

PCR

Polymerázová řetězová reakce

- Průlom v práci s nukleovou kyselinou -

Metody molekulární biologie pro farmaceuty

Doc. RNDr. Jan Hošek, Ph.D.
hosek@mail.muni.cz

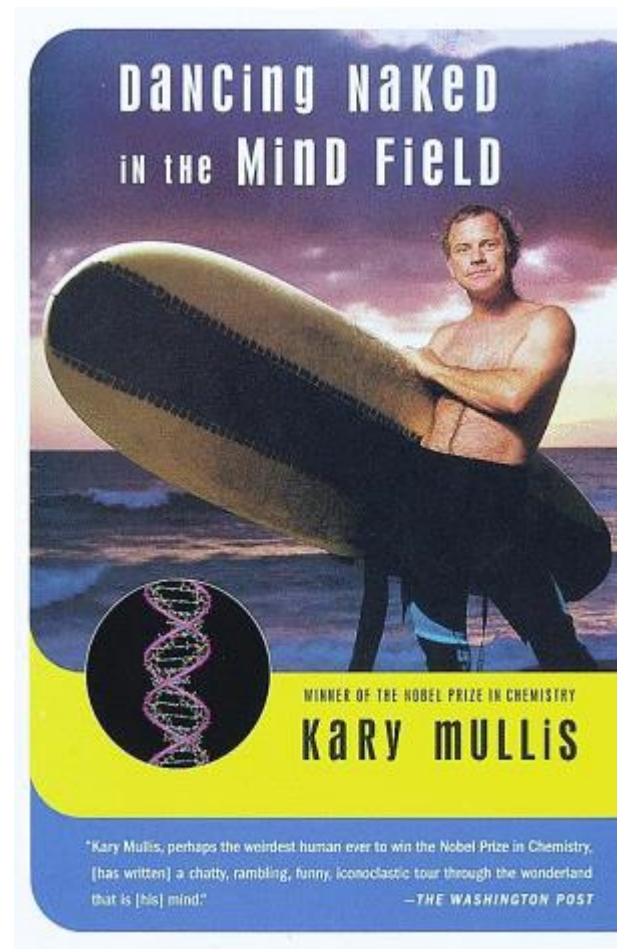
Ústav molekulární farmacie
FaF MU

Kdo za to může ?



Kary Mullis 1985

Nobelova cena v roce 1993



The origin of PCR by Kary Mullis

- “Sometimes a good idea comes to you when you are not looking for it. Through an improbable combination of coincidences, naïveté, and luck mistakes, such a revelation came to me one Friday night in April, 1983, as I gripped the steering wheel of my car and snaked along a moonlit mountain road into northern California’s redwood country.”
Sci. Am. 1990 262:56-61, 64-5.

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

DNA primer

TTTTT

nově syntetizovaný řetěz

5'

3'

3'

5'

DNA templát

Princip
PCR

Parametry
PCR

Technické
provedení PCR

Varianty PCR
v praxi

Princip PCR

- Zásadní předpoklady správné polymerace -

Princip
PCR



Parametry
PCR



Technické
provedení PCR



Varianty PCR
v praxi

Přítomnost templátu

Polymerace je možná pouze podle známé matrice
- 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'

Princip PCR

- Cyklické změny teplot reakční směsi -

Princip
PCR



Parametry
PCR

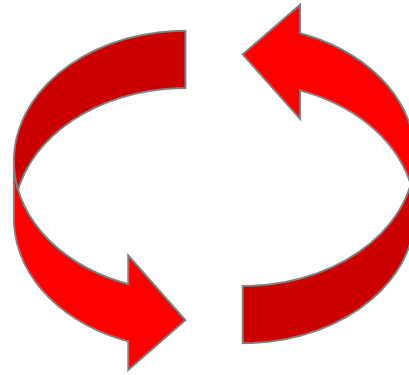


Technické
provedení PCR



Varianty PCR
v praxi

Denaturace

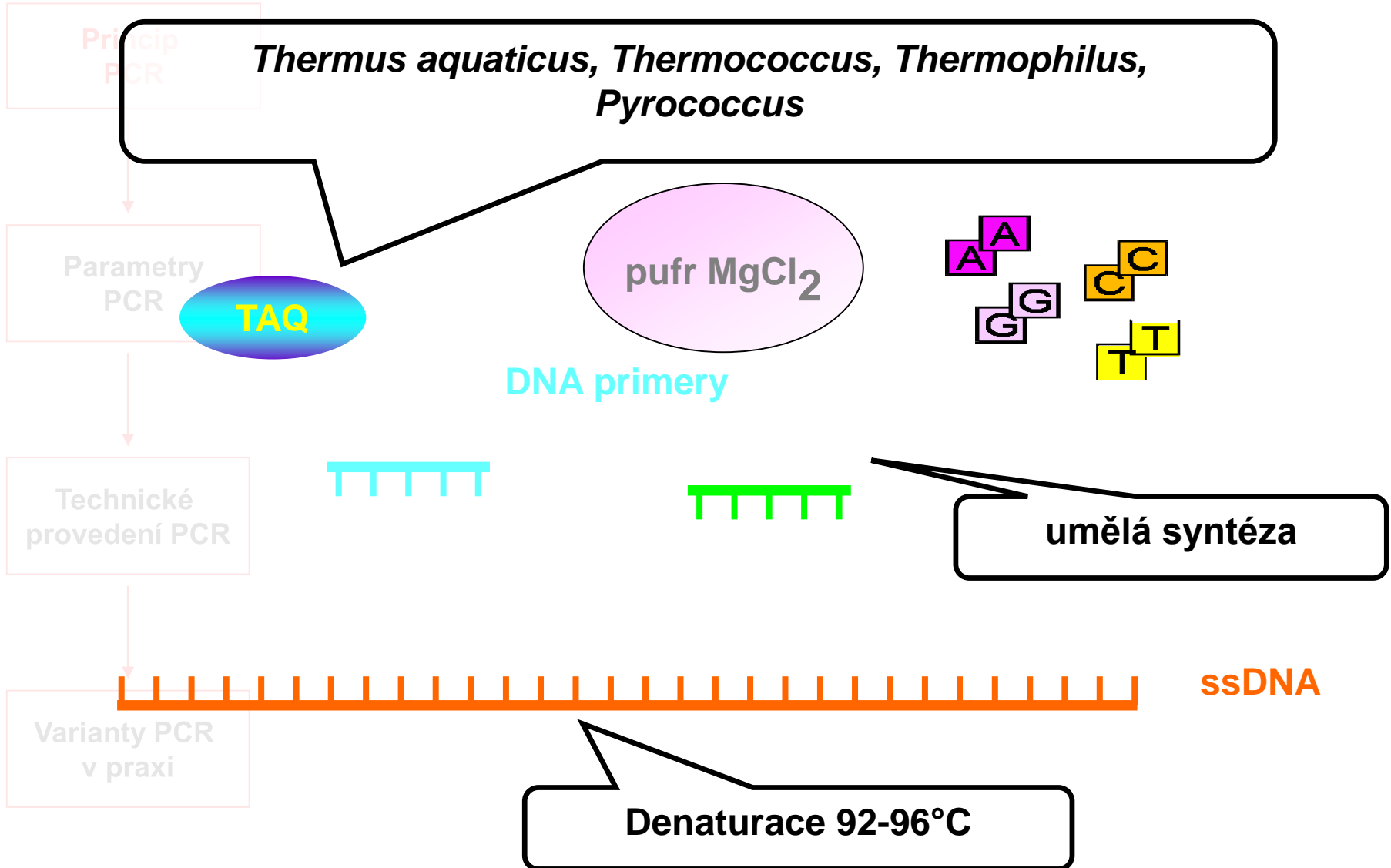


Annealing

Extenze

Princip PCR

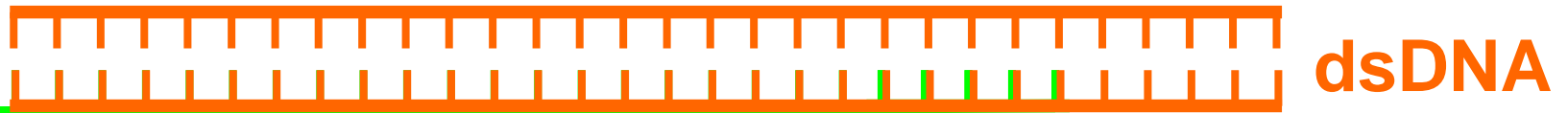
- komponenty *in vitro* reakce -



Průběh polymerace

- 1. PCR cyklus -

1. denaturace (92-96°C)



2. annealing (45-72°C)

primární produkty

3. extenze (72°C)



