ილიას სახელმწიფო უნივერსიტეტი

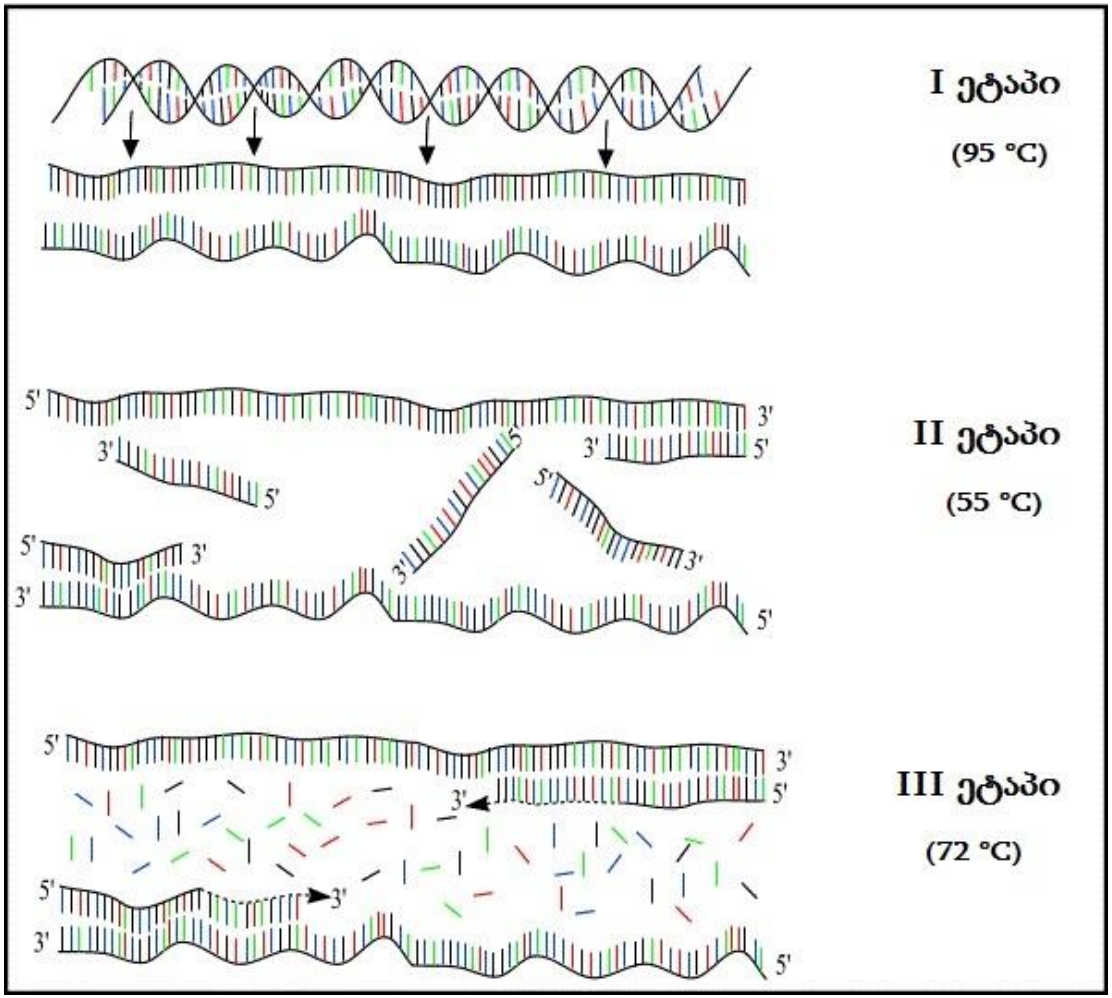
შოთა რუსთაველის ეროვნული სამეცნიერო ფონდი
SHOTA RUSTAVELI NATIONAL SCIENCE FOUNDATION

კვადრუპლექს პრაიმერული ამპლიფიკაცია მოლეკულური დიაგნოსტიკისათვის

ლევან ლომიძე

სკოლა-ლიცეუმი პრომეთე
თბილისი, 2020

პოლიმერაზული ჯაჭვური რექცია (PCR)

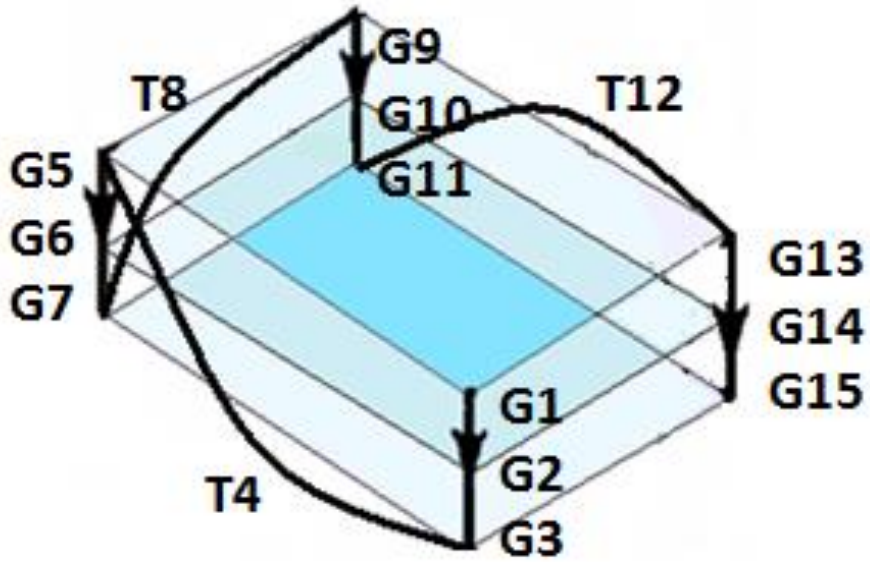


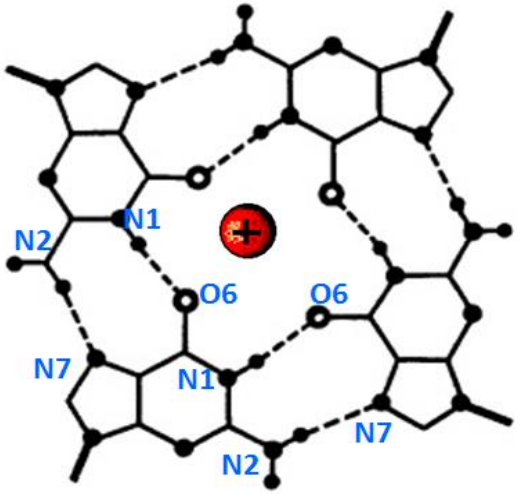
- ამპლიფიკაცია;
- რაოდენობრივი განსაზღვრა;

