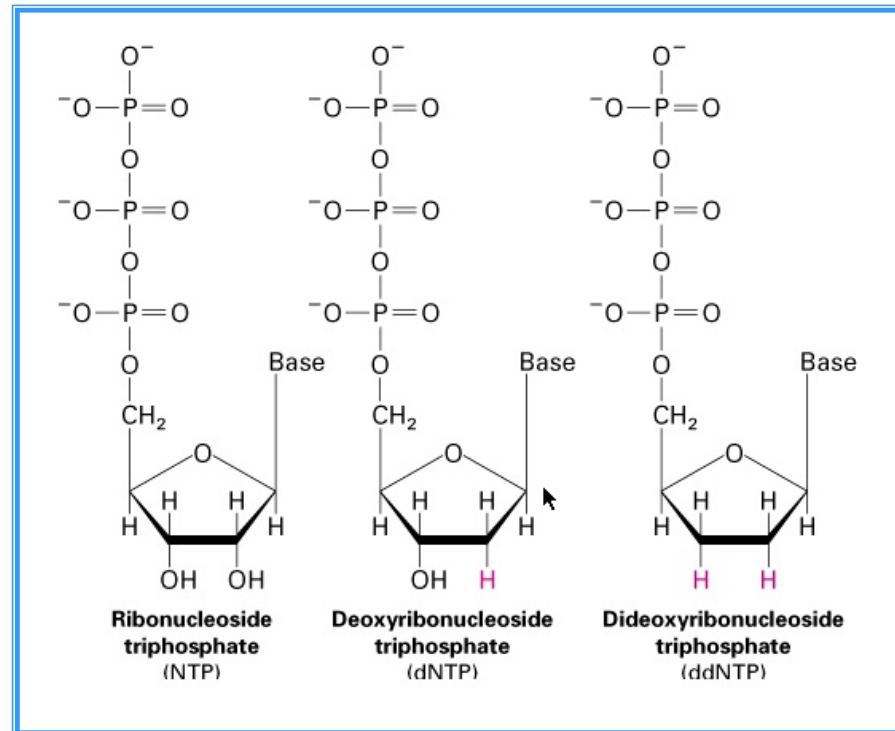
❑ Tali elementi neoplastici, presenti ad un livello inferiore alla capacità di rilevazione delle metodiche convenzionali, sono in grado di espandersi e dare origine alla recidiva.

# Analisi della sequenza nucleotidica del DNA

- Uno dei metodi più comunemente usati per questa analisi è quello di **Sanger**, detto anche metodo della *terminazione della catena* o dei *didesossiribonucleotidi (ddNTP)*.
- Si tratta di una metodica elegante e relativamente semplice che consiste nel far sintetizzare frammenti di catena polinucleotidica di lunghezza diversa sullo stampo del DNA che si vuole sequenziare. Ciò si ottiene facendo avvenire la sintesi della nuova catena utilizzando oltre ai 4 dNTP anche uno dei 4 ddNTP. In presenza di DNA polimerasi un ddNTP può essere incorporato all'estremità 3' di una catena nucleotidica in accrescimento su uno stampo di DNA, ma non può poi legare un altro nucleotide perchè non è disponibile l'OH in 3'.



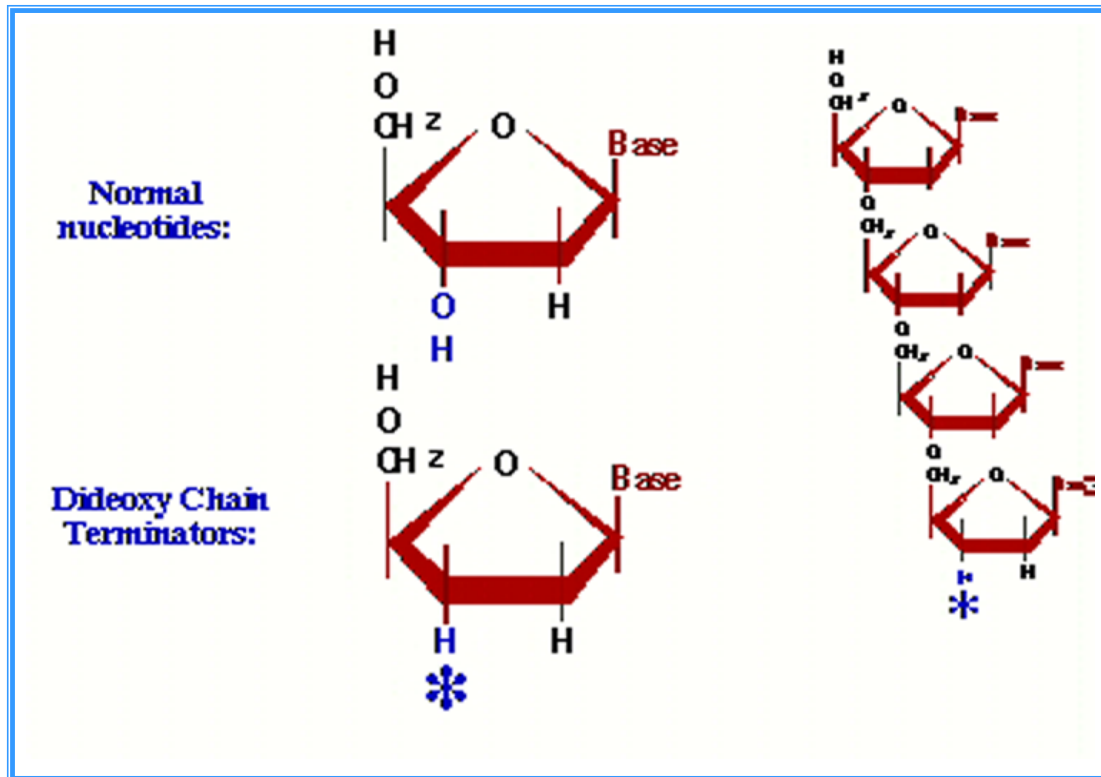
# *ddNTP*



- ❖ Il principio del procedimento può essere brevemente riassunto: si prepara una miscela di reazione contenete
- - il frammento di DNA da sequenziare, denaturato, quindi a singolo filamento;
  - - un *primer*, cioè una breve sequenza nucleotidica con le estremità 3' e 5' libere;
  - - una DNA polimerasi con elevata processività e bassa attività esonucleasica (sia in direzione 5'-3', sia in direzione 3'-5'; as es. *Sequenasi* del commercio);
  - - i 4 dNTP;
  - - un dNTP marcato con  $^{32}\text{P}$  o con  $^{35}\text{S}$  (incorporato in una base modificata).

- Si suddivide quindi la miscela in 4 frazioni (A, T, G, C), a ciascuna delle quali si aggiunge un diverso ddNTP, cioè ddATP, ddTTP, ddGTP, ddCTP e si incuba per un tempo opportuno.
- Poichè l'incorporazione del ddNTP nella catena in accrescimento è del tutto casuale, durante l'incubazione si formano in ciascuna frazione *frammenti* polinucleotidici di *lunghezza diversa*, aventi tutti come sequenza iniziale quella del *primer*, sequenza successiva in direzione 5' → 3' complementare al segmento duplicato del DNA stampo, e tutti terminanti con il ddNTP presente in quella frazione.
- Dopo incubazione le quattro frazioni vengono denaturate al calore, per separare le catene nucleotidiche appaiate, e sottoposte ad elettroforesi in un unico gel di poliacrilammide.

# Terminazione della catena



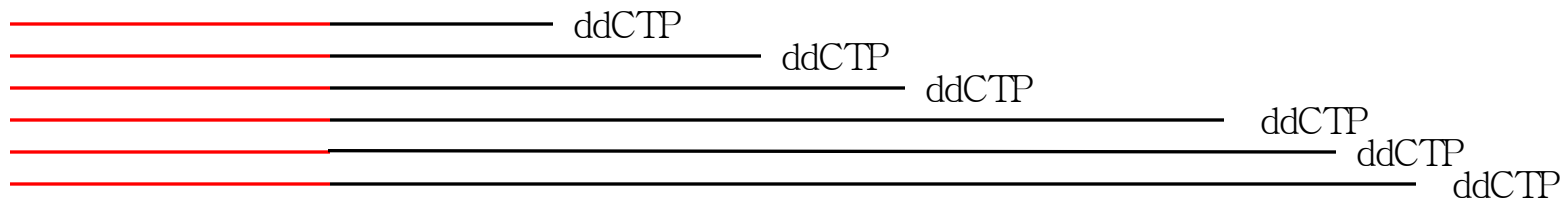


+ ddNTP ( per es. ddCTP)

