

PCR

(Polymerázová řetězcová reakce)



Michal Mahdal, Lukáš Martinek,
Zdeněk Pluháček

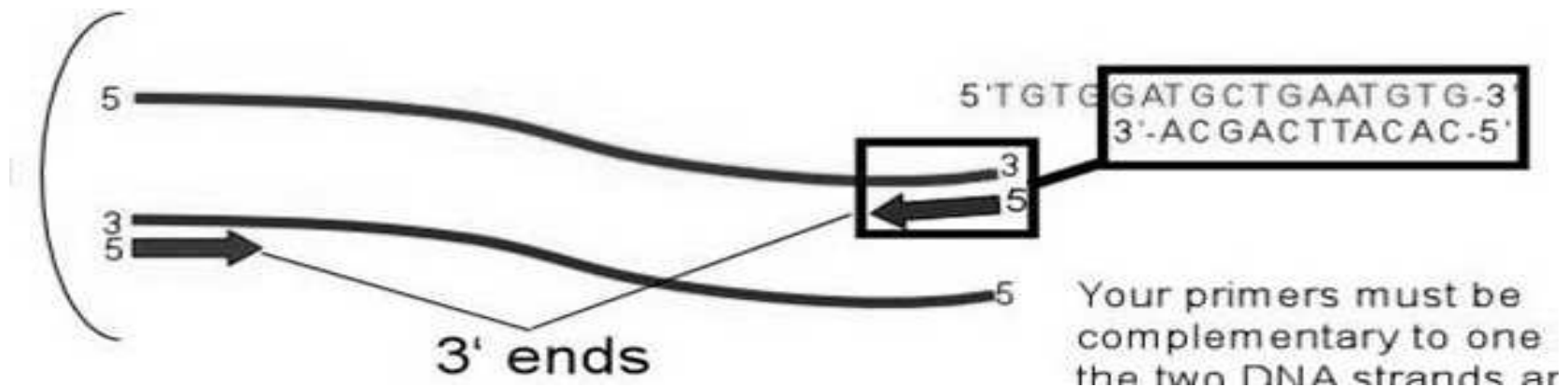
Česky?

- **Polymerase Chain Reaction**
polymerázová řetězová reakce
- biochemická reakce, která využívá enzym DNA-polymerázu ke kopírování DNA
- produkt se hromadí geometrickou řadou



DNA - polymeráza

- DNA-polymeráza syntetizuje komplementární vlákno podle templátu **jednovláknové DNA** ve směru **5' > 3'**

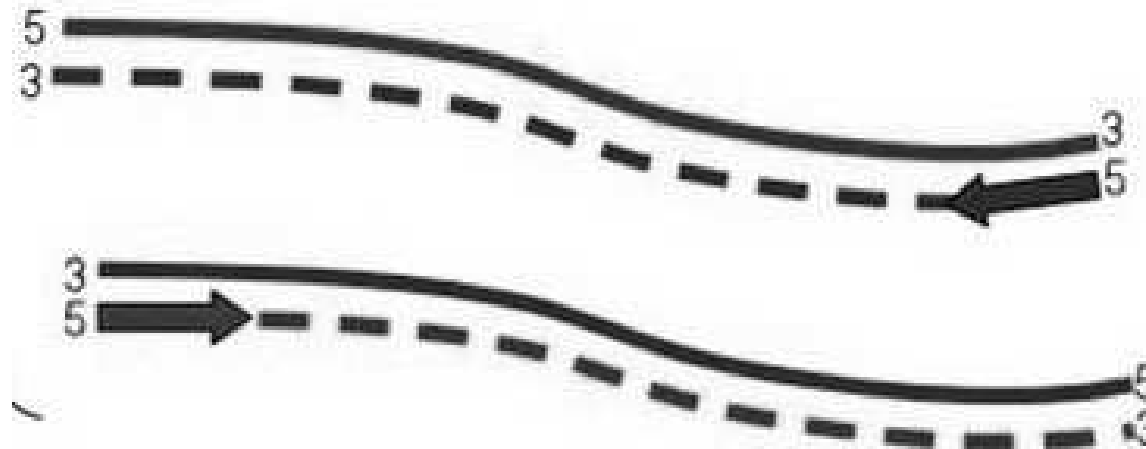


Nasednutí primeru

- Stačí krátký existující úsek druhého vlákna, tzv. primer, který můžeme vyrobit uměle jako oligonukleotid
- **Primer** vytvoří vodíkové můstky s komplementární sekvencí v templátovém vlákně - **nasednutí primeru**

