



Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

MŠMT
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní
plán
obnovy

Advanced techniques in the diagnostics of viral infections in science and research

Vladimir Celer

Department of Infectious Diseases and Microbiology, VETUNI

Roman Pogranichniy

College of Veterinary Medicine, Kansas State university



Principles of clinical samples handling



- Compliance with general rules - biological risks
- Use of protective equipment - gloves, shield...
- Decontamination of the material with 10 % bly
- Appropriate waste management
- Glove!!!! Essential when manipulating RNA !



Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

MŠMT
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní
plán
obnovy

Types of molecular diagnostic samples

Full blood

Bone marrow

Serum/plasma

Smears from the mucous
membrane

Cell cultures

Blood stains

Body fluids

CSF

Bronchoalveolar lavage

Amniotic fluid

Semen

Tissue samples

fresh / frozen

Embedded in paraffin

Hair

Anti - coagulant substances

EDTA

Sodium citrate

Heparin

PCR Inhibitors



Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

MŠMT
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní
plán
obnovy

Sample packing and shipping:

Freezing???

Avoid temperature changes

Avoid temperature extremes

The three-pack rule

1. Mechanically resistant packaging
2. Absorbent layer
3. Impermeable layer



Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

MŠMT
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní
plán
obnovy

Sample storage — DNA

Blood, bone marrow, body fluids...

22-25 °C Unsuitable (<24 h)

2-8 °C Max. 72 hours

– 20 °C Not suitable

– 70 °C Depending on the application

Do not freeze blood and bone marrow before lysis of erythrocytes



Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

MŠMT
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní
plán
obnovy

Specimen storage — RNA

Blood, bone marrow, body fluids...

22-25 °C: Unsuitable, up to 2 hours

2-8 °C: Unsuitable, up to 2 hours

– 20 °C: 2-4 weeks

– 70 °C: Suitable

Do not freeze blood and bone marrow before lysis of erythrocytes



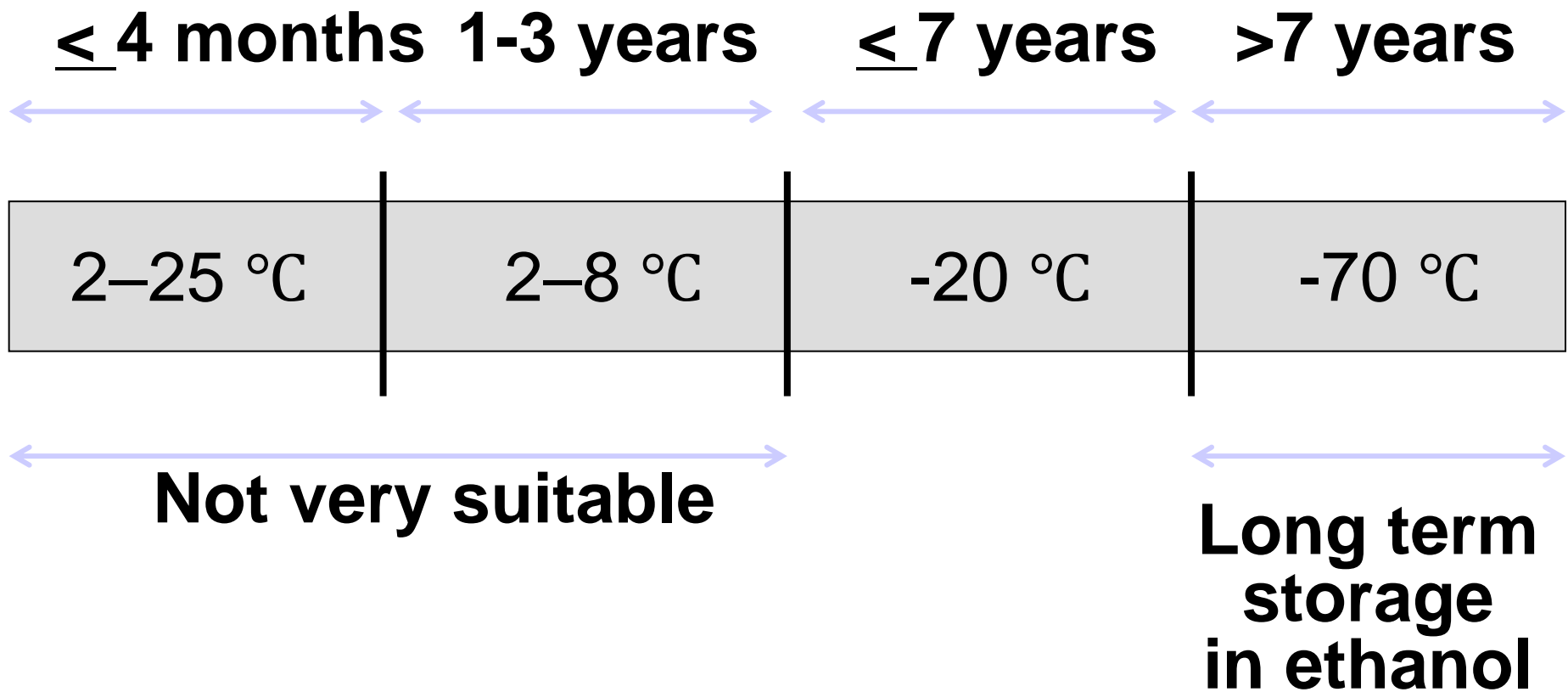
Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

MŠMT
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní
plán
obnovy

DNA storage



Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

MŠMT
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní
plán
obnovy

NK preparation - what to take into account??

The quantity or volume of DNA or RNA needed for test

Number of samples

- Centrifuge capacity
- The speed of the methods used

Automated systems?

Microtiter plates

semi - automated systems



Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

MŠMT
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní
plán
obnovy

Precautions for working with RNA

RNA is a very unstable molecule !

Easily degraded

Sterile, plastic utensils marked “ For **RNA** Use Only ”

Always use gloves!

Specially treated water (DEPC)



Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

MŠMT
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní
plán
obnovy

With placing of NK

DNA in TE buffer at 4 °C for weeks at –20 °C to -80 °C (long term)

RNA in Rnase free, ultra pure water at –70 °C



Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

**MS
MT**
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní
plán
obnovy

Analysis and characterization of nucleic acids



Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

**MS
MT**
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní
plán
obnovy

NA analysis

DNA

- Amplification methods (PCR, LCR)
- Hybridization methods (Southern blot)
- Cleavage with restriction enzymes

RNA

- Amplification methods (RT-PCR)
- Hybridization methods (Northern blot)



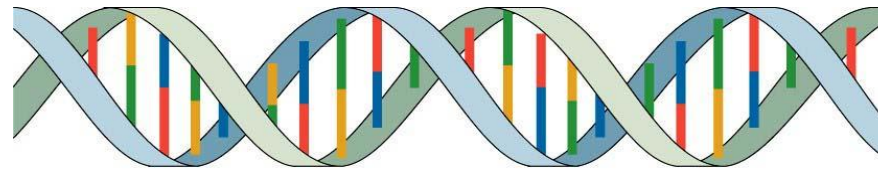
Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

MŠMT
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

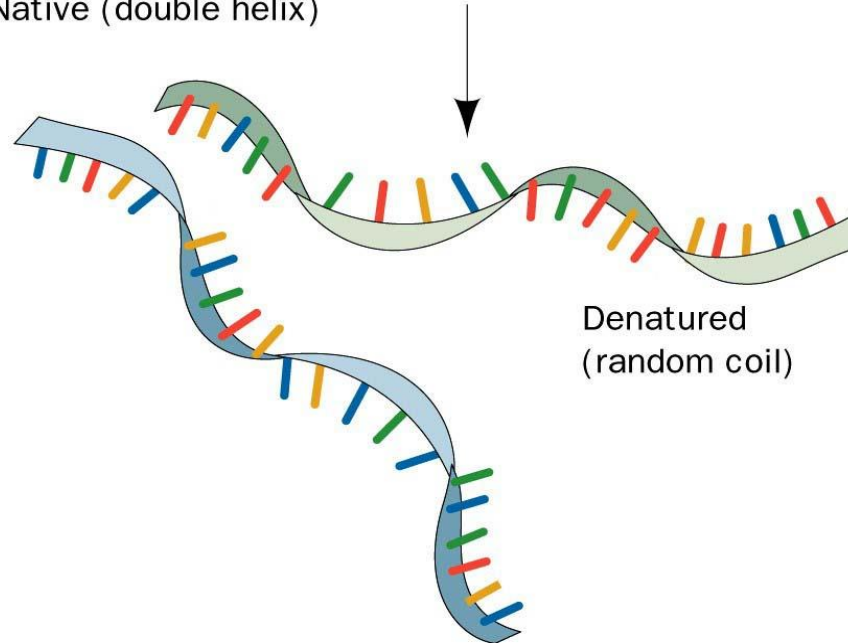


Národní
plán
obnovy

DNA denaturation



Native (double helix)



Denatured
(random coil)



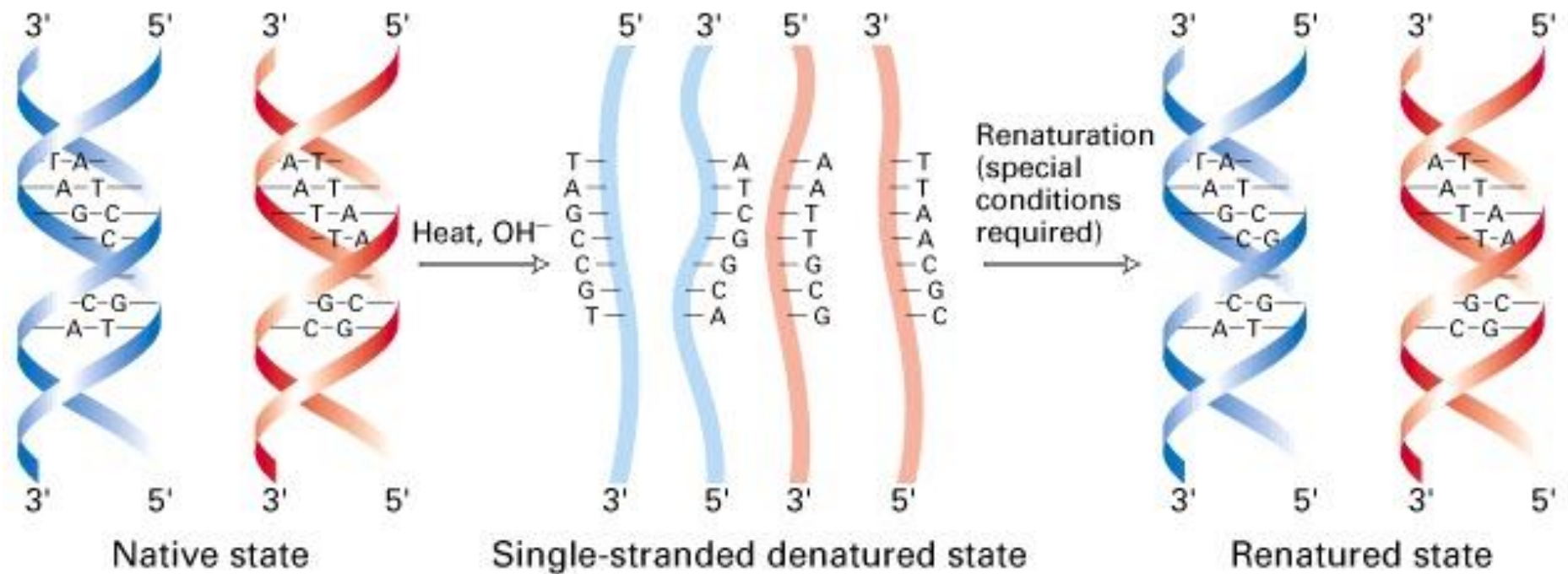
Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

**MS
MT**
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní
plán
obnovy

Denaturation and renaturation



NA amplification



Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

**MS
MT**
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



**Národní
plán
obnovy**

Polymerase Chain Reaction

Enzymatic amplification of a specific DNA fragment



Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

MŠMT
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní
plán
obnovy

Kary Mullis, PCR and the Nobel Prize

Knew that you could boil dsDNA to get ssDNA

Knew that you could use primers to initiate DNA synthesis

Knew that a cheap, commercial enzyme was available (Klenow fragment of *E. coli* DNA polymerase)



Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

MŠMT
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní
plán
obnovy

Kary Mullis, PCR and the Nobel prize

He wanted to get a large amount of DNA from a single copy

He originally used the "3 students" method

1. Denaturing one
2. Annealing one
3. Extending one



Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

MŠMT
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní
plán
obnovy

Three steps of PCR

Denaturation template

Usually 95 °C

Annealing primers

annealing temperature depends on the G+C content

High temperatures lead to high selectivity

Extension of the new strand



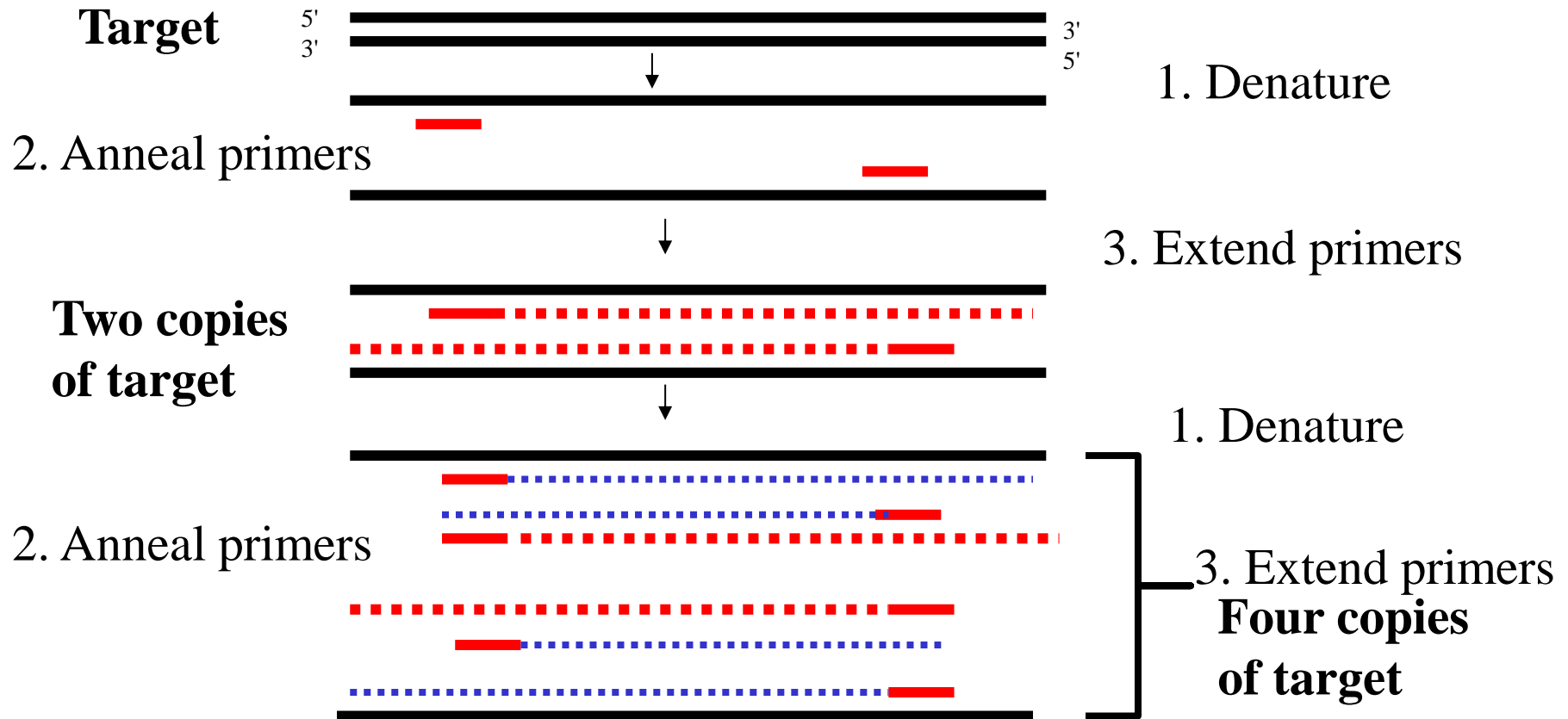
Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

