

PRŮKAZ NUKLEOVÉ KYSELINY

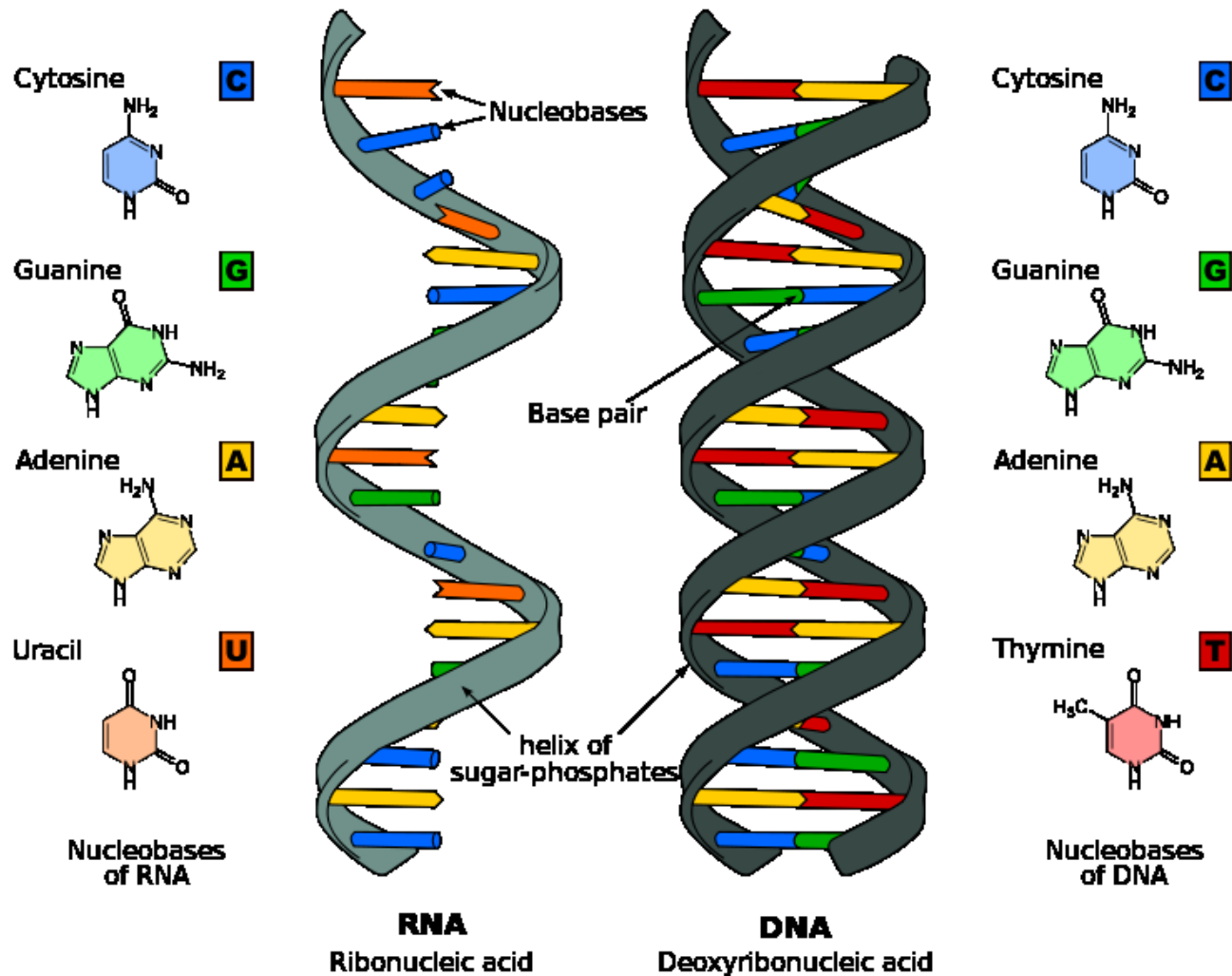
Lékařská mikrobiologie – cvičení, jarní semestr 2017
Mikrobiologický ústav LF MU

Osnova

- ▶ Nukleové kyseliny, izolace NK
- ▶ Metody průkazu nukleové kyseliny
- ▶ Využití průkazu nukleové kyseliny
- ▶ PCR reakce a její modifikace
- ▶ Možnosti detekce specifických sekvencí nukleové kyseliny



Nukleové kyseliny



Průkaz nukleové kyseliny

- ▶ Metoda velice přesná a citlivá (někdy až příliš → falešné výsledky).
- ▶ Pomocí detekce nukleových kyselin lze detekovat stopy mikroorganismů i v historických preparátech.
- ▶ **Použití:**
 - ❑ Jiné metody jsou příliš nespolehlivé.
 - ❑ Jiné metody jsou příliš obtížné.



Praktické využití průkazu NK

► Diagnostika:

- ❑ **Bakterie:** *Mycobacterium tuberculosis* (kultivace je příliš dlouhá – týdny), *Borrelia burhdorferi* (kultivace je příliš dlouhá a složitá)
 - ❑ **Viry:** virus vztekliny, hepatitidy B, enteroviry, chřipkové viry, viry parainfluenzy, adenoviry, RS-virus, HSV, virus průušnic, viry způsobující průjmy
 - ❑ Nehodí se na detekci široce rozšířených patogenů právě kvůli přílišné citlivosti.
- Nehodí se pro detekci běžně rozšířených patogenů (přílišná citlivost).



Metody průkaz NK – přehled

▶ **Metody bez amplifikace:**

- ❑ Genetické sondy

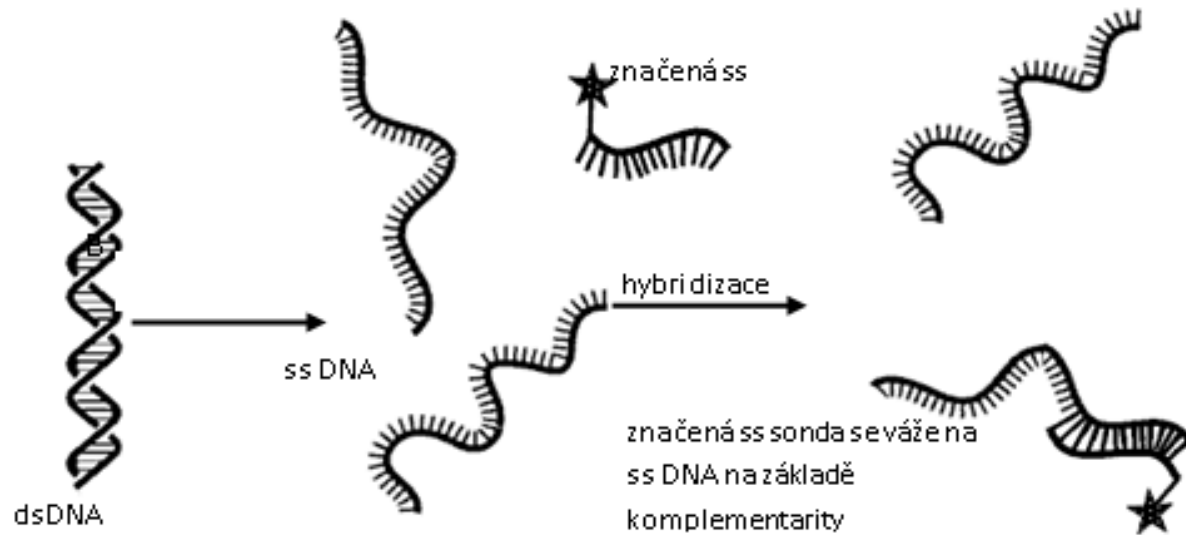
▶ **Amplifikační metody:**

- ❑ Polymerase chain reaction = PCR
- ❑ Ligase chain reaction = LCR
- ❑ NASBA



Genetické (genové) sondy

- ▶ Metoda, při níž je proces hybridizace vizualizován pomocí značených molekul sondy (např. biotin, digoxigenin,...).



