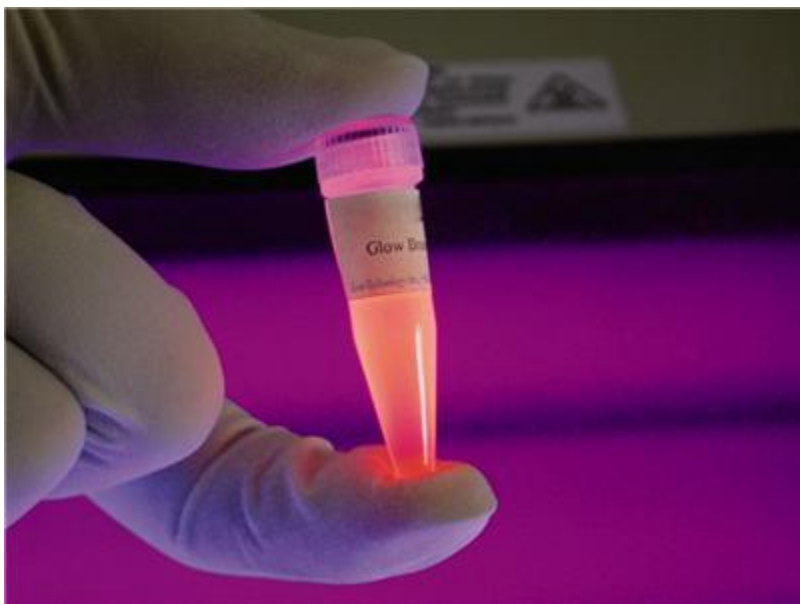
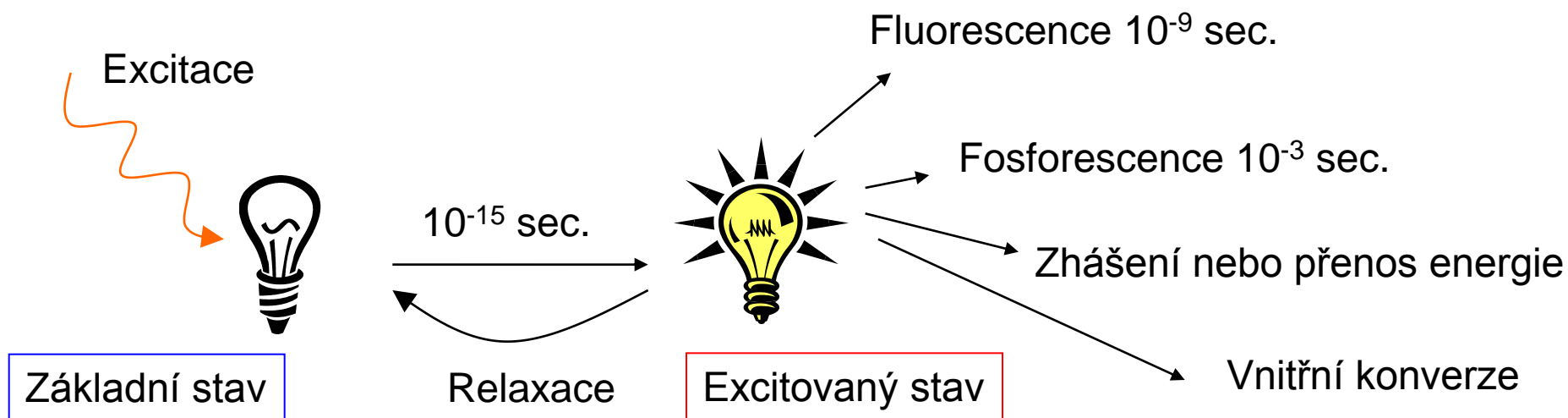


# ÚVOD DO KVANTITATIVNÍ REAL-TIME PCR



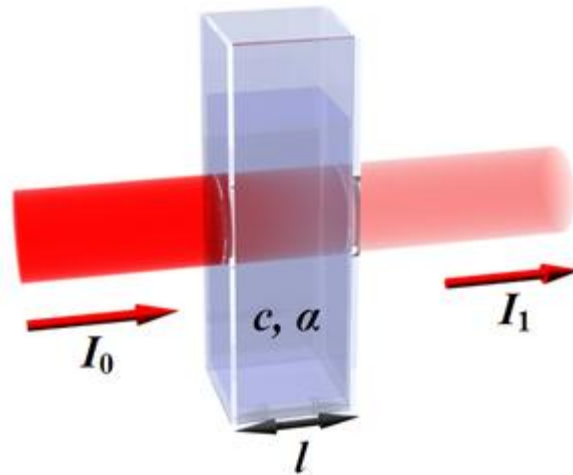
## IV. Interkalační barviva a sondy

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

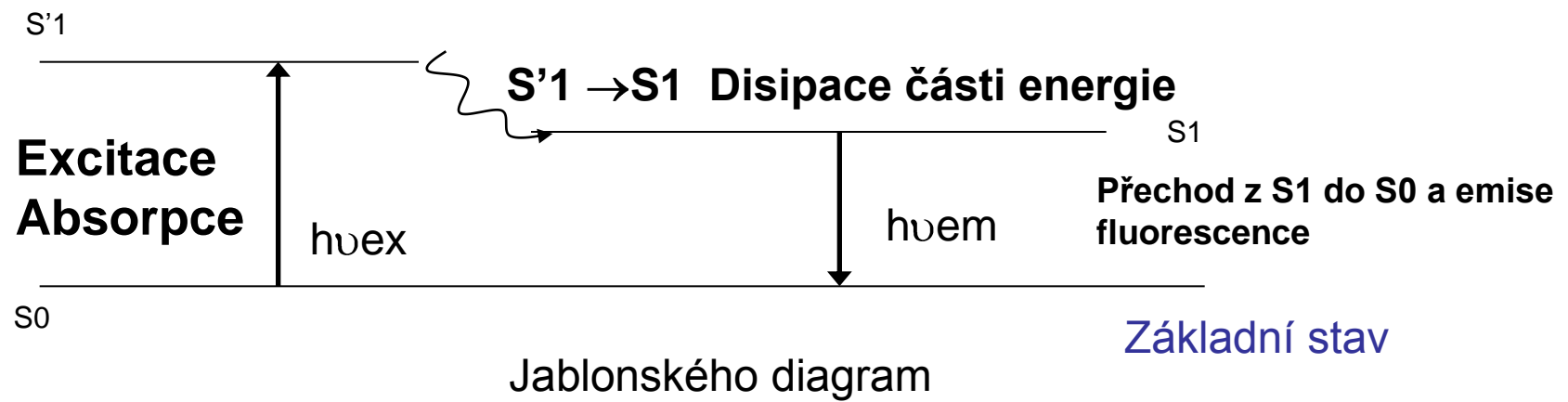
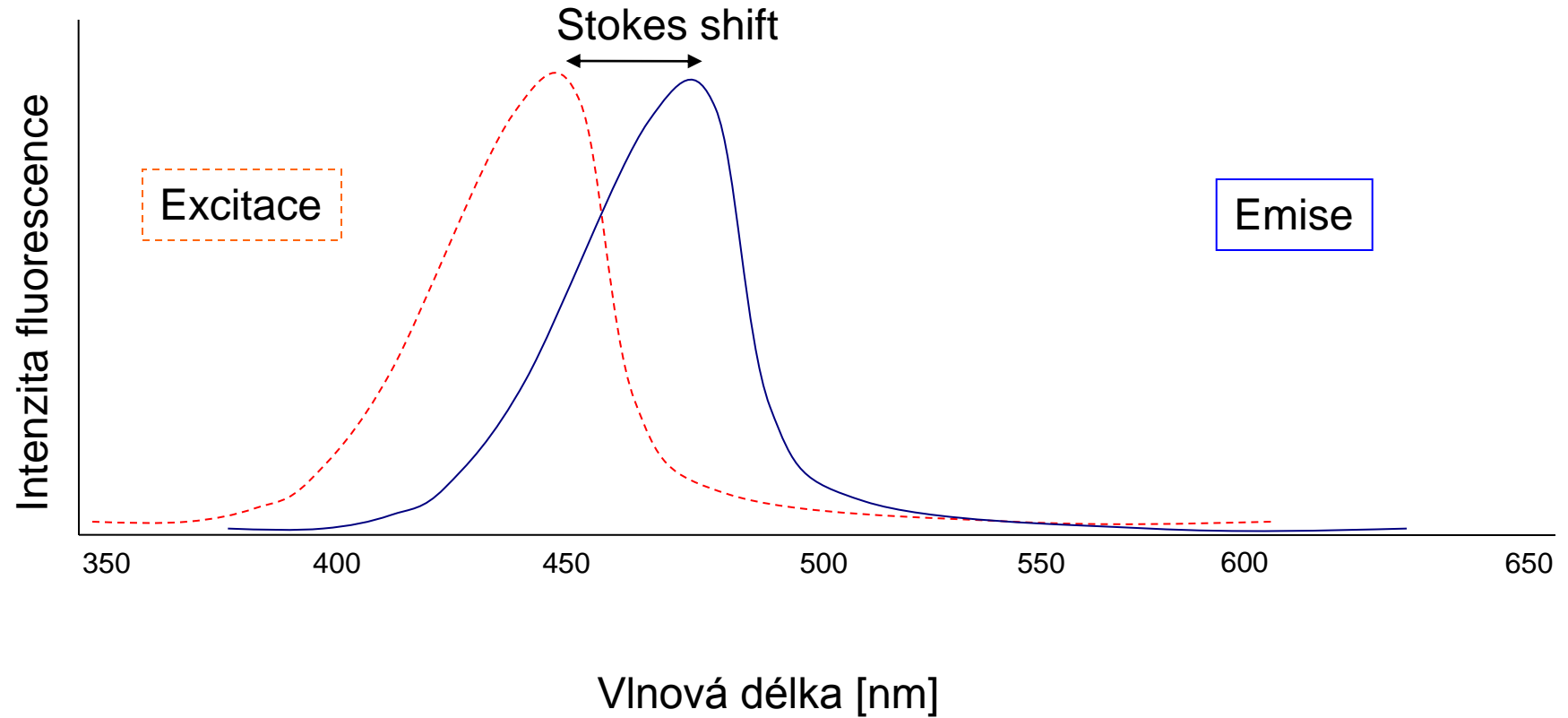


