

Grzegorz Kaczmarczyk¹, Grzegorz Machnik²,
Ewa Pelc³, Monika Czapla³

¹ Krakowska Akademia im. Andrzeja Frycza Modrzewskiego,
Wydział Zdrowia i Nauk Medycznych, Kraków

² Śląski Uniwersytet Medyczny, Katowice

³ Diagnostyka Sp. z o.o., Kraków

NAJNOWSZE TECHNIKI BIOLOGII MOLEKULARNEJ W PROFILAKTYCE PRZEWLEKŁYCH ZAKAŻEŃ WIRUSOWYCH

Adres korespondencyjny

Grzegorz Kaczmarczyk, Krakowska Akademia im. Andrzeja Frycza Modrzewskiego, Wydział Zdrowia i Nauk Medycznych, 30-705 Kraków, ul. Gustawa Herlinga-Grudzińskiego 1.
e-mail: gardan@gazeta.pl

Streszczenie: Postęp medycyny i związany z tym postęp technik biologii molekularnej stworzyły daleko idące możliwości kontrolowania i zapobiegania powikłaniom w przebiegu przewlekłych chorób wirusowych, takich jak zakażenia wirusowe wątroby oraz wirusem ludzkiego niedoboru odporności (HIV). Jeszcze kilkanaście lat wstecz niemożliwe było dokładne kontrolowanie poziomu wirēmii oraz serokonwersji wirusa HBV podczas zakażeń. Od kilku lat istnieją już w pełni wystandaryzowane i wykorzystywane w diagnostyce metody biologii molekularnej, potwierdzające zakażenia HCV, HBV oraz HIV nawet podczas nieobecności przeciwciał we krwi pacjenta, wykrywające bezpośrednio obecność genomu wirusa. Coraz częściej wykorzystuje się również techniki pozwalające monitorowanie stanu zakażenia oraz szybkie reagowanie na zmiany zachodzące w organizmie zakażonego. Do wyżej wymienionych technik należy przede wszystkim odmiana reakcji PCR, czyli ilościowy PCR w czasie rzeczywistym (Real-Time PCR) czy sekwen-

cjonowanie kwasów nukleinowych. Każda z tych technik pozwala nie tylko na wykrycie zakażenia na poziomie dotychczas nieosiągalnym, lecz również na jego skuteczne obserwowanie i skuteczne leczenie. Przy pomocy reakcji Real-Time PCR możliwe jest określenie ilości cząstek wirusa w badanej jednostce objętości krwi. Technika sekwencjonowania pozwala na dokładne określenie typu wirusa, a co za tym idzie zjadliwości. Wszystkie te techniki wzięte razem pozwalają na dokładne określenie ilości wirusów we krwi oraz na skuteczną walkę z nimi.

Słowa kluczowe: ELISA, PCR, Real-Time PCR, sekwencjonowanie, hybrydyzacja, infekcje wirusowe

Każda z chorób zakaźnych, na jakie w ciągu całego życia może zachorować człowiek, charakteryzuje się pewnymi cechami stałymi:

- inwazja czynnika zakaźnego do organizmu,
- rozpoznanie obcego – potencjalnie groźnego dla organizmu czynnika,
- reakcja układu immunologicznego – obrona nieswoista i zniszczenie patogenu,
- przejście obrony nieswoistej w swoistą i zniszczenie patogenu,
- przewlekły stan zapalny.

Jeszcze kilkanaście lat wstecz nie były znane metody pozwalające na monitorowanie obecności czynnika zakaźnego na każdym z etapów choroby. W szczególności dotyczy to stanu przewlekłego, gdy nie wiadomo, czy zastosowana terapia jest skuteczna. Do niedawna (i dziś również) w pewnym stopniu było to możliwe poprzez określanie obecności i poziomu przeciwciał skierowanych przeciwko danemu wirusowi/bakterii z zastosowaniem metody ELISA. Lecz nie zawsze jest to możliwe w przypadku, gdy czynnikiem zakaźnym jest mikroorganizm, który „chowa się” przez układem odporności wykorzystując ku temu kilka mechanizmów, takich jak:

- obecność na powierzchni patogenu białek ludzko podobnych do noszonych przez komórki człowieka,
- zakażenie bezpośrednio komórek układu odporności,
- zakażenie komórek układu nerwowego, do których układ odporności nie ma dostępu,
- wolny rozwój wewnątrz komórek narządów.

Czynniki te powodują, że po krótkim okresie wczesnego zakażenia, gdy patogen jest obecny we krwi i są ku niemu produkowane przeciwciała, niemożliwe jest stwierdzenie, czy organizm został zaatakowany przez groźną chorobę czy też był to epizod przeziębienia.

