

# Basisprincipes van polymerasekettingreactie (PCR) - II



# Agenda

Basisprincipes PCR,  
deel I

Basisprincipes van moleculaire biologie

Definitie van PCR

De fasen van PCR

**Basisprincipes PCR,  
deel II**

**Definitie van realtime PCR**

**Kwalitatieve realtime PCR**

**Kwantitatieve realtime PCR**

Basisprincipes PCR,  
deel III

Definitie van smeltemperatuur

Analyse smeltcurve

# Realtime PCR



# Realtime PCR (RT-PCR)

- Realtime PCR is een gewone PCR-reactie die gebruikmaakt van een extra oligonucleotide die is gemarkeerd met een fluorescerende molecuul: deze wordt een probe genoemd.
- De probe is een enkelstrengs DNA dat matcht met een targetsequentie
- De fluorescerende probe geeft een fluorescentiesignaal af wanneer hij wordt geactiveerd door hybridisatie
- Eén kopie van het target-DNA activeert één probe-molecuul, dus het fluorescentiesignaal is recht evenredig aan het aantal gegenereerde kopieën van het target-DNA
- Voorbeelden van probes gebruikt voor realtime PCR: TaqMan-, molecular beacon-, scorpion-probes...

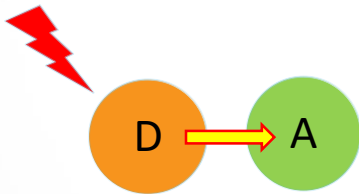


# FRET-technologie:

- Overdracht van fluorescentie-resonantie-energie (FRET, fluorescence resonance energy transfer) is een van afstand afhankelijke interactie tussen twee kleurstofmoleculen.
- Excitatie-energie wordt van een donormolecuul overgedragen op een acceptormolecuul zonder emissie van een foton.
- FRET kent allerlei toepassingen, waaronder PCR.