**Fluorescenční kvantový výtěžek** (Fluorescence quantum yield, QY) – poměr emitovaných fotonů k absorbovaným.

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



# Stokesův posun; Jablonského diagram



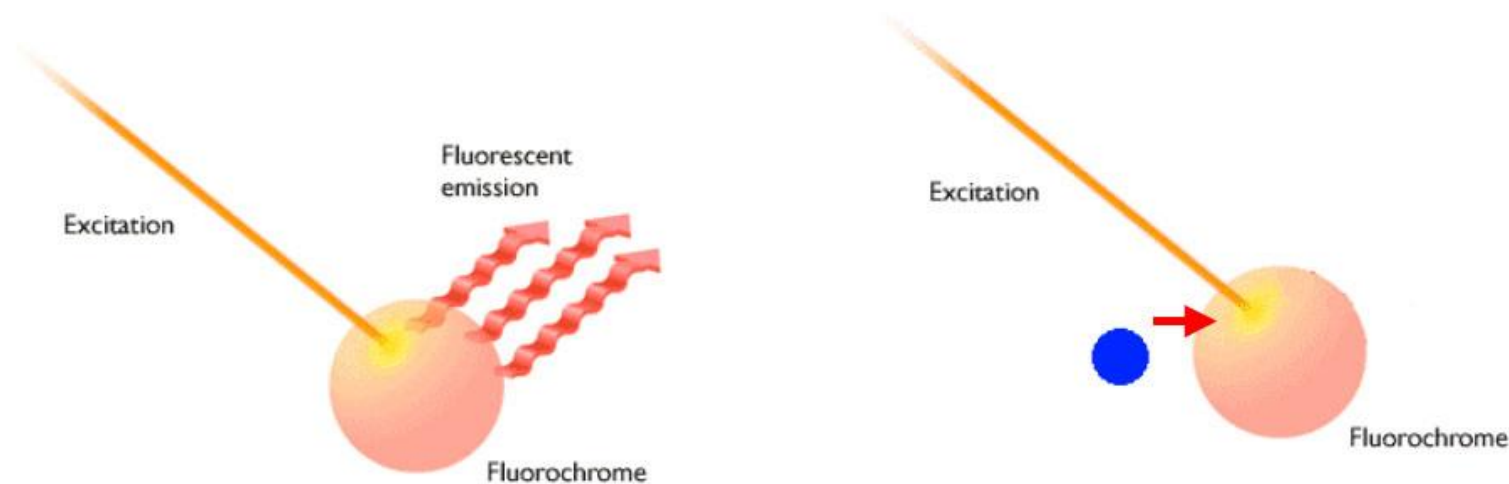
# Quenchers – Zhášeeče (Q)

## 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

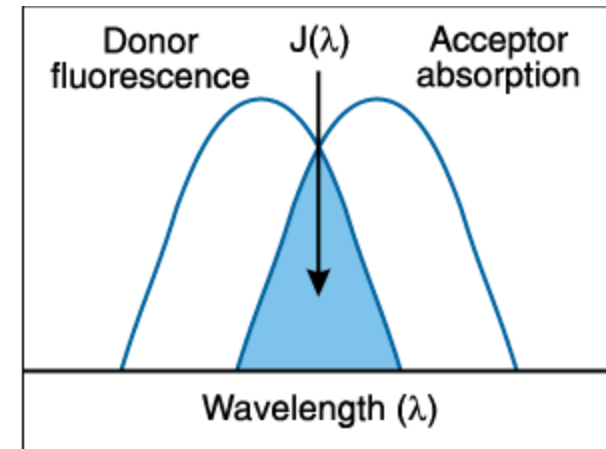
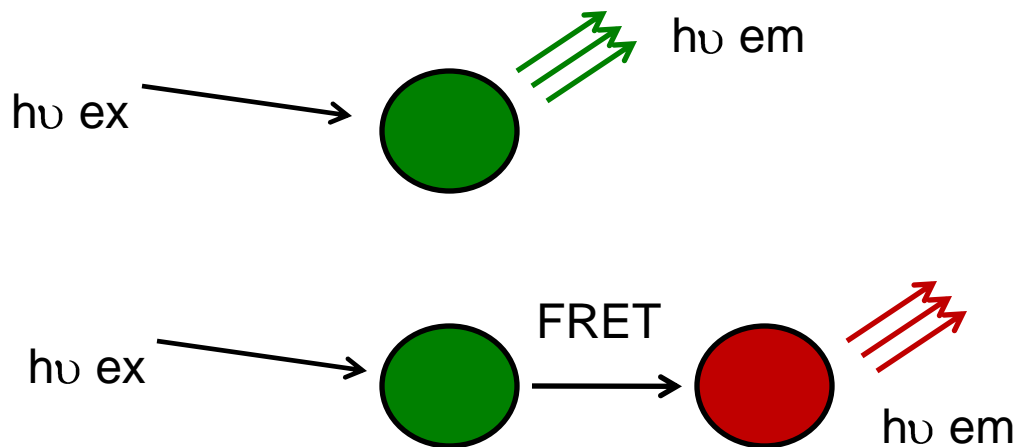
- Fluorofor velmi blízko zhášeeče – přenos energie z F na Q ve formě tepla – nenastane žádná fluorescence
- Proximální zhášeeče: molekulární kyslík,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{NO}^{3-}$



