La tecnica della PCR real-time nello studio del DNA

Data 28 aprile 2008
Categoria medicina_legale

Le tecniche di studio del DNA, specialmente in ambito forense, sono in continua evoluzione: migliorano l' affidabilita', i tempi d' attesa. La recente tecnica del PCR Real-Time apre nuove prospettive. Breve illustrazione della metodica

Senza dubbio la PCR (Polymerase Chain Reaction) rappresenta una delle scoperte più importante del 900, ed "rivoluzionato " il mondo scientifico, sopratutto nel settore della Medicina forense.
In precedenza, trovando sul luogo del delitto una traccia biologica, per poter effettuare un profilo genetico erano necessarie discrete quantità di materiale biologico. Grazie alla tecnica della pcr, invece , riesce ad ottenere , spesso , un buon profilo genico anche a partire da modeste quantità di tracce, smagari degradate o mal conservate (saliva adesa a chewingum , saliva da mozzicone di sigaretta,saliva adesa ad una tazzina di caffè, una goccia di sangue), tale da permettere di identificare una persona od operare un valido raffronto con un sospetto.
Tutto cio', inoltre, in tempi molto piu' brevi.

TECNICA DELLA PCR
La PCR (il cui acronimo sta per "reazione a catena della polimerasi") è un metodo attraverso cui una sequenza di acido nucleico può essere riprodotta e amplificata esponenzialmente in vitro partendo da quantita' piccolissime e producendo milioni di copie del breve segmento di DNA/Rna che interessa, in modo da poterlo analizzare .

La PCR avviene in tre fasi:
nella prima , che avviene a temperature elevate (intorno ai 95C), si ha la denaturazione (il dna apre la sua doppia elica); poi avviene " l'annealing ",ovvero si verifica il legame tra due primers con le sequenze complementari a temp. + basse, poi avviene l'estensione dei primers con la conseguente sintesi del frammento di interesse.
NellaPCR cio' che varia, a seconda del target di interesse, sono il numero dei cicli, le temperature dei tre step ed altri piccoli elementi ancora che consentono di " modellare " la tecnica al frammento di interesse.
Negli ultimi anni si è andata affinando una tecnica specifica della pcr, ancora più mirata , che consente ancora ulteriori applicazioni, quale è

La tecnica della REAL TIME –PCR.

La PCR real-time, PCR quantitativa in tempo reale (rt-PCR), è un metodo in cui il fenomeno dell'amplificazione viene "monitorato "in tempo reale, in cui si analizza momento per momento ogni singola fase della reazione .
L'analisi del prodotto amplificato non avviene ,quindi come nella pcr classica, al termine della stessa, ma durante la reazionestessa.
Le chimiche utilizzate sono diverse, anche se il principio sostanzialmente è lo stesso.Elencheremo qui di seguito alcune diesse:
Sybr-GreenI
Dual labeled probes 5'-3'
Quenched FRET probes (Fluorescent resonance energy transfer), in cui si verifica un fenomeno di fluorescenza solo se si verifica l' incontro tra la sonda chimica e il suo DNA bersaglio.

CAMPO DI APPLICAZIONE DELLA REAL TIME NELLA PRATICA LABORATORISTICA.
La PCR - real time trova notevoli applicazioni in diversi settori della diagnostica :
ad es. per la determinazione degli Organismi geneticamente modificati (ogm) , nella Quantificazione dei batteri ; nel campo della virologia (la tecnica risulta molto utile per il dosaggio quantitativo di diversi virus).
Rispetto ai metodi tradizionali presenta notevoli vantaggi :
consente di eliminare eventuali segnali pcr- aspecifici .
il risultato del campione analizzato viene valutato all'interno di una" curva di calibrazione " in cui i componenti sono standard a concentrazione nota.
al termine dell'amplificazione la reazione ha termine e non è necessario , verificare ulteriormente il prodotto ottenuto dell'amplificazione.
è possibile conservare i dati nella memoria del computer .

L'impiego diagnostico della r.t pcr è applicabile nella pratica laboratoristica, ad esempio, per indagini sulle patologie cardiovascolari (CVD): ai tradizionali fattori di rischio (ipertensione, ipercolesterolemia, fumo e obesità), si aggiungono infatti "predisposizioni genetiche allo sviluppo della patologia ". Con questa tecnica è possibile identificare con certezza la presenza di diverse mutazioni legate a a queste patologie, passando quindi dalla diagnostica fenotipica a quella genotipica.
Il risultato è specifico , con modesti costi per il laboratorio ed è sicuramente rapido.
Il principio della metodica è sostanzialmente lo stesso: attraverso l'analisi della curva di melting (curva di dissociazione) si potranno distinguere i tre genotipi in base alla posizione dei picchi : singoli (in due posizioni diverse) per i campioni (selvatico /mutato) ; doppio per l'eterozigote.

Ma uno degli impieghi fondamentali resta quello forense, della quantificazione del DNA, in quanto favorisc una ottimizzazione e standardizzazione della metodica (al fine, per esempio, di identificare un profilo biologico).
Dopo l'amplificazione , la concentrazione del dna del campione viene calcolata per interpolazione su una curva standard e ciò consente di realizzare sospensioni con livelli ottimali di DNA.

Contributo originale di Anna D' Ambrosio (Roma), biologa, Consulente del Tribunale