



World Health
Organization

Ukraine

ПЛР в діагностиці холери та інфекцій з водним шляхом передачі

Лора Чернишова,
Офіцер з лабораторій
Бюро ВОЗ в Україні,
chernyshoval@who.int
+38-063-639-56-65

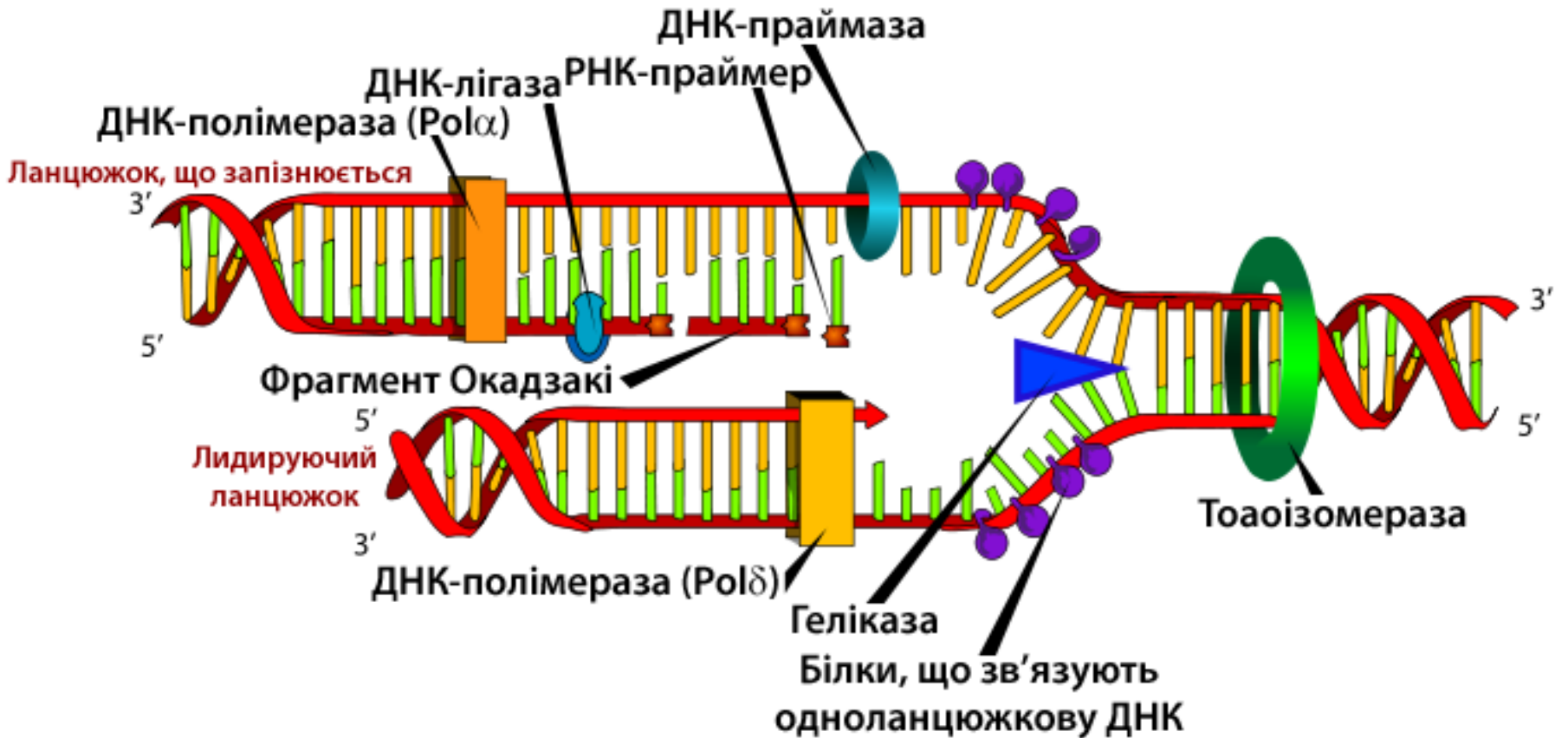


**World Health
Organization**

Ukraine

День 1. Полімеразна ланцюгова реакція

Механізм реплікації ДНК в клітині

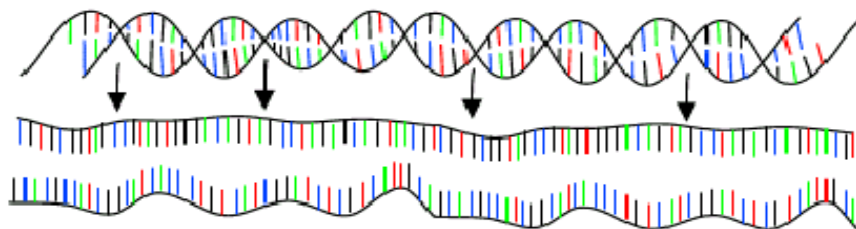


Реплікація ДНК у клітині – прообраз полімеразної ланцюгової реакції.

Полімеразна ланцюгова реакція досить точно повторює принципи реплікації ДНК в клітині. ПЛР являє собою тріступеневий процес (цикл), який повторюється задану кількість разів

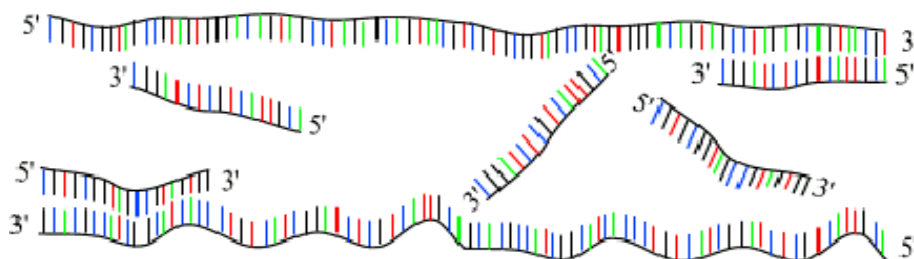
Кроки ПЛР

Денатурація
ДНК
(95°C)



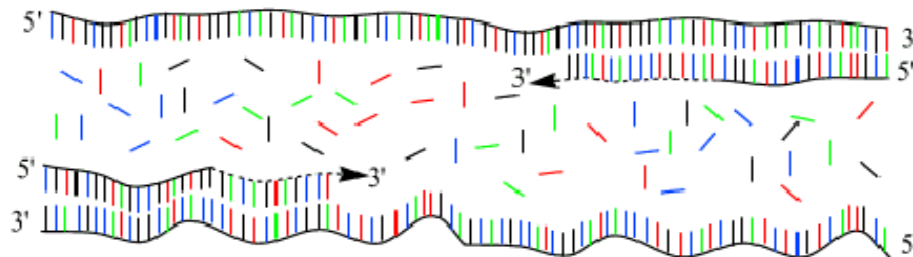
95°C

Відпалення
праймерів
(55-65°C)



60°C

Елонгація
ланцюгів ДНК
(72°C)



72°C

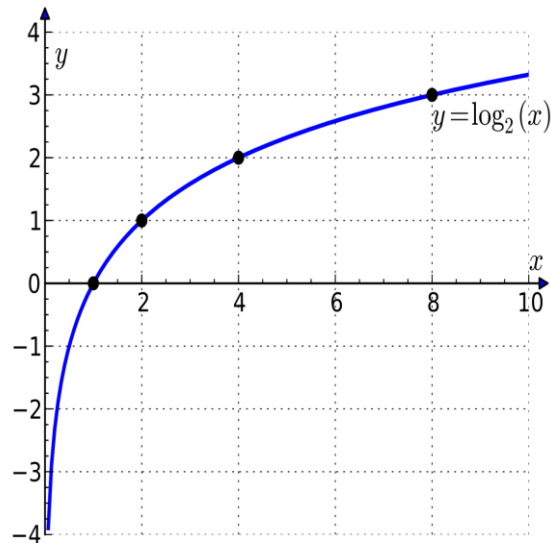
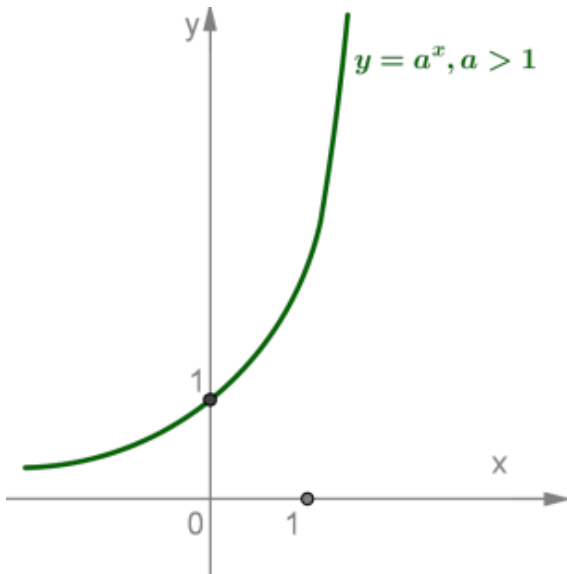
Відео 1

[Знайшла тут](#)

Питання 1

• Виходячи з усіх наших знань про ПЛР, як ви вважаєте який характер збільшення кількості ампліфікованих фрагментів?

- Лінійний
- Логарифмічний
- Експоненційний



Питання 2

Припустимо, що спочатку в розчині є 5 молекул (дволанцюгових) ДНК-матриці для ПЛР. Розрахуйте, скільки в розчині буде молекул ДНК заданого розміру, обмежених праймерами, після 10 циклів. Для цього можна скористатися формулою:

$$N = k * (2^n) * k$$

де **N** – кінцева кількість молекул заданого розміру

k – кількість одноланцюгових молекул ДНК-матриці

n – число циклів ПЛР

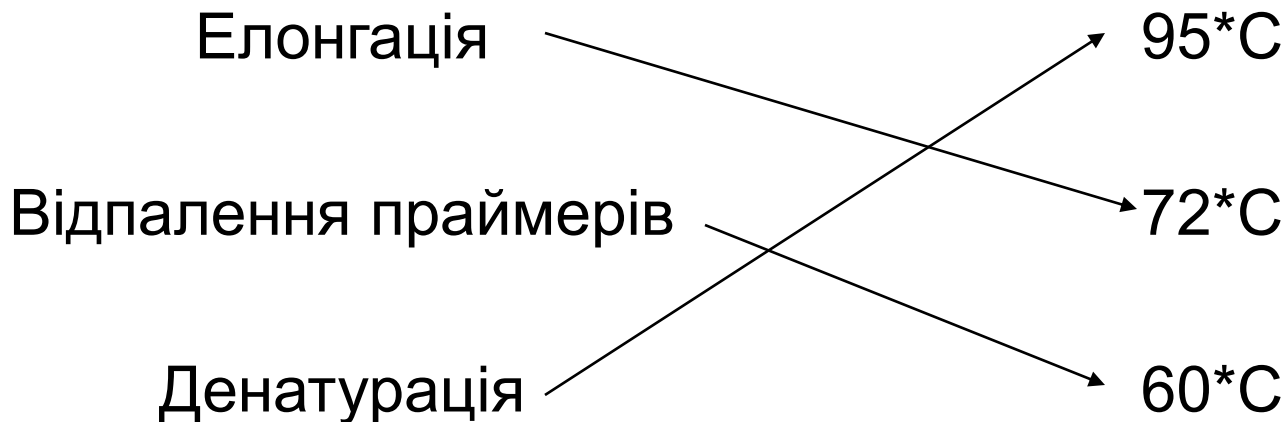
(Відповідь: 10130)

Питання 3

Співвіднесіть етап полімеразної ланцюгової реакції та температуру, при якій він відбувається.

* Температура відпалення праймерів залежить від праймерів, тому число в одному з варіантів відповіді умовне

** Вважайте, що використовується Taq-полімераза



Питання 4

Для постановки полімеразної ланцюгової реакції необхідний певний набір реагентів. Серед запропонованих варіантів виберіть лише ті компоненти, які потрібні для постановки реакції.

- Дезоксирибонуклеозидтрифосфати (ДНТФ)
- ДНК-матриця для ПЛР
- Протеїназа K
- ДНКаза
- X-gal
- Амінокислоти
- Реакційний буфер
- F-праймер
- Полімераза
- R-праймер
- Топоізомераза
- РНКаза А

Дизайн праймерів

1. Відповідність послідовності (специфічність)
2. Довжина 17-35 нуклеотидів
3. Температура плавлення 55-75*С
4. Різниця у температурі плавлення між праймерами не більше 5*С
5. GC-склад - 40-60%
6. Наявність 1-2 G\C (але не більше 3) на 3'-кінці
7. Відсутність шпильок
8. Відсутність спарювання з іншими праймерами
9. Відсутність гомополімерів
10. Концентрація

Дизайн праймерів

1. Відповідність послідовності (специфічність) – праймер повинен повністю відповідати таргетній послідовності, яку він фланкує

Як підібрати праймер?

1. Заходимо до бази даних

- *BLAST*
- *HIV LANL* (ВІЛ)
- *EMBL* (Європа)
- *DDBJ* (Японія)
- *GenBank* (США)
- *SWISS-PROT*
- *PIR* та ін.

2. Знаходимо консервативний фрагмент

3. Підбираємо праймер (наприклад, за допомогою *BioEdit*). Вуаля!

Питання 5

Підберіть праймери довжиною 20 нуклеотидів до зазначеної послідовності і запишіть їх через пробіл.

**5'-CCCTGACTTTCAACTCTGTCTCCTTCCTCTTCCTACAGTACTCCCC
TGCCCTCAACAAGATGTTTTGCCAACTGGCCAAGACCTGCCCTGTGCAGCTGTGGGTTG
ATTCCACACCCCCGCCCGGCACCCGCGTCCACGCCATGGCCATCTACAAGCAGTCACAGC
ACATGACGGAGGTTGTGAGGCGCTGCCCCACCATGAGCGCTGCTCAGATAGCGATGGT
GAGCAGCTGGGGCTGGAGAGACGACAGGGCTGGTTGCCAGGGTCCCCAGGCCTCTG
ATTCCTCACTGATTGCTCTTAGGTCTGGCCCCTCCTCAGCATCTTATCCGAGTGGAAGGAA
ATTTGCGTGTGGAGTATTTGGATGACAGAAACACTTTTCGACATAGTGTGGTGGTGCCCT
ATGAGCCGCCTGAGGTCTGGTTTGCAACTGGGGT-3'**

Результат має виглядати приблизно так:

ATCGATCGATCGATCGATCG ACGTACGTACGTACGTACGT

- * Пам'ятайте, що нуклеотидні послідовності записуються від 5' до 3' кінця
- ** Послідовність має бути ампліфікована цілком, тому праймери треба підбирати до кінців представленого фрагмента ДНК

А якщо ми помилились? Домашнє завдання №1



The Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan HCV Test, Version 2.0, Real-Time PCR Assay Accurately Quantifies Hepatitis C Virus Genotype 4 RNA

Stéphane Chevaliez,^{a,b} Magali Bouvier-Alias,^{a,b} Christophe Rodriguez,^{a,b} Alexandre Soulier,^{a,b} Jean-Dominique Poveda,^c Jean-Michel Pawlotsky^{a,b}

National Reference Center for Viral Hepatitis B, C, and Delta, Department of Virology, Hôpital Henri Mondor, Université Paris-Est, Créteil, France^a; INSERM U955, Créteil, France^b; Laboratoire Cerba, Cergy-Pontoise, France^c

Accurate hepatitis C virus (HCV) RNA quantification is mandatory for the management of chronic hepatitis C therapy. The first-generation Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan HCV test (CAP/CTM HCV) underestimated HCV RNA levels by $> 1\text{-log}_{10}$ international units/ml in a number of patients infected with HCV genotype 4 and occasionally failed to detect it. The aim of this study was to evaluate the ability of the Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan HCV test, version 2.0 (CAP/CTM HCV v2.0), to accurately quantify HCV RNA in a large series of patients infected with different subtypes of HCV genotype 4. Group A comprised 122 patients with chronic HCV genotype 4 infection, and group B comprised 4 patients with HCV genotype 4 in whom HCV RNA was undetectable using the CAP/CTM HCV. Each specimen was tested with the third-generation branched DNA (bDNA) assay, CAP/CTM HCV, and CAP/CTM HCV v2.0. The HCV RNA level was lower in CAP/CTM HCV than in bDNA in 76.2% of cases, regardless of the HCV genotype 4 subtype. In contrast, the correlation between bDNA and CAP/CTM HCV v2.0 values was excellent. CAP/CTM HCV v2.0 accurately quantified HCV RNA levels in the presence of an A-to-T substitution at position 165 alone or combined with a G-to-A substitution at position 145 of the 5' untranslated region of HCV genome. In conclusion, CAP/CTM HCV v2.0 accurately quantifies HCV RNA in genotype 4 clinical specimens, regardless of the subtype, and can be confidently used in clinical trials and clinical practice with this genotype.

Дизайн праймерів

1. Відповідність послідовності (специфічність)
2. Довжина 17-35 нуклеотидів

Дизайн праймерів

1. Відповідність послідовності (специфічність)
2. Довжина 17-35 нуклеотидів
3. Температура плавлення 55-75*С
4. Різниця у температурі плавлення між праймерами не більше 5*С

Температура плавлення (T_m) – температура, при якій 50% праймерів у розчині будуть у двонитковому стані (тобто, відпалилися на матричний ланцюг ДНК), а 50% праймерів – в одонитковому стані.

T_m залежить від GC-складу праймера

$$t \text{ плавлення} = (G+C)*4 + (A+T)*2$$

Питання 6

Розрахуйте температуру плавлення даного праймера за формулою

$$t \text{ плавлення} = (G+C)*4 + (A+T)*2$$

5'-АСТАТСАТГСТАГСАТГСТТТСГ-3'

*(Відповідь: 66*С)*

Домашнє завдання №2

Є й інші методи розрахувати температуру плавлення праймера. На цей раз скористаємося однією з найвідоміших програм для підбору праймерів - Primer3plus).

Розрахуйте з її допомогою температуру плавлення праймера

5' АСТАТСАТГСТАГСАТГСТТТСГ 3'

Для цього в випадаючому меню Task необхідно вибрати *Primer_check*, в рядок (*Primer to test*) вставити послідовність нашого праймера та натиснути на зелену кнопку *Check Primer*. Серед інших параметрів праймера знайдіть *Tm* і це буде відповіддю на дане завдання

Primer3Plus
pick primers from a DNA sequence

[Primer3Manager](#) [Help](#)
[About](#) [Source Code](#)

Task Primer_Check ▾ *Evaluate a primer of known sequence with the given settings.* Check Primer Reset Form

Main Settings **Advanced Settings** Internal Oligo Penalty Weights Sequence Quality

Sequence Primer_Check

Primer to test:



Primer3Plus
pick primers from a DNA sequence

[Primer3Manager](#) [Help](#)
[About](#) [Source Code](#)

Left primer is unacceptable: High self complementarity/High end self complementarity

< Back

Oligo:

Sequence:

Length: 23 bp
Tm: 60.8 °C
GC: 43.5 %
ANY: 12.0
SELF: 6.0
3' Stability: 9.0 ΔG

Send to Primer3Manager Reset Form

Дизайн праймерів

1. Відповідність послідовності (специфічність)
2. Довжина 17-35 нуклеотидів
3. Температура плавлення 55-75*С
4. Різниця у температурі плавлення між праймерами не більше 5*С
5. GC-склад - 40-60% (або GC: AT = 1:1)

(G+C) \ загальна кількість нуклеотидів

Питання №8

Розрахуйте GC-склад праймера та запишіть відповідь у відсотках.

5' АСТГГАААСТАГСТАГСТАС 3'

Домашнє завдання №3

Маючи послідовності праймерів та матричної ДНК, можна передбачити, які фрагменти у нас вийдуть. Для цього скористаємося ресурсом

UCSC Genome Bioinformatics site -> tools -> in silico PCR

Використовуючи представлену пару праймерів, визначте розмір ПЛР-фрагменту:

F_primer: СТТСССАГГАСГГТГАСА

R_primer: СТСССААСАТТГСАТТССТА

У випадяючому меню *Genome* виберіть *Cat* і в меню *Assembly* останню збірку геному (за листопад 2017). У рядки *Forward primer* та *Reverse primer* вставте послідовності F- та R-праймера відповідно. Інші параметри залиште за замовчуванням.

Наведіть розмір отриманого фрагмента в парах нуклеотидів (наприклад: 150)

Домашнє завдання №3

UNIVERSITY OF CALIFORNIA SANTA CRUZ Genomics Institute UCSC Genome Browser

Genomes Genome Browser Tools Mirrors Downloads My Data Projects Help About Us

Tools

- Blat
- In-Silico PCR**
- Table Browser
- LiftOver
- Gene Sorter
- Variant Annotation Integrator
- Data Integrator
- Genome Graphs
- Gene Interactions
- Other Tools

tools

- ome Browser actively visualize genomic data
- VID-19 Research the SARS-CoV-2 genome browser and explore coronavirus datasets
- IT
- ly align sequences to the genome
- le Browser
- load data from the Genome Browser database
- ant Annotation Integrator
- unctional effect predictions for variant calls
- a Integrator
- combine data sources from the Genome Browser database
- Genome Browser in a Box (GBIB) run the Genome Browser on your laptop or server
- In-Silico PCR rapidly align PCR primer pairs to the genome
- LiftOver convert genome coordinates between assemblies



UCSC In-Silico PCR

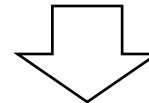
Genome: **Human** Assembly: Dec. 2013 (GRCh38/hg38) Target: genome assembly

Forward Primer: Reverse Primer: submit

Min Perfect Match: 15 Min Good Match: 15 Flip Reverse Primer:

Output

When successful, the search returns a sequence output file in fasta format containing all sequence in the database that lie between and include the primer pair. The fasta header



UCSC In-Silico PCR

>chrE1:2550949-2551155 207bp CTTCCCAGGACGGTGACA CTCCAACATTGCATTCTCA
 CTTCCCAGGACGGTGACA cgtcccctgaggttcgggtaagctcctgcct
 gagccagatgagtcctcctctgagtcaccggctcttggctccgtgatttt
 cagcttgggagaattgtggggtctggggatggggcactggggacttagcg
 atttgggggaatggacgcttggtgacggcaccgacaTAGGAATGCAATG
 TTGGGAG

Primer Melting Temperatures

Forward: 60.7 C cttcccaggacggtgaca
 Reverse: 58.6 C ctccaacattgcattctca

The temperature calculations are done assuming 50 mM salt and 50 nM annealing oligo concentration. The code to calculate the melting temp comes from [Primer3](#).

Help

[What is chr_alt & chr_fix?](#)
[Replicating in-Silico PCR results on local machine](#)

Дизайн праймерів

1. Відповідність послідовності (специфічність)
2. Довжина 17-35 нуклеотидів
3. Температура плавлення 55-75*С
4. Різниця у температурі плавлення між праймерами не більше 5*С
5. GC-склад - 40-60%
6. Наявність 1-2 G\C (але не більше 3) на 3'-кінці (3'-clamp)

Питання №9

Forward:

20 нуклеотидів

G\C склад — 50%

Tm - 60°C

Revers:

20 нуклеотидів

G\C склад — 25%

Tm - 40°C

Що можна зробити?

1. Подовжити реверс-праймер
2. Перенести місце відпалення реверс-праймера в більш G\C-багату ділянку геному

Дизайн праймерів


1. Відповідність послідовності (специфічність)
2. Довжина 17-35 нуклеотидів
3. Температура плавлення 55-75*С
4. Різниця у температурі плавлення між праймерами не більше 5*С
5. GC-склад - 40-60%
6. Наявність 1-2 G\C (але не більше 3) на 3'-кінці
7. Відсутність шпильок

Шпилька - вторинна структура ДНК\РНК, що виникає за рахунок комплементарної взаємодії в межах одного ланцюга ДНК
Заважає посадці праймера на ДНК-мішень

AC**TTTTT**G**AAAAA**GCAGTAC

Дизайн праймерів

1. Відповідність послідовності (специфічність)
2. Довжина 17-35 нуклеотидів
3. Температура плавлення 55-75*С
4. Різниця у температурі плавлення між праймерами не більше 5*С
5. GC-склад - 40-60%
6. Наявність 1-2 G\C (але не більше 3) на 3'-кінці
7. Відсутність шпильок
8. Відсутність парування з іншими праймерами (праймер-димери)

F: ACGT**GACTGCTC**

R: AGCA**GAGCAGTC**

.....3'-GGACCAATCATTA-5
5'-ATTAATAACCAGG-3' _ _ _ _ _

Дизайн праймерів

1. Відповідність послідовності (специфічність)
2. Довжина 17-35 нуклеотидів
3. Температура плавлення 55-75*С
4. Різниця у температурі плавлення між праймерами не більше 5*С
5. GC-склад - 40-60%
6. Наявність 1-2 G\C (але не більше 3) на 3'-кінці
7. Відсутність шпильок
8. Відсутність парування з іншими праймерами (праймер-димери)
9. Відсутність гомополімерів, динуклеотидних повторів

ACTACGTACCCCCCCCAT

ATCAGTATATATATATATC

Дизайн праймерів

1. Відповідність послідовності (специфічність)
2. Довжина 17-35 нуклеотидів
3. Температура плавлення 55-75*С
4. Різниця у температурі плавлення між праймерами не більше 5*С
5. GC-склад - 40-60%
6. Наявність 1-2 G\C (але не більше 3) на 3'-кінці
7. Відсутність шпильок
8. Відсутність парування з іншими праймерами (праймер-димери)
9. Відсутність гомополімерів, динуклеотидних повторів
10. Концентрація праймерів (зазвичай знаходиться в діапазоні 0,1-1 пМ/мкл). Зависока концентрація –ризик утворення неспецифічних продуктів ампліфікації. Занизька концентрація – зниженн аналітичної чутливості методу

Для постановки полімеразної ланцюгової реакції необхідний певний набір реагентів. Серед запропонованих варіантів оберіть лише ті компоненти, які потрібні для постановки реакції.

Дезоксирибонуклеозидтрифосфати (ДНТФ)

ДНК-матриця для ПЛР

Реакційний буфер для полімерази

✓ F_праймер

Полімераза

✓ R_праймер

Відео 2

Варіанти «гарячого старту»

1. Розділення шаром парафіну
2. Інгібування полімерази антитілами
3. Хімічна модифікація полімерази формаліном або іншими інгібіторами (напр., модифікованими олігами)

Запитання:

1. У яких випадках гарячий старт може не спрацювати?
2. Як може виглядати протокол постановки?
3. Як виправити ситуацію? (а краще – запобігти)

Для постановки полімеразної ланцюгової реакції необхідний певний набір реагентів. Серед запропонованих варіантів оберіть лише ті компоненти, які потрібні для постановки реакції.

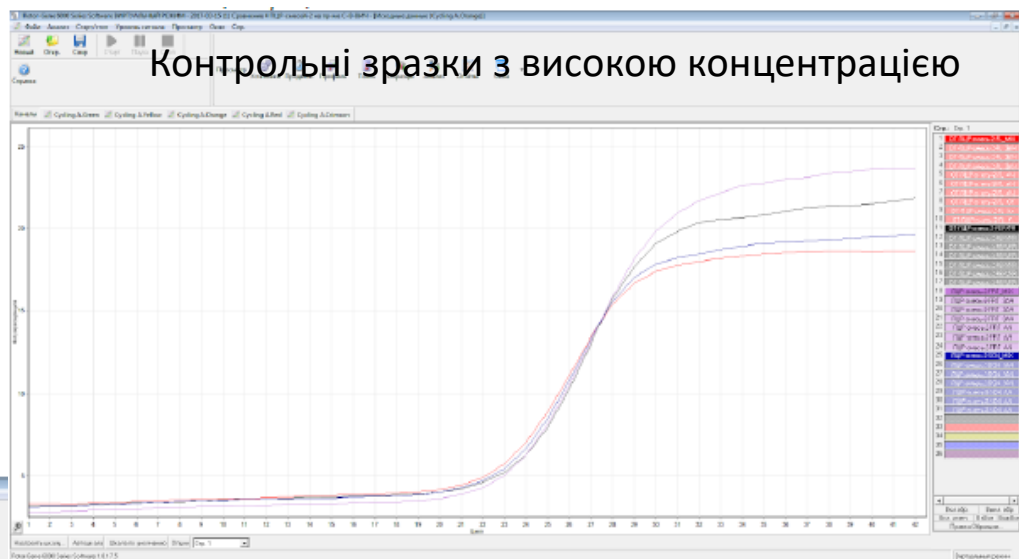
- Дезоксирибонуклеозидтрифосфати (ДНТФ)
- ДНК-матриця для ПЛР
- Реакційний буфер для полімерази (іони Mg^{2+})**
- ✓ F_праймер
- ✓ Полімераза
- ✓ R_праймер

Реакційний буфер для полімерази (іони Mg^{2+})

1. Утворюють розчинні комплекси з дНТФ
2. Оптимальна концентрація 1-5 мМ (підбираємо емпірично)
3. Підвищують температуру плавлення матричної ДНК
4. Багато іонів – гарне розгорання, але багато «неспецифіки»
5. Мало іонів – слабке розгорання

Практичний кейс 3. Тестування різних буферів для полімерази:

1. Буфер 1 (концентрація іонів Mg 20 мМ\мл)
2. Буфер 2 (стандартна; концентрація іонів Mg 15 мМ\мл)
3. Буфер 3 (концентрація іонів Mg 15 мМ\мл, змінений йонний склад за рахунок SO4)



Основні характеристики ПЛР

- Висока чутливість, заснована на експонентному принципі накопичення продукту.
- Висока специфічність, заснована на виявленні унікальних для мікро-(макро)-організму ділянок генетичного матеріалу.
- Метод прямого виявлення збудника, заснований на універсальності способу зберігання та передачі генетичної інформації живої матерії.