

Количественная полимеразная цепная реакция в реальном времени

Семинар по биобезопасности
Антось Шахбазов
Институт генетики и цитологии
Национальной Академии Наук Беларуси
Сентябрь 2, 2004

Что такое ПЦР в реальном времени (РВ-ПЦР)

- ПЦР в реальном времени – это лабораторный метод, позволяющий осуществлять относительно точные, достоверные и воспроизводимые измерения количественного содержания специфической нуклеотидной последовательности. Этот метод применяется в различных областях биологии, в том числе и при идентификации ГИО. РВ-ПЦР становится очень распространенным методом в связи с необходимостью достоверного определения количественного содержания трансгенов в образце. РВ-ПЦР также применяется в традиционной селекции для более точного и эффективного определения аллелей. Эта презентация объясняет принципы РВ-ПЦР и применение этого метода в селекции растений и для идентификации ГИО.

Цели презентации

1. Разница между ГИО и обычными растениями.
2. Отличие РВ-ПЦР от традиционного ПЦР анализа.
3. Сходство и отличие различных методов идентификации.
4. Значение системы Tagman.
5. Анализ преимуществ и недостатков РВ-ПЦР.

Разница между ГИО и обычными растениями

- Методами генетической инженерии можно вводить новые гены в растения, увеличивая тем самым их коммерческий потенциал. В связи с коммерциализацией многих сортов растений необходимо разрабатывать технологии идентификации трансгенных организмов и их частей. Например, в лабораторных условиях на первых этапах отбора трансгенных организмов от нетрансгенных используются простые методы визуального скрининга. Можно также отобрать растения, имеющие одну или две копии трансгена. Однако, необходимо развивать технологии, позволяющие оценить возможность переноса трансгенов в растения дикого типа, а также, в связи с введением регуляторных нормативных актов, определить количественное содержание трансгенных организмов в продуктах питания, и т.д.
- Например, в Европейский Союз возможно импортировать зерно при количественном содержании в нем ГИО менее 0,9%.



Метод ПЦР анализа

- Лабораторный метод полимеразной цепной реакции используется для определения копий специфического нуклеотидного сиквенса ДНК.
- Сейчас Вам будет продемонстрировано, как работает ПЦР, и что необходимо для успешного проведения ПЦР реакции.



Для чего нужна ПЦР в реальном времени

- К сожалению, одной идентификации наличия или отсутствия трансгенов уже недостаточно для исследователей, правительственных организаций, продавцов или покупателей. Например, они могут пожелать узнать, а какое же содержание трансгенных семян присутствует в продукте. Все это можно сделать с помощью метода количественной ПЦР в реальном времени. Так, можно определить первоначальное количество определенного гена в образце. Можно сказать, гомо- или гемизиготное растение по анализируемому гену, поскольку многие методы трансформации приводят к введению нескольких копий трансгена в геном растения. Используя метод ПЦР в реальном времени можно определить количество копий трансгена.

Что такое ПЦР в реальном времени

- По определению, это ПЦР реакция, детектируемая в «реальном времени», т.е. Когда идентификация и амплификация ДНК измеряется постоянно во время проведения реакционного процесса. Для ПЦР в реальном времени используется лазерная оптика и флюоресцентные молекулы (зонды) для измерения амплификации в каждом цикле реакционного процесса, а не только в конце, после проведения реакции.

Температурные циклы при ПЦР в реальном времени



Пример оборудования, используемого для ПЦР в реальном времени

Процедура ПЦР в реальном времени очень похожа на традиционный метод ПЦР. Как для ПЦР в реальном времени, так и для традиционной ПЦР необходимы циклы нагревания и охлаждения во время протекания реакции. Во время нагревания происходит денатурация ДНК-матрицы, а охлаждение позволяет осуществить отжиг праймеров на соответствующем участке ДНК-матрицы. В некоторых случаях ПЦР в реальном времени, меченные зонды также связываются во время цикла охлаждения. Ключевая разница этих двух методов заключается в том, каким образом, амплифицированный фрагмент ДНК определяется.

Компоненты для ПЦР в реальном времени

- Как и при традиционной ПЦР, для ПЦР в реальном времени необходимы дополнительные нуклеотиды (A, C, G, T), реакционный буфер, специфичные праймеры (пара олигонуклеотидов длиной ~18-20 п.н.), *Taq*-полимераза, магний и вода. Для ПЦР в реальном времени необходимо наличие дополнительного компонента, либо флюоресцентного красителя, который будет связываться с двуцепочечной ДНК, либо флюоресцентно меченных зондов. Меченный зонд – это олигонуклеотид длиной 25-30 п.н., содержащий флюорофор. Флюорофор высвобождает энергию определенной длины волны, что может быть определено прибором для ПЦР в реальном времени.



