

Metody amplifikacji* kwasów nukleinowych stosowane w diagnostyce mikrobiologicznej

Jacek Jenek

Maciej Bryl

Zakład Mikrobiologii Lekarskiej

Instytut Mikrobiologii i Chorób Zakaźnych

Akademia Medyczna im. Karola Marcinkowskiego

Poznań

1. Wprowadzenie

W następstwie zakażenia dochodzi do pojawienia się w organizmie, obok stale obecnej informacji genetycznej gospodarza i flory saprofitycznej, nowej jakościowo informacji w postaci swoistych dla czynnika etiologicznego zakażenia sekwencji nukleotydowych. Stosowanie metod biologii molekularnej pozwala wykryć i zidentyfikować swoiste dla mikroorganizmu sekwencje DNA lub RNA obecne w próbce materiału pobranego od osoby zakażonej, co jest równoznaczne z identyfikacją drobnoustroju. Podstawowym sposobem wykrywania sekwencji jest hybrydyzacja z wyznakowanym DNA lub RNA, komplementarnym do poszukiwanej sekwencji (tzw. sondą DNA lub RNA). Jednakże ze względu na relatywnie niską czułość diagnostyczne zastosowania sond kwasów nukleinowych są ograniczone. Wprowadzone w ostatnim dziesięcioleciu nowe metody amplifikacji, charakteryzują się znacznie większą czułością i umożliwiają skuteczniejsze wykrywanie poszukiwanej sekwencji w minimalnej ilości DNA wyizolowanego z badanej próbki. Najszerzej znaną i stosowaną, ale nie jedyną metodą tego typu, jest opracowana na początku lat osiemdziesiątych przez K. Mullisa i po raz pierwszy praktycznie zastosowana w 1985 r. (26) reakcja łańcuchowa polimerazy znana powszechnie pod nazwą PCR (*polymerase chain reaction*). Celem pracy jest krótki przegląd i porównanie dotychczas opracowanych, wynikających z różnych technologii, metod amplifikacji *in vitro* kwasów nukleinowych, wykorzystywanych w diagnostyce mikrobiologicznej. W pracy pominięto metody zwielokrotniania nieznanych lub tylko częściowo znanych sekwencji kwasów nu-

* Termin amplifikacja używany jest w piśmiennictwie w dwóch znaczeniach: węższym, częściej stosowanym, oznaczającym zwielokrotnienie fragmentu kwasu nukleinowego i szerszym — użytym również w tej pracy, obejmującym dodatkowo wzmocnienie sygnału detekcyjnego hybrydyzacji.

kleinowych, takich jak: SISPA (*sequence-independent, single-primer amplification*) (25) czy BDA (*boomerang DNA amplification*) (11), które nie znajdują zastosowania w diagnostyce.

Stosowane obecnie metody (tab. 1) amplifikacji kwasów nukleinowych można ująć w 3 grupach:

1) metody w których następuje zwielokrotnienie sekwencji zawartej między oligonukleotydowymi starterami reakcji (w literaturze anglojęzycznej amplifikacja tego typu zwana jest *target amplification*). Do tej grupy należy łańcuchowa reakcja polimerazy (*polymerase chain reaction* — PCR), amplifikacja metodą wypierania nici (*strand displacement amplification* — SDA) i systemy amplifikacji oparte na transkrypcji (np. *self-sustaining sequence replication* — 3SR);

2) metody w których zwielokrotnieniu ulega sekwencja oligonukleotydowej sondy molekularnej (*probe molecule amplification*). Do tej grupy należy liganowa reakcja amplifikacji i metoda wykorzystująca $\Phi\beta$ -replikazę. Zaliczyć tu można również reakcję cyklicznej hybrydyzacji (*cycling probe reaction*);

3) metody wzmacniania sygnału generowanego przez sondę (*signal amplification*): metody wykorzystujące sondy: sprzężone (*compound probes*) i rozgałęzione (*branched probes*).

TABELA 1
PORÓWNANIE METOD AMPLIFIKACJI KWASÓW NUKLEINOWYCH

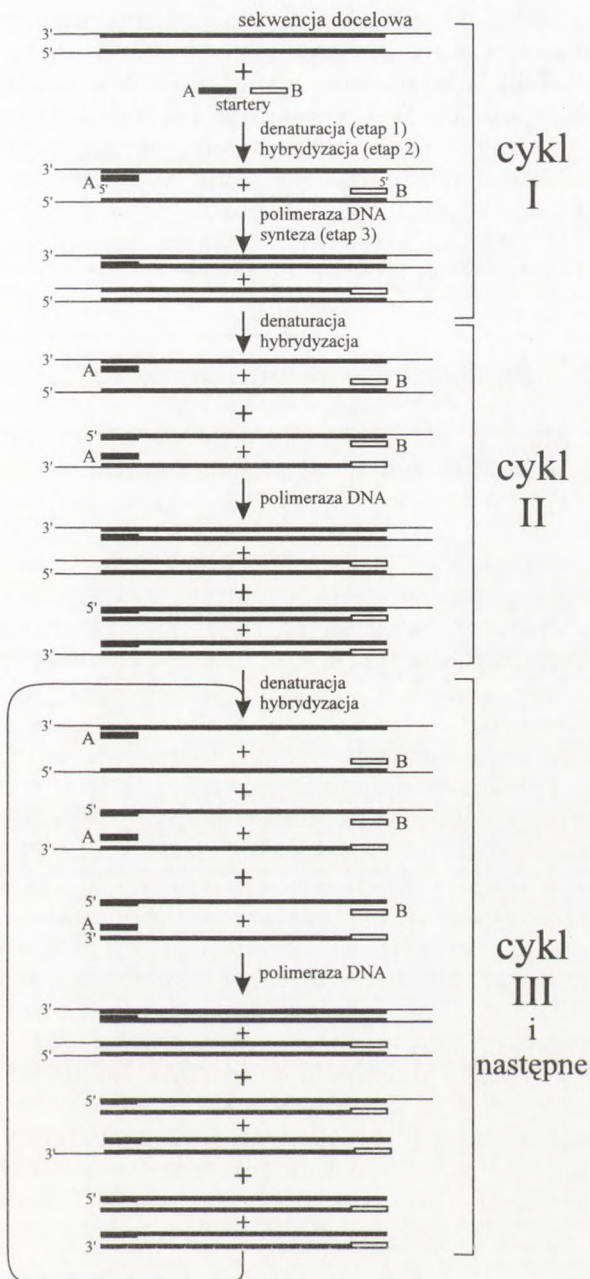
Metoda	Amplifikacja		Czułość	Zmiany temp.	Liczba swoistych sond	Liczba enzymów	Wrażliwość na zanieczyszczenia
	sekwencji	sondy/sygnału					
PCR	wykładnicza		wysoka	tak	2	1	wysoka
3SR	wykładnicza		wysoka	nie	2	3	wysoka
SDA	wykładnicza		wysoka	nie	2	2	wysoka
LCR		wykładnicza	wysoka	tak	4	1	wysoka
$\Phi\beta$ -replikaza		wykładnicza	wysoka	nie	1	1	wysoka
ampliprobe		liniowa	niska	nie	1	1	niska
sonda rozgałęziona		liniowa	niska	nie	1	1	niska

2. Łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR)

Łańcuchowa reakcja polimerazy jest metodą syntezy *in vitro* wybranej sekwencji nukleotydowej (19,20,26), polegającą na wielokrotnym, zazwyczaj 30 – 40 razy, powtarzaniu trzyetapowego cyklu (rys. 1), w którym matrycowy dwuniciowy DNA zawierający sekwencję przeznaczoną do amplifikacji pod-

Rys. 1. PCR — łańcuchowa reakcja polimerazy polega na wielokrotnym (30 - 40 razy) powtarzaniu trój-etapowego cyklu: denaturacja — hybrydacja — synteza DNA.

