



PCR v reálném čase



doc. RNDr. Milan Bartoš, Ph.D.

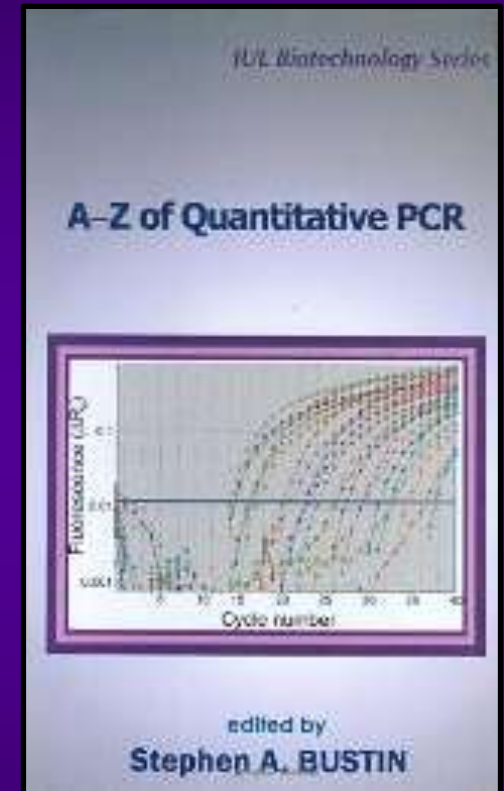
bartosm@vfu.cz

Přírodovědecká fakulta MU, 2012

Doporučená literatura



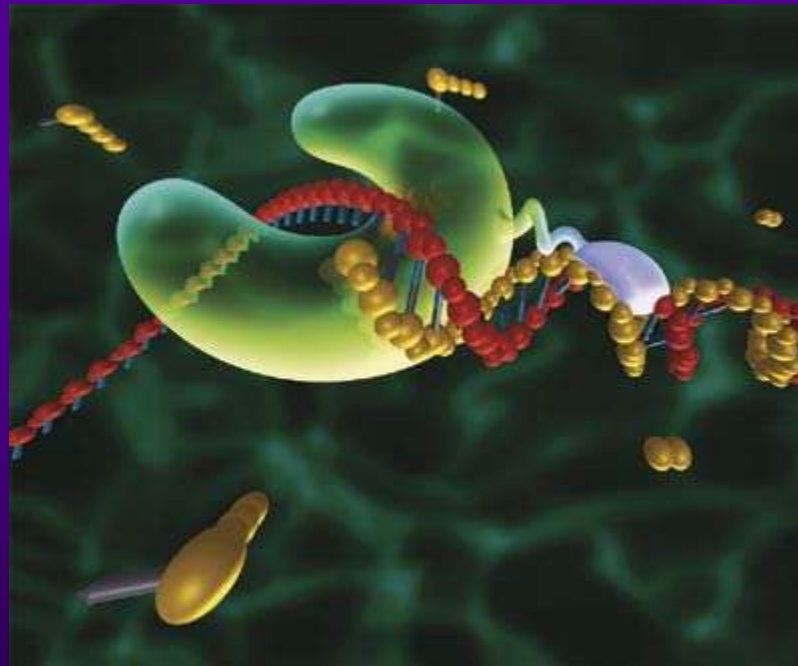
Bustin S.A. (2004): A-Z of Quantitative PCR, International University Line, La Jolla, California



Obsah přednášky

- 1) Princip PCR v reálném čase**
- 2) Komponenty specifické pro real-time PCR**
- 3) Vlastnosti fluoroforů**
- 4) Vlastnosti zhášečů**
- 5) Sondy**
- 6) Nespecifické formáty**
- 7) Specifické formáty**
- 8) Příklady využití**
- 9) Emulsní PCR a pyrosekvenování**

**„Real-time PCR“ je nejmodernějším
výdobytkem polymerázové řetězové
reakce**



Real-time PCR - princip

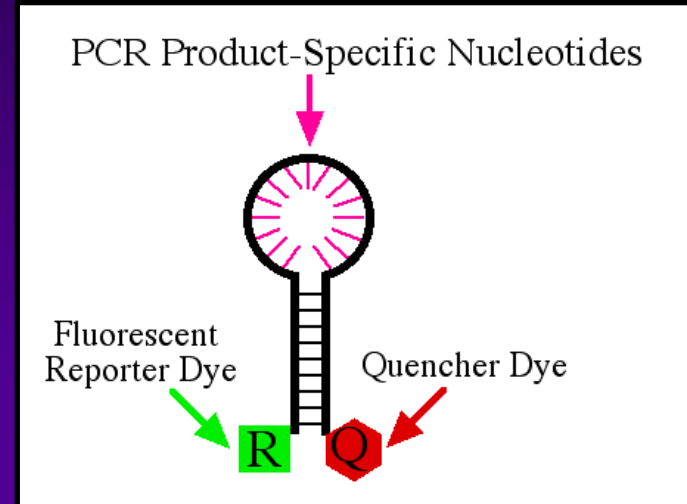
- kombinované provádění DNA **amplifikace** a **detekce** cílové nukleové kyseliny současně **v jedné zkumavce** pomocí světelného signálu z fluoroforů
- je možno **dynamicky posuzovat průběh** syntézy PCR produktu
- stanovení množství matrice vložené do reakce (**kvantitativní PCR**)

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 patogenního mikroorganismu, hladina mRNA**
- **rozmanité typy sond – více lokusů v jedné reakci (multiplex)**

Komponenty real-time PCR

- **Fluorofory**
- **Zhášeče**
- **Sondy**



Fluorofory

Navazují se na amplikony nebo jsou jimi značeny hybridizační sondy

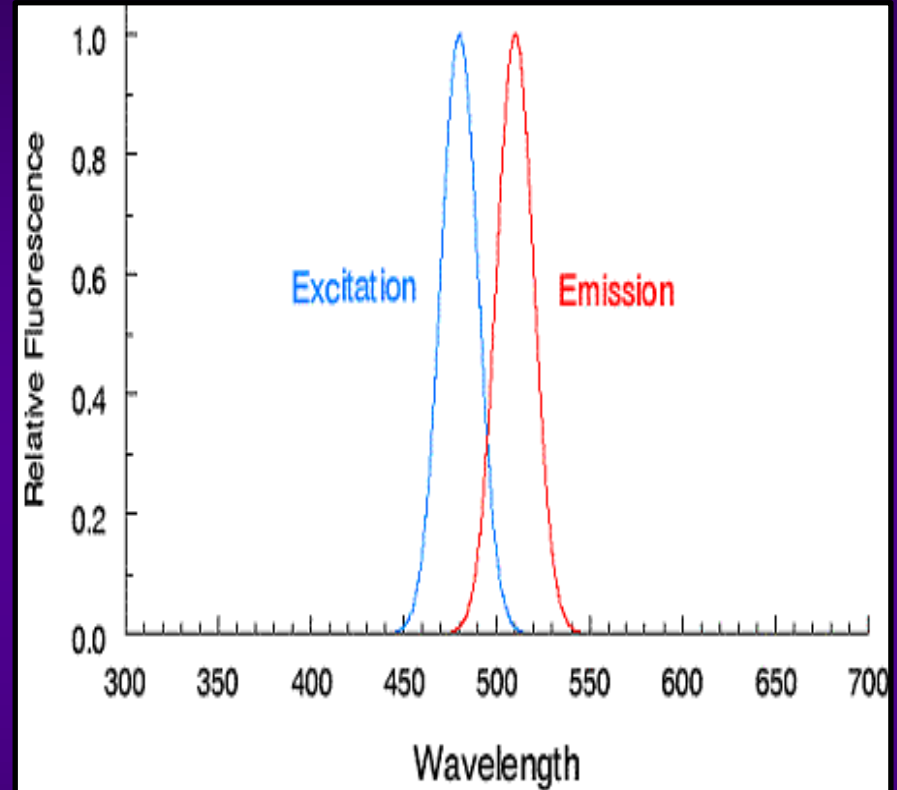
- 1) Nespecifické metody: založené na nespecifické vazbě fluoroforu do vznikající molekuly dsDNA
- 2) Specifické metody: založené na specifické vazbě sondy označené fluoroforem

Vlastnosti fluoroforů

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

Princip fluorescence

- 1) Světlo o definované vlnové délce je absorbováno molekulou fluoroforu
- 2) Molekula fluoroforu přejde do excitovaného stavu s vyšší energií
- 3) Molekula se vrátí do základního stavu po emisi světelného záření o jiné vlnové délce



Zhášeče

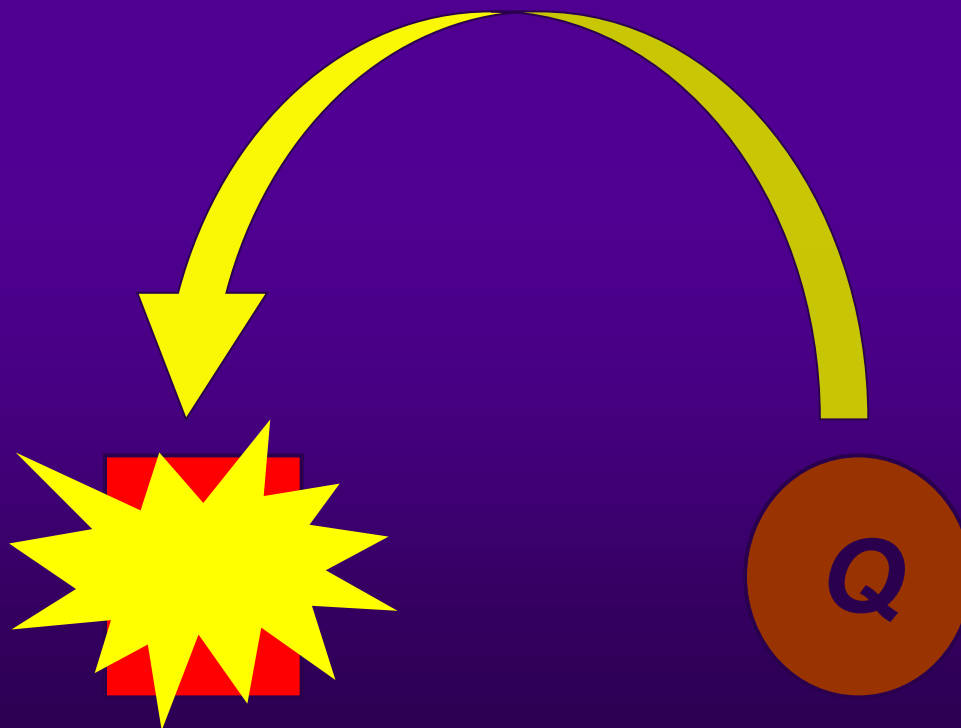
Heterocyklické polyaromatické uhlovodíky schopné absorbovat nebo disipovat energii z excitovaného fluoroforu

Zhášeč přijímá energii z fluoroforu a absorbuje nebo disipuje ji mechanismem

- 1) Proximálního zhášení – proximal quenching
- 2) FRET - Fluorescence Resonance Energy Transfer

Proximální zhášení

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.

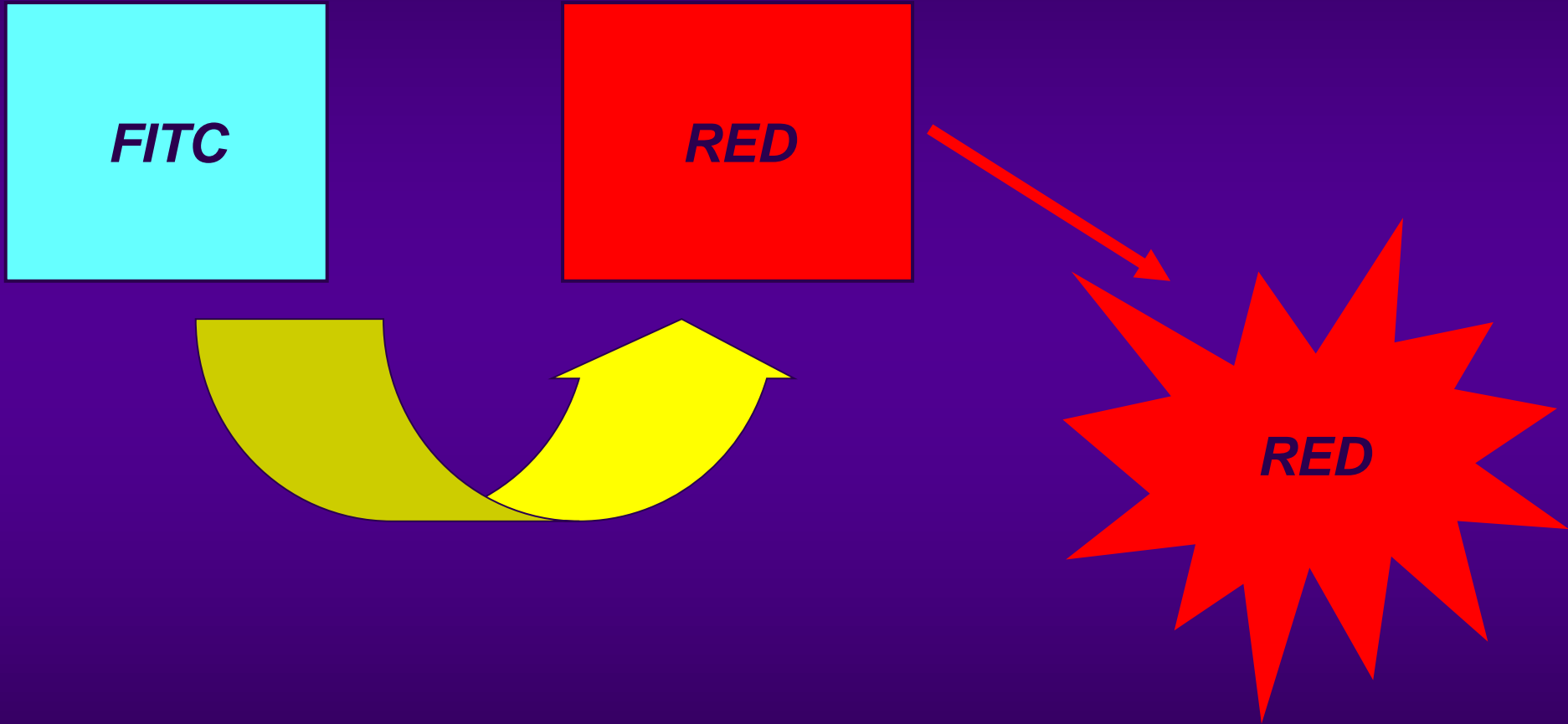


FRET

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).

