

Polymerázová řetězová reakce v reálné čase

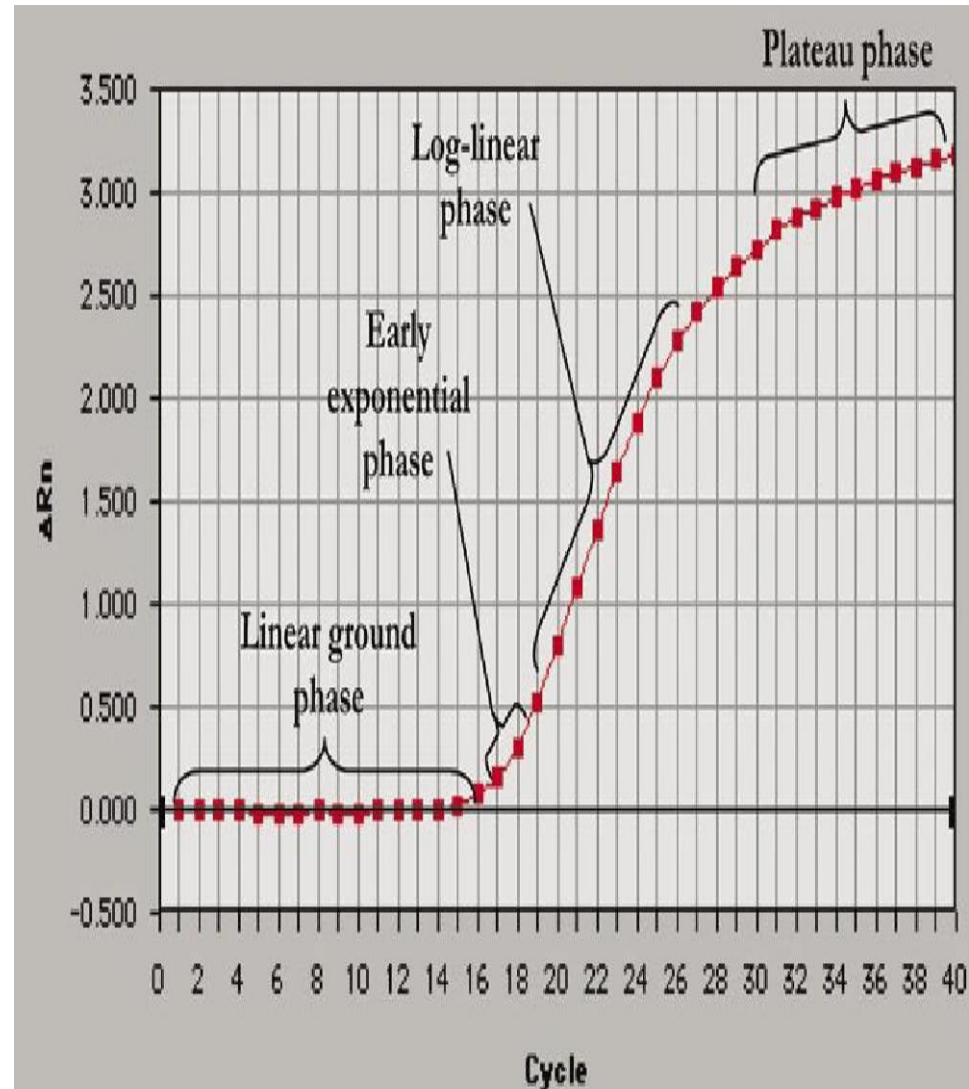
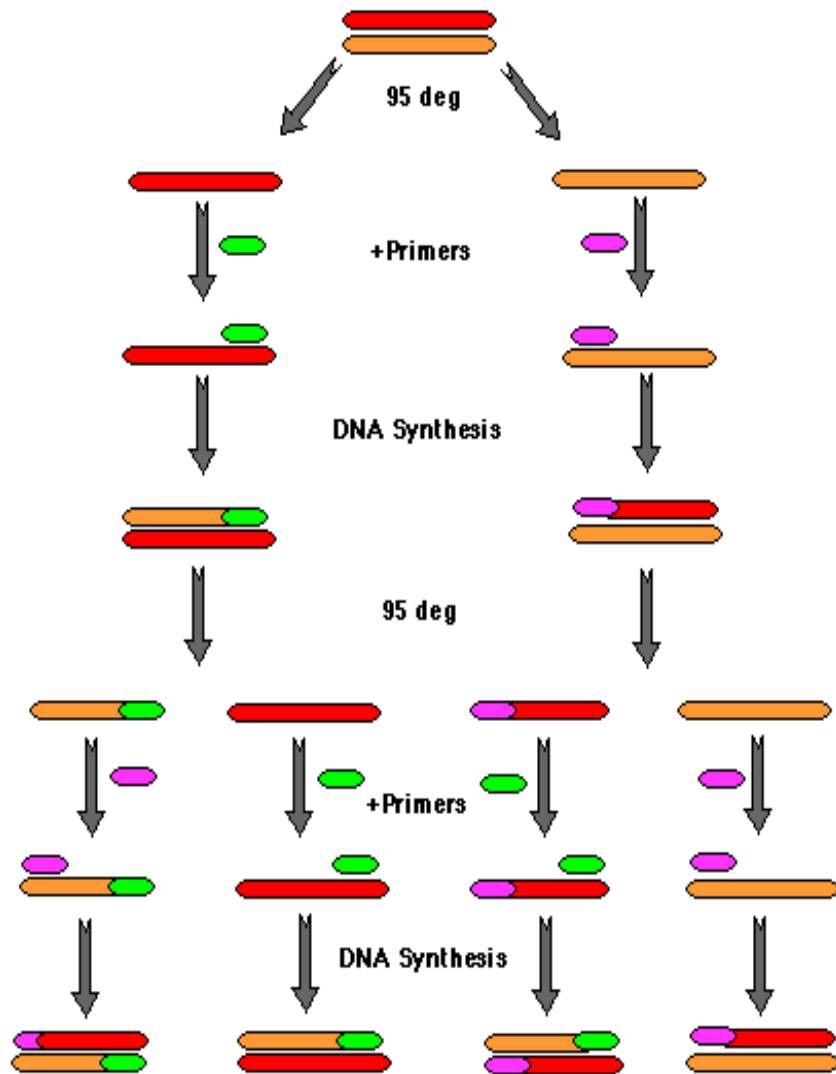
**Složitá vědecká konstrukce, nebo technologie
s širokým využitím v praxi?**

Metody molekulární biologie pro farmaceuty

Doc. RNDr. Jan Hošek, Ph.D.
hosek@mail.muni.cz

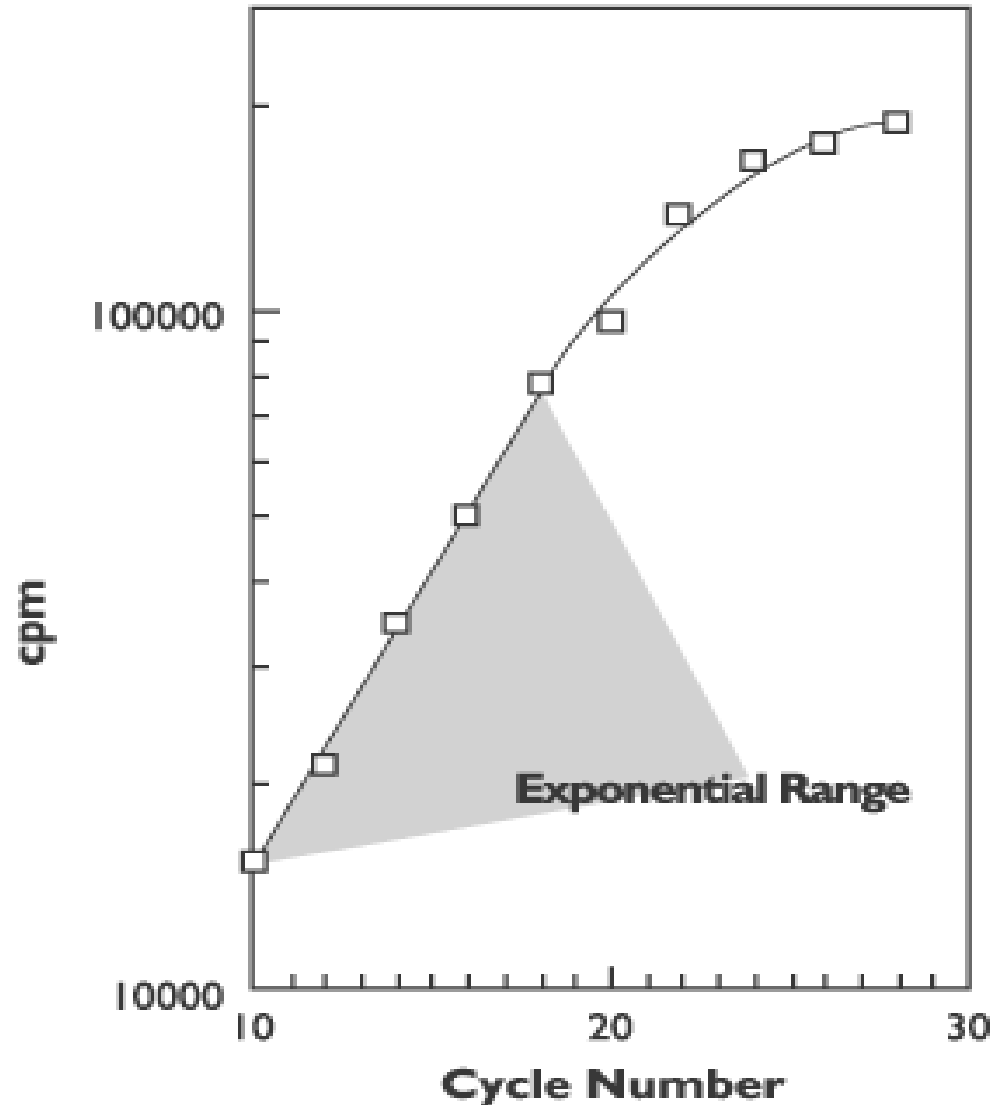
Ústav molekulární farmacie
FaF MU

Fáze PCR amplifikace



Kinetika PCR

- Teoreticky se množství produktu během každého PCR cyklu zdvojí.
- Ve skutečnosti se zdvojování produktu během každého cyklu pouze blíží 100%.



Real Time PCR

základní principy metody

- Principem metody je vizualizace nárůstu amplifikačního produktu pomocí měření nárůstu fluorescence v průběhu PCR.
- Výstupní intenzita fluorescence je přímo úměrná koncentraci templátu.
- Korelace mezi množstvím PCR produktu a intenzitou fluorescence je využita k výpočtu množství templátu přítomného na počátku PCR.

Real Time přístroje

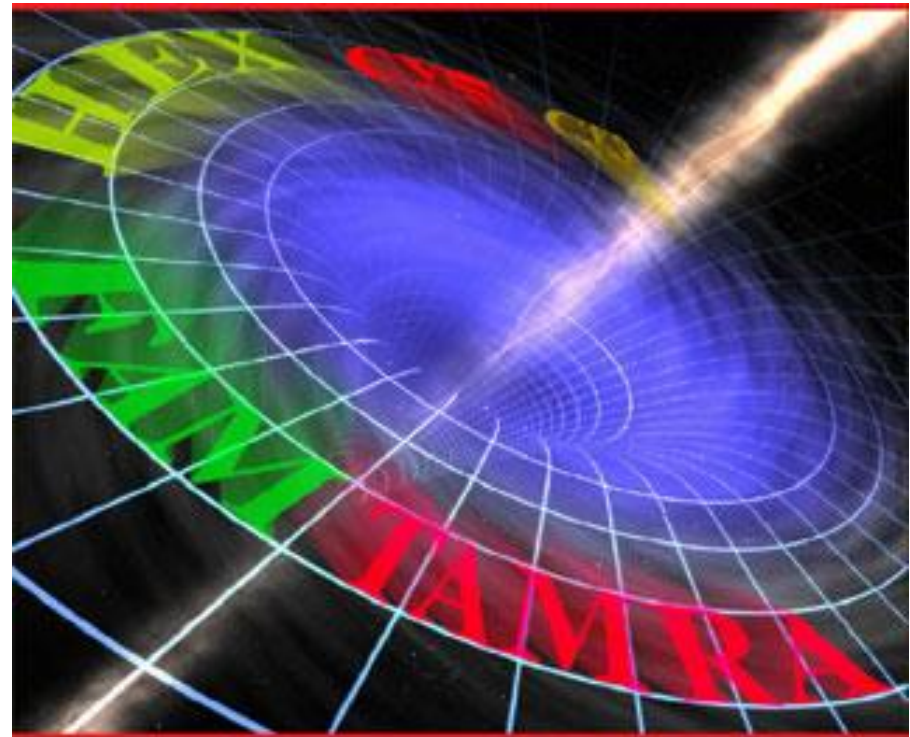


Výhody Real Time PCR

- **stejná nebo vyšší citlivost bez manipulace se vzorky – snížení rizika kontaminace**
- **není třeba provádět elektroforézu**
- **automatizace procesu pro klinické využití**
- **kvantifikace templátu – množství patogena, hladina mRNA**
- **rozmanité typy sond – více lokusů v jedné reakci (multiplex)**