MŠMT
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní
plán
obnovy

PCR AMPLIFICATION

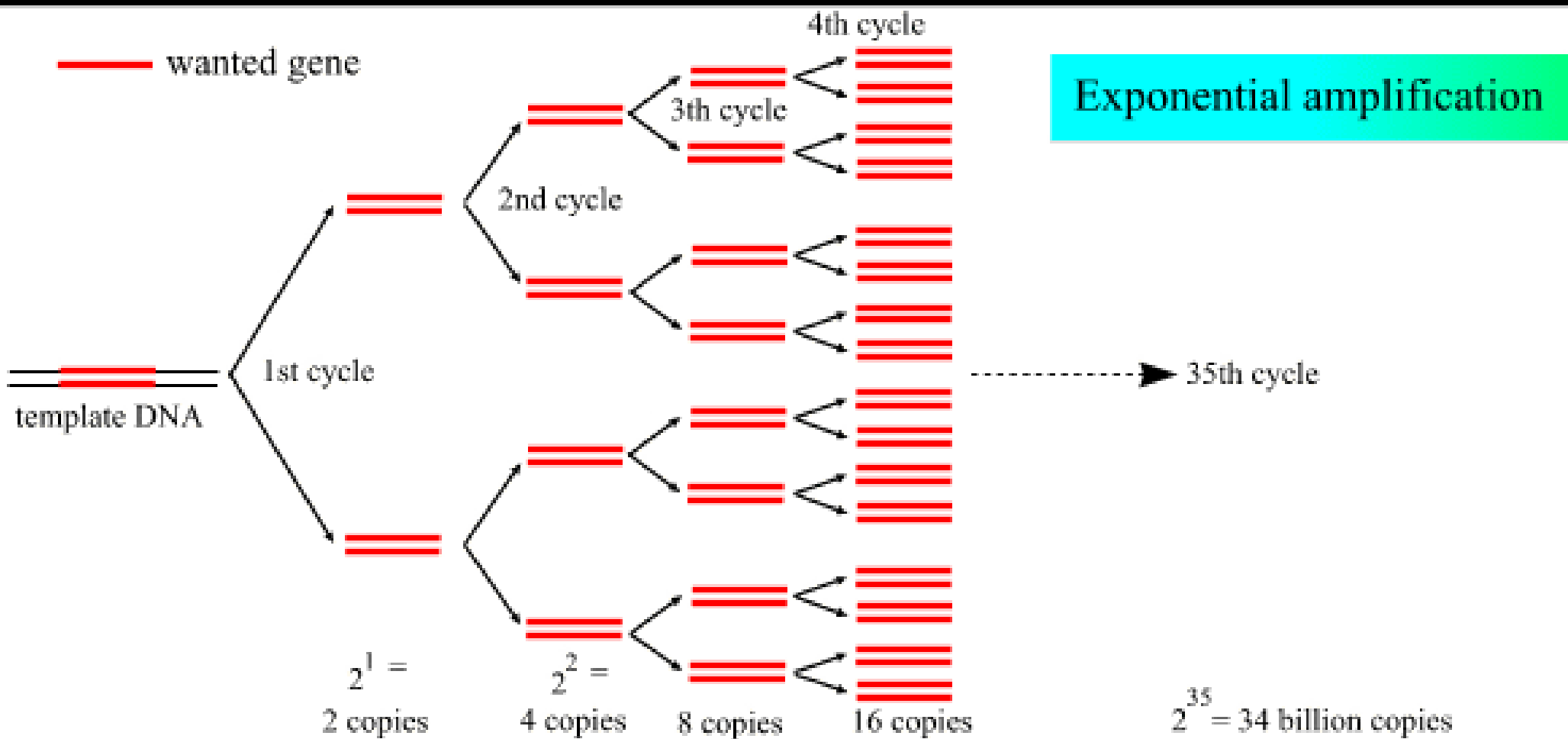


Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

MŠMT
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní
plán
obnovy



(Andy Vierstraete 2001)



Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

MŠMT
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní
plán
obnovy

PCR Primers

Primers are ssDNA fragments 18–30 bp long complementary to the sequences flanking the amplified region of the genome

The primers are responsible for PCR specificity

The size of the PCR product depends on the primers position



Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

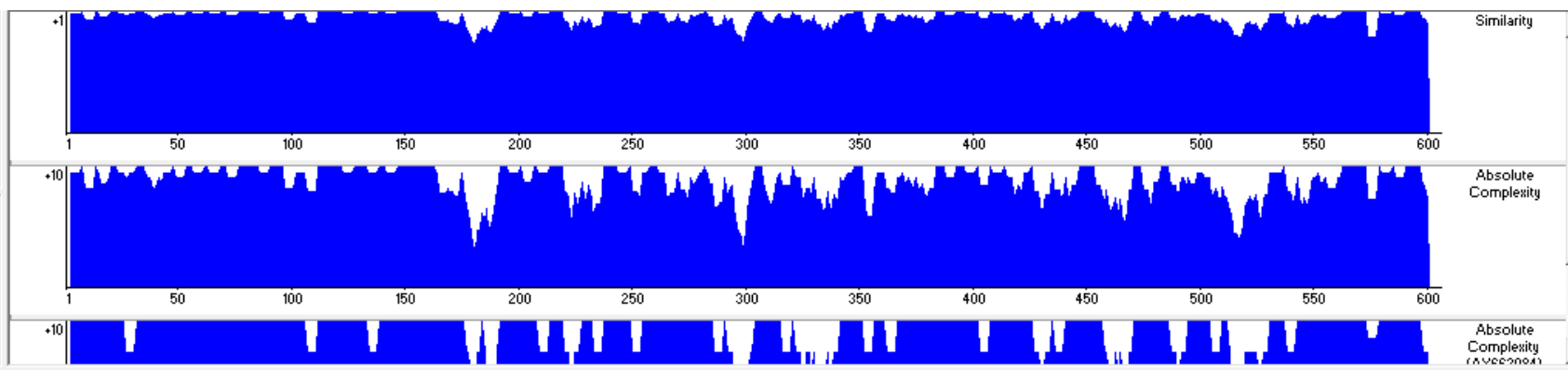
**MS
MT**
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní
plán
obnovy

- AY035909 (606)
- AY035910 (606)
- AY035911 (606)
- AY035912 (606)
- AY035913 (606)
- AY035914 (606)

- AX663084 (0.0050)
- AX663099 (0.0000)
- AY035900 (0.0000)
- AY035901 (0.0000)
- AY035909 (0.0349)
- AY035914 (0.0451)



	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
AX663084	261	CCATTTT	TTGACGGCT	CGGTCT	CGGCT	GTATCCACT	GCAGGATTT	GTTGGCGG	GCGGTAC	GTACTCTGCAG	CGTCTACGGC	GCTTGTGCT	TTCGCAGCG	TTCGTATGTTT	TGTCATCCGTGCTGCTAAAAATTGCATGG
AX663099	261	CCATTTT	TTGACGGCT	CGGTCT	CGGCT	GTATCCACT	GCAGGATTT	GTTGGCGG	GCGGTAC	GTACTCTGCAG	CGTCTACGGC	GCTTGTGCT	TTCGCAGCG	TTCGTATGTTT	TGTCATCCGTGCTGCTAAAAATTGCATGG
AY035900	261	CCATTTT	TTGACGGCT	CGGTCT	CGGCT	GTATCCACT	GCAGGATTT	GTTGGCGG	GCGGTAC	GTACTCTGCAG	CGTCTACGGC	GCTTGTGCT	TTCGCAGCG	TTCGTATGTTT	TGTCATCCGTGCTGCTAAAAATTGCATGG
AY035901	261	CCATTTT	TTGACGGCT	CGGTCT	CGGCT	GTATCCACT	GCAGGATTT	GTTGGCGG	GCGGTAC	GTACTCTGCAG	CGTCTACGGC	GCTTGTGCT	TTCGCAGCG	TTCGTATGTTT	TGTCATCCGTGCTGCTAAAAATTGCATGG
AY035909	261	CCATTTT	TTGACGGCT	CGGTCT	CGGCT	GTATCCACT	GCAGGATTT	GTTGGCGG	GCGGTAC	GTACTCTGCAG	CGTCTACGGC	GCTTGTGCT	TTCGCAGCG	TTCGTATGTTT	TGTCATCCGTGCTGCTAAAAATTGCATGG
AY035914	261	CCATTTT	TTGACGGCT	CGGTCT	CGGCT	GTATCCACT	GCAGGATTT	GTTGGCGG	GCGGTAC	GTACTCTGCAG	CGTCTACGGC	GCTTGTGCT	TTCGCAGCG	TTCGTATGTTT	TGTCATCCGTGCTGCTAAAAATTGCATGG
AY035903	261	CCATTTT	TTGATGCGCT	CGGTCT	CGGGCT	GTATCCACT	GCAGGATTT	GTTGGCGG	GCGGTAC	GTACTCTGCAG	CGTCTACGGC	GCTTGTGCT	TTCGCAGCG	TTCGTATGTTT	TGTCATCCGTGCTGCTAAAAATTGCATGG
AY035908	261	CCATTTT	TTGACGGCT	CGGTCT	CGGGCT	GTATCCACT	GCAGGATTT	GTTGGCGG	GCGGTAC	GTACTCTGCAG	CGTCTACGGC	GCTTGTGCT	TTCGCAGCG	TTCGTATGTTT	TGTCATCCGTGCTGCTAAAAATTGCATGG
AY035905	261	CCATTTT	TTGACGGCT	CGGTCT	CGGGCT	GTATCCACT	GCAGGATTT	GTTGGCGG	GCGGTAC	GTACTCTGCAG	CGTCTACGGC	GCTTGTGCT	TTCGCAGCG	TTCGTATGTTT	TGTCATCCGTGCTGCTAAAAATTGCATGG
AY035902	261	CCATTTT	TTGACGGCT	CGGTCT	CGGGCT	GTATCCACT	GCAGGATTT	GTTGGCGG	GCGGTAC	GTACTCTGCAG	CGTCTACGGC	GCTTGTGCT	TTCGCAGCG	TTCGTATGTTT	TGTCATCCGTGCTGCTAAAAATTGCATGG
AY035904	261	CCATTTT	TTGATGCGCT	CGGTCT	CGGGCT	GTATCCACT	GCAGGATTT	GTTGGCGG	GCGGTAC	GTACTCTGCAG	CGTCTACGGC	GCTTGTGCT	TTCGCAGCG	TTCGTATGTTT	TGTCATCCGTGCTGCTAAAAATTGCATGG
AY035907	261	CCATTTT	TTGATGCGCT	CGGTCT	CGGGCT	GTATCCACT	GCAGGATTT	GTTGGCGG	GCGGTAC	GTACTCTGCAG	CGTCTACGGC	GCTTGTGCT	TTCGCAGCG	TTCGTATGTTT	TGTCATCCGTGCTGCTAAAAATTGCATGG
AY035910	261	CCATTTT	TTGATGCGCT	CGGTCT	CGGGCT	GTATCCACT	GCAGGATTT	GTTGGCGG	GCGGTAC	GTACTCTGCAG	CGTCTACGGC	GCTTGTGCT	TTCGCAGCG	TTCGTATGTTT	TGTCATCCGTGCTGCTAAAAATTGCATGG
AY035911	261	CCATTTT	TTGATGCGCT	CGGTCT	CGGGCT	GTATCCACT	GCAGGATTT	GTTGGCGG	GCGGTAC	GTACTCTGCAG	CGTCTACGGC	GCTTGTGCT	TTCGCAGCG	TTCGTATGTTT	TGTCATCCGTGCTGCTAAAAATTGCATGG
AY035912	261	CCATTTT	TTGATGCGCT	CGGTCT	CGGGCT	GTATCCACT	GCAGGATTT	GTTGGCGG	GCGGTAC	GTACTCTGCAG	CGTCTACGGC	GCTTGTGCT	TTCGCAGCG	TTCGTATGTTT	TGTCATCCGTGCTGCTAAAAATTGCATGG
AY035906	261	CCATTTT	TTGACGGCT	CGGTCT	CGGGCT	GTATCCACT	GCAGGATTT	GTTGGCGG	GCGGTAC	GTACTCTGCAG	CGTCTACGGC	GCTTGTGCT	TTCGCAGCG	TTCGTATGTTT	TGTCATCCGTGCTGCTAAAAATTGCATGG
AY035913	261	CCATTTT	TTGACGGCT	CGGTCT	CGGGCT	GTATCCACT	GCAGGATTT	GTTGGCGG	GCGGTAC	GTACTCTGCAG	CGTCTACGGC	GCTTGTGCT	TTCGCAGCG	TTCGTATGTTT	TGTCATCCGTGCTGCTAAAAATTGCATGG



Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

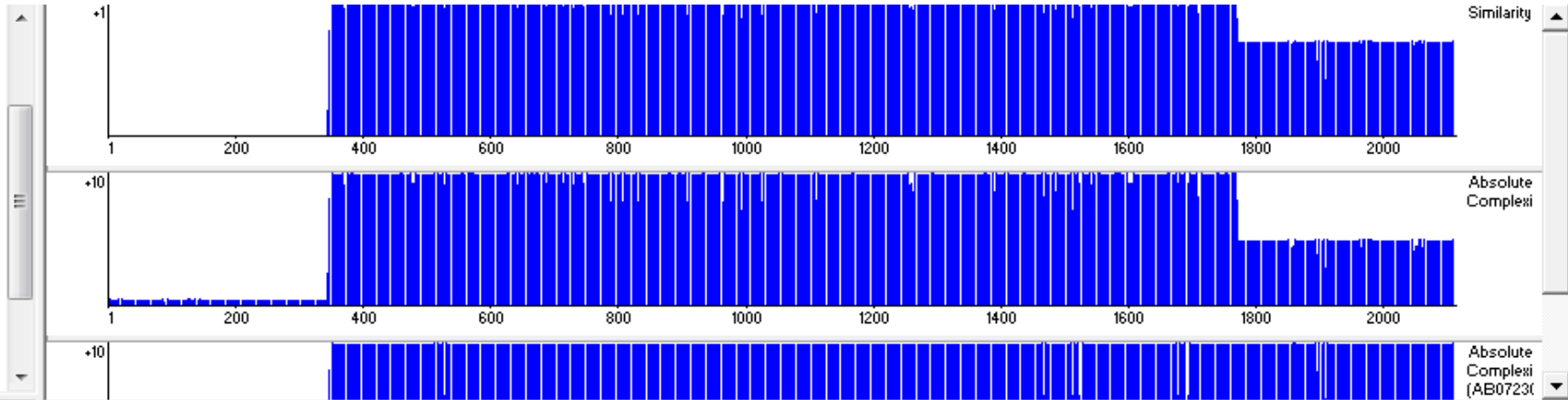


MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní
plán
obnovy

- AF055392 (1768)
- AF055392@18 (1768)
- AF085695 (1768)
- AF086834 (1768)
- AF086835 (1768)
- AF086836 (1768)
- AF109397 (1768)
- AF109398 (1768)
- AF109399 (1768)
- AF112862 (1768)
- AF117753 (1768)
- AF118005 (1768)