Schéma FRET

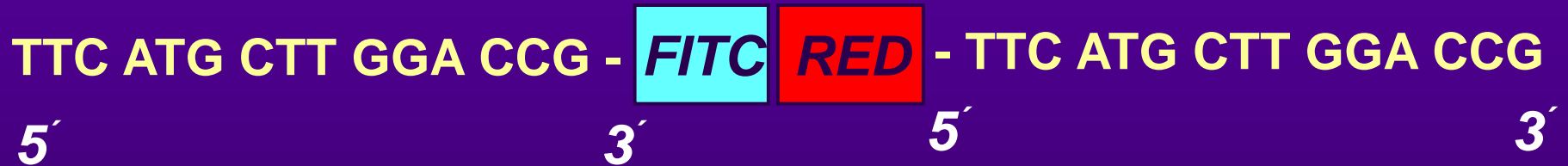


Sondy

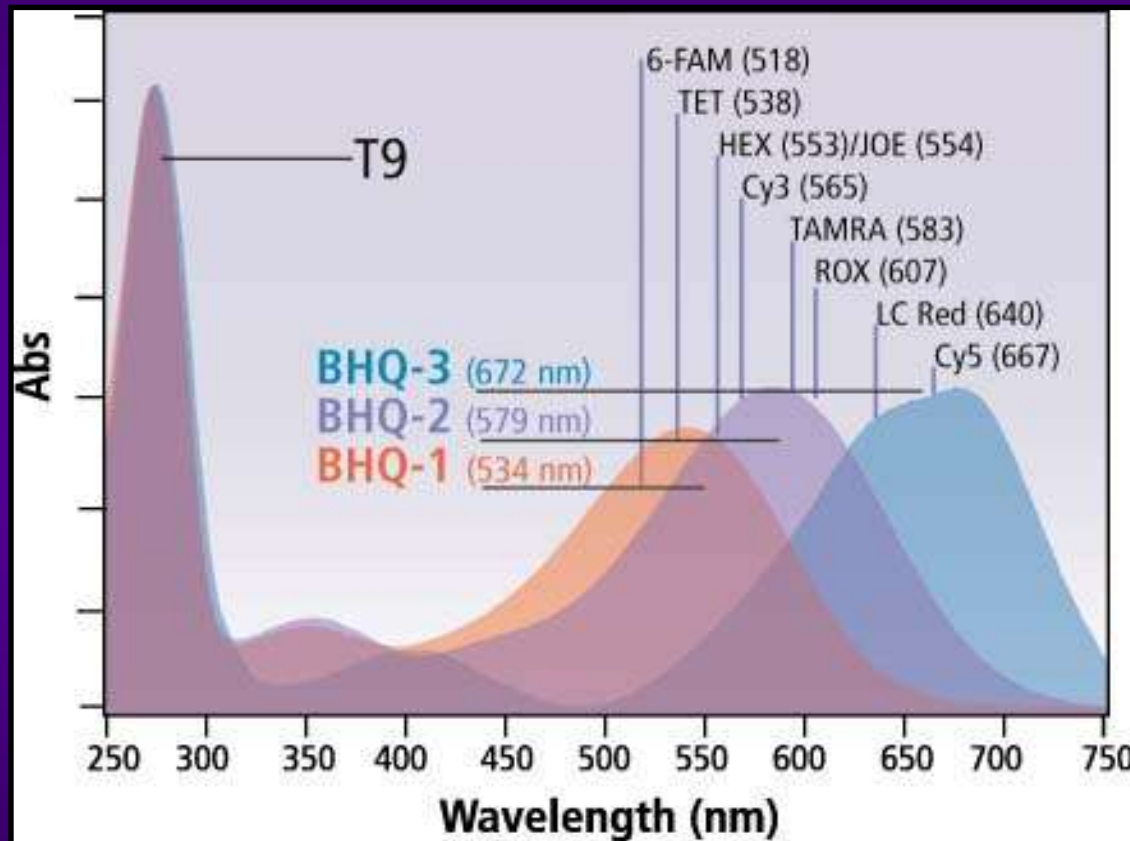
Krátký oligonukleotid s podobnými vlastnostmi jako PCR primer – váže se na DNA řetězec stejným způsobem jako PCR primer

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

Fluorofor, sonda, zhášec



Nejčastěji používané kombinace fluorofor/proximální zhášec



FAM

5'

3'

BHQ1

Formáty real-time PCR

- fluorofory s vazbou na dvouřetězcový fragment DNA = **SYBR® Green I**;
- princip 5' → 3' exonukleázové aktivity DNA polymerázy na značené sondy = **TaqMan®**;
- princip hybridizace lineárních a nebo vlásenkových („hairpin“) sond = **FRET, Beacons**, aj.;
- princip fluoreskujících amplikonů = **Amplifluor™, Scorpions**;

Formáty real-time PCR – jiné dělení

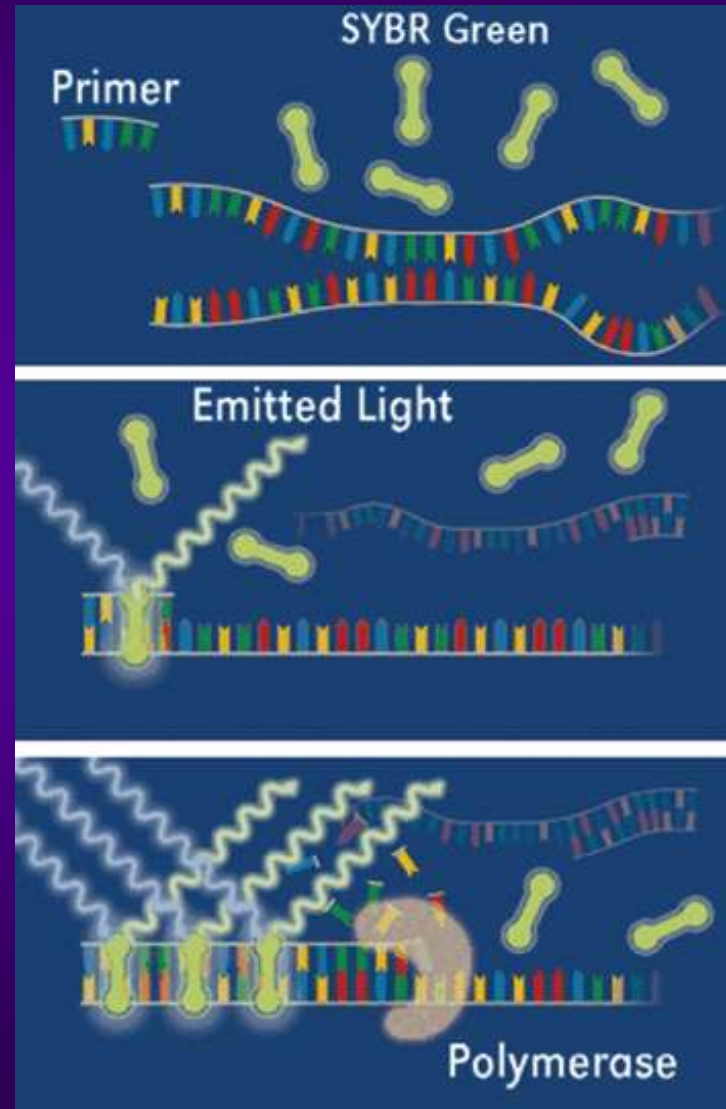
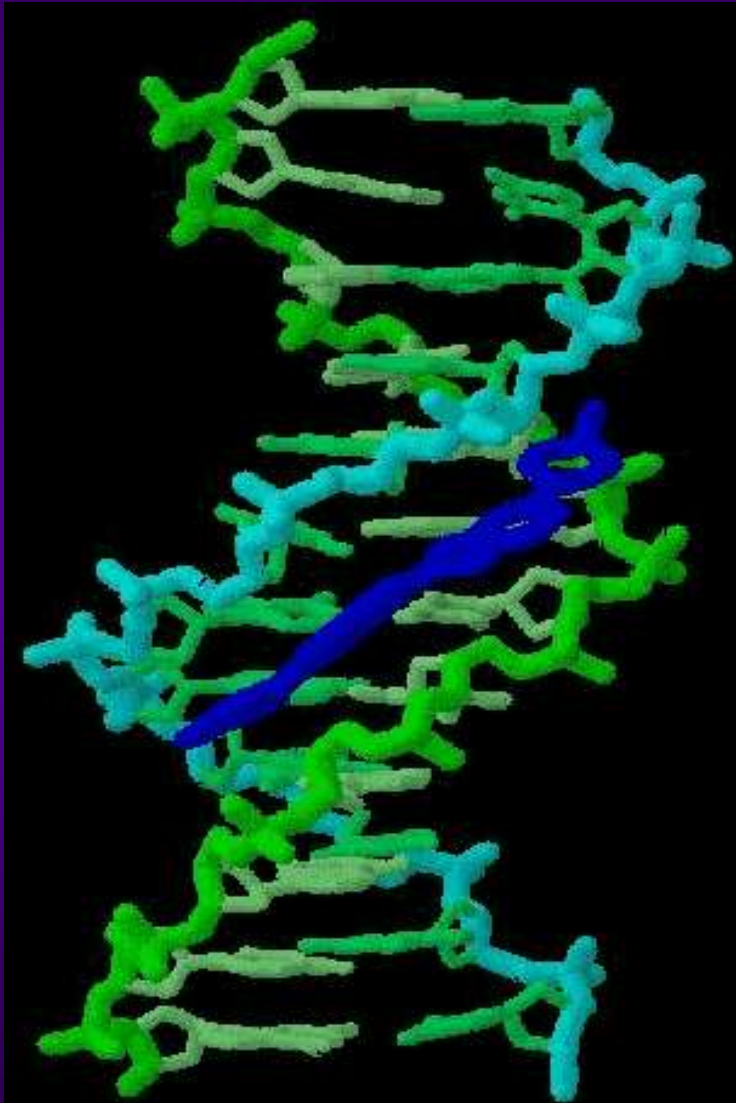
- **Nespecifické metody**: založené na nespecifické vazbě fluoroforu do vznikající molekuly dsDNA
- **Specifické metody**: založené na specifické vazbě sondy označené fluoroforem

Nespecifické metody

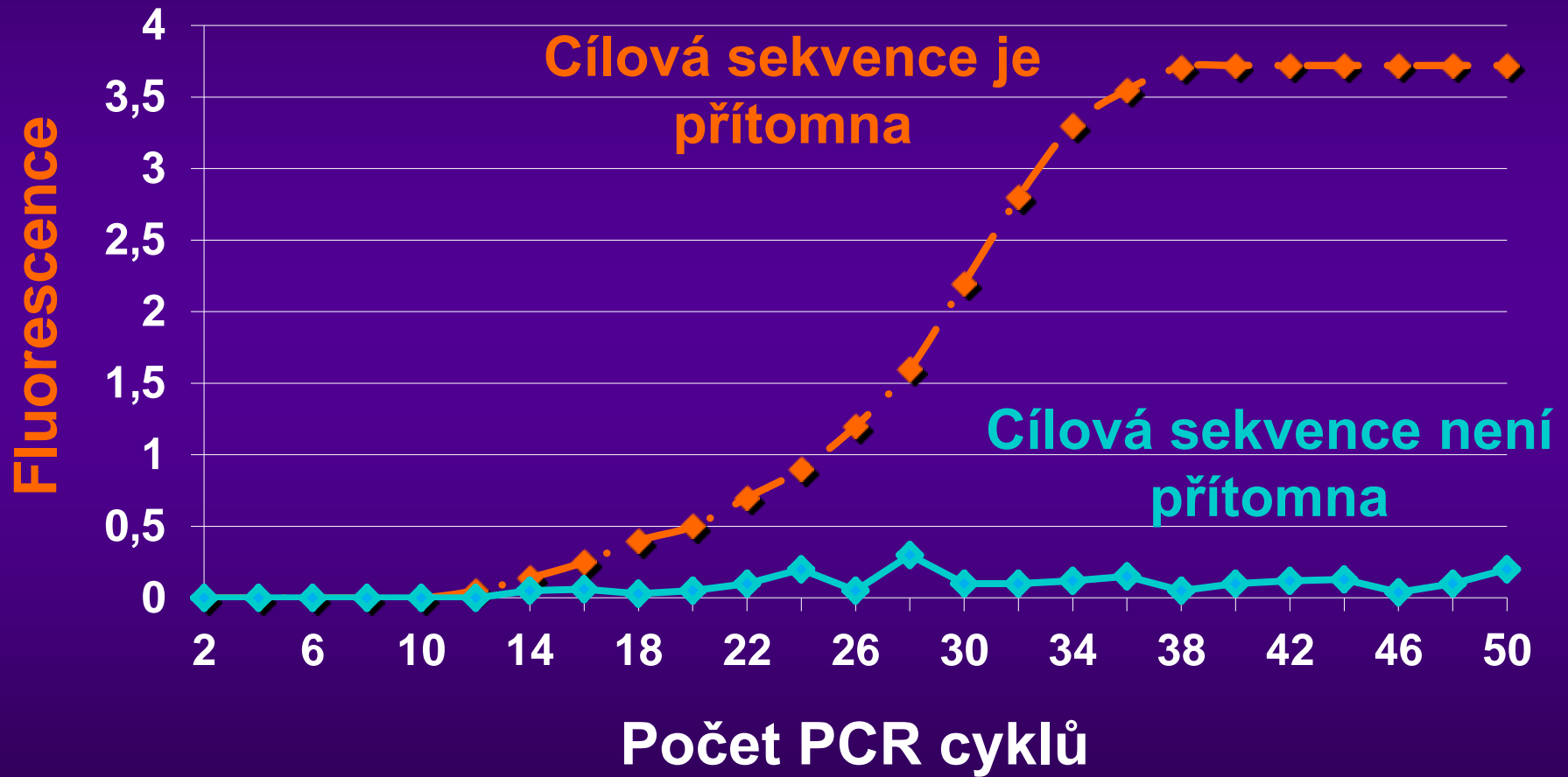
Využívají DNA interkalátory

- **Fluorofor se interkaluje, „váže“ do vznikajícího řetězce DNA v průběhu PCR**
- **Vazba v malém žlábků molekuly DNA**
- **Quencher-Labeled Primer I**
- **Quencher-Labeled Primer II**
- **LUX™ Primers**
- **Amplifluor™**
- **SYBR Green I**

