

# Diagnostické amplifikační metody nevyužívající PCR

Amplifikační metody umožňují detekovat jedinou kopii cílové DNA, zatímco při hybridizačních metodách musí být k dispozici minimálně  $10^4$  -  $10^5$  kopií DNA, aby bylo možné při detekci získat signál.

# Přehled metod používaných pro amplifikaci nukleových kyselin

Amplifikační metoda	Používané enzymy	Rok publikace
<i>Amplifikace specifické sekvence</i>		
• PCR (polymerázová řetězová reakce) a její modifikace	termofilní DNA polymeráza ( <i>Taq, Tth, Tma</i> )	1986
• TAS (amplifikace pomocí transkripce)	zpětná transkriptáza, RNA polymeráza	1989
• 3SR (amplifikace pomocí transkripce)	zpětná transkriptáza, RNáza H, RNA polymeráza	1990
• SDA (amplifikace vytěsňováním řetězce)	restrikční endonukleáza, DNA polymeráza (bez 3' → 5' exonukleázové aktivity)	1992
<i>Amplifikace sondy</i>		
• LAR (ligázová amplifikační reakce)	DNA ligáza	1989
• LCR (ligázová řetězová reakce)	termofilní DNA ligáza	1991
• reakce s Q $\beta$ -replikázou	Q $\beta$ -replikáza	1988

# Amplifikační systémy založené na transkripci (TAS a 3SR)

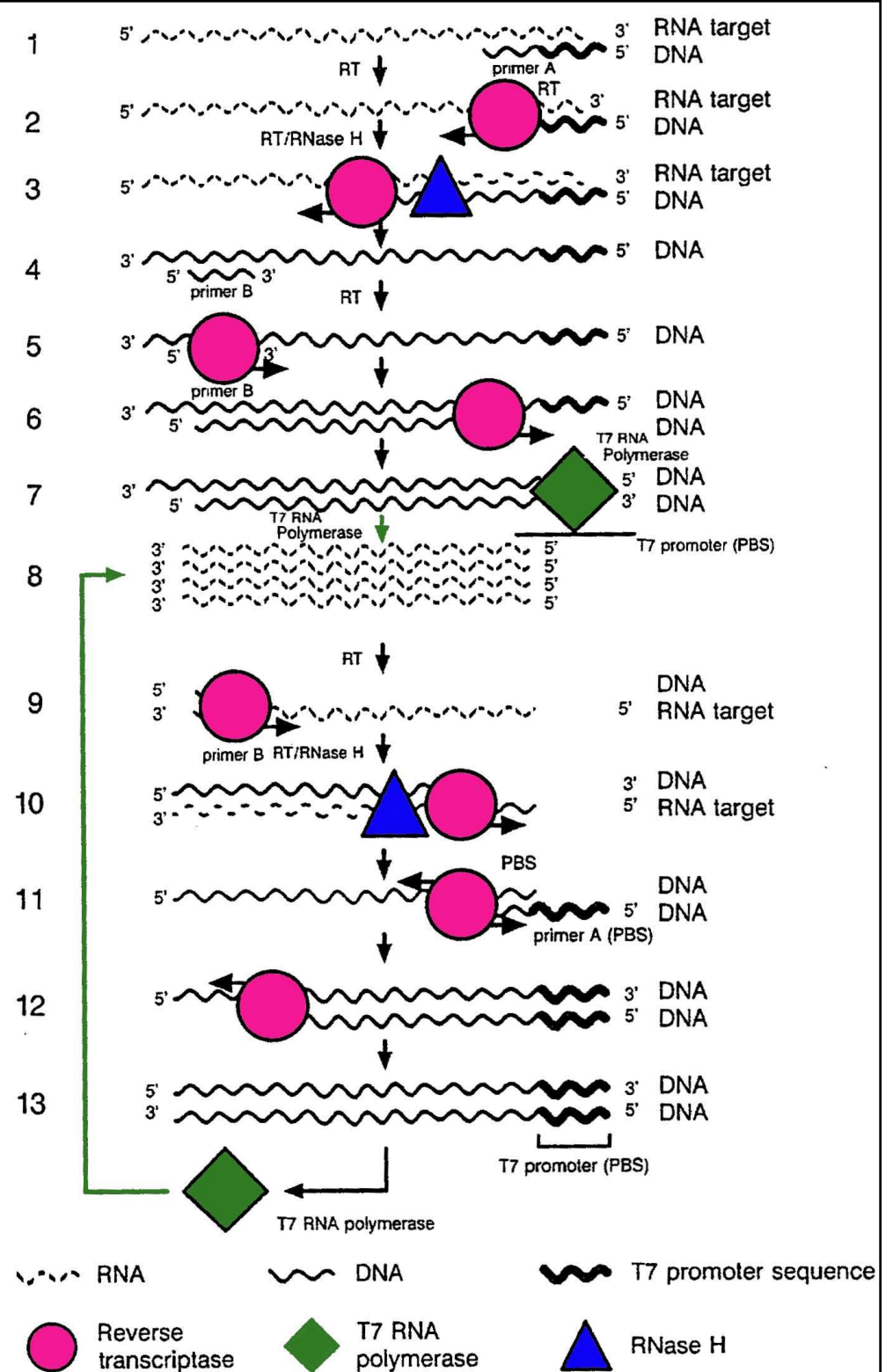
- **Transcription-based Amplification System:** metoda využívá pro amplifikaci nukleových kyselin transkripci *in vitro*.
- Každý cyklus TAS se skládá ze dvou částí:
  - syntéza molekuly DNA, která je komplementární k cílové nukleové kyselině (RNA nebo ssDNA)
  - transkripce nově syntetizované cDNA, která slouží jako intermediát a templát pro RNA polymerázu *in vitro*.
- Syntéza cDNA je umožněna připojením speciálně navržených primerů:
  - oblast primeru směrem ke 3'-konci je komplementární k cílové DNA
  - oblast primeru směrem k 5'-konci tvoří specifická sekvence obsahující promotor pro T7 RNA polymerázu.

