

# SMAMII

Amplifikační metody

# Amplifikační techniky v molekulární diagnostice NK

- Lze rozlišit do 3 skupin:
- Podle toho, co se amplifikuje
- Podle toho, který enzym se využívá

# 1. Skupina metod

- které využívají amplifikace cílové sekvence NK:
- PCR – termmostabilní DNA polymeráza
- transkripční amplifikační systém (TAS) a jeho modifikace – RNA polymeráza, RNáza H, reverzní transkriptáza
- amplifikace s vytěsňováním řetězce (SDA) – DNA polymeráza, restriční endonukleáza
- amplifikace otáčivou kružnicí (RCA) – DNA polymeráza

## 2. Skupina metod

- Které využívají amplifikace molekul detekční sondy
- ligázová amplifikační reakce (LAR), ligázová řetězová reakce (LCR) – T4 ligáza, termostabilní T4 ligáza
- Amplifikace RNA sondy pomocí Q beta replikázy – Q beta replikáza

# 3. Skupina metod

- Které využívají amplifikace (zesílení) signálu na detekční sondě
- Větvená DNA (branched DNA, bDNA)
- Amplifikace signálu s využitím syntézy a štěpení složené sondy (NEESA, SISAR, Invader)
- Amplifikace signálu s využitím DNA čipů

# Amplifikace cílové sekvence NK

- Amplifikační systémy založené na replikaci DNA
- Konvenční PCR a její modifikace
- Hnízdová (odstupňovaná, nested) PCR
- Multiplexová PCR
- Reverzně transkripční PCR
- In situ PCR
- EMA/PMA PCR

# Metody určené k detekci polymorfismů – typisační metody

- Genotypizace zprostředkovaná PCR
- Reakce polymerázová řetězová náhodná (arbitrary primed AP-PCR, RAPD, DNA amplified fingerprinting DAF)
- Je používán 1 krátký primer, který se váže na cílovou DNA na náhodných místech
- Výsledkem je soubor amplikonů charakteristický pro daný organismus

# Polymorfismus délky amplifikovaných fragmentů

- AFLP – amplified fragment length polymorfism
- Typisační metoda, která využívá selektivní amplifikaci souboru fragmentů DNA vytvářeného štěpením restrikcími endonukleázami.
- Výsledkem je soubor amplikonů charakteristický pro daný organismus



# PCR-RFLP

- Diagnostická a typizační metoda využívající kombinaci metod polymerázové řetězové reakce a analýzy polymorfismu restričních fragmentů amplifikovaného úseku DNA
- Metoda ARDRA – je amplifikována a následně štěpena rDNA

# PCR-ribotypizace

- Typisační metoda vhodná pro charakterizaci genomu většiny bakterií
- Je založena na amplifikaci intergenových mezerníků mezi geny pro 16SrRNA a 23SrRNA pomocí PCR

# PCR interrepetitivní

- Rep-PCR
- Typisační metoda, při které se amplifikují sekvence oddělující v genomu různé typy repeticí (např. REP elementy, ERIC, BOX, IS elementy)

