

*Józef Kur<sup>1</sup>, Alfred Samet<sup>2</sup>, Jacek Juszczyk<sup>3</sup>, Andrzej Gładysz<sup>4</sup>*

## PCR – NOWA ERA W KLINICZNEJ DIAGNOSTYCE MIKROBIOLOGICZNEJ I BADANIACH EPIDEMIOLOGICZNYCH? (CZĘŚĆ I)

<sup>1</sup>Katedra Mikrobiologii Politechniki Gdańskiej

<sup>2</sup>Pracownia Bakteriologiczna, Państwowego Szpitala Klinicznego 1 w Gdańsku

<sup>3</sup>Klinika Chorób Zakaźnych

Akademii Medycznej im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu

<sup>4</sup>Katedra i Klinika Chorób Zakaźnych Akademii Medycznej we Wrocławiu

*Celem pracy jest przedstawienie podstawowych zasad techniki łańcuchowej reakcji polimerazowej (PCR) oraz zastosowanie jej w klinicznej diagnostyce mikrobiologicznej i w badaniach epidemiologicznych.*

### 1. WSTĘP

Rozwinięta w drugiej połowie lat osiemdziesiątych technika łańcuchowej reakcji polimerazowej (ang. Polymerase Chain Reaction, PCR) w ciągu kilku lat stała się jedną z podstawowych technik zarówno badawczych, jak i diagnostycznych. Umożliwia ona zwielokrotnienie (amplifikację), w ciągu kilku godzin, określonego fragmentu DNA w milionowych liczbach jego kopii (12, 16). Analiza zmian w sekwencji nukleotydów, w wyizolowanej w ten sposób frakcji DNA, jest nieporównywalnie łatwiejsza niż badanie całej cząsteczki DNA.

Dotychczas stosowane metody wykrywania i identyfikacji drobnoustrojów opierają się głównie na cechach morfologicznych, serologicznych i biochemicznych. Jednak, ze względu na występowanie dużej zmienności fenotypowej drobnoustrojów, klasyfikacja na podstawie ich cech fenotypowych, jest w wielu wypadkach niejednoznaczna. W ostatnich latach w diagnostyce mikrobiologicznej zaczyna się coraz częściej wprowadzać techniki biologii molekularnej oparte na badaniu genomu drobnoustrojów. Jedną z najbardziej eksploatowanych metod w tych próbach, opartych na analizie materiału genetycznego, jest właśnie technika PCR. Szczególne znaczenie ma zastosowanie PCR w klinicznej diagnostyce mikrobiologicznej, gdzie wykrywanie mikroorganizmu i jego namnażanie, wymagają długiego okresu czasu, bądź specjalnych warunków hodowli. Technika PCR pozwala na specyficzne wykrycie drobnoustrojów (niekoniecznie żywych) przy czułości wykrywania dochodzącej nawet do 1 komórki w badanym materiale (10, 15). Ponadto możliwe jest uzyskanie identyfikacji drobnoustroju na różnych poziomach specyficzności (określenie gatunku,

identyczności szczepów, powiązań filogenetycznych itp.). Dzięki tym zaletom PCR znajduje coraz szersze zastosowanie w klinicznej diagnostyce mikrobiologicznej. Wydaje się, że już w najbliższej przyszłości, metody diagnostyczne oparte na technice PCR staną się rutynowymi procedurami diagnostycznymi, wykorzystywanymi przez laboratoria szpitalne.