- თერმული ციკლი;
- პლატოს ეფექტი (საბოლოო პროდუქტის რაოდენობა);
- ძვირად ღირებული სათვლელი პრობები;

დნმ-ის G-კვარტეტები (კვადრუპლექსები)

5′ –GGGN…NGGGN…NGGGN…NGGG–3′

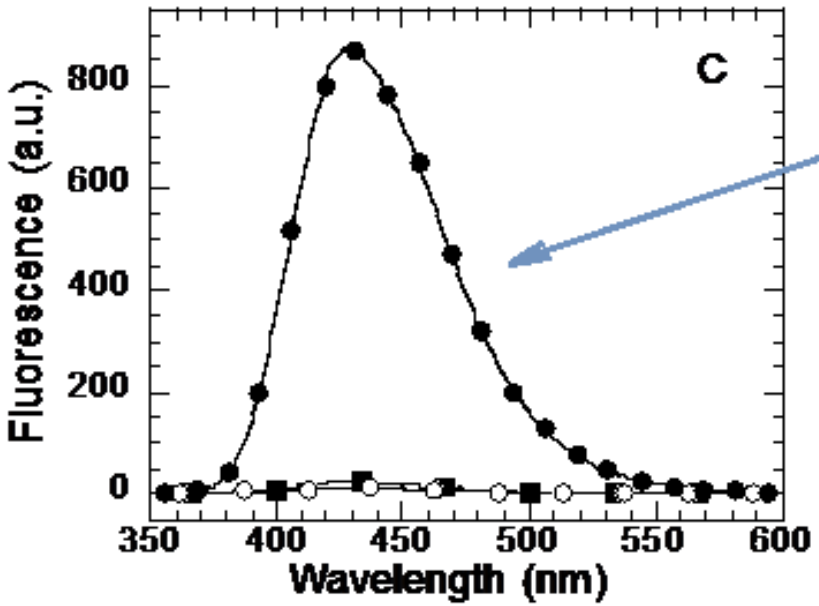


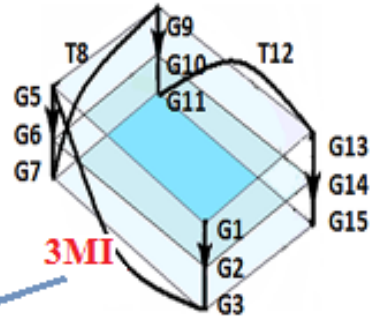


- კათიონი;
- თერმოდინამიკური სტაბილურობა;

