

Основные принципы полимеразной цепной реакции (ПЦР) — II



Круг основных вопросов

Основные принципы ПЦР.
Часть I

Основные принципы молекулярной
биологии

Что представляет собой ПЦР

Фазы ПЦР

Основные принципы ПЦР.
Часть II

Что представляет собой ПЦР
в реальном времени

Качественная ПЦР в реальном времени

Количественная ПЦР в реальном
времени

Основные принципы ПЦР.
Часть III

Что такое температура плавления

Анализ кривых плавления

ПЦР в реальном времени



ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ)

- ПЦР в реальном времени является обычным процессом ПЦР, при котором используют дополнительный олигонуклеотид, помеченный флюоресцирующей молекулой. Его называют зондом.
- В качестве зонда используют одноцепочечную ДНК, последовательность нуклеотидов в которой совпадает с целевой последовательностью
- При активации флюоресцентного зонда гибридизацией он излучает флюоресцентный сигнал
- Одна копия целевой ДНК активирует одну молекулу зонда, поэтому флюоресцентный сигнал прямо пропорционален числу созданных копий целевой ДНК
- Примеры зондов, используемых для ПЦР в реальном времени: TaqMan, молекулярные маяки, зонды-скорпионы ...



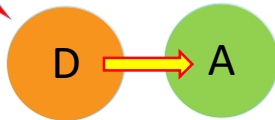
Зонд

Технология FRET:

- Резонансный перенос энергии флюоресценции (Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET) является зависимым от расстояния взаимодействием двух молекул красителя.
- Энергия возбуждения передается от молекулы-донора к молекуле-акцептору без излучения фотона.
- Принцип FRET имеет много применений, в том числе в ПЦР.

