Akceptuję
W ramach naszej witryny stosujemy pliki cookies w celu świadczenia państwu usług na najwyższym poziomie, w tym w sposób dostosowany do indywidualnych potrzeb. Korzystanie z witryny bez zmiany ustawień dotyczących cookies oznacza, że będą one zamieszczone w Państwa urządzeniu końcowym. Możecie Państwo dokonać w każdym czasie zmiany ustawień dotyczących cookies. Więcej szczegółów w naszej Polityce Prywatności

Łańcuchowa reakcja polimerazy z analizą w czasie rzeczywistym (Real- Time PCR) i jej wykorzystanie w diagnostyce

Opracowanie w 1983 roku łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR- ang. Polymerase Chain Reaction) przyczyniło się do znacznego postępu w dziedzinie diagnostyki. Dzięki reakcji PCR stała się możliwa synteza miliardów kopii dowolnej sekwencji genomowego DNA w ciągu kilku godzin. Jednocześnie znacznie przyśpieszono i udoskonalono szeroko pojętą diagnostykę [3].

Z kolei, opracowanie przez Higuchi’ego i wsp. (na początku lat dziewięćdziesiątych ubiegłego

stulecia) tzw. PCR w czasie rzeczywistym (ang. Real-Time PCR), przyczyniło się do ulepszenia analizy diagnostycznej pod względem jakościowym i ilościowym [3].

Dziś Real-Time PCR jest jedną z najczęściej stosowanych metod w wielu dziedzinach nauki: od medycyny po kryminalistykę i toksykologię [4].

Słowa kluczowe: *PCR, Real-Time PCR, cytomegalowirus (CMV), przeszczep allogeniczny, alloHSCT, znaczniki fluorescencyjne.*

Łańcuchowa reakcja polimerazy (Polimerase Chain Reaction- PCR) uważana jest za bardzo skuteczną technikę biologii molekularnej. Metoda ta pozwala na szybkie wykrycie, amplifikację i identyfikację nawet znikomych ilości kwasów nukleinowych. Pomimo, iż PCR jest aktualnie niezbędnym narzędziem badawczym w wielu dziedzinach nauki, to niestety jest metodą nie dającą całkowicie precyzyjnych wyników ilościowych. W związku z tym, w ostatnich latach opracowano ulepszoną metodę PCR, znaną jako Real-Time PCR [2].

Real-Time PCR jest łańcuchową reakcją polimerazy z analizą w czasie rzeczywistym. Metoda ta zyskała szersze uznanie ze względu na fakt, że jest metodą mniej pracochłonną, szybszą bardziej czułą i wiarygodną, a dodatkowo zminimalizowano w niej ryzyko zanieczyszczenia. Ponadto, co najważniejsze, Real-Time PCR pozwala na monitorowanie ilości kopii produktu w każdym cyklu reakcji [Wiedro K]. Dużą zaletą reakcji Real-Time PCR, że zwiększona czułość techniki pozwoliła na zastosowanie zmniejszonych początkowych ilości analizowanej sekwencji DNA (w porównaniu do innych stosowanych powszechnie metod). Ponadto, możliwość jednoczesnej analizy oraz wizualizacji produktu w trakcie trwania reakcji , zwiększa rolę reakcji r-t PCR jako techniki, która umożliwia rozwój wysoce skutecznych zastosowań diagnostycznych [2].

Wizualizację przyrostu produktu PCR w trakcie reakcji uzyskano dzięki dodaniu do mieszaniny reakcyjnej bromku etydyny (EtBr) interkalującego do dwuniciowych cząsteczek (odcinków) DNA. Dzięki temu, że bromek etydyny wbudowuje się w DNA, barwnik wzbudzany światłem UV emituje fluorescencję, która wzrasta w kolejnych cyklach wraz ze stężeniem amplifikowanego produktu. To właśnie dzięki temu, zmiany stężenia produktu w mieszaninie reakcyjnej mierzone są na bieżąco podczas przebiegu reakcji. W związku ze znacznym rozwojem techniki, w ostatnich latach znacznie udoskonalono metody śledzenia przebiegu reakcji PCR, wykorzystując w tym celu barwniki fluorescencyjne (np. Sybr Green I) lub wyznakowane za pomocą fluorochromów- sondy molekularne , które są komplementarne do powielanych sekwencji [3].