# 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



## 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



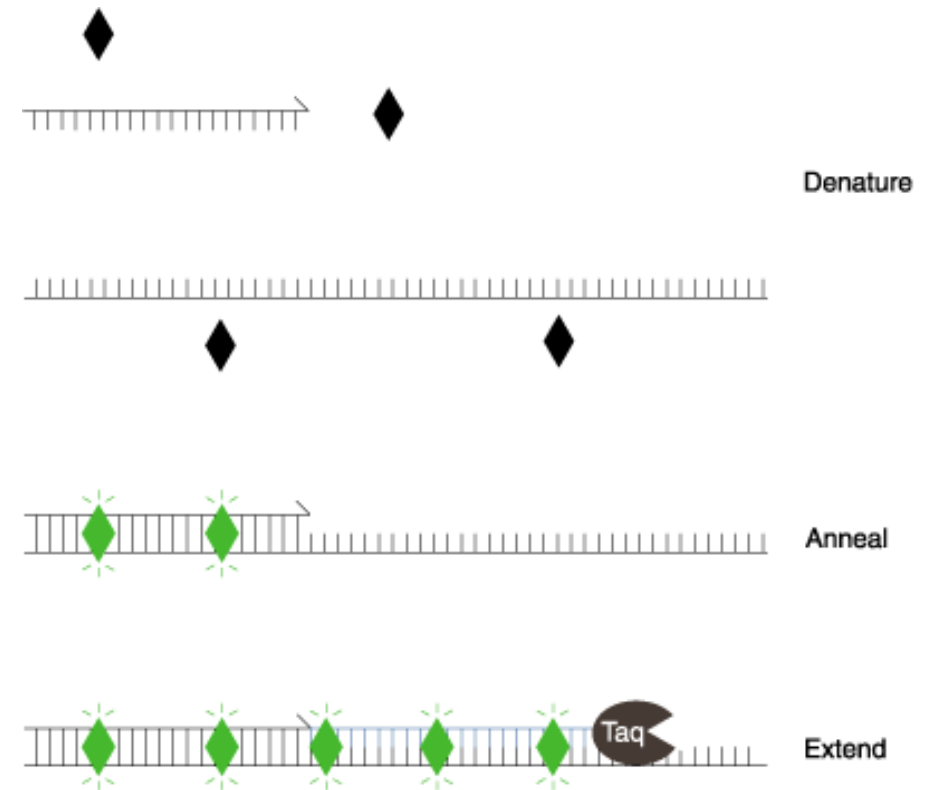
# 1. Interkalační barviva

## Reverzibilní vazba na dsDNA

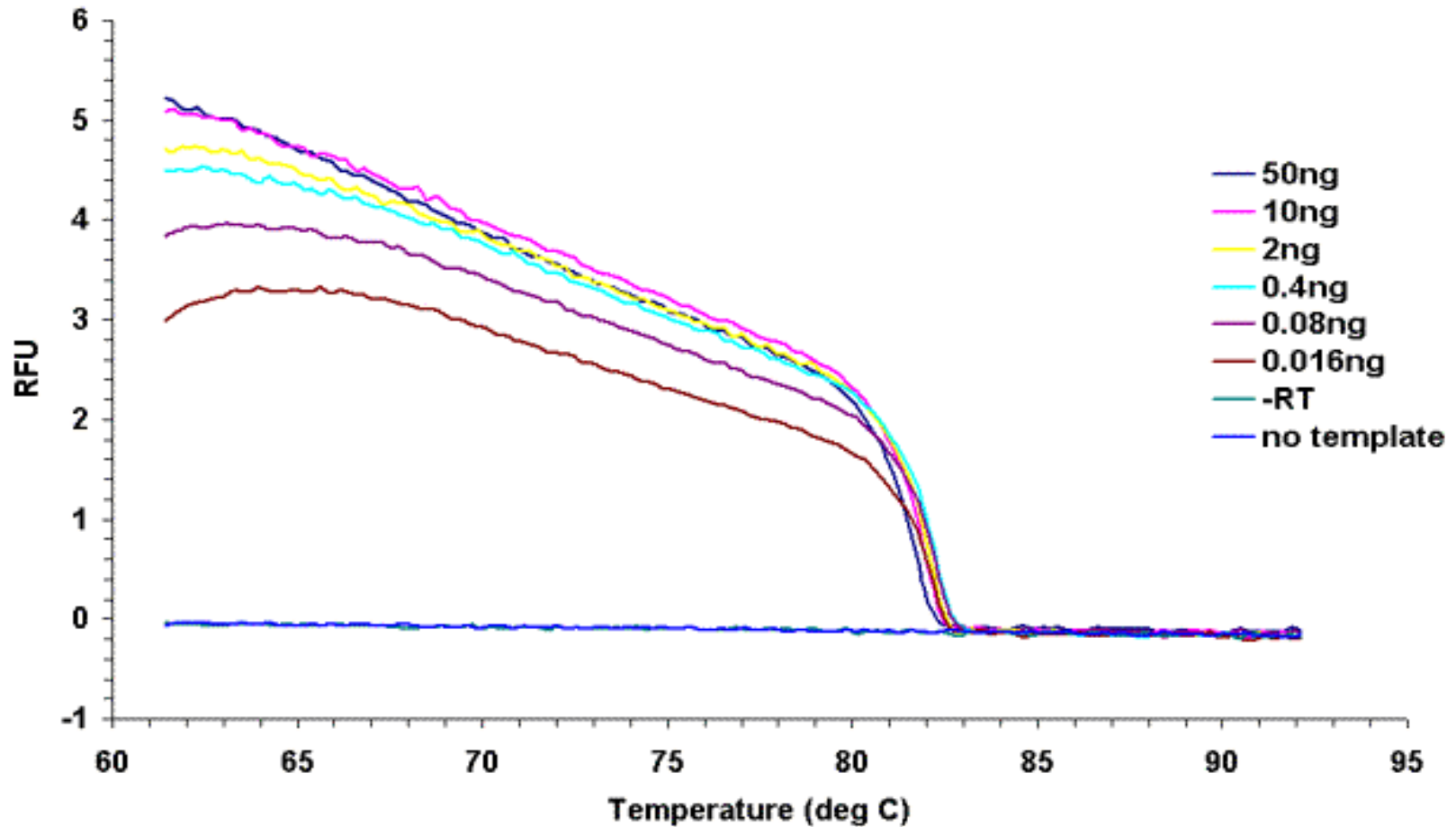
- Relativně levné
- Citlivé

### Nevýhody:

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

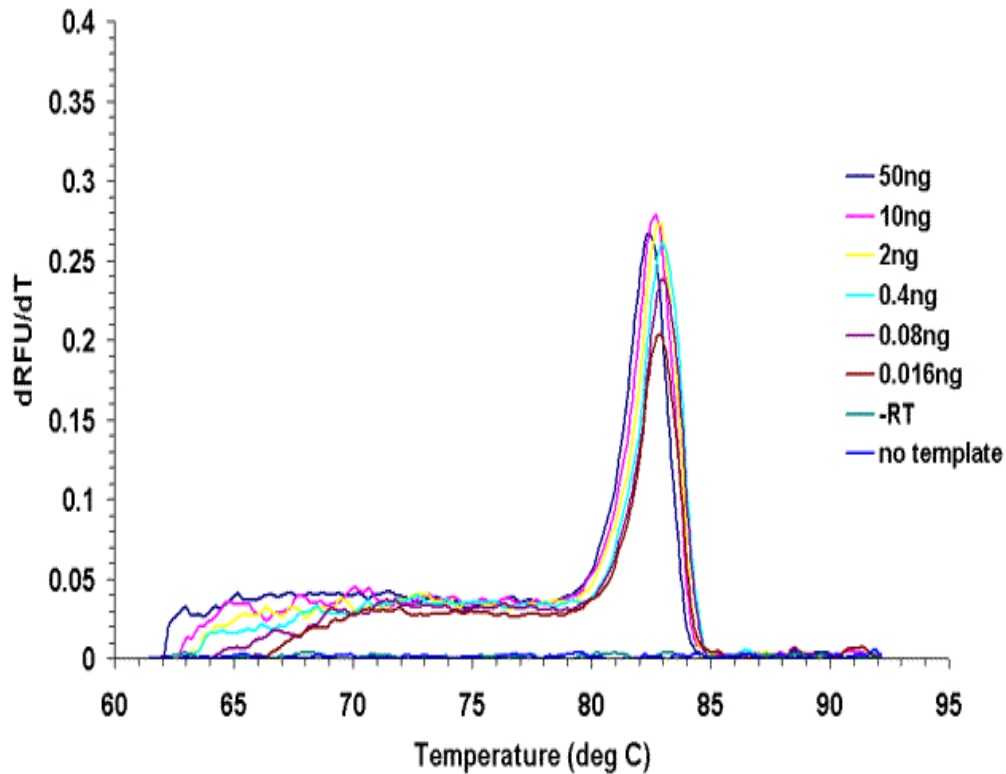


# Melting curves



Melting Curve for Standard Curve Samples in Real Time for GAPDH

# Melting curves



T<sub>m</sub> of amplicon 82.5C  
No contamination

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

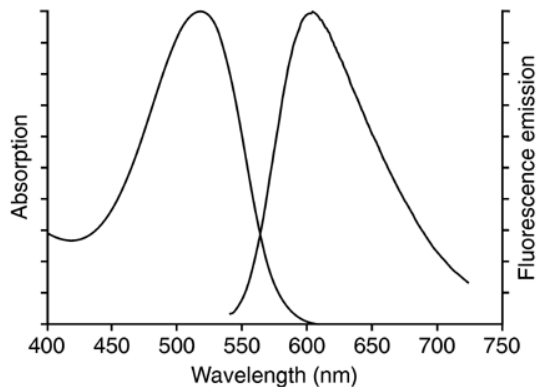
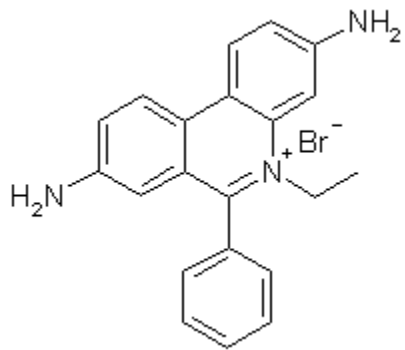
## Ethidium bromid

30ti násobný nárůst fluorescence  
po vazbě na dsDNA

Nepravidelná vazba na DNA

$Q_y = 0,15$

Mutagen ☠



## SYBR Green

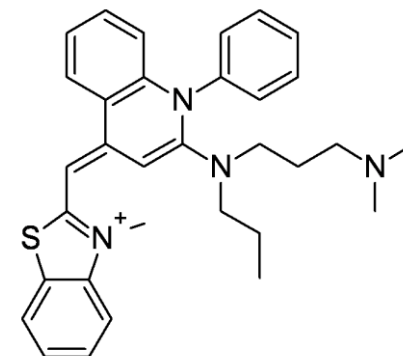
SYBR Green II

SYBR Gold

YO (Oxazole Yellow)

