

Téma 07_Molekulárně-biologické metody



Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU



NÁRODNÍ
PLÁN OBNOVY



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

Molekulárně-biologické metody pro diagnostiku mikroorganismů

```

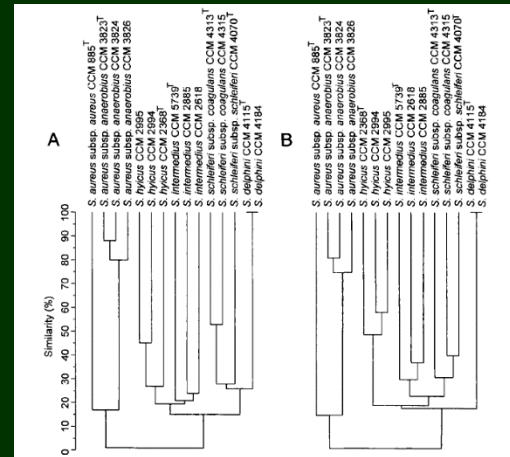
Human 1 GLECDGRTNLCCRQQFFIDFRLIGNDWIILAPIGYGNVCEGSCPAYLAGVPGASSPHT 60
Monkey 1 GLECDGRTNLCCRQQFFIDFRLIGNDWIILAPIGYGNVCEGSCPAYLAGVPGASSPHT 60
Pig 1 GLECDGRTNLCCRQQFFIDFRLIGNDWIILAPIGYGNVCEGSCPAYLAGVPGASSPHT 60
Cow 1 GLECDGRTNLCCRQQFFIDFRLIGNDWIILAPIGYGNVCEGSCPAYLAGVPGASSPHT 60
Rat 1 GLECDGRTNLCCRQQFFIDFRLIGNDWIILAPIGYGNVCEGSCPAYLAGVPGASSPHT 60
Mouse 1 GLECDGRTNLCCRQQFFIDFRLIGNDWIILAPIGYGNVCEGSCPAYLAGVPGASSPHT 60
    
```

```

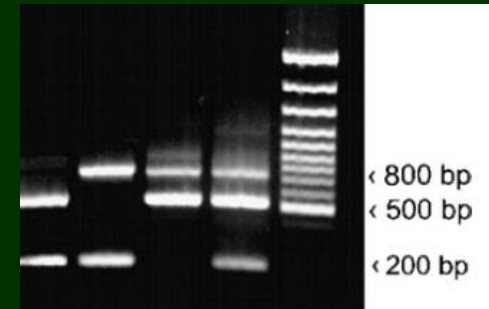
Human 61 AVVNQYRMRLNPGTVNSCCIPTKLSMSMLYFDDEYNIVKRDVPMIVRECCGA 115
Monkey 61 AVVNQYRMRLNPGTVNSCCIPTKLSMSMLYFDDEYNIVKRDVPMIVRECCGA 115
Pig 61 AVVNQYRMRLNPGTVNSCCIPTKLSMSMLYFDDEYNIVKRDVPMIVRECCGA 115
Cow 61 AVVNQYRMRLNPGTVNSCCIPTKLSMSMLYFDDEYNIVKRDVPMIVRECCGA 115
Rat 61 AVVNQYRMRLNPGTVNSCCIPTKLSMSMLYFDDEYNIVKRDVPMIVRECCGA 115
Mouse 61 AVVNQYRMRLNPGTVNSCCIPTKLSMSMLYFDDEYNIVKRDVPMIVRECCGA 115
    
```

znalost sekvence

PŘÍMÉ METODY



Předmětem analýzy je nukleová kyselina studovaného organismu (chromozomová, plazmidová, mobilní element...)



molekulární otisk (pattern, fingerprint)

NEPŘÍMÉ METODY

Molekulárně-biologické metody pro diagnostiku mikroorganismů

Bez amplifikace DNA
pomocí PCR

Na bázi amplifikace

Purifikace a separace nukleových kyselin

Purifikace NK chromatografií (afinitní, izolační kolony)

LYZE BUNĚK

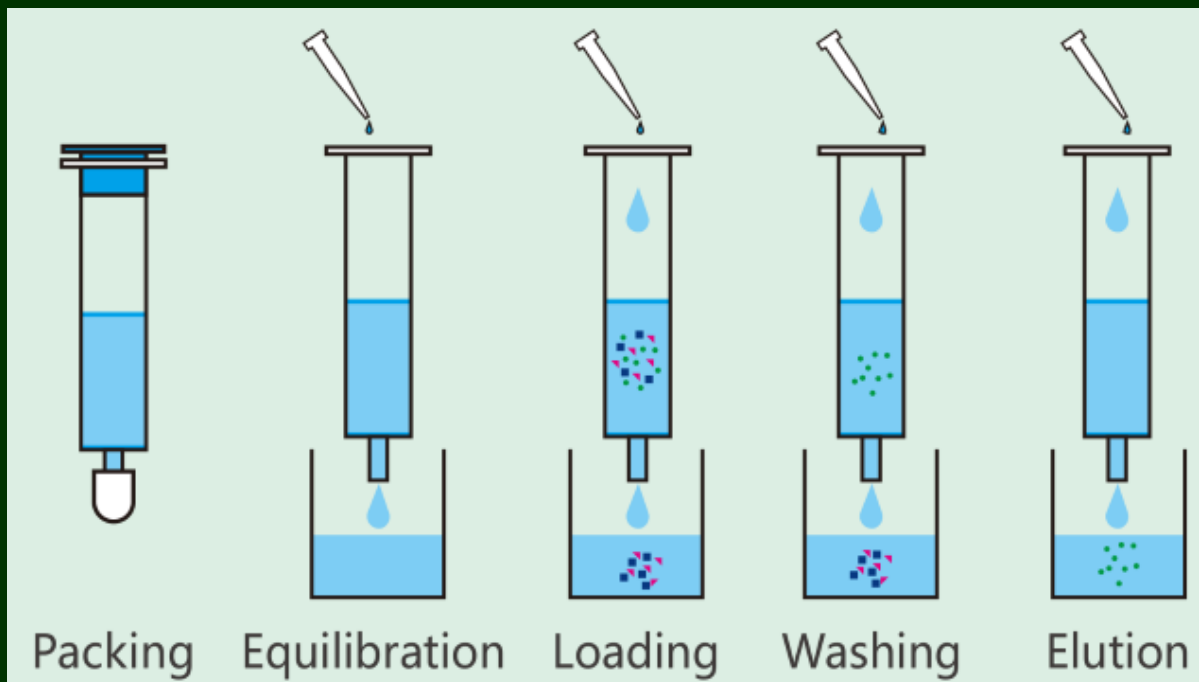
- u bakterií nutno degradovat BS pomocí **enzymů (lysozym)**
- **detergenty** k solubilizaci buněčné membrány (laurylsulfát sodný) a chelatační činidla (EDTA, vazba dvojmocných kationtů, destabilizace membrány, inhibice DNázy)
- u virů degradace částic detergenty, někdy purifikace virových částic gradientovou centrifugací

PŘEČIŠŤOVACÍ ENZYMY

- odstranění RNA z purifikované DNA: ribonukleázy (**RNázy**, stabilní při vysoké teplotě, možno zahřátím na 65 °C zbavit nežádoucích deoxyribonukleáz)
- odstranění DNA z purifikované RNA je obtížnější (**DNázy** bez RNázových aktivit, dnes komerčně dostupné)
- většinou však není přečištění třeba, stačí následné purifikační kroky
- odstranění proteinů: **proteináza K, pronáza E** (zde důležité, enzymy, vazba na NK, omezení dalších experimentů).

Afinitní kolony: interakce mezi makromolekulami vzorku a náplní kolony

- **elektrické interakce**
- **specifická interakce**: oligo-dT vzázané na zrnka nosiče a sekvence polyA na mRNA
- vždy vazba a odmytí nežádoucích molekul
- eluce: uvolnění makromolekul
- vysoký stupeň čistoty
- izolace DNA/RNA z různých materiálů
- často afinitní membrány místo klasických sloupcových nosičů



Starší (ale stále používané) techniky extrakce NK

EXTRAKCE SMĚSÍ FENOL-CHLOROFORM

- nemísí se s vodným prostředím, tvorba dvou fází
- po promíchání denaturace proteinů, precipitace, centrifugací koncentrujeme sraženinu do fázového rozhraní
- fenol ekvilibrovaný neutrálním/alkalickým pufrům: NK ve vodné fázi
- kyselý fenol: DNA v org. fázi, RNA ve vodné fázi (izolace RNA)

SRÁŽENÍ NUKLEOVÝCH KYSELIN ALKOHOLEM

- po extrakci fenolem je k dispozici vodný roztok NK, zbavený proteinů, ale příliš naředěný, stopy fenolu a chloroformu (tyto denaturují enzymy při další práci)
- **srážení (precipitace) alkoholem (etanol nebo izopropylalkohol)**
- za přítomnosti jednomocných iontů (Na^+ , K^+ , NH_4^+) agregace, cfg, sedimentace
- snížení teploty $-70\text{ }^\circ\text{C}$, přidavek solí – srážení NK
- srážení DNA (bez RNA) – provést při RT
- odsolení promytím 70% alkoholem, po odpaření rozpustit DNA ve vodném roztoku s TrisHCl, inhibitory nukleáz, EDTA
- uchování izolované DNA při $4\text{ }^\circ\text{C}$, zmražení láme DNA

ALKALICKÁ DENATURACE

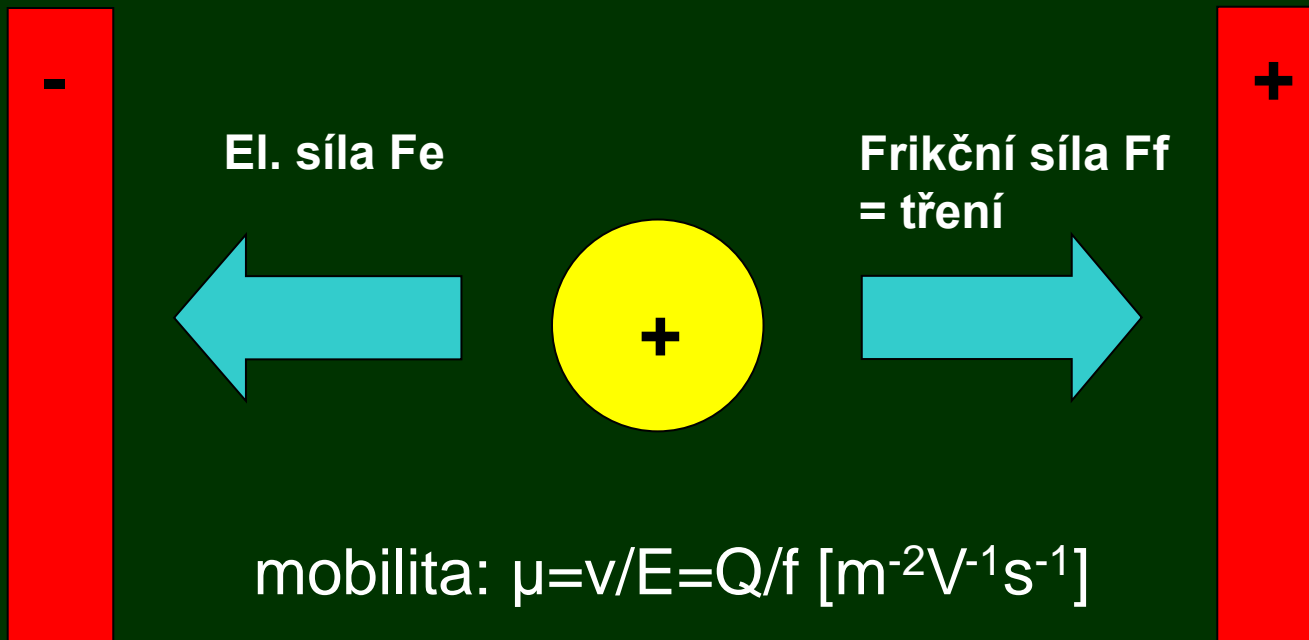
- pro oddělení plasmidů od chromozomové DNA
- chromozomální DNA je v extraktech přítomna ve formě lineárních fragmentů
- zvýšení pH (12): přerušování vodíkových vazeb, denaturace DNA
- při snížení pH: nedochází k rychlé obnově struktury, agregace v přítomnosti SDS (součást lyz. pufru a octanu draselného) do nerozpustné hmoty, která může být odstraněna cfg
- plasmidová DNA v nadšroubovicové formě, při vysokém pH také přerušování vazeb, ale řetězce nelze fyzicky oddělit, snížení pH obnovuje původní strukturu
- plasmidová DNA zůstává tedy v roztoku a je dostatečně čistá
- v případě potřeby dalšího přečištění: přesrážení octanem amonným a izopropanolem, afinitní chromatografie, nebo cfg v CsCl s etidium bromidem

CENTRIFUGACE (v diagnostice se příliš nepoužívají)

- diferenciální cfg
- zonální cfg
- izopyknická cfg

Elektroforéza nukleových kyselin

Separace nabitých látek ve stejnosměrném elektrickém poli



Elektroforéza

Dělení nabitých částic na základě rozdílných mobilit

Volná

**Separace probíhá
volně v elektrolytu**

Zónová

Stabilizující prostředí

- rotace
- gradienty hustoty
- porézní médium
- kapilára

Porézní média

homogenita

inertnost

reprodukovatelnost

snadná příprava

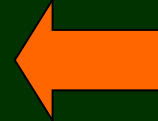
mechanická pevnost

transparentnost

Porézní média

chromatografický papír

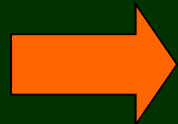
agar, agaróza



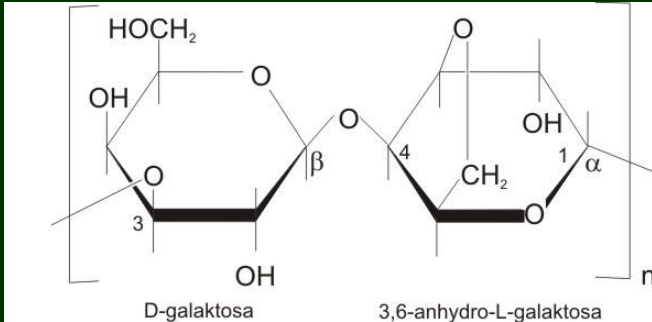
acetát celulózy

škrob (hydrolyzovaný)

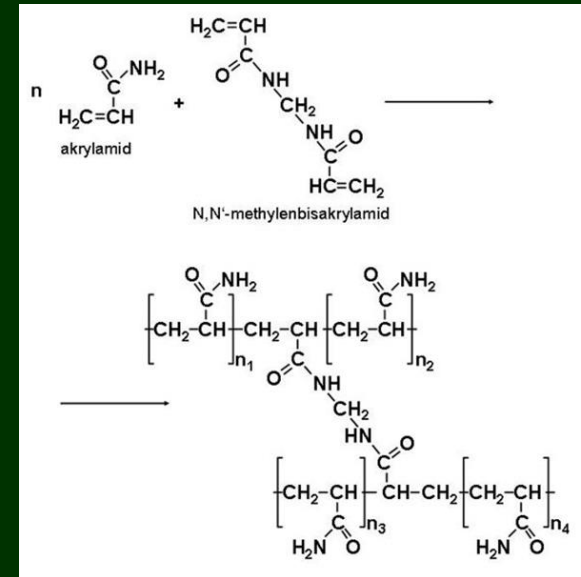
sypané (nalévané) vrstvy (Sephadex)



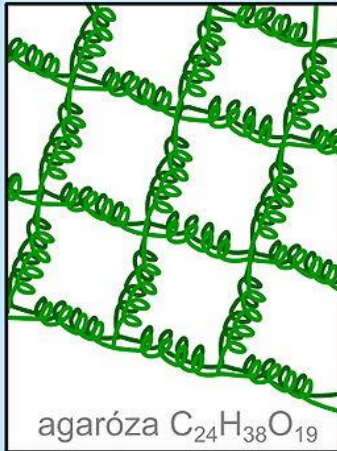
polyakrylamid



od 100 bp do 50 kb

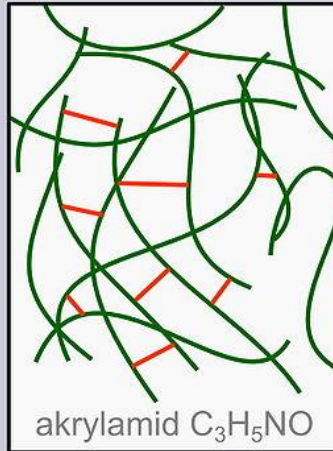


agarózový gel



Agarózový gel tvoří **nekovalentní** vodíkové můstky a hydrofóbní vazby mezi dlouhými cukernými řetězci.

akrylamidový gel



Akrylamidový gel tvoří kovalentní **příčné** vazby mezi dlouhými řetězci.

10 až 1000 bp

Elektroforetická pohyblivost: rychlost pohybu DNA v gelu, je nepřímo úměrná logaritmu jejich velikostí

Standardy velikostí, hmotnostní standardy

Vizualizace: ethidiumbromid nebo jiná komerční barviva, např. fluoresceční kyaninová barviva označovaná SYBR

Na polyakrylamidovém gelu: barvení stříbrem

Radioaktivně značené molekuly: autoradiogram

Pulsní gelová elektroforéza

- pro dělení DNA molekul nad 50 kb
- gel je vystaven el. poli, jehož směr se pod určitým úhlem (90-180°) v časových intervalech periodicky mění.
- reorientace – reorientační čas
- větší molekuly: vyšší reorientační čas, menší molekuly: nižší reorientační čas
- separace intaktních molekul DNA (např. chromozomů bakterií, kvasinek), restričních fragmentů DNA o velikosti desítek kilobází až několika megabází.
- molekuly DNA pro PFGE analýzu nutno izolovat speciálním postupem (ne fenolová extrakce/adsorbce na chromatografických kolonkách)
- hmotnostní standardy: konkatemery plazmidů, konkatemery DNA fága lambda, makrorestriční fragmenty bakteriálních genomů, chromozomy kvasinek a jiných organismů

Pulsní gelová elektroforéza

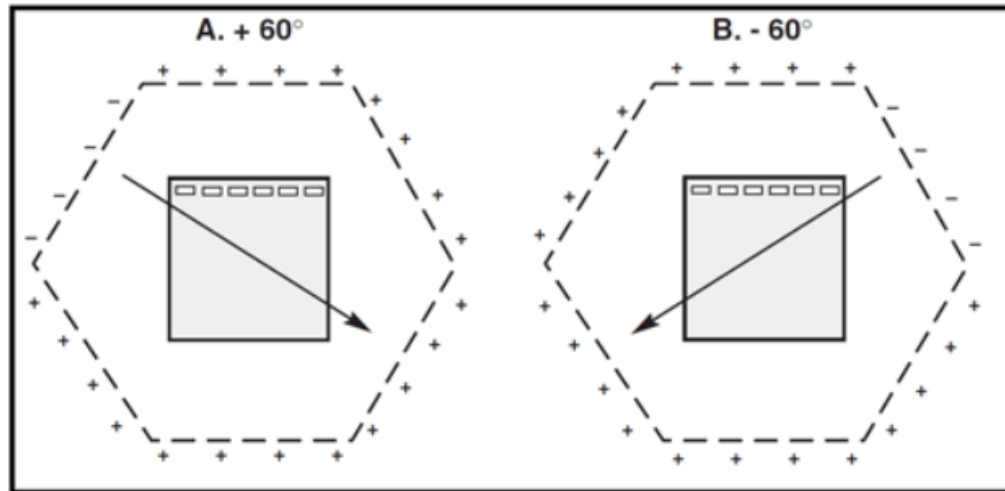


Fig 1a. Voltage clamping by the CHEF Mapper system (Bio-Rad). A. Relative electrode potentials when the $+60^\circ$ field angle is activated. B. Relative electrode potentials when the -60° field angle is activated.

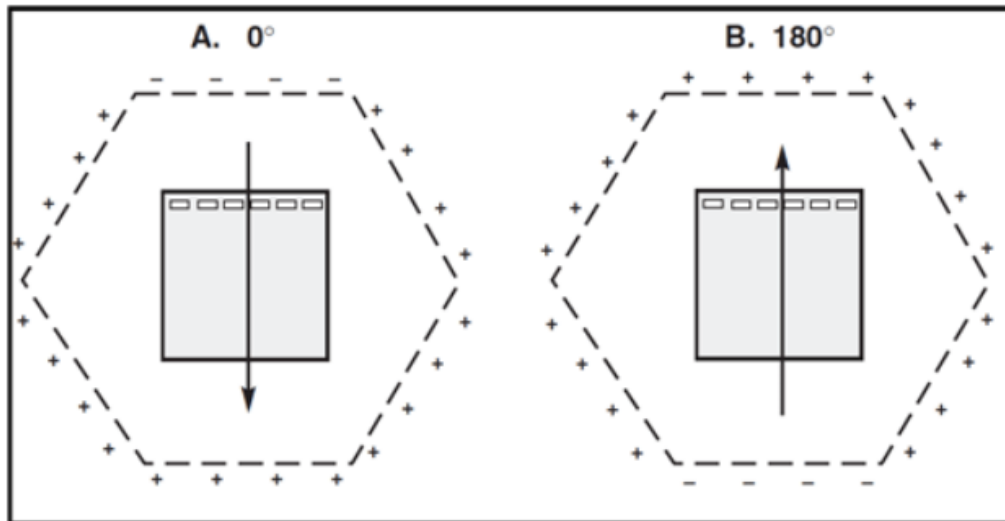
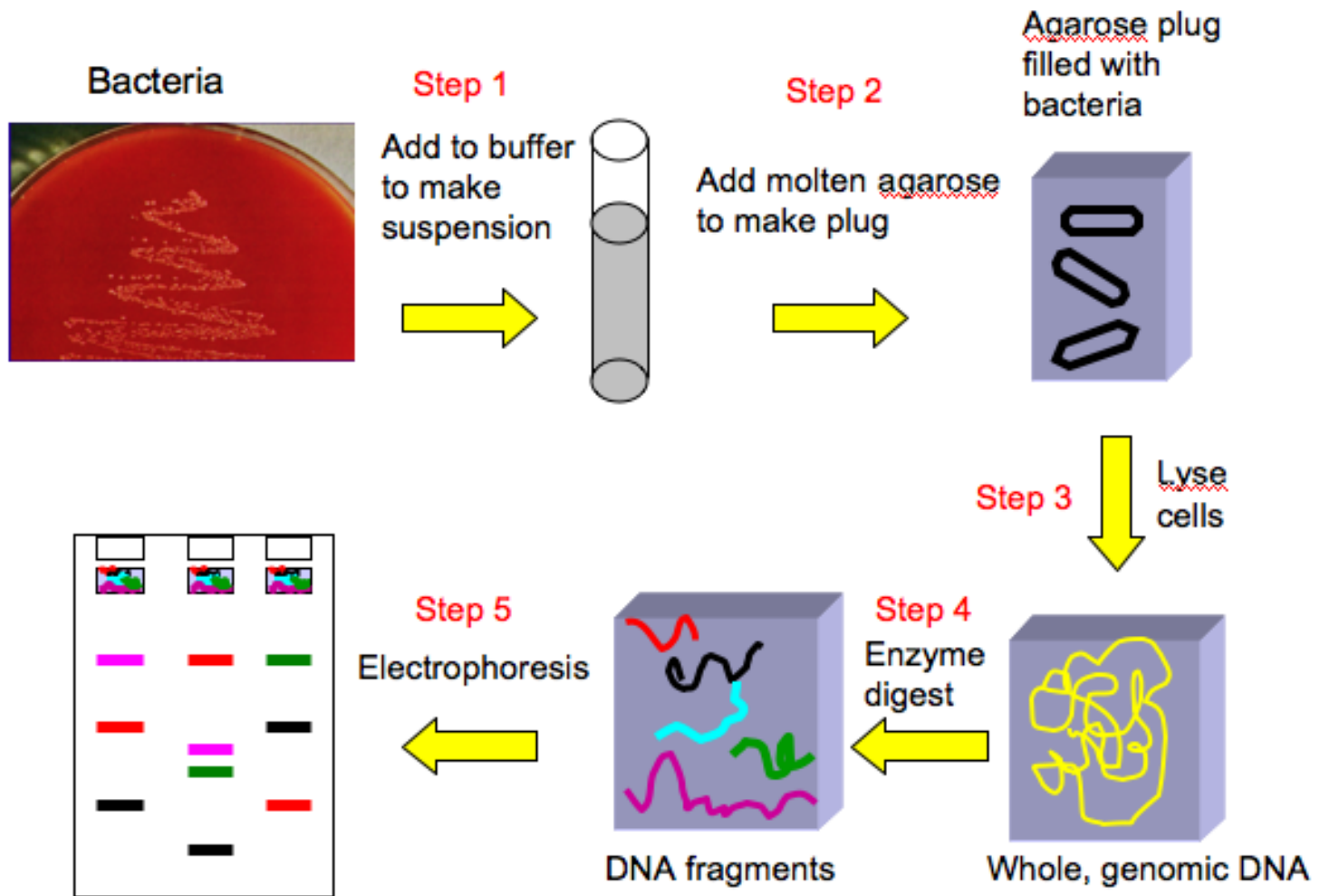


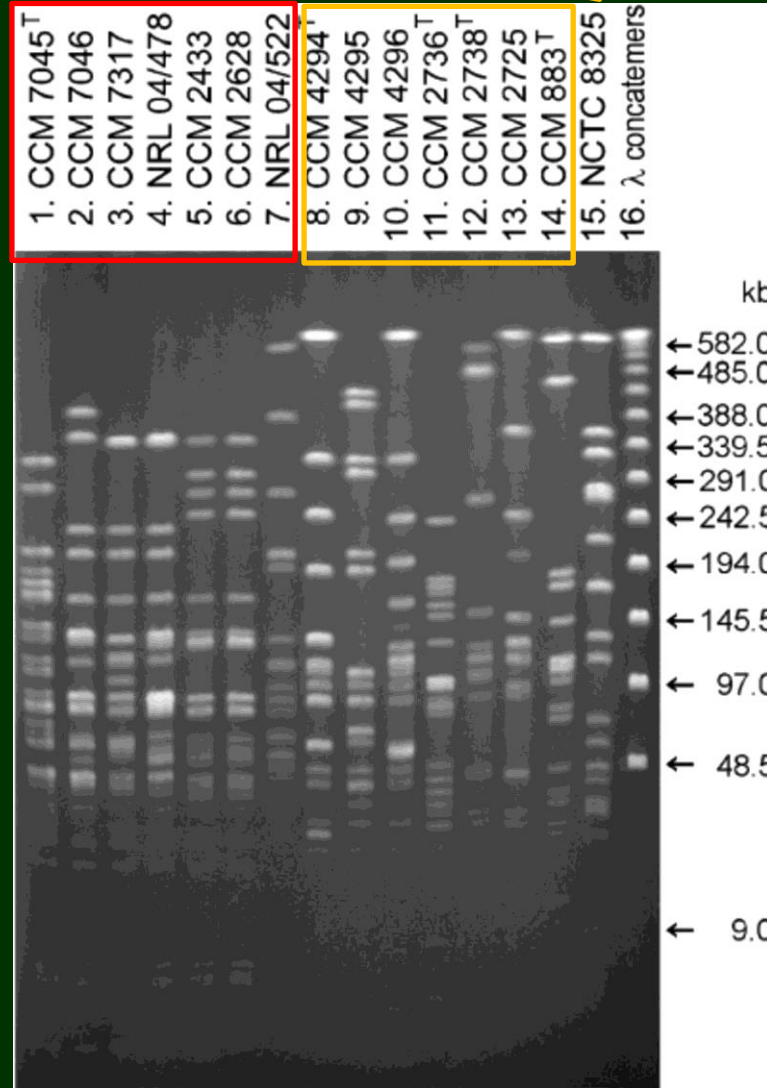
Fig 1b. Voltage clamping by the CHEF Mapper system (Bio-Rad) in the FIGE mode. A. Relative electrode potentials when the 0° field vector is activated. B. Relative electrode potentials when the 180° field vector is activated.

Izolace DNA pro PFGE analýzu

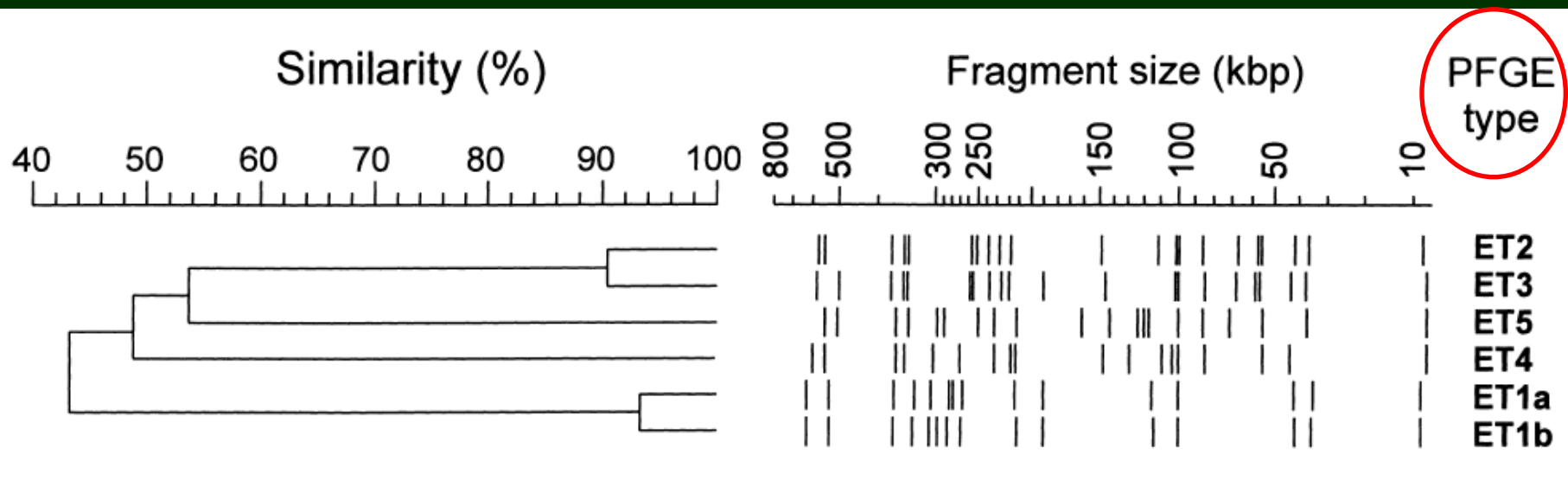


S. nepalensis

referenční kmeny



PFGE genomové DNA různých kmenů stafylokoků
restriktivně štěpených pomocí *Sma*I



Dendrogram znázorňující stupeň podobnosti genomové DNA u 16ET-pozitivních stafylokoků. DNA byla naštěpena pomocí *Sma*I a restriční fragmenty byly rozděleny pomocí PFGE.