GGGTGGGTGGGTGGG CCCACCCACCCACCC	60˚C
GGGTGGGTGGGTGGG	100˚C
GGGTGGGTGGGTGG	ND

ფლუორესცირებადი ნუკლეოტიდები კვადრუპლექსებში

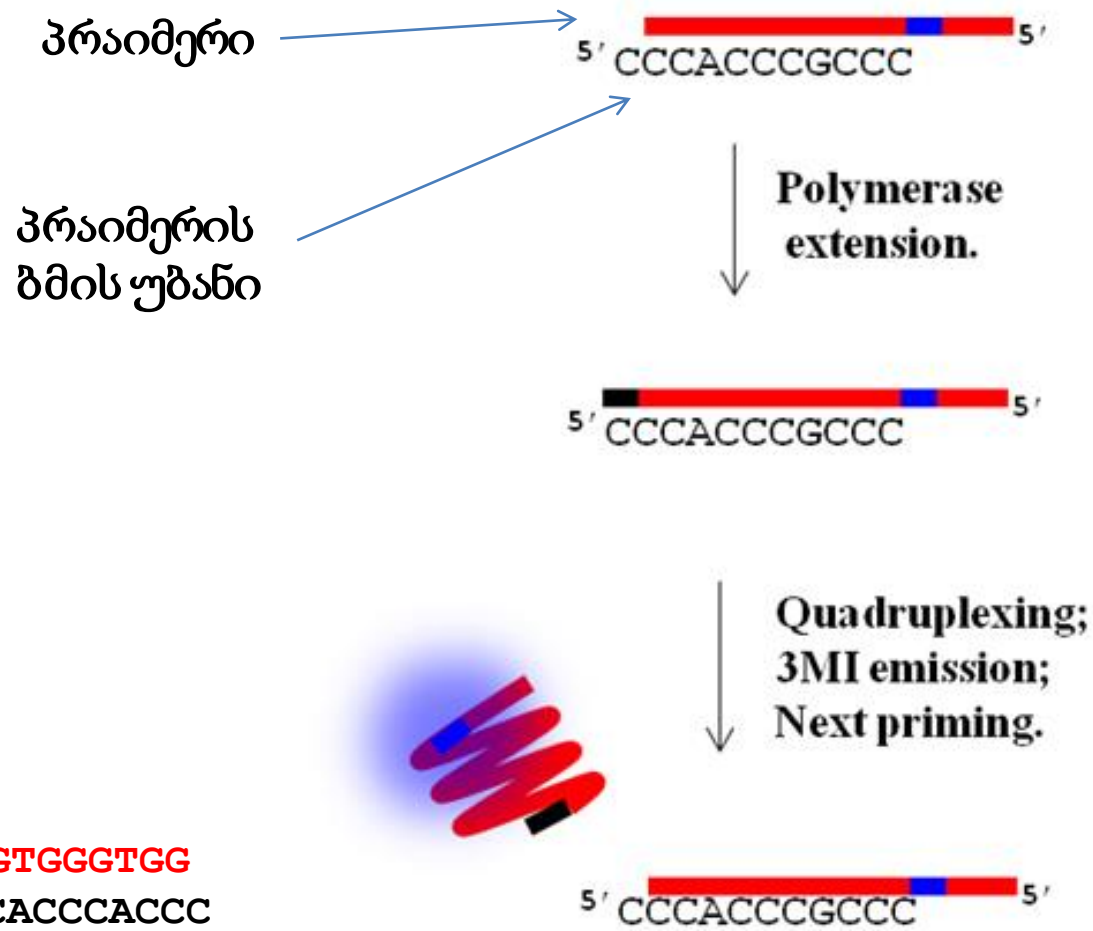




5′–GGG(3MI)GGGTGGGTGGG–3′

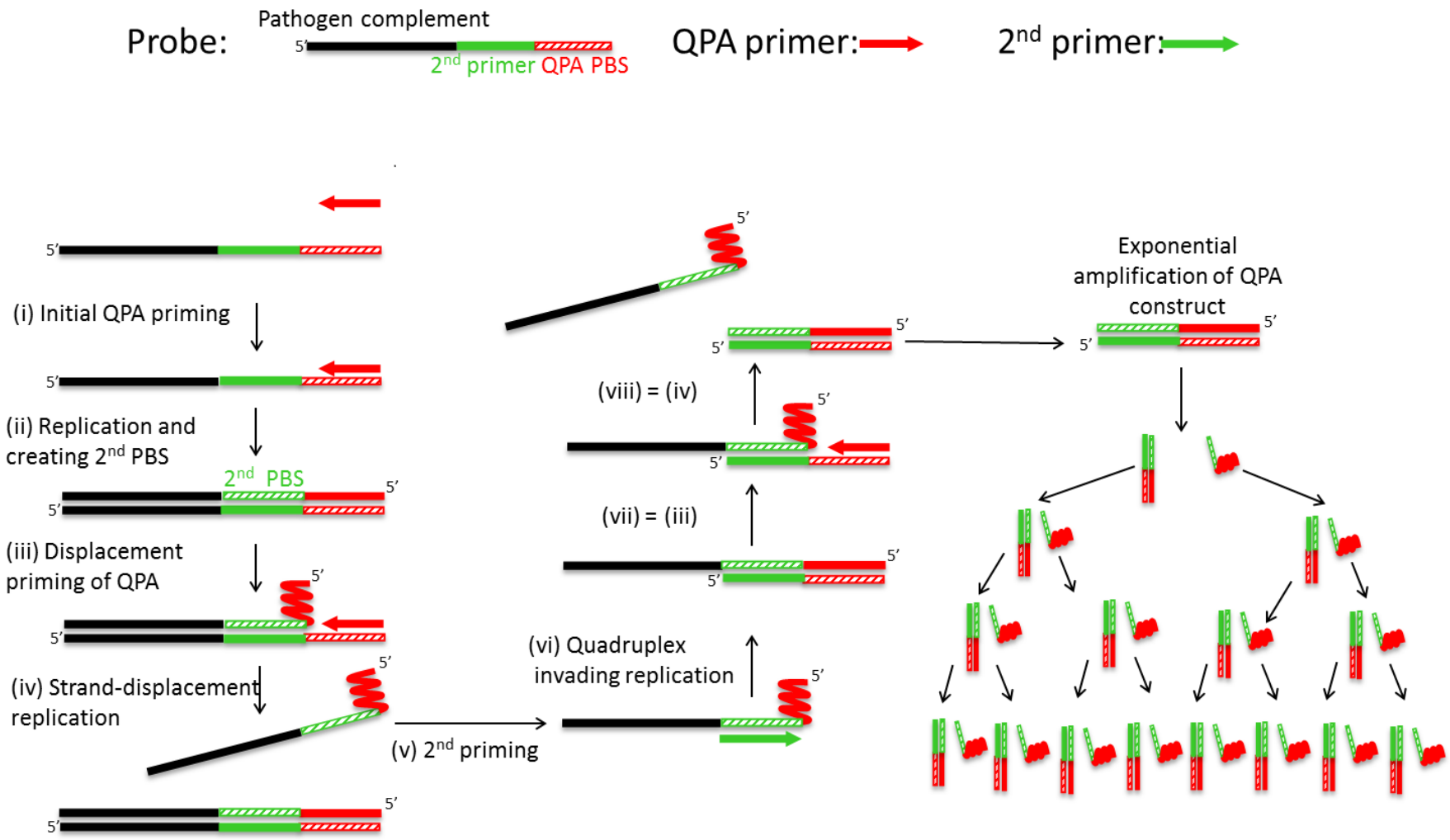
2-Aminopurin (2AP) (Ex310, Em370)
3-Methylisoxanthopterin (3MI) (Ex348, Em431)
6-Methylisoxanthopterin (6MI) (Ex340, Em430)

კვადრუპლექს პრაიმერული ამპლიფიკაცია (QPA)



