



# *Aplikace PCR v mikrobiologii*



*doc. RNDr. Milan Bartoš, Ph.D.*

*bartosm@vfu.cz*

*Přírodovědecká fakulta MU, 2012*

# ***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

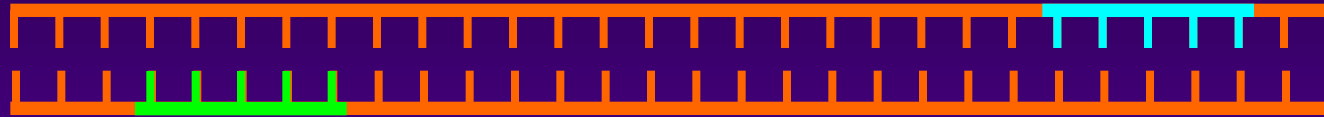
## Zajistit

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

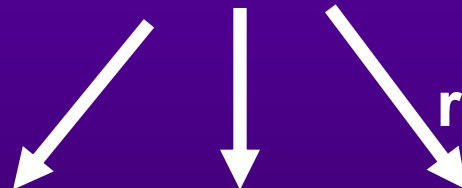
# ***Diagnostické varianty PCR***

- **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



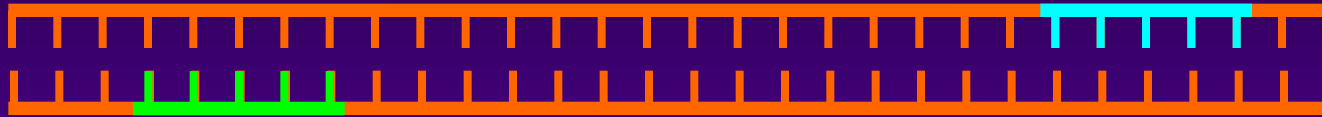
restrikční štěpení



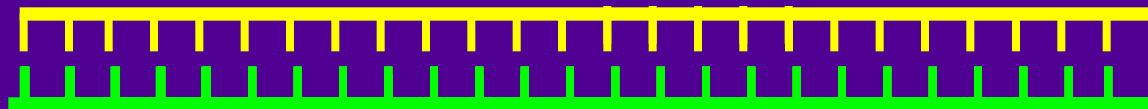
***Praktický příklad***  
***PCR-REA, PRA, PCR-RFLP***

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

# Asymetrická PCR



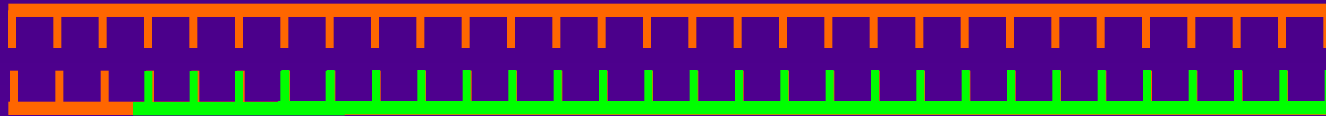
amplifikace



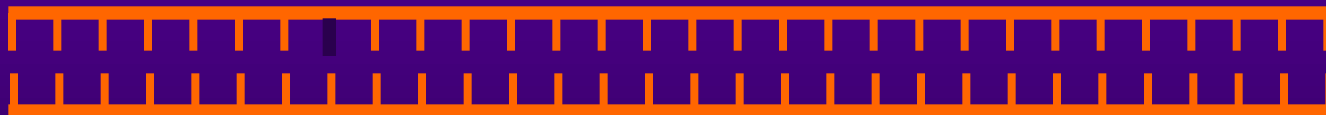
jednořetězcové produkty určené k sekvenování

