

# Podstawy łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) - II



# Plan prezentacji

## Podstawy biologii molekularnej

---

### Podstawy PCR część I

#### Definicja PCR

---

#### Etapy PCR

---

### Podstawy PCR część II

#### **Definicja PCR w czasie rzeczywistym (real time PCR)**

---

#### **Jakościowa PCR w czasie rzeczywistym**

---

#### **Ilościowa PCR w czasie rzeczywistym**

---

### Podstawy PCR część III

#### Definicja temperatury topnienia

---

#### Analiza krzywych topnienia

---

# PCR w czasie rzeczywistym



# PCR w czasie rzeczywistym (RT-PCR)

- PCR w czasie rzeczywistym to zwykła reakcja PCR wykorzystująca dodatkowy oligonukleotyd znakowany cząsteczką fluorescencyjną: Cząsteczka ta nazywana jest sondą.
- Sonda jest jednoniciowym fragmentem DNA wiążącym się do sekwencji docelowej
- Sonda fluorescencyjna emituje sygnał fluorescencji, kiedy jest aktywowana przez hybrydyzację
- Jedna kopia docelowego DNA aktywuje jedną cząsteczkę sondy, dlatego sygnał fluorescencji będzie wprost proporcjonalny do liczby wytworzonych kopii docelowego DNA
- Przykłady sond używanych do PCR w czasie rzeczywistym: sondy TaqMan, Molecular beacon, Scorpion...



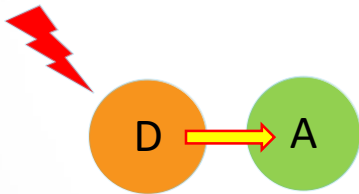
Sonda

# Technologia FRET

- Rezonansowe przeniesienie energii fluorescencji (Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET) to zależne od odległości oddziaływanie pomiędzy dwiema cząsteczkami barwnika.
- Energia wzbudzenia jest przekazywana z cząsteczki donora na cząsteczkę akceptora bez emisji fotonu.
- Technika FRET znalazła wiele zastosowań, w tym w PCR.

