

Семинар

Медицинская генетика

Фармация Курс 3 ЦИОП «Медицина будущего»

**ПЦР и его модификации для решения
различных задач в генетике человека и
медицине**

Молекулярно-генетическая диагностика

Основные стадии молекулярно-генетического анализа:

- Выделение ДНК или РНК из клинического материала
- Амплификация анализируемых участков генов
- Детекция продуктов амплификации и определение генетических нарушений

Из какого материала приходится выделять ДНК и РНК при проведении биомедицинских исследований?

Клеточные «суспензии»

Ликвор, плазма крови, смывы с бронхов и т.п. – наиболее удобный материал с точки зрения сложности этапов выделения, включающих лизис клеток, очистку от белков и клеточных фрагментов, отмывку от низкомолекулярных примесей спиртовыми растворами и концентрирование.

Цельная кровь – все те же этапы, но сначала необходимо провести гемолиз и избавиться от высвободившегося содержимого эритроцитов.

Соскоб буккального эпителия, соскобы из уретры – при выделении НК зачастую приходится сначала лизировать образец специальными муколитиками или удлинять первый этап лизиса с детергентами.

Осадки мочи – могут быть, фактически, суспензиями клеток, а могут содержать значительное количество слизи и/или пигментов, солей; необходимо индивидуально оценивать целесообразность того или иного метода выделения.

Структурированная ткань

Замороженные образцы от макропрепарата – операционного материала. Наиболее удобный материал для выделения больших количеств ДНК и РНК высокого качества, но предварительно требует гомогенизации и, желательно, лизиса с протеиназой К.

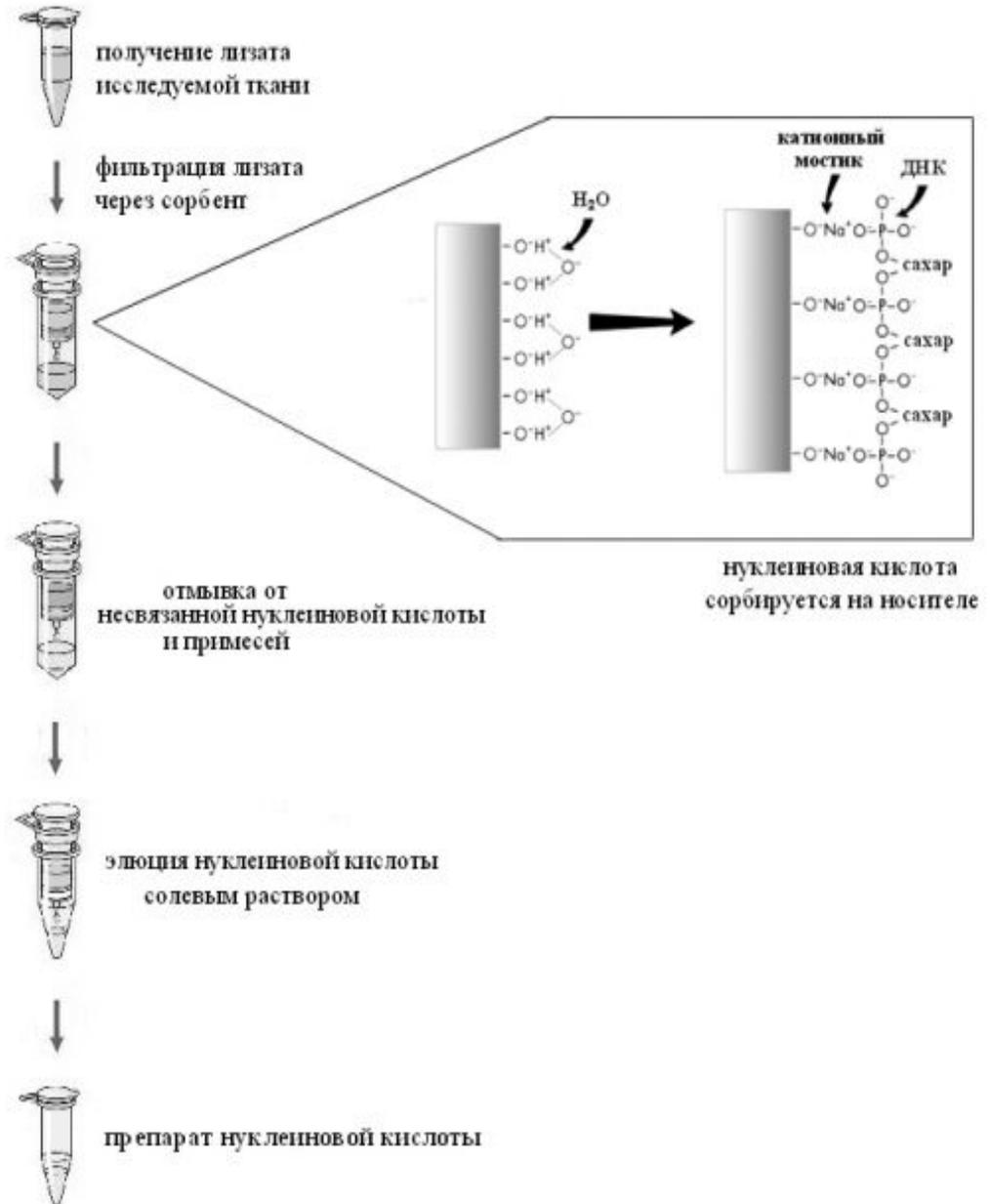
Биоптаты – без гомогенизации, только с протеиназой К, но гораздо меньший выход НК по сравнению с операционным материалом.

Архивные образцы в парафиновых блоках – необходима депарафинизация (желателен этап с восстановлением химических связей, нарушенных формальдегидом при фиксации ткани), подсушка, затем лизис с протеиназой. Как правило, хорошо отобранный и аннотированный материал, но может быть со значительной фрагментацией и деградацией НК (особенно РНК).

Метод сорбции нуклеиновых кислот на силиконовом носителе

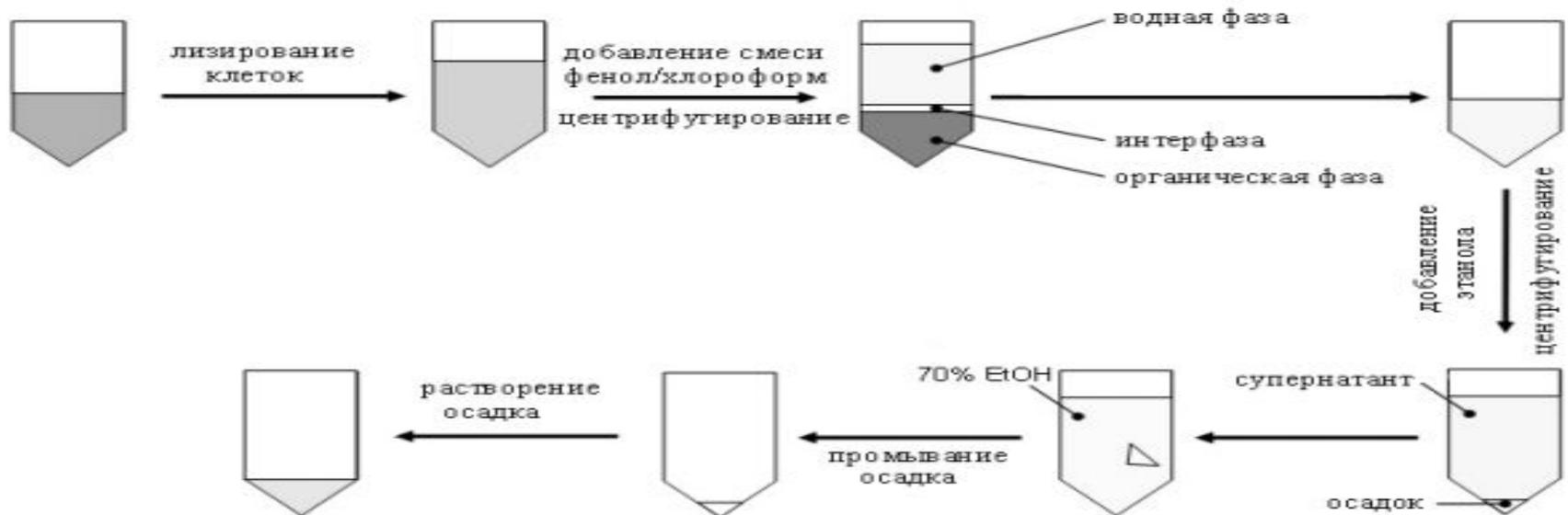
В основе лежит избирательная сорбция НК в присутствии хаотропной соли на носитель, содержащий кремний (суспензии стеклянных порошков, диатомовые земли, диоксид кремния, стеклянные волокна). В качестве хаотропной соли используют перхлорат натрия, гуанидин тиоционат и др. Следует отметить, что многие из используемых хаотропных солей так же осуществляют лизис клеточных компонентов. После аффинной сорбции НК на поверхности носителя ингибиторы ферментативных реакций, другие примеси и компоненты биологического материала остаются в растворе. Носитель, связавший НК, осаждается с помощью центрифугирования, а надосадочная жидкость удаляется. Серия последующих отмывок обеспечивает получение высокоочищенного препарата.

НОСИТЕЛЕ



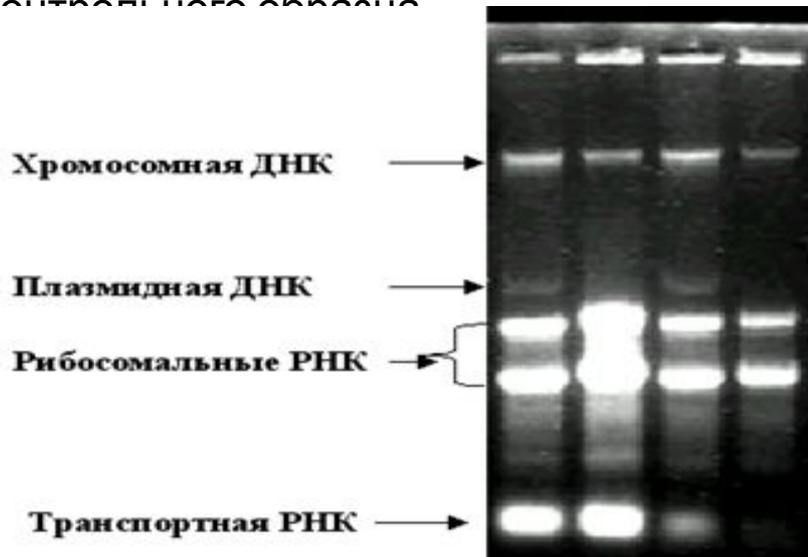
Метод фенол-хлороформной экстракции

Принцип метода основан на том, что НК является полярной молекулой и не растворяется в органических растворителях. Смесь фенола с хлороформом не смешивается с водой. При добавлении к лизату смеси фенола с хлороформом и интенсивном перемешивании, присутствующие в растворе белки денатурируют, а гидрофобные примеси (липиды, жиры и др.) растворяются хлороформом. Последующее центрифугирование приводит к разделению на водную (верхнюю) и органическую (нижнюю) фазы. НК находится в водной фазе, а денатурированные белки формируют кольцо на границе раздела фаз или растворяются в нижней фазе.



Определение количества и качества нуклеиновых кислот

Качественный метод – электрофорез в агарозном геле нуклеиновой кислоты и контрольного образца с известной концентрацией (например, коммерческий маркер размерности ДНК). При этом для более точного определения количества нуклеиновой кислоты используют стандартное разведение контрольного образца. После проведения электрофореза концентрацию препарата нуклеиновой кислоты оценивают по яркости свечения полосы в ультрафиолетовом свете по сравнению с флуоресценцией контрольного образца.



Количественный метод – измерение концентрации с помощью спектрофотометра или флуориметра. Белки и нуклеиновые кислоты УФ между 210 и 300 нм. Максимум поглощения растворов ДНК и РНК при 260 нм, а для белков – 280 нм. Для оценки содержания примесей препарата НК используют отношение A_{260}/A_{280} , которое для чистого препарата ДНК приблизительно равно 1,8, а для РНК – 2,0. При использовании флуориметра Qubit измеряется свечение от разных флуорофоров, каждый из которых специфично связывается с ДНК, РНК или белками, т.е. это более точное измерение, чем на спектрофотометре (но более дорогостоящее – необходимо периодически делать стандартные разведения).



ПЦР – репликация ДНК *in vitro*

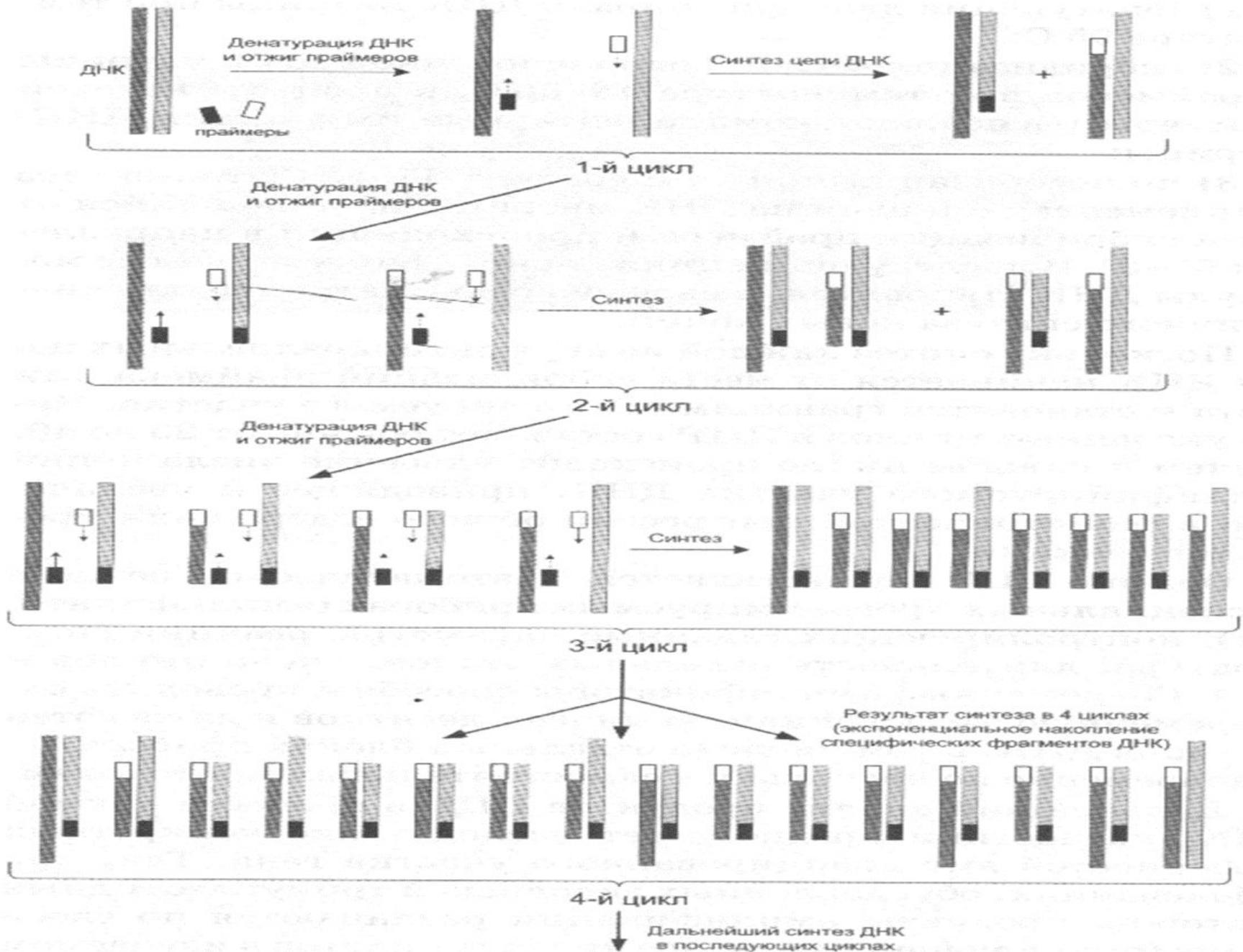
В 1983 г. Kary B. Mullis изобрел метод ПЦР



В 1993 г. Kary B. Mullis стал лауреатом Нобелевской премии

- ▶ Первоначально искусственный синтез ДНК с использованием олигонуклеотидов был предложен в 1971 (!) г. но не нашел применения (Kleppe et al., 1971)
- ▶ Предложен в 1983 г Кэрри Маллисом (Kary Mullis, (публикация 1985г).
- ▶ Нобелевская премия по химии 1993 г.
- ▶ Патент Cetus Corporation, затем продан за 300000 Hoffmann-La Roche. Значительно тормозил развитие методов, основанных на ПЦР, неоднократно оспаривался в судах (Du Pont, Promega)
- ▶ Патент истек в 2005 г.!

Метод ПЦР – краткое напоминание



Компоненты ПЦР

- ✓ Буфер (Tris-HCl, pH 8.0-8.8, KCl)
- ✓ $MgCl_2$ (1-3 mM)
- ✓ Праймеры (0.4 мкМоль каждого)
- ✓ dNTP (40-200 мкМоль каждого)
- ✓ ДНК-полимераза (1 ед. акт)
- ✓ Матрица (50-1000 нг)

Ферменты ПЦР

Некоторые характеристики ДНК-полимераз

Полимеразы	Время полужизни при 95С (min)	Экзонуклеазная активность 5'-3' (+/-)	Экзонуклеазная активность 3'-5' (+/-)	Достройка 3'-концов
Taq	40	+	-	A-он
Tth	20	+	-	A-он
Pfu	120	-	+	blunt ends
Vent	400	-	+	blunt ends
Deep Vent	1300	-	+	blunt ends
UITma	50	-	+	blunt ends
Pwo	120 при 100С	-	+	blunt ends

Праймеры для ПЦР

Длина 18-30 пар оснований

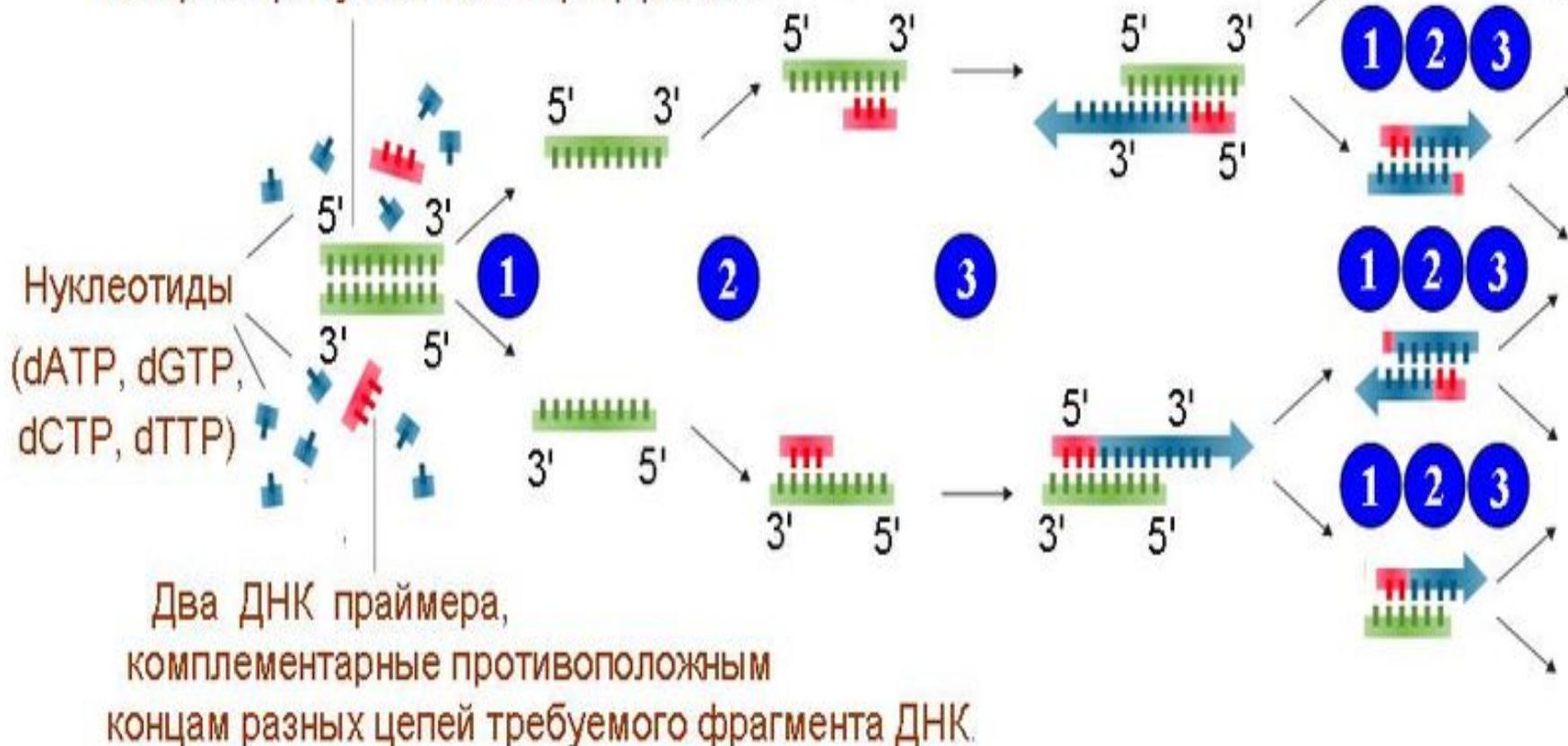
- ▶ GC-состав ~ 40—60 %;
- ▶ близкие T_m праймеров (отличия не более, чем на 5 °C);
- ▶ Температура отжига более 55C и менее 60C (если возможно)
- ▶ $T_m = 2 \cdot (n_A + n_T) + 4 \cdot (n_G + n_C)$
- ▶ отсутствие неспецифических вторичных структур — шпилек и димеров;
- ▶ желательно, чтобы на 3'-конце был гуанин или цитозин, поскольку они образуют три водородные связи с молекулой матрицы, делая гибридизацию более стабильной.

