

Aplikace PCR v mikrobiologii



doc. RNDr. Milan Bartoš, Ph.D.

bartosm@vfu.cz

Přírodovědecká fakulta MU, 2013

Obsah přednášky

- 1) Obecné principy diagnostiky**
- 2) Diagnostické varianty PCR**
- 3) Vybrané ukázky jednotlivých metod**
- 4) Příklad a praktické vyhodnocení multiplex PCR**
- 5) Ukázka praktického využití inverzní PCR**
- 6) Real-time PCR**
- 7) Emulsní PCR a pyrosekvenování**

Jak na PCR?



Využití PCR pro detekci mikroorganismů

Specificita

- schopnost reakce amplifikovat pouze cílový produkt
- schopnost primerů vázat se pouze na cílovou sekvenci

Senzitivita

- limitní detekční mez
- počet kopií cílové sekvence, kterou je reakce ještě schopna amplifikovat do viditelného produktu

Detekce a Identifikace

Primární detekce

- **záchyt patogenů v primárních odběrech vzorků (krev, tkáně, tělní tekutiny, potraviny, stěry, ..)**
- **požadavek na specificitu i senzitivitu PCR**

Sekundární detekce

- **záchyt cílové sekvence v narostlé bakteriální kultuře**
- **požadavek na specificitu PCR**

Identifikace

- **rozlišení genů, kmenů, druhů, toxinů, apod.**

Evaluace PCR systémů

Převzaté z literatury

Nově vyvíjené

Panely pozitivních a negativních kontrol

Test specificity PCR reakce

- primárně teoreticky při navrhování systému
- panel známých zdrojů (bakteriálních druhů)

Detekční limit PCR reakce

- na rekombinantních plasmidech
- na vzorcích se známým obsahem detekovaných sekvencí

Postup vyšetření

Způsob odběru vzorku

- kontaminace při odběru
- množství materiálu

Manipulace se vzorkem

- teplota skladování

Uskladnění vzorků

- teplota skladování
- doba do izolace DNA
- doba od izolace DNA do provedení PCR

Vlastní PCR

System PCR kontrol

Vyloučit

- falešnou negativitu – kontrola inhibice PCR reakce
- falešnou pozitivitu – negativní izolační kontrola

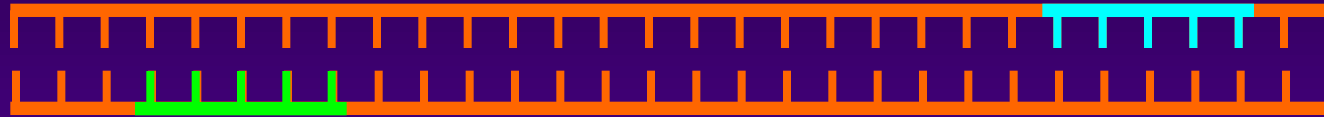
Zajistit

- funkčnost všech komponent a správný průběh
- reakce - pozitivní kontrola
- správný průběh izolace – pozitivní izolační kontrola

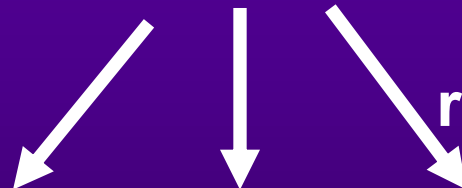
Diagnostické varianty PCR

- **PCR-REA, PRA, PCR-RFLP**
- **asymetrická PCR**
- **alelově specifická PCR**
- **nested PCR**
- **multiplex PCR**
- **Inverzní PCR**
- **kompetitivní PCR**
- **RT-PCR**
- **expresní PCR**
- **„real-time“ PCR**

PCR-REA, PRA, PCR-RFLP



amplifikace



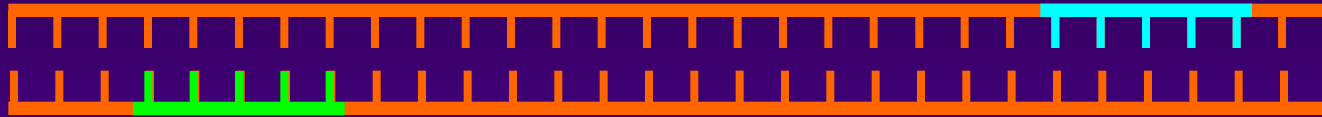
restrikční štěpení



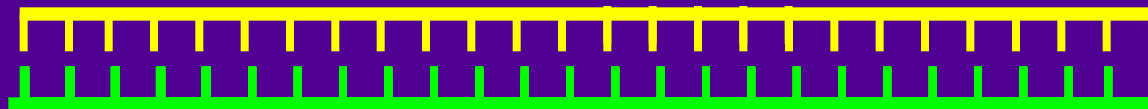
Praktický příklad
PCR-REA, PRA, PCR-RFLP

**Podrobně bude probráno v přednášce
číslo 4 pro 5. ročník**

Asymetrická PCR



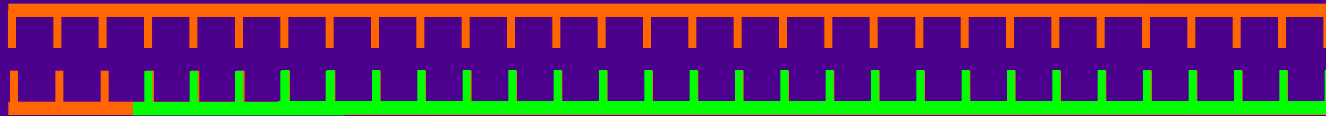
amplifikace



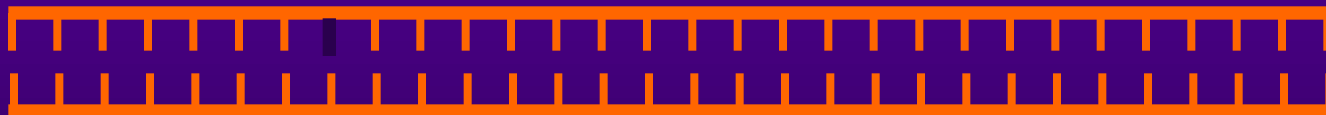
jednořetězcové produkty určené k sekvenování

Alelově specifická PCR

efektivní annealing zajišťuje 3'-konec primeru



amplifikace



žádná amplifikace



Příklad alelově specifické PCR

**Tento typ PCR je používán ke stanovení
SNP u eukaryotických organismů**

**Řada aplikací byla popsána při studiu
genomu kvasinek**



Výroba saké

- Metoda byla použita k detekci dominantní mutantní alely FAS2-1250S u kvasinek
- Gen kóduje modifikovanou formu syntázy mastných kyselin
- Kmeny s touto alelou syntetizují zvýšené množství ethyl kaproátu



Akada et al. (2001): Detection of a point mutation in FAS2 gene of sake yeast strains by allele-specific PCR amplification. J Biosci Bioeng. 92(2):189-92.

Domácí úkol?



