



ONB
Ordine Nazionale dei Biologi

Il laboratorio di Biologia molecolare nella routine diagnostica: consigli pratici

A cura della:
Commissione Permanente di Studio
"Microbiologia, Virologia e Biologia molecolare" dell'ONB

Il Laboratorio di Biologia molecolare nella routine diagnostica: consigli pratici



Questo documento è stato redatto da:

dr. Antonio Russo

componente della Commissione Permanente di Studio su
“Microbiologia, Virologia e Biologia molecolare”
dell’Ordine Nazionale dei Biologi



e revisionato criticamente da:

dr.ssa Paola Menegazzi

componente della Commissione Permanente di Studio su
“Microbiologia, Virologia e Biologia molecolare”
dell’Ordine Nazionale dei Biologi



dr. Luigi Tagliaferro

referente per la Commissione Permanente di Studio su
“Microbiologia, Virologia e Biologia molecolare”
dell’Ordine Nazionale dei Biologi

A cura della:

Commissione Permanente di Studio “Microbiologia, Virologia e Biologia molecolare” dell’ONB

Sommario

PREFAZIONE.....	5
PRESENTAZIONE.....	7
INTRODUZIONE.....	9
LA REAZIONE POLIMERASICA A CATENA (PCR).....	10
Denaturazione del DNA.....	11
Appaiamento dei primer (<i>annealing</i>).....	13
Estensione dei primer (<i>elongation</i>).....	14
Tampone di reazione.....	15
Numero di cicli.....	16
Additivi vari.....	17
DISEGNO DEI PRIMER.....	19
Lunghezza dei primer.....	20
Contenuto in G+C e sequenze ripetute.....	20
Strutture secondarie e formazione di dimeri.....	21
IL LABORATORIO DI BIOLOGIA MOLECOLARE.....	22
Suddivisione degli ambienti di lavoro e delle attività svolte.....	23
Strumenti, reagenti, pipette e puntali dedicati nelle diverse aree.....	26
Buona Prassi di Laboratorio (BPL).....	28
Raccomandazioni finali.....	31
BIBLIOGRAFIA ESSENZIALE.....	32

PREFAZIONE

La nuova gestione dell'Ordine Nazionale dei Biologi è impegnata da diversi mesi nell'elaborazione di strumenti utili a facilitare l'ingresso dei propri iscritti nel mondo del lavoro.

In tale contesto si inserisce la pubblicazione del vademecum approntato dalla Commissione "Microbiologia, virologia e biologia molecolare" dal titolo "Il Laboratorio di Biologia molecolare nella routine diagnostica: consigli pratici".

Si tratta del quarto vademecum proposto dall'ONB, dopo il "Vademecum del biologo nutrizionista", il "Vademecum sull'Igiene degli alimenti" e il vademecum di orientamento alla professione dal titolo "Il Biologo. Figura dinamica nel mondo del lavoro".

Si sentiva l'esigenza di un manuale per l'approccio pratico alla biologia molecolare, disciplina strettamente legata alla ricerca scientifica e all'analisi di laboratorio. Si tratta di un campo di studi dove il biologo può capitalizzare la propria sapienza a beneficio della collettività.

La ricchezza dell'età contemporanea risiede nel sapere. Per questo motivo è nostro intendimento contribuire a dotare la "cassetta degli attrezzi" del biologo di tutti gli strumenti possibili per consentirgli di accrescere la propria caratura scientifica.



Dott. Ermanno Calcatelli

Presidente dell'Ordine Nazionale dei Biologi

PRESENTAZIONE

A circa 30 anni dall'invenzione della *Polymerase Chain Reaction (PCR)* da parte di Kary Mullis, che per questo ha conseguito un premio Nobel, la diagnostica di laboratorio ha visto un susseguirsi di trasformazioni tali da relegare un'intuizione così geniale quasi ad una mera routine.

Proprio per non perdere di vista i capisaldi di questa stupenda tecnologia e per permettere ai giovani colleghi che si apprestano ad avvalersi dei relativi benefici diagnostici, di travalicare i moderni automatismi e di escogitare nuove applicazioni, la Commissione di studio in Microbiologia, Virologia e Biologia molecolare dell'ONB ha inteso promulgare questa prima edizione di un manuale essenziale.

Solo conoscendo a fondo i pilastri di questa tecnica, che ha stravolto letteralmente la moderna diagnostica di laboratorio, sarà possibile per i Biologi (e per tutte le figure coinvolte nel settore) implementarne l'uso, applicandola a settori professionali finora non interessati.

Dall'originario impiego nel settore della Virologia, sotto la spinta socio-medica dell'AIDS e dell'epatite C negli anni '90, fino alla corrente applicazione nei campi dell'onco-ematologia, della genetica forense, della diagnosi prenatale, della nutrigenetica, la PCR è prepotentemente entrata nella diagnostica di laboratorio dell'ultimo ventennio.

