

Полімеразна ланцюгова реакція ПЛР

Тренінг в рамках ПЗБЗ

Детекція *Francisella tularensis* методом ПЛР

м. Харків, 4 вересня 2018 р.

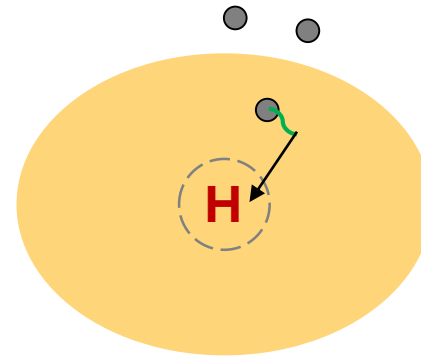
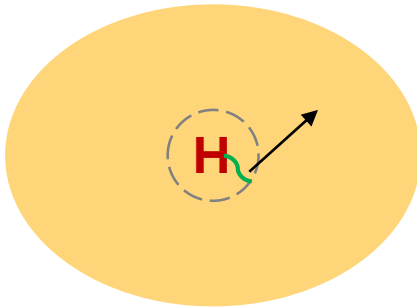
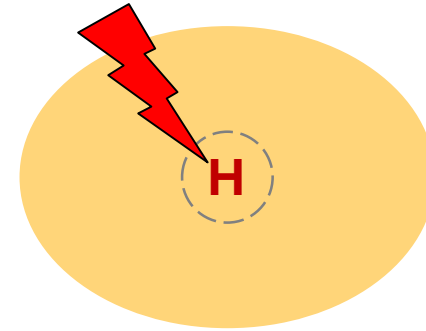
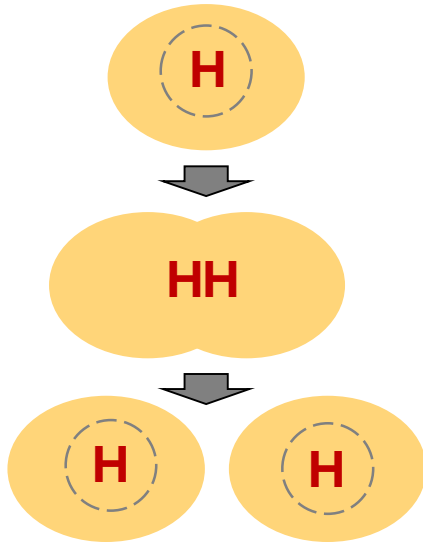
Крістіан Ланге, лікар ветеринарної медицини, PhD

Зміст



- Основи ампліфікації ДНК
- ПЛР в загальному
- Принципи кількісної ПЛР
- Інтерпретація та аналіз результатів ПЛР

Ампліфікація нуклеотидів у природі



Ампліфікація нуклеотидів у природі



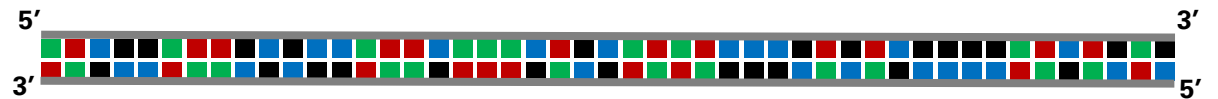
- Реплікація геному при поділі клітин
- Механізми репарації ДНК
- Транскрипція ДНК до РНК
- Зворотна транскрипція РНК до ДНК

Основи реплікації ДНК



5' ATGCAAACACTTGATTCCTCTGATGTACAAAG 3'
 3' TACGTTTGTGAACTAAGGAGACTACATGTTTC 5'

5' ATGCAAACACTTGATTCCTCTGATGTACAAAG 3'
 3' TACGTTTGTGAACTAAGGAGACTACATGTTTC 5'



Основи реплікації ДНК



- ДНК як комплементарні ланцюги в подвійній спіралі
- Засади парування комплементарних основ
 - Аденін (А) – Тимін (Т)
 - Гуанін (G) – Цитозин (С)
- Форвардний та реверсний ланцюг

Процес реплікації ДНК

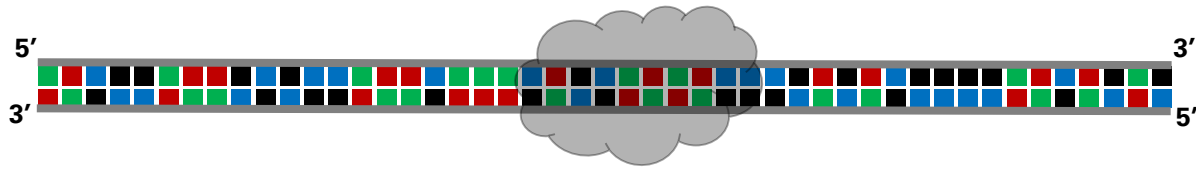


- Ініціація
 - Зв'язування ферментів
 - Відокремлення
 - Розплетення
 - Праймінг
- Елонгація
 - Активність полімерази 5' - 3'
 - Відокремлення
 - Розплетення

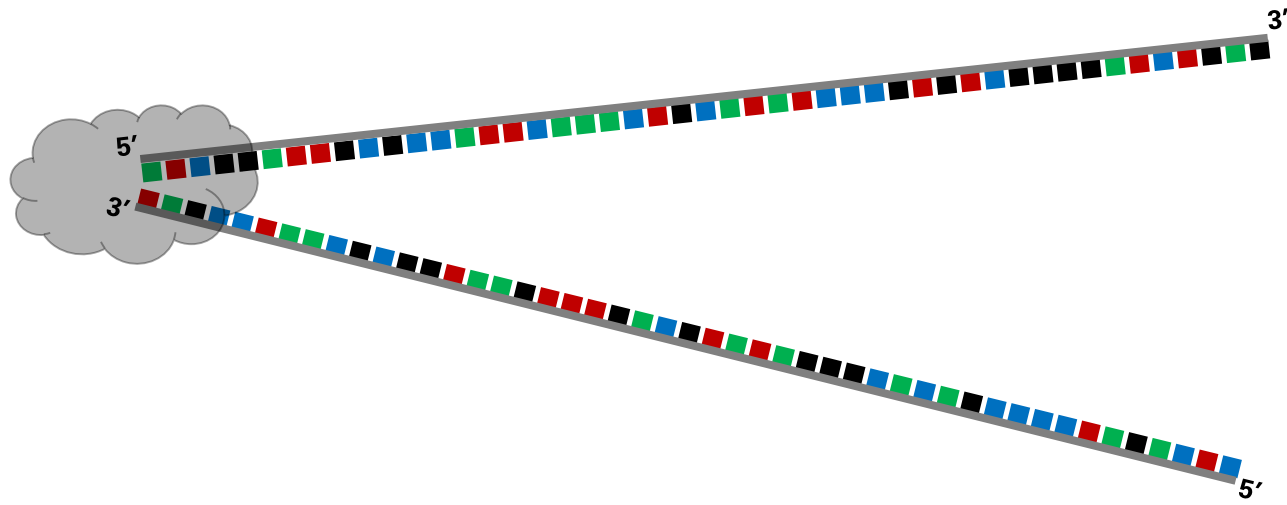
Процес реплікації ДНК



Процес реплікації ДНК



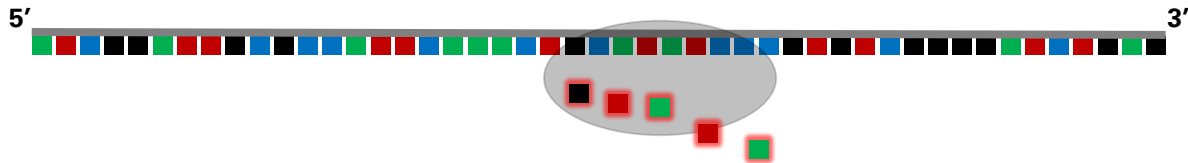
Процес реплікації ДНК



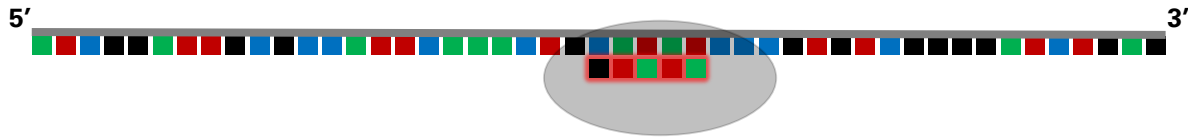
Процес реплікації ДНК



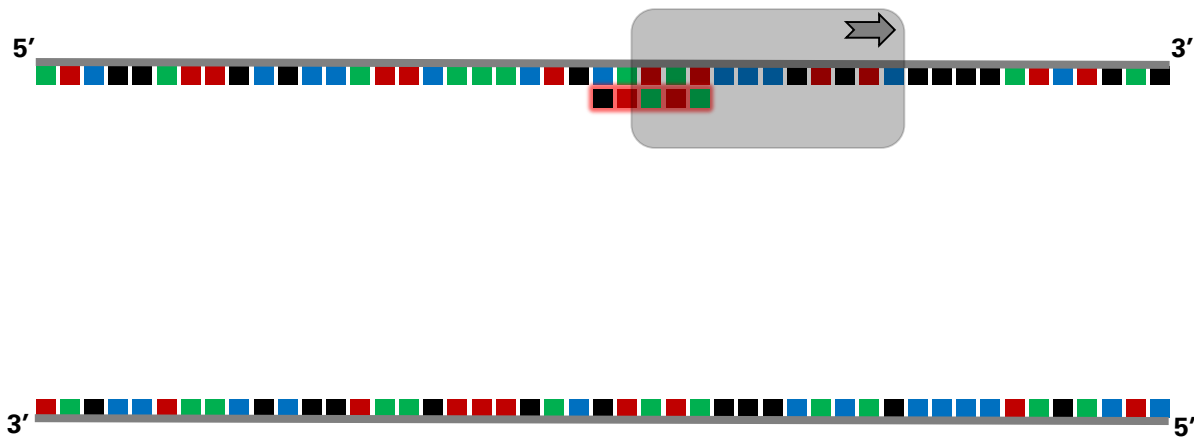
Процес реплікації ДНК



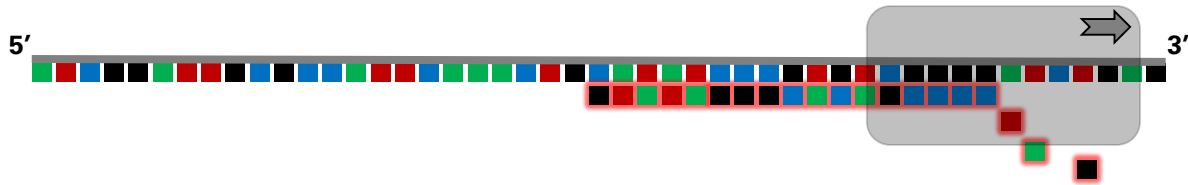
Процес реплікації ДНК



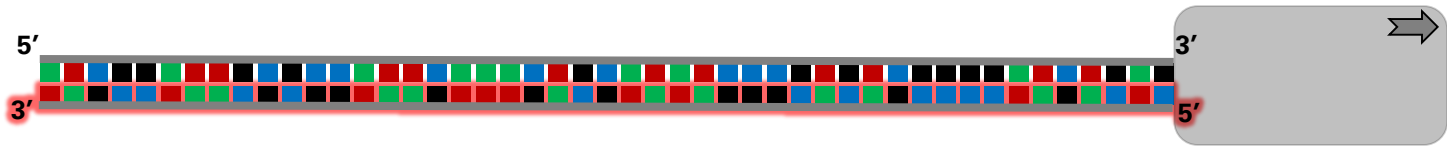
Процес реплікації ДНК



Процес реплікації ДНК




Процес реплікації ДНК

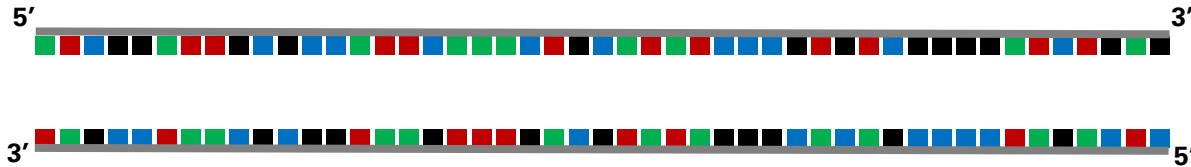


Історія

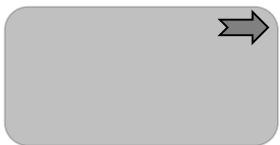


- 1953 Вотсон та Крік описали структуру ДНК
 - 1957 Кронерг дослідив ДНК полімеразу
 - 1969 Брок виділив *Thermus aquaticus* (Taq)
 - 1976 Чін виділив Taq полімеразу
 - 1977 секвенування за Сангером
 - 1984 Мюлліс провів першу ПЛР
 - 1993 Хігучі описав принципи кількісної ПЛР (qPCR)
- 

