

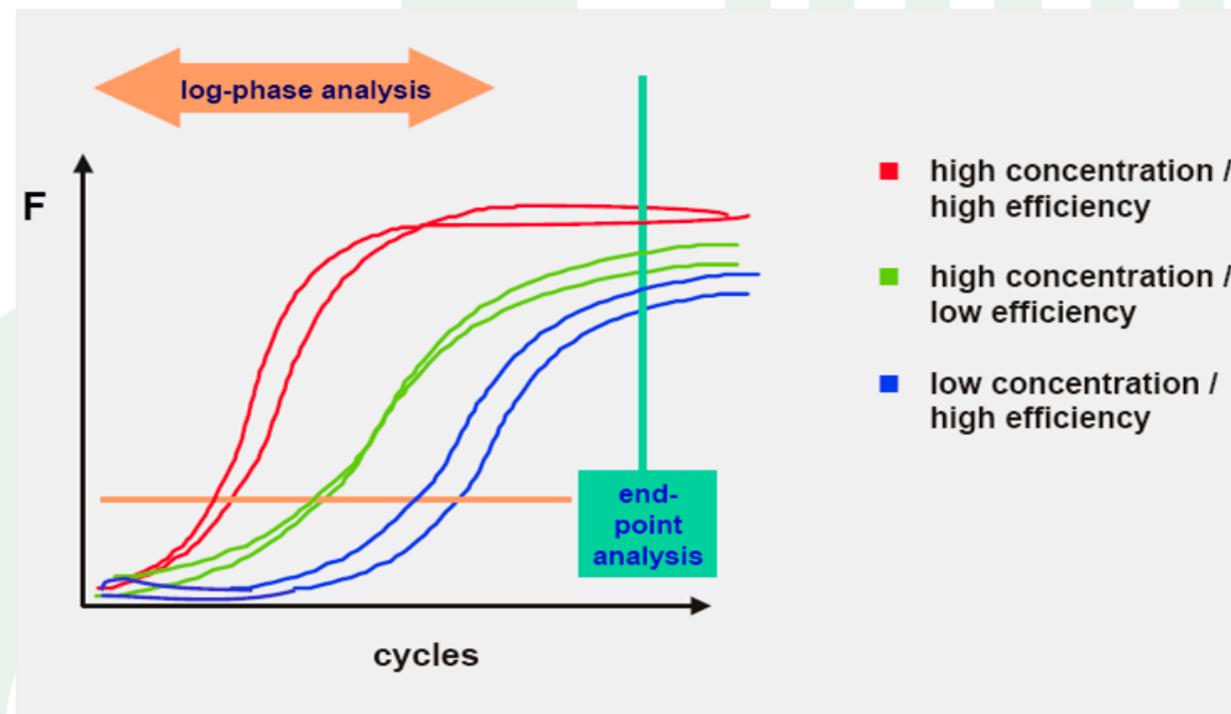
# Ilościowe oznaczanie GMO metodą Real time PCR – sposoby prowadzenia obliczeń

**Magdalena Żurawska-Zajfert**

**IHAR-PIB Radzików, Laboratorium Kontroli GMO**

## Real-Time PCR – PCR ilościowy – qPCR

- PCR w czasie rzeczywistym
- metoda stanowiąca rozwinięcie konwencjonalnego PCR
- wykorzystuje techniki fluorescencyjne
- pozwala na monitorowanie ilości produktu reakcji w każdym cyklu prowadzonej reakcji PCR



Real-Time PCR to:

*”Oglądanie PCR-u w czasie jego trwania”*

Proces ten możemy oglądać dzięki:

fluorescencji znakowanego DNA

instrumentom odczytującym fluorescencję

Detekcja amplifikacji poprzez pomiar fluorescencji w każdym cyklu reakcji PCR

Analiza komputerowa liniowej zależności cykl/fluorescencja w czasie



# Metody wykrywania amplikonu

## Znakowanie amplikonu

SYBR-Green (barwnik interkalujący do DNA)

EVA-Green

LUX™ starter



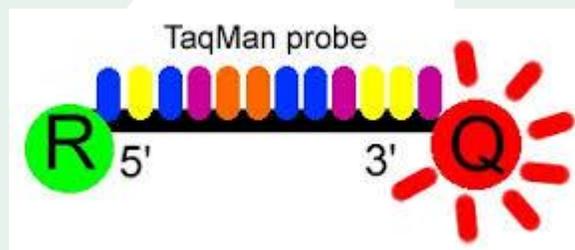
## Wykrywanie amplikonu z użyciem znakowanych sond

Sondy Taq Man

Sondy hybrydizacyjne

Molecular beacons

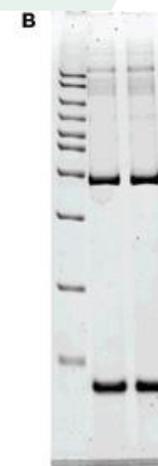
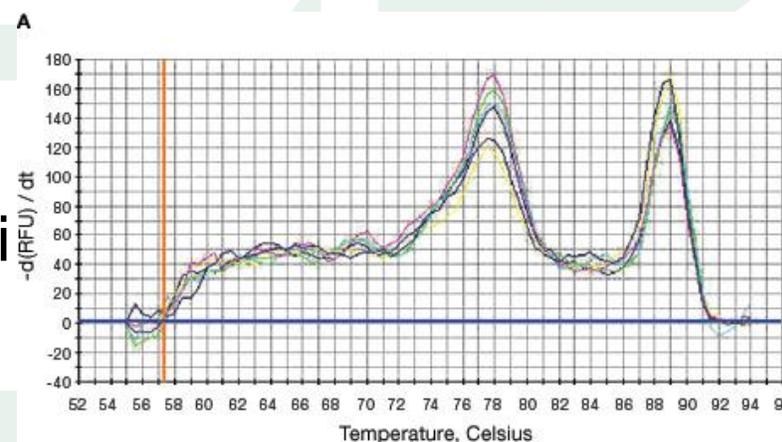
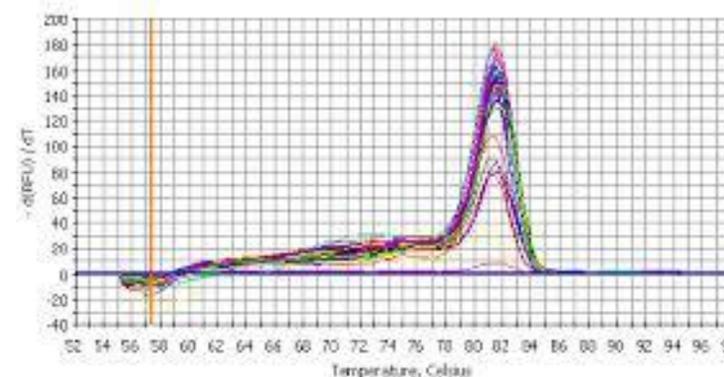
Sondy Scorpion



