

### RPA Recombinase Polymerase Amplification

La RPA è una reazione isoterica che permette di amplificare sia DNA che RNA. Per amplificare RNA è necessario inserire nella miscela di reazione una *trascrittasi inversa*. La reazione avviene a temperatura costante, tra i 25 e i 42°C.

I vantaggi di questa tecnica sono la semplicità, la flessibilità data la presenza di molti kit di rilevamento, e la rapidità in quanto i risultati si ottengono in 5-20 minuti.

Il campione non va denaturato prima dell'amplificazione RPA.

### Componenti

Due proteine sostituiscono il passaggio di denaturazione termica del campione. Queste proteine sono la *ricombinasi RecA* di *E.coli* e la *single-strand DNA binding protein SSB*.

La ricombinasi è una proteina che è in grado di catalizzare il processo di ibridazione tra primer oligonucleotidici e la sequenza target omologa.

La reazione di replicazione è fatta con una DNA polimerasi con attività di *strand displacement*, come la *Sau* polimerasi di *S.aureus*.

È necessaria la presenza di proteine e cofattori che supportano la reazione, quali:

- la proteina **T4 UvsY**, che assiste la ricombinasi RecA durante la formazione del complesso primer-ricombinasi.
- Il **polietilen glicole**, che è una macromolecola ad alto peso molecolare che ha mostrato di stimolare l'interazione delle proteine chiave per la RPA con il DNA, agendo da crowding agent
- La proteina **creatina chinasi**, che usa la fosfocreatina per generare ATP, necessario al funzionamento degli enzimi presenti nella miscela di reazione.

## Come funziona

La reazione RPA inizia con la formazione di un complesso primer-ricombinasi (RecA). Questi complessi si muovono sul template cercando una sequenza complementare al primer. Trovati i siti specifici, la ricombinasi apre la doppia elica e permette la formazione di un complesso primer-DNA. Questo processo è facilitato dalle SSB, che si legano alle porzioni di ssDNA. La DNA polimerasi accede alla forcella di replicazione ed estende il primer. Il filamento neosintetizzato è in grado di fungere da template per il ciclo successivo di replicazione.

Il complesso primer-ricombinasi si forma in presenza di ATP. La ricombinasi (*UvsX*) si lega cooperativamente agli oligonucleotidi.

In seguito all'idrolisi dell'ATP il complesso primer-ricombinasi si disassembla. La ricombinasi si dissocia dal primer e viene sostituita dalla SSB (gp32 in questo caso).

In presenza della proteina *UvsY* e degli agenti addensanti si stacca SSB e si sposta l'equilibrio verso il complesso primer-ricombinasi. Si ha quindi un equilibrio tra le due forme.

È necessaria la presenza di ATP nella miscela, per questo è presente la *creatina chinasi* che produce ATP a partire dalla fosfocreatina.