	1199	1200	1210	1220	1230	1240	1250	1260	1270	1280	1290	1300	1310
AB072303	852	GTCCCAGCTGTAGAAGCTCTCTATCGGAGGATTACTTCCTTGGTATTTTGAAGAATGCTACAGAACAATCCACGGAGGAAGGGGGCCAGTTC	GTCACCCTTTCCCCCCATGCCCTGAATT										
AB426905	852	GTCCCAGCTGTAGAAGCTCTCTATCGGAGGATTACTTCCTTGGTATTTTGAAGAATGCTACAGAACAATCCACGGAGGAAGGGGGCCAGTTC	GTCACCCTTTCCCCCCATGCCCTGAATT										
AF085695	852	GTCCCAGCTGTAGAAGCTCTCTATCGGAGGATTACTTCCTTGGTATTTTGAAGAATGCTACAGAACAATCCACGGAGGAAGGGGGCCAGTTC	GTCACCCTTTCCCCCCATGCCCTGAATT										
AF086836	852	GTCCCAGCTGTAGAAGCTCTCTATCGGAGGATTACTTCCTTGGTATTTTGAAGAATGCTACAGAACAATCCACGGAGGAAGGGGGCCAGTTC	GTCACCCTTTCCCCCCATGCCCTGAATT										
AF086835	852	GTCCCAGCTGTAGAAGCTCTCTATCGGAGGATTACTTCCTTGGTATTTTGAAGAATGCTACAGAACAATCCACGGAGGAAGGGGGCCAGTTC	GTCACCCTTTCCCCCCATGCCCTGAATT										
AF086834	852	GTCCCAGCTGTAGAAGCTCTCTATCGGAGGATTACTTCCTTGGTATTTTGAAGAATGCTACAGAACAATCCACGGAGGAAGGGGGCCAGTTC	GTCACCCTTTCCCCCCATGCCCTGAATT										
AF055392	1199	GTCCCAGCTGTAGAAGCTCTCTATCGGAGGATTACTTCCTTGGTATTTTGAAGAATGCTACAGAACAATCCACGGAGGAAGGGGGCCAGTTC	GTCACCCTTTCCCCCCATGCCCTGAATT										
AF055392@18	1199	GTCCCAGCTGTAGAAGCTCTCTATCGGAGGATTACTTCCTTGGTATTTTGAAGAATGCTACAGAACAATCCACGGAGGAAGGGGGCCAGTTC	GTCACCCTTTCCCCCCATGCCCTGAATT										
AF109397	852	GTCCCAGCTGTAGAAGCTCTCTATCGGAGGATTACTTCCTTGGTATTTTGAAGAATGCTACAGAACAATCCACGGAGGAAGGGGGCCAGTTC	GTCACCCTTTCCCCCCATGCCCTGAATT										
AF027217	852	GTCCCAGCTGTAGAAGCTCTCTATCGGAGGATTACTTCCTTGGTATTTTGAAGAATGCTACAGAACAATCCACGGAGGAAGGGGGCCAGTTC	GTCACCCTTTCCCCCCATGCCCTGAATT										
AF055391	1199	GTCCCAGCTGTAGAAGCTCTCTATCGGAGGATTACTTCCTTGGTATTTTGAAGAATGCTACAGAACAATCCACGGAGGAAGGGGGCCAGTTC	GTCACCCTTTCCCCCCATGCCCTGAATT										



Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU



Národní
plán
obnovy

PCR Master Mix standard

0.25 mM of each of the

0.2 mM of each of dATP, dCTP, dGTP, dTTP

50 mM KCl

10 mM Tris, pH 8.4

1.5 mM MgCl₂

2.5 U Taq Polymerase

10² - 10⁵ template DNA

50 µl reaction volume



Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

MŠMT
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní
plán
obnovy

In Vitro amplification

How many amplicons will we get?

$$\text{Number of amplicons} = A * 2^{n-2}$$

n = number of PCR cycles

A = number of copies inserted into the reaction

Depletion of reaction components and polymerase errors lead to a plateau effect



Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

MŠMT
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní
plán
obnovy

Thermostable polymerases

Taq: *Thermus aquaticus*

Sequenase: *T. aquaticus* YT - 1

Restorase (Taq + *repair* enzyme)

Tfl: *T. flavus*

Tth: *T. thermophilus* HB-8

Tli: *Thermococcus litoralis*

Carbothermus hydrothermalis (RT-PCR)

P. kodakaraensis (*Thermococcus*) (fast synthesis)

Pfu: *Pyrococcus furiosus* (accuracy)



Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

MŠMT
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní
plán
obnovy

PCR controls

Blank

- Contamination control
- All reagents except DNA

Negative control

- Specificity check
- All ingredients and DNA without target sequence

Positive control

- Sensitivity Control
- All ingredients and known positive DNA



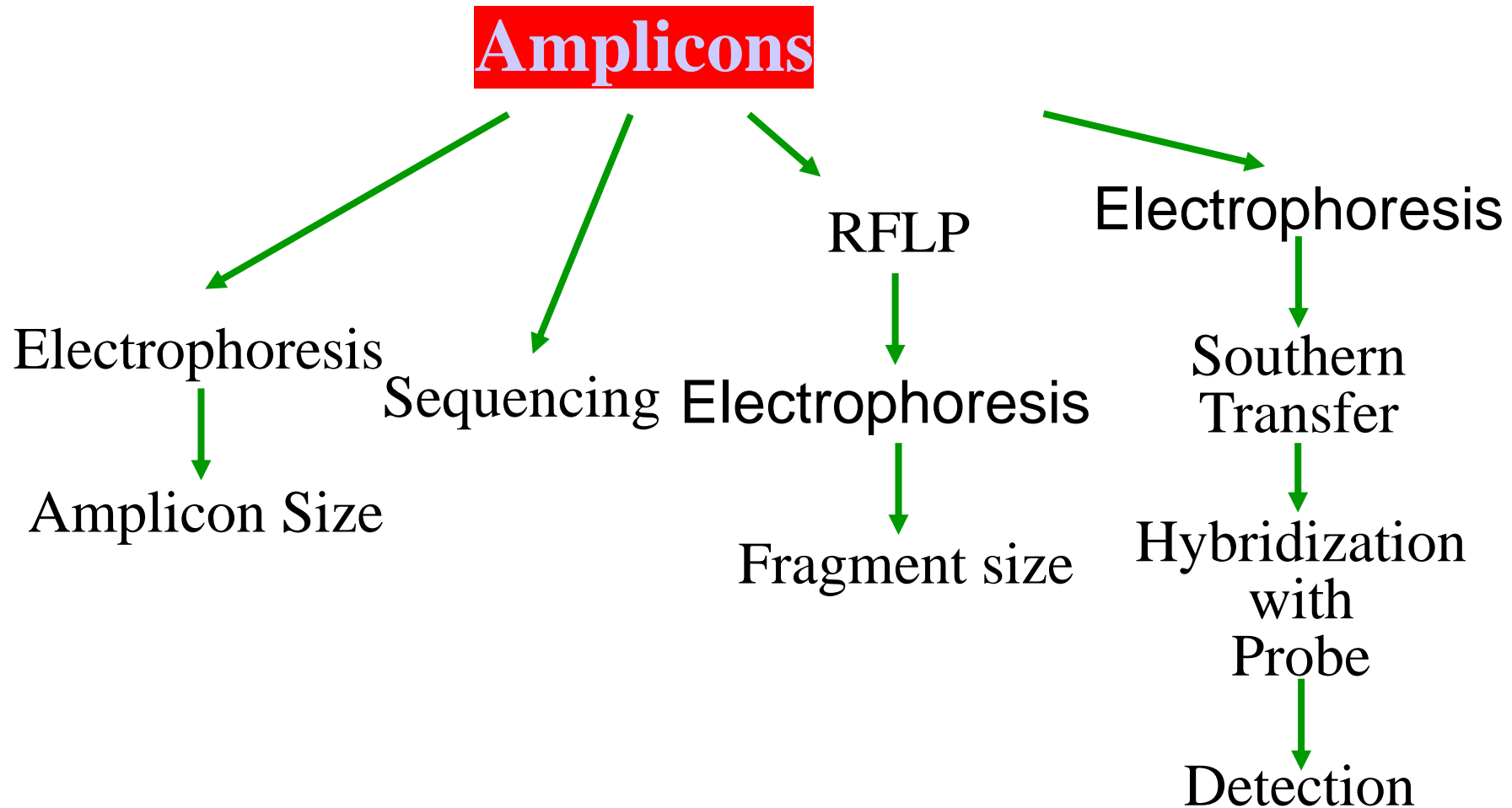
Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

MŠMT
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní
plán
obnovy

PCR products analysis



Contamination of PCR reaction

Any DNA molecule containing the target sequence is a potential source of contamination

The products of the preceding PCR reaction pose the greatest risk

Setting rules limiting sources of contamination



Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

**MS
MT**
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní
plán
obnovy

Contamination control

Physical barrier

Air flow

PCR boxes with UV lamps

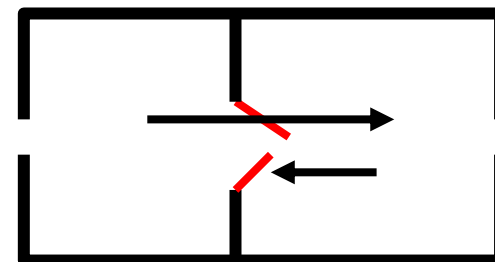
dUTP + uracil -N- glycosylase _

Psoralen + UV

10% caustic soda (surface decontamination)

Tips with an aerosol barrier

Pre-PCR Post-PCR



Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

MŠMT
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní
plán
obnovy

Advantages of PCR

Speed (2–5 hours)

Simple, fast and cheap

Both DNA and RNA
amplification

High amplification rate (10^6 -
 10^9)

Theoretically 1 molecule

Highly specific

DNA can also be partially
damaged (fragmentation)

The PCR product can be
sequenced

The PCR product can be
cloned into vectors

Amplification of fragments up
to 30 kb long



Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

MŠMT
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní
plán
obnovy

Limitations of PCR

Highly susceptible to contamination and false positives

Complexity of primers

DNA sequence (Genebank)

Analysis of PCR products takes longer than the reaction itself



Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

MŠMT
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní
plán
obnovy

PCR modification

Nested PCR

Multiplex PCR

Sequence-specific PCR

Allele specific

Reverse-transcriptase PCR (RT-PCR)

Long-range PCR

Quantitative real-time PCR



Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

MŠMT
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní
plán
obnovy

Reverse transcription

Reverse transcription is the process of enzymatic conversion of an ssRNA molecule into complementary DNA (cDNA)



Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

MŠMT
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní
plán
obnovy

RT-PCR

Phases of the RT-PCR reaction :

- Isolation of RNA
- Reverse transcription
- PCR amplification
- PCR product analysis



Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

MŠMT
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní
plán
obnovy

Reverse transcription

Primers

- Oligo (dT)
- Random hexamers
- Random nonamers
- Classic primers

Reverse transcriptases

Retroviral RNA - dependent DNA polymerase

AMV Reverse transcriptase (Avian myeloblastosis virus)

MMLV reverse transcriptase (Moloney murine leukemia virus)



Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

MŠMT
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní
plán
obnovy

Allelic specific PCR amplification



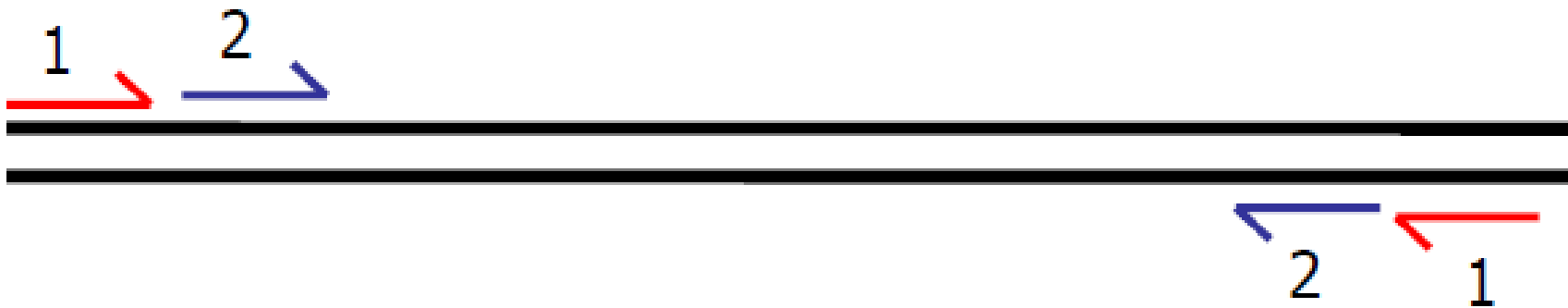
Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

MŠMT
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní
plán
obnovy

Nested PCR



- A substantial gain in both specificity and sensitivity
- High risk of contamination



Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

MŠMT
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní
plán
obnovy

Multiplex PCR

- Simultaneous detection of multiple microorganisms (genes)
- Difficult optimization
- Medical diagnostics



Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

MŠMT
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní
plán
obnovy

REAL TIME PCR

Detection of PCR products

Intercalating dye (ethidium bromide, syber green dye):
non-specific

Fluorogenic probes: more specific



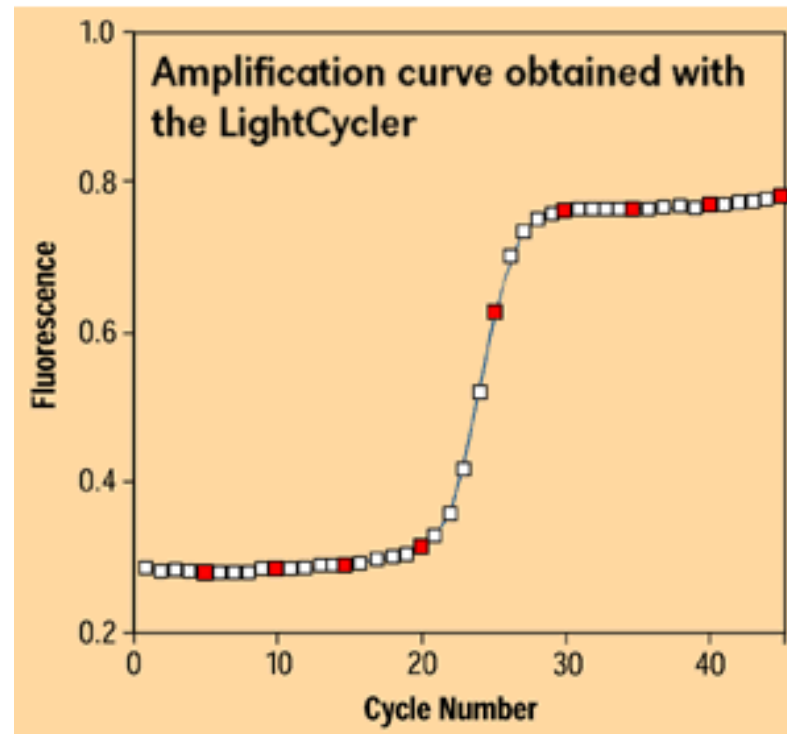
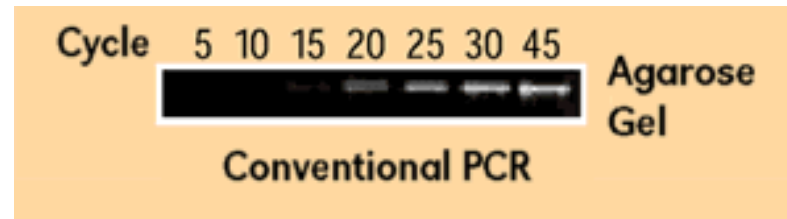
Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

MŠMT
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní
plán
obnovy

Graph of dependence of fluorescence intensity on the number of PCR cycles



Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

MŠMT
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní
plán
obnovy

Quantitative PCR (qPCR)

The PCR product is exponentially multiplied (double in each cycle)

The PCR signal is recorded as an exponential curve described by phases: lag, log, linear and plateau

The length of the lag phase is inversely proportional to the amount of starting material.



