



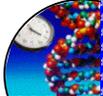
GENEDIA S.R.L.

Divisione Biomolecolare

INTRODUZIONE ALLA



REAL TIME



GENEDIA SRL: VIA LOMBARDA, 169/A - 55013 LAMMARI (LU) - TEL./FAX 0583962672 - EMAIL: info@genedia.it
LAB. RICERCA E SVILUPPO: TRAV. PIETRAVALLE, 11- 80100 NAPOLI - TEL./FAX 0815465026 - EMAIL: ricercanapoli@genedia.it

INTRODUZIONE ALLA REAL TIME PCR™

PREMESSA

La possibilità di condurre rapide analisi del DNA al fine di definire la presenza di mutazioni, oppure la quantità di un determinato gene, o di Dna e/o Rna estraneo in un campione biologico, diventa ogni giorno di più, per la diagnostica clinica di laboratorio, una necessità. Si avverte, conseguentemente, sempre maggiore l'esigenza di aumentare la potenzialità dei test diagnostici, curandone particolarmente la semplicità operativa e la robustezza anche attraverso l'applicazione di tecnologie strumentali sempre più raffinate e possibilmente sempre più automatizzate. L'accoppiamento di nuove e sofisticate tecnologie dei sistemi di rivelazione, semplici ed affidabili nella presentazione dei risultati, con sistemi d'automazione dedicati alla Biologia Molecolare, consentiranno ben presto l'espansione di questa ormai fondamentale tecnica analitica a tutti i livelli di diagnostica clinica.

Per quanto concerne i sistemi di analisi del Dna, esistono attualmente alcune tecniche più o meno in grado di rispondere ai necessari requisiti; tra queste, forse, la più competitiva e destinata ad una rapida espansione ed integrazione con l'automazione è la REAL TIME PCR™.

LA STORIA.

La tecnologia della reazione di polimerizzazione a catena (PCR), permettendo l'amplificazione rapida e riproducibile di segmenti di DNA, è stata strumento essenziale per il progresso in biologia molecolare negli ultimi dieci anni ed ha accelerato in modo sorprendente l'acquisizione di conoscenze nell'ambito della genetica.

La tecnologia della "REAL TIME PCR™", introduce nuove possibilità poiché rende realizzabile la misurazione diretta e la quantificazione della reazione mentre l'amplificazione è in atto. Higuchi e collaboratori furono i primi ad analizzare la cinetica della PCR, costruendo un sistema che era in grado di rivelare i prodotti PCR durante il loro accumulo; questo sistema, in "tempo reale", utilizzava il colorante intercalante fluorescente etidio bromuro. Gli strumenti per Real-Time PCR™ oggi disponibili si basano in sostanza sul medesimo principio di funzionamento: i campioni vengono irradiati da una sorgente a singola o ad ampio spettro di lunghezza d'onda, e, a seconda della strategia adottata, la fluorescenza emessa dai campioni viene rilevata da una telecamera CCD, il tutto sotto controllo del computer.

I PRINCIPI.

La curva di amplificazione che deriva da una PCR, ossia il diagramma del segnale di fluorescenza ottenuto rispetto al numero di cicli, è solo teoricamente di tipo esponenziale; in realtà, dopo la prima fase esponenziale, in cui nessuno dei componenti della reazione è limitante, tende ad assumere un andamento di tipo lineare ed eventualmente raggiunge un plateau. Poiché repliche di reazioni identiche presentano efficienze di reazione diverse, la misurazione della reazione in fase finale non risulta direttamente connessa con l'ammontare iniziale di DNA target. La possibilità di seguire le reazioni in tempo reale permette di analizzarle nel momento in cui l'amplificazione è in fase esponenziale. L'andamento delle reazioni viene visualizzato in forma di un grafico nel quale per ogni DNA viene rappresentata la fluorescenza (asse y) misurata in ogni ciclo di reazione (asse x). I primi cicli della REAL TIME PCR™, in cui non è misurabile variazione nel segnale della fluorescenza, definiscono un primo importante parametro: la linea di base (baseline) della curva. Un aumento della fluorescenza oltre la linea di base indica il rilevamento del prodotto di PCR in fase di accumulo. Un secondo parametro importante è la linea-soglia: tale linea, parallela alla linea di base, deve tagliare le curve dei campioni nella loro fase di crescita esponenziale. Appare da subito chiaro quanto sia importante, ai fini della quantificazione del DNA iniziale nei campioni, un corretto posizionamento di tale linea, che può essere definita in vari modi (automatico, semi-automatico o manuale). La curva di amplificazione di ogni campione taglia la linea-soglia in un punto, chiamato ciclo-soglia (threshold cycle): il ciclo-soglia è quindi definibile come il numero del ciclo (o frazione di questo numero) in cui la curva di amplificazione del campione in fase esponenziale taglia la linea-soglia; il ciclo-soglia, al contrario di un valore misurato alla fine dell'amplificazione, è dunque un indicatore fedele della quantità iniziale di DNA: un diagramma del logaritmo delle quantità iniziali di DNA nei confronti dei valori di ciclo-soglia è una retta.

Ciò significa che, se nella reazione erano presenti campioni a quantità nota di DNA (standards) dai quali viene ricavata una retta di riferimento, diventa possibile calcolare la quantità di DNA iniziale presente in campioni oggetto di studio.