D=донор/репортер
A=акцептор/гаситель

Возбуждение



Близкое расположение —
флюоресценция поглощается

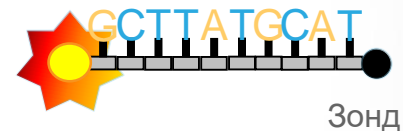
Возбуждение



Удаленное расположение — флюоресценция излучается

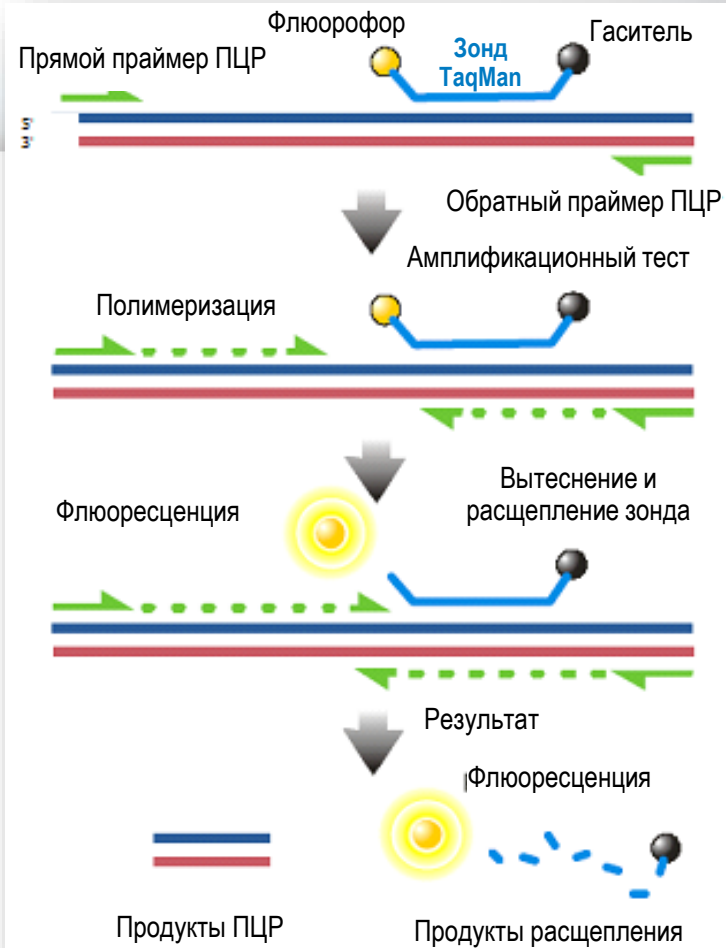
Зонд TaqMan

- Зонд TaqMan является коротким олигонуклеотидным зондом (длиной 15–30 оснований), меченым флюоресцентным красителем на 5' конце и гасителем на 3' конце.
- Пока репортер и гаситель расположены рядом, гаситель поглощает флюоресценцию репортера
- В качестве зонда используют последовательность ДНК, прикрепляющуюся к целевой последовательности
- В фазе элонгации ПЦР-полимеразы Taq расщепляет зонд
- Это приводит к физическому разделению репортера и гасителя, после чего флюоресцентный сигнал излучается и может быть измерен



1 свободный
флюорофор/амплик
он ДНК

Зонд TaqMan



Зонд TaqMan

Репортер

Гаситель



Зонд TaqMan

Репортер

Гаситель



Прямой праймер



Зонд TaqMan

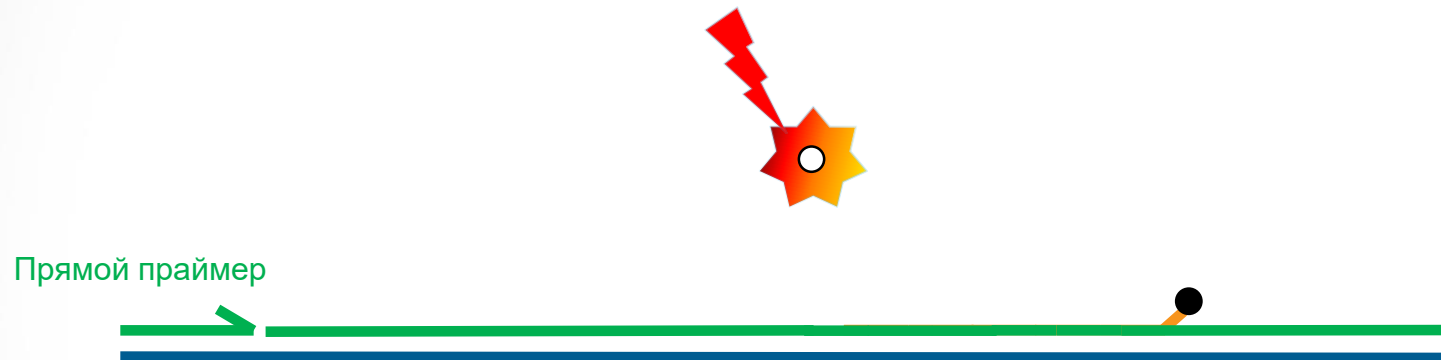
Прямой праймер

Репортер

Гаситель

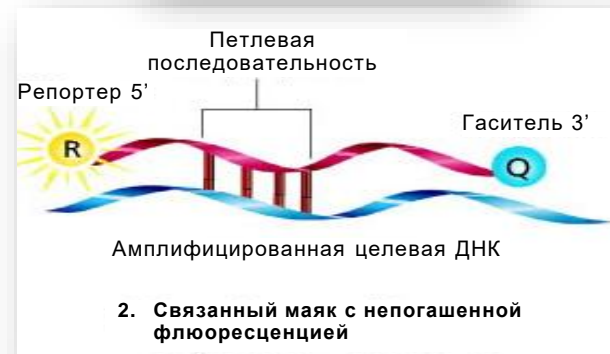


Зонд TaqMan



Зонд — молекулярный маяк

- Зонд — молекулярный маяк является молекулой, имеющей форму шпильки и состоящей из флюорофора (репортера) и гасителя
- Последовательность зонда имеет длину примерно 17–21 оснований. Последовательность стебля должна содержать много гуанина и цитозина (более 80 % всей последовательности) для формирования стабильного дуплекса длиной 5–8 оснований
- При свободном нахождении этой молекулы в растворе ее два конца сближены и флюоресценция гасится.
- В присутствии целевой ДНК зонд прикрепляется к целевой последовательности и флюорофор отделяется от гасителя, что приводит к излучению флюоресцентного сигнала



