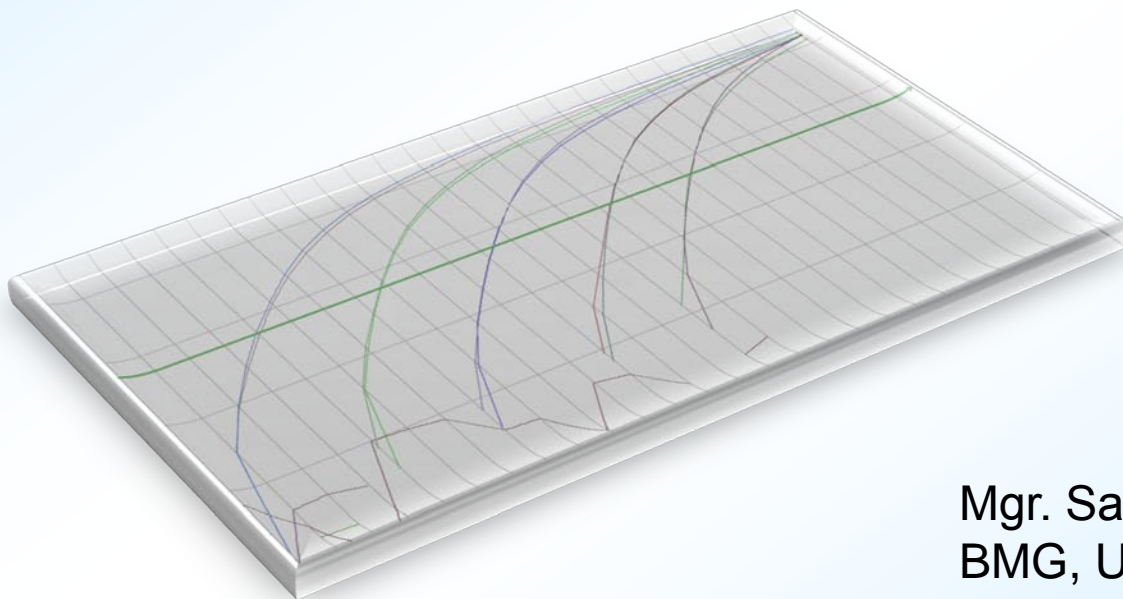


ÚVOD DO KVANTITATIVNÍ REAL-TIME PCR

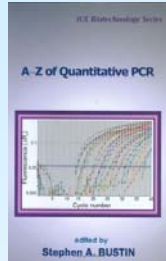


Mgr. Sabina Ševčíková, PhD
BMG, UPF LF MU

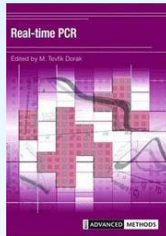
- I. Teorie PCR, kvantifikační strategie, instrumentace
- II. Interkalační barviva a sondy, design primerů, sond
- III. Aplikace, troubleshooting, design experimentů, MIQE



<http://www.gene-quantification.info/>



- Bustin SA: A-Z of quantitative PCR. IUL Biotechnology Series, Vol. 5, La Jolla, California, 2004-2006




- Dorak T: Real Time PCR. BIOS Advanced Methods, Taylor & Francis Group, NY, 2007



- Pfaffl MW. Methods (in Enzymology), The ongoing Evolution of qPCR. 50(4), 2010

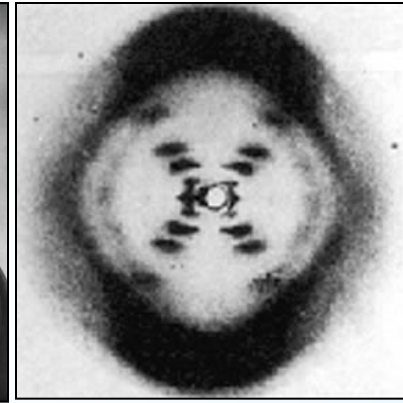
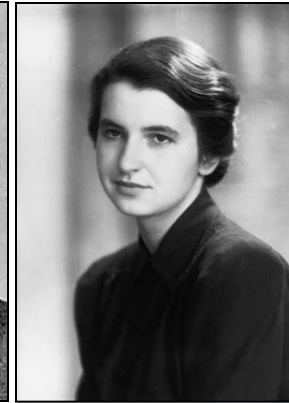
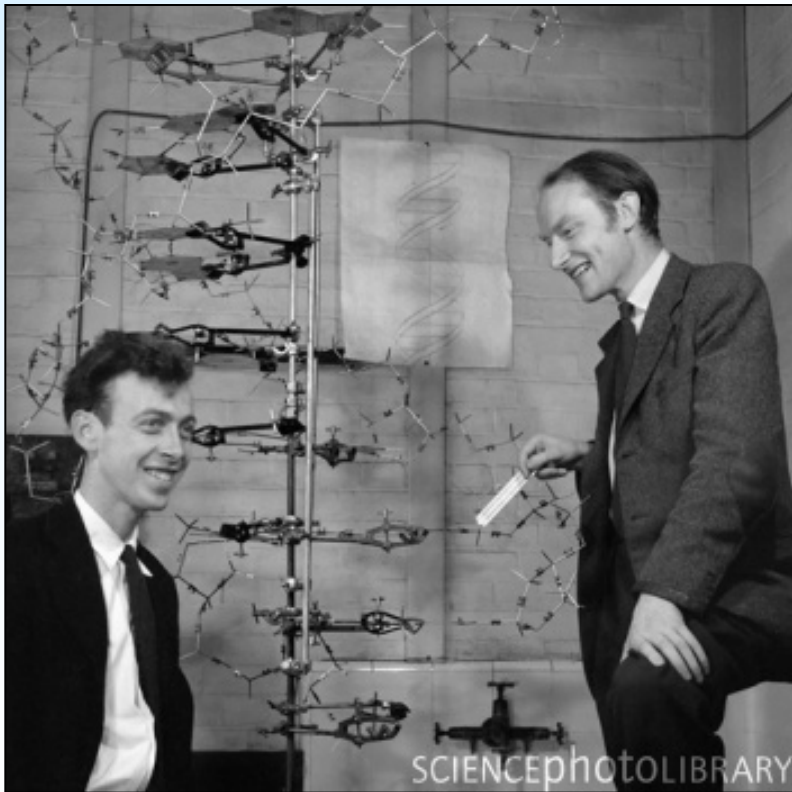
Molekulární technologie

1952	Elektroforéza
1967	<ul style="list-style-type: none"> • Rekombinantní DNA • Objev DNA ligázy
1969	FISH
1970	<ul style="list-style-type: none"> • Restrikční endonukleázy • Reverzní transkriptáza
1972	Klonování
1973	In vitro konstrukce bakteriálního plazmidu
1975	Southern blot
1977	Sekvenování DNA
1980	Koncept RFLP
1981	Western blotting
1982	<ul style="list-style-type: none"> • Manipulace s genomem Drosophily – P elementy • Whole genome shotgun

1984	Pulzní gelová elektroforéza
1985	 <ul style="list-style-type: none"> • PCR • DNA fingertying
1987	<ul style="list-style-type: none"> • YACs • Místně cílená mutagenese
1988	Taq Polymeráza ChIP
1990	BLAST
1992	BACs
1995	Microarrays
1998	RNAi
2002	UCSC Genome Browser
2003	DNA assembly programs
2004	Anotace genů – ENSEMBL
2005	<ul style="list-style-type: none"> • Projekt HapMap • Ligační sekvenování
2006	Celogenomové metylační mapy
2007	miRNA
2009	Next Generation Sequencing

What about DNA?

- Maurice Wilkins-James Watson-Francis Crick- **Rosalind Franklin**, 1953
- Dr. Franklin died in 1958
- Nobelova cena Wilkins-Watson-Crick, 1962
- model dsDNA



King's College London



Jakým způsobem zjistíte:

1. zda pacient nese nějakou klinicky významnou bodovou mutaci, která určuje jeho další léčbu?
2. který ze dvou genů je v nějaké tkáni exprimován více než druhý ?
3. druh patogenní bakterie u nemocného?
4. zastoupení leukemických buněk v krvi pacienta před a po léčbě?

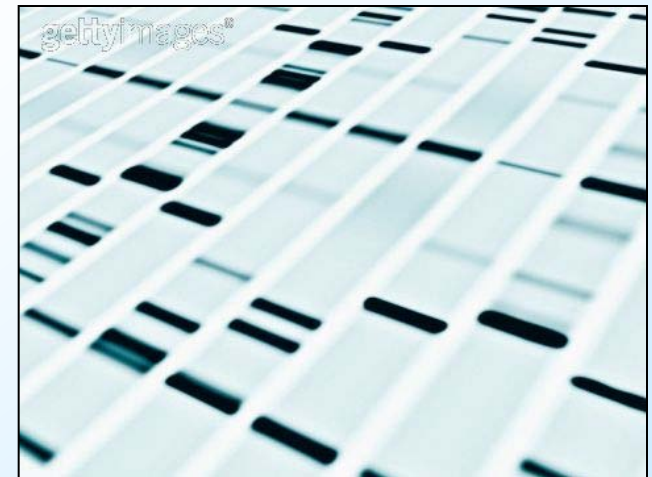


Southern

**Northern
Flowcyt**

**Kultivace, biochemické analýzy
PCR**

Cytogenetické vyšetření

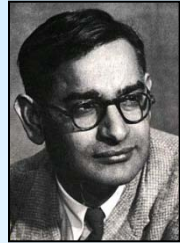


Studies on polynucleotides XCVL. Repair Replication of Short Synthetic DNA's as catalysed by DNA polymerases.

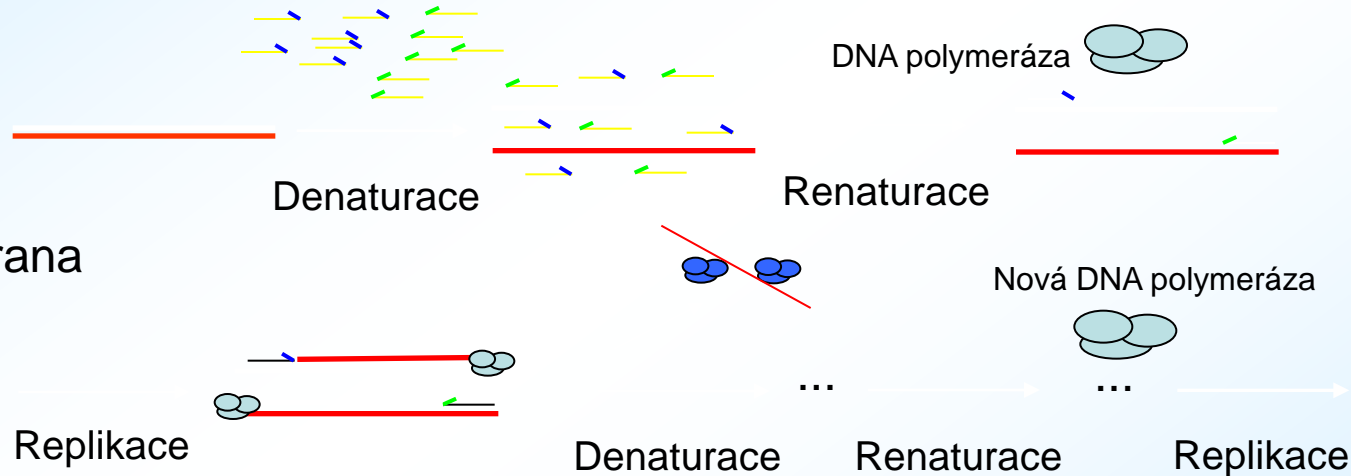


Kjell Kleppe

Kleppe K., Ohtsuka E., Kleppe R., Molineux I., Khorana H. G. (1971): J.Mol.Biol.56,341-361.



Har Gobind Khorana



Práce popsala některé parametry reparativní replikace – účinnost replikace, minimální délky prumerů a templátu, sekundární struktury atd.

Proč se nerozšířila tato metoda už v 70.letech?

