

# ÚVOD DO KVANTITATIVNÍ REAL-TIME PCR

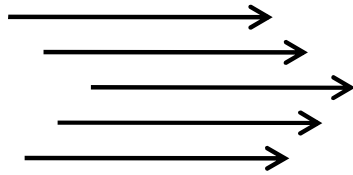


## III. Instrumentace

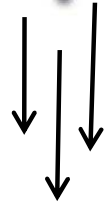
# Instrumentace

PCR - termocykler

qRT-PCR - termocykler kombinovaný s fluorimetrem



Excitační filtr



Emisní filtr



Detektor



# Instrumentace

## Zdroje excitačního záření

### Halogenová lampa

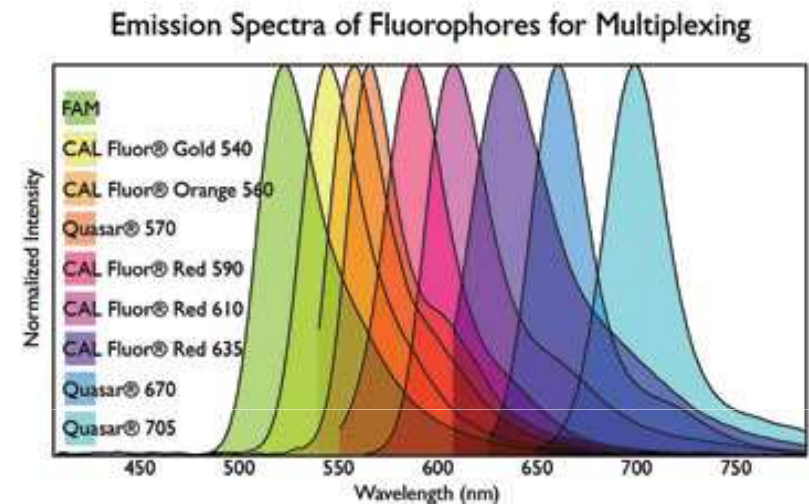
- Všechny vlnové délky viditelného světla (320nm – 2600nm)
- Uniformní excitace
- př. ABI 7300, 7500, Stratagene Mx4000/Mx3000p, BioRad iCycler
- Normalizace fluorescence (Rox)

### Laser

- Specifická vlnová délka
- Není nutný excitační filtr
- Omezený výběr fluoroforů
- př. ABI PRISM 7700/7900

### Elektroluminiscenční diody (LED)

- Úzké pásmo vlnové délky (30-40nm)
- Běžné LED emitují na 430, 450, 505, 592, 612 a 637 nm
- nově i modrá a UV část spektra
- př. Corbett Rotor-Gene, Roche Light Cycler



# Instrumentace

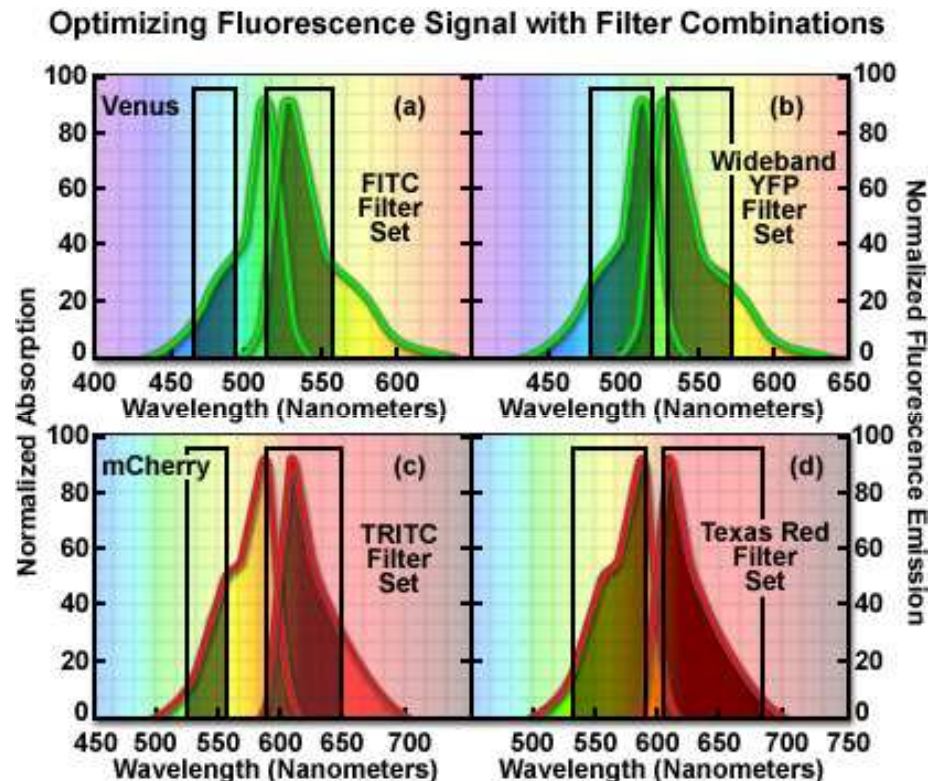
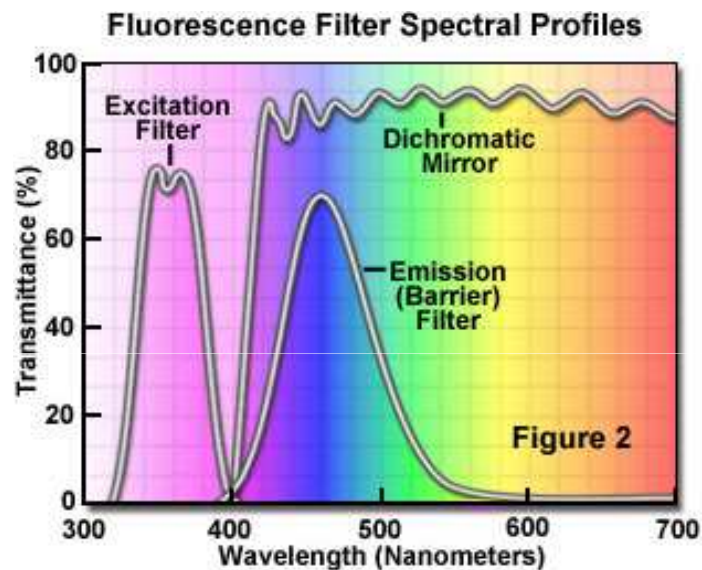
## Filtry

Excitační/emisní – selekce excitační/emisní vlnové délky

Optická kvalita filtru často určuje výkonnost přístroje

Bandpass a Long Pass Filtry

Volba fluoroforu



# Instrumentace

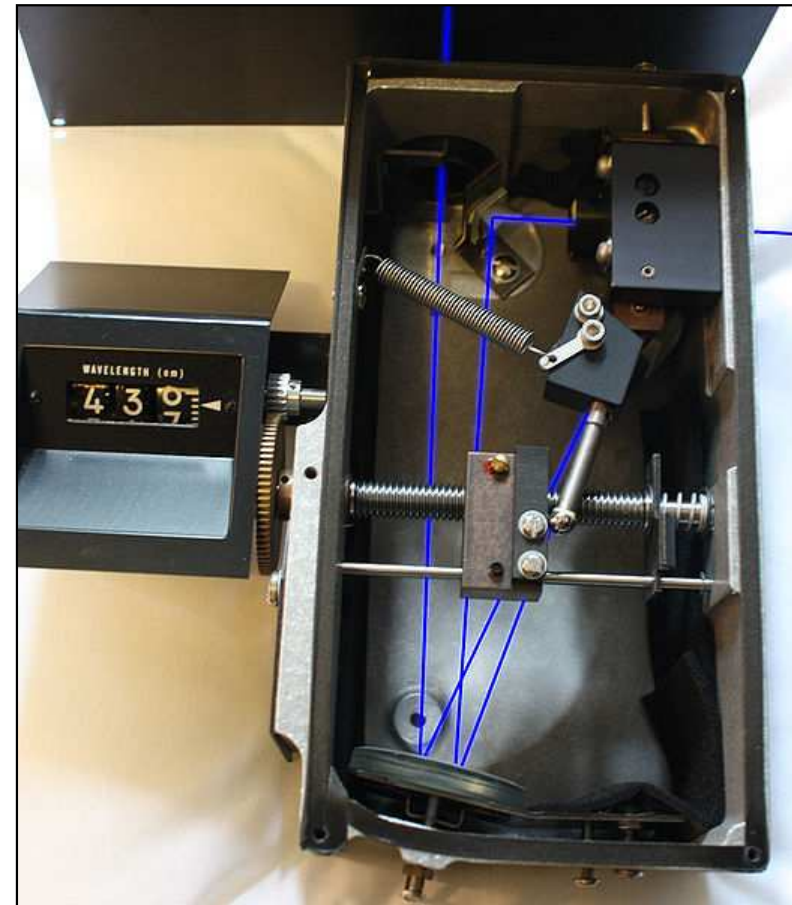
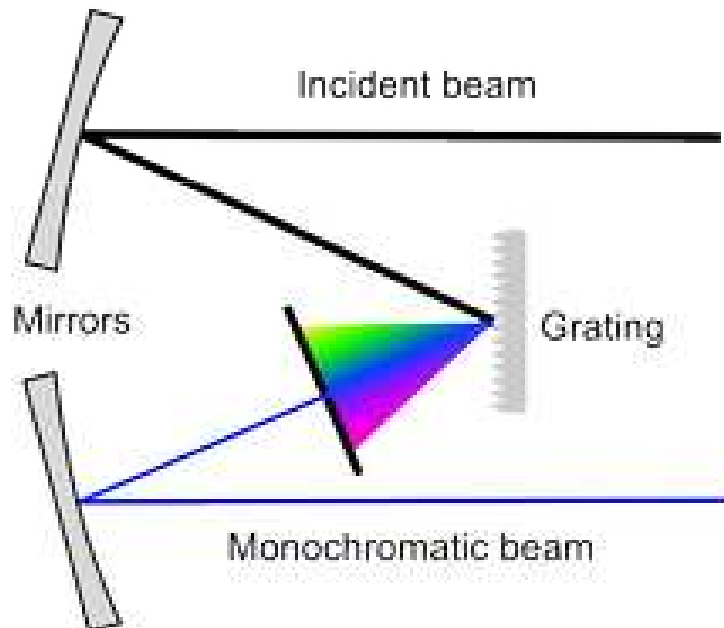
## Monochromátor

Volba libovolné vlnové délky

Difrakční mřížka

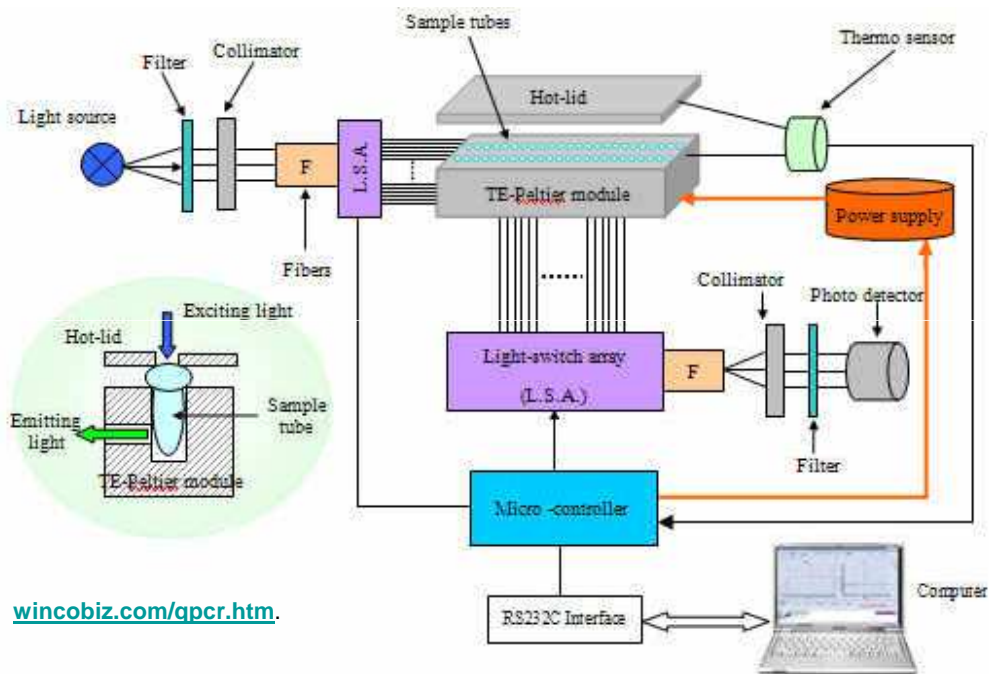
## Fotodetektory

Snímací zařízení (CCD )

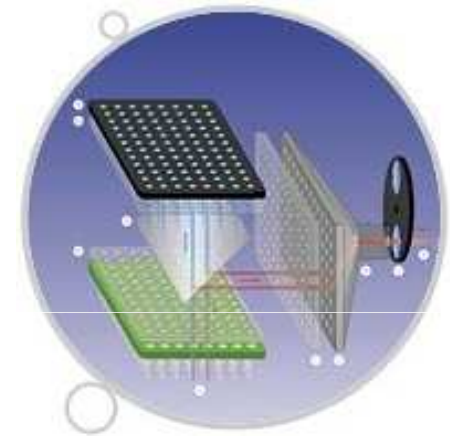
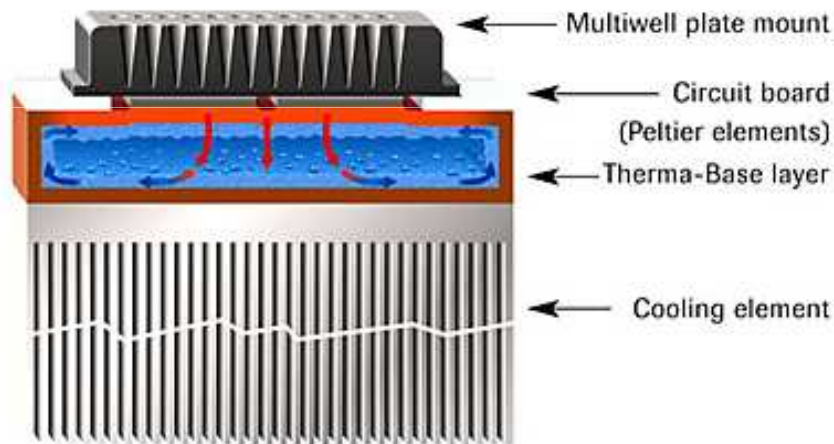


# Instrumentace

## Teplotní uniformita



[wincobiz.com/qpcr.htm](http://wincobiz.com/qpcr.htm)



# Instrumentace

## Parametry RT cyklu

Citlivost – minimální kvantifikovatelné množství templátu – fluorescence, kterou je přístroj schopný odlišit od úrovně pozadí (šum)

Dynamický rozsah – rozsah koncentrací – rozsah intenzity fluorescence

Linearita – intenzita fluorescence je lineární

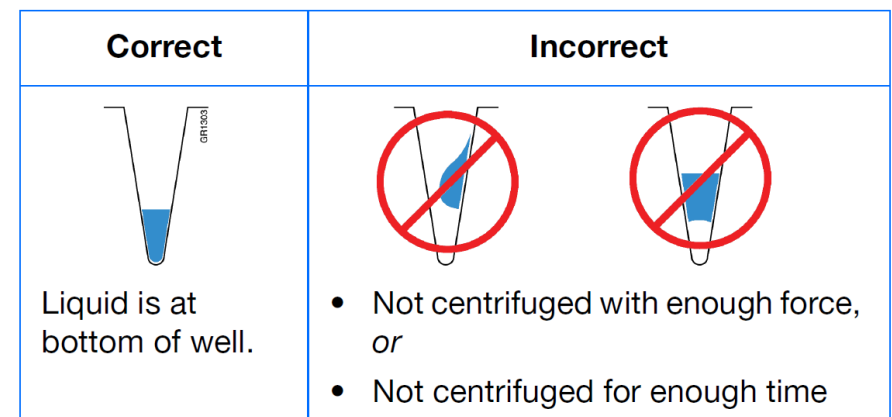
ale:

- koncentrace:

- vysoká koncentrace vzorku – nemusí dojít k excitaci
- i u „normálních“ koncentrací, může dojít k preferenčnímu absorbování světla povrchovými vrstvami vzorku, vzdálenější část vzorku už není excitována světlem o stejné intenzitě

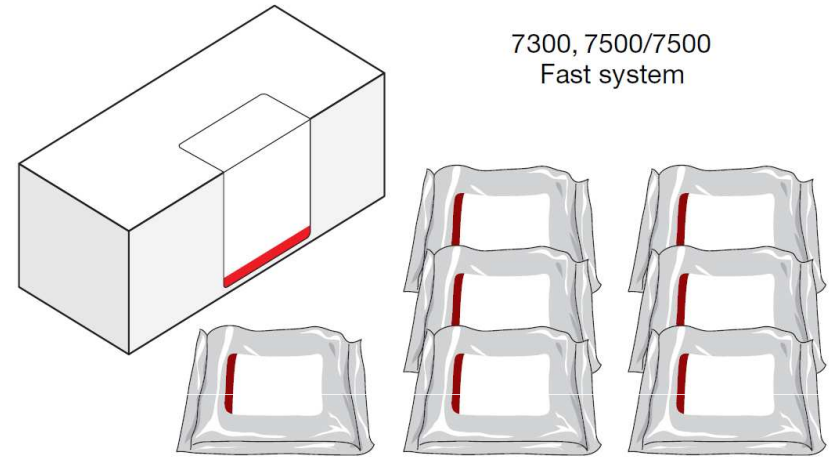
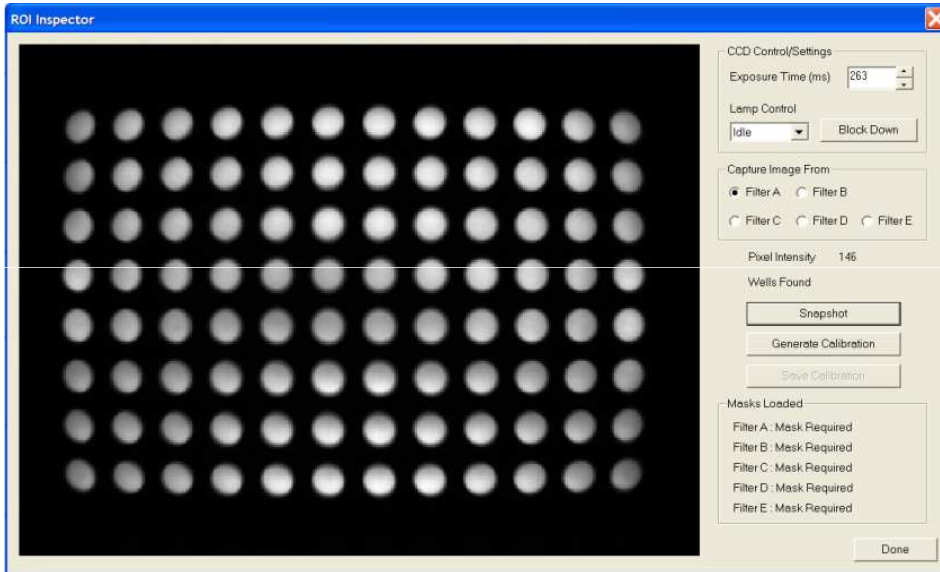
- optická dráha
- laboratorní plastik
- homogenita vzorku

Fluorescenční standardy – kalibrace přístroje



# Instrumentace

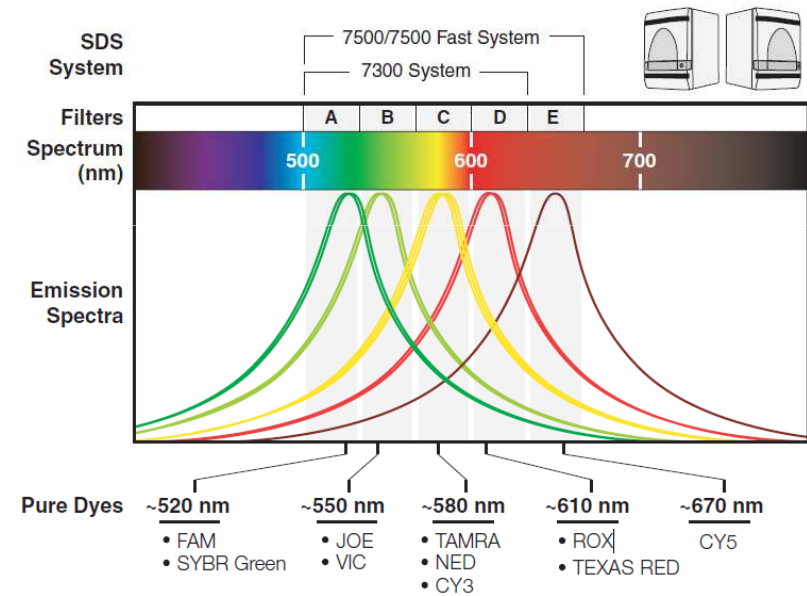
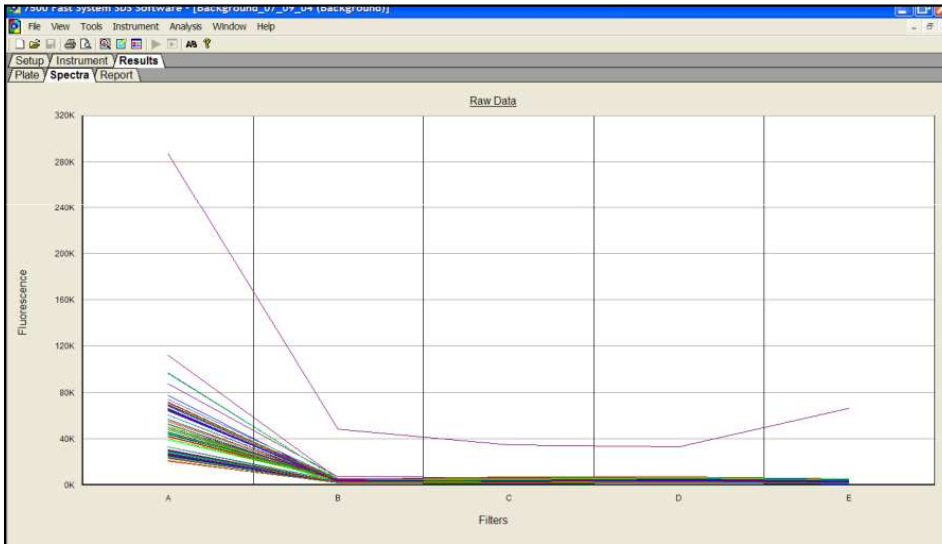
## Kalibrace



7300, 7500/7500  
Fast system

Applied Biosystems  
Real-Time PCR System  
Spectral Calibration Kit

Pure Dye Plates  
(FAM™, JOE™, NED™,  
ROX™, SYBR® Green,  
TAMRA™, and VIC® dyes)



Pure Dyes

- ~520 nm
  - FAM
  - SYBR Green
- ~550 nm
  - JOE
  - VIC
- ~580 nm
  - TAMRA
- ~610 nm
  - ROX
  - TEXAS RED
- ~670 nm
  - CY5





# ÚVOD DO KVANTITATIVNÍ REAL-TIME PCR

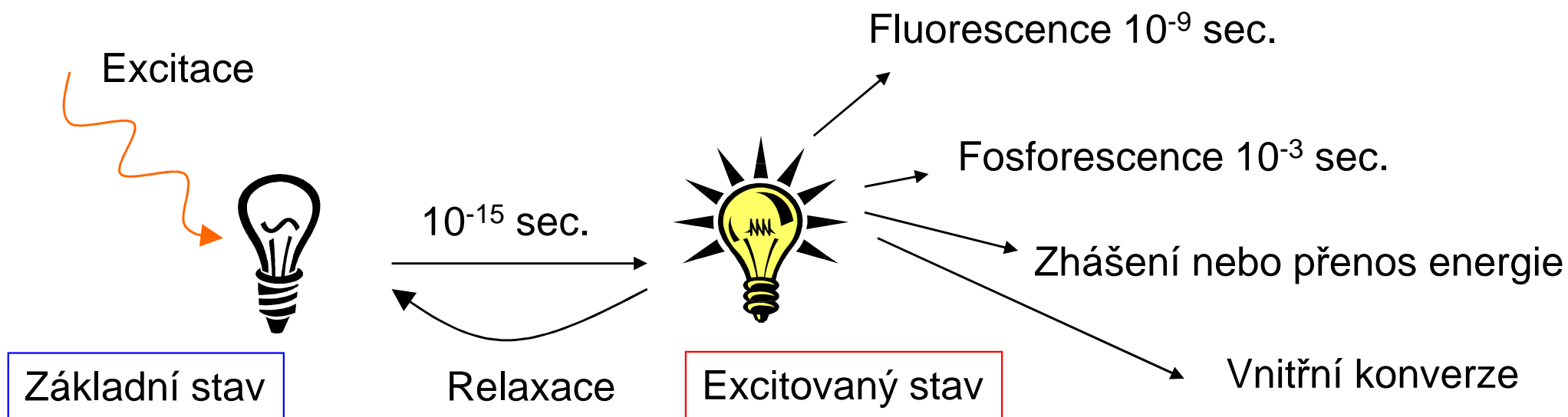


## IV. Interkalační barviva a sondy

# Fluorofor

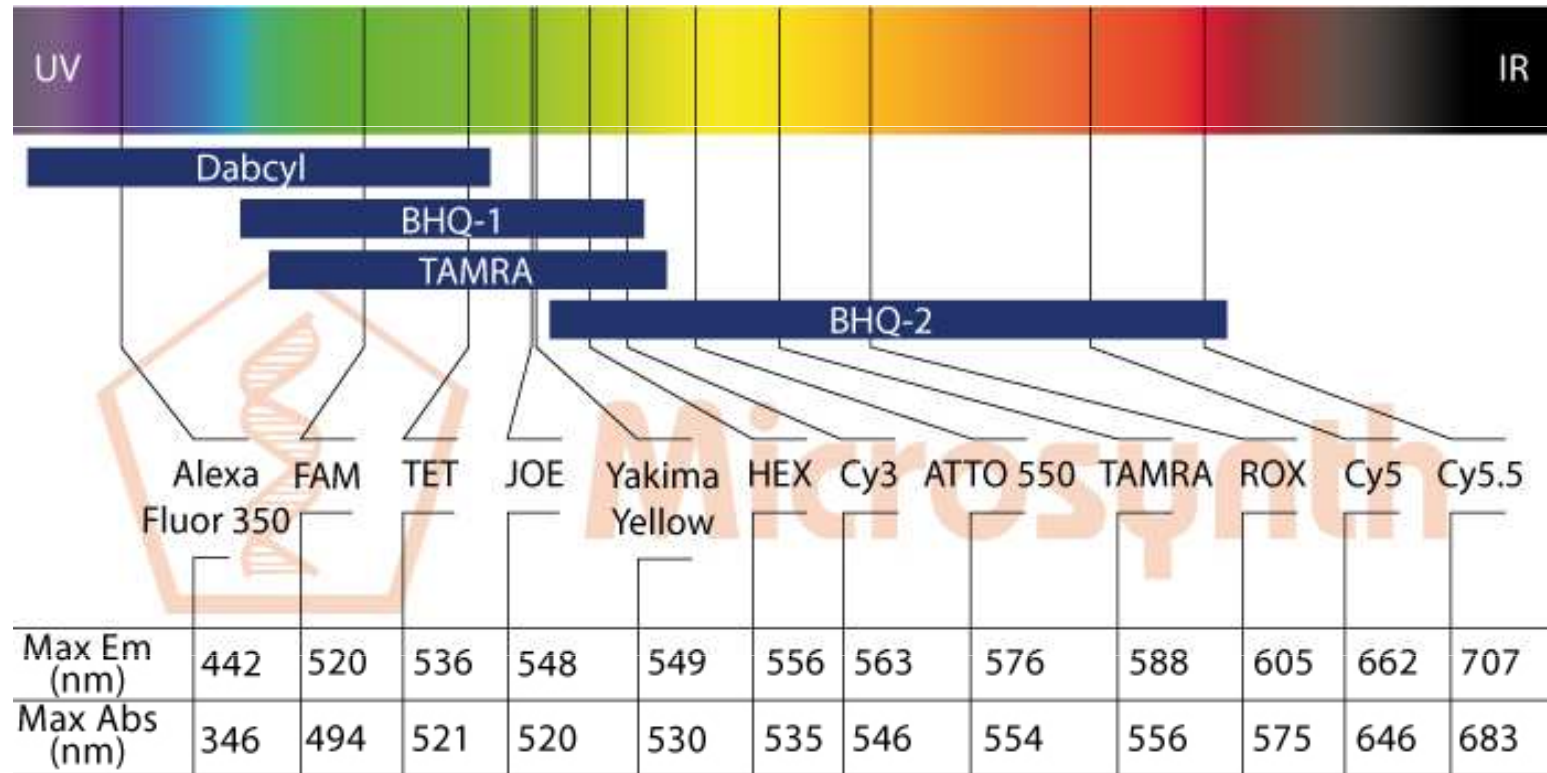
(F)

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



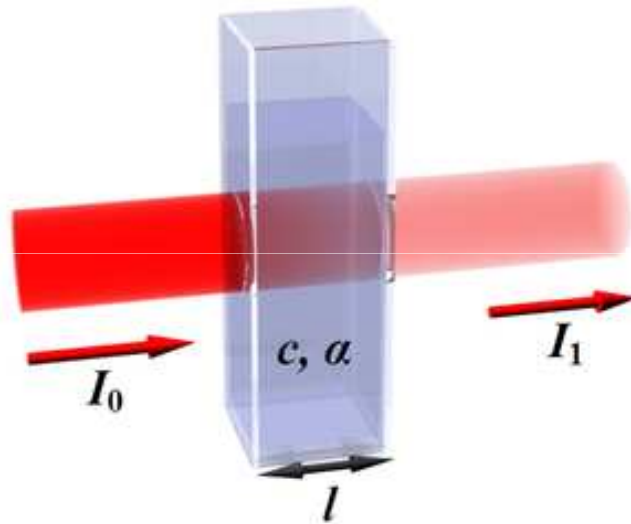
# Fluorofor

(F)