## I primers

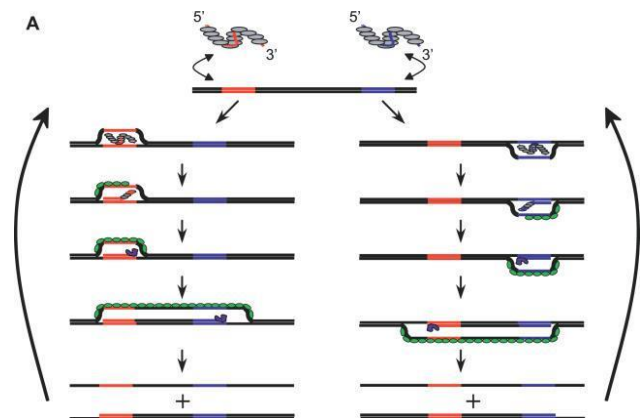
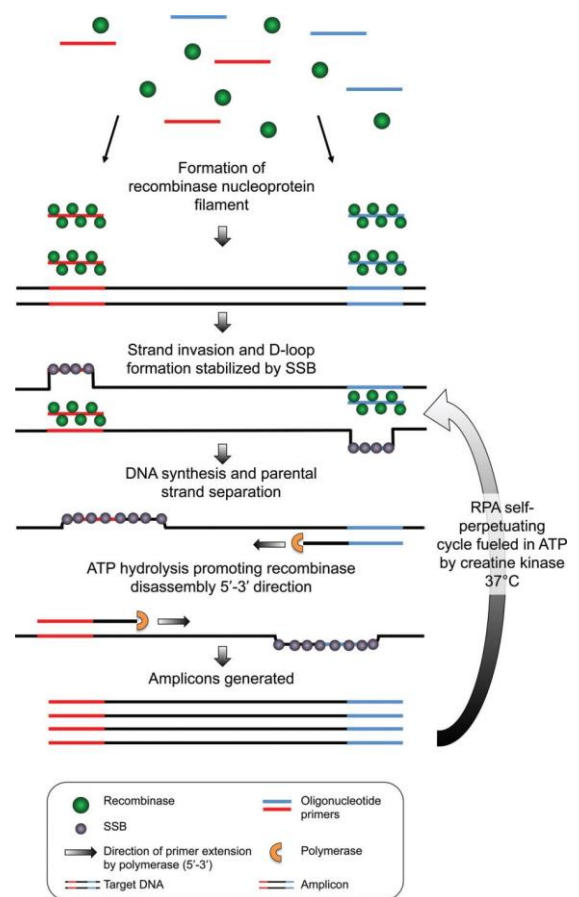
I primers hanno una lunghezza che va dalle 30 alle 35 basi, che permette di avere la formazione ottimale del complesso primer-ricombinase.

Vanno evitate piccole sequenze ripetute e segmenti di un solo nucleotide. Il contenuto di GC deve essere tra il 40 e il 60%.

I primers non devono appaiarsi tra loro né ripiegarsi su sé stessi.

RPA può amplificare sequenze lunghe, fino a 1500 basi; tuttavia risultati migliori si ottengono con sequenze di 100-200 bp.

La reazione è isoterica, quindi non c'è una temperatura di melting da raggiungere.



## Componenti della miscela di reazione

- T4 UvsX protein, che è la recombinasi. Si può usare anche la ricombinasi RecA di E.coli.
- T4 UvsY protein, che è il fattore di caricamento della recombinasi.
- T4 gp32, che lega i filamenti di DNA liberi. Si può usare anche la SSB (single strand binding protein) di E.coli.
- DNA polimerasi I, da *Bacillus subtilis* *Bsu*, oppure da *S.aureus* *Sau*.
- Deossinucleotidi trifosfato
- Primers
- DNA template
- Agenti addensanti come PEG o Carbowax
- Creatina chinasi
- Fosfocreatina
- Tampone Tris
- Potassio acetato
- Magnesio acetato

## Amplificazione di regioni specifiche di genoma

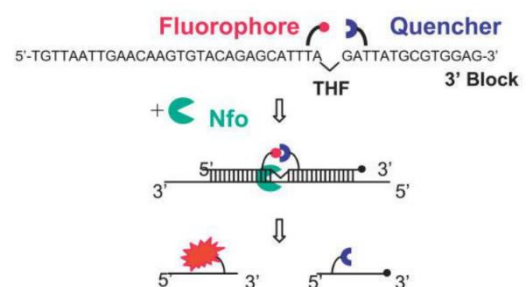
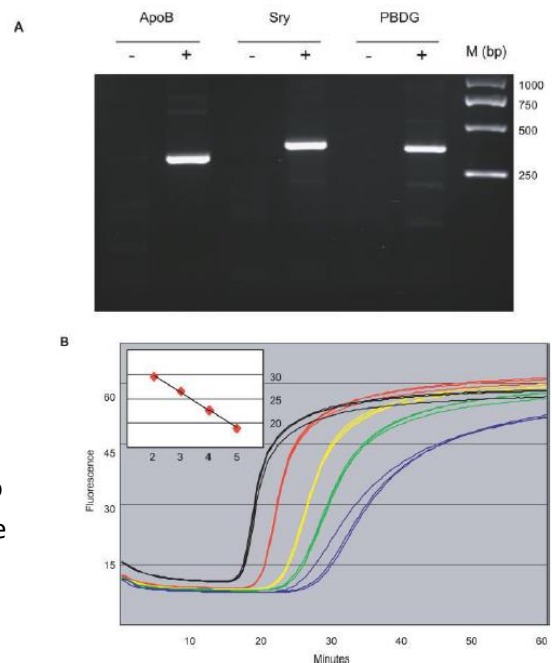
Nello studio di Piepenburg del 2006 dove è stata presentata la tecnica RPA si è visto che questa metodica è in grado di amplificare specifici markers genetici da una miscela complessa di DNA, utilizzando specifici primers. Rimane comunque un rumore di fondo.