Изображение: Sigma-Aldrich



Зонд — молекулярный маяк



Зонд — молекулярный маяк



Зонд — молекулярный маяк



Зонд — молекулярный маяк



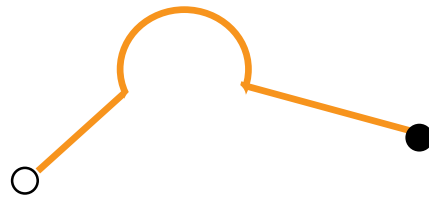
Зонд — молекулярный маяк



Зонд — молекулярный маяк



Зонд — молекулярный маяк



Зонд — молекулярный маяк

Прямой праймер



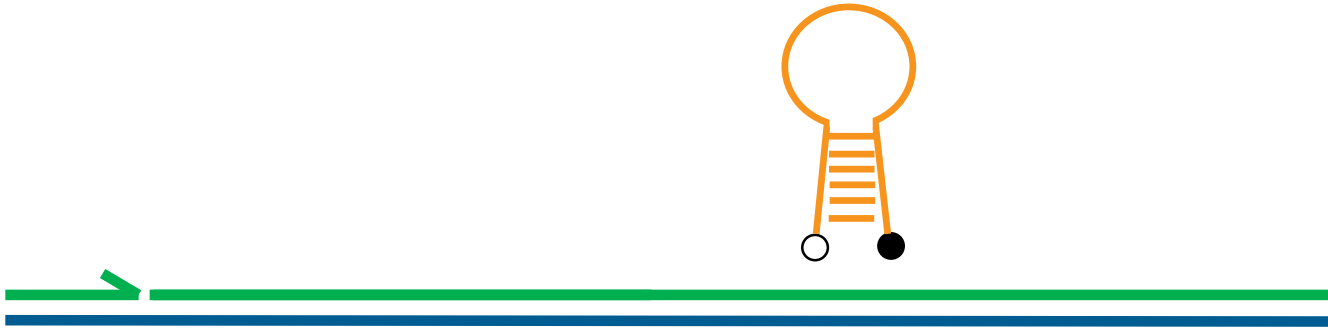
Зонд — молекулярный маяк



Зонд — молекулярный маяк



Зонд — молекулярный маяк

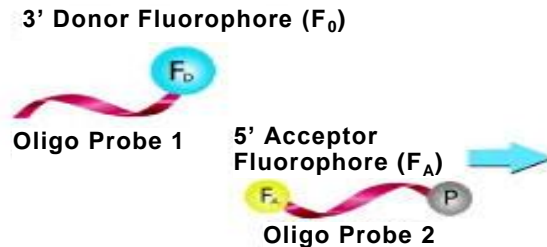


Зонд — молекулярный маяк



Зонд FRET

- Зонды FRET являются парами олигонуклеотидов с флюорофором-донором и флюорофором-акцептором
- Возбуждаемый прибором донор возбуждает акцептор, который излучает флюоресцентный сигнал. Эта флюоресценция обнаруживается прибором
- Когда зонды находятся в свободном состоянии в растворе, этот феномен не происходит из-за отсутствия близости.
- В фазе отжига ПЦР зонды тесно сближаются, что создает условия для передачи энергии и излучения флюоресцентного сигнала, который может быть измерен