Если используем ранее опубликованные праймеры:

- ▶ Внимательно читать раздел методы !
- ▶ Не верить условиям ПЦР в разделе «методы» (требуется оптимизация под Ваши реактивы и оборудование)

Полимеразная цепная реакция - ПЦР

ДНК-матрица, с участком ДНК,
который требуется амплифицировать



1 Денатурация при 94 - 96°C

2 Отжиг при ~ 68°C

3 Элонгация при 72°C

Оптимизация ПЦР

- Температурный профиль реакции
- Временной профиль реакции
- Состав реакционной смеси

конц. ионов магния

конц. праймеров

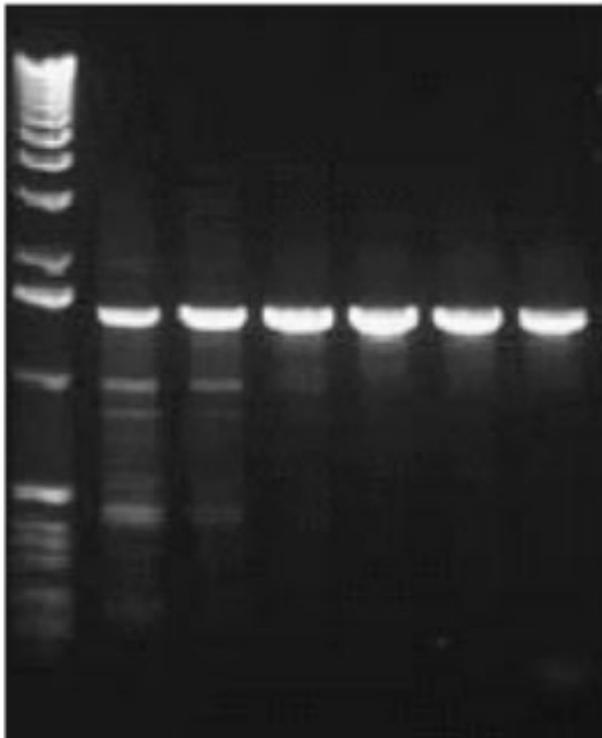
конц. полимеразы

добавки (глицерин, ДМСО, формамид, БСА и др.)

Оптимизация ПЦР

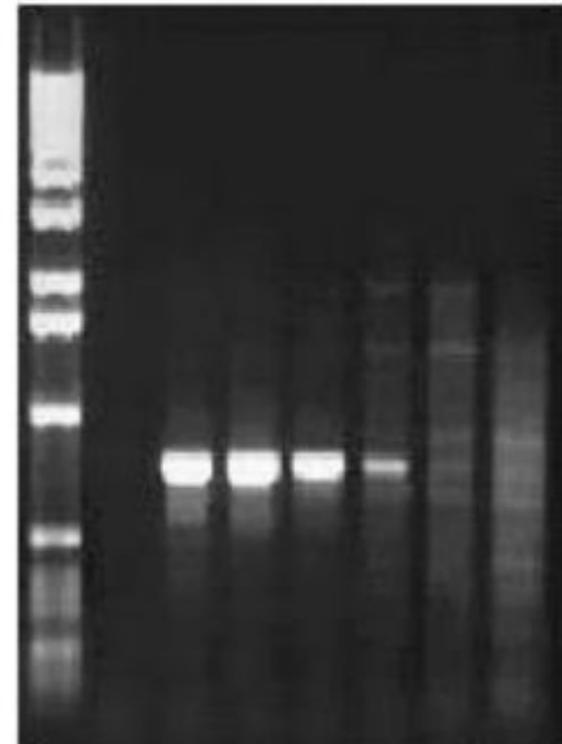
Подбор
температуры
отжига

М 50 52 54 56 58 60



Подбор
концентрации
ионов магния

М 1.5 2.0 2.5 3.0 3.5 4.0



Вещества, улучшающие специфичность и/или выход ПЦР

Вещество	Сток	Используемые концентрации	Механизм действия
BSA	10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	$\sim 0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$	стабилизация фермент
DMSO	100%	2.0-15% (оптимально $\sim 5\%$)	повышение растворимости
Glycerol	100%	5-20% (оптимально 10-15%)	стабилизация фермента
Formamid	100%	1-5%	
Pyrophosphatase thermostable	5 $\text{u}/\mu\text{l}$	0.001 - 1 $\text{u}/\text{реакцию}$	устранение пирофосфатов, которые могут обращать реакцию полимеризации

Другие вещества, влияющие на ПЦР

Вещество	действие
Агароза	не мешает до ~1%.
AcONa (pH 5.0)	начинает ингибировать при $\geq 5\text{mM}$.
EDTA	связывается с Mg^{2+} стехиометрически, начинает ингибировать при $\geq 0.5\text{mM}$, PCR не идёт при 1mM .
DEPC	ингибирует реакцию, лучше не использовать в PCR-реакции растворы, обработанные DEPC.
Желатин	$10\mu\text{g/ml}$ - не мешает.
Изопропанол	ингибирование при концентрациях $\geq 1\%$ (более сильный ингибитор, чем этанол).
Масло, покрывающее PCR	может устранять ингибирующий эффект некоторых загрязнений.
NaCl	заметно ингибирует при 25mM , PCR не идёт при 50mM .
Сахароза	не мешает до 30%.
Фенол	уменьшает выход при $>0.2\%$, PCR не идёт при 0.5%
Этанол	для некоторых реакций - стимулирующий эффект при 1%, для других - ингибирование при концентрациях $\geq 1\%$.

Влияние красителей на на ПЦР

▶ Красители:

❖ Cresol red 0.2mM

❖ Бромфеноловый синий <20µg/ml

❖ EtBr~ 0.1 µg/ml

Вывод – краситель и утяжелитель (глицерин, сахароза можно добавлять непосредственно в ПЦР реакцию

ПЦР: правила хорошего тона

- ▶ Всегда ставить отрицательный контроль (вода вместо ДНК)
- ▶ Ставить положительный контроль (с заведомо работающей ДНК)
- ▶ ПЦР-гигиена - не допускать попадания ПЦР-продукта в зону, где Вы собираете реакцию
- ▶ Иметь «свой» набор реактивов и праймеров, пипетки должны быть четко маркированы (до и после ПЦР разные комплекты)
- ▶ ПЦР продукты хранятся в отдельном холодильнике, и берутся другим комплектом рук.

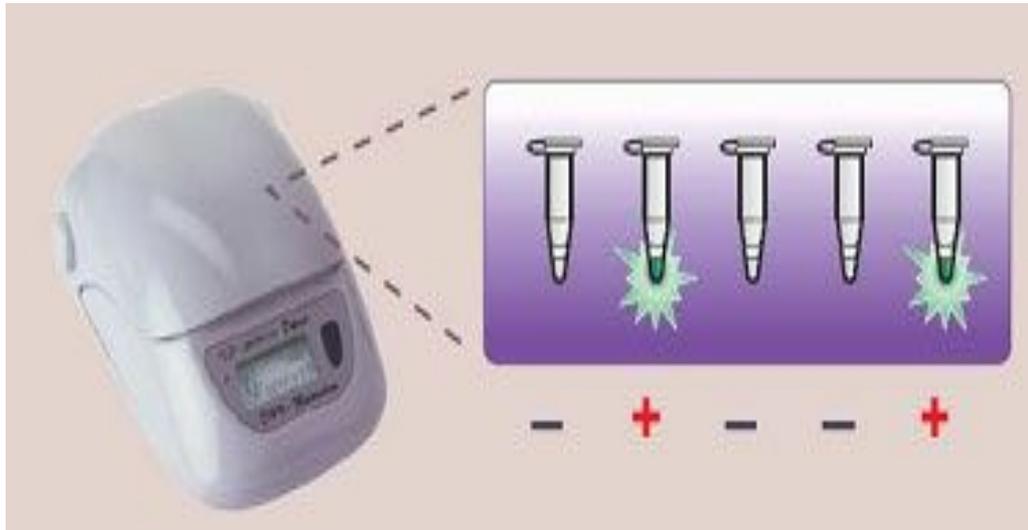
Программируемые термоциклеры

Что важно учитывать при выборе:

1. Формат (стандартные 0,2 мл, или 0,1 мл, или 0,5 мл в Терцике)
2. Возможность работы с индивидуальными пробирками, стрипами, плашками.
3. Наличие нескольких независимых программируемых модулей, что особенно востребовано в научных лабораториях.



Способы визуализации ПЦР «по конечной точке»

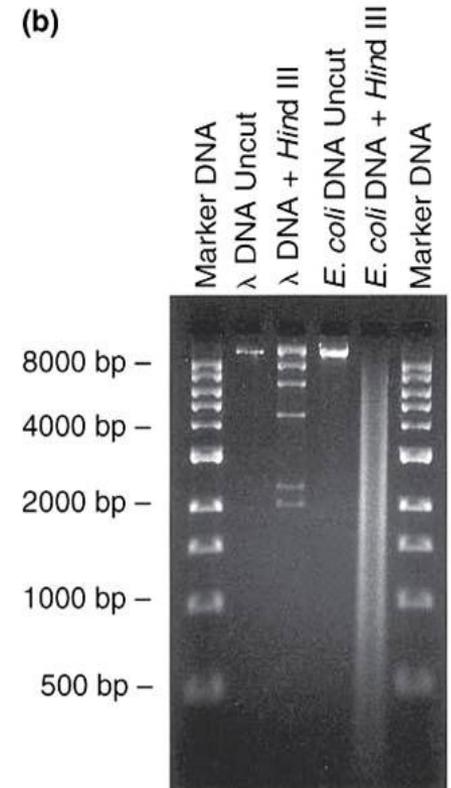
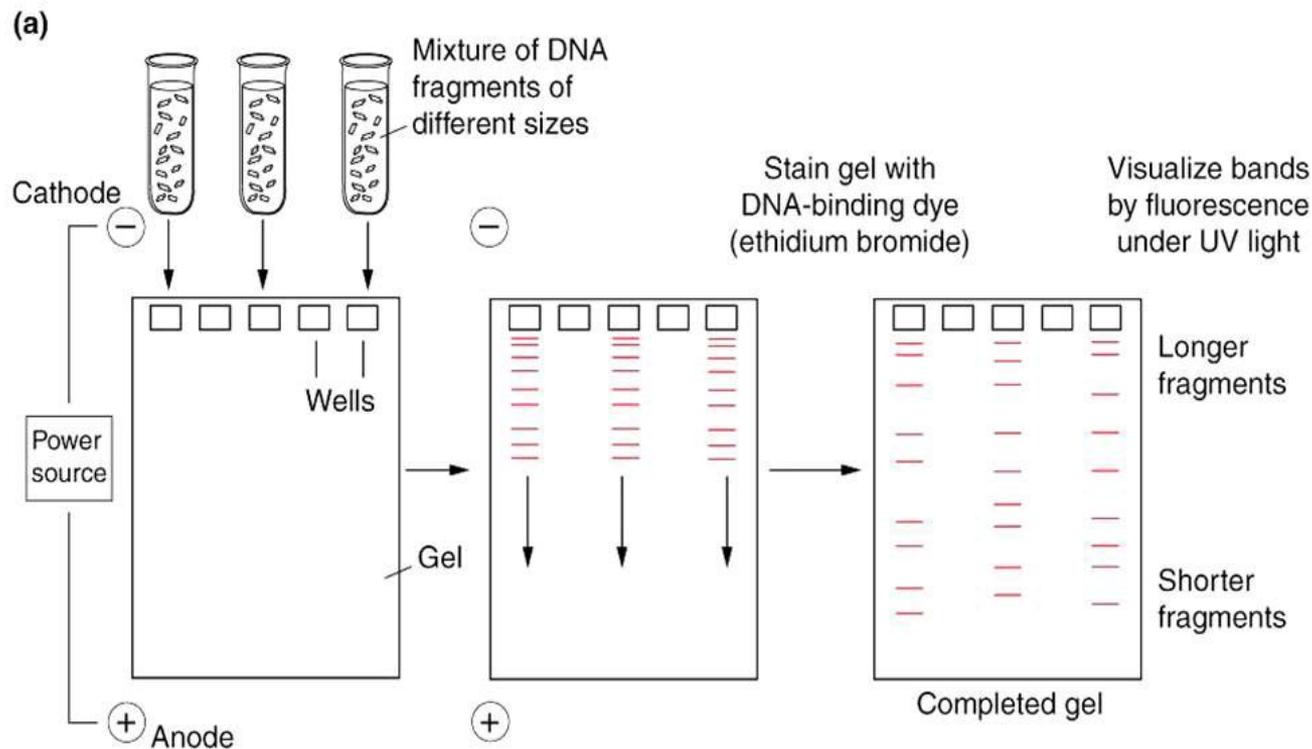


Детекция по конечной
точке:

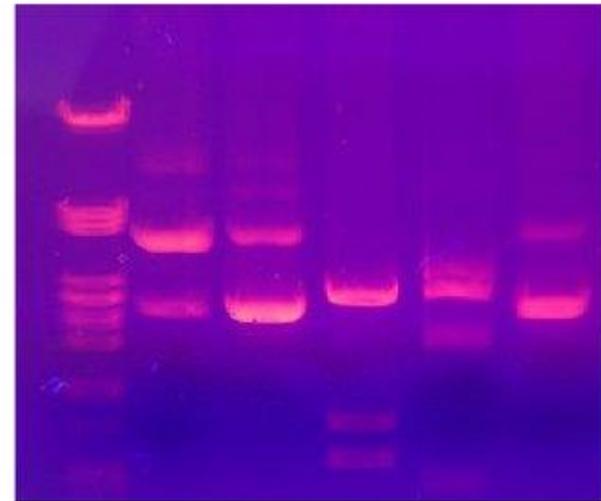
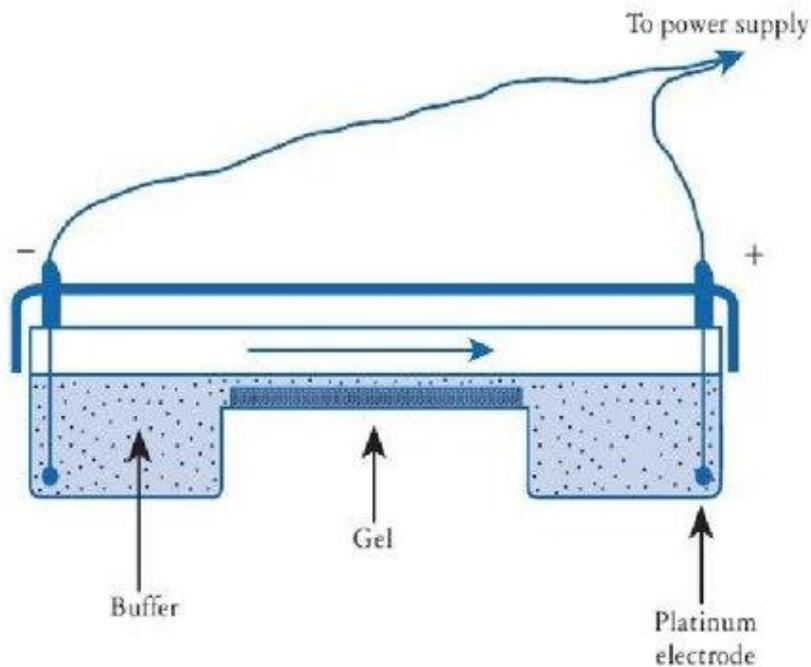
1. FLASH
2. Электрофорез в геле

Электрофорез в агарозном геле

Гель формируется за счет нековалентных связей. Имеет относительно низкую разрешающую способность. Раньше широко использовался в диагностических лабораториях. Сейчас, в основном, его используют для препаративного электрофореза.

