

Ingeniería Genética II

Unidad VII

***Métodos de detección para ácidos nucleicos
no basados en PCR***

Detección de ácidos nucleicos

Point-of-Care Diagnosis

- La **detección de ácidos nucleicos** se ha transformado en un **excelente procedimiento** para el **diagnóstico de patógenos**.
- Para ello, la **tecnología de PCR** (en sus **tres generaciones**) surge como **procedimiento clave** por la **sensibilidad, precisión y exactitud** que puede lograrse.
- Sin embargo, la **necesidad de equipamiento** muy específico, el **requerimiento de consumibles particulares y costosos** y la **disponibilidad de recursos humanos muy calificados** hacen **complicado** su **aplicación** en el diagnóstico **a campo**, aunque **sí** se transforman en poderosas herramientas ***Gold Standard*** o ***Standard in house***.
- La **práctica** conocida como ***Point of Care Diagnosis*** (POCD) o ***Point of Care Testing*** (POCT) es el **diagnóstico** que se realiza de un patógeno en el lugar donde se encuentra el paciente.

Detección de ácidos nucleicos

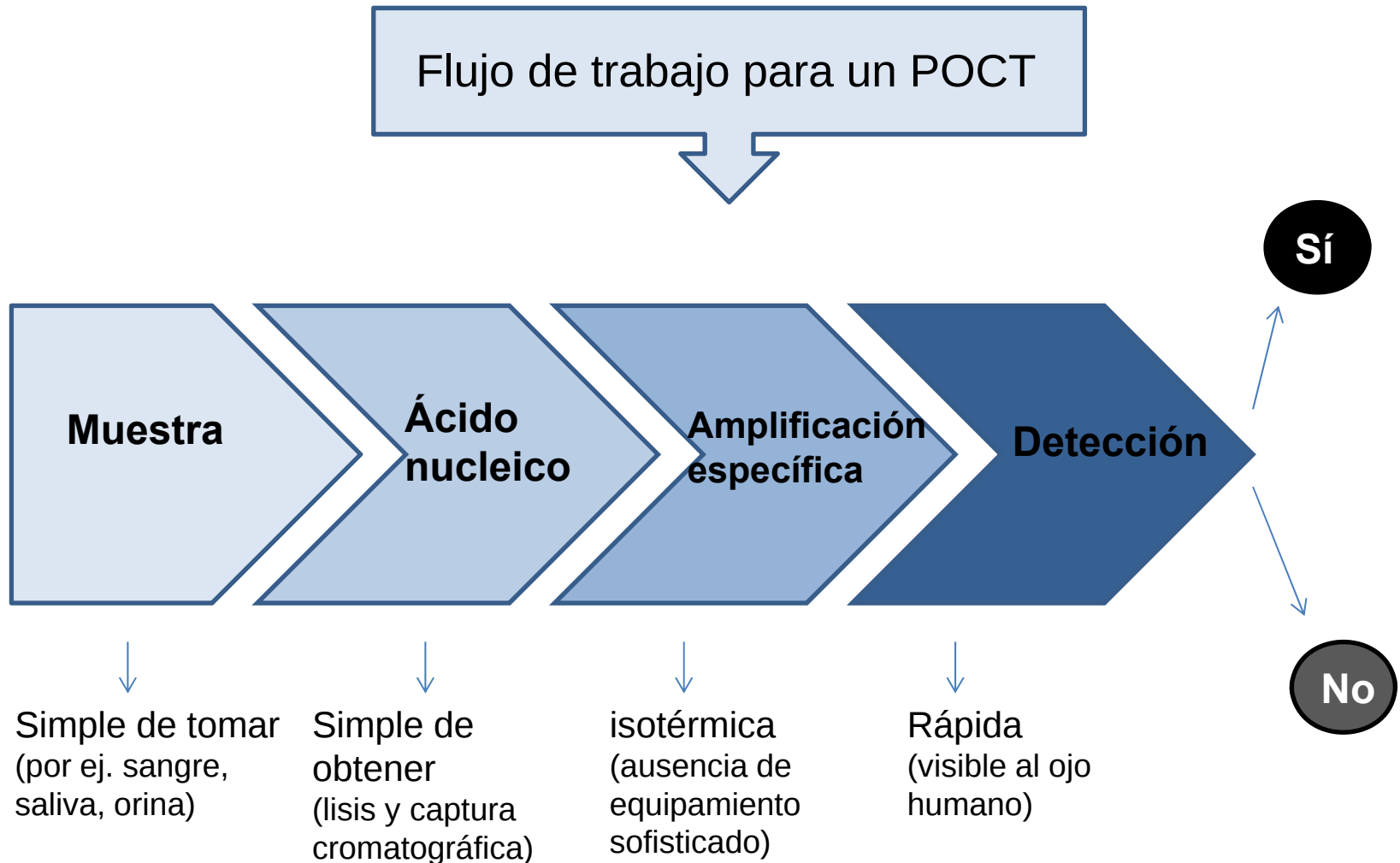
Point-of-Care Diagnosis

- Ante la **situación anterior**, es claro que los **procesos de amplificación** son **necesarios** para aumentar la **sensibilidad** del diagnóstico.
- Combinando dichas cuestiones, las **amplificaciones isotérmicas** aparecen como **procedimientos posibles** para realizar **POCT**.



Detección de ácidos nucleicos

Point-of-Care Diagnosis



Detección de ácidos nucleicos

Point-of-Care Diagnosis

● Algunos **procedimientos** de **amplificación isotérmica** son:

- *Strand-Displacement Amplification (SDA)*
- *Rolling Circle Amplification (RCA)*
- *Helicase Dependent Amplification (HDA)*
- *Recombinase Polimerase Amplification (RPA)*

Detección de ácidos nucleicos

Point-of-Care Diagnosis: SDA

● Algunos **procedimientos** de **amplificación isotérmica** son:

■ ***Strand-Displacement Amplification (SDA)***

■ *Rolling Circle Amplification (RCA)*

■ *Helicase Dependent Amplification (HDA)*

■ *Recombinase Polimerase Amplification (RPA)*

Deteccción de ácidos nucleicos

Point-of-Care Diagnosis: SDA

- El método **SDA** más estudiado y plicado es **LAMP**.
- **LAMP** (*Loop-mediated isothermal amplification*) otorga eficiencias de **amplificación** que pueden ser **mayores a 10^9** en **15-60 minutos** con alta especificidad.
- **LAMP requiere** de la síntesis de **6 oligonucleótidos específicos**.
- El **resultado** de la amplificación puede ser **analizado** por **diversos procedimientos**.

