

Polymerázová řetězová reakce

Základní technika molekulární diagnostiky.

GeneProof
Molecular diagnostics for your routine



Kdo za to může?



Kary Mullis
1983

Nobelova
cena 1993



5.5. 2010 Mendelovo muzeum

Princip PCR

Polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction – PCR) umožňuje selektivní zmnožení (amplifikaci) určité oblasti DNA v podmínkách in vitro

*a to procesem, který připomíná replikaci
DNA in vivo*

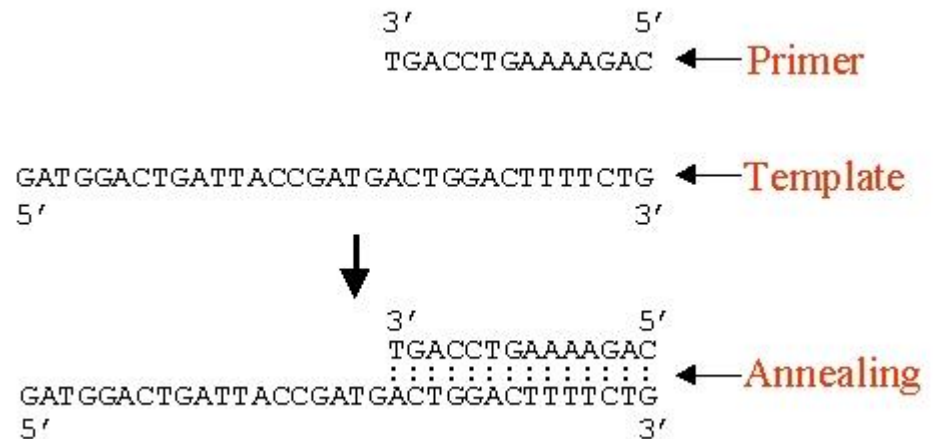
Princip PCR

- Zásadní předpoklady správné polymerace -

- **Přítomnost templátu:** polymerace je možná pouze podle známe matrice-templátu
- **Přítomnost primerů:** nelze začít od nuly
- **Komplementarita:** k polymeraci nukleotidů dochází vždy podle komplementární dvojice primer/templát
- **Směr polymerace:** připojování nukleotidů je vždy ve směru 5'-3'

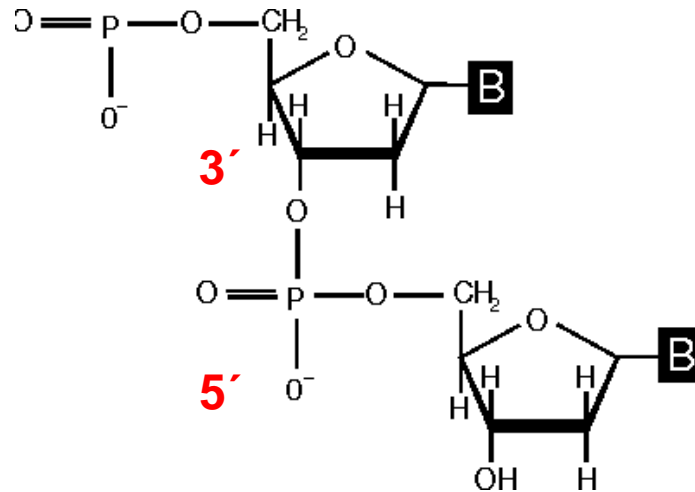
Primer

- Je řetězec nukleové kyseliny, který se skládá ze 18 až 25 nukleotidů (oligonukleotid)
- T_m (melting teplota) alespoň 50°C
- $T_m = 4(G + C) + 2(A + T) ^\circ\text{C}$
- zodpovědné za specifičnost PCR
- obsah G+C od 40% do 75%