Stosowany w pionierskich pracach Higuchi'ego i wsp. bromek etydyny, wraz z rozwojem metody Real-time PCR został zastąpiony mniej toksycznym, a jednocześnie bardziej czułym (10-25 razy) i bardziej specyficznym barwnikiem, jakim jest SYBR Green I. SYBR Green I jest barwnikiem fluorescencyjnym mającym zdolność przyłączać się do dwuniciowego DNA. Barwnik ten w roztworze wodnym, w stanie wolnym charakteryzuje się niską fluorescencją, jednak związanie się go z dwuniciowym DNA prowadzi do ponad 1000-krotnego wzrostu fluorescencji. Tak więc, w trakcie przebiegu reakcji Real-Time PCR, sygnał emitowanej fluorescencji wzrasta wprost proporcjonalnie do wzrostu ilości syntetyzowanego DNA wraz z każdym cyklem reakcji [8].

Zaletą stosowania SYBR Green I jest to, że eksperyment w którym wykorzystuje się ten barwnik jest stosunkowo łatwy do zaprojektowania, optymalizacji i co najważniejsze, SYBR Green I charakteryzuje stosunkowo niski koszt w porównaniu do innych barwników fluorescencyjnych [8].

Zastosowanie reakcji Real-Time PCR rzuciło nowe światło na kinetykę reakcji PCR, a także na wzrost wydajności różnych metod izolacji kwasów nukleinowych (DNA i RNA), oraz rolę niektórych związków chemicznych, mających zdolność hamowania reakcji amplifikacji [Wiedro K]. W porównaniu z klasyczną reakcją PCR podczas, której określany jest tylko wynik końcowy amplifikacji, TP -time PCR pozwala na śledzenie zmian ilości produktu PCR, co okazało się bardzo ważnym elementem podczas szeroko stosowanej diagnostyki różnych chorób [2].

PCR w czasie rzeczywistym- Real-Time PCR [6].

Do reakcji należy przygotować RNA wolne od zanieczyszczeń DNA. W cym celu należy zmieszać 5µg RNA z 10 jednostkami inhibitora rybonukleaz (Fermentas), 1 jednostkę deoksyrybonukleazy I(wolnej od RNAz- Fermentas), 1 µl buforu do reakcji (tj. 100 mM Tris-HCl, 25 mM MgCl2 oraz 1 mM CaCl2). Mieszaninę należy uzupełnić wodą do końcowej objętości równej10 µl. Tak otrzymaną mieszaninę reakcyjną należy inkubować prze 30-60 minut w 37°C. Zachodzącą reakcję zatrzymać przez dodanie 1 µl 25 mM EDTA, a następnie ogrzanie w 65°C przez 10 minut [6].
Otrzymane próbki przetestowano na obecność pozostałości DNA, przeprowadzając w tym celu reakcję PCR. W reakcji zastosowano startery komplementarne do genu β-2-mikroglobulny. Reakcję przeprowadzono stosując następujące warunki:

- 30 cykli denaturacji (15s, 95°C),
- przyłączania starterów (30 s, 59°C)
- synteza (30 s, 72°C)).

Do reakcji Real-Time PCR użyto 1 µl oczyszczonego (wyżej opisaną metodą) RNA [6].

Odwrotna transkrypcja ze starterem oligo(dT)18 [6].