LE STRATEGIE.

La tecnologia della PCR quantitativa Real-Time legata alla fluorescenza prevede l'uso di:

- coloranti intercalanti nel DNA in grado di emettere fluorescenza, se opportunamente eccitati;
- oppure sonde ad ibridazione, di varie tipologie, legate a molecole fluorescenti "reporter" e "quencher", per un approccio sequenza-specifico.

Il principio dell'uso dei coloranti intercalanti si basa sul fatto che ad esempio il SYBR-Green I, il colorante più utilizzato, è in grado di emettere una fluorescenza 200 volte superiore se legato a DNA a doppia elica; durante la fase dell'estensione, l'enzima produce l'elica complementare innescato dai primers, ed il colorante viene intercalato nella sintesi. In questa fase viene rilevata la fluorescenza che rispecchierà la concentrazione di amplificato nella reazione. Qualora durante le reazioni di PCR avvenga un'amplificazione di DNA nonspecifica, anch'essa sarà rilevata.

Le strategie utilizzate con le sonde ad ibridazione, ad oggi, si possono classificare in tre diverse categorie:

- saggi cosiddetti "cleavage based" che comportano un taglio enzimatico della sonda utilizzata, che perciò viene anche detta "sonda a idrolisi";
- saggi che utilizzano le cosiddette "displaceable probes" in cui la sonda viene scalzata dal template a cui si era ibridata e viene riutilizzata;
- saggi che comportano l'uso di sonde o particolari sequenze nucleotidiche legate direttamente a uno dei primers.

Il vantaggio delle sonde ad ibridazione, rispetto all'uso dei coloranti intercalanti, risiede nel fatto che è necessaria un'ibridazione specifica tra il DNA-target e la sonda per generare il segnale fluorescente; in questo caso le amplificazioni non specifiche come il "mis-priming" o gli artefatti come la dimerizzazione dei primers non generano segnale.

Tra le sonde a idrolisi troviamo le sonde TaqMan. La sonda TaqMan, oligonucleotide complementare ad una determinata sequenza di DNA individuata all'interno della sequenza amplificata dai primers, presenta una molecola "Reporter" all'estremità 5' e una molecola "Quencher" al 3', che impedisce al "Reporter" di emettere liberamente segnale. Durante la fase di estensione, la polimerasi, che sta sintetizzando sul DNA template il secondo filamento a partire da un primer, incontra l'estremità 5' della sonda, anch'essa legata al template, ed effettua uno "strand-displacement", ossia stacca la sonda dal template per una lunghezza di alcuni nucleotidi e la taglia. In questo modo la molecola reporter passa in soluzione, aumentando l'intensità della fluorescenza che sarà direttamente in relazione alla concentrazione di amplificato specifico all'interno della reazione.

Tra le "displaceable probes" troviamo i "molecular beacons" che sono formati da un oligonucleotide, complementare alla sequenza di DNA da rilevare, posizionato centralmente tra due brevi sequenze tra loro complementari: le modificazioni con i fluorofori sono alle estremità 5' e 3'. Nelle fasi della reazione in cui, grazie alla stabilità dei legami tra le sequenze complementari, questo tipo di sonda mantiene la sua conformazione ripiegata su se stessa a "stem-loop", non si ha emissione di fluorescenza. Nella fase dell'annealing in cui la sonda si appaia al template prendendo una conformazione distesa, i due fluorofori si trovano al massimo della distanza: all'inizio di tale fase si misura l'intensità di fluorescenza, che sarà in relazione alla concentrazione di amplificato; poi, in fase di estensione, appena ha luogo il fenomeno di "strand displacement" la conformazione distesa della sonda diminuisce di stabilità nei confronti della conformazione ripiegata, e la sonda, cambiando repentinamente conformazione, interrompe l'emissione di fluorescenza. Sempre nella stessa categoria troviamo le sonde FRET (Foster Resonance Energy Transfer), un sistema costituito da due sonde

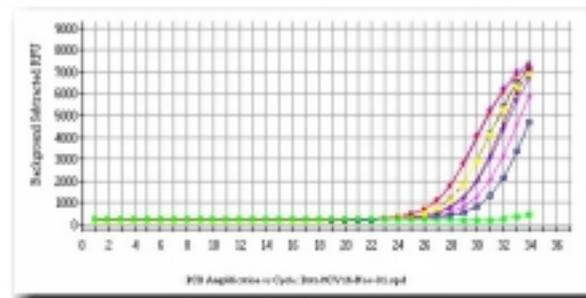


Figura 1: Visualizzazione Plot dell'intensità di Fluorescenza verso i Cicli

anziché una, di cui una marcata al 5' e l'altra al 3': in fase di annealing esse si legano al template: le molecole fluorescenti vengono a trovarsi a distanza di poche basi e vi è emissione di fluorescenza per l'effetto FRET. Nella fase di estensione, in seguito al fenomeno dello "strand displacement" le sonde sono scalzate dal template e l'emissione di fluorescenza si annulla.

Le sonde legate direttamente ad un primer, come il primer "Scorpions" o il sistema che utilizza il primer "Amplifluor" sfruttano il fenomeno dell'allontanamento dei fluorofori durante la fase dell'estensione per ottenere l'emissione di fluorescenza, inserendo il sistema nell'amplificato. Questi sistemi, ancora non utilizzati ampiamente, sono comunque sfruttati in situazioni particolari.