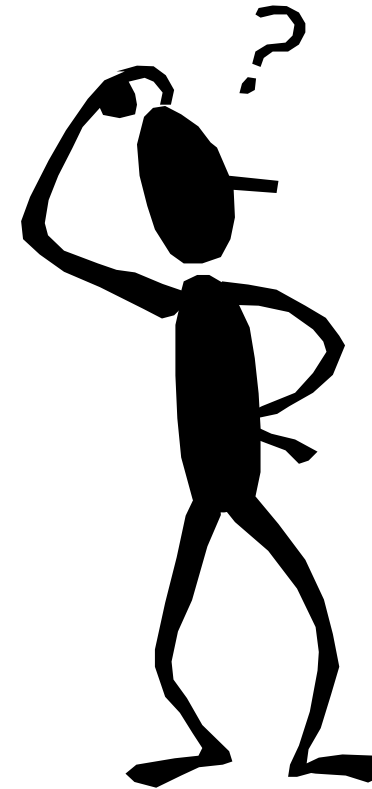
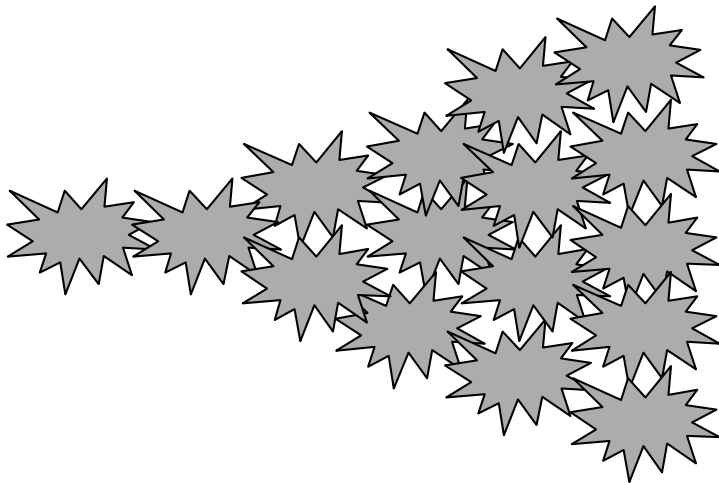
Elongace primeru

- Primer se pomocí DNA-polymerázy prodlužuje
= **extenze primeru**



Co vznikne?

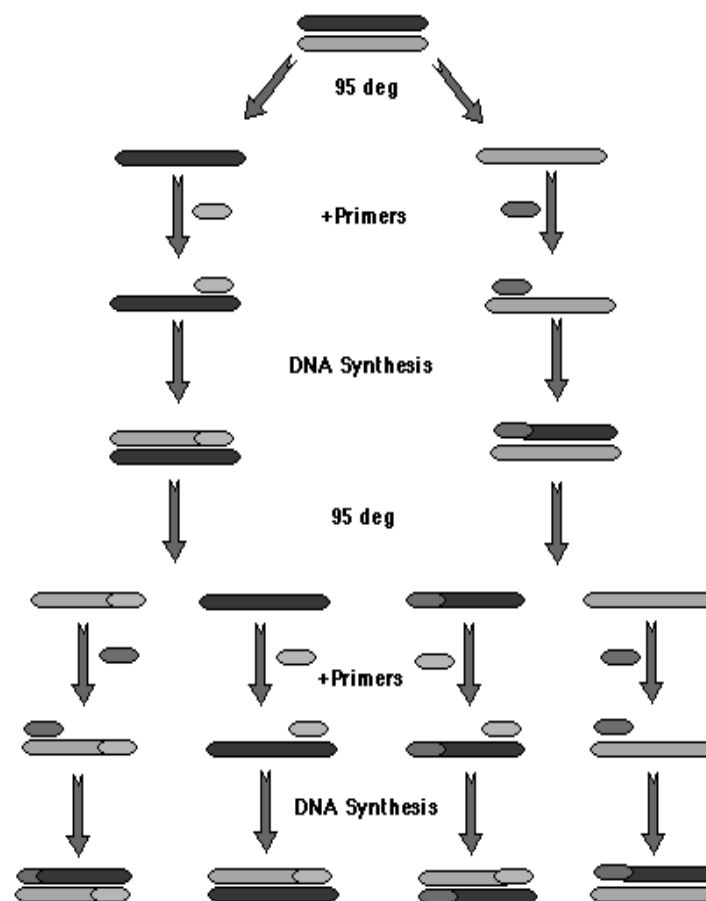
- Z jednoho templátového vlákna vznikne 1 kopie
- Řetězové hromadění produktu?

