

БИОИНЖЕНЕРИЯ



315-й межгалактический съезд биоинженеров. Бетельгейзе, 2747 год.

ПЦР в реальном времени

- **ПЦР в реальном времени** – метод, основанный на проведении полимеразной цепной реакции (ПЦР) с одновременной детекцией сигнала, генерируемого в ходе проведения ПЦР.

ПЦР

Получение информации

- анализ уровня представленности транскриптов
- *in situ* ПЦР
- ДНК-диагностика в медицине
- генотипирование

ПЦР в реальном времени

Получение материи

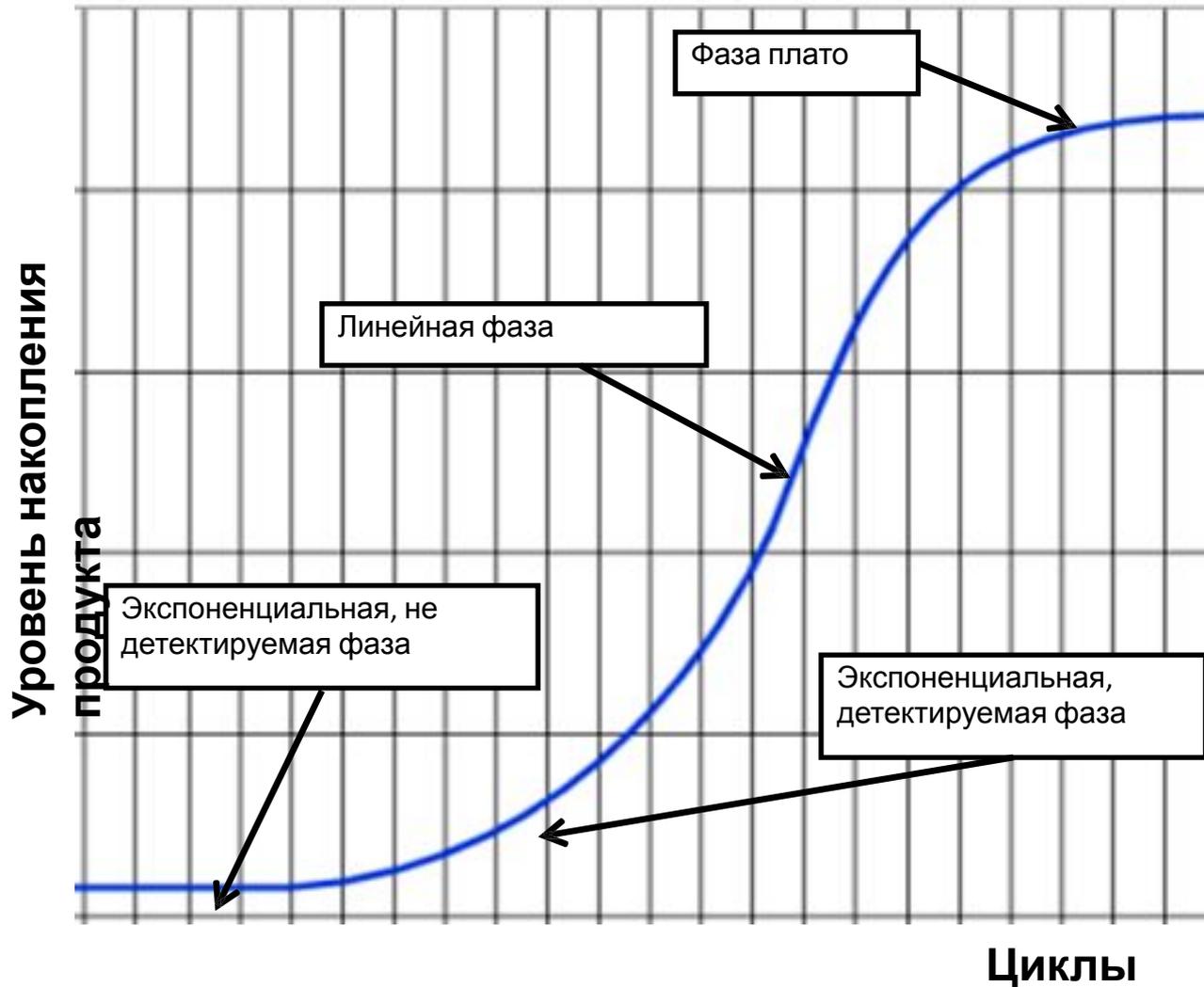
- клонирование ДНК
- вычитающая гибридизация
- дифференциальный дисплей
- *in vitro* мутагенез и др.

Обычная ПЦР

Способы детекции сигнала при проведении ПЦР

	Электрофорез	ГиФА	Система «FLASH» и флуориметр «Джин»	Система детекции результатов ПЦР в режиме реального времени (Real Time PCR)
Приблизительное время детекции для 30 образцов	40 мин	60 мин	3 мин	0 мин
Контаминация продуктами ПЦР	Высокая	Высокая	Низкая	Низкая
Фиксирование данных	Вручную	Автоматическое	Автоматическое	Автоматическое
Особенности	Возможность увидеть результат ПЦР в виде полоски на геле, оценить количество и качество амплификата по нескольким параметрам	Повышение достоверности исследования за счет специфичности пробы к целевому амплификату	Повышение достоверности исследования за счет специфичности пробы к целевому амплификату	Возможность оценки исходного количества копий ДНК в образце

Фазы ПЦР



Классификация ПЦР-РВ по способу снятия сигнала

ПЦР
РВ

```
graph TD; A[ПЦР РВ] --> B[Анализ по конечной точке. Данные снимаются с фазы плато. Используется для проведения качественных анализов. Примеры – плюс-минус анализ, анализ дискриминации аллелей.]; A --> C[Анализ в реальном времени. Данные снимаются с экспоненциальной фазы реакций. Используется для проведения количественных анализов. Примеры – абсолютный количественный анализ, относительный количественный анализ.];
```

Анализ по конечной точке. Данные снимаются с фазы плато.