Princip
PCR

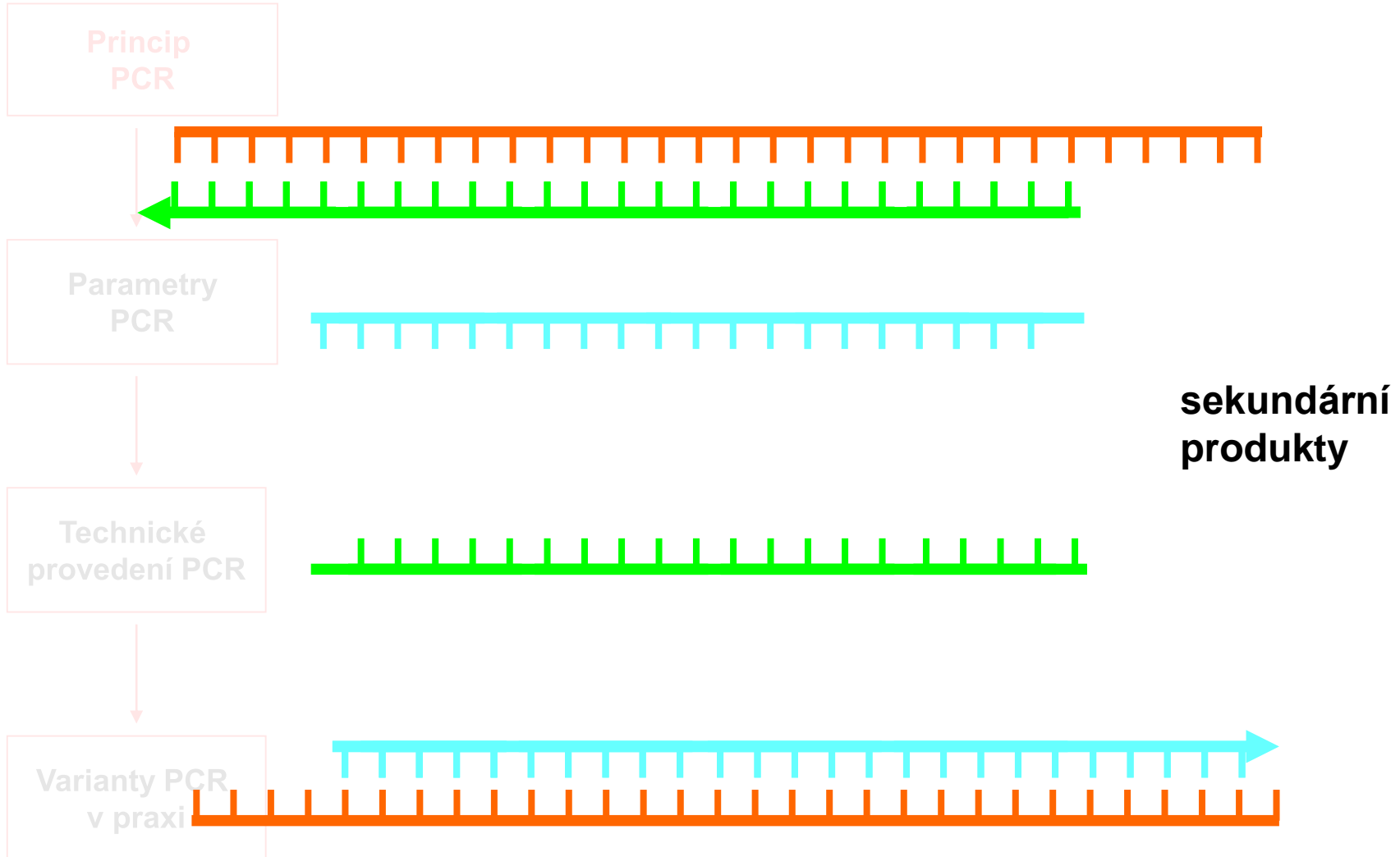
Parametry
PCR

Technické
provedení PCR

Varianty PCR
v praxi

Průběh polymerace

- 2. PCR cyklus -



Průběh polymerace

- 3. PCR cyklus -

Princip
PCR



Parametry
PCR



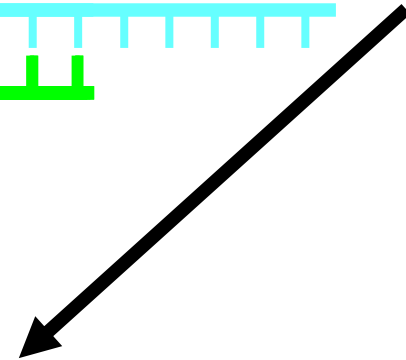
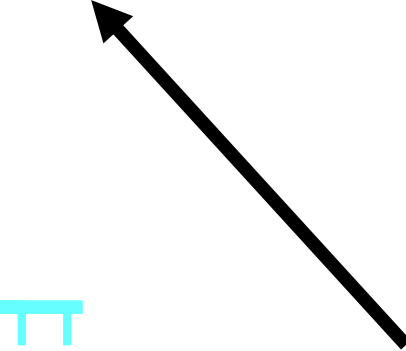
Technické
provedení PCR



Varianty PCR
v praxi

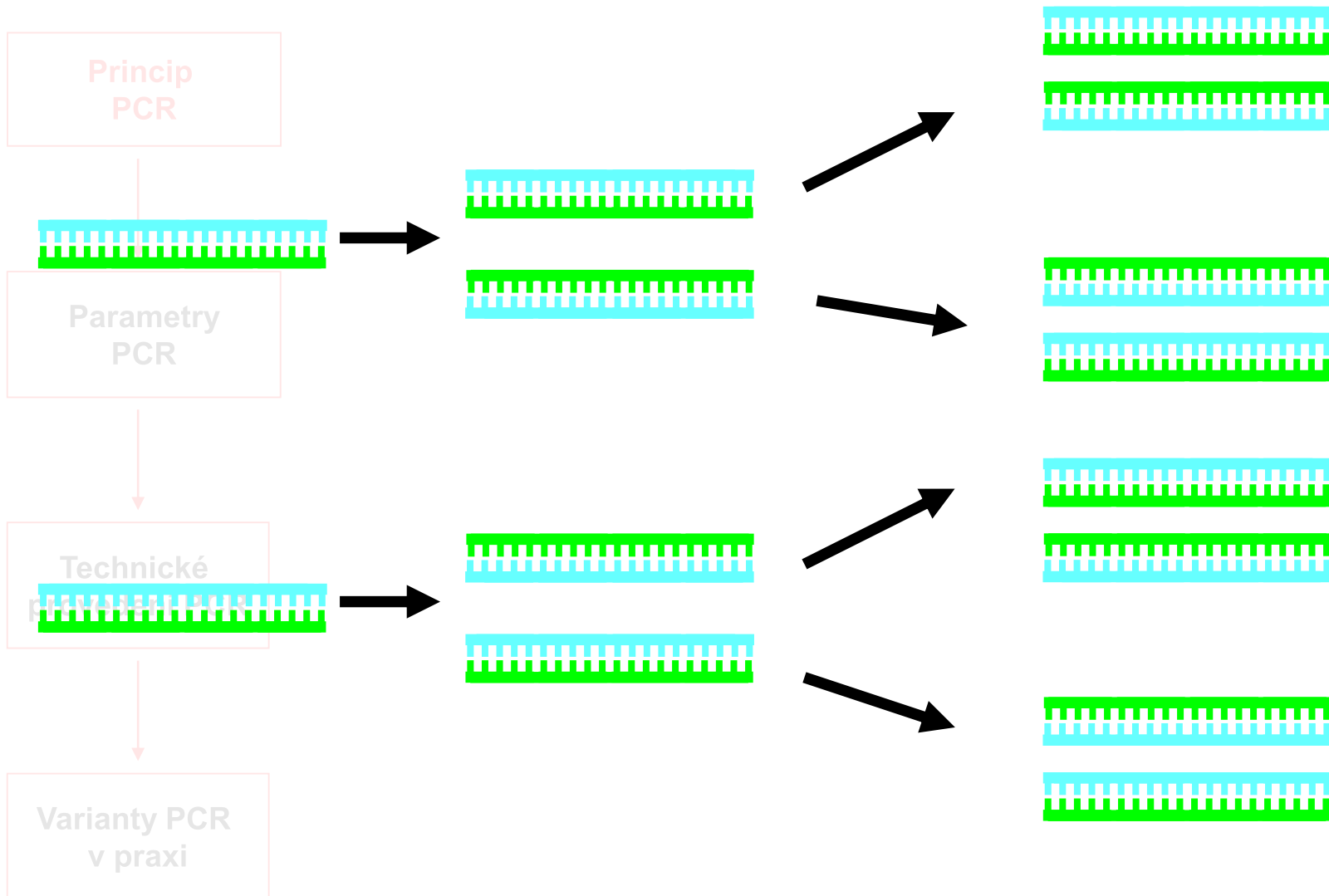


amplikony



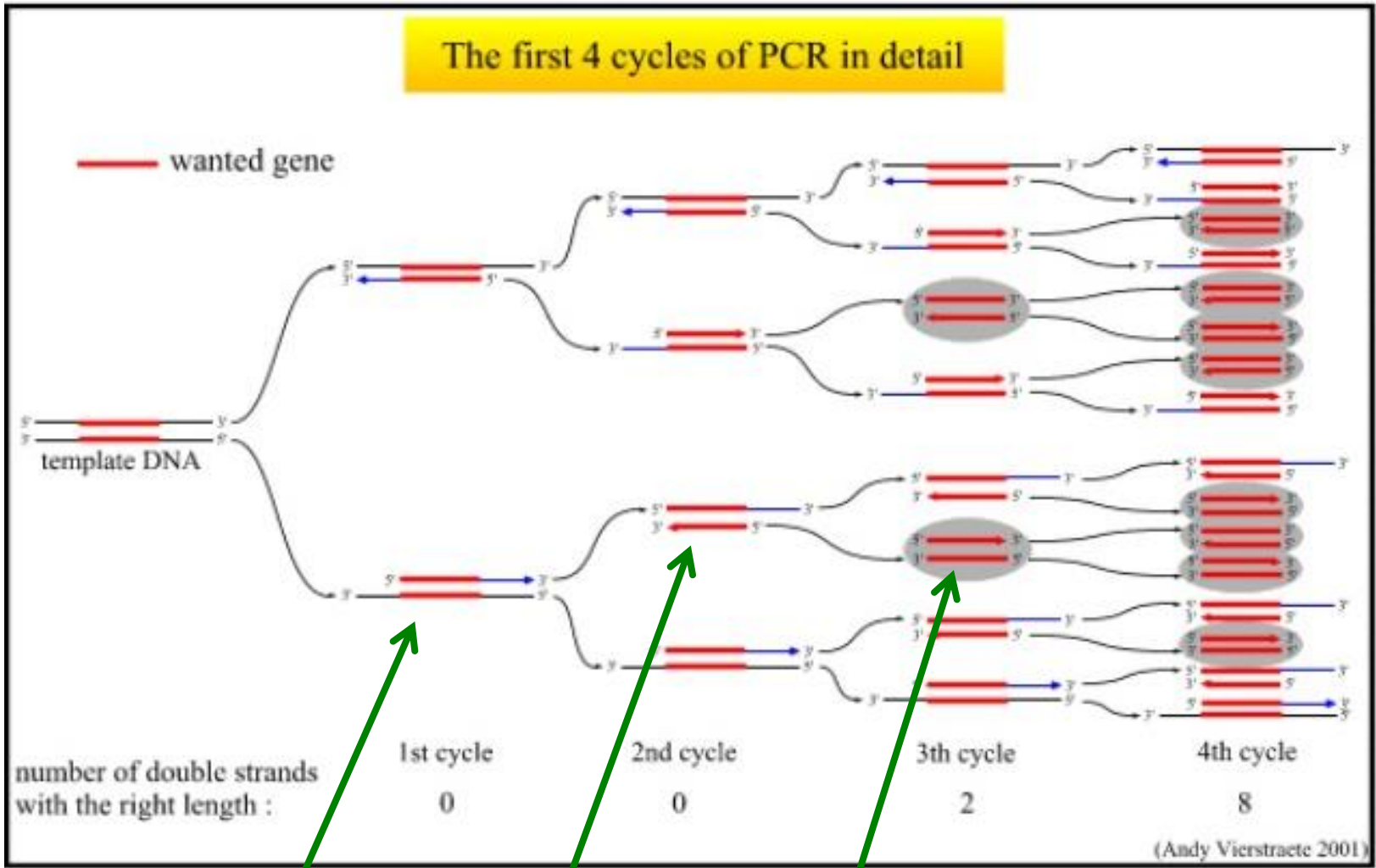
Průběh polymerace

- Další cykly -



Počet amplikonů vzrůstá geometricky

PCR - cycles



Primární produkt

Sekundární produkt

Amplikon

Průběh polymerace

- Nárůst množství a typu produktů polymerace-

Cyklus č. PCR	Primární	Sekundární	Amplikony	Celkem (pro X =1)
0	0	0	0	1
1 Parametr PCR	2	0	0	2
2	2	2	0	4
3	2	4	2	8
4 Technické provedení PCR	2	6	8	16
5	2	8	22	32
Obecně Varianty PCR v praxi	2x	x(2n-2)	$(2^n - 2n)x$	$(2^n)x$