# Amplifikační systémy založené na transkripci (TAS a 3SR)

- V prvním kroku je po připojení primeru pro každou cílovou RNA nebo ssDNA syntetizována molekula ssDNA pomocí zpětné transkriptázy.
- Syntéza druhého řetězce vyžaduje tepelnou denaturaci  
\*RNA-DNA nebo DNA-DNA hybridních molekul.
- Po přidání druhého primeru a opět zpětné transkriptázy, probíhá syntéza druhého řetězce. Výsledná kopie dsDNA obsahuje funkční T7 promotor na jednom nebo obou koncích cDNA.
- Po přidání T7 RNA polymerázy dochází k transkripci cDNA a z každého templátu vzniká až 40 molekul RNA (toto je amplifikační krok).

# TAS a 3SR

- Nové molekuly RNA tvoří substrát pro další cyklus TAS. Po několikanásobném opakování cyklu získáme několik miliónů kopií.
- \* proces tepelné denaturace RNA-DNA duplexů může být nahrazen enzymatickým odstraněním RNA pomocí RNázy H. Takto modifikovaná amplifikační technika je isothermní (nevyžaduje změny inkubační teploty a přidávání zpětné transkriptázy při dalším cyklu). Proces se nazývá **Self-Sustaining Sequence Replication (3SR)** nebo **Nucleic Acid Sequence-Based Amplification (NASBA)**.
- Aplikace a použití:
  - detekce lidského papilomaviru
  - detekce rezistence k azidotymidinu u HIV
  - detekce *Chlamydia trachomatis*
  - detekce *Mycobacterium tuberculosis*



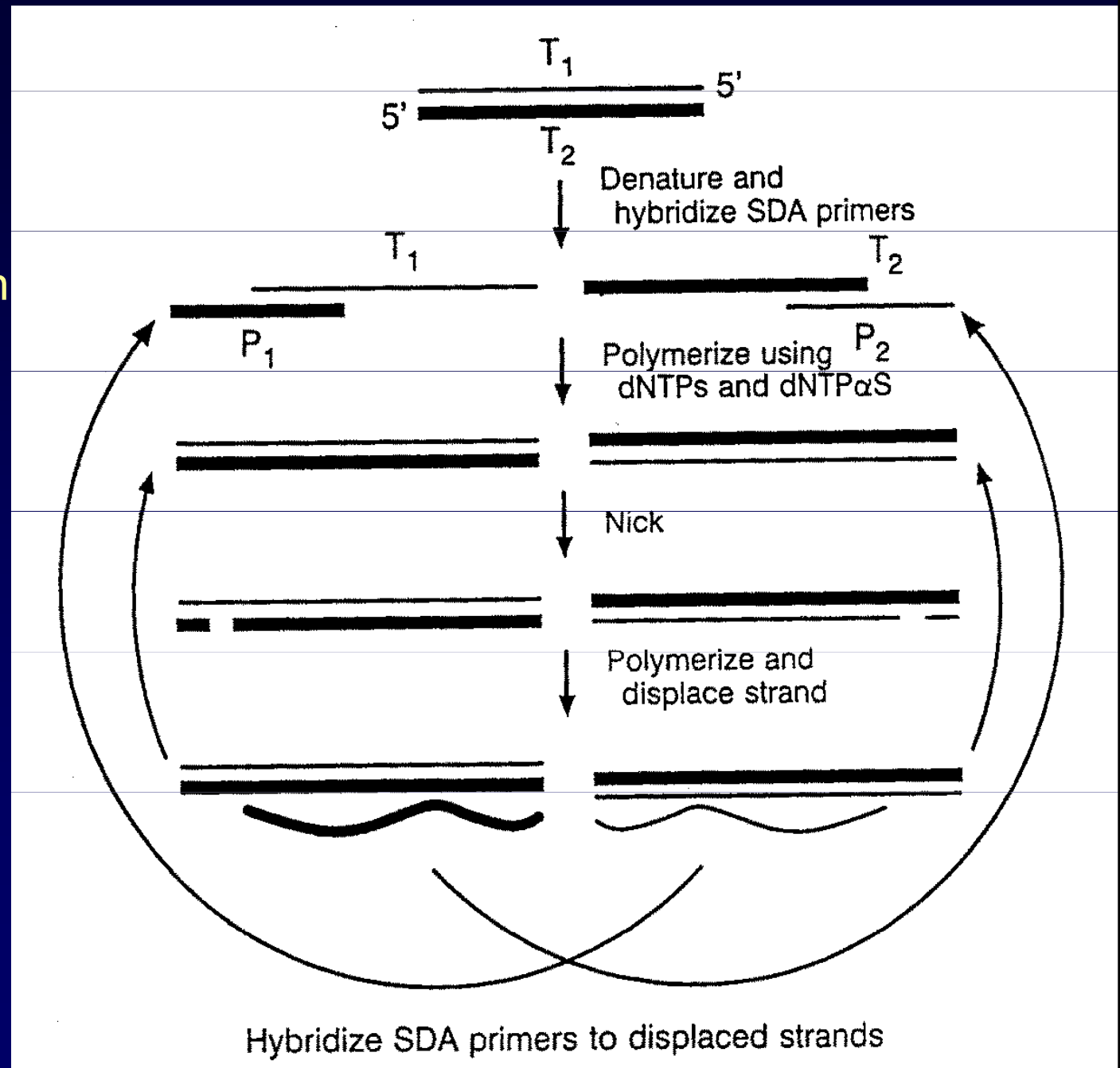
# Amplifikace DNA vytěsňováním řetězce (Strand Displacement Amplification - SDA)