Docelowy DNA poddawany jest w pierwszym etapie denaturacji termicznej (92 - 95°C). Po obniżeniu temperatury do ok. 55°C następuje przyłączenie oligonukleotydowych starterów komplementarnych do końców 3' sekwencji docelowej (etap 2). Po czym termostabilna polimeraza DNA (np. *Taq*-polimeraza) syntetyzuje komplementarną nić DNA, która także w kolejnych cyklach jest wykorzystywana jako matryca do syntezy DNA. W każdym cyklu dochodzi do podwojenia ilości matrycy — amplifikowanej sekwencji, a począwszy od trzeciego cyklu następuje gromadzenie fragmentów DNA ściśle określonej długości.



dawany jest najpierw denaturacji termicznej (etap 1) w obecności dodanych w nadmiarze dwóch oligonukleotydowych starterów. Startery te są komplementarne do końców 3' sekwencji przeznaczanej do amplifikacji (od <100 do 10 000 pz). Po obniżeniu temperatury startery przyłączają się (etap 2)

swoiście do komplementarnych sekwencji matrycowego DNA i ulegają wydłużeniu (etap 3) przez termostabilną polimerazę DNA (26), co prowadzi do powstania komplementarnej nici DNA, która w kolejnych cyklach jest wykorzystywana jako matryca. Po każdym cyklu ilość DNA ulega podwojeniu dochodząc po zakończeniu reakcji, obejmującej zazwyczaj 30 – 40 cykli w ciągu kilku godzin, do 10^7 – 10^9 kopii wybranej sekwencji. Łańcuchowa reakcja polimerazy była wielokrotnie omawiana w piśmiennictwie — m.in. (3,8,23,28) i jest obecnie szeroko stosowana, zarówno w wersji podstawowej, jak i w licznych modyfikacjach (3,11,21).

3. Amplifikacja metodą wypierania nici (SDA)

Jest to metoda oparta na właściwości endonukleaz restrykcyjnych do nacinania niezmodyfikowanej nici częściowo zmodyfikowanego miejsca restrykcyjnego (jedna z nici DNA zawiera międzynukleotydowe wiązanie tiofosfostrowe w obrębie rozpoznawanej sekwencji) i zdolności polimerazy DNA do rozpoczęcia w miejscu tego nacięcia syntezy komplementarnej nici, która wypiera nią nie będącą matrycą (31,32,33) (rys. 2).

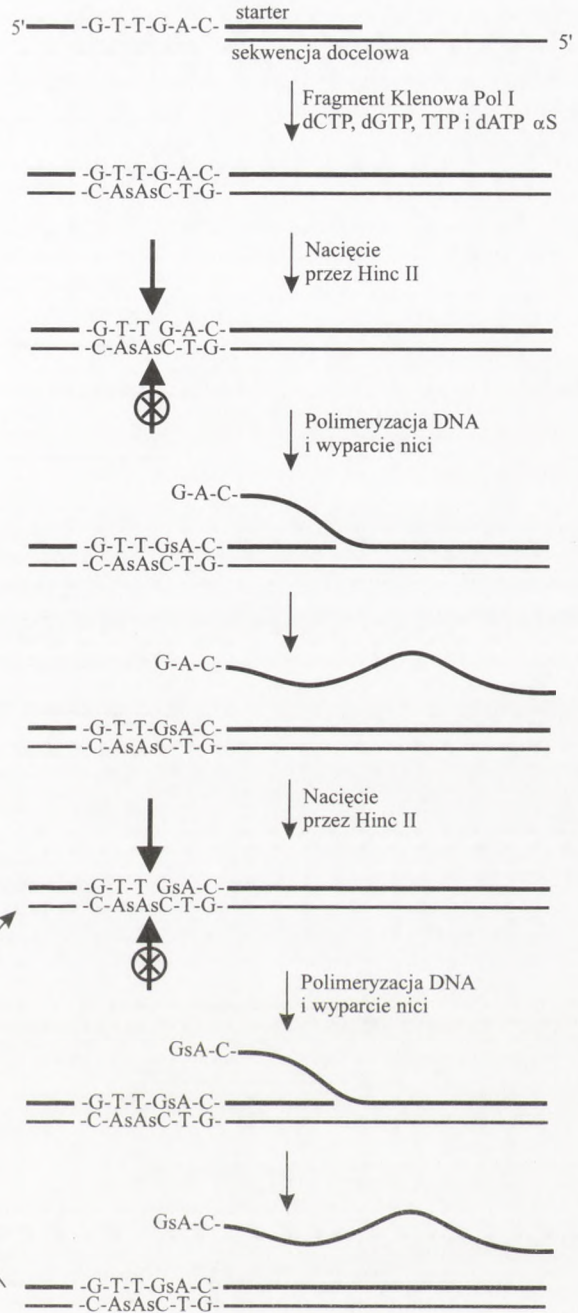
Startery komplementarne do końców 3' fragmentu przeznaczonego do zwielokrotnienia mają na końcach 5' sekwencję rozpoznawaną przez endonukleazę restrykcyjną. Reakcja, poza wstępnym etapem denaturacji termicznej, prowadzona jest w stałej temp. 37°C, nie wymaga zatem programowanych bloków grzewczych, jak ma to miejsce w PCR.

