



# *PCR v reálném čase*



*doc. RNDr. Milan Bartoš, Ph.D.*

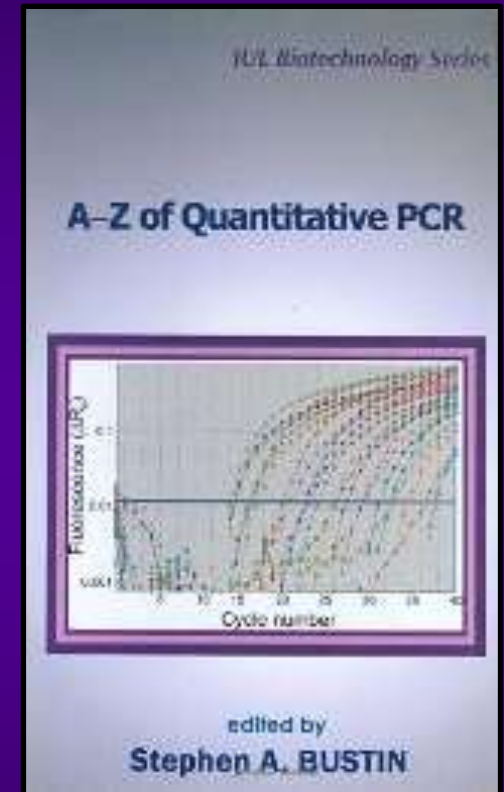
*bartosm@vfu.cz*

*Přírodovědecká fakulta MU, 2014*

# *Doporučená literatura*



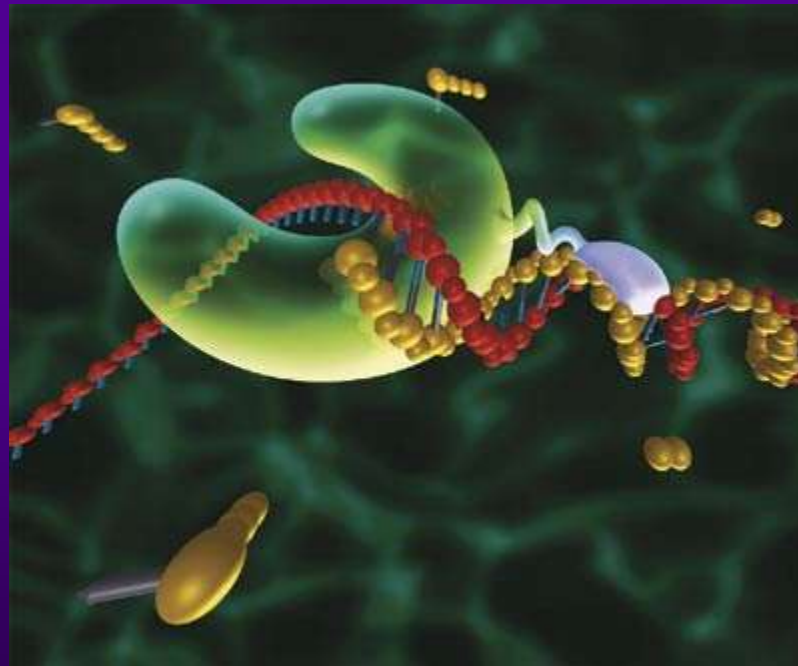
**Bustin S.A. (2004): A-Z of Quantitative PCR, International University Line, La Jolla, California**



# ***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*

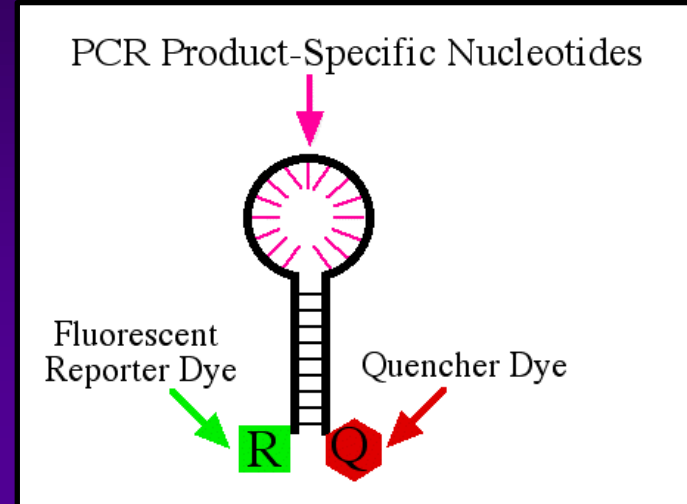
- kombinované provádění DNA **amplifikace** a **detekce** cílové nukleové kyseliny současně **v jedné zkumavce** pomocí světelného signálu z fluoroforů
- je možno **dynamicky posuzovat průběh** syntézy PCR produktu
- stanovení množství matrice vložené do reakce (**kvantitativní PCR**)

# ***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

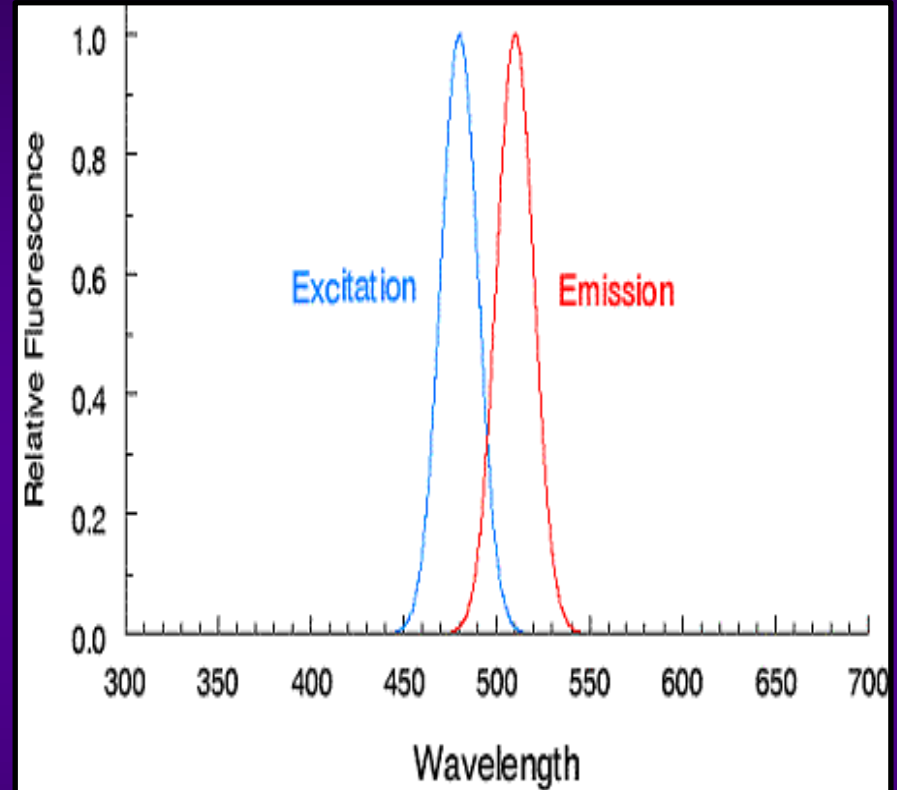
- 1) Nespecifické metody: založené na nespecifické vazbě fluoroforu do vznikající molekuly dsDNA
- 2) Specifické metody: založené na specifické vazbě sondy označené fluoroforem

# ***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

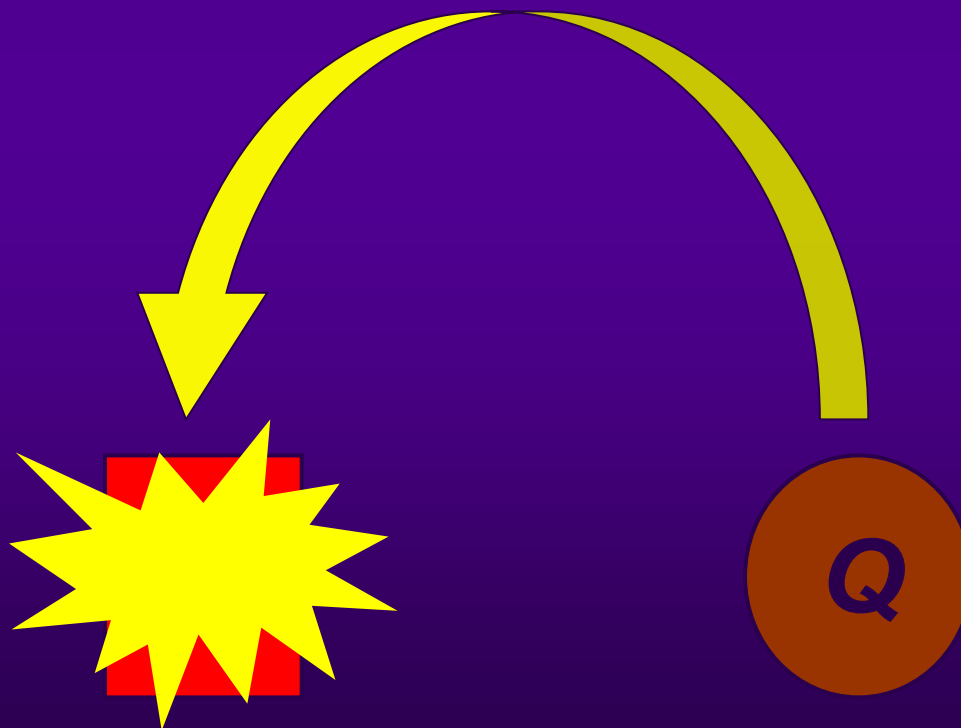
Heterocyklické polyaromatické uhlovodíky schopné absorbovat nebo disipovat energii z excitovaného fluoroforu

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.

