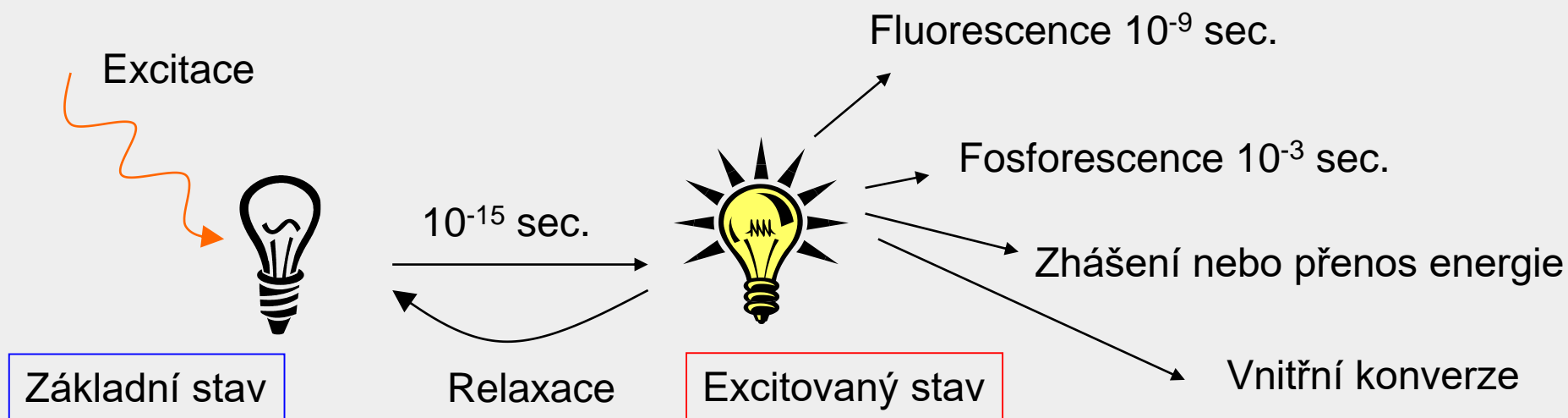


ÚVOD DO KVANTITATIVNÍ REAL-TIME PCR



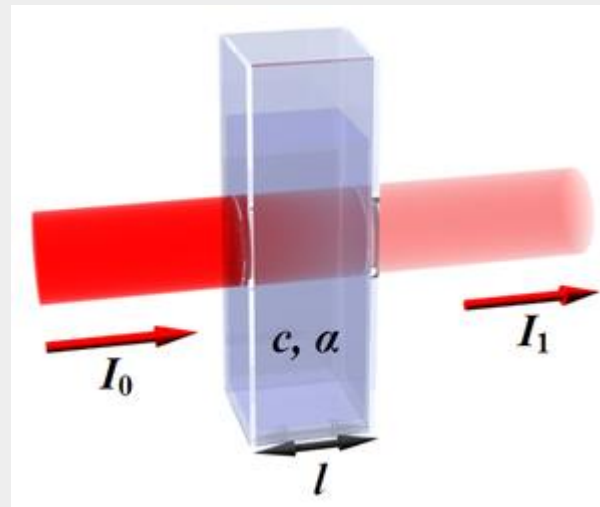
IV. Interkalační
barviva a sondy

Fluorofor – většinou heterocyklická nebo polyaromatická sloučenina, při přechodu z excitovaného do základního stavu fluoreskuje

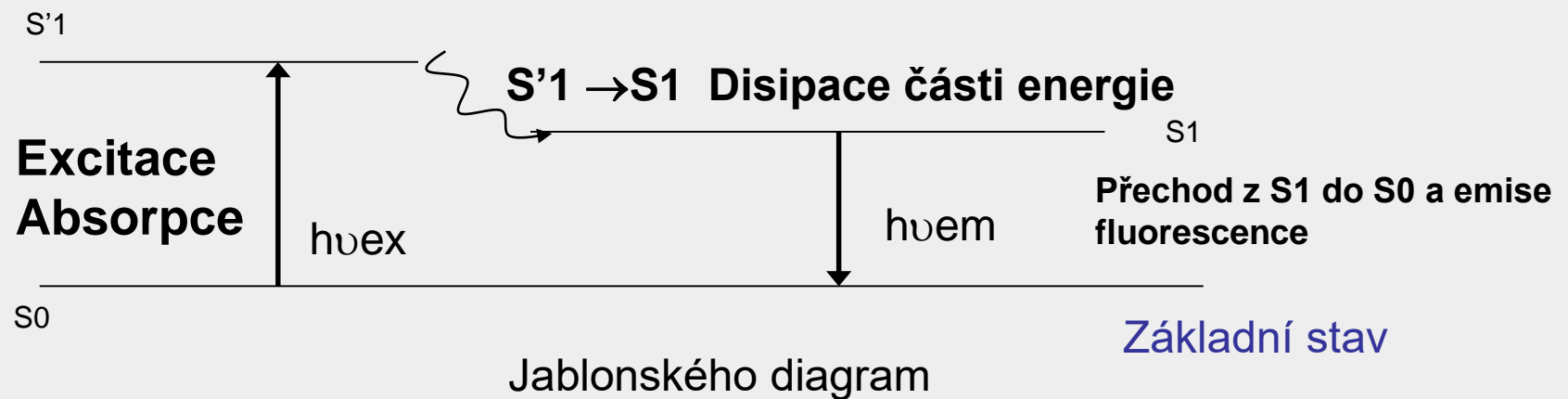
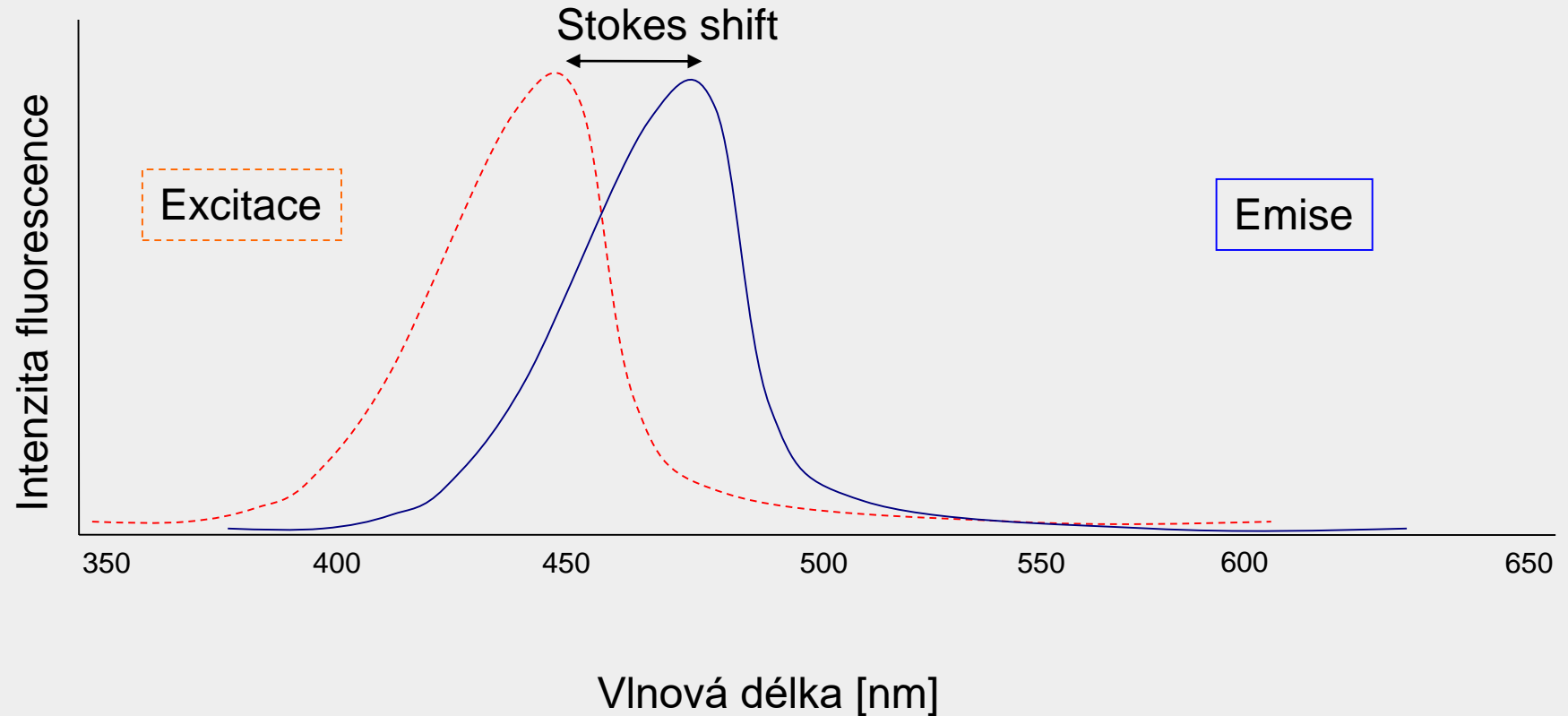


Fluorescenční kvantový výtěžek (Fluorescence quantum yield, QY) – poměr emitovaných fotonů k absorbovaným.

Molární extinkční (absorpční) koeficient – jak silně daná látka absorbuje světlo o dané vlnové délce $A = \epsilon c l$



Stokesův posun; Jablonského diagram



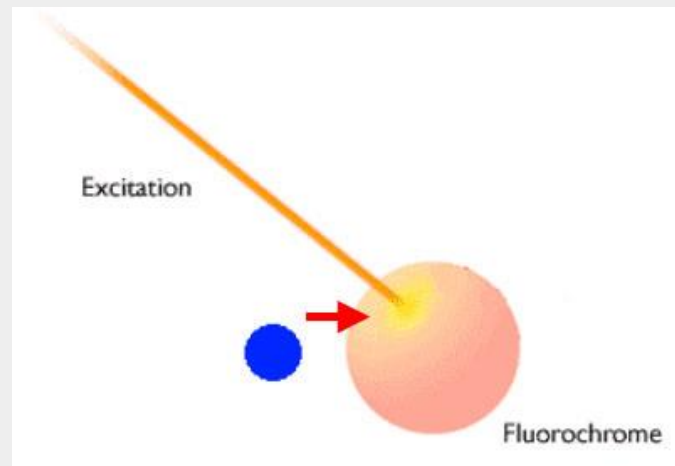
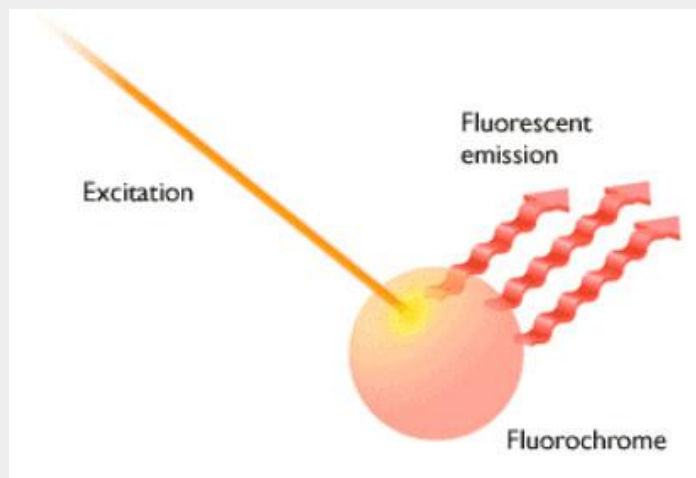
Quenchers – Zhášeeče (Q)

Zhášení – quenching

- Redukce QY (quantum yield) v daném fluorescenčním ději
- Absorpce nebo disipace energie – návrat fluoroforu do základního stavu bez emise fluorescence

Proximální zhášení – kolizní quenching

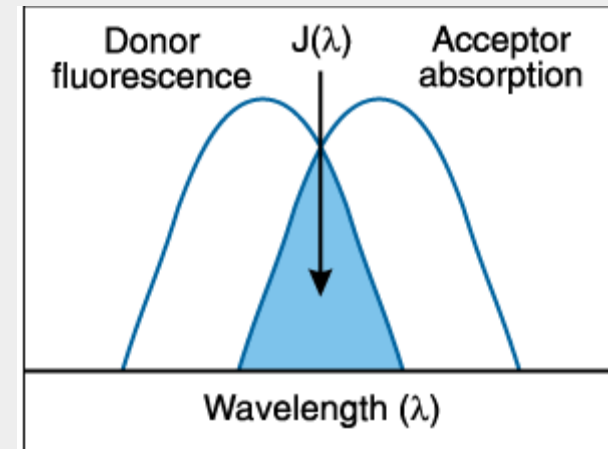
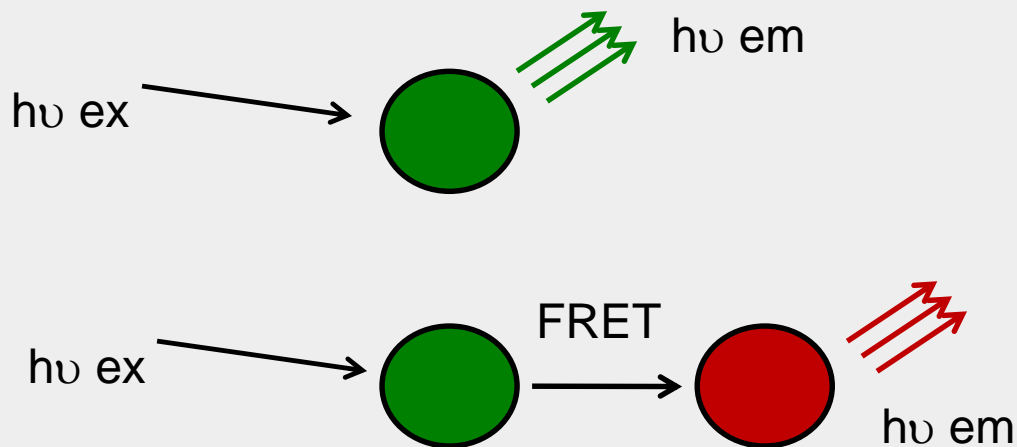
- Fluorofor velmi blízko zhášeeče – přenos energie z F na Q ve formě tepla – nenastane žádná fluorescence
- Proximální zhášeeče: molekulární kyslík, Cu^{2+} , Mn^{2+} , NO^{3-}



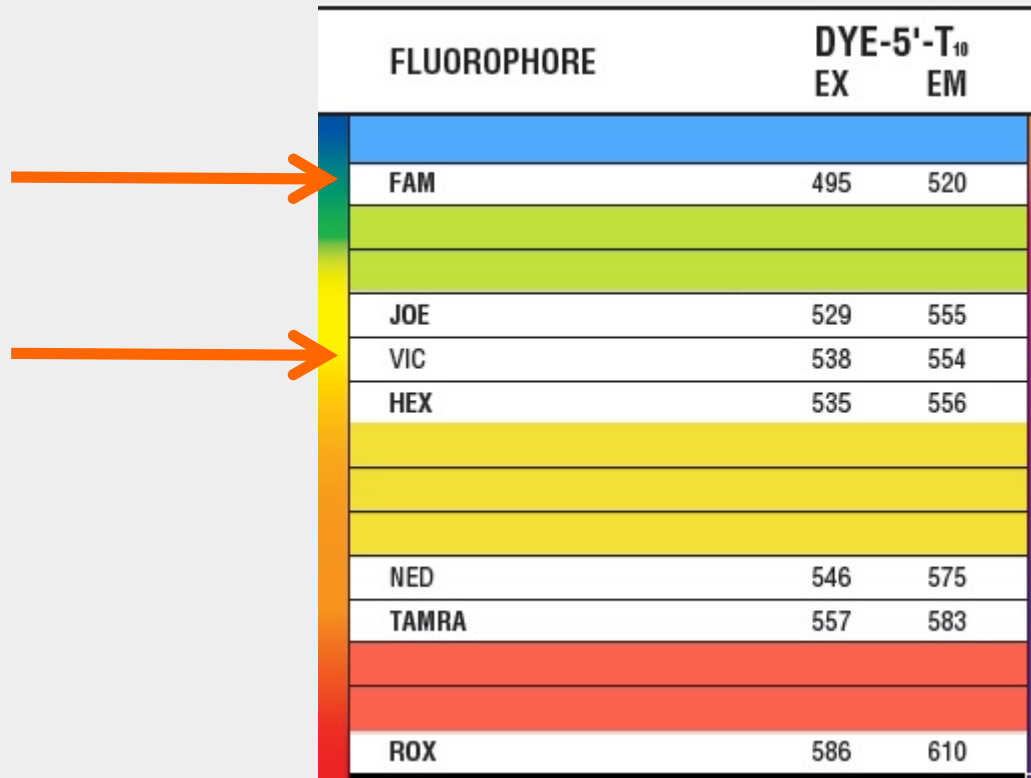
Fluorescenční rezonanční energetický transfer (FRET)