Reakcję odwrotnej transkrypcji wykonać przy użyciu zestawu Omniscript RT Kit (Qiagen) oraz startera oligo(dT)18 według wskazówek producenta:

W probówce reakcyjnej należy zmieszać 1 µl buforu do reakcji RT, 1 µl Mix TP (tj. 0.5 mM każdego z TP), 1 µl startera oligo(dT)18 (10 µM), 10 jednostek (0,25 µl) inhibitora rybonukleaz (Fermentas), 2 jednostki (0,5 µl) odwrotnej transkryptazy Omniscript, 4,25 µl wody oraz 1 µg (2 µl) RNA (wolnego od zanieczyszczeń DNA). Otrzymaną mieszaninę reakcyjną należy inkubowano przez 60 min w 37°C. Następnie reakcję zatrzymać przez ogrzanie w 93°C przez 5 minut. Po inkubacji próbkę natychmiast schłodzić przez umieszczenie w lodzie. Otrzymane w ten sposób cDNA- jego jakość sprawdzić przeprowadzając reakcję PCR, stosując startery komplementarne do genu ß- 2- makroglobuliny [6].

Reakcja PCR z użyciem zestawu QuantiTect® SYBR® Green PCR (Qiagen) [6].

Reakcję PCR w czasie rzeczywistym wykonać w urządzeniu LightCycler (Roche). W reakcji zastosować następujący skład mieszaniny reakcyjnej : 10 µl mixu QuantiTect® SYBR® Green PCR Master Mix, po 2 µl starterów P i L o stężeniu 5 µM, 0,5-1,5 µl otrzymanego cDNA . Całość uzupełnić wodą mQ do końcowej objętości równej 20 µl [6].
Reakcję PCR przeprowadzić w następujących warunkach reakcyjnych:

- etap wstępnej denaturacji i aktywacji polimerazy DNA (15 min, 95°C)
- 35 cykli denaturacji (5 s, 95°C)
- przyłączenia starterów (30 s, 55-59°C w zależności od użytej pary starterów)
- synteza (72°C, 15-25s, w zależności od użytej pary starterów) [6].

Po zakończeniu reakcji, wykonać krzywą topnienia, w celu sprawdzenia jakości otrzymanych produktów PCR. W celu sporządzenia krzywej kalibracyjnej wykonać 3 reakcje PCR stosując 20, 40 i 80 ng totalnego DNA wyizolowanego zestawem DNA Tissue Kit (Qiagen) [6].

Reakcja PCR z użyciem polimerazy Taq (Fermentas) oraz barwnika SYBR® Green I (Sigma) [6].

Reakcję Real-Time PCR przeprowadzić stosując następujący skład mieszaniny reakcyjnej: 2 µl buforu do reakcji z (NH3)2SO4 tj. 750 mM Tris-HCl (pH 8,8), 200 mM (NH4)2SO4, 0,1% Tween 20), 2 µl 25 mM MgCl2, 1,5 µl Mix TP (każdy TP w stężeniu 2 mM), 2 µl starterów P i L o stężeniu 5 µM, 2 jednostki (2 µl) polimerazy Taq, 0,5-1,5 µl cDNA. Próbkę uzupełnić wodą mQ do końcowej objętości równej 20 µl. Do buforu do reakcji dodatkowo dodać barwnik SYBR® Green I w ilości 0,25 µl barwnika na 1 ml buforu. Bufor reakcyjny (po dodaniu barwnika) przetrzymywano w 4˚C przez okres nie dłuższy niż 2 miesiące [6].

Reakcję PCR przeprowadzić w następujących warunkach reakcyjnych:

- etap wstępnej denaturacji (1 min) i aktywacji polimerazy DNA (15 min, 95°C)
- 35 cykli denaturacji (5 s, 95°C)
- przyłączenia starterów (30 s, 55-59°C w zależności od użytej pary starterów)
- synteza (72°C, 15-25s, w zależności od użytej pary starterów)

Szybkość wzrostu temperatury w czasie reakcji zmniejszyć do 2°C/min [6].

Metoda Real-Time PCR jest coraz częściej stosowana do ilościowej oceny ekspresji genów w materiale pochodzącym z utrwalanych w formalinie tkanek. Zaletą metody Real-Time PCR w odniesieniu do specyficznego materiału (jamik jest RNA z tkanek utrwalonych), jest wysoka czułość metody, a dodatkowo fakt, że do przeprowadzenia reakcji wystarczy niewielka ilość wyizolowanego RNA [5].