Типові складові класичної ПЛР

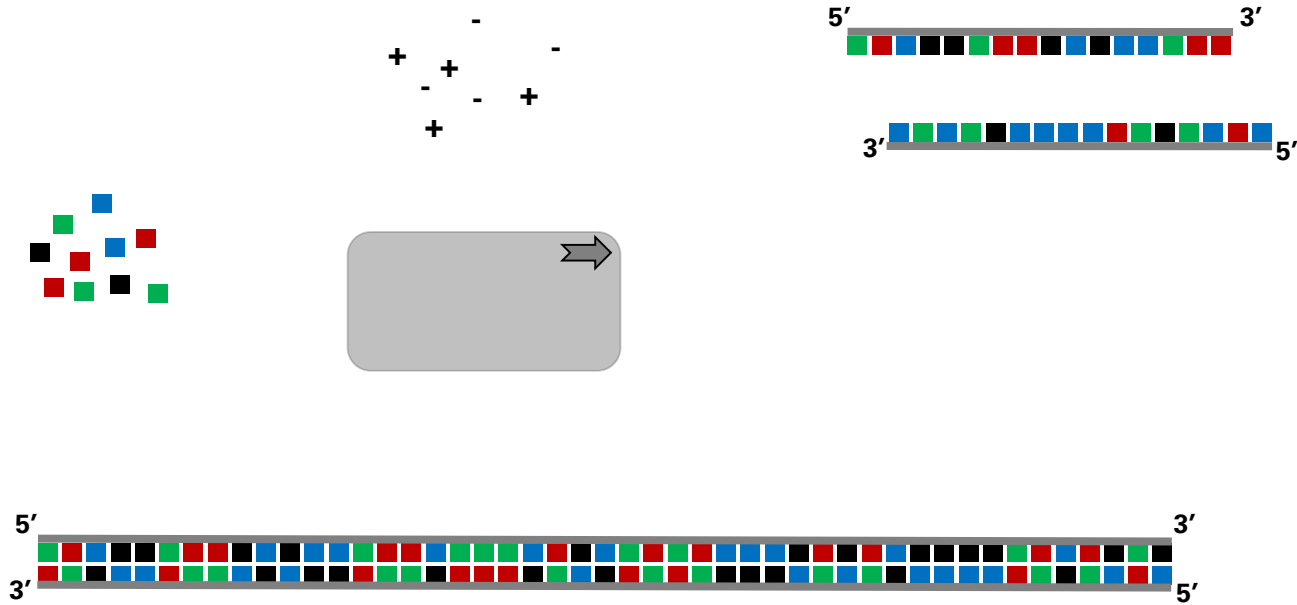


94°C

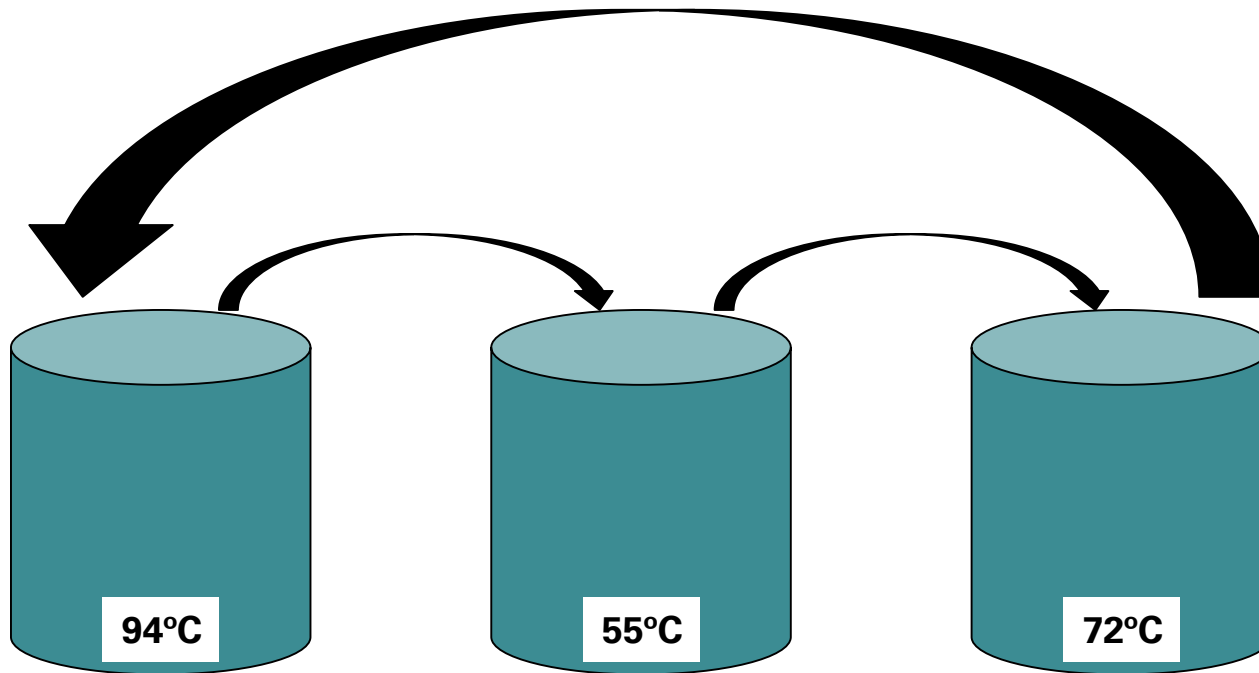


37°C

Типові складові класичної ПЛР



Типові складові класичної ПЛР



Типові складові класичної ПЛР



- Термостабільна ДНК полімераза
- Специфічні праймери
- дНТФ (дезокси nukлеотидтрифосфати)
- Буфер
- Термоциклер

