

SMAMII-6b

Amplifikační metody

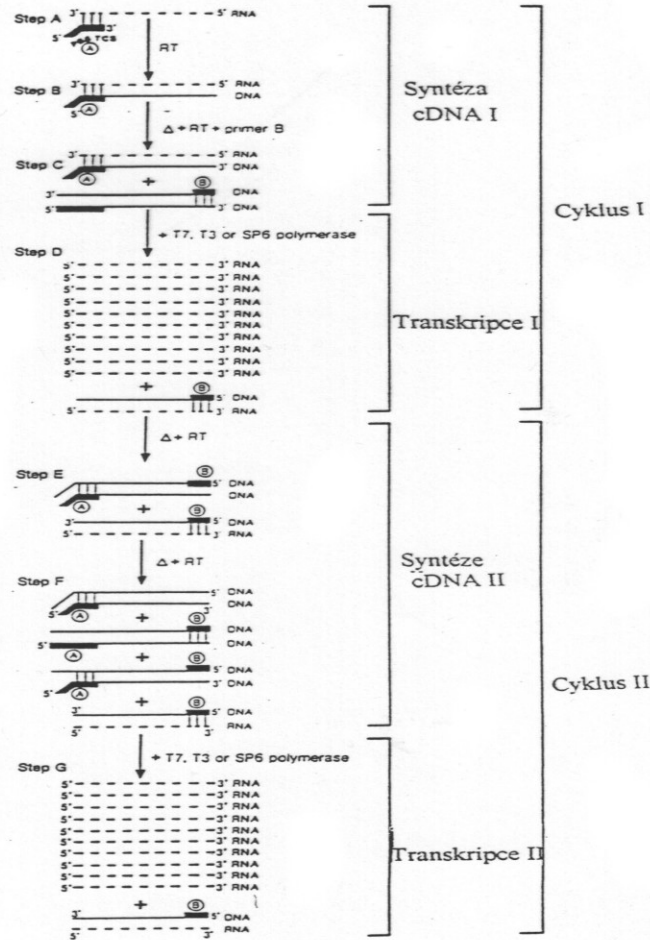
Amplifikační systémy založené na transkripci

- Transkripční amplifikační systém TAS
- Vypracován pro detekci HIV-1 RNA (Kwoh a spol. 1989)
- 2 cykly:
- Syntéza DNA komplementární s RNA matricí pomocí reverzní transkriptázy
- In vitro transkripce nově syntetizované DNA pomocí RNA polymerázy

TAS

- Syntéza DNA pomocí reverzní transkriptázy
- Je řízena 2 primery (ohraničují amplikon),
- Jeden primer nese na 5'konci sekvenci promotoru pro T7 RNA polymerázu
- Díky tomu ds amplikony obsahují T7 promotor
- Na ten se váže T7 RNA polymeráza a začíná transkripce
- Z každé molekuly DNA matrice se syntetizuje asi 40 molekul RNA
- Molekuly RNA jsou použity do dalšího cyklu TAS a následuje opět 40 násobná amplifikace
- Docílit lze až 10^6 násobné amplifikace
- Výhoda: naamplifikovaná ss RNA může být afinitně vychytávána pomocí komplementárních oligonukleotidů kovalentně přichycených k pevné matrici

Obr. Transkripční amplifikační systém



Každý cyklus TAS se sestává ze dvou částí. První je reverzní transkripce RNA → cDNA. Nově vzniklá cDNA je komplementární k cílové nukleotidové sekvenci. Druhá část je transkripce *in vitro* s novou cDNA jako templátem. Syntéza cDNA se odvíjí od speciálních primerů. Jeden konec primeru se skládá z cílově specifické sekvence a konec obsahuje promotor pro řádkovou T7 RNA polymerázu. Následuje denaturační krok zvýšením teploty, přidavek reverzní transkriptázy a syntetizování na dvouřetězcové molekuly. Výsledná dvouřetězcová kopie cílové molekuly obsahuje na jednom nebo na obou koncích T7 promotor. Po přidavku T7 RNA polymerázy je z každé templátové cDNA syntetizováno až 40 molekul RNA. Aktivita T7 polymerázy je hlavní amplifikační složkou. Nová cDNA slouží jako templát pro syntézu RNA, za účasti T7 polymerázy a vede k velkému nadbytku RNA, která je znovu použita jako substrát v dalších cyklech TAS. Několikeré opakování této čtyřicetnásobné amplifikace vede k několikamilionovému zmnožení cílové sekvence.