Určete místo tvorby ethyl kaproátu v metabolismu mastných kyselin

Nested PCR



1. stupeň

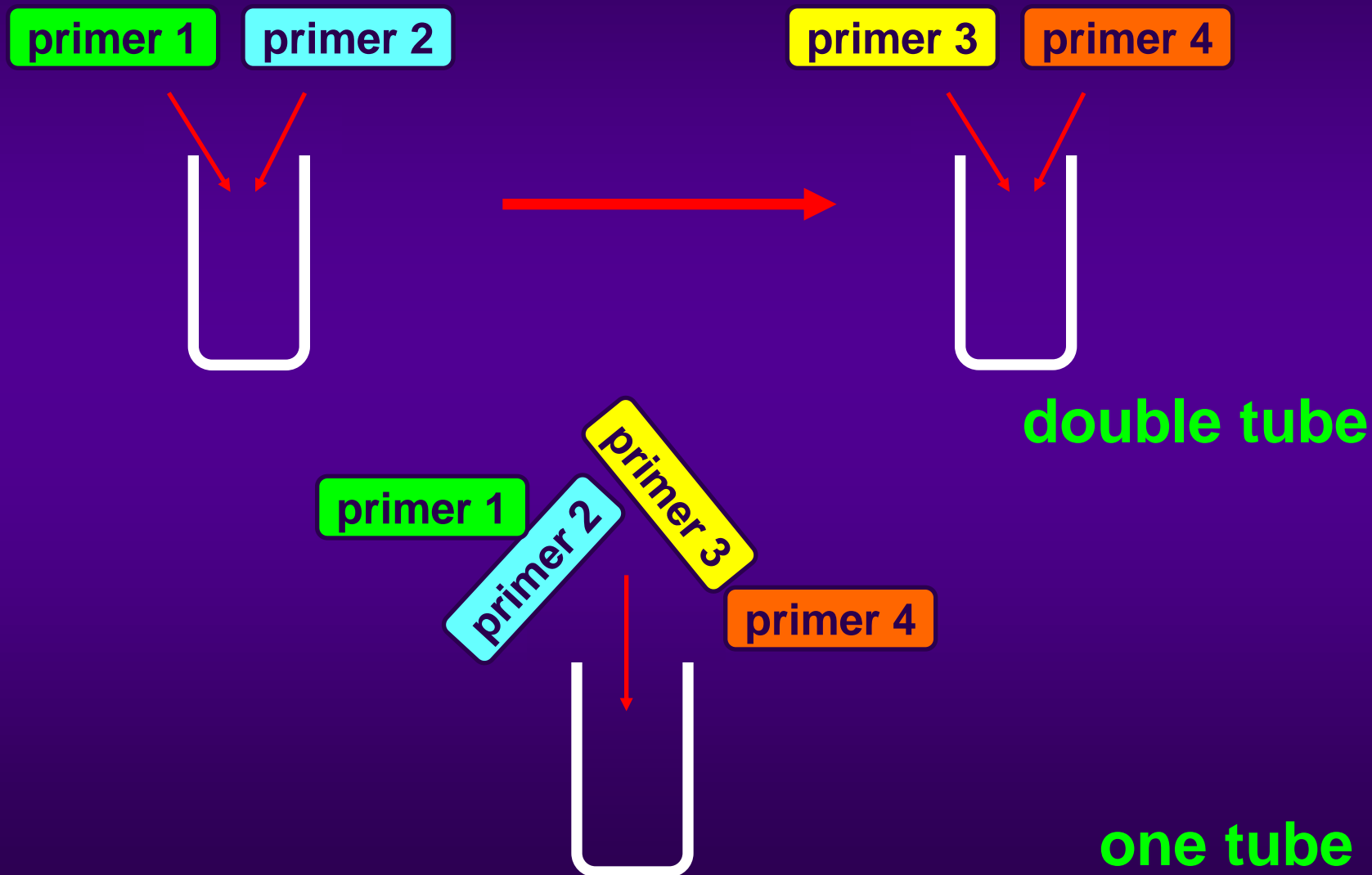


2. stupeň



citlivost
specifičnost

Uspořádání nested PCR



Příklad nested PCR

Detekce IS900 u *M. paratuberculosis*

M. avium subsp. *avium* serotypy 1-3, *M. avium* subsp. *silvaticum*



M. avium subsp. *hominissuis*, serotypy 4-6, 8-11 a 21



M. avium subsp. *paratuberculosis*



Citlivost metody

Citlivost pro DNA
1 genom/reakci

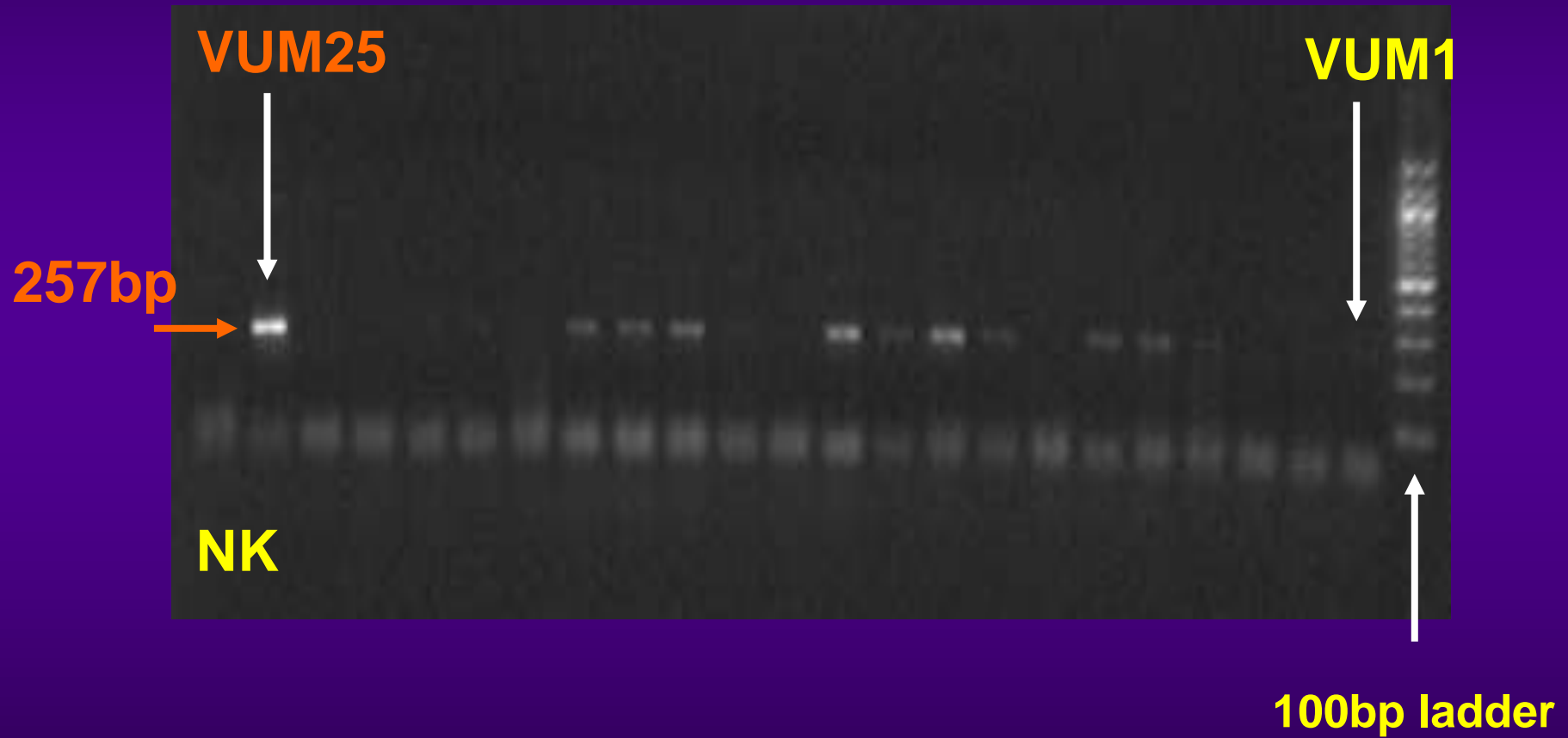
257bp
→



Citlivost pro lyzát
???

257bp
→

Analýza nepasterizovaných mlék



Porovnání PCR a kultivace

Celkem 142 vzorků mléka a sýrů

	Mléko		Sýry
	Pasterizované	Nepasterizované	
ČR	14/0/44 (32%)	5/2/9 (65/22%)	7/0/48 (15%)
Řecko	-	-	18/2/41 (44/12%)

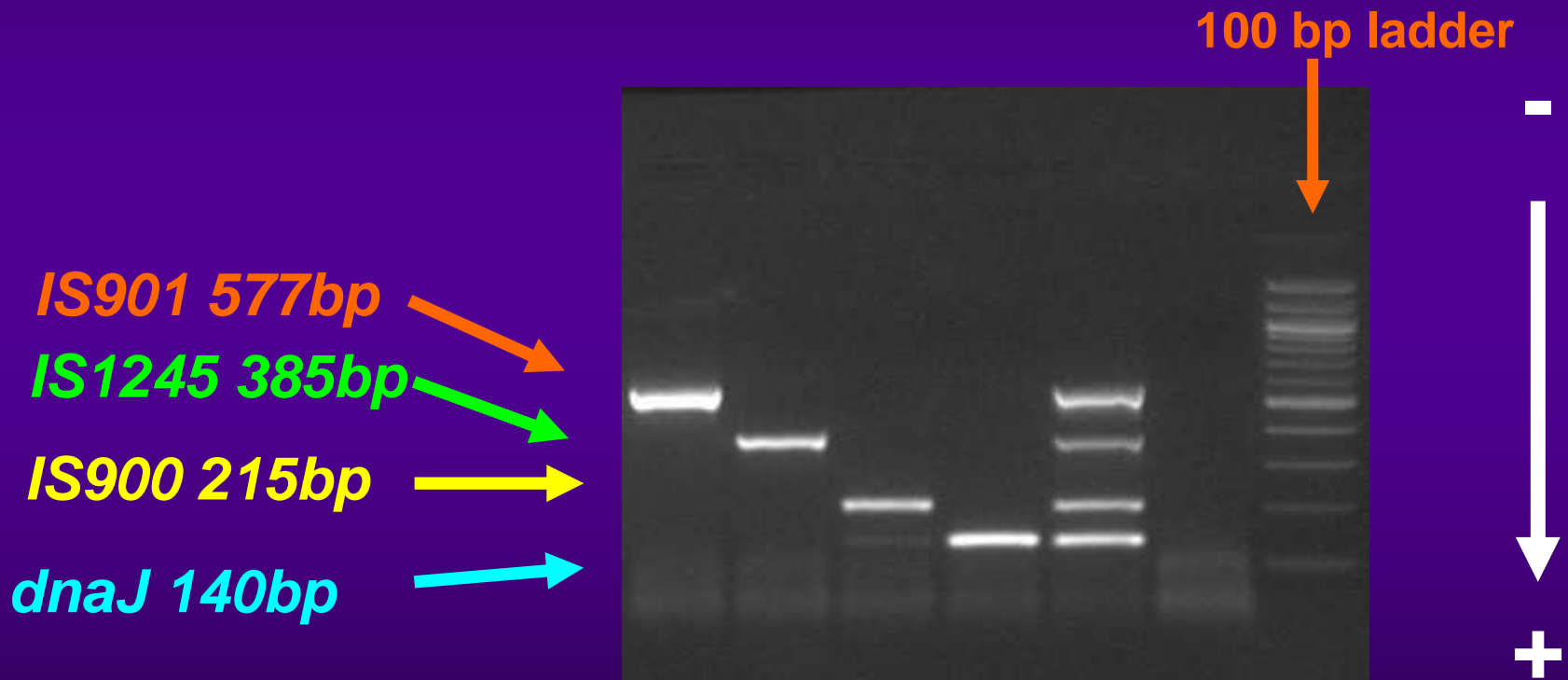
Multiplex PCR

amplifikace několika lokusů současně

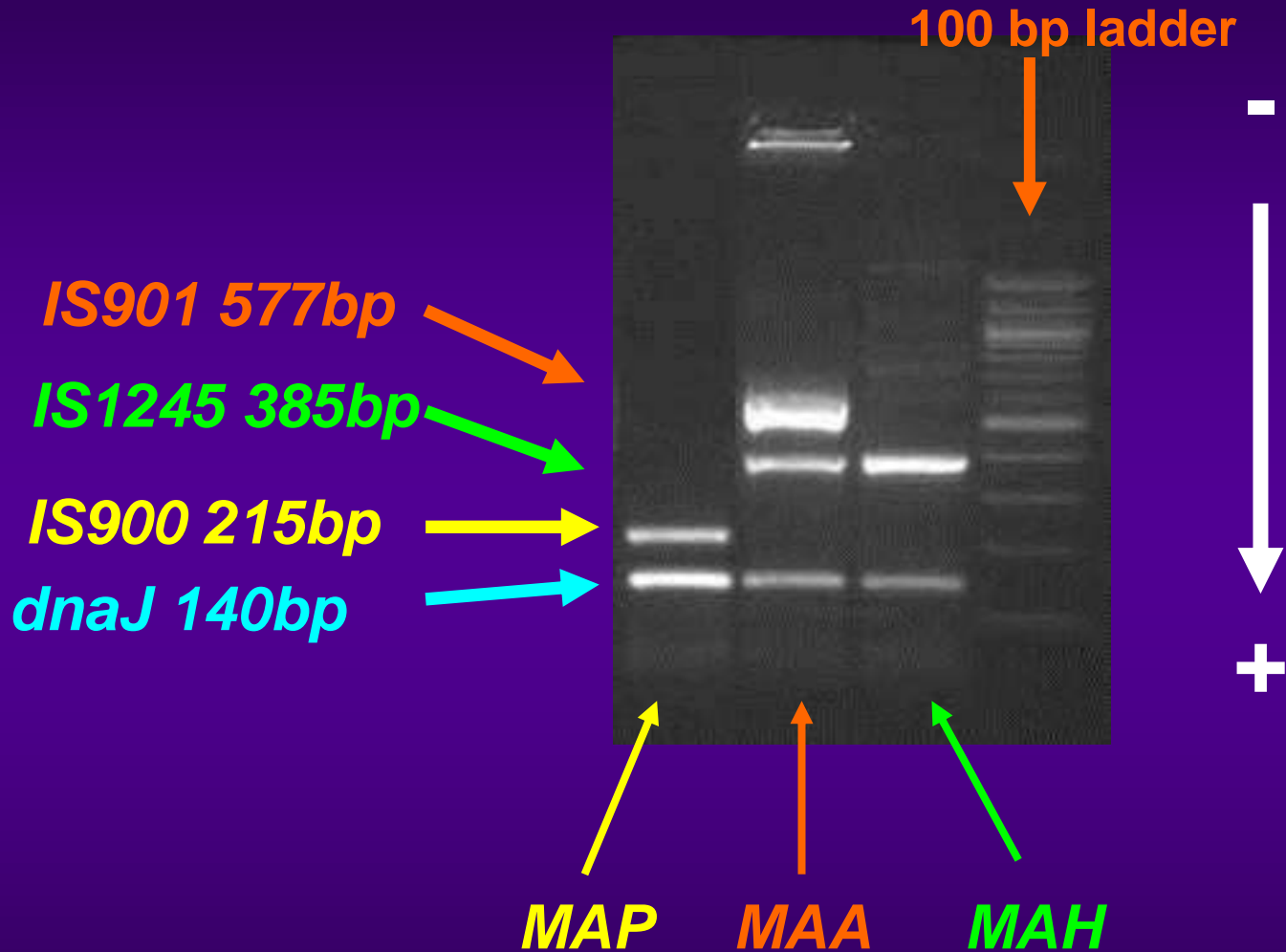
diagnostika více lokusů současně

Příklad multiplex PCR

Diferenciace poddruhů *Mycobacterium avium*



Ukázka diagnostické elektroforézy



Morávková et al. (2008): Strategy for the detection and differentiation of *Mycobacterium avium* species in isolates and heavily infected tissues, Research in Veterinary Science 85 (2008) 257–264.