- ▶ **Hybridizace** = proces, při němž jsou spojována dvě komplementární vlákna DNA v souladu s pravidly o párování bází.

PCR– složky

- ▶ Polymerázová řetězová reakce: Karry Mullis – vyvinuta 1983, 1993 Nobelova cena.
- ▶ Pro reakci je třeba:
 - ❑ Templátová DNA
 - ❑ Specifické primery označující cílovou sekvenci
 - ❑ Termostabilní polymeráza
 - ❑ Deoxynukleotidy
 - ❑ Pufr obsahující ionty hořčíku



PCR – průběh

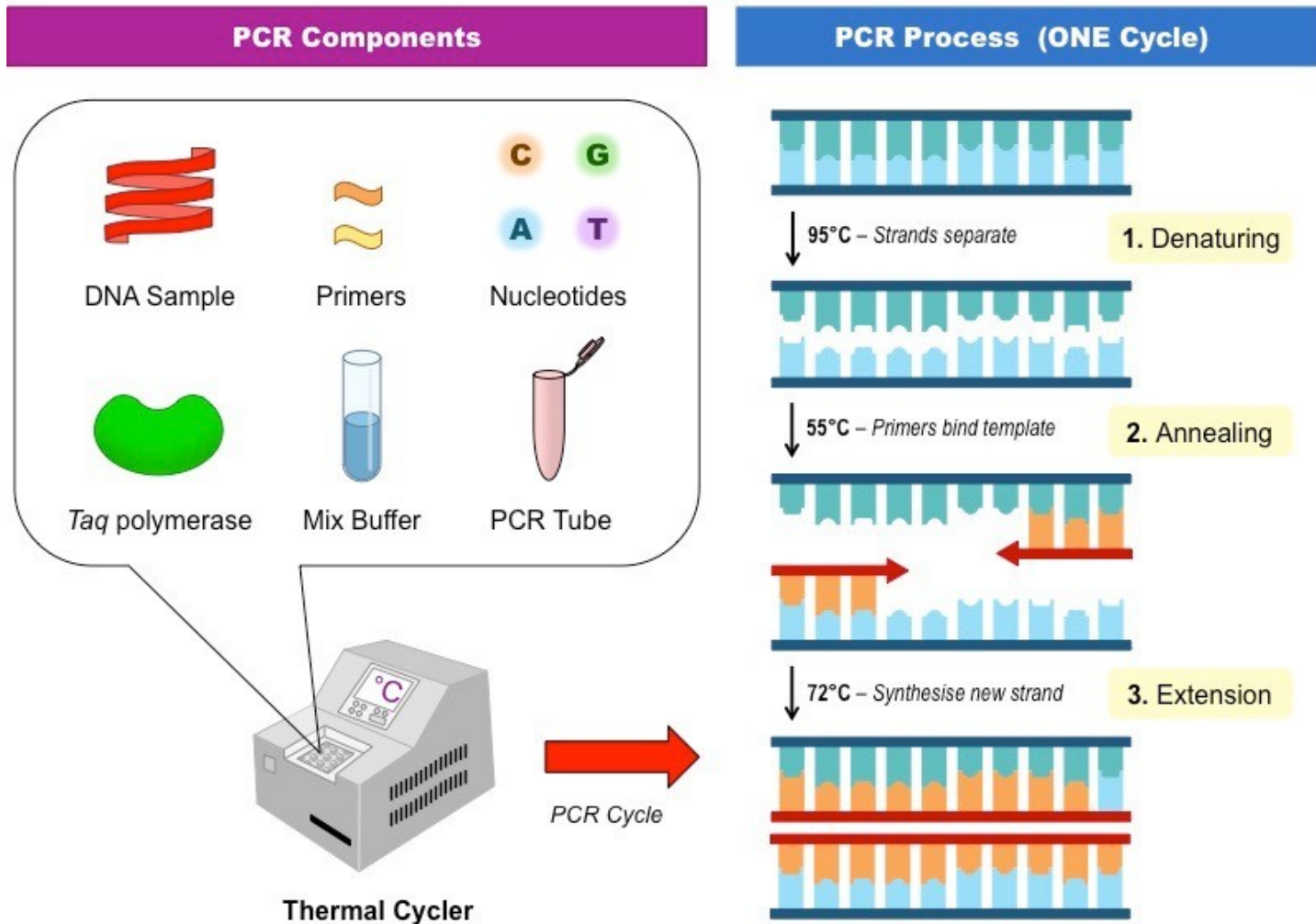
► Probíhá v cyklech.

► 1 cyklus:

- ❑ Denaturace – oddělení dvou vláken DNA od sebe (rozpad vodíkových můstků, z dsDNA vzniká ssDNA).
- ❑ Annealing (=zacílení) – primery hybridizují ke komplementární sekvenci DNA. Teplota, při níž jednotlivé primery nasedají, je kritická a charakteristická pro každou PCR reakci.
- ❑ Elongace (=prodlužování) – pomocí DNA polymerázy je řetězec DNA prodlužován. Prodlužování probíhá od 3' konce.



Polymerázová řetězová reakce



PCR – modifikace (1)

- ▶ **„Klasická“ PCR** – po skončení je třeba analyzovat produkty pomocí gelové elektroforézy.
- ▶ **Real-time PCR** – možnost sledovat přírůstek produktu v reálném čase po každé proběhlém cyklu. Nejčastěji se používá kvantitativně (qPCR).
- ▶ **Reverzně transkripční PCR (RT-PCR)** – k analýze RNA.

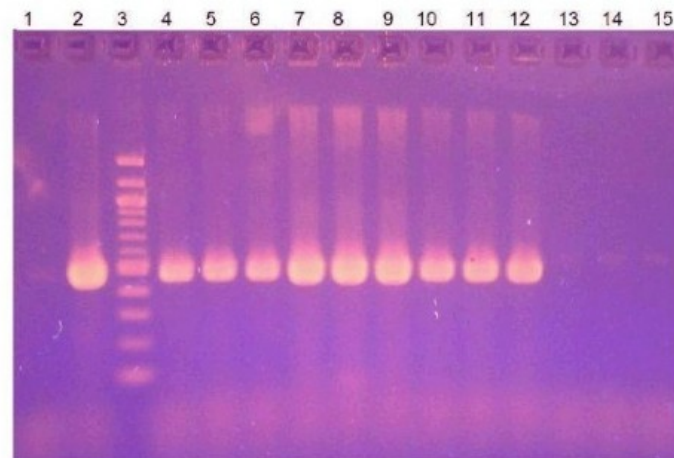
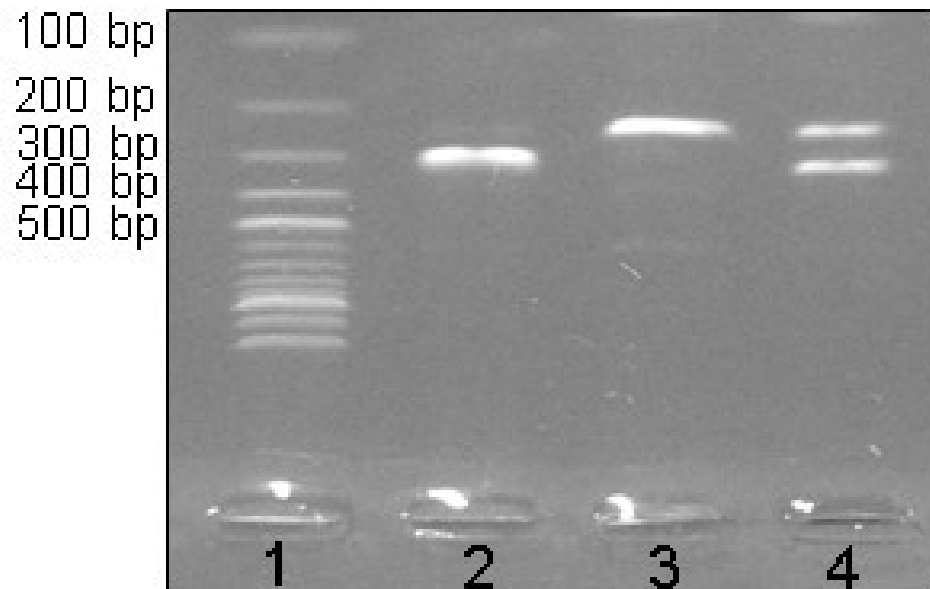