# PCR v reálném čase

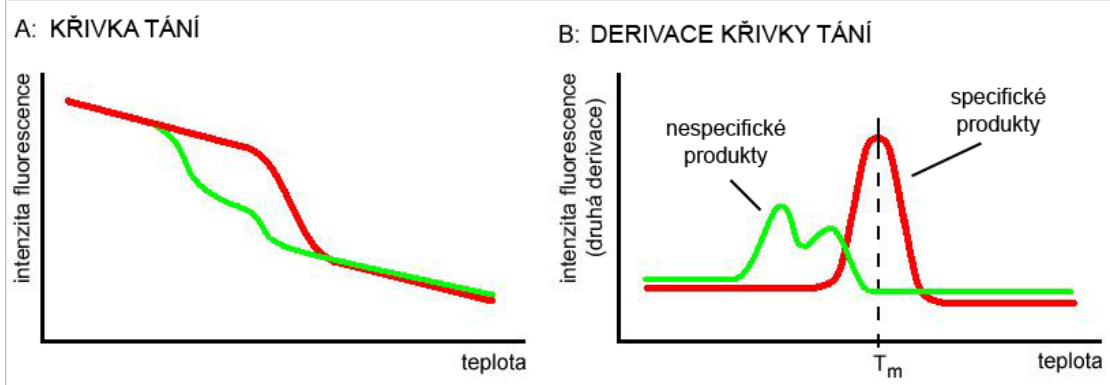
- Real-time PCR, online PCR, qPCR
- Díky detekci fluorescence
- Varianta PCR, která umožňuje detekovat PCR produkt on-line, v reálném čase, během jeho syntézy
- Tento způsob detekce umožňuje i kvantifikaci
- Výhodou je větší citlivost, rychlost a snadnost provedení a možnost zpracovat velké množství vzorků současně

# PCR v reálném čase

- využívá barviva, které fluoreskuje po vazbě na dsDNA (SYBRGREEN)
- Fluorescenční signál se zvyšuje se vzrůstajícím množstvím PCR produktů
- Nevýhoda: váže se na všechny ds DNA, i na dimery primerů

# Analýza křivky tání

- je metoda, která se používá po ukončení real-time PCR reakce
- ke zjištění povahy produktů PCR
- k odlišení specifických a nespecifických produktů PCR reakce.
- nespecifické produkty mají odlišnou (*obvykle nižší*) hodnotu  $T_m$  než produkty specifické.



# PCR v reálném čase dále využívá

- luorescentně značených hybridizačních sond
- které se pomocí komplementárního párování bazí vážou na vznikající PCR produkty (vnitřní část amplikované sekvence)



# Fluorescence vzniká

- Poté, co se fluorofor vzdálí od zhášedce tj. poté, co je odbourán DNA polymerázou
- Po navázání 2 značených sond těsně vedle sebe – dochází k přenosu energie mezi fluorofory a 5' a 3' koncích sond
- (metodu lze použít i pro detekci bodových mutací)

# Pro on-line detekci se používají

- tři systémy
- DNA sondy degradované polymerázou
- Vlášenkové sondy
- Hybridizační sondy

# Sondy odbourávané polymerázou

- Oligonukleotidové sondy komplementární s vnitřní sekvencí PCR produktu
- Značené fluorescenční značkou (fluorofor) a fluorescenčním zhášedčem (funkční skupina, která eliminuje fluorescenci)
- Při syntéze PCR produktu se využívá 5'-3' exonukleázové aktivity Taq polymerázy,

# Taq polymeráza s 5'-3'aktivitou

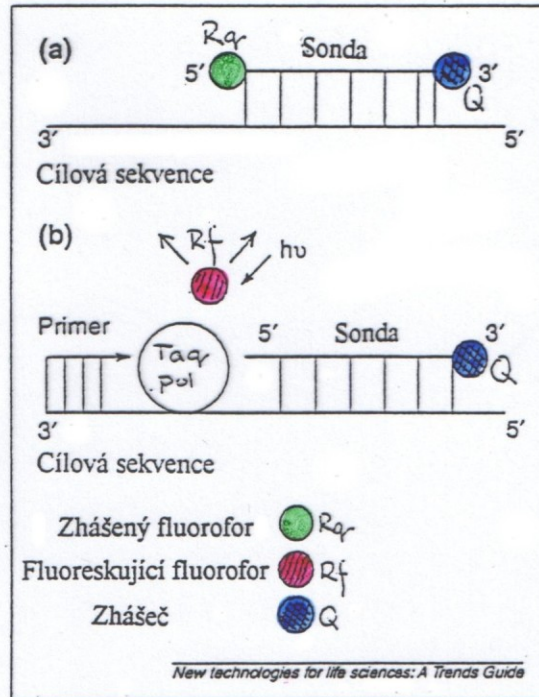
- rozeznává hybridní strukturu sondy a hydrolyzuje ji od 5' konce
- Tím se uvolňuje fluorofor a ruší se jeho interakce se zhášecem
- Fluorescence se zvyšuje s přibývajícím počtem amplifikačních cyklů
- Stanovuje se fluorometrem