Extrémně nákladná syntéza oligonukleotidů, nedokonalé sekvenování, termolabilita a nákladná purifikace DNA polymeráz, nedostupná instrumentace...

Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia.

The logo for the journal Science, featuring the word "Science" in red and "AAAS" in blue.

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. *Science*. 1985 Dec 20;230(4732):1350-4.

Two new methods were used to establish a rapid and highly sensitive prenatal diagnostic test for sickle cell anemia. The first involves the primer-mediated enzymatic amplification of specific beta-globin target sequences in genomic DNA, resulting in the exponential increase (220,000 times) of target DNA copies. In the second technique, the presence of the beta A and beta S alleles is determined by restriction endonuclease digestion of an end-labeled oligonucleotide probe hybridized in solution to the amplified beta-globin sequences. The beta-globin genotype can be determined in less than 1 day on samples containing significantly less than 1 microgram of genomic DNA.

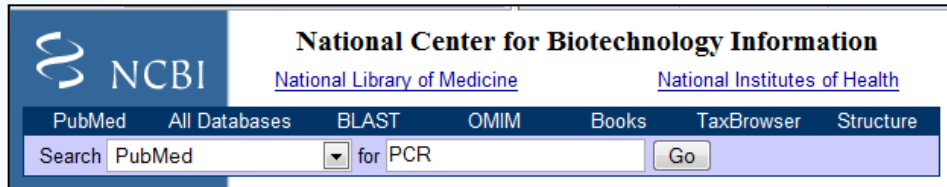
Kary B. Mullis



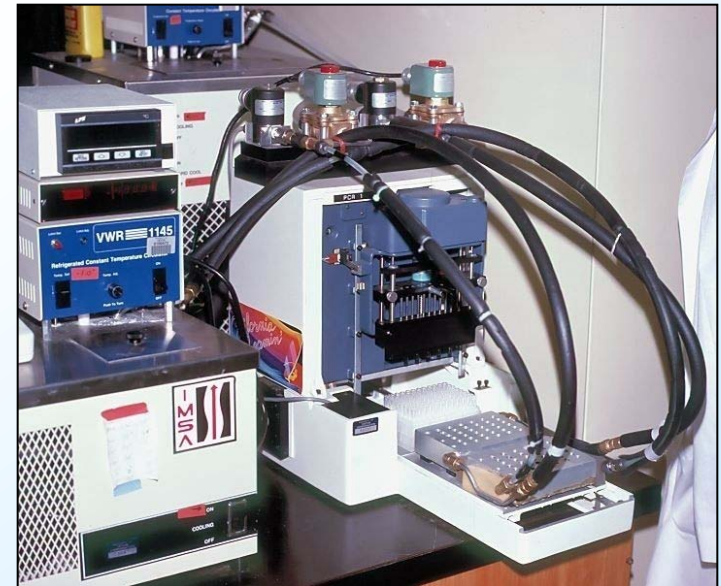
Nobelova cena za chemii
1993



- Použití termostabilní DNA polymerázy
- Rozvedení konceptu navrženého K. Kleppem
- Obrovský boom PCR díky technologickému pokroku



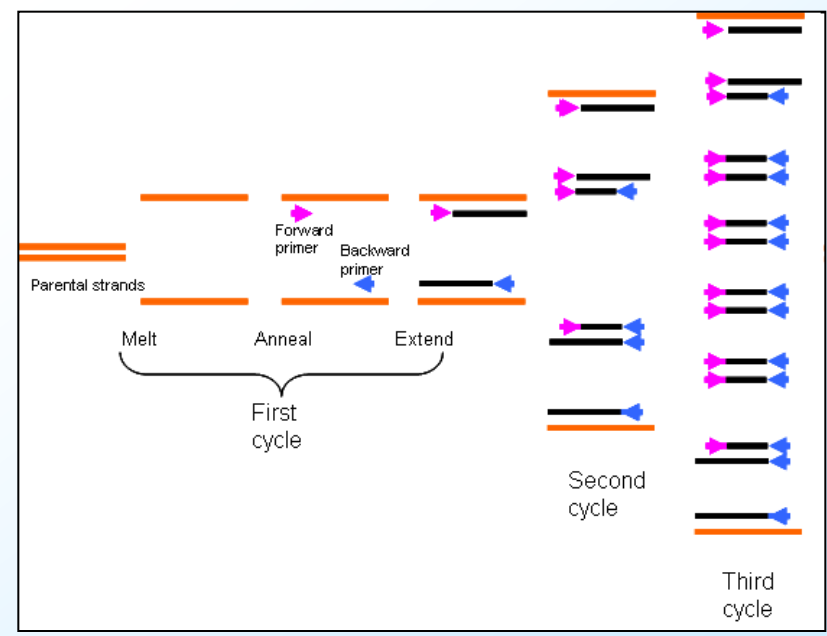
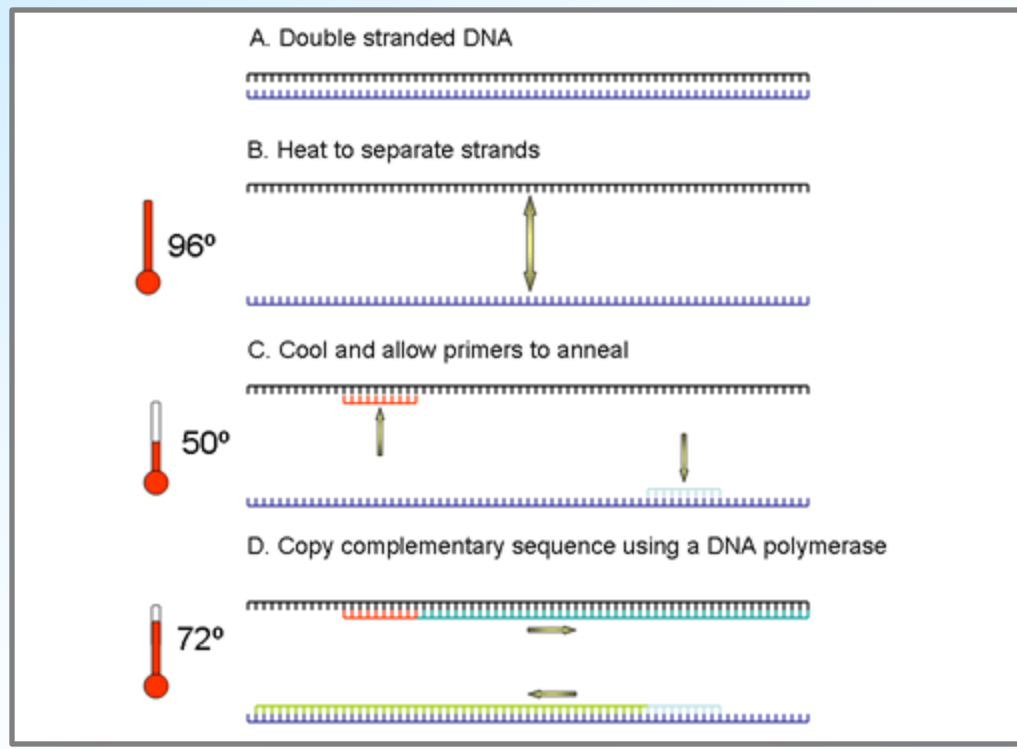
- 363 629 článků (27.11.2008)
- 399 022 (1.12.2009)
- 428 622 (15.12.2011)



PCR

Cyklické střídání fází denaturace, annealingu a extenze jednoduchou změnou teploty reakční směsi

Polymeráza využívá syntetické primery ohraničující amplifikovaný úsek DNA



Templát- co jde do reakce
Amplikon- co se amplifikuje

$$\text{Amplifikace (y)} = N \times 2^n$$

N= počet molekul templátu, n počet cyklů PCR

Otázka:
Jedna molekula DNA je amplifikována v **25 cyklech**. Teoreticky, kolik molekul amplikonu (y) je vytvořeno?

1. Počáteční množství molekul templátu je **N=600**. Kolik molekul amplikonu je vytvořeno?
2. Reakce je provedena v 100 μl. Kolik molekul amplikonu bude přítomno v **1 nl** (0,001 μl)?

Odpověď:

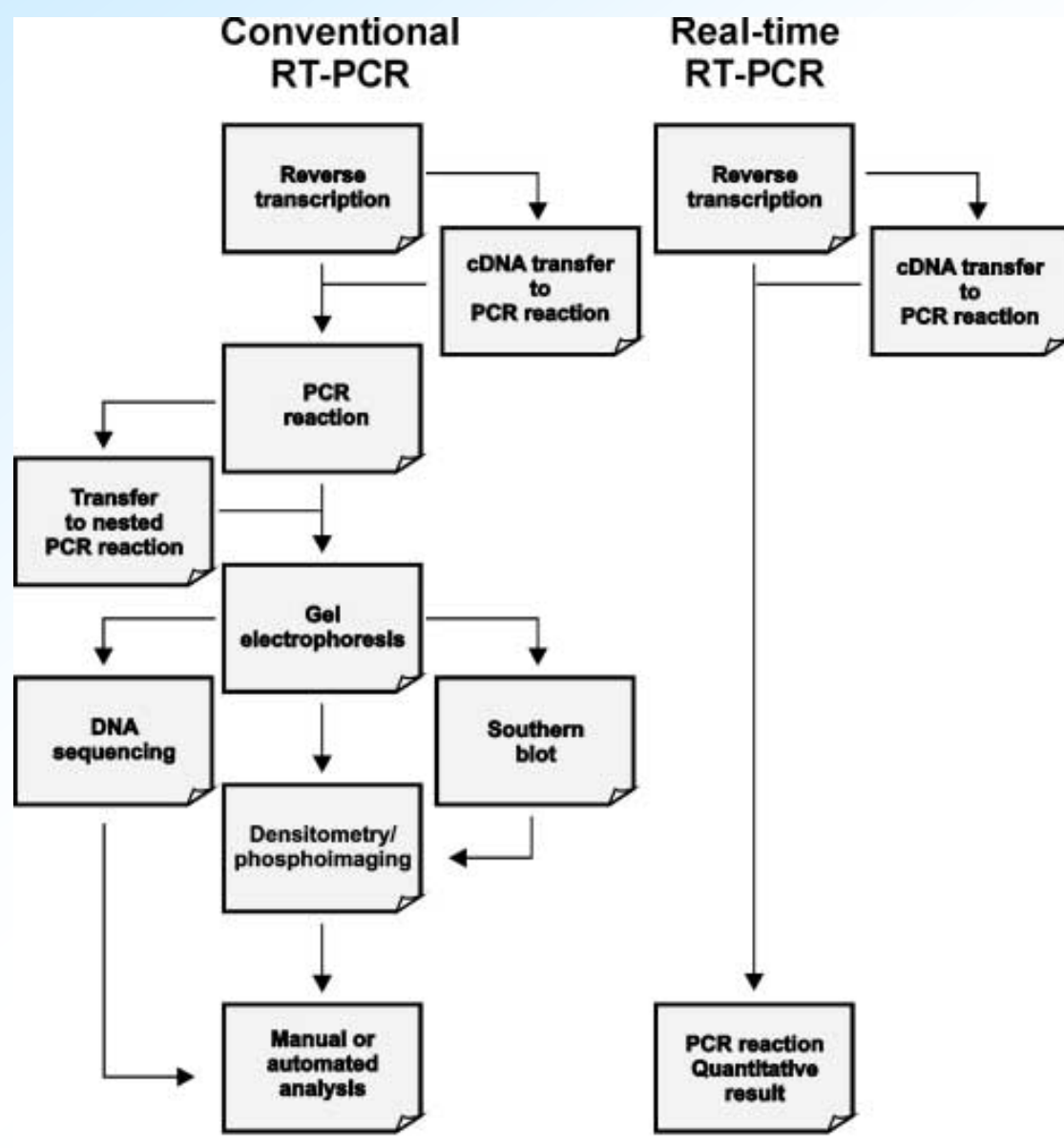
1. $2^{25} = 33\,554\,432$
 2. $600 \times 2^{25} = 2 \times 10^{10}$
 3. 2×10^{10} ve 100 μl
- **v 0,001 μl bude 2×10^5 (200 000) molekul amplikonu**

KONTAMINACE JE PROBLÉM

Jediná molekula DNA může způsobit velké problémy

(forenzní genetika, rutinní screening a diagnostika, GMO...)