Princip PCR

- Zásadní předpoklady správné polymerace -



DNA primer



nově syntetizovaný
řetězec

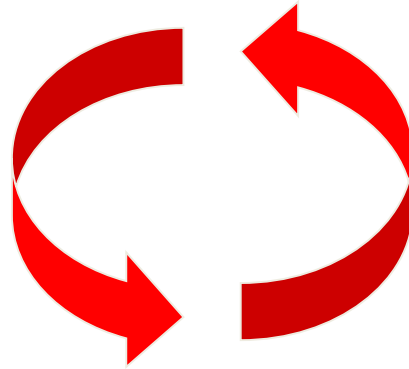


DNA matrice

Princip PCR

- Cyklické změny teplot reakční směsi -

Denaturace



Annealing

Extenze

Princip PCR

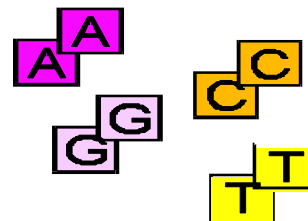
- komponenty in vitro reakce -

Thermus aquaticus, Thermococcus, Thermophilus, Pyrococcus

TAQ

puf^r MgCl₂

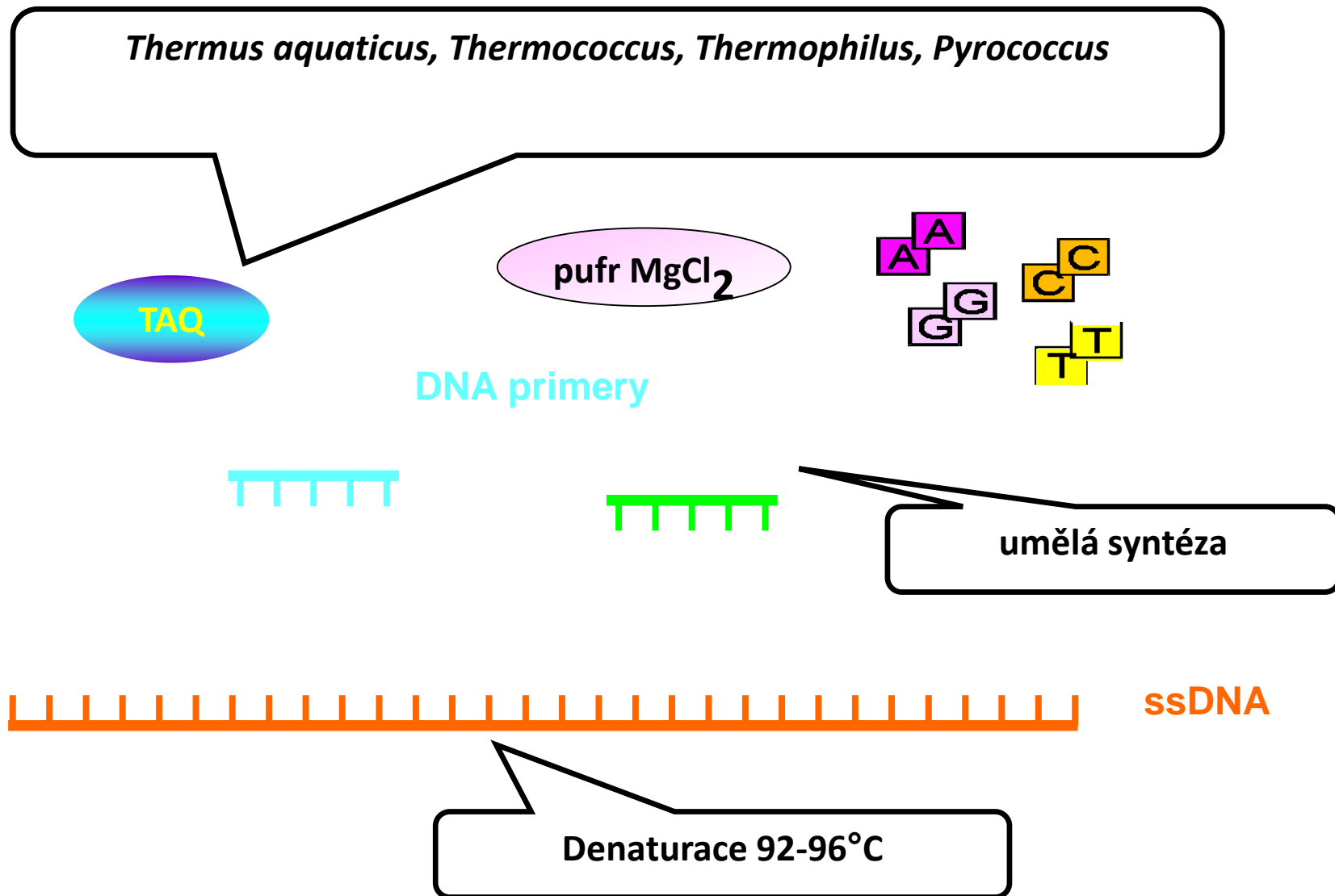
DNA primery



umělá syntéza

ssDNA

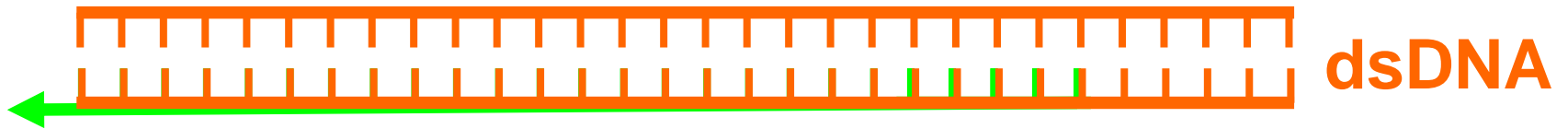
Denaturace 92-96°C



Průběh polymerace

- 1. PCR cyklus -

1. denaturace (92-96°C)



2. annealing (45-72°C)

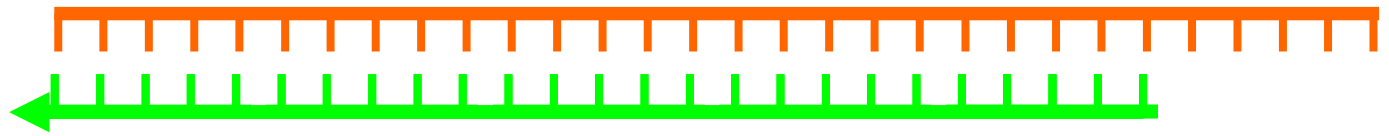
primární produkty

3. extenze (72°C)



