



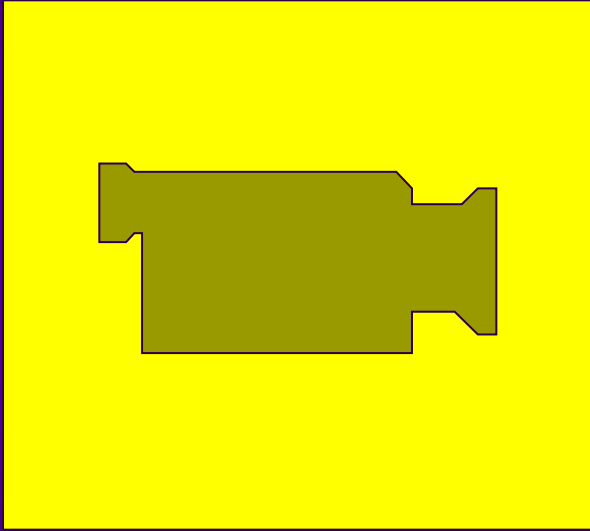
Amplifikační metody v molekulární diagnostice mikroorganismů



doc. RNDr. Milan Bartoš, Ph.D.

bartosm@vfu.cz

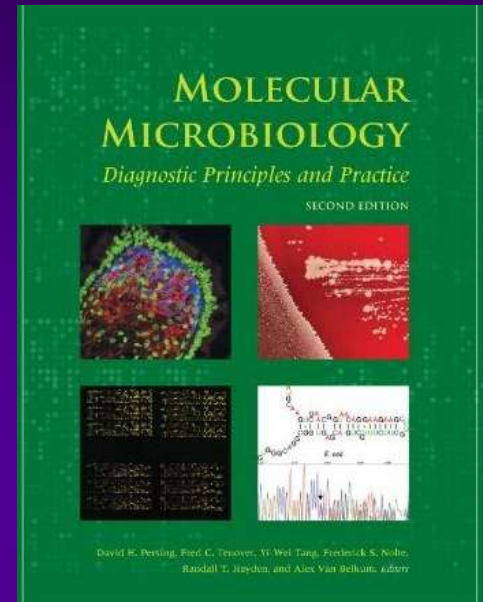
Přírodovědecká fakulta MU, 2012



Doporučená literatura



- 1) **Persing et al. (1993): Diagnostic Molecular Microbiology, ASM Press, Washington, D.C.**
- 2) **Persing (2011): Molecular Microbiology - second edition, ASM Press , Washington, D.C.**



Obsah přednášky

- 1) Amplifikace cílové sekvence metodou polymerázové řetězové reakce**
- 2) Příklady aplikací PCR v mikrobiologii**
- 3) Amplifikační systémy založené na transkripci**
- 4) Technologie SDA**
- 5) Amplifikace sondy a signálu neseného sondou - amplifikace replikázou Q β , ligázová řetězová reakce**

Polymerázová řetězová reakce

**Dnes nejrozšířenější metoda
molekulární biologie**



Kdo za to může ?



Kary Mullis 1985

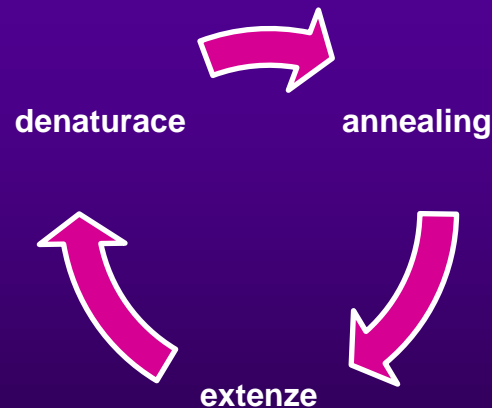
Nobelova cena v roce 1993



Princip PCR

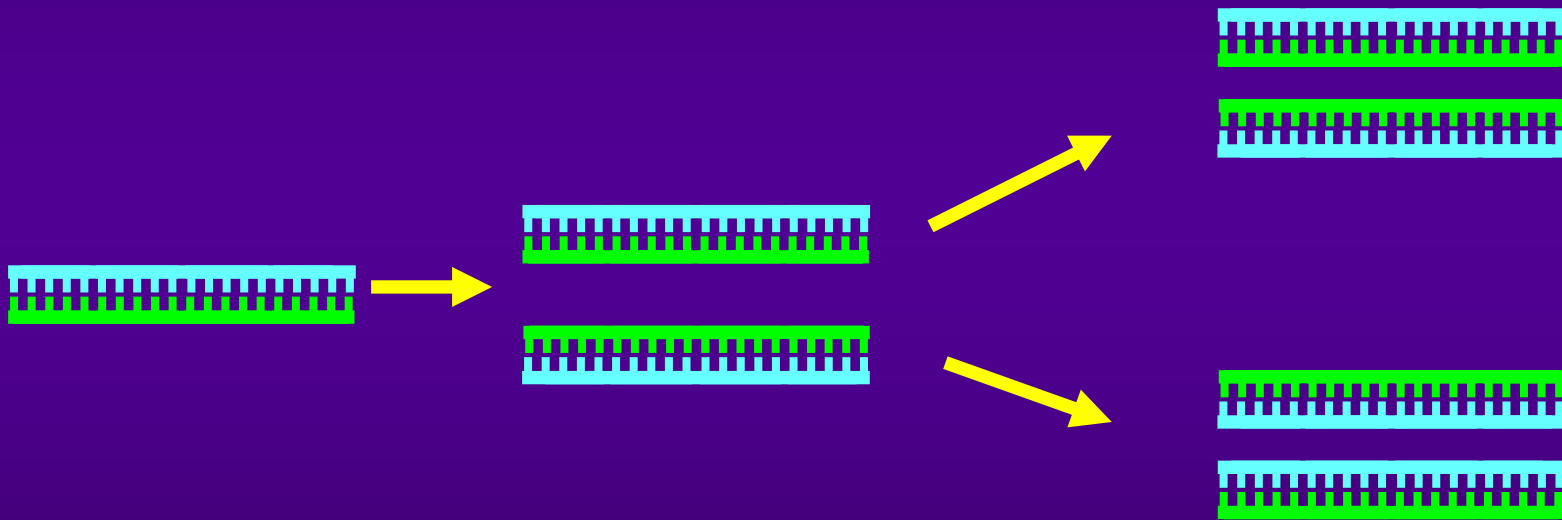
Polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction – PCR) umožňuje selektivní zmnožení (amplifikaci) určité oblasti DNA v podmínkách *in vitro*; a to procesem, který připomíná replikaci DNA *in vivo*

PCR probíhá v cyklech



Amplifikace znamená, že ...

Z každé molekuly ampliconu vznikají v každém cyklu dvě nové



Počet ampliconů vzrůstá geometricky

Množení amplikonů

Cyklus č.	Primární	Sekundární	Amplikony	Celkem (pro X =1)
0	0	0	0	1
1	2	0	0	2
2	2	2	0	4
3	2	4	2	8
4	2	6	8	16
5	2	8	22	32
Obecně	$2x$	$x(2n-2)$	$(2^n-2n)x$	$(2^n)x$

X = počet matric na počátku, n = počet cyklů

Výtěžek PCR

Cyklus č.	Primární	Sekundární	Amplikony	Celkem
10	2	18	1 004	1 024
20	2	38	10 485 438	1 024 ²
30	2	58	~ 1.1 x 10 ⁹	1 024 ³
40	2	78	~ 1.1 x 10 ¹²	1 024 ⁴
50	2	98	~ 1.1 x 10 ¹⁵	1 024 ⁵



**A teď nás čeká šílené
počítání! ☹**

Výtěžek PCR - příklad

Kolik cyklů PCR musíte použít, aby bylo možno detekovat amplikony o velikosti 500 bp vzniklé z jedné kopie dsDNA ?

Zařízení (transluminátor) detekuje 5ng DNA.