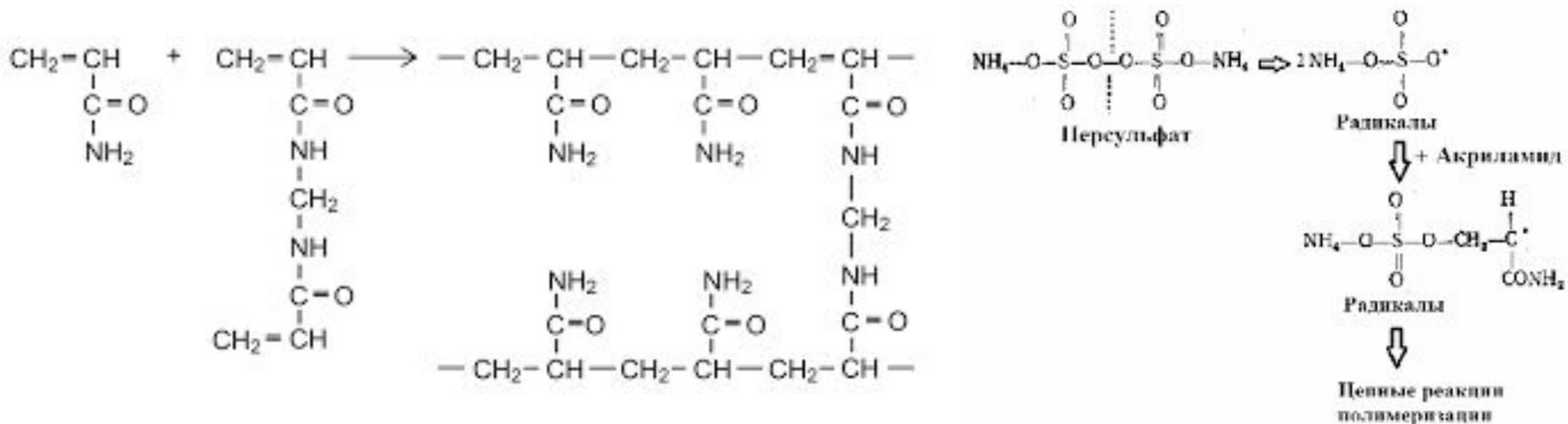
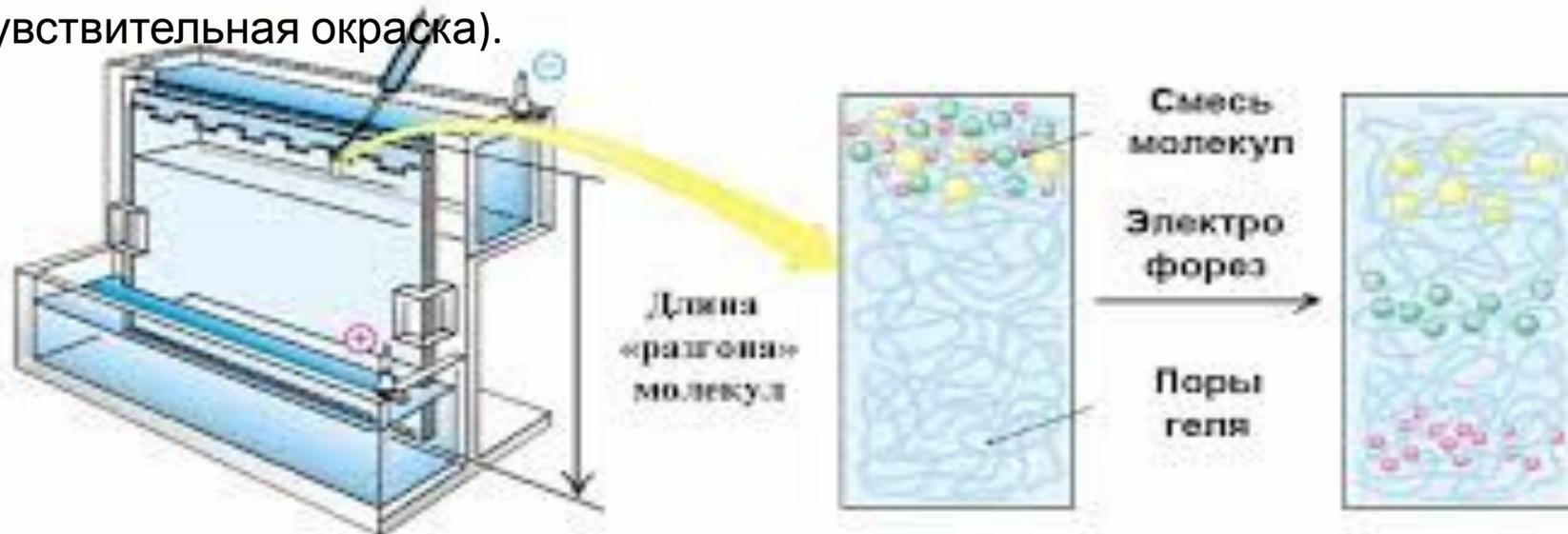


- **Электрофорез** – метод разделения макромолекул, различающихся по таким параметрам, как размеры (или молекулярная масса), пространственная конфигурация, вторичная структура и электрический заряд.



Электрофорез в полиакриламидном геле

Большая разрешающая способность. Часто используют в молекулярно-генетической диагностике. Красить лучше нитратом серебра (наиболее чувствительная окраска).



Гетеродуплексный анализ

Метод основан на том, что при ренатурации смеси нормальных и мутантных аллелей наряду с нормальным и мутантным гомодуплексами образуются гетеродуплексы между нормальной и мутантной цепочками ДНК с выпетливаниями между ними. Они отличаются по подвижности при электрофорезе от гомодуплексов. Применяются для:

1. Скрининга образцов на наличие делеций/инсерций

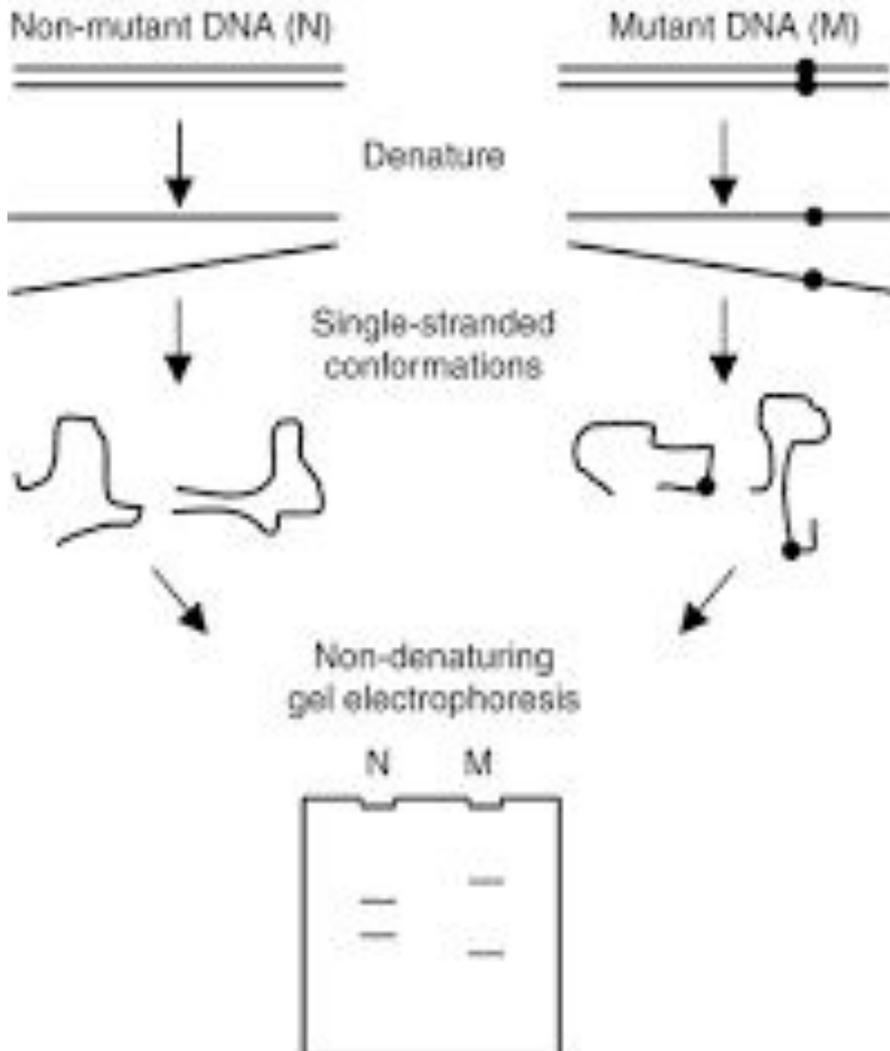


2. Генотипирования по известным аллелям



SSCP-анализ

SSCP



SSCP – Single Strand Conformation Polymorphism. Метод основан на разной подвижности при электрофорезе в ПААГ быстро ренатурированной одноцепочной ДНК референсного и мутантного аллелей. Применяется для скрининга наличия мутаций (полиморфизмов). Недостаток – нельзя определить новую мутацию без последующего секвенирования.

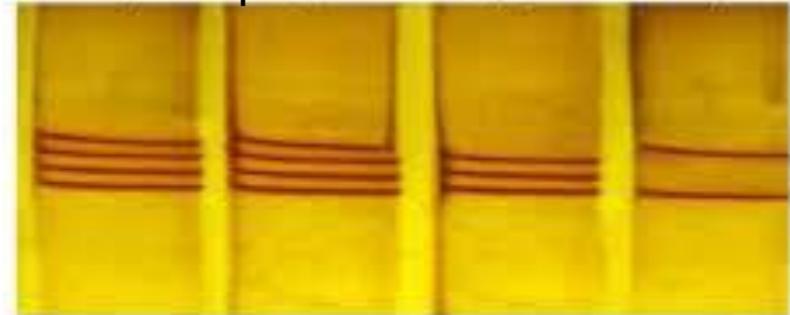


Figure 2 PCR-SSCP analysis of the *CYP2D6**10.

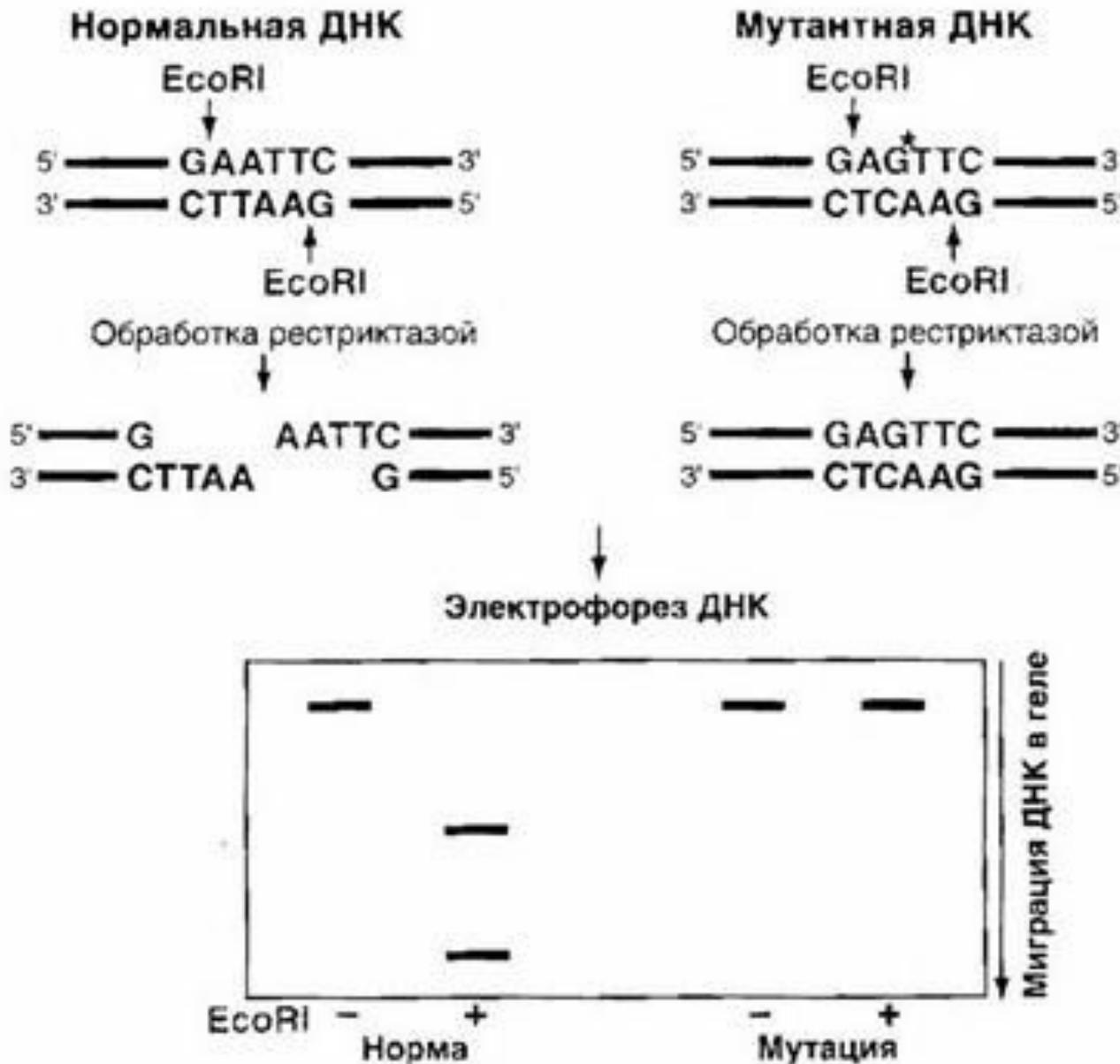
Notes: The two, three, and four bands in each lane represent the homozygous wild-type (C/C), homozygous (T/T), and heterozygous (C/T) alleles of the *CYP2D6**10, respectively; Lanes 1 and 2 represent the heterozygous C/T genotype (four fragments), lane 3 represents the homozygous T/T genotype (three fragments), while lane 4 represents the wild-type C/C genotype (two fragments).

Abbreviation: PCR-SSCP, polymerase chain reaction-single-strand conformation polymorphism.

Мультиплексная ПЦР

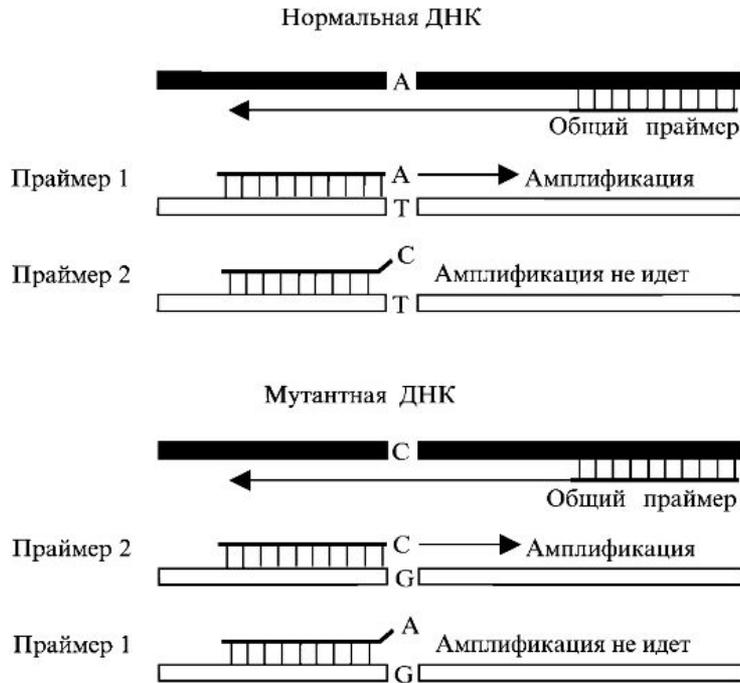
1. При увеличении количества локусов в мультиплексной ПЦР, практически, экспоненциально растут затраты времени на отработку условий.
2. Необходимо подбирать праймеры с, примерно, одинаковой температурой отжига. Желательно также проверять праймеры на образование дуплексов между разными парами.
3. При электрофоретической детекции обеспечить разницу между соседними по длине ПЦР-продуктами, хотя бы в несколько десятков п.н. Если используют меченые праймеры с разными флуорофорами и затем продукты мультиплексной ПЦР детектируют на секвенаторе в режиме фрагментного анализа, то можно располагать их ближе по длине, они даже могут перекрываться, но в этом случае возникают ограничения по сбалансированности высоты пиков и др.

ПЦР-ПДРФ

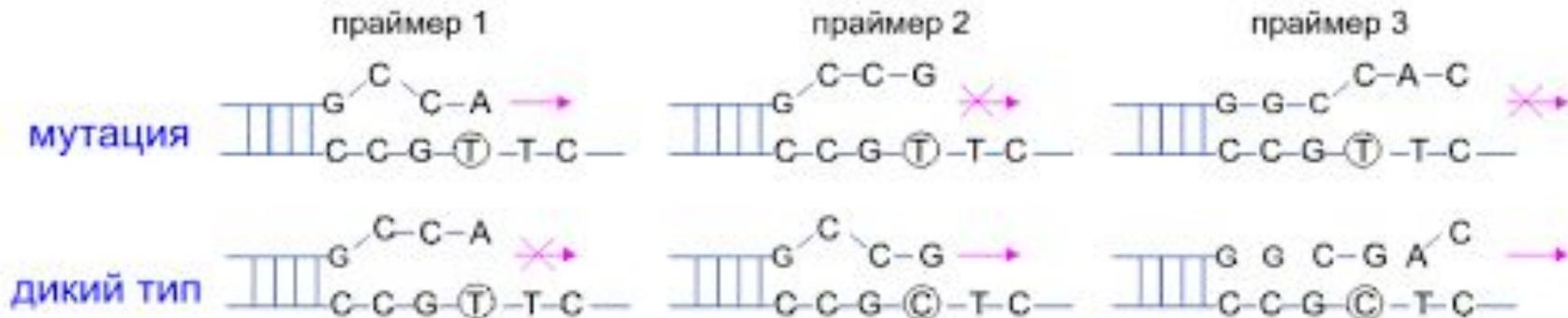


ПДРФ – полиморфизм длин рестрикционных фрагментов. ПЦР-продукт обрабатывают рестриктазой, которая гидролизует только один из аллелей (мутантный или нормальный). Затем продукты рестрикции подвергают электрофорезу.

Аллель-специфичная ПЦР

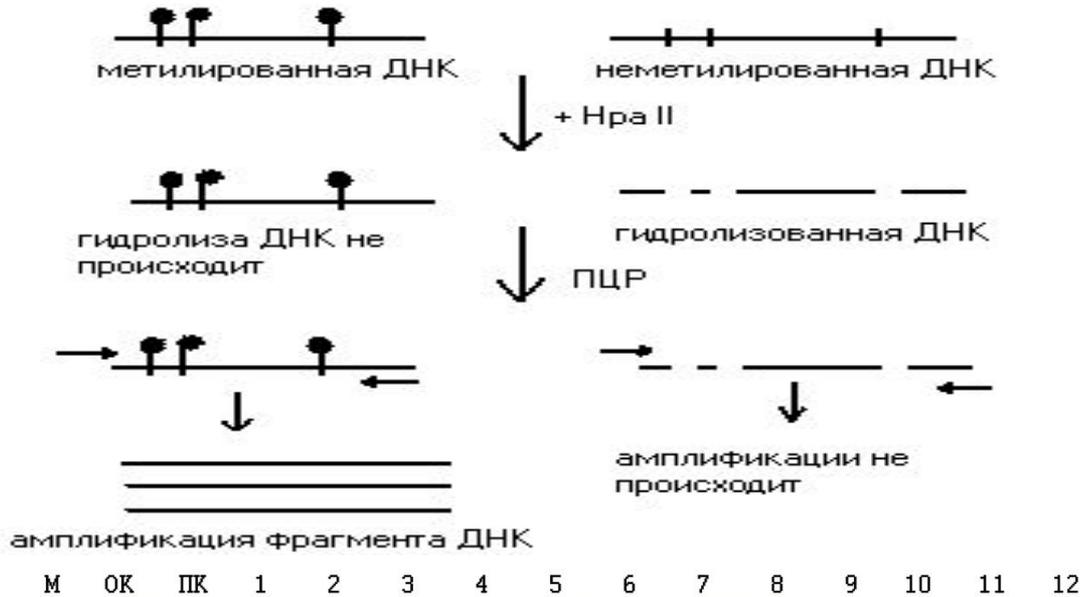


Основная проблема АС-ПЦР – это неспецифический синтез с частично комплементарного праймера. Решения: вводить неспаренные основания недалеко от 3'-конца праймера, использовать LNA, блокирующие олиги на другой аллель, долго отрабатывать условия.



