

PCR

Polymerase chain reaction

Polymerázová řetězová reakce

In vitro replikace DNA

Objev PCR

- vyvinuta v laboratořích společnosti **Cetus Corporation** v Kalifornii **KARY MULLISEM** a jeho spolupracovníky
- popsali in vitro amplifikaci jedné kopie savčích genů pomocí fragmentu DNA polymerázy I. *Escherchia coli*
- r. 1993 mu byla za objev PCR udělena **Nobelova cena**

Princip a účinnost PCR

- podstatou je **syntéza jednoho či více úseků DNA o předem známé nukleotidové sekvenci.**
- po hybridizaci krátkých syntetických oligonukleotidů (primerů) ke komplementárním úsekům na DNA řetězci, dojde za katalytického působení DNA dependentní polymerázy **k syntéze nového řetězce nukleové kyseliny**
- reakce probíhá v opakovaných reakčních cyklech

Kroky amplifikačních cyklů PCR

1. Denaturace dvouřetězcové DNA
 2. Hybridizace primerů - annealing
 3. Syntéza nového řetězce DNA – elongace
- opakováním těchto cyklů - běžně 30x – dojde k namnožení DNA fragmentů v milionech kopií

1. Denaturace dvouřetězcové DNA

- optimální denaturační teplota je **90 – 95 °C** při použití **Taq DNA polymerázy**
- v prvním cyklu PCR doba denaturace prodloužena až na **8-9 min.** (úplné oddělení řetězců dlouhé molekuly DNA), v dalších cyklech **15 – 30 sekund**