Przewlekłe zakażenia są domeną zarówno bakterii, jak i wirusów. Pomimo, że do schorzeń przewlekłych ze strony bakterii można zaliczyć takie

groźne choroby, jak gruźlica, zapalenie wsierdza czy przewlekłe zapalenie prostaty, to dużo groźniejsze są przewlekłe zakażenia spowodowane przez wirusy. Zalicza się tu cztery rodzaje zakażeń, które zgodnie z dzisiejszym stanem wiedzy, są szczególnie trudne bądź niemożliwe do całkowitego wyleczenia. Należą tu zakażenia wirusami HIV, HCV, HBV i HPV. Należy zauważyć, że zakażenia wirusem HBV i HPV w większości przypadków (około 90% w przypadku HBV i 80% w przypadku HPV) kończą się wyleczeniem przy pomocy farmakoterapii bądź samowyleczeniem. Pomimo tak wysokiej liczby wyleczeń, w obrębie wirusa HPV istnieją typy, które w mniejszym bądź większym stopniu mogą powodować rozwój nowotworu (tak zwane typy niskiego i wysokiego ryzyka). Natomiast zakażenie HBV może również przejść w formę przewlekłą gdy organizm nie wyeliminuje wirusa z krwi, a jego genom zintegruje się z ludzkim DNA.

Dokładna analiza zakażeń przewlekłych, obejmująca stosowane nowoczesne metody diagnostyki zakażeń wirusowych, umożliwiające również monitorowanie stanu pacjenta podczas leczenia, to niewątpliwie bardzo ważne osiągnięcie medycyny ostatnich dziesięcioleci w tym zakresie.

Analizę i późniejsze monitorowanie zakażenia przewlekłego można podzielić na kilka etapów. Są to:

- badanie przesiewowe i rozpoznanie,
- potwierdzenie (złoty standard),
- oznaczenie typu (szczepu),
- oznaczenie ilościowe,
- leczenie (oznaczenie typu/szczepu),
- oznaczenie ilościowe,
- kontynuacja leczenia bądź zaprzestanie w przypadku wyeliminowania choroby.

Przesiewowe badania zakażeń wirusowych pozwalają na ich wykrywanie w chwili, gdy w krwi obecne są przeciwciała skierowane przeciwko konkretnemu patogenowi lub białka strukturalne określonego wirusa. Jednymi z najpowszechniej stosowanych metod przesiewowych są metody immunoenzymatyczne typu ELISA, czyli metody immunosorpcji koniugowanych enzymów (*enzyme-linked immunosorbent assay*) [1]. Są one obecnie dość rozbudowaną grupą metod analitycznych o dość dużej czułości, specyficzności i bardzo szerokim spektrum zastosowań. U podstaw metody leżą specyficzne reakcje między antygenem i przeciwciałem. W zależności od warunków można stosować zarówno antygen czy przeciwciało nieznakowane, jak i koniugowane ze znacznikami enzymatycznymi. ELISA kompetycyjna (*competitive*) stosowana jest do antygenów, które mają jeden epitop, tj. fragment rozpoznawany przez specyficzne przeciwciało, natomiast ELISA niekompetycyjna (*non-competitive*), przeznaczona jest do wykrywania obecności również większych antygenów [1]. Ponadto, w zależności od sposobu przeprowadzenia reakcji i rodzaju użytych przeciwciał, wyróżnia się:

- metody bezpośrednie, z użyciem przeciwciała bezpośrednio skierowanego w stosunku do badanego antygenu, znakowanego enzymem,
- metody pośrednie dwu- i trzystopniowe, z użyciem wtórnych przeciwciał koniugowanych najczęściej ze znacznikami, wyprodukowanych w stosunku do przeciwciał pierwotnych.

Do najczęściej stosowanych metod należą: ELISA bezpośrednia kompetycyjna (*direct competitive ELISA*), pośrednia niekompetycyjna (*indirect competitive ELISA*), test wykrywania specyficznych przeciwciał (*antibody class capture ELISA*) oraz ELISA kanapkowa (*double antibody sandwich ELISA*) [1].

Należy tu również zauważyć, że umiejętność sprzęgania przeciwciała z fluorochromem bądź enzymem stała się podstawą do identyfikacji różnych chorób nie tylko wirusowych. Istnieje cała gama technik pozwalających rozpoznać schorzenie posługując się również preparatami mikroskopowymi (immunohistochemia).

Jeśli wynik testu przesiewowego jest pozytywny, w dalszej kolejności uzyskany wynik potwierdza się wysoce czułymi metodami uznanymi za tzw. złoty standard. W zależności od typu wirusa, za złoty standard przy zakażeniach przyjmuje się: HIV – *Real-Time* PCR; HBV, HCV – *Real-Time* PCR; HPV – *southern blot*.