Типові складові класичної ПЛР

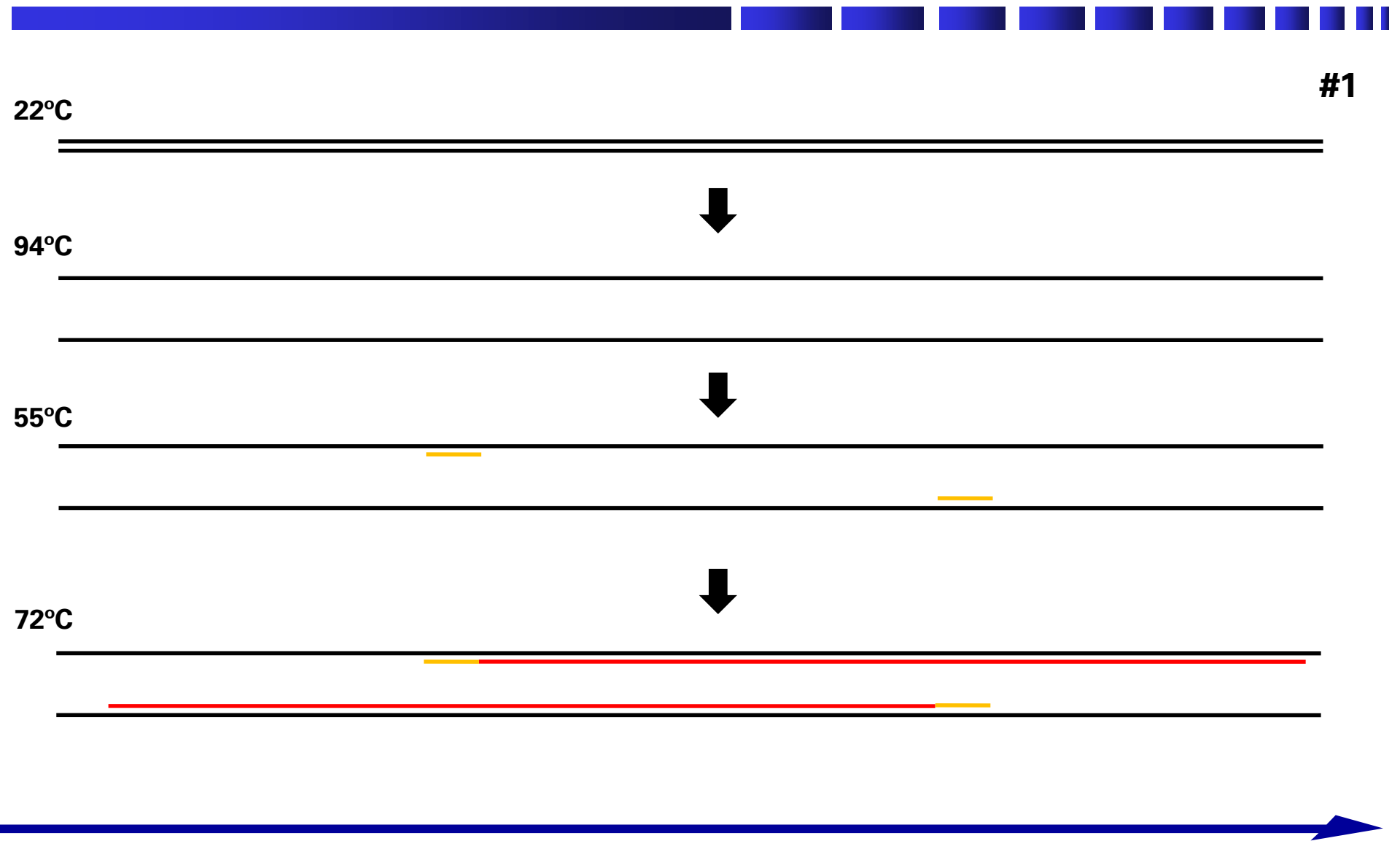
#1

22°C

94°C

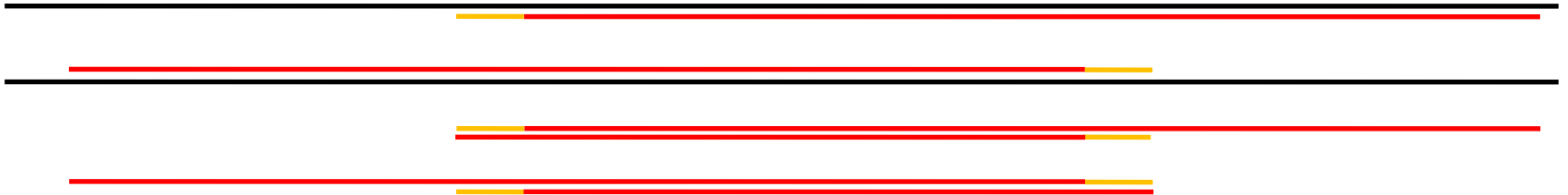
55°C

72°C



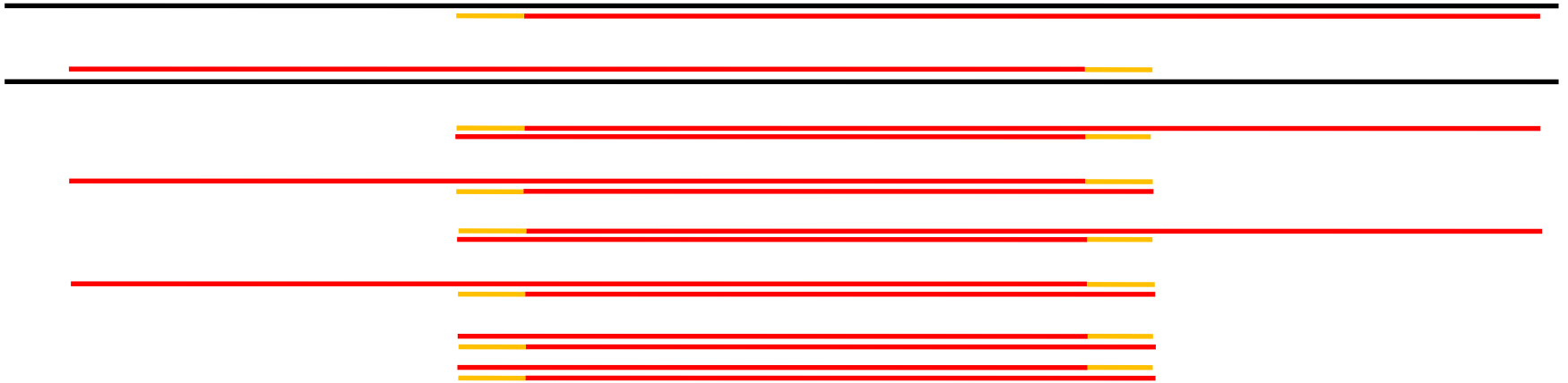
Типові складові класичної ПЛР

#2



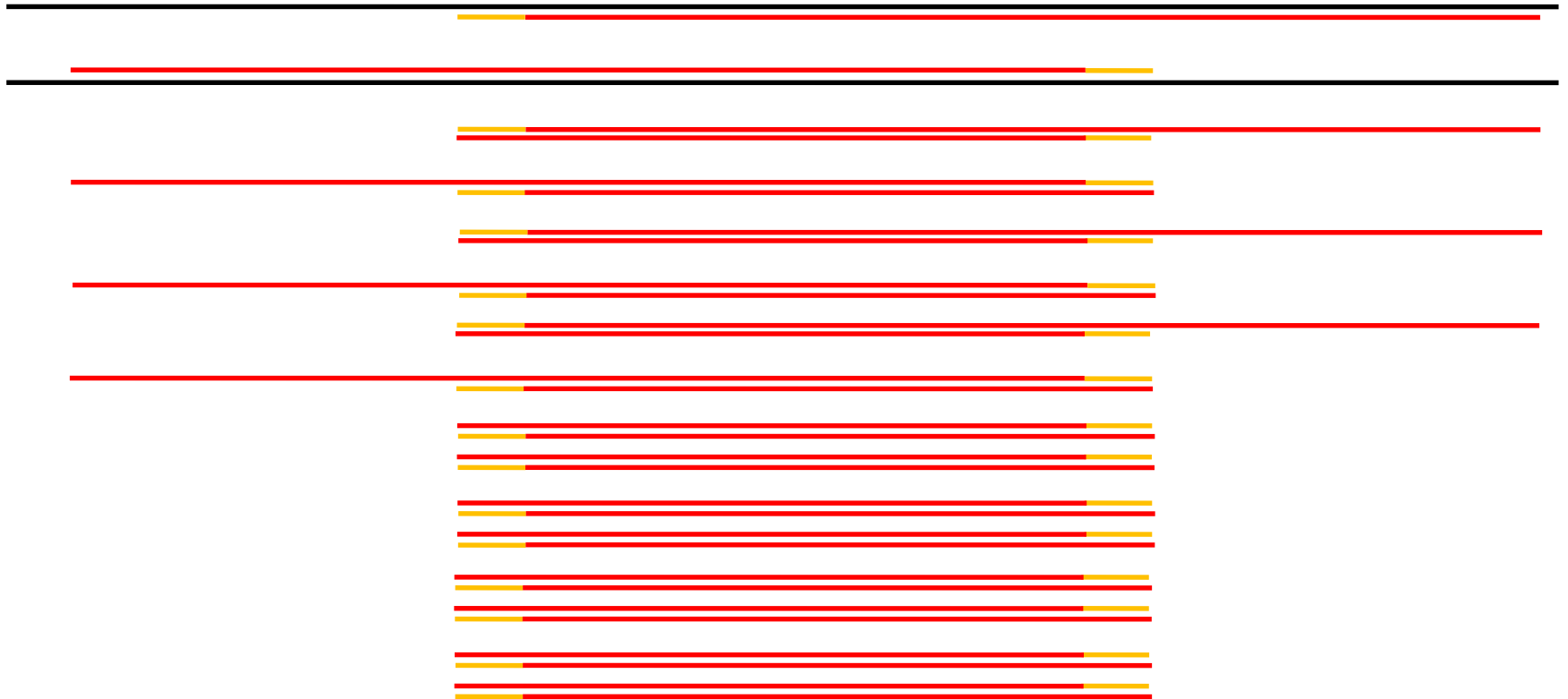
Типові складові класичної ПЛР

#3



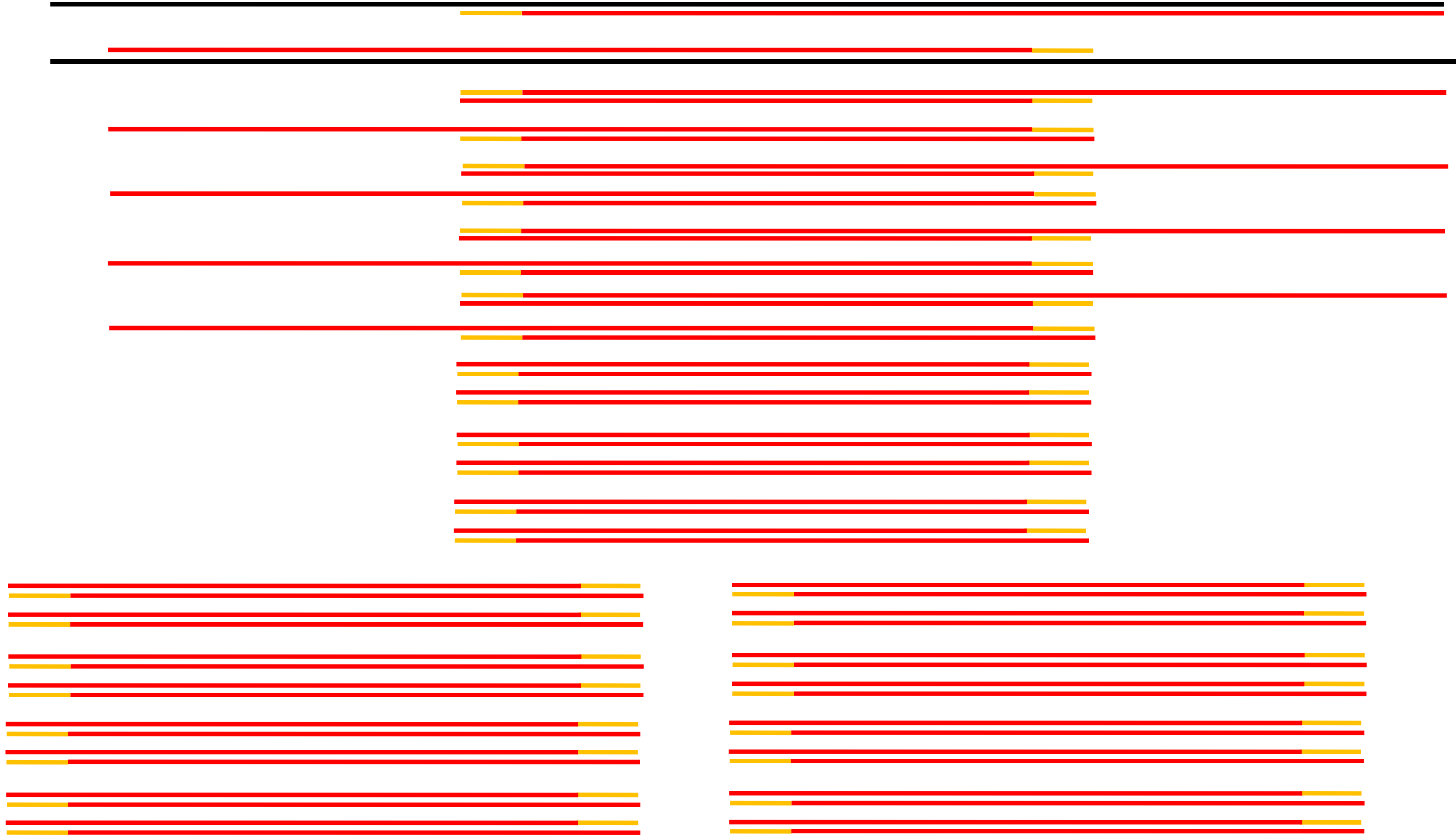
Типові складові класичної ПЛР

#4

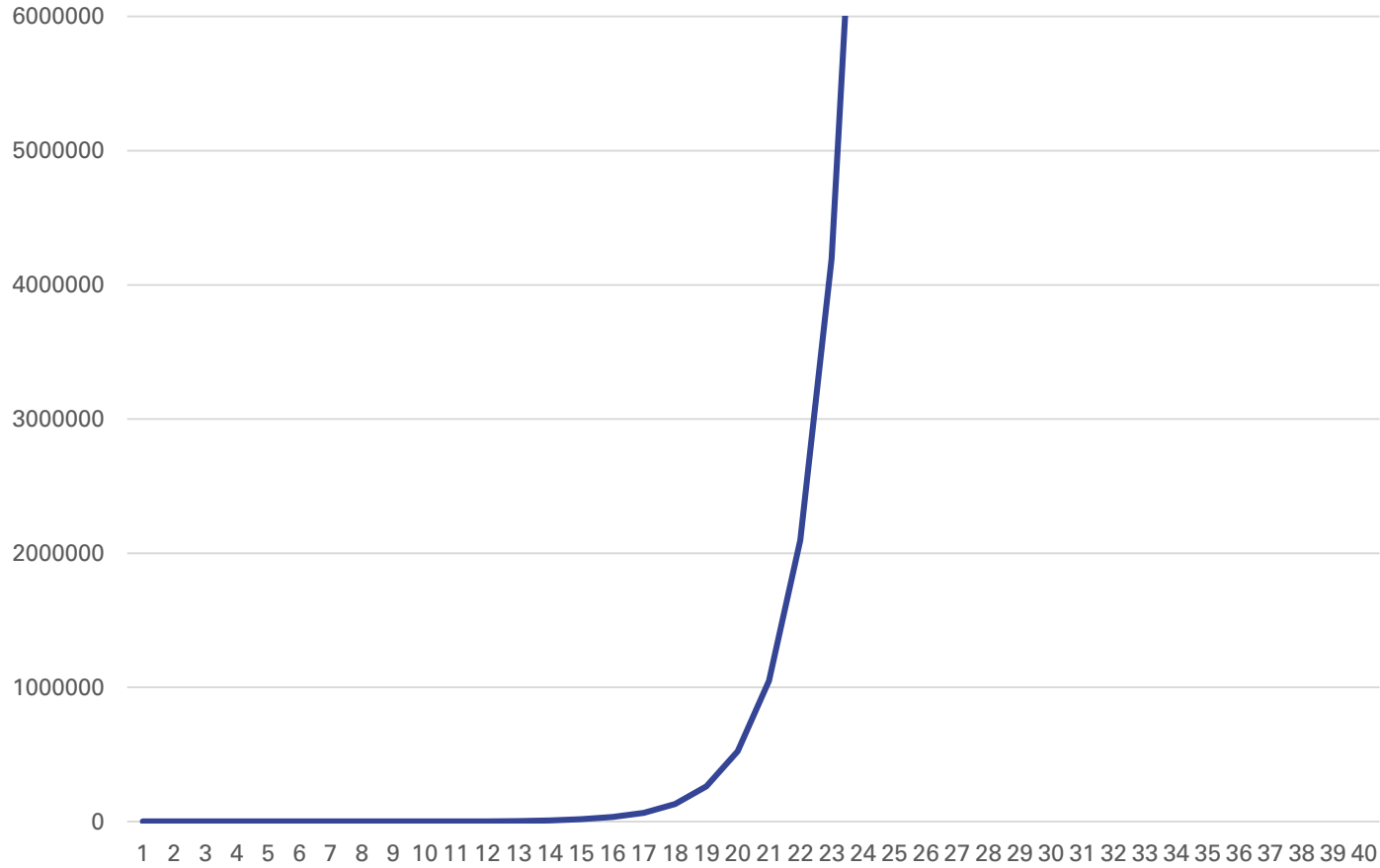


Типові складові класичної ПЛР

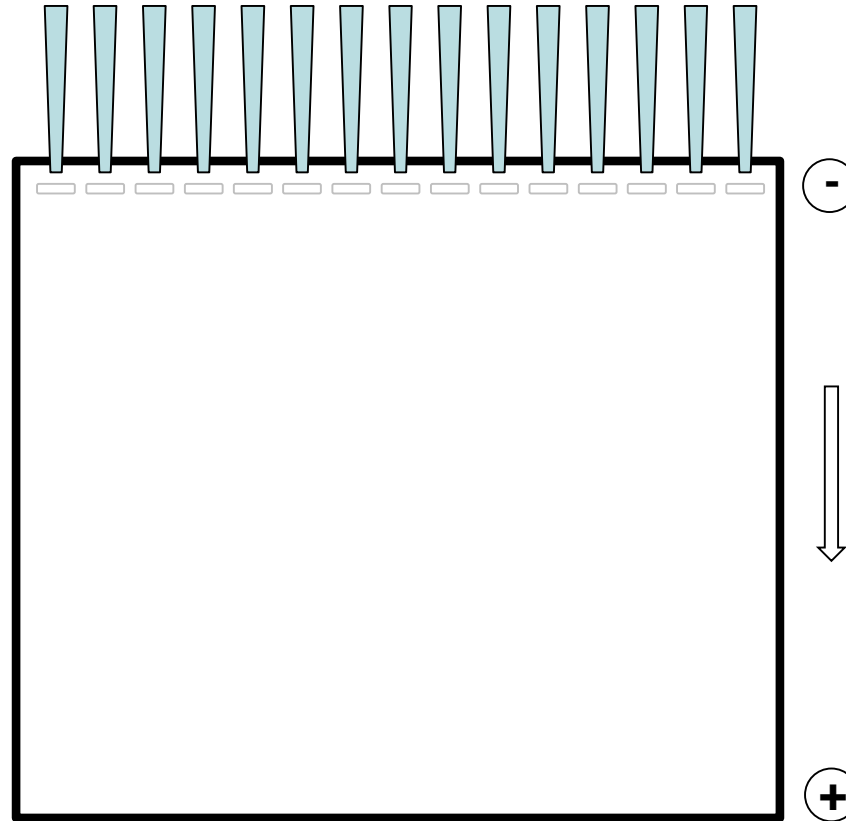
#5



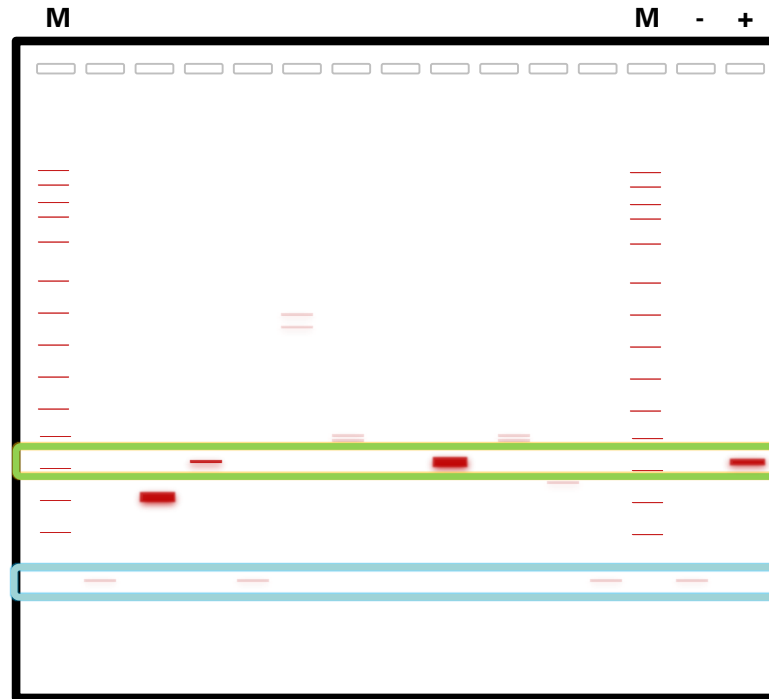
Типові складові класичної ПЛР