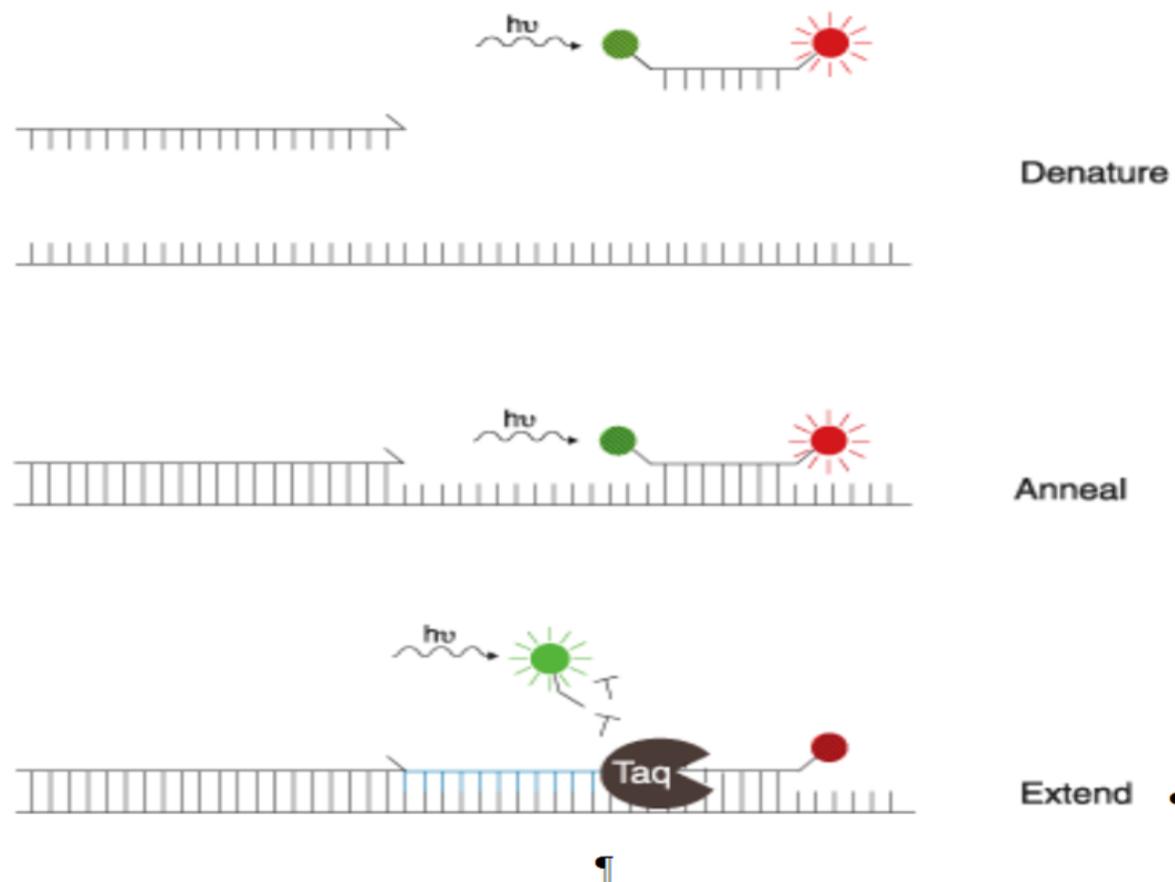
# Real Time PCR – barwniki interkalujące

- SYBR Green
- EVA Green
- Interkalacja do dwuniciowego DNA
- Emitowana fluorescencja jest proporcjonalna do liczby zamplifikowanych cząsteczek i rośnie w każdym cyklu
- Konieczne określenie specyficzności reakcji przez analizę krzywej topnienia produktu

Możliwość wiązania barwników z nieswoistymi produktami PCR (dimery starterów, produkty nieswoistej amplifikacji), - błędna interpretacja wyników reakcji