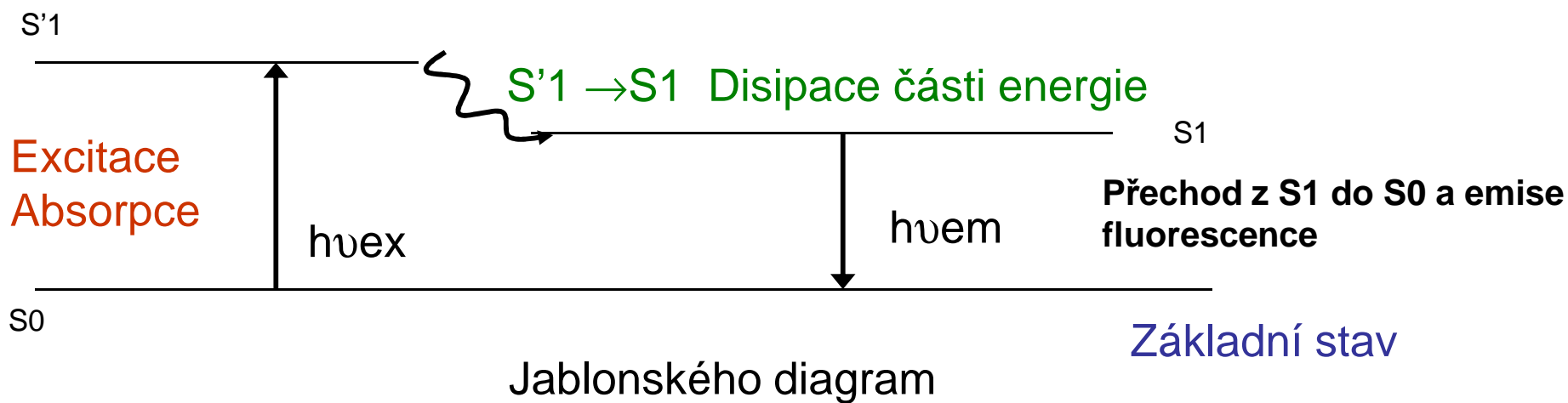
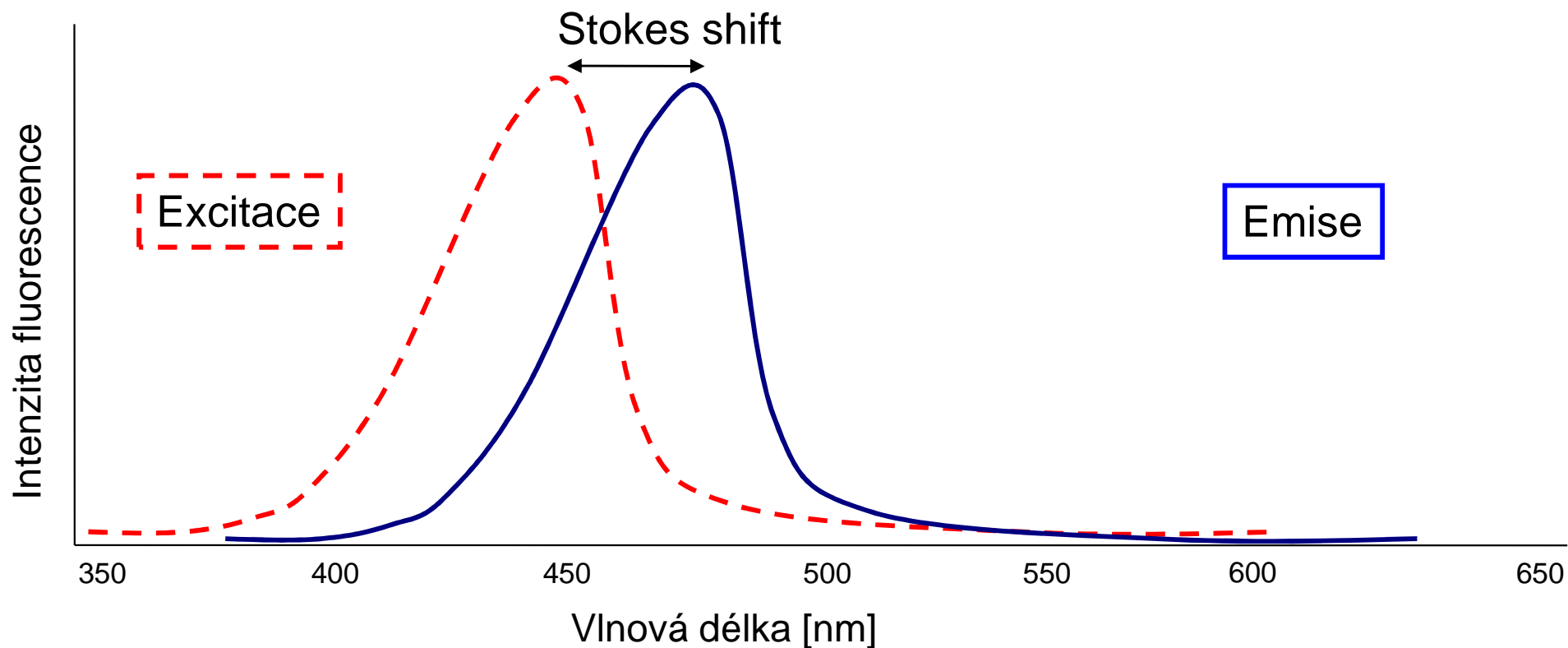


**Fluorescenční kvantový výtěžek** (Fluorescence quantum yield, QY) – poměr emitovaných fotonů k absorbovaným.

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



# Stokesův posun; Jablonského diagram

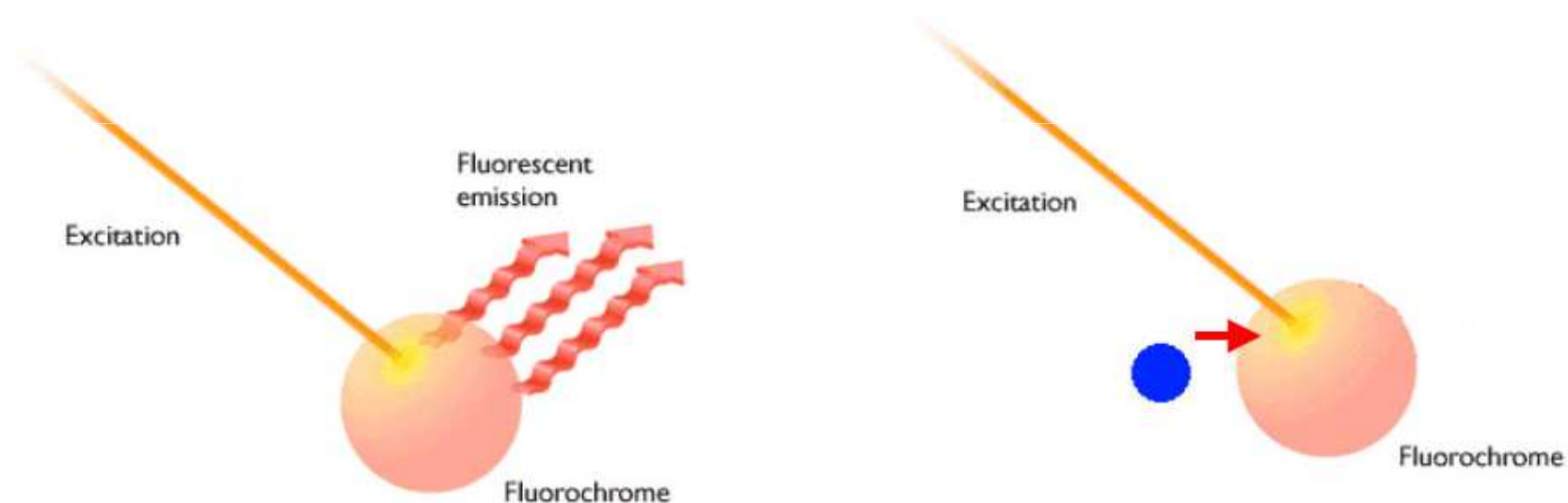


## Zhášení – quenching

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

### Proximální zhášení – kolizní quenching

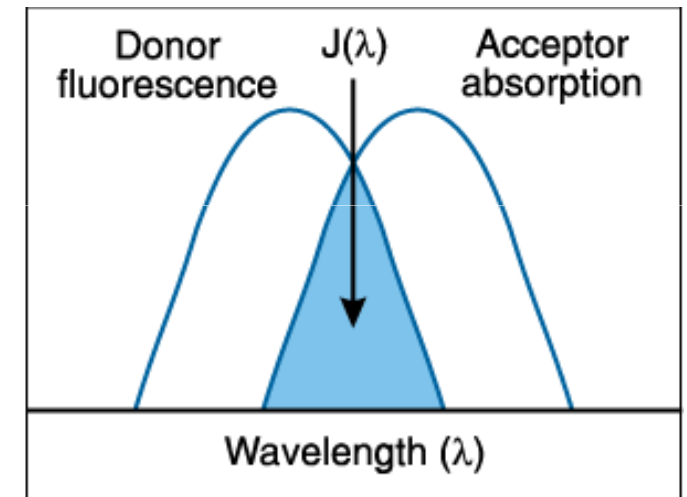
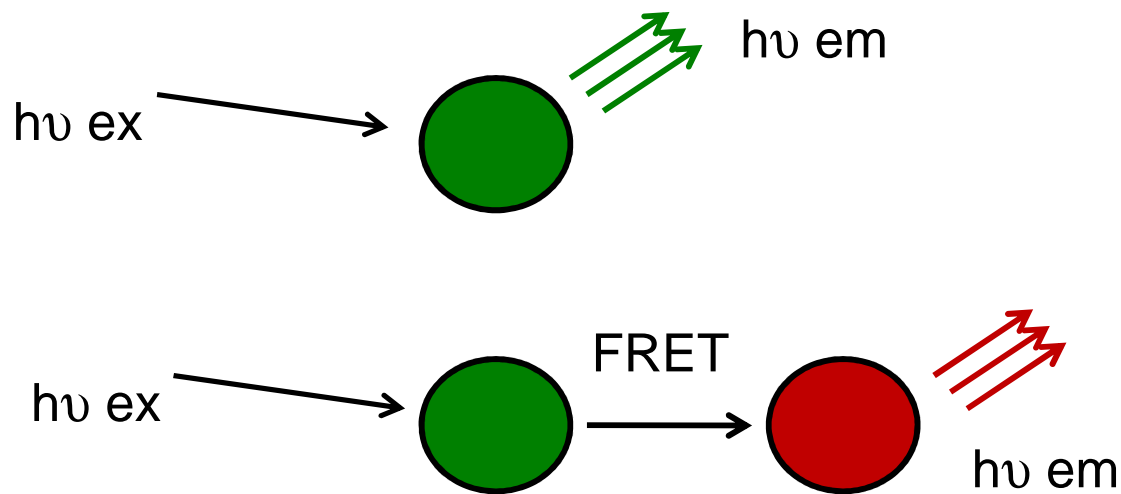
- Fluorofor velmi blízko zhášeeče – přenos energie z F na Q ve formě tepla – nenastane žádná fluorescence
- Proximální zhášeeče: molekulární kyslík,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{NO}_3^-$



# 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





# Specifická vs. nespecifická detekce amplikonu

## 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

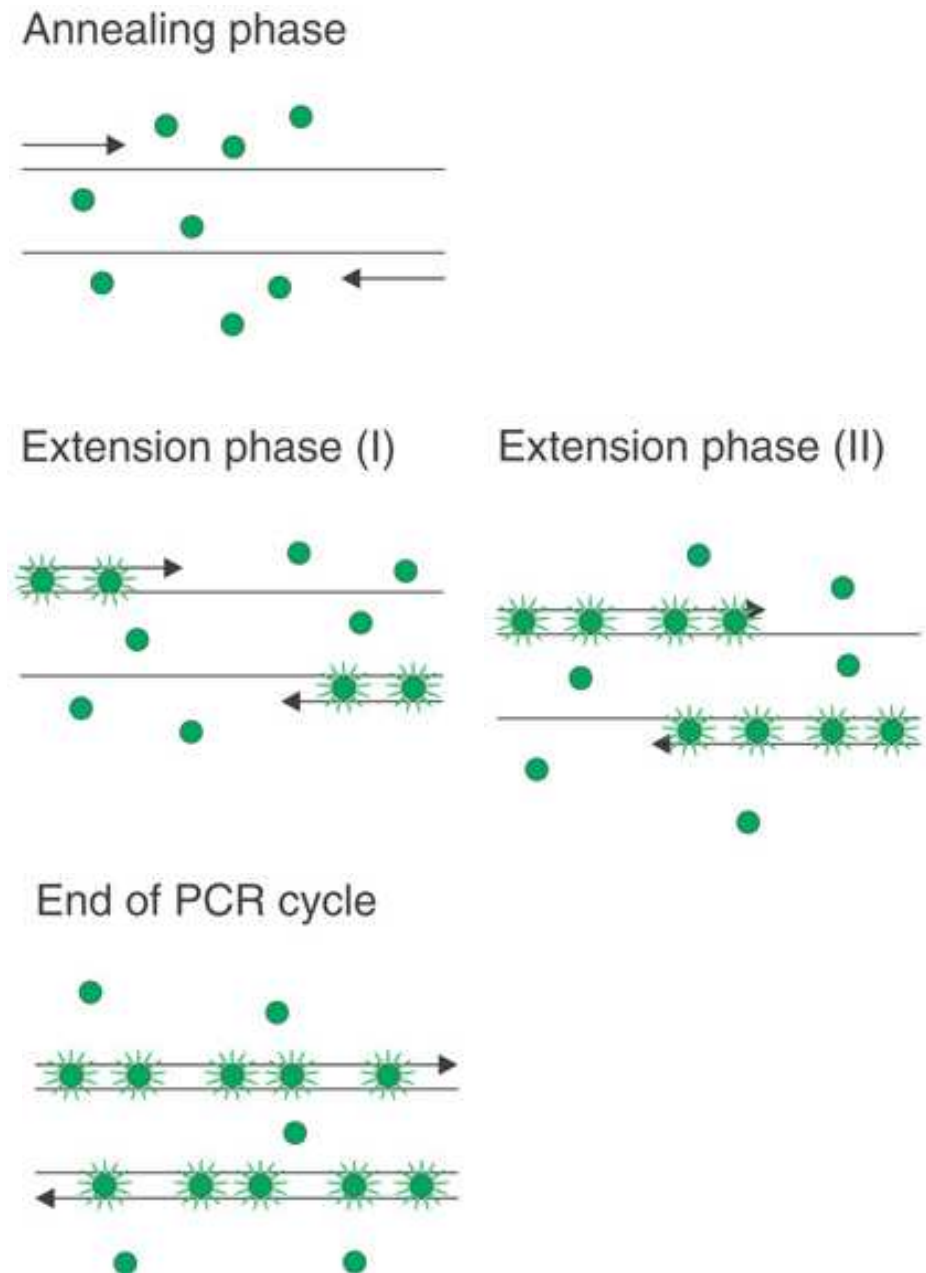
# Interkalační barviva

## Reverzibilní vazba na dsDNA

- Relativně levné
- Citlivé

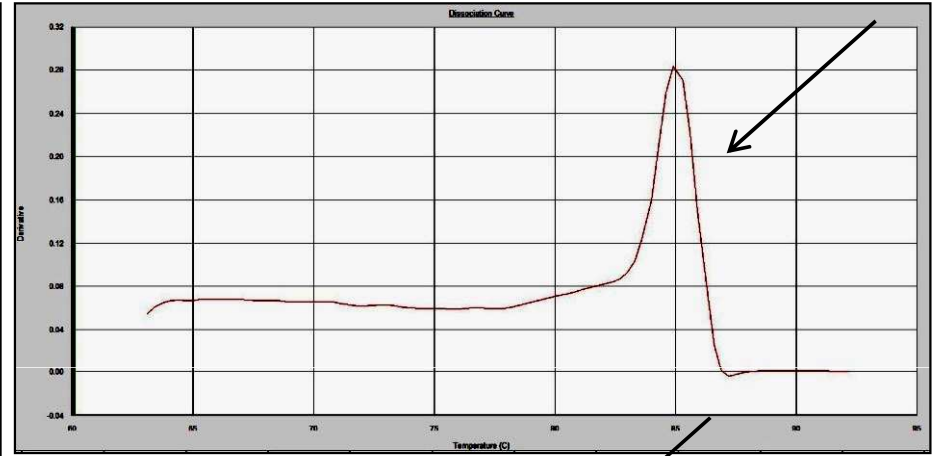
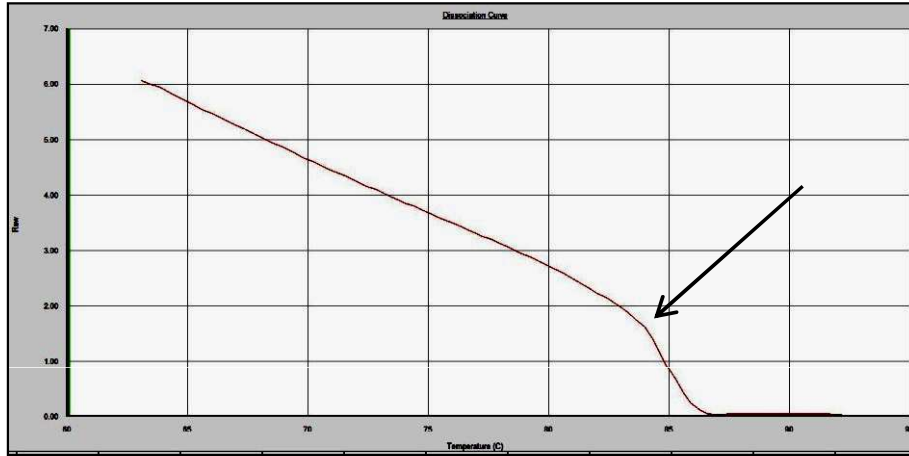
## Nevýhody:

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

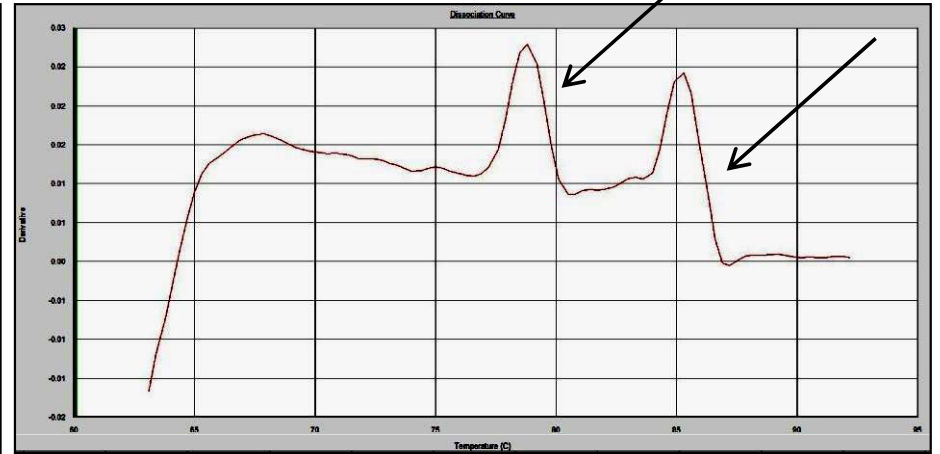
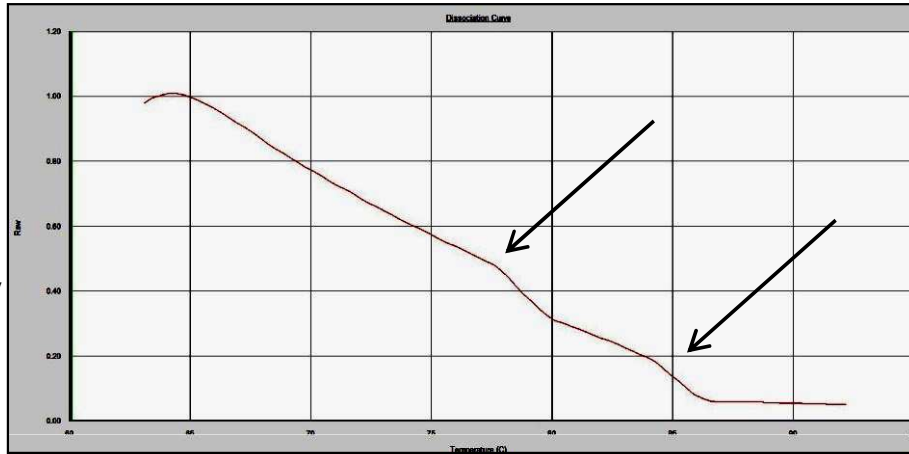


# Disociační křivky – melting curves

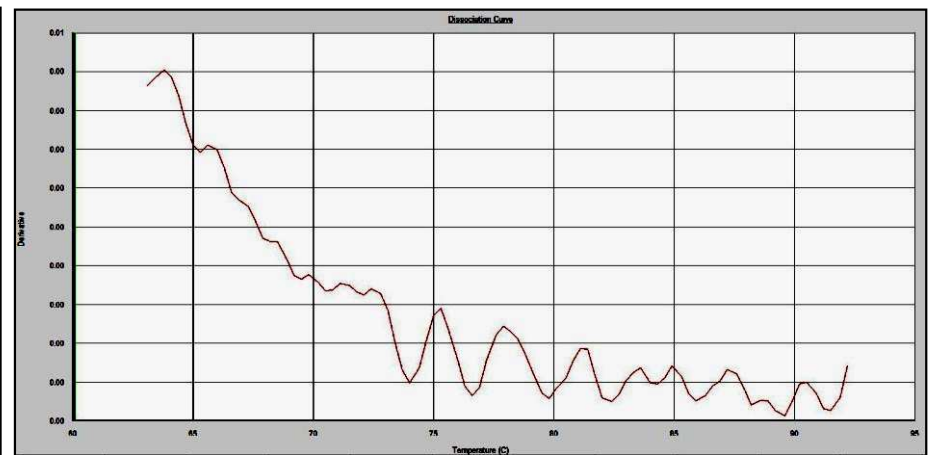
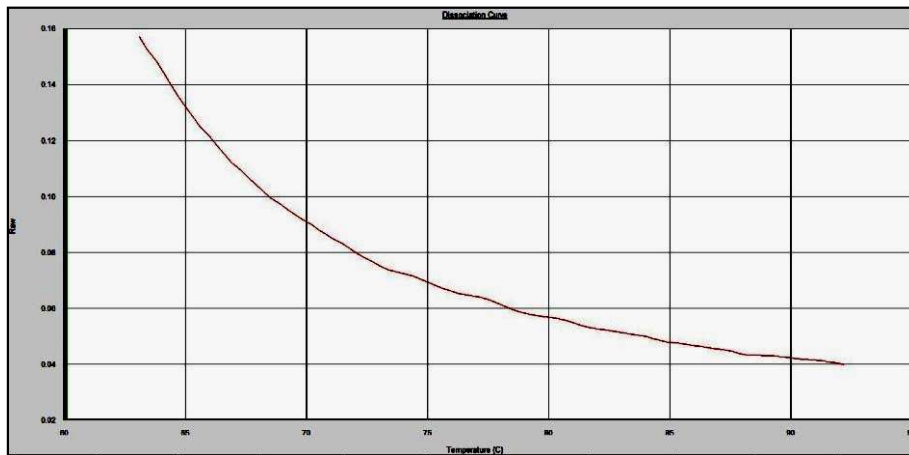
1 amplikon



2 amplikony



Žádná  
amplifikace



# Interkalační barviva

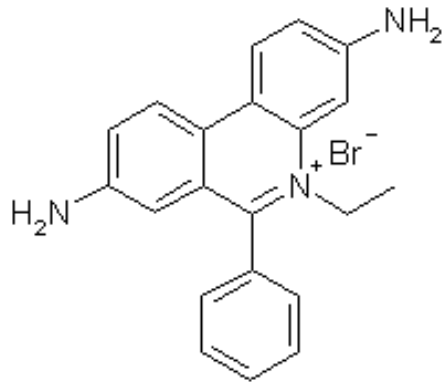
## Ethidium bromid

30ti násobný nárůst fluorescence  
po vazbě na dsDNA

Nepravidelná vazba na DNA

$Q_y = 0,15$

Mutagen ☠



## SYBR Green

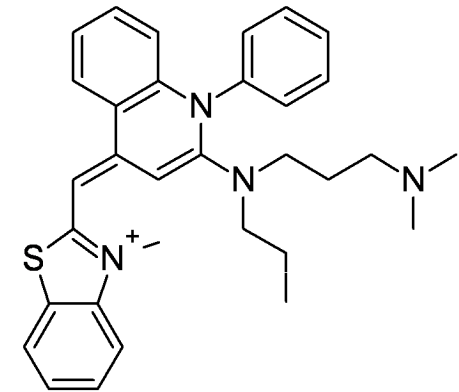
SYBR Green II

SYBR Gold

YO (Oxazole Yellow)

TO (Thiazole Orange)

PG (PicoGreen)

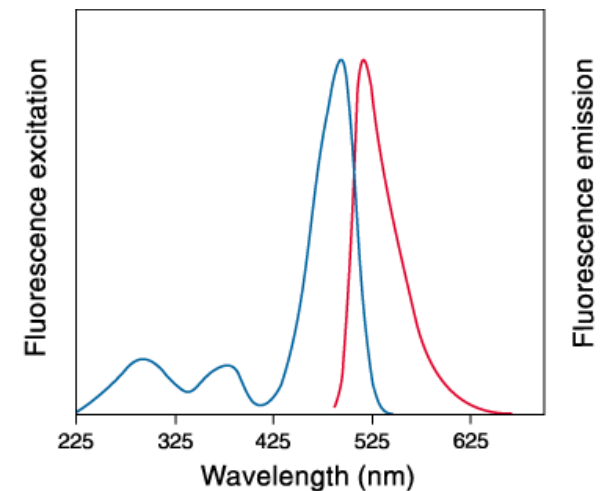
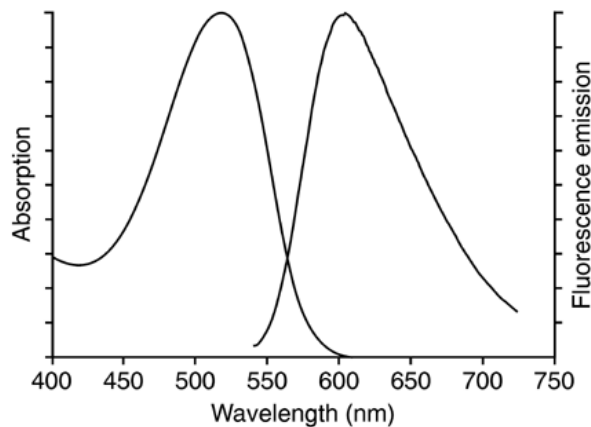


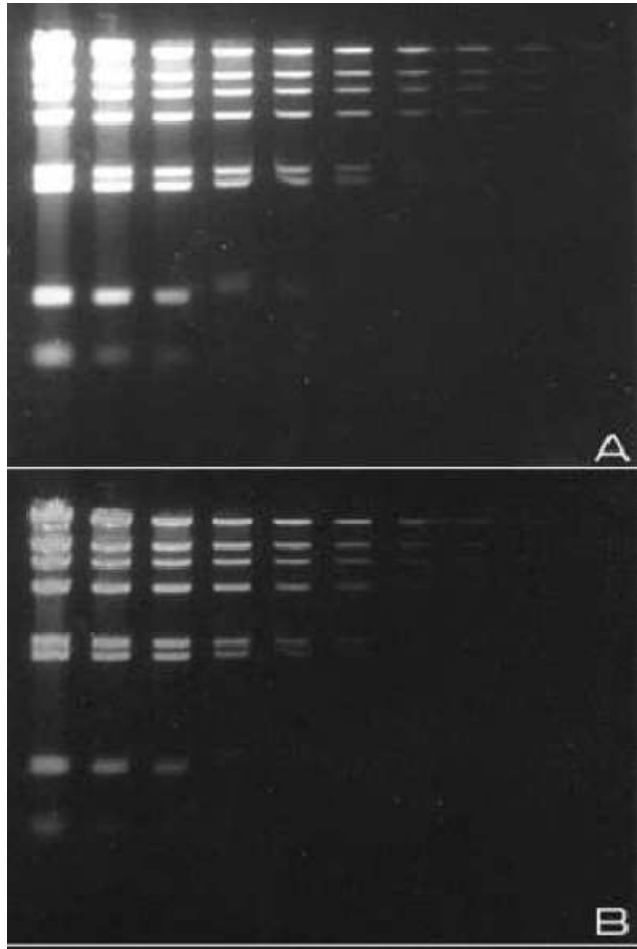
>1000 násobný nárůst  
fluorescence

Rovnoměrná vazba na DNA

$Q_y = 0,60$

Bezpečný





A) SYBR Green

B) Ethidium bromide

Použití dvou odlišných molekul

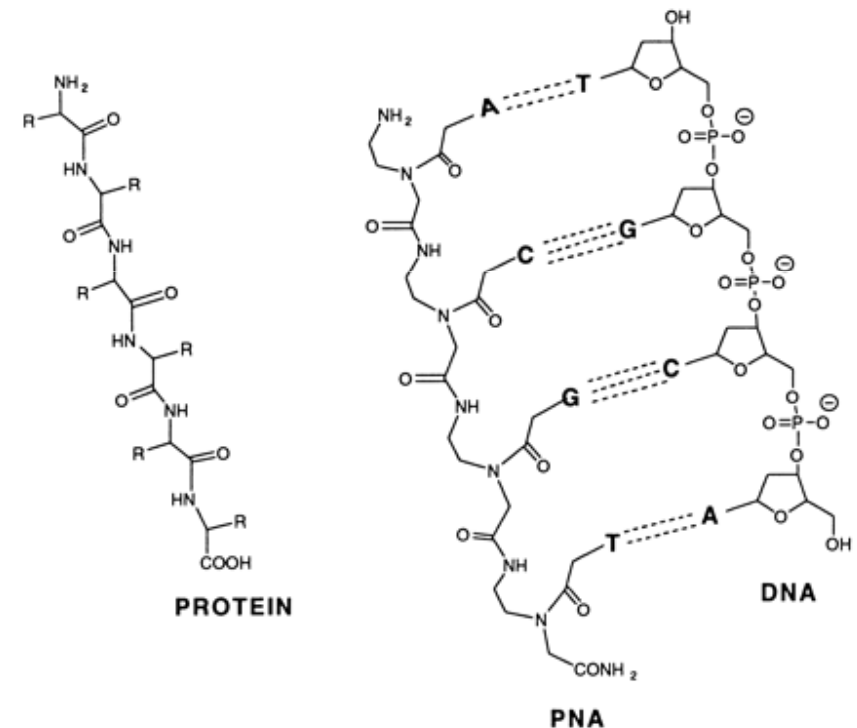
PNA (peptide nucleic acid) označenou na C konci zhášecem DABCYL (Q-PNA)

+

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

$T_m \text{ primer/amplikon} > T_m \text{ Q-PNA/primer} > T_a \text{ primer}$

1. Nadbytek primerů je zhášen při  $T_a$
2. Fluorescence měřená během  $T_a$  udává množství primerů hybridizovaných k templátu /amplikonu plus množství fluorescenčně označených dsDNA amplikonů
3. Real-time i end point

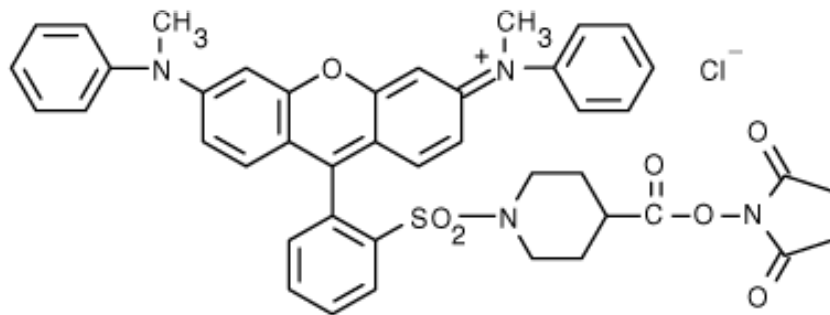


Primer >25bp se zhášečem na 5' konci (QSY 7, QSY 9), **Molecular Probes-Invitrogen**