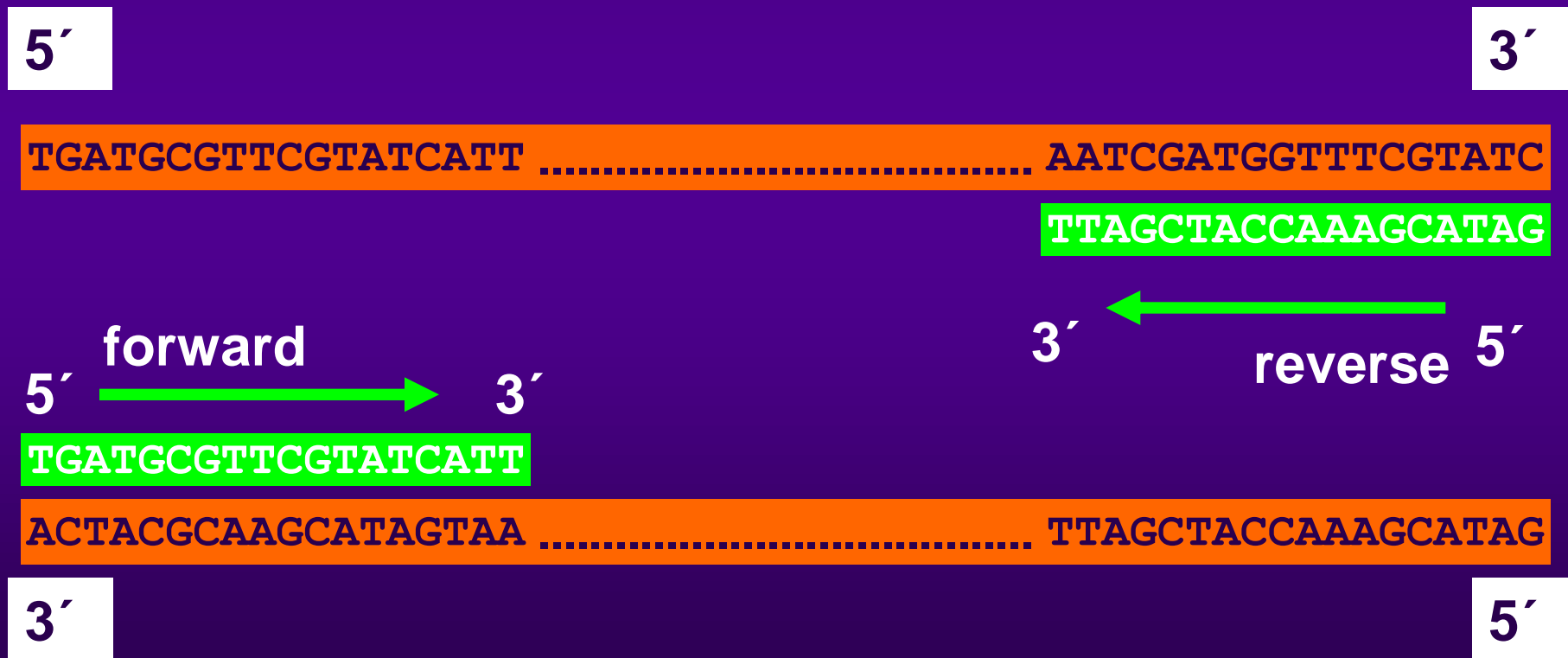
Výtěžek PCR - řešení

Musí proběhnout alespoň 34 cyklů

**Řešení je uvedeno v samostatném souboru
ve Wordu**

Primer forward a reverse

Pozice primerů na cílové molekule DNA určuje specifčnost a délku amplikonu

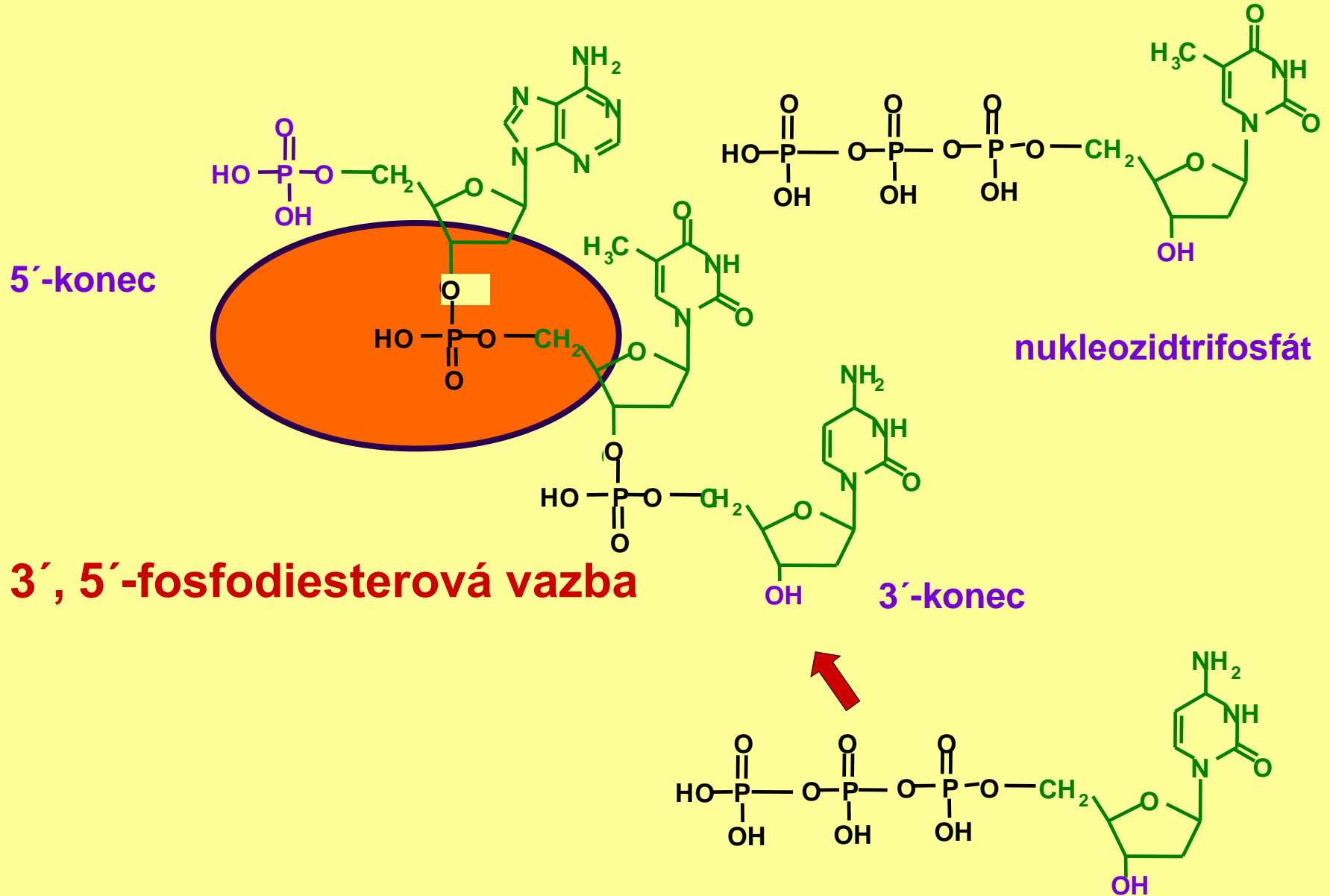


„Syntéza DNA probíhá jen ve směru $5' \rightarrow 3'$ “. Tak to příroda stvořila!

