Методи досліджень та ідентифікації вірусів

(лабораторна діагностика вірусних інфекцій)

Valeriy Polischuk Virology Department Kyiv National Taras Shevchenko University

Список основної літератури:

- Вирусология. Методы. Под ред. Б. Мейхи. -М., Мир, 1988, -344 стр.
- И.П. Западнюк и др. Лабораторные животные. -К., Вища школа, 1983, -384 стр.
- Т. Маниатис, Э. Фрич, Д. Сэмбрук. Молекулярное клонирование. -М. Мир, 1984, -480стр.
- Общая и частная вирусология в 2х т. Под ред. В.М. Жданова -М. Медицина, 1982.
- S.A. Hill. Methods in Plant Virology. -Blackwell Oxford 1998 -167 pp.
- Феннер Ф. и др. „Биология вирусов животных”. т.1. –М., Мир, 1977. -447 с.
- Антитела. Методы. т.1. Под ред. Д. Кетти. -М., Мир, 1991 -288стр.
- Моекулярная клиническая диагностика. Методы. Под ред. С. Херрингтона. -М., Мир, 1999, - 558стр.

- Візуальна діагностика (?)
- Пряме вивчення (Direct Examination)
- Непряме вивчення (Virus Isolation)
- Серологія (?)

Опосередковані дослідження вірусу

- Методи виділеня, накопичення вірусів на різних модельних системах
- Виділення та дослідження нуклеїнової кислоти та білків вірусів
- Електрофорез білку та нуклеїнової кислоти
- Ультрацентрифугування
- Рентгеноструктурний аналіз
- Гібридизація нуклеїнових кислот
- Полімеразна ланцюгова реакція

Direct Examination

1. **Детекція антигенів** імунофлуоресценція, ELISA etc.

2. **Електронна мікроскопія** морфологія віріонів
імунна електронна мікроскпія

3. **Світлова мікроскопія** гістологічні дослідження
включення

4. **Генетична детекція** молекулярна гібридація
полімеразна ланцюгова реакція (PCR)

Indirect Examination

1. **Культура клітин** цитопатичний ефект (CPE)
   гемадсорбція
   іммунофлуоресценція
2. **Курячі ембріони** хоріоналантоїсна оболонка
   гемаглютинація
   включення
3. **Лабораторні тварини** хвороба або смерть

Серологічні методи досліджень

Класичні методи	Новітні методи
▪метод фіксації комплементу ▪гальмування гемаглютинації ▪реакція нейтралізації ▪ імунофлюоресцентні методи	▪радіоімунний аналіз ▪імуноферментний аналіз ▪імуноелектроблотинг

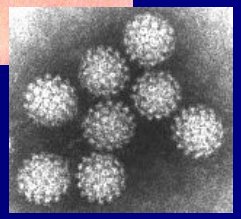
Візуальна діагностика

За симтомами вірусних інфекцій

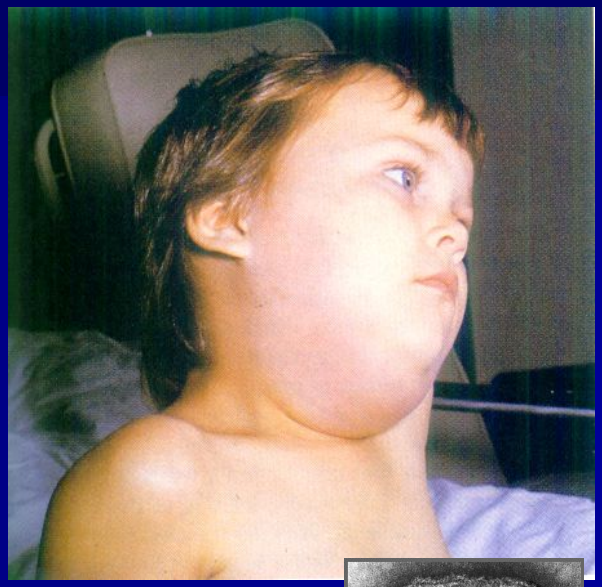
- людина
- тварини
- рослини
- бактерії **??**

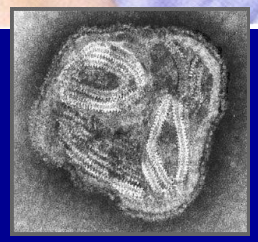
Симптоми вірусних інфекцій у людини

Вірус віспи



Вірус папіломи





Вірус паротиту

Вірус герпесу

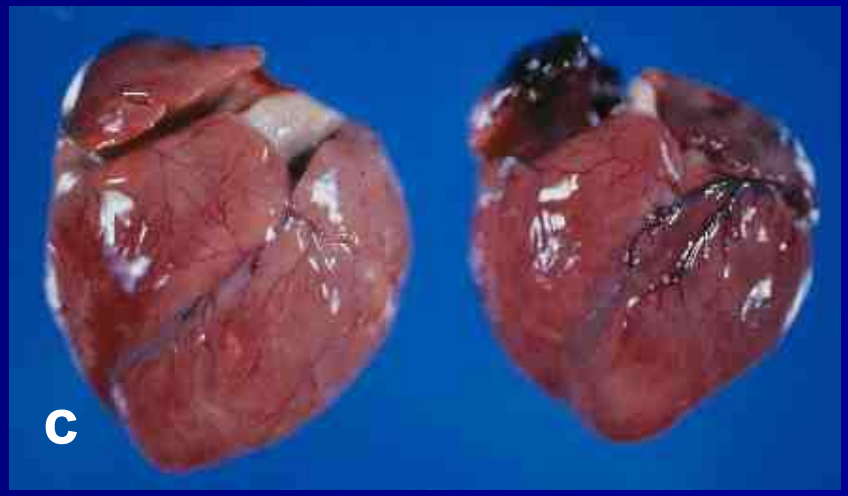
Симптоми вірусних інфекцій у тварин

а

в

а, в – зовнішні сиптоми ураження вірусом ящуру

с – патологічні зміни серцевого м’язу при інфекції вірусом ящуру



с

Симпотми ураження папіломавірусами у людини і тварин

Діагностика вірусних інфекцій людини

Common Pathogenic Viruses	Specimens for Culture	Comments
Respiratory Tract		
Adenovirus; influenza virus; enterovirus (picornavirus); rhinovirus; paramyxovirus; rubella virus; HSV	Nasal washing, throat swab, nasal swab, sputum	Enterovirus is also shed in stool
Gastrointestinal Tract		
Reovirus; rotavirus; adenovirus; Norwalk virus, calicivirus	Stool, rectal swab	Samples are analyzed by electron microscopy and antigen detection (ELISA); viruses are not cultured
Maculopapular Rash		
Adenovirus; enterovirus (picornavirus)	Throat swab, rectal swab	—
Rubella virus; measles virus	Urine	—
Vesicular Rash		
Coxsackievirus; echovirus; HSV; VZV	Vesicle fluid, scraping, or swab, enterovirus in stool	Initial diagnosis of HSV and VZV can be obtained from vesicle scraping (Tzanck smear)
Central Nervous System (Aseptic Meningitis, Encephalitis)		
Enterovirus (picornavirus)	Stool	PCR
Arboviruses (e.g., togaviruses, bunyavirus)	Rarely cultured	Diagnosis is by serologic tests
Rabies virus	Tissue, saliva, brain biopsy	Diagnosis is by immunofluorescence analysis for antigen
HSV; CMV; mumps virus; measles virus	Cerebrospinal fluid	PCR, virus isolation, and antigen are assayed
Urinary Tract		
Adenovirus; CMV	Urine	CMV may be shed without apparent disease
Blood		
HIV; human T-cell leukemia virus; hepatitis B, C, and D viruses	Blood	Serologic antigen or antibody detection (ELISA), PCR, and RT-PCR are performed

From Medical Microbiology, 5th ed., Murray, Rosenthal & Pfaller, Mosby Inc., 2005, Table 51-1.

Симптоми вірусної інфекції у рослин

Вірус тютюнової мозаїки на томатах

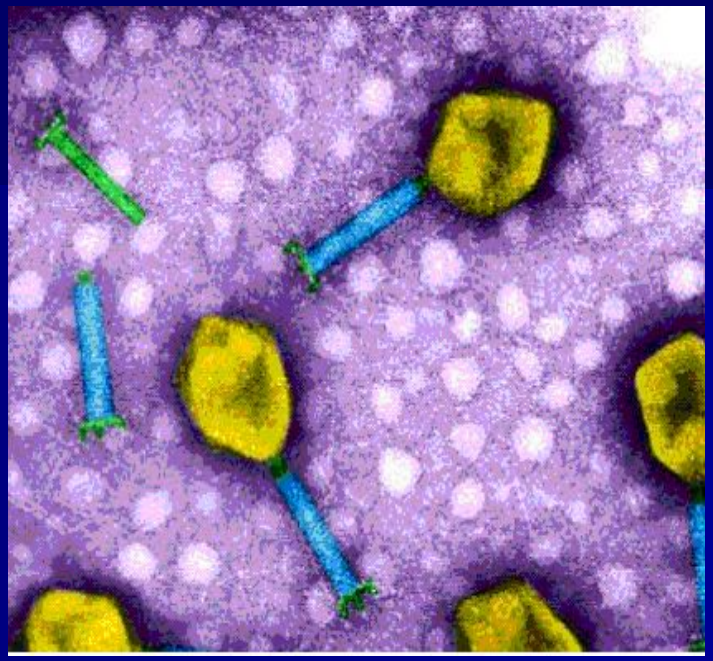
ВЖКЯ на озимій пшениці

Вірус мозаїки турнепсу на капусті

Вірус огіркової мозаїки на огірках

Аналіз біологічних властивостей фагу

Утворення бляшок на газоні *E.coli* на чашці Петрі.
бляшки малого діаметру – “дикий” фаг Т4
бляшки великого діаметру – мутант rII



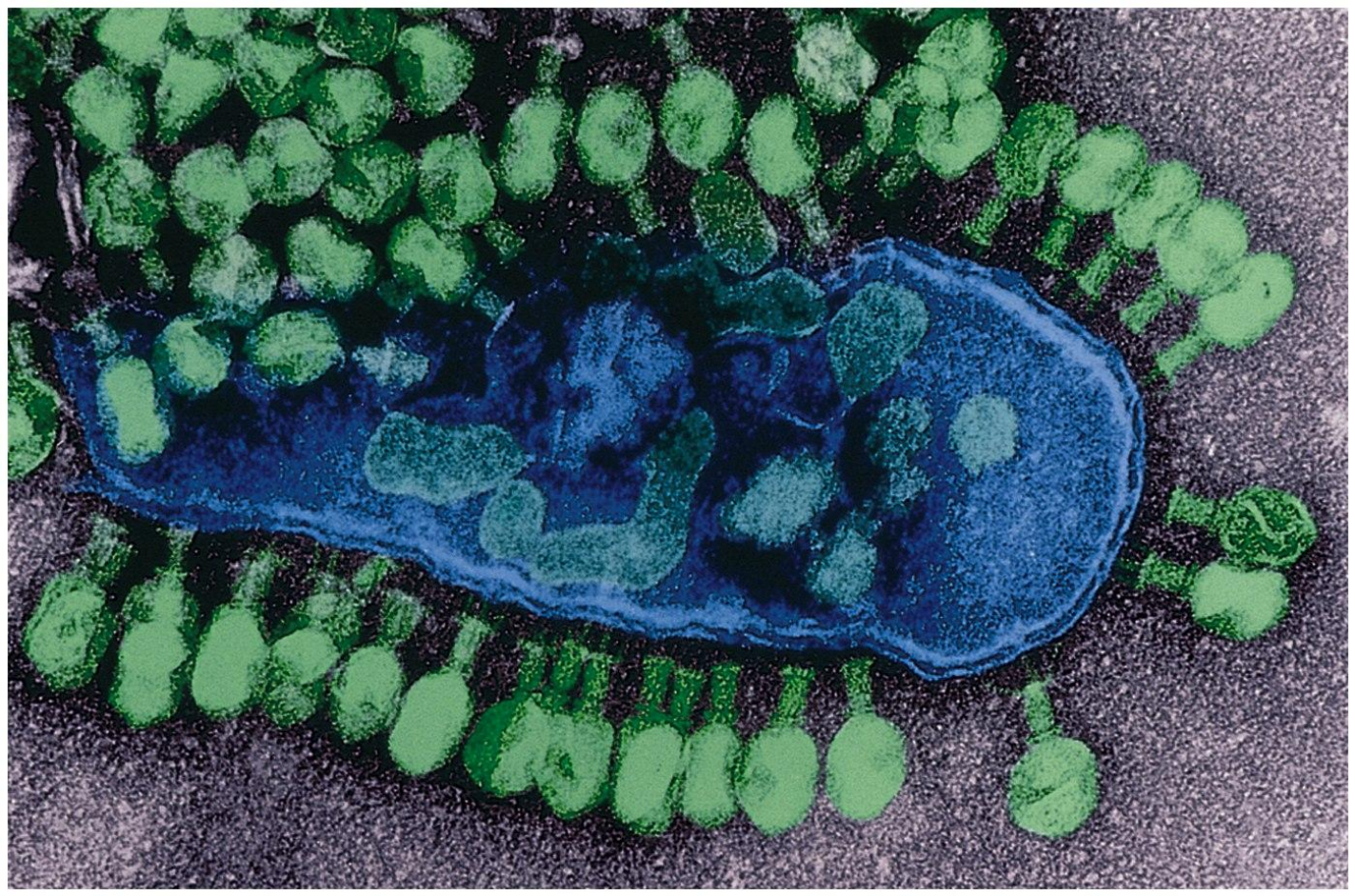
Електронно-мікроскопічне зображення бактеріофагу Т4 після виходу з клітини; Видно окремі “хвости” і стрижні. Морфологія “дикого” типу Т4 і мутанту rII не відрізняється. *Інструментальне збільшення 40 000*

Приклади модельних систем

Модельні системи — системи, що використовуються як моделі для вивчення властивостей, процесів та явищ в живій природі (оскільки вони мають багато спільного з іншими живими системами, які ще не так добре вивчені; результати вивчення модельних систем можуть на них екстраполюватися).

- тютюн- вірус тютюнової мозаїки
- бактерія *E. coli* – бактеріофаг Т4
- курячий ембріон – вірус грипу
- Новонароджені білі миші – вірус поліомієліту
- Культура клітин HeLa - аденовірус

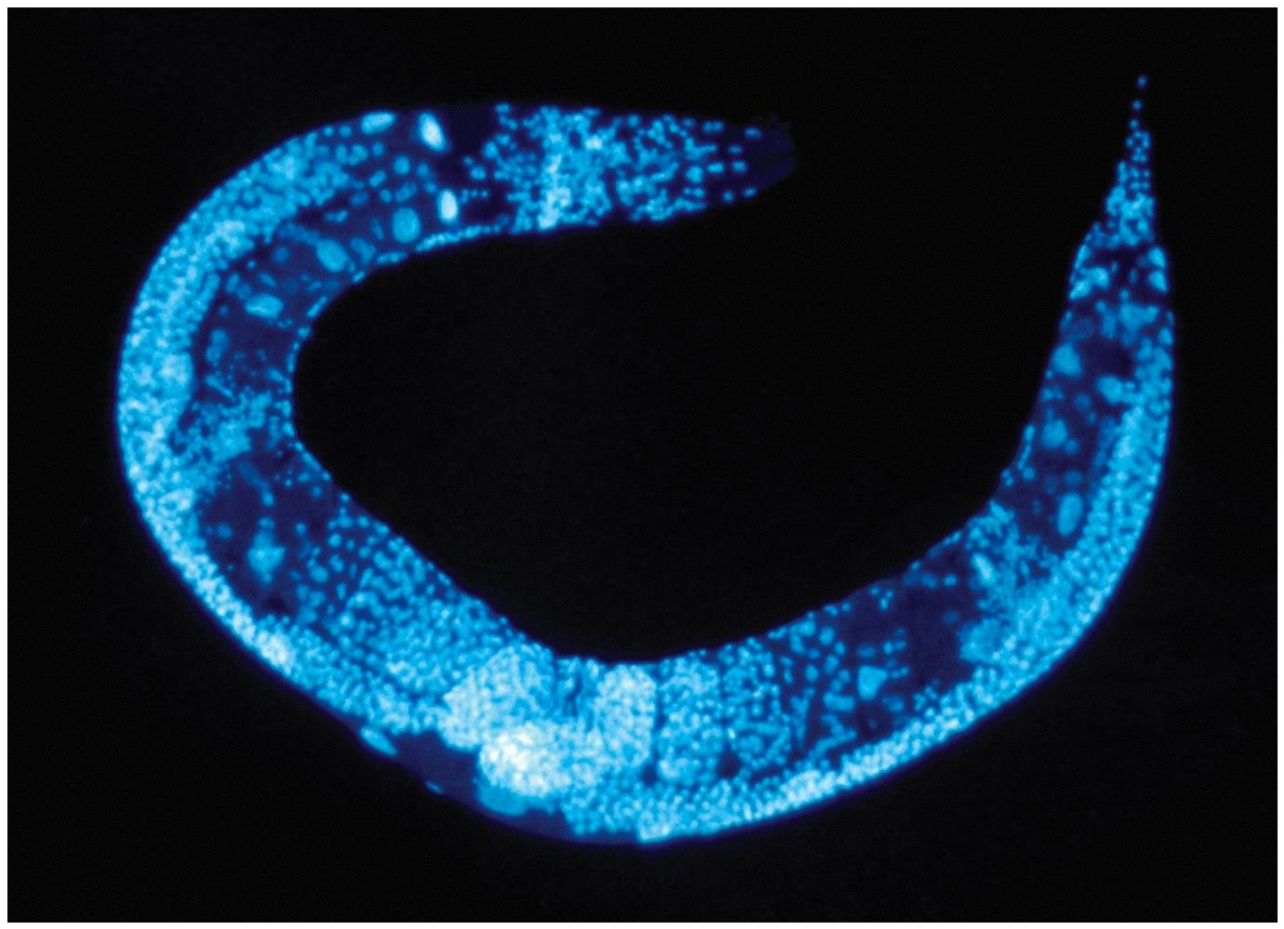
бактерія **E. coli** – бактеріофаг Т**4**



Arabidopsis thaliana

157 000 000 пнп, 5 хромосом, 25,498 генів.

Caenorhabditis elegans



100 000 000 пнп 20,000 генів

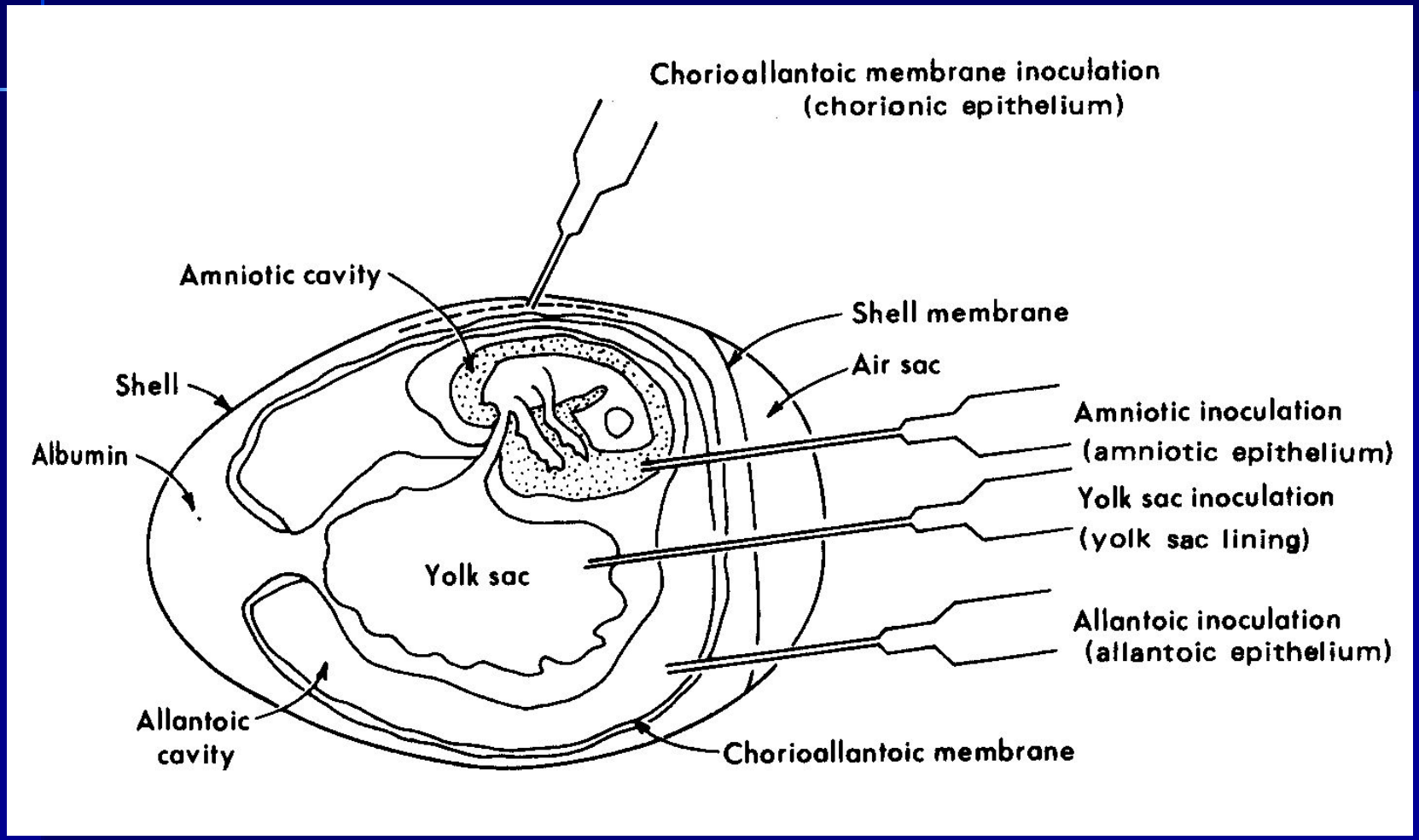
Використання тварин, рослин та бактерій для ідентифікації вірусів

Лабораторні тварини

Використовуються:

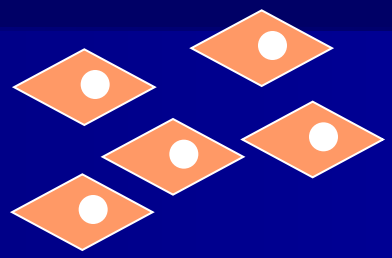
- для безпосереднього виділення вірусів з оточуючого середовища;
- для виявлення (індикації) вірусу в патологічному матеріалі, тобто для проведення біологічної проби;
- для накопичення вірусів у значній кількості;
- для пасування вірусів у лабораторних умовах з метою тривалого підтримання їх в активному стані;
- для титрування вірусів, тобто встановлення їх концентрації у патологічному матеріалі;
- для одержання вакцин та гіперімунних сироваток;
- для оцінки ефективності профілактичних та лікувальних засобів;
- для вивчення прояву вірусної інфекції на всіх стадіях хвороби, тобто патогенезу захворювання на рівні організму;
- для дослідження імунної відповіді організму на ураження вірусом.