PCR – modifikace (2)

- ▶ **Nested PCR** – používají se dvě sady primerů ve dvou po sobě jdoucích PCR reakcích. Omezuje se tak vznik nespecifických produktů.
- ▶ **Multiplex PCR** – v jedné reakci je přítomno několik cílových míst.
- ▶ **Specifická PCR** – specifická pro určité geny kódující enzymy, faktory patogenity atd.
- ▶ **Univerzální PCR** – cílovou sekvencí je úsek DNA společný všem bakteriím, nejčastěji 16S rRNA.

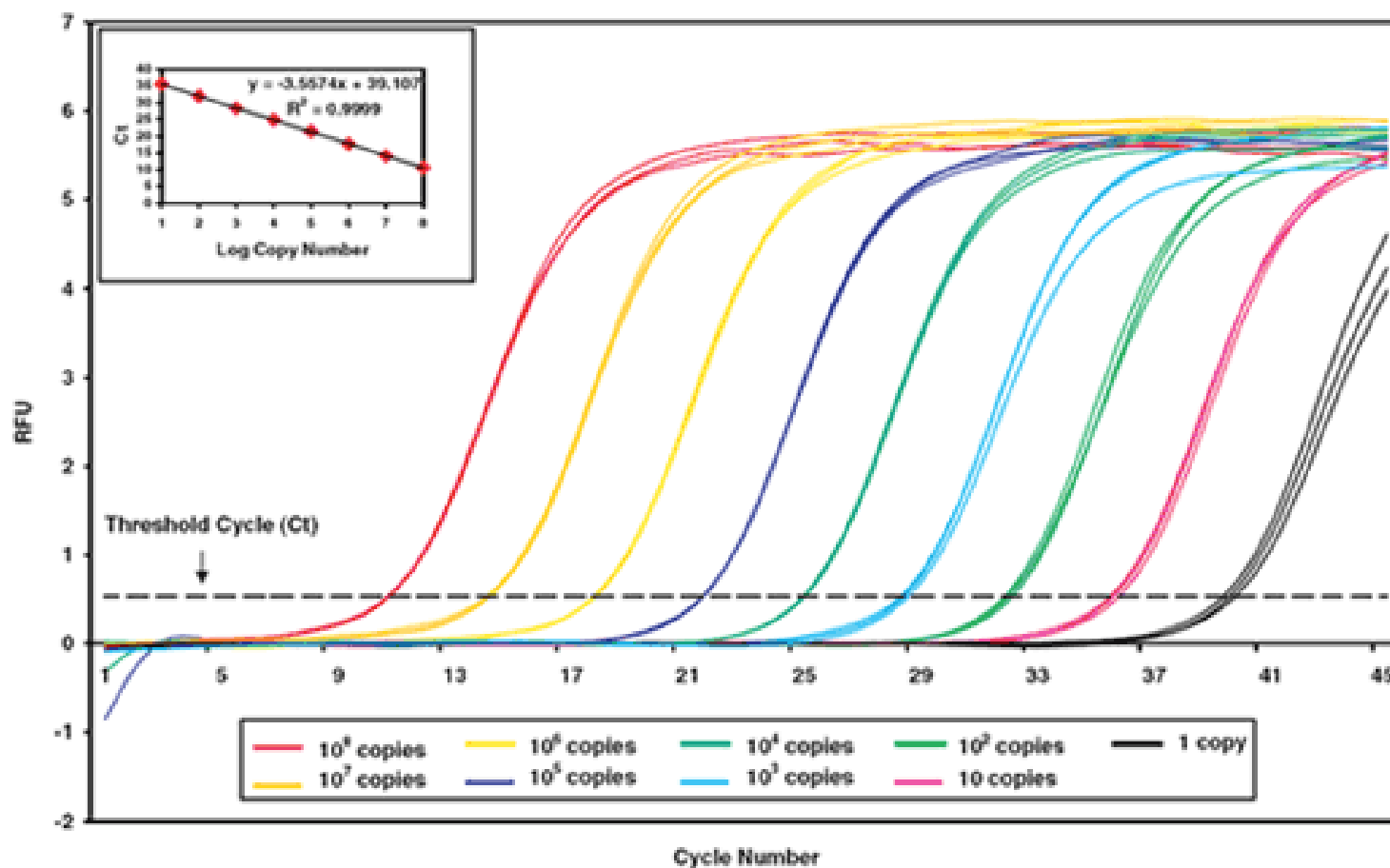


PCR – výsledek „klasické“ PCR



PCR – výsledek qPCR

Fig. 2. Real-time PCR Amplification using HotStart-IT™ Probe qPCR Master Mix with UDG (PN 75764).



PCR – interní kontrola (1)

- ▶ Velice senzitivní reakce, takže může být velice snadno inhibována přítomností různých interferujících látek.
- ▶ K detekci těchto látek se používá směs, která obsahuje krom vzorku takové kontrolní DNA a druhou sadu primerů.



PCR – interní kontrola (2)