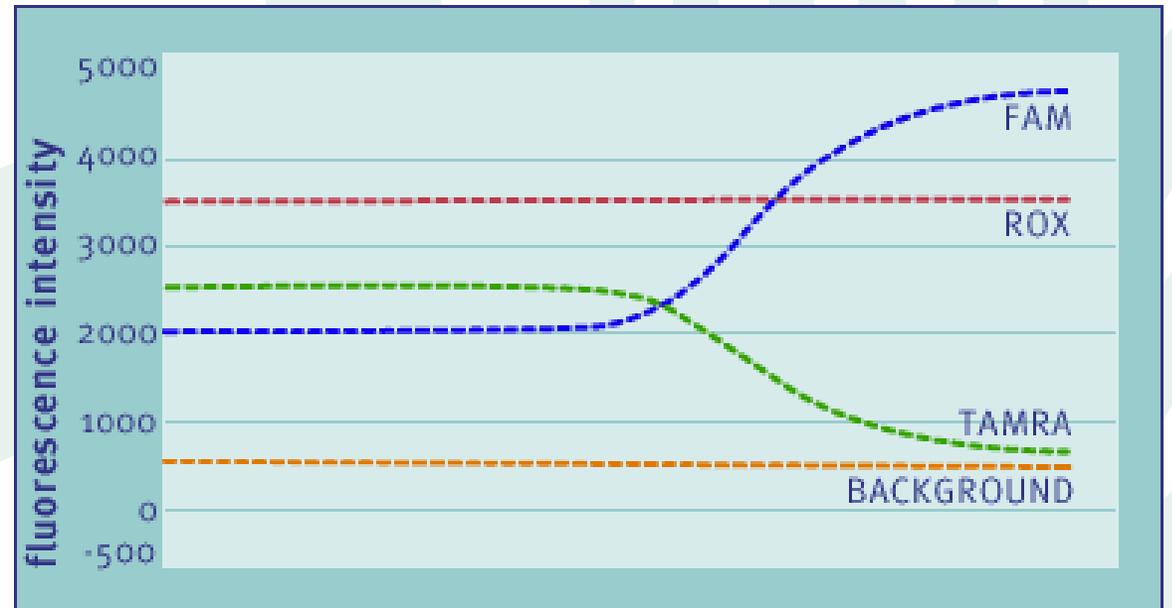


# Zasada działania sond Taqman

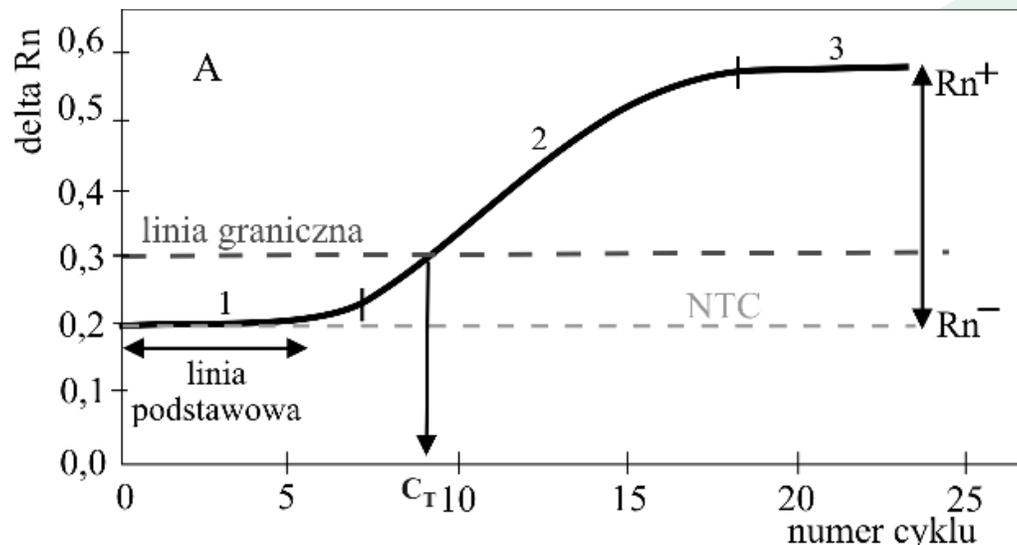


- 20-40 pz
- 40-60% GC
- Brak powtórzonych sekwencji, identycznych nukleotydów GGGG,
- Brak hybrydyzacji ze starterami,
- Bez G na końcu 5'
- 5°C  $T_m$  > od starterów

- Pozytywny wynik reakcji przedstawiony jako wykres zmian w intensywności fluorescencji poszczególnych fluoroforów.
- Dwa barwniki związane z sondą TaqMan to np. 6-karboksyfluoresceina (FAM) i 6-karboksy-tetrametyl-rodamina (TAMRA). Pozytywny wynik reakcji obrazowany jest przez wzrost intensywności fluorescencji FAM i spadku intensywności fluorescencji TAMRA.
- Pasywny barwnik referencyjny np. ROX-barwnik będący wewnętrznym odnośnikiem w reakcji, stosowany do normalizacji i porównania z barwnikiem reporterowym, w celu korekty błędów wynikających z pipetowania czy zmiennych stężeń próbek



## Krzywa amplifikacji PCR

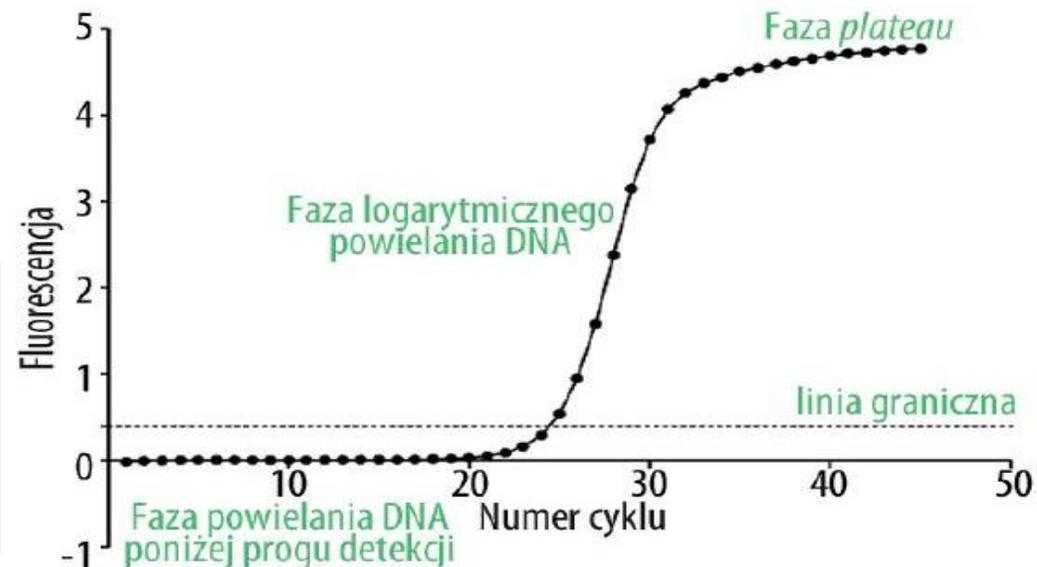


Ciesielska i Sikorski, 2008

**$C_T$** - wartość cyklu przy którym fluorescencja przekracza ustaloną linię graniczną

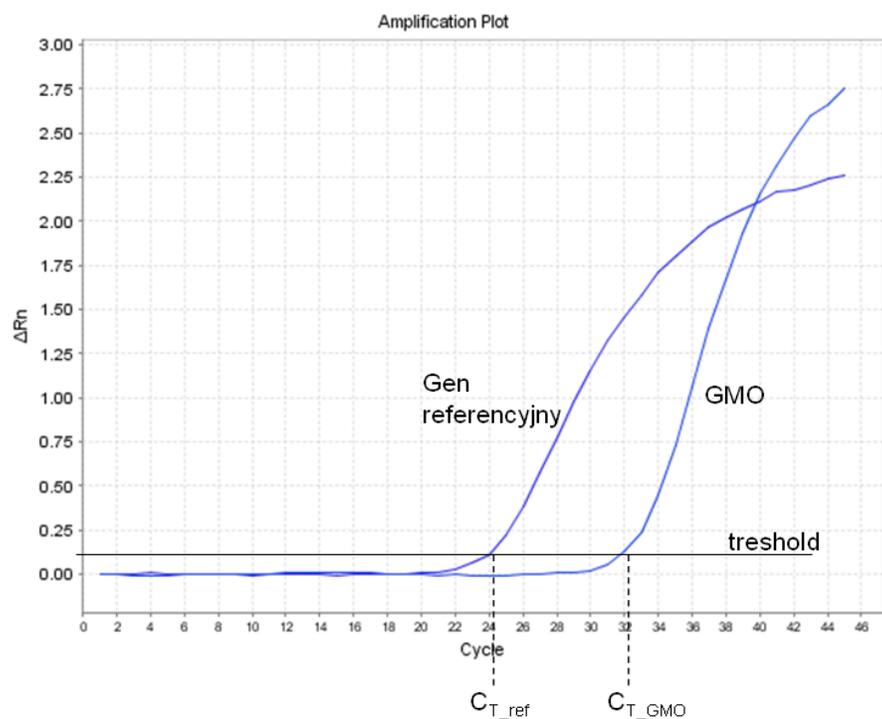
**Baseline** – linia bazowa, linia podstawowa – poziom szumów w pierwszych cyklach, bez wyraźnych zmian fluorescencji (zazwyczaj 5-20 cykli, ustalana dla każdej próbki)

