

COVID-19 og qPCR

af Andreas Vedel, Aalborg City Gymnasium

De fleste gymnasieelever i Danmark har formodentlig prøvet at blive testet for COVID-19 vha en PCR-test eller en antistof-test. Her præsenteres først en kortfattet biologisk baggrund for PCR-testen og dernæst en vejledning til et PCR-eksperiment. Det er en fordel at have kendskab til den oprindelige udgave af PCR-processen, inden dette dokument læses og qPCR-eksperimentet udføres.

Baggrundsviden

Den oprindelige anvendelse af PCR (Polymerase Chain Reaction)¹ er en såkaldt endepunkts-måling. Når reaktionen begynder, så observeres der ikke noget undervejs og man venter indtil reaktionen er afsluttet fuldstændigt, typisk efter 30 eller flere cyklusser. Dette ændrede sig med opfindelsen af qPCR (quantitative PCR) i begyndelsen af 1990'erne.

Når man starter en PCR-reaktion er det DNA eller RNA, som man er interesseret i (mål-sekvensen), oftest til stede i en kompleks blanding med meget andet og uinteressant DNA eller RNA. Derfor anvendes primere som sikrer at kun den meget specifikke målsekvens kopieres vha polymerasen. Den fase af PCR-reaktionen hvor polymerasen fordobler antallet af kopier af målsekvens i hver cyklus, kaldes den eksponentielle fase.

Antallet af kopier af mål-sekvensen pr. cyklus aftager først, når en eller flere af de nødvendige reagenser i prøven er opbrugt. Denne fase af en PCR-reaktion kaldes plateau-fasen.

I konventionel PCR venter man normalt på, at reaktionen når plateaufasen før man - vha elektroforese – efterfølgende aflæser resultaterne.

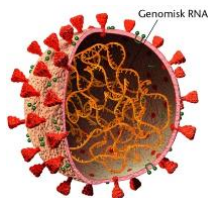
I qPCR er det den eksponentielle fase, som er interessant og man behøver ikke at aflæse resultaterne vha elektroforese.

COVID-19

SARS-CoV-2, se figur 1, er navnet på den corona-virus, der blev opdaget i 2019 i Kina og som forårsager en luftvejsinfektion, coronavirus disease 2019, forkortet til COVID-19.

SARS-CoV-2 er en RNA-virus: Genomet består af enkeltstretet RNA (ssRNA = single-stranded RNA). Den inficerer en celle ved at overføre ssRNA fra virus til værtscellen.

Der henvises til s. 78-80 i *Mikrobiologibogen* af Lone A. Egebo for flere detaljer vedr. livscyklus for SARS-CoV-2.



Figur 1

SARS-CoV-2 er en RNA-virus.

¹ PCR-metoden blev opfundet i 1980'erne, revolutionerede biologien og medførte en Nobelpris til metodens opfinder, Dr. Kary Mullis. Ved hjælp af få ingredienser kunne forskerne tage en kompleks DNA-prøve og lave milliarder af kopier af en meget specifik sekvens, alt sammen i løbet af få timer. PCR blev hurtigt en grundpille i biologilaboratorier rundt om i verden og PCR-maskiner er nu automatiseret. Se i din genetik- eller bioteknologi-bog for en nærmere beskrivelse af den oprindelige PCR-metode.