Типові складові класичної ПЛР



Типові складові класичної ПЛР



Зчитування результатів класичної ПЛР



- Розділення в агарозному гелі
- Візуалізація ДНК
- Стандарти розмірів
- Секвенування

Ключові моменти класичної ПЛР



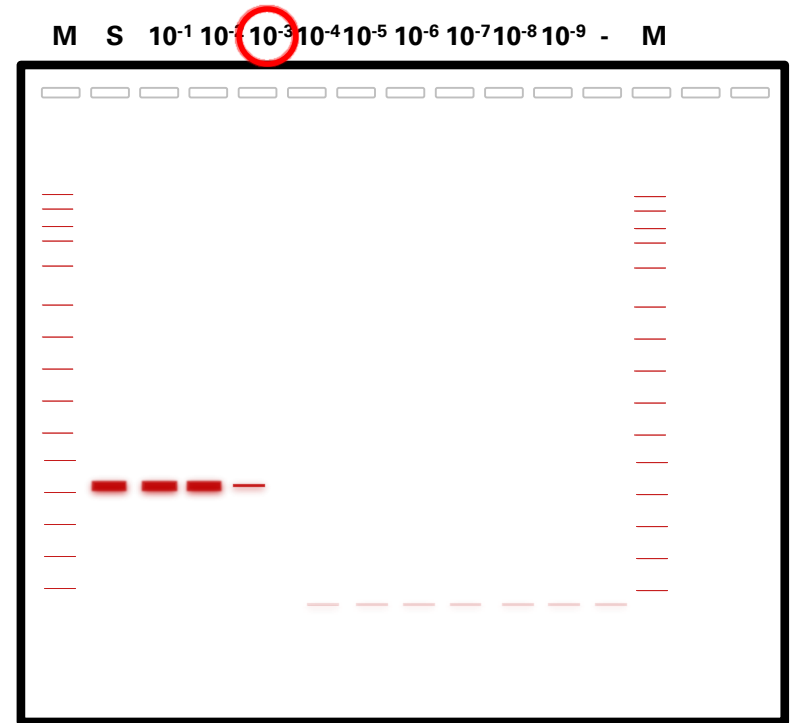
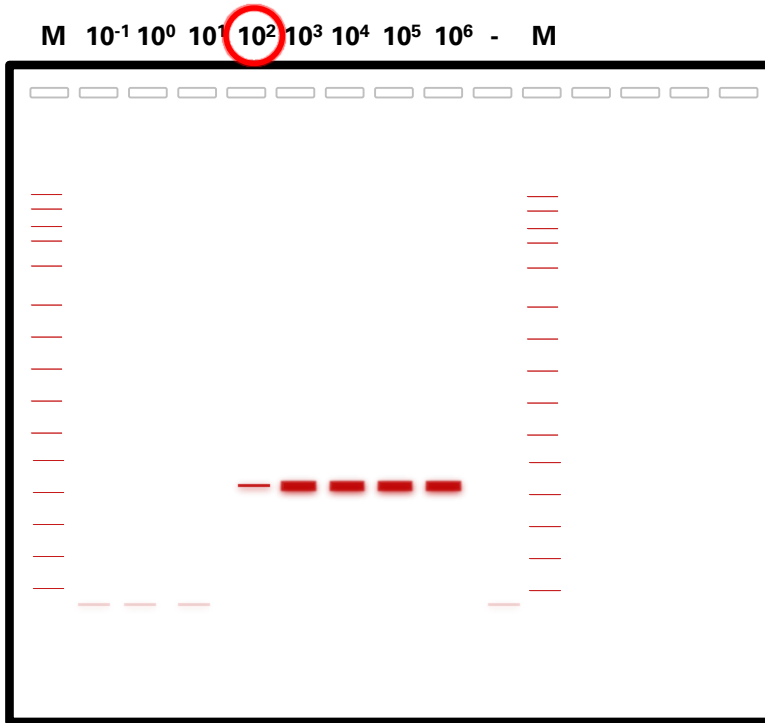
- ПЛР завжди проходить з ДНК, якщо йдеться про РНК, її спершу зворотно транскрибують в ДНК
- Праймери можуть бути частково неоднозначними, щоб забезпечити ампліфікацію пов'язаних ділянок
- Розмір продукту може змінюватися залежно від цілі, переважно у діапазоні 0,2-2 т.п.н.

