



PCR v reálném čase



doc. RNDr. Milan Bartoš, Ph.D.

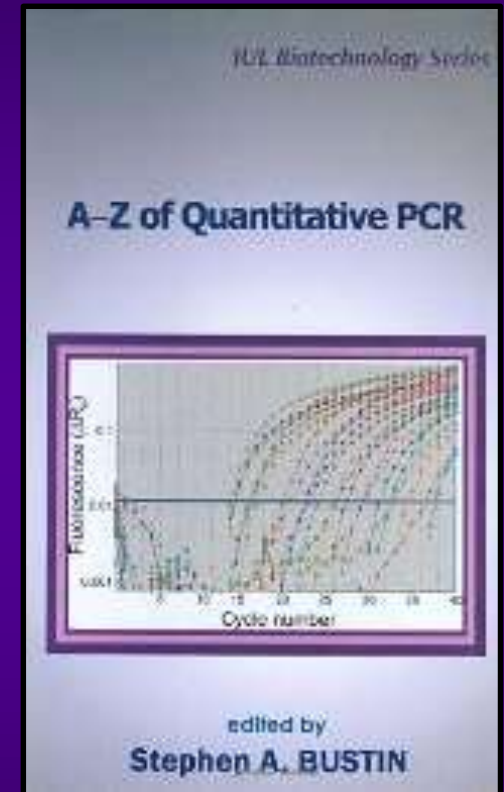
Bartos.Milan@atlas.cz

Přírodovědecká fakulta MU, 2017

Doporučená literatura



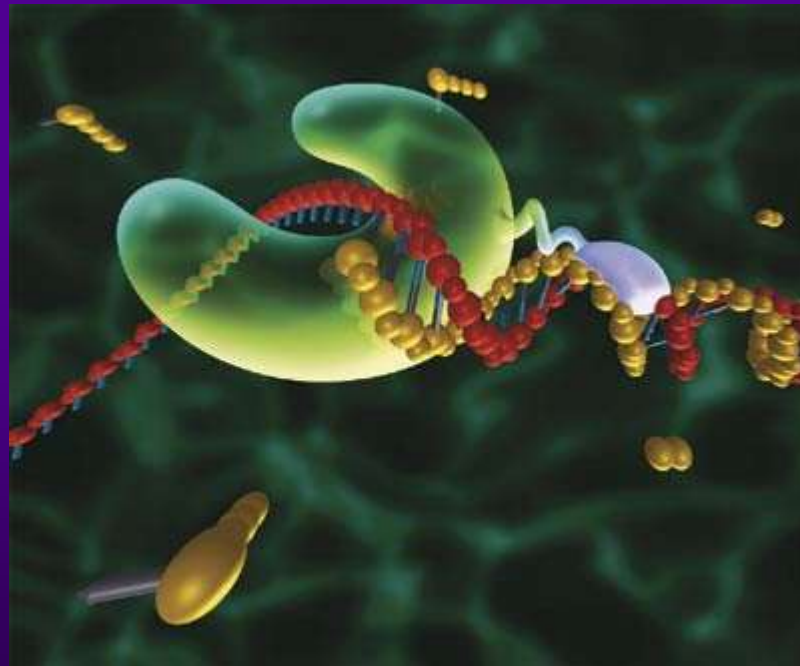
Bustin S.A. (2004): A-Z of Quantitative PCR, International University Line, La Jolla, California



Obsah přednášky

- 1) Princip PCR v reálném čase**
- 2) Komponenty specifické pro real-time PCR**
- 3) Nespecifické formáty**
- 4) Specifické formáty**
- 5) Fluorofory a jejich vlastnosti**
- 6) Vlastnosti zhášečů**
- 7) Sondy**
- 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**)

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

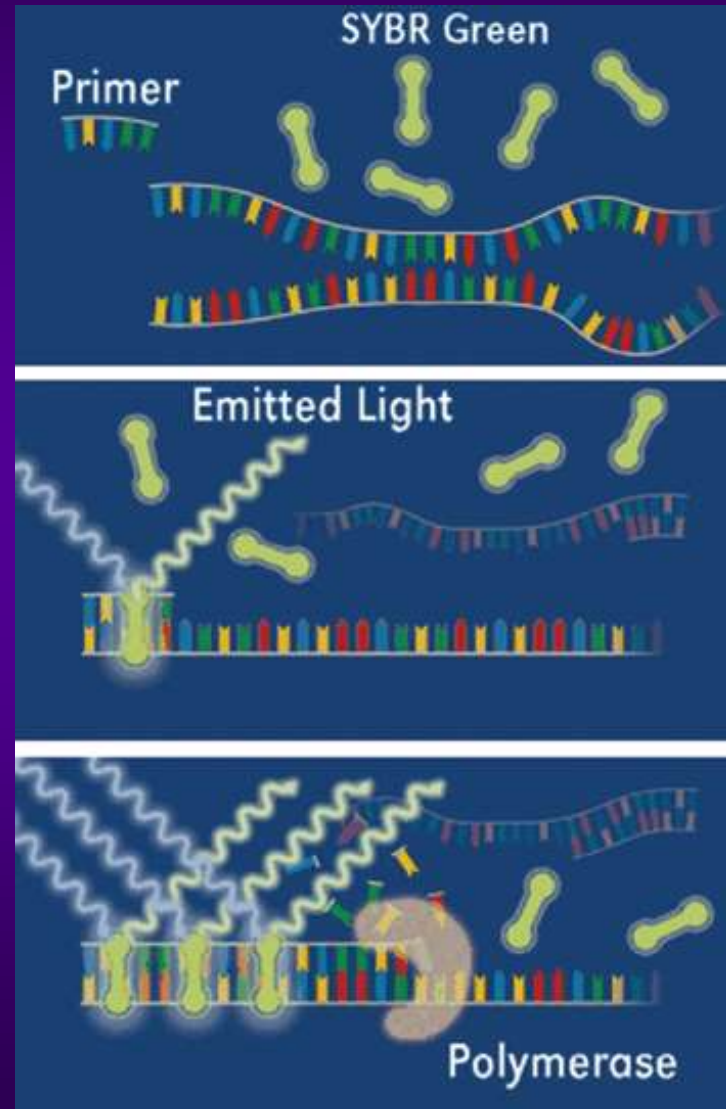
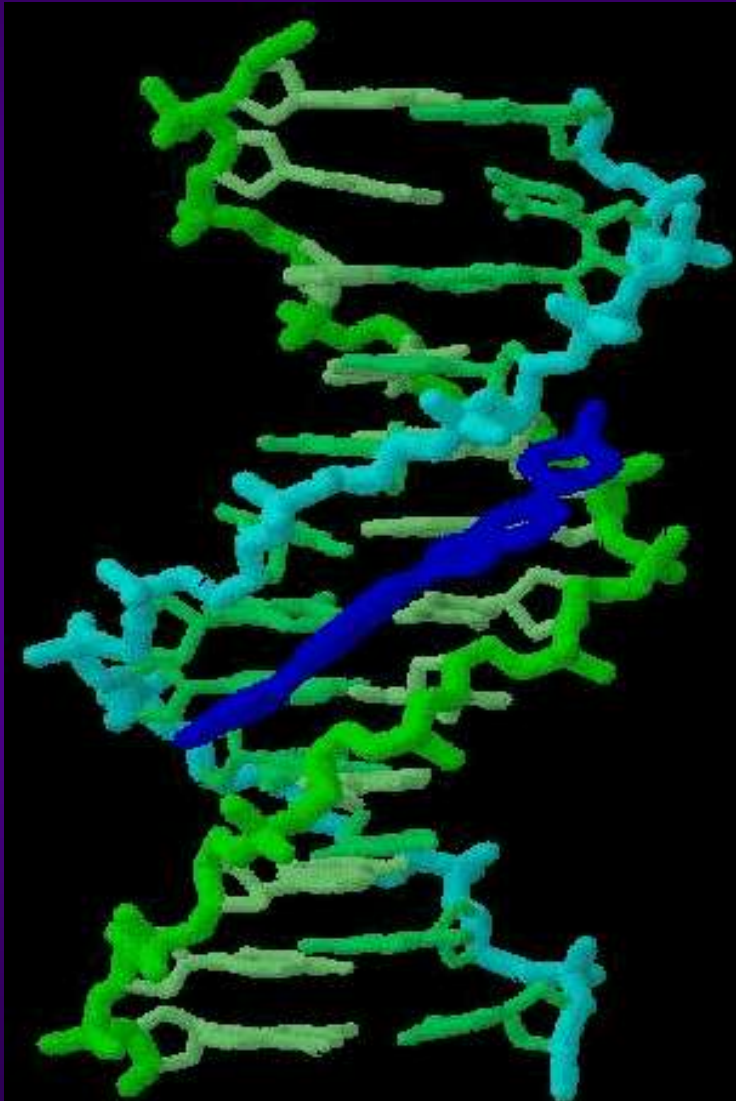
- **Nespecifické metody**: založené na nespecifické vazbě fluoroforu do vznikající molekuly dsDNA, **fluorofor vázaný do struktury dsDNA svítí více**
- **Specifické metody**: založené na specifické vazbě sondy označené fluoroforem

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



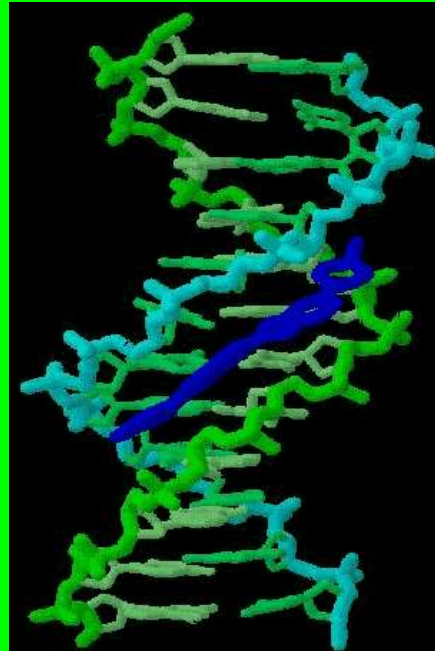
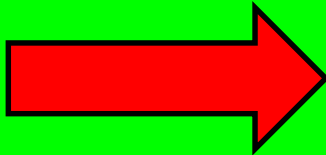
Co se děje uvnitř termocykleru při real-time PCR?





**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 -

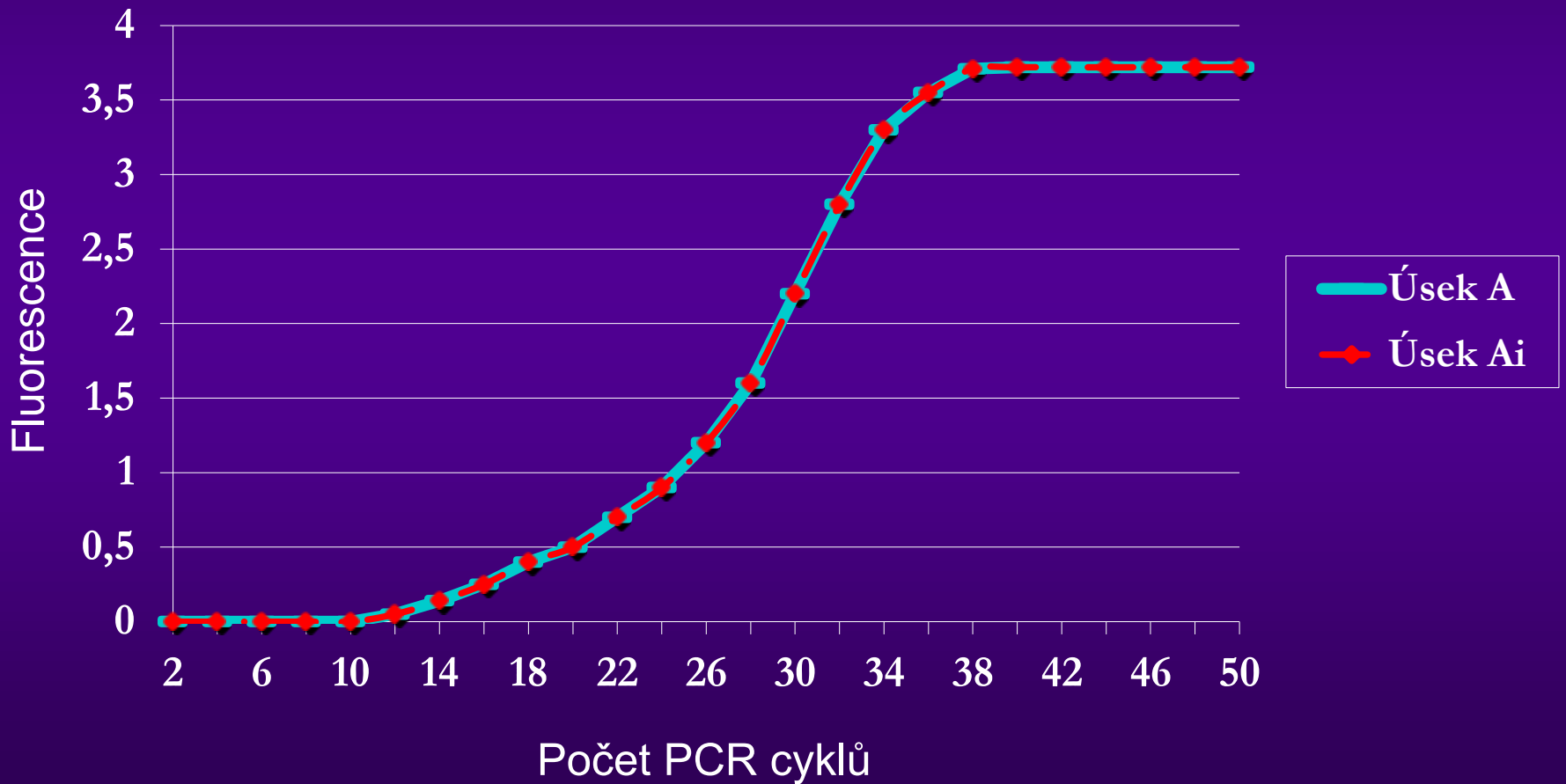
Úsek A o délce 200 bp ohraničený primery