Используется для проведения качественных анализов.

Примеры – плюс-минус анализ, анализ дискриминации аллелей.

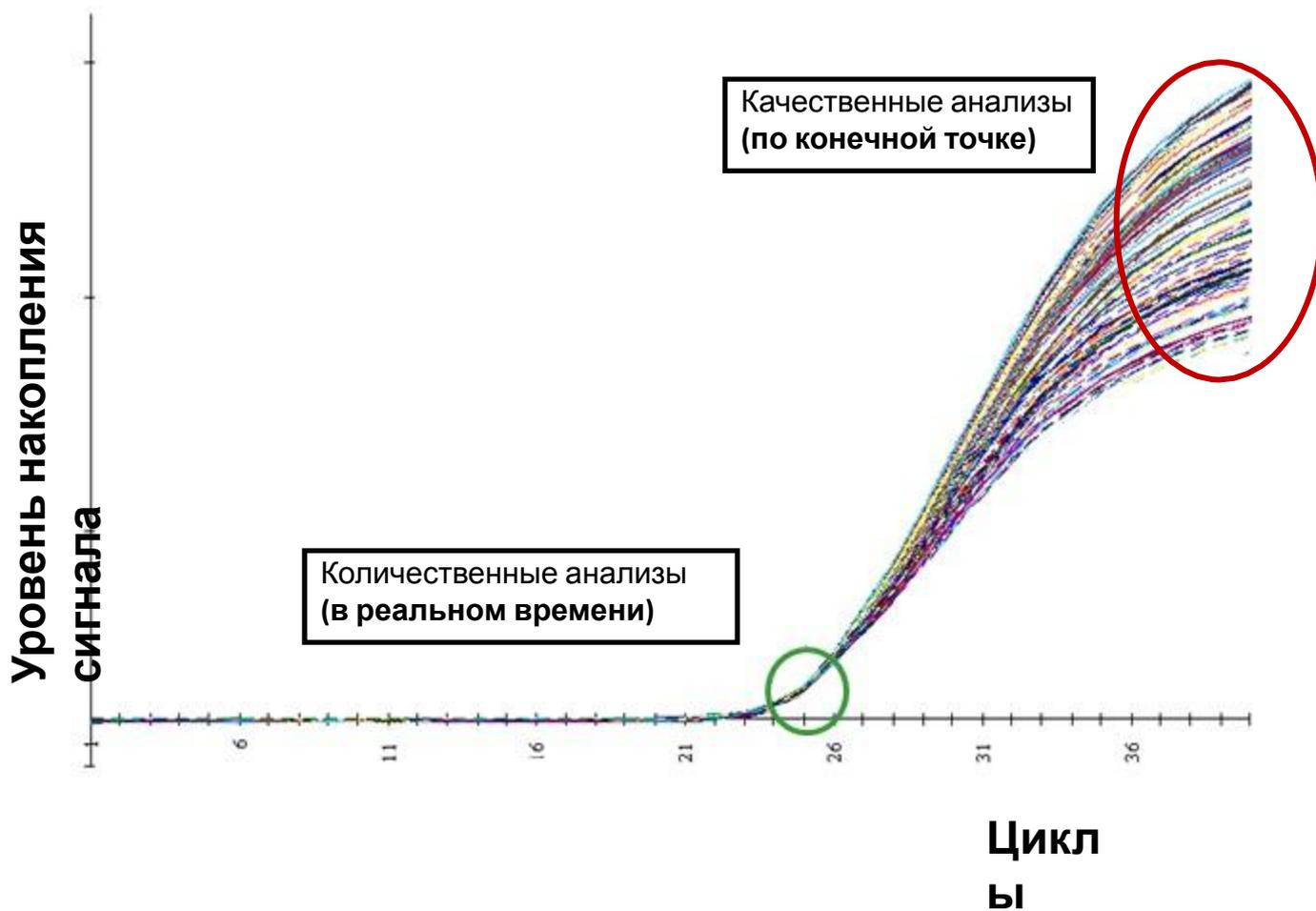
Анализ в реальном времени.

Данные снимаются с экспоненциальной фазы реакций.

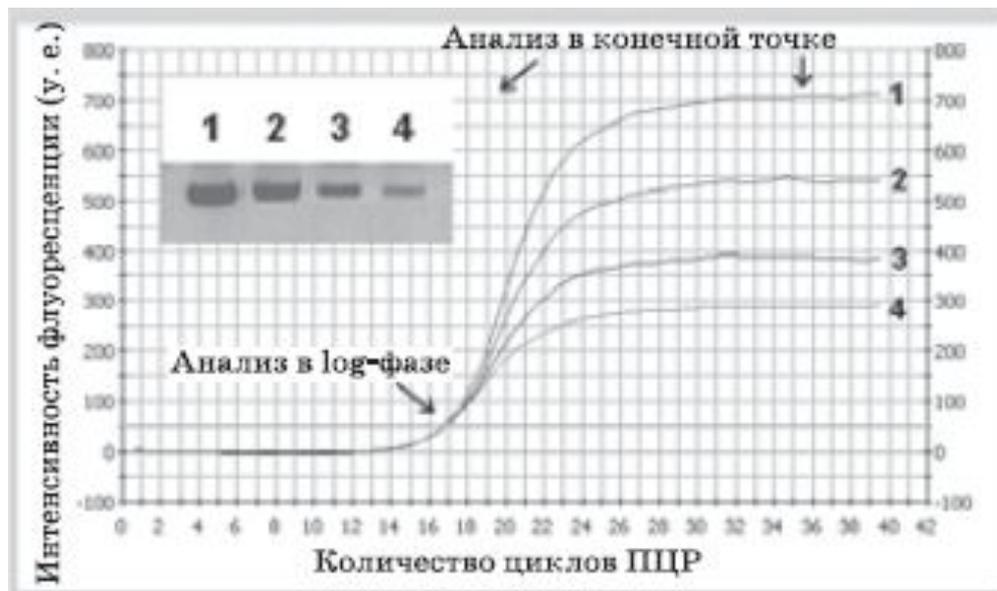
Используется для проведения количественных анализов.