# *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

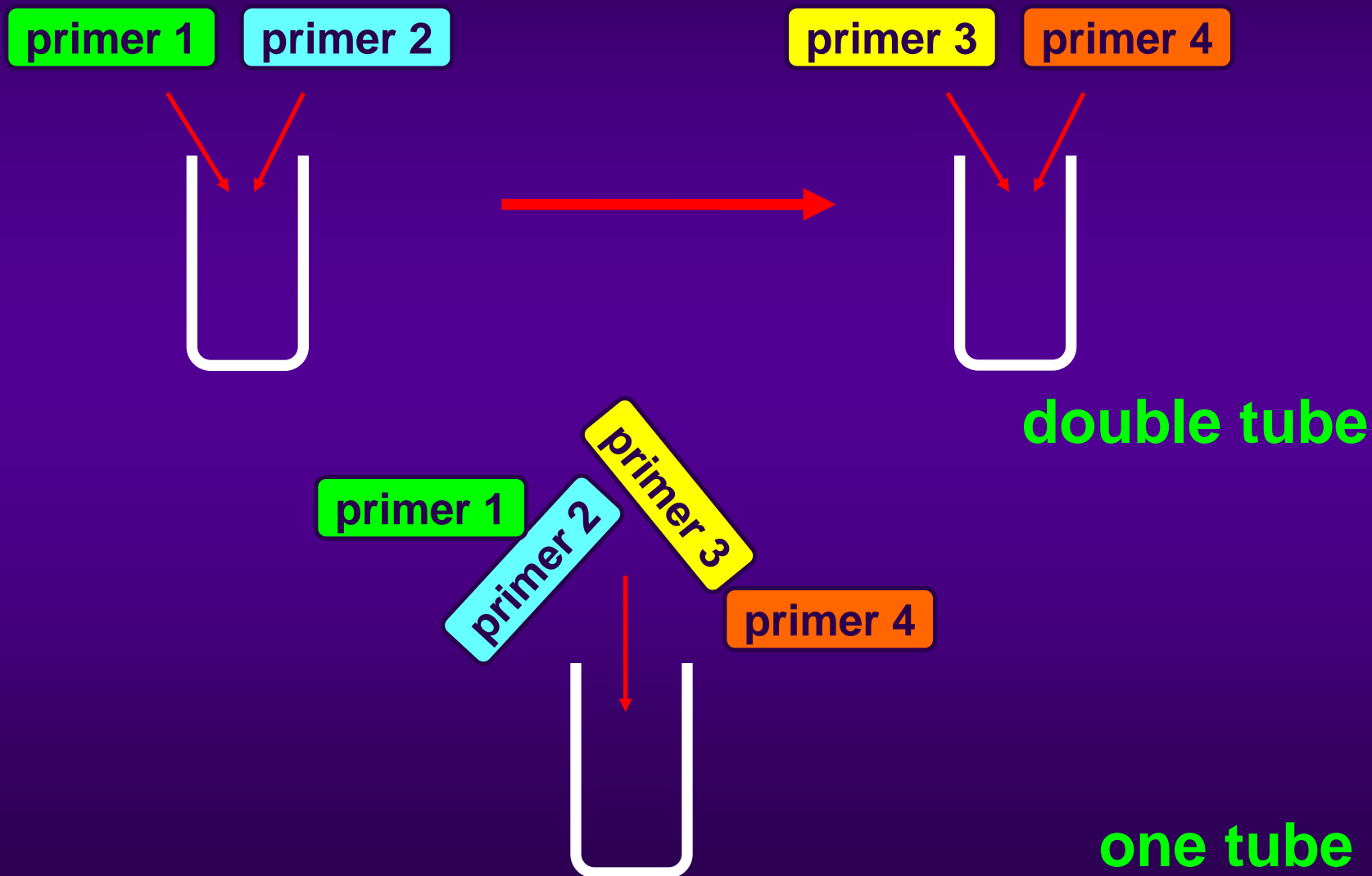


2. stupeň



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

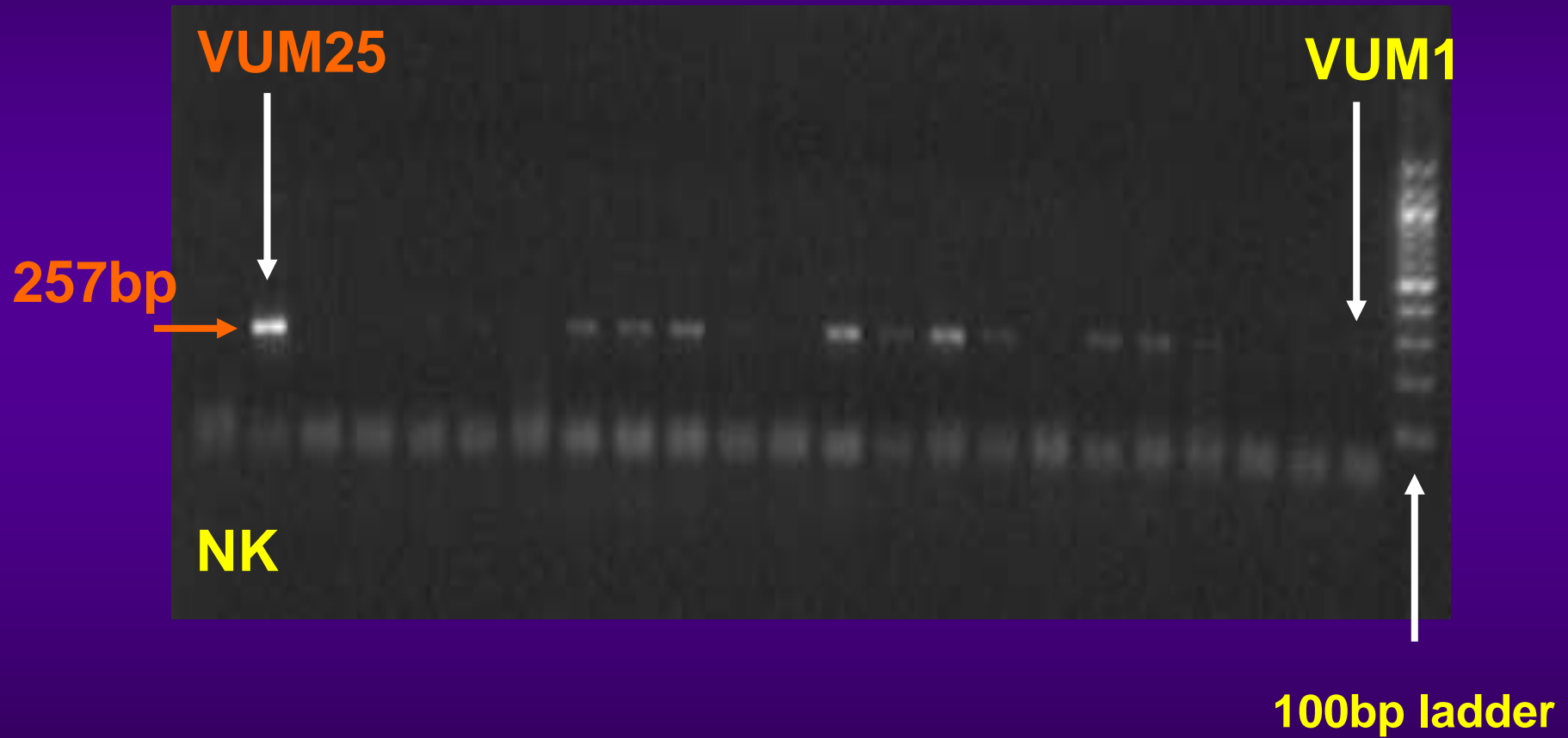
257bp  
→



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***

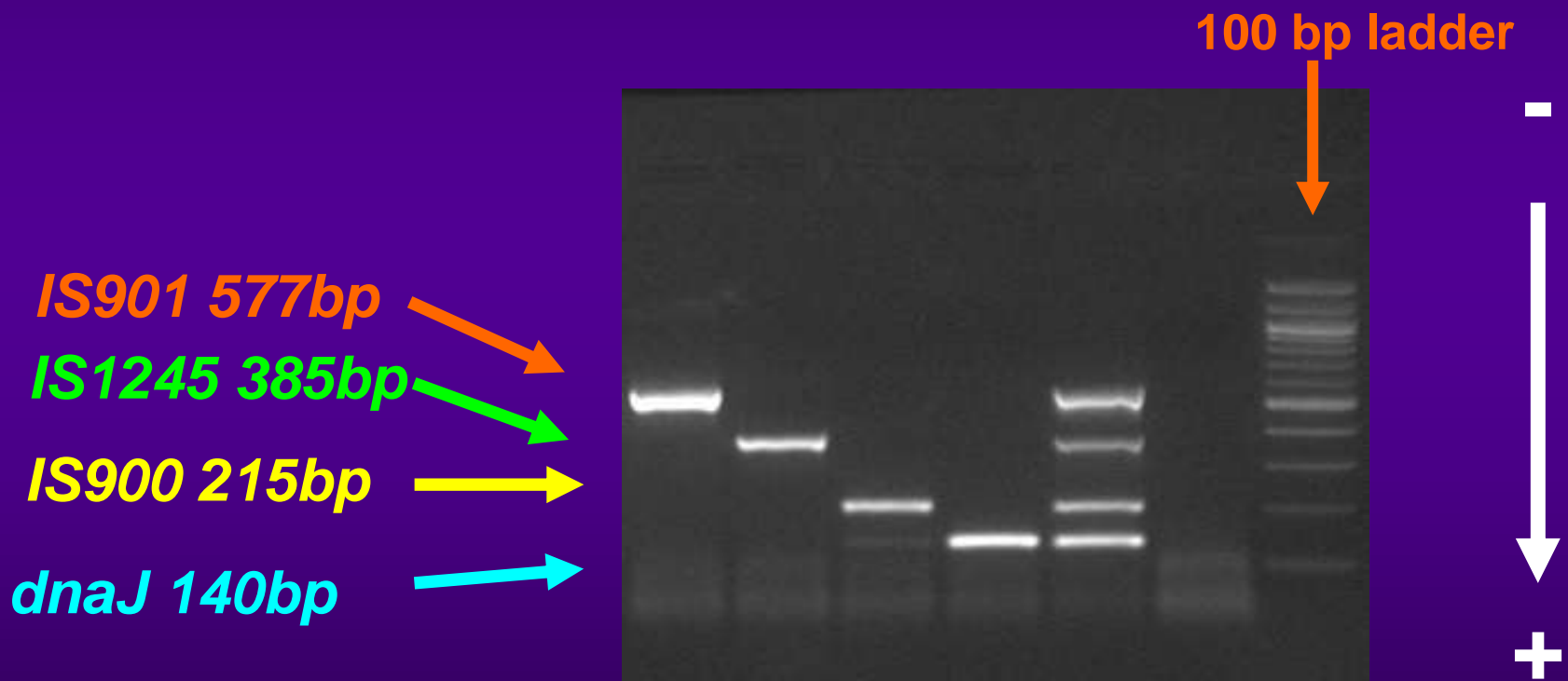
**amplifikace několika lokusů současně**

**diagnostika více lokusů současně**

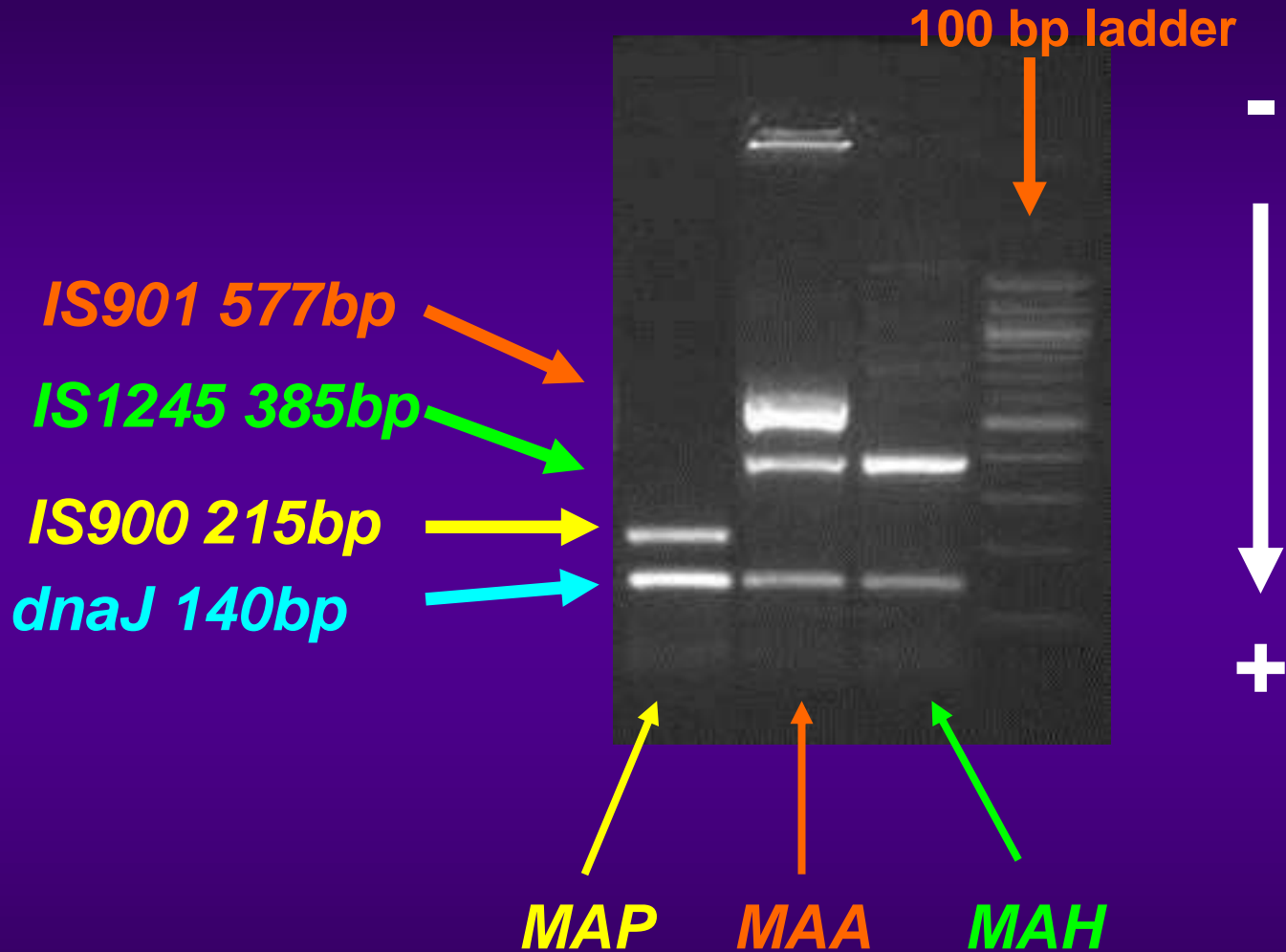


# Příklad multiplex PCR

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.