Tedy primery musí začínat $5'$ -koncem a končit $3'$ -koncem. Na $3'$ -konci je OH skupina, ke které se připojuje vstupující dNTP



Narůstání nukleotidového řetězce



Primer forward

- musí svým 3'- koncem směřovat „dovnitř“ budoucího amplikonu
- je komplementární ke „spodnímu“ řetězci
- ale má sekvenci „horního“ řetězce

5'

3'

TGATGCGTTCGTATCATT AATCGATGGTTTCGTATC

5' forward → 3'

TGATGCGTTCGTATCATT

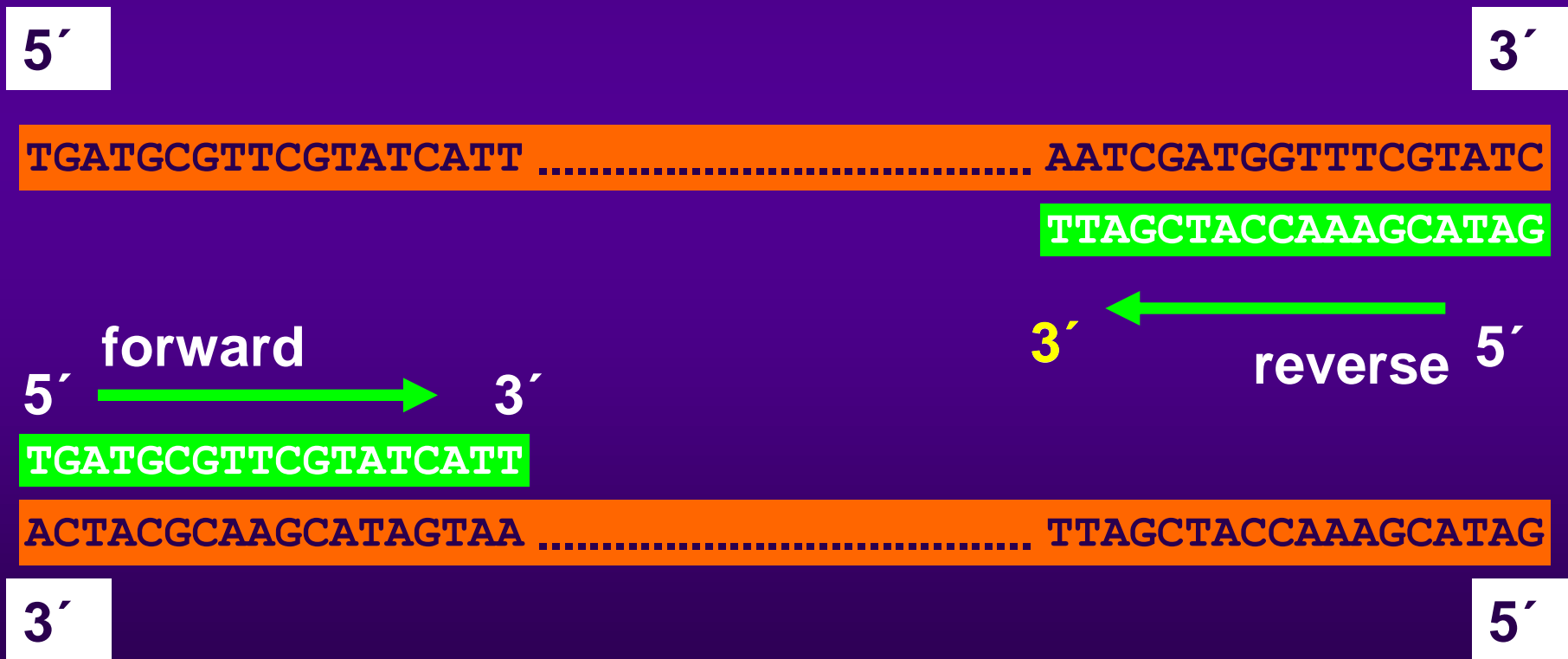
ACTACGCAAGCATAGTAA TTAGCTACCAAAGCATAG

3'

5'

Primer reverse

- musí svým 3'- koncem směřovat „dovnitř“ budoucího amplikonu
- je komplementární k „hornímu“ řetězci
- ale má sekvenci „dolního“ řetězce



POZOR !!!

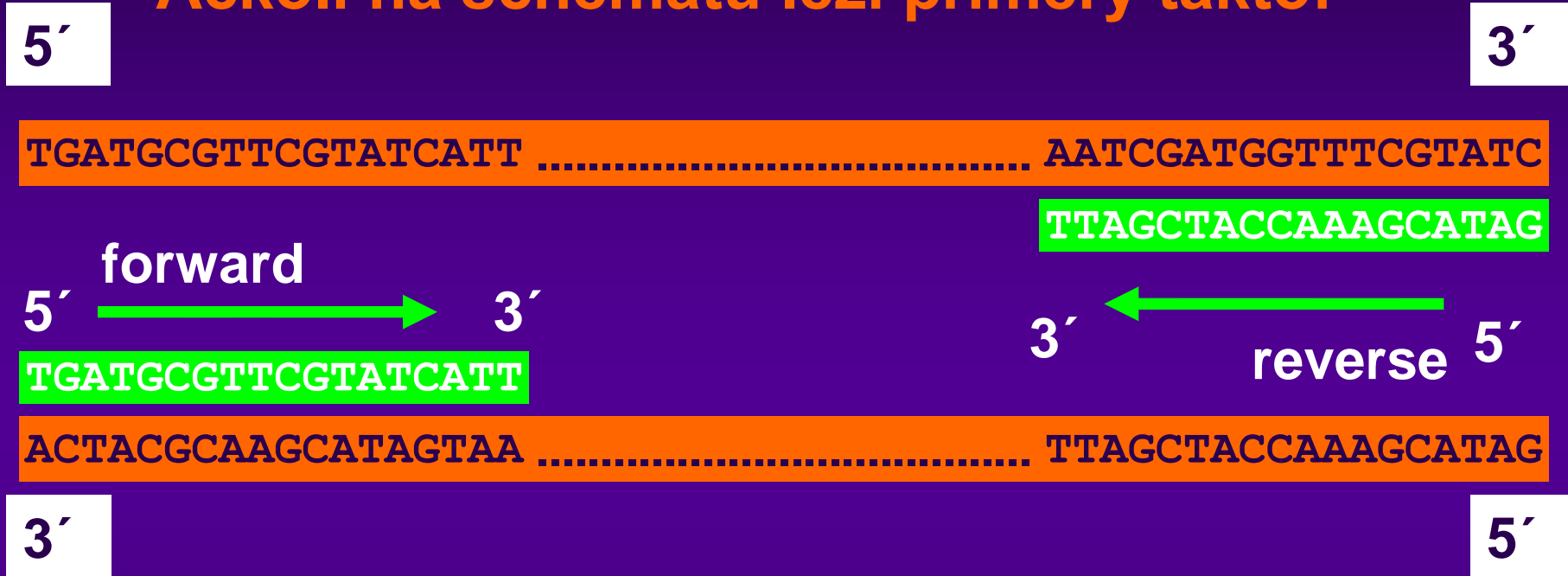
**Primery se zapisují ve směru
 $5' \rightarrow 3'$, tedy 5' - konec nalevo a
3' - konec napravo**

**Platí to jak pro primer forward (kde
je to jednoduché), tak pro primer
reverse – podívejte se na další
snímek, jak to dopadne !!!**



Jak zapsat primery „na papír“

Ačkoli na schématu leží primery takto:



Napsat „na papír“ je musíte takto:

forward

5' – TGATGCGTTCGTATCATT – 3'

reverse

5' – GATACGAACCATCGATT – 3'

A co když se spletu ?



Podívejte se, co se stane



Když napíšete primer reverse takto

reverse

5' - AATCGATGGTTTCGTATC - 3'

- syntéza z obou primerů bude probíhat ve stejném směru
- nebude docházet k amplifikaci

5'

3'

TGATGCGTTCGTATCATT AATCGATGGTTTCGTATC

TTAGCTACCAAAGCATAG

forward

5' → 3'

3' ← 5'
5' → 3'
reverse
reverse

TGATGCGTTCGTATCATT

AATCGATGGTTTCGTATC

ACTACGCAAGCATAGTAA TTAGCTACCAAAGCATAG

3'

5'

Když napíšete primer reverse takto

reverse

5' - CTATGCTTTGGTAGCTAA - 3'

- polymerace z takového primeru nemůže probíhat, řetězce nejsou antiparalelní

5'

3'

TGATGCGTTCGTATCATT AATCGATGGTTTCGTATC

TTAGCTACCAAAGCATAG

forward

5' → 3'

reverse ← 5'
← 3'

TGATGCGTTCGTATCATT

AATCGATGGTTTCGTATC

ACTACGCAAGCATAGTAA TTAGCTACCAAAGCATAG

3'

5'



**A teď zase nějaká
otázka! ☹**

Návrh primerů - příklad

Napište sekvenci primerů, které by mohly amplifikovat vyznačenou část daného úseku dsDNA

- znáte sekvenci jen jednoho z řetězců
- primery pište ve směru 5' - 3'

5' - TGA TGC AAA GTT CGC TCA GGT ACG ATT CCC
AAA TGT GGA GCT TAG TCG ATG ATG GGC AAA
TCT GTG ATT ATC CGA CGT CCC ATG TGC GTC
AAA TGC CGT AGG ACC CTA TTT TGA CGT CCT
GCT GGT ACG CAT CAT CCC TGG TGA CGT CCT
ACG TGC TGC GCT CGC ACG ATG CGT ACG AAC
GCT CGT CGG - 3'

Jak dlouhý bude vzniklý amplikon ?