## Przebieg krzywej amplifikacji



1. Powielanie DNA poniżej progu detekcji
2. Faza logarytmiczna - w warunkach idealnych dochodzi do podwajania się liczby kopii DNA w każdym cyklu,
3. Faza przejściowa - obserwuje się hamujący wpływ niedoboru polimerazy, starterów oraz nagromadzonych produktów PCR, przez co amplifikacja stopniowo staje się coraz mniej efektywna,
4. Faza końcowa - plateau, w której nie dochodzi już do powielania DNA.

# Ilościowe oznaczanie GMO



- Różnica w amplifikacji sekwencji specyficznej dla GMO i endogennego genu referencyjnego- podstawą do obliczenia zawartości GMO w próbce
- Porównanie do amplifikacji materiału referencyjnego CRM

## Ilościowe oznaczanie GMO

- powielane są specyficzne sekwencje transgeniczne, a ich ilość określana jest w stosunku do endogennego genu referencyjnego określającego całkowitą ilość DNA w próbce

$$\%GMO = \frac{gmDNA}{referencyjnyDNA} \times 100$$

- system wymaga starterów specyficznych dla transgenu i starterów gatunkowo-specyficznych komplementarnych do endogennego genu referencyjnego

### Geny referencyjne w analizach GMO

gatunkowo –specyficzne

pojedyncze kopie w genomie haploidalnym

reprezentatywne dla różnych linii tego samego gatunku

podczas analizy powielane jak GMO

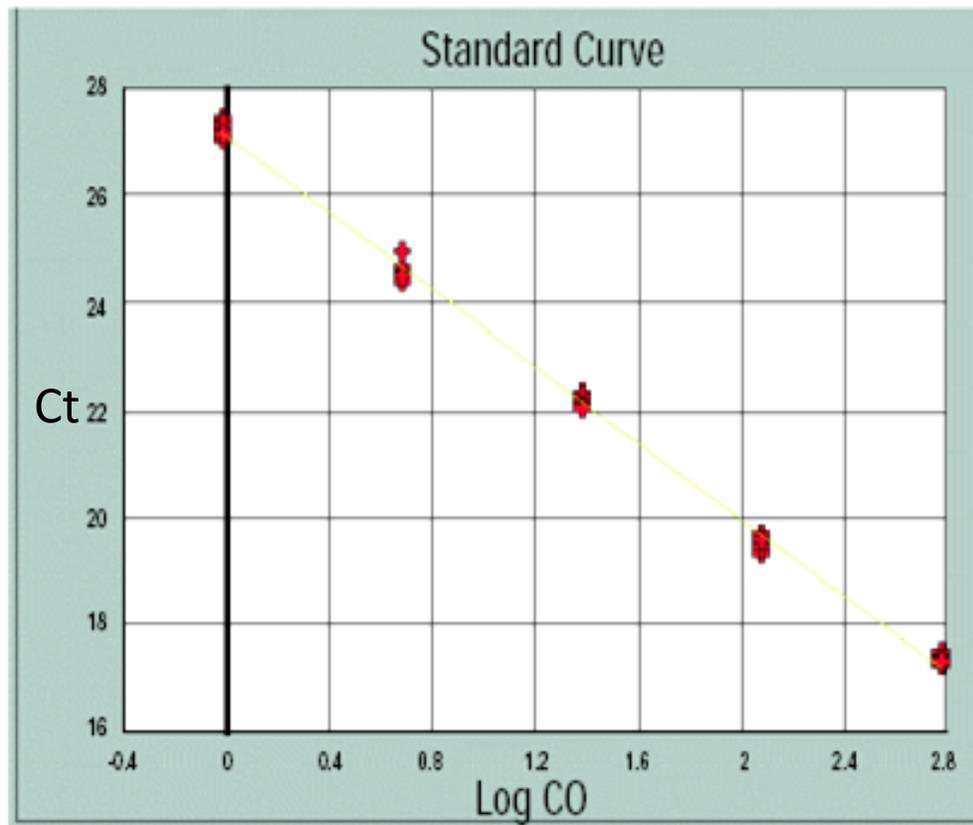
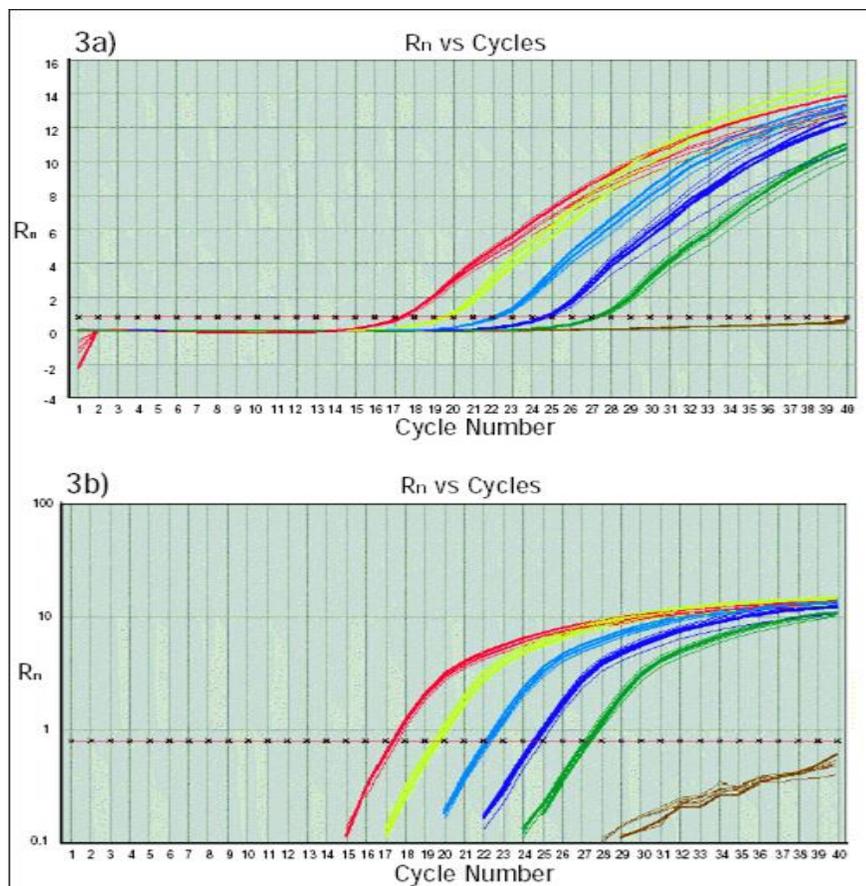
# Wyznaczanie zawartości GMO w próbie