D=Donor/fluorofor  
A=Akceptor/wygaszacz

Wzbudzenie



Niewielka odległość –  
fluorescencja jest absorbowana

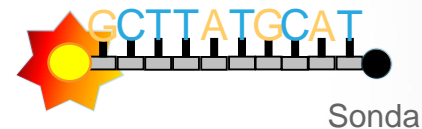
Wzbudzenie



Duża odległość –  
fluorescencja jest emitowana

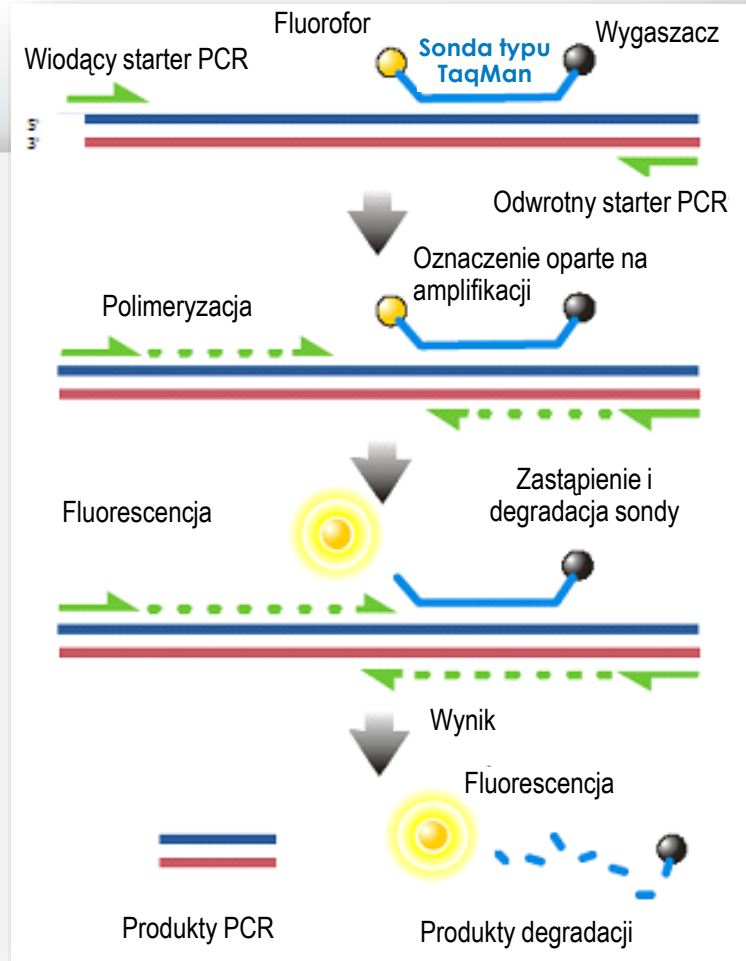
# Sonda typu TaqMan

- Sonda typu TaqMan jest sondą zbudowaną z krótkiego oligonukleotydu (15-30 zasad długości) wyznakowanego barwnikiem fluorescencyjnym na końcu 5' i wygaszaczem na końcu 3'.
- Tak długo jak fluorofor i wygaszacz znajdują się w bliskiej odległości, wygaszacz będzie absorbował fluorescencję fluorofora
- Sonda, dzięki odpowiednio zaprojektowanej sekwencji DNA, powinna przyłączać się do fragmentu docelowego
- Podczas etapu elongacji PCR, polimeraza Taq zdegraduje sondę
- To doprowadzi do fizycznego rozdzielenia fluorofora i wygaszacza, pozwalając na emisję i pomiar fluorescencji



