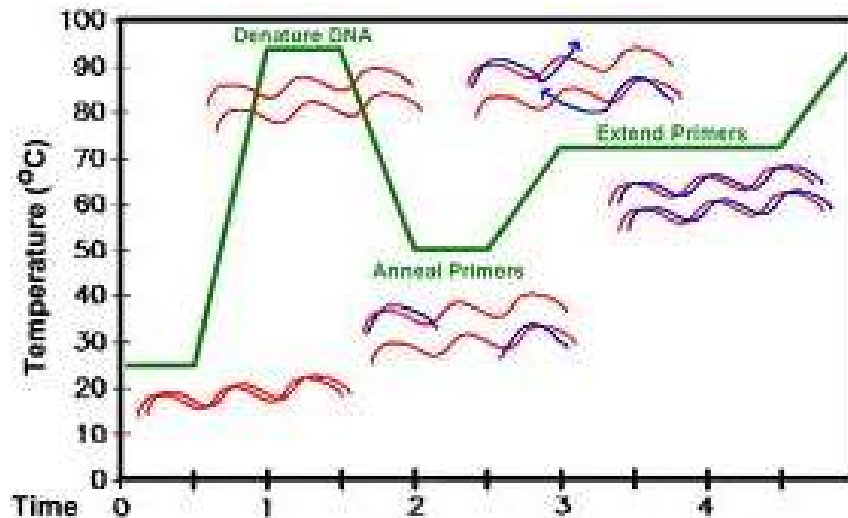


# PCR

## Polymerázová řetězová reakce

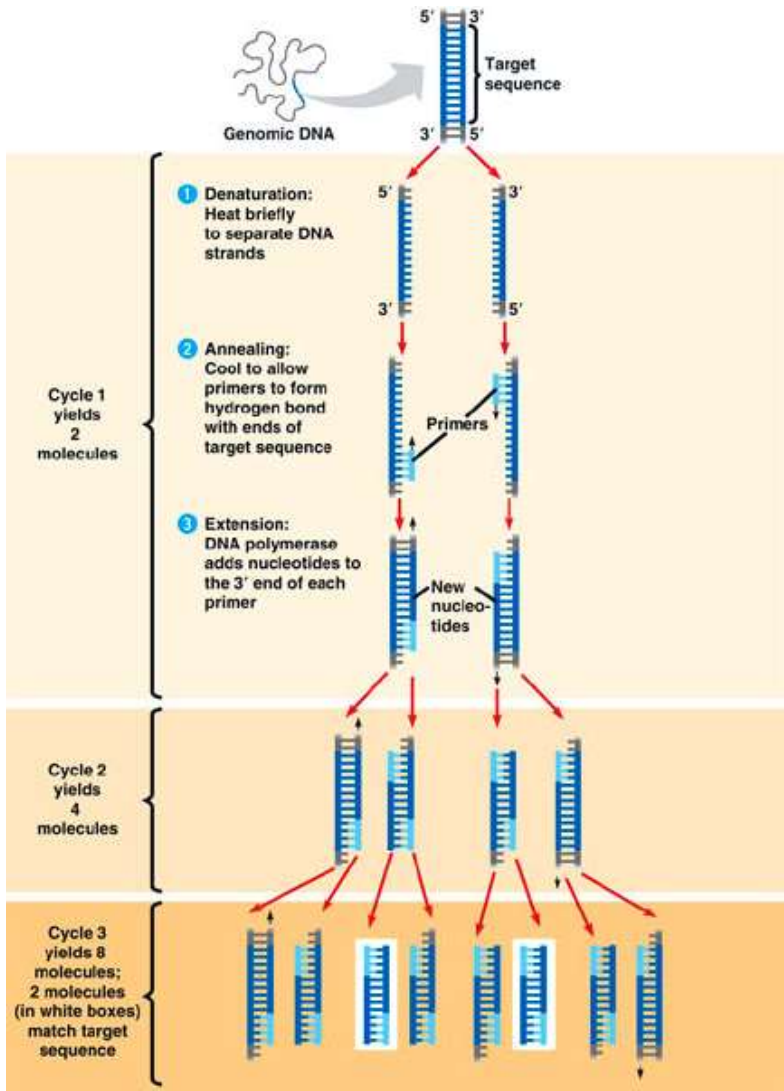
Metody molekulární biologie pro farmaceuty



Ing.Dr. Branislav Ruttkay-Nedecký  
ruttkay-nedeb@vfu.cz

# POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE

PCR umožňuje selektivní zmnožení (amplifikaci) určité oblasti DNA v podmínkách in vitro; a to procesem, který připomíná replikaci DNA in vivo.



1983 – Karry Mullis  
(Dostal nápad během  
noční jízdy autem)  
1993 – Nobelova cena za chemii

<http://schoolworkhelper.net/pcr-uses-steps-purpose/>

# ZÁSADNÍ PŘEDPOKLADY SPRÁVNÉ POLYMERACE

---

## Přítomnost templátu

Polymerace je možná pouze podle známé matrice DNA  
- templátu-

## Přítomnost primeru

Nelze začít z nuly

## Komplementarita

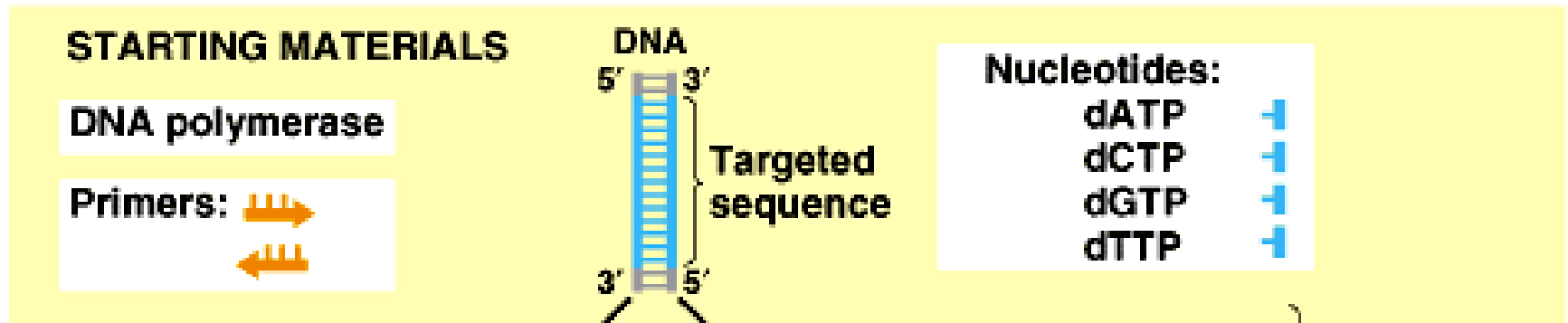
K polymeraci nukleotidů dochází vždy podle  
komplementární dvojice primer/templát

## Směr polymerace

Připojování nukleotidů je vždy ve směru 5' - 3'

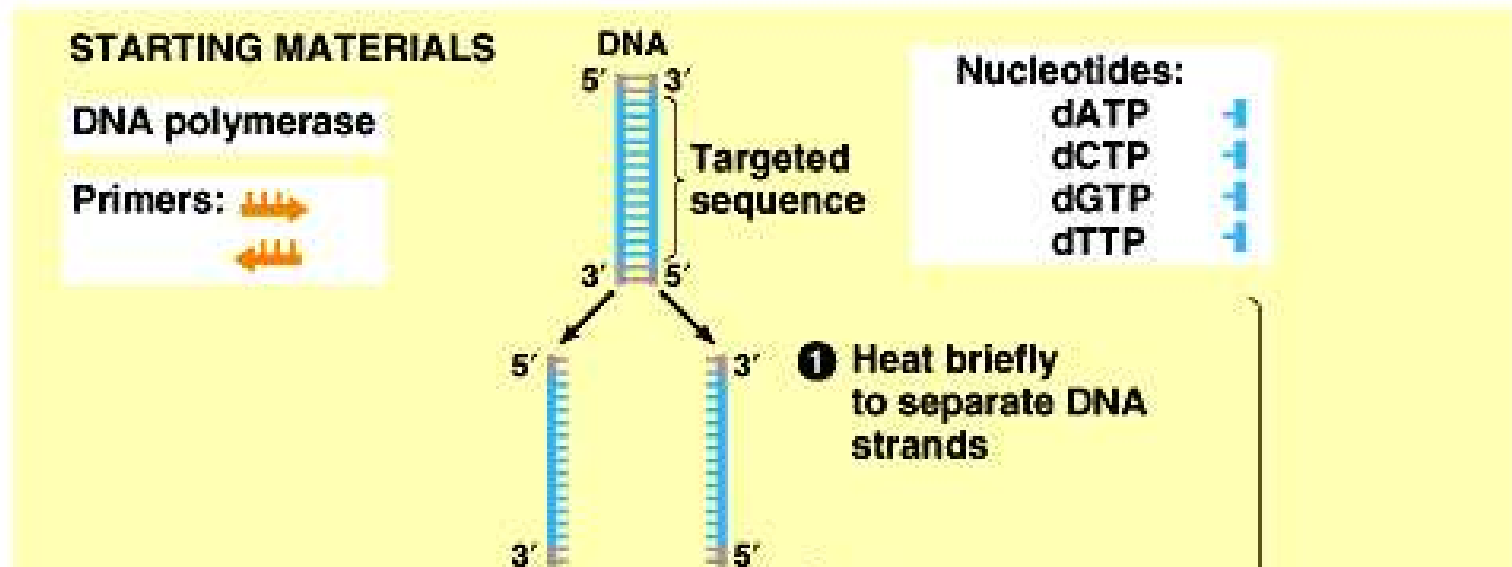
# PCR - KOMPONENTY

- **Templát – DNA, která má být namnožena**
  - **MgCl<sub>2</sub>**
- **Nukleotidy dNTPs** (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
  - **Primery** (forward and reverse primer)  
Primery-oligonukleotidy ohraničující cílovou sekvenci
  - **Taq DNA polymeráza**  
Zajišťuje připojování nukleotidů



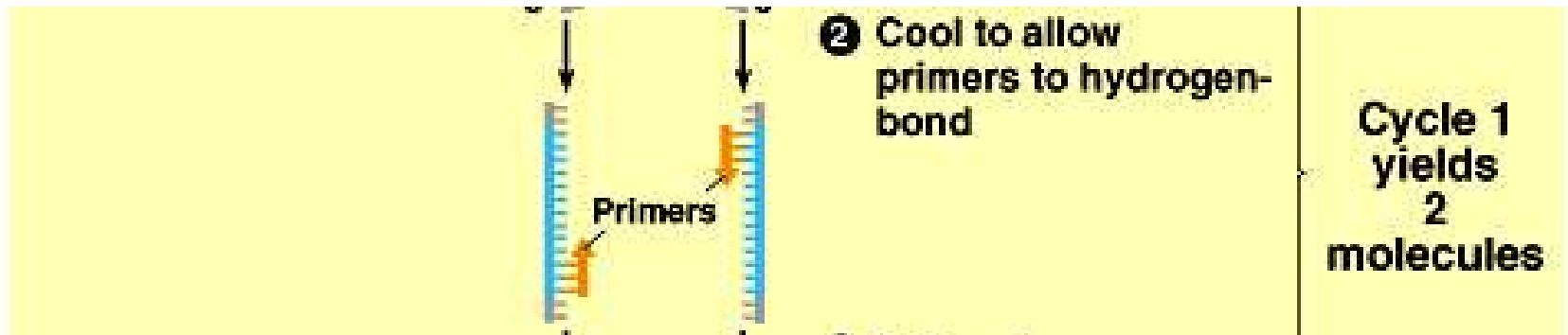
# PCR – PRŮBĚH DENATURACE DNA

Prvním krokem je krátké zahřátí celé směsi na 94°C -96°C. Teplem se poruší vodíkové vazby a oba řetězce DNA se oddělí



