

# *Amplifikační metody v molekulární diagnostice mikroorganismů*



*doc. RNDr. Milan Bartoš, Ph.D.*

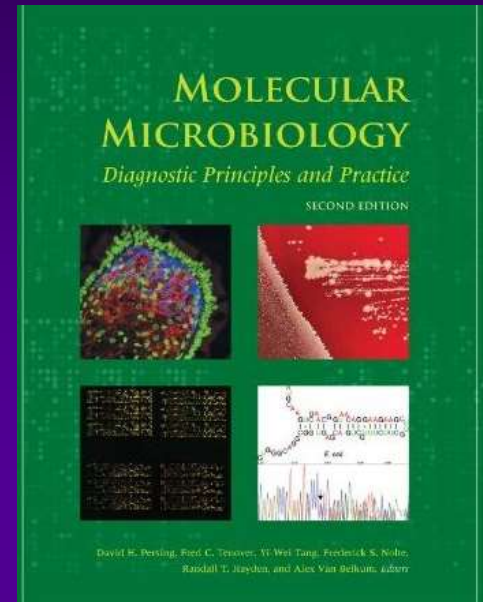
*bartosm@vfu.cz*

*Přírodovědecká fakulta MU, 2014*

# 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 - opakování**
- 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 $\beta$ , ligázová řetězová reakce**

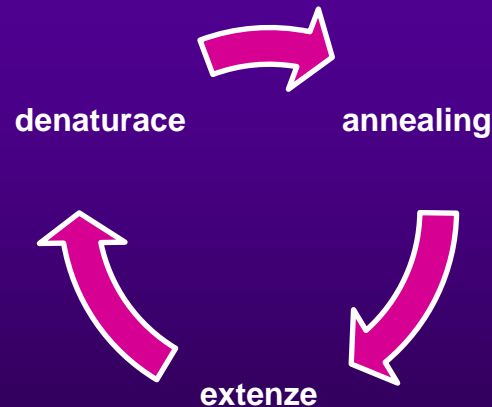
# *Kdo za to může ?*



# *Princip PCR*

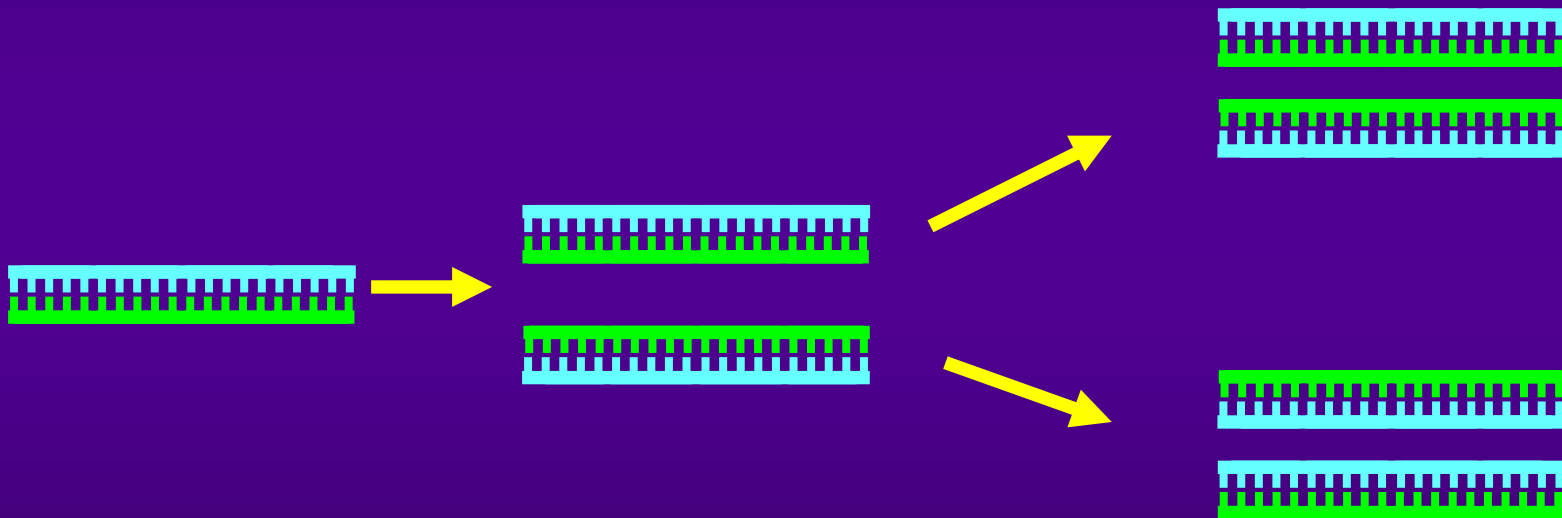
Polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction – PCR) umožňuje .....

*PCR probíhá v .....*



# Amplifikace znamená, že ...

Z každé molekuly amplikonu vznikají v každém cyklu ..... nové



Počet amplikonů vzrůstá .....