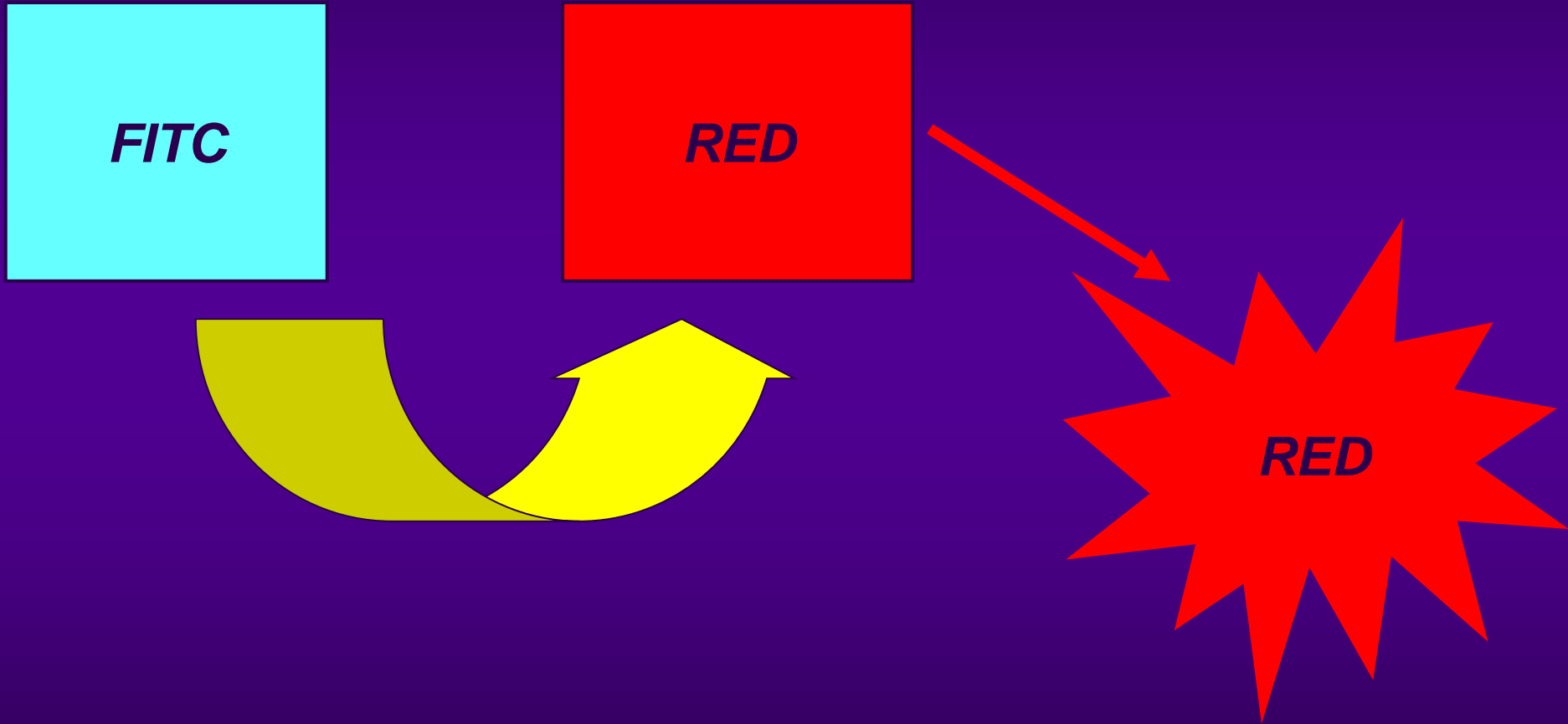


# ***FRET***

**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**

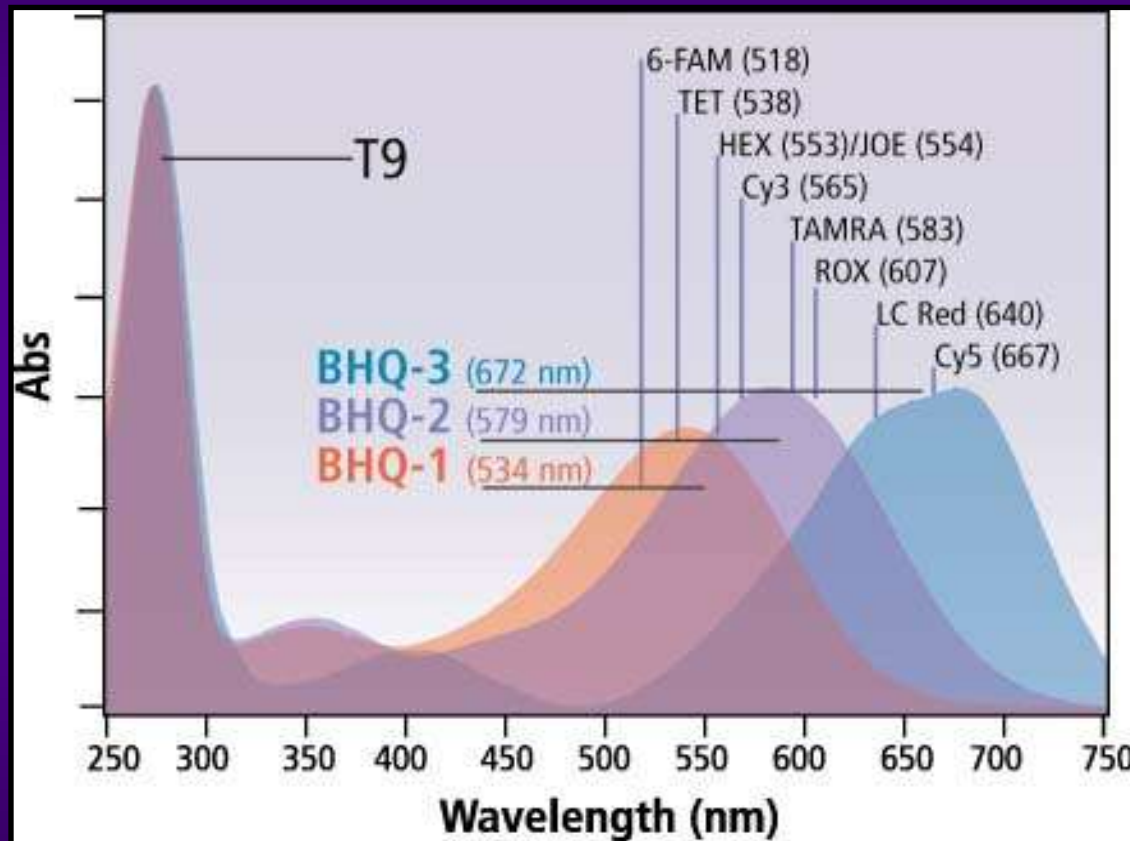
**Umožňuje vázat fluorofor a zhášec v efektivní vzdálenosti od sebe a tím zajistit proces zhášení fluoroforu do doby detekce**



# 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*

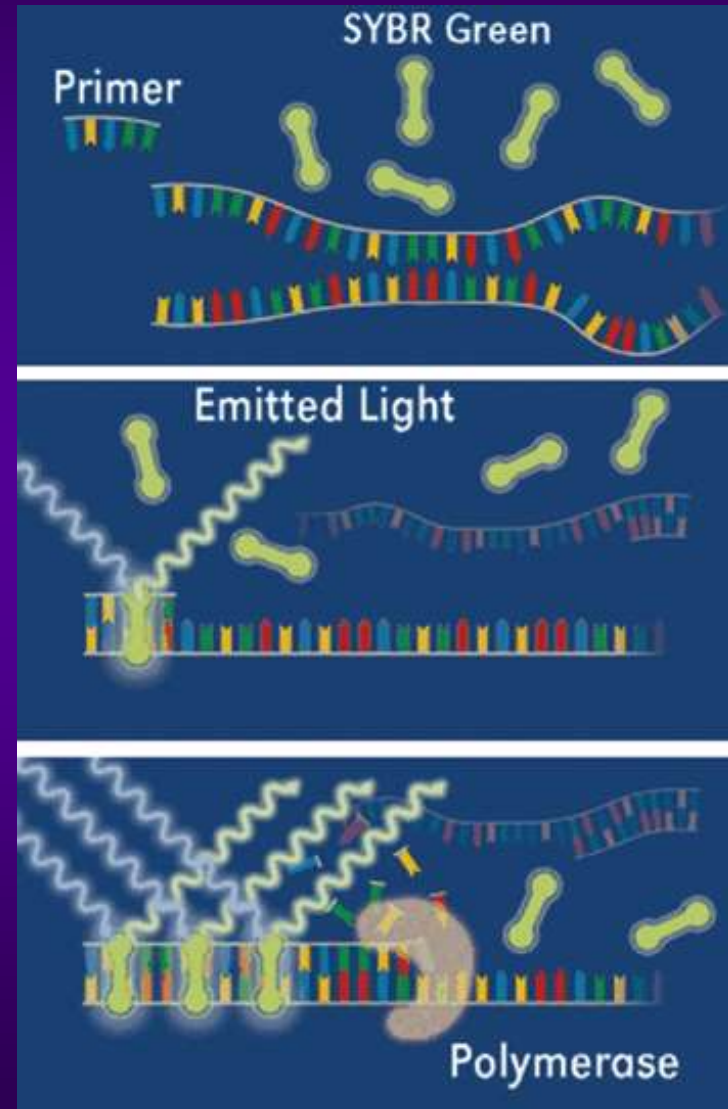
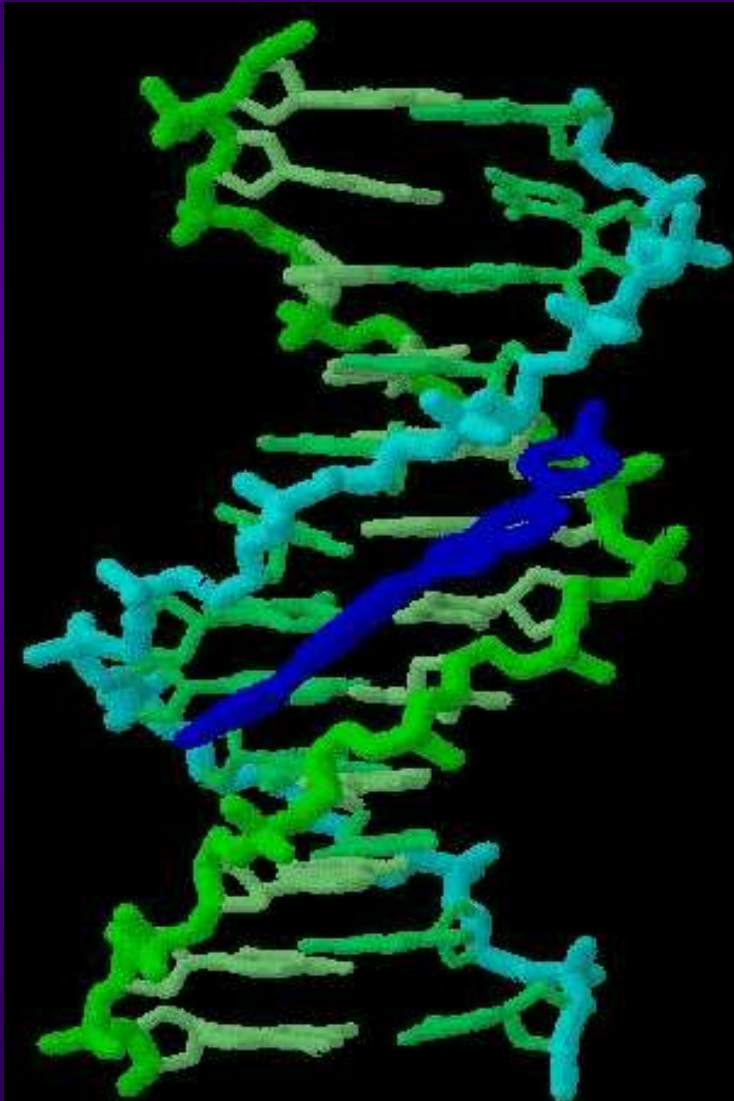
- **Nespecifické metody**: založené na nespecifické vazbě fluoroforu do vznikající molekuly dsDNA
- **Specifické metody**: založené na specifické vazbě sondy označené fluoroforem

# *Nespecifické metody*

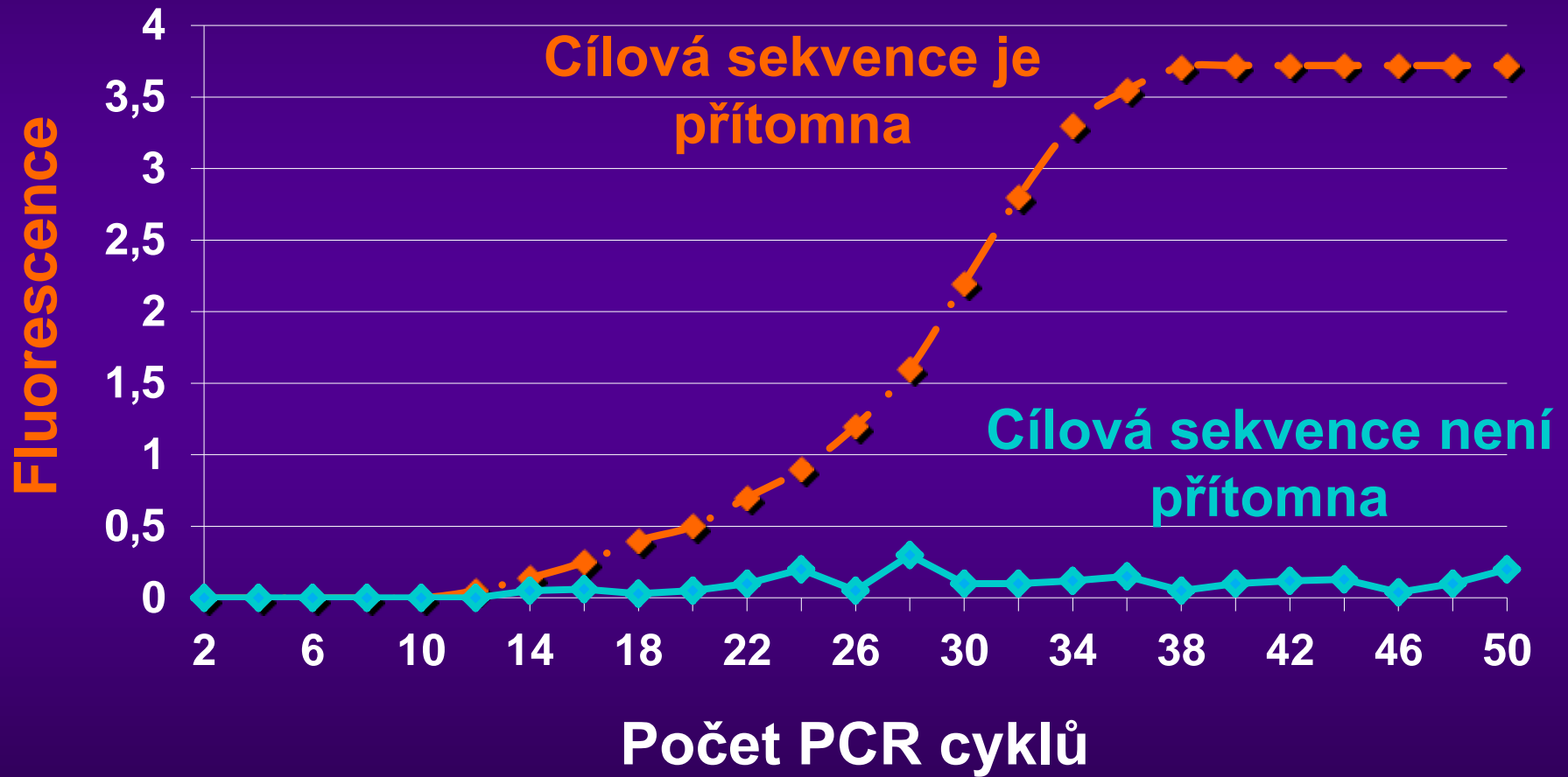
## **Využívají DNA interkalátory**

- **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<sup>TM</sup> Primers**
- **Amplifluor<sup>TM</sup>**
- **SYBR Green I**