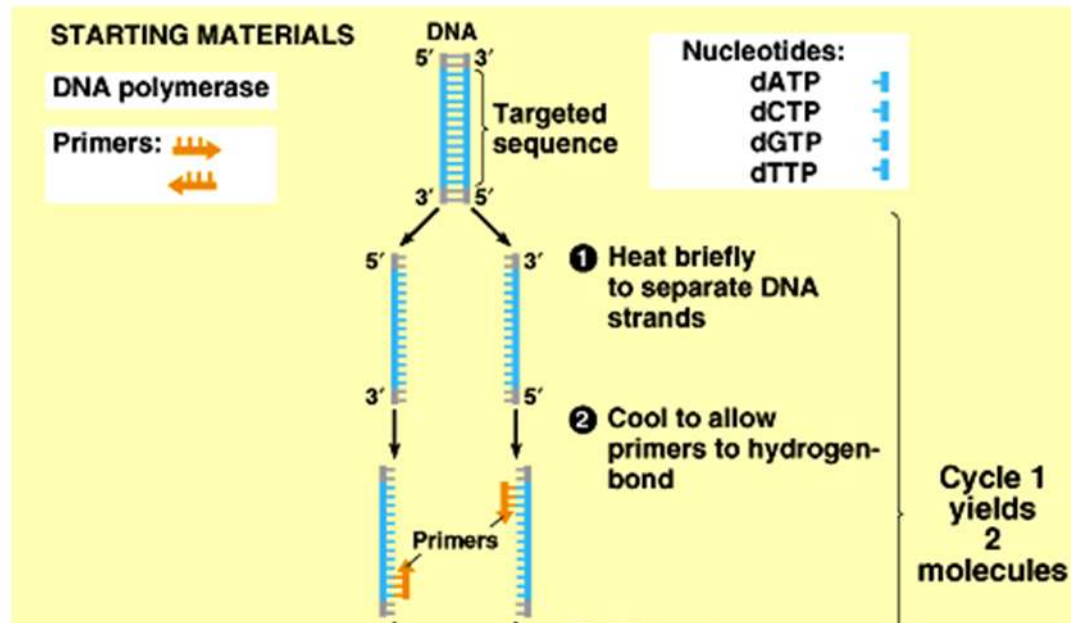
# PCR – PRŮBĚH ANNEALING

**Druhým krokem** je nasedání primerů (annealing).  
Ochlazení reakční směsi na 50°C - 65°C  
umožní primerům navázat se na cílovou DNA  
vodíkovými můstky podle pravidel komplementarity



# PCR – PRŮBĚH PRIMERY

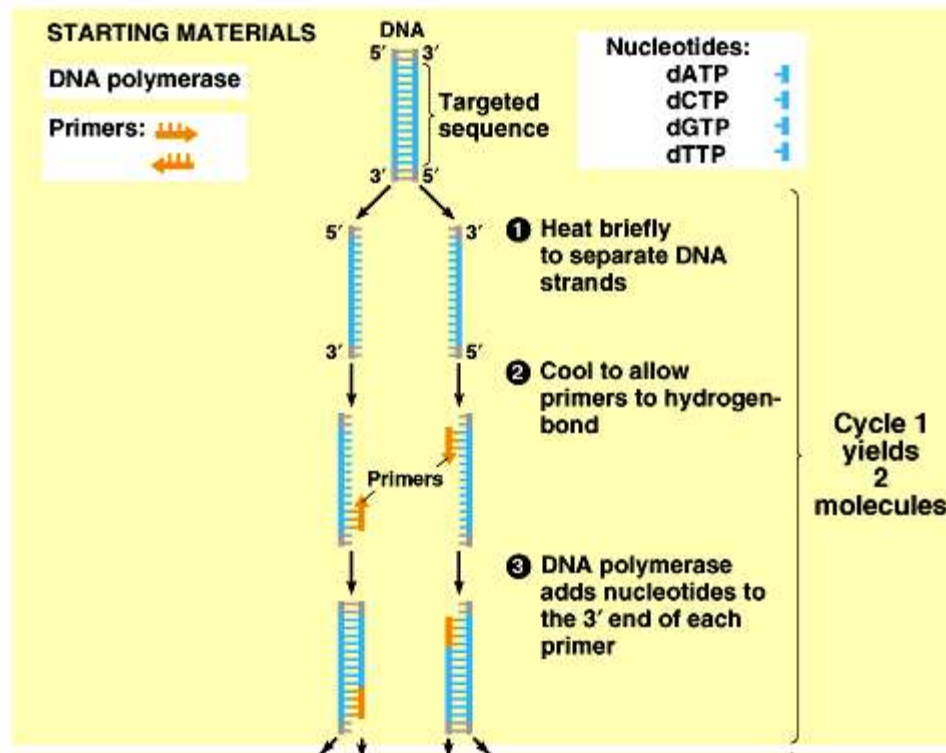
Primery jsou krátké, synteticky vyrobené molekuly jednořetězcové DNA (20-30 nukleotidů), které jsou komplementární ke koncům DNA, která má být amplifikována. Primery tak determinují místo na DNA, které má být zmnoženo (na obrázku označeno **modře**)



# PCR – PRŮBĚH EXTENSION

## Třetí krok:

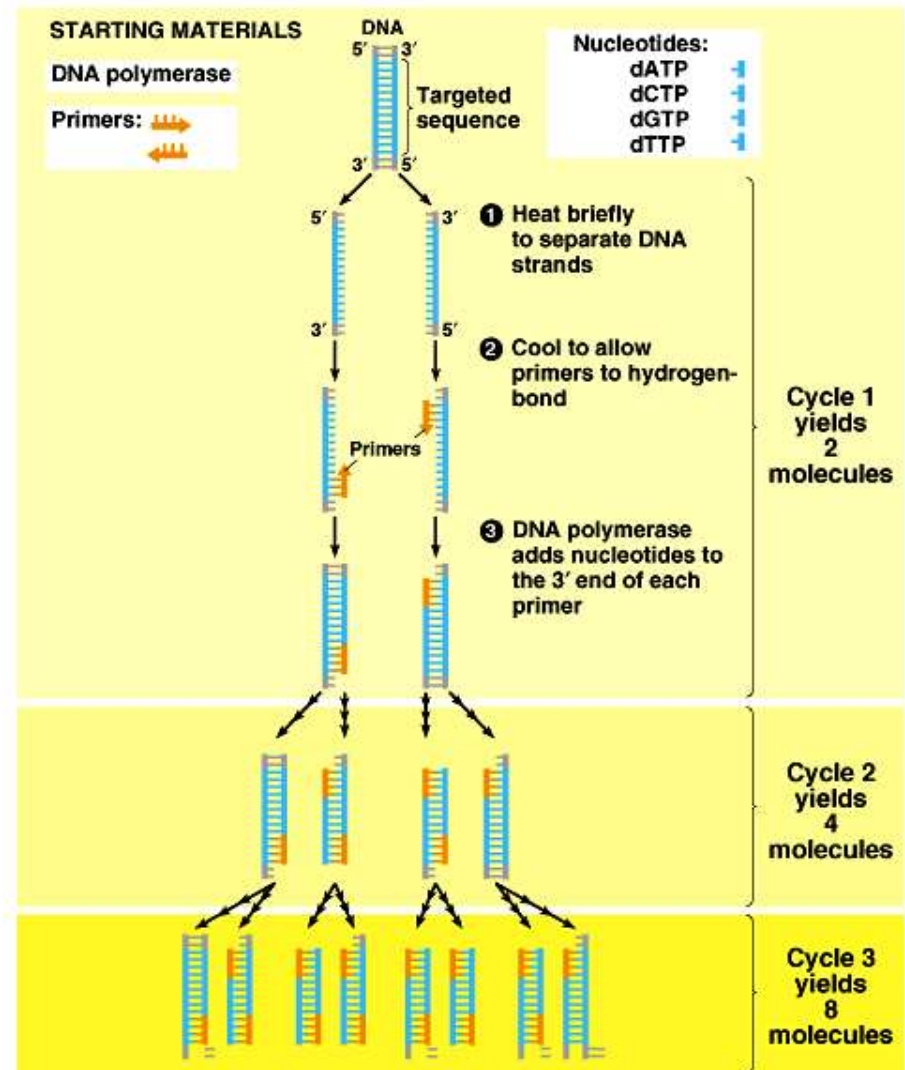
DNA-polymeráza nyní může přidávat nukleotidy k 3' koncům primerů, jako při obvyklé replikaci  
Směs je zahřáta na 72°C .





# PCR – PRŮBĚH CYKLY

- Směs je nyní znovu ohřáta a začíná nové kolo cyklu
- každé kolo trvá pouze asi 5 minut. Výsledkem je dvojnásobné množství cílové DNA, dlouhé i stovky párů bází
- tento tříkrokový cyklus je následně opakován znovu a znovu. Za třicet cyklů je možno teoreticky obdržet miliardu kopií



Copyright © Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

# POČET CYKLŮ

- analytická PCR – ne více než 40
- nejčastěji 25-35 cyklů
- vyšší počet cyklů vznik nespecifických artefaktů
- vyčerpávání komponent reakce
- degradace polymerázy i DNA

***Například při vyčerpání primerů se zbývající nukleotidy účastní syntézy nespecifických produktů, které vznikají po vzájemném annealingu již vzniklých amplikonů a výsledkem jsou delší amplifikační produkty vytvářející „šmouhy“ na elektroforetickém gelu***

# ZÁVĚREČNÁ EXTENZE

- slouží k dokonalému dosyntetizování všech produktů
- probíhá po dobu 5-15 min. při 72°C
- poté je možné produkty amplifikace uschovat a následně analyzovat