TO (Thiazole Orange)

PG (PicoGreen)

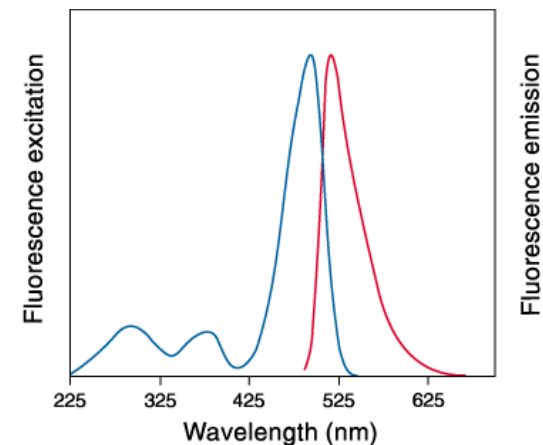


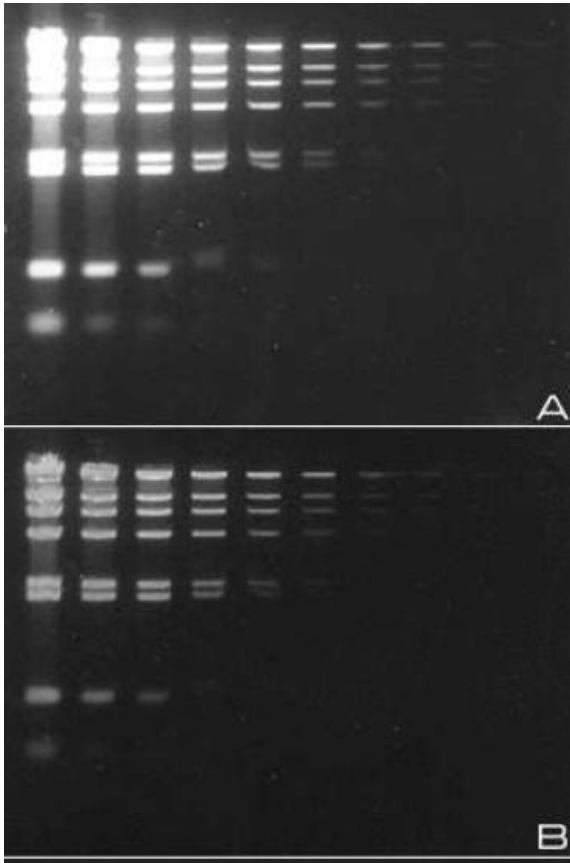
>1000 násobný nárůst  
fluorescence

Rovnoměrná vazba na DNA

$Q_y = 0,60$

Bezpečný





A) SYBR Green

B) Ethidium bromide

## 2. Quencher Labeled Primers

Použití dvou odlišných molekul

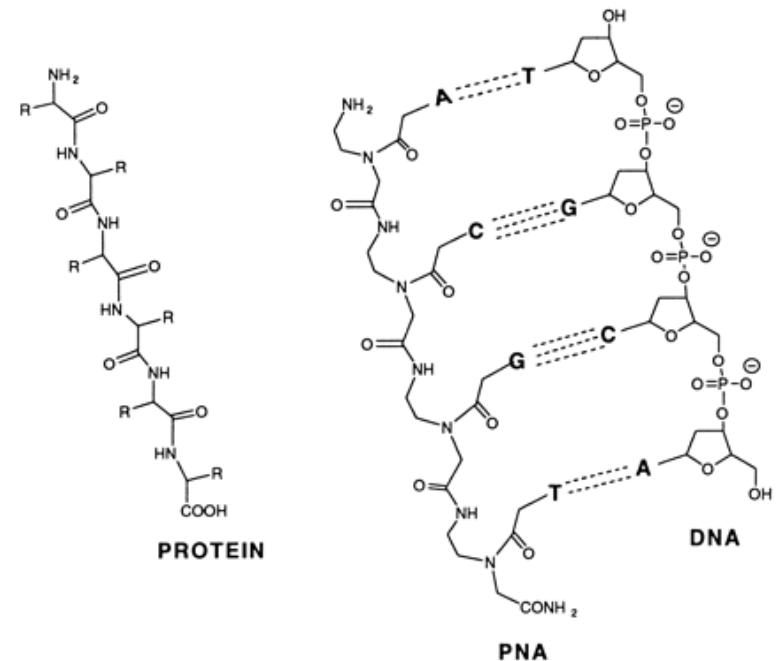
PNA (peptide nucleic acid) označenou na C konci zhášecem DABCYL (Q-PNA)

+

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

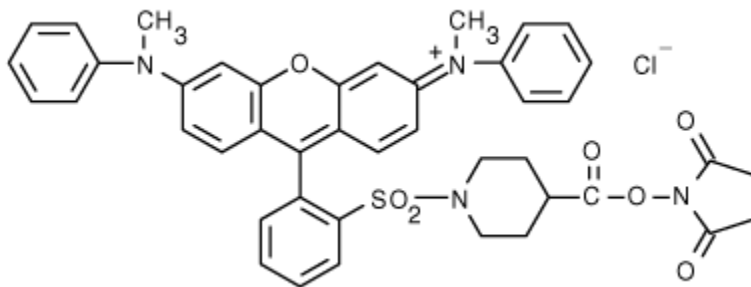


## 2. Quencher Labeled Primers

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

## LUX™ detection

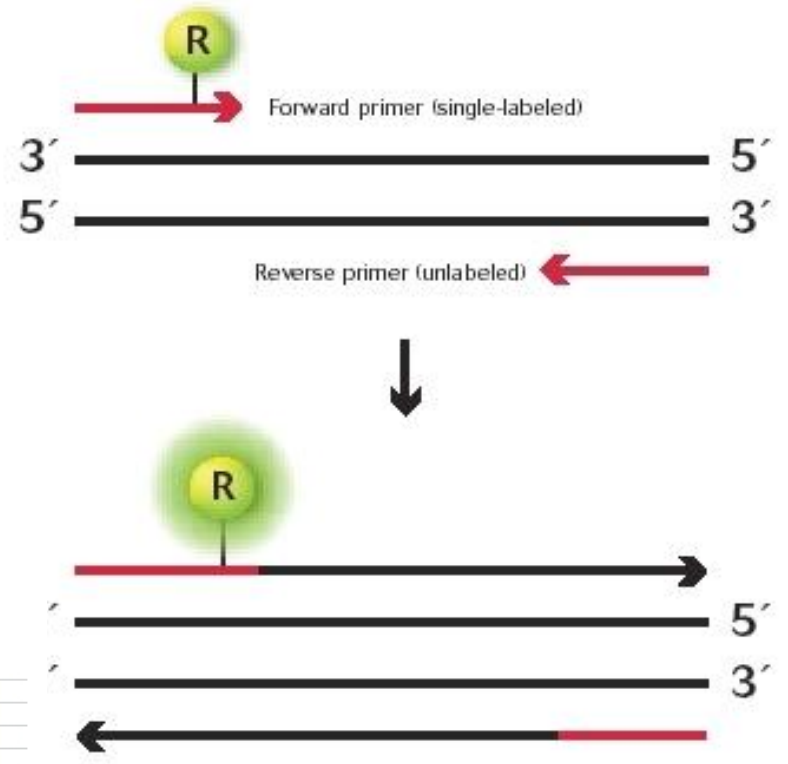
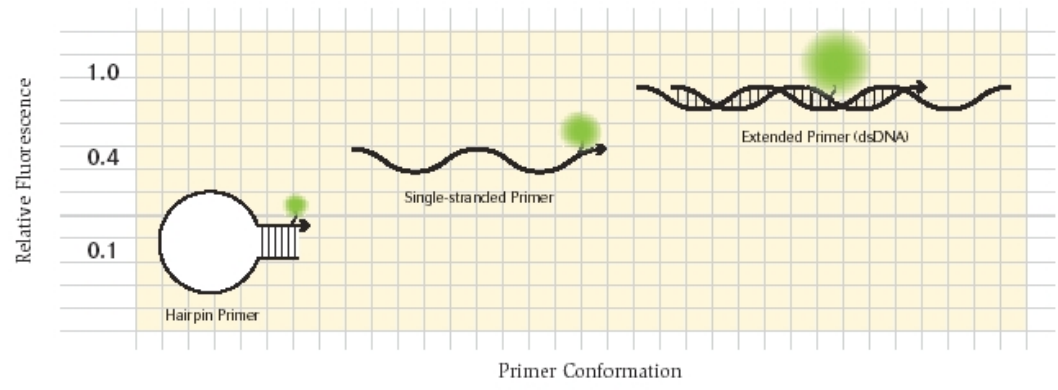
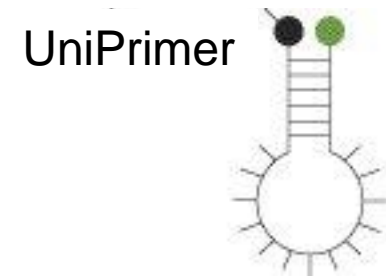