# Princip použití SYBR<sup>TM</sup> Green I



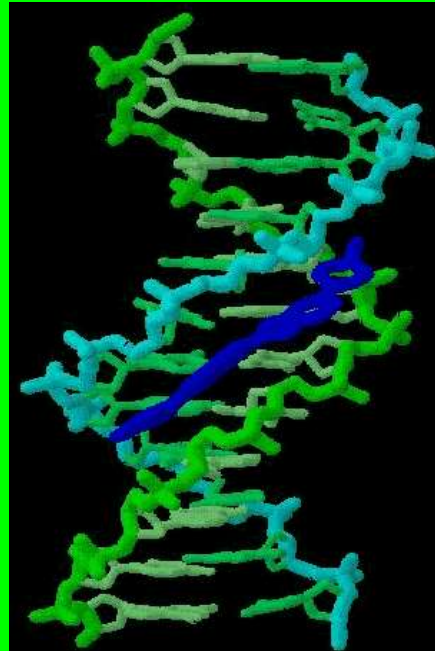
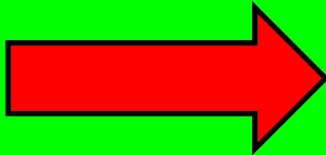
# Co se děje uvnitř termocykleru při real-time PCR?





**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**

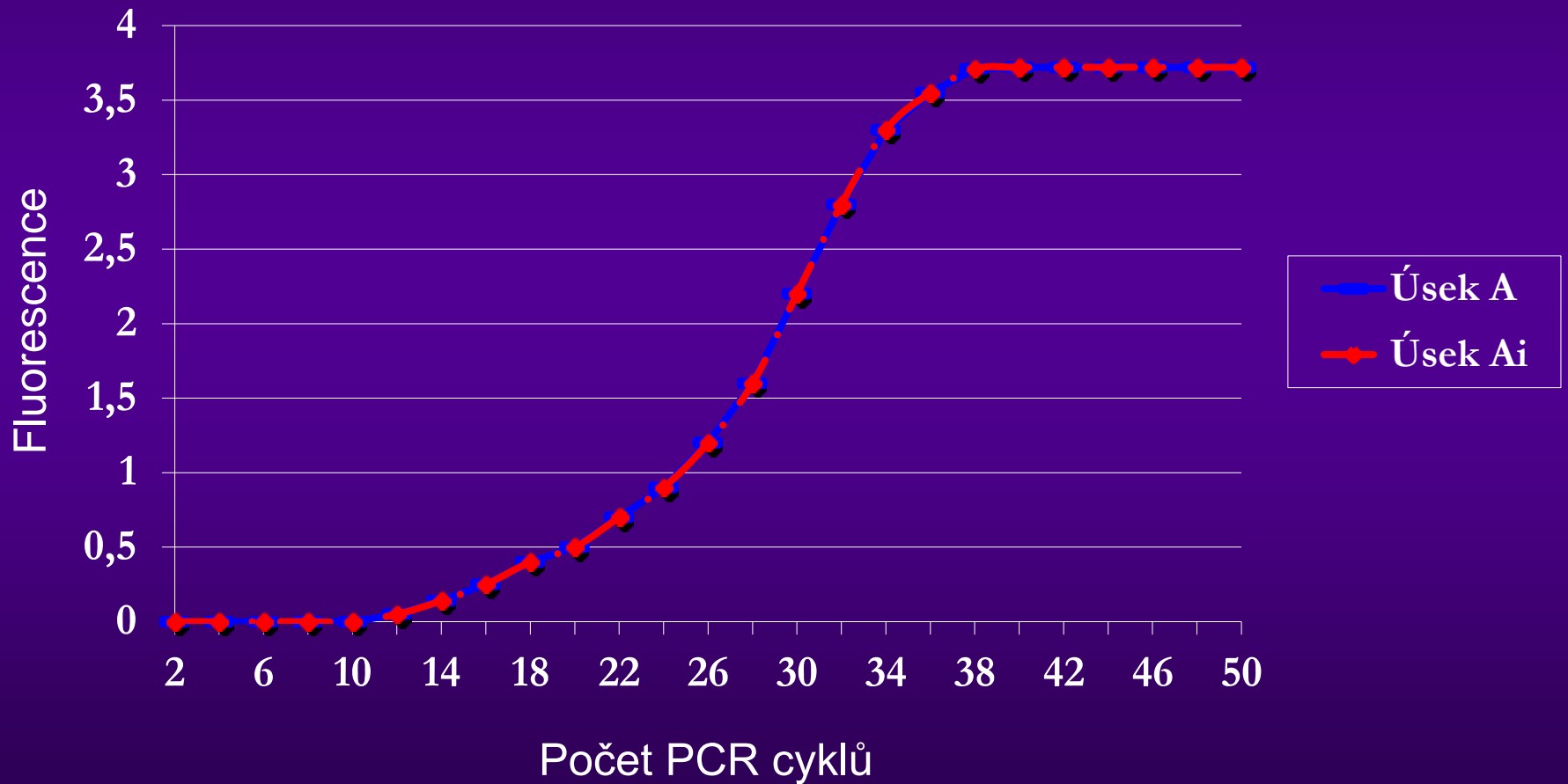
CCTCCTGCCTCTACCAATCGCCAGTCAGGAAGGCAGCCTACCCCGCTG  
ACTCCACCTTTGAGAGACTCATCCTCAGGCCATGCAGTGGAATTCC  
ACAACCTTCCACCAAACCTCTGCAAGATCCCAGAGTGAGAGGCCTGTAT  
CTCCCTGCTGGTGGCTCCAGTTCAGGAACAGTAAACCCTGTTCCGACT  
ACTGCCTC

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

CCTCCTGCCTCTACCAATCGCCAGTCAGGAAGGCAGCCTACCCCGCTG  
ACTCCACCTTTGAGAGACACTACTCATCCTCAGGCCATGCAGTGGA  
TTCCACAACCTTCCACCAAACCTCTGCAAGATCCCAGAGTGAGAGGCCT  
GTATCTCCCTGCTGGTGGCTCCAGTTCAGGAACAGTAAACCCTGTTCC  
GACTACTGCCTC