Questo manuale si accolla semplicemente il compito di spiegare i principi elementari di un settore così delicato, non trascurando le norme di buona prassi. E' auspicio di questa Commissione editare nuovi lavori che, propeudeicamente, spiegheranno via via le evoluzioni e le diverse varianti di questa affascinante "alchimia".

Luigi Tagliaferro

INTRODUZIONE

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

Questo *vademecum* intende fornire alcuni consigli pratici a chi approccia per la prima volta nel mondo delle tecniche bio-molecolari.

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

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

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

LA REAZIONE POLIMERASICA A CATENA (PCR)

La reazione prevede il succedersi di cicli di amplificazione durante i quali si alternano tre diverse fasi caratterizzate da specifiche temperature (figura 1) che rendono possibile rispettivamente:

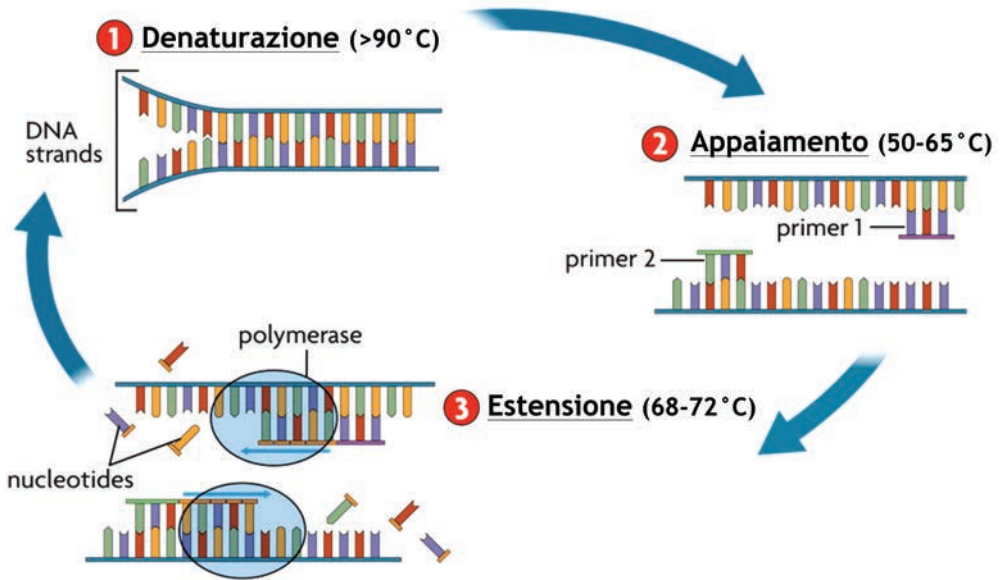


Figura 1: Rappresentazione schematica delle tre fasi del ciclo di PCR.

1. la **denaturazione** (*denaturation*) della doppia elica del DNA stampo in due singoli filamenti (a temperature superiori a 90°C) per rottura dei ponti idrogeno che tengono appaiate le basi complementari;
2. l'**appaiamento** (*annealing*) dei *primer* alle sequenze complementari di DNA a singola elica localizzate alle estremità del frammento bersaglio (ad una temperatura in genere compresa tra i 50 ed i 65°C);
3. l'**estensione** (*elongation*) dei *primer* ad opera dell'enzima DNA Polimerasi mediante aggiunta di nucleotidi nella direzione 5'-3' (ad una temperatura compresa tra i 68 e i 72 °C). L'enzima riconosce come innesco il sito in cui è avvenuta l'ibridazione dei *primer* con i filamenti di DNA complementare e aggiunge i nucleotidi liberi presenti nella soluzione all'estremità 3' dei *primer*. Si ottiene così la sintesi

di una nuova elica complementare al DNA stampo.

Il numero di nuove molecole di DNA aumenta al succedersi di ogni ciclo. Infatti, durante il primo ciclo da un singola molecola di DNA si ottengono due molecole, ciascuna costituita da un'elica "originale" che ha fatto da stampo alla sintesi dell'elica "copia"; al secondo ciclo ciascuna delle due molecole si denatura, i quattro filamenti di DNA che si ottengono fanno da stampo per l'attività della DNA polimerasi ed alla fine le molecole di DNA diventano quattro. Il processo di amplificazione procede in questo modo, di ciclo in ciclo (figura 2). In teoria, quindi, ad ogni ciclo il numero di copie della sequenza bersaglio aumenta in maniera esponenziale; di fatto il numero di copie si duplica ad ogni ciclo fino al raggiungimento di un *plateau*.

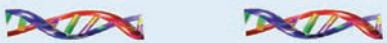



Numero di cicli	Numero di copie del bersaglio (ampliconi)	Bersaglio
1	2	
2	2 ² (4)	
3	2 ³ (8)	
4	2 ⁴ (16)	
5	2 ⁵ (32)
6	2 ⁶ (64)
20	2 ²⁰ (1.048.576)
30	2 ³⁰ (1.073.741.824)

Figura 2: Crescita esponenziale degli ampliconi nel corso dell'amplificazione.