- SDA je založená na **schopnosti DNA polymerázy iniciovat syntézu DNA v místě jednořetězcového zlomu** uvnitř cílové molekuly a vytěsnit řetězec se zlomem během syntézy nového řetězce DNA.
- Takto vzniklé jednořetězce slouží jako substrát pro další SDA-reakci a isothermní akumulaci dvou- a jednořetězcových kopií cílové molekuly.
- Klíčem technologie je **vytvoření místně specifických jednořetězcových zlomů pomocí restriční endonukleázy**. Za normálních podmínek restriční endonukleázy štěpí oba řetězce, což není pro SDA vhodné.
- Při syntéze DNA je proto použit **jeden z nukleotidů  $\alpha$ -thio-substituovaný** (např. deoxyadenosin-5'- $\alpha$ -thio-trifosfát, dGTP, dCTP a dTTP). Jeden z řetězců syntetizované DNA potom obsahuje modifikované nukleotidy.
- Restriční endonukleáza v takto modifikovaném rozpoznávacím místě **štěpí pouze jeden řetězec a vytvoří místně specifický jednořetězcový zlom**.
- Pro SDA se používá dvojice primerů s dvěma funkčními oblastmi:
  - oblast směrem k 3'-konci obsahuje 15 až 20 bp dlouhou sekvenci komplementární k cílové molekule DNA
  - oblast směrem k 5'-konci obsahuje rozpoznávací sekvenci pro restriční endonukleázu.

# Strand Displacement Amplification - SDA

Reakce zahrnuje následující kroky:

- denaturaci cílové molekuly dsDNA
- připojení SDA primerů
- syntézu  $\alpha$ -thiolovaných řetězců pomocí DNA polymerázy
- štěpení jednoho řetězce restriční endonukleázou
- reakci s DNA polymerázou (s deficientní  $3' \rightarrow 5'$  exonukleázovou aktivitou)
- nový cyklus s vytěsněnými řetězci obou polarit



- Použití a aplikace SDA:
  - detekce různých mykobakterií na základě amplifikace IS6110
- Nevýhody:
  - Cenově náročná metoda.
  - Je potřeba vhodná restriční endonukleáza.
  - Další rozpoznávací místo pro restriční endonukleázu se nesmí nacházet v amplifikované sekvenci.