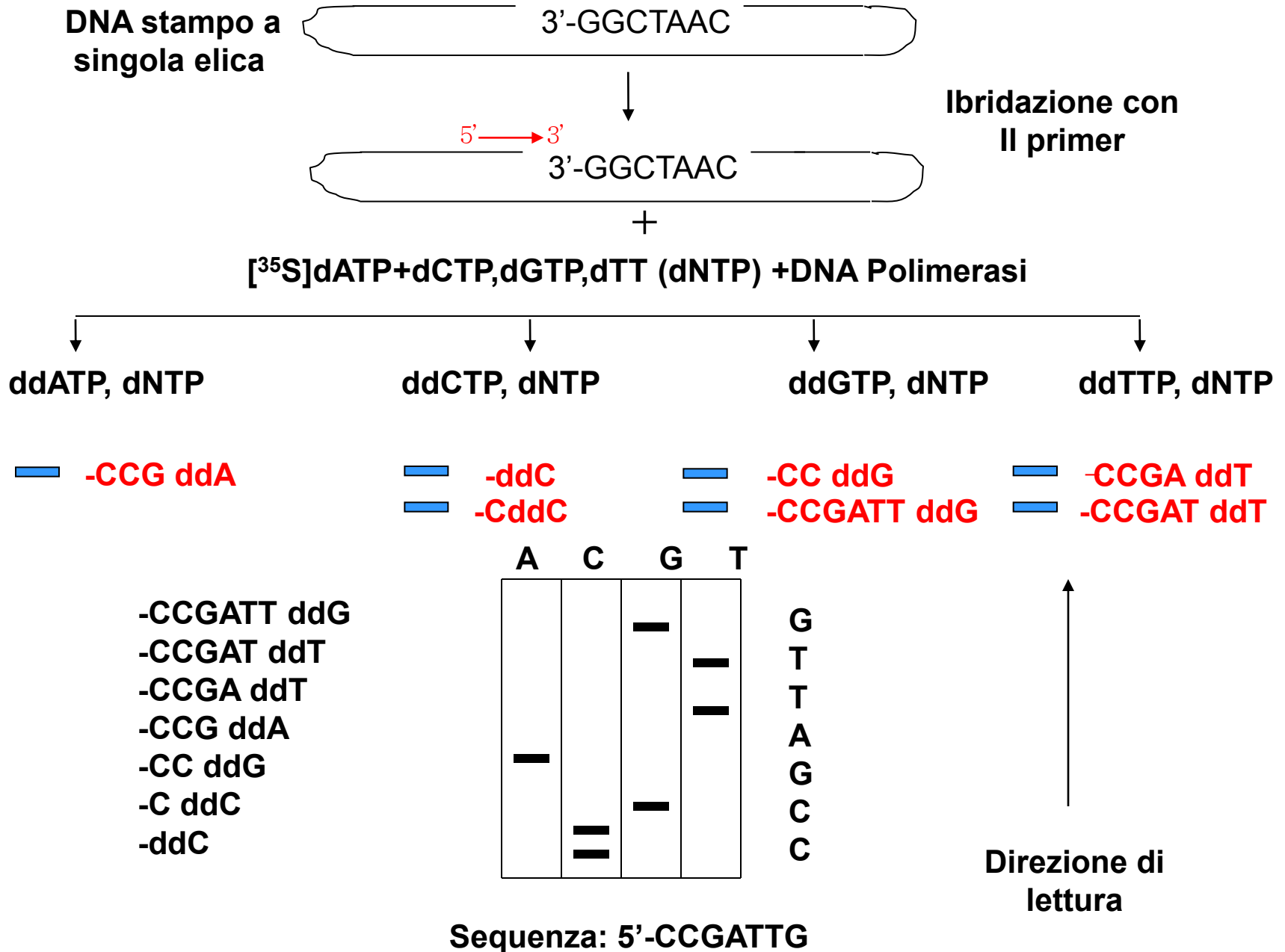
**STOP**



**Il risultato è una serie di frammenti interrotti ciascuno in corrispondenza di ogni ddCTP**

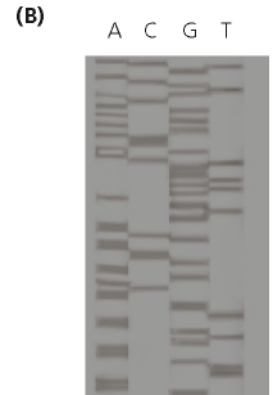
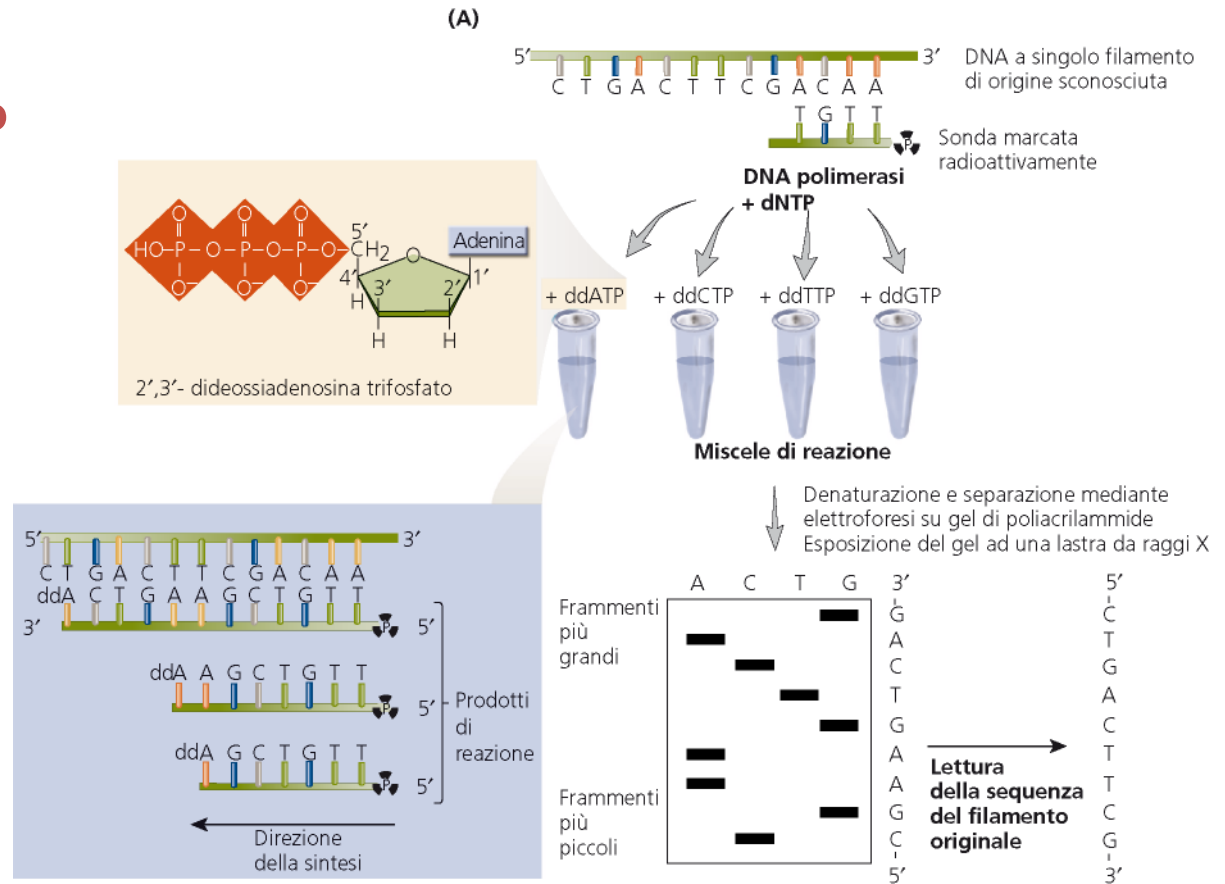


# Schema di sequenziamento a terminazione di catena



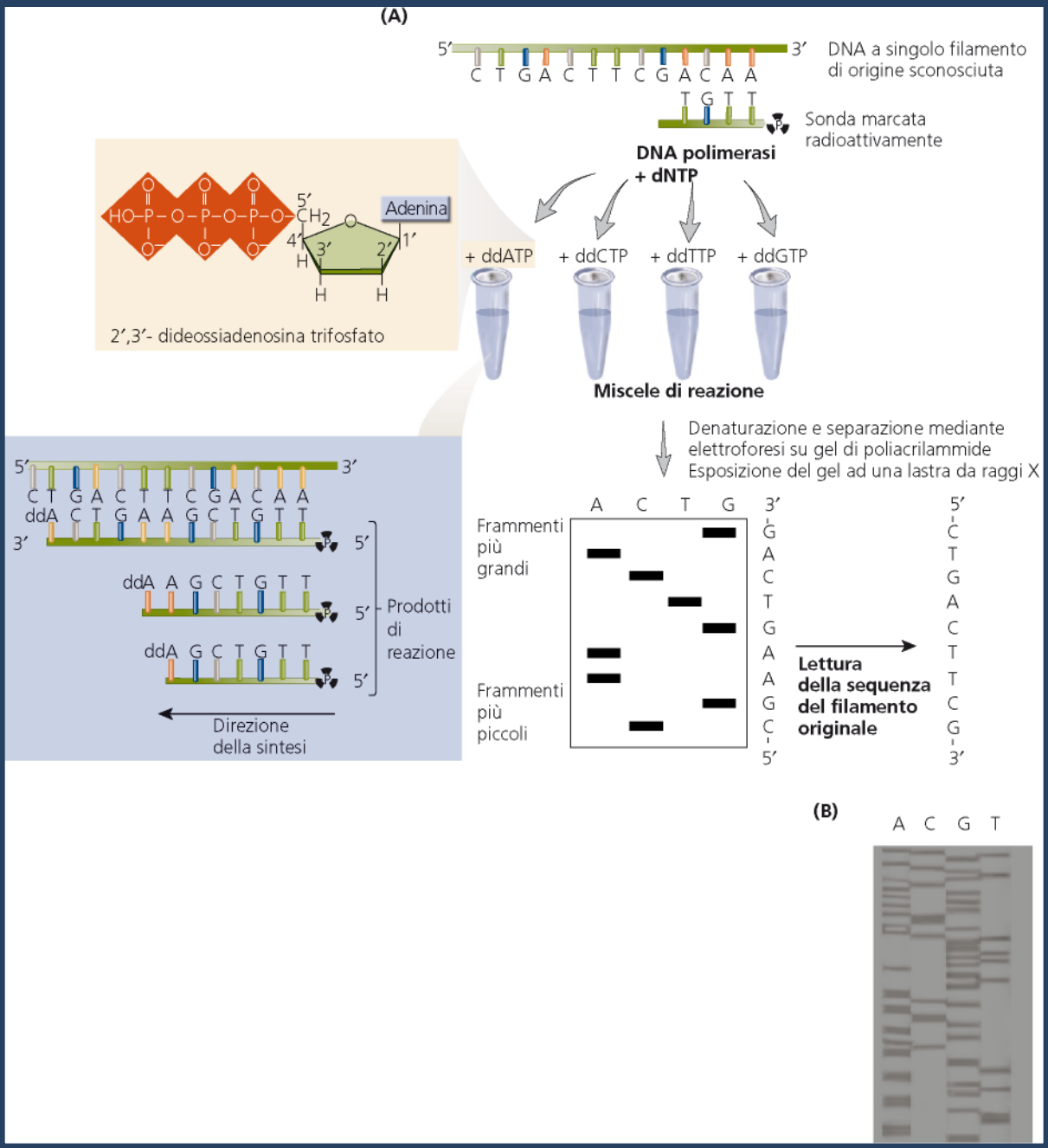
- Le diverse catene polinucleotidiche neosintetizzate migreranno nel gel verso l'anodo in funzione della loro lunghezza e possono essere facilmente localizzate, poichè radioattive, per autoradiografia. Si possono così evidenziare centinaia di bande e separare catene che differiscono di *un solo nucleotide*.
- Nelle 4 corsie del gel le bande si disporranno in ordine di lunghezza dal fondo verso la zona di deposizione.
- Dalla successione di tutte le bande presenti nelle 4 corsie del gel si può risalire alla sequenza del frammento di DNA usato come stampo.

# Metodo di sequenziamento del DNA "dideossi" di Sanger





# Metodo di sequenziamento del DNA "dideossi" di Sanger



- Alla rilevazione per autoradiografia si può sostituire una rilevazione con marcatori fluorescenti di quattro colori diversi legati all'estremità 5' del primer. Si incubano i primer di colore diverso per ciascuna delle quattro frazioni. Al termine dell'incubazione si mescolano le quattro frazioni e si fanno correre in un unico pozzetto. Si otterranno sul tracciato bande fluorescenti di colori diversi, che identificano la base con cui termina ciascun frammento. Questa modalità ha consentito di mettere a punto metodi di sequenziamento automatizzato del DNA, nei quali si effettua una scansione del gel con un raggio laser che eccita i fluorofori e si rilevano e registrano le diverse colorazioni delle singole bande.
- Ciò consente di esaminare in un unico gel più campioni, ognuno in una diversa corsia, di identificare per ogni campione la sequenza di diverse centinaia di basi, di paragonare tra loro diversi campioni.