Denaturazione del DNA

Il primo *step* nella reazione di PCR consiste nella denaturazione del DNA stampo

a doppia elica. In questa fase occorre ottimizzare due parametri essenziali:

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

Normalmente il DNA si trova nella classica conformazione a doppio filamento in cui i due filamenti (**strands**) del DNA sono tenuti assieme dai legami a ponte di idrogeno formati tra le basi azotate complementari (**A=T; G≡C**). Il DNA deve essere portato ad una condizione di singola elica (**single-stranded**) in modo che successivamente si verifichi l'appaiamento (**annealing**) alle molecole di primer (anch'esse a singolo filamento).

La rottura dei legami idrogeno che tengono appaiati i due filamenti può essere ottenuta mediante un aumento della temperatura (figura 3). La separazione provocata dall'instabilità dei legami tra le basi complementari viene indicata con il termine di **fusione**. In particolare, si definisce "temperatura di fusione" (**melting temperature, T_m**) la temperatura in corrispondenza della quale il 50% del DNA è svolto in forma di singolo filamento. Nel tampone di reazione in cui viene normalmente effettuata la reazione di PCR la temperatura di fusione è solitamente compresa tra 92 e 96°C. L'energia termica necessaria dipende dalla composizione delle basi (percentuale delle coppie di basi A=T e G≡C), dalla lunghezza del DNA e dalla concentrazione salina dei tamponi utilizzati.

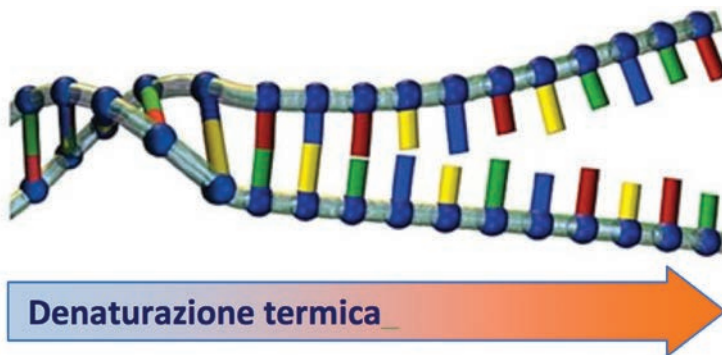


Figura 3: Dissociazione dei ponti idrogeno provocata dall'aumento della temperatura.

La denaturazione viene favorita dalla presenza di concentrazioni saline relativamente alte (circa **150 mM NaCl**). Per ogni aumento della concentrazione dei cationi

monovalenti pari ad 1 logaritmo corrisponde un aumento della temperatura di fusione pari a 16,6°C.

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

Appaiamento dei primer (*annealing*)

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

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

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

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

E' bene precisare, in ogni caso, che in letteratura sono riportate altre formule più sofisticate ed in grado di tener conto in maniera più precisa delle variabili chimico-fisiche che intervengono nella struttura degli oligonucleotidi.

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

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

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

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

Estensione dei primer (*elongation*)

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

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

La *Taq* DNA polimerasi ha un’attività specifica a 37 °C molto simile a quella del frammento di Klenow della DNA polimerasi I di *E. coli*. Tuttavia l’attività della *Taq* DNA polimerasi presenta la massima processività a circa 70°C e l’estensione dei primer avviene ad una velocità di circa 100 basi/sec. Generalmente 1 minuto è sufficiente per amplificare con una buona resa stampi lunghi circa 1 Kbp. Il tempo di estensione viene quindi calibrato sulla lunghezza dello stampo da amplificare tenendo conto che una preparazione di *Taq* DNA polimerasi, a causa della sua pro-

cessività non alta, solitamente non amplifica con buona resa frammenti di DNA di lunghezza superiore a 3 Kbp. In alcuni casi (soprattutto per l'amplificazione di stampi oltre le 3 Kbp) può essere conveniente incrementare il tempo di estensione ciclo dopo ciclo per andare incontro alla diminuzione della concentrazione di *Taq* DNA polimerasi attiva (o altre DNA polimerasi termostabili).

Tampone di reazione

Un tampone di reazione (buffer) standard contiene:

- 10-50 mM Tris-HCl pH 8.3,
- fino a 50 mM KCl,
- **1.5 – 4 mM MgCl₂**,
- 0.2 – 1 M di ciascun primer,
- 50-200 M di ciascun deossiribonucleotide (dNTP),
- gelatina o BSA (siero albumina bovina) fino a 100 g/ml.

In alcuni casi vengono aggiunti detergenti non ionici come Tween-20, Nonidet P-40 o Triton X-100 (0.05-0.10% v/v) che agiscono stabilizzando la polimerasi, riducono la formazione di strutture secondarie ma possono favorire amplificazioni non specifiche.