X = počet matric na počátku, n = počet cyklů

Průběh polymerace

- Výtěžek reakce versus počet cyklů -

Cyklus č.	Primární	Sekundární	Amplikony	Celkem
10	2	18	1 004	1 024
20	2	38	10 485 438	$1\,024^2$
30	2	58	$\sim 1.1 \times 10^9$	$1\,024^3$
40	2	78	$\sim 1.1 \times 10^{12}$	$1\,024^4$
50	2	98	$\sim 1.1 \times 10^{15}$	$1\,024^5$

Princip PCR

Parametry PCR

Technické provedení PCR

Variety PCR v praxi

Princip PCR

- Závěr -

Princip
PCR

- Každý amplikon je složen ze dvou řetězců = dvě matrice, které se v dalším cyklu zase zdvojí

Parametry
PCR

- Počet amplikonů extrémně vzrůstá oproti počtu primárních a sekundárních produktů

Technické
provedení PCR

- Po několika cyklech už amplikony v reakčních produktech naprosto dominují

Varianty PCR
v praxi

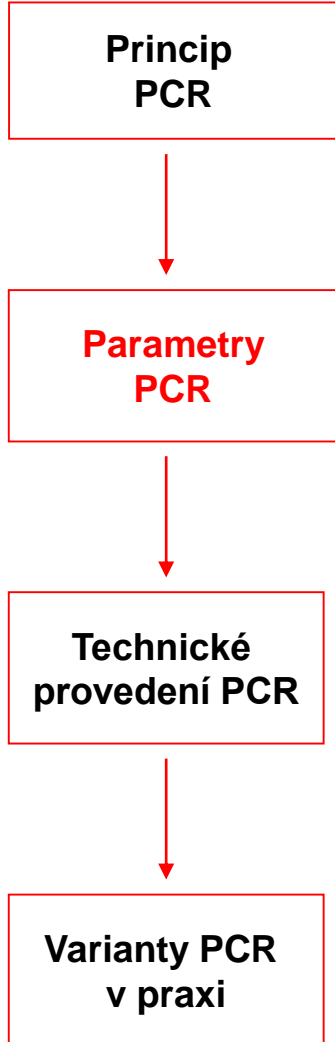
- Primární a sekundární produkty tvoří jen minoritní složku ve výsledných produktech PCR

Parametry PCR

**Kvalita průběhu a výsledek PCR
je ovlivněn sadou v zásadě
predikovatelných**

Chemických parametrů

Fyzikálních parametrů



Chemické parametry PCR

Princip
PCR



Parametry
PCR



Technické
provedení PCR



Varianty PCR
v praxi

- 1) Množství Taq polymerázy
- 2) Reakční pufr
- 3) Množství dNTP
- 4) **Primery**
- 5) Objem PCR reakce
- 6) Kvalita DNA

Množství Taq polymerázy

Princip
PCR



Parametry
PCR



Technické
provedení PCR



Varianty PCR
v praxi

- **0,5-2,5 jednotky, což odpovídá 25-125 fmol enzymu.**
- **v současné době je k dispozici řada různých Taq polymeráz a jejich směsí**
- **vysoká termostabilita a přesnost začlenění správného nukleotidu do struktury DNA (tzv. fidelity)**

Reakční pufr

Princip
PCR

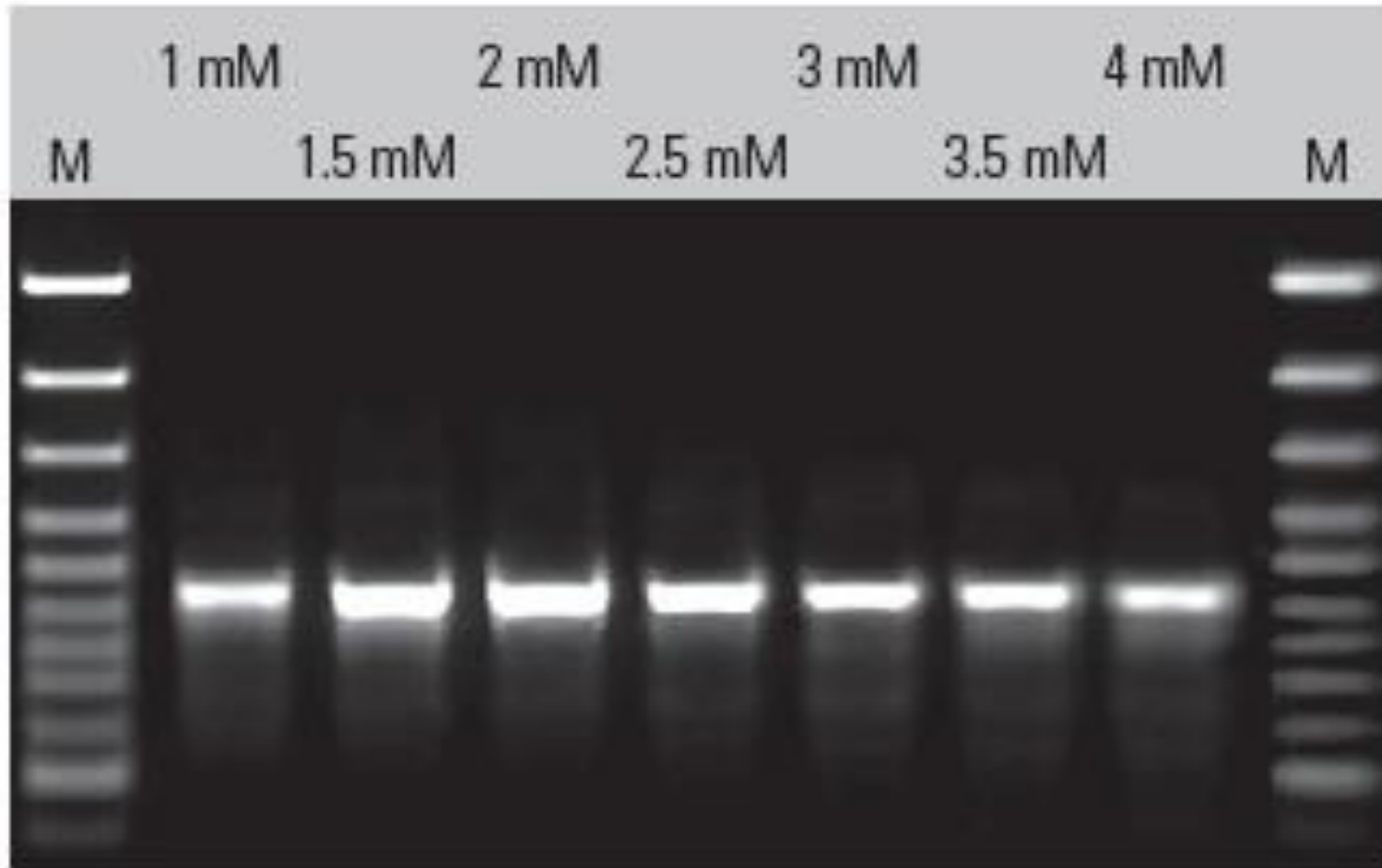
Parametry
PCR

Technické
provedení PCR

Varianty PCR
v praxi

- Obsahuje kofaktor Taq polymeráz = ionty Mg^{2+} ve formě $MgCl_2$ nebo $MgSO_4$
- Koncentrace Mg^{2+} se pohybuje v rozmezí 0,5-5,0 mM (1,5 mM)
- Ionty ovlivňují aktivitu enzymu, zvyšují Ta dvoušroubovicové DNA a tvoří rozpustné komplexy s nukleotidy, což je proces nutný k inkorporaci nukleotidů do DNA

Influence of Mg²⁺ ions on PCR



Množství dNTP

Princip
PCR



Parametry
PCR



Technické
provedení PCR



Varianty PCR
v praxi

- Do struktury DNA jsou v podmínkách *in vitro* účinně začleňovány při koncentracích kolem 10 μM , což jsou ale hodnoty nižší, než ty, které se používají při PCR (100-200 μM)

Nastavení vhodné koncentrace (množství) závisí na:

- délce amplifikačních produktů
- koncentraci Mg^{2+}
- koncentraci primerů
- nastavení teplotního profilu reakce

Primery

Princip
PCR

Parametry
PCR

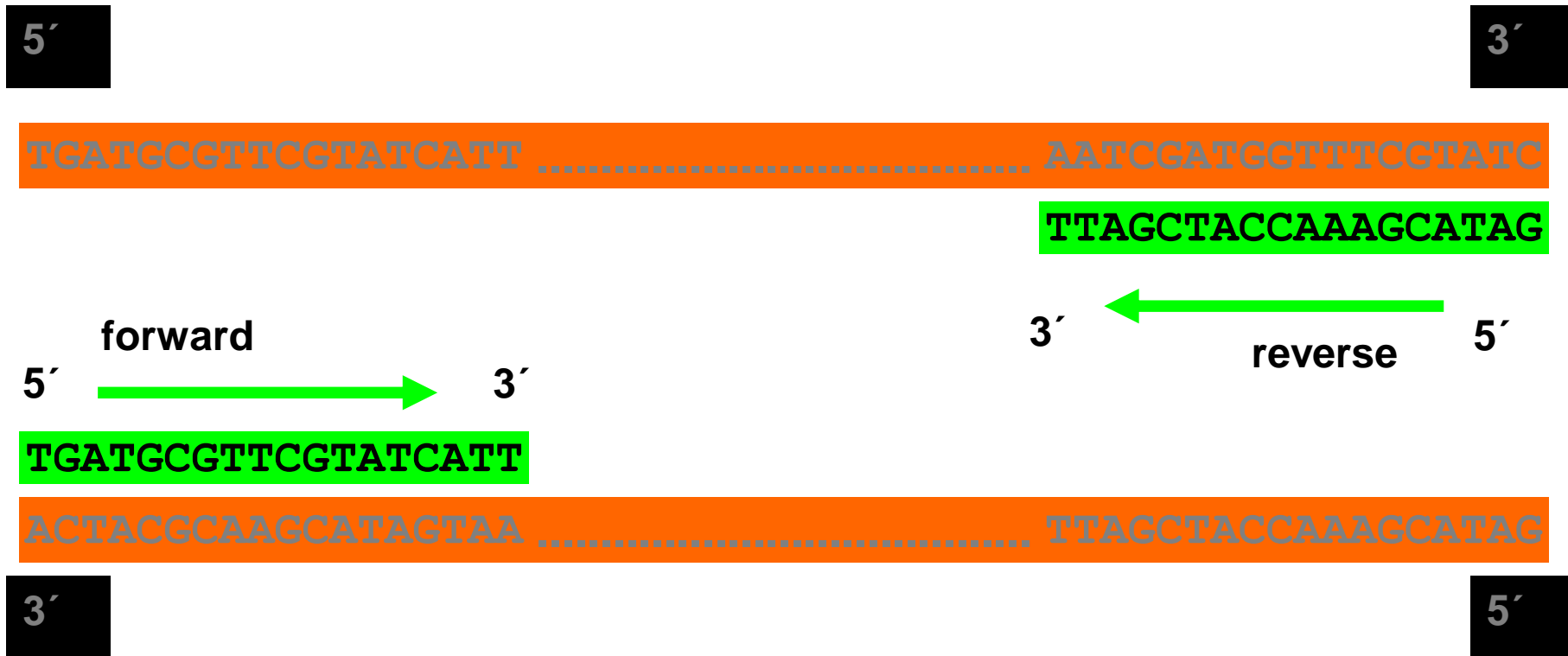
Technické
provedení PCR

Varianty PCR
v praxi

- zodpovědné za specifičnost PCR
- délky 14 až 40 nukleotidů
- obsah G+C od 40% do 75%
- 3'- konce jednoho primeru by měly obsahovat takové sekvence nukleotidů, které nejsou komplementární k sekvencím druhého primeru – vznik dimerů
- homogenní rozložení domén bohatých na G/C a A/T
- 5'- konec primeru je méně citlivý k mutacím přítomným na templátové DNA
- koncentrace v rozsahu 0,1 - 1,0 μM

Primery

Délka a specifičnost PCR produktu je dána pozicí primerů na cílových sekvencích DNA-matrice



Návrh primerů - příklad

Napište sekvenci primerů, které by mohly amplifikovat vyznačenou část daného úseku dsDNA

- znáte sekvenci jen jednoho z řetězců
- primery pište ve směru 5' - 3'

5' - TGA TGC AAA GTT CGC TCA GGT ACG ATT CCC
AAA TGT GGA GCT TAG TCG ATG ATG GGC AAA
TCT GTG ATT ATC CGA CGT CCC ATG TGC GTC
AAA TGC CGT AGG ACC CTA TTT TGA CGT CCT
GCT GGT ACG CAT CAT CCC TGG TGA CGT CCT
ACG TGC TGC GCT CGC ACG ATG CGT ACG AAC
GCT CGT CGG - 3'

Jak dlouhý bude vzniklý amplikon ?