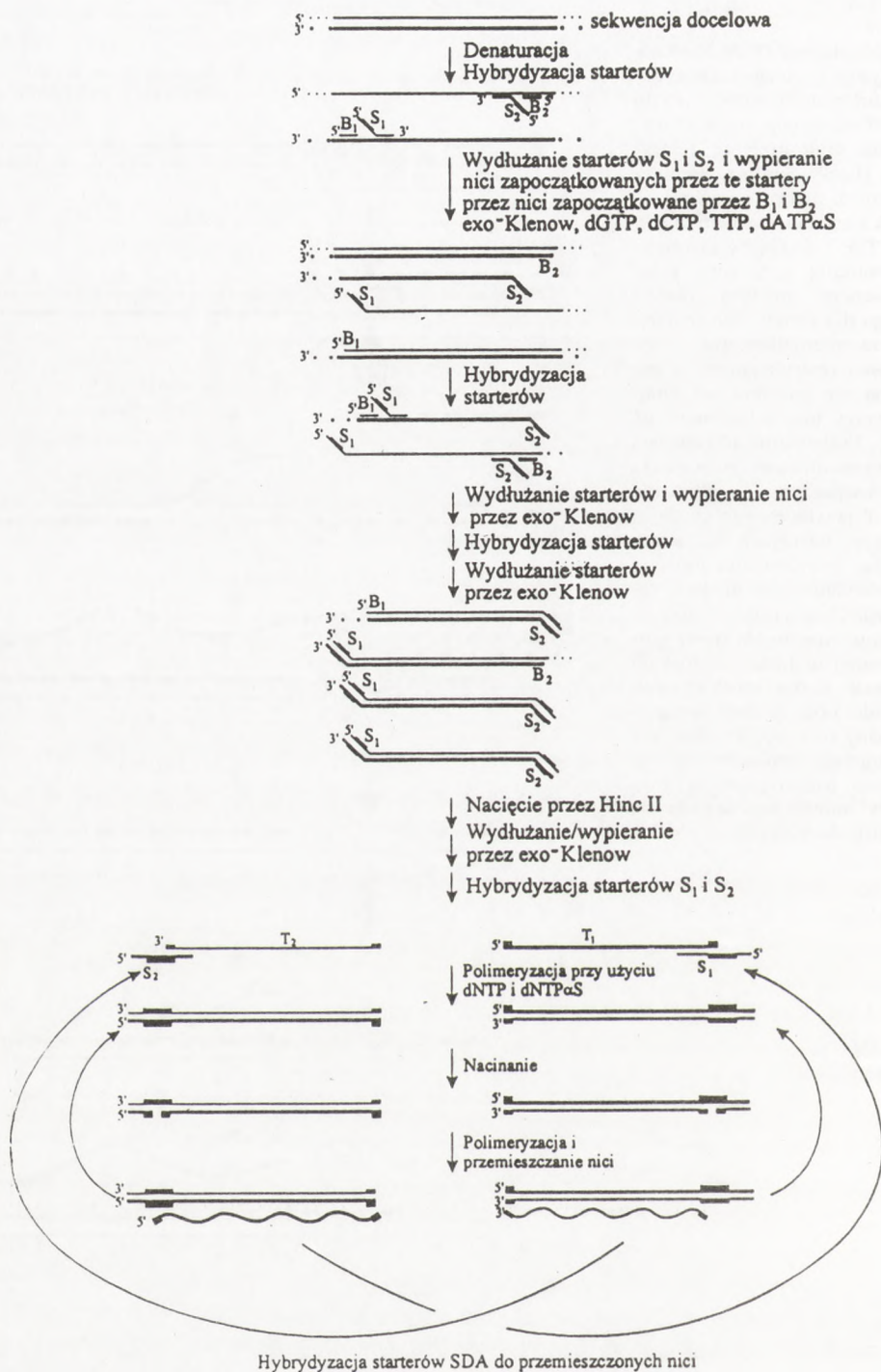
Pierwszym etapem reakcji (rys. 3) jest termiczna denaturacja (95°C przez 4 min) DNA w obecności dodanych w nadmiarze starterów i innych składników reakcji, z wyjątkiem enzymów. Po obniżeniu temp. do 37°C, w której następuje przyłączanie starterów do komplementarnych sekwencji obu zdenaturowanych nici, dodaje się endonukleazy restrykcyjnej *HincII** i pozbawionego właściwości egzonukleazy fragmentu Klenowa polimerazy I DNA *Escherichia coli* (exo⁻ Klenow). Polimeraza DNA wykorzystując dGTP, dCTP, dTTP i dATP α S syntetyzuje komplementarne nici DNA, nacinane w miejscu restrykcyjnym przez endonukleazę (rys. 3). Nacięcie jest miejscem rozpoczęcia syntezy przez polimerazę DNA komplementarnej nici, która wypiera nią niematrycową, co prowadzi do pojawienia się mieszaniny dwuniciowego i jednoniciowego DNA. Matryce do syntezy DNA stanowią dwuniciowe DNA, po nacięciu przez endonukleazę oraz wolne jednoniciowe DNA, po przyłączeniu startera.

* Metoda SDA została opracowana przez firmę Becton-Dickinson, Sparks, MD, USA z wykorzystaniem endonukleazy restrykcyjnej *HincII*, możliwe jest jednak zastosowanie innej endonukleazy, np. *NeiI* rozpoznającej sekwencję 5'-CCGGG z użyciem dATP, TTP, dGTP i dCTP α S.

Rys. 2. Schemat zasady reakcji SDA.

Jednoniciowy DNA docelowy hybryduje z oligonukleotydowym starterem SDA mającym na końcu 5' sekwencję rozpoznawaną przez endonukleazę restrykcyjną *HincII*. Synteza komplementarnych nici przez polimerazę DNA z wykorzystaniem dGTP, dCTP, TTP i dATP[α S] prowadzi do powstania częściowo zmodyfikowanego miejsca restrykcyjnego dla *HincII*. *HincII* nacięciem niezmodyfikowaną nić w miejscu restrykcyjnym, a pozostawia nie ruszoną nić zmodyfikowaną (na schemacie nić cienka). Pozbawiona aktywności 5'-3' egzonukleazy polimeraza DNA rozpoczyna wydłużanie końca 3' przyłączonego startera, wypierając istniejącą nić i odtworząc jednocześnie częściowo zmodyfikowane miejsce restrykcyjne: obecność 5'-GsA-3' nie hamuje nacinania nowo syntetyzowanej nici zaznaczonej na schemacie grubą kreską. Nacinanie nici oraz synteza komplementarnej nici wypierającej nić już istniejącą prowadzi do wytworzenia jednoniciowych fragmentów komplementarnych do sekwencji docelowych.





4. Systemy amplifikacji oparte na transkrypcji (TAS — 3SR, NASBA)

W 1989 r. Kwoh i wsp. (14) opisali pierwszy system amplifikacji sekwencji oparty nie na metodzie PCR, a na transkrypcji (*transcription based amplification system* — TAS). W metodzie tej wykorzystuje się dwa enzymy: odwrotną transkryptazę (RT) i DNA zależną polimerazę RNA (T7, T3 lub SP6) oraz parę oligonukleotydowych starterów. Sekwencja końców 3' starterów jest komplementarna do końców 3' amplifikowanego fragmentu kwasu nukleinowego, natomiast sekwencja końca 5' jest sekwencją rozpoznawaną przez polimerazę RNA.

TAS (rys. 4) obejmuje dwa cyklicznie powtarzane etapy: syntezę DNA komplementarnego do amplifikowanego kwasu nukleinowego i transkrypcję *in vitro* nowo powstałego DNA. Na matrycy DNA (zdenaturowanego termicznie) lub RNA pod wpływem RT powstaje komplementarna nić DNA. Po denaturacji termicznej nowo powstałego dupleksu DNA-DNA lub RNA-DNA, druga nić DNA jest syntetyzowana przez nowo dodaną RT i powstaje dwuniciowy DNA z regionem promotorowym polimerazy RNA na jednym lub obu końcach. Pod wpływem dodanej polimerazy RNA następuje synteza RNA (10 – 1000 kopii

Rys. 3. SDA — amplifikacja metodą wypierania nici.