# Sequenziamento automatizzato con marcatori fluorescenti

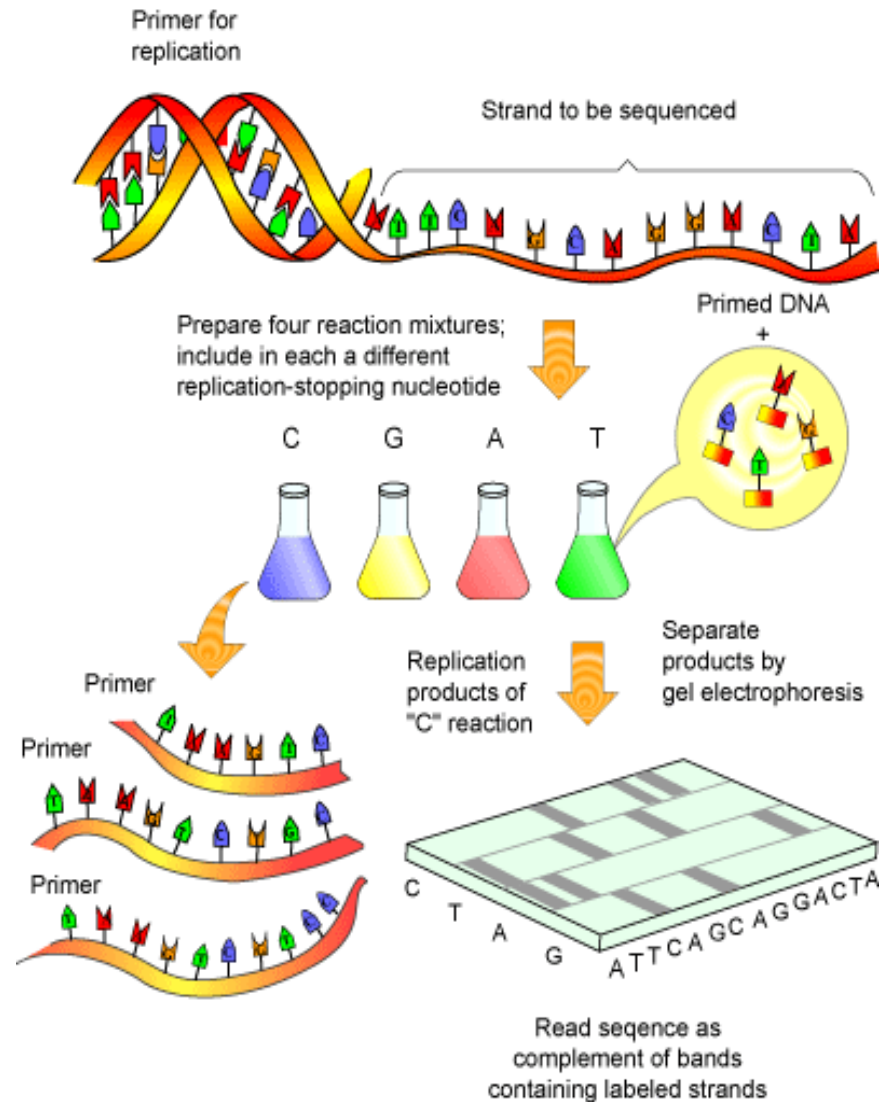
Coniugando a ciascun ddNTP un diverso marcatore fluorescente, è possibile effettuare le quattro reazioni di sequenziamento in un unico tubo da saggio e caricare il tutto in solo pozzetto di gel

ddA 

ddT 

ddC 

ddG 

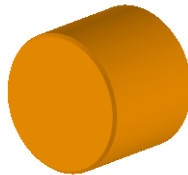


# *Detection of Fluorescently Tagged DNA*

**DNA Fragments Separated by Electrophoresis**



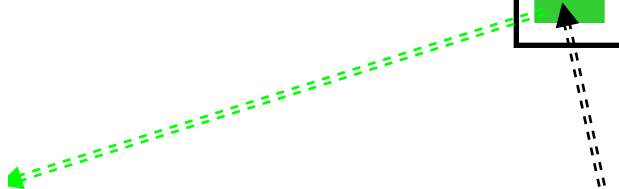
**Optical Detection System**



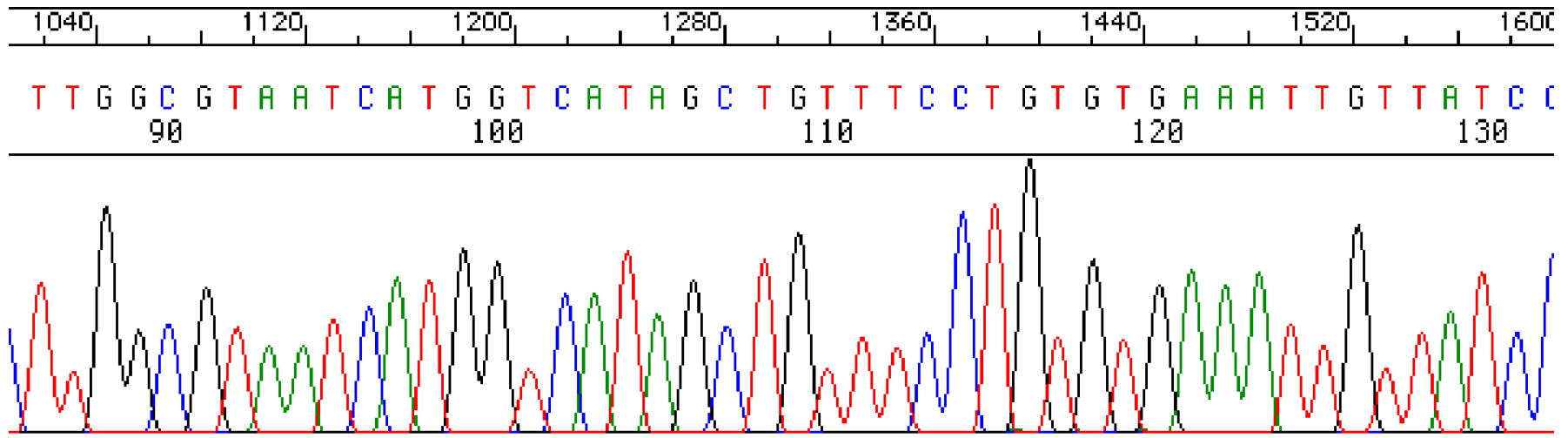
**Output to Computer**



**Scanning Laser Excites Fluorescent Dyes**

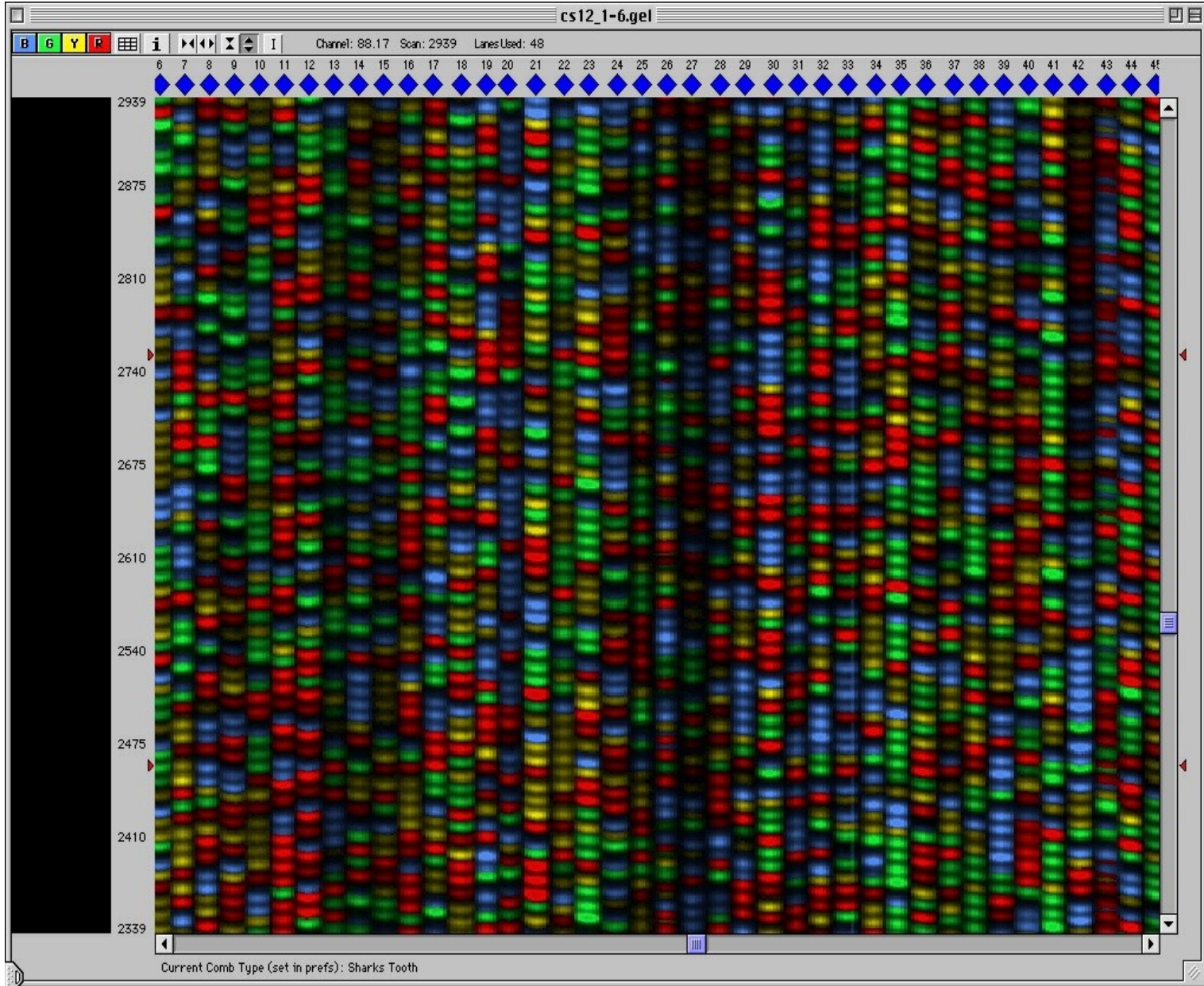


Le emissioni fluorescenti vengono captate da un rilevatore e le informazioni vengono integrate e trasformate in picchi di colore diverso, con aree proporzionali all'intensità di emissione.



eleetroferogramma

# Fluorescent DNA Sequencing Data



# Metodo di Sequenziamento di Maxam e Gilbert

« Marcatura terminale al 5' o al 3' del DNA a doppio filamento

« Denaturazione e separazione dei due filamenti

« DNA a singola elica viene suddiviso in quattro campioni, ognuno dei quali viene trattato con un reagente chimico che demolisce una o due delle 4 basi del DNA.