Restrikční analýza

- typizační metoda založená na detekci polymorfismů v restrikčních místech
- RESTRIKČNÍ ENDONUKLEÁZY: sekvenčně specifické endonukleázy, produkované většinou bakteriálních druhů
- souvislost s RM systémem, degradace cizorodé (nemetylované) DNA, např. fágové
- restrikční místo (místo štěpení): uvnitř rozpoznávacího místa nebo těsně vedle
- hydrolýza fosfodiesterových vazeb
- produkce tzv. restrikčních fragmentů
 - - tupé (zarovnané) konce
 - - 5'-jednořetězcové přesahující konce
 - - 3'-jednořetězcové přesahující konce
- nejvýznamnější restrikční endonukleázy II. třídy
- známo kolem 4000 RE II. třídy, rozpoznávání 160 sekvencí
- enzymy rozpoznávající stejná místa: izoschizomery
- názvy odvozeny od kmene nebo sérotypu (*EcoRI*: *E. coli* RY13)
- relaxovaná specifita (za určitých podmínek štěpí blízké příbuzné sekvence: *EcoRI* GATTC, GGATTC, GGATTT, AGATTT)
- citlivost k metylaci bazí, izoschizomery lišící se citlivostí k methylaci: studium metylace

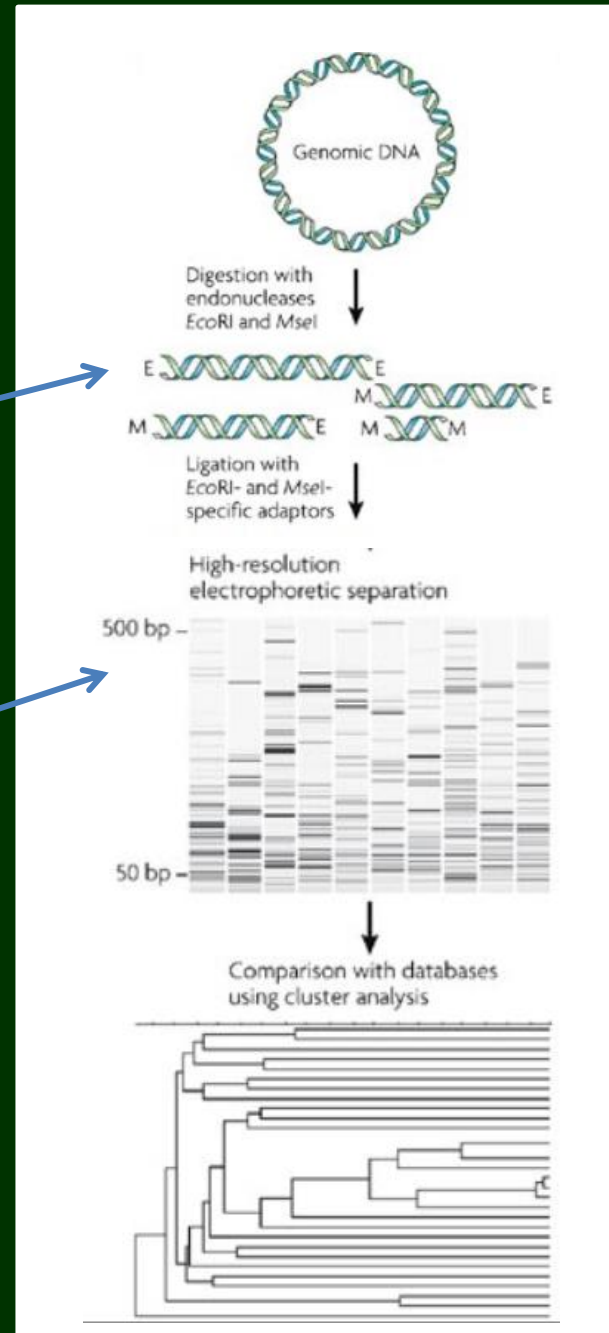
Enzyme	Source	Recognition Sequence	Cut
<u>EcoRI</u>	<u>Escherichia coli</u>	5' GAATTC 3' CTTAAG	5' ----G AATC---3' 3' ----CTTAA G---5'
<u>EcoRII</u>	<u>Escherichia coli</u>	5' CCWGG 3' GGWCC	5' ---- CCWGG---3' 3' ----GGWCC ---5'
<u>BamHI</u>	<u>Bacillus amyloliquefaciens</u>	5' GGATCC 3' CCTAGG	5' ----G GATCC---3' 3' ----CCTAG G---5'
<u>HindIII</u>	<u>Haemophilus influenzae</u>	5' AAGCTT 3' TTCGAA	5' ----A AGCTT---3' 3' ----TTCGA A---5'
<u>TaqI</u>	<u>Thermus aquaticus</u>	5' TCGA 3' AGCT	5' ----T CGA---3' 3' ----AGC T---5'
<u>NotI</u>	<u>Nocardia otitidis</u>	5' GCGGCCGC 3' CGCCGGCG	5' ----GC GGCCGC---3' 3' ----CGCCGG CG---5'
<u>HinFI:"Hin"FI</u>	<u>Haemophilus influenzae</u>	5' GANTC 3' CTNAG	5' ----G ANTC---3' 3' ----CTNA G---5'
<u>Sau3AI</u>	<u>Staphylococcus aureus</u>	5' GATC 3' CTAG	5' ---- GATC---3' 3' ----CTAG ---5'
<u>PvuII*</u>	<u>Proteus vulgaris</u>	5' CAGCTG 3' GTCGAC	5' ----CAG CTG---3' 3' ----GTC GAC---5'
<u>SmaI*</u>	<u>Serratia marcescens</u>	5' CCCGGG 3' GGGCCC	5' ----CCC GGG---3' 3' ----GGG CCC---5'
<u>HaeIII*</u>	<u>Haemophilus aegyptius</u>	5' GGCC 3' CCGG	5' ----GG CC---3' 3' ----CC GG---5'
<u>HgaI^[67]</u>	<u>Haemophilus gallinarum</u>	5' GACGC 3' CTGCG	5' ----NN NN---3' 3' ----NN NN---5'
<u>AluI*</u>	<u>Arthrobacter luteus</u>	5' AGCT 3' TCGA	5' ----AG CT---3' 3' ----TC GA---5'
<u>EcoRV*</u>	<u>Escherichia coli</u>	5' GATATC 3' CTATAG	5' ----GAT ATC---3' 3' ----CTA TAG---5'
<u>EcoP15I</u>	<u>Escherichia coli</u>	5' CAGCAGN ₂₅ NN 3' GTCGTCN ₂₅ NN	5' ----CAGCAGN ₂₅ NN--- 3' ----GTCGTCN ₂₅ NN --- 5'
<u>KpnI^[68]</u>	<u>Klebsiella pneumoniae</u>	5' GGTACC 3' CCATGG	5' ----GGTAC C---3' 3' ----C CATGG---5'
<u>PstI^[68]</u>	<u>Providencia stuartii</u>	5' CTGCAG 3' GACGTC	5' ----CTGCA G---3' 3' ----G ACGTC---5'
<u>SacI^[68]</u>	<u>Streptomyces achromogenes</u>	5' GAGCTC 3' CTCGAG	5' ----GAGCT C---3' 3' ----C TCGAG---5'
<u>SalI^[68]</u>	<u>Streptomyces albus</u>	5' GTCGAC 3' CAGCTG	5' ----G TCGAC---3' 3' ----CAGCT G---5'
<u>ScaI*^[68]</u>	<u>Streptomyces caespitosus</u>	5' AGTACT 3' TCATGA	5' ----AGT ACT---3' 3' ----TCA TGA---5'
<u>SpeI</u>	<u>Sphaerotilus natans</u>	5' ACTAGT 3' TGATCA	5' ----A CTAGT---3' 3' ----TGATC A---5'

Restrikční analýza: obecné schéma

restrikční fragmenty

2 přístupy pro redukci počtu
restrikčních fragmentů:

- southern blot + hybridizace
- štěpení vzácně štěpicími endonukleázami
- spojení s PCR – tzv. PCR-RFLP



izolace DNA

štěpení RE

PFGE

klasifikace/
typizace

Polymorfismus délky restričních fragmentů (RFLP)

Rozdíly podmíněné **různou délkou a počtem restričních fragmentů** vytvořených štěpením genomové DNA (nebo její části) restriční endonukleázou.

Podstatou jsou **mutace vedoucí k vytvoření nebo ztrátě restričních míst**, nebo vznikají jako důsledek přítomnosti **různého počtu repetitivních sekvencí, delecí, inzercí jiných nebo přestaveb DNA**

Rozdíly ve velikosti restričních fragmentů lze detekovat pomocí PFGE, někdy doplněnou Southernovou hybridizací.

Selektivní hybridizace: snížení počtu srovnávaných fragmentů

Selektivní hybridizace (u prokaryot):

- sondy připravené z **náhodně vybraných sekvencí**
- sondy specifické pro **esenciální geny nebo geny kódující faktory virulence u patogenů**
- sondy odvozené z **inzerčních sekvencí, transpozonů, repeticí**
- sondy připravené z genů pro **16s rRNA nebo 23S rRNA (ribotypizace)**

Restrikční vzory různých bakteriálních druhů získaných štěpením genomové DNA pomocí *SmaI*, *NotI*, *ApaI* a *XbaI*. Získané restrikční fragmenty byly rozděleny pomocí pulzní gelové elektroforézy. Použity různé pulzní časy a různé „running časy“ – odlišné restrikční vzory

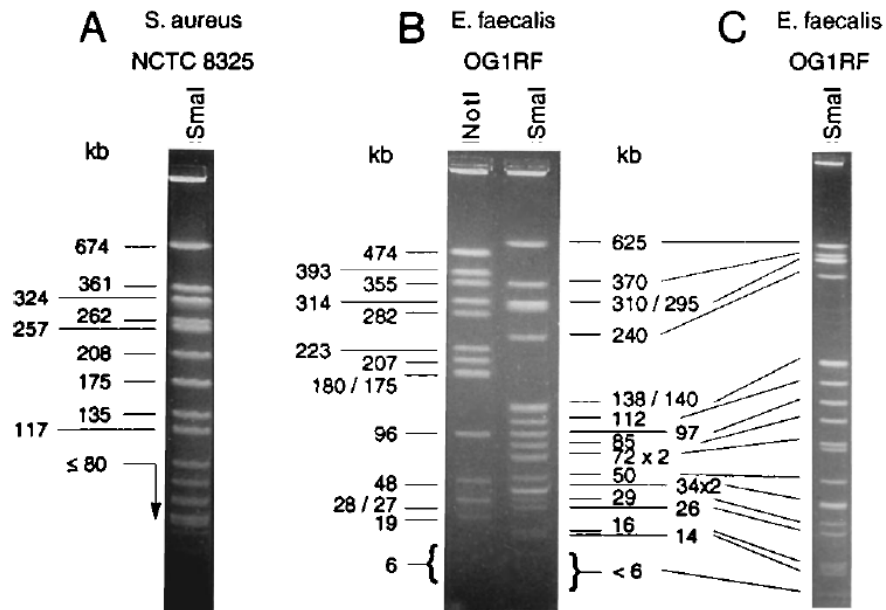


FIG. 2. PFGE patterns of chromosomal DNA restriction fragments resolved in 1.6% Seakem Gold agarose in 0.5× TBE buffer (35) for *S. aureus* NCTC 8325 DNA digested with *SmaI* (pulse times, 2 to 45 s; running time, 29.5 h) (A), *E. faecalis* OG1RF DNA digested with *NotI* or *SmaI* (pulse times, 2 to 45 s; running time, 29.5 h) (B), and *E. faecalis* OG1RF DNA digested with *SmaI* (pulse time, 2 to 45 s; running time, 29.5 h) (C). The sizes of the fragments are indicated in kilobases.

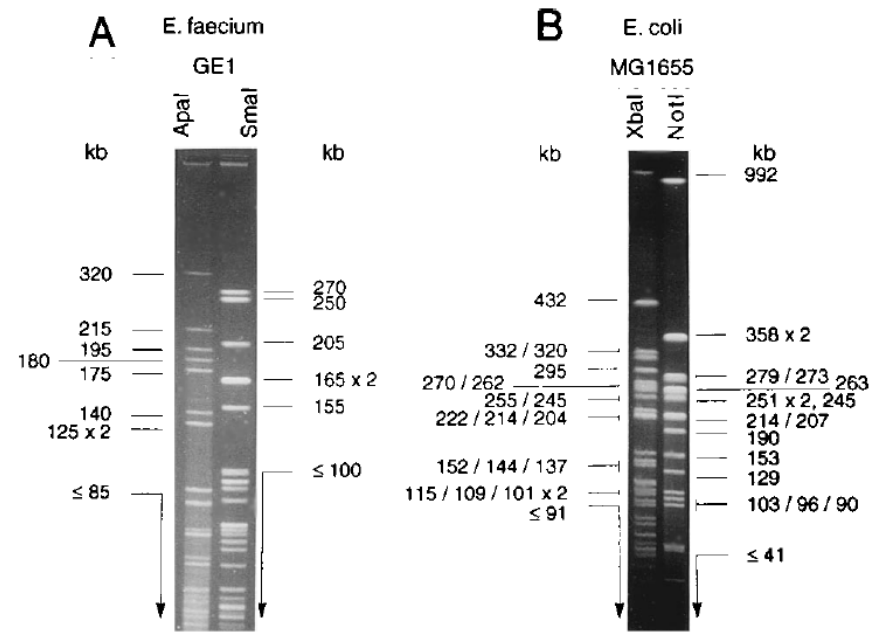


FIG. 3. PFGE patterns of chromosomal DNA restriction fragments resolved in 1.6% Seakem Gold agarose in 0.5× TBE buffer (35) for *E. faecium* GE1 DNA digested with *ApaI* or *SmaI* (pulse time, 2 to 21 s; running time, 50 h) (A) and *E. coli* MG1655 DNA digested with *XbaI* or *NotI* (pulse time, 5 to 75 s; running time, 55 h) (B). The sizes of the fragments are indicated in kilobases.

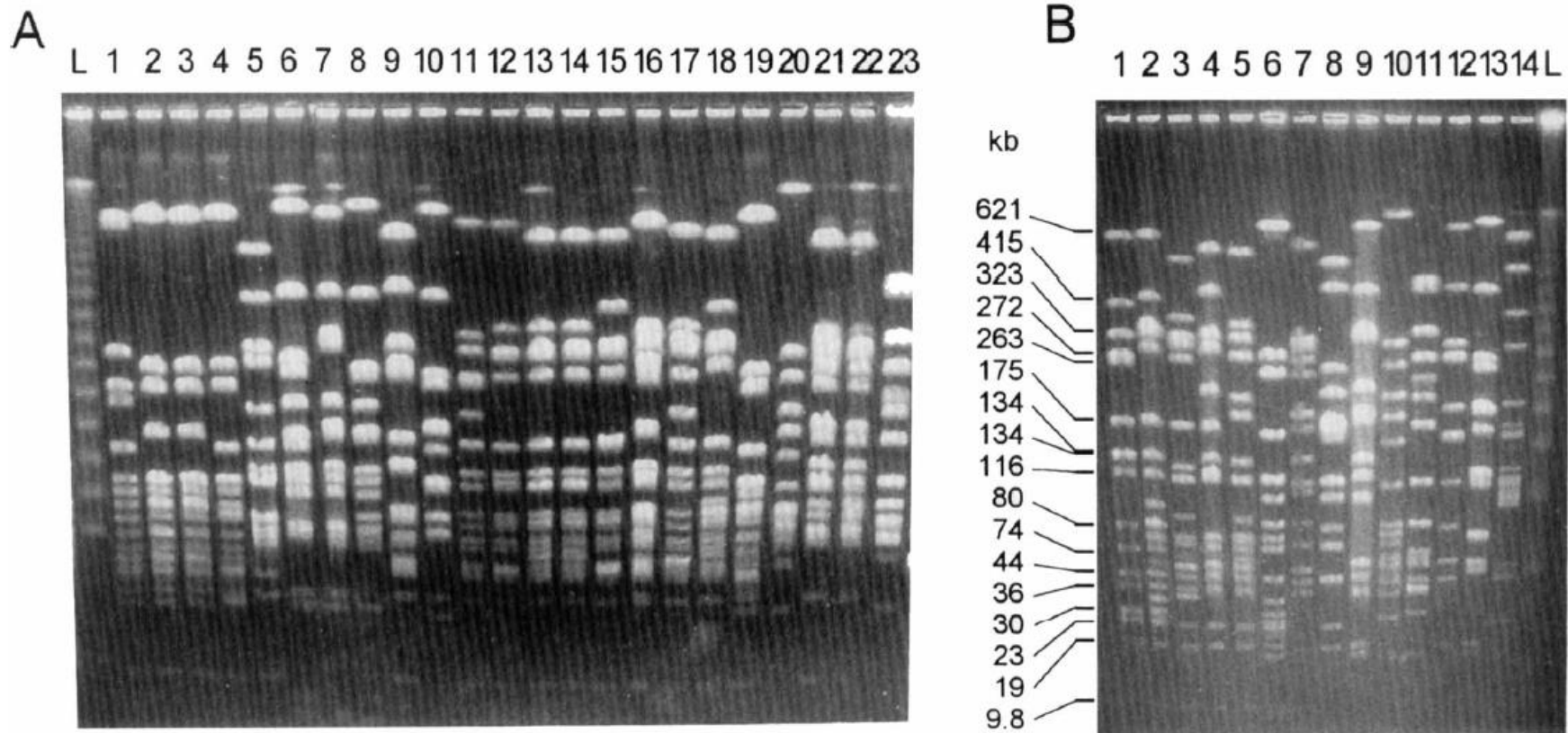


FIG. 1. (A) PFGE of *Sma*I-cleaved genomic DNAs of *S. aureus* strains used as hosts for the phages belonging to the International Standard Set. Lane L, molecular size marker (lambda concatemers). Lane 1, PS 29; lane 2, PS 52; lane 3, PS 52A; lane 4, PS 80; lane 5, PS 3A; lane 6, PS 3C; lane 7, PS 55; lane 8, PS 71; lane 9, PS 6; lane 10, PS 42E; lane 11, PS 47; lane 12, PS 53; lane 13, PS 75; lane 14, PS 54; lane 15, PS 77; lane 16, PS 83A; lane 17, PS 84; lane 18, PS 85; lane 19, PS 81; lane 20, PS 95; lane 21, PS 94; lane 22, PS 96; lane 23, PS 187. (B) PFGE of *Sma*I-cleaved genomic DNAs of representative strains of the *S. aureus* ISRGs listed in Table 1. Lane 1, CCM 885^T; lane 2, PS 85; lane 3, FN 15; lane 4, PS 3A; lane 5, CCM 2323; lane 6, PS 80; lane 7, PS 96; lane 8, CCM 2287; lane 9, PS 55; lane 10, PS 95; lane 11, PS 187; lane 12, FN 4; lane 13, PS 42E; lane 14, *S. aureus* subsp. *anaerobius* CCM 3823^T; lane L, molecular size marker (lambda concatemers). The estimated sizes of *S. aureus* CCM 885^T *Sma*I fragments are indicated on the left.

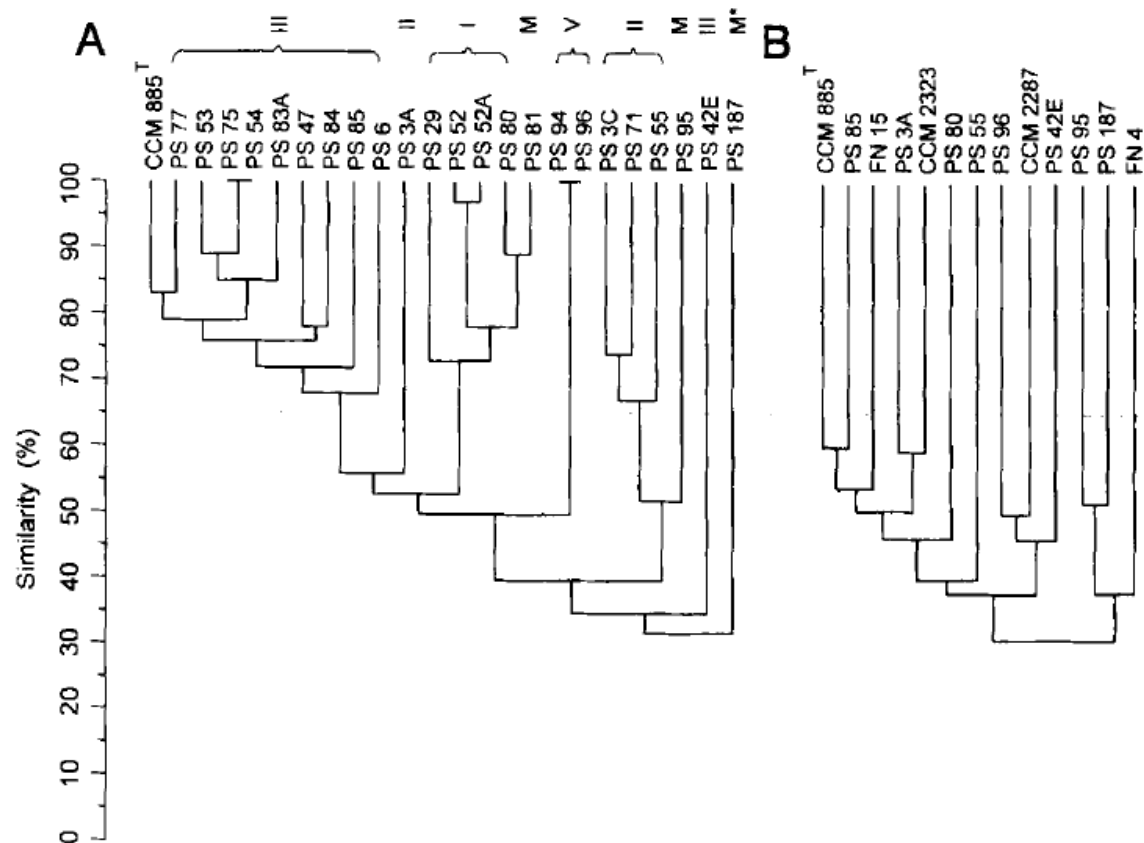
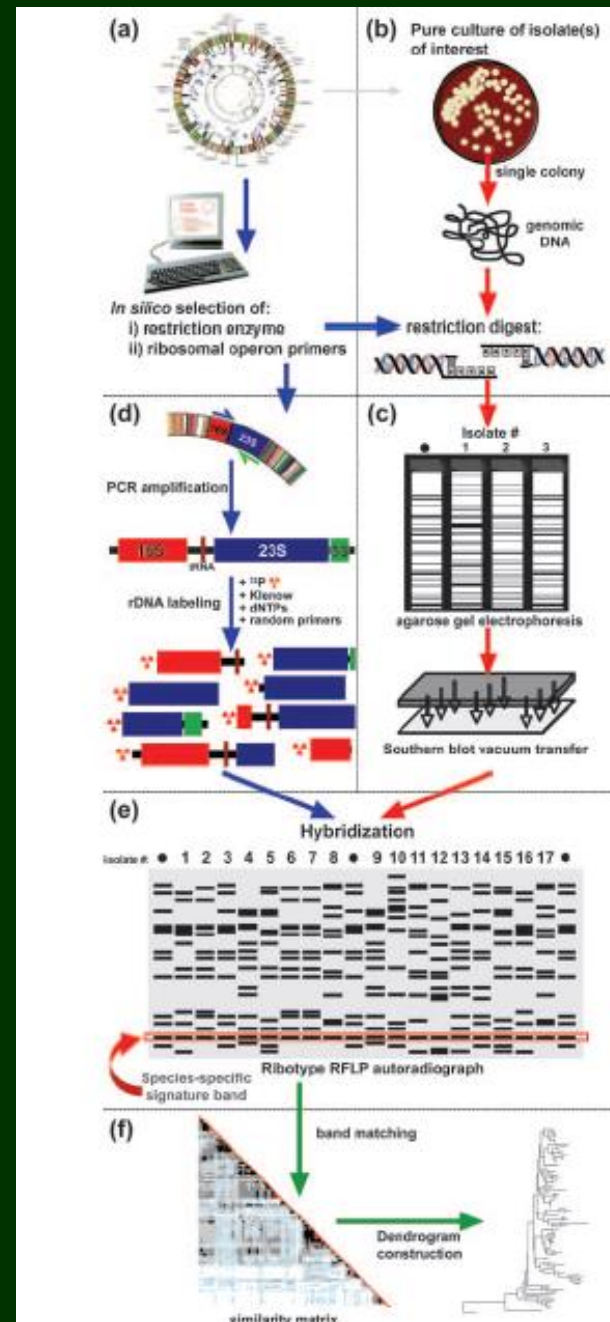


FIG. 2. (A) Dendrogram showing the levels of similarity of the *Sma*I restriction patterns of the genomic DNAs of *S. aureus* strains used as hosts for the phages belonging to the International Standard Set for phage typing. The phage lytic groups to which the PS strains belong are indicated at the top. *S. aureus* CCM 885^T was included for comparison. (B) Dendrogram showing the levels of similarity of the *Sma*I restriction patterns of the genomic DNAs of *S. aureus* strains that were used as representatives of ISRGs. Strain PS 187 has not belonged to the International Standard Set for phage typing since 1974 (2).