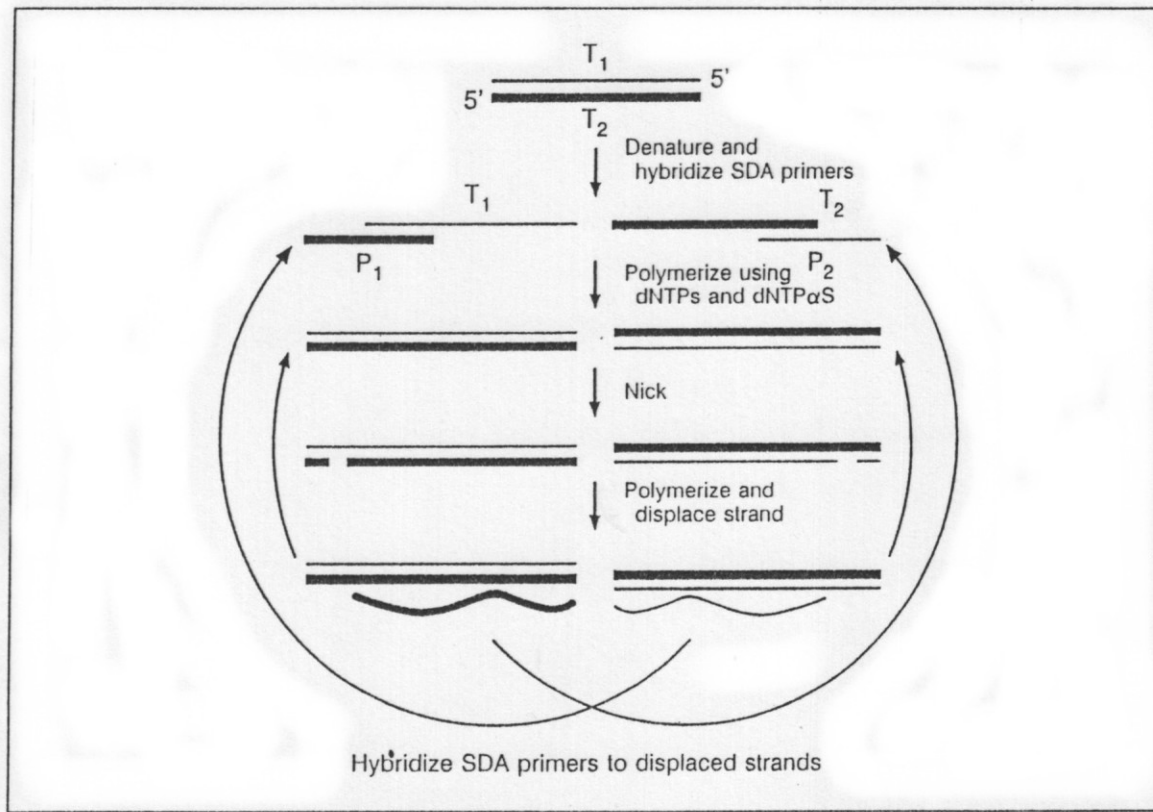
Isotermální modifikace

- Probíhá za 1 teploty
- Využívá enzymatickou aktivitu 3 enzymů:
- Reverzní transkriptázy, T7 RNA polymerázy a RNázy H
- RNáza H degraduje RNA v komplexu DNA/RNA
- S využitím RNázové aktivity reverzní transkriptázy izolované z AMV virusu byl postup zjednodušen a využívá pouze 2 enzymů – AMV reverzní transkriptázy a T7 RNA polymerázy
- Tato metoda se nazývá 3SR (self-sustaining sequence replication) nebo NASBA (nucleic acid sequence based amplification).
- Jejím zdokonalením bylo dosaženo 10^8 násobné amplifikace cílové molekuly během 30 minut.

Amplifikace s vytěsňováním řetězce (SDA)

- Walker a spol. 1992
- Je založena na schopnosti DNA polymeráz iniciovat syntézu komplementárního DNA řetězce
- Od místa zlomu v jednom z řetězců cílové molekuly
- A nahradit tento rozštěpený řetězec řetězcem novým
- Enzymem vytěsněná ss molekula DNA slouží jako substrát k následnému připojení primerů a syntéze komplementární DNA, což vede ke geometrickému nárůstu kopií cílové sekvence

SDA reaction. After restriction enzyme digestion and denaturation of a double-stranded target fragment, primers P_1 and P_2 bind to single-strand target fragments T_1 and T_2 . The primers contain recognition sites at their 5' ends for a restriction enzyme. DNA replication with three deoxynucleoside triphosphates (dNTPs) and one dNTP[α S] produces double-stranded primer-target complexes with hemiphosphorothioate recognition sites, which are subsequently nicked by the appropriate restriction enzyme. A DNA polymerase lacking 5'-to-3' exonuclease activity extends the 3' end at the nick and displaces the downstream strand. Nicking and polymerization/displacement steps cycle continuously because of regeneration of a nickable recognition site. Exponential amplification occurs because strands displaced from the P_1 - T_1 complex serve as target for primer P_2 and strands displaced from the P_2 - T_2 complex serve as target for primer P_1 . (Adapted from reference 146.)



Primery používané v SDA

- Mají 2 funkční oblasti
- Sekvenčně specifickou oblast (15 až 20 nukleotidů) a
- Cílové místo pro restriktázu
- Klíčovým krokem je tvorba ss zlomů
- V řetězci dsDNA je přítomen abnormální nukleotid (deoxyadenosin 5'-(alpha-thio)-trifosfát a díky tomu restriktáza štěpí jen 1 řetězec
- Do reakce je přidáván spolu s dNTP
- Podmínkou je, aby amplifikovaná sekvence neobsahovala cílové místo pro restriktázu, která je používána pro tvorbu ss zlomů (nicků)
- Reakce je isotermální
- Metodu lze použít i pro amplifikaci na pevné fázi v miniaturním uspořádání (na mikročipu)

Nová metoda - MDA

- mnohočetná amplifikace s vytěsňováním řetězce (multiple displacement amplification)
- s využitím DNA polymerázy Phi29
- se provádí s cílem nabohatit malé množství genomové DNA
- (whole genome amplification, WGA)
- Fragmenty dlouhé desítky kb se syntetizují podél celého genomu od náhodných hexamerových primerů, bez chyb, syntetizuje se větší množství DNA než v PCR
- Není potřeba znalost sekvence
- Reakce probíhá za 1 teploty