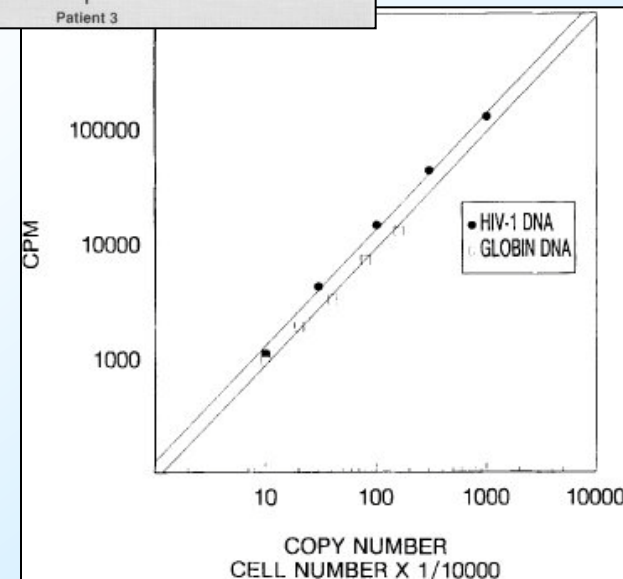
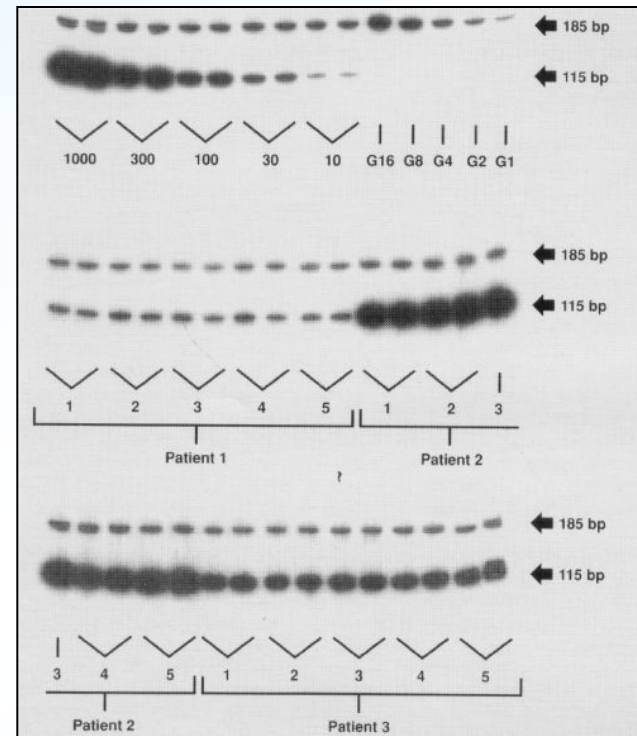
Kvantifikace pomocí PCR



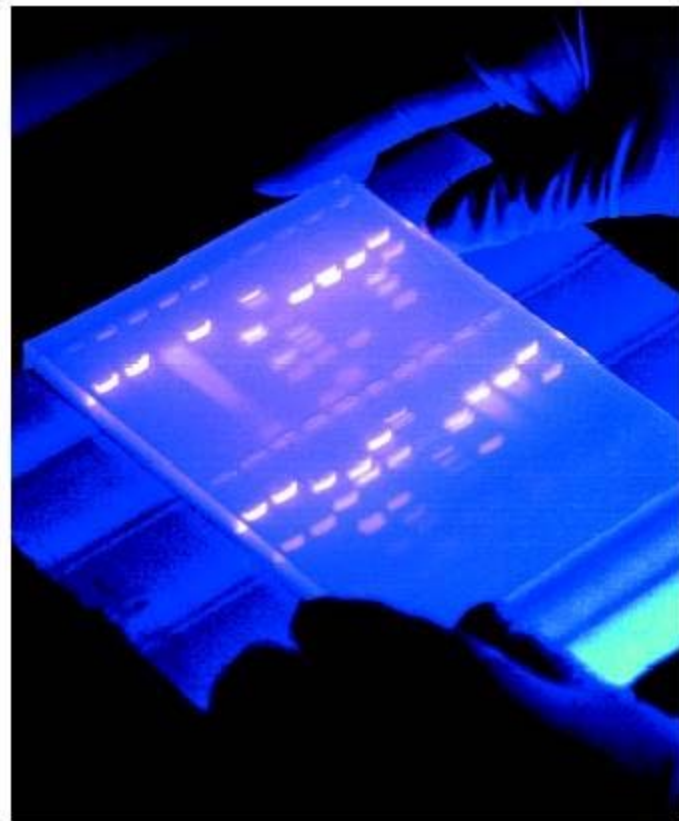
Konvenční kvantitativní PCR

- „End point“ stanovení

- Kvalitativní odpověď YES/NO
- Extenzivní validace, kontroly
- Denzitometrie
- Minimální rozptyl v parametrech reakce má obrovský vliv na množství amplikonu
- Interní heterologní kontrola (housekeeping gene)
- *Viral load* u HIV+ pacientů
- Výskyt minimální reziduální choroby u onkologických pacientů



Zásadní omezení – gelová elektroforéza



- Nízká přesnost
- Nízká citlivost
- Malý dynamický rozsah – pouze 2log.
- Nízké rozlišení, pouze na délce amplikonu
- Není automatizovaná
- Výstup není numerický – subjektivní hodnocení
- EtBr – neváže se na DNA pravidelně
- Post PCR zpracování - kontaminace

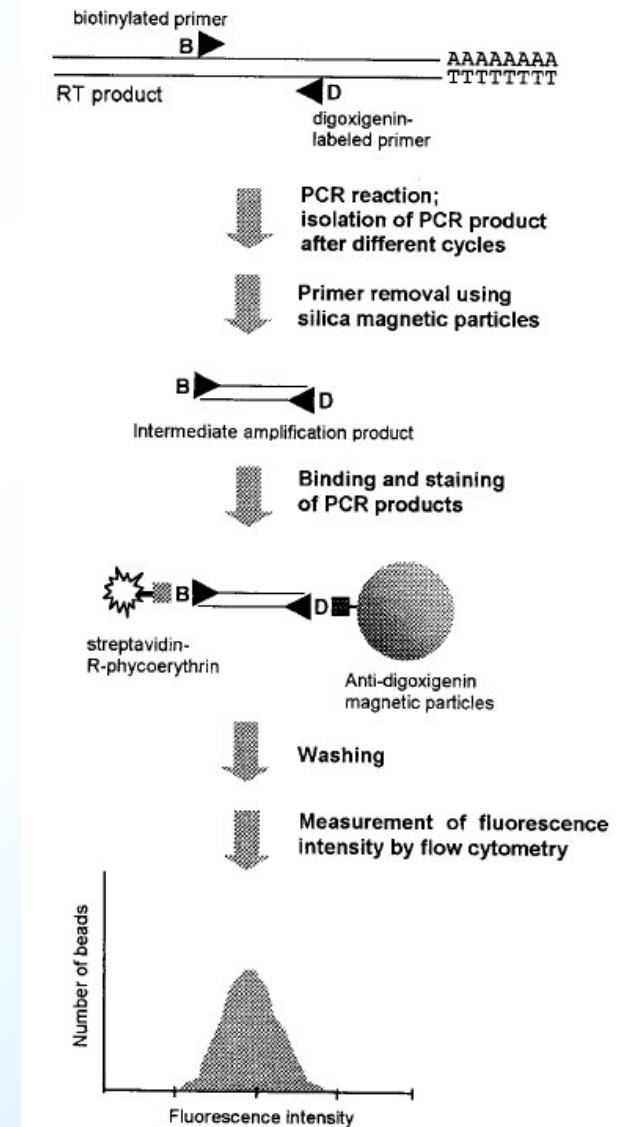
Průtoková cytometrie

Clinical Chemistry 46:8
1057–1064 (2000)

Molecular Diagnostics
and Genetics

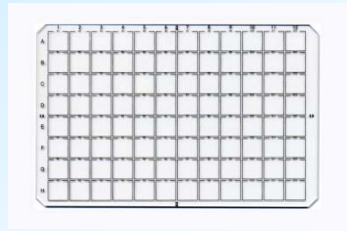
Flow Cytometric Analysis of Reverse Transcription-PCR Products: Quantification of p21^{WAF1/CIP1} and Proliferating Cell Nuclear Antigen mRNA

NIELS WEDEMEYER,* WOLFGANG GÖHDE, and THOMAS PÖTTER

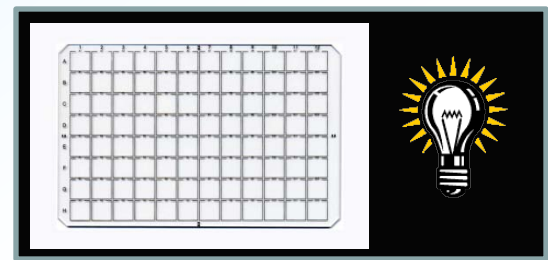


Chemiluminiscence

PCR → DNA



Denaturace a hybridizace se specifickou sondou



Intenzita chemiluminiscenčního signálu v závislosti na množství amplifikované DNA