Detección de ácidos nucleicos

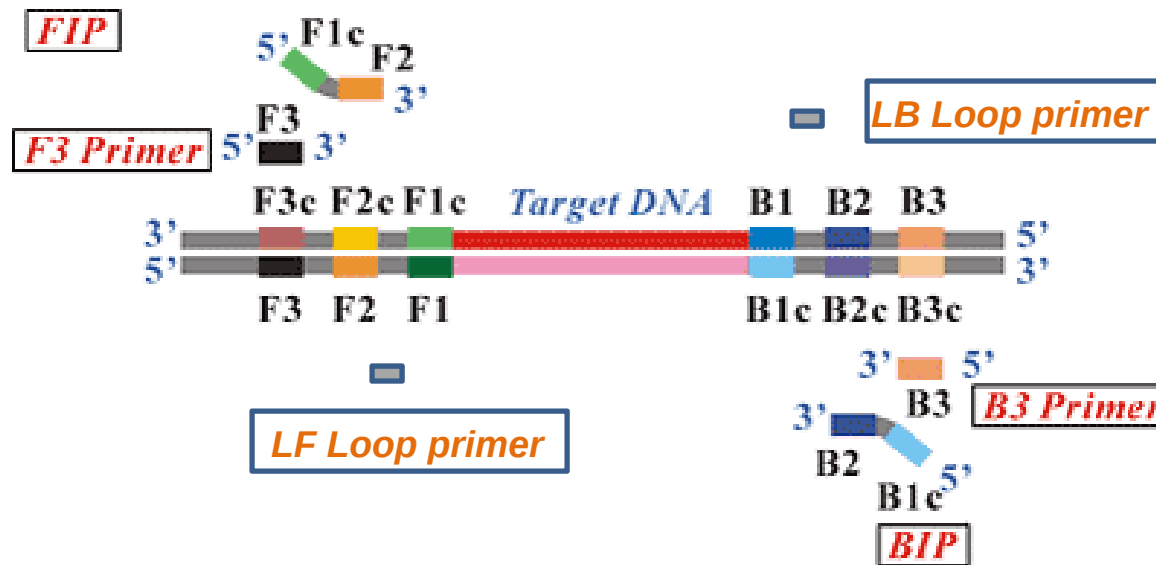
Point-of-Care Diagnosis: LAMP

- ❑ **Molécula de detección :** GENOMA PATÓGENO
 - ❑ **Especificidad:** Diseño de 6 *PRIMERS*
 - ❑ **Amplificación:** Bst DNA polimerasa ó
RT + Bst DNA pol
- ❑ **Ciclado:** 1 CICLO a 60-65°C (isotérmico)
- ❑ **Detección:** ELECTROFORESIS/BrEt
HIBRIDACIONES
COLORIMÉTRICO
LATERAL FLOW DIPSTICK

Detección de ácidos nucleicos

Point-of-Care Diagnosis: LAMP

❑ Diseño de *primers*



Nt entre F1c-F2 / B1c-B2
(TTTT)

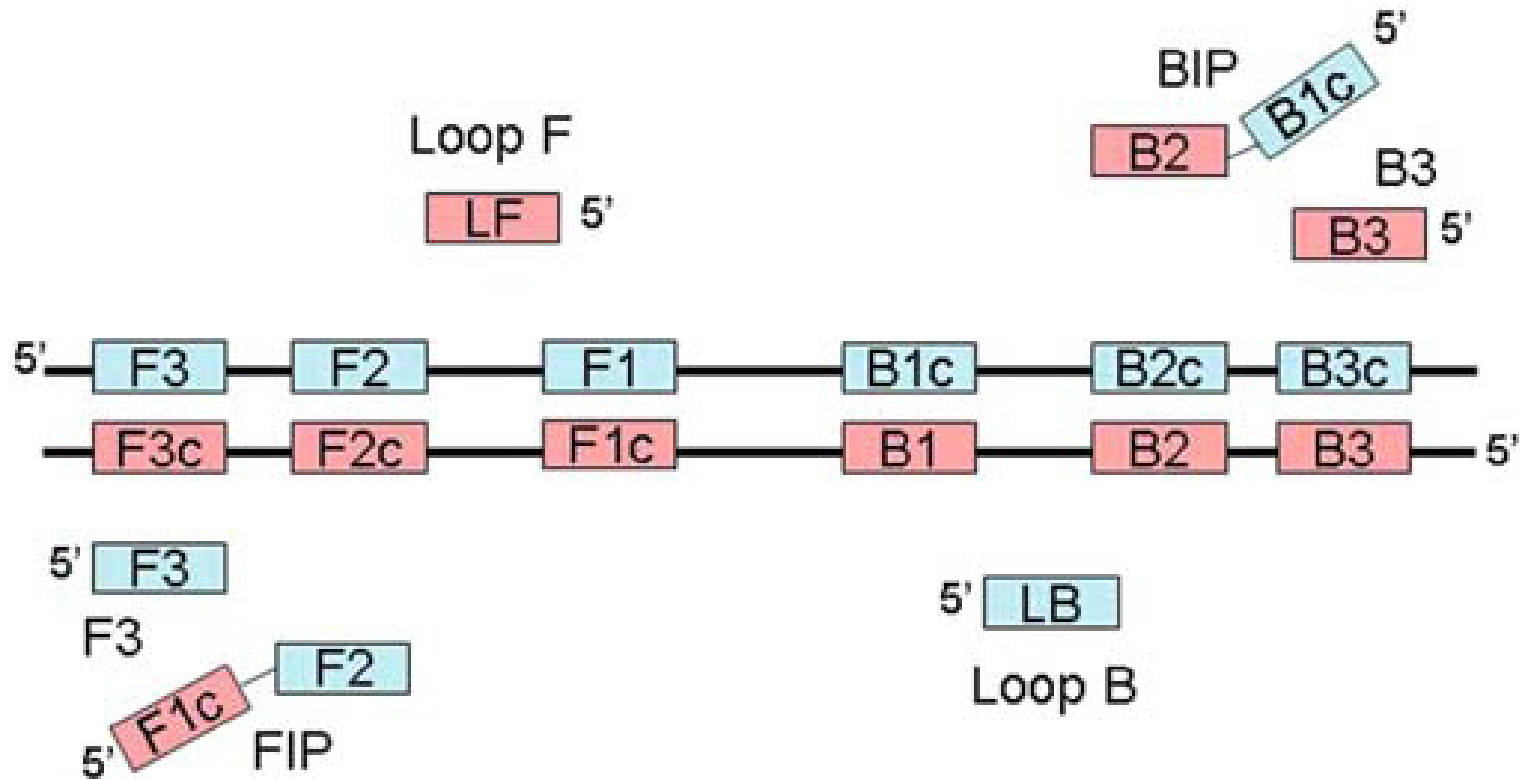
FIP: *Forward Inner Primer*
BIP: *Backward Inner Primer*

Distancia entre F2-B2
(120-180 nt)

Distancia entre F2-F3, B2-B3
(0-20 nt)

Detección de ácidos nucleicos

Point-of-Care Diagnosis: LAMP



Yasuyoshi Mori · Tsugunori Notomi. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases *J Infect Chemother* (2009) 15:62–69