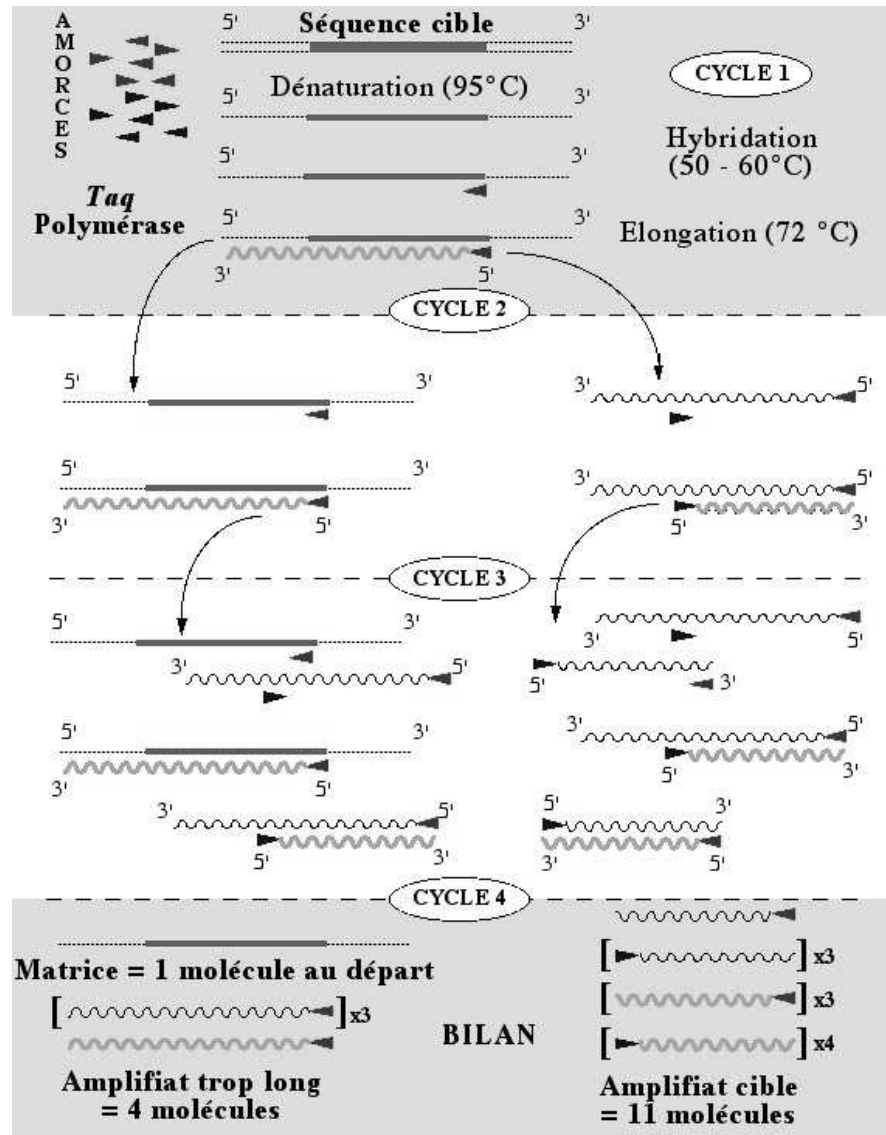


Odpálená bomba

- Použijeme dva primery, které nasednou na komplementární sekvence ve dvou templátových vláknech.
- Templátová vlákna vznikají denaturací původně dvouvláknové DNA. Primery na tato vlákna nasedají v protisměrné orientaci, takže po opakovaných cyklech denaturace, nasedání primeru a extenze primeru DNA-polymerázou vznikají produkty, které slouží jako templáty pro nový reakční cyklus.