Důležité komponenty pro Real Time PCR

- **Fluorofory**
- **Zhášeče**
- **Sonda**

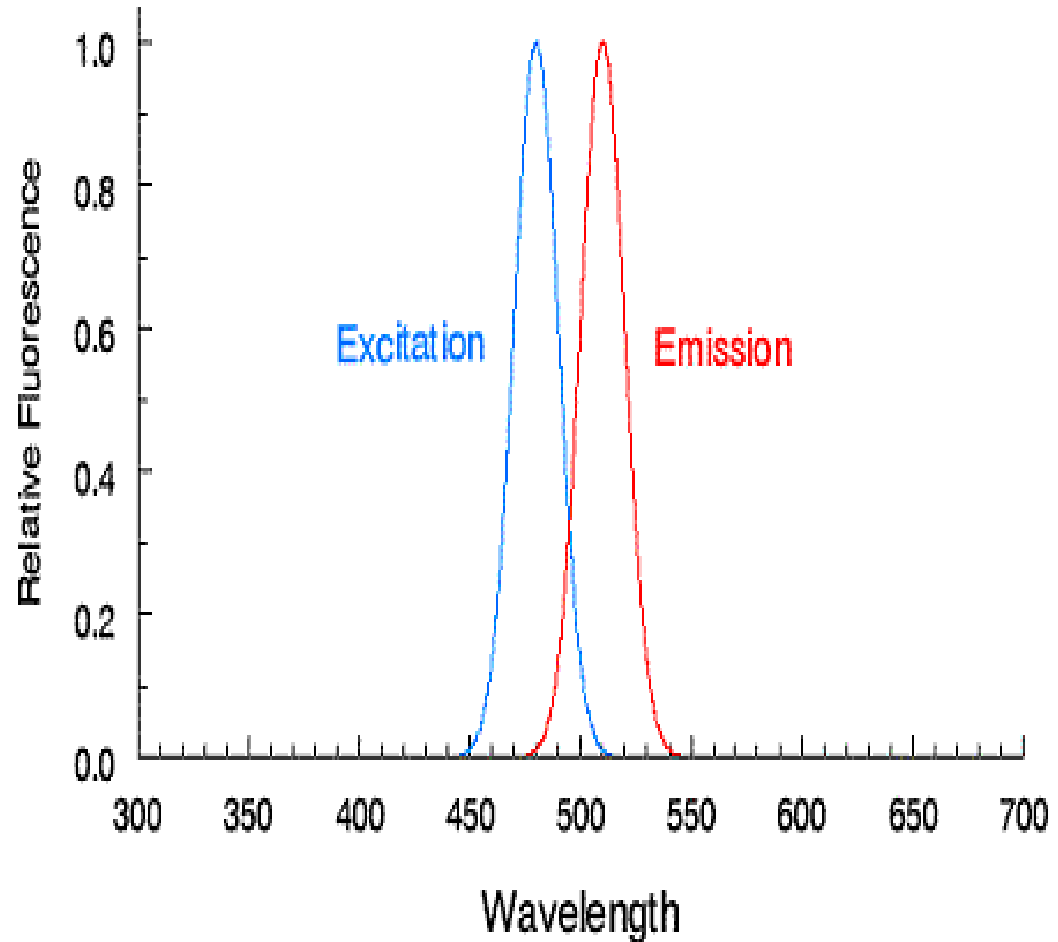


Fluorofory

- **Velká část fluoroforů jsou heterocyklické polyaromatické uhlovodíky**
- **Jejich konečná fluorescence (emise) závisí na schopnosti molekuly fluoroforu absorbovat a emitovat fotony**
- **Emise fluoroforu je silně závislá na teplotě**

Princip fluorescence

- Absorbce světla o definované vlnové délce molekulou fluoroforu
- Přejchod molekuly do excitovaného stavu s vyšší energií
- Návrat molekuly do základního stavu následovaného emisí světelného záření o jiné vlnové délce



Zhášeče

- **Molekuly schopné absorbovat nebo disipovat energii z excitovaného fluoroforu**
- **Zhášeč přijímá energii z fluoroforu a absorbuje nebo disipuje ji mechanismem „Proximálního zhášení“ nebo „FRET“**

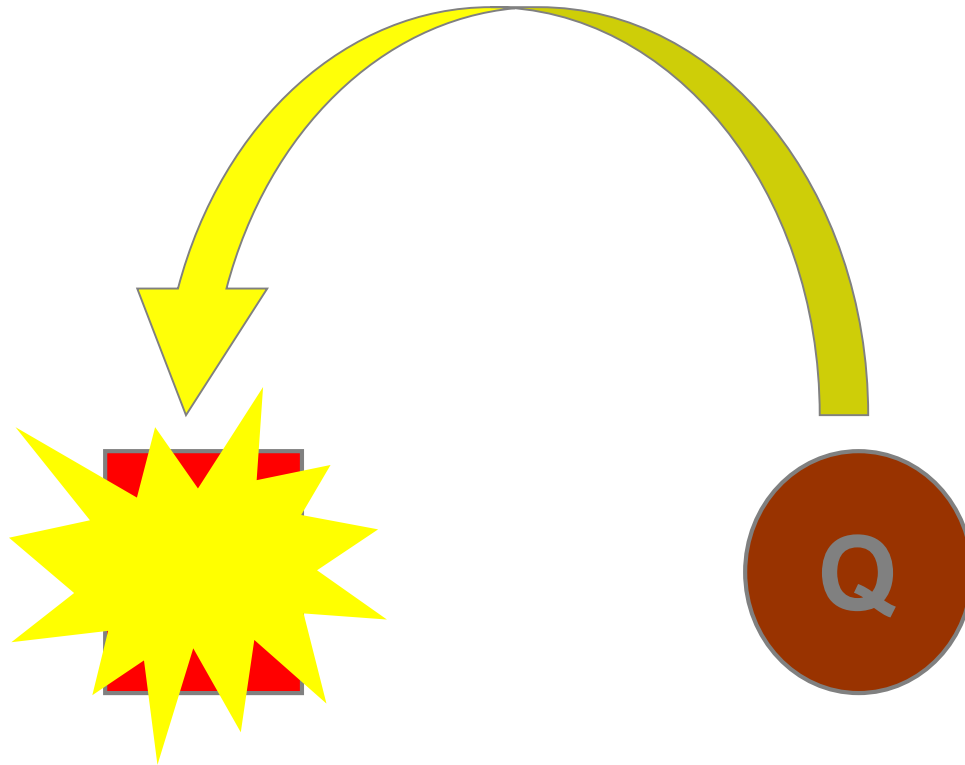
Proximální zhášení

Proximal quenching

- **Založeno na krátké vzdálenosti mezi fluoroforem a zhášečem, která mezi nimi dovoluje efektivní přenos energie, již zhášeč převádí na teplo a tím „zháší“ excitovaný fluorofor.**

Proximální zhášení

Proximal quenching



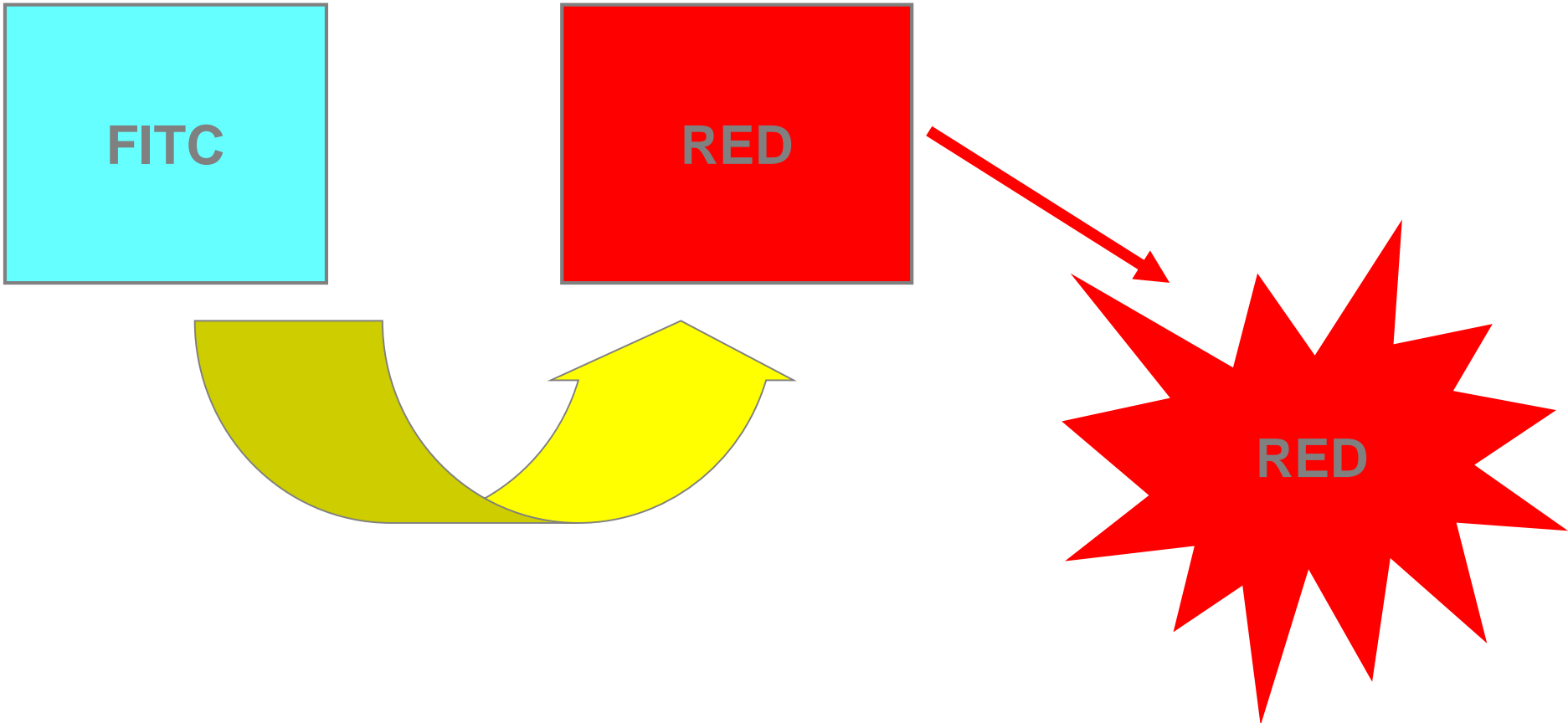
FRET

Fluorescence resonance energy transfer

- Donorová molekula (excitovaná externím světelným zdrojem) předává část své energie na akceptorovou molekulu, která vyzáří světlo o jiné vlnové délce.
- Účinnost tohoto procesu je mimo jiné silně závislá na vzdálenosti molekuly donoru a akceptoru (účinně 100Å, cca 30 bp v lineárním formátu sond).