CCTCCTGCCTCTACCAATCGCCAGTCAGGAAGGCAGCCTACCCCGCTG
ACTCCACCTTTGAGAGACTCATCCTCAGGCCATGCAGTGGAATTCC
ACAACCTTCCACCAAACCTCTGCAAGATCCCAGAGTGAGAGGCCTGTAT
CTCCCTGCTGGTGGCTCCAGTTCAGGAACAGTAAACCCTGTTCCGACT
ACTGCCTC

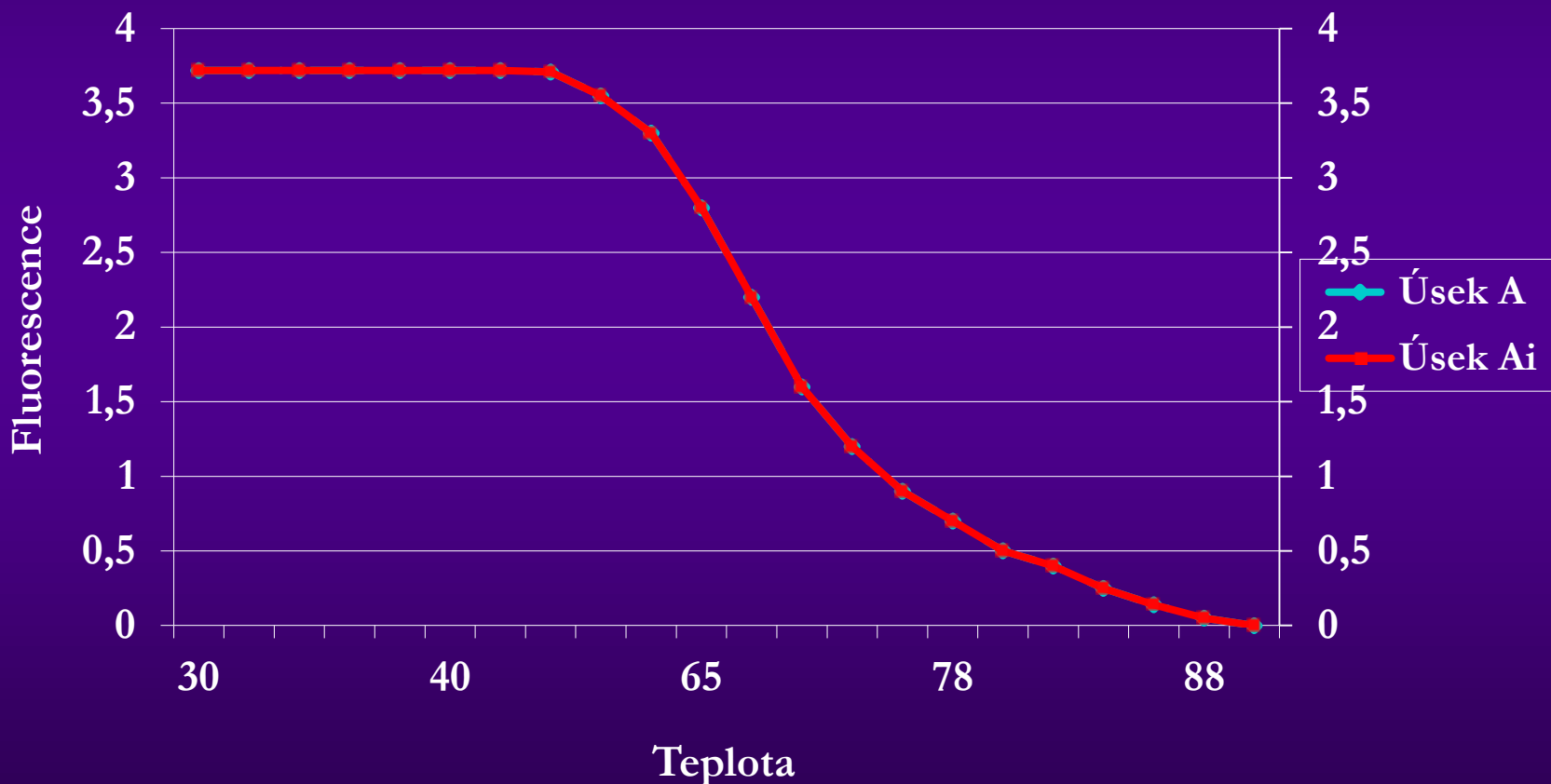
Úsek Ai s inzercí 5 bp o délce 205 bp ohraničený primery

CCTCCTGCCTCTACCAATCGCCAGTCAGGAAGGCAGCCTACCCCGCTG
ACTCCACCTTTGAGAGACACTACTCATCCTCAGGCCATGCAGTGGA
ATTCCACAACCTTCCACCAAACCTCTGCAAGATCCCAGAGTGAGAGGCC
TGATCTCCCTGCTGGTGGCTCCAGTTCAGGAACAGTAAACCCTGTTCC
GACTACTGCCTC

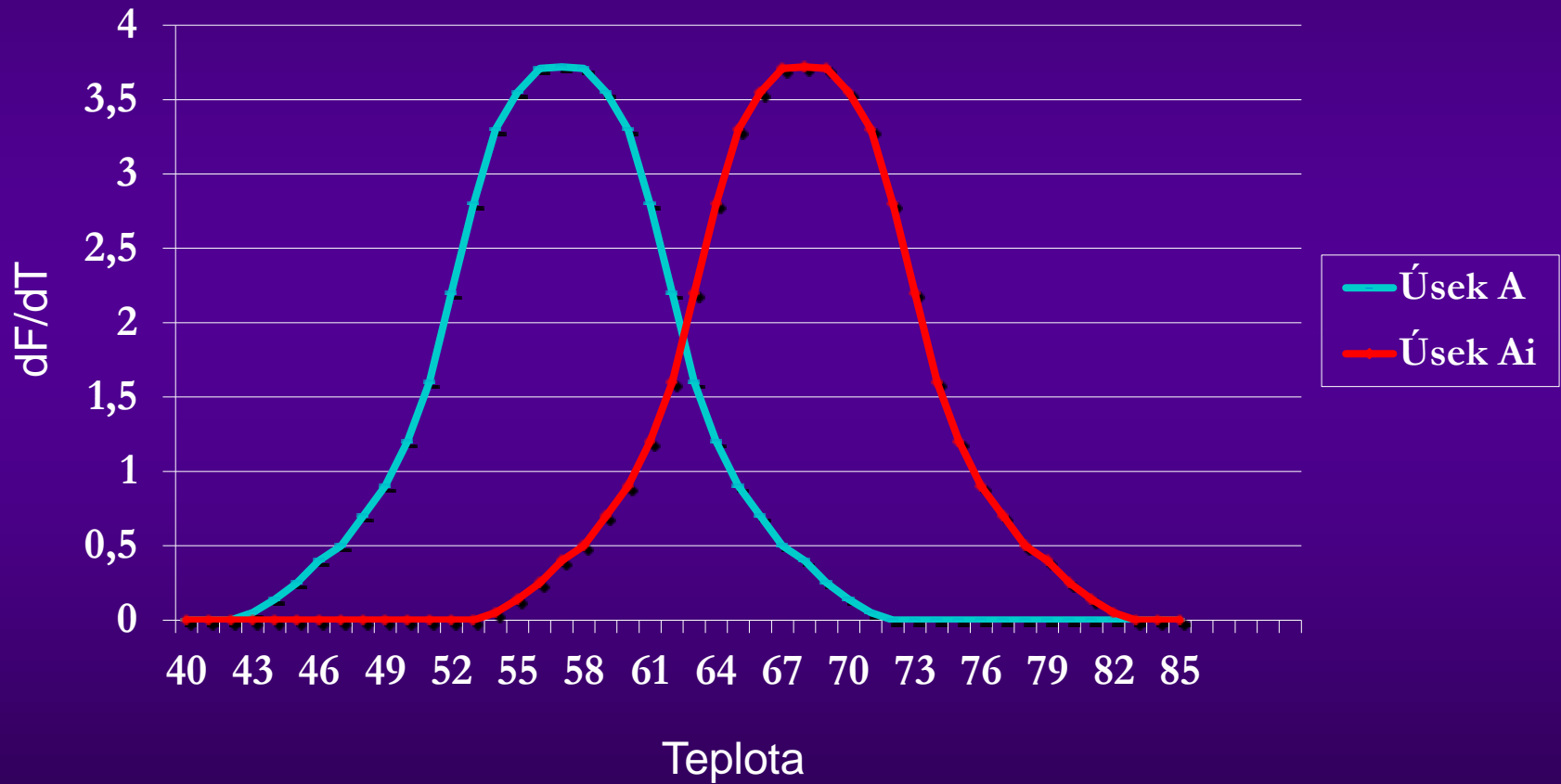
Výsledek detekce pomocí SYBR Green I Základní data



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**

Komponenty specifických systémů real-time PCR

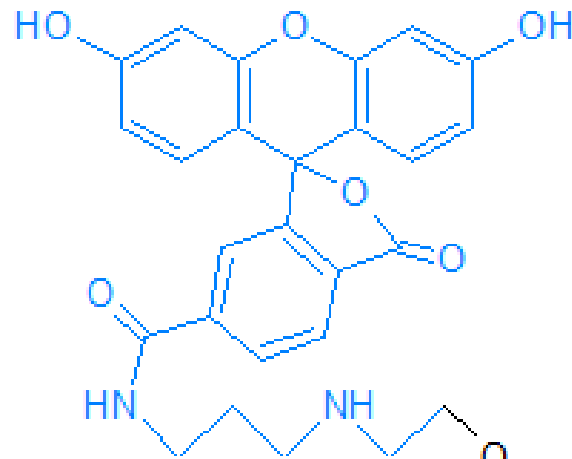
- **Fluorofory**
- **Zhášeče**
- **Sondy**

Vlastnosti fluoroforů

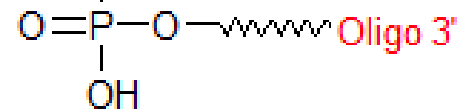
- 1) Velká část fluoroforů jsou heterocyklické polyaromatické uhlovodíky**
- 2) Jejich konečná fluorescence (emise) závisí na schopnosti molekuly fluoroforu absorbovat a emitovat fotony**
- 3) Emise fluoroforu je silně závislá na teplotě**

Fluorofor FAM

Fluorescein

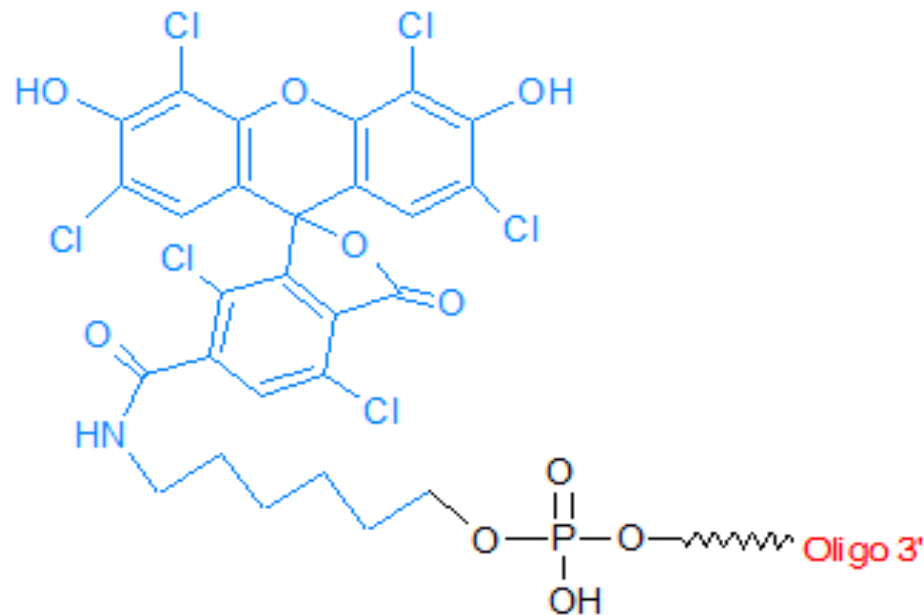


5'-Fluorescein (6-FAM)
[26-6431-XX]