DESCRIZIONE DEL SISTEMA DI REAL TIME PCR™

Il Sistema è basicamente composto da un termociclatore equipaggiato con un rivelatore a fluorescenza (con sorgente allo xenon o laser) che permette l'acquisizione in tempo reale della fluorescenza emessa dal DNA target. Sono attualmente in commercio alcuni Sistemi di REAL TIME PCR™, più o meno sofisticati, ma di provata affidabilità e di software che ne rendono semplice l'utilizzo e l'interpretazione dei risultati analitici.

Se la PCR viene condotta in presenza di un colorante in grado di legare il DNA a doppia elica, come il Sybr Green I, è possibile monitorare l'accumulo del prodotto di PCR in tempo reale. Il Sybr Green I, infatti, è altamente specifico per il Dna a doppia elica e mostra un grande incremento di fluorescenza quando si lega ad esso. I sistemi di lettura in Real Time sono costruiti per poter registrare la fluorescenza emessa da un Fluoroforo, piuttosto che dai Probes, durante la reazione stessa. Nella figura viene riportato uno schema di questa strumentazione.

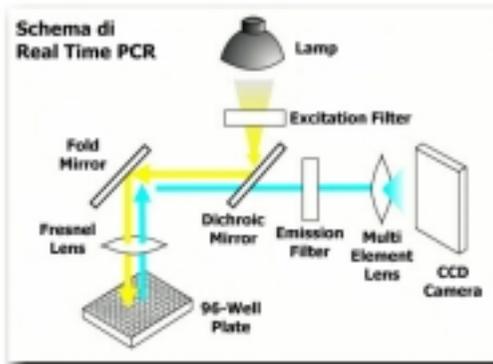


Figura 2: Schema Ottico

La luce della lampada alogena passa attraverso un filtro ottico che la taglia a 485 nm. A questa lunghezza d'onda è possibile eccitare sia il Sybr Green che vari fluorofori legati a probes (FAM, TET, VIC e JOE). La luce viene poi riflessa su un deviatore ed attraverso uno specchio viene convogliata su una lente di Fresnel e quindi sui campioni. La luce emessa dal campione viene raccolta da una CCD camera che acquisisce il segnale e lo memorizza. Durante ogni ciclo di PCR, vengono acquisite immagini multiple dei campioni, che alla fine della reazione vengono analizzate da un software in grado di costruire una curva di calibrazione degli standard, consentendo all'operatore di modificare il C_T in funzione della linearità di risposta alle varie concentrazioni. La fluorescenza emessa dal campione a concentrazione sconosciuta, al C_T selezionato, viene interpolata nella curva standard e se ne ricava la concentrazione.

ANALISI QUANTITATIVA

La quantificazione ottenibile con questi sistemi può essere relativa o assoluta. La quantificazione assoluta, che richiede standard di concentrazioni note ad alta precisione, non è poi così necessaria per la maggior parte delle applicazioni. Nella quantificazione relativa, utilizzata per esempio per la valutazione dell'espressione genica, nel rilevamento di OGM negli alimenti o nella determinazione della carica virale è comunque sempre necessaria la presenza di un controllo interno che, amplificato,



Figura 3: Strumentazione

darà la possibilità di normalizzare i dati ottenuti con un confronto di tipo relativo. Ad esempio, la carica virale di HCV-RNA può essere quantificata usando una curva standard generata con una diluizione scalare (da 3 a più punti) di uno standard a titolo noto, calibrato in Unità Internazionali, rispetto allo standard di riferimento della WHO n° 97/746, nel range lineare di lettura 10²-10⁶ UI/ml. Riportando i valori incogniti direttamente sulla curva, siamo in grado di ottenere, direttamente in UI/ml, la carica virale HCV-RNA di un numero di campioni per seduta anche fino ad 80.

Il calcolo accurato della concentrazione di Dna o di cDna in campioni sconosciuti, si ottiene misurando la fluorescenza emessa al ciclo soglia (C_T) con l'ausilio dell'algoritmo descritto da Higuchi et al.. Il C_T rappresenta il ciclo o la frazione di ciclo a cui il segnale di fluorescenza raggiunge un arbitrario ma definito valore soglia nell'ambito della fase esponenziale precoce della reazione. I valori di C_T sono proporzionali al logaritmo del numero di copie iniziali del target.

L'accuratezza del sistema dipende strettamente dall'efficienza di amplificazione, che deve essere strettamente sovrapponibile tra i calibratori ed i campioni da quantizzare.

La costruzione della curva di calibrazione degli standard quantitativi, ottenuta in questo modo, presenta i seguenti vantaggi:

- 1) Non viene penalizzata la sensibilità del sistema, perché non è necessario ridurre il numero di cicli per evitare la saturazione del segnale;
- 2) Non è richiesta alcuna manipolazione del prodotto di PCR, poiché non è necessaria una fase di rivelazione post-PCR, con conseguente risparmio di tempo e riduzione della possibilità di contaminazione da carry-over;
- 3) Il prodotto della reazione può essere sottoposto, in caso di necessità, a successiva analisi su gel o mediante elettroforesi capillare.
- 4) Non è richiesta la presenza dell'operatore durante la fase di amplificazione ed acquisizione dei dati di fluorescenza.
- 5) La refertazione relativa alla quantizzazione è immediata.