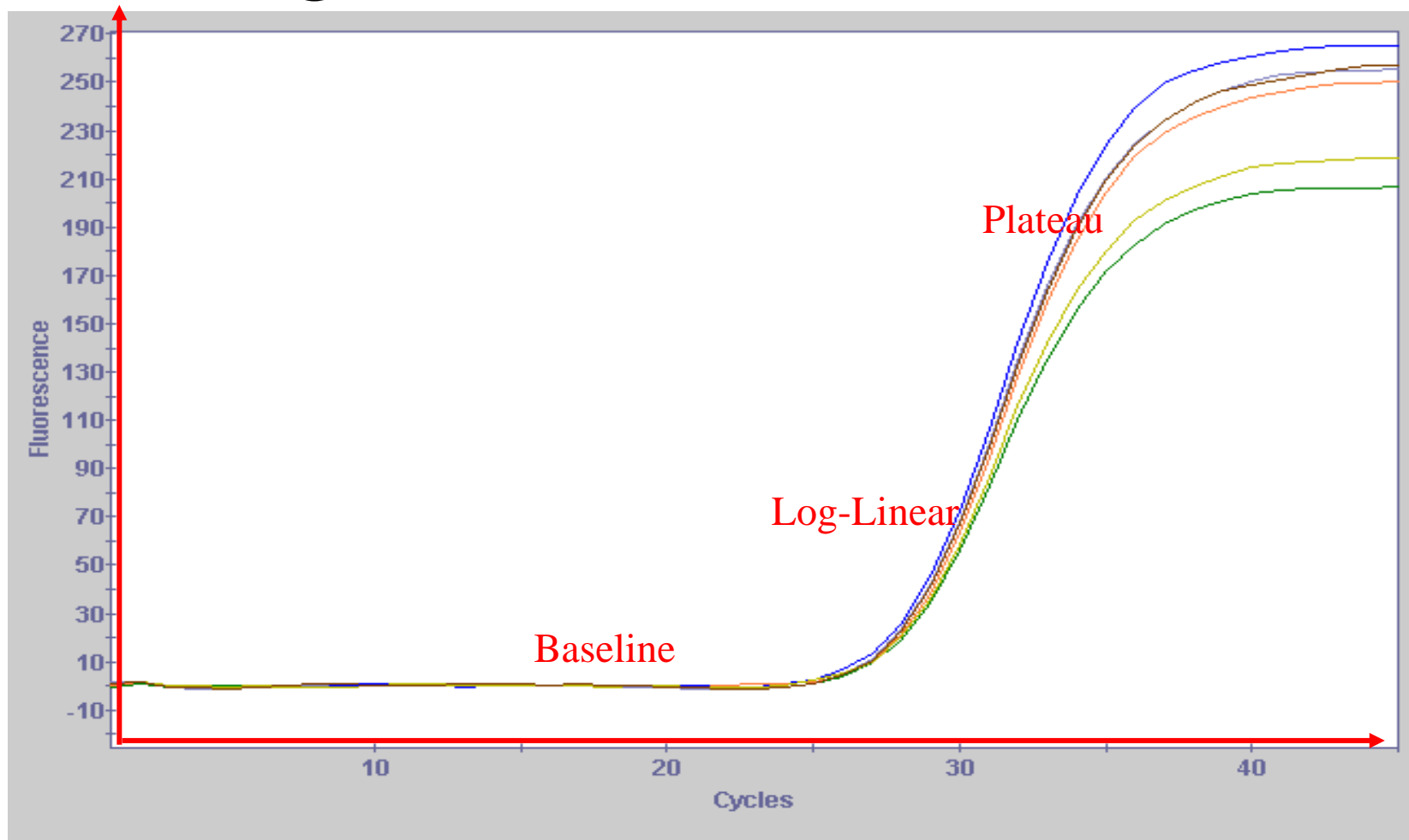
Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

MŠMT
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní
plán
obnovy

Progress of Real Time PCR



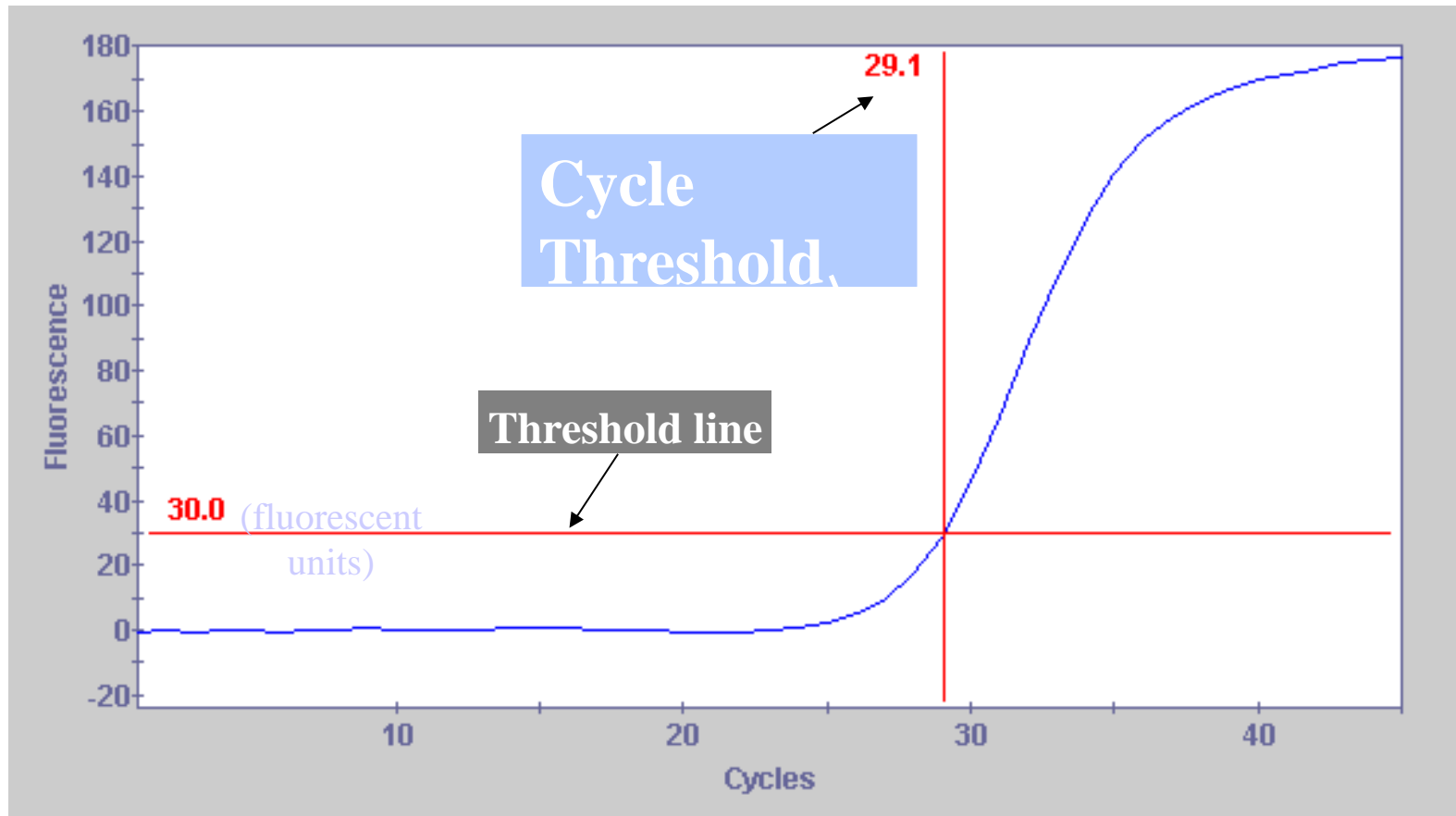
Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

MŠMT
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní
plán
obnovy

Threshold Cycle (Ct)



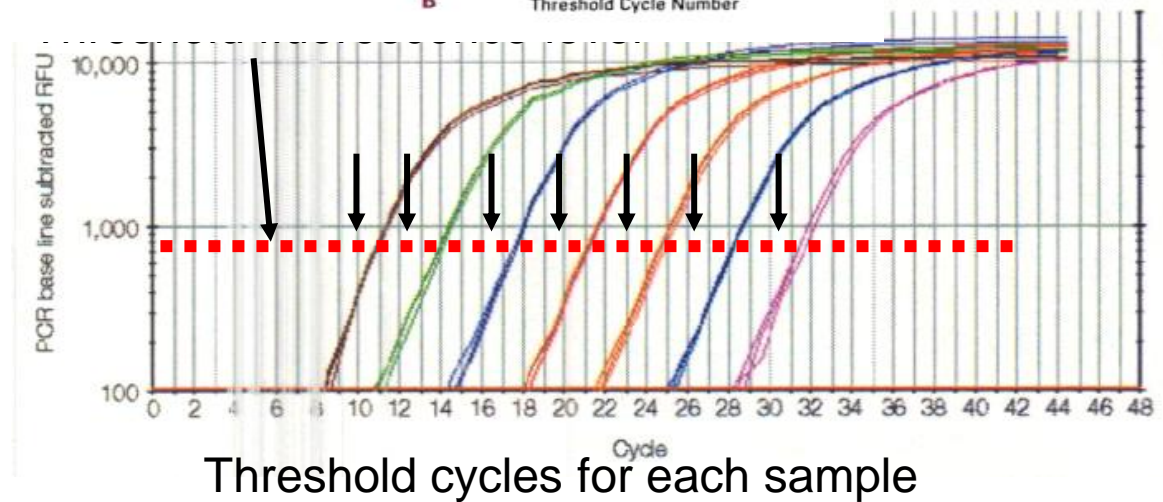
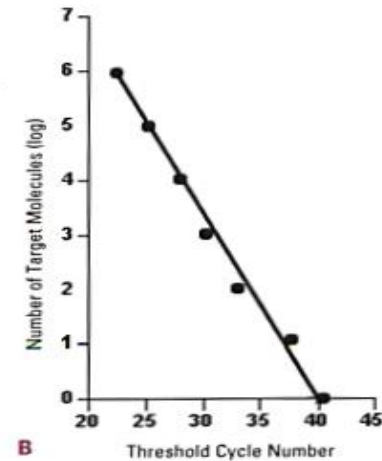
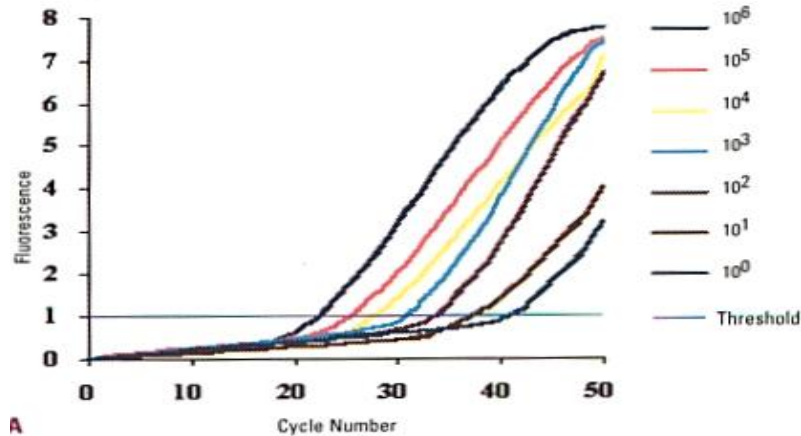
Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

MŠMT
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní
plán
obnovy

Construction of a standard curve



qPCR

DNA specific

Ethidium bromide

SyBr® green

Hybridization probes

Hydrolyzing (TaqMan ®)