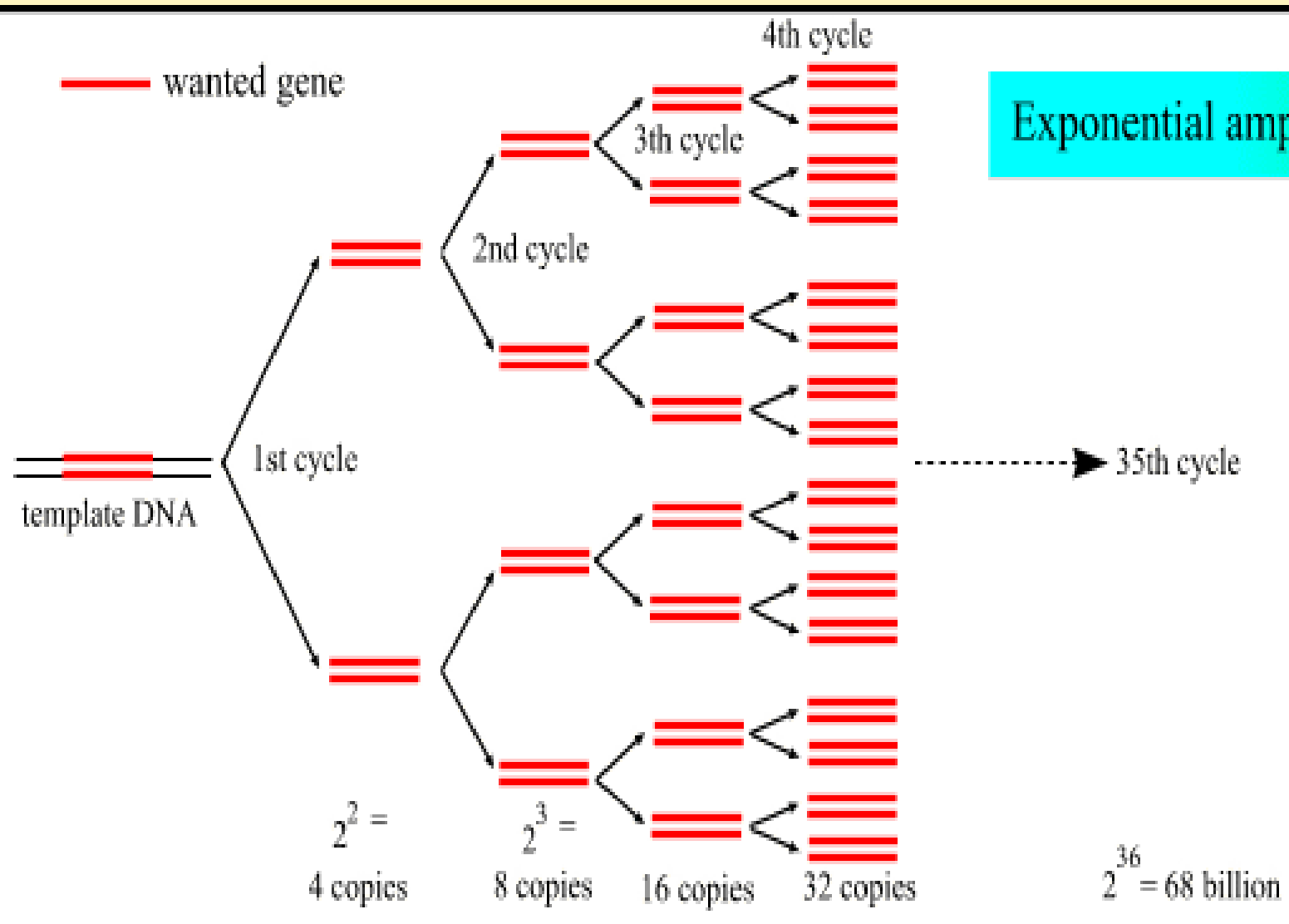
2. Hybridizace primerů

- tzv. **annealing** = hybridizace primerů k jednotlivým řetězcům DNA templátu.
- určení teploty hybridizace je klíčové – reakce probíhá neoptimálněji při teplotě **60 – 65 °C**
- příliš vysoká teplota brání napojení primerů k cílové sekvenci na DNA
- příliš nízká teplota hybridizace vede ke snížení specifiity reakce a k amplifikaci nežádoucích fragmentů DNA
- připojení primerů trvá **15 - 30 sekund**