- Ze dvou templátových vláken vzniknou dvě kopie.
- Pro další cyklus máme k dispozici už čtyři vlákna, podle kterých vzniknou čtyři kopie.
- Ze dvou vláken získáme po 30 cyklech teoreticky celkem cca. 107 milionů kopií





LA P.C.R. : UNE AMPLIFICATION SPÉCIFIQUE D'ADN

d'après Sambrook, Fritsch & Maniatis (1989); modifié par E. Douzery.

Důležité!

- Pro každou PCR, je potřeba navrhnout vhodný pár primerů. Musíme zajistit, aby oba primery nasedly při stejné teplotě na správné místo
- Kdyby nasedaly i jinde v templátové DNA, nedošlo by k efektivní amplifikaci zvoleného úseku.

- Primery musejí mít shodnou teplotou tání
 - závisí na poměru G-C párů a A-T párů)
- Primery se nesmí vzájemně párovat
 - dimery
 - vlásenky
- Pro výběr primerů se dnes obvykle využívá PC s příslušným softwarem

Problém?



- Na začátku každého cyklu musíme denaturovat templátovou DNA vysokou teplotou.
- Potřebujeme **termostabilní polymerázy**.
- Nejčastější je **Taq-polymeráza**, nazvaná podle bakterie *Thermus aquaticus*

Thermus aquaticus žije v podmořských sopkách.



Jak se PCR prakticky provádí?

- Cyklické změny teplot reakční směsi lze řídit automatizovaně pomocí tzv. termocykleru. Zkumavky s reakční směsí jsou v termocykleru uloženy v kovovém bloku, jehož teplota je řízena podle programu, nastaveného uživatelem. Reakční směs je podobně jako u jiných biochemických reakcí sestavena v mikrozkuhavce, odlišnost spočívá v tom, že mikrozkuhavka musí být tenkostěnná, aby umožňovala rychlé změny teplot vzorku. Obvyklé je také sestavování reakční směsi tzv. "na ledu", tzn. že mikrozkuhavka je stále chlazená na teplotu mírně nad 0 °C, aby se zabránilo předčasné aktivitě Taq-polymerázy. Při laboratorní teplotě totiž mohou primery nespecificky nasednout na místa, která neodpovídají zcela jejich sekvenci, a Taq-polymeráza by mohla zahájit jejich extenzi. Reakční směs by tak mohla být hned zpočátku obohacena o nespecifické produkty, které by v pozdějších krocích snižovaly účinnost reakce, příp. by vedly ke vzniku zcela chybných produktů. Dokonale lze toto riziko eliminovat jen tzv. horkým startem reakce. Protože Taq-polymeráza nefunguje bezchybně a může se někdy z templátového vlákna předčasně uvolnit, takže mohou vznikat neúplné produkty, provádí se na závěr ještě tzv. konečná extenze.

- V průběhu PCR tak dochází k uvolňování dalších a dalších molekul fluorescenčního barviva, takže roste fluorescence reakční směsi. Tento nárůst je přímo úměrný množství produktu, který v reakci vzniká. Speciální termocyklery, určené pro kvantitativní PCR v reálném čase, jsou schopny v průběhu PCR ozařovat vzorek excitačním zářením, které vybudí fluorescenci uvolněného barviva. Tuto fluorescenci přístroj po každém cyklu změří a výsledek předá řídicímu softwaru, který zobrazuje průběžně - v reálném čase - množství uvolněné fluorescence, které odpovídá množství vzniklého produktu. Výsledek reakce tak známe často dříve, než proběhnou všechny cykly. Kromě tohoto urychlení a vypuštění zdlouhavé detekce produktu na gelu je tato technika hlavně výhodná tam, kde potřebujeme znát přesné množství vstupní templátové DNA - zejména u sledování exprese genů pomocí tzv. reverzní transkripce-polymerázové řetězové reakce (RT-PCR).