Docelowy DNA jest denaturowany termicznie w obecności dodanych w nadmiarze czterech oligonukleotydowych starterów (B_1 , B_2 , S_1 , S_2). Na końcach 3' starterów S_1 i S_2 znajdują się sekwencje komplementarne do sekwencji docelowej. Bezpośrednio z nimi sąsiaduje sekwencja rozpoznawana przez endonukleazę restrykcyjną *Hind*III (5'-GTTGAC), niekomplementarna do sekwencji docelowej. S_1 i S_2 wiążą się z przeciwnymi niciami sekwencji docelowej, ograniczając fragment przeznaczony do amplifikacji. Startery B_1 i B_2 są komplementarne do sekwencji docelowych. Lokalizację miejsc z którymi wiążą się startery S_1 i B_1 oraz S_2 i B_2 pokazuje schemat. Po asocjacji starterów (temp. 37 – 40°C) dodawana jest jednocześnie endonukleaza *Hind*III i pobawiony aktywności egzonukleazy fragment Klenowa polimerazy I DNA z *E. coli* (exo⁻ Klenow). Exo⁻ Klenow, obecny w nadmiarze w stosunku do liczby sekwencji docelowych, wykorzystując dGTP, dCTP, TTP i dATP[α S], wydłuża jednocześnie końce 3' wszystkich czterech starterów. Wydłużone S_1 i S_2 są wypierane podczas wydłużania B_1 , B_2 i przyłączają na swych końcach 3' przeciwnie startery B_1 lub B_2 i odpowiednio S_1 lub S_2 . Wydłużanie tych starterów, któremu towarzyszy wypieranie wydłużanych starterów S_1 i S_2 prowadzi do pojawienia się dwóch fragmentów z częściowo zmodyfikowanym miejscem restrykcyjnym *Hind*III na obu końcach i dwóch dłuższych fragmentów z częściowo zmodyfikowanym miejscem restrykcyjnym *Hind*III na jednym końcu. Nacięcie przez *Hind*III i wydłużenie/wyparcie przez exo⁻ Klenow w tych czterech fragmentach rozpoczyna cykliczną reakcję przedstawioną w dolnej części schematu. Podczas każdego z cykli, koniec 3' startera S_1 hybrydyzuje z końcem 3' wypartej nici T_1 tworząc dupleks z wystającymi końcami 5'. Podobnie S_2 wiąże się z T_2 . Exo⁻ Klenow wydłuża końce 3' obu dupleksów odtwarzając częściowo zmodyfikowane miejsce restrykcyjne dla *Hind*III na S_1 - T_1 i S_2 - T_2 . *Hind*III nacina niezmodyfikowaną nić w miejscu restrykcyjnym pozostawiając nie ruszoną nić zmodyfikowaną. Exo⁻ Klenow wydłuża końce 3' w miejscu nacięcia na nici S_1 - T_1 i wypiera istniejącą nić będącą odpowiednikiem T_2 . Podobnie wydłużanie w miejscu nacięcia na S_2 - T_2 powoduje wyparcie T_1 . Ponieważ wydłużanie w miejscu nacięcia odtwarza każdorazowo częściowo zmodyfikowane miejsce restrykcyjne dla *Hind*III, nacinanie i wydłużanie/wypieranie powtarzają się cyklicznie, prowadząc do wykładniczego zwielokrotnienia sekwencji docelowej. Nić sensowna i antysensowna są różnicowane na schemacie różnymi grubościami linii. Cała i nacięta sekwencja rozpoznawana przez endonukleazę *Hind*III jest przedstawiona odpowiednio jako $\blacksquare\blacksquare$ i $\blacksquare\blacksquare$. Fragmenty sekwencji rozpoznawanej przez *Hind*III 5'-GAC i 5'-GTC występujące na końcach 5' i 3' wypieranych nici przedstawiono jako \blacksquare i \blacksquare .

w jednym cyklu), wykorzystywanego przez aktywną wciąż RT do syntezy cDNA. Zaledwie czterokrotne powtórzenie cyklu wystarcza do otrzymania 10^6 kopii sekwencji docelowej. System ten ze względu na konieczność zmian temperatury i dodawanie w każdym cyklu nowej porcji natywnych enzymów okazał się pracochłonny i mało przydatny. Po modyfikacji polegającej na zastąpieniu termicznej denaturacji dupleksu DNA—RNA trawieniem RNazą H z *E. coli* stał się wydajnym i skutecznym stałotemperaturowym systemem amplifikacji sekwencji. Modyfikacji TAS dokonali niezależnie od siebie Gingeras i wsp. (9,10) opracowując metodę samopodtrzymującej się replikacji sekwencji (3SR — rys. 5) i Compton (6) — opracowując metodę amplifikacji opartej na sekwencji kwasów nukleinowych (NASBA). W zmodyfikowanym systemie wykorzystującym aktywność trzech enzymów: RNazy H, odwrotnej transkryptazy i polimerazy DNA T7, zachodzi pewne podobieństwo do naturalnych procesów replikacji genomowego RNA renowirusów.

Dobierając warunki reakcji w taki sposób, że DNA zawierający poszukiwane sekwencje pozostanie niezdenaturowany, tworzy się układ, w którym dostępne do amplifikacji będą jedynie sekwencje RNA. Umożliwia to tym samym selektywną amplifikację RNA w próbce zawierającej oba typy kwasów nukleinowych, bez uprzedniego oczyszczenia.

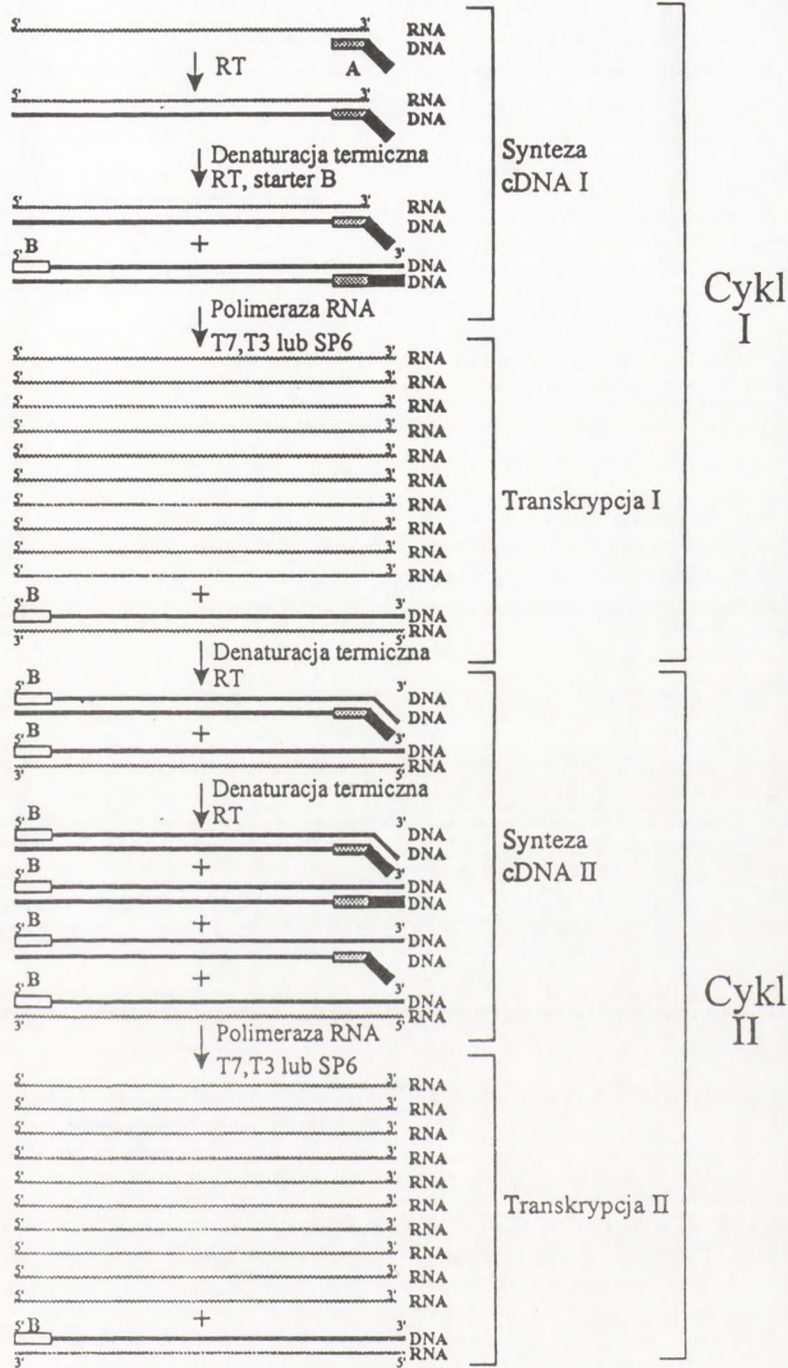
5. Ligazowa reakcja amplifikacji (LAR, LCR™)