Princip použití SYBRTM Green I



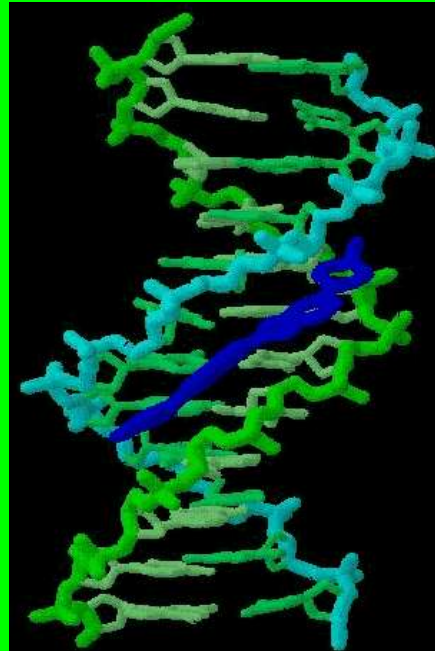
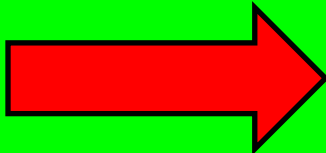
Co se děje uvnitř termocykleru při real-time PCR?





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

**Podívej se ještě jednou na
strukturu**



Jak detekovat rozdíly v sekvenci DNA pomocí SYBR Green I - modelový příklad -

Úsek A o délce 200 bp ohraničený primery

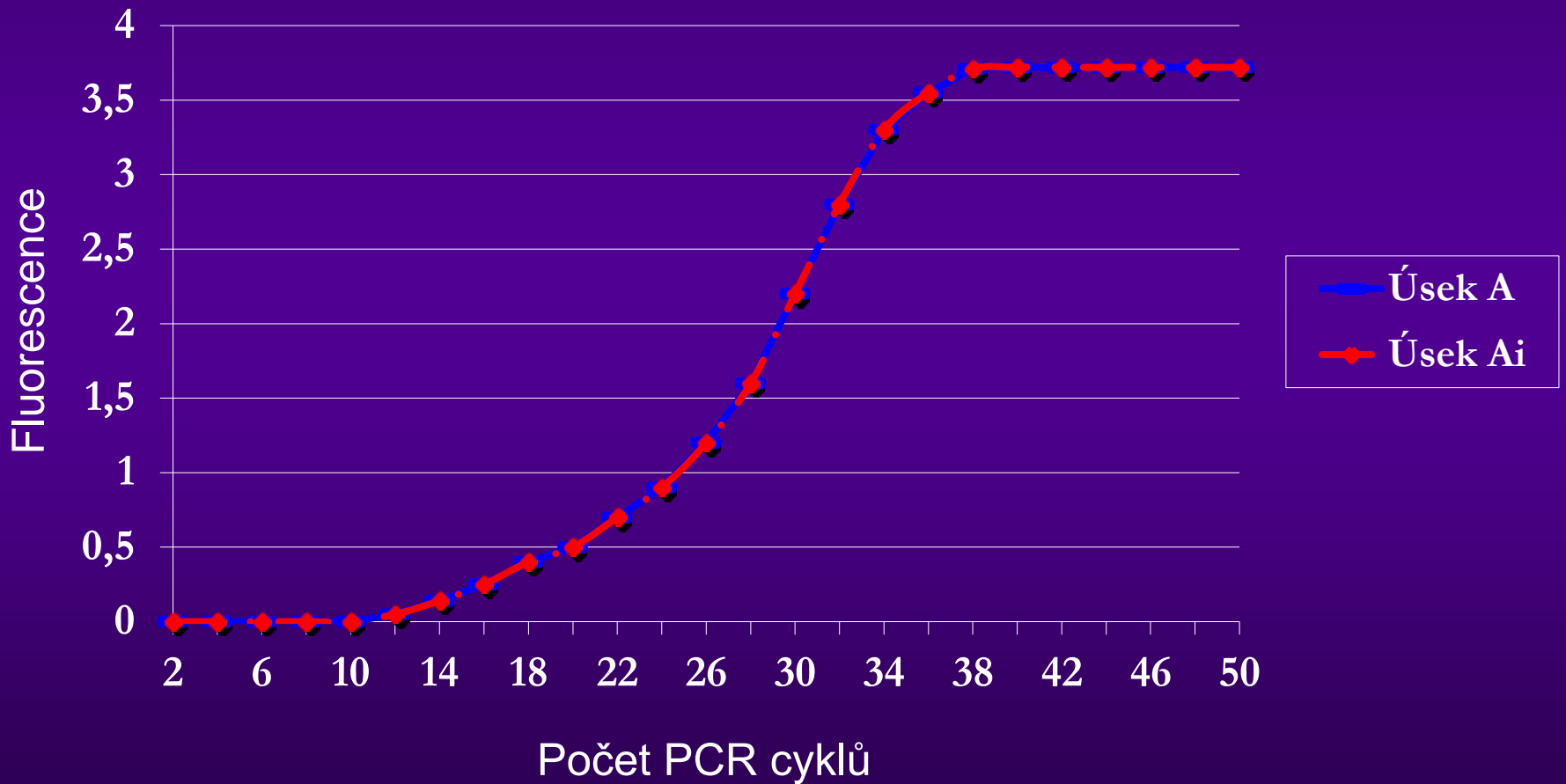
CCTCCTGCCTCTACCAATCGCCAGTCAGGAAGGCAGCCTACCCCGCTG
ACTCCACCTTTGAGAGACTCATCCTCAGGCCATGCAGTGGAAATTCC
ACAACCTTCCACCAAACCTCTGCAAGATCCCAGAGTGAGAGGCCTGTAT
CTCCCTGCTGGTGGCTCCAGTTCAGGAACAGTAAACCCTGTTCCGACT
ACTGCCTC

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

CCTCCTGCCTCTACCAATCGCCAGTCAGGAAGGCAGCCTACCCCGCTG
ACTCCACCTTTGAGAGACACTACTCATCCTCAGGCCATGCAGTGGAA
TTCCACAACCTTCCACCAAACCTCTGCAAGATCCCAGAGTGAGAGGCCT
GTATCTCCCTGCTGGTGGCTCCAGTTCAGGAACAGTAAACCCTGTTCC
GACTACTGCCTC