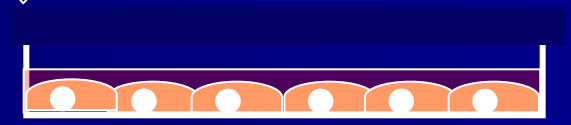
Використання курячих ембріонів

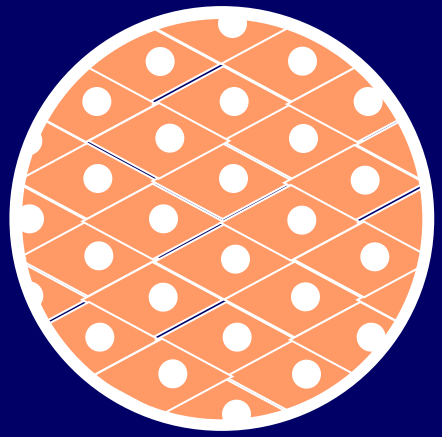


Davis, Duylbecco, Eisen, Ginsberg “Microbiology” 4th ed, J.B. Lippincott 1990, Fig. 48-1

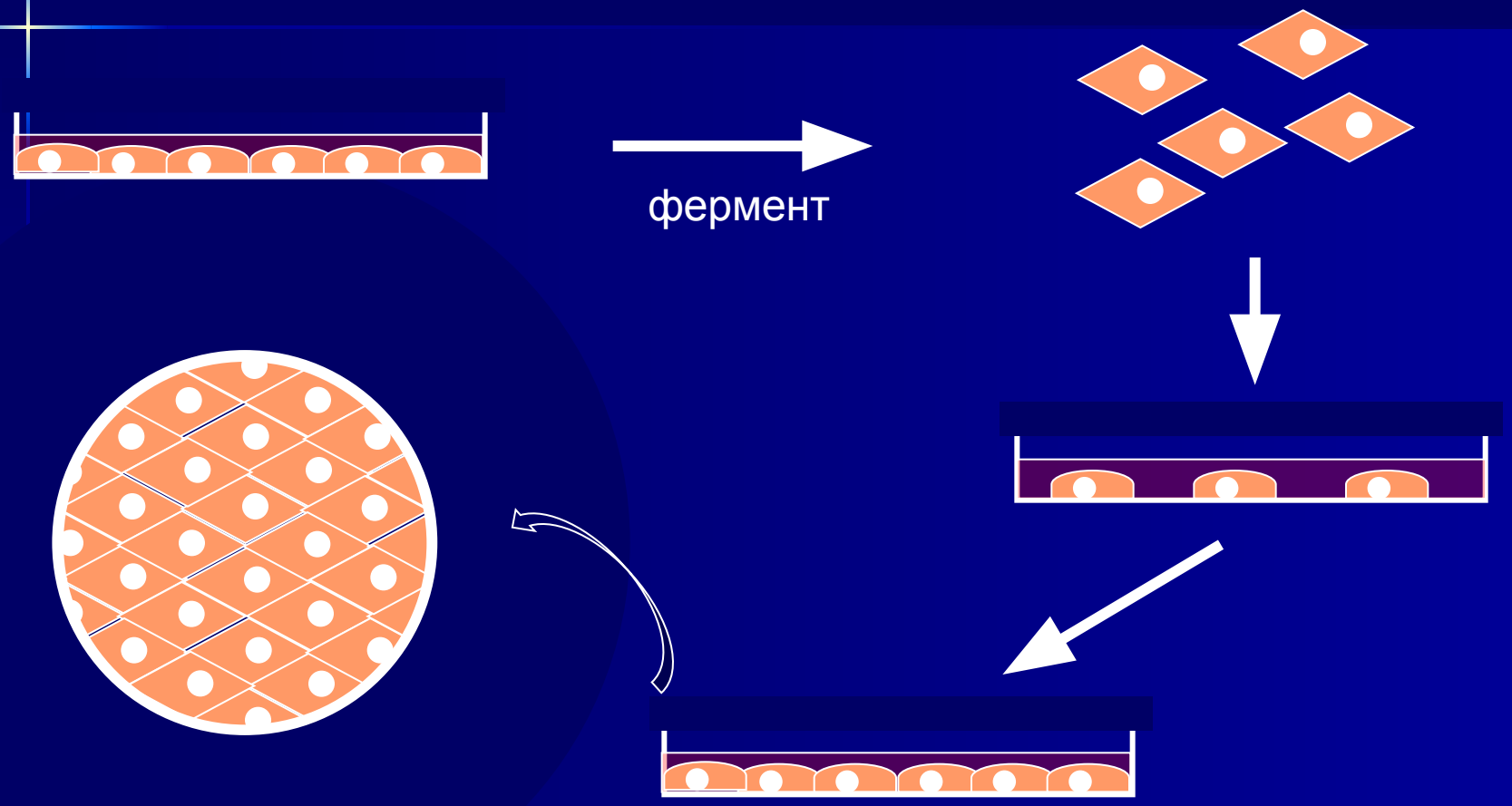
Первинна культура клітин





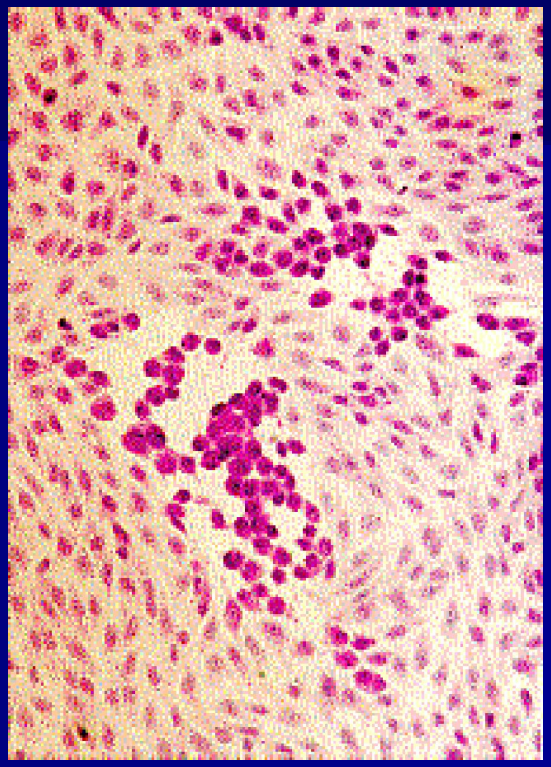


Субкультура



Цитопатичний ефект

Fig. 1, Cytopathic effects of enterovirus 71 in rhesus monkey kidney cells



Cytopathic effect of enterovirus 71 and HSV in cell culture: note the ballooning of cells.
(Virology Laboratory, Yale-New Haven Hospital, Linda Stannard, University of Cape Town)

Використання рослин для ідентифікації вірусів

Визначення:

Рослини-індикатори **– це рослини, які дають чітку специфічну реакцію на даний вірус, що легко відрізняється від реакції цієї рослини на інший вірус.**

Приклади симптомів:

Мозаїка

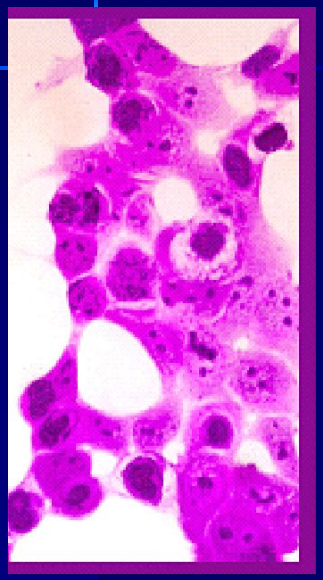
хлорози

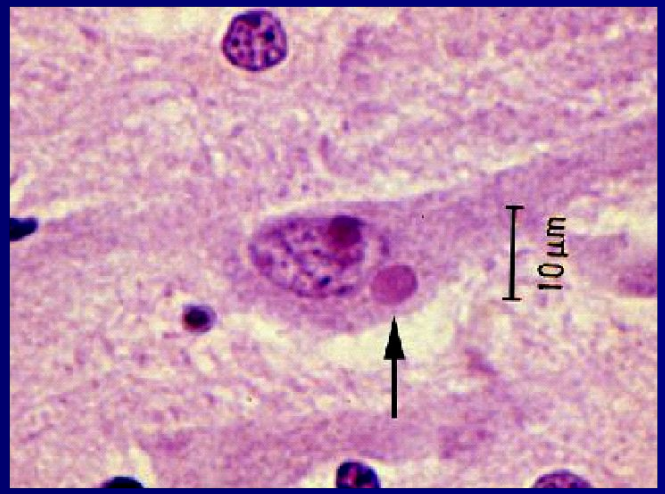
некрози

Використання бактерій

Негативні колонії (форма, розмір, ореол)

Світлова мікроскопія

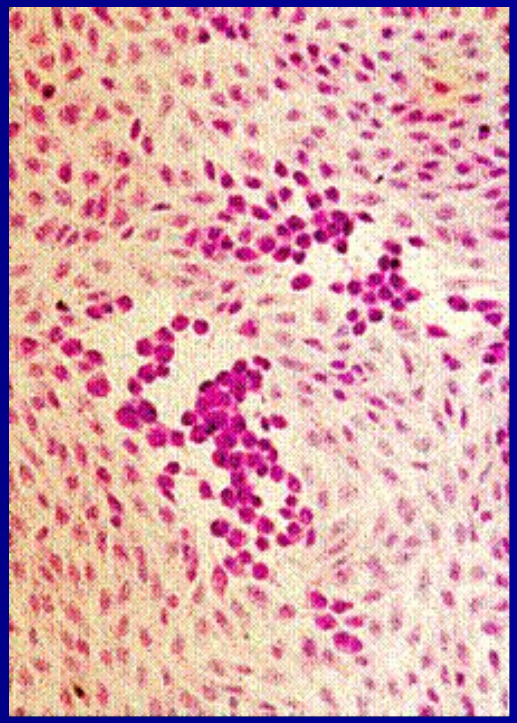




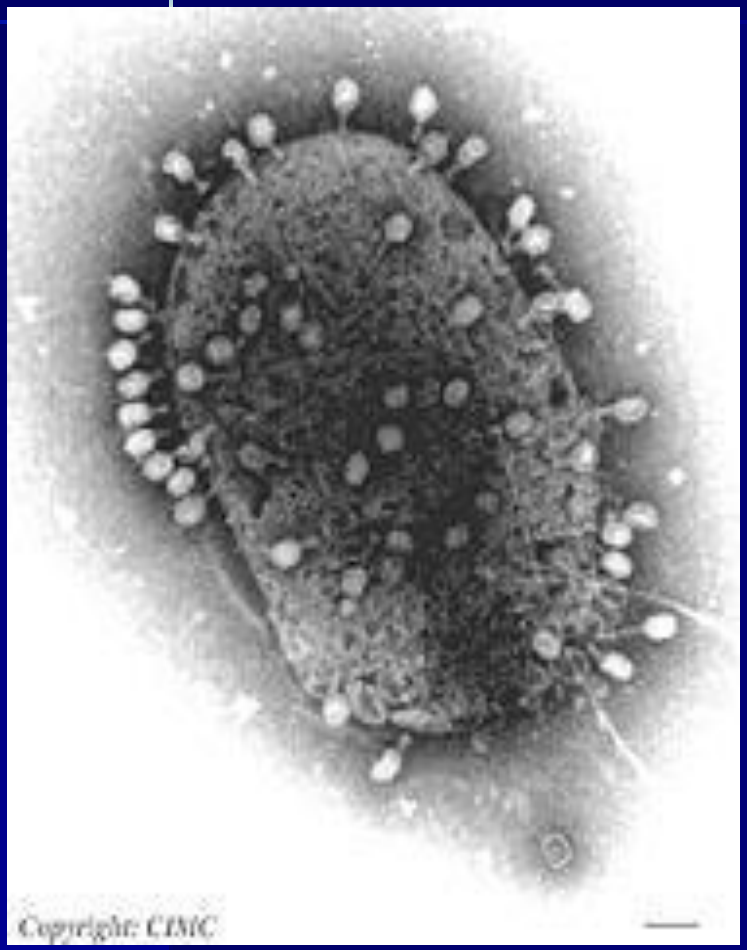
a b

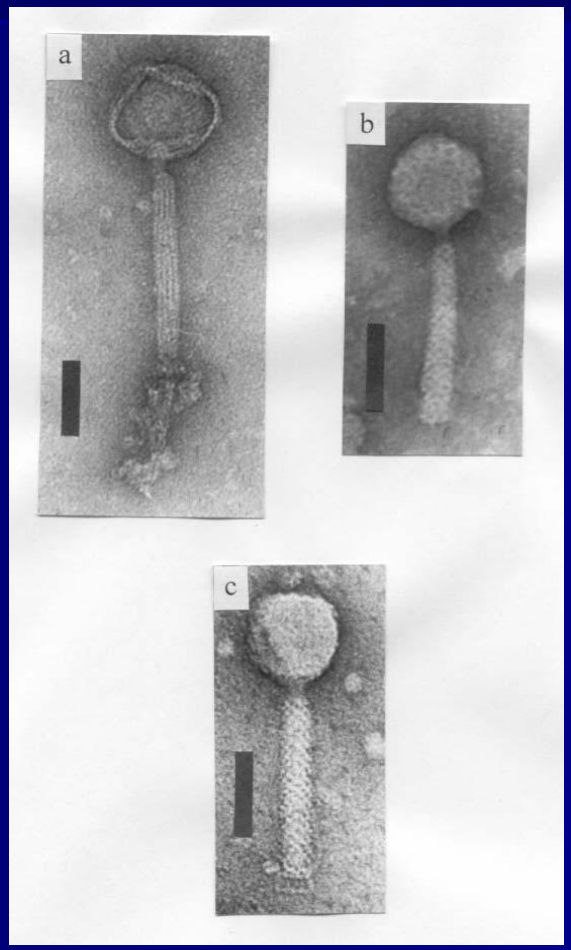
Включення при ураженні аденовірусом (a) та вірусом сказу – тільця Бабеша-Негрі (b) (тільця позначені стрілкою)

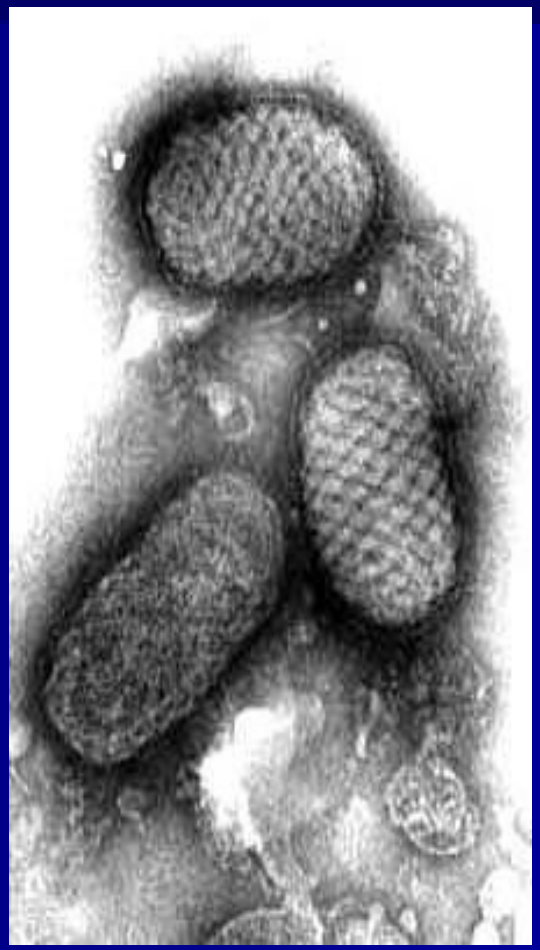
Заокруглення клітин у випадку зараження культури клітин вірусом простого герпесу



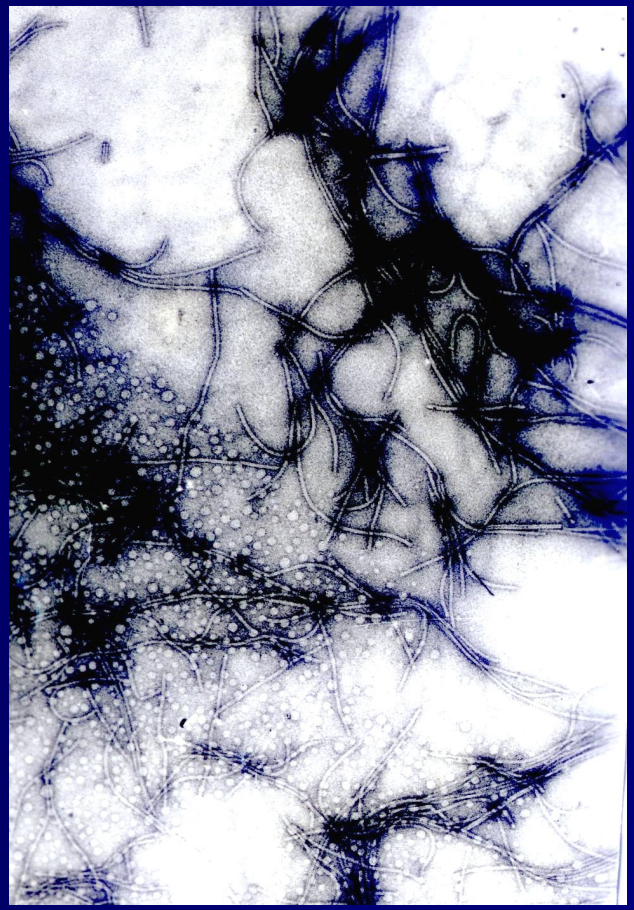
Електронна мікроскопія

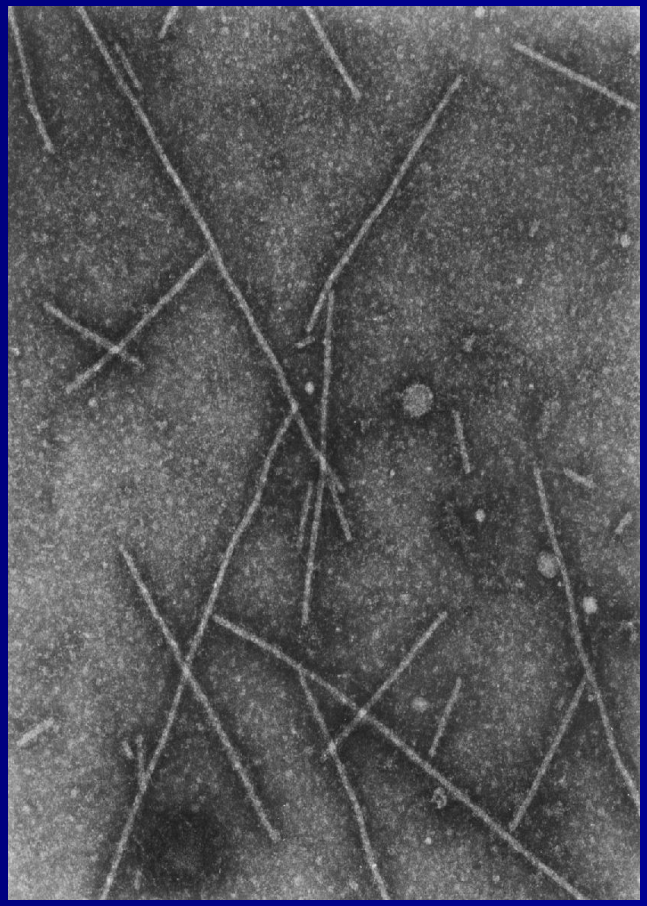






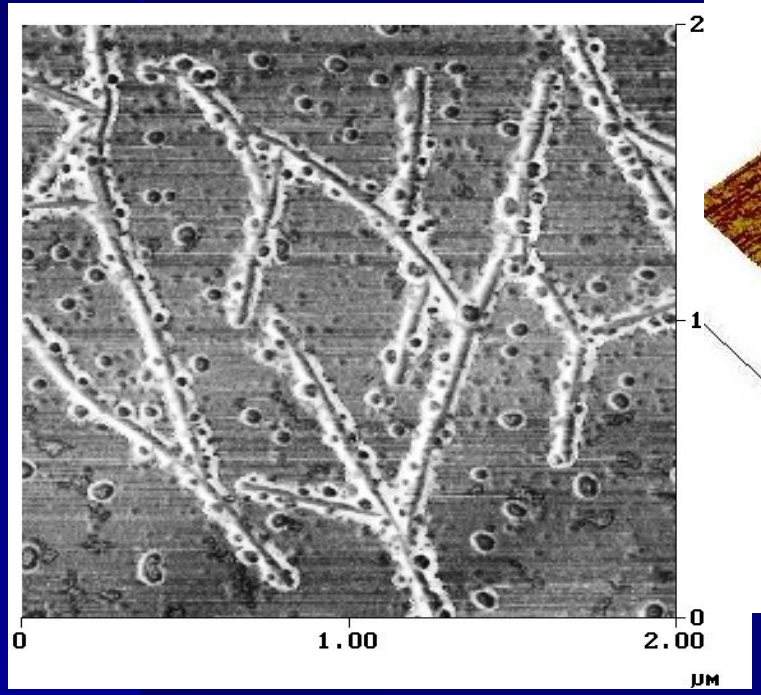
Імуносорбентна електронна мікроскопія

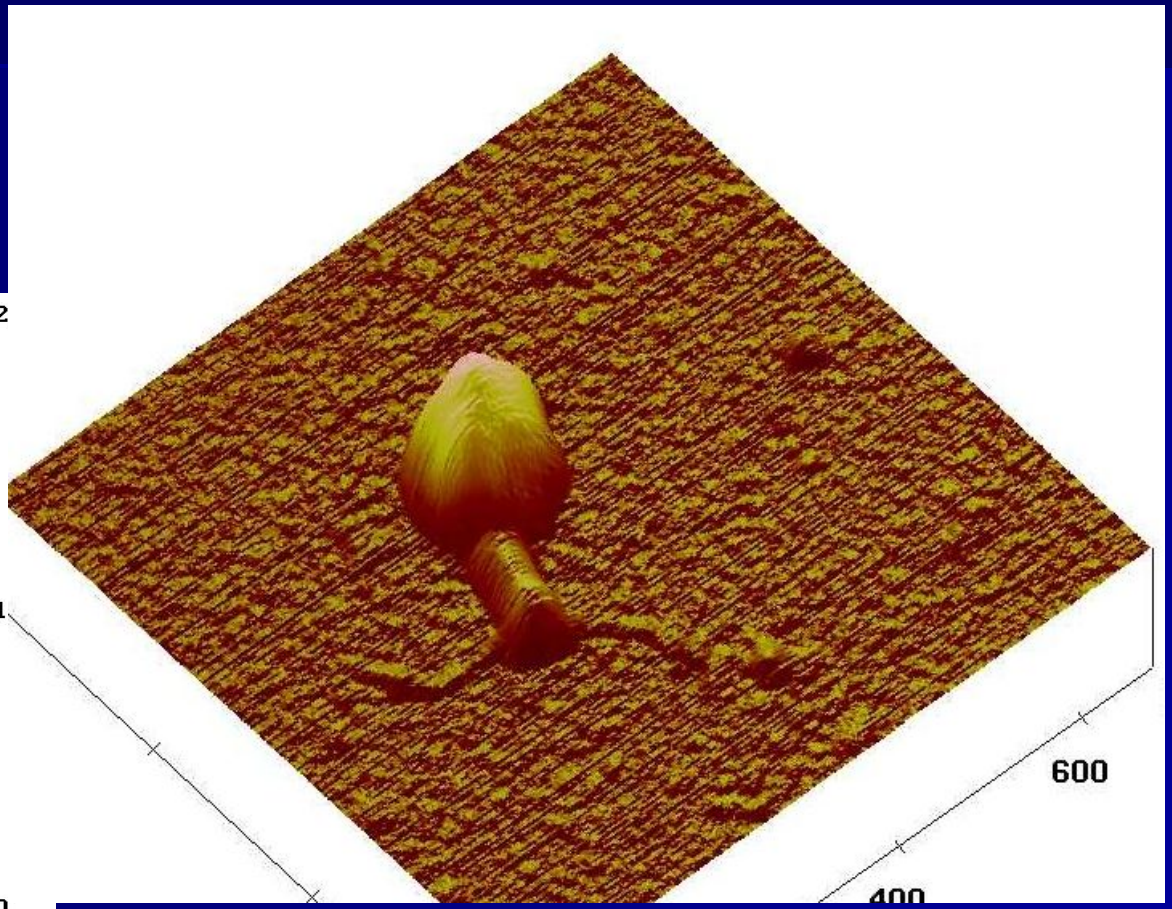




Атомно-силова мікроскопія

АСМ зображення ВТМ





АСМ зображення фагу Т4

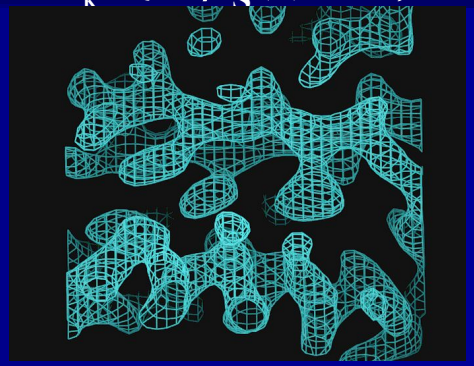
Рентгено-структурний аналіз вірусів

The solving of the structure

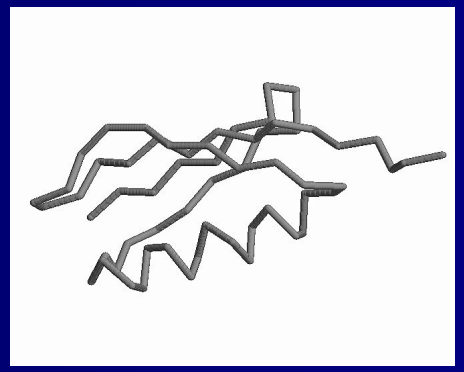
h	k	l	F	σ
0	0	6	46.09	2.74
0	0	8	212.95	5.00
0	0	20	98.75	3.15
0	1	6	188.33	5.06
0	1	7	14.88	8.00
0	1	8	226.02	7.9

The phase problem

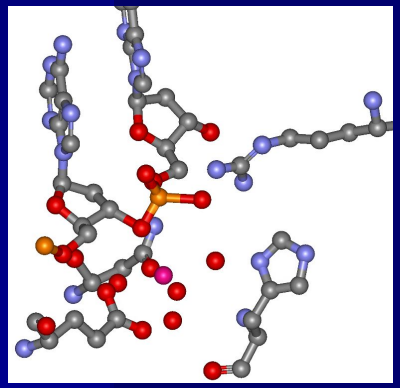
$\Omega_\kappa = \{\mathbf{r}: \rho_S(\mathbf{r}) > \kappa\}$



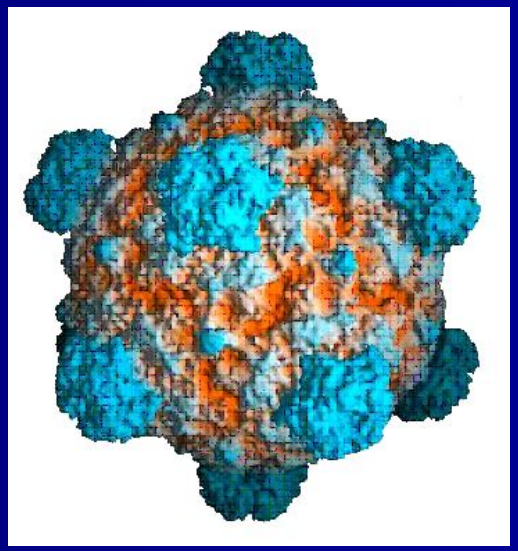
preliminary model



refined model



Protein Data Bank



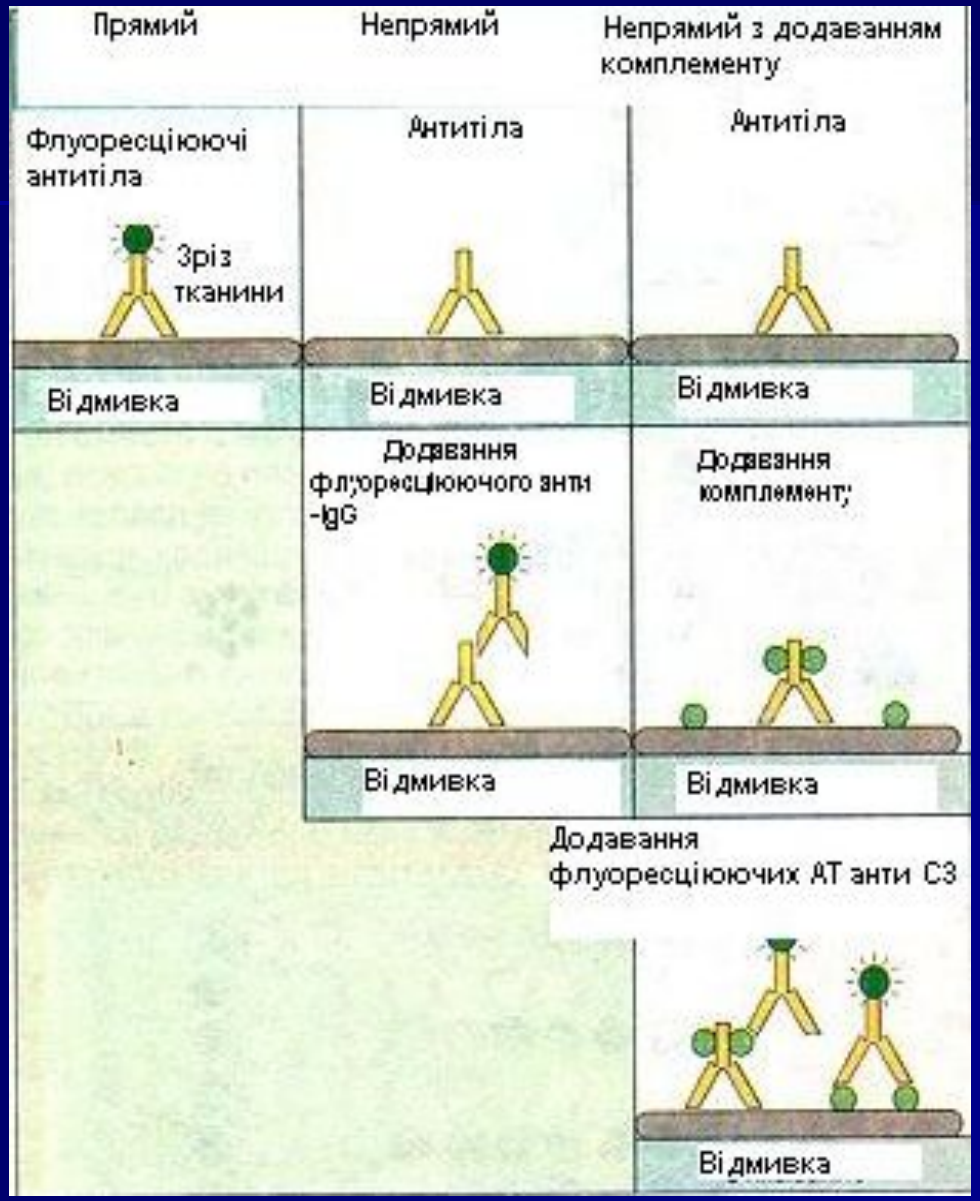
Серологічні методи досліджень в вірусології

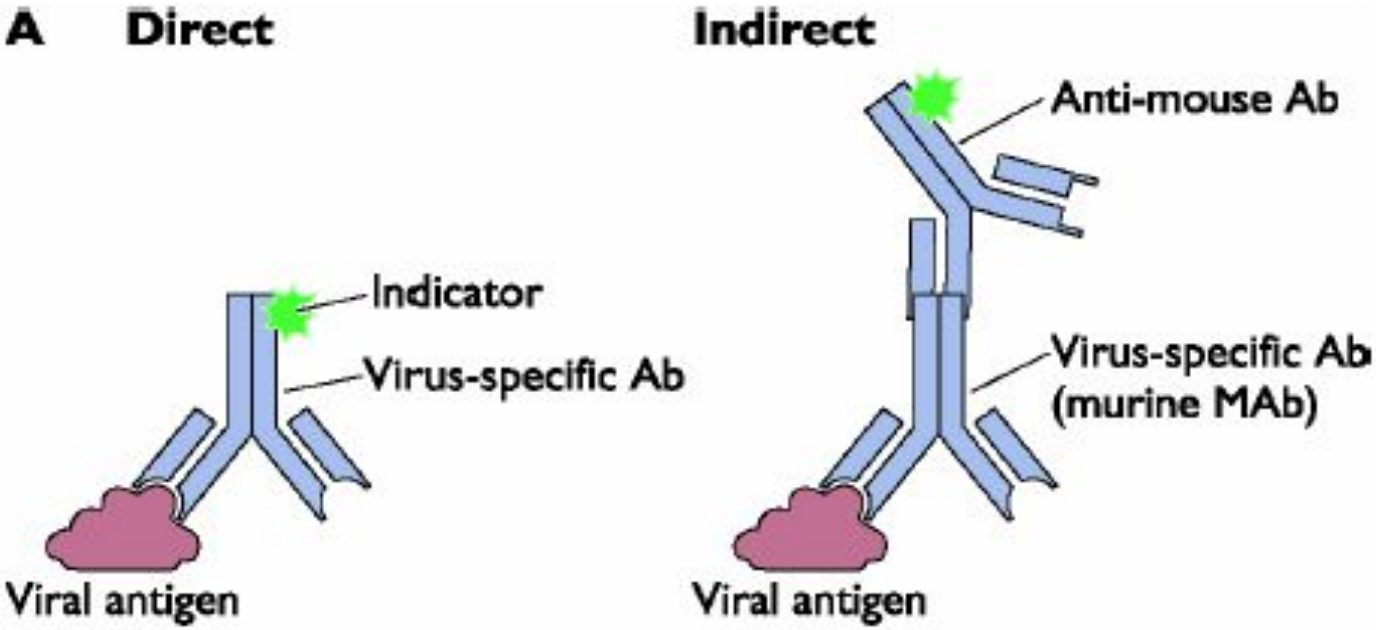
- Всі серологічні реакції базуються на специфічній взаємодії антигену з антитілом. З поняттям “антигенність” пов’язують три властивості:
- 1. Здатність індукувати утворення антитіл при введенні тваринам або викликати імунологічну реакцію.
- 2. Здатність виявляти специфічність утворених антитіл.
- 3. Здатність специфічно з’єднуватись з утвореними антитілами.

