

# 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

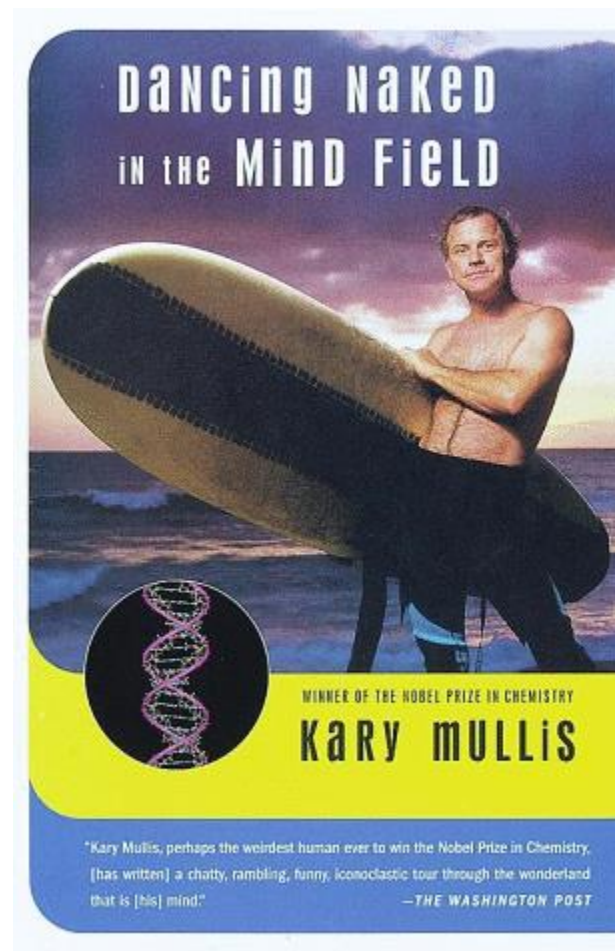
Ústav molekulární farmacie  
FaF MU

# Kdo za to může ?



**Kary Mullis 1985**

**Nobelova cena v roce 1993**



"Kary Mullis, perhaps the weirdest human ever to win the Nobel Prize in Chemistry, [has written] a chatty, rambling, funny, iconoclastic tour through the wonderland that is [his] mind."  
—THE WASHINGTON POST