Kvantitativní PCR v reálném čase

- Množství produktu, vytvořeného amplifikací, závisí v každé PCR na množství templátové DNA, která je přidána do reakce. Reakce tedy probíhá tzv. kvantitativně. Hrubé určení množství produktu je možné posouzením intenzity pruhu, který se objeví po rozdělení výsledku PCR na gelu.
- Přesné určení tohoto množství je možné pomocí sondy označené fluorescenčním barvivem. Tato sonda musí být navržena tak, aby hybridizovala s templátovou DNA za stejných podmínek jako primery, a to tak, že nasedne na templátovou DNA v místě mezi místy nasednutí obou protisměrně orientovaných primerů. DNA-polymeráza, která provádí extenzi jednoho ze dvou primerů, narazí při syntéze komplementárního vlákna na nasedlou sondu.

- Protože DNA-polymeráza má kromě své schopnosti syntetizovat komplementární vlákno také tzv. exonukleázovou aktivitu, odbourá nasedlou sondu. Při odbourávání uvolní jednotlivé nukleotidy sondy, z nichž některé jsou označeny fluorescenčním barvivem. Pro tento typ sond se přitom používá fluorescenční barvivo, které není schopné fluorescence, dokud je vázáno ve struktuře sondy. Jakmile se ale uvolní do roztoku, tak schopnost fluorescence získá.
- průběhu PCR tak dochází k uvolňování dalších a dalších molekul fluorescenčního barviva, takže roste fluorescence reakční směsi. Tento nárůst je přímo úměrný množství produktu, který v reakci vzniká.

Nevýhody PCR

- Používáme-li klasickou Taq-polymerázu, má PCR svá omezení - Taq-polymeráza nemá tzv. korektorskou aktivitu, takže při syntéze nového vlákna dělá chyby.
- Protože v PCR je produkt předchozího cyklu syntézy templátem pro další cykly syntézy, tyto chyby se hromadí.
- Taq-polymeráza také nedokáže efektivně syntetizovat produkty delší než cca 3-15 tisíc párů bází (skutečná výkonnost závisí na zdroji DNA - z malých genomů probíhá amplifikace určitých úseků snadněji než z velkých genomů).

Výhody PCR

- lékařské diagnostika - pomnožení určité sekvence velmi malého množství DNA
- Jednodušší než klonování
- Vysoká citlivost.
- Např. detekce patogenních mikroorganismů v krvi pacienta (není-li možná kultivace nebo byla-li by moc dlouhá)

DNA Fingerprints

- The only difference between people (or any animal) is the order of the base pairs. There are so many millions of base pairs in each person's DNA that every person has a different sequence.
 - Using these sequences, every person could be identified solely by the sequence of their base pairs. However, because there are so many millions of base pairs, the task would be very time-consuming. Instead, scientists are able to use a shorter method, because of repeating patterns in DNA.
 - These patterns do not, however, give an individual "fingerprint," but they are able to determine whether two DNA samples are from the same person, related people, or non-related people. Scientists use a small number of sequences of DNA that are known to vary among individuals a great deal, and analyze those to get a certain probability of a match.
-
- <http://protist.biology.washington.edu/fingerprint/dnaintro.html>

PCR Fingerprints

- **Why use PCR Fingerprints? What good are they?**
- **PCR Fingerprints are quick, simple and inexpensive ways to assay DNA sequence differences. PCR fingerprinting of genomes, unlike VNTR, will not require Southern blots**
- **Uses of PCR fingerprinting:**
 - Linkage mapping
 - Individual ID
 - Pedigree analysis
 - Determination of family relationships
 - Determination of population genetic parameters
 - Epidemiology
 - Taxonomy and Phylogeny

Děkujeme za pozornost