Примеры – абсолютный количественный анализ, относительный количественный анализ.

Точки сбора данных для различных видов анализа



ОТЛИЧИЕ АНАЛИЗА ПРОДУКТОВ ПЦР «ПО КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ» И «В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ»

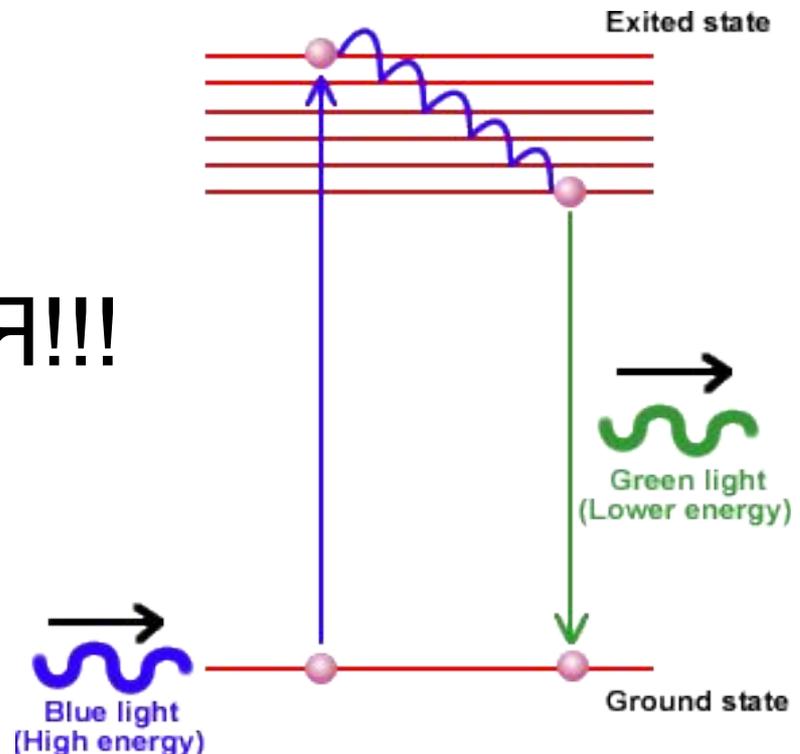


Несмотря на различие в конечной концентрации продуктов реакции, появление регистрируемого прибором сигнала для всех пробирок произошло одновременно, что свидетельствует о схожести начального количества ДНК.

Визуализация накопления ПЦР-продукта

- Во время прохождения стандартной ПЦР не нарабатывается видимого сигнала
- Накопление ПЦР-продукта нужно каким-то образом визуализировать.

ФЛЮОРЕСЦЕНЦИЯ!!!

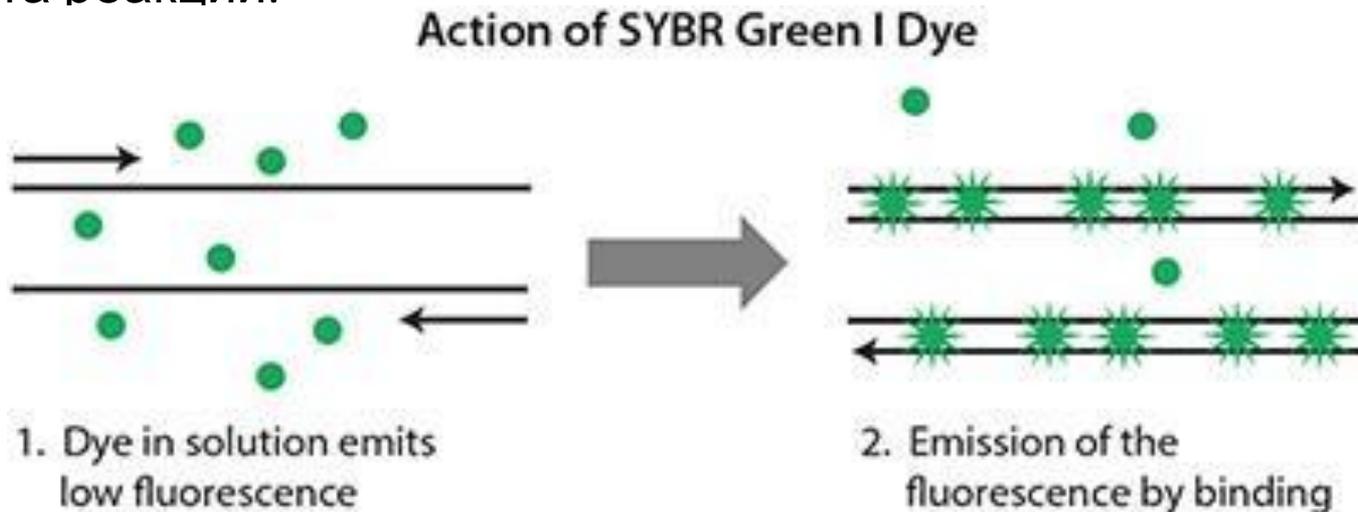


Интеркалирующие красители. SYBR Green

Связывается с малой бороздкой ДНК.