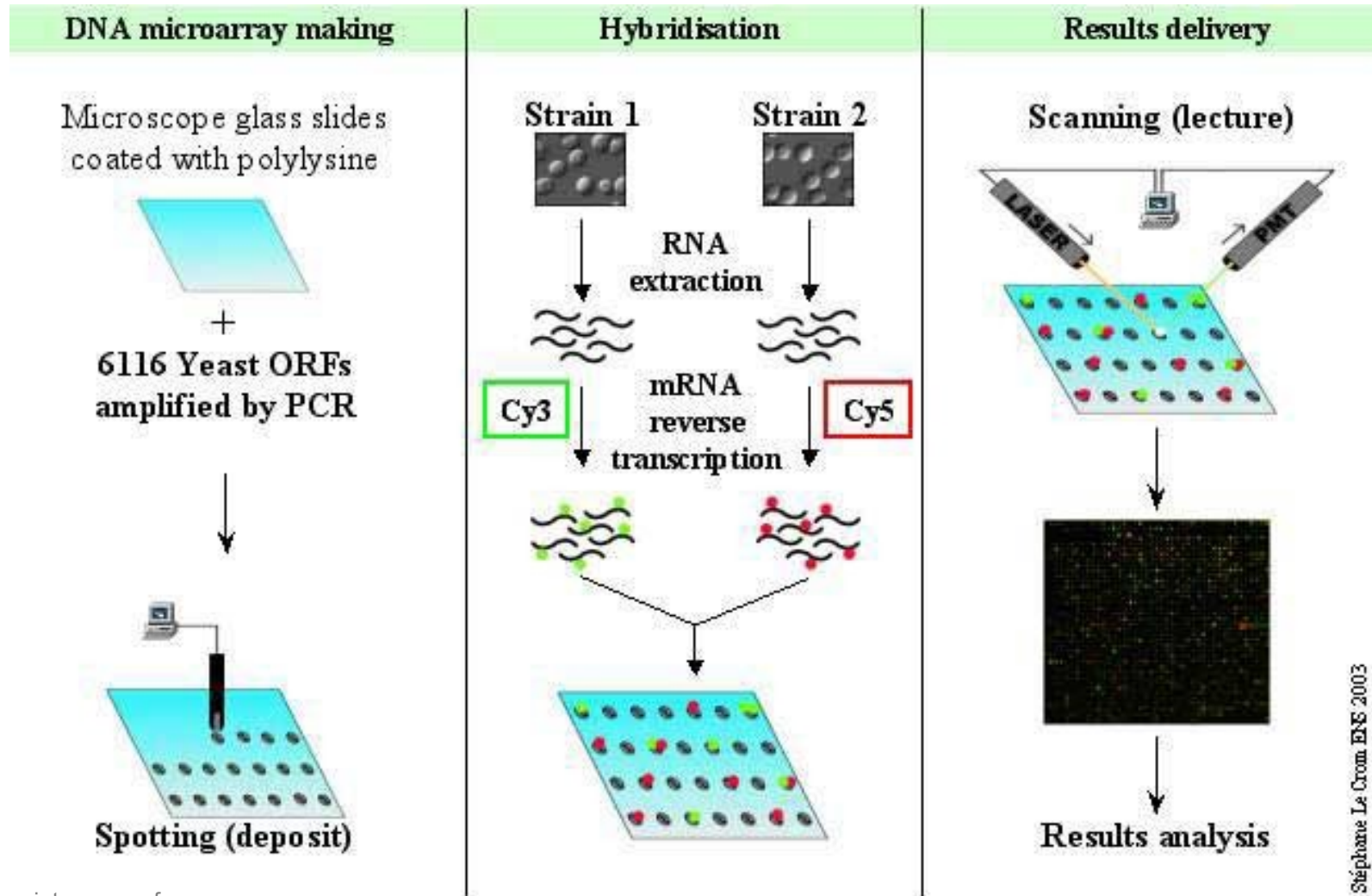
- ▶ Pozitivita interní kontroly → nedošlo k inhibici reakce.
 - ▶ Pozor! U velice silně pozitivní vzorků může být interní kontrola negativní!
 - ▶ **Interpretace s PCR:**
 - ❑ Pozitivní vzorek i pozitivní interní kontrola = pozitivní výsledek.
 - ❑ Pozitivní vzorek a negativní interní kontrola = může se jednat po silně pozitivní výsledek.
 - ❑ Negativní vzorek i negativní interní kontrola = negativní výsledek.
 - ❑ Negativní vzorek a pozitivní interní kontrola = negativní výsledek.
-

DNA mikročipy (1)

- ▶ **Oligonukleotidy** (krátké úseky DNA) známé sekvence (=sondy) **jsou přichyceny k podkladu na známých místech (=spotech).**
 - ▶ Následuje **izolace příslušné NK** a její **amplifikace** (DNA – PCR, RNA jako cDNA – RT-PCR).
 - ▶ Amplifikovaná NK je označena **fluorescenčním barvivem** (Cy3, Cy5).
 - ▶ Posledním krokem je **hybridizace** značeného vzorku se sondami na čipu.
 - ▶ Vše, co se nenazávalo je odmyto při promývání.
 - ▶ Je zachycována míra **eliminace fluorescence** a vyhodnocována **bioinformaticky.**
-



DNA mikročipy (2)



LCR

- ▶ Obdoba PCR – jde o amplifikaci DNA pomocí dvou těsně sousedících sond a ligázy.
- ▶ Tyto dvě sondy a ligáza tvoří specifitější primer pro následnou PCR.
- ▶ Používá se k detekci SNP (single nucleotide polymorphism).

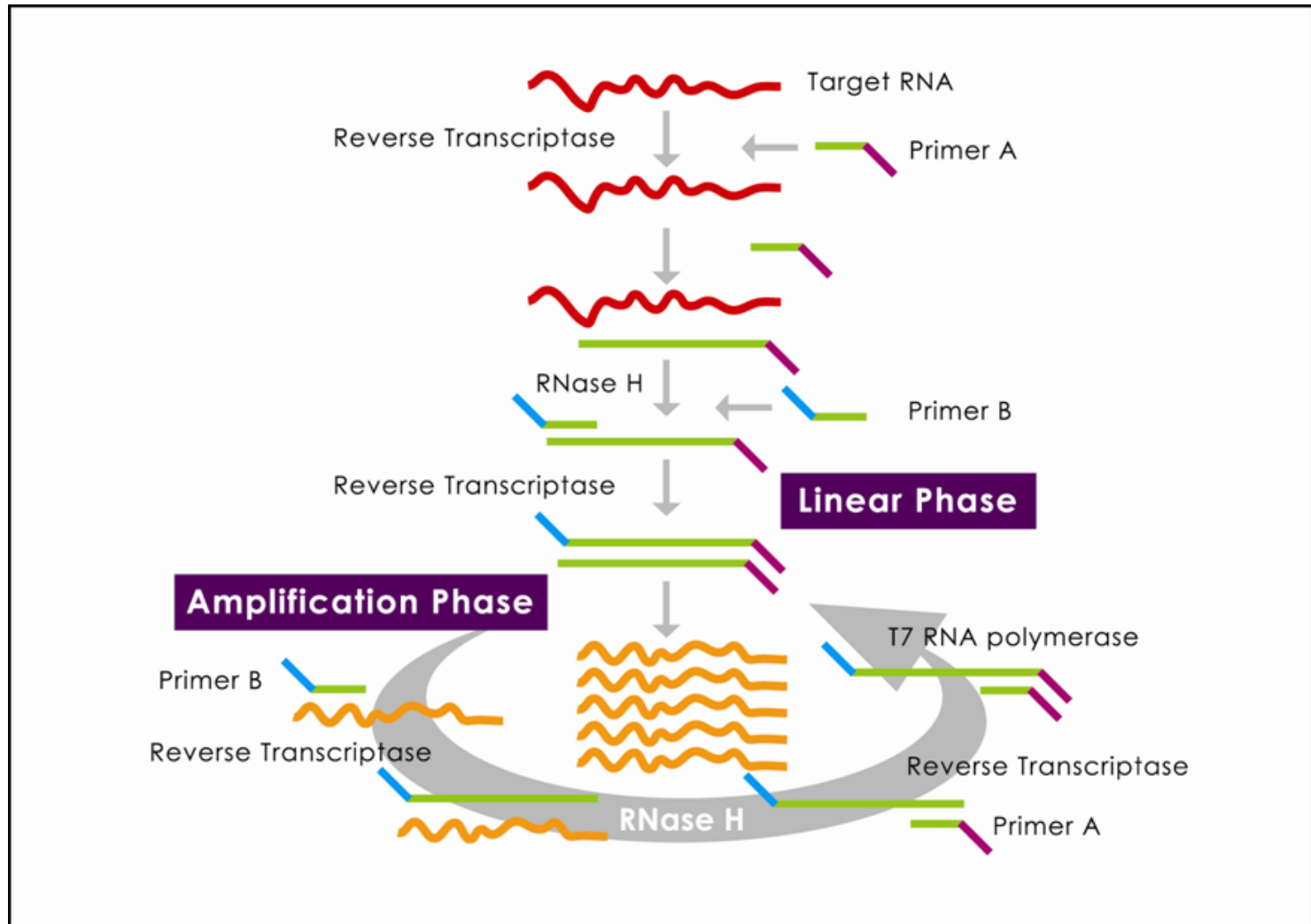


NASBA

- ▶ Nucleic acid sequence based amplification
 - ▶ **Amplifikace RNA** – používá se např. pro diagnostiku a kvantifikaci **HIV** v séru.
 - ▶ **Reakce izotermická, při 41 °C.**
 - ▶ **Složky:**
 - ❑ Templátová RNA
 - ❑ 2 primery (1 z nich obsahuje promotor pro T7 RNA polymerázu)
 - ❑ Reverzní transkriptázu
 - ❑ Rnázu H (v hybridech DNA/RNA odbourává RNA)
 - ❑ T7 RNA polymerázu
-