Rozwój różnych technik łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR), pozwala na szybkie rozwijanie się wielu dziedzin nauki. W związku z tym, PCR znalazł bardzo szerokie zastosowanie w toksykologii. Użycie bardzo czułej reakcji Real-Time PCR w toksykologii umożliwia wykrycie wielu różnych zmian wywołanych przez daną substancję chemiczną. Zmiany te wykrywane są w bardzo krótkim czasie , a także we wczesnym- jeszcze całkowicie uleczalnym stadium. Reakcje PCR- szeroko stosowane w diagnostyce, pozwalają na wykrycie zmian chorobowych , które wywoływane są już niewielkimi dawkami danej substancji. Dzięki temu znacznie ułatwione są badania na dawkowanie leków. Wszystko to przyczyniło się do dużego usprawnienia diagnostyki [4].

Nerki są organami bardzo intensywnie zaangażowanymi w wydalanie toksyn z organizmu. Niestety, wczesne wykrycie uszkodzeń tych narządów jest często bardzo trudne. Najnowsze badania przeprowadzone na szczurach z wykorzystaniem reakcji Real-Time PCR, wykazują że stosując ten rodzaj PCR możliwe jest wcześniejsze wykrycie uszkodzeń nerek [4].

W przeprowadzonych badaniach szczurom podawano tzw. substancje neurotoksyczne w 2 różnych dawkach przez 1, 3 i 14 dni. Następnie analizowano potencjalne markery neurotoksyczności: Kim-1, Lcu-1, clusterin i Timp-1, występujące w nerkach oraz w moczu, stosując w tym celu test ELISA,

metody histochemiczne, a także Real-Time PCR. Dzięki temu doświadczeniu udało się wykryć zmiany na poziomie molekularnym w ekspresji białek (wykryte metodą r-t PCR), które korelowały z wynikami badań histopatologicznych, jednakże zmiany te wykryto znacznie wcześniej, i co bardzo ważne – już po podaniu znacznie mniejszych dawek toksykologicznej [4].

Wirus cytomegalii (CMV) jest jednym ze śmiertelnych powikłań po przeszczepie szpiku kostnego (BMT). Identyfikacja pacjentów z grupy ryzyka rozwoju CMV jest bardzo ważnym elementem wczesnej diagnostyki i profilaktyki tej choroby. PCR jest bardzo użyteczną metodą wczesnego rozpoznawania choroby CMV. Jednakże, niekiedy może być metodą zbyt wrażliwą do stosowania w praktyce klinicznej. Dzieje się tak ze względu na fakt, że CMV-pozytywne, uzyskane metodą PCR nie muszą wskazywać na bezpośrednie ryzyko wystąpienia choroby CMV [7].

Machida i wsp. w swoich badaniach pokonali ten problem stosując metodę automatycznego PCR w czasie rzeczywistym (Real-Time PCR) w diagnostyce zakażenia CMV. Metoda ta okazała się bardzo czuła i swoista w wykrywaniu CMV. Ponadto test ten jest bardzo korzystny, ponieważ nie ma wpływu na liczbę białych krwinek krwi obwodowej, ani na ekspresję antygenu pp65 [7].

W wyniku przeprowadzonych badań (Machida i wsp.) potwierdzo kilka istotnych zalet Real-Time PCR w stosunku do konwencjonalnego pCR. W toku badań udało się określić liczbę kopii DNA wirusa w badanym materiale, ponadto wykazano pozytywną korelację pomiędzy liczbą kopii DNA CMV a ilością cykli reakcji. Dodatkowo, zauważono wysoką powtarzalność wyników stosując ten rodzaj PCR.

Pomimo, iż przeprowadzone badanie było pilotażowym, obejmującym tylko ograniczoną liczbę pacjentów, niezaprzeczalne jest, że metoda Real-Time PCR jest obiecująca w dalszej diagnostyce zakażeń wirusem cytomegalii [7].