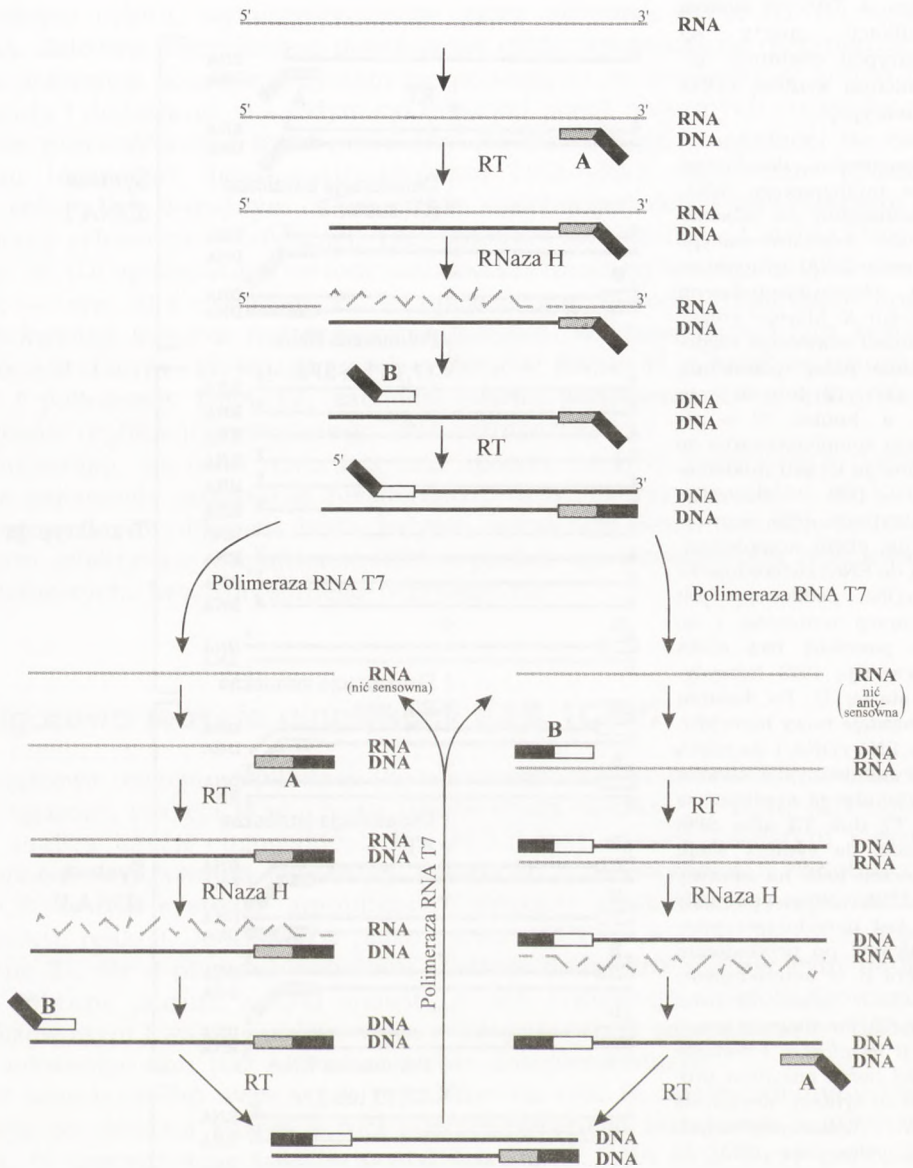
Ligazowa reakcja amplifikacji (*ligase amplification reaction*) (35), zwana również ligazową reakcją łańcuchową (*ligase chain reaction* — LCR) (2,15,30,34) lub analizą ligacji oligonukleotydów (8,22) jest wysoce swoistym i czułym sposobem wykrywania wybranej sekwencji nukleotydowej. Podobnie jak w PCR, w tym systemie amplifikacji następuje wykładnicze nagromadzenie produktu reakcji. Jednakże w porównaniu z PCR, w reakcji ligazowej stosuje się nie 2-, ale 4-oligonukleotydowe startery dodawane w molowym nadmiarze, dobrane parami w taki sposób, że ich sekwencje są zlokalizowane na analizowanym kwasie nukleinowym w bezpośrednim sąsiedztwie i jednocześnie sekwencje obu par są wobec siebie komplementarne.

W standardowej wersji, jak pokazano na rys. 6, oligonukleotydy hybrydują po dwa na każdej z nici zdenaturowanego termicznie matrycowego DNA. W następnym etapie termostabilna ligaza DNA (1,2) łączy parę sąsiadujących oligonukleotydów w jeden łańcuch. Każdy z produktów ligazy, razem z wyjściową matrycą, może służyć jako matryca w następnych cyklach denaturacji, przyłączania oligonukleotydów i ligacji. Modyfikacja tej metody amplifikacji, zwana G-LCR™ (*gapped-LCR*) różni się od standardowej wersji LCR tym, że pomiędzy oligonukleotydami przyłączonymi do matrycy powstaje krótka przerwa (*gap*) wypełniana przez termostabilną polimerazę DNA, po czym termostabilna ligaza łączy oba odcinki w całość (4).

Rys. 4. TAS — system amplifikacji oparty na transkrypcji obejmujące naprzemienną syntezę cDNA i transkrypcję.

Cząsteczka docelowego kwasu nukleinowego (RNA, jak zaznaczono na schemacie, lub zdenaturowanego termicznie DNA) hybryduje z oligonukleotydowym starterem A, którego koniec 5' stanowi sekwencja rozpoznawana przez polimerazę RNA (T7, T3 lub SP6) — PBS, a koniec 3' — sekwencja komplementarna do docelowego kwasu nukleinowego — TCS. Odwrotna transkryptaza (RT) syntetyzuje nić cDNA komplementarną do RNA. Heteroduplex RNA-cDNA poddawany jest denaturacji termicznej i do nowo powstałej nici cDNA z sekwencją PBS hybryduje starter B. Po dodaniu RT powstaje nowy heteroduplex RNA-cDNA i ds cDNA mający na jednym z końców PBS. Inkubacja z polimerazą RNA T7 (lub T3 albo SP6) prowadzi do syntezy wielu cząsteczek RNA na matrycy ds cDNA. Nowo powstały RNA jest natychmiast przekształcany, po przyłączeniu startera B, w heteroduplex RNA-cDNA przez aktywną wciąż RT. Powtórzenie denaturacji termicznej i dodanie świeżej porcji enzymów prowadzi do syntezy nowych ds cDNA wykorzystywanych przez polimerazę RNA do transkrypcji.



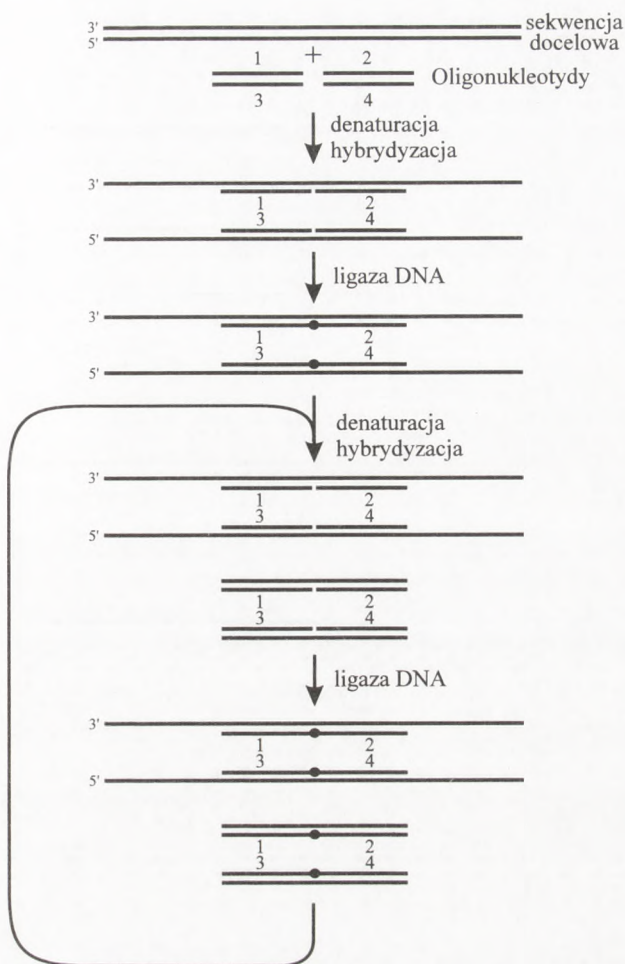


Rys. 5. Amplifikacja kwasu nukleinowego metodą 3SR.