# Sondy jsou navrhovány tak

- Aby měly nižší teplotu tání ( $T_m$ ) než je  $T_m$  primerů
- Aby docházelo k maximálnímu vyvázání sondy před připojením primerů
- To je rozhodující pro úspěšné štěpení sondy a uvolňování fluoroforu
- Komerční název sondy tohoto typu je TaqMan

Obr. Princip detekce pomocí sond odbourávaných polymerázou

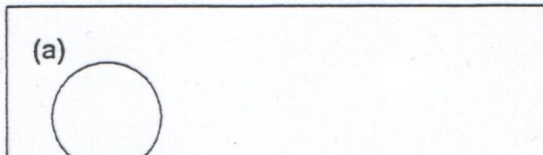
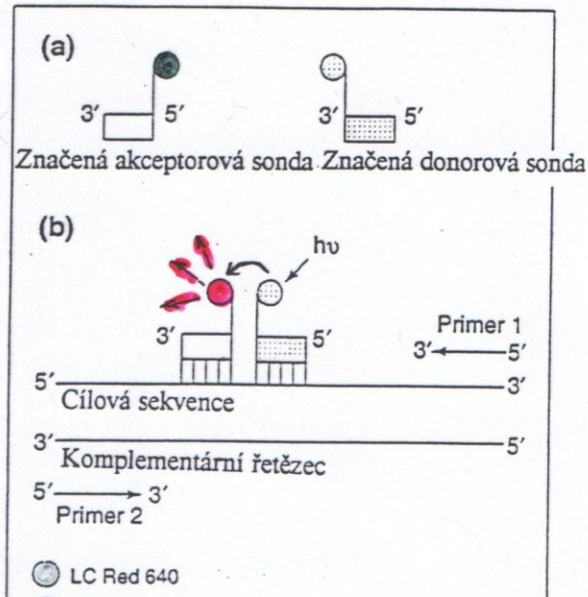
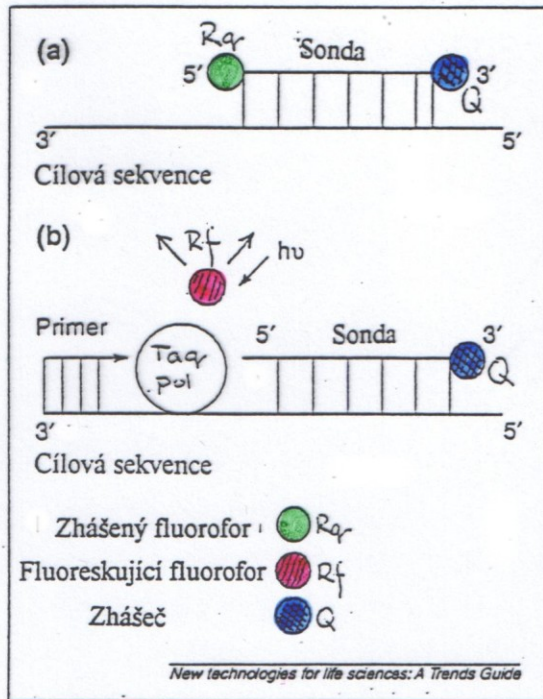
Taq Max