D = donor/reporter  
A = acceptor/quencher

Excitatie



Nabij – fluorescentie wordt geabsorbeerd

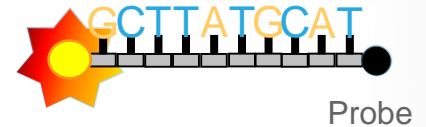
Excitatie



Gescheiden – fluorescentie wordt afgegeven

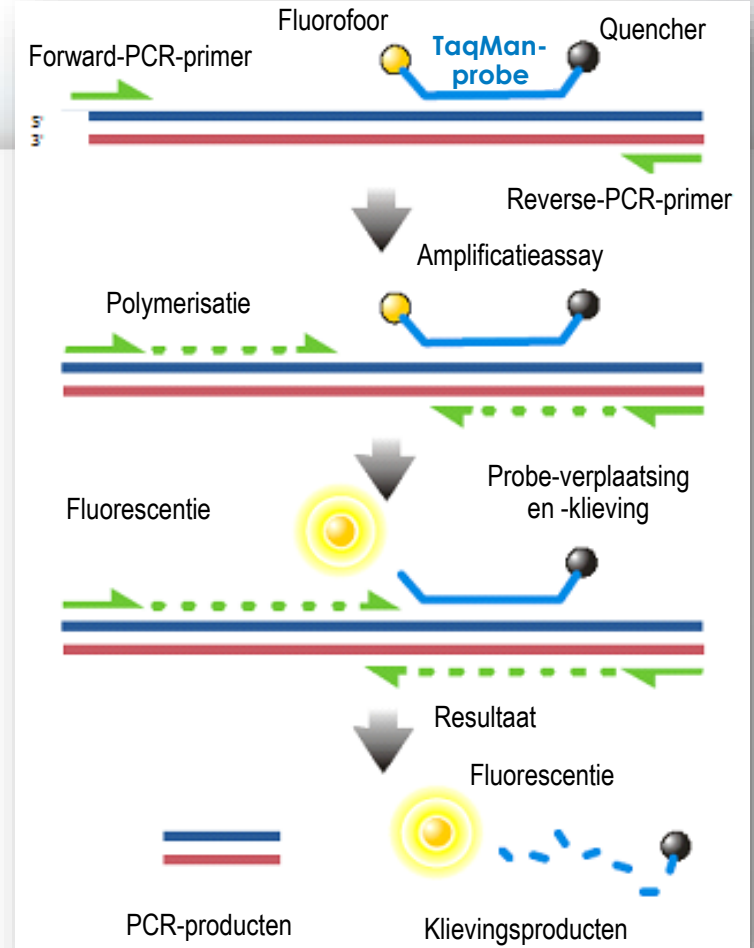
# TaqMan-probe

- Een TaqMan-probe is een korte oligonucleotide-probe (15-30 basen lang) gelabeld met een fluorescerende kleurstof aan het 5'-uiteinde en een quencher aan het 3'-uiteinde.
- Zolang de reporter en de quencher dicht bij elkaar zijn, absorbeert de quencher de fluorescentie van de reporter
- De probe heeft een DNA-sequentie die is ontworpen voor hybridisatie aan het doel
- Tijdens de elongatiefase van PCR breekt de taq-polymerase de probe af
- Hierdoor worden de reporter en de quencher fysiek van elkaar gescheiden, zodat fluorescentie kan worden afgegeven en gemeten



1 vrije fluorofoor/  
DNA-amplicon

# TaqMan-probe



# TaqMan-probe





# TaqMan-probe



Forward-primer



# TaqMan-probe

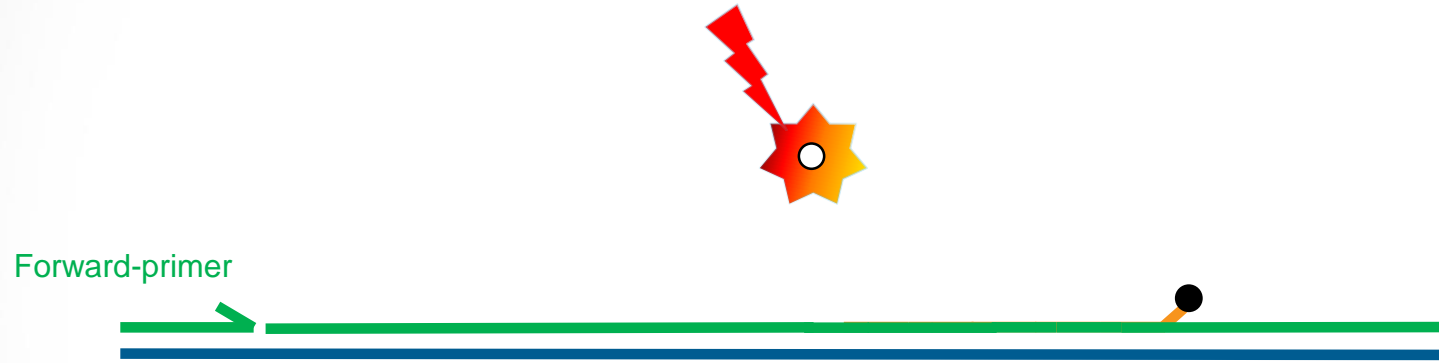
Forward-primer

Reporter

Quencher

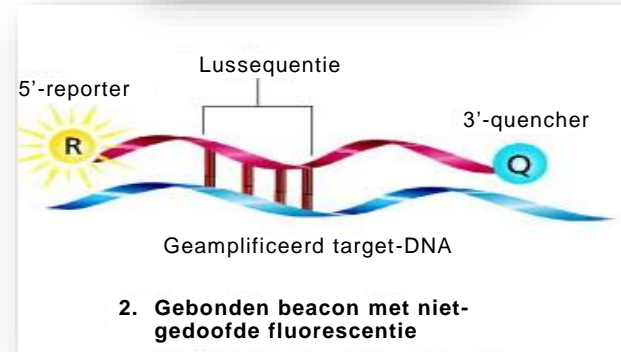
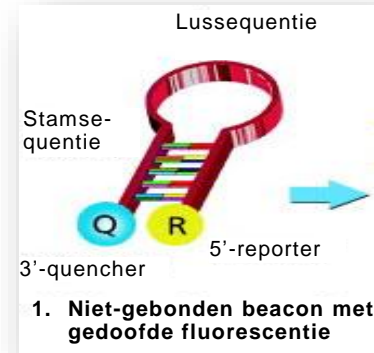