1. Probes in solution emit low fluorescence

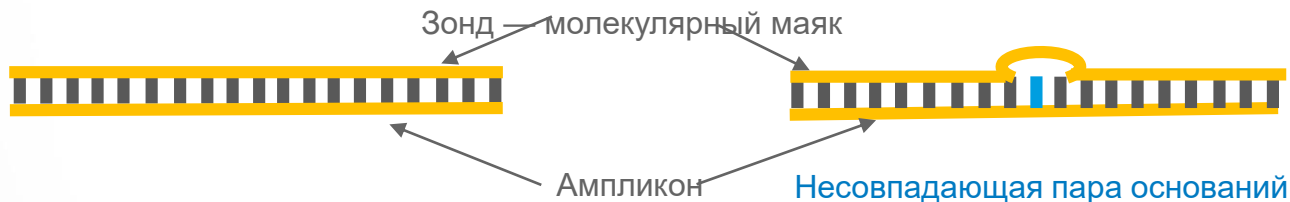


2. Emission through fluorescence resonance energy transfer

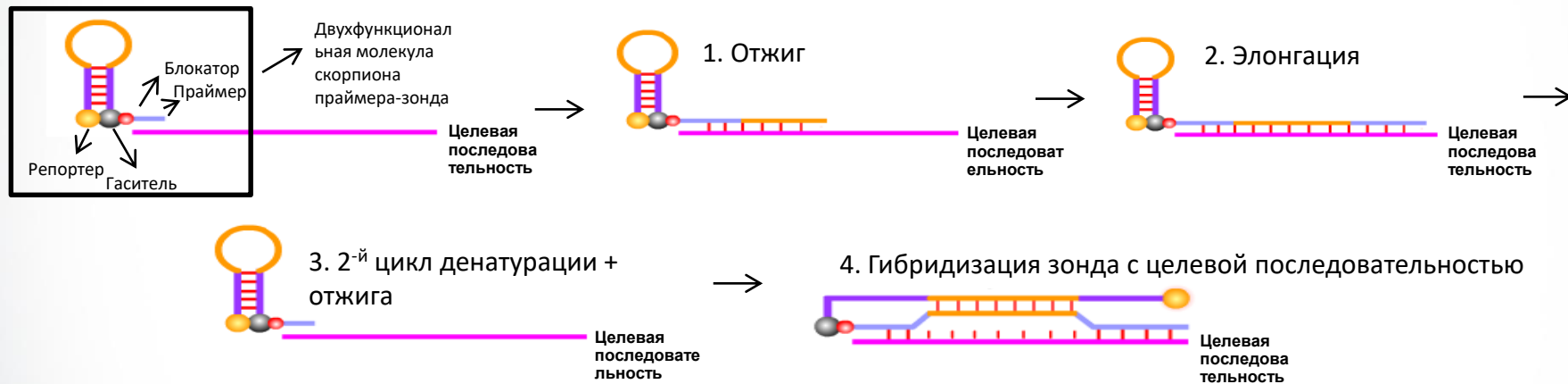
Изображение: Sigma-Aldrich

Неточные молекулярные маяки

- Неточные («sloppy») молекулярные маяки обладают сравнительно длинными (примерно 30–40 оснований) последовательностями зондов, что позволяет им образовывать гибриды с ампликонами многих различных видов, несмотря на наличие **несовпадающих пар оснований**.