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

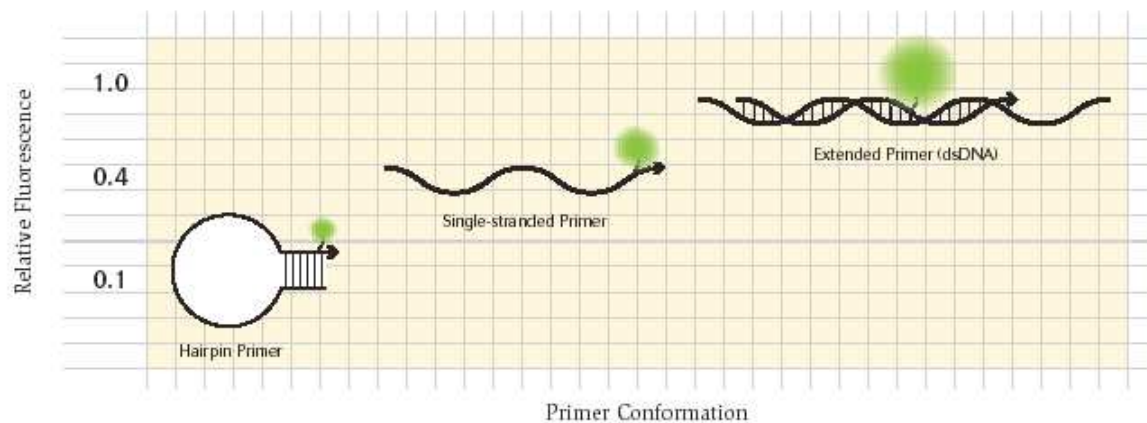


# LUX Primery

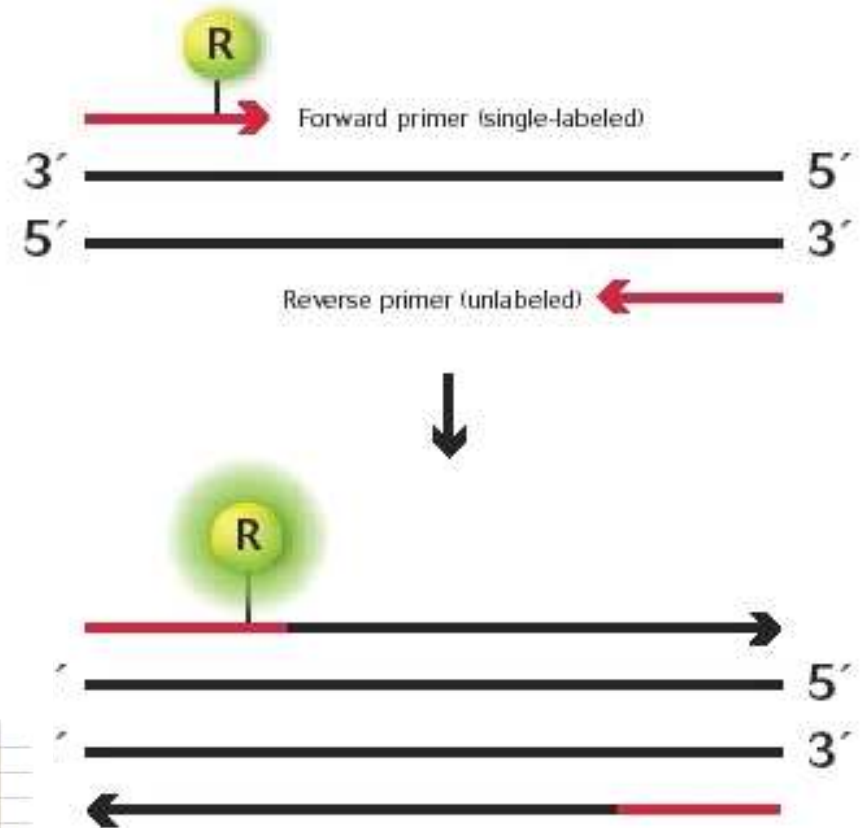
## Light Upon eXtension – Invitrogen

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

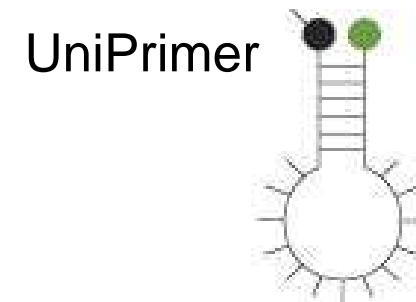
Figure 2 - The LUX™ (Light Upon eXtension) effect



## LUX™ detection



- 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 zhášečem (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

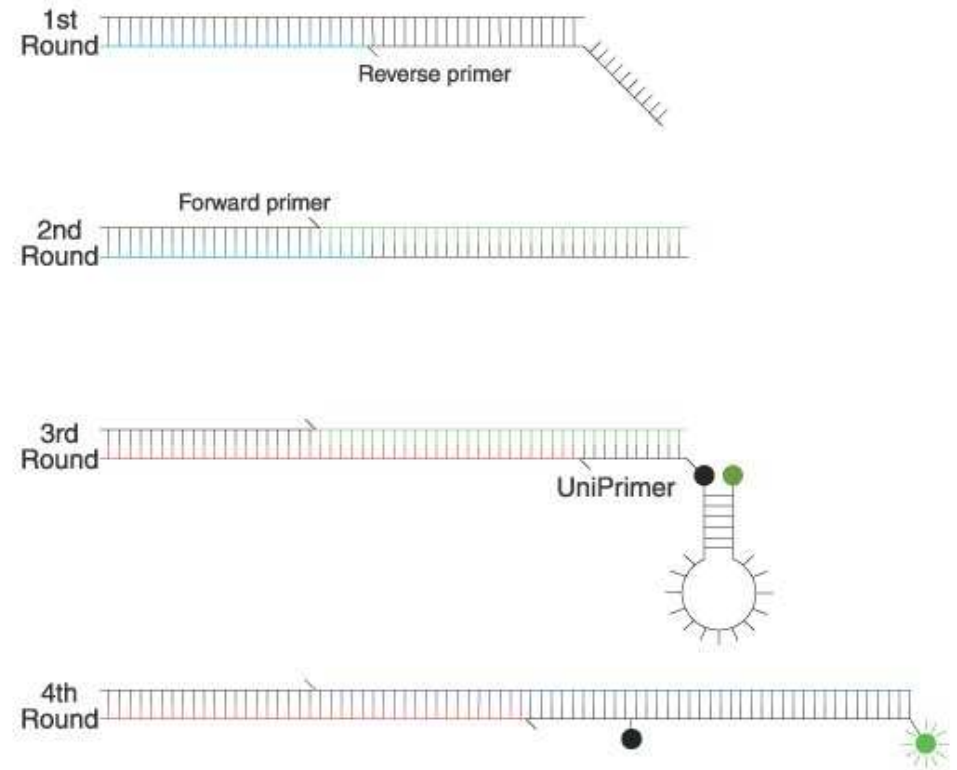
Cyklus 1: primer se Z sekvencí je inkorporovaný do nově syntetizovaného řetězce

Cyklus 2: polymerace z druhého primeru inkorporuje sekvenci komplementární k Z do druhého řetězce

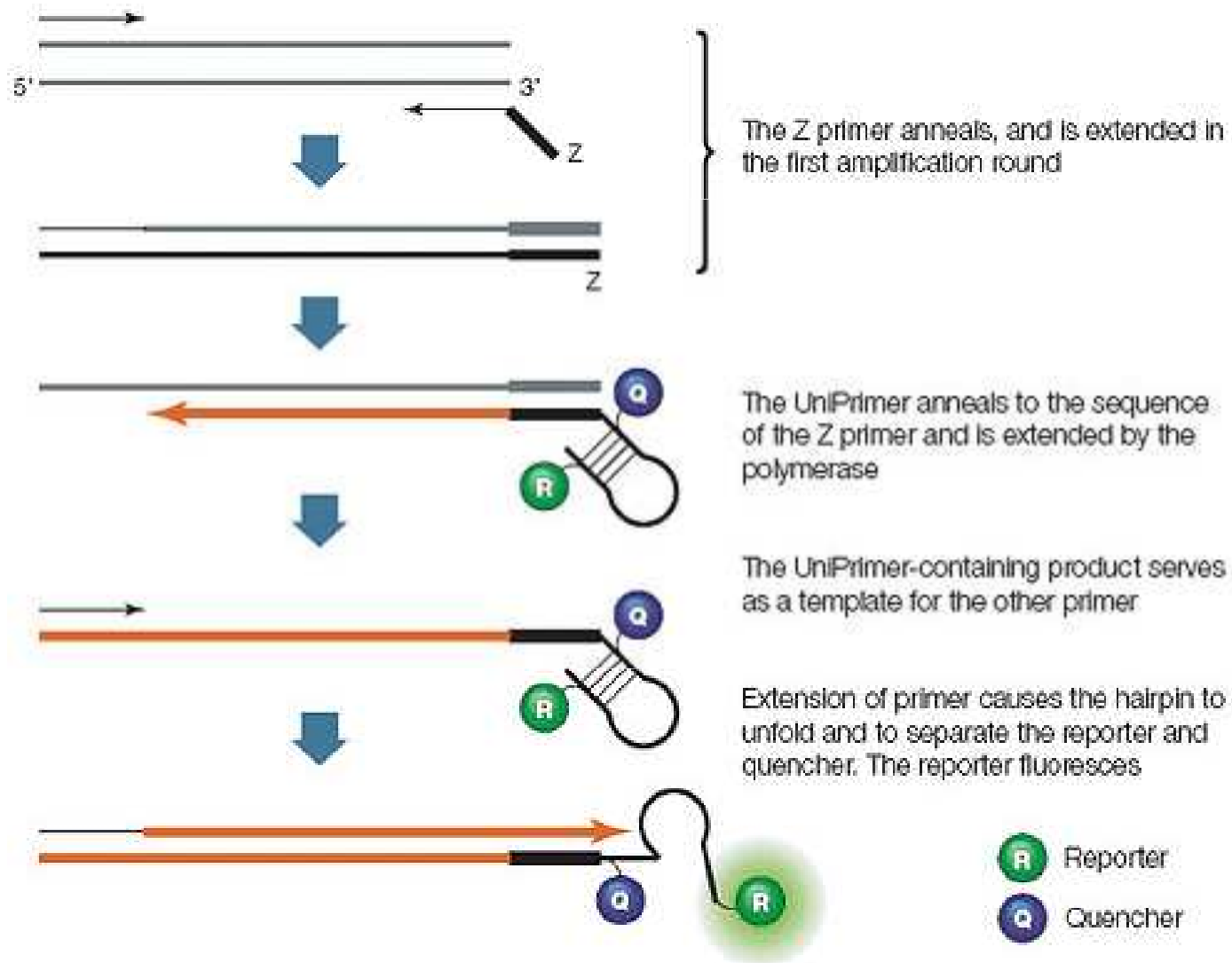
Cyklus 3: konec Uniprimeru se komplementárně váže k Z sekvenci, poskytuje volnou OH skupinu polymeráze a je sám začleněn do nově vznikajícího řetězce – uvolňuje se vlásenková konformace

Cyklus 4: polymeráza uvolňuje vlásenkovou strukturu a celý Uniprimer se stává součástí nového řetězce. Zhášecí je oddělen od fluoroforu a dochází k emisi fluorescence.

- Od tohoto cyklu je Uniprimer inkorporován do amplikonu
- Fluorescenční signál je generován v každém PCR cyklu (je snímán během annealingu) a koreluje s množstvím amplikonu.
- Nezačleněný Uniprimer tvoří vlásenku a nefluoreskuje.



# Amplifluor



# Specifická detekce množství amplikonu

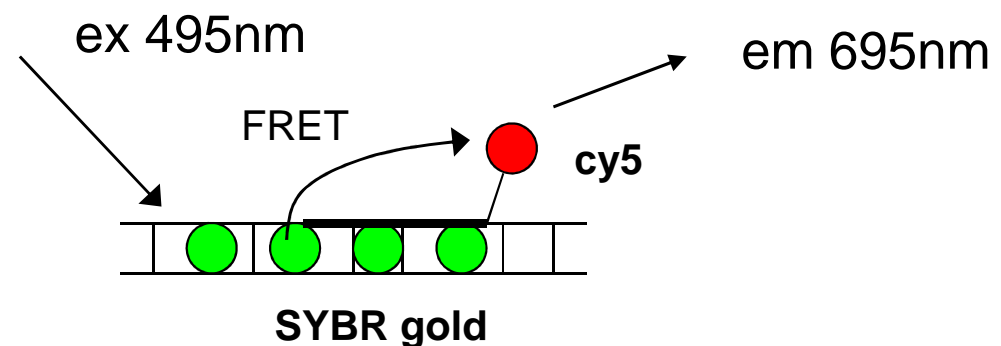
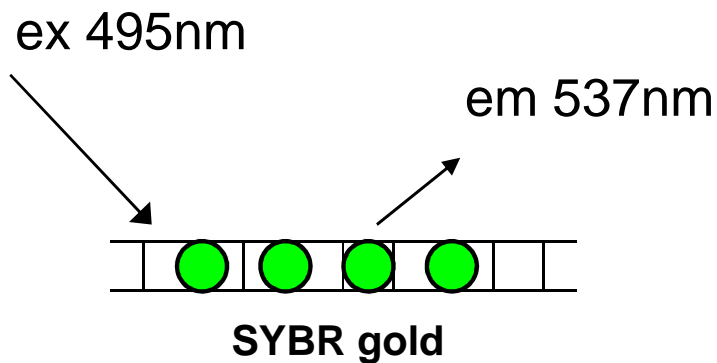
## Lineární sondy

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

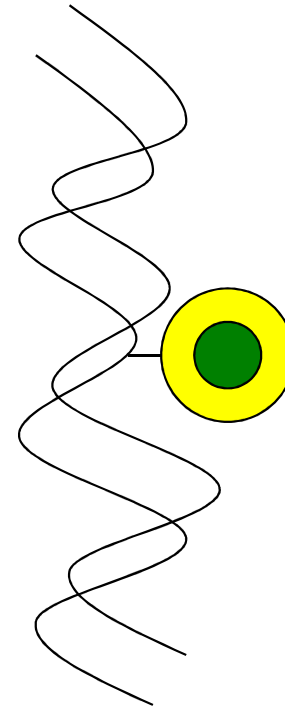
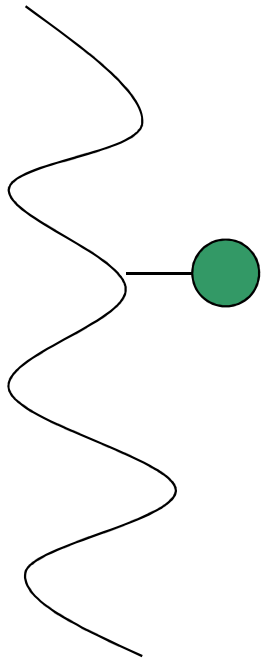
## Strukturní sondy

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

- urychlení qPCR - optimální fluorescenční signál již po 5 sec. v annealingovém kroku
- DNA interkalátor (SYBR Gold) – FRET donor + sonda specifická k jedinému ampliconu – 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