Návrh primerů – řešení příkladu

Primer forward

5' - AAA GTT CGC TCA GGT ACG - 3'

Primer reverse

5' - CGT ACG CAT CGT GCG AGC - 3'

Amplikon bude mít délku 171bp

Objem PCR reakce

Princip
PCR



Parametry
PCR



Technické
provedení PCR



Varianty PCR
v praxi

- ovlivňuje výsledek v míře menší než faktory uvedené doposud
- může mít vliv na citlivost reakce
- objemy reakčních směsí 20 až 100 μl
- PCR v kapilárách - reakční objemy až 10 μl

Kvalita DNA

Princip
PCR



- jedním z rozhodujících faktorů kvalitního průběhu PCR

Parametry
PCR



- Čistota a kvalita DNA ovlivňuje zejména citlivost reakce

Technické
provedení PCR



- PCR je kompletně inhibována látkami jako jsou **heparin**, porfyriny a jim podobné sloučeniny a ionty $H_xPO_4^{n-}$.

Varianty PCR
v praxi

Fyzikální parametry PCR

Princip
PCR



Parametry
PCR



Technické
provedení PCR



Varianty PCR
v praxi

1) Počáteční denaturace

2) **Připojení primerů**

3) Syntéza nukleotidových řetězců

4) Počet cyklů

5) Závěrečná extenze

Počáteční denaturace

Princip
PCR



Parametry
PCR



Technické
provedení PCR



Varianty PCR
v praxi

- jednorázové zahřátí PCR směsi na teplotu 94-96°C po dobu přibližně 3-5 minut
- dokonalá denaturace genomové DNA a odbourání všech struktur, které by bránily připojení primerů k cílovým sekvencím
- následné připojení primerů je velmi efektivní
- nesmí být příliš dlouhá - poškození řetězců DNA a ničení Taq polymerázy

Teplota připojení primerů

Princip
PCR



Parametry
PCR



Technické
provedení PCR

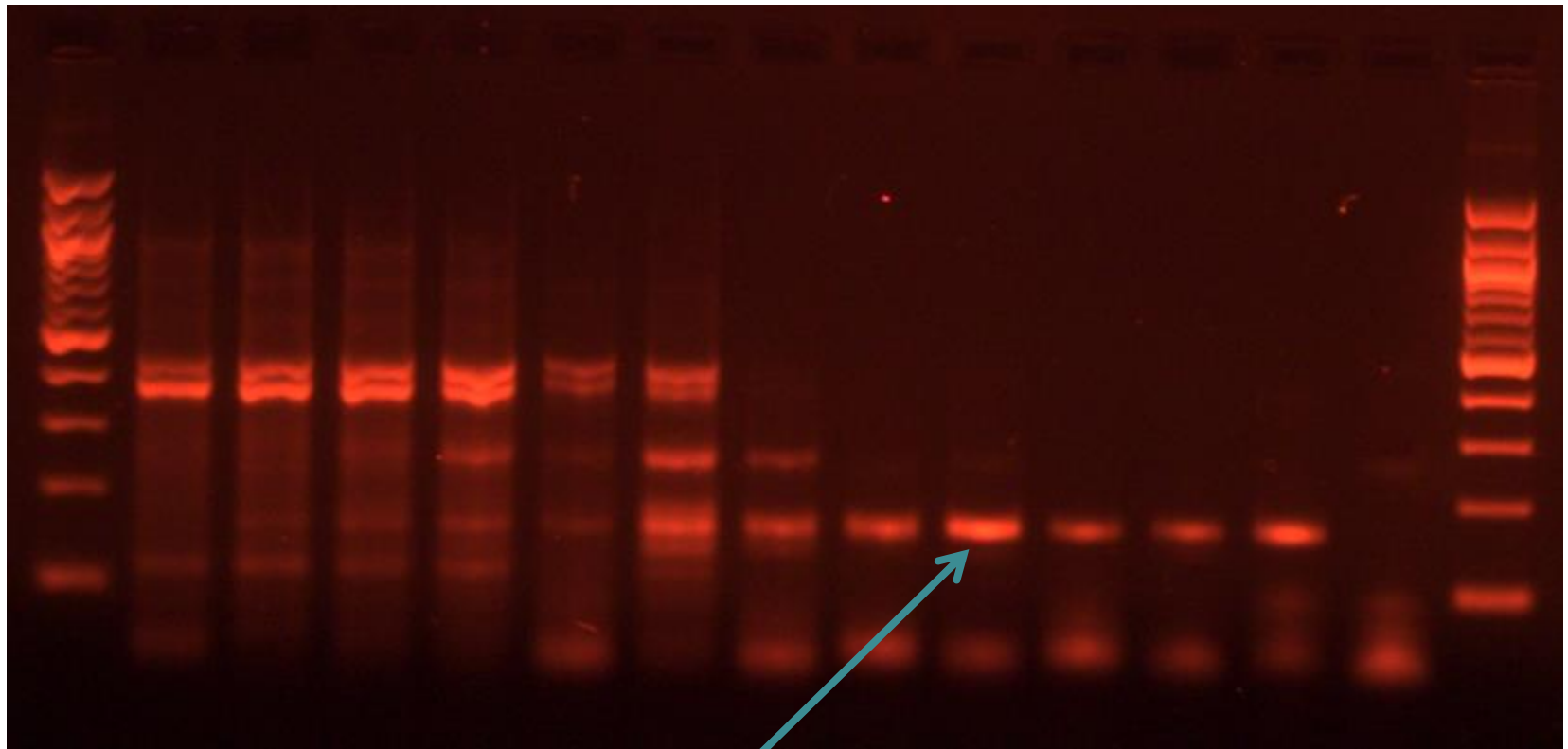


Varianty PCR
v praxi

- rozhodující pro specificitu PCR
- vysoká teplota = primery se nepřipojí
- nízká teplota = vznikají nespecifické produkty

Vliv T_a na PCR

teplota



Optimální teplota

Teplota připojení primerů

Princip
PCR

Parametry
PCR

Technické
provedení PCR

Varianty PCR
v praxi

T_m (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_a (annealing temperature)

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

$$T_a = T_m - (3-5^\circ\text{C})$$

Výpočet T_m a T_a – příklad

Princip
PCR

Parametry
PCR

Technické
provedení PCR

Varianty PCR
v praxi

Jakou T_m a T_a mají tyto primery?

Primer forward 5' - AAA GTT CGC TCA GGT ACG - 3'

Primer reverse 5' - CGT ACG CAT CGT GCG AGC - 3'

Výpočet T_a – příklad

Princip
PCR

Primer forward 5' - AAA GTT CGC TCA GGT ACG - 3'

$T_m = 54^\circ\text{C}$, $T_a = 50^\circ\text{C}$

Parametry
PCR

Primer reverse 5' - CGT ACG CAT CGT GCG AGC - 3'

$T_m = 60^\circ\text{C}$, $T_a = 56^\circ\text{C}$

Technické
provedení PCR

Varianty PCR
v praxi

Ideální annealingová teplota této dvojice oligonukleotidů v experimentu bude 50°C

Syntéza nukleotidových řetězců

Princip
PCR

Parametry
PCR

Technické
provedení PCR

Varianty PCR
v praxi

- probíhá při 72°C
- pro fragmenty o velikosti do 500bp se doporučuje ne delší než 20s
- pro fragmenty do 1,2 kbp asi 40s
- rychlost Taq polymerázy činí 150 připojených nukleotidů/sekundu