- Chemiluminiscence

PCR → Biotinylované primery

Biotinylovaný amplikon

Streptavidin + magnetické částice

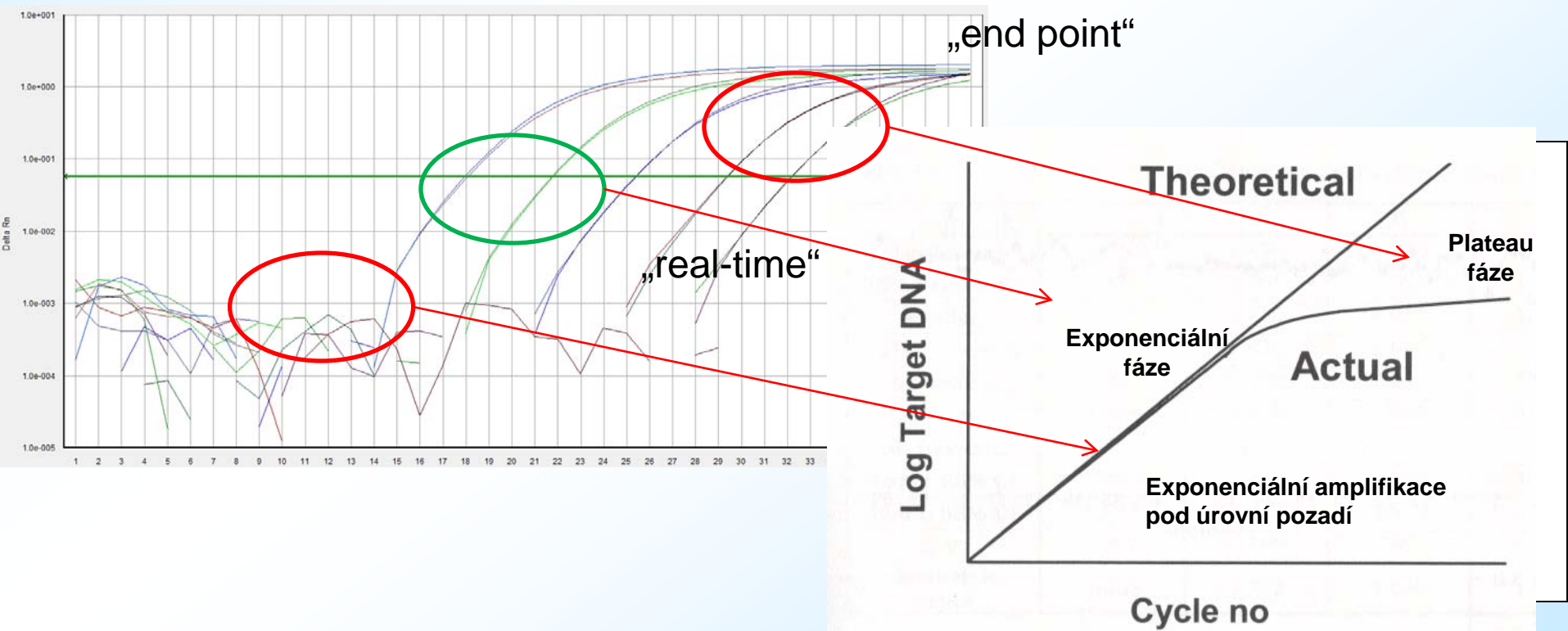
Separace chemiluminiscence



Kvantitativní vztah mezi

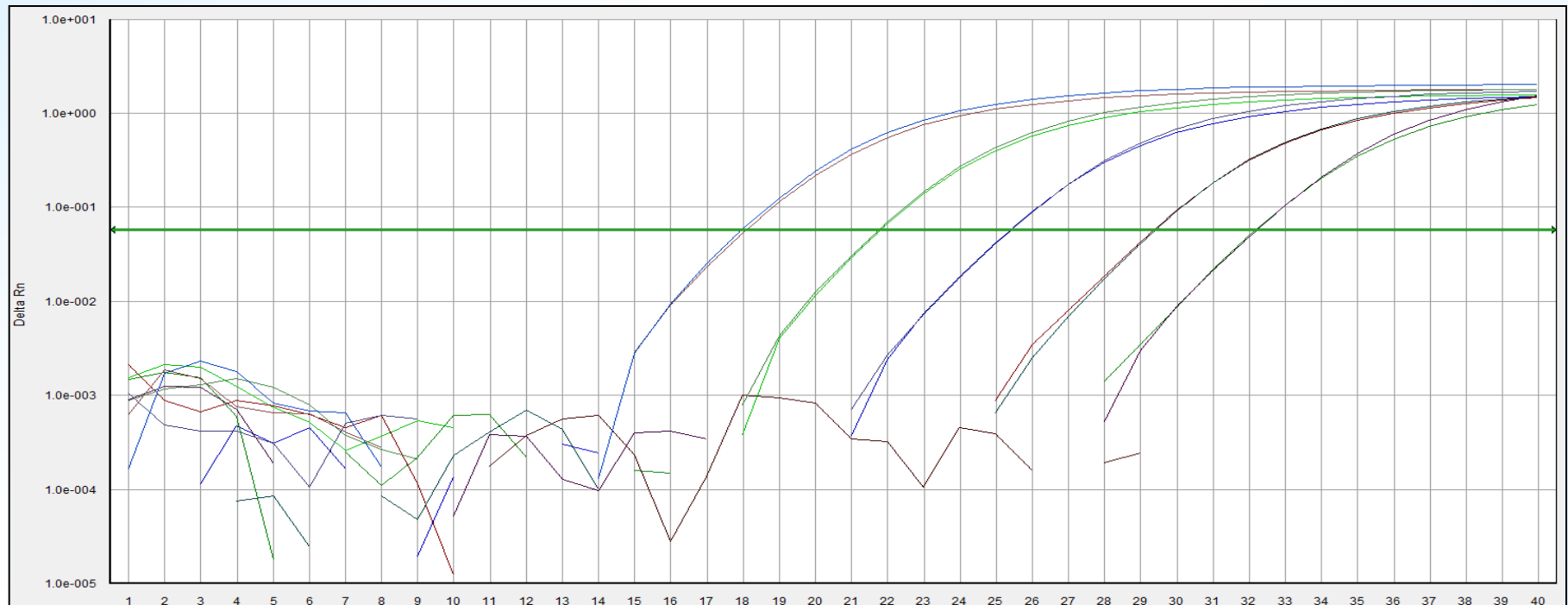
množstvím PCR produktu (amplikonu) a intenzitou fluorescence

- Amplifikační práh detekce (Ct)



Real-time Fluorescence Based PCR

Fluorescence R je zajištěna např. vazbou fluorescenčního interkalačního barviva na DNA, použitím hydrolyzační sondy atd. Fluorescence reportérového fluoroforu je normalizována vůči pasivnímu fluoroforu (Rox) - R_n . Změnu fluorescence v čase vůči pozadí udává ΔR_n . ($\Delta R_n = R_n^+ - R_n^-$).



Reportérový fluorofor

Intenzita fluorescence závisí na amplifikaci templátu během PCR

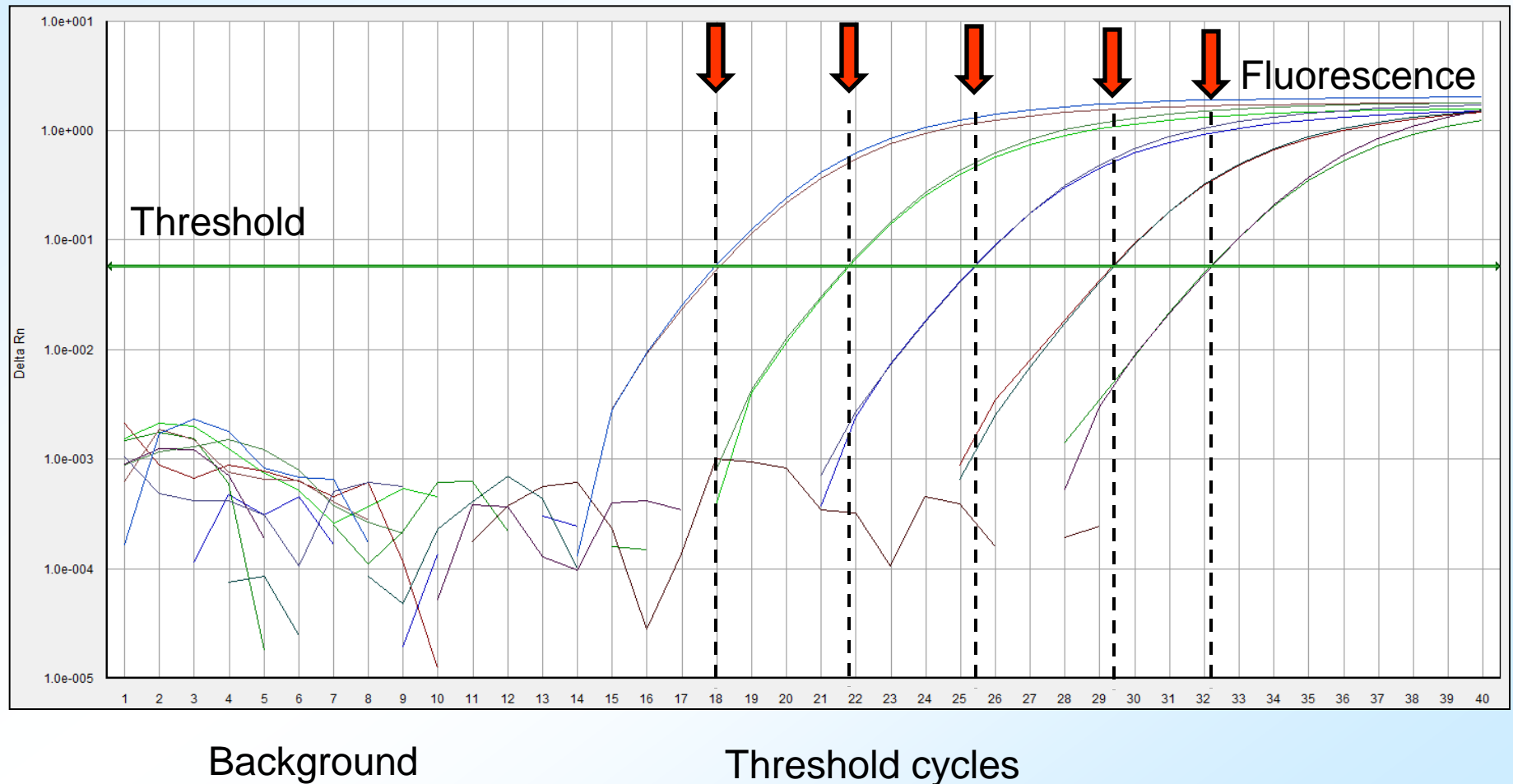
Pasivní fluorofor

Intenzita fluorescence je během PCR konstantní.

Zahrnutí fluorescence pasivního fluoroforu do výpočtu technicky zpřesňuje analýzu

Threshold cycle „Ct“

- určený na základě hodnoty fluorescence pozadí (background) a aktuální fluorescence vzorku
- kvantitativní výstup pro každý vzorek



Threshold cycle „Ct“

- počáteční množství kopií templátu
- definovaný v exponenciální fázi PCR
- stejná účinnost PCR ve všech reakcích
- účinnost štěpení fluorogenní sondy nebo vazby fluoroforu na DNA
- citlivost detekce
- čím menší Ct - tím větší počet kopií templátu na začátku reakce



$A > B > C$

Threshold cycle „Ct“

- rozdíl 1 Ct – dvojnásobné množství templátu

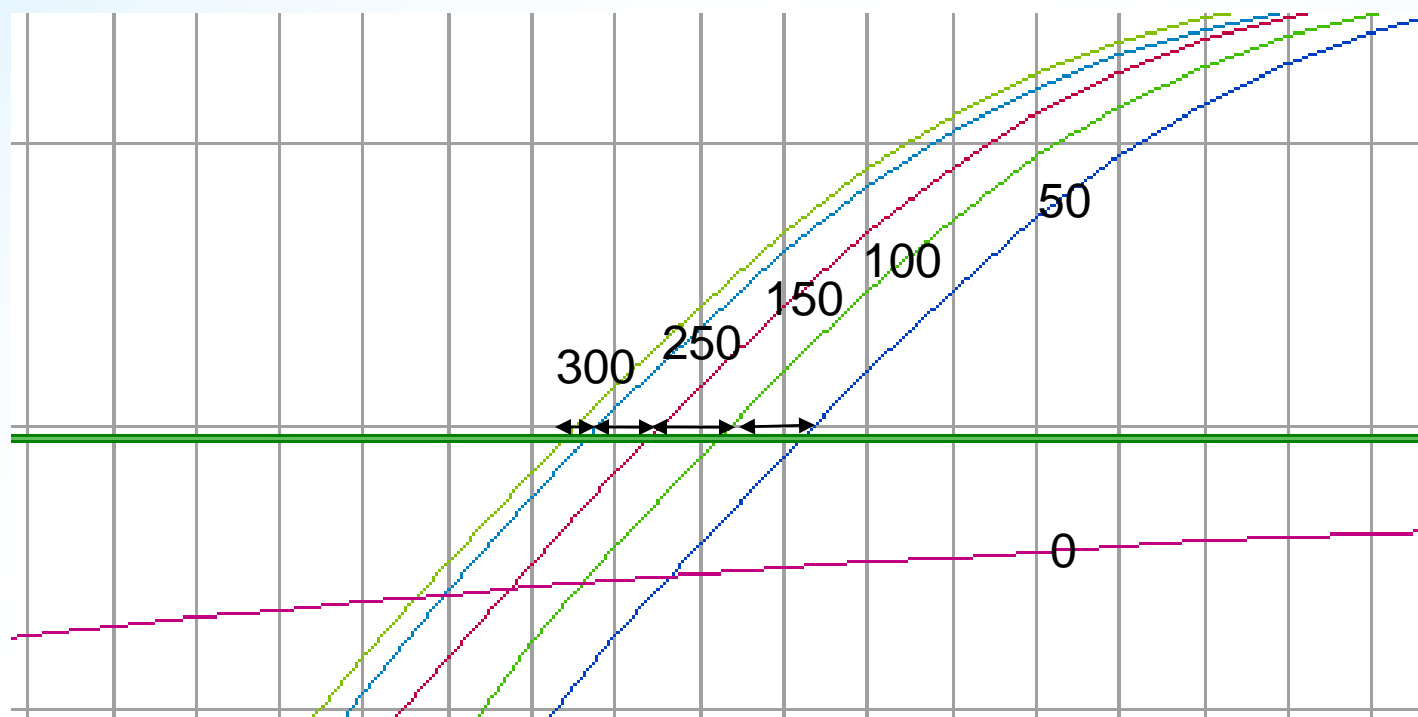
$$2^1 = 2$$

- kolika cyklům odpovídá odpovídá 10ti násobný rozdíl v množství templátu?