**G = DMS + piperidina**

**G + A = DMS + piperidina + acido formico**

**C + T = idrazina + piperidina**

**C = idrazina + piperidina in NaCl 1,5 M**

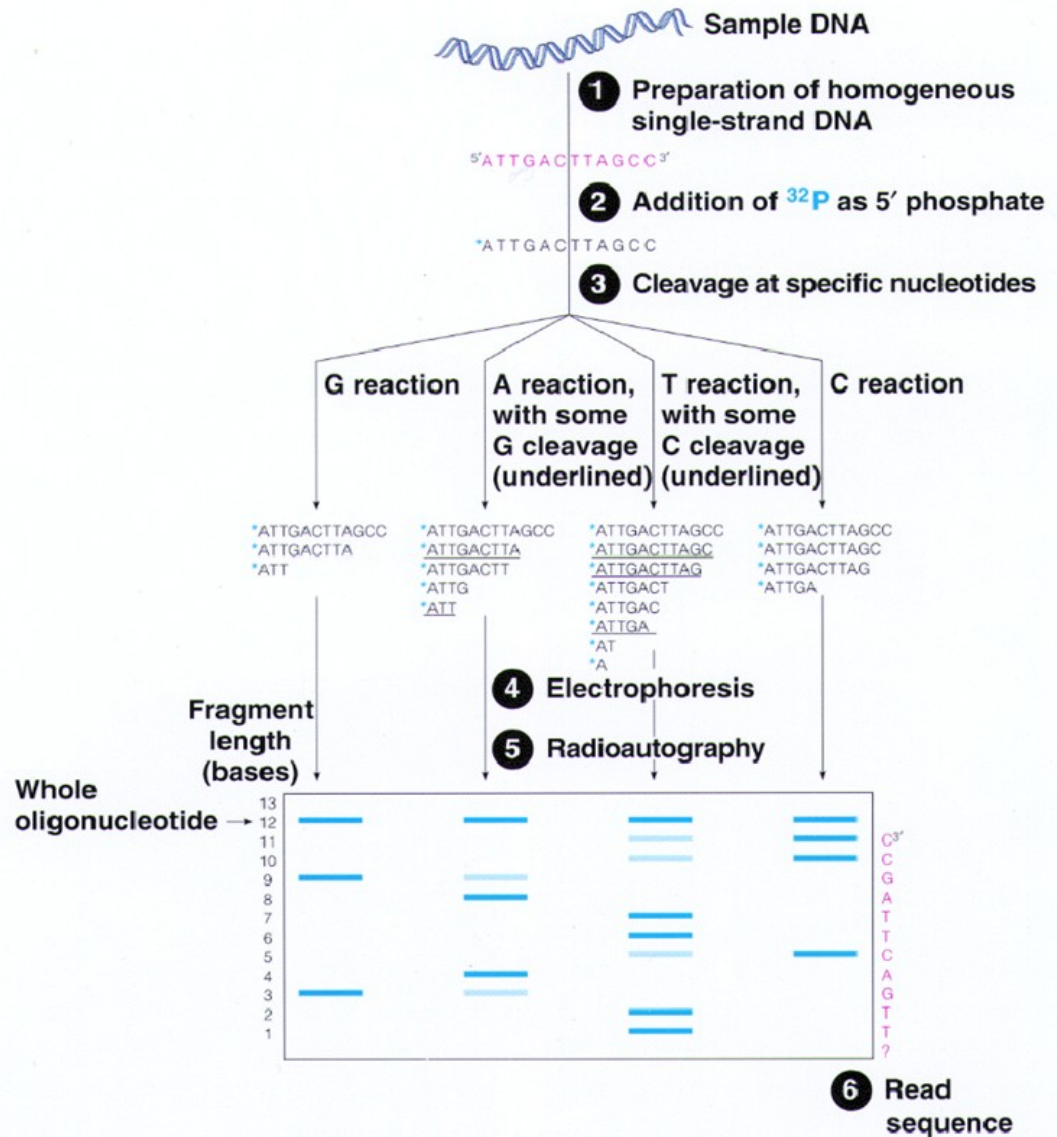
« Le reazioni sono controllate in modo da avere una frammentazione parziale: statisticamente tutte le possibili basi saranno degradate producendo una serie di frammenti la cui lunghezza dipenderà dalla distanza tra l'estremità marcata e il sito di taglio

« Separazione dei frammenti marcati mediante gel elettroforesi e

« Visualizzazione dei risultati mediante autoradiografia

# Metodo di Sequenziamento chimico secondo Maxam e Gilbert

Figure 4A.4 Sequencing an oligonucleotide by the Maxam-Gilbert method

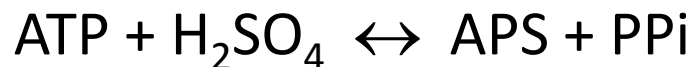




- ❖ Un altro metodo per la determinazione della sequenza, attualmente di larga diffusione, è quello definito ***Pyrosequencing*** od anche *sequenziamento per sintesi*. La prima denominazione che è un termine brevettato deriva dal fatto che l'analisi sfrutta la liberazione di pirofosfato che si ha quando la DNA polimerasi reagisce con un nucleoside trifosfato e lega un nucleotide ad una catena polinucleotidica in accrescimento.
- ❖ Come nel metodo di Sanger, si opera su un segmento di DNA a singolo filamento che agisce come template per la sintesi di una

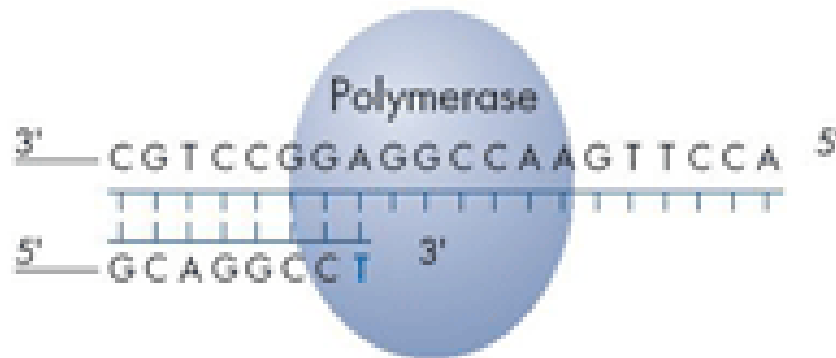
- ❖ Le tappe del pyrosequencing possono essere riassunte come segue:
  - ✓ il DNA di cui si vuole determinare la sequenza viene ridotto in frammenti di un centinaio di paia di basi e denaturato così da formare DNA a singolo filamento che sarà il template;
  - ✓ al frammento di ssDNA viene aggiunto un primer e quindi un cocktail di enzimi e di substrati  $\Rightarrow$  DNA polimerasi, ATP solforilasi, apirasi, luciferasi, adenosinfosfosolfato (APS) e luciferina;
  - ✓ si dà quindi inizio alla reazione di sintesi aggiungendo in successione, separatamente, uno dei 4 dNTP.

Reazione catalizzata della ATP solforilasi:



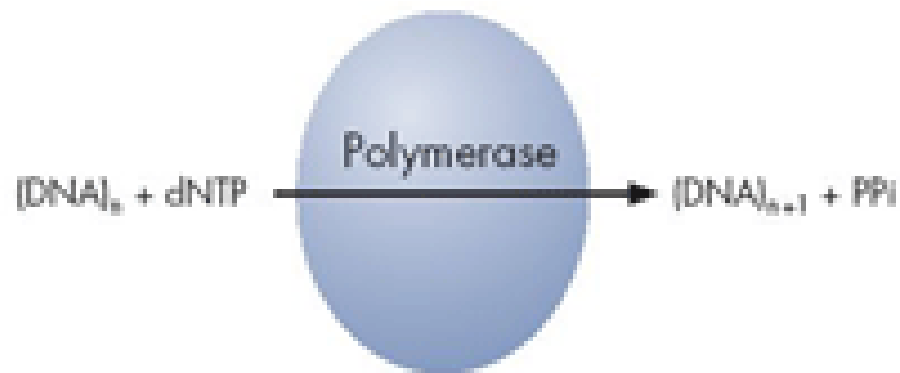
- **Step 1**

A sequencing primer is hybridized to a single-stranded PCR amplicon that serves as a template, and incubated with the enzymes, DNA polymerase, ATP sulfurylase, luciferase, and apyrase as well as the substrates, adenosine 5' phosphosulfate (APS), and luciferin.



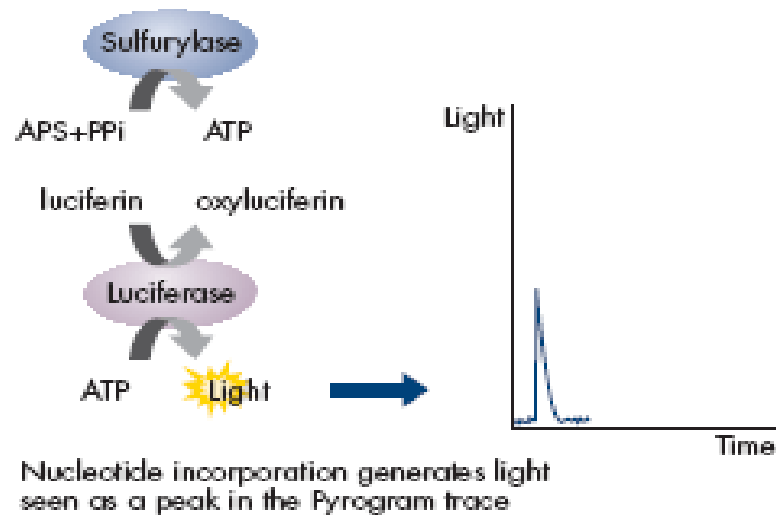
- **Step 2**

The first deoxribonucleotide triphosphate (dNTP) is added to the reaction. DNA polymerase catalyzes the incorporation of the dNTP into the DNA strand, if it is complementary to the base in the template strand. Each incorporation event is accompanied by release of pyrophosphate (PPi) in a quantity equimolar to the amount of incorporated nucleotide.



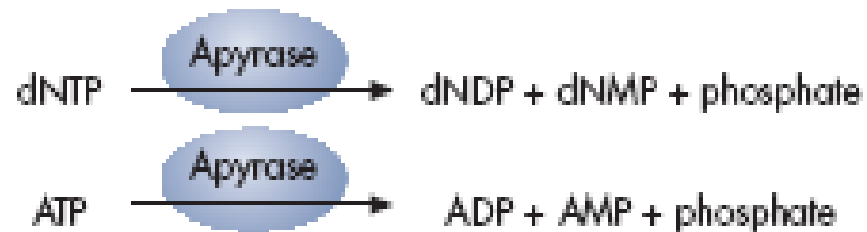
- **Step 3**

ATP sulfurylase converts PPI to ATP in the presence of adenosine 5' phosphosulfate (APS). This ATP drives the luciferase-mediated conversion of luciferin to oxyluciferin that generates visible light in amounts that are proportional to the amount of ATP. The light produced in the luciferase-catalyzed reaction is detected by a charge coupled device (CCD) chip and seen as a peak in the raw data output (Pyrogram). The height of each peak (light signal) is proportional to the number of nucleotides incorporated.



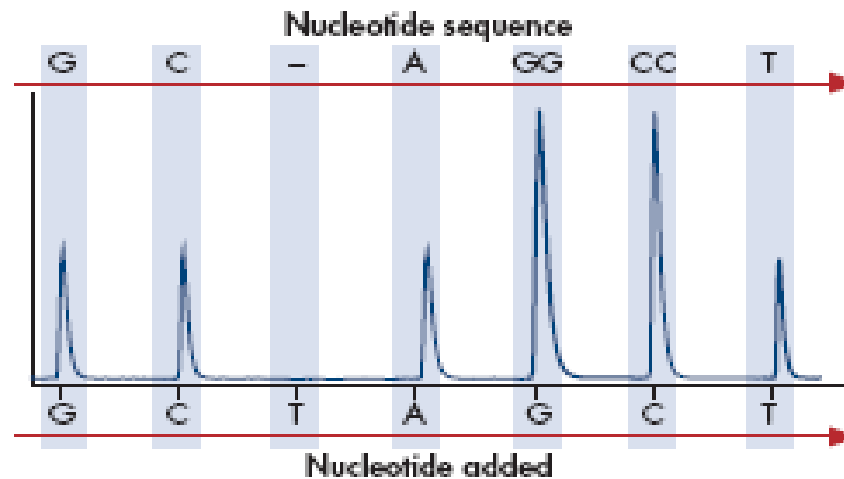
- **Step 4**

Apyrase, a nucleotide-degrading enzyme, continuously degrades unincorporated nucleotides and ATP. When degradation is complete, another nucleotide is added.