## 2. OGÓLNE INFORMACJE O REAKCJI PCR

### 2.1. Zasady PCR

Technika łańcuchowej reakcji polimerazowej DNA (PCR) pozwala na selektywną amplifikację wybranych regionów DNA w warunkach *in vitro* poprzez naśladowanie zjawiska replikacji DNA zachodzącego *in vivo*. Wymaga ona następujących czynników reakcji: jednoniciowej matrycy DNA, primerów (czyli starterów – sekwencji oligonukleotydów komplementarnych do końców zdefiniowanej sekwencji matrycowego DNA), trójfosforanów deoksynukleozydów (dNTP) i termostabilnego enzymu DNA polimerazy. W określonych warunkach reakcji, syntetyzowana jest nowa nić DNA, komplementarna do matrycy. Jednoniciową matrycę DNA otrzymuje się przez denaturację termiczną (topnienie) dwuniciowego DNA. Reakcja PCR wymaga zazwyczaj trzech etapów: (i) denaturacji dupleksu DNA w temperaturze 92–96°C; (ii) dołączenia primerów do miejsca komplementarnego matrycy w temperaturze 37–72°C (ang. *annealing*); (iii) wydłużania primera od końca 3'-OH przez sukcesywne dosyntetyzowanie dNTP w temperaturze 72°C; proces ten katalizowany jest przez polimerazę DNA. Te trzy etapy reakcji, trwające przez określony czas, nazywa się cyklem reakcji. Powtórzenia takich cykli prowadzą w efekcie do amplifikacji DNA (4, 11).

Jeśli dwa primery – każdy selektywnie wiążący się do jednej z komplementarnych nici – są wydłużane w cyklu amplifikacji, to nowo syntetyzowana nić DNA będzie zawierać miejsce wiązania dla następnego primera. W ten sposób, każda nowa nić DNA staje się matrycą w następnym cyklu amplifikacji, powiększając liczbę matryc po każdym cyklu. Amplifikacja teoretycznie prowadzi do wzrostu ilości odpowiednich fragmentów DNA w postępie wykładniczym. Długość powstających w ten sposób fragmentów DNA zdeterminowana jest przez końce 5' stosowanej pary primerów. Te, właściwej długości produkty reakcji, powstają począwszy od 3 cyklu.

### 2.2. Temperatura i czas termicznego cyklu w reakcji PCR

Denaturację matrycowego DNA przeprowadza się zwykle w temperaturze 95°C przez 20–30 s. Czas denaturacji może zależeć nieznacznie od takich czynników jak rodzaj stosowanej próbki i rodzaj termocyklera. W końcowych cyklach, niższa temperatura denaturacji może być korzystna ze względu na dłuższe zachowanie aktywności przez polimerazę. Etap denaturacji nie powinien być ostatnim, kończącym proces amplifikacji PCR.

Najbardziej krytycznym czynnikiem dla optymalizacji specyficzności reakcji PCR jest wybór odpowiedniej temperatury dołączania primerów. Wśród wielu czynników,

wpływających na dołączanie primerów, temperatura, czas oraz stężenie matrycy i samych primerów są najważniejsze. Efektywne dołączanie primerów w pierwszych cyklach jest determinowane głównie przez liczbę kopii matrycy oraz przez to czy jest wystarczająco dużo czasu na „efektywne przeszukiwanie” genomu przez primer w celu znalezienia komplementarnej sekwencji. Jeśli temperatura jest zbyt wysoka, niemożliwe jest efektywne przyłączanie primerów do sekwencji komplementarnej matrycy (brak produktu reakcji). Gdy temperatura jest za niska, primery mogą hybrydyzować do wielu miejsc na genomie, które charakteryzują się tylko częściową komplementarnością (wiele nieswoistych produktów). Dla większości zastosowań, temperatura dla specyficznej hybrydyzacji primerów musi być dobierana empirycznie. Czas hybrydyzacji primerów wynosi na ogół 20–40 s. Wydłużanie primerów (etap elongacji) zwykle przeprowadza się w temperaturze 72°C przez 20 s – dla fragmentów krótszych niż 500 par zasad i 40 s – dla fragmentów o długości do 1200 par zasad. W przypadku, gdy spodziewane jest występowanie drugorzędowej struktury amplifikowanych produktów, wymagany jest dłuższy czas elongacji (do 2 min).

W analitycznej metodzie PCR, liczba cykli nie powinna przekraczać 40. Wykazano, że produkt amplifikacji, zapoczątkowany przez mniej niż 10 wyjściowych cząsteczek DNA, w optymalnych warunkach reakcji, jest łatwo wykrywany przez barwienie żelu agarozowego bromkiem etydydy już po 40 cyklach PCR. Uważa się, że najbardziej wskazana liczba cykli wynosi od 25 do 35. Często, zwiększając liczbę cykli obserwuje się niechcianą amplifikację artefaktów zamiast pożądanego produktu.