Метилчувствительная ПЦР

Схема эксперимента

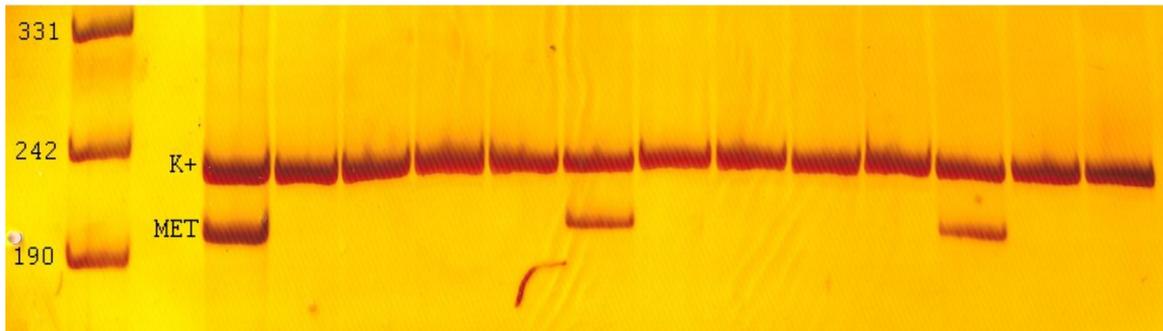


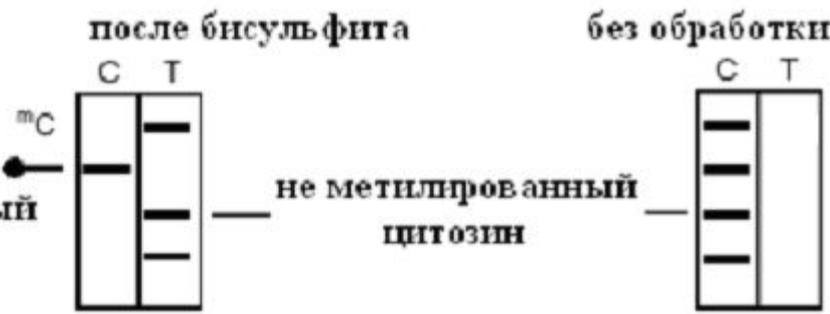
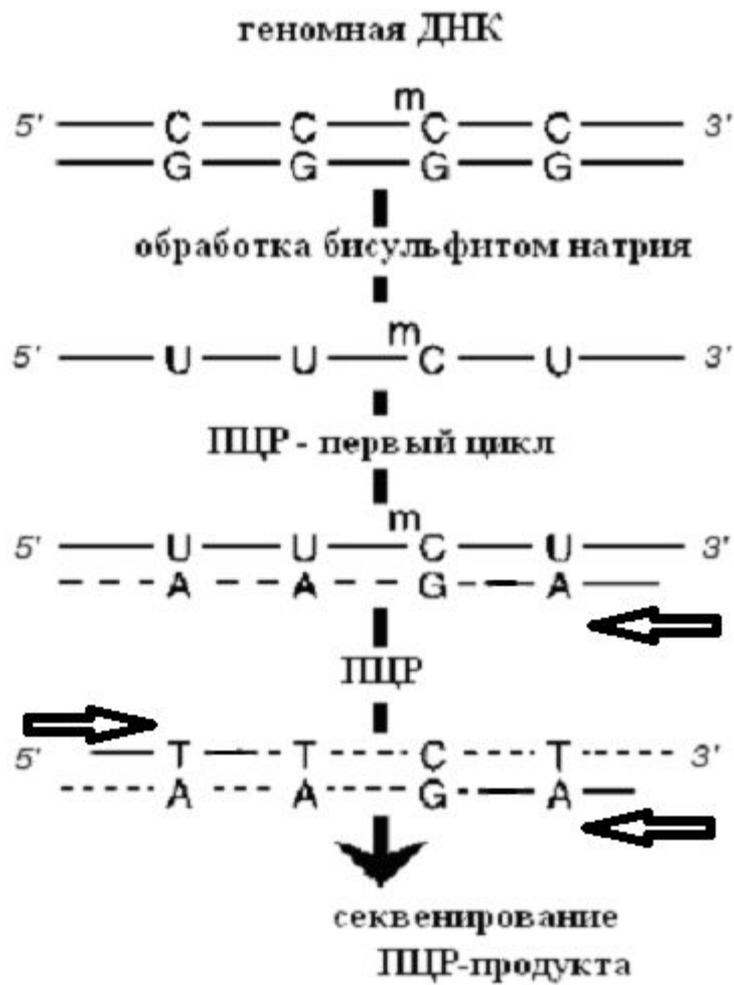
Преимущества:

1. Дешевизна и доступность реактивов и расходных материалов
2. Высокая чувствительность

Недостатки:

1. Можно анализировать только те CpG-динуклеотиды, которые попадают в сайты узнавания известных рестриктаз
2. Ложноположительные результаты из-за неполного гидролиза матрицы рестриктазой





Преимущества:

Возможность анализировать CpG независимо от локализации

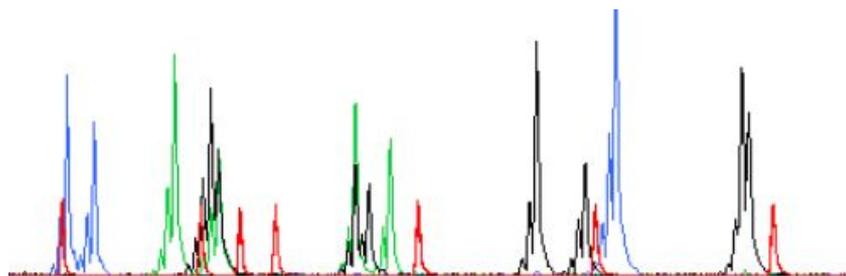
1. Стандартизированная методика
2. ПЦР-продукт можно секвенировать и определить статус метилирования всех нуклеотидов на исследуемом участке

Недостатки:

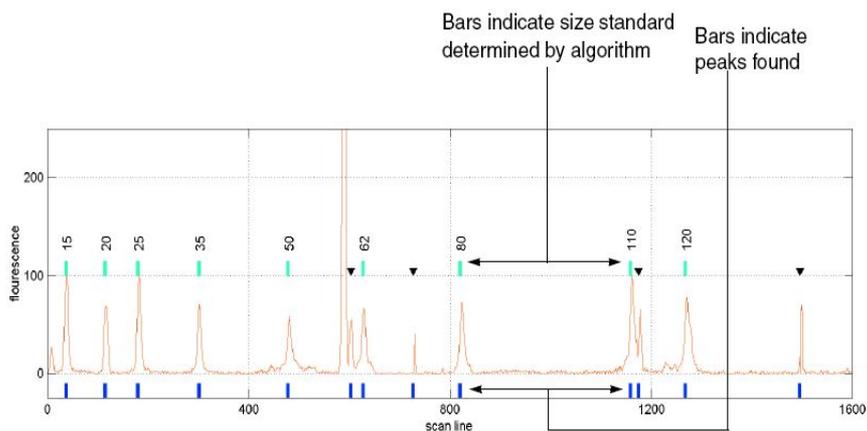
В случае бисульфитной обработки home made – потери ДНК из-за деградации, неполная конверсия C→T

1. Если анализировать 1-2 CpG на конце праймера – проблемы аллель-специфической ПЦР
2. Нужны silica spin колонки для очистки, если еще и импортные наборы использовать – дорогой

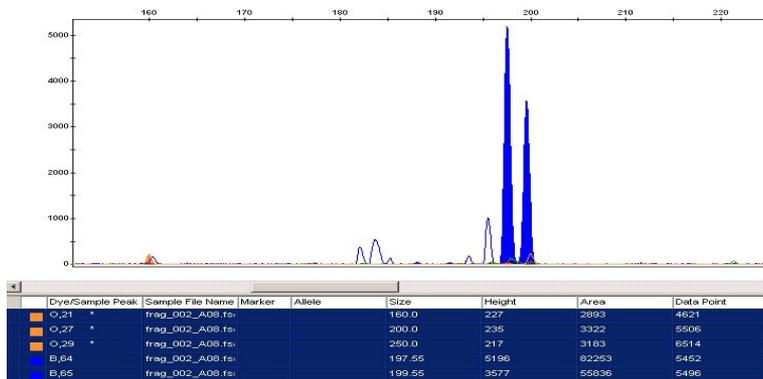
Фрагментный анализ STR-маркеров на капиллярном секвенаторе



1. Сбор исходных данных о флуоресценции в режиме реального времени

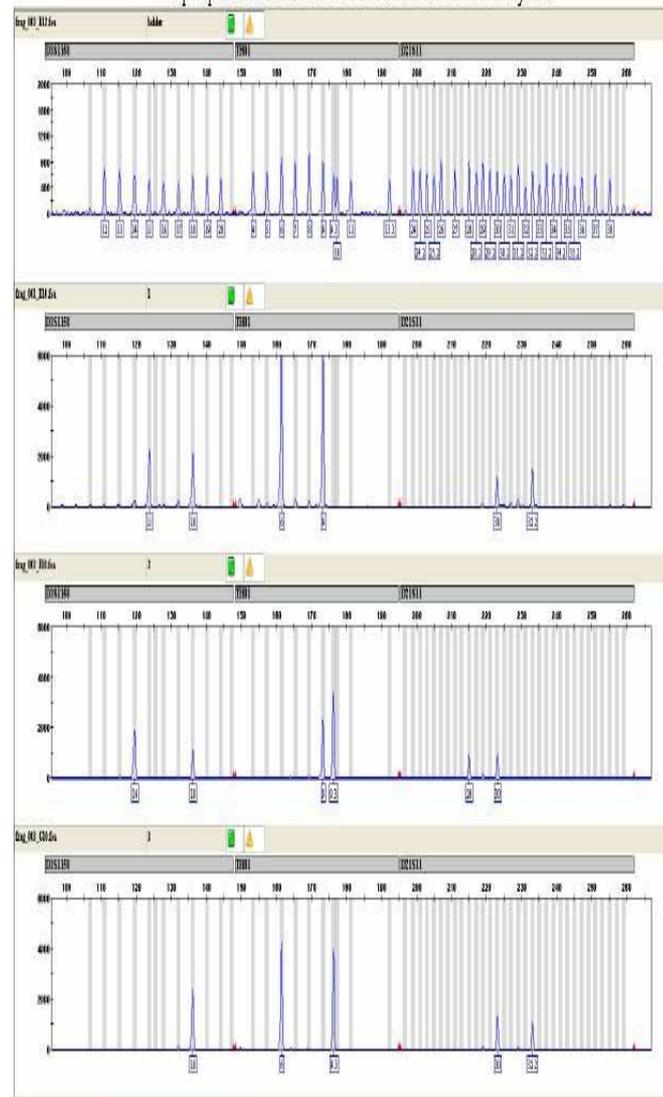


2. Анализ флуоресцентных пиков маркера молекулярной массы



3. Определение длины других флуоресцентно-меченых фрагментов относительно маркера

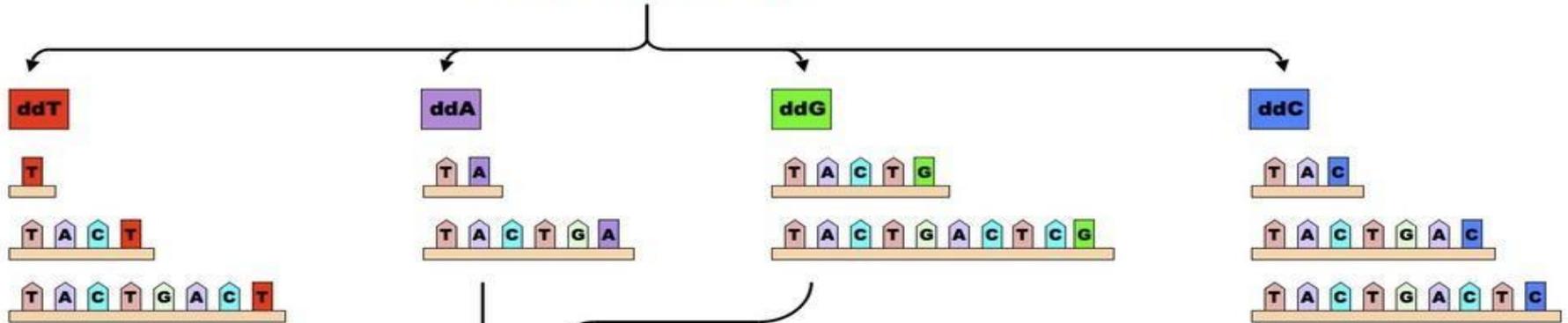
Рис. 3. Представление результатов типирования исследуемых лиц аппаратно-программным комплексом 3130 Genetic Analyzer.



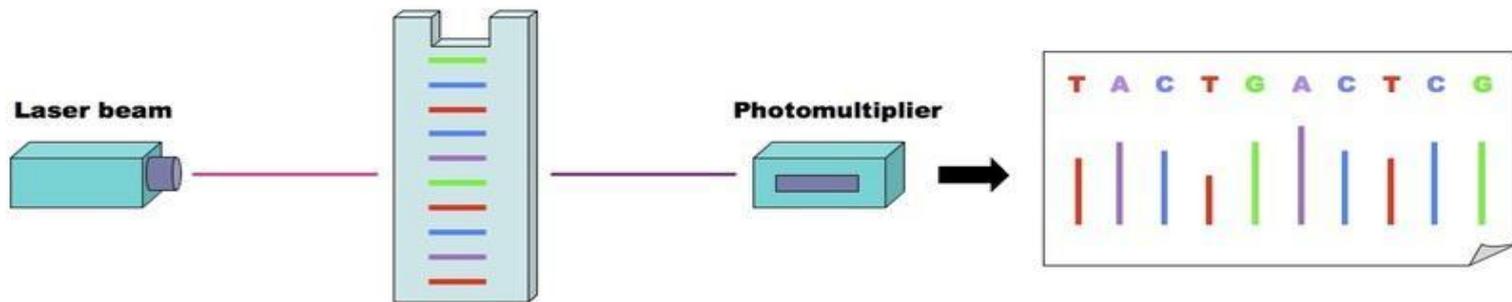
Секвенирование ПЦР-продуктов по Сэнгеру

PCR in presence of fluorescent, chain-terminating nucleotides

A T G A C T G A G C

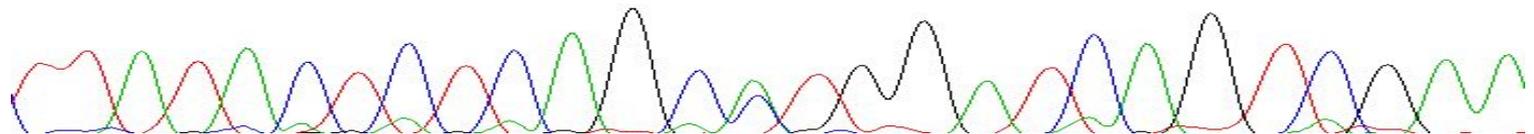


Fragments run through gel electrophoresis

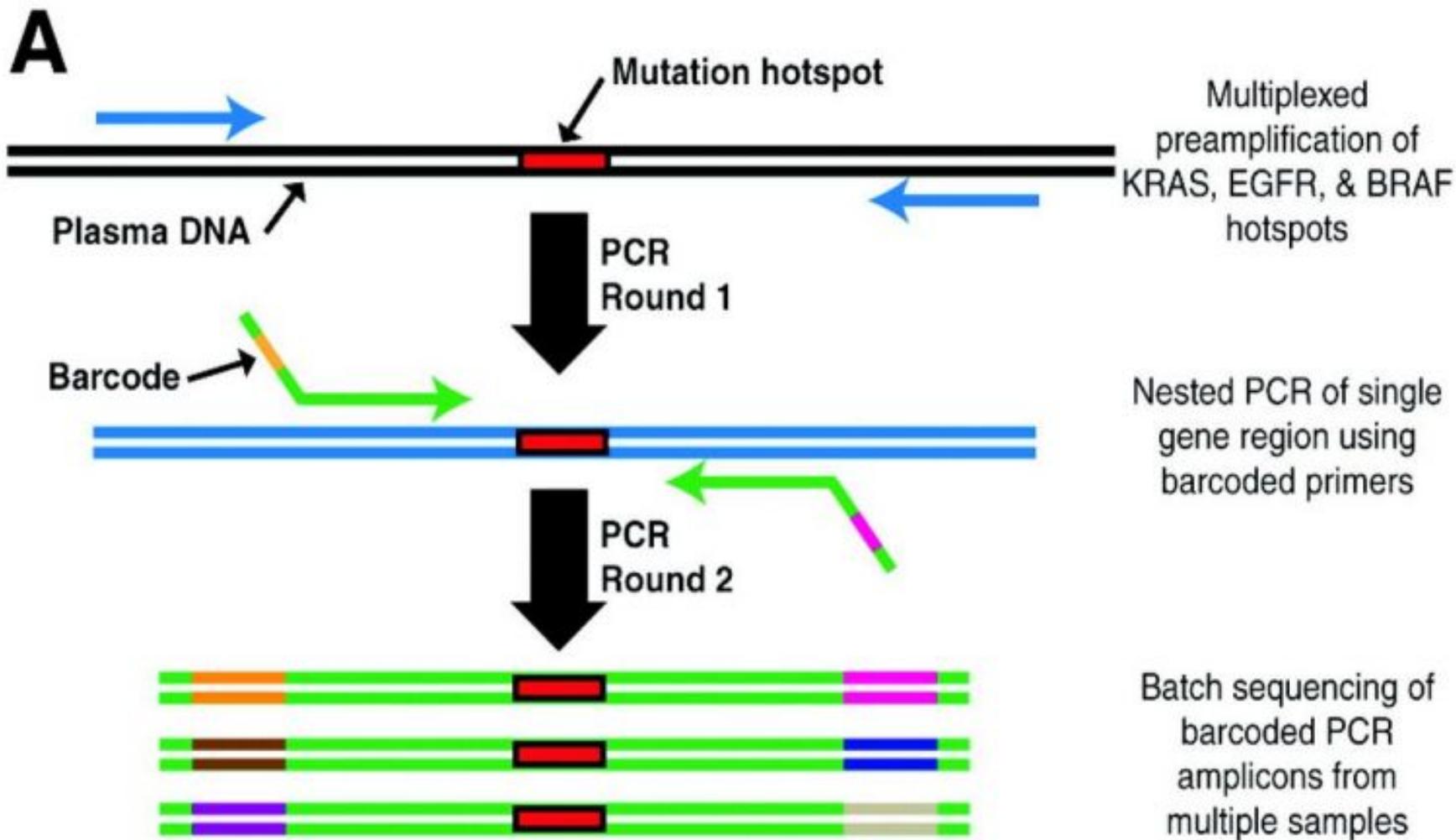


Fluorescent fragments detected by laser and represented on a chromatogram

A A T A T C A C A C T G C N A G G T A C T G A C G T T



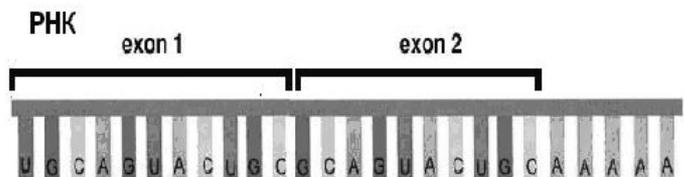
Гнездовая (nested) ПЦР



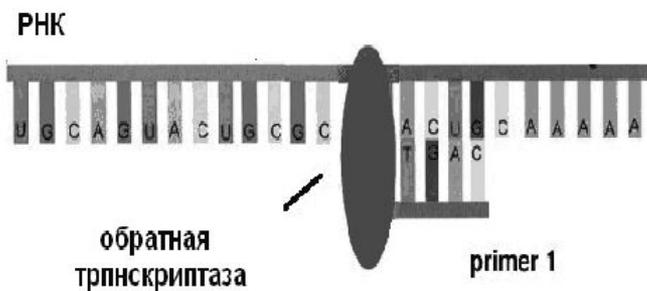
1.



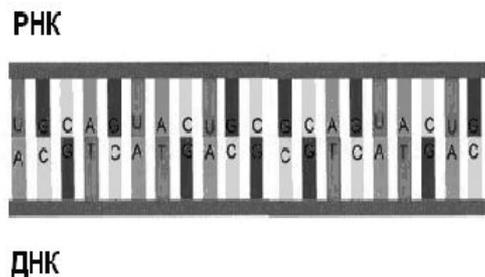
2.



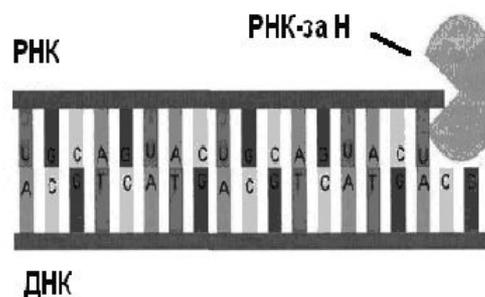
3.



4.



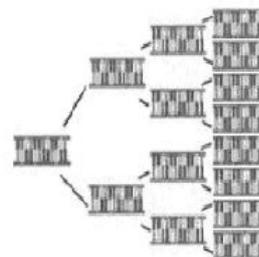
5.



6.