# TaqMan-probe



# Molecular beacon-probe

- Een molecular beacon-probe is een haarspeldvormige molecuul die bestaat uit een fluorofoor (reporter) en een quencher
- De probe-sequentie is circa 17-21 basen lang. De stamsequentie moet rijk aan GC zijn (> 80% van de totale sequentie) om een stabiele duplo te vormen die 5-8 basen lang is
- Vrij in een oplossing bevinden de twee uiteinden zich dicht bij elkaar, wat leidt tot uitdoven van de fluorescentie.
- Bij aanwezigheid van target-DNA wordt de probe aan het target gehybridiseerd en worden de fluorofoor en quencher van elkaar gescheiden, wat leidt tot emissie van fluorescentie

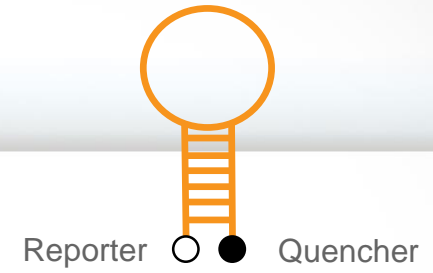


Illustratie:Sigma-Aldrich

# Molecular beacon-probe



# Molecular beacon-probe



# Molecular beacon-probe



# Molecular beacon-probe

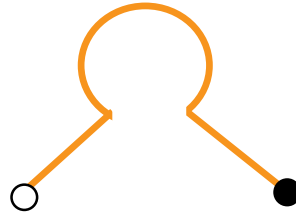




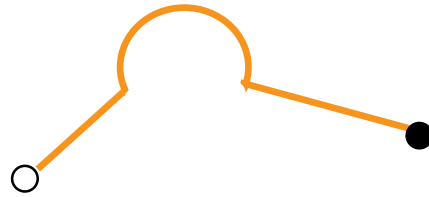
# Molecular beacon-probe



# Molecular beacon-probe



# Molecular beacon-probe



# Molecular beacon-probe

Forward-primer



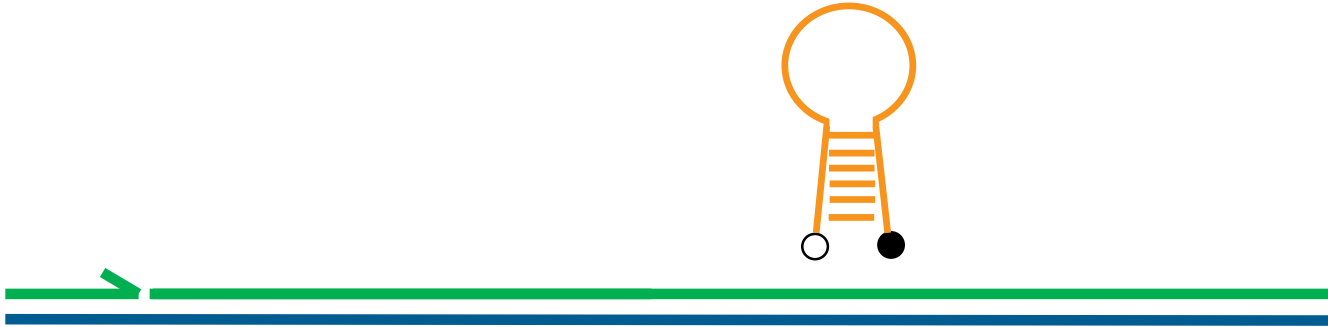
# Molecular beacon-probe



# Molecular beacon-probe



# Molecular beacon-probe



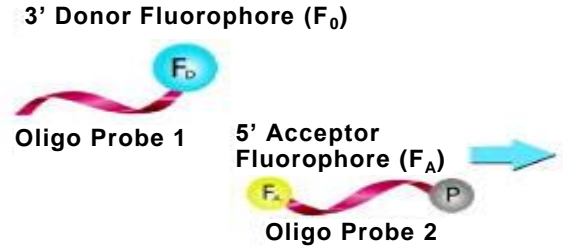
# Molecular beacon-probe





# FRET-probe

- FRET-probes zijn een paar oligonucleotiden met een donorfluorofoor en een acceptorfluorofoor.
- Bij excitatie van de donor door het instrument, wordt de acceptor door de donor geëxciteerd, waardoor fluorescentie-emissie ontstaat. Deze fluorescentie wordt door het instrument gedetecteerd.
- Wanneer de probes vrij in oplossing zijn, treedt dit fenomeen niet op vanwege gebrek aan proximititeit.
- Tijdens de hybridisatiefase van de PCR hybridiseren de probes dicht bij elkaar, waardoor de energieoverdracht en fluorescentie-emissie en -meting mogelijk wordt.