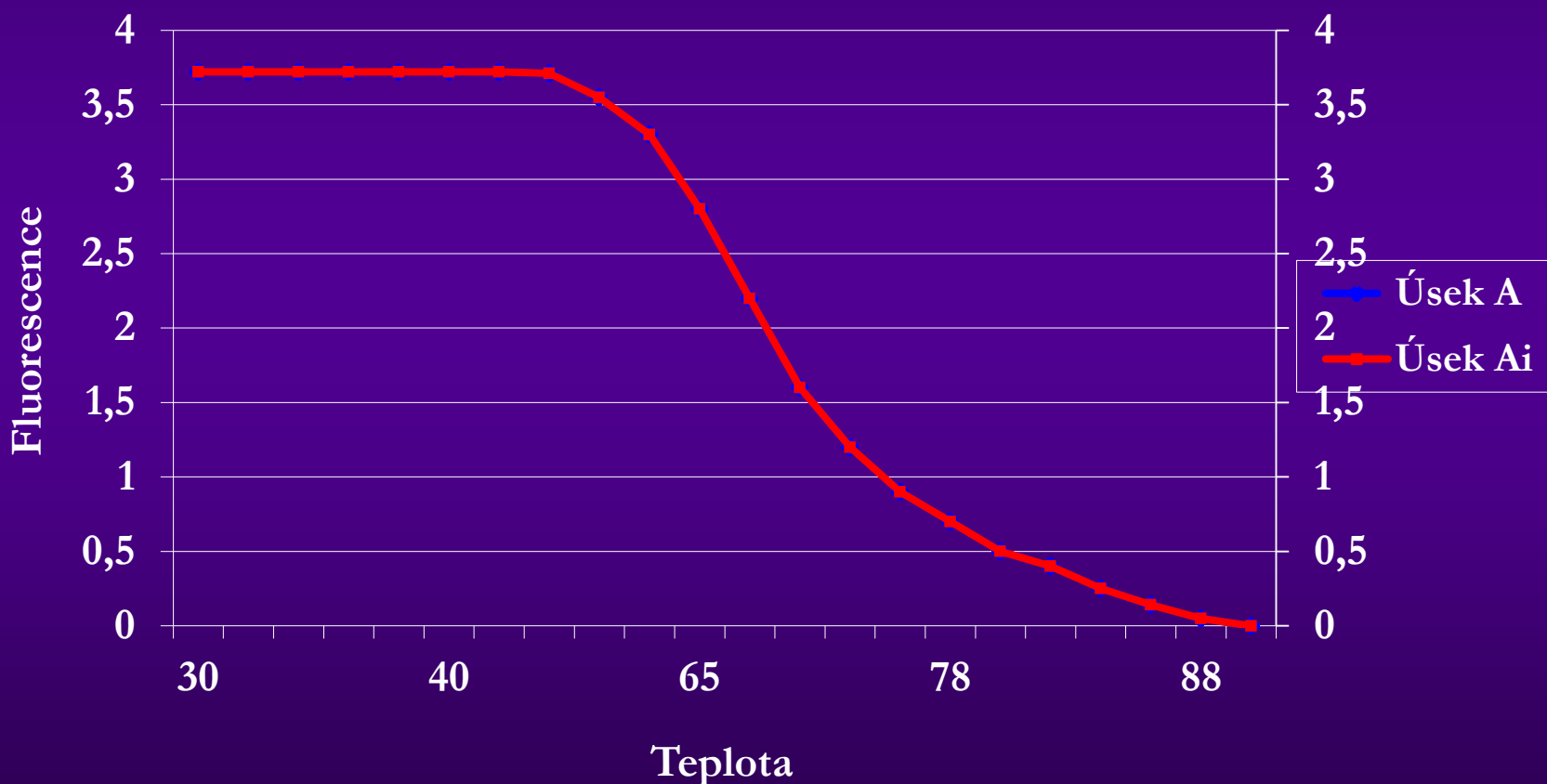
Výsledek detekce pomocí SYBR Green I

Základní data

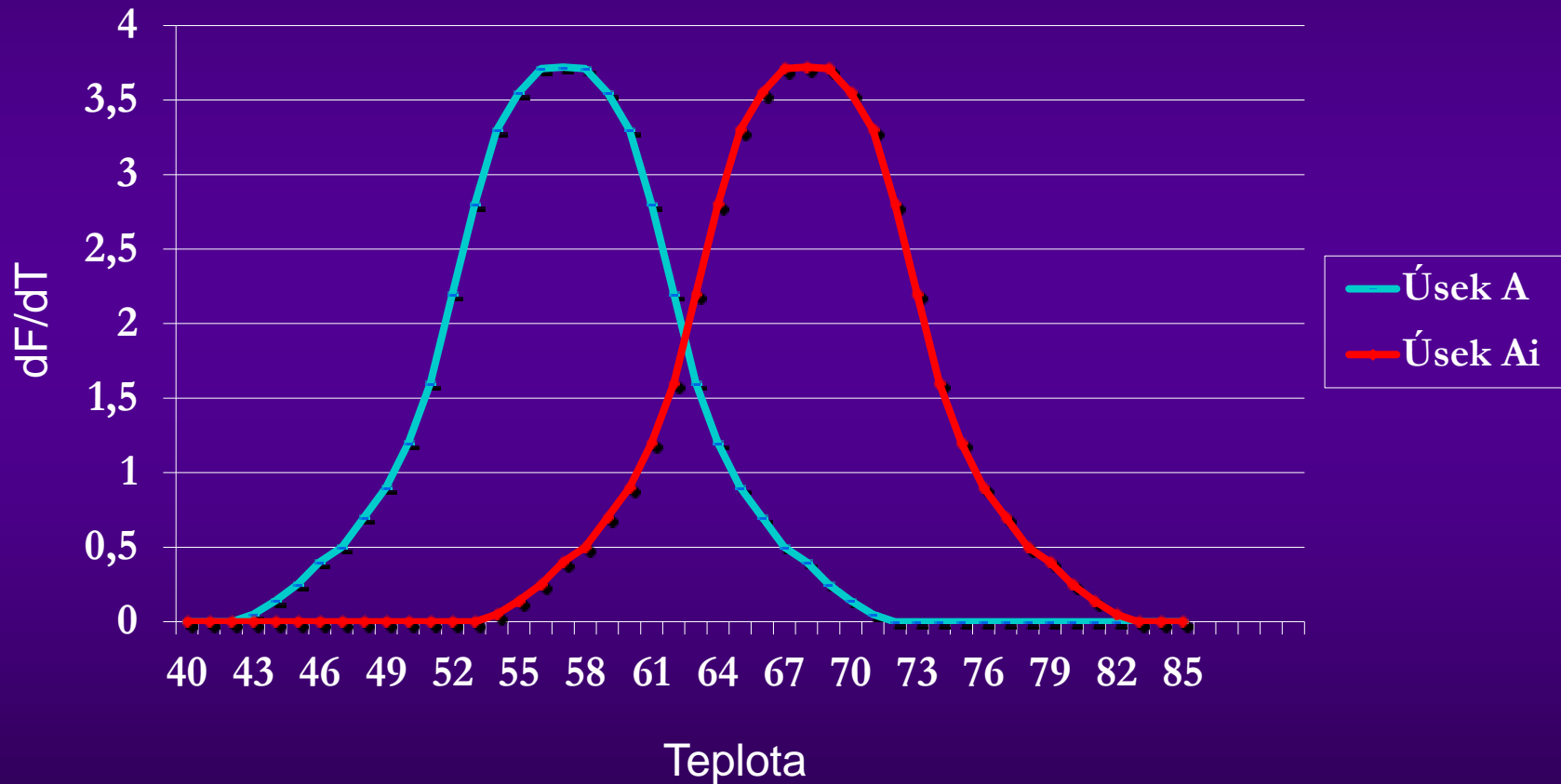


Výsledek analýzy T_m pomocí SYBR Green I

Základní data



Vyhodnocení detekce pomocí SYBR Green I – analýza T_m



Výhody a nevýhody 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

Využívají značené DNA sondy

Metody jsou založené na hybridizaci primerů a sondy specifické pro hledaný úsek DNA

Hlavní typy značených DNA 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

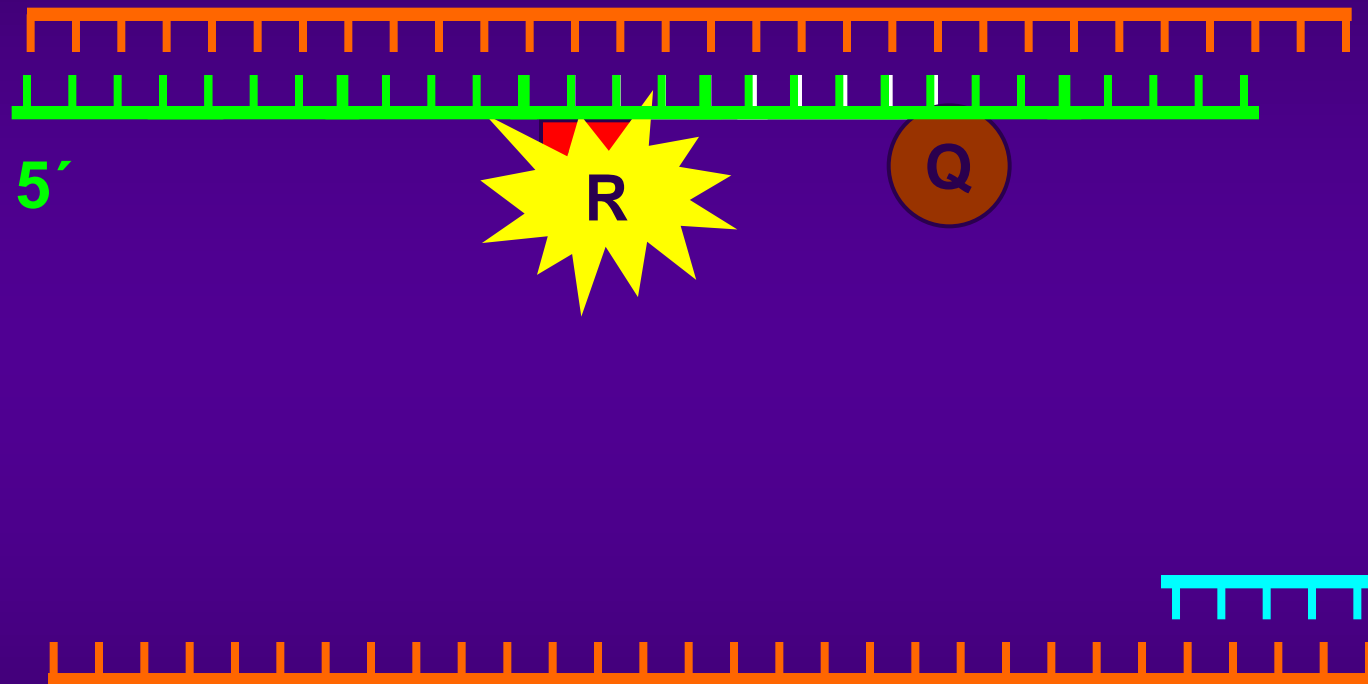
Při jakémkoli formátu je výsledek pořád stejný



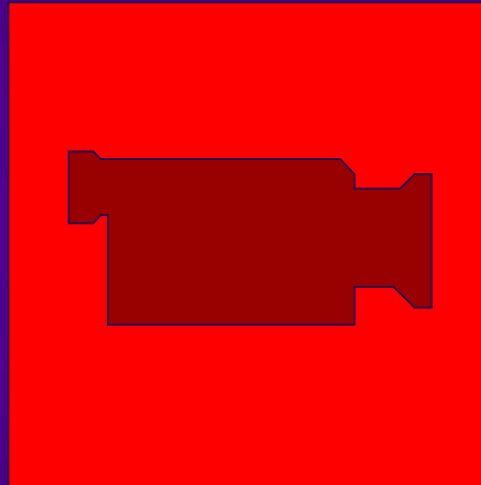
TaqMan sonda

- monitoruje 5' → 3' exonukleázový efekt Taq DNA polymerázy na vzniklý duplex mezi sondou a jejím komplementárním řetězcem na PCR produktu
- Taq DNA polymeráza uvolňuje a hydrolyzuje sondu hybridizovanou v průběhu syntézy správného řetězce na matrici DNA
- fluorofor s excitační energií (R) a fluorofor (Q) pohlcující energii, tzv. „quencher dye“

Schéma fungování TaqMan sondy



TaqMan sonda - animace



Kvalitativní detekce 2 úseků DNA v jedné reakci (duplex PCR) pomocí TaqMan sond - modelový příklad -

Úsek A o délce 100 bp ohraničený primery a označený sekvenčně specifickou sondou, která nese fluorofor s emisním maximem při 530 nm

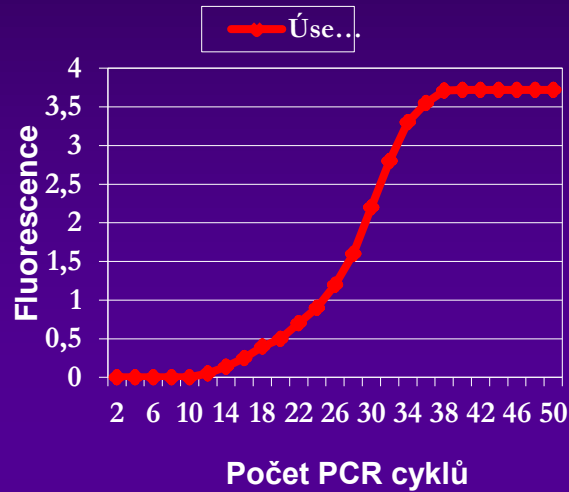
CCTCCTGCCTCTACCAATCGCCAGT**CAGGAAGGCAGCCTACCCCGCTGACTCC**
ACCTTTGAGAGACACTCATCCTCAGGCCATGCAGT**GGAATTCCACAA**

Úsek B o délce 100 bp ohraničený primery a označený sekvenčně specifickou sondou, která nese fluorofor s emisním maximem při 560 nm

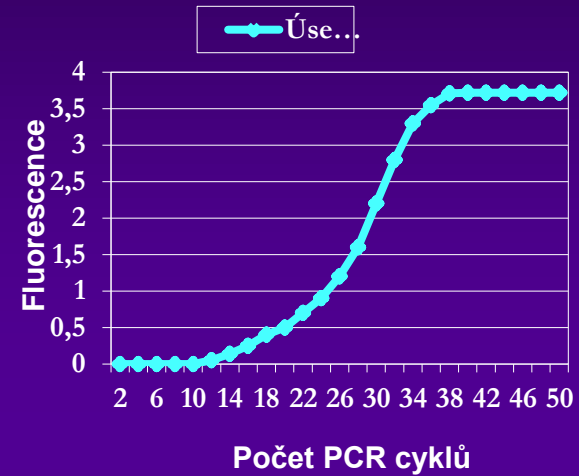
TTGTTCACCTCACCATACTGCTCTCAGG**CAAGCAATTCTTTGCTGGG****GGGAACT**
AATGACTCTAGCTACCTGGGTGGGTGGTAATTTGGAAGATCCAACATC

Výsledek detekce pomocí TaqMan sond

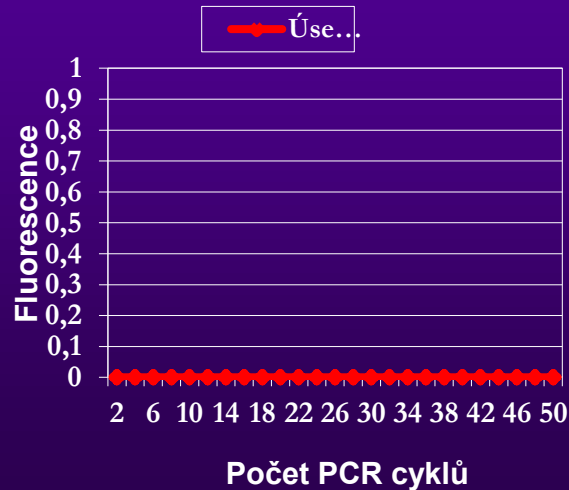
Snímací kanál 530 nm



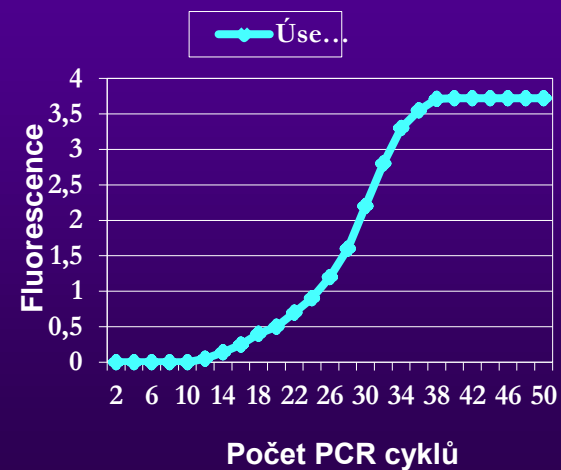
Snímací kanál 560 nm



Snímací kanál 530 nm



Snímací kanál 560 nm



Kvantitativní detekce pomocí Real Time PCR s využitím TaqMan sond - modelový příklad -

Úsek A o délce 100 bp ohraničený primery a označený sekvenčně specifickou sondou, která nese fluorofor s emisním maximem při 530 nm

CCTCCTGCCTCTACCAATCGCCAGTCAGGAAGGCAGCCTACCCCGCTGACTCC
ACCTTTGAGAGACTCATCCTCAGGCCATGCAGTGGGAATTCCACAA

Jaký je počet kopií (koncentrace) úseku A ve vzorku 1?

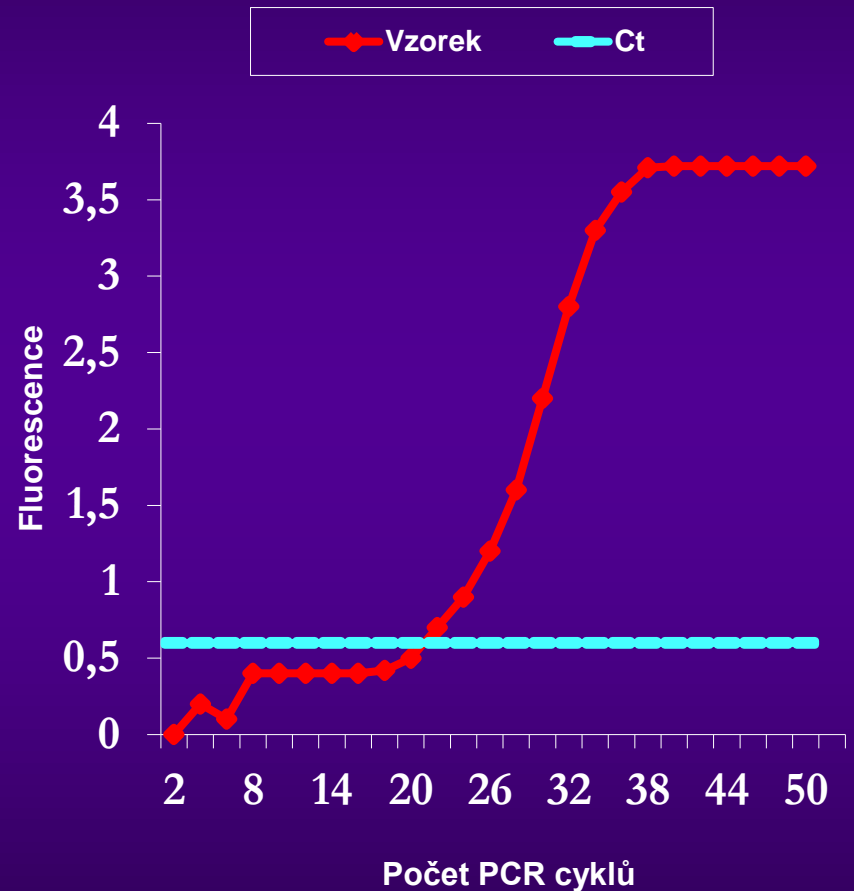
Jaký je počet kopií (koncentrace) úseku A ve vzorku 2?