7. ПЦР



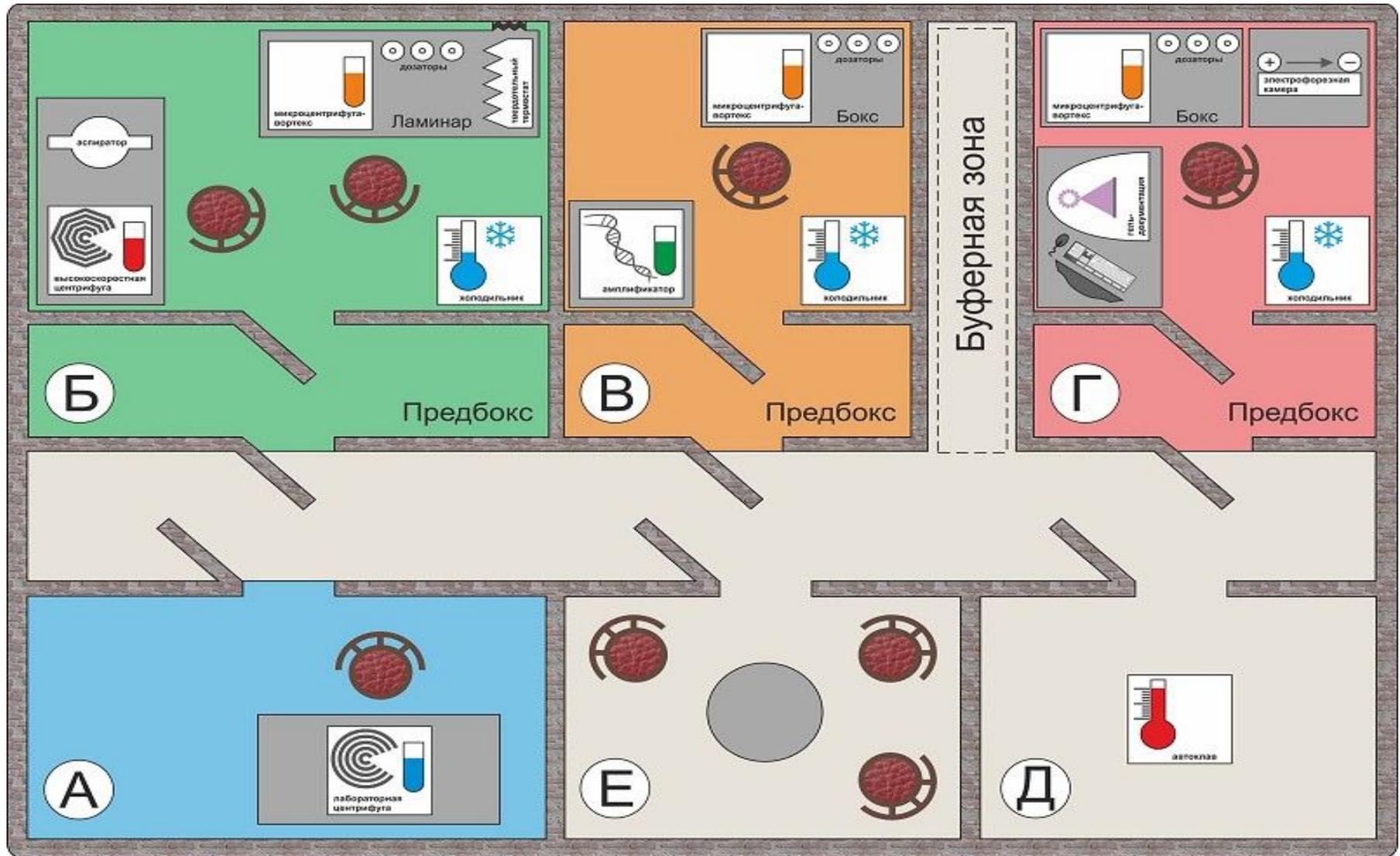
1 - двухцепочечная ДНК, с экзонами и интронами. Праймер 1 (прямой) расположен в 1 экзоне, праймер 2 (обратный) расположен во втором экзоне. ПЦР между ними не пройдет из-за большого расстояния между праймерами;
2 – одноцепочечная молекула РНК с вырезанными интронами;
3 – с помощью праймера 1 и обратной транскриптазы достраивается гомологичная цепь ДНК;
4 – гибридная цепь РНК-ДНК;
5 – фермент РНК-за расщепляет цепь РНК, с образованием ДНК-матрицы для ПЦР;
6,7 – добавляется праймер 2 и праймер 1 для осуществления реакции ПЦР.

Hot-Start ПЦР

- ▶ Добавление полимеразы после предварительного прогрева
- ▶ Или: активация инактивированной белками полимеразы предварительным длительным прогревом (10-15 минут)
- ▶ Или: использование плавких разделителей между полимеразой и матрицей

- ▶ Позволяет избежать удлинения неспецифически севших праймеров, повышает специфичность реакции

Требования к организации работы ПЦР-лабораторий



Если есть реал-тайм ПЦР, то зона Г не нужна. Д – можно рассматривать как склад.

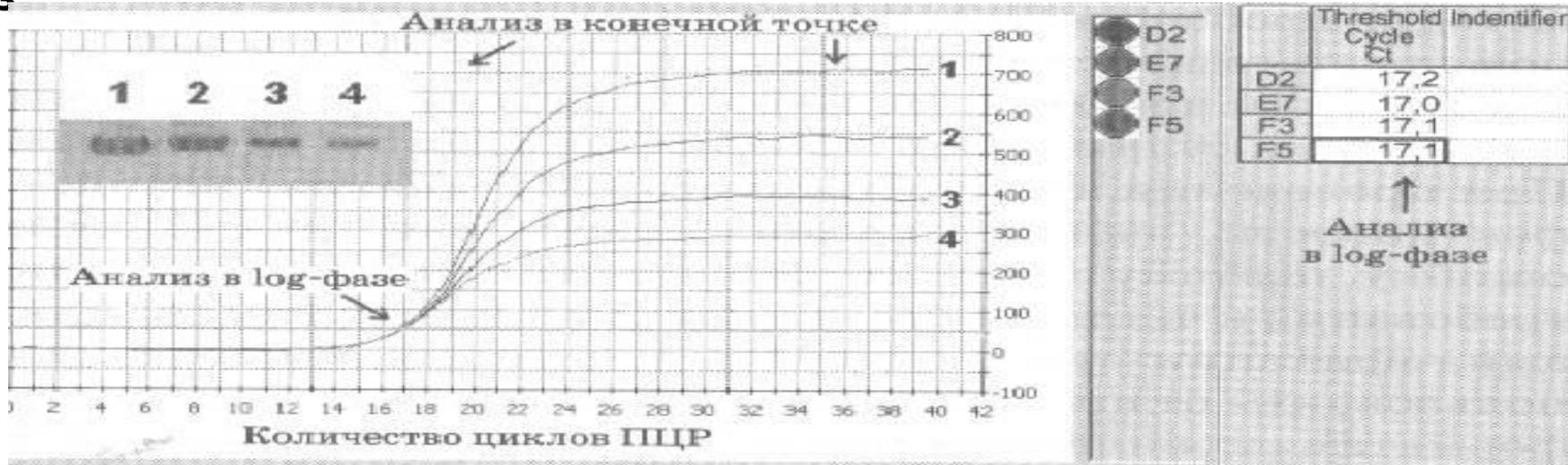
ПЦР – это качественный или количественный анализ?

Если оценивать по конечной точке - качественный

$N_n = N_0 2^n$, где: n – номер цикла реакции, N_0 – количество целевых молекул в начале реакции, N_n – количество продуктов реакции на цикле n и 2 – эффективность ПЦР.

Эффективность ПЦР, как правило, не бывает строго равна 2 и меняется на протяжении ПЦР, особенно в конце реакции, когда возникает конкуренция между процессами отжига праймеров и реассоциации ампликонов, или заканчивается один из компонентов ПЦР. С учетом эффективности как переменной величины, количество нарабатываемой ДНК будет равно: $N_n = N_0 E^n$, где E – эффективность ПЦР.

E – это число, показывающее, во сколько раз за один цикл реакции изменится количество фрагментов ДНК. Даже небольшие изменения E ведут к существенным различиям в получаемых в ходе эксперимента результатах ПЦР. Так, отличие E на 0.15 к 30 -му циклу ПЦР дает разницу в количестве продукта в 10 раз



ПЦР – это качественный или количественный анализ? (продолжение)

Если измерять концентрации продуктов в log-фазе -
количественный

$N_n = N_0 E^n$, тогда:

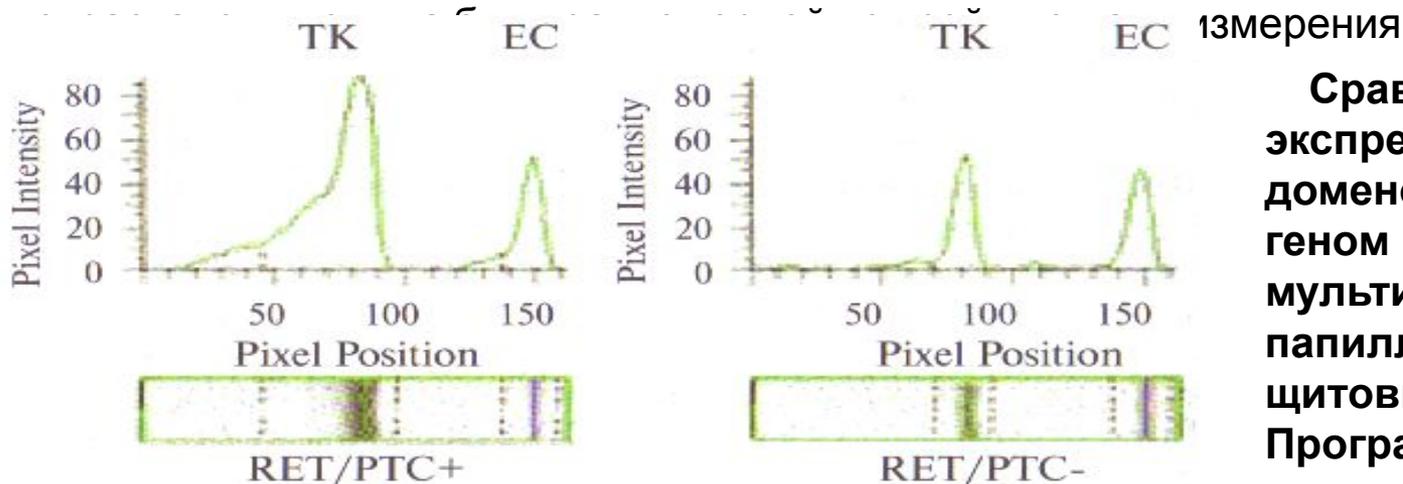
$N1_n / N2_n = (N1_0 / N2_0) (E1 / E2)^n$ - отношение количества ПЦР-продуктов при одновременной амплификации 2 локусов. Если n относится к экспоненциальной фазе, то: $E1 = E2 \approx 2$, следовательно:

$$N1_n / N2_n = N1_0 / N2_0$$

При денситометрии в геле $N1 = a1S1$, $N2 = a2S2$, где $a1$ и $a2$ – коэффициенты пропорциональности. Если a одинаковы по анализируемой площади геля и для всех нанесенных образцов, то: $N1_n / N2_n = S1 / S2 = N1_0 / N2_0$

Трудности:

- надо точно знать, на каком цикле остановить реакцию (ПЦР-продукта уже достаточно для определения в геле, но еще идет экспоненциальная фаза)
- в лунки геля должно быть нанесено оптимальное количество ПЦР-продукта



Сравнительный анализ экспрессии EC- и ТК- доменов, кодируемых геном *RET*, с помощью мультиплексной ПЦР при папиллярной карциноме щитовидной железы. Программа TotalLab v.1.10.

Количественный анализ – ПЦР в реальном времени



Сигнал от флуоресцентной метки, пропорциональный количеству ПЦР-продукта, считывают на каждом цикле амплификации

Детектирующие амплификаторы

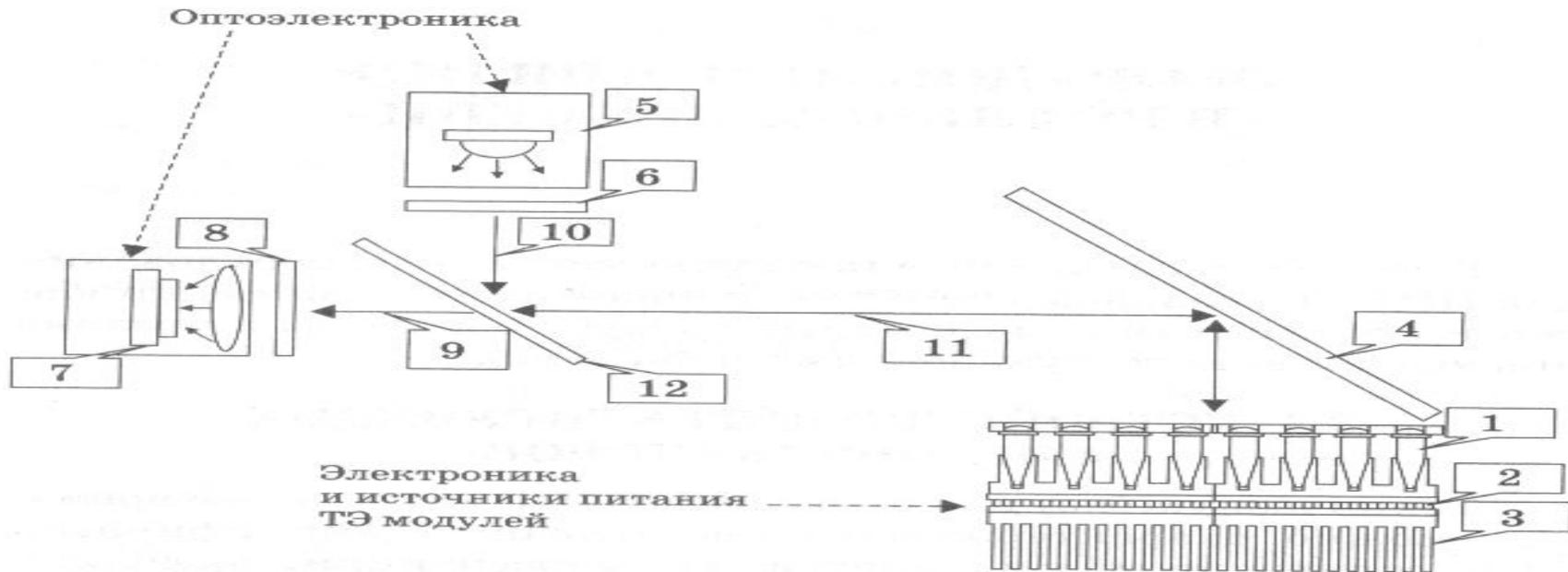


Схема организации детектирующего амплификатора

1 — пробирки; 2 — термоэлектрические (ТЭ) модули (элементы Пельтье);
3 — радиатор; 4 — зеркало; 5 — источник света возбуждения флуоресценции;
6 — светофильтр источника возбуждения; 7 — детектор излучения флуоресценции;
8 — светофильтр детектора; 9 — излученный световой поток; 10 — световой поток возбуждения; 11 — суммарный световой поток; 12 — спектроделитель

1. **ДТ-96 (ДНК-технология, Россия): 4 канала, 96-луночная плашка**
2. Rotorgene 6000 (Corbett Research, Австралия): нельзя использовать плашки
3. MX-3005 (Stratagene, США): 96-луночная плашка, но разные моменты измерения относительно температурного цикла
4. **iCycler iQ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, США): 96-луночная плашка, есть градиент, 5 каналов (возможен широкий выбор красителей)**
5. **StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, США): 96-луночная плашка, 4 канала.**

ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ)

Детектирующий амплификатор определяет количество ПЦР-продукта на каждом цикле, но не молекулы ДНК непосредственно, а флуоресцентный сигнал, который пропорционален их концентрации в растворе: $F = \alpha N$, где: F – интенсивность флуоресценции, α – коэффициент пропорциональности, N – число молекул ДНК, тогда с учетом $N_n = N_0 E^n$ на цикле n : $F_n = \alpha N_0 E^n$

Для сравнения графиков при ПЦР-РВ используют пороговый метод (определение порогового цикла реакции C_t , threshold cycle, как точки пересечения графика накопления ДНК и пороговой линии) или метод прямого сравнения графиков (определение значения некоторой точки C_p , crossing point, на графике накопления ДНК по форме кривой, например – метод максимума второй производной).

Пороговый метод сравнения графиков накопления ДНК

Суть порогового метода заключается в том, чтобы определить момент C_t , выраженный в циклах ПЦР-РВ, когда количество ДНК в реакционной пробирке (а следовательно, и флуоресцентный сигнал) достигает одинаковой для всех образцов пороговой величины N_t (задается пользователем или программным обеспечением).

Сравнивая полученные значения C_t , можно судить о начальных концентрациях ДНК в исследуемых образцах. Чем меньше C_t , тем больше было в образце целевой ДНК в начальный момент времени.

$$N_{tr} = N_{or} E^{(C_{tr})}$$

$$N_t = N_0 E^{(C_t)}$$

$$N_{tr} = N_t$$

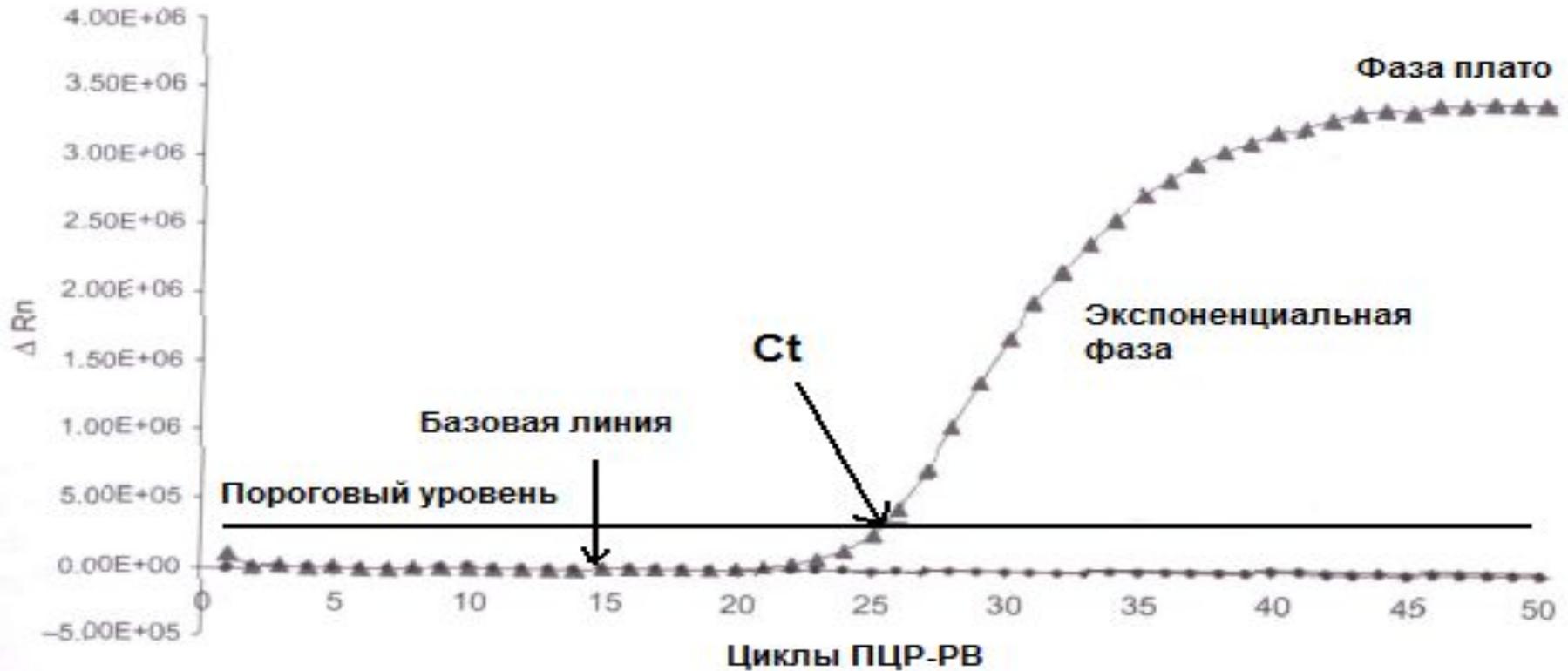
$$N_0 = N_t / E^{(C_t)} = (N_{or} E^{(C_{tr})}) / E^{(C_t)} = N_{or} E^{(C_{tr} - C_t)}$$