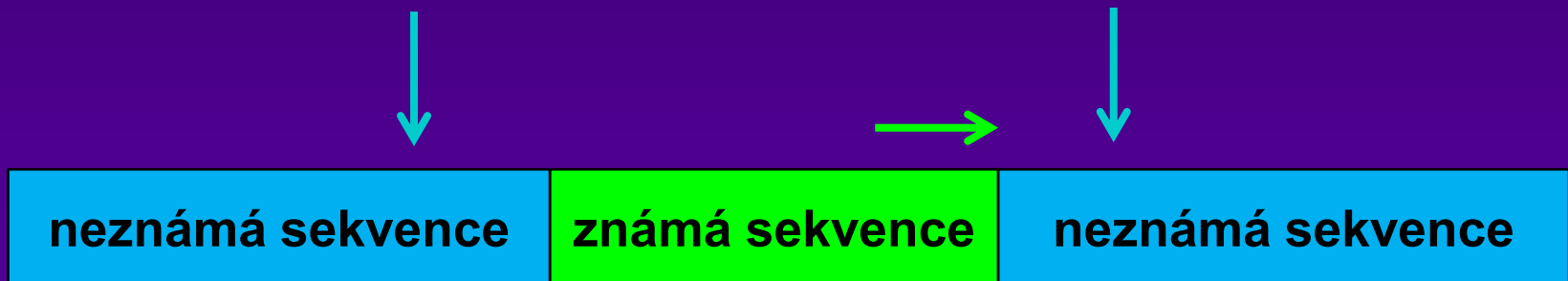
*A teď si to vyzkoušíme prakticky*



**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

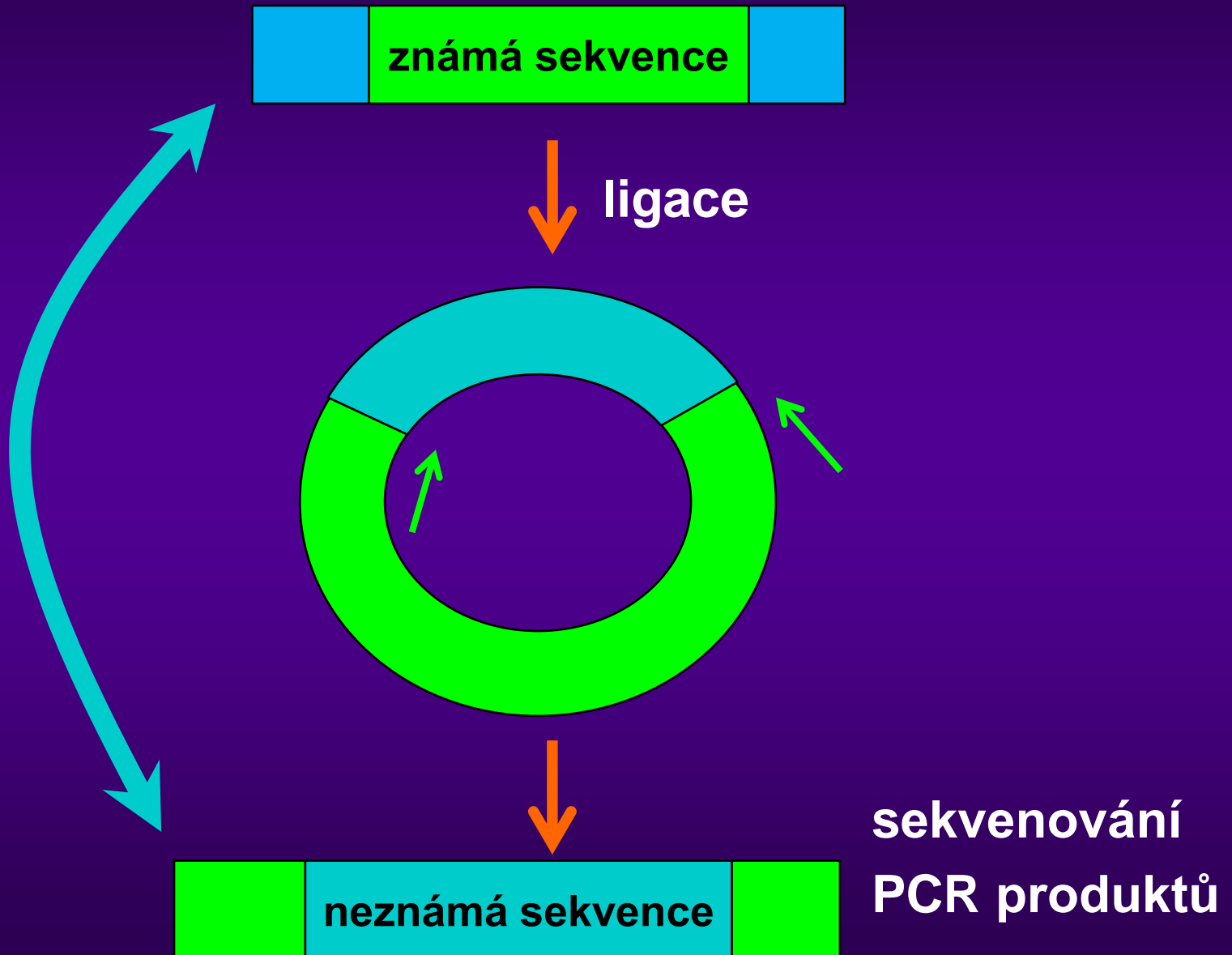


restrikční štěpení



ligace

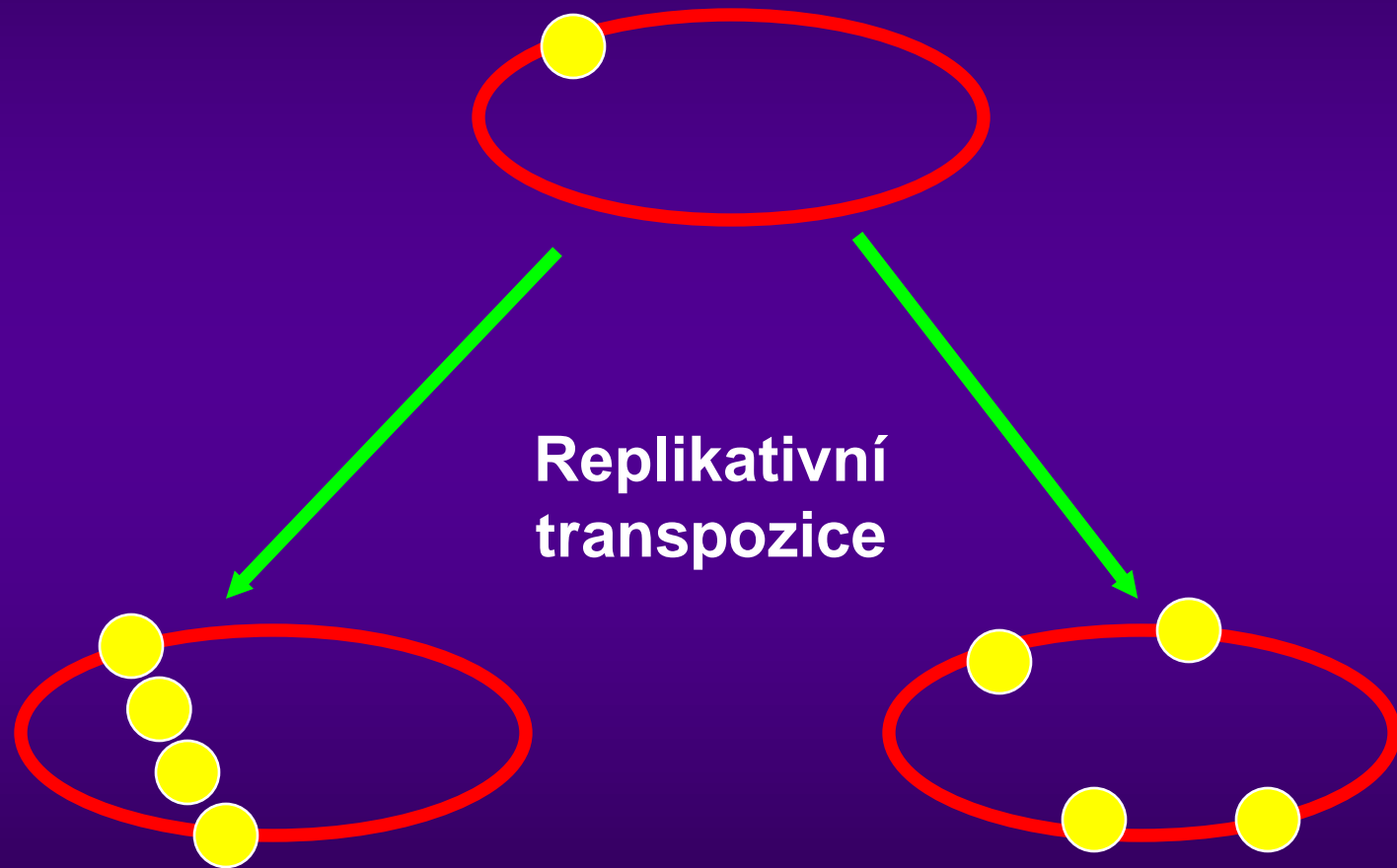
# *Inverzní PCR II*



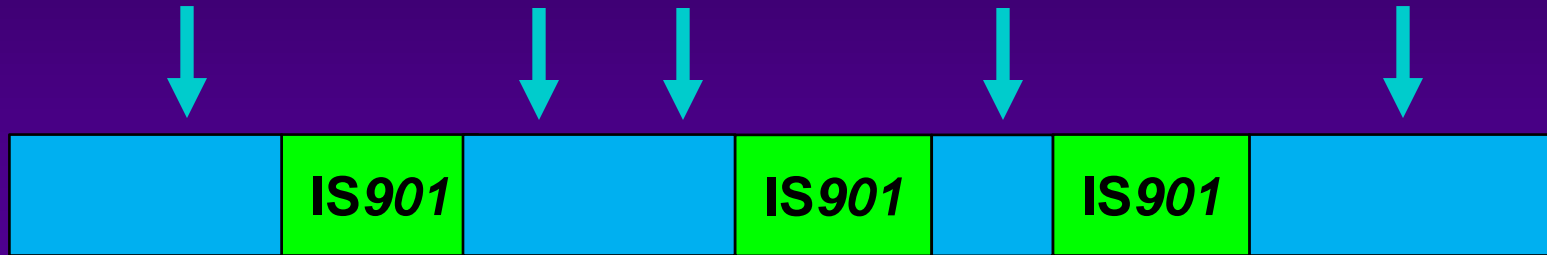
# ***Příklad aplikace inverzní PCR***

**Mapování pozic inzerční sekvence  
v genomu mykobakterií**

