


# Методи детекції продуктів ампліфікації



# Методи детекції продуктів ПЛР

- Електрофоретичний розподіл в агарозному гелі з УФ-детекцією при фарбуванні бромистим етідієм
- ГІФА (гібридизаційно-ферментний аналіз)
- Real-Time (флуоресцентна мітка)



Електрофорез - метод розділення заряджених молекул в пористому гелі в залежності від їх розміру під дією електричного поля.

Електрофорез базується на двох «китах»:

- ✓ ДНК (продукт ампліфікації - амплікон) має негативний заряд і рухається в електричному полі від «-» до «+»
- ✓ Молекули ДНК різного розміру рухаються з різною швидкістю в агарозному гелі.



# Типи електрофоретичного розділення ДНК

- ЕФ горизонтальний в агарозному гелі під УФ з Et-Br, межа детекції - 20 нг ДНК, роздільна здатність - 100 п.н. (для генотипування - 25 - 50 п.н.)
- ЕФ вертикальний в поліакриламідному гелі (під УФ з Et-Br або нітратом срібла), межа детекції - 1 нг при фарбуванні сріблом, роздільна здатність - 10 п.н.
- УФ капілярний з флуоресцентною міткою, межа детекції < 1нг, роздільна здатність - 1 п.н.

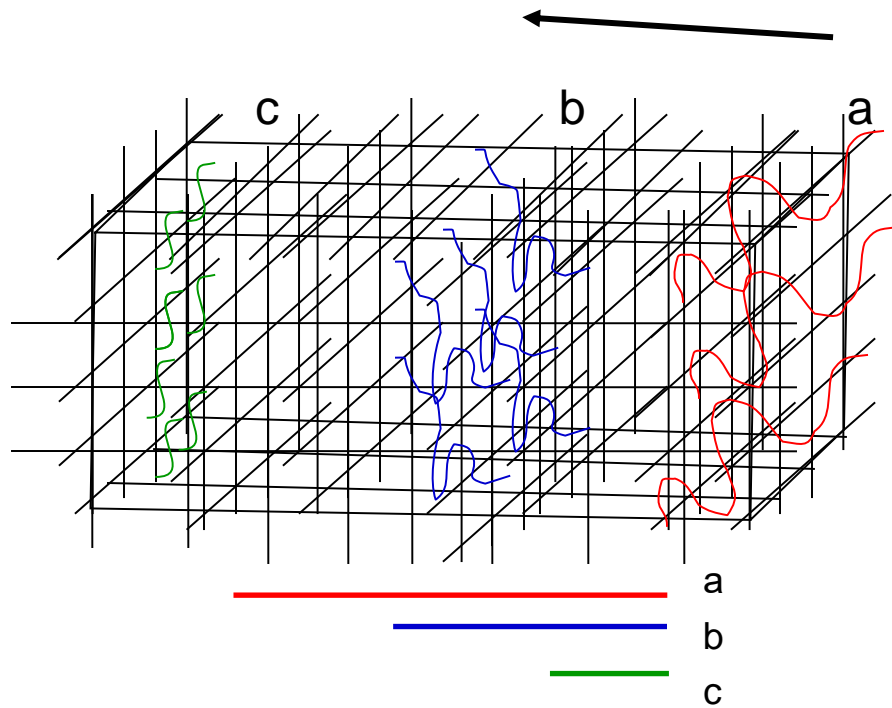


## Параметри, що впливають на швидкість міграції ДНК

- ✓ Розмір молекул ДНК
- ✓ Концентрація агарози
- ✓ Напруженість електричного поля



+



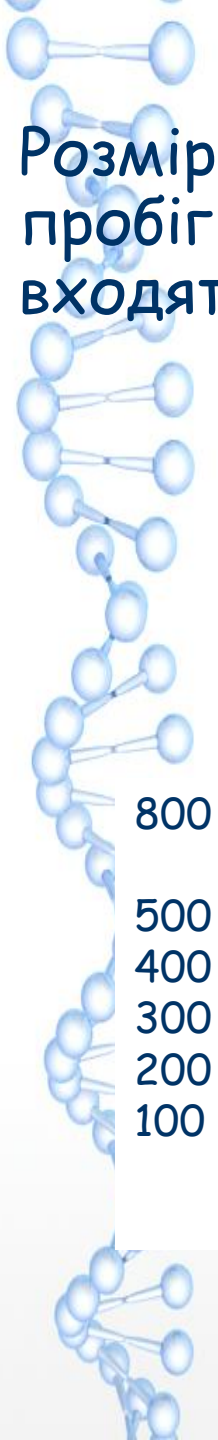
-

Швидкість міграції ( $V$ ) зворотно пропорційна  $\lg$  довжини фрагмента ДНК, що виражена в п.н. ( $L$ ):

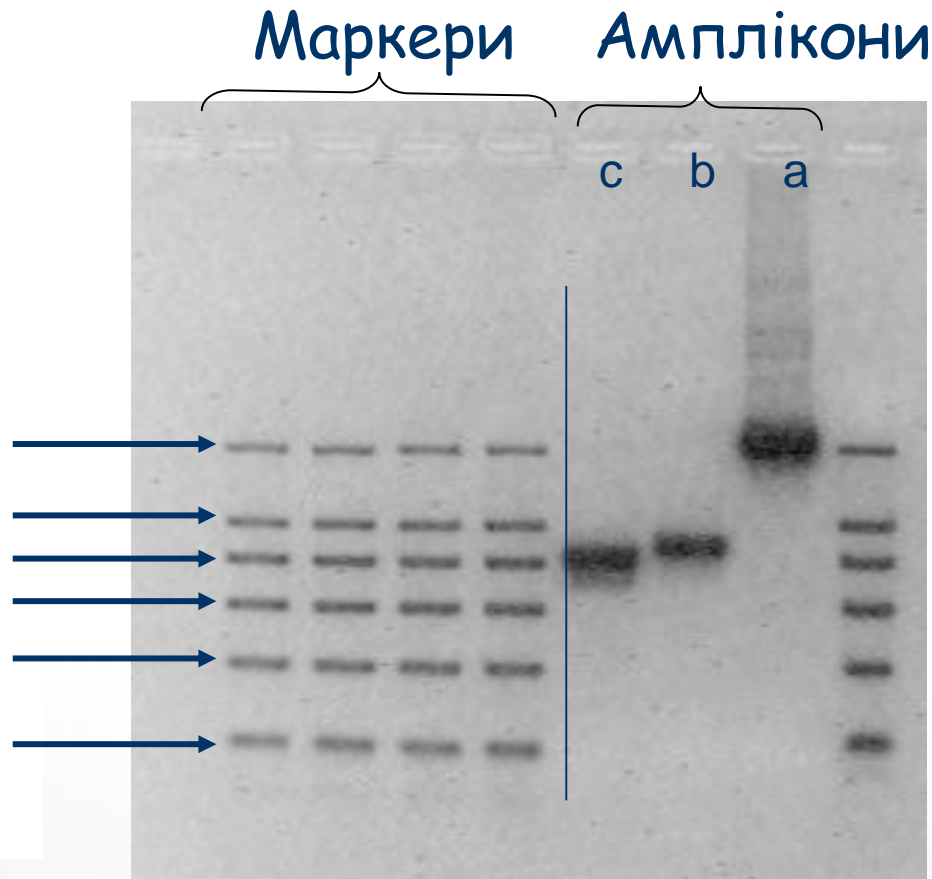
$$V \sim 1 / \lg L$$

Ця залежність нелінійна - розмір молекул по довжині пробігу розрахувати неможливо, необхідний маркер довжин (контрольний зразок)

Розмір амплікона можна визначити, порівнявши його пробіг з пробігом молекул ДНК відомої довжини, які входять в склад маркера довжин ДНК



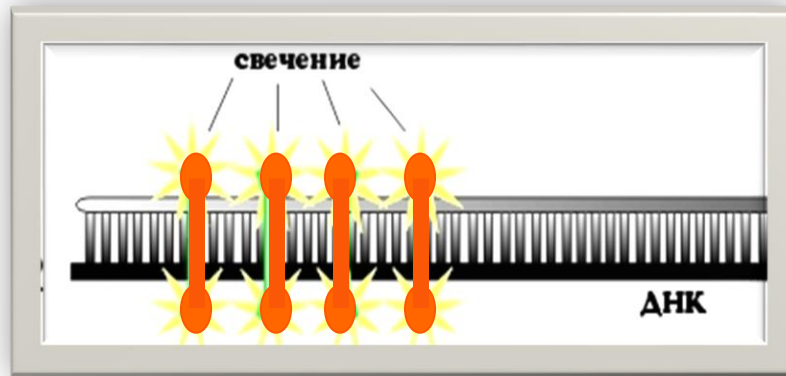
800  
500  
400  
300  
200  
100



а - 800 п.н.  
б - 450 п.н.  
с - 400 п.н.

# Візуалізація ДНК

Для візуалізації ДНК вона фарбується інтеркалюючим фарбником, напр. бромистим етидієм в концентрації 0,1-0,5 мкг/мл

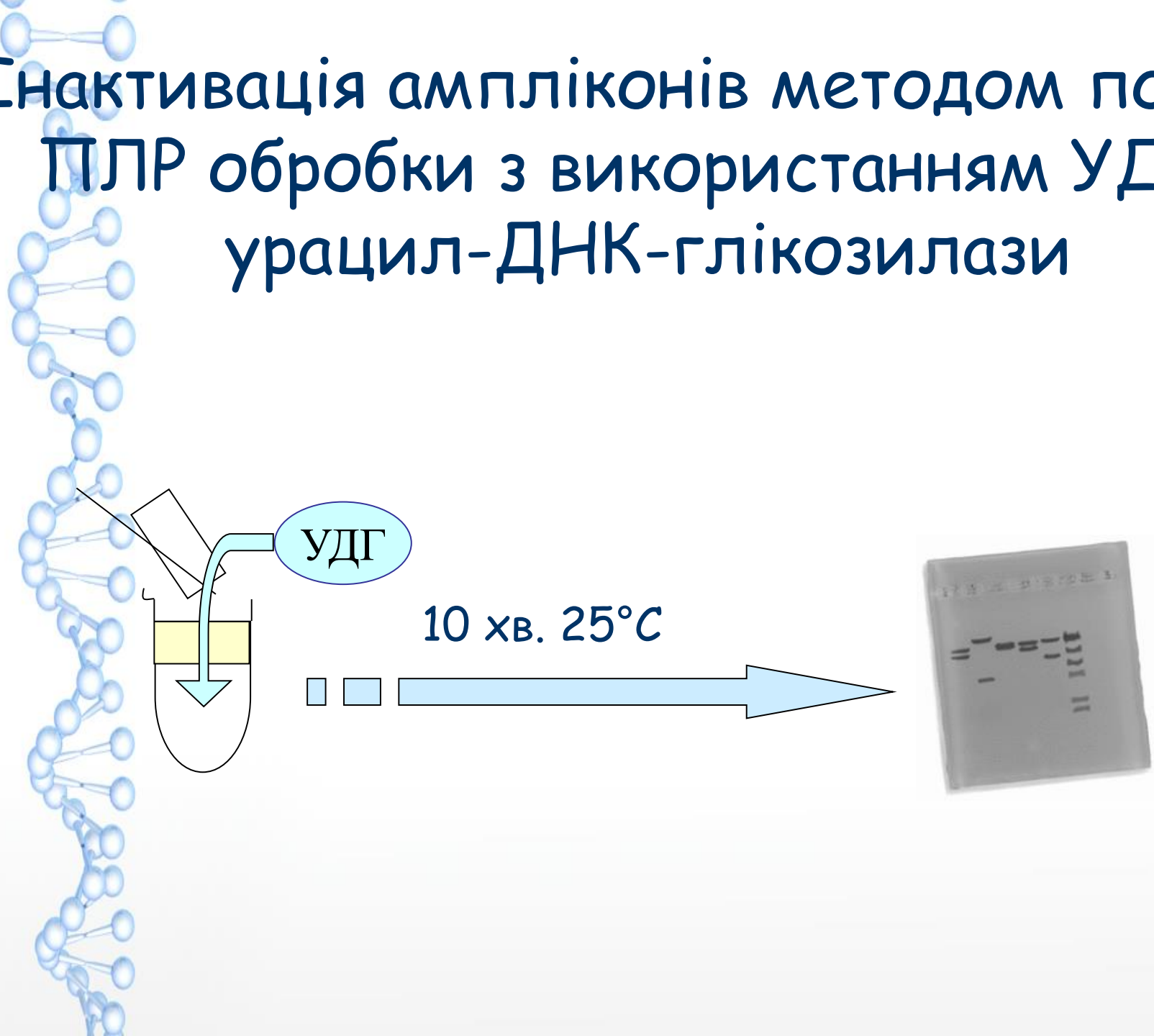


Бромистий етидій входить в склад буфера і геля і використовується для посилення флуоресценції ДНК під УФ випромінюванням (трансілюмінатор)