Návrh primerů – řešení

Primer forward

5' – AAA GTT CGC TCA GGT ACG – 3'

Primer reverse

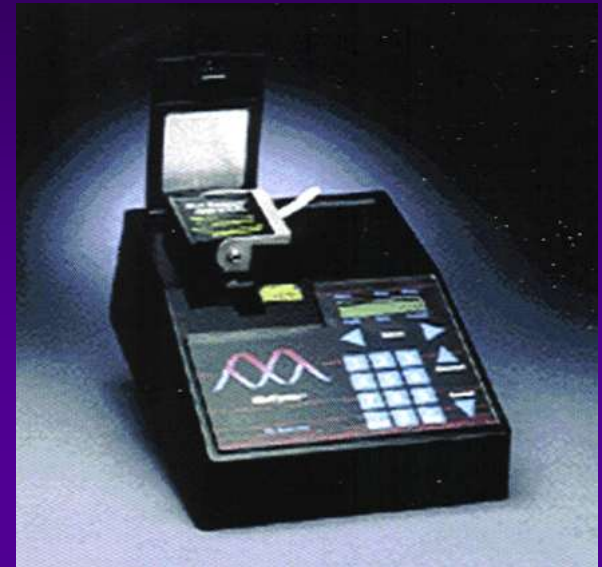
5' – CGT ACG CAT CGT GCG AGC – 3'

Amplikon bude mít délku 171bp

Technické provedení PCR

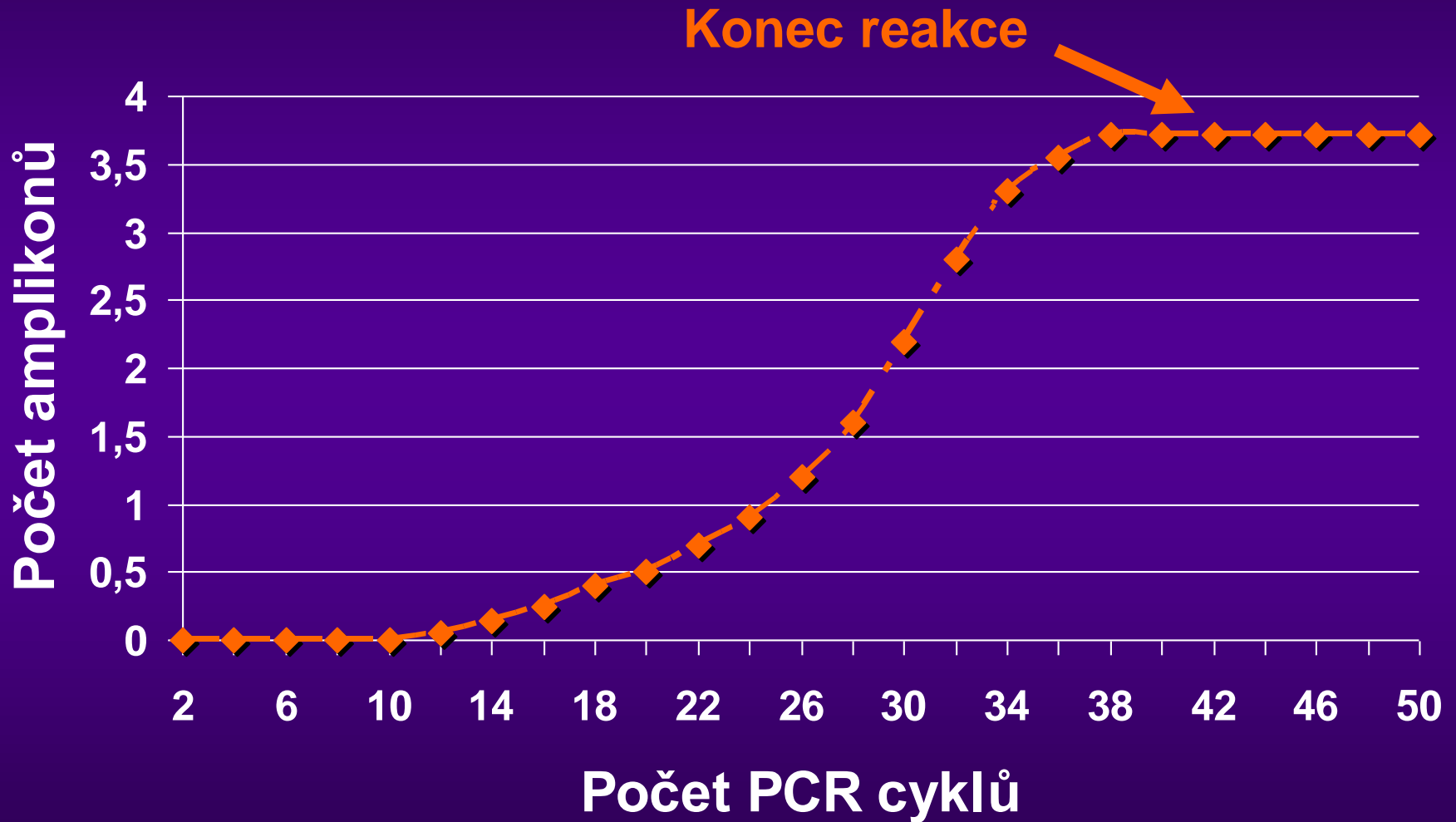
Termocyklery

➤ mikroprocesorem kontrolované zařízení, které obsahuje kovové reakční bloky **vyhříváné a chlazené polovodiči** (Peltierova pumpa), **vodou**, **vzduchem** nebo **mikrovlnami**



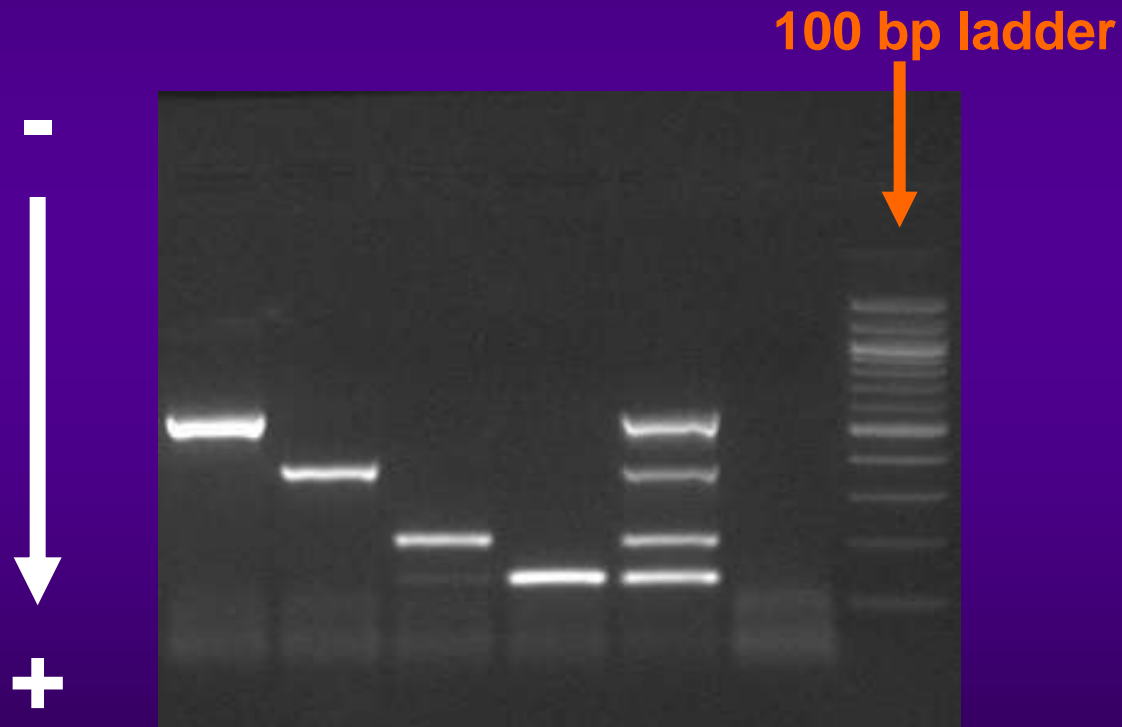
Termocyklery dokáží automaticky rychle měnit teplotu v reakčních blocích mezi třemi základními teplotami PCR cyklu

Co se děje uvnitř termocykleru ?