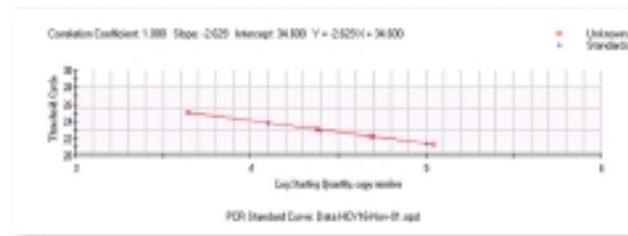
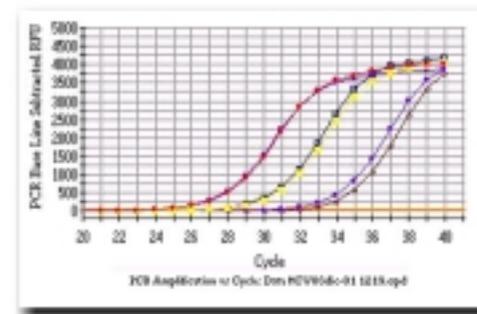


Figura 4: Visualizzazione Plot Fluorescenza e relativa Curva di Calibrazione

ANALISI QUALITATIVA

Sebbene appaia evidente che l'impiego primario della REAL TIME PCR™ sia quello quantitativo, non è da trascurare la possibilità ed i vantaggi nell'utilizzare questa tecnica anche per analisi qualitative. L'aggiunta di qualche ciclo al "ciclo soglia" del protocollo quantitativo fino alla saturazione della curva di Pcr, evitando di trasportare i dati su una curva di calibrazione, ma riferendoli esclusivamente ad un controllo positivo di adeguata concentrazione, permette di ottenere dati qualitativi con limiti di rivelabilità paragonabili, se non migliorativi, rispetto a tecniche di lettura dirette ed indirette del Dna attualmente in uso. La specificità del dato qualitativo ottenuto viene confermato in maniera del tutto automatizzata e con pochissimo impiego di tempo (solo 5 minuti), attraverso il calcolo e relativo plot della curva di dissociazione del prodotto di PCR di ogni campione analizzato, che consente di migliorare la specificità del sistema con la misura del Tm del DNA target. Questo dato ci consente di discriminare eventuali segnali di amplificazione derivanti da prodotti aspecifici della reazione.

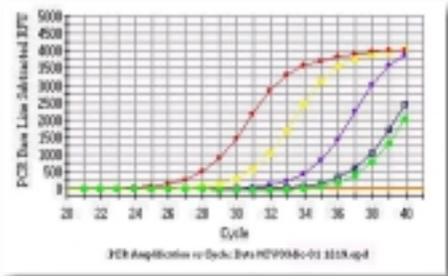


Figura 5: Visualizzazione Plot Fluorescenza

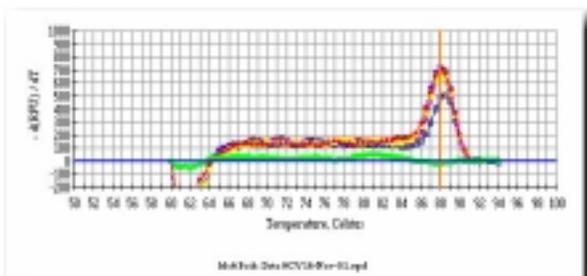


Figura 6: Derivata 1ª della Curva di Dissociazione

OTTIMIZZAZIONI.

Il livello di ottimizzazione dei parametri che intervengono nel processo preparativo ed analitico di un'applicazione di Biologia Molecolare è strettamente correlato alla destinazione d'uso delle applicazioni stesse. Anche nell'utilizzo della REAL TIME PCR™, si distinguono basicamente due obiettivi che ne differenziano la strategia di ottimizzazione sin dalla fase di estrazione del campione:

- L'utilizzo di tale tecnica a scopo di ricerca, caratterizzato cioè da poche informazioni di partenza, dalla necessità di indagare aspetti complementari al target onde fornire conferme sulla validità dell'approccio scelto e di ottenere un limitato numero di risultati analitici (quelli necessari e sufficienti a dimostrare la validità della ricerca stessa, che, quasi mai ha uno scopo solamente analitico). Logico ed immediato, per quanto fin qui illustrato, il collegamento con la REAL TIME PCR™ e la strategia di utilizzo delle sonde fluorogeniche.
- L'utilizzo di tale tecnica a scopo cosiddetto "routinario", è caratterizzato invece da un grandissimo numero di informazioni di partenza, da molteplici strategie analitiche di confronto, dalla necessità di ottenere, anche giornalmente, un grande numero di risultati analitici validati da un "robusto" protocollo di lavoro e da riferimenti interni "certi" (standards e relativa curva di calibrazione) e da riferimenti esterni (programmi intralaboratori di Controllo Qualità). Logico ed immediato, anche qui, il collegamento con la REAL TIME PCR™ e con la strategia dell'utilizzo dell'intercalante SYBR-Green I°.

Stabilita la relazione tra strategia di utilizzo della tecnica ed obiettivo, risulta evidente che il lavoro di messa a punto ed ottimizzazione dei due sistemi analitici di cui ai punti a. e b. diverge sostanzialmente.