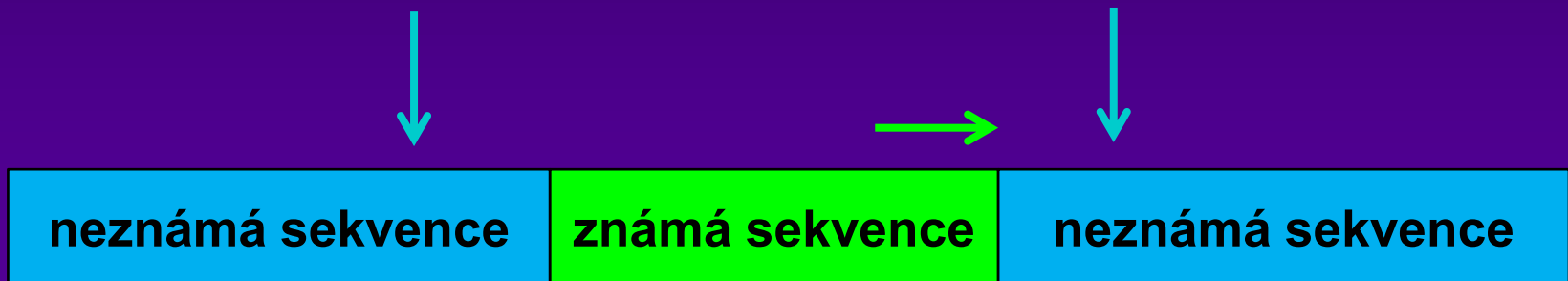
A teď si to vyzkoušíme prakticky



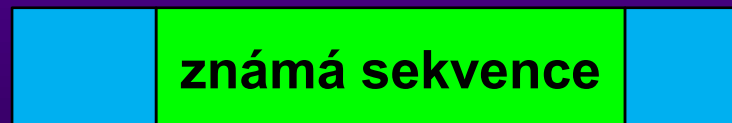
**Praktické procvičení s využitím
připraveného výukového materiálu**

Inverzní PCR I

Obrácená (inverzní) PCR umožňuje amplifikovat úseky DNA o neznámé sekvenci ohraničené na obou stranách DNA o známé sekvenci