Figure 2 - The LUX™ (Light Upon eXtension) effect

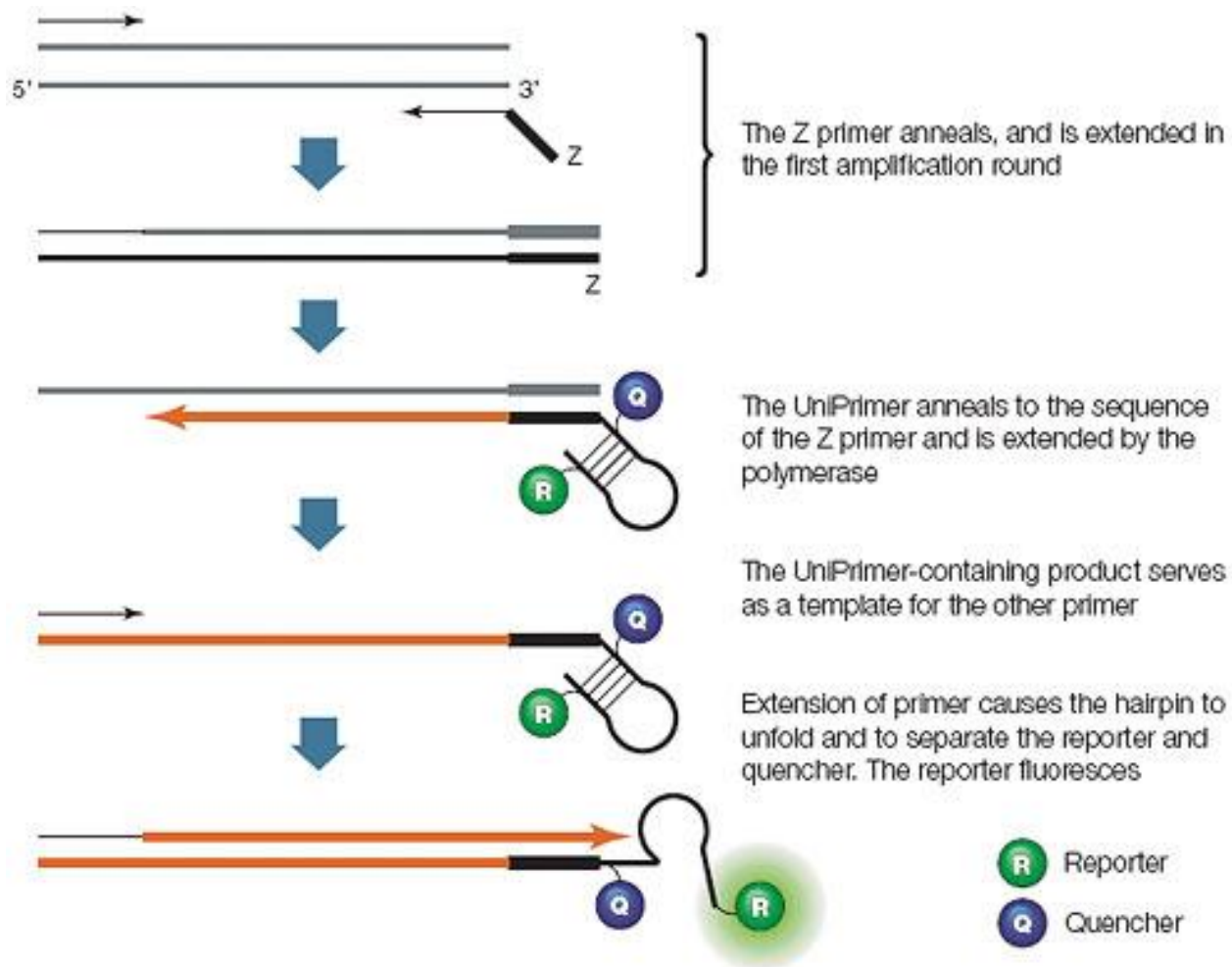




- 3 typy primerů - Dva specifické pro amplifikovanou sekvenci a jeden tzv. UniPrimer
- Jeden ze specifických primerů obsahuje univerzální (Z) sekvenci na 5' konci, druhý není nijak modifikovaný
- 3'konec UniPrimeru je komplementární k Z sekvenci prvního primeru, zbytek směrem k 5'konci tvoří vlásenku 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

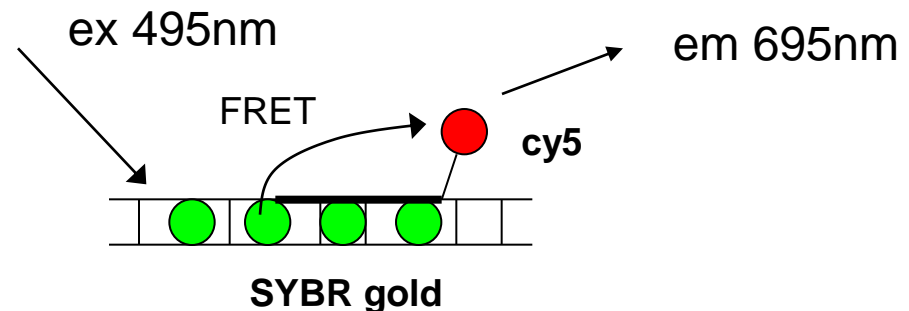
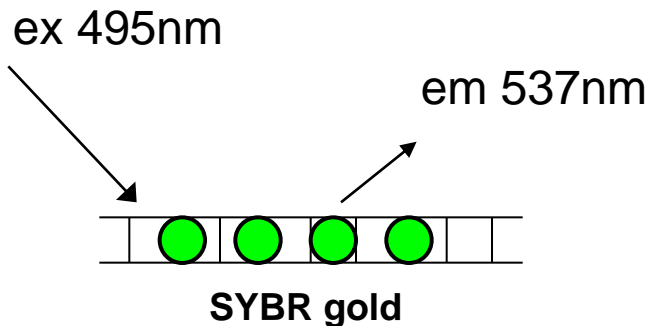
## **Lineární sondy**

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

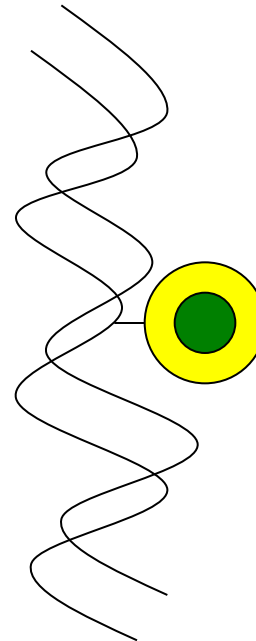
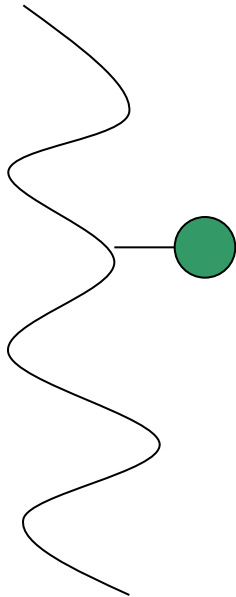
## **Strukturní sondy**

- Molekulární majáky
- Scorpions
- Nanoparticle Probes

- 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)

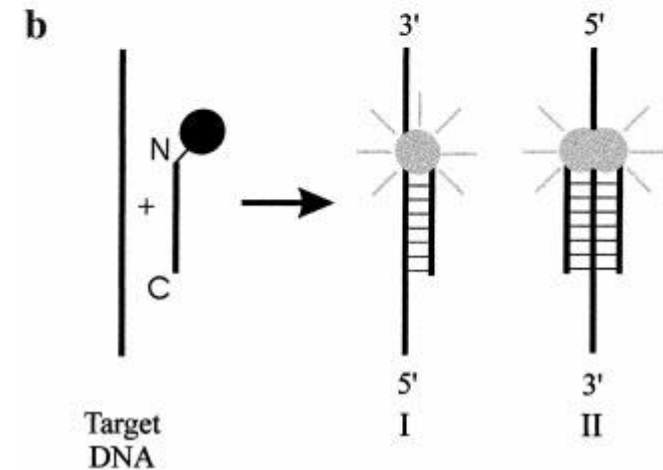
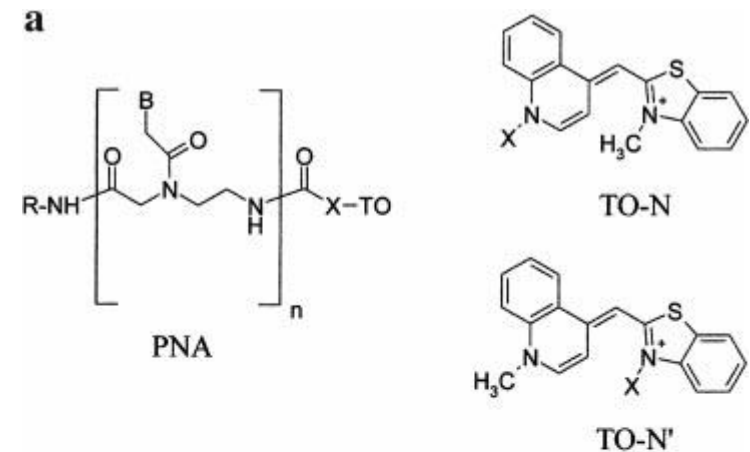