Ribotypizace

- typizace bakteriálních druhů/kmenů na základě polymorfismu v sekvenci (resp. restričních místech) ribosomálních operonů (operonů kódujících rRNA)
- každý ribosomální operon sestává ze tří genů kódujících strukturální rRNA molekuly: 16S, 23S a 5S rRNA
- počet kopií, velikost ribosomálního operonu, sekvence a sekundární struktura genů pro 3 rRNA je vysoce konzervativní v rámci bakteriálních druhů
- nejvyšší míra konzervativnosti u 16S rRNA: zlatý standard pro identifikaci a taxonomickou klasifikaci bakteriálních druhů
- počet fragmentů získaných ribotypizací odráží multiplicitu rRNA operonů u bakteriálních druhů. Počty kopií rRNA operonů se liší od 1 (*Chlamydia trachomatis*) po 15 (*Photobacterium profundum*)

Ribotypizace: základní schéma



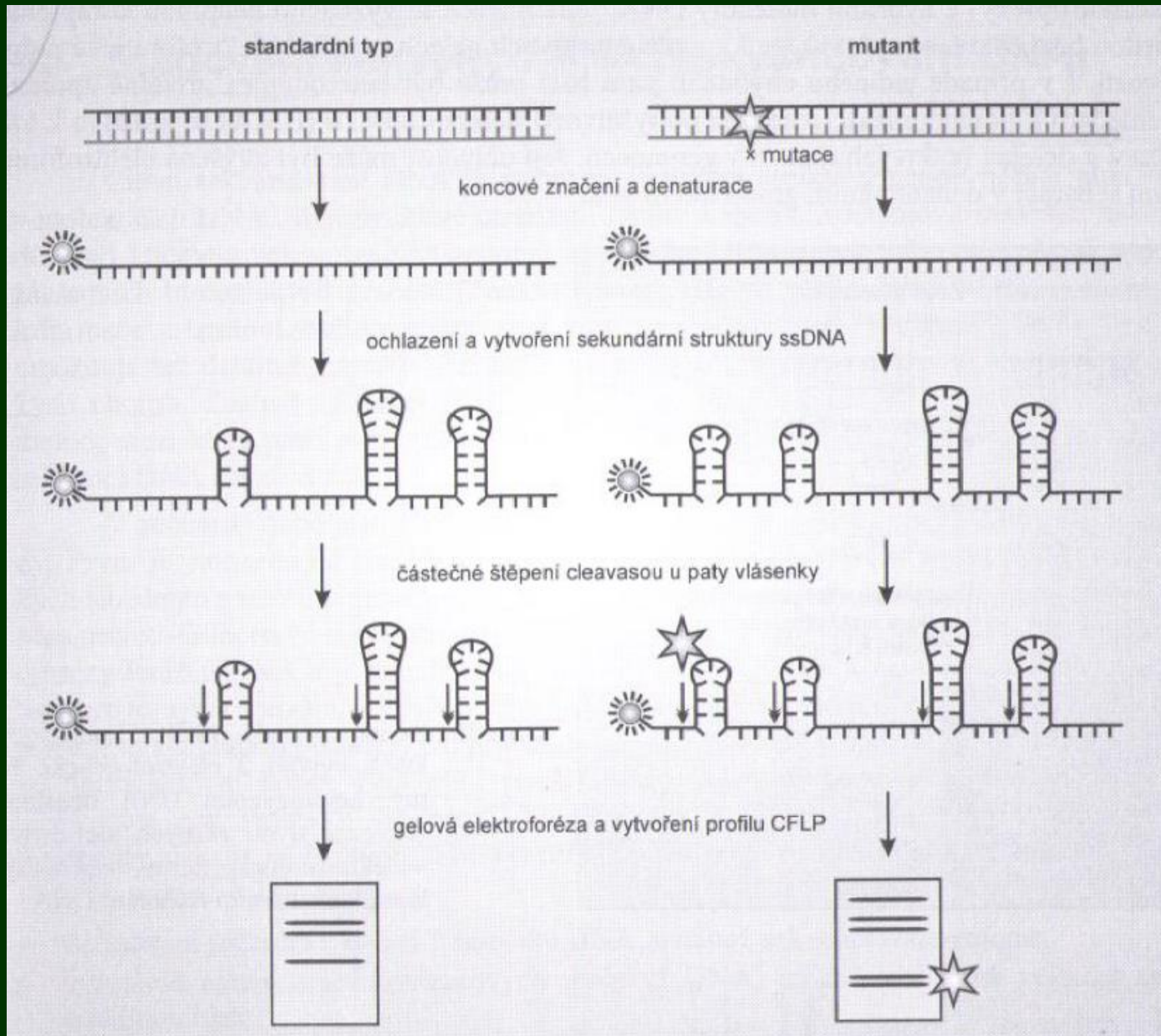
RFLP ve virologii

- analýza genomů DNA virů nebo i RNA virů (po přepisu do DNA)
- detekce mutací majících za následek vznik, zánik restrikčního místa
- odlišení kmenů stejného druhu
- použití u adenovirů, herpesvirů atd.
- **herpesviry** mají velký genom, mohou mít 20 až 50 RF
- **adenoviry** malý genom, 5 až 10 RF
- detekce onemocnění CMV, HSV....
- pro RNA viry (enteroviry atd) se genom nebo cílová část na 5´konci (UTR) přepíše reverzní transkriptázou do DNA a ta je pak amplifikována a štěpena restriktázou
- **Southern přenos a hybridizace je modifikace RFLP pro analýzu subtypů CMV u pacientů s AIDS nebo s transplantací ledvin**

Polymorfismus délky fragmentů DNA vytvořených Cleavasou (CFLP)

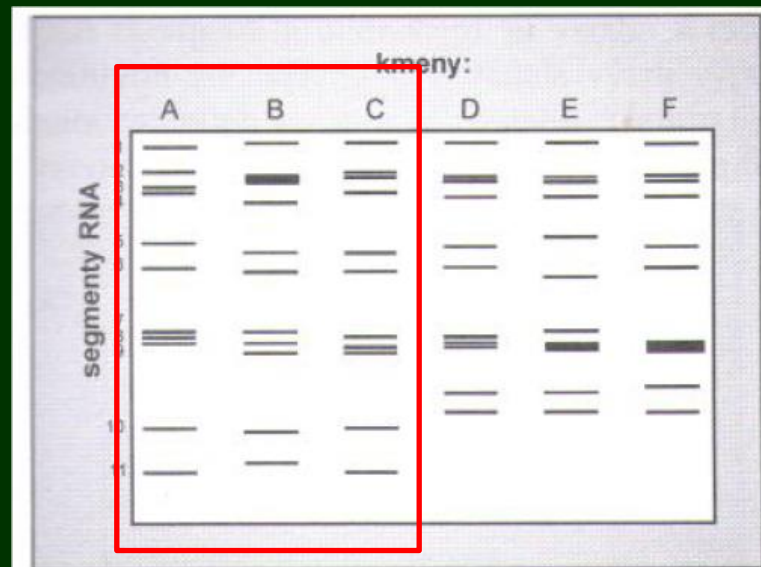
- Cleavasa I je specifická endonukleáza upravená metodami genového inženýrství, jejichž cílové místo se nachází vždy u paty vlásenky v ssDNA.
- využití tohoto enzymu k detekci a lokalizaci polymorfismů v ssDNA připravených denaturací fragmentů koncově značené genomové DNA (do 2700 bp)
- mutace a modifikace v nukleotidových sekvencích ovlivňují sekundární strukturu ssDNA – vytvoření rozdílných míst rozpoznávaných enzymem a vznik spektra fragmentů.
- **separace na denaturačním PAGE gelu + autoradiografie**
- analogie s RFLP

Polymorfismus délky fragmentů DNA vytvořených Cleavasou (CFLP)



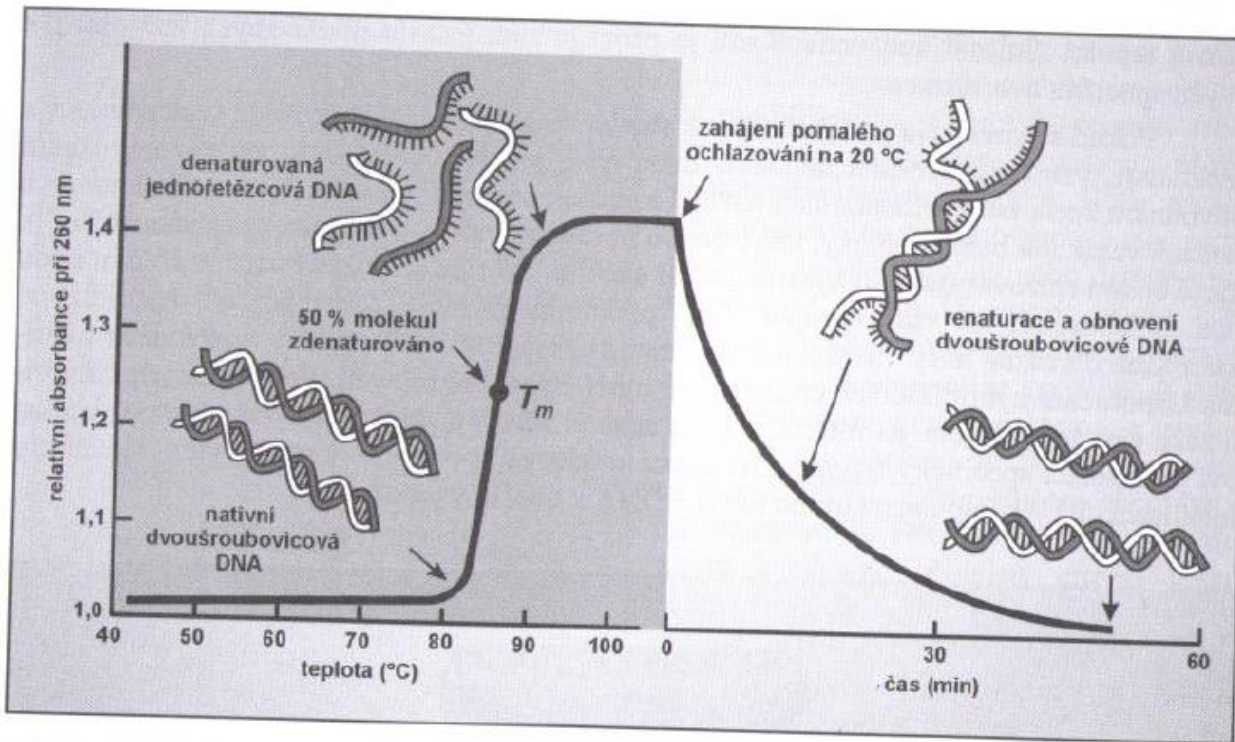
Polymorfismus délky genomových segmentů (GSLPA)

- pro typizaci virů se segmentovaným genomem
- např. rotaviry (Reoviridae) nebo viry chřipky
- Rotaviry: 11 segmentů, kmeny se liší délkou segmentů (je to dsRNA)
- GSLPA: elektroforetická analýza celkové RNA izolované z klinických vzorků v 10% PAGE gelu
- lidské rotaviry mají dlouhé elektroforetogramy, ostatní kmeny (skupiny D až G) mají krátké elektroforetogramy (tyto neinfikují člověka)

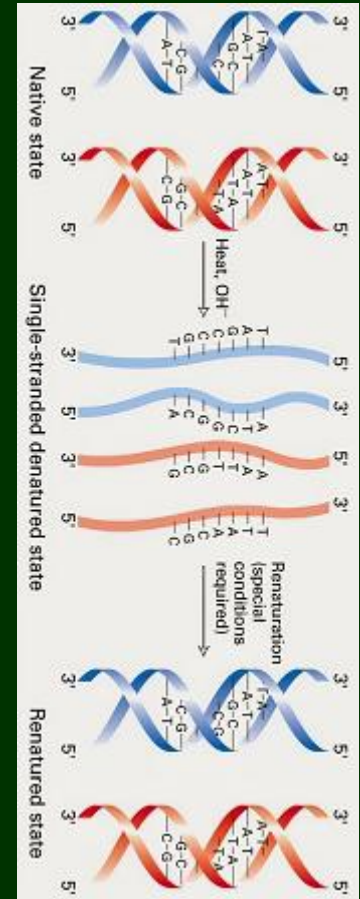


Obr. 107 Genotypizace rotavirů metodou polymorfizmu délky genomových segmentů

Hybridizační techniky



Obr. 7 Změny absorbance roztoku DNA při teplotní denaturaci a renaturaci postupným ochlazením



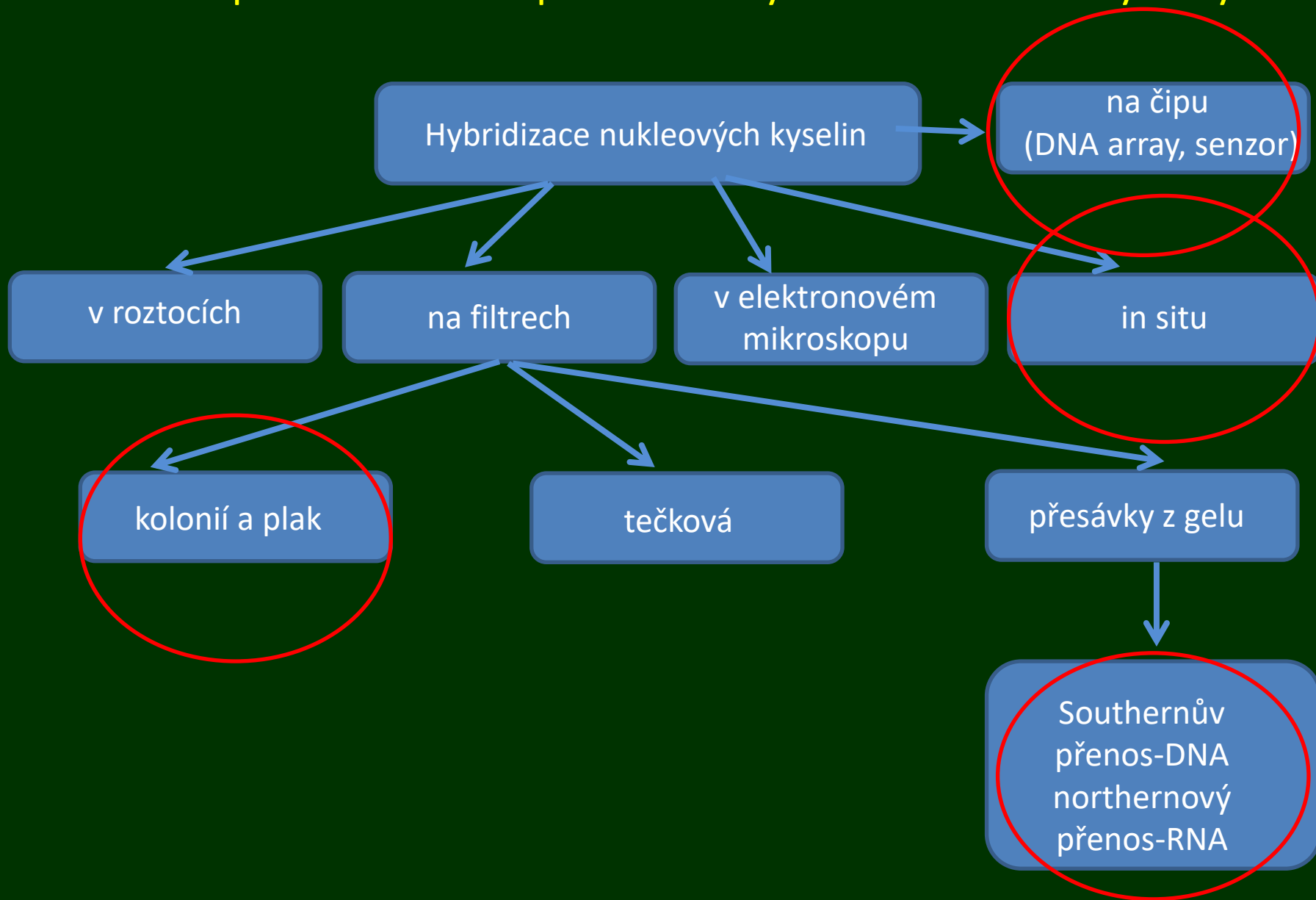
Denaturace: zvýšení absorpčních schopností (optické hustoty) pro ssDNA při 260 nm

Melting temperature

Vodíkové vazby, hydrofobní interakce, negativní náboje fosfátových skupin

Při ne zcela shodných sekvencích: homoduplexy, heteroduplexy (mismatches)

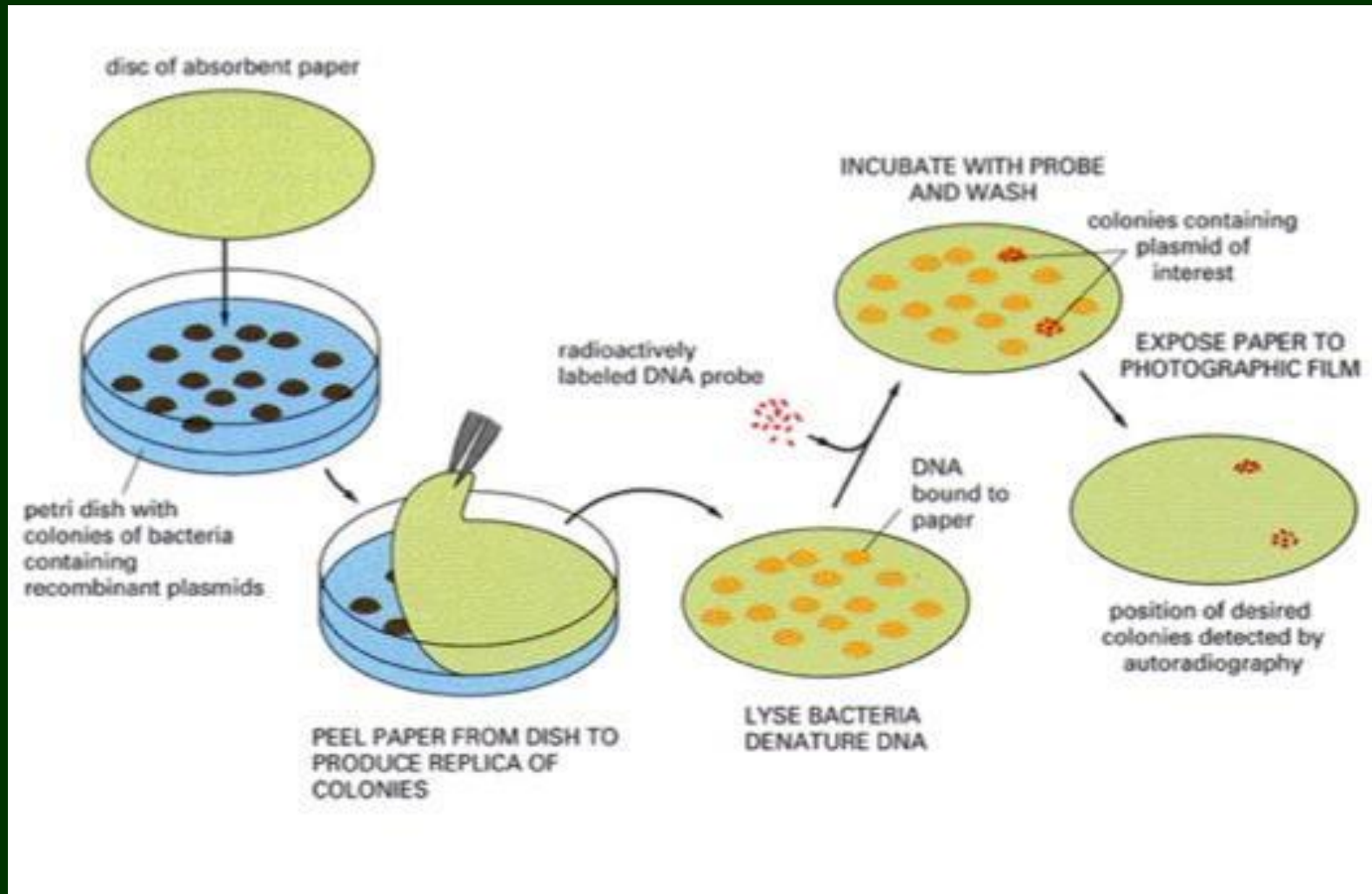
Možnosti experimentálního provedení hybridizace nukleových kyselin



Hybridizační sondy

- jedořetězcové, radioaktivně nebo chemicky značené nukleotidové sekvence DNA nebo RNA, vázající se na cílovou sekvenci
- sekvence genomové DNA nebo cDNA klonované ve vektoru nebo amplifikované PCR
- uměle syntetizované oligonukleotidy o délce 15-70 bází. Jejich sekvence je odvozena ze sekvence aminokyselin proteinu, jehož kódující oblast na DNA vyhledáváme
- sekvence genů příbuzných organismů, u nichž existuje vysoká pravděpodobnost, že připravená sonda rozezná sekvenci homologních genů
- při radioaktivním značení jsou do sekvence sondy začleněny nukleotidy, obsahující radioaktivní izotop
- při neradioaktivním značení jsou do sekvence sondy zabudovány chemicky modifikované nukleotidy (reportérská molekula: biotin, digoxigenin navázané na dUTP, začleňuje se místo tyminu)
- detekce avidinem, streptavidinem nebo značenou protilátkou
- **fluorescenčně značené nukleotidy**

Hybridizace na pevných podkladech: hybridizace kolonií/plak



Identifikace bakterií ze směsných kultur

Identifikace kolonií exprimujících rekombinantní protein

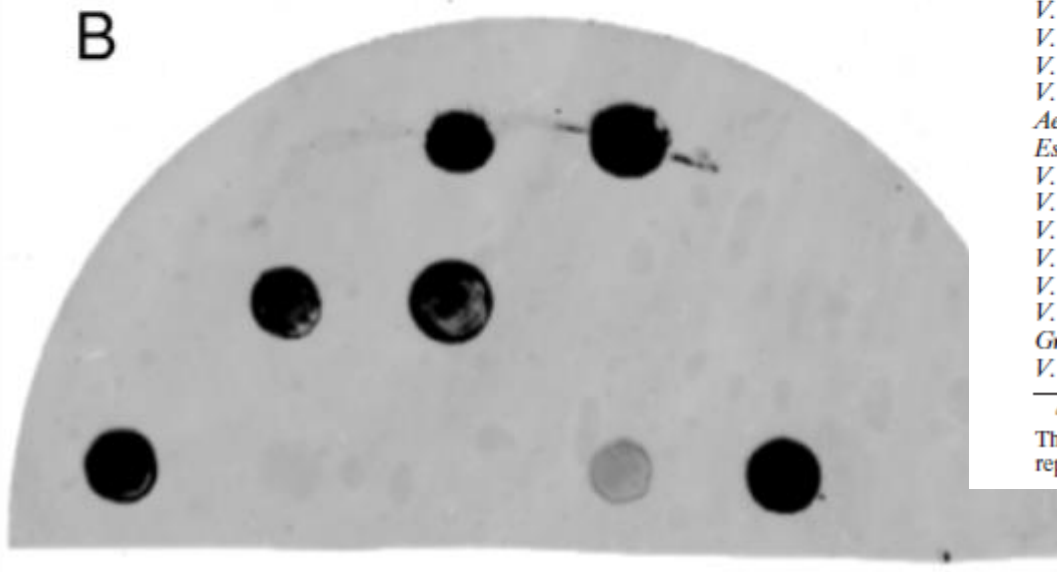
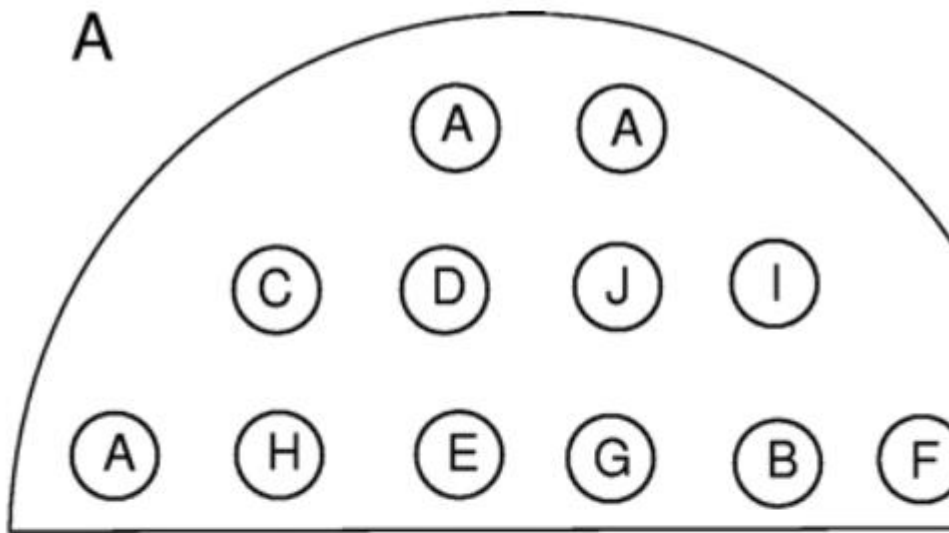


TABLE 1. Bacterial strains used to evaluate RNA colony blot hybridization method employing probe Vchomim1276

Strain	Hybridization result
<i>V. cholerae</i> O1 classical ATCC 14035.....	+
<i>V. cholerae</i> O1 classical ATCC 11623.....	+
<i>V. cholerae</i> O139 AI1877.....	+
<i>V. cholerae</i> O139 EM-0208.....	+
<i>V. cholerae</i> O1 El Tor N16961.....	+
<i>V. cholerae</i> O1 El Tor EB-0184.....	+
<i>V. cholerae</i> non-O1, non-O139 CB98-203.....	+
<i>V. cholerae</i> non-O1, non-O139 CB99-18.....	+
<i>V. cholerae</i> non-O1, non-O139 EC1.....	+
<i>V. cholerae</i> non-O1, non-O139 UM4089.....	+
<i>V. cholerae</i> non-O1, non-O139 TMA21.....	+
<i>V. cholerae</i> non-O1, non-O139 EB-0172.....	+
<i>V. cholerae</i> non-O1, non-O139 EM-0232.....	+
<i>V. mimicus</i> ATCC 33563.....	+
<i>V. mimicus</i> UM4198.....	+
<i>Aeromonas caviae</i> ATCC 15468.....	-
<i>Escherichia coli</i> K-12.....	-
<i>V. salmonicida</i> ATCC 43839.....	-
<i>V. vulnificus</i> ATCC 27562.....	-
<i>V. orientalis</i> ATCC 33934.....	-
<i>V. splendidus</i> ATCC 33125.....	-
<i>V. furnissii</i> ATCC 35016.....	-
<i>V. anguillarum</i> ATCC 19264.....	-
<i>Grimontia (Vibrio) hollisae</i> ATCC 33564.....	- ^a
<i>V. fluvialis</i> CB99-14.....	-

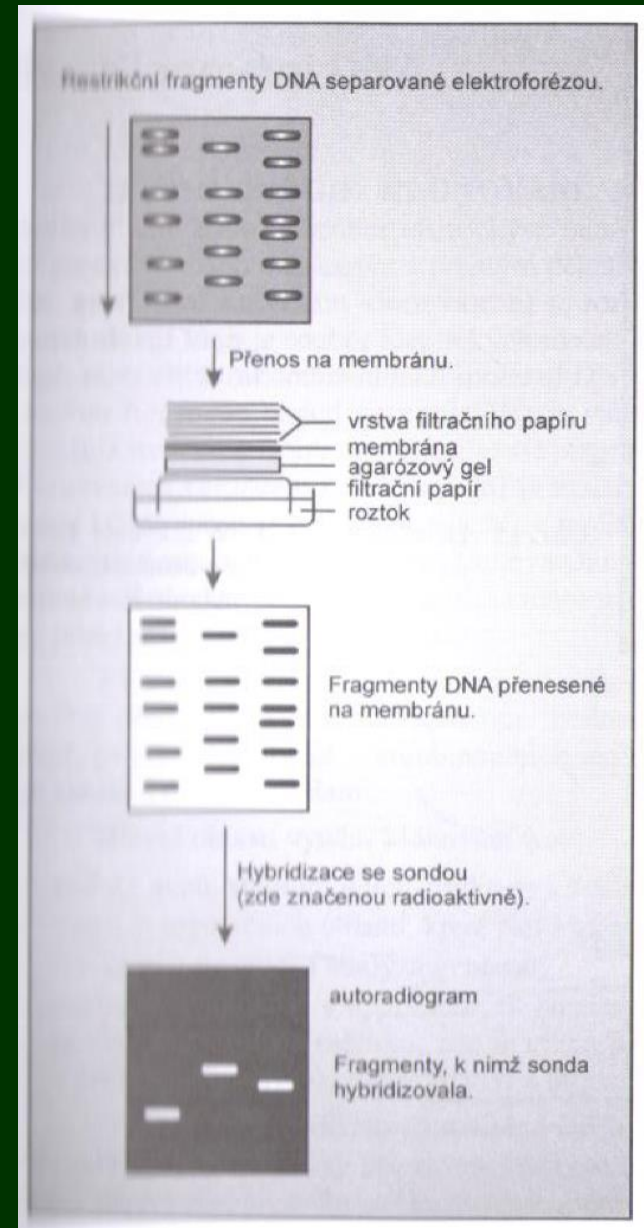
^a Weak cross-reactivity. *V. hollisae* was reclassified as *Grimontia hollisae* by Thompson et al. (19), based on its 16S rRNA-based genetic distance from representative *Vibrio* species.