Огляд кількісної ПЛР



- Базується на тих же принципах, що й класична ПЛР
- Використовує флуоресцентні мітки
- Отримані результати легше перевести в кількісні значення, ніж результати класичної ПЛР
- Результати отримати швидше, ніж у класичній ПЛР
- Цифрове зчитування

Огляд кількісної ПЛР




$$C \ 10^2 \approx S \ 10^{-3}$$

$$S \approx 10^5$$

Принципи кількісної ПЛР



- Використання (без впливу) флуоресценції
 - Вимірювання інтенсивності сигналу чутливим датчиком
 - Проходження процесу ПЛР цикл за циклом у режимі реального часу
 - Продуктами кількісної ПЛР (qPCR) є короткі фрагменти для гарантування ефективності та однорідності ампліфікації
 - Використання стандартів для отримання
- 

Принципи кількісного визначення



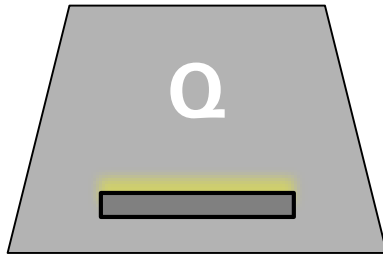
- Стандартна крива, контроль
- Контрольні зразки
- Контрольні гени

Складові кількісної ПЛР (qPCR)

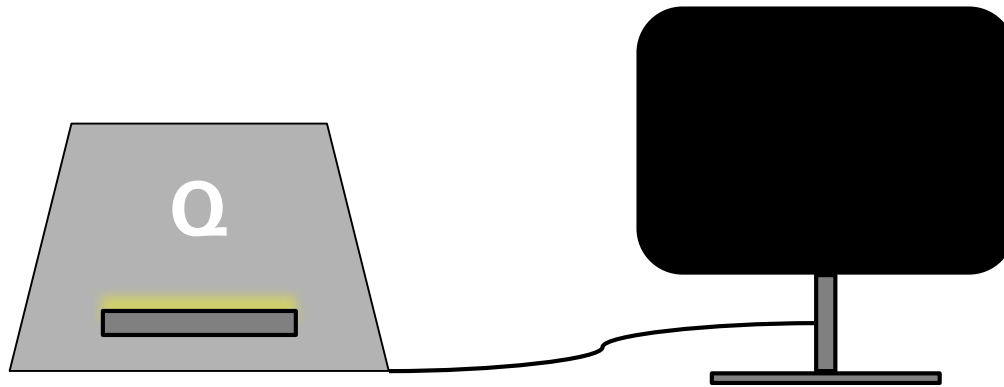


- Полімераза
- Праймери
- Флуорохроми
- дНТФ
- Буфер
- Плашки/смужки з пробірками/мікропробірки
- Стандарт

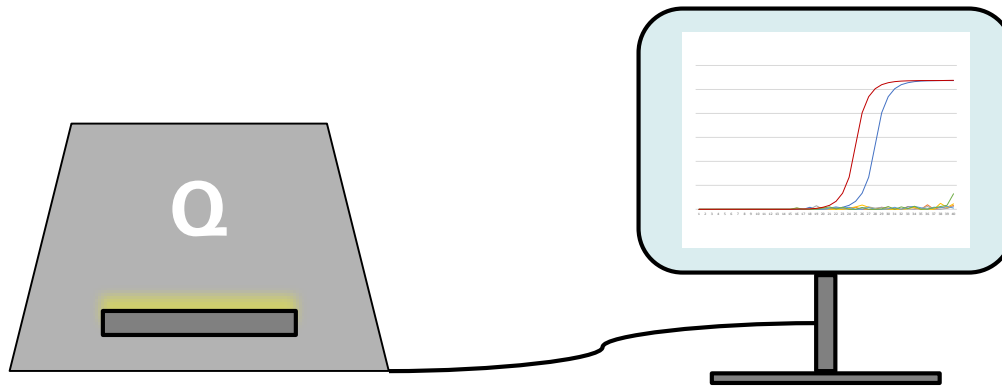
Зчитування результатів кількісної ПЛР (qPCR)




Зчитування результатів кількісної ПЛР (qPCR)



Зчитування результатів кількісної ПЛР (qPCR)



Зчитування результатів кількісної ПЛР (qPCR)



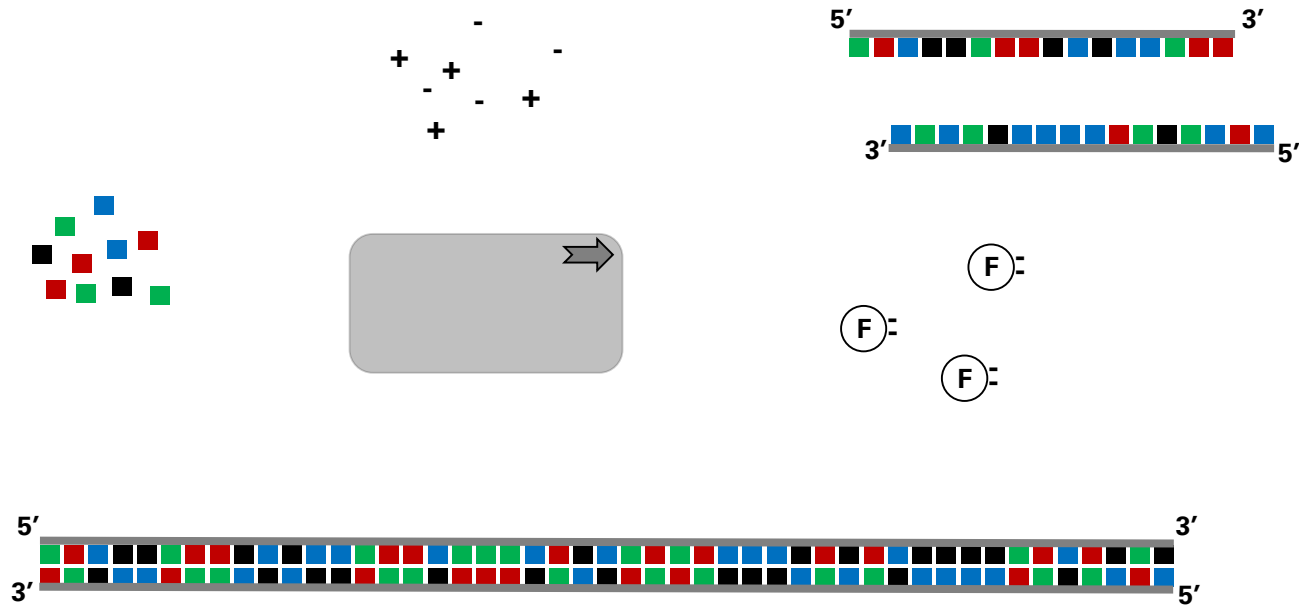
- Термоциклер із детектором флуоресценції
- Комп'ютер
- Програмне забезпечення

Тип: неспецифічна детекція

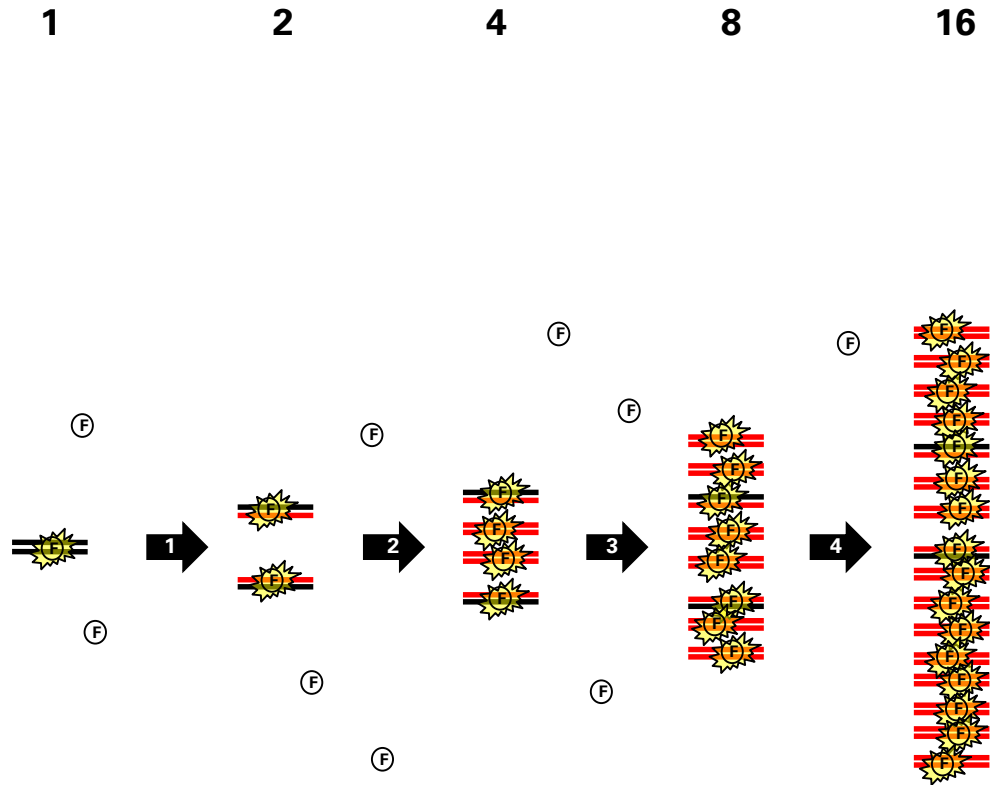


- Дволанцюгова ДНК зв'язується з флуорохромом
- Дуже подібна до класичної ПЛР
- Легка в моделюванні
- Специфічність визначається праймерами та параметрами циклювання

Тип: неспецифічна детекція



Тип: неспецифічна детекція



Тип: неспецифічна детекція



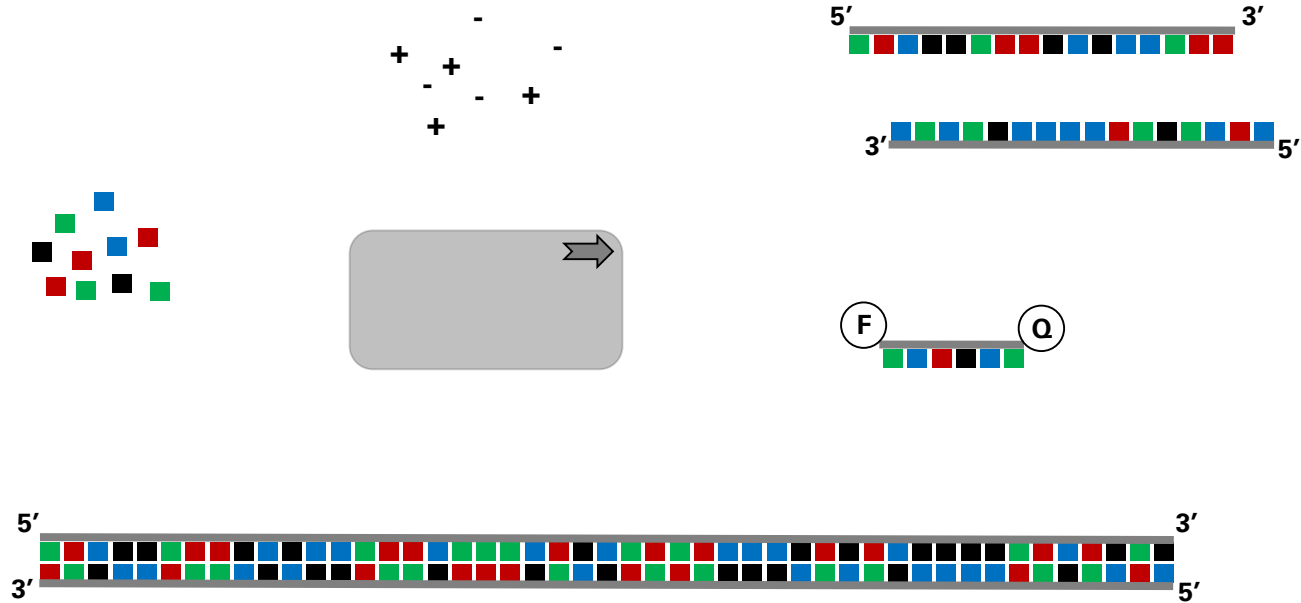
- Дволанцюгова ДНК зв'язується з флуорохромом
- Дуже подібна до класичної ПЛР
- Легка в моделюванні
- Специфічність визначається праймерами та параметрами циклювання