პრაიმერი: 5′-GGG(3MI)GGGTGGGTGG
პბუ: 3′-CCCACCCACCC

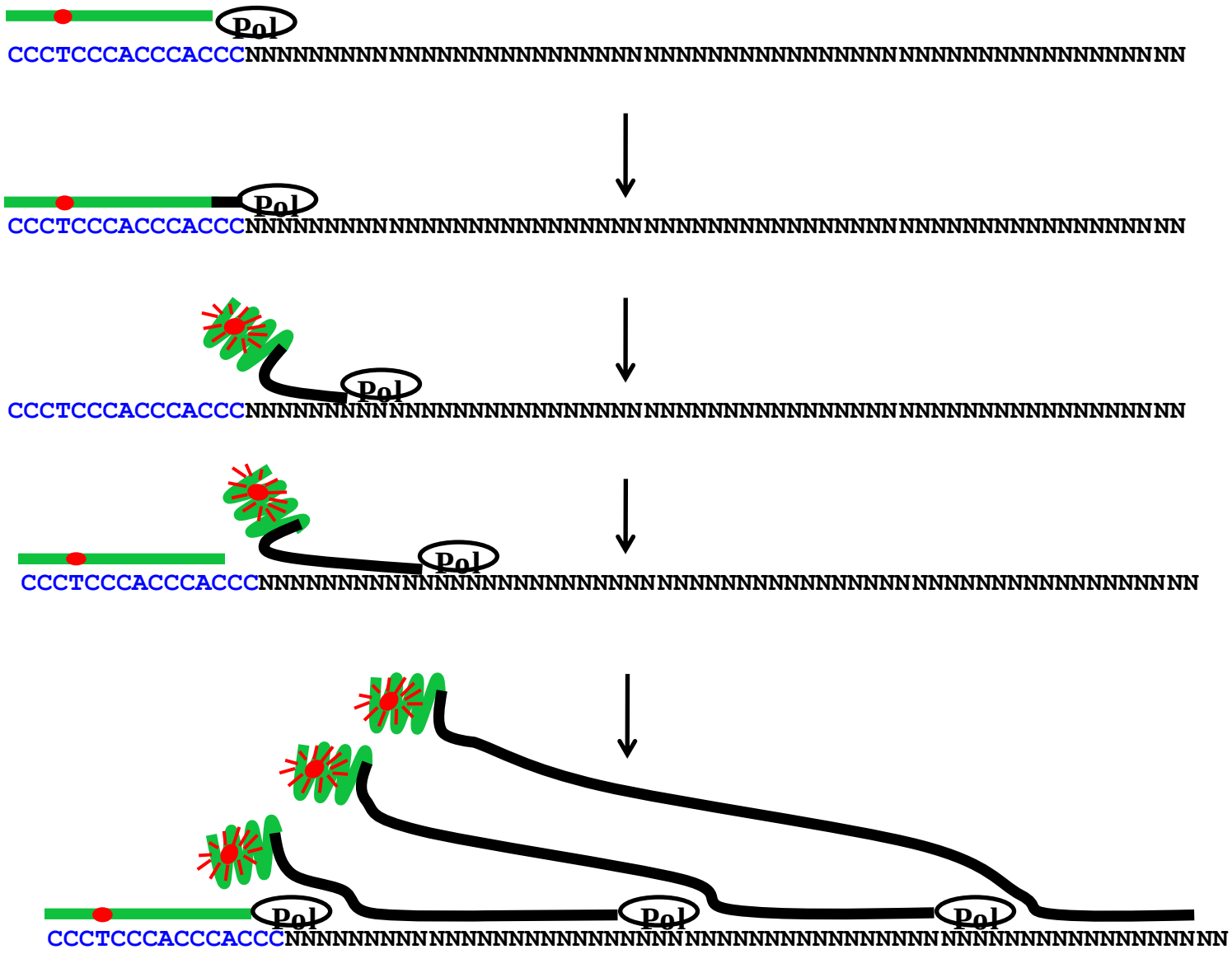
ექსპონენციური QPA რეაქცია



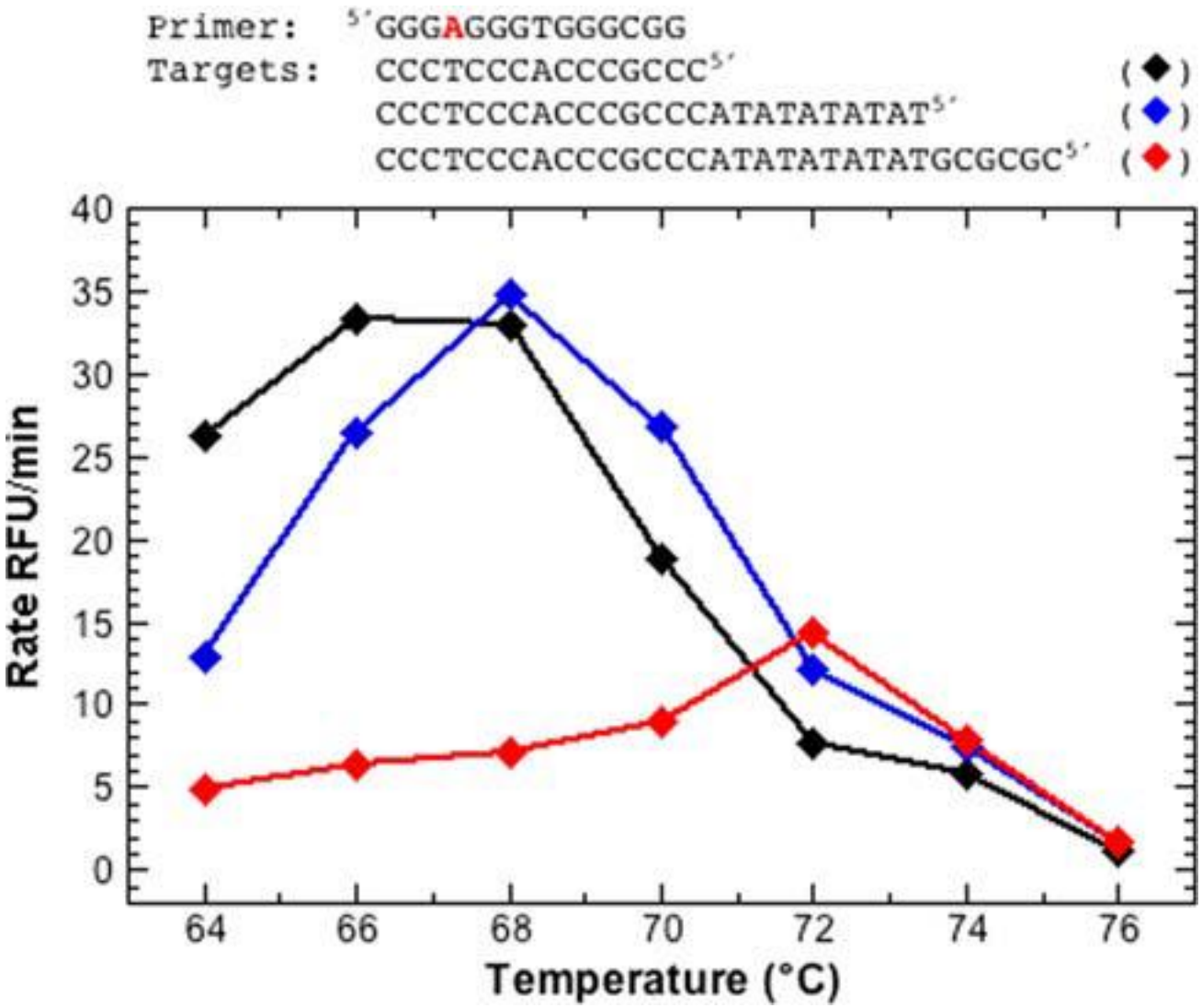
ძირითადი საკვლევი საკითხები

- წრფივი QPA რეაქცია გრძელ სამიზნე დნმ-ზე;
- კვადრუპლექსის გახსნის რეაქცია;
- რეაქციის პირობების ოპტიმიზაცია: სამუშაო ბუფერი, პრაიმერების კონცენტრაცია, პოლიმერაზას შერჩევა, რეაქციის ტემპერატურა;