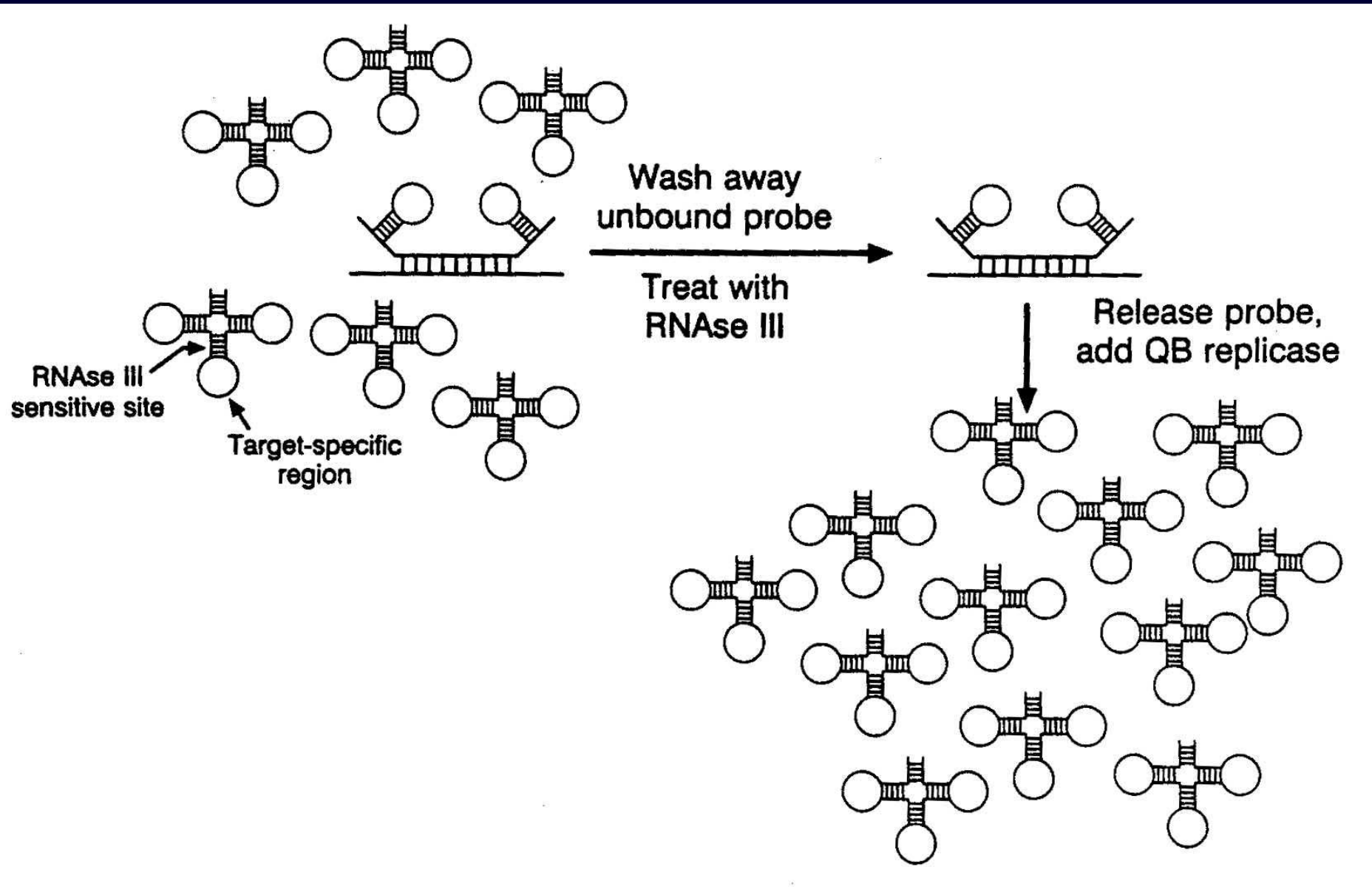
# Skupina metod pro amplifikaci molekuly navázané sondy

Alternativní metody pro detekci  
nízkého počtu molekul cílové  
sekvence využívající amplifikaci  
samotné sondy po vazbě na  
cílovou sekvenci.

# Amplifikace RNA-sondy pomocí Q $\beta$ -replikázy

- Q $\beta$ -replikáza je **RNA-dependentní RNA polymeráza**, která replikuje genomovou RNA bakteriofága Q $\beta$  (*Leviviridae*). Enzym rozpoznává specifickou **sekundární strukturu RNA** tvořenou párováním bazí uvnitř molekuly bakteriofágové RNA. Jiné sekundární struktury RNA nejsou enzymem rozpoznávány.
- Sonda se připravuje transkripcí *in vitro*. Pro konstrukci sondy, která je schopná replikace se využívá:
  - **predikce sekundární struktury RNA** podobné standardní struktuře v genomu bakteriofága
  - sonda nese navíc ve smyčce s vlásenkou na 3' nebo 5' konci **sekvenci specifickou pro cílovou molekulu**.
- Po provedení hybridizace se volná sonda se odstraní RNázou III (u navázané sondy chybí rozpoznávací místo pro RNázu III v důsledku změny sekundární struktury po vazbě na cíl).
- Systém s Q $\beta$ -replikázou byl vyvinut za účelem zesílení hybridizačních signálů amplifikací samotné sondy.
- Využívá se pro detekci obtížně kultivovatelných mikroorganismů, např. *Chlamydia trachomatis*.