La metodica RPA può anche essere monitorata in real-time, ad esempio mediante l'aggiunta nella miscela di un agente intercalante fluorescente, come il SYBR green.

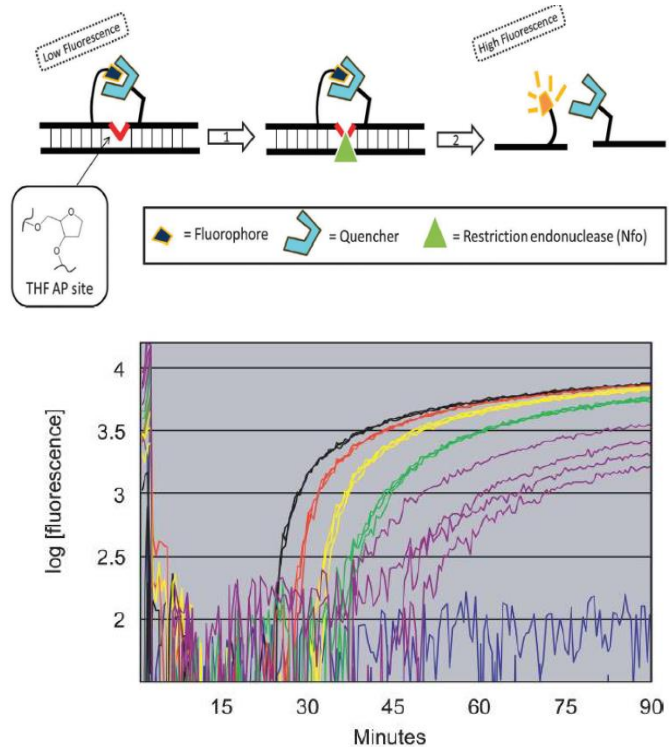
I ricercatori hanno amplificato soluzioni a concentrazione progressivamente decrescente di DNA, oltre ad un controllo con acqua. Con il progredire della reazione si vede l'aumento del segnale nella miscela; questo aumento di segnale avviene più precocemente quando nella miscela c'è una concentrazione maggiore di DNA. Si vede però l'aumento di segnale anche nella soluzione controllo, che contiene sola acqua.

### Rimuovere il rumore di fondo

Gli autori descrivono un modo per poter diminuire il rumore di fondo. Si utilizza un ulteriore primer a ssDNA che presenta un sito abasico, che diventa substrato della endonucleasi Nfo (*E.coli* endonuclease IV) nel momento in cui il primer si appaia alla sequenza complementare. Questo primer viene disegnato in modo da appaiarsi all'interno del template e



possiede un fluoroforo legato da una parte del sito abasico ed un quencher legato dalla parte opposta. Ha una lunghezza che va dalle 46 alle 52bp. La porzione di primer che lega il quencher non può fungere da primer perché lega un gruppo bloccante a 3'. Il quencher blocca il fluoroforo fino a quando il sito abasico è integro. Quando il primer si appaia al template e la endonucleasi cliva il sito abasico, il quencher si allontanerà da fluoroforo, che emetterà fluorescenza. Inoltre il clivaggio del sito abasico lascia una estremità 3' libera, che viene utilizzata per l'estensione da parte della DNA polimerasi. Questo primer funge così allo stesso tempo da primer e da sonda fluorescente.



## Multiplex

È possibile effettuare reazioni multiplex mediante RPA, amplificando più regioni di interesse del template in una sola reazione, utilizzando primer specifici per le regioni di interesse, marcate con fluorofori diversi.