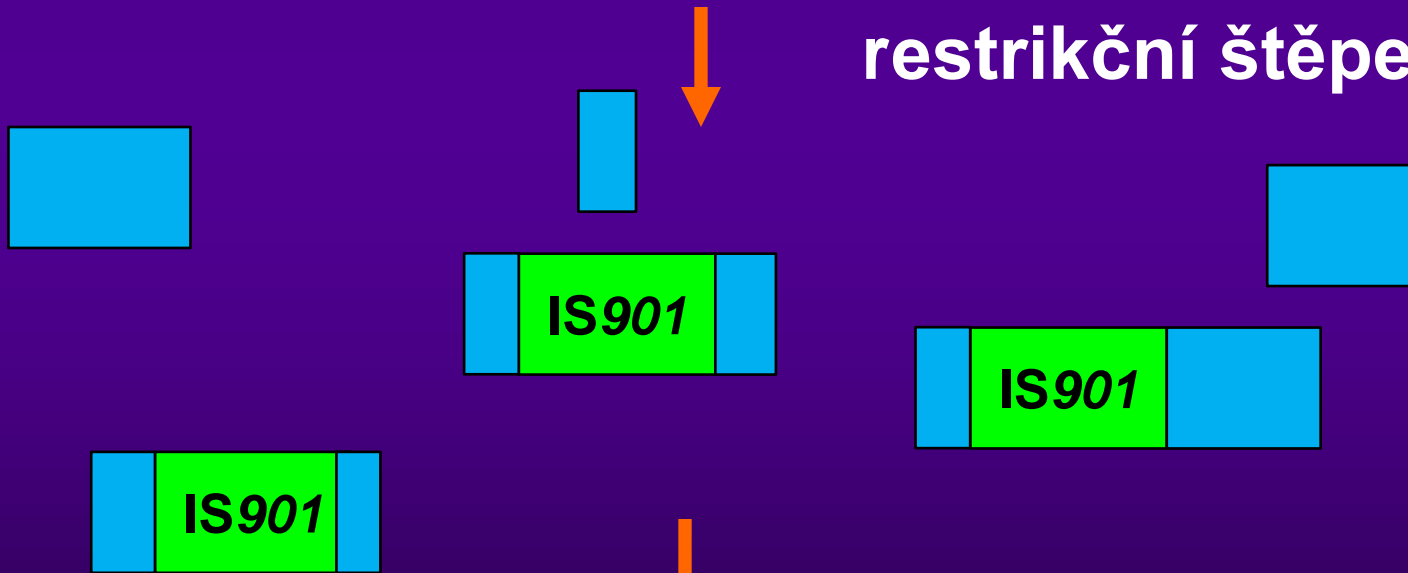
# *Inzerční sekvence IS901 u M. avium*



# Průběh inverzní PCR pro IS901



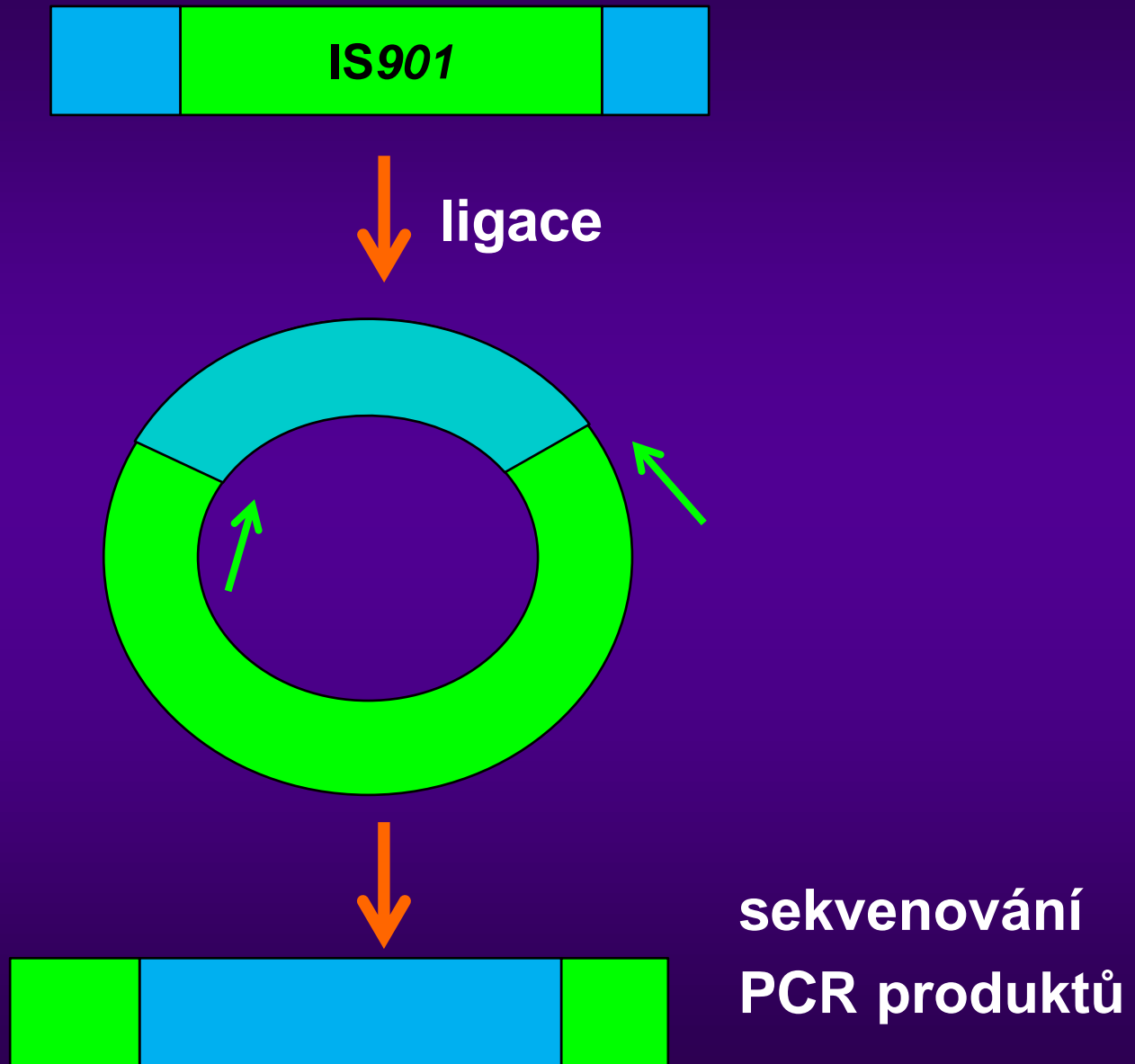
restrikční štěpení



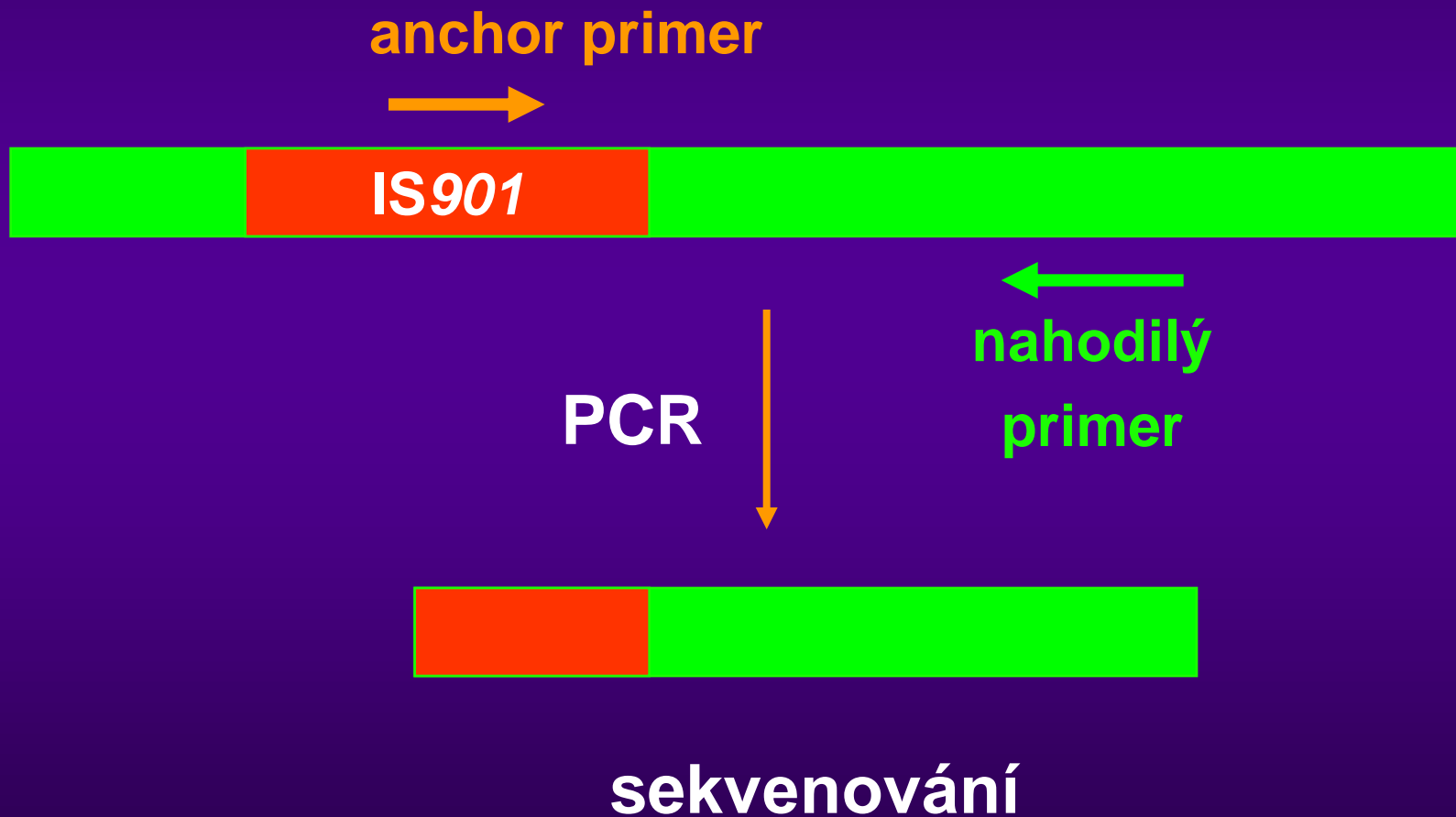
ligace



# Průběh inverzní PCR pro IS901



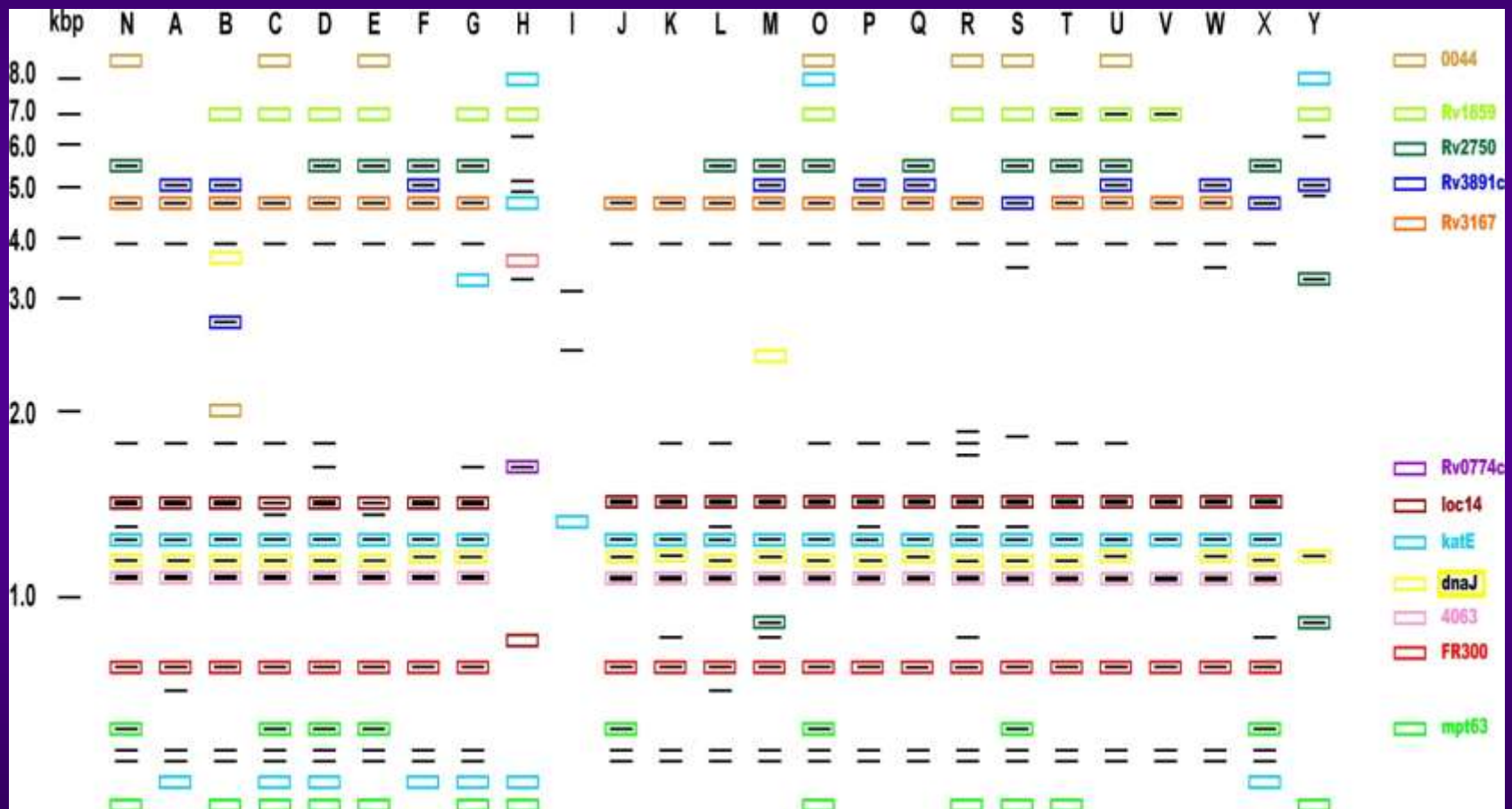