Průběh polymerace

- 2. PCR cyklus -

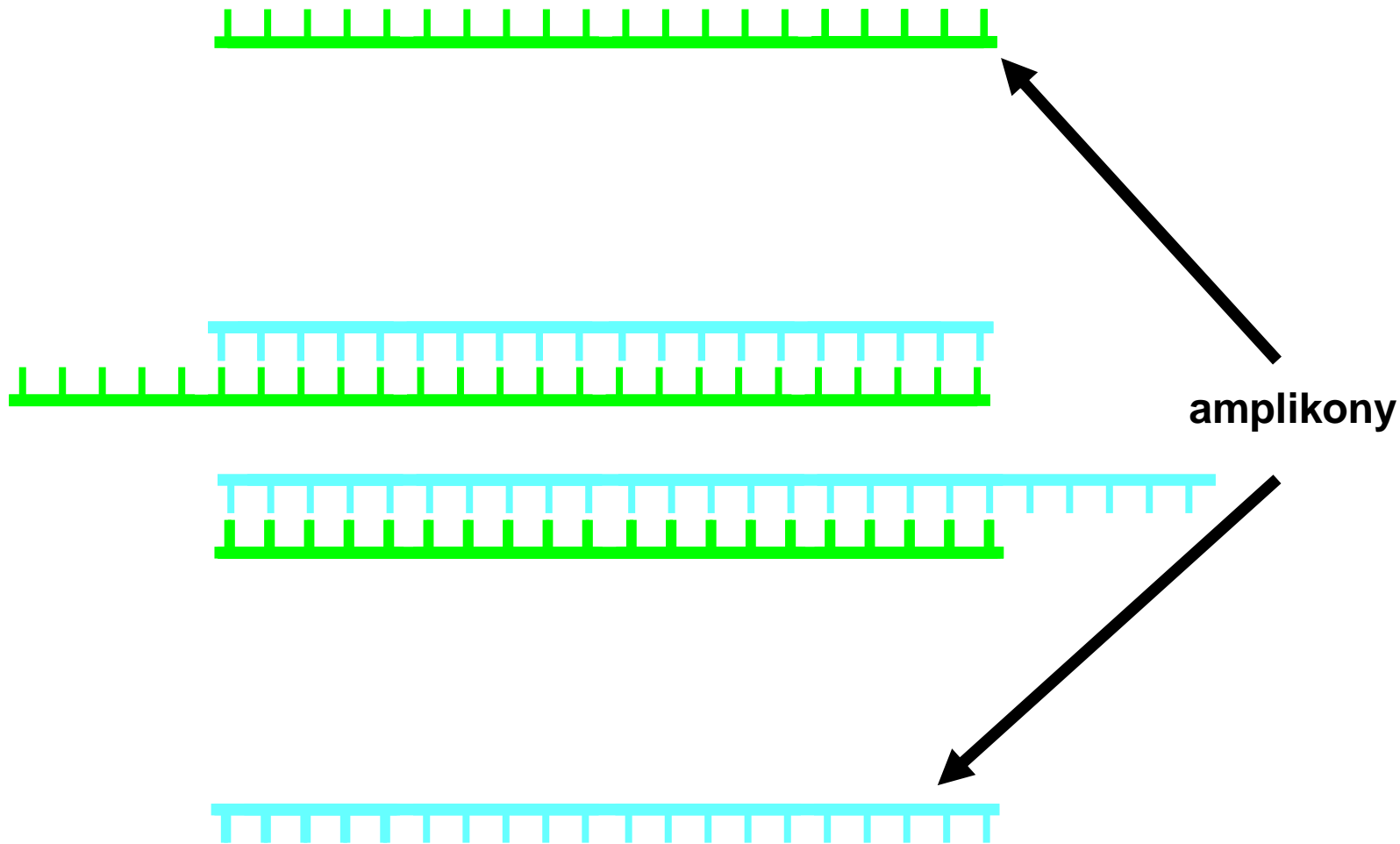


sekundární
produkty



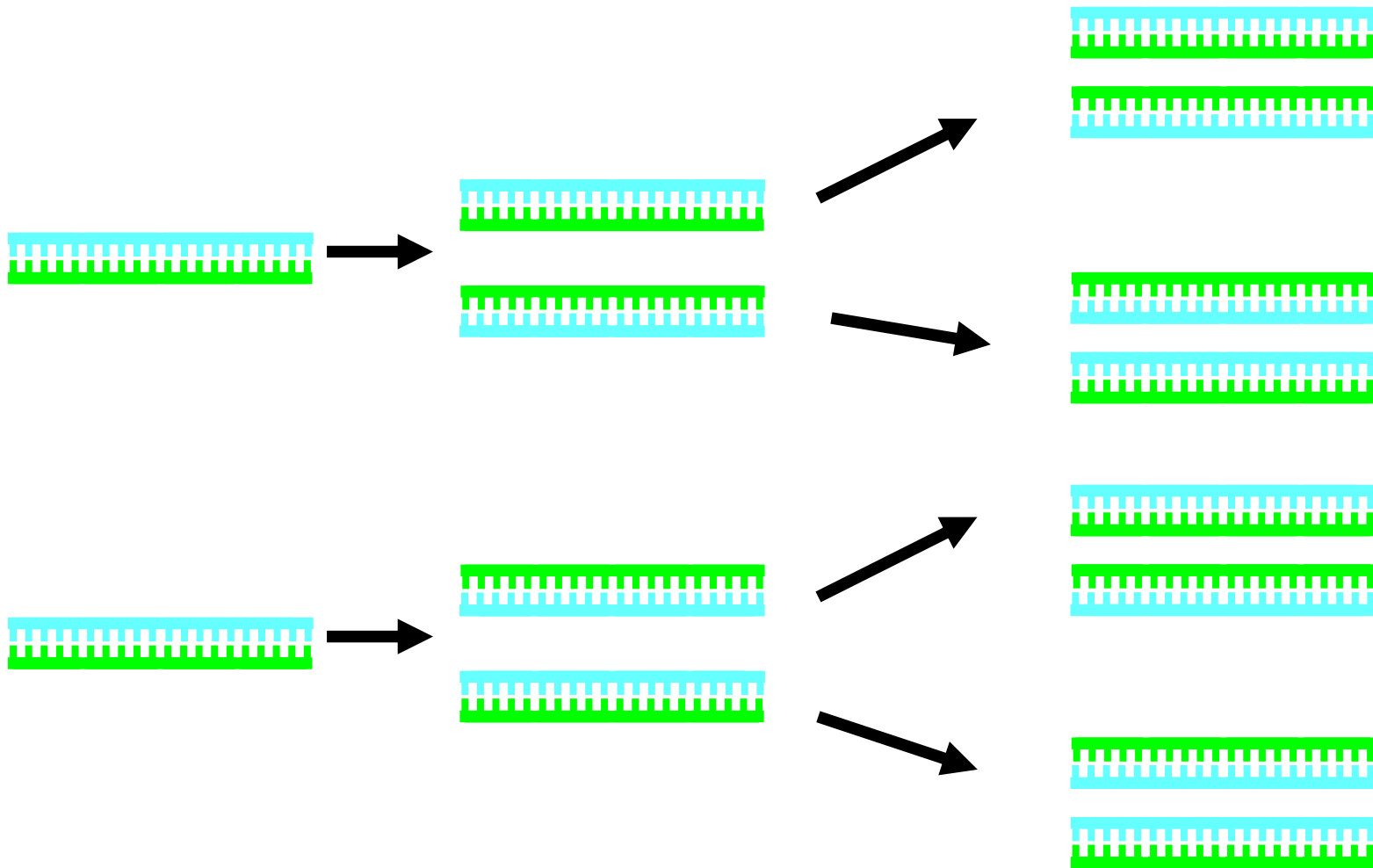
Průběh polymerace

- 3. PCR cyklus -



Průběh polymerace

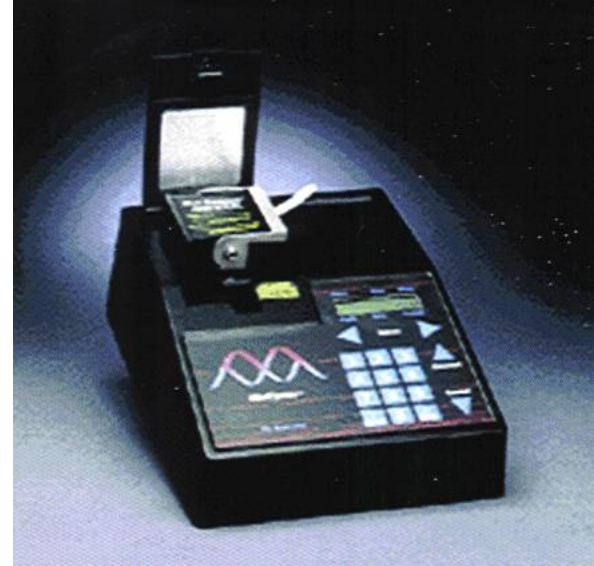
- Další cykly -



Počet ampliconů vzrůstá geometricky

Technické provedení PCR - termocyklery -

Mikroprocesorem kontrolované
zařízení, které obsahuje kovové
reakční bloky **vyhřívané a chlazené**
polovodiči, vodou, vzduchem nebo
mikrovlnami



Termocyklery dokáží
automaticky rychle měnit
teplotu v reakčních blocích
mezi třemi základními teplotami
PCR cyklu

System reakčních kontrol

Negativní kontrola (NK)

- Kontroluje rizika falešné positivity v důsledku kontaminace PCR, master mixu, při přidávání vzorků
- Provádí se min.1x na vyšetřovanou sadu vzorků
- přidání sterilní vody (zaručeně bez přítomnosti NK) do amplifikační reakce namísto vzorku
- Musí být negativní

Izolační negativní kontrola (INK)

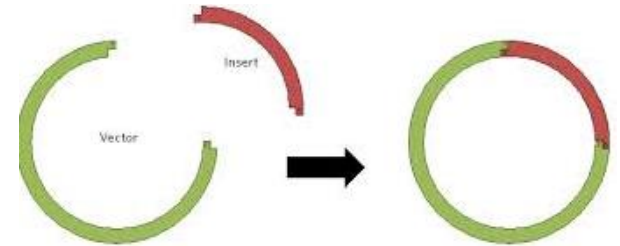
- Kontroluje rizika falešné positivity v důsledku kontaminace procesu izolace NK
- do procesu izolace NK je namísto vzorku vložena sterilní voda
- Musí být negativní

Na rozdíl od negativní kontroly indikuje nejen přítomnost kontaminace v samotné amplifikační reakci, ale také případnou kontaminaci při izolaci NK.

System reakčních kontrol

Pozitivní kontrola (PK)

- Testuje selhání amplifikace
- Provádí se min.1 na celou vyšetřovanou sadu vzorků
- Musí generovat pozitivní signál o určité očekávané intenzitě
- Jako pozitivní kontrola slouží uměle připravený vzorek (plasmid,..)