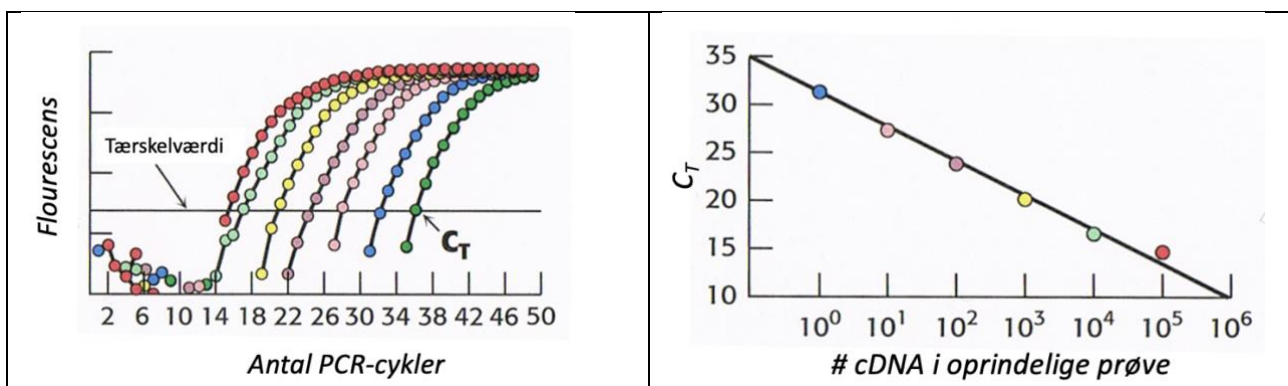
Test for COVID-19 vha qPCR

En oplagt måde at teste for COVID-19 er at analysere en vævsprøve for ssRNA fra SARS-CoV-2. qPCR kan bruges til at påvise ssRNA fra én enkelt viruspartikel i en slimprøve fra næsen eller halsen. Derfor kan qPCR bruges til at måle om en prøve fra svælget eller næsen indeholder vira. Her forklares to lidt forskellige metoder til hvordan qPCR anvendes til at udføre en COVID-19-test.

Metode 1: DNA-farvestof

Efter revers transkription af ssRNA til dobbeltstrenget DNA (dsDNA) kan det mangedobles vha nogle specifikke primere og et flourescerende molekyle, fx farvestoffet SYBR Green I. Primerne sikrer at DNA-kopieringen, vha DNA-polymerase, begynder i et bestemt område af DNA, som er karakteristisk for det pågældende gen.

Farvestoffet udsender en kraftig flouescens når det bindes til dobbelt-strengt DNA (dsDNA). I de første PCR-cykler af den eksponentielle fase vil der som regel endnu ikke være dannet nok dsDNA til at det kan registreres som et flouescens-signal.



Figur 2

Mængden af flouescerende dobbeltstrenget DNA anvendes til at bestemme C_T . Hver farve repræsenterer en forskellig koncentration af det oprindelige DNA. C_T -værdierne er omvendt proportionale med antallet af DNA-kopier i den oprindelige cDNA-prøve.

Figur 2 viser at når mængden af flouescerende dsDNA fordobles for hver PCR-cyklus, så vil flouescens-intensiteten på et tidspunkt overstige detektionsgrænsen (vist som "Tærskelværdi" i figur 2). For hver PCR-cyklus forstærkes signalet. Antallet af PCR-cykler før flouescens-signalet kan registreres kaldes for C_T (fra engelsk: cycle-treshold, dvs cyklus-tærskelværdi) og er omvendt proportional med mængden af mRNA i den oprindelige vævsprøve.

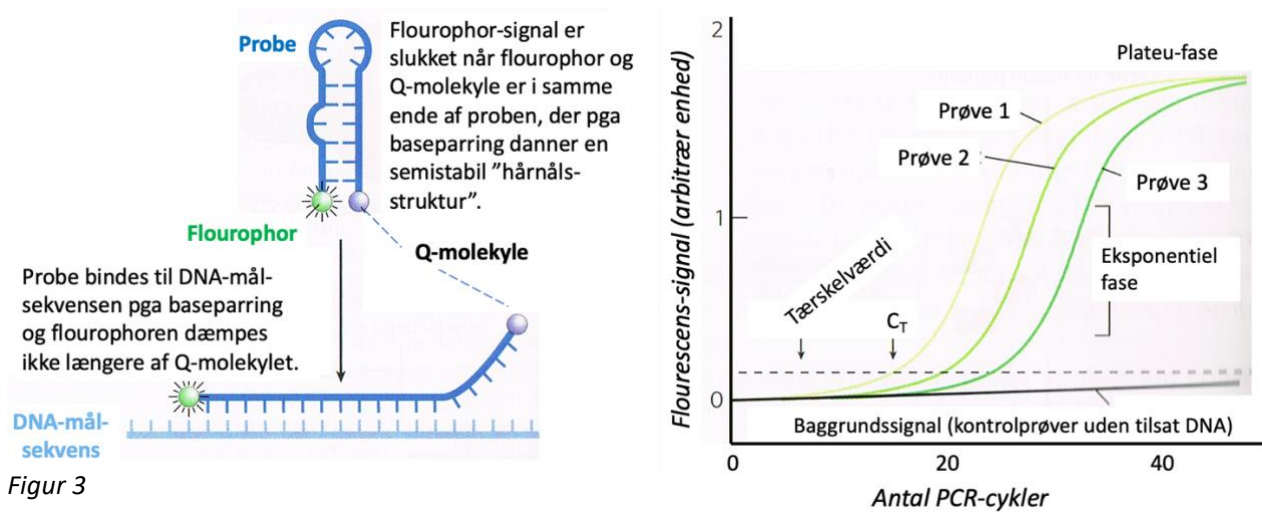
Ved at sammenligne C_T med en kendt standard kan den oprindelige mængde mRNA i vævsprøven bestemmes.