Należy zwrócić uwagę, że zakażenia wyżej wymienionymi wirusami wykrywane są najczęściej w późnej fazie choroby i wymienione metody stosuje się również do potwierdzeń zakażeń chronicznych, a w trakcie leczenia również używa się metody *Real-Time* PCR lub rzadziej cytofluorymetrii przepływowowej albo sekwencjonowania. Preparaty histologiczne uzyskane z bioptatu mogą być również użyte do badań metodą ELISA lub sekwencjonowania.

Technika hybrydyzacji kwasów nukleinowych, jakkolwiek wypierana obecnie przez metodę PCR, była uznawana do niedawna za złoty standard ze względu na możliwość stwierdzenia obecności i/lub identyfikacji wielu białek wirusa (*western blot*) lub jego kwasów nukleinowych (*southern blot*). Metoda hybrydyzacji opiera się na zjawisku łączenia się rozdzielonych poprzez elektroforezę białek (*western blot*) lub kwasów nukleinowych (*nothern blot*, *southern blot*) w kompleksy, w których jedna cząsteczka jest „sondą molekularną”, a druga fragmentem DNA lub białka patogenu [2].

Metoda *western blot* składa się z kilku etapów. Pierwszy etap polega na uzyskaniu homogenatu komórkowego lub ekstraktu białkowego i uwolnieniu białek komórkowych z badanego preparatu. Następnie przeprowadza się elektroforezę próbek na denaturującym żelu poliakrylamidowym, co daje w efekcie rozdział wszystkich białek z uzyskanego ekstraktu lub homogenatu według ich masy cząsteczkowej. Następnym etapem jest przeniesienie białek na odpowiednią membranę wykonaną najczęściej z nitrocelulozy. Niekiedy stosowany jest tak zwany transfer kapilarny poprzez umieszczenie membrany pomiędzy żelem a stosem fragmentów bibuły, które zasysając bufor z żelu, powodują naniesie-

nie białek ekstraktu na membranę [2]. Do przeniesienia białek na membranę można wykorzystać również pole elektryczne. Wtedy jest możliwe posłużenie się tzw. elektrotransferem. Kolejnym etapem jest zabezpieczenie membrany przed niespecyficznym wiązaniem się do niej przeciwciał, czyli blokowanie. Blokowanie zachodzi podczas inkubacji membrany w roztworze albuminy z surowicą wołową lub odtłuszczonym mlekiem oraz detergentem Tween. Po zakończeniu blokowania inkubuje się membranę w roztworze przeciwciał lub antygenów. Zwykle stosuje się dwa przeciwciała. Pierwsze to przeciwciało pierwszorzędowe które wiąże się specyficznym z poszukiwanym białkiem. Ponieważ pierwsze przeciwciało jest dodawane w dużej ilości, jego nadmiar należy dokładnie usunąć przez odpłukanie odpowiednim buforem. Następnie wykonuje się blokowanie niespecyficznym miejsc wiążących na membranie, które mogły pozostać po odpłukaniu pierwszego przeciwciała, po czym podaje się roztwór drugiego (drugorzędowego) przeciwciała skierowanego przeciwko przeciwciału pierwszorzędowemu. Przeciwciało pierwszorzędowe wiąże się z przeciwciałem drugorzędowym, które jest znakowane, co umożliwia jego detekcję. Elementem znakującym może być radioizotop, barwnik fluorescencyjny lub enzym katalizujący. W zależności od stosowanego barwnika efekt reakcji ogląda się na kliszy, bezpośrednio na membranie lub przy pomocy detektora CCD sprzężonego z kamerą lub aparatem fotograficznym. Możliwe jest również znakowanie przeciwciała pierwszorzędowego, lecz ze względu na niską czułość, jest to rzadziej stosowane [2].

Odmianą techniki *western blot* jest wariant, w którym w badanym materiale (np. surowica) określa się obecność przeciwciał wytworzonych przeciwko antygenom poszukiwanego patogenu (przeciwciała z badanej surowicy traktuje się wtedy jako odpowiednik przeciwciał pierwszorzędowych). Reakcję taką można przeprowadzać techniką *western blot*, jednakże częściej wykorzystuje się metodę ELISA.

Podobną metodą, służącą do wykrywania obecności specyficznych fragmentów DNA, jest *southern blot*. Metoda ta uznana została jako złoty standard przy wykrywaniu infekcji HPV, choć obecnie jest zastępowana z dużym powodzeniem przez metodę *Real-Time PCR*, pozwalającą na identyfikację nie tylko typów wirusa, ale również na określenie aktywności niektórych wysokoonkogenicznych typów (np. 16, 18) poprzez wykrywanie obecności mRNA wirusowego powstającego w trakcie replikacji wirusa [3].