Il tampone di reazione viene sempre fornito insieme all'enzima. In alcuni casi il produttore della *Taq* DNA polimerasi mette in commercio sia tamponi di reazione contenenti MgCl₂ sia privi di esso. Nel caso si debba mettere a punto una PCR è di norma preferibile avere a disposizione il tampone di reazione privo di MgCl₂, ed aggiungere il sale separatamente.

Infatti la concentrazione degli ioni **Mg²⁺** ha due ruoli: da un lato è un cofattore essenziale per la *Taq* DNA polimerasi per il caricamento dei nucleotidi, dall'altro la concentrazione di **Mg²⁺ influenza l'appaiamento dei primer** allo stampo. Maggiore è la concentrazione di MgCl₂ minore è la specificità dell'appaiamento. La variazione delle concentrazioni di MgCl₂ gioca quindi un ruolo simile (ma opposto) a quello

della temperatura di annealing e spesso la messa a punto di un'elevata (o bassa) **stringenza** (specificità) nella PCR è basata tanto sulla T_a quanto sulla concentrazione di $MgCl_2$. Uno schema riassuntivo sull'influenza della temperatura e del cloruro di magnesio sulla stringenza della reazione di PCR è presentato in figura 4.

Fattore	ELEVATA STRINGENZA	BASSA STRINGENZA
Temperatura di annealing	↑	↓
$MgCl_2$	↓	↑

Figura 4: Effetto del cloruro di magnesio ($MgCl_2$) e della temperatura di annealing sulla stringenza (**specificità**) di una reazione di PCR. Le frecce in alto e in basso indicano rispettivamente un aumento o una diminuzione della Temperatura di annealing e del $MgCl_2$.

Numero di cicli

In generale il numero di cicli è compreso tra 30 e 45. Il numero di cicli di amplificazione necessari ad ottenere una banda visibile su gel di agarosio può dipendere in gran parte dalla concentrazione di DNA iniziale.

Un'amplificazione PCR può essere suddivisa in tre fasi (figura 5):

esponenziale: dopo ogni ciclo si verifica un'esatta duplicazione del prodotto accumulato (efficienza di reazione pari al 100%). La reazione segue la formula:

$$a = t \times 2^n$$

- a.** quantità di amplicone prodotto
- t.** numero di molecole target iniziali
- n.** numero di cicli eseguiti

- lineare: continua la crescita esponenziale come fase logaritmica lineare, ma si assiste ad una graduale riduzione della disponibilità dei reagenti e dell'efficienza del sistema che porta ad un rallentamento della reazione.

plateau: nelle fasi tardive dell'amplificazione il tasso di accumulo di prodotto diminuisce drasticamente a causa di numerosi fattori tra cui la degradazione dei reagenti (dNTP, DNA polimerasi) e l'inibizione da parte del pirofosfato accumulato (inibizione da prodotto).

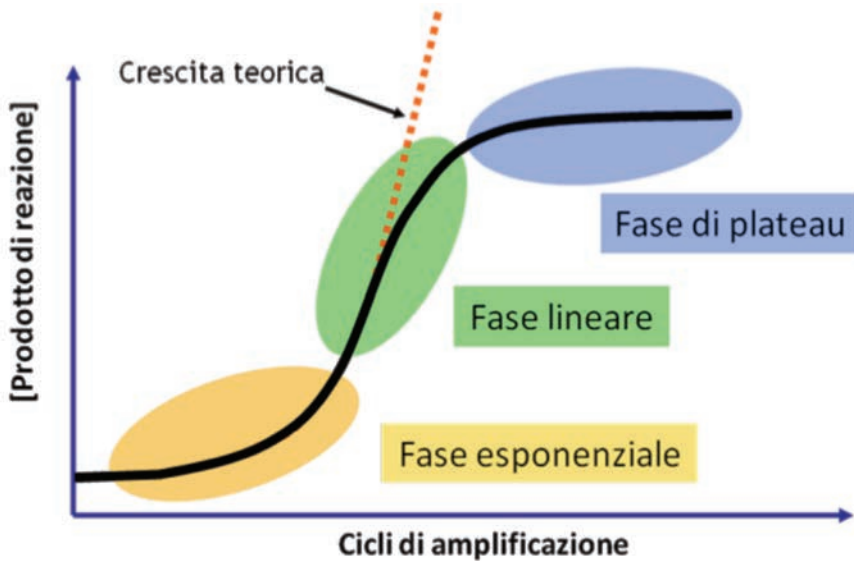


Figura 5: "Effetto Plateau" della reazione di PCR causato dalla degradazione dei reagenti e dall'accumulo di prodotti.