# 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

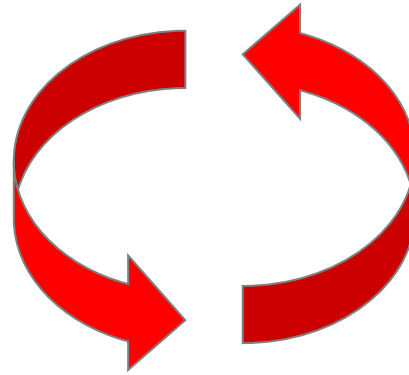


Technické  
provedení PCR



Varianty PCR  
v praxi

Denaturace

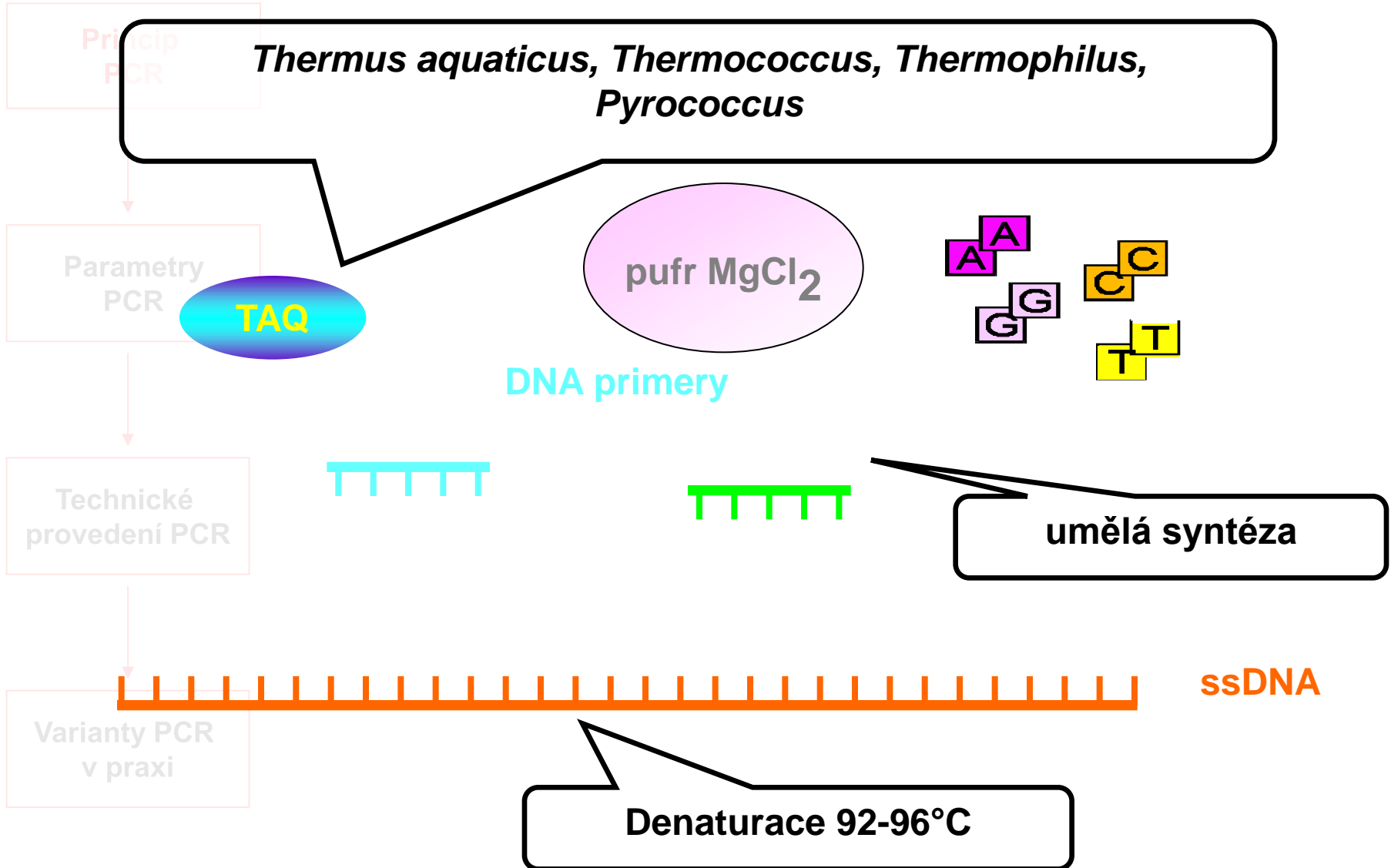


Annealing

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

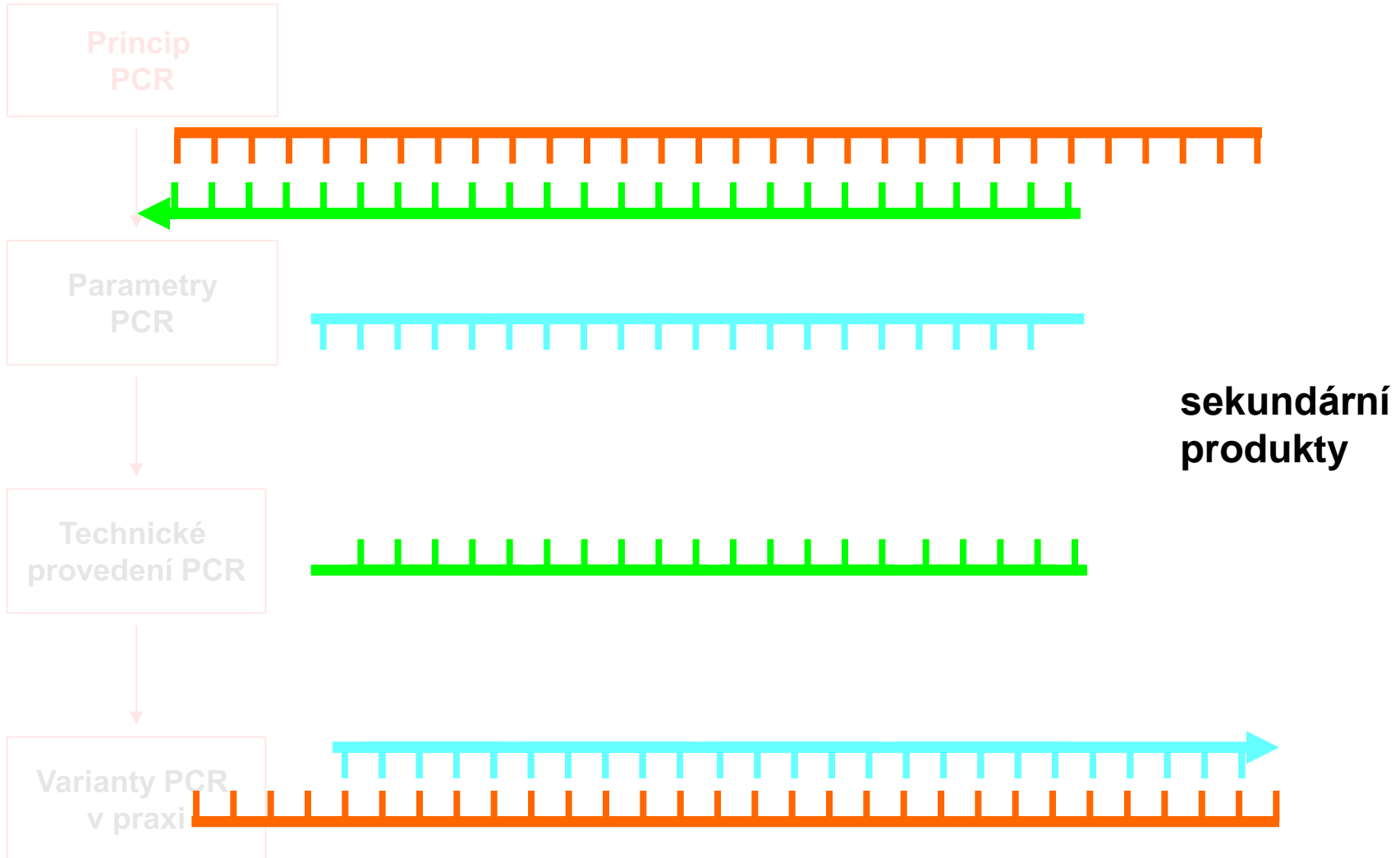
Technické  
provedení PCR

Varianty PCR  
v praxi



# Průběh polymerace

## - 2. PCR cyklus -



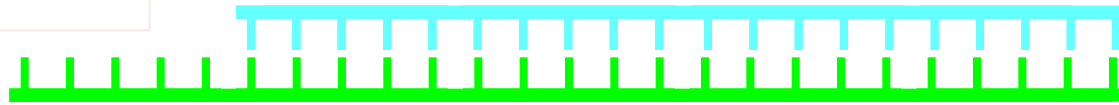
# Průběh polymerace

## - 3. PCR cyklus -

Princip  
PCR



Parametry  
PCR



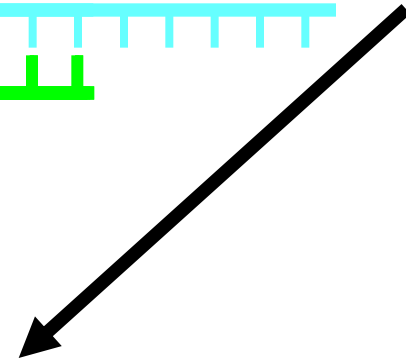
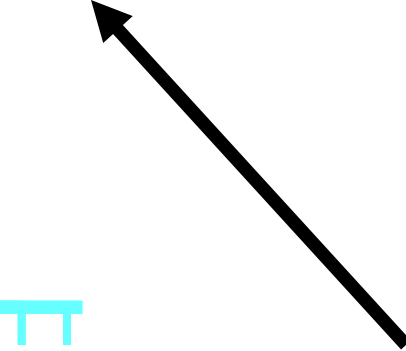
Technické  
provedení PCR