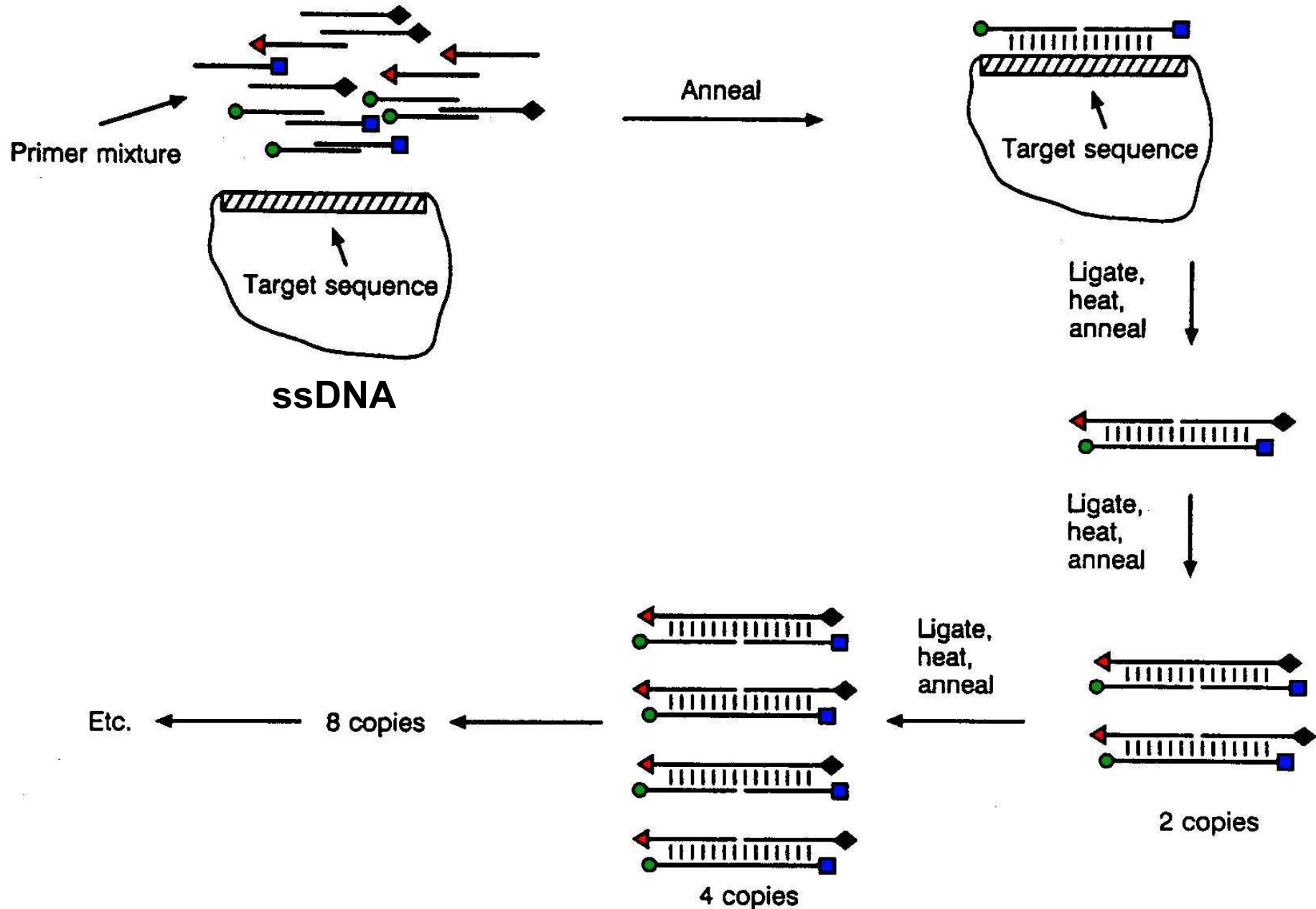
# Amplifikace sondy Q $\beta$ -replikázou



# Ligázová řetězová reakce (Ligase chain reaction - LCR)

- **Amplifikace cílové sekvence pomocí ligázy** je alternativní metoda pro amplifikaci **oligonukleotidové sondy** navázané na cílovou sekvenci využívající **DNA ligázu**.
- Při LCR se nevytváří nové kopie cílové sekvence, proto se řadí do skupiny **metod pro amplifikaci sondy**.
- Metoda využívá DNA ligázu ke **spojení dvou párů komplementárních oligonukleotidových sond po jejich připojení na cílovou sekvenci**.
  - Úspěšná ligace proběhne pouze při dokonalém párování 3' a 5' konců obou oligonukleotidových sond k cílové molekule.
- Po proběhnutí první úspěšné ligace vzniká produkt, který **napodobuje původní molekulu** a slouží jako templát pro připojení zbývajících dvojic oligonukleotidů a jejich ligaci.
- Nevýhodou **ligázové amplifikační reakce (LAR)** je teplotní nestabilita DNA ligázy a nutnost přidávat ligázu po každé denaturaci.
  - V současnosti se používá **termostabilní DNA ligáza** z *Thermus aquaticus*, která je stabilní po mnoha cyklech denaturace (LCR).

# Ligázová řetězová reakce (LCR)



## Použití LCR

- pro detekci obtížně kultivovatelných patogenů
  - *Neisseria gonorrhoeae*
  - *Borrelia burgdorferi*
  - *Mycobacterium* sp.
- pro detekci mutací v lidských genech (dědičná onemocnění)

# Oligonukleotidové ligační stanovení (OLA)

- Modifikace LCR využívající pouze jedné dvojice sousedících oligonukleotidů může být kvantitativní metodou
  - ligázová detekční reakce (LDR)
  - oligonukleotidové ligační stanovení (OLA)
- Lineární kinetika amplifikace
- Ve spojení s analýzou produktů PCR, kde se dá očekávat dostatečné množství templátu, je OLA používáno jako účinný detekční systém bodových mutací (PCR-OLA).
- Tento přístup nevyžaduje průkaz amplifikovaného produktu na elektroforéze
  - využívá 5'-koncového značení první oligonukleotidové sondy afinitní značkou - biotinem a opačného konce druhé sondy reportérskou značkou (např. fluorescenční látka, digoxigenin nebo alkalická fosfatáza).
  - Pouze po ligaci jsou obě značky nesený jednou molekulou.
  - Po ligázové reakci jsou produkty zachyceny na afinitní matici se streptavidinem a nezlígované reportérské sondy jsou odmyty.
  - Navázaný materiál je měřen na základě
    - fluorescence,
    - barevné reakce
    - enzymatické aktivity
    - FRET
  - může se stát v budoucnu rozšířenou automatizovanou metodou využívající DNA-čipy pro detekci nízkokopiových cílů a změn v nukleotidových bázích