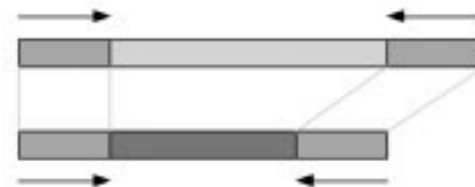
Kvantitativní standard / sada kalibrátorů

- Několik ředění PK – slouží ke generování kalibrační křivky
- Umožňuje kvantitativní stanovení NK ve vzorku
- Jeho kvalita určuje přesnost kvantifikace

System reakčních kontrol

Interní standard

- Kontroluje rizika falešné negativity v důsledku inhibice reakce
- Je součástí KAŽDÉ jednotlivé reakce / detekce
- je zpravidla uměle připraven (plasmid / MIMICs)
- přidán přímo do amplifikační reakce - kontroluje inhibice PCR
- přidán do vzorku před izolací NK – kontroluje izolaci a inhibici PCR zároveň (metodicky správnější ; u některých patogenů povinný postup)



MIMICs metoda

Interní standardy se připravují nejčastěji jako úseky NK ohraničené sekvencemi primerů používaných pro amplifikaci specifické sekvence NK hledaného patogenu. Při detekci mikroorganismů s genomem tvořeným DNA se používají interní standardy připravené tzv. MIMICS metodu, kdy je uměle připravený úsek NK ohraničený sekvencemi specifických primerů začleněn do plazmidu a ten je pak používán jako interní standard.

House-keeping kontrola

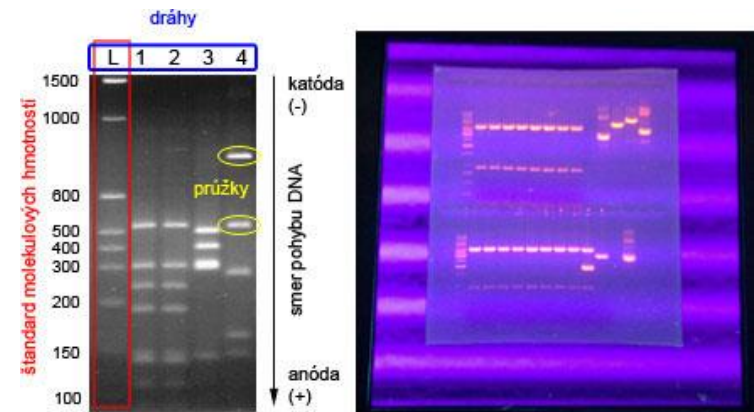
V případě detekce RNA virů, zejména hepatitidy C a HIV, je výhodné používat namísto takto uměle připraveného klonovaného interního standardu koamplifikaci tzv. house-keeping genů či transkriptů (gen v eukaryotické buňce, který je exprimován ve všech typech buněk a ve všech vývojových stádiích; produkty kódované provozními geny jsou nezbytné pro základní funkce buňky).

Výsledek PCR



Elektroforéza

- V molekulární biologii se používá k separaci nukleových kyselin a bílkovin
- Principem je pohyb nabitých molekul v elektrickém poli
- Gelová, polyakrylamidová



Obr. Schéma elektroforetickej separácie (vľavo) a gél pod UV svetlom (vpravo)

Varianty PCR v praxi

- PCR-RFLP
- nested PCR
- multiplex PCR
- RT-PCR – reverse-transcription PCR
- LAMP – loop-mediated isothermal amplification
- real-time PCR

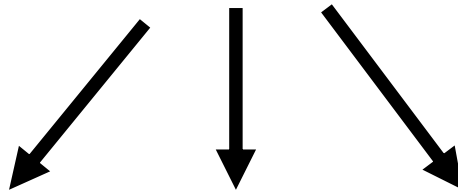
PCR-RFLP

- Stanovení polymorfismu délky restričních fragmentů
- Amplifikace pomocí PCR a následné štěpení restriční endonukleázou
- Analýza elektroforézou
- Př. analýza prokaryotických genů pro 16S rRNA

PCR-RFLP



amplifikace



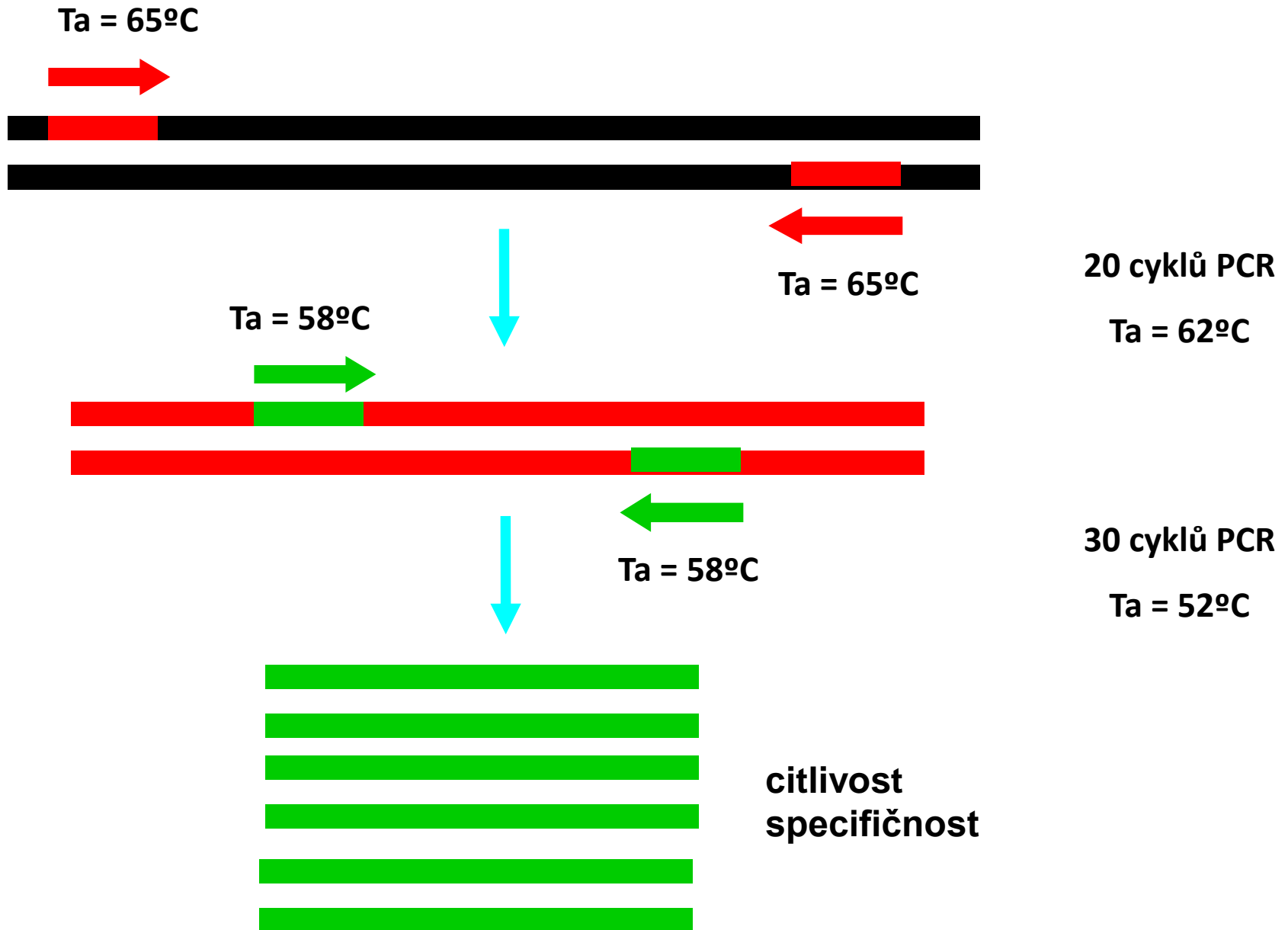
restrikční štěpení



Nested PCR

- Odstupňovaná PCR neboli PCR využívající vnějších a vnitřních primerů
- Amplifikace ve dvou krocích:
 - 1) Amplifikace jedním párem vnějších primerů
 - 2) Amplifikace vnitřními primery
- elektroforéza