Základ řady experimentálních metod v biochemii a molekulární biologii

- Přenos energie z donorové na blízkou akceptorovou molekulu, donor se vrací do základního stavu bez vyzáření fluorescence; akceptor vyzáří energii ve formě fluorescence
- Emisní a absorpční spektra se musí překrývat
- Försterova vzdálenost obv. 100Å
- Energie, kterou donor vyzáří nebo předá musí být dostatečná k excitaci akceptoru
- Příklad: FAM-TAMRA, DABCYL, BHQ

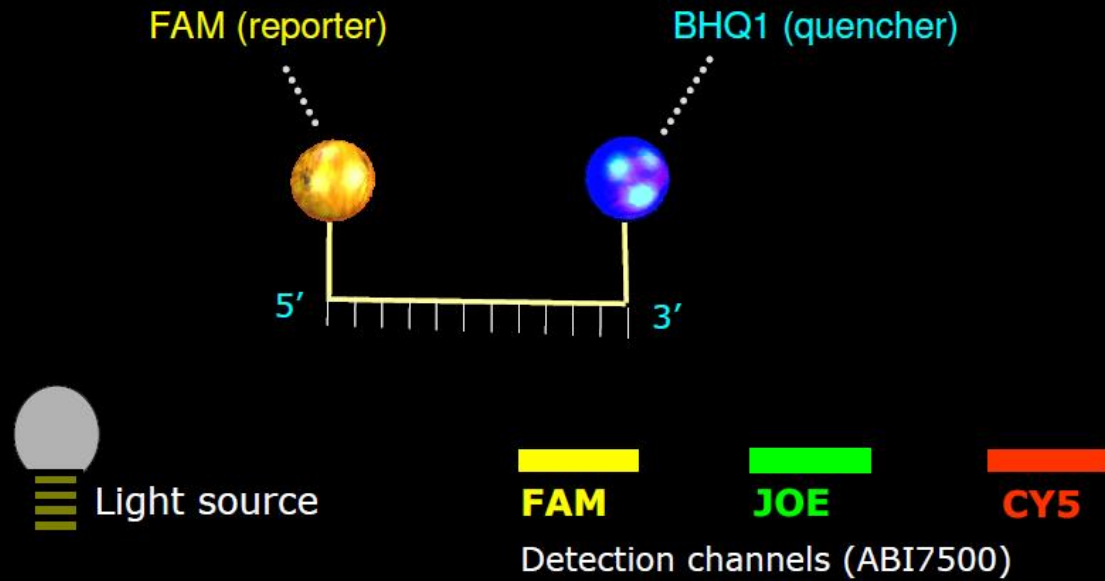


Nejčastěji používané fluorofory

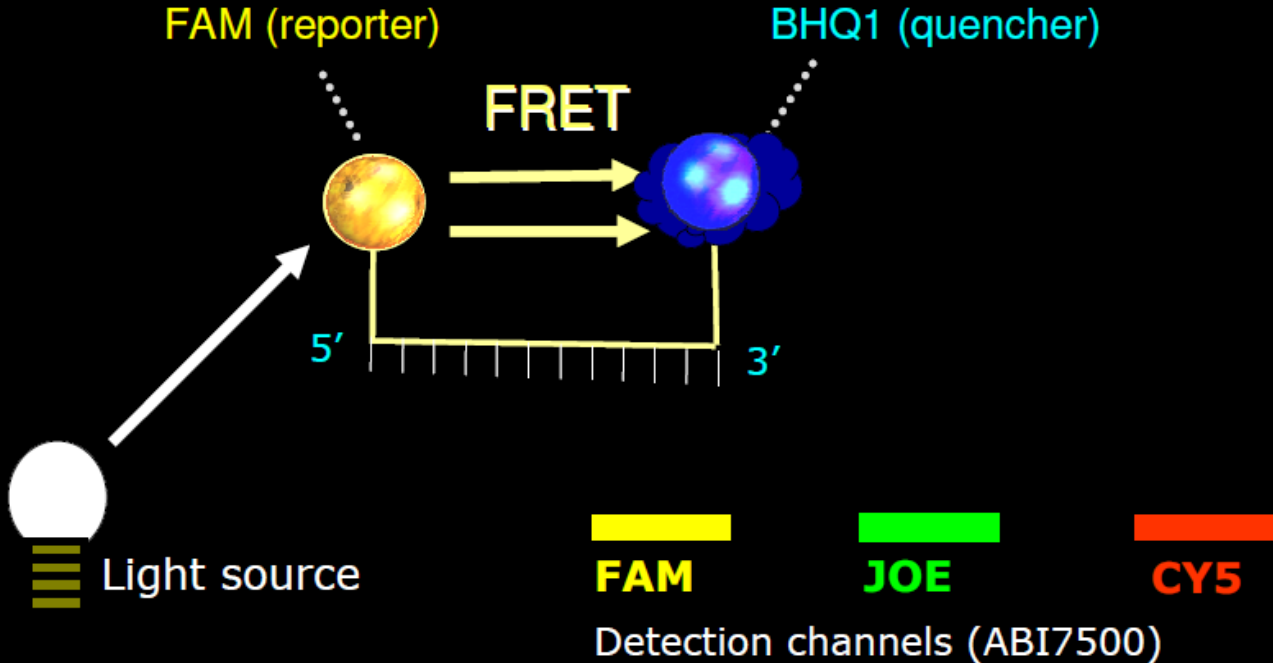


FLUOROPHORE	DYE-5'-T ₁₀	
	EX	EM
FAM	495	520
JOE	529	555
VIC	538	554
HEX	535	556
NED	546	575
TAMRA	557	583
ROX	586	610

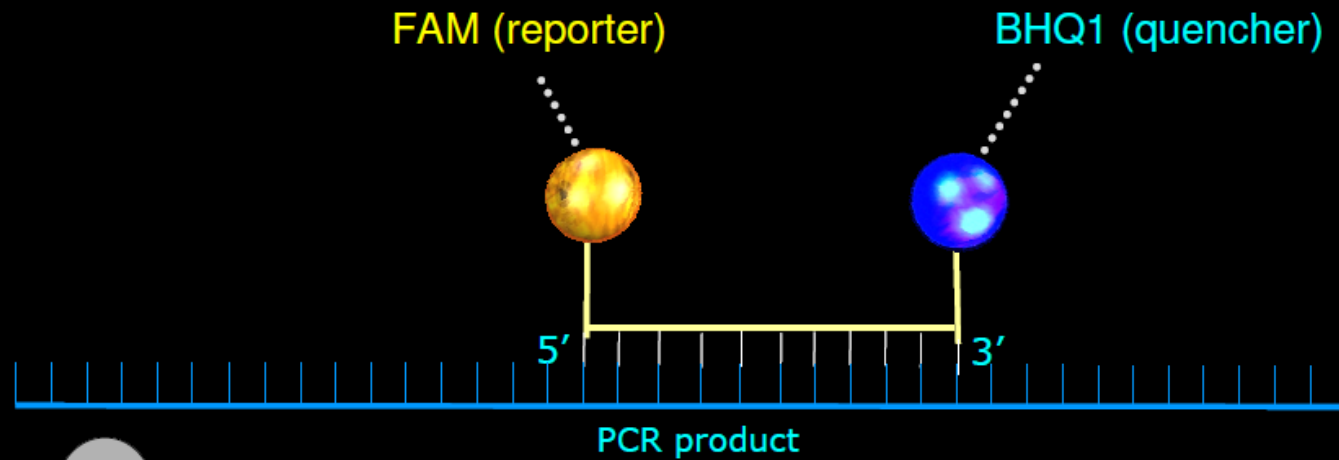
TaqMan (Nuclease) probes



TaqMan probes :



TaqMan probes :



Light source



FAM



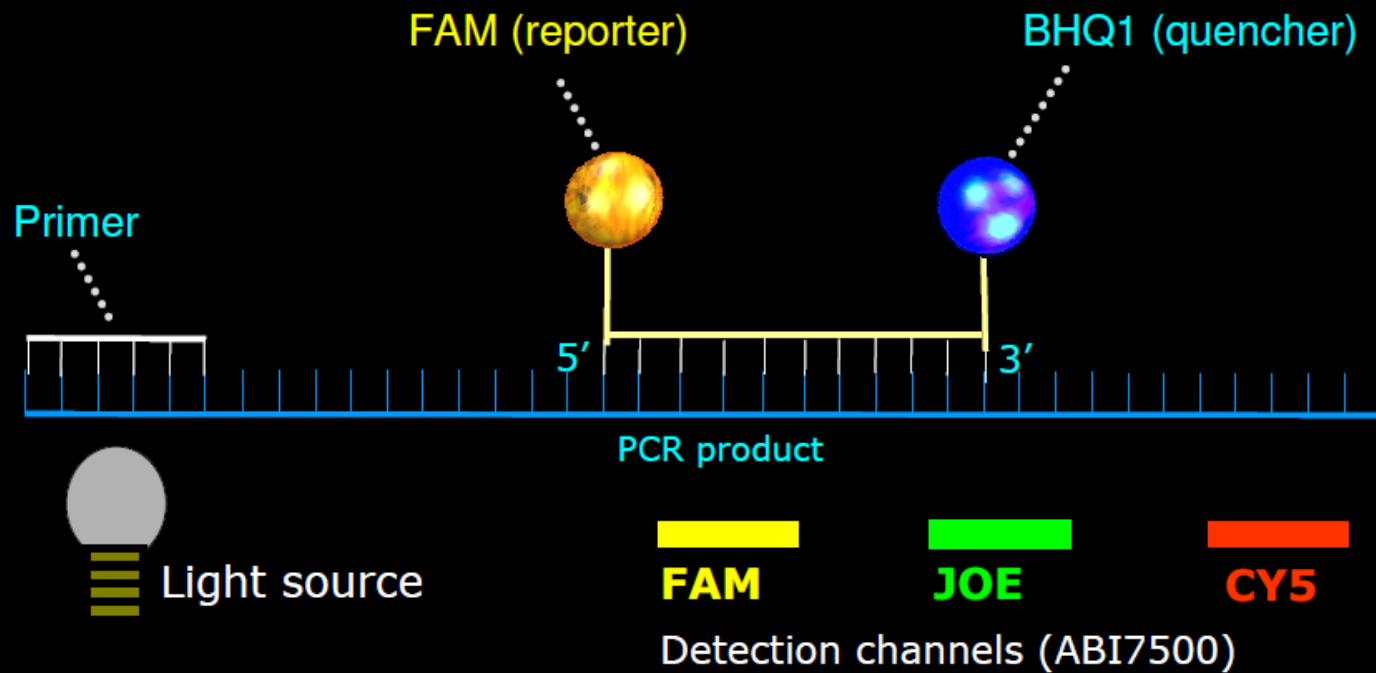
JOE



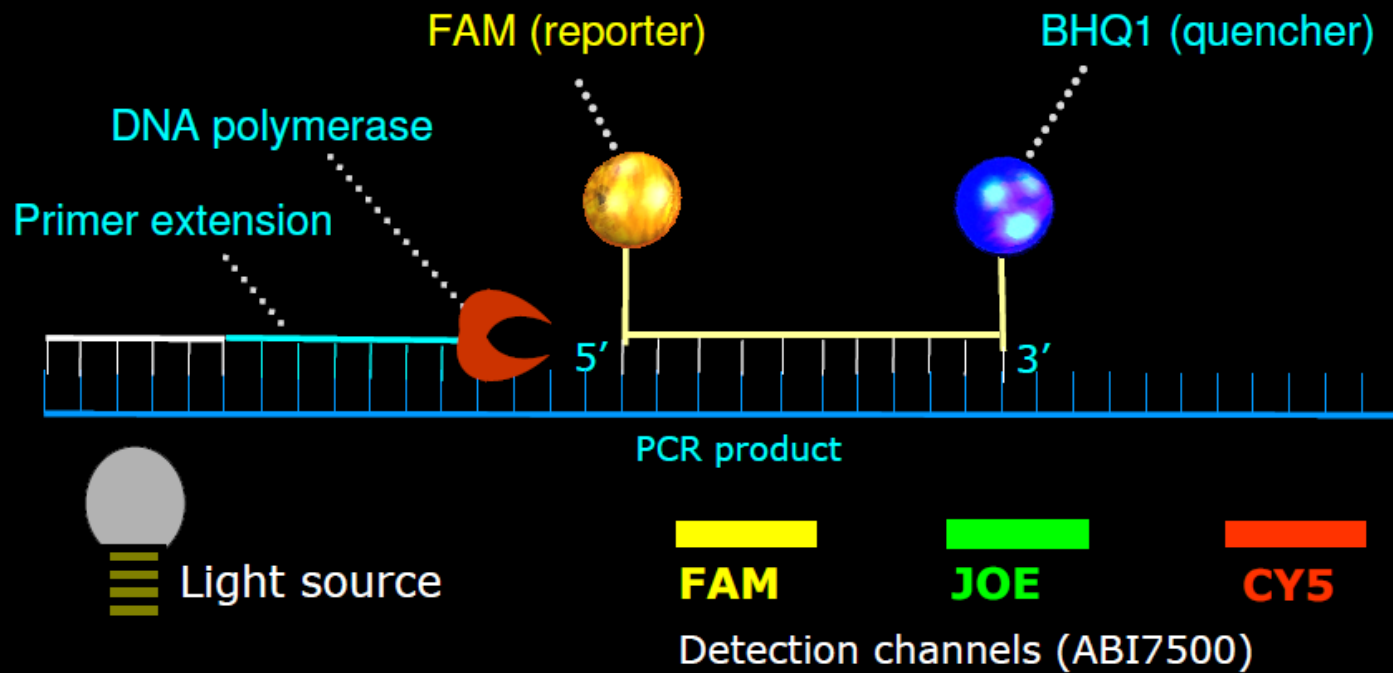
CY5

Detection channels (ABI7500)

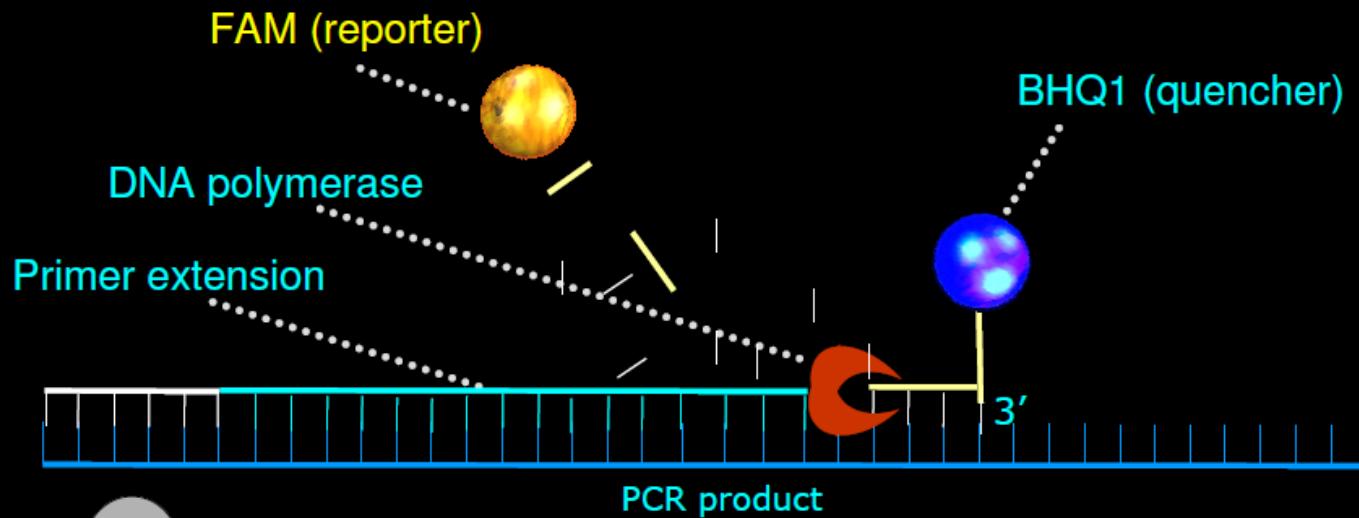
TaqMan probes :