Varianty PCR  
v praxi

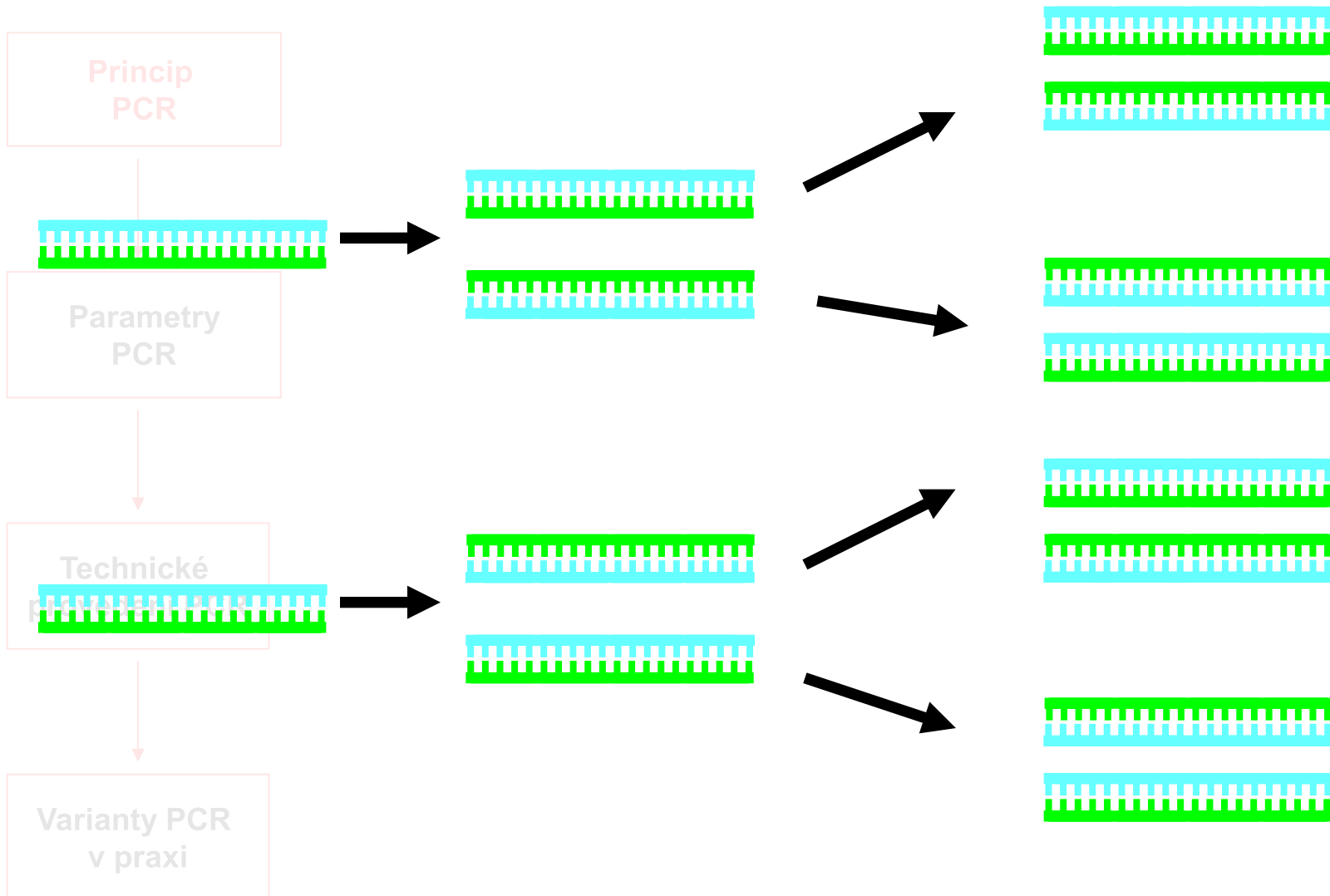


amplikony



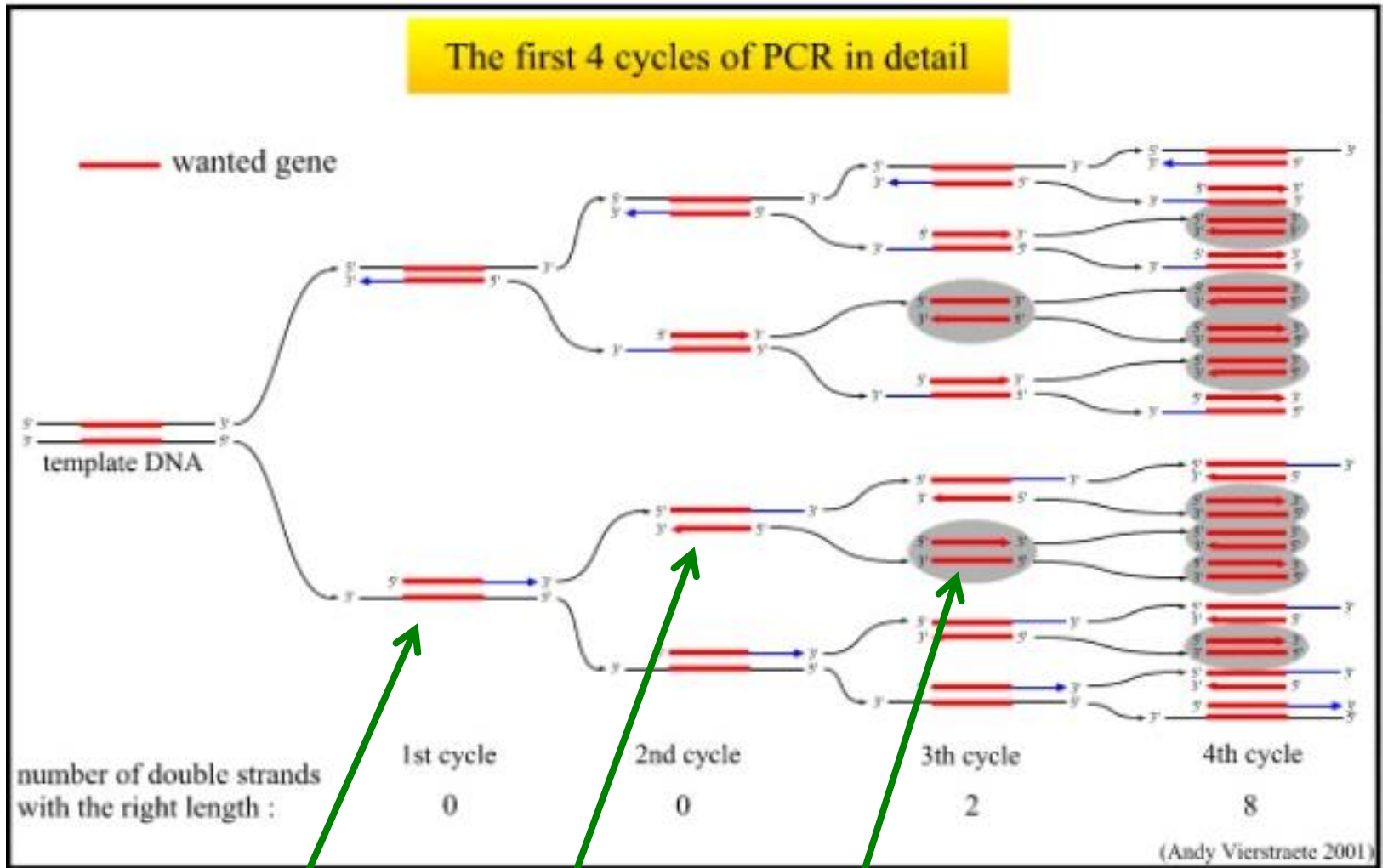
# Průběh polymerace

- 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 <sup>2</sup>
30	2	58	~ 1.1 x 10 <sup>9</sup>	1 024 <sup>3</sup>
40	2	78	~ 1.1 x 10 <sup>12</sup>	1 024 <sup>4</sup>
50	2	98	~ 1.1 x 10 <sup>15</sup>	1 024 <sup>5</sup>