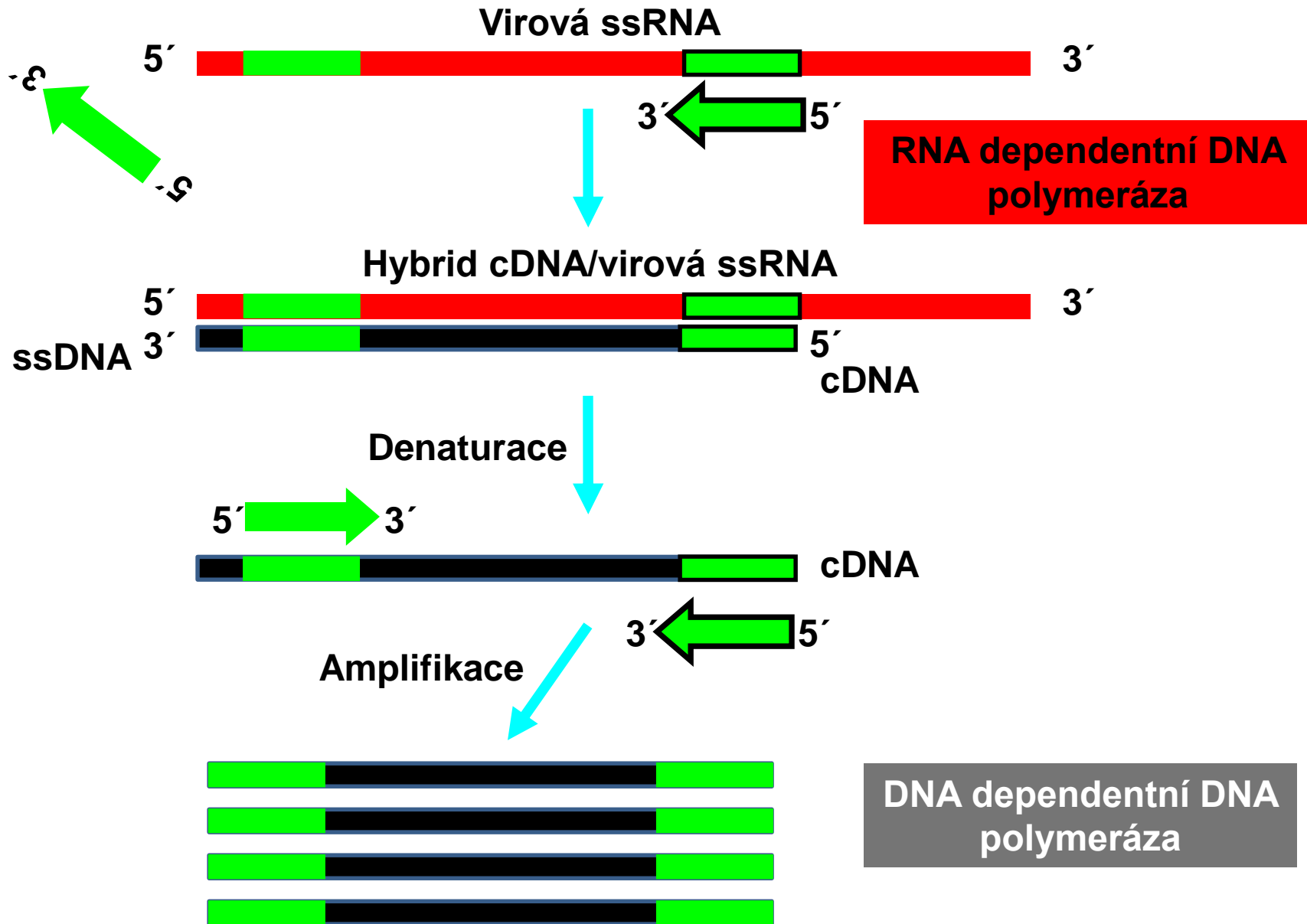
One tube nested PCR



RT-PCR

- Reverzně transkripční PCR
- Určená pro amplifikaci molekul RNA
- Izolovaná RNA je převedená do cDNA
- Retrovirová zpětná transkriptáza

Reverzně transkripční PCR

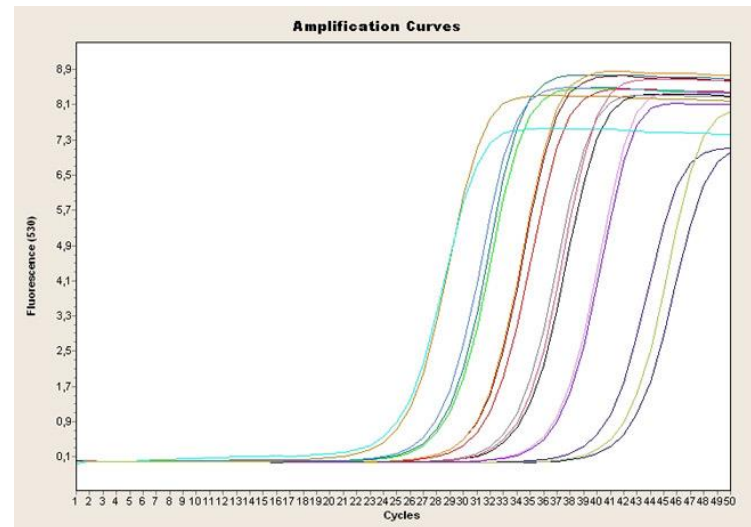


Real-time PCR

- Kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase
- Umožňuje kvantifikaci produktů v průběhu celé reakce
- Kvantifikace je důležitá při diagnostice některých patogenů (HBV, HCV, CMV, VZV, BK, JC, EBV, HSV)
- Není nutná elektroforéza

Princip real-time PCR

- Detekce a kvantifikace fluorescenčního signálu
- Real-time PCR cyclery umožňují nejen střídání teplot, ale také čtení fluorescenčního signálu