Что такое зонд?

- Зонд – это специфичная последовательность либо ДНК, либо РНК (в зависимости от эксперимента), которая будет реагировать только с целевым геном/РНК/белком. Зонд метится таким образом, чтобы исследователь мог его легко идентифицировать. Для мечения используют радиоактивные химические вещества, флюорофоры, антитела и т.д. Зонды должны быть очень высоко специфичными, чтобы они могли связываться только с интересующей последовательностью.

Системы флюоресценции

- Для ПЦР в реальном времени обычно используются несколько разных систем. Однако все эти системы принципиально похожи – происходит измерение флюоресценции во время процесса ПЦР. Количество излученной флюоресценции пропорционально количеству продукта (копий специфического трансгена) синтезированному в процессе ПЦР.

Системы флюоресценции

- Простейший метод определения флюоресценции основан на интеркаляции красителя в двуцепочечную ДНК во время ПЦР реакции (Holden et al., 2003; Terry et al., 2002).
- Другой метод связан с использованием химически модифицированных олигонуклеотидов или флюоресцентно меченных проб, которые добавляются в реакцию. Флюоресценция происходит либо после деградации зонда (гидролиз зонда) либо при связывании двух олигонуклеотидов с мишенью (гибридизация зонда). Этот метод определения ПЦР-продукта более специфичен, по сравнению с системой интеркаляции.
- Кроме того, существуют другие методы, например, Скорпион (Whitcome et al., 1999; Thewell et al., 2000); молекулярный бекон (Tyagi and Kramer 1996; Tyagi et al., 2000).

Система SYBR Green-интеркаляция красителя

- Система SYBR Green – это метод интеркаляции красителя и сходен с работой этидиум бромид. SYBR green связывается более эффективно с двухцепочечной ДНК, чем с одноцепочечной ДНК. При образовании комплементарной копии матрицы максимальное количество красителя связывается с вновь образованной двухцепочечной ДНК. Таким образом, происходит детекция сигнала и показывается, что образовалась новая копия целевого гена. К сожалению, SYBR green также связывается с другими двухцепочечными неспецифичными ПЦР продуктами, например с димерами праймеров. Для улучшения специфичности количественного определения трансгена разработаны системы [FRET](#) и [Taqman](#).

Система FRET (Haugland et al., 2002)

- FRET расшифровывается как Флюоресценсная Резонансная Энергия Переноса. При этой системе идентификации необходимо два фланкирующих праймера. Кроме того, необходимы два нуклеотидных зонда (при системе Taqman требуется только один зонд). Зонды должны быть расположены внутри фланкирующих праймеров. На 3' конце одного из химически модифицированных олигонуклеотидов находится флюоресцентная донорная молекула. Эта молекула возбуждается, когда излучается свет длиной 493 нм. На 5' конце другого химически модифицированного олигонуклеотида находится акцепторная молекула, которая флюоресцирует при длине волны 640 нм или 710 нм. Акцептор должен быть расположен возле донора (1-5 п.н.) для переноса энергии с донора на акцептор. Когда они расположены далеко друг от друга, донор излучает свет с длиной волны 493 нм.

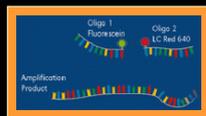
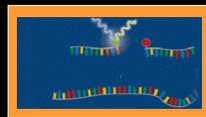
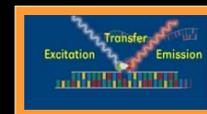


Диаграмма двух меченных зондов, используемых в системе FRET. Oligo 1 – донорная молекула, Oligo 2 –рецептор.



Излучение флюоресценции в системе FRET. Oligo 1 –донорная молекула, Oligo 2 –рецептор.

- Если два зонда расположены близко, свет адсорбируется донорной молекулой и переносится на акцептор, после чего акцепторная молекула будет излучать флюоресценцию с длиной волны 640 - 710 нм.



Oligo 1 и 2 расположены достаточно близко для передачи энергии света акцепторной молекуле, которая затем флюоресцирует.

Флюоресценция измеряется ПЦР машиной, имеющей специальные оптические датчики.



PCR амплификатор для измерения флюоресценции.