Postup kvantifikace pomocí Real Time PCR s využitím TaqMan sondy

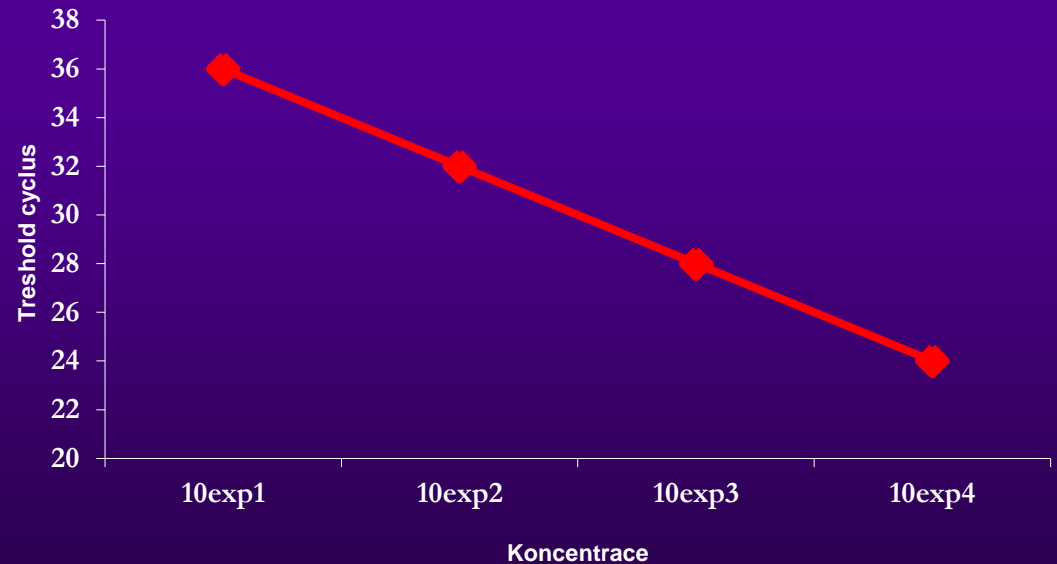
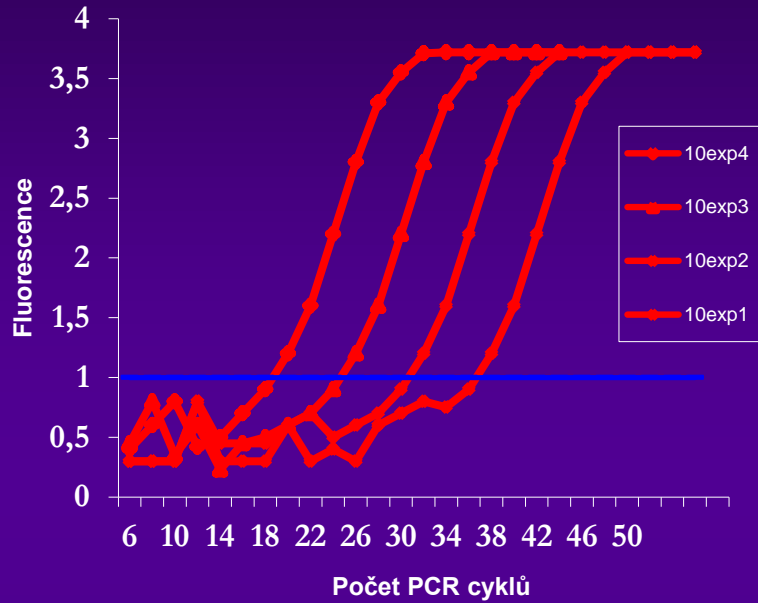
- 1. Stanovení Ct (Treshold cyklus)**
- 2. Vytvoření kalibrační křivky**
- 3. Kvantifikace neznámého vzorku pomocí vložené kalibrační řady**

Stanovení Ct - Treshold cyclus -

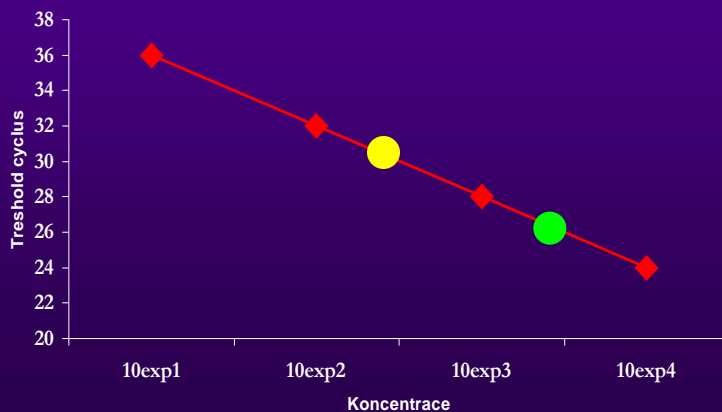
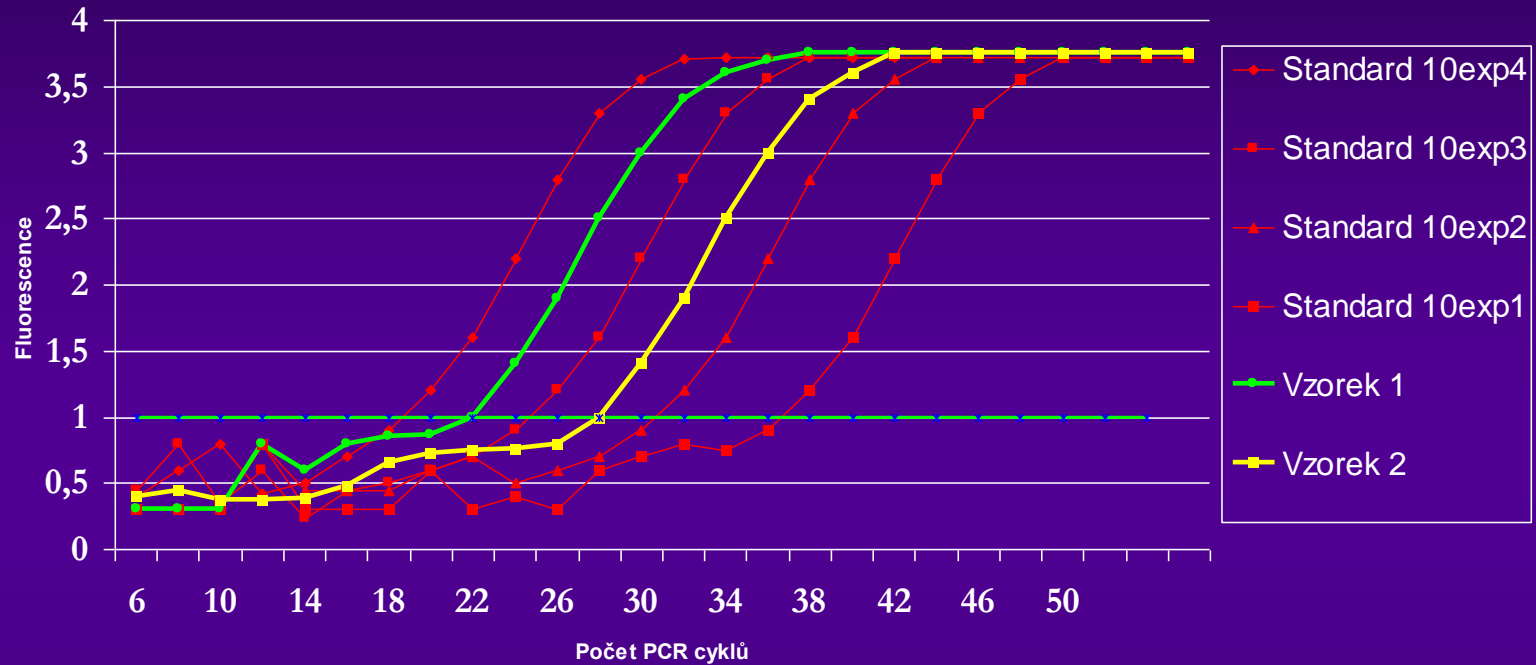
- Ct – číselná hodnota udávající PCR cyklus ve kterém je přístrojem detekována první změna fluorescence v amplifikovaném vzorku
- Číselnou hodnotu Ct určuje přístroj automaticky



Vytvoření kalibrační křivky



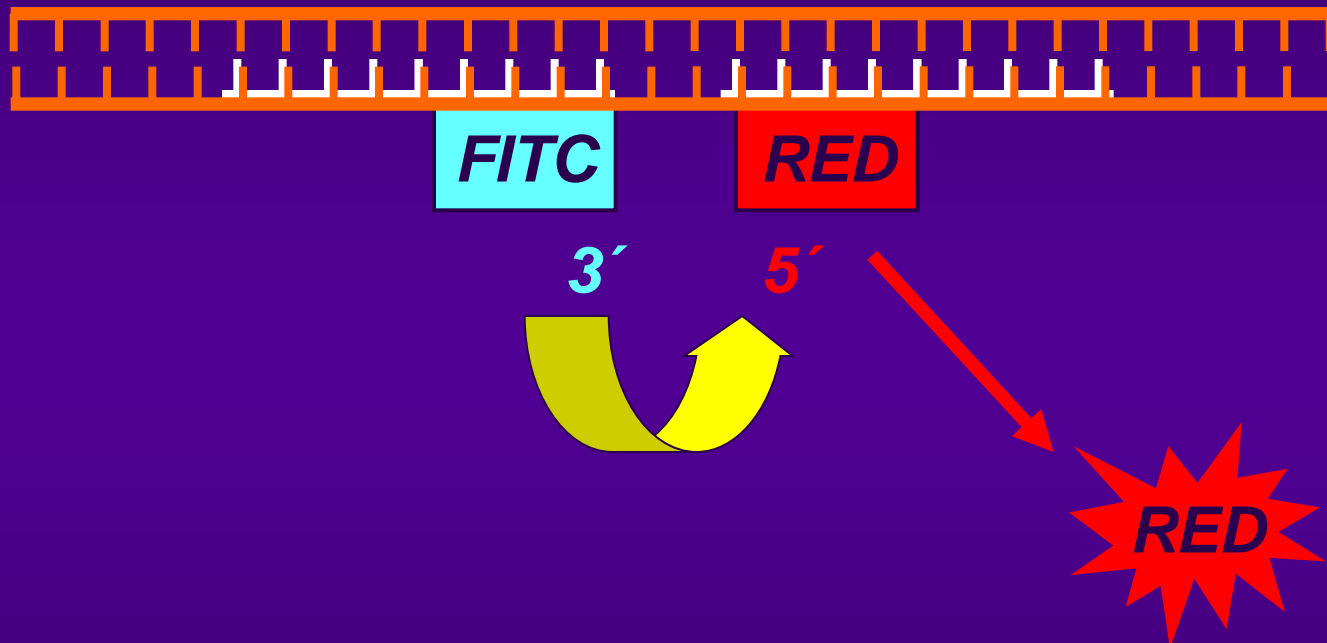
Kvantifikace neznámého vzorku pomocí vložené kalibrační řady



| 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

CCTCCTGCCTCTACCAATCGCCAGTCAGGAAGGCAGCCTACCCCGCTGACTCC
ACCTTTGAGAGACACTCATCCTCAGGCCATGCAGTGGAATTCCACAACCTTCCA
CCAAACTCTGCAAGATCCCAGAGTGAGAGGCCTGTATCTCCCTGCTGGTGGCT
CCAGTTCAGGAACAGTAAACCCTGTTCCGACTACTGCCTC

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

CCTCCTGCCTCTACCAATCGCCAGTCAGGAAGGCAGCCTACCCCGCTGACTCC
ACCTTTGAGAGCCACTACACTCATCCTCAGGCCATGCAGTGGAATTCCACAACC
TTCCACCAAACCTCTGCAAGATCCCAGAGTGAGAGGCCTGTATCTCCCTGCTGGT
GGCTCCAGTTCAGGAACAGTAAACCCTGTTCCGACTACTGCCTC