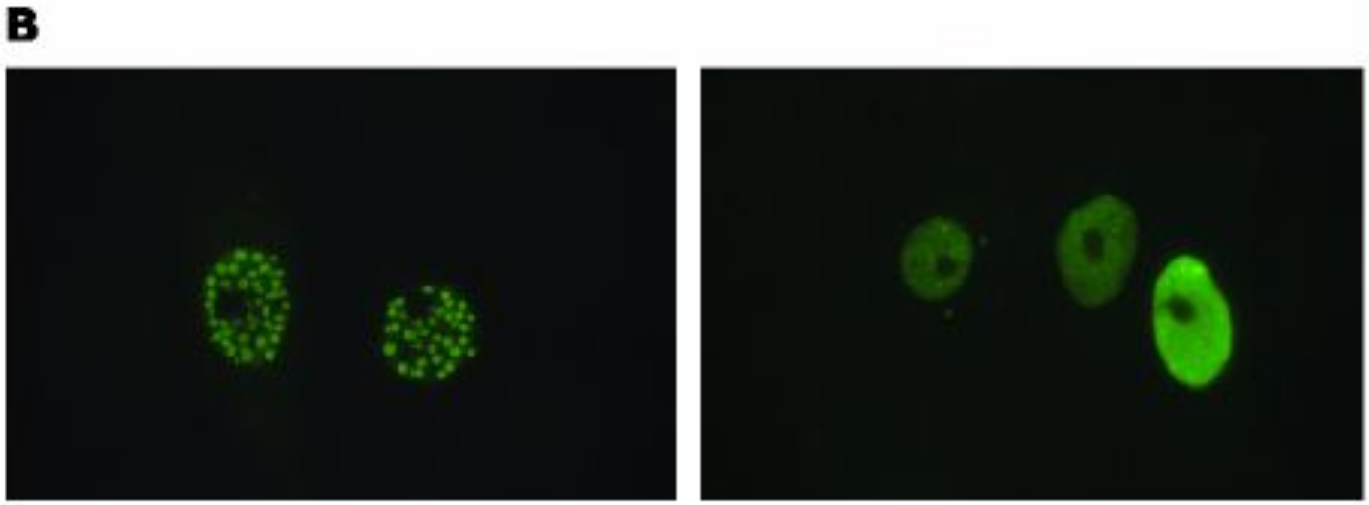
Основні компоненти серологічних реакцій

- Антигени
- Антитіла (поліклональні та моноклональні)

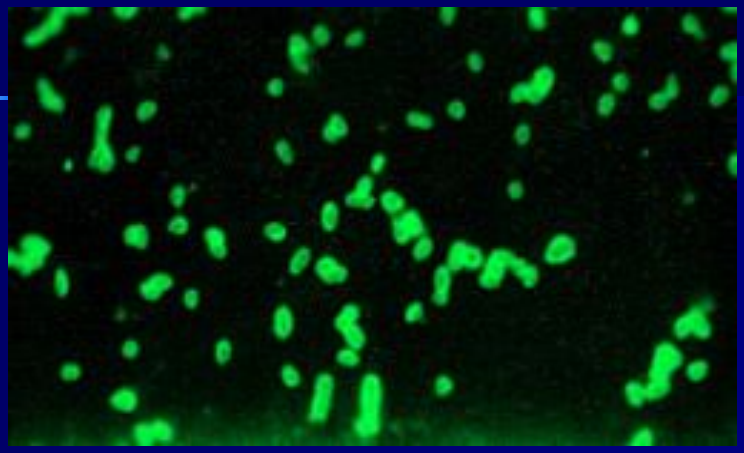
Імунофлюоресцентні методи




A
Direct
Indirect
Indicator
Virus-specific Ab
Viral antigen
Anti-mouse Ab
Virus-specific Ab
(murine MAb)
Viral antigen


B

Імунофлуоресцентний аналіз



Виявлення АГ вірусу грипу типу А

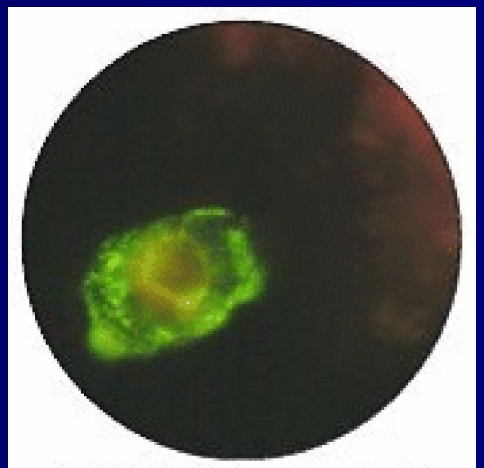
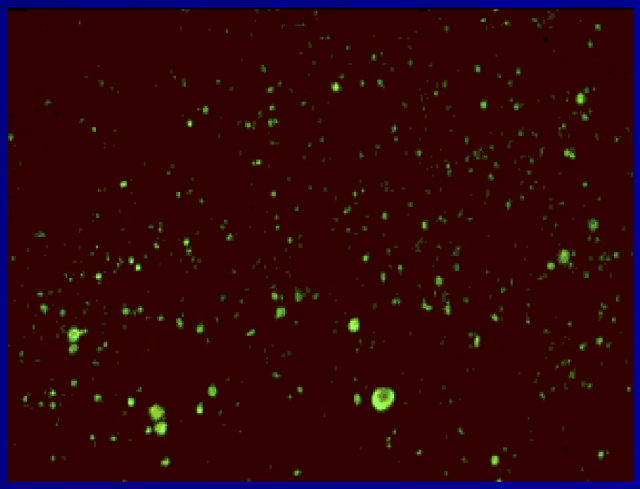
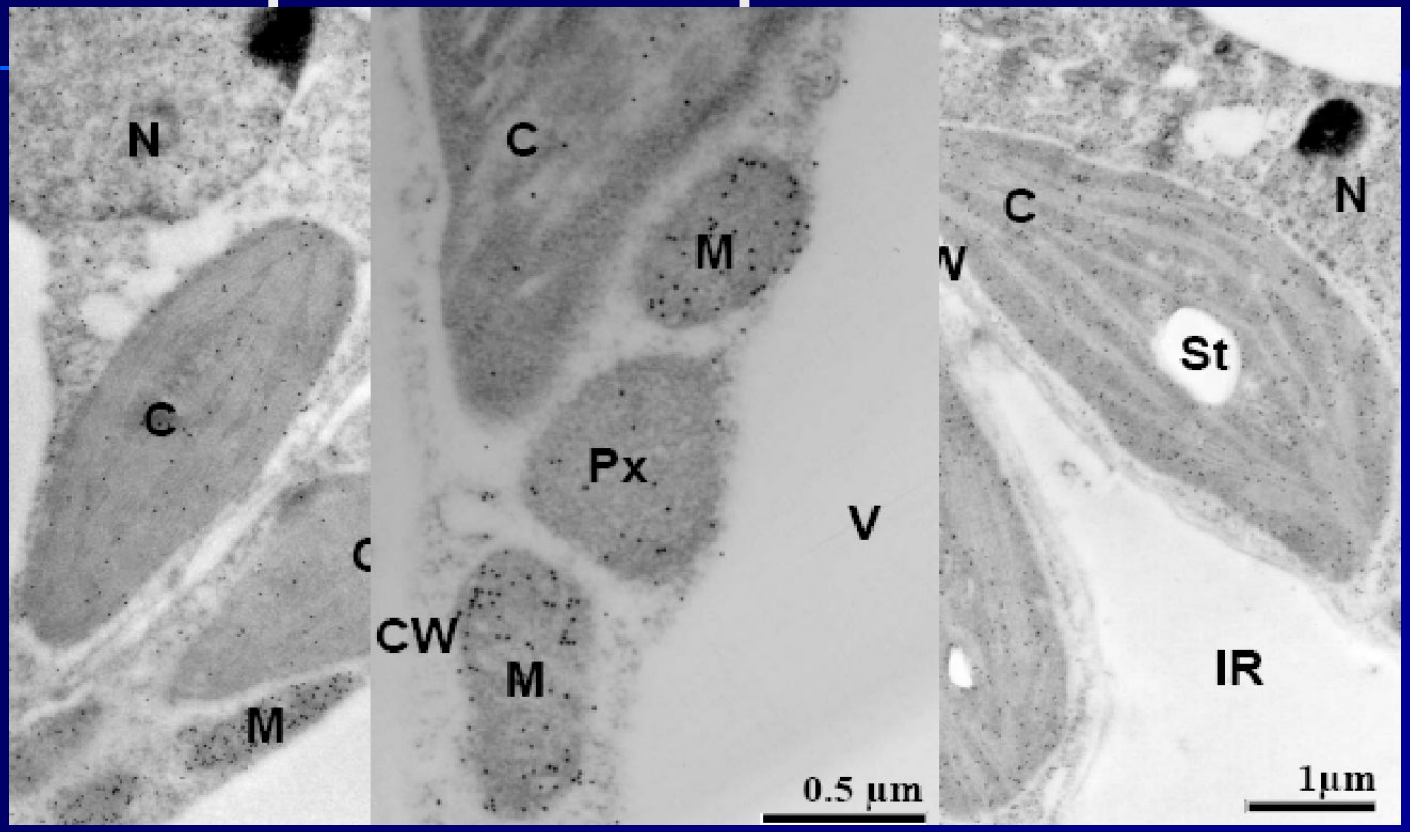


Fig. 3, HSV-infected epithelial cell from skin lesion (DFA)



Позитивний аналіз АГ вірусу сказу (Source: CDC)

Імуно-голд (*Immunogold*) електронна мікроскопія



Антитіла до ВЖМЦ (вірусу жовтої мозаїки цукіні) кон'юговані колоїдним золотом

Імуноферментний аналіз

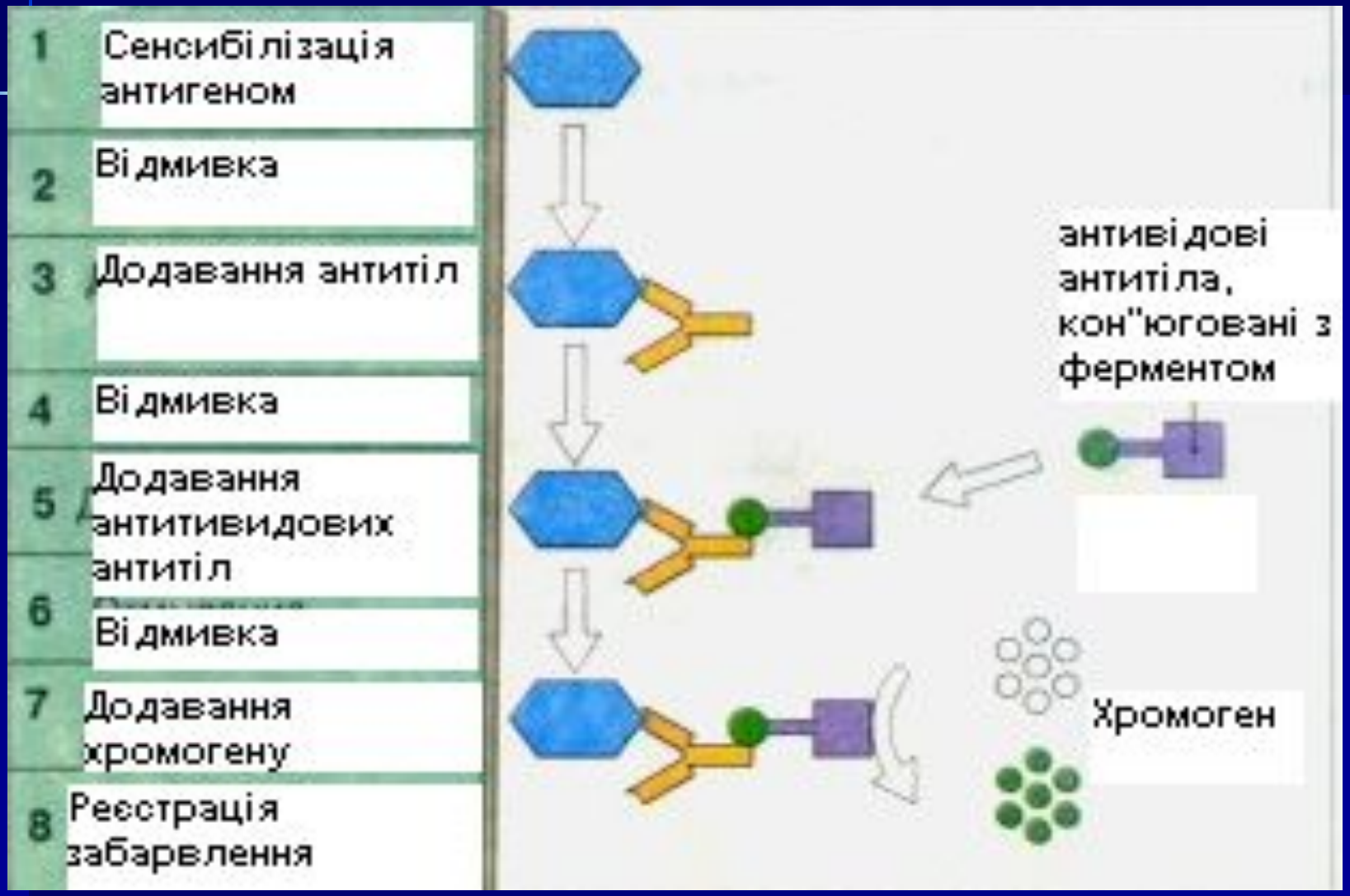
- Початком використання імуноферментних методик у вірусологічних дослідженнях вважають появу перших повідомлень про можливість приєднання ферментів до білків, в тому числі і до імуноглобулінів. Зусилля дослідників зконцентрувались на розробці методів кількісного імунохімічного аналізу, заснованого на використанні антигенів (Аг) та антитіл (Ат), мічених ферментами.

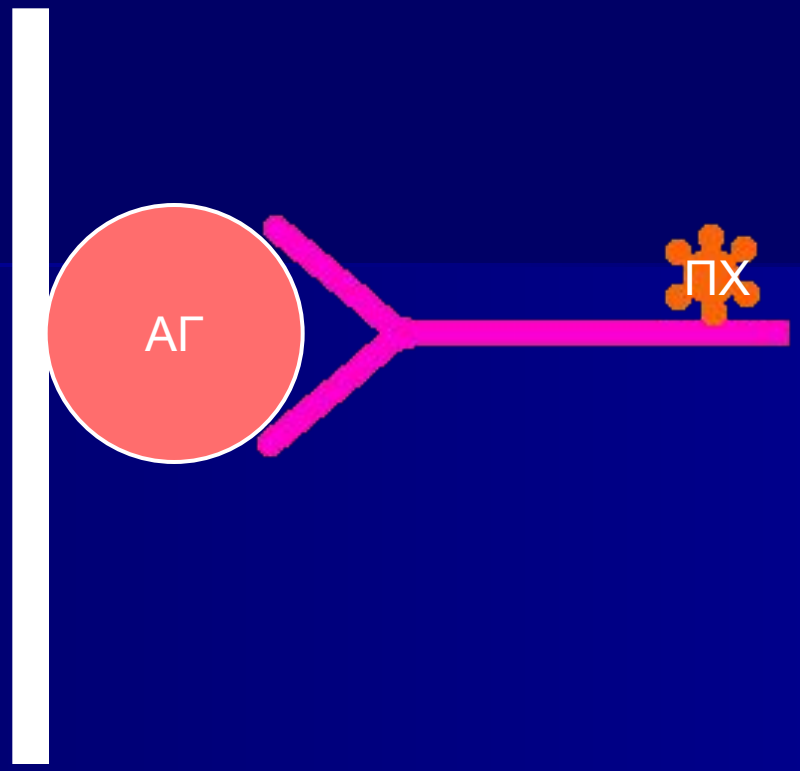
- На початку 1970-х років був запропонований метод, який поєднує ферментативний та імунохімічний підходи, що призвело до створення імуноферментного аналізу (ІФА), в якому антитіло виступає як специфічний детектор речовини, що визначається, а фермент – як маркер імунохімічної реакції, з допомогою якого візуалізується утворення комплексів.

Компоненти ІФА

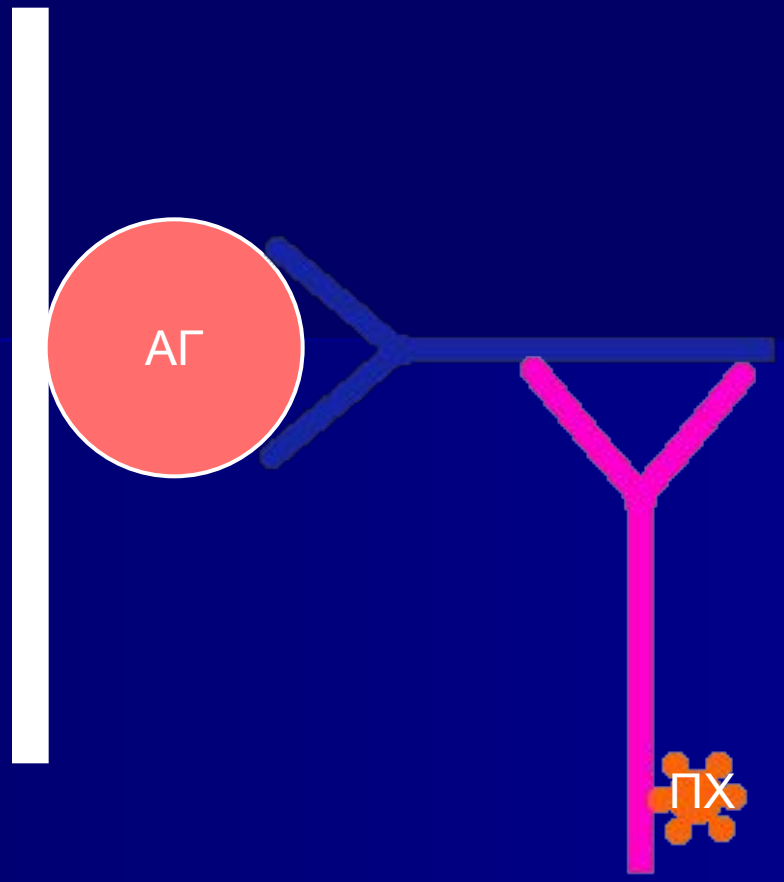
- Антиген
- Специфічні антитіла
- Антитіла специфічні мічені ферментом або антивидові антитіла, мічені ферментом
- Субстрат

Основні етапи ІФА (непрямого)

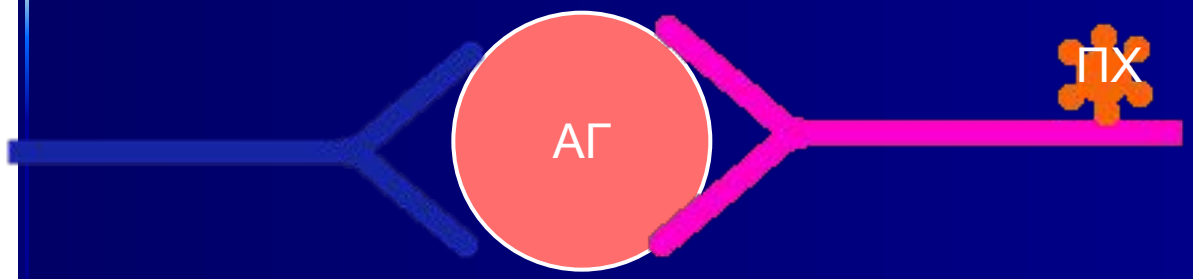




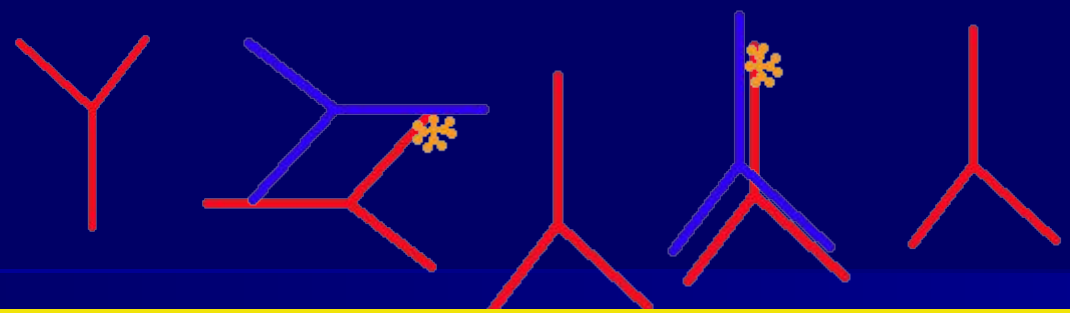
Прямий імуноферментний аналіз



Непрямий імуноферментний аналіз

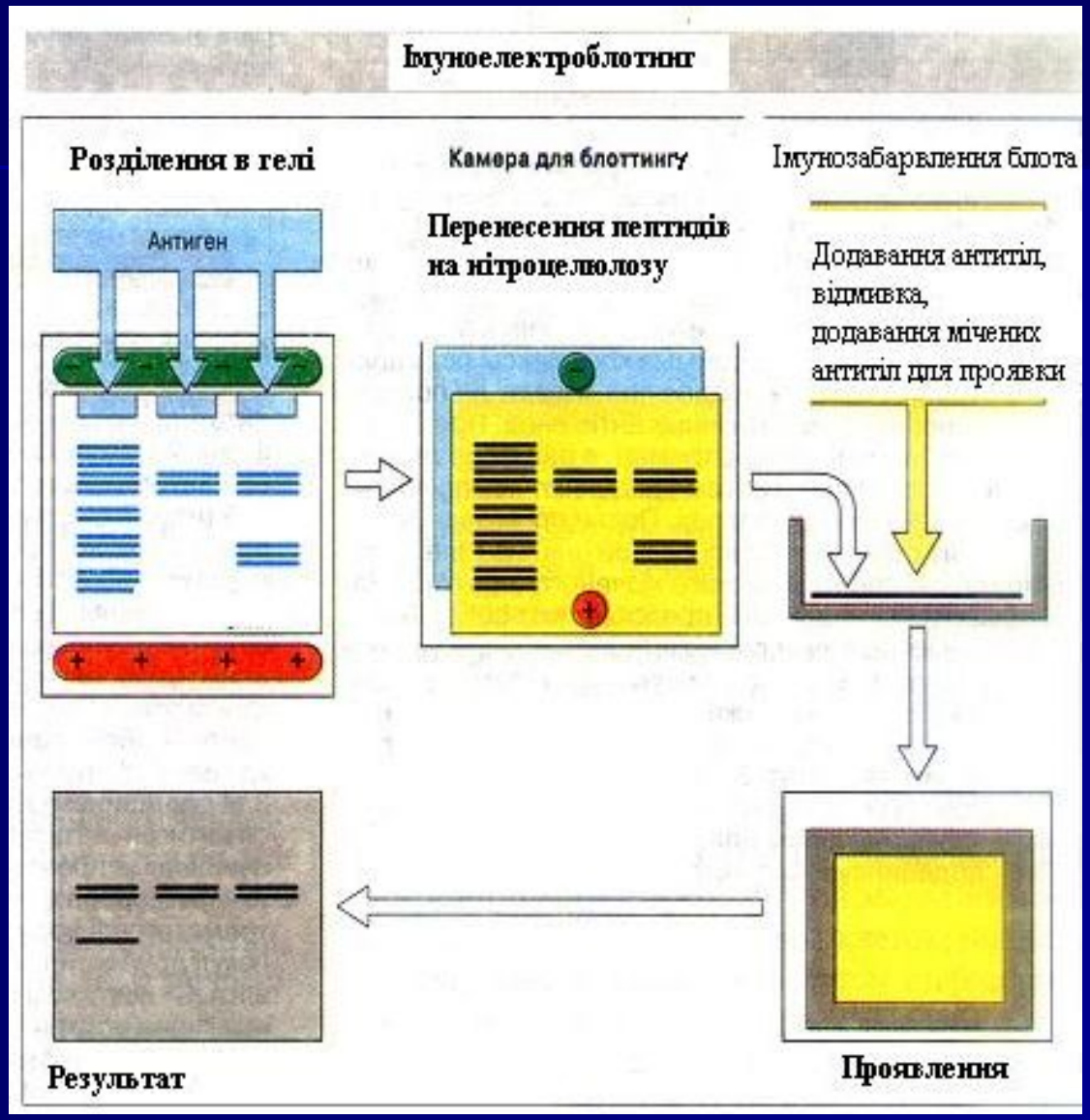


Сендвіч - імуноферментний аналіз (сендвіч-метод)