Počet cyklů

Princip
PCR



Parametry
PCR



Technické
provedení PCR



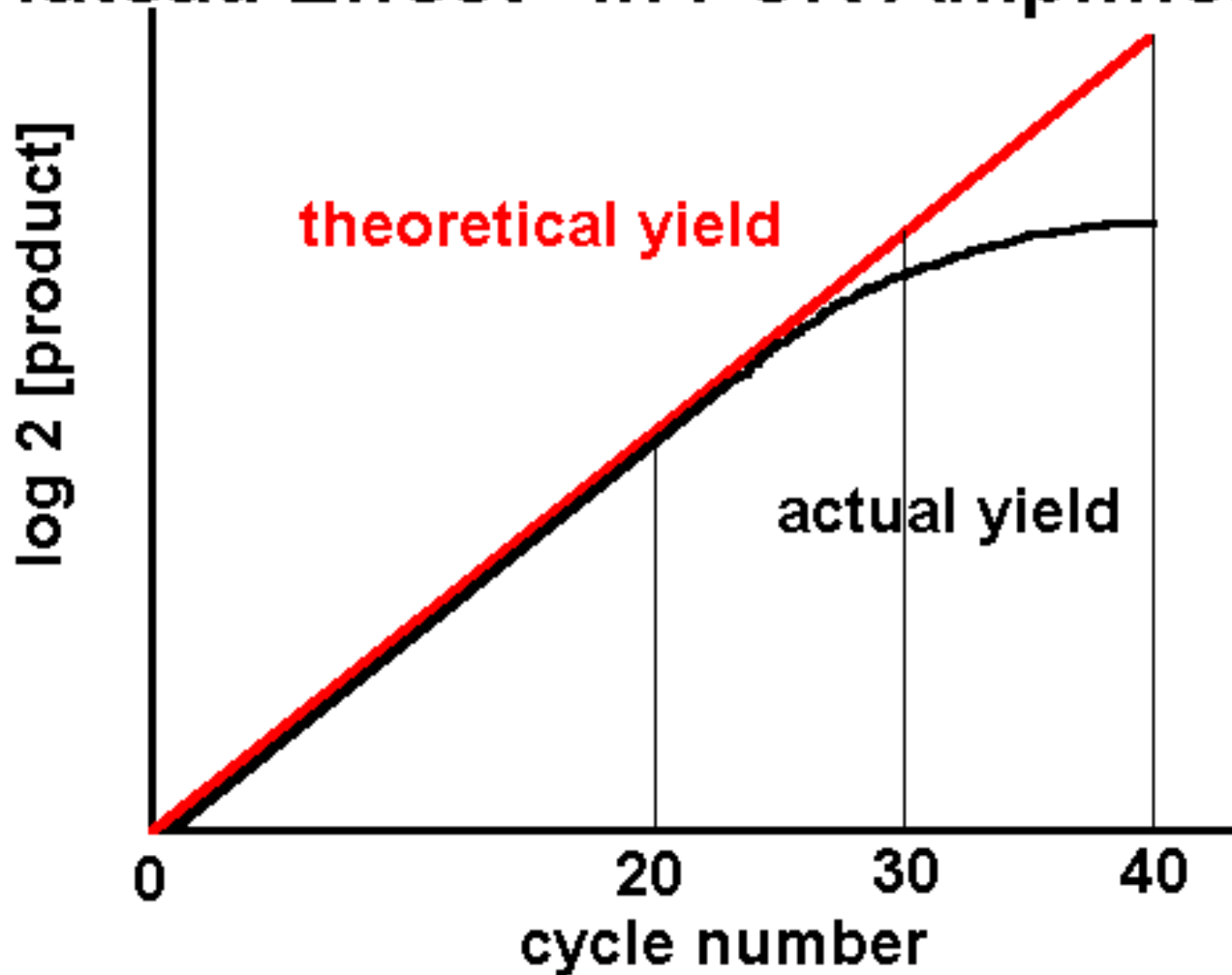
Varianty PCR
v praxi

- 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

Cycle number

"Plateau Effect" in PCR Amplification



Závěrečná extenze

Princip
PCR



Parametry
PCR



Technické
provedení PCR



Varianty PCR
v praxi

- 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 -

Princip
PCR



Parametry
PCR

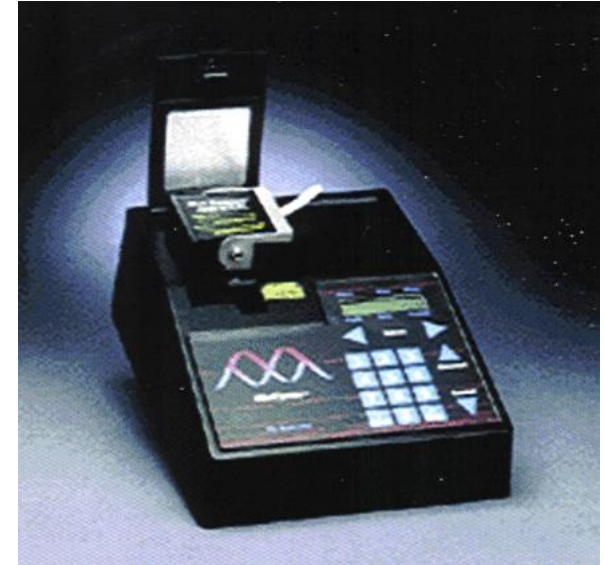


Technické
provedení PCR



Varianty PCR
v praxi

Mikroprocesorem kontrolované
zařízení, které obsahuje kovové
reakční bloky **vyhříváné a chlazené**
polovodiči (Peltierova pumpa),
vodou, vzduchem nebo **mikrovlnami**



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

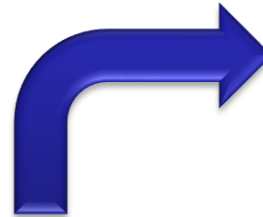
Thermocycler evolution



Far far ago...



"Baby Blue", a 1986 prototype machine for doing PCR



Now



Varianty PCR v praxi

Princip
PCR

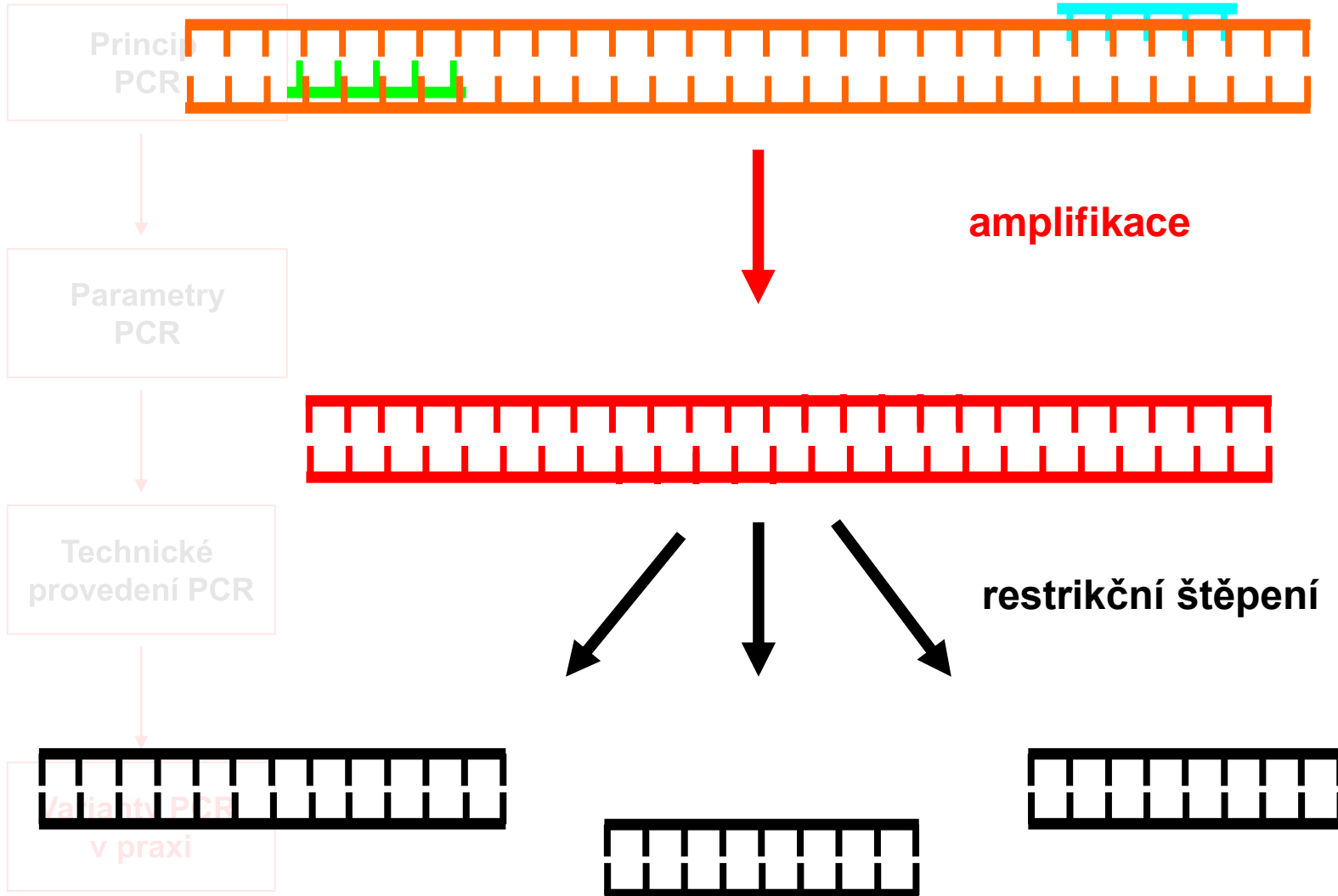
Parametry
PCR

Technické
provedení PCR

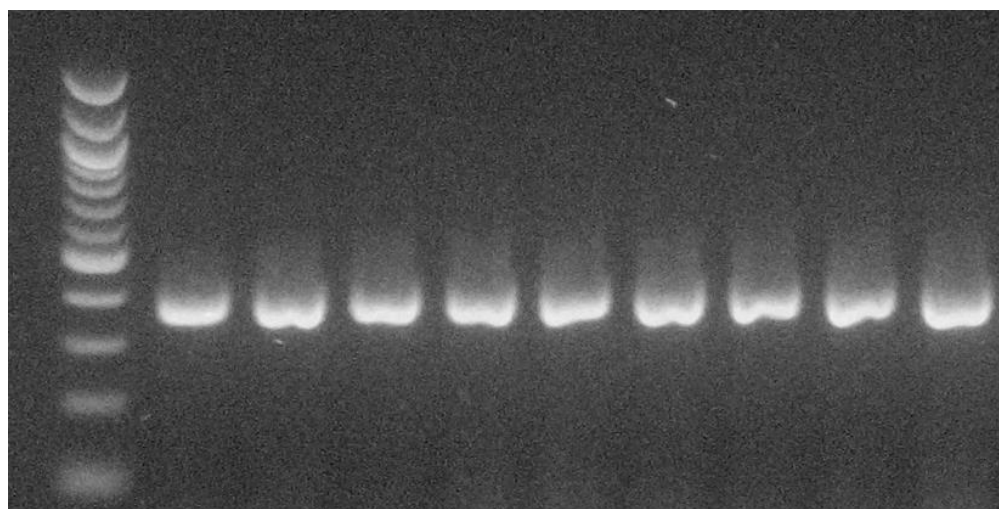
**Varianty PCR
v praxi**

- PCR-REA, PRA, PCR-RFLP
- nested PCR
- multiplex PCR
- kompetitivní PCR
- RT-PCR
- real-time PCR