FRET

Fluorescence resonance energy transfer

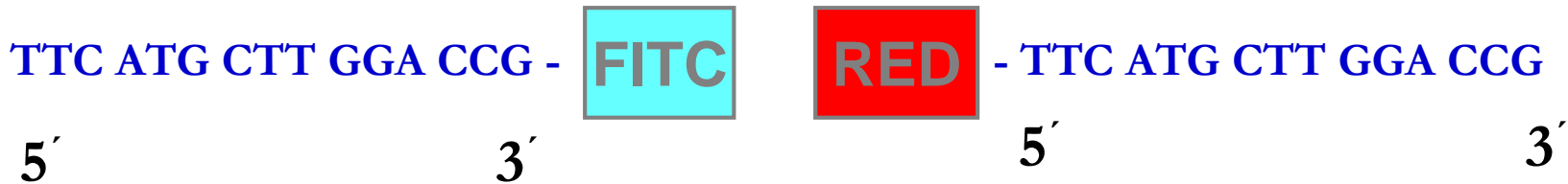


Sonda

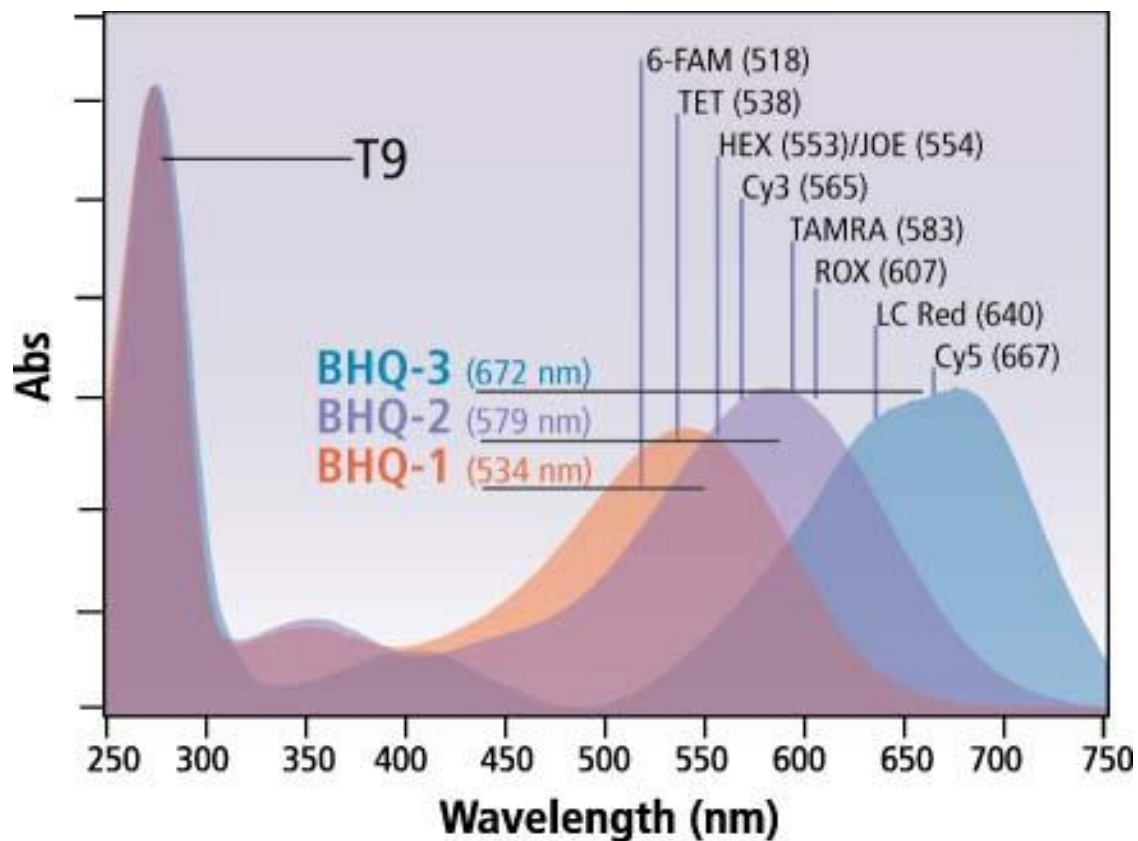
Krátký oligonukleotid s podobnými vlastnostmi jako PCR primer (vazba na DNA řetězec stejným způsobem jako PCR primer)

Umožňuje vázat fluorofor a zhášec v efektivní vzdálenosti od sebe a tím zajistit proces zhášení fluoroforu do doby detekce

Spojení fluoroforu, sondy a zhášeče



Nejčastěji používané kombinace fluorofor/proximální zhášec ve vazbě se sondou



FAM

5'

3'

BHQ1

Metody Real Time PCR

- I. **Nespecifické metody:** založené na nespecifické vazbě fluoroforu do vznikající molekuly dsDNA

- II. **Specifické metody:** založené na specifické vazbě sondy označené fluoroforem

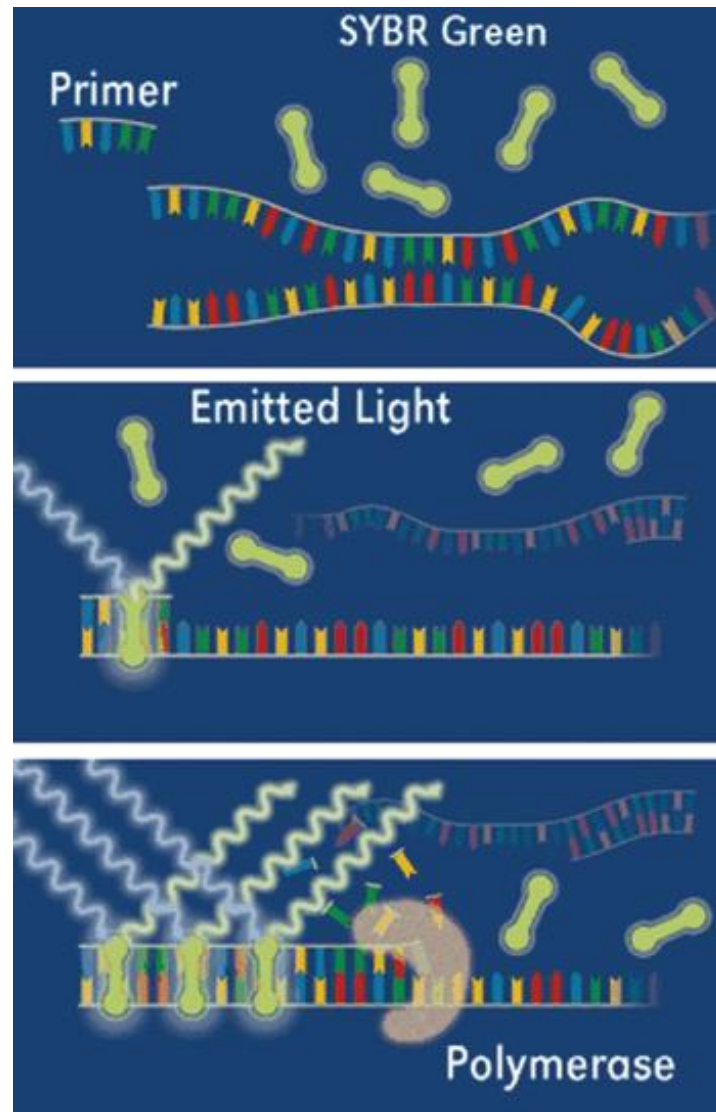
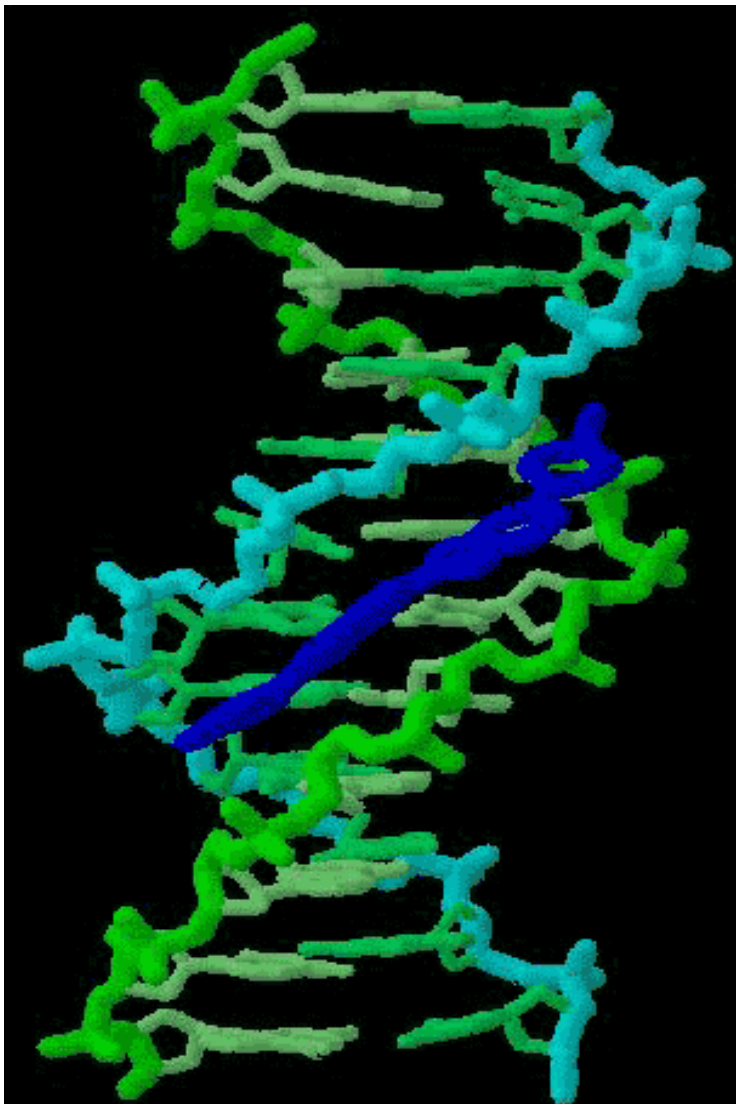
Nespecifické metody - DNA interkalátory -

- **Fluorofor se interkaluje, „váže“ do vznikajícího řetězce DNA v průběhu PCR**
- **Vazba v malém žlábků molekuly DNA**

Formáty nespecifických systémů

- **Quencher-Labeled Primer I**
- **Quencher-Labeled Primer II**
- **LUXTM Primers**
- **AmplifluorTM**
- **SYBR Green I**

Princip použití SYBRTM Green I



Důležitá otázka:

Je vazba molekuly SYBR Green do vznikající molekuly DNA reversibilní nebo ireversibilní děj a proč tomu tak je?

Detekce rozdílů v sekvenci DNA pomocí SYBR Green I

- modelový příklad -

Úsek A o délce 200 bp ohraničený primery

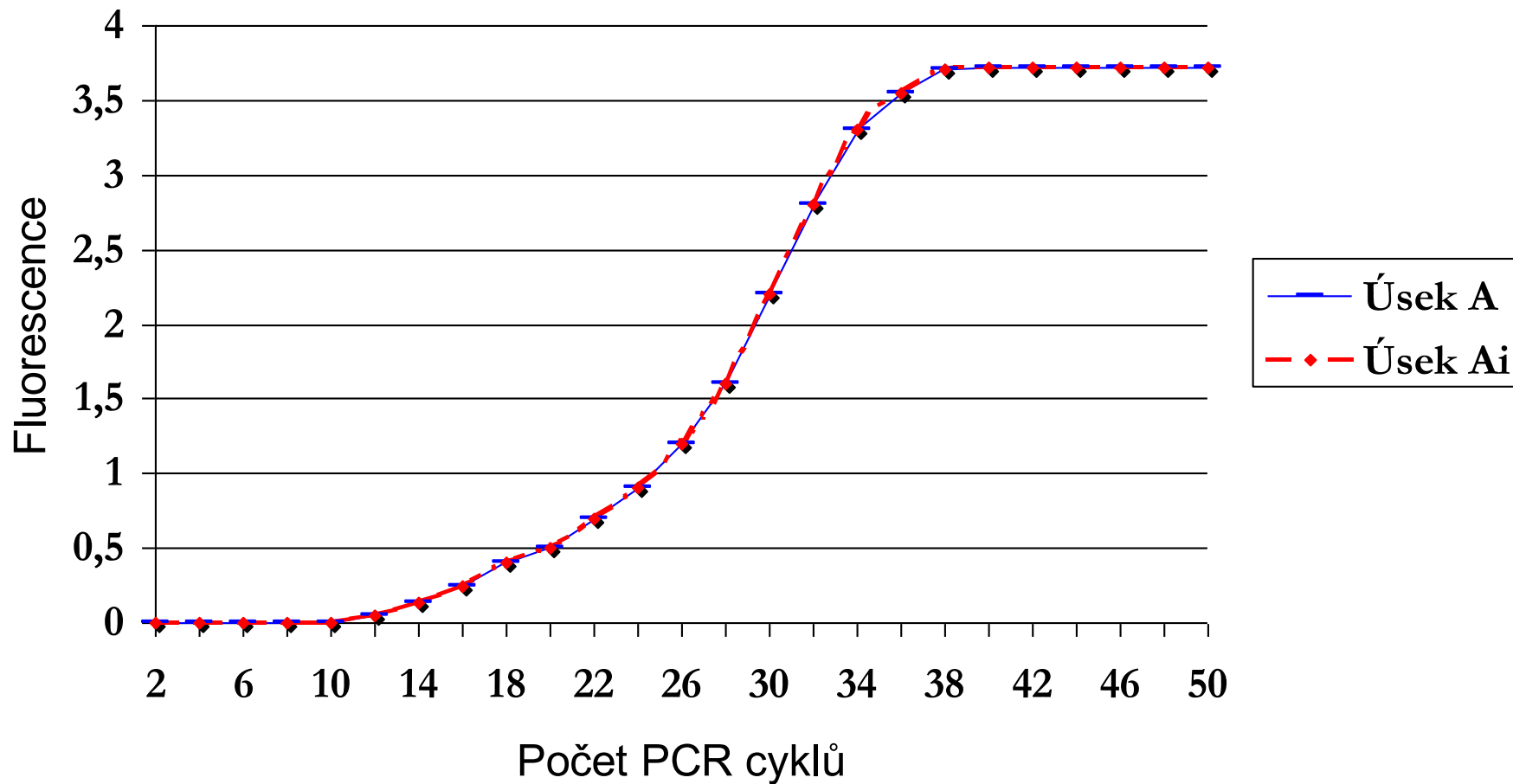
CCTCCTGCCTCTACCAATCGCCAGTCAGGAAGGCAGCCTACCCCGCTG
ACTCCACCTTTGAGAGACTCATCCTCAGGCCATGCAGTGGAATTCC
ACAACCTTCCACCAAACCTCTGCAAGATCCCAGAGTGAGAGGCCTGTAT
CTCCCTGCTGGTGGCTCCAGTTCAGGAACAGTAAACCCTGTTCCGACT
ACTGCCTC