Princip PCR

Parametry PCR

Technické provedení PCR

Variety PCR v praxi

# Princip PCR

- Závěr -

Princip  
PCR

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

Parametry  
PCR

- Počet ampliconů extrémně vzrůstá oproti počtu primárních a sekundárních produktů

Technické  
provedení PCR

- Po několika cyklech už amplicony 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

Princip  
PCR

Parametry  
PCR

Technické  
provedení PCR

Varianty PCR  
v praxi



# 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



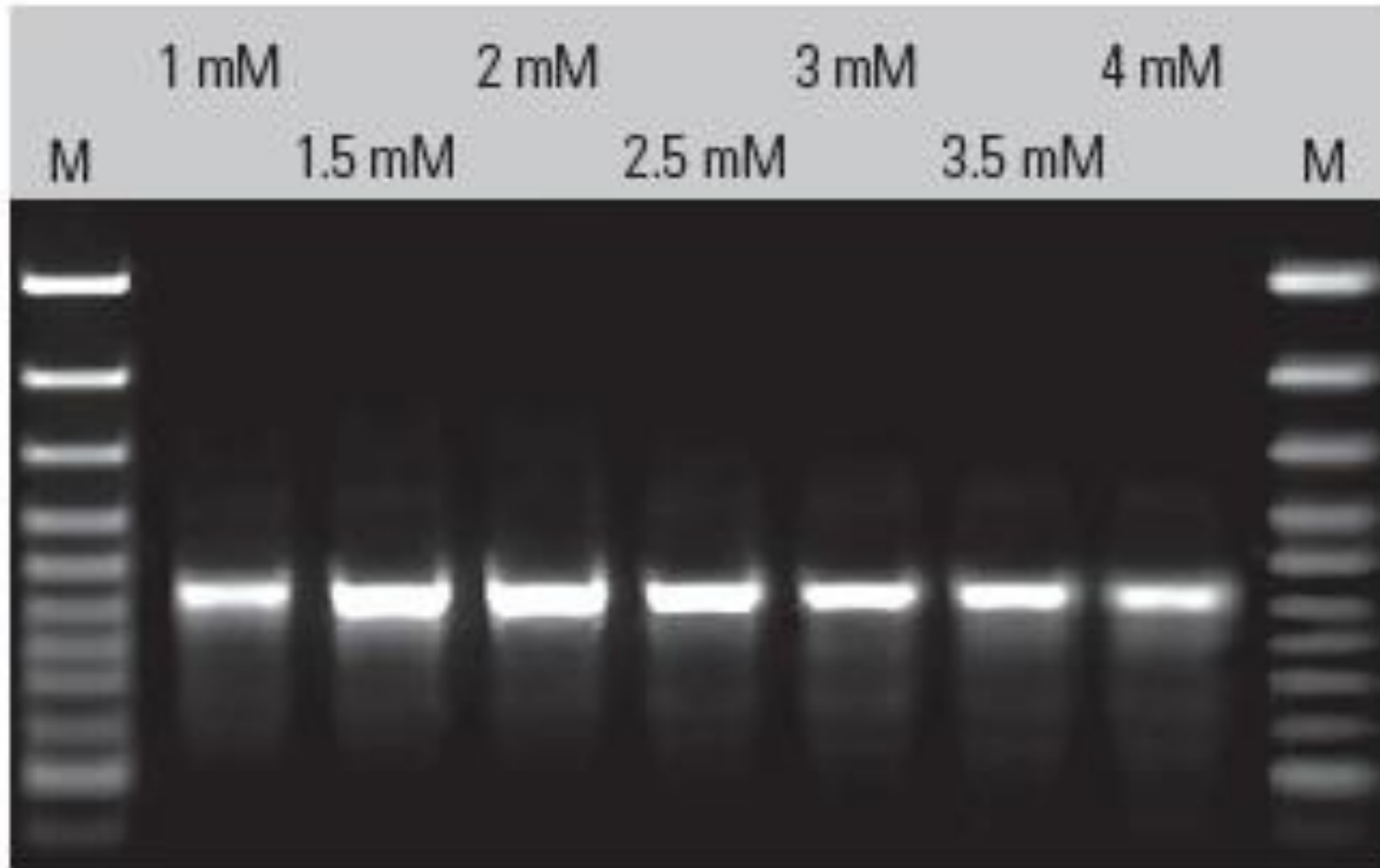
Technické  
provedení PCR



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 Mg<sup>2+</sup> 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  $\mu\text{M}$ , což jsou ale hodnoty nižší, než ty, které se používají při PCR (100-200  $\mu\text{M}$ )