# 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	$2x$	$x(2n-2)$	???????	$(2^n)x$

$X$  = počet matric na počátku,  $n$  = počet cyklů

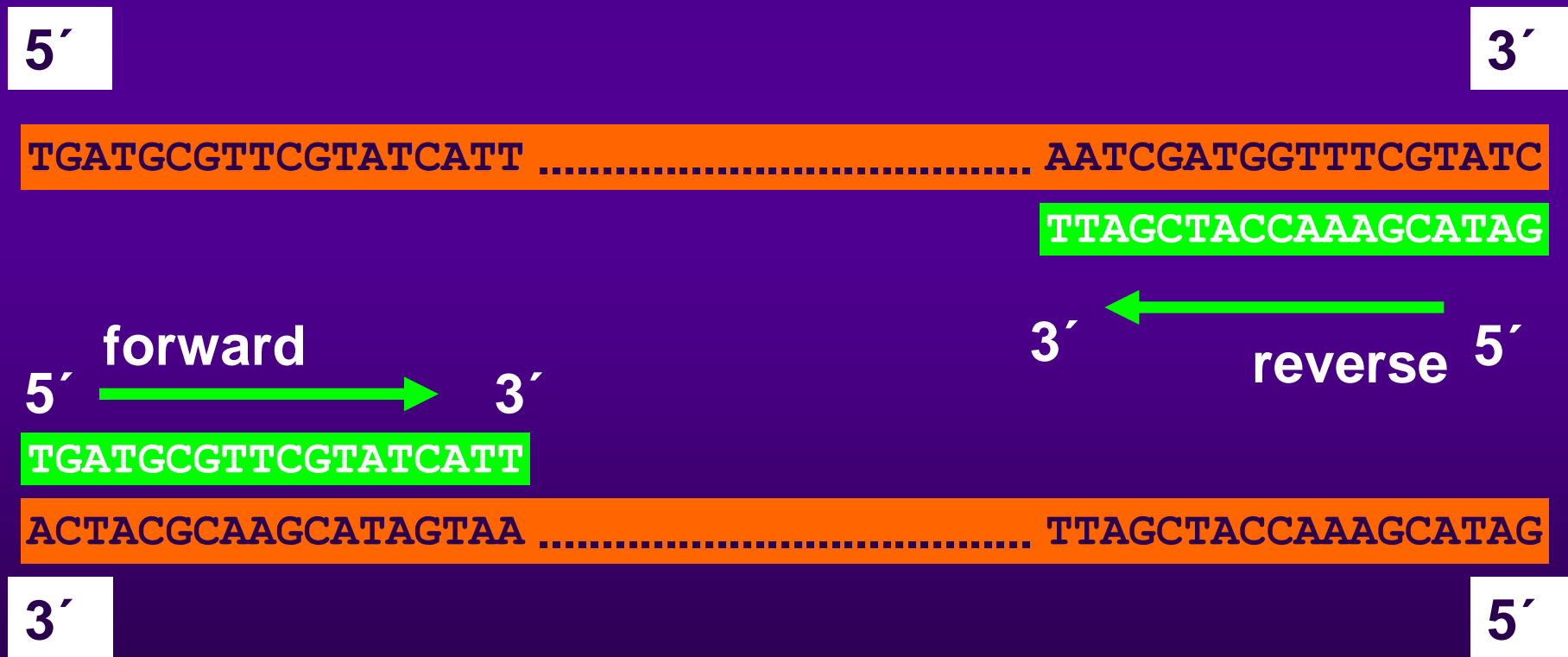
# Výtěžek PCR

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



# Primer forward a reverse

Pozice primerů na cílové molekule DNA určuje .....a ..... amplikonu



**„Syntéza DNA probíhá jen ve směru ...→ ...“. Tak to příroda stvořila!**

**Tedy primery musí začínat ..... - koncem a končit .... - koncem. Na ...´ - konci je OH skupina, ke které se připojuje vstupující dNTP**



# 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

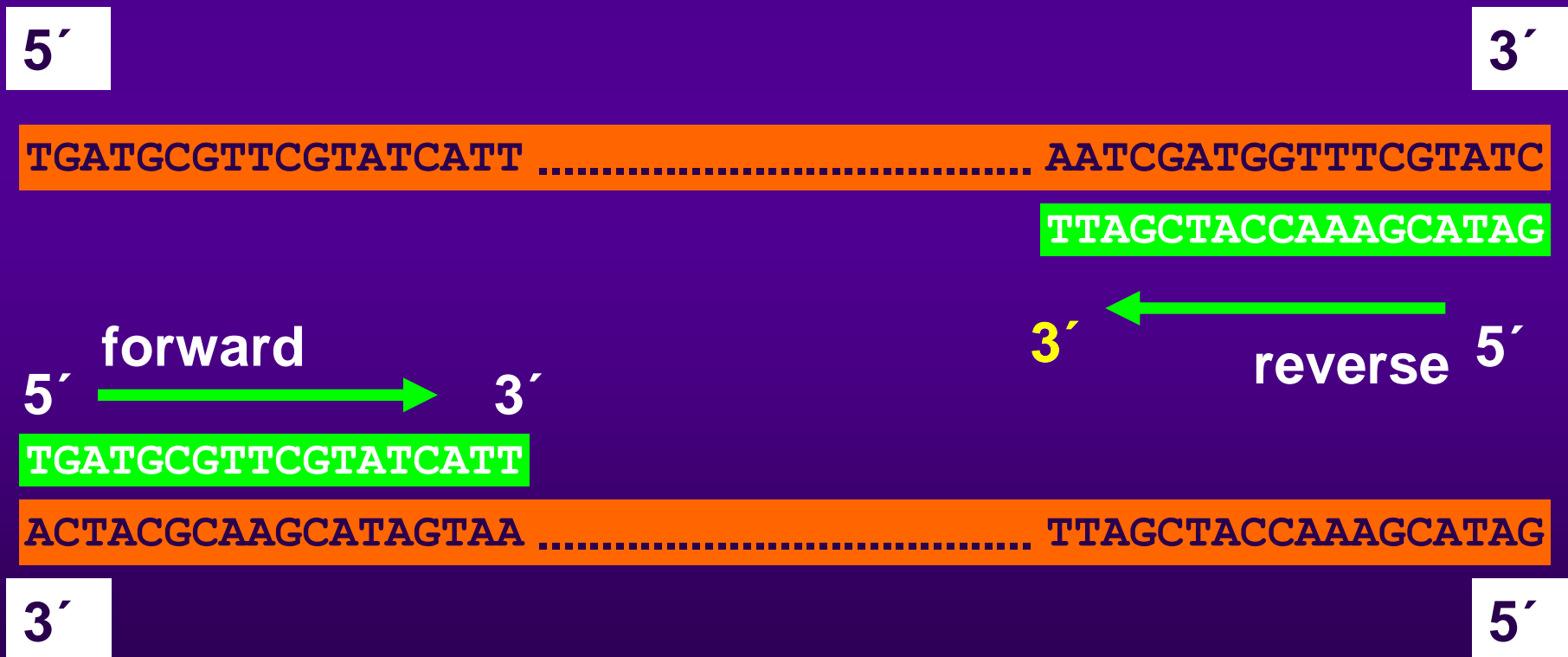
ACTACGCAAGCATAGTAA ..... TTAGCTACCAAAGCATAG

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' → 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

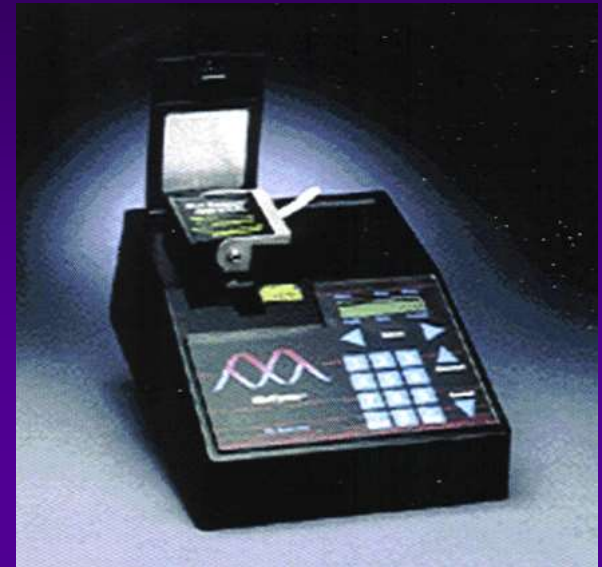
3'