- Velmi jednoduchý princip i design
- Sonda emituje fluorescenci pouze v duplexu s DNA
- P na 3'OH konci – není volná OH skupina pro polymerázu
- Snímání fluorescence v annealingovém kroku
- Bez nutnosti FRET, návrhu sekundární struktury nebo enzymatického štěpení
- Rozlišení blízce příbuzných sekvencí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

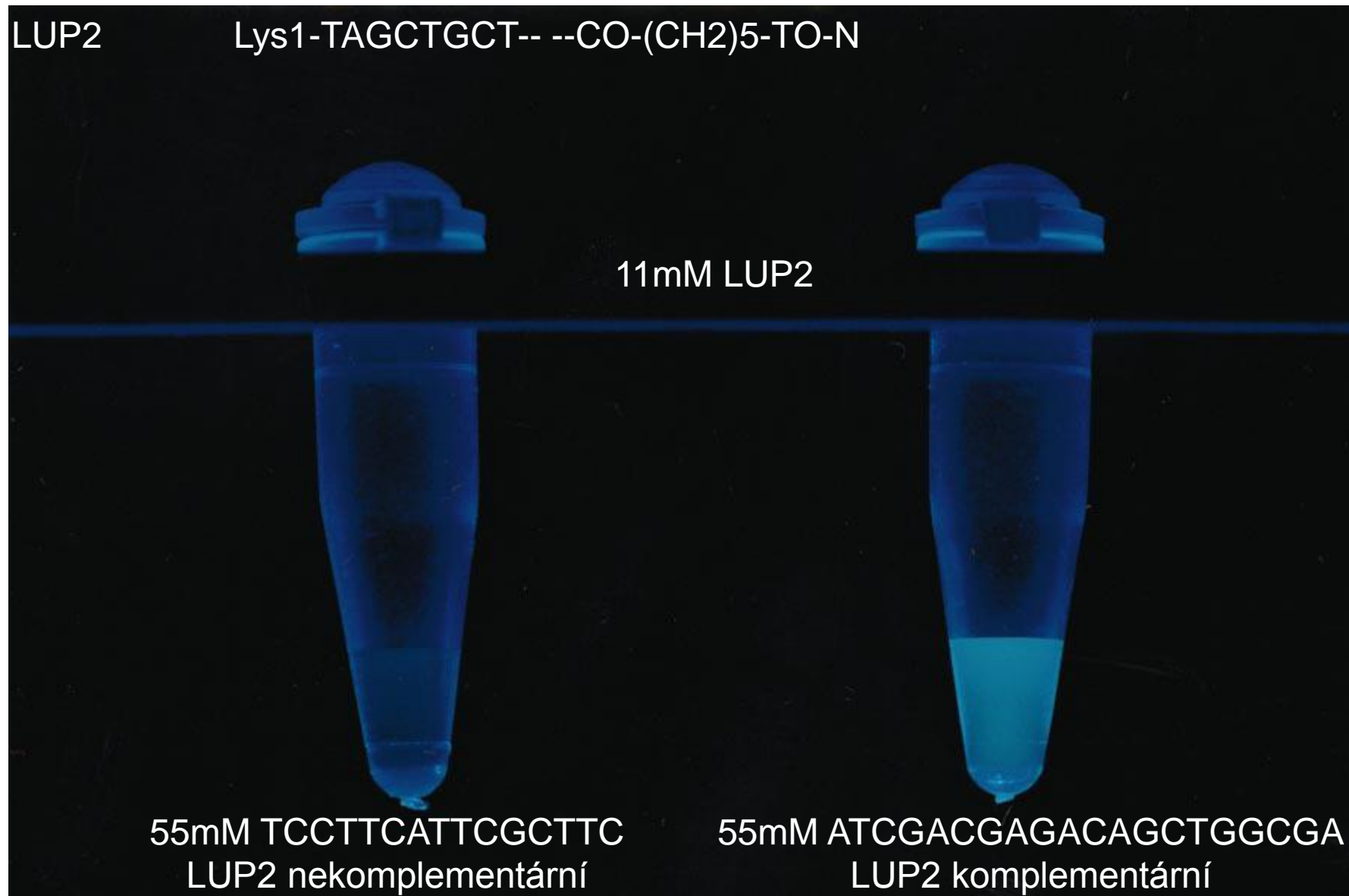


# 3. Light Up Probes

- 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)

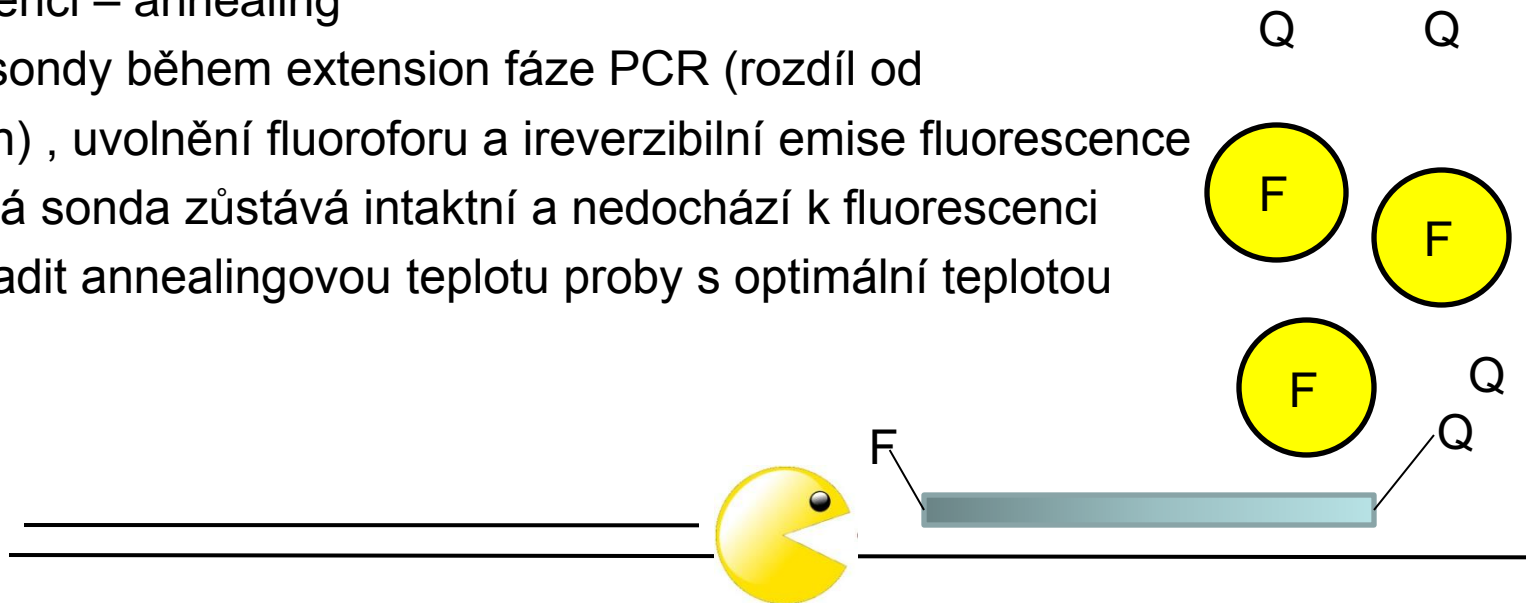


# Light Up Probes



## 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 probe s optimální teplotou polymerázy

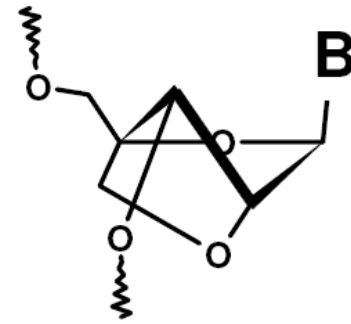


- Sloučení annealingového a extension kroku do jediného, obvykle 8-10 C pod  $T_m$  sondy (60-62 C)
- Kvantifikace, SNP, alelická diskriminace atd.
- Multiplexní reakce