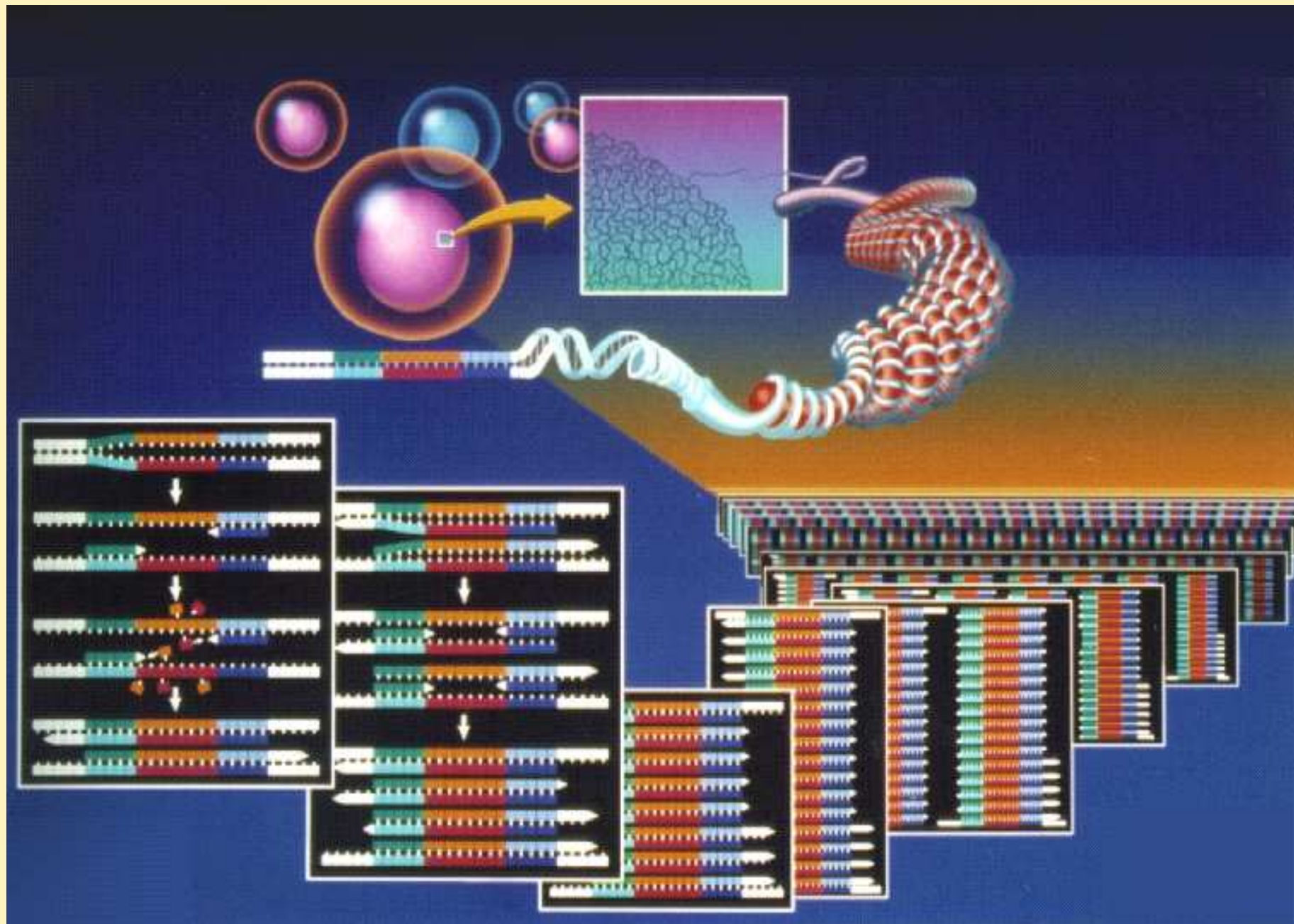
3. Syntéza nového řetězce DNA

= elongace

- katalytickým působením Taq polymerázy se prodlužují připojené primery, optimální je zahřátí na teplotu **68 – 72 °C** po dobu 30 – 60 s.
- závěrečná elongace prodloužena na 6 min. – zaručení kompletace všech amplikonů



Exponential amplification

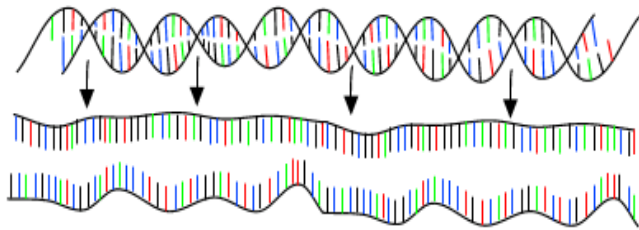


PCR : Polymerase Chain Reaction

30 - 40 cycles of 3 steps :

Step 1 : denaturation

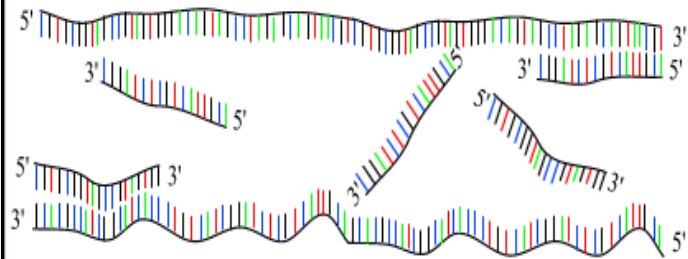
1 minut 94 °C



Step 2 : annealing

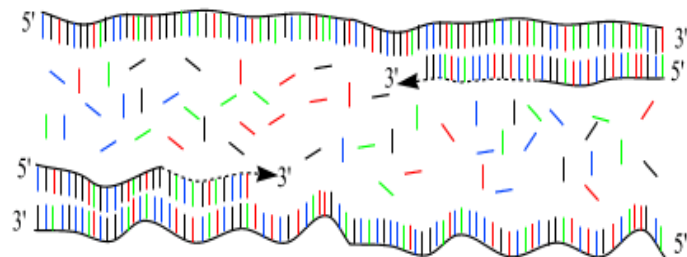
45 seconds 54 °C

forward and reverse primers !!!