# TaqMan sonda

Obr. Princip detekce pomocí sond odbourávaných polymerázou

TaqMan

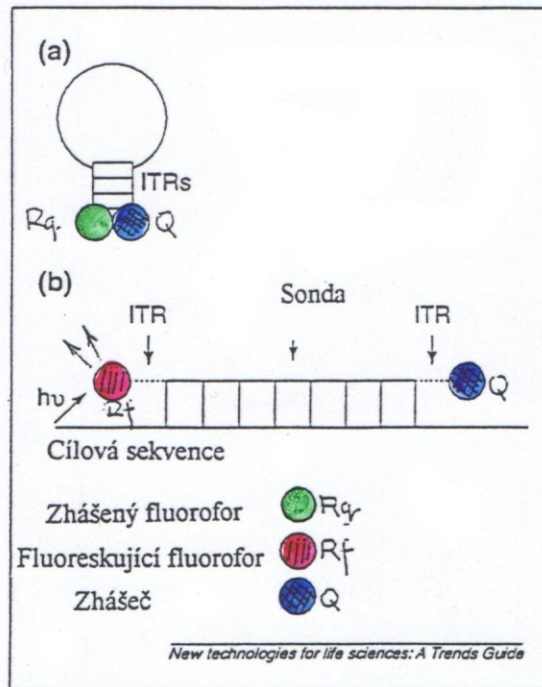


# Vlásenkové sondy

- Neboli molekulové majáčky (beacon) jsou delší a
- Na svých koncích mají invertované repetitivní sekvence
- Díky nim vzniká vlásenková struktura sondy
- Na jednom konci je fluorofor, na druhém konci je zhášecí a obě skupiny jsou těsně vedle sebe
- Vnitřní sekvence vlásenky je komplementární k část cílové oblasti (PCR produktu)
- Při hybridizaci sondy k cílové oblasti dochází k oddělení zhášecího a fluoroforu
- A tím ke vzniku fluorescence, kterou lze měřit