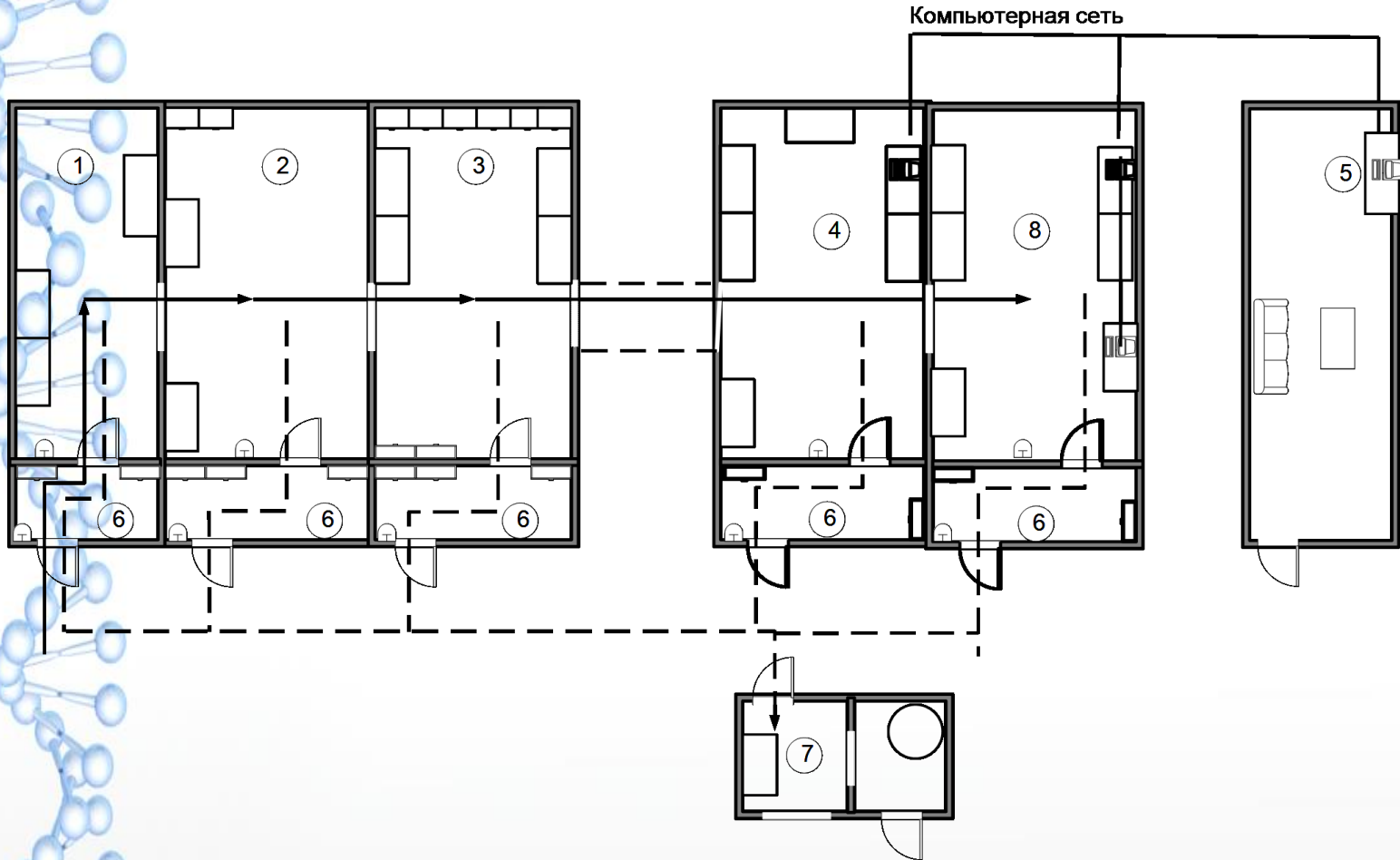
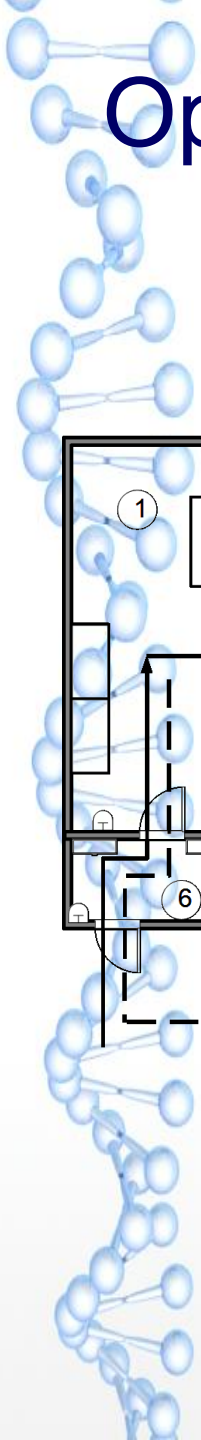
ДНК поглинає світло в частині спектру 260 нм, бромистий етидій поглинає світло довжиною хвилі 300-360 нм і випромінює в помаранчево-червоній ділянці видимого спектра (590 нм)



# Інактивація ампліконів методом пост-ПЛР обробки з використанням УДГ - урацил-ДНК-глікозилази



# Організація ПЛР лабораторії з ЕФ детекцією





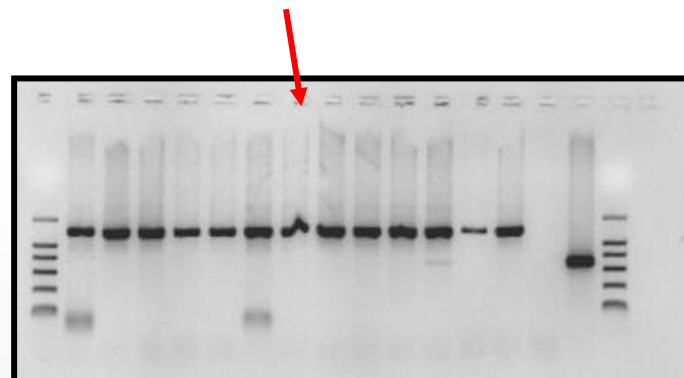
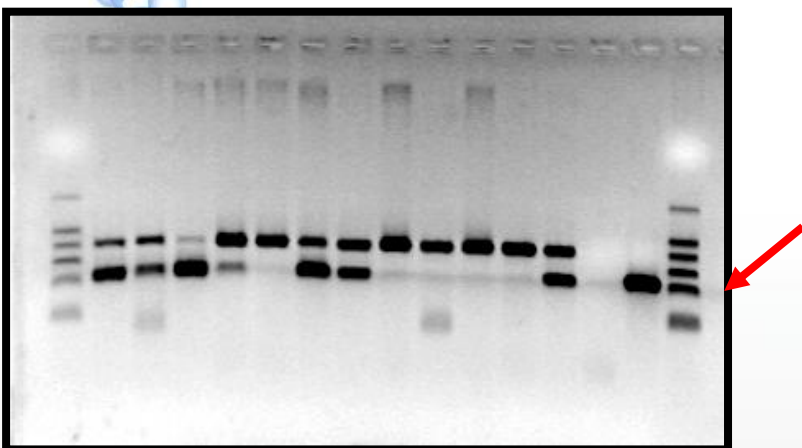
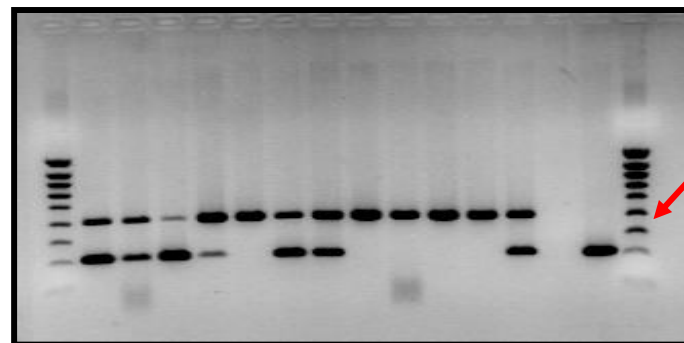
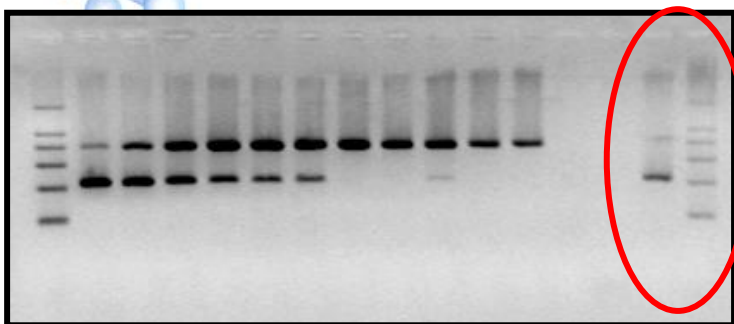
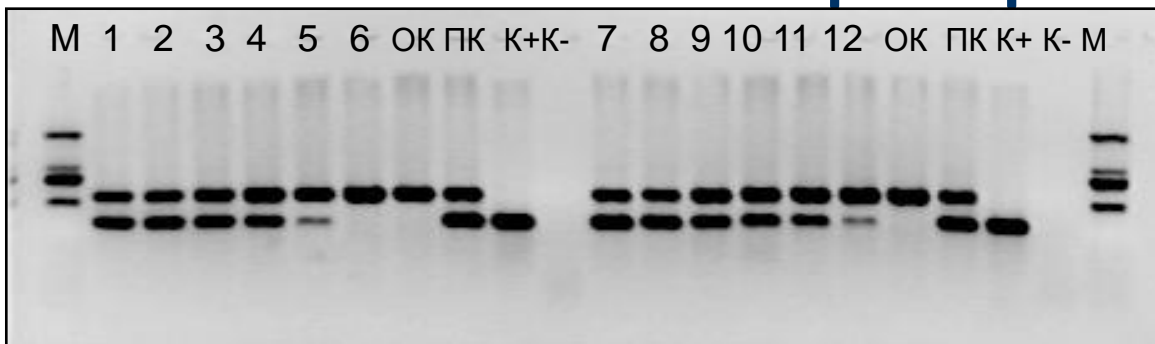
## ! Увага

ЕФ проводиться при напруженості електричного поля не більше 10 Вольт/см.

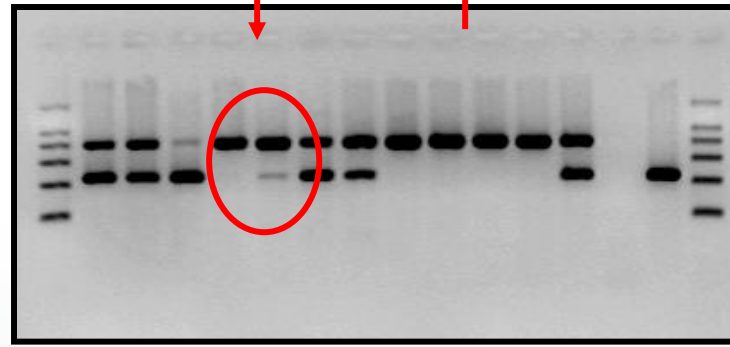
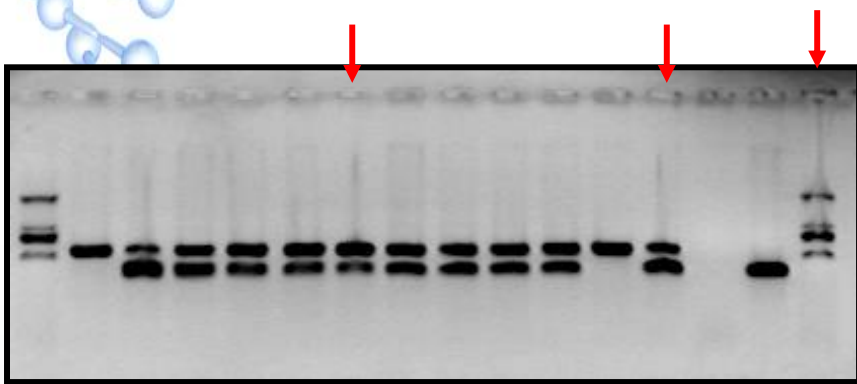
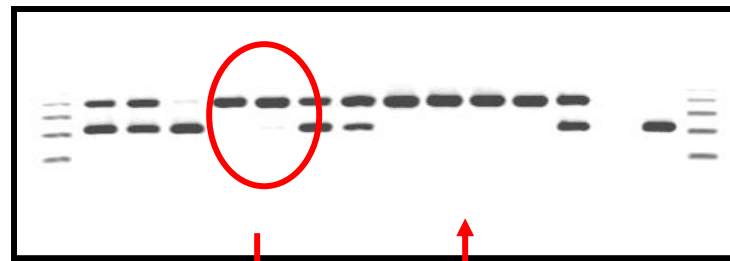
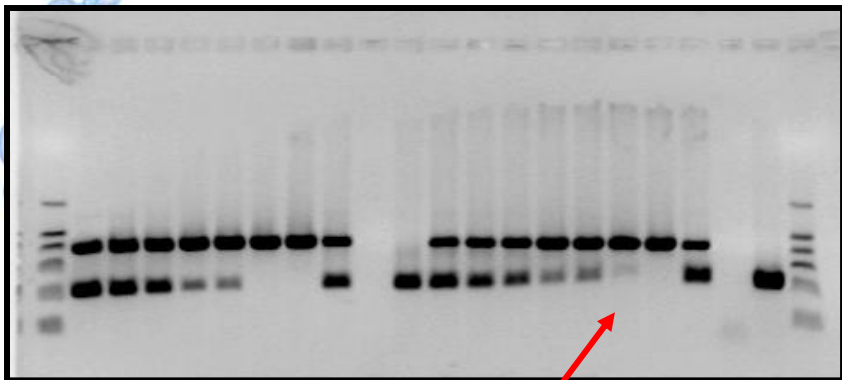
Більш висока напруга може призвести до перегріву геля та викликати:

- Викривлення смуг, вигинання у вигляді «посмішки»
- Розмиття смуг
- Плавлення геля

# Основні помилки - артефакти ЕФ



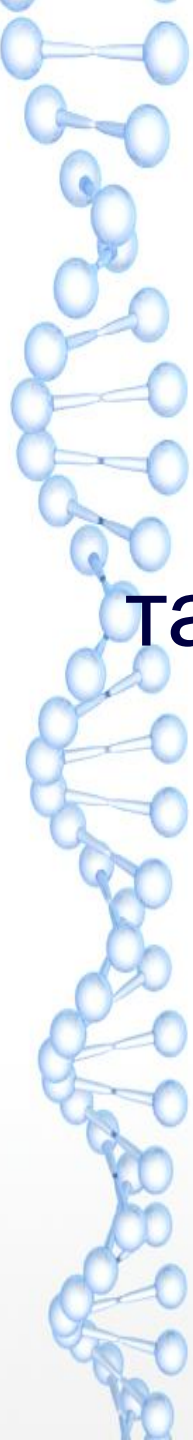
# Основні помилки - артефакти ЕФ





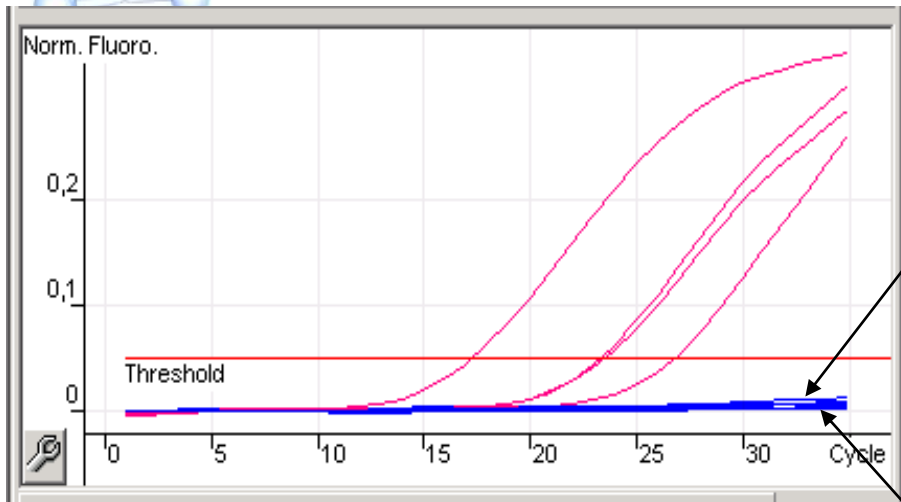
## Недоліки ЕФ детекції

- Візуалізація всього – включаючи артефакти та неспецифічні продукти ампліфікації
- Суб'єктивність сприйняття лікарем «спірних» результатів
- Необхідність організації «брудної зони»
- Відсутність стандартних параметрів реєстрації зображення за допомогою транслюмінатора, відеосистем тощо.
- Виключно якісний (не кількісний) формат результатів

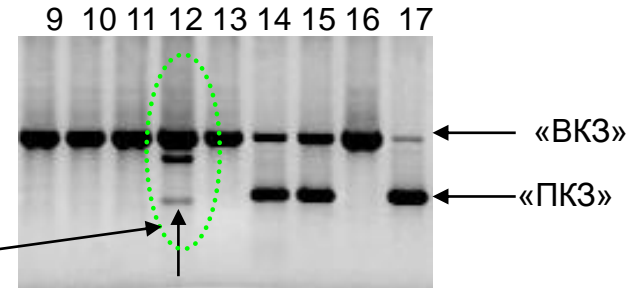


ПЛР с гібридизаційно-  
флуоресцентною детекцією  
та ПЛР в режимі реального часу  
(Real Time PCR)

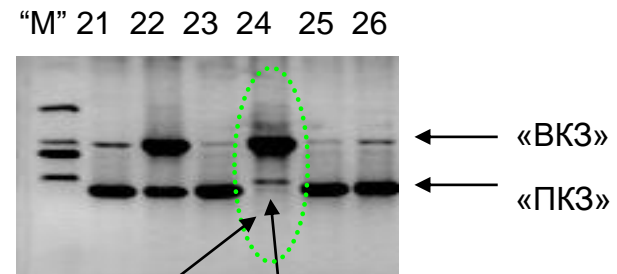
# Гібридизаційно-флуоресцентна детекція: підвищення специфічності, виключення суб'єктивних помилок:



Для зразків 12 та 24 відсутнє Ct  
(немає перетинання порогової лінії)



«НС»



«НС»

Неоднозначні результати ЕФ однозначно інтерпретуються в RT-PCR

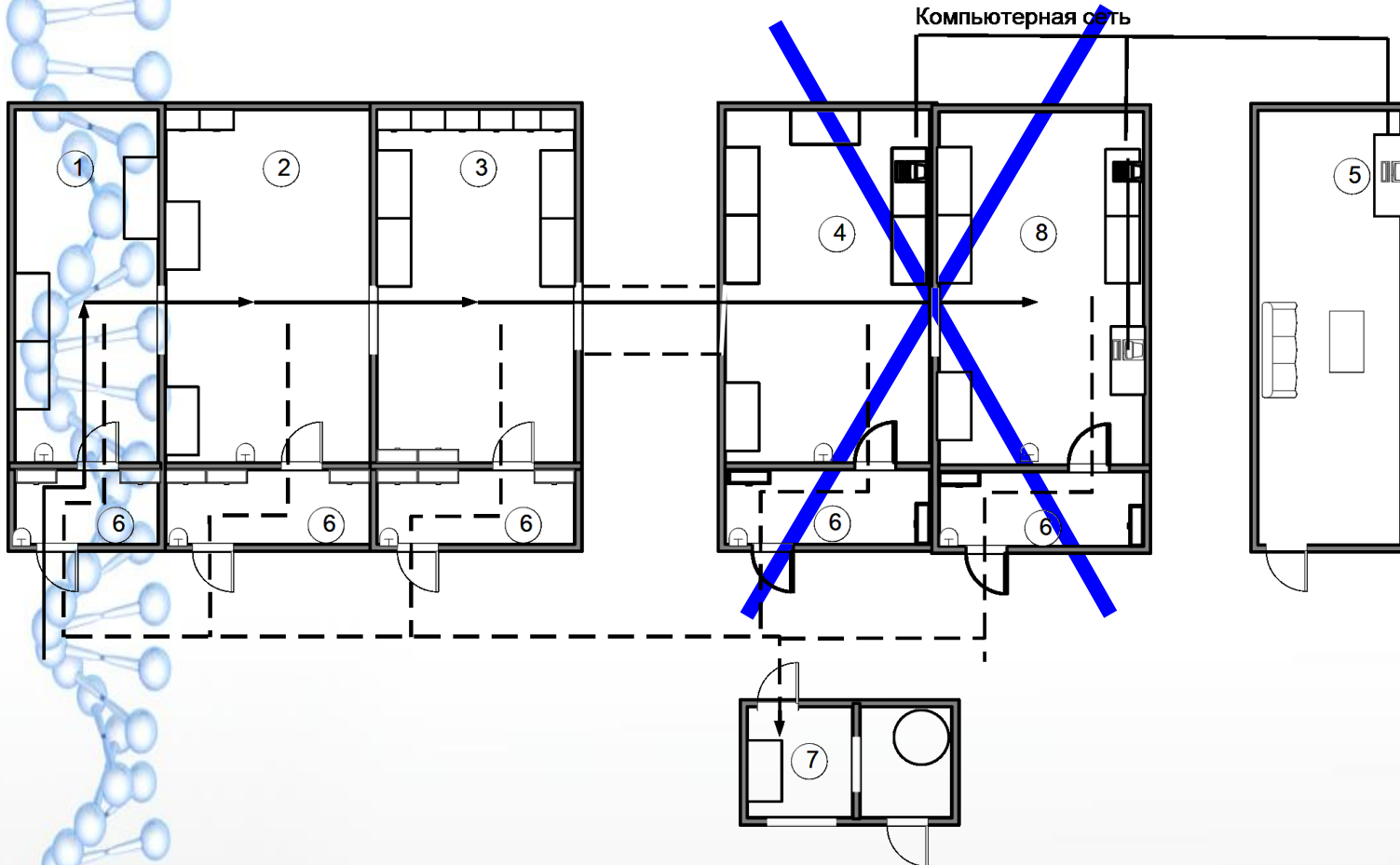




## Можливості ПЛР з гібридизаційно-флуоресцентною детекцією

- Мінімізація ризику контамінації та хибно-позитивних результатів
- Спрощення організації ПЛР-лабораторії
- Автоматизація ПЛР-лабораторії
- Підвищення інформативності ПЛР—досліджень:
  - ✓ Кількісний аналіз
  - ✓ Виявлення точкових мутацій
  - ✓ Аналіз алельного поліморфізму
  - ✓ Генотипування мікроорганізмів

# Організація ПЛР-лабораторії з гібридизаційно-флуоресцентною детекцією



# Принцип гібридизаційно-флуоресцентної детекції

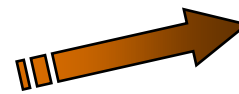
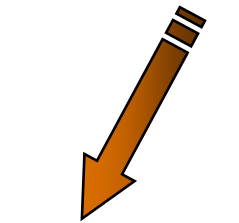
Накопичення  
продуктів  
ПЛР



Посилення  
флуоресцентного  
сигналу



Реєстрація  
накопичення  
флуоресцентного  
сигналу

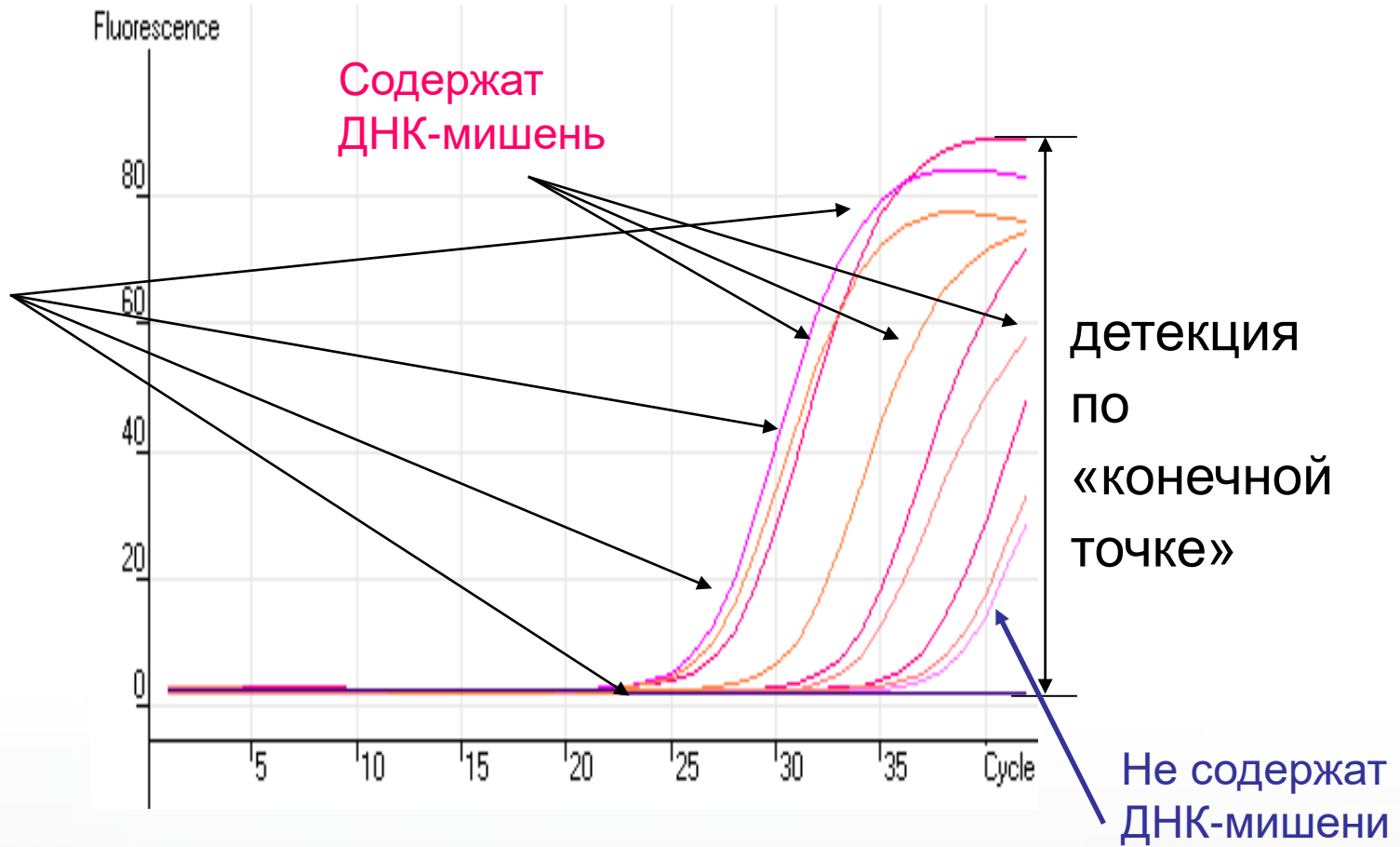


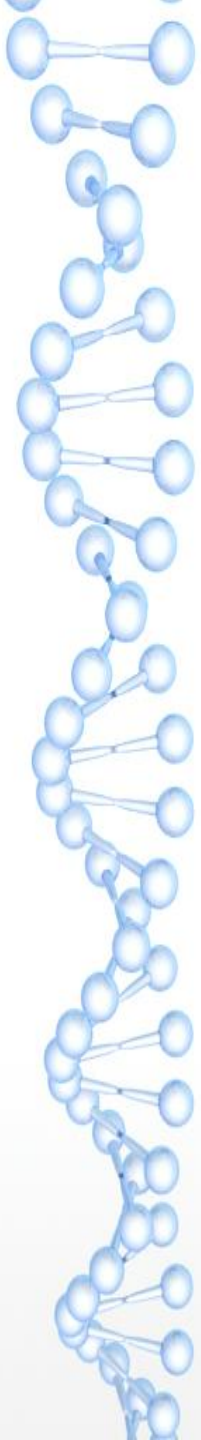
В процесі ПЛР -  
- Real-time PCR

Або по закінченню  
ПЛР (детекція за  
кінцевою точкою)