(A) Schematic representation. (B) Digital fluorescence image of 16S-rRNA colony blot hybridization with Cy3-labeled Vchomim1276 probe (spec. to *V. cholerae* a mimicus, labeled with HPR) to determine specificity of probe. A, clinical *V. cholerae* O1; B, environmental *V. cholerae* O1; C, clinical *V. mimicus*; D, environmental *V. mimicus*; E, *V. anguillarum*; F, *V. fluvialis*; G, *G. hollisae*; H, *V. vulnificus*; I, *Aeromonas caviae*; J, *Escherichia coli*

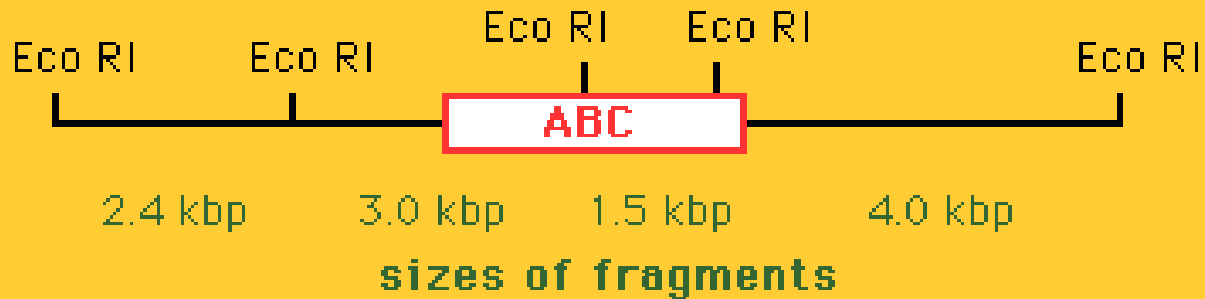
Další formy hybridizačních technik

- tečková (kapková) hybridizace
- zpětná (reverzní) hybridizace: značená testovaná DNA, neznačená sonda
- přenos po elektroforetické separaci (kapilární, elektroforetický, vakuový přenos)

- **Southernův přenos** – přenos DNA (podle E. M. Southerna, který zavedl kapilární přenos)
- **Northernový přenos** – přenos RNA
- **Westernový přenos** – přenos proteinů



Example 1: Map of the plasmid pA1



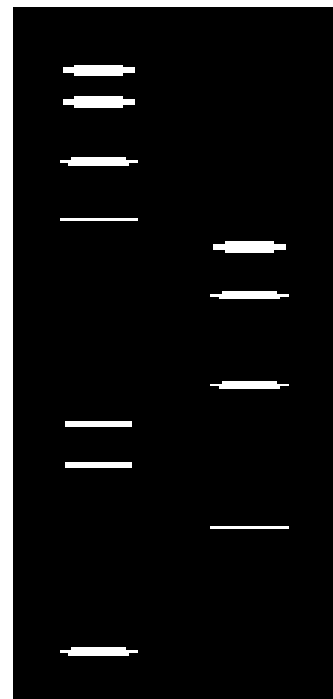
Example 1: pA1 Southern, probed with ABC

Gel stained with ethidium bromide

λ /Hind III

pA1/EcoRI

Southern Blot of gel, probed with ABC

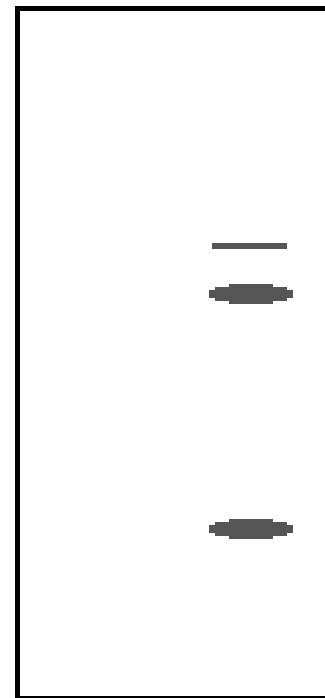


4.0 kbp

3.0 kbp

2.4 kbp

1.5 kbp



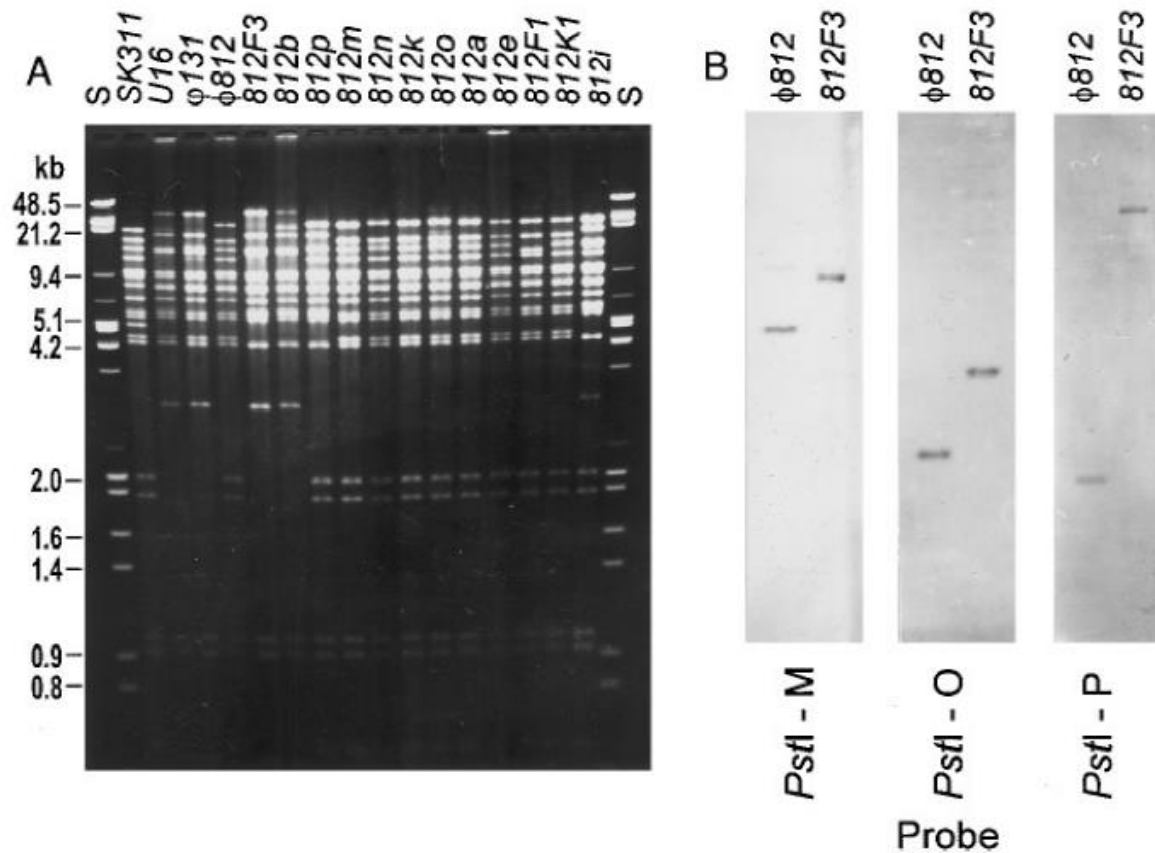
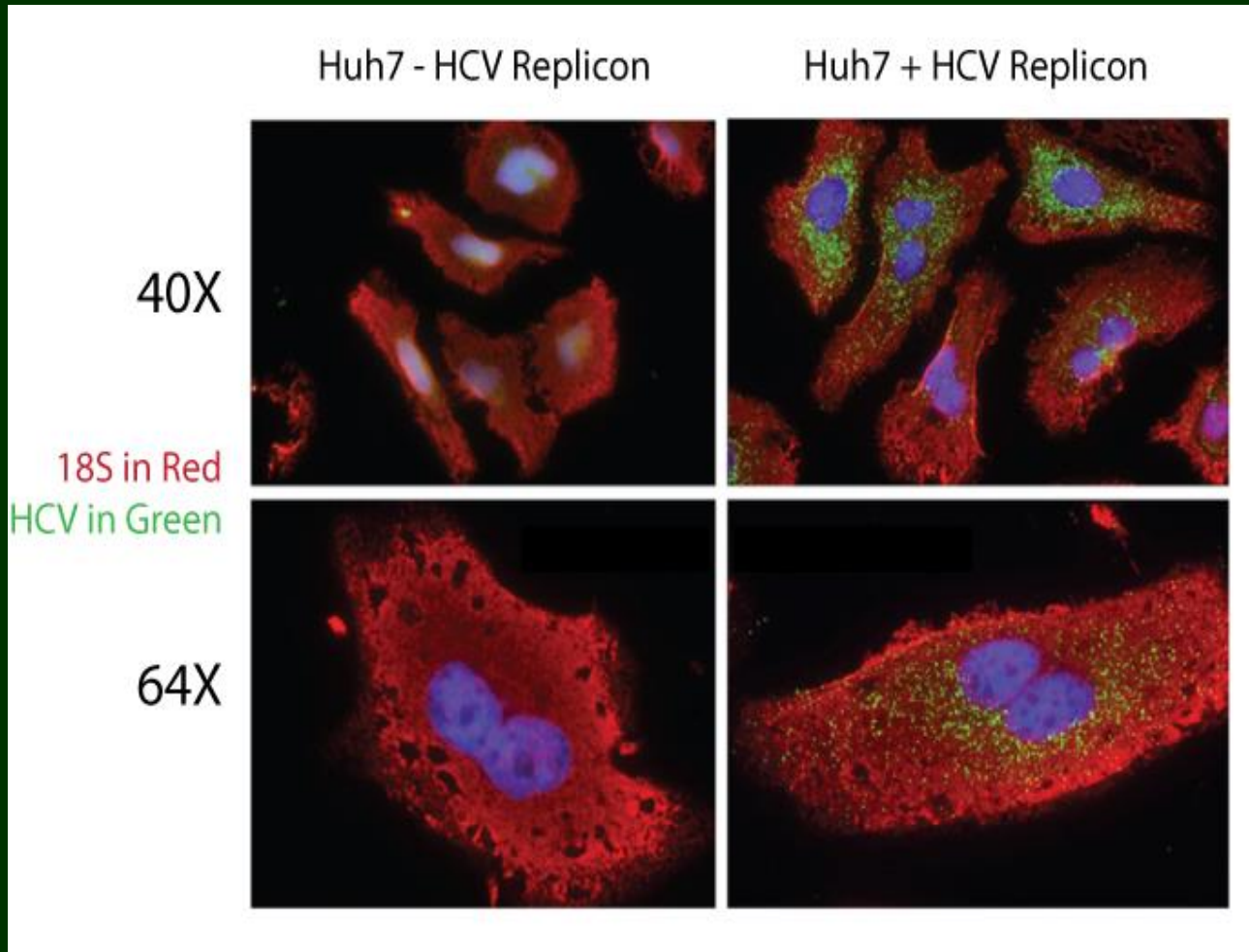


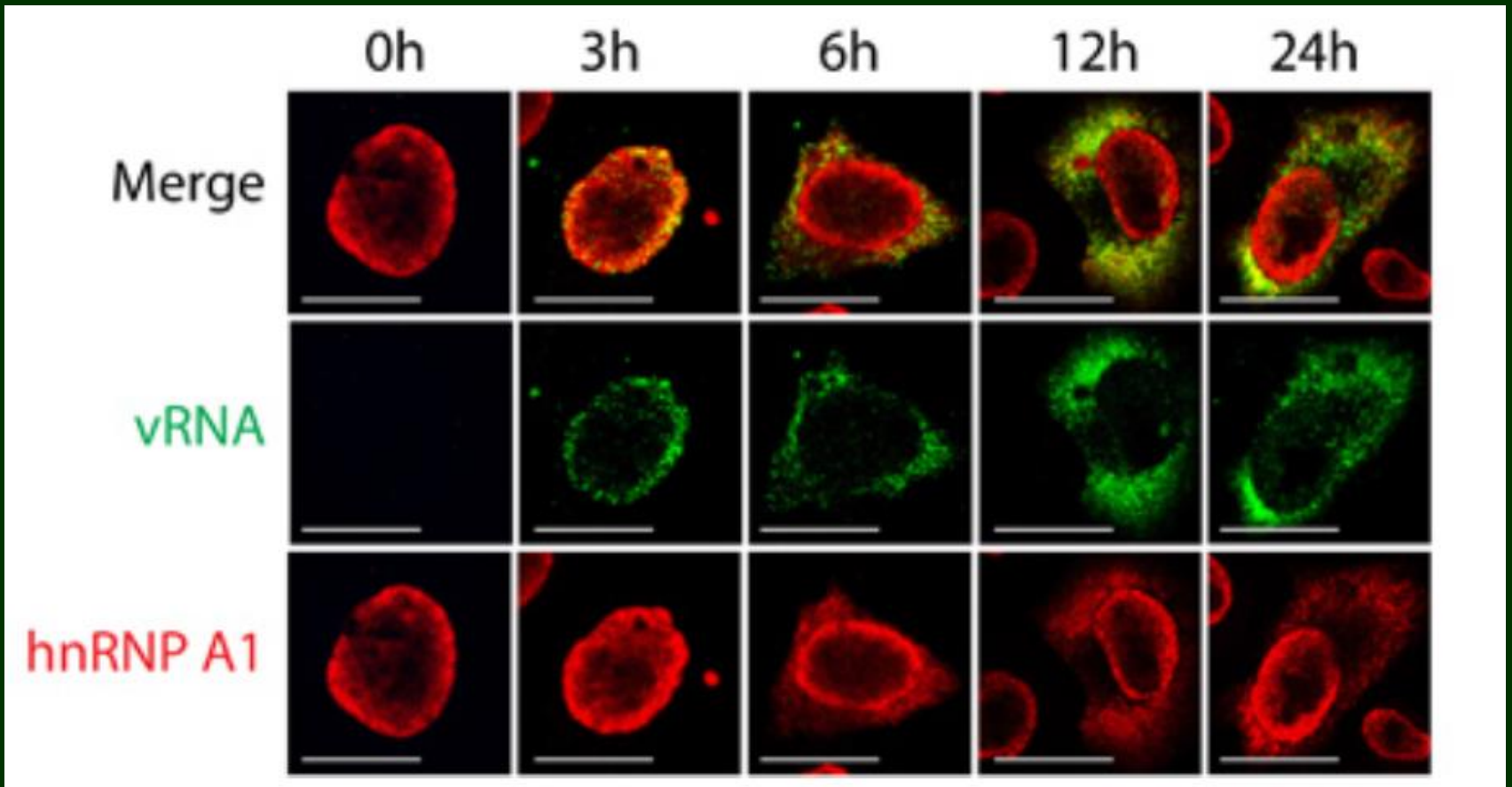
FIG. 5. Analysis of the restriction patterns of polyvalent bacteriophages. (A) PFGE separation of DNAs from the polyvalent phages ϕ 812, SK311, ϕ 131, and U16 and from ϕ 812 host-range mutants. DNAs were digested with restriction endonuclease *Pst*I. Sizes in kb are indicated on the left. Lane S, λ DNA molecular weight marker. (B) Southern blot hybridization of *Pst*I-digested DNAs from ϕ 812 and the host-range mutant 812F3 with DIG-labeled probes prepared from the restriction fragments 812F3-*Pst*I-M, 812F3-*Pst*I-O, and 812-*Pst*I-P.

Hybridize in situ

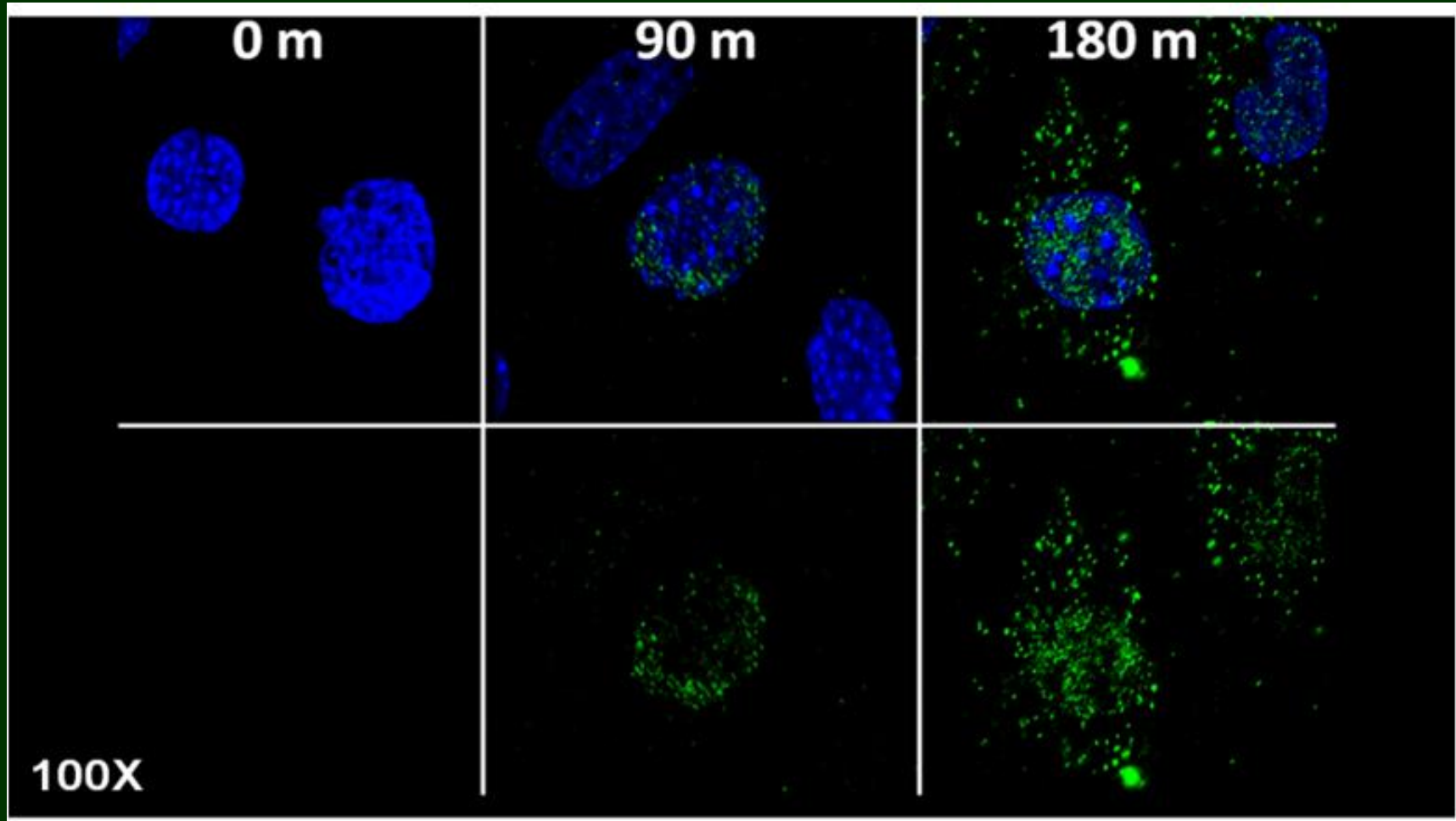
sondy značené fluorescenční protilátkou, nebo sondy tvořeny fluorescenčně značenými nukleotidy – **fluorescenční hybridizace in situ (FISH)**.



Multiplex detection in Huh-7 cells using the RNA FISH assay. Multiplex fluorescence RNA in situ detection of HCV viral genomic RNA (green) and 18S RNA (red) in Huh-7 cells lacking (-HCV) or containing (+HCV) an HCV replicon (Ikeda et al., 2002, J. Virol., 76: 2997-3006). In both panels, nuclei are stained with DAPI (blue).

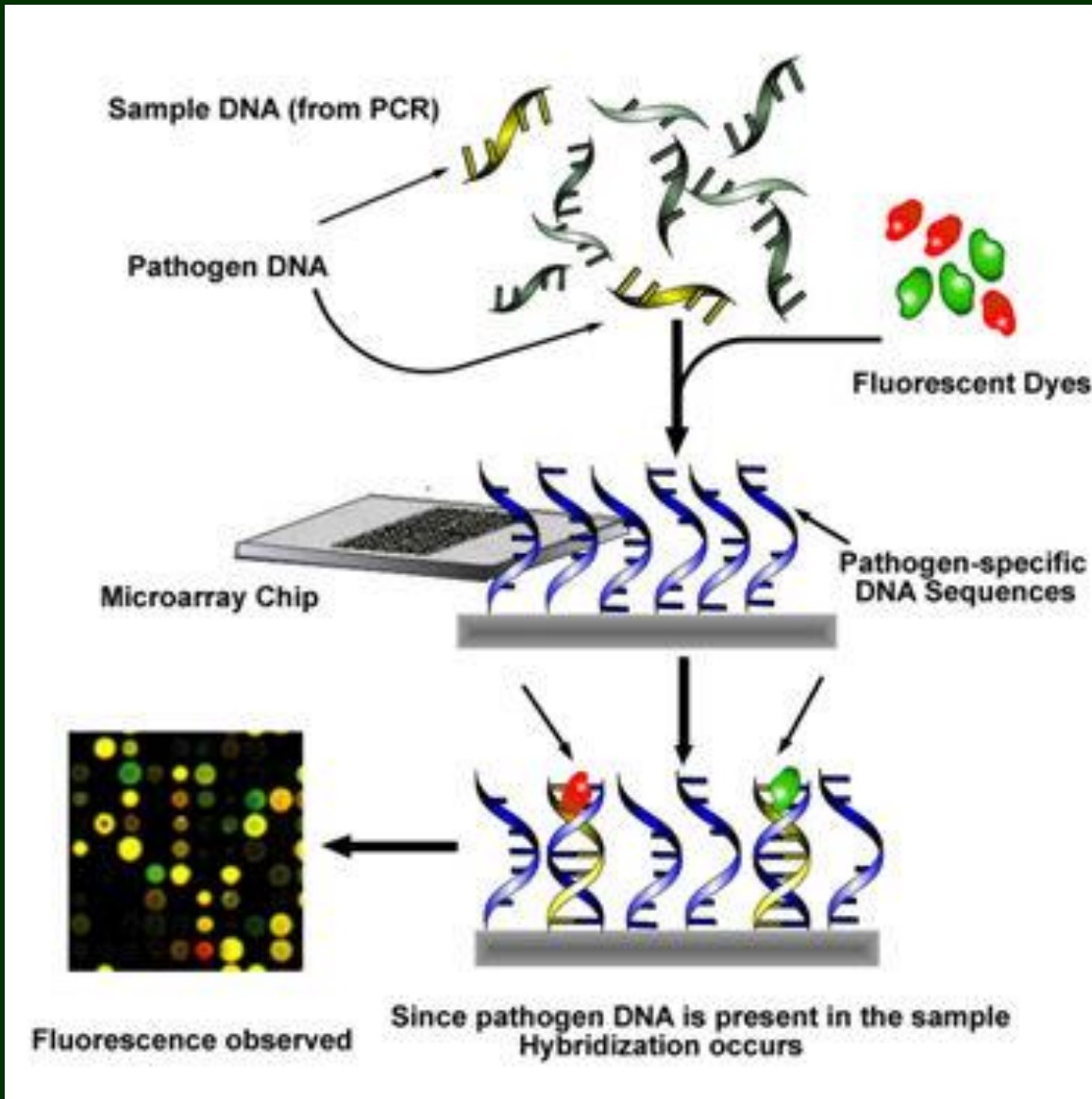


HIV-1 is expressed in HeLa and collected at different time points. Viral RNA expression is tracked in green while the cellular protein, hnRNP A1, is stained in red. Size bars are 10 μm .



Detection of H1N1 Influenza A RNA migration in MEF cells using RNA fluorescence *in situ* hybridization. Murine embryonic fibroblasts (MEFs) were incubated on ice with influenza A virus (H1N1, PR8 strain). The cells were fixed and processed with the probe set against the nucleoprotein (NP) viral genomic segment (green). DNA is stained blue with DAPI.

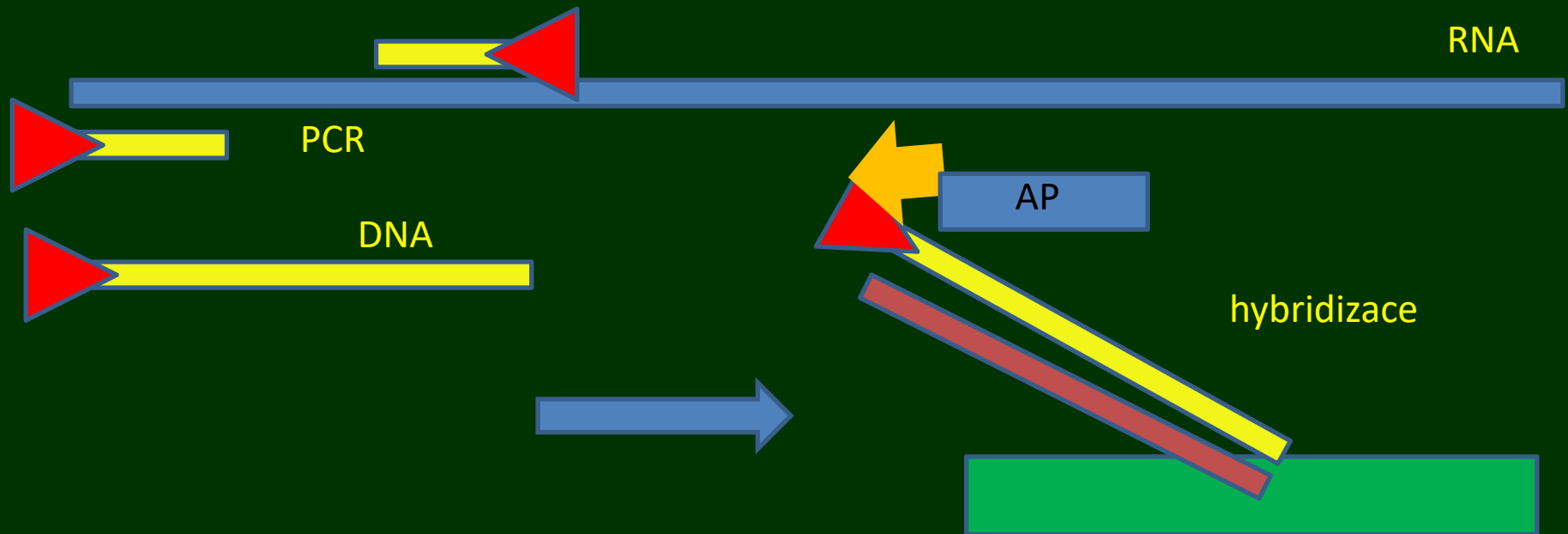
DNA-microarrays



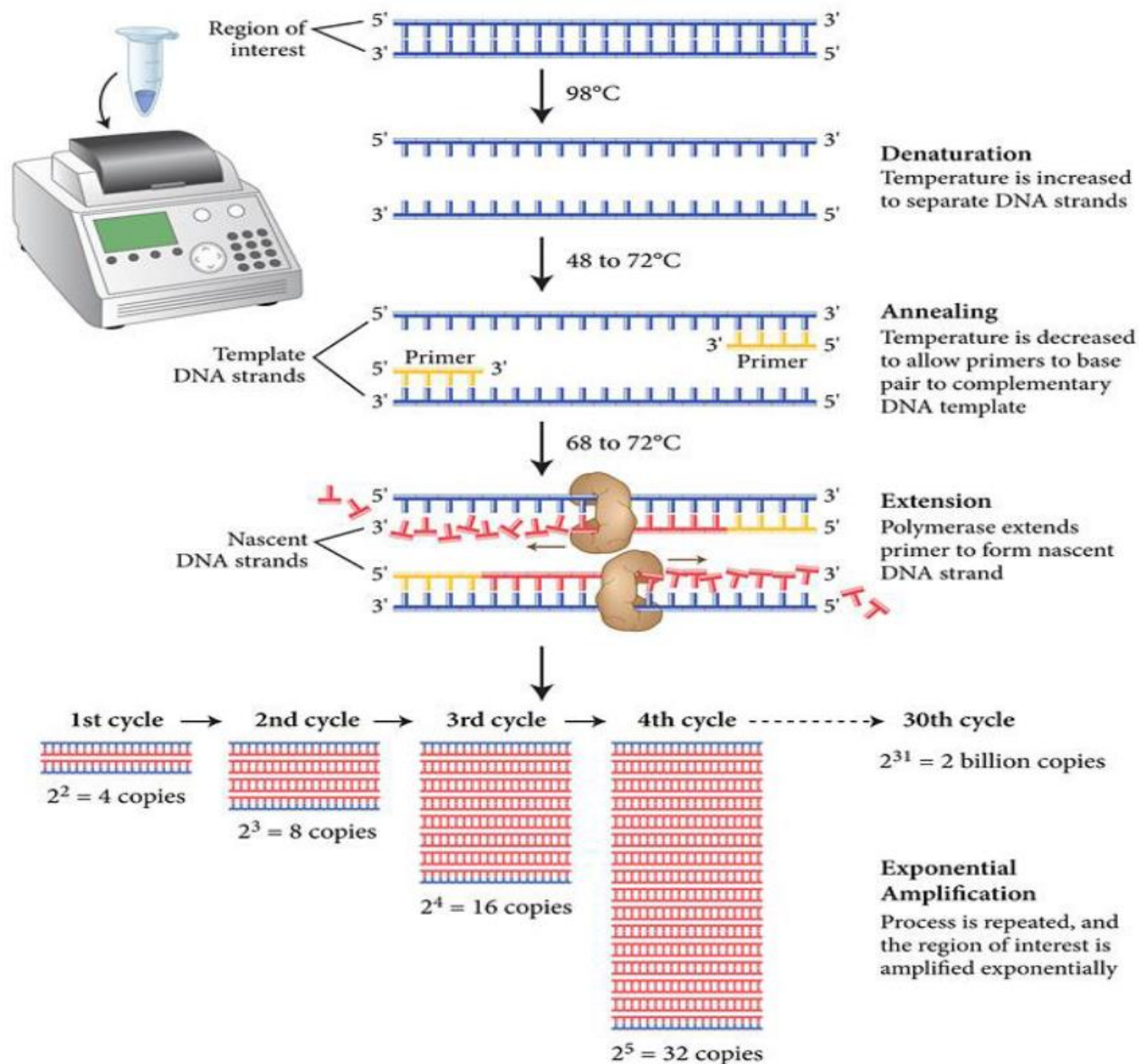
- Labeled PCR product is hybridized to the probes, and hybridization signals are mapped to several positions within the array.
- Sequencing by hybridization
- Confocal microscopy is used to scan the chip.
- First application: rapid sequencing to detect HIV mutations associated with drug resistance.

Zpětná hybridizace – užití ve virologii

- výchozí materiál je genomová RNA (u RNA virů), izolovaná ze séra pacienta
- **amplifikace pomocí nested RT-PCR s primery značenými biotinem**
komplementárními k sekvencím nekódující oblasti na 5´-konci RNA genomu
- PCR produkt (nyní značený) hybridizuje se sondami imobilizovanými v paralelních liniích v membráně
- hybridizované sekvence detekovány streptavidinem navázaným na alkalickou fosfatázu.
- genotypizace flavivirů, hepatitidy C
- musí být k dispozici dostupné sondy
- tedy máme značený vzorek a neznačenou sondu



Metody založené na polymerázové řetězové reakci (PCR)

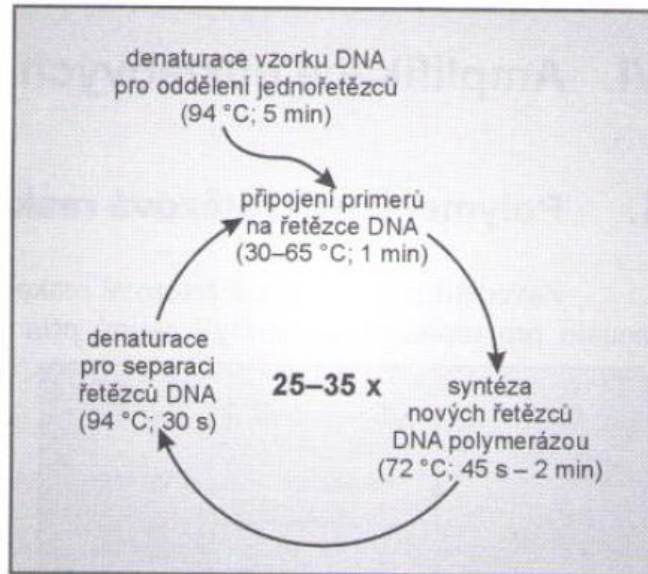


POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE (PCR)

- 1985 Kary B. Mullis
- cyklicky se opakující enzymová syntéza nových řetězců vybraných úseků dsDNA ve směru 5' -> 3' prostřednictvím DNA polymerázy
- studovaný úsek vymezen připojením dvou primerů, které se vážnou na protilehlé řetězce tak, že jejich 3' konce směřují proti sobě
- termostabilní polymerázy z termofilních organismů, Taq DNA polymeráza z *Thermus aquaticus* odolávající teplotám, při nichž DNA denaturuje.
- cyklické střídání kroků:
 - 1) denaturace dsDNA (94 °C)
 - 2) připojení primerů k odděleným řetězcům (30 – 65 °C)
 - 3) syntéza nových řetězců DNA pomocí DNA-polymerázy (65 – 75 °C)

Reakce probíhá v zařízení termocykler, automatická změna teplot v naprogramovaných časových intervalech. Postupným opakováním procesu se exponenciálně (2^n , n =počet cyklů) vytvoří až miliarda kopí DNA

Číslo cyklu	Počet syntetizovaných molekul produktu
1	0
2	0
3	2
4	4
5	8
6	16
7	32
8	64
9	128
10	256
11	512
12	1024
13	2048
14	4096
15	8192
16	16384
17	32768
18	65536
19	131072
20	262144
21	524288
22	1048576
23	2097152
24	4194304
25	8388608
26	16777216
27	33554432
28	67108864
29	134217728
30	268435456
31	536870912
32	1073741824



Obr. 46 Teplotní režim a doby trvání jednotlivých kroků při polymerázové řetězové reakci

Tabulka 3 Teoretická amplifikace cílového fragmentu DNA při zvyšujícím se počtu cyklů

Teoretická amplifikace cílové sekvence DNA v závislosti na počtu cyklů (vlevo)

Schéma PCR (teplotní režim a doby trvání jednotlivých kroků) (vpravo)

NÁVRH PRIMERŮ

- mělo by se jednat o jedinečnou sekvenci a primer by se měl vázat specificky jen k jednomu místu
- délka zpravidla 18 – 25 nukleotidů
- obsah G+C 40 až 60%
- rovnoměrná distribuce oblastí bohatých na G/C a A/T páry
- teplota T_m primeru alespoň 50 °C
- podobná teplota T_m u obou primerů
- specificita primerů – na matricové DNA nesmí být nespecifická vazebná místa
- absence komplementárních sekvencí v primerech, který by vedly k duplexům
- absence vnitřních sekundárních struktur (vlásenek)
- zařazení 1 až 2 zbytků G nebo C v sekvenci na 3'-koncích primerů pro zajištění přesné vazby na templát.