# Vlásenkové sondy

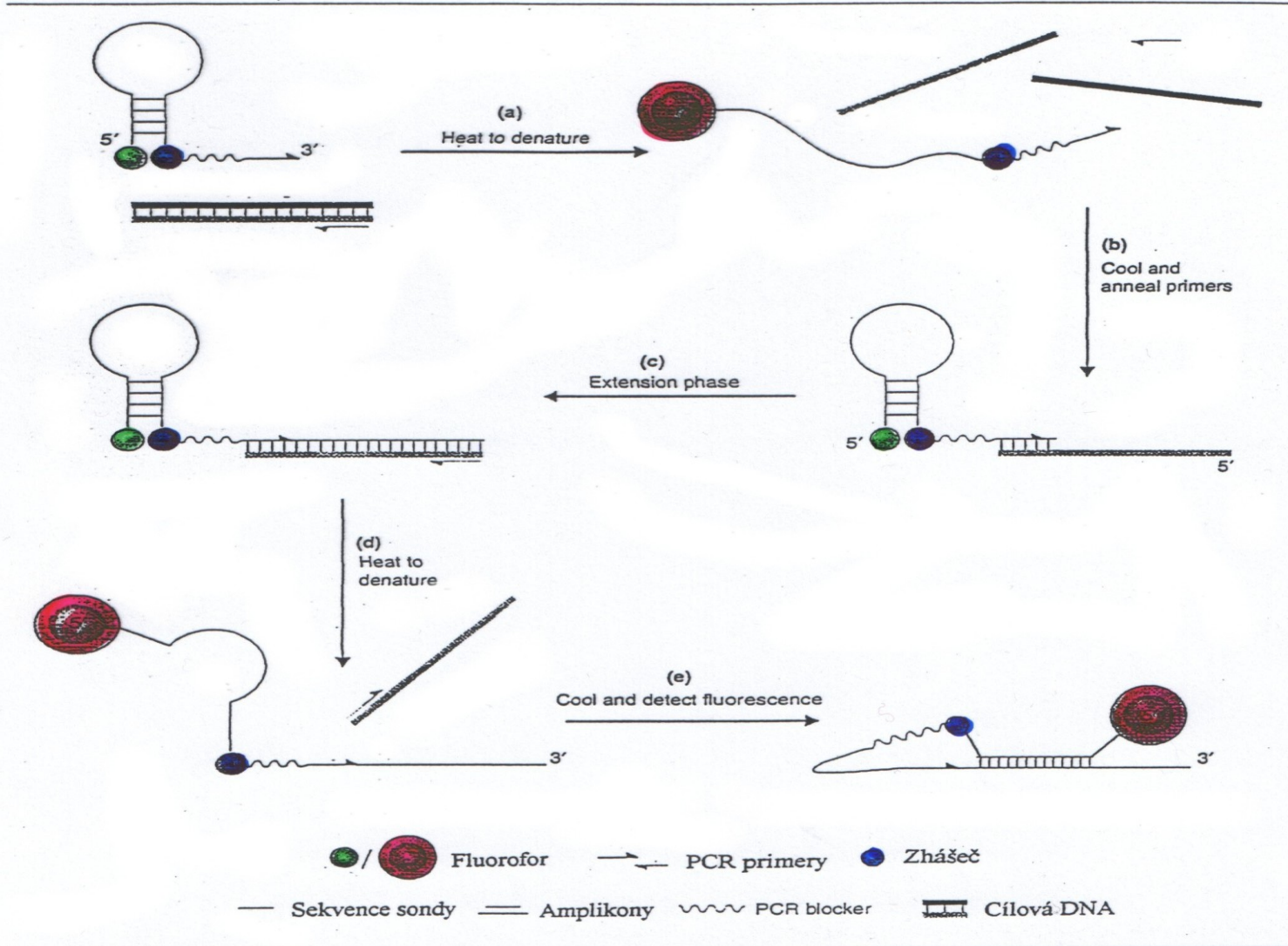


Obr. Princip detekce pomocí vlásenkových sond

# Vlásenkové sondy

- Mají komerční názvy Amplifluor, Scorpion
- Součástí sondy Scorpion je krátká sekvence, která slouží jako primer v pCR reakci
- Tato sonda zůstává navázána na vzniklý PCR produkt
- Princip detekce amplikonu pomocí upravené vlásenkové sondy je uveden na Obr.

Obr. Princip detekce pomocí upravené vlásečkové sondy "Scorpion"

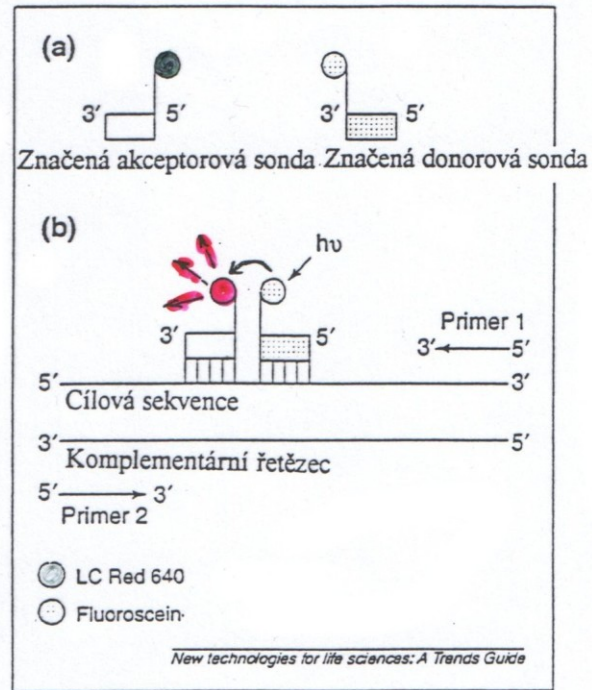


Scorpion. (a) počáteční denaturace sondy a cílové sekvence. (b) připojení priméru. (c) syntéza DNA (d) denaturace produktu (e) snížení teploty a detekce fluorescence.