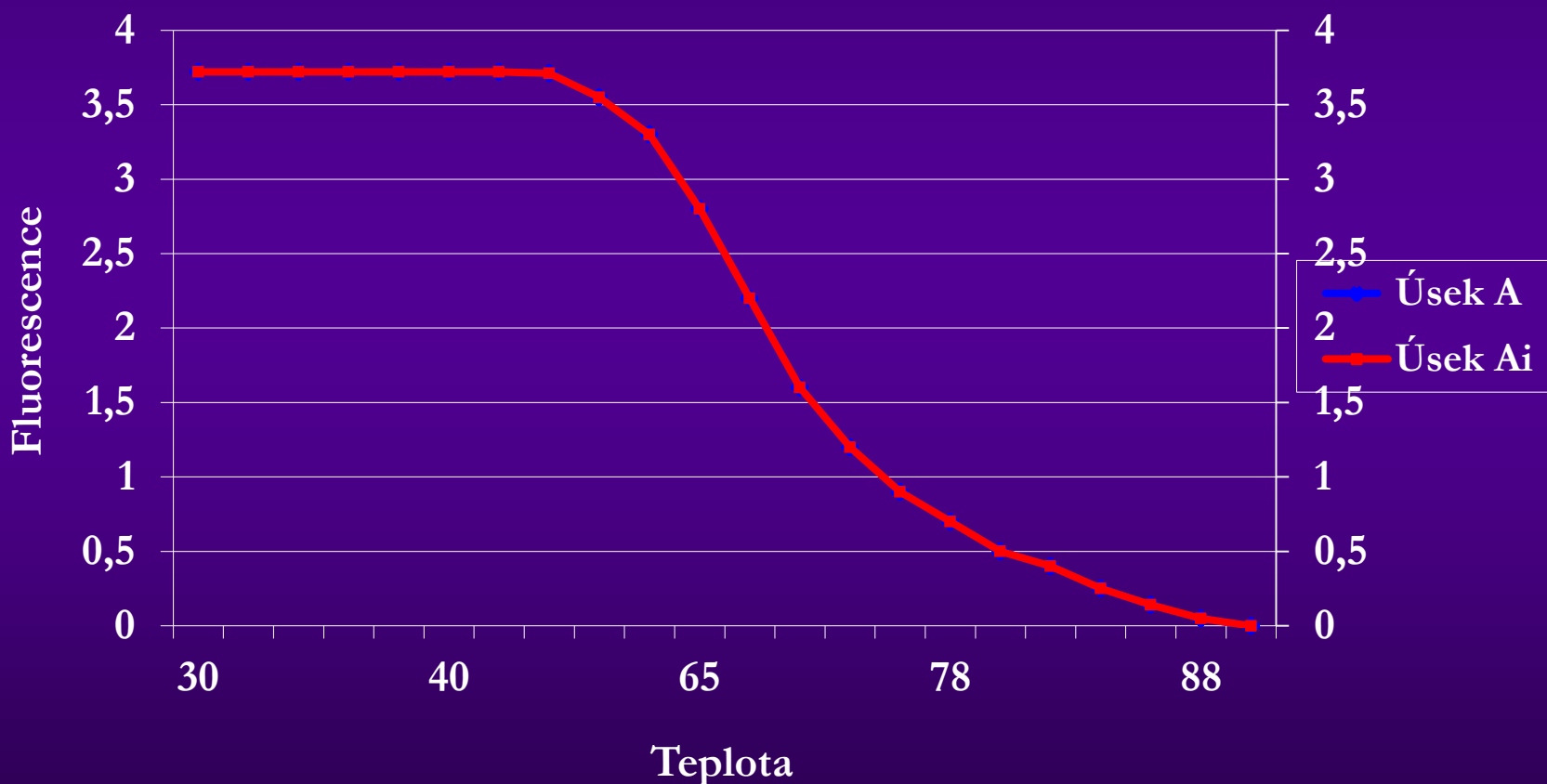
# Výsledek detekce pomocí SYBR Green I

## Základní data

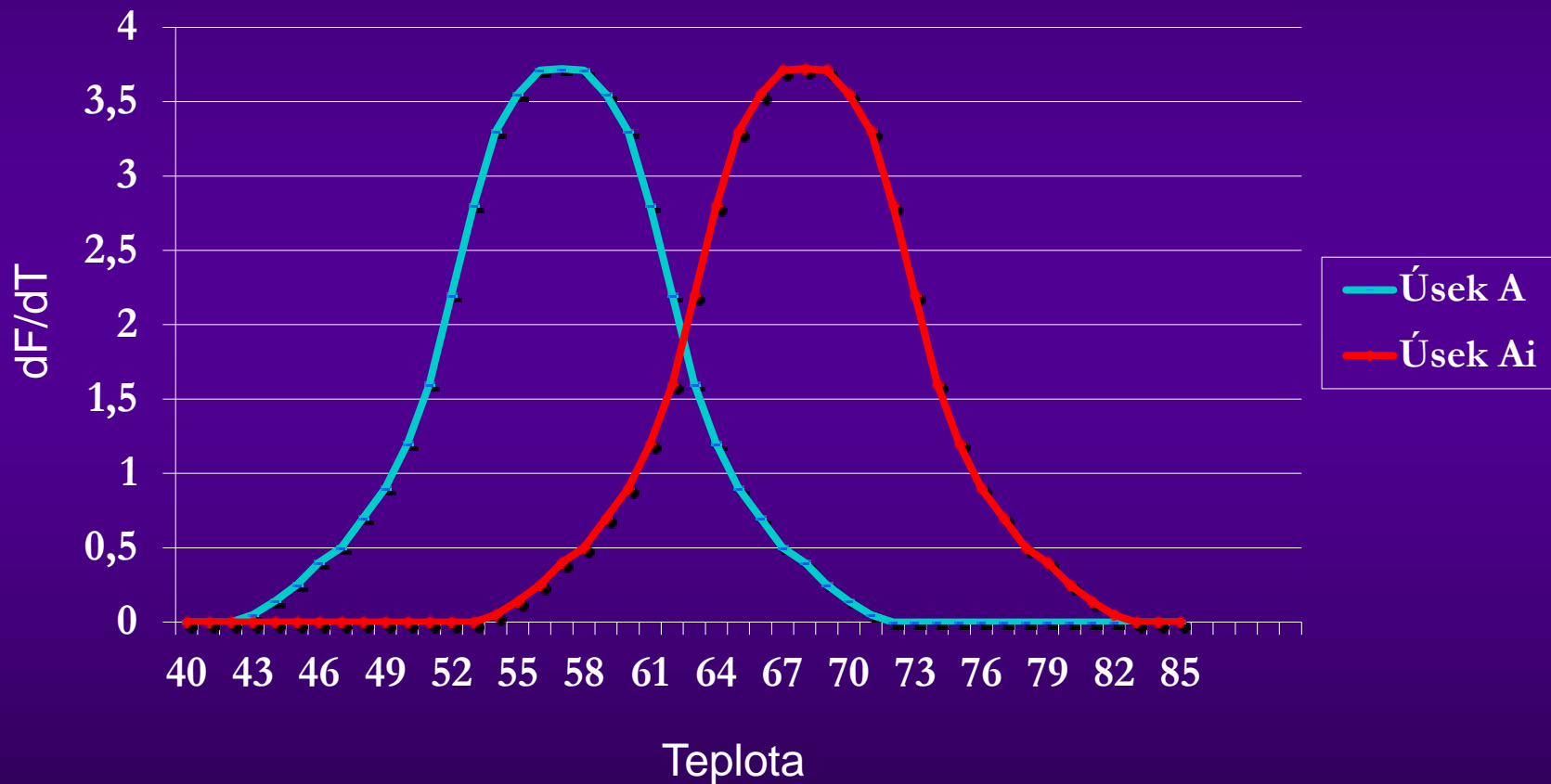


# Výsledek analýzy $T_m$ pomocí SYBR Green I

## 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*

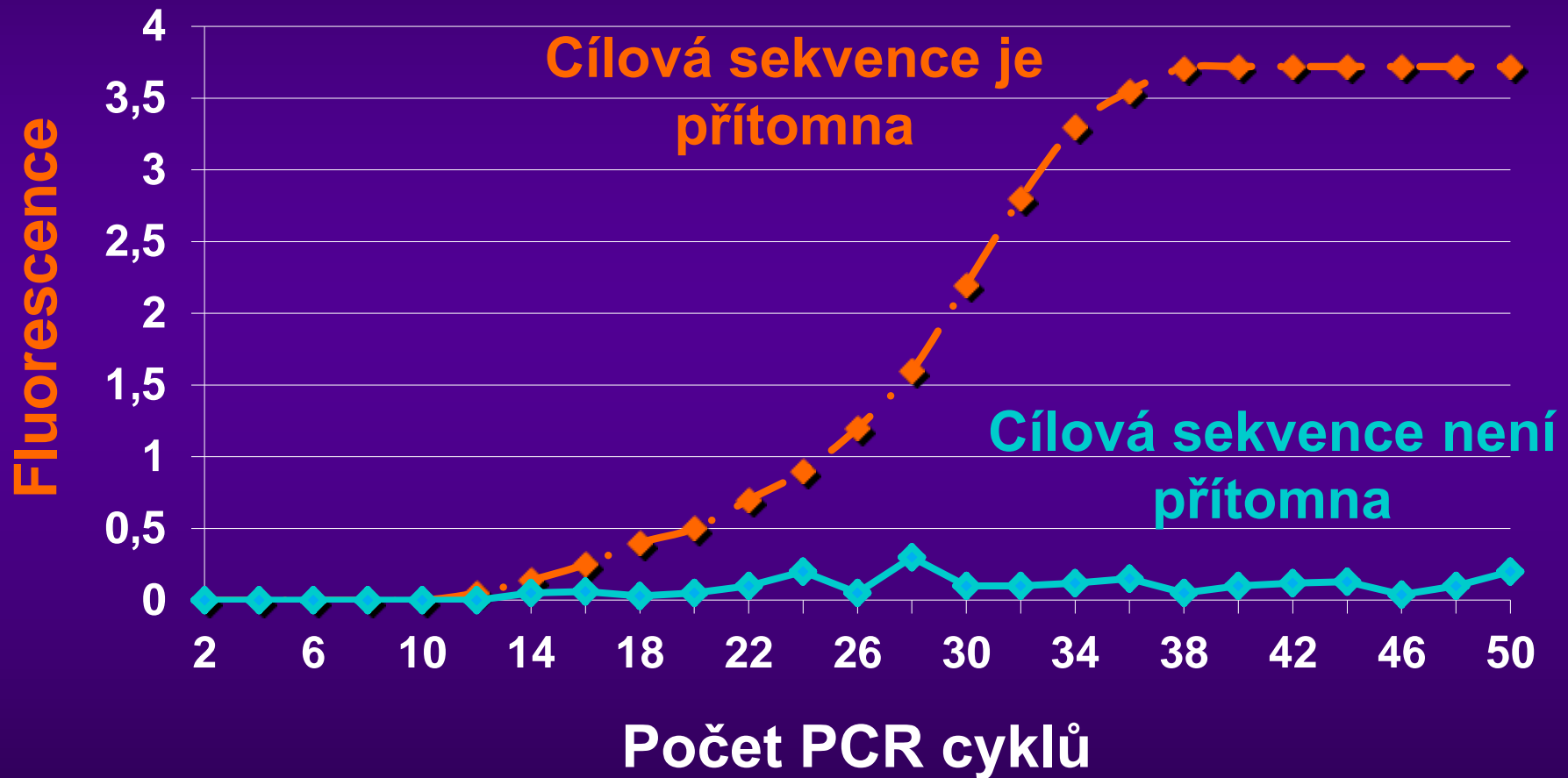
## Lineární sondy

- 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*

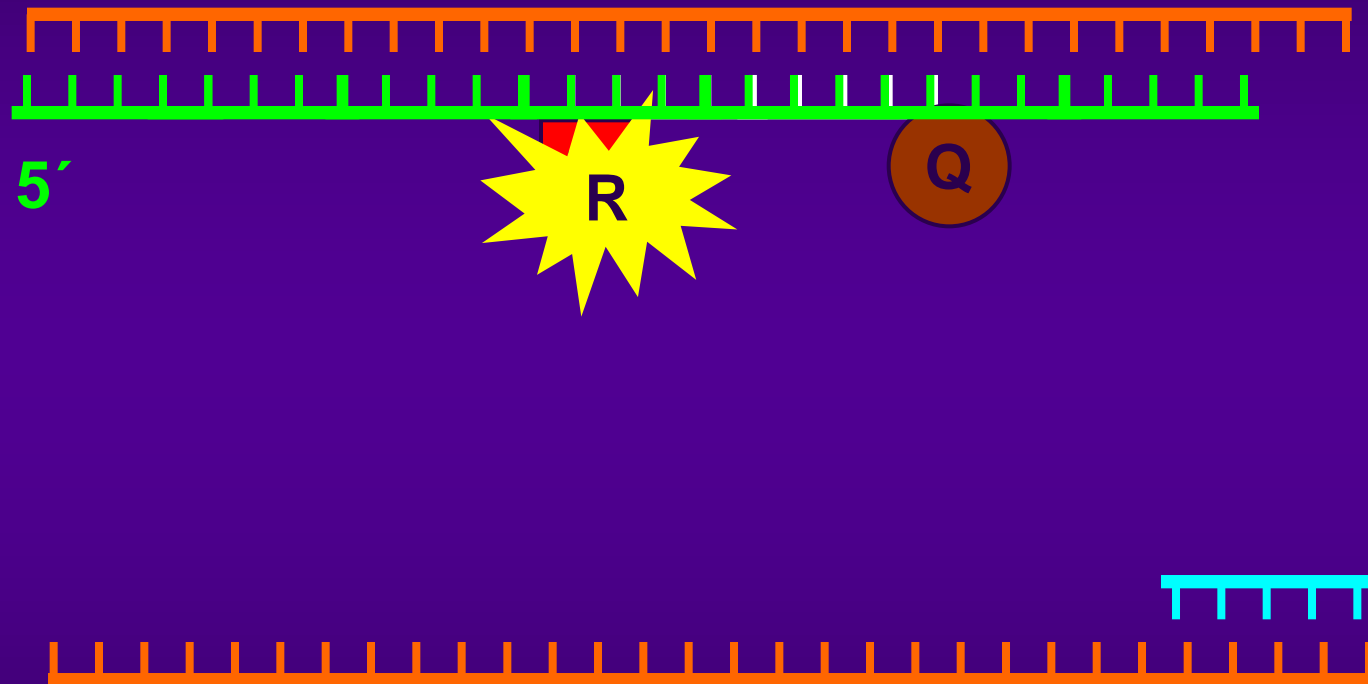




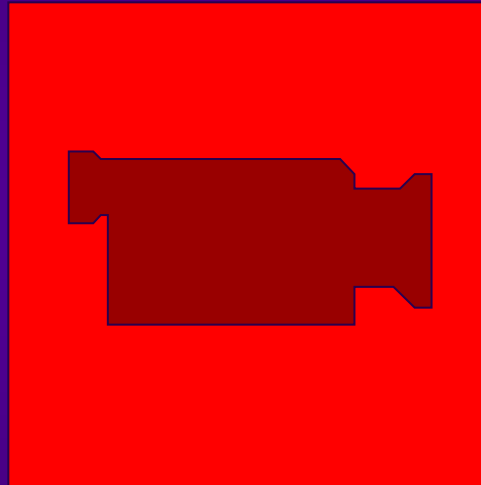
# ***TaqMan sonda***

- **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

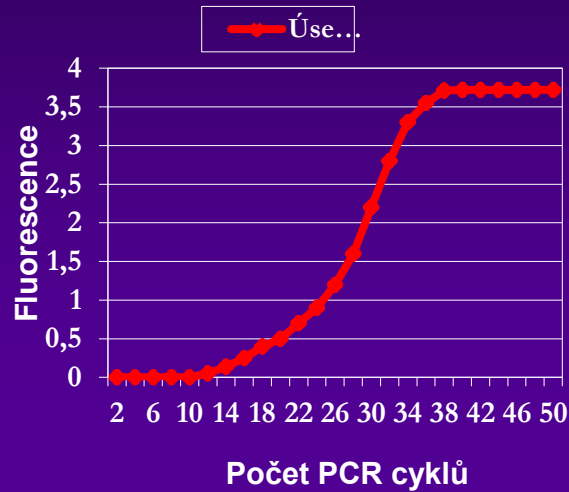
CCTCCTGCCTCTACCAATCGCCAGTCAGGAAGGCAGCCTACCCCGCTGACTCC  
ACCTTTGAGAGACACTCATCCTCAGGCCATGCAGTGGAATTCCACAA

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

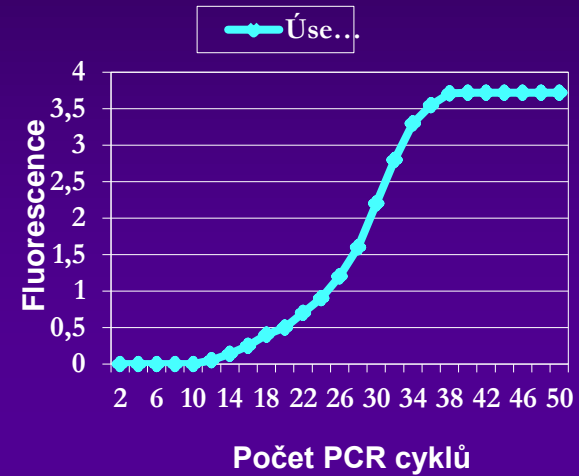
TTGTTCACCTCACCATACTGCTCTCAGGCAAGCAATTCTTTGCTGGGGGGAACT  
AATGACTCTAGCTACCTGGGTGGGTGGTAATTTGGAAGATCCAACATC