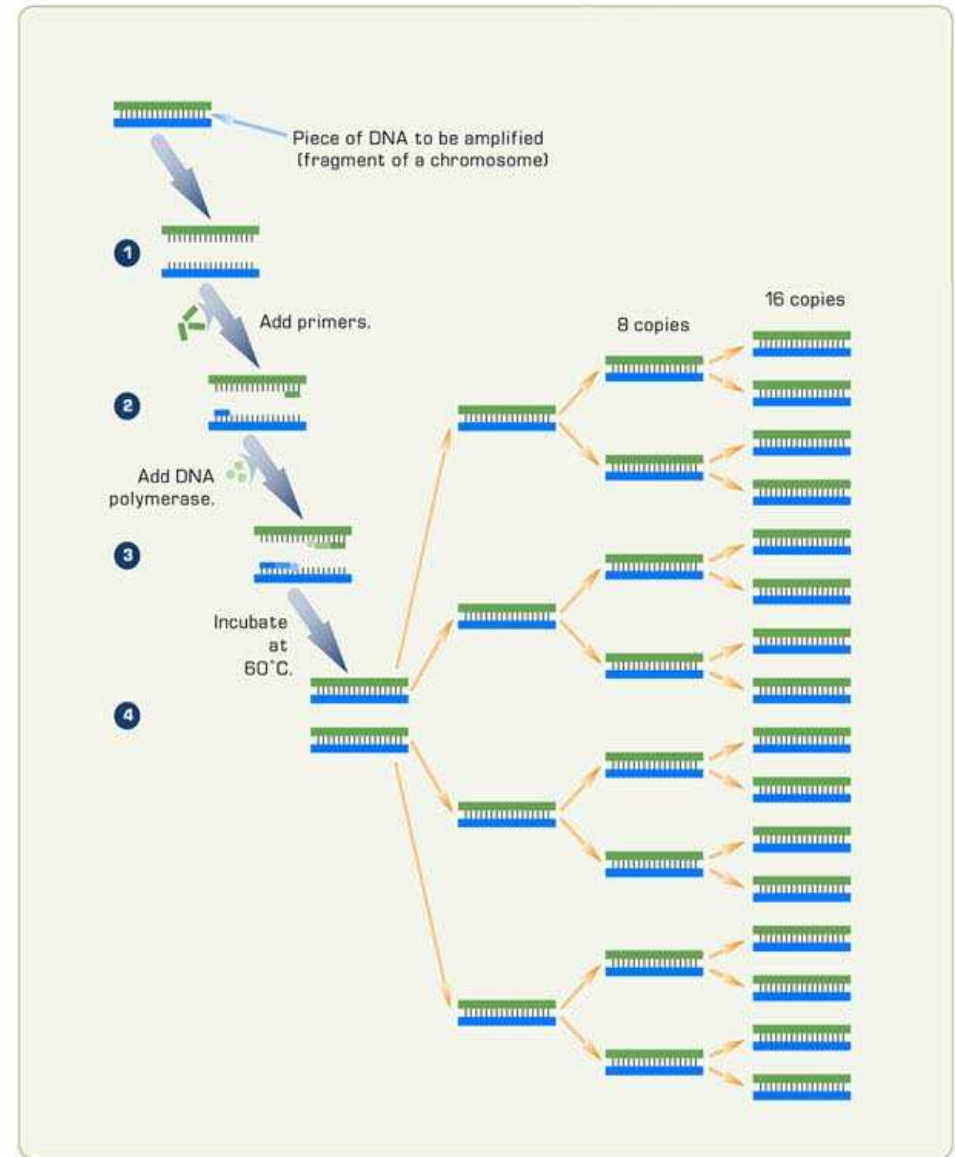


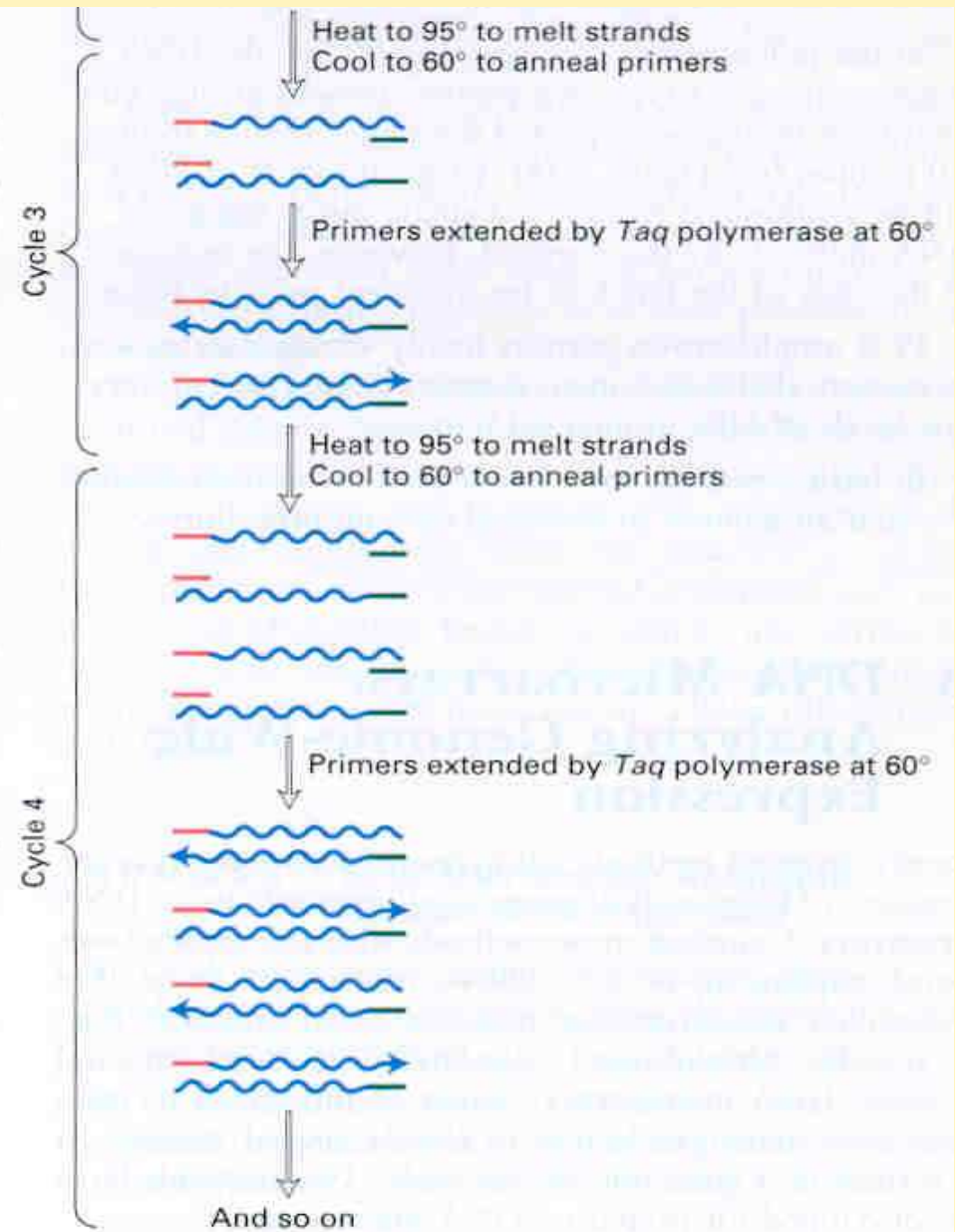