Fluorofor HEX

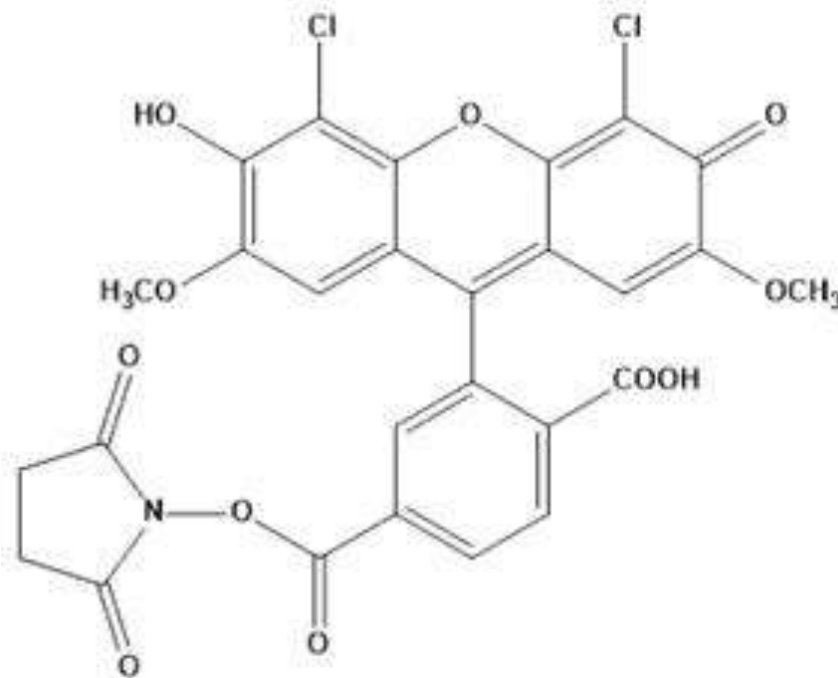
HexachloroFluorescein



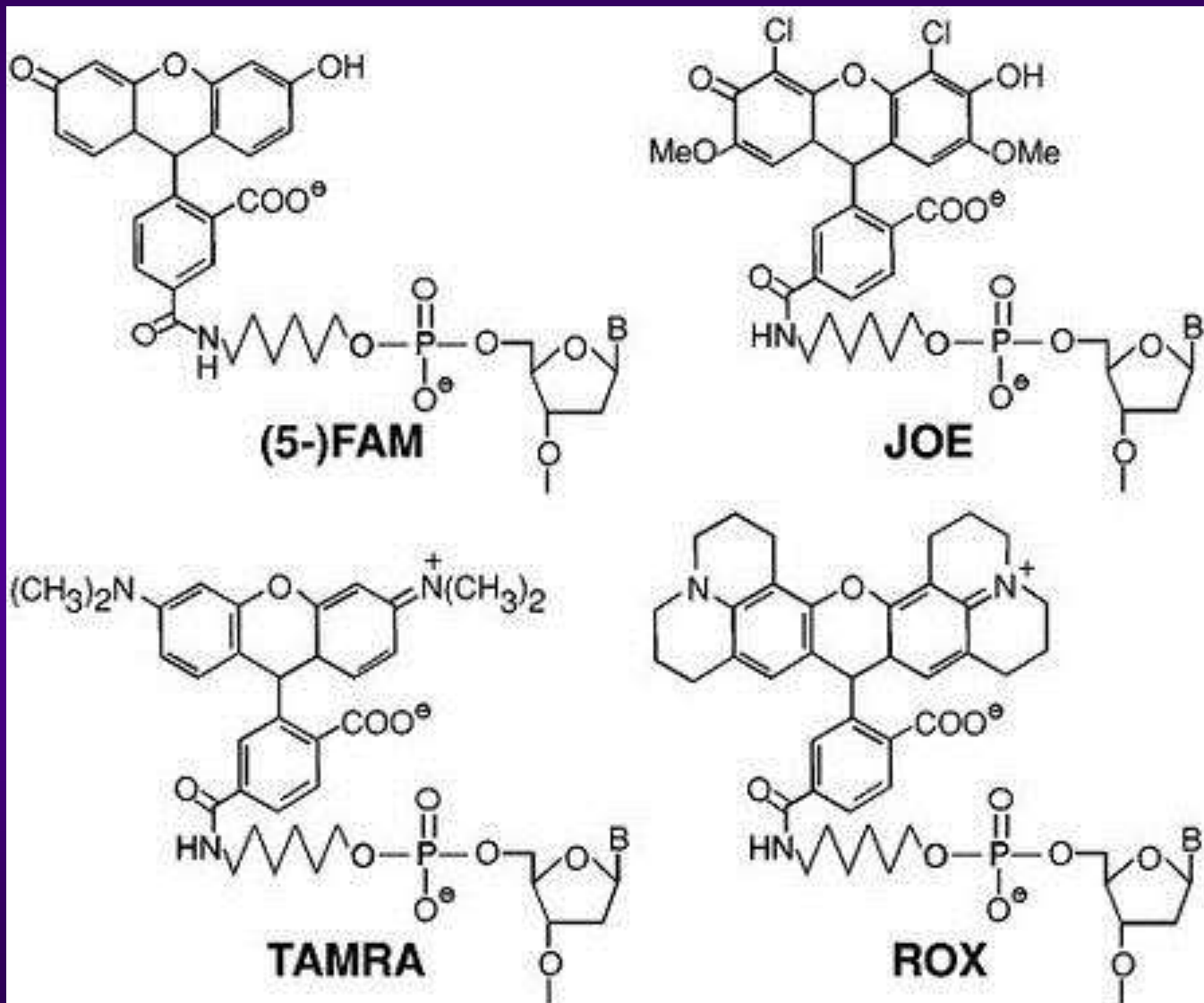
5' Hexachloro-Fluorescein (HEX)
[26-6432-XX]

Fluorofor JOE

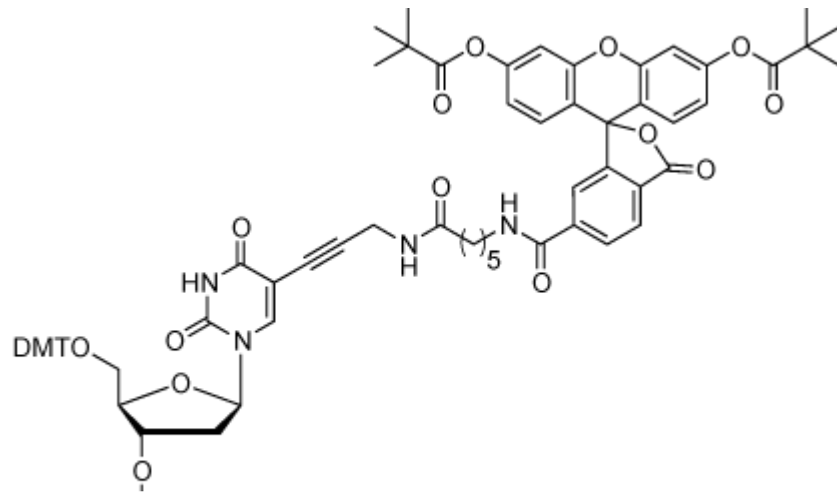
6-carboxy-4',5'-dichloro-2',7'-
dimethoxyfluorescein N-hydroxysuccinimide
ester



Způsob vazby na DNA

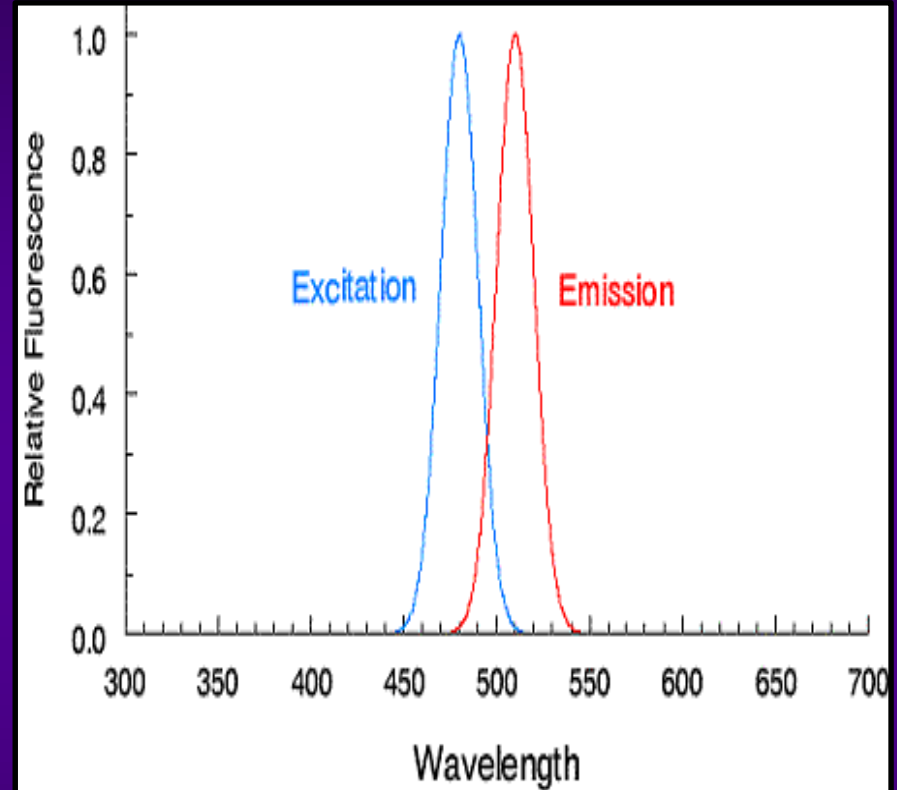


Způsob vazby na DNA – jiný způsob



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

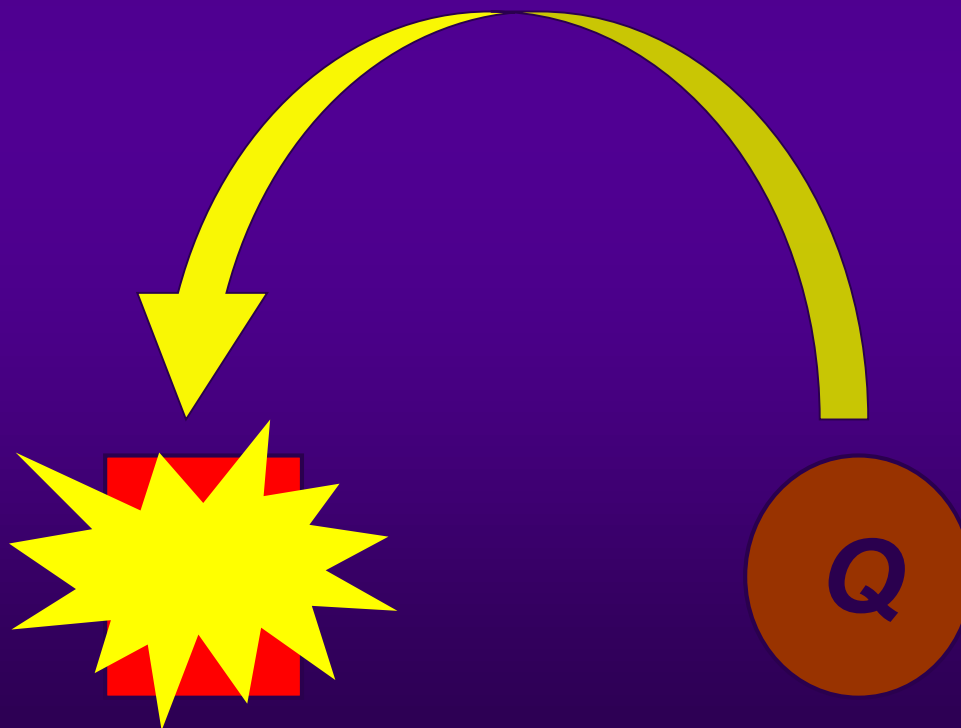
Heterocyklické polyaromatické uhlovodíky schopné absorbovat nebo disipovat energii z excitovaného fluoroforu

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.

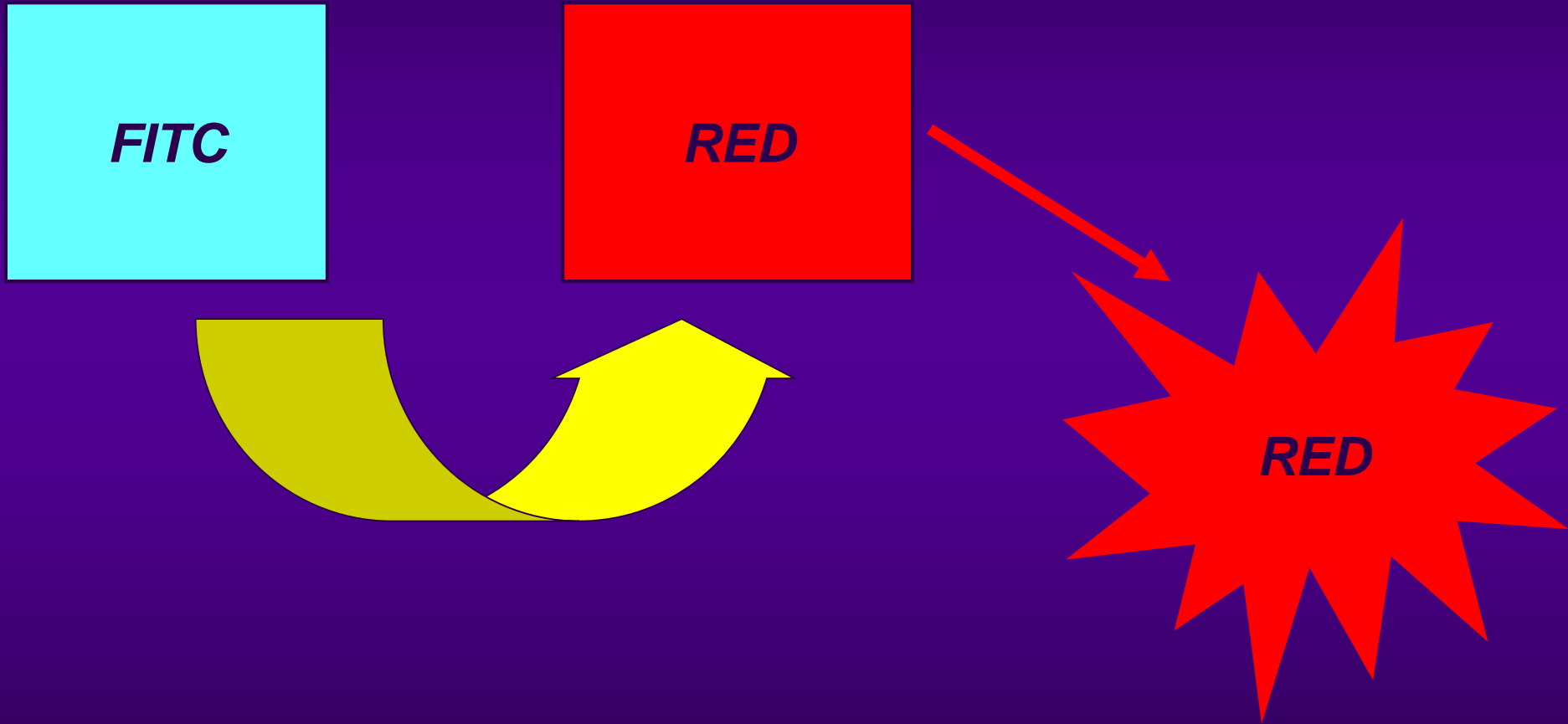


FRET

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).