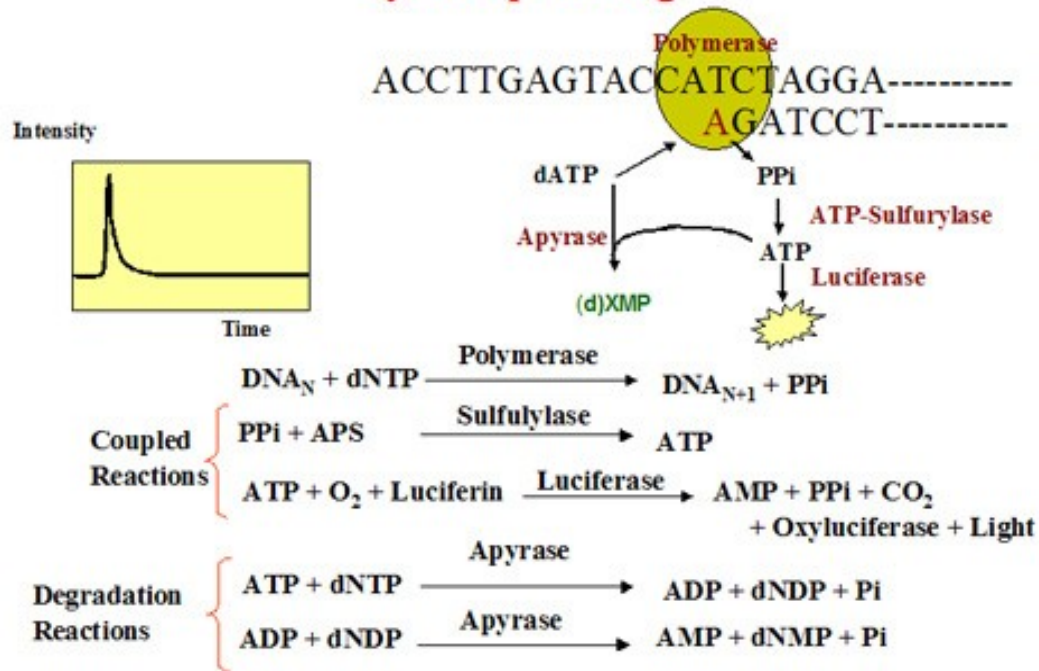


- **Step 5**

Addition of dNTPs is performed sequentially. It should be noted that deoxyadenosine  $\alpha$ -thio triphosphate (dATP-S) is used as a substitute for the natural deoxyadenosine triphosphate (dATP) since it is efficiently used by the DNA polymerase, but not recognized by the luciferase. As the process continues, the complementary DNA strand is built up and the nucleotide sequence is determined from the signal peaks in the Pyrogram trace.

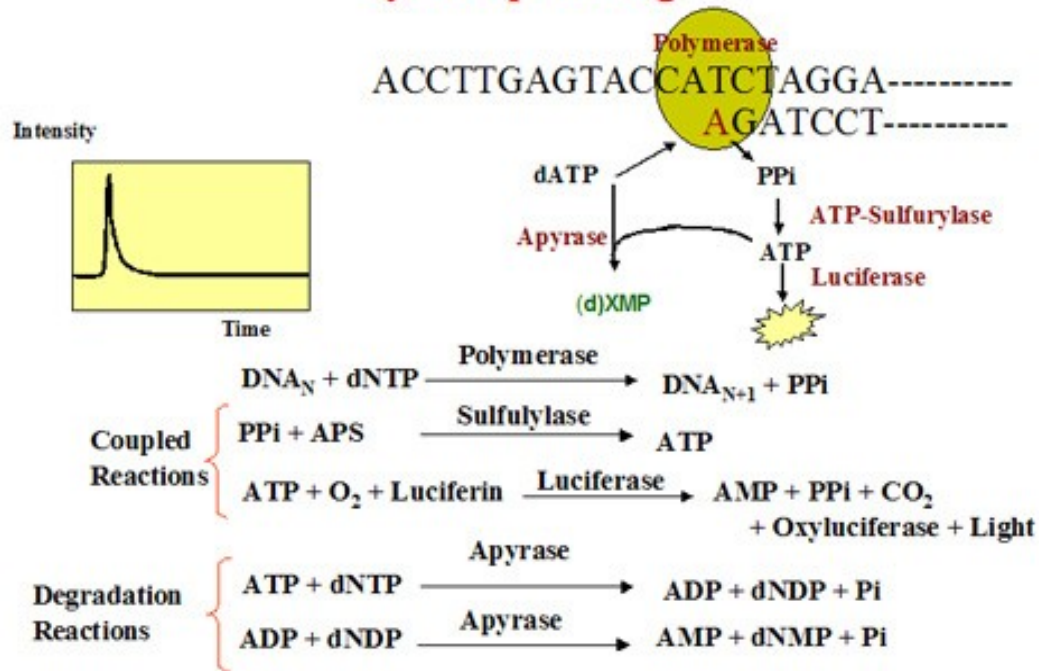


# Pyrosequencing





# Pyrosequencing

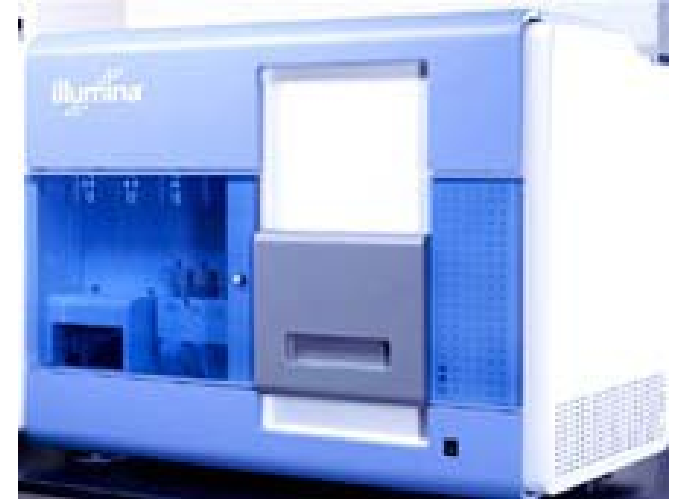


- Il pyrosequencing ha notevoli vantaggi perchè non necessita l'utilizzo di dNTP marcati, ne di ddNTs, e non è necessaria la separazione elettroforetica dei frammenti.
- Il metodo è stato automatizzato e sono stati messi a punto sequenziatori che effettuano le determinazioni su molti campioni in parallelo, utilizzando DNA chip; in pratica in ciascun pozzetto è fissato un frammento di ssDNA. Il succedersi delle reazioni che avvengono contemporaneamente in tutti i pozzetti, il rilevamento, l'analisi e l'elaborazione dei risultati è gestito da un software dedicato, che riporta i dati in programmi od in tabulati riferiti a ciascun campione.
- Con queste strumentazioni è possibile determinare in poche ore sequenze geniche di milioni di paia di basi.
- E' anche possibile anche effettuare contemporaneamente un'analisi comparativa di DNA di origine diversa, e rilevare con facilità mutazioni di singole basi.

# What is Next-Generation Sequencing?

❖ One can sequence hundreds of millions of short sequences (35bp-100bp) in a single run

- **Illumina/Solexa GA II / HiSeq 2000**
- **Life Technologies/Applied Biosystems SOLiD**
- Roche/454 FLX, Tita
- Helicos



## **Illumina was founded in April 1998**

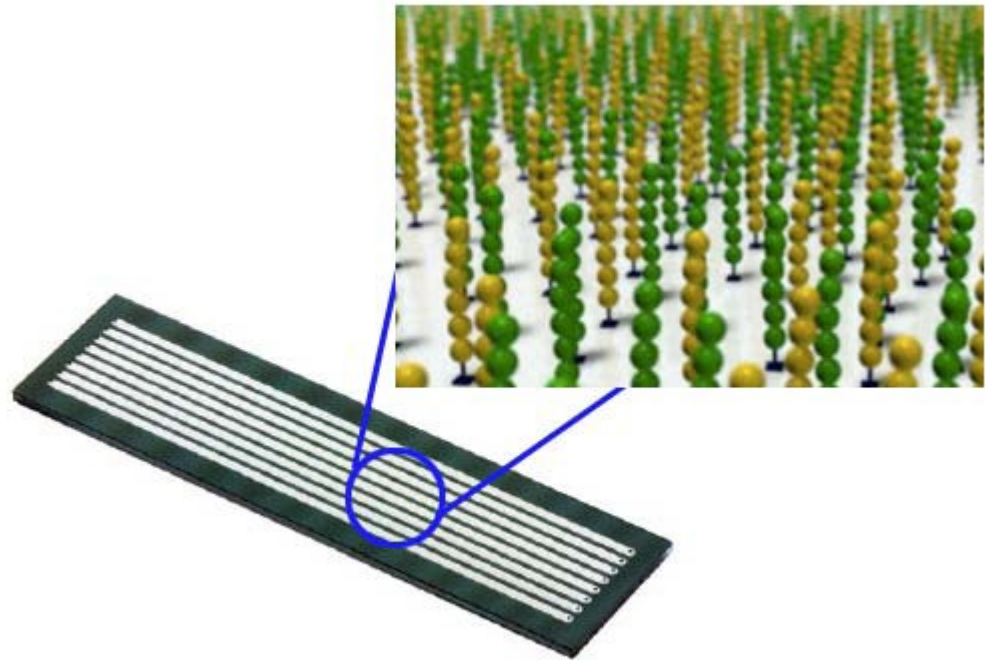
- Illumina sells a number of very high-throughput [DNA sequencing](#) systems, [DNA sequencers](#), based on technology developed by Solexa. The technology features bridge amplification to generate clusters and reversible terminators for sequence determination. The technology behind these sequencing systems involves ligation of fragmented DNA to a chip, followed by primer addition and sequential fluorescent [dNTP](#) incorporation and detection.

# Illumina sequencing technology

- **Library preparation:** il DNA è frammentato, adenilato, oligonucleotidi adattatori sono legati a ciascuna estremità; i frammenti sono selezionati in base alle dimensioni e purificati.
- **Cluster amplification:** i frammenti di DNA a singolo filamento sono isotermicamente amplificate in celle di flusso per prepararle al sequenziamento. Le celle di flusso hanno degli oligonucleotidi legati, che si ibridizzano agli adattatori dei frammenti di DNA. Amplificazione del DNA: produzione di copie di DNA covalentemente legate alle celle. Ogni copia della libreria è amplificata attraverso una serie di estensioni e di amplificazioni isotermiche a ponte. I filamenti “reverse” vengono tagliati ed eliminati mediante lavaggio. Le estremità libere dei singoli filamenti di DNA nelle celle vengono bloccati.

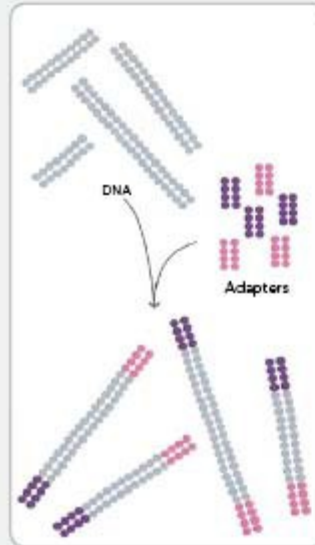
# Illumina Genome Analyzer

- ❑ 1 “flow cell” = 8 “lanes”
- ❑ 1 lane = ~10-30 million “reads”
- ❑ ~5-20 million “mapped reads”
- ❑ 36bp, 50bp, 75bp, 100bp
- ❑ Single-end (SE) or Paired-ends (PE)
  
- ❑ 1 lane: \$800-\$2000
- ❑ Multiplexing



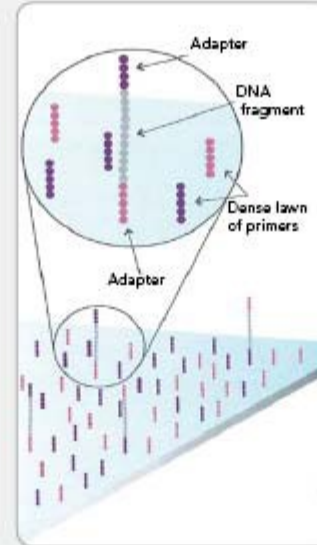
# ILLUMINA: Sequencing-by-synthesis

1. PREPARE GENOMIC DNA SAMPLE



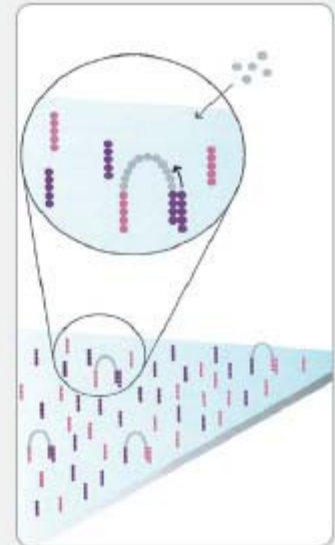
Randomly fragment genomic DNA and ligate adapters to both ends of the fragments.