(předpokládáme 100% účinnost PCR)

$$2^n = 10$$

$$n=3,32$$



c [ng/μl]	Ct
50	28,16
100	27,16
150	26,66
250	26,06
300	25,66

Faktory ovlivňující qPCR

Koncentrace Mg^{II+} (Mn^{II+})

- Kritický faktor pro DNA polymerázy

- Např. Tth (*Thermus thermophilus* HB-8)

Mn^{II+}

(3-6mM)

Taq (*Thermus aquaticus*)

Mg^{II+}

(3-4mM)

- Některé polymerázy preferují určitou formu Mg^{II+} , $MgCl_2$, $MgSO_4$

Koncentrace primerů

-obvykle 100-900nM

- ne vždy poskytuje ekvimolární koncentrace nejlepší výsledek

Koncentrace sondy

- obvykle 100-400nM

- volba sondy podle typu analýzy a žádaného výstupu (genová exprese, SNP,

absolutní kvantifikace...)

DNA polymerázy

- Vyžadují 3'OH primer
- Teplotní stabilita - nejvyšší katalytická účinnost mezi 70-80 C
- Výrazná ztráta aktivity při nižších teplotách
- např. Taq při 37 C má pouze 10% své normální aktivity
- *Fidelity*, maximální amplifikovatelná délka ampliconu
- bakteriální Taq *Thermus aquaticus*
- nízká *fidelity* - absence 3' > 5' exonukleázové aktivity (proofreading)
- Archeální enzymy
- *Thermococcus* sp. (*T. gorgonarius*, *litolaris*, *kodakaraensis*)
- *Tgo*, *Vent*, *Pfx*
- *Pyrococcus* sp. (*P. furiosus*)
- *Pfu*



DNA polymerázy a PCR

Jméno	3'>5' Exoaktivita	Zdroj	Poznámka
Taq	-	<i>Thermus aquaticus</i>	Poločas rozpadu v 95 C - 1,6 hod.
Pfu	+	<i>Pyrococcus furiosus</i>	Nejmenší error-rate
Vent (Tli)	+	<i>Thermococcus litoralis</i>	Poločas rozpadu v 95 C - 7 hod.

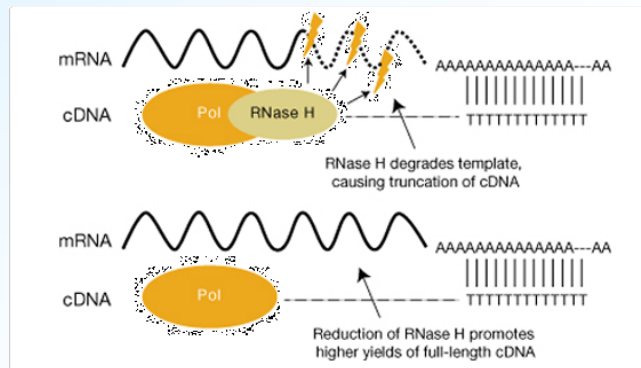
- Zajištění 3' > 5' exonukleázové aktivity zvyšuje specifitu reakce
- Některé aplikace (TaqMan) vyžadují 5' > 3' exonukleázovou aktivitu polymerázy (odbourání sondy, in vivo RNA primerů při syntéze Okazakiho fragmentů), jiné aplikace (molekulární majáky, scorpions) naopak vyžadují polymerázy bez nukleázové aktivity

RT PCR

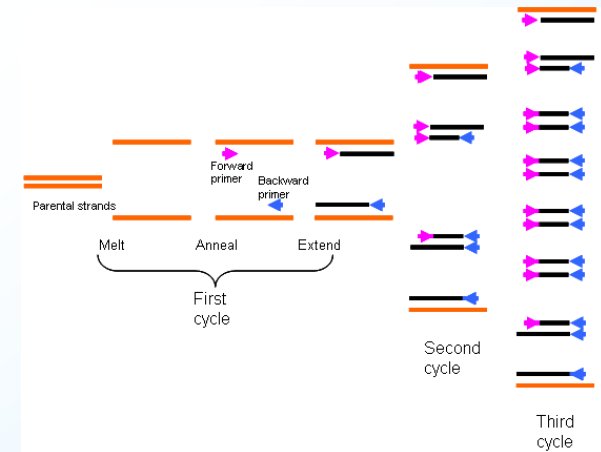
Reverse Transcription PCR

- dvě na sebe navazující enzymatické reakce

Reverzní transkripce



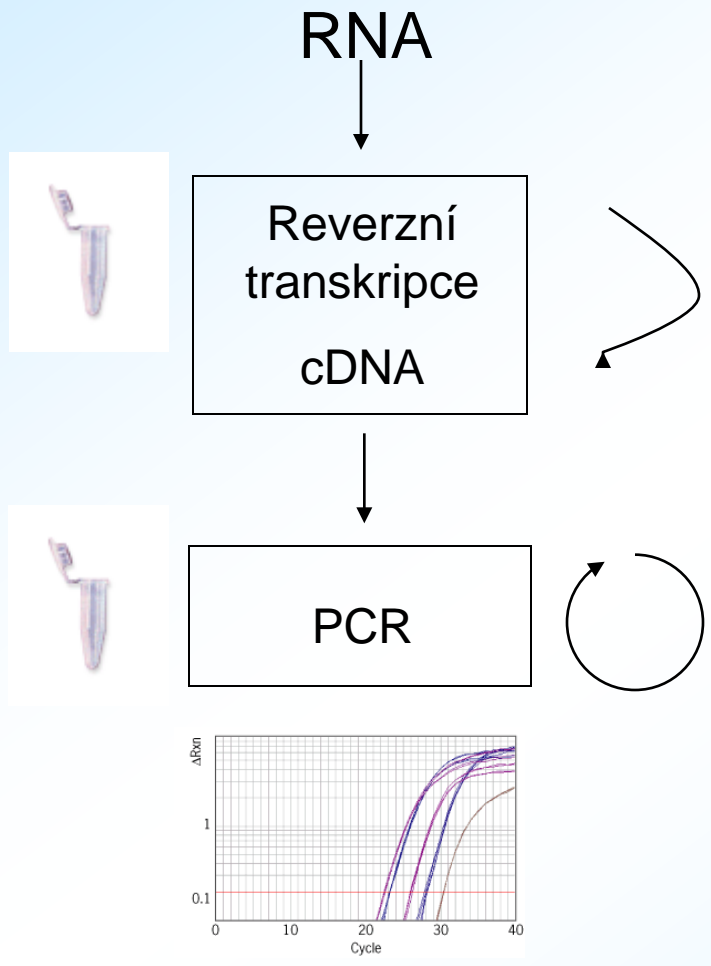
PCR



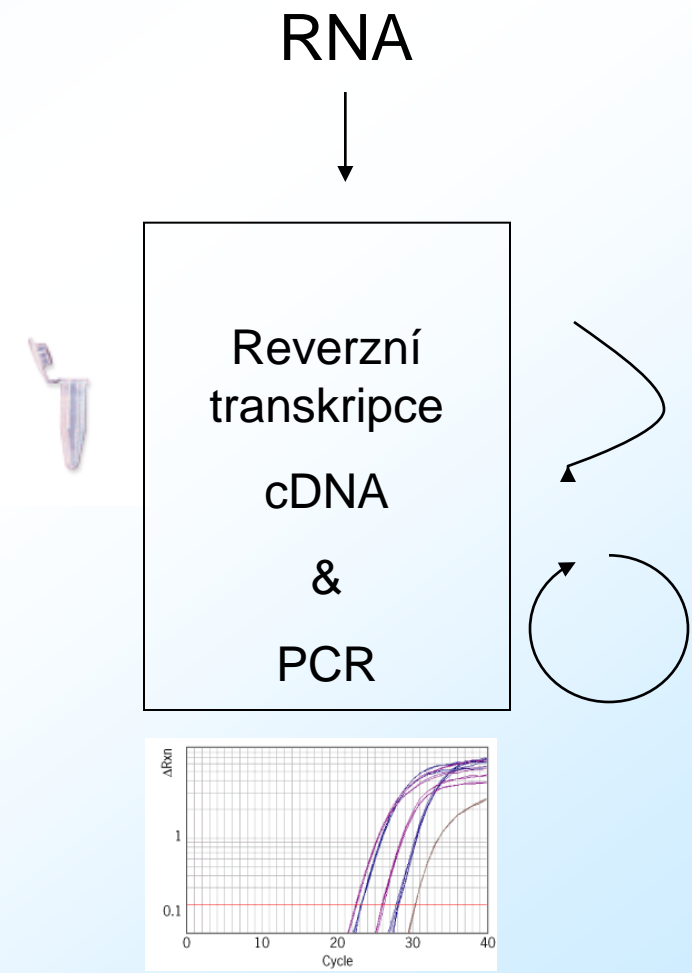
- mnohonásobně citlivější než např. northern/dot blot, RNase /S1 protection assays, nebo ISH

- exprese mRNA, detekce a kvantifikace virů atd.

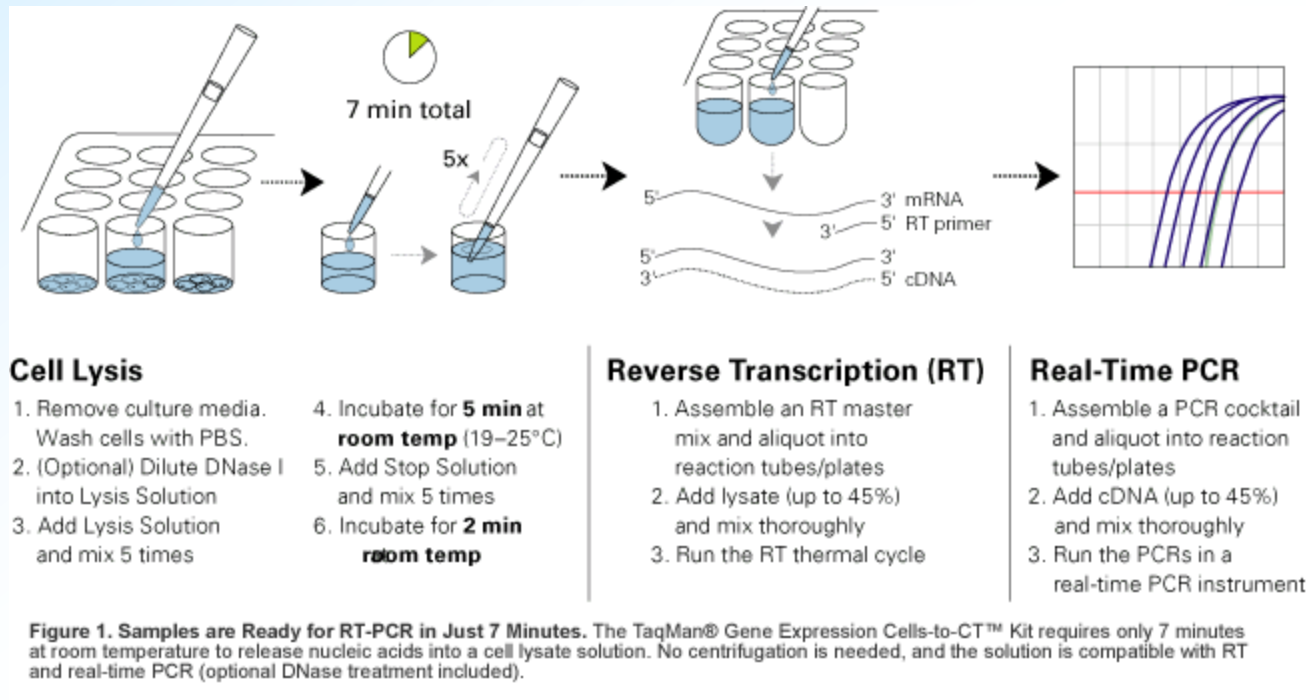
„two step“ RT-PCR



„one step“ RT-PCR



„Cells to Ct“ approach



One step or two step PCR?