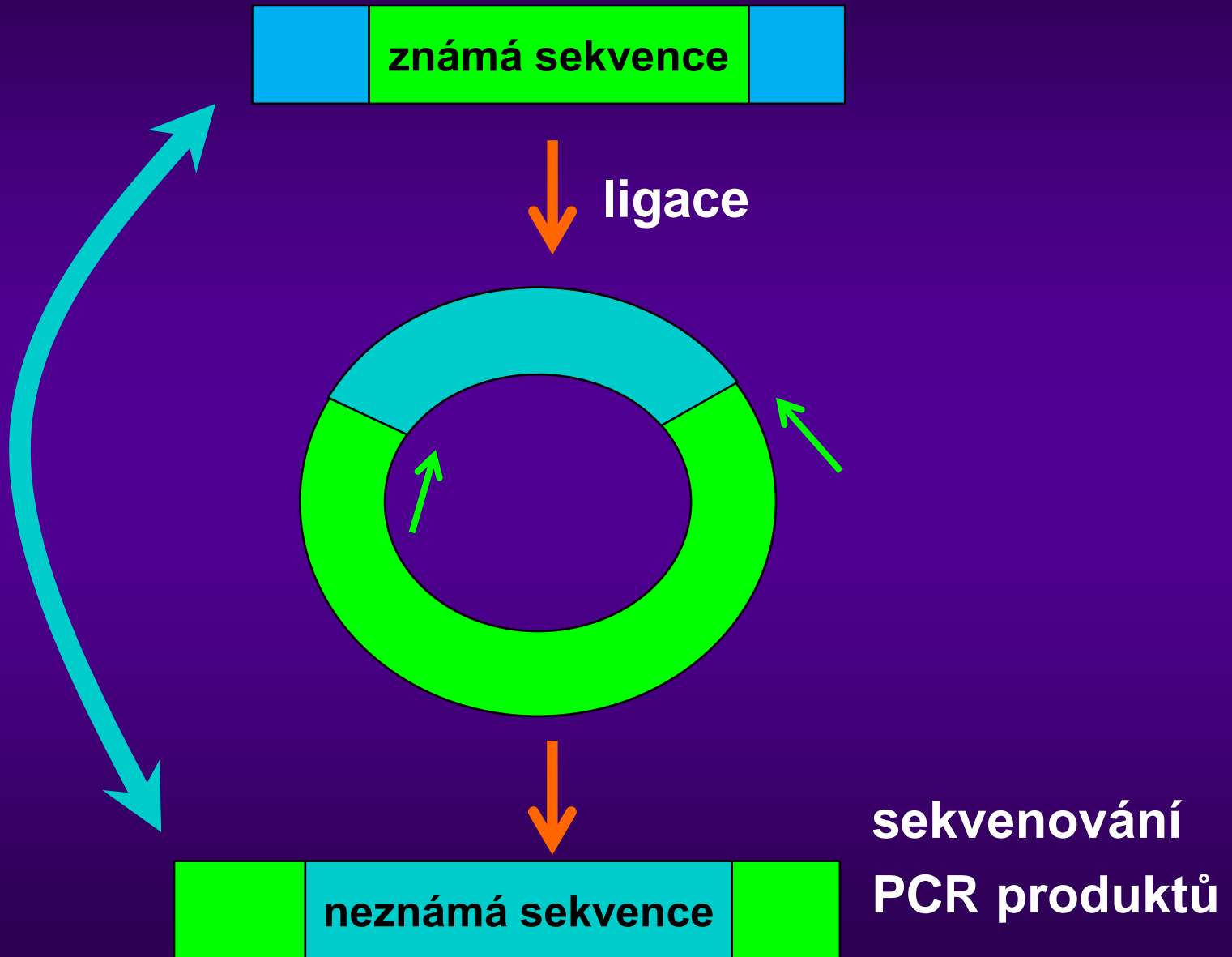


restrikční štěpení



ligace

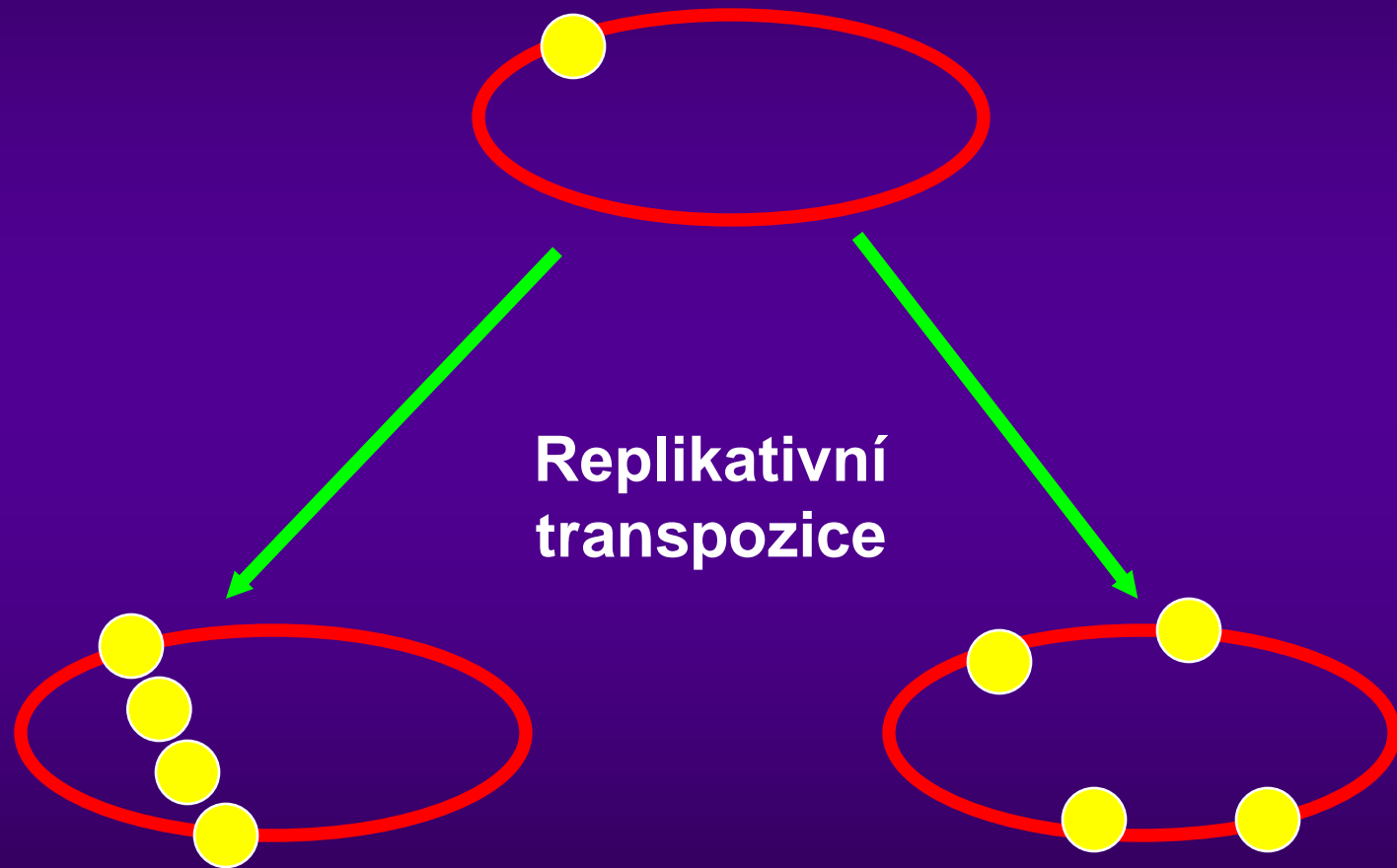
Inverzní PCR II



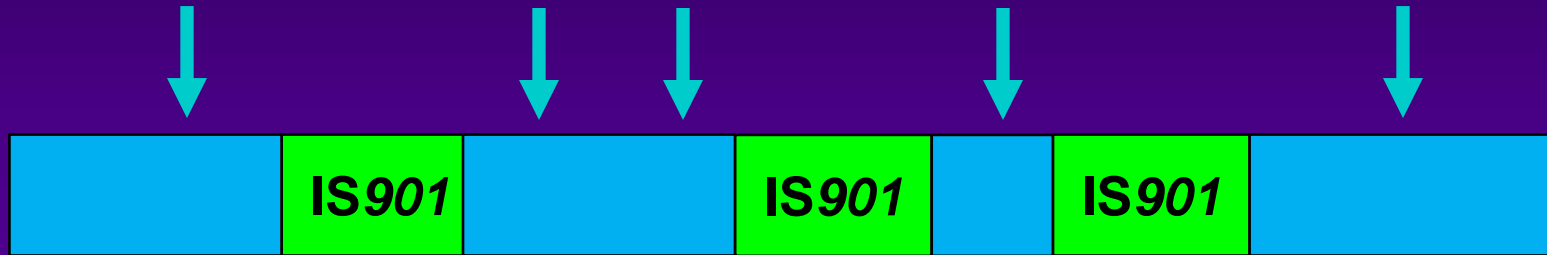
Příklad aplikace inverzní PCR

**Mapování pozic inzerční sekvence
v genomu mykobakterií**

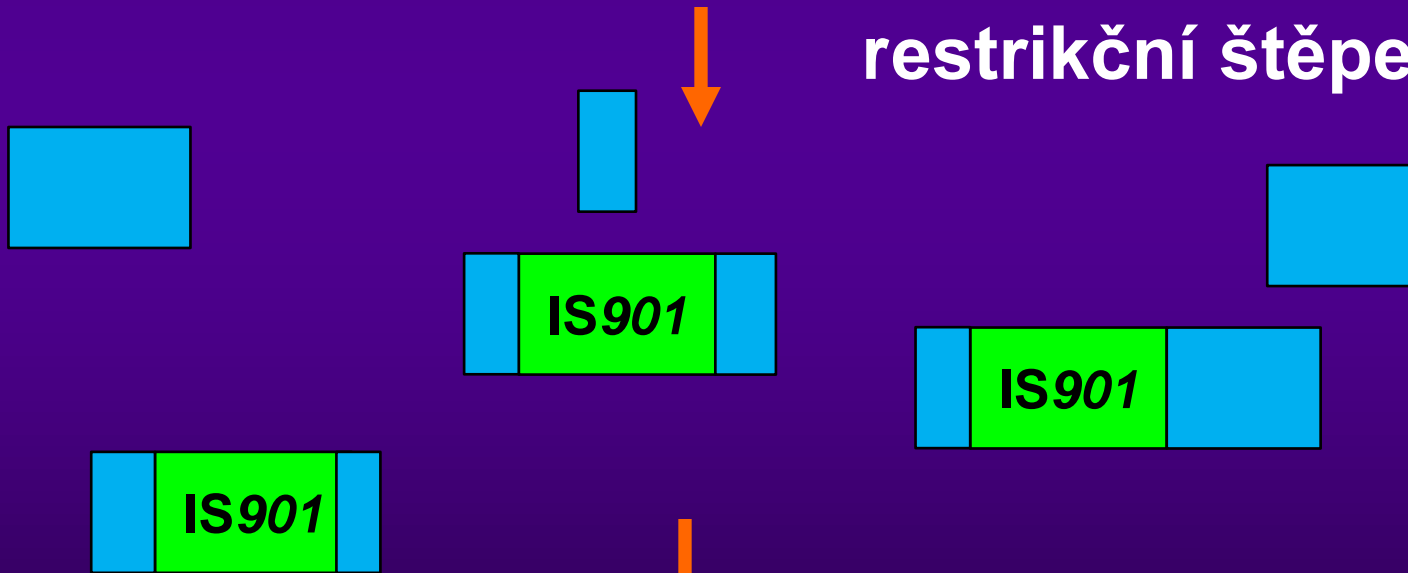
Inzerční sekvence IS901 u M. avium



Průběh inverzní PCR pro IS901

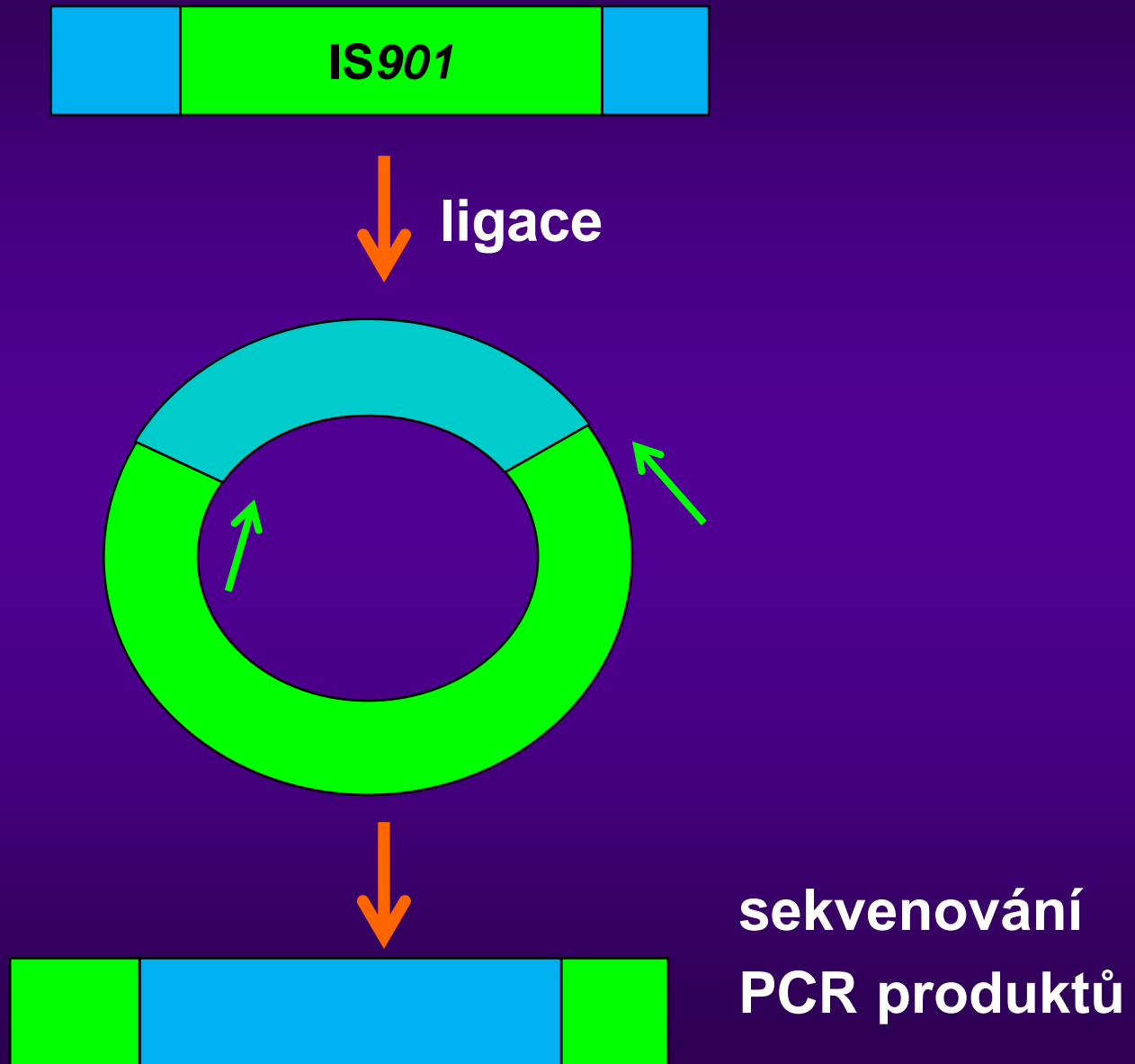


restrikční štěpení

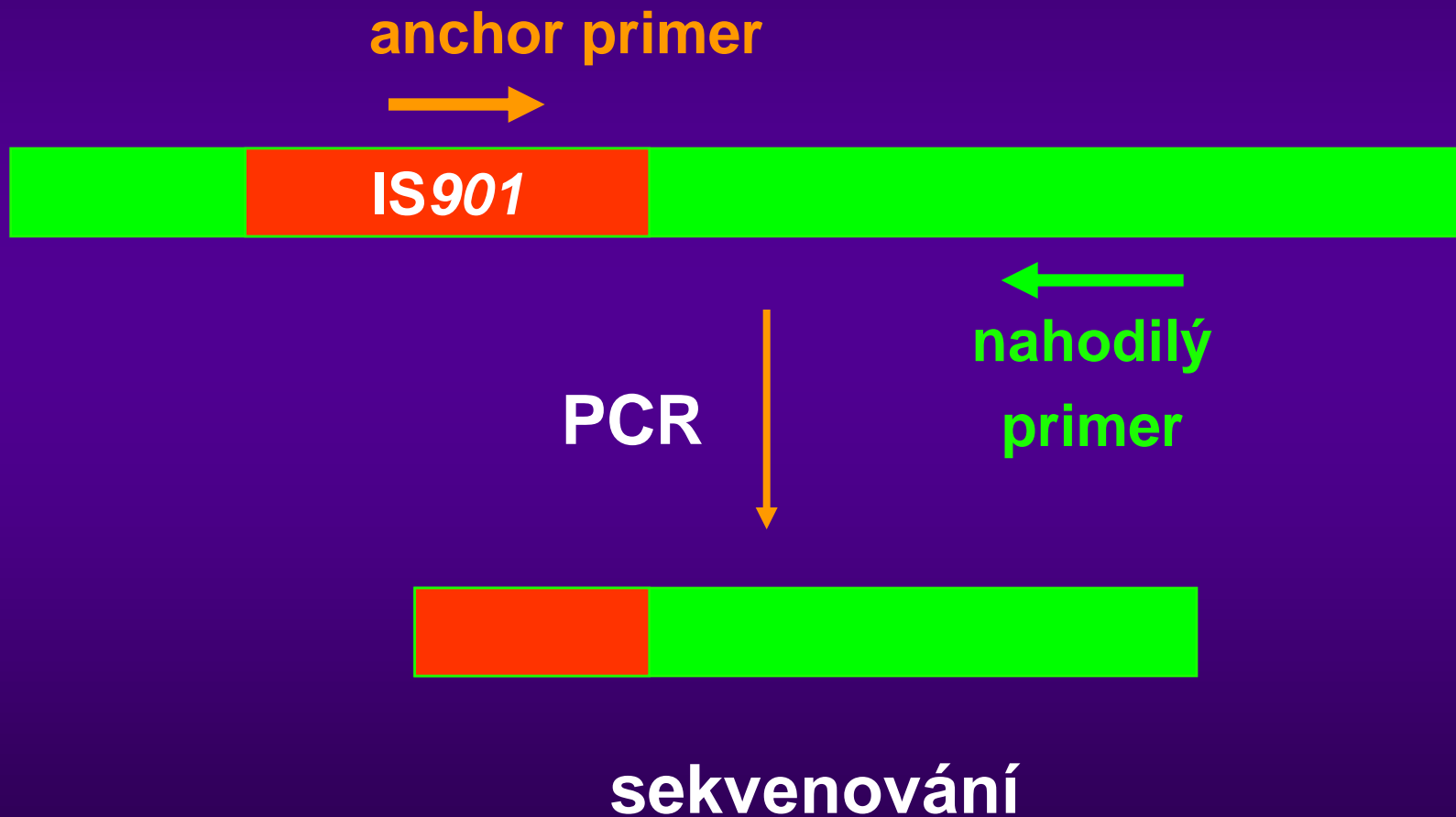


ligace

Průběh inverzní PCR pro IS901



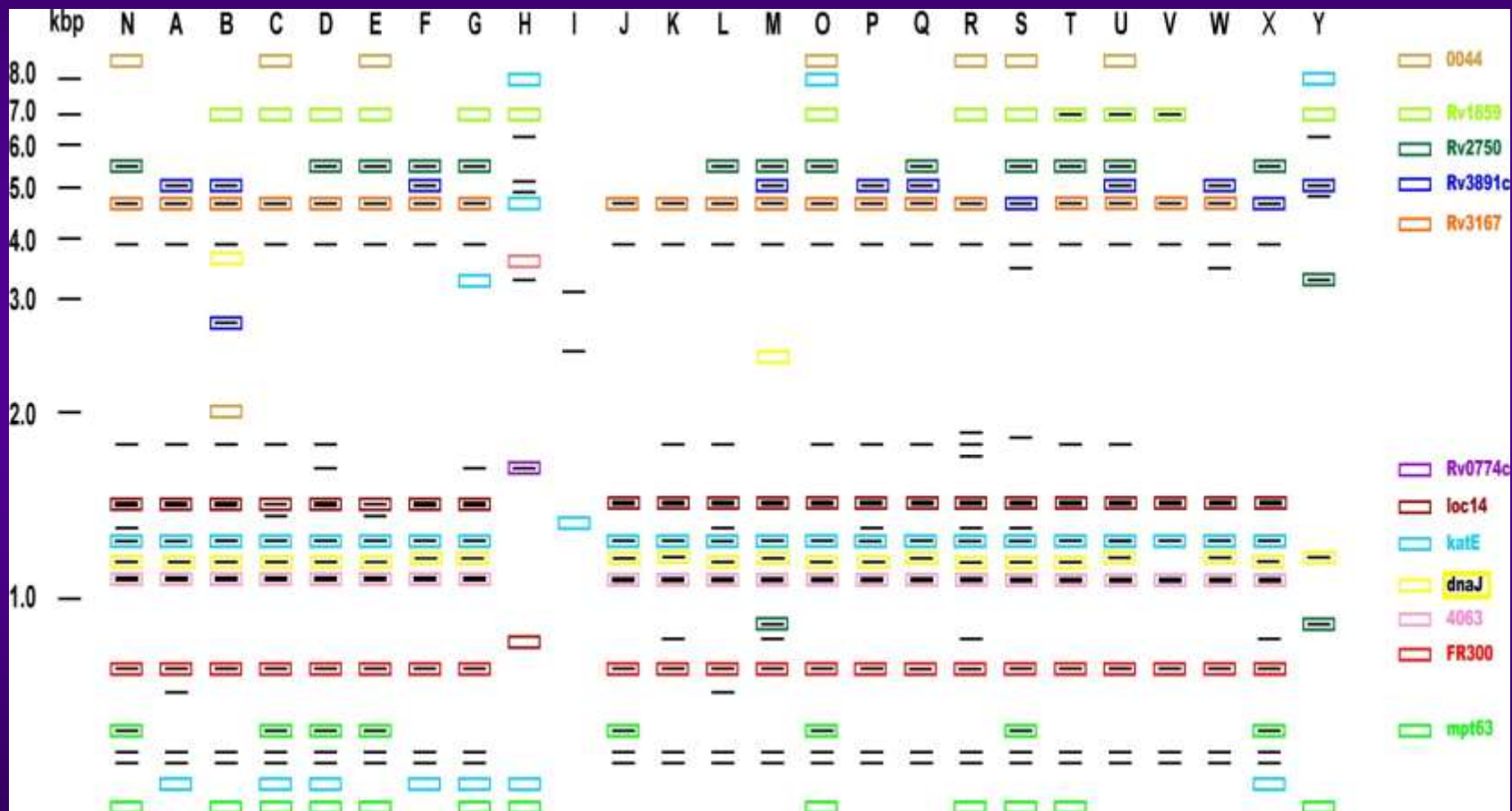
Anchor (ukotvená PCR)



Inzerční sekvence a fyziologie mykobakterií

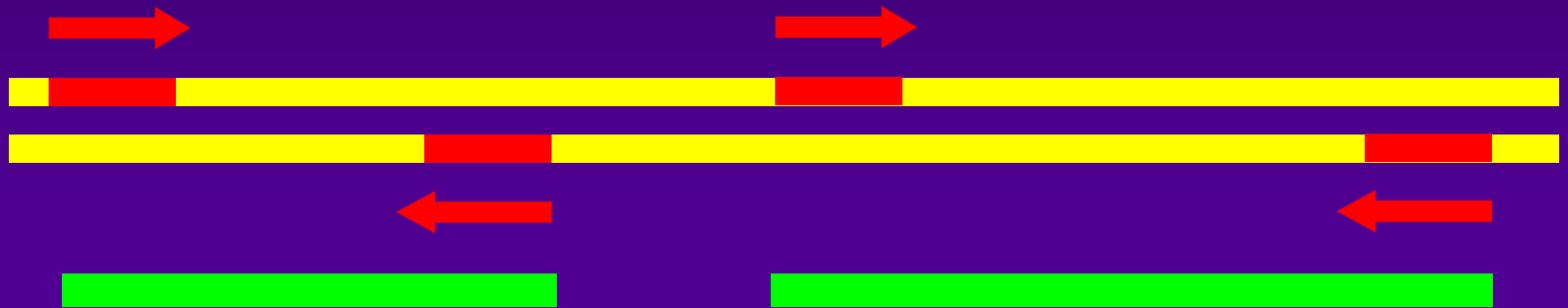
- identifikace 16 lokusů *MAA*, do kterých se začleňuje *IS901*
- fyzikální mapa pozic *IS901* u 25 izolátů *MAA* s definovanými RFLP profily
- identifikace inzerce *IS901* do promotoru genu *katE* – faktor virulence
- studium rezistence vybraných kmenů *MAA* k izonikotinhydrazidu