TaqMan probes :



TaqMan probes :



Light source



FAM



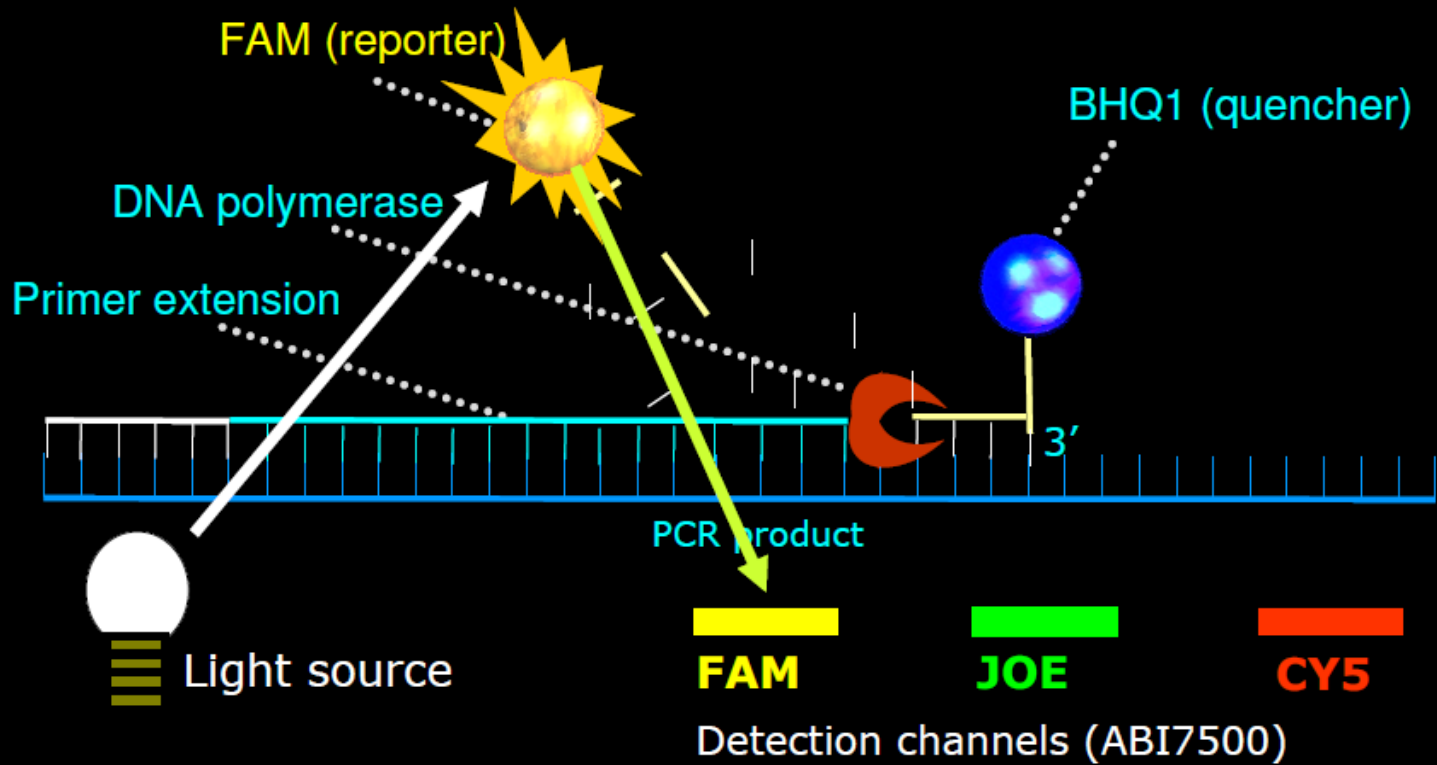
JOE



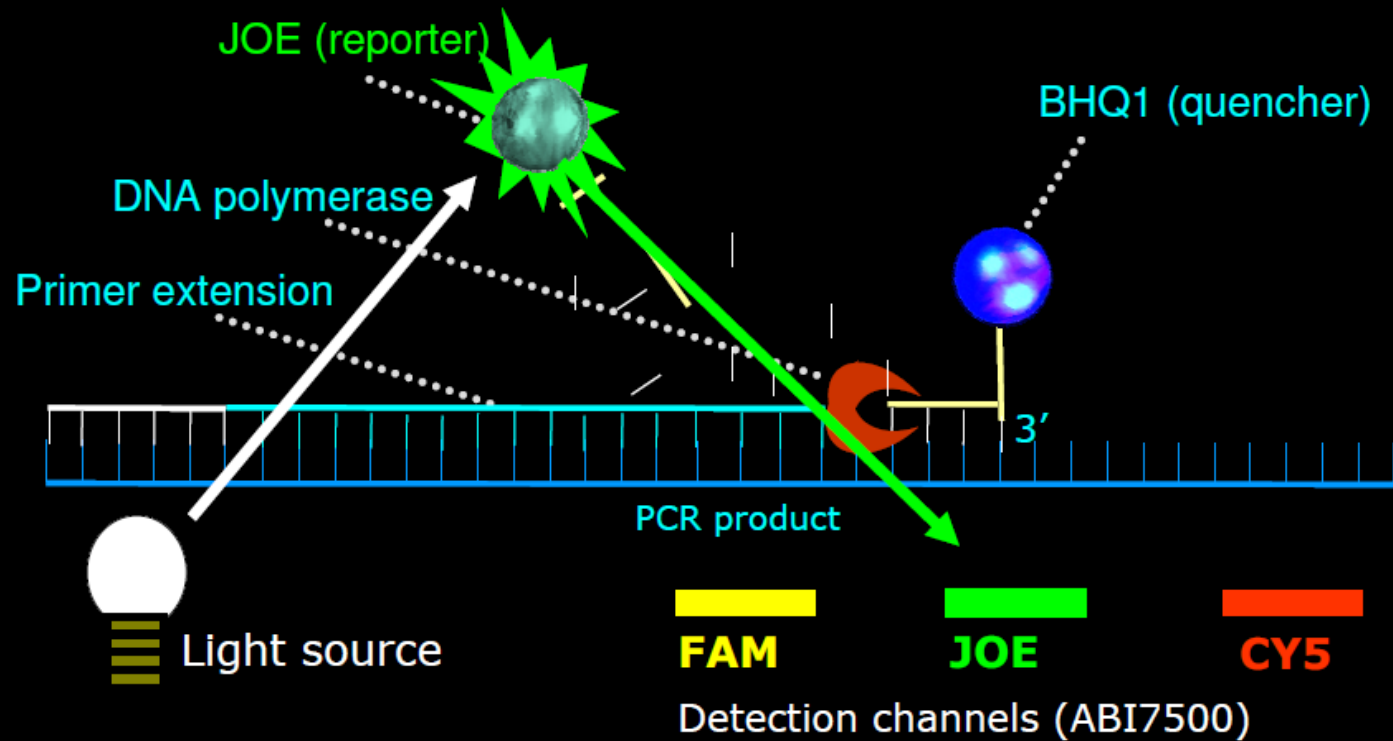
CY5

Detection channels (ABI7500)

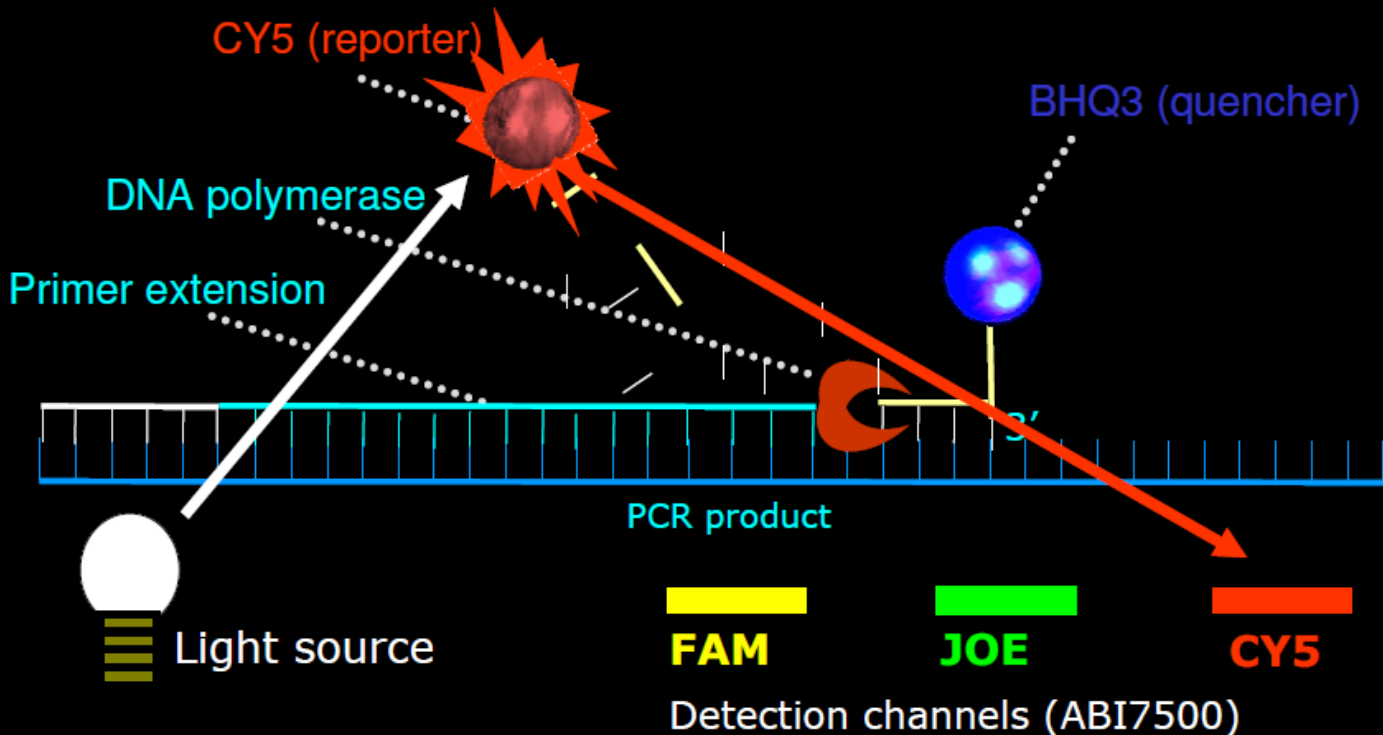
TaqMan probes :



TaqMan probes :



TaqMan probes :



Multiplexní reakce

- Detekce dvou nebo více targetových sekvencí v jedné reakci (simultánní amplifikace)
- Dva nebo více setů primerů
- Dva nebo více fluoroforů (FAM, VIC)

Multiplex PCR assays:

BENEFITS –

- *Reduced cost*

Platform	3 x monoplex	Multiplex (x3)
LightCycler	\$ 9.75	\$ 4.00
ABI/RotorGene	\$ 6.90	\$ 3.05

- *Reduced hands-on-time*

- fewer reaction mixes to make, store, QC etc.
- Fewer reactions per sample to prepare

- *Higher throughput*

- saves valuable space on real-time PCR instrumentation

Multiplex PCR assays:

LIMITATIONS –

- Preferential amplification of one target sequence over another is a known phenomenon in multiplex PCR (ie bias in template-to-product ratio)
- Two processes that induce this bias have been identified,
- **PCR drift** and **PCR selection** (competitive inhibition)

PCR drift

PCR drift is due to stochastic fluctuation in the interactions of PCR reagents particularly in the early cycles, which could arise in the presence of very low template concentrations, or through assay design.

Eg. Primer / probe interactions:

EXAMPLE:

Duplex LC assay for *Bordetella pertussis* & *B. parapertussis*:

- sensitivity was reduced when assays were duplexed.

	Detection limit (copies/reaction)	
	<i>B. pertussis</i>	<i>B. parapertussis</i>
Individual assays	10	10
Duplex	100	1000

(Kosters et al. J Clin Microbiol. 2002 May;40(5):1719-22.)

- The loss of sensitivity for the *B.parapertussis* assay was caused by interaction between the reverse primer and the 2nd hydrolysis probe of *B.pertussis*.

Primer Premier Software:

$\Delta G = -14.2$ [kcal/mol] (3' Cross Dimer)

```
5' CCTCGACAATGCTGGTGTTC A 3'      B.parapertussis reverse primer
      |||||
3' CCCACAAGTAGGCCGGCCCGA 5'      B.pertussis probe2
```

The 3' end of the *B.parapertussis* primer was complementary to the *B.pertussis* probe.

1. *Primer/probe binding limits their availability during the reaction*
2. *The primer can bind to the probe and extend, reducing the available primer for amplification of *B. parapertussis* DNA.*

It is important to carefully select primers and probes.

PCR selection (competitive inhibition)

PCR selection is defined as a mechanism which inherently favours the amplification of certain templates due to the relative **target concentrations** or properties of the target.

- Amplification bias may also be due to the choice of primers used in the multiplex PCR.
- Primer pairs with **high amplification efficiency** will produce amplification product independent of starting template concentrations.
- Primers with **lower amplification efficiency** can result in amplification bias depending on the template (concentration)

PCR selection (competitive inhibition)

This Means That:

- *In cases of mixtures of primer pairs of high and low efficiency, the earlier amplification of one target may inhibit the amplification of a second target*
- *Can be an issue for inclusion of internal controls:*
 - *internal control DNA added to a reaction mix should be less than the expected Target DNA*

Detekce amplitud

Nespecifická

- Interkalační barviva
- Quencher Labeled Primers
- LUX Primers
- Amplifluor

Specifická

Lineární sondy

- ResonSense, Angler Probes
- HyBeacons
- Light-up probes
- TaqMan sondy (Hydrolyzační sondy)
- Lanthanidové sondy
- Hybridizační sondy
- Eclipse
- Displacement Hybridization/Complex Probes

Strukturní sondy

- Molekulární majáky
- Scorpions
- Cyclicons
- Nanoparticle Probes
- Konjugované polymery a PNA sondy