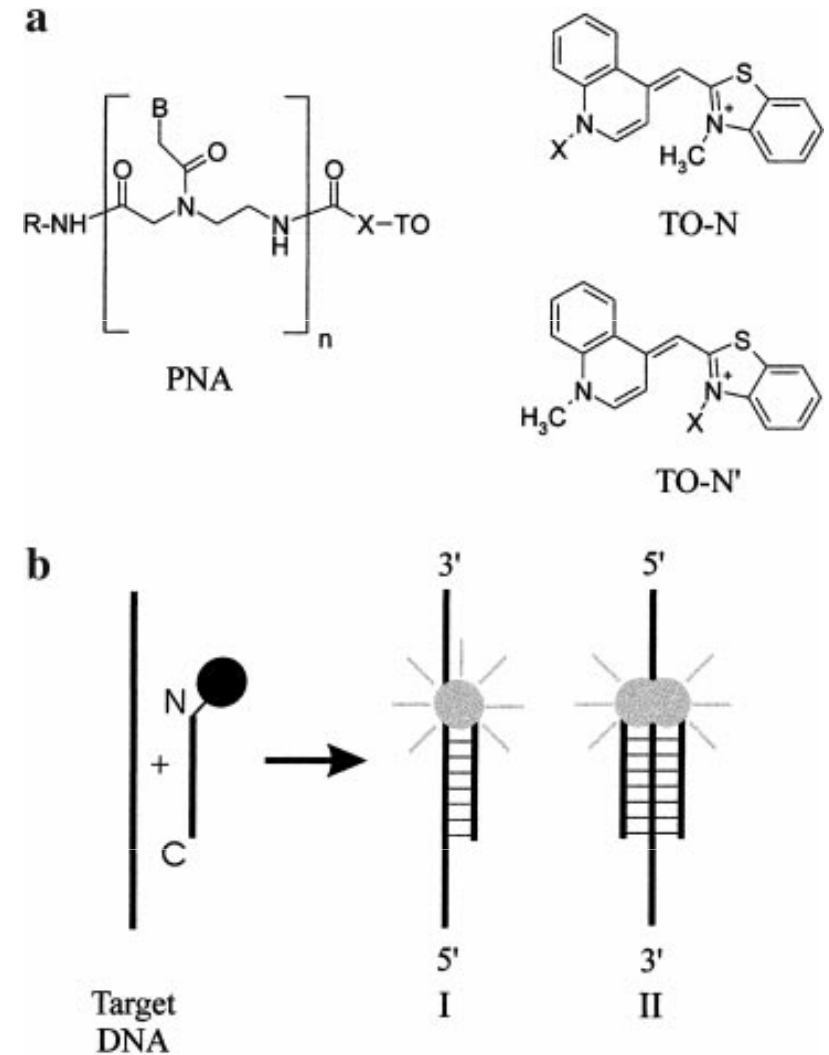






# Light Up Probes

- 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

LUP2

Lys1-TAGCTGCT-- --CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-TO-N

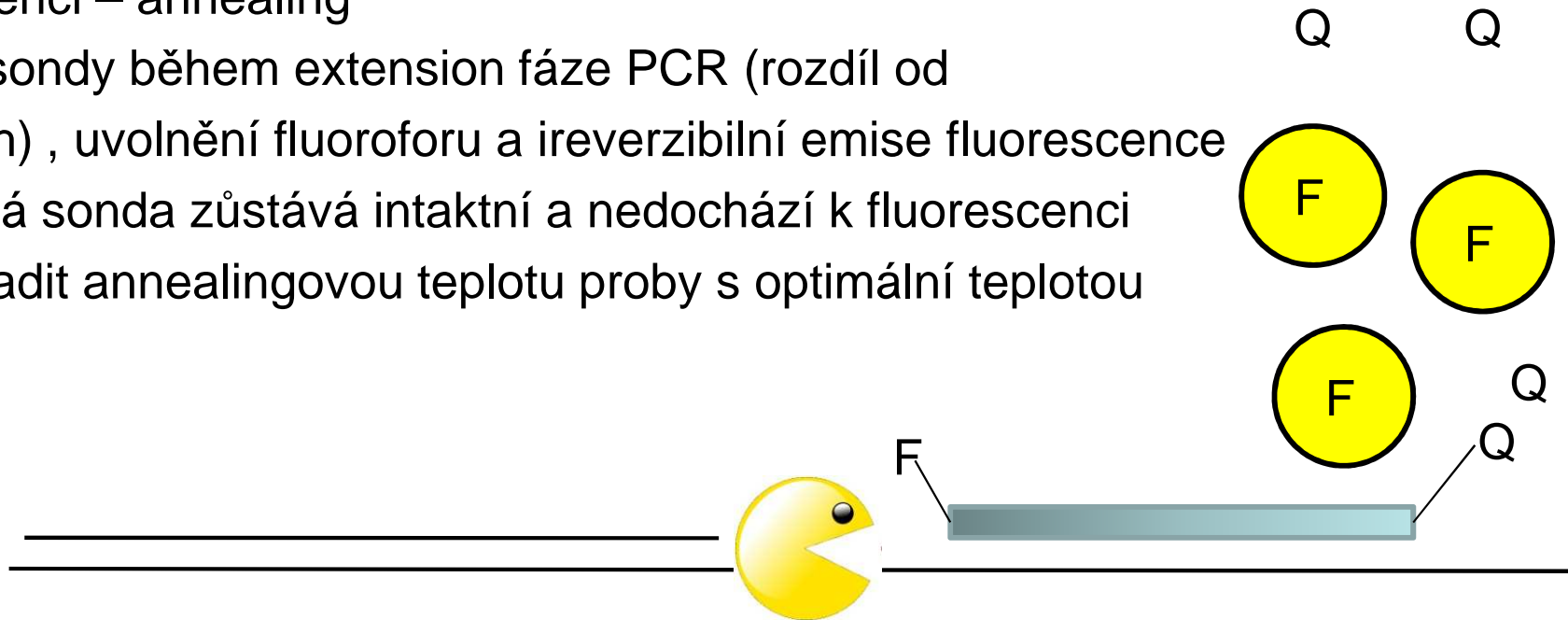
11mM LUP2

55mM TCCTTCATTCGCTTC  
LUP2 nekomplementární

55mM ATCGACGAGACAGCTGGCGA  
LUP2 komplementární

# Hydrolyzační sondy (TaqMan Probes)

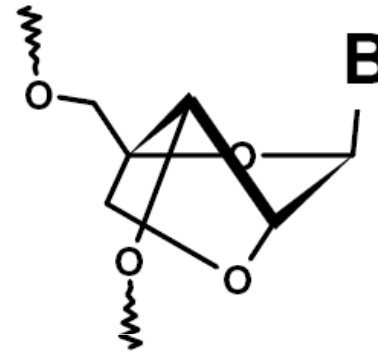
- 5' nuclease assay
- Velmi populární design a univerzální použití
- Fluorofor na 5', zhášec na 3' konci (snadná syntéza)
- 5'-3' ds exonukleázová aktivita DNA polymerázy
- F-Q – FRET (TAMRA) nebo emise tepla (BHQ)
- Pokud je přítomen templát, sonda se komplementárně váže na cílovou sekvenci – annealing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

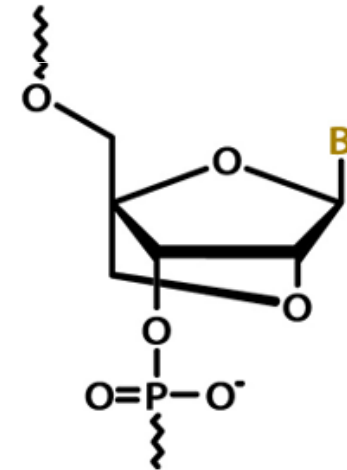
# UPL sondy

- 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

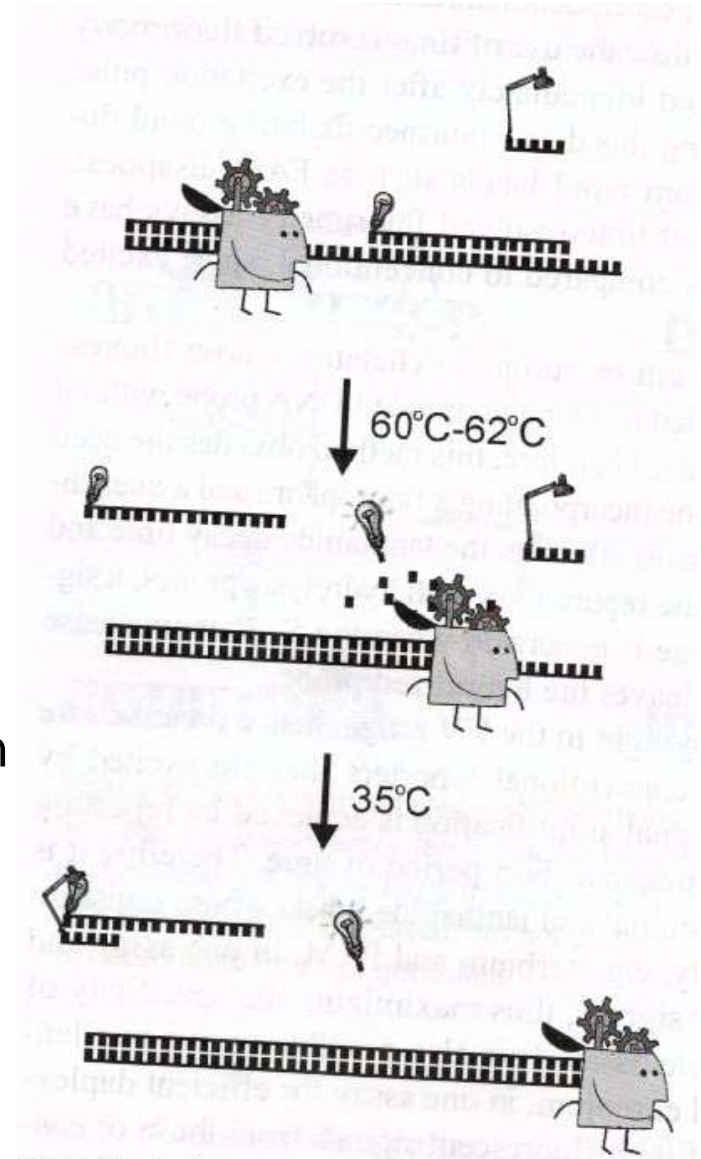
$\beta$ -D configuration



	Perfect Match	Single Mismatch	$\Delta T_m$
 LNA 8-mer 5'-TGC <b>I</b> GGTG-3'	3'-ACG <b>A</b> CCAC-5' 71°C	3'-ACG <b>G</b> CCAC-5' 45°C	26°C
 DNA 8-mer 5'-TGC <b>I</b> GGTG-3'	35°C	25°C	10°C

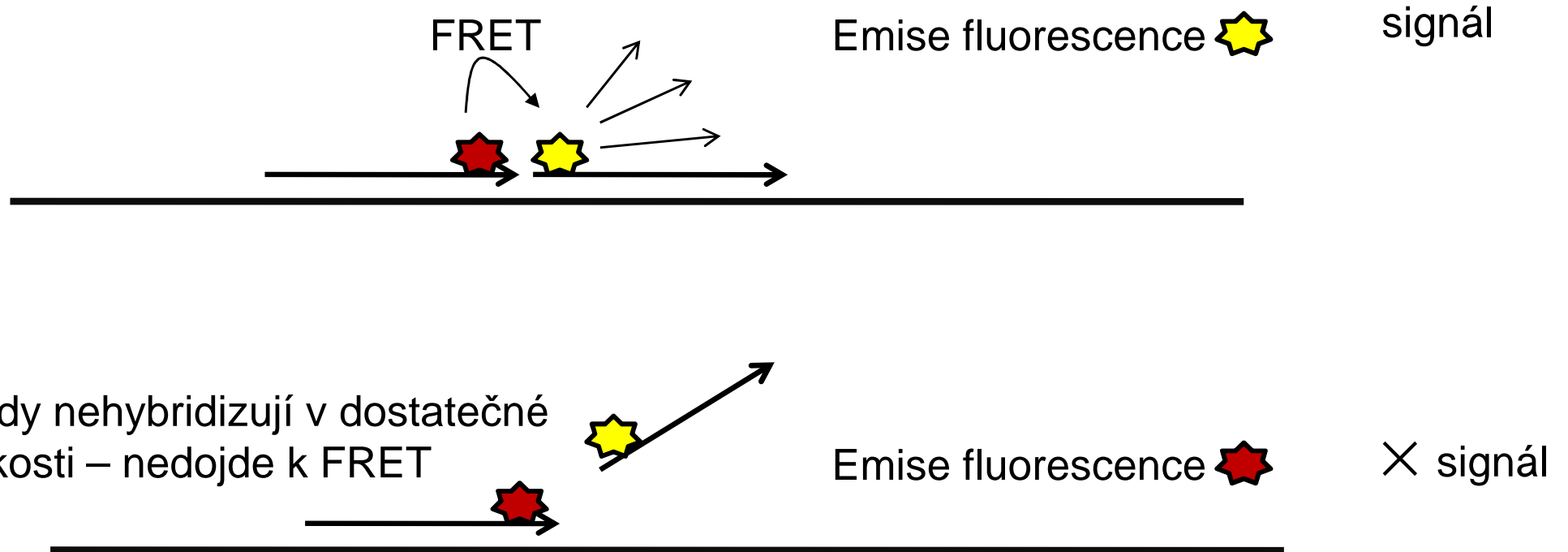
# Lanthanidové sondy

- varianta hydrolyzačních sond (TaqMan)
- fluorescenční zančka – 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 zhášečem – do cyklu je zařazen krok 35°C kdy se váže sonda se zhášečem na nenavázanou reportérovou sondu
- kombinace s klasickými fluorofory



# Lightcycler - Hybridizační sondy

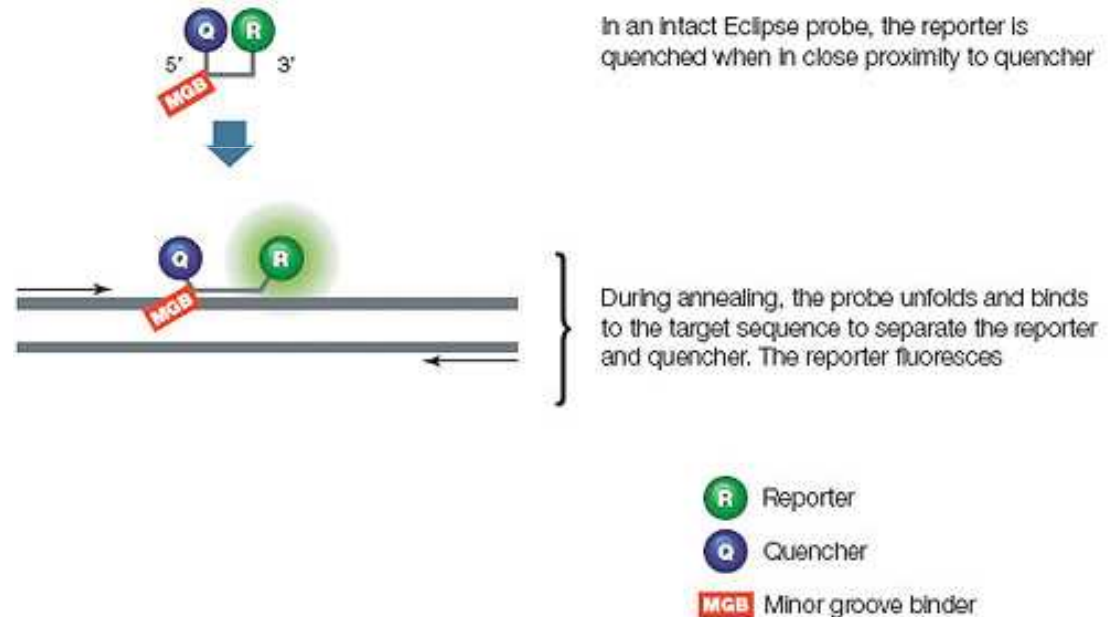
- dva oligonukleotidy, navržené tak, aby hybridizovaly na templátu vedle sebe
- fluorofory tvořící FRET pár
- pouze po úspěšné hybridizaci dojde k emisi fluorescence



- kvantifikace, genová exprese, SNP

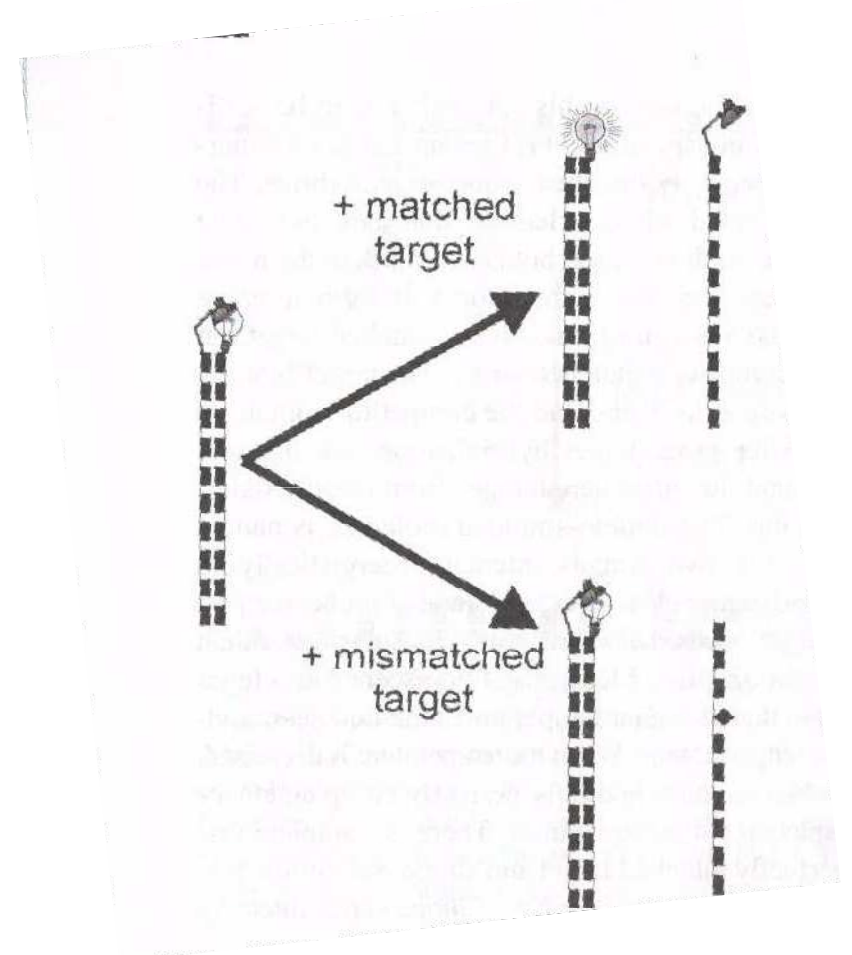
# Eclipse

- 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  $T_m$



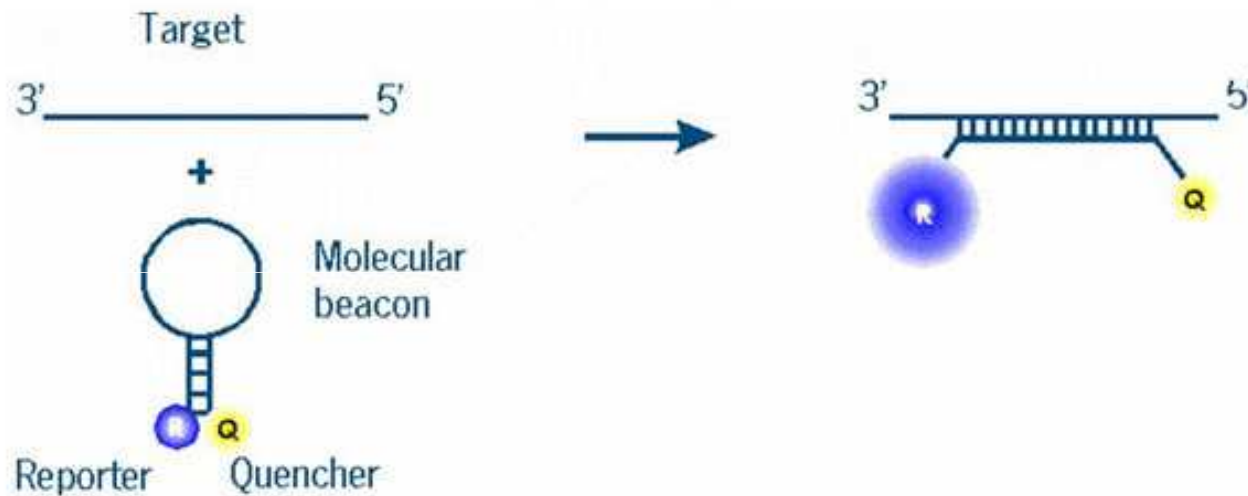
# Displacement Hybridization/Complex Probes