Podczas przeprowadzania reakcji *southern blot* izoluje się z badanego materiału całkowite DNA, które następnie tnie się na fragmenty używając do tego celu enzymów restrykcyjnych. Taką mieszaninę fragmentów DNA o różnej długości rozdziela się według wielkości na żelu agarozowym bądź poliakrylamidowym. Następnie żel umieszcza się w buforze alkaicznym. Alkalizacja środowiska powoduje, że DNA ulega denaturacji, czyli rozdzieleniu na pojedyncze nici. W roztworze alkaicznym przeprowadza się również następny etap, czyli

przeniesienie (transfer) DNA z żelu na filtr nitrocelulozowy lub błonę nylonową. Transfer może być wspomagany poprzez nałożenie na filtr silnie nasiąkającego materiału (np. fragmentów bibuły), co powoduje „zasysanie” buforu i jednocześnie przenoszenie zdenaturowanego DNA na błonę nylonową. Przenoszenie można też usprawnić i przyspieszyć przez przyłożenie napięcia elektrycznego. Ponieważ DNA posiada ładunek ujemny, będzie przemieszczać się w kierunku elektrody dodatniej. Po przeprowadzeniu transferu błonę przenosi się i zanurza w roztworze z obecną sondą hybrydazyjną, sprzęgniętą najczęściej z radioizotopem. Znakowanie najczęściej wykonuje się wykorzystując radioizotopy fosforu wstawione w miejsce atomów nie wykazujących promieniowania. Po przeprowadzeniu hybrydazyjacji odpłukuje się nadmiar roztworu z sondą, a DNA uwidacznia się na kliszy lub w liczniku scyntylacyjnym. Powszechnie stosuje się również techniki nieradioizotopowe w znakowaniu sond molekularnych, polegające na dołączaniu biotyny lub digoksygeniny [3].

W momencie potwierdzenia długotrwałego zakażenia wirusem oraz w przypadku udowodnionego świeżego zakażenia, w celu dalszej diagnostyki oraz monitorowania choroby można posłużyć się dwiema metodami: sekwencjonowaniem – w celu stwierdzenia, jakim typem/szczepem wirusa pacjent został zakażony, oraz metodą *Real-Time* PCR – aby określić poziom wirusii.

W przypadku świeżego wykrycia długotrwałej choroby ważniejsze jest określenie wirusii i szybkie działanie farmakologiczne niż określanie szczepu. W tym celu można zastosować odmianę metody PCR, pozwalającą na bardzo dokładne określenie ilości wirusa w badanej próbce.

Technika PCR należy do najczęściej obecnie stosowanych technik biologii molekularnej. W znaczny sposób przyspieszyła ona uzyskiwanie wyników w pracach nad poznaniem struktury i funkcji genów. Technika ta nie tylko umożliwia specyficzną amplifikację *in vitro* wybranych odcinków DNA i RNA przy zachowaniu wysokiej czułości. Pozwala też amplifikować DNA pojedynczych genów ponad milion i więcej razy mimo obecności innych sekwencji. Możliwość amplifikacji pojedynczych matryc daje również tej metodzie przewagę nad innymi sposobami, podczas diagnostyki przewlekłych zakażeń wirusowych, gdzie ilość matrycy (wirusowego materiału genetycznego) niekiedy może być bardzo znikoma [4].

Przy pomocy techniki PCR można nie tylko stwierdzić, czy poszukiwana sekwencja znajduje się w próbce. Technika ta pozwala również na szybkie namnożenie określonego fragmentu DNA, o określonej długości.

Cały proces reakcyjny odbywa się w specjalnych urządzeniach – termocyklarach, pozwalających na szybkie (nawet kilka stopni/sekunde), precyzyjne i cykliczne zmiany oraz utrzymanie ściśle określonej temperatury w każdej badanej próbce. Do każdej badanej próbki zawierającej wyizolowany uprzednio materiał genetyczny przed przeprowadzeniem reakcji dodaje się dwóch krótkich odcinków DNA, zwanych starterami (muszą być komplementarne do sekwencji okala-