# Real Time v.s. FEP

детекция  
в режиме  
реального  
времени



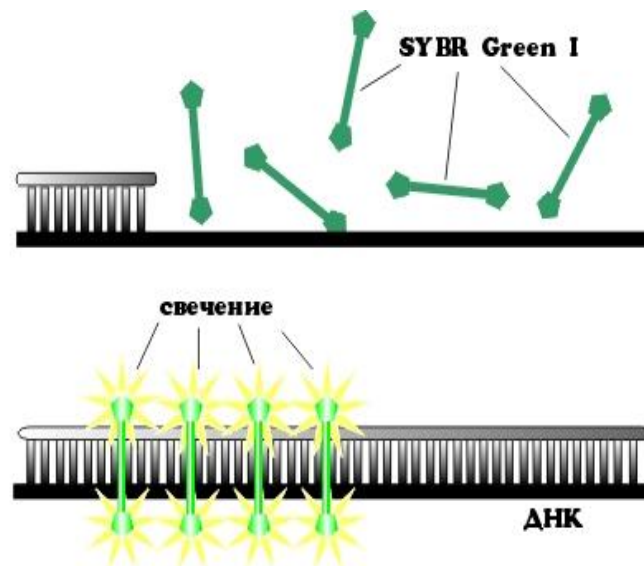


# Як візуалізувати специфічні продукти ампліфікації?

- **Використання інтеркалюючих барвників**
- Використання зондів з флуоресцентними мітками
- Використання флуоресцентно мічених праймерів (рідко)

## Використання інтеркалюючих барвників

- Рівень флуоресценції інтеркалюючих барвників різко зростає при зв'язування з будь-якою дволанцюговою ДНК
- Для ідентифікації специфічного продукту ПЛР використовується додатковий етап – аналіз кривих плавлення (проводиться в автоматичному режимі)
- Необхідний відповідний прилад – ампліфікатор, що проводить аналіз кривих плавлення (ампліфікатор для Real-time PCR)





## Інтеркалюючі барвники

- Недорогі
- Неспецифічні продукти ампліфікації та праймер-димери будуть давати флуоресцентний сигнал
- Необхідний додатковий етап аналізу кривих плавлення
- Обмежена мультиплексність

## Специфічні зонди з флуоресцентною міткою

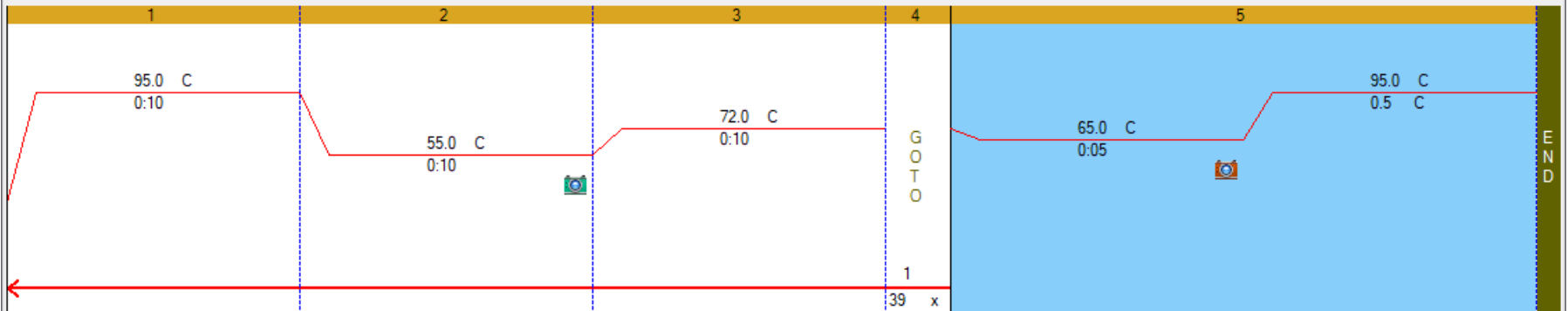
- Зонди підвищують специфічність аналізу
- Не має необхідності в додатковій післяобробці та аналізі кривих плавлення
- Складність підбору зонда
- Широкі можливості мультиплексування



Protocol Editor - New

File Settings Tools

Insert Step After Sample Volume 25 µl Est. Run Time 01:26:00



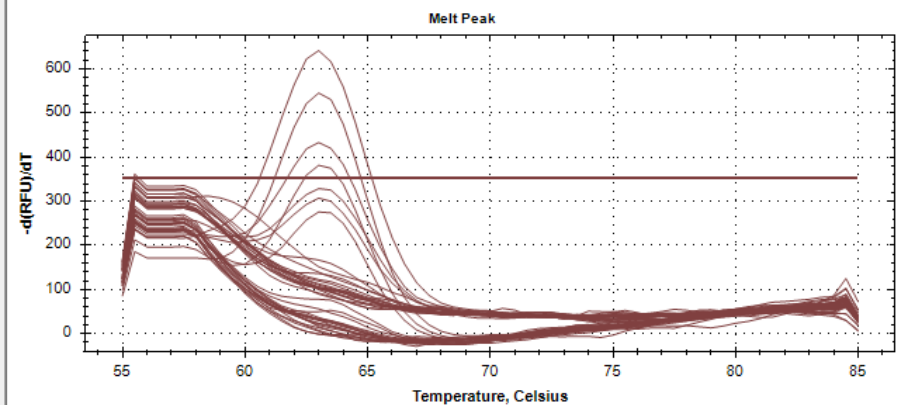
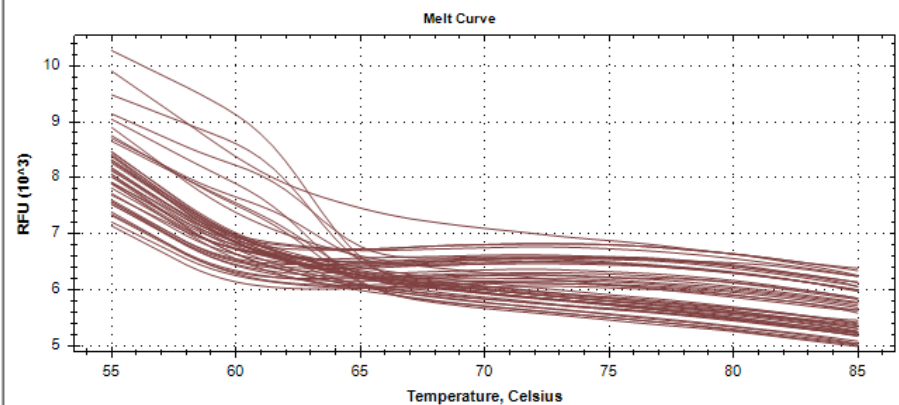
- Insert Step
- Insert Gradient
- Insert GOTO
- Insert Melt Curve
- Add Plate Read to Step
- Step Options
- Delete Step

```
1 95.0 C for 0:10
2 55.0 C for 0:10
+ Plate Read
3 72.0 C for 0:10
4 GOTO 1 , 39 more times
5 Melt Curve 65.0 to 95.0 C, increment 0.5 C,
for 0:05 + Plate Read
END
```

OK

Cancel





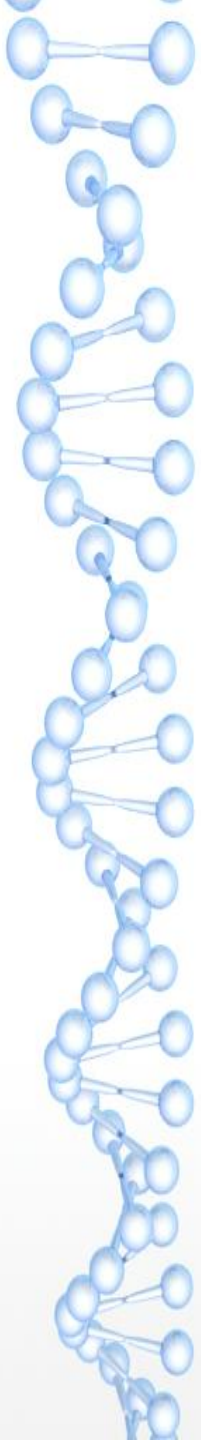
FAM  HEX  Cal Red 610  Quasar 670  Quasar 705

Peak Type: Positive Step Number: 8

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk			
B	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk			
C	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk			
D	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk			
E	Unk	Unk	Unk	Unk	Pos	Pos	Unk	Unk	Pos			
F	Unk	Unk	Unk	Unk	Pos	Pos	Unk	Unk	Pos			
G	Unk	Unk	Unk	Unk	Pos	Pos	Unk	Unk	Pos			
H	Unk	Unk	Unk	Unk	Neg	Neg	Unk	Unk	Neg			

Well	Fluor	Target	Content	Sample	Melt Temp
A01	Quasar 670		Unkn	50092	None
A02	Quasar 670		Unkn	50092	None
A03	Quasar 670		Unkn	53251	None
A04	Quasar 670		Unkn	53251	None
A05	Quasar 670		Unkn	44183	None
A06	Quasar 670		Unkn	44183	None
B01	Quasar 670		Unkn	50367	None
B02	Quasar 670		Unkn	50367	None
B03	Quasar 670		Unkn	53948	None
B04	Quasar 670		Unkn	53948	None
B05	Quasar 670		Unkn	41485	None
B06	Quasar 670		Unkn	41485	None

Completed Scan Mode: All Channels Plate Type: BR White Baseline Setting: Baseline Subtracted Curve Fit



# Як візуалізувати специфічні продукти ампліфікації?

- Використання інтеркалюючих барвників
- **Використання зондів з флуоресцентними мітками**
- Використання флуоресцентно мічених праймерів (рідко)