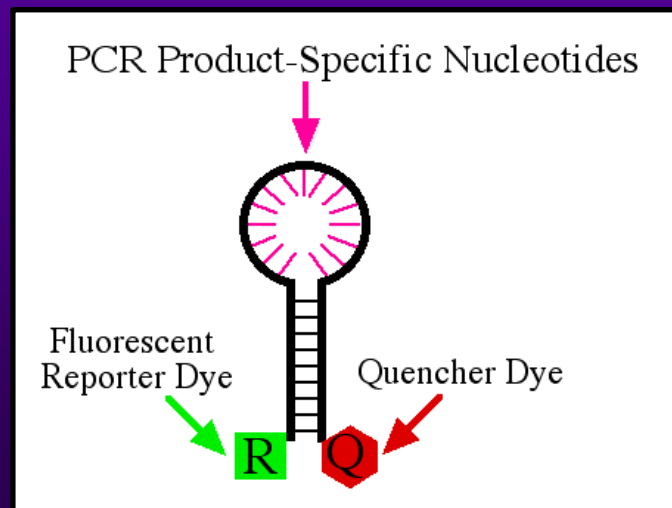
Schéma FRET



Sondy

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

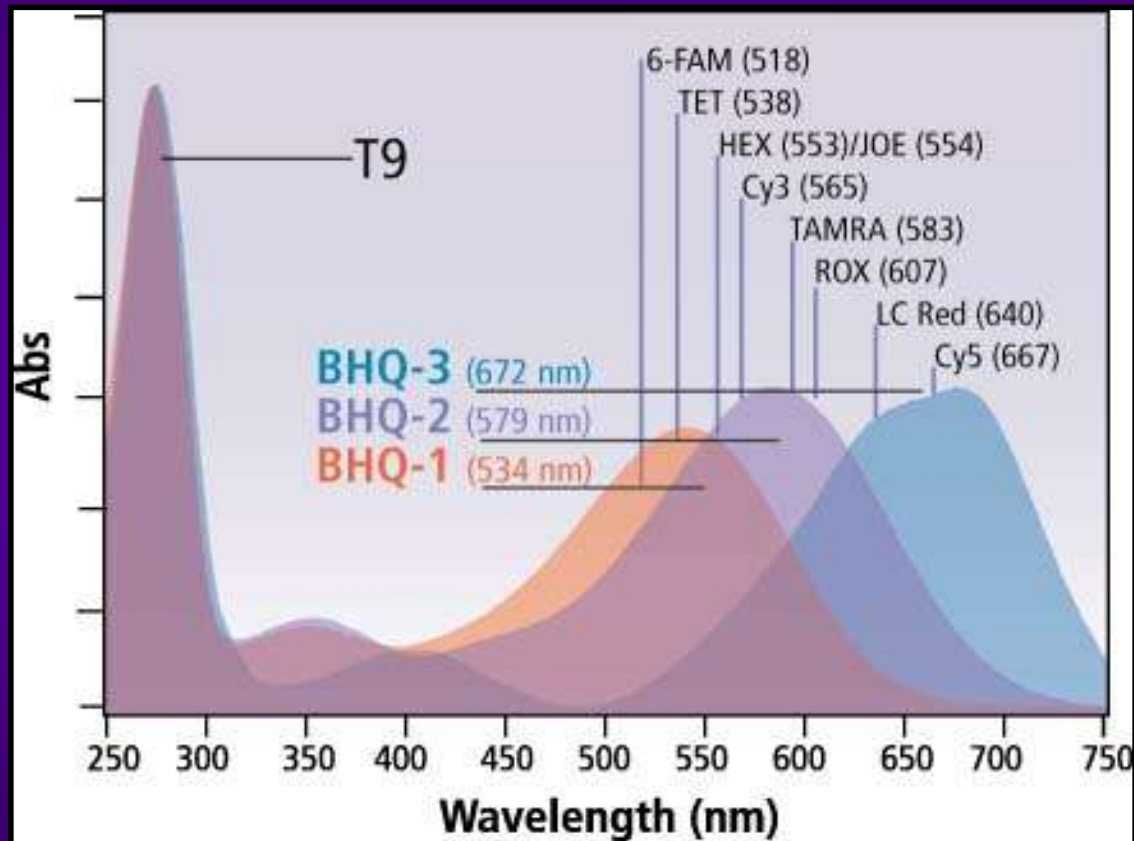
Umožňuje vázat fluorofor a zhášec v efektivní vzdálenosti od sebe a tím zajistit proces zhášení fluoroforu do doby detekce



Fluorofor, sonda, zhášec



Nejčastěji používané kombinace fluorofor/proximální zhášec



FAM

5'

3'

BHQ1

Formáty 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

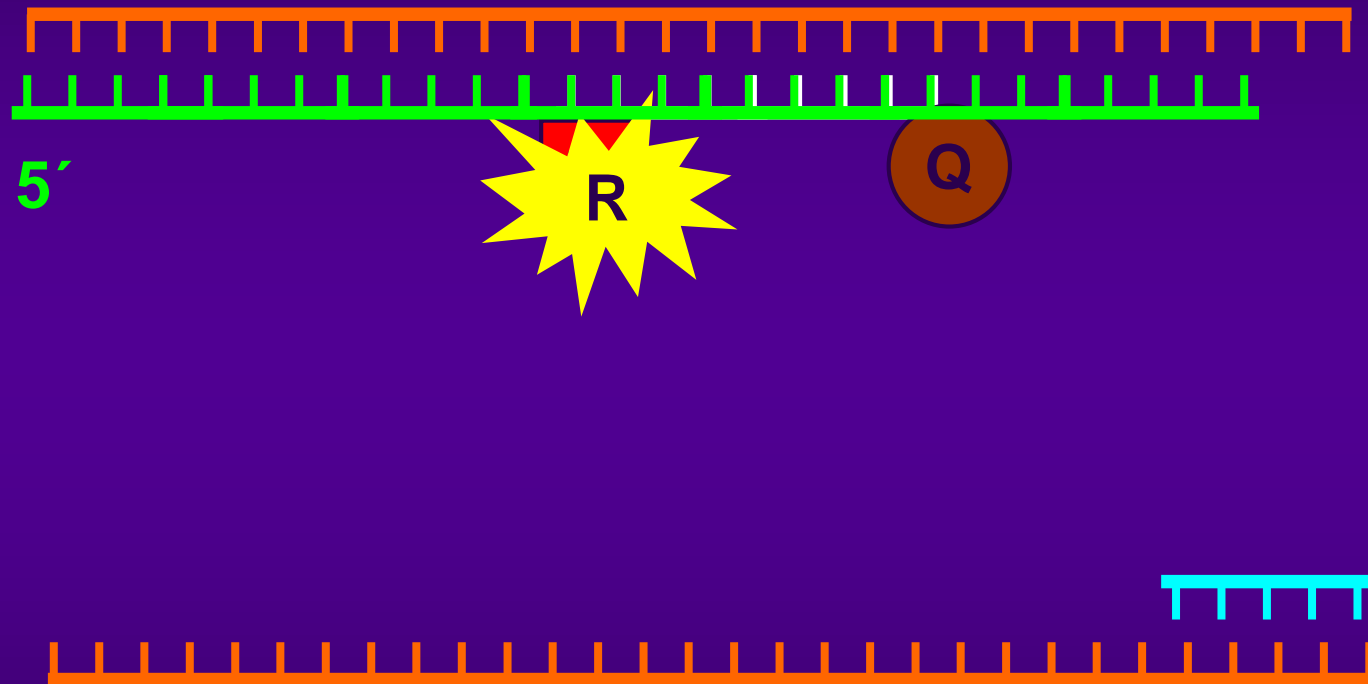
Při jakémkoli formátu je výsledek pořád stejný



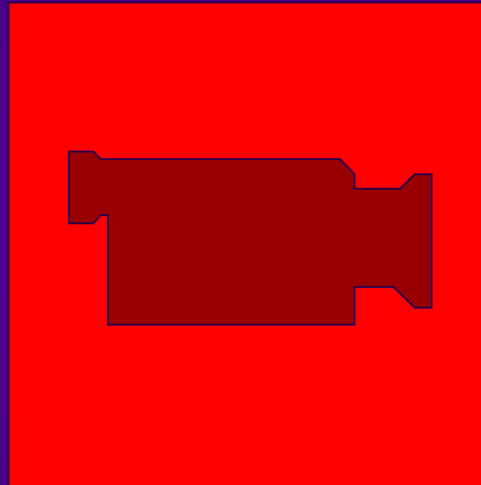
TaqMan sonda

- 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

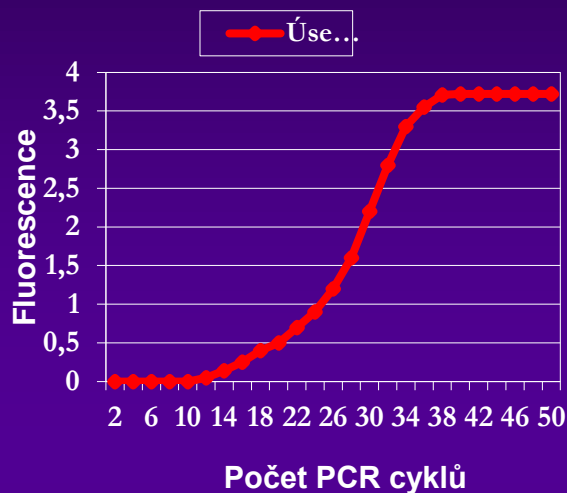
CCTCCTGCCTCTACCAATCGCCAGTCAGGAAGGCAGCCTACCCCGCTGACTCC
ACCTTTGAGAGACACTCATCCTCAGGCCATGCAGTGGAATTCCACAA

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

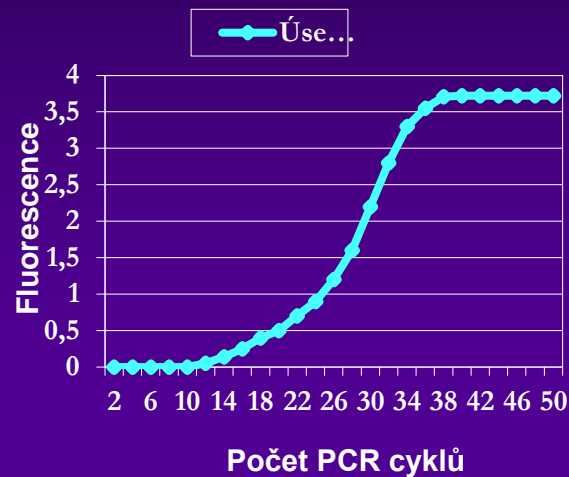
TTGTTCACCTCACCATACTGCTCTCAGGCAAGCAATTCTTTGCTGGGGGGAACT
AATGACTCTAGCTACCTGGGTGGGTGGTAATTTGGAAGATCCAACATC

Výsledek detekce pomocí TaqMan sond

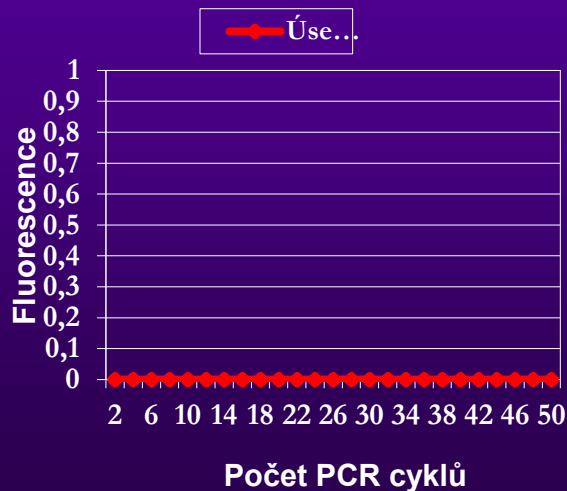
Snímací kanál 530 nm



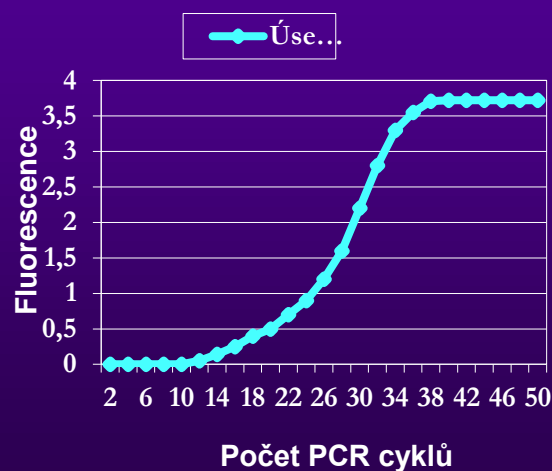
Snímací kanál 560 nm



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?