NASBA

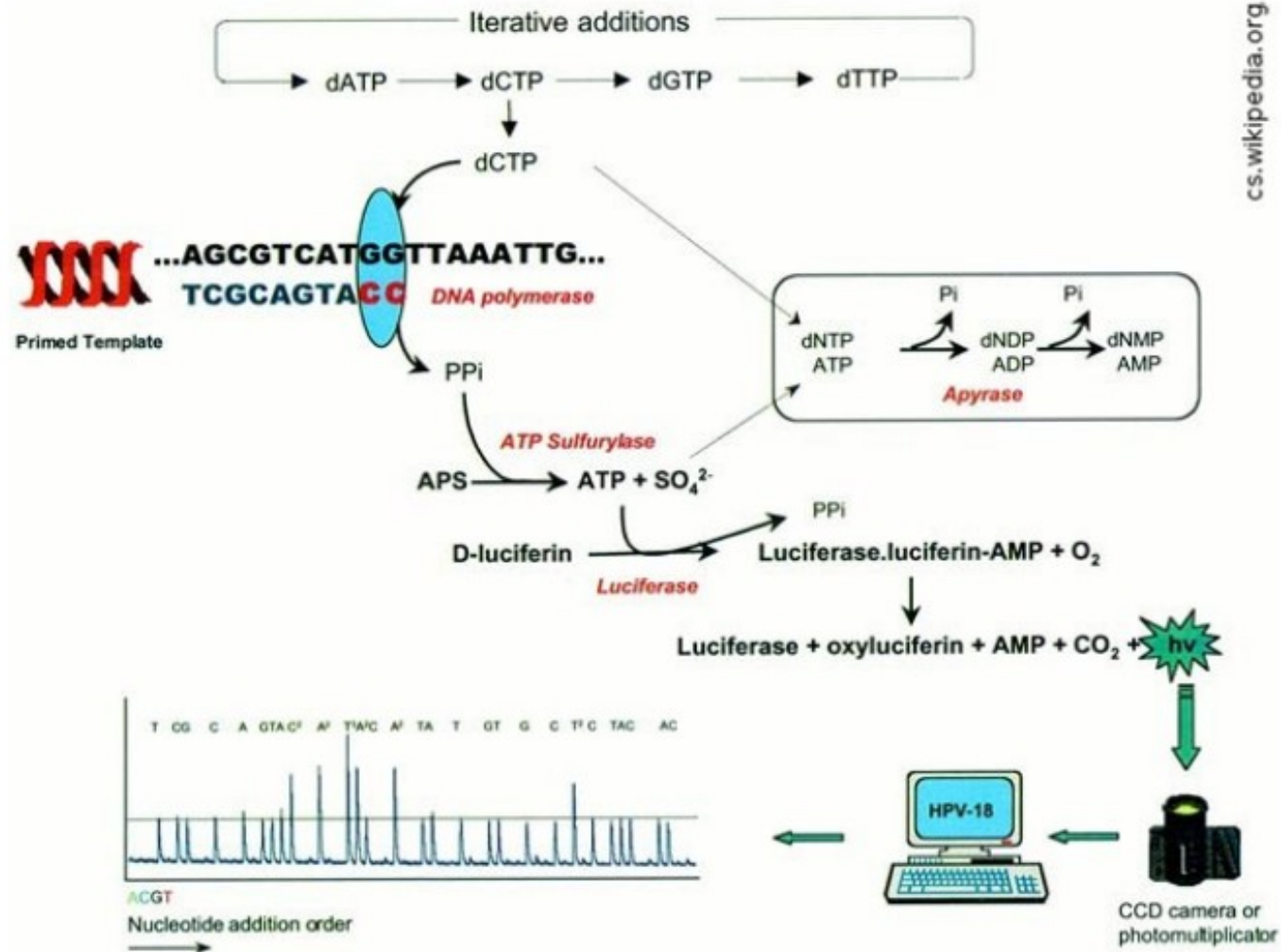


Sekvenování DNA

- ▶ biochemické metody zjišťující pořadí nukleotidových bází v sekvenci DNA
- ▶ **Maxam–Gilbertova metoda** (chemické sekvenování, radioaktivní značky, dnes téměř nepoužívaná)
- ▶ **Sangerova metoda** (současná modifikace: fluorescenční barviva navázaná na jednotlivé dideoxynukleotidy)
- ▶ **Pyrosekvenování** (uvolnění pyrofosfátu z nově začleněného nukleotidu dalšími reakcemi je energie v → pyrofosfátu (difosfát) využita na vznik ATP využito → luciferázou k oxidaci luciferinu a emise světelného kvanta)
- ▶ **Next-generation sequencing (NGS)**