# Výsledek detekce pomocí TaqMan sond

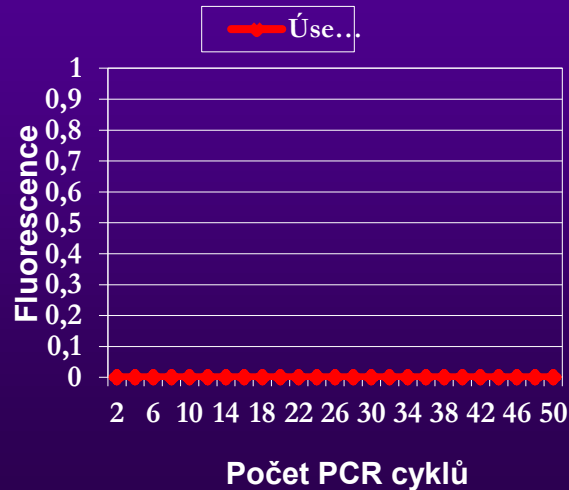
Snímací kanál 530 nm



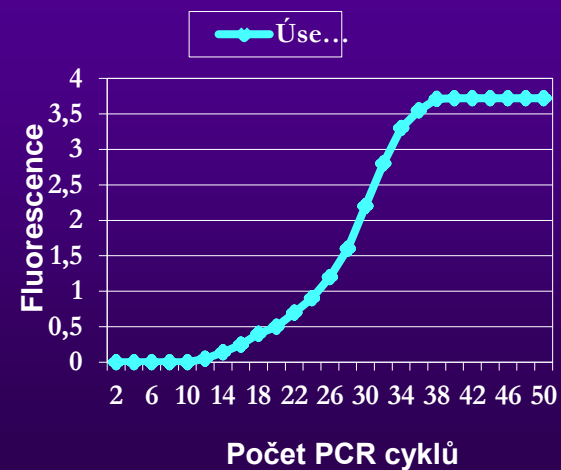
Snímací kanál 560 nm



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?**

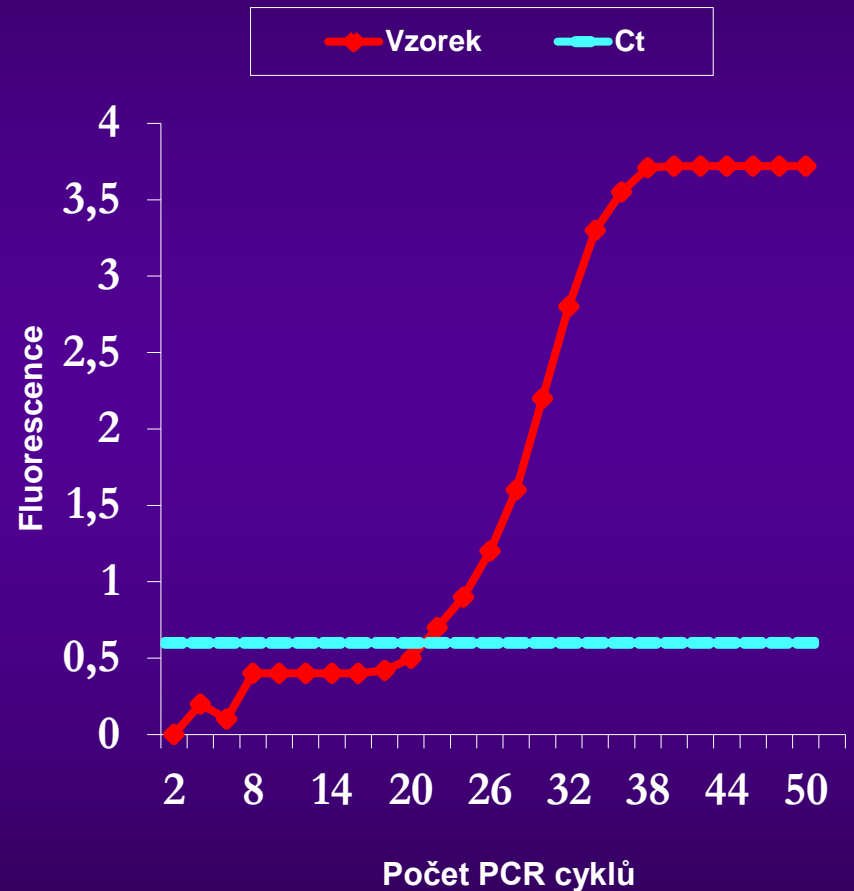
**Jaký je počet kopií (koncentrace) úseku A ve vzorku 2?**

# ***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**

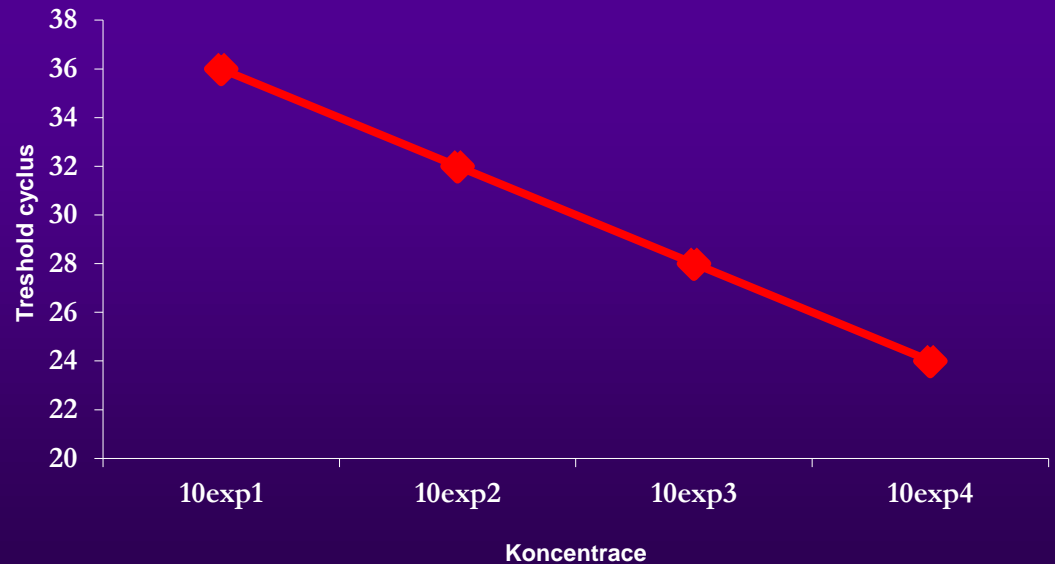
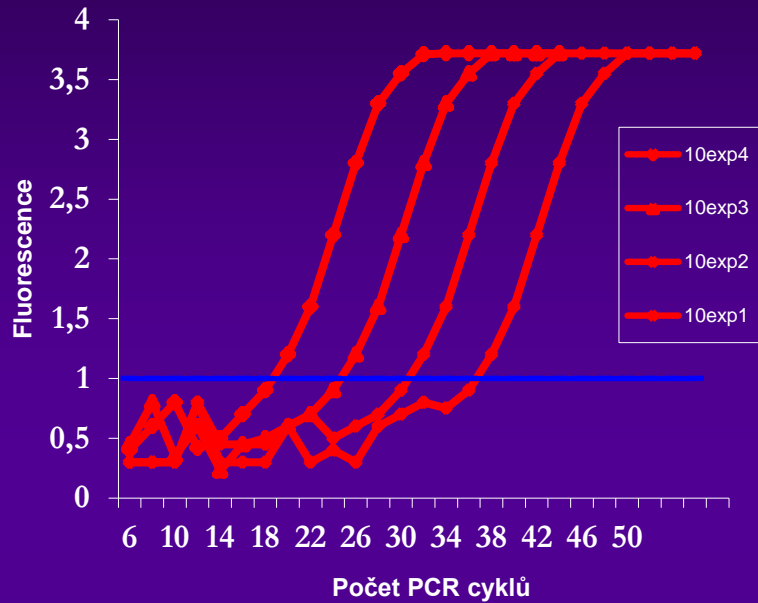
# Stanovení Ct - Treshold cyclus -

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

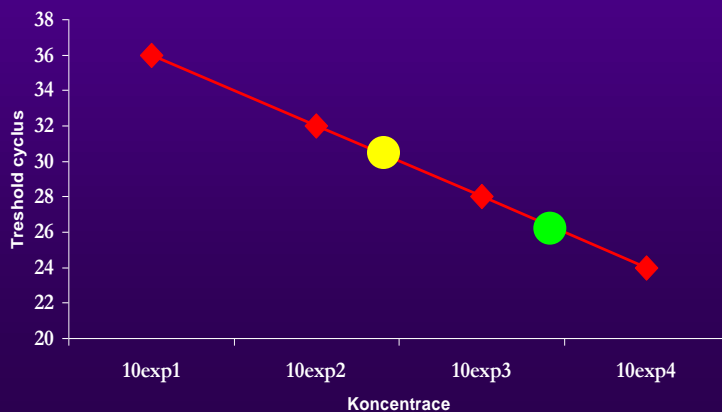
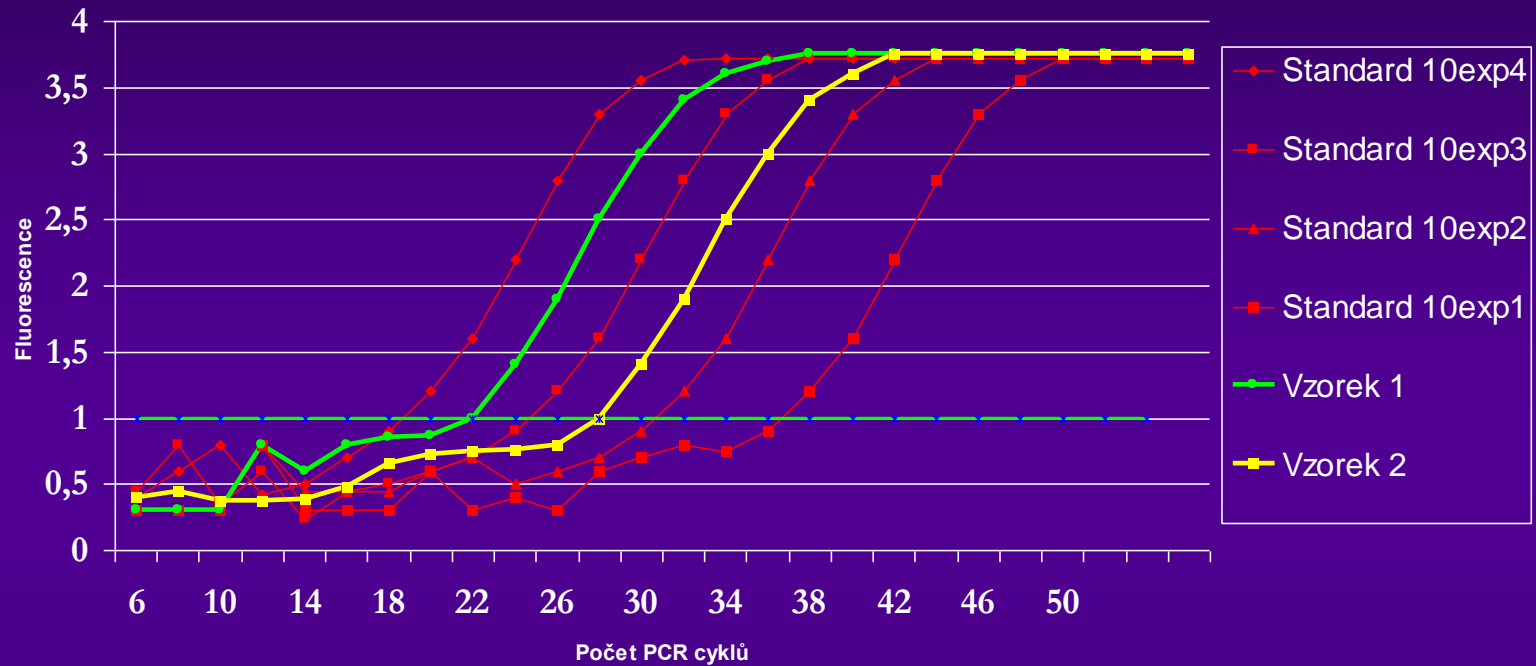




