



Warszawa, 12 kwietnia 2017

Nowa metoda analizy w rekordowo szybkim przyrządzie do badania DNA

W diagnostyce medycznej znaczenie badań kodu genetycznego rośnie z dnia na dzień, a współczesna biologia molekularna nie mogłaby bez nich funkcjonować. Obecne techniki analizy DNA trudno jednak nazwać doskonałymi. Podczas prac nad rekordowo szybkim przyrządem do badań genetycznych firma Curiosity Diagnostics, spin-off warszawskiego Instytutu Chemii Fizycznej PAN akcelerowany w grupie Scope Fluidics, opracowała nowy sposób analizy DNA, łączący kluczowe zalety dwóch obecnie najczęściej stosowanych metod.

Diagnostyka molekularna odgrywa coraz większą rolę w dzisiejszej medycynie: w wykrywaniu chorób genetycznych, monitorowaniu skuteczności terapii antynowotworowych, w walce z agresywnymi infekcjami bakteryjnymi, gdzie wczesna identyfikacja gatunku bakterii zagrażającej pacjentowi może zadecydować o jego życiu. W należącej do grupy Scope Fluidics firmie Curiosity Diagnostics (CD) opracowano – przy udziale Instytutu Chemii Fizycznej Polskiej Akademii Nauk (IChF PAN) w Warszawie – nową technikę analizy DNA: synergiczny PCR (sPCR). Metoda, szczególnie opisana we wspólnej publikacji naukowców CD i IChF PAN w znanym czasopiśmie naukowym „Scientific Reports”, łączy zalety dwóch obecnie najpopularniejszych technik analizy kodu genetycznego i może być zaimplementowana na powszechnie dostępnej aparaturze.

„Zaproponowana przez nas technika badania DNA narodziła się podczas prac nad nowatorskim przyrządem analitycznym PCR|ONE, za pomocą którego badanie kodu genetycznego można zrealizować nawet w siedem minut. To czas ponaddziesięciokrotnie krótszy od wymaganego w klasycznych rozwiązaniach”, mówi prof. dr hab. Piotr Garstecki (IChF PAN, CD).

Próbki przekazywane do badań DNA zwykle zawierają tak mało materiału genetycznego, że jego analiza za pomocą typowych technik laboratoryjnych nie byłaby możliwa. Po oczyszczeniu próbki z zanieczyszczeń pierwszym krokiem jest więc zwiększenie ilości materiału genetycznego, nierzadko nawet miliard razy. Stosuje się w tym celu łańcuchową reakcję polimerazy (Polymerase Chain Reaction, PCR).

Reakcja PCR polega na cyklicznym ogrzewaniu i schładzaniu roztworu zawierającego powielany materiał genetyczny oraz odpowiednie reagenty: polimerazę (czyli enzym katalizujący reakcję syntezy DNA), nukleotydy niezbędne do budowy nici DNA oraz startery, czyli krótkie fragmenty DNA zdolne do przyłączania się do początku i końca namnażanego fragmentu kodu (np.

konkretnego genu). Każdy cykl reakcji PCR składa się z dwóch faz: podgrzewania i schładzania. W pierwszej fazie, w temperaturze ok. 95 stopni Celsjusza, pękają mostki wodorowe i dotychczas dwuniciowy łańcuch DNA rozdziela się na dwie pojedyncze nici. W fazie chłodnej, w temperaturze ok. 50 stopni, startery z roztworu przyłączają się do odpowiednich miejsc na niciach, po czym polimeraza dobudowuje między nimi nić komplementarną. Po zakończeniu każdego cyklu dwuniciowych fragmentów DNA jest (w idealnych warunkach) dwukrotnie więcej niż na początku.

Reakcję PCR stosuje się zarówno do wykrywania określonych fragmentów kodu genetycznego, jak też do szacowania pierwotnej ilości materiału genetycznego. Pomiary ilościowe przeprowadza się najczęściej za pomocą (analogowej) techniki znanej jako real-time PCR. Próbkę poddaje się namnażaniu i w kolejnych cyklach sprawdza się ilość DNA za pomocą fluorescencyjnych barwników. Gdy intensywność zmian przekroczy ustalony próg, na podstawie przeprowadzonej liczby cykli szacuje się pierwotną ilość materiału genetycznego. Technika analogowego PCR jest stosunkowo prosta, jednak z uwagi na wrażliwość reakcji PCR na nawet pojedyncze cząsteczki zanieczyszczeń wymaga uważnego, ciągłego kalibrowania.

Inna metoda to cyfrowy PCR. Próbkę dzieli się na dziesiątki lub setki tysięcy, a nierzadko nawet na miliony jednakowych co do objętości części. Następnie w każdej części przeprowadza się procedurę powielania materiału genetycznego i sprawdza, czy pojawia się ustalona zmiana. Ponieważ podczas dzielenia próbki cząsteczki DNA trafią tylko do niektórych podobjętości, zmiana nie wystąpi wszędzie. Pierwotną ilość DNA można więc oszacować na podstawie liczby zarejestrowanych sygnałów. Zaletą techniki cyfrowej jest brak konieczności kalibrowania aparatury. Z uwagi na wymóg równoległego prowadzenia ogromnej liczby reakcji, sprzęt do badań jest jednak dość drogi i w laboratoriach występuje znacznie rzadziej niż aparatura do analogowego PCR.