One tube/two enzymes			Two tubes/two enzymes		
Feature	Advantages	Disadvantages	Feature	Advantages	Disadvantages
Reduced hands-on time	Fewer errors More rapid Higher throughput		Dedicated enzymes	Separate optimisation enhanced sensitivity	More pipetting errors
Less pipetting	Fewer errors		Multiple priming options	Separate cDNA pool Multiple targets	
Reagents added at start	Less contamination	No separate optimization	cDNA synthesis	Safer long term storage	
Higher temperature	Higher specificity	Target specific priming only			

Reverzní transkripce

- templát polyribonukleotidy i polydeoxyribonukleotidy
- syntéza DNA na základě RNA templátu - tzv. RDDP nebo DDDP aktivita (RNA/DNA directed DNA polymerase)
- replikace retrovirů (HIV)



Průběh RT

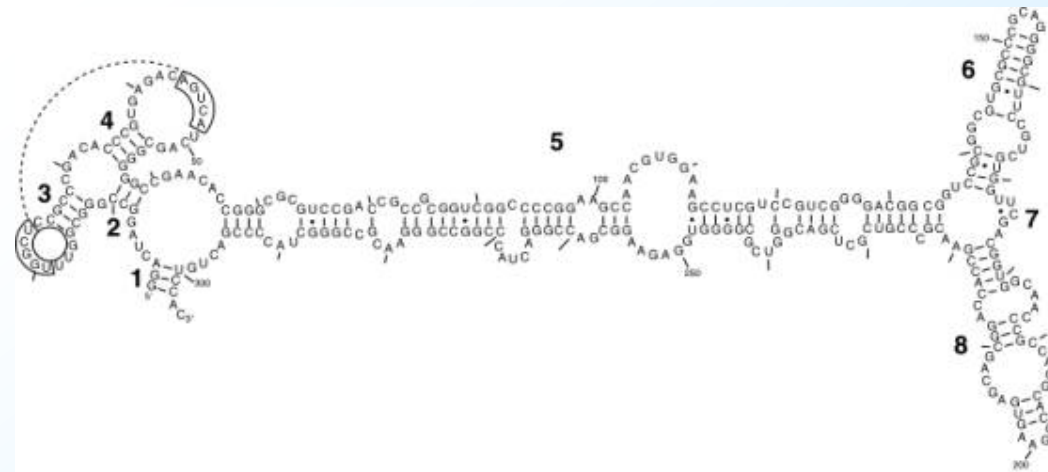
1. RDDP syntéza DNA řetězce podle RNA templátu
2. odbourání RNA, RNase H
3. DDDP syntéza druhého DNA řetězce

Primery

- endogenní náhodný priming – nežádoucí variabilita v PCR
- náhodné primery (hexamery, oktamery, dekamery)
 - převažující frakce cDNA – rRNA, problematická determinace low copy targets
 - nadhodnocuje množství mRNA vůči specifickým primerům
- oligo dT
 - poly A mRNA TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
NNNNNNNNNAAAAAAAAAAAAAAAAA
 - histony nebo virové geny postrádají poly A
 - nutná RNA o vysoké kvalitě (nefragmentovaná)
- specifické primery
 - nejvhodnější pro kvantifikaci
 - separátní reakce pro jednotlivé stanovované sekvence

Reverzní transkriptázy

- vysoké procento chyb (nemají proofreading)
- citlivost k sekundárním strukturám
 - způsobí terminaci polymerace nebo vynechání úseku sekundární struktury
- vysoká procesivita v případě malých amplikonů - krátké molekuly cDNA
- optimální reakční teplota 50-55 C
- dvojmocné ionty, Mn^{II+} , Mg^{II+}



Aditiva

- optimalizace účinnosti RT
- mechanismus nejasný, pravděpodobně ovlivňují termostabilitu enzymu nebo tvorbu sekundárních struktur templátu
- různé výsledky s různými enzymy a reakčními podmínkami

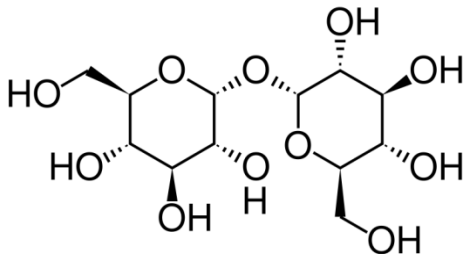
Trehalóza

0,6M/15% glycerol - brání tepelné inaktivaci enzymu

Zvyšuje enzymatickou aktivitu MMLV-RT při 60 C

Úspěšná syntéza řetězců o délce 10kb

Zvýšení specifiky odT primerů (Superscript II)



Betain (trimethylglycerin)

Osmoprotektant

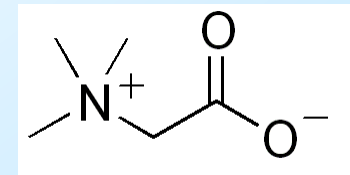
Stabilizace AT párů

Snížení termostability GC párů – snížení T_m

Kombinace 2M betainu a 0,6M trehalózy

Závislost na templázu a ampikonu

Optimalizace



RNáza H

degradace duplexu cDNA/RNA

Kompetuje se syntetickou aktivitou RT (Degradace duplexu DNA primer/RNA proběhne s větší pravděpodobností než extenze řetězce)

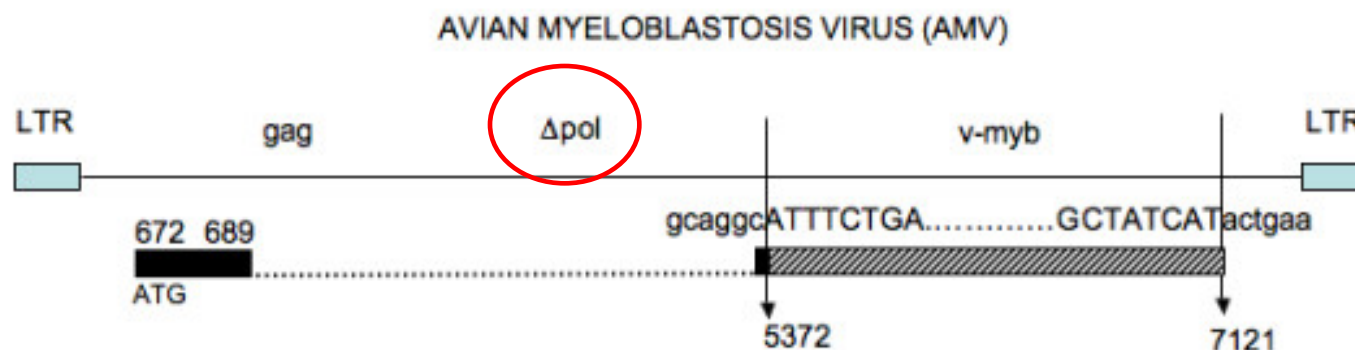
= snížený výtěžek cDNA

Ale:

- neodbouraná RNA může omezovat hybridizaci primerů a snižuje citlivost PCR
- PCR primery mohou být zbytkovou RNA vyvázány

AMV RT (Avian myeloblastosis virus)

- Syntéza DNA z DNA nebo RNA templátu
- DNA primery, oktamery a delší jsou efektivnější než hexamery
- Nekompetetivně inhibovaná tRNA
- Optimální reakční teplota 42 C
- Modulární enzym
- *Thermoscript* (Invitrogen) – vyšší teplotní stabilita (65 C), redukovaná aktivita RNázy H (tvorba cDNA knihoven)
- Četnost chyb $4,9 \times 10^{-4}$



MMLV RT (Moloney murine leukemia virus)

- Nižší aktivita RNázy H než v případě AMV-RT
- Termolabilní, optimum 37 C
- DNA i RNA primery, DNA primery 9-15bp vhodnější
- Modulární enzym
- Modifikované MMLV RT (redukce aktivity RNázy H, termostabilita)
 - *Superscript II* (Invitrogen), *Powerscript* (Clontech)
- Mg^{II+} - syntéza dlouhých cDNA



DNA polymerázy s RT aktivitou

Tth (*Thermus thermophilus*), **Tfl** (*T. flavus*), **BcaBEST** (*Bacillus caldotenax*) -Takara

RDDP i DDDP aktivita

Vyšší termostabilita než RT

Vysoká četnost chyb (nemají 3' - 5' exonukleázovou aktivitu)

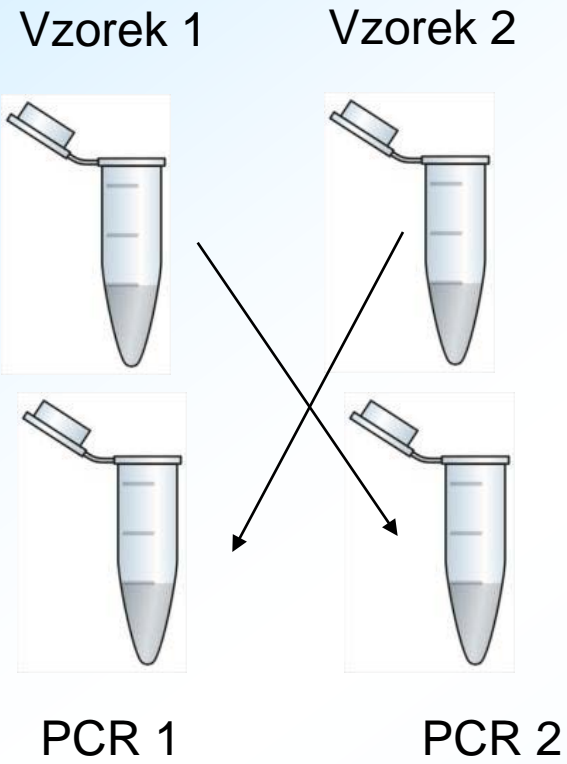
C. therm polymerase (Roche)

Klenowův fragment z *Carboxydotherrnus hydrogenoformus*

Vysoká teplotní stabilita a přesnost syntézy

(četnost chyb poloviční ve srovnání s Tth)

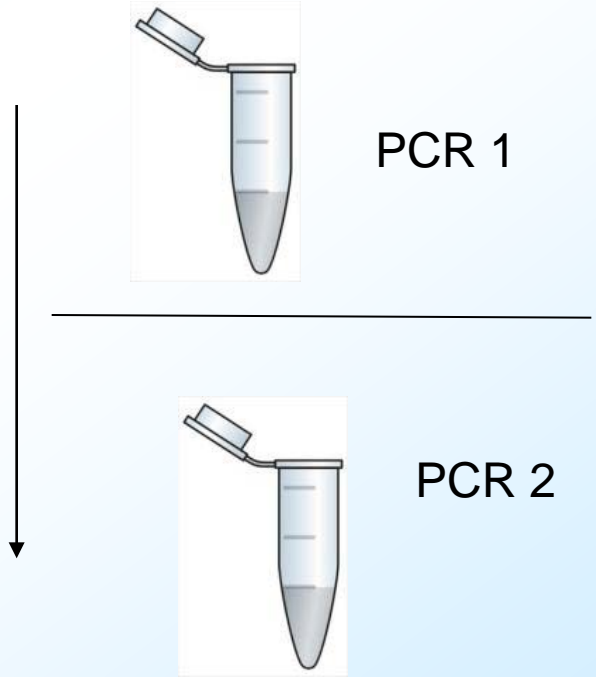
Cross contamination



Vzájemná
kontaminace
vzorků

Přenos amplikonu
do dalších PCR

Carry-over contamination

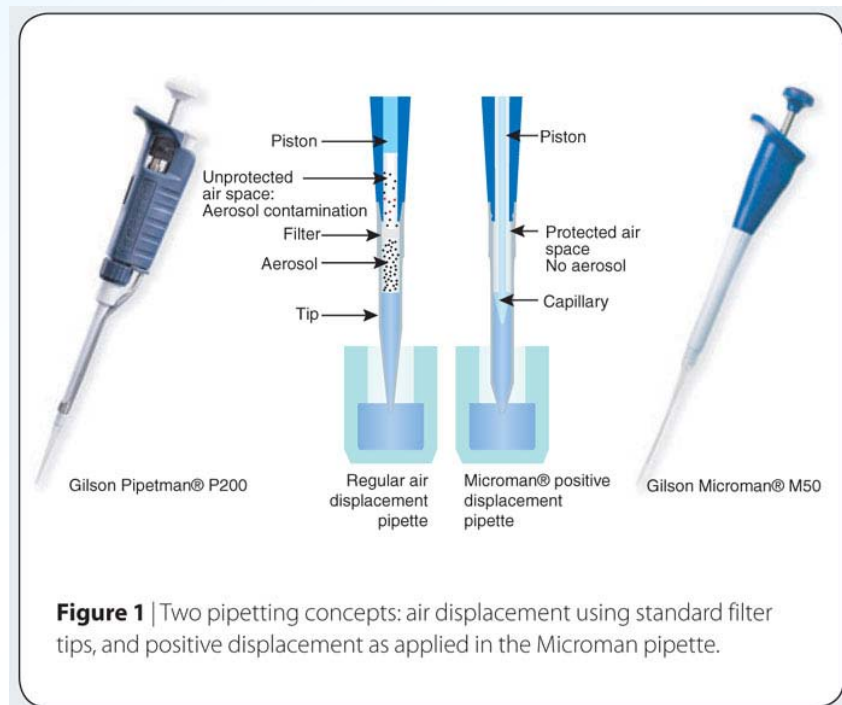


Jak předejít kontaminaci

- Správná laboratorní praxe
- Plastik v RNA kvalitě
- Automatizace



×



HotStart Taq

- Modifikace polymerázy (Chemická modifikace, MoAb)
- Upravená, teplotně senzitivní polymeráza