**Nastavení vhodné koncentrace (množství) závisí na:**

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

# Primery

Princip  
PCR

➤ 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

Parametry  
PCR

➤ homogenní rozložení domén bohatých na G/C a A/T

Technické  
provedení PCR

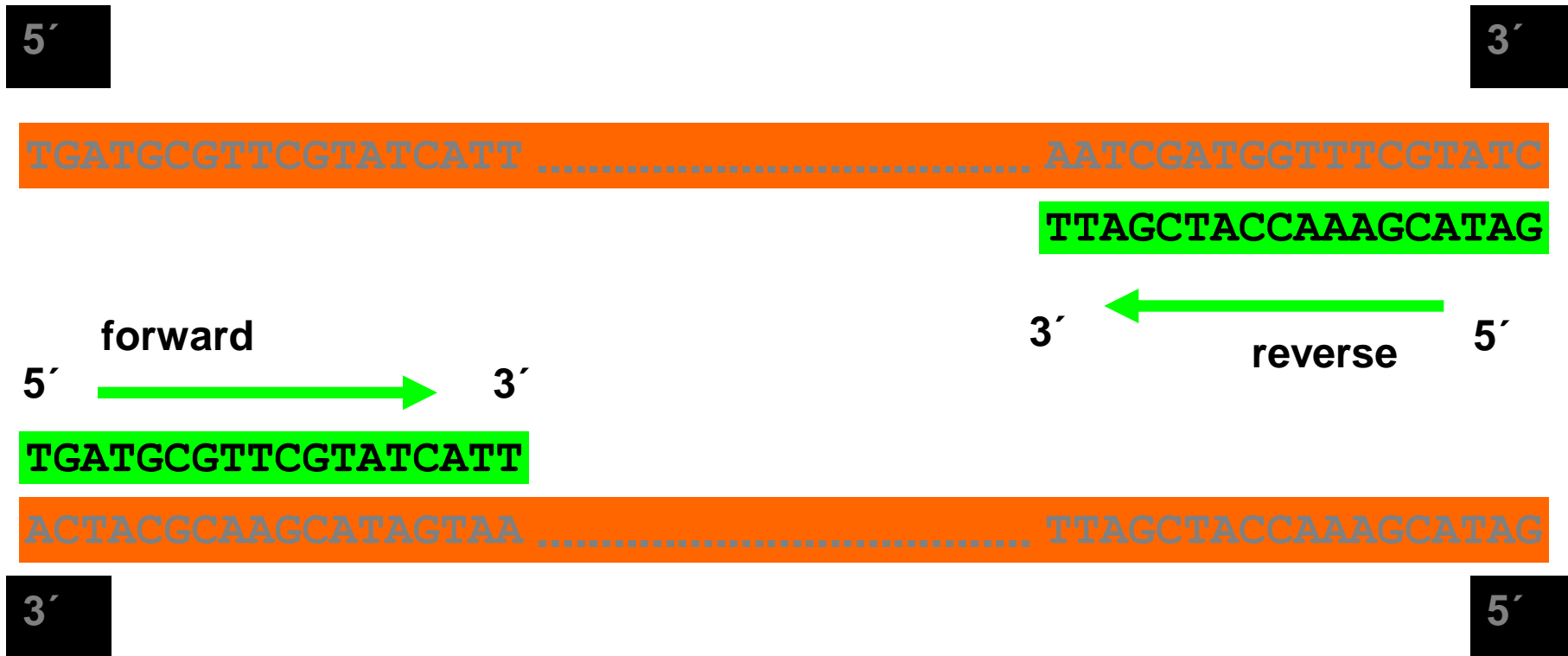
➤ 5'- konec primeru je méně citlivý k mutacím přítomným na templátové DNA

Varianty PCR  
v praxi

➤ koncentrace v rozsahu 0,1 - 1,0  $\mu\text{M}$

# 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  $\mu\text{l}$
- PCR v kapilárách - reakční objemy až 10  $\mu\text{l}$