Molecular Beacons® , FRET®



Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

MŠMT
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní
plán
obnovy

Probes for Real-Time PCR

Hydrolysis probes

Taq Man probes

Fluorescent reporter at the 5' and quencher at the 3' end

Molecular beacons

Hair-like structure

Fluorescent reporter at the 5' and quencher at the 3' end

FRET probes

Fluorescence resonance energy transfer



Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

**MS
MT**
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

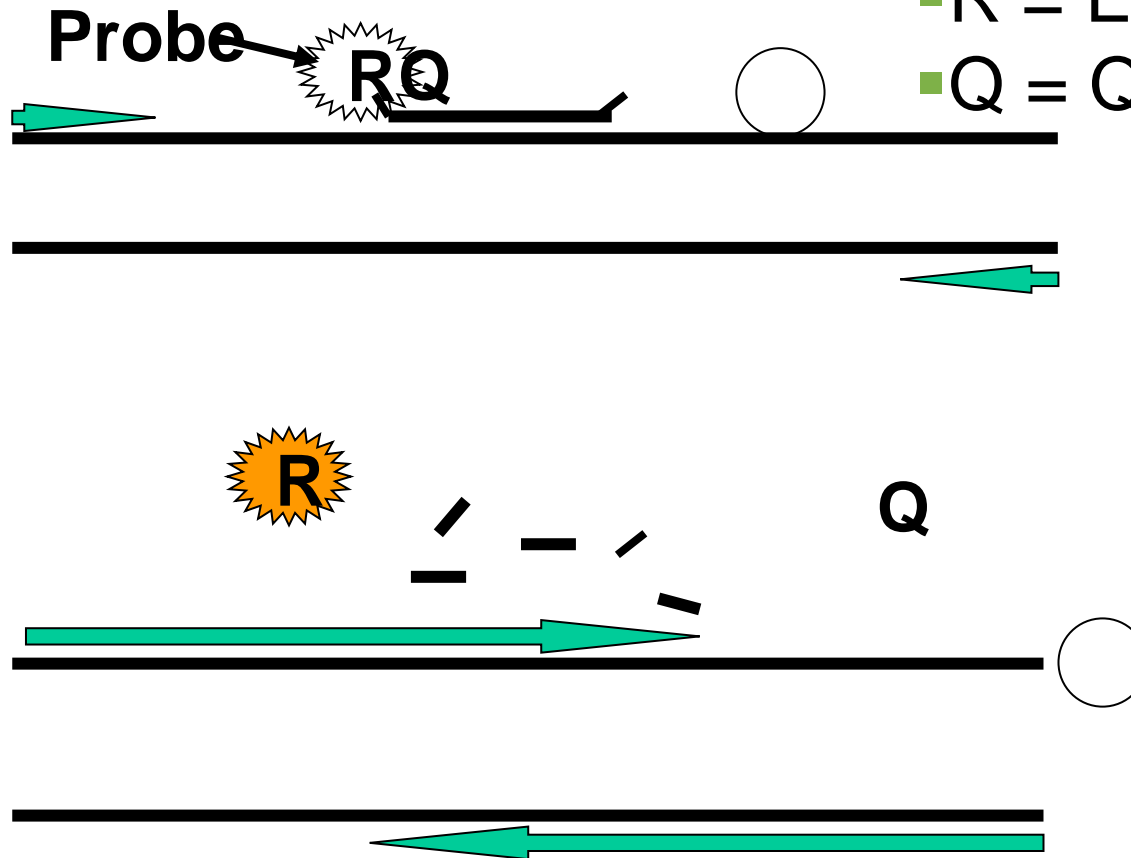


Národní
plán
obnovy

qPCR: TaqMan

TaqMan 5'-3' Exonuclease

- R = Emitter
- Q = Quencher



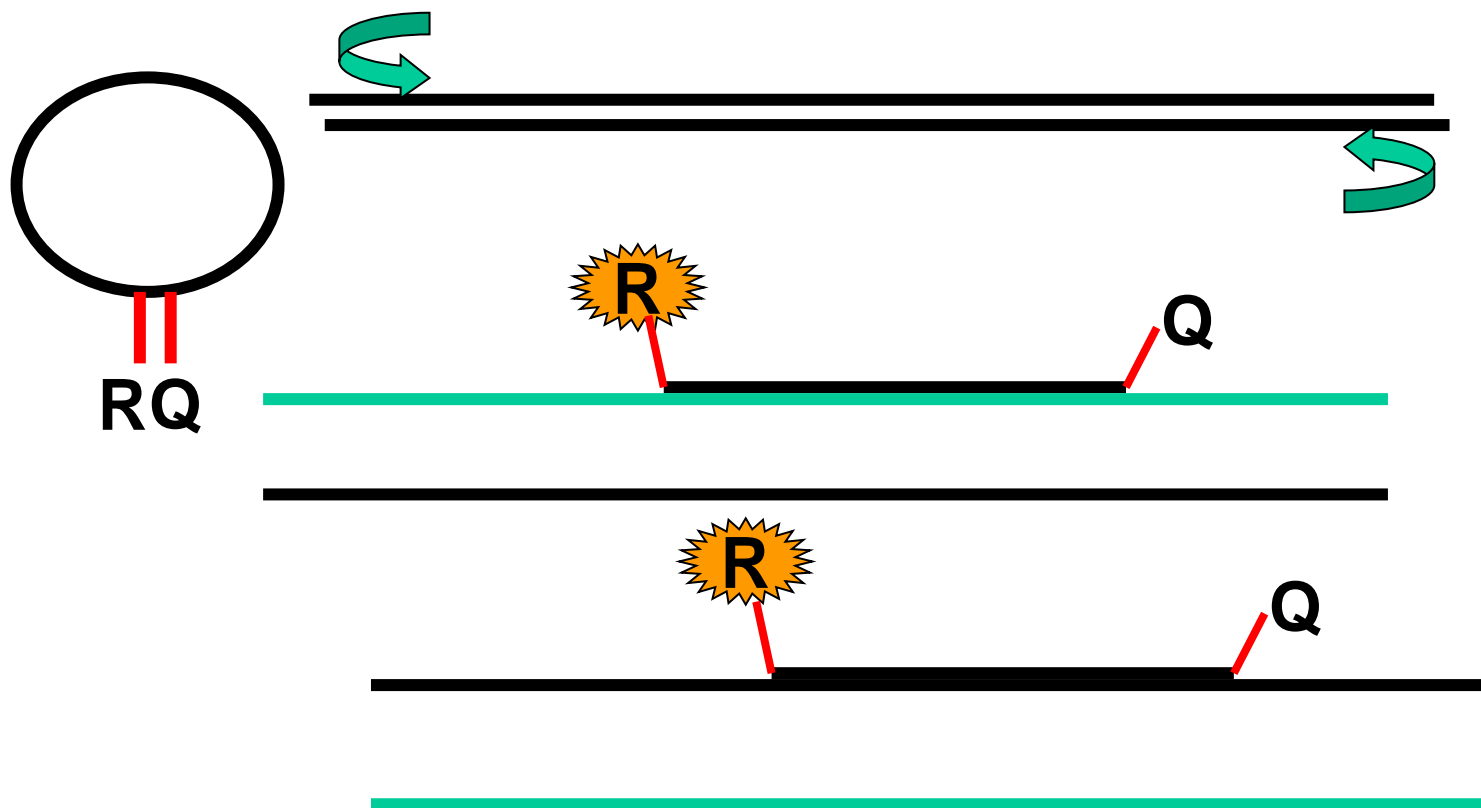
Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

MŠMT
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní
plán
obnovy

qPCR: Molecular Beacons



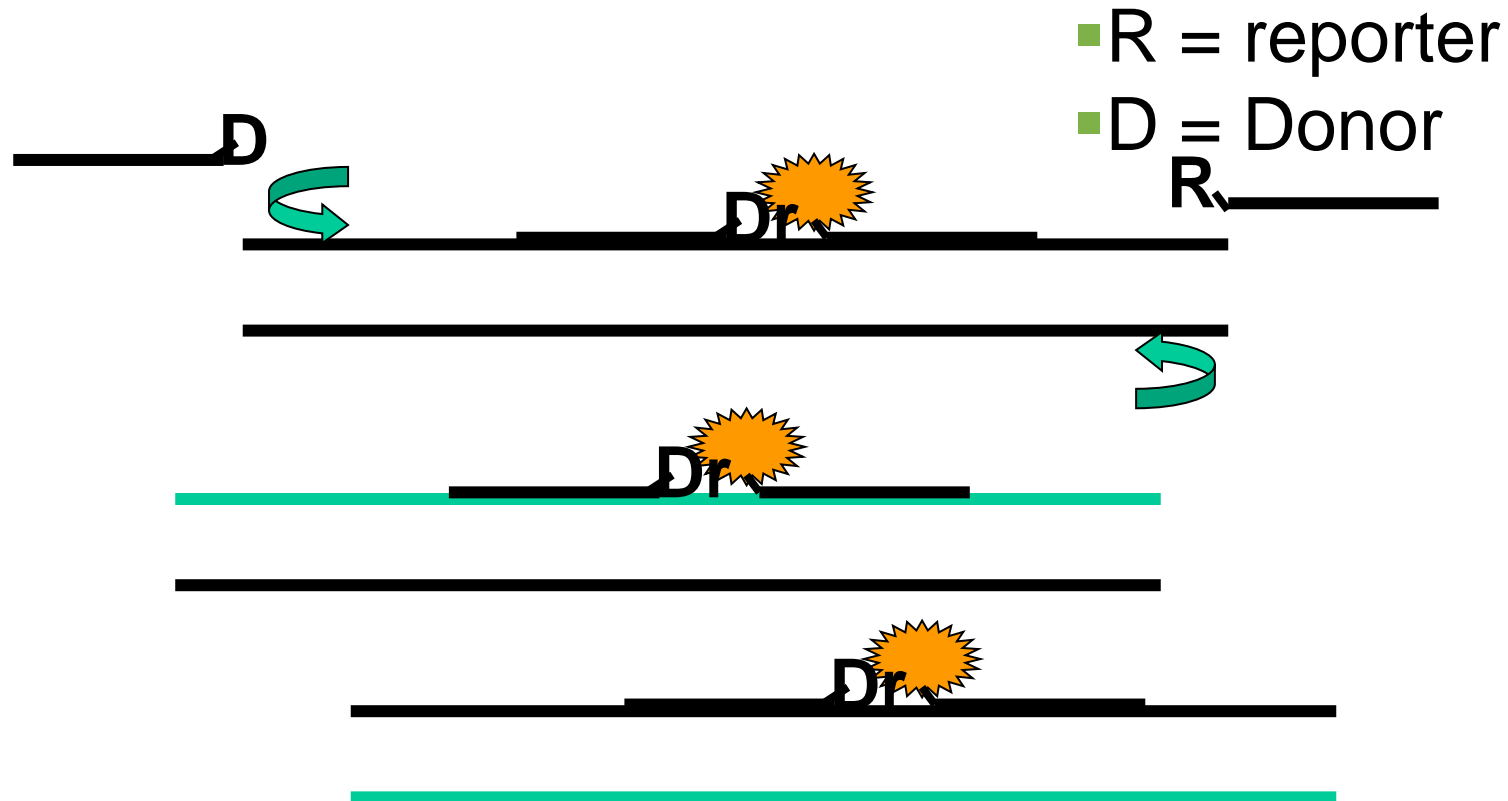
Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

**MS
MT**
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní
plán
obnovy

qPCR: FRET



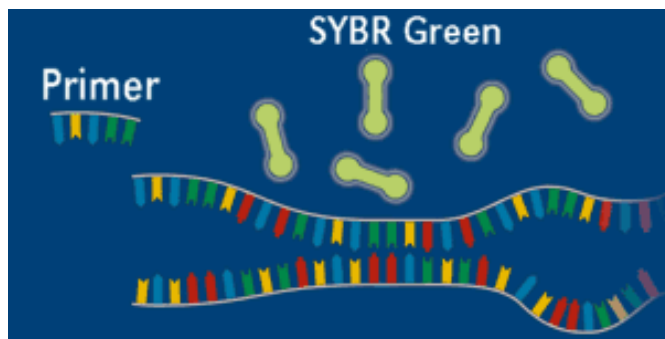
Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

MŠMT
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

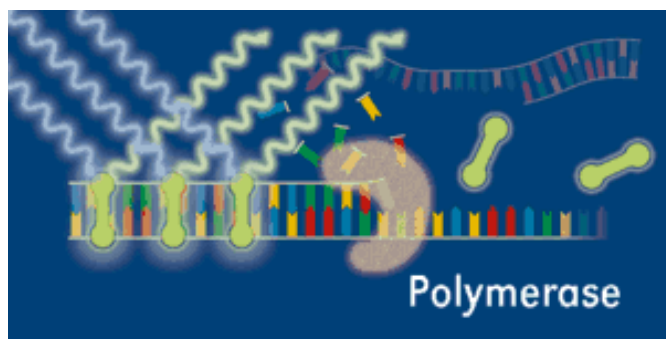


Národní
plán
obnovy

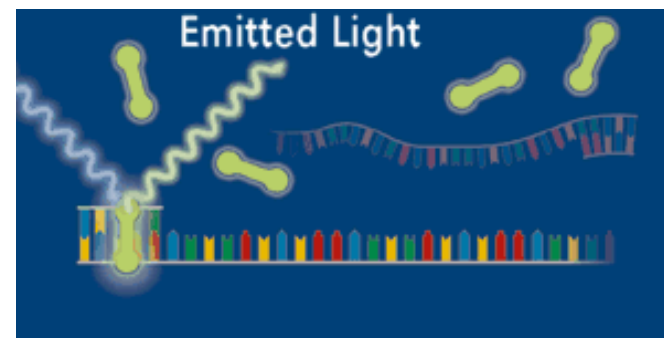
SYBR Green I



Denaturation



Extension



annealing



Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

MŠMT
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní
plán
obnovy

qPCR systems

Cyclers with fluorescence detection and specialized software

The PCR reaction takes place in plates, test tubes or capillaries



Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

MŠMT
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní
plán
obnovy

Sequencing



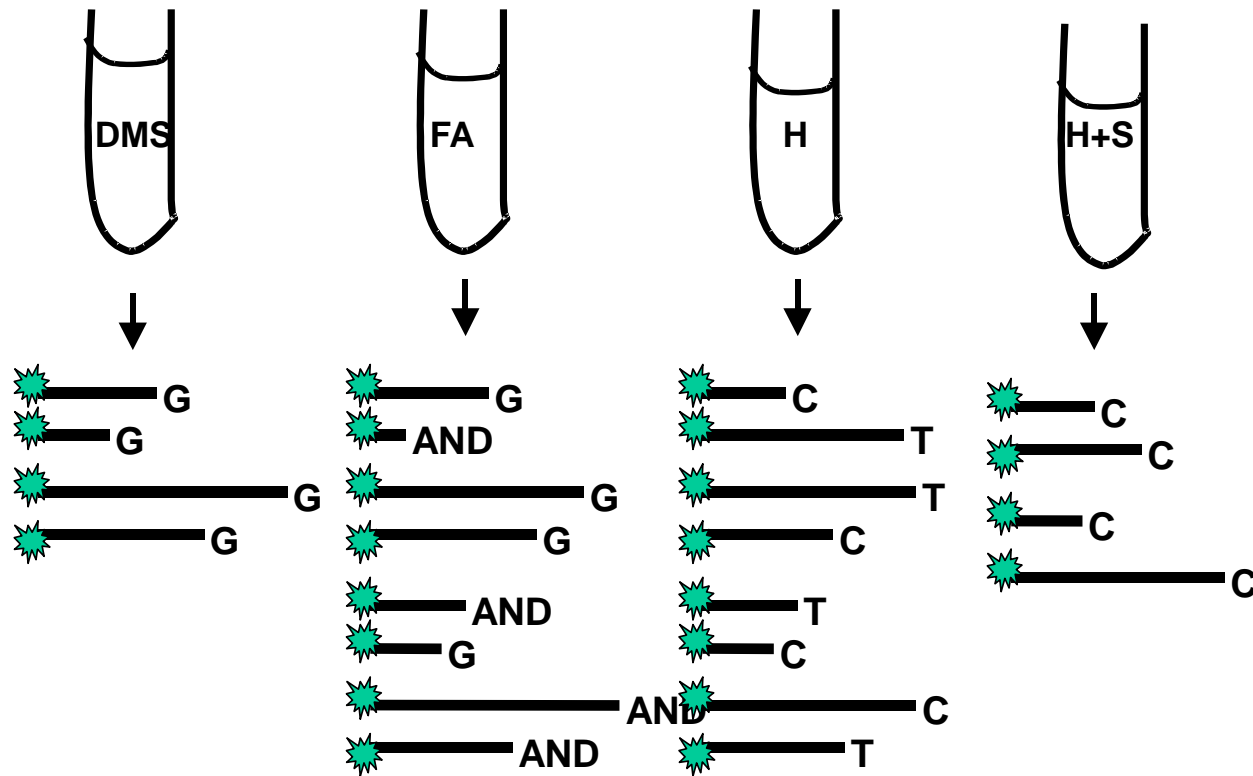
Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