1. Probes in solution emit low fluorescence

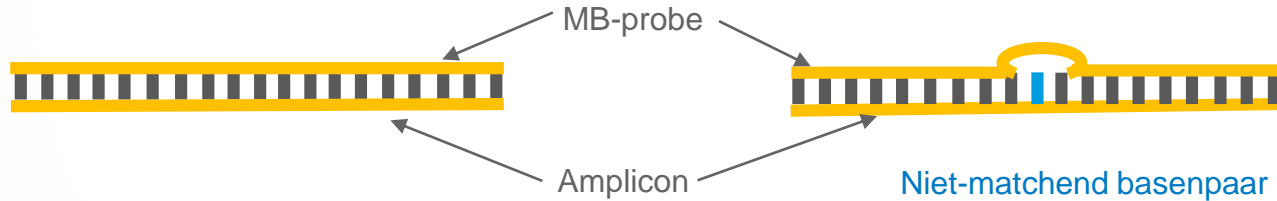


2. Emission through fluorescence resonance energy transfer

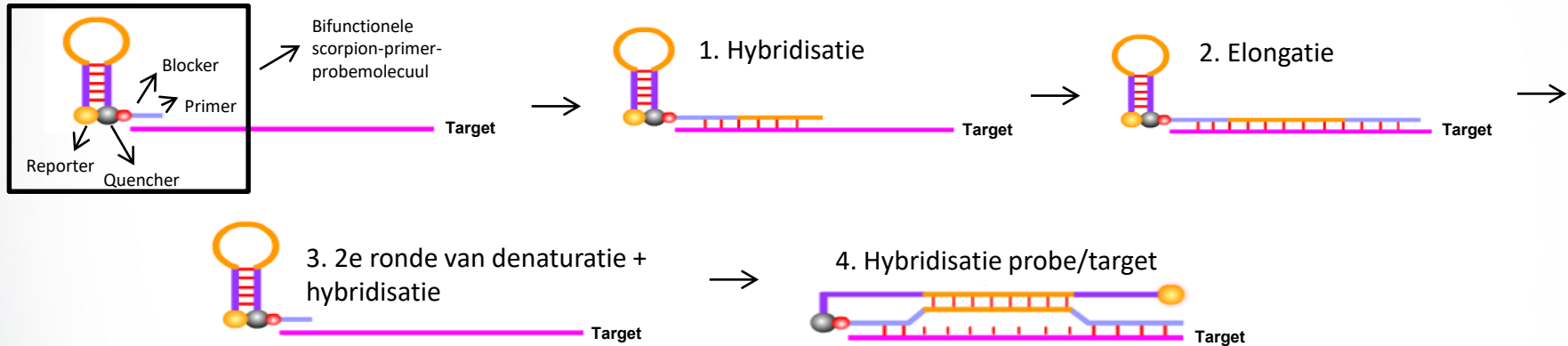
Afbeelding: Sigma-Aldrich

# Sloppy molecular beacon

- Sloppy molecular beacons hebben een relatief lange probesequentie (circa 30-40 basen lang), waardoor ze in staat zijn hybrid te vormen met amplicons van veel verschillende soorten ondanks de aanwezigheid van **niet-matchende basenparen**.