Amplifikace otáčivou kružnicí (RCA)

- Lizardi a spol. 1998, rolling circle amplification
- Umožňuje amplifikaci jak cílové molekuly tak signálu
- Amplifikace probíhá za 1 teploty
- Lze ji použít pro amplifikaci DNA uvnitř buňky a na čipu

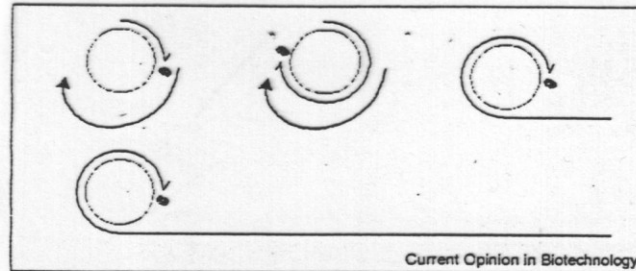
Byly popsány

- Lineární i exponenciální formy RCA
- Lineární forma: DNA kružnice je amplifikována syntézou DNA od komplementárního primeru Z každého primeru vzniká více než 10^5 tandemových repetit, spojených v konkatemer.
- Lineární RCA je omezena na kruhové cílové molekuly virů, plasmidů a na cirkulární chromosomy
- Multiple primed rolling circle amplification (MPRCA) využívá Phi29 DNA polymerázu a je založena na stejném principu jako MDA.

Exponenciální RCA

- Používá 2 primery
- První primer a primer komplementární k sekvenci produktu
- V provedení on-line je kvantitativní
- Byl popsán i postup využívající oligonukleotidy kovalentně připojené k nanočásticím zlata
- Využití těchto komplexů vedlo ke zvýšení citlivosti detekce

Obr. Lineární amplifikace otáčivou kružnicí



Obr. Exponenciální amplifikace otáčivou kružnicí

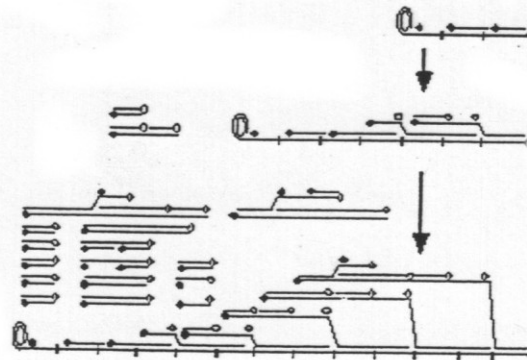


Schéma vystihuje princip amplifikace otáčivou kružnicí
A lineární forma využívající primer komplementární
k sekvenci kružnicové molekuly B exponenciální
amplifikace využívající navíc primery komplementární
k sekvenci primárního produktu

RCA lze použít

- I k detekci proteinů
- Tato technika se nazývá imunoRCA (Schweitzer 2000)
- Využívá DNA k amplifikaci sondy
- K amplifikaci může dojít i na mikročipu