წრფივი QPA რეაქცია გრძელ სამიზნე დნმ-ზე

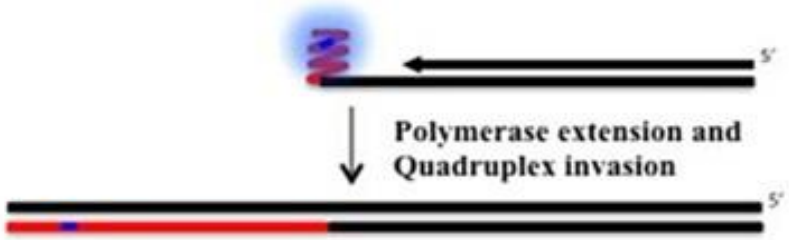

Pol
CCCTCCCACCCACCCNNN

წრფივი QPA რეაქცია

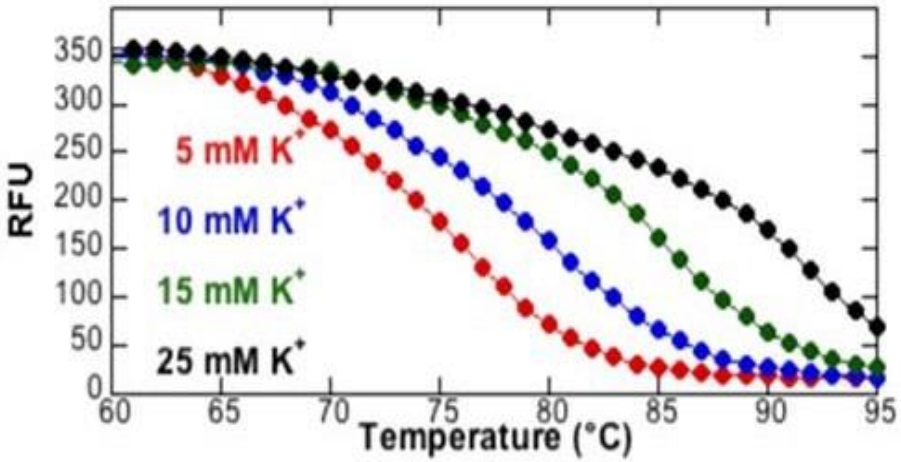


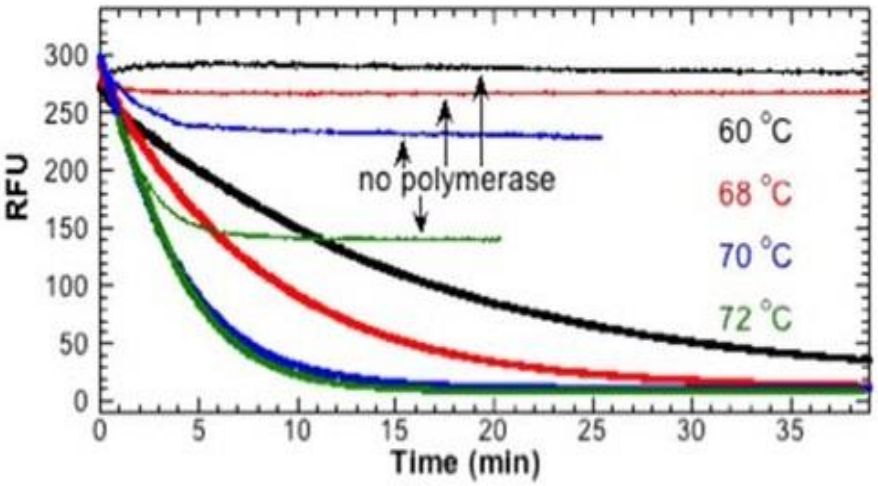
რეაქციის პირობები: 1 μM primer, 1 nM target, 800 μM dNTP, 0.05 U/μL Taq, ბუფერი: 25 mM KCl, 25 mM CsCl, 2 mM $MgCl_2$, 10 mM Tris-HCl.

კვადრუპლექსის გახსნის ექსპერიმენტები



CCCGTGTGCTGTCGCGTG5'
GGGAGGGTGGGCGGGTTGGGCACACGACAGCGCAC3'