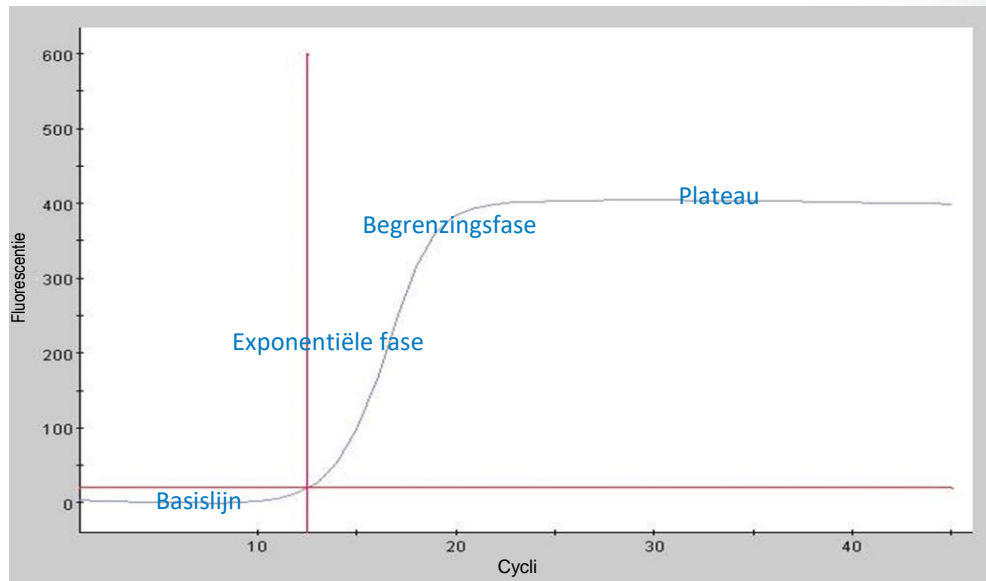
# Scorpion-probe



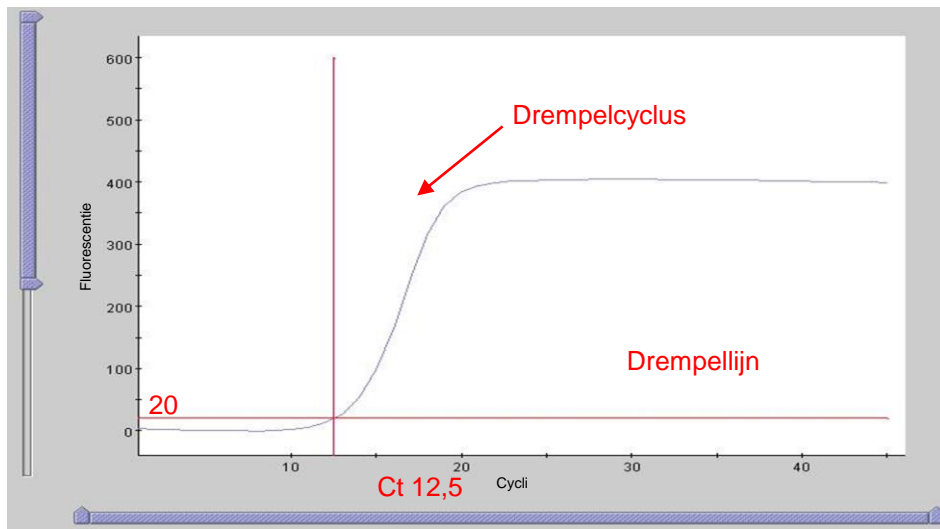
De probe-sequentie moet circa 17-27 basen lang zijn.

# Veranderingen in fluorescentie tijdens PCR

- De amplificatiecurve bestaat uit 4 fasen:



# Definitie van Ct – op basis van drempel



- Drempelcyclus (Ct, threshold cycle): de eerste cyclus waarbij een gedefinieerde fluorescentiedrempel wordt overschreden
- Deze cycluswaarde kan een breuk zijn

# Validatiecriteria van een PCR: Ct-bereik en eindpuntfluorescentie

- Ct-bereik
  - Dit is het aanvaardbare bereik voor een Ct-waarde
  - Het wordt begrensd door  $Ct_{\min}$  en  $Ct_{\max}$
- Eindpuntfluorescentie
  - De fluorescentiewaarde aan het einde van de PCR (plateau)







Bij Xpert-testen wordt de amplificatiecurve buiten dit bereik niet gevalideerd; er kan geen resultaat worden verstrekt