Окрашивает любую двуцепочечную ДНК.

Интенсивность флуоресцентного сигнала SYBR Green пропорциональна количеству наработавшегося двуцепочечного продукта реакции.



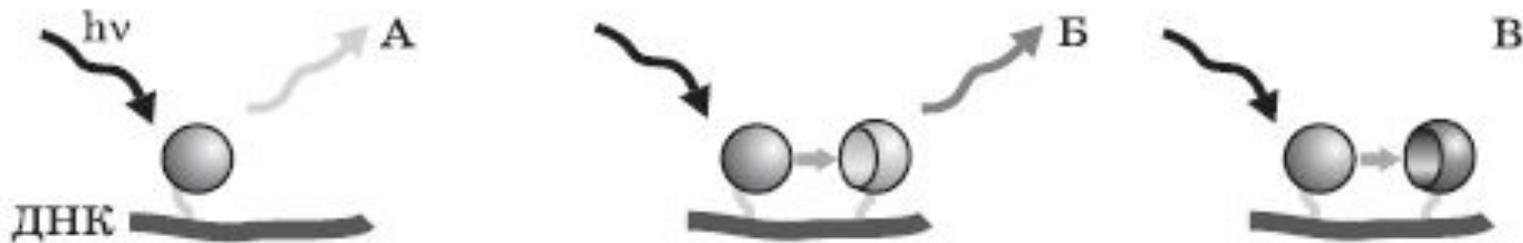
Достоинства интеркалирующих красителей:

- Дешевизна
- Простота в использовании

Недостатки интеркалирующих красителей:

- Недостаточная точность (сигнал от димеров праймеров!)
- Невозможность проведения мультиплексной ПЦР

Чтобы компенсировать эти недостатки, были придуманы **системы «флюорофор – гаситель».**

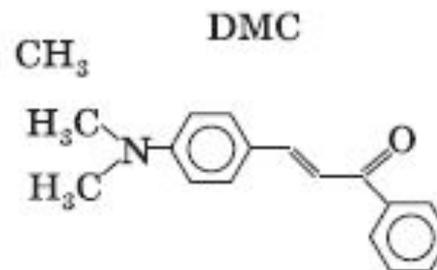
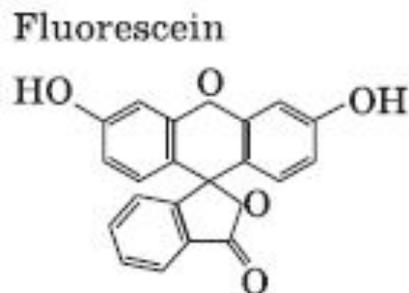
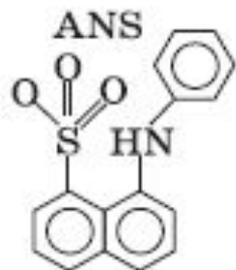


А. Флюорофор связан с ДНК и флюоресцирует.

Б. Флюорофор и гаситель связаны с ДНК в непосредственной близости друг от друга. Энергия передается с флюорофора на гаситель и испускается последним с другой длиной волны (флюоресцирующий гаситель).

В. Флюорофор и гаситель связаны с ДНК в непосредственной близости друг от друга. Энергия передается с флюорофора на гаситель и диссипирует (темновой гаситель).

Флюорофоры – небольшие химические соединения ароматической природы.



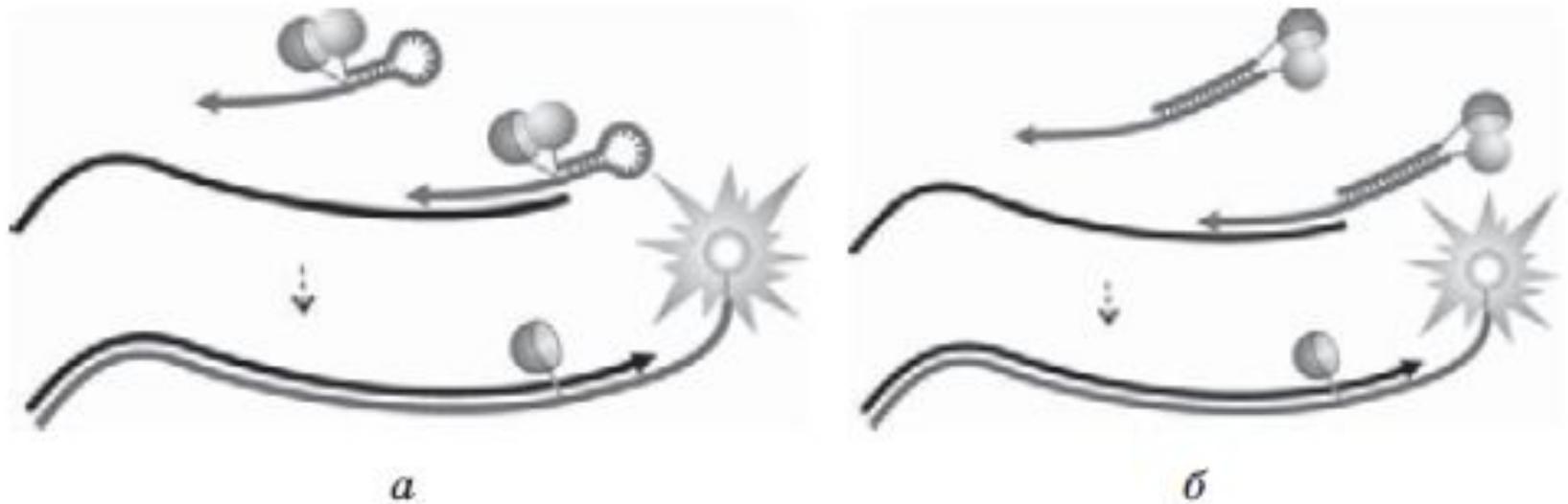
Гасители – небольшие химические соединения ароматической природы.