5'

# Technické provedení PCR

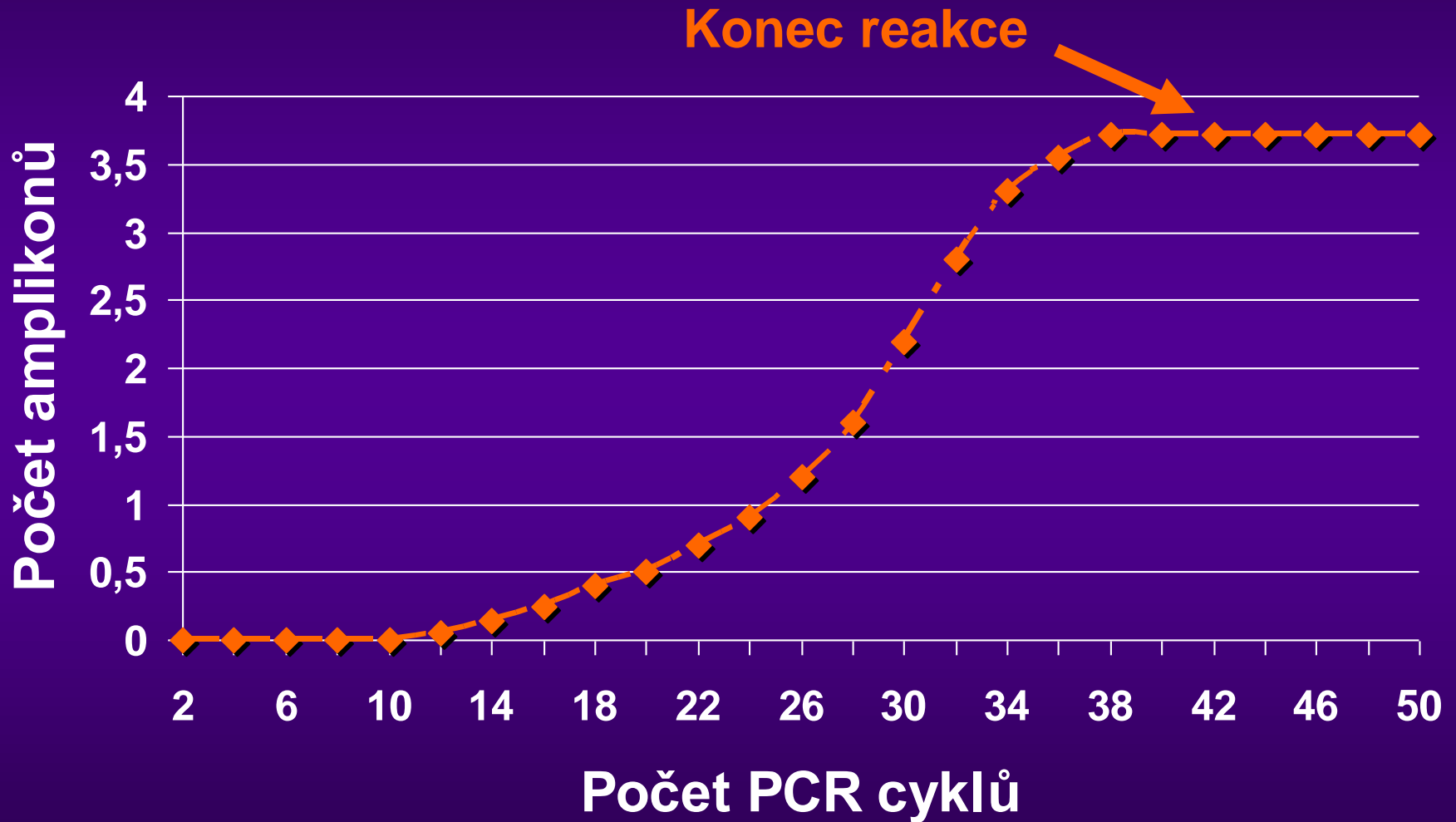
## Termocyklery

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



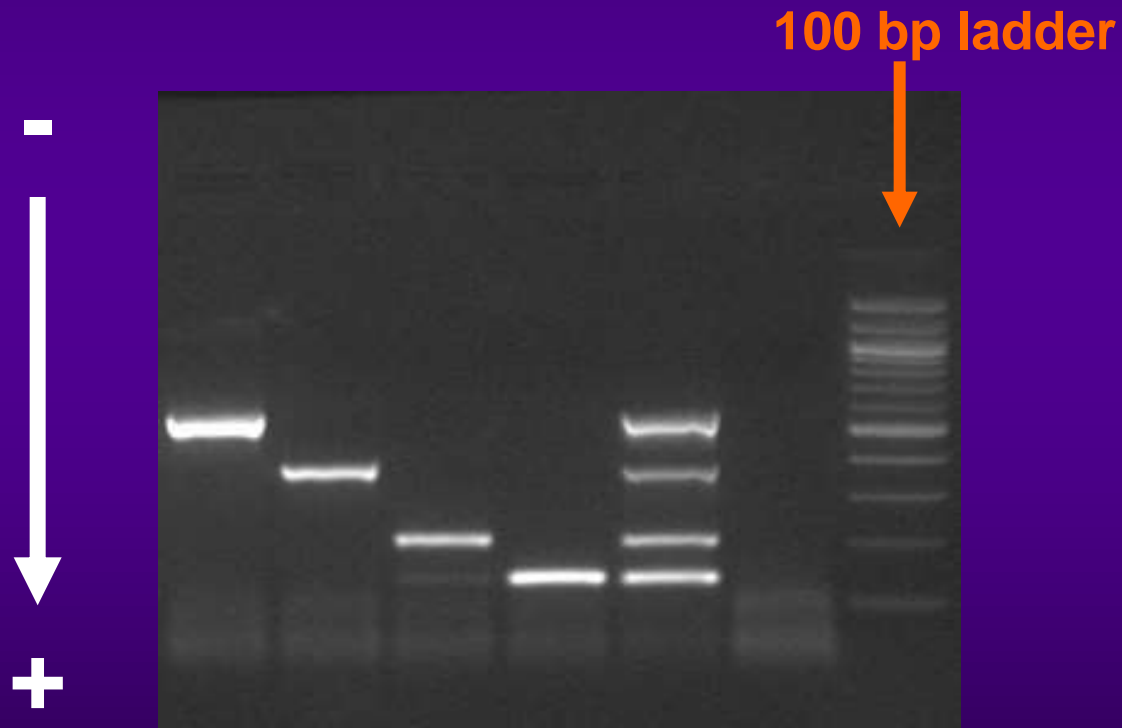
Termocyklery dokáží automaticky rychle měnit teplotu v reakčních blocích mezi třemi základními teplotami PCR cyklu