Úsek Ai s inzercí 5 bp o délce 205 bp ohraničený primery

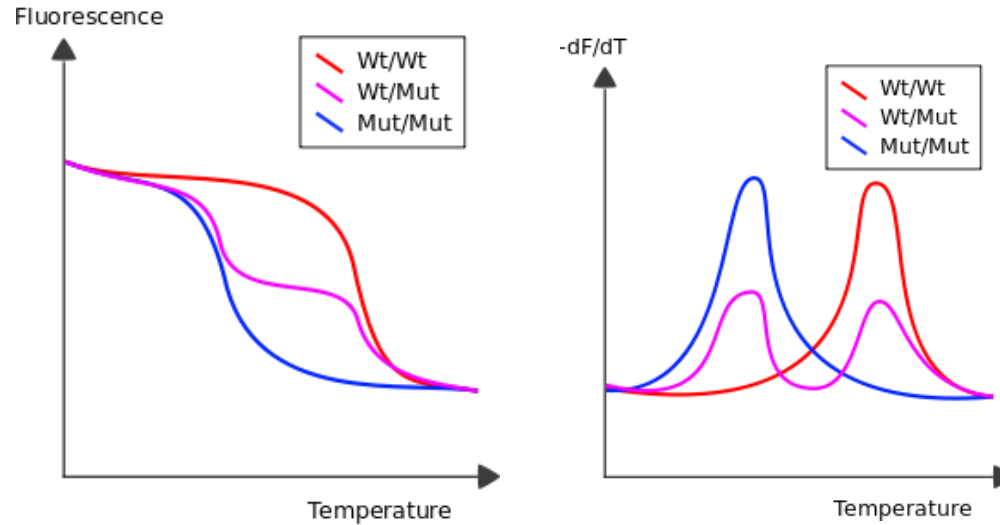
CCTCCTGCCTCTACCAATCGCCAGTCAGGAAGGCAGCCTACCCCGCTG
ACTCCACCTTTGAGAG **ACACT** AACTCATCCTCAGGCCATGCAGTGGA
ATTCCACAACCTTCCACCAAACCTCTGCAAGATCCCAGAGTGAGAGGCC
TGTATCTCCCTGCTGGTGGCTCCAGTTCAGGAACAGTAAACCCTGTTCC
GACTACTGCCTC

Výsledek detekce pomocí SYBR Green I

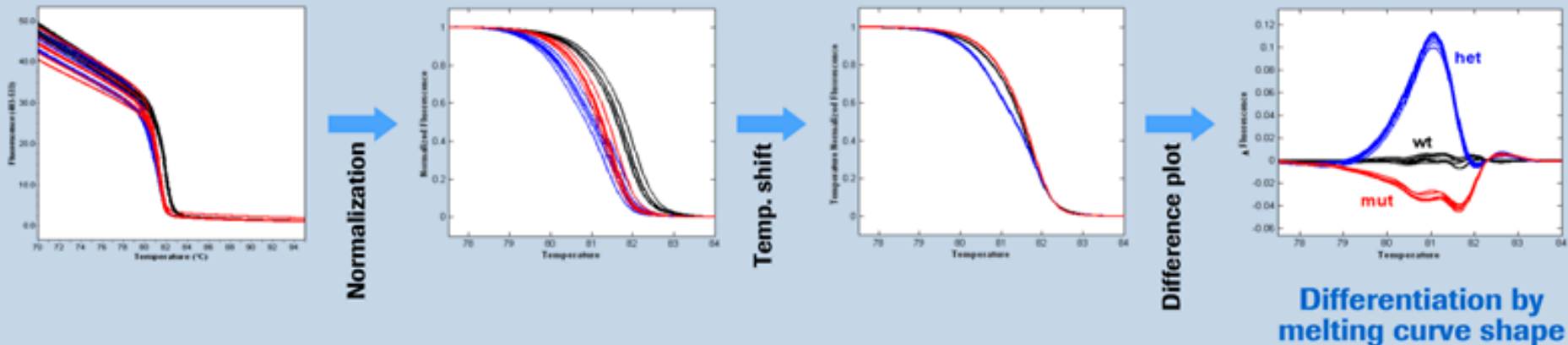
Základní data



Vyhodnocení detekce pomocí SYBR Green I – Meltingová analýza



Amplicon melting



Výhody a nevýhody použití nespecifických systémů

Výhody

- **Cenově „nenáročná“**
- **Není nutná analýza sekvence pro návrh sond**

Nevýhody

- **Vazba do ssDNA**
- **Problematická analýza primer/dimer struktur**
- **Problematická kvantifikace**

Specifické metody

- Značené DNA sondy -

Metoda založená na hybridizaci primerů a sondy specifické pro hledaný úsek DNA

Popsány 2 hlavní typy sond:

- Lineární sondy**
- Strukturní sondy**

Formáty specifických systémů

Lineární sondy

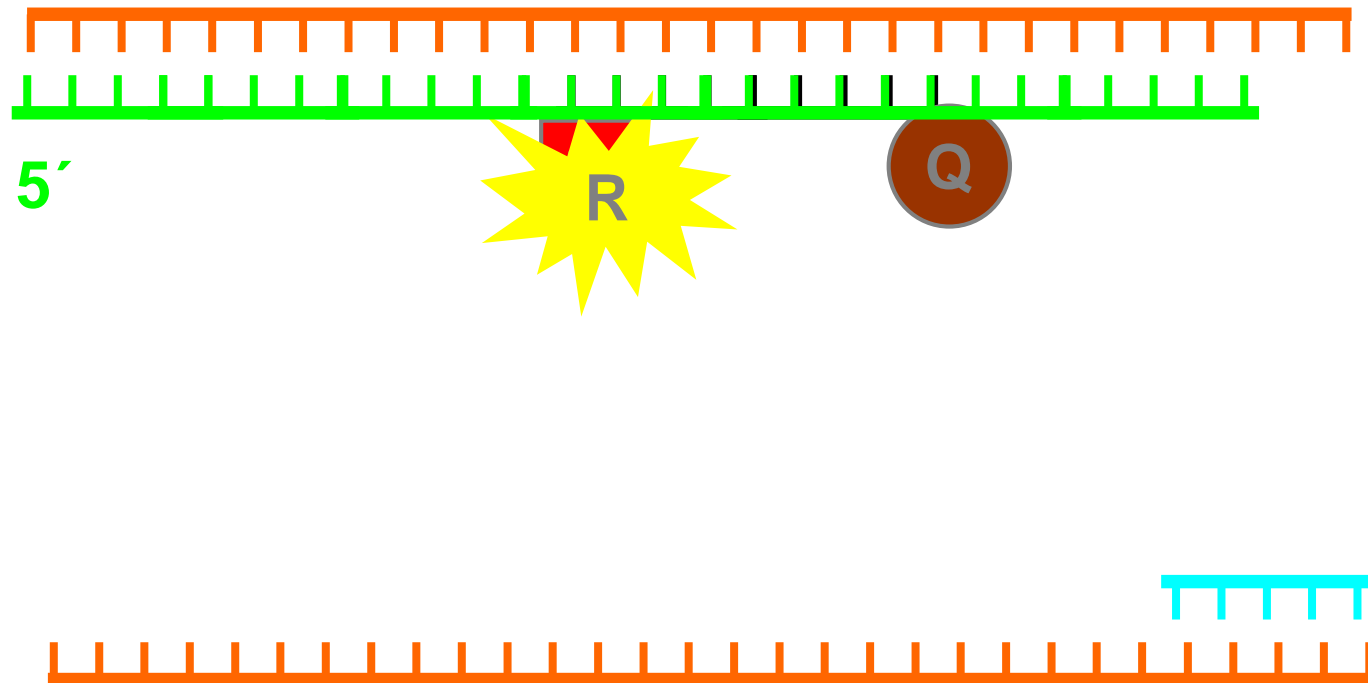
- ResonSense® Probes
- Angler® Probes
- HyBeacons™
- Light-up Probes
- Hydrolysis (TaqMan®) Probes
- Lanthanide Probes
- Hybridization Probes (FRET)
- Eclipse™
- Displacement Hybridization/Complex Probe

Strukturní sondy

- Molecular Beacons
- Scorpions™
- Cyclicons™
- Nanoparticle Probes
- Conjugated Polymers/Peptide Nucleic Acid Probes