Флюорофоров бывает много!

Флюорофор	Максимум поглощения (нм)	Максимум испускания (нм)
Coumarin	402	443
AttoPhos	440	555
Cy2	489	506
Oregon Green	490	514
SYBR Green II	492	521
FITC/FAM	494	518
SYBR Green I	494	521
Alexa Fluor 488	495	520
SYBR Gold	495	537
RiboGreen	500	520
PicoGreen	502	523
Rhodamine 123	505	533

Флюорофор	Максимум поглощения (нм)	Максимум испускания (нм)
JOE (6-JOE)	520	548
HEX	530	556
Alexa Fluor 532	531	554
TAMRA (5-TAMRA)	542	568
Cy3	550	565
R-phycoerythrin	180/565	578
ROX (5-ROX)	567	591
Lissamine Rhodamine	570	590
XRITC	572	595
Cy3.5	581	596
Texas Red	596	615
Alexa Fluor 633	631	647
Cy5	650	670

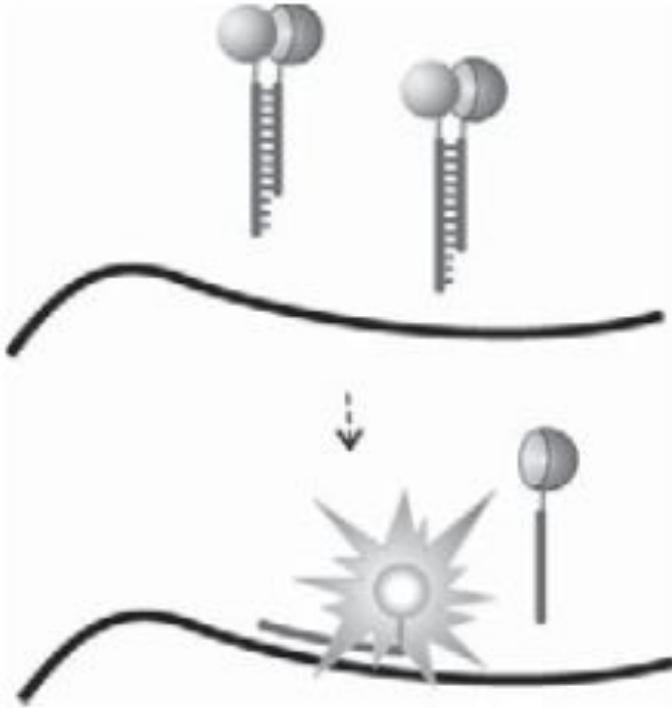
Меченые праймеры с адаптерной последовательностью («амплифлюры»)



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

б — праймер содержит меченый 5'-адаптер, комплементарный дополнительному олигонуклеотиду с гасителем. Синтез второй цепи «сталкивает» олигонуклеотид с гасителем.

Вытесняющие пробы



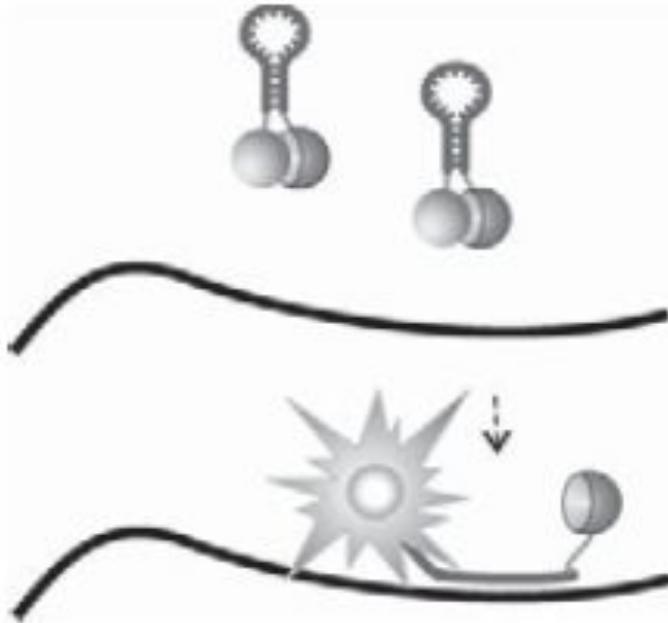
■ Проба – это не праймер!

С пробы амплификация не идет, она просто с чем-нибудь связывается.

Вытесняющая проба - пара частично комплементарных друг другу олигонуклеотидов, один из которых несет флуорофор, а другой — гаситель флуоресценции.

В отсутствие мишени проба образует дуплекс, в котором флуоресценция подавлена. При накоплении соответствующего пробе продукта реакции процесс реассоциации пробы начинает конкурировать с процессом гибридизации олигонуклеотидов на мишень, что ведет к увеличению уровня флуоресценции.

Молекулярные маячки (molecular beacons – молекулярный бекон!)