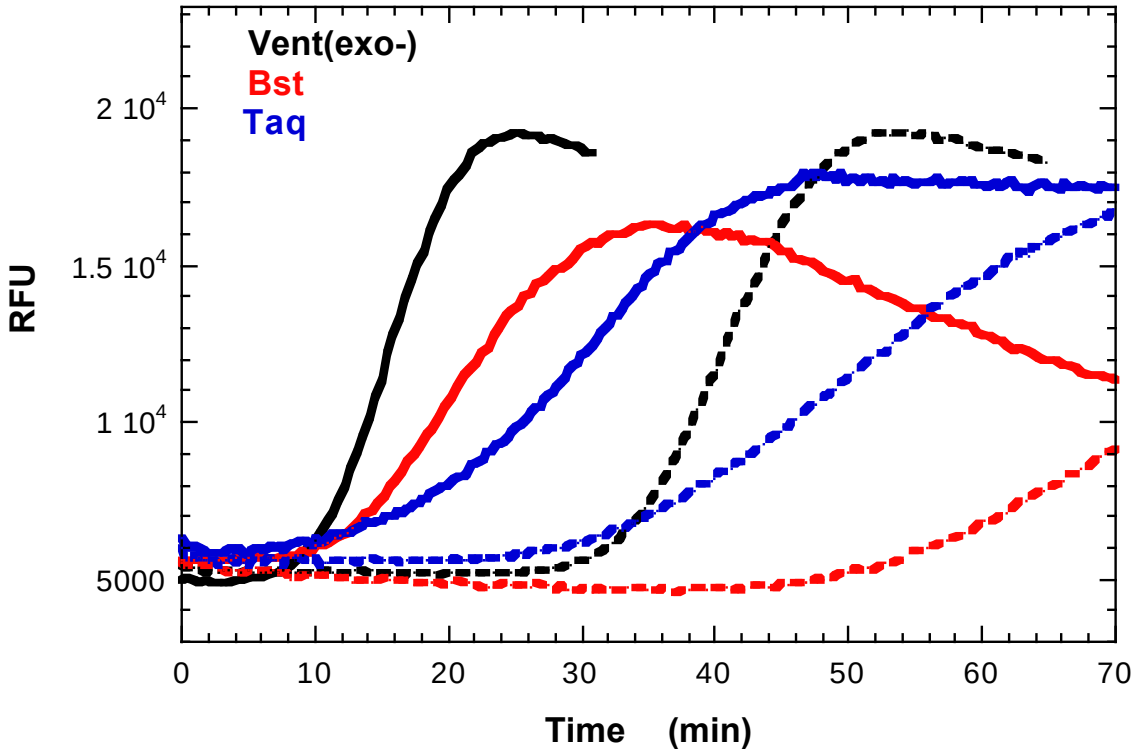




კვადრუპლექსის ლღობის მრუდები K^+ იონების სხვადასხვა კონცენტრაციაზე. ექსპერიმენტის პირობები: 50 mM მონოვალენტური კათიონები (K^+ + Cs^+), 2 mM $MgCl_2$, 10 mM Tris-HCl, pH 8.7.

კვადრუპლექსის გახსნის მრუდები სხვადასხვა ტემპერატურაზე; 5 mM KCl, 45 mM CsCl, 2 mM $MgCl_2$ ბუფერში, Taq პოლიმერაზას გამოყენებით.

პოლიმერაზას შერჩევა



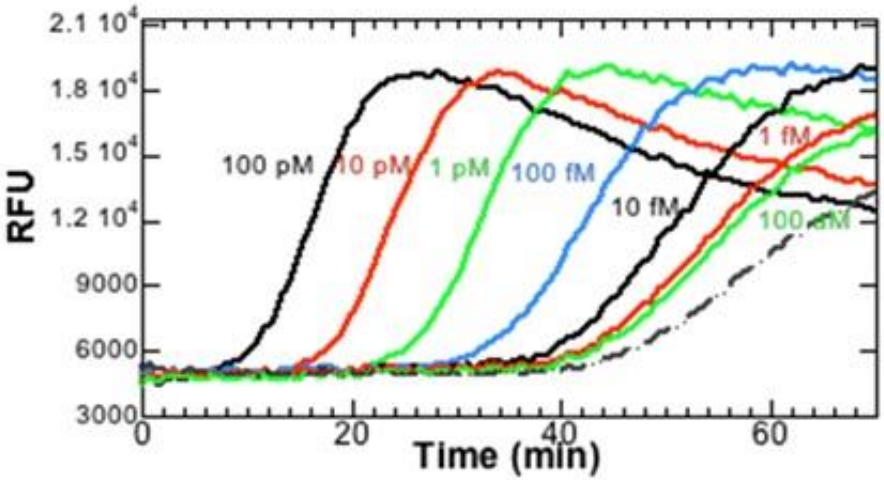
QPA პრაიმერი: 3′ - GGTGGGCGGG(3MI)GGG – 5′

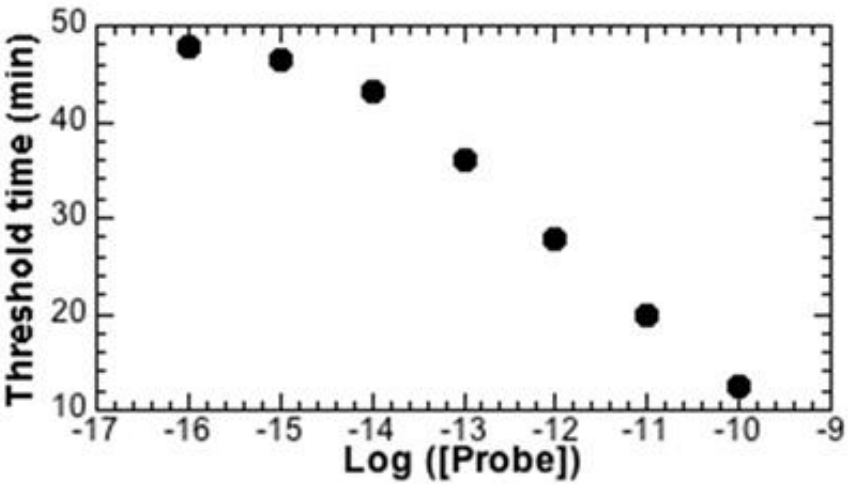
სამიზნე დნმ-ი: 5′ - ATTATTCATTTATCTTTATTTATATCTCCCACCCGCCC-3′

მეორე პრაიმერი: 5′ - ATTATTCATTTATCTTTATTTATATCTCCC - 3′

ექსპერიმენტის პირობები: 350 nM QPA პრაიმერი, 300 nM *მეორე* პრაიმერი, 400 μM dNTP, 0.06 U/μl Vent (exo-), (შავი) 0.08 U/μl Bst 2.0 (წითელი), 0.1 U/μl Taq (ლურჯი). ბუფერი: 10 mM KCl, 40 mM CsCl, 2 mM $MgCl_2$; ექსპერიმენტი ჩატარდა 66 °C ტემპერატურაზე.