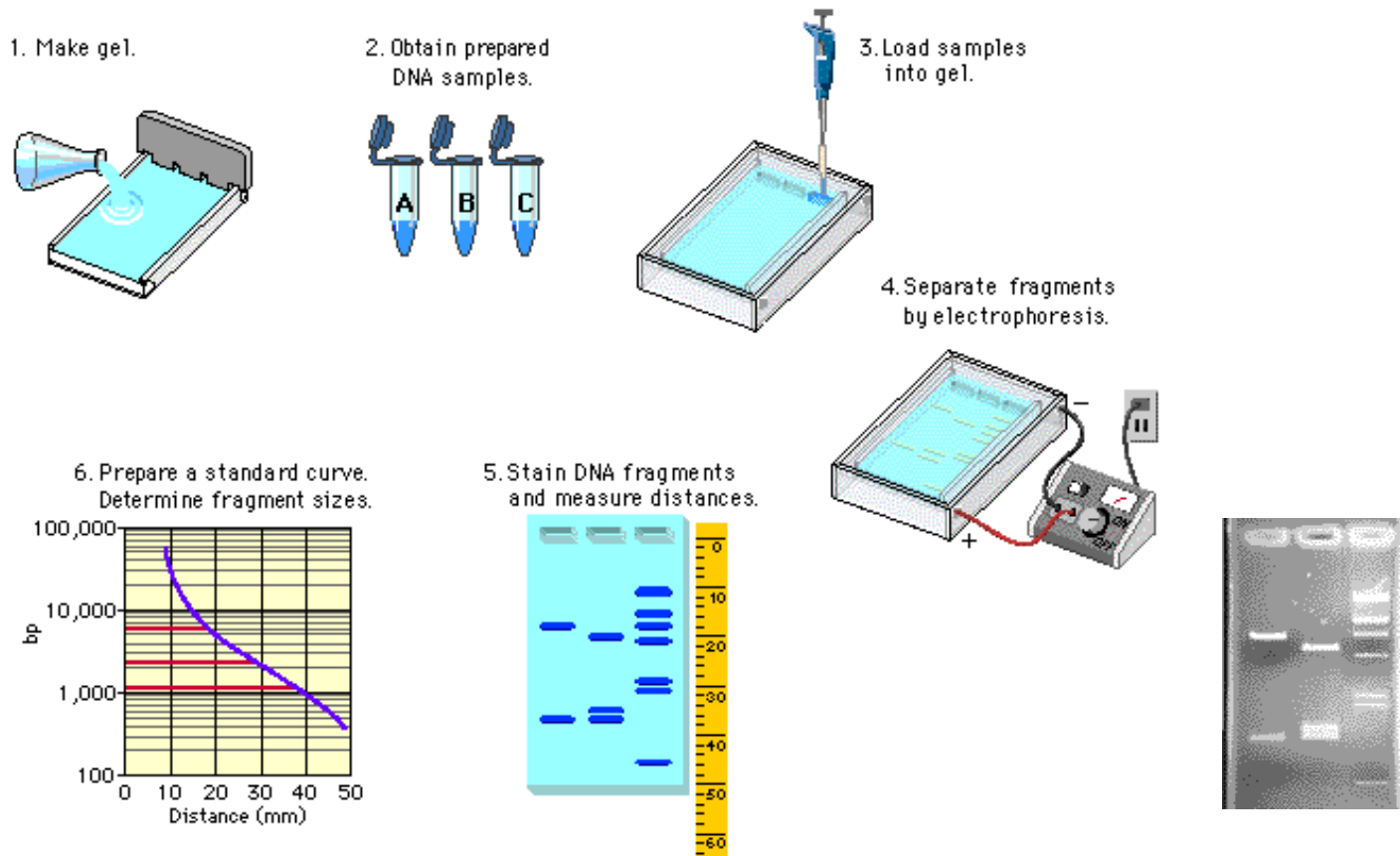
# Technické provedení PCR - termocyklery

- Mikroprocesorem kontrolované zařízení, které obsahuje kovové reakční bloky **vyhřívané a chlazené polovodiči** (Peltierova pumpa), **vodou, vzduchem** nebo **mikrovlnami**
- Termocyklery dokáží automaticky rychle měnit teplotu v reakčních blocích mezi třemi základními teplotami PCR cyklu



# PCR vyhodnocení **GELOVÁ ELEKTROFORÉZA**

Gelová elektroforéza je metoda, která odděluje jednotlivé fragmenty DNA na základě jejich pohybu gelem. Pohyb je způsoben elektrickým polem. Směr a rychlost pohybu je dán nábojem molekul, jejich velikostí a tvarem a rovněž velikostí náboje elektrického pole a složením gelu. DNA je záporně nabitá, bude se tedy pohybovat ke kladnému konci



# SLOŽENÍ REAKČNÍ SMĚSI

- **Termostabilní DNA polymeráza** (1 – 2 U/ reakci; tolerance 0.5 – 5 U/reakci)

enzym	5' → 3'	3' → 5'
<i>Taq</i>	ano	ne
<i>Tth</i>	ano	ne
<i>Pfu</i>	ne	ano

Hot start polymerázy – DNA polymeráza vázaná na protilátku,  
zabránění polymeraci při RT – 70 °C,  
nutná počáteční denaturace (2 – 10 minut / 95 °C)



vyšší specifita reakce

# TEPLOTA PŘIPOJENÍ PRIMERŮ

## T<sub>m</sub> (melting temperature)

teplota, při které se bude zhruba 50% primerů v reakci vázat k templátu.

$$T_m = (\text{počet G+C}) \times 4 + (\text{počet A+T}) \times 2$$

## T<sub>a</sub> (annealing temperature)

teplota, při které bude docházet k vazbě většiny primerů v reakci k templátu

$$T_a = T_m - 4^\circ\text{C}$$

## Výpočet T<sub>m</sub> a T<sub>a</sub> – příklad

Jakou T<sub>m</sub> a T<sub>a</sub> mají tyto primery?

Primer forward (dopředný) 5'- AAA GTT CGC TCA GGT ACG – 3'

Výsledek : T<sub>m</sub> = 54°C, T<sub>a</sub> = 50°C

Primer reverse (reverzní) 5'- CGT ACG CAT CGT GCG AGC – 3'

Výsledek : T<sub>m</sub> = 60°C, T<sub>a</sub> = 56°C

**Ideální annealingová teplota této dvojice primerů bude 50°C**

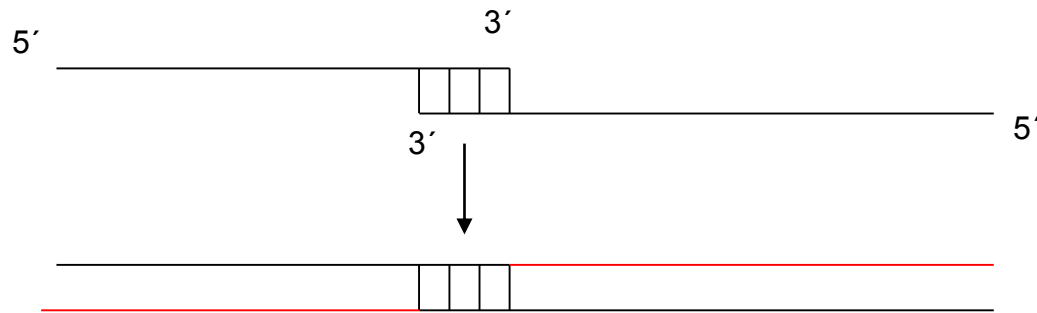
# SLOŽENÍ REAKČNÍ SMĚSI

- **Oligonukleotidové primery**

koncentrace v reakční směsi 0.1 – 1.0 mM (optimalizace – qPCR)

20 – 30 nukleotidů, CG ~ 40 - 60%, podobná  $T_m$

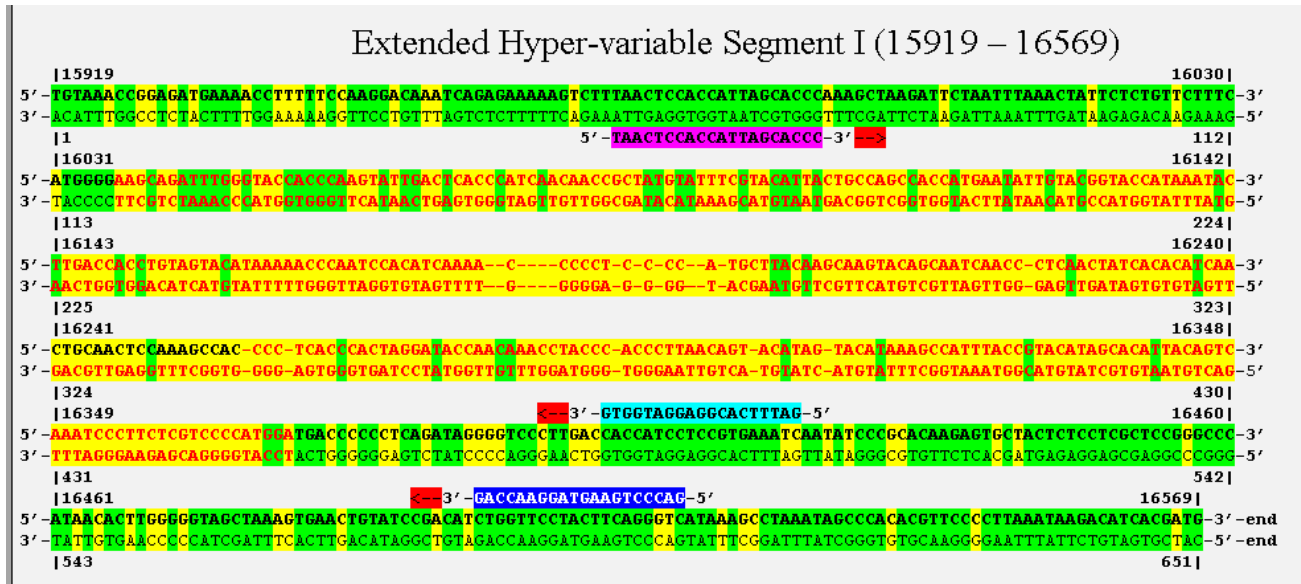
primery by neměly být vzájemně komplementární, hlavně na 3'konci





# SLOŽENÍ REAKČNÍ SMĚSI

- Oligonukleotidové primery



tvorba nežádoucích sekundárních struktur (vlášenky), hlavně CG bohaté

Programy na návrh PCR primerů: Integrated Gene Technologies  
Gene Script Primer Design  
VizPrimer, CODEHOP, GeneFisher, Primer3, .....  
BioMath (kalkulace T<sub>m</sub>)

Komerční sady primerů pro modelové organismy: Roche

SABiosciences (Qiagen)

# SLOŽENÍ REAKČNÍ SMĚSI

---

- **dNTP** (dTTP, dATP, dCTP, dGTP), ~ 200  $\mu\text{M}$  každý (50 – 500  $\mu\text{M}$ )

dUTP místo dTTP – jedna z metod prevence kontaminace

DNA s dUTP – degradace uracil-N-glykosylázou

přidána před zahájením reakce, inaktivace během prvního cyklu

nelze použít s polymerázami s „proofreading“ aktivitou (*Pfu*)

- **Templátová DNA**

Nemusí být známa kompletní sekvence, ale aspoň úseky pro návrh primerů

1 – 10 ng bakteriální DNA

0.1 – 1 ng plasmidové DNA

1 – 200 ng genomové DNA

2  $\mu\text{l}$  cDNA / 50  $\mu\text{l}$

# SLOŽENÍ REAKČNÍ SMĚSI

**Mg<sup>2+</sup>** - nezbytné pro aktivitu polymeráz, zvyšují T<sub>m</sub>  
koncentrace pro *Taq* polymerázy 1.5 mM (200 μM dNTPs)  
nutno optimalizovat (1 – 10 mM) nebo použít komerční pufr

## Reakční pufr

složka	koncentrace	úloha
síran amonný	5–30 mM	usnadňuje rozvolnění DNA
BSA	50-500 ng / 50 μl	vazba inhibitorů (ze vzorku)
DMSO	2-10% (v/v)	snižuje T <sub>m</sub> , usnadňuje annealing
DMF	< 10% (v/v)	snižuje T <sub>m</sub> , usnadňuje annealing
formamid	1.25-10% (v/v)	snižuje T <sub>m</sub> , vyšší specifita stabilizace polymerázy
glycerol	0.01-0.1% (v/v)	stabilizace polymerázy
PEG6000	5-15% (v/v)	stabilizace polymerázy
SDS	< 0.01%	zabraňuje agregaci polymerázy
spermidin		redukce nespecif. vazby polymerázy
Triton X-100	0.01% (v/v)	zabraňuje agregaci polymerázy
močovina	1-1.5 M	snižuje T <sub>m</sub> , usnadňuje annealing