PCR-REA, PRA, PCR-RFLP

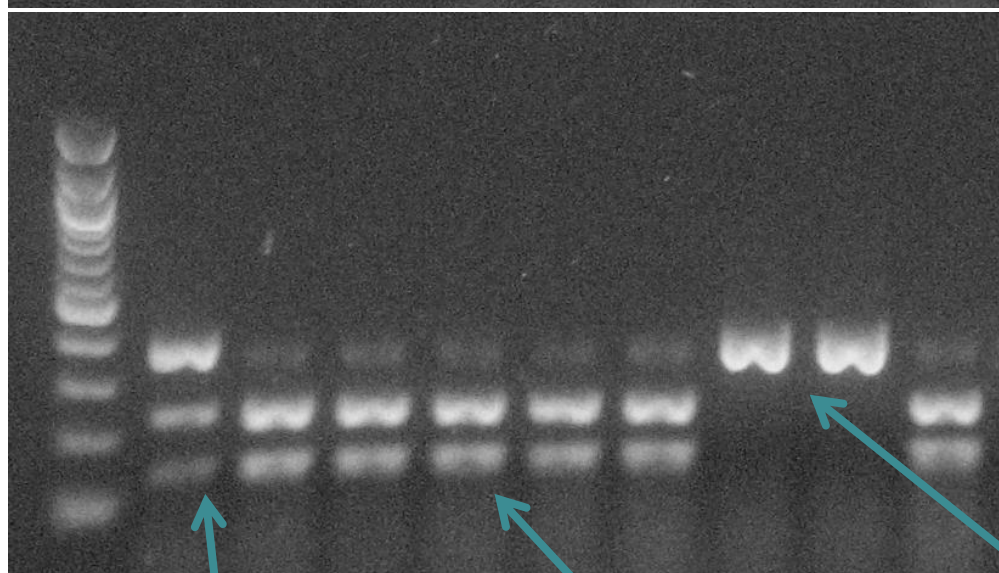


PCR-REA, PRA, PCR-RFLP - example



Uncut

Detection of polymorphism G908R in NOD2 gene



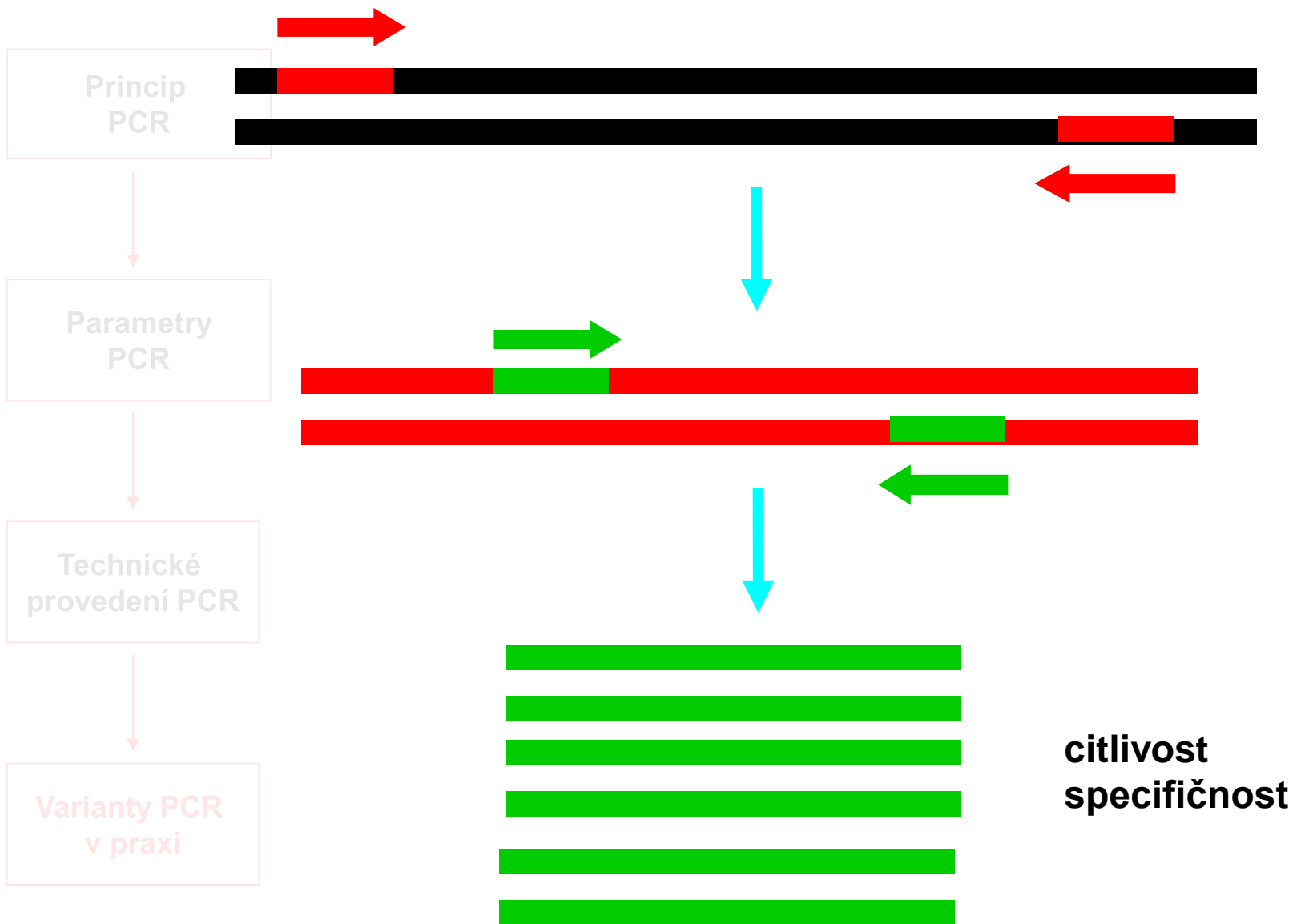
Cut by restriction endonuclease

Heterozygot

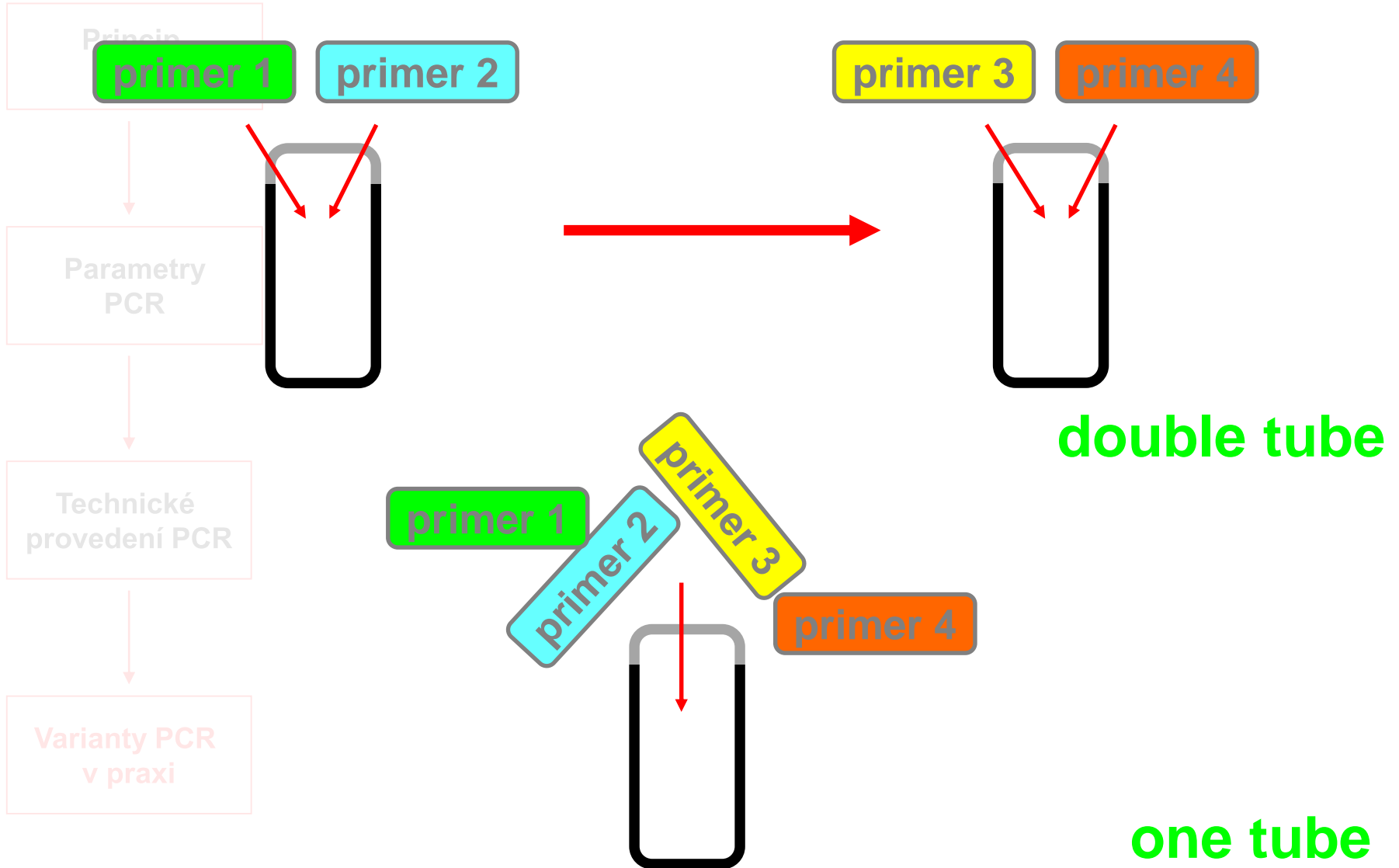
Homozygot 1

Homozygot 2

Nested PCR



Uspořádání nested PCR



One tube nested PCR

$T_m = 65^\circ\text{C}$



$T_m = 65^\circ\text{C}$

20 cyklů PCR

$T_a = 62^\circ\text{C}$

Parametry PCR