# Anchor (ukotvená PCR)



# ***Inzerční sekvence a fyziologie mykobakterií***

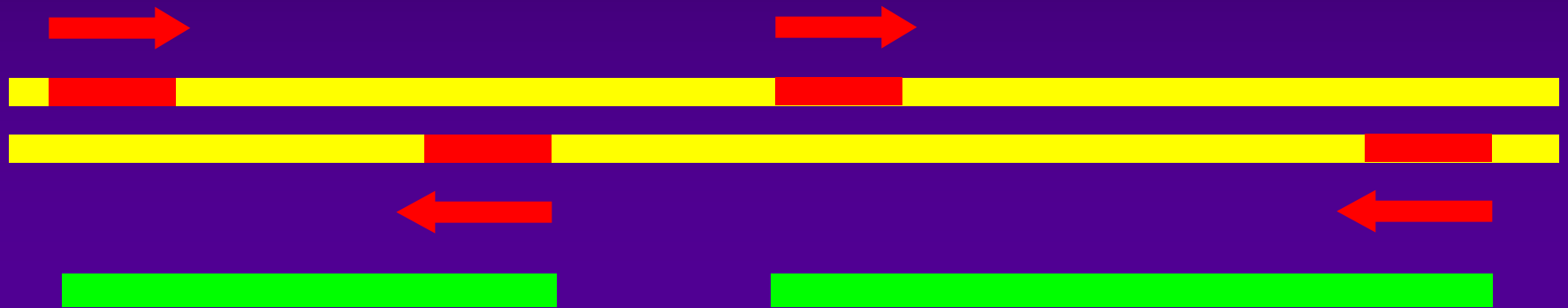
- identifikace 16 lokusů *MAA*, do kterých se začleňuje *IS901*
- fyzikální mapa pozic *IS901* u 25 izolátů *MAA* s definovanými RFLP profily
- identifikace inzerce *IS901* do promotoru genu *katE* – faktor virulence
- studium rezistence vybraných kmenů *MAA* k izonikotinhydrazidu