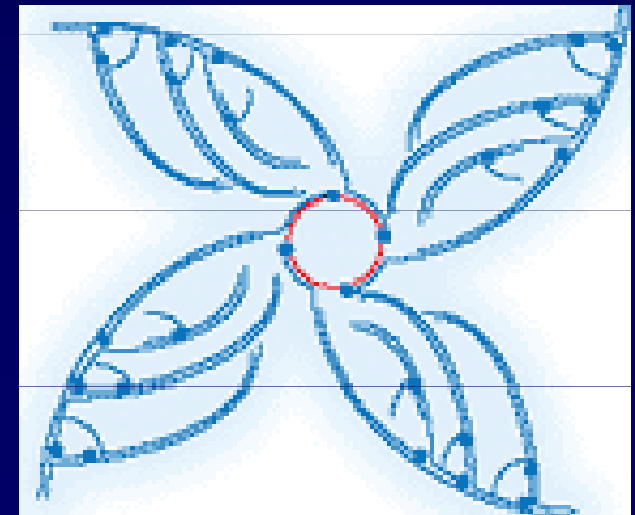
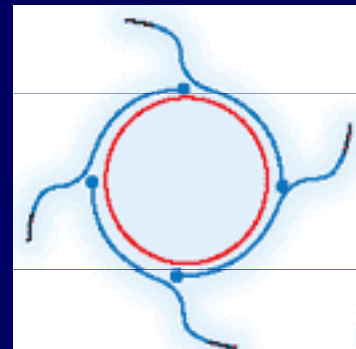
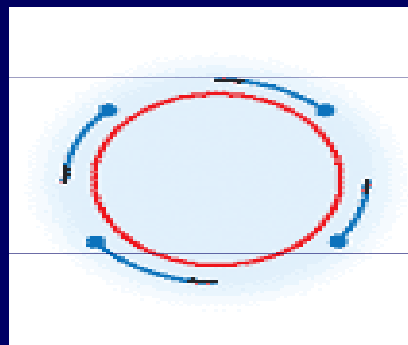
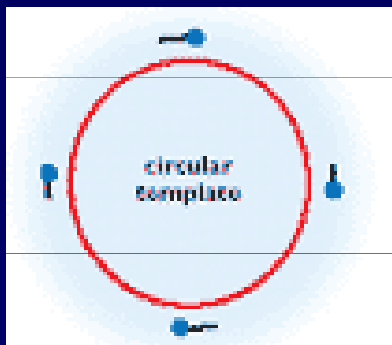
# Amplifikace otáčivou kružnicí - RCA (Rolling Circle Amplification)

- Metoda amplifikace sondy navržená pro detekci jednonukleotidových polymorfizmů přímo v genomové DNA.
- Pro každý polymorfizmus je navržena alelově specifická sonda, kterou tvoří oligonukleotid dlouhý 80 až 90 bází.
  - Fosforylovaný 5'-konec sondy nese přibližně 20 nukleotidů, které hybridizují k oblasti bezprostředně vedle 5' polymorfního místa.
  - 3'-konec sondy obsahuje 10 až 20 nukleotidů, komplementárních k oblasti bezprostředně vedle 3' polymorfního místa.
- Používané alelově-specifické sondy jsou identické s výjimkou báze na 3'-konci, která se liší tak aby byla komplementární k polymorfnímu místu.
- První krok RCA zahrnuje
  - společnou hybridizaci obou konců sondy s cílovou sekvencí (vytvoření otevřené kružnice)
  - diskriminační ligaci sondy termostabilní ligázou, jejímž výsledkem je kružnicová ssDNA.
  - Ligační krok proběhne pouze v případě, že se 3'-konec sondy páruje s polymorfním místem.
- Mezi koncovými rameny sondy, která jsou cílově specifická pro detekovanou sekvenci jsou vtěsnaná vazebná místa pro RCA-primery.
- Druhý krok RCA zahrnuje
  - hybridizaci RCA-primerů, případně náhodných hexanukleotidů na cirkularizovanou sondu
  - izotermní replikaci otáčivou kružnicí v přítomnosti DNA-polymerázy vytěsňující řetězce (např. DNA-polymeráza fága 29)
  - Prodlužující se řetězce jsou vytěsňovány a tvoří jednořetězcové konkatemery původní sondy, na které se mohou vázat další RCA-primery a vytvořit složité replikativní struktury