Substrate
100 ml
Sample Dilu
250 ml
MicroGeneSys, Inc.
Stopping
CAUTION:
100 m

Імуноелектроблотинг (вестерн –блотинг)



Імуноелектроблотинг (вестерн –блотинг)

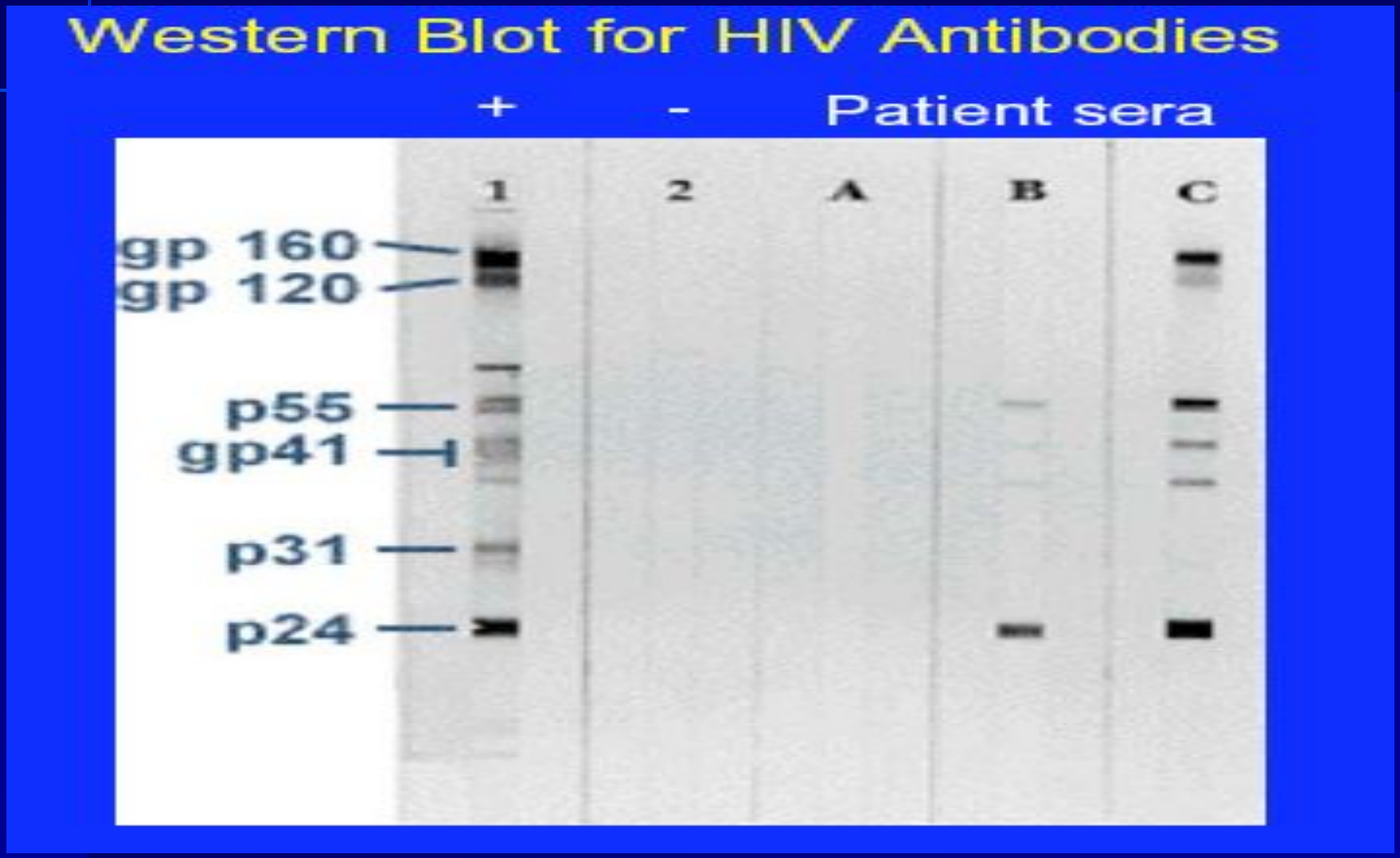
1 етап – електрофорез білків в денатуруючих умовах (за Леммлі)

2 етап – ренатурація розділених поліпептидів та перненіс їх на нітроцелюлозну мембрану

3 етап – додавання антитіл, відмивка та фарбування

(див. ***імуноферментний аналіз***)

Імуноелектроблотинг (вестерн –блотинг)



Молекулярно-генетичні методи детекції вірусів

Генетичні методи детекції

- Гібридизація нуклеїнових кислот (Саузерн,- нозерн–блотинг, гібридизація *in situ*)
- Рестрикційний аналіз
- Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР, ЗТ-ПЛР, ПЛР в реальному часі)
- Сіквенування НК
- DNA-array

Використання ПЛР

- ПЛР використовується не тільки для детекції аномальних генів та вірусів, але і для фундаментальних досліджень в області молекулярної біології.
- Завдяки ПЛР стало можливим досліджувати віруси, вбудовані в геном клітини-господаря, а також віроїди та вірусоіди.
- ПЛР дає можливість протягом дня з одієї молекули ДНК отримати 100 млрд. подібних по структурі молекул.
- Ця реакція дуже проста у виконанні, необхідні лише пробірка, декілька відносно простих реагентів, джерело тепла та охолодження.
- Препарат ДНК, якій необхідно копіювати, може бути очищеним, а може представляти собою складну суміш біологічних речовин.
- Як джерело ДНК підходить і біоптат з тканини пацієнта, і тотальна НК з рослин, і одна волосина, і крапля крові, знайдена на місці злочину, і мозок мумії і навіть тіло мамонта, який пролежав 40 000 років у вічній мерзлоті.

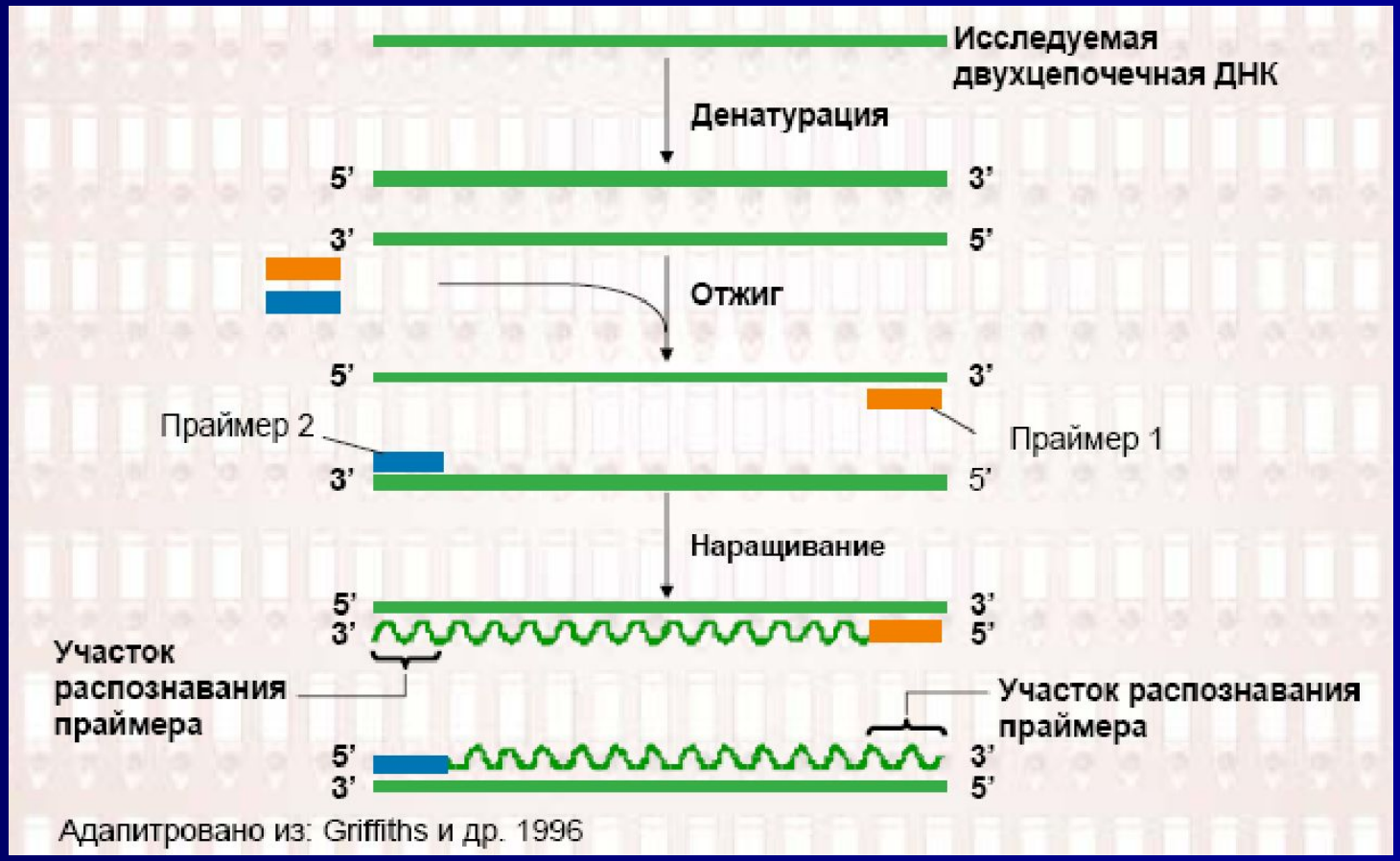
Процес ампліфікації

Процес ампліфікації складається з циклів, що повторюються:

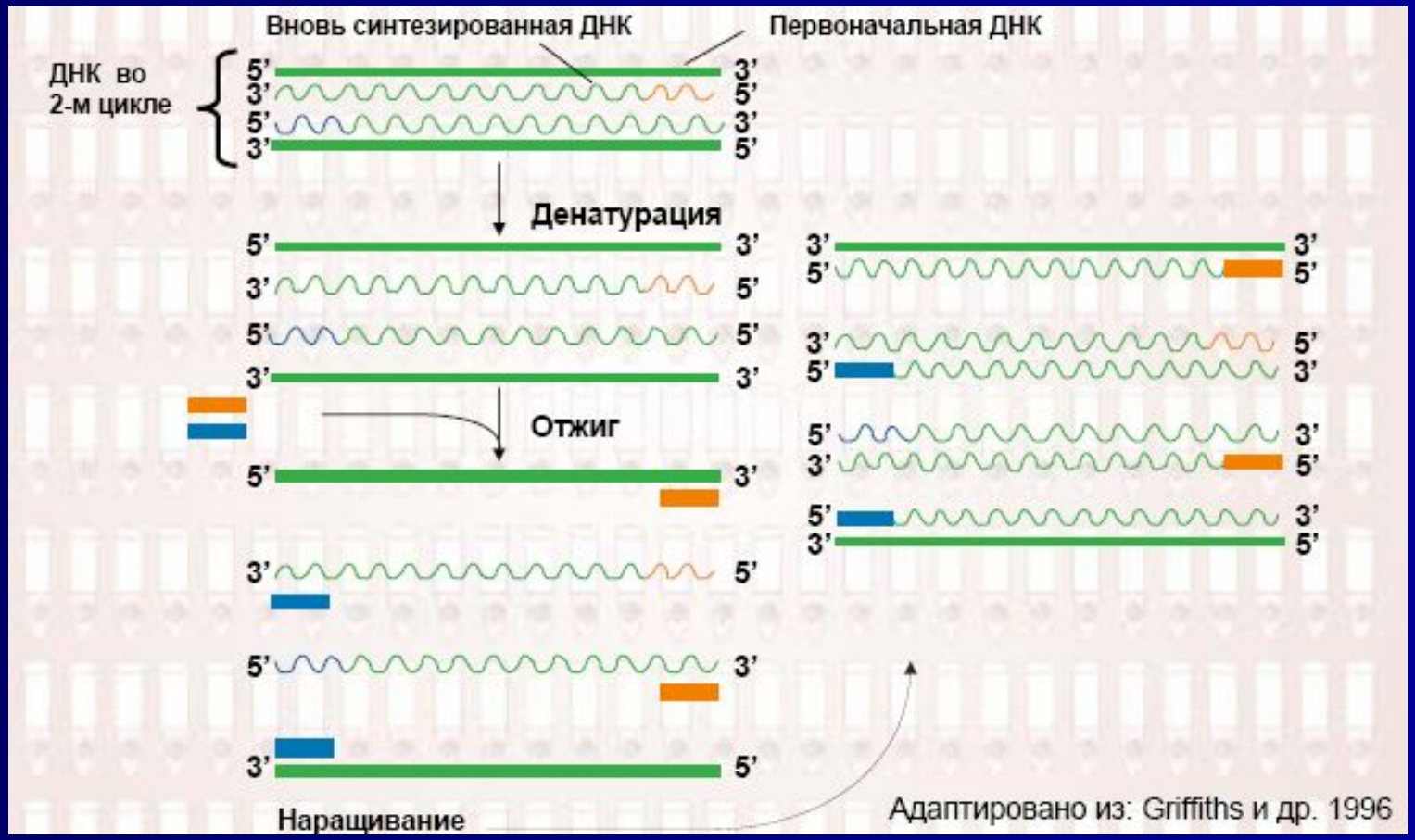
- температурної денатурації ДНК,
- відпалу праймерів з комплементарними послідовностями та
- послідуючою добудовою полінуклеотидних ланцюгів за допомогою ДНК-полімерази.

Праймери орієнтовані таким чином, що синтез за допомогою полімерази відбувається тільки між ними, подвоюючи кількість копій цієї ділянки ДНК

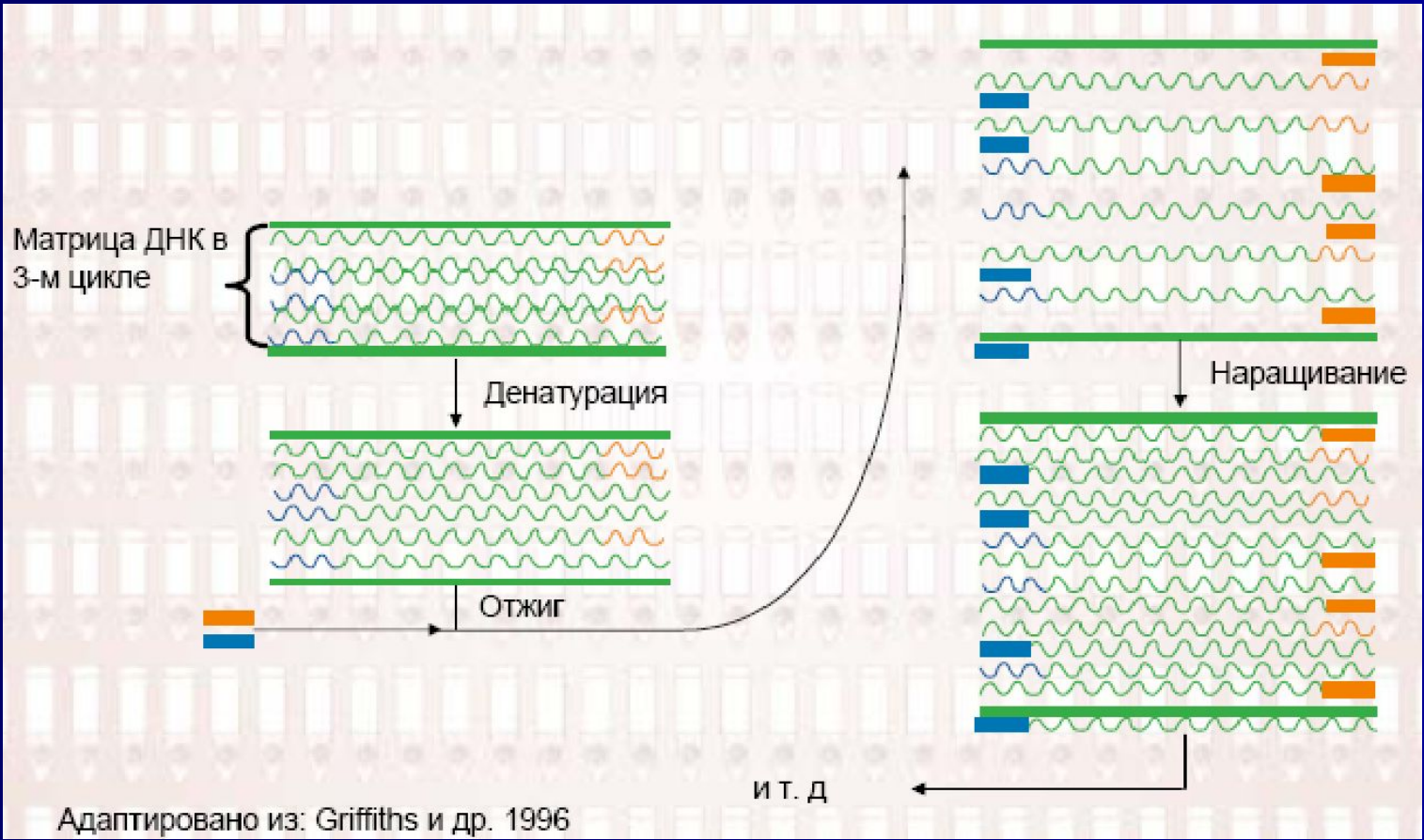
1й крок


Исследуемая двухцепочечная ДНК
Денатурация
5'
3'
3'
5'
Отжиг
5'
3'
Праймер 2
Праймер 1
3'
5'
Наращивание
5'
3'
3'
5'
Участок распознавания праймера
Участок распознавания праймера
5'
3'
3'
5'
Адапитровано из: Griffiths и др. 1996

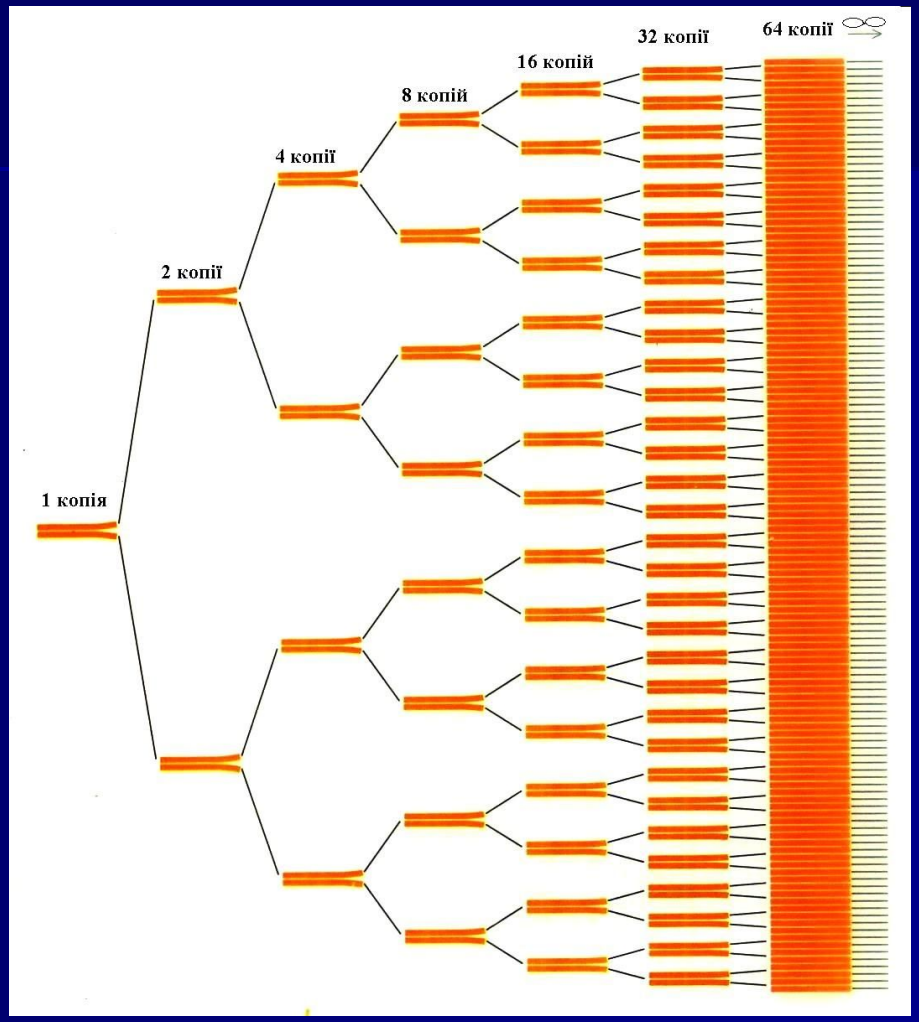
2й крок


Вновь синтезированная ДНК
Первоначальная ДНК
ДНК во 2-м цикле
5'
3'
Денатурация
Отжиг
Наращивание
Адаптировано из: Griffiths и др. 1996

3й крок


Матрица ДНК в
3-м цикле
Денатурация
Отжиг
Наращивание
и т. д
Адаптировано из: Griffiths и др. 1996

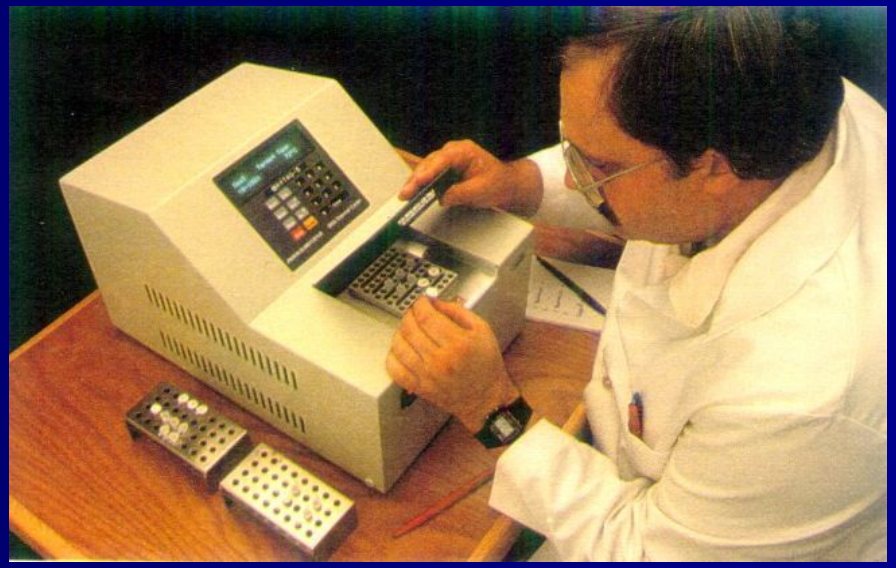
Експоненційне збільшення ділянок ДНК, які утворюються за допомогою ПЛР.



A= M x(2n-n-1) ≈ 2 n , де
A- кількість специфічних (обмежених праймерами) продуктів реакції ампліфікації;
M - початкова кількість ДНК-мішеней;
n - число циклів ампліфікації.

Обладнання для ПЛР

- Реакції зазвичай проводять у 0,2 чи 0,5 мл мікропробірках Епендорф. Обладнання для нагрівання та охолодження може бути зовсім простим, як наприклад набір водяних бань з різною температурою води, якими користувався Керрі Мюлліс, або складним та включати нагрівальний блок, який керується мікропроцесором .
- Такий блок використовується для автоматичної ампліфікації. Він називається термоциклер, ампліфікатор, або просто ПЛР - машина. Контролюємий комп'ютером блок, розроблений виключно для ПЛР, сьогодні можна придбати у багатьох молекулярно-біологічних фірм.



Компоненти реакції

- Для проведення ПЛР необхідні такі складові частини:
- послідовність ДНК, що досліджується;
- буфер;
- дезоксирибонуклеозидтрифосфати (dNTP);
- два праймери, специфічних у відношенні зв’язування з дослідним зразком;
- *Tag-полімераза.*

Компоненти реакції

- Послідовність ДНК, що досліджується, має бути попередньо підготована для аналізу (повинно бути проведено виділення нуклеїнової кислоти з дослідного матеріалу.)
- Буферна система має забезпечити оптимальні умови для проведення реакції.
- Буфер для ПЛР, при використанні *Tag-полімерази* , вміщує 50мМ KCl, 10mM Tris-HCl, pH 8,4, 2,5 mM MgCl2 та 100 мкг/мл желатини. При використання комерційних ферментів цей буфер надається разом з ДНК-полімеразою.
- *Нейтральні розчини dNTP*. Краще всього використовувати ліофілізовані порошки і робити з них водні розчини. Обов' язково робити аліквоти в декількох пробірках для можливості часткового використання, зберігати їх при –20С.
- *Праймери* (штучно синтезовані олігонуклеотиди) для ПЛР частіше мають довжину 18-25 нуклеотидів. Можливий синтез і більш довгих затравок, але вони рідко бувають необхідні. Їх можливо синтезувати за допомогою автоматичних синтезаторів ДНК. Кількості олігонуклеотидів, які отримують таким чином (0,2-1 мкмолів) достатні для проведення декількох сотен або тисяч реакцій.