## 1. Metoda krzywej standardowej

Wynik ilościowy otrzymuje się dzięki wyznaczeniu krzywej standardowej

- wymagane jest zastosowanie seryjnych rozcieńczeń standardu DNA o znanej liczbie cząstek (dwie krzywe -dla GMO i genu referencyjnego)
- zastosowanie izolatów DNA z różnych CRMów – jedna krzywa standardowa, metoda  $\Delta\Delta\text{Ct}$

## 2. Oznaczenie ilościowe względne - metoda porównawcza $\Delta\Delta\text{Ct}$

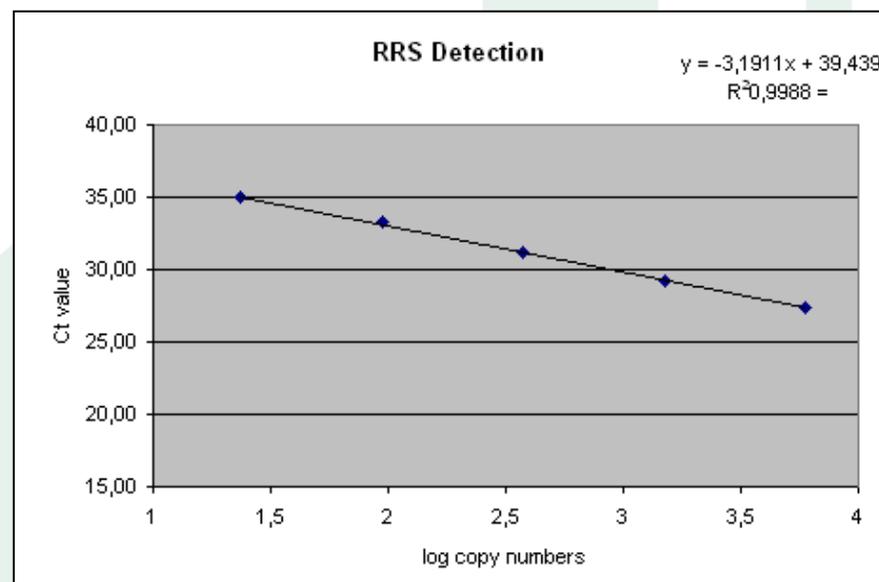
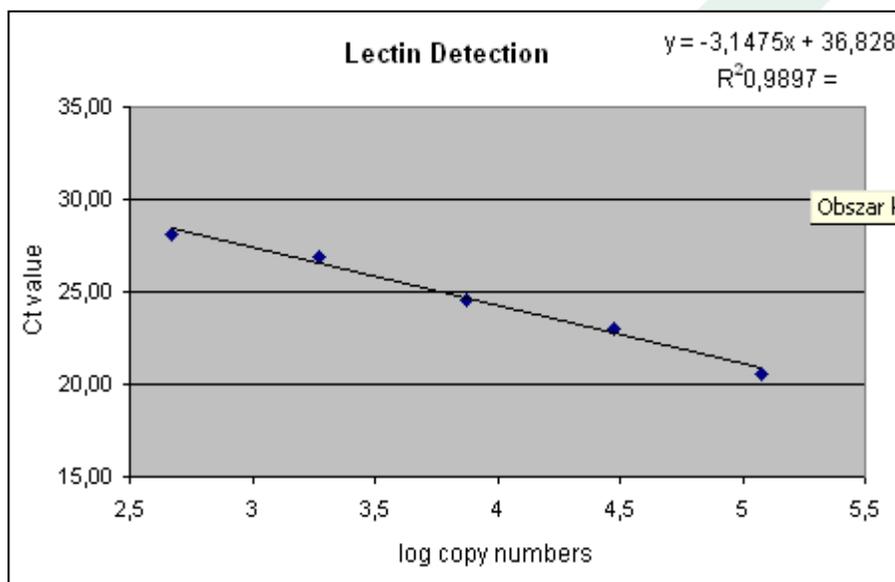