Per quanto concerne l'utilizzo per la ricerca (attualmente il più comune), fatte salve regole generali coerenti con la tecnica, si opererà alla ricerca delle migliori condizioni specifiche al target: scelta accurata della sonda a garanzia della specificità e replica di misure a garanzia dell'analisi quantitativa.

Per quanto concerne l'utilizzo della REAL TIME PCR™ per l'analisi "routinaria" diagnostica, di cui al punto b., occorrerà:

- Curare e standardizzare un protocollo di estrazione di DNA/RNA che garantisca un prodotto estratto di alta purezza e concentrazione costante
- Selezionare reagenti ed enzimi di qualità omogenea e dosaggio ottimale per il protocollo di preparazione della reazione di RT e di Pcr
- Utilizzare Primers ad alto grado di purezza e di concentrazione calibrata con lo scopo di minimizzare l'effetto dimerizzazione degli stessi.
- Porre particolare cura nella scelta di Standards calibrati e di matrice equivalente alla grande quantità di campioni da analizzare e a cui far "subire" l'intero processo analitico.
- Prevedere, a fine analisi, come parte integrante dell'intero protocollo analitico, la verifica, attraverso il calcolo della temperatura di "melting" ("Tm"), della specificità del prodotto amplificato per ogni singolo campione. I sistemi più completi di RTPcr attualmente in commercio prevedono questa funzione in modo automatico.

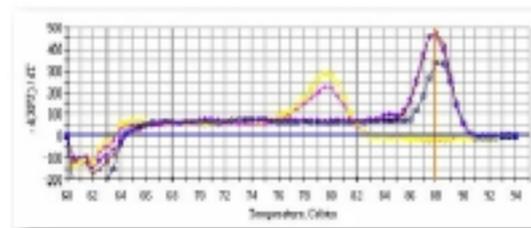


Figura 7: Derivata 1ª della Curva di Dissociazione di RNA HCV (88°C), in presenza di prodotti aspecifici

Un'altra importante fonte di errore, la contaminazione tra gli esperimenti, o contaminazione "carry-over", che è una delle maggiori cause di falsi positivi, può essere superata utilizzando dUTP e l'enzima UNG nelle reazioni di PCR (ad es. Platinum Quantitative PCR SuperMix-UDG, Life-Technologies). L'uracil-N-glicosilasi (UNG) è in grado di rimuovere i residui di uracile dal DNA in forma di singola o doppia elica; il DNA che viene digerito dall'enzima UNG non è così più in grado di servire come template in PCR future. Dal momento che dUTP sostituisce dTTP nel mix della PCR, tutto il DNA amplificato conterrà uracile. Quindi in una prima fase della PCR (50°C per alcuni minuti) l'enzima distruggerà tutto il DNA contaminante, se presente, e verrà in seguito inattivato (95°C per alcuni minuti) per permettere l'amplificazione del template.

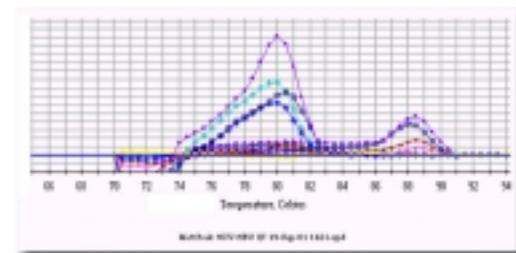


Figura 8: Derivata 1ª della Curva di Dissociazione di DNA HBV (80°C) e RNA HCV (88°C)

ALCUNI RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI:

- Higuchi R. et al. Kinetic PCR: Real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology* (1993) 11:1026-1030
- Higuchi R. et al. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology* (1992) 10:413-417
- Livak K.J. et al. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods and Applications* (1995) 4:357-362
- Roberts C.A. et al. Real-time RT-PCR fluorescent detection of tomato spotted wilt virus. *J. Virol. Meth.* (2000) 88:1-8
- Tyagi S. et al. Multicolor molecular beacons for allele discrimination. *Nat. Biotechnol.* (1998) 16:49-53
- VaTilingom M. et al. Maximizer Maize and Roundup Ready Soybean in some representative foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (1999) 47:5261-5266
- Vet J.A.M. et al. Multiplex detection of four pathogenic retroviruses using Molecular Beacons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1999) 96:6394-6399
- Whitcombe D. et al. Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence. *Nat. Biotechnol.* (1999) 17:804-807

DETERMINAZIONE QUANTITATIVA DI RNA HCV MEDIANTE HPA (HIGH PERFORMANCE AMPLIFICATION) "TOTAL VIREMIC ASSAY"

L'HPA è un protocollo d'amplificazione che coniuga le conoscenze acquisite con le tecniche Real Time™ Pcr e l'ottimizzazione estrema del protocollo d'amplificazione. L'accurata selezione dei componenti costituenti la reazione quali reagenti, additivi, intercalanti e il particolare disegno e sintesi dei Primers fanno di HPA uno strumento particolarmente indicato nella diagnostica virale. L'utilizzo di questo protocollo, in grado di determinare la viremia totale indipendentemente dallo sciami virale presente nel campione, garantisce un'accuratezza superiore alle normali tecniche attualmente in uso.