Fyzikální mapa pozic IS901



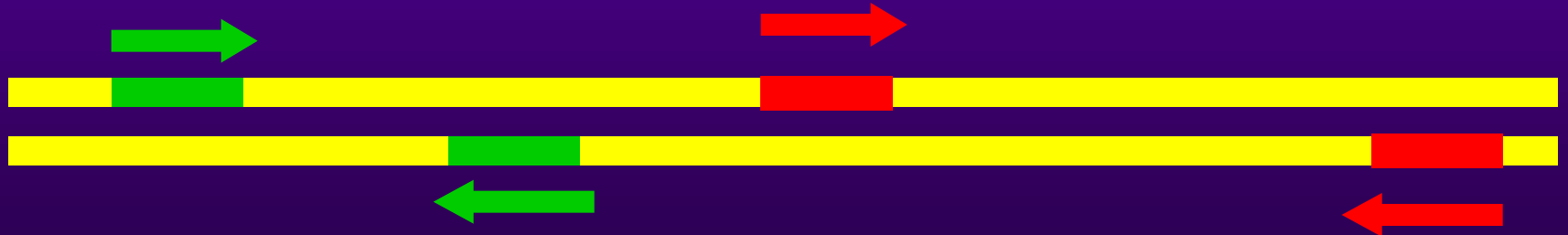
Kompetitivní PCR

stejné primery, 2 matrice



kompetice o primery

různé primery, 2 matrice



kompetice o substrát a enzym

RT - PCR

mRNA



zpětná
transkripce

ssDNA



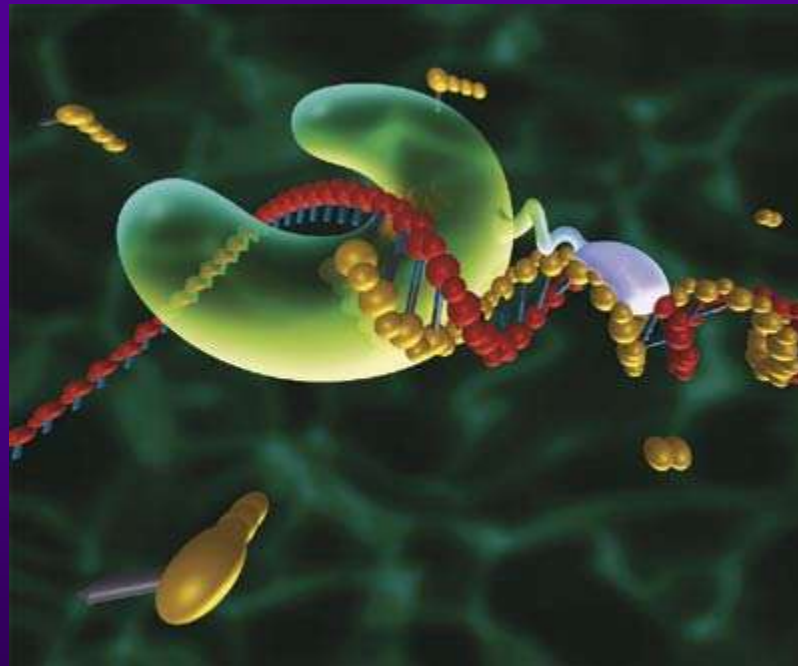
PCR



Expresní PCR

- uplatnění při translaci *in vitro*
- příprava genového konstruktů s připojeným promotorem
- translace *in vitro*
- nevyžaduje klonování do specifických vektorů
- umožňuje přípravu mutovaných variant genu pro srovnávací studie následných produktů – rekombinantních proteinů

**„Real-time PCR“ je nejmodernějším
výdobytkem polymerázové řetězové
reakce**



Real-time PCR - princip

- kombinované provádění DNA **amplifikace** a **detekce** cílové nukleové kyseliny současně **v jedné zkumavce** pomocí světelného **signálu z fluoroforů**
- je možno **dynamicky posuzovat průběh** syntézy PCR produktu
- stanovení množství matrice vložené do reakce (**kvantitativní PCR**)