# Зонд з флуоресцентною міткою

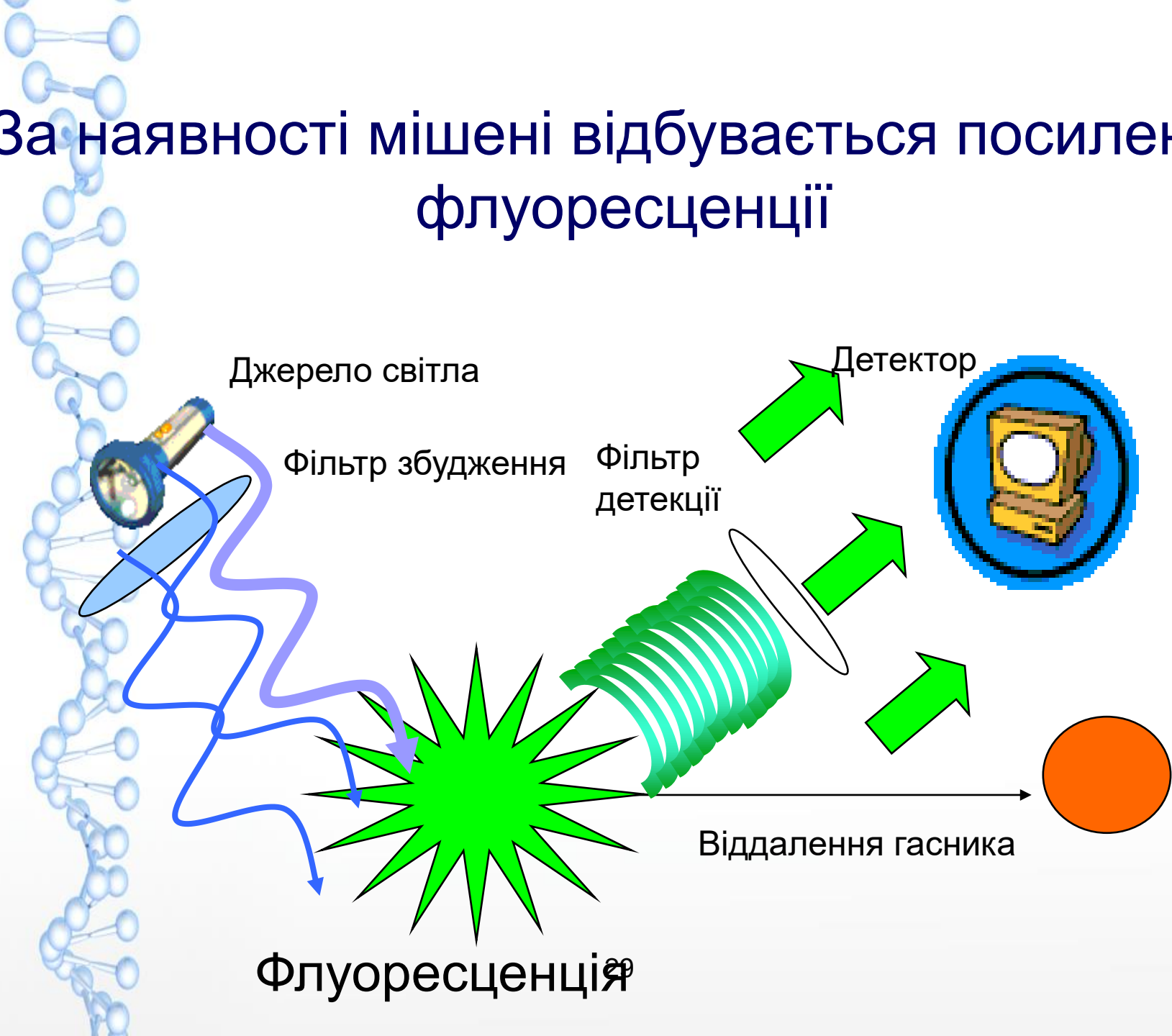


- Комплементарний до середини амплікону
- Є додатковим олігонуклеотидом – тобто, підвищує специфічність
- Кінці зонда заблоковані, він не є затравкою для полімерази
- На одному кінці розташований флуорофор (флуоресцентна мітка), на протилежному – гасник флуоресценції

# За відсутності мішені флуоресценція гаситься



# За наявності мішені відбувається посилення флуоресценції

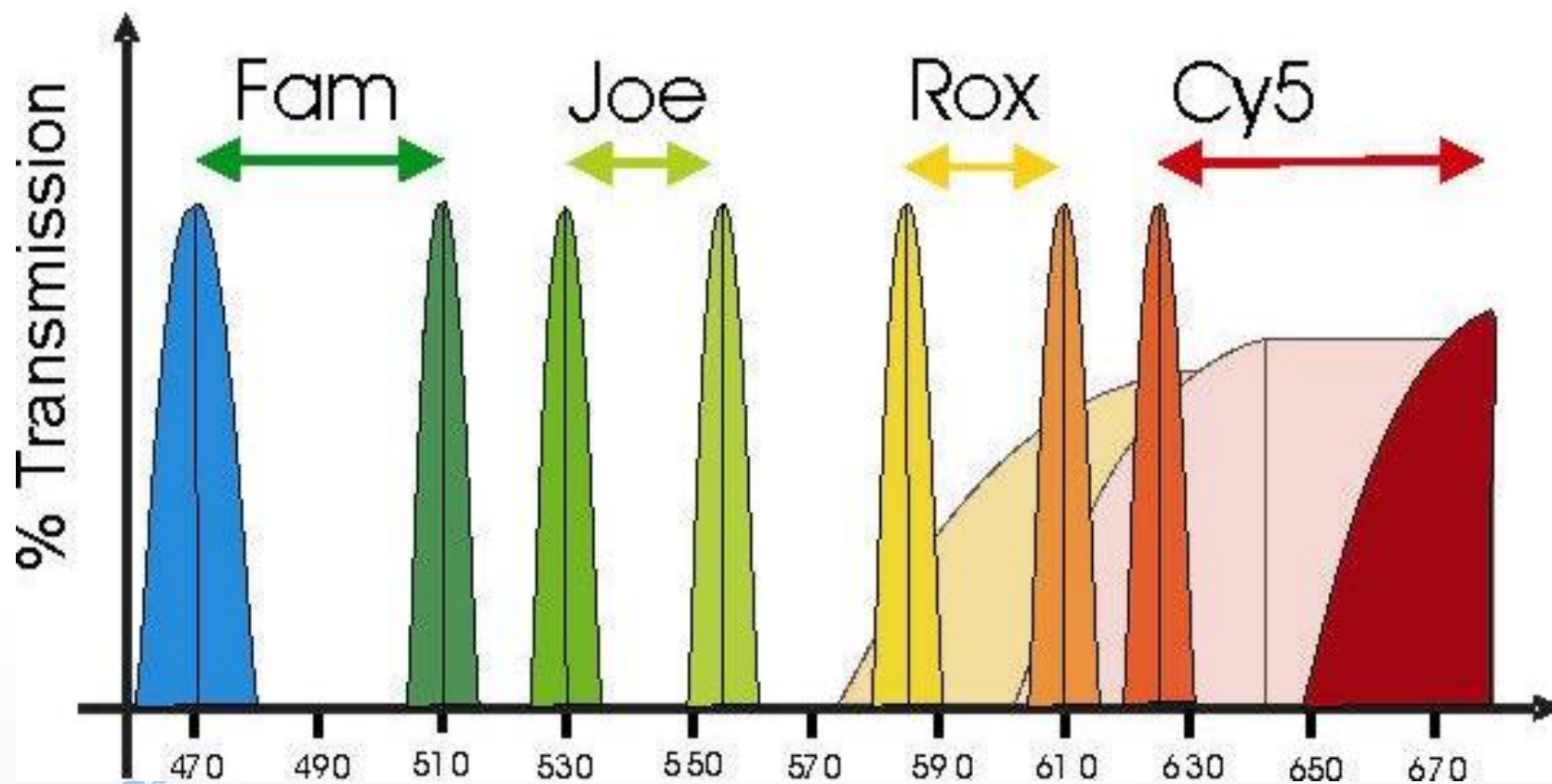


# На чому заснований ефект флуоресценції

Флуоресценції передуює перехід електрона флуорофора в збуджений стан завдяки поглинанню (абсорбції) кванта світла. А випромінювання, що супроводжує зворотній перехід електрона зі збудженого стану в основний, і називається флуоресценцією.

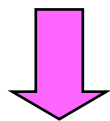


# Широко вживані флуорофори

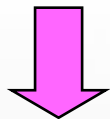


# Стадії ПЛР з гібридизаційно-флуоресцентною детекцією

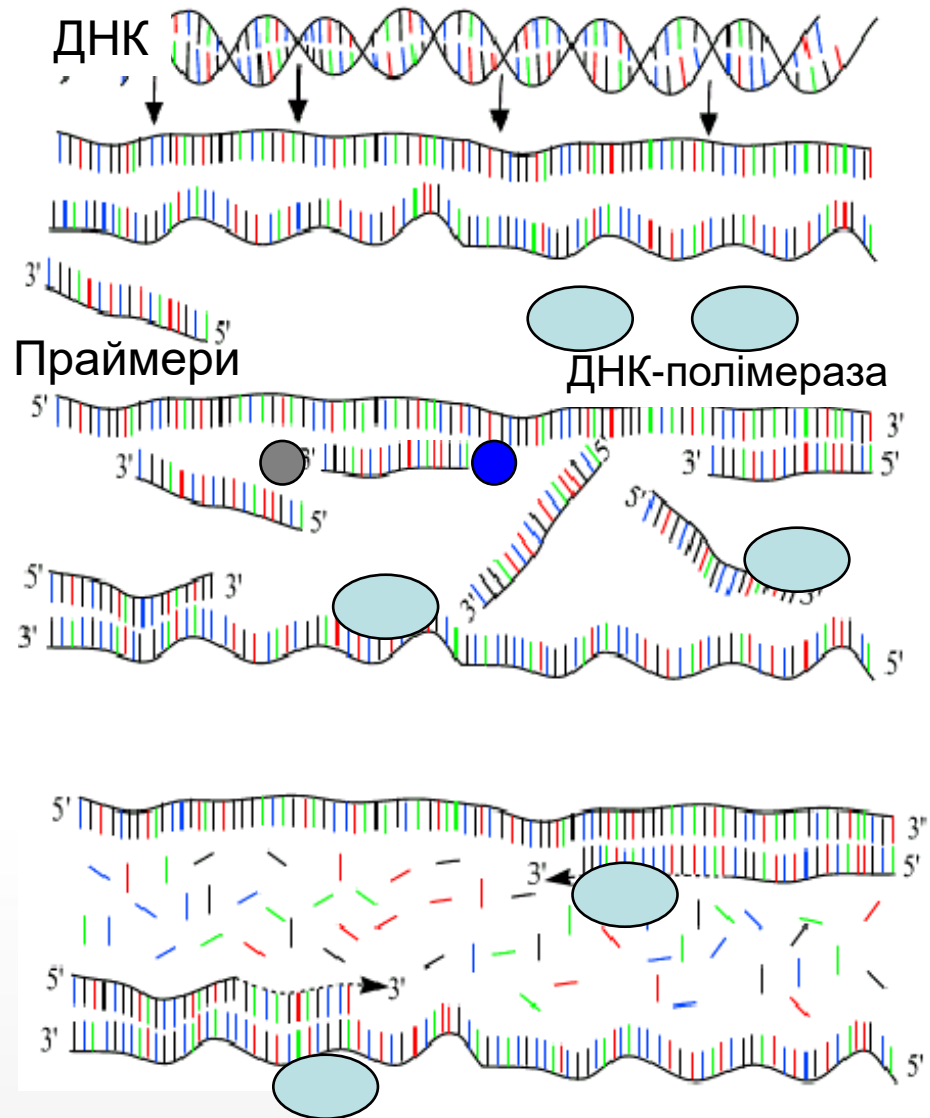
Денатурація ДНК  
(95°C)



Відпалення праймерів  
(55-65°C) + відпалення  
зонда з флуоресцентною  
міткою (або зв'язування  
інтеркалюючого барвника)



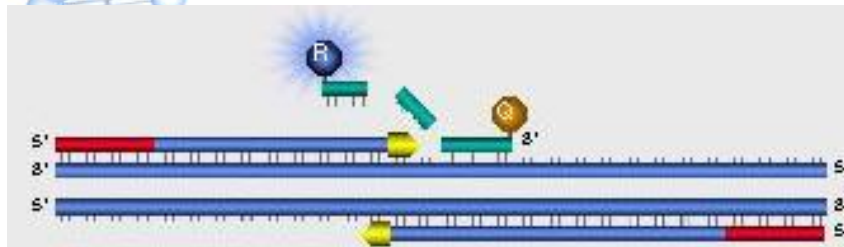
Елонгація (60-72°C)





# Зонд формату «TaqMan®» - вищеплення 5' кінцевої мітки (5'-exonuclease assay)

► - Taq-pol      «R» - мітка  
                  «Q» - гасник



1. Денатурація

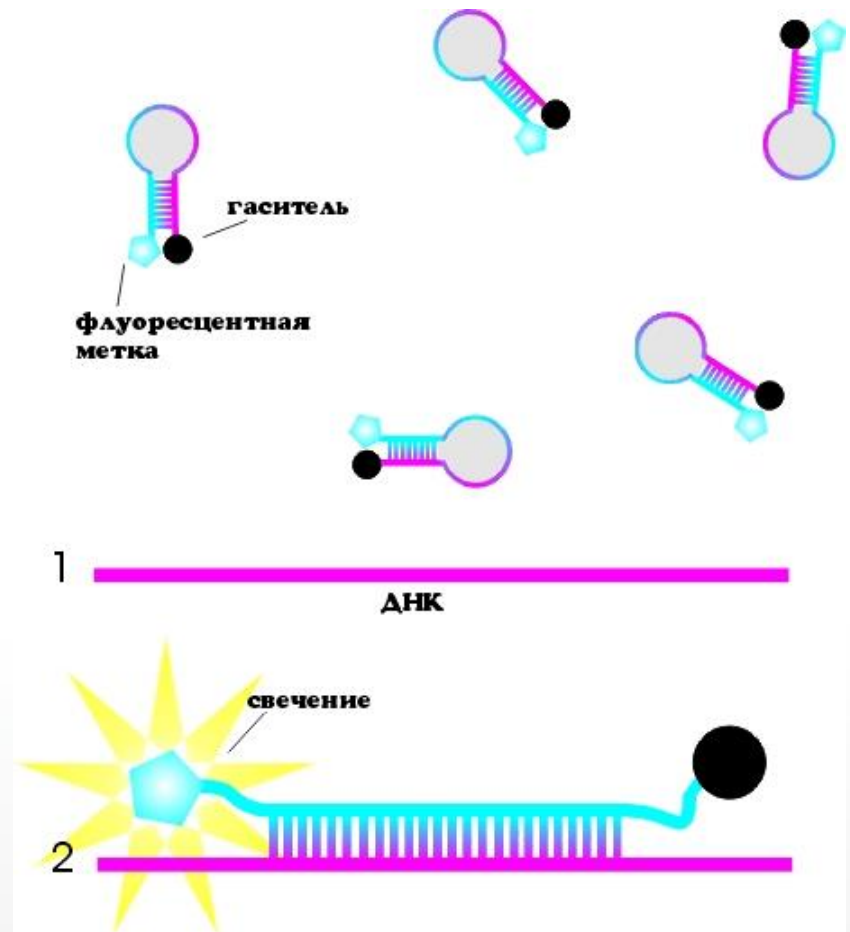
2. Відпалення зонда

3. Елонгація; розщеплення зонда ДНК-полімеразою, вивільнення флуоресцентної мітки