Il processo analitico è costituito da tre fasi distinte:

- Estrazione - arricchimento
- Retrotrascrizione
- Amplificazione Real Time™

ESTRAZIONE

L'estrazione dell'acido nucleico virale (RNA) è la fase più delicata dell'intero processo analitico. La variabile fondamentale nella determinazione della carica virale risiede nella riproducibilità del recovery d'estrazione unita al controllo della degradazione dell'RNA. A tal fine, il protocollo estrattivo proposto utilizza i Sali di Guanidinio per la lisi del capsid virale e l'inattivazione delle ribonucleasi presenti nel campione. La soluzione lisante, pronta all'uso, contiene un RNA Carrier che favorisce la precipitazione alcolica dell'acido Nucleico, presente a concentrazioni infinitesimali, agendo sul prodotto di solubilità dello stesso; l'RNA Carrier, inoltre, diviene molecola bersaglio per le Ribonucleasi eventualmente presenti nei materiali o nell'ambiente.

La validazione del protocollo, ha dimostrato un recovery superiore al 90% per concentrazioni comprese tra 10^6 e 10^2 /copie/ml e una variabilità inferiore al 5%.

La procedura prevede i seguenti steps:

- a 100 µl di siero o plasma vengono addizionati 400 µl di soluzione Lisante (Guanidinio) e 500 µl di isopropanolo,
- si centrifuga per 10' a 14.000 rpm e si rimuove il surnatante.
- il pellet viene lavato per due volte con etanolo 70% e quindi ricostituito con 50 µl di H₂O-DEPC.

La procedura descritta è applicabile a tutti i virus, RNA e DNA, quali HCV, HIV-RNA, HGV, HBV, parvo virus B19 ecc.

Prove condotte nei nostri laboratori con standard multipli, contenenti virus HCV, HBV, HIV, B19 a concentrazioni inferiori a 200 UI/ml, hanno dimostrato l'efficacia estrattiva e la completa rimozione di interferenti e fattori di inibizione della reazione di amplificazione.

VIREMIE "LOW LEVEL"

Qualora si renda necessaria la determinazione della carica virale in campioni con titolo inferiore alle 200 UI/ml (Es RNA HIV), GeneDia ha sviluppato un processo d'arricchimento del campione che permette l'estrazione di volumi compresi tra 250-500 µl di siero o plasma.

Il fattore di arricchimento, fino a 5 volte, migliora significativamente la riproducibilità estrattiva e supera i limiti statistici dovuti al campionamento di piccoli volumi, con viremie inferiori alle 200 UI/ml.

Il processo d'arricchimento, rapido ed efficace, si realizza con una precipitazione selettiva del virus ad opera di una soluzione PEG/Saccarosio.

La procedura consiste nell'aggiungere 250/500 µl di campione alla soluzione precipitante, già predisposta in tubi da estrazione, centrifugare a 14.000 rpm per 12', eliminare il sovrantante ed eseguire l'estrazione con sali di Guanidinio.

La fig 9 mostra, un esempio di determinazione di RNA HCV, in campioni con concentrazione compresa tra 250-32 UI/ml (estratti 250 µl), utilizzando la procedura di arricchimento.

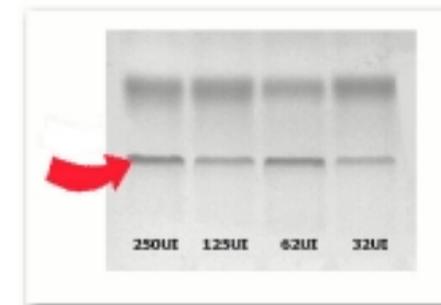


Figura 9: Gel in Agarosio al 2% rivelazione Bromuro di Etidio

RETROTRASCRIZIONE ED AMPLIFICAZIONE.

La specificità dei Primers selezionati per la regione 5'UTR, che producono un frammento di 236 bp, è stata verificata su campioni di RNA HCV di genotipo 1, 2 e 3; gli amplificati prodotti sono stati sottoposti a reazione di sequenza, previa purificazione, con gli stessi Primers utilizzati in RT-PCR.

Il protocollo di trascrizione selettivo, riportato in tabella, utilizza il Primer antisense al fine di selezionare specificamente il target evitando di produrre cDNA aspecifici.

A 25µl di estratto si addizionano 25 µl di mix RT e si incuba a 42°C per 15 min.

Tabella RT	
Reagente	Volume per campione in µl
H ₂ O-DEPC	5.45
Rnase Inb. 40 UI/µl	0.5
Pre Mix RT	15.0
MgCl ₂ 100 mM	3.75
Reverse 50 UI/µl	0.3
Volume Totale	25 µl

Il cDNA prodotto può essere immediatamente processato o conservato a -20°C, previa inattivazione della Reverse Transcriptasi incubando per 5' a 95°C.

La reazione d'amplificazione si ottiene aggiungendo 40 µl di Mix PCR a 10 µl di cDNA. La tabella mostra la composizione della master Mix d'amplificazione.