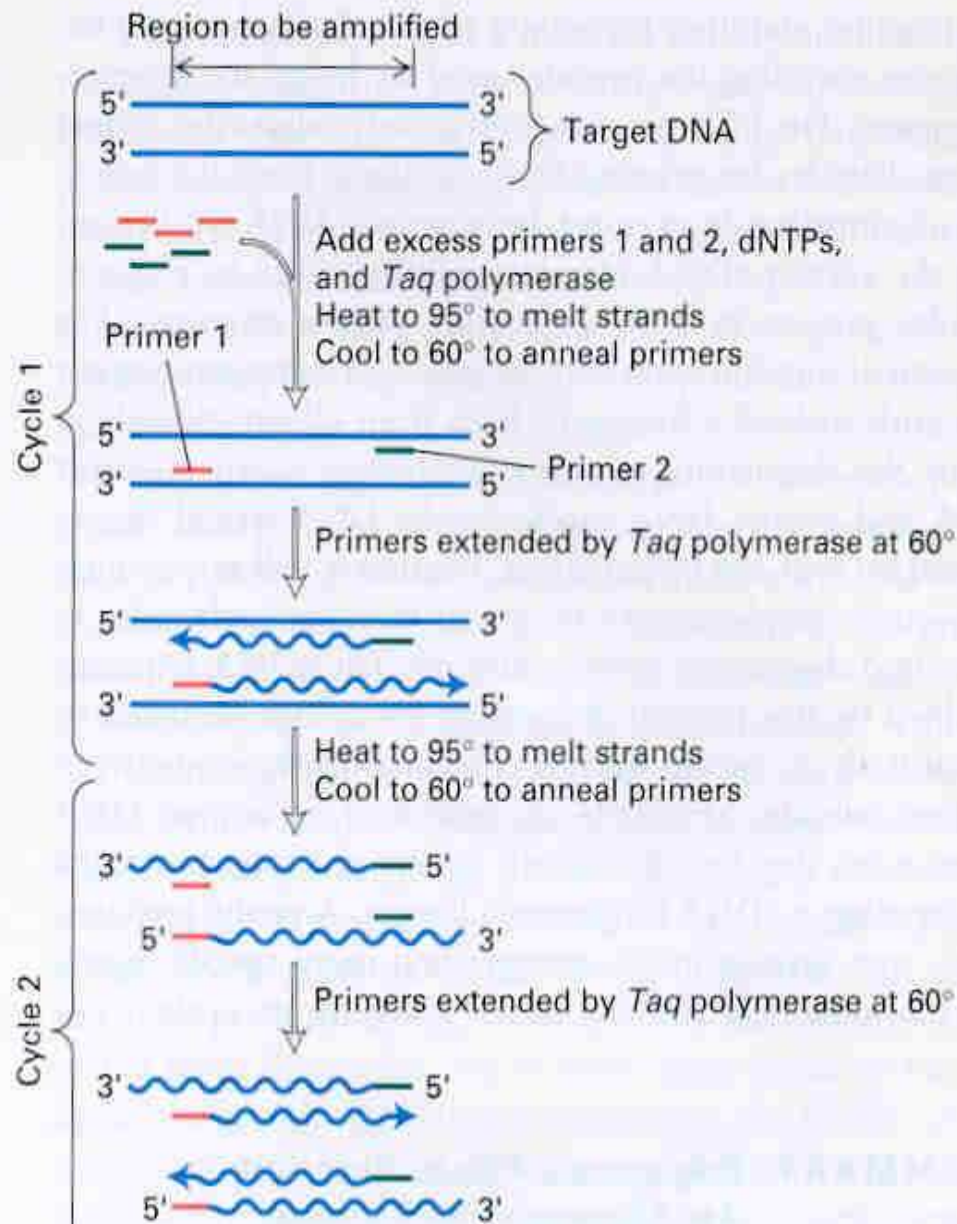
Step 3 : extension