# 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

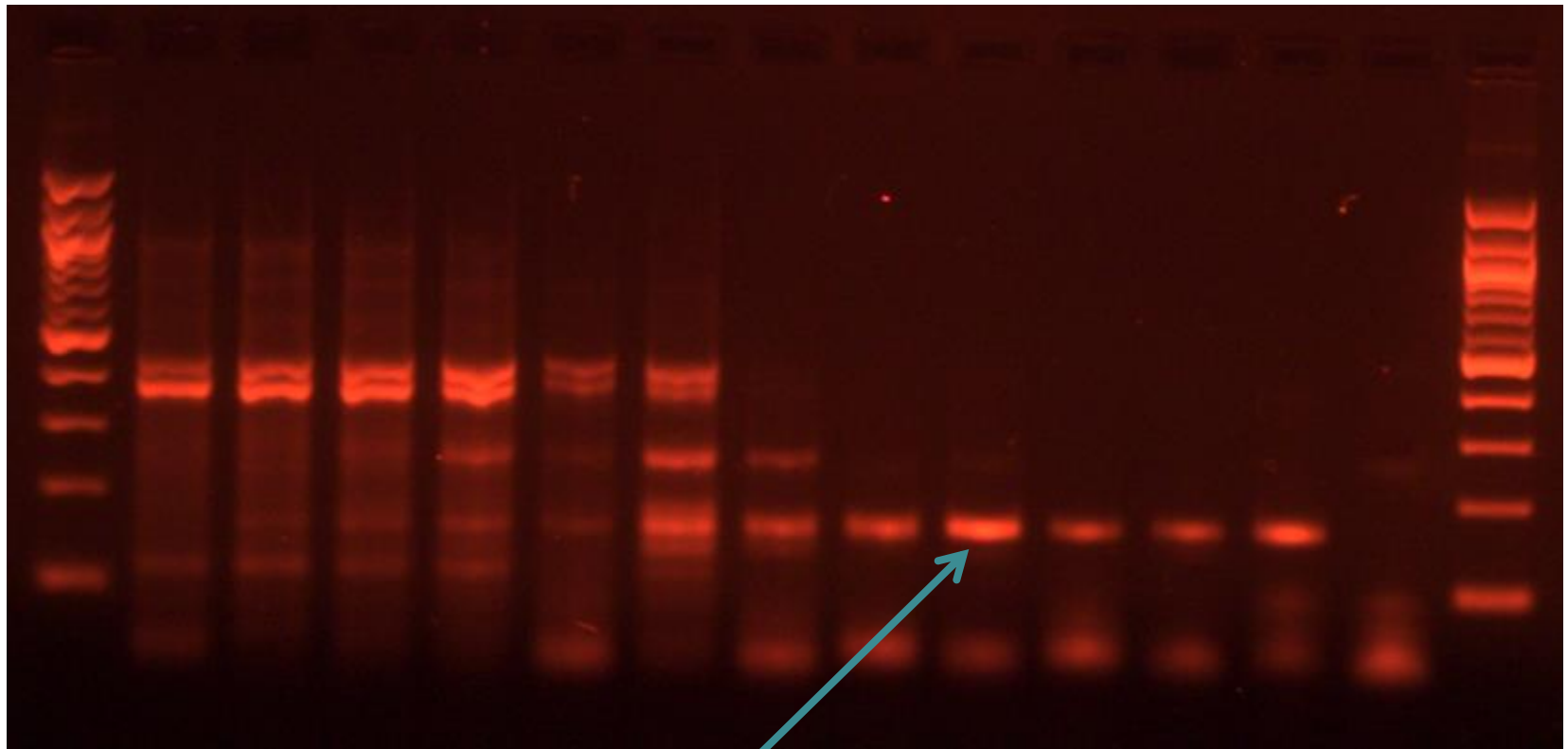


Varianty PCR  
v praxi

- 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  $50^\circ\text{C}$

# 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



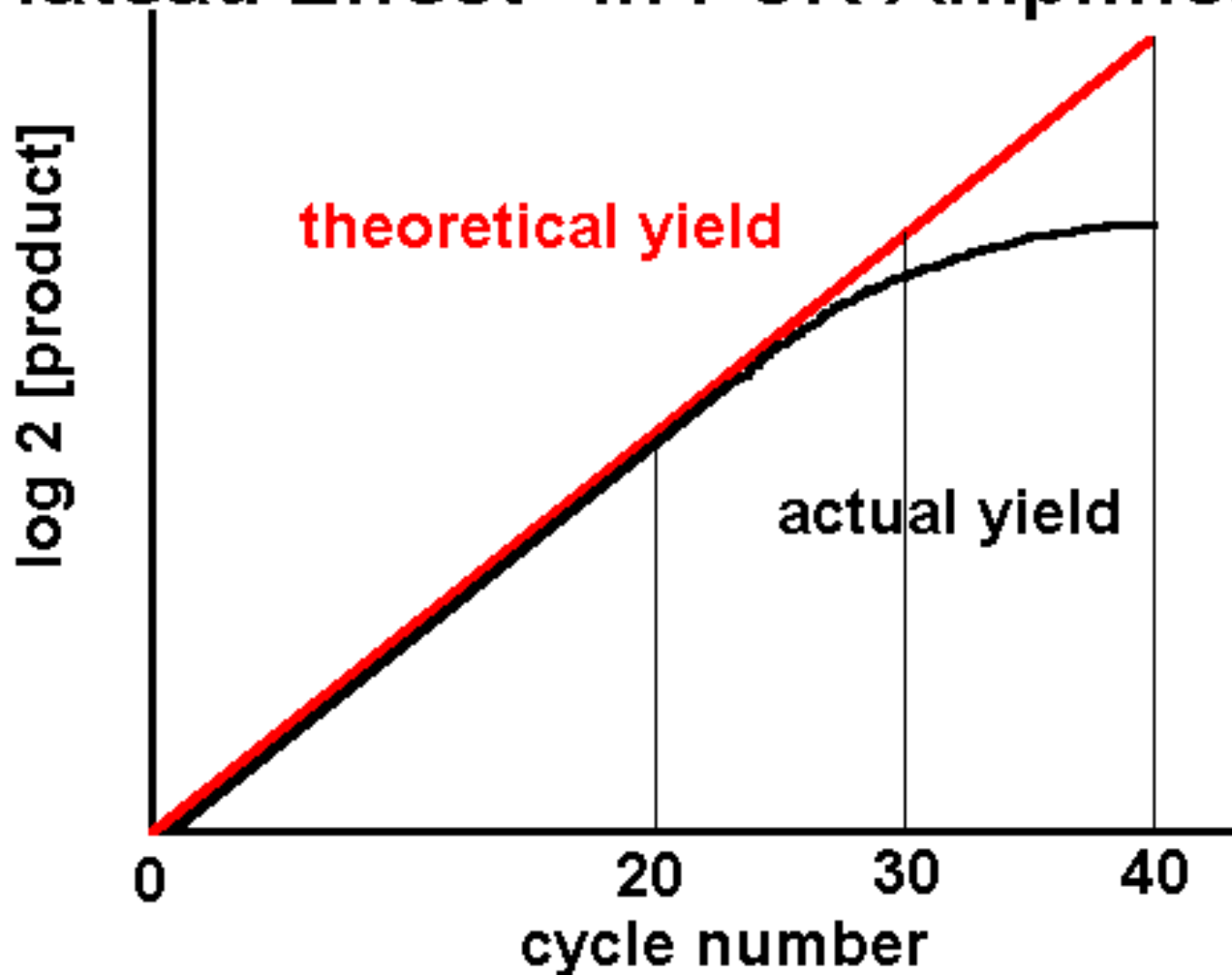
Varianty PCR  
v praxi

- 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 **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

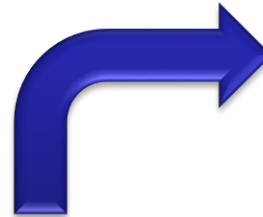
# Thermocycler evolution



Far far ago...