REAKČNÍ SMĚS

- Taq polymeráza
- primery
- kofaktor Mg^{2+} ionty, které tvoří rozpustný komplex s jednotlivými 2'-deoxyribonukleosid-5'-trifosfáty rozpoznávaný DNA-polymerázou (koncentraci stanovit empiricky pro každou reakci)
- templátová DNA

OPTIMÁLNÍ POČET CYKLŮ: 25 až 35

- při vysokém počtu cyklů – vyšší množství nespecifických produktů

POČÁTEČNÍ DENATURACE: 94 – 97 °C po 2-5 min

- částečná denaturace: rychle renaturují, nespec. vazba primerů (self-priming)
- Taq pol má při 95 °C poločas stability 40 min, proto se volí pro následnou denaturaci během reakce doba pouze 15 – 45 sekund

- **Připojení (hybridizace) primerů** závisí na zastoupení bazí, délce oligonukleotidů a hodnotě T_m produktu
- Teplota pro připojení (T_a) je pohybuje od 55 do 68 °C po dobu 30 – 60 s
- **Syntéza DNA** probíhá při 68 – 72 °C
- Taq polymeráza syntetizuje DNA rychlostí 60 bází/s
- výsledným produktem je **PCR amplikon**, úseky DNA definované délky o velikosti desítky až tisíce bp, analogické restriční fragmentům, jejichž přítomnost v reakční směsi se prokazuje stanovením jejich velikosti elektroforézou v agarozovém nebo PAGE gelu, a nebo kvantitativním měřením množství produktu v reálném čase.

Typy sekvencí pro připojování primerů u bakterií

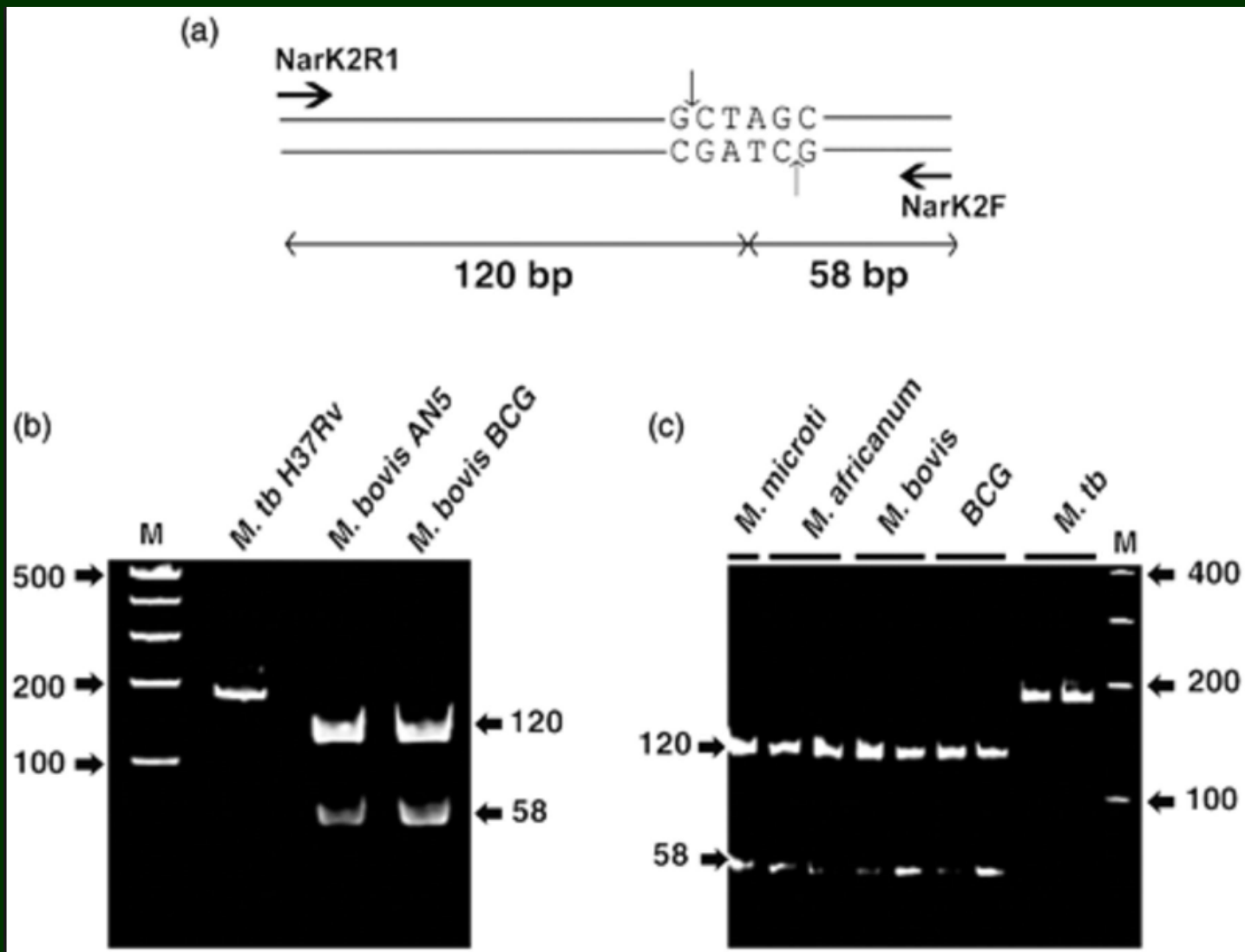
- Esenciální geny (geny kódující esenciální strukturní proteiny a enzymy)
- Geny kódující faktory virulence
- Profágy
- Geny kódující markery rezistence k antibiotikům
- Homologické/ortologní geny
- Genové rodiny
- Geny (operony) pro 16S, 5S a 23S rRNA
- Mobilní elementy (inzerční sekvence, transpozony, eukaryotické mobilní elementy)
- 3' a 5' nekódující regiony virových genomů
- Náhodně vybrané sekvence
- Repetice (vnitřní přepisované mezerníky, opakující se extragenové palindromové **Rep-elementy** *E. coli*, enterobakteriální opakující se intergenové shodné sekvence (**ERIC sekvence**), dlouhé roztroušené repetitivní elementy **RepMP3** z *Mycoplasma pneumoniae*, mozaikové repetitivní **BOX-elementy** z *Streptococcus pneumoniae*, tandemově opakované polynukleotidové sekvence (GTG)_n popsané u enterobakterií)

PCR techniky pro identifikaci/typizaci mikroorganismů

Vzniklý PCR produkt je buď sekvenován (přímá detekce polymorfismu) nebo je PCR provedeno tak, že poskytuje různé produkty různých délek (fingerprint, pattern, molekulární otisk) = nepřímá detekce polymorfismu

Stanovení polymorfismu délky restričních fragmentů u produktů PCR (PCR-RFLP)

- modifikace standardní PCR používaná pro typizaci cílové sekvence, obvykle určitého genu (až 5 kb), obsahujícího sekvenční polymorfismus
- amplifikované produkty jsou štěpeny restriční endonukleázou a poté opět analyzovány elektroforézou v agarozovém nebo polyakrylamidovém gelu.
- pro účely molekulární typizace bakterií je často využívá analýza RFLP u prokaryotických genů pro **16S rRNA nebo inserčních sekvencí**, ale může kterýkoli gen/sekvence s vhodným rest.místem

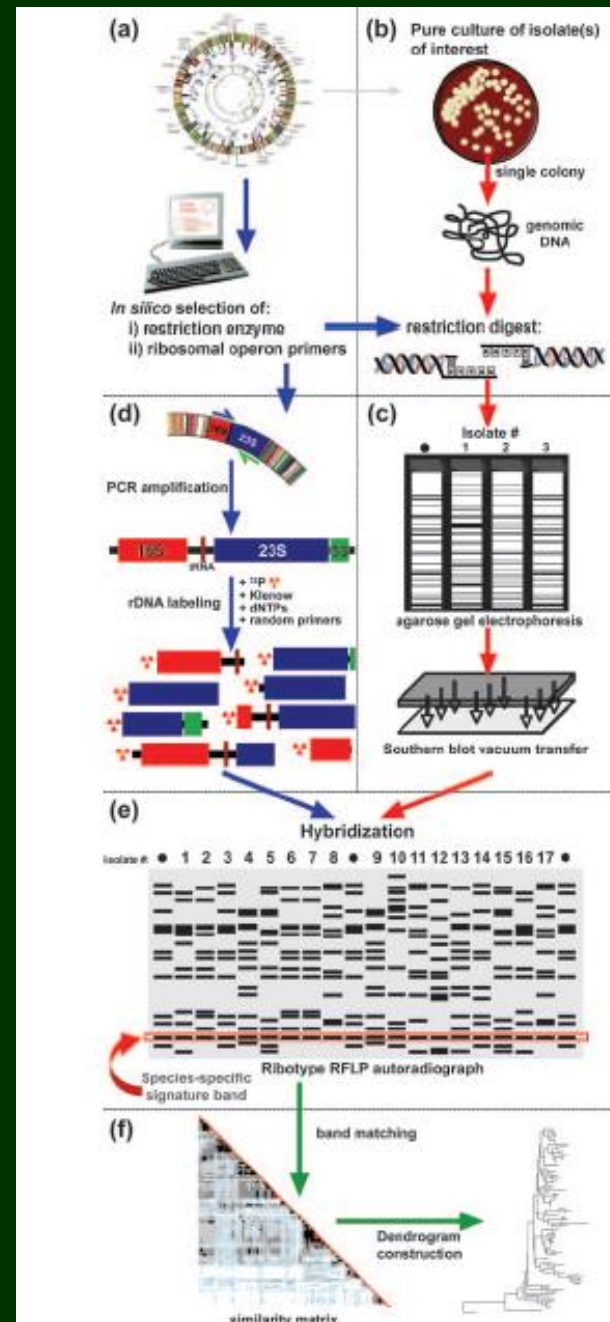


PCR-RFLP assay for differentiating *Mycobacterium tuberculosis* from *Mycobacterium bovis*, BCG and other members of the MTC. (a) The 178-bp PCR product, amplified using primers NarK2R1 and NarK2F, was digested with the NheI restriction enzyme. Representative electrophoretic PCR-RFLP profiles with (b) standard and (c) clinical isolates of *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium africanum*, *M. bovis*, BCG and *M. tb* are shown.

PCR ribotypizace

- typizační přístup kombinující ribotypizaci s PCR
- primery komplementární k 3' konci 16S rRNA genu a k 5' konci 23S rRNA genu.
- PCR ribotypizace dokáže odhalit heterogenitu v délce amplifikovaného produktu.
- PCR ribotypizaci je možno spojit se subtypizací pomocí restričních endonukleáz (PCR ribozomálního operonu + následné štěpení pomocí vhodných restričních endonukleáz)

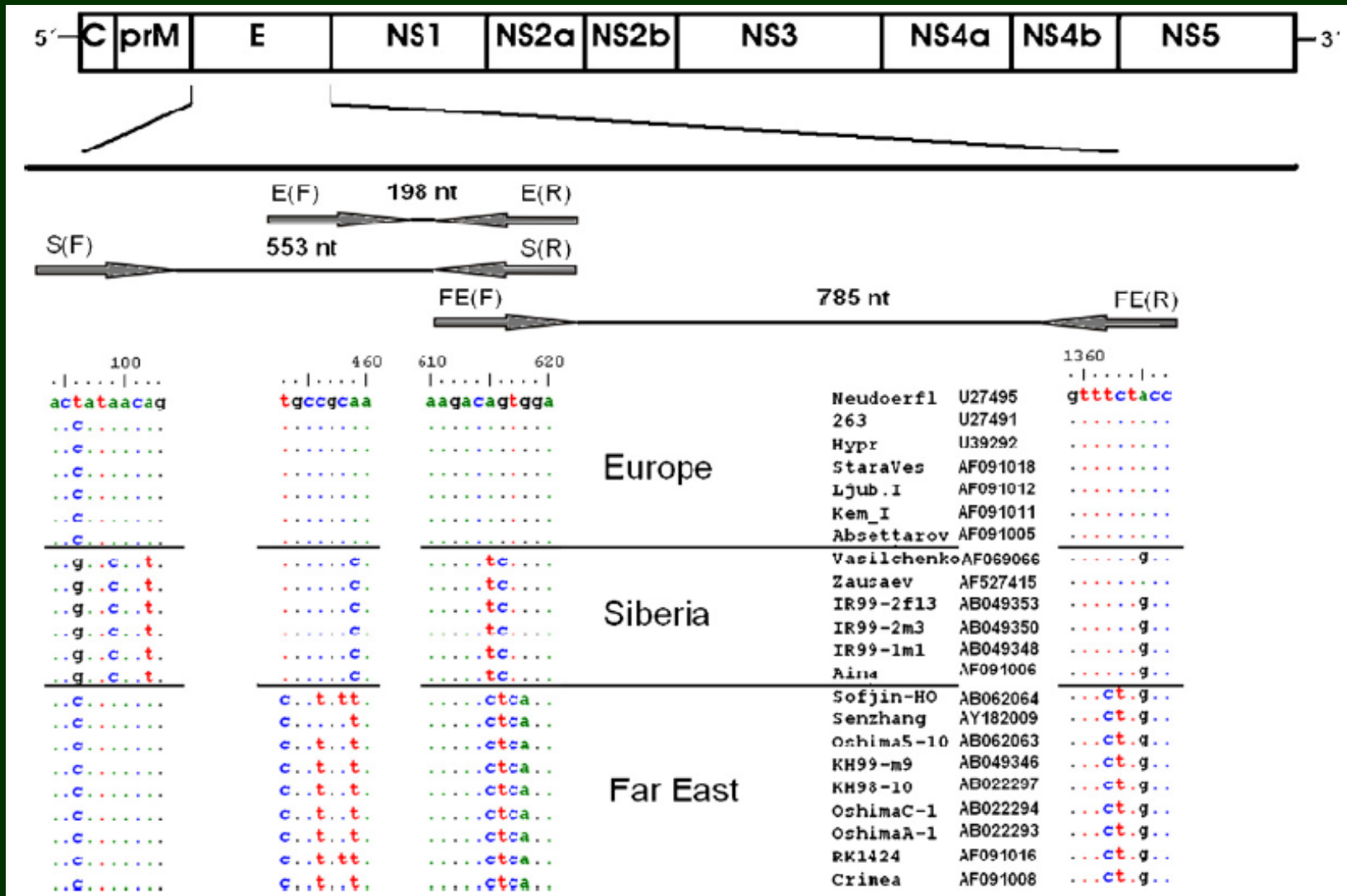
Ribotypizace: základní schéma



Mnohonásobná („MULTIPLEX“) PCR

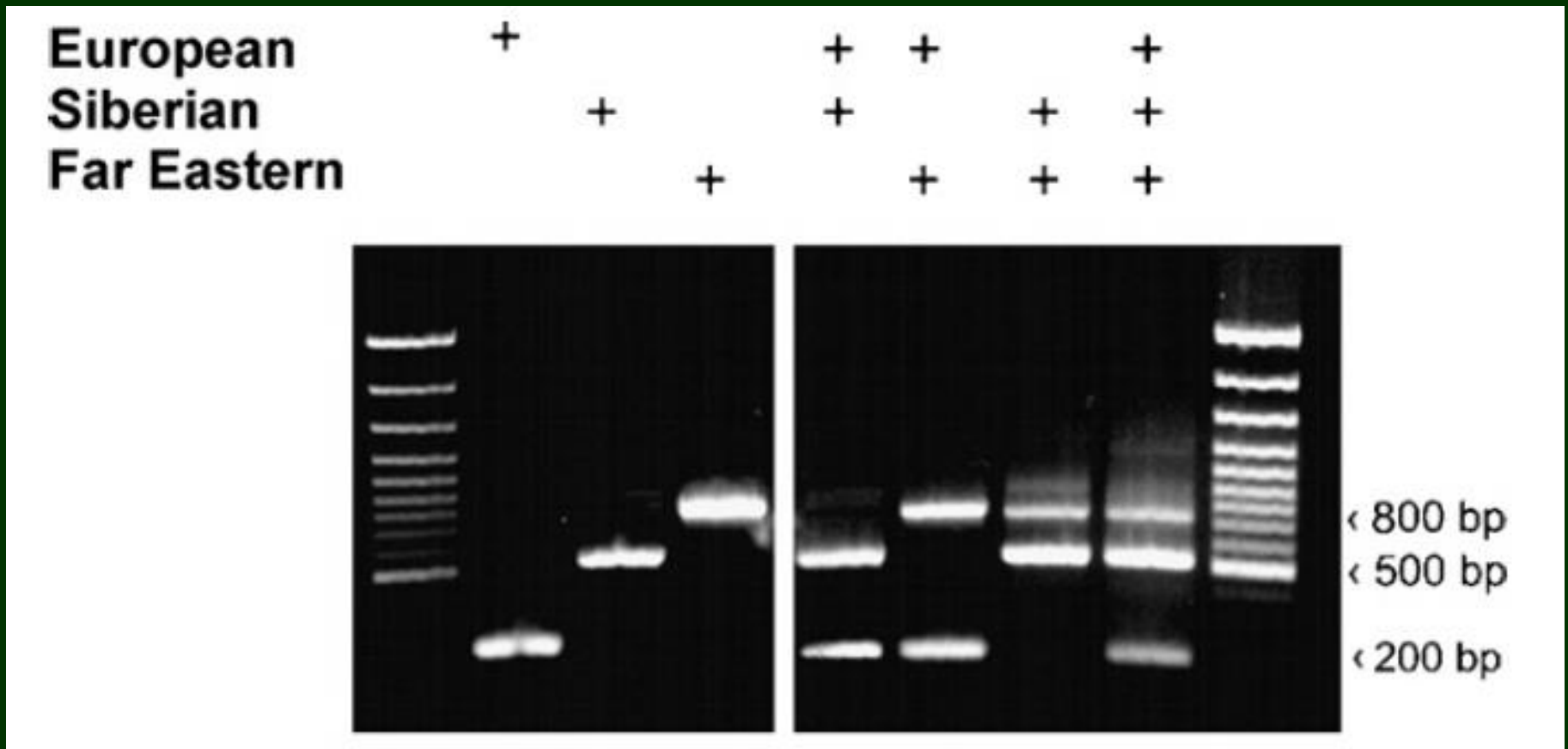
- do reakční směsi je přidáno několik párů primerů rozpoznávajících několik rozdílných cílových sekvencí, což umožňuje detekci několika genů současně v jedné reakční směsi
- výhoda: nižší cenové náklady než při samostatných amplifikacích a proto se používá pro vyhledávání změn na dlouhých úsecích DNA, testování vzájemně nesouvisejících oblastí na DNA a zejména pro amplifikaci vnitřních kontrol současně se vzorky.

Multiplex RT-PCR for subtyping of tick-borne encephalitis virus isolates



Unique combination of oligonucleotide primers hybridizing with subtype-specific signature positions of the sequence encoding viral E protein. (Růžek et al., 2007)

Multiplex RT-PCR for subtyping of tick-borne encephalitis virus isolates

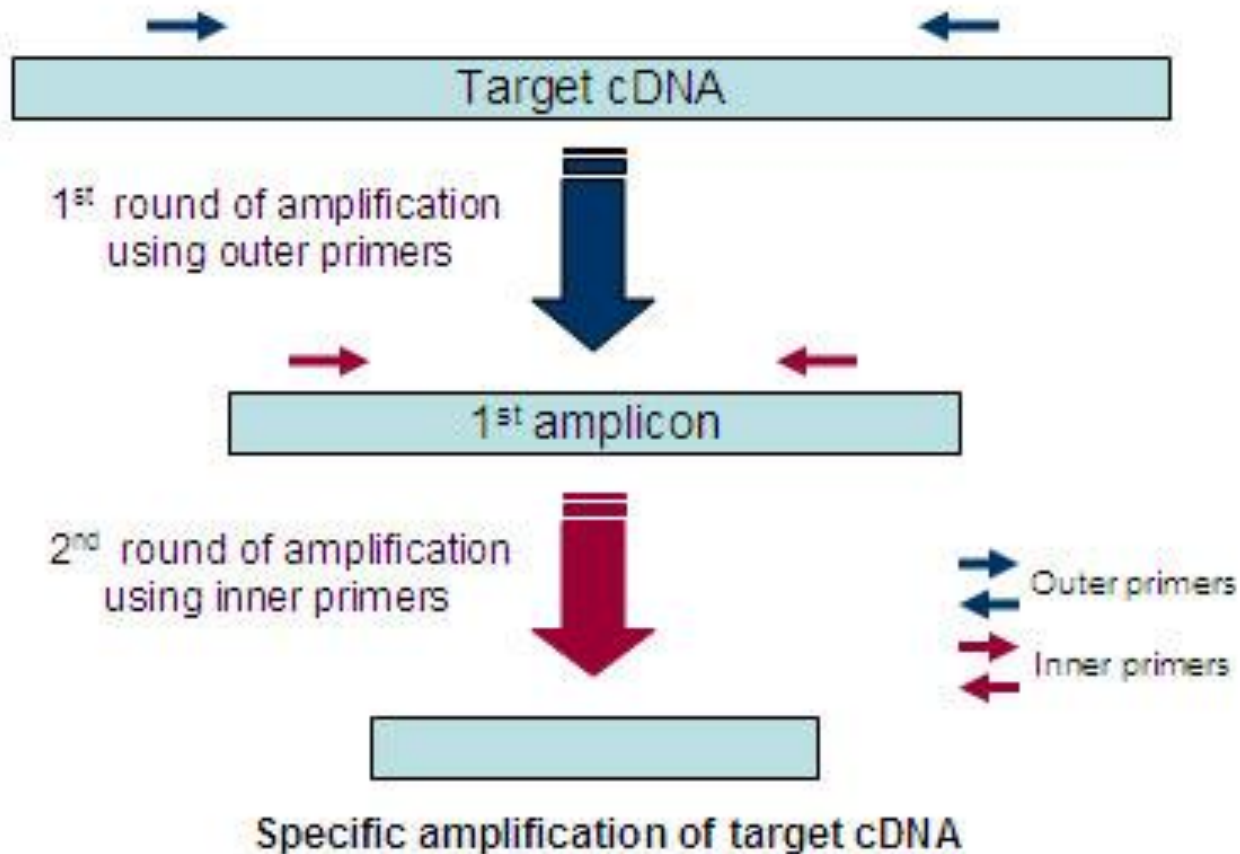


Subtyping of TBEV strains using the multiplex RT-PCR. Members of separate subtypes were analyzed individually (a) and in all possible combinations (b).

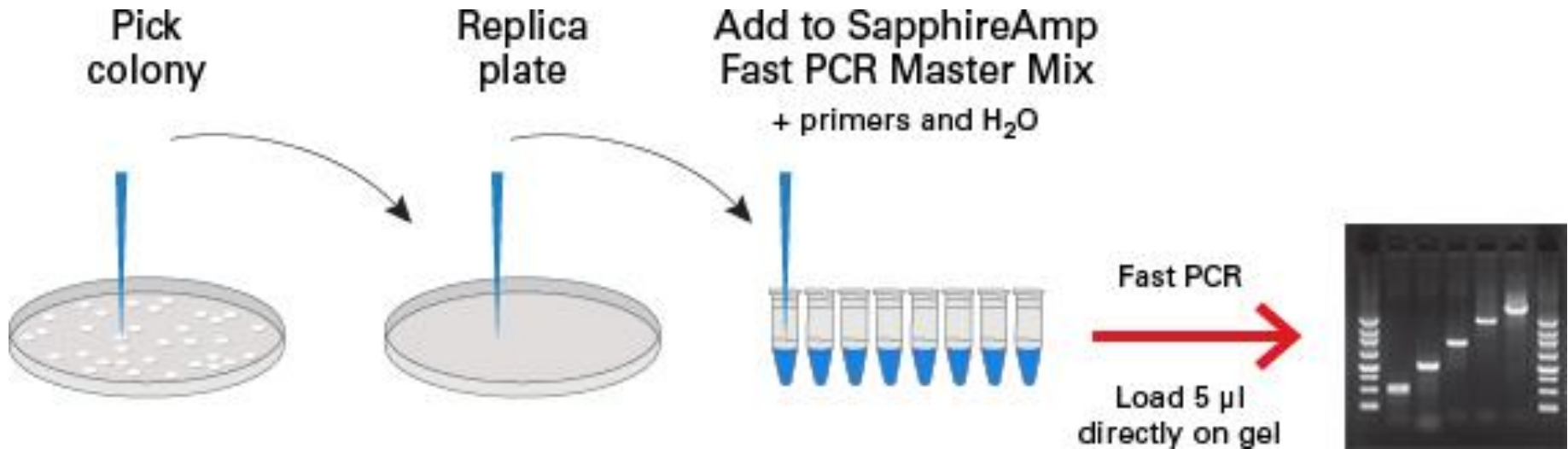
(Růžek et al., 2007)

Odstupňovaná PCR využívající vnějších a vnitřních primerů (nested PCR)

Nested polymerase chain reaction (PCR)



PCR kolonií



DIAGNOSTIKA: druhově/kmenově specifické primery

SCREENING GENOVÝCH KNIHOVEN: univerzální primery, připojení na vektoru

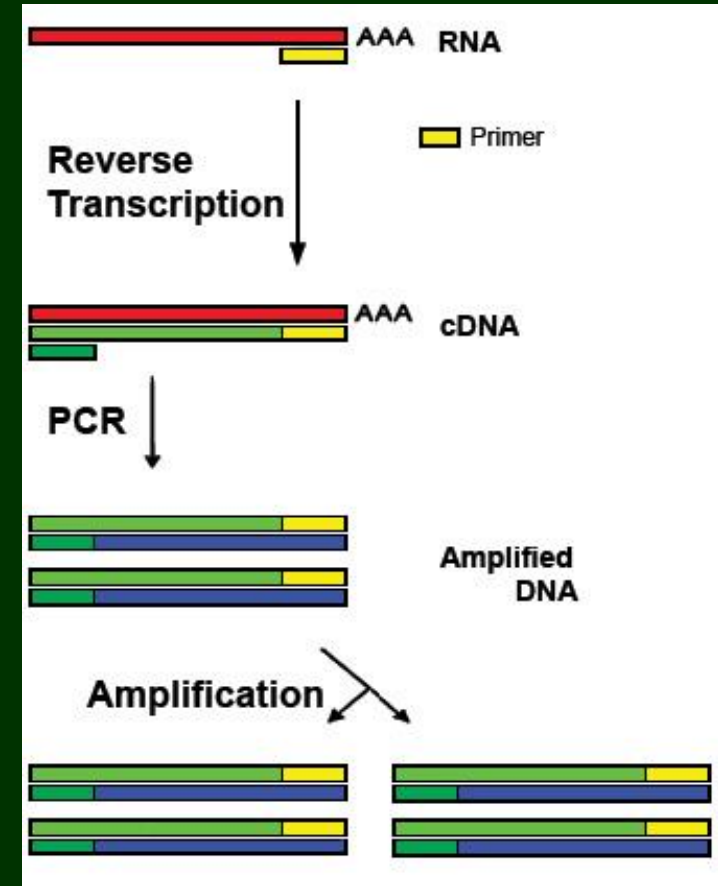
Přenos kultury z pevného agaru párátkem do PCR směsi, proběhne PCR, elfo vyhodnocení

Buňky lyzují během počáteční denaturace

Amplifikace začíná v prvním cyklu s nižší teplotou pro připojení primerů (např. 45 °C, málo přísné podmínky) a pokračuje jejím postupným zvyšováním o 1 až 2 °C (jak narůstá množství amplifikované DNA) v následujících cyklech až na optimální teplotu

Zpětná PCR (RT-PCR)

- metoda určená k amplifikaci molekul RNA
- **RNA – cDNA – DNA**
- retrovirové zpětné traskriptázy: M-MuLV, AMV (termolabilita, enzym ztrácí funkčnost nad 42°C)
- **termostabilní Tth DNA-polymeráza**, za přítomnosti Mn²⁺ se vyznačuje RNA-dependentní DNA-polymerázovou aktivitou
- pro zahájení RT-PCR se využívá jako jeden z primerů oligo(dT)-primer rozeznávající poly(A)-konce mRNA nebo náhodné hexanukleotidy v případě, že mRNA není polyadenylovaná
- možnost využití taktéž sekvenčně specifických primerů



RT-PCR-method for early differential diagnosis of tick-borne encephalitis

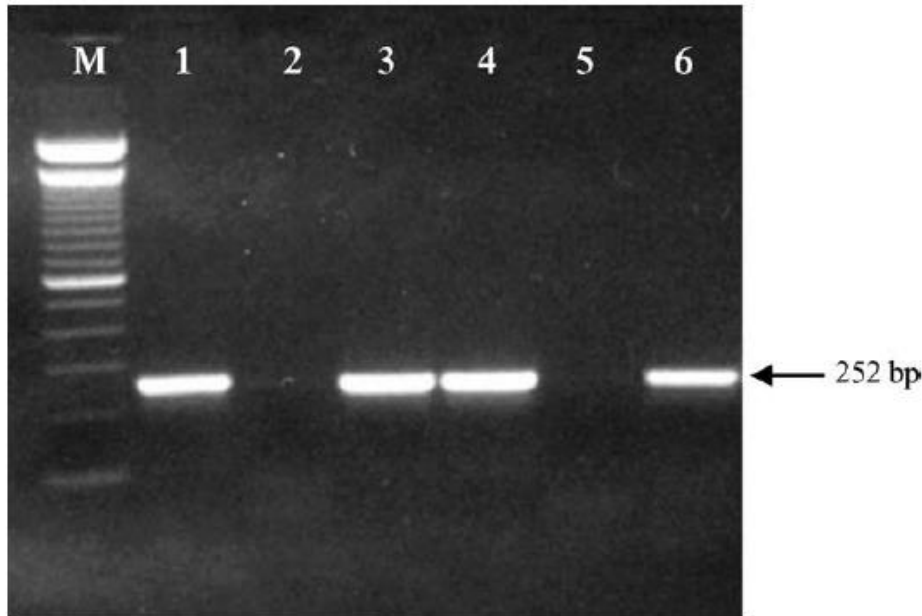
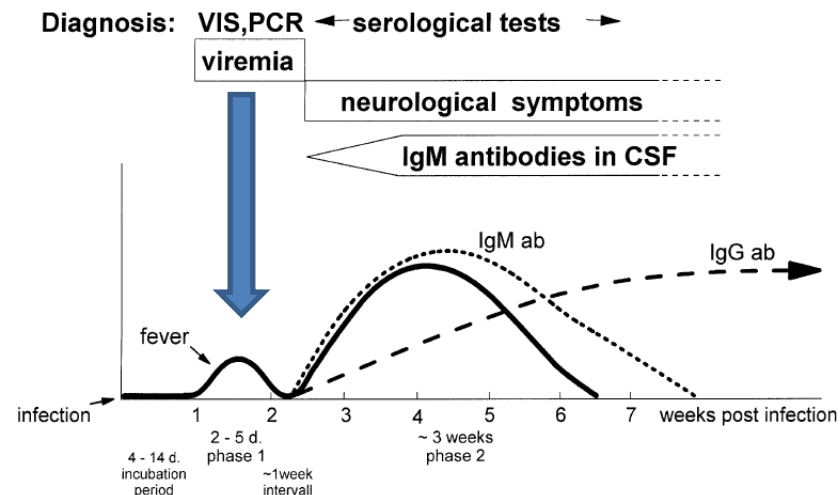


Fig. 1. Agarose gel analysis after TBEV RT-PCR. Lanes 1–4: results obtained from serum samples of patients with TBE; lane 5: negative control; lane 6: positive control; lane M: GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder (Fermentas GmbH, Germany).