Tabella PCR	
Reagente	Volume per campione in µl
H ₂ O-DEPC	28.5
Pre Mix PCR	10.0
TAQ 5 UI/µl	0.5
UDG 1 UI/µl	1.0
Volume Totale	40.0 µl

Dal protocollo d'amplificazione Real Time™ utilizzato, mostrato in figura, si evidenziano le varie fasi:

- 1 controllo carry over
- 2 hot start
- 3 pre cicli formazione templat
- 4 cicli amplificazione con lettura della fluorescenza a 72°C
- 5-6 melting curve
- 7 hold



Figura 10: Protocollo REAL TIME PCR™

Il protocollo descritto utilizza un intercalante specifico per il ds DNA, SYBR Green I°, disciolto nella pre Mix PCR, che permette di monitorare la cinetica d'amplificazione al formarsi del prodotto d'amplificazione. Al termine della reazione viene registrata la curva di dissociazione dei prodotti d'amplificazione formatesi, con la conseguente determinazione del Tm specifico. La determinazione quantitativa si ottiene attraverso il calcolo automatico di una curva di calibrazione ottenuta amplificando, contemporaneamente ai campioni, dei calibratori a titolo noto. I calibratori utilizzati, non infettivi, contengono l'intero genoma virale e vengono preventivamente titolati contro lo standard di riferimento internazionale WHO std 96/790.

Il report sotto riportato evidenzia la curva di calibrazione per tre diluizioni (1.25 x10⁴, 2.5 x10⁴ e 1x10⁵ UI/ml di RNA HCV) e la replica delle stesse calcolate come campione incognito. I dati riportati confermano una elevata accuratezza, verificabile dal coefficiente di correlazione e la riproducibilità della curva duplicata, mentre la slope di - 3.2 evidenzia una efficienza di reazione prossima al valore teorico, confermata osservando i TC (ciclo soglia)

Data Analysis Parameters

Threshold has been calculated using baseline cycles 2 to 22.
 Calculated threshold is 16.86 = 1.69 (average standard deviation) X 10.00.
 Calculated threshold has been replaced by user selected threshold of 17.22.
 Data analysis window is set at 10.00% of a cycle, centered at end of the cycle.
 Weighted Mean digital filtering has been applied. Global filtering is off.

Standard Curve Spreadsheet Data for SYBR Green I Units: U.I./ml number

Well	Type	Repl	TC	Log SQ	SQ	SQ Mean	SQ SD	TC Mean	TC SD
C02	Standard	1	26.13	4.097	1.25E+04	1.25E+04	N/A	26.130	N/A
D02	Replica STD	1	26.15	4.057	1.14E+04	1.14E+04	N/A	26.149	N/A
C03	Standard	2	24.88	4.398	2.50E+04	2.50E+04	N/A	24.876	N/A
D03	Replica STD	2	25.18	4.354	2.26E+04	2.26E+04	N/A	25.183	N/A
C05	Standard	3	23.14	5.000	1.00E+05	1.00E+05	N/A	23.139	N/A
D05	Replica STD	3	23.01	5.023	1.05E+05	1.05E+05	N/A	23.009	N/A

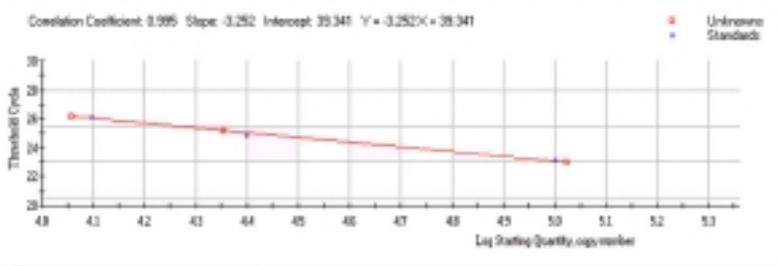
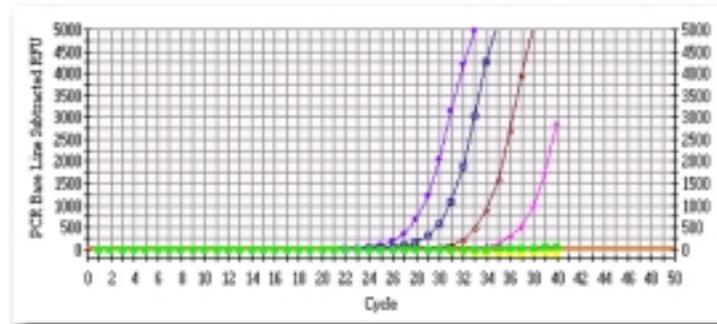


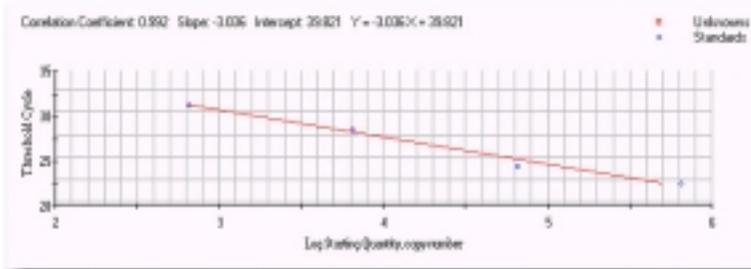
Figura 11: Esempio di Report

Il Δ teorico del ciclo soglia, per diluizioni seriali, è pari a 1 ciclo; dal report si evince che i valori registrati di TC sono prossimi al valore teorico, confermando che il protocollo HPA mostra una elevata efficienza d'amplificazione che si mantiene costante nell'intervallo di concentrazione considerato, permettendo una elevata accuratezza nel dosaggio della viremia totale. Il range di linearità del protocollo HPA, verificato sperimentalmente, è compreso tra 10² e 10⁶ U.I./ml di RNA HCV; il report illustrato nella figura successiva ne mostra un esempio.