jącej z dwóch stron fragment, który chce się powielić), substraty do syntezy DNA (trifosforany deoksyrybonukleozydów), enzym zdolny do jej przeprowadzania (termostabilną polimerazę DNA) i odpowiedni bufor (roztwór utrzymujący stałe pH w próbce), a także jony magnezu Mg^{++} jako kofaktor polimerazy. Powstała mieszanina umieszczana jest w termocyklerze. Na początku reakcji próbka jest podgrzewana (do około $95^{\circ}C$) w celu denaturacji i uzyskania jednoniciowego DNA, a następnie szybko schładzana do temperatury, w której zachodzi przyłączanie starterów do odpowiedniej nici (między 50 a $65^{\circ}C$). Ponieważ każdy starter ma w swoim składzie różne nukleotydy – temperatura przyłączania może być inna dla każdej stosowanej pary starterów. Następnie próbka jest ponownie podgrzewana do temperatury optymalnej dla działania polimerazy DNA (około $70^{\circ}C$), która wydłuża startery i dobudowuje drugą nić DNA od miejsca zakończenia startera. Następnie cały cykl zmian temperatury powtarza się określoną ilość razy (18 – 45 , w zależności od ilości dodanego DNA i typu reakcji) tak, aby uzyskać odpowiednią ilość produktu do wizualizacji. Warunkiem zajścia całej reakcji jest komplementarność starterów do DNA znajdującego się w badanej próbce [4]. Po zakończeniu reakcji produkt lub produkty (niekiedy niespecyficzne) poddawane są rozdzielaniu elektroforetycznemu w żelu agarozowym lub poliakrylamidowym o odpowiedniej gęstości (z zależności od długości oczekiwanego produktu reakcji). Pozwala to na sprawdzenie, czy w badanej próbce było DNA/RNA, do którego pasowały startery oraz – jeśli na żelu pojawi się produkt – czy jego długość odpowiada opisanej przez producenta lub określonej podczas projektowania starterów. Do barwienia żeli agarozowych stosuje się głównie bromek etydyny lub, rzadziej, SYBR Green – barwniki interkalujące się między dwie nici DNA. Bromek etydyny daje różowo-pomarańczową fluorescencję pod wpływem promieniowania UV, SYBR Green daje barwę zieloną. Produkty PCR rozdzielane na żelach poliakrylamidowych uwidacznia się stosując głównie barwienie azotanem srebra oraz bromkiem etydyny.

Przy rozdzielaniu mieszaniny reakcyjnej produktów PCR należy zastanowić się nad metodą rozdzielania. Stosowanie żeli poliakrylamidowych oraz barwienie azotanem srebra daje możliwość wykrycia fragmentów DNA różniących się o kilka nukleotydów, czego nie zapewnia rozdział z użyciem agarozy, gdzie łatwo dostrzegalne różnice między produktami reakcji PCR są widoczne dopiero kilkunastu-kilkudziesięciu nukleotydach. Ponadto żele poliakrylamidowe można po wysuszeniu przechowywać, czego nie można wykonać z żelami agarozowymi.

W przypadku wirusów, które jako materiał genetyczny posiadają RNA, niezbędne jest przed reakcją PCR przeprowadzenie tak zwanej odwrotnej transkrypcji (RT), czyli „przepisania” RNA wirusa na DNA (tak zwane cDNA – komplementarne DNA). W mieszaninie reakcyjnej używa się wówczas specjalnej polimerazy „odwrotnej transkryptazy” oraz tylko jednego startera. Sama reakcja zaś zachodzi w takim samym termocyklerze, jak w przypadku zwykłej reakcji

PCR, z tą różnicą, że stosuje się tylko jedną temperaturę dla całej reakcji [5]. Po przeprowadzeniu reakcji odwrotnej transkrypcji, jej produkty służą jako matryca dla normalnej reakcji PCR.

Mając na uwadze fakt, że podczas przewlekłej infekcji wirusowej liczba kopii wirusa może pod wpływem farmakoterapii ulegać znacznym wahaniom, zaistniała potrzeba znalezienia metody, która pozwala na detekcję przede wszystkim bardzo małych ilości DNA/RNA wirusowego. Przed wynalezieniem metody PCR, w czasie rzeczywistym dla detekcji małej ilości matryc wirusów służyła i, w dalszym ciągu jest stosowana, metoda *Nested* PCR (zagnieżdżony PCR, wewnętrzny PCR). Metodę zaprojektowano w celu zwiększenia czułości standardowej techniki PCR. Metoda polega na wykonaniu dwuetapowej amplifikacji, w której produkt amplifikacji uzyskany w pierwszej reakcji PCR, stanowi matrycę powielaną w drugim PCR, co znacznie zwiększa czułość metody, jednocześnie bez obniżenia jej specyficzności. W drugim etapie wykorzystuje się pary starterów zlokalizowane wewnątrz fragmentu DNA powielonego przy pierwszym PCR. Nazywa się je starterami wewnętrznymi – dla odróżnienia od pierwszej pary starterów, określanej mianem starterów zewnętrznych. Do reakcji *Nested* PCR używa się tych samych odczynników, co do standardowego PCR, z jedną różnicą, polegającą na użyciu innych starterów. Zaletą tej metody jest bardzo wysoka czułość i niskie koszty. Wadą – możliwość łatwego zanieczyszczenia próbki i uzyskania niespecyficznych produktów. Niemniej metodę tą wykorzystuje się z powodzeniem w wielu laboratoriach diagnostycznych i naukowych ze względu na wysoki koszt zakupu urządzenia do reakcji *Real-Time* [4].