Detección de ácidos nucleicos *Point-of-Care Diagnosis: LAMP*

801 AGATATGATG ATGGGTAAAC TAGTAACCAA GTCAACTGAA GAGAGACTAA
TCTATACTAC TACCCATTG ATCATTGGTT CAGTTGACTT CTGTCTGATT

F3

851 ATCTAAATCC ACACAACATG CTTTGGACTC CAGGGGATAA TCCAATTGAA
TAGATTTAGG TGTGTTGTAC GAAACCTGAG GTCCCCTATT AGGTAACTT

F2

901 TTAGAATTCA ACGATATGAA CGGAACTTGG TTCATTATGC CAGAGTTAGA
AATCTTAAGT TGCTATACTT GCCTTGAACC AAGTAATACG GTCTCAATCT

LF

B1c

F1C

951 GAATGGAAAG TATCATCTAT TGCCTATGGA ATCTGGAATT GGAAACAACA
CTTACCTTTC ATAGTAGATA ACGGATACCT TAGACCTTAA CCTTTGTTGT

LB

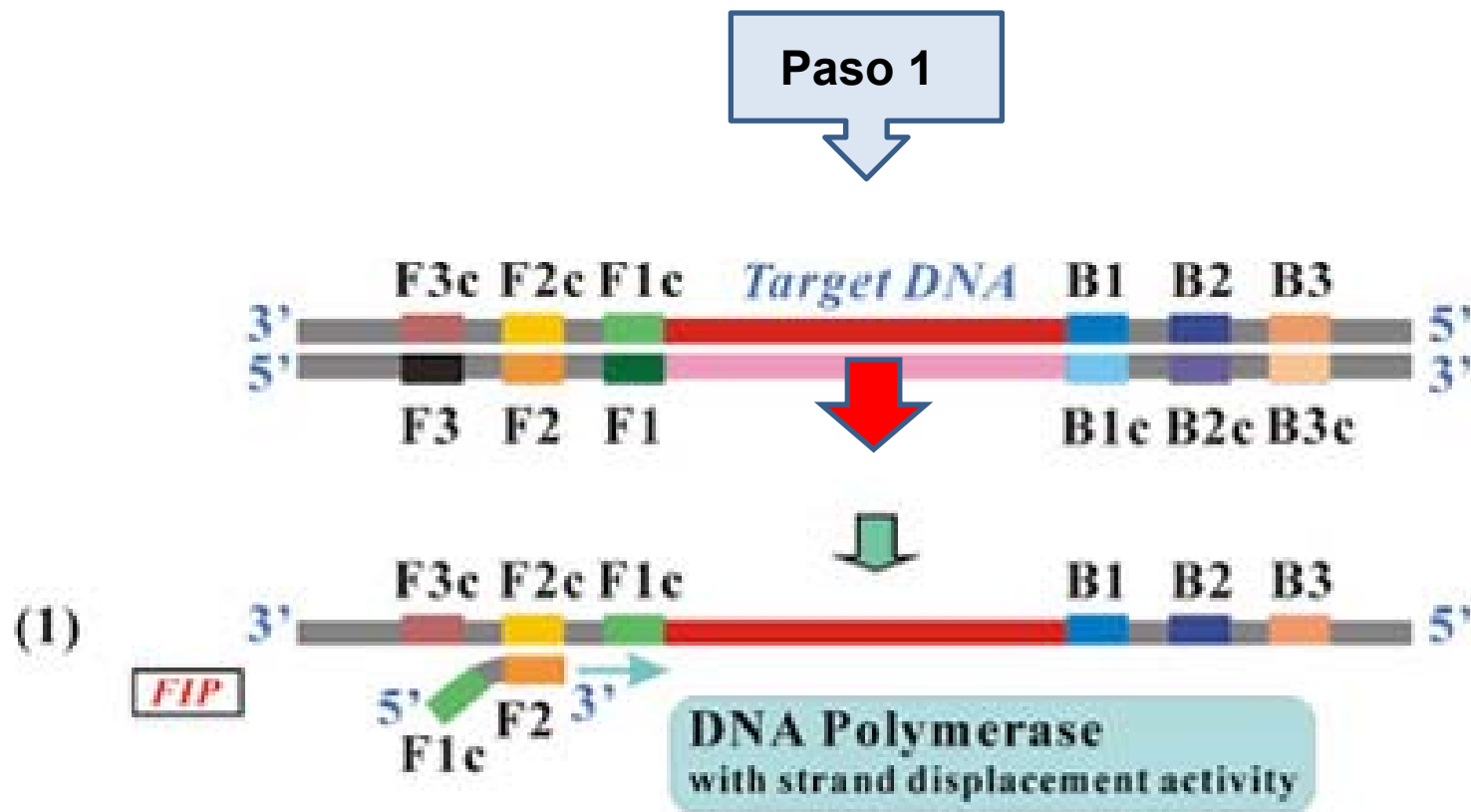
1001 CAACAGACAC TTATGAGATG CCATCAAATG ACGAAAGAGG AAATTTTCATT
GTTGTCTGTG AATACTCTAC GGTAGTTTAC TGCTTTCTCC TTAAAGTAA

B2

B3

Detección de ácidos nucleicos

Point-of-Care Diagnosis: LAMP

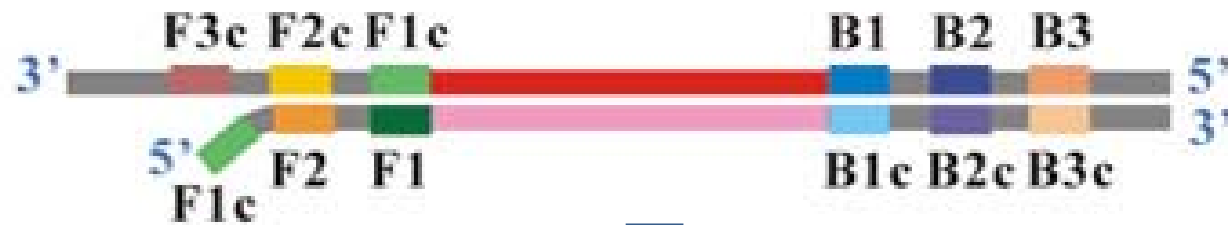


Detección de ácidos nucleicos

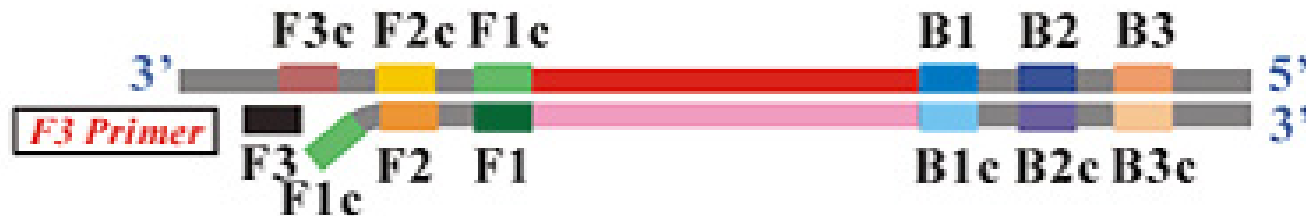
Point-of-Care Diagnosis: LAMP

Pasos 2 y 3

(2)



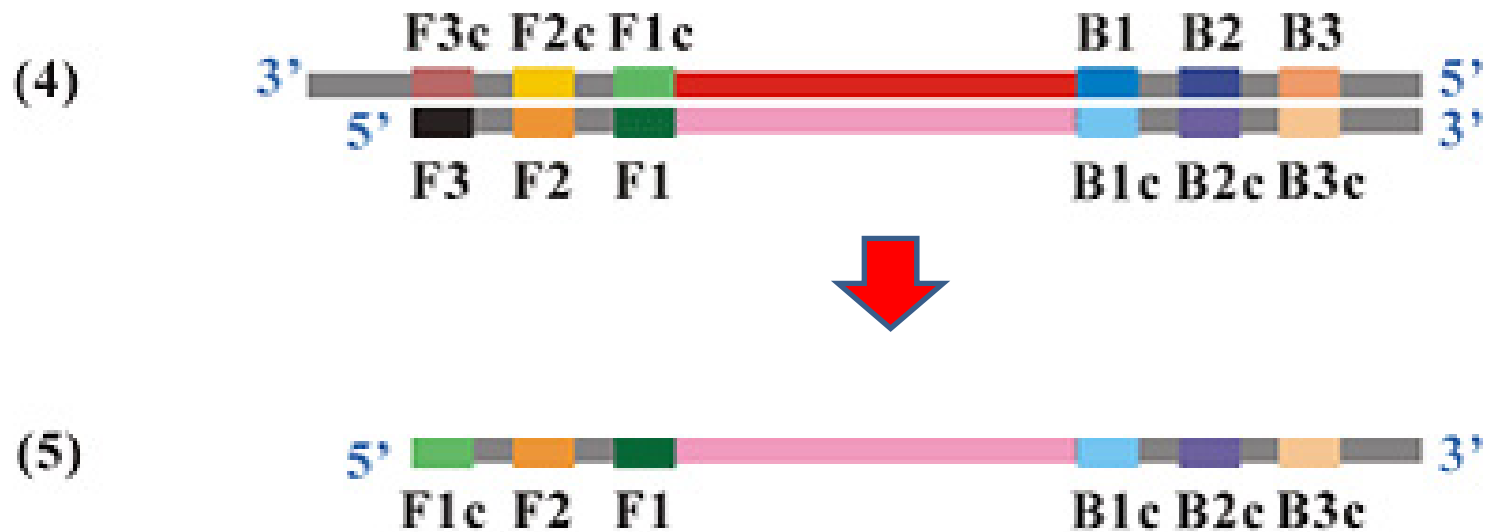
(3)