**MS
MT**
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní
plán
obnovy

Maxam – Gilbert sequencing



Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

MŠMT
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní
plán
obnovy

Maxam - Gilbert

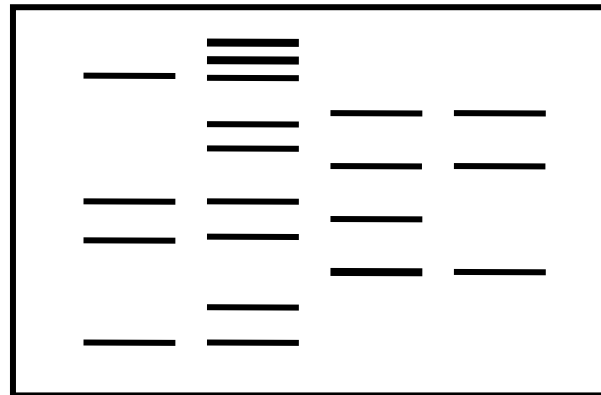
Longer fragments



Shorter fragments



G G+A T+CC



3'
AND
AND
G
C
AND
AND
C
G
T
G
C
AND
G
5'



Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

MS
MT
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



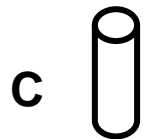
Národní
plán
obnovy

Chain Termination (Sanger) sequencing



ddATP +
four dNTPs

ddA
dAdGdCdTdGdCdCdCdG



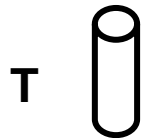
ddCTP +
four dNTPs

dAdG **ddC**
dAdGdCdTdG **ddC**
dAdGdCdTdGdC **ddC**
dAdGdCdTdGdCdC **ddC**



ddGTP +
four dNTPs

dA **ddG**
dAdGdCdT **ddG**
dAdGdCdTdGdCdCdC **ddG**



ddTTP +
four dNTPs

dAdGdC **ddT**
dAdGdCdTdGdCdCdCdG



Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

MŠMT
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní
plán
obnovy

Dye Terminator Sequencing

Different fluorochromes are used

The reaction can thus be carried out in one test tube



Fragments are distinguished based on size and "color"



Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

MS
MT
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

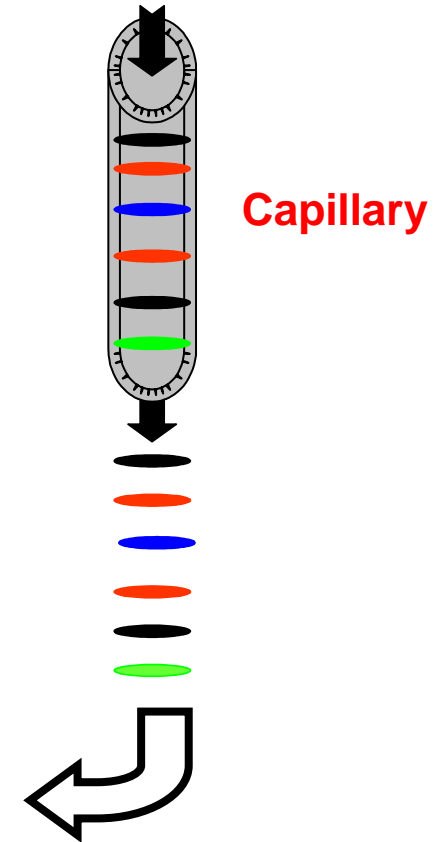
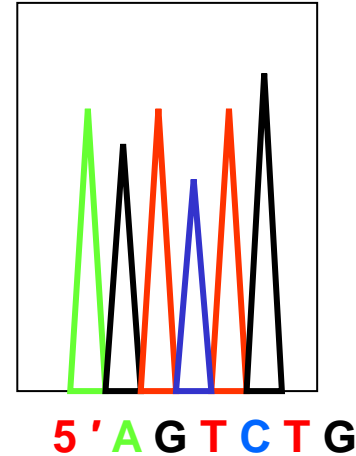


Národní
plán
obnovy

Dye Terminator Sequencing

The reaction is read in the capillary

Electropherogram

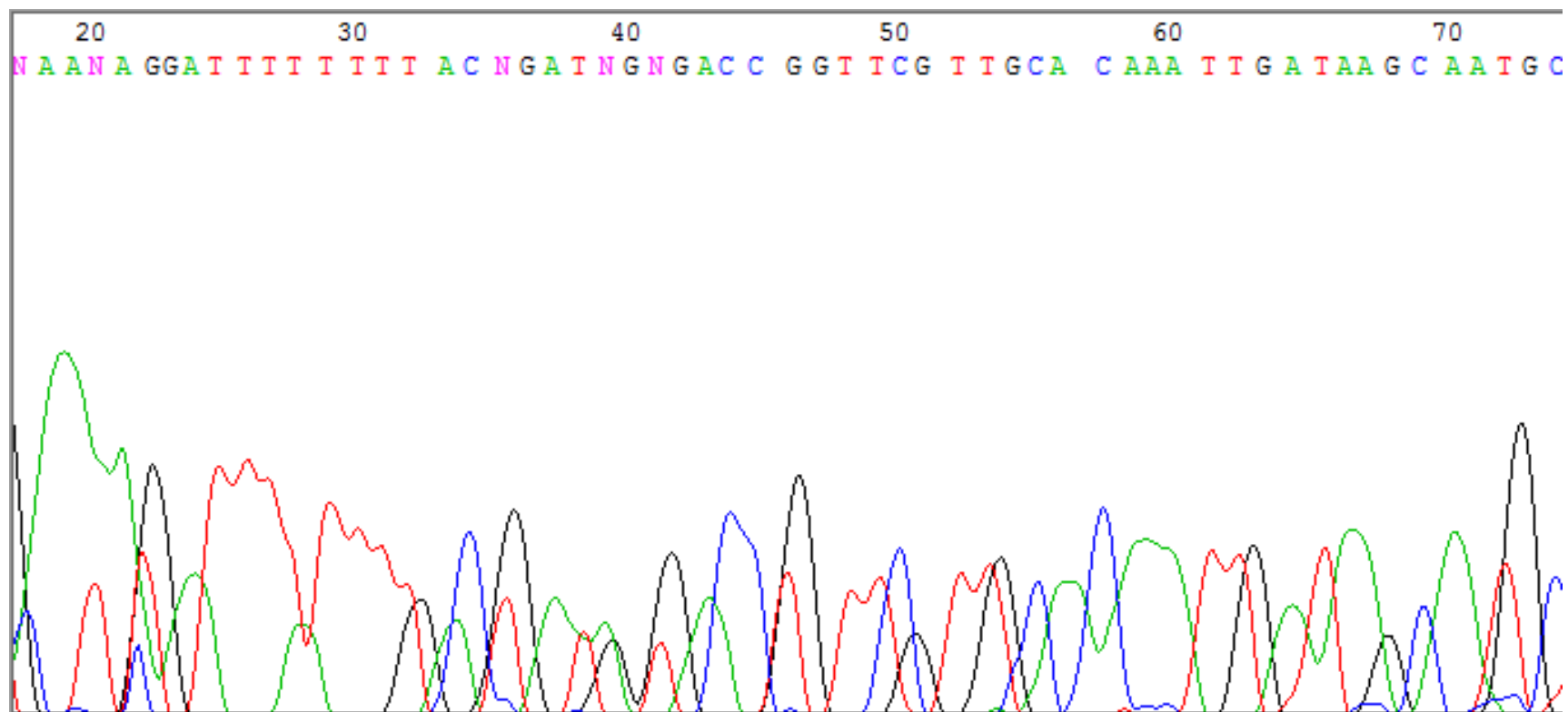


Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

MŠMT
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní
plán
obnovy



Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

**MS
MT**
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní
plán
obnovy

RFLP (restriction fragment length polymorphism)



Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

MŠMT
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní
plán
obnovy

Restriction enzymes

Type I

Methylation / Cleavage (3 subunits)

>1000 bp from the binding site

eg Eco AI GAGNNNNNGTCA

Type II

Cleavage in specific locations

Type III

Methylation / Cleavage (2 subunits)

24–26 bp from the binding site

e.g. Hinf III CGAAT



Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

MŠMT
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

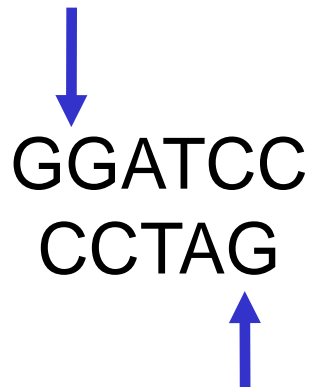


Národní
plán
obnovy

Restriction endonucleases

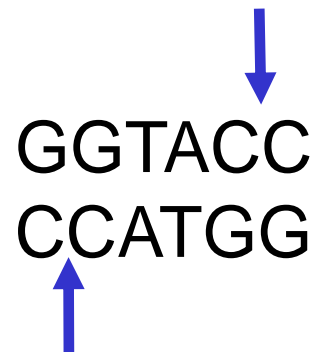
Cohesive ends
(5' overhang)

BamH1



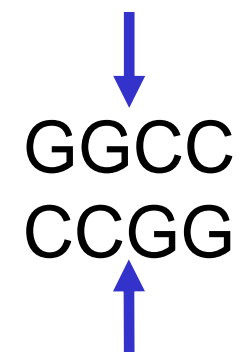
Cohesive ends
(3' overhang)

KpnI



Blunt ends
(no overhang)

HaeIII



Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

**MS
MT**
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní
plán
obnovy

Restriction enzyme mapping

DNA cleavage by restriction endonucleases

Electrophoresis

The number of fragments indicates the number of restriction sites

The size of the fragments indicates the distance between the cleavage sites



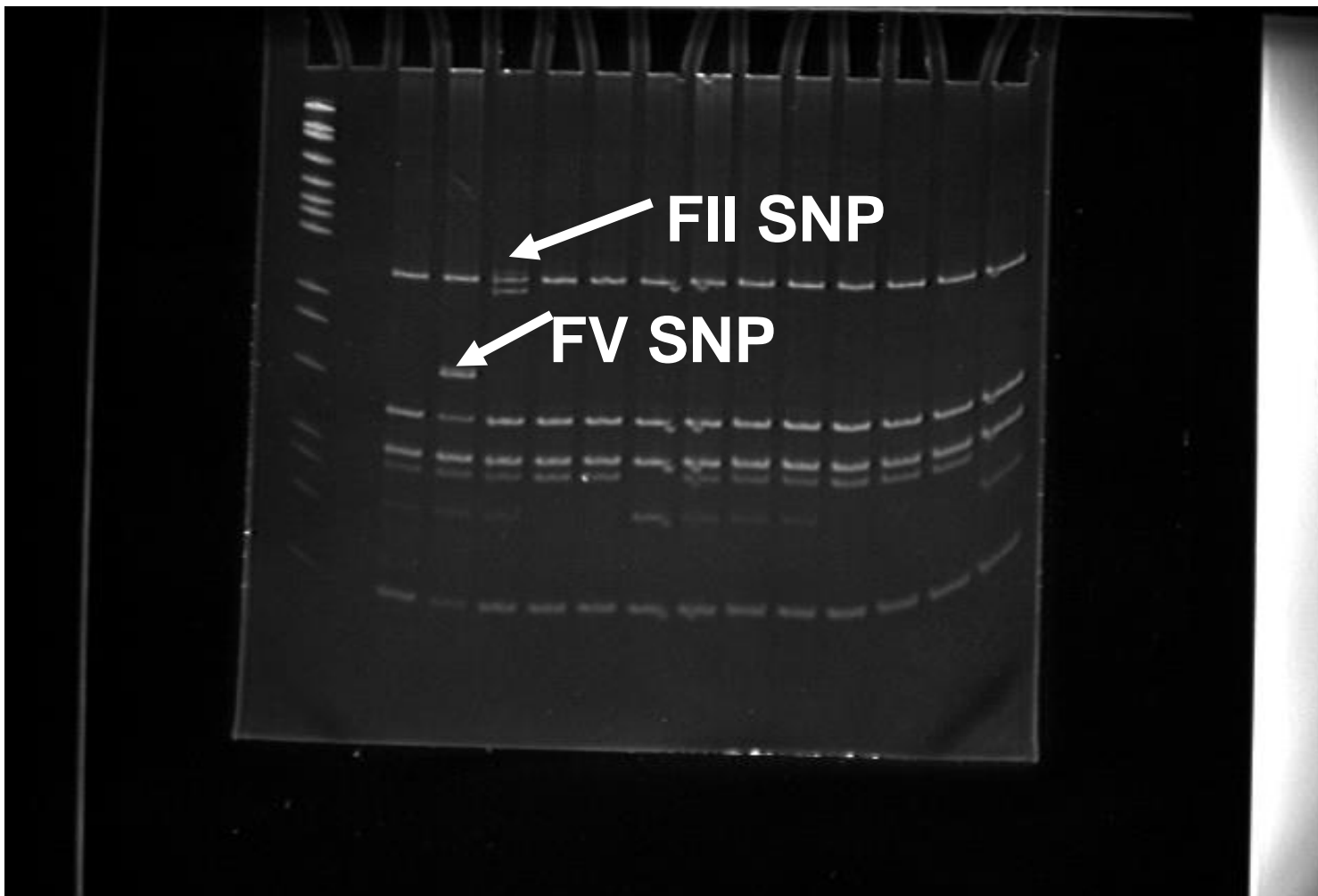
Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