- 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 rozdílu i v jediné bázi
- fluorescence se měří v annealingové fázi





# Molekulární majáky/ Molecular beacons

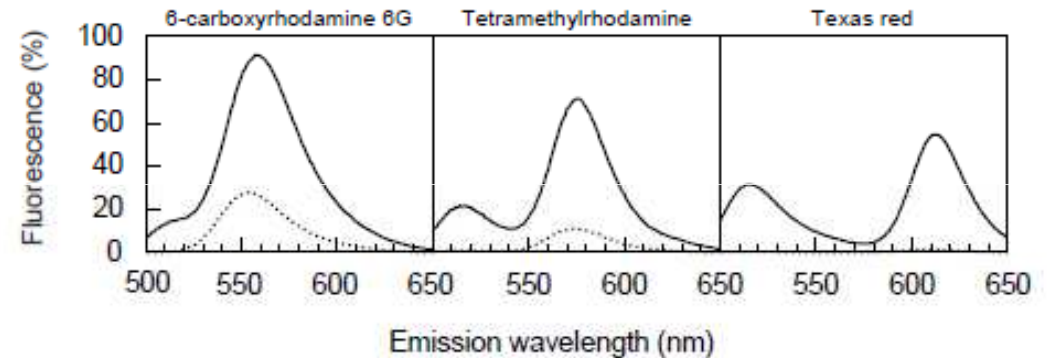


- vlásenková struktura, konce jsou vzájemně komplementární; smyčka je komplementární k cílové sekvenci
- konce označeny fluoroforem a zhášedčem
- ve vlásenkové konformaci je fluorescence zhášena
- po vazbě na komplementární templát dochází k emisi fluorescence
- fluorescence je odečtena v annealingovém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

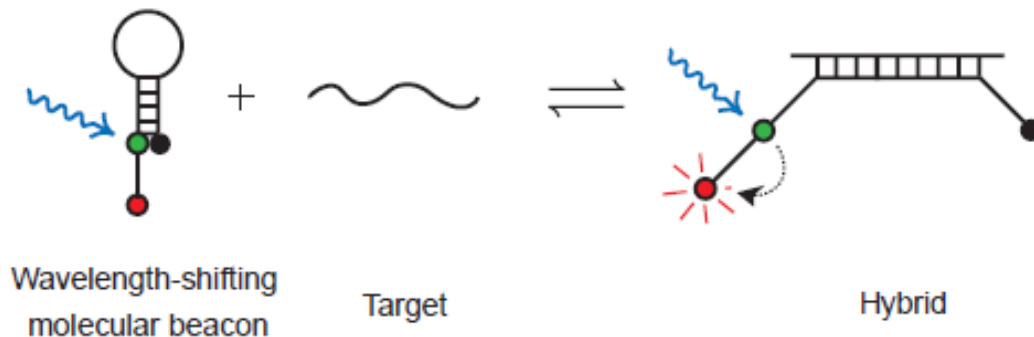
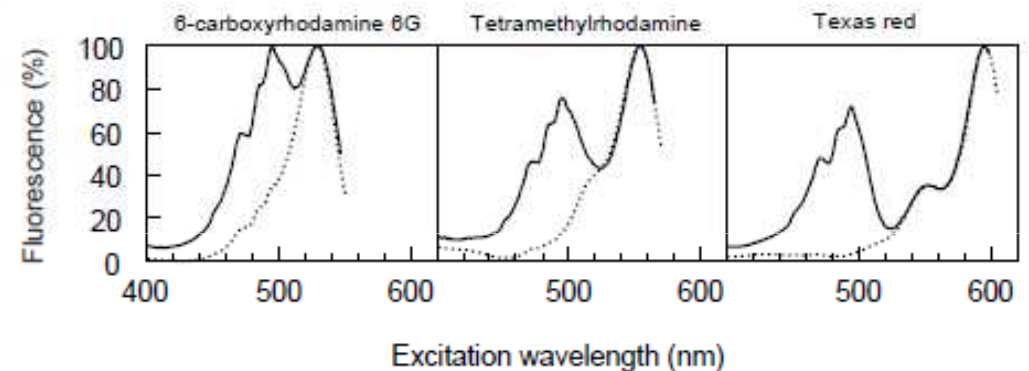
# Molekulární majáky/ Wavelength shifting beacons

- sonda má na jednom konci navázané dva fluorofory – tzv. „harvester“ a „emitter“, na druhém konci zhášec
- harvester absorbuje světlo, emitter díky FRET fluoreskuje
- výrazně jasnější výstup než klasické majáky (v případě běžných zdrojů monochromatického světla)

**A**

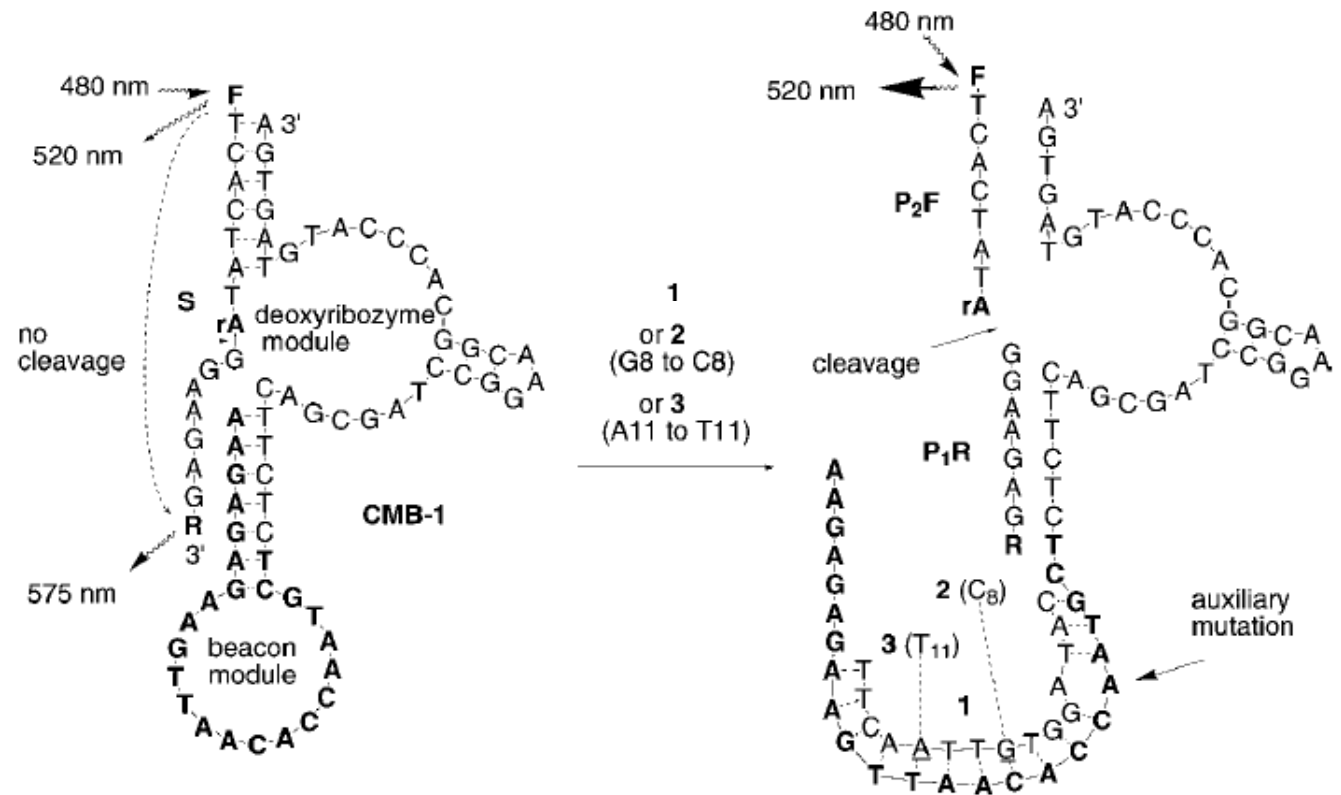


**B**

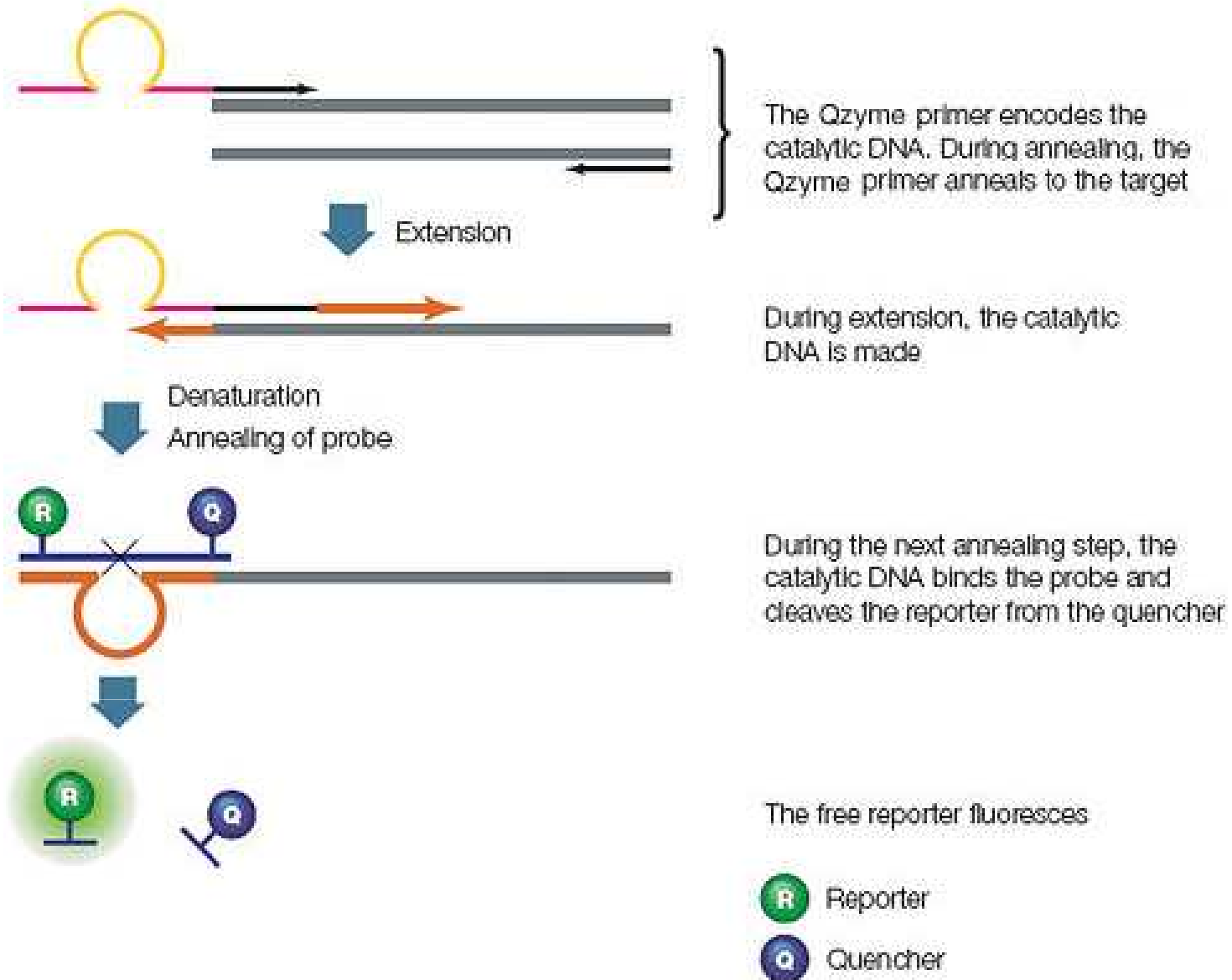


# Katalytické molekulární majáky

- Molekulární maják je kombinovaný s DNAzymem
- Lineární oligonukleotid (sonda) značený fluoroforem a zhášedčem, intramolekulárně komplementární k DNAzymu
- Absence cílové sekvence – maják intramolekulárně hybridizuje s DNAzymem a alostericky inhibuje jeho aktivitu; sonda není štěpená
- V přítomnosti cílové sekvence DNAzym štěpí sondu, odděluje zhášedč a dochází k emisi fluorescence
- Modulární design umožňuje různé assaye

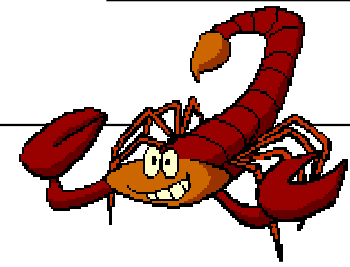


# Katalytické molekulární majáky

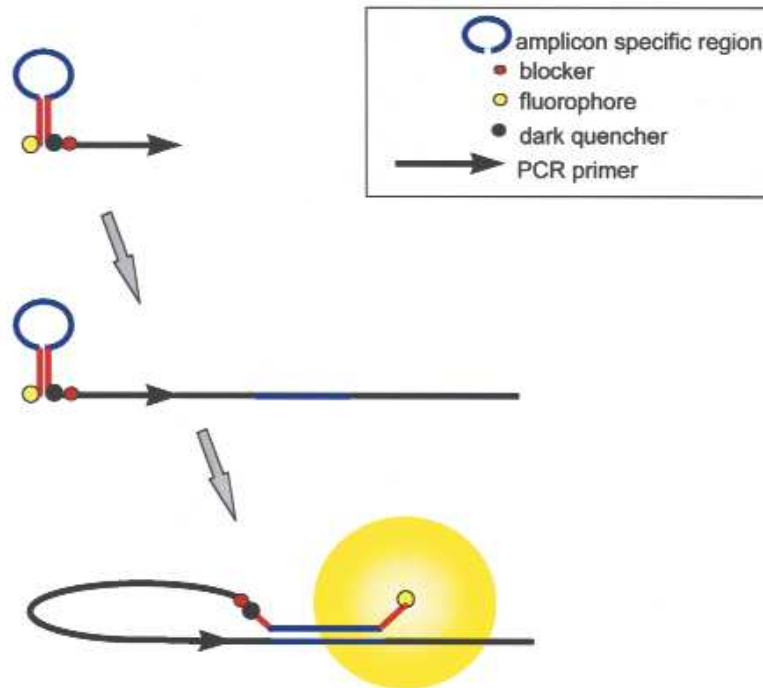
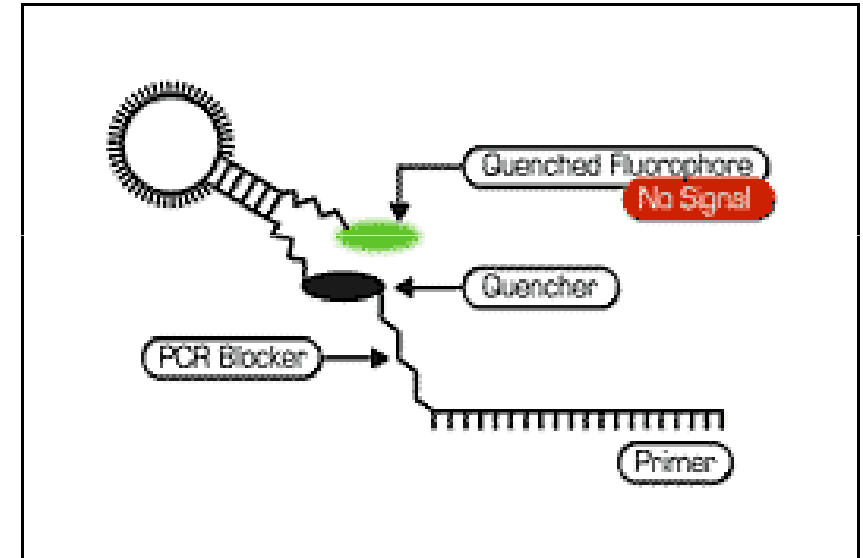