При технологии FRET флюоресценция измеряется в конце каждого периода отжига. При технологии Taqman измерение происходит в конце каждого периода элонгации.

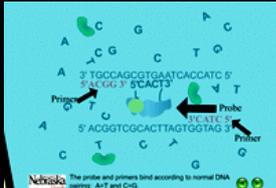


ЗОНД

Система Taqman

- В системе Taqman используется меченный зонд, содержащий репортерную молекулу (FAM) присоединенную к 5' концу олигонуклеотида (желтый шар на рисунке). Эта молекула излучает флюоресценцию при возбуждении светом определенной длины волны (используется прибор Taqman). К репортерной молекуле на 3' конце зонда присоединена стабилизирующая молекула (TAMARA) (облачко на рисунке). Когда стабилизирующая молекула расположена недалеко от репортера, репортер не флюоресцирует. В таком виде зонд находится в начале ПЦР (флюоресценции нет).

Когда ПЦР реакция находится на стадии охлаждения, зонд связывается с ДНК матрицей в соответствии с принципом комплементарности: цитозин (С) с гуанином (G), и аденин (А) с тиминном (Т).



Фермент *Taq* полимеразы связывается сначала с 3' концом праймеров и затем добавляет комплементарные нуклеотиды в направлении 5' → 3' для увеличения копий целевого гена.

Taq полимеразы обладает также экзонуклеазной активностью, что позволяет ей удалять ошибочно спаренные нуклеотиды. В случае ПЦР в реальном времени при достижении *Taq* полимеразой связанного зонда экзонуклеазная активность позволяет ей удалять нуклеотиды зонда и таким образом, добавлять освободившиеся нуклеотиды к новой ДНК матрице. В результате, стабилизирующая молекула отщепляется и происходит флуоресценция. Чем больше копий трансгена присутствует, тем больше флуоресценции фиксируется.



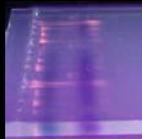
Стабилизирующая и репортерная молекулы разъединены и происходит флуоресценция



Получение данных традиционным методом ПЦР

- При традиционной ПЦР образцы после реакции наносят в гель и проводят разделение фрагментов ДНК. Гель окрашивают и полосы, содержащие амплифицированные фрагменты визуализируют в ультрафиолетовом свете.

Визуализация ДНК в геле помещением в источник ультрафиолетового света.



- Визуализация - это не количественный метод. Можно только определить наличие или отсутствие трансгена.

Получение данных методом ПЦР в реальном времени

- При ПЦР в реальном времени измерение происходит в каждом цикле и данные обрабатываются компьютером. Графики измерения флуоресценции используются для определения экспоненциальной фазы реакции (необходимо для точного определения количества копий гена в начале реакции). В связи с экспоненциальным характером амплификации невозможно определить различия в количестве определяемого гена в разных образцах в конце реакции.

Стрелки показывают когда флуоресценция в системе Taqman была определена на достоверном уровне



Пример ПЦР-РВ для определения содержания ГИО

- Количество циклов - ось x, количество флуоресценции - ось y. Сравнивался неизвестный образец с образцами, содержащими ГИО-ДНК стандарты (10%, 1%, 0.1% и 0.01 % ГИО ДНК). Для образца с 10 % ГИО ДНК 24 цикл - достоверные отличия. Для образца, содержащего 0,01% ГИО - достоверным является 31 цикл. Таким образом, чем больше копий гена присутствует, тем быстрее количество флуоресценции достигает достоверных пороговых значений.



Сравнение образца со стандартом

- Данные флуоресценции неизвестного образца совпадают с данными для стандартного образца, содержащего 0.1% ГИО. Таким образом, неизвестный образец содержит такое же количество ГИО-ДНК, как и стандартный образец, содержащий 0.1% ГИО.



Требования к ПЦР-РВ

- Результаты, полученные методом ПЦР-РВ всегда должны сравниваться с известным контролем.
1. Количество ГИО
 2. Размер ампликона
 3. Источник ДНК
- Эти факторы необходимы для получения воспроизводимых и достоверных результатов методом полимеразной цепной реакции в реальном времени.

Анализ преимуществ и недостатков РВ-ПЦР

Преимущества

- Динамичный количественный анализ
- Высоко чувствительный
- Точный
- Не требует проведения гель-электрофореза
- Идентификация небольших количеств искомой ДНК

Недостатки связаны с тем, что ПЦР-РВ требует:

- хороших реактивов
- Хорошо подобранных праймеров и зондов
- Специфичные условия реакции

Благодарю за внимание