$$N_0 = N_{or} E^{(C_{tr} - C_t)}$$

Зная пороговый цикл C_{tr} для образца со стандартной начальной концентрацией N_{or} , можно вычислить начальную концентрацию неизвестных образцов:

$$N_0 = N_{or} E^{(C_{tr} - C_t)}$$

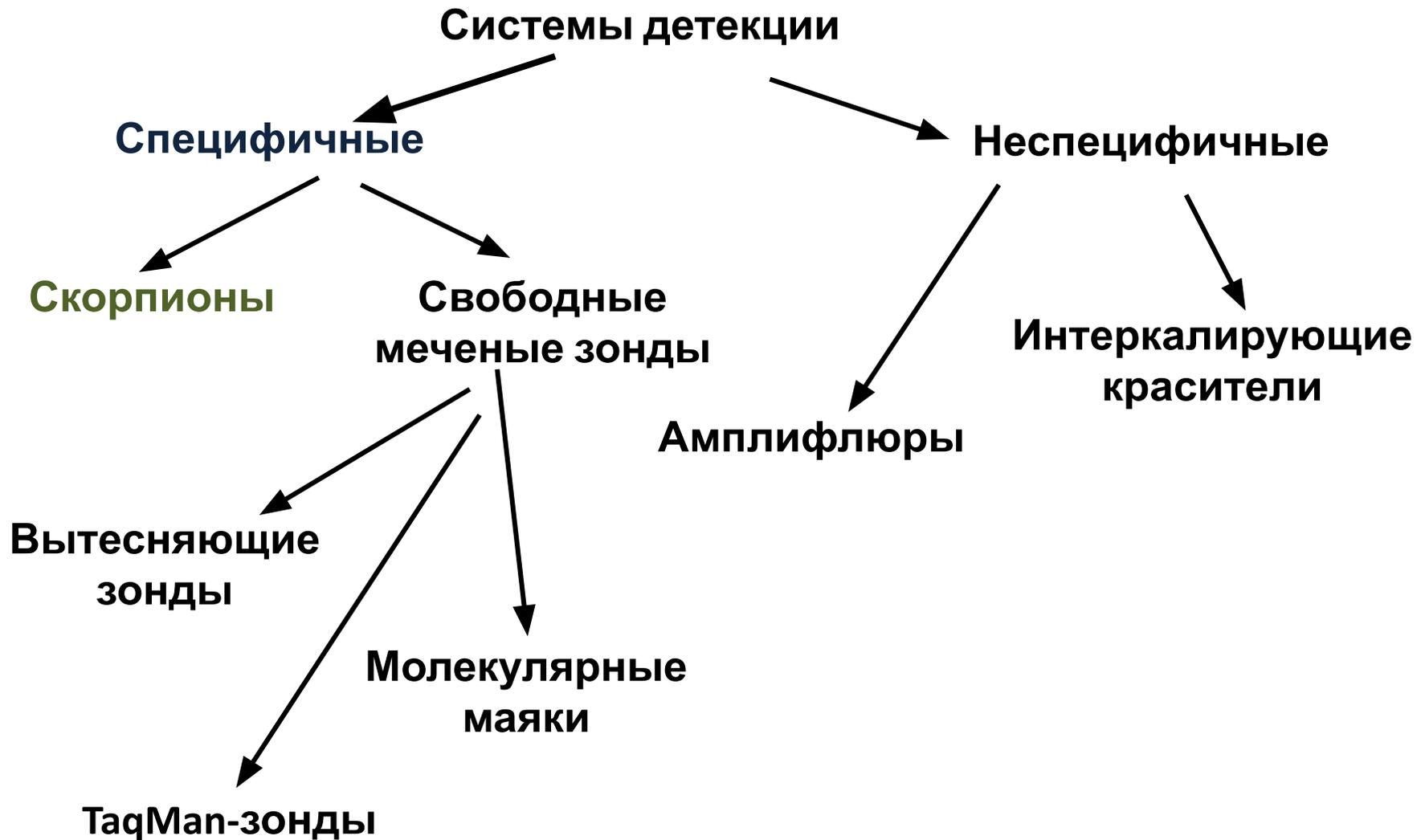
Пороговый метод сравнения графиков накопления ДНК

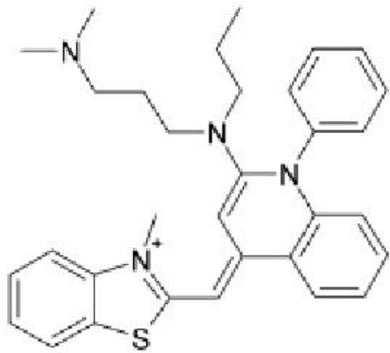


Сначала необходимо вычислить E и произвести нормировку α .

Для нормировки коэффициента α используются методы с предварительным преобразованием кривых и последующим определением C_t и методы сравнения кривых по характеристическим точкам. Например, компания "Applied Biosystems" с целью определения фона добавляет в реакционные смеси для ПЦР-РВ референсный свободный флуорофор ROX. Выравнивание графиков может быть также осуществлено приведением плато для всех кривых к одному значению при умножении кривых на различные нормировочные коэффициенты (при одинаковой E). Можно выравнивать графики по нескольким значениям флуоресценции, полученным при разных температурах реакционной смеси на каждом цикле реакции (ΔTF -нормировка).

Варианты ПЦР в реальном времени

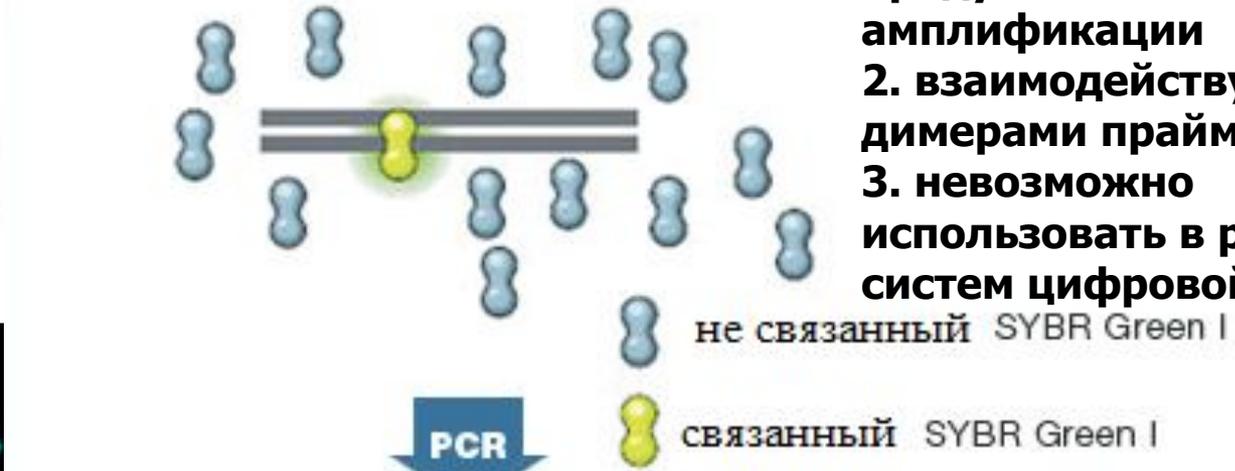




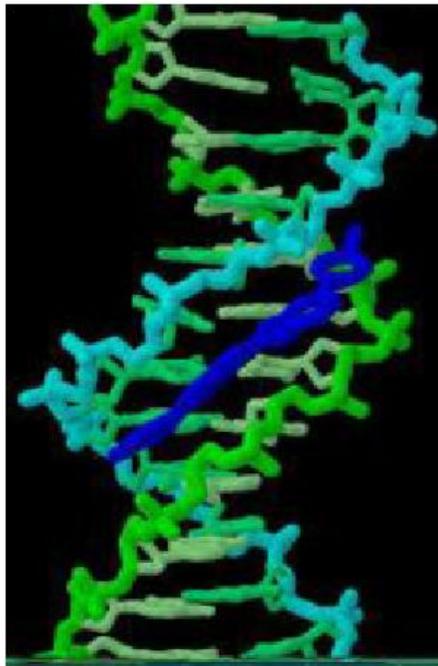
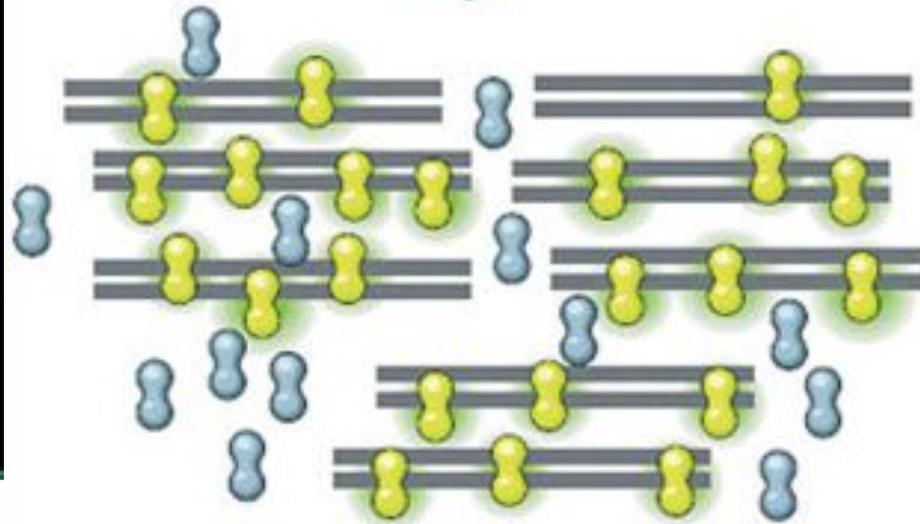
SYBR Green

Недостатки:

1. взаимодействует с неспецифическими продуктами амплификации
2. взаимодействует с димерами праймеров
3. невозможно использовать в ряде систем цифровой ПЦР



PCR



Амплифлюры

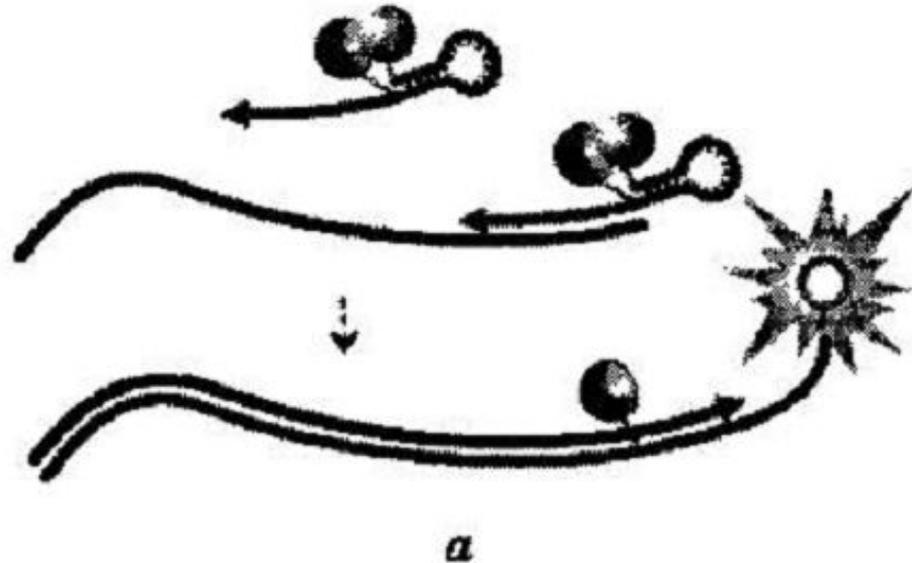


Схема работы праймеров «амплифлюр»

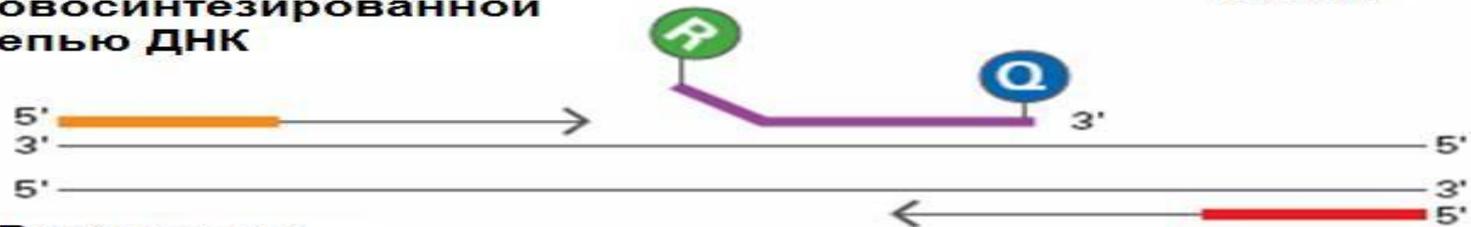
праймер содержит 5'-адаптер с инвертированным повтором, по краям которого расположены флуорофор и гаситель. При температуре элонгации инвертированный повтор образует шпильчатую структуру, в которой флуорофор и гаситель сближены. В ходе синтеза второй цепи ДНК шпильчатая структура «разворачивается» и интенсивность флуоресценции возрастает.

Зонды TaqMan

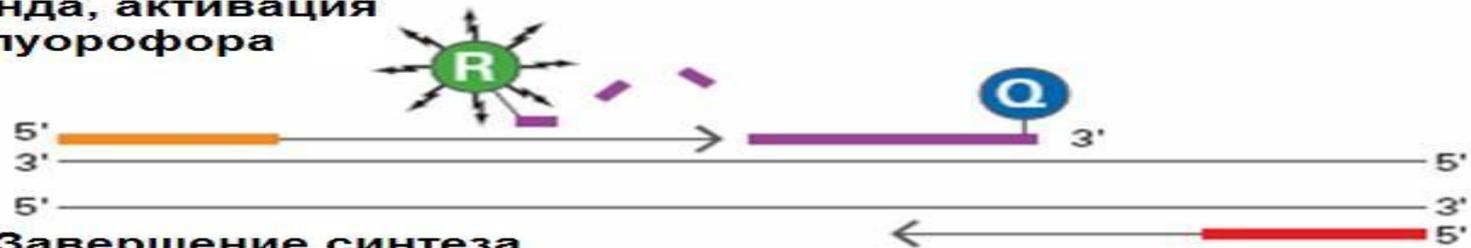
1. Полимеризация



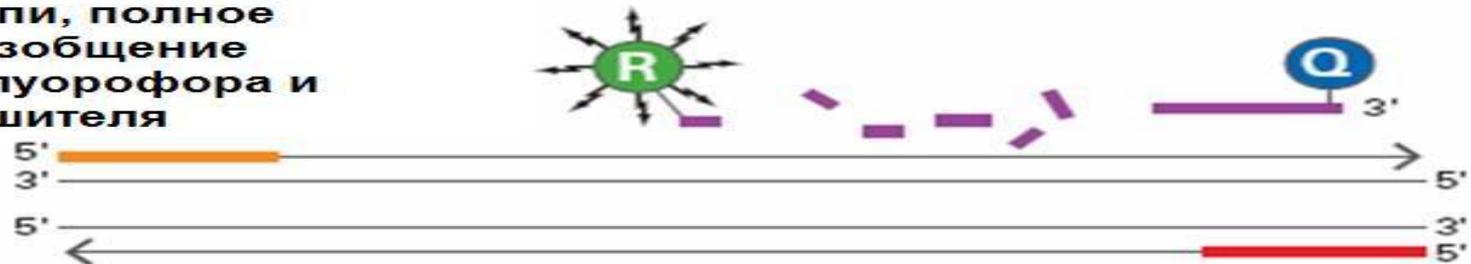
2. Замещение зонда новосинтезированной цепью ДНК



3. Разрушение зонда, активация флуорофора



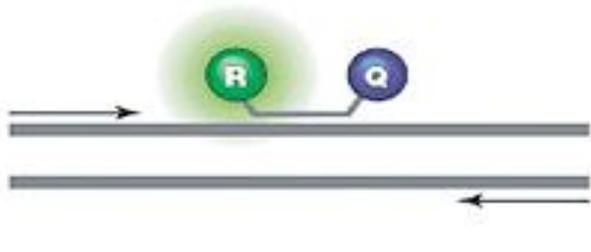
4. Завершение синтеза комплементарной цепи, полное разобщение флуорофора и тушителя



Специфические методы детекции. Молекулярные маяки



молекулярный маяк является шпилечной пробой с репортером и гасителем



Молекулярный маяк представляет собой меченый красителем олигонуклеотид (25-40 нуклеотидов), который образует шпилечную структуру со стеблем и петлей. 5'- и 3'-концы зонда имеют комплементарные последовательности из 5-6 нуклеотидов, которые образуют створочную структуру. Петлевая часть шпильки предназначена для специфической гибридизации с 15-30-нуклеотидным участком последовательности-мишени. Флуоресцентная репортерная молекула присоединена к 5'-концу молекулярного маяка, а гаситель прикреплен к 3'-концу. Шпилька приводит репортер и тушитель вместе, поэтому флуоресценции не возникает.

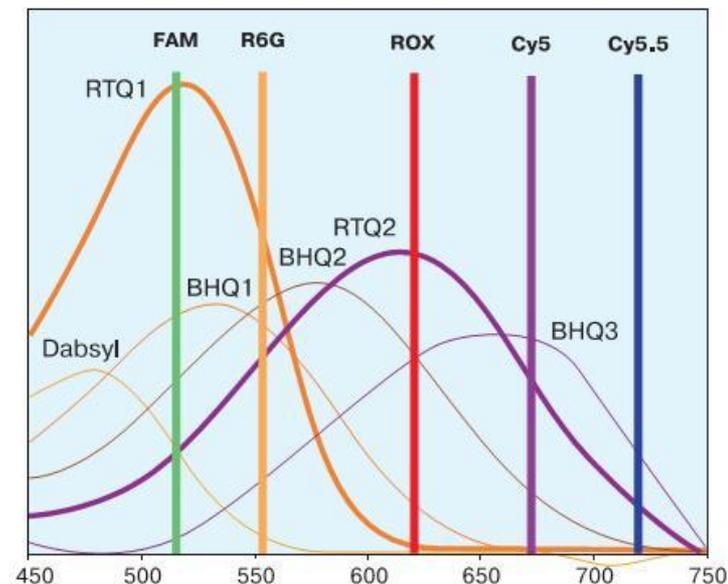
Преимущества: Они являются высокоспецифичными, могут использоваться для многолокусного использования, и если таргетная ДНК точно не соответствует последовательности маяка, гибридизация и флуоресценция не пройдет. Молекулярные маяки вытесняются, но не разрушаются во время амплификации, потому что используется ДНК-полимераза с 5'-экзонуклеазной активностью.

Основным недостатком использования молекулярных маяков является то, что их сложно спроектировать. Стебель шпильки должен быть достаточно прочным, чтобы молекула спонтанно не сворачивалась, что приводит к непреднамеренной флуоресценции. И наоборот, стебель шпильки не должен быть слишком сильным или маяк может неправильно гибридизоваться с мишенью.

Флуорофоры и гасители ПЦР-РВ

Флуоресцентный краситель	$\lambda_{\text{макс. поглощения, нм}}$	$\lambda_{\text{макс. флуоресценции, нм}}$
FAM	490	520
R6G	520	550
TAMRA	550	580
ROX	580	610
Cy5	645	670

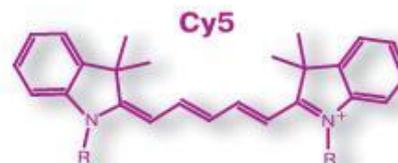
Гаситель флуоресценции	$\lambda_{\text{макс. поглощения, нм}}$	Диапазон гашения, нм
RTQ-1	520	470-570
BHQ-1	535	480-580
BHQ-2	575	550-650
RTQ-2	625	580-670
BHQ-3	670	620-730



Флуорофоры и гасители флуоресценции.

Как правило, корректное проведение ПЦР требует постановки нескольких реакций в одной пробирке одновременно. Для этого необходимо использовать зонды, меченные разными флуоресцентными красителями и соответствующими им гасителями флуоресценции.