Additivi vari

Nel caso di sequenze da amplificare ricche in G+C può rendersi talvolta necessario aggiungere alla miscela di reazione delle molecole in grado di **favorire la denaturazione** della doppia elica del DNA. Le molecole più frequentemente utilizzate sono:

- dimetilsolfossido (**DMSO**) (2-10%)

- betaina (0.5-2 M)
- dimetilformamide (**DMF**)
- urea
- formammide (1-5%)
- glicerolo (in caso di sequenze ricche di strutture secondarie, inoltre protegge l'enzima dalle elevate temperature)
- sieroalbumina bovina (**BSA**) (fino a 0,8 g/l) in presenza dell'inibitore melanina
- polietilenglicole (**PEG**)

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

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

Infine, occorre citare il **polietilenglicole (PEG)** che può essere utilizzato per amplificare **DNA in concentrazione molto bassa**, in quanto promuove l'associazione macromolecolare tra DNA e DNA polimerasi attraverso l'esclusione del solvente.

DISEGNO DEI PRIMER

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

- **Primer3 URL:**

<http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3>; <http://www.cgi>;
oppure <http://frodo.wi.mit.edu/>;

- **GeneFisher URL:**

<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/genefisher2>;

- **Oligonucleotide calculator URL:**

<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>;

L'interfaccia web di Primer3 prevede una maschera in cui si incolla la sequenza sulla quale si desidera disegnare la coppia di primer ed una serie di opzioni relative alla lunghezza che devono avere i primer e la regione amplificata, la T_m dei primer da disegnare e eventuali restrizioni o zone particolari della sequenza sulle quali si vuole concentrare il disegno dei primer ottimali. Una volta impostate si avvia la ricerca ed il programma fornirà una prima coppia di primer ottimale, più una serie di coppie alternative che l'utente può scegliere a seconda delle necessità. Coppie di primer possono comunque anche essere disegnate a mano seguendo i parametri descritti sotto. Si deve ovviamente tener conto di disegnare un primo primer (**primer forward**) sull'elica senso del DNA e l'altro (**primer reverse**) sull'elica opposta (antisense) in modo da avere i due terminali 3' dei primer a delimitare il segmento da amplificare. Il programma *GeneFisher* è particolarmente utile per disegnare primer degenerati. Il software *Oligonucleotide calculator* permette di calcolare diverse proprietà degli oligonucleotidi quali il contenuto in GC, l'assorbanza della soluzione a 260 nm, la temperatura di melting a differenti concentrazioni di sali, le costanti termodinamiche e la presenza di complementarità.

Un altro software è offerto dalla Life Technologies al seguente link: <http://tools.lifetechnologies.com/content.cfm?pageid=9716>; che progetta primer per il clonaggio, sequenziamento, e gli esperimenti di rivelazione.

Lunghezza dei primer

La lunghezza ottimale di un primer dipende sia dal suo contenuto in A+T, sufficientemente basso da poter avere T_m (e quindi T_a) superiori a 50°C, sia dalla composizione nucleotidica della sua sequenza, in modo che la probabilità di avere siti di *annealing* diversi da quello voluto sia estremamente bassa (alta specificità). A questo proposito si può far notare che la probabilità di trovare una singola base (A, G, C o T) in una sequenza casuale di DNA è $\frac{1}{4}$ (cioè 4^{-1}); su un dinucleotide sarà il prodotto delle singole probabilità cioè $4^{-1} \times 4^{-1} = 4^{-2}$. Per un oligonucleotide di 16 basi sarà perciò 4^{-16} (**=1/4 294 967 296**) che corrisponde alla dimensione di un genoma di un eucariote complesso medio (come *Homo sapiens* o il *Zea mays*) ed è 1000 volte più grande del genoma di *E. coli*. Di conseguenza un oligonucleotide con **almeno 17 o più basi** sarà estremamente specifico e primer di questa lunghezza sono comunemente utilizzati per l'amplificazione PCR sia nei procarioti sia negli eucarioti con genomi complessi.

Il limite superiore per la lunghezza di un primer è dettato dalla sua T_m . Un primer troppo lungo avrà una T_m così alta che anche temperatura alte (70-72 °C di *annealing*) durante i cicli di PCR non sono sufficienti a limitare i casi di *annealing* a siti aspecifici dovuti alla stabilità di legami non complementari (*mismatch pairing*). Solitamente quindi la lunghezza di un primer non supera le **30-35 basi**. Nei programmi più comuni di disegno di primer citati sopra la lunghezza di *default* è definita in **20 basi**.

Contenuto in G+C e sequenze ripetute

G+C Il contenuto in G+C determina la T_m , quindi occorre evitare sia valori troppo bassi (bassa T_m) sia valori troppo alti (alta T_m). Solitamente il contenuto in G+C si aggira tra il **40 e il 60%**. Si preferisce, in alcuni casi, per aumentare la specificità dell'amplificazione, disegnare primer in cui le ultime basi al terminale 3' abbiano G o C (il terminale 3' è quello che porta all'innescio effettivo della polimerizzazione).