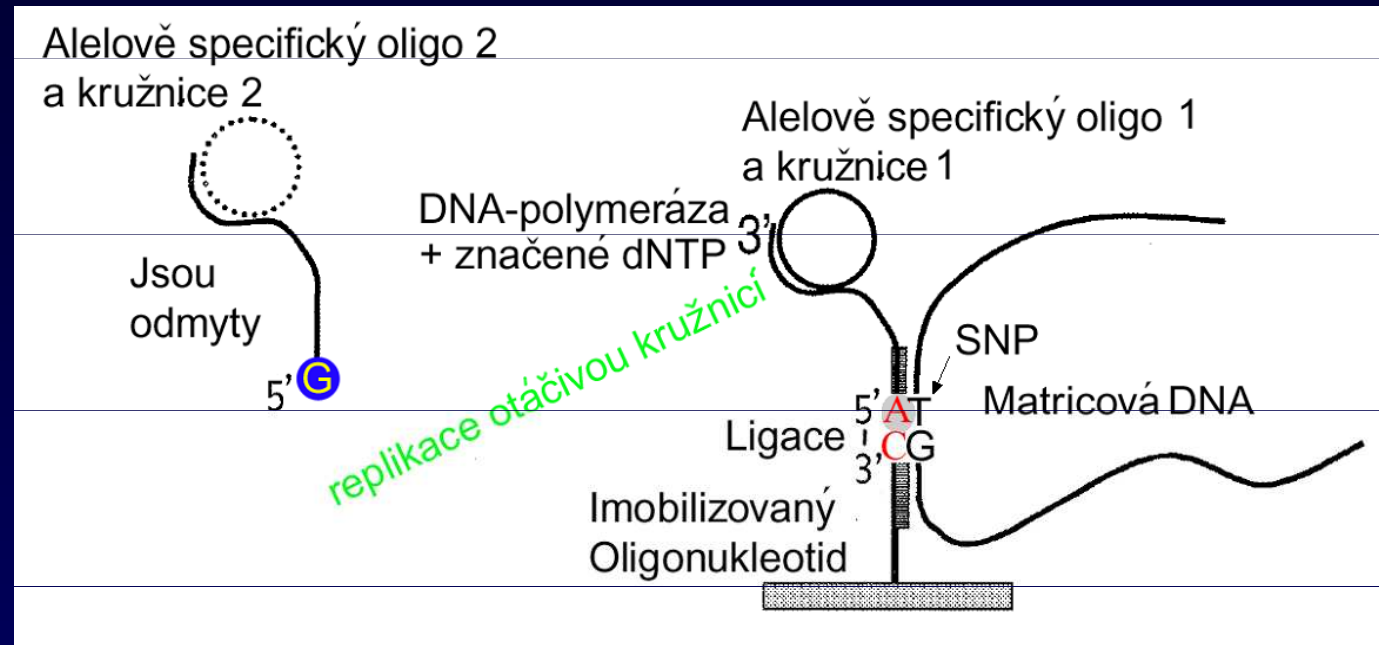
# RCA v homogenním roztoku

- Ligáza katalyzuje ligaci sondy ve formě otevřené kružnice, která přesně svými 3'- a 5'-konci hybridizuje k místu se SNP
- Hybridizace náhodných hexanukleotidů
- Replikace otáčivou kružnicí pomocí DNA-polymerázy fága 29
- Vznikne až  $10^9$  kopií sekvence