Zwykle, po ostatnim cyklu, przeprowadza się przez 5–15 min inkubację w 72°C, w celu dokończenia niekompletnych syntez i pełnej hybrydyzacji jednoniciowych komplementarnych produktów (5, 7).

### 2.3. Polimerazy DNA

Najczęściej stosowaną polimerazą w reakcji PCR jest termostabilna polimeraza Taq wyizolowana z termofilnej bakterii *Thermus aquaticus*. Wydajność syntezy Taq polimerazy zależy głównie od: (a) temperatury; (b) efektywnego stężenia jonów  $Mg^{2+}$ ; (c) struktury drugorzędowej matrycy; (d) stężenia dNTP.

Szybkość syntezy zależy głównie od temperatury reakcji, a także od czasu półtrwania enzymu w danej temperaturze. Ilość dodawanej do reakcji polimerazy jest jednym z najważniejszych czynników do optymalizowania w zależności od rodzaju eksperymentu. Dla większości zastosowań optymalna ilość enzymu wynosi między 0.5 i 2.5 jednostki w próbce o objętości 50  $\mu$ l na około 40 cykli. Zwiększenie stężenia enzymu prowadzi często do zmniejszenia specyficzności. Stosowane w buforach stężenie  $MgCl_2$  może wahać się między 0,5 do 5 mM. Jony  $Mg^{2+}$  wpływają na aktywność enzymu, a jego stężenie zależy od ilości dNTP, PP<sub>i</sub> i EDTA. Każdy z tych komponentów wiąże się stechiometrycznie z  $Mg^{2+}$ .

### 2.4. Trójfosforany deoksynukleozydów (dNTP) i primery

Najczęściej stężenie dNTP (dATP, dTTP, dCTP i dGTP) w mieszaninie reakcyjnej wynosi 250  $\mu$ M dla każdego z deoksynukleozydów. Nierówne ilości czterech dNTP redukują wydajność amplifikacji.

W większości przypadków, takie czynniki jak: odpowiedni wybór sekwencji oraz kombinacje stosowanych primerów odgrywają zasadniczą rolę w osiągnięciu pozytywnych rezultatów amplifikacji. W zależności od celu, użyteczna długość primerów wynosi od 14 do 40 nt, a zawartość par G+C w zakresie 40–75%. Większość specyficznych reakcji PCR kontrolowana jest głównie przez odpowiednie zaprojektowanie, wybór kombinacji i stężenia primerów.

### 2.5. Próbką DNA do reakcji PCR

W próbkach do amplifikacji, poza DNA mogą znajdować się inne substancje interferujące z procesem PCR. Czasami czystość próbki DNA limituje poprawność eksperymentu. W niektórych przypadkach, nawet jednorazowe lub kilkukrotne zamrażanie może wpływać na reproduktywność. Dla próbek klinicznych, ważnym jest aby mieć świadomość obecności w próbkach potencjalnych inhibitorów reakcji, takich jak: EDTA, heparyna, porfiryny i inne. Próbki genomowego DNA izolowane z surowych ekstraktów komórkowych nigdy nie są roztworami homogenicznymi. Czasami pożyteczne jest rozcieńczenie próbki przed reakcją PCR i zastosowanie większej objętości mieszaniny reakcyjnej. Optymalne stężenie DNA w próbkach dla analizy PCR zależy od czystości i celu eksperymentu.

### 2.6. Ogólne zasady przygotowywania reakcji PCR

Ogólne zasady przygotowania próbek do reakcji PCR są następujące:

- (1) zachowanie ostrożności w stosunku do wszelkiego rodzaju zanieczyszczeń;
- (2) wydzielenie fizycznego rejonu w laboratorium tylko do doświadczeń PCR;
- (3) używanie tylko osobistych zestawów odczynników i pipet;
- (4) używanie rękawiczek do wszystkich operacji związanych z reakcją;
- (5) używanie materiałów, butli i probówek jednorazowego użytku;
- (6) używanie oddzielnych zestawów pipet do odczynników i próbek DNA.