Nespecifická detekce množství amplikonu

- Interkalační barviva
- Quencher labeled Primer
 - LUX Primers
 - Amplifluor

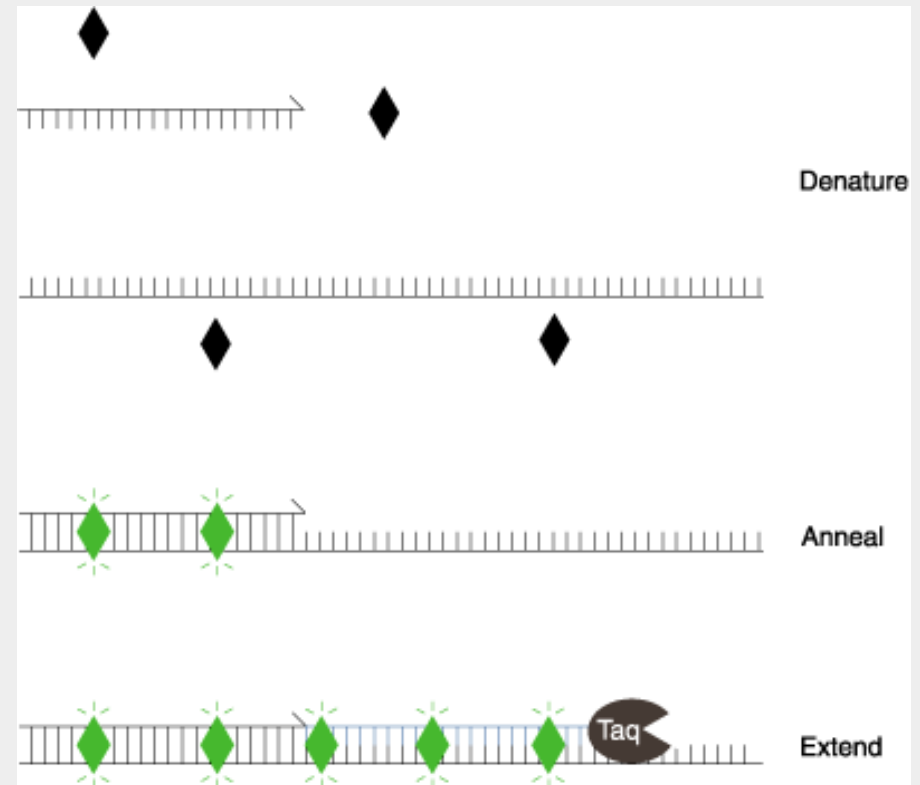
1. Interkalační barviva

Reverzibilní vazba na dsDNA

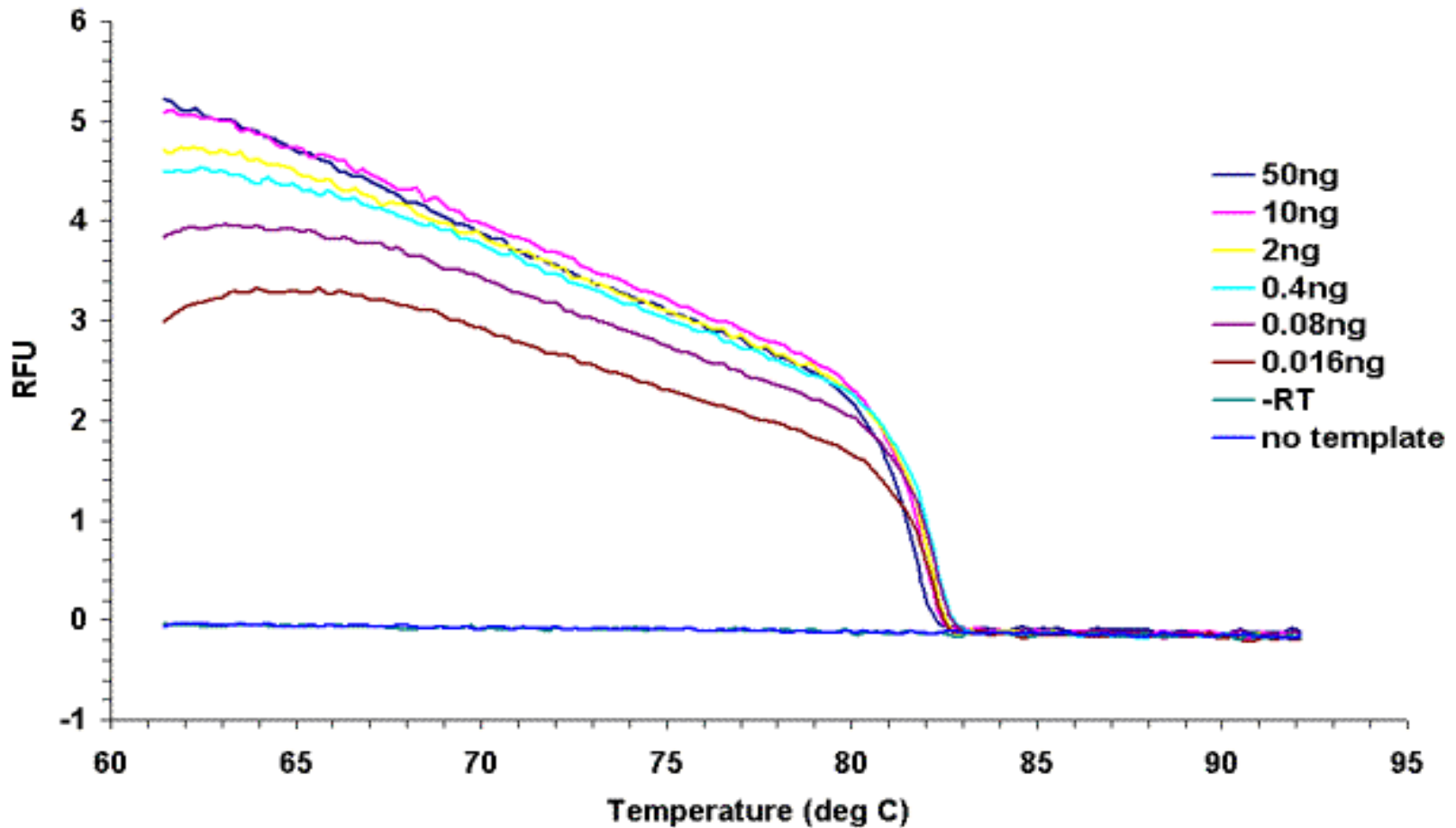
- Relativně levné
- Citlivé

Nevýhody:

- Některá barviva se váží na ssDNA
- Nespecifická vazba na jakoukoli dsDNA (primer dimery)
- Pečlivý návrh primerů a extenzivní validace, disociační křivky

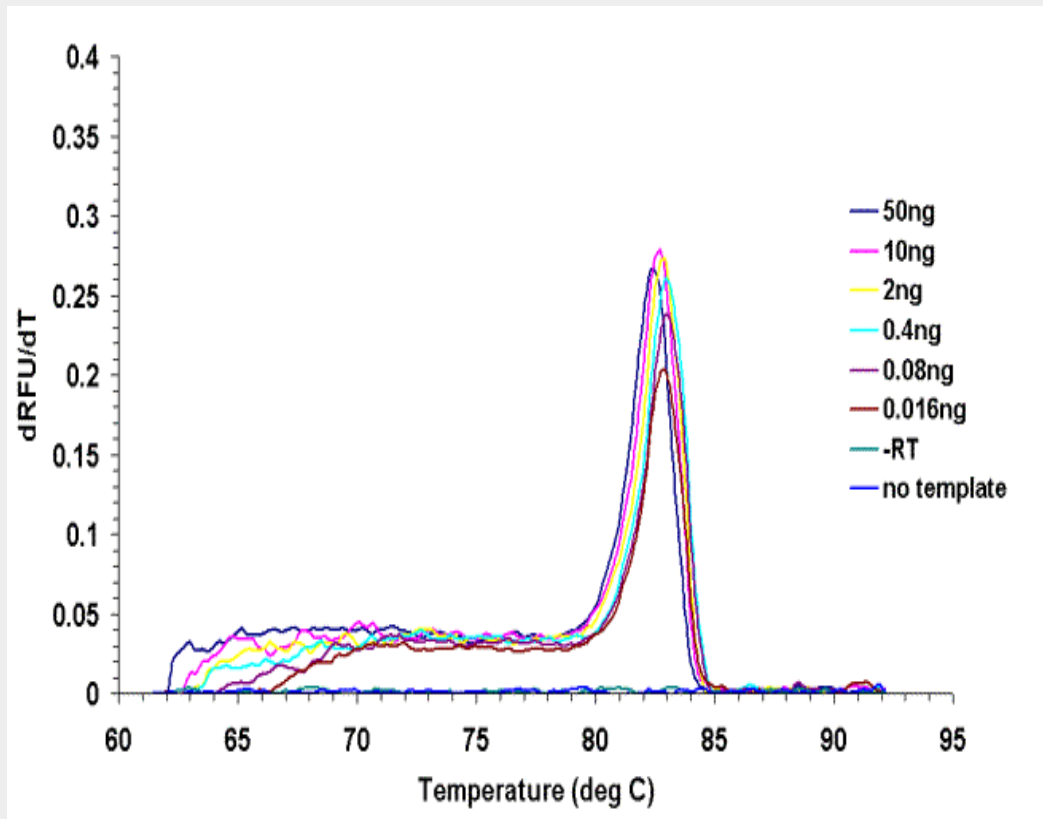


Melting curves



Melting Curve for Standard Curve Samples in Real Time for GAPDH

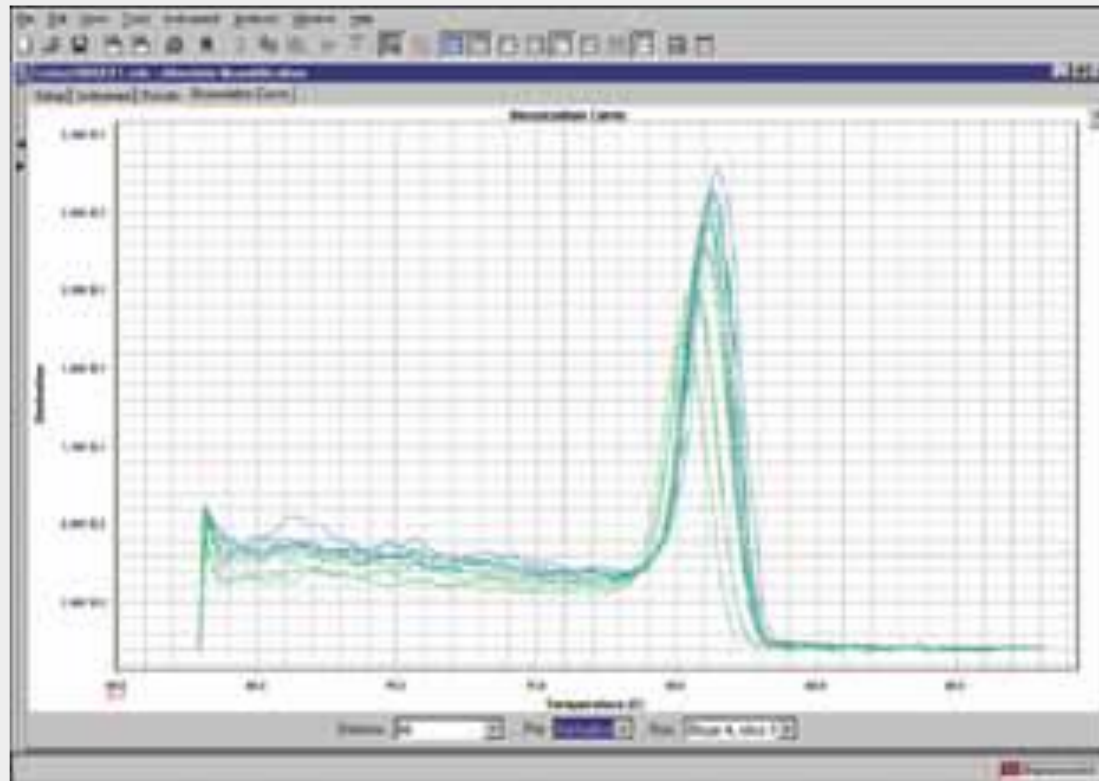
Melting curves



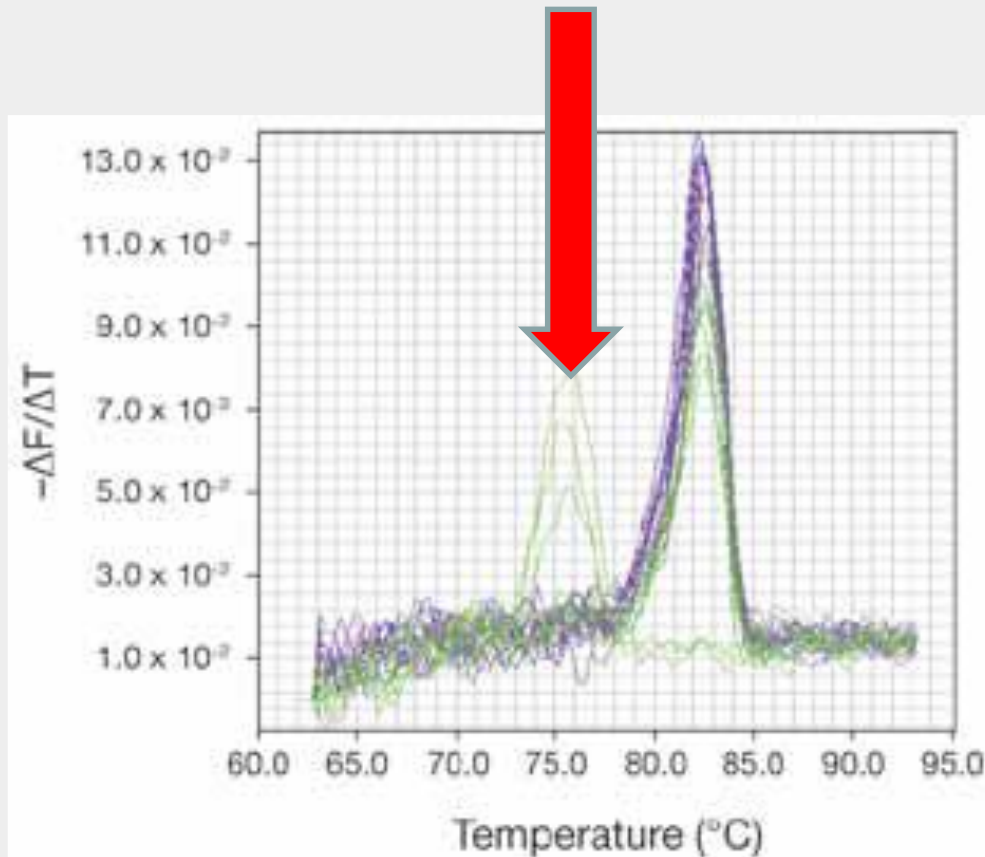
T_m of amplicon 82.5C
No contamination

**Derivative Melting Curve for Standard Curve Samples in Real Time,
GAPDH Endogeneous Control**

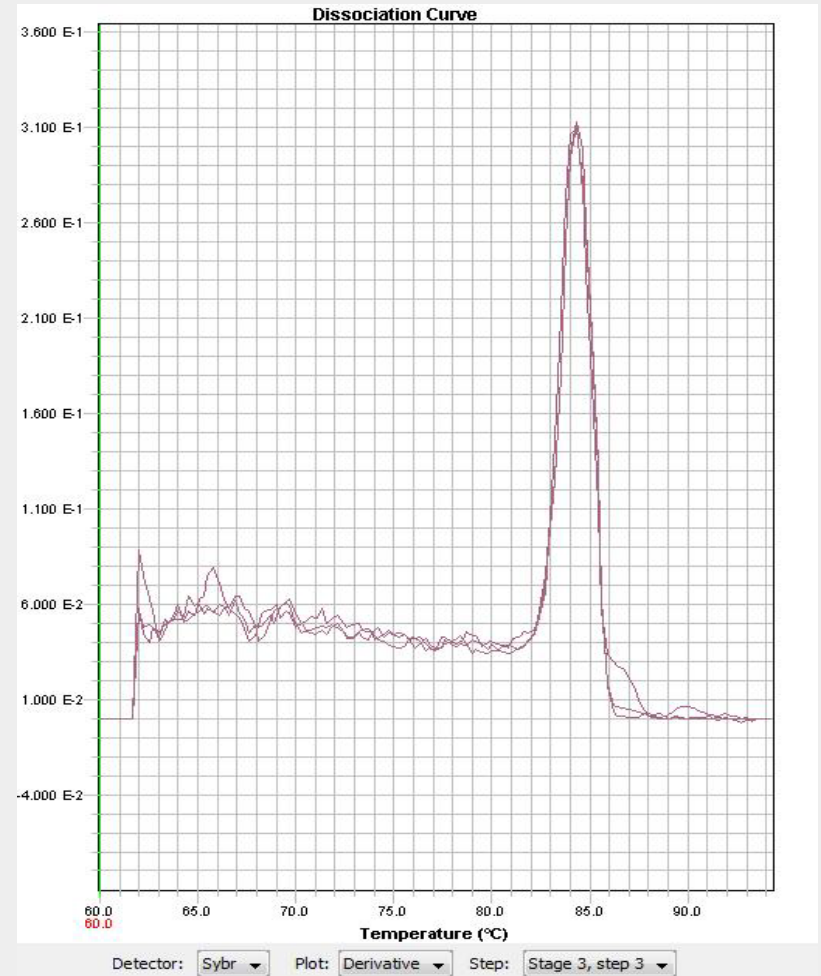
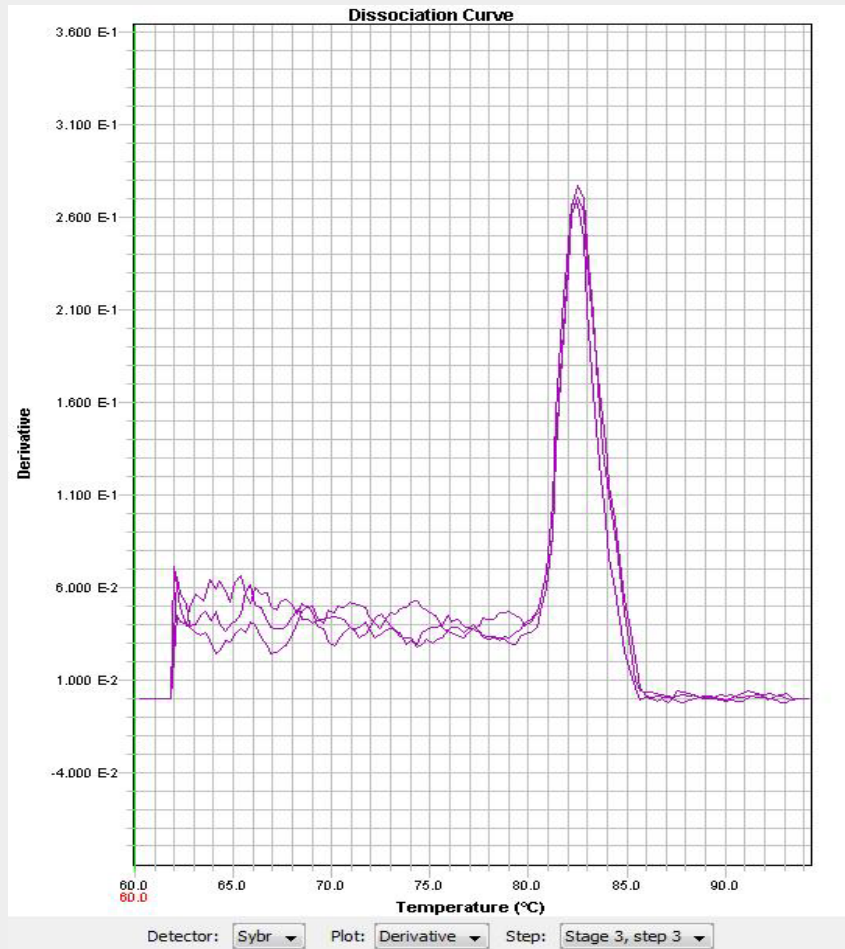
Melting curve