# Multiplex-PCR

- Multiplex-PCR is de amplificatie van **meerdere DNA-targets** tegelijk
  - Elk target heeft zijn eigen set primers
  - Elk target wordt gedetecteerd of gekwantificeerd door zijn eigen probe, gelabeld met een verschillende kleurstof, gedetecteerd op een specifieke fluorescentiegolflengte
- Bij het ontwerpen van een multiplex-PCR moet concurrentie tussen de verschillende targets worden vermeden

# Detectie van meerdere kleurstoffen – tot 2020 6 kleurstoffen

- Er worden verschillende kleurstoffen (reporters) geselecteerd
- Deze worden geëxciteerd en vertonen elk emissie op een eigen golflengte

Analyt	Reporter	Excitatie (nm)	Emissie (nm)
Target 1	Kleurstof 1	375-405	420-480 
Target 2	Kleurstof 2	450-495	510-535 
Target 3	Kleurstof 3	500-550	565-590 
Target 4	Kleurstof 4	630-650	665-685 
SPC	Kleurstof 6		> 700 
Target 5	Kleurstof 5	555-590	606-650 



# Detectie van meerdere kleurstoffen – nu 10 kleurstoffen

- Er worden verschillende kleurstoffen (reporters) geselecteerd
- Deze worden geëxciteerd en vertonen elk emissie op een eigen golflengte

		iCore-detectie			
Optische kanalen iCore		Blauw + IR (420-477 nm + > 700 nm)	Groen + diep rood (510-535 nm + 660-680 nm)	Geel (565-585 nm)	Rood (620-645 nm)
Excitatie iCore	UV (400 nm)	CF1			
	Blauw (470 nm)		FAM	CF7 (FAM-CF3)	CF9
	Groen (520 nm)	CF10 (CF3-CF6)		A532 (CF3)	CF8 (CF3-CF4)
	Geel (574-584 nm)				TxR (CF4)
	Rood (635 nm)	CF6	A647 (CF5)		

# Kwantificering met realtime PCR

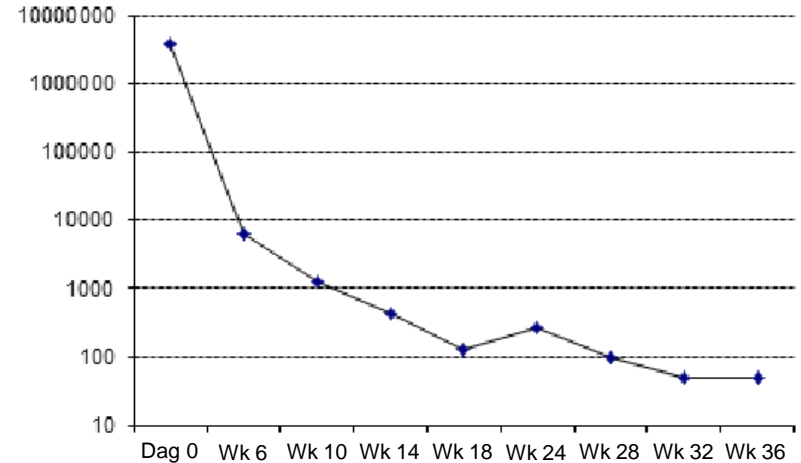


# Kwantificering

- Absolute kwantificering: resultaat gerapporteerd als een concentratie (kopieën/ml, IE/ml, enz...):

Xpert HIV-1 VL en Xpert HCV

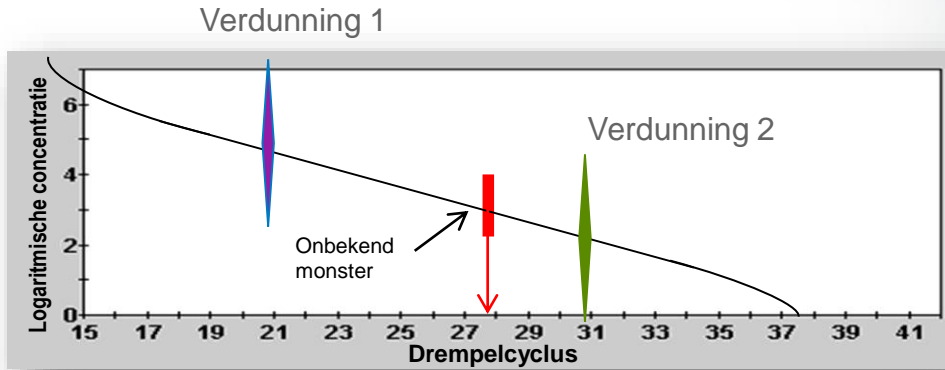
- Relatieve kwantificering: resultaat gerapporteerd als een verhouding: Xpert BCR-ABL