Po przeszczepach allogenicznych (alloHSCT) rutynowo przeprowadza się monitorowanie markerów zakażenia cytomegalowirusem (CMV). Zakażenie cytomegalowirusem (obserwowane u chorych w stanach immunosupresji), może stanowić bardzo istotne zagrożenie dla życia. Stan ten dotyczy przede wszystkim chorych po zabiegach transplantacji komórek hematopoetycznych. Zagrożone są także osoby po przeszczepach narządów unaczynionych, po chemioterapii, a także cierpiące na AIDS [1].

Wykrycie aktywnego zakażenia wirusem (CMV), a także wdrożenie odpowiedniego leczenia jeszcze przed wystąpieniem objawów, uważane jest za najefektywniejszy sposób zapobiegania powikłaniom. W związku z tym, zalecane jest monitorowanie skuteczności podawanych leków przeciwwirusowych. W tym celu niezbędne jest zastosowanie odpowiednich metod diagnostycznych, dla szybkiego wykrywania zakażenia CMV [1].

W dotychczasowych badaniach diagnostyka CMV opierała się głównie na przeprowadzaniu reakcji PCR, w celu jakościowego wykrywania DNA wirusa, a także badano określone antygeny wirusa (głównie pp65) w leukocytach krwi obwodowej przy zastosowaniu metody immunoenzymatycznej. Jednakże, metody te ze względu na wiele wad, zostały ostatnio wyparte przez metodę Real-Time PCR (r-t PCR), dzięki której udało się połączyć wysoką czułość metody z możliwością oceny ilościowej wyizolowanego DNA w badanym materiale [1].

Metoda Real Time PCR aktualnie ma bardzo szerokie zastosowanie w diagnostyce. To właśnie z jej wykorzystaniem możliwe jest diagnozowanie różnorodnych zakażeń, w tym m.in. zakażenia cytomegalowirusem (CMV). Metoda ta jest rutynowo stosowana po przeszczepach allogenicznych komórek krwiotwórczych określanych jako alloHSCT (ang. hematopoietic stem cells

transplantation). Ma to na celu ustalenie wskazania do leczenia przeciwwirusowego , a także do oceny skuteczności leczenia.

Grabarczyk i wsp. w swoich badaniach oceniali użyteczność ilościowego badania DNA wirusa(CMV), do monitorowania po przeszczepie allogenicznym.

W przeprowadzonym doświadczeniu (Grabarczyk i wsp.) DNA CMV oznaczano metodą Real-Time PCR w próbkach surowicy i pełnej krwi, które były pobierane od osób po przeszczepie dwa razy w tygodniu (do 30-tego dnia po przeszczepieniu). W późniejszych okresach badań materiał pobierano raz w tygodniu (do setnego dnia po przeszczepie), a dalej co 2 do 3 tygodni [1].

Dzięki tak rozplanowanemu doświadczeniu, na podstawie początkowego stężenia DNA cytomegalowirusa, jego zmian a także stanu klinicznego, podejmowano decyzję o wprowadzeniu odpowiedniego leczenia. Wyniki badania ilościowego DNA CMV (oznaczonego metodą Real-Time PCR) decydowały o zmianie dotychczasowego leczenia pacjentów na bardziej skuteczne, a także o zmianie dawek (w tym przypadku zmniejszeniu dawek) stosowanych leków przeciwwirusowych.
Zastosowanie metody Real-Time PCR do ilościowego oznaczania DNA w przeprowadzonym badaniu (Grabarczyk i wsp.), pozwoliło na skuteczne optymalizowanie leczenia przeciwwirusowego u chorych cierpiących na immunosupresję po przeszczepieniu allogenicznych komórek krwiotwórczych (alloHSCT) [1].
W doświadczeniu (Grabarczyk i wsp) DNA potrzebne do przeprowadzenia reakcji Real-Time PCR izolowano z 200µl surowicy/osocza lub 200 µl pełnej krwi pobranej na EDTA przy użyciu QIAmp DNA Mini Kit (Quiagen)). Następnie eluowano je 50 µl buforu AE.Tak otrzymane DNA cytomegalowirusa wykrywano metodą Real-Time PCR według procedury wprowadzonej przez Machida i wsp. [1], [7].