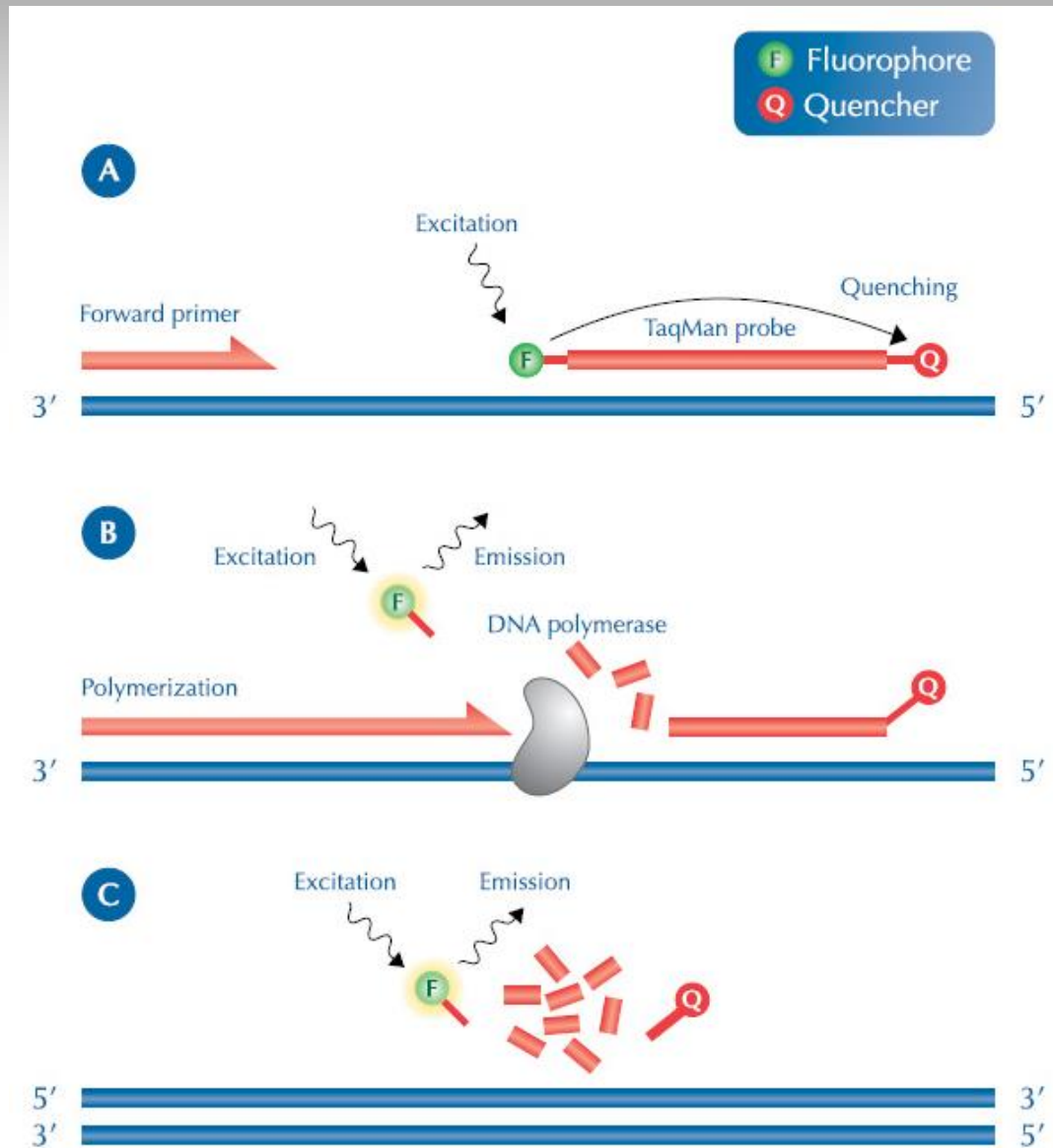
Lineární sondy

- Hydrolysis (TaqMan[®]) Probes -



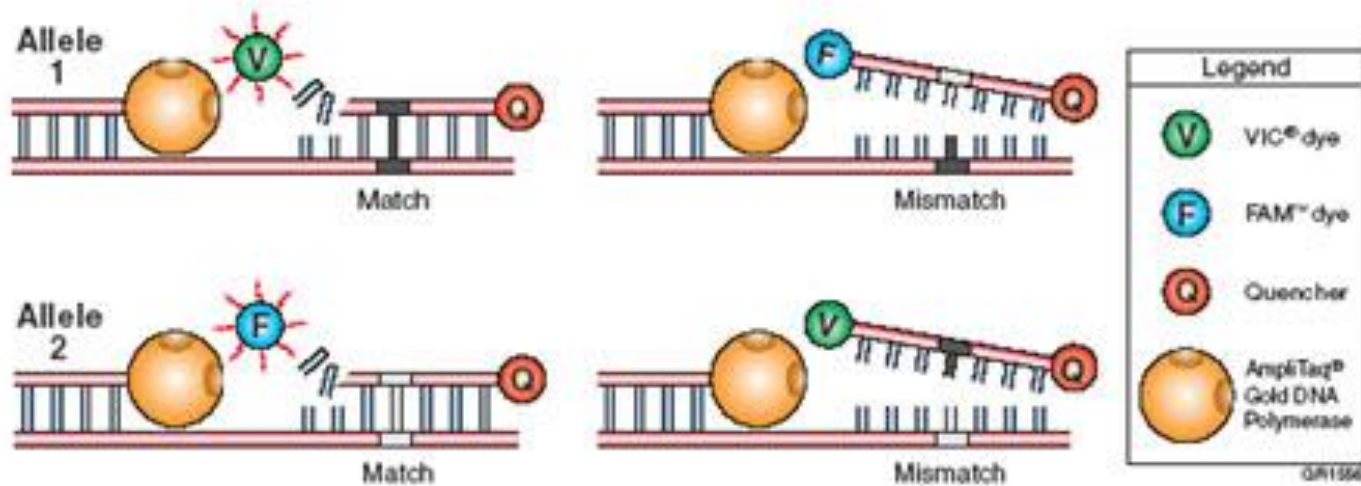
Linear probes

- Hydrolysis (TaqMan[®]) Probes -



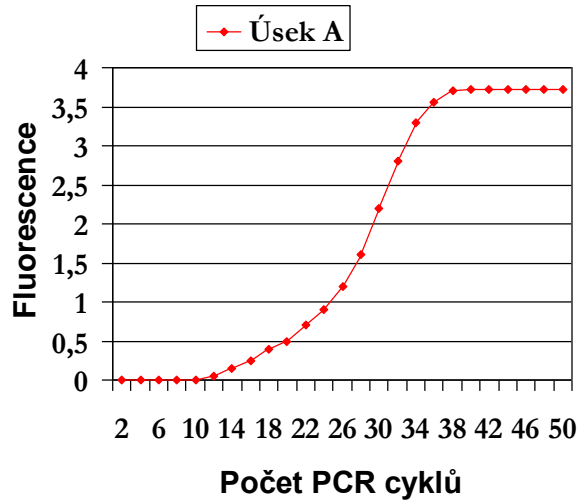
Alelově specifické TaqMan sondy

- V reakci jsou 2 sondy nesoucí 2 různé fluorofory
- Každá sonda se váže pouze k jedné alele



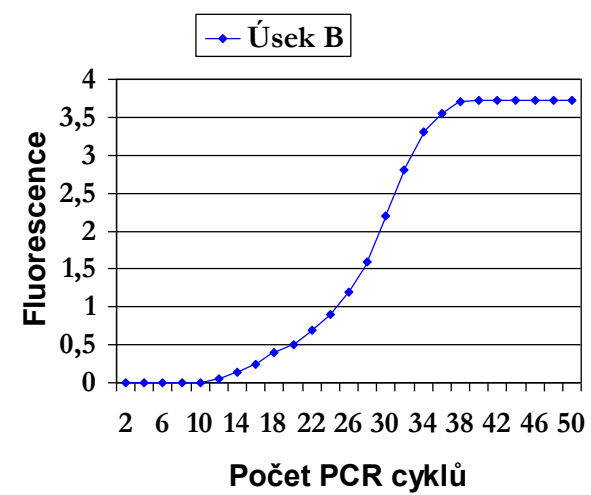
Výsledek detekce pomocí TaqMan sond

Snímací kanál 530 nm

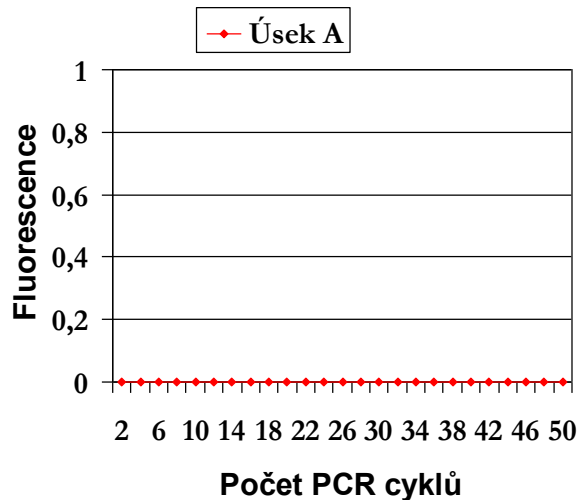


**Pozitivní
reakce pro
A i B**

Snímací kanál 560 nm

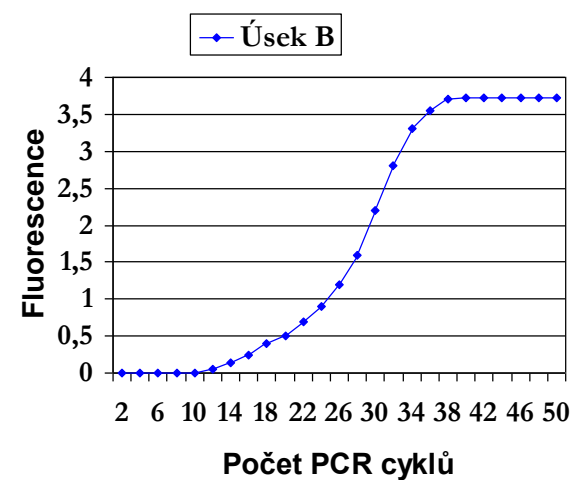


Snímací kanál 530 nm



**Negativní
reakce pro
A, poz**

Snímací kanál 560 nm

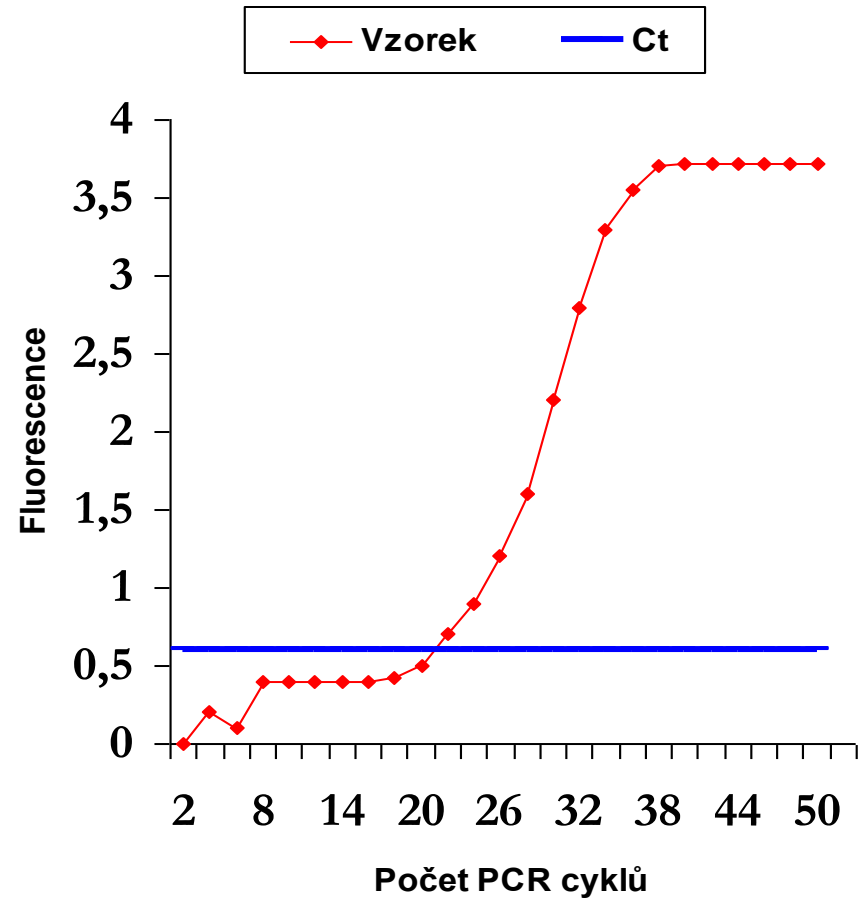


Postup kvantifikace pomocí Real Time PCR s využitím TaqMan sondy

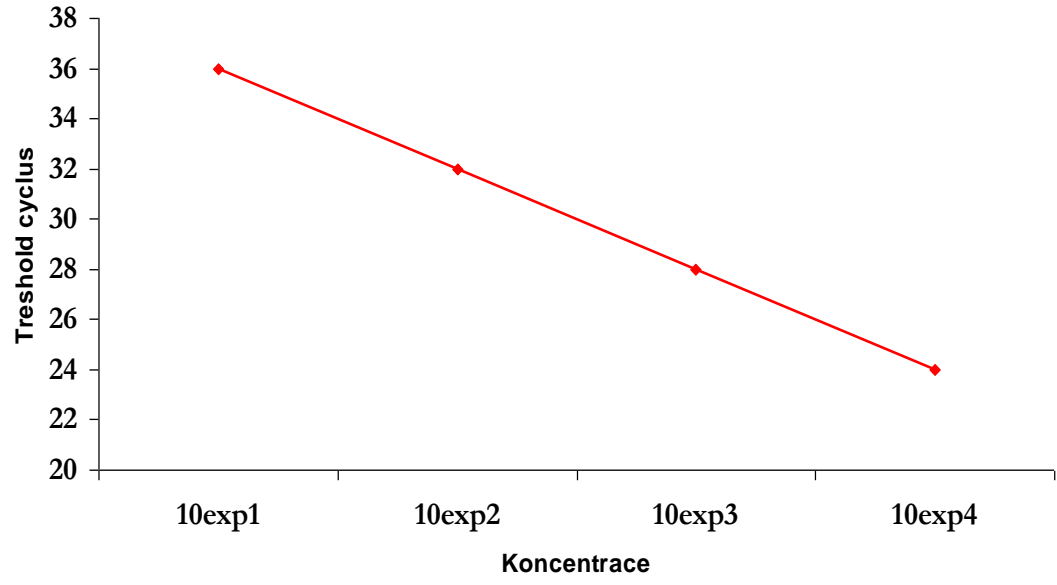
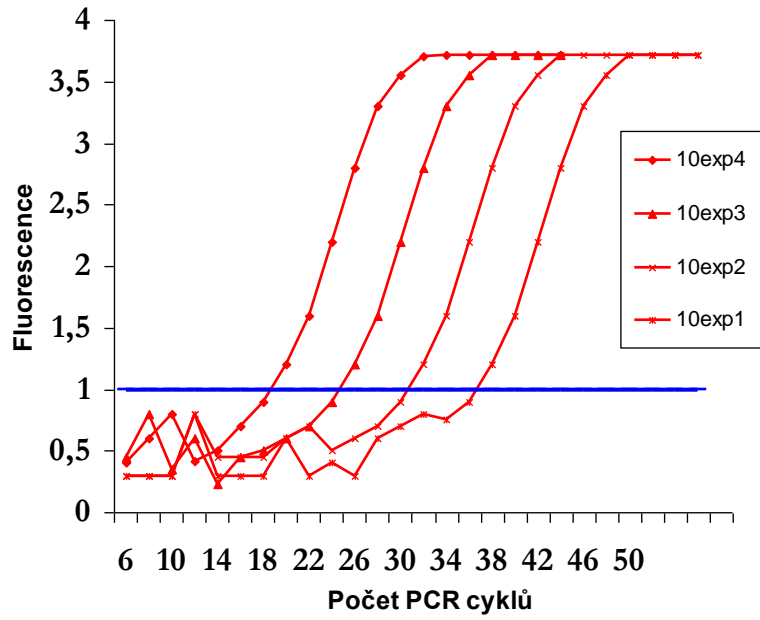
- 1. Stanovení Ct (Treshold cyklus)**
- 2. Vytvoření kalibrační křivky**
- 3. Kvantifikace neznámého vzorku pomocí vložené kalibrační řady**

Stanovení Ct - Treshold cyclus -

- Ct – číselná hodnota udávající PCR cyklus ve kterém je přístrojem detekována první změna fluorescence v amplifikovaném vzorku
- Číselnou hodnotu Ct určuje přístroj automaticky