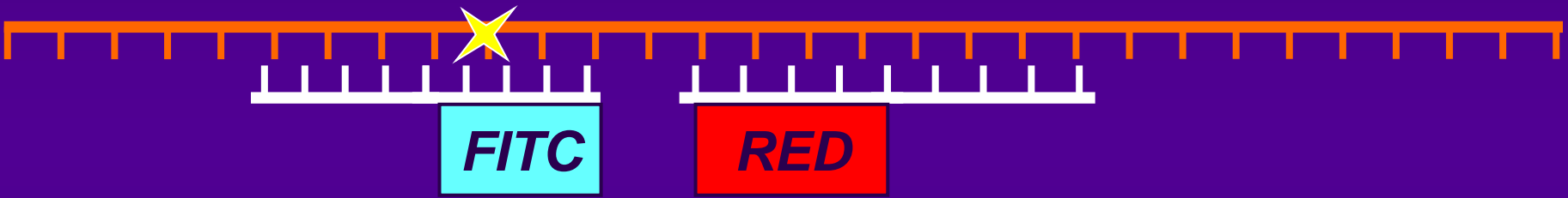
Návrh sond pro detekci SNP pomocí FRET

GAGAGATCACTCAT-FITC RED-CCATGCAGTGGA

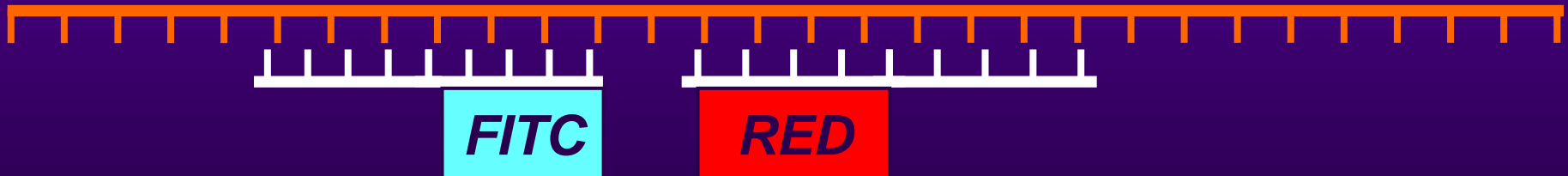
GACTCCACCTTTGAGAGATCACTCA(C)TCCTCAGGCCATGCAGTGGA

Princip analýzy SNP pomocí FRET sond

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

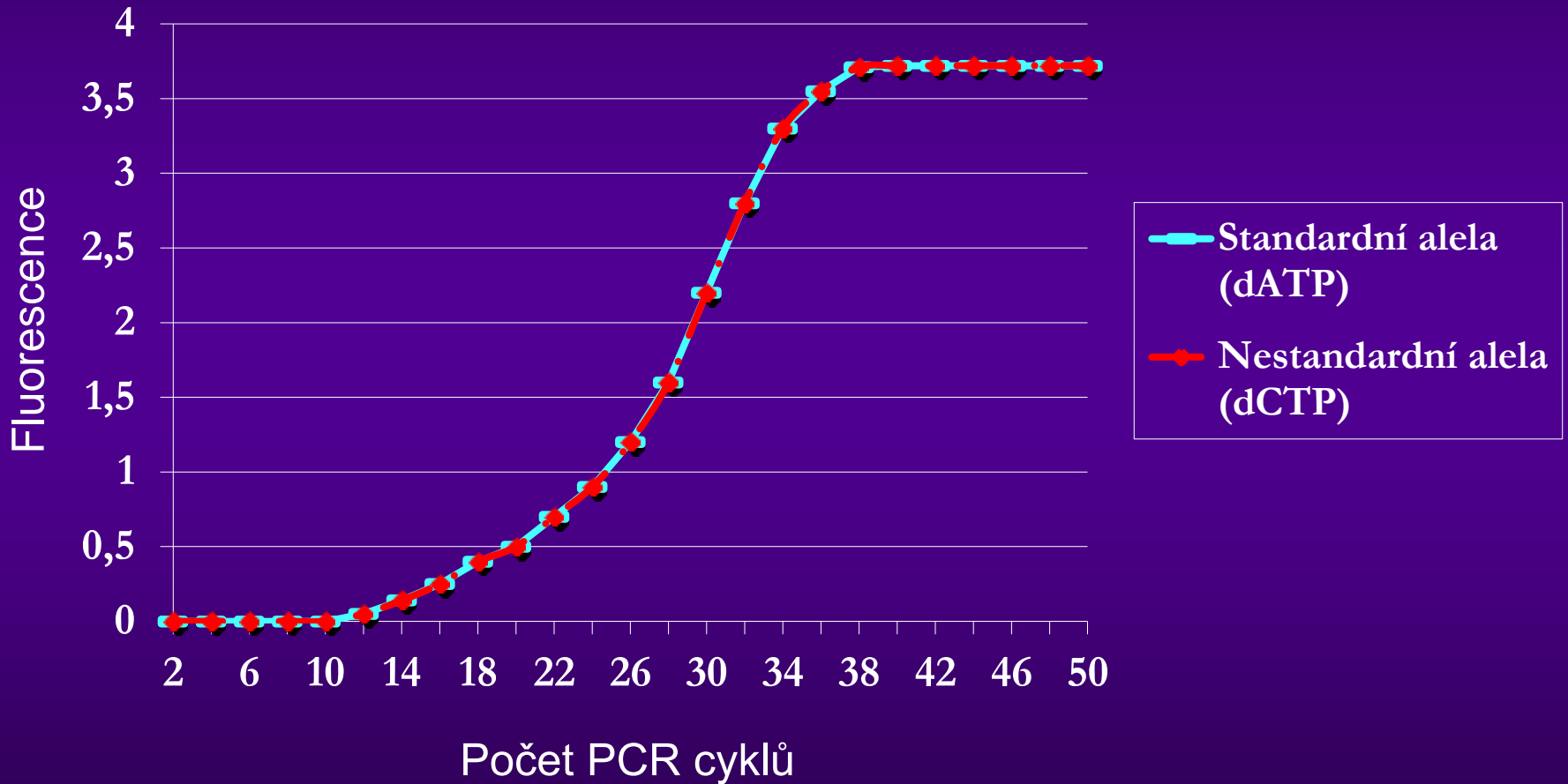


Standardní alela (dATP)
 $T_m = 62^\circ\text{C}$

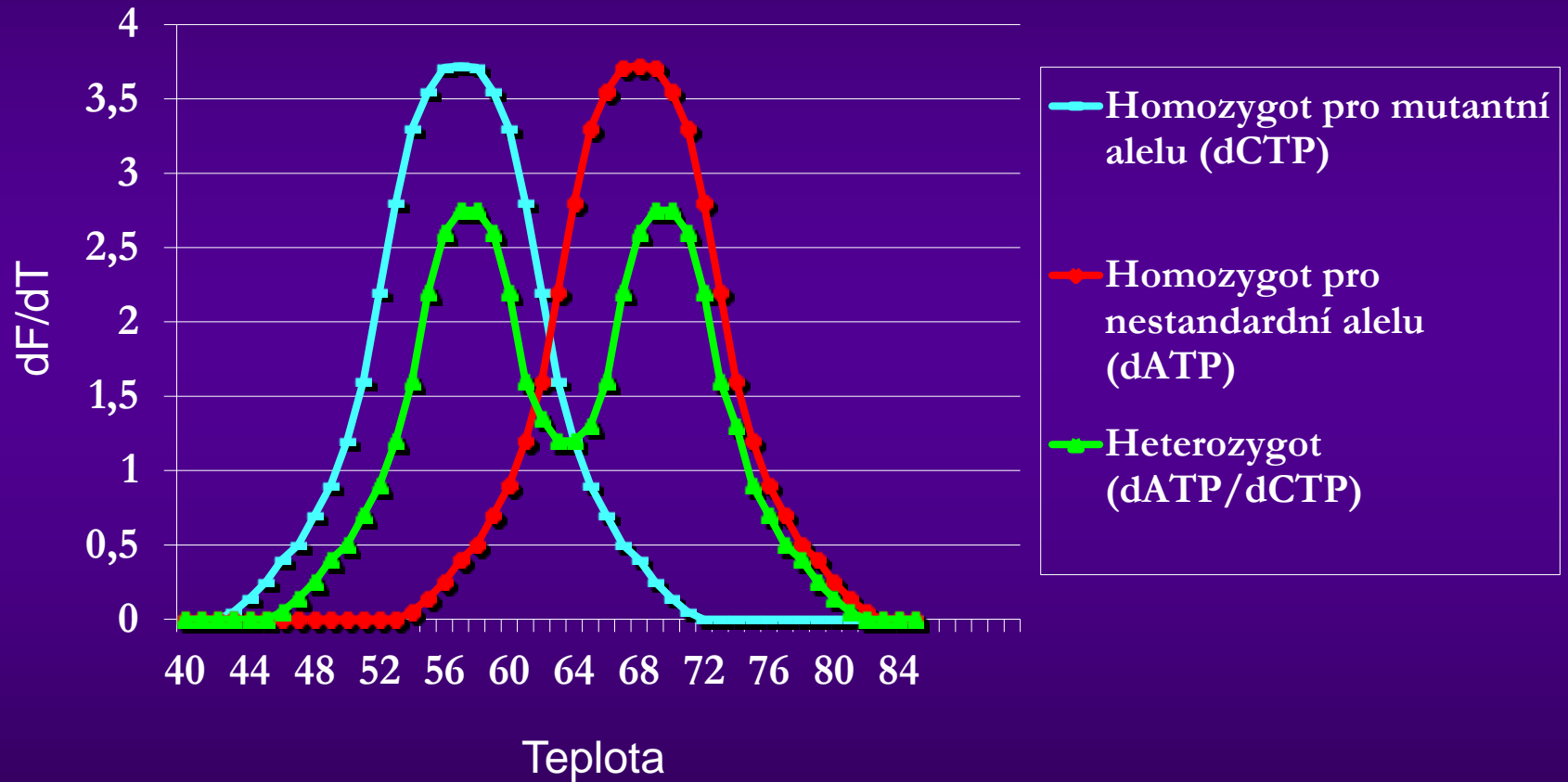


Výsledek detekce SNP pomocí FRET

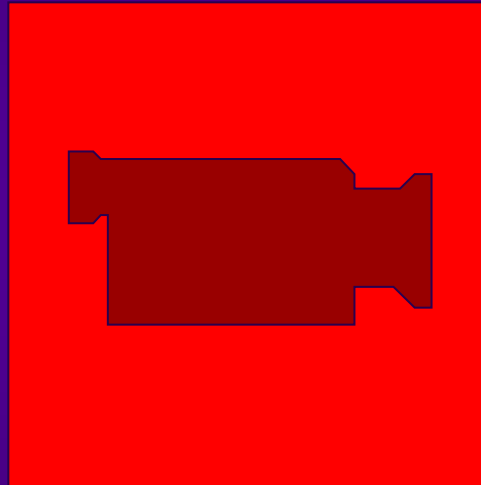
Základní data



Vyhodnocení detekce SNP s použitím FRET pomocí analýzy T_m

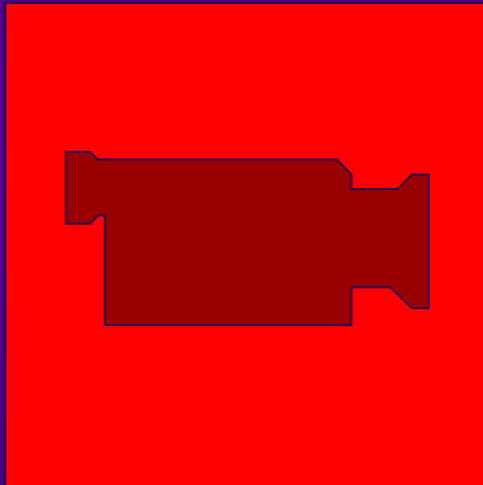


Light-up sonda

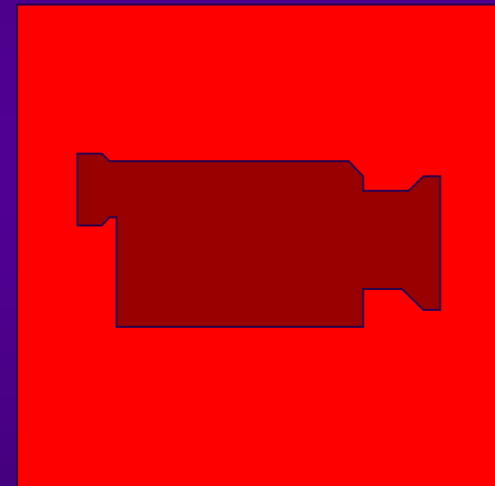


Strukturní sondy

Molecular Beacons



Scorpions



Real Time přístroje





Je možné metodou real-time kvantifikovat také RNA?