# Fyzikální mapa pozic IS901



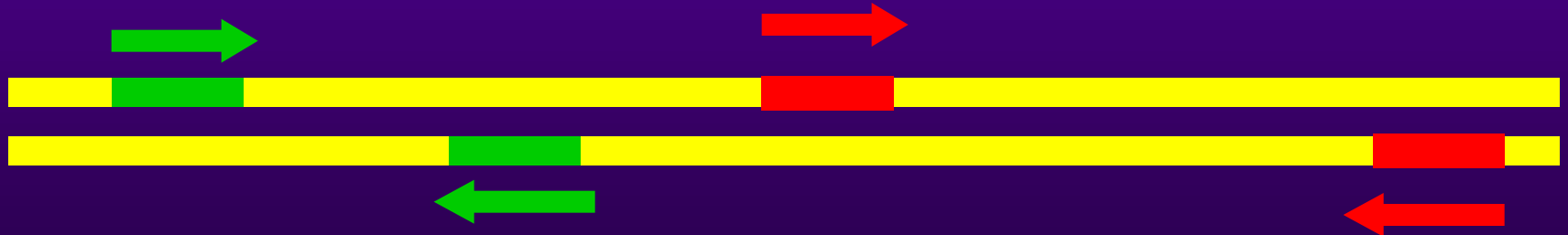
# Kompetitivní PCR

stejné primery, 2 matrice



kompetice o primery

různé primery, 2 matrice



kompetice o substrát a enzym

# RT - PCR

mRNA

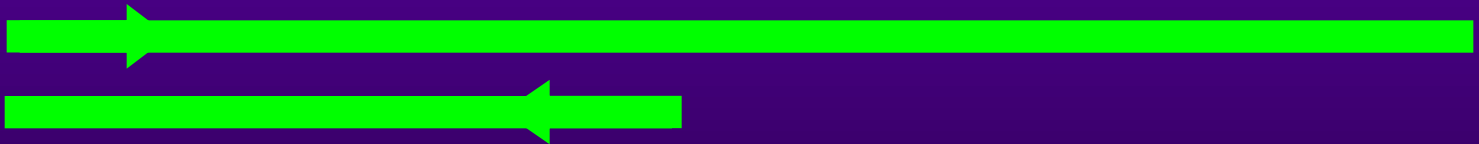


zpětná  
transkripce

ssDNA



PCR



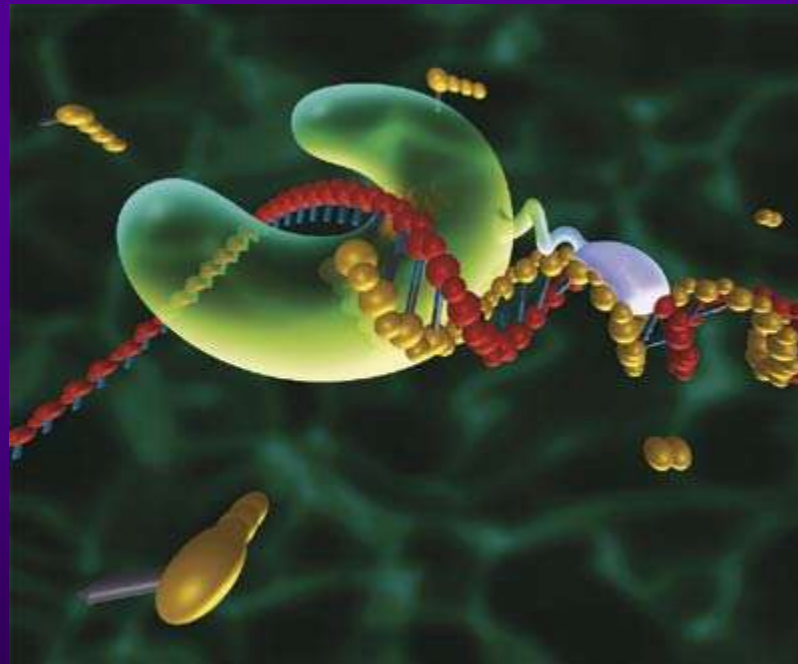
# Expresní PCR

- 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

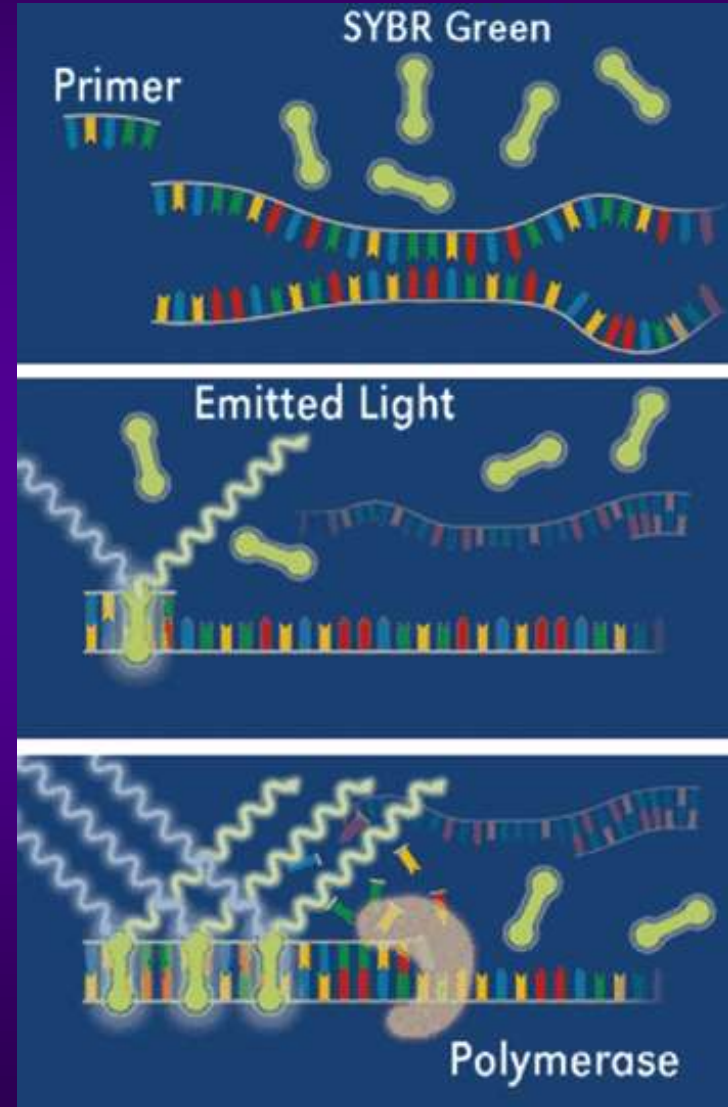
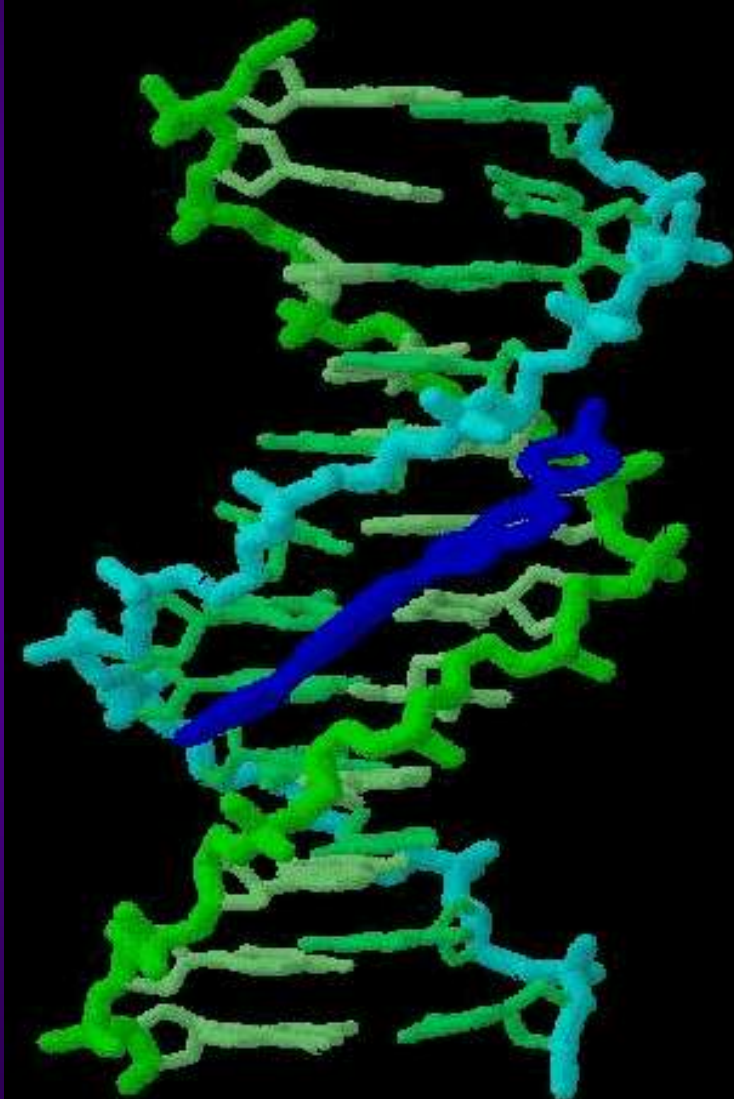
Navazují se na amplikony nebo jsou jimi značeny hybridizační sondy

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

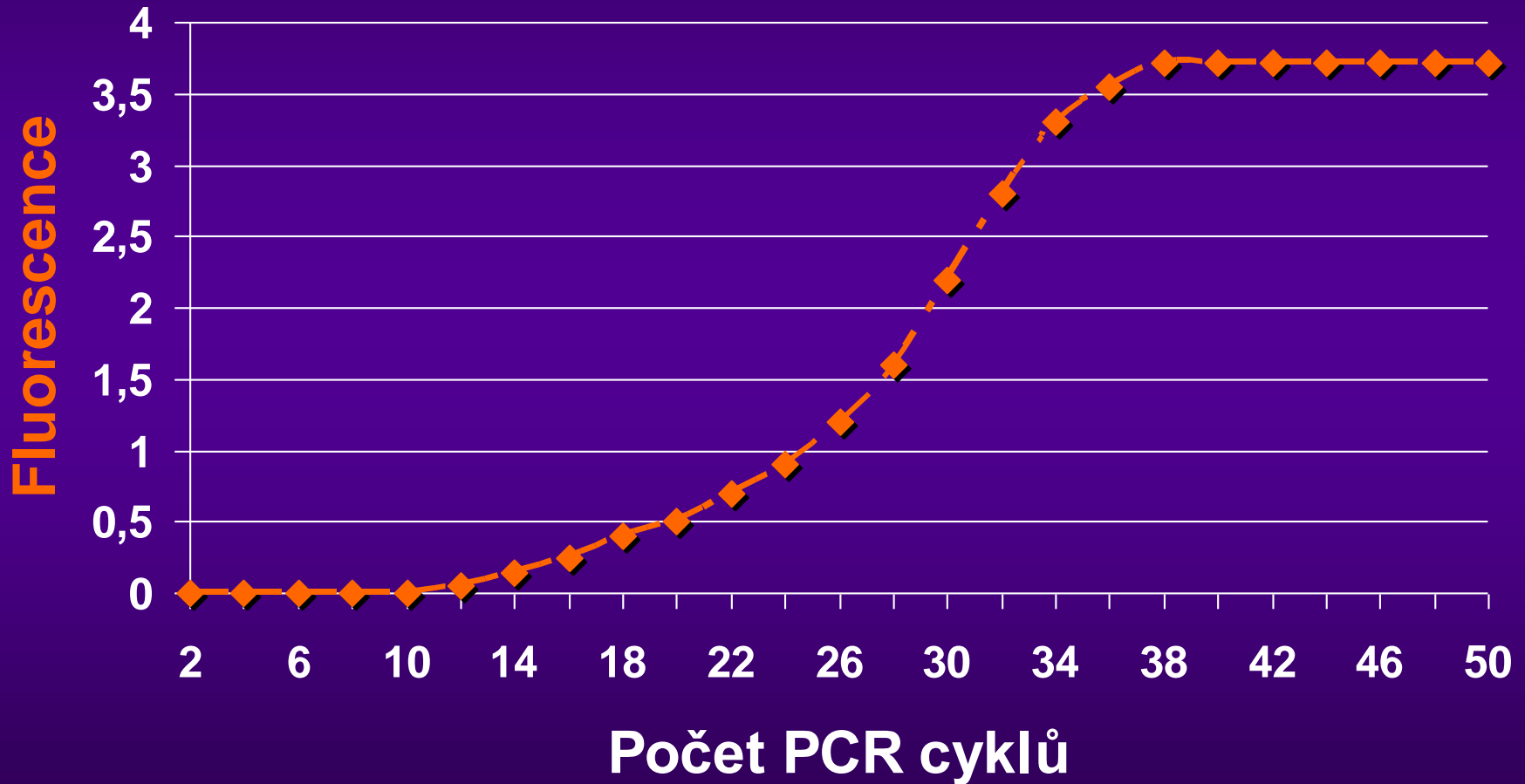
# Real-time PCR - formáty

- 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



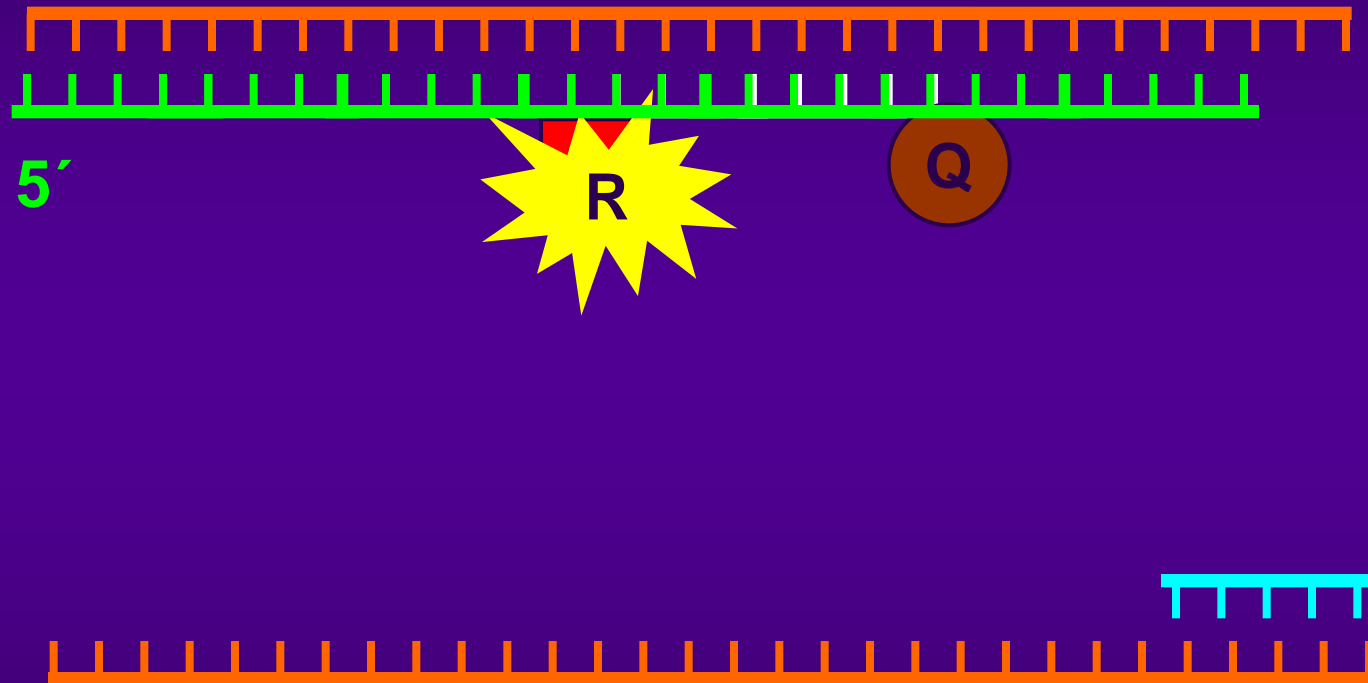
# Co se děje uvnitř termocykleru při real-time PCR?