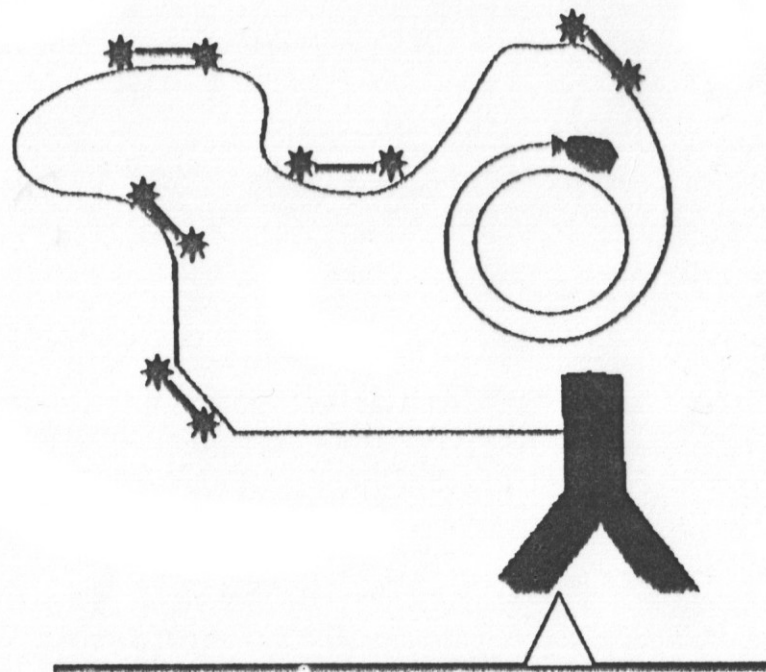
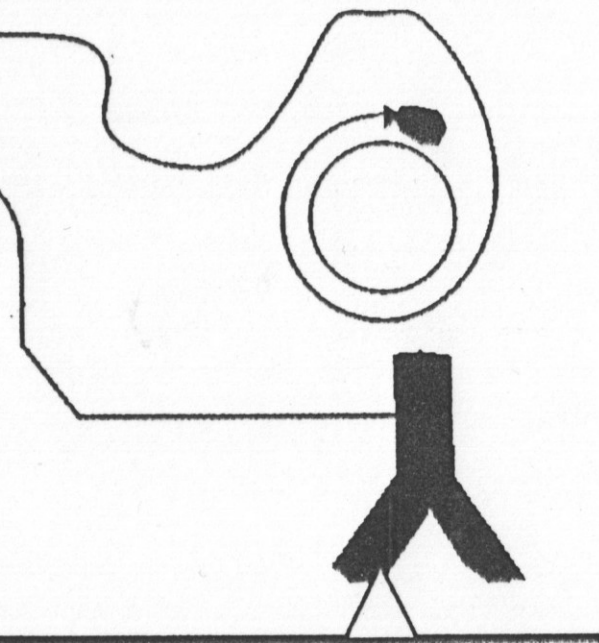
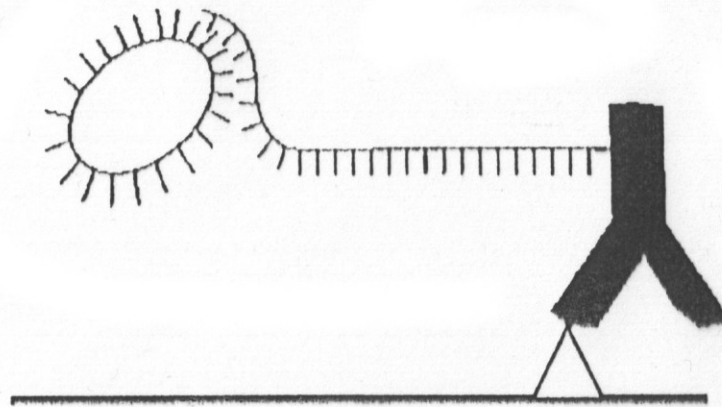
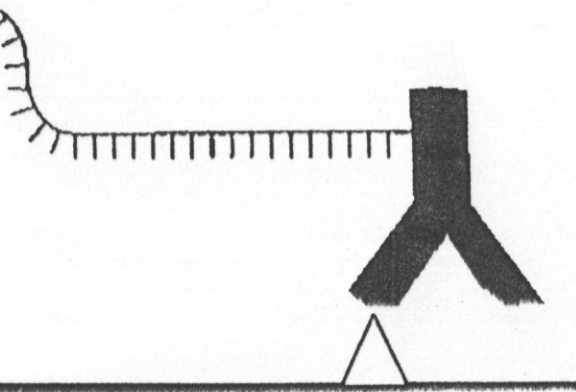


Fig. 1. Schematic of immunoRCA assay. (*Top Left*) A reporter Ab conjugated to an oligonucleotide binds to a test analyte that is captured on a solid surface by covalent attachment or by a capture Ab. (*Top Right*) A DNA circle hybridizes to a complementary sequence in the oligonucleotide. (*Bottom Left*) The resulting complex is washed to remove excess reagents, and the DNA tag is amplified by RCA. (*Bottom Right*) The amplified product is labeled *in situ* by hybridization with fluor-labeled oligonucleotides.

2) Techniky využívající amplifikace molekul detekční sondy

- Alternativní strategie pro detekci malých množství cílových molekul

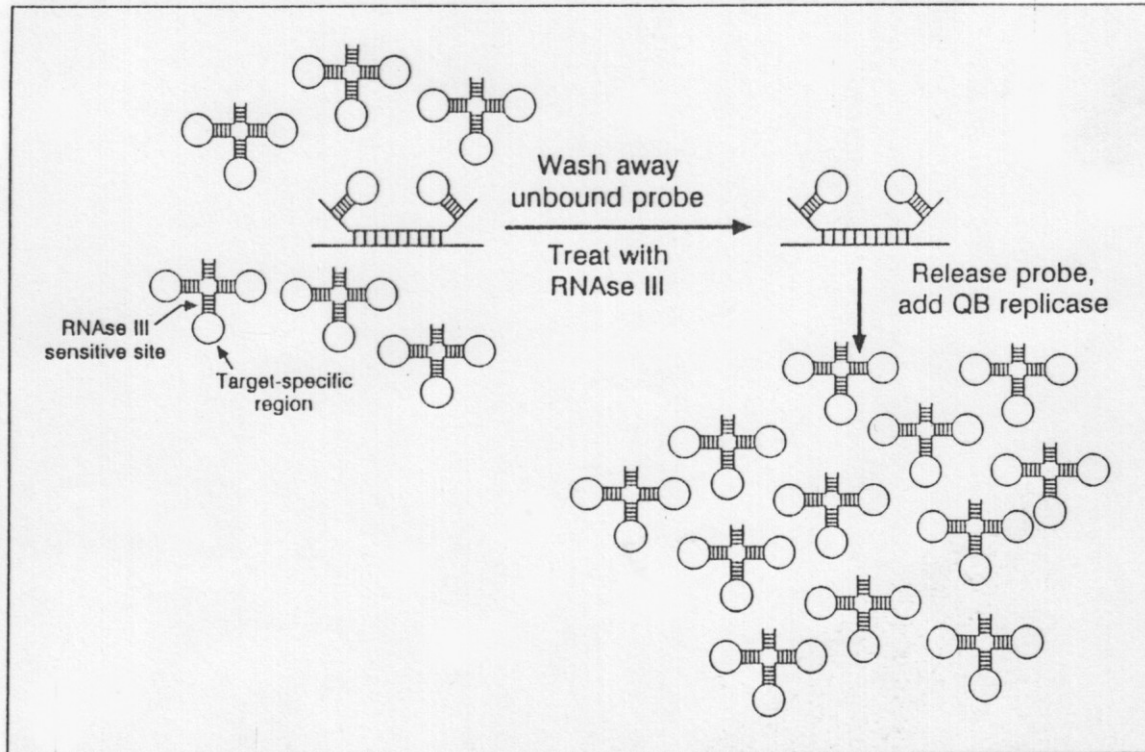
Amplifikace RNA sond pomocí Q beta replikázy