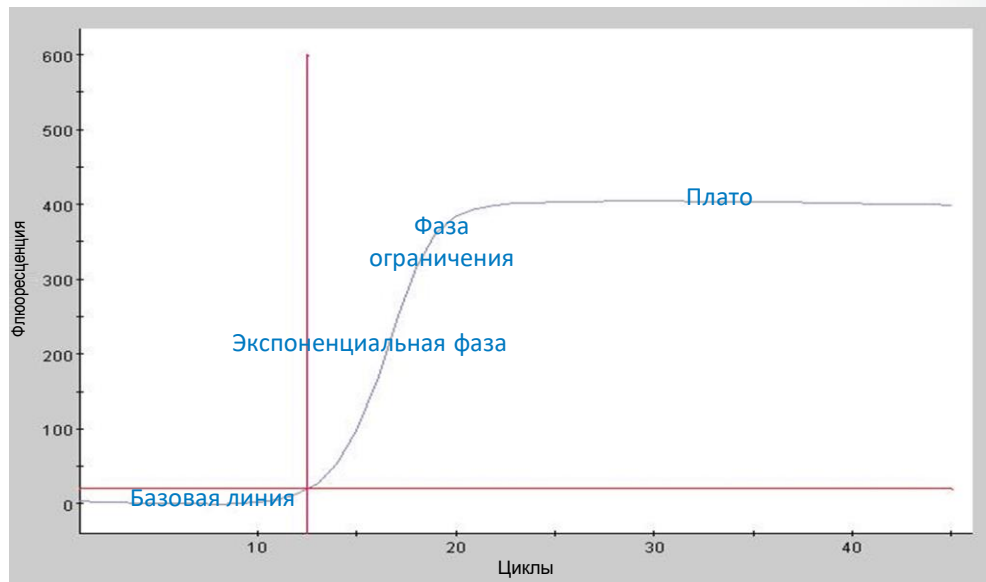
Зонд-скорпион



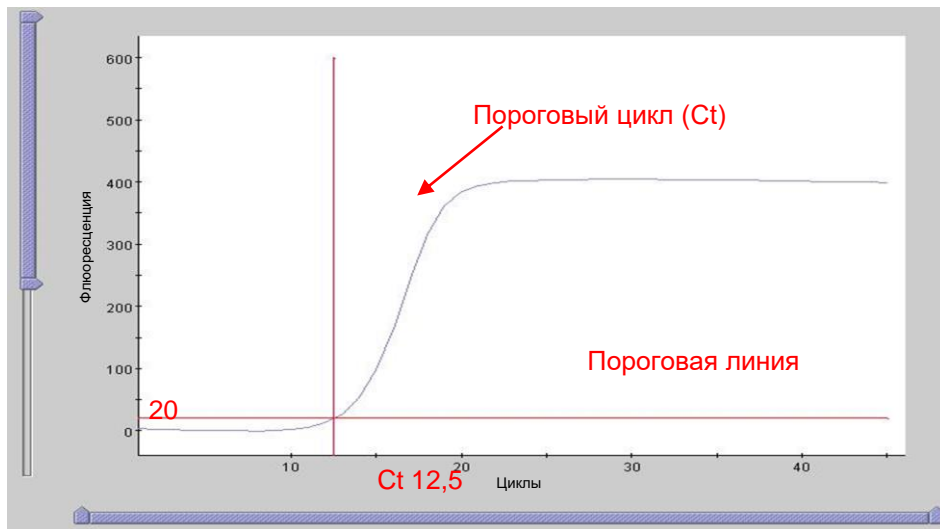
Последовательность зонда должна иметь длину 17–27 оснований.

Изменения флюоресценции во время ПЦР

- Кривая амплификации состоит из 4 частей:



Определение Ct основано на пороге



- Пороговый цикл (Ct) — первый цикл, в ходе которого флуоресценция достигает заданного порогового уровня
- Этот цикл может быть выражен дробным числом

Критерии валидации ПЦР: Диапазон C_t и флюоресценция в конечной точке

- Диапазон C_t
 - Это диапазон допустимых значений C_t
 - Он находится между $C_{t_{\text{мин}}}$ и $C_{t_{\text{макс}}}$
- Флюоресценция в конечной точке
 - Значение флюоресценции в конце ПЦР (плато)

В тестах Xpert валидация кривой амплификации за пределами диапазона не выполняется: результат не может быть выдан

Мультиплексная ПЦР

- Мультиплексная ПЦР — это одновременная амплификация **нескольких целевых последовательностей ДНК**
 - Каждая целевая последовательность имеет собственный набор праймеров
 - Каждую целевую последовательность количественно определяют по ее собственному зонду, причем каждый помечен отдельным красителем и детекция выполняется на его конкретной длине волны
- При планировании мультиплексной ПЦР следует избегать конкуренции между мишенями

Обнаружение нескольких красителей — 6 красителей до 2020 г.