# Hybridizační sondy

- Využívají 2 specificky značené oligonukleotidové sekvence
- Donorová a akceptorová sekvence,
- Které využívají přenos fluorescenční rezonanční energie
- 3'konec donorové sondy bývá značen fluoresceinem
- 5'konec akceptorové sondy bývá značen LCRed 640 nebo LCRed 705
- Obě sondy jsou navrženy tak, aby hybridizovaly s cílovou sekvencí v těsné blízkosti (1-5 bp od sebe) způsobem „hlava k patě“
- Po hybridizaci dochází k přenosu fluorescenční rezonanční energie
- Signál je detekován fluorometrem

# Hybridizační sondy



Obr. Princip detekce pomocí hybridizačních son

# Kvantifikace pomocí qPCR

- Tj. přesné stanovení výchozího počtu kopií templátové sekvence DNA
- Fluorescence je měřena během každého cyklu PCR a její intenzita je přímo úměrná množství amplikonů v reakční směsi.
- Kvantifikace se provádí prostřednictvím matematické analýzy **amplifikačních křivek** vzniklých vynesáním naměřené fluorescence oproti cyklu PCR

# Amplifikační křivka

- má esovitě zakřivený tvar
- lze ji rozdělit na 3 části:
- 1) pozadí dané přirozenou fluorescencí („background,“) tj. fázi, kdy je PCR produktů tak málo, že jejich fluorescence ještě nedosahuje měřitelných hodnot;
- 2) **exponenciální fáze**, kdy množství PCR produktů exponenciálně roste (tato fáze trvá asi 4-8 cyklů) a
- 3) fázi plató, kdy dochází k saturaci, množství PCR produktů se dále nemění a fluorescenční signál zůstává konstantní.
-





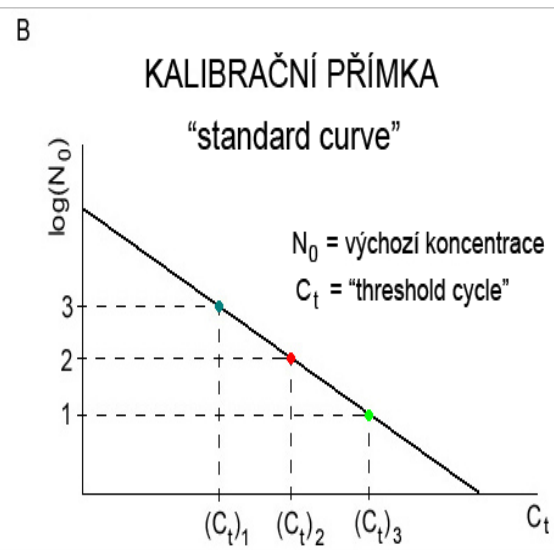
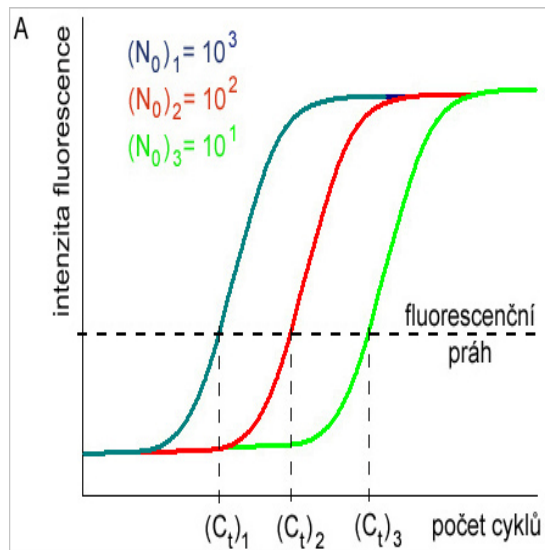


# Platí, že

- čím dříve amplifikační křivka dosáhne exponenciální fáze, popř. překročí určitý fluorescenční práh umístěný do této fáze,
- tím více molekul cílové DNA bylo přítomno ve vzorku na počátku reakce
- Používané matematické modely pracují s hodnotou zvanou CT („*threshold cycle*“), která se rovná cyklu, kdy amplifikační křivka překročí zmíněný fluorescenční práh umístěný do exponenciální fáze reakce..