Najbardziej dziś zaawansowaną techniką PCR, jest tak zwany *Real-Time* PCR, czyli PCR w czasie rzeczywistym. Jest to metoda ilościowa, która pozwala na obserwację amplifikacji w czasie rzeczywistym, gdzie podczas reakcji, wraz z przyrostem ilości produktów PCR, wzrasta intensywność fluorescencji barwnika rejestrowanej przez detektor. Odzwierciedlone jest to w postaci wykresu na monitorze komputera [5]. Głównym zastosowaniem tej metody jest określenie liczby cząsteczek wirusów w materiałach klinicznych. Metoda umożliwia również monitorowanie postępów leczenia. Określenie wyjściowego poziomu wirerii jest wskazaniem koniecznym do rozpoczęcia właściwego leczenia, a późniejsze monitorowanie stanu pacjenta warunkuje jego terapię [6]. Mechanizm działania techniki *Real-Time* PCR polega bądź na użyciu barwnika wbudowanego się pomiędzy nici DNA podczas reakcji i świecącego po naświetleniu wiązką światła o określonej długości (np. SYBR Green), bądź na użyciu specjalnie skonstruowanych sond przypominających starter, lecz znakowanych fluorescencyjnie. Taką sondę projektuje się tak, ażeby jej przyłączenie do matrycy zachodziło pomiędzy miejscami przyłączenia się starterów. Do samej reakcji używa się tych samych odczynników, co do standardowej reakcji PCR, z tą różnicą, że dodatkowo dodaje się do mieszaniny reakcyjnej sondę lub barwnik (obecnie większość używanych sond jest typu TaqMan, natomiast najpopularniejszym

barwnikiem jest SYBR Green II). Barwnik używany do metody *Real-Time* PCR jest niespecyficzny, co znaczy, że jeśli do próbówki reakcyjnej dostanie się obce DNA, to nie będzie wiadomo, z którego materiału pochodzi fluorescencja [7]. Zaletą zaś jest stosunkowo niski koszt. Ogólnie, zaletą stosowania sond jest ich wysoka specyficzność i brak zależności od długości produktu. Wadą zaś wysoki koszt powodowany przez konieczność syntezy osobnej sondy do każdej nowej matrycy.

Metoda *Real-Time* PCR szybko stała się bardzo pożytecznym narzędziem w rękach naukowców i diagnostów. Technika oznaczania obecności (ilości) DNA w czasie rzeczywistym pojawiła się na początku lat 90. XX w. W pierwszych doświadczeniach do reakcji jako barwnika użyto bromku etydyny i światła UV, co znacznie komplikowało oznaczanie ilości DNA (światło UV niszczyło polimerazę, a bromek etydyny zakłócał działanie enzymu). W miarę rozwoju techniki zaczęto konstruować sondy molekularne znakowane innymi barwnikami oraz inne rodzaje światła do detekcji. Pierwsze komercyjne urządzenia do urządzenia do reakcji *Real-Time* PCR zostały wyprodukowane przez Applied Biosystems oraz Roche. Prawie każde urządzenie do reakcji *Real-Time* jest wyposażone w termocykler, działający na takich samych zasadach, jak przy klasycznej reakcji PCR. Warto tu wspomnieć o zestawie do reakcji *Real-Time*, który jako źródło ciepła i chłodzenia wykorzystuje powietrze, a jako próbówki reakcyjne specjalne kapilary (Roche). Ponadto dla detekcji w czasie rzeczywistym urządzenie do reakcji *Real-Time* jest wyposażone w źródło światła, fotodetektor odbierający sygnał płynący z próbek i specjalne oprogramowanie, mające na celu zarówno kontrolę nad aparatem, jak i analizę wyników [8].

Zadaniem światła jest zapewnienie odpowiedniego wzbudzenia barwnika połączanego z sondą. Obecnie najczęściej jako źródło światła wykorzystuje się lampę halogenową – z powodu szerokiego spektrum emisji fal o różnej długości lub diodę luminescencyjną LED zapewniającą bardzo długi czas pracy, lecz o węższym spektrum emisji fali świetlnej.

Fotodetektory to obecnie bardzo skomplikowane systemy zbudowane nie tylko z elementów światłoczułych, lecz także z filtrów optycznych i lusterek przepuszczających tylko światło o określonej długości.

Oprogramowanie załączone do aparatów przeprowadzających reakcję *Real-Time* PCR pozwala w zależności od producenta tylko na zaprogramowanie aparatu do wykonania reakcji na określonej ilości próbek i analizy wyników (system zamknięty) lub jest przystosowane do pełnej kontroli użytkownika (system otwarty). W systemie otwartym jest możliwość zaprogramowania aparatu według własnych potrzeb i analizy wyników, a nierzadko również konstruowania sond i starterów.

Wyniki reakcji PCR w czasie rzeczywistym mogą być przedstawione zarówno w postaci wykresów pokazujących przebieg reakcji poszukiwanej sekwencji, jak i w postaci tabeli z określonym *Ct* (*threshold cycle*), czyli liczbą okre-

ślającą kinetykę reakcji i zależną od ilości początkowej poszukiwanej sekwencji (czyli jej obecności) [8].