Detección de ácidos nucleicos

Point-of-Care Diagnosis: LAMP

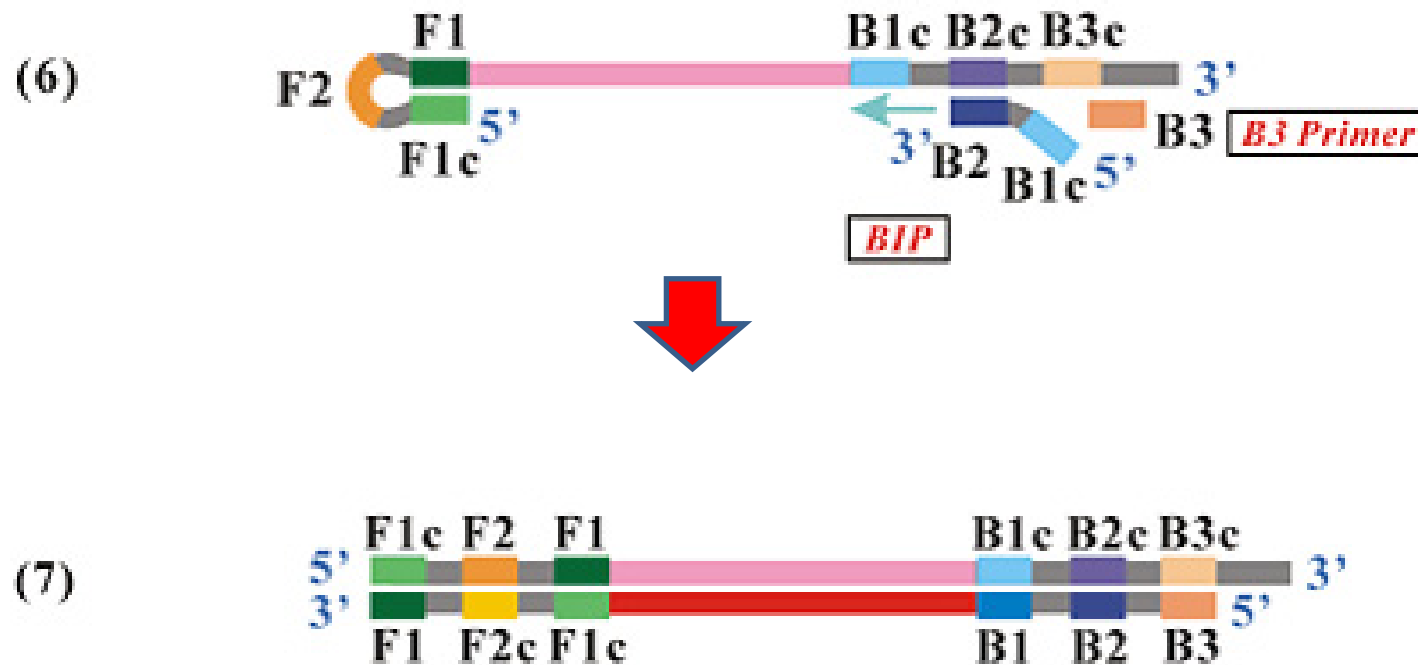
Pasos 4 y 5



Detección de ácidos nucleicos

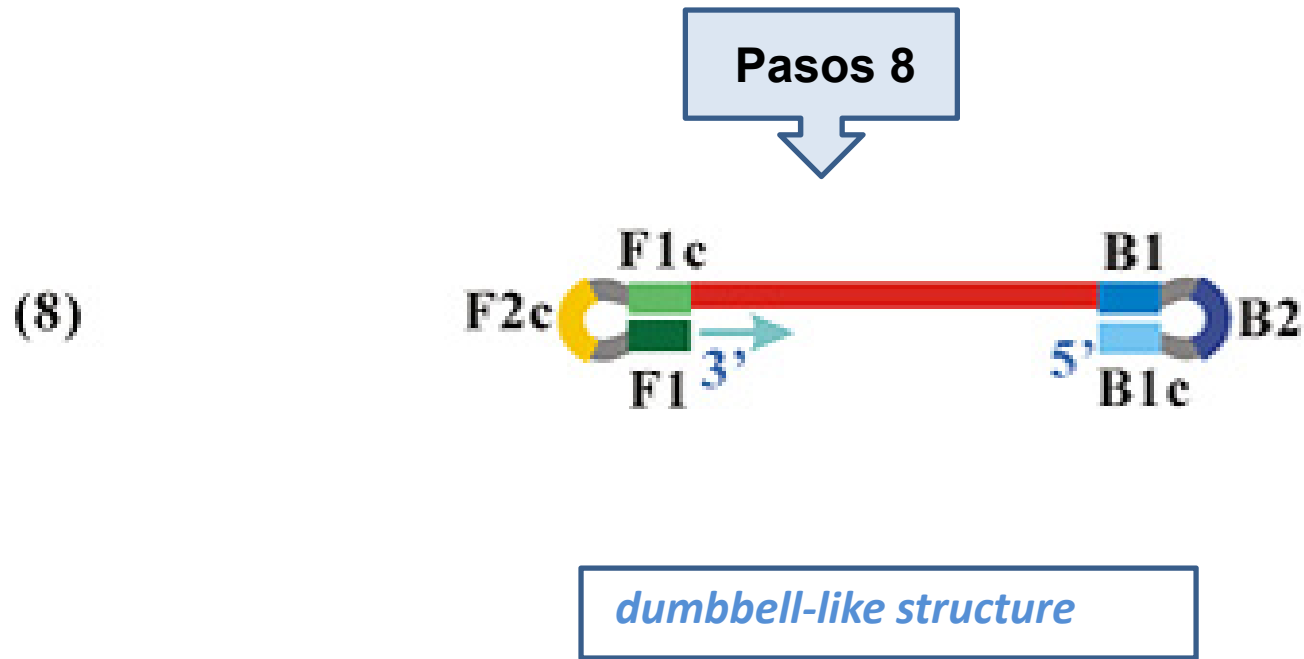
Point-of-Care Diagnosis: LAMP

Pasos 6 y 7



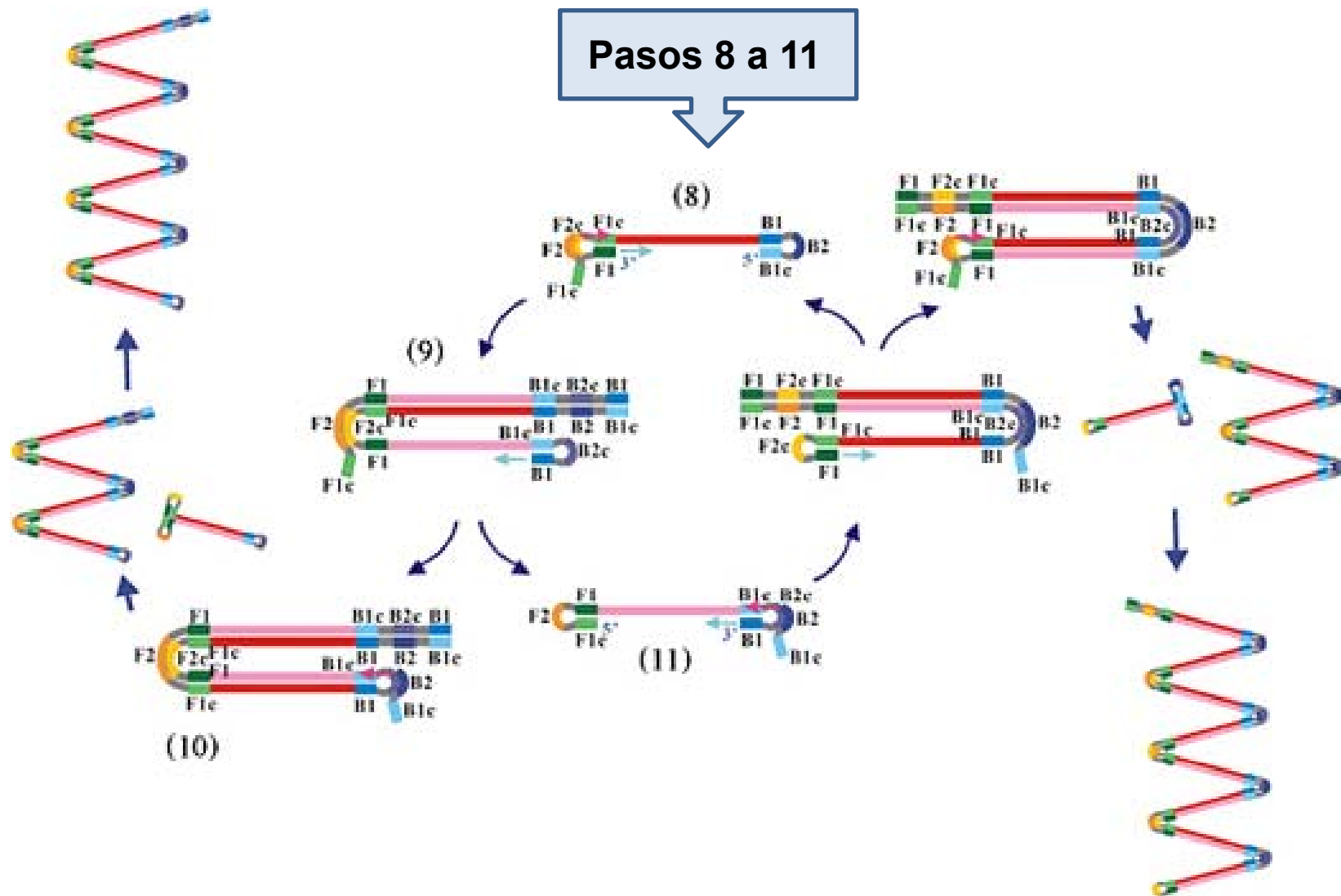
Detección de ácidos nucleicos

Point-of-Care Diagnosis: LAMP



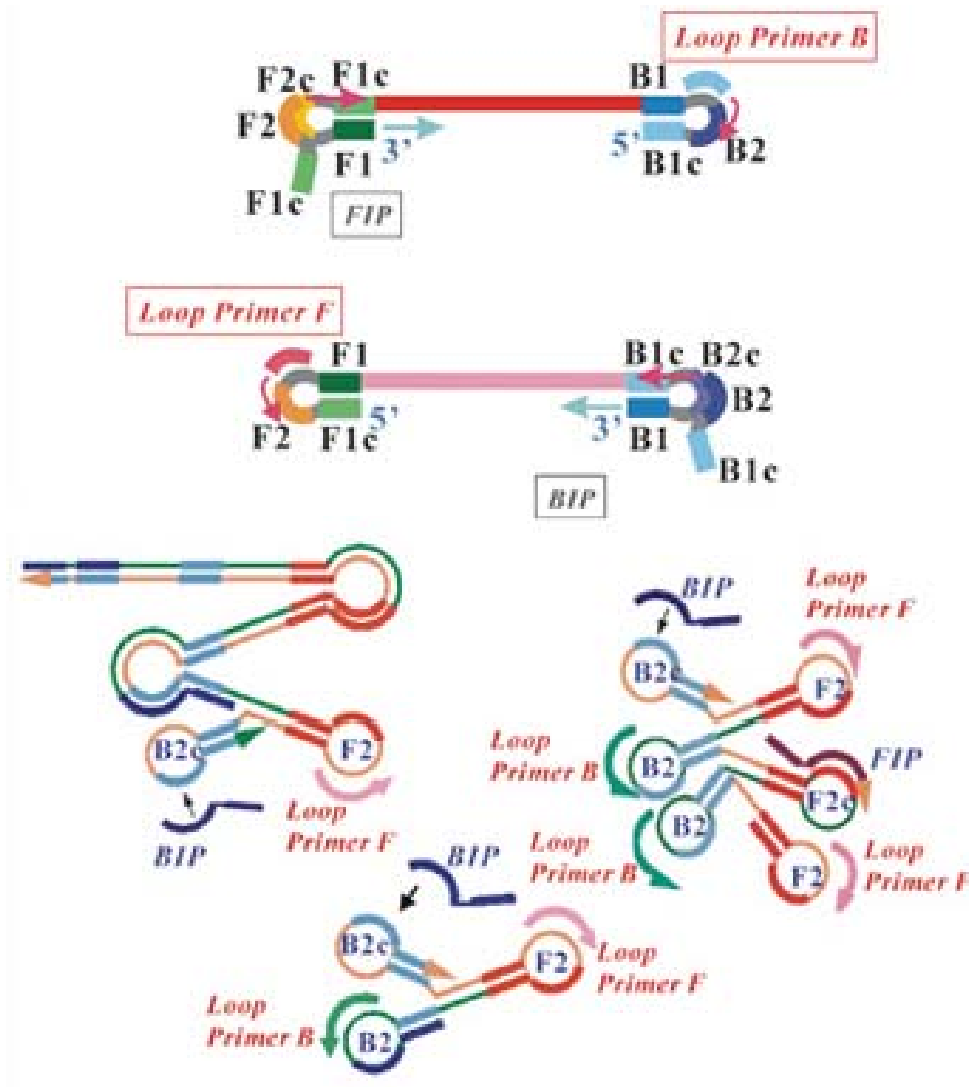