Synergistyczny PCR, technika zaproponowana przez CD i IChF PAN, łączy najważniejsze zalety metod analogowych i cyfrowych. Aby otrzymać wiarygodne pomiary, próbkę wystarczy rozcieńczyć na zaledwie kilkanaście, najwyżej kilkadziesiąt części. Tak zaprojektowana metoda nie wymaga kalibrowania.

„Niewielka liczba podobjętości, charakterystyczna dla naszej techniki, ma konkretne przełożenie praktyczne. Oznacza bowiem, że do przeprowadzenia analizy wystarczą standardowe płytki wielodołkowe, wykorzystywane w popularnych urządzeniach do analogowego PCR”, podkreśla Paweł Dębski, doktorant IChF PAN, który rozwijał metodę sPCR w Curiosity Diagnostics.

Z uwagi na małą liczbę podziałów próbki, technika sPCR jest łatwiejsza do przeprowadzenia i nieco szybsza niż odmiany cyfrowe. W porównaniu do technik analogowych wymaga jednak większej ilości reagentów. Zdaniem warszawskich naukowców, z tego powodu nie zastąpi odmiany analogowej. Może być jednak jej cennym uzupełnieniem, ponieważ jako niewymagająca kalibracji pozwoli laborantom samodzielnie i regularnie sprawdzać poprawność pomiarów analogowych.

„Opracowana przez nas technika badania DNA została opatentowana. Chcemy jednak podkreślić swobodę jej używania w celach niekomercyjnych. A ponieważ korzysta ona z typowej, popularnej aparatury do badań genetycznych, żeby zacząć ją zastosować wystarczy sięgnąć po nasz artykuł”, zaznacza prof. Garstecki.

Technika sPCR powstała jako integralny składnik PCR|ONE, innowacyjnego urządzenia grupy Scope Fluidics, przeznaczonego do szybkich analiz DNA. W standardowych aparatach PCR do podgrzewania i schładzania materiału genetycznego wykorzystuje się stosunkowo wolną dyfuzję ciepła między próbką a stykającym się z nią dużym blokiem naprzemiennie podgrzewanego bądź schładzanego materiału. W PCR|ONE do błyskawicznego podgrzania próbki używa się promieniowania podczerwonego. Zmodyfikowano także mechanizm dyfuzyjnego schładzania: stosowany w tym celu blok jest mniejszy niż w tradycyjnych przyrządach i utrzymywany w stałej, ściśle kontrolowanej temperaturze. W wyniku wprowadzonych udoskonaleń technicznych i analitycznych, testowane obecnie prototypowe egzemplarze PCR|ONE są w stanie zakończyć badanie DNA w czasie poniżej kwadransa, a samą reakcję PCR realizują w zaledwie siedem minut. Pierwsze egzemplarze PCR|ONE trafią na rynek najprawdopodobniej w ciągu 2-3 lat.

Informacja prasowa zrealizowana ze środków europejskiego grantu ERA Chairs w ramach programu Horizon 2020.

Instytut Chemii Fizycznej Polskiej Akademii Nauk (<http://www.ichf.edu.pl/>) został powołany w 1955 roku jako jeden z pierwszych instytutów chemicznych PAN. Profil naukowy Instytutu jest silnie powiązany z najnowszymi światowymi kierunkami rozwoju chemii fizycznej i fizyki chemicznej. Badania naukowe są prowadzone w dziewięciu zakładach naukowych. Działający w ramach Instytutu Zakład Doświadczalny CHEMIPAN wdraża, produkuje i komercjalizuje specjalistyczne związki chemiczne do zastosowań m.in. w rolnictwie i farmacji. Instytut publikuje około 200 oryginalnych prac badawczych rocznie.

KONTAKT:

prof. dr hab. **Piotr Garstecki**
Instytut Chemii Fizycznej Polskiej Akademii Nauk w Warszawie
tel.: +48 22 3432233
email: pgarstecki@ichf.edu.pl

PUBLIKACJE NAUKOWE:

1. „Calibration-free assays on standard real-time PCR devices”
P. R. Dębski, K. Gewartowski, S. Bajer, P. Garstecki
Scientific Reports 7:44854
DOI: 10.1038/srep44854

POWIĄZANE STRONY WWW:

<http://curiositydiagnostics.com/>
Strona firmy Curiosity Diagnostics.

<http://www.ichf.edu.pl/>
Strona Instytutu Chemii Fizycznej Polskiej Akademii Nauk.

<http://www.ichf.edu.pl/press/>
Serwis prasowy Instytutu Chemii Fizycznej PAN.

<http://www.ichfdlafirm.pl/>
Oferta Instytutu Chemii Fizycznej Polskiej Akademii Nauk skierowana do przedsiębiorców i przemysłu.

MATERIAŁY GRAFICZNE:

ICHF170412d_fot01s.jpg

HR: http://ichf.edu.pl/press/2017/04/ICHF170412d_fot01.jpg

Synergistyczny PCR, nowa technika analizy DNA opracowana przez Curiosity Diagnostics przy udziale Instytutu Chemii Fizycznej PAN w Warszawie, nie wymaga kalibrowania i może być zaimplementowana na powszechnie dostępnej aparaturze laboratoryjnej. (Źródło: IChF PAN, Grzegorz Krzyżewski)