Pyrosekvenování

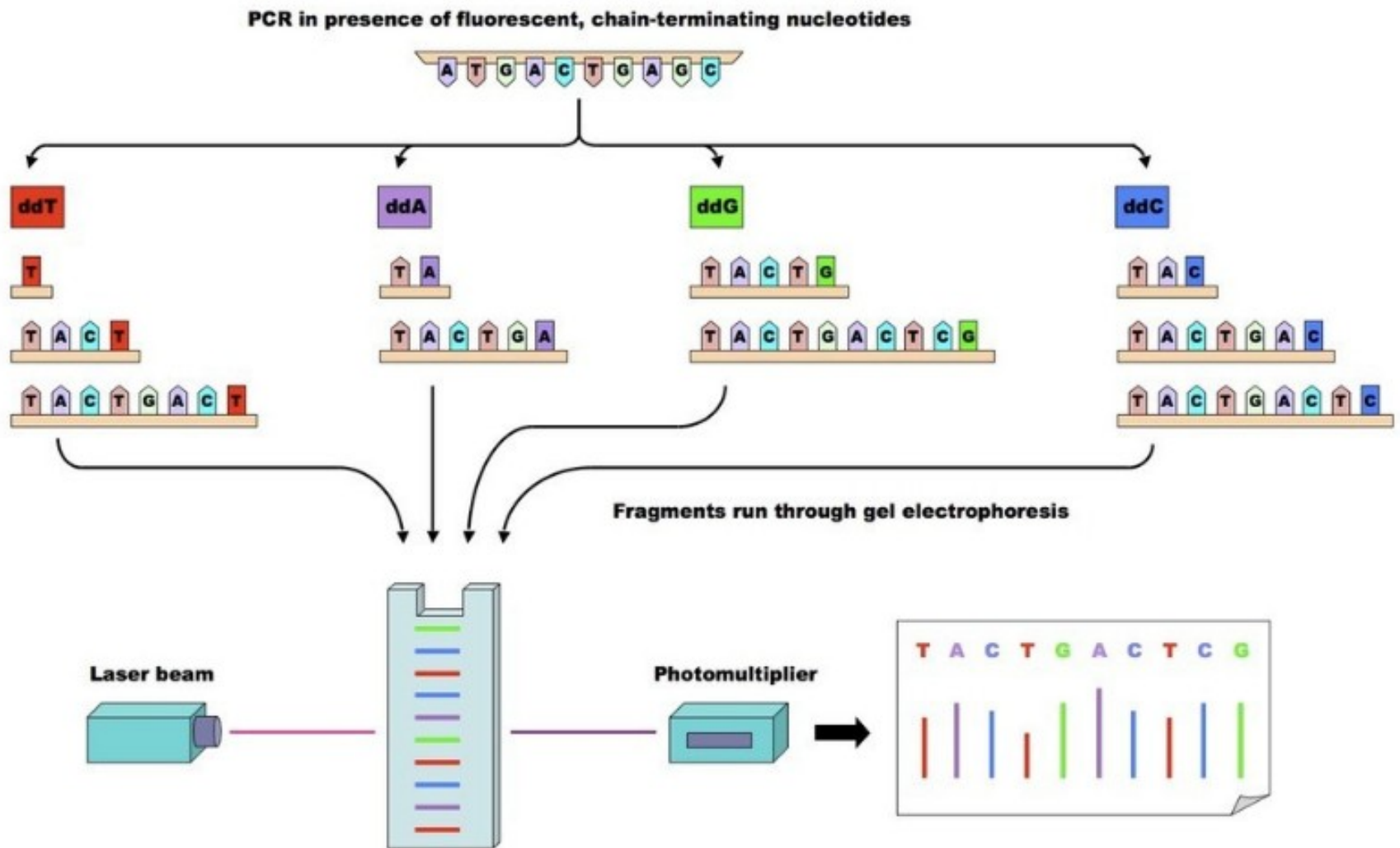


Sangerova metoda (1)

- ▶ Současná modifikace: **fluorescenční barviva navázaná na jednotlivé dideoxynukleotidy.**
- ▶ Proces „připomíná“ PCR:
 - ❑ Místo dvou primerů **pouze jeden primer**
 - ❑ **Krom deoxynukleotidů ještě dideoxynukleotidy**
- ▶ **Detekce elektroforézou (gelová nebo kapilární)**

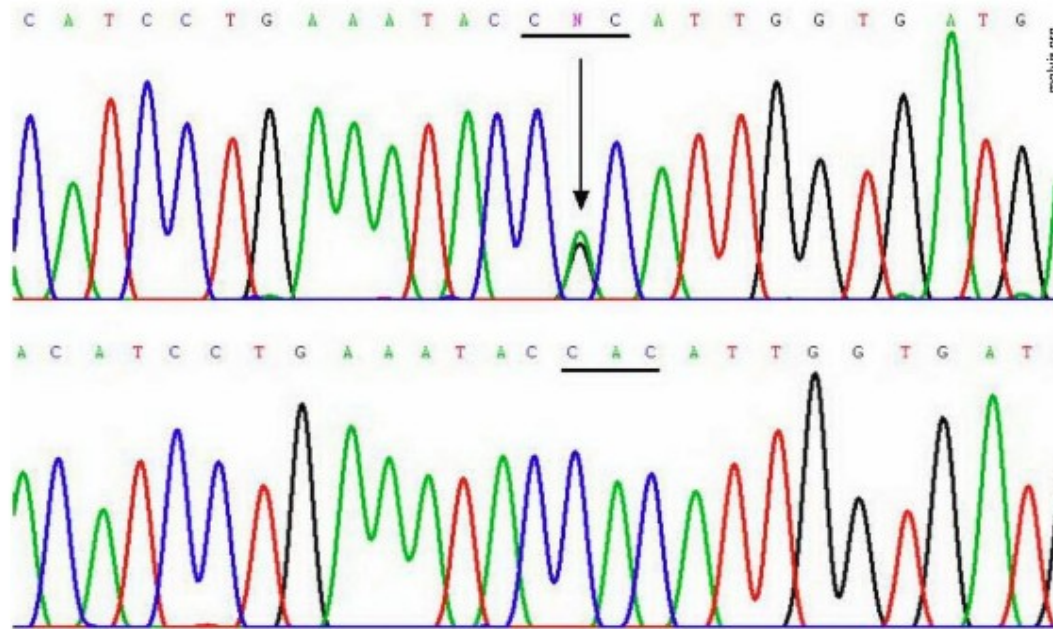


Sangerova metoda (2)



Vzorek pro sekvenování

- ▶ Vzorek do laboratoře → izolace DNA → amplifikace DNA → vizualizace gelovou elektroforézou → vyříznutí vzorku z gelu → přečištění → sekvenace



Analýza výsledků sekvenace

- ▶ Bioinformatické přístupy
 - ▣ BLAST – Basic Local Alignment Search Tool (NCBI)
- ▶ Vyhledávání podobností v databázi.



Úkol 1: Izolace DNA (1)

- ▶ Video!
- ▶ Promíchání lyzátu buněk s roztokem fenolu (nebo směsí fenol/chloroform).
- ▶ **Fenol** se používá k oddělení proteinů od NK. Proteiny (hydrofobnější) zůstanou v organické fázi, zatímco NK jsou vysoce nabitě a přejdou do fáze vodné.
- ▶ **Chloroform** v reakci denaturuje proteiny, rozpouští tuky a pomáhá oddělení jednotlivých fází získaných při centrifugaci.



Úkol 1: Izolace DNA (2)

▶ **Centrifugace – oddělení fází:**

- ❑ Spodní fáze = organická – tvořena fenolem (směsí fenol/chloroform)
- ❑ Mezifáze – denaturované proteiny a zbytky buněk
- ❑ Horní fáze = vodná – v ní jsou rozpuštěny NK

▶ **Odebereme horní fázi a NK vysrážíme pomocí etanolu.**

▶ **Shromáždíme precipitát NK – centrifugací a následným rozpuštěním sedimentu ve vhodném roztoku.**



Úkol 2: Amplifikace specifických úseků NK

- ▶ Prohlédněte si video, přečtete text, zodpovězte otázky.