# 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

# ***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

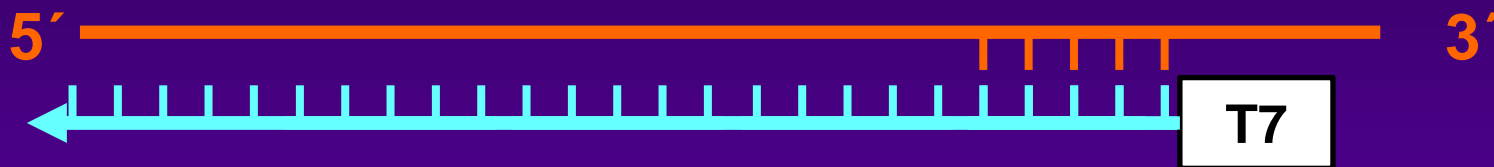


DNA primer A s  
promotorem pro T7  
RNA-polymerázu



# Průběh NASBA

RNA matrice

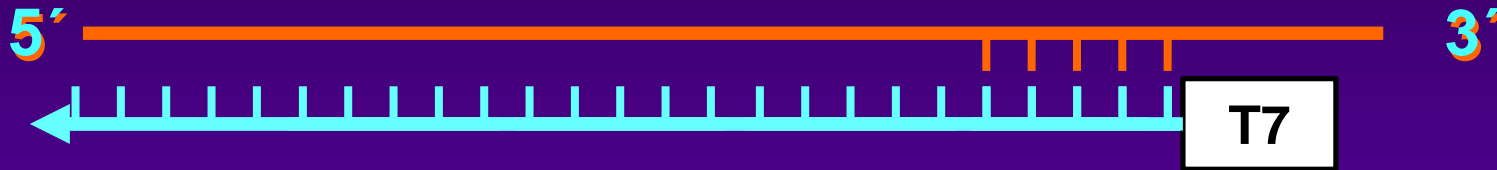


Zpětná transkriptáza



# Průběh NASBA

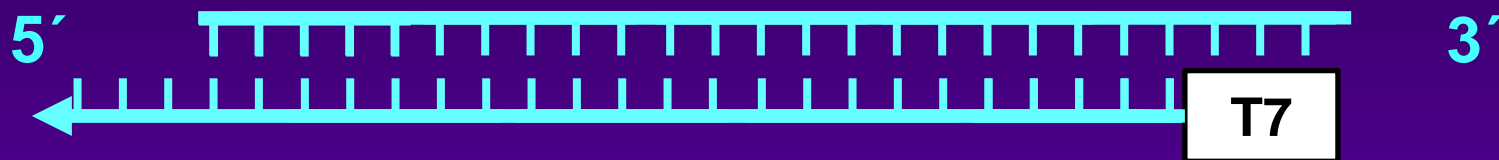
RNA matrice



RNáza H – degradace RNA

# Průběh NASBA

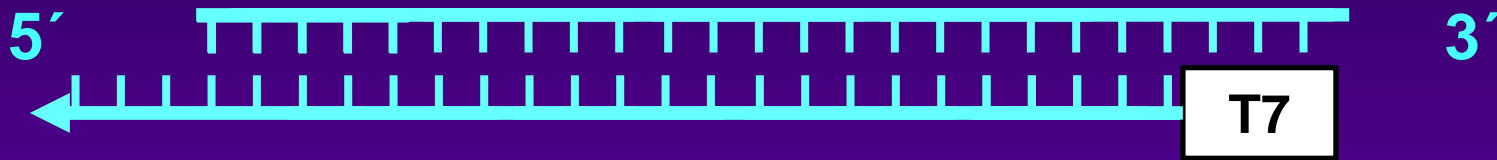
Vznikla dsDNA s promotorem pro T7 RNA polymerázu