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



Now





# Varianty PCR v praxi

Princip  
PCR

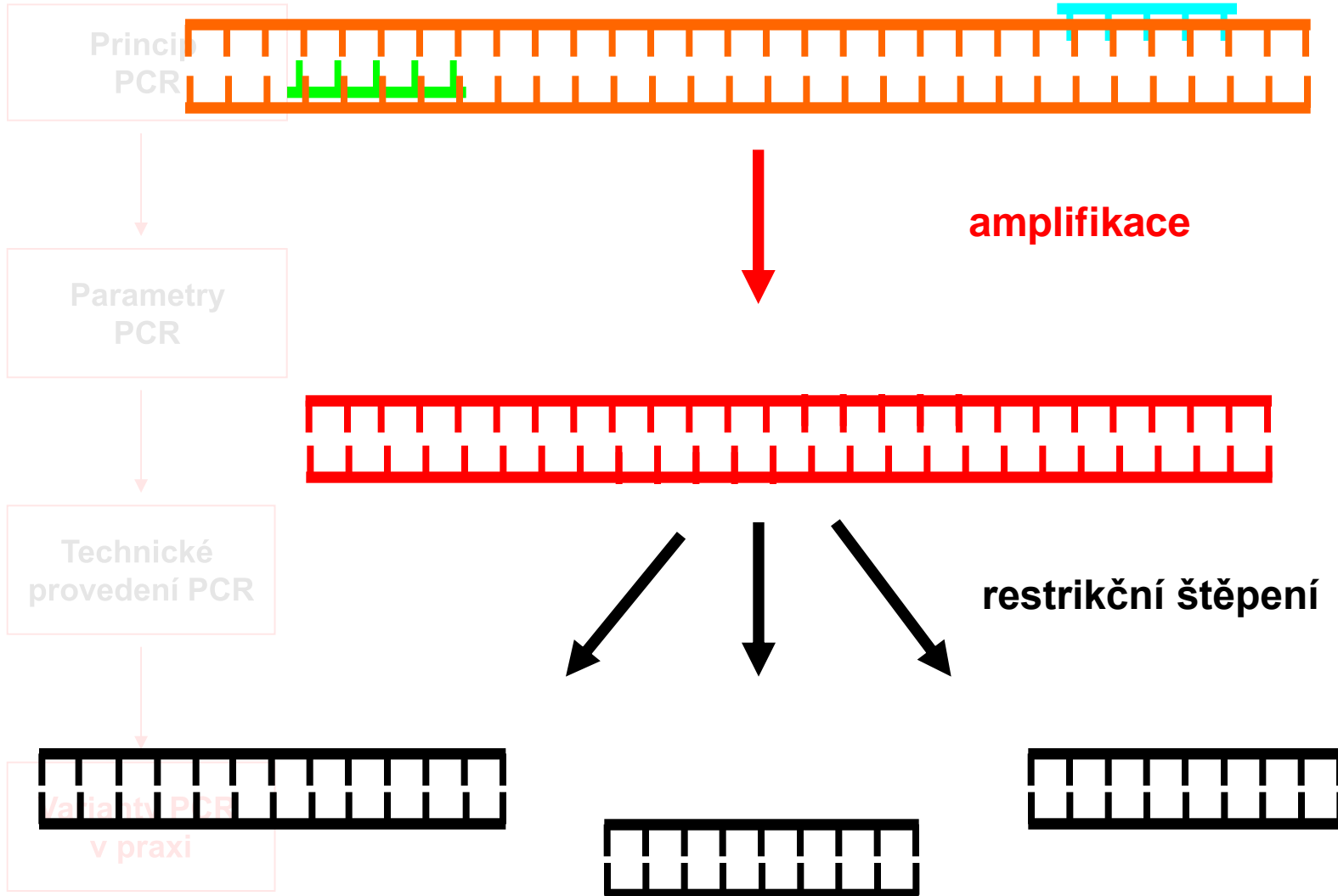
Parametry  
PCR

Technické  
provedení PCR

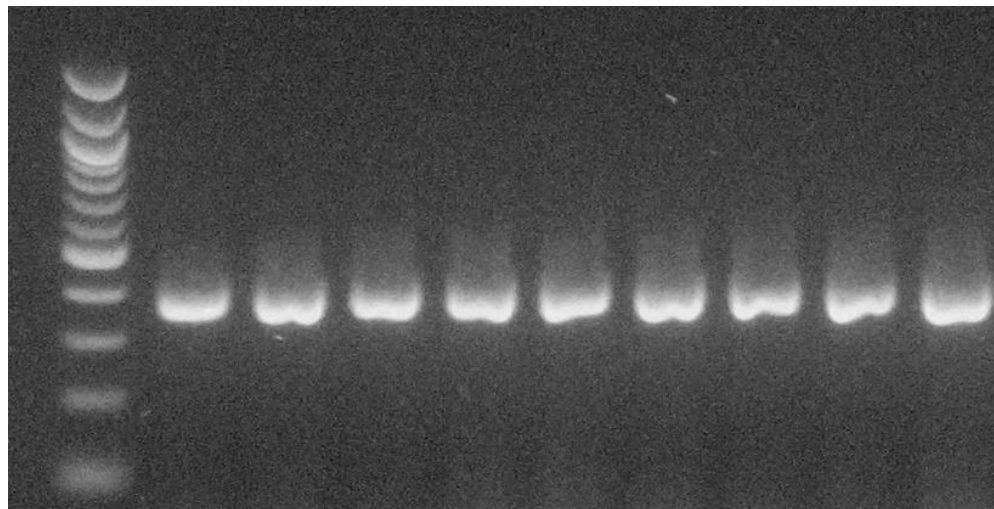
**Varianty PCR  
v praxi**

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

# PCR-REA, PRA, PCR-RFLP

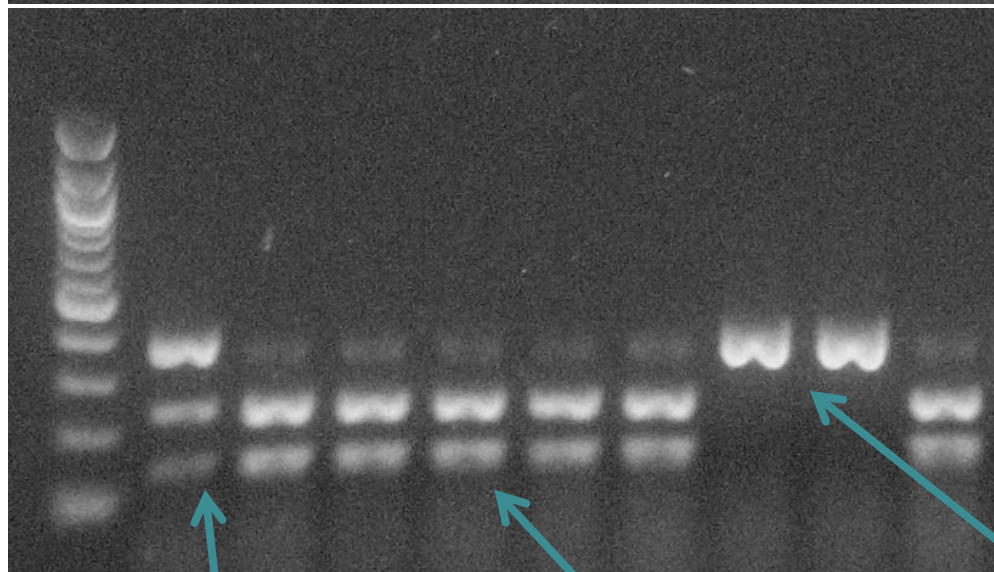