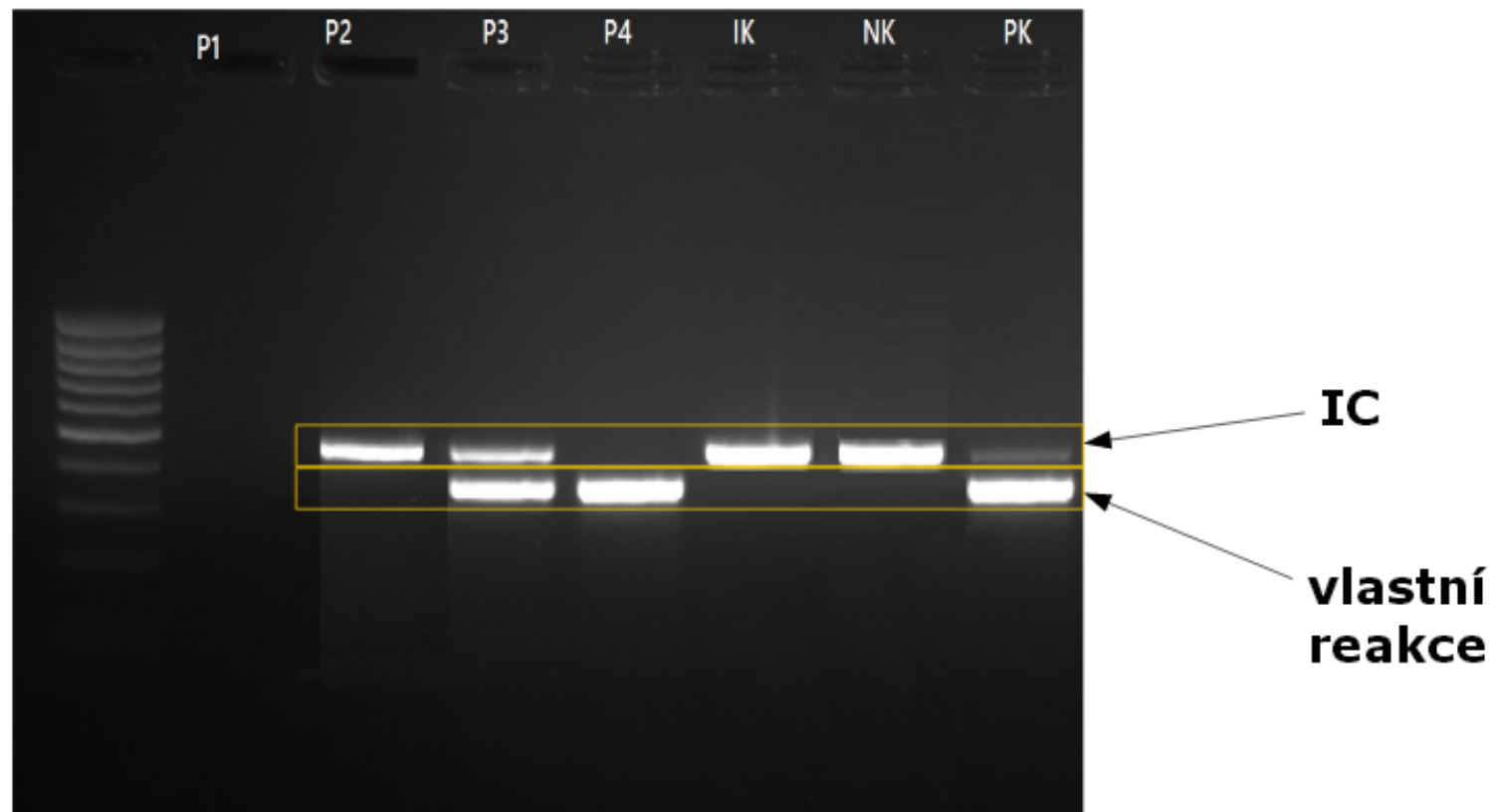


Úkol 3: Detekce PCR produktu gelovou elektroforézou

- ▶ Pro detekci se přidává barvivo (Ethidium bromid, SYBR Green)
 - ❑ Interkalační barviva: vmezeřují se mezi báze v malém žlábků DNA
 - ❑ Ozáření gelu UV
 - ❑ Navázané barvivo emitují světlo
- ▶ Produkty putují od katody směrem k anodě (NK je záporně nabitá)
- ▶ Nutná přítomnost interní kontroly a ladderu.

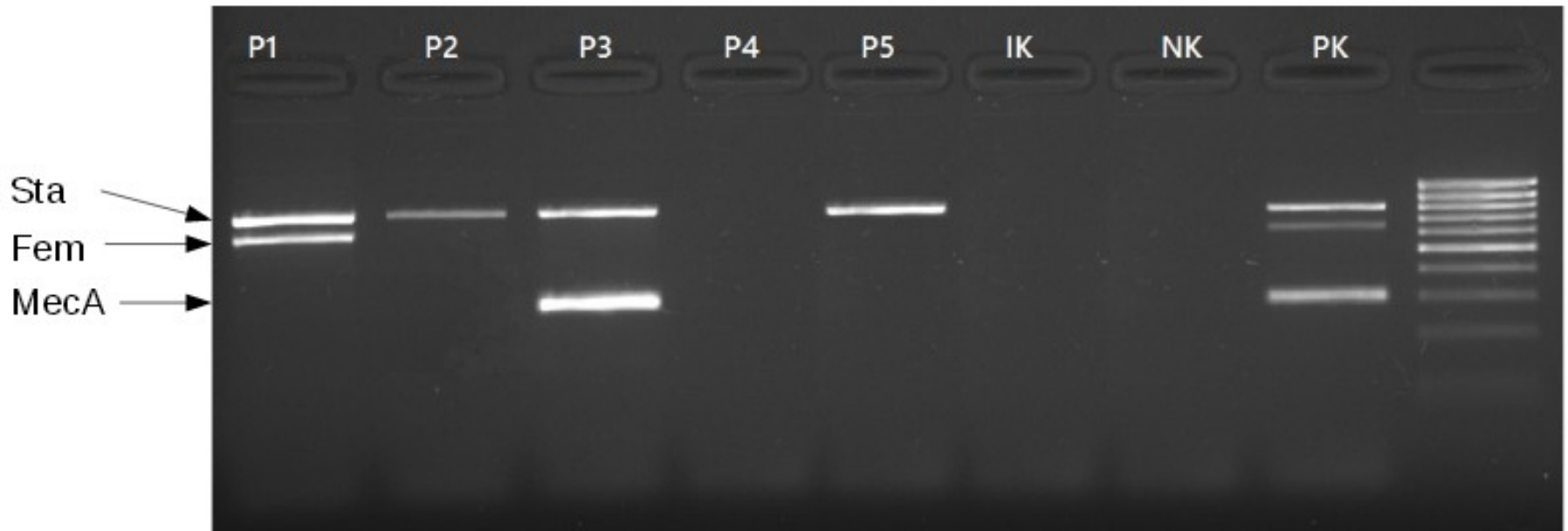


Úkol 3a: Detekce PCR produktu



Pacienti P3 a P4 – pozitivní, pacient P2 – negativní, pacient P1 – inhibice reakce. IK = kontrola, PK = pozitivní kontrola, NK = negativní kontrola; zcela vlevo ladder :