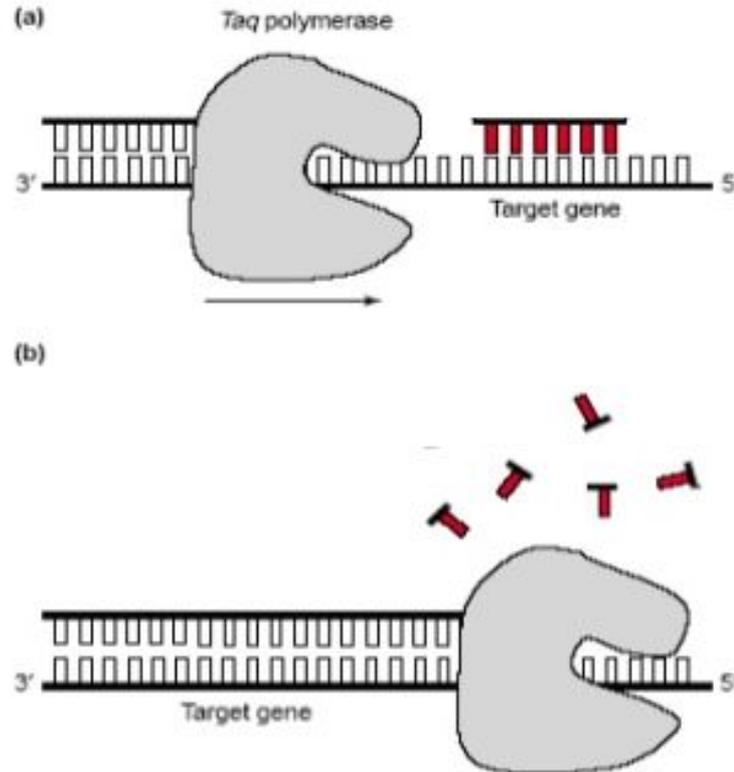


Пробы несут короткий инвертированный концевой повтор, по краям которого расположены флуорофор и гаситель флуоресценции. В растворе проба формирует шпильчатую структуру, в которой флуорофор и гаситель сближены.

При гибридизации со специфичным продуктом реакции проба «разворачивается», что ведет к разобщению флуорофора и гасителя и, как следствие, к усилению флуоресценции.

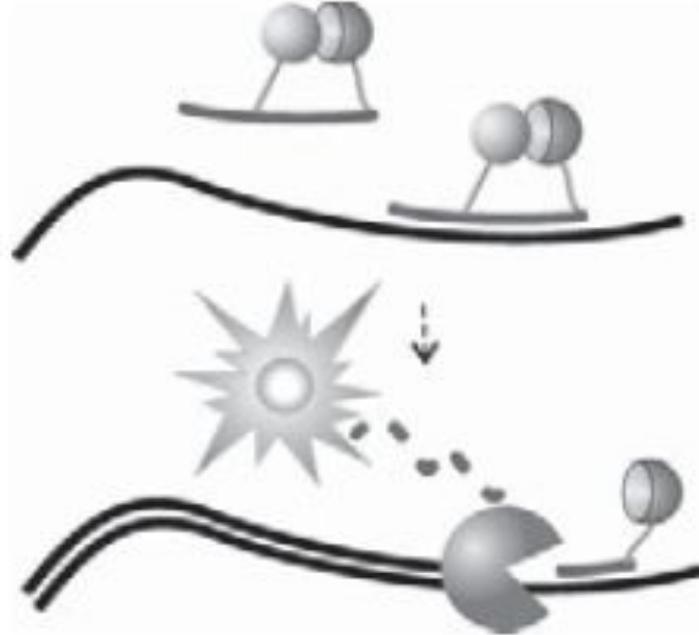
Вы думали, здесь будет еще один вариант флюоресцентной детекции?
А вот и нет!

5'-экзонуклеазная активность Taq-полимеразы



Активность эта «биоинженерная» - в рекомбинантный белок добавлен соответствующий домен.

Линейные разрушаемые пробы (TaqMan)



Пробы несут флуорофор и гаситель флуоресценции. Пока проба находится в растворе, за счет близкого расположения гаситель эффективно поглощает энергию флуорофора. В случае гибридизации со специфичным продуктом реакции проба разрушается за счет 5'-эксонуклеазной активности полимеразы, что ведет к разобщению флуорофора и гасителя и возрастанию флуоресценции.

ПЦР в реальном времени – количественный метод!

Идеальная ПЦР:

$$N_n = N_0 2^n$$

n —номер цикла реакции;
 N_0 —количество целевых молекул в начале реакции (на первом цикле);
 N_n —количество продуктов реакции на цикле n ;
2 — коэффициент эффективности ПЦР.

Реалистическая ПЦР:

$$N_n = N_0 E^n$$

E – коэффициент эффективности, находящийся в интервале от 1 до 2.

Отличие значения E всего на 0,15 к 30-му циклу ПЦР дает разницу в количестве продукта в 10 раз!

Регистрируется не количество молекул ДНК, а флюоресцентный сигнал!

$$F = \alpha N$$

F - сигнал флуоресценции;
α - (неизвестный) коэффициент пропорциональности;
N - число молекул ДНК.



$$F_n = \alpha N_0 E^n$$

Коэффициент α зависит от:

- настроек прибора, параметров реакционной пробирки, точности разнесения реактивов по пробиркам и т. д.
- системы визуализации накопления ДНК (интеркалирующие красители, олигонуклеотидные зонды, меченые праймеры и т. д.).