Vytvoření kalibrační křivky



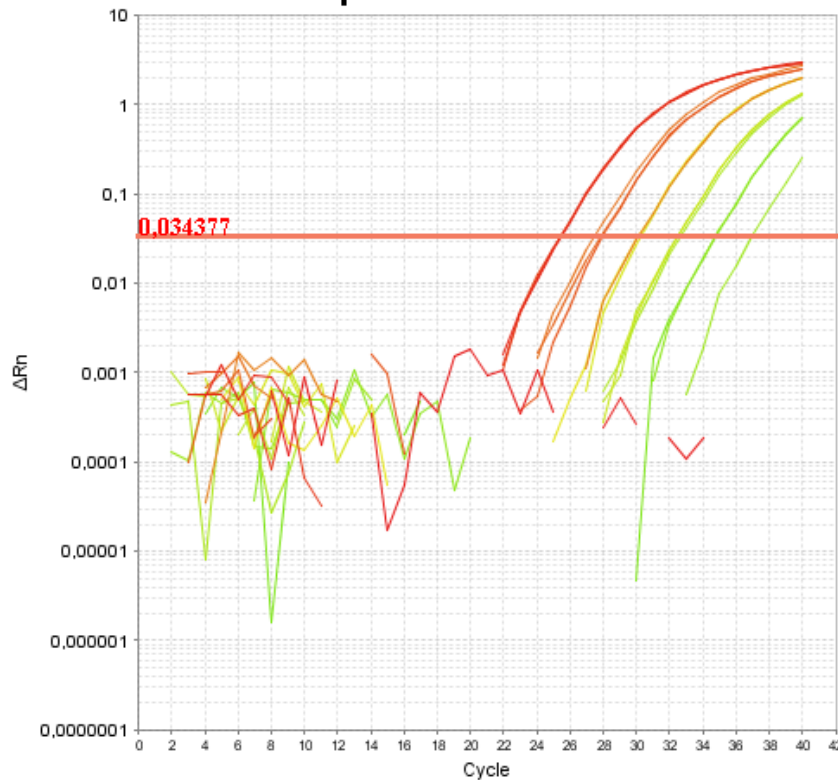
Real picture of calibration curve

Plot Settings

Plot Type: ΔRn vs Cycle Graph Type: Log Color: Well



Amplification Plot



Legend

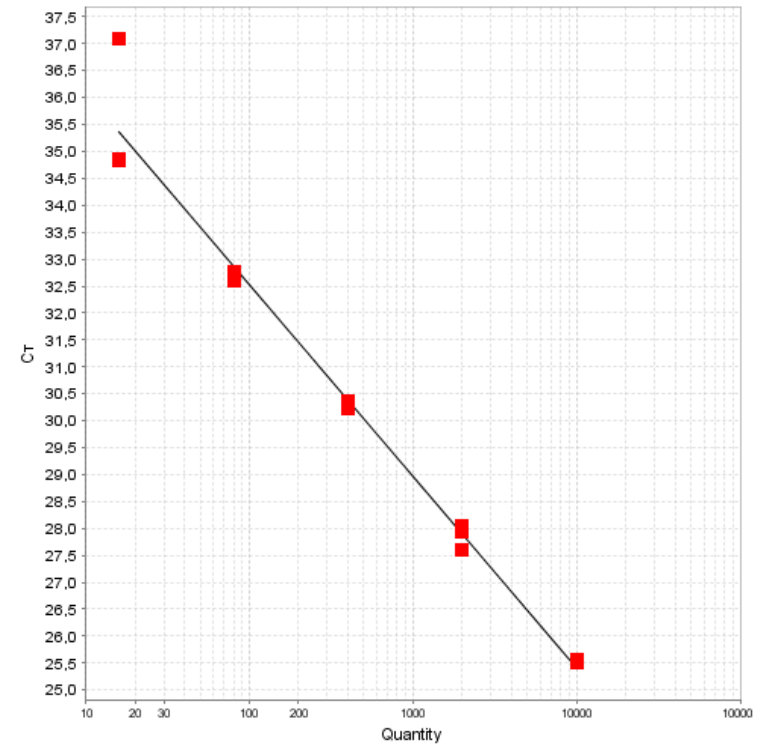
A B C D E F

Plot Settings

Target All Plot Color Default



Standard Curve

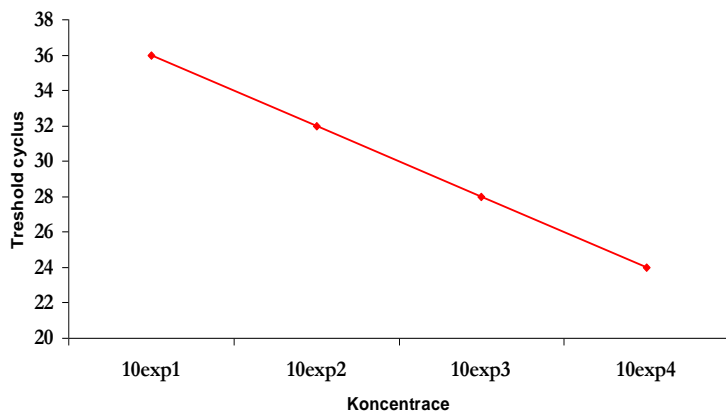
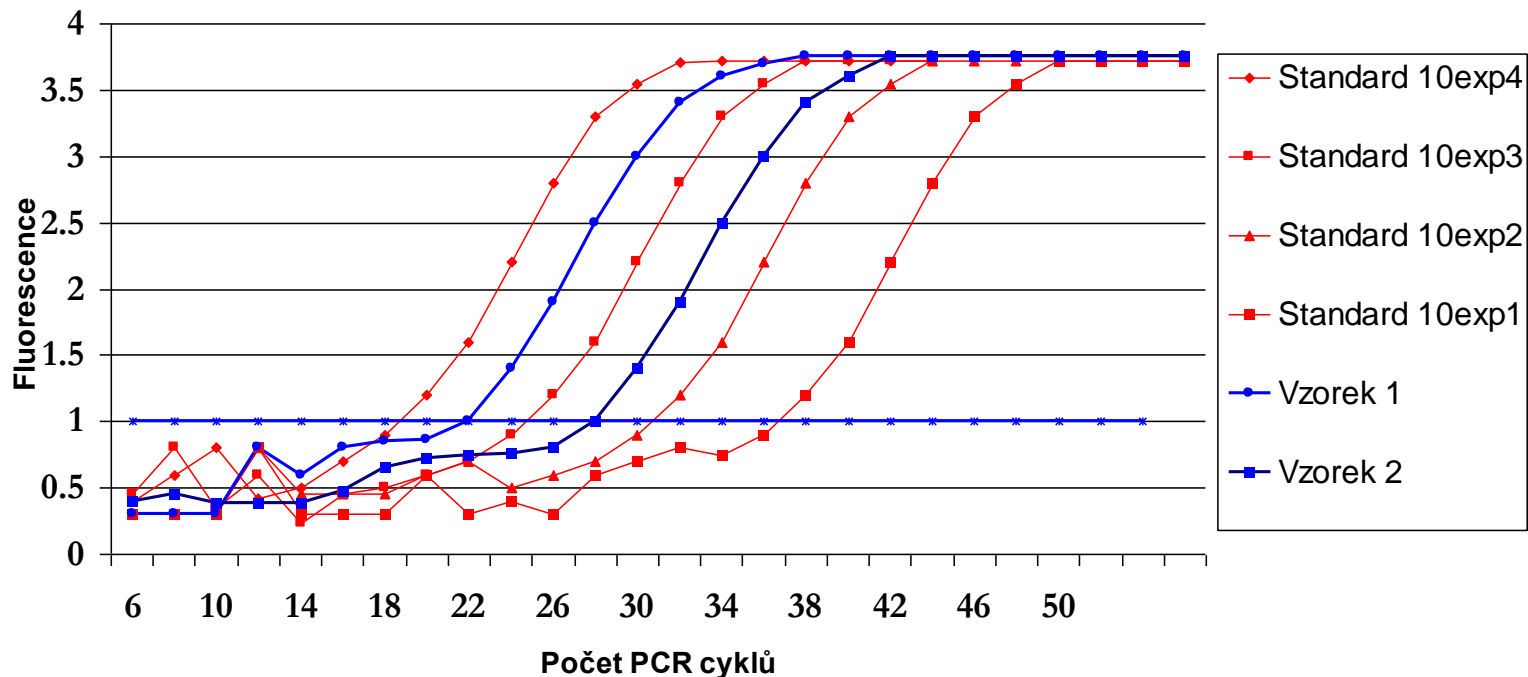


Target: Target1 Slope: -3,568 Y-Inter: 39,671 R^2 : 0,98 Eff%: 90,675

Legend

Standard Unknown Unknown (Flagged)

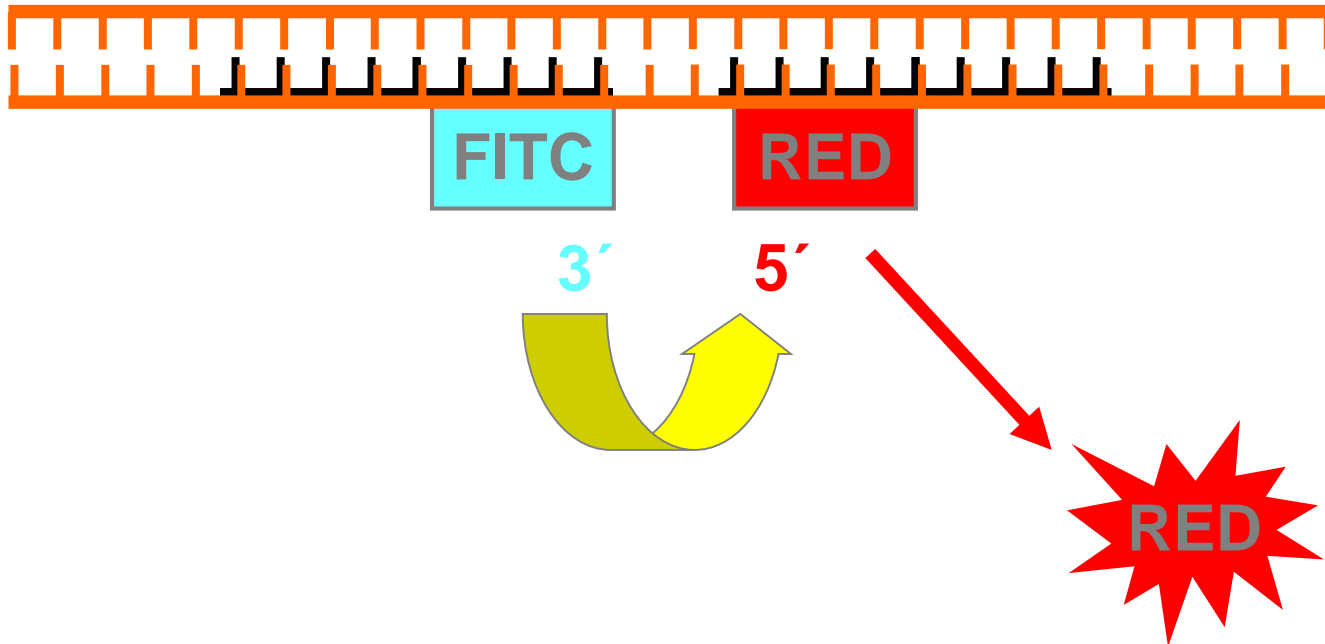
Kvantifikace neznámého vzorku pomocí vložené kalibrační řady



Vzorek	Typ vzorku	Ct	Koncentrace (kopií/ul)
1	Neznámý	25,64	3,50E+03
2	Neznámý	29,23	2,50E+02
K1	Standard	23,97	1,00E+04
K3	Standard	27,16	1,00E+03
K3	Standard	30,68	1,00E+02
K4	Standard	33,53	1,00E+01

Lineární sondy

- Hybridization Probes (FRET) -



Použití FRET analýzy pro detekci jednonukleotidové mutace (SNP) v úseku DNA - modelový příklad -

Standardní alela o délce 200 bp

CCTCCTGCCTCTACCAATCGCCAGTCAGGAAGGCAGCCTACCCCGCTG
ACTCCACCTTTGAGAG**A**CACTCATCCTCAGGCCATGCAGTGGAATTCC
ACAACCTTCCACCAAACCTCTGCAAGATCCCAGAGTGAGAGGCCTGTAT
CTCCCTGCTGGTGGCTCCAGTTCAGGAACAGTAAACCCTGTTCCGACT
ACTGCCTC

Mutantní alela (s mutací v jediném nukleotidu) o délce 200 bp

CCTCCTGCCTCTACCAATCGCCAGTCAGGAAGGCAGCCTACCCCGCTG
ACTCCACCTTTGAGAG**C**CACTACACTCATCCTCAGGCCATGCAGTGGA
ATTCCACAACCTTCCACCAAACCTCTGCAAGATCCCAGAGTGAGAGGCC
TGTATCTCCCTGCTGGTGGCTCCAGTTCAGGAACAGTAAACCCTGTTCC
GACTACTGCCTC