Fluorofory

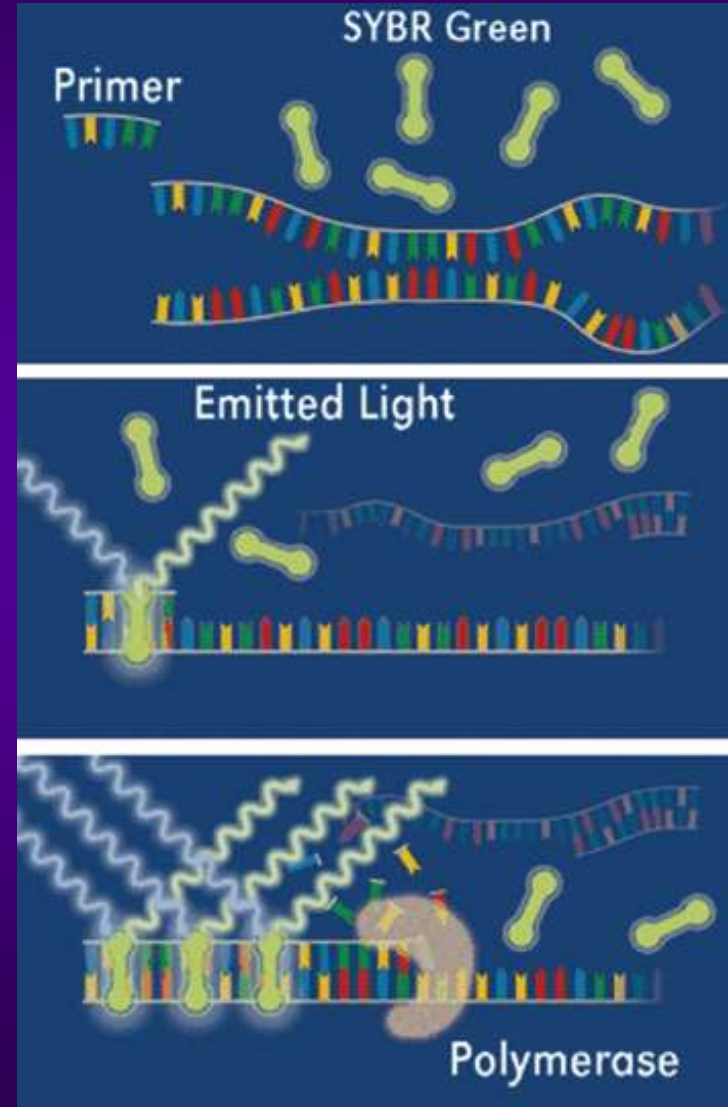
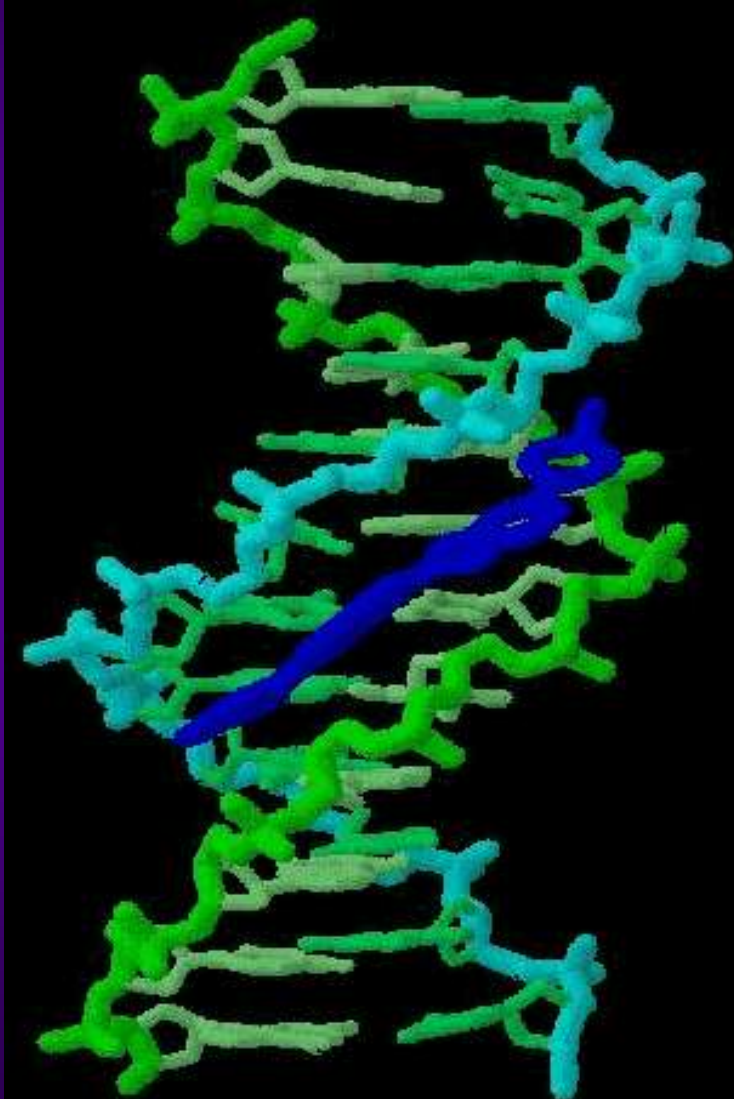
Navazují se na amplikony nebo jsou jimi značeny hybridizační sondy

- 1) Nespecifické metody: založené na nespecifické vazbě fluoroforu do vznikající molekuly dsDNA
- 2) Specifické metody: založené na specifické vazbě sondy označené fluoroforem

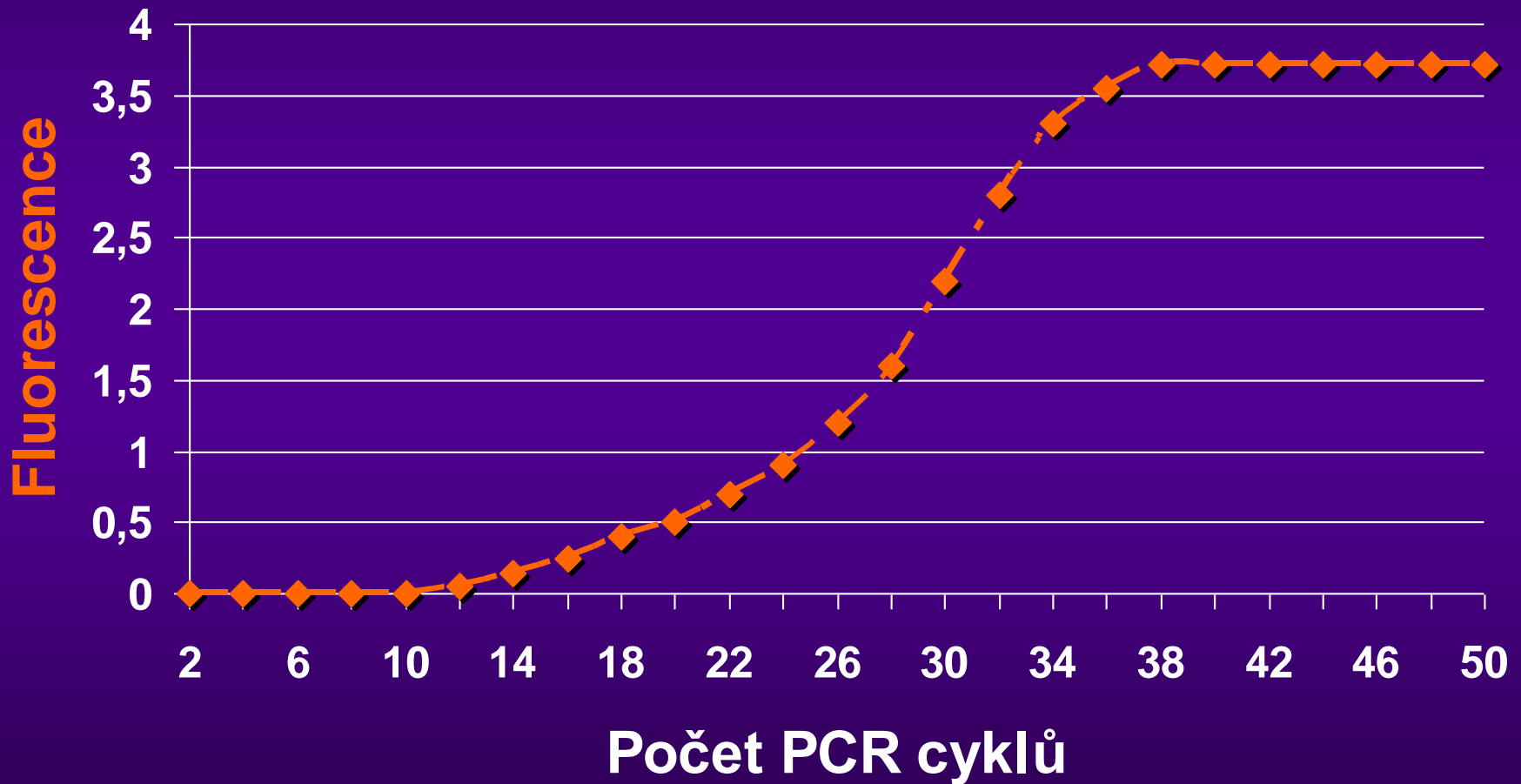
Real-time PCR - formáty

- fluorofory s vazbou na dvouřetězcový fragment DNA = **SYBR® Green I**;
- princip 5' → 3' exonukleázové aktivity DNA polymerázy na značené sondy = **TaqMan®**;
- princip hybridizace lineárních a nebo vlásenkových („hairpin“) sond = **FRET, Beacons**, aj.;
- princip fluoreskujících amplikonů = **Amplifluor™, Scorpions**;

Princip použití SYBR™ Green I



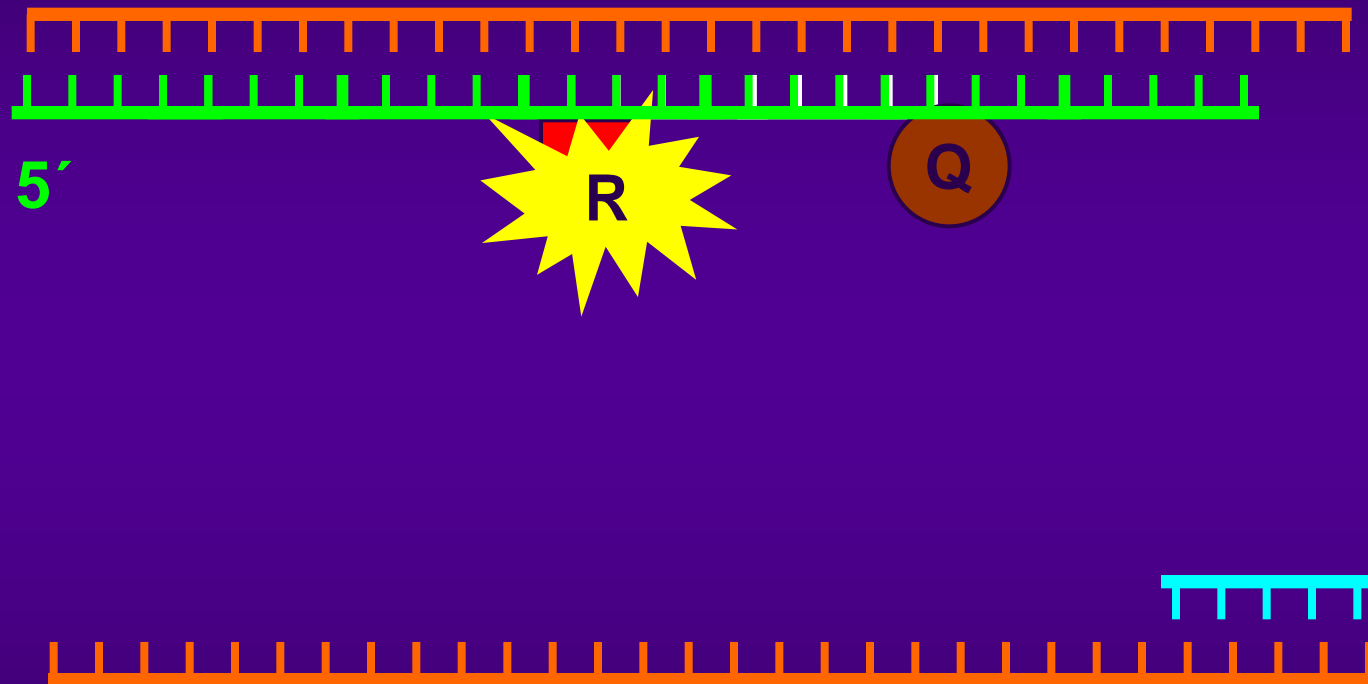
Co se děje uvnitř termocykleru při real-time PCR?