2. ATTACH DNA TO SURFACE



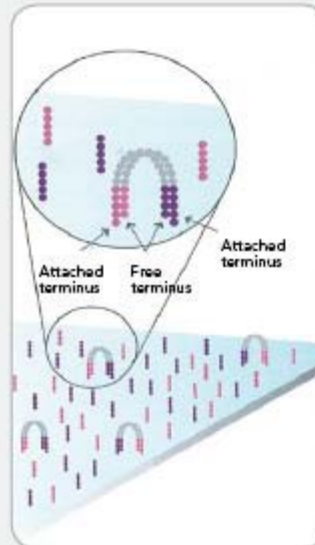
Bind single-stranded fragments randomly to the inside surface of the flow cell channels.

3. BRIDGE AMPLIFICATION



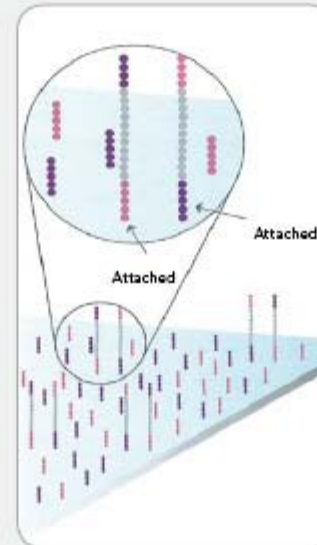
Add unlabeled nucleotides and enzyme to initiate solid-phase bridge amplification.

4. FRAGMENTS BECOME DOUBLE STRANDED



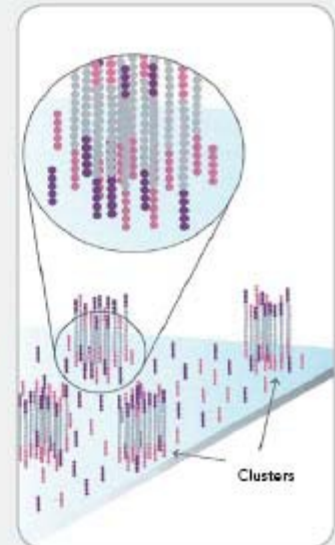
The enzyme incorporates nucleotides to build double-stranded bridges on the solid-phase substrate.

5. DENATURE THE DOUBLE-STRANDED MOLECULES



Denaturation leaves single-stranded templates anchored to the substrate.

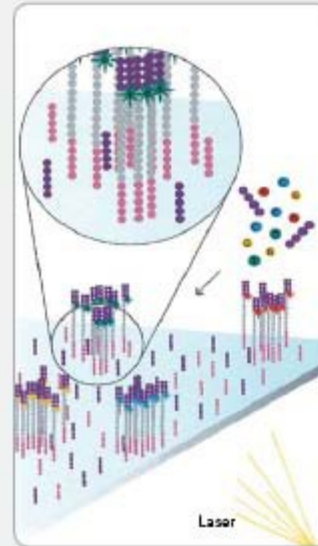
6. COMPLETE AMPLIFICATION



Several million dense clusters of double-stranded DNA are generated in each channel of the flow cell.

# Illumina: Sequencing-by- synthesis

## 7. DETERMINE FIRST BASE



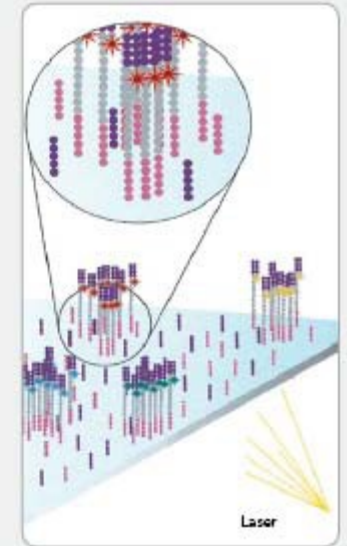
First chemistry cycle: to initiate the first sequencing cycle, add all four labeled reversible terminators, primers and DNA polymerase enzyme to the flow cell.

## 8. IMAGE FIRST BASE



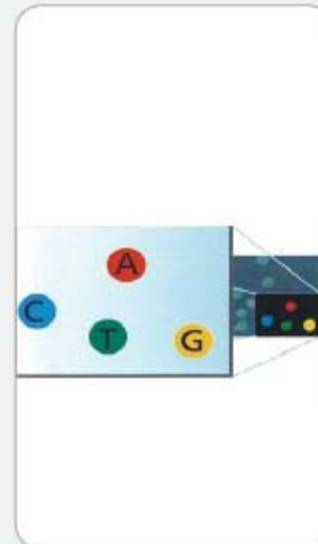
After laser excitation, capture the image of emitted fluorescence from each cluster on the flow cell. Record the identity of the first base for each cluster.

## 9. DETERMINE SECOND BASE



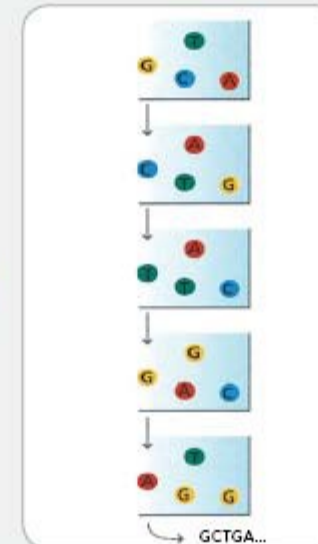
Second chemistry cycle: to initiate the next sequencing cycle, add all four labeled reversible terminators and enzyme to the flow cell.

## 10. IMAGE SECOND CHEMISTRY CYCLE



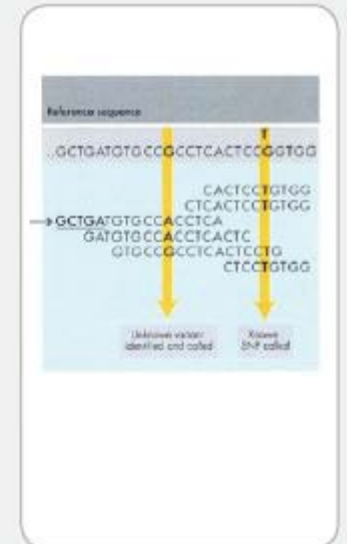
After laser excitation, collect the image data as before. Record the identity of the second base for each cluster.

## 11. SEQUENCE READS OVER MULTIPLE CHEMISTRY CYCLES



Repeat cycles of sequencing to determine the sequence of bases in a given fragment a single base at a time.

## 12. ALIGN DATA



Align data, compare to a reference, and identify sequence differences.



# Illumina sequencing technology

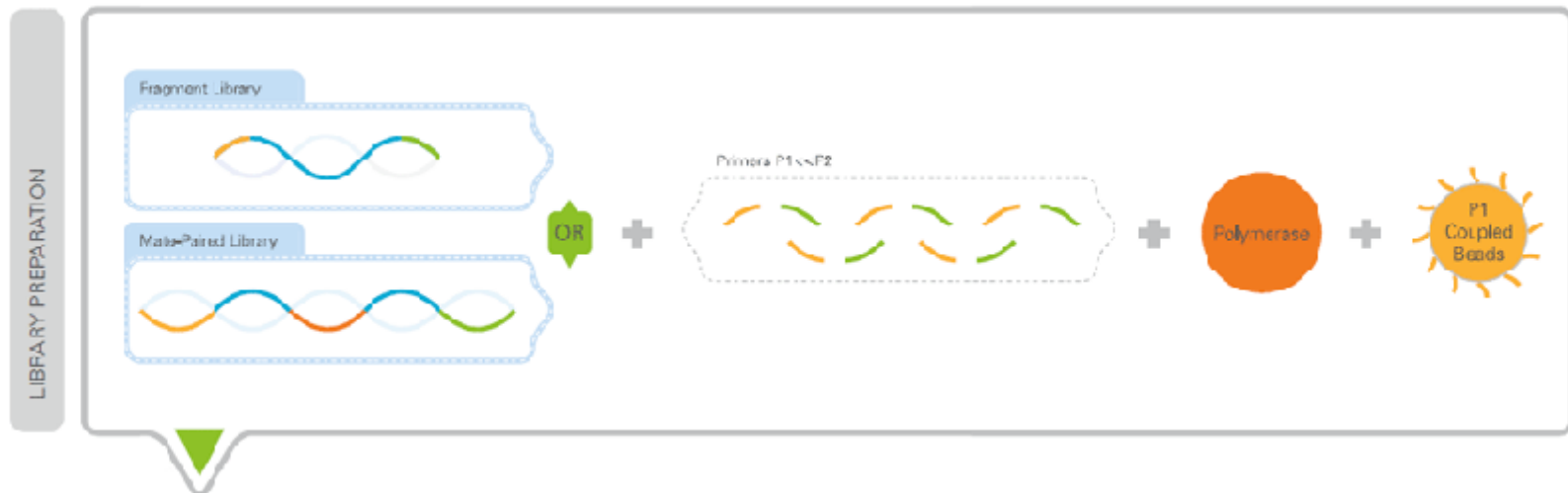
- **Sequencing**: appaiamento dei primers ai frammenti DNA. Estensione dei primers usando i 4 dNPT con legati 4 fluorofori. La fluorescenza è rilevabile mediante l'eccitazione con un raggio laser. Rimozione del blocco reversibile al 3' OH, così che può venir legato un nuovo nucleotide fluorescente.
- I quattro nucleotidi fluorescenti competono per il legame.

# ABI SOLiD (Seq by Oligo Ligation/Detection)

- Clonal bead library via emulsion PCR.
- The actual base detection is no longer done by the polymerase-driven incorporation of labeled dideoxy terminators.
- SOLiD uses a mixture of labeled oligonucleotides and queries the input strand with ligase.
- Each base is interrogated twice:
  - built-in error checking capability that distinguishes between measurement errors and true polymorphisms;
  - detection of more complicated variations.