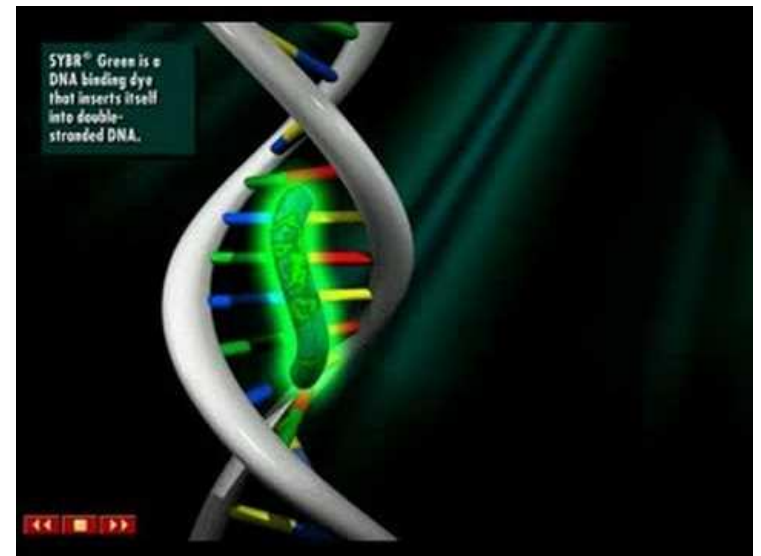


3 metody kvantitativní detekce

- Pomocí **interkalačního barviva** vázajícího se na DNA
- Pomocí **fluorescenčně značených primerů**
- Pomocí **fluorescenčně značených sond**, vázajících se na střední část ampliconu

SYBR Green

- Fluorescenční kyninové barvivo, které fluoreskuje po vazbě na menší žlábek DNA
- Fluorescenční signál se zvyšuje se vzrůstajícím počtem ampliconů
- Nemožnost odlišení nespecifických produktů



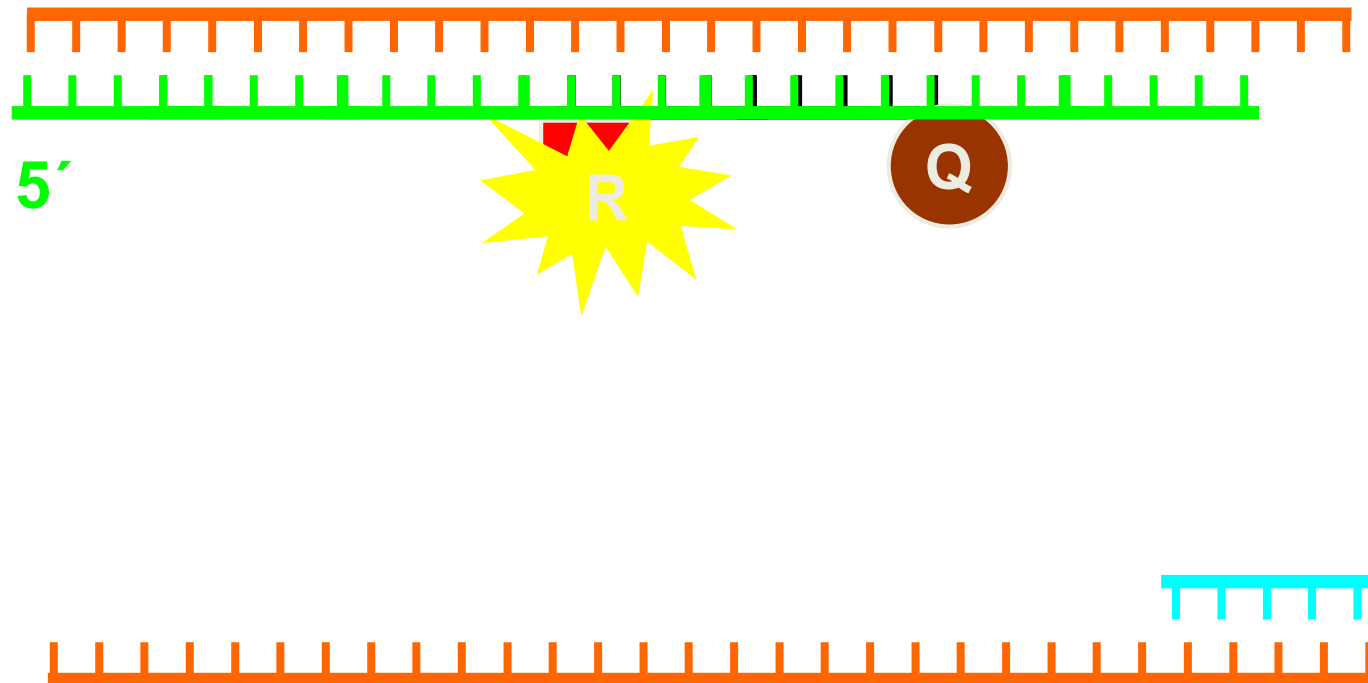
TaqMan sondy

- Jsou oligonukleotidy delší než primery, s hodnotou T_m o 10°C vyšší než primery, opatřené na 5' konci fluoroforem a na 3' konci zhášecem
- **Fluorofory**-heterocyklické polyaromatické uhlovodíky
- **Zhášecé**-molekuly, které jsou schopny absorbovat energii z excitovaného fluoroforu



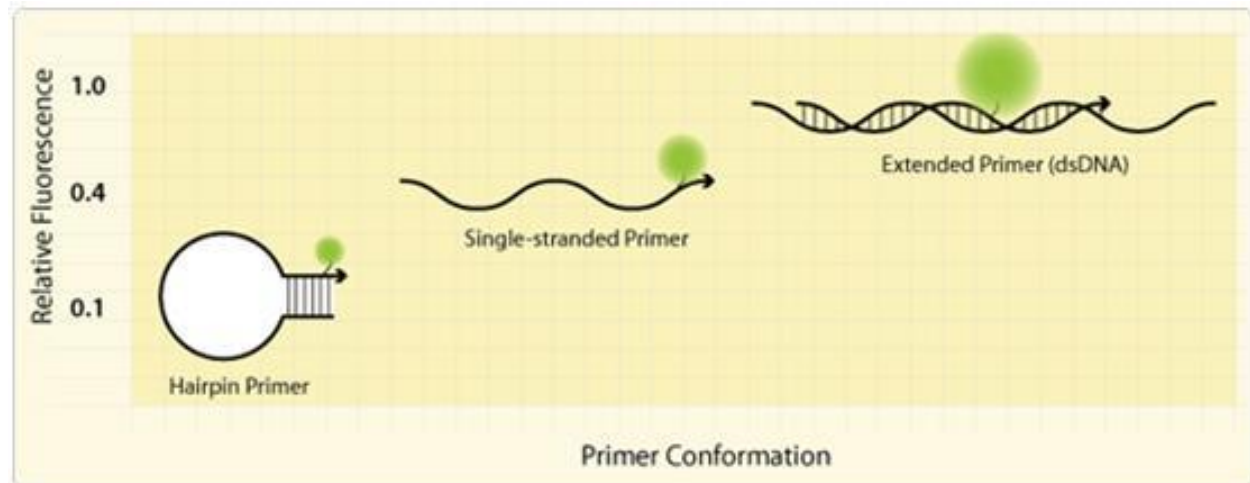
Lineární sondy

- Hydrolysis (TaqMan[®]) Probes -



LUX technologie

- Využívá 2 primery, z nichž jeden z nich je fluorescenčně značený
- Zhášení primeru je zajištěno sekundární strukturou vlásenky
- K emisi fluorescence dojde po prodloužení primeru