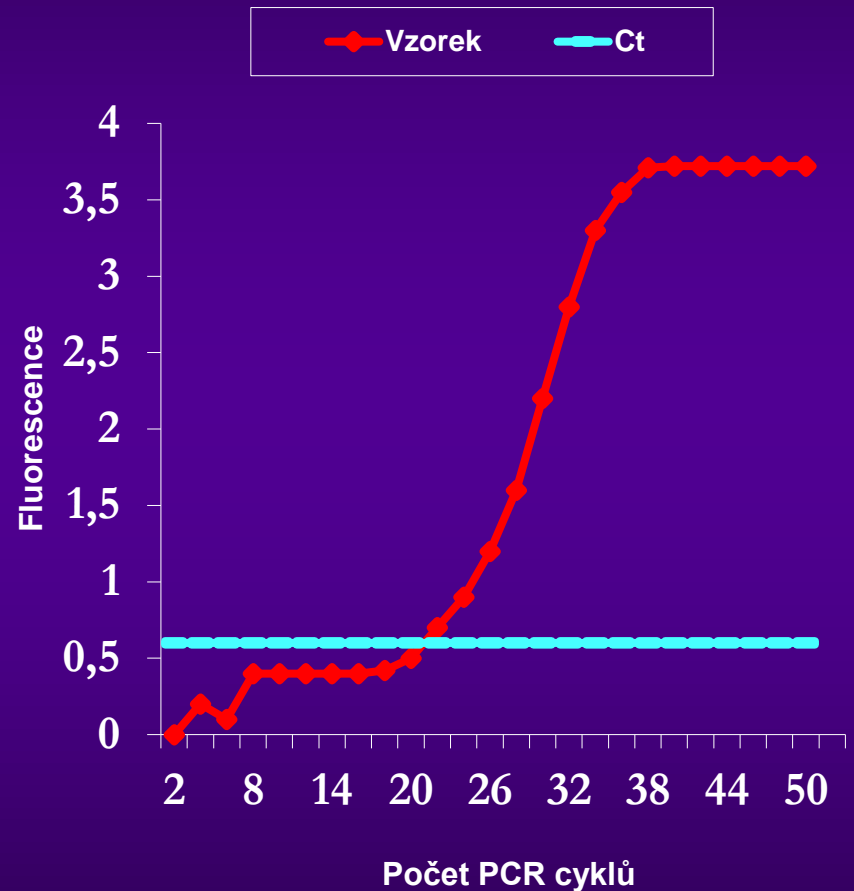
Jaký je počet kopií (koncentrace) úseku A ve vzorku 2?

Postup kvantifikace pomocí Real Time PCR s využitím TaqMan sondy

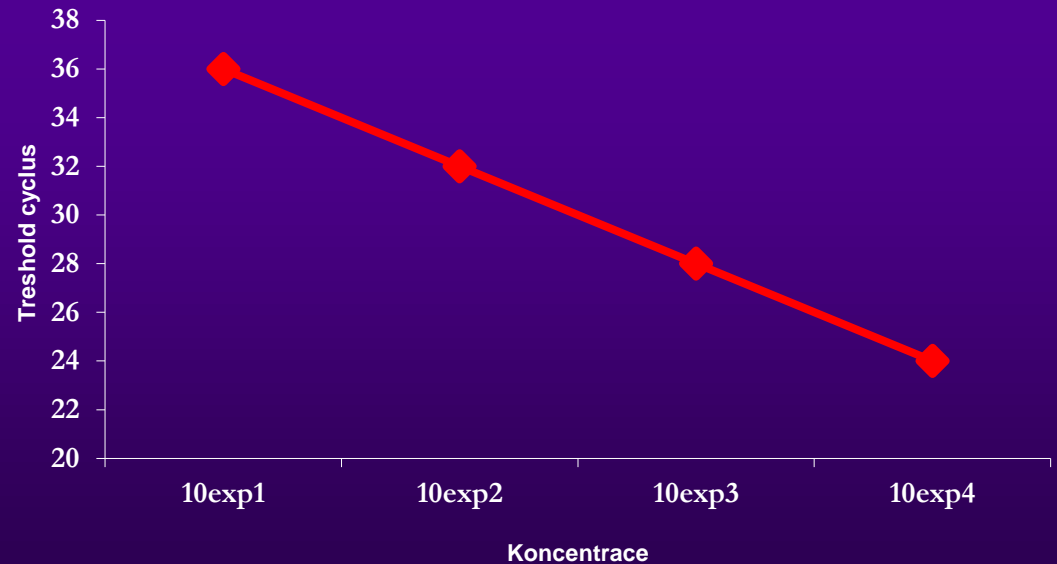
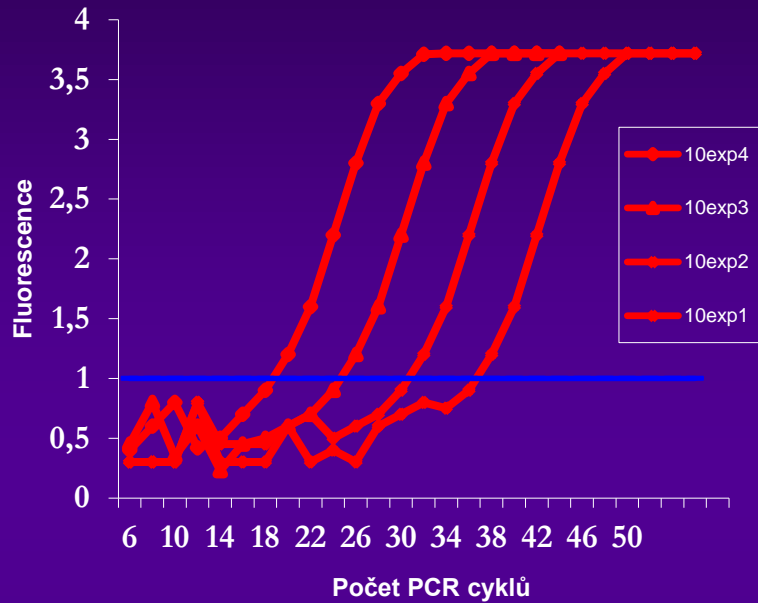
- 1. Stanovení Ct (threshold cycle), Cp (crossing point)**
- 2. Vytvoření kalibrační křivky**
- 3. Kvantifikace neznámého vzorku pomocí vložené kalibrační řady**

Stanovení Ct - threshold cycle -

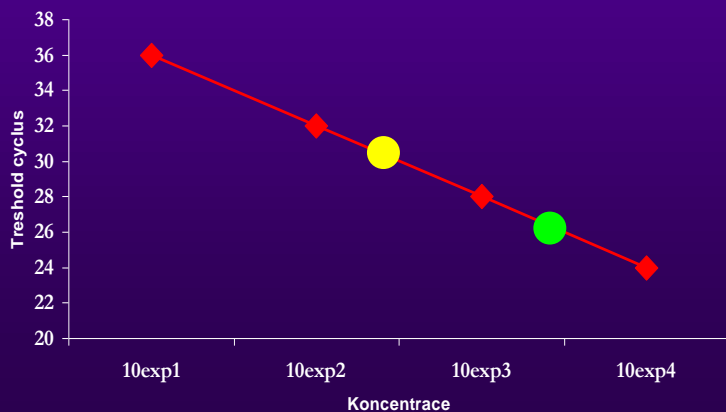
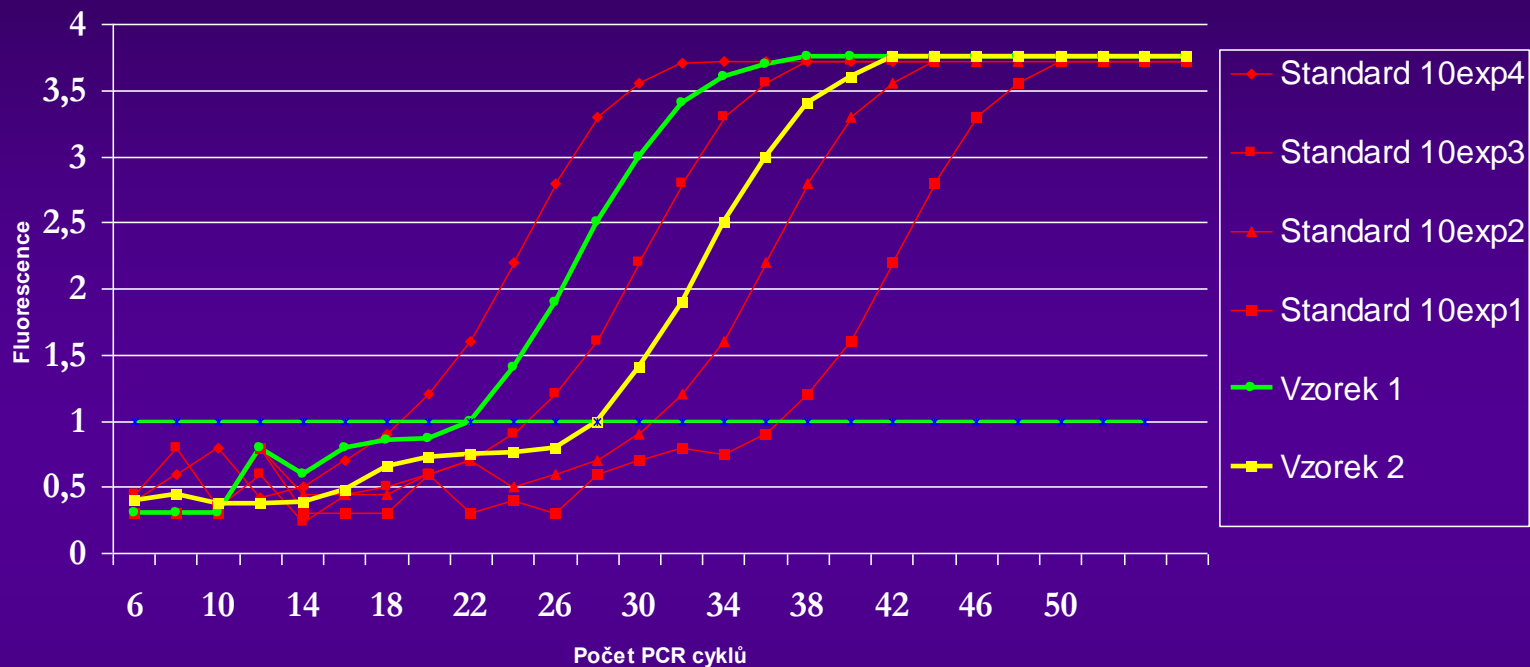
- Ct – číselná hodnota udávající PCR cyklus ve kterém je přístrojem detekována první změna fluorescence v amplifikovaném vzorku
- Číselnou hodnotu Ct určuje přístroj automaticky



Vytvoření kalibrační křivky



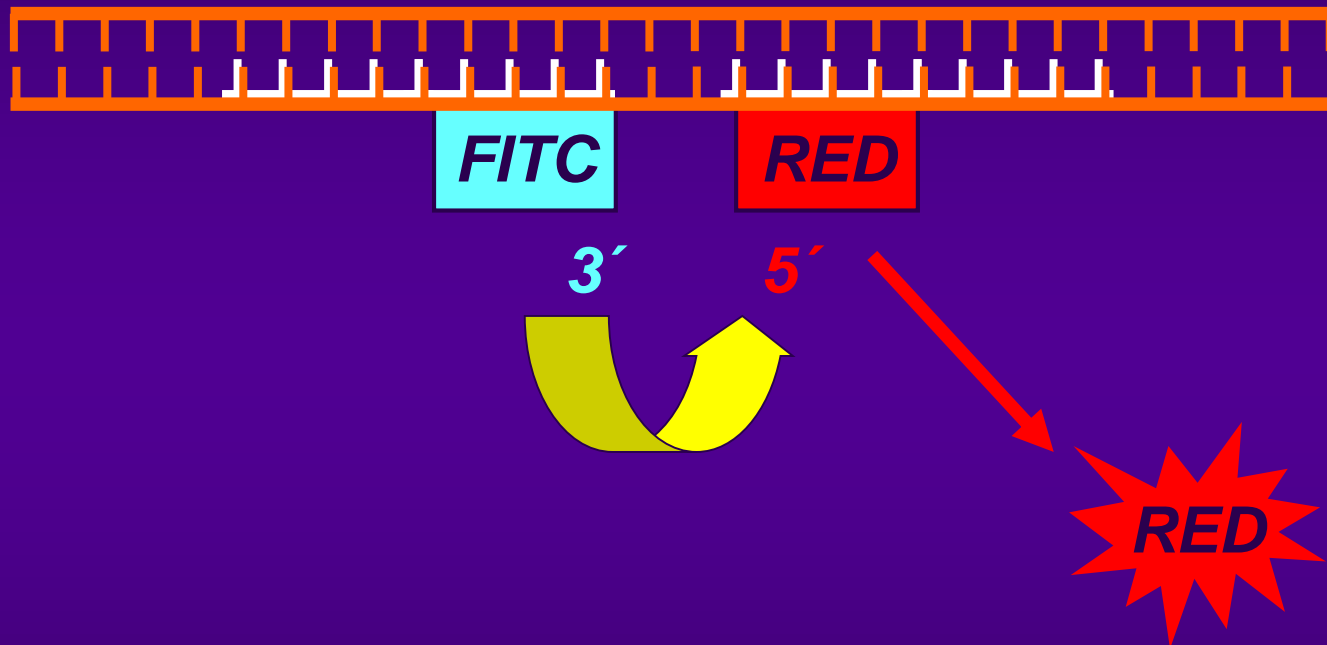
Kvantifikace neznámého vzorku pomocí vložené kalibrační řady