# REAKČNÍ PODMÍNKY

---

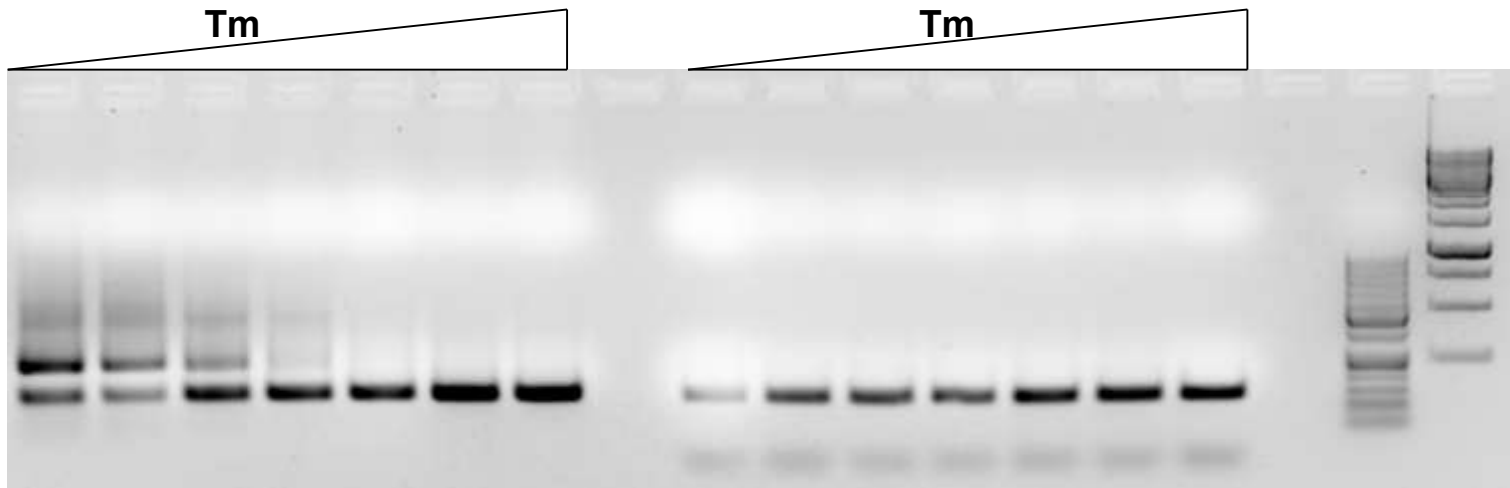
- **Denaturace** 95 °C (92 – 98 °C), 15 s pro krátké fragmenty (do ~1 kb)  
30 – 60 s pro dlouhé fragmenty  
delší časy – aktivace polymerázy, inaktivace glykosylázy  
Denaturace dvouvláknové DNA
- **Nasedání (hybridizace) primerů** 50 - 55 °C (podle  $T_m$  duplexu DNA:primer)  
OPTIMALIZACE!  
20 - 30 s
- **Syntéza DNA** 72 °C (70 – 74 °C)  
doba závislá na délce fragmentu (do 1 kb 30 – 60 s  
6 – 10 kb až 10 min)

**Počet cyklů:** 25 – 35, vždy negativní kontrolu!!!  
faktor zmnožení  $2^n$

**Cyklery**

# OPTIMALIZACE TEPLoty NASEDÁNÍ PRIMERŮ

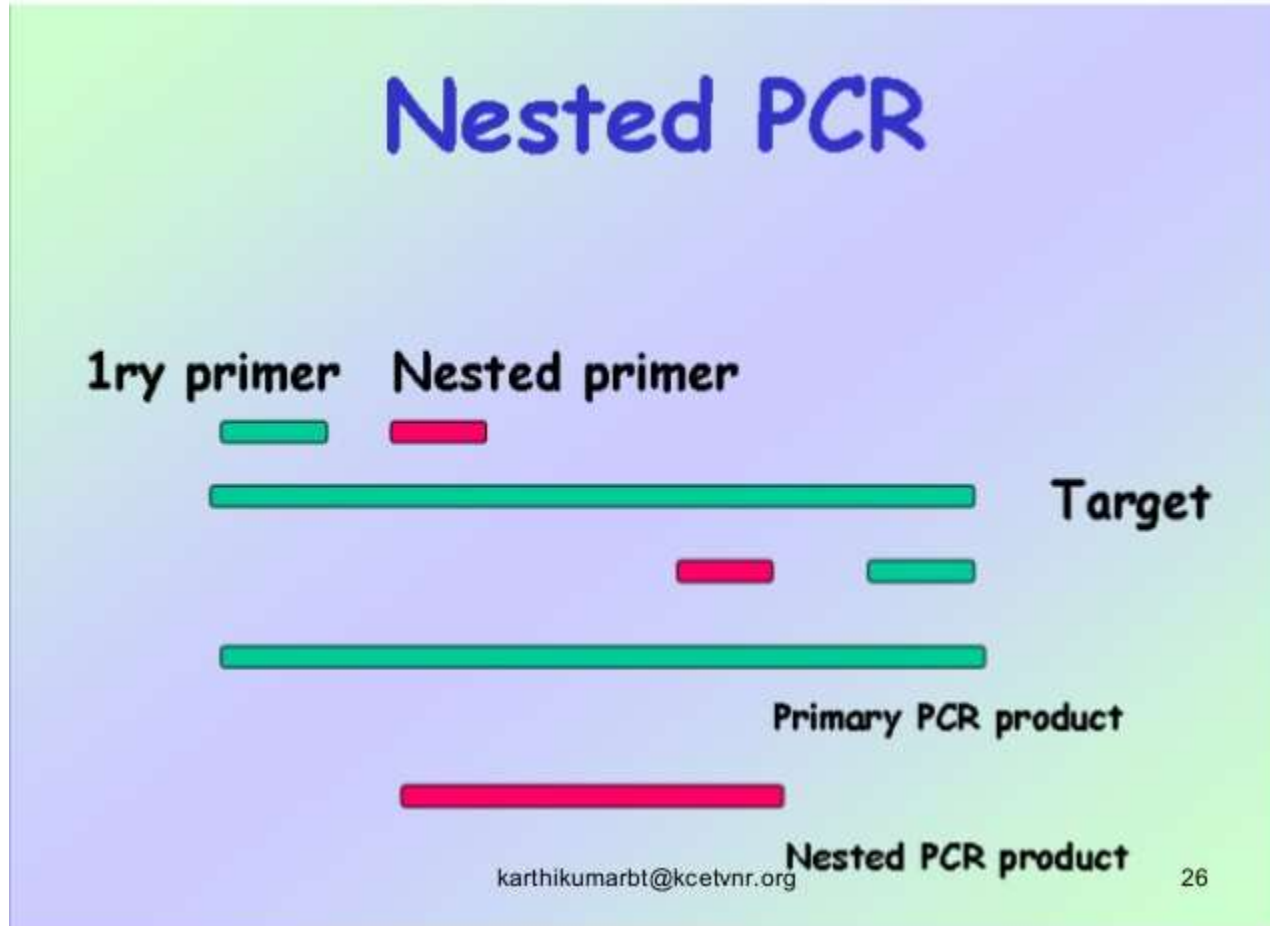
Gradientová PCR – sada PCR s postupně se zvyšující teplotou nasedání primerů  
Gradientové cykly



Kontrola všech parametrů PCR – qPCR – kalibrační křivka - účinnost reakce

# TYPY PCR - NESTED PCR

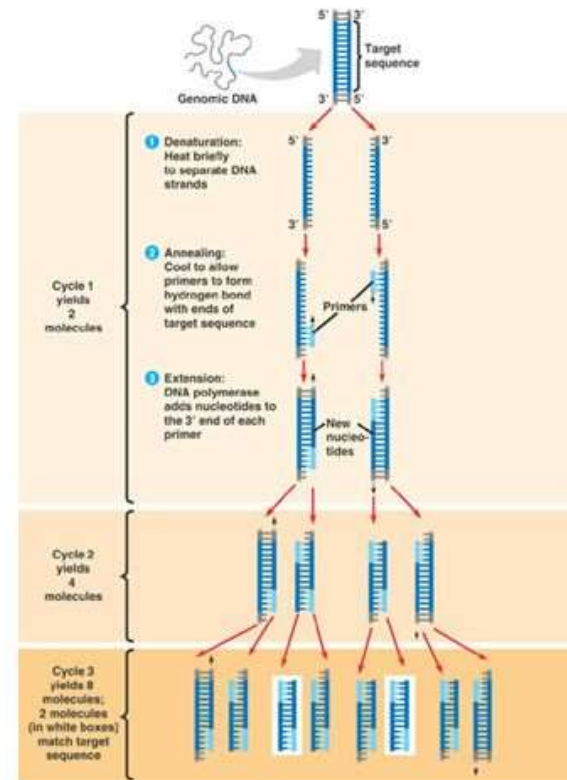
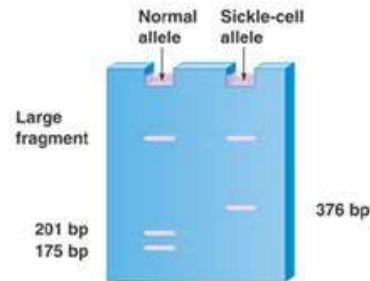
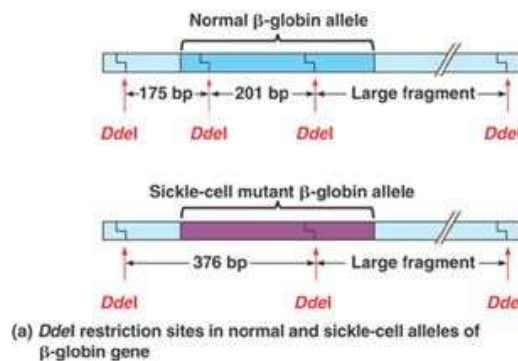
„Nested“ PCR: Amplifikace, templát – genomová DNA.  
Reamplifikace – templátem je produkt první reakce.