1 wolny  
fluorofor/amplikon  
DNA

# Sonda typu TaqMan



# Sonda typu TaqMan

Fluorofofor

Wygaszacz





# Sonda typu TaqMan

Fluorofor

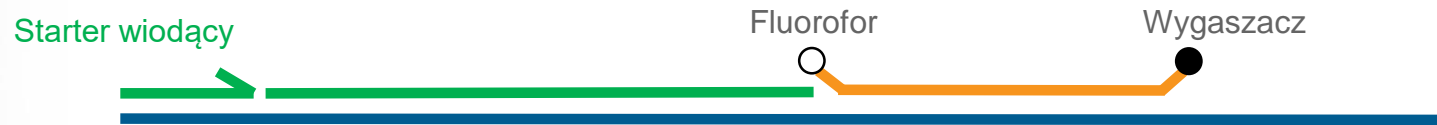
Wygaszacz



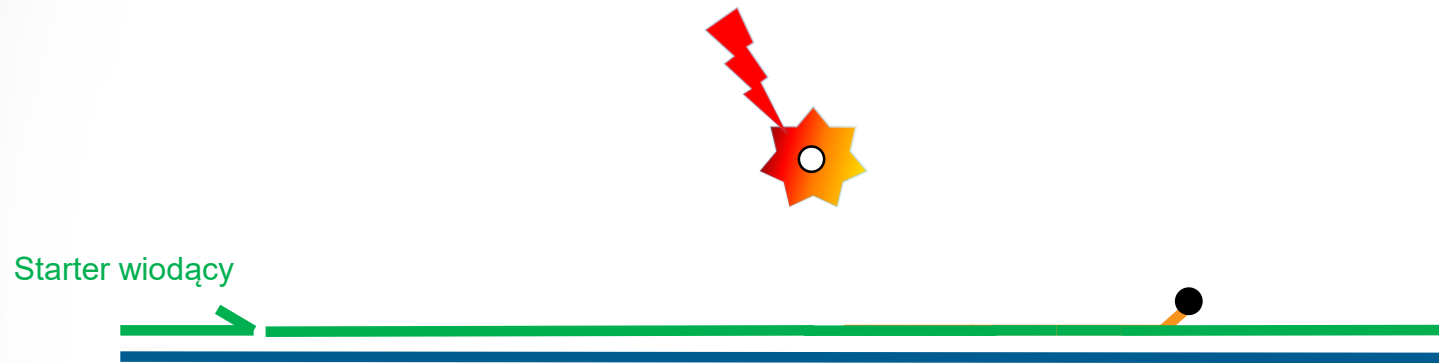
Starter wiodący



# Sonda typu TaqMan

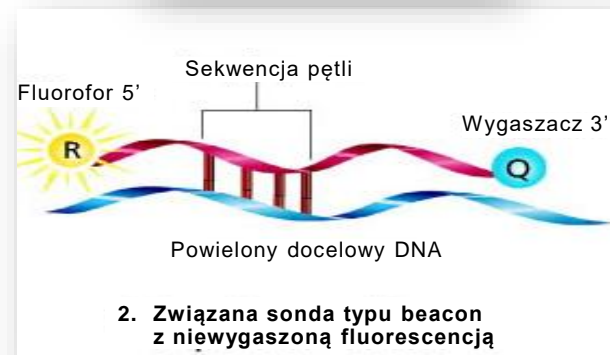


# Sonda typu TaqMan



# Sonda typu Molecular beacon

- Sonda typu Molecular beacon to cząsteczka w kształcie spinki do włosów, która zawiera fluorofor i wygaszacz
- Sekwencja sondy liczy około 17-21 zasad. Sekwencja rdzeniowa powinna być bogata w pary GC (>80% całkowitej długości sekwencji), co pozwala na utworzenie stabilnego dupleksu, długiego na 5-8 zasad
- Kiedy sonda pływa swobodnie w roztworze, oba jej końce pozostają w bliskiej odległości, co prowadzi do wygaszania fluorescencji.
- W obecności docelowego DNA, sonda wiąże się z sekwencją docelową, co prowadzi do rozdzielenia fluorofora i wygaszacza, pozwalając na emisję fluorescencji

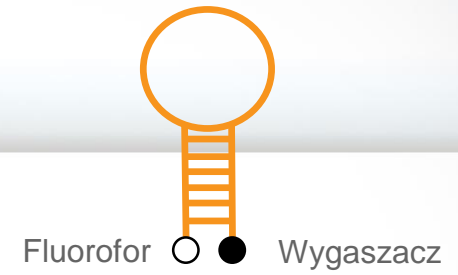


Ilustracja: Sigma-Aldrich

# Sonda typu Molecular beacon



# Sonda typu Molecular beacon



# Sonda typu Molecular beacon



# Sonda typu Molecular beacon

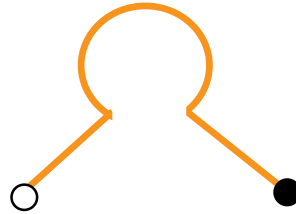




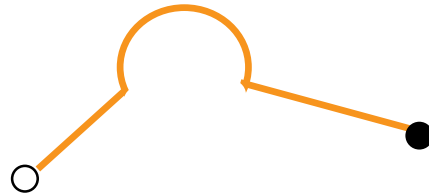
# Sonda typu Molecular beacon



# Sonda typu Molecular beacon



# Sonda typu Molecular beacon



# Sonda typu Molecular beacon

Starter wiodący



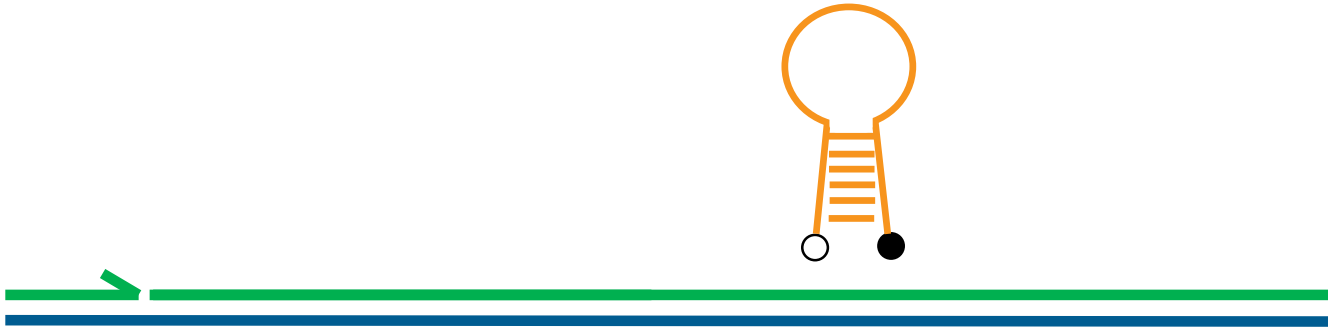
# Sonda typu Molecular beacon



# Sonda typu Molecular beacon



# Sonda typu Molecular beacon



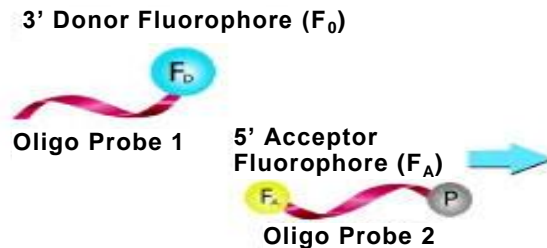
# Sonda typu Molecular beacon





# Sonda FRET

- Sondy FRET to para oligonukleotydów z fluoroforem-donorem i fluoroforem-akceptorem
- Donor, po wzbudzeniu go przez urządzenie, wzbudzi akceptor, który wyemituje fluorescencję. Jego fluorescencja zostanie wykryta przez urządzenie
- Kiedy sondy pływają swobodnie w roztworze, zjawisko to nie występuje z powodu zbyt dużej odległości
- W fazie hybrydyzacji reakcji PCR, sondy przyłączają się do matrycy w bliskiej odległości od siebie, co pozwoli na transfer energii i emisję mierzalnej fluorescencji