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

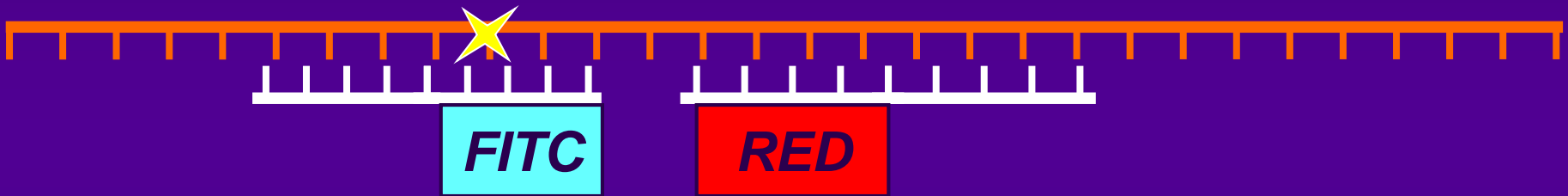
Návrh sond pro detekci SNP pomocí FRET

GAGAGATCACTCAT-FITC RED-CCATGCAGTGGA

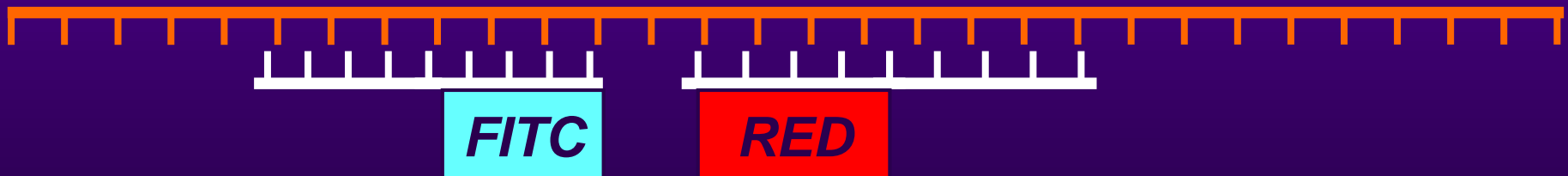
GACTCCACCTTTGAGAGATCACTCA(C)TCCTCAGGCCATGCAGTGGA

Princip analýzy SNP pomocí FRET sond

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

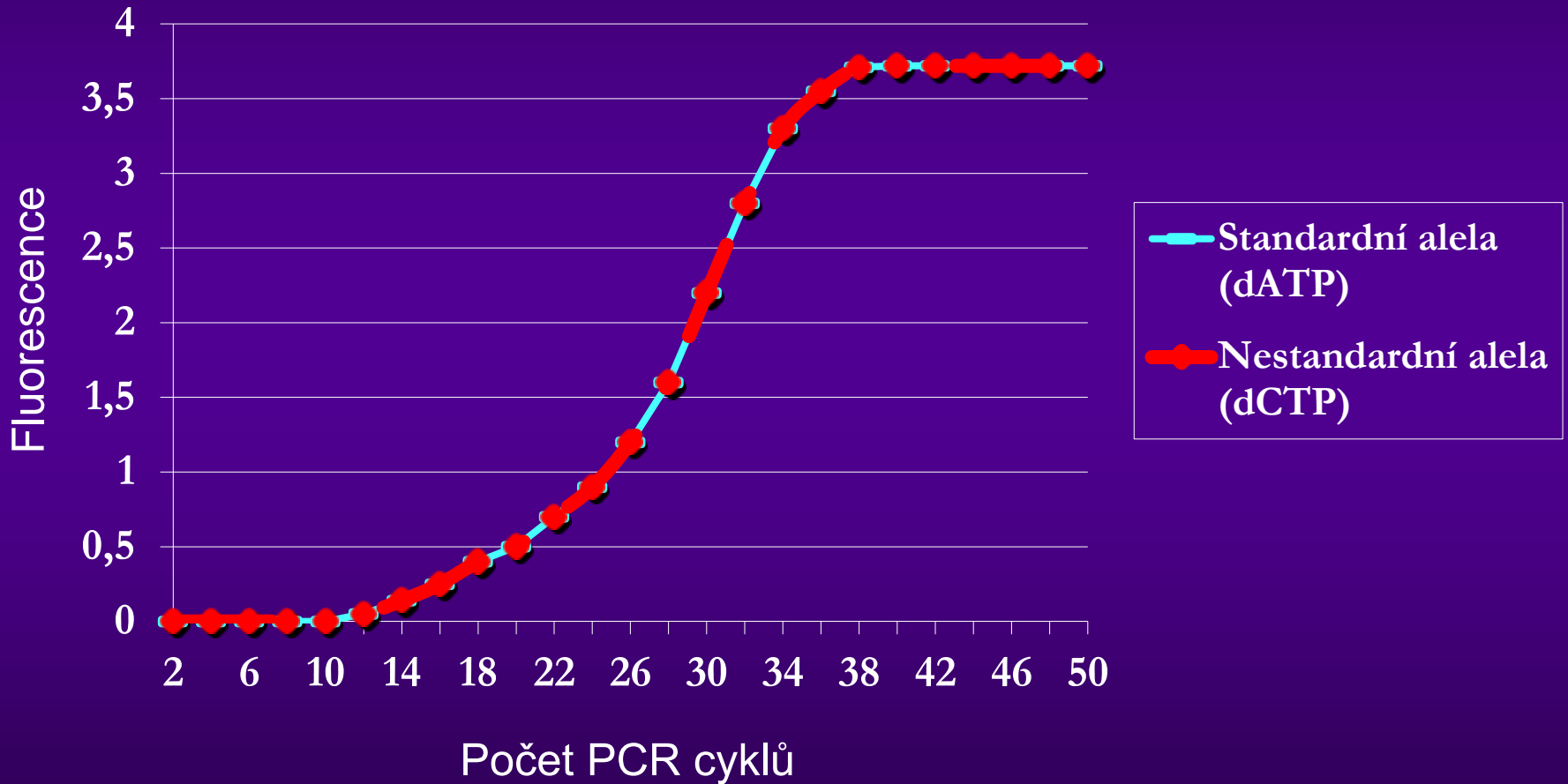


Standardní alela (dATP)
 $T_m = 62^\circ\text{C}$

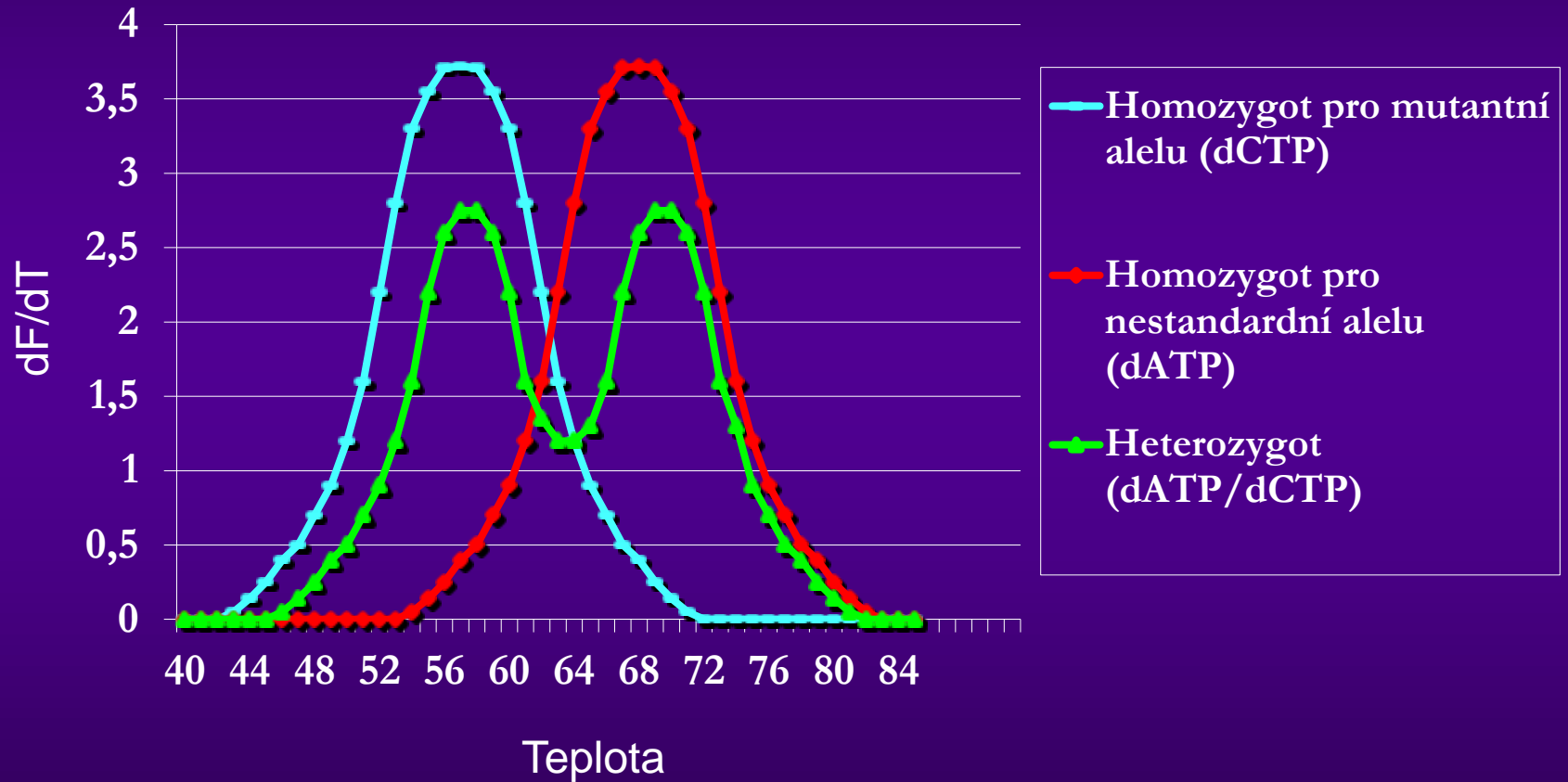


Výsledek detekce SNP pomocí FRET

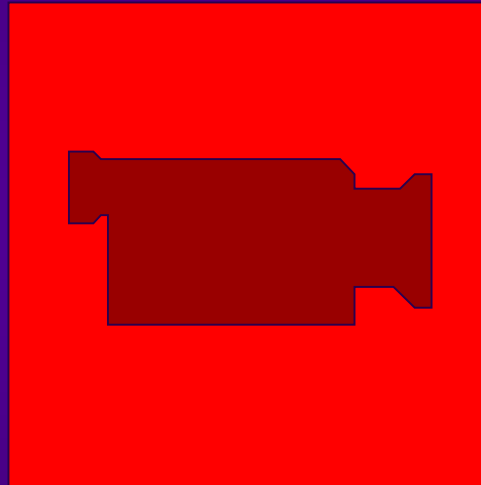
Základní data



Vyhodnocení detekce SNP s použitím FRET pomocí analýzy T_m

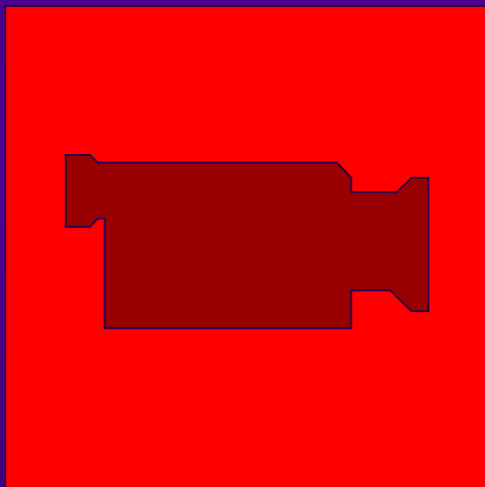


Light-up sonda

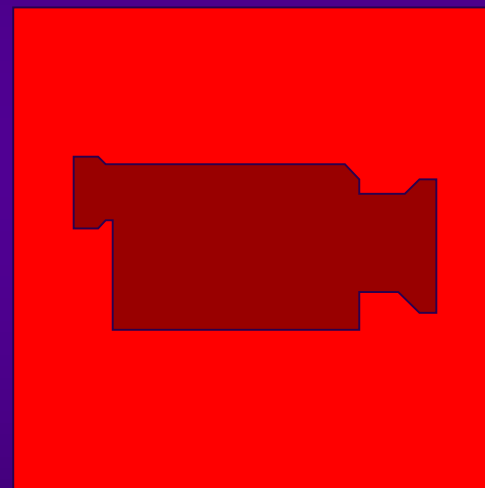


Strukturní sondy

Molecular Beacons



Scorpions



Real Time přístroje



Vývoj pokračuje – miniaturizace



Temperature Input Range	35 – 99°C (min 40°C)
Temperature Accuracy	± 0.25°C
Temperature Uniformity	± 0.05°C
Heating Ramp Rate	4°C/s (fast mode)
Cooling Ramp Rate	3°C/s (fast mode)
Channels used	FAM™, HEX™, ROX™, Cy™ 5 / Cy™ 5.5
Reaction Vessels	48 Samples
Reaction Volume Range	5 – 30 µl
Dimensions (mm)	W: 150, L: 150, H: 130
Weight	2.1 kg



Vývoj pokračuje – multiplexní systémy



- RUO verze
- CE-IVD verze

„Čipy“ pro vyšetření 8, 4, 2 nebo 1 pacienta na až 15, 23, 31, 47, 63, 95, 191 nebo 380 specifických cílových sekvencích



Je možné metodou real-time kvantifikovat také RNA?