# TYPY PCR - PCR - RFLP

RFLP = Restriction fragment length polymorphism

## Genetics Techniques: RFLP & PCR



# TYPY PCR

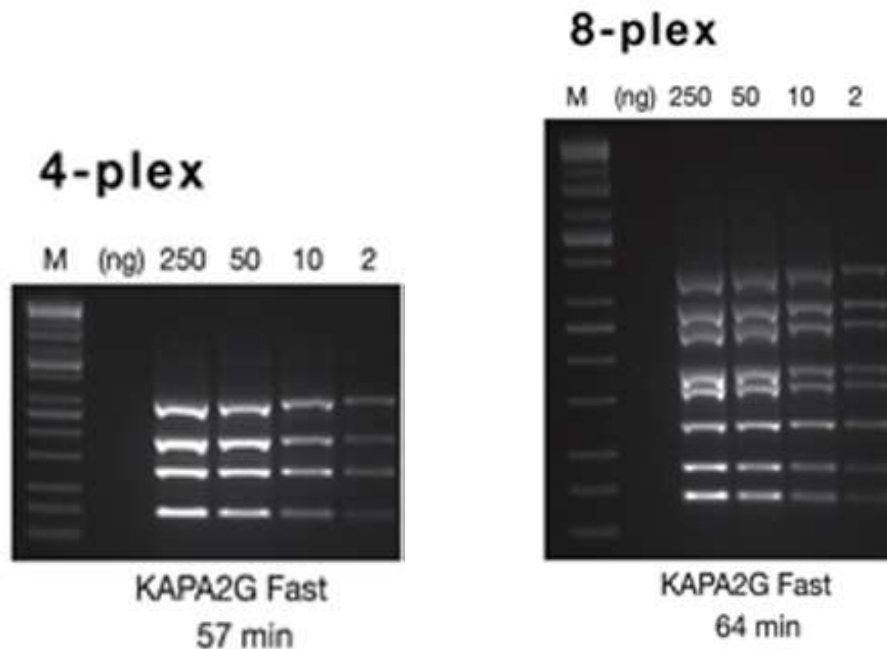
**Multiplexová PCR:** testování více delecí / bodových mutací v jedné reakci

komplikovaná optimalizace (návrh primerů)

hlavně v kvantitativním uspořádání s různými fluorescenčními barvami

Diagnostika delecí v genu pro dystrofin: 11 exonů na 3'konci v jedné reakci

7 exonů na 5'konci v jedné reakci



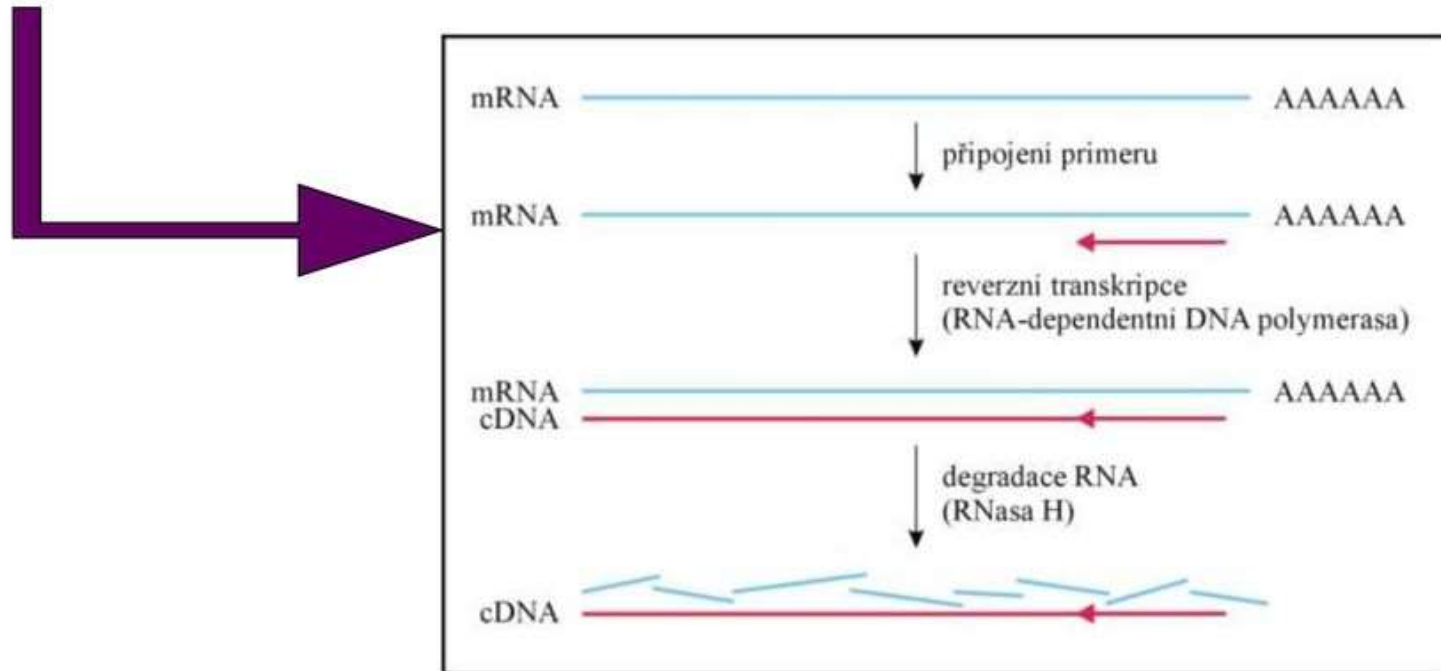


# Reverzně transkripční - PCR

RT-PCR - polymerasová řetězová reakce s reverzní transkripcí



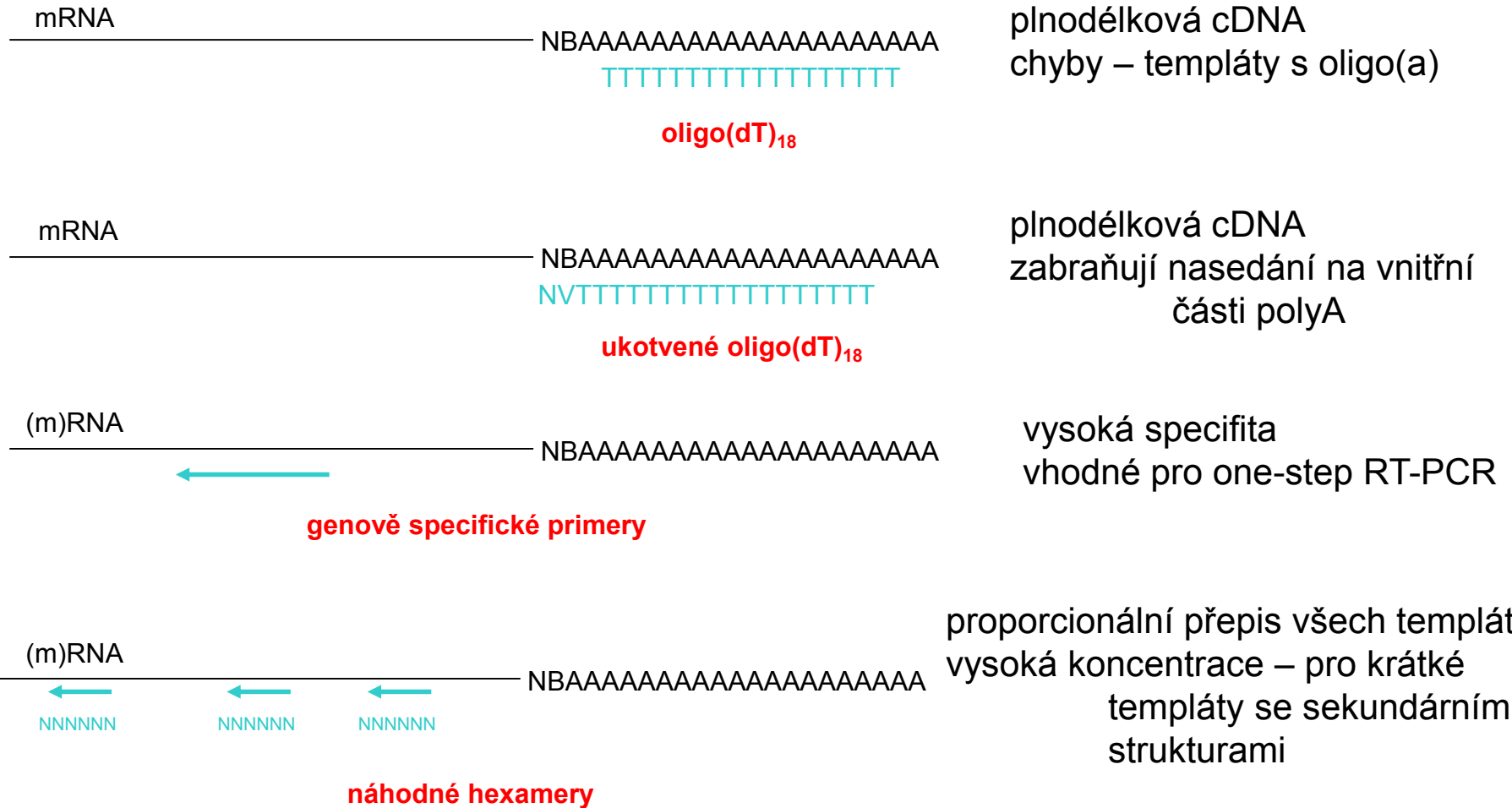
Reverzní transkripce



# REVERZNÍ TRANSKRIPTÁZY

enzym	délka (kb)	teplotní optimum	citlivost	“difficult templates”	RNaseH	modif. nucleotidy
Transcriptor (Roche)	14	42-65	+++	+++	A	A
Expand (Roche)	14	42-50	++	+	N	A
AMV	12	42 (až 60)	++	+	A	A
M-MuLV	10	37	+	+(+)	A	A
<i>C. therm.</i>	3	60-70	++	+++	N	A
<i>Tth</i>	1	55-70	+	+	N	A

# PRIMERY PRO RT

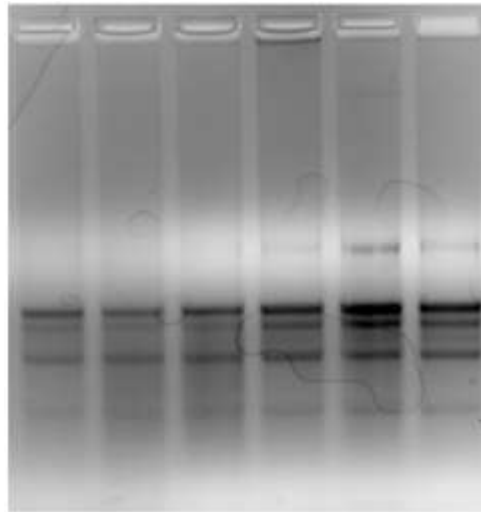


# KVALITA TEMPLÁTU (RNA)

---

Analýza transkripce genů – izolace mRNA (smír 0.5 – 800 kb, většina 1.5 – 2 kb)

Celková RNA – bandy 18S, 28S rRNA



rostlinná RNA (*A. thaliana*)

# JEDNOKROKOVÁ RT-PCR

---

Reverzní transkripce a PCR v jedné reakci

Vysoce kvalitní RNA, množství do reakce musí být stanoveno empiricky  
(dle množství transkriptu a použitého enzymu)