Autor: Lidia Koperwas

Literatura:

[1]. Grabarczyk P, Brojer E, Nasiłowska B, Mariańska B, 2006. Użyteczność ilościowego badania techniką Real-Time PCR do wykrywania i monitorowania zakażenia cytomegalowirusem po przeszczepieniu allogenicznych komórek krwiotwórczych. Pol. Merk.Lek., 2006, XXI, 123, 227.
[2]. Wiedro K, Stachowska E, Chlubek D, 2007. Łańcuchowa reakcja polimerazy z analizą w czasie rzeczywistym (RT-PCR). ANNALES ACADEMIAE MEDICAE STETINENSIS ROCZNIKI POMORSKIEJ AKADEMII MEDYCZNEJ W SZCZECINIE 2007, 53, 3, 5-9.
[3]. Studzińska A, Tyburski J, Daca P, Tretyn A, 2008. PCR w czasie rzeczywistym. Istota metody i strategie monitorowania przebiegu reakcji. Prace przeglądowe, Biotechnologia 1 (80), 71-73 2008.
[4]. Kazubek M, Długosz A, Pawlik K, 2010. Zastosowanie technik PCR w toksykologii. Postępy Hig Med. Dosw. (online) 2010; 64; 482-489.
[5]. Korga A, Wilkołaska K, Korobowicz E, 2007. Trudności w wykorzystaniu tkanek z archiwalnych bloczków parafinowych w badaniach ekspresji RNA. Postępy Hig Med. Dosw. (online), 2007; 61; 151-155.
[6]. Dr Piechota J,2009. PCR w czasie rzeczywistym http://metlab.pl/PCR_w_czasie_rzeczywistym_p2.html
[7]. Machida U, Kami M, Fukui T, Kazuyama Y, Kinoshita M, Tanaka Y, Kanda Y, Ogawa S, Honda H, Chiba S, Mitani K, Muto Y, Osumi K, Kimura S, Hirai H, 2000. Real-Time Automated PCR for Early Diagnosis and Monitoring of Cytomegalovirus Infection after Bone Marrow Transplantation. J. Clin. Microbiol. July 2000 vol.38 no. 7 2536-2542.
[8]. Słomski R, 2008. Analiza DNA. Teoria i praktyka. Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, 2008, s. 169-173.

ARTYKUŁ DO POBRANIA: Laboratoria.net - Łańcuchowa reakcja polimerazy z analizą w czasie rzeczywistym (Real- Time PCR) i jej wykorzystanie w diagnostyce

https://laboratoria.net/artykul/12957.html

Informacje dnia: Rusza 15. edycja konkursu Złoty Medal Chemii Behawiorystka: żyć jak kot z kotem, czyli źle Proteza stawu biodrowego z pomocą robota Szkic rozporządzenia o ewaluacji nauki będzie gotowy późną jesienią Wystarczył jeden gen, aby przenieść zachowanie między gatunkami Napoje izotoniczne Rusza 15. edycja konkursu Złoty Medal Chemii Behawiorystka: żyć jak kot z kotem, czyli źle Proteza stawu biodrowego z pomocą robota Szkic rozporządzenia o ewaluacji nauki będzie gotowy późną jesienią Wystarczył jeden gen, aby przenieść zachowanie między gatunkami Napoje izotoniczne Rusza 15. edycja konkursu Złoty Medal Chemii Behawiorystka: żyć jak kot z kotem, czyli źle Proteza stawu biodrowego z pomocą robota Szkic rozporządzenia o ewaluacji nauki będzie gotowy późną jesienią Wystarczył jeden gen, aby przenieść zachowanie między gatunkami Napoje izotoniczne

Partnerzy