Sequenze ripetute La presenza di regioni a bassa complessità, cioè di sequenze ripetute (sia di singoli nucleotidi sia di regioni di- o tri-nucleotidiche) all'in-

terno di un primer deve essere evitata in quanto può portare ad uno slittamento dell'appaiamento o all'*annealing* su siti aspecifici (occorre ricordare che i genomi eucarioti sono ricchi di sequenze a bassa complessità) e quindi all'amplificazione di prodotti aspecifici.

Strutture secondarie e formazione di dimeri

La presenza di strutture secondarie intramolecolari o intermolecolari può determinare una diminuzione della resa di amplificazione o addirittura un'assenza di amplificazione. Le strutture secondarie infatti competono per l'*annealing* del primer con lo stampo sulla sequenza di DNA bersaglio, diminuendo drasticamente la concentrazione effettiva di primer disponibile per la reazione di amplificazione. Le strutture secondarie si possono classificare come "hairpin" (forcine), "self dimer" (autodimeri) e "cross dimer" (dimeri crociati):

Hairpin: le strutture ad *hairpin* si formano per l'interazione intramolecolare tra i nucleotidi del singolo primer (figura 6A). Gli *hairpin* al terminale 3' sono i meno tollerati in quanto sequestrano direttamente il residuo ossidrilico necessario alla polimerizzazione.

Self dimer: si formano per l'interazione intermolecolare tra due molecole di primer dello stesso tipo nei punti in cui il primer è omologo a se stesso (figura 6B).

Cross dimer: si formano tra due molecole di primer di tipo diverso nelle regioni di omologia di sequenza (figura 6C).



Figura 6: Esempi di strutture secondarie inibenti la reazione di amplificazione.

IL LABORATORIO DI BIOLOGIA MOLECOLARE

Quando si progetta un laboratorio di Biologia Molecolare bisogna rispettare dei criteri di sicurezza che tutelino l'operatore e al tempo stesso garantiscano l'attendibilità dei risultati.

L'estrema sensibilità della PCR, reazione che consente di generare quantità enormi di ampliconi a partire da una sequenza bersaglio di DNA o RNA, rappresenta l'aspetto che maggiormente deve essere tenuto in considerazione nell'applicazione della metodica. Le **contaminazioni** (*carry over*), intese non nel senso classico in termini di inquinamento microbiologico ma come propagazione di DNA precedentemente amplificato nei campioni in trattamento, sono sempre in agguato e possono essere di natura diversa:

- **Carry-over derivante da amplificazioni precedenti:** il saggio è pericolosamente sensibile alla presenza di molecole di DNA provenienti da precedenti amplificazioni, disperse nell'ambiente, sull'operatore e sugli strumenti; l'apertura di una provetta contenente l'amplificato può dar luogo ad un effetto aerosol che rende l'ambiente inutilizzabile per l'allestimento di ulteriori reazioni di PCR.
- **DNA esogeno:** DNA stampo per la PCR può essere presente nell'ambiente di lavoro (ad esempio, nel caso in cui vengano amplificate regioni del genoma umano, l'operatore può essere fonte di contaminazione con le proprie cellule di desquamazione)
- **Cross-contaminazione tra campioni:** si verifica durante la preparazione dei campioni o durante l'allestimento della reazione tra campioni positivi e negativi.
- **Contaminazione in fase di rivelazione del prodotto amplificato.**

La riduzione del rischio di contaminazione si ottiene agendo su diversi livelli:

- suddivisione fisica degli ambienti di lavoro (l'osservazione di questo accorgimento, consente di garantire gli obiettivi di *specificità*, *sensibilità* e *riproducibilità*, che si rendono necessari per una perfetta resa della reazione)

- uso dedicato di strumenti, reagenti, pipette, puntali nelle diverse aree
- adozione di una prassi di laboratorio appropriata (*Buona Prassi di Laboratorio*).

Suddivisione degli ambienti di lavoro e delle attività svolte

Un modello base di Laboratorio di Biologia Molecolare consta fondamentalmente di tre blocchi fisicamente separati: un'area riservata alle fasi di **PRE-AMPLIFICAZIONE** (suddivisa in un ambiente per la preparazione della **miscela di reazione** ed un ambiente per la preparazione del **campione**) ed una riservata all'**AMPLIFICAZIONE/RIVELAZIONE** dei prodotti PCR.

(A) Area pre-PCR

1. Ambiente per la preparazione della Master Mix nel quale si compiono le operazioni di:

- suddivisione in aliquote e stoccaggio dei reagenti di amplificazione.

E' necessario aliquotare e stoccare i reagenti utilizzati per la PCR (tampone, primer, nucleotidi, enzima) in quest'area.

- Preparazione della miscela di reazione (*master mix*) e allestimento dei tubi per l'amplificazione.