- Lomeli a spol. 1989
- Q beta replikáza je RNA polymeráza, která replikuje RNA bakteriofága Q beta
- Enzym je zvláštní – specificky rozpoznává sekundární strukturu RNA a replikuje ji
- Enzym toleruje krátké inserce, které se vkládají do RNA a které se komplementárně párují s cílovou DNA (RNA sonda)

Postup

- Sonda se váže na cílové sekvence DNA, zbytek nenavázané RNA je vymyt nebo degradován pomocí RNázyIII
- Následuje replikace in vitro
- A detekce replikonů sondy
- Metoda umožňuje kvantifikaci

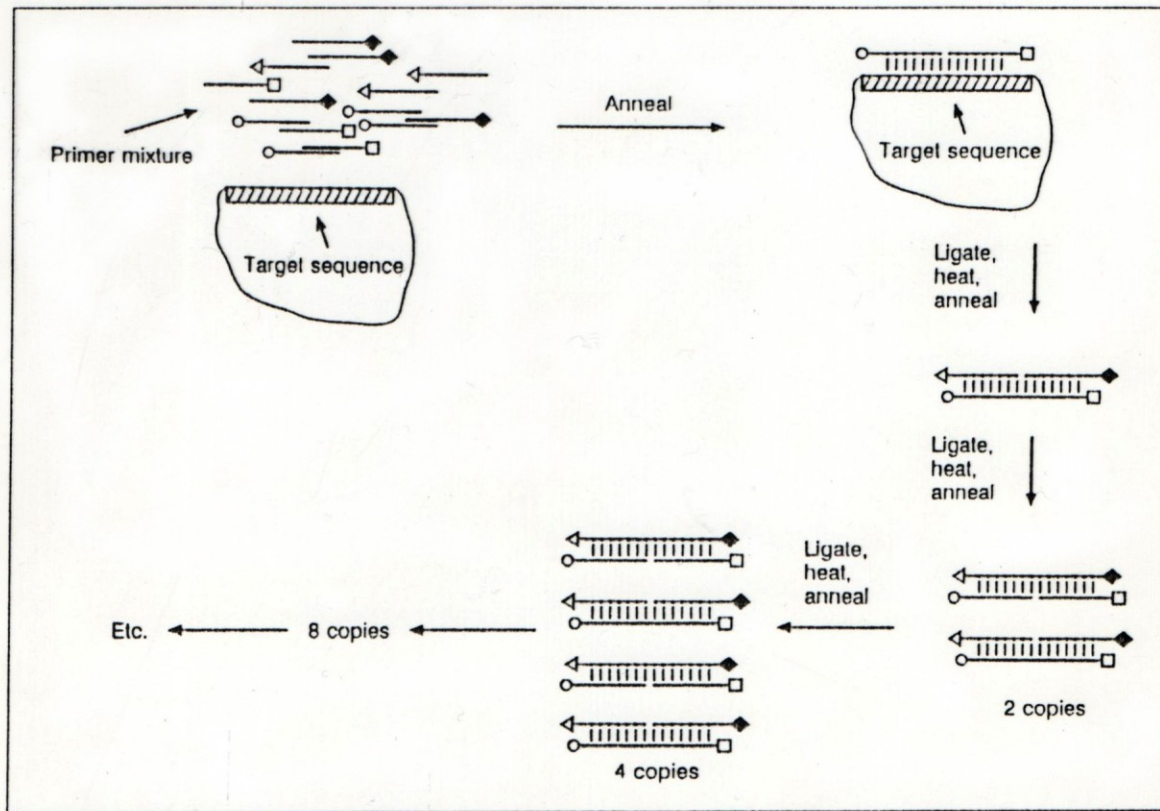
Q β replicase-based probe amplification. A Q β replicase substrate which contains both a target-specific probe region and an endonuclease cleavage site formed by intramolecular base pairing of the probe region is produced. When the molecule is annealed to the target sequence, it is RNase III resistant. Unbound probe is treated with RNase and then washed from the reaction mixture by target cycling (73). Q β replicase is then added to the washed target-probe complex, and the reaction is incubated at 37°C, resulting in amplification of the probe.



Amplifikace dependentní na DNA ligáze

- Wu a spol. 1989
- Ligázová amplifikační reakce (LAR) je založena na ligacích specifických oligonukleotidových sond
- Dvě komplementární sondy jsou po hybridizaci na cílové sekvenční DNA matrice spojeny DNA ligázou (hybridizují těsně vedle sebe)
- Po denaturaci slouží ligační produkty (komplementární s řetězcem původní DNA) jako matrice pro ligaci dalších komplementárních oligonukleotidů
- Opakováním se dosahuje zdvojování ligačních produktů geometrickou řadou

LCR. Oligonucleotide probes are annealed to template molecules in a head-to-tail fashion, with the 3' end of one probe abutting the 5' end of the second. DNA ligase joins the adjacent 3' and 5' ends to form a duplicate of one strand of the target. A second primer set, complementary to the first, then uses this duplicated strand (as well as the original target) as a template for ligation. Repeating the process results in a logarithmic accumulation of ligation products, which can be detected via the functional groups attached to the oligonucleotides.