# Používané matematické modely

- pracují s hodnotou zvanou **CT** („*threshold cycle*“),
- která se rovná cyklu, kdy amplifikační křivka překročí fluorescenční práh umístěný do exponenciální fáze reakce.



# Kvantifikace

- Absolutní
- relativní

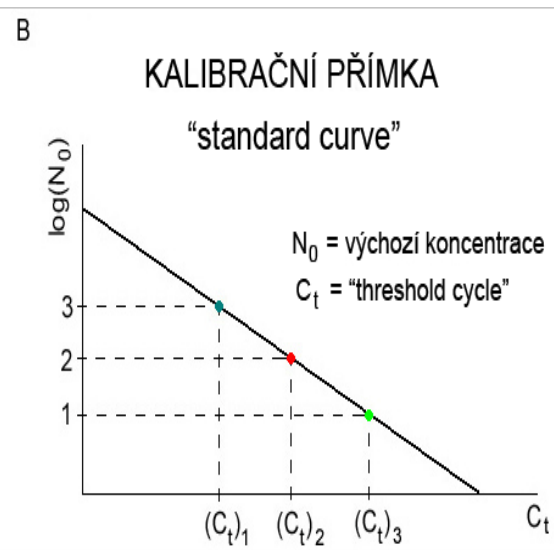
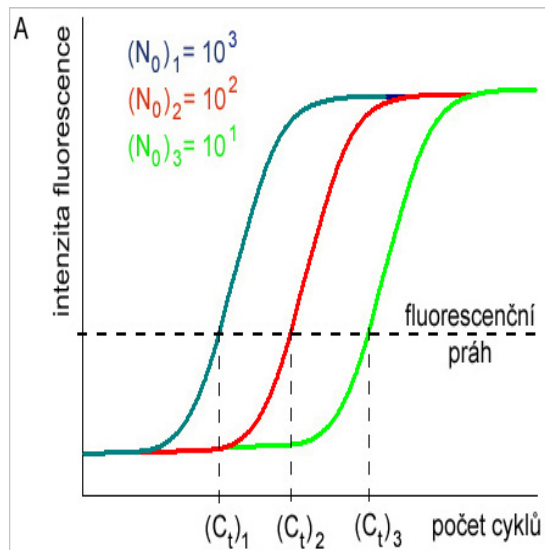
# Absolutní kvantifikace