1. Probes in solution emit low fluorescence

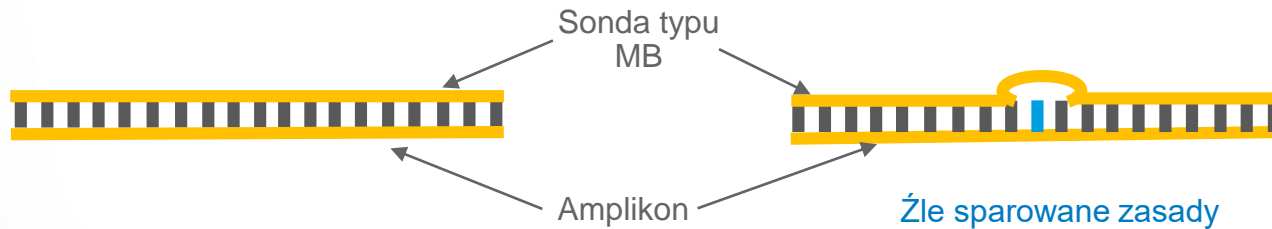


2. Emission through fluorescence resonance energy transfer

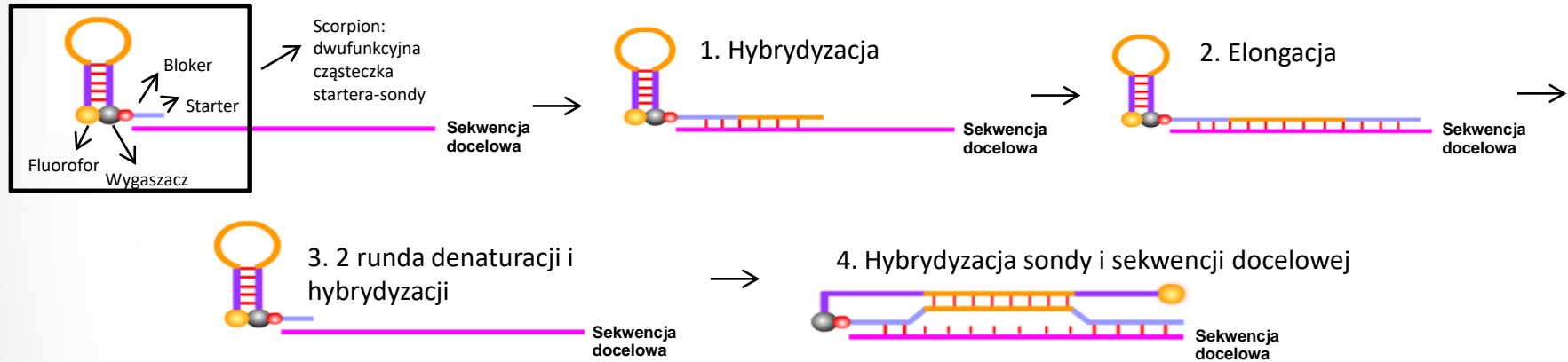
Obraz: Sigma-Aldrich

# Sondy typu Sloppy molecular beacon

- Sondy typu Sloppy molecular beacon cechuje względnie długa sekwencja (około 30-40 zasad długości), umożliwiającą im tworzenie hybryd z amplikonami wielu różnych gatunków mimo obecności **źle sparowanych zasad**.