Ligázová řetězová reakce (LCR)

- Využívá termofilní DNA ligázu
- Je vhodná pro detekci bodových mutací (záleží na perfektním párování na 3' a 5' koncích oligonukleotidů s DNA matricí)
- Oligonukleotidy mohou být značeny afinitní značkou (např. biotinem) nebo fluoresceinem nebo enzymaticky z důvodu usnadnění detekce produktu.

3) Techniky využívající amplifikace signálu detekční sondy

- Nejsou založeny na replikaci cílové sekvence ani sondy a proto jsou méně náchylné ke kontaminaci
- Tento postup se používá tehdy, když není potřeba získat cílovou sekvenci
- Techniky využívají ke zvýšení intensity signálu hybridizace – k molekule DNA sondy je navázána další DNA s vhodnou reporterovou skupinou.

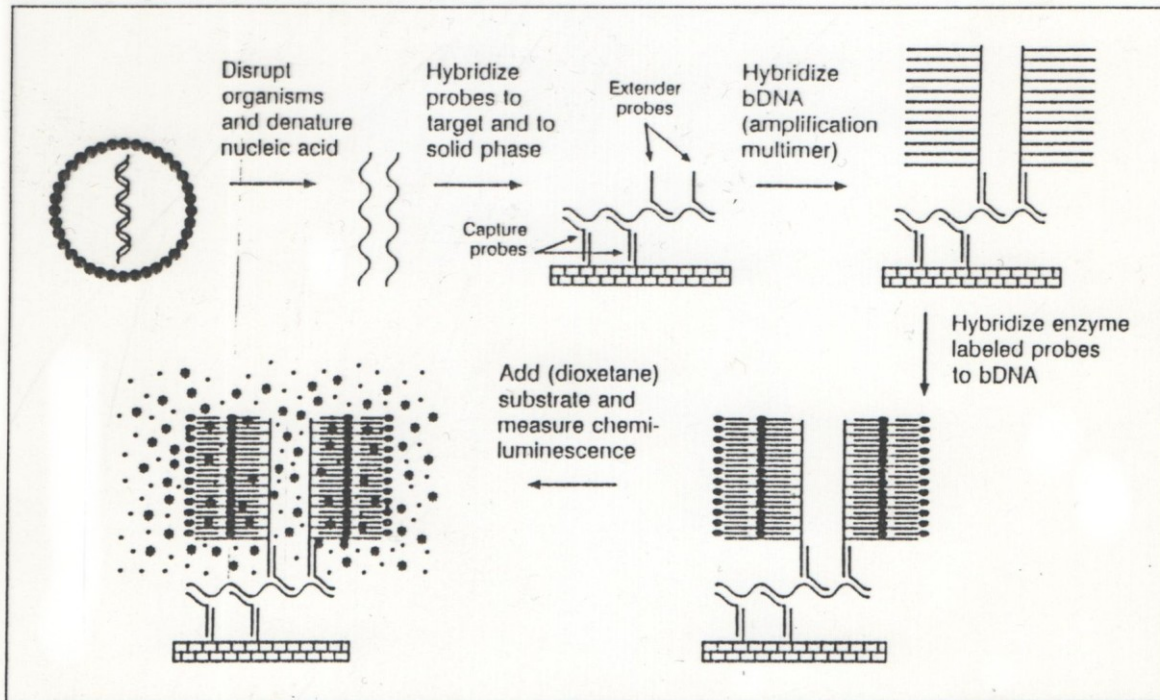
Větvená DNA (bDNA)

- bDNA, amplifikační multimer
- Větvená DNA umožňuje amplifikaci signálu s využitím DNA dendrimeru (struktura podobná stromečku) s navázanými molekulami např. alkalické fosfatázy, která štěpí substrát za vzniku chemiluminiscence
- Váže se na sondu, která vymezuje cílovou sekvenci

Složené sondy

- Rozpoznávají 2 funkční komponenty:
- Primární komponentu (sondu), jež rozpoznává cílovou sekvenci
- a zároveň nese mnohočetné vazebné místo pro sekundární komponentu s reporterovou molekulou (signálem)
- Inkubace s cílovou DNA (která může být imobilizována pomocí vychytávací sondy)
- vede ke vzniku molekulové sítě, v níž je primární sonda navázána na cílovou oblast, při čemž ostatní sekvence zůstávají k dispozici pro vazbu ostatních sond.
- Vzniklý stromeček umožňuje zvýšit intenzitu signálu

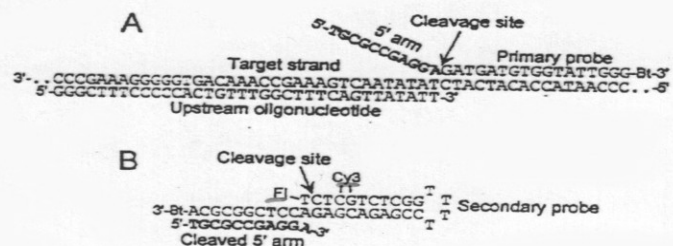
bDNA-based signal amplification. Target nucleic acid is released by disruption and captured to a solid surface via multiple contiguous capture probes. Contiguous extender probes hybridize with adjacent target sequences and contain additional sequences homologous to the branched amplification multimer. Enzyme-labeled oligonucleotides bind to the bDNA via homologous base pairing, and the enzyme-probe complex is measured by detection of chemiluminescence. All hybridization reactions occur simultaneously.