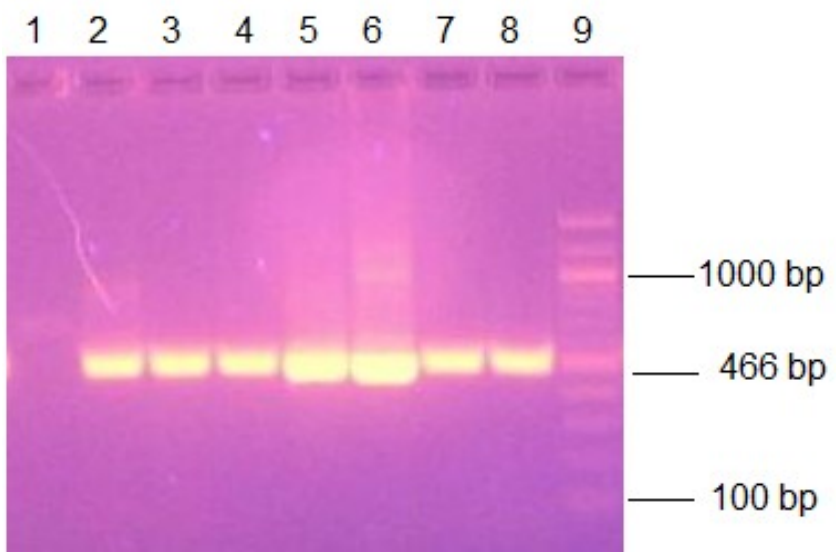
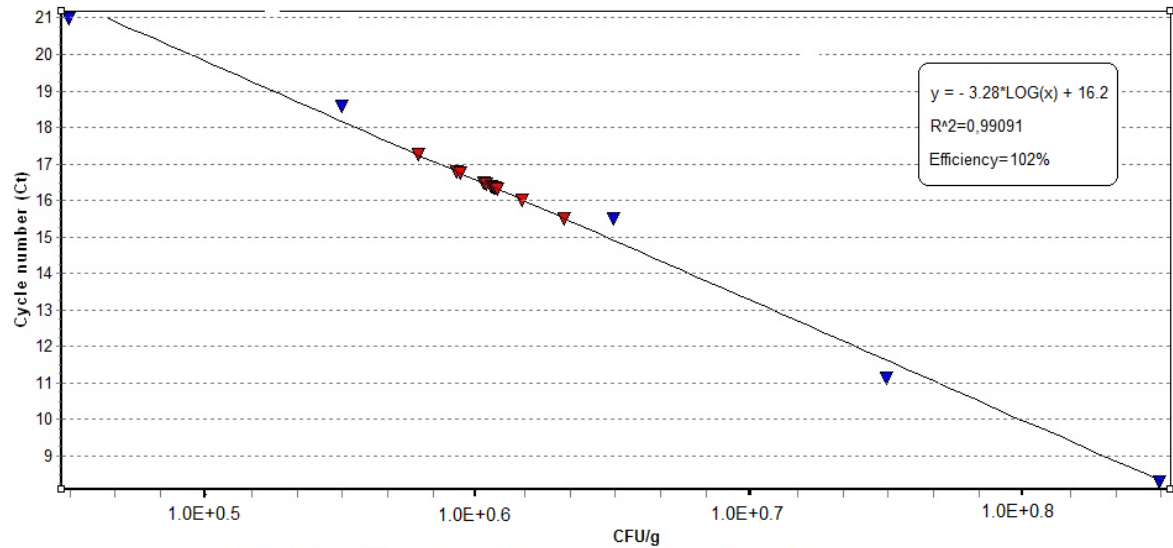
- se používá např. při detekci specifických mikroorganismů
- přímo determinuje výchozí počet kopií cílových molekul DNA mikroorganismů
- Využívá lineární vztahu mezi logaritmem počtu templátových kopií DNA ve vzorku a hodnotou CT příslušné amplifikační křivky.
- Amplifikuje se vzorek o neznámé koncentraci společně se standardy o známé koncentraci
- Pomocí standardů se získá kalibrační křivka, ze které lze odečíst výchozí koncentraci neznámého vzorku.

•

# Absolutní kvantifikace

- Regresní koeficient kalibrační křivky musí být  $R^2 > 0.985$
- Účinnost amplifikace  $M = -3.0$  až  $-3.5$
- K amplifikaci dochází v exponenciální fázi







# Relativní kvantifikace

- která se používá ke stanovení míry genové exprese
- zpravidla nevyžaduje sestavení kalibrační přímky.
- Porovnává se relativní změna genové exprese (*relativní expresní poměr*) v testovaném vzorku oproti kontrolnímu vzorku
- Hodnota CT amplifikační křivky daného genu se normalizuje oproti CT housekeeping genu.

# Využití PCR a jejich modifikací

- ve výzkumu a v praxi

# Základní výzkum

- Izolace genů
- Mutageneze in vitro
- Analýza klonů a genových knihoven
- Příprava DNA sond

# Aplikovaný výzkum

- Prenatální diagnostika dědičných chorob
- Detekce mutací v genech
- Studium polymorfismu genů

# Klinické aplikace

- Detekce patogenních bakterií, virů, prvoků, hub
- Typizace patogenních mikroorganismů
- Identifikace onkogenů
- Typizace nádorů
- Stanovení pohlaví

# Ostatní obory

- Archeologie
- Soudnictví
- Kriminalistika
- Šlechtění rostlin a živočichů
- potravinářství