Startery wykorzystywane w tej reakcji mają na swoich końcach 3' sekwencję rozpoznawaną przez polimerazę RNA T7. Odwrotna transkryptaza (RT), po hybrydyzacji jednego ze starterów do sekwencji docelowej, syntetyzuje komplementarną nić cDNA. RNA w powstałym heteroduplexie jest degradowany przez RNazę H, a cDNA — po przyłączeniu drugiego startera — służy jako matryca do syntezy dwuniciowego cDNA. Obecność sekwencji rozpoznawanych przez polimerazę RNA na obu końcach ds cDNA pozwala na transkrypcję obu nici DNA. Nowo powstałe cząsteczki RNA są przekształcane w ds cDNA i wykorzystywane jako matryce transkrypcji.

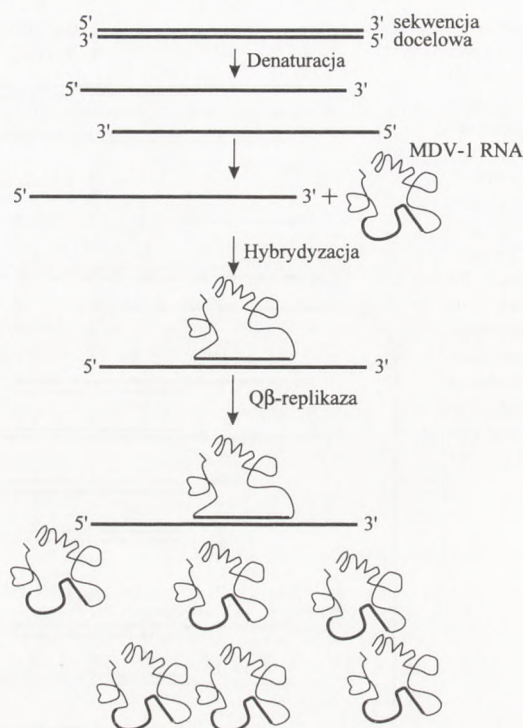
Rys. 6. Amplifikacja sondy oparta na łańcuchowej reakcji ligazy — LCR.

Docelowy DNA jest denaturowany termicznie w obecności dwóch par oligonukleotydowych starterów dobranych, tak że koniec 3' sekwencji komplementarnej do jednego ze starterów, sąsiaduje bezpośrednio z końcem 5' sekwencji komplementarnej względem drugiego startera. Obydwie pary oligonukleotydów są względem siebie komplementarne. Po przyłączeniu starterów do sekwencji docelowych termostabilna ligaza DNA łączy sąsiadujące startery. Powstały w wyniku działania ligazy produkt w kolejnych cyklach reakcji wykorzystywany jest przez komplementarne startery jako sekwencja docelowa.



6. Reakcja Q β -replikazy

Q β -replikaza jest składającą się z 4 podjednostek RNA-zależną polimerazą RNA replikującą 215 kDa RNA genomu bakteriofaga Q β . Enzym ten swoiście rozpoznaje drugorzędową strukturę RNA wykorzystywanego jako matryca. Większość struktur drugorzędowych RNA nie jest rozpoznawana, a RNA nie jest wykorzystywany jako matryca (5). Q β -replikaza zdolna jest do replikacji cząsteczki RNA oznaczonej jako *midvariant-1* (MDV-1) (12). Wstawienie w jedną z pętli cząsteczki MDV-1 krótkiej sekwencji nukleotydowej (sonda) nie zakłóca replikacji (18). Taka zmodyfikowana cząsteczka MDV-1 może być wykorzystywana jako sonda hybrydacyjna (18). Dodanie Q β -replikazy po usunięciu niezwiązanej sondy, powoduje syntezę MDV-1 RNA (rys. 7), który



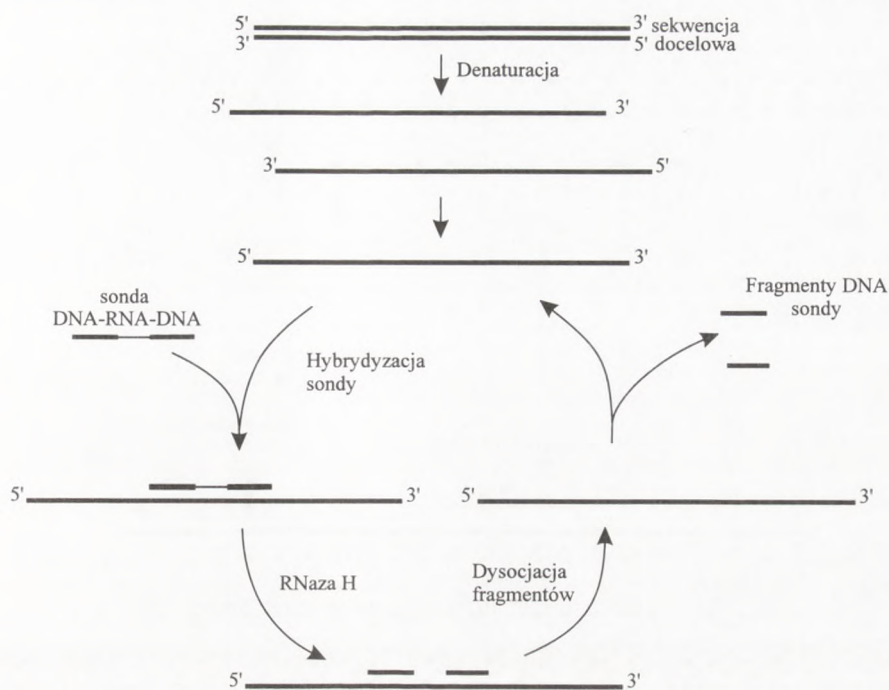
Rys. 7. Amplifikacja sondy oparta na reakcji Qβ-replikazy.

Sonda RNA, będąca jednocześnie substratem dla Qβ-replikazy, hybryduje z sekwencją docelową. Po wypłukaniu niezwiązanej i/lub związanej nieswoiście sondy pod wpływem dodanej Qβ-replikazy enzymatyczna replikacja *in vitro* sondy, do poziomu pozwalającego na łatwe wykrycie produktu Qβ-replikazy (w formie RNA).

może być łatwo wykryty poprzez zastosowanie standardowych metod (13,16,17,24).

7. Reakcja cyklicznej hybrydyzacji

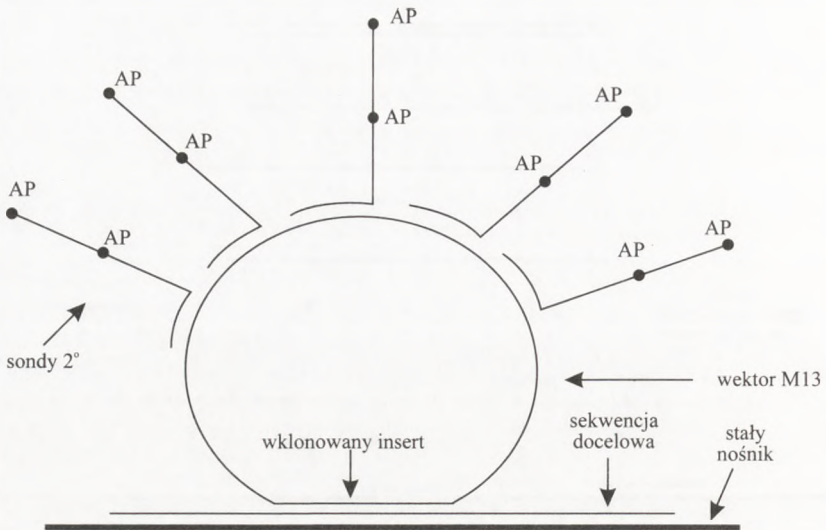
Reakcja cyklicznej hybrydyzacji (rys. 8) jest w zasadzie odwróceniem LCR. W metodzie tej otrzymywana syntetycznie chimeryczna jednoniciowa sonda,



Rys. 8. Reakcja cyklicznej hybrydyzacji.