## Rilevamento dei prodotti di amplificazione

È possibile rilevare i prodotti di amplificazione in vari modi.

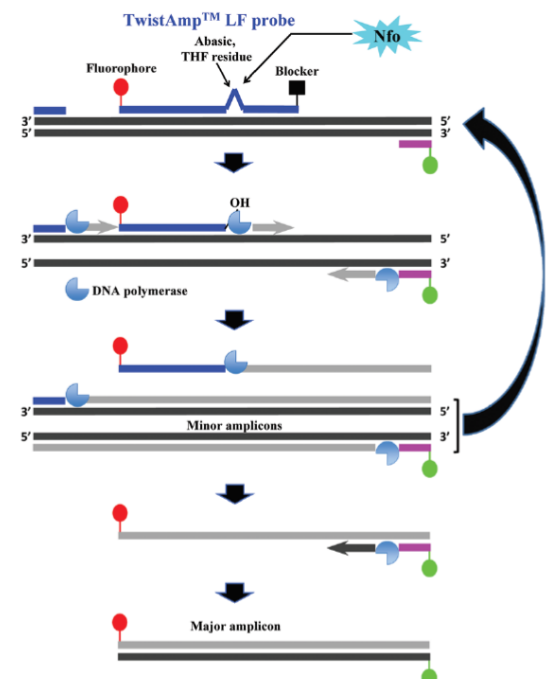
### Elettroforesi

Tra questi troviamo l'elettroforesi su gel di agarosio, che richiede di inserire anche un agente intercalante fluorescente, per facilitare la visualizzazione dei prodotti di amplificazione sul gel.

### Lateral flow strips

Un'altra metodica molto utilizzata sono le *lateral flow strips*. Questi sono dispositivi diagnostici monouso che servono a visualizzare la presenza di un certo prodotto di amplificazione all'interno di una RPA. L'amplificato è marcato al 5' con due diversi antigeni, uno per filamento, ad esempio FAM (carbossifluoresceina) e biotina.

Prodotti di questo tipo, che legano due antigeni diversi possono essere ottenuti nel seguente modo: uno si ottiene marcando uno dei due primer usati per l'amplificazione. L'altro si ottiene marcando la sonda interna, quella col sito abasico, che dopo il taglio funge da primer. Dato che il primer è interno, il filamento



neosintetizzato verrà scalzato dall'allungamento del primer a monte. In questo modo si ottengono due ampliconi, come in figura.

La porzione *sample pad* della *lateral flow strip* va immersa in una miscela contenente particelle d'oro visibili, che sono legate ad un anticorpo in grado di riconoscere uno dei due antigeni legati all'amplicato.

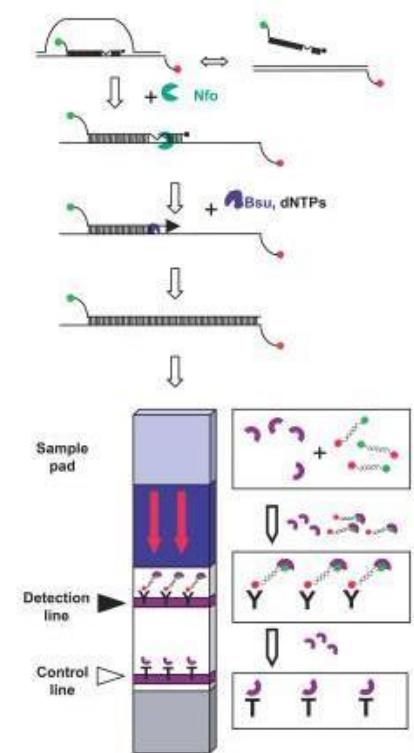
Un secondo anticorpo, in grado di riconoscere il secondo antigene, è immobilizzato sulla *lateral flow strip*, al livello della *detection line*.

Quando viene caricata la miscela di reazione sulla *lateral flow strip*, se è presente il materiale genetico ricercato e si è quindi formato dell'amplicato, gli anticorpi legati alle particelle d'oro riconoscono l'antigene legato all'amplicato. Il campione si sposta sulla *detection line* e se è presente anche il secondo antigene apparirà una linea.