- Выбирают различные красители (репортеры)
- Они имеют различные длины волн возбуждения и излучения

Анализируемое вещество	Репортер	Возбуждение (нм)	Излучение (нм)
Целевая последовательность 1	Краситель 1	375–405	420–480 
Целевая последовательность 2	Краситель 2	450–495	510–535 
Целевая последовательность 3	Краситель 3	500–550	565–590 
Целевая последовательность 4	Краситель 4	630–650	665–685 
SPC	Краситель 6		>700 
Целевая последовательность 5	Краситель 5	555–590	606–650 

Обнаружение нескольких красителей — теперь 10 красителей

- Выбирают различные красители (репортеры)
- Они имеют различные длины волн возбуждения и излучения

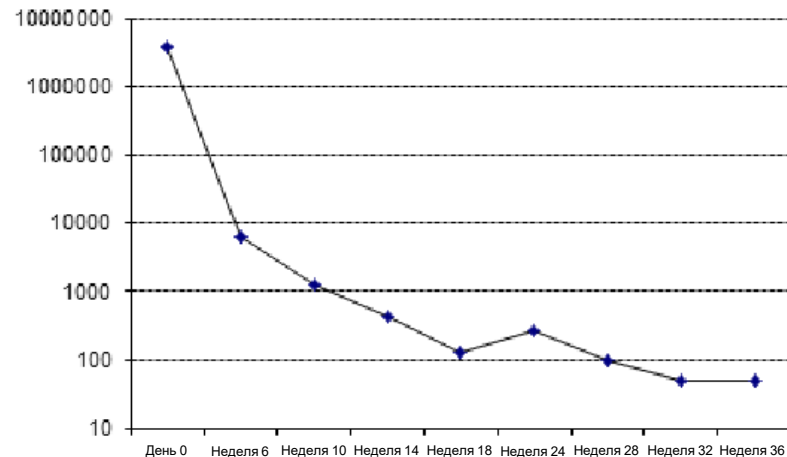
		Детектирование iCore			
Оптические каналы iCore		Синий + ИК (420–477 нм + > 700 нм)	Зеленый + глубокий красный (510–535 нм + 660-680 нм)	Желтый (565–585 нм)	Красный (620–645 нм)
Возбуждение iCore	УФ (400 нм)	CF1			
	Синий (470 нм)		FAM	CF7 (FAM-CF3)	CF9
	Зеленый (520 нм)	CF10 (CF3-CF6)		A532 (CF3)	CF8 (CF3-CF4)
	Желтый (574–584 нм)				TxR (CF4)
	Красный (635 нм)	CF6	A647 (CF5)		

Количественное определение методом ПЦР в реальном времени



Количественное определение

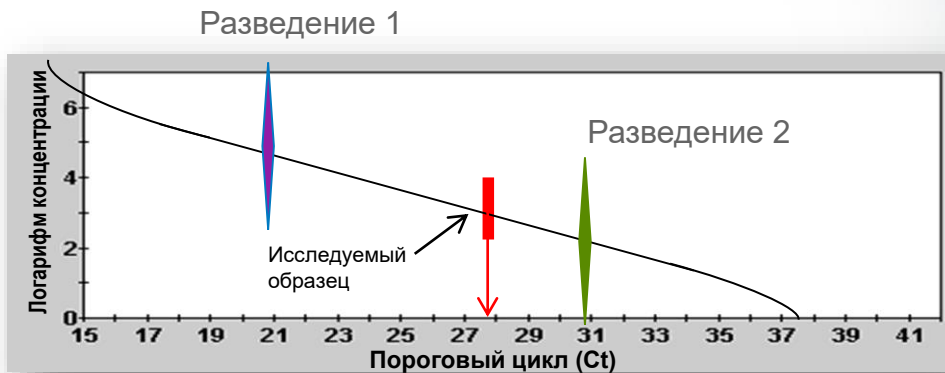
- Абсолютное количественное определение: результат выдается в единицах концентрации (копии/мл, МЕ/мл и др.):
тесты Xpert HIV-1 VL и Xpert HCV
- Относительное количественное определение: результат выдается в виде отношения: тест Xpert BCR-ABL



Снижение вирусной нагрузки HIV-1 VL при АРТ (другой метод, не GeneXpert).
График: hivbook.com