Detección de ácidos nucleicos

Point-of-Care Diagnosis: LAMP



Detección de ácidos nucleicos

Point-of-Care Diagnosis: LAMP



LAMP: Detección



Visualización por electroforesis
(Bromuro de Etidio)

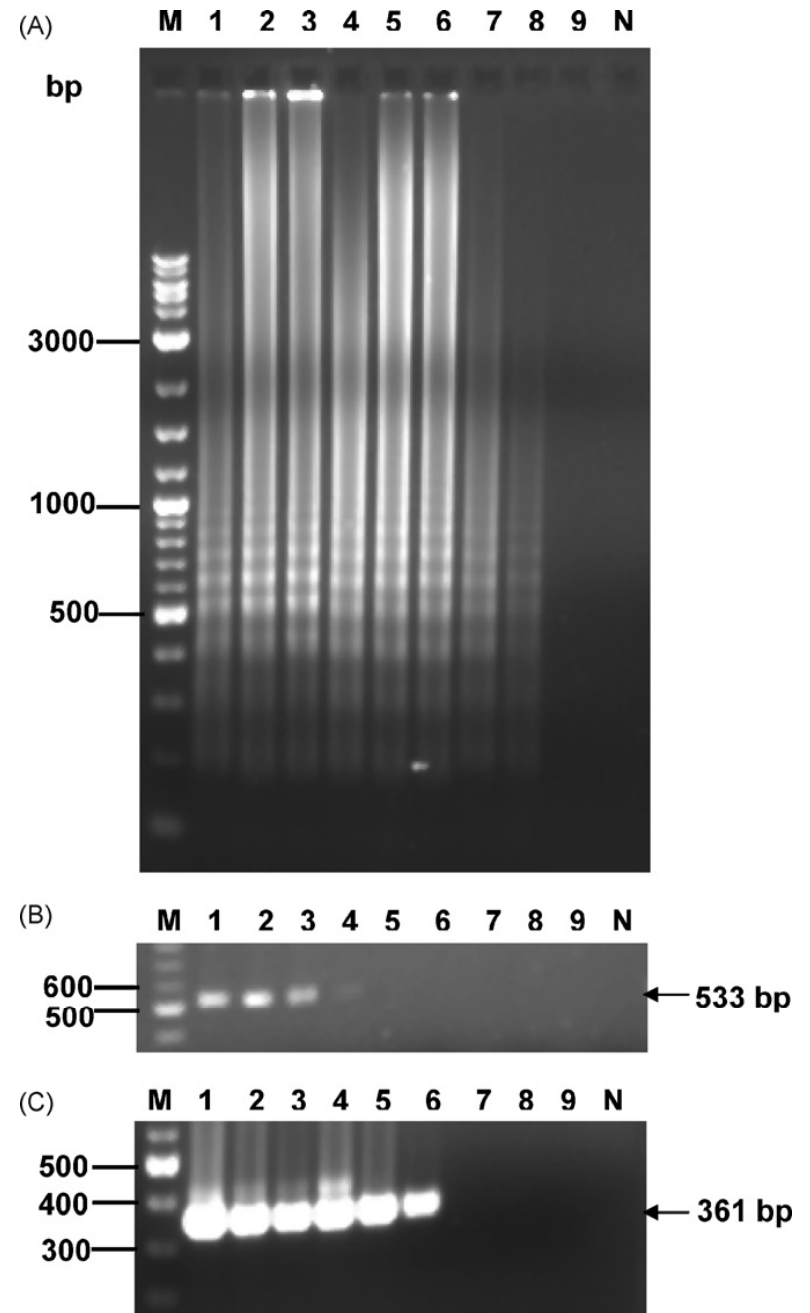


Calle 1: 7 ng de muestra
Calle 8: 0,7 fg de muestra
Muestra: DNA aislado de
PemoNPV-infected P. monodon