# TaqMan

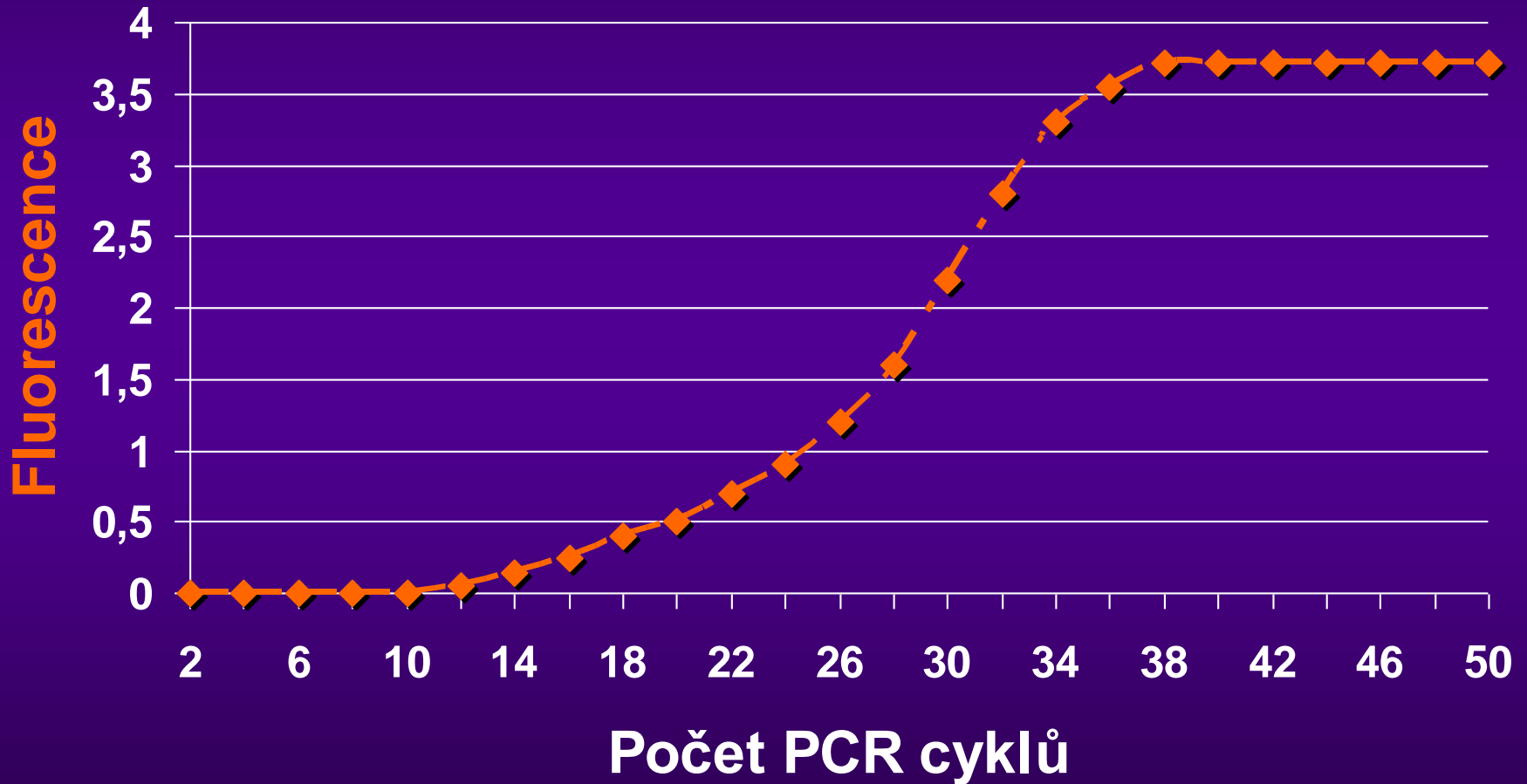
- **monitoruje 5' → 3' exonukleázový efekt Taq DNA polymerázy na vzniklý duplex mezi sondou a jejím komplementárním řetězcem na PCR produktu**
- **Taq DNA polymeráza uvolňuje a hydrolyzuje sondu hybridizovanou v průběhu syntézy správného řetězce na matrici DNA**
- **fluorofor s excitační energií (R)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

# TaqMan

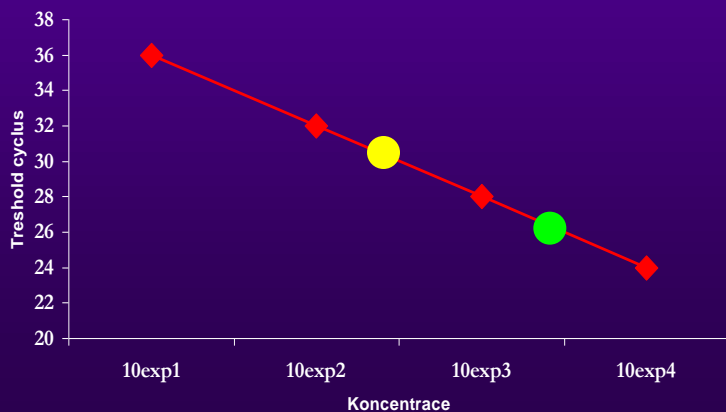
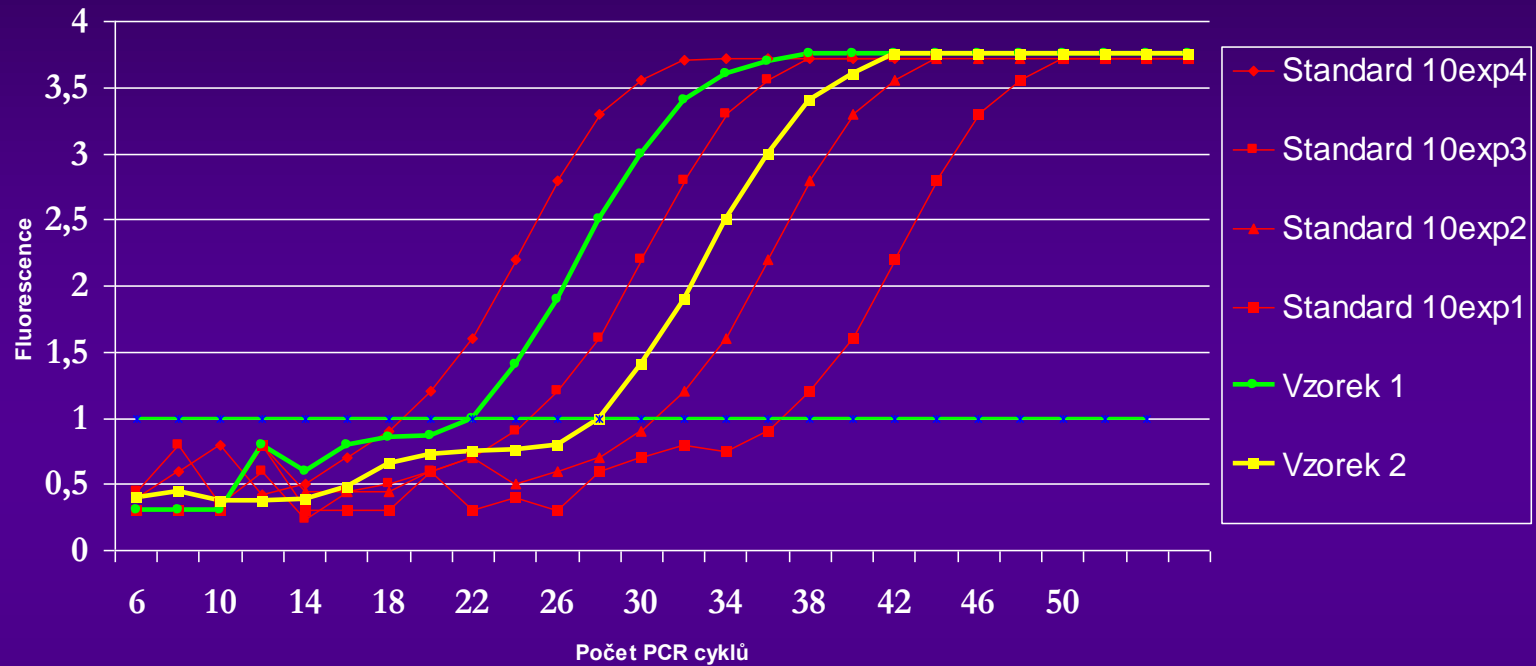