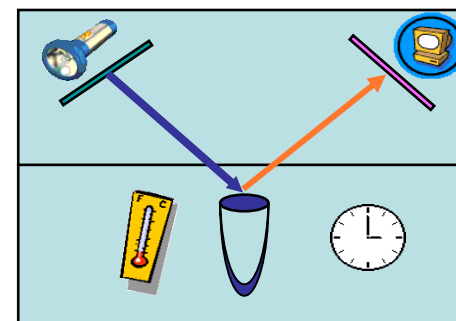
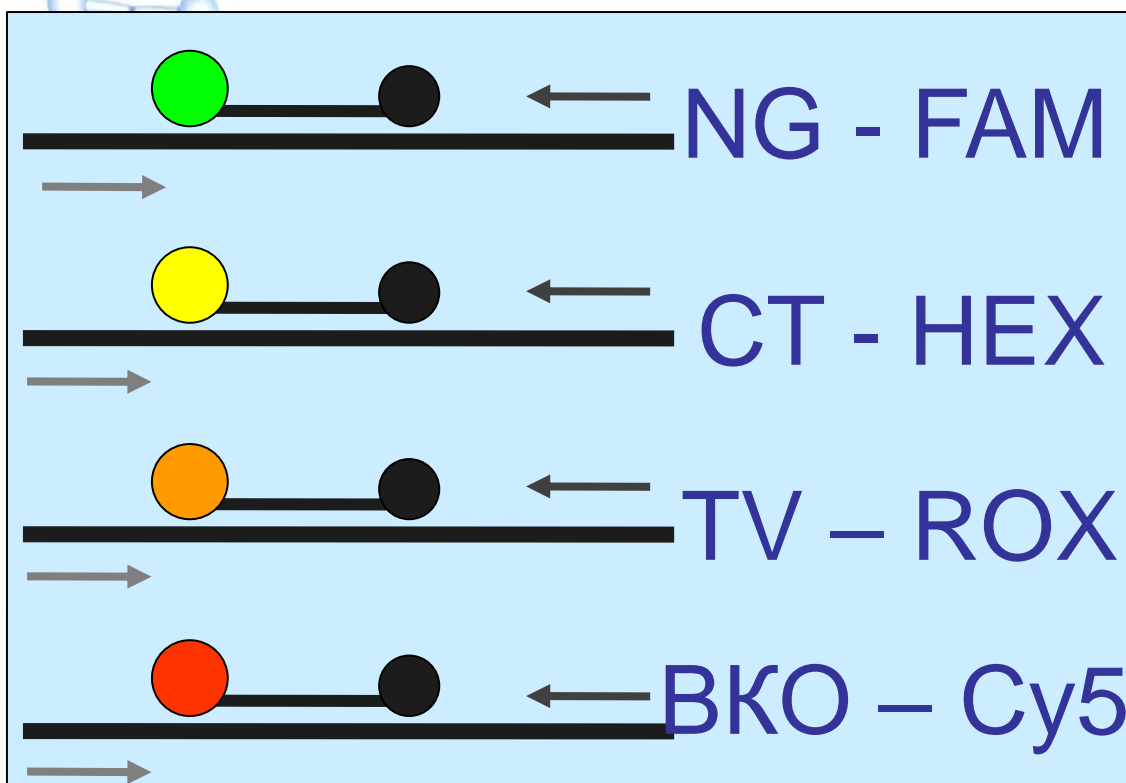
4. Продовження елонгації

# Зонди з комплементарними кінцевими послідовностями («molecular beacons»)

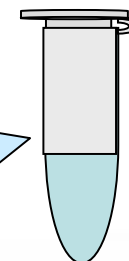
- Наявність комплементарних одна до одної послідовностей призводить до утворення шпильки і гасінню флуоресценції гасником
- Під час відпалення відбувається розходження гасника та флуорофора та оборотне посилення флуоресценції