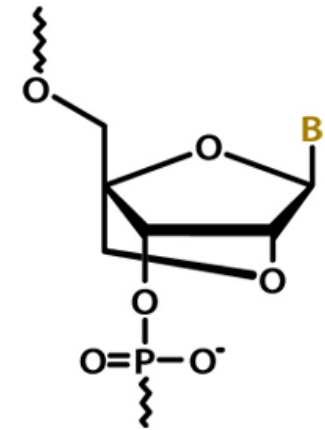


# 5. UPL sondy

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



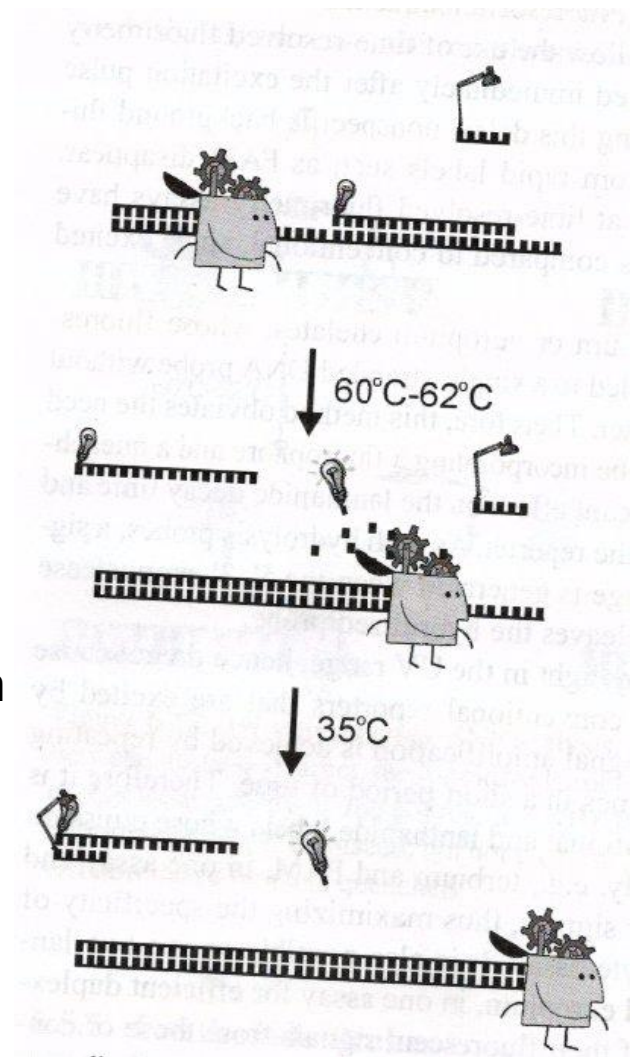
**LNA Monomer**  
 $\beta$ -D configuration



	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

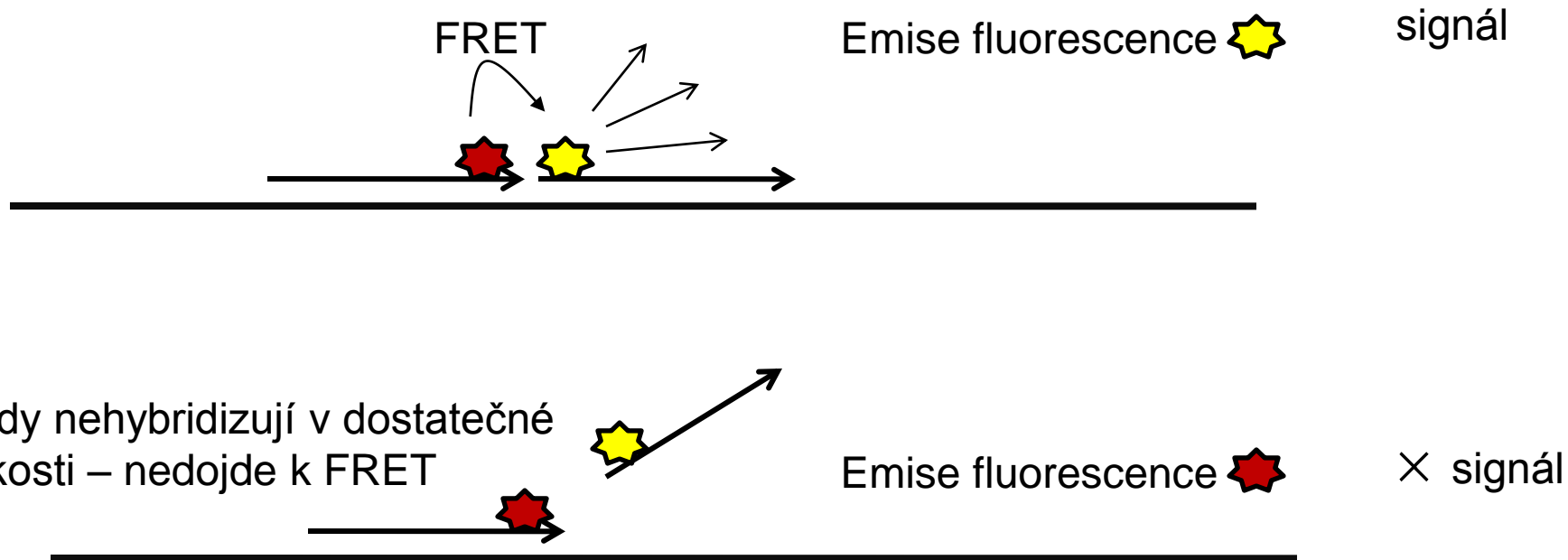
## 6. Lanthanidové sondy

- 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 zhášečem – do cyklu je zařazen krok 35 C kdy se váže sonda se zhášečem na nenavázanou reportérovou sondu
- kombinace s klasickými fluorofory



## 7. Hybridizační sondy

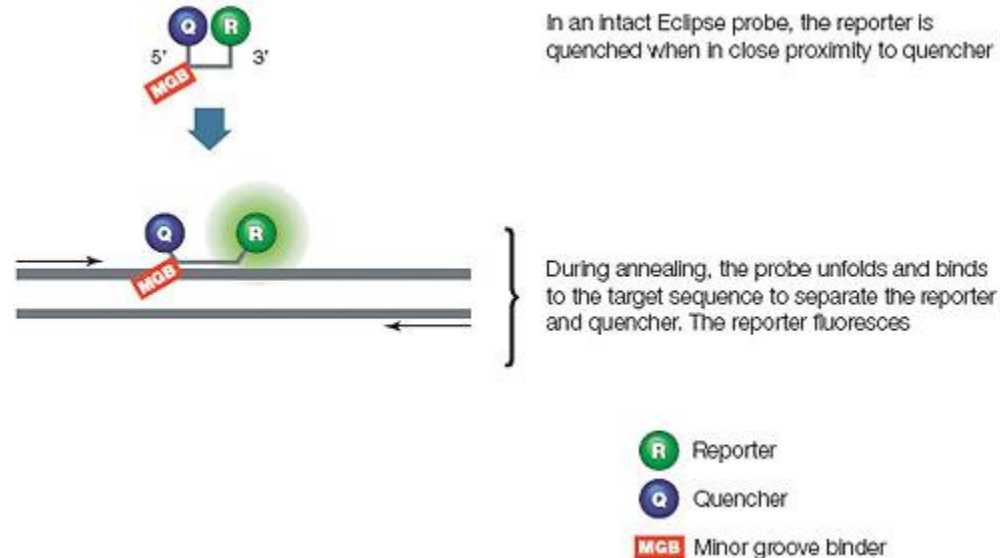
- dva oligonukleotidy, navržené tak, aby hybridizovaly na templátu vedle sebe
- fluorofory tvořící FRET pár
- pouze po úspěšné hybridizaci dojde k emisi fluorescence