Тип: специфічна детекція

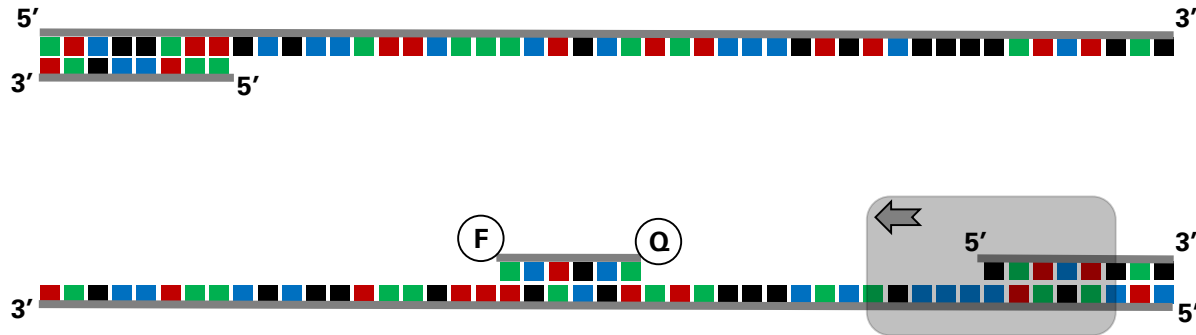


- Специфічний зонд із флуорохромом та гасником флуоресценції
- Сигнал вивільняється завдяки екзонуклеазній активності Taq полімерази
- Специфічність визначається пробєю
- Легко мультиплексувати

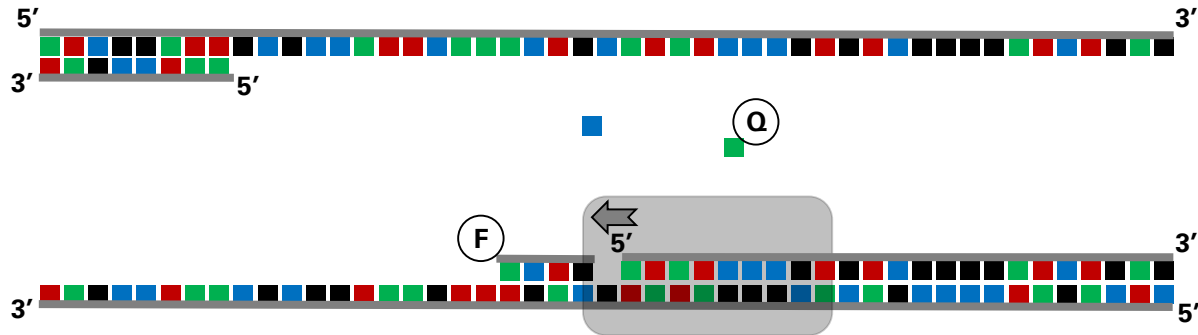
Тип: специфічна детекція



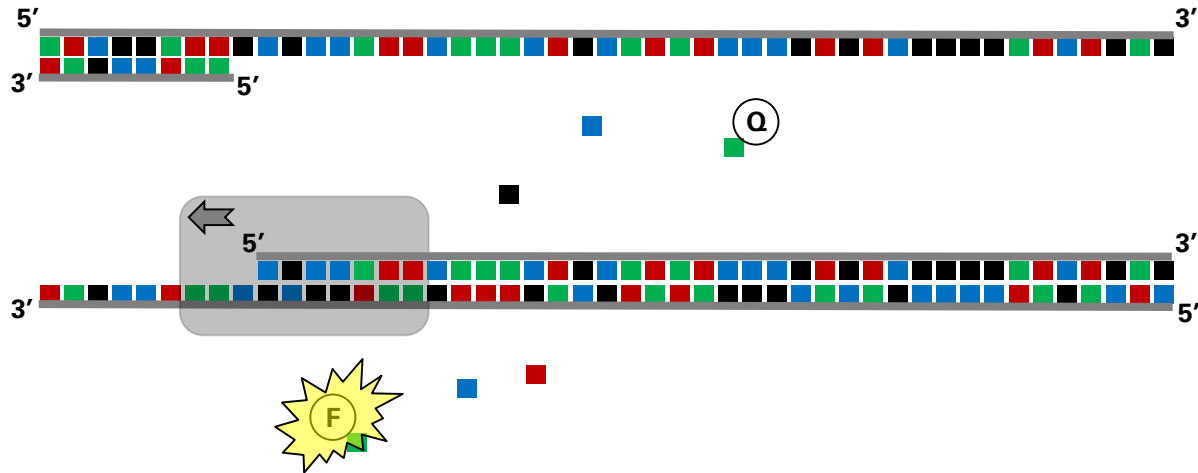
Тип: специфічна детекція



Тип: специфічна детекція



Тип: специфічна детекція

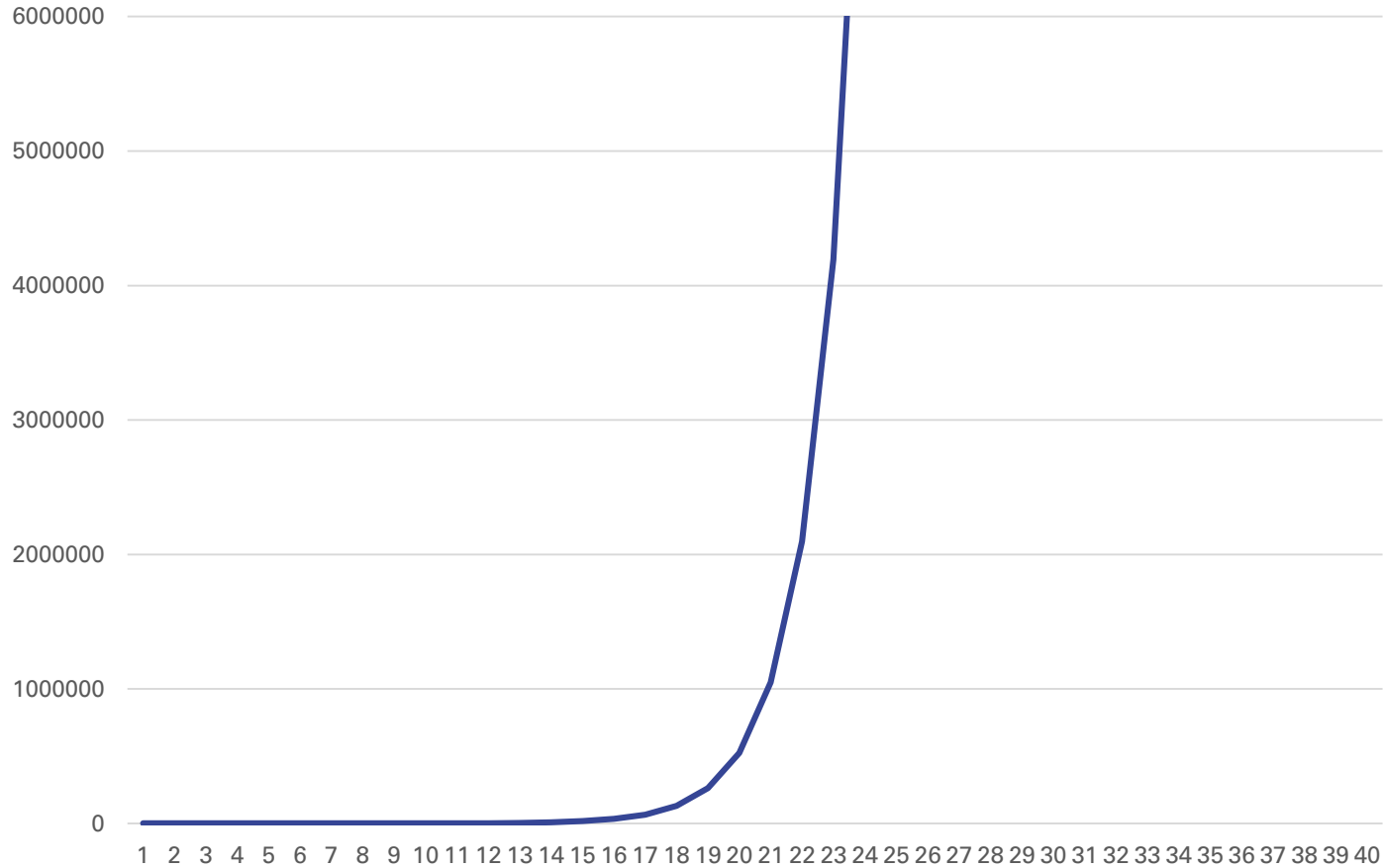


Тип: специфічна детекція

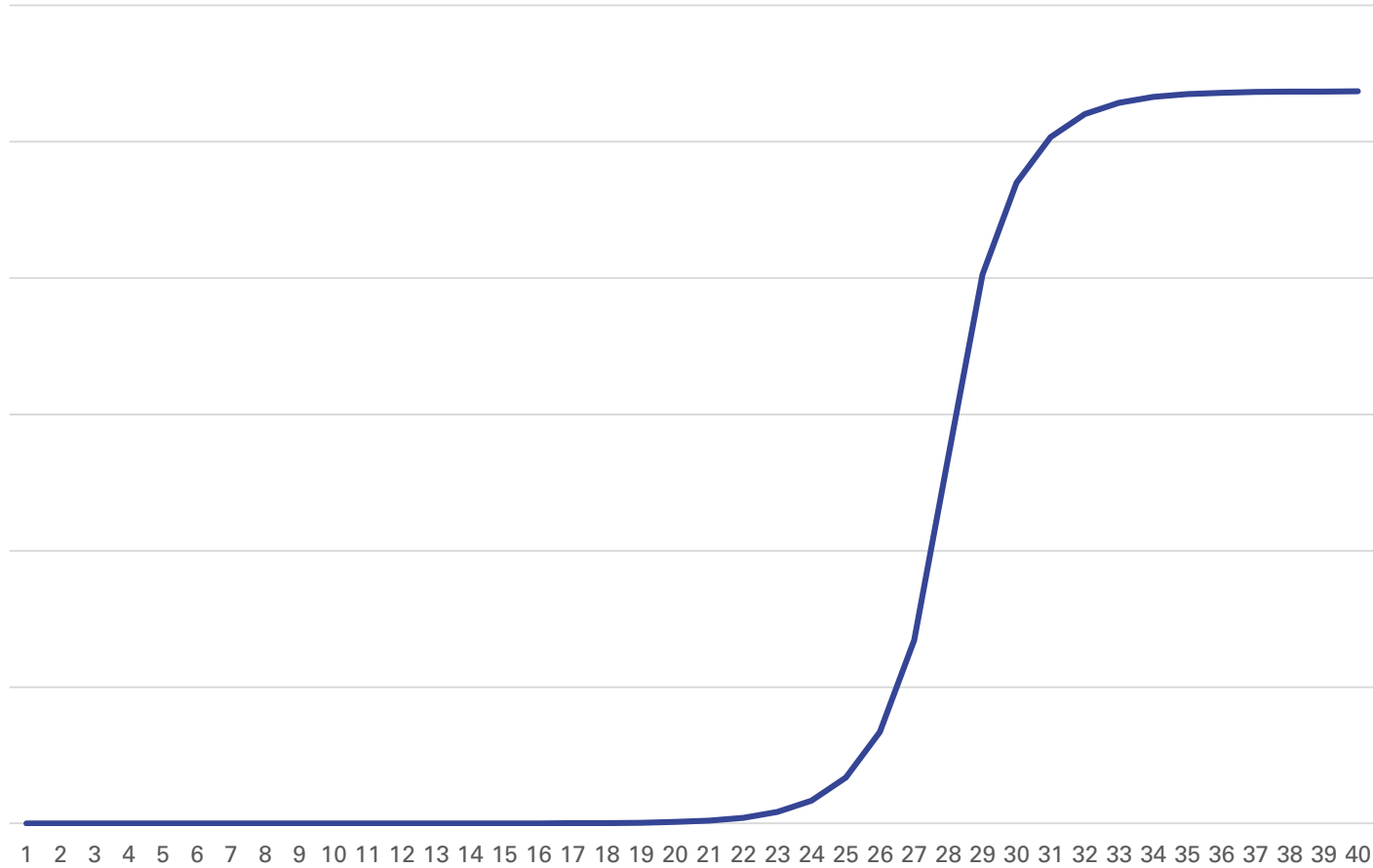


- Специфічний зонд із флуорохромом та гасником флуоресценції
- Сигнал вивільняється завдяки екзонуклеазній активності Taq полімерази
- Специфічність визначається пробєю
- Легко мультиплексувати