Nella *lateral flow strip* è presente anche una *control line*, che contiene anticorpi in grado di legare le particelle d'oro, legate o meno all'antigene.

La comparsa della linea sulla *detection line* indica che il campione è stato amplificato e che quindi era presente il materiale genetico ricercato.

Se non appare una linea di *detection line* possono esserci due ipotesi: il campione non conteneva il materiale cercato, oppure non ha funzionato il test. La linea di controllo serve ad evidenziare che le particelle di oro si sono effettivamente spostate lungo la *lateral flow strip*, ma dato che non legavano antigeni non è comparsa la *detection line*.

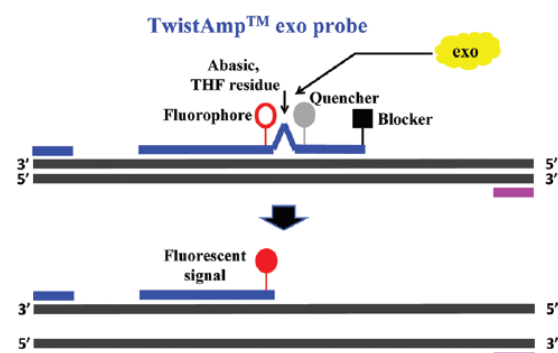


### Sonde fluorescenti in real time

I prodotti di amplificazione possono essere visualizzati mediante sonde fluorescenti in real-time.

### RPA *exo probe*

La sonda è come quella del primer interno contenente un fluoroforo ed un quencher separati da un sito abasico, ed un gruppo bloccante in 3'. L'esonucleasi III di E.coli taglia al sito abasico quando la sonda è appaiata al filamento complementare, allontanando il quencher e dando la fluorescenza. La sonda può anche servire da primer con la sua estremità 3' libera (lei dice che la exonucleasi degrada i prodotti e quindi lo stesso filamento non può fare da primer). La fluorescenza permette l'identificazione dei prodotti.

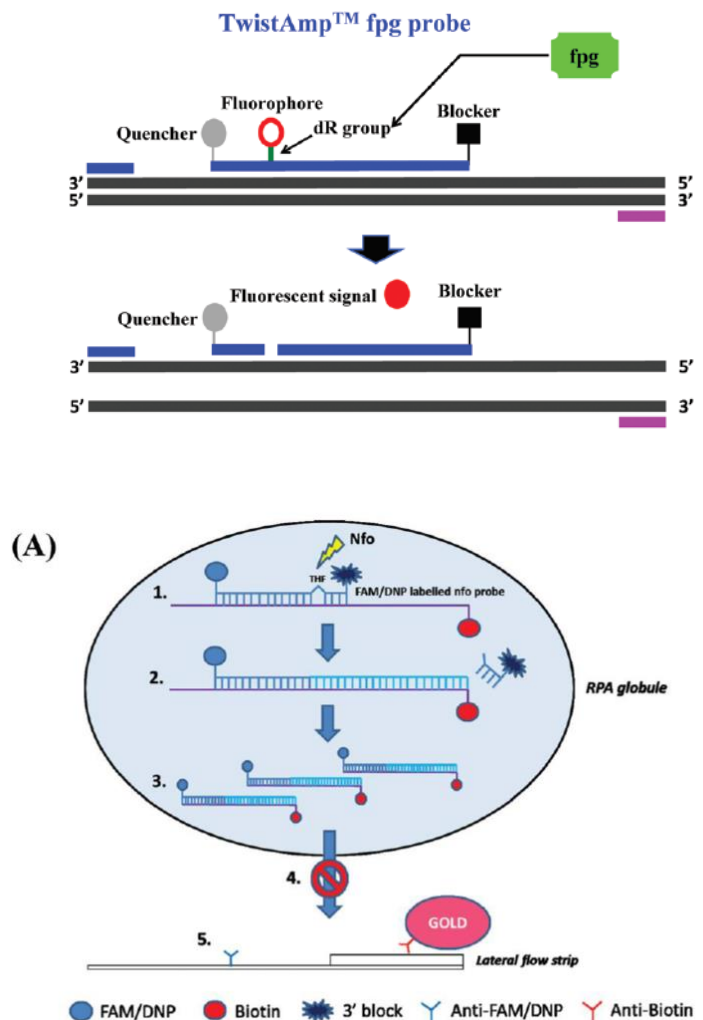


## RPA *fpg*

Si usa una sonda primer un po' più corta della *exo*, con una lunghezza compresa tra 32 e 35 nucleotidi.