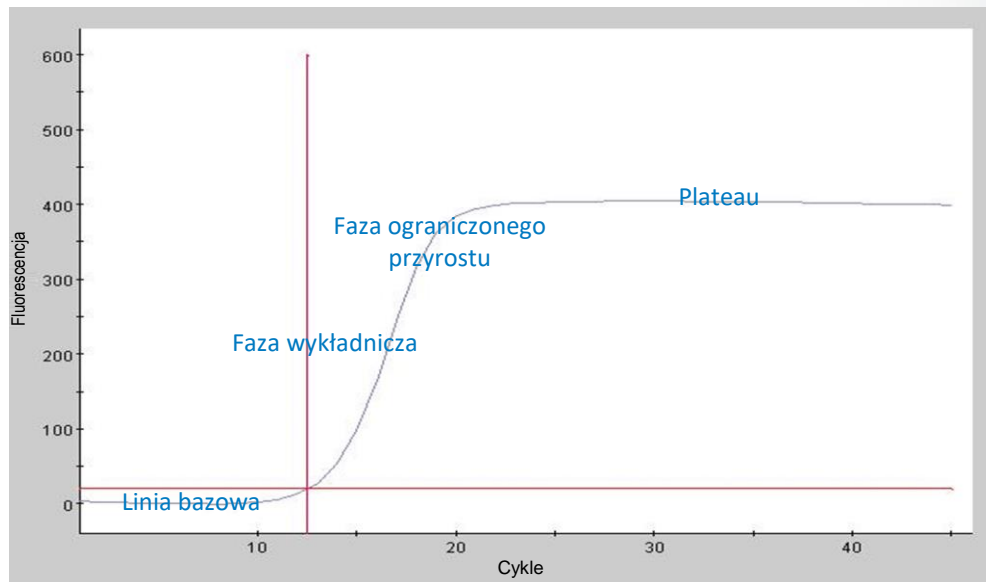
# Sonda typu Scorpion



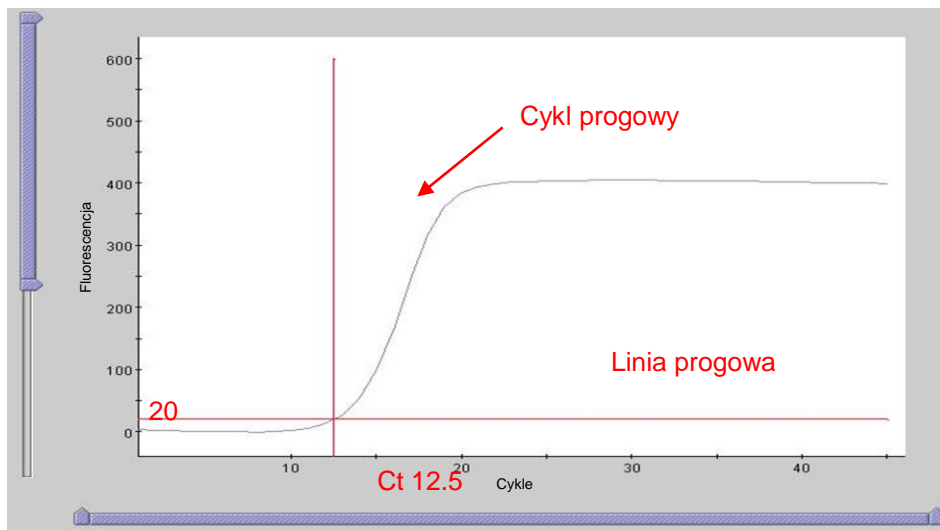
Sekwencja sondy powinna liczyć 17-27 zasad.

# Zmiany fluorescencji w trakcie PCR

- Krzywa amplifikacji składa się z czterech faz:



# Definicja Ct – w oparciu o próg



- Cykl progowy (Ct): pierwszy cykl, podczas którego przekroczony zostaje zdefiniowany próg fluorescencji
- Ta wartość może być ułamkiem

# Kryteria weryfikacji PCR: Zakres Ct i końcowa wartość fluorescencji

- Zakres Ct
  - Jest to akceptowalny zakres wartości Ct
  - Jest on ograniczony wartościami  $Ct_{\min}$  i  $Ct_{\max}$
- Końcowa wartość fluorescencji
  - Wartość fluorescencji na zakończenie PCR (faza plateau)







W testach Xpert, krzywa amplifikacji nie jest weryfikowana poza zakresem: nie można zatem dostarczyć wyniku

# Multipleksowa pCR

- Multipleksowa PCR polega na jednoczesnej amplifikacji **wielu sekwencji docelowych DNA**
  - Każda z sekwencji docelowych ma swój własny zestaw starterów
  - Każda z sekwencji docelowych jest oznaczana ilościowo dzięki zastosowaniu własnej sondy, znakowanej odrębnym barwnikiem, wykrywanej przy określonej długości fali fluorescencji
- Podczas planowania multipleksowej PCR należy unikać konkurencji między sekwencjami docelowymi