Metode 2: Flourophor og Q-molekyle

Figur 3 viser lidt forenklet princippet i en anden qPCR-metode hvor der benyttes en RNA-probe der kan baseparre med et stykke af det ønskede cDNA. Til proben er bundet et flourophor-molekyle i den ene ende og et Q-molekyle (fra det engelske 'quench', der betyder at dæmpe eller slukke) i den anden ende. Ved tilsætning af RNA-proben til cDNA-prøven har proben en 'hårnålsstruktur' der sikrer at flourophor- og Q-molekylet er så tæt på hinanden at Q-molekylet dæmper flouescens fra flourophor-molekylet.

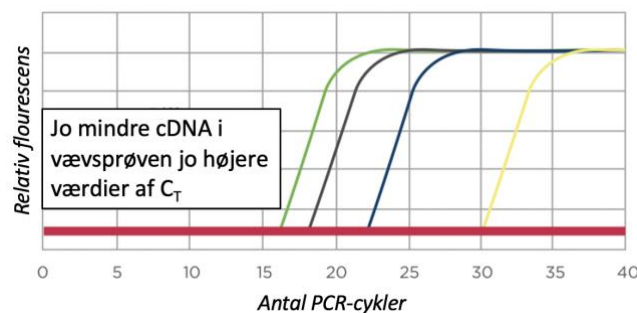
Hvis proben vha baseparring bindes til et område på et stykke cDNA, adskilles flourophoren og Q-molekylet så meget at flourophoren ikke længere dæmpes af Q-molekylet. Mængden af PCR-

produkt, dvs antal kopieret cDNA, måles som graden af fluorescence fra proben der er bundet til det kopierede DNA.



Opsamling

En af flere fordele ved qPCR er at gel-elektroforese ikke er nødvendig for at få et test-resultat. I stedet for (som i traditionel PCR), at se på produktet i slutningen af PCR-reaktionen så er forskerne vha qPCR i stand til at måle om en vævsprøve indeholder meget små mængder af RNA fra SARS-CoV-2, som forårsager sygdommen COVID-19.



Figur 4

Sammenhæng mellem C_T og virusinfektion?

Det er en almindelig misforståelse at C_T -værdier fra en qPCR-test - et eksempel ses i figur 4 - er et direkte mål for mængden af vira (kaldet viral belastning) i patientens næse eller svælg. Brugen af C_T -værdier er derfor blevet foreslået som et værktøj til at identificere patienter, der ikke smitter med corona-virus på trods af at de er testet positive, men hvorfor er det en misforståelse?

Mens det er rigtigt, at C_T er relateret til startmængden af virus-RNA i PCR-reaktionen er dette ikke en lineær relation. En af årsagerne er at de fleste diagnostiske SARS-CoV-2 qPCR-tests udføres på en måde, der afhænger af både operatørens evne til at foretage testen og af testpersonens evne til at samarbejde med operatøren.

En anden årsag er at selve begrebet viral belastning er tvivlsom fordi antallet af vira eller inficerede celler i prøven fra den testede person er ukendt. Endelig anvender forskellige laboratorier ikke nødvendigvis samme ekstraktions- og enzymsystemer, så sammenligneligheden mellem forskellige laboratoriers test er vanskelig.

Altså er der ikke en direkte sammenhæng mellem qPCR-signalet og mængden af virus i patientens svælg eller næse.