$$y = -3.3386x + 39.57$$

$$R^2 = 0.9933$$

# Dwie oddzielne krzywe standardowe: dla genu referencyjnego i dla transgenu

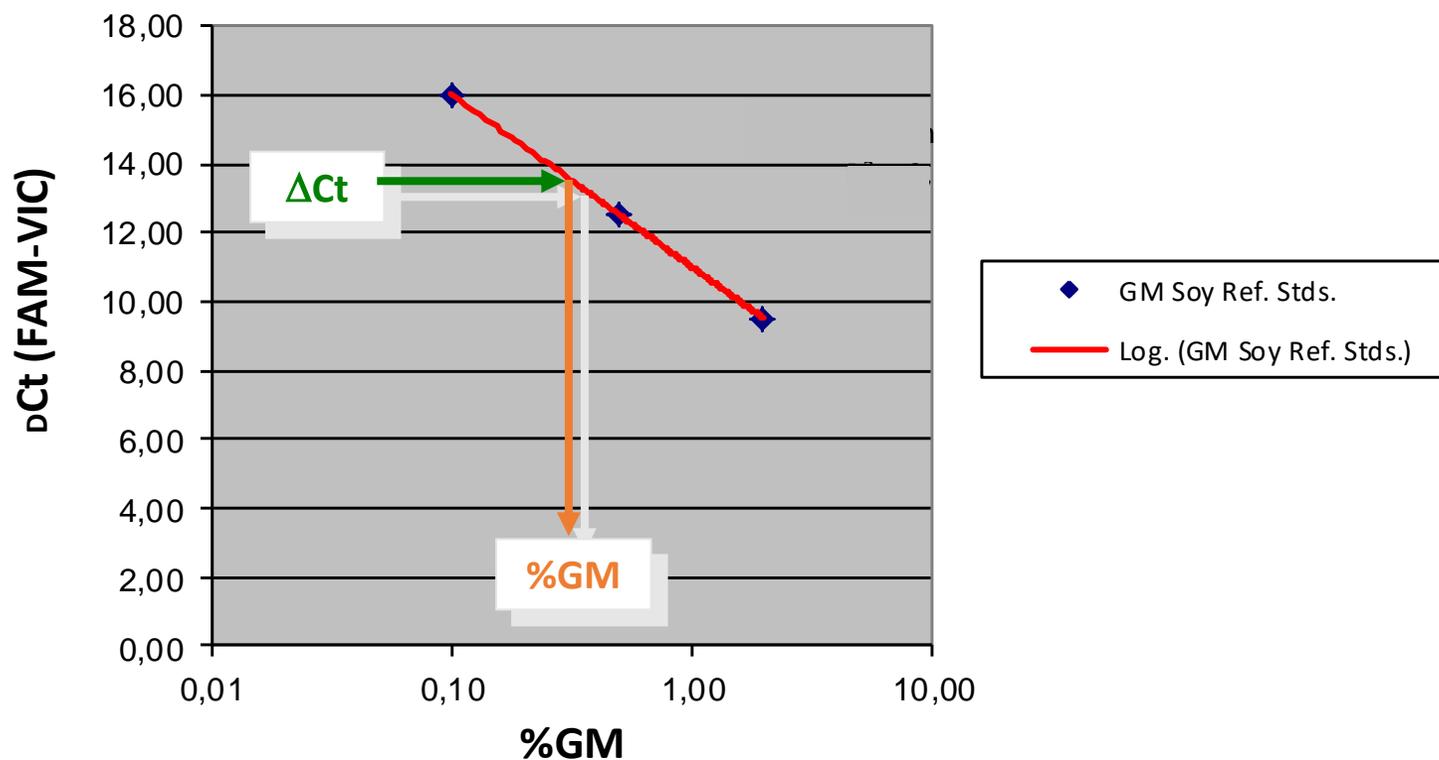
(wyliczenie ilości specyficznych sekwencji GMO i referencyjnych sekwencji endogennych)



Im bardziej zbliżone są efektywności 2 esejów (GMO i Ref), a ich wartości bliższe są 1, tym wiarygodniejsze będą wyniki

$$\%GMO = \frac{\text{liczba sekwencji GMO w genomie haploidalnym}}{\text{liczba sekwencji endogennego genu referencyjnego w genomie haploidalnym}} \times 100\%$$

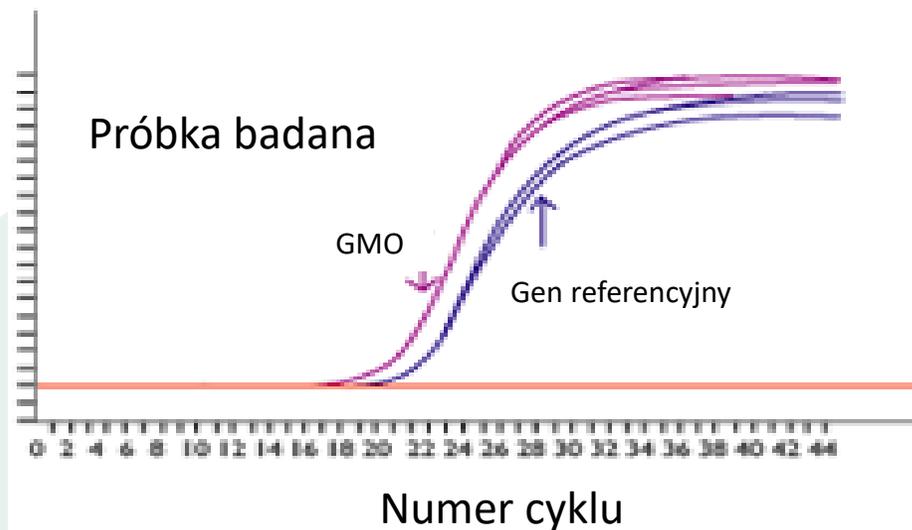
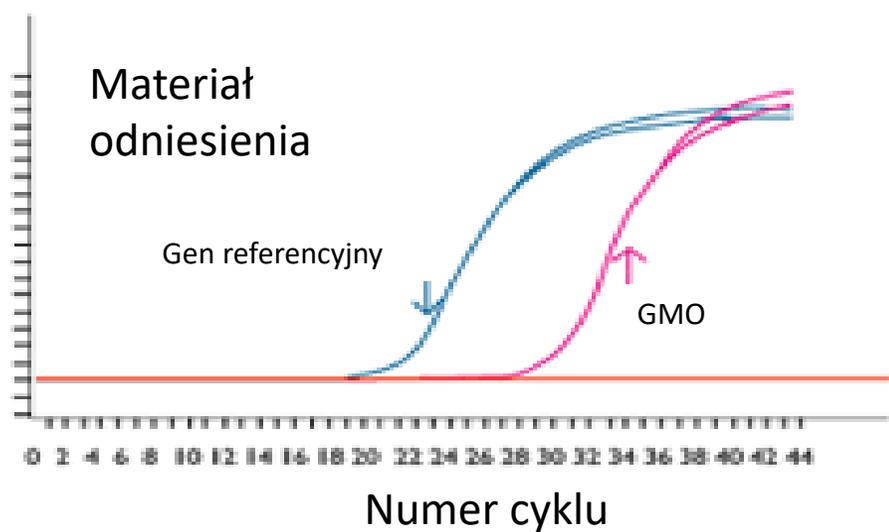
Krzywa standardowa wartości ( $\Delta C_t$ ), powstaje przez zastosowanie serii próbek o różnych znanych zawartościach GMO (IRMM)



- Im bardziej zbliżone są efektywności 2 esejów (GMO i Ref), a ich wartości bliższe są 1, tym wiarygodniejsze będą wyniki!
- $\Delta C_t$  pozostaje niezmienna, gdzie  $\Delta C_t = C_{T \text{ genu referencyjnego}} - C_{T \text{ GMO}}$
- Optymalne nachylenie krzywej (slope = -3,3 do -3,4)