# Vytvoření kalibrační křivky



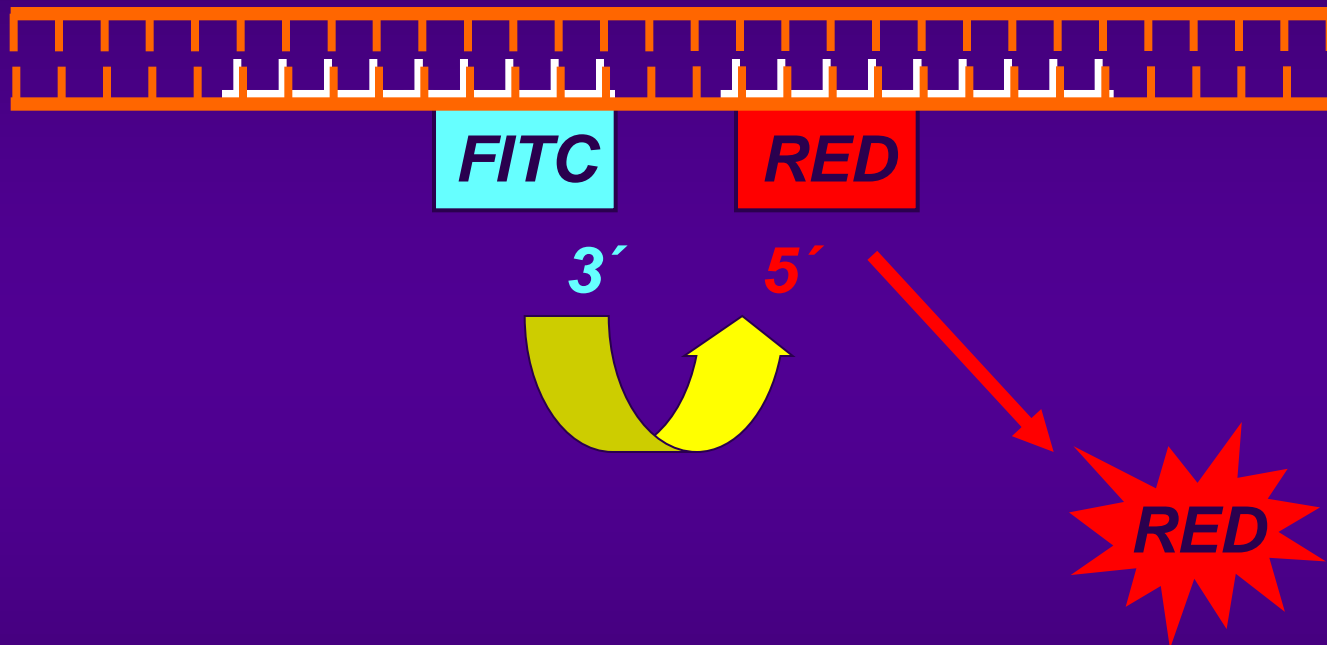
# Kvantifikace neznámého vzorku pomocí vložené kalibrační řady



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

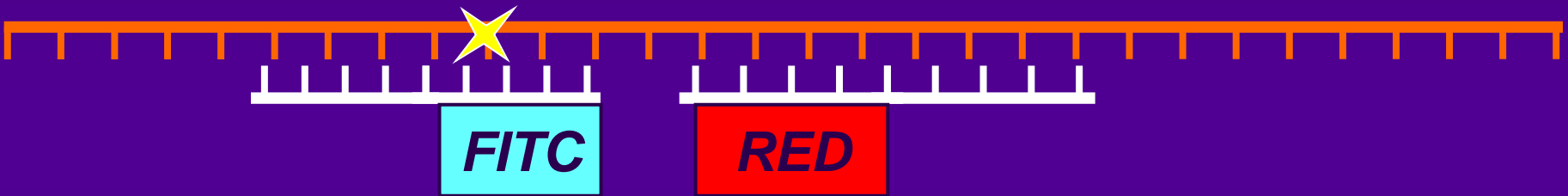
# *Návrh sond pro detekci SNP pomocí FRET*