PCR Amp/Cycle Chart for SYBR Green I



Standard Curve Chart for SYBR Green I



Data Analysis Parameters

Threshold has been calculated using baseline cycles 2 to 21.
 Calculated threshold is 17.55 = 1.76 (average standard deviation) X 10.00.

Data analysis window is set at 10.00% of a cycle, centered at end of the cycle.
 Weighted Mean digital filtering has been applied. Global filtering is off.

Standard Curve Spreadsheet Data for SYBR Green I Units: U.I./ml RNA HCV

Well	Type	Repl	TC	Log SQ	SQ	SQ Mean	SQ SD	TC Mean	TC SD
C02	Standard	1	31.29	2.813	6.50E+02	6.50E+02	N/A	31.293	N/A
C03	Standard	2	28.57	3.813	6.50E+03	6.50E+03	N/A	28.574	N/A
C04	Standard	3	24.51	4.813	6.50E+04	6.50E+04	N/A	24.510	N/A
C05	Standard	4	22.53	5.813	6.50E+05	6.50E+05	N/A	22.527	N/A

Figura 12: Esempio di Report

La specificità del protocollo analitico, verificabile per ogni seduta di reazione, si evince dalla curva di dissociazione registrata al termine della reazione d'amplificazione.

Il TM del prodotto della reazione, amplificato di 236 bp, è di $88^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$; la figura mostra la derivata 1° della curva di dissociazione.

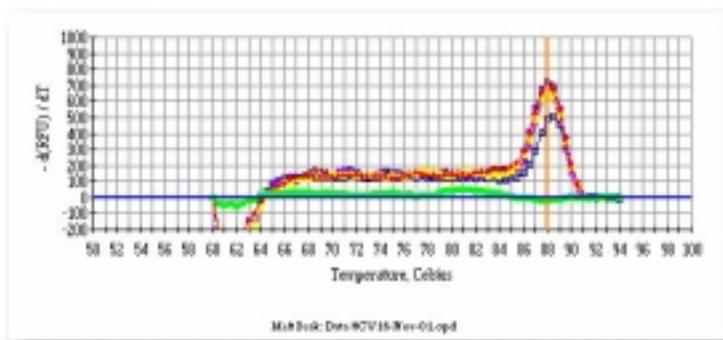


Figura 13: Derivata 1° della Curva di Dissociazione

L'utilizzo dell'intercalante SYBR Green I permette la sicura rivelazione di tutti i prodotti della reazione, fornendo altresì utili informazioni quali: aspecifico, primers, dimers.

La classica rivelazione diretta in gel di Agarosio al 2%, inoltre, conferma la validazione della seduta di lavoro

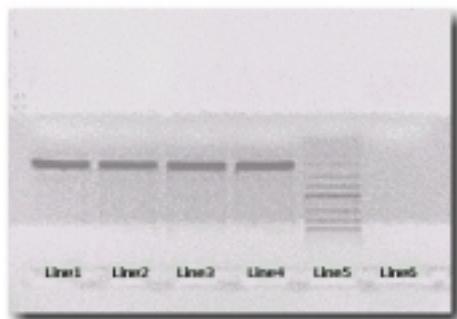


Figura 14: Gel in Agarosio al 2% rivelazione Bromuro di Etidio

LEGENDA:

Line 1	C02	Standard 1	6.50E+02 UI/ml
Line 2	C03	Standard 2	6.50E+03 UI/ml
Line 3	C04	Standard 3	6.50E+04 UI/ml
Line 4	C05	Standard 4	6.50E+05 UI/ml
Line 5		MARKER VIII	
Line 6		Campione Negativo	

CONCLUSIONI

Riteniamo che la HIGH PERFORMANCE AMPLIFICATION sia una importante innovazione, nell'analisi molecolare, per la determinazione della carica virale.

Caratteristiche peculiari della tecnica RTPcr quali l'ampio range di linearità, l'elevata riproducibilità analitica, la semplicità ed immediatezza del risultato, accoppiate all'approfondito studio di ottimizzazione dell'intero processo offrono all'utilizzatore un tool analitico estremamente accurato, robusto e di semplice utilizzo.

La specificità e sensibilità inferiore alle 200 UI/ml promuovono l'utilizzo della metodica e anche per la determinazione qualitativa di RNA HCV.

La robustezza analitica e i parametri estrapolabili quali il calcolo del ciclo soglia, il coefficiente angolare nel calcolo della curva di calibrazione e la determinazione del TM del prodotto d'amplificazione, permettono all'utilizzatore la valutazione critica della seduta d'amplificazione consentendo il significativo miglioramento degli standards qualitativi del referto.

PRODOTTO DA:



AMMINISTRAZIONE E PRODUZIONE: VIA LOMBARDA, 169/A - 55013 LAMMARI (LU) - TEL./FAX 0583 962672 - EMAIL: adminlucca@genedia.it - info@genedia.it

LABORATORIO RICERCA E SVILUPPO: TRAV. PIETRAVALLE, 11 - 80100 NAPOLI - TEL./FAX 081 5465026 - EMAIL: ricercanapoli@genedia.it

WEB: www.genedia.it