Úkol 3b: Specifická detekce PCR produktu pomocí gelové elektroforézy



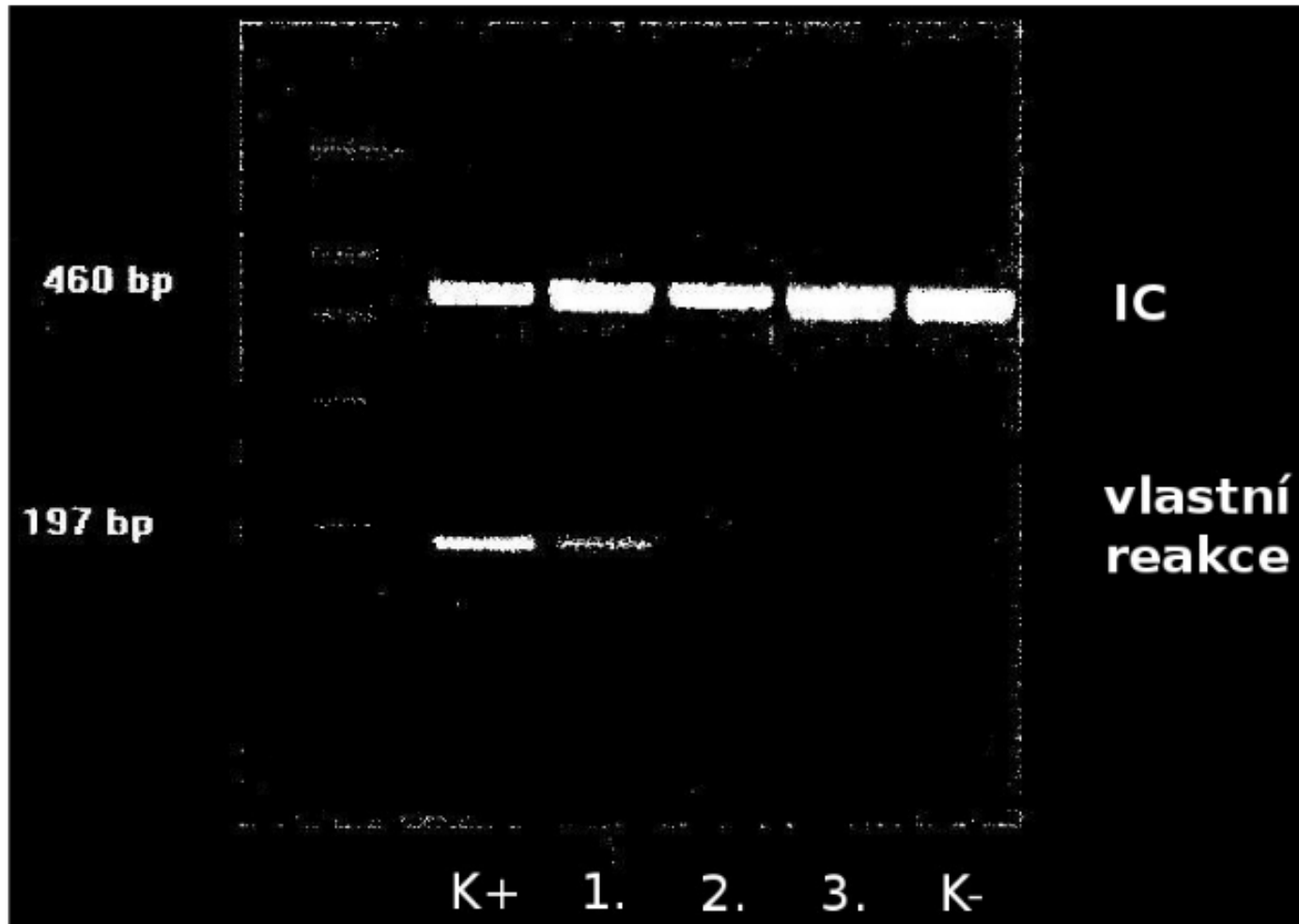
Podobné jako předchozí, ale paralelní detekce tří fragmentů DNA. **Interní kontrola není zařazena**, nelze tedy odlišit negativitu od inhibice reakce.

Úkol 4: Srovnání výsledků průkazu DNA s výsledky průkazu protilátek

- ▶ Nemůžeme se spoléhat na výsledek jedné jediné reakce.
- ▶ Nutno kombinovat znalosti výsledků z různých reakcí.
- ▶ **K dispozici:** výsledek PCR (přímý průkaz), výsledek reakce ELISA (nepřímý průkaz)



Úkol 4a: PCR NK u lymeské borreliózy



Úkol 4b: Průkaz protilátek proti původci lymeské borreliózy

- ▶ A1 – negativní kontrola
- ▶ B1 – cut off č. 1
- ▶ C1 – cut off č. 2
- ▶ D1 – pozitivní kontrola
- ▶ E1 – pacient P1
- ▶ F1 – pacient P2
- ▶ G1 – pacient P3
- ▶ $\text{Cut off} = (B1 + C1) / 2$
- ▶ Interpretace platí pro IgM i IgG



Úkol 4c: Závěr úkolů 4a a 4b

Pacient	PCR	ELISA IgM	ELISA IgG	Závěr
1	+	+	+	Aktuálně nakažen
2	–	–	+	Prodělal infekci
3	–	–	–	Nikdy se nesetkal s i.



Úkol 5: Průkaz DNA pomocí PCR s detekcí produktu pomocí ELISA (1)

- ▶ Viz. Praktikum J08 – ELISA k průkazu protilátek byla také použita jako součást předchozího úkolu.
- ▶ V tomto úkolu nejde o sérologické použití této reakce.
- ▶ Detekce produktu PCR pomocí ELISA.
- ▶ Vedle důlku vzorku také důlek patřící interní kontrole.



Úkol 5: Průkaz DNA pomocí PCR s detekcí produktu pomocí ELISA (2)

- ▶ A1 = pozitivní kontrola,
 - ▶ D1 = negativní kontrola
 - ▶ B1 a C1 = důlky cut off (cut off = jejich průměr)
 - ▶ hodnoty nad „cut off“ (referenční hodnota) jsou považovány za pozitivní hodnoty.
 - ▶ E1, F1, G1, H1 = pacienti 1, 2, 3, 4
 - ▶ E2, F2, G2, H2 = interní kontroly k 1, 2, 3, 4
 - ▶ **pozitivní reakce = pozitivní výsledek**
 - ▶ **negativní reakce, pozitivní IC = negativní výsledek**
 - ▶ **negativní reakce, negativní IC = inhibice reakce**
-



Úkol 6: Real-time PCR

- ▶ vyhodnoťte pozitivní a negativní kontroly a čtyři obrázky Real-time PCR, které máte na pracovním stole
- ▶ **osa x ukazuje počet cyklů**
- ▶ **osa y vyjadřuje množství produktu**
- ▶ pozitivní křivka by měla dosáhnout limitní linie („threshold“) před 42. cyklem
- ▶ plná čára označuje produkt vlastní reakce, čerchovaná čára ukazuje interní kontrolu



Úkol 7: Real-time PCR: kvantifikace

- ▶ Nedetekujeme pouze pozitivitu, ale také kvantifikujeme virovou nálož.
- ▶ Spočítejte virovou nálož u čtyř případů podle vzorce v protokolu.

	počet kopií viru na μl	počet kopií viru na 1 ml plné krve
P1	14,75	$1,5 \cdot 10^3$
P2	2,3	230
P3	1589	$1,6 \cdot 10^5$
P4	0,5	<100



Úkol 8: správné odpovědi

1. Jaký je rozdíl mezi ddNTPs a dNTPs a proč nestačí přidat do reakce pouze jeden typ?:
ddNTPs mají na 3' uhlíku navázaný -H místo -OH. Nedokáží vytvořit fosfodiesterovou vazbu s dalším nukleotidem. Pokud bychom do reakce přidali jen ddNTPs, tak by se syntéza zastavila hned při prvním nukleotidu a nedošlo by k sekvenaci celého řetězce. Pokud bychom přidali jen dNTPs, došlo by sice k syntéze celého řetězce, ale nedochazelo by k emitaci světla a nebyli bychom schopní sekvenci přečíst.
2. Zkuste se zamyslet, proč jsou nejdříve čteny nejkratší fragmenty DNA (náповěda: fragmenty putují gelem)?: Kratší fragmenty DNA putují gelem rychleji.
3. Jak by vypadala naše sekvence, kdybychom do jedné reakce přidali oba primery (forward i reverse) (náповěda: každý primer nasedá na jiné vlákno dsDNA): Syntetizovala by se obě vlákna DNA zároveň a došlo by k překryvu sekvencí. Sekvence by byla nečitelná.



Po tomto cvičení byste měli umět

- ▶ Znát a popsat využití metod založených na průkazu NK.
- ▶ Uvést příklady využití této detekce v mikrobiologii.
- ▶ Vysvětlit postup izolace DNA a PCR.