# Stanovení SNP pomocí DNA čipu a RCA

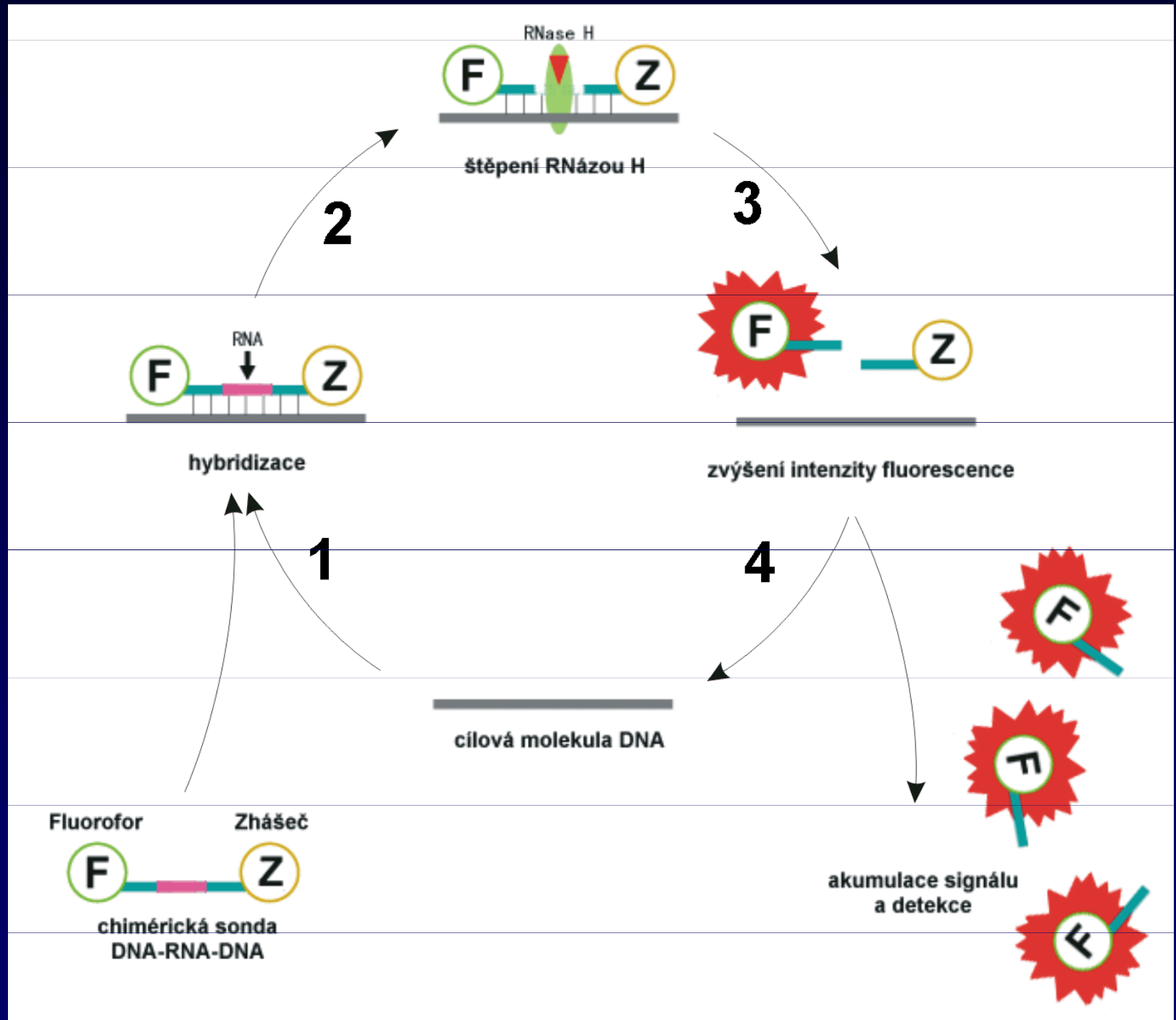
- Metoda pracuje na principu amplifikace signálu na DNA-čipu
- Studovaná cílová molekula DNA je denaturována
- Při hybridizaci k cílové sekvenci ligáza katalyzuje spojení dvou oligonukleotidových sond z nichž jedna je imobilizovaná na pevném podkladu čipu
- Ligace nastane pouze tehdy jestliže je 5' báze v místě SNP přesně komplementární k cílové DNA (je 500× efektivnější než při nehomologickém páru)
- Rozdíly v sekvenci na 5'-konci poskytují možnost specificky a simultánně detekovat jednotlivé varianty SNP
- $\phi$ 29 DNA-polymeráza katalyzuje izotermní replikaci formou otáčivé kružnice, inkorporuje značené nukleotidy a rostoucí řetězec je vytěsňován



# Technologie cirkulující sondy – Cycling Probe Technology (CPT)

- CPT využívá hybridizaci cílové sekvence DNA (může být použit i amplifikovaný produkt PCR) s chimérickou na obou koncích fluorescenčně značenou DNA-RNA-DNA sondou
- Sonda po navázání na komplementární sekvenci poskytuje vytvoření štěpitelného místa pro RNázu H.
- Reakce probíhá za specifické konstantní teploty, která umožňuje jak hybridizaci sondy, tak zachování templátové DNA v jednořetězcovém stavu.
- Vytvořený duplex chimérické sondy a cílové sekvence je rozpoznán RNázou H a RNA-sekvence sondy je degradována.
- Rozštěpené fragmenty sondy nemají v cílovém místě při reakční teplotě stabilní vazbu a disociují do prostředí.
- Uvolněná fluorescenčně značená část sondy emituje fluorescenci, jejíž intenzita je měřena.
- Cílové místo je potom volné, hybridizuje s další sondou a celý cyklus se opakuje
- Fragmenty sondy se akumulují lineární kinetikou a slouží jako základ pro detekci a kvantifikaci cílové sekvence.
- Výhodou oproti PCR je, že cílová sekvence sama o sobě není amplifikována a tím se minimalizuje riziko přenosu kontaminace. Současnou snahou je optimalizace reakce CPT tak, aby bylo možné detekovat jednonukleotidové polymorfismy

# CPT



# Amplifikace signálu

- Pro zvýšení citlivosti hybridizačních metod je možné použít alternativní techniky k technikám enzymatickým (založeným na polymeráze nebo ligáze).
- Zesílení signálu vytvořeného navázanou sondou může být dosaženo
  - větší reportérskou molekulou
  - skupinou více molekul připojených na samotnou sondu (složené sondy)
- Výsledkem metod pro amplifikaci signálu nejsou amplifikované sekvence DNA, proto jsou tyto metody více citlivé na kontaminaci a nespecifické signály
- Detekční citlivost metod pro amplifikaci signálu je vyšší než u klasických hybridizačních metod s autoradiografickou barevnou nebo chemiluminiscenční detekcí.

# Amplifikace signálu pomocí složené sondy