$T_m = 58^\circ\text{C}$



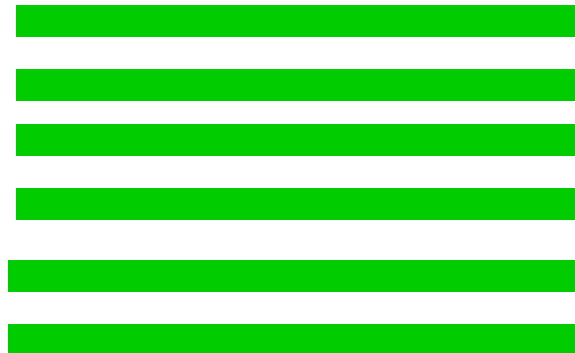
$T_m = 58^\circ\text{C}$

30 cyklů PCR

$T_a = 52^\circ\text{C}$

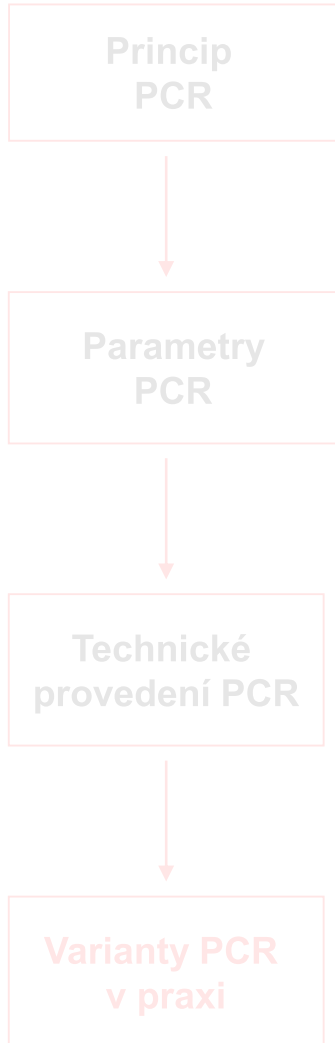
Technické provedení PCR

Varianty PCR v praxi

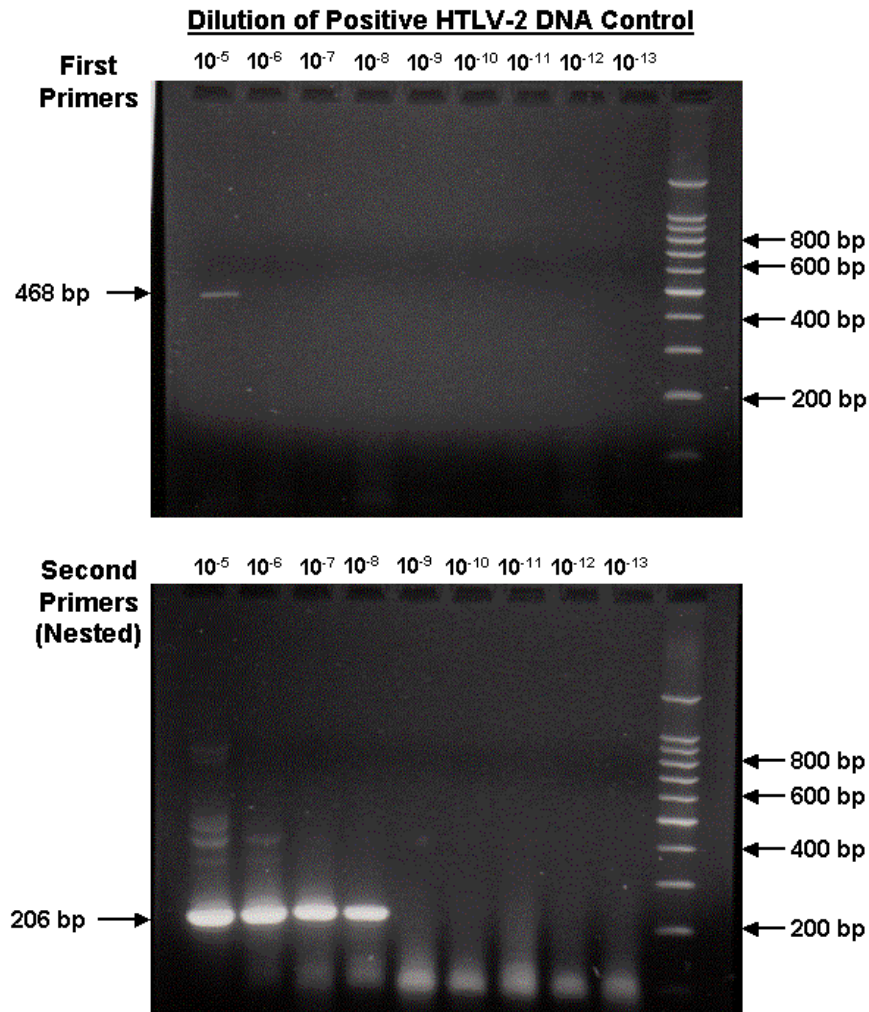


citlivost
specifičnost

Nested PCR/PCR

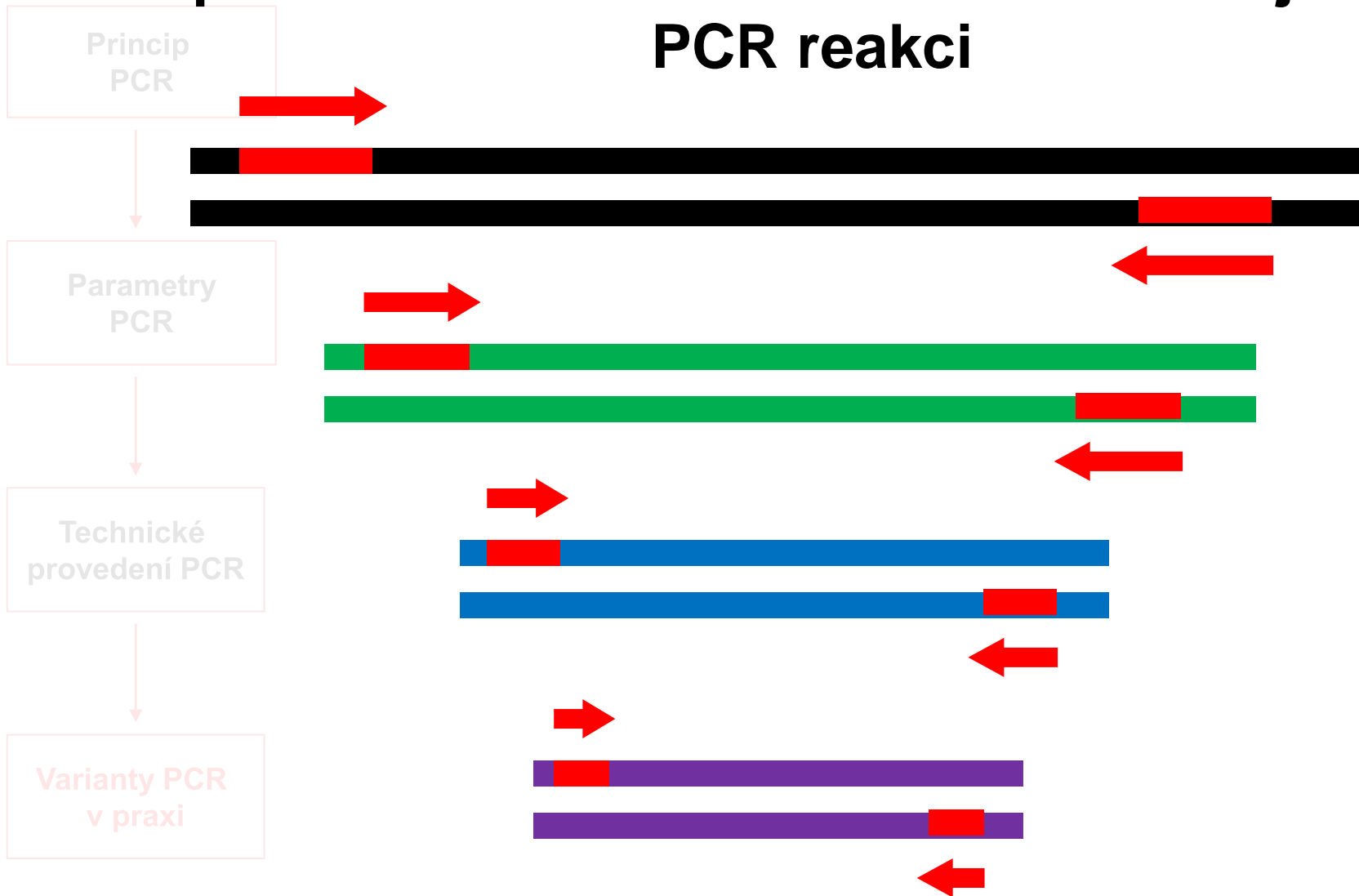


IVP gag HTLV-2 PCR System Titration



Multiplex PCR

Amplifikace několika lokusů současně v jedné PCR reakci



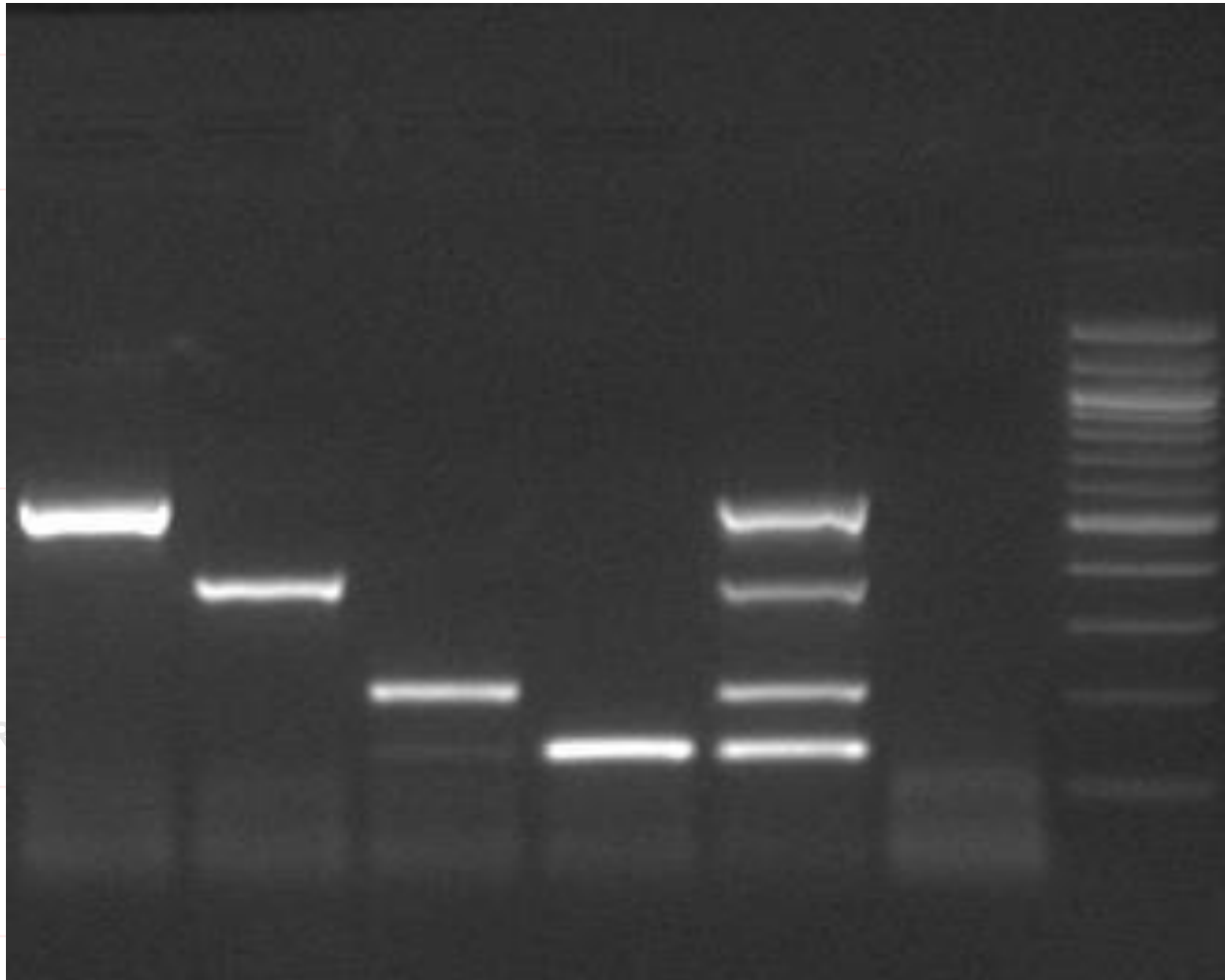