## 3. ODMIANY TECHNIKI PCR NAJCZĘŚCIEJ STOSOWANE W DIAGNOSTYCE MIKROBIOLOGICZNEJ

Metodami analizy DNA opartymi na technice PCR można rozpoznawać szereg drobnoustrojów powodujących choroby zakaźne. Szczególny postęp zanotowano w diagnostyce patogenów wolno rosnących lub trudnych do hodowli *in vitro* (8, 13, 20). Diagnostyka tradycyjna zostaje uzupełniana lub zastępowana amplifikacją charakterystycznego dla danego drobnoustroju fragmentu DNA. Należy jednak pamiętać o tym, że wynik otrzymany w reakcji PCR nie ma znaczenia różnicującego, podobnie jak dla metod genetycznych stosowanych w medycynie. Oznacza to, że uzyskany wynik pozytywny, przy zachowaniu wszelkich środków ostrożności związanych z techniką PCR, nie świadczy o chorobie pacjenta, tak jak wynik ujemny o tym, że jest zdrowy. Wartość różnicującą ma kliniczny obraz przebiegu choroby, na co składają się wywiady, badanie przedmiotowe i wyniki badań specjalistycznych, co jest podstawą rozpoznania lekarskiego (21). Do naj-

częściej stosowanych obecnie odmian techniki PCR w diagnostyce mikrobiologicznej należy zaliczyć:

- (1) PCR z zastosowaniem specyficznych primerów dla badanego drobnoustroju,
- (2) PCR z zastosowaniem arbitralnych primerów (AP-PCR),
- (3) przypadkowe amplifikowanie polimorficznego DNA (RAPD)
- (4) „fingerprinting” zamplifikowanego DNA (DAF) (9).

### 3.1. PCR z zastosowaniem specyficznych primerów dla danego drobnoustroju

PCR pozwala na wykrycie i powielenie specyficznych, znanych sekwencji DNA drobnoustroju, przy użyciu odpowiednich oligonukleotydów (primery). W tym przypadku regionem docelowym (ang. *target*) wykorzystywanym do amplifikacji jest fragment genomu, np.: gen, element insercyjny, kryptyczny plazmid występujący tylko w danym gatunku, bądź szczepie. Długość oraz sekwencja primerów komplementarnych do wybranego regionu DNA, jest jednym z czynników determinujących swoistość (specyficzność) reakcji PCR. Dlatego też, primery stosowane w specyficznej reakcji charakteryzują się zwykle stosunkowo długą sekwencją. Czas przylegania startera do matrycowego DNA jest krótki (od kilku sekund do około 1 min), a temperatura wysoka (55°C-68°C). Przy wykrywaniu drobnoustroju w materiale klinicznym stosuje się 35-40, a z hodowli – 25 cykli amplifikacji. Profil temperaturowy reakcji wpływa na stopień swoistości reakcji.

### 3.2. PCR z zastosowaniem starterów o dowolnej sekwencji (ang.: *arbitrary primers*)

Swoista amplifikacja wymaga znajomości sekwencji nukleotydowej DNA regionu docelowego i zastosowania swoistych primerów o pełnej komplementarności do matrycy.

Stopnie pokrewieństwa pomiędzy organizmami mogą być określane poprzez różnice w długości lub sekwencji nukleotydowej swoistych regionów DNA. Badania te można prowadzić bez znajomości sekwencji nukleotydowej badanej matrycy przy użyciu dowolnych tzw. arbitralnych primerów, gdzie powielanym targetem są regiony DNA, często polimorficzne. Metody umożliwiające tego typu badania to głównie: (a) technika MAAP – ang.: *Multiple Arbitrary Amplikon Profiling* (1), (b) RAPD – ang.: *Random Amplified Polymorphic DNA* (przypadkowe amplifikowanie polimorficznego DNA), (c) AP-PCR – ang.: *Arbitrary Primed PCR* (18), (d) DAF – ang.: *DNA Amplification Fingerprinting* – (2). Regionem docelowym w metodzie MAAP są regiony wielokrotnie powtórzone na genomie (*multiple*) bądź amplikony (*amplicons*). Uzyskany tu wzór amplifikacji zależy od rodzaju użytych primerów.