Chimeryczna sonda DNA-RNA-DNA hybryduje z docelowym zdenaturowanym DNA w tak dobranych warunkach, że po zdegradowaniu przez RNazę H fragmentu w związanej sondzie, fragmenty DNA odysocjują, umożliwiając wiązanie się z sekwencją docelową następnej cząsteczki sondy. O obecności sekwencji docelowej w analizowanym kwasie nukleinowym świadczą wolne fragmenty DNA gromadzące się w wykrywalnych ilościach.

w której naprzemiennie znajdują się sekwencje DNA-RNA-DNA wykorzystywana jest do hybrydyzacji z uprzednio zdenaturowanym, analizowanym DNA w stałej, specyficznej temperaturze, dobranej w zależności od sekwencji i długości sondy. Rybonukleaza H swoiście degradowuje środkową część związanej sondy — sekwencję RNA powodując dysocjację pozostałych fragmentów DNA. Analizowana sekwencja jest dostępna dla następnej cząsteczki sondy, dzięki czemu reakcja przebiega cyklicznie bez jakiegokolwiek ingerencji z zewnątrz, a nagromadzenie wolnych fragmentów DNA sondy, wykrywalnych za pomocą odpowiednich metod, świadczy o obecności poszukiwanej sekwencji (7). W systemie tym pojedyncza sekwencja docelowa działa jako „katalizator” przekształcenia wielu cząsteczek sondy. Obok formy wyjściowej pojawiają się formy krótkie, nieobecne przy braku poszukiwanej sekwencji.



Rys. 9. Amplifikacja sygnału oparta na sondach sprzężonych.

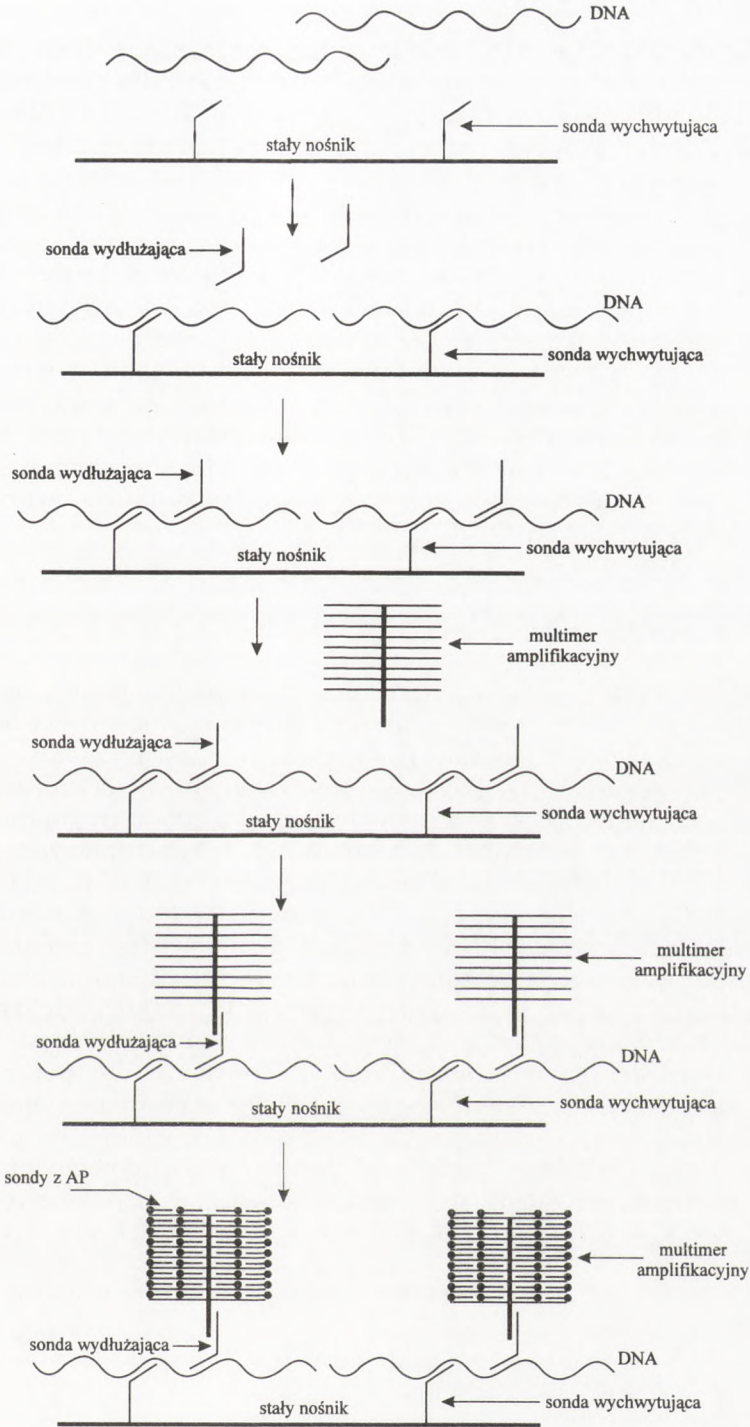
Docelowy kwas nukleinowy związany ze stałym nośnikiem hybryduje z sondą mającą sekwencję komplementarną do sekwencji docelowej i liczne miejsca wiążące sondy „drugiego stopnia” wyznakowane fosfatazą alkaliczną, umożliwiającą wykrycie związanej sondy.

8. Sondy sprzężone

Przykładem wykorzystania sondy sprzężonej jest system pokazany na rys. 9, polegający na amplifikacji sygnału wykrywającego sekwencję docelową, a nie jej samej. DNA, komplementarny do wybranej sekwencji, zostaje sklonowany w wektorze bakteriofagowym M13. Wyizolowany DNA wektora zawiera jednoniciową sondę wykorzystywaną do hybrydyzacji z docelowym DNA związanym ze stałym nośnikiem. Następnie, przy użyciu wyznakowanych alkaliczną fosfatazą sond „drugiego stopnia”, komplementarnych do sekwencji wektora wykrywa się kompleks matrycy z sondą (4).

Rys. 10. Amplifikacja sygnału oparta na sondzie rozgałęzionej (bdNA).

Do docelowego kwasu nukleinowego związanego po denaturacji termicznej ze stałym nośnikiem przez sondy wychytujące, wiąże się sondę przedłużającą, na jednym końcu komplementarną do sekwencji docelowej, na drugim zaś do rozgałęzionego multimeru amplifikacyjnego. Z sekwencjami bdNA wiążą się komplementarne oligonukleotydy wyznakowane alkaliczną fosfatazą, umożliwiającą wykrycie kompleksu sond.



9. Sondy rozgałęzione (bDNA)

Sondy rozgałęzione (rys. 10) wykorzystują rozgałęziony DNA (*branched DNA* — bDNA) do stworzenia wielu miejsc hybrydyzacji dla cząsteczki reporterowej (wyznakowanej sondy) (27,29). Kompleksy oparte na bDNA są określane jako multimery amplifikacyjne. Ich oligonukleotydowy rdzeń zawiera, wbudowane w trakcie chemicznej syntezy, w regularnych odstępach, rozgałęzione analogi nukleozydów. Do tych rozgałęzionych nukleozydów przyłączone są oligonukleotydowe sekwencje rozpoznawane przez cząsteczki reporterowe.