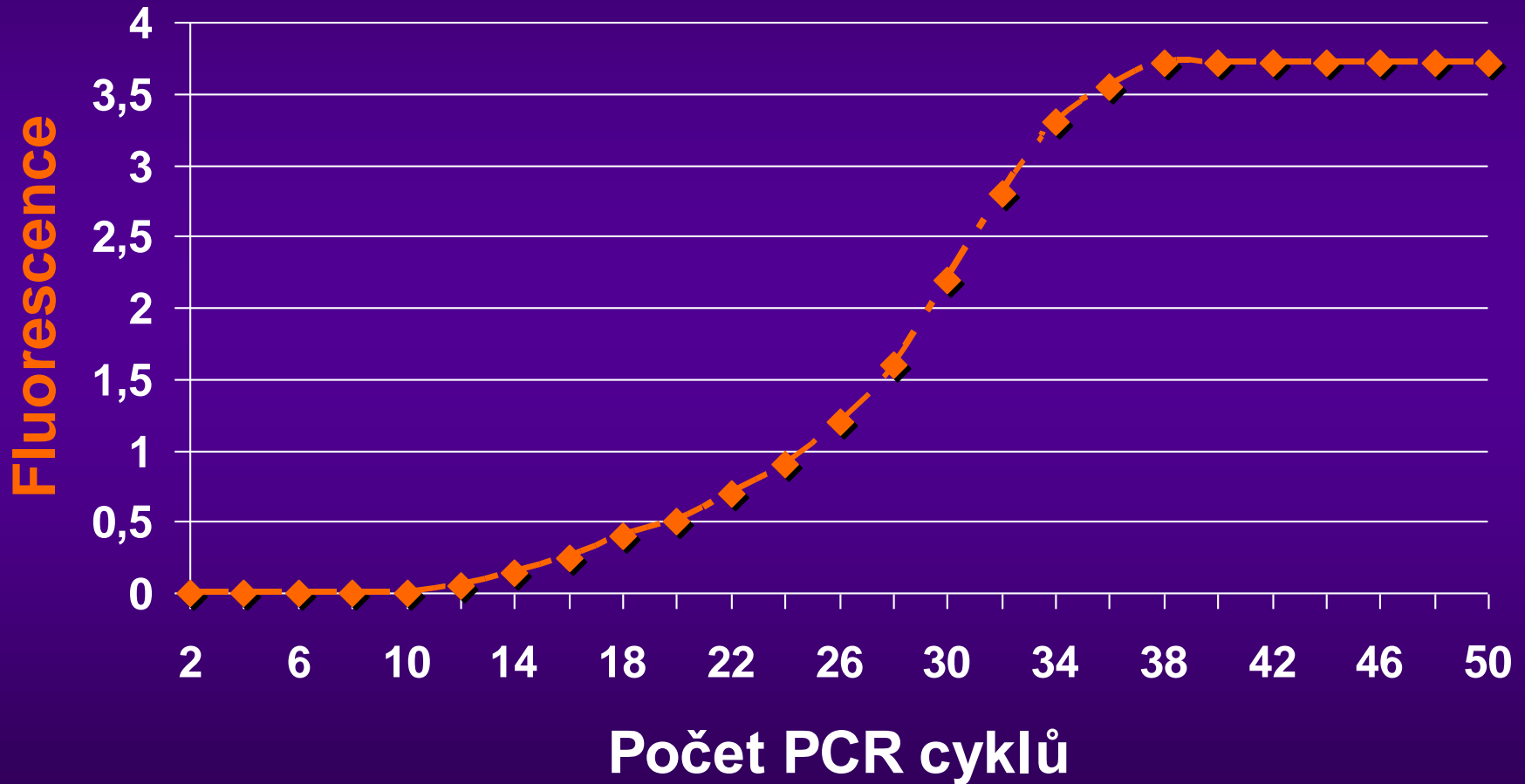
TaqMan

- **monitoruje 5' → 3' exonukleázový efekt Taq DNA polymerázy na vzniklý duplex mezi sondou a jejím komplementárním řetězcem na PCR produktu**
- **Taq DNA polymeráza uvolňuje a hydrolyzuje sondu hybridizovanou v průběhu syntézy správného řetězce na matrici DNA**
- **fluorofor s excitační energií (R) a fluorofor (Q) pohlcující energii, tzv. „quencher dye“**

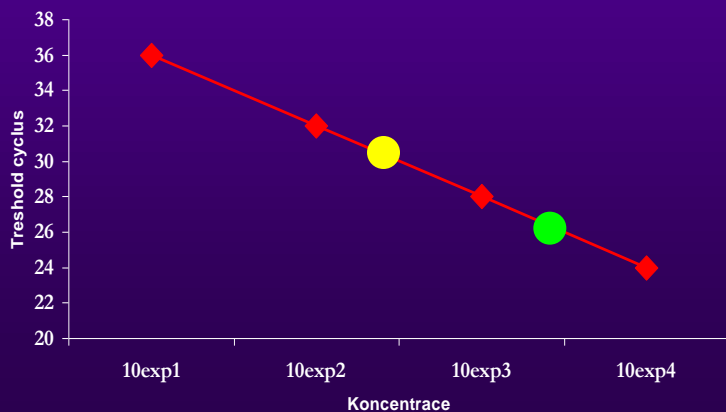
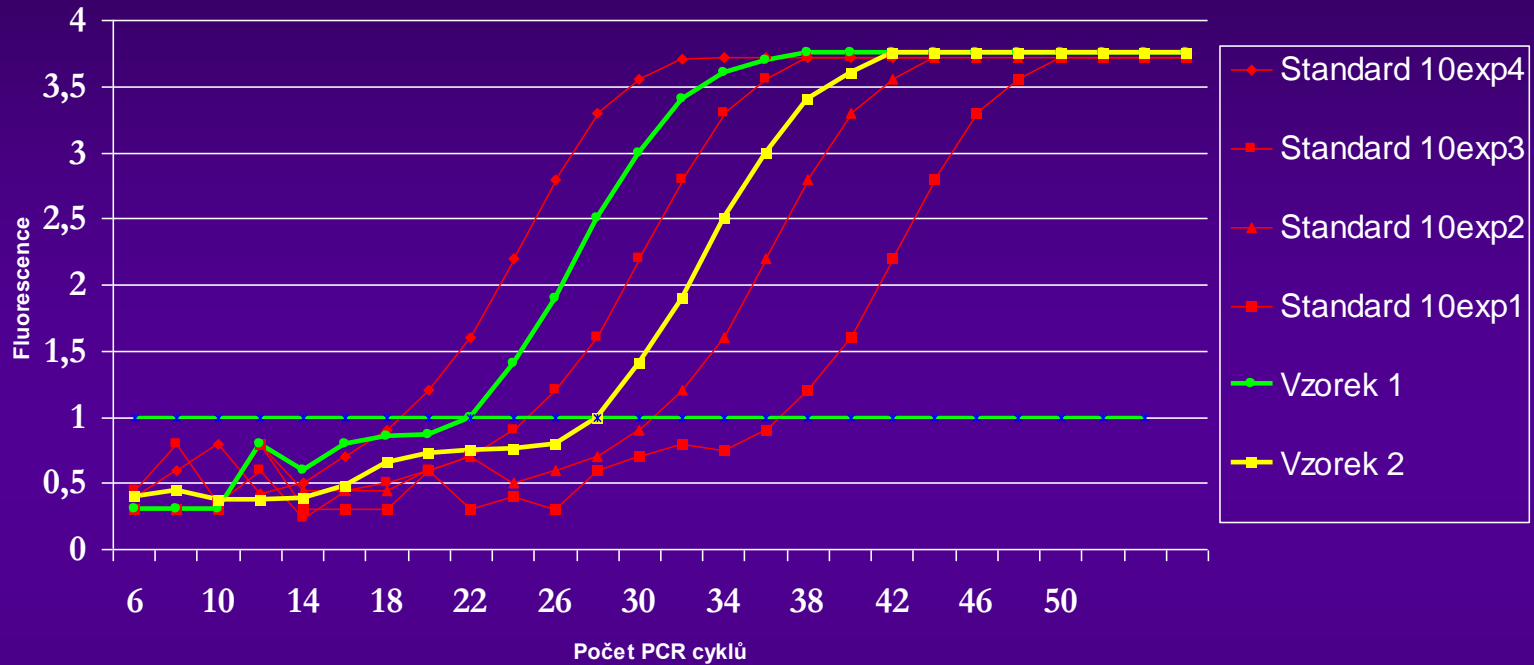
TaqMan



Při jakémkoli formátu je výsledek pořád stejný



Kvantifikace neznámého vzorku pomocí vložené kalibrační řady



Vzorek	Typ vzorku	Ct	Koncentrace (kopií/ul)
1	Neznámý	25,64	3,50E+03
2	Neznámý	29,23	2,50E+02
K1	Standard	23,97	1,00E+04
K3	Standard	27,16	1,00E+03
K3	Standard	30,68	1,00E+02
K4	Standard	33,53	1,00E+01

Real Time přístroje

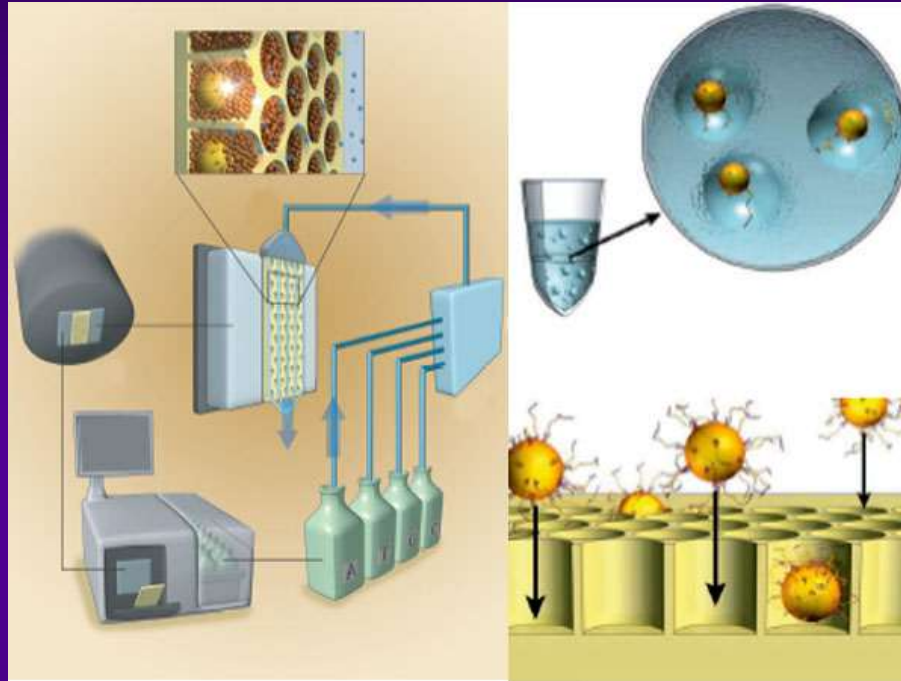


Real-time v mikrobiologii

- Umožňuje všechny formáty klasické PCR
- Stejná nebo vyšší citlivost bez manipulace se vzorky – snížení rizika kontaminace
- Je více specifická – 2 primery + sonda
- Umožňuje stanovit počet mikroorganismů ve vzorku (kvantifikace)
- Není třeba provádět elektroforézu
- Automatizace procesu pro klinické využití