# Wykrywanie wielu barwników – 6 barwników do 2020 r.

- Wybierane są różne barwniki (fluorofory)
- Są one wzbudzane i emitują w różnych długościach fal

Analityt	Fluorofor	Wzbudzenie (nm)	Emisja (nm)
Sekwencja docelowa 1	Barwnik 1	375-405	420-480 
Sekwencja docelowa 2	Barwnik 2	450-495	510-535 
Sekwencja docelowa 3	Barwnik 3	500-550	565-590 
Sekwencja docelowa 4	Barwnik 4	630-650	665-685 
SPC	Barwnik 6		>700 
Sekwencja docelowa 5	Barwnik 5	555-590	606-650 



# Wykrywanie wielu barwników – teraz 10 barwników

- Wybierane są różne barwniki (fluorofory)
- Są one wzbudzane i emitują w różnych długościach fal

		Wykrywanie dzięki iCore			
Kanały optyczne iCore		Błękit + podczerwień (420-477 nm + > 700 nm)	Zieleń + głęboka czerwień (510-535 nm + 660-680 nm)	Żółcień (565-585 nm)	Czerwień (620-645 nm)
Wzbudzenie iCore	UV (400 nm)	CF1			
	Błękit (470 nm)		FAM	CF7 (FAM-CF3)	CF9
	Zieleń (520 nm)	CF10 (CF3-CF6)		A532 (CF3)	CF8 (CF3-CF4)
	Żółcień (574-584 nm)				TxR (CF4)
	Czerwień (635 nm)	CF6	A647 (CF5)		

# Oznaczenia ilościowe techniką PCR w czasie rzeczywistym

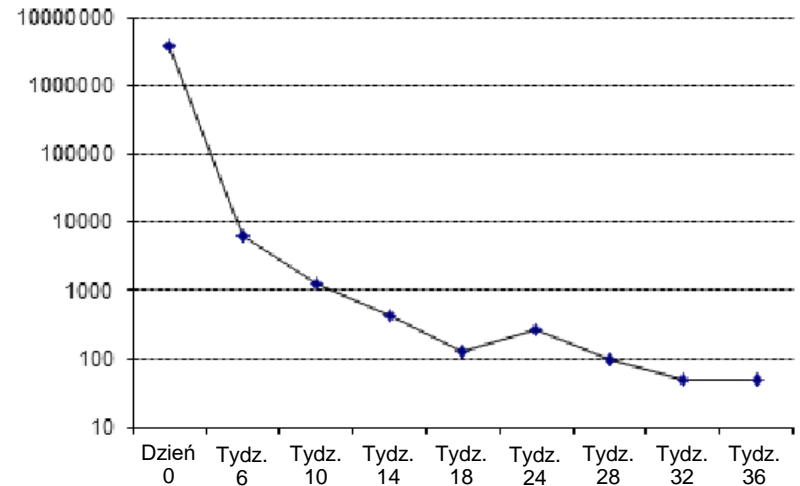


# Oznaczenia ilościowe

- Wartości bezwzględne: wynik jest przedstawiony jako stężenie (kopie/mL, IU/mL, itd.):

Xpert HIV-1 VL i Xpert HCV

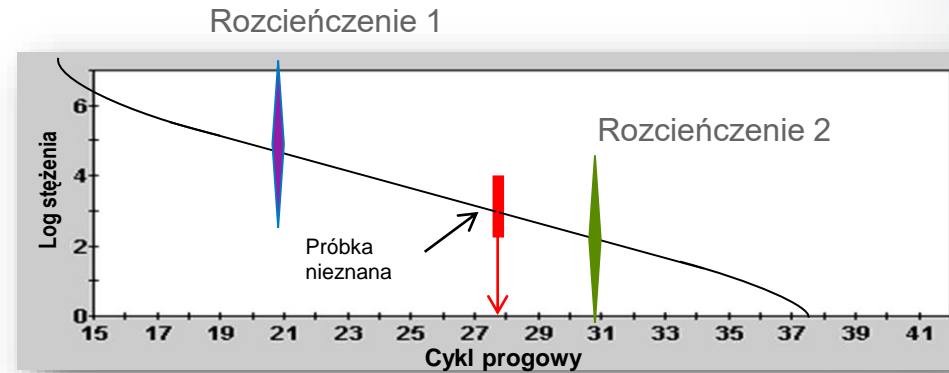
- Wartości względne: wynik jest przedstawiony jako Ratio: Xpert BCR-ABL