Абсолютное количественное определение с применением внешних стандартов

1. Готовят разведения образца, содержащего известную концентрацию целевой ДНК.
2. Эти разведения анализируют одновременно с исследуемым образцом, каждый в отдельной пробирке
3. Для каждого разведения сообщают C_t
4. Строят стандартную кривую связи C_t и концентрации
5. Величину C_t исследуемого образца используют для определения его концентрации методом экстраполяции по стандартной кривой



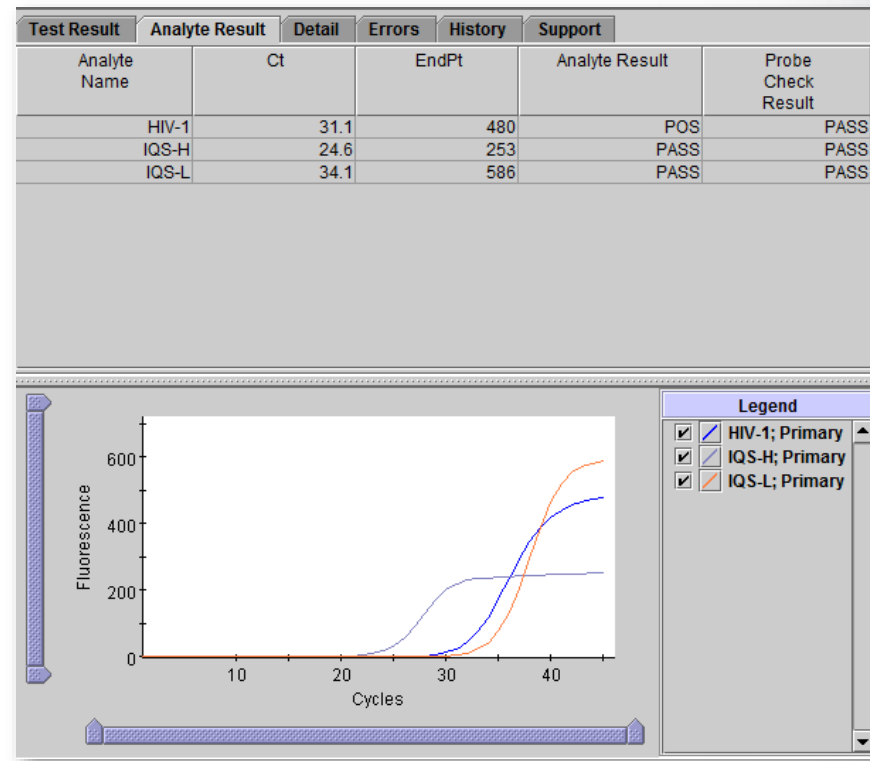
В линейном диапазоне концентраций достаточно использовать 2 стандарта

Абсолютное количественное определение с применением внутренних стандартов.

В тесте Xpert HIV-1 VL:

Для определения концентрации в образце используют 2 стандарта:

- 1 стандарт с высокой концентрацией (IQS-H) = 10^6 копий/мл
- 1 стандарт с низкой концентрацией (IQS-L) = 10^3 копий/мл
- Программное обеспечение GeneXpert вычислит концентрацию исследуемого образца на основании значений Ct и известной концентрации каждого стандарта и Ct исследуемого образца.