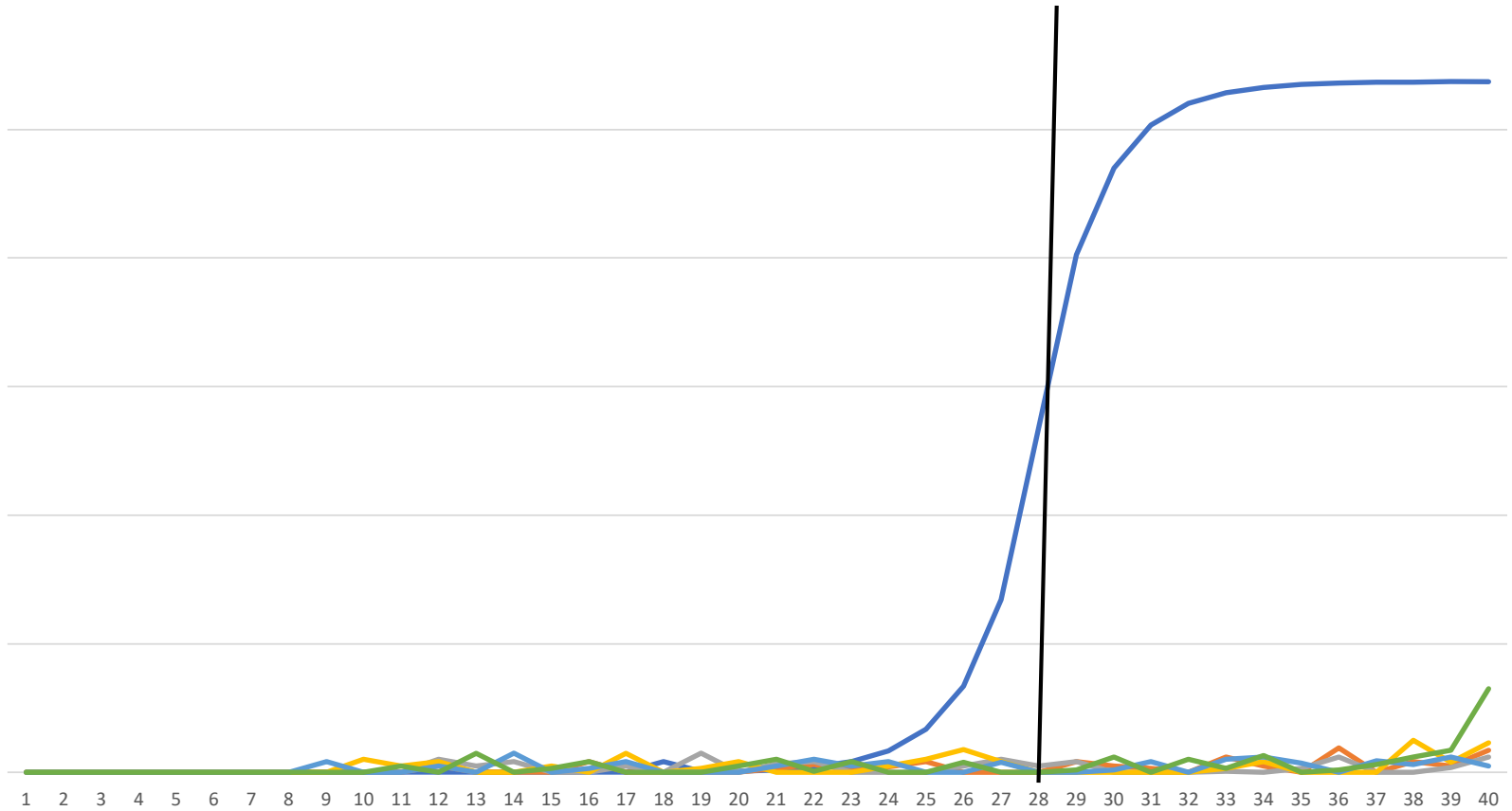
Параметри: значення σ_t




Параметри: значення ст



Параметри: значення ст

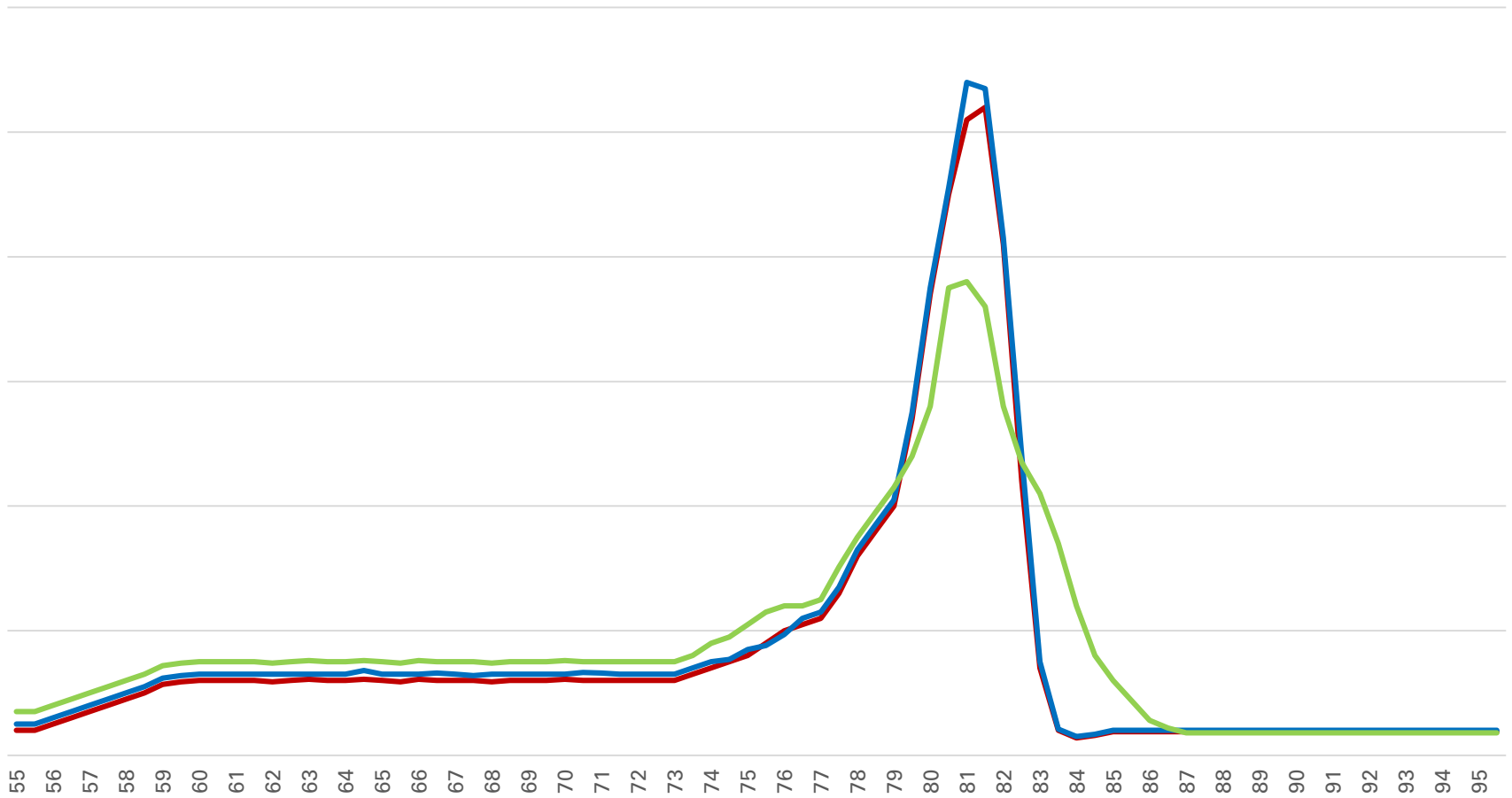


Параметри: значення ct



- Кількість цільової ДНК та сигнал дублюються кожного циклу ПЛР (за ідеальних умов)
- Порогове значення циклу (ct) вказує, на якому циклі сигнал перевищує фоновий рівень
- Значення ct обернено пропорційне до кількості цільової ДНК у зразку

Параметри: крива плавлення

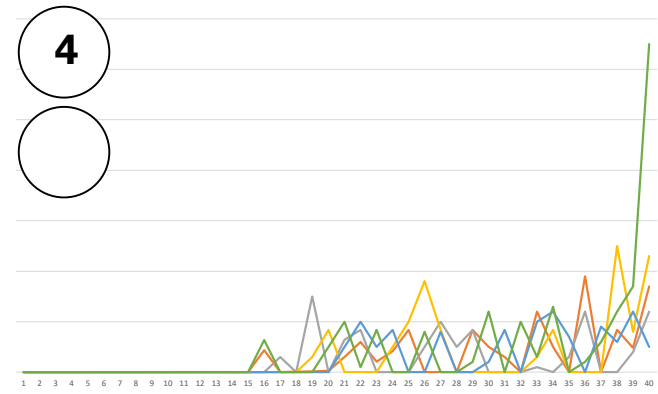
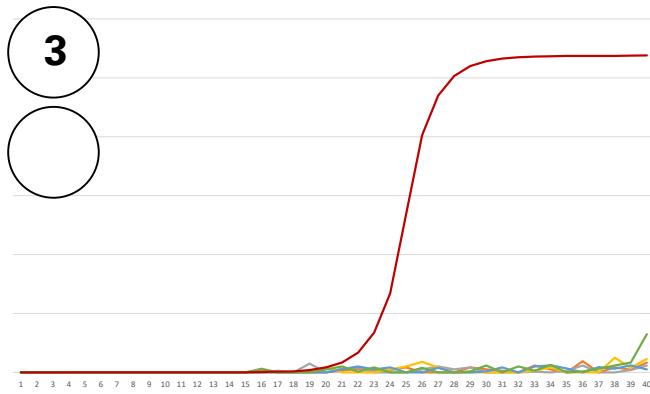
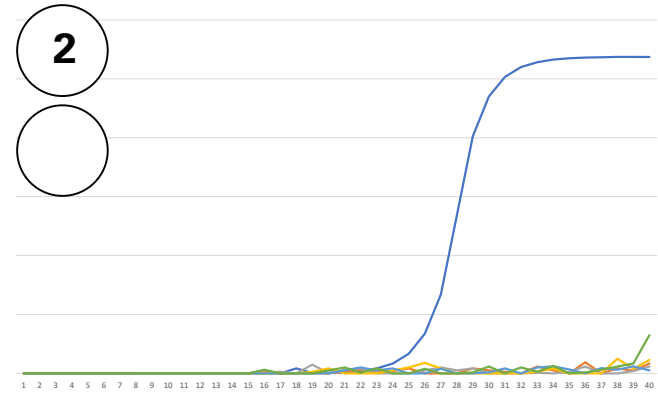
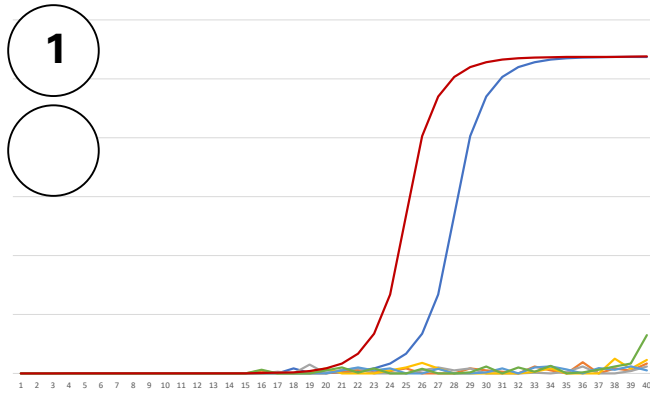