Výsledek PCR

záznam z elektroforézy v agarózovém gelu



Zopakujte si faktory ovlivňující PCR



Faktory fyzikální

- 1) Počáteční denaturace
- 2) Připojení primerů
- 3) Syntéza nukleotidových řetězců
- 4) Počet cyklů
- 5) Závěrečná extenze

Faktory chemické

- 1) Množství Taq polymerázy
- 2) Reakční pufr
- 3) Množství dNTP
- 4) Primery
- 5) Objem PCR reakce
- 6) Kvalita DNA

A jak byste naamplikovali virus HIV?



Jaký genom má virus HIV?

RNA, proto použijeme tzv. RT-PCR



RT - PCR

virová RNA



ssDNA



zpětná
transkripce



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

**A ještě něco pro ty, kteří rádi
počítají**



Příprava primerů - příklad

V jakém množství rozpustíte lyofilizovaný vzorek primerů, aby jeho koncentrace byla $100\mu\text{M}$?

Vzorek obsahuje $138,6\ \mu\text{g}$ primeru

**Molekulová hmotnost tohoto primeru
(o délce 18 nukleotidů) je $5\ 119$**

Příprava primerů – řešení

ve 271μl

Použití primerů – příklad

Jaké množství primeru ze zásobního roztoku 100 μ M napipetujete do PCR reakce o objemu 20 μ l jestliže chcete do reakce dát 10pmol primeru ?

Použití primerů – řešení

1M roztok 1mol částic / litr (1 μ mol částic / μ l)

1mM roztok 1nmol částic / μ l

1 μ M roztok 1pmol částic / μ l

100 μ M roztok 100pmol částic / μ l

10pmol částic 0,1 μ l

Amplifikační systémy založené na transkripci

Transkripčně amplifikační systémy

Využívá transkripci *in vitro* a nikoli replikaci s *Taq* polymerázou

- **nejběžnější varianta je známá pod názvem NASBA (Nucleic Acid Sequence Based Amplification) nebo 3SR (Self-sustained Sequence Replication)**
- **je vhodnější pro detekci molekul RNA**
- **využívá RNA polymerázu**
- **je to isotermický proces**

Je to kontinuální série zpětných transkripcí matrice RNA a transkripcí vzniklých DNA

Průběh NASBA

RNA matrice

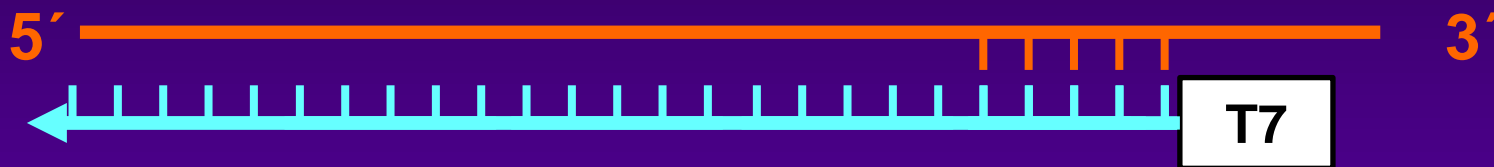


DNA primer A s
promotorem pro T7
RNA-polymerázu



Průběh NASBA

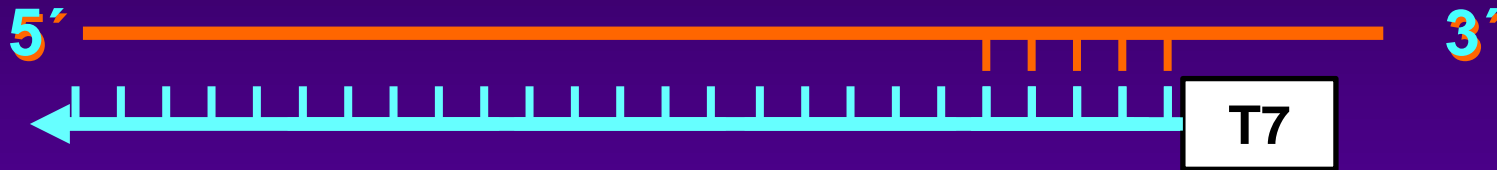
RNA matrice



Zpětná transkriptáza

Průběh NASBA

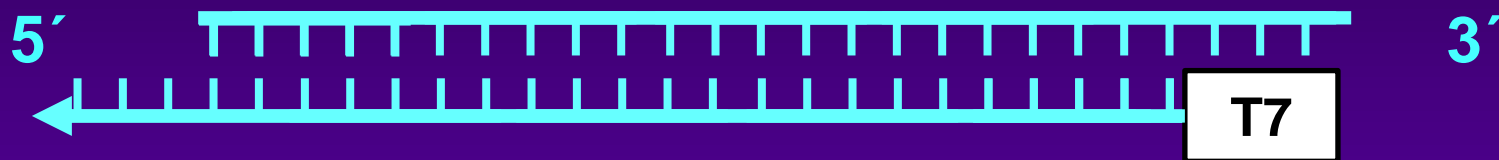
RNA matrice



RNáza H – degradace RNA

Průběh NASBA

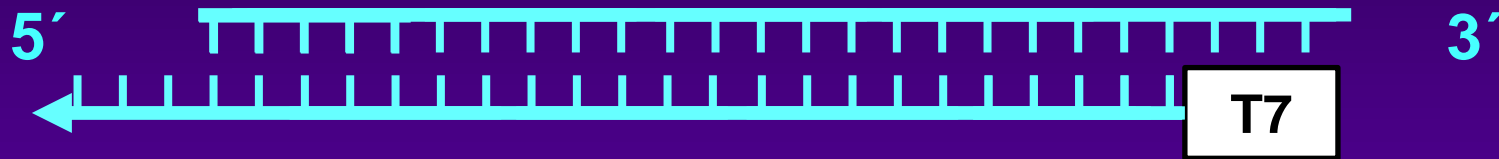
Vznikla dsDNA s promotorem pro T7 RNA polymerázu