# Мультипрайм-ПЦР: одновременная амплификация и детекция нескольких генетических мишеней

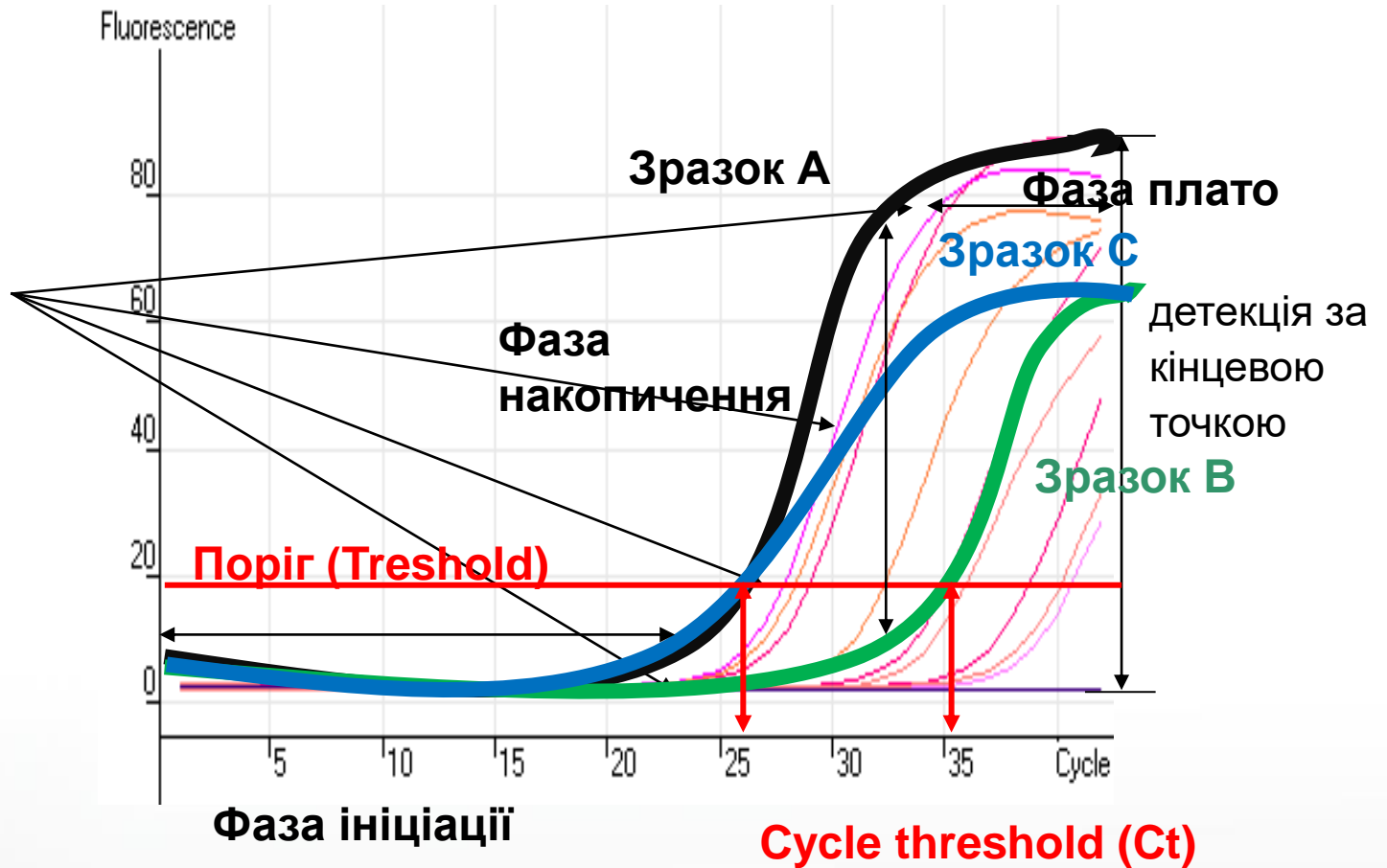


4 канала детекции

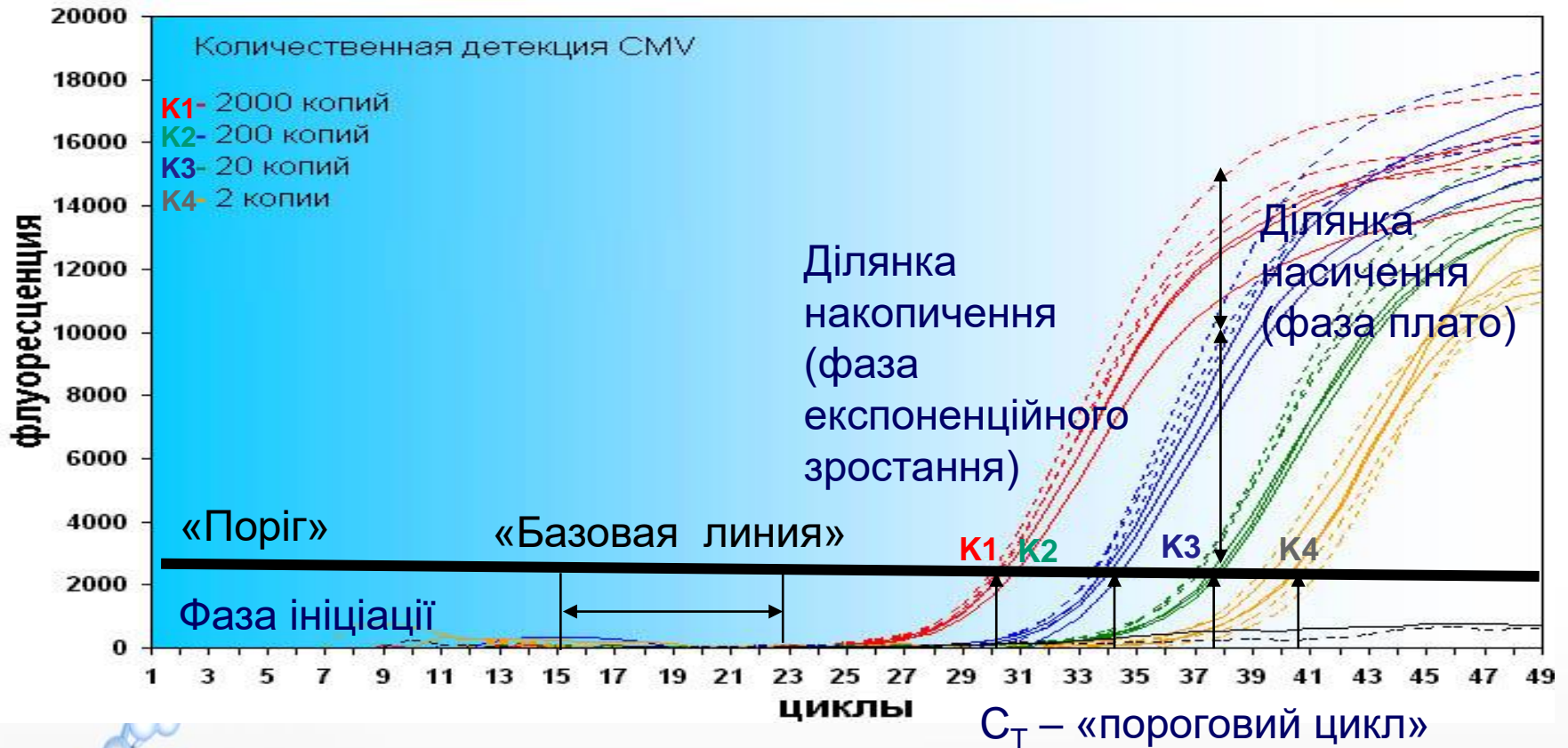


# Кінетика ПЛР. Cycle threshold. Real Time v.s. End point detection

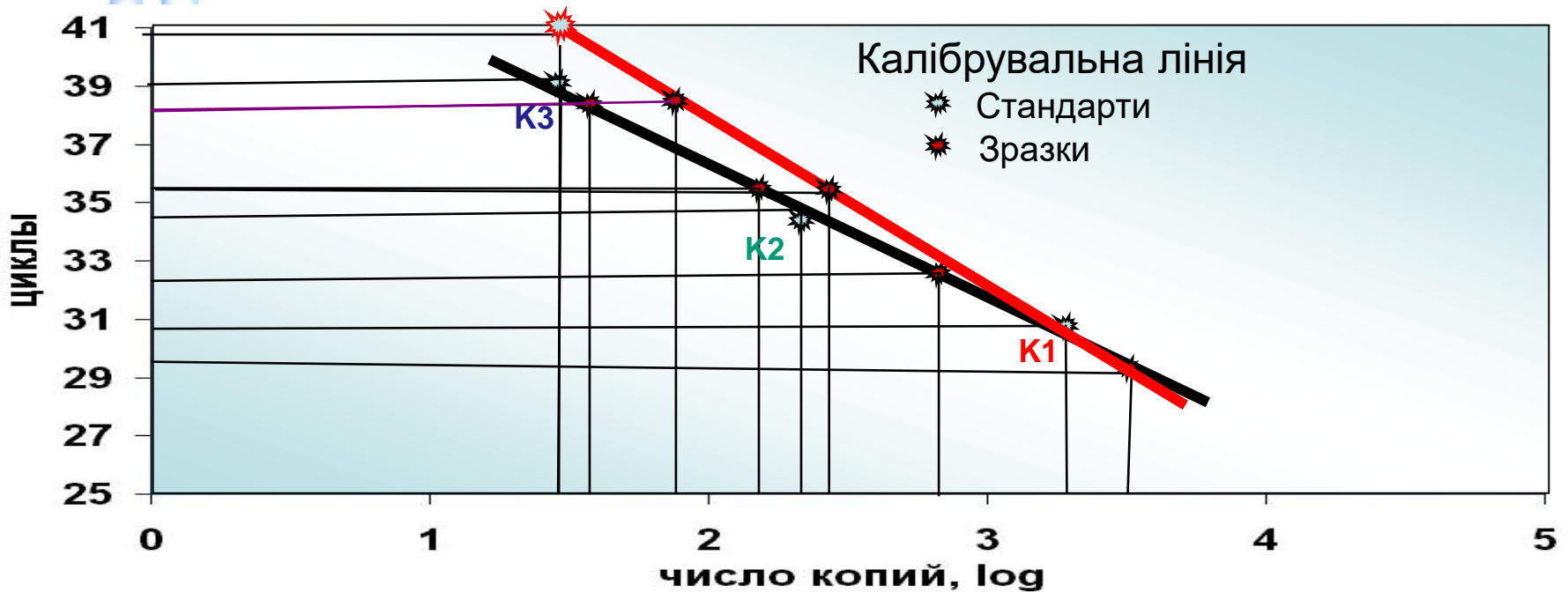
Детекція в режимі реального часу



# Кількісний аналіз Real-time PCR:



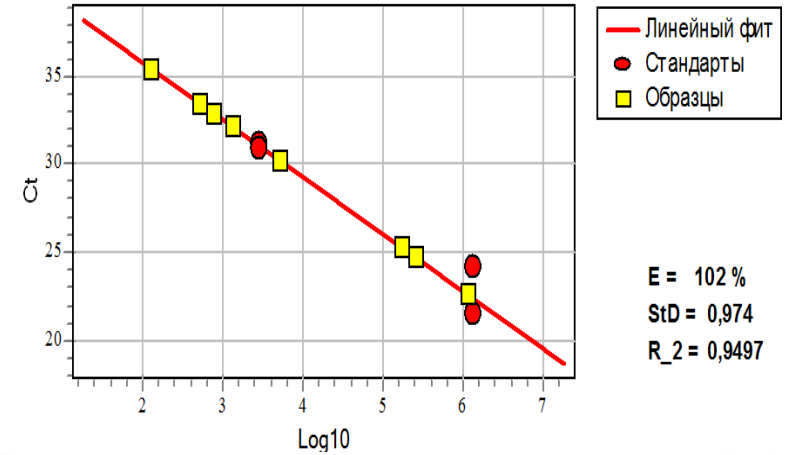
Значення «порогового циклу»  $C_t$   
зворотно пропорційно логарифму  
вихідної концентрації ДНК-мішені





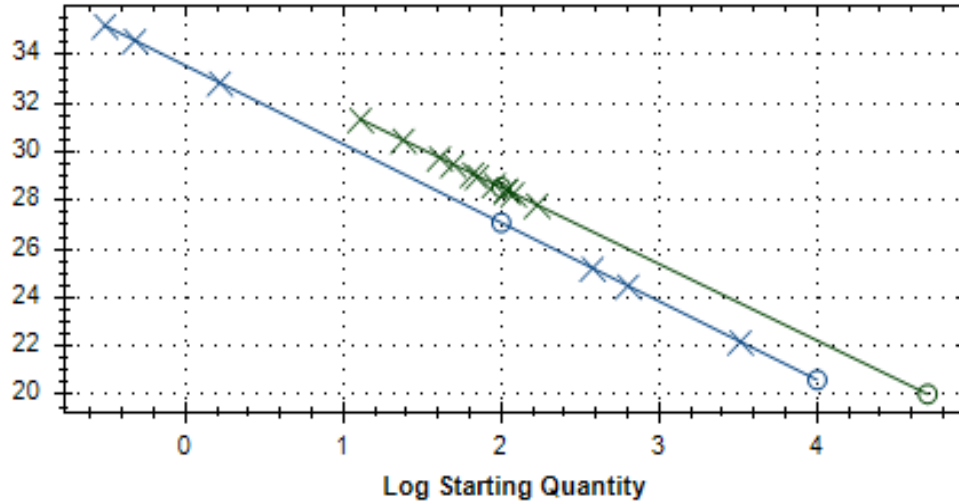
# Деякі параметри для оцінки ефективності ПЛР

$$Y = 42,298 - 3,254 * X$$

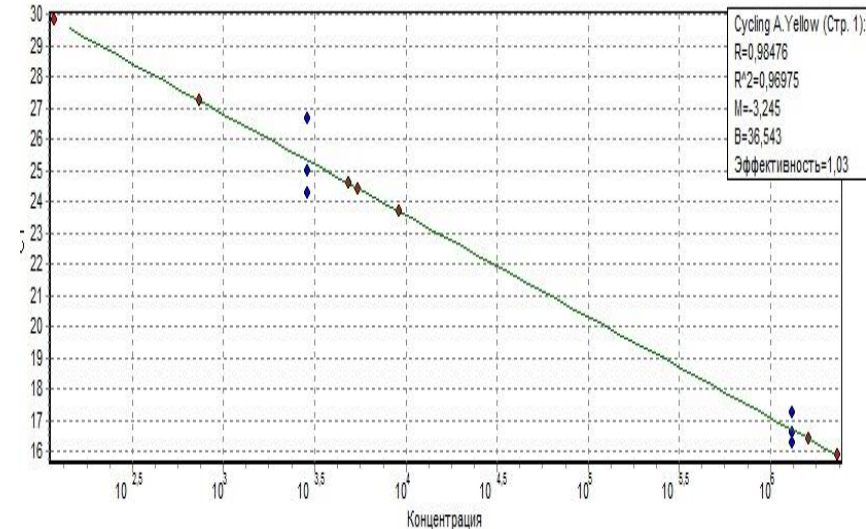


**E = 102 %**  
**StdD = 0,974**  
**R\_2 = 0,9497**

Standard Curve



○	Standard
×	Unknown
— (Blue)	FAM E=103.6% R <sup>2</sup> =1.000 Slope=-3.239 y-int=33.571
— (Green)	HEX E=107.5% R <sup>2</sup> =1.000 Slope=-3.154 y-int=34.850





# Некоторые параметры для оценки эффективности ПЦР

**$R$ ,  $R^2$**  – Correlation coefficient, коэффициент аппроксимации, коэффициент корреляции; показывает, насколько виртуальный калибровочный график соответствует действительности, отражает линейность стандартной кривой. Равен 1 (2 калибратора), стремится к 1 (>2 калибратора). Нормальные значения > 0.95 (0.98) (в идеале >0.99)

**Коэффициент  $B$ ,  $Y$ -intercept** – теоретический предел обнаружения, ожидаемое значение  $C_t$ , определенное для образца с минимальной концентрацией мишени, которую возможно определить данным набором реагентов. Нельзя использовать как прямой метод определения АЧ (обычно определяет теоретический предел детекции в 2-10 молекул НК), но полезен при сравнении АЧ различных наборов.

**Коэффициент  $M$ ,  $Slope$**  (всегда с отрицательным знаком) – тангенс угла наклона калибровочного графика; показывает, за сколько циклов происходит увеличение сигнала флуоресценции (количества ДНК) на порядок. Следовательно,  $1/Slope$  показывает, на сколько порядков изменится количество ДНК за один цикл реакции. Чтобы определить, во сколько раз изменится количество ДНК за один цикл, необходимо 10 возвести в степень  $1/Slope$ . Является мерой эффективности ПЦР. При 100% эффективности ПЦР угол наклона равен -3.32. Хорошая ПЦР реакция должна иметь эффективность 90-110%, что соответствует углу наклона (-3.58) – (-3.10)





# Некоторые параметры для оценки эффективности ПЦР

***E*, Efficiency, Эффективность ПЦР** – это число, показывающее, во сколько раз за один цикл изменится количество фрагментов ДНК. В идеале равна 100% (или 2), что означает удвоение количества ампликонов в каждом цикле ПЦР. Хорошая ПЦР реакция должна иметь эффективность 90-110%, Рассчитывается на основании параметра *Slope*:

$$E = 10^{(-1/Slope) - 1}$$

***Уравнение реакции*** – описывает калибровочный график формулой зависимости значения *Ct* от исходной концентрации образца:  $Y = 42.298 - 3.254 * X$ , где:

*Y* – значение *Ct* образца

**42.298** – коэффициент В (*Y*-intercept)

**- 3.254** – коэффициент М (*Slope*)

*X* – исходная концентрация образца (*lg*)

Т.о.,  $Ct = -3.254 \lg \text{обр} + 42.298$

**$\lg \text{обр} = (Ct - 42.298) / -3.254$ , концентрация, копий/реакции =  $10^{\lg \text{обр}}$**



**Источники  
погрешностей  
ПЦР,  
влияющие на  
точность  
калибровки**

---

Ферменты ОТ (MMIv) и DTT (дитиотрейтол) ингибируют ПЦР

---

Изменение концентрации реакционных компонентов и условий амплификации

---

Структура праймеров для ОТ (специфические праймеры лучше гексамеров)

---

Структура и концентрация РНК-матрицы, вторичные структуры (петли)

---

Праймеры ПЦР могут отжигаться на РНК во время ОТ, образуя неспецифические продукты ПЦР (для one-step ОТ-ПЦР)

---

Межсерийные различия реагентов одного производителя (напр., при смене поставщика сырья)

---

Ошибки лаборантов (напр., погрешности пипетирования) и т.д...

# Приборы для ПЦР-РВ



Rotor-Gene 6000  
Rotor-Gene Q



CFX

**BIO-RAD**



AB 7500



Applied Biosystems®



ДТ-96



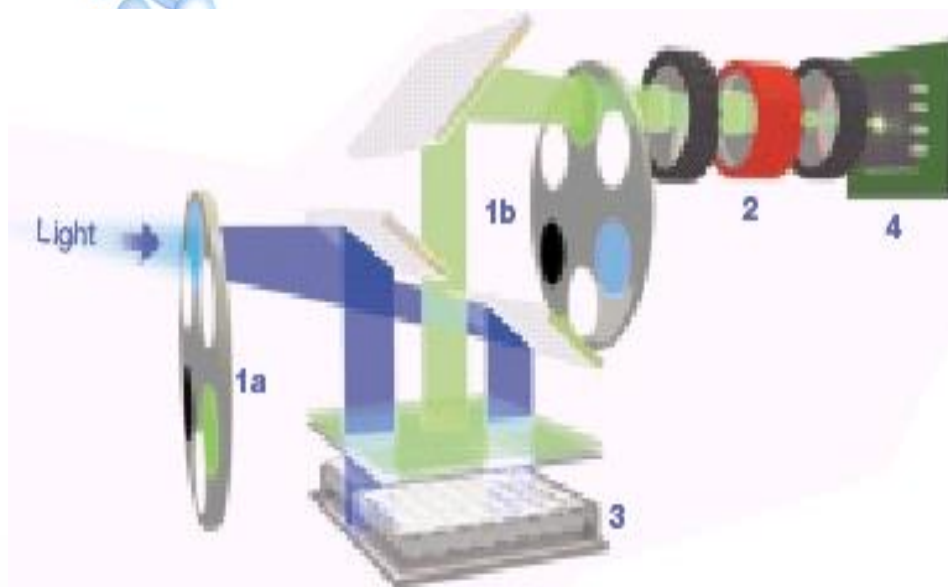
# “iCycler iQ” (“Bio-Rad”, США) Характеристики прибора



- Источник излучения: галогеновая лампа  
– Светофильтры:  
5 пар фильтров – 5 каналов детекции  
(4 для мультиплекса) (490/530нм, 530/575,  
545/585, 575/620, 635/680 нм)
- Детектирующее устройство:  
CCD-камера
- Термоциклирование: элементы Пелтье
- Емкость реакционного модуля: 96-  
луночная плашка или 96 пробирок x 0,2 ml

# “iCycler iQ” (“Bio-Rad”, США)

## Схема устройства оптического модуля



- 1a фильтры возбуждения
- 1b фильтры испускания
- 2 усилитель сигнала
- 3 плашка с образцами
- 4 детектор испускаемого сигнала