ექსპონენციური QPA რეაქცია





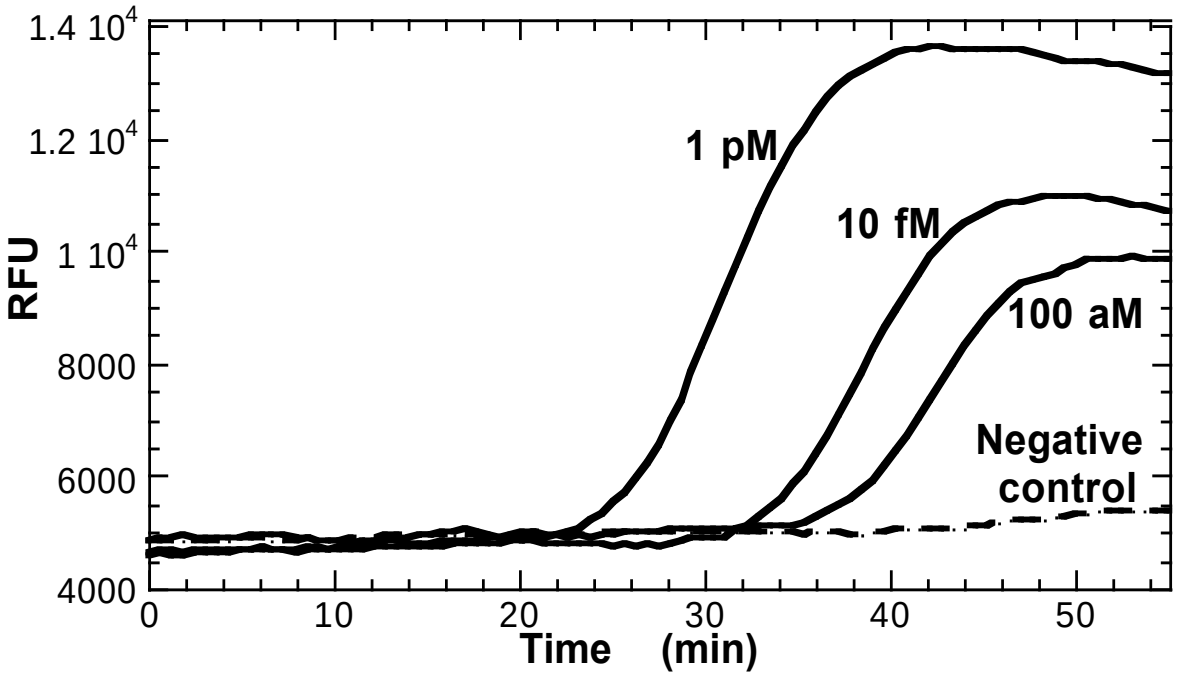
QPA პრაიმერი: 3′ - GGTGGGCGGG(3MI)GGG – 5′

სამიზნე დნმ-ი: 5′ - ATTATTCATTTATCTTTATTTATATCTCCCACCCGCCC-3′

მეორე პრაიმერი: 5′ - ATTATTCATTTATCTTTATTTATATCTCCC - 3′

რეაქციის პირობები: 350 nM QPA primer, 300 nM *მეორე* პრაიმერი, 400 μM dNTP, 0.06 U/μL Vent (exo-). ბუფერი: 10 mM KCl, 40 mM CsCl, 2 mM $MgCl_2$, 10 mM Tris-HCl, 66 ˚C.

ექსპონენციური QPA რეაქცია



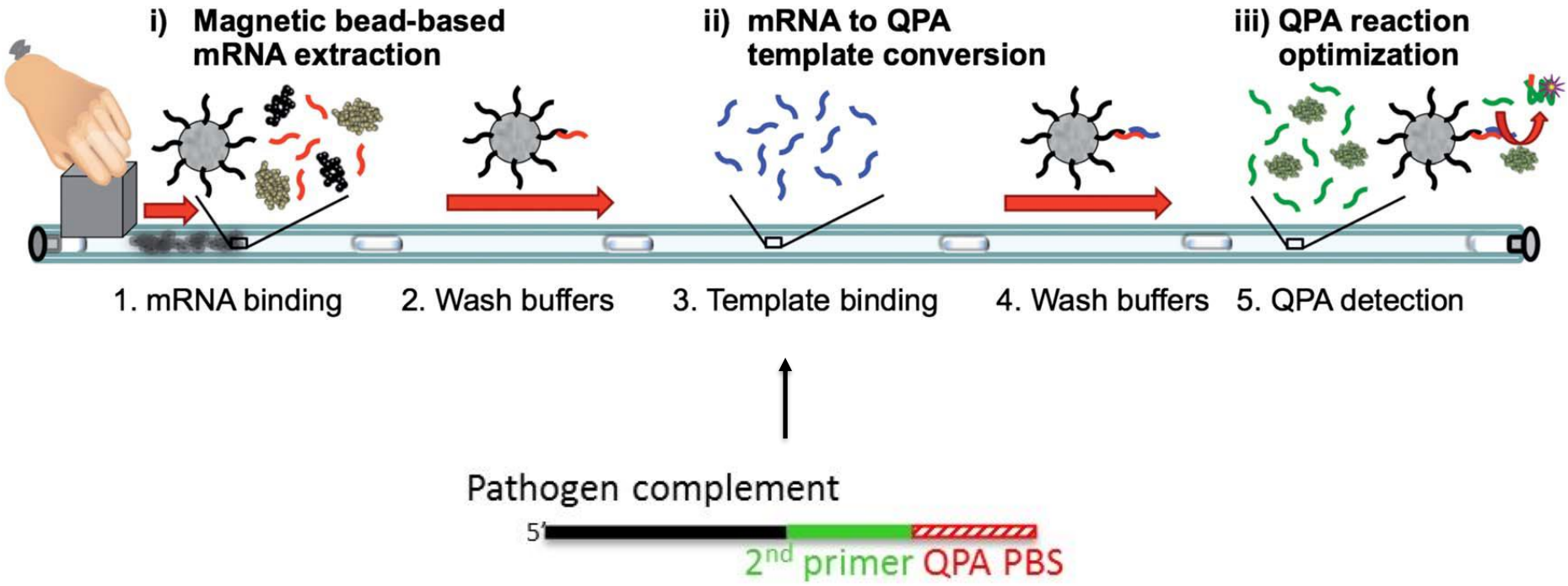
QPA პრაიმერი: 3′ - GGTGGGCGGG(3MI)GGG – 5′