Amplifikace molekulového signálu založená na štěpení sondy

- Capaldi a spol. 2000, Hall a spol.2000
- Amplifikace signálu je docíleno pomocí syntézy a štěpení DNA sondy.
- Využívá se polymerázová a 3' - 5' exonukleázová aktivita T7 DNA polymerázy
- Vzniká anorganický pyrofosfát
- Který je enzymaticky přeměňován za vzniku bioluminiscence,
- Která je měřena luminometrem.
- Metoda se nazývá NEESA (nucleotide extension and excision-based signal amplification)

Obr. Amplifikace molekulového signálu založená na štěpení DNA sondy (SISAR)



SISAR je test založený na štěpení sondy. A Na cílovou sekvenci (target strand) se váže oligonukleotid 1 (upstream oligonucleotide) a oligonukleotid 2 (primary probe), který se skládá z části komplementární k cílové sekvenci a z části nekomplementární k cílové sekvenci (5' arm). Takto se tvoří specifické rozpoznávací místo (cleavage site) pro speciální endonukleázu (naznačeno šipkou). B 5' konec štěpeného oligonukleotidu 2 (cleaved 5' arm) je komplementární k oligonukleotidu 3 (secondary probe). Tento komplex opět obsahuje rozpoznávací místo (cleavage site) pro speciální endonukleázu a je štěpen (naznačeno šipkou). Rozštěpením tentokrát oligonukleotidu 3 se oddělí funkční skupiny (Fl a Cy3), které byly navázány na tento oligonukleotid. Těmito funkčními skupinami mohou být například fluorofor a zhášec.

Amplifikace molekulového signálu založená na štěpení DNA sondy

- Využívá více metod
- V jedné se využívá RNA sonda, která se váže na komplementární DNA řetězec
- RNA v hybridní molekule RNA/DNA je štěpena RNázouH a vznikající fragmenty sondy jsou detekovány imunotestem s využitím flow cytometru nebo spektrofotometricky.

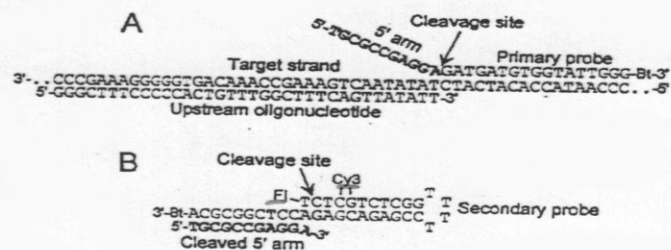
Na štěpení sondy

- Je založena metoda s komerčním názvem Invader
- Využívá 2 částečně se překrývající sondy, které jsou po navázání na cílové sekvence DNA štěpeny nukleázou
- Při použití termostabilní nukleázy a zvýšení teploty může být evokováno až 3000 štěpení na 1 cílovou molekulu

Amplifikace signálu

- S využitím strukturně specifických 5' nukleáz, které štěpí sondu
- Využívá metoda SISAR (seriál invasive signal amplification reaction)
- Štěpený produkt je vázán k sekundární sondě, která obsahuje fluorofor a zhášec
- Tato sekundární sonda je štěpena nukleázou, což vede ke vzniku fluorescenčního signálu postačujícího k detekci 1000 cílových molekul
- SISAR umožňuje rozlišit změnu 1 nukleotidu podobně jako restriční štěpení, protože nedokonalé párování ZABRAŇUJE ŠTĚPENÍ SEKUNDÁRNÍ SONDY

Obr. Amplifikace molekulového signálu založená na štěpení DNA sondy (SISAR)



SISAR je test založený na štěpení sondy. **A** Na cílovou sekvenci (target strand) se váže oligonukleotid 1 (upstream oligonucleotide) a oligonukleotid 2 (primary probe), který se skládá z části komplementární k cílové sekvenci a z části nekomplementární k cílové sekvenci (5' arm). Takto se tvoří specifické rozpoznávací místo (cleavage site) pro speciální endonukleázu (naznačeno šipkou). **B** 5' konec štěpeného oligonukleotidu 2 (cleaved 5' arm) je komplementární k oligonukleotidu 3 (secondary probe). Tento komplex opět obsahuje rozpoznávací místo (cleavage site) pro speciální endonukleázu a je štěpen (naznačeno šipkou). Rozštěpením tentokrát oligonukleotidu 3 se oddělí funkční skupiny (FI a Cy3), které byly navázány na tento oligonukleotid. Těmito funkčními skupinami mohou být například fluorofor a zhášec.