Samozřejmě, použiješ metodu RT-Real-Time PCR (RT-qPCR)



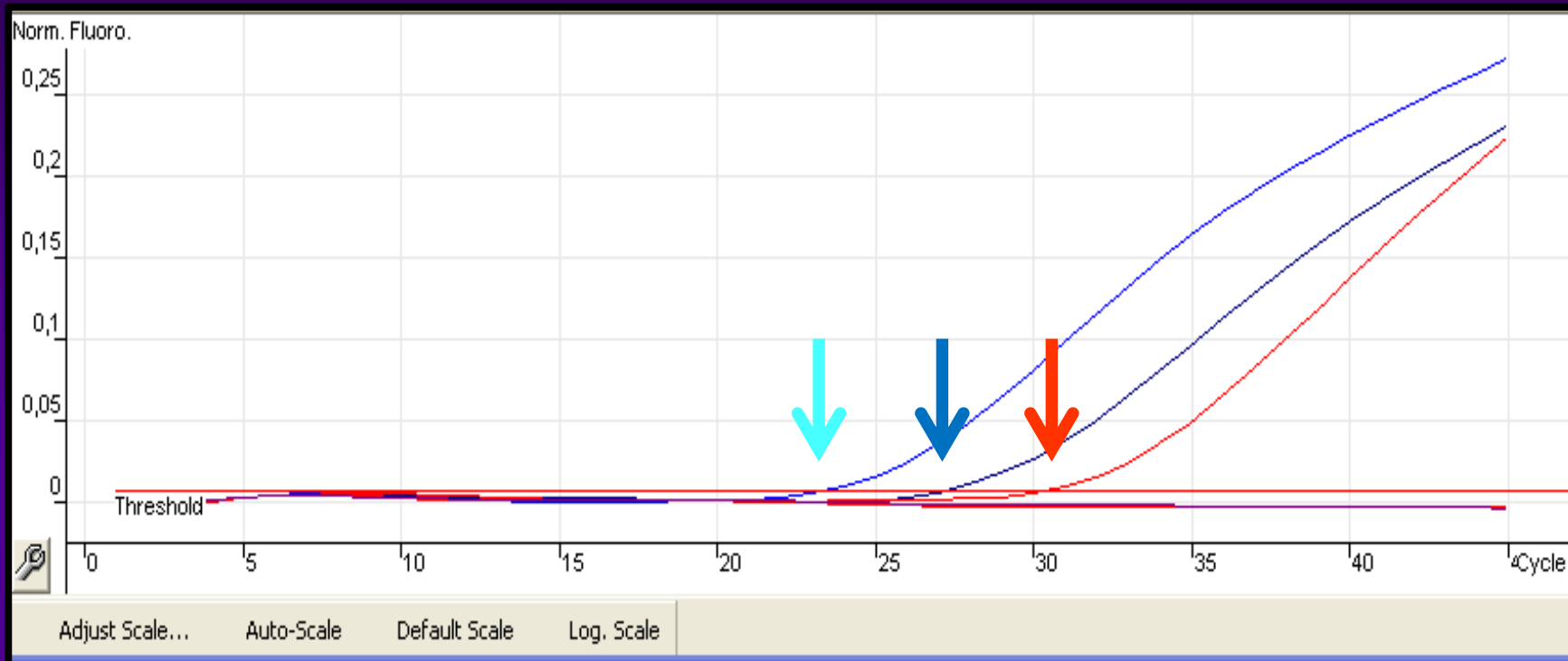
Real-time PCR v mikrobiologii

- 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

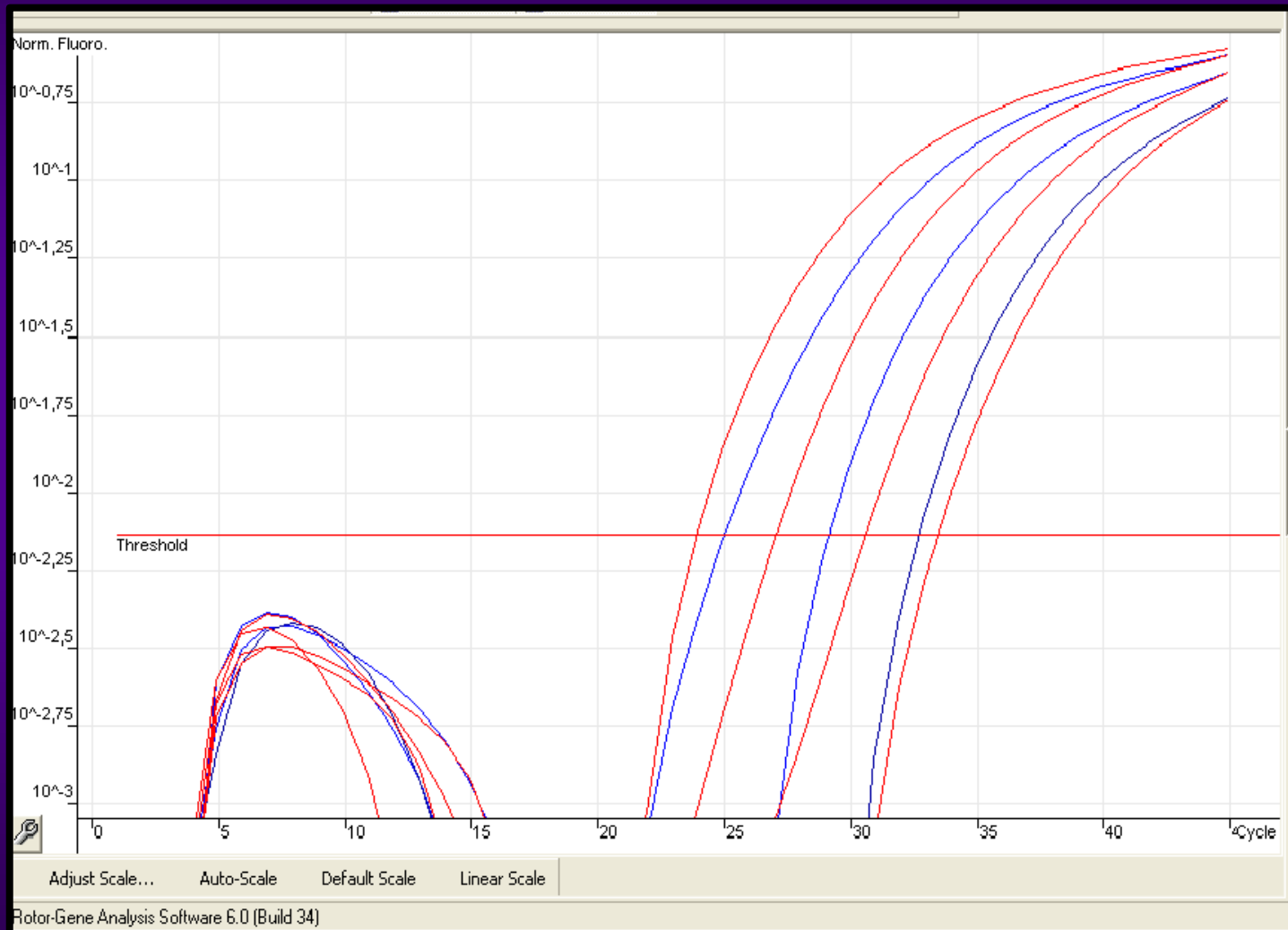


Name	Type	Ct
Sample 1	Unknown	23,78
Sample 2	Unknown	27,55
Sample 3	Unknown	
PK 10 ²	Positive Control	30,68
NK	Negative Control	

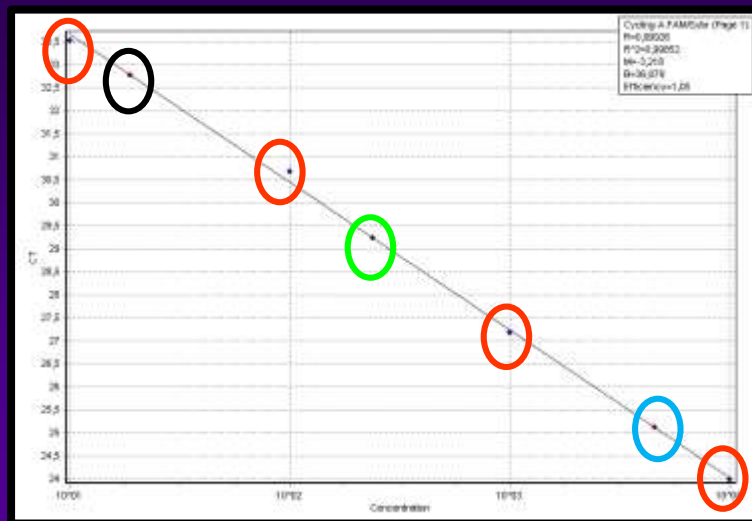
Využití Real Time PCR ve formátu TaqMan pro detekci a kvantifikaci cytomegalovirusu



Naměření dat



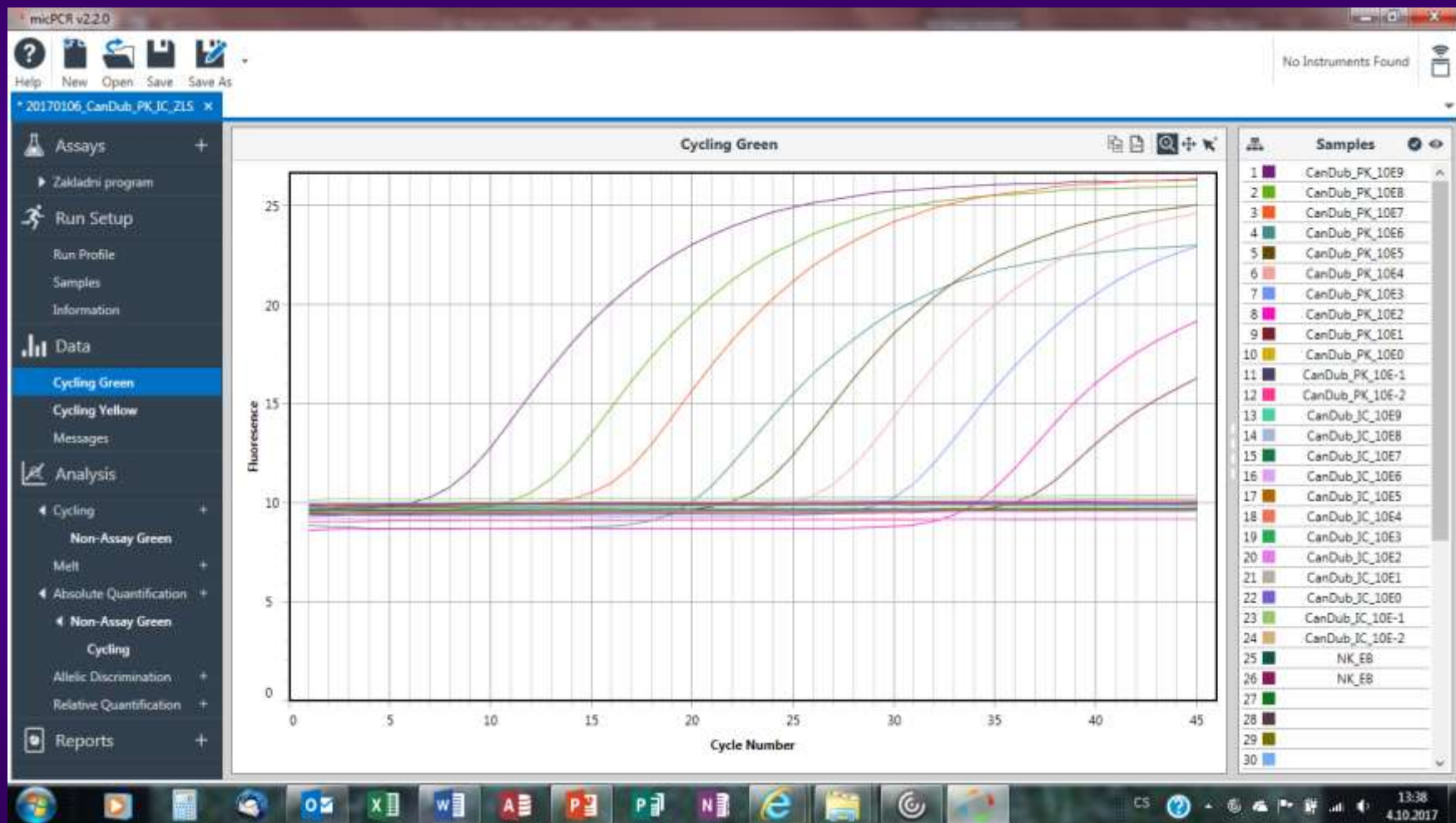
Kvantifikace a odečtení výsledků



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

***Příklad stanovení
Candida dubliniensis
na termocykleru MIC***

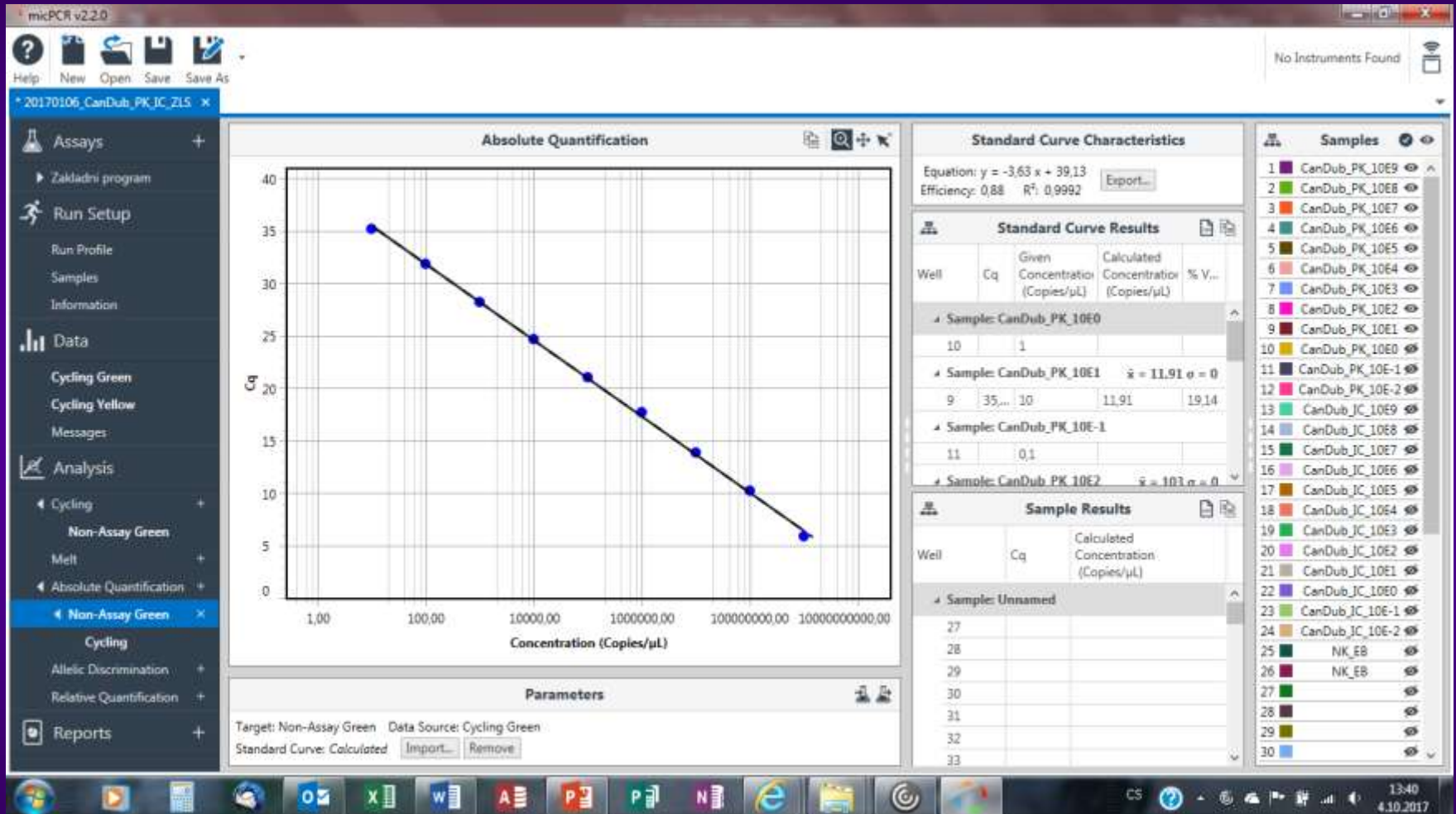
Základní data



Normalizovaná data



Lineární rozsah



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 hodnoty Ct odečtěte 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