PCR



Nested-PCR



LAMP: Detección

Visualización x turbidez

Diagnóstico de un mRNA marcador para tumores próstata



Precipitado de pirofosfato de Mg
(agregado de Mg)

Visualización fluorescente

Diagnóstico del RNA del virus SARS



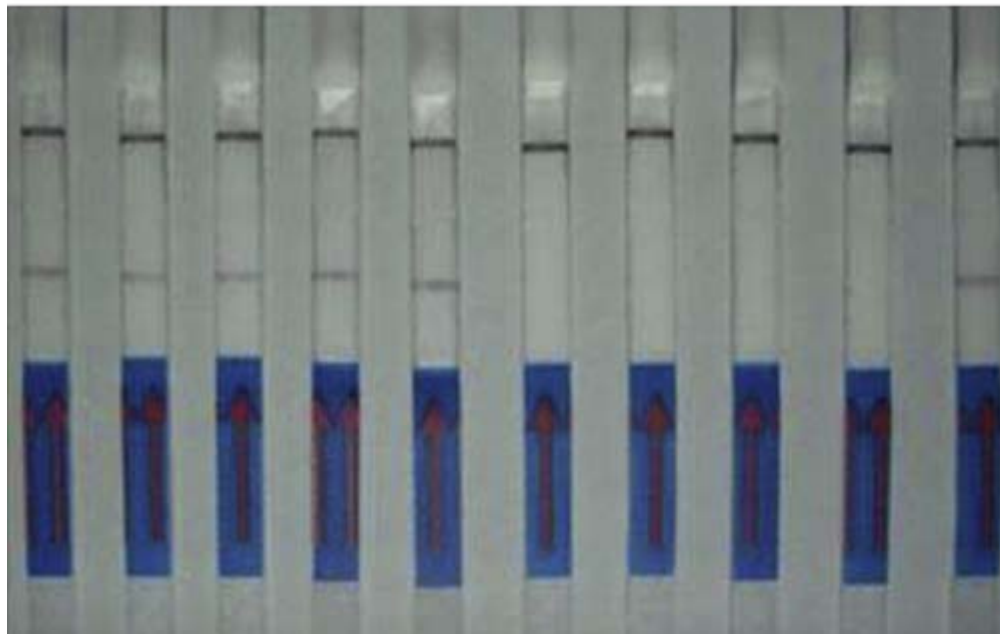
Precipitado de pirofosfato de Mn + Calceína

Yasuyoshi Mori · Tsugunori Notomi. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases *J Infect Chemother* (2009) 15:62–69

LAMP: Detección

Lateral –flow dipstick

1	10 ⁻¹	10 ⁻²	1	10 ⁻¹	10 ⁻²	1	10 ⁻¹	N	P
ng	ng	ng	pg	pg	pg	fg	fg		



← Control lines

← Test lines

Rapid and sensitive detection of *Penaeus monodon* nucleopolyhedrovirus (PemoNPV) by loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral-flow dipstick. Tongchai Nimitphak, Watcharachai Meemetta, Narong Arunrut, Saengchan Senapin a,b, Wansika Kiatpathomchai. Journal of Virological Methods 162 (2009) 188–193

DetECCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Point-of-Care Diagnosis: LAMP

LAMP es una técnica **NAT** con importantes **ventajas**:

Simple (una única reacción, una o dos enzimas)

Rápido (30-60 minutos, más la detección)

Sensible (amplificación de hasta 10^9 , 1-10 moléculas de molde)

Seguro (pueden no usarse reactivos tóxicos como el BrEt)

Económico (no requiere equipamiento sofisticado, la detección puede hacerse de manera muy económica)

Específico (se utilizan 6 *primers* por molde que dan alta especificidad)

Detección de ácidos nucleicos

Point-of-Care Diagnosis

● Algunos **procedimientos** de **amplificación isotérmica** son:

■ *Strand-Displacement Amplification (SDA)*

■ ***Rolling Circle Amplification (RCA)***

■ *Helicase Dependent Amplification (HDA)*

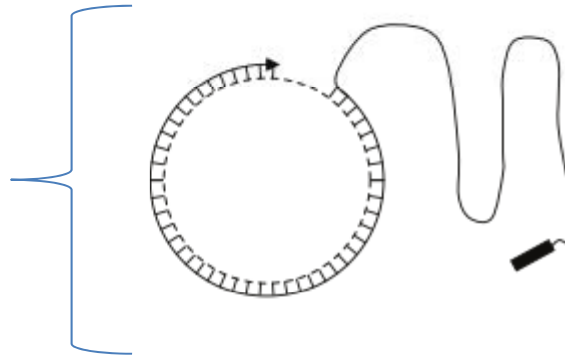
■ *Recombinase Polimerase Amplification (RPA)*

Deteccción de ácidos nucleicos

Point-of-Care Diagnosis: RCA

- La **replicación** mediante **círculo rodante** es un **mecanismo** que poseen numerosos **genomas virales** y **plásmidos**.
- En este **proceso natural**, se **generan concatémeros** de una secuencia que luego son circularizados mediante diversos mecanismos que incluyen la recombinación homóloga y la recombinación sitio específica.