Primer dimer



NO RT CTRL – kontaminace gDNA



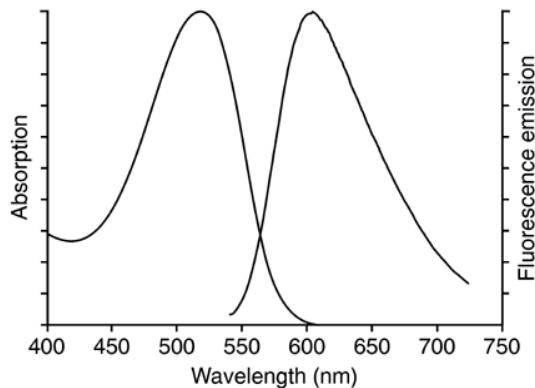
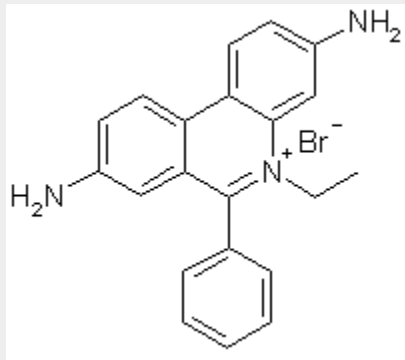
Ethidium bromid

30ti násobný nárůst fluorescence
po vazbě na dsDNA

Nepravidelná vazba na DNA

$Q_y = 0,15$

Mutagen ☠



SYBR Green

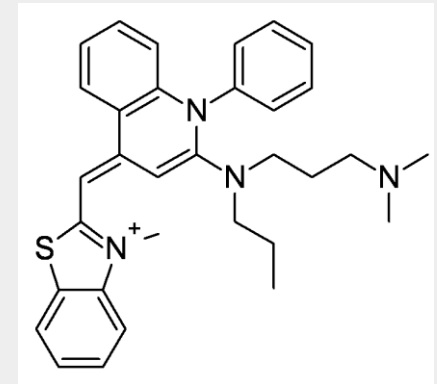
SYBR Green II

SYBR Gold

YO (Oxazole Yellow)

TO (Thiazole Orange)

PG (PicoGreen)

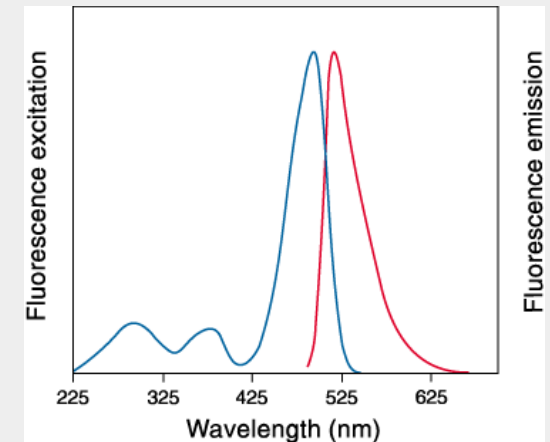


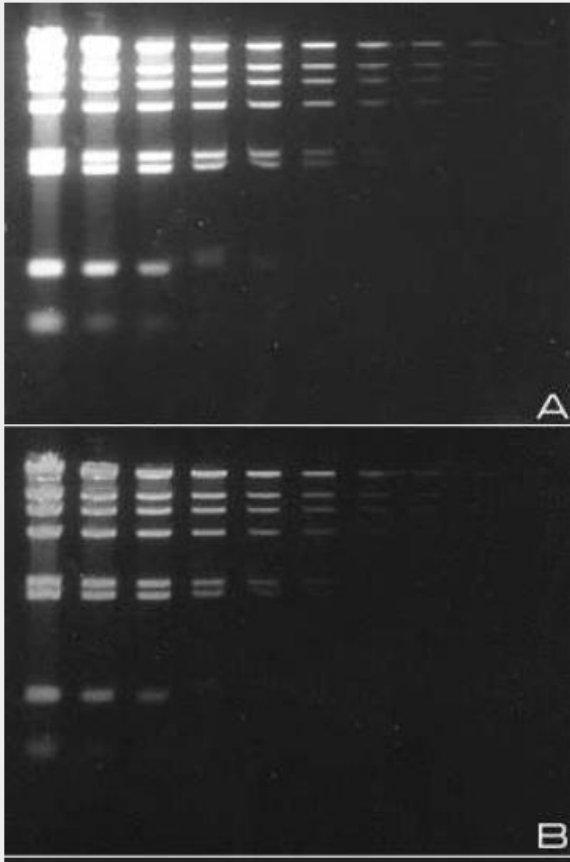
>1000 násobný nárůst
fluorescence

Rovnoměrná vazba na DNA

$Q_y = 0,60$

Bezpečný

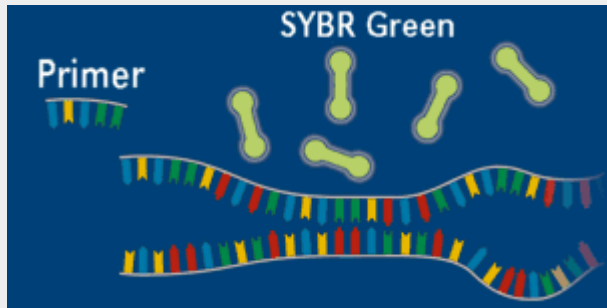




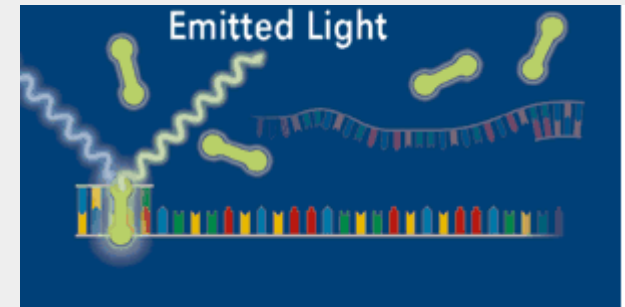
A) SYBR Green

B) Ethidium bromide

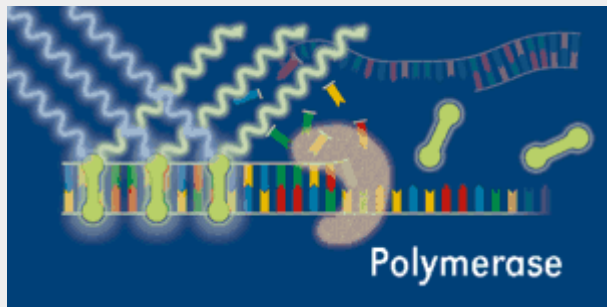
DNA Detection: SYBR Green I Dye



DENATURATION STEP: DNA + PRIMERS + DYE
WEAK BACKGROUND FLUORESCENCE



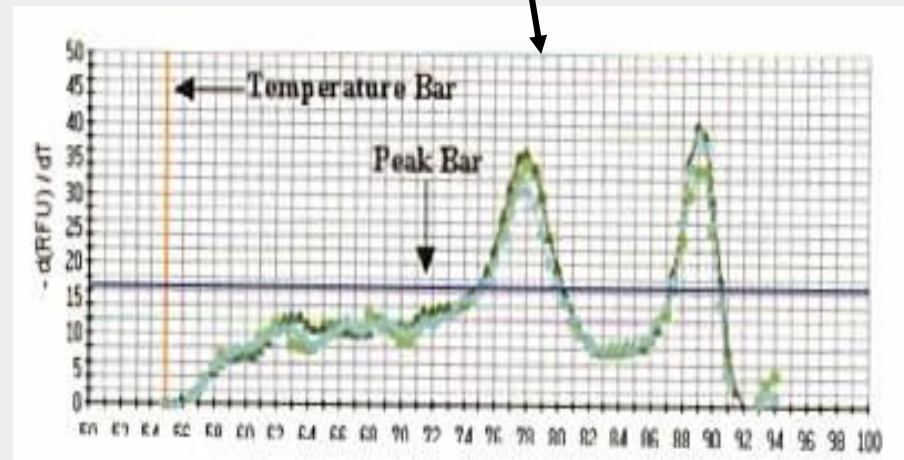
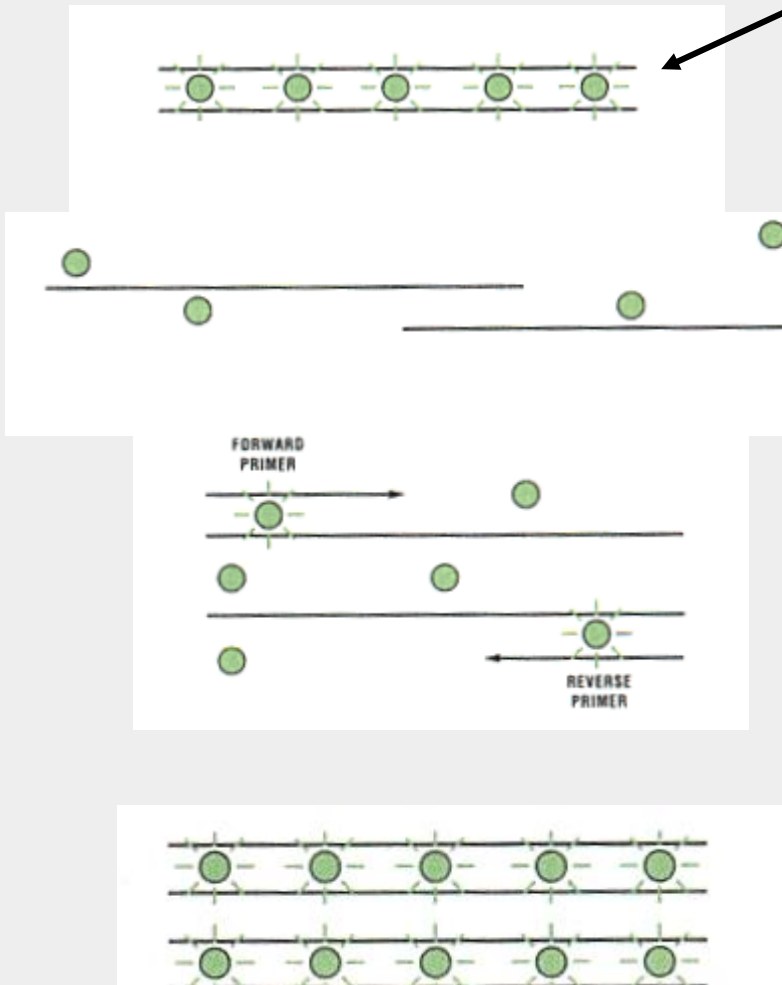
ANEALING STEP: DYE
BINDS dsDNA, EMITS LIGHT



EXTENSION STEP: MEASURE
LIGHT EMISSION

qPCR: SyBr[®] Green

- Binds minor groove of double-stranded DNA.
- Product can be further tested in a post-amplification melt curve in which sequences have characteristic melting temperatures.



2. Quencher Labeled Primers

Použití dvou odlišných molekul

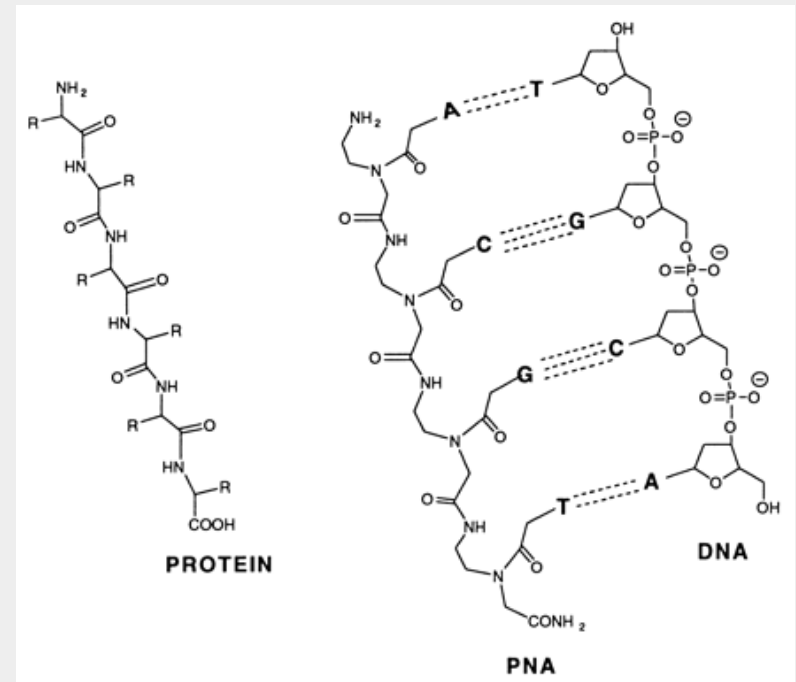
PNA (peptide nucleic acid) označenou na C konci zhášecem DABCYL (Q-PNA)

+

Primer se specifickou sekvencí na 3' konci a fluoroforem a PNA komplementární sekvencí na 5' konci

Fluorescence udává množství primerů hybridizovaných k templátu /amplikonu plus množství fluorescenčně označených dsDNA amplikonů

Real-time i end point



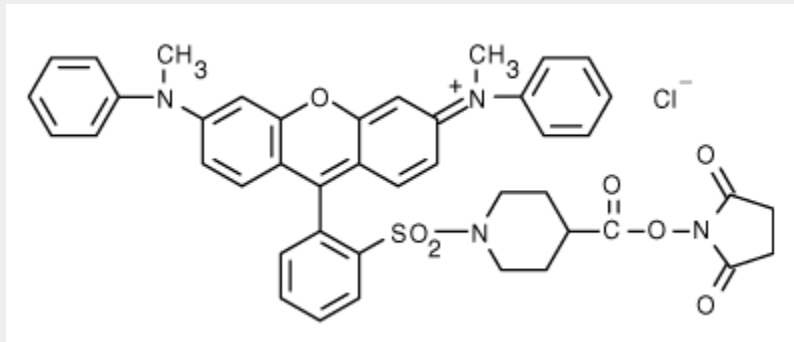
2. Quencher Labeled Primers

Primer >25bp se zhášečem na 5' konci (QSY 7, QSY 9), **Molecular Probes-Invitrogen**