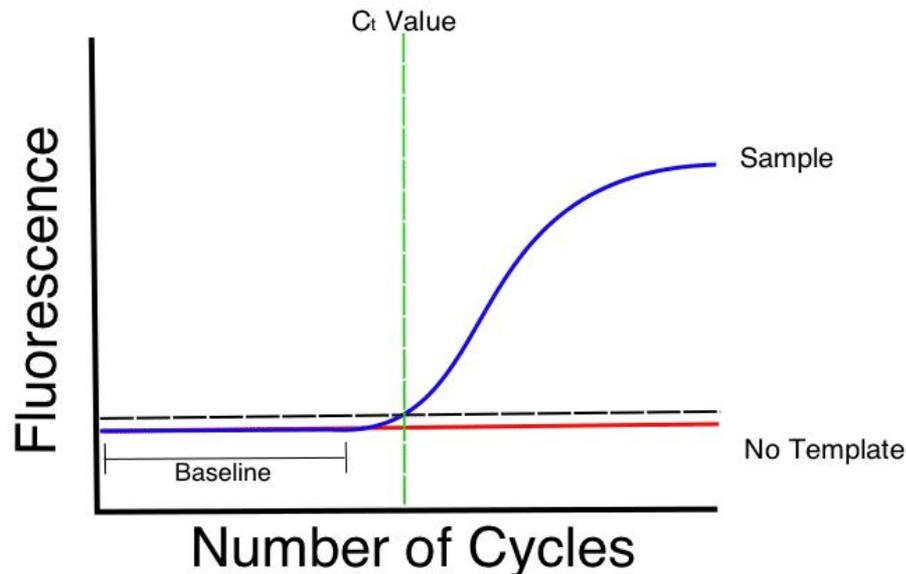
При сравнении разных экспериментов или даже разных пробирок внутри одного эксперимента полученные данные нельзя сравнивать напрямую: коэффициент для них может отличаться.

Господи Иисусе, как же все это можно посчитать?!

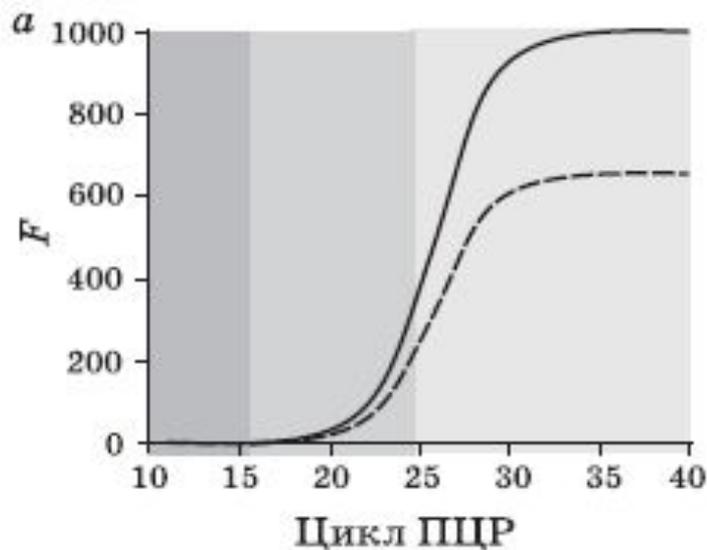
(Да, в общем-то, довольно просто).

Пороговый метод: определение момента C_t (выраженного в циклах ПЦР), 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.

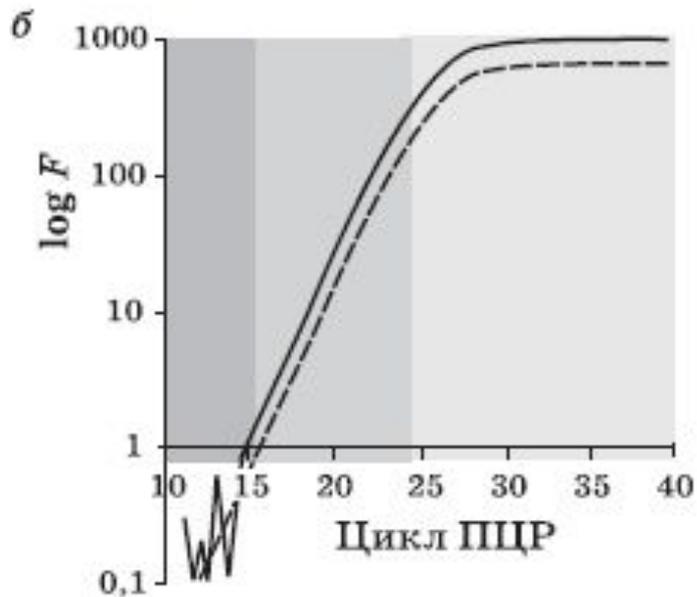
Для корректной работы порогового метода, необходимым является сходство коэффициентов преобразования уровня флуоресценции в количество ДНК.