Círculo de DNA replicando



DetECCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

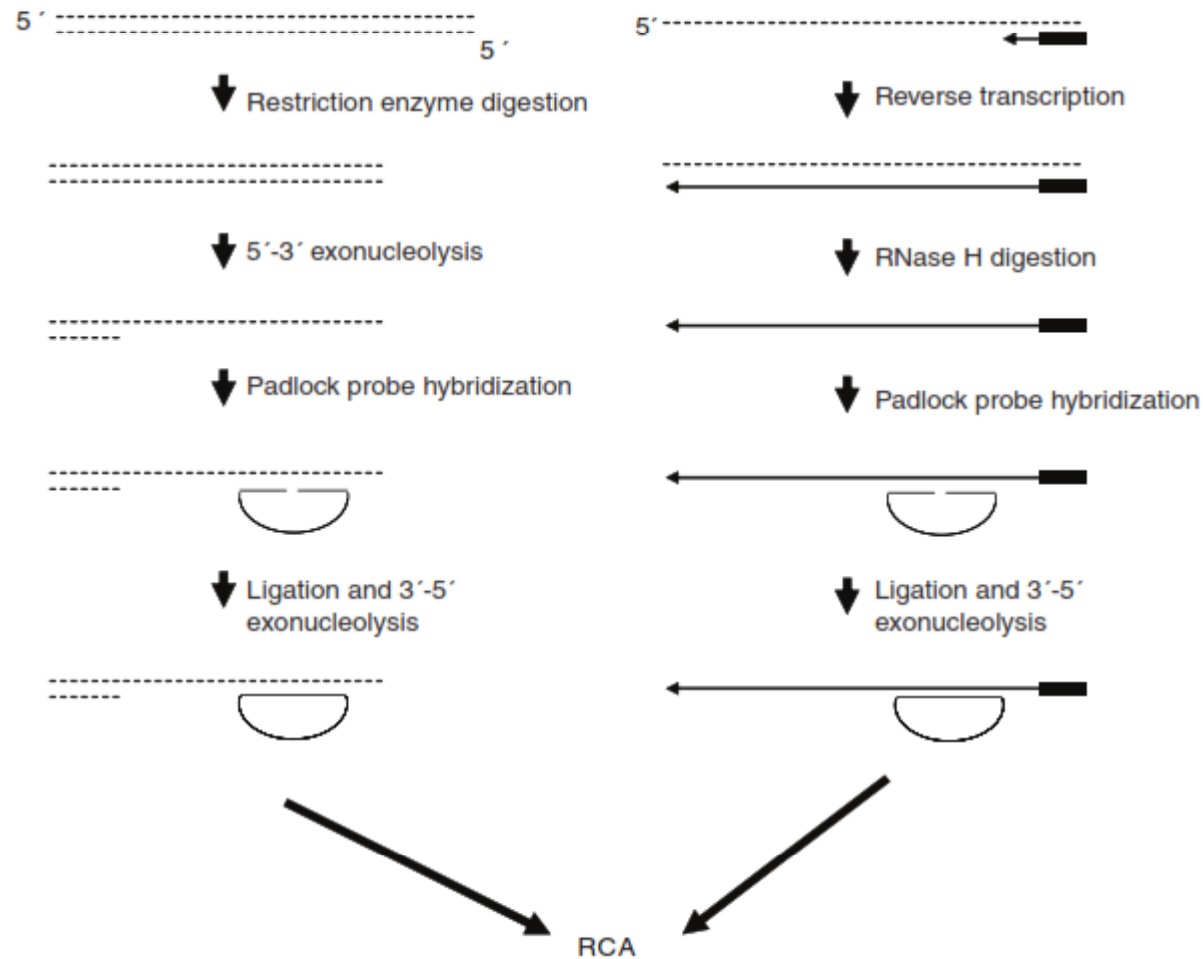
Point-of-Care Diagnosis: RCA

- En esta estrategia, el **dsDNA** es **fragmentado** y **expuesto** en sus **extremos** como **ssDNA**.
- **Luego**, una **sonda *padlock**** (candado) se **une** solo si existe el DNA específico en la muestra.
- La sonda al unirse **acerca sus extremos**, y por acción de una **DNA ligasa** se **circulariza**.
- Así, la **sonda circular** es **amplificada** mediante **RCA** con la **DNA polimerasa del fago ϕ 29**.

*Nilsson M, Malmgren H, Samiotaki M, Kwiatkowski M, Chowdhary BP, Landegren U. Padlock probes: circularizing oligonucleotides for localized DNA detection. *Science* 265(5181), 2085–2088 (1994).

Detección de ácidos nucleicos

Point-of-Care Diagnosis: RCA



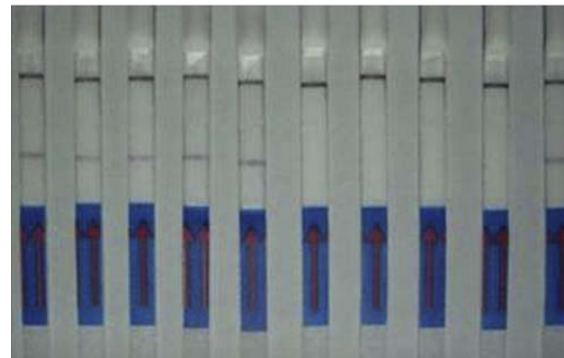
Detección de ácidos nucleicos

Point-of-Care Diagnosis: RCA

- La **detección** del método puede ser **similar** a la realizada por **LAMP**.



1	10 ⁻¹	10 ⁻²	1	10 ⁻¹	10 ⁻²	1	10 ⁻¹	N	P
ng	ng	ng	pg	pg	pg	fg	fg		



← Control lines

← Test lines

Detección de ácidos nucleicos

Point-of-Care Diagnosis

● Algunos **procedimientos** de **amplificación isotérmica** son:

■ *Strand-Displacement Amplification (SDA)*

■ *Rolling Circle Amplification (RCA)*

■ ***Helicase Dependent Amplification (HDA)***

■ *Recombinase Polimerase Amplification (RPA)*

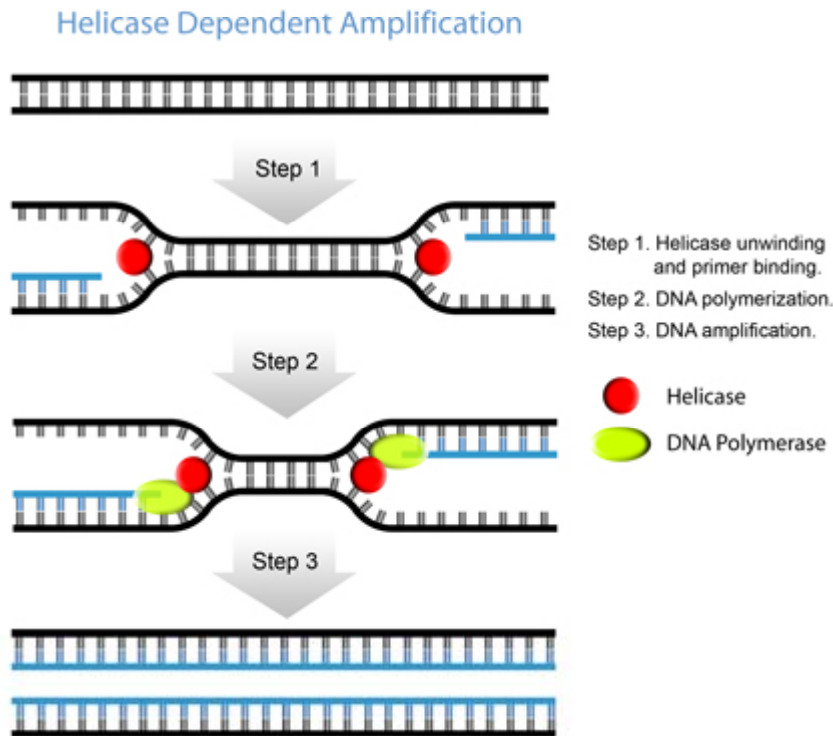
Deteccción de ácidos nucleicos

Point-of-Care Diagnosis: HDA

- Las **DNA helicases** tienen como principal **actividad separar** un **dsDNA** (requieren para ello ATP).
- La **combinación** de una **DNA Helicasa** junto con **ssDNA binding proteins** permite **reemplazar** el paso de **desnaturalización** térmica en una **PCR**.
- El **método HDA** es **similar** a una **PCR**, utilizándose dos *primers* específicos **sin ciclado térmico**.

Detección de ácidos nucleicos

Point-of-Care Diagnosis: HDA



Patent Application Publication Nov. 11, 2010 Sheet 15 of 17 US 2010/0285473 A1

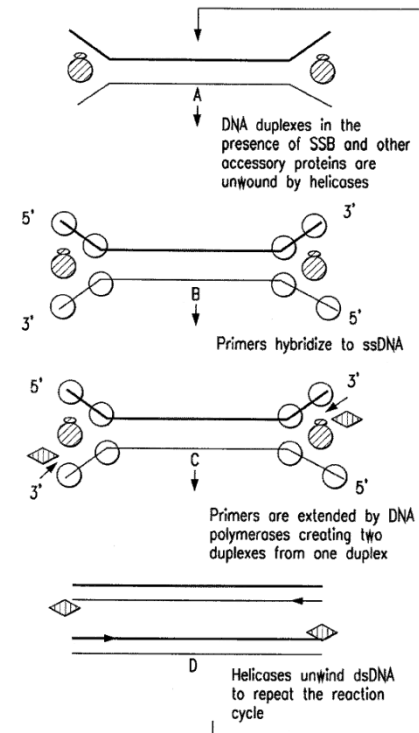


FIG.15

DetECCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

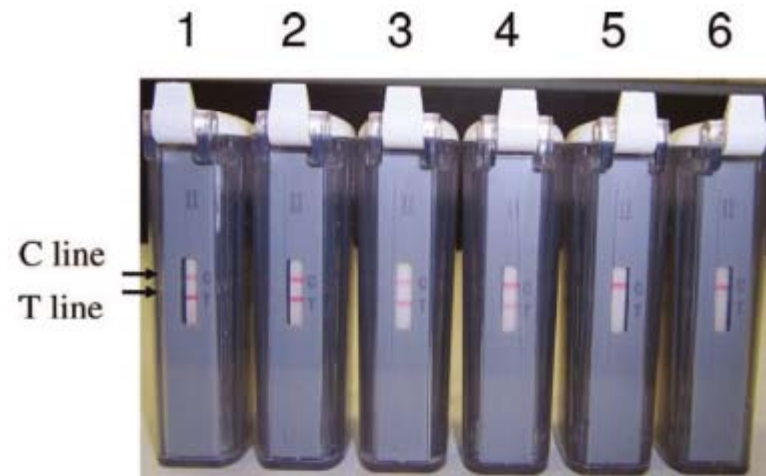
Point-of-Care Diagnosis: HDA

- Las **DNA helicasas evaluadas** fueron varias: *E. coli* UvrD helicase, Tte-UvrD helicase, T7 Gp4 helicase, RecBCD helicase, DnaB helicase, MCM helicase, Rep helicase, RecQ helicase, PcrA helicase, SV40 large T antigen helicase, Herpes virus helicase, yeast Sgs1 helicase, DEAH_ ATP-dependent helicases y Papillomavirus helicase E1 protein, entre otras.
- Las **DNA polimerasas** utilizadas son: Taq DNA polimerasa, T7 DNA polimerasa, BstI DNA polimerasa, Klenow, entre otras.
- La **ssDNA Binding Protein** en general es gp32 del bacteriofago T4.
- La **detección** de un **HDA** es **similar a los anteriores**. Cabe aclarar que la **observación** en una **electroforesis** da un **resultado similar** a una **PCR tradicional** con ciclado térmico.