Daling virale belasting (VL, viral load) HIV-1 op ART (andere methode dan GeneXpert).  
Illustratie: hivbook.com

# Absolute kwantificering aan de hand van externe standaarden

1. Bereid verdunningen van een monster dat een bekende concentratie van het target-DNA bevat.
2. Deze verdunningen worden samen met het onbekende monster getest, elk in een eigen reageerbuis
3. Voor elke verdunning wordt de Ct gerapporteerd
4. De standaardcurve wordt uitgezet: Ct t.o. concentratie
5. De Ct van het onbekende monster wordt gebruikt om de concentratie daarvan te extrapoleren aan de hand van de standaardcurve



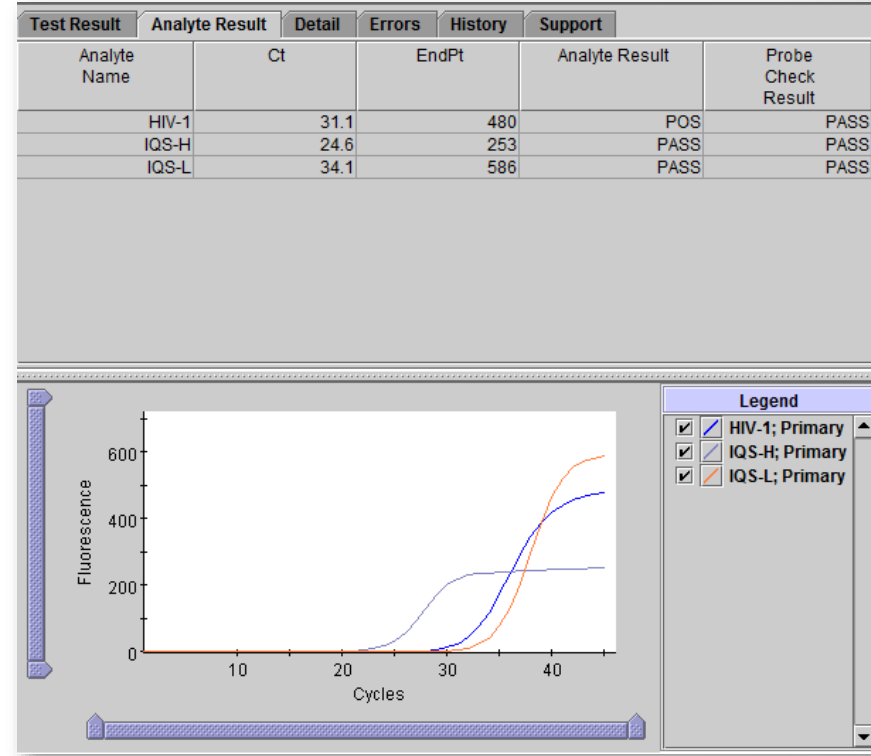
Binnen het lineaire concentratiebereik zijn 2 standaarden voldoende

# Absolute kwantificering aan de hand van interne standaarden

Voor Xpert HIV-1 VL:

Er worden 2 standaarden gebruikt om de concentratie van het monster te berekenen:

- 1 hoge standaard (IQS-H) =  $10^6$  kopieën/ml
- 1 lage standaard (IQS-L) =  $10^3$  kopieën/ml
- Op grond van de Ct's en de bekende concentratie van elke standaard en de Ct van het onbekende monster wordt de concentratie van het onbekende monster berekend door de GeneXpert-software.