HIV-1 VL spadek wiremii podczas terapii antyretrowirusowej (antiretroviral therapy, ART) (metoda inna niż GeneXpert).  
Grafika: hivbook.com

# Oznaczenie wartości bezwzględnych dzięki zewnętrznym wzorcom

1. Należy przygotować rozcieńczenia próbki zawierającej docelową sekwencję DNA w znanym stężeniu.
2. Te rozcieńczone próbki będą oznaczane równoległe z próbkami nieznanymi, każda w oddzielnej próbówce
3. Dla każdego stężenia podaje się wartość Ct
4. Wykreśla się krzywą wzorcową: Ct w funkcji stężenia
5. Wartość Ct dla próbki nieznanej stosuje się do ekstrapolacji jej stężenia na podstawie krzywej wzorcowej



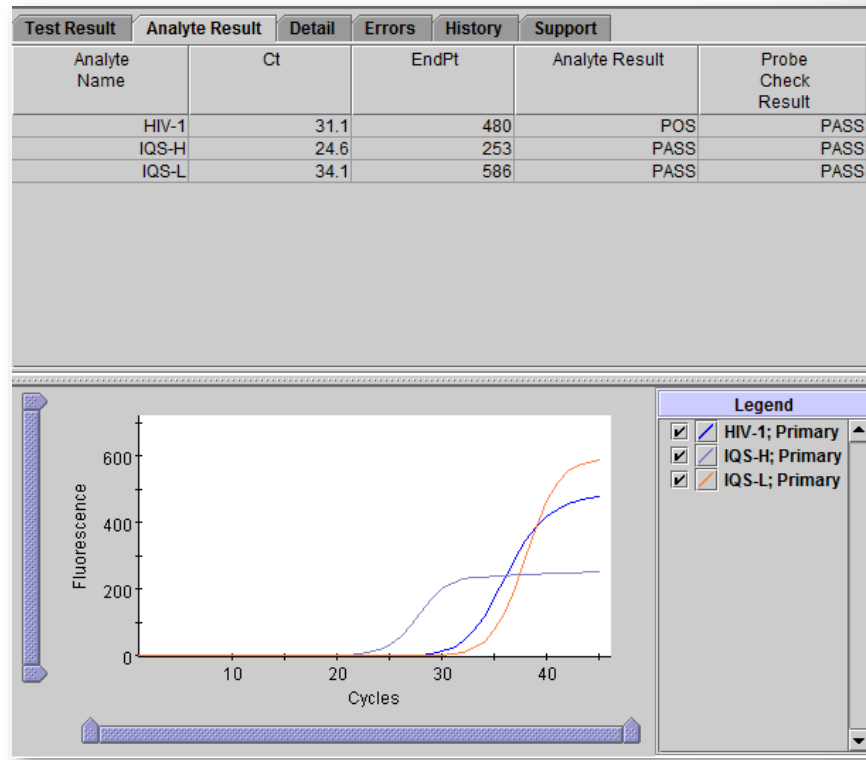
W liniowym zakresie stężenia, 2 wzorce wystarczają

# Oznaczenie wartości bezwzględnych za pomocą wzorców wewnętrznych.

W wypadku Xpert HIV-1 VL:

Do wyliczenia stężenia w próbce stosuje się 2 wzorce:

- 1 wzorzec o wysokim stężeniu (IQS-H) =  $10^6$  kopii/mL
- 1 wzorzec o niskim stężeniu (IQS-L) =  $10^3$  kopii/mL
- W oparciu o wartości Ct i znane stężenie każdego ze wzorców oraz wartość Ct nieznaney próbki, stężenie w nieznaney próbce zostanie obliczone przez oprogramowanie GeneXpert.