W technice RAPD stosuje się krótkie primery (około 10 nukleotydów) (19). Wynikiem amplifikacji RAPD jest kilka produktów uwidoczniomych na żelu agarozowym lub poliakrylamidowym barwionym bromkiem etydyny i oglądanym w świetle UV.

W AP-PCR używane są primery o długości 20-30 nukleotydów (18). Zwykle dołączanie primerów do matrycy dla tej techniki następuje w niskiej temperaturze (z reguły poniżej 45°C) przez długi czas (np. 5 min) przez 40 cykli. Wykrywanie produktów AP-PCR wykonuje się najczęściej przez wcielenie  $\alpha$  <sup>32</sup>P-ATP w ciągu ostatnich 10 cykli amplifikacji i późniejszej autoradiografii.

W technice DAF stosuje się najkrótsze primery o długości zwykle 5–8 nukleotydów 7–8 (2). DAF daje obraz w postaci dużej ilości fragmentów DNA o różnej wielkości, uwidocznionych na żelu poliakrylamidowym. Fragmenty uzyskane w wyniku „*PCR-fingerprinting*” zależne są od długości primerów i zastosowanej temperatury dołączania ich do matrycy.

Technika RAPD z zastosowaniem 10 nukleotydowych primerów daje 3–10 razy mniej produktów PCR, niż technika DAF z użyciem primerów o takiej samej długości (3). W technice RAPD i DAF przyleganie starterów odbywa się na ogół w temperaturze 30–35°C.

Zastosowanie techniki „*DNA fingerprinting*” może pozwolić na klasyfikowanie genomów pochodzących ze szczepów badanego gatunku bakterii, na różnych poziomach polimorfizmu DNA, zależnie od wyboru primerów. Primery o dowolnej sekwencji mają zastosowanie w określaniu genetycznych powiązań pomiędzy organizmami w procesie ich rozwoju rodowego, w badaniach filogenetycznych i taksonomicznych (3).

### 3.3. Wykrywanie produktów amplifikacji

Sposób wykrywania produktów reakcji PCR zależy od rodzaju reakcji i cech jej przeprowadzania (14, 15).

Najczęściej wykrywanie produktów reakcji PCR dokonuje się przez elektroforetyczny rozdział w żelu agarozowym lub poliakrylamidowym oraz późniejsze barwienie bromkiem etydyny (ogłądanie w świetle UV) bądź srebrem. Rozdzielone w wyniku elektroforezy produkty PCR można również przenieść na filtry (np. nitrocelulozę) i hybrydyzować ze specyficzną sondą molekularną. Stosowana sonda genetyczna może być znakowana radioaktywnie lub nieradioaktywnie np. digoksygeniną-11-dUTP. Wykrywanie sondy (np. digoksygeniny) może polegać na zasadzie reakcji immunologicznej z użyciem koniugatu przeciwciała antyDig/alkaliczna fosfataza oraz reakcji barwnej przeprowadzanej przez enzym. Na podobnej zasadzie oparty jest system, w którym DNA znakowane jest biotyną. W praktyce jako sondę molekularną stosuje się najczęściej dwuniciowe DNA (dsDNA) znakowane digoksygeniną-11-dUTP. Sonda ta hybrydyzuje z obiema niciami (sensowną i antysensowną) produktów reakcji amplifikacji. W wyniku stosowania wyżej opisanego sposobu wykrywany jest produkt amplifikacji w ilości 0.1–1 pg (17). Większą czułość uzyskuje się stosując detekcję digoksygeniny metodą chemiluminescencyjną (6).