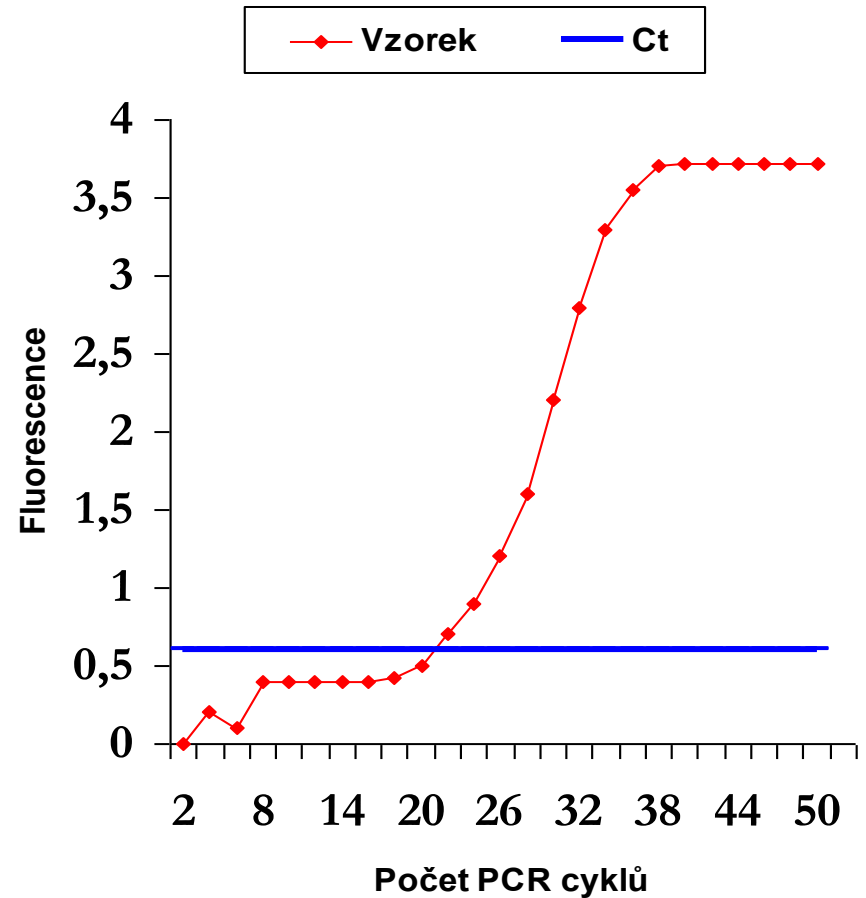
Postup kvantifikace pomocí Real Time PCR s využitím TaqMan sondy

1. Stanovení Ct (Threshold cyklus)
2. Vytvoření kalibrační křivky
3. Kvantifikace neznámého vzorku pomocí vložené kalibrační řady

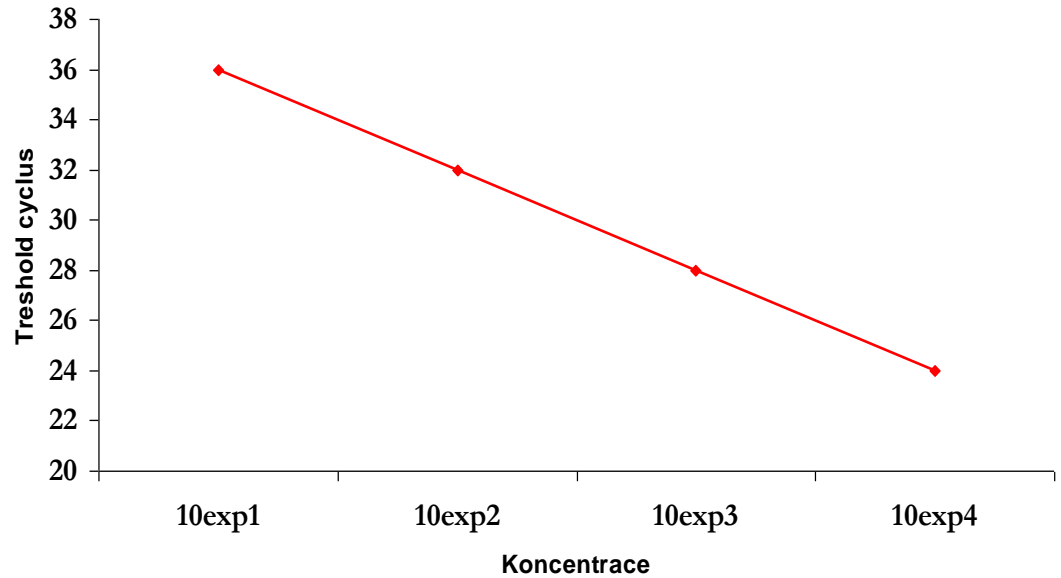
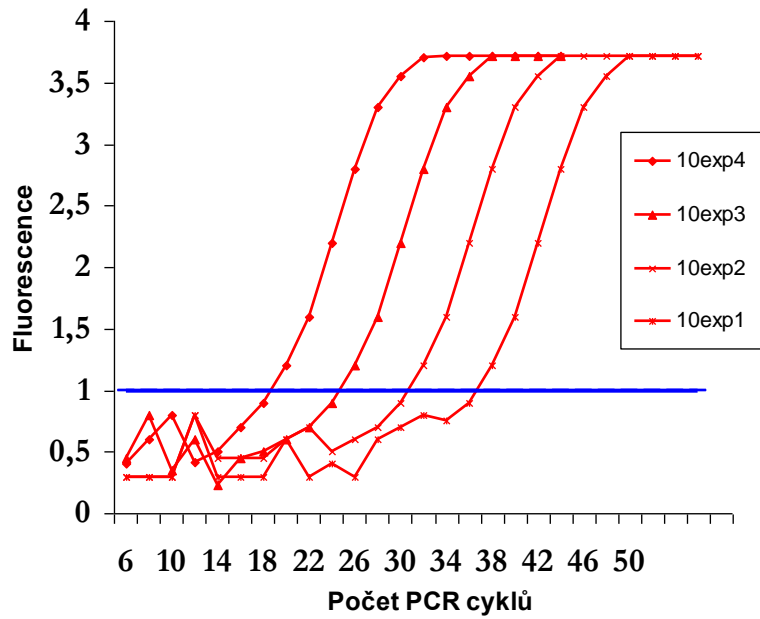
Stanovení Ct