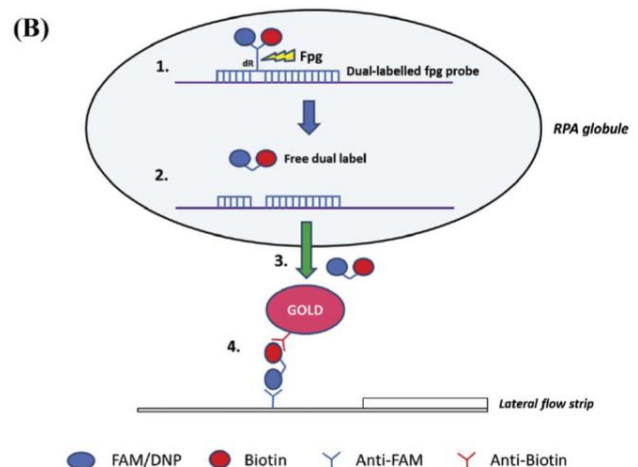
È caratterizzata dalla presenza di un quencher alla estremità 5', che è separato da circa 5 – 6 nucleotidi da un fluoroforo legato allo zucchero di un sito abasico (dR group, desossiribosio). Fluoroforo e quencher interagiscono, per cui non si ha emissione di fluorescenza.

La glicosilasi *fpg* di E.coli è in grado di riconoscere e tagliare al livello del sito abasico, liberando il fluoroforo che può ora emettere fluorescenza. Il segnale fluorescente indica quindi la presenza di templatato nel campione. La glicosilasi *fpg* taglia la sonda lasciando un gruppo fosfato esposto, che non permette l'allungamento da parte della polimerasi. Questa sonda non funge da primer.



Se si usano le *Lateral flow strip* la miscela di RPA deve essere diluita prima del caricamento sulla strip. I prodotti di amplificazione sono solitamente molecole lunghe almeno 100 bp, che possono rimanere intrappolate nei globuli RPA. I globuli RPA si formano a causa della presenza degli agenti addensanti PEG o Carbowax, che fanno sì che gli ampliconi di dimensioni relativamente grandi non riescano a legarsi alla strip. Per evitare questo fenomeno il campione va diluito.

Il passaggio di diluizione è evitabile utilizzando kit commerciali che permettono di visualizzare direttamente i prodotti di amplificazione. La sonda in questione è una sonda *fpg* con due antigeni uniti da un linker, che li lega allo zucchero di un sito abasico. La glicosilasi *fpg* libera gli antigeni, che restano legati tra loro. Questa coppia di antigeni è di piccole dimensioni e sfugge ai globuli RPA, potendo essere quindi facilmente rilevata dalla lateral flow strip senza che il campione venga diluito.



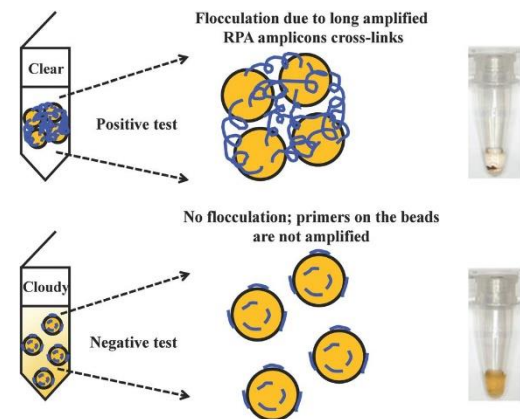
I prodotti di amplificazione RPA possono essere rilevati con gli stessi metodi usati per rilevare di prodotti di PCR. Inoltre ci sono diversi metodi specifici per la rilevazione di prodotti RPA.