Участки кривой накопления флюоресцентного сигнала



Линейная шкала

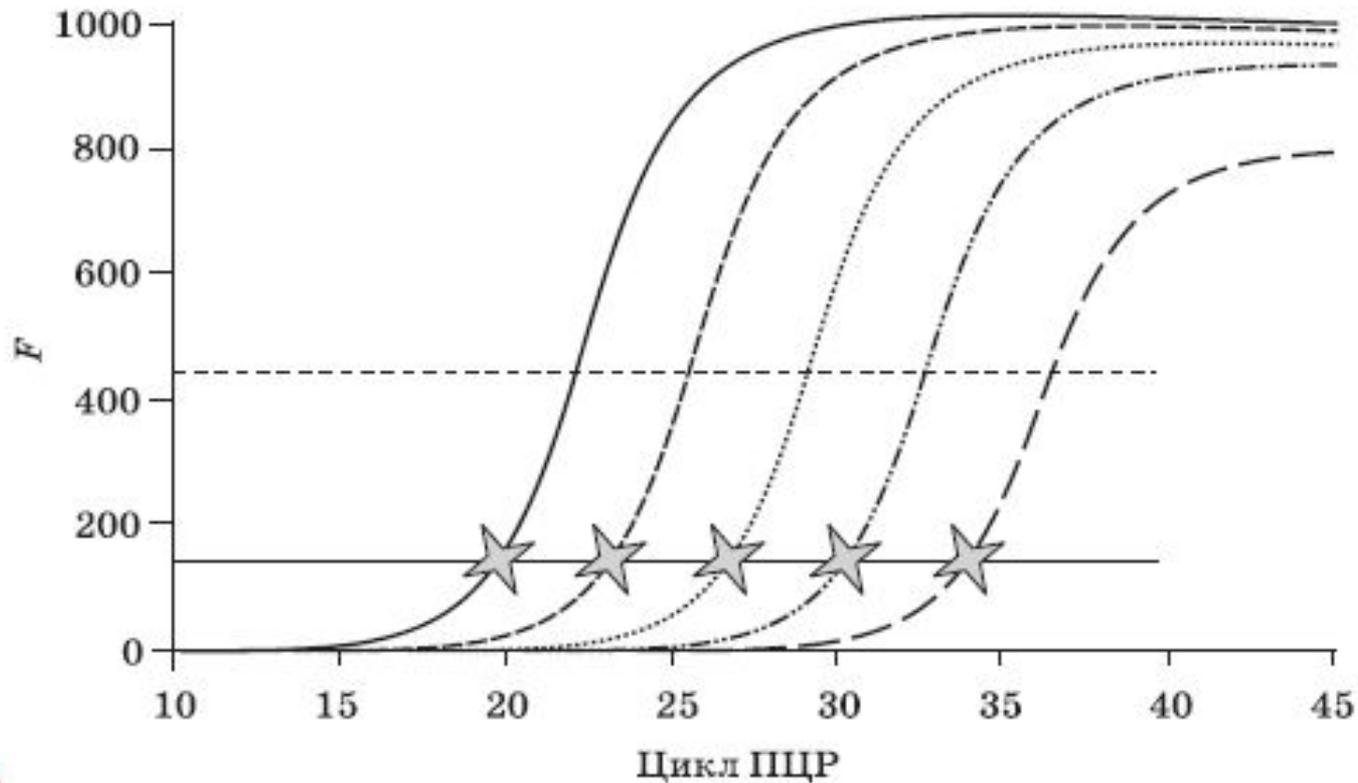


Логарифмическая шкала

- участок «шумов» изменение (сигнала флуоресценции меньше уровня шумов)
- «экспоненциальный» участок
- участок «плато» (резкое падение эффективности реакции)

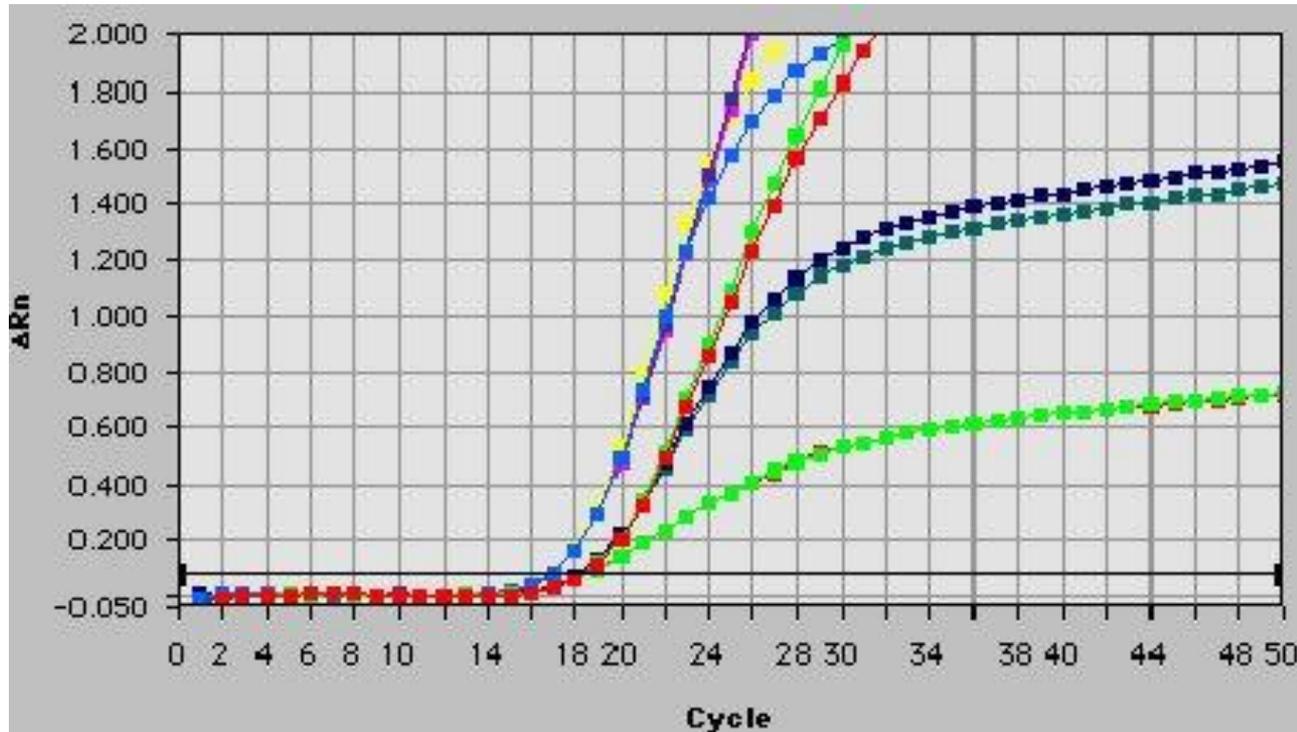
Информативен только экспоненциальный участок!

Сравнение нескольких реакций ПЦР пороговым методом



Можно ли сделать это в одной пробирке?

Мультиплексная ПЦР в реальном времени



Просто добавьте зонты с разной шириной волны испускаемой тьмы к разным молекулам ДНК и используйте прибор с возможностью детекции нескольких глубин волн – и все у вас будет ништяк!