QSY 7/QSY9 zháší fluorescenci interkalačního barviva (SYBR), které se může vázat na primer dimery nebo primer samotný

Po prodloužení řetězce není již fluorofor zhášený

Redukce pozadí/ nespecifických signálů



QSY 7

3. LUX Primery

Light Upon eXtension – Invitrogen

- Reverse nebo forward primer označený fluoroforem.
- Ve vlásenkové konformaci zhášeny. Druhý primer je neoznačený.
- Po inkorporaci do dsDNA je zhášení uvolněno a emitována fluorescence

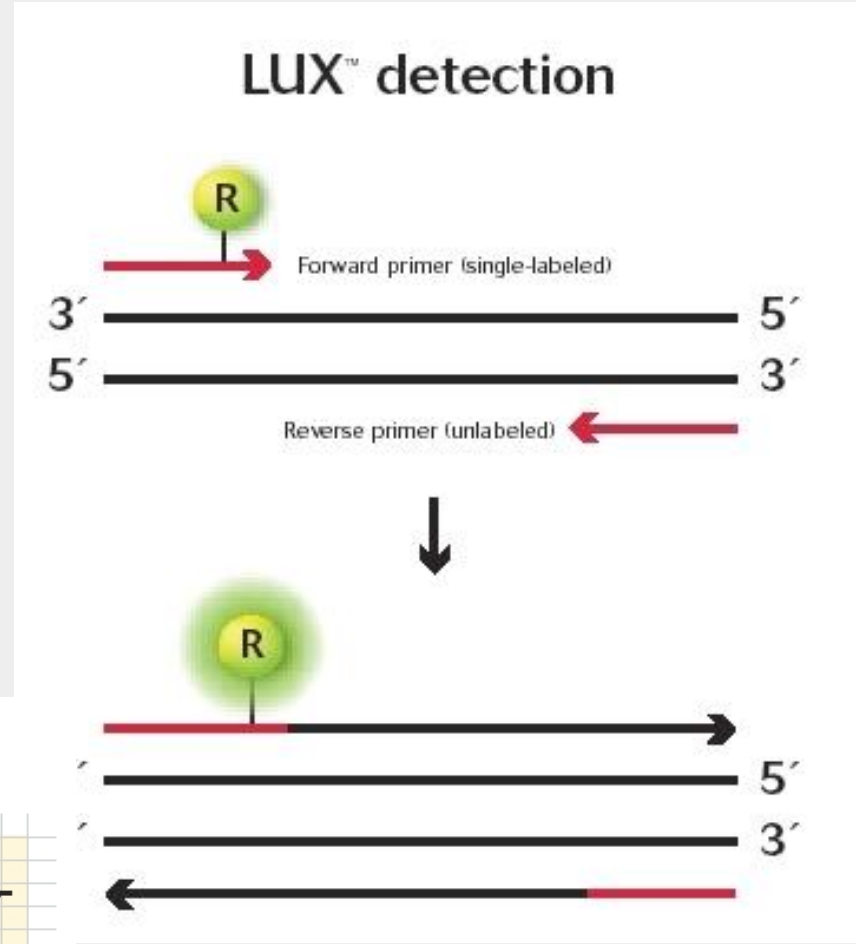
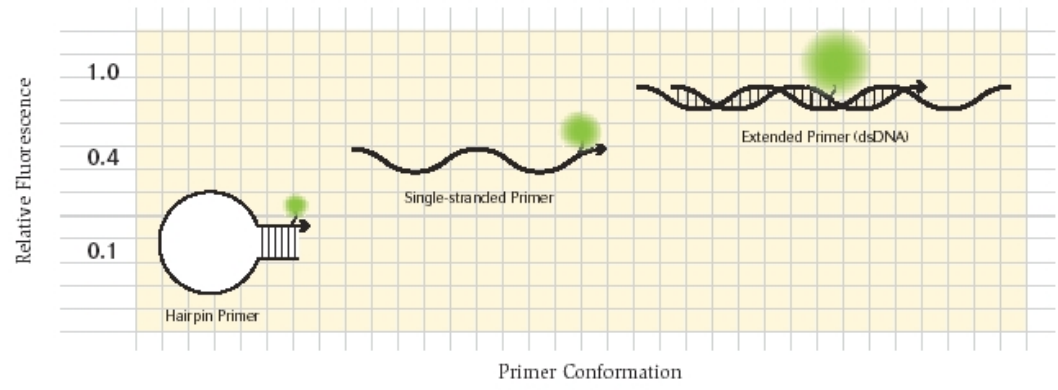
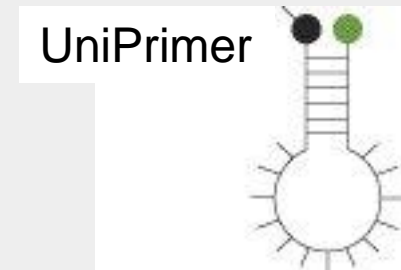


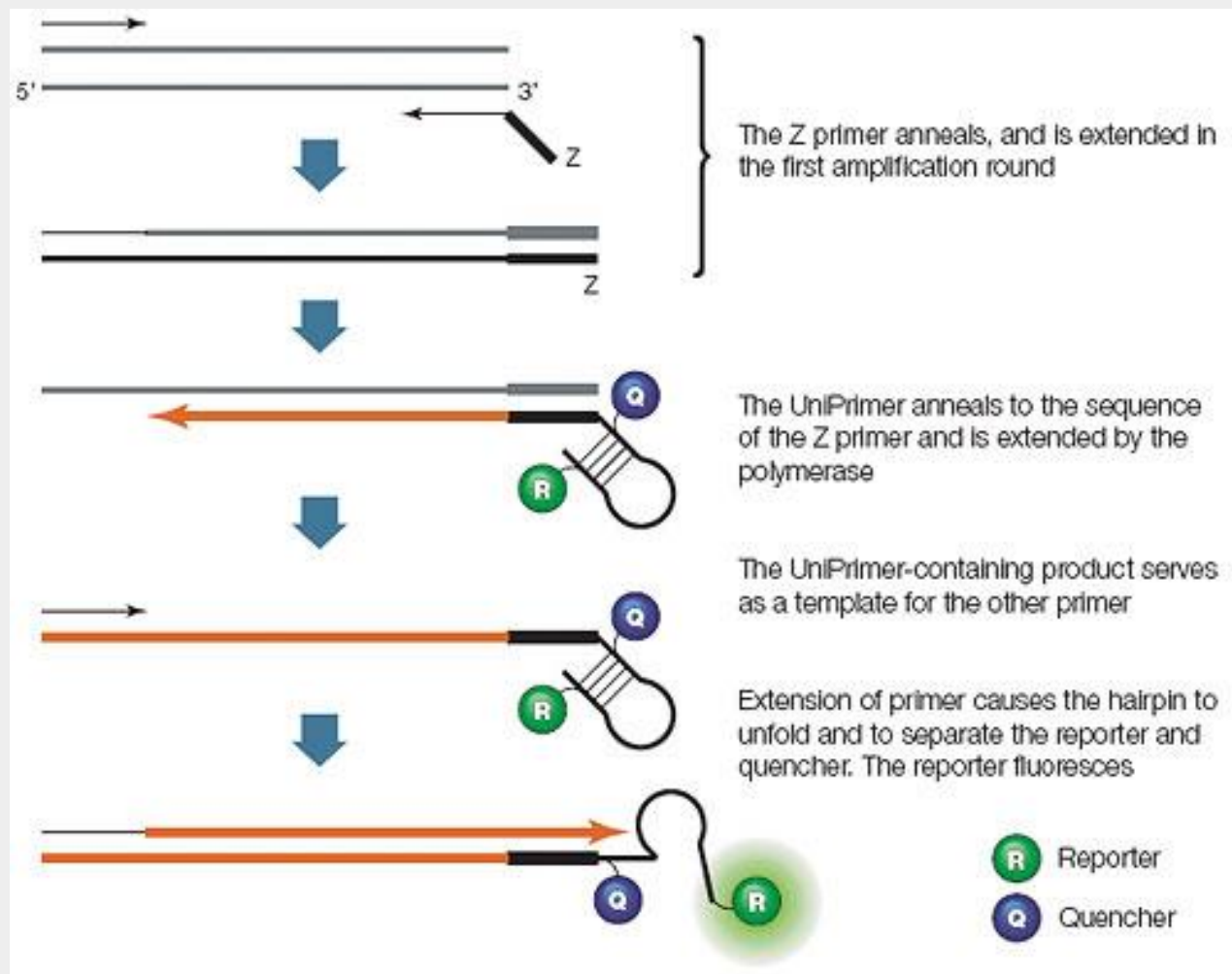
Figure 2 - The LUX™ (Light Upon eXtension) effect



- 3 typy primerů - Dva specifické pro amplifikovanou sekvenci a jeden tzv. UniPrimer
- Jeden ze specifických primerů obsahuje univerzální (Z) sekvenci na 5' konci, druhý není nijak modifikovaný
- 3'konec UniPrimeru je komplementární k Z sekvenci prvního primeru, zbytek směrem k 5'konci tvoří vlásenku označenou fluoroforem (FAM) a zhášedčem (DABSYL)
- výhoda: každá PCR může být snadno adaptována na Amplifluor PCR, začleněním Z sekvence na 5'konec jednoho z primerů
- možnost použít dva různě značené UniPrimery s konci komplementárními k odlišným Z sekvencím – SNP analýza/alelická diskriminace



Amplifluor



Specifická detekce množství amplikonu

Lineární sondy

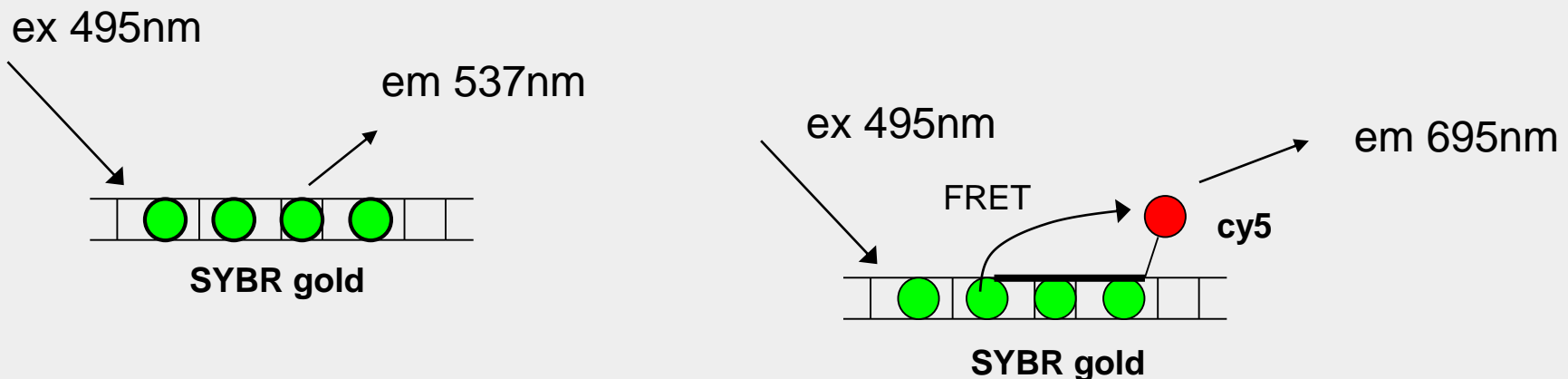
- ResonSense, Angler Probes
- HyBeacons
- Light-up probes
- Hydrolyzační sondy
- Lanthanidové sondy
- Hybridizační sondy
- Eclipse
- Displacement Hybridization Probes

Strukturní sondy

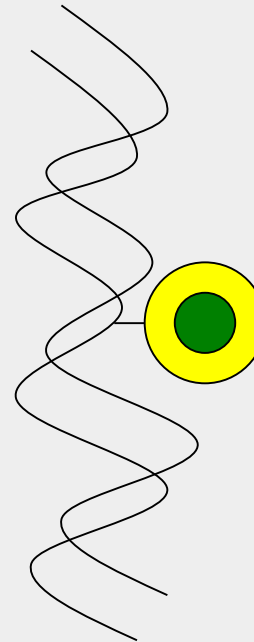
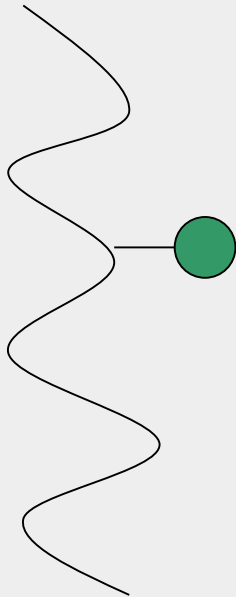
- Molekulární majáky
- Scorpions
- Nanoparticle Probes

Lineární sondy

- urychlení qPCR - optimální fluorescenční signál již po 5 sec. v annealingu
- DNA interkalátor (SYBR Gold) – FRET donor + sonda specifická k jedinému amplikonu – FRET akceptor (Cy5 na 5'konci) – buď volně (**ResonSense**) nebo připojena k primeru linkerem (**Angler Probe**)
- DNA polymeráza bez exonukleázové aktivity v případě ResonSense
- Pokud není přítomná cílová sekvence, nebo během denaturace, není SYBR a Cy5 v dostatečné blízkosti aby došlo k FRET a emisi fluorescence
- kvantitativní PCR i alelická diskriminace (více různě značených sond)

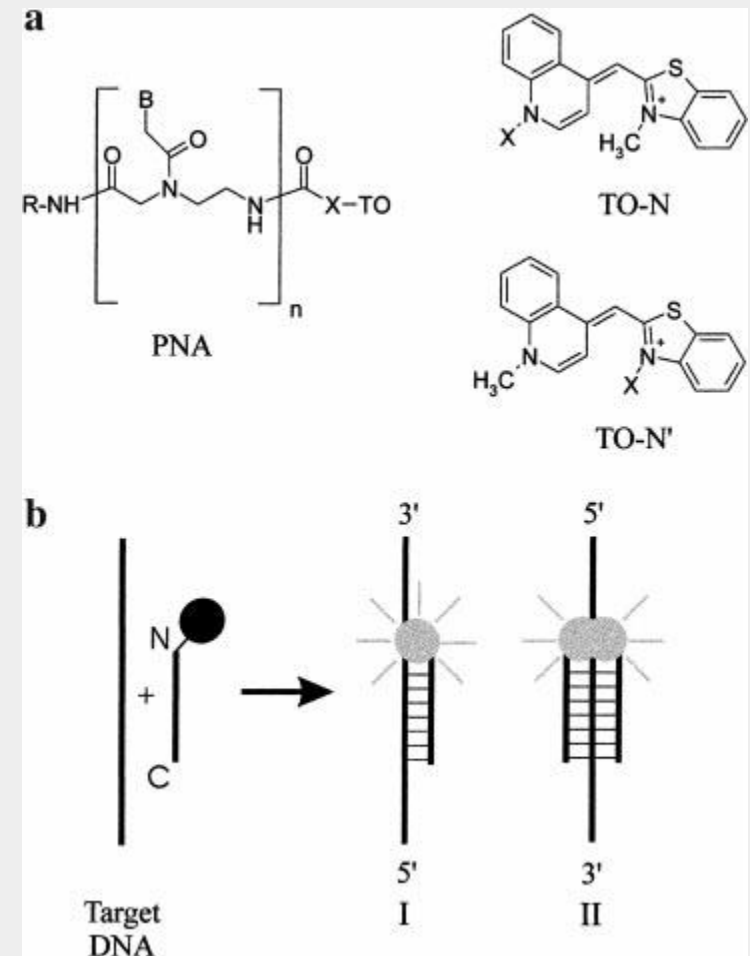


- Velmi jednoduchý princip i design
- Sonda emituje fluorescenci pouze v duplexu s DNA
- P na 3'OH konci – není volná OH skupina pro polymerázu
- Snímání fluorescence v annealingovém kroku
- Bez nutnosti FRET, návrhu sekundární struktury nebo enzymatického štěpení
- Rozlišení blízce příbuzných sekvencí na základě T_m umožňuje detekci SNP i kvantitativní analýzu