W przypadku stosowania do reakcji PCR biotynylowanych primerów, produkty reakcji amplifikacji wykrywa się kolorymetrycznie. Takie produkty reakcji PCR posiadają biotynylowane primery. Wykrywanie polega na denaturowaniu produktów amplifikacji i hybrydyzowaniu z RNA. Powstałe hybrydy RNA/DNA wylapywane są przez streptawidynę. Następnie przeciwciała związane z enzymem wiążą się do hybryd, a wytworzony sygnał mierzony jest kolorymetrycznie. Ten sposób wykrywania produktów amplifikacji jest 100-krotnie czulszy niż metoda barwienia żeli bromkiem etydyny.

*W drugiej części pracy zostaną przedstawione przykłady zastosowania techniki PCR do identyfikacji drobnoustrojów (bakterii, wirusów, grzybów, pasożytów) oraz w badaniach epidemiologicznych.*

*J. Kur, A. Samet, J. Juszczyk, A. Gładysz*

PCR – A NEW ERA IN CLINICAL MICROBIOLOGICAL DIAGNOSIS  
AND EPIDEMIOLOGICAL STUDIES? (PART I)

SUMMARY

The study discusses basic concepts of the polymerase chain reaction (PCR) and its use in microbiological clinical diagnosis and in epidemiological studies.

PIŚMIENICTWO

1. *Caetano-Anolle's G., Bassam B.J., Gresshoff P.M.*: Bio / Technology, 1992, 10, 937.
- 2. *Caetano-Anolle's G., Bassam B.J., Gresshoff P.M.*: Bio/Technology, 1991, 9, 553. – 3. *Caetano-Anolle's G.*: In PCR Methods and Applications. Cold Spring Harbour Laboratory Press ISSN, 1993, 85–94. – 4. *Erlich H.A. (ed.)*: In PCR Technology – Principles and Applications for DNA Amplification. Stockton Press 1989. – 5. *Erlich H.A., Gelfand D., Sninsky J.J.*: Science, 1991, 252, 1643. – 6. *Höltke H.J., Sagner G., Kessler C., Schmitz G.*: BioTechniques, 1992, 12, 104. – 7. *Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., White T.J. (eds.)*: In PCR Protocols A Guide to methods and Applications. Academic Press, 1990. – 8. *Karch H., Schwarzkopf A., Schmidt H.*: J. Microbiol. Methods, 1995, 23, 55. – 9. *Kur J., Burkiewicz A., Nowak A.*: Rocznik Wojskowego Instytutu Higieny i Epidemiologii im. gen. R. Kaczkowskiego, 1994, 31, supl. 1, 2. – 10. *Lassence A., Lecossier D., Pierre C., Cadranet J., Stern M., Hance A.J.*: Thorax, 1992, 47, 265.
11. *Mcpherson M.J., Quirke P., Taylor G.R. (eds.)*. In PCR A Practical Approach. IRL Press, 1991. – 12. *Mullis K.B., Faloona F.A.*: In Methods Enzymol., 1987, 155, 335. 13. *Persing D.H., Smith T., Tenover F.C., White T.J. (ed.)*: In Diagnostic Molecular Microbiology. Principles and applications. Mayo Foundation Press, Rochester (1993). – 14. *Rolfs A., Schuller I., Finckh V., Weber-Rolfs I.*: In PCR: Clinical Diagnostics and Research, 1992, 112–36. – 15. *Ronai Z., Yakubovskaya M.*: J. Clin. Lab. Anal., 1995, 9, 269. – 16. *Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., Erlich H.A.*: Science, 1988, 239, 487. – 17. *Sealey P.G., Southern E.M.*: In: Gel electrophoresis of nucleic acids a partial approach. *Rickwood P., Hames B.D. (ed.)* IRL Press, Oxford, Washington, 1982, 39–76. – 18. *Welsh J., McClelland M.*: Nucleic Acids Res., 1990, 18, 7213. – 19. *Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A., Tingey S.V.*: Nucleic Acids Res., 1990, 18, 6531. – 20. *Wilson S.M.*: Transactions of the Royal of Tropical Medicine and Hygiene, 1993, 87, 609.
21. *Witt M.*: Pneumonol. Alergol. Pol., 1995, 63, supl. 1, 88.

Adres: Katedra Mikrobiologii Politechniki Gdańskiej,  
ul. G. Narutowicza 11/12, 80-952 Gdańsk