Area pre-PCR (A1): dotazione ambiente per la preparazione della Master Mix

Area pre-PCR: dotazione ambiente per la preparazione della Master Mix



- una serie di micropipette dedicate con puntali dotati di filtro
- provette sterili e porta provette
- camice
- guanti

2. Ambiente per la preparazione del campione nel quale si compiono le operazioni di:

- preparazione e conservazione del campione (separazione delle matrici biologiche, isolamento cellulare, concentrazione cellulare): i campioni di DNA o RNA devono essere preparati in un'area distinta da quella in cui vengono manipolati i reagenti e da quella in cui vengono analizzati gli amplificati.
- Lisi ed estrazione degli acidi nucleici dalle diverse matrici biologiche con metodiche diverse
 - sistema con particelle solide di silice;
 - sistema di separazione con solventi organici e precipitazione in fase alcolica;
 - sistema con colonnine filtranti con membrane di silice;
 - sistema di cattura mediante biglie magnetiche.
- Conservazione degli acidi nucleici.
 - Gli acidi nucleici (**DNA** o **RNA**) possono essere quantificati, con metodi spettrofotometrici o fluorimetrici, al fine di verificarne la purezza e le diluizioni da usare per la preparazione della mix di reazione.
- Aggiunta del DNA o dell'RNA estratto e dei controlli negativo e positivo alla miscela di reazione (PCR o retro trascrizione)

Area pre-PCR: dotazione ambiente per la preparazione del campione



- cappa a flusso laminare
- centrifughe
- vortex
- blocco termostato
- una serie di micropipette dedicate con puntali dotati di filtro
- provette sterili e porta provette
- camice
- guanti

(B) Area PCR/post-PCR deputata alle operazioni di:

- amplificazione mediante PCR classica e real-time.
- Dopo la fase di amplificazione si deve effettuare una centrifugazione per evitare l'effetto aerosol (condensa) sulla superficie interna dei tappi, determinato dai cicli termici.
- Rivelazione (elettroforesi su gel, tecniche di ibridazione su striscia, piastra, bio-chip, sequenziamento, analisi di restrizione, ecc.).
- Gestione dati ed archiviazione.

Area PCR/post-PCR: dotazione ambiente



- thermal cycler e real-time cycler
- sequenziatore
- cella elettroforetica e transilluminatore
- centrifughe
- vortex
- blocco e bagno termostato
- una serie di micropipette dedicate con puntali dotati di filtro
- provette sterili e porta provette
- camice
- guanti

Concludendo, è il caso di ribadire l'importanza di un corretto ed univoco flusso di movimenti da parte degli operatori, per ridurre al minimo il rischio di contaminazioni, come si evince dalla figura 7.



Figura 7: Percorsi consigliati in un laboratorio di biologia molecolare

Strumenti, reagenti, pipette e puntali dedicati nelle diverse aree

- **Cappa a flusso laminare**
- **Microcentrifuga**
- **Vortex**
- **Blocco termostato a secco e stufa**
- **Fotometro**
- **Frigorifero, congelatore -20 °C**
- **Thermal-cycler**
- **Sistema elettroforetico**
- **Timer**
- **Pipette variabili autoclavabili (0,5-1000 µL) con supporti**
 - le normali pipette per puntali monouso usate comunemente in laboratorio sono fonte di contaminazione. Si possono formare infatti aerosol contenenti frammenti di DNA che possono essere trasportati in campioni

negativi. Per eliminare questa cross-reazione è necessario l'uso di pipette con puntali contenenti un filtro (barriera tra campione e pipetta) o pipette ad espulsione positiva con puntali dotati di pistone .

- N.B.: E' ASSOLUTAMENTE INDISPENSABILE UTILIZZARE SET DI PIPETTE DISTINTI NELLE DIVERSE AREE.
- **Puntali con filtro in portapuntali**
- **Tubi di biologia molecolare (0.2/0.5/1.5/2.0 ml)**
- **Rack porta tubi (anche refrigerati)**
- **Guanti in lattice**
- **Pennarello indelebile**
- **Cilindri e Becker**
- **Reagenti aggiuntivi (alcool etilico - isopropilico - tamponi ipoclorito)**

Buona Prassi di Laboratorio (BPL)

In tutte le varie fasi:

- Cambio frequente guanti
- Apertura attenta provette per minimizzare aerosol;
- Aggiungere il campione come ultimo ingrediente della mix;
- Chiudere la provetta dopo aver dispensato il campione e prima di passare al successivo;
- Pulire le superfici di lavoro con prodotti detergenti specifici.

Controlli

Come in tutte le tecniche laboratoristiche è necessario allestire un controllo positivo (**C⁺**) ed un controllo negativo (**C⁻**).

Il controllo positivo

La positività di questo campione attesta la corretta esecuzione della reazione di amplificazione. Il controllo positivo è costituito da un plasmide o da un campione di DNA/RNA contenente la sequenza bersaglio.

Sono sufficienti poche molecole di target per ottenere un segnale positivo dopo l'amplificazione.