# Overview of ABI SOLiD™ Sequencing Chemistry

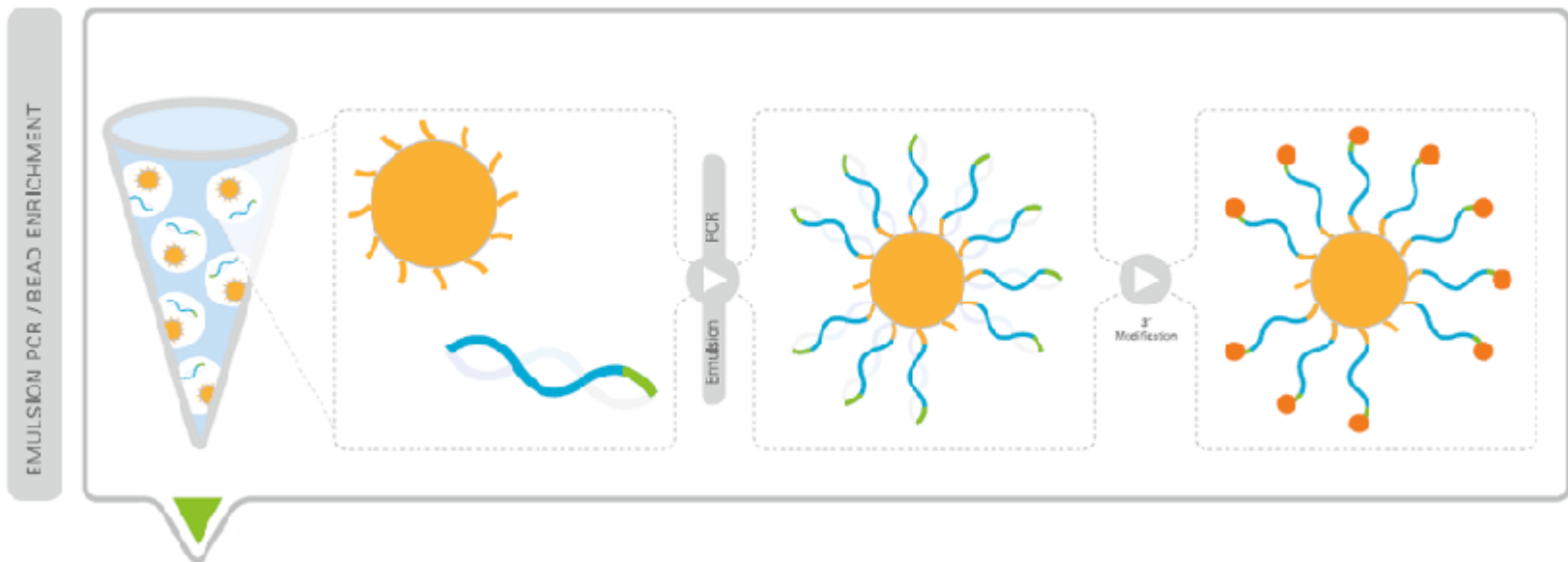
- **Library Preparation** Prepare one of the two types of libraries for SOLiD™ System sequencing—fragment or mate-paired. Your choice of library depends on the application you're performing and the information you



## Emulsion PCR/Bead Enrichment

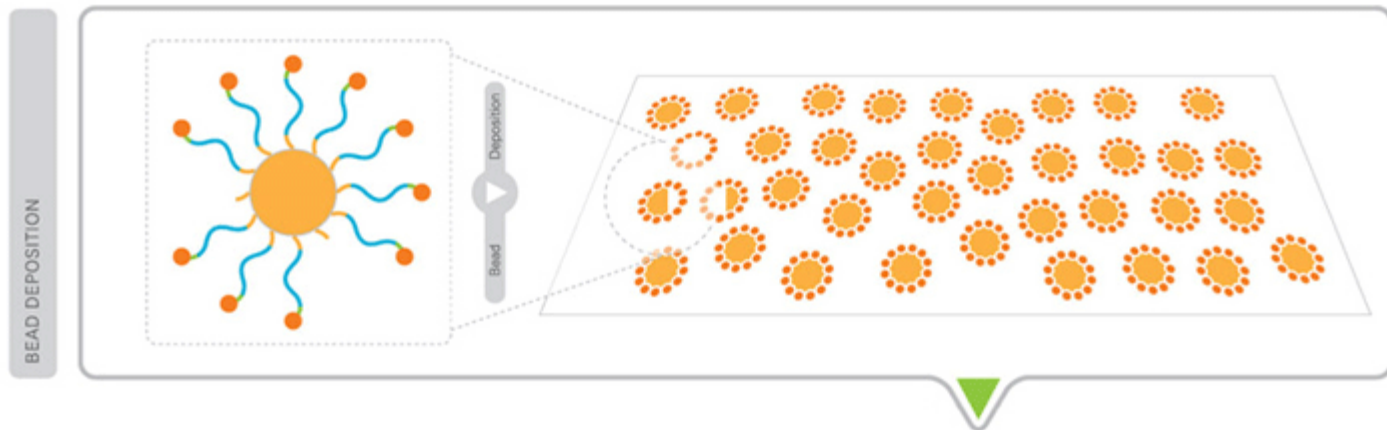
Prepare clonal bead populations in microreactors containing template, PCR reaction components, beads, and primers.

After PCR, denature the templates and perform bead enrichment to separate beads with extended templates from undesired beads. The template on the selected beads undergoes a 3' modification to allow covalent attachment to the slide.



## Bead Deposition

Deposit 3' modified beads onto a glass slide. During bead loading, deposition chambers enable you to segment a slide into one, four, or eight sections. A key advantage of the system is the ability to accommodate increasing densities of beads per slide, resulting in a higher level of throughput from the same system.



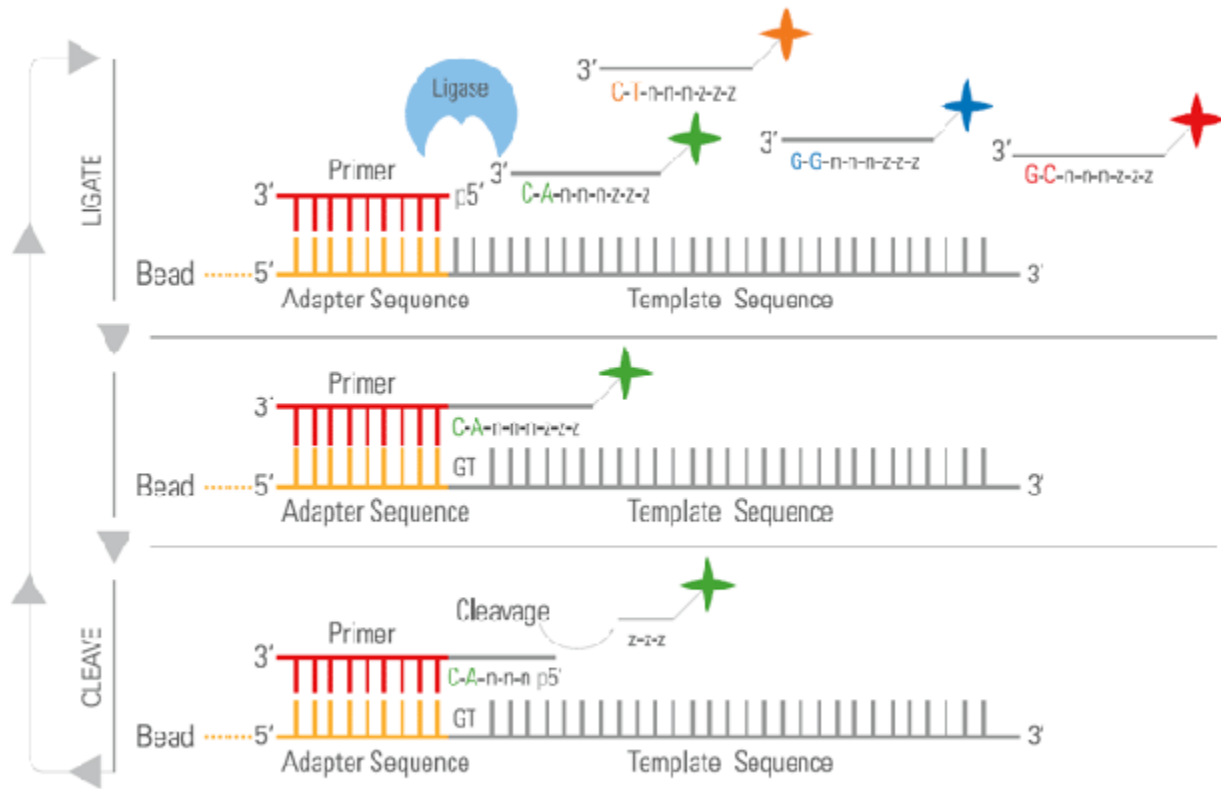
## Sequencing by Ligation

Primers hybridize to the P1 adapter sequence on the templated beads .

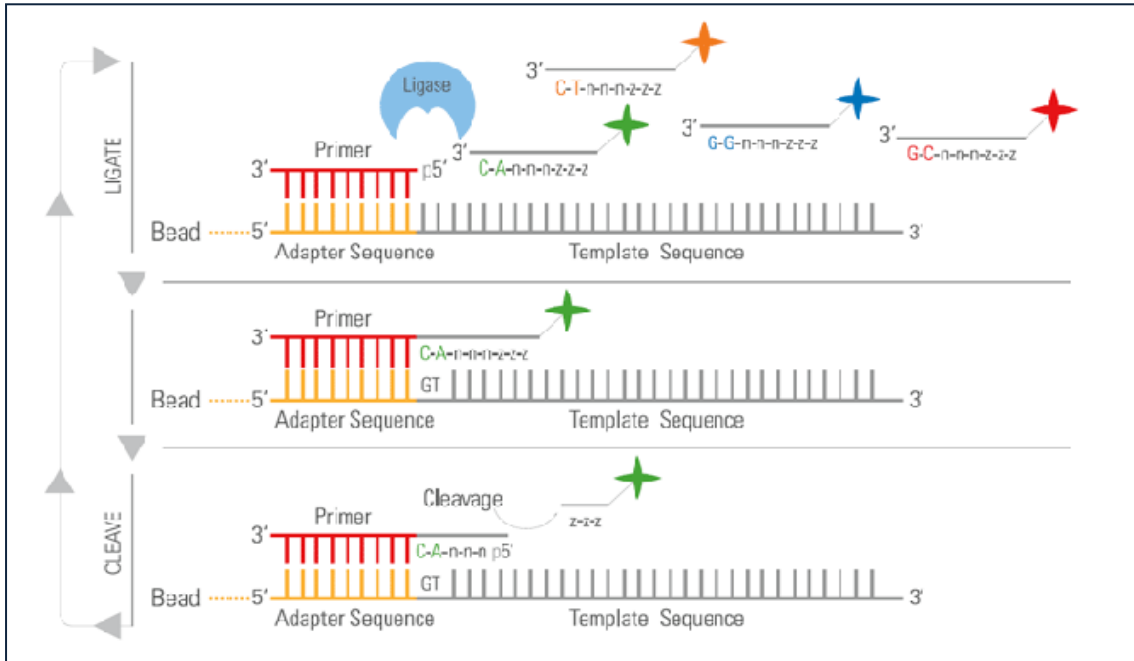
A set of four fluorescently labeled di-base probes compete for ligation to the sequencing primer. Specificity of the di-base probe is achieved by interrogating every 1st and 2nd base in each ligation reaction.

Multiple cycles of ligation, detection and cleavage are performed with the number of cycles determining the eventual read length.

Following a series of ligation cycles, the extension product is removed and the template is reset with a primer complementary to the n-1 position for a second round of ligation cycles.