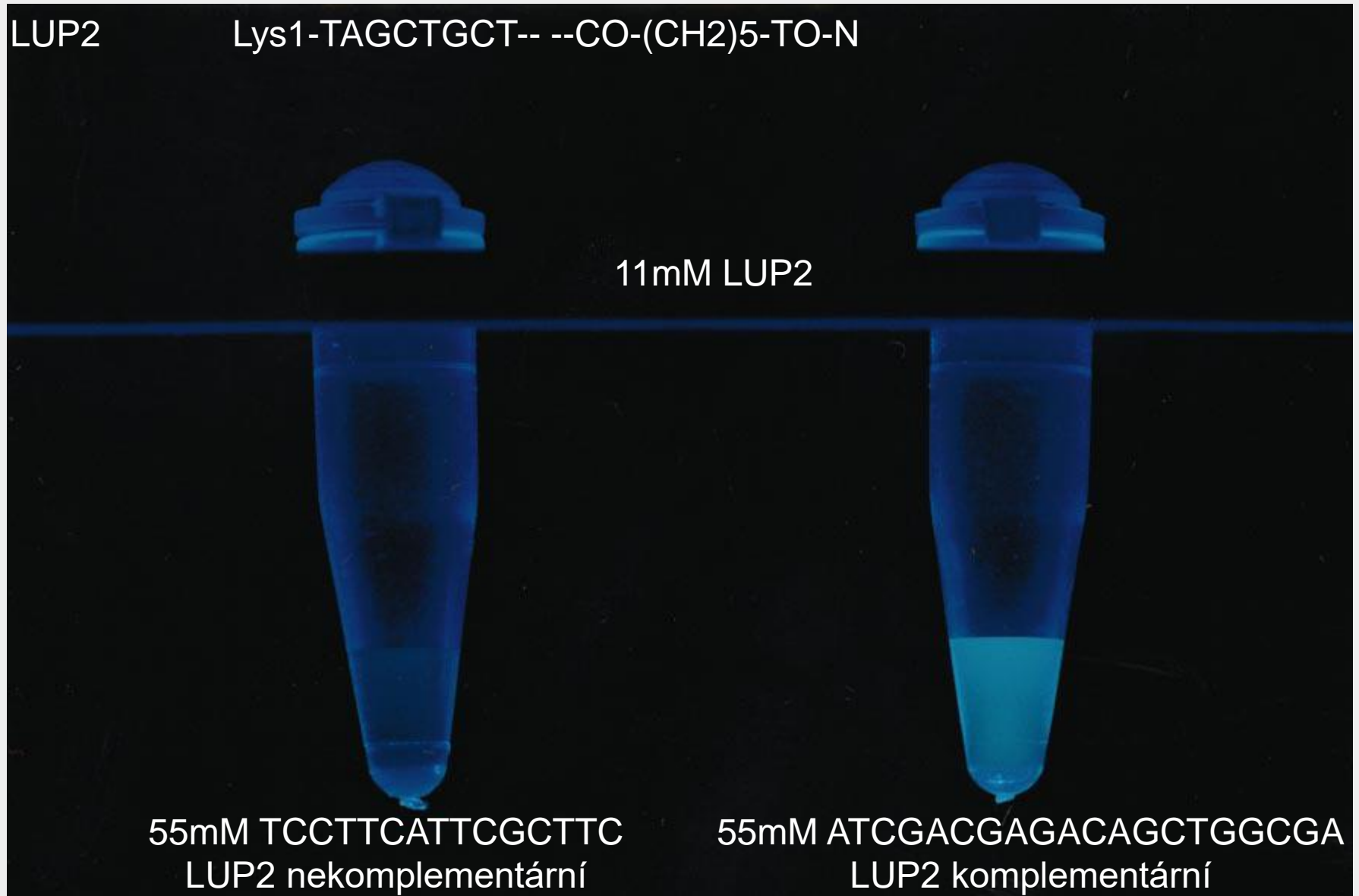


3. Light Up Probes

- Podobné HyBeacons
- PNA s konjugovanou thiazolovou oranží (asymetrické cyaninové barvivo)
- PNA neinterferuje s PCR
- Nízká fluorescence volné sondy – nárůst po vazbě k DNA (annealingový krok – snímání fluorescence)
- SNPs (jediná báze)

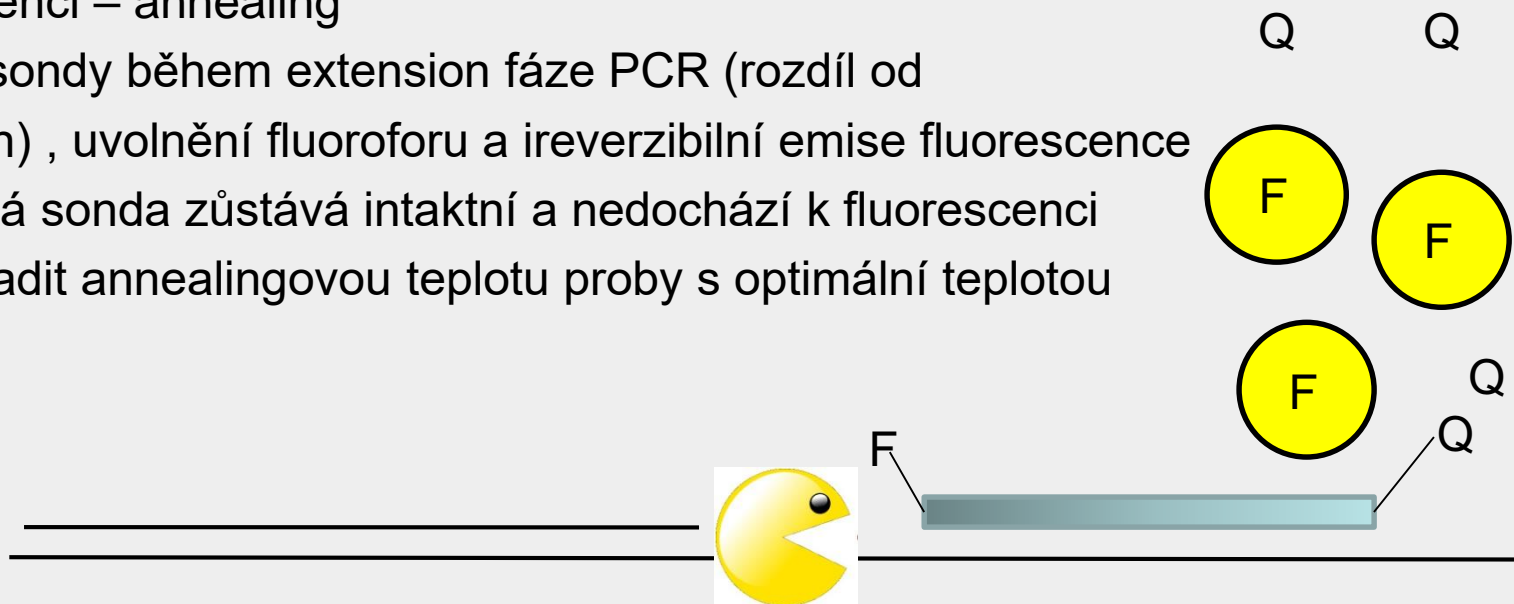


Light Up Probes



4. Hydrolyzační sondy (TaqMan Probes)

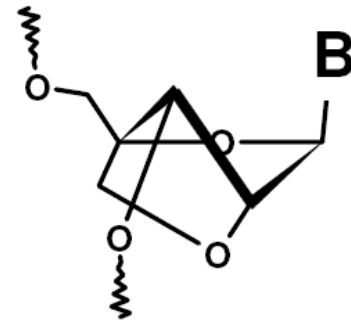
- 5' nuclease assay
- Velmi populární design a univerzální použití
- Fluorofor na 5', zhášec na 3' konci (snadná syntéza)
- 5'-3' ds exonukleázová aktivita DNA polymerázy
- F-Q – FRET (TAMRA) nebo emise tepla (BHQ)
- Pokud je přítomen templát, sonda se komplementárně váže na cílovou sekvenci – annealing
- Hydrolýza sondy během extension fáze PCR (rozdíl od předchodzích) , uvolnění fluoroforu a ireverzibilní emise fluorescence
- Nenavázaná sonda zůstává intaktní a nedochází k fluorescence
- Je nutné sledit annealingovou teplotu proby s optimální teplotou polymerázy



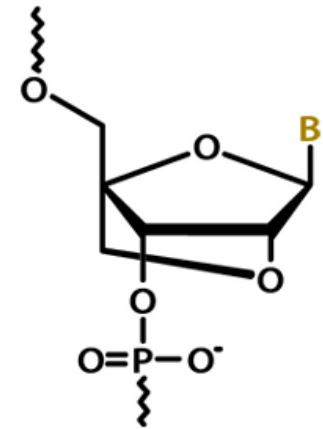
- Sloučení annealingového a extension kroku do jediného, obvykle 8-10°C pod T_m sondy (60-62°C)
- Kvantifikace, SNP, alelická diskriminace atd.
- Multiplexní reakce

5. UPL sondy

- Podobné TaqMan sondám
- Sekvenčně specifický pár primerů + semiuniverzální sonda - knihovna
- Do sekvence sondy začleněna Locked nucleic acid (LNA) – zvyšuje teplotní stabilitu – T_m



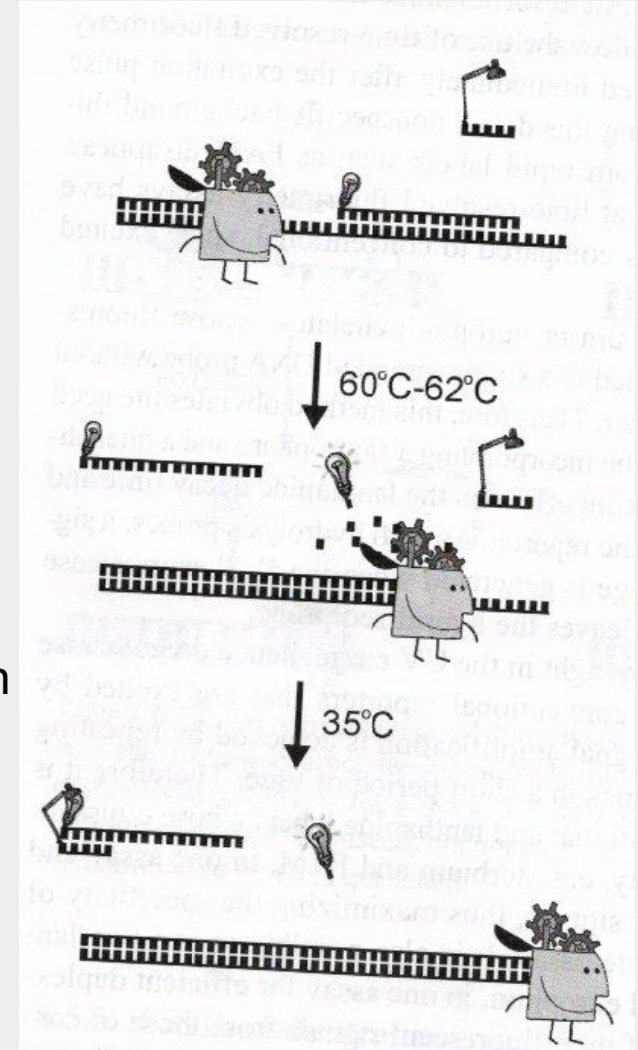
LNA Monomer
 β -D configuration



	Perfect Match	Single Mismatch	ΔT_m
 LNA 8-mer 5'-TGC I GGTG-3' 3'-ACG A CCAC-5'	71°C	45°C	26°C
 DNA 8-mer 5'-TGC I GGTG-3' 3'-ACG G CCAC-5'	35°C	25°C	10°C

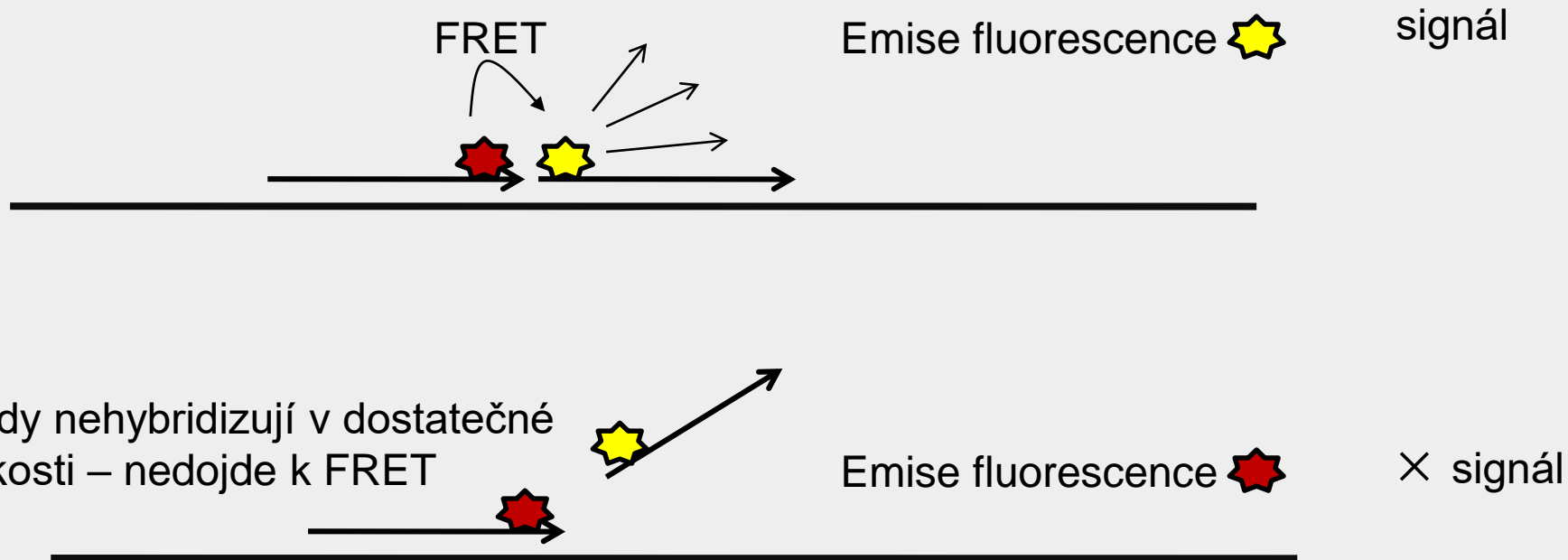
6. Lanthanidové sondy

- varianta hydrolyzačních sond (TaqMan)
- fluorescenční značka – lanthanidové cheláty (terbium, europium) s molekulami, schopnými absorpce UV – úzké emisní spektrum
- zhášeny ssDNA – řádový nárůst fluorescence po hydrolýze sondy
- time resolved FRET – odečet fluorescence po určité době od excitačního pulzu – snížení fluorescence pozadí
- další snížení zbytkové nespecifické fluorescence pomocí krátké sondy se zhášecem – do cyklu je zařazen krok 35°C kdy se váže sonda se zhášecem na nenavázanou reportérovou sondu
- kombinace s klasickými fluorofory



7. Hybridizační sondy

- dva oligonukleotidy, navržené tak, aby hybridizovaly na templátu vedle sebe
- fluorofory tvořící FRET pár
- pouze po úspěšné hybridizaci dojde k emisi fluorescence