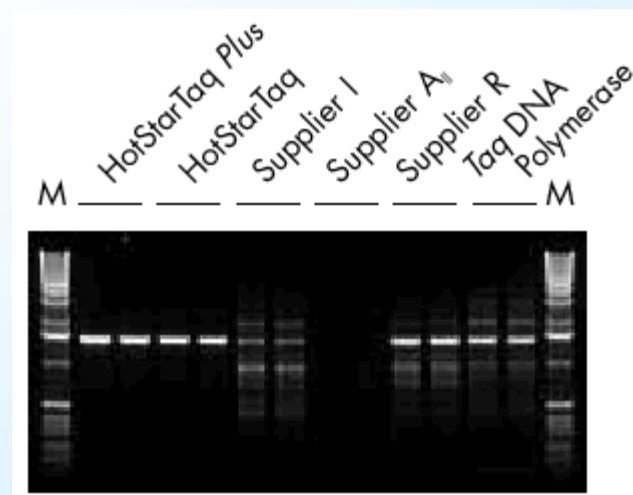
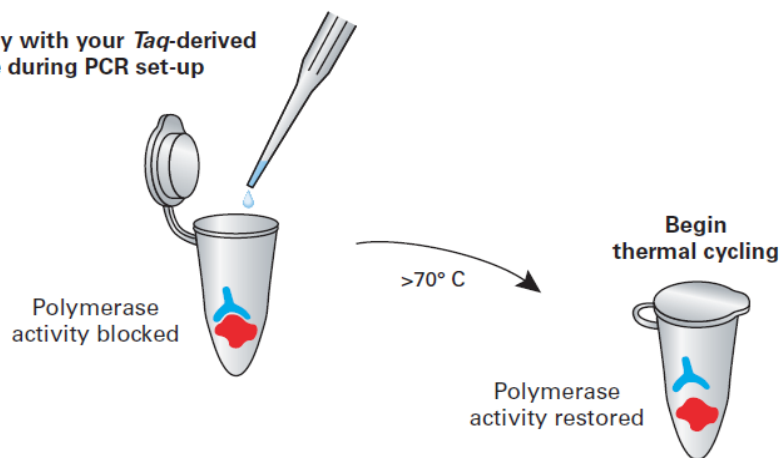
Nucleic Acids Research, 2003, Vol. 31, No. 21 6139–6147
DOI: 10.1093/nar/gkg813

Cold-sensitive mutants of Taq DNA polymerase provide a hot start for PCR

Milko B. Kermekchiev, Anatoly Tzekov and Wayne M. Barnes*

DNA Polymerase Technology Inc., 1508 South Grand Avenue, St Louis, MO 63104, USA and Department of Biochemistry and Molecular Biophysics, Washington University School of Medicine, 660 South Euclid Avenue, St Louis, MO 63110, USA

Add TaqStart Antibody with your *Taq*-derived DNA Polymerase during PCR set-up



HotStart dNTPs

- Modifikace termolabilní tetrahydrofuranovou (THF) skupinou (cyklický ether)
- Brání extenzi a dimerizaci primerů
- Zvýšením teploty dojde k uvolnění THF

Fig 1: Proposed activation mechanism of CleanAmp™ dNTPs

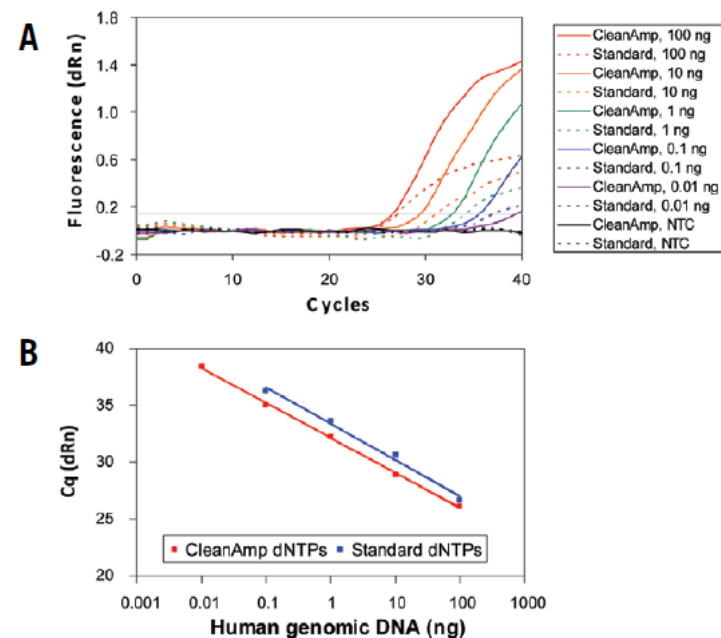
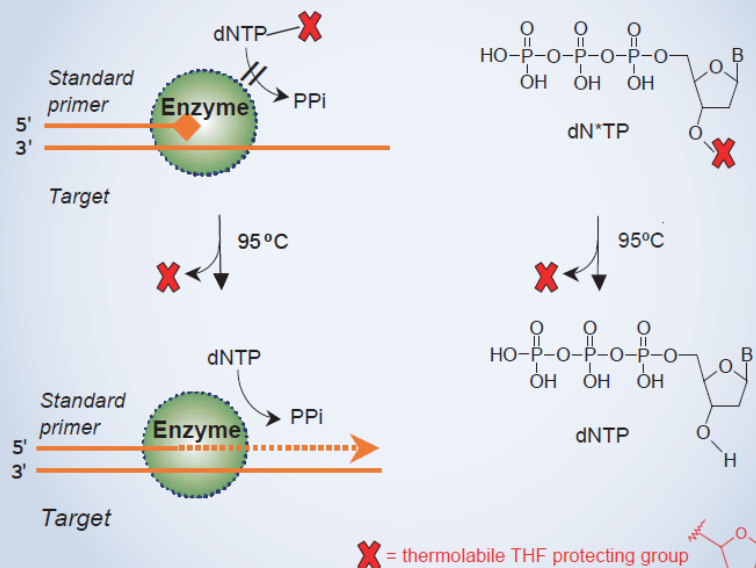


Figure 2. Comparison between standard dNTPs and CleanAmp™ dNTPs for amplification of a 187 bp target from human genomic DNA in quantitative PCR. Results are presented as an amplification plot (A) and a standard curve (B) with standard dNTPs: $Y = -3.191 \cdot \text{LOG}(X) + 33.36$, Eff. = 105.8%) and CleanAmp™ dNTPs ($Y = -3.079 \cdot \text{LOG}(X) + 32.12$, Eff. = 111.2%).

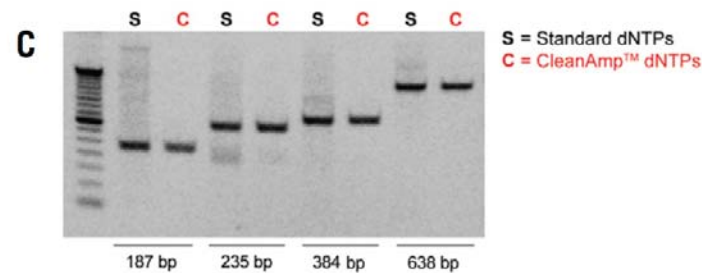
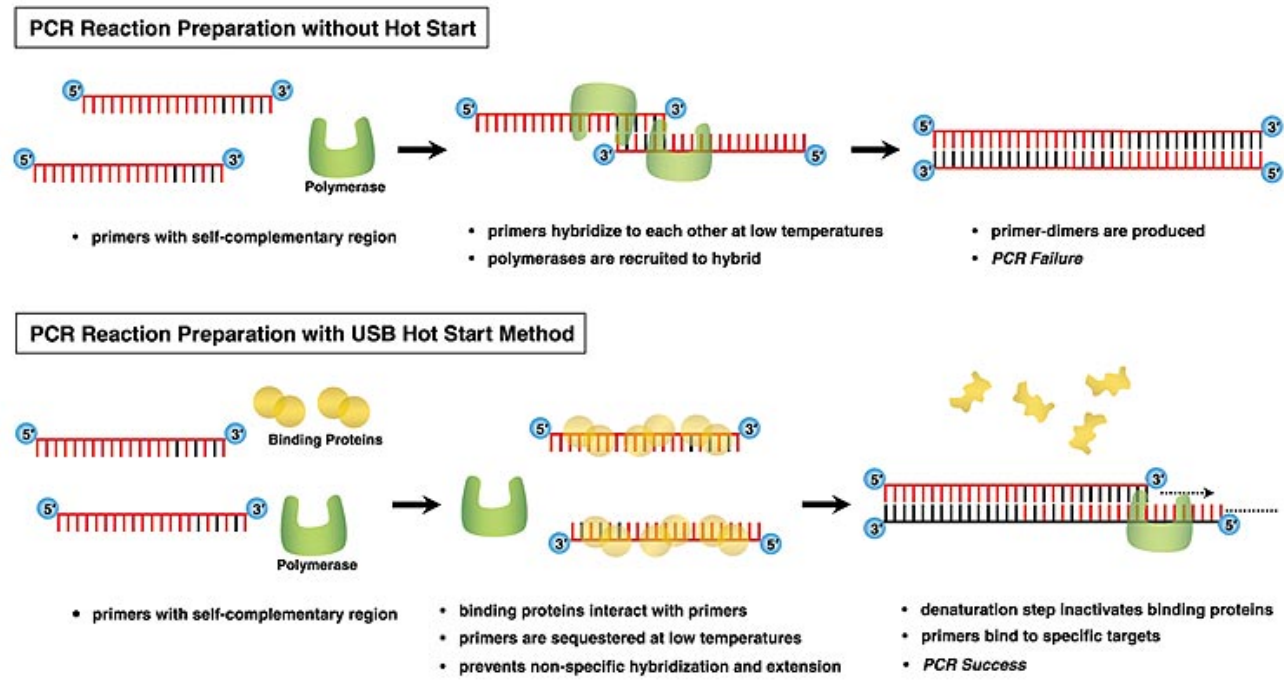


Figure 1. Comparison of (A) standard dNTPs and (B) CleanAmp™ dNTPs for amplification of a 235 bp target from human genomic DNA over a range of annealing temperatures. (C) Performance of standard and CleanAmp™ dNTPs for the amplification of four targets from human genomic DNA.