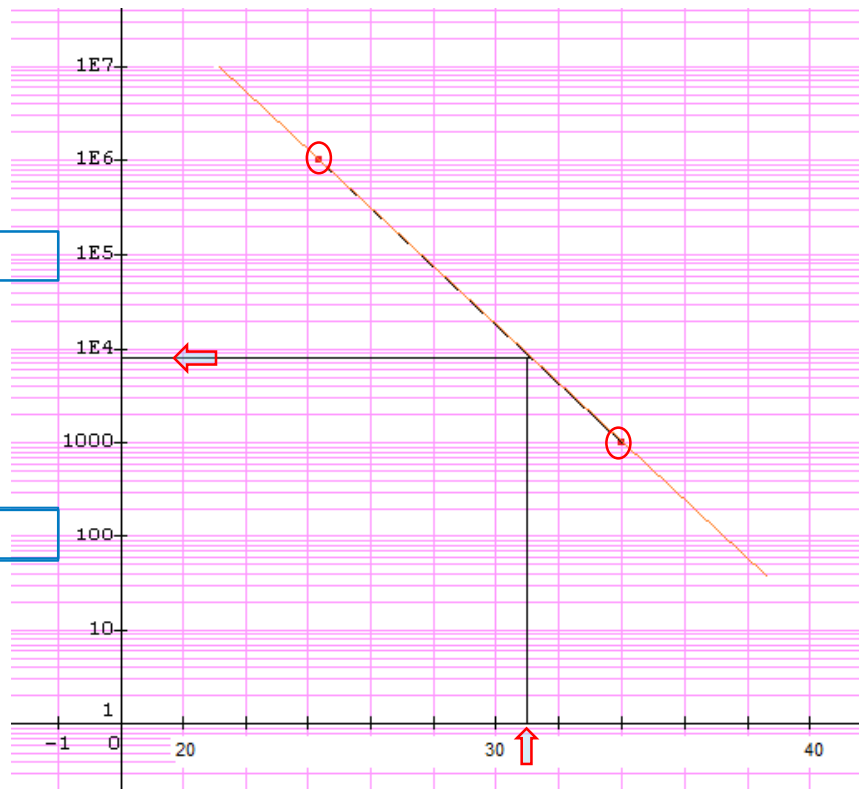
# Obliczenie stężenia w próbce

$y = \text{wiremia}$   
(kopii/mL)

Analyte Name	Ct
HIV-1	31.1
IQS-H	24.6
IQS-L	34.1

IQS-H

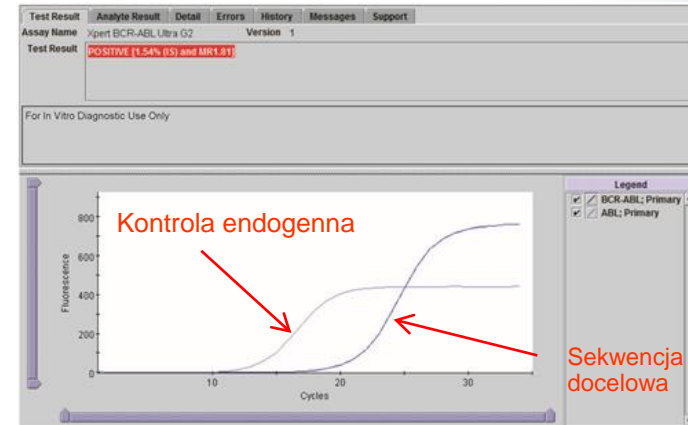
IQS-L



$x = Ct$

# Oznaczanie wartości względnych za pomocą PCR w czasie rzeczywistym (Z: Xpert BCR-ABL)

- Oznaczanie wartości względnych wyraża zmierzony poziom sekwencji docelowej względem poziomu kontroli wewnętrznej (genu referencyjnego)
- Gen referencyjny może być endogenny. Dzięki temu może także potwierdzać, że w badaniu użyto wystarczającej ilości próbki.
- Dzięki niskiej zmienności, kontrolę endogenną można także stosować jako wskaźnik hamowania PCR.



**DODATNI [1,54% (IS) i MR 1,81]**

Przykładem jest wynik testu  
Xpert BCR-ABL Ultra

# Wnioski

PCR w czasie rzeczywistym jest:

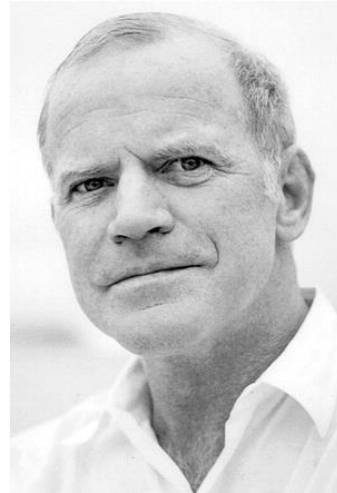
- Szybka
- Czuła
- Precyzyjna
- Łatwa w wykonaniu
- Możliwa do zastosowania do oznaczeń ilościowych



“

**Nauka co roku w nieprzerwany sposób dostarcza nowych zasobów cudownych prawd i olśniewających urządzeń.**

*Kary Mullis*



Dziękujemy.



[www.Cepheid.com](http://www.Cepheid.com)