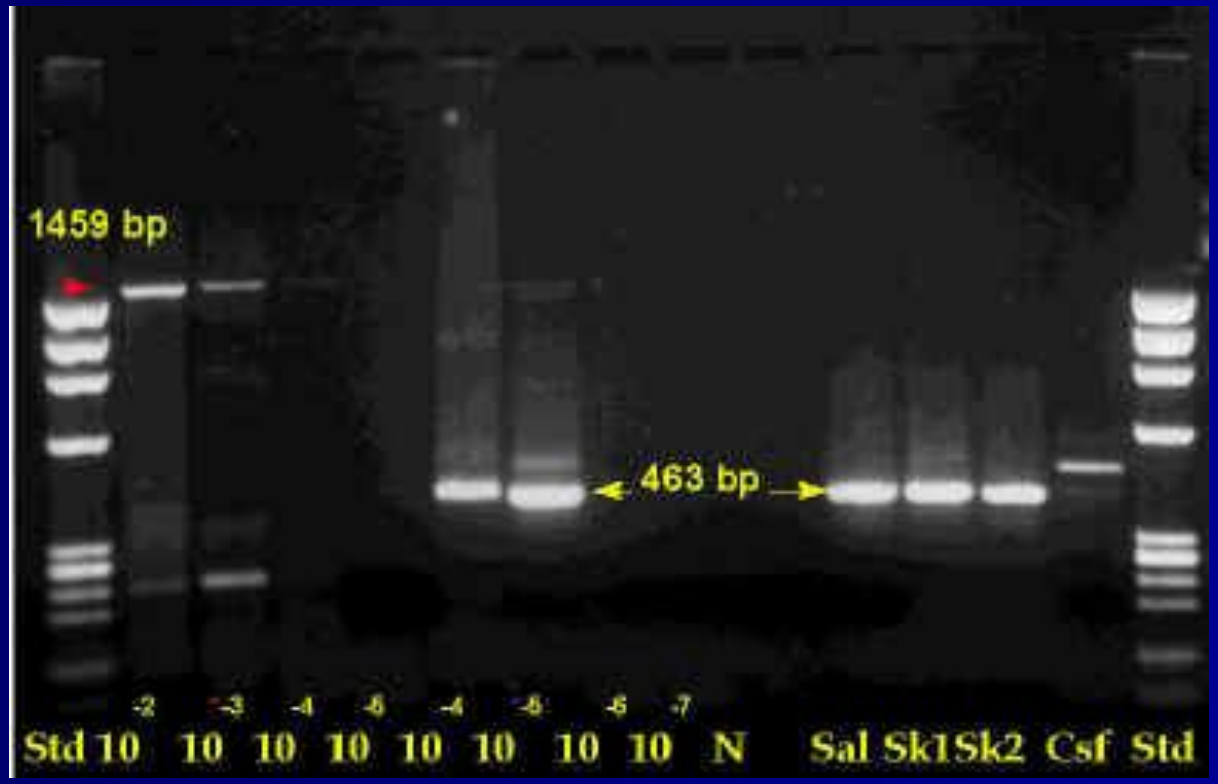
Параметри температурних циклів

- **ПЛР передбачає інкубацію зразків при трьох температурах, які відповідають трьом етапам циклу ампліфікації – денатурації, відпалу, добудові.**
- **Звичайно длДНК денатурують шляхом короткочасного нагрівання зразку до 90-95С,**
- **потім проводять відпалювання, охолоджуючи зразок до 40-60С (в залежності від довжени праймера та вмісту ГЦ пар). Цю температуру можливо оцінити за формулою:**
- **4˚С х (Г+С) +2˚С х (А+Т)-3).**
- **За рахунок великого надлишку затравок в реакційній суміші гібридизація відбувається майже миттєво та не вимагає довгої інкубації при температурі відпалювання.**
- **Далі суміш нагрівають до 70-75˚С для синтезу (добудови) затравок. Оптимальна температура для роботи *Tag-полімерази* – 72С. Час інкубації при цій температурі залежить від довжини ділянки, що ампліфікується (вважається, що *Tag* -полімераза синтезує послідовність в 1000 нуклеотидів за 1 хв.)**

Аналіз ПЛР-ампліфікованої ДНК

- Для аналізу продукту, отриманого в ПЛР, використовують різні методи, такі як: гель-електрофорез, дот-блот-гібридизацію та блот-гібридизацію за Саузерном. З їх допомогою можливо аналізувати більшість ПЛР-продуктів, але абсолютно достовірні результати можливо отримати тільки сіквенуванням.
- Частіше всього для швидкої візуалізації результатів ПЛР використовують гель-електрофорез в агарозному гелі за загальноприйнятими методиками.

Діагностика вірусу сказу



Праймери, специфічні до послідовності гену капсидного білка ВШМЯ

left - 5’GTGAGGAGGTGATGGGTAAT3’;
right - 5’TTCCAGTCTTTCAGAATCTCTC3’

продукт ампліфікації **417 bp**

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

Детекція ВШМЯ за допомогою IC-RT-PCR

1 - 2 дослідні рослини; 3 - 9 зразки здорових рослин з *Taq*-полімеразою (Sigma); 10 - маркери; 11 - 12 позитивні контролі; 13 - 19 зразки здорових рослин з *Taq*-полімеразою (Gibco)

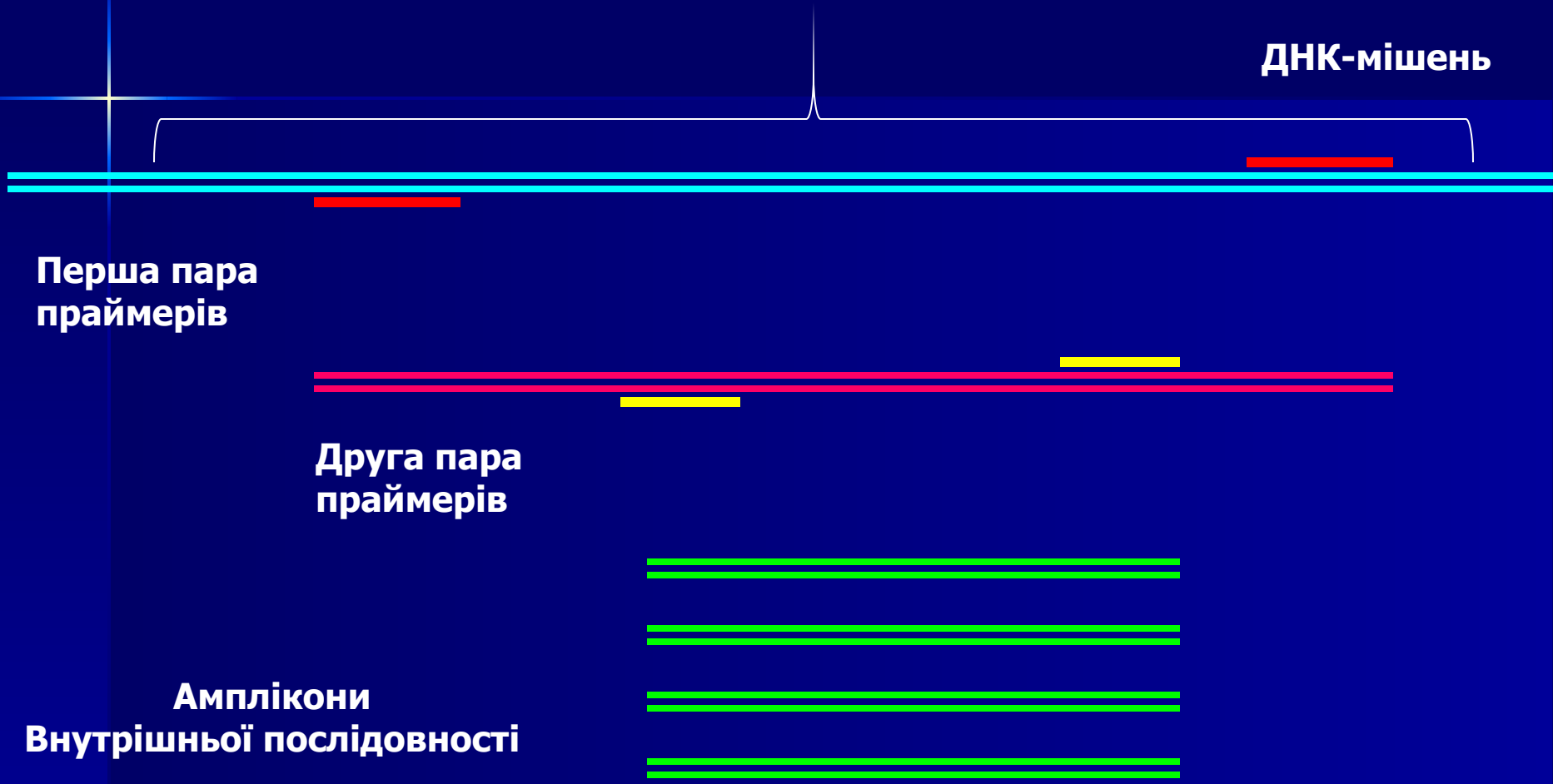
```
654037 GCCGCAGAAGGCAGACCCCTTCATGGAAAGACAGGGGCAATTCTGGAACAGACACTGGAG
                                  :::::::::::::::::::
       ---------------------------TCATGGAAAGACAGGGGCAA---------------------
                                          10        20

               6910      6920      6930      6940      6950      6960
654037 GCCATCTTCGCGAACTAGCGATACAGGGGACCTCGGAACAAACAGAGTTCCTGGACCTG

       ------------------------------------------------------------

               6970      6980      6990      7000      7010      7020
654037 CTGGTGGAGGTGAAATCCATGGAGGATCAGAAGGTGGTGGGGTCATTCAATCTGAAGGAG

       ------------------------------------------------------------

               7030      7040      7050      7060      7070      7080
654037 GTAGTCGGTTTGATCAAAATATTCAGGACTACATCTTCGGACCCGAATATAAGCAGCCATG

       ------------------------------------------------------------

               7090      7100      7110      7120      7130      7140
654037 ACCTTCCGCCAAGTGTGTGAGGCATTTGCCCCGGAGGCAAGAAATGGGCTCGTAAAGCTA

       ------------------------------------------------------------

               7150      7160      7170      7180      7190      7200
654037 AAGTACAAAGGGGTCTTCACAAACCTCTTTTCTACTACGCCTGAAGTGGGGGGGAAGTAT

       ------------------------------------------------------------

               7210      7220      7230      7240      7250      7260
654037 CCGGAGCTCATGTTTGACTTCAATAAGGGCCTAAATATGTTCATAATGAACAAAGCCCAG

       ------------------------------------------------------------

               7270      7280      7290      7300      7310      7320
654037 CAGAAAGTGATAACTAATATGAACCGGCGTCTTTTACAGACTGAATTTGCAAGAGCGAA

       ------------------------------------------------------------

               7330      7340      7350      7360      7370      7380
654037 AATGAGGCGAAAATGTCGTCTGTTACAACTGATCTTTGCGTTTAGTCTCATAAGGAAGTT

       ------------------------------------------------------------

               7390      7400      7410      7420      7430      7440
654037 TGGTTTAATAAATAAAGTTAATAAATAGTGTGCATTTGGTTTAATGTCAATTGTGTGTAT

       ------------------------------------------------------------

               7450      7460      7470      7480      7490      7500
654037 TTAATTAACGTCAAACTCTTGAACCCATGAGAGAGTATAAACAGTCATGGTATCTAATTG

       ------------------------------------------------------------

               7510      7520      7530      7540      7550
654037 GAGTGTTTAGACTTATAATAAATAGCCTGTAGACTTTTAAATATTTTACTAC
                 :::::::::::::::::::::::::
                 TAGACTTATAATAAATAGCCTGTAGACTT
```

Нуклеотидна послідовність капсидного білка ВХПЛЯ та праймери до нього (перший праймер змістовий, другий – антизмістовий)

«nested» PCR

Для збільшення чутливості та специфічності методу ПЛР була розроболена так звана «гніздова» полімеразна ланцюгова реакція («nested» PCR), при якій друга пара праймерів сідає на ділянку ДНК-мішені, ообмежену першою парою праймерів.

«nested» PCR


ДНК-мішень
Перша пара праймерів
Друга пара праймерів
Амплікони Внутрішньої послідовності

10 причин, з яких ПЛР може «не йти»

- Неякісний дизайн праймерів
- Невірна концентрація праймерів
- Занадто багато dNTP або ж деградовані dNTP
- Не перемішаний розчин $MgCl_2$
- Невірна концентрація $MgCl_2$
- Нявність інгібіторів
- Неякісне мінеральне масло
- Занадто багато ферменту
- Помилки в програмі ампліфікатора
- Недостатність або надлишок матриці

Проблеми при використанні ПЛР

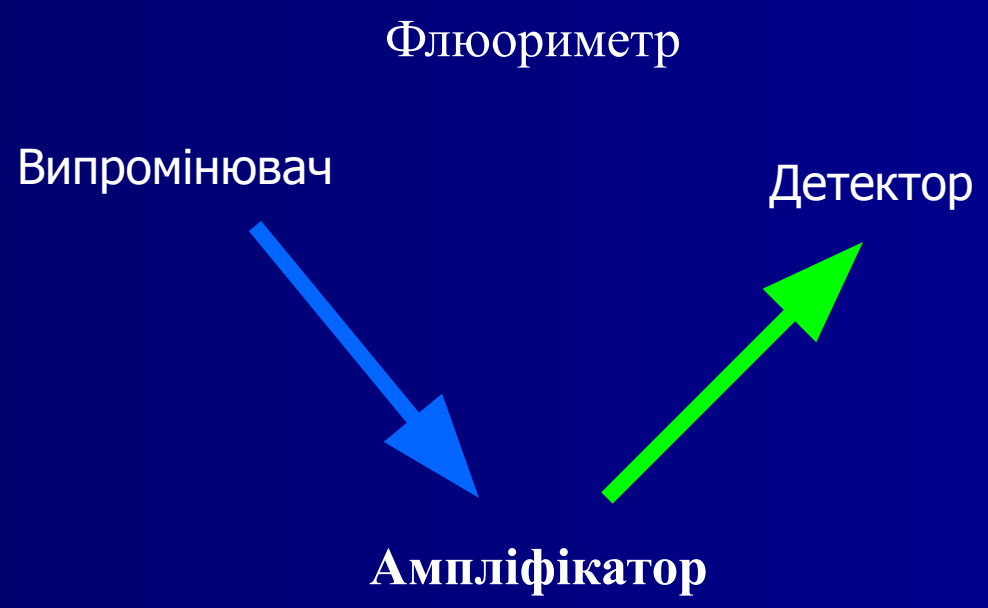
Високий ризик контамінації продуктами ПЛР
Суб'єктивізм в оцінці результатів (аналіз електрофорезу)
Складність процесу автоматизації ПЛР
ВІдсутність залежності кількості продукту ПЛР від вихідної концентрації мішені

Real-time PCR

ПЛР з детекцією накопичення продуктів в режимі реального часу

Основний принцип:
Накопичення продуктів ПЛР – накопичення флуоресціюючого сигналу – детекція флуоресціюючого сигналу

Детекція флуоресціюючого сигналу



Оптична система iQ5™

- Збудження: вольфрам-галогенова лампа
- Детектування: 12-bit CCD камера

Excitation	Emission	Dyes
490/20	530/30	FAM, SYBR Green I
530/30	575/20	HEX, TET, VIC, JOE
545/30	585/20	TAMRA, Cy3
575/30	620/30	Texas Red, ROX
635/30	680/30	Cy5, LC640

Real-time PCR

Інтеркалюючі фарбники

- SYBR green

Гібридизаційні зонди

- Taqman
- Molecular beacons
- FRET probes

Real-time PCR

Інтеркалюючі фарбники

- SYBR green

Гібридизаційні зонди

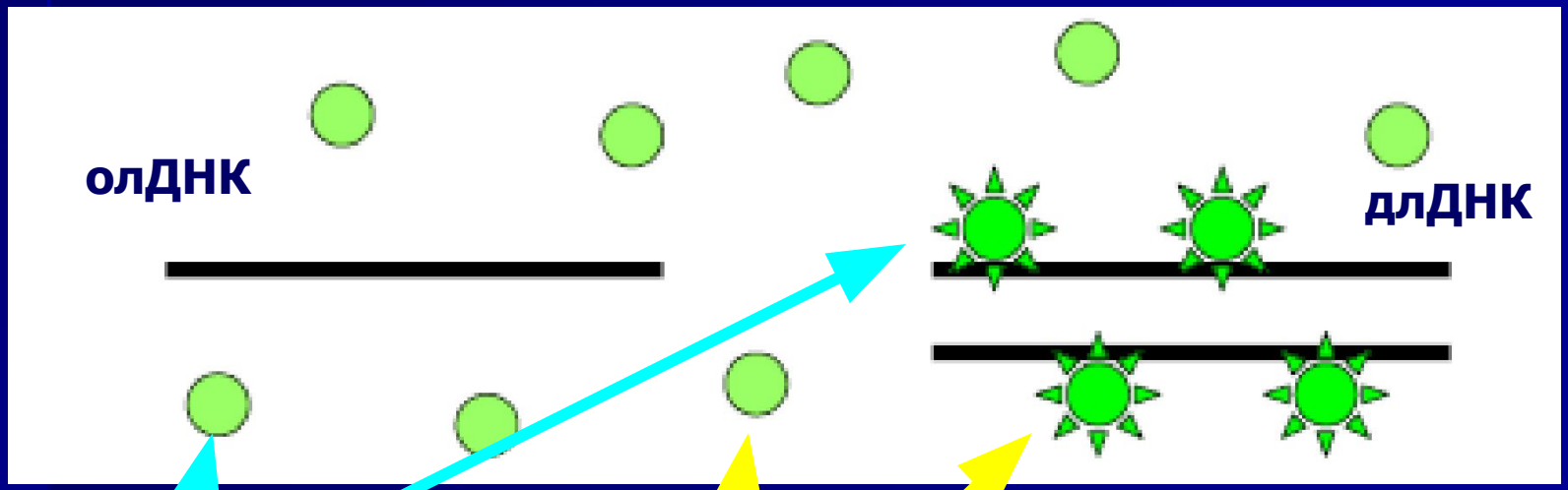
- Taqman
- Molecular beacons
- FRET probes

SYBR green

- Цей спосіб детекції заснований на тому факті, що флуоресценція бромистого етидію та SYBR Green I значно підвищується при їх інтеркаляції в дволанцюгові молекули ДНК. Таким чином, можна спостерігати за накопиченням продуктів ампліфикації.
- Однак збільшення флуоресценції може бути пов’язано як з накопиченням специфічного продукту, так і неспецифічного (праймери-димери, шмери). Для отримання коректных результатів необхідно додаткове вивчення отриманих ампліконів за дрпомогою так званих "кривих плавлення" (melting curves).

SYBR green

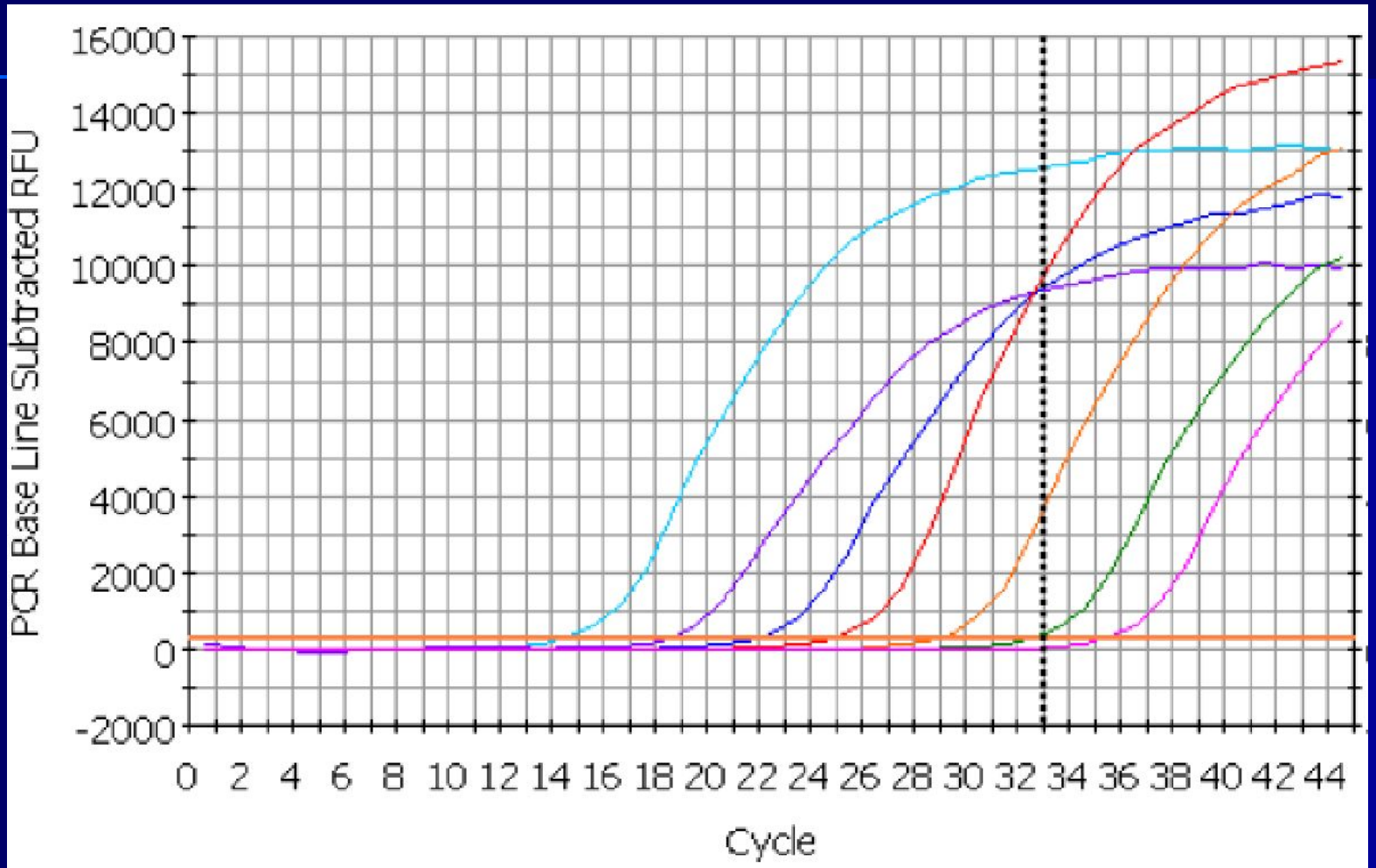
Ампліфікація



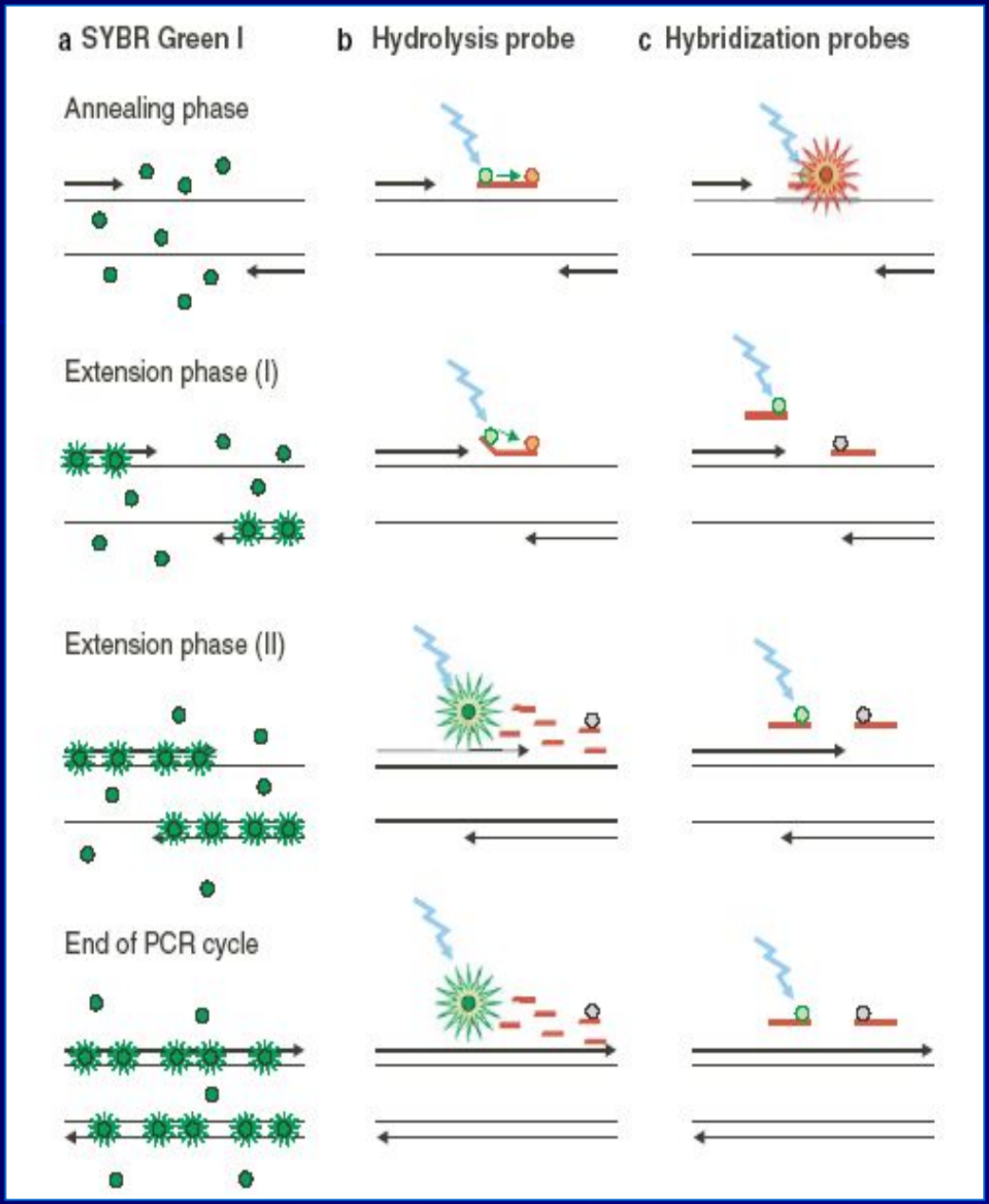
SYBR green

Інтеркаляція

SYBR green



SERIES OF 10-FOLD DILUTIONS



Van der Velden, Leukemia 2003 (www)

Real-time PCR

Інтеркалюючі фарбники

- SYBR green

Гібридизаційні зонди

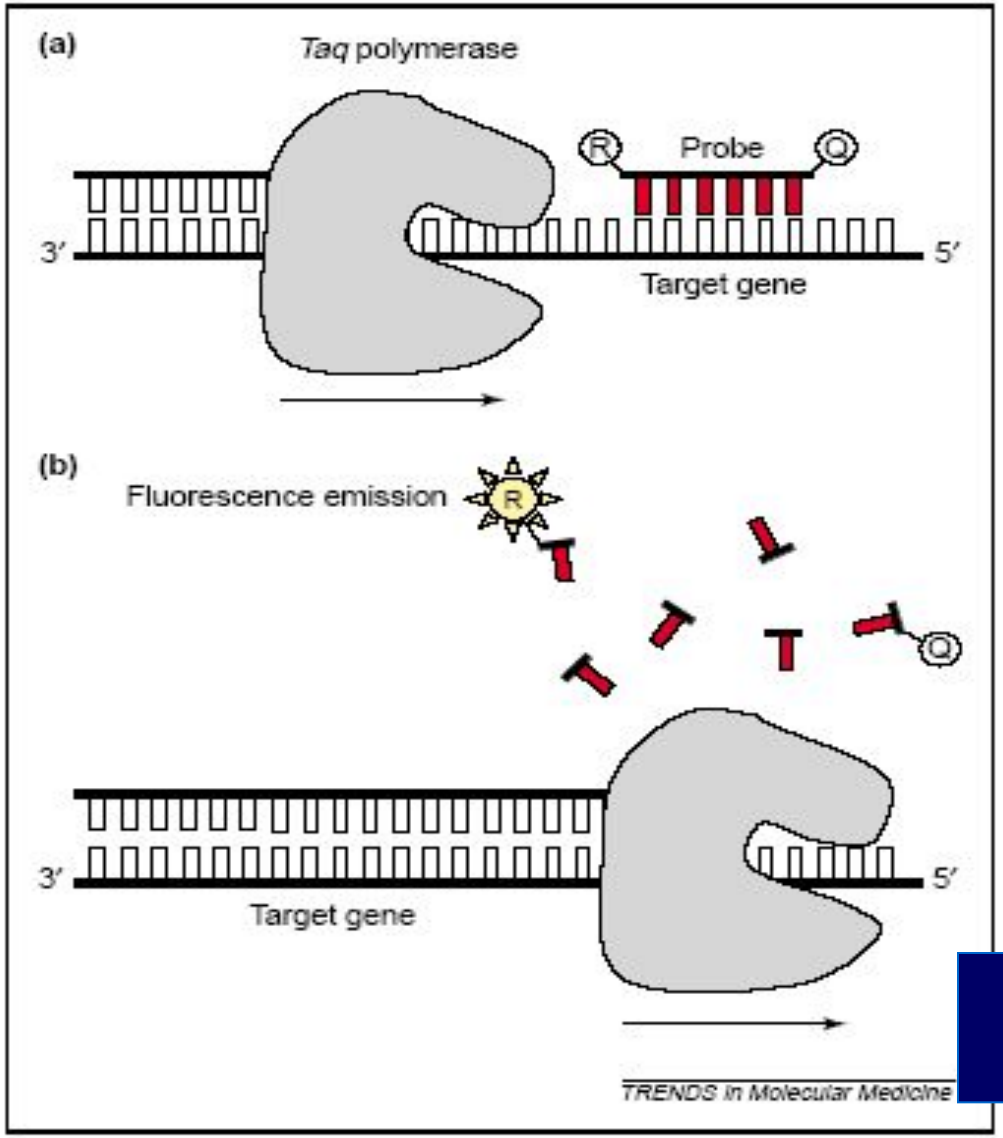
- Taqman
- Molecular beacons
- FRET probes

PCR Real - Time

- На відміну від класичного ПЛР методу в реакції ПЛР в реальному часі використовується крім праймерів зонд.
- Зонд – олігонуклеотид, до якого приєднані молекули флуорофора та молекула гасника флуорисценції. Зонд відпалюється на матрицю між прямим і зворотним праймером – флуорисценція флуорофора потушена
- Флюорофор – молекули, які при поглинанні фотону випромінюють світло з більшою довжиною хвилі –флуорисциюють
- Гасник флуоресценції – молекула, спектр поглинання якої лежить в області довжин хвиль спектра випромінювання флуорофора.