E' preferibile che il C⁺ non abbia troppe copie bersaglio, al fine di evitare che costituisca una pericolosa fonte di contaminazione (generando quantità enormi e non necessarie di sequenze di DNA).

Il controllo negativo

Nell'allestimento di ogni reazione è necessario aggiungere uno o più controlli

negativi, interposti fra i campioni. La negatività di questo campione attesta l'assenza di contaminazione della miscela di amplificazione. Il controllo negativo può essere costituito da un campione sicuramente negativo o in alternativa da acqua distillata.

Per controllare la specificità, può essere utile includere anche controlli contenenti sequenze di DNA che non corrispondono alla sequenza da amplificare.

Inattivazione del DNA amplificato

Può avvenire a due livelli: durante l'allestimento di una nuova reazione (inattivazione **pre-PCR**) o al termine della reazione, prima della fase di rivelazione dei prodotti amplificati (**post-PCR**).

Inattivazione pre-PCR

Una di queste strategie è basata sui sistemi di restrizione-modificazione e di taglio-riparo delle cellule. Per poter distinguere il DNA bersaglio da quello derivante da precedenti PCR, nella miscela di reazione la deossitimidintrifosfato (dTTP) viene sostituita con la deossiuridinatrifosfato (dUTP) che viene incorporata nel DNA amplificato.

Nell'allestimento di una nuova reazione viene aggiunto l'enzima *Uracil N-glicosilasi* (UNG) che prima dei cicli di amplificazione catalizza la rottura del legame fosfodiesterico dell'uracile dal deossiribosio nel DNA contaminante (eventualmente presente) lasciando intatto il DNA nativo contenente dTTP. Il DNA risultante, privo degli uracili, è suscettibile all'idrolisi in soluzione alcalina (Tamponi) e alle alte t°C.

Altri metodi di inattivazione pre-PCR

- **Irradiazione** della miscela di reazione con raggi UV a bassa lunghezza d'onda (tra 254 e 300 nm per 20 min.)
- **Digestione** con DNA-asi I o con enzimi di restrizione che taglino all'interno del frammento contaminante

Tuttavia tali sistemi hanno dei limiti:

- Non efficaci per quantità superiori a 10^3 molecole
- La miscela di reazione non deve contenere né la DNA polimerasi né il campione.

Inattivazione post-PCR

Inattivazione tramite modificazione fotochimica del DNA dopo l'amplificazione:

- la presenza nel filamento stampo di una base alterata, per via fotochimica, blocca l'estensione della Taq polimerasi.
- Alla miscela possono essere aggiunti reagenti in grado di rimanere stabili durante la PCR e poi, una volta foto-attivati, di formare degli "adducts" che impediscono al DNA di fare da stampo.

Raccomandazioni finali

Ogni stanza o zona dedicata deve essere attrezzata con tutto ciò che necessita (strumenti e materiali) al completamento della procedura prevista in quella stanza o zona.

Per nessuna ragione la strumentazione o il materiale dedicato ad una stanza o area va trasportato o utilizzato in un'altra. Ogni area, infatti, deve essere dotata di un frigo adibito alla conservazione rispettivamente di:

- ❖ reattivi per le reazioni di amplificazione;
- ❖ campioni, prodotti estratti, reagenti per l'estrazione;
- ❖ ampliconi e reagenti per la rivelazione.

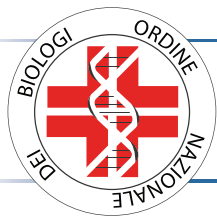
Norme di sicurezza

In laboratorio bisogna utilizzare sempre:

- ❖ guanti monouso;
- ❖ occhiali di protezione (sempre ben puliti);
- ❖ camici;
- ❖ adeguata ventilazione dei locali;
- ❖ manutenzione delle apparecchiature;
- ❖ addestramento specifico;
- ❖ adozione, aggiornamento e divulgazione del protocollo per la sicurezza.

BIBLIOGRAFIA ESSENZIALE

- G. Mangiarotti - *Biologia Molecolare* – Padova: Piccin Editore, 2001.
- B. Alberts *et al.* - *Biologia Molecolare della cellula* – Zanichelli Editore, 2002.
- R.J. Reece - *Analisi dei geni e genomi* – Napoli: EdiSES Editore, 2011.
- M.G. Marin - *Diagnostica di Laboratorio. Tecniche di amplificazione genica: dal Laboratorio alla pratica clinica.* Milano: Sorbona editore, 1999.
- R. Verna - *La diagnostica di Laboratorio con i metodi della biologia molecolare.* Padova: Piccin Editore, 1998.
- S. Ursia *et al.* - *Organizzazione e gestione tecnica di un laboratorio di medicina molecolare.* Riv Med Lab - JLM, Vol. 2, S.1, 2001.
- L. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis - *Molecular Cloning, a laboratory manual (second edition).* Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.



Ordine
Nazionale
Biologi

®