2 minutes 72 °C
only dNTP's



(Andy Vierstraete 1999)





PCR směs

- **voda**
- **pufř pro Taq polymerázu**
- **dvojmocné kationty** – Mg^{2+}
- **směs nukleotidů** – 3-deoxynukleosid-5-trifosfátů – stavební kameny pro syntézu nového řetězce DNA
- **primery A a B** – chemicky syntetizovaná sekvence 15 -20 nukleotidů odpovídající sekvencím na koncích DNA segmentů, které mají být namnoženy
- **Taq polymeráza** – katalyzuje syntézu DNA ve směru 5' – 3' podle sekvence nukleotidů v komplementárním řetězci DNA od místa primerů navázaného na templát až po jeho konec (izolovaná z termofilní bakterie *Thermus aquaticus*)
- **směs vzorků DNA a vody** – DNA templát slouží jako matrice pro syntézu nových DNA řetězců

Termální cykler

- přístroj sloužící k namnožení DNA a zajištění optimálních teplotních podmínek reakce



Kontrola výtěžků PCR produktů

- kontrola množství namnožené DNA pomocí elektroforézy na agarózovém poli

Uplatnění PCR

- základní molekulárně genetická metoda – slouží k získání dostatečného množství specifického úseku DNA pro další analýzy

Využití:

- základní výzkum v molekulární genetice
- diagnostické použití pro detekci infekčního agens
- prenatální diagnostika
- amplifikace DNA z paleontologických nálezů
- kriminalistika
- klinická praxe - hematologická, onkologická nebo mikrobiologická diagnostika

Výhody:

- vysoká specifčnost, citlivost, možnosti standardizovaného přístrojového provedení s minimálním množstvím biologického materiálu potřebného k vyšetření

Nevýhody:

- metoda je nákladná, proto se běžně neprovádí – nyní jen v Národní referenční laboratoři v Praze

Video projekce

<http://www.dnalc.org/ddnalc/resources/pcr.html>

Nějaké otázky????