Amplifikacja sygnału przez bDNA obejmuje kilka równoległych hybrydyzacji. DNA zawierający poszukiwaną sekwencję jest wychwytywany przez swoiste sondy związane ze stałym nośnikiem. Drugi zestaw swoistych sond przedłużających hybryduje z sąsiadującymi sekwencjami, i służy jednocześnie jako miejsce wiązania rozgałęzionych multimerów amplifikacyjnych, które z kolei mogą przyłączyć wiele cząsteczek oligonukleotydów wyznakowanych alkaliczną fosfatazą. W ten sposób do każdej z sekwencji docelowych można przyłączyć do 3000 cząsteczek enzymu, co pozwala na wykrycie 10^3 - 10^5 kopii sekwencji poszukiwanej.

10. Podsumowanie

Większość spośród przedstawionych metod amplifikacji kwasów nukleinowych ogranicza się tylko i wyłącznie do wykrywania obecności określonej sekwencji w analizowanym kwasie nukleinowym. Obszar zastosowań tych metod jest zatem ograniczony. Bardziej uniwersalnymi metodami są niewątpliwie PCR i 3SR, ponieważ otrzymane w ich wyniku produkty (oprócz wykrycia) można wykorzystać następnie do klonowania, sekwencjonowania, czy też analizy restrykcyjnej. 3SR posiada pewną przewagę nad PCR: jest szybsza, izotermiczna i, jak wspomniano, w pewnych warunkach pozwala na selektywne odróżnienie matrycy RNA od DNA. PCR z kolei jest metodą bardziej swoistą. SDA ze względu na wykorzystanie fragmentu Klenowa polimerazy I *E. coli* może być wykorzystana do syntezy relatywnie krótkich odcinków DNA.

Znaczenie metod amplifikacji w laboratoriach naukowych jest ugruntowane i niepodważalne, a w laboratoriach diagnostycznych, pomimo wielu przeszkód, perspektywy ich zastosowań są wielce obiecujące. Opracowanie zestawów diagnostycznych dostępnych handlowo spowoduje, że już w najbliższej przyszłości będziemy świadkami gwałtownego upowszechniania się tych metod w rutynowej diagnostyce mikrobiologicznej czy genetycznej.

Dziękujemy doc. dr. hab. A. Kraszewskiemu za życzliwe uwagi w trakcie pisania tego artykułu.

Literatura

1. Backman K., (1992), *Clin. Chem.*, 38, 457-458.
2. Barany F., (1991), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 189-193.
3. Bej A., Mahbubani H., Atlas R. M., (1991), *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 26, 301-334.
4. Birkenmeyer L. G., Mushawar I. K., (1991), *J. Virol. Methods*, 35, 117-126.
5. Cahill P., Foster K., Mahan D. E., (1991), *Clin. Chem.*, 37, 1482-1485.
6. Compton J., (1991), *Nature*, 350, 91-92.
7. Duck P., Alvarado-Urbina G., Burdick B., Collier B., (1990), *Bio Techniques*, 9, 142-147.
8. Erlich H. A., Gelfand D., Sninsky J. J., (1991), *Science*, 252, 1643-1651.
9. Gingeras T. R., Richman D. D., Kwoh D. Y., Guatelli J. C., (1990), *Vet. Microbiol.*, 24, 235-251.
10. Guatelli J. C., Whitfield K. M., Kwoh D. Y., Barringer K. J., Richman D. D., Gingeras T. R., (1990), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 1874-1878.
11. Hengen P. N., (1995), *Trends Genet. Sci.*, 20, 372-373.
12. Kacian D. L., Mills D. R., Kramer F. R., Spiegelman S., (1972), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69, 3038-3042.
13. Kramer F. R., Lizardi P. M., (1989), *Nature*, 339, 401-402.
14. Kwoh D. Y., Davis G. R., Whitfield K. M., Chappelle H. L., DiMichele L. J., Gingeras T. R., (1989), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 1173-1177.
15. Landegren U., Kaiser R., Sanders J., Hood L., (1988), *Science*, 241, 1077-1080.
16. Lizardi P. M., Guerra C. E., Lomeli H., Tussia-Luna I., Kramer F. R., (1988), *Bio/Technology*, 6, 1197-1202.
17. Lomeli H., Tyagi S., Pritchard G. C., Lizardi P. M., Kramer F. R., (1988), *Clin. Chem.*, 35, 1826-1831.
18. Miele E. A., Mills D. R., Kramer F. R., (1973), *J. Mol. Biol.*, 171, 281-295.
19. Mullis K. B., (1990), *Sci. Amer.*, 240, 56-65.
20. Mullis K. B., Faloona F. A., (1987), *Methods Enzymol.*, 155, 335-350.
21. Newton C. R., Graham A., Heptinstall L. E., Powell S. J., Summers C., Kalsheker N., Smith J. C., Markham A. F., (1989), *Nucleic Acids Res.*, 17, 2503-2516.
22. Nickerson D. A., Kaiser R., Lappin S., Stewart J., Hood L., (1990), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 8923-8927.
23. Persing D. H., (1991), *J. Clin. Microbiol.*, 29, 1281-1285.
24. Pritchard C. G., Stefano J. E., (1990), *Ann. Biol. Clin. (Paris)*, 48, 492-497.
25. Reyes G. R., Kim J. P., (1991), *Mol. Cel. Probes*, 5, 473-481.
26. Saiki R. K., Scharf S., Faloona F. A., Mullis K. B., Horn G. T., Erlich H. A., Arnheim N., (1985), *Science*, 230, 1350-1354.
27. Sanchez-Pescador R., Stempien M. S., Urdea M. S., (1988), *J. Clin. Microbiol.*, 26, 1934-1938.
28. Steffan R. J., Atlas R. M., (1991), *Annu. Rev. Microbiol.*, 45, 137-161.
29. Urdea M. S., Fultz S. T., Anderson T. J., Running M., Hamren J. A., Ahle S., Chang C. A., (1991), *Nucleic Acids symp. Ser.*, 24, 197-200.
30. van Brunt J., (1990), *Bio/Technology*, 5, 211-221.
31. Walker G. T., (1993), *PCR Methods Appl.*, 3, 1-6.
32. Walker G. T., Fraiser M. S., Schram J. L., Little M. C., Nadeau J. G., Malinowski D. P., (1992), *Nucleic Acids Res.*, 20, 1691-1696.
33. Walker G. T., Little M. C., Nadeau J. G., Shank D. D., (1992), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 392-396.
34. Winn-Deen E. S., Wallace R. B., Iovannisci D. M., (1991), *Clin. Chem.*, 37, 1522-1523.
35. Wu D. Y., Wallace R. B., (1989), *Genomics*, 4, 560-569.

Nucleic acids amplification methods used in microbiological diagnosis

Summary

The highly sensitive *in vitro* methods for the detection of specific nucleic acid sequences are presented. These methods include target amplification (polymerase chain reaction — PCR, strand displacement amplification — SDA, transcription based amplification systems (TAS; self-sustaining sequence replication — 3SR, nucleic acid sequence-based amplification — NASBA), probe molecule amplification (ligase chain reaction — LCR and $\Phi\beta$ -replicase), cycling probe reaction and signal amplification methods (compounds and branched probes).

Key words:

polymerase chain reaction, strand displacement amplification, ligase amplification reaction, transcription based amplification systems, cycling probes reaction, $\Phi\beta$ -replicase amplification, branched probes, compounds probes.

Adres do korespondencji:

Jacek Jenek, Zakład Mikrobiologii Lekarskiej AM, ul. Wieniawskiego 3, 61-712 Poznań.