## Saggio di flocculazione

Nel saggio di flocculazione la miscela viene diluita in un tampone a pH acido in presenza di sferette magnetiche. Se nella miscela di reazione sono presenti ampliconi relativamente lunghi, di circa 100 bp, questi precipitano sulle sferette magnetiche. Gli ampliconi che precipitano sulle sferette magnetiche possono crosslinkare tra loro, dando luogo a degli aggregati che flocculano in soluzione.

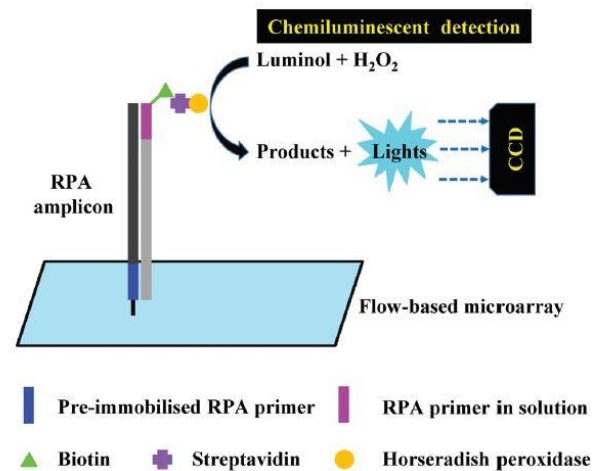
Se non si hanno ampliconi nella soluzione non si avrà la formazione degli aggregati con relativa flocculazione. Questo è un metodo di rilevazione rapido (circa 10 minuti), di tipo end-point.



## Rilevazione della chemiluminescenza

Il saggio viene effettuato mediante un supporto solido, su cui sono fissate copie di uno dei primer. L'altro primer è in soluzione assieme ai reagenti necessari alla reazione. Il primer in soluzione è legato alla *biotina*. Se il template è presente viene amplificato grazie alla coppia di primer.

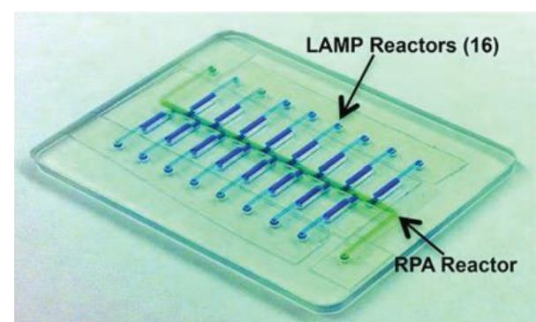
La visualizzazione è end-point, per cui al termine della reazione si aggiunge la streptavidina coniugata alla perossidasi di rafano (*horseradish peroxidase*). La streptavidina legata alla perossidasi si lega alla biotina. Quando si aggiunge il *luminol* in presenza di *acqua ossigenata* si avrà l'ossidazione del luminol, con produzione di luce che viene rilevata da una CCD camera.



## Multiplex RPA

L'amplificazione multiplex con metodo RPA si può eseguire in combinazione con la tecnica LAMP. In questo sistema si avrà prima la reazione RPA e successivamente la reazione LAMP.

In un apposito reattore RPA si amplificano dei template (16 template diversi nel reattore nell'immagine) contemporaneamente. Si effettuano successivamente le reazioni LAMP, che avvengono ognuna in un reattore diverso, 16 nell'immagine. In ogni reattore LAMP è contenuto un set di primer specifici per uno solo dei template. In ognuno dei reattori ci sarà un segnale fluorescente soltanto se il template specifico è stato amplificato.



In commercio esistono diversi kit per effettuare reazioni RPA sia su DNA, che su RNA mediante l'inserimento di una trascrittasi inversa nella miscela di reazione.

La metodica RPA ed altre metodiche di amplificazione sono capaci di rilevare DNA o RNA in matrici biologiche complesse, ed hanno un grande potenziale per l'uso *point-of-care*.