Metoda *Real-Time* PCR pozwala na precyzyjne i szybkie rozróżnienie, oznaczenie obecności oraz ilości (nawet mniej niż pięciu kopii poszukiwanej sekwencji) kwasów nukleinowych nawet w bardzo małej próbce. Dzięki temu, że jest przeprowadzana w systemie zamkniętym, nie wymaga żadnych dodatkowych manipulacji, co mogłyby zwiększyć zagrożenie występowania zanieczyszczeń, które mogą zakłócić ostateczny wynik. Jest to również metoda stosunkowo szybka i wydajna, choć podstawowa liczba cykli jest większa o około 10 cykli, niż w przypadku „standardowego” PCR. Ze względu na te właściwości, *Real-Time* PCR może być wykorzystywana do wykonywania analiz nie tylko na obecność fragmentów DNA pochodzących z bakterii, wirusów, grzybów w badanej próbce, ale też do ich ilościowego oznaczania. Określenie ilości wirusowego DNA jest pożytecznym wskaźnikiem rozwoju infekcji, relacji wirus–gospodarz oraz odpowiedzi na antywirusową terapię.

Kolejną metodą pozwalającą na określenie, jaki typ/szczep danego wirusa pozostaje w organizmie pacjenta oraz, co ważniejsze, czy wirus nie uległ podczas długotrwałego zakażenia jakiejś poważnej mutacji – jest sekwencjonowanie kwasów nukleinowych.

Metoda sekwencjonowania, czyli określania sekwencji nukleotydowej, jest obecnie bardzo zautomatyzowana i praktycznie nie wykonuje się już sekwencjonowania na tzw. żelach poliakrylamidowych wraz z użyciem izotopów. Niemniej należy przedstawić ogólną metodykę tej techniki. Istnieją dwie metody określania sekwencji nukleotydowej.

1. Metoda opracowana przez Maxama i Gilberta – metoda sekwencjonowania DNA wykorzystująca specyficzną, chemiczną degradację DNA. W metodzie tej fragment DNA poddany sekwencjonowaniu musi być znakowany radioaktywnie izotopem fosforu na końcu 5', a następnie poddany 4, osobnym reakcjom rozrywania łańcucha DNA w miejscach występowania określonych zasad. W pierwszym etapie następuje jedynie modyfikacja specyficznych dla danego odczynnika zasad azotowych określonych nukleotydów. W wyniku modyfikacji możliwe jest ich selektywne oderwanie od reszt cukrowych, a w miejscach pozbawionych zasad nieć DNA ulega pęknięciu (miejsce cięcia znajduje się za zmodyfikowanym nukleotydem). Uzyskane w ten sposób fragmenty z 4 niezależnych reakcji, rozdziela się na elektroforetycznie na żelu poliakrylamidowym, a sekwencję odczytuje się przy pomocy autoradiografii [9].
2. Metoda opracowana przez Gilberta i Sangera – sekwencjonowanie DNA; wykorzystuje polimerazę DNA i fosforany dideoksynukleotydów (deoksynukleotydy bez grupy -OH w pozycji 3') do zatrzymania syntezy matrycy. Podczas 4 osobnych reakcji (w każdej z 4 próbek jest dideoksynukleotyd jednego rodzaju) znakowany izotopowo starter sekwencyjny,

po przyłączeniu się do jednoniciowej matrycy DNA, zaczyna być wydłużany przez polimerazę. Wydłużanie kończy się, jeśli do nowopowstającej nici wbudowany zostanie dideoksynukleotyd. W ten sposób otrzymuje się fragmenty DNA różnej długości zakończone określonym nukleotydem. Produkty reakcji rozdziela się elektroforetycznie w osobnych ścieżkach na żelu poliakrylamidowym, co powoduje ich segregację pod względem wielkości. Sekwencję odczytuje się przy pomocy autoradiografii [10].

Obecnie metodę Sangera zmodyfikowano i nie stosuje się już znakowanych izotopowo starterów. W ich miejsce do mieszaniny reakcyjnej dodaje się znakowane fluorescencyjnie dideoksynukleotydy, z których każdy posiada przyłączony inny barwnik. Sama zasada zakończenia wydłużania syntezy nowej nici nie zmieniła się. Synteza każdej nowopowstającej nici kończy się, jeśli zostanie do niej wbudowany znakowany fluorescencyjnie dideoksynukleotyd. Rozdział produktów reakcji jest obecnie zautomatyzowany i następuje w specjalnych urządzeniach (sekwenatorach) posiadających jako źródło światła laser wzbudzający fluorescencję barwników przyłączonych do nowych nici DNA, które migrując w specjalnym żelu rozdzielają się według wielkości.