DNA primer B

Průběh NASBA

Vznikla dsDNA s promotorem pro T7 RNA polymerázu



Transkripce T7 RNA polymerázou



A tím skončil první „cyklus“

Průběh NASBA

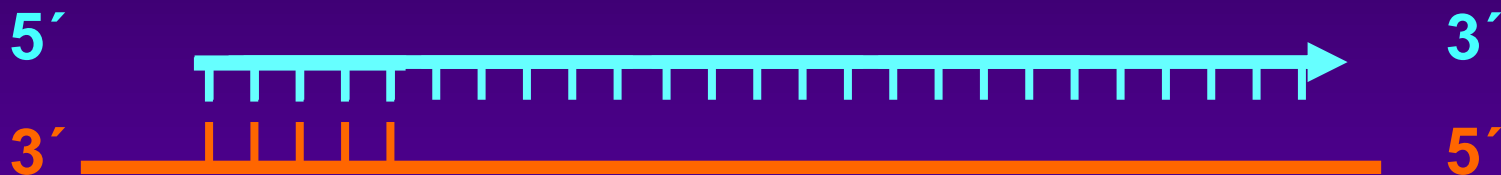
Produkty RNA z 1. cyklu



DNA primer B

Průběh NASBA

Produkty RNA z 1. cyklu



zpětná transkriptáza

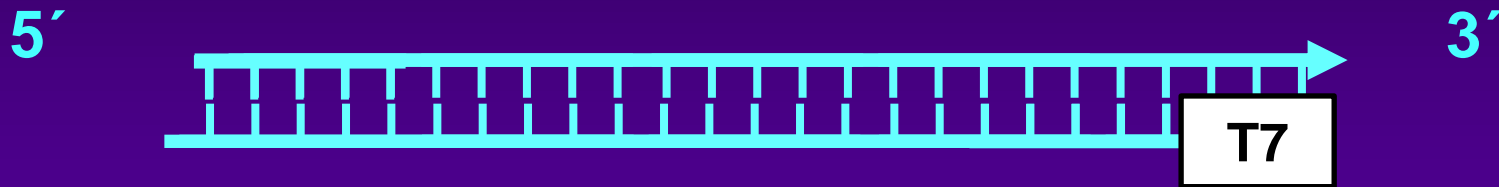
Průběh NASBA



RNáza H

Průběh NASBA

Vznikla dsDNA s promotorem pro T7 RNA polymerázu



primer A

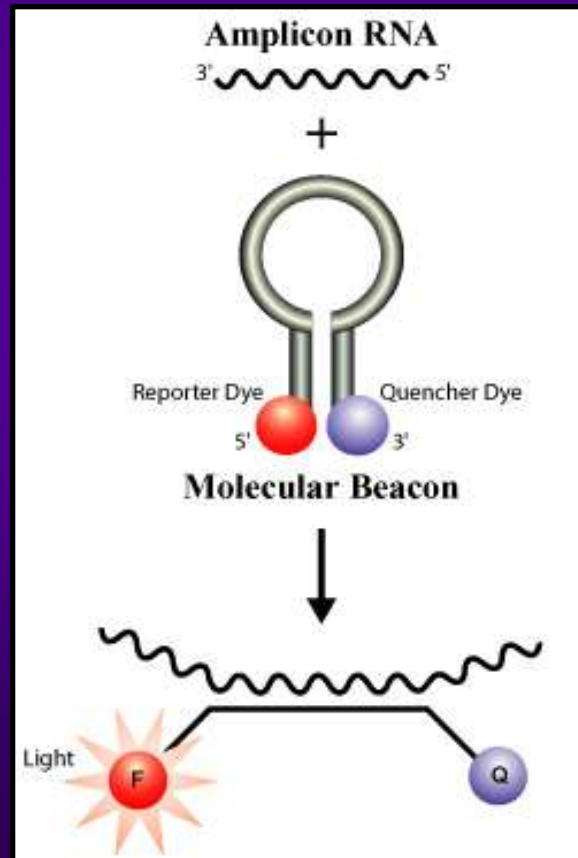
Transkripce T7 RNA polymerázou



A vracíme se zase na začátek ...

Vylepšené přístupy

- K molekulám RNA jsou připojovány molecular beacons, což zvyšuje citlivost reakce



Praktické využití?

- **Molekulární diagnostika lidského papilomaviru**
- **Detekce rezistence k azidotyminu u viru HIV-1**
- **Detekce obtížně kultivovatelných bakterií (*Chlamydia trachomatis*, *Mycobacterium tuberculosis*)**

Metoda SDA

strand displacement amplification

amplifikace vytěsňováním řetězce

- **Metoda využívá schopnosti DNA polymerázy iniciovat syntézu DNA v místě jednořetězcového zlomu v cílové molekule a vytěsňovat řetězec se zlomem během nové syntézy**
- **Vytěsněné řetězce jsou substrátem pro další cyklus SDA**

Jedná se o izotermickou reakci

Průběh SDA

denaturace dsDNA



Průběh SDA

připojení primerů

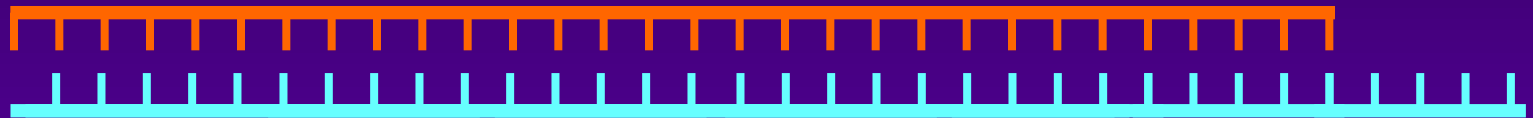


Primery obsahují restriční místo na 5'-konci

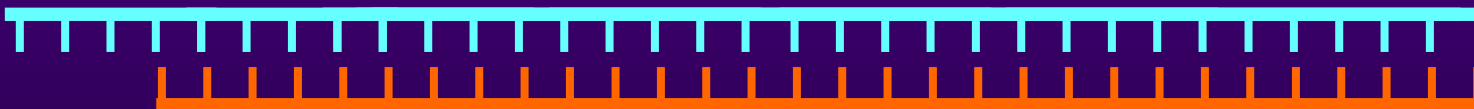


Průběh SDA

Polymerizace s dNTP a dNTP α S

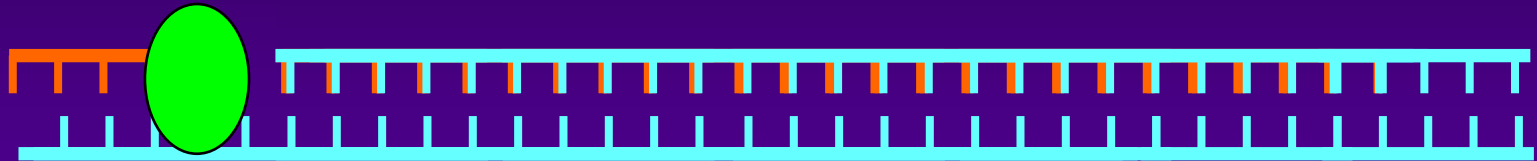


dNTP α S = thio substituovaný NTP, neštěpitelný

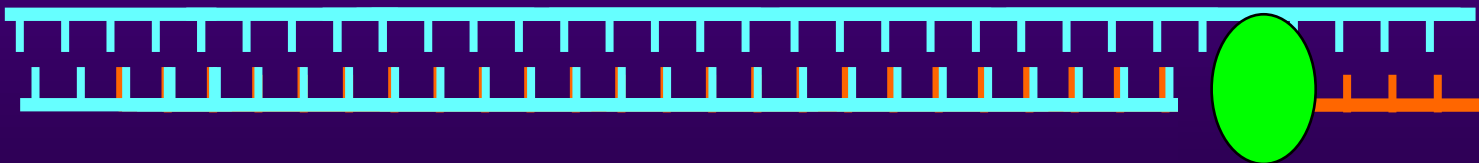


Průběh SDA

Vytvoření jednořetězcového zlomu



Extenze DNA polymerázou



A všechno se opakuje

připojení primerů



Využití SDA

- Detekce obtížně kultivovatelných mykobakterií
- Detekce *Chlamydia trachomatis* a *Neisseria gonorrhoeae* (Becton Dickinson ProbeTec ET assay)
- Detekce Herpes Simplex Virus I a II (BD ProbeTec)
- Diferenciace *Saccharomyces cerevisiae* metodou AFLP provedenou technikou SDA

***Další informace k detekčním
systémům na bázi SDA se dočtete
na komerčních stránkách firmy
Becton, Dickinson***

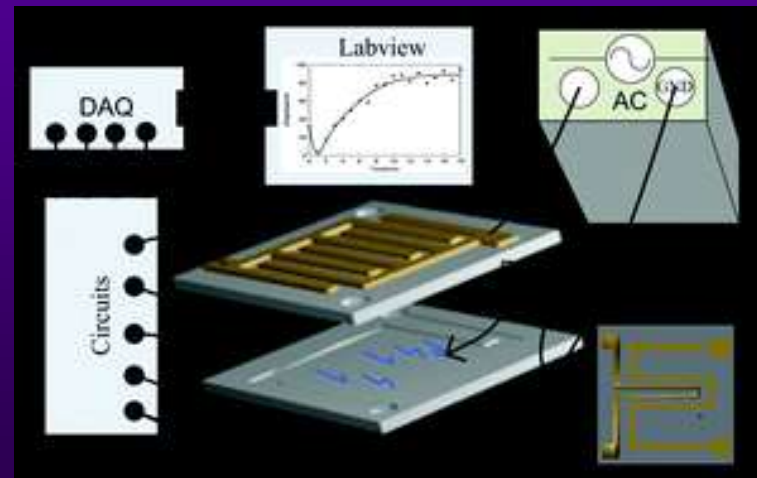
<http://www.bd.com/ds/>



SDA na čipu

Lab Chip, květen 2012, DOI:[10.1039/C2LC40384F](https://doi.org/10.1039/C2LC40384F)

- Elektrochemické bezkontaktní měření vodivosti v reakční komůrce v reálném čase
- S rostoucím počtem produktů roste vodivost
- Citlivost 0,1 pg/μl, minimální pozadí
- Žádné značení DNA



Jaký jiný postup byste použili?