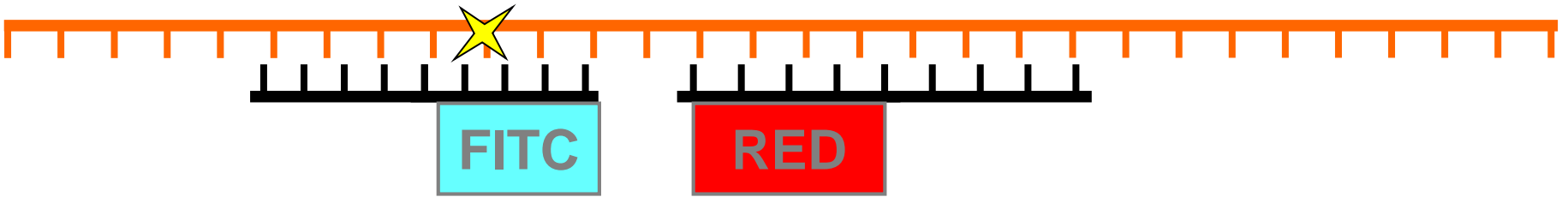
Návrh sond pro detekci SNP pomocí FRET

GAGAGATCACTCAT-FITC RED-CCATGCAGTGGA

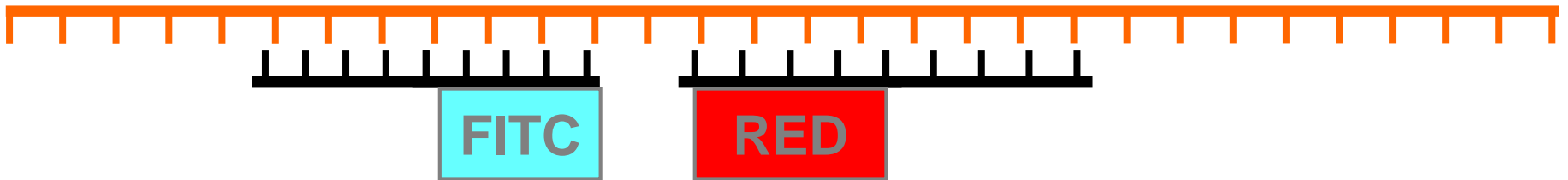
GACTCCACCTTTGAGAGATCACTCA(C)TCCTCAGGCCATGCAGTGGA

Princip analýzy SNP pomocí FRET sond

Mutantní alela (dCTP) $T_m = 55^\circ\text{C}$

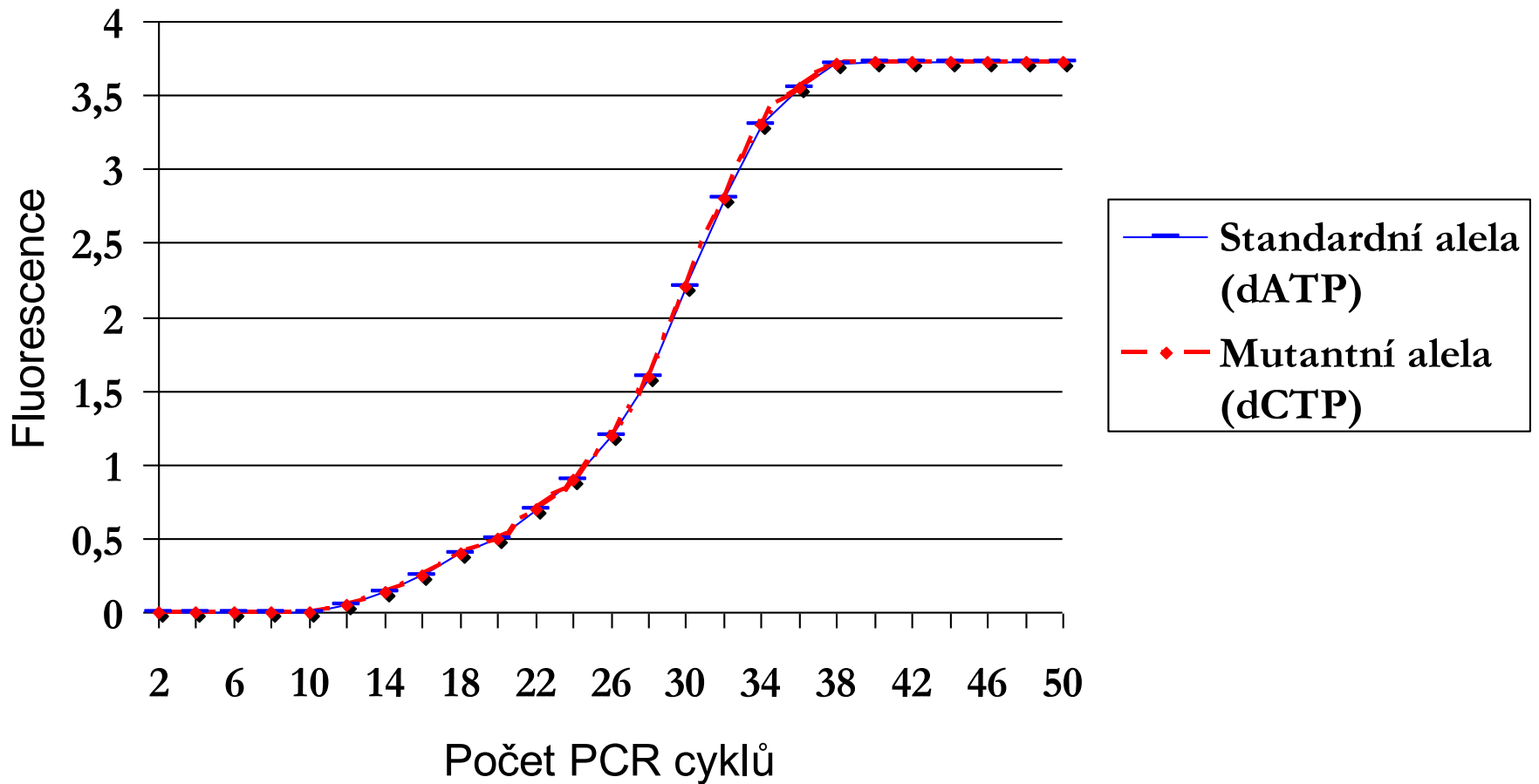


Standardní alela (dATP) $T_m = 62^\circ\text{C}$

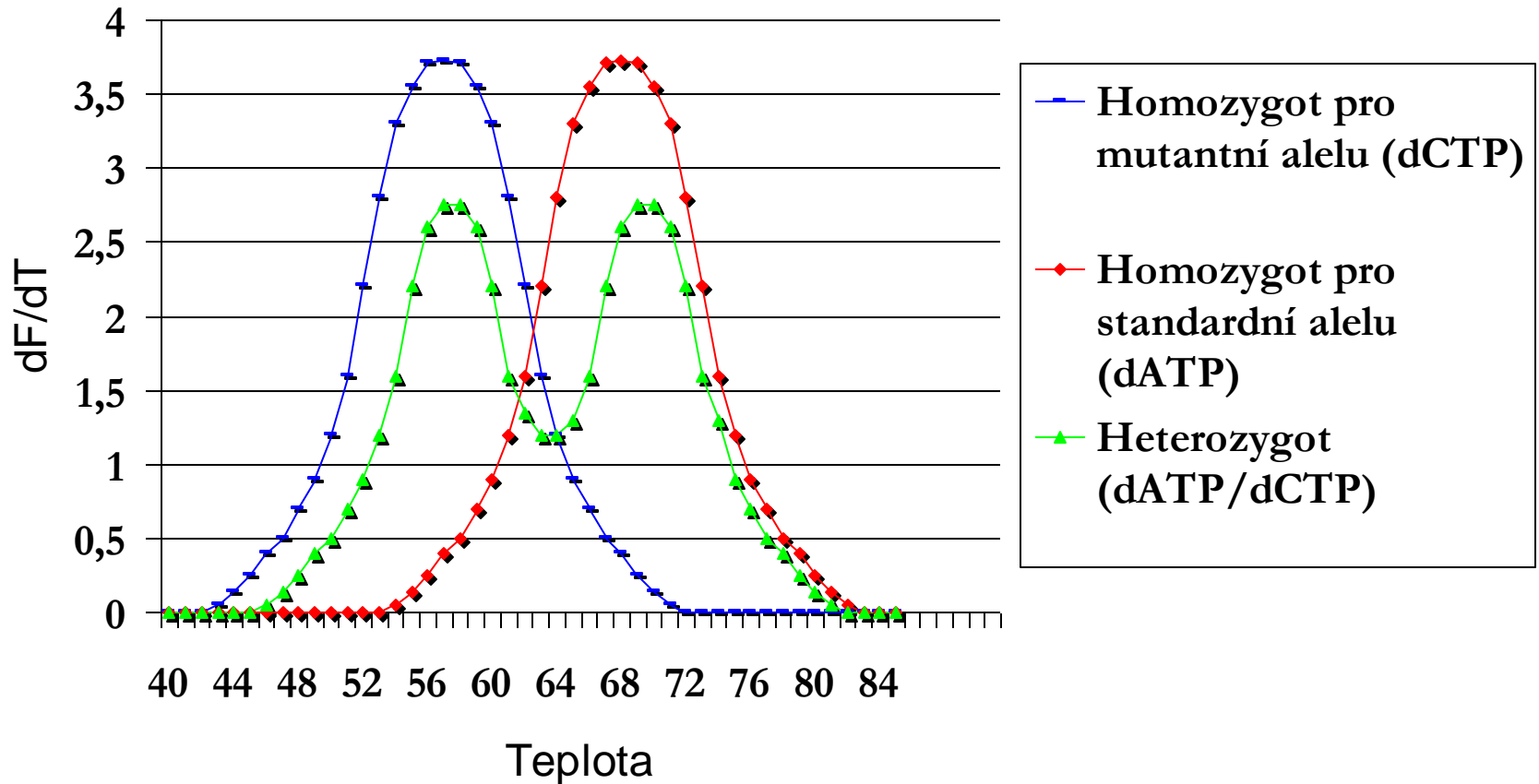


Výsledek detekce SNP pomocí FRET

Základní data

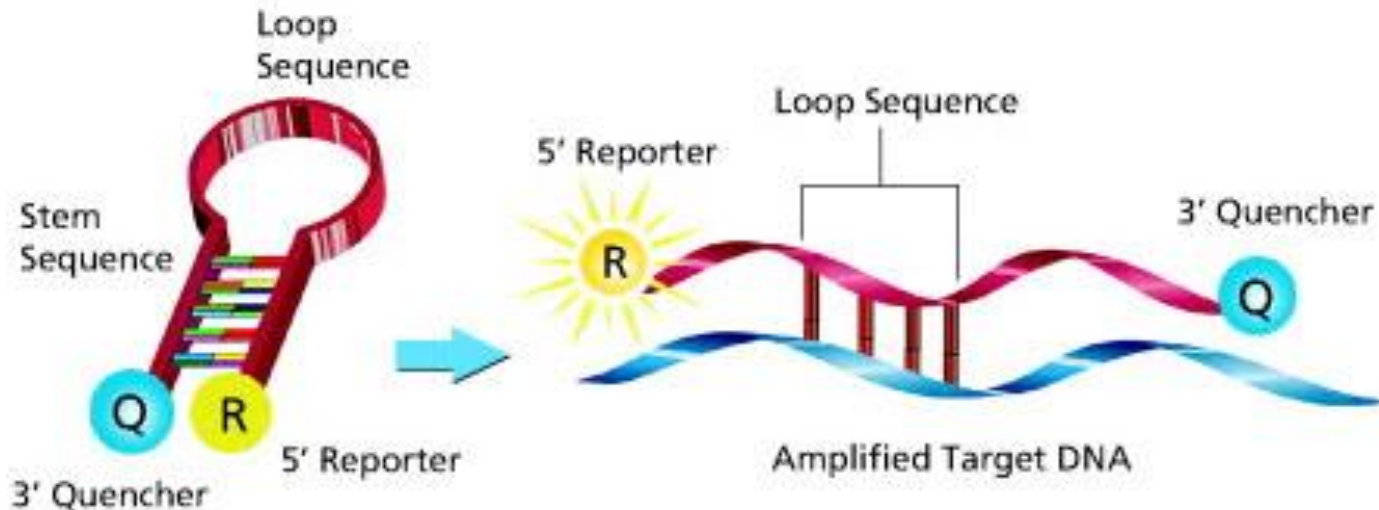


Vyhodnocení detekce SNP s použitím FRET pomocí meltingové analýzy



Structure probes – molecular beacon

- Contains:
 - Loop with target complementary sequence
 - Stem which „closes“ the hairpin
 - Reporter and quencher
- High sensitivity – protects probe during reaction
 - SNPs detection
 - Allelic discrimination