Budoucnost ? - emulsní PCR

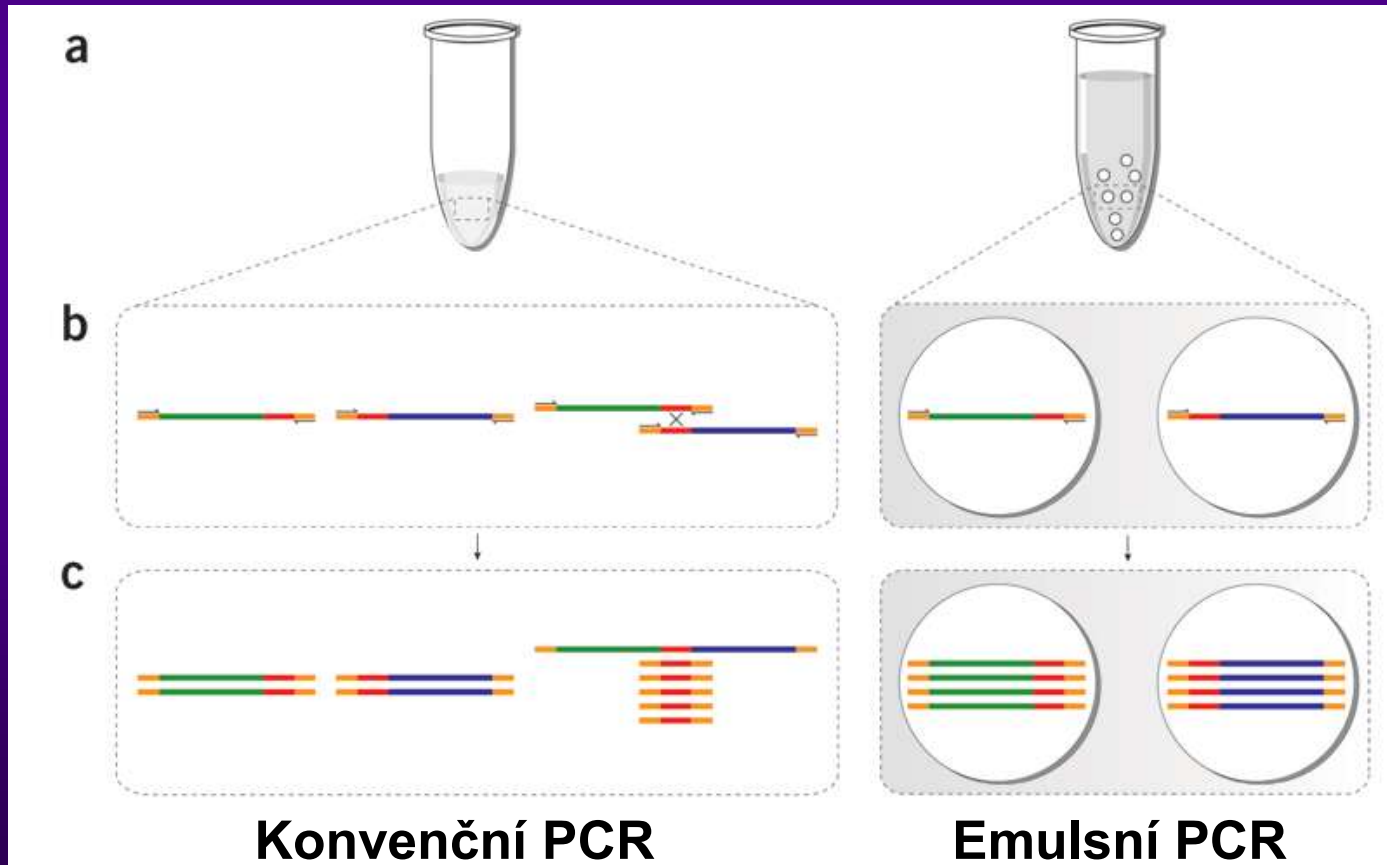
454 Life Sciences



- Amplifikace probíhá v emulsi (voda-olej)
- Jednotlivé matrice navázány samostatně na povrch jednotlivých kapek

Emulsní PCR

- Amplikon je výsledkem jedinečné PCR
- Méně nespecifických produktů



Využití emulsní PCR

- Mapování genomů
- Vyhledávání genových polymorfismů
- Analýza mikrobiálních společenstev

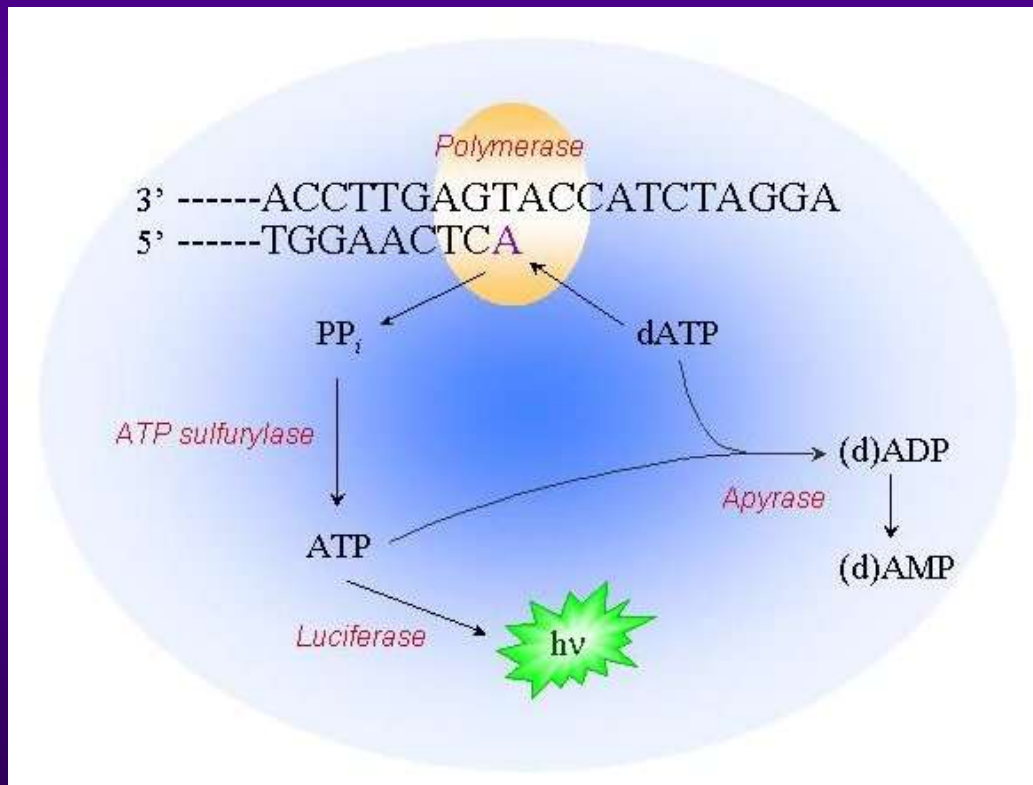


- bakterie v biofilmech
- mikroorganismy v potravinářských vzorcích
- nekultivovatelné bakterie

Používá se ve spojení s pyrosekvenováním

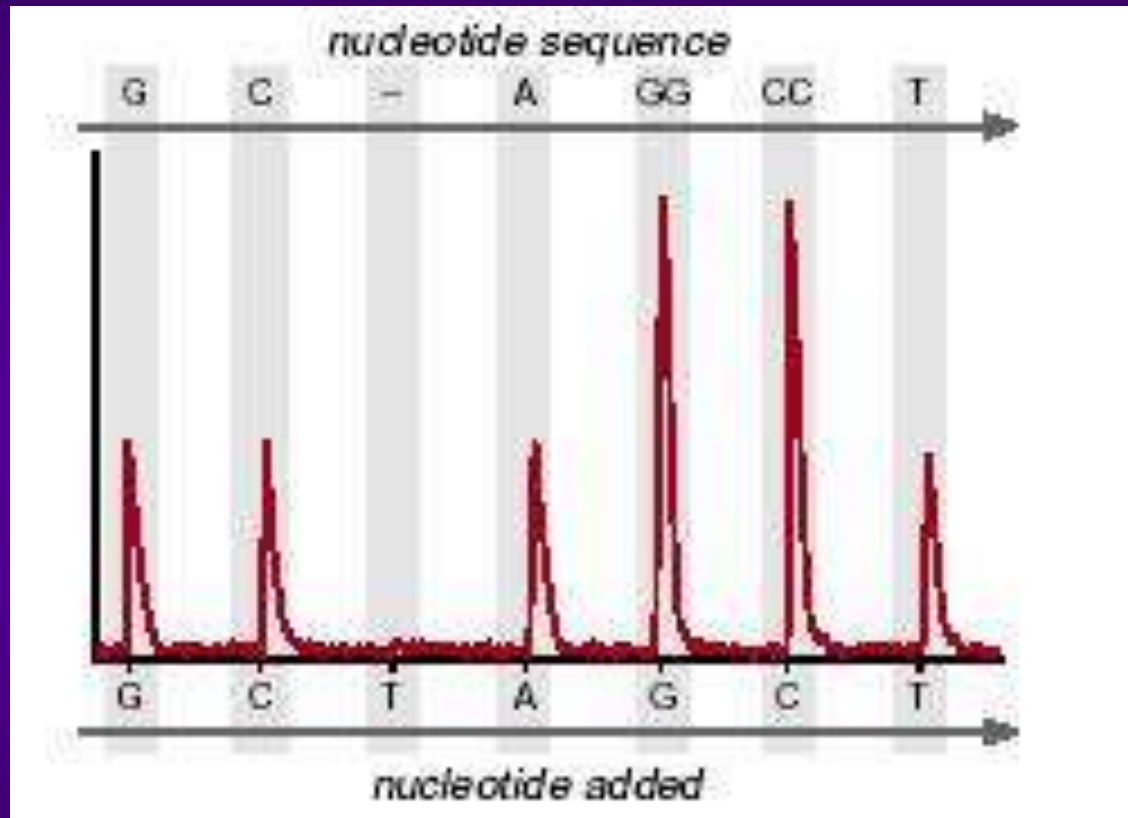
Pyrosekvenování

- Metoda popsaná Mostafa Ronaghi et al. v roce 1990
- Určena pro krátké úseky DNA, SNP a úseky methylované



- 4 enzymy
- velmi přesná
- reakce se záhy „zahltí“

Pyrosequencing - záznam



Intenzita signálu odpovídá počtu začleněných nukleotidů

***Více o real-time PCR a
moderních aplikacích uslyšíte
v 5. ročníku***



Shrnutí

- 1) Obecné principy diagnostiky
- 2) Diagnostické varianty PCR
- 3) Vybrané ukázky jednotlivých metod
- 4) Příklad a praktické vyhodnocení multiplex PCR
- 5) Ukázka praktického využití inverzní PCR
- 6) Real-time PCR
- 7) Emulsní PCR a pyrosekvenování