(Saksida et al., 2005)

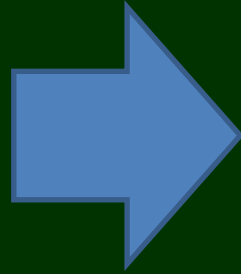
- 252-bp long portion of highly conserved NS5 region of TBEV genome
- AMV reverse transcriptase



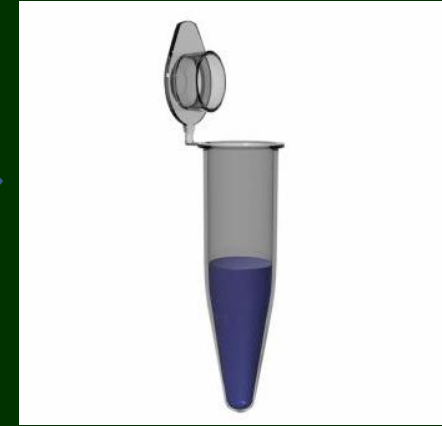
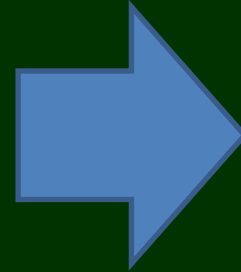
Diagnosis of TBEV in ticks



tick samples

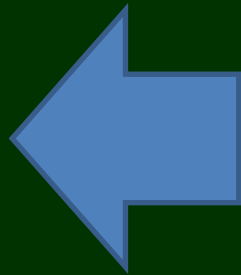
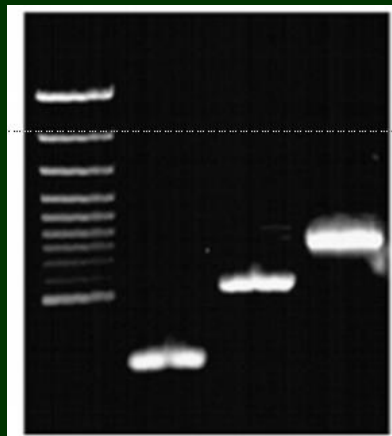


tick homogenisation



virus RNA isolation
QIAamp RNA kit
(Qiagen)

identification of TBEV
positive samples



PCR amplification of
sequence encoding E
protein

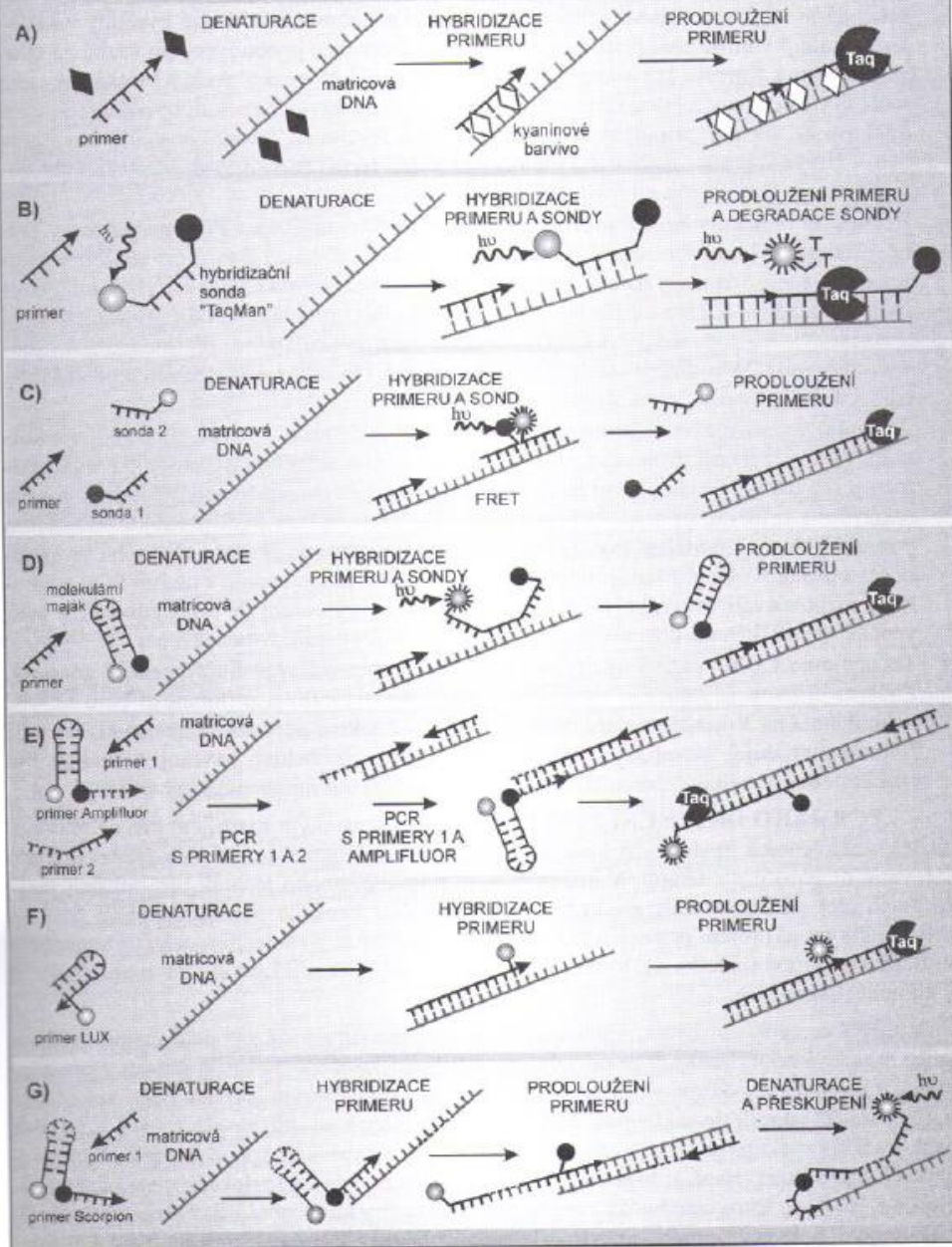


(Růžek et al., 2007)

Kvantitativní PCR

- amplifikace a detekce probíhají simultánně
- kvantifikace amplikonu v reálném čase se provádí prostřednictvím detekce a kvantifikace fluorescenčního signálu ve speciálním zařízení, které kromě cyklického střídání teplot umožňuje detekci fluorescence a monitorování postupu PCR v reálném čase bez nutnosti detekovat produkty PCR elektroforeticky
- pro kvantitativní detekci produktu v průběhu PCR existují tři obecné metody založené na použití:
 1. interkalačního barviva vázajícího se na DNA
 2. fluorescenčně značených sond vázající se na střední část amplifikovaného produktu
 3. fluorescenčně značených primerů
- Dvojitě značené sondy obsahují kromě fluoroforu také zhášec (absorpční spektrum zhášedce musí překrýt emisní spektrum fluoroforu)

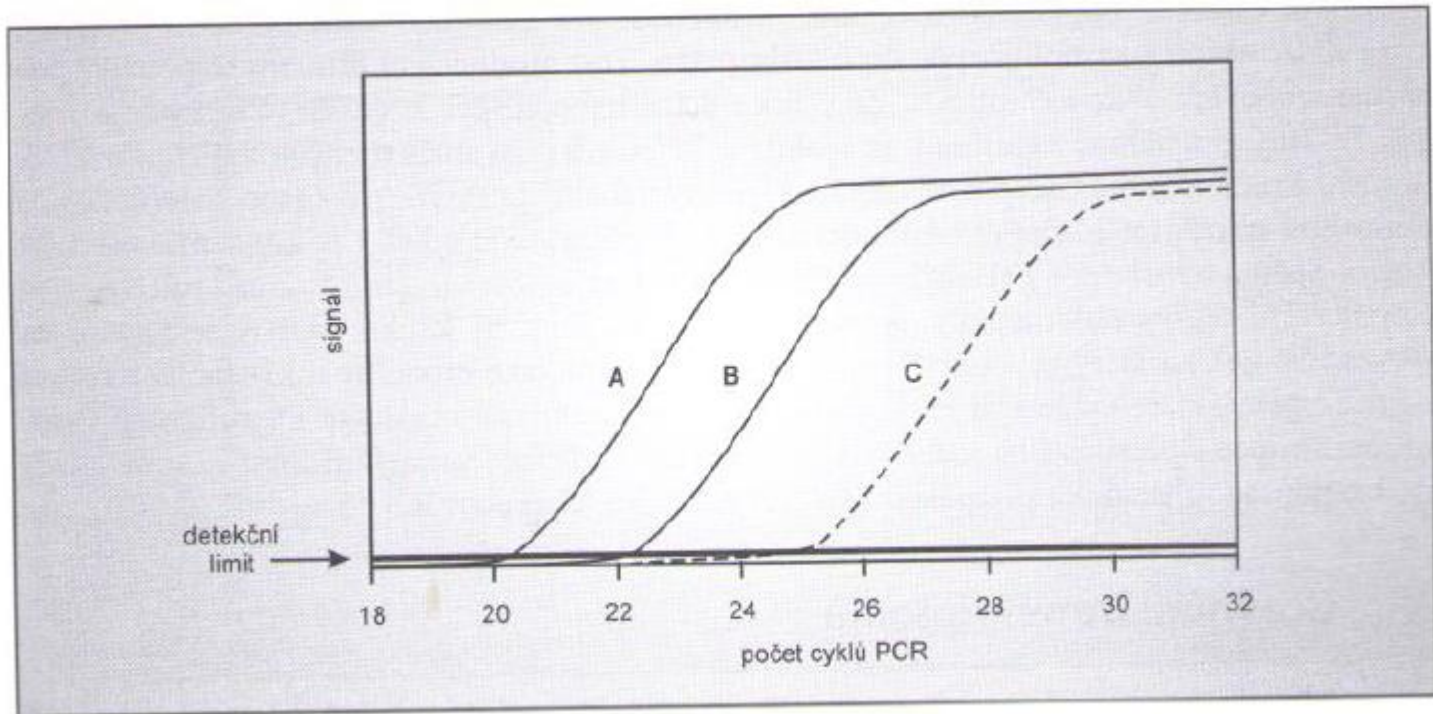
Typy sond pro q-PCR



Obr. 50 Technologie používané pro detekci produktů při kvantitativní PCR. A) Fluorescenční barvivo vázající se na DNA. B) Technologie TaqMan. C) FRET mezi fluorofory nesenými dvěma sondami. D) Molekulární majáky. E) Technologie primerů AmpliFluor. F) Technologie primerů LUX. G) Bifunkční molekuly Scorpion

- a) kyaninová barviva SYBR Green
- b) sondy TaqMan
- c) dvojice fluorescenčních sond využívajících FRET
- d) molekulární majáky
- e) primery Amplifluor
- f) technologie LUX
- g) primery Scorpion

Kvantitativní PCR



Obr. 80 PCR v reálném čase

Typický výstup z q-PCR. X: počet cyklů pcr, Y: intenzita signálu – převedení na počet kopií/uL, detekční limit: intenzita signálu vyšší než šum.
Obvykle vytvořit kalibrační křivku se vzorky DNA o známých koncentracích a k ní vztáhnout neznámý vzorek

Kvantitativní RT-PCR (RT-qPCR) pro diagnostiku SARS-CoV-2

*Soupravy pro detekci SARS-CoV-2
dodávané společností
ELISABETH PHARMACON*



EliGene[®] COVID19 BASIC A RT

Princip metody

- založena na reverzní transkripci virové RNA SARS-CoV-2 a následné jednokrokové analýze pomocí qPCR.
- Použita je inovativní směs 4 sad primerů (3 dvojice pro virovou RNA, 1 pro kontrolní) a 4 sond TaqMan (sondy označené FAM pro detekci virů a sondy označené HEX pro vizualizaci vnitřní kontroly)
- Primery a sondy použité v soupravě byly schváleny a doporučeny WHO. Jedná se o tři nezávislé cíle v genu N v RNA sekvenci viru SARS-CoV-2.
- Jiné kity (viz praktika): sondy pro cílové sekvence v genu E, RdRp a N; bývají označeny odlišnými fluorofory
- Veškeré specifické primery a sondy použité v soupravách jsou každý měsíc ověřovány na základě databáze GenBank s novými známými sekvencemi viru, aby byla kontinuálně zabezpečena úplná funkčnost souprav.
- Zvýšená citlivost a specifita této soupravy je založena na amplifikaci tří nezávislých cílů SARS-CoV-2 v jediné PCR reakci.

Stěry: Uvedené vzorky odeberte dle standardního protokolu do odběrových zkumavek. Doporučené **odběrové tampony**: FLOQSwabs (Copan) –suché stěry nebo do UTM –(Universal Transport Medium, Copan) Darcon swap –suché stěry nebo do **transportního média pro viry** MicroTest™ M4RT nebo MicroTest™ M6 (Termo Scientific)

Jiné odběrové sady na bázi polymerových materiálů –suché nebo stransportním médiem proviry. Nepoužívejte bavlněné tampony z důvodu možné inhibice PCR reakce.

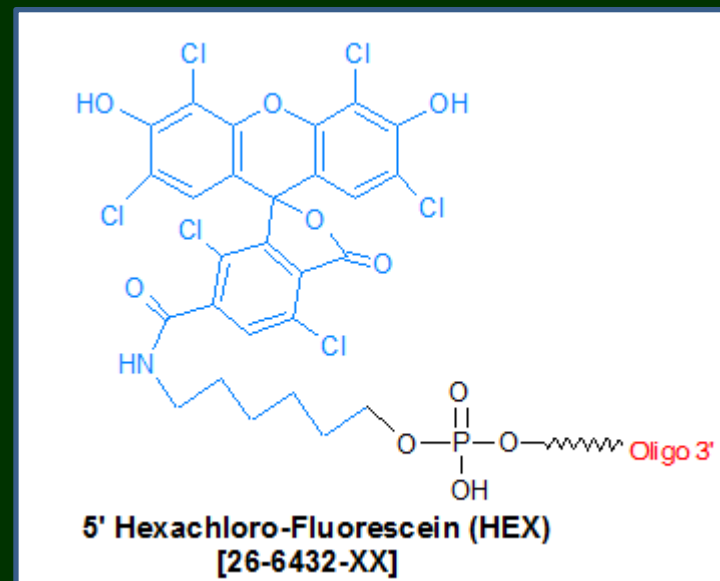
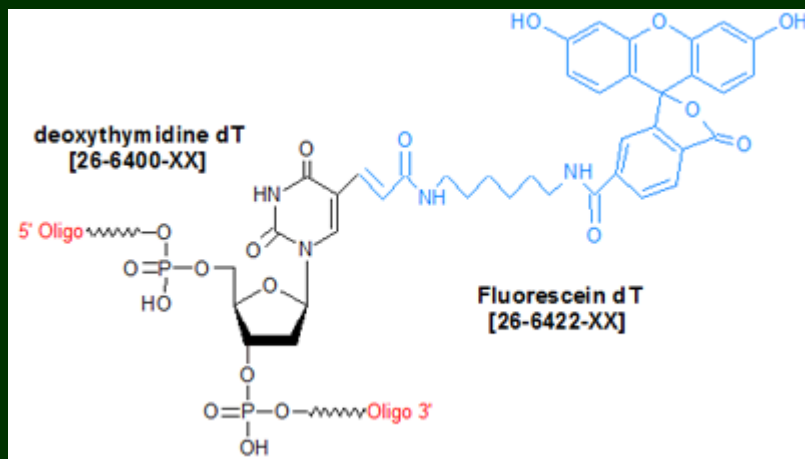
Vzorky by měly být přepravovány do laboratoře při 4 ° C. Jsou stabilní minimálně 72 hodin od odběru vzorků při 4 ° C. V případě, že nemáte možnost transportovat suché výtěry do laboratoře při 4 ° C, je třeba přepravovat suché výtěry **při pokojové teplotě do šesti hodin.** Pro **delší skladování vzorků než 72 hodin zmrazte vzorek na -20 ° C.** Suché tampóny by měly být ponořeny do lyzačního pufru podle návodu k použití použité izolační soupravy. Po odstranění tampónu musí být přidáno 5µl interní kontroly RNA (IC RNA) do 200 µl vzorku použitého pro izolaci RNA.

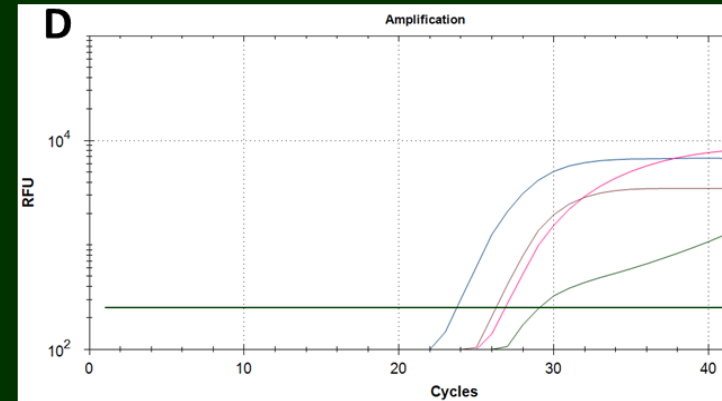
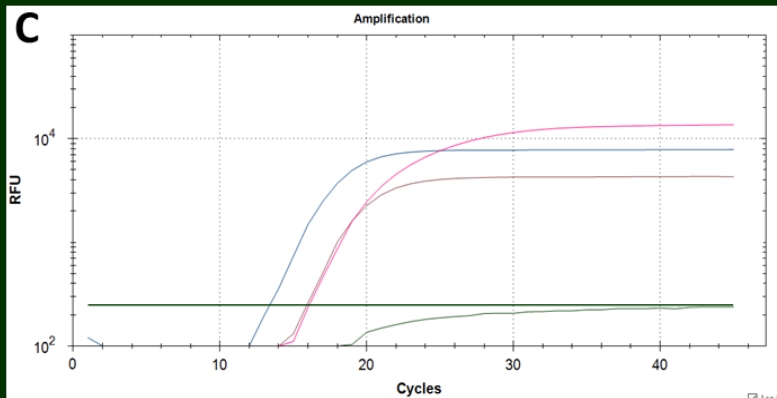
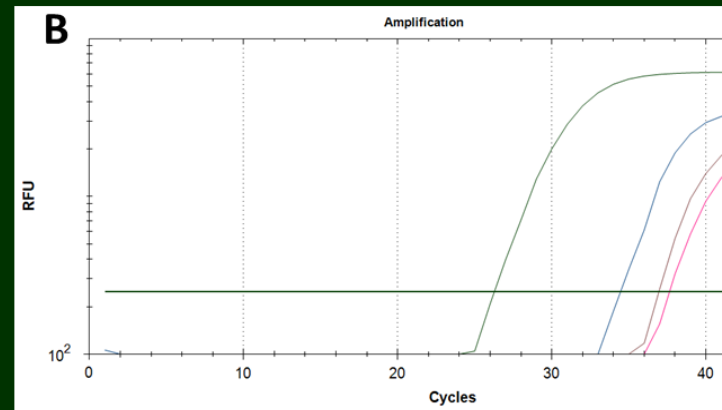
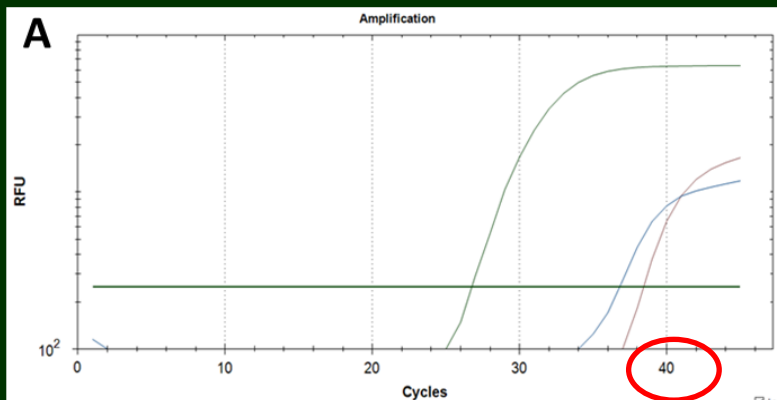
Zařízení pro Real Time PCR –souprava je optimalizována pro přístroje LightCycler® 480, QuantStudio 3 a 5 Real-Time PCR Systems (ThermoFisherScientific), Rotor-Gene Q (Qiagen) a CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). RT-qPCR využívá detekci pomocí TaqMan technologie (FAM a HEX značené sondy) a může být použita i na dalších termocyklérech umožňujících detekci v těchto kanálech.

Laboratorní ochranné rukavice a respirátory FFP3. Pracujte v příslušných boxech pro biologické nebezpečí. Také odstředování vzorků musí být prováděno v boxech pro biologické nebezpečí. Mějte na paměti, že i virová RNA může způsobit infekci. •Protože se jedná o závažný patogen, dodržujte prosím aktuální doporučení WHO **pro laboratoře BSL2+ nebo BSL3.**

Pro detekci cílových sekvencí SARS-CoV-2 jsou použity 3 sondy značené **FAM (exc. 494nm – em. 518 nm)**

Pro detekci Interní kontroly je použita sonda značená **HEX (exc. 520nm – em. 548 nm)**





A: +vzorek s vyššími Ct pouze pro geny E a N (začínající nebo končící infekce)

B: +vzorek s vyššími Ct – nízká virová nálož

C: +vzorek s extrémně nízkými Ct – vysoká virová nálož

D: +vzorek s nízkými Ct - probíhající infekce

Negativní výsledek

Pokud **nedojde** k nárůstu amplifikačního signálu v kanálu FAM **před 40. cyklem**, lze výsledek interpretovat jako pravděpodobně negativní nebo s koncentrací RNA pod detekčním limitem soupravy (15 genomových RNA/reakci). **Signál pro interní kontrolu (IC RNA) musí být pozitivní**. Výsledek nevyklučuje přítomnost infekce virem SARS-CoV-2, protože výsledky testu jsou závislé na správném odběru vzorku i jeho zpracování. Výsledky jsou též závislé na přítomnosti dostatečného množství analyzované RNA viru SARS-CoV-2. Bylo zjištěno, že virus může být vylučován přerušovaně, a dokonce i u infikovaného pacienta může být hladina viru v klinických vzorcích v daných dnech pod detekčním limitem jakékoli metody RT-qPCR. Z tohoto důvodu se doporučuje provést alespoň dvě, nejlépe více RT-qPCR vyšetření u jednoho pacienta v průběhu několika dnů.

Pozitivní výsledek

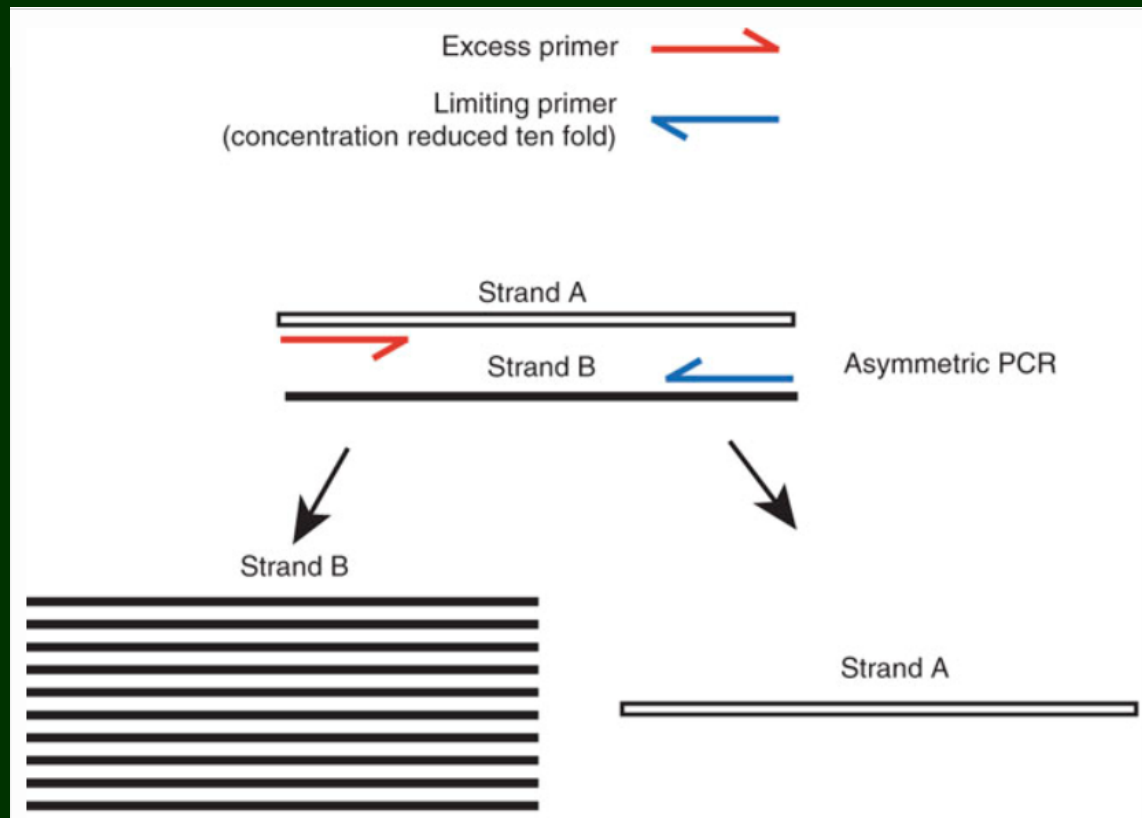
Amplifikační **signál se objeví** ve FAM kanálu **před 40. cyklem**. SARS-CoV-2 RNA byla detekována ve vzorku. Vzorek je pozitivní na RNA SARS-CoV-2.