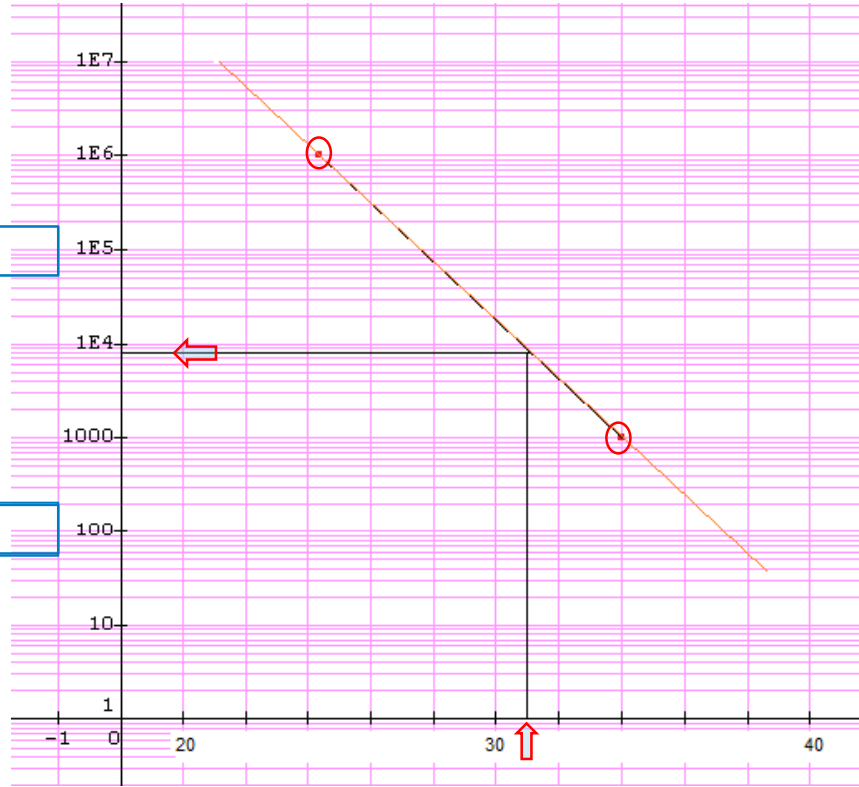
# Berekening van de monsterconcentratie

$y = \text{virale belasting}$   
(kopieën/ml)

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

IQS-H

IQS-L

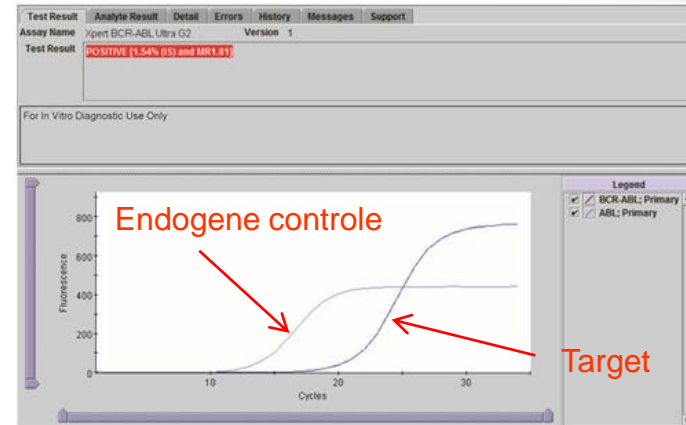


$x = Ct$

# Relatieve kwantificering met realtime PCR

(Vb.: Xpert BCR-ABL)

- Bij relatieve kwantificering wordt het niveau van een target gemeten en wordt dit uitgedrukt in verhouding tot het niveau van een interne controle (referentiegen)
- Het referentiegen kan endogeen zijn. Daarom kan het ook waarborgen dat er voldoende monster wordt gebruikt in de test.
- Vanwege de geringe variabiliteit van de endogene controle kan deze ook worden gebruikt voor het indiceren van PCR-remming.



POSITIEF [1,54% (IS) EN MR1,81]

Voorbeeld van het resultaat van een Xpert BCR-ABL Ultra-test

# Conclusie

RT-PCR is:

- Snel
- Gevoelig
- Precies
- Gemakkelijk uit te voeren
- Kan kwantitatief zijn



“

**Elk jaar weer produceert de wetenschap een rijke oogst aan wonderbaarlijke kennis en verbluffende apparaten.**

*Kary Mullis*





Dank u.

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