Samozřejmě, použiješ metodu RT-Real-Time PCR



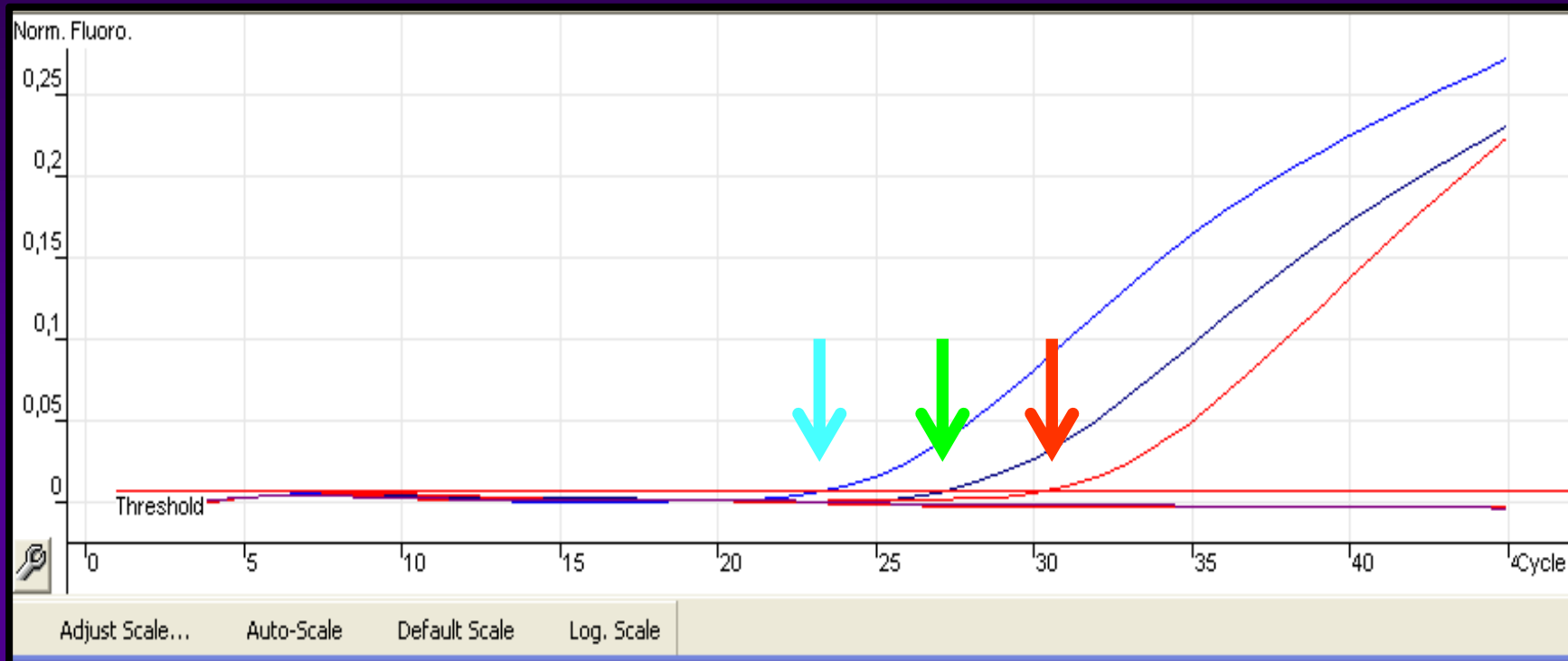
Real-time PCR v mikrobiologii

- Umožňuje všechny formáty klasické PCR
- Stejná nebo vyšší citlivost bez manipulace se vzorky – snížení rizika kontaminace
- Je více specifická – 2 primery + sonda
- Umožňuje stanovit počet mikroorganismů ve vzorku (kvantifikace)
- Není třeba provádět elektroforézu
- Automatizace procesu pro klinické využití

***Využití Real Time PCR ve formátu
TaqMan pro kvalitativní detekci
M. tuberculosis komplex***



Naměření a hodnocení dat

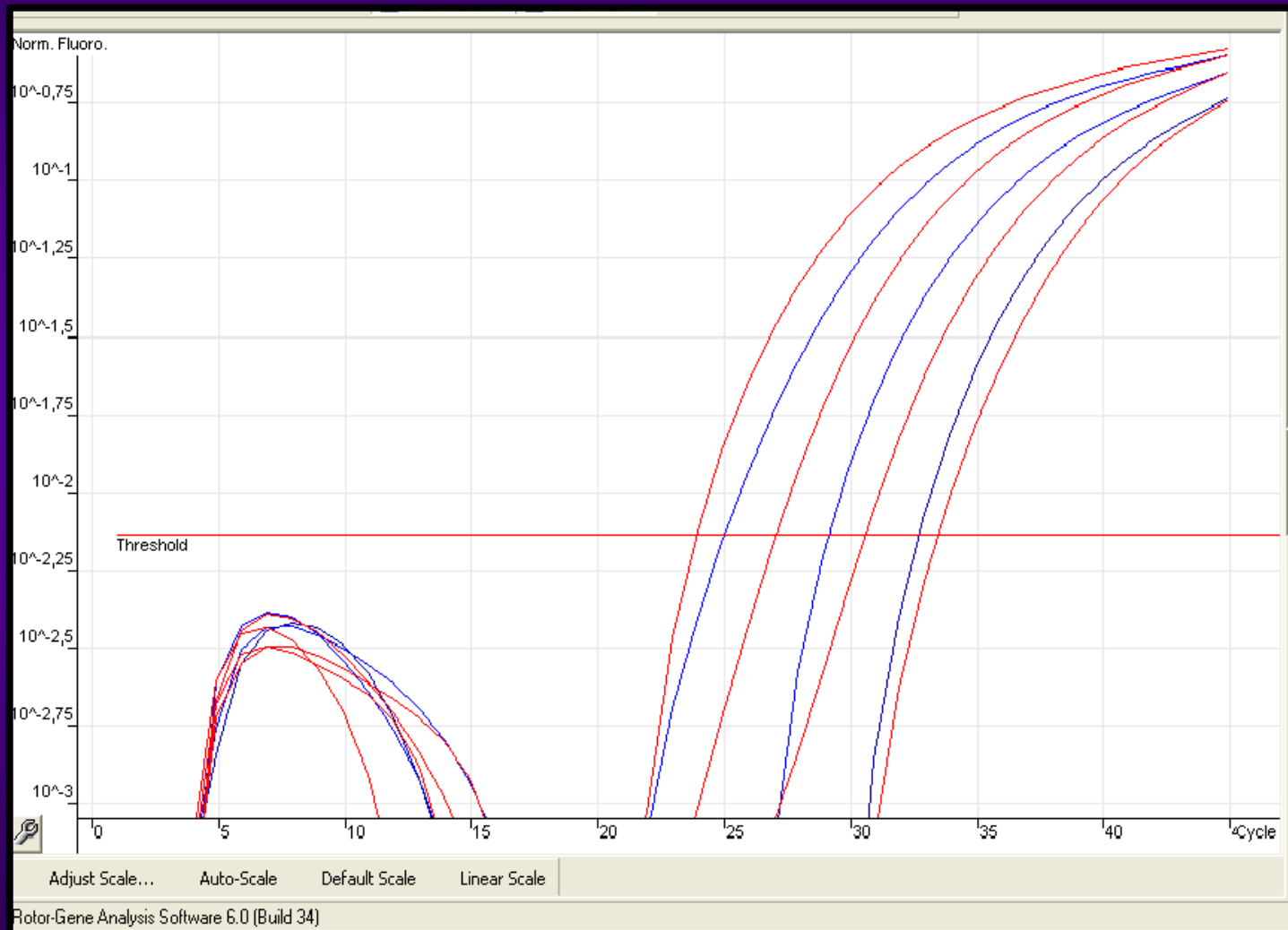


| Name | Type | Ct |
|--------------------|------------------|-------|
| Sample 1 | Unknown | 23,78 |
| Sample 2 | Unknown | 27,55 |
| Sample 3 | Unknown | |
| PK 10 ² | Positive Control | 30,68 |
| NK | Negative Control | |

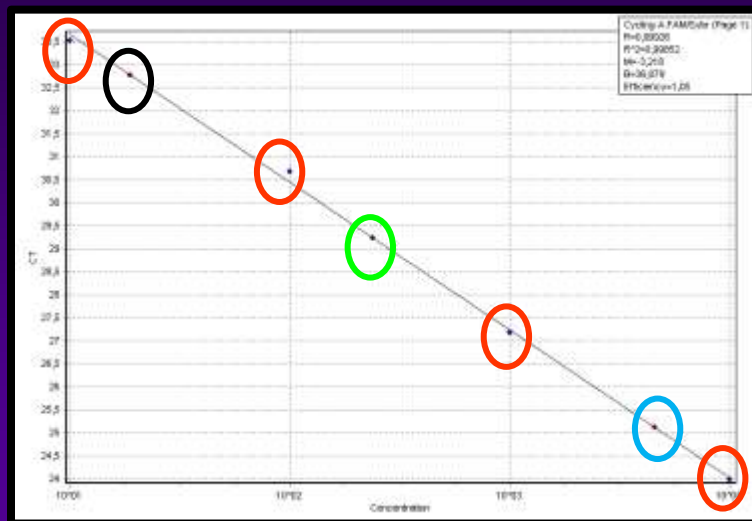
Využití Real Time PCR ve formátu TaqMan pro detekci a kvantifikaci HCMV



Naměření dat



Kvantifikace a odečtení výsledků



| Name | Type | Ct | Given Conc (copies/ml) | Calc Conc (copies/ml) |
|--------------------|----------|-------|------------------------|-----------------------|
| Sample 1 | Unknown | 25,11 | | 4,53E+03 |
| Sample 2 | Unknown | 29,23 | | 2,39E+02 |
| Sample 3 | Unknown | 32,78 | | 1,88E+01 |
| PK 10 ⁴ | Standard | 23,97 | 1,00E+04 | 1,03E+04 |
| PK 10 ³ | Standard | 27,16 | 1,00E+04 | 1,05E+03 |
| PK 10 ² | Standard | 30,68 | 1,00E+04 | 8,47E+01 |
| PK 10 ¹ | Standard | 33,53 | 1,00E+04 | 1,10E+01 |

A dáme si nějaký příklad



Stanovte koncentraci cytomegaloviru (v počtu virionů na mililitr) ve 4 vzorcích na základě dat uvedených v následující Tabulce I

Tabulka I

| Vzorek | Ct | Počet virionů/μl |
|--------------------|-----------|-------------------------|
| PK 10 ⁴ | 22,52 | 1,300 x 10 ⁴ |
| PK 10 ³ | 27,86 | 6,373 x 10 ² |
| PK 10 ² | 30,95 | 1,119 x 10 ² |
| PK 10 ¹ | 35,09 | 1,078 x 10 ¹ |
| Vzorek 1 | 34,86 | |
| Vzorek 1 | 35,13 | |
| Vzorek 1 | 35,44 | |
| Vzorek 2 | 38,02 | |
| Vzorek 2 | - | |
| Vzorek 2 | 38,51 | |
| Vzorek 3 | 24,76 | |
| Vzorek 3 | 24,81 | |
| Vzorek 3 | 24,36 | |

Tabulka I

| Vzorek | Ct | Počet virionů/μl |
|--------------------|-----------|-------------------------|
| PK 10 ⁴ | 22,52 | 1,300 x 10 ⁴ |
| PK 10 ³ | 27,86 | 6,373 x 10 ² |
| PK 10 ² | 30,95 | 1,119 x 10 ² |
| PK 10 ¹ | 35,09 | 1,078 x 10 ¹ |
| Vzorek 1 | 34,86 | |
| Vzorek 1 | 35,13 | |
| Vzorek 1 | 35,44 | |
| Vzorek 2 | 38,02 | |
| Vzorek 2 | - | |
| Vzorek 2 | 38,51 | |
| Vzorek 3 | 24,76 | |
| Vzorek 3 | 24,81 | |
| Vzorek 3 | 24,36 | |

- 1) Z hodnot pro standardy vytvořte kalibrační křivku (počet virionů/Ct)**
- 2) Podle odnoty Ct odečtete z kalibrační křivky počty virionů/ μ l**
- 3) Vypočítejte průměr ze dvou měření pro jednotlivé vzorky**
- 4) Přepočítejte počet virionů/ml**



Řešení pro Tabulku I

| Vzorek | Ct | Počet virionů/ μ l | Průměr | Počet virionů/ml |
|--------------------|-------|-------------------------|-------------------------|------------------|
| PK 10 ⁴ | 22,52 | 1,300 x 10 ⁴ | - | - |
| PK 10 ³ | 27,86 | 6,373 x 10 ² | - | - |
| PK 10 ² | 30,95 | 1,119 x 10 ² | - | - |
| PK 10 ¹ | 35,09 | 1,078 x 10 ¹ | - | - |
| Vzorek 1 | 34,99 | 1,230 x 10 ¹ | 1,059 x 10 ¹ | 10 590 |
| Vzorek 1 | 35,13 | 1,058 x 10 ¹ | | |
| Vzorek 1 | 35,44 | 8,888 x 10 ⁰ | | |
| Vzorek 2 | 38,02 | 2,068 x 10 ⁰ | 1,212 x 10 ⁰ | 1 212 |
| Vzorek 2 | - | 0,00 | | |
| Vzorek 2 | 38,51 | 1,568 x 10 ⁰ | | |
| Vzorek 3 | 24,76 | 3,676 x 10 ³ | 3,945 x 10 ³ | 3 945 000 |
| Vzorek 3 | 24,81 | 3,574 x 10 ³ | | |
| Vzorek 3 | 24,36 | 4,586 x 10 ³ | | |

**A pro utužení znalostí ještě jeden
příklad**



Stanovte koncentraci viru Epstein-Barrové (v počtu virionů na mililitr) ve 3 vzorcích na základě dat uvedených v následující Tabulce II

- **pozor na zápis výsledků z přístroje!**
- **vzorky byly před zahájením izolace DNA 4x „zahuštěny“, počítejte s tím při přepočtu**