MŠMT
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní
plán
obnovy

RFLP



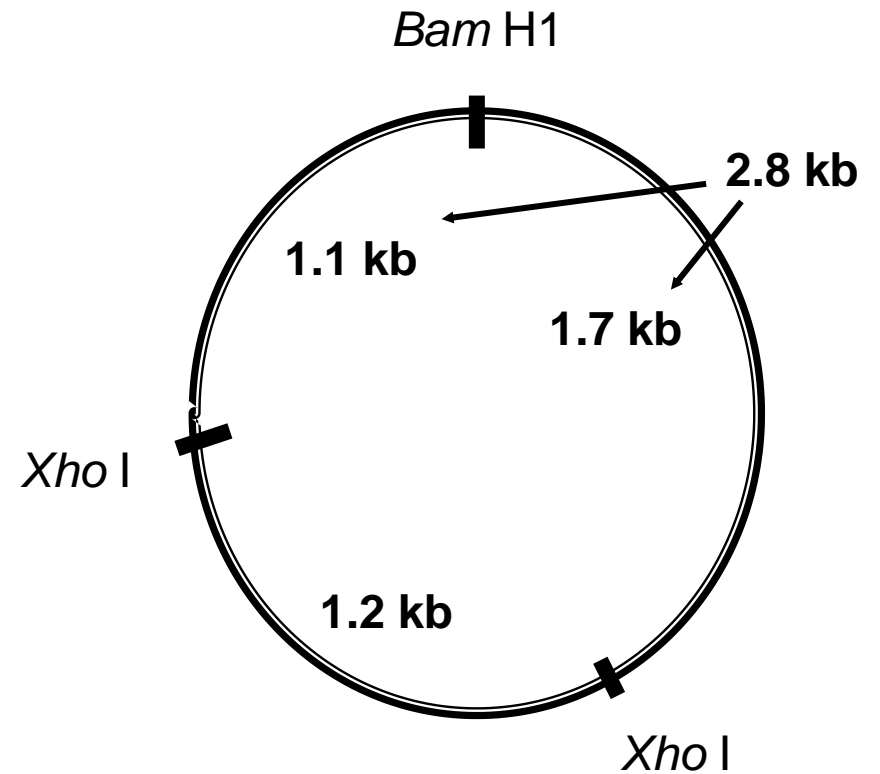
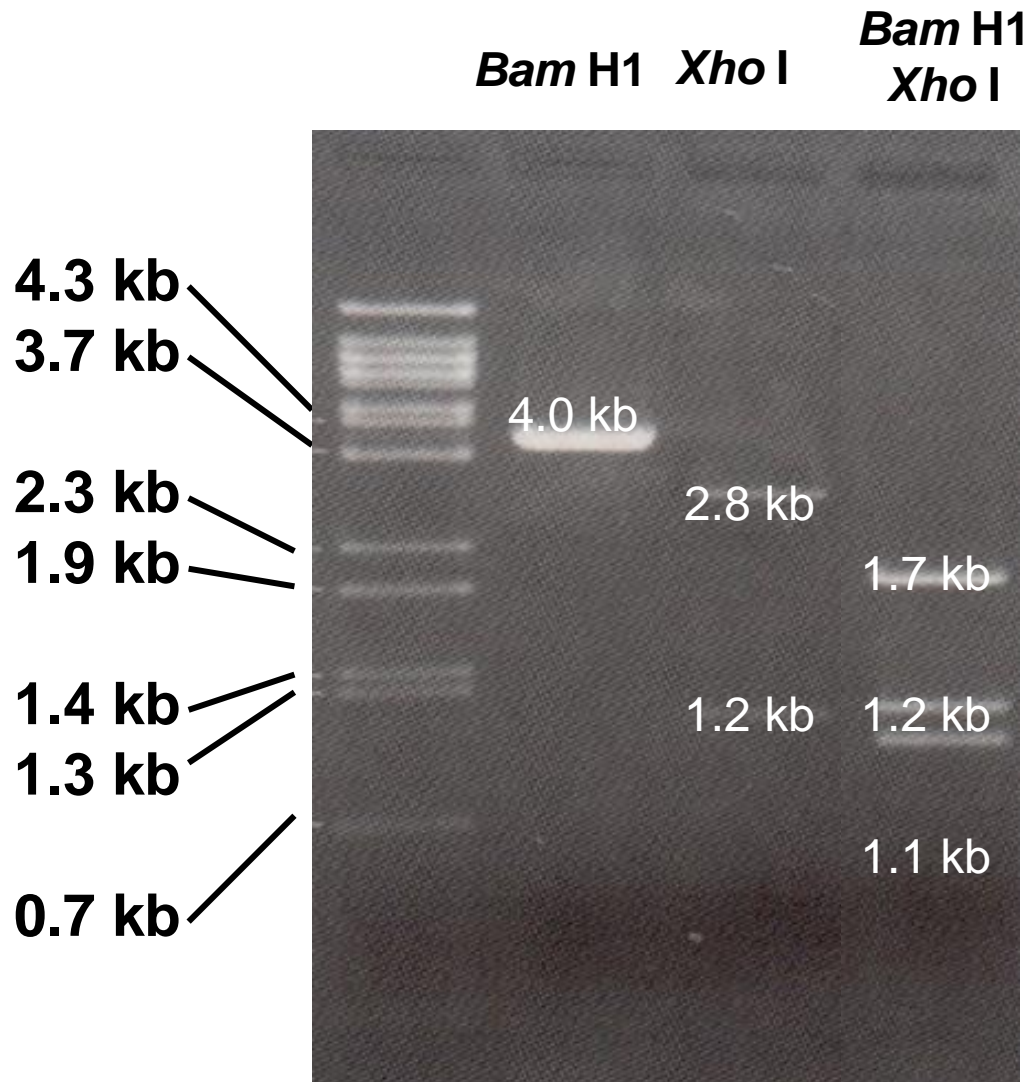
Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

**MS
MT**
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní
plán
obnovy

Restriction enzyme mapping



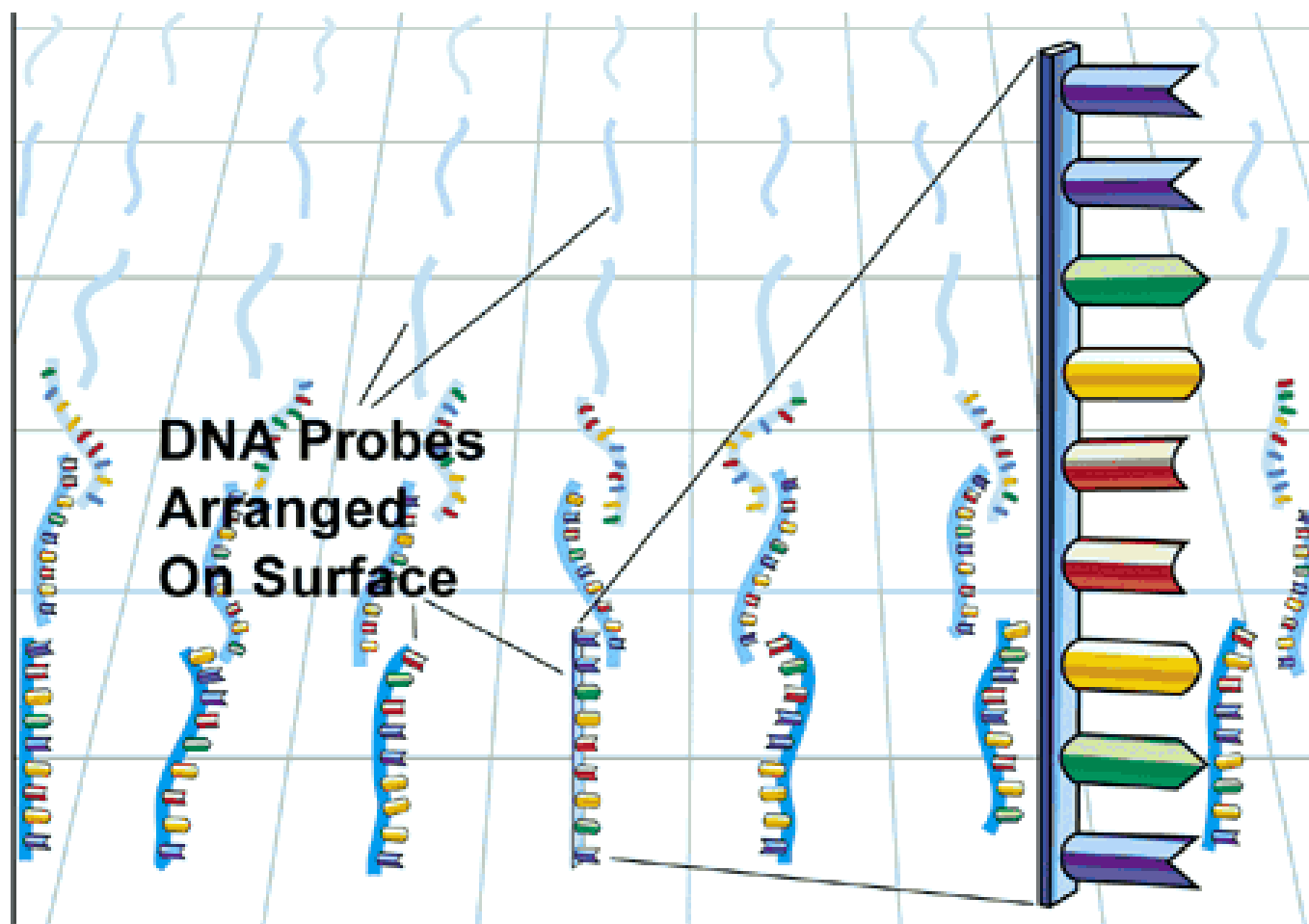
Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

MŠMT
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní
plán
obnovy

Hybridization



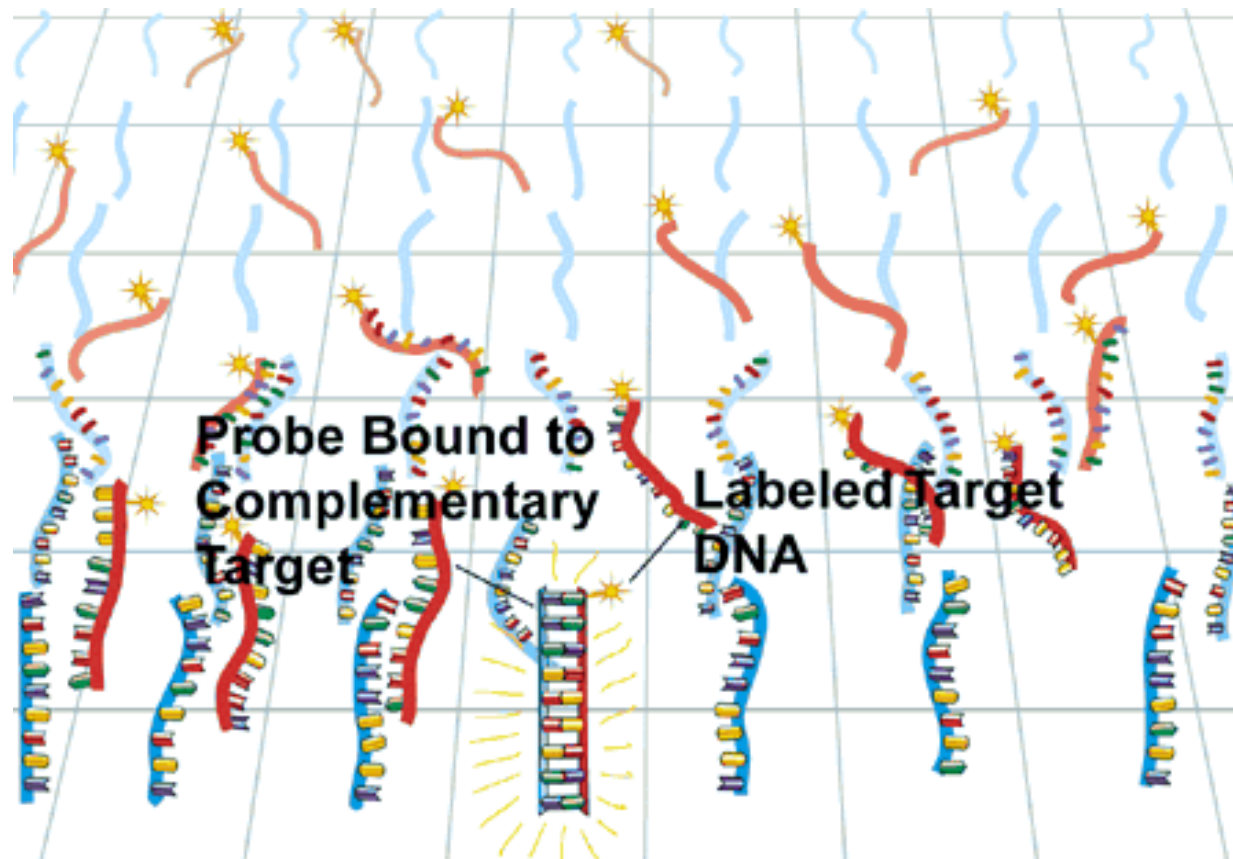
Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

MŠMT
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní
plán
obnovy

Annealing



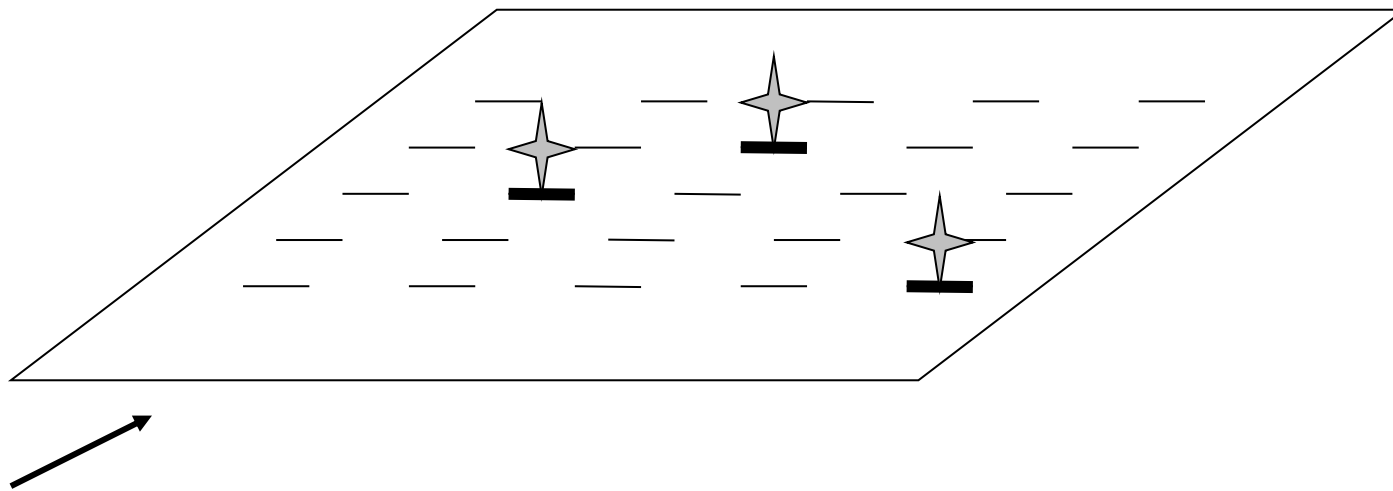
Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

**MS
MT**
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní
plán
obnovy

Radioactive detection



Filter with bound DNA

✦ Radioactive isotope

— Probe



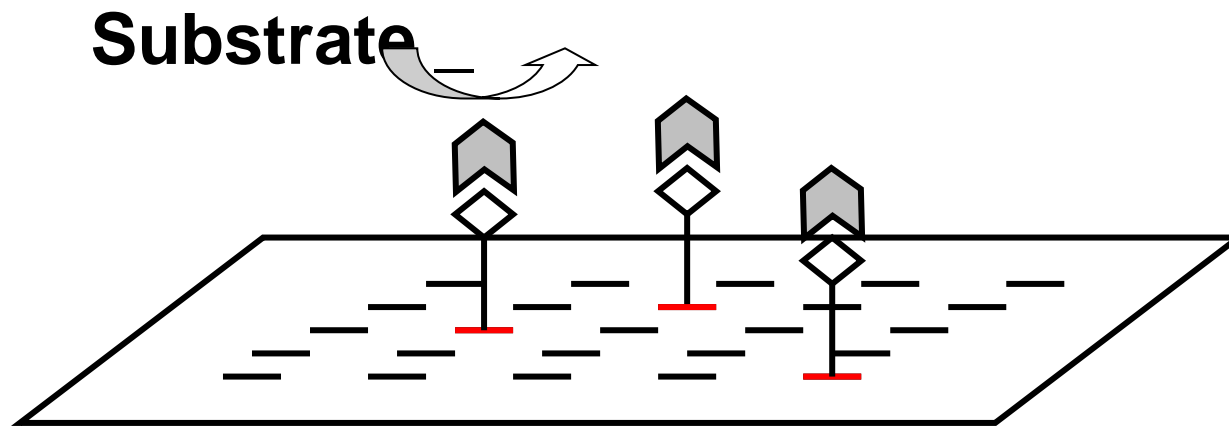
Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

MŠMT
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní
plán
obnovy

Non-radioactive detection



Antidigoxigenin antibody conjugated with alkaline phosphatase or horseradish peroxidase
Probe covalently labeled with biotin



Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

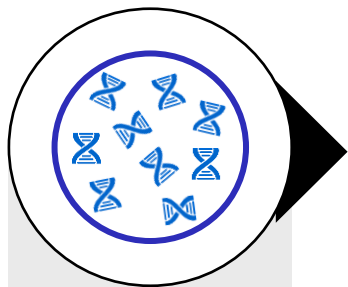
MŠMT
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní
plán
obnovy