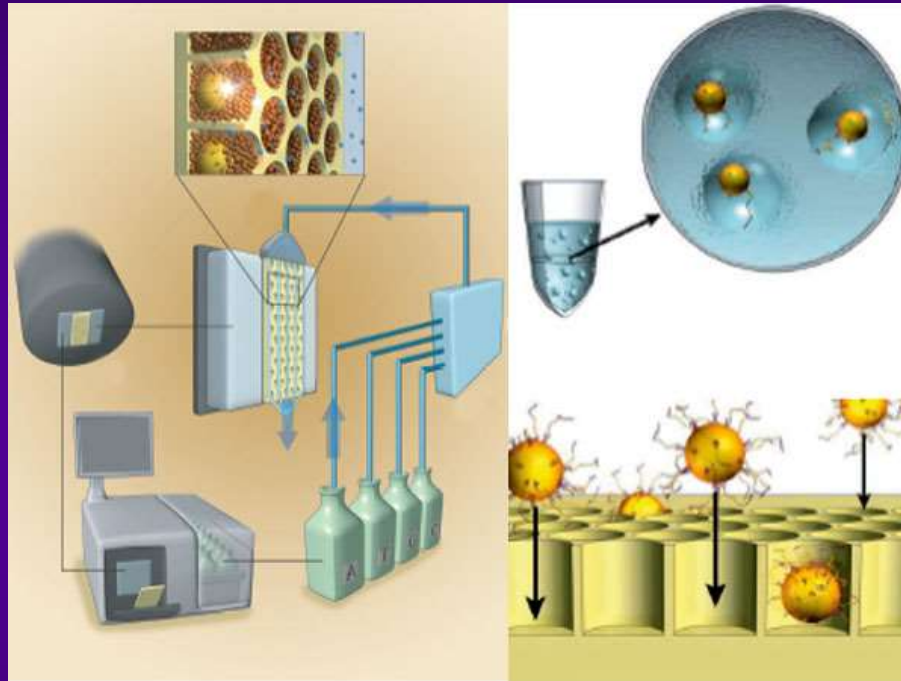
Vzorek	Ct	Počet virionů/μl
PK 10 ⁴	21,59	1.041E+04
PK 10 ³	25,53	8.779E+02
PK 10 ²	28,77	1.149E+02
PK 10 ¹	32,74	9.522E+00
Vzorek 1	30,53	
Vzorek 1	31,89	
Vzorek 1	31,30	
Vzorek 2	33,11	
Vzorek 2	33,34	
Vzorek 2	33,69	
Vzorek 3	26,63	
Vzorek 3	26,78	
Vzorek 3	27,00	

Řešení pro Tabulku II

Vzorek	Ct	Počet virionů/ μ l	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		

Minulost nebo žhavá současnost? - emulsní PCR

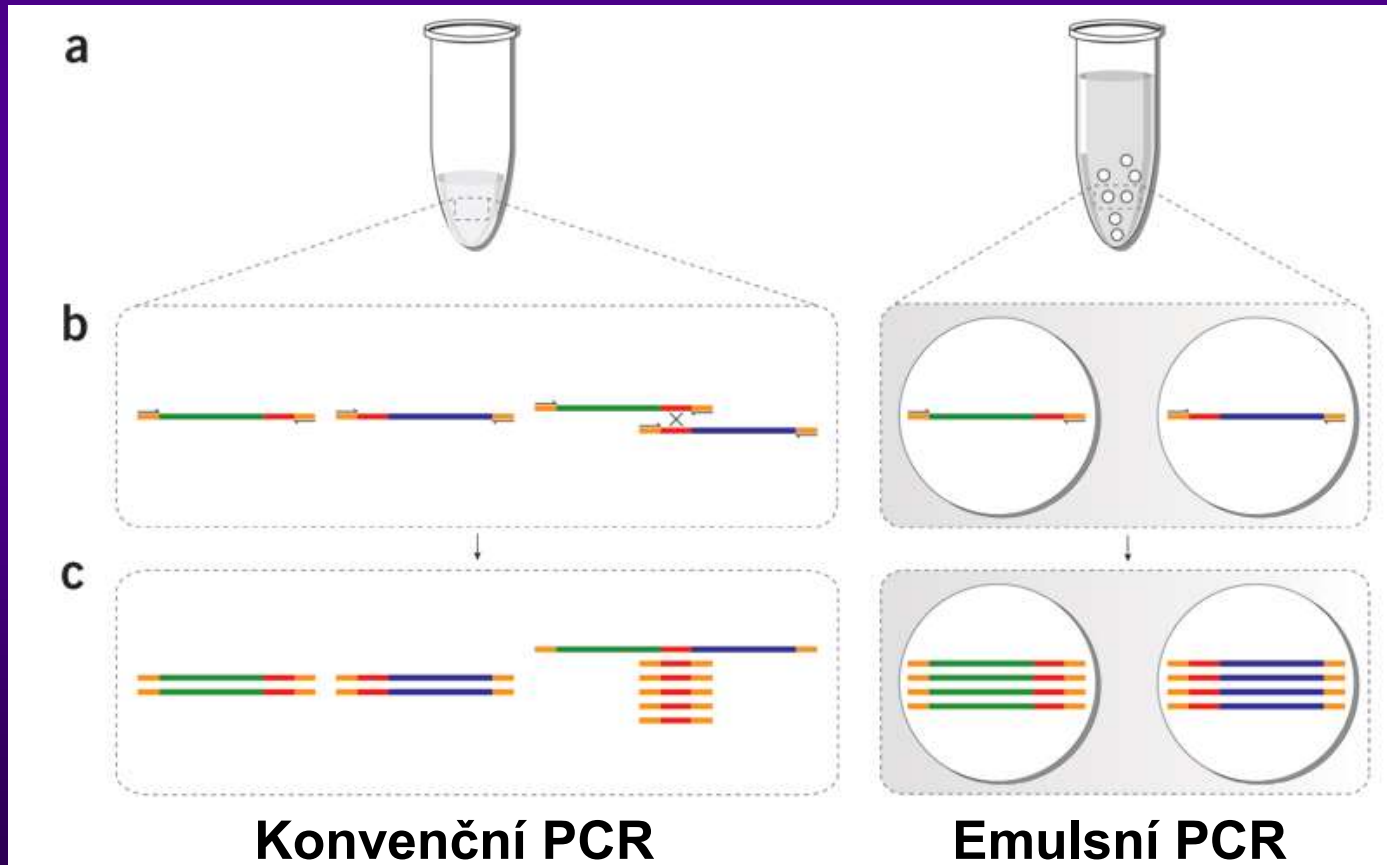
454 Life
Sciences



- 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

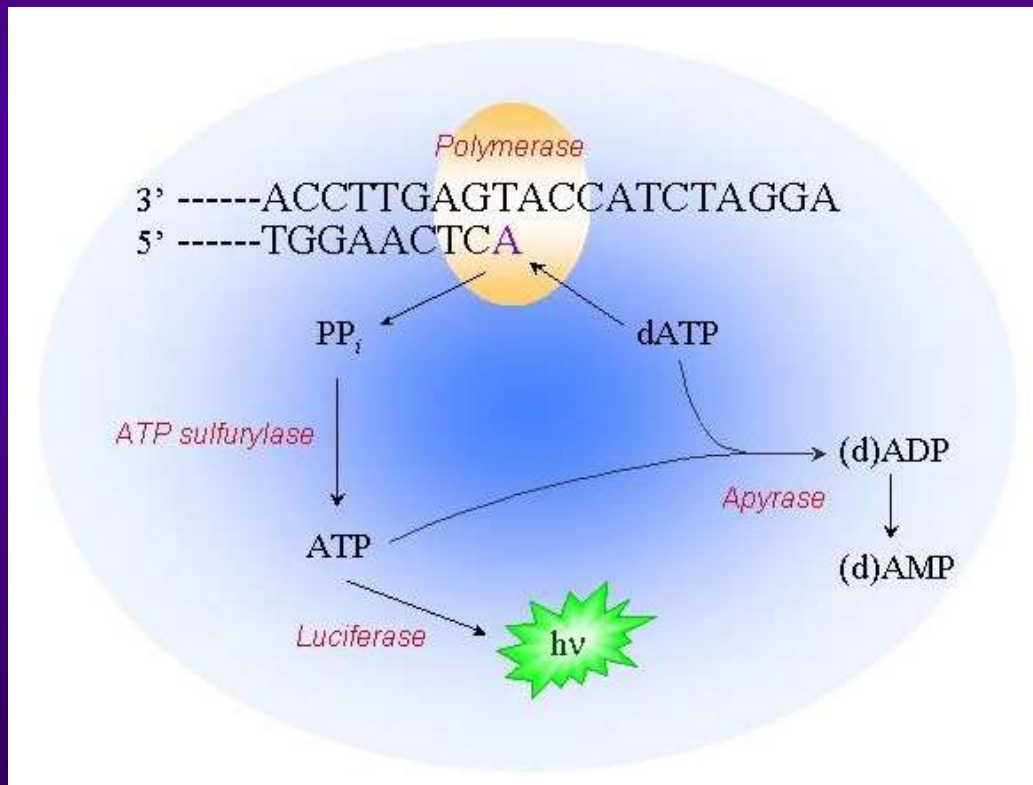


- bakterie v biofilmech
- mikroorganismy v potravinářských vzorcích
- nekultivovatelné bakterie

Používá se ve spojení s pyrosekvenováním

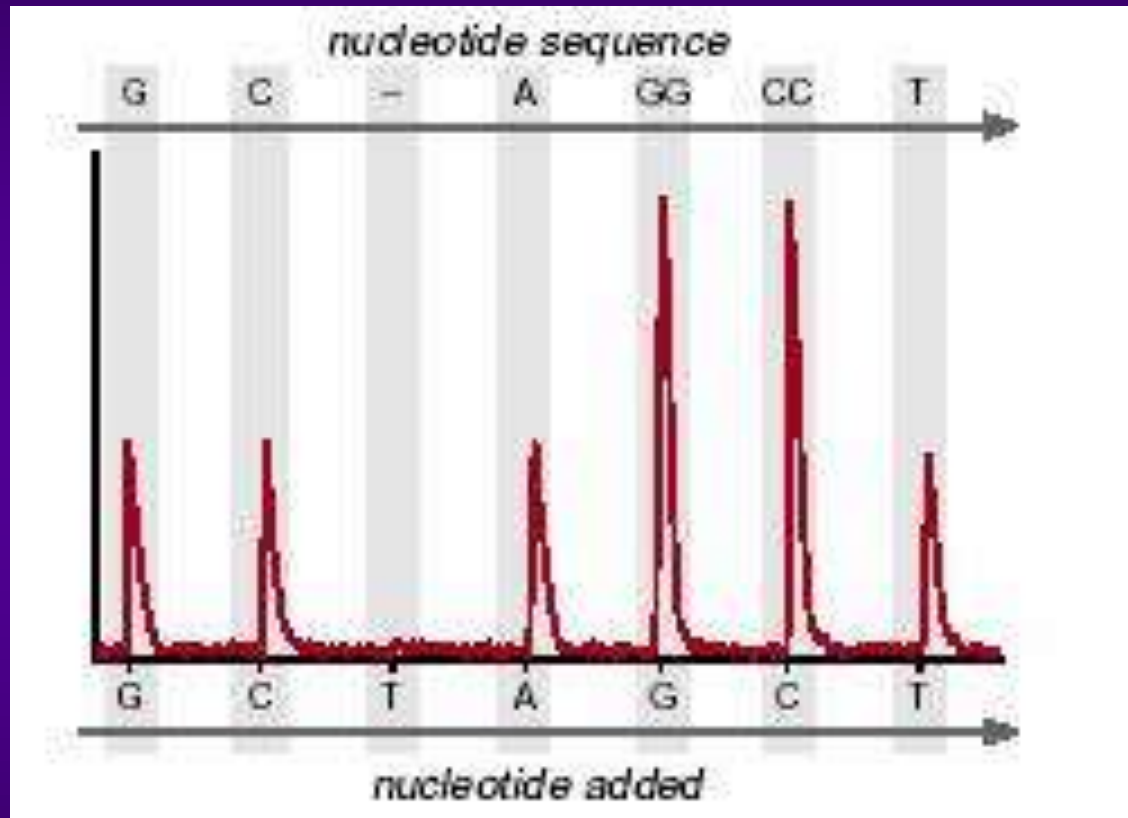
Pyrosekvenování

- 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) Nespecifické formáty**
- 4) Specifické formáty**
- 5) Fluorofory a jejich vlastnosti**
- 6) Vlastnosti zhášečů**
- 7) Sondy**
- 8) Příklady využití**
- 9) Emulsní PCR a pyrosekvenování**