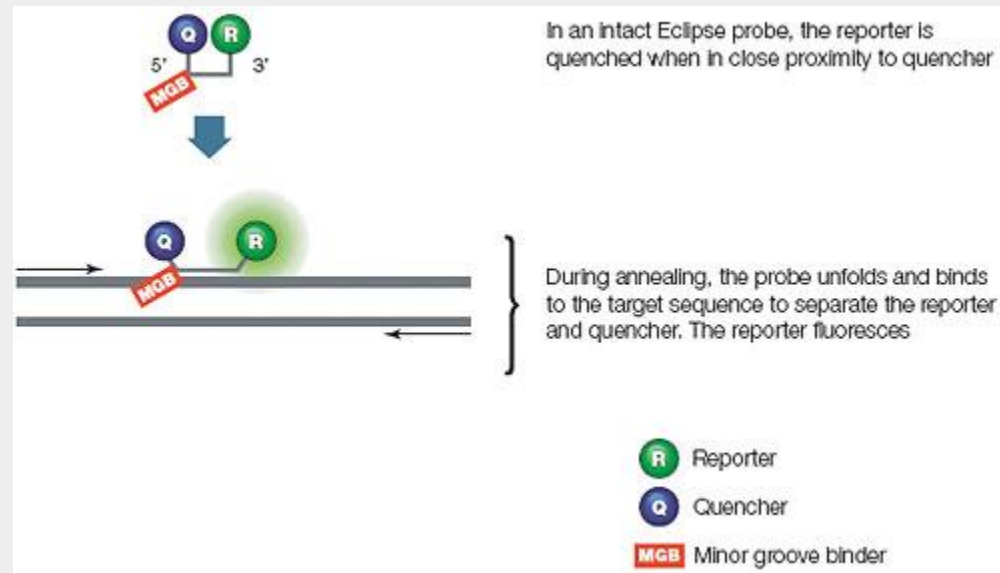


Sondy nehybridizují v dostatečné blízkosti – nedojde k FRET

- kvantifikace, genová exprese, SNP

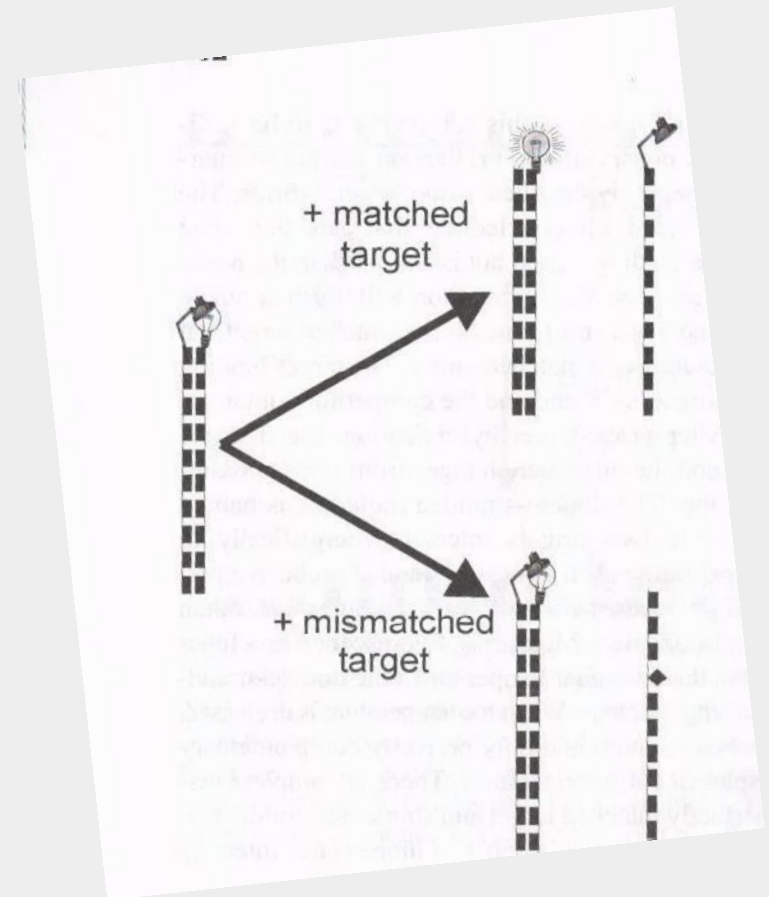
8. Eclipse

- Lineární sondy, podobné TaqMan
- 3' konec – fluorofor, 5' MGB protein a zhášec
- Nejsou hydrolyzovány Taq polymerázou
- Pokud není Eclipse sonda hybridizována k templátu, zaujímá konformaci, ve které jsou fluorofor a zhášec v těsné blízkosti
- Přítomnost MGB zvyšuje účinek zhášec – redukce fluorescence pozadí a umožňuje konstrukci kratších sond s vyšší T_m



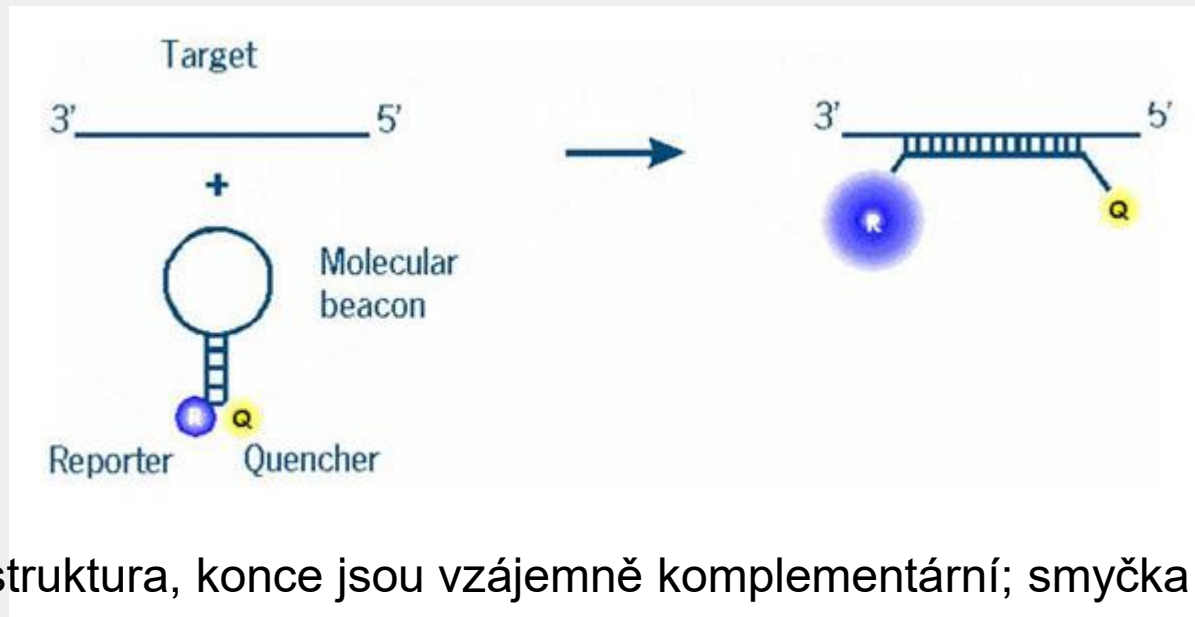
9. Displacement Hybridization/Complex Probes

- v reakci kromě sondy a templátu je navíc kompetitor
- kompetitor blokuje nespecifickou hybridizaci sondy k podobným sekvencím, ale nezasahuje do hybridizace mezi přesně odpovídajícím templátem a sondou
- SNP – diskriminace rozdílů i v jediné bázi
- fluorescence se měří v annealingové fázi



Strukturní sondy

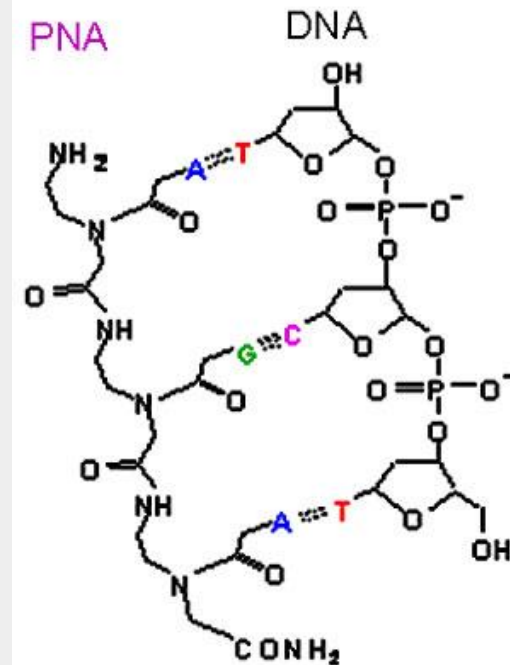
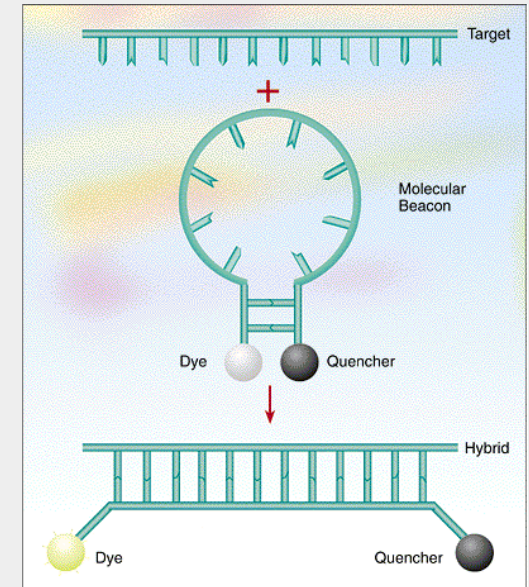
1. Molekulární majáky/ Molecular beacons



- vlásenková struktura, konce jsou vzájemně komplementární; smyčka je komplementární k cílové sekvenci
- konce označeny fluoroforem a zhasičem
- ve vlásenkové konformaci je fluorescence zhasena
- po vazbě na komplementární templát dochází k emisi fluorescence
- fluorescence je odečtena v annealingovém kroku
- po zvýšení na extenzní teplotu, sonda disociuje a nebrání polymeraci
- Stratagene

1a. PNA Molekulární majáky

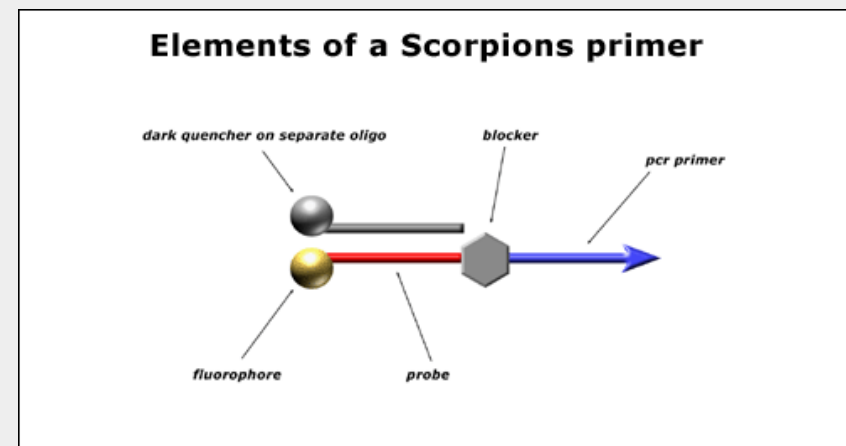
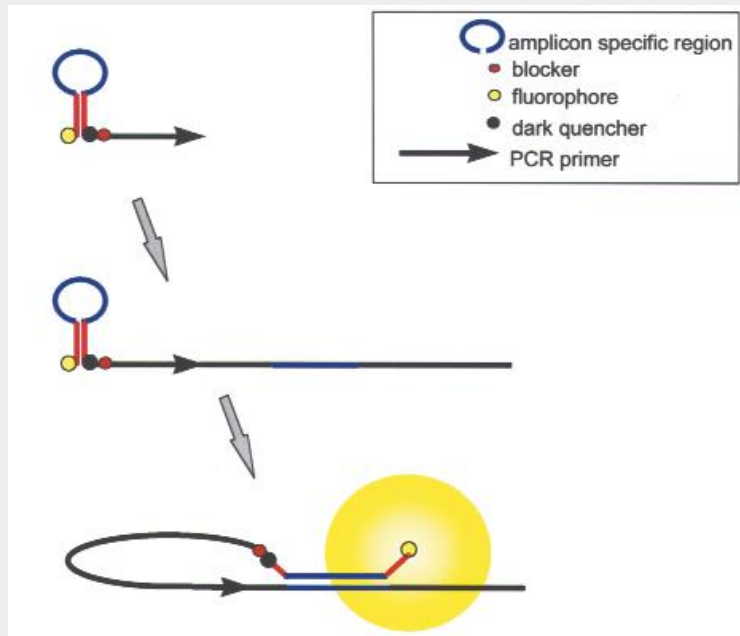
- Klasické majáky špatně hybridizují ke komplementární ssDNA v roztocích o nízké iontové síle, poměr signál/šum je různý, ale zvyšuje se s rostoucí iontovou silou
- „stemless“ majáky výborně hybridizují i za nízkých koncentrací solí, ale mají nízký poměr signál/šum
- PNA „stemless“ majáky kombinují výhody obou systémů
- Výhody:
 - Neobsahují jiné sekvence než komplementární k cílové molekule → výrazné urychlení kinetiky reakce
 - Rezistentní k nukleázám
 - Necitlivé k přítomnosti DNA vazebných proteinů
 - Účinné i v nízké iontové síle a při vyšších teplotách



2. Scorpion primers

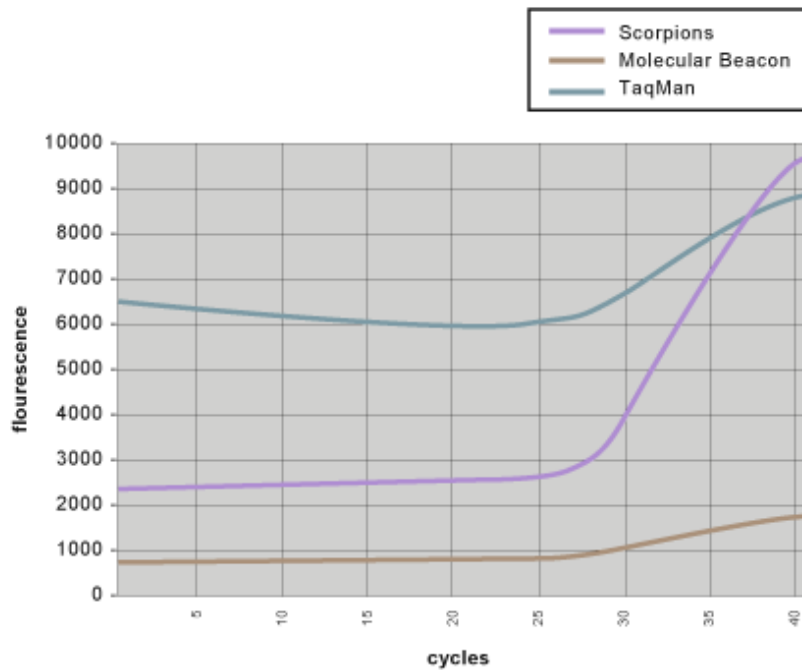


- kombinace sondy a primeru v jediné molekule
- nedochází k enzymatickému štěpení – rychlejší proces
- poměr ampliconů a hybridizovaných sond (tedy i fluorescence) 1:1
- vlásečková struktura - sonda (specifická sekvence) kovalentně vázaný primer
- PCR blocker – zabraňuje replikaci sekvence sondy a tedy i nespecifickému fluorescenčnímu signálu
- zhášení fluoroforu je zajištěno separátním oligonukleotidem



Scorpion primers

- Nízké pozadí
- Rychlá analýza
- Jednoduchý design
- SNP – vysoká citlivost
- Multiplex
- Jednoduchá příprava



The Scorpions reaction

Step 1 - the Scorpions primer is extended on target DNA.



Step 2 - the extended primer is heat denatured - the quencher dissociates.



Step 3 - as it cools the extended Scorpion rearranges and begins to fluoresce in a target specific manner; unextended primer is quenched.



3. Sondy založené na nanočásticích (nanoparticles probes)

- Hybridní materiály složené z biomolekul (oligonukleotidy) a anorganických látek – např. zlaté koloidní nanočástice
- kovové clustery – efektivní zhášče
- hybridní konjugát – ssDNA oligonukleotid, 1,4nm zlatá nanočástice a fluorescenční barvivo
- 5' a 3' konce oligonukleotidu jsou vzájemně komplementární, struktura podobná molekulárnímu majáku

Nevýhody

- Nižší citlivost – řešení změna velikosti nanočástic,
- Změna absorpčního spektra v závislosti na vlnové délce
- Vazba Au-DNA