Tabulka II

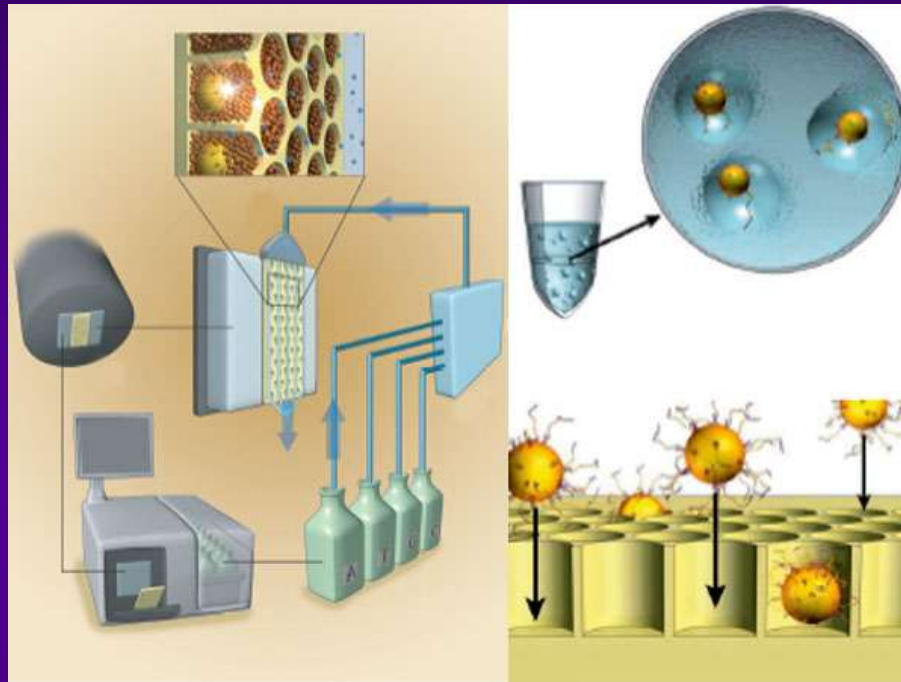
| Vzorek | Ct | Počet virionů/μl |
|--------------------|-----------|-------------------------|
| PK 10 ⁴ | 21,59 | 1.041E+04 |
| PK 10 ³ | 25,53 | 8.779E+02 |
| PK 10 ² | 28,77 | 1.149E+02 |
| PK 10 ¹ | 32,74 | 9.522E+00 |
| Vzorek 1 | 30,53 | |
| Vzorek 1 | 31,89 | |
| Vzorek 1 | 31,30 | |
| Vzorek 2 | 33,11 | |
| Vzorek 2 | 33,34 | |
| Vzorek 2 | 33,69 | |
| Vzorek 3 | 26,63 | |
| Vzorek 3 | 26,78 | |
| Vzorek 3 | 27,00 | |

Řešení pro Tabulku II

| Vzorek | Ct | Počet virionů/μl | Průměr | Počet virionů/ml |
|--------------------|-------|------------------|-----------|------------------|
| PK 10 ⁴ | 21,59 | 1.041E+04 | - | - |
| PK 10 ³ | 25,53 | 8.779E+02 | - | - |
| PK 10 ² | 28,77 | 1.149E+02 | - | - |
| PK 10 ¹ | 32,74 | 9.522E+00 | - | - |
| Vzorek 1 | 30,53 | 3,826E+01 | 2,601E+01 | 6 502,3 |
| Vzorek 1 | 31,89 | 1,624E+01 | | |
| Vzorek 1 | 31,30 | 2,353E+01 | | |
| Vzorek 2 | 33,11 | 7,559E+00 | 6 461E+00 | 1 615 |
| Vzorek 2 | 33,34 | 6,561E+00 | | |
| Vzorek 2 | 33,69 | 5,262E+00 | | |
| Vzorek 3 | 26,63 | 4,422E+02 | 3,973E+02 | 99 325 |
| Vzorek 3 | 26,78 | 4,004E+02 | | |
| Vzorek 3 | 27,00 | 3,493E+02 | | |

Budoucnost ? - emulsní PCR

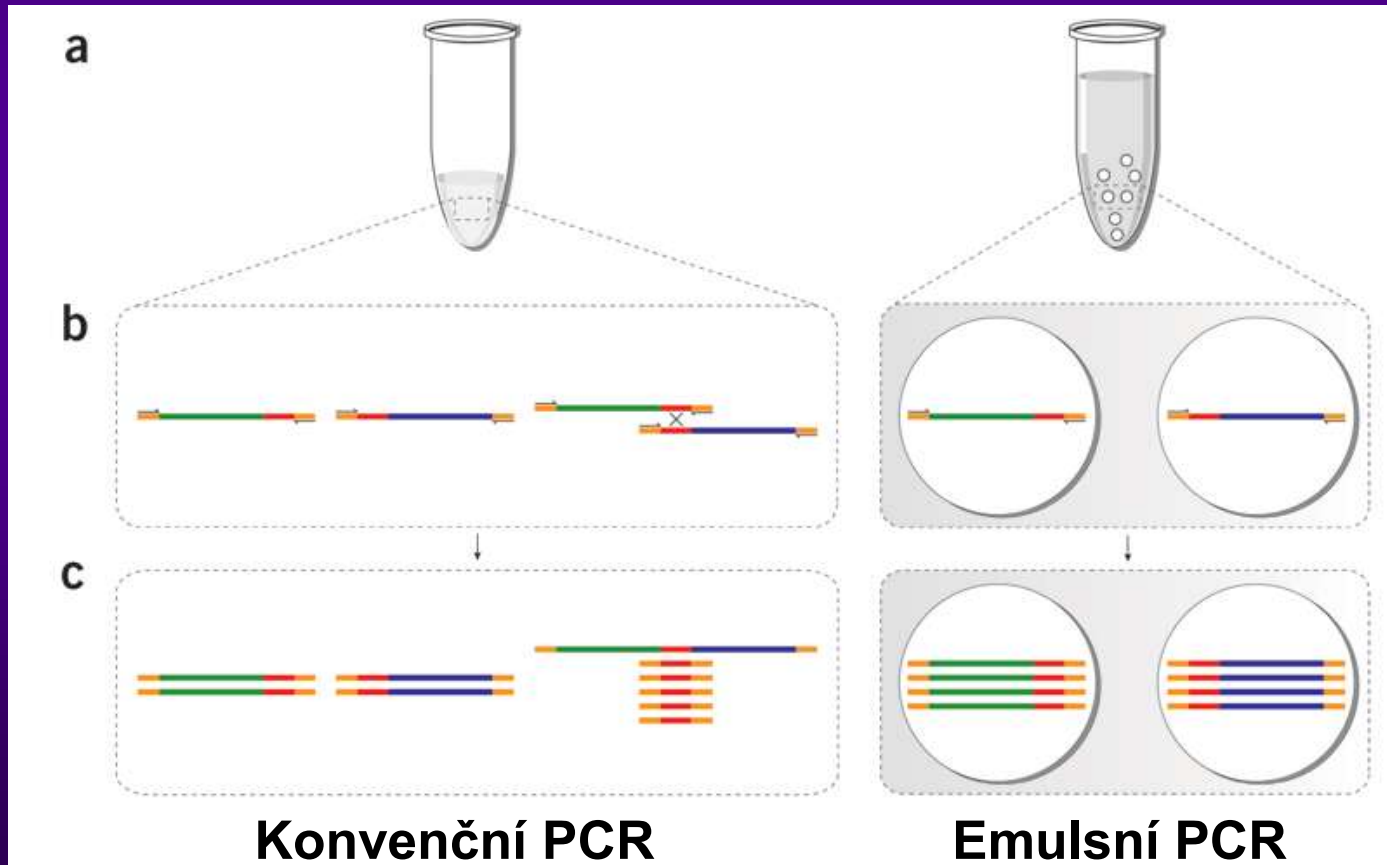
454 Life
Sciences



- Amplifikace probíhá v emulsi (voda-olej)
- Jednotlivé matrice navázány samostatně na povrch jednotlivých kapek

Emulsní PCR

- Amplikon je výsledkem jedinečné PCR
- Méně nespecifických produktů



Využití emulsní PCR

- Mapování genomů
- Vyhledávání genových polymorfismů
- Analýza mikrobiálních společenstev

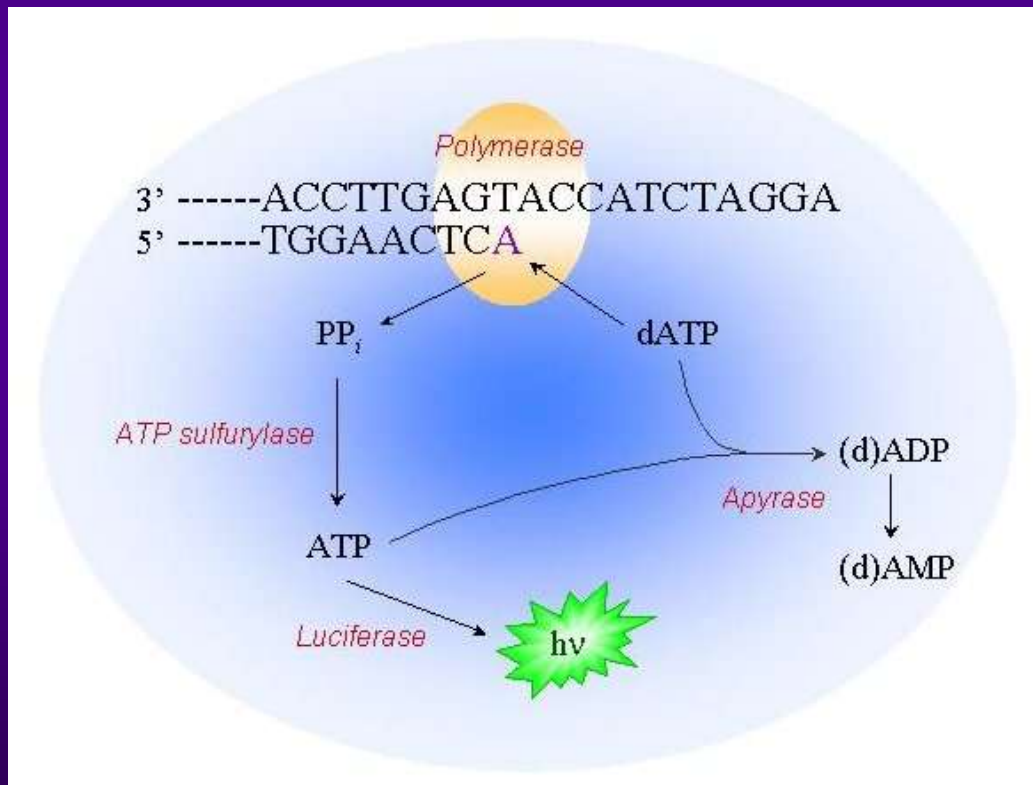


- bakterie v biofilmech
- mikroorganismy v potravinářských vzorcích
- nekultivovatelné bakterie

Používá se ve spojení s pyrosekvenováním

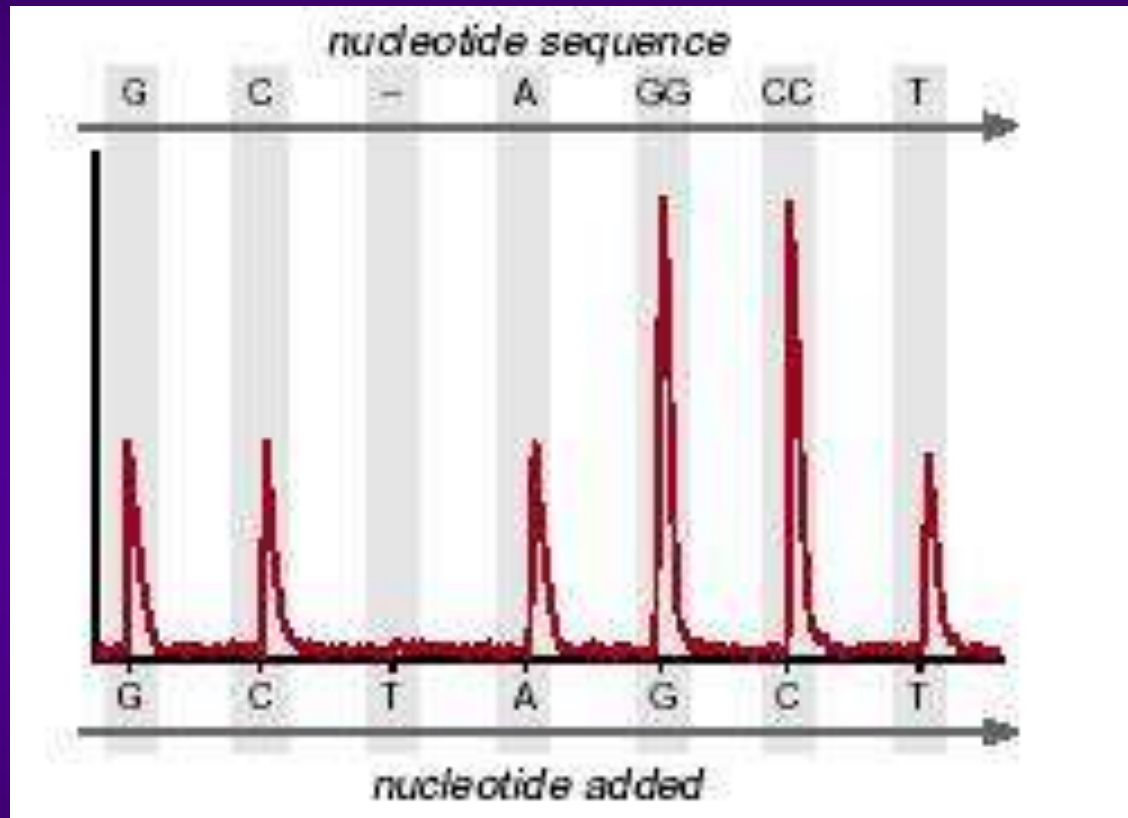
Pyrosekvenování

- Metoda popsaná Mostafa Ronaghi et al. v roce 1990
- Určena pro krátké úseky DNA, SNP a úseky methylované



- 4 enzymy
- velmi přesná
- reakce se záhy „zahltí“

Pyrosekvenování - záznam



Intenzita signálu odpovídá počtu začleněných nukleotidů

Shrnutí

- 1) Princip PCR v reálném čase**
- 2) Komponenty specifické pro real-time PCR**
- 3) Vlastnosti fluoroforů**
- 4) Vlastnosti zhášečů**
- 5) Sondy**
- 6) Nespecifické formáty**
- 7) Specifické formáty**
- 8) Příklady využití**
- 9) Emulsní PCR a pyrosekvenování**