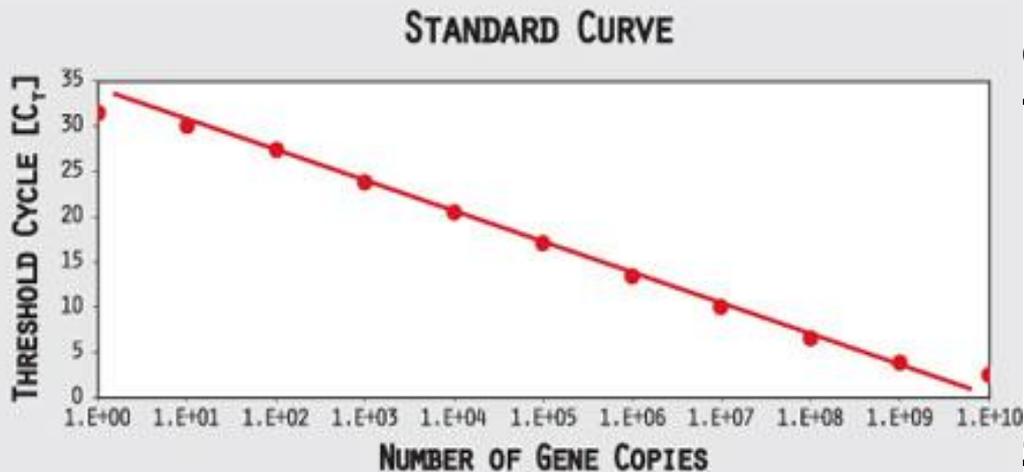
Для эффективного гашения флуоресценции спектр поглощения гасителя должен перекрывать спектр флуоресценции флуорофора. Возможен широкий выбор комбинаций флуорофоров и эффективных гасителей флуоресценции



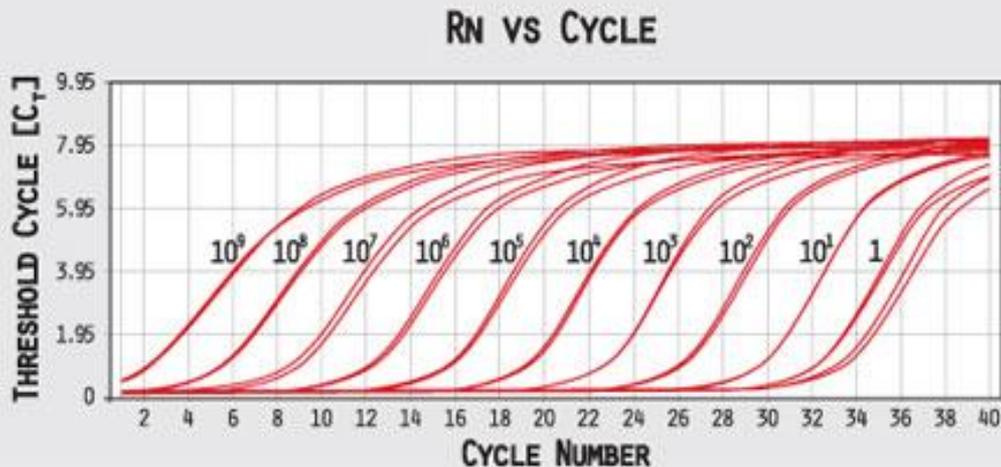
Определение эффективности ПЦР-РВ

Вычисление E по последовательным разведениям образца (измерение абсолютного количества ДНК на определенном цикле)

A



B



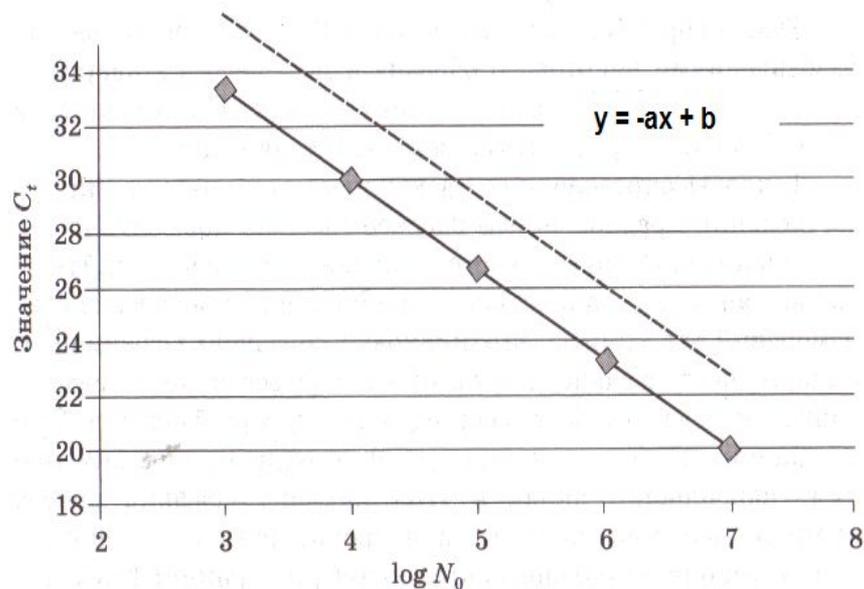
Традиционный метод определения эффективности требует калибровочной кривой. Серийно разбавляют искусственный шаблон известной концентрации. После реакции для каждого разведения определяют C_t , затем строят прямую в координатах $\log(N) ; C_t$. В общем уравнении прямой $y = -ax + b$ коэффициент $-a$ показывает, за сколько циклов происходит увеличение сигнала флуоресценции (количества ДНК) на порядок. Чтобы определить, во сколько раз изменится количество ДНК за один цикл (величина E), надо 10 возвести в степень $1/a$: $E = 10^{1/a}$

Определение эффективности ПЦР-РВ

Вычисление E по последовательным разведениям образца

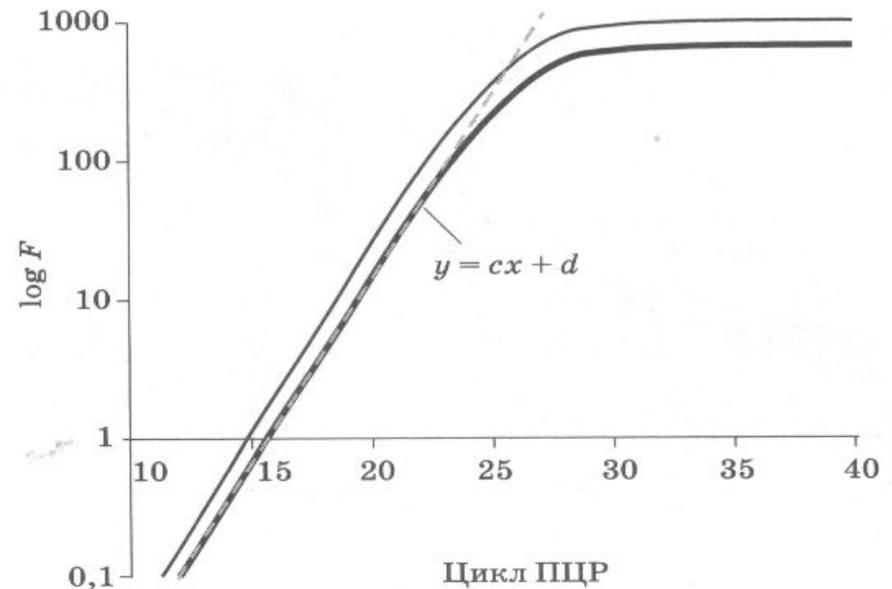
После реакции для каждого разведения определяют C_t , затем строят прямую в координатах $\log(N) ; C_t$. В общем уравнении прямой $y = -ax + b$ коэффициент $-a$ показывает, за сколько циклов происходит увеличение сигнала флуоресценции (количества ДНК) на порядок. Чтобы определить, во сколько раз изменится количество ДНК за один цикл (величина E), надо 10 возвести в степень $1/a$:

$$E = 10^{1/a}$$



Вычисление E по углу наклона прямого участка графика накопления ДНК

Подход заключается в определении угла наклона прямого участка графика накопления ДНК, изображенного в логарифмическом масштабе. В этом случае можно определить эффективность ПЦР без последовательных разведений по графику единственной реакции. Если описать рассматриваемый участок графика стандартным уравнением прямой $y = cx + d$, то $\log(E) = c$, тогда:

$$E = 10^c$$


Абсолютное и относительное определение количества исходной ДНК

Формула $N_0 = N_{or} E^{(C_{tr} - C_t)}$ необходима тогда, когда нужно вычислить количество исходной матричной ДНК в растворе (алгоритм «absolute quantification»), а если нужно сравнить исходные концентрации ДНК в разных образцах, то вычисляем величину $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (алгоритм «relative quantification»)

В таких экспериментах в одной пробирке одновременно амплифицируют участки кДНК исследуемого гена и референсного гена («гена домашнего хозяйства»). Расчеты строятся на следующих соображениях. Количество целевой ДНК (target, t) можно представить как:

$$N_n = N_0 \times (1 + E_t)^n, \text{ где:}$$

N_n – количество целевой ДНК на цикле n, N_0 – количество кДНК в начале реакции, E_t – эффективность амплификации кДНК исследуемого гена. Когда количество целевой ДНК достигнет порогового уровня в определенной точке $C_{t,t}$, уравнение примет вид:

$$N_{th} = N_0 \times (1 + E_t)^{C_{t,t}} = K_t, \text{ где:}$$

N_{th} – количество целевой ДНК при достижении порогового уровня (threshold, t), $C_{t,t}$ – точка пересечения графика накопления целевого ПЦР-продукта с пороговым уровнем, K_t – константа.

Аналогичное уравнение описывает накопление ПЦР-продукта при амплификации последовательности кДНК референсного гена (reference, r):

$$R_{th} = R_0 \times (1 + E_r)^{C_{t,r}} = K_r, \text{ где:}$$

R_{th} – количество референсной ДНК при достижении порогового уровня, $C_{t,r}$ – точка пересечения графика накопления ПЦР-продукта референсного гена с пороговым уровнем, K_r – константа.

В точке пересечения порогового уровня количества кДНК исследуемого гена и референсного гена будут относиться как:

$$N_{th} / R_{th} = (N_0 \times (1 + E_t)^{C_{t,t}}) / (R_0 \times (1 + E_r)^{C_{t,r}}) = K_t / K_r = K, \text{ где } K \text{ – константа.}$$

Абсолютное и относительное определение количества исходной ДНК (продолжение)

Предполагая, что условия ПЦР-РВ оптимизированы и эффективности реакции для целевой и референсной последовательностей практически равны, получаем:

$$E_t = E_r = E$$

$$(N_0 / R_0)(1 + E)^{C_{t,t} - C_{t,r}} = K \text{ или:}$$

$$N_{\text{norm}} (1 + E)^{\Delta C_t} = K, \text{ где:}$$

$N_{\text{norm}} = (N_0 / R_0)$ – количество кДНК исследуемого гена, нормализованное по референсному гену, $\Delta C_t = C_{t,t} - C_{t,r}$ – разность пороговых циклов при амплификации целевой и референсной ДНК. Произведя перестановку, получим:

$$N_{\text{norm}} = K(1 + E)^{-\Delta C_t}$$

В заключительном шаге разделим нормализованное количество ДНК исследуемого гена в опухоли на аналогичное значение в норме:

$$N_{\text{norm(опухоль)}} / N_{\text{norm(норма)}} = (K(1 + E)^{-\Delta C_t(\text{опухоль})}) / (K(1 + E)^{-\Delta C_t(\text{норма})}) = (1 + E)^{-\Delta \Delta C_t}, \text{ где:}$$

$$\Delta \Delta C_t = \Delta C_t(\text{опухоль}) - \Delta C_t(\text{норма})$$

Для оптимизированной ПЦР-РВ и профессионального дизайна праймеров и зондов можно принять, что величина E близка к единице, тогда разность количества кДНК исследуемого гена в опухоли и норме, нормализованная по референсному гену, будет равна $2^{-\Delta \Delta C_t}$. Полученная величина показывает, во сколько раз экспрессия исследуемого гена в опухоли изменена относительно нормы.

И тем не менее, сам по себе этот алгоритм не позволяет исключить ошибки из-за:

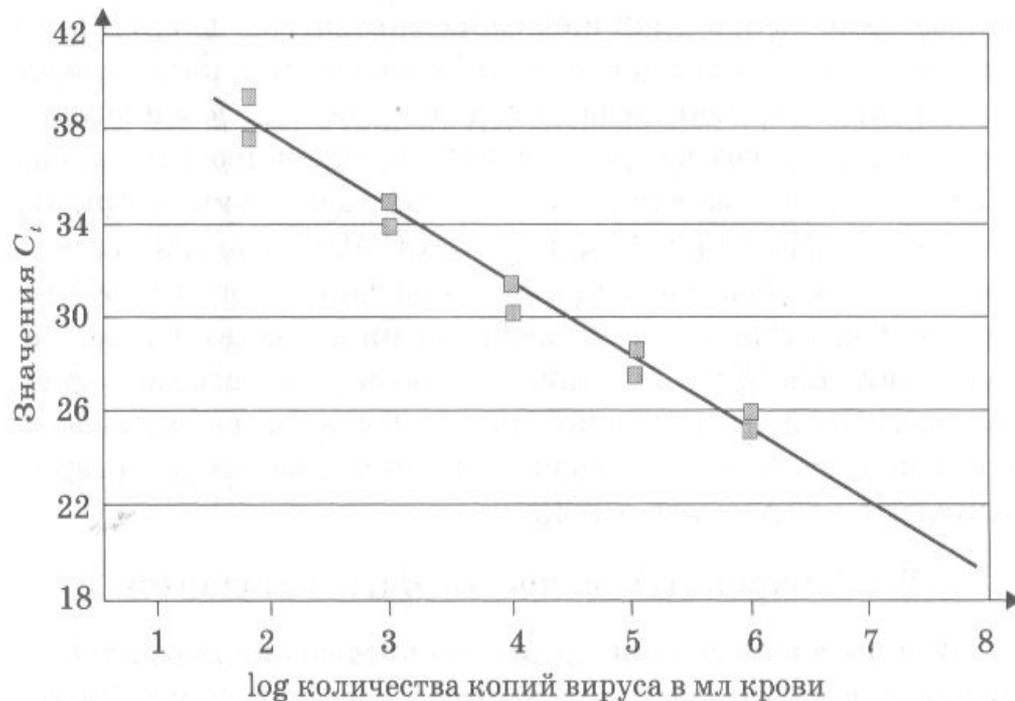
- различия в экспрессии референсного гена между «образцом» и «калибратором»
- неодинаковой эффективности обратной транскрипции для мРНК исследуемого и референсного генов

Количественное определение вирусной нагрузки

Этапы эксперимента:

1. Пробоподготовка (выделение вирусной РНК из плазмы крови)
2. Обратная транскрипция (получение кДНК)
3. ПЦР-РВ (как правило, абсолютное определение копий вирусной кДНК)

Разработаны международные стандартные панели для HBV, HCV, HIV-1, которые содержат серию разведений образцов с заранее известной концентрацией молекул-мишеней.



Варианты количественных стандартов:

- плазида с клонированным ПЦР-продуктом (концентрацию матрицы для ПЦР определяют на спектрофотометре)
- вирусная культура (концентрация матрицы для ПЦР определяется с помощью электронного микроскопа)
- **РНК-стандарты с использованием фага MS2 E.coli (вместо гена репликазы помещают РНК-копию амплифицируемого участка) – наиболее перспективные стандарты**
- еще нужны контроли: отрицательный, ОТ-, внутренний.

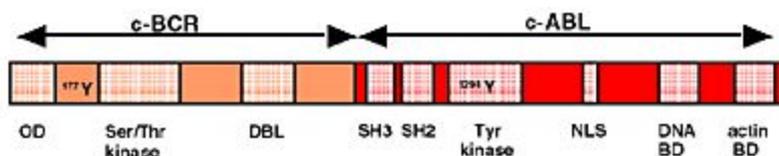
Зачем это нужно:

- оценка эффективности противовирусной терапии
- определение начала прогрессии заболевания

ДНК-диагностика онкогематологических заболеваний

Полная ремиссия: отсутствие клинических симптомов болезни (клиническая ремиссия) и присутствие в миелограмме менее 5% морфологически идентифицируемых бластных клеток (гематологическая ремиссия). При минимальной резидуальной болезни (МРБ) введены в практику понятия о цитогенетической (нет бластных клеток в поле зрения) и молекулярной ремиссии (отрицательный результат ПЦР-РВ).

Хронический миелолейкоз $t(9;22)(q34;q11)$

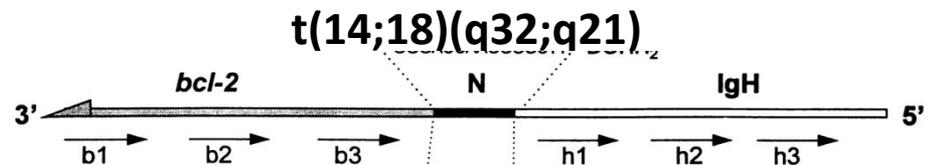


Этапы анализа:

1. Биопсия костного мозга
2. С помощью проточной флуоресцентной цитометрии выделяют фракцию клеток-предшественников CD34+/CD38+
3. Выделение из них суммарной РНК
4. Обратная транскрипция
5. ПЦР в реальном времени (определяем химерный ген *BCR-ABL*)

Интерпретация результата: молекулярной ремиссии соответствует концентрация менее 100 химерных транскриптов на 1 мкг тотальной РНК. Точное количественное определение *BCR-ABL1* нужно не только для оценки МРБ и раннего выявления рецидива, но и для своевременного изменения тактики лечения. Так, около 20% пациентов с хроническим миелолейкозом рефрактерны к иматинибу, и высокий уровень экспрессии химерного онкогена указывает на целесообразность применения препаратов (других ингибиторов тирозинкиназ) второй линии вместо иматиниба.

Фолликулярная лимфома в 85% случаев



Рядом авторов изучена МРБ после аллогенной трансплантации стволовых клеток костного мозга при хроническом миелолейкозе с помощью флуоресцентной гибридизации in situ (FISH) и ПЦР-РВ. В течение 2 лет после трансплантации химерный ген *BCR-ABL1* выявляли двумя методами, и количество его копий постепенно уменьшалось. После 30 месяцев наблюдения не удавалось выявить FISH-позитивные клетки с транслокацией, но ПЦР-РВ позволял оценивать остаточные количества клеток, экспрессирующих химерный онкоген *BCR-ABL1*, что указывает на большую чувствительность этого

Метилспецифическая ПЦР-РВ при изучении генов-супрессоров

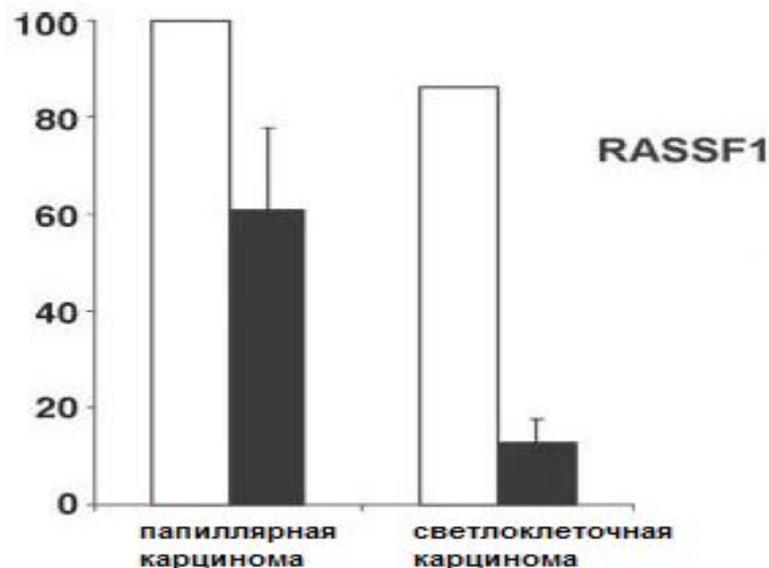
Метилирование – это присоединение метильной группы в позиции N5 пиримидинового кольца в цитозине, которое осуществляется ДНК-метилтрансферазами. Метилироваться у человека могут только цитозины, входящие в состав CpG-динуклеотидов, скопления которых, в свою очередь, в подавляющем большинстве случаев образуют CpG-островки. Эти CpG-островки находятся в 5'-регуляторной области, промоторе или первом интроне генов, экспрессия которых может регулироваться метилированием. Злокачественная трансформация клетки сопряжена со снижением общего уровня метилирования генома и локальным гиперметилированием промоторов в генах-супрессорах.