Флуорисцентный краситель	Макс.поглощения (НМ)	Макс. флуорисценция (НМ)
FAM	490	520
Гаситель флуорисценции	Макс. поглощения (НМ)	Диапазон гашения (нм)
BHQ -1	535	480-580

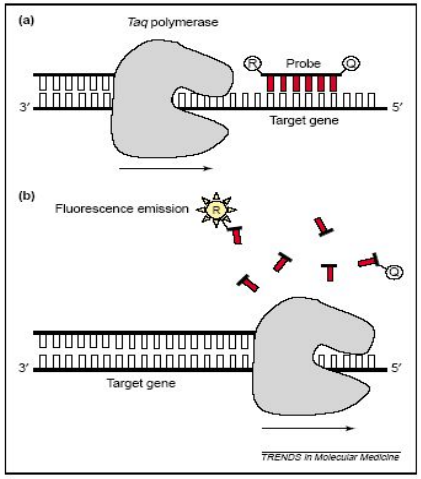
5' Екзонуклеазна активність ДНК-полімерази (TaqMan Assay)



Mocellin et al.

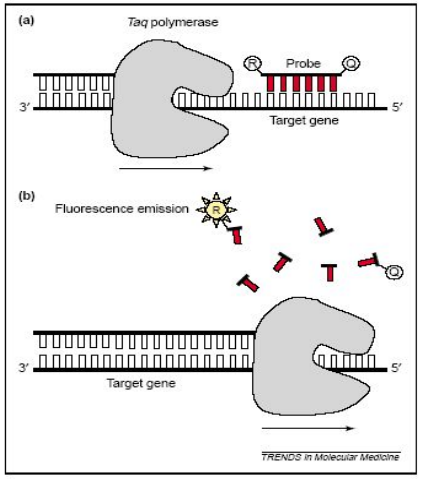
Trends Mol Med 2003

(www)



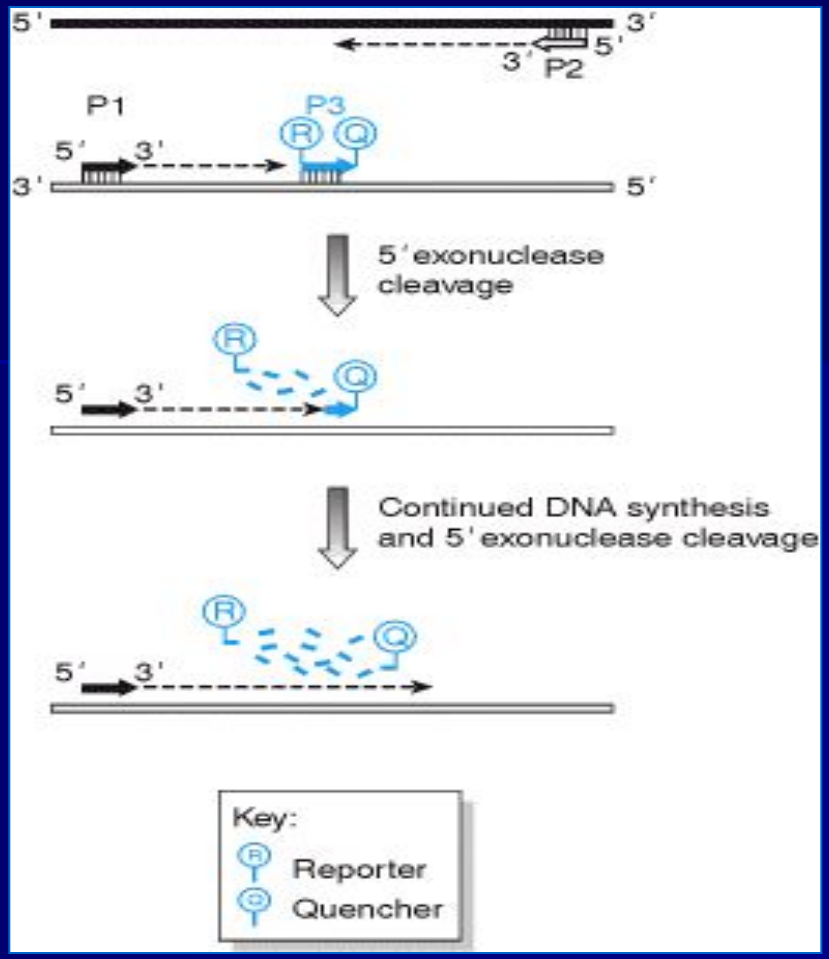
5' Екзонуклеазна активність ДНК-полімерази (TaqMan Assay)

- Дана методика заснована на використанні 5'-екзонуклеазної активності полімерази. В реакційну суміш додають ДНК-зонди, в склад яких входить флуоресцентна мітка в 5'-положенні и гасник флуоресценції в 3'-положенні, а також фосфатна група в 3'-положенні. Ці зонди мають місця посадки всередині облсті, що ампліфікується. Гасник поглинає випромінювання флуоресцентної мітки, а фосфатна група в 3'-положенні блокує полімеразу.



5' Екзонуклеазна активність ДНК-полімерази (TaqMan Assay)

- В ході ПЛР під час стадії відпалу праймерів відбувається приєднання ДНК-зонду до комплементарного ланцюга ДНК, причому чим більше продуктів ампліфикації утвориться в ході ПЛР, тим більше молекул зондів зв’яжеться з відповідними ампліконами. Під час стадії елонгації полімераза синтезує комплементарний ланцюг ДНК і при досягненні зонду починає його розщеплювати завдяки наявності 5'-екзонуклеазної активності. Таким чином відбувається роз’єднанняе флуоресцентної мітки і гасника, що приводить до збільшення сигналу (свічення), що детектується. Очевидно, що чим більше ампліконів напрацьовується в ході ПЛР на даний момент часу, тим інтенсивнішим буде сигнал (свіченння).



The TaqMan 5' Exonuclease Assay

In addition to two conventional PCR primers, P1 and P2, which are specific for the target sequence, a third primer, P3, is designed to bind specifically to a site on the target sequence downstream of the P1 binding site. P3 is labelled with two fluorophores, a reporter dye (R) is attached at the 5 end, and a quencher dye (D), which has a different emission wavelength to the reporter dye, is attached at its 3 end. Because its 3 end is blocked, primer P3 cannot by itself prime any new DNA synthesis. During the PCR reaction, *Taq* DNA polymerase synthesizes a new DNA strand primed by P1 and as the enzyme approaches P3, its 5 3 exonuclease activity processively degrades the P3 primer from its 5 end. The end result is that the nascent DNA strand extends beyond the P3 binding site and the reporter and quencher dyes are no longer bound to the same molecule. As the reporter dye is no longer in close proximity to the quencher, the resulting increase in reporter emission intensity is easily detected.

(www)

Схема розщеплення зонду під час реакції

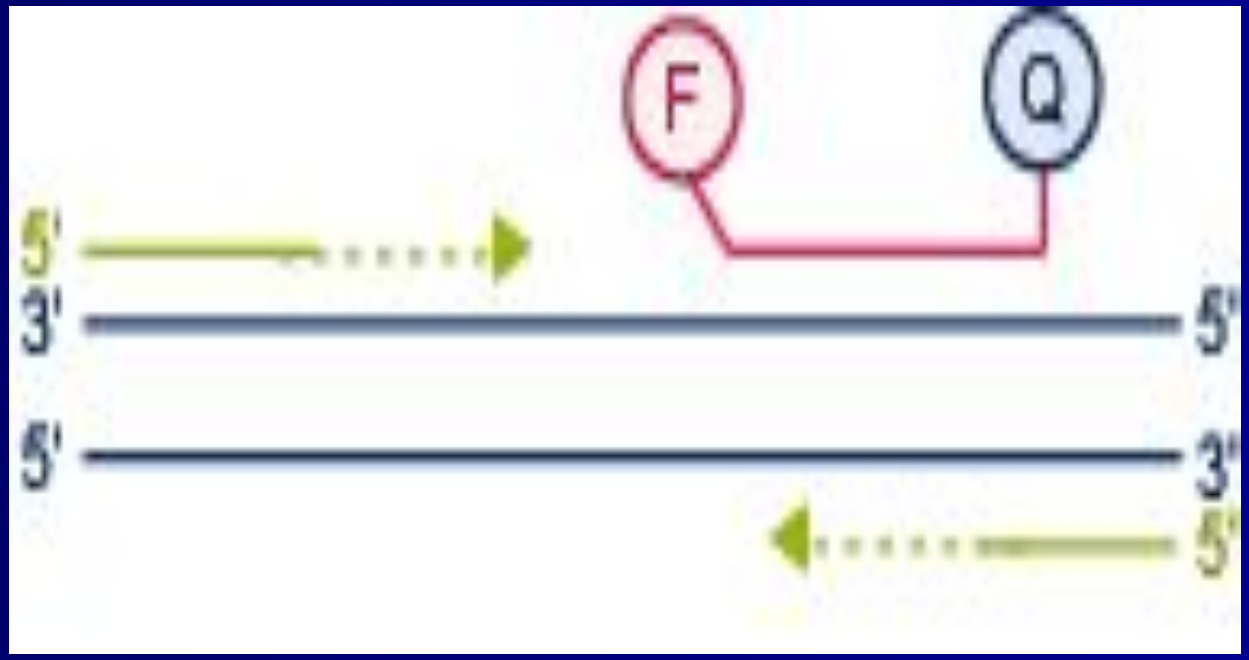


Схема розщеплення зонду під час реакції

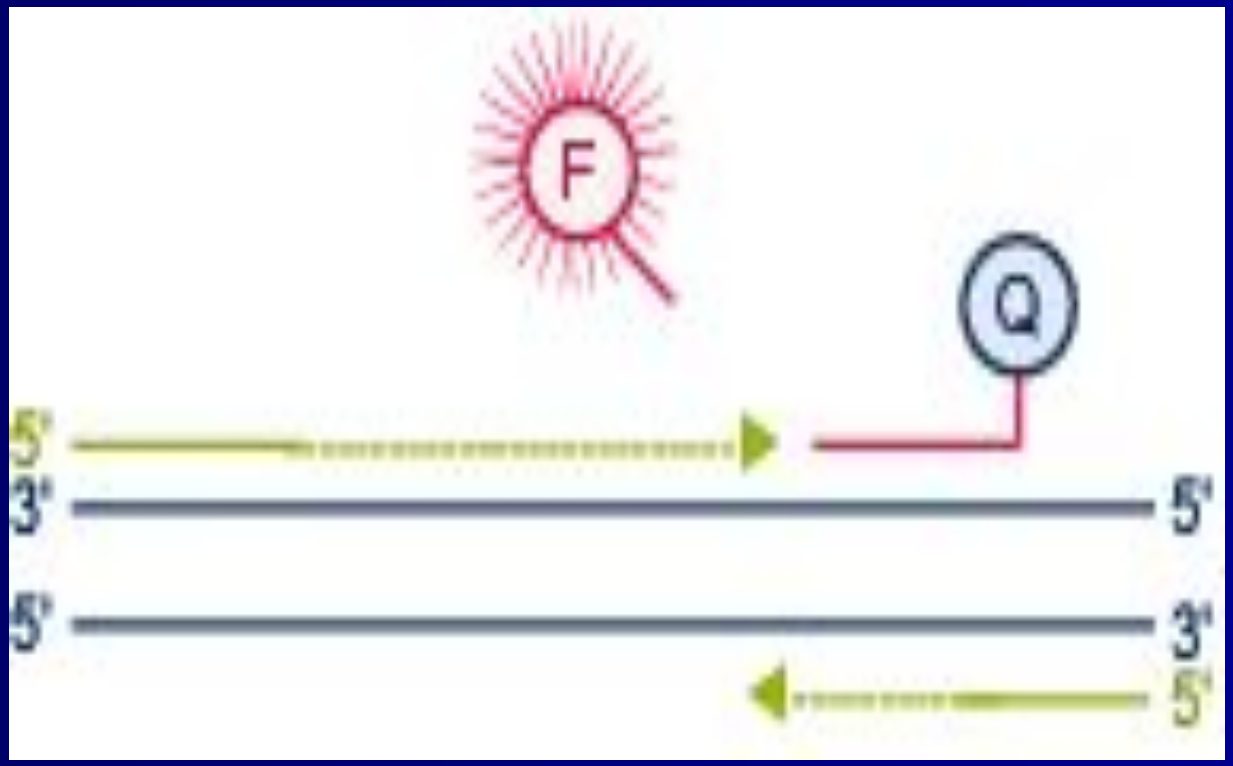
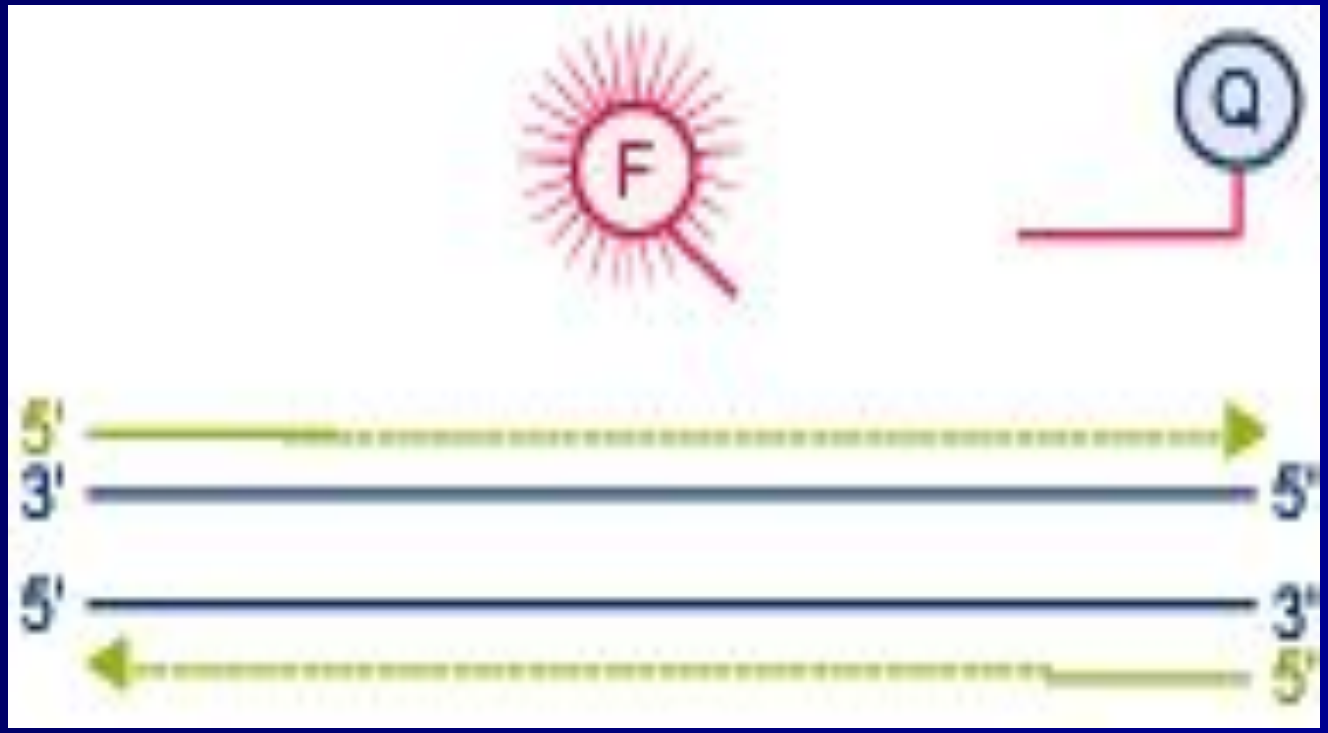


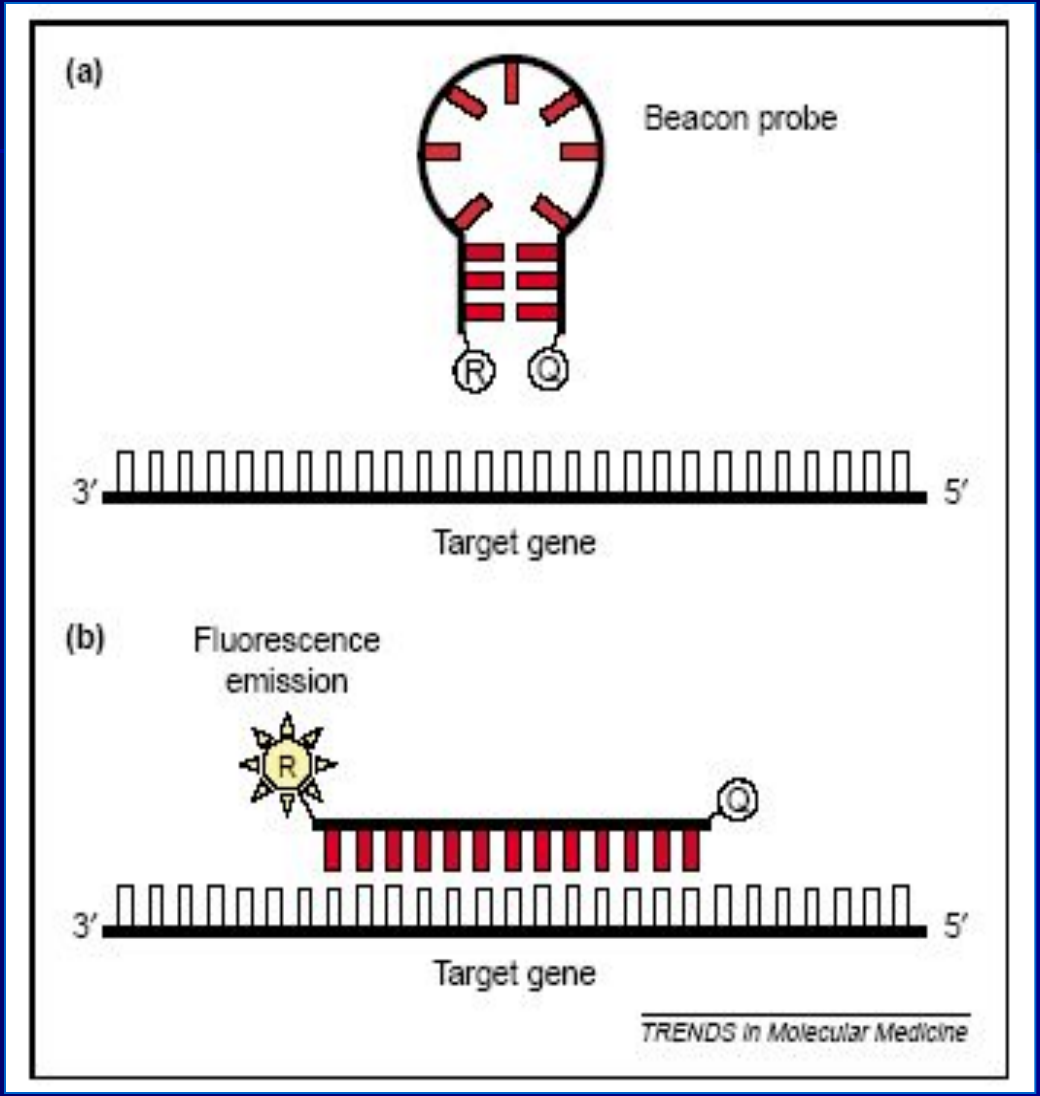
Схема розщеплення зонду під час реакції



Molecular beacons

- Дана методика відрізняється від попередньої (*TaqMan Assay)* тим, що кінцеві послідовності зонду являють собою взаємно комплементарні області, тому при температурі відпалу праймерів вони «злипаються»і утворюють шпильки. Внутрішня область зондів має нуклеотидну послідовність, комплементарну області, що ампліфікується. При відпалі праймерів зонди, що не прєдналися до ДНК- матриці, залишаються в «злипнутому" стані (це означає, що відбувається гасіння флуоресценції). Ті ж зонди, які відпалилися на матрицю, розвертаються, тому флуоресцентна мітка и гасник розходяться. Таким чином, інтенсивність свіченням збільшується.

Molecular beacons



Mocellin et al. Trends Mol Med 2003 (www)

Застосування 2-х зондів з резонансним переносом энергії (LightCycler assay)

- Даний спосіб детекції накопичення продуктів ампліфікації відрізняється підвищеною специфічністю, оскільки збільшення флуоресценції відбувається при комплементарному зв’язуванні з ампліконами відразу 2-х ДНК зондів. Принцип методу заключається в переносі енергії від одного флуорофора, який знаходиться на 3` кінці першого зонду, до другого флуорофору, який знаходиться на 5` кінці другого зонду, причому відстань між флуорофорами складає 1-3 нуклеотида. При одночасному зв’язуванні обох зондів з ДНК- матрицею випрмінювання першого флуорофора передається на другий флуорофор, а його випромінювання детектується приладом. Таким чином, зрастає специфічність аналізу.