Inhibovaný vzorek

V případě, že **nedojde k nárůstu amplifikačního signálu specifického pro SARS-CoV-2 v kanálu FAMa ani k nárůstu amplifikačního signálu v kanálu HEX**, je nutné analýzu zopakovat nejlépe s nově izolovanými vzorky RNA. Ujistěte se, že eluční pufr neinhibuje reakci PCR. V tomto případě se doporučuje provádět eluce do vody pro molekulární biologii

Asymetrická PCR

- **technika pro přípravu PCR produktů pro sekvencování** (Sangerova metoda vyžadující ssDNA)
- při asymetrické PCR jsou preferenčně tvořeny ssDNA
- výchozí koncentrace primerů: jeden z primerů je ve 100x vyšší koncentraci než druhý primer. Dvouřetězcové formy se tvoří až do okamžiku, kdy se jeden z primerů vyčerpá. Druhý primer pak dále syntetizuje pouze jeden z řetězců
- asymetrická PCR může být prováděna rovněž pouze s jedním primerem, zejména pro účely automatického sekvencování



Sekvenační techniky-přímá detekce polymorfismů

- Stanovení primární struktury DNA/RNA pro diagnostické účely
- Výchozí materiál: restriční fragmenty naklonované ve vektoru nebo PCR amplikony
- Definování jednoho z konců
- Vytvoření souboru jednořetězcových molekul DNA, lišících se velikostí o jedinou bázi
- Rozdělení takového souboru elektroforézou s takovou rozlišovací schopností, která umožňuje oddělit řetězce DNA lišící se délkou o jedinou bázi

CHEMICKÁ METODA (Maxamovo-Gilbertovo sekvenování)

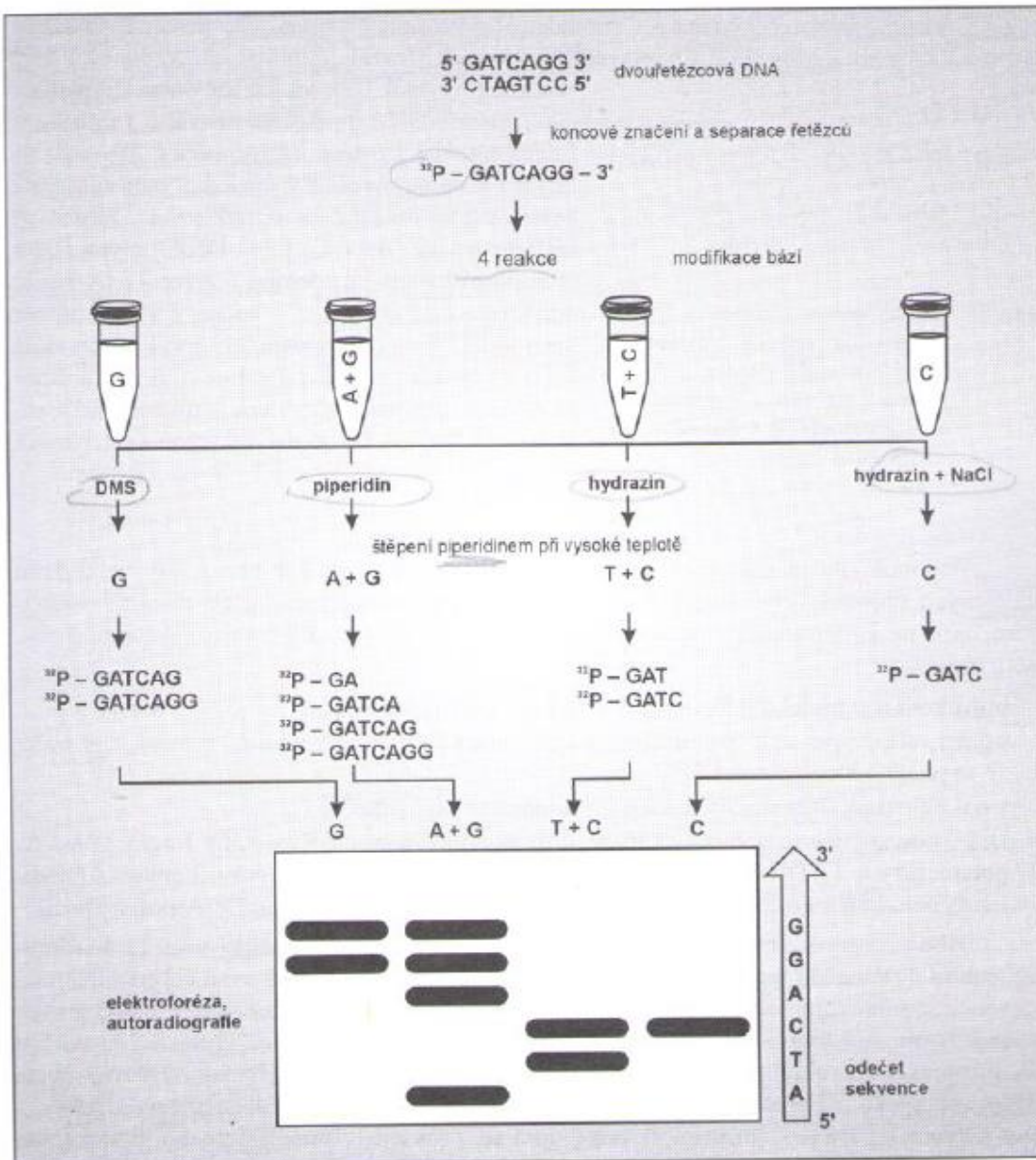
- podstatou je specifické rozštěpení molekuly DNA chemickými činidly v místech, kde je lokalizována báze určitého typu
- každou ze 4 bazí lze specificky modifikovat
- výsledkem modifikace a eliminace báze je vytvoření křehkého místa
- podmínky volit tak, aby byla poškozena průměrně 1 báze v řetězci
- piperidin: za vysoké teploty – štěpení řetězce v místě modifikace
- výsledkem je soubor fragmentů DNA lišící se o jedinou bázi

Tabulka 2 Chemické modifikace bází používané při Maxamově–Gilbertově sekvencování

Báze	Specifická modifikace
G	Metylace dusíku N ⁷ dimetylsulfátem při pH 8,0 způsobuje, že vazba C ⁸ –C ⁹ je citlivá ke štěpení.
A + G	Piperidin při pH 2,0 zeslabuje glykosidovou vazbu adeninu a guaninu protonací dusíkových atomů v purinových cyklech.
C + T	Hydrazin otevírá pyrimidinové cykly, které recyklují do pětičlenných, citlivých ke štěpení.
C	Hydrazin za přítomnosti NaCl (1,5 M) reaguje pouze s cytozinem.
A > C	Hydroxid sodný (1,2 N) při 90 °C způsobuje silné štěpení u A a slabé štěpení u C.

- příprava značených jednořetězcových fragmentů DNA, jejichž sekvence má být stanovena
- rozdělení souboru fragmentů DNA do 4 vzorků
- působení chemickou látkou, která specificky modifikuje jeden nebo dva typy bází DNA
- působení další chemické látky, která vede k rozštěpení řetězců DNA ve všech místech, kde byly báze modifikovány
- rozdělení fragmentů DNA elektroforézou v denaturujícím PAGE gelu, vzorky z každé ze čtyř reakcí na gel nanoseny vedle sebe v definovaném pořadí
- autoradiografická detekce fragmentů, které nesou označený konec
- odečtení sekvence
- není rutinně používáno – nejednoznačnost dat (aktivita činidel ovlivněna nečistotami atd), radioaktivita, kratší sekvence, laboratorně náročná metoda

Chemické sekvenování podle Maxama a Gilberta



Obr. 36 Chemické sekvenování DNA podle Maxama a Gilberta

ENZYMOVÁ METODA (Sangerovo sekvenování)

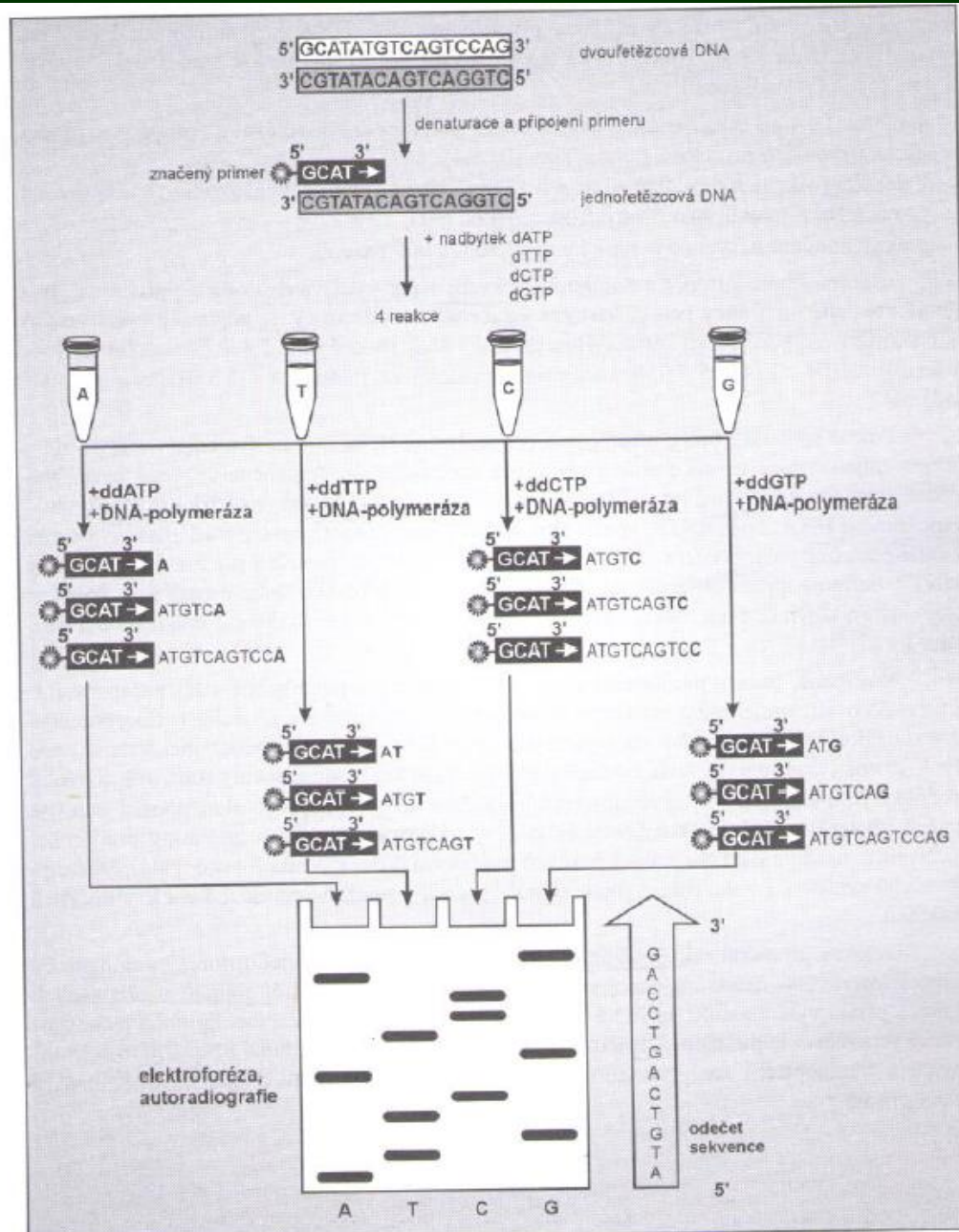
- dnes nejběžněji používaná sekvenační metoda
- sekvenovaná molekula DNA je použita jako matrice pro syntézu komplementárních řetězců různé délky pomocí DNA-polymerázy
- syntéza zahájena z místa, kde je připojen sekvenčně specifický (značený) primer a ukončena v místě, v němž je do rostoucího řetězce inkorporován místo normálního deoxyribonukleotid-trifosfátu jeho analog 2',3'-dideoxyribonukleosidtrifosfát (ddNtp). Ten má roli koncového inhibitoru (terminátoru) syntézy DNA (absence 3' - OH)
- reakce běží ve čtyřech oddělených vzorcích
- reakční směs obsahuje:
 - 1) purifikovanou molekulu DNA, jejíž sekvence má být stanovena
 - 2) primer
 - 3) směs obsahující 4 NTP + jeden ze 4 ddNTP
 - 4) DNA-polymerázu (např. Taq)

Primery: délka cca 10 bp, v případě sekvenování PCR produktů lze užít stejný primer, v případě klonovaných fragmentů ve vektoru lze užít univerzální primery
-značení: radioaktivně, fluorescenčně

-po proběhnutí reakce se produkty denaturují a separují na PAGE gelu

-vhodná délka sekvenované sekvence: 300 – 400 bp

Klasické Sangerovo sekvenování s radioaktivně značenými primery



Obr. 38 Enzymové sekvenování DNA podle Sangera

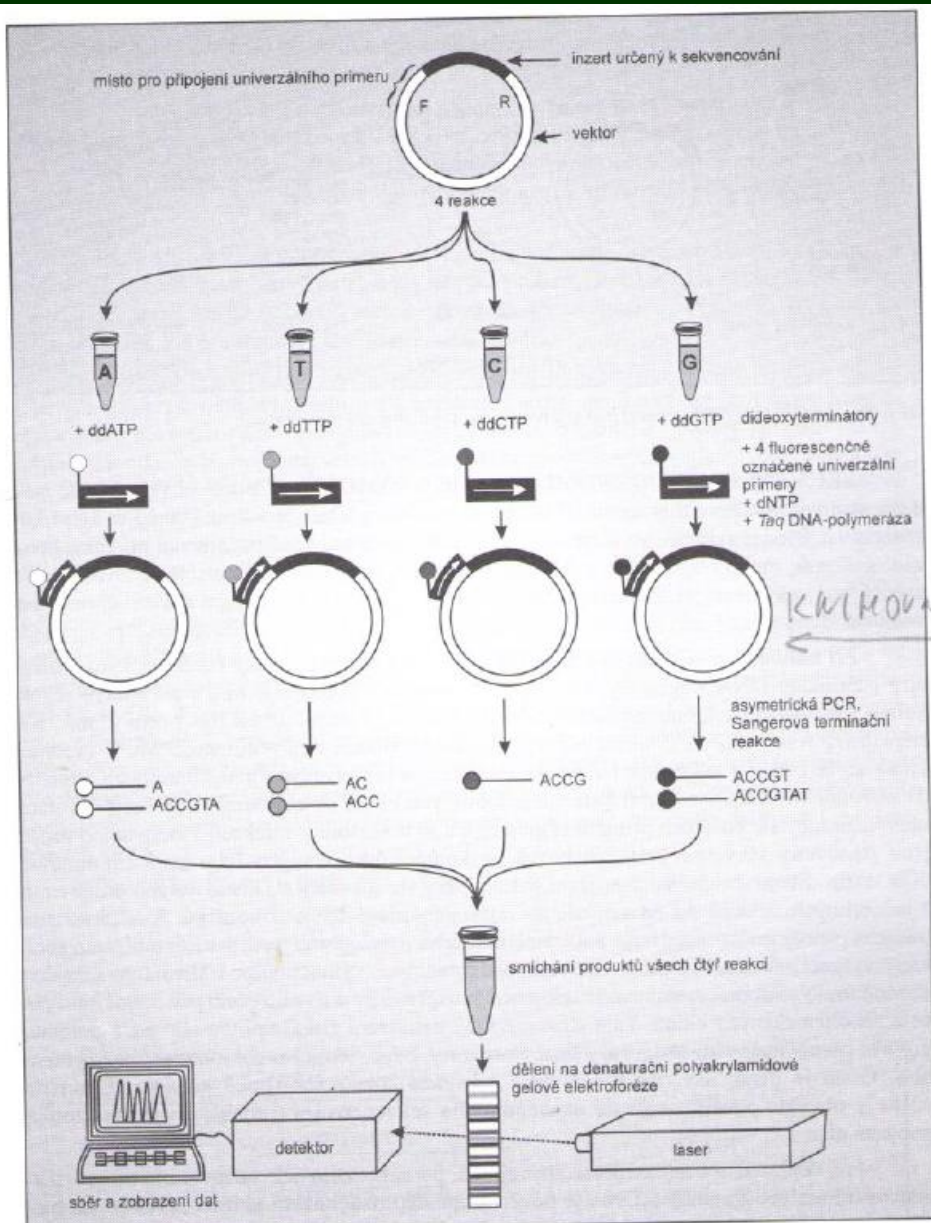
AUTOMATICKÉ SEKVENOVÁNÍ DNA

- zdokonalení Sangerova sekvenování s využitím plně automatizovaných aparatur
 - rychlejší stanovení, možnost sekvenace DNA z genomových knihoven o tisících klonů
 - odlišnosti proti klasickému Sangeru
- 1) syntéza DNA probíhá metodou asymetrické PCR s využitím Taq polymerázy
 - 2) k detekci se užívají 4 různé fluorescenční značky, každá pro detekci produktů zakončených specifickou bází
 - 3) délka stanovované sekvence: 500 – 1000 bází

Fluorofory – dva odlišné přístupy:

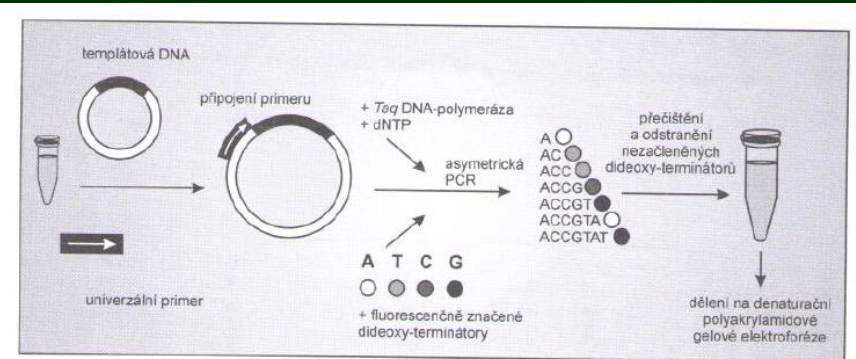
- buď značené primery nebo značené terminátory
- FAM (6-karboxyfluorescein), TET (6-karboxy-2',4,7,7'-tetrachloro-fluorescein), HEX (2',4,4',5',7,7'-hexachlorofluorescein) a TAMRA (5-karboxytetramethylrodamin)

Detekce v průběhu elektroforézy automaticky pomocí laserového detektoru v kombinaci s počítačem, který z pořadí signálů v příslušných drahách přímo vyhodnocuje sekvenci DNA. Deskové ale častěji kapilární uspořádání.



Obr. 39 Automatické sekvenování využívající barevné značení primerů

Automatické sekvenování na bázi Sangerovy sekvenace se značenými primery (vlevo) a terminátory (dole)

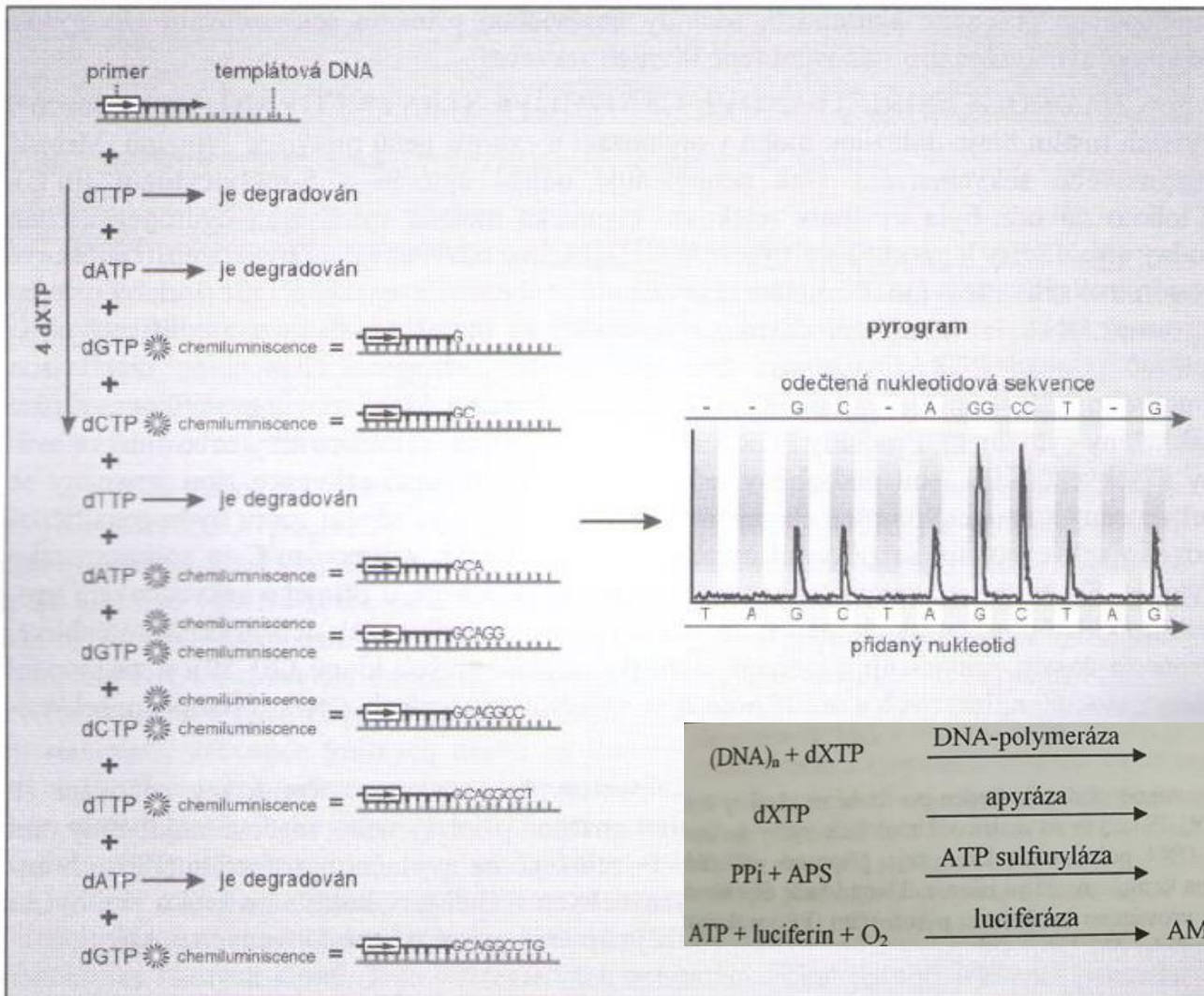


Obr. 40 Automatické sekvenování využívající barevné značení terminátorů

PYROSEKVENOVÁNÍ

- sekvenace v reálném čase, bez značených primerů nebo NTP, ani separace na eflo
- založena na uvolnění pyrofosfátu (PPi) při elongaci, kvantitativní emise světla
- v prvním kroku hybridizuje sekvenační primer ssDNA templátu a je inkubován s enzymy/substráty: DNA-pol I z E. coli, ATP sulfuryláza, luciferáza, apyráza, adenosin 5'-fosfosulfát (APS), luciferin
- ve druhé kroku se postupně jeden po druhém přidávají všechny 4 nukleotidy (dNTP, dXTP). Pokud je komplementarita, polymeráza katalyzuje připojení nukleotidu k primeru. Pokud není komplementarita, nukleotid degradován apyrázou. Každé připojení je provázeno uvolněním PPi, ty jsou kvantitativně přiváděny ATP sulfurylázou za přítomnosti APS na ATP. To umožňuje luciferázou zprostředkovanou konverzi luciferinu na oxyluciferin – vytvoření záblesku světla. Nepřipojené dXTP a nespotřebované ATP jsou degradovány apyrázou. Namísto dATP je používán 2'-deoxyadenosin-5'-alfa-thio-TP, který je zpracován DNA-pol, ale ne luciferázou.
- rychlost: 1 báze/min, běžná délka 100 bp
- ověření krátkých fragmentů DNA a identifikace jednonukleotidových polymorfismů.
- v roztoku vs. na pevné fázi

Pyrosekvenování



Obr. 42 Princip pyrosekvencování DNA

CELOGENOMOVÉ SEKVENOVÁNÍ

- pro sekvenování fragmentů DNA větších než 500 – 1000 bází
- NÁHODNÉ SEKVENOVÁNÍ: tvorba náhodných fragmentů (1300 – 2000 bp), klonování do vektorů, sekvenace pomocí univerzálních sekvenačních primerů, uspořádání klonovaných fragmentů do souvislé sekvence = kontigy (překrývající se fragmenty), počítačové vyhodnocení
- USPOŘÁDANÉ SEKVENOVÁNÍ: tzv. procházení primerem (primer walking)- znalost sekvence na niž se připojí primer – extenze, vzniklý fragment do další reakce, další primer nasedá na konec fragmentu, další extenze atd atd.
- Dnes celogenomové sekvenování na bázi pyrosekvenování je základ pro sekvenovací techniku II. generace. Genomová DNA je rozštěpena na krátké fragmenty a pyrosekvenací jsou souběžně sekvenovány jednotlivé fragmenty, pak dedukce celé sekvence.

HYBRIDIZAČNÍ SEKVENACE

Využití kombinatorických přístupů

Analyzovaná sekvence se nechá hybridizovat se souborem krátkých prob (6 až 20 bazí), který obsahuje všechny možné kombinace stejné délky sestavených ze 4 bazí

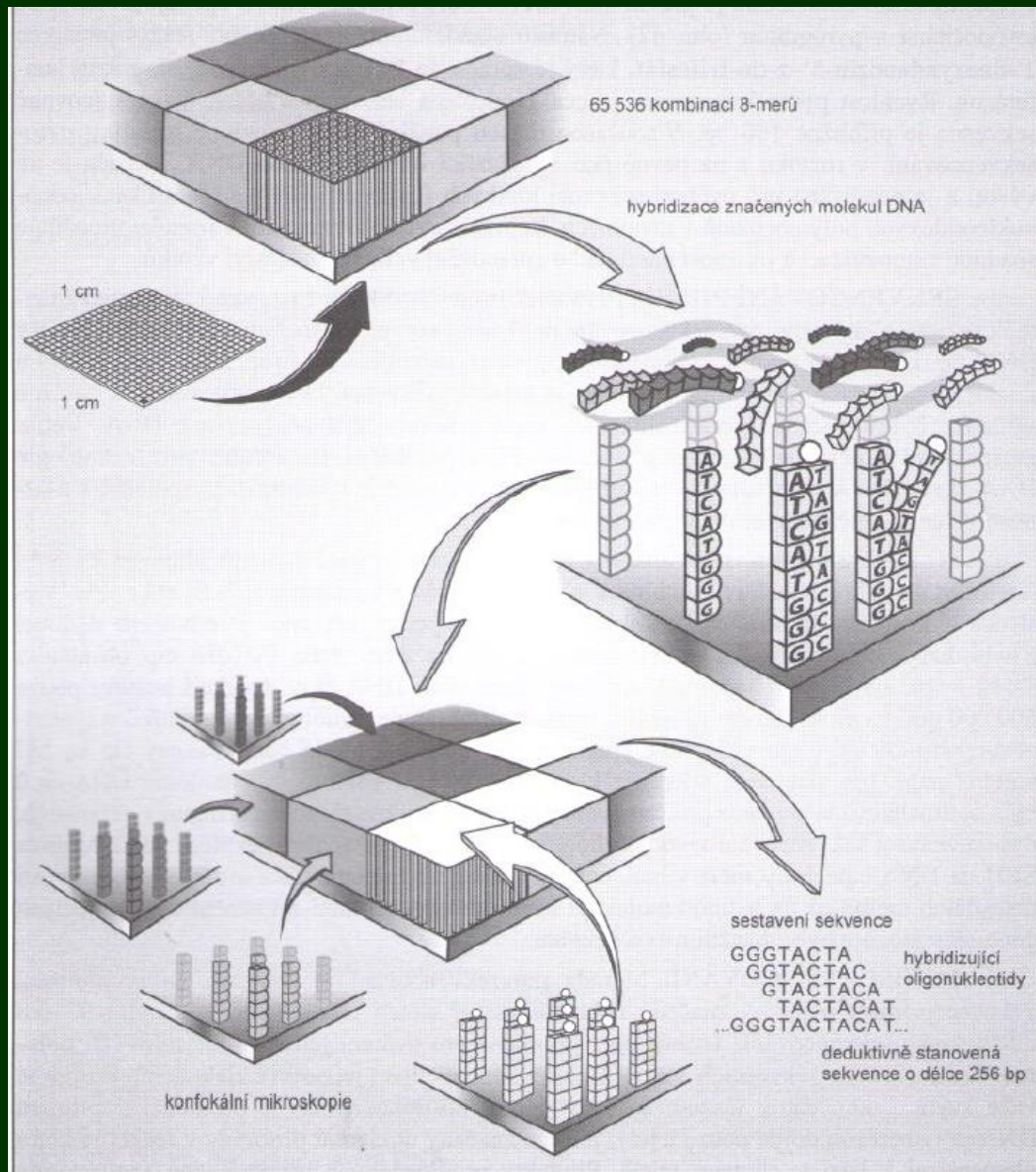
Podle toho, se kterými probami DNA hybridizuje, se usuzuje na přítomnost známé krátké sekvence v jejím řetězci

Pomocí překrývajících se úseků pak rekonstruujeme celou sekvenci.