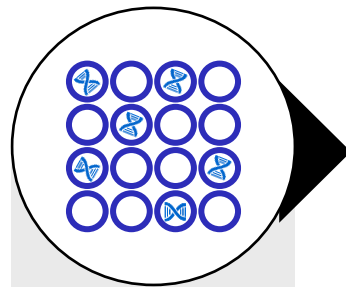
digital PCR principle

General workflow



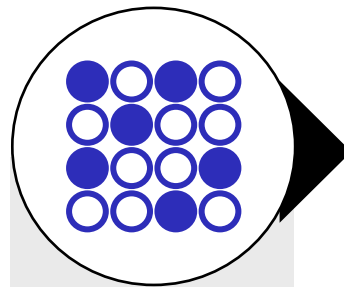
Prepared dPCR reaction mixture

Master mix reagent and sample (nucleic acid)

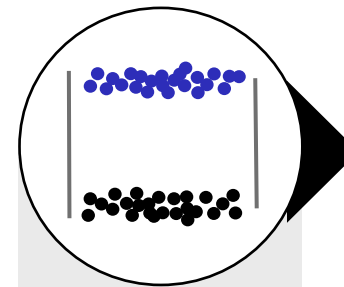


Partitioning

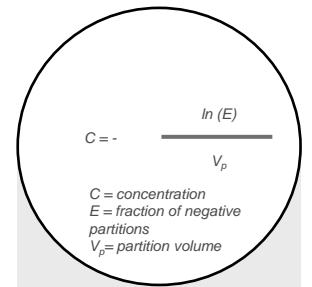
Distribute sample (nucleic acid) into many chambers or partitions



Perform thermal cycling and endpoint detection



Clustering:
Count positives and negatives



Apply **Poisson correction** to calculate concentration



Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

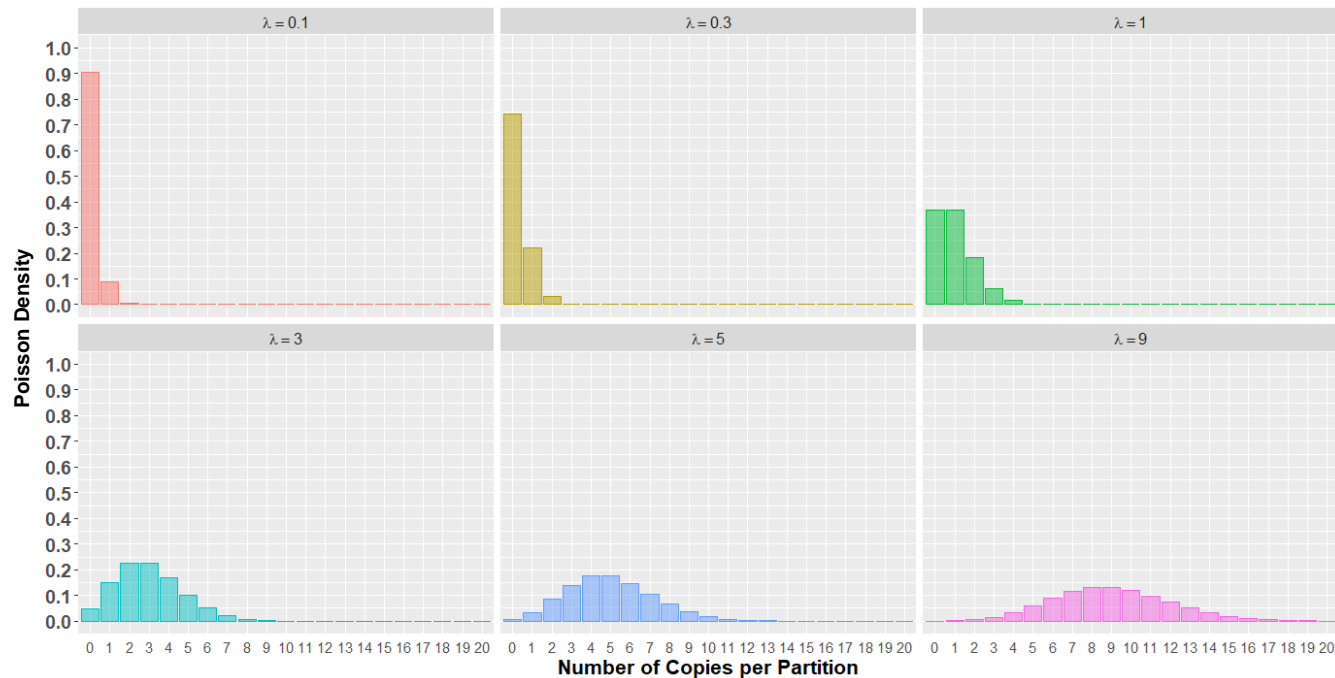
MŠMT
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní
plán
obnovy

The dPCR Principle

Poisson distribution



Poisson describes the probability that a partition contains k target molecules ($k=0, 1, 2, \dots, 20$) for various target concentrations ($\lambda = 0.1, 0.3, 1, \dots, 9$)



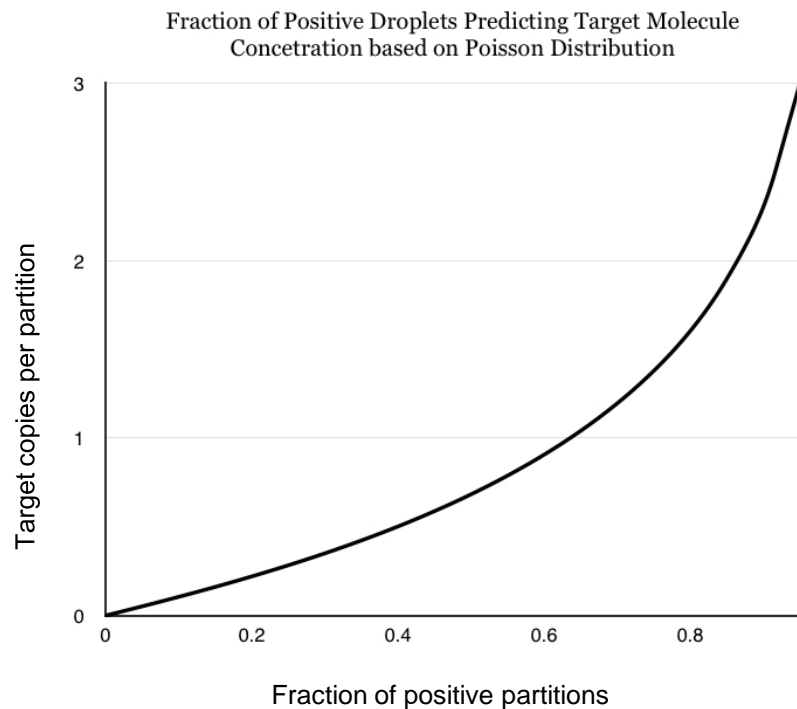
Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

MŠMT
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní
plán
obnovy

Poisson correction



$$\lambda = -\ln(1-P) = -\ln(E)$$

λ : Target copies/partition

P: Fraction of positive partitions

E: Fraction of negative partitions



Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

MŠMT
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

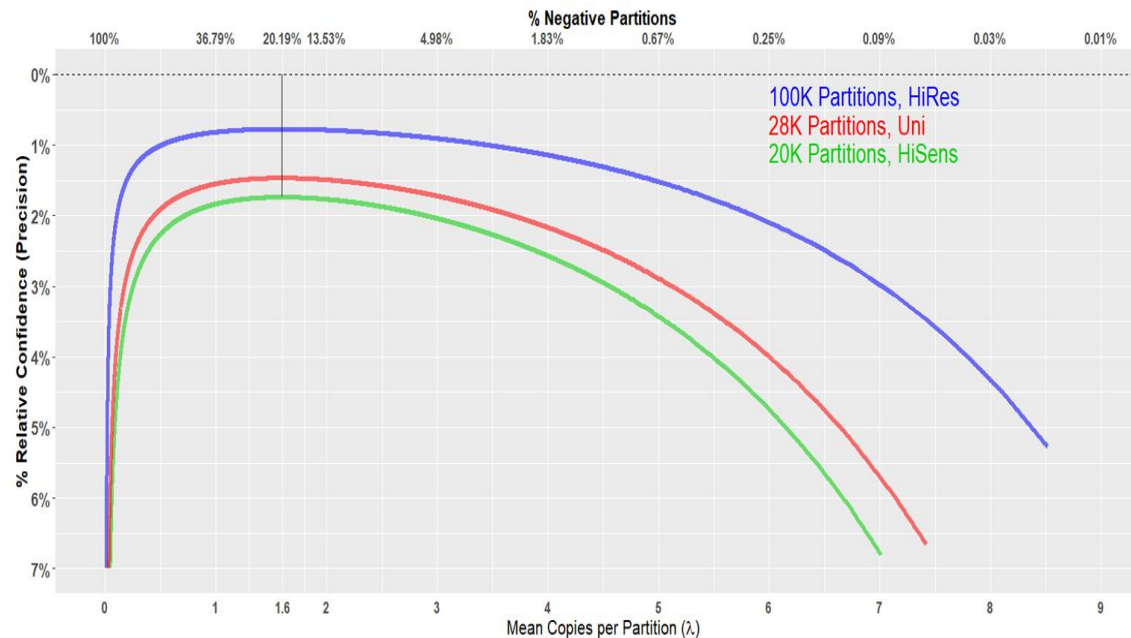


Národní
plán
obnovy

The dPCR Principle

Quantification accuracy

At low concentrations, the error is dominated by the subsampling uncertainty



At high concentrations, the error is dominated by the partitioning uncertainty

Quantification accuracy of dPCR

The accuracy of dPCR is non-uniform and depends on the average occupancy of the target sequence per partition (Lambda; λ). The accuracy of dPCR increases with an increasing number of partitions. The relative uncertainty is generally minimal at $\lambda \approx 1.6$ or 20% negative partitions and decreases with increasing partition numbers.



Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

MŠMT
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní
plán
obnovy

dPCR application

Quantification accuracy



Oncology



Rare species and
variant detection



Microsatellite
instability
detection







Pathogen load

Known specific variants
of interest and tracking of
treatment efficacy and
disease progression

Absolute quantification
without a standard curve

Hypersensitivity

Absolute quantification with a
standard curve

Application	 Graft rejection monitoring in transplant cases	 ID - Environmental surveillance	 Pharma - Large clinical trials	 Non-invasive prenatal testing
Digital LightCycler® System Potential	Ability to measure graft cfDNA	Higher sensitivity and precision. Inhibitors for particular sample types may mask NA content making difficult the rtPCR curve analysis	Large volume testing for specific biomarkers & higher accuracy than qPCR	Limited accuracy with antigen testing



Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

MŠMT
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní
plán
obnovy

dPCR Advantages

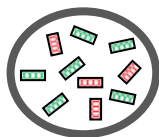
Accuracy and robustness

Quantitative
PCR

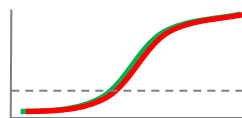
Real-time
PCR

dPCR

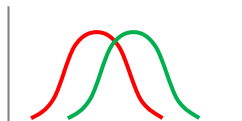
Scenario 1:
Similar Number of Genome Copies



1,000 vs. 1,100 copies

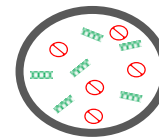


Unable to distinguish
differences in CT

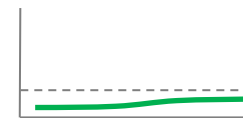


Significant difference
in Poisson distributions

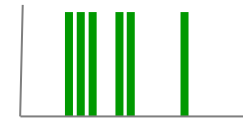
Scenario 2:
Few Copies in Presence of Inhibitors



Few copies in presence of inhibitors



Inhibitors reduce
amplification efficiency



Endpoint PCR where
efficiency is not critical



Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

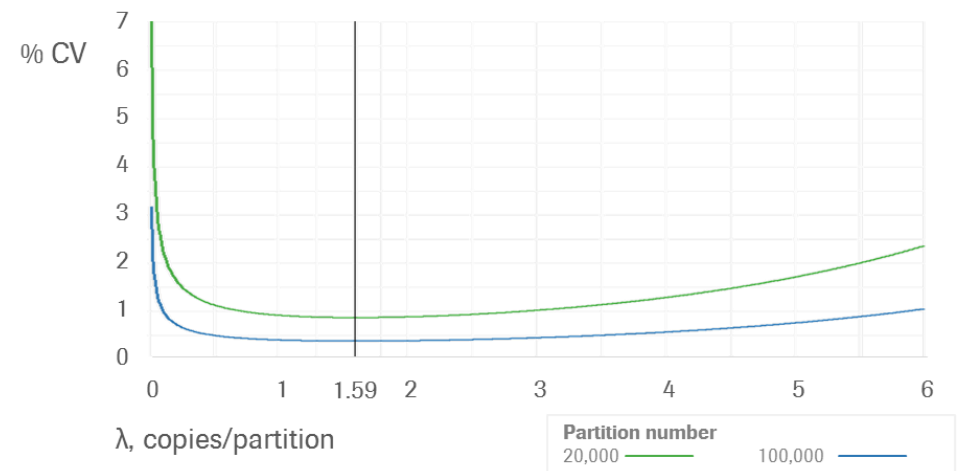
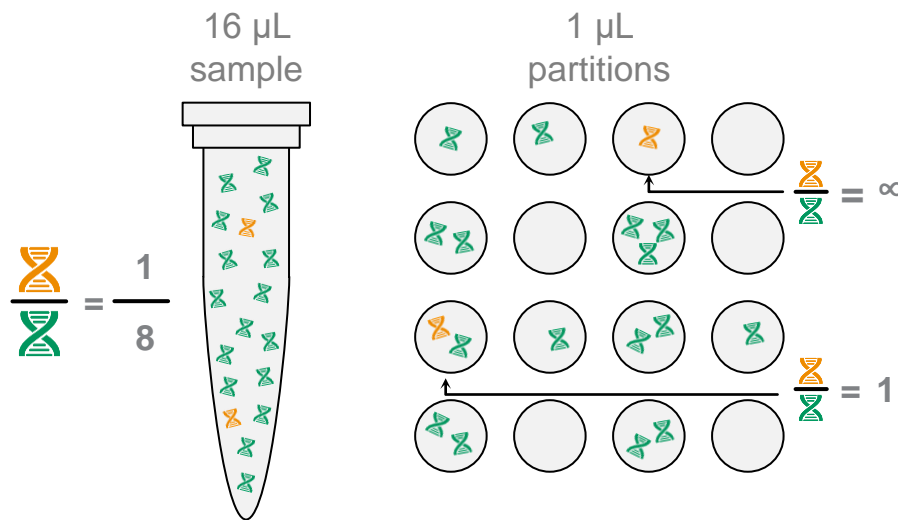
MŠMT
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní
plán
obnovy

dPCR Advantages

Reduced competition and high precision



Absolute quantitation without need for reference standards

Increased detection sensitivity for low-abundance targets due to **enrichment**

Digital PCR delivers **high precision** (low CV) over wide dynamic range

More partitions deliver **even higher precision**



Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

MŠMT
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Národní
plán
obnovy