DNA primer B

# Průběh NASBA

Vznikla dsDNA s promotorem pro T7 RNA polymerázu



Transkripce T7 RNA polymerázou



A tím skončil první „cyklus“

# Průběh NASBA

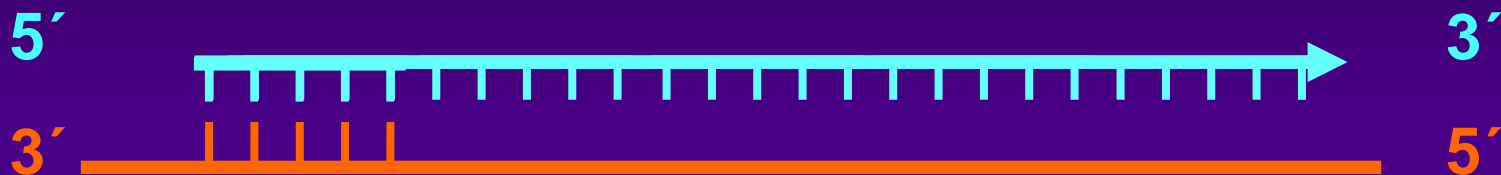
Produkty RNA z 1. cyklu



DNA primer B

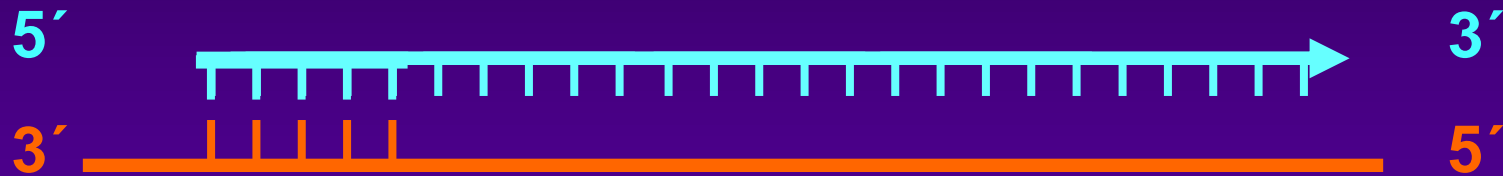
# Průběh NASBA

Produkty RNA z 1. cyklu



zpětná transkriptáza

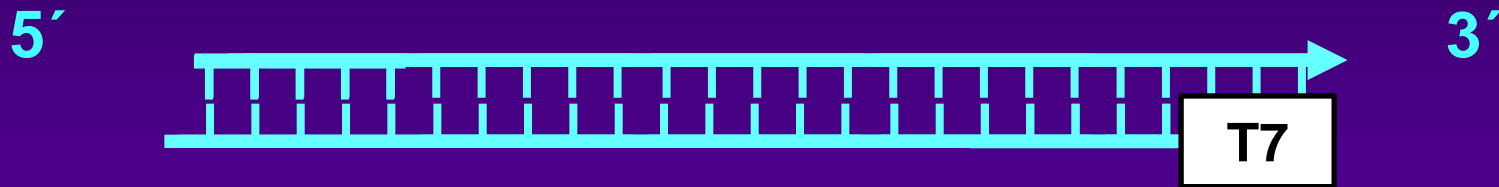
# Průběh NASBA



RNáza H

# Průběh NASBA

Vznikla dsDNA s promotorem pro T7 RNA polymerázu



primer A

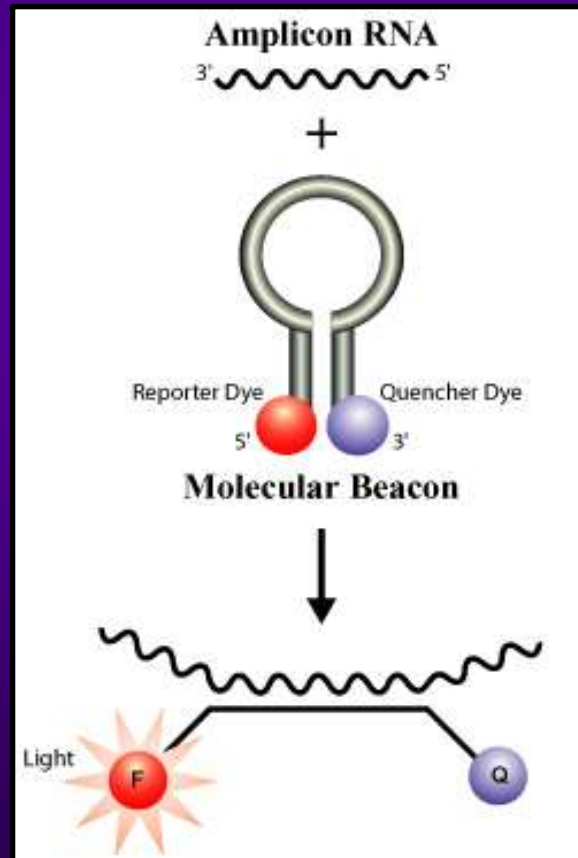
Transkripce T7 RNA polymerázou



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**

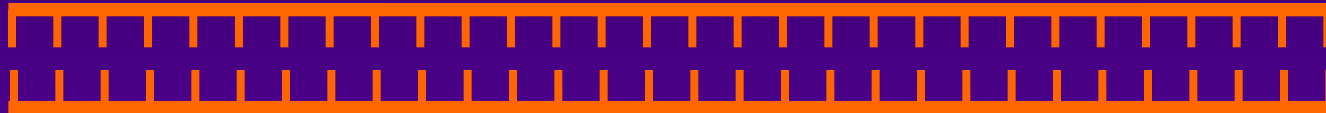
**amplifikace vytěsňováním řetězce**

- **Metoda využívá schopnosti DNA polymerázy iniciovat syntézu DNA v místě jedno-řetězcového 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