# “AB 7500”

(“Life Technologies”, США)

## Характеристики прибора



AB 7500



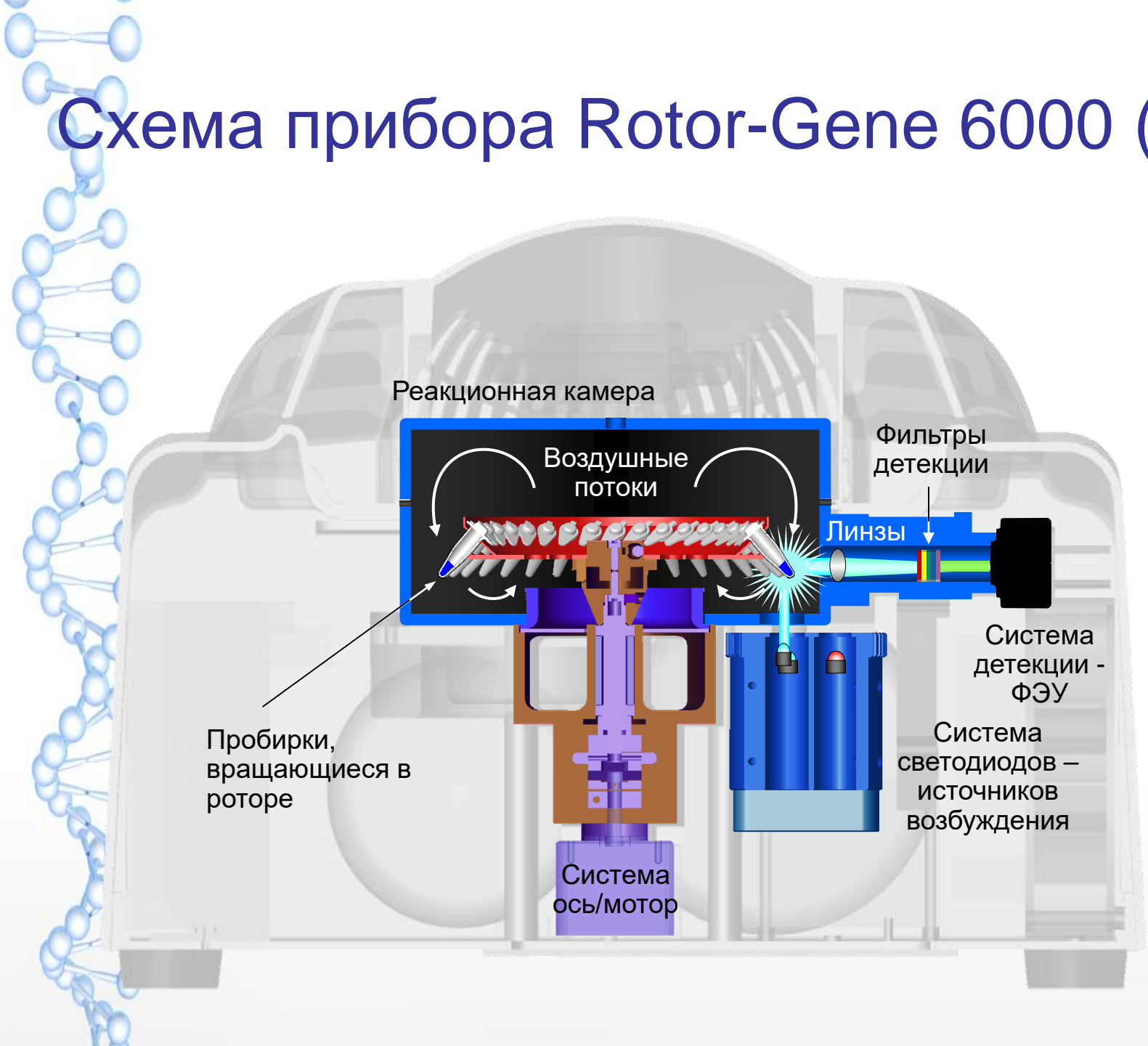
- Источник излучения: галогеновая лампа
- Светофильтры: 4 фильтра – 4 канала для детекции флуоресценции (3 канала для мультиплекса)
- Детектирующее устройство: CCD-камера
- Термоциклирование: элементы Пелтье
- Емкость реакционного модуля: 96-луночная плашка или 96 пробирок x 0,2 ml

# “Rotor-Gene Q (6000)” (“QIAGEN”) Характеристики прибора



- Источники излучения: 6 светодиодов -  
- 6 каналов (365, 470, 530, 585, 620 и 680 нм)
- Детектирующее устройство: ФЭУ
- Детекция флуоресценции: 460, 510нм, 555нм, 610нм, 660нм, 710 high pass – 6 каналов (мультиплекс, HRM, FRET)  
дополнительный канал – для HRM – плавления с высоким разрешением
- Термоциклирование: циркулирующий поток воздуха и никель-хромовый нагрев. элемент
- Емкость реакционного модуля:  
36 пробирок x 0,2ml, 72 пробирки x 0,1 ml

# Схема прибора Rotor-Gene 6000 (Q):





# «Rotor-Gene Q (6000)»

## Дополнительные характеристики



Оригинальная конструкция прибора обеспечивает следующие преимущества:

- ✓ Максимальную точность и воспроизводимость детекции флуоресцентного сигнала (идентичные условия детекции для всех пробирок в модуле)
- ✓ Максимальное единообразие температурного режима во всех пробирках
- ✓ Удобное и гибкое программное обеспечение реализует: оптимальную обработку данных, точность и воспроизводимость результатов
- ✓ Русскоязычный интерфейс программы RG 6000

Оптимальный прибор для Real-time ПЦР  
в диагностической лаборатории

# «Mx3005P» («Agilent Technologies», США) Характеристики прибора



Mx3005P

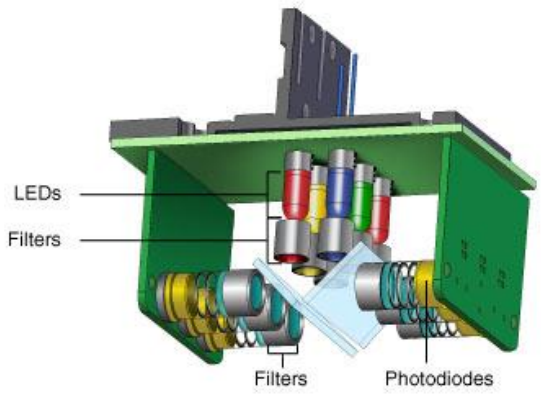
Agilent Technologies

- Источник излучения: галогеновая лампа
- Светофильтры: 4 канала для детекции флуоресценции (8 пар заменяемых фильтров Fam 492/516 нм, Joe 535/555, Rox 585/610, Cy5 635/665, TET, Cy3, Alexa )
- Детектирующее устройство: ФЭУ
- Сканирующий световод
- Термоциклирование: элементы Пелтье
- Емкость реакционного модуля: 96-луночная плашка или 96 пробирок x 0,2ml с прозрачной крышкой

# «CFX» («Bio-Rad», США): устройство прибора



- Источник излучения: светодиоды
- 5 каналов детекции: FAM / HEX (VIC) / ROX / Cy5 (Quasar-670) / Quasar-705
- Детектирующее устройство:  
фотодиоды с фильтрами в составе сканирующего оптического «челнока»
- Термоциклирование: элементы Пелтье
- Емкость реакционного модуля:  
96-луночная плашка или 96 пробирок x 0,2 ml





# LineGene 9600 (BIOER, КНР)

## Характеристики прибора




Источник излучения:

Светофильтры: 5 каналов детекции (FAM (470-525 нм), HEX (523-584 нм), ROX (571-612 нм), Cy5 (628-692 нм), Cy5,5 (678-718 нм))

Детектирующее устройство: ФЭУ

Термоциклирование: элементы Пелтье

Емкость реакционного модуля: 96-луночная плашка или 96 пробирок x 0,2 ml



*Детекция через дно пробирок (то есть можно использовать любой прозрачный пластик)*

# LineGene9600



[http://www.bioer.com.cn/bioer/bioer\\_en](http://www.bioer.com.cn/bioer/bioer_en)

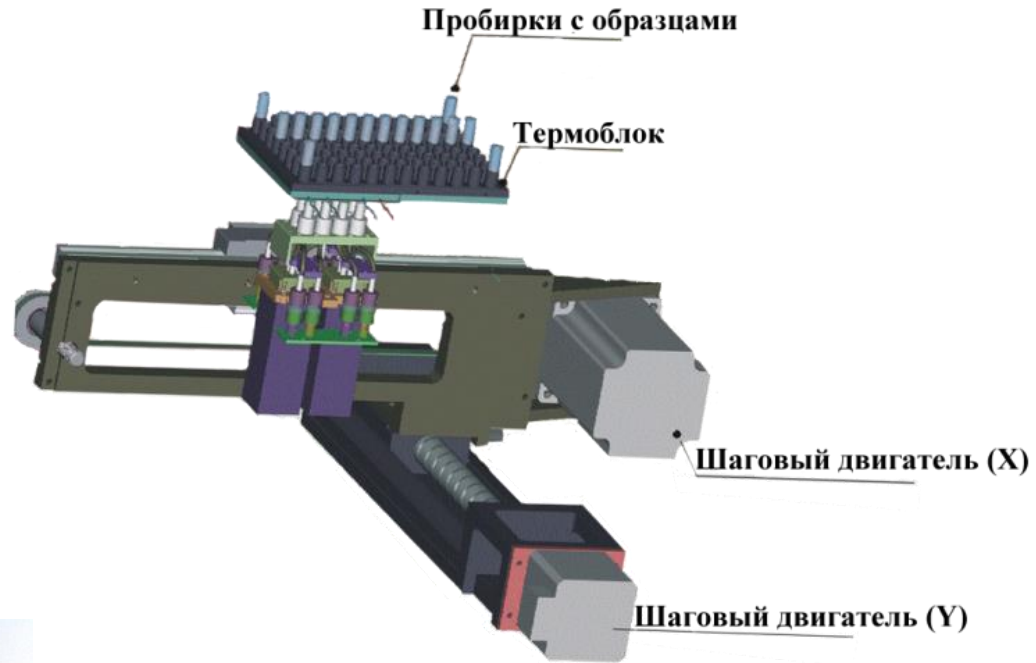
Габариты - 43 x 40 x 35 (28 кг)

- Планшетный блок на 96 реакций
- Элементы Пельтье компании Ferrotec
- Температурный градиент до 36°C
- 5 каналов флуоресцентной детекции



# Система детекции

Детекция осуществляется  
через дно пробирок!



Полное сканирование плашки (5  
каналов) 2 прогона - за 14 секунд

# «DT-96»

(«ДНК-Технология», Россия)



- Источник излучения: светодиоды
- Светофильтры: 5 каналов для детекции флуоресценции
- Детектирующее устройство: CCD-камера
- Термоциклирование: элементы Пелтье
- Емкость реакционного модуля: 96 пробирок x 0,2ml с прозрачной крышкой

# ПЦР-диагностика РНК-содержащих вирусов

**Выделение  
РНК**

100 РНК

Обратная транскрипция

**Эффективность  
от 1 до 50 %**

**кДНК**

от 1 до 50 кДНК

**Аmplификация**

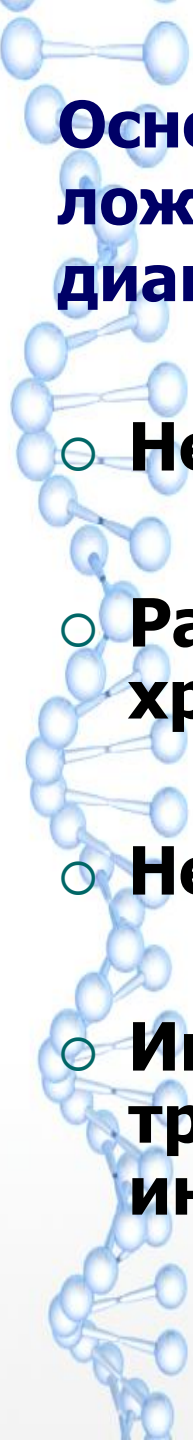
**Чувствительность – 3 копии/реакцию  
(19 «+» результатов из 20 ПЦР)**





## **Форматы реакции обратной транскрипции (ОТ)**

- **Отдельная реакция со случайными затравками (Random-hexanucleotides)**
- **Отдельная реакция со специфическим праймером, сдвинутым вправо**
- **Совмещенная с ПЦР реакция с использованием одной пары праймеров**



## **Основные причины ложноотрицательных результатов при диагностике РНК-содержащих вирусов**

- **Неэффективное выделение РНК**
- **Разрушение РНК в процессе экстракции и хранения**
- **Неэффективная обратная транскрипция**
- **Ингибирование ПЦР реагентами обратной транскрипции (DDT, MMLV) – разведение ингибиторов**



## **Рибонуклеазы (РНК-азы) – ферменты дегградации РНК**

- Чрезвычайно стабильны в окружающей среде.**
- Выдерживают длительное кипячение.**
- Основной источник рибонуклеаз - кожные покровы, частицы пыли.**