Alternativní HotStart přístupy

- Fyzické oddělení jednotlivých reakčních složek
- Vyvázení nebo chemická modifikace primerů

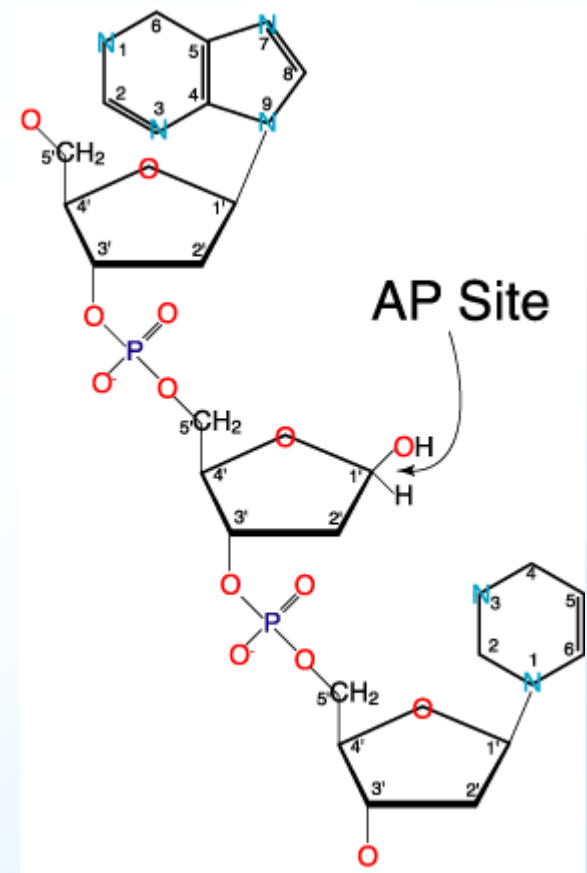
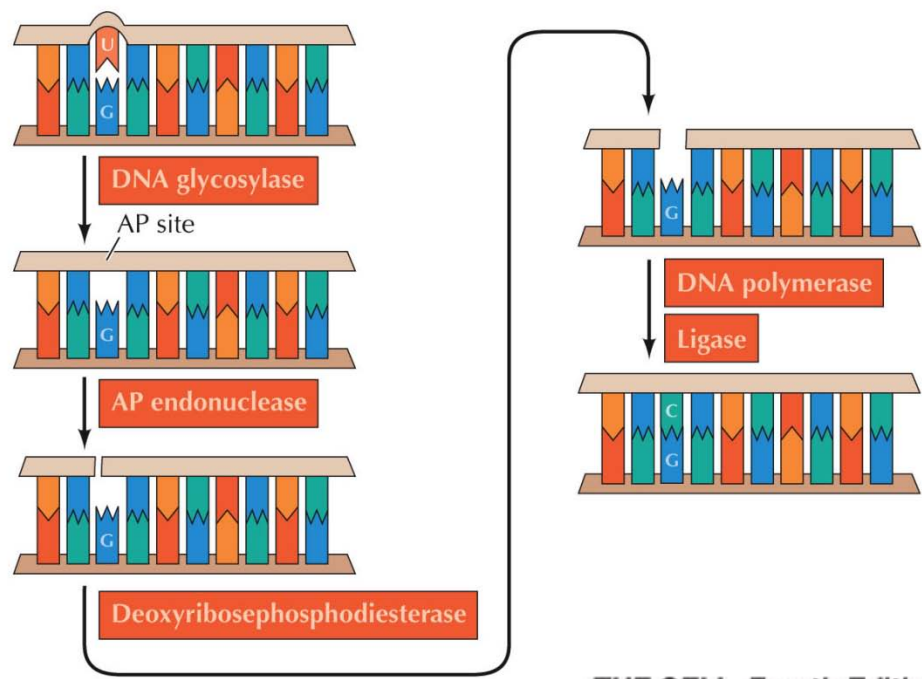
Fig. 1. USB HotStart-IT Method: Primer Sequestration



Uracil-DNA-glykosidáza (UNG)

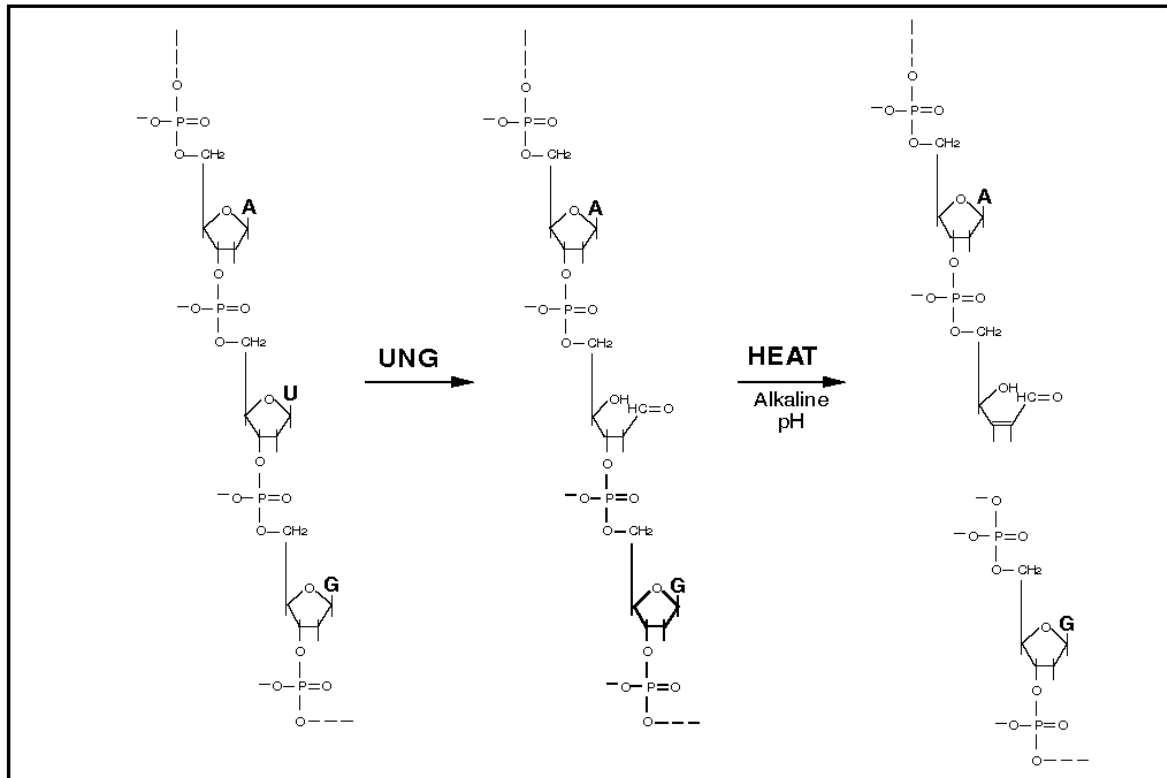
- odstraňuje uracil z DNA
- zahajuje bazovou excizní reparaci – dochází k odštěpení poškozené báze (deaminovaný cytosin) a vzniku AP místa (apurinové, apyrimidinové místo)

DNA containing U formed by deamination of C



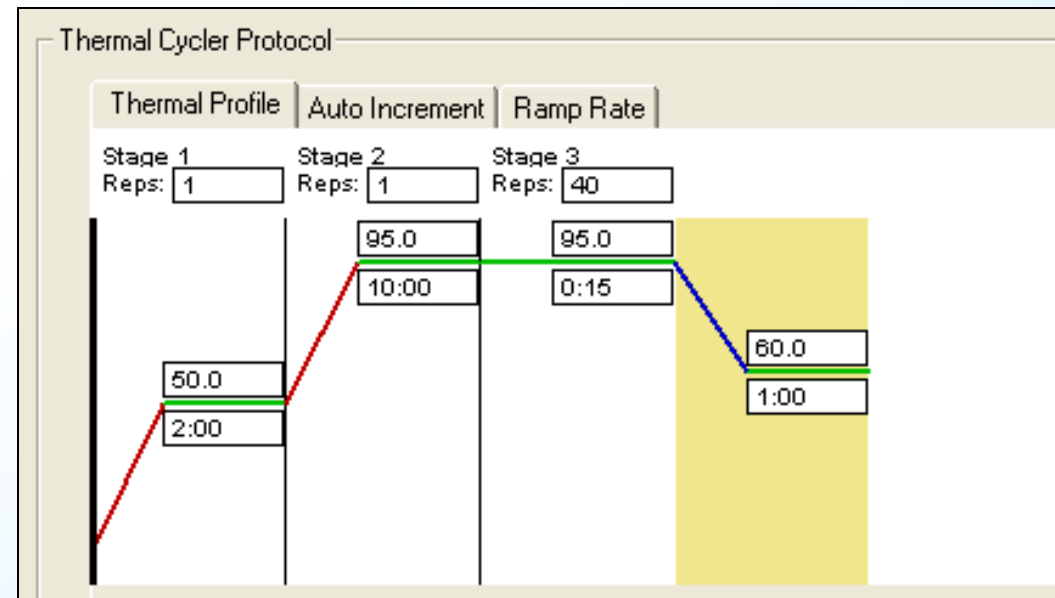
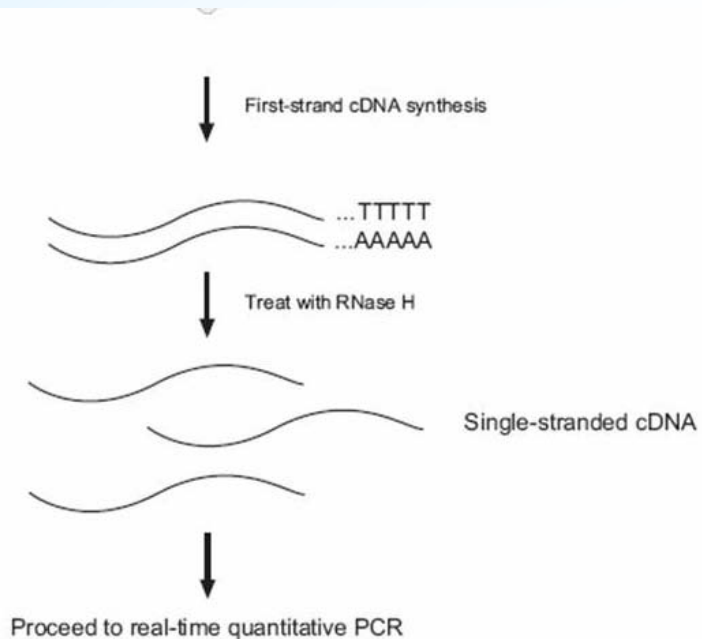
Uracil-DNA-glykosidáza (UNG)

- Pokud reakční PCR směs obsahuje dUTP místo dTTP, výsledný amplikon bude obsahovat „U“ místo „T“
- UNG rozpozná místa v DNA, která obsahují „U“ a štěpí je za vzniku AP místa
- DNA obsahující AP místa je termolabilní
- Lze tak zabránit „carry over“ kontaminaci – PCR produkt nemůže být reamplifikovaný



Uracil-DNA-glykosidáza (UNG)

- Použitím UNG a vhodné směsi dNTP, lze zabránit „carry over“ kontaminacím v laboratoři – PCR produkt nemůže být reamplifikovaný
- Vlastnosti DNA obsahující „U“ místo „T“:
 - dU mají stejnou schopnost hybridizace jako dT
 - lze ji použít i pro dideoxy-NTP sekvenování
 - PCR fragment lze přímo klonovat do UNG- kmenů



Shrnutí

Po dnešní přednášce:

- umíte popsat kinetiku PCR
- znáte rozdíl mezi *end-point* a *real-time PCR*
- víte, co to je R , R_n , ΔR_n , C_t
- znáte vztah mezi C_t a množstvím amplikonu
- umíte popsat a rozhodnout se, kdy použít One Step a Two Step PCR
- víte, co to jsou DNA polymerázy a reverzní transkriptázy
- víte, co to znamená HotStart PCR a UNG
- Víte, jak předejít případným kontaminacím