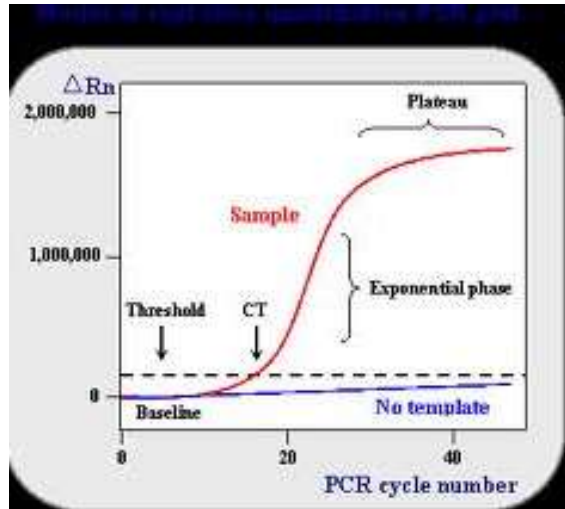
Sekvenčně specifické primery

- RT při 50 – 60 °C
- počáteční denaturace
- PCR

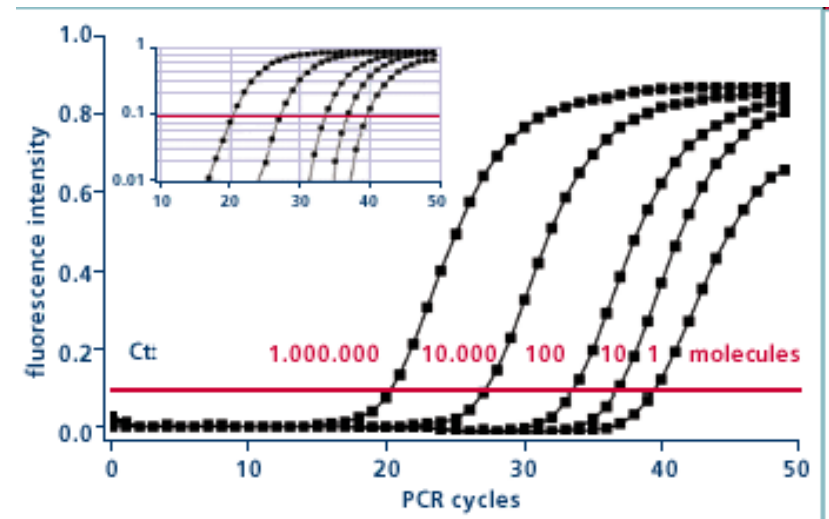
# KVANTITATIVNÍ RT-PCR

Současná amplifikace a detekce produktu v přítomnosti fluorescenční látky

- rychlejší (bez elfo)
- spolehlivé výsledky, citlivá detekce



<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>



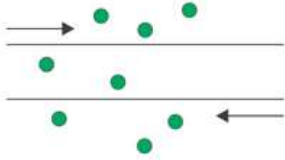
<http://www.bio-equip.cn/>

Exponenciální fáze:  $N_n = N_0 \times (E_{\text{const}})^n$

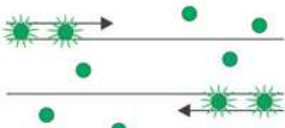
End-point fáze:  $N_n = N_0 \times (E_{\text{var}})^n$

# SEKVENČNĚ NESPECIFICKÁ ANALÝZA

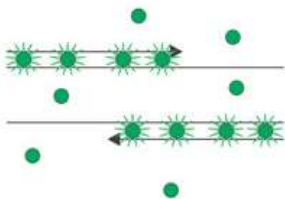
Annealing phase



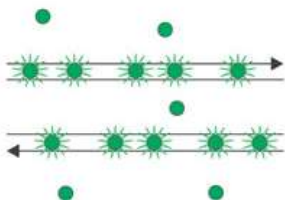
Extension phase (I)



Extension phase (II)



End of PCR cycle

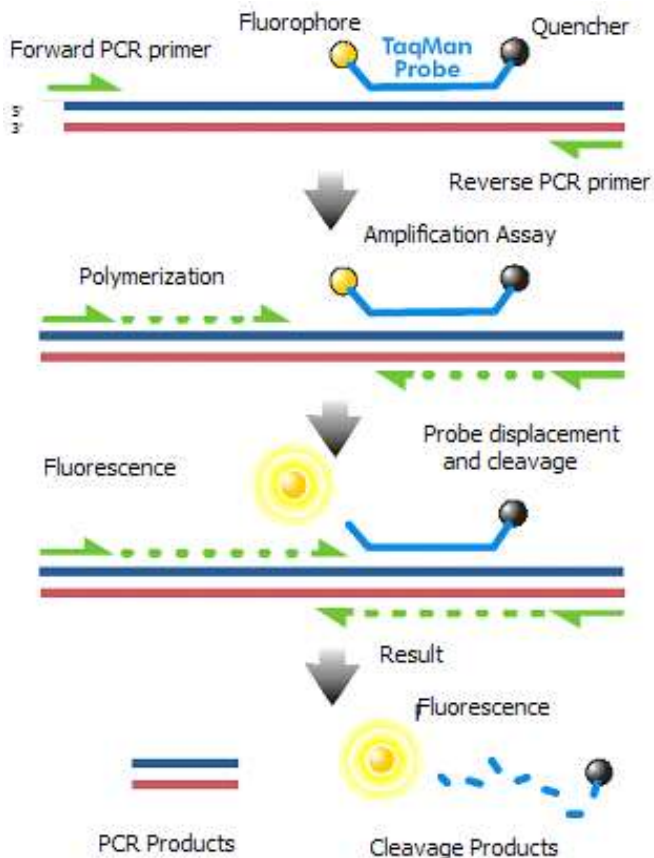


## SYBR Green I

- fluorescence výrazně roste po vazbě na dsDNA
- signál při 530 nm, detekce na konci každého cyklu
- relativně snadný návrh primerů a optimalizace PCR
- pozor na nespecifické produkty (dimery primerů)!!!
  - vždy na konci melting analýza
  - detekce fluorescence za vyšší teploty
- RT s oligo-dT nebo random nonamery, analýza více genů z jedné cDNA
- hand-made mixy s hot start polymerázou (náročné na přesnost pipetování – reproducibilita)
- komerční mixy – přidávají se pouze primery a templát
- reakce v multiplikátech (nejméně triplikáty), biologické repliky

# SEKVENČNĚ SPECIFICKÁ ANALÝZA

Využití oligonukleotidových sond  
komplementárních k PCR produktu  
Vysoce specifická analýza



## Hydrolytické próby

- reportérový fluorochrom v blízkosti zhášeče
- během amplifikace – hydrolýza próby
  - oddělení fluorochromu a zhášeče
  - detekce fluorescence
- během PCR exponenciálně roste množství volných fluorochromů

## TaqMan próby:

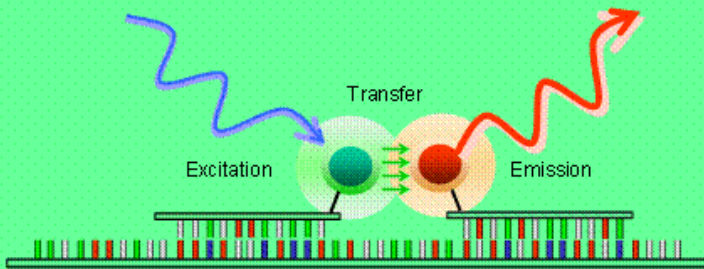
Firemní knihovny

Validované sety (primery + próba) pro kvantifikaci transkripce v modelových organismech (člověk, myš, krysa, primáti, *Drosophila*, *Caenorhabditis elegans*, *Arabidopsis*)



# SEKVENČNĚ SPECIFICKÁ ANALÝZA

FRET Probes



## Hybridizační próby

- dvě próby, jedna značená (3´) donorovým fluorochromem (fluorescein), druhá (5´) akceptorovým fluorochromem, homologní k vnitřní části amplifikovaného úseku
- po hybridizaci – próby v těsné blízkosti
- fluorescein je excitován modrým světlem – emise zeleného světla – emitované světlo excituje akceptorivý fluorochrom – detekce
- amplifikace – může hybridizovat více prób - vyšší signál detekované fluorescence

**FRET** – fluorescence resonance energy transfer

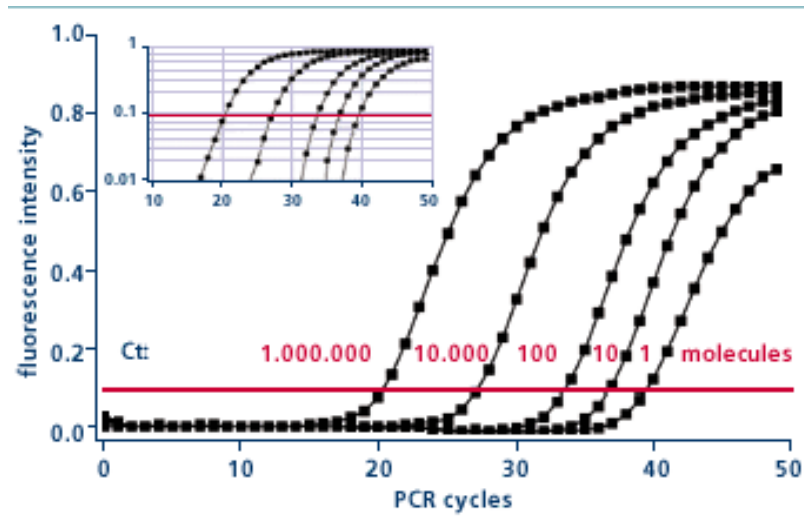
Výhoda: próby jsou během PCR stabilní

# METODY KVANTIFIKACE

**Ct (CP)** – cyklus, ve kterém fluorescence stoupne nad detekční limit přístroje závisí na počáteční koncentraci templátu:

nižší koncentrace templátu – vyšší Ct

vyšší koncentrace templátu – nižší Ct

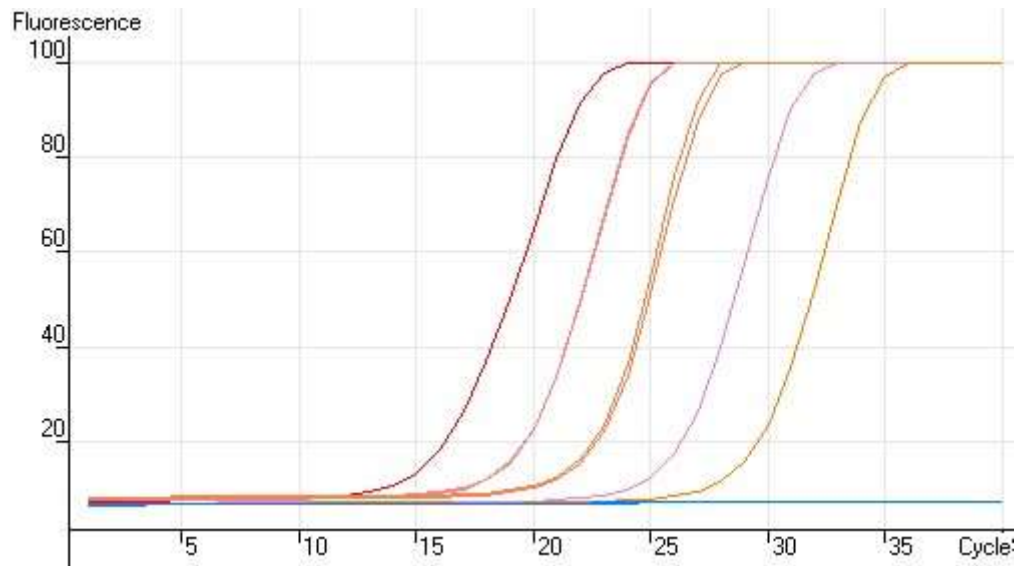


<http://www.bio-equip.cn/>

# ABSOLUTNÍ KVANTIFIKACE

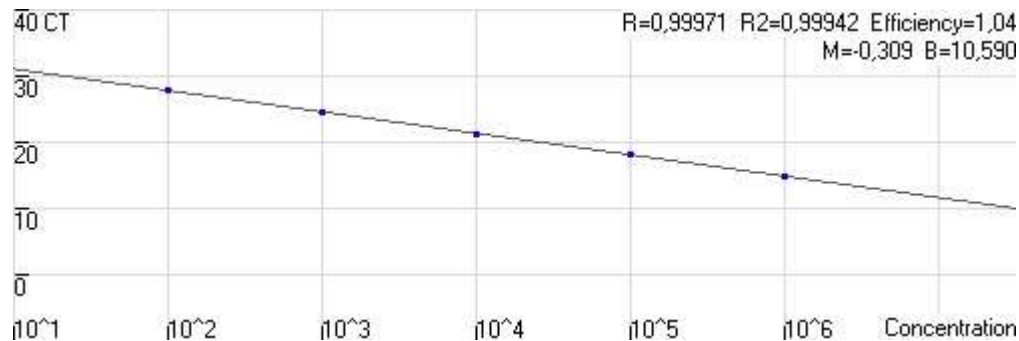
Koncentrace templátu je vyjádřena v absolutních číslech  
(kopie,  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )

KALIBRAČNÍ KŘIVKA – vzorky standardů o známé koncentraci



# ABSOLUTNÍ KVANTIFIKACE

KALIBRAČNÍ KŘIVKA – vzorky standardů o známé koncentraci



R – korelační koeficient (% dat v souladu se statistickou hypotézou)

B – „intercept“, teoretické množství kopií detekovatelné v 1. cyklu

M – sklon (směrnice) přímky, zásadní pro výpočet efektivity reakce

Optimální parametry:  $M = -3.332$

$$E = 1 \quad (E = (10^{-1/M}) - 1)$$

amplifikace 2

# KALIBRAČNÍ KŘIVKA - OPTIMALIZACE PCR

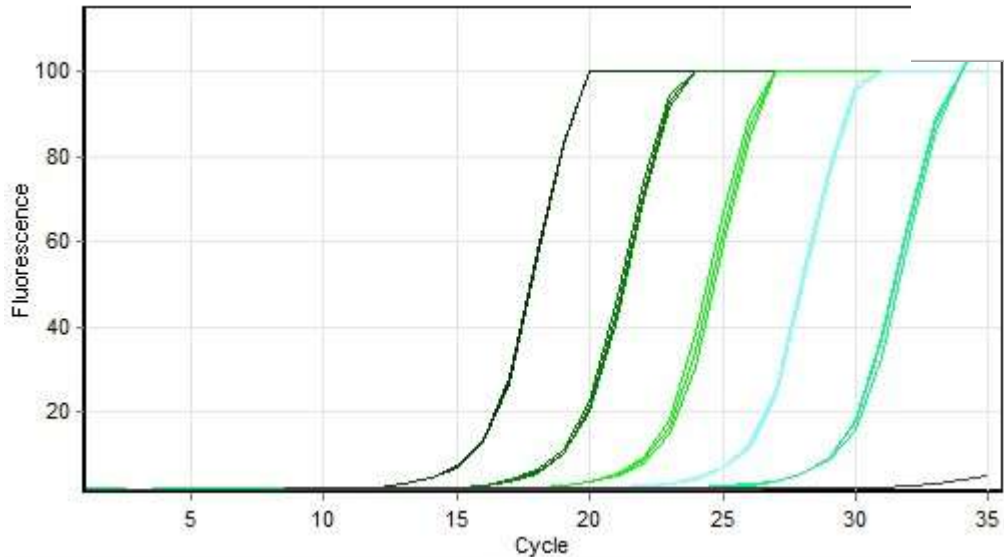
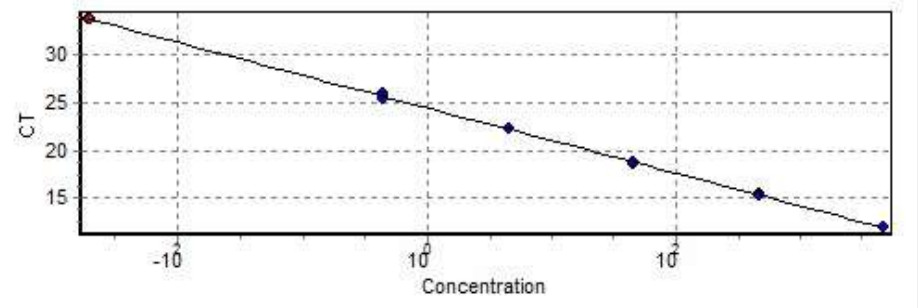
Kalibrační křivka s parametry blízcími se optimu – optimální podmínky PCR

návrh primerů

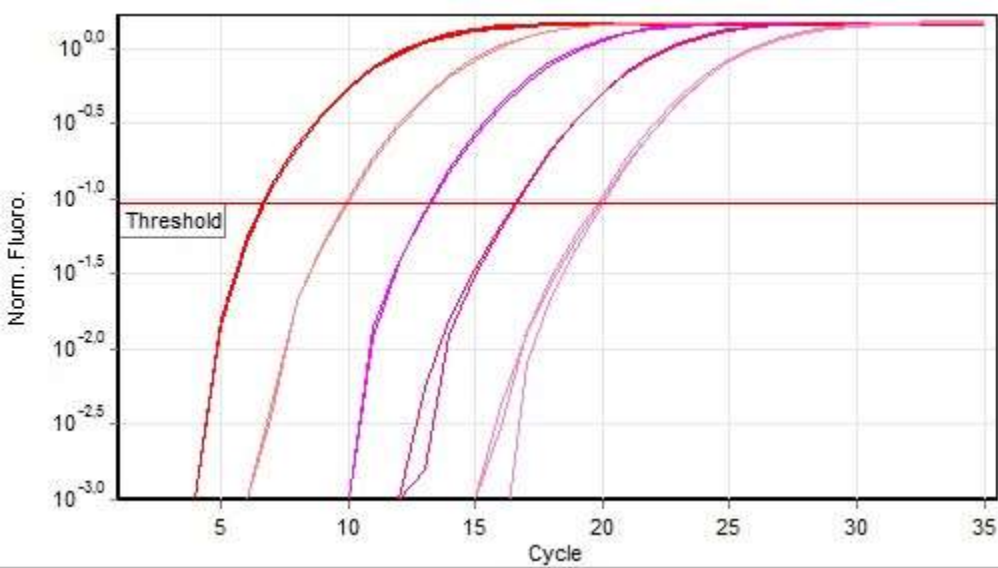
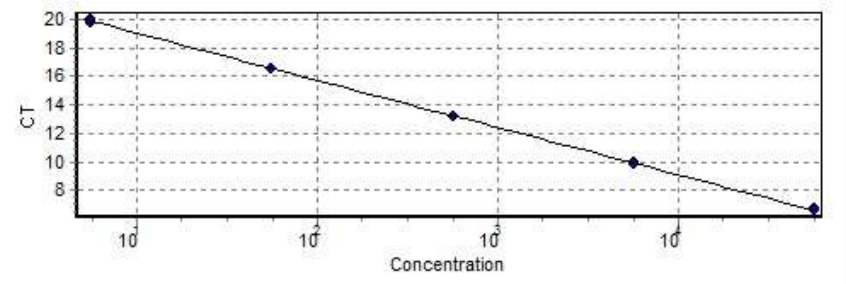
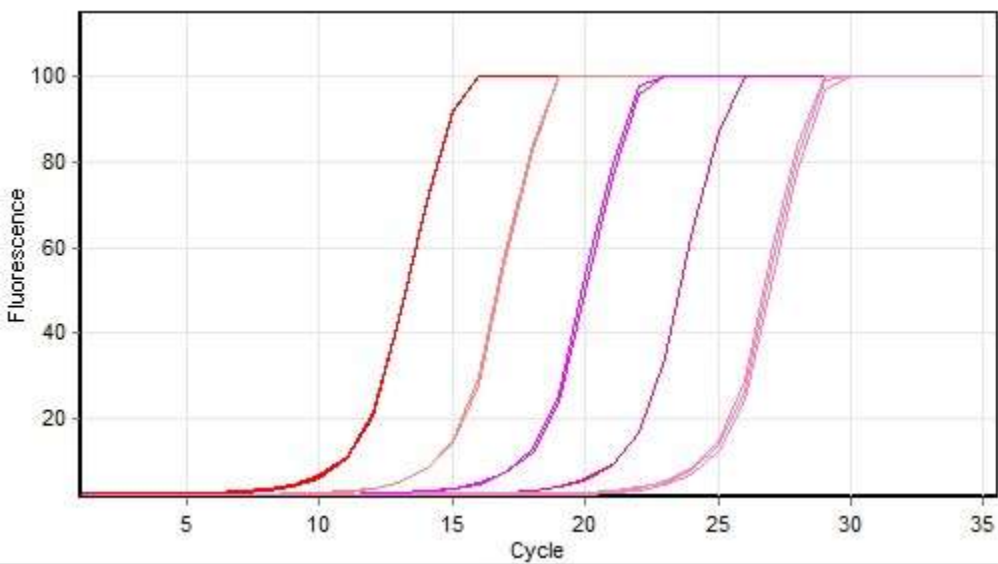
teplota nasedání primerů

časy

koncentrace primerů



Reaction efficiency (*)	0,96336 (* = $10^{(-1/m) - 1}$ )
M	-3,41298
B	24,42021
R Value	0,99963
R^2 Value	0,99926



Reaction efficiency (*)	1,00413 (* = $10^{(-1/m)} - 1$ )
M	-3,31208
B	22,34521
R Value	0,99991
R <sup>2</sup> Value	0,99981

# ABSOLUTNÍ KVANTIFIKACE

---

- vlastní analýzu je nutno provádět za stejných podmínek jako kalibrační křivku
- koncentrace analyzovaných vzorků by měly ležet mezi mezními body kalibrační křivky
- efektivita amplifikace standardů a analyzovaných vzorků musí být stejná!!!!

# RELATIVNÍ KVANTIFIKACE

Srovnání množství transkriptu mezi více vzorky relativně k transkripci referenčního genu

REFERENČNÍ GEN – konstantní množství ve všech analyzovaných vzorcích  
amplifikován v separátní reakci nebo současně (multiplex PCR)

Bez korekce na efektivitu reakce:

$$R = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{vzorek}) - \Delta Ct (\text{kontrola, kalibrátor})$$

$$\Delta Ct (\text{vzorek}) = Ct(\text{analyzovaný gen}) - Ct(\text{referenční gen})$$

$$\Delta Ct (\text{kontrola}) = Ct(\text{analyzovaný gen}) - Ct(\text{referenční gen})$$

Korekce na efektivitu reakce:

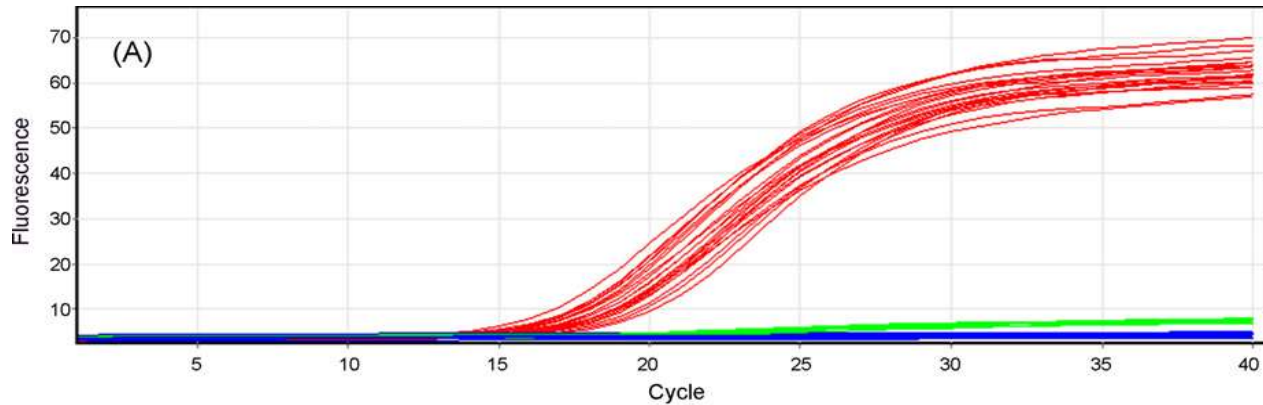
$$R = (E_{\text{gen}})^{\Delta Ct(\text{gen})} / (E_{\text{ref.gen}})^{\Delta Ct(\text{ref.gen})}$$

$$Ct(\text{kontrola}) - Ct(\text{vzorek})$$

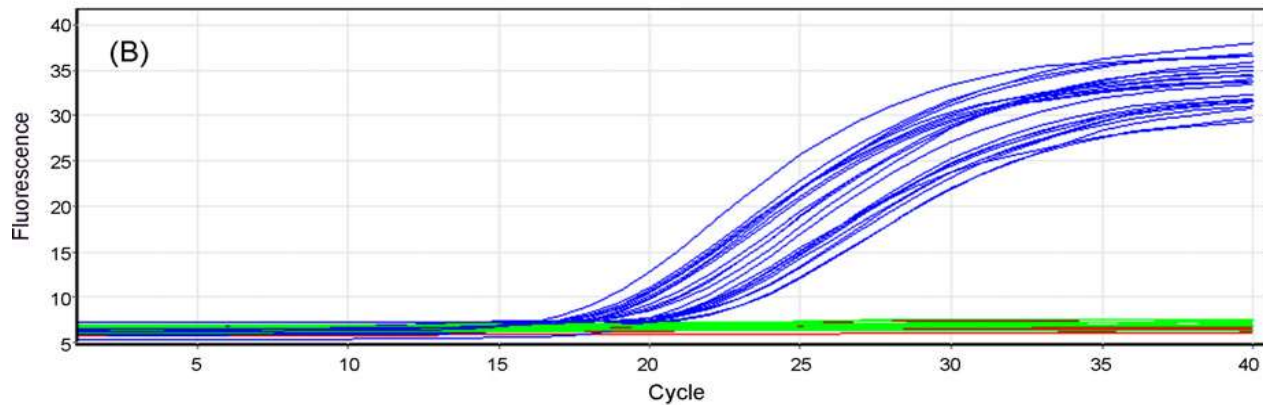
$$Ct(\text{kontrola}) - Ct(\text{vzorek})$$



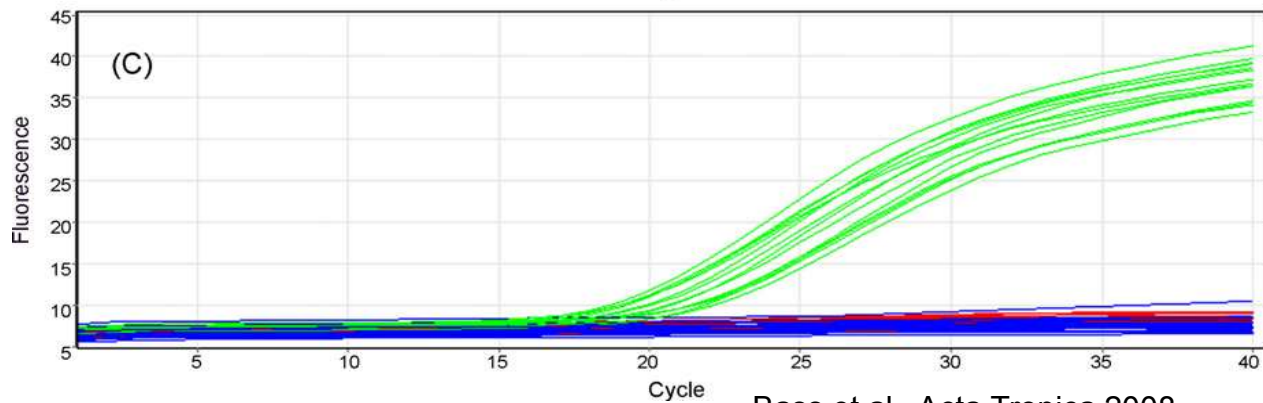
# MULTIPLEX qPCR



VIC yellow (530nm excitation and 555nm emission)

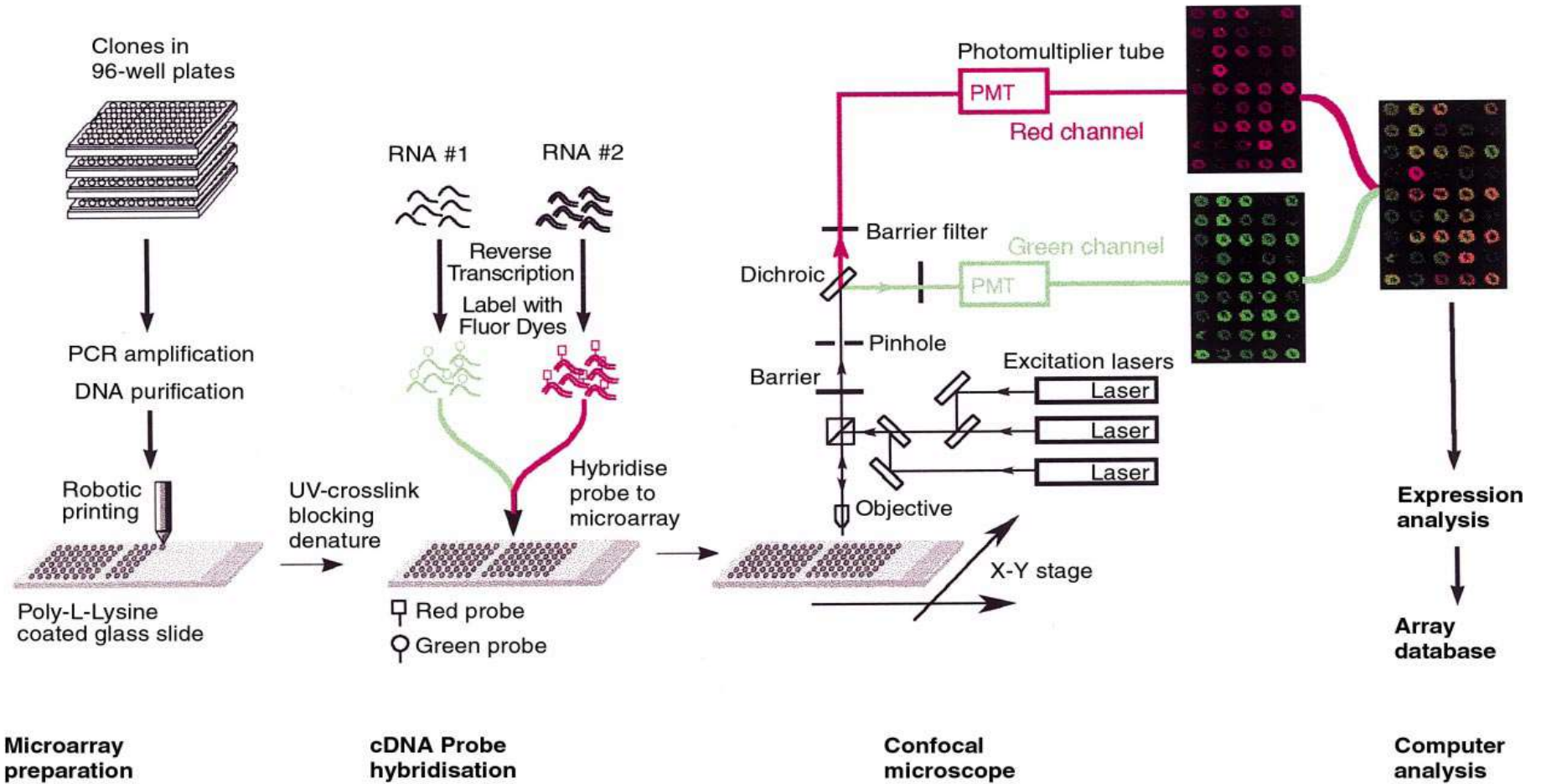


Cy5 green (470nm excitation and 510 emission)

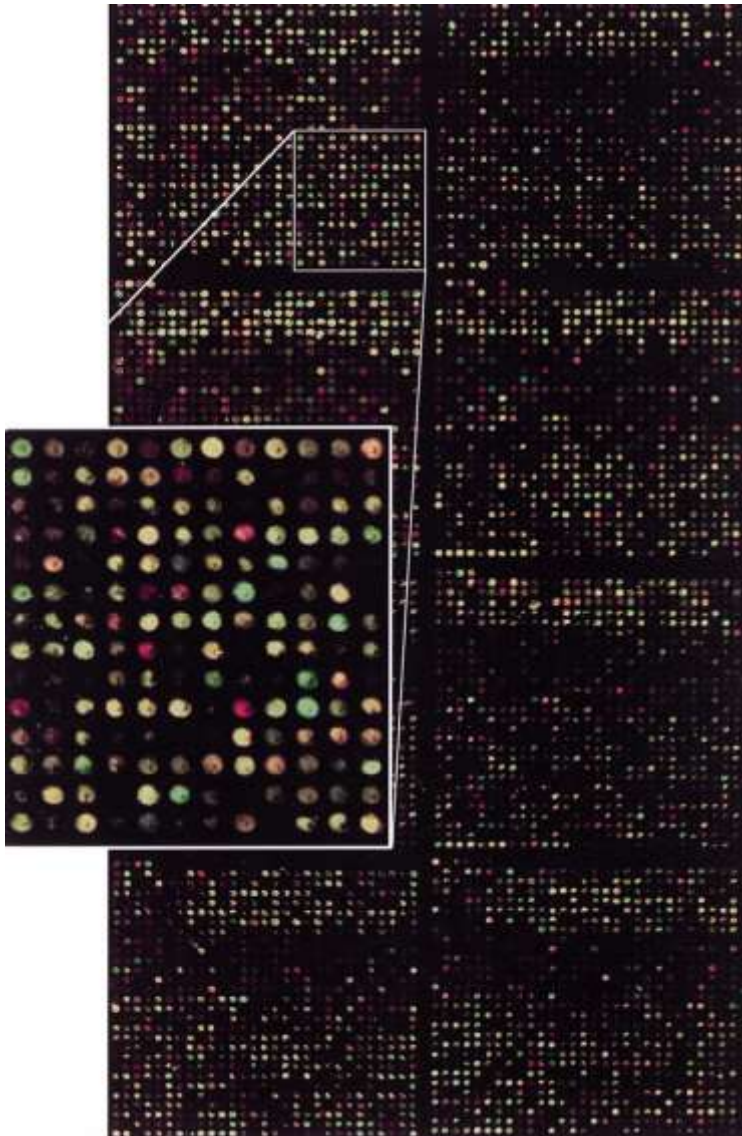


FAM red (625nm excitation and 660 nm emission)

# cDNA MICROARRAYS



# cDNA MICROARRAYS



# Děkuji za Vaši pozornost

## WHAT IS PCR USED FOR?