GAGAGATCACTCAT-FITC    RED-CCATGCAGTGGA

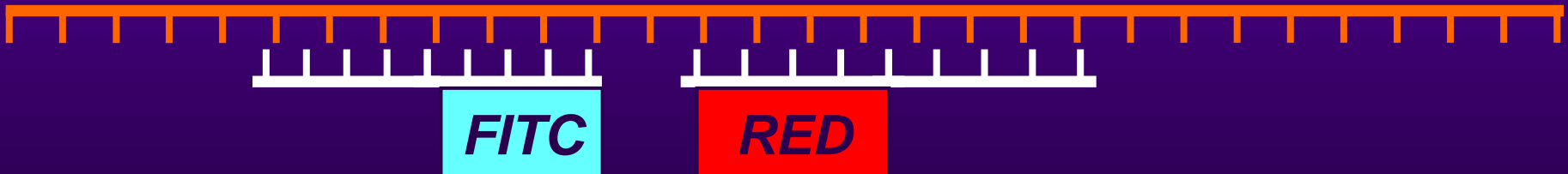
GACTCCACCTTTGAGAGATCACTCA(C)TCCTCAGGCCATGCAGTGGA

# Princip analýzy SNP pomocí FRET sond

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

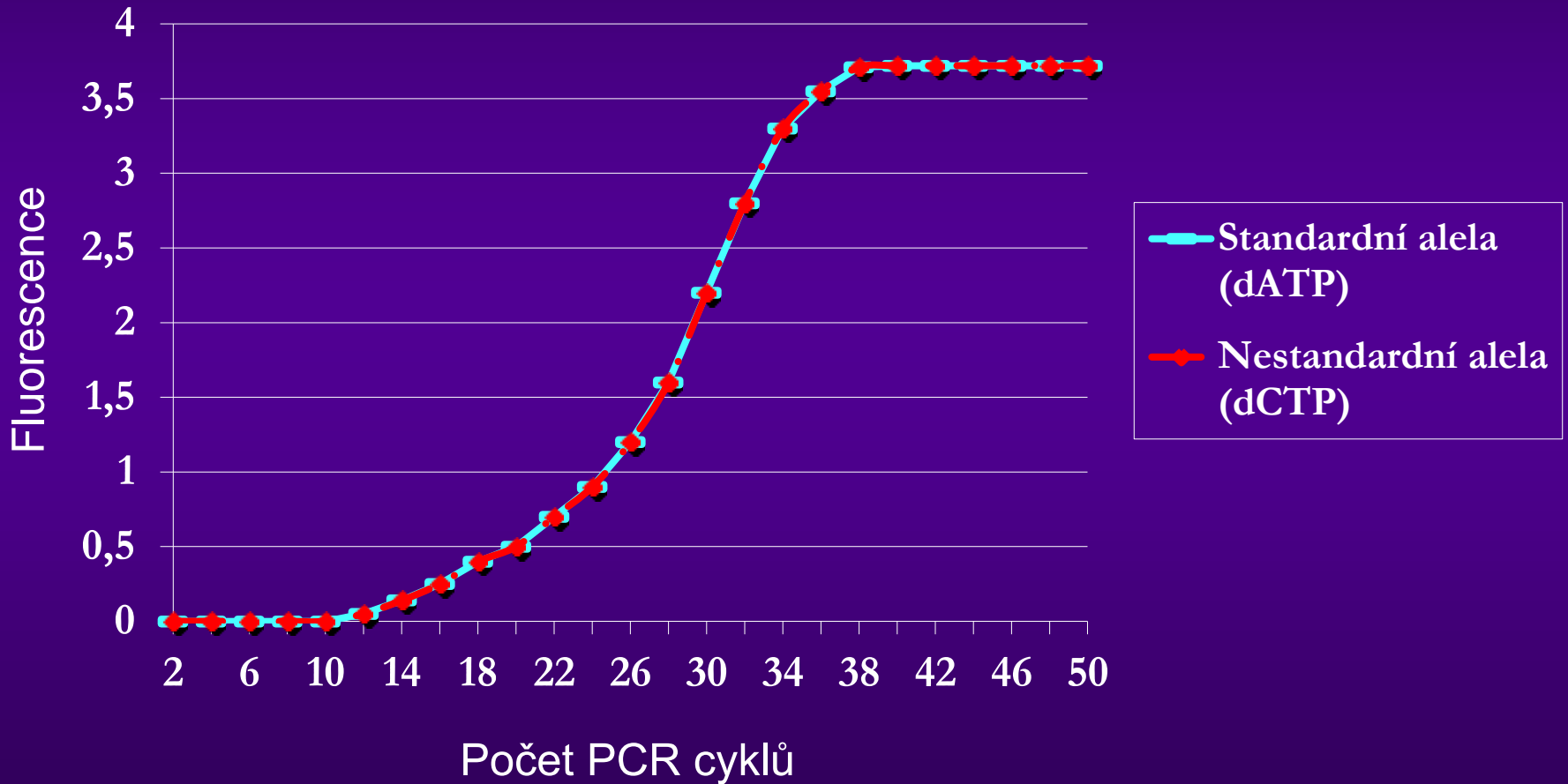


Standardní alela (dATP)  
 $T_m = 62^\circ\text{C}$

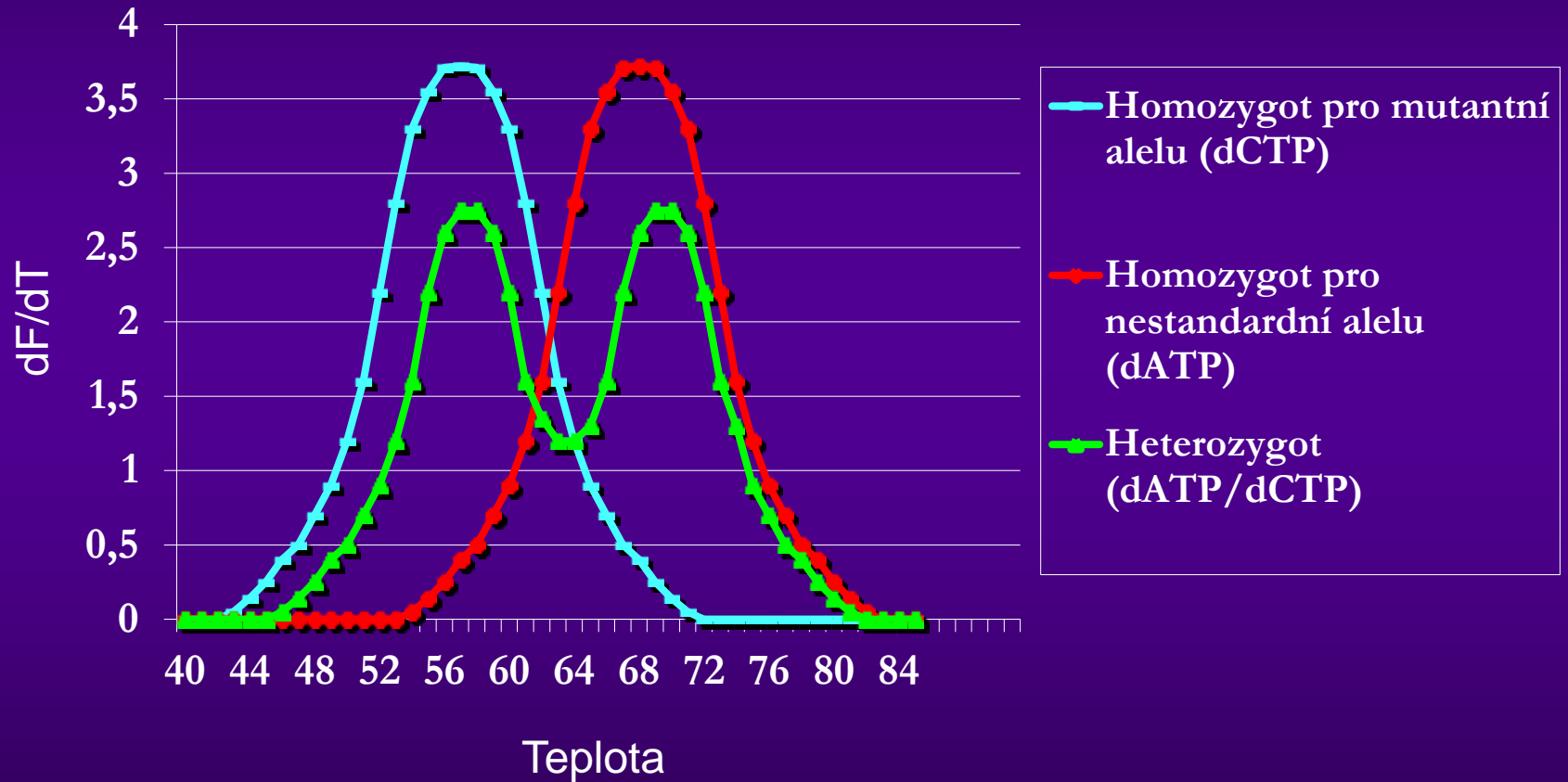


# Výsledek detekce SNP pomocí FRET

## Základní data

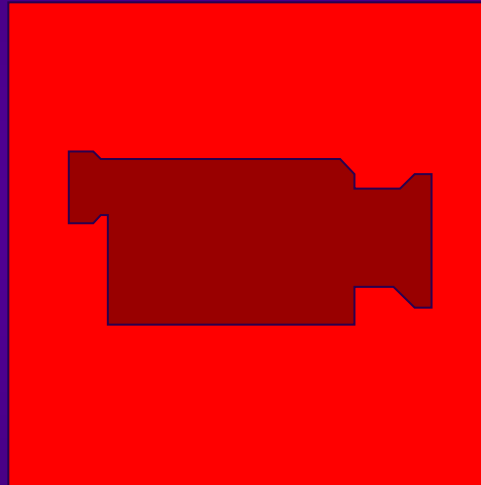


# Vyhodnocení detekce SNP s použitím FRET pomocí analýzy $T_m$



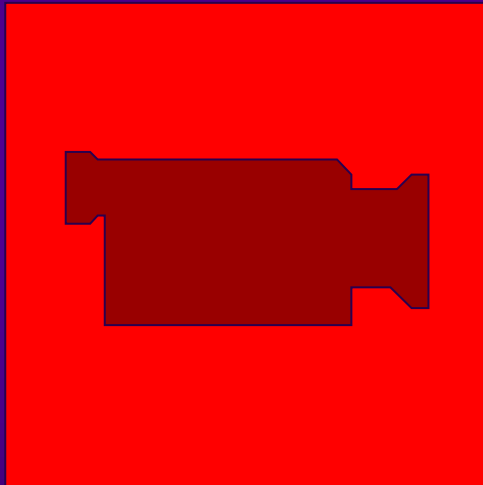


# *Light-up sonda*

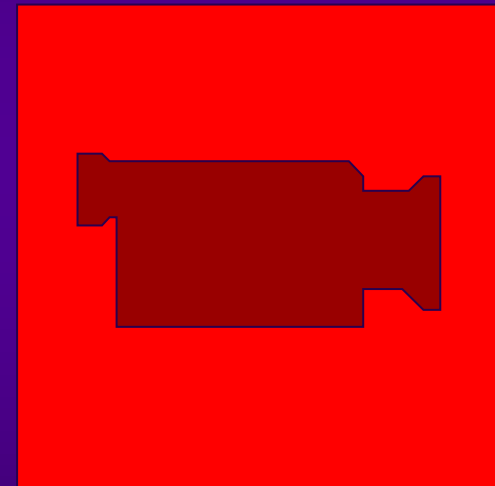


# *Strukturní sondy*

**Molecular Beacons**



**Scorpions**



# *Real Time přístroje*





**Je možné metodou real-time kvantifikovat také RNA?**

**Samozřejmě, použiješ metodu RT-Real-Time PCR**



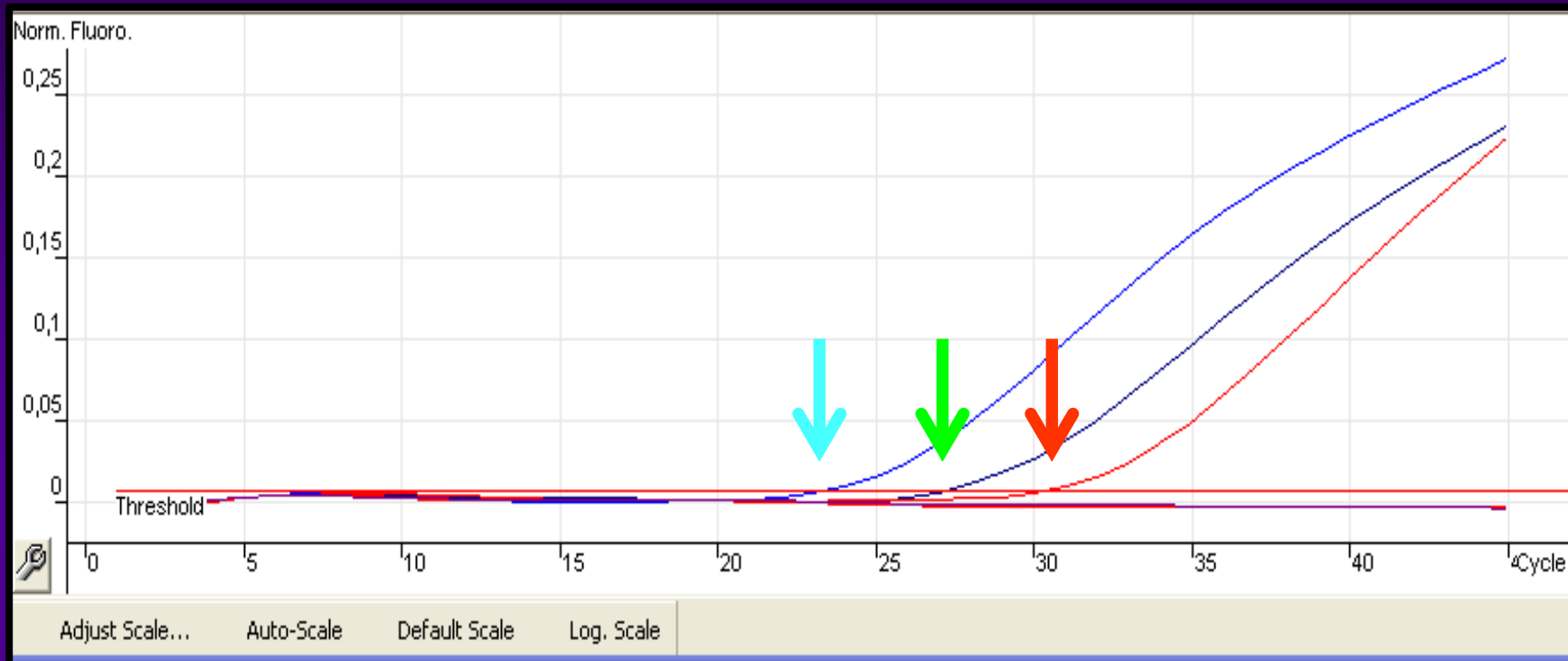
# ***Real-time PCR v mikrobiologii***

- **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



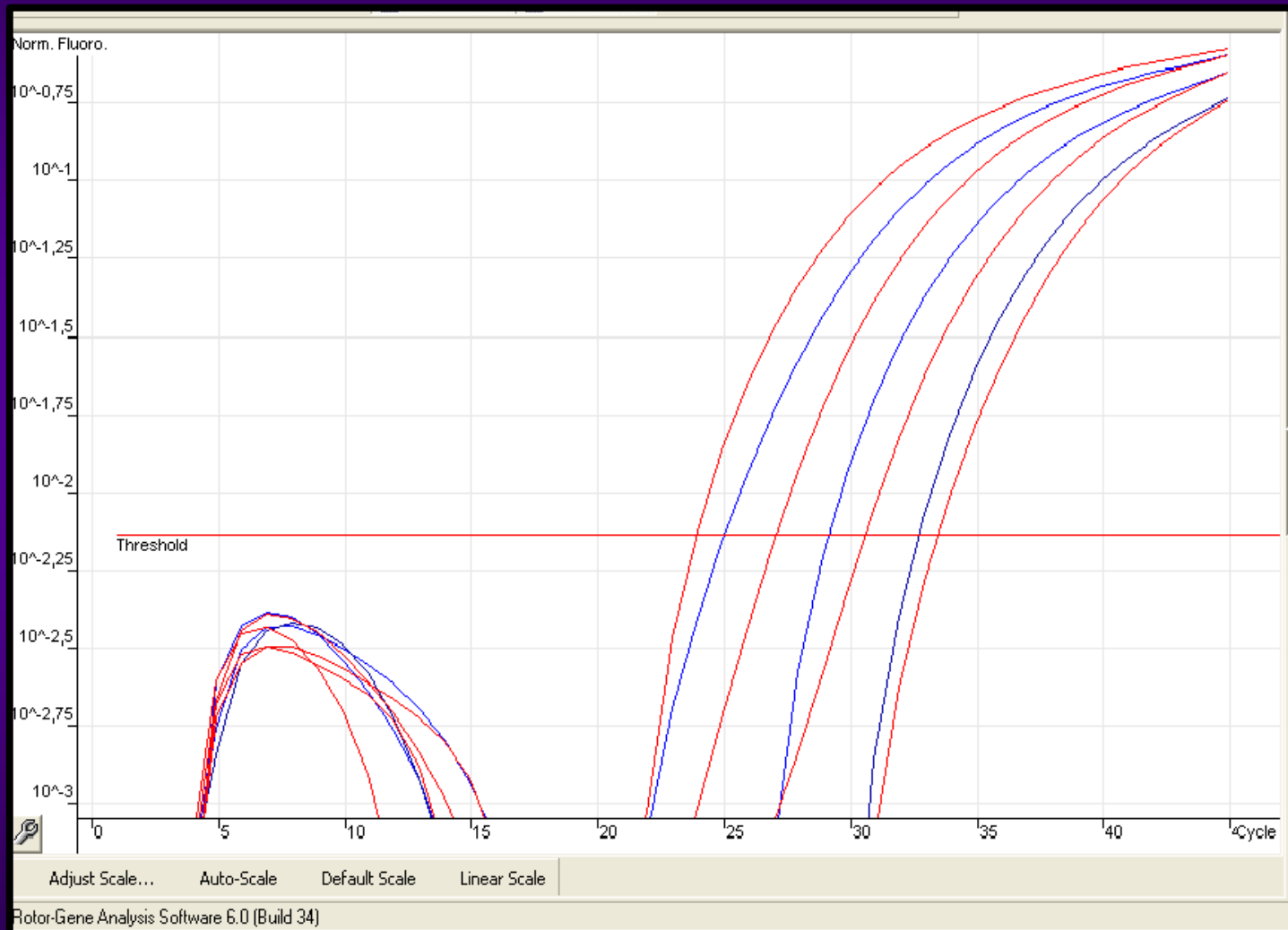
Name	Type	Ct
Sample 1	Unknown	23,78
Sample 2	Unknown	27,55
Sample 3	Unknown	
PK 10 <sup>2</sup>	Positive Control	30,68
NK	Negative Control	

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

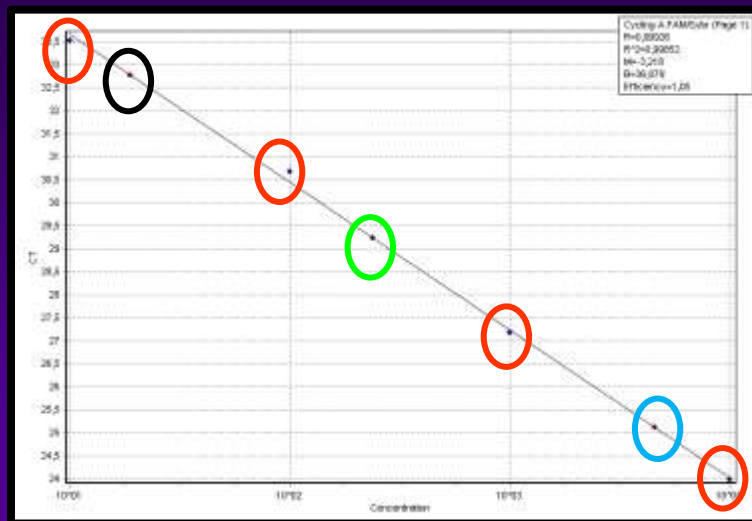




# Naměření dat



# 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 <sup>4</sup>	Standard	23,97	1,00E+04	1,03E+04
PK 10 <sup>3</sup>	Standard	27,16	1,00E+04	1,05E+03
PK 10 <sup>2</sup>	Standard	30,68	1,00E+04	8,47E+01
PK 10 <sup>1</sup>	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***

<b>Vzorek</b>	<b>Ct</b>	<b>Počet virionů/μl</b>
PK 10 <sup>4</sup>	22,52	1,300 x 10 <sup>4</sup>
PK 10 <sup>3</sup>	27,86	6,373 x 10 <sup>2</sup>
PK 10 <sup>2</sup>	30,95	1,119 x 10 <sup>2</sup>
PK 10 <sup>1</sup>	35,09	1,078 x 10 <sup>1</sup>
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***

<b>Vzorek</b>	<b>Ct</b>	<b>Počet virionů/μl</b>
PK 10 <sup>4</sup>	22,52	1,300 x 10 <sup>4</sup>
PK 10 <sup>3</sup>	27,86	6,373 x 10 <sup>2</sup>
PK 10 <sup>2</sup>	30,95	1,119 x 10 <sup>2</sup>
PK 10 <sup>1</sup>	35,09	1,078 x 10 <sup>1</sup>
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 hodnoty Ct odečtete z kalibrační křivky počty virionů/ $\mu$ l**
- 3) Vypočítejte průměr ze dvou měření pro jednotlivé vzorky**
- 4) Přepočítejte počet virionů/ml**