- 1) Oživte své znalosti o restriktázách
- 2) Na stránkách www.neb.com najděte termín „nicking endonuclease“
- 3) Najděte nějakou restriktázu, která by byla použitelná i bez thiosubstituovaných dNTP

Amplifikace sondy a signálu nesené sondou

***Těmito metodami amplifikujeme
sekvence, které jsou pak použity
jako sonda při hybridizaci a
umožní tak zesílení signálu nebo
selektivní detekci amplikonů***



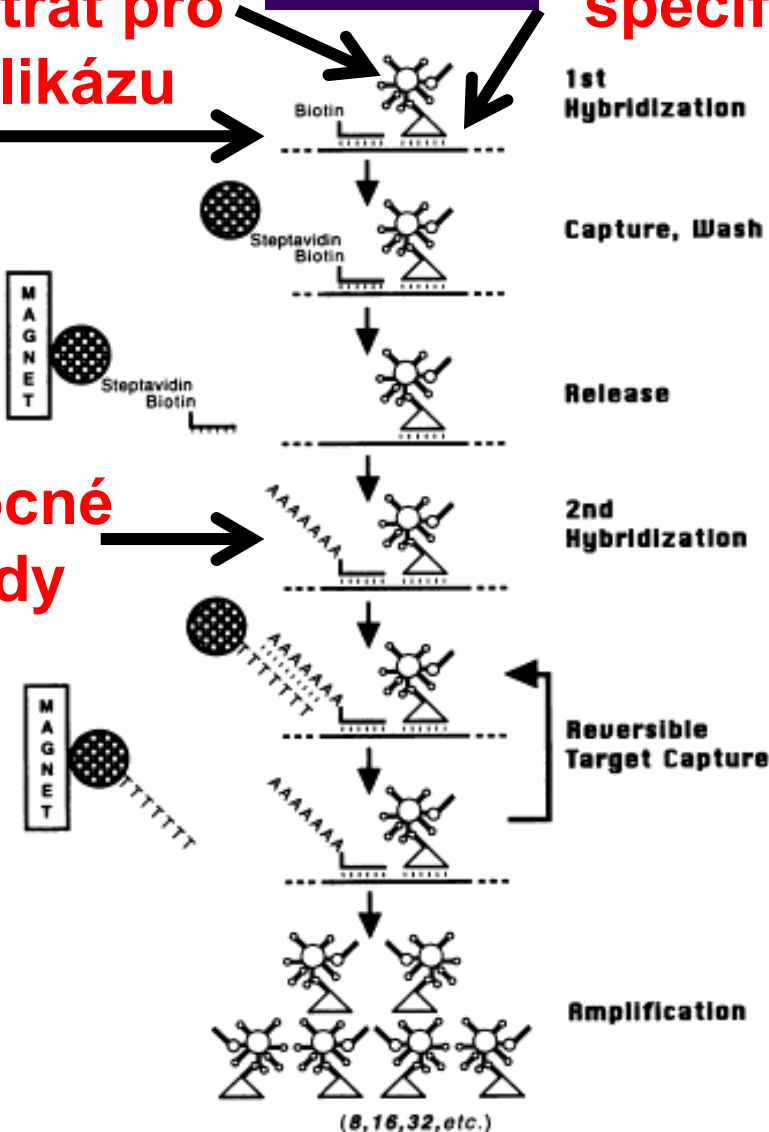
Amplifikace replikázou Q β

- replikáza Q β je RNA dependentní RNA polymeráza
- pochází z RNA bakteriofága Q β (*Lentiviridae*)
- rozpoznává specifickou sekundární RNA strukturu, ale toleruje i vložené sekvence
- sonda nese rozpoznávací sekvenci pro polymerázu + místo pro připojení k cílové sekvenci
- volná sonda se odstraní RNázou III

Jak reakce probíhá

substrát pro replikázu

specifická sonda



odmytí nespecifických sekvencí

uvolnění první pomocné sondy

odmytí zbylých nespecifických sekvencí

uvolnění druhé pomocné sondy

amplifikace

Jak reakce probíhá

- **Všechno při teplotě 37°C**
- **Jediný enzym**
- **Za 30 minut detekovatelné množství produktů**
- **Musí se pipetovat z jedné reakční jamky do druhé**
- **K promývání se využívá separace magnetických kuliček, ke kterým jsou připojeny pomocné sondy**

Využití metody amplifikace replikázou Q β

- **Detekce obtížně kultivovatelných mikroorganismů, např. *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae***
- **Detekce *Mycobacterium tuberculosis***
- **Kvantifikace molekul RNA viru HIV-1**
- **Detekce cytomegaloviru**

Ligázová řetězová reakce

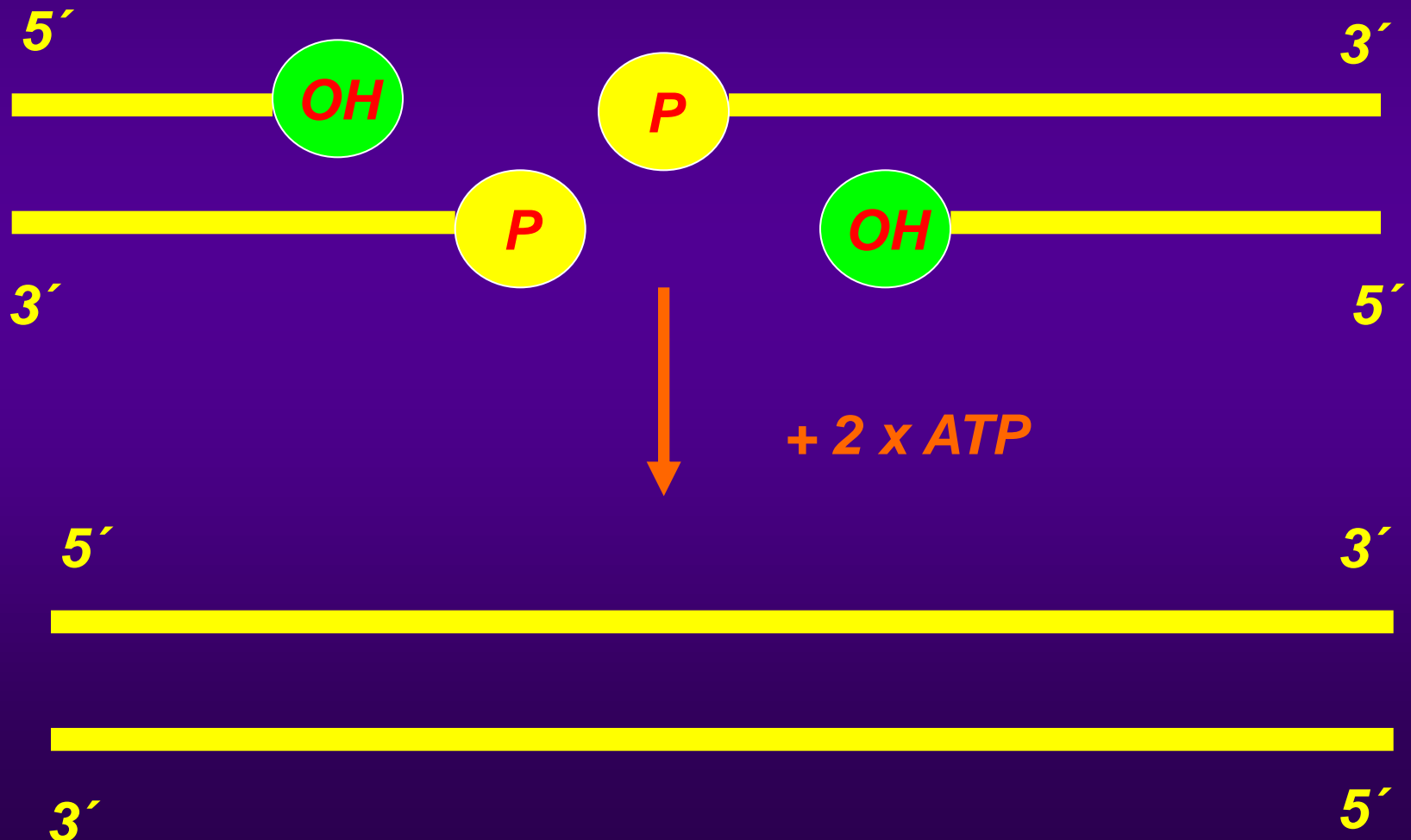
- **Ligace oligonukleotidových sond, pokud dojde k jejich vazbě na cílovou sekvenci DNA**
- **Vyžaduje 4 oligonukleotidy (LCR-primery)**
- **Dva oligonukleotidy specificky hybridizují k jednomu a dva k protilehlému řetězci**