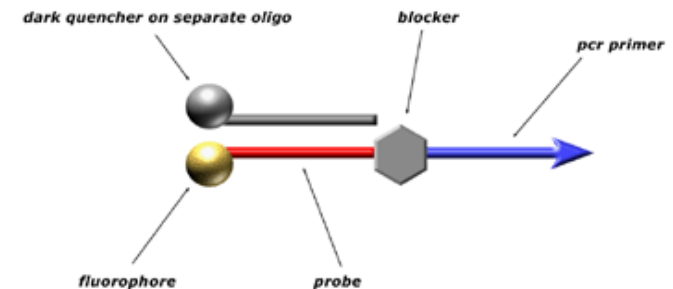
# Scorpion primers



- kombinace sondy a primeru v jediné molekule
- nedochází k enzymatickému štěpení – rychlejší proces
- poměr ampliconů a hybridizovaných sond (tedy i fluorescence) 1:1
- vlásenková 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

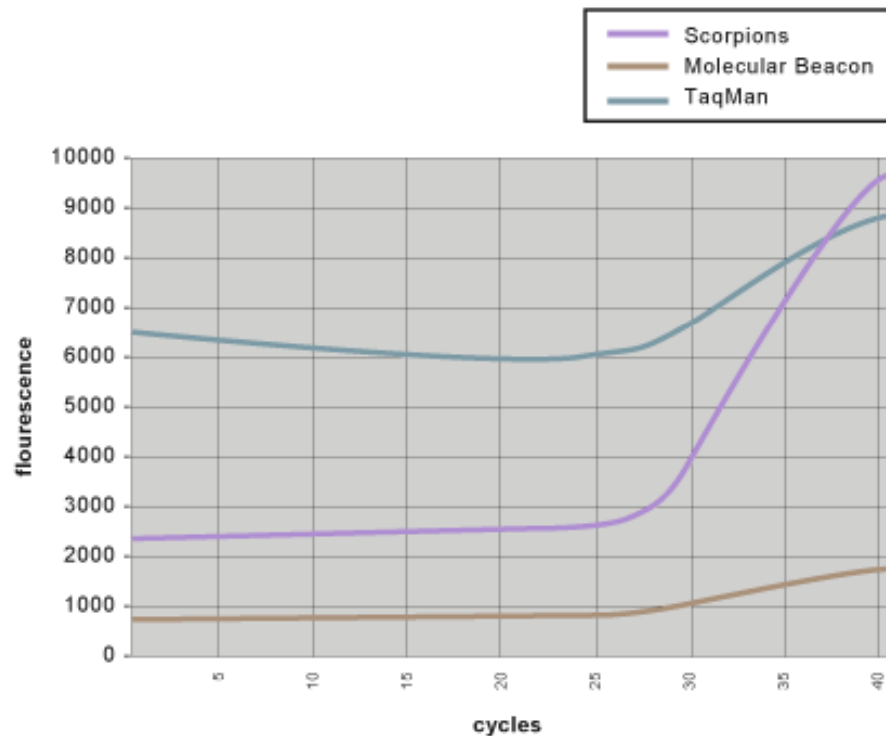


## Elements of a Scorpions primer



# 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 disassociates.

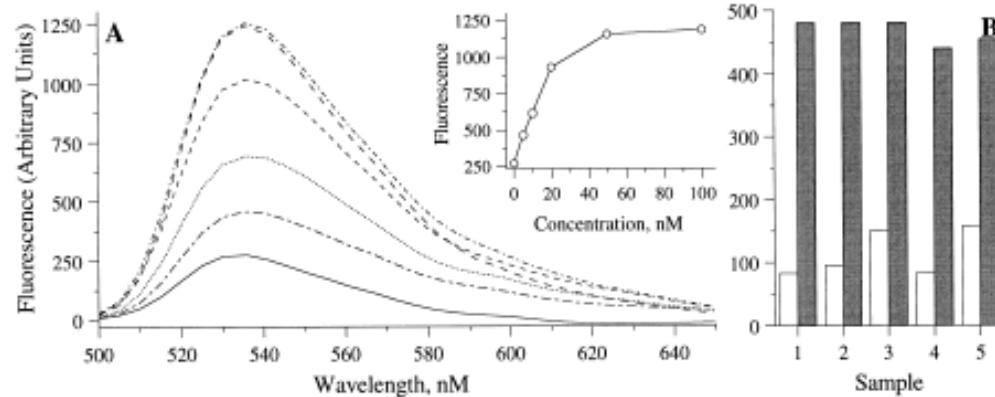
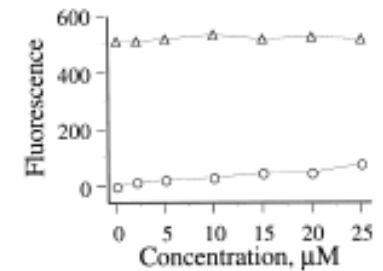
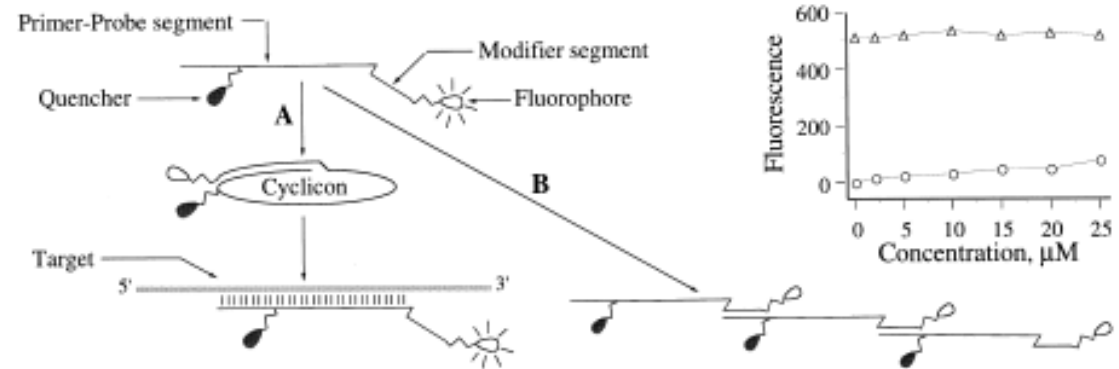


Step 3 - as it cools the extended Scorpion rearranges and begins to fluoresce in a target specific manner; unextended primer is quenched.



# Cyclicons

- Pseudocyklické oligonukleotidy (PCO) – dva oligonukleotidy spojené v oblastech 3'-3' a 5'-5'
- Jeden segment je komplementární k cílové sekvenci
- Druhý segment 5-8 nukleotidů je komplementární k 3' nebo 5' antisense oligonukleotidu
- Pokud není přítomný templát, PCO tvoří intramolekulární pseudocyklické struktury,





# Sondy založené na nanočásticích (nanoparticles probes)

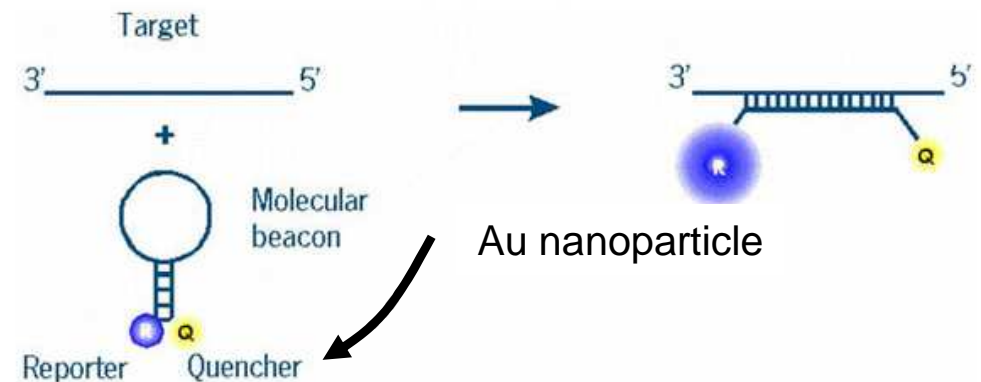
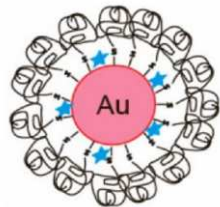
- Hybridní materiály složené z biomolekul (oligonukleotidy) a anorganických látek – např. zlaté koloidní nanočástice (polovodičový charakter)
- kovové clustery – efektivní zhášče
- hybridní konjugát – ssDNA oligonukleotid, 1,4nm zlatá nanočástice a fluorescenční barvivo
- 5' a 3' konce oligonukleotidu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

## Výhody

- Au nanočástice zhášejí fluorescenci např. 100x účinněji než DABCYL a mají téměř 100% účinnost zhášení pro fluorofory absorbující v IR části spektra (Texas Red, Cy5)
- V přítomnosti cílové sekvence se vlásenka otvírá, odděluje se F a Q a dochází k emisi fluorescence

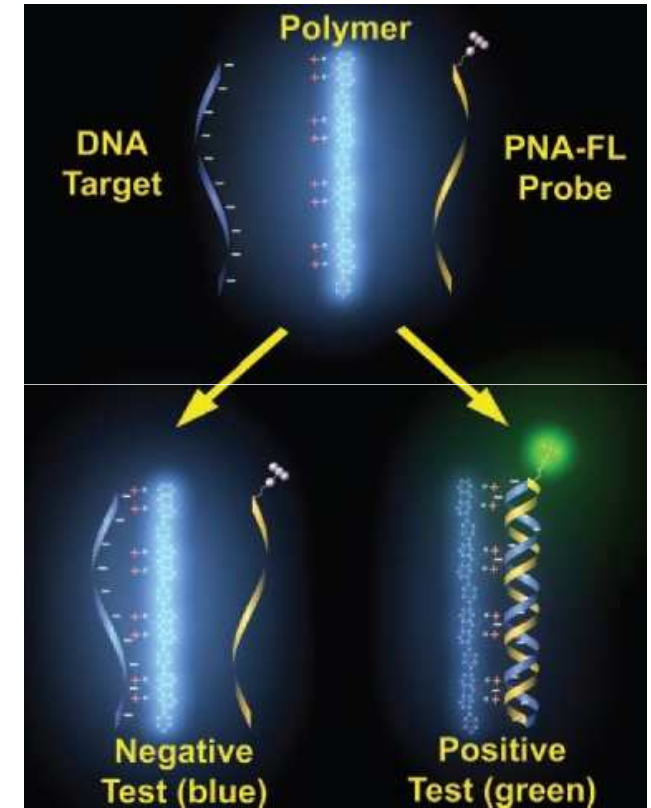
## Nevýhody

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



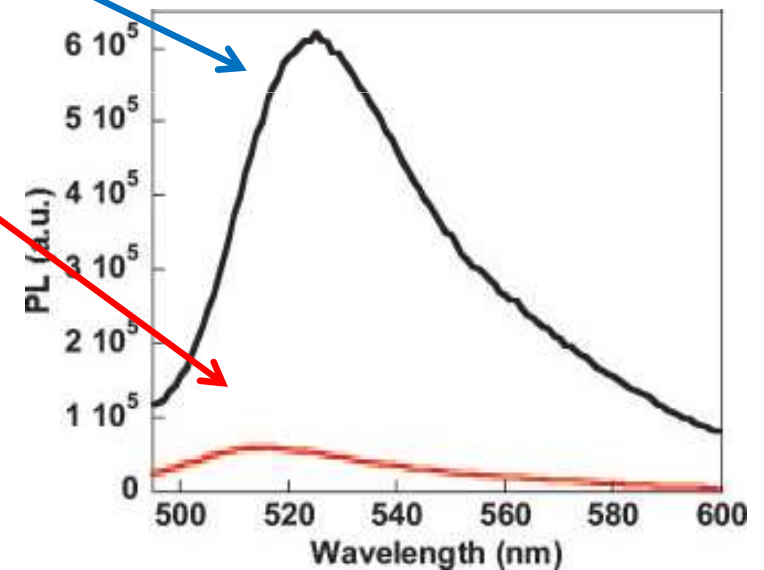
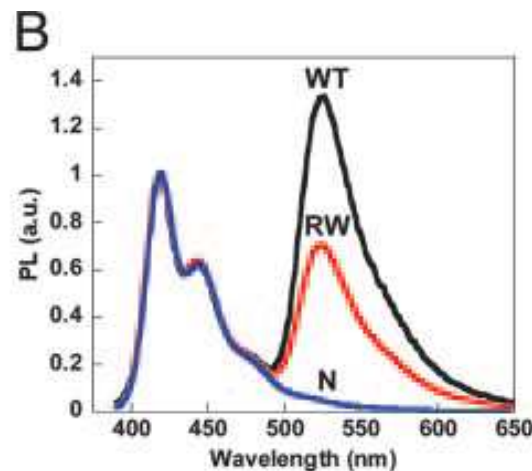
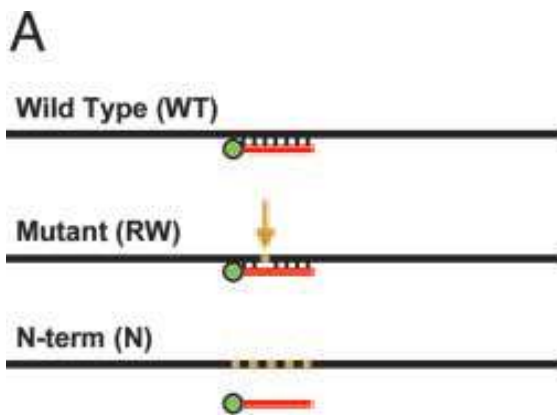
# Konjugované polymery a PNA sondy

- Cíl – zjednodušení syntézy sond, zvýšení citlivosti
- Vývoj kationtových konjugovaných polymerů CCPs
- Delokalizovaná elektronová struktura, vazba na DNA
- PNA sonda s navázaným fluoroforem
- V případě tvorby ideálního duplexu DNA/PNA, se CCP dostává do blízkosti fluoroforu a dochází k FRET
- Pokud není cíl přítomný, CCP se váže pouze na DNA a dochází pouze k fluorescenci CCP, ne FRET
- Efektivní detekce SNP



Fluorescence po excitaci CCP komplexu

Fluorescence po přímé excitaci fluoresceinu



# Shrnutí

- Princip fungování real-time termocykleru
- Základní principy excitace a emise fluorescence, FRET, zhášení
- Interkalační barviva
- Lineární a strukturní sondy
- Hydrolyzační sondy (Taq-Man)