Souhrnná tabulka

- Uvádějící charakteristiku různých DNA diagnostických technik
- Využívajících různých způsobů amplifikace amplifikace

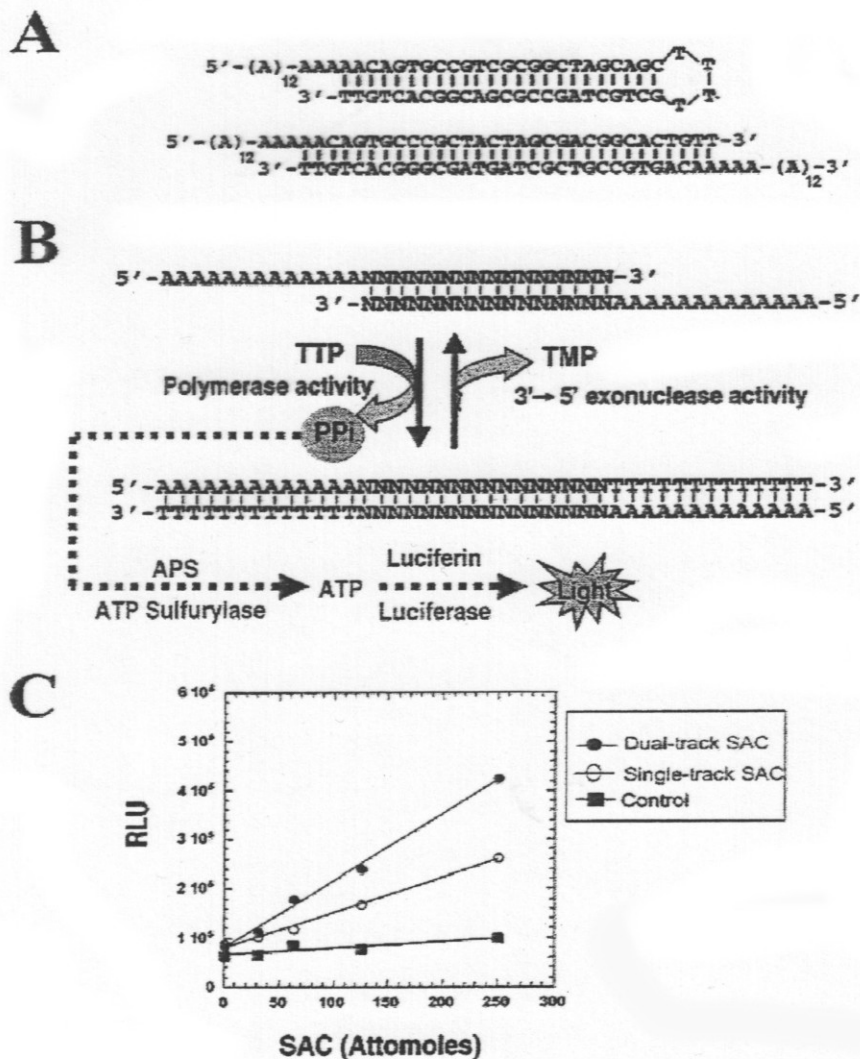


Figure 1. (A) Two examples of SACs used in the study. The single-track SAC (top) is a hairpin molecule with a single template strand consisting of 15 residues of adenines. The dual-track SAC (bottom) has two such template strands. (B) A schematic representation of the principle behind the NEESA approach. The polymerase activity of T7 DNAP extends (fill-in reaction) the recessive 3'-end of a SAC molecule with TTP. For each TTP molecule incorporated a PPI molecule is liberated to the medium. Once extension is completed, the template is regenerated by the 3'→5' exonuclease activity for another round of polymerase activity. The end result of these two reactions is the accumulation of a high concentration of PPI. The PPI produced in this manner will be enzymatically converted to ATP by ATP sulfurylase and APS. The amount of ATP generated in the reaction can be detected with firefly luciferase and luciferin. (C) Bioluminescence signal produced by SAC molecules. Closed circles indicate the signal generated by the dual-track SAC molecule shown in (A), whereas the open circles show the level of signal derived from a single-track SAC molecule. Squares show the control experiment in which a DNA strand (5'-ATGCCTAAGTTTCGAACGCGGCTAGCCAGCTTTTGCTGGCTAGCCGCGT-3') that could fold into a hairpin structure was used as the substrate. This hairpin substrate allows extension and excision of a single thymidine residue. These experiments were carried out under decoupled conditions.

Table 1

Properties of various nucleic acid amplification technologies.

Property	PCR	LCR	SDA	NASBA	bDNA	Invader	RCA
DNA target amplification	✓	✓	✓	✗	✗	✗	✓
RNA target amplification	✓	✗	✓	✓	✗	✗	✓
DNA signal amplification	✗	✗	✗	✗	✓	✓	✓
RNA signal amplification	✗	✗	✗	✗	✓	✓	✓
Protein signal amplification	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✓
Multiplexing	Little	✗	Little	Little	✗	✗	✓
Mesothermal	✗	✗	✓	✓	✓	✓	✓
Amplification within cells	✓	✗	✗	✗	✗	✗	✓
Amplification on microarrays	✗	✗	✓	✗	✗	✗	✓
Sensitivity (copies)	<10	100	500	100	500	600	1
Range (logs)	5	3	4	5	3	4	7
Specificity (allele discrimination factor)	50	5000	50	50	10	3000	100,000

PCR

LCR ... ligázová nábožová reakce

SDA ... amplifikace DNA s vyběšňováním většice

NASBA ... nucleic acid based sequence amplification
transkripční amplifikační systém

bDNA ... větvečná (branched DNA)

Invader ... amplifikace založená na štěpní sondy (≠ SISAR)

RCA ... amplifikace obádivou kružnicí