Probíhá na křemíkovém čipu, rychlé stanovení (minuty)

Vyhodnocení: fluorescenční sonda na analyzovanou DNA, nebo indikátor hybridizace. Detektor: CCD kamera, počítačové vyhodnocení, rekonstrukce sekvence

Hybridizace na DNA čipu (princip DNA biosenzorů)



Obr. 43 Princip sekvencování pomocí hybridizace s použitím DNA-čipu

Využití sekvenačních technik pro vyšetření rezistence viru na léčiva (antivirotika): HIV

Table I. List of currently available US FDA-approved antiretroviral drugs

Generic name	Abbreviation	Brand name (US) ^a
Nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTIs)		
Abacavir	ABC	Ziagen [®]
Didanosine	ddI	Videx [®]
Emtricitabine	FTC	Emtriva [®]
Lamivudine	3TC	Epivir [®]
Stavudine	d4T	Zerit [®]
Tenofovir	TDF	Viread [®]
Zidovudine	AZT, ZDV	Retrovir [®]
Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs)		
Delavirdine	DLV	Rescriptor [®]
Efavirenz	EFV	Sustiva [®]
Etravirine	ETR	Intelence [®]
Nevirapine	NVP	Viramune [®]
Nevirapine extended release	NVP XR	Viramune [®] XR [™]
Rilpivirine	RPV	Edurant [®]
Protease inhibitors (PIs)		
Atazanavir	ATV	Reyataz [®]
Darunavir	DRV	Prezista [®]
Fosamprenavir	FPV	Lexiva [®]
Indinavir	IDV	Crixivan [®]
Lopinavir/ritonavir	LPV/r	Kaletra [®]
Nelfinavir	NFV	Viracept [®]
Ritonavir	RTV, /r	Norvir [®]
Saquinavir hard gel caps	SQV	Invirase [®]
Tipranavir	TPV	Aptivus [®]
Integrase inhibitors (INIs)		
Raltegravir	RAL	Isentress [®]
CCR5 antagonist		
Maraviroc	MVC	Selzentry [®]
Fusion inhibitor		
Enfuvirtide (T20)	ENF	Fuzeon [®]

Cons	Discriminatory mutations				Thymidine analogue mutations (TAMs)						MDR mutations	
	184 M	65 K	74 L	115 Y	41 M	67 D	70 K	210 L	215 T	219 K	69 T	151 Q
3TC	<u>VI</u>	R									Ins	M
FTC	<u>VI</u>	R									Ins	M
ABC	<u>VI</u>	<u>R</u>	<u>V</u>	E	L			W	YF		<u>Ins</u>	<u>M</u>
ddI	<u>VI</u>	<u>R</u>	<u>V</u>		L			W	YF		<u>Ins</u>	<u>M</u>
TDF	***	<u>R</u>	*	F	L		R	W	YF		<u>Ins</u>	M
d4T	***	<u>R</u>			L	N	R	W	<u>YF</u>	QE	<u>Ins</u>	<u>M</u>
ZDV	***	***	*		L	N	R	W	<u>YF</u>	QE	<u>Ins</u>	<u>M</u>

Fig. 2. Summary of nucleoside/nucleotide reverse transcriptase inhibitor drug-resistance mutations. Mutations are represented by their numeric position and amino acid letter code. The amino acid of the consensus wild-type sequence is represented by letters in the top row, while the amino acids of the mutations are below. Bold and underlining indicates mutations with high-level phenotypic and/or clinical resistance; bold indicates moderate phenotypic and/or clinical resistance; plain text indicates low-level resistance. Asterisks (***) represent increased susceptibility to the drug if the mutation is present. Refer to table I for a full list of drug name abbreviations and definitions. Adapted from the Stanford University HIV Drug Resistance Database.^[40] **Cons** = consensus wild-type; **Ins** = insertion; **MDR** = multi-drug resistance.

Metody založené na sekvenačních technikách příklad: stafylokoky

Přímá identifikace na základě sekvence DNA

- Stanovení sekvence konzervativních genů o délce 300 až 2500 bp
- Moderní vysoce účinná sekvenace celých genomů
- DNA microarrays

Přímé metody pro vnitrodruhovou typizaci

- Jednolokusová analýza
- Multilokusová analýza

Přímé metody pro identifikaci stafylokoků na základě sekvencí DNA

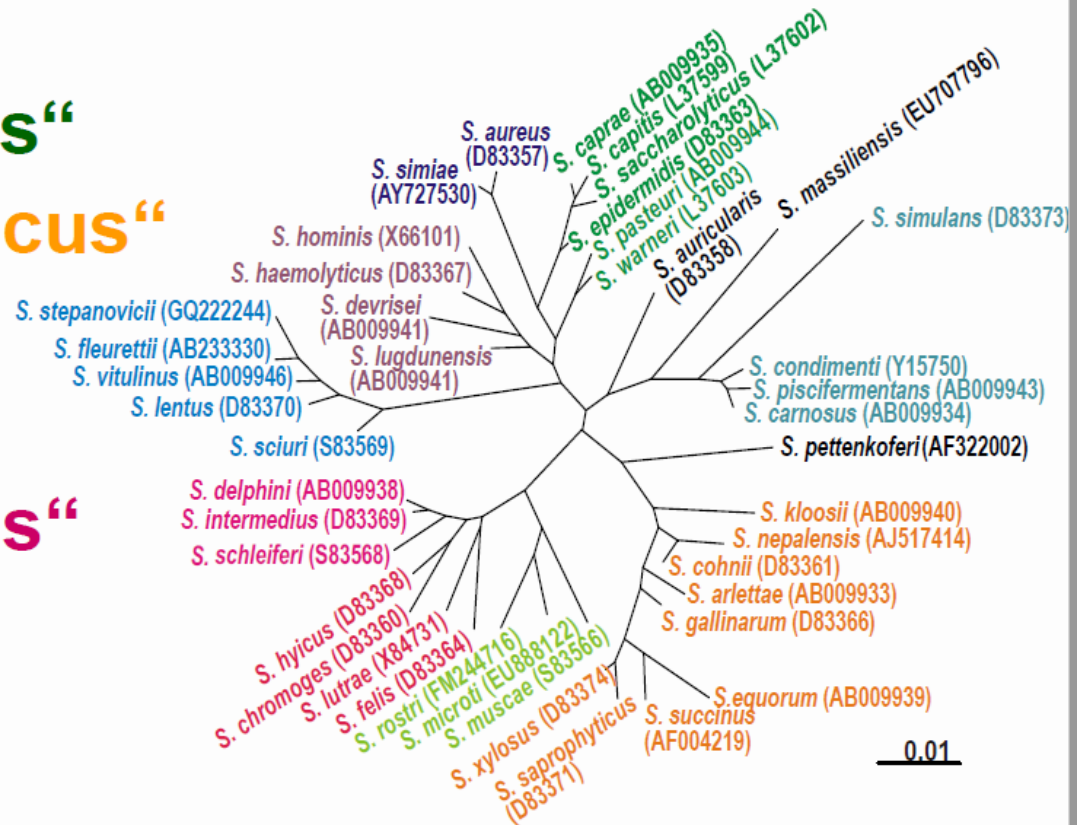
- Více než 30 ortologních genů vhodných pro diagnostiku a fylogenetické studie
- Rozdílná úroveň konzervovanosti sekvencí
- Nejpoužívanější lokusy:
 - geny pro funkční RNA
 - 16S ribosomal RNA (16S rRNA)
 - 23S ribosomal RNA (23S rRNA)
 - často používané geny, data dostupná pro většinu druhů
 - 60 kDa heat shock protein (*hsp60*, *cpn60*, *groEL*)
 - RNA polymeráza beta-podjednotka (*rpoB*)
 - 40 kDa heat shock protein DnaJ (*dnaJ/dnaK*)
 - Shah et al., 2007, IJSEM 57: 25-30
 - superoxide dismutase (*sodA*)
 - Poyart et al., 2001, JCM 39: 4296–4301
 - méně často používané geny, data dostupná pro některé druhy
 - glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza (*gap*)
 - Ghebremedhin et al., 2008, JCM: 46: 1019–1025
 - elongační faktor Tu (*tuf*)
 - Martineau et al., 2001, JCM 39: 2541–2547

16S rRNA – *fylogenetická analýza*

- **Takahashi et al., IJSB 1999, 49: 725–728**
- Spolehlivá identifikace na úrovni **rodu** a druhových komplexů
 - **Stanovení kompletní sekvence genu pro 16S rRNA vyžaduje provedení min. 4 - 6 sekvenačních reakcí**
 - **Fylogenetická analýza**
 - **Dosahované podobnosti sekvencí 97 – 99%**
 - **Definovány „species-groups“**

16S rRNA – species groups

- „S. aureus“
- „S. epidermidis“
- „S. saprophyticus“
- „S. muscae“
- „S. hyicus“
- „S. intermedius“
- „S. simulans“
- „S. sciuri“



Pantůček et al., IJSEM 2005, 55:1953-1958, doplněno

- Srovnání diskriminační schopnosti sekvenování jednotlivých genů u stafylokokových druhů

Lokus	Podobnost mezi druhy	Průměrná podobnost	Délka (bp)
16S rRNA	97- 99,5 %	98 %	~ 1400
<i>rpoB</i>	72 - 94 %	86 %	~ 480 nebo 750
<i>hsp60</i>	74 - 93 %	82 %	~ 600
<i>sodA</i>	68 - 92 %	81 %	~ 430
<i>dnaJ</i>	71 – 89 %	78 %	~ 880
<i>gap</i>	24 – 96 %	65 %	~ 930

- Diagnostika:** Využití poznatků a analýzy sekvenčních dat pro přípravu DNA microarrays
- Taxonomie:** Rozvoj a využití vysoce účinných metod pro sekvenování celých genomů pro jejich klasifikaci



Získávání sekvenčních dat

- **Databáze nukleotidových sekvencí**
 - GenBank/EMBL/DDBJ
 - Lokální hledání podobností
 - BLAST
 - FASTA
- **Specializované databáze**
 - SILVIA, RDP (rRNA)
 - cpnDB
- **Integrované zdroje**
 - StrainInfo
- **Integrované identifikační databáze**
 - BIBI database

Jednolokusová Spa-typizace

- Sekvenování DNA polymorfního regionu genu pro protein A (*spa*)
- Určení kombinace opakovaných jednotek (repetic) v oblasti X dává jedinečný spa-typ
 - reprodukovatelné, jednoznačné a snadno interpretovatelné výsledky
 - postačující pro zkoumání vypuknutí infekce
 - v dlouhodobém časovém horizontu by měla by být doplněna další technikou (PFGE, MLVA, aj.)

Jednolokusová sekvenační typizace

- Vhodná sekvence DNA je amplifikována pomocí PCR a sekvencována
- Sekvence jsou vzájemně srovnány
- Možná náhrada celogenomovým sekvenováním

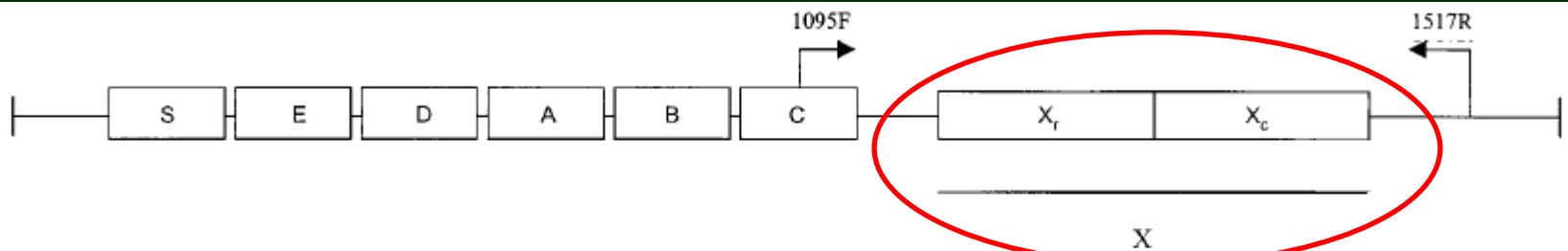


FIG. 1. Protein A gene map. Boxes indicate segments of the gene coding for the signal sequence (S), the immunoglobulin G-binding regions (A–D), a region homologous to A–D (E), and the COOH terminus (X), which includes the SSRs (X_r) and the cell wall attachment sequence (X_c). Primers are numbered from the 5' end of the primer on the forward strand of *S. aureus* (GenBank accession no. J01786 [29]).

protein A gene (*spa*)

SSR = short sequence repeat

polymorfismus v lokusu X
(variabilní počet 24-bp repetice)

Princip spa-typizace

1. stanovení sekvence polymorfní oblasti genu spa

TTTAGCAGAAGCTAAAAAGCTAAACGATGCTCAAGCACCAAAAAGAGGAAGACAACAAAAACCTGGTAAAGAAGACGGCAACAAGCCT
GGTAAAGAAGACAACAACAACCTGGCAAAGAAGACGGCAACAAGCCTGGTAAAGAAGACAACAACAAGCCTGGTAAAGAAGACGGCA
ACAAGCCTGGTAAAGAAGACGGCAACAAGCCTGGTAAAGAAGACGGCAACAACCTGGTAAAGAAGACGGCAACGGAGTACATGTCGT
TAAACCTGGTGATACAGTAAATGACAT

2. vyhledání koncových signaturních sekvencí

5'-signature

TTTAGCAGAAGCTAAAAAGCTAAACGATGCTCAAGCACCAAAAAGAGGAAGACAACAAAAACCTGGTAAAGAAGACGGCAACAAGCCT
GGTAAAGAAGACAACAACAACCTGGCAAAGAAGACGGCAACAAGCCTGGTAAAGAAGACAACAACAAGCCTGGTAAAGAAGACGGCA
ACAAGCCTGGTAAAGAAGACGGCAACAAGCCTGGTAAAGAAGACGGCAACAACCTGGTAAAGAAGACGGCAACGGAGTACATGTCGT
TAAACCTGGTGATACAGTAAATGACAT

3'-signature

3. identifikace repetice dlouhých zpravidla 24 bp


• 5' GCACCAAAA

• GAGGAAGACAACAACAACCTGGT	repetice č. 26
• AAAGAAGACGGCAACAAGCCTGGT	repetice č. 17
• AAAGAAGACAACAACAACCTGGC	repetice č. 20
• AAAGAAGACGGCAACAAGCCTGGT	repetice č. 17
• AAAGAAGACAACAACAAGCCTGGT	repetice č. 12
• AAAGAAGACGGCAACAAGCCTGGT	repetice č. 17
• AAAGAAGACGGCAACAAGCCTGGT	repetice č. 17
• AAAGAAGACGGCAACAACCTGGT	repetice č. 16
• AAAGAAGACGGCAACGGAG	

• 3' TACATGTCGT

4. určení spa typu podle databáze

26-17-20-17-12-17-17-16 = spa typ t003



MLST – multilokusová sekvenční typizace

- Stanovení sekvence 7 genů rozmístěných v různých místech genomu
- Přiřazení sekvencí do alelových typů
- Kombinace typů alel tvoří **sekvenční typ (ST)**
 - Zavedena u celé řady druhů
 - Databáze přístupná na webu
- S vhodnými statistickými algoritmy umožňuje provádět shlukovou analýzu a dedukci klonálních linií
- Vhodná pro dlouhodobé a globální epidemiologické analýzy

Multilokusová sekvenační analýza

TABLE 1. Sequences of primers used in the PCR

Gene	Primer	Sequence (5'-3')
Carbamate kinase (<i>arcC</i>)	<i>arcC</i> -Up	TTGATTCACCAGCGCGTATTGTC
	<i>arcC</i> -Dn	AGGTATCTGCTTCAATCAGCG
Shikimate dehydrogenase (<i>aroE</i>)	<i>aroE</i> -Up	ATCGGAAATCCTATTTTCACATTC
	<i>aroE</i> -Dn	GGTGTGTGATTAATAACGATATC
Glycerol kinase (<i>glpF</i>)	<i>glpF</i> -Up	CTAGGAACTGCAATCTTAATCC
	<i>glpF</i> -Dn	TGGTAAAATCGCATGTCCAATTC
Guanylate kinase (<i>gmk</i>)	<i>gmk</i> -Up	ATCGTTTTATCGGGACCATC
	<i>gmk</i> -Dn	TCATTAAC TACAACGTAATCGTA
Phosphate acetyltransferase (<i>pta</i>)	<i>pta</i> -Up	GTAAAAATCGTATTACCTGAAGG
	<i>pta</i> -Dn	GACCCTTTTGTGAAAAGCTTAA
Triosephosphate isomerase (<i>tpi</i>)	<i>tpi</i> -Up	TCGTTCAATTCTGAACGTCGTGAA
	<i>tpi</i> -Dn	TTTGCACCTTCTAACAATTGTAC
Acetyl coenzyme A acetyltransferase (<i>yqiL</i>)	<i>yqiL</i> -Up	CAGCATAACAGGACACCTATTGGC
	<i>yqiL</i> -Dn	CGTTGAGGAATCGATACTGGAAC

TABLE 2. Sequence variation at the seven loci

Gene	Sequence length (bp)	No. of alleles	No. of polymorphic sites
<i>arcC</i>	456	17	19
<i>aroE</i>	456	17	23
<i>glpF</i>	465	11	14
<i>gmk</i>	429	11	13
<i>pta</i>	474	15	18
<i>tpi</i>	402	14	18
<i>yqiL</i>	516	16	19

VIROLOGIE

- sekvenování k detekci bodových mutací nebo rozsáhlejších přestaveb
- pro subtypizaci virů se užívá ta část genomu, v níž jsou geny pro antigenní epitopy povrchových proteinů, vystavených imunologické odpovědi
- také jedinečné nepřekládané sekvence, kde dochází k mutacím zřídka
- také fragmenty získané PCR pro analýzu malých úseků, cca 1 kb
- pro RNA genomy, nutný přepis pomocí RT-PCR do DNA

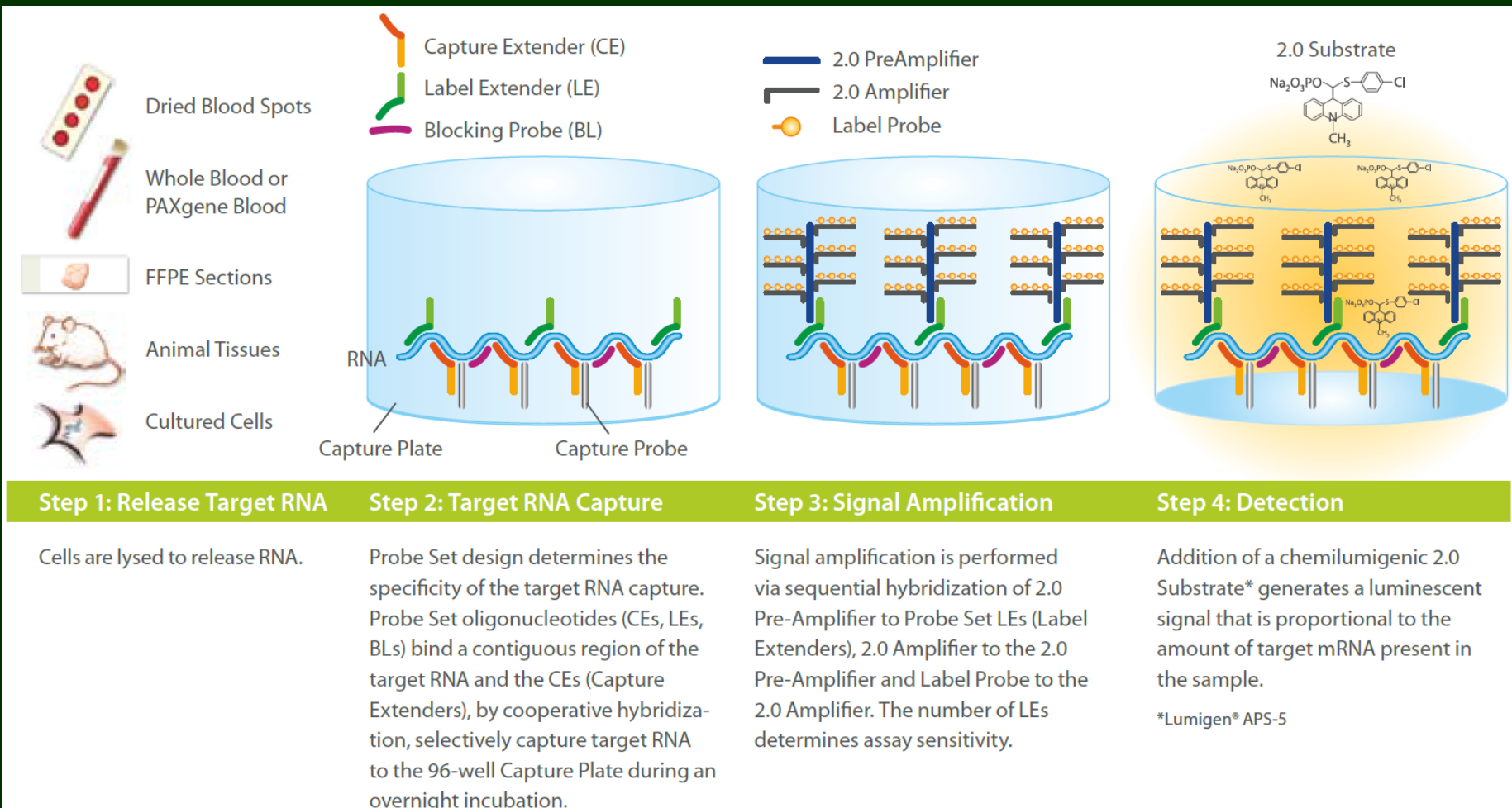
- HIV: geny gag a env
- na této bázi klasifikace izolátů HIV z různých geografických lokalit
- tak identifikovány subtypy A, B, C a E
- dále forenzní soudnictví, důkaz iatrogení infekce HIV

- u TBEV: klasifikace dle sekvence genu pro protein E do 3 subtypů

- chřipka: hlavně genu pro hemagglutinin a neuramidáza

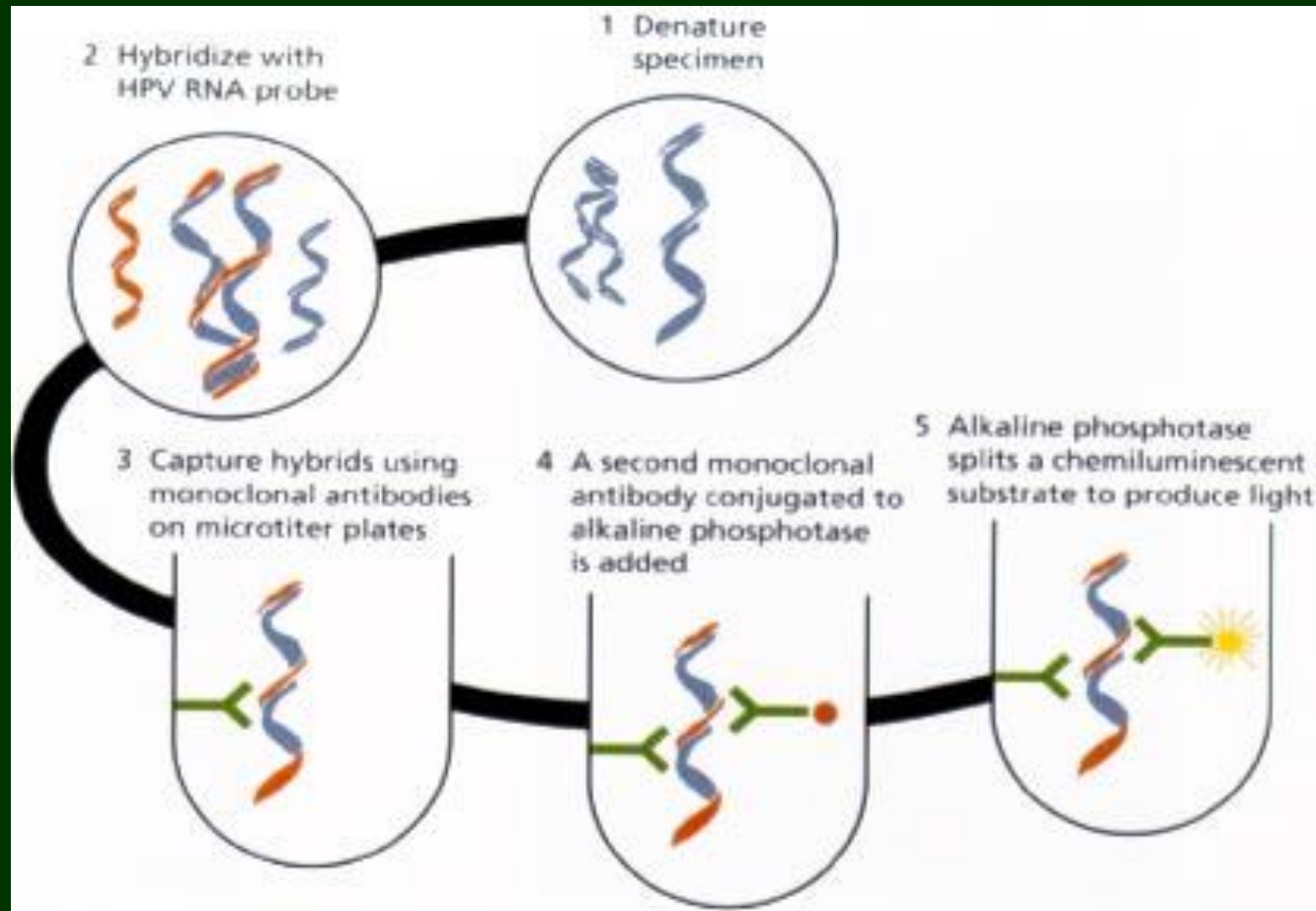
Alternativní molekulárně-biologické metody pro diagnostiku mikroorganismů

bDNA (branched DNA) assays



- The signal is proportional to the number of labeled probes
- Commercially available assays (Bayer HealthCare, Diagnostic Division, Tarrytown, N.Y.)
- HCV, HBV, HIV-1

Hybrid Capture Assays



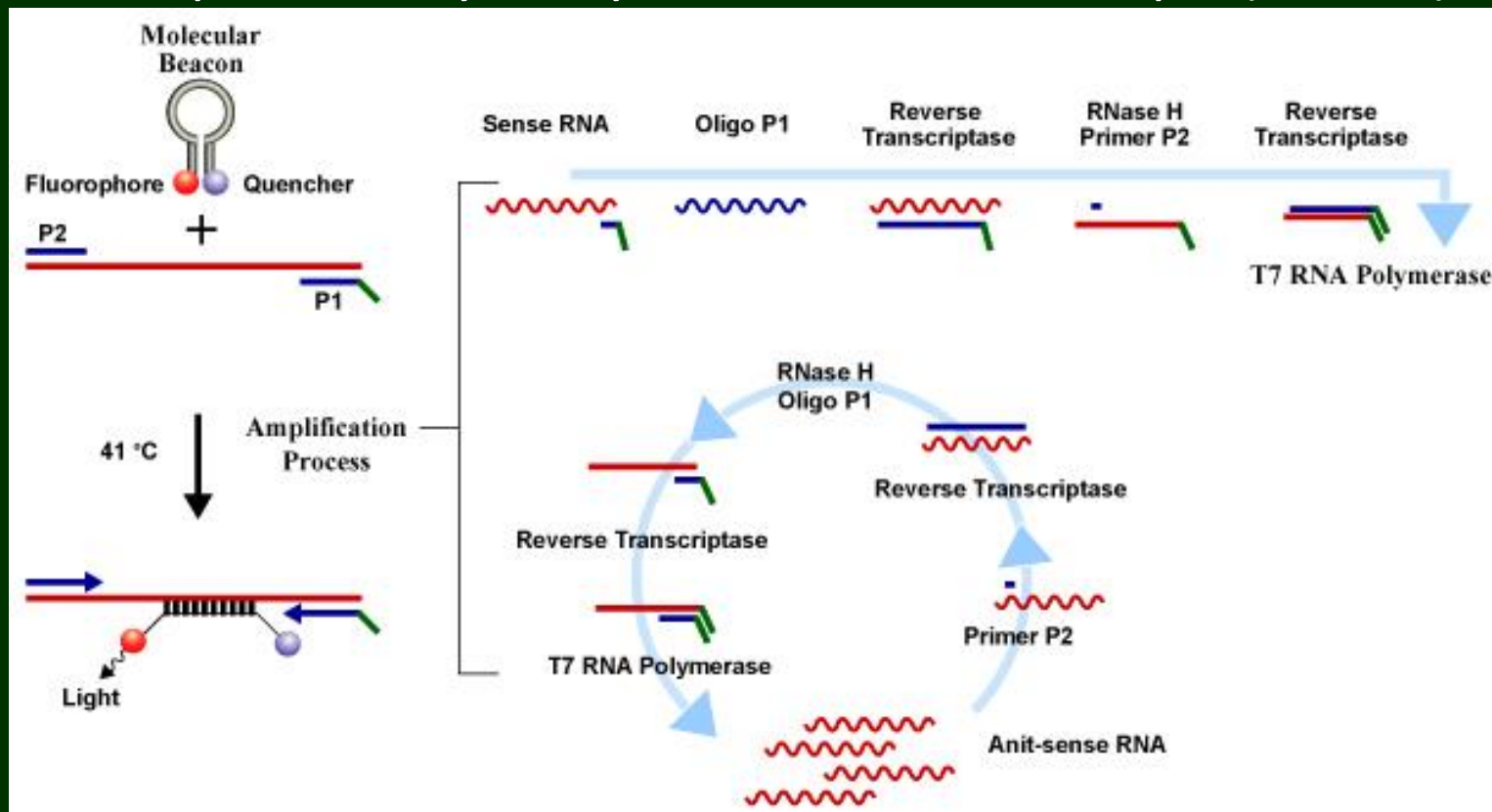
- RNA/DNA hybrid molecule
- Anti-hybrid antibody (capture), anti-hybrid detection antibody (labeled)
- Commercially available assays: Digene Corp. (Gaithersburg, Maryland, USA): HPV, CMV, Chlamydia, Neisseria

Isothermal amplification methods

- simple operation, rapid reaction, easy detection
 - not require thermal cycler
 - performed in a heating block or water bath
 - single uniform temperature
-
- **Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP)**
 - **Helicase-Dependent Amplification (HDA)**
-
- **LAMP:** Dengue, SARS, influenza A/B, CMV, HSV, VZV...
 - **HDA:** HIV-1 in human plasma, HSV 1 and 2 from genital lesions

Amplifikace nukleových kyselin za nepřítomnosti termofilní DNA-polymerázy

Amplifikační systémy založené na transkripci (NASBA)



- isothermal RNA amplification method
- avian myeloblastosis virus RT, RNase-H, T7-RNA polymerase
- no requirement for a thermal cycler, rapid kinetics, ssRNA-no denaturation prior detection
- bioMérieux: HIV-1, CMV, enterovirus, respiratory syncytial virus
West Nile virus, St. Louis encephalitis, Dengue virus