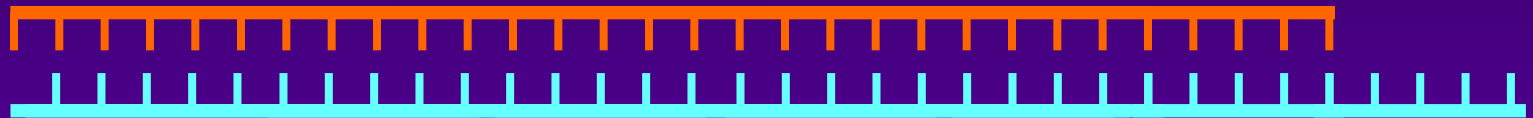


Primery obsahují restriční místo na 5'-konci

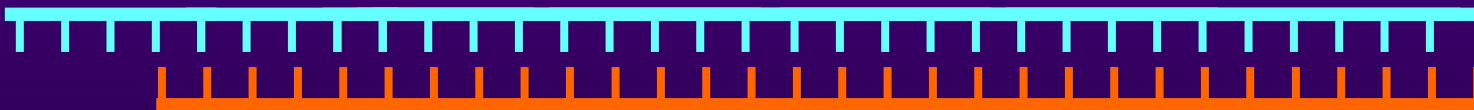


# *Průběh SDA*

Polymerizace s dNTP a dNTP $\alpha$ S

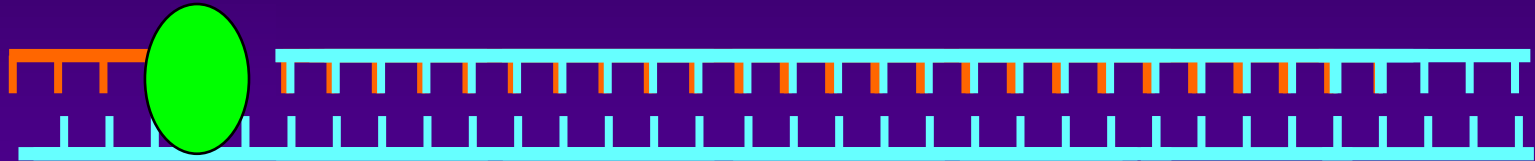


dNTP $\alpha$ S = thio substituovaný NTP, neštěpitelný

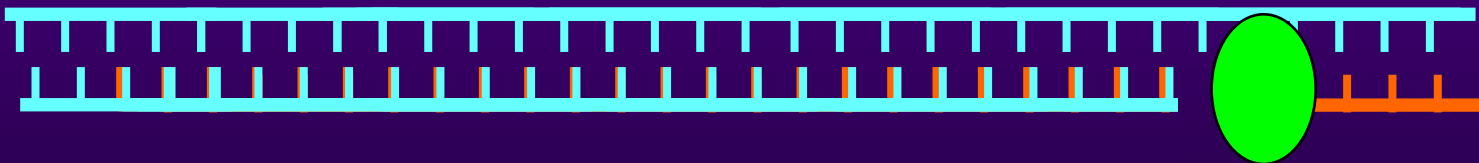


# Průběh SDA

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***

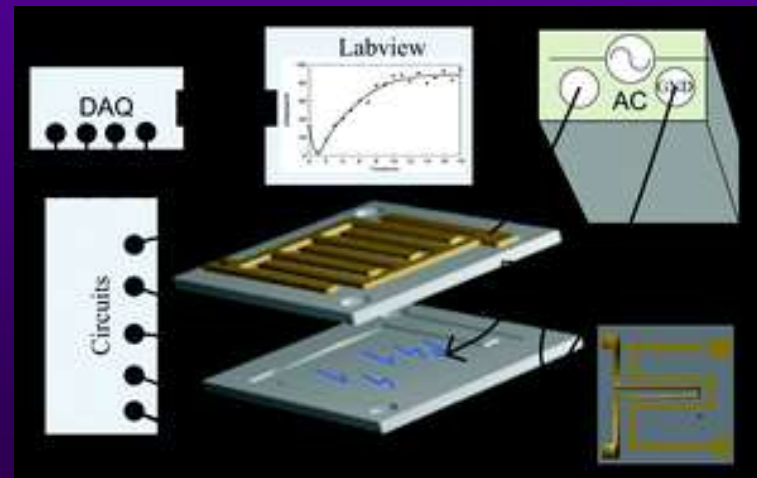
**<http://www.bd.com/ds/>**



# ***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](http://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***



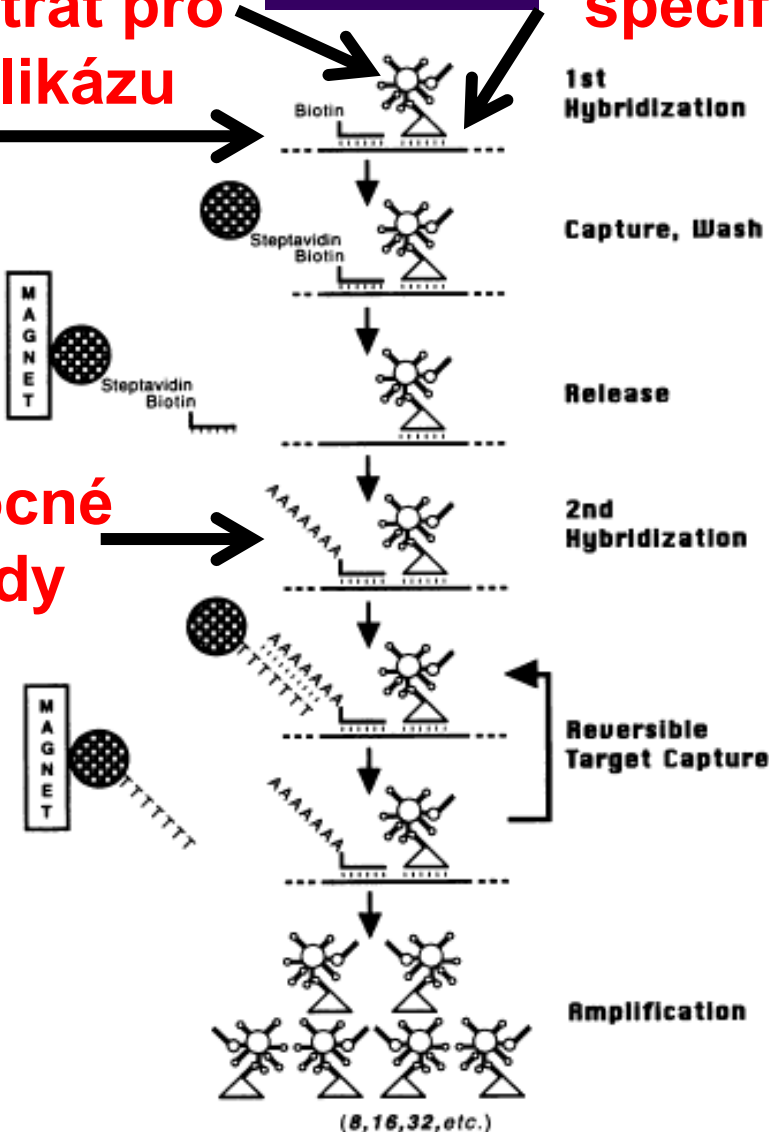
# ***Amplifikace replikázou Q $\beta$***

- replikáza Q $\beta$  je RNA dependentní RNA polymeráza
- pochází z RNA bakteriofága Q $\beta$  (*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