Multiplex PCR

Princip
PCR

Parametry
PCR

Technické
provedení PCR

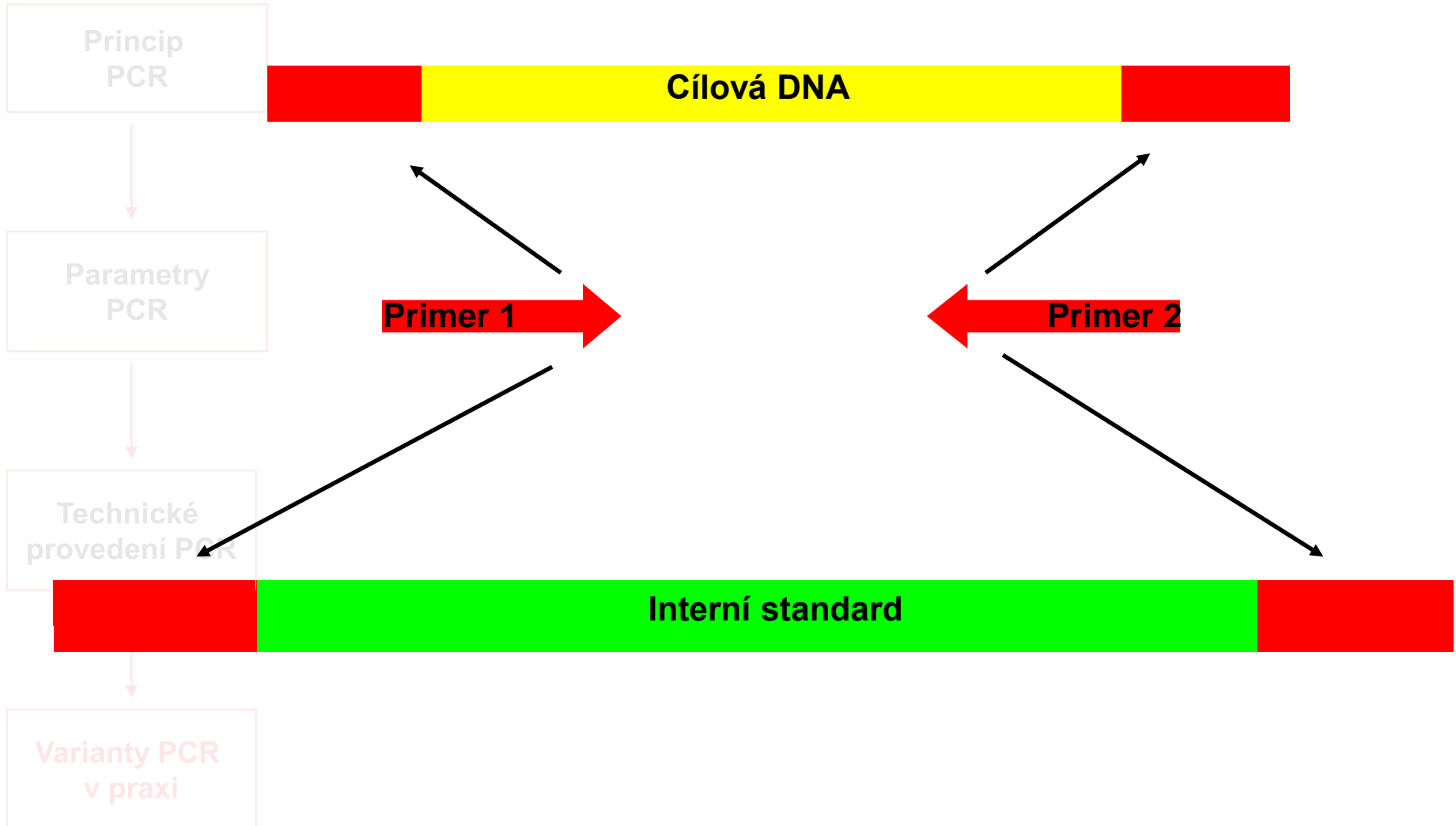
Varianty PCR
v praxi



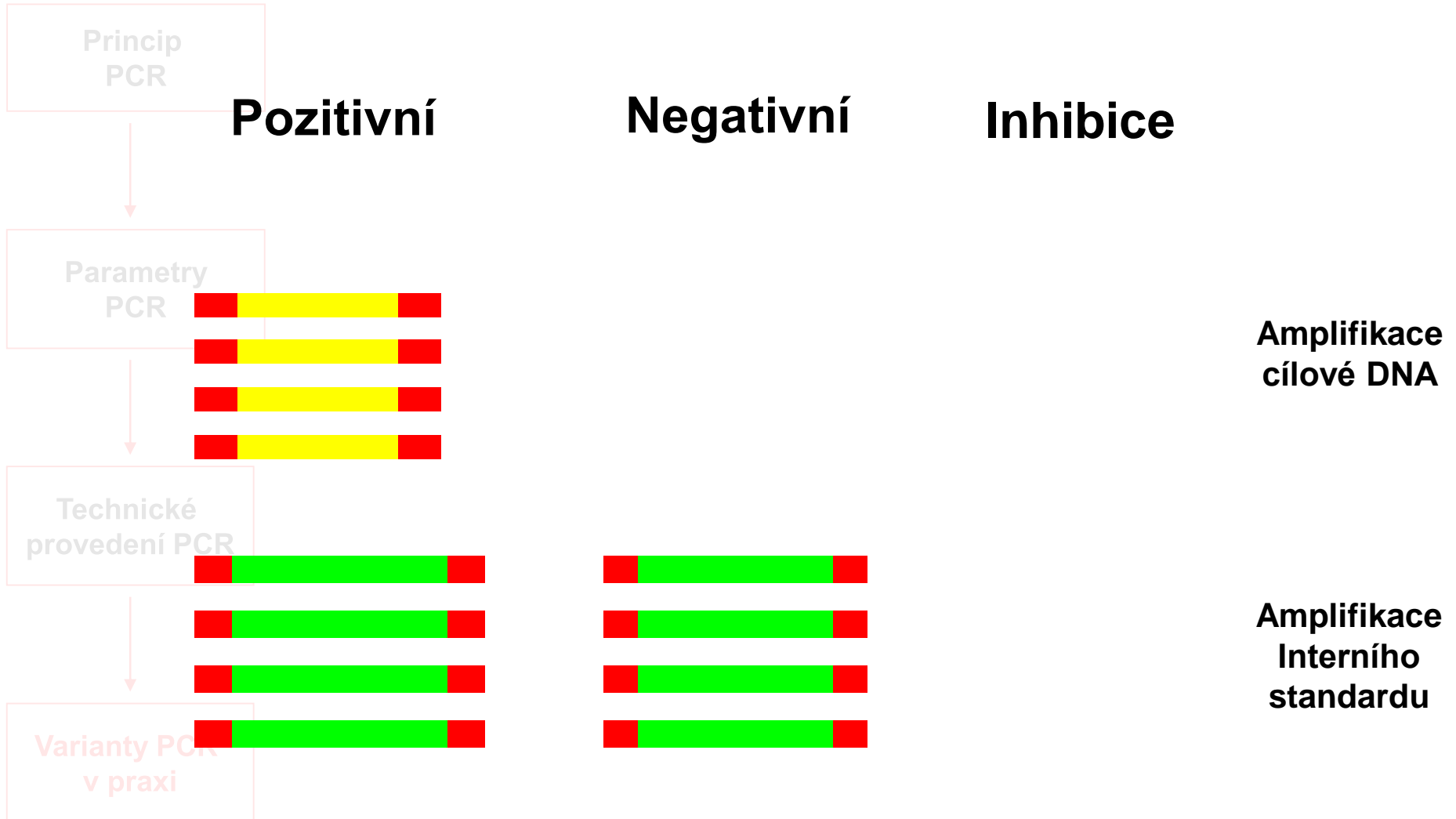
Strategy for the detection and differentiation of *Mycobacterium avium* species in isolates and heavily infected tissues

Moravkova M, Hlozek P, Beran V, Pavlik I, Preziuso S, Cuteri V, Bartos M

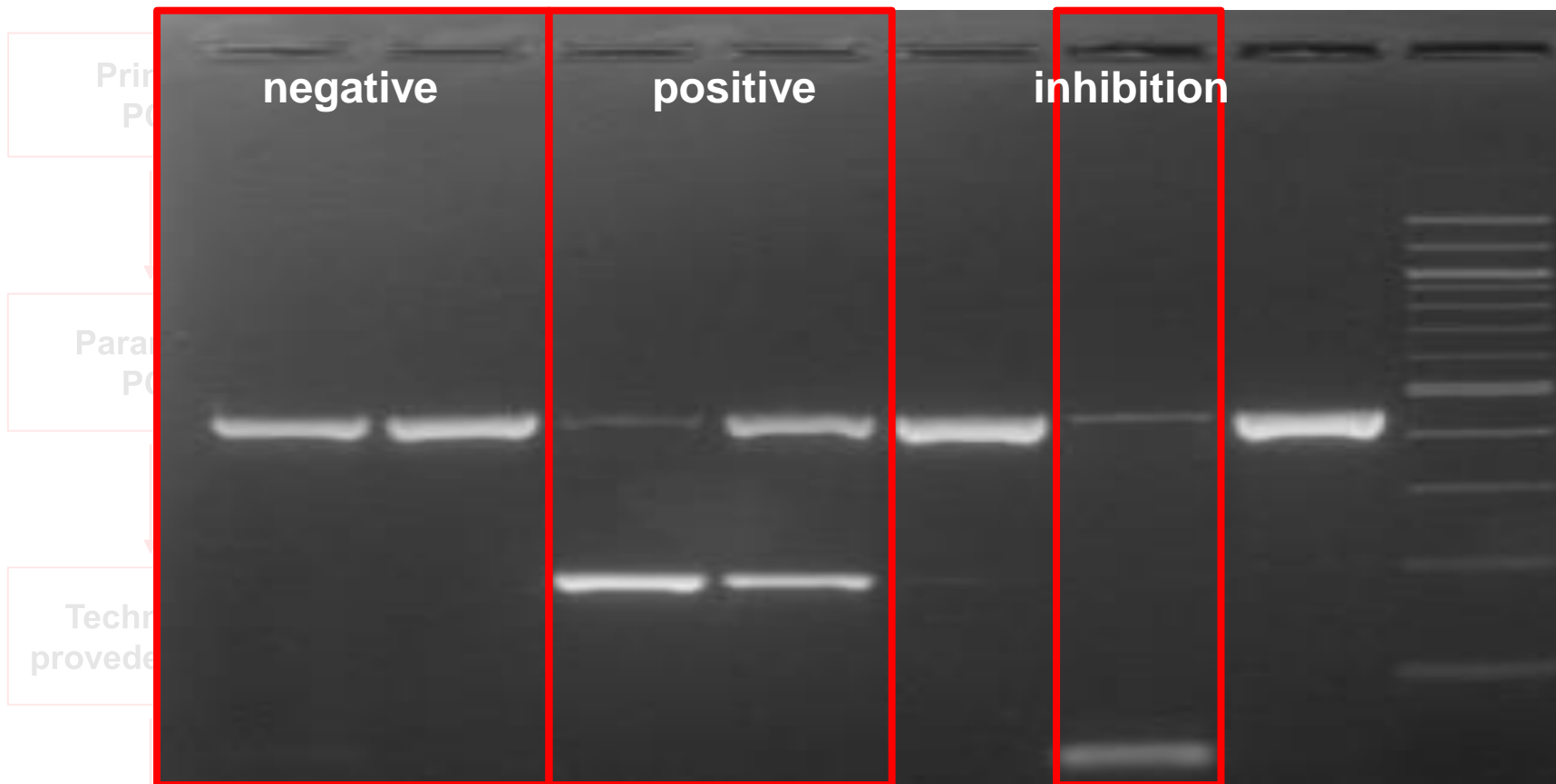
Kompetitivní PCR



Kompetitivní PCR



Kompetitivní PCR



Reverzně transkripční PCR