სამიზნე დნმ-ი: 5′ - ATTATTCATTTATCTTTATTTATATCTCCCACCCGCCC-3′

მეორე პრაიმერი: 5′ - ATTATTCATTTATCTTTATTTATATCTCC - 3′

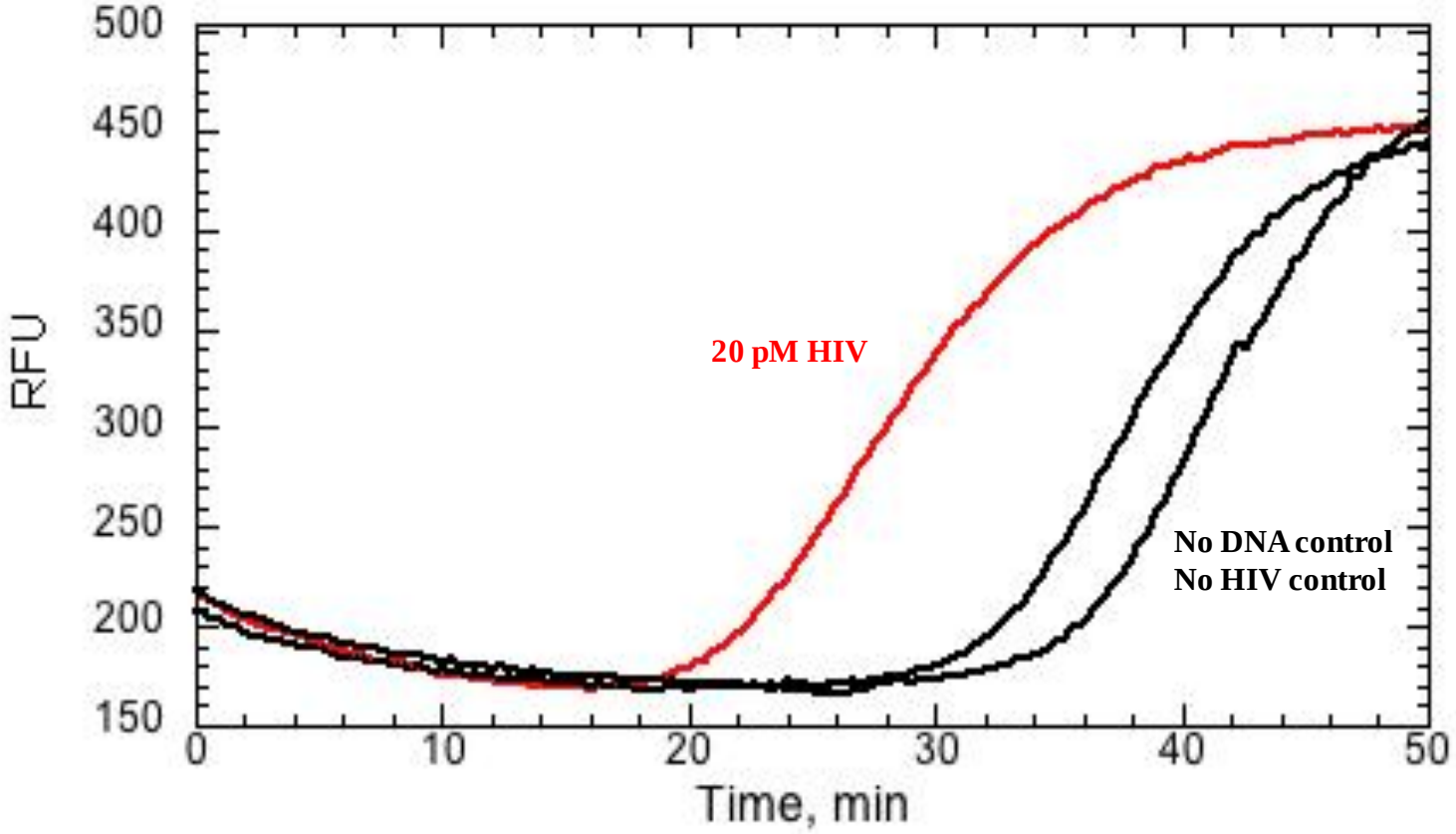
ექსპერიმენტული პირობები: 350 nM QPA პრაიმერი, 300 nM *მეორე* პრაიმერი, 400 μM dNTP, 0.08 U/μl Vent (exo-). ბუფერი: 5 mM KCl, 45 mM CsCl, 2 mM $MgCl_2$ ექსპერიმენტი ჩატარდა 66 °C.

მრავალსინჯარიანი (Multi Tube) მეთოდი



Funded by a grant from the Bill & Melinda Gates Foundation through the Grand Challenges in Global Health initiative.

პათოგენური რნმ-ის დეტექცია ექსპონენციური QPA რეაქციის გამოყენებით



QPA პრაიმერი: 5′-GGG(3Mi)GGGCGGGTGG-3′

სამიზნე დნმ: 3′AGTCTAGGACGTATATTCGTCGACTTTTCCCGCCCACCCTCTATATTTATTTCTATTTACTTATTA-5′

მეორე პრაიმერი: 3′-CCCTCTATATTTATTTCTATTTACTTATTA-5′

პათოგენური რნმ (HIV RNA): 5′ ----------ucagauccugcauauaagcagcug----------cuucaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa-3′

მაგნიტურ მძივზე მიმაგრებული ნუკლეოტიდური თანმიმდვრობა: 3′-GAAGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-5′Bt-●

ექსპერიმენტული პირობები: Biotin DNA / Beads – 100 nM / 0.2 mg/mL, 20 pM HIV RNA, 100 nM სამიზნე დნმ; QPA რეაქცის ექსპერიმენტული პირობები: 300 nM QPA პრაიმერი, 300 nM *მეორე* პრაიმერი, 400 μM dNTP, 0.06 U/μl Vent (exo-). ბუფერი: 10 mM KCl, 40 mM CsCl, 2 mM $MgCl_2$ ექსპერიმენტი ჩატარდა 69 °C.

დასკვნები

- **QPA** არის იზოთერმული რეაქცია;
- პრაიმერის მეშვეობით ხდება პროდუქტის დეტექცია და დათვლა;
- რეაქციის პროდუქტის თვლის სისტემა მონომოლეკულურია;
- რეაქციას არის პლატოსგან თავისუფალი;
- პრაიმერების შერჩევით შესაძლებელია რეაქციის სხვადასხვა ტემპერატურაზე წარმართვა;
- **QPA** რეაქცია შესაძლებელია გამოვიყენოთ მრავალსინჯარიან (Multi Tube) დიაგნოსტიკურ მეთოდში;
- **QPA** რეაქციით შესაძლებელია დნმ-ს სიგნალის 10^{10}-ჯერ გამრავლება ~40 წუთში;

მადლობა ყურადღებისთვის