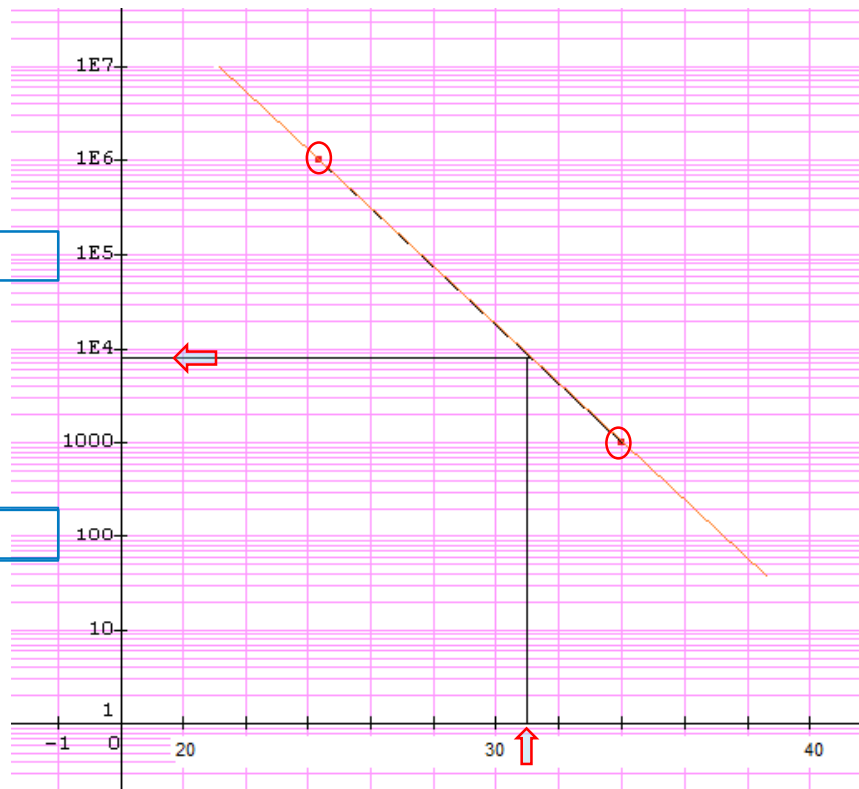
Вычисление концентрации образца

$y = \text{вирусная нагрузка}$
(копий/мл)

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

IQS-H

IQS-L

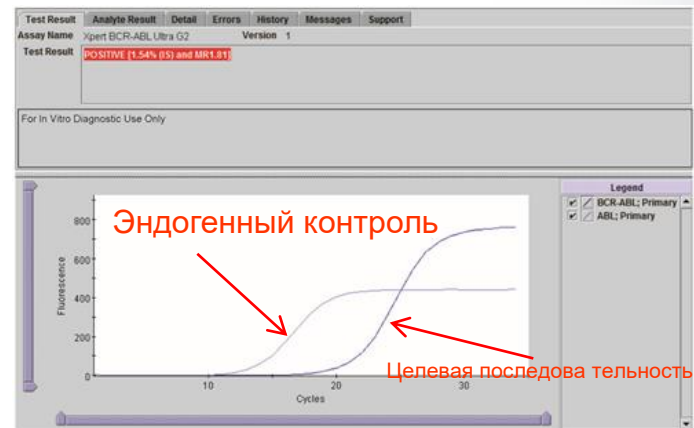


$x = Ct$



Относительное количественное определение методом ПЦР в реальном времени (пример: Xpert BCR-ABL)

- Относительное количественное определение измеряет уровень целевой последовательности и выражает его в единицах относительно уровня внутреннего контроля (референсного гена)
- Этот референсный ген может быть эндогенным. В этом случае его можно также использовать для контроля достаточности объема пробы, использованной в тесте.
- По причине низкой вариабельности эндогенного контроля его можно также использовать как индикатор наличия ингибитора ПЦР.



ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ [1,54% (IS) и MR 1,81] (POSITIVE [1.54% (IS) and MR1.81])

Пример результата теста Xpert BCR-ABL Ultra

Заключение

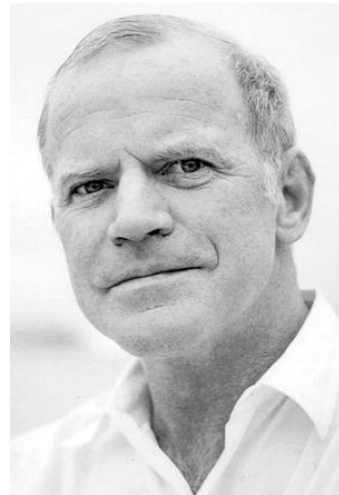
Особенности метода ПЦР-РВ:

- быстрота
- чувствительность
- точность
- простота выполнения
- может быть количественным

“

Наука каждый год приносит нам удивительные факты и дарит великолепные устройства.

Кери Маллис (Kary Mullis)



Благодарим за
внимание!



www.Cepheid.com