- kvantifikace, genová exprese, SNP

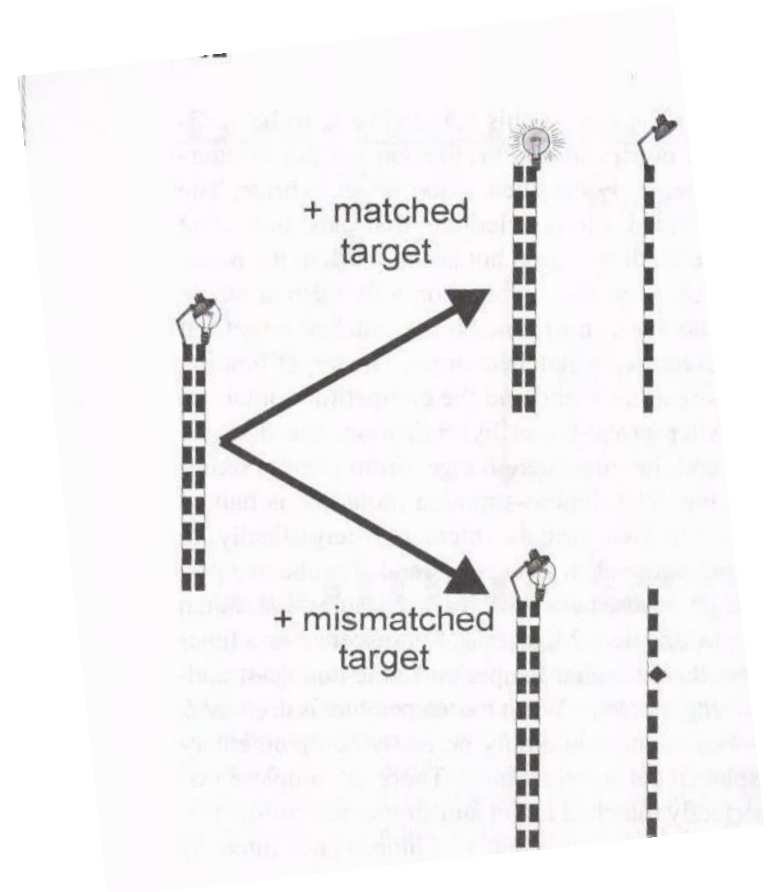
# 8. Eclipse

- 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



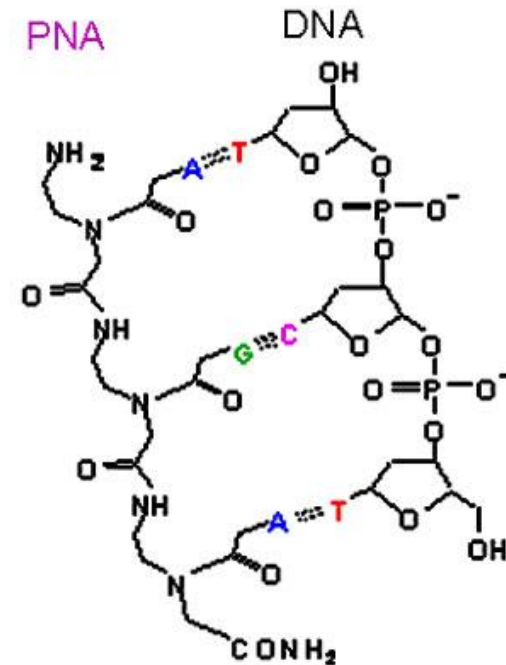
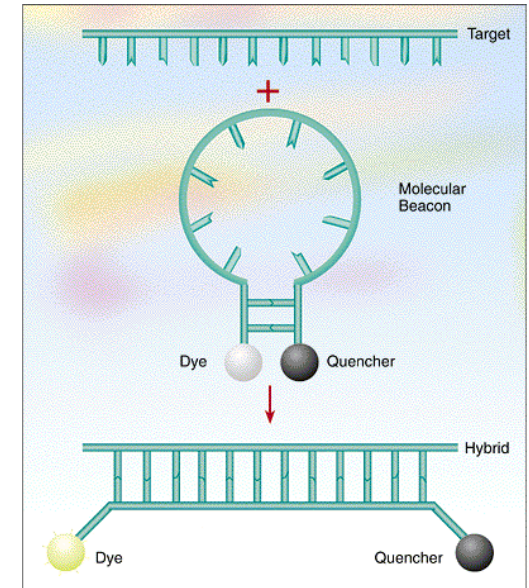
# 1. Molekulární majáky/ Molecular beacons



- vlásenková struktura, konce jsou vzájemně komplementární; smyčka je komplementární k cílové sekvenci
- konce označeny fluoroforem a zhasěčem
- 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

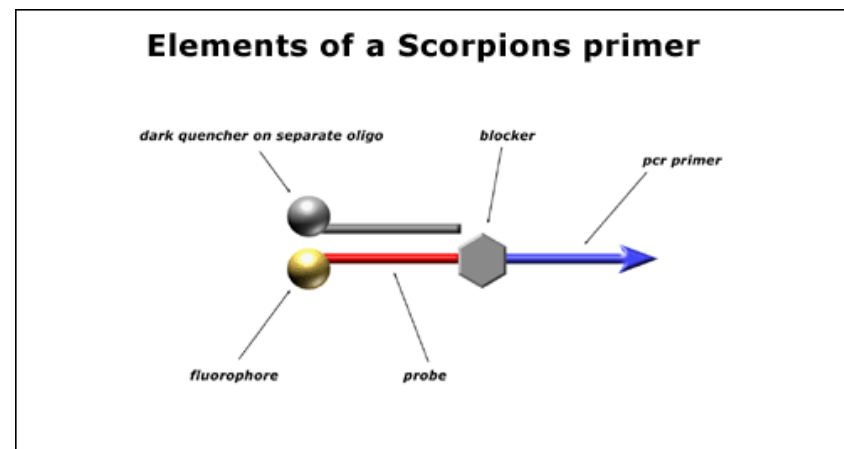
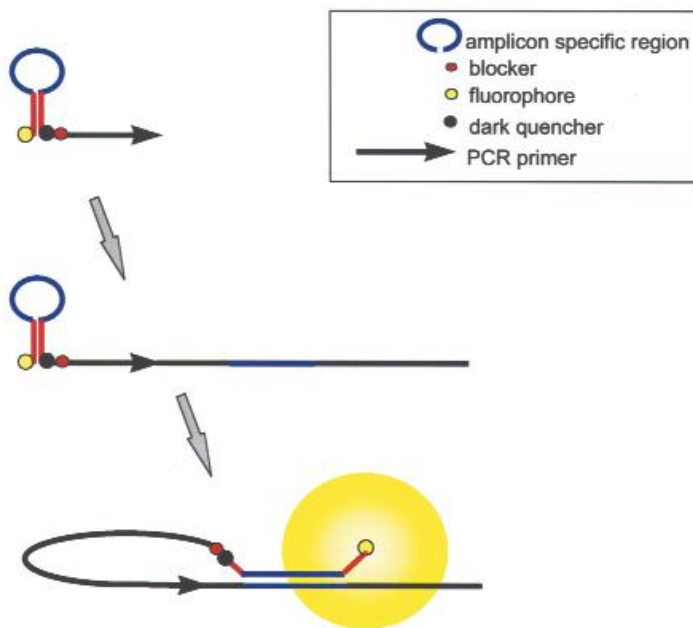
- Klasické majáky špatně hybridizují ke komplementární ssDNA v roztocích o nízké iontové síle, poměr signál/šum je různý, ale zvyšuje se s rostoucí iontovou silou
- „stemless“ majáky výborně hybridizují i za nízkých koncentrací solí, ale mají nízký poměr signál/šum
- PNA „stemless“ majáky kombinují výhody 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



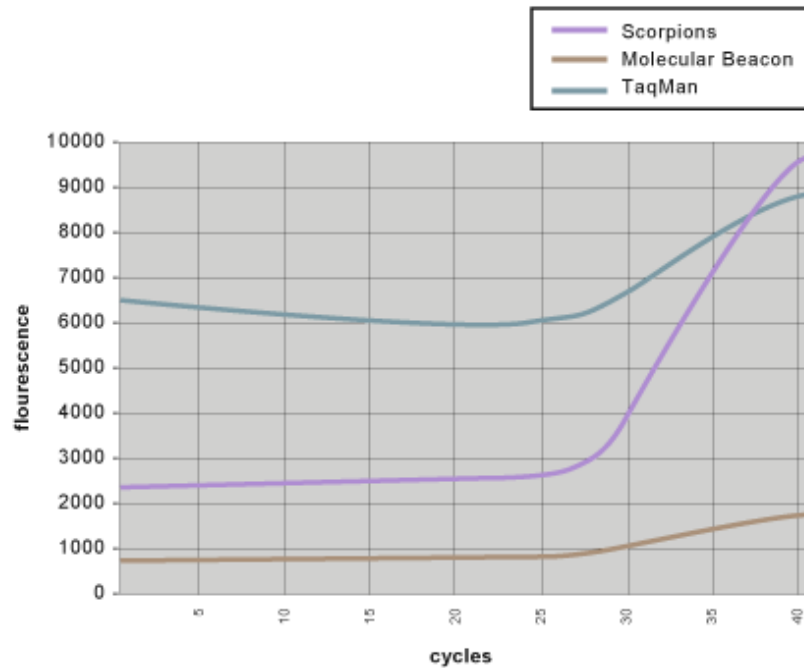
- kombinace sondy a primeru v jediné molekule
- nedochází k enzymatickému štěpení – rychlejší proces
- poměr ampliconů a hybridizovaných sond (tedy i fluorescence) 1:1
- vlásenková struktura - sonda (specifická sekvence) kovalentně vázaný primer
- PCR blocker – zabraňuje replikaci sekvence sondy a tedy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





# Scorpion primers

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

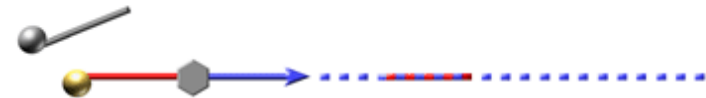


## The Scorpions reaction

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