# Řešení pro Tabulku I

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

**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***

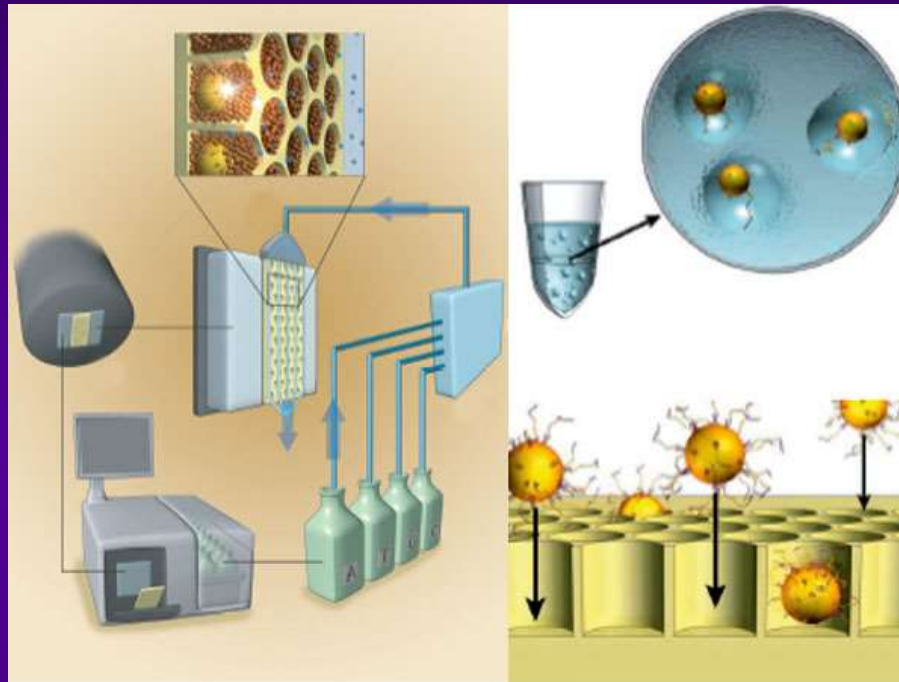
<b>Vzorek</b>	<b>Ct</b>	<b>Počet virionů/μl</b>
PK 10 <sup>4</sup>	21,59	1.041E+04
PK 10 <sup>3</sup>	25,53	8.779E+02
PK 10 <sup>2</sup>	28,77	1.149E+02
PK 10 <sup>1</sup>	32,74	9.522E+00
Vzorek 1	30,53	
Vzorek 1	31,89	
Vzorek 1	31,30	
Vzorek 2	33,11	
Vzorek 2	33,34	
Vzorek 2	33,69	
Vzorek 3	26,63	
Vzorek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

# Řešení pro Tabulku II

Vzorek	Ct	Počet virionů/ $\mu$ l	Průměr	Počet virionů/ml
PK 10 <sup>4</sup>	21,59	1.041E+04	-	-
PK 10 <sup>3</sup>	25,53	8.779E+02	-	-
PK 10 <sup>2</sup>	28,77	1.149E+02	-	-
PK 10 <sup>1</sup>	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*

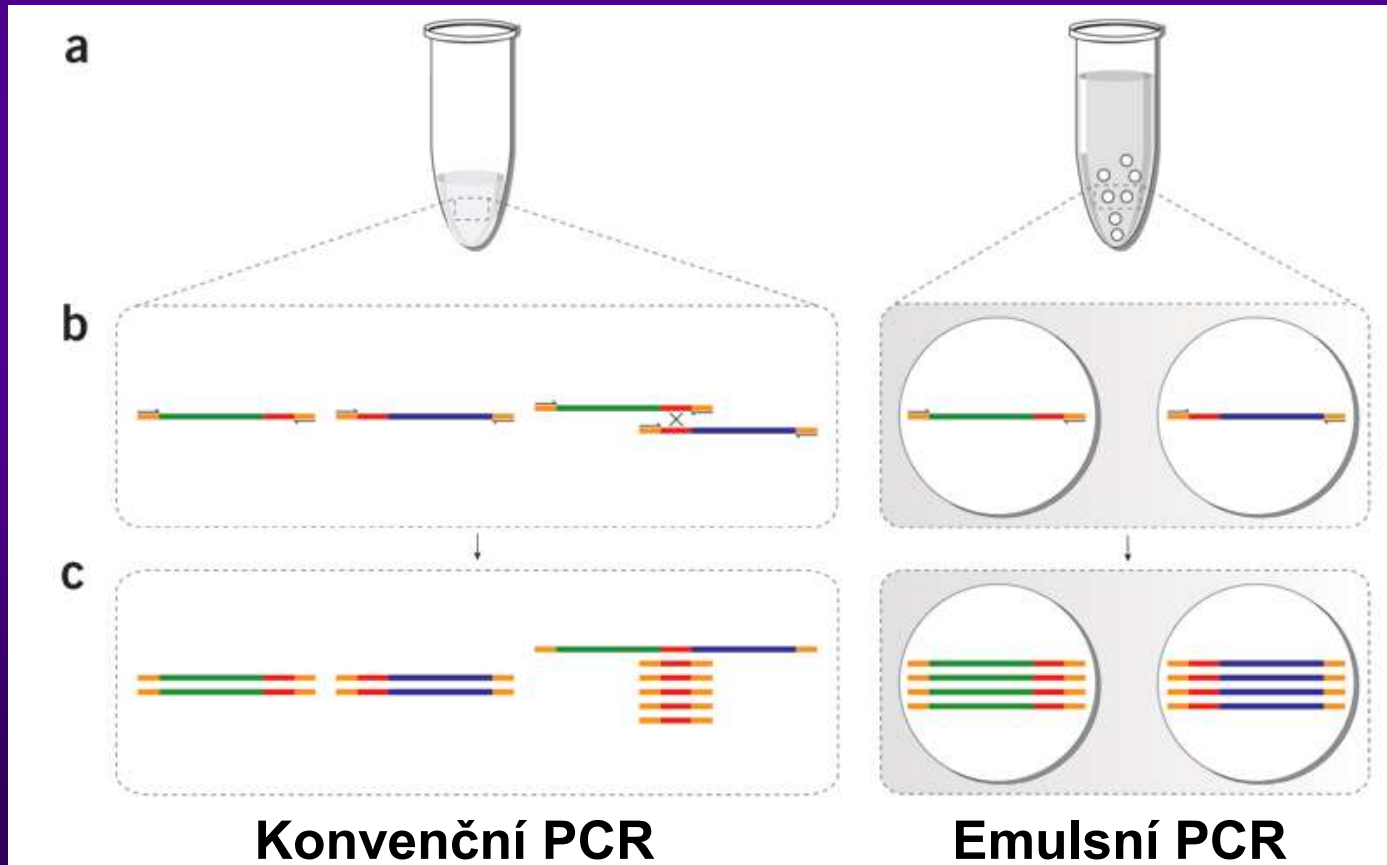
454 Life  
Sciences



- 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

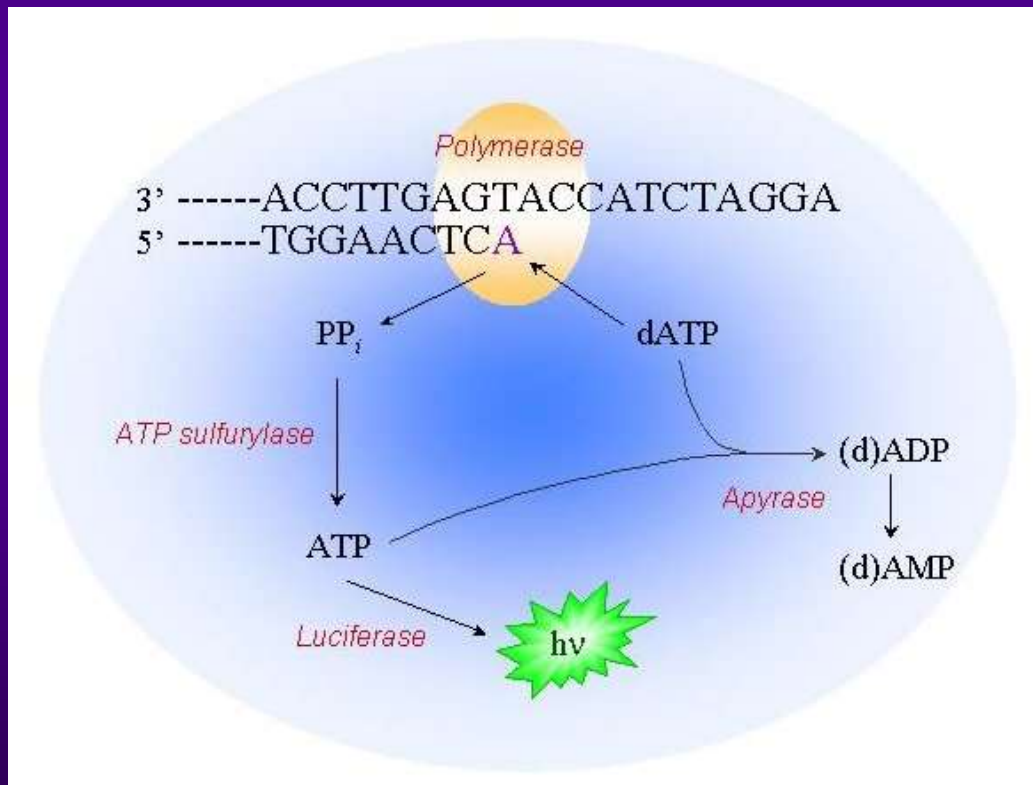


- bakterie v biofilmech
- mikroorganismy v potravinářských vzorcích
- nekultivovatelné bakterie

**Používá se ve spojení s pyrosekvenováním**

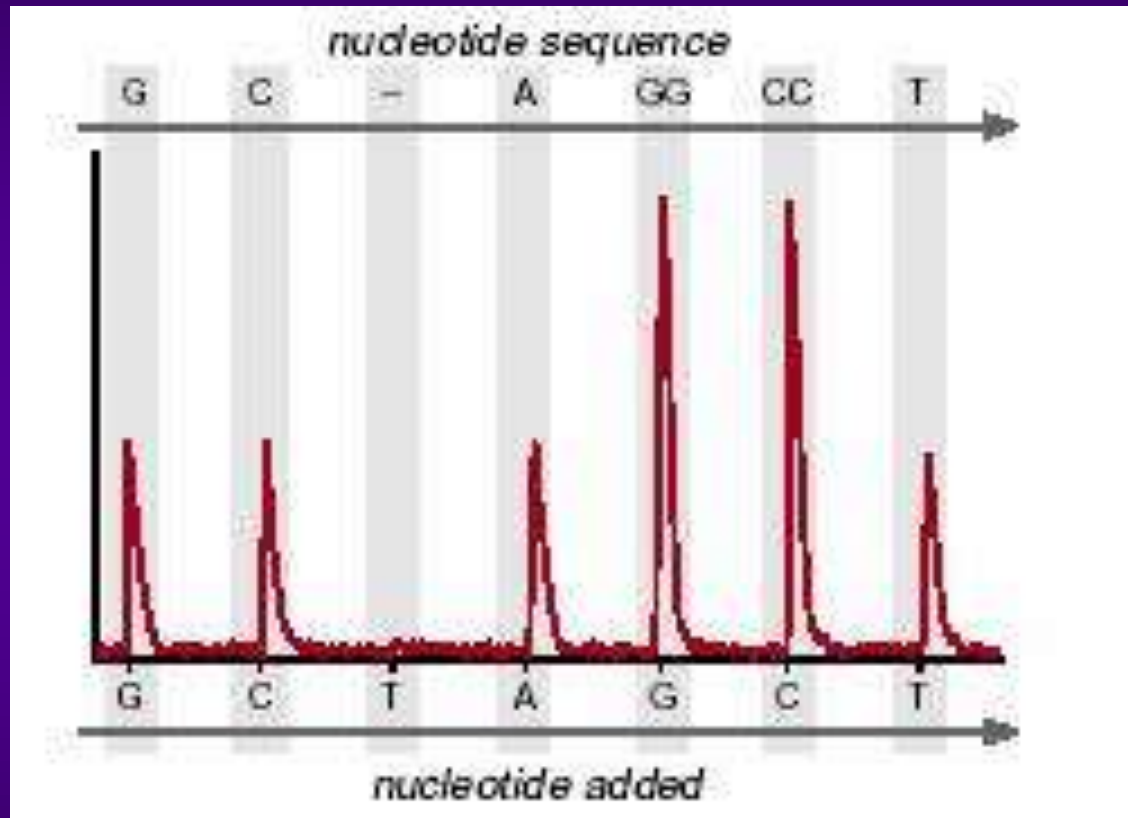
# Pyrosekvenování

- 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**