Niegdyś stosowane sekwenatory wymagały nie tylko przygotowania manualnego od przeprowadzającego reakcję. W pierwszych urządzeniach wykorzystujących znakowane fluorescencyjnie startery jako medium, w którym odbywał się rozdział służył odpowiedziany żel poliakrylamidowy wylany pomiędzy dwie duże i ciężkie tafle specjalnego szkła. Wykorzystywane szkło musiało być myte i płukane specjalnymi środkami oraz wodą dejonizowaną. Odczyt odbywał się przy pomocy specjalnego skanera umieszczonego w sekwenatorze. Obecnie najpopularniejsze stosowane sekwenatory kwasów nukleinowych wykorzystują do rozdziału kwasów nukleinowych płynne żele umieszczone w kapilarach, a odczyt następuje przy pomocy na stałe umieszczonego fotodetektora [10].

Również w przypadku sekwenatorów cały proces rozdziału, pracy aparatu oraz analizy wyników możliwy jest wyłącznie przy pomocy specjalnego oprogramowania dołączonego przez producenta. W ostatnich latach nieocenioną pomocą w analizie wyników służą również duże bazy danych zamieszczone w internecie. Porównanie sekwencji nukleotydowych analizowanych wirusów może dać bardzo szybko odpowiedź na pytanie, z jakim typem wirusa ma się do czynienia oraz jakie są jego cechy szczególne [11].

Podsumowanie

W ciągu kilkunastu ostatnich lat medycyna i diagnostyka medyczna zrobiły bardzo duży postęp w rozpoznawaniu, analizie i monitorowaniu przewlekłych chorób wirusowych, takich jak HCV, HPV czy HIV. Dzięki temu postępowi możliwe stało się dokładne określenie dawki farmaceutyków które przyjmuje chory, mo-

onitorowanie postępu/regresji choroby oraz określanie, jaki typ/szczep wirusa zaatakował danego człowieka. Dzisiejsza technika i metody biologii molekularnej może nie są jeszcze w pełni doskonałe, lecz pozwalają na lepsze życie i leczenie pacjentów z przewlekłymi chorobami wirusowymi.

Bibliografia

1. Dieffenbach CW, Dveksler GS, *PCR Primer: A Laboratory Manual Second Edition*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York 2003.
2. Raszka A, Ziemińska A, Wiechetek A, *Metody I techniki biologii molekularnej w biotechnologii środowiskowej*. Czas Tech. 2009; 106: 101–114.
3. www.slidefinder.net, Najważniejsze odmiany techniki PCR, [01.07.2012].
4. Valasek MA, Repa JJ, *The Power of Real-time PCR*. Adv Physiol Educ. 2005; 29: 151–159.
5. Radwan M, Jonszta D, Kosz-Vnenchak M, *Metoda PCR w czasie rzeczywistym (Real-time PCR) – wyzwania i perspektywy*. Diag Laborat. 2008; 6: 10–17.
6. Romanowski T, Markiewicz A, Bednarz N et al, *Geny metabolizmu podstawowego jako geny referencyjne w ilościowym oznaczaniu ekspresji genów metodą real-time PCR*. Postępy Hig Med Dośw. 2007; 61: 500–510.
7. Mackay IM, Arden KE, Nitsche A, *Real-time PCR in Virology*. Nucleic Acids Res. 2002; 30: 1292–1305.
8. www.appliedbiosystems.com, [01.07.2012].
9. Maxam AM, Gilbert W, *A New Method for Sequencing DNA*. Proc Natl Acad Sci USA. 1977; 74: 560–564.
10. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR, *DNA Sequencing with Chain-terminating Inhibitors*. Proc Natl Acad Sci USA. 1977; 74: 5463–5467.
11. Saccone C, Pesole G, *Handbook of Comparative Genomics: Principles and Methodology*. Wiley-Liss, New York 2003.

The latest molecular biology techniques in prevention of chronic viral infections

Abstract: Progress either in medicine or molecular biology technics induces perspective possibilities of control and complication prevention in case of chronic viral diseases such as viral hepatitis and HIV infection. Accurate control of HBV viremia and seroconversion level during infection was impossible several years ago. For the last couple of years molecular biology methods for HCV, HBV and HIV infection have been generally accepted and used for diagnosis, even without antibodies detectable in blood. Infection monitoring technics, such as Real-Time PCR, nucleic acid sequencing have been usefull and *flow cytometry*, have been useful in rapid reacting on changes in the infected patient state. Each of the mentioned technics provides either the infection detection on the level unavailable in the past, or efficient observation and, consequently, proper treatment of the

infection. Real-Time PCR allows to define the quantity of viral molecules in the volume of tested blood sample. Sequencing technic provides viruses type and virulence definition. The combination of all the other hand the cytofluorometry technic allows to define precisely the quantity of viral proteins presented on the infected cells and detect other blood proteins expression. The combination of all those technics provides accurate definition of virus amount and efficient treatment.

Key words: ELISA, PCR, Real-Time PCR, sequencing, hybridization, viral infections