pomocné sondy

# ***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 $\beta$***

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

# ***Ligázová řetězová reakce***

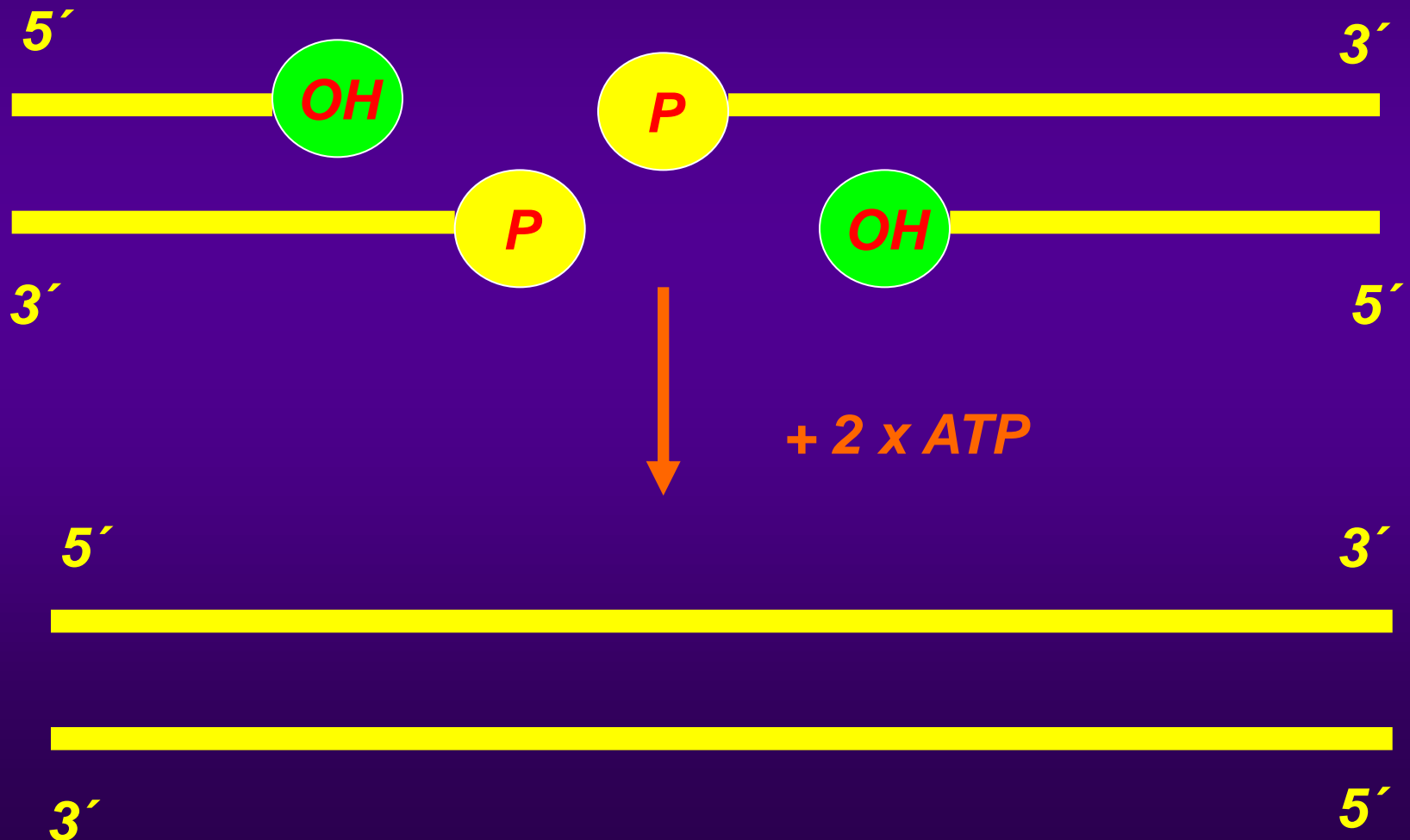
- **Ligace oligonukleotidových sond, pokud dojde k jejich vazbě na cílovou sekvenci DNA**
- **Vyžaduje 4 oligonukleotidy (LCR-primery)**
- **Dva oligonukleotidy specificky hybridizují k jednomu a dva k protilehlému řetězci**