# Metoda $\Delta\Delta C_t$

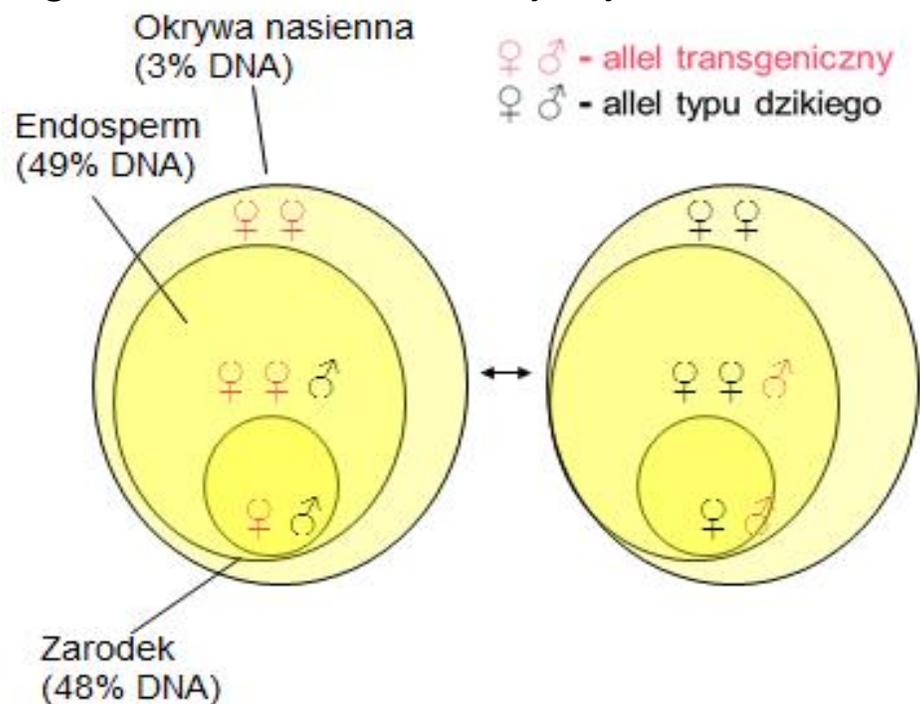
względem materiału odniesienia np. 1%



MATERIAŁY REFERENCYJNE		CERTYFIKOWANE MATERIAŁY REFERENCYJNE
Homogeniczność Odpowiednia stabilność	Charakterystyka materiału	Homogeniczność Odpowiednia stabilność
-	Dodatkowe badania	Metrologicznie wyznaczona potwierdzona na certyfikacie określona zawartość gm w materiale
Zapewniona określona homogeniczność i stabilność	Dołączone informacje	Stwierdzona określona homogenność i stabilność Właściwość wartości CRM potwierdzona odpowiednim system referencyjnym Określone zastosowanie
Określanie precyzji metod Rozwój nowych metod	Zastosowanie	Kalibracje Walidacje metod Zapewnienie i kontrola jakości badań

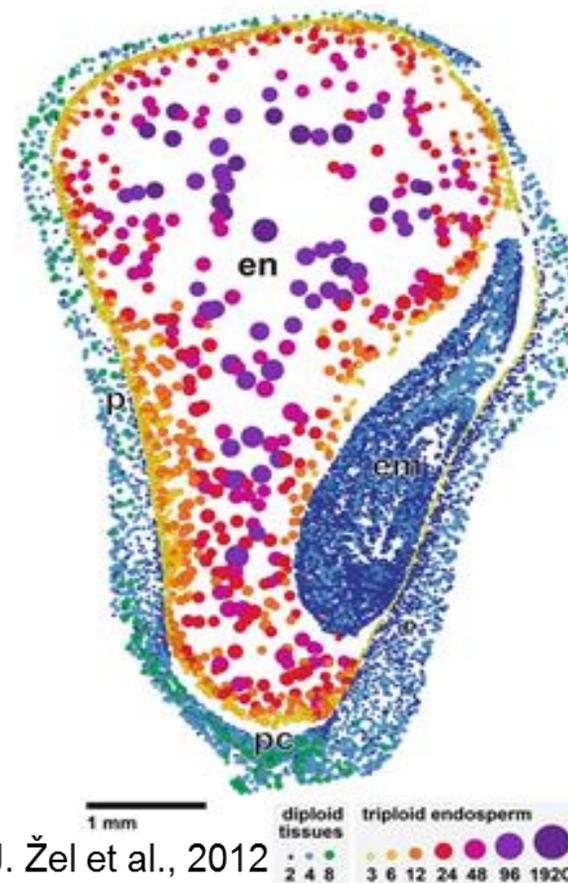
# Zygotyczność GM kukurydzy

Biorąc pod uwagę tylko zarodek i endosperm (97% DNA) w zależności od pochodzenia allelu transgenicznego mamy 3/5 lub 2/5 liczby kopii transgenu w ziarniaku kukurydzy.



I. Taverniers, 2005

Endoreduplikacja w tkankach ziarniaka



J. Žel et al., 2012

## Przeliczenie jednostek hge/mass

- % GM [mass] = % GM [hge]/zygotyczność

gdy:

- % GM [hge] = 0,06%

to:

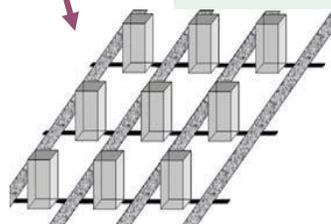
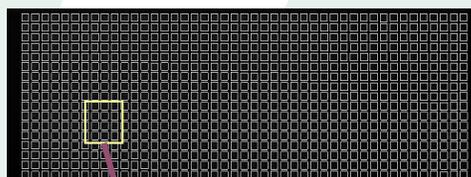
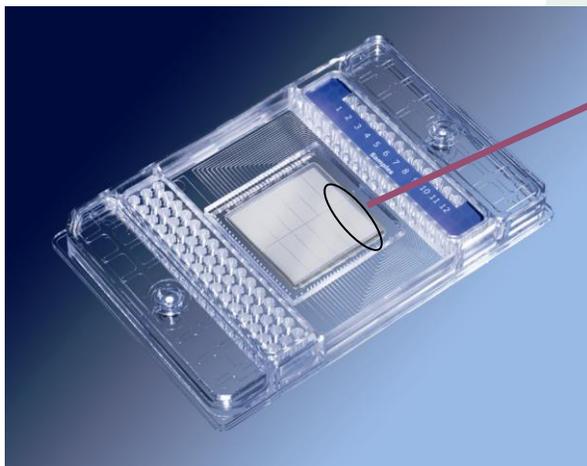
Sample Zygoty	Zygoty <sub>market</sub>	% GM (Mass)
market 100% Male GM hybrid	0,4	0,15%
market 100% Female GM hybrid	0,6	0,10%
market 100% Homozygous	1	0,06%
Expert Opinion hybrid feed maize	0,5	0,12%

## Problemy Real time PCR

- Niewykładnicza amplifikacja w początkowych cyklach
- Mała liczba kopii sekwencji docelowej w próbce-  
trudności z wykryciem
- Wydajność reakcji dla sekwencji szukanej inna niż dla  
genu referencyjnego
- Niezoptymalizowana metoda, wadliwy gen referencyjny
- Inhibitory reakcji w próbkach