# SOLiD Technology



Ligation-based chemistry with dibase labelled probes

Oligos:

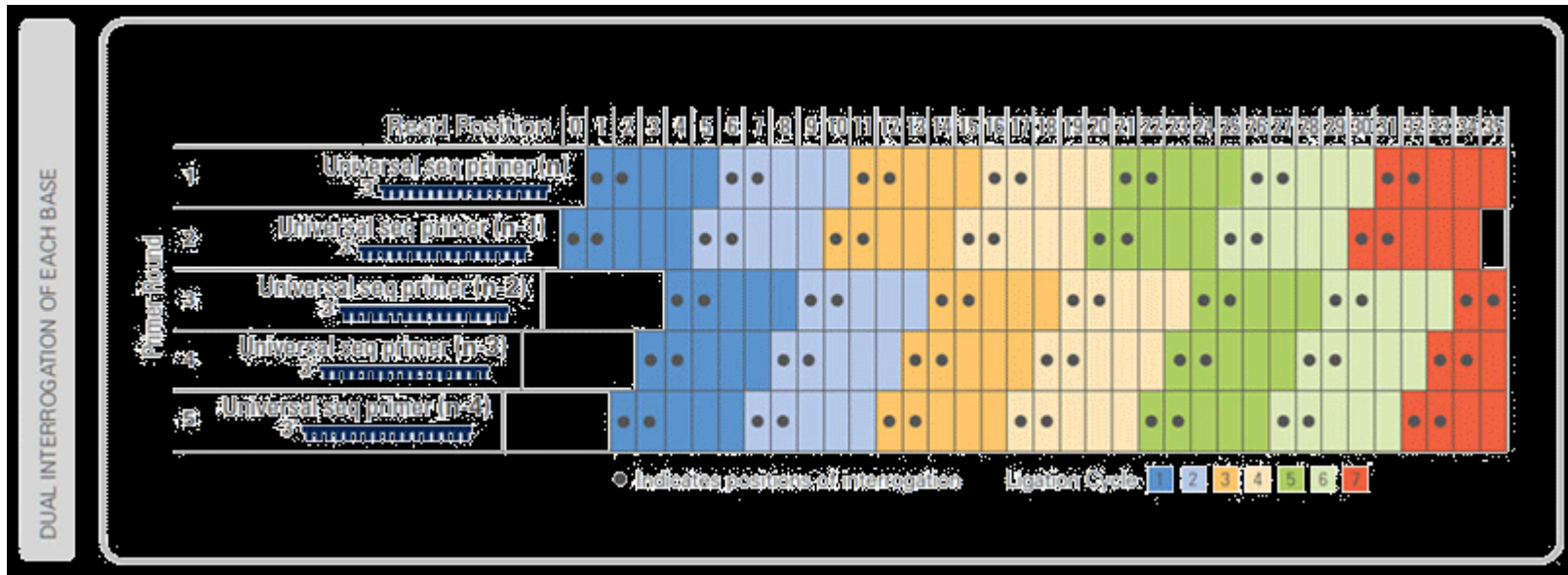
- Positions 1-2 (from 3' side): one of 16 dinucleotides
- Positions 3-5: degenerate (Ns)
- Positions 6-5': degenerate and holds one of four fluorescent dyes
- 5-7 ligation reactions are followed by a reset cycle
- Next a new initial primer is used that is N-1 in length



## **Primer Reset**

Five rounds of primer reset are completed for each sequence tag . Through the primer reset process, virtually every base is interrogated in two independent ligation reactions by two different primers.

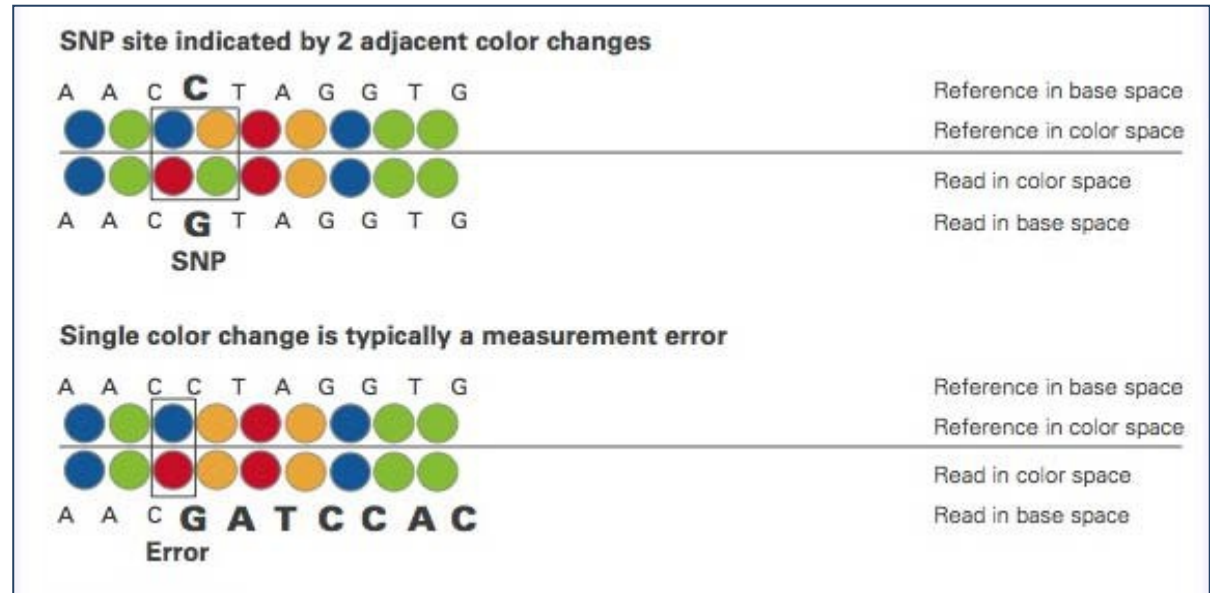
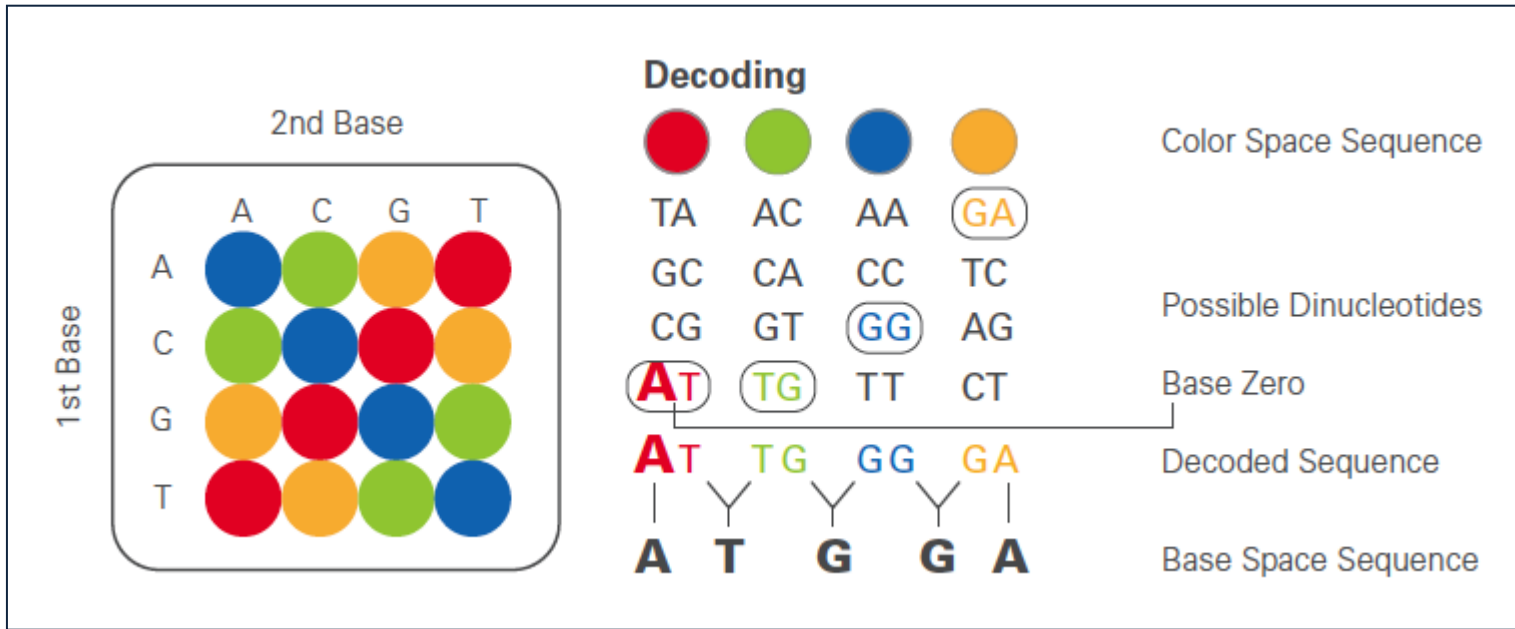
For example, the base at read position 5 is assayed by primer number 2 in ligation cycle 2 and by primer number 3 in ligation cycle 1. This dual interrogation is fundamental to the unmatched accuracy characterized by the SOLiD™ System.



## Exact Call Chemistry

Up to 99.99% accuracy is achieved with the Exact Call Chemistry Module by sequencing with an additional primer using a multi-base encoding scheme.

# Working in “Colorspace”



# Latest Platforms:

## ILLUMINA HiSeq:

- ~1 billion clusters
- 30x coverage of two human genomes in a single run
- ~10K per sample?
- 1 x 35bp: ~1.5 days, ~30Gb
- 2 x 50bp: ~4 days, 75-100Gb
- 2 x 100bp: ~8 days, 150-200Gb

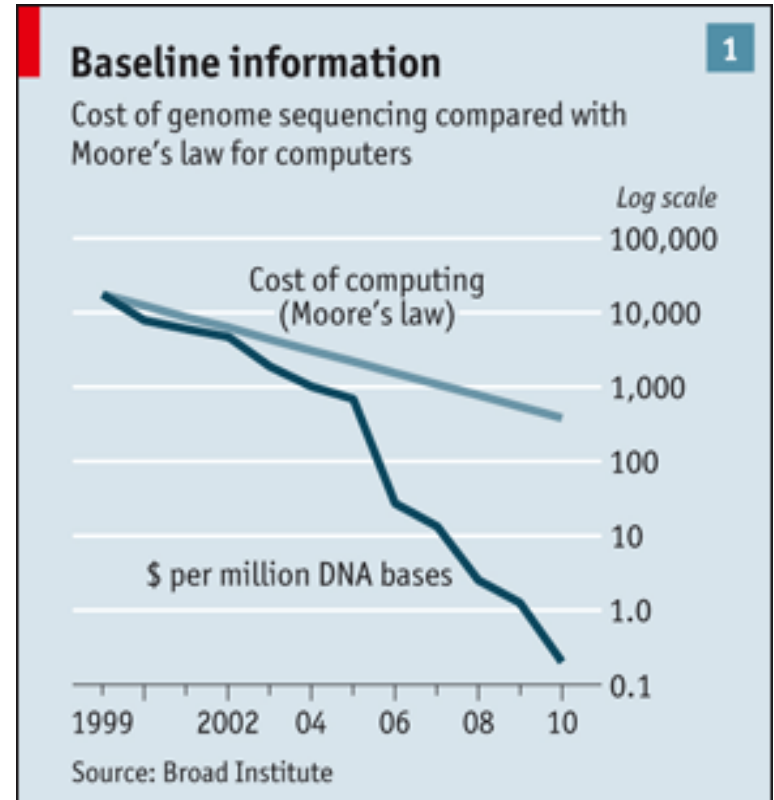


## SOLiD 5500xl:

- With microbeads or nanobeads
- 20-45 Gb/day
- 12 lanes
- Similar run times as HiSeq
- Up to 180-300Gb per run

# Rapid Decrease in Cost

- The Human Genome Project: 13 years and \$3 billion.
- Sequencing of the Watson Genome by 454 in 2007: \$2 million
- Illumina: eight days at a cost of about \$10,000.
- ~10<sup>4</sup> reduction in 5 yrs
- Claims: a genome in 15 minutes for \$1000?



## Campi di applicazione delle piattaforme NGS

- Sequenziamento *de novo* e risequenziamento di genomi completi.
- Identificazione di siti polimorfici e mutazioni.
- Analisi su larga scala del trascrittoma.
- Mappaggio su scala genomica di siti di interazione tra DNA (RNA) e proteine ed analisi epigenetiche dell'intero genoma.
- Caratterizzazione del metiloma e studio dell'editing.
- Analisi metagenomiche.