# PCR-REA, PRA, PCR-RFLP - example



Uncut

Detection of polymorphism G908R in NOD2 gene



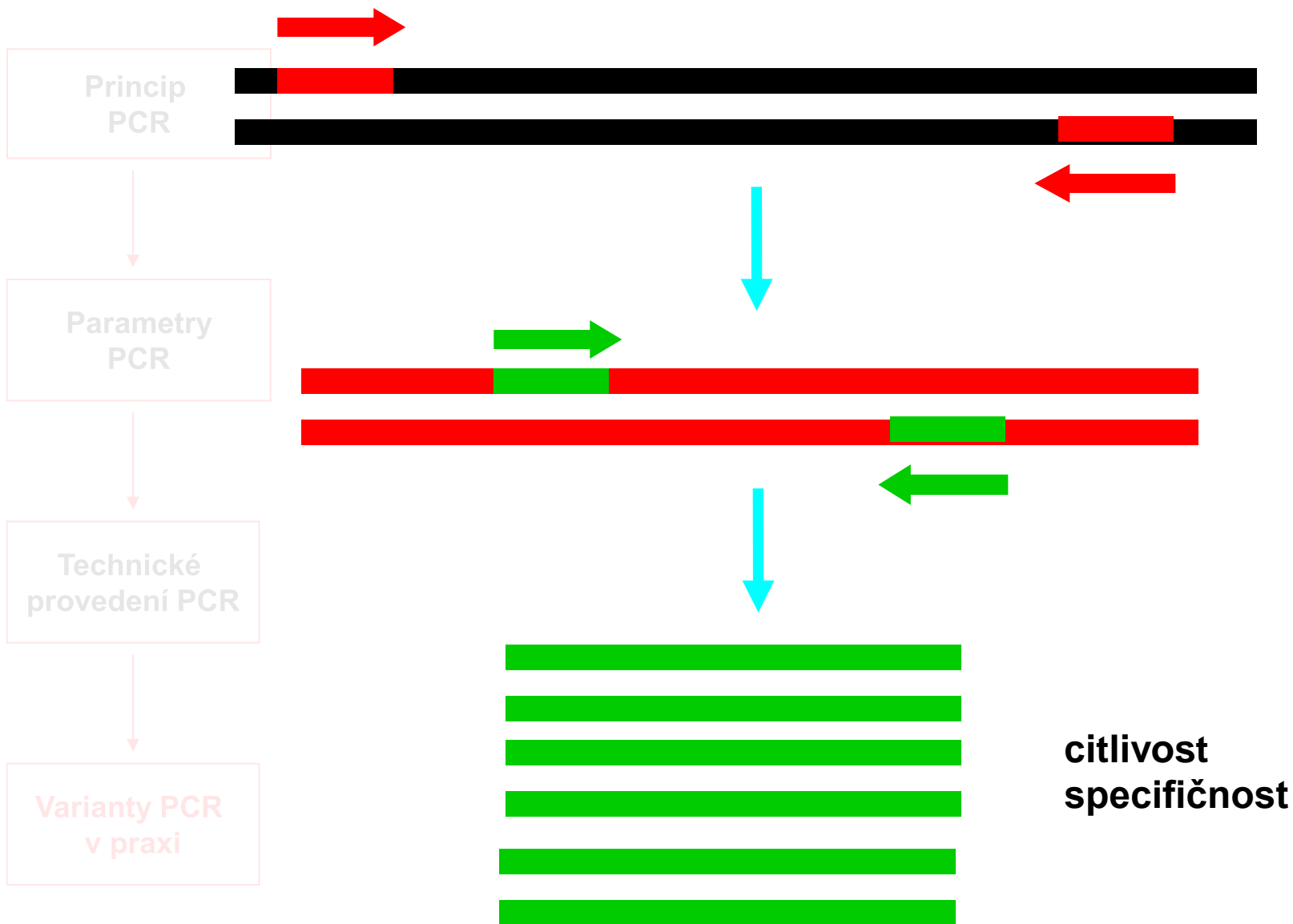
Cut by restriction endonuclease

Heterozygot

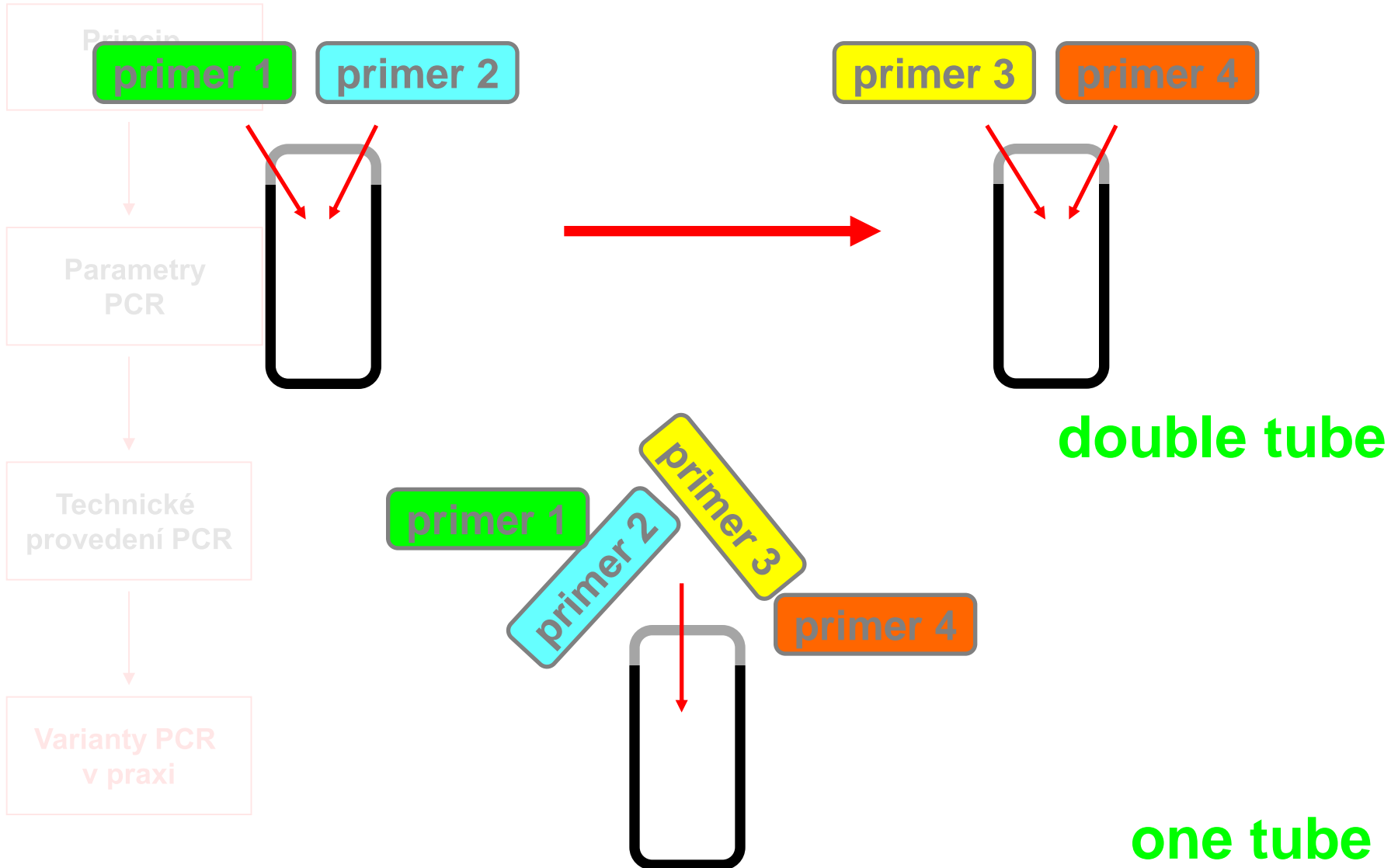
Homozygot 1

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

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