**Ligace termostabilní DNA-ligázou
(z *Thermus aquaticus*)**



Zopakujme si, co je to ligace

T4 DNA ligáza (E. coli infikované bakteriofágem T4)



Mechanismus ligace



samovolné připojení



spojení ligázou

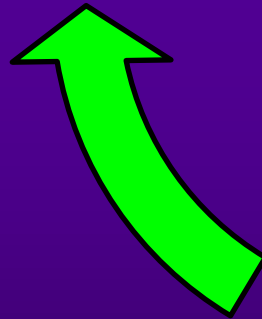
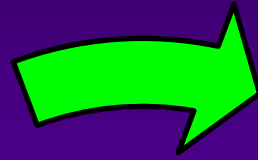
+ 2 x ATP



LCR probíhá v cyklech

denaturace

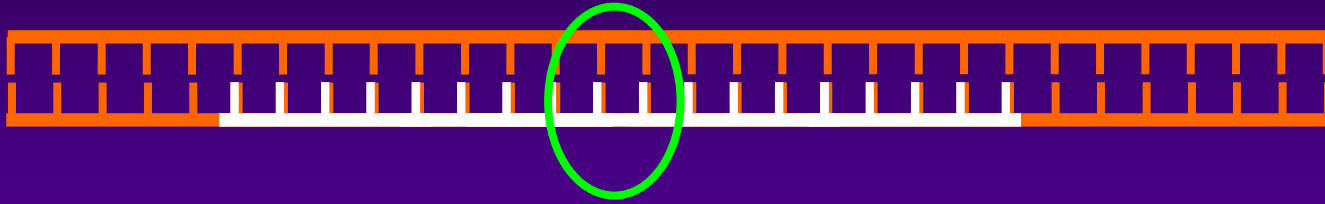
hybridizace



ligace



Průběh ligázové řetězové reakce



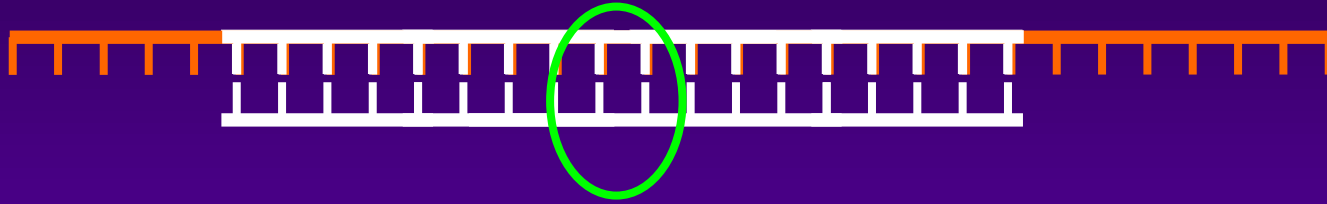
denaturace

hybridizace

ligace



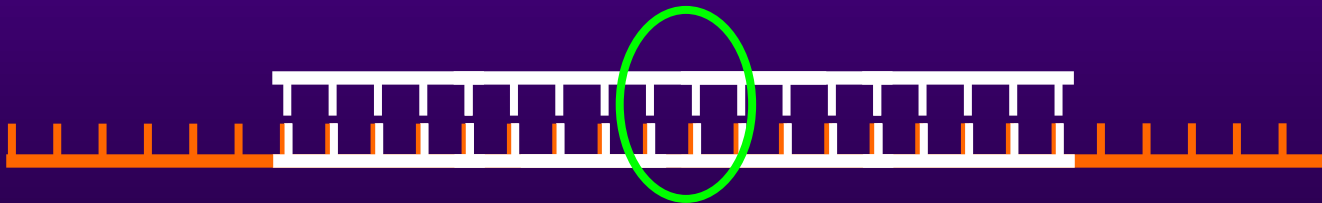
Průběh ligázové řetězové reakce



denaturace

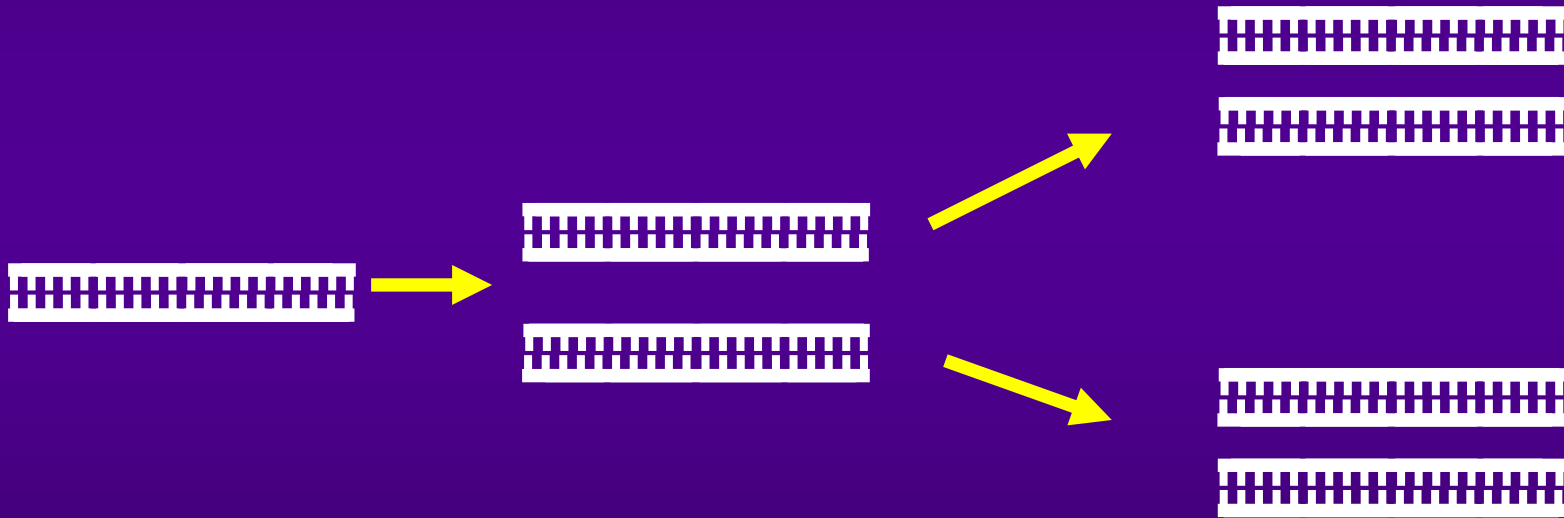
hybridizace

ligace



Důsledky obdobné jako u PCR

Z každé molekuly vznikají v každém cyklu dvě nové



Počet produktů LCR vzrůstá geometricky

Formáty ligázové řetězové reakce

- **Většinou kvalitativní**
- **Lze aplikovat i kvantitativně**
- **Standardní detekce na gelu**
- **Sonda může být značena např. biotinem, + fluoresceční značkou nebo digoxigeninem nebo alkalickou fosfatázou**
- **Detekce po zachycení na streptavidin fluorescenčně, barevnou reakcí nebo enzymaticky**

Příklady využití LCR

- Již v roce 1993 použita k vysoce specifické detekci *Chlamydia trachomatis* (Dille et al. (1993): J Clin Microbiol. 31(3):729-31)
- Detekce kmenů *Lactococcus lactis* exprimujících nisinA a nisinZ (bakteriociny, E234) - hledání strukturních variant genu, rok 2006
- *Borrelia burgdorferi* (1991), *Neisseria gonorrhoeae* (1992), *Mycobacterium tuberculosis* (1993),
- Lidský papillomavirus (1990), HSV (1991, HIV (DNA, 1991)

Více o aplikacích LCR

**Wiedmann et al. (1994): Ligase chain reaction (LCR)-overview and applications.
Genome Res. 3: S51-S64**

Shrnutí

- 1) Amplifikace cílové sekvence metodou polymerázové řetězové reakce**
- 2) Příklady aplikací PCR v mikrobiologii**
- 3) Amplifikační systémy založené na transkripci**
- 4) Technologie SDA**
- 5) Amplifikace sondy a signálu neseného sondou - amplifikace replikázou Q β , ligázová řetězová reakce**