Detección de ácidos nucleicos

Point-of-Care Diagnosis: HDA

Ejemplo de un sistema de detección basado en HDA



Journal of Molecular Diagnostics, Vol. 10, No. 5, September 2008
Copyright © American Society for Investigative Pathology
and the Association for Molecular Pathology
DOI: 10.2353/jmoldx.2008.080008

Application of Isothermal Helicase-Dependent
Amplification with a Disposable Detection Device in
a Simple Sensitive Stool Test for Toxigenic
Clostridium difficile

Wing Huen A. Chow,* Cindy McCloskey,[†]
Yanhong Tong,* Lin Hu,[‡] Qimin You,[‡]
Ciarán P. Kelly,[§] Huimin Kong,* Yi-Wei Tang,[†]
and Wen Tang*

Detección de ácidos nucleicos

Point-of-Care Diagnosis

● Algunos **procedimientos** de **amplificación isotérmica** son:

■ *Strand-Displacement Amplification (SDA)*

■ *Rolling Circle Amplification (RCA)*

■ *Helicase Dependent Amplification (HDA)*

■ ***Recombinase Polimerase Amplification (RPA)***

DetECCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Point-of-Care Diagnosis: RPA

- Muchos **virus** replican generando **concatémeros genómicos**, los cuales luego son **resueltos** por **procesos recombinogénicos**.
- En tales procesos, suceden **recombinaciones** basadas en **homología** de secuencias, donde suceden invasiones de cadena.
- El **bacteriofago T4** posee una recombinasa (**Recombinasa UvsX**) que tiene la capacidad de **promover** la **unión de moléculas** de dsDNA y ssDNA **homólogas**.

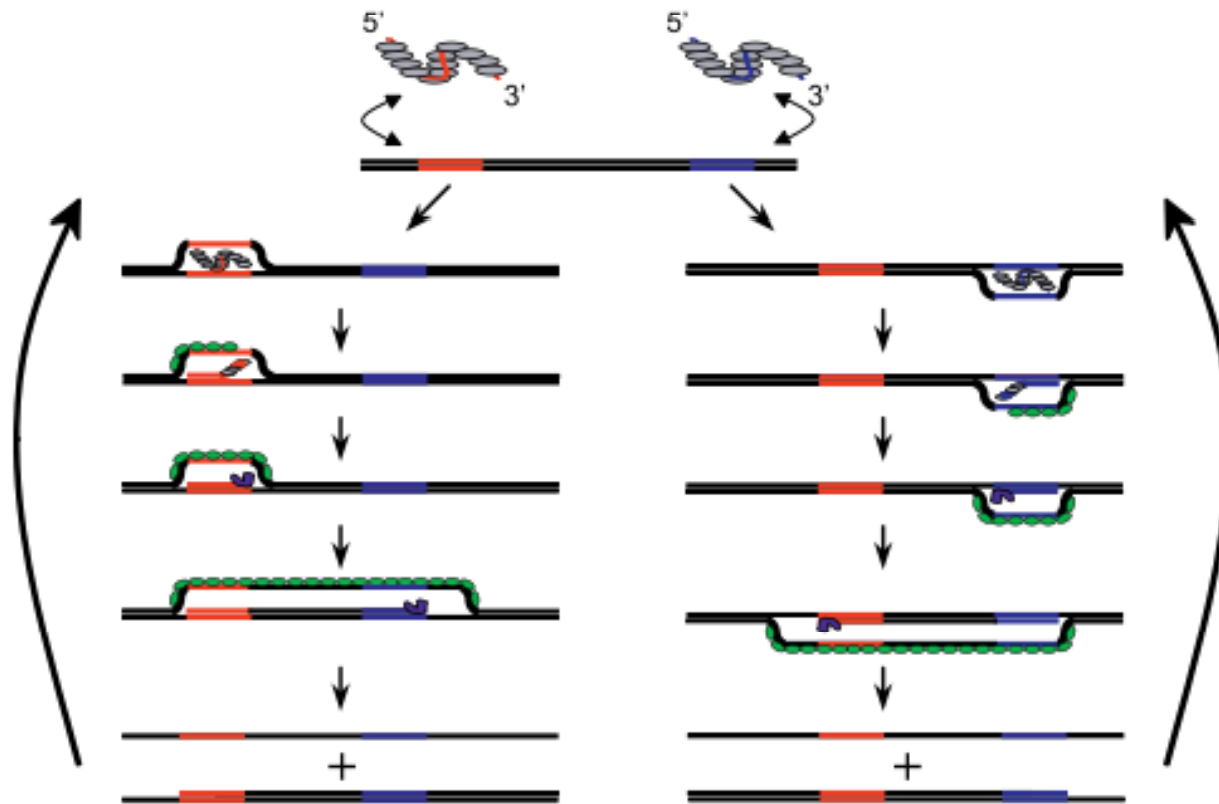
DetECCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Point-of-Care Diagnosis: RPA

- La **recombinasa UvsX** se **asocia** a **ssDNAs** formando complejos nucleoproteicos en presencia de ATP.
- Se ha demostrado que la **recombinasa**, **junto** a la proteína del fago **UvsY** y **PEG** estabilizan la unión a oligonucleótidos, facilitando el **intercambio de cadenas** con **dsDNA** conteniendo **secuencias homólogas**.
- La presencia de una proteína de unión a ssDNA, como **gp32** (propia del bacteriofago T4), **estabiliza** la **hebra desplazada**.
- Así, en presencia de una **polimerasa**, se puede realizar **síntesis de DNA** en **condiciones isotérmicas**.

Detección de ácidos nucleicos

Point-of-Care Diagnosis: RPA



Detección de ácidos nucleicos

Point-of-Care Diagnosis

OPEN ACCESS Freely available online

PLOS BIOLOGY

DNA Detection Using Recombination Proteins

Olaf Piepenburg¹, Colin H. Williams¹, Derek L. Stemple², Niall A. Armes^{1*}

¹ ASM Scientific Ltd, Cambridge, United Kingdom, ² Wellcome Trust Sanger Institute, Hinxton, Cambridge, United Kingdom

DNA amplification is essential to most nucleic acid testing strategies, but established techniques require sophisticated equipment or complex experimental procedures, and their uptake outside specialised laboratories has been limited. Our novel approach, recombinase polymerase amplification (RPA), couples isothermal recombinase-driven primer targeting of template material with strand-displacement DNA synthesis. It achieves exponential amplification with no need for pretreatment of sample DNA. Reactions are sensitive, specific, and rapid and operate at constant low temperature. We have also developed a probe-based detection system. Key aspects of the combined RPA amplification/detection process are illustrated by a test for the pathogen methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. The technology proves to be sensitive to fewer than ten copies of genomic DNA. Furthermore, products can be detected in a simple sandwich assay, thereby establishing an instrument-free DNA testing system. This unique combination of properties is a significant advance in the development of portable and widely accessible nucleic acid-based tests.