- Treshold cyclus -

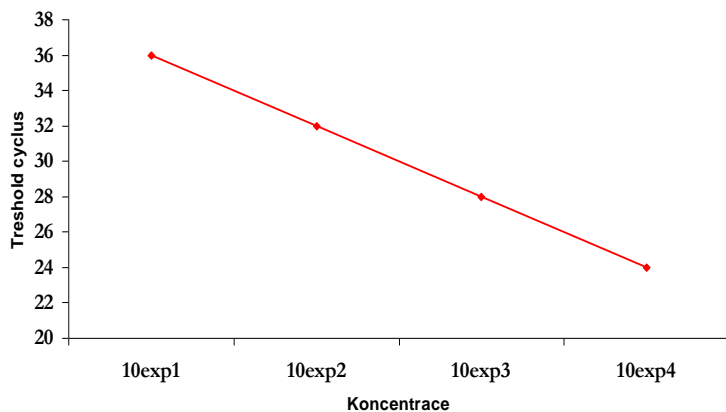
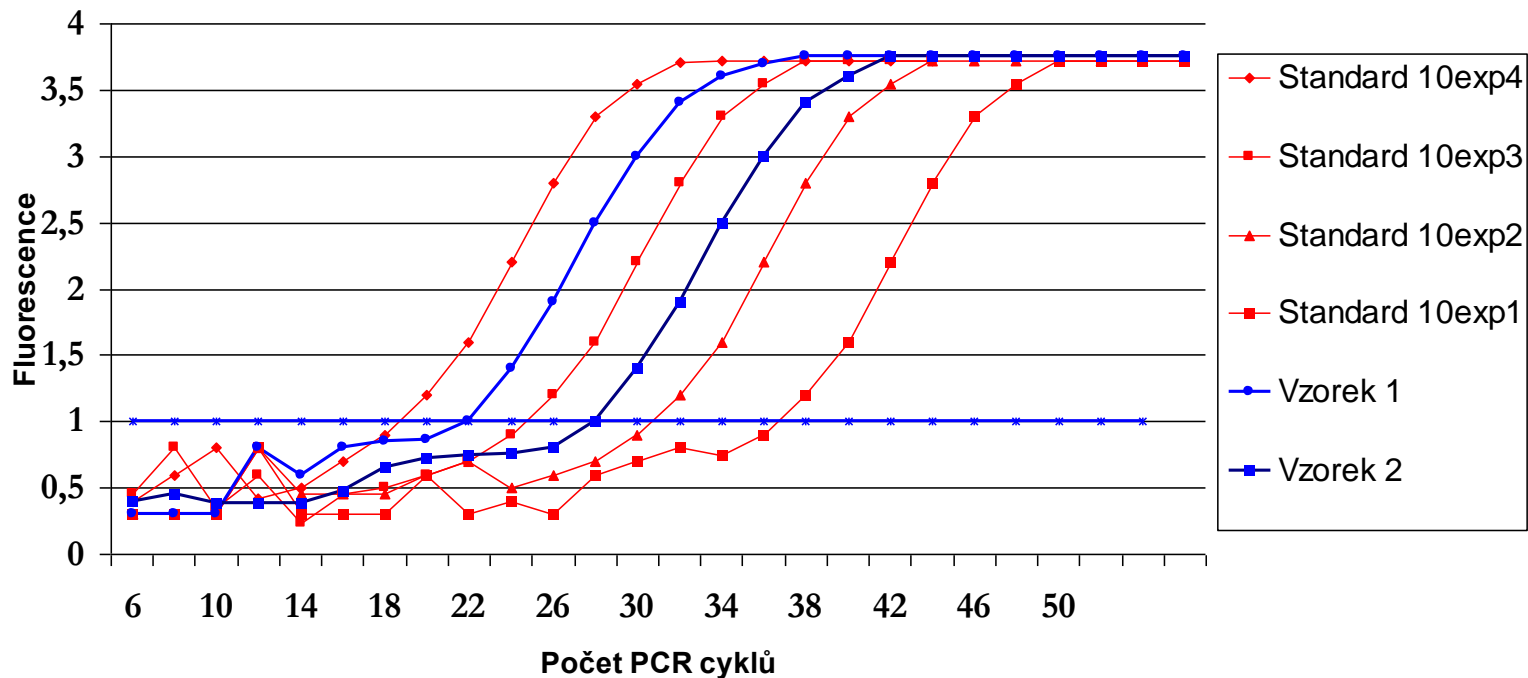
- **Ct** – číselná hodnota udávající PCR cyklus ve kterém je přístrojem detekována první změna fluorescence v amplifikovaném vzorku
- Číselnou hodnotu Ct určuje přístroj automaticky



Vytvoření kalibrační křivky

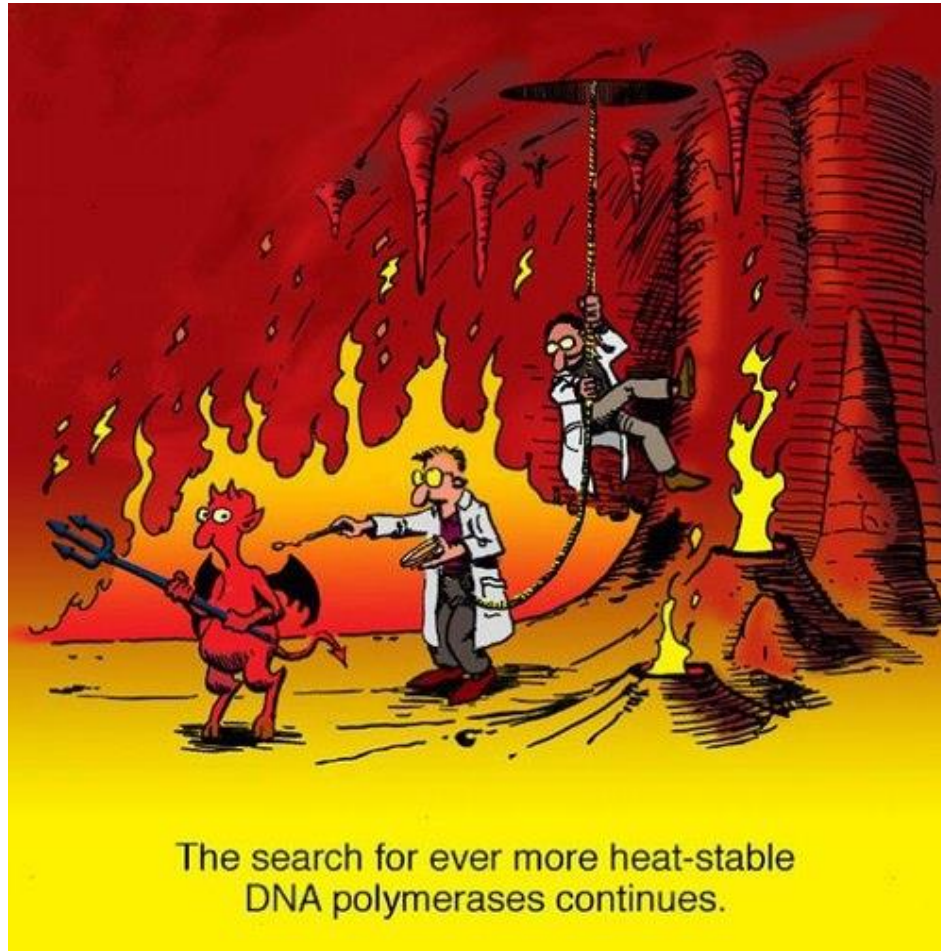


Kvantifikace neznámého vzorku pomocí vložené kalibrační řady



Vzorek	Typ vzorku	Ct	Koncentrace (kopií/ul)
1	Neznámý	25,64	3,50E+03
2	Neznámý	29,23	2,50E+02
K1	Standard	23,97	1,00E+04
K3	Standard	27,16	1,00E+03
K3	Standard	30,68	1,00E+02
K4	Standard	33,53	1,00E+01

Dotazy?



The search for ever more heat-stable DNA polymerases continues.