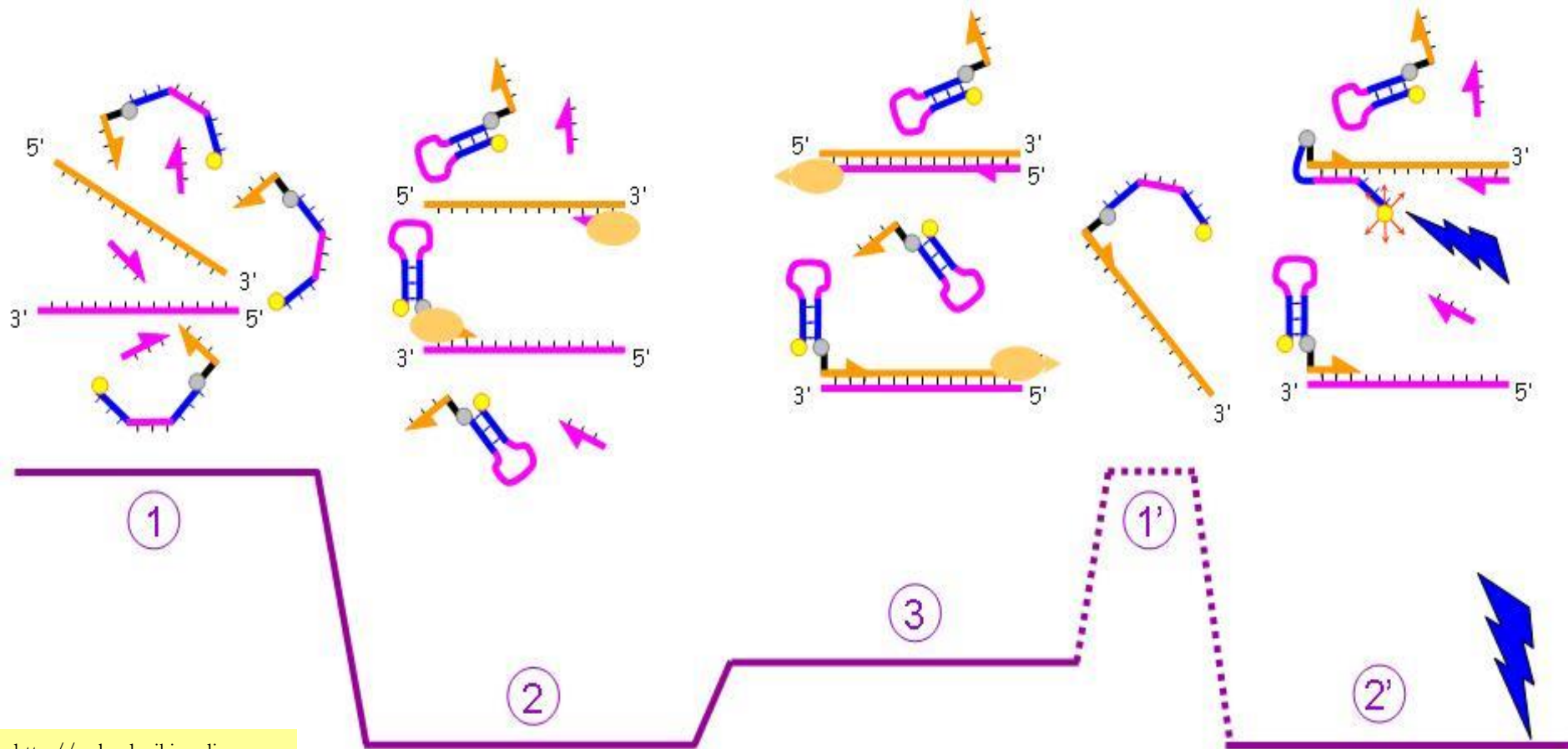


1. Unbound beacon with quenched fluorescence

2. Bound beacon with unquenched fluorescence

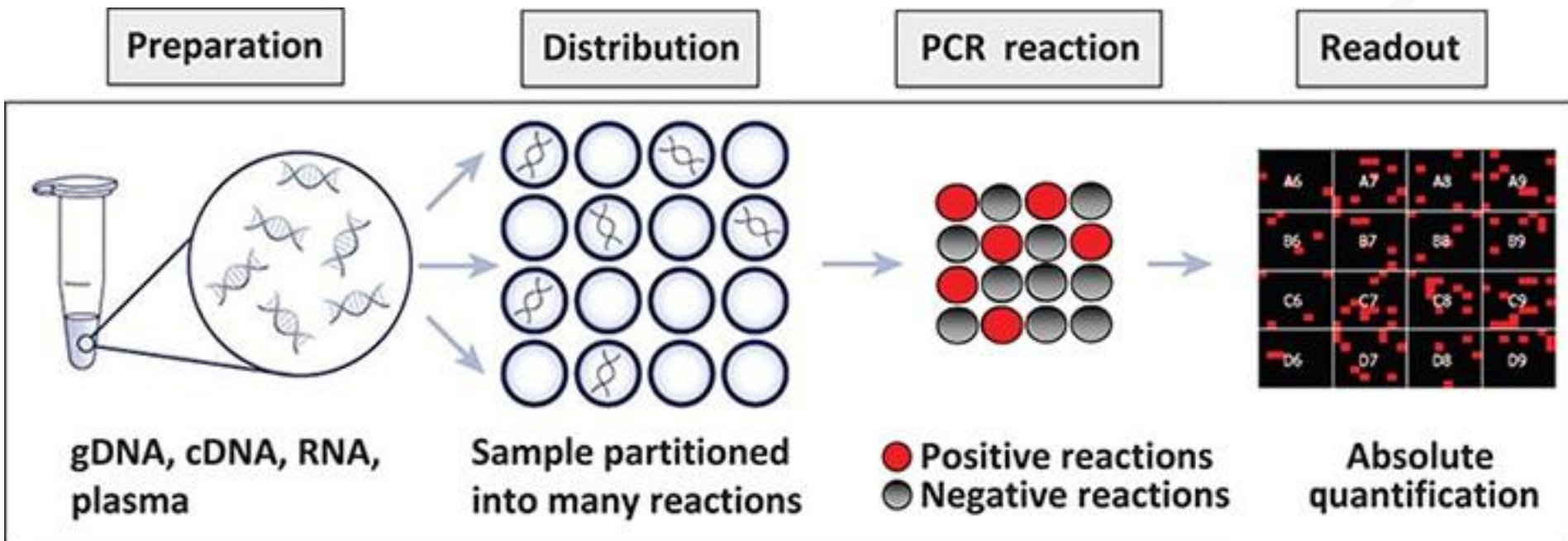
Structure probes – Scorpions

- Bi-function molecules – contain primer and probe in one molecule
- The signal is detected one cycle after probe binding

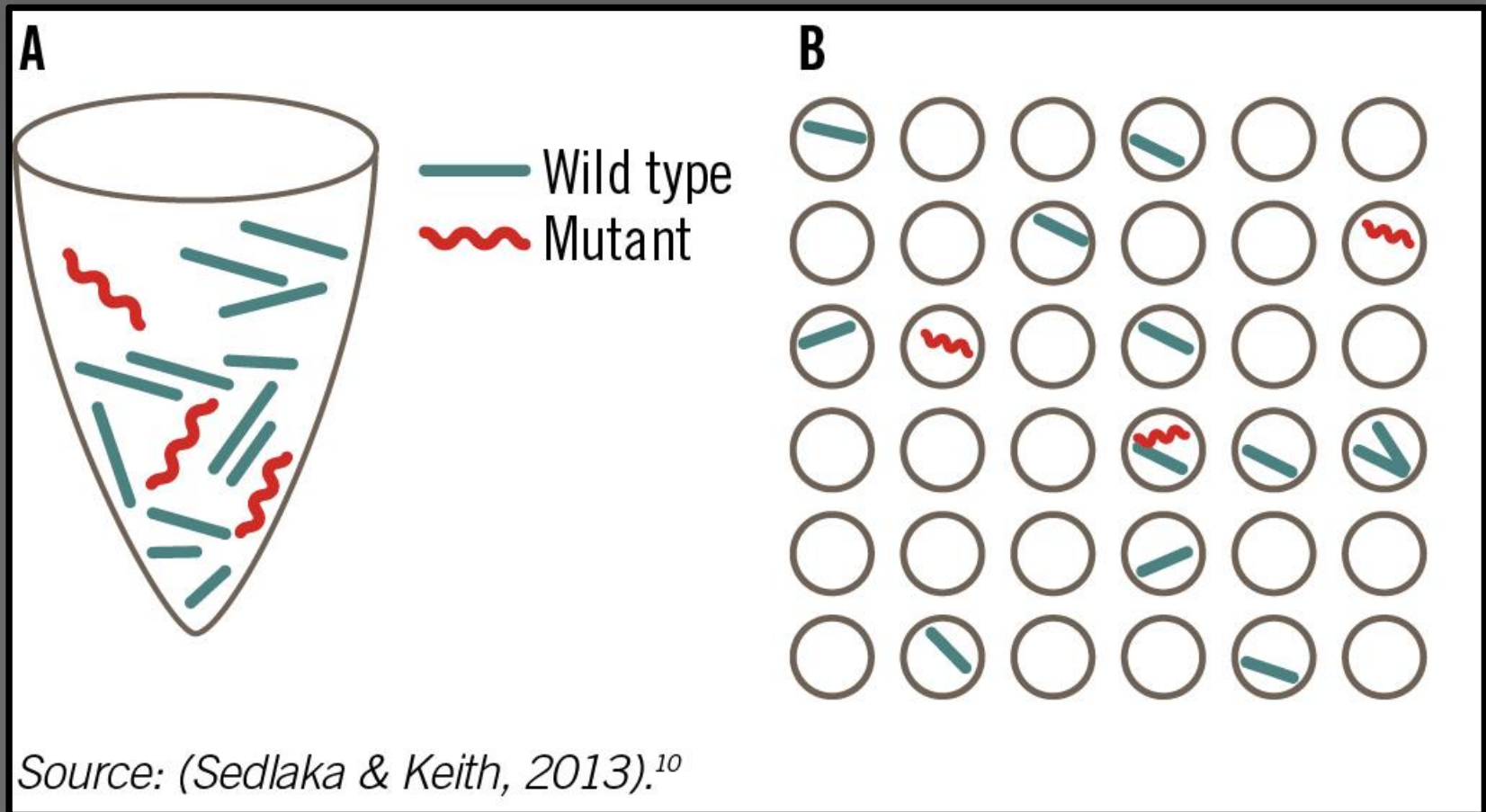


Digital PCR

- Theoretically - **One DNA molecule in one reaction well**
- Molecules in wells follow Poisson distribution => „cleaning“ data by mathematical operations
- Result of the reaction is **1** or **0** (positive or negative)



Digital PCR



Využití qPCR pro ELISA

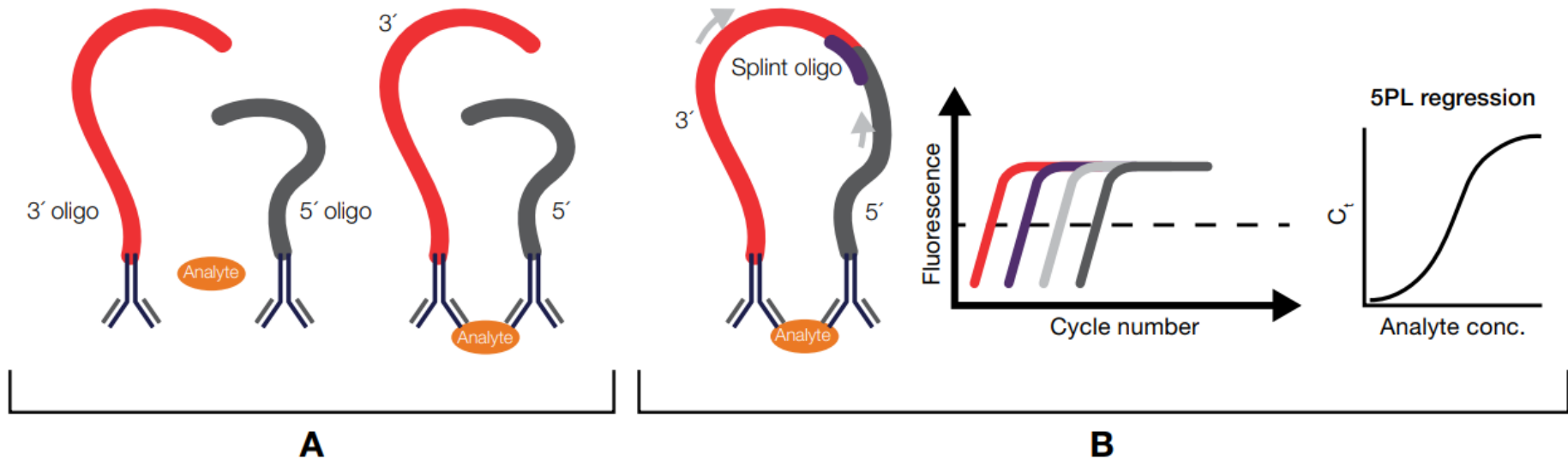


Figure 1. How ProQuantum immunoassays work.

How does it work?

ProQuantum immunoassays utilize proximity ligation assay (PLA™) technology to combine antigen–antibody binding for analyte detection with qPCR signal amplification and readout (Figure 1).

The assay is a two-step process:

A. Analyte binding by paired antibodies conjugated to oligonucleotides

Two antibody conjugates are provided in each kit: a 3' end oligonucleotide and a 5' end oligonucleotide, each conjugated to a target-specific antibody. When the antibody pair binds to two different epitopes of the protein, the 3' and 5' oligos come into close proximity.

B. Ligation of the oligonucleotides by DNA ligase and amplification by Applied Biosystems™ TaqMan® qPCR Assay

Only when the pair of antibodies binds to the analyte (A) can the associated oligos become bound to the complementary splint oligo and subsequently joined to each other with DNA ligase (B). Following the oligo ligation, 95°C heat inactivation denatures the ligase, antibodies, and other proteins, leaving 100-base strands in concentrations proportional to the level of antibody–analyte binding in the first stage. This 100-base DNA strand serves as the amplification template for 40 cycles of qPCR using TaqMan Assays.

Děkuji za Vaši pozornost