Застосування 2-х зондів з резонансним переносом энергії (LightCycler assay)

LIGHT CYCLER - Primer and Probe Design

1. Isolate Genomic DNA

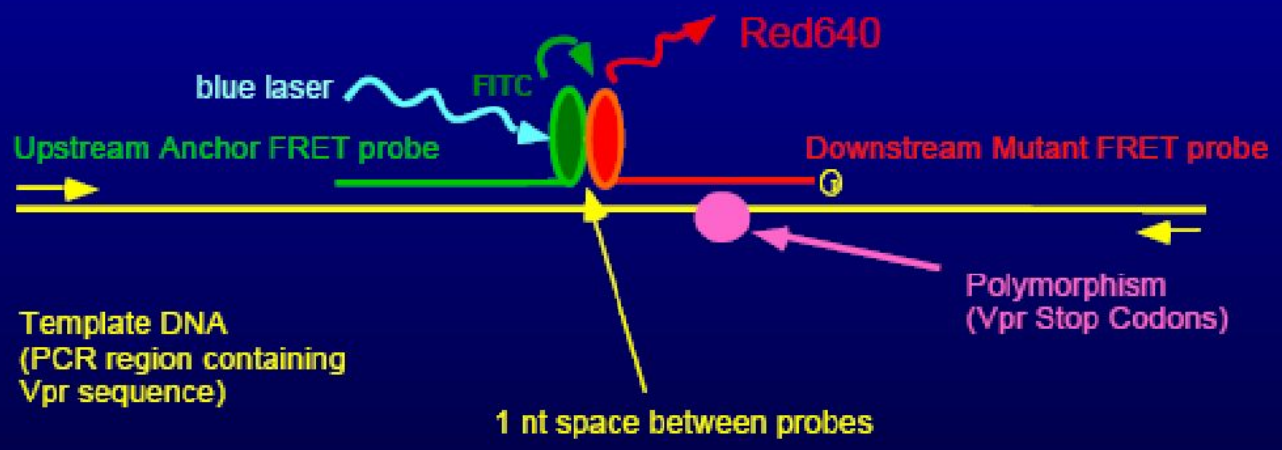
2. PCR Amplify region:
5' primer: Spans Vif Region
3' primer: Downstream Vpr
520 bp

= Template DNA

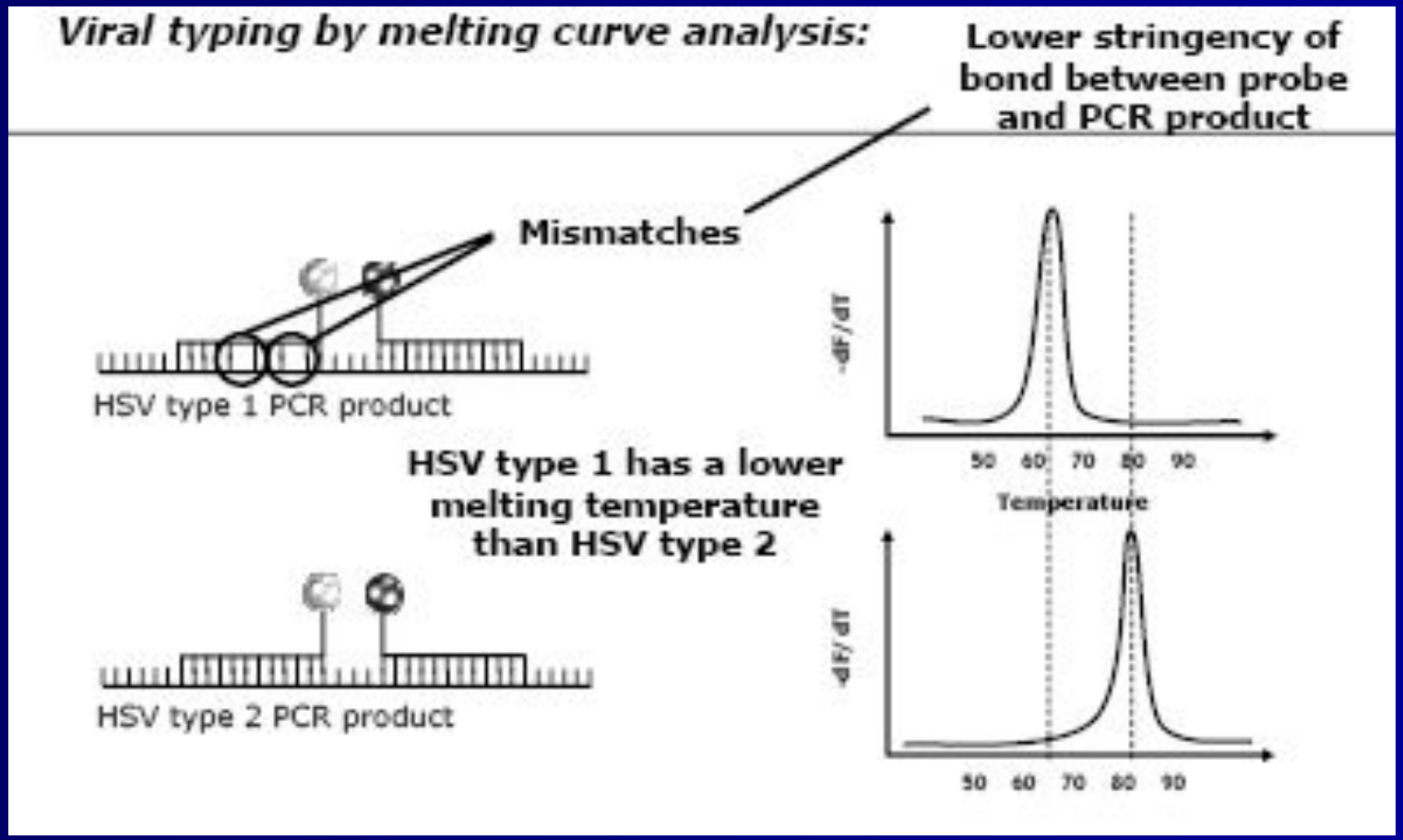
3. Design FRET Probes:

Mutant Probe: Also comprised of wild type sequence. Vpr polymorphisms in ΔVpr viruses have a lower Tm than wild type sequences and can be distinguished; 3' FITC

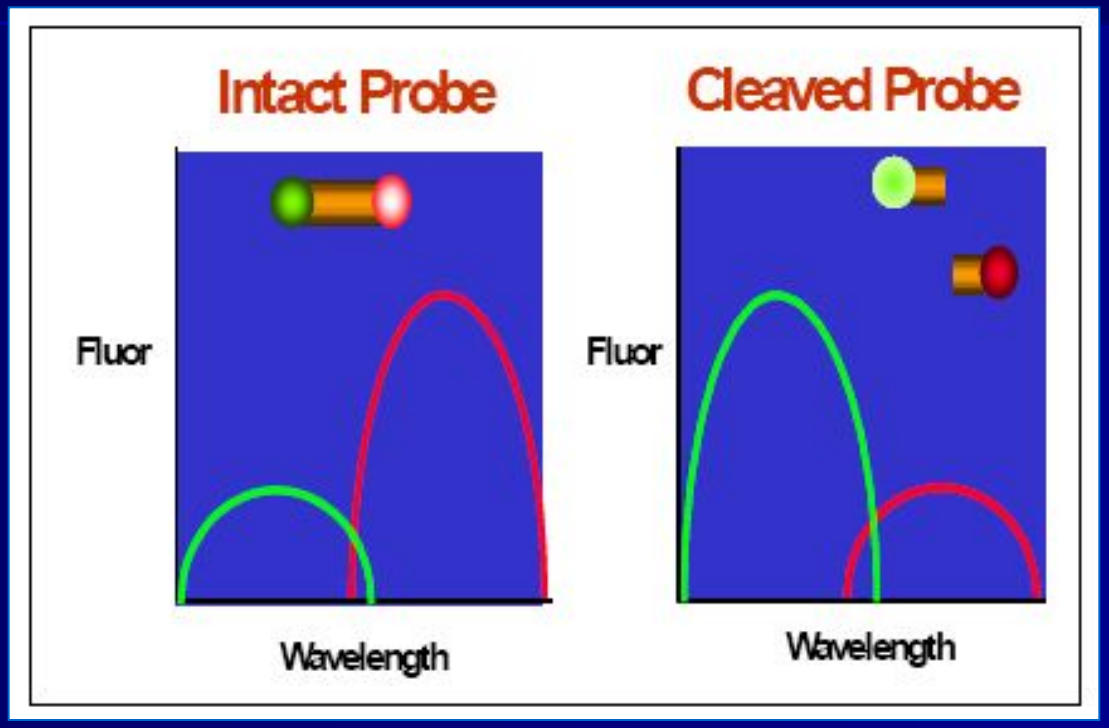
Anchor Probe: binds to wild type sequence downstream of polymorphism; 5' Red 640



Застосування 2-х зондів з резонансним переносом энергії (LightCycler assay)

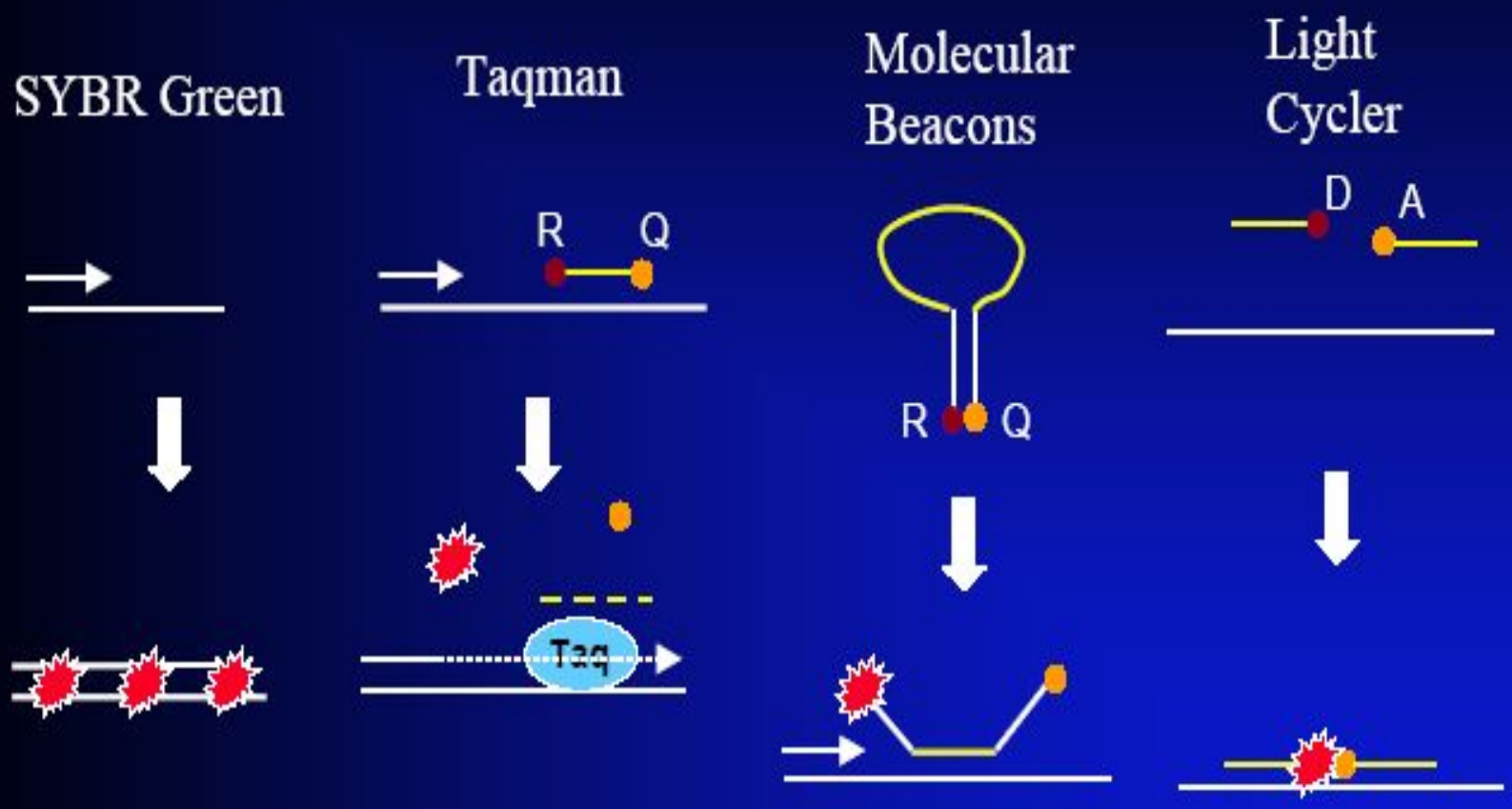


FRET = Förster/fluorescence resonance energy transfer



(www)

Methods of fluorescence detection

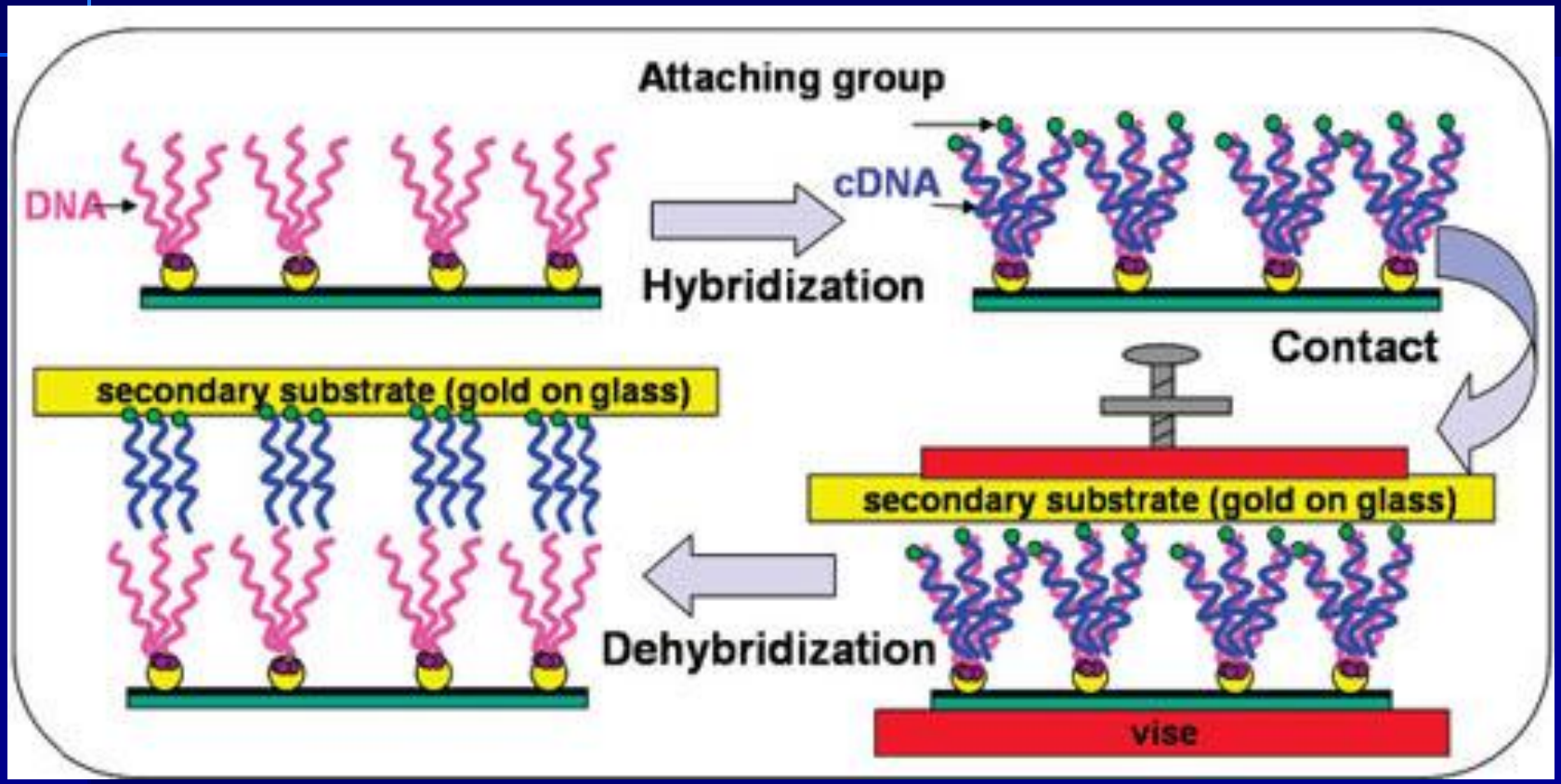


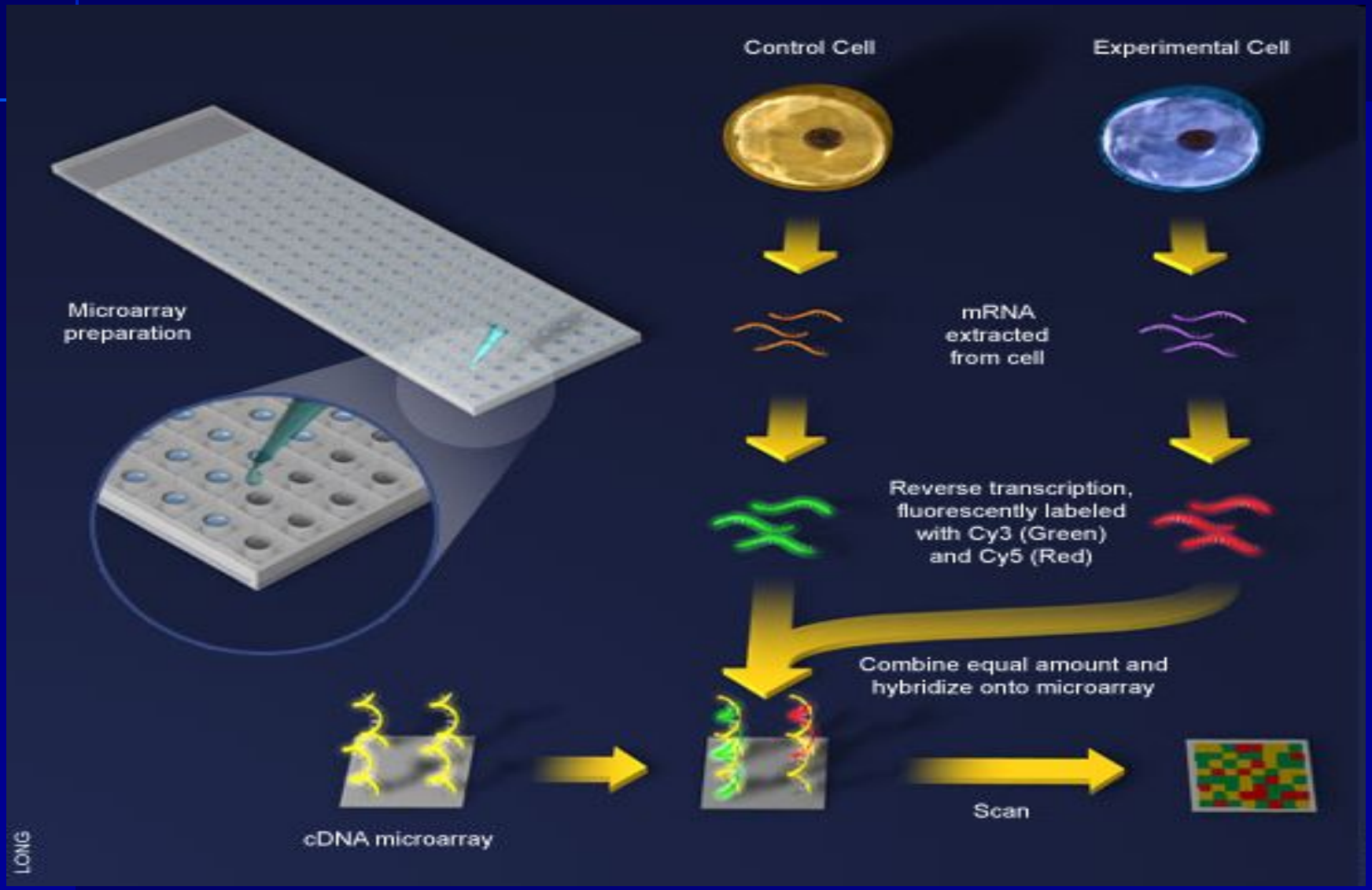
Nigel Walker, NIEHS (www)

ДНК-чіпи

(DNA-array)

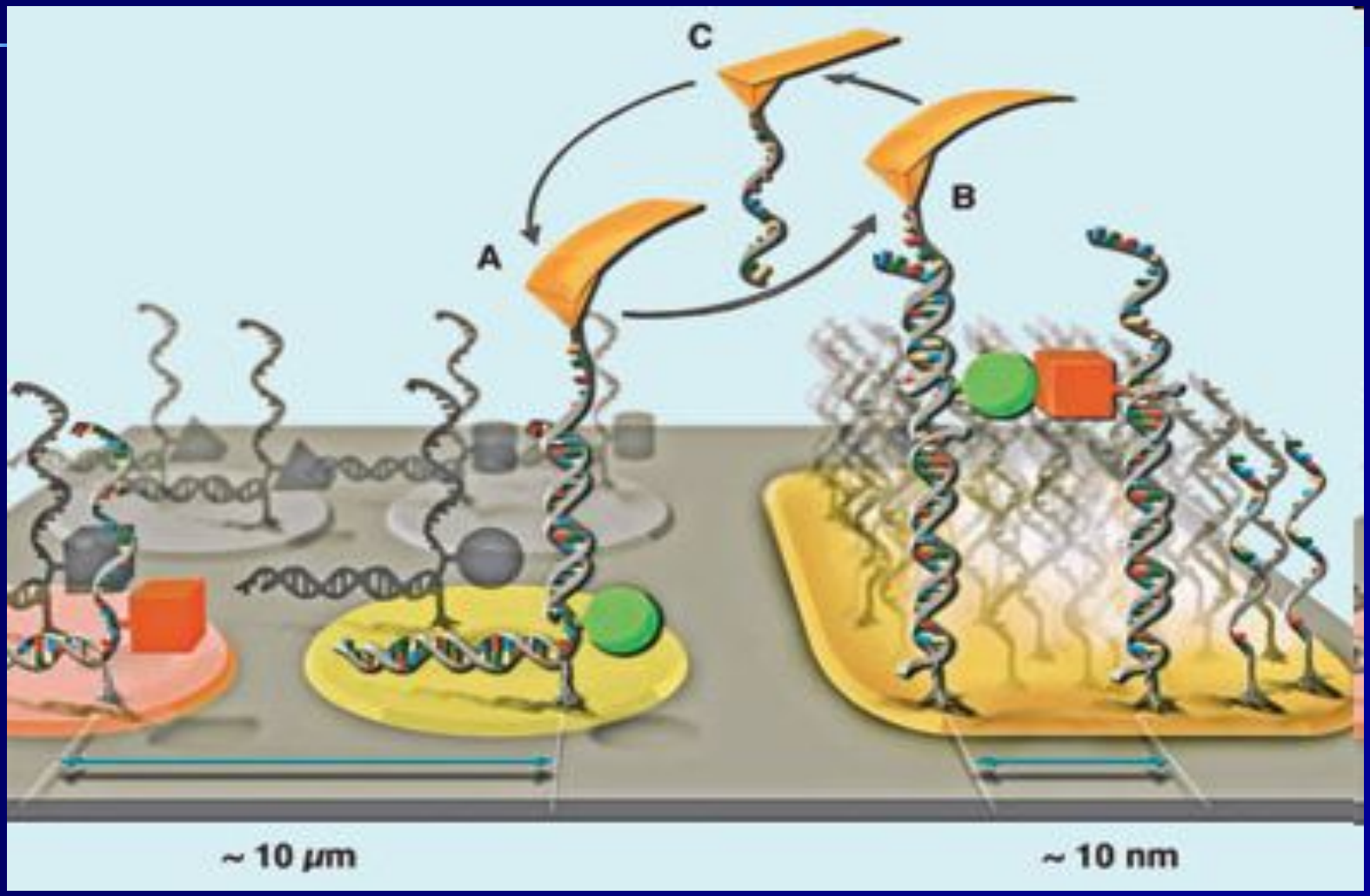
Технологія ДНК-чіпів




Control Cell
Experimental Cell
Microarray preparation
mRNA extracted from cell
Reverse transcription, fluorescently labeled with Cy3 (Green) and Cy5 (Red)
Combine equal amount and hybridize onto microarray
Scan
cDNA microarray
LONG

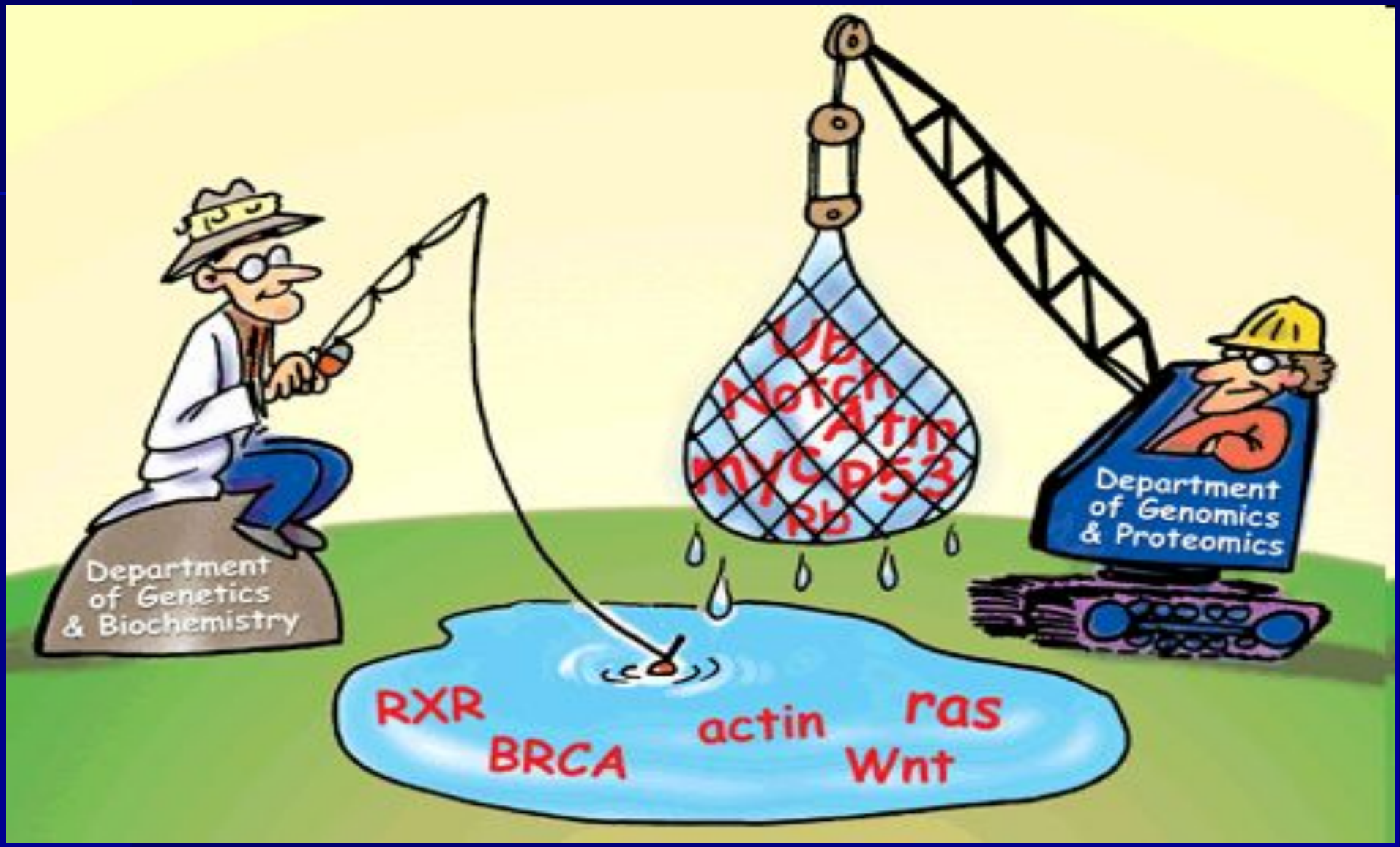
ДНК-чіп

+ ACM



Microarrays

08-Microarrays.flv


Department of Genetics & Biochemistry
Department of Genomics & Proteomics
RXR
BRCA
actin
ras
Wnt

Визначення філогенетичних зв’язків українських ізолятів вірусів рослин за допомогою порівняльного та філогенетичного аналізу ділянок гену білку оболонки

побудова філогенетичних дерев

The time will come, I believe, though I shall not live to see it, when we shall have fairly true genealogical trees of each great kingdom of Nature.

Charles Darwin

- **<u>Біологічні завдання</u>:**

  - **порівняння 3-х і більше об єктів**
    (хто на кого подібний ....)
  - **реконструкція еволюції**
    (хто від кого, як і коли пішов…)

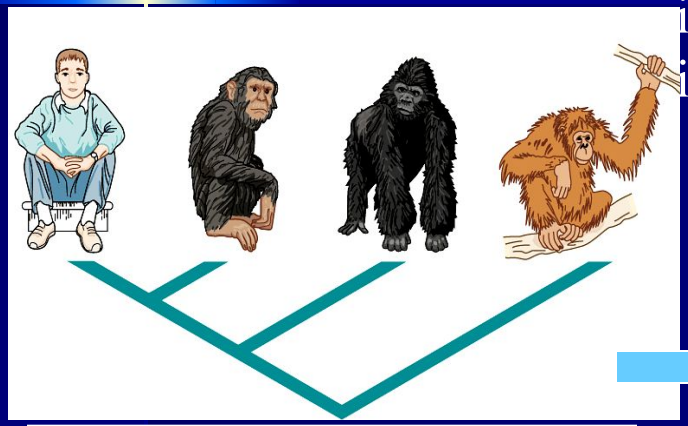
- **<u>Математичне завдання</u>** – завдання комбінаторної оптимізації : на основі «первинних» біологичних даних отримати дерево, можливо більш узгоджене з цими даними.