# Při jakémkoli formátu je výsledek pořád stejný



# 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

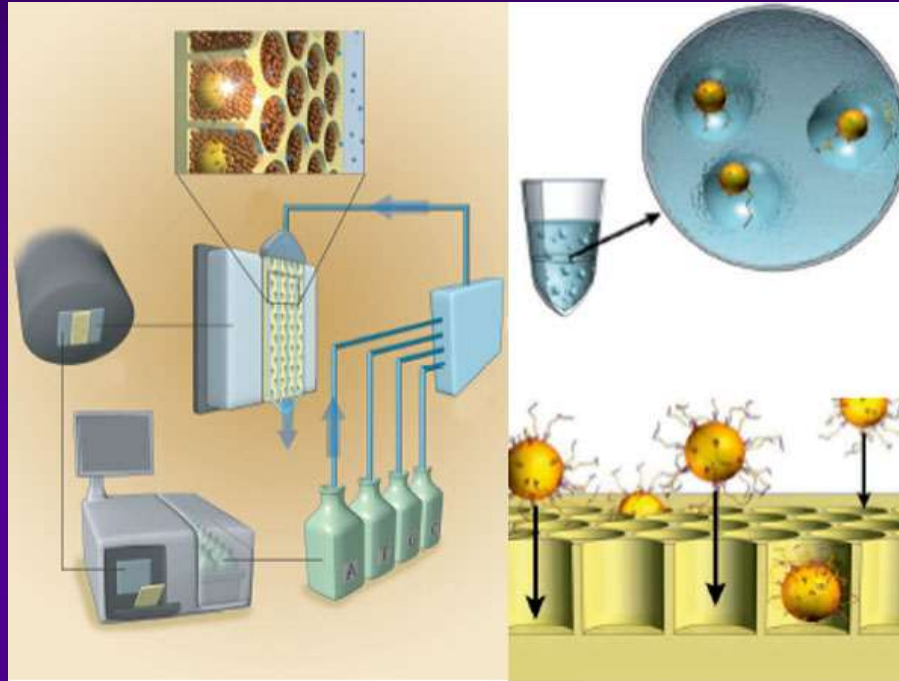


# Real-time v mikrobiologii

- 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

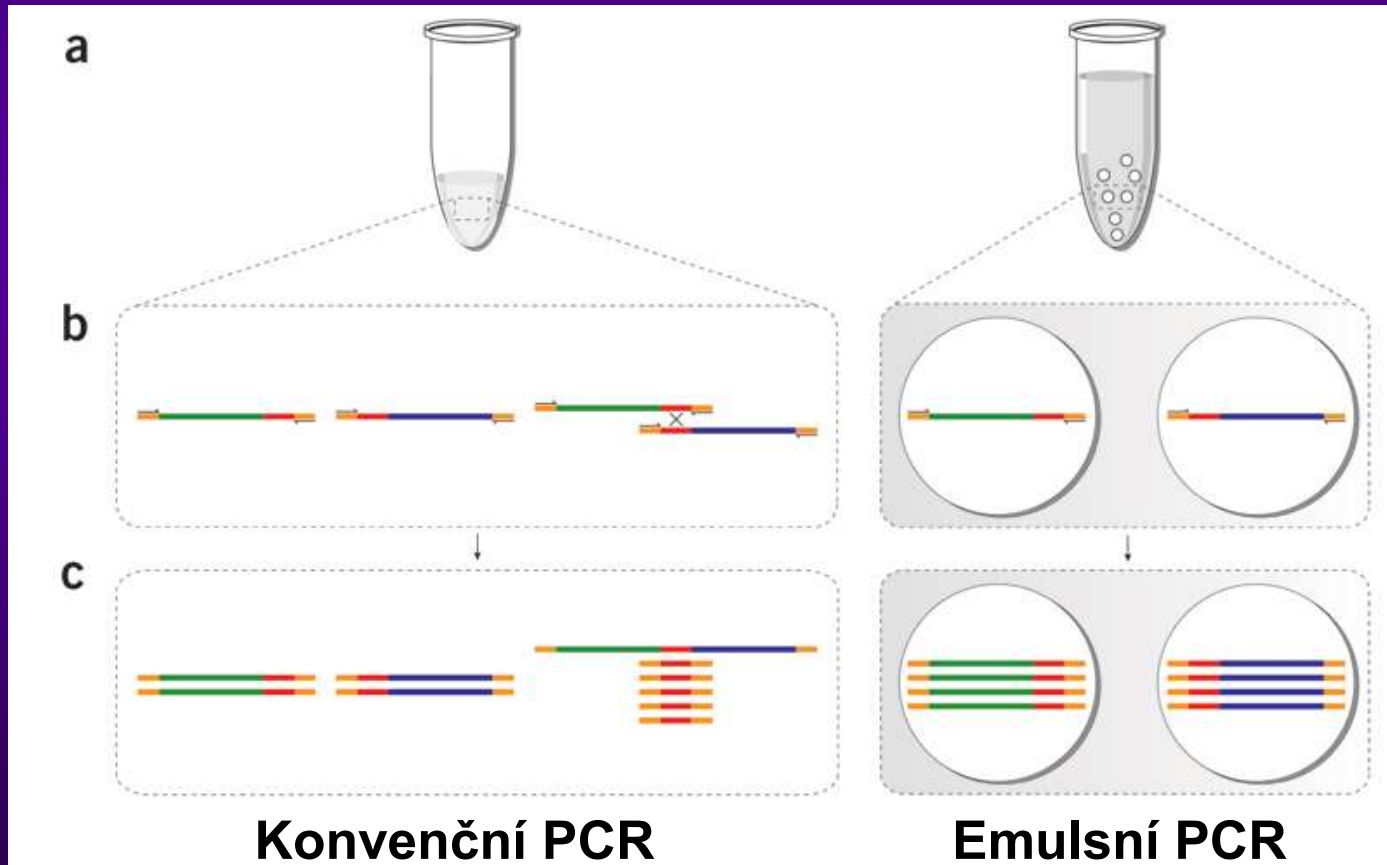
454 Life  
Sciences



- 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

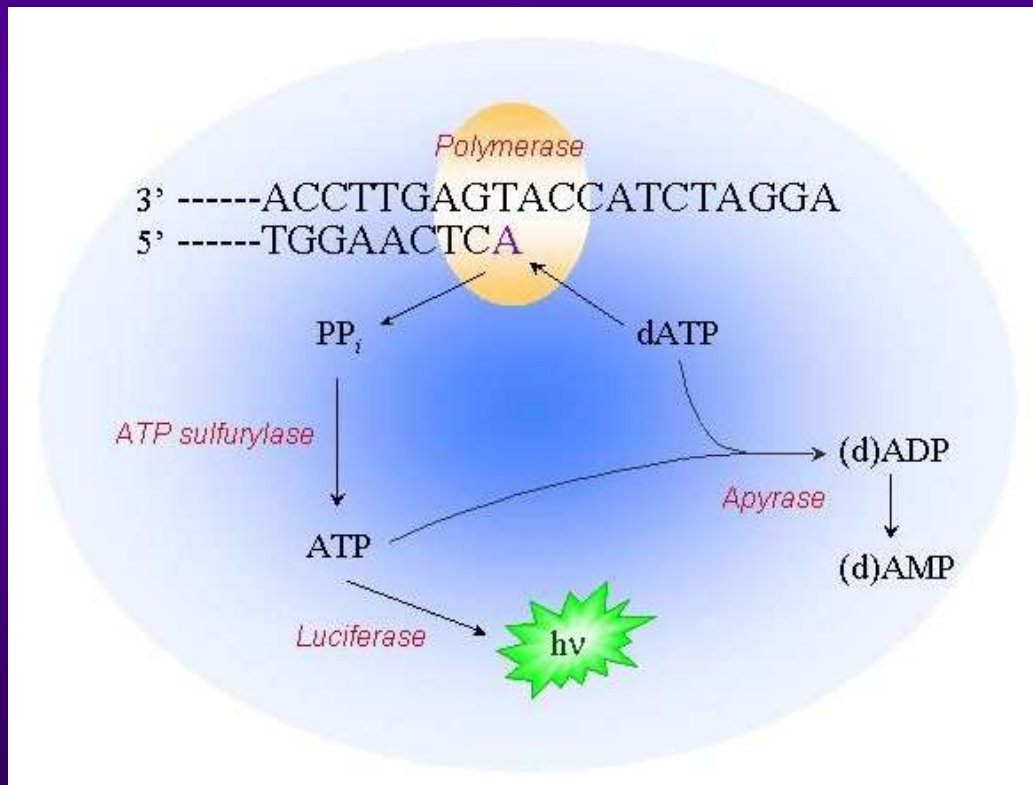


- bakterie v biofilmech
- mikroorganismy v potravinářských vzorcích
- nekultivovatelné bakterie

**Používá se ve spojení s pyrosekvenováním**

# Pyrosekvenování

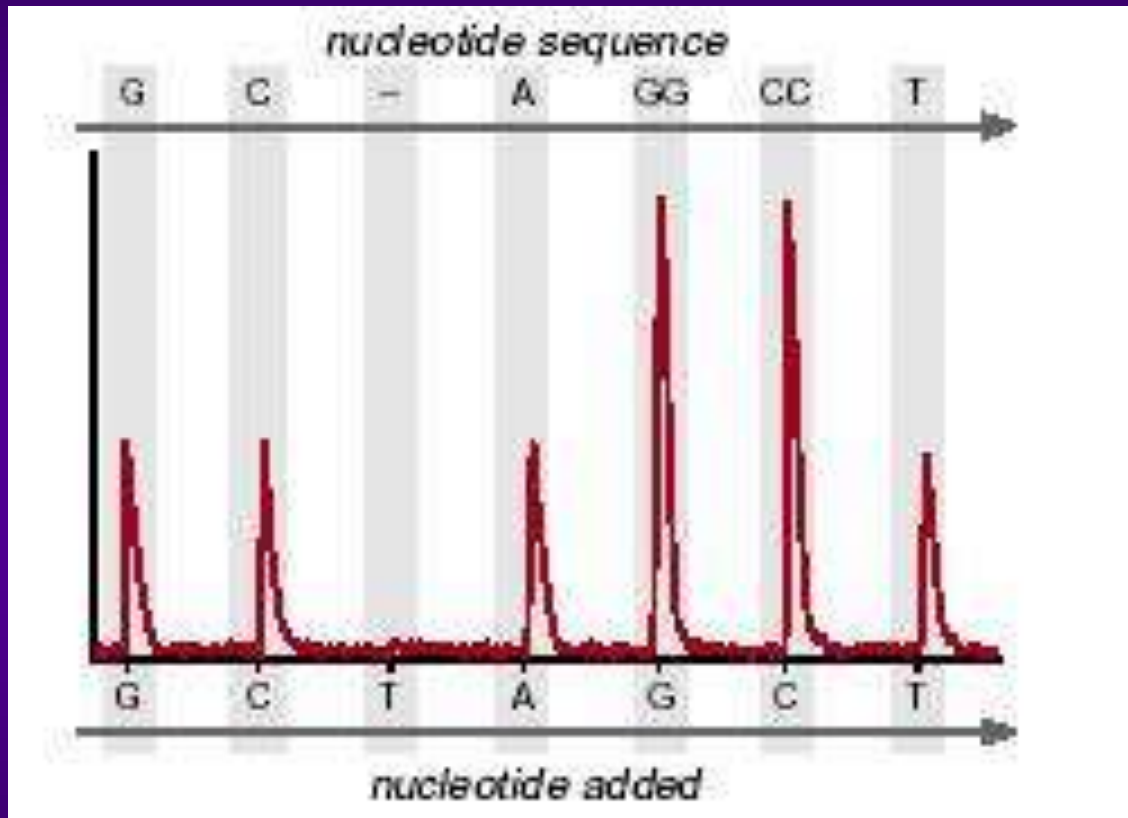
- Metoda popsaná Mostafa Ronaghi et al. v roce 1990
- Určena pro krátké úseky DNA, SNP a úseky methylované



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



# Pyrosekvenování - 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