# Cyfrowy PCR – digital PCR

- Digital PCR: przełożenie danych wykładniczych (analogowe) na sygnały cyfrowe (0/1)
- Trawienie DNA enzymem restrykcyjnym przed reakcją PCR
- Macierz: 12 paneli, każda po 765 części
- Objętość reakcji 6 nl (4,6  $\mu$ l na panel)



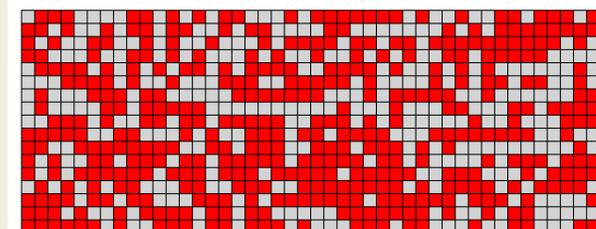
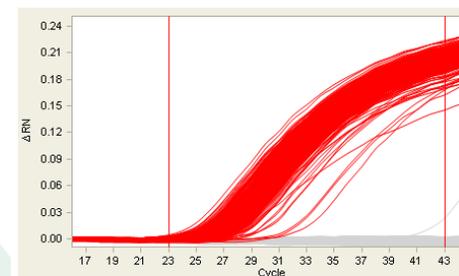
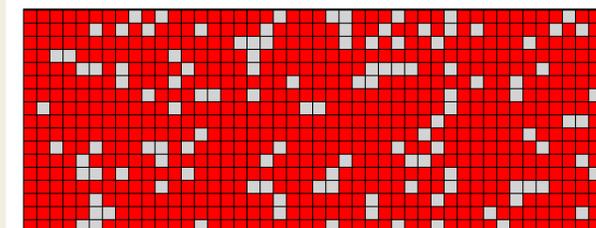
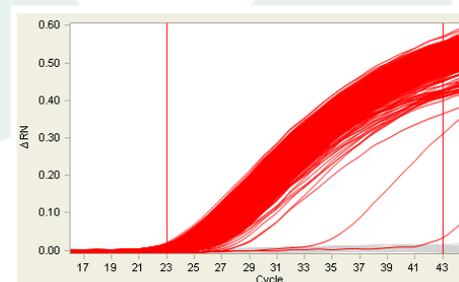
Obliczenie wyników- rozkład dwumianowy

$$M = \frac{\log\left(1 - \frac{H}{C}\right)}{\log\left(1 - \frac{1}{C}\right)}$$

M- liczba kopii w próbce

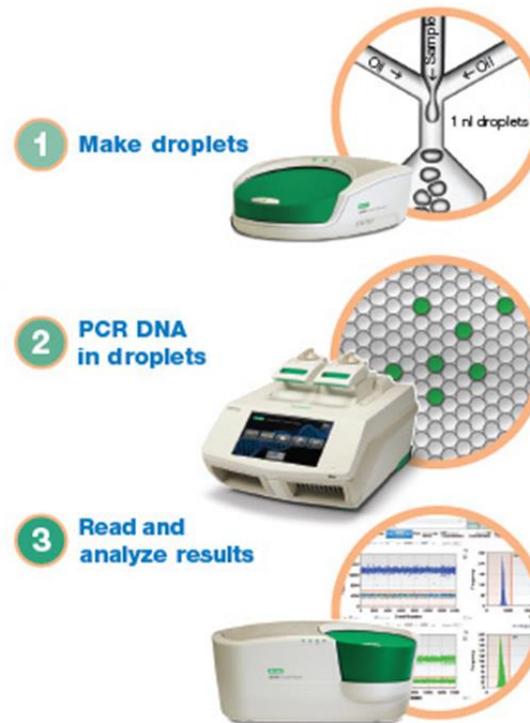
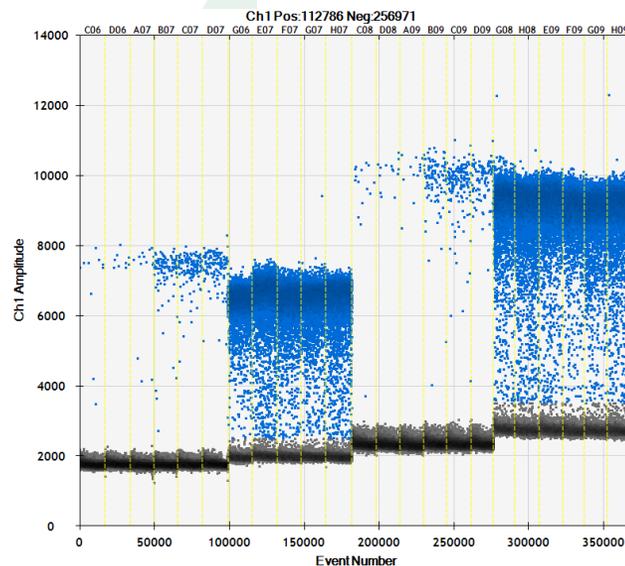
H- liczba pozytywnych sygnałów amplifikacji w panelu

C- całkowita liczba części w panelu (765)



# PCR cyfrowy – droplet digital PCR

- Sondy fluorescencyjne lub barwnik EvaGreen
- Analiza end-point
- Obliczenie liczby kopii szukanej sekwencji w próbce- rozkład Poissona
- Zawartość GMO= liczba kopii szukanej sekwencji/liczba kopii genu referencyjnego



## Digital PCR – zalety i wady

- Oznaczenie ilościowe, jednostka: % kopii GM DNA w przeliczeniu na genom haploidalny
- Obliczenie bezpośrednie, brak konieczności stosowania materiałów referencyjnych
- Wysoka wartość metrologiczna oznaczenia
- Zastosowanie do analiz GMO
- Zastosowanie do walidowania materiałów referencyjnych w odniesieniu do liczby kopii DNA
- Zastosowanie do oznaczania liczby kopii genów w genomie
- Specjalny sprzęt i oprogramowanie, wysokie koszty

## Dziękuję za uwagę

Radzików  
05-870 Błonie  
tel. +48 22 733 45 00  
NIP: 5290007029  
REGON: 000079480  
e-mail: [postbox@ihar.edu.pl](mailto:postbox@ihar.edu.pl)  
[www.ihar.edu.pl](http://www.ihar.edu.pl)

**Magdalena Żurawska-Zajfert**

tel. 22 733 45 26 lub 22 733 45 00 wew. 319  
e-mail: [m.zurawska@ihar.edu.pl](mailto:m.zurawska@ihar.edu.pl)