Этапы эксперимента:

1. Выделение геномной ДНК из опухолевой и нормальной тканей
2. Бисульфитная конверсия ДНК
3. ПЦР-РВ с метилспецифическими праймерами и Taq-Man-зондами, построение калибровочной кривой с учетом сигналов от гена MYOD1 (нет CpG-динуклеотидов) и разведениям положительного контроля (ДНК, обработанная Sssl).

4. Расчет нормализованного индекса метилирования (NIM)

$$NIM = \frac{\text{количество метилированных промоторных последовательностей } RASSF1}{\text{количество геномной ДНК, прошедшей бисульфитную конверсию}}$$



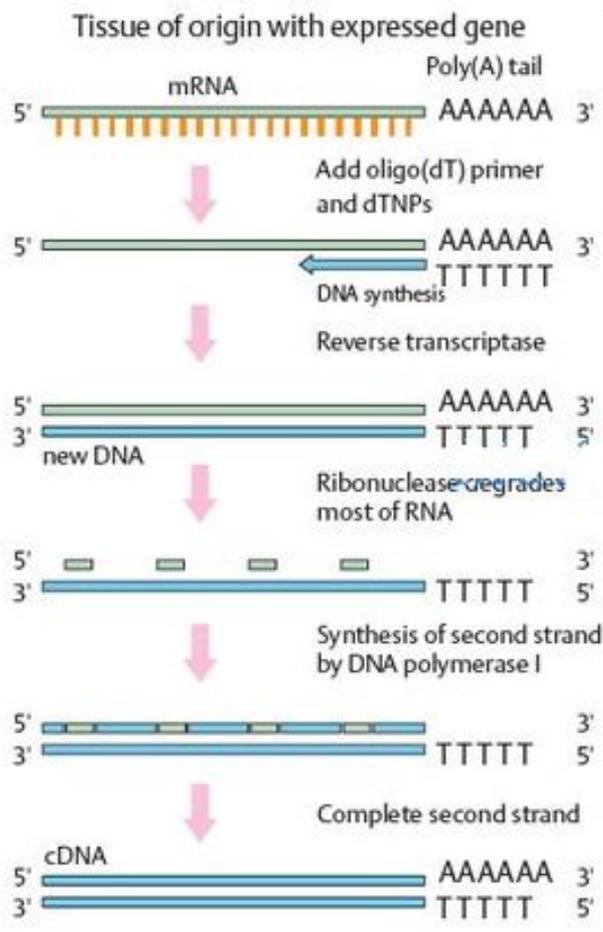
Показано, что частоты метилирования *RASSF1* в светлоклеточных и папиллярных карциномах почки относятся как 86 : 100, тогда как NIM – как 12.8 : 60.8.

Что надо сделать до проведения ПЦР в реальном времени для изучения экспрессии гена?

1. Выделение РНК

Метод кисл-фенольной экстракции

Метод сорбции на колонках



2. Очистка от геномной ДНК (если необходимо) с помощью экзонуклеазы

3. Обратная транскрипция

Праймеры олиго-dT

Отжиг случайных гексануклеотидов (random primers)

Выбор референсных генов

Клетки нейробластомы	Фибробласты	Лейкоциты	Костный мозг	Усредненное соотношение
<i>B2M</i>	<i>HMBS</i>	<i>ACTB</i>	<i>ACTB</i>	<i>B2M</i>
<i>RPL13A</i>	<i>B2M</i>	<i>HMBS</i>	<i>B2M</i>	<i>ACTB</i>
<i>ACTB</i>	<i>RPL13A</i>	<i>HPRT1</i>	<i>HMBS</i>	<i>YWHAZ</i>
<i>TBP</i>	<i>SDHA</i>	<i>SDHA</i>	<i>TBP</i>	<i>RPL13A</i>
<i>YWHAZ</i>	<i>TBP</i>	<i>TBP</i>	<i>SDHA</i>	<i>UBC</i>
<i>HMBS</i>	<i>ACTB</i>	<i>RPL13A</i>	<i>GAPD</i>	<i>TBP</i>
<i>UBC</i>	<i>UBC</i>	<i>GAPD</i>	<i>HPRT1</i>	<i>HPRT1</i>
<i>SDHA</i>	<i>YWHAZ</i>	<i>B2M</i>	<i>YWHAZ</i>	<i>HMBS</i>
<i>HPRT1-GAPD</i>	<i>HPRT1-GAPD</i>	<i>UBC-YWHAZ</i>	<i>UBC-RPL13A</i>	<i>SDHA-GAPD</i>

Референсные гены, расположенные в порядке увеличения стабильности их экспрессии (Vandesompele et al., 2002).

Нормировка данных при определении уровня представленности транскриптов

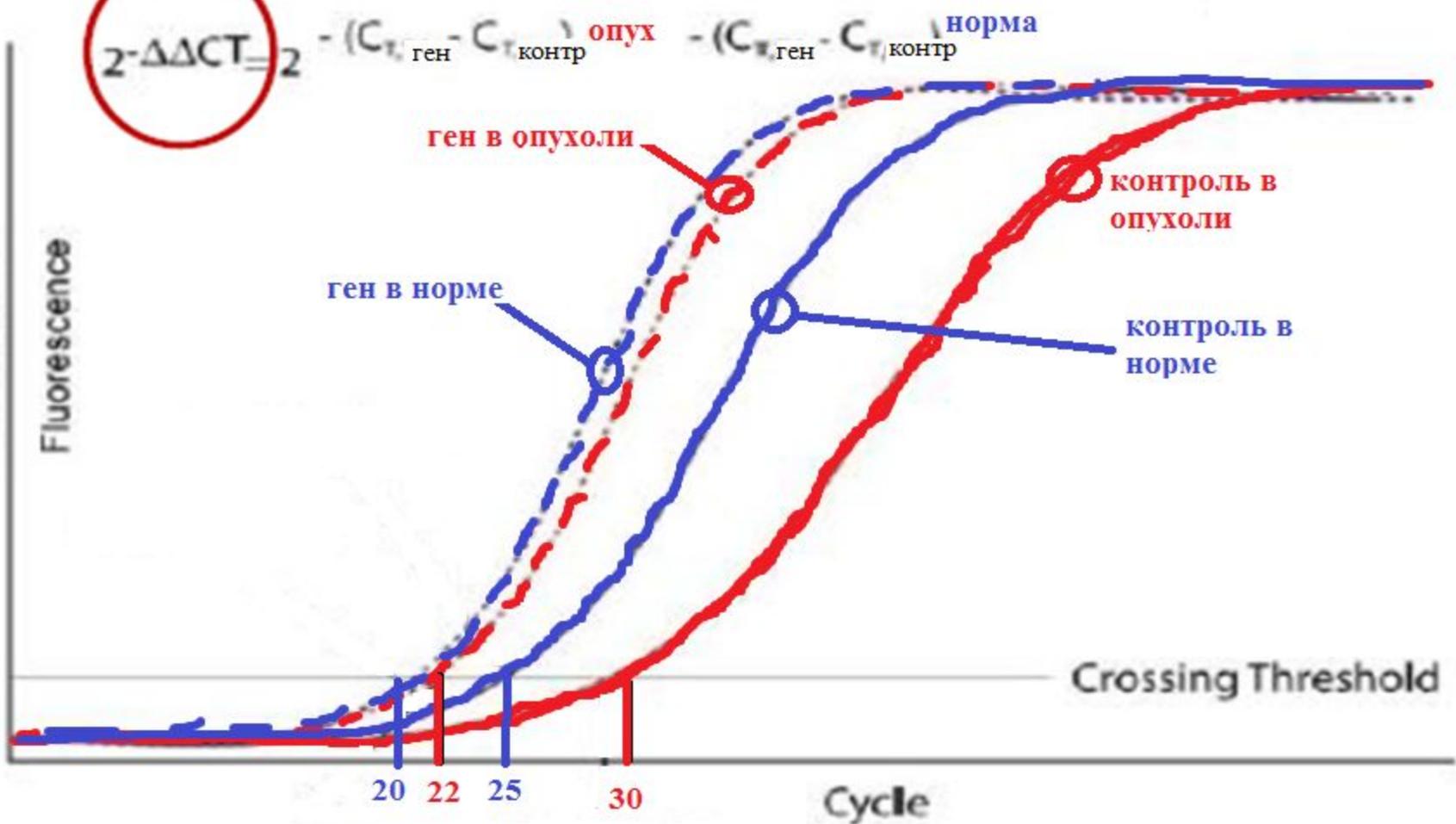
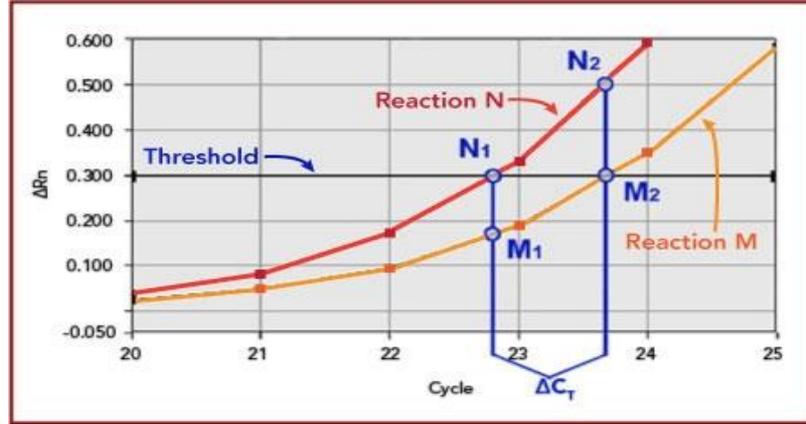
1. Нормировка по числу клеток (FACS, образцы крови)
2. Использование рибосомальной РНК (28S-рРНК лучше отражает целостность мРНК, чем 18S рРНК; рРНК и мРНК транскрибируются разными полимеразами; нельзя использовать олиго-Т праймеры)
3. Измерение концентрации суммарной РНК (проблема: нельзя оценить деградацию материала и мРНК в низких концентрациях)
4. Использование геномной ДНК для нормировки образцов
5. **Использование мРНК гена «домашнего хозяйства» (еще лучше – нескольких таких генов).**

$$R = 2^{-[\Delta CP \text{ sample} - \Delta CP \text{ control}]}$$

$$R = 2^{-\Delta\Delta CP}$$

$$\frac{\Delta CT_{\text{ген}}}{\Delta CT_{\text{ген}}} - \frac{\Delta CT_{\text{ген}}}{\Delta CT_{\text{ген}}} = (22-30) - (20-25) = -8+5 = -3$$

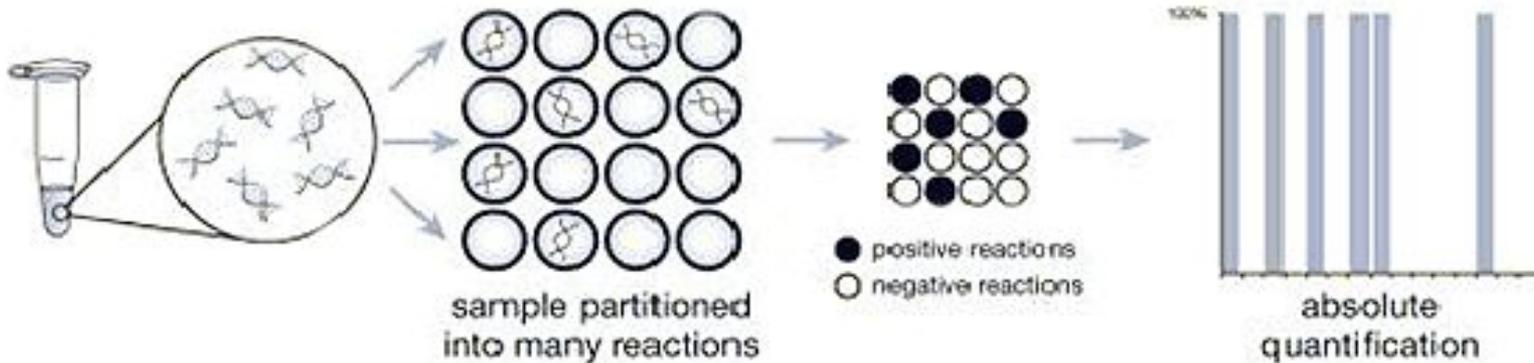
$$2^{-\Delta\Delta CT} = 2^{-(-3)} = 2^3 = 8$$



Цифровая ПЦР (Digital PCR)

Схема метода по сравнению экспрессии генов:

- 1) Выделение РНК, обратная транскрипция, разведение препарата кДНК
- 2) Заполнение лунок микрочипа (только в часть лунок попадет хотя бы одна молекула кДНК), ПЦР
- 3) Подсчет лунок, в которых прошла ПЦР, на микрочипах, относящихся к разным образцам



Оборудование для цифровой ПЦР

- 1) Микрочип
- 2) OpenArray термоциклер

Приложения цифровой ПЦР

- 1) Анализ экспрессии генов
- 2) Анализ количества копий участков ДНК (точное количество амплифицированных копий онкогенов, достоверное выявление делеций одного из двух аллелей в ДНК-диагностике наследственных заболеваний)

Выходящий тестовый контроль

1. Увеличение количества ПЦР-продуктов при эффективности ПЦР, равной 2, происходит:

- линейно
- логарифмически
- стохастически
- только при выходе реакции на стадию плато

2. Увеличение концентрации праймеров:

- Уменьшает специфичность ПЦР
- Увеличивает специфичность ПЦР
- Не влияет на специфичность ПЦР
- Концентрацию праймеров не меняют при отработке условий ПЦР

3. Снижение температуры отжига:

- Уменьшает специфичность ПЦР
- Увеличивает специфичность ПЦР
- Не влияет на специфичность ПЦР
- Возможно только до 65°C

4. Увеличение концентрации ионов магния:

- Уменьшает специфичность ПЦР
- Увеличивает специфичность ПЦР
- Не влияет на специфичность ПЦР
- Ионы магния не добавляют в ПЦР-смесь

5. Отрицательный контроль в ПЦР - это:

- Образец ДНК с тестируемой мутацией
- Реакционная смесь без Taq-полимеразы
- Реакционная смесь с ингибитором полимеразы
- Реакционная смесь без ДНК

6. Что обладает более высокой разрешающей способностью при электрофорезе ПЦР-продуктов:

- Полиакриламидный гель
- Буферный раствор
- Агарозный гель
- Ватмановская бумага

7. Гетерозиготный по наличию сайта рестрикции образец после проведения ПЦР-ПДРФ в геле разделится на:

- 2 фрагмента
- 3 фрагмента
- 4 фрагмента
- Будет представлен 1 фрагментом

8. ДНК после бисульфитной конверсии используется в:

- Метилчувствительной ПЦР
- Touch-Down ПЦР
- Метилспецифической ПЦР
- Обратной транскрипции

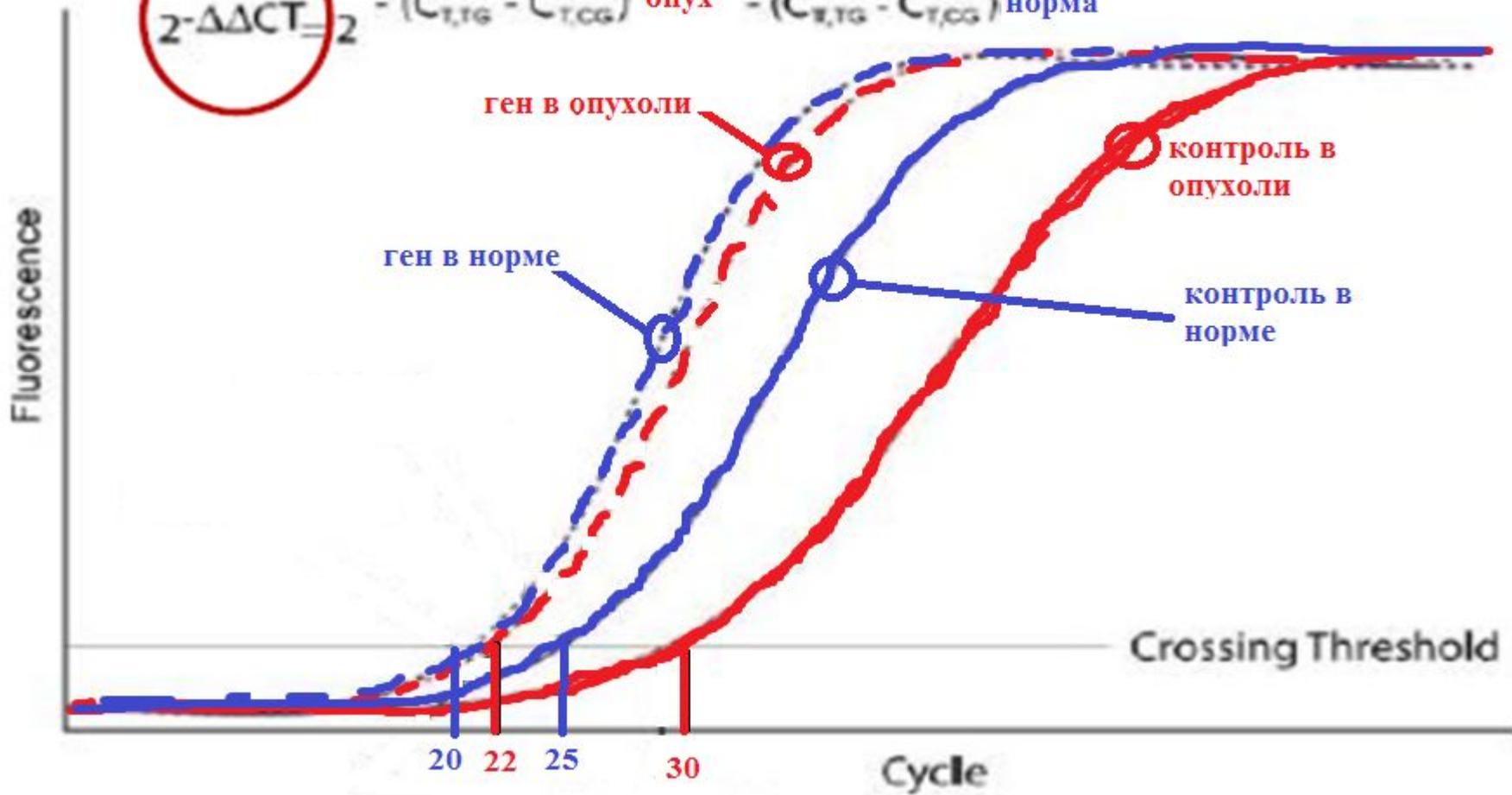
9. При гнездовой ПЦР анализируемая последовательность ДНК находится:

- Между внутренними и внешними праймерами
- В любом месте между внешними праймерами
- Между внутренними праймерами
- На 5'-конце одного из внутренних праймеров

10. Taq-полимеразы, конъюгированная с антителами, используется в:

- Реакции секвенирования
- Hot-Start ПЦР
- Метилспецифической ПЦР
- Выделении ДНК из раствора

$$2^{-\Delta\Delta CT} = 2^{-(C_{T,IG} - C_{T,CG}) \text{ опух}} - (C_{T,IG} - C_{T,CG}) \text{ норма}$$



Анализ экспрессии генов

$$2^{-\Delta\Delta CT} = 2^{-((C_{T,TG} - C_{T,CG})_{\text{treated}} - (C_{T,TG} - C_{T,CG})_{\text{control}})}$$