Реальні події : → Дані: → Побудоване дерево

еволюція в природі чи в лабораторії, компьютерна симуляція

наприклад, н.к. послідовності

дерево, ***розраховане на основі даних***, може відображати чи не відображати реальні події



I -> L

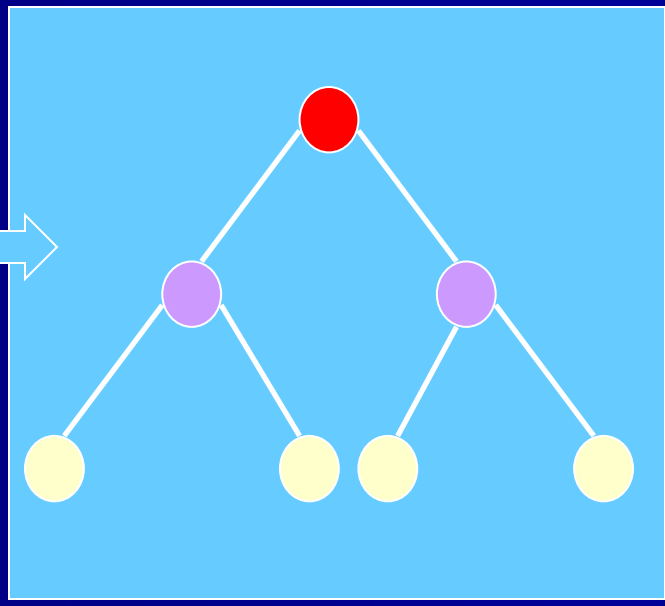
ACGCTAFKL

ACGCTAFKI

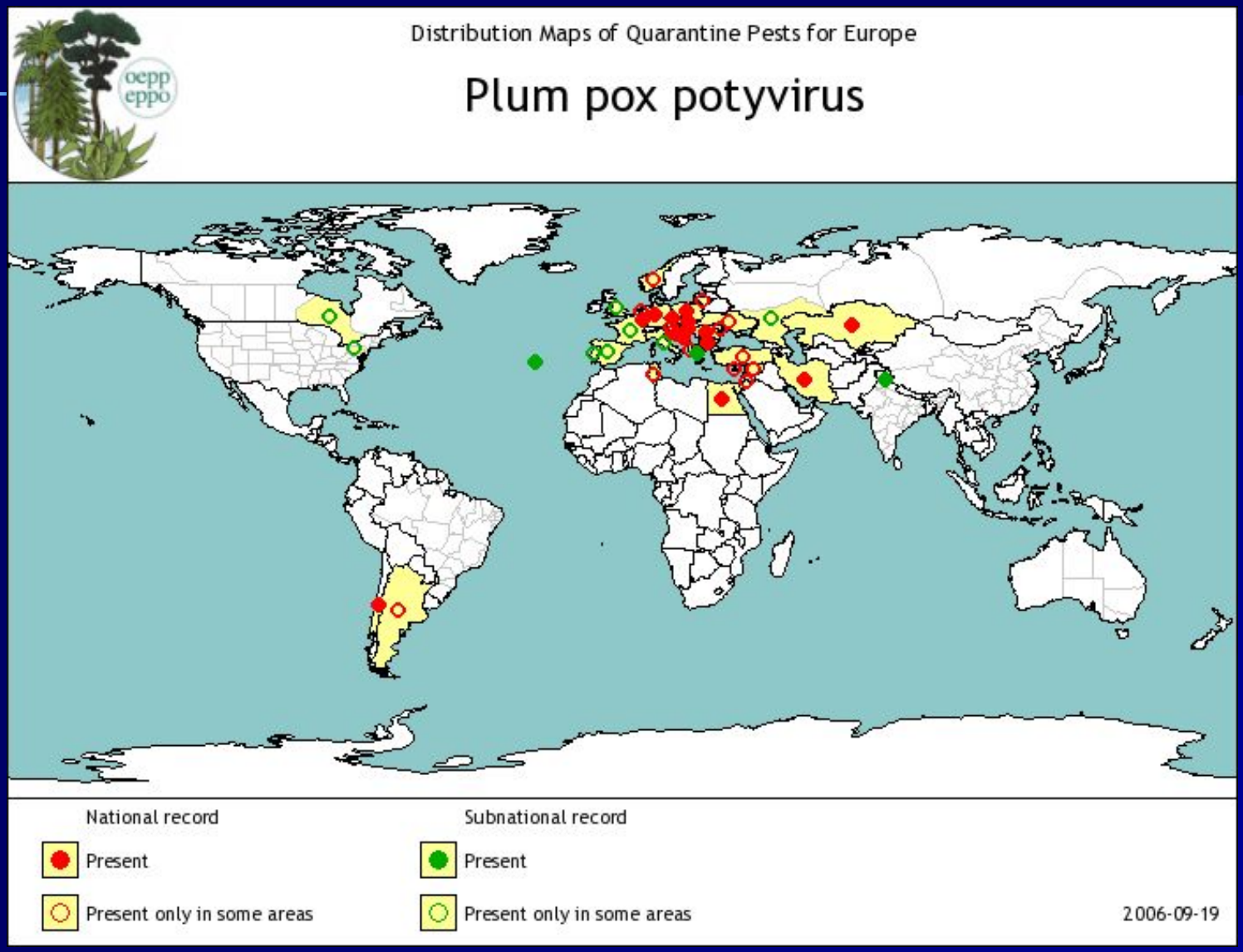
A -> G

GCGCTAFKI

>Seq1
ASGCTAFKL
. . .
>Seq3
GCGCTLFKI
>Seq4
GCGCTGFKI
. . . . .

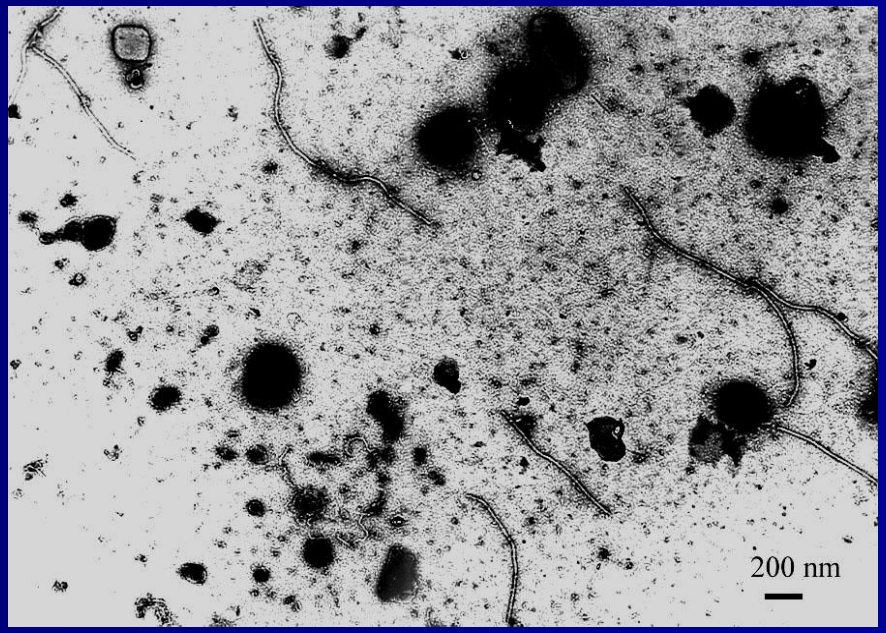


Поширення PPV в світі



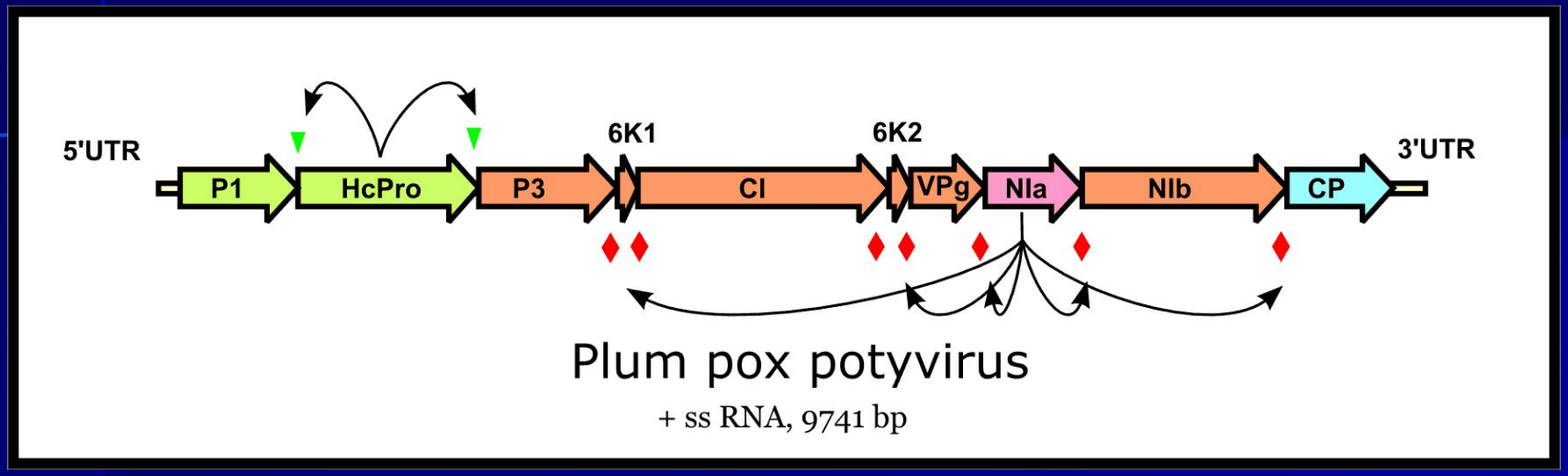
ВШС (PPV, *Potyvirus*, *Potyviridae*)

- Гнучні палички без оболонки, близько 760 нм довжиною і 20 нм в діаметрі
- Вірус складається з однієї молекули лінійної плюс одноланцюгової РНК, оточеної одним типом субодиниць капсидного білку.

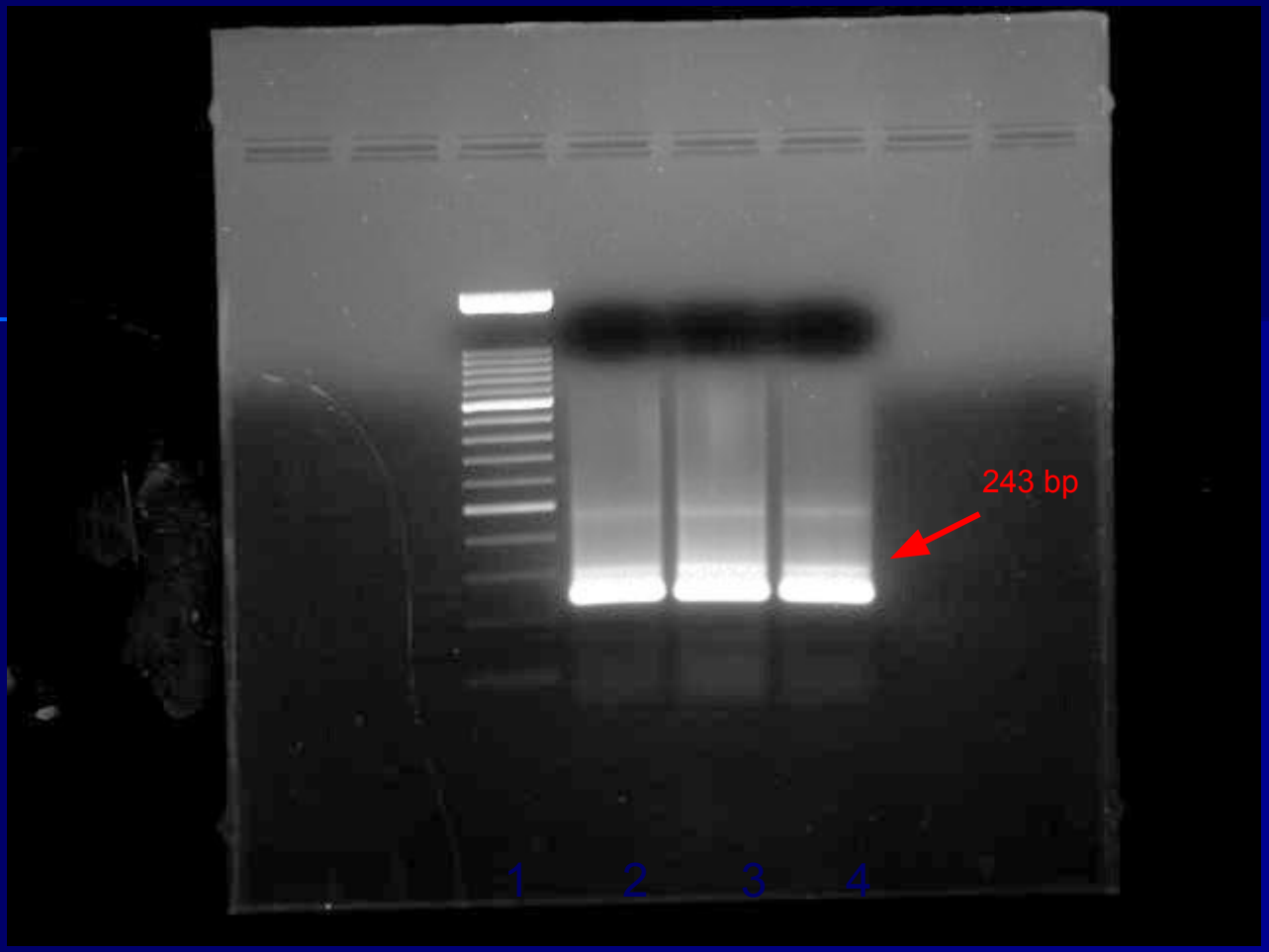


Ниткуваті часточки ВШС з соку рослин сливи (ICEM) Бар 200 нм

Геном ВШС



- Для діагностики вірусу шарки сливи використовували праймери специфічні до послідовності капсидного білка
  left- 5’ GGCTACGTCGCCGAATCGGA,
  right- 5’GGGTAACG GGGGGATTCGA
- продукт ампліфікації 243 bp



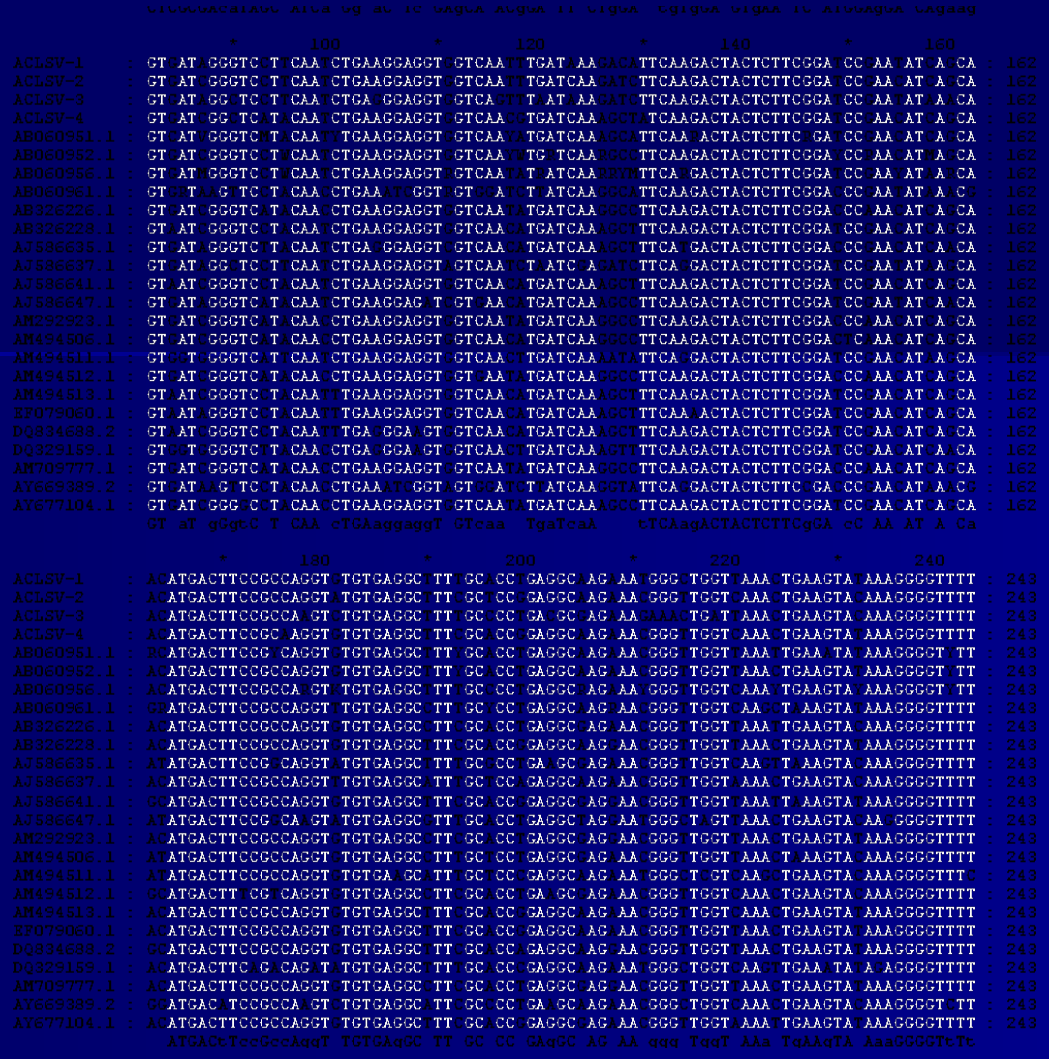
Електрофореграма продуктів RT-PCR в агарозному гелі по виявленню вірусу шарки сливи

1 – маркери (HyperLadder 1); 2 – зразок сливи з Київської області (Жуляни); 3 - зразок сливи з Київської області (Жуляни); 4 - зразок сливи з Одеської області.

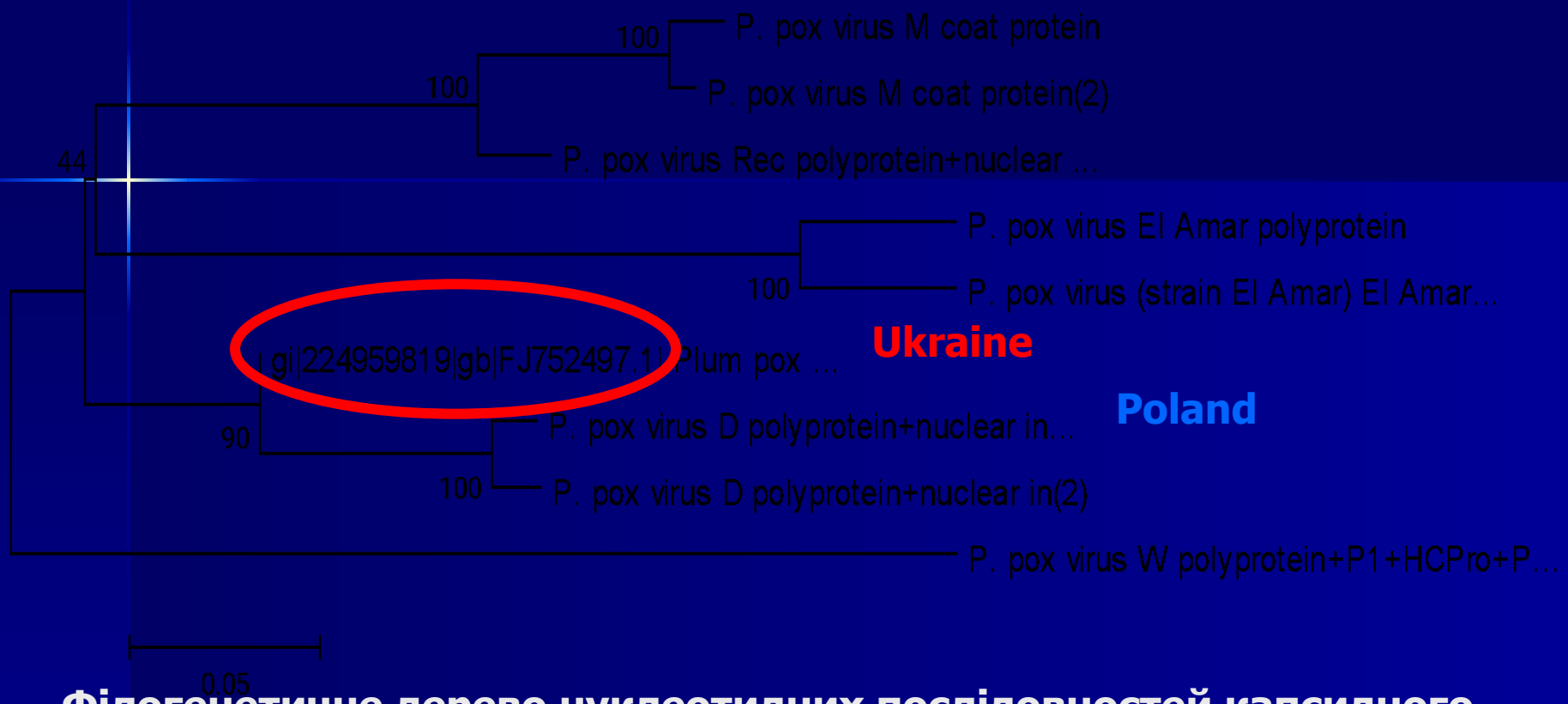
Сиквенс кДНК

TGCATGTTGCGATTAACGTCACCAGCGGTGTGTCTCTCTGTGTCC
TCTTCTTGTGTTCCGACGTTTCCATCCAAGCCAAATAAACGATTT
TGAACATTTCTCAATGCTGCTGCCTTCATCTGGATATGAGCTTCA
CGTGCCCGTACGGGTGTCGTTGAAGTCATTTCGTAAAAATCAAAG
GCATATCTGGCGAGGCTGTAGTCT

Нуклеотидна послідовність амплікону, отриманого з інфікованих зразків сливи

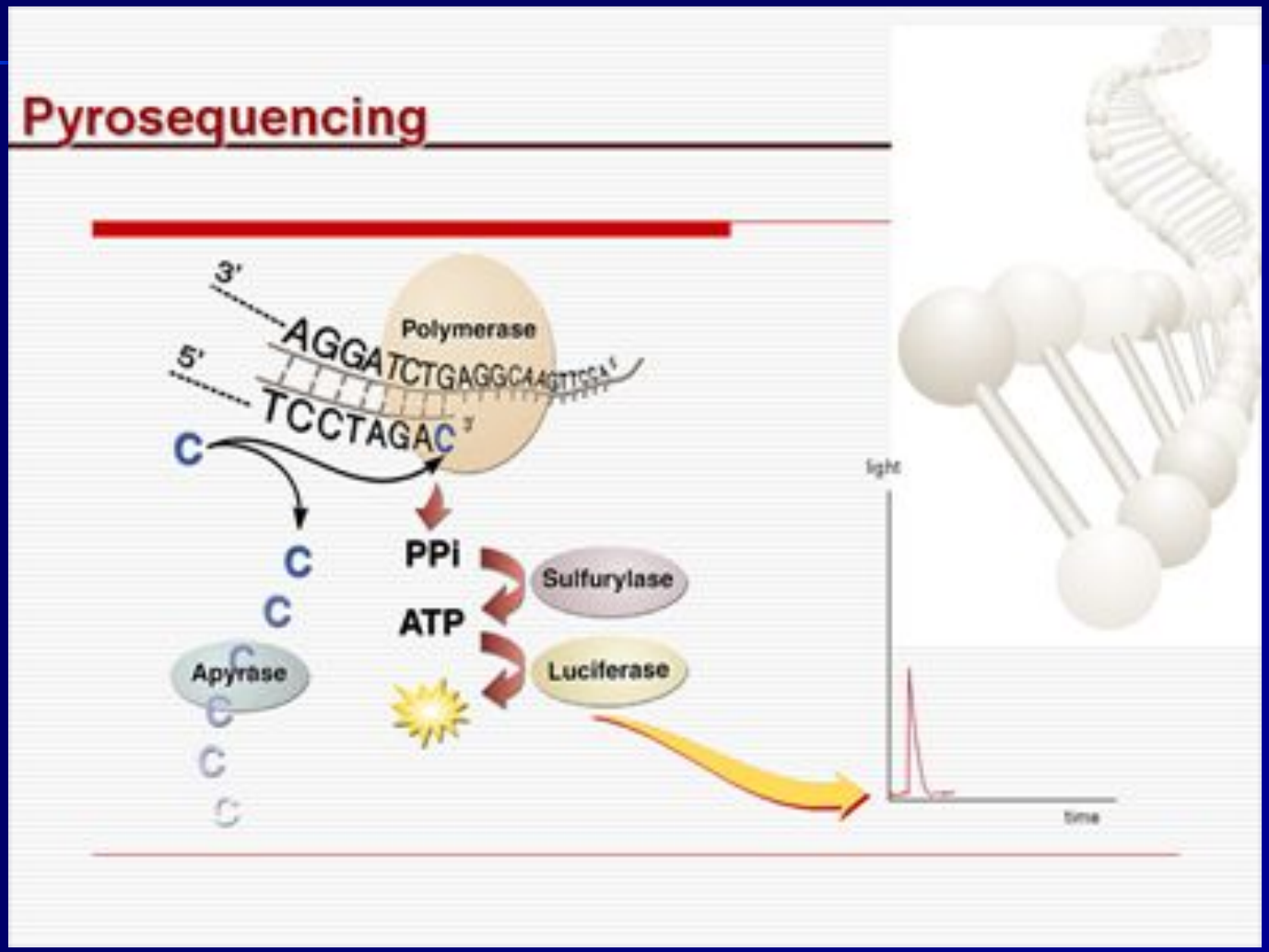


- Вигляд таблиці результатів вирівнювання нуклеотидних послідовностей гену капсидного білка з послідовностями генів капсидного білка, представлених в Генбанку, засобами пакету GENEDOC



Філогенетичне дерево нуклеотидних послідовностей капсидного білка українського ізоляту та відомих ізолятів ВШС, побудоване за методом NJ (найближчих сусідів), модель Кімура з 1000 бутстреп реплікацій (філограма). Філогенетичний аналіз проведений за допомогою програми MEGA.

Піросеквенування



Дякую за увагу!