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

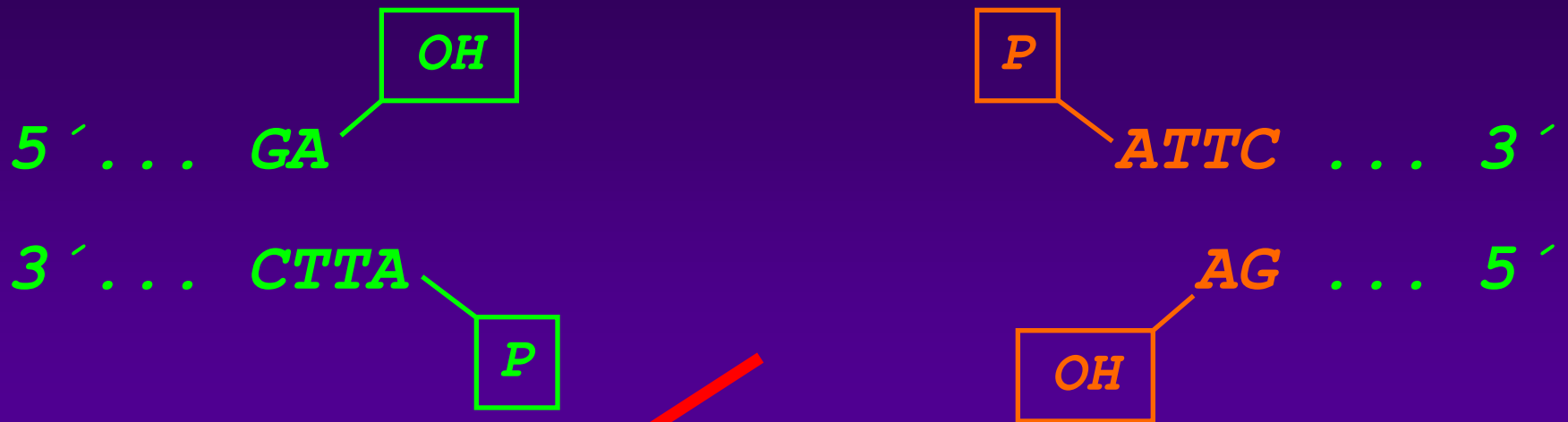


# Zopakujme si, co je to ligace

*T4 DNA ligáza (E. coli infikované bakteriofágem T4)*



# Mechanismus ligace



samovolné připojení

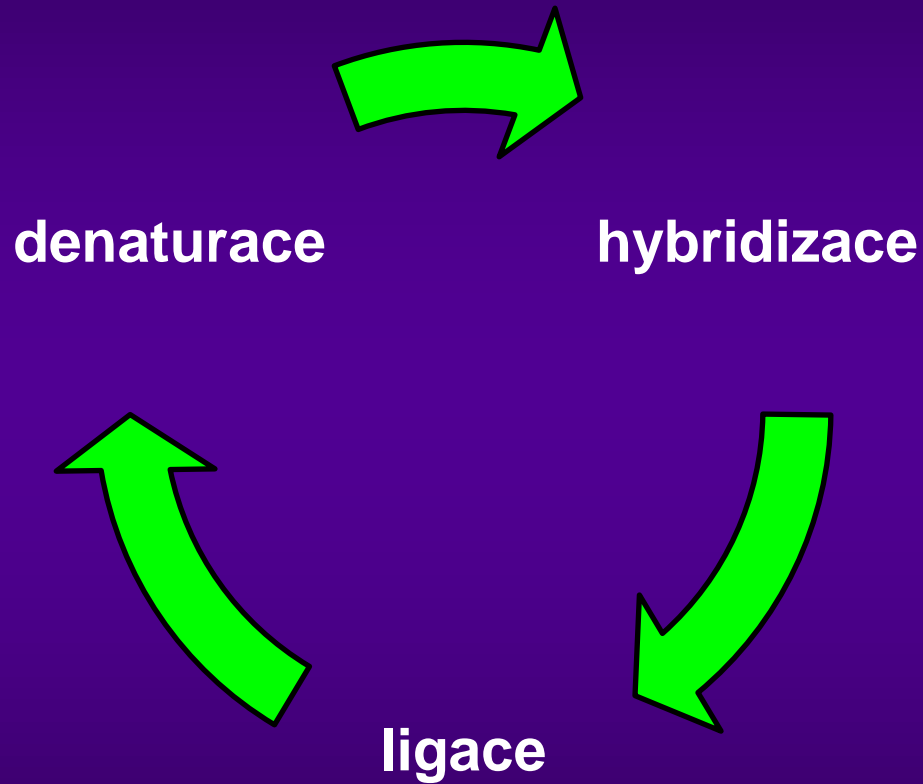


spojení ligázou

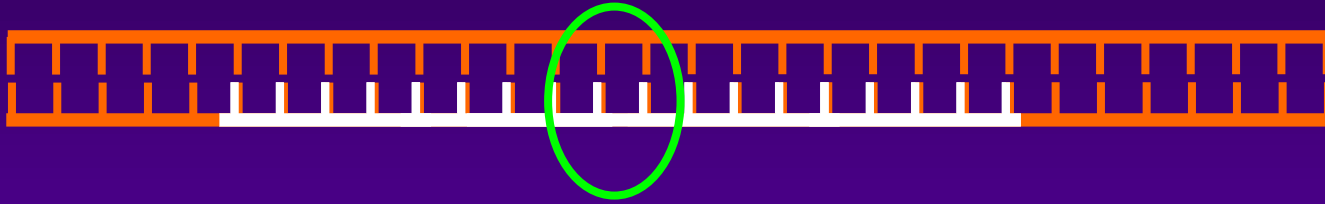
+ 2 x ATP



# *LCR probíhá v cyklech*



# *Průběh ligázové řetězové reakce*



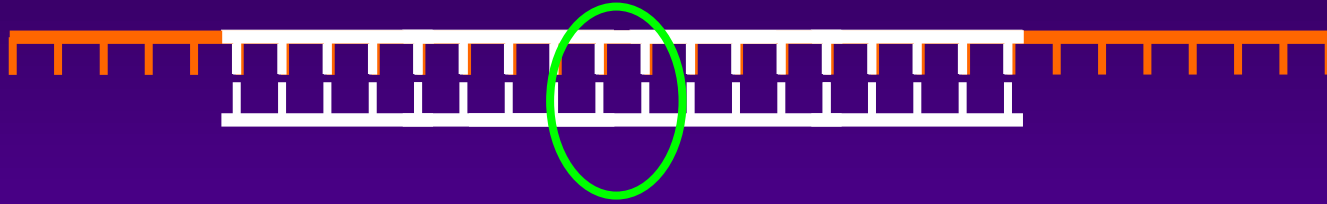
denaturace

hybridizace

ligace



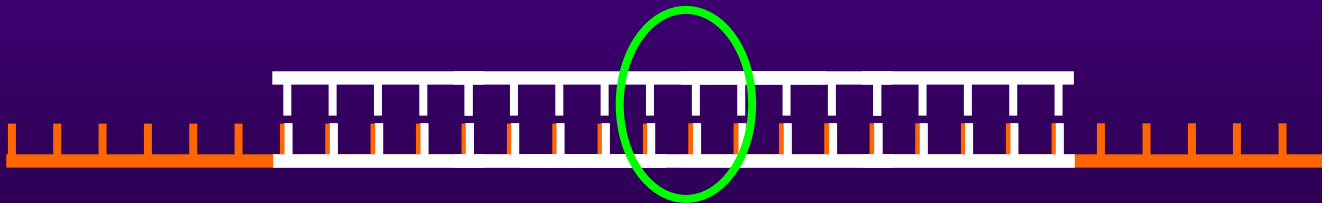
# *Průběh ligázové řetězové reakce*



denaturace

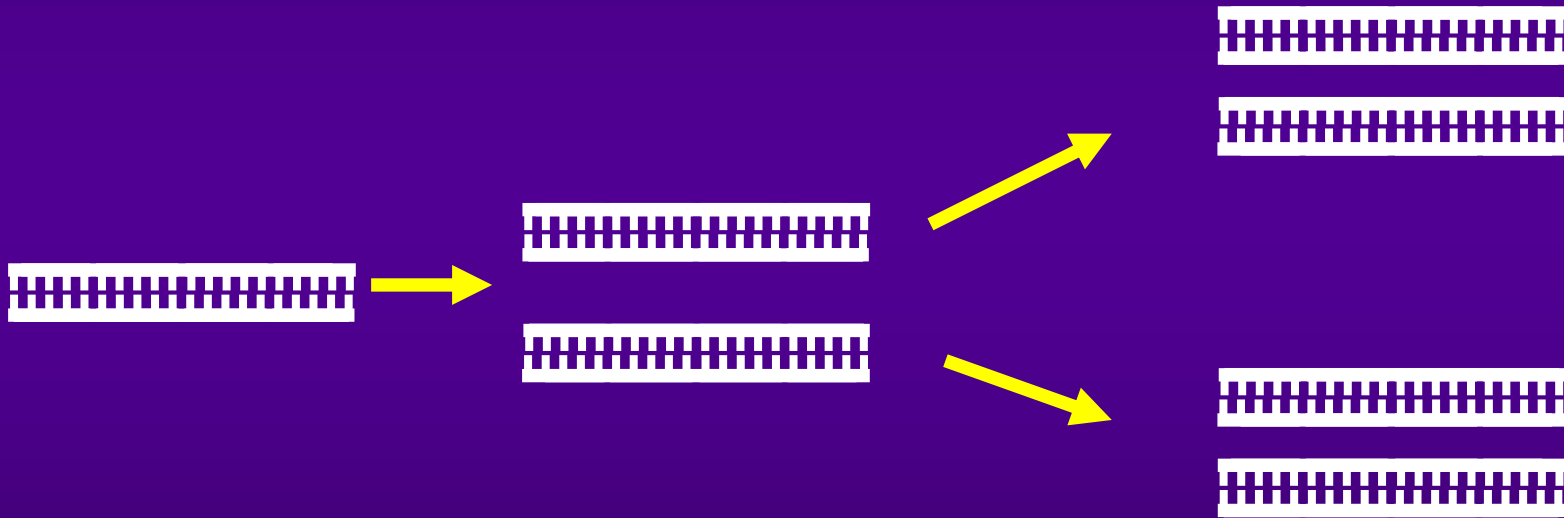
hybridizace

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 $\beta$ , ligázová řetězová reakce**