Параметри: крива плавлення

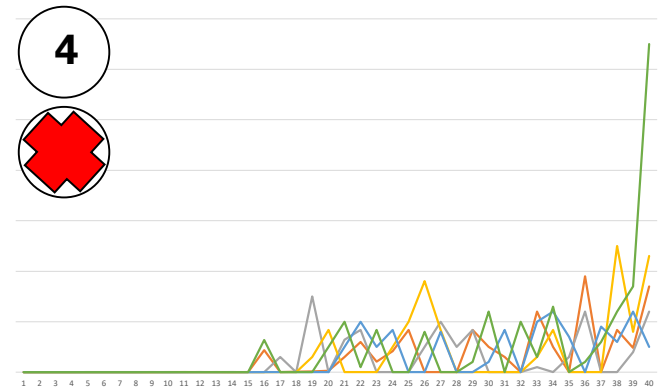
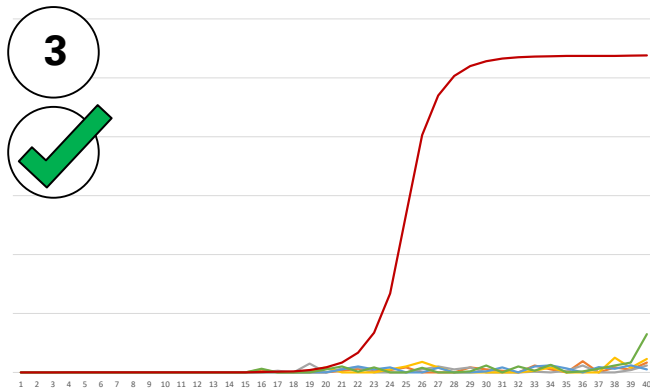
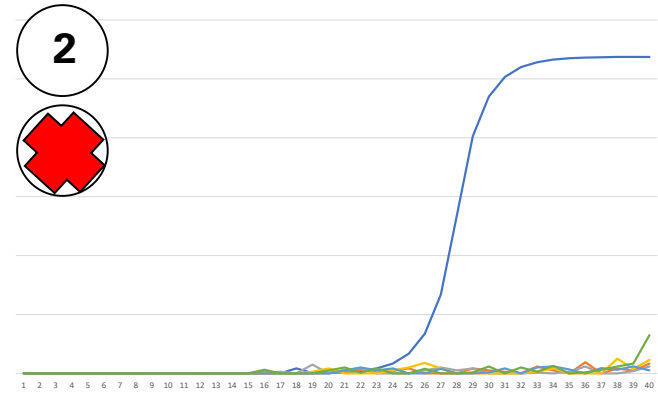
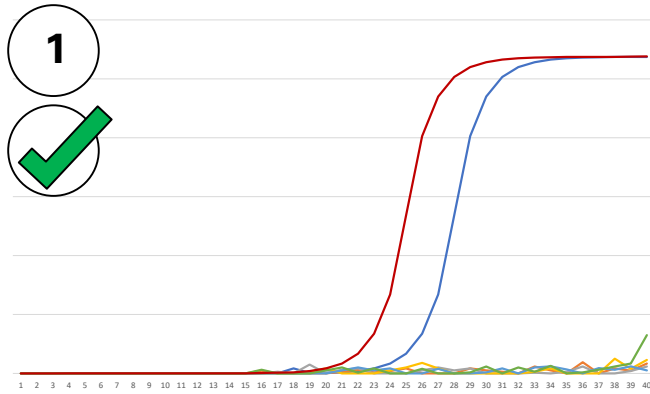


- Температура плавлення продуктів ПЛР є специфічною і залежить від довжини послідовності та складу
- Її можна використовувати, щоб відрізнити очікувані продукти від побічних продуктів, таких як димери праймерів
- Зміни послідовностей відображені змінами кривої плавлення

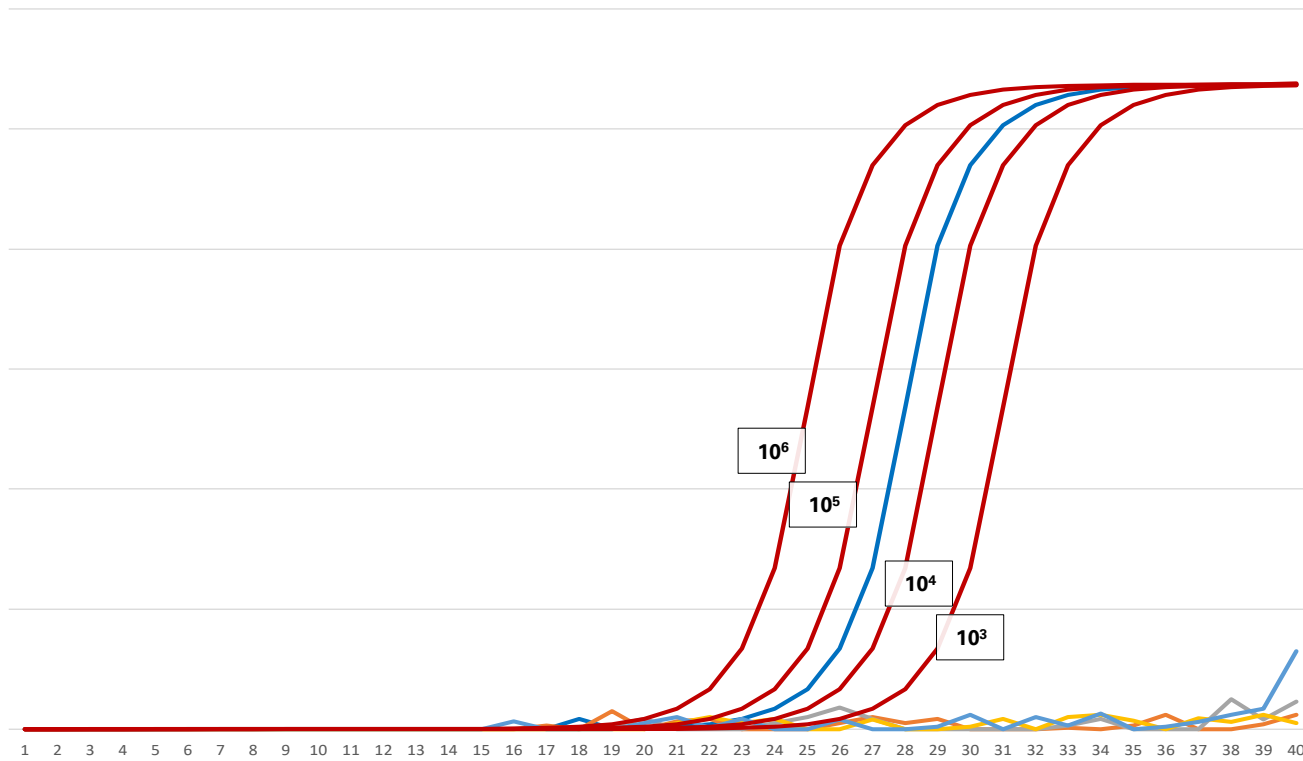
Інтерпретація



Інтерпретація




Інтерпретація



Інтерпретація



- Оцінка стандарту та контролю, оскільки кожна реакція дещо відрізняється
 - Інтерпретація кривої плавлення для оцінки, чи ампліфікувалась цільова ділянка
 - Порівняння значення ct для кількісної оцінки
 - Продовження з іншими методами, такими як різні кількісні ПЛР, гель-електрофорез, секвенування, класична ПЛР
- 

Особливості

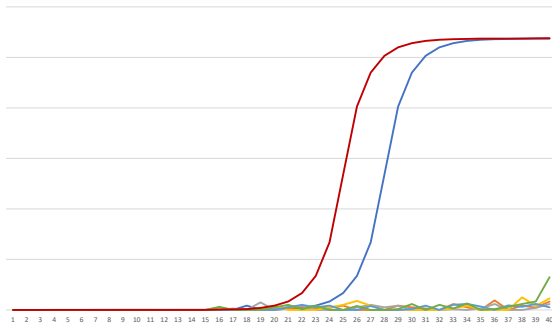


- Тип кількісної ПЛР (qPCR), комбінація праймерів та зондів слід вибрати відповідно до бажаного ступеня специфічності
- Продукти кількісної ПЛР (qPCR) є короткими фрагментами для забезпечення ефективної та гомогенної ампліфікації

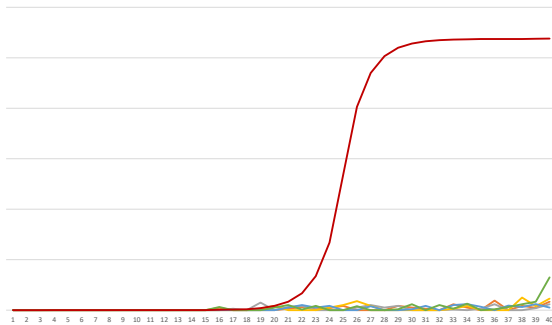
Особливості

Influenza A (H1) qPCR

H1N1

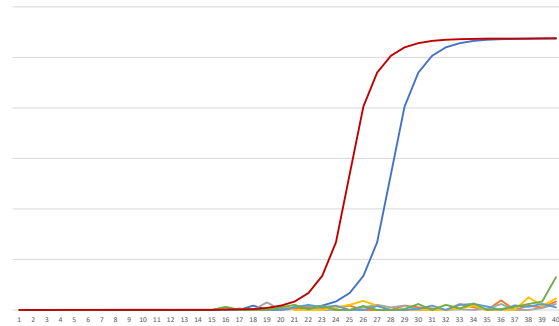


H3N2

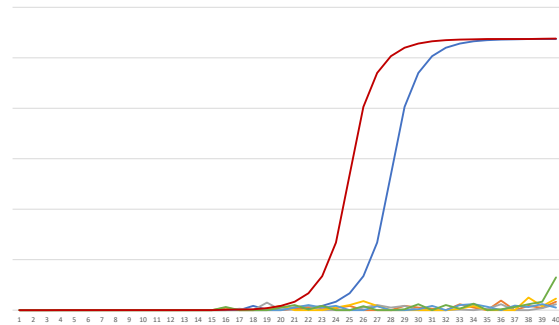


Influenza A (H) qPCR

H1N1



H3N2



Робота над помилками



- Вимірювання контролів та стандартів
- Параметри обладнання та програмного забезпечення
- Реагенти
- Процес піпетування
- Плашки/ смужки з пробірками
/мікропробірки
- Якість зразка

Назви- Абревіатури



- Полімеразна ланцюгова реакція - ПЛР
- Класична ПЛР - ПЛР
- ПЛР зі зворотною транскрипцією - ЗТ-ПЛР (RT-PCR)
- ПЛР у реальному часі = кількісна ПЛР - кількісна ПЛР (qPCR)
- Кількісна ПЛР зі зворотною транскрипцією - RT-qPCR
- Комплементарна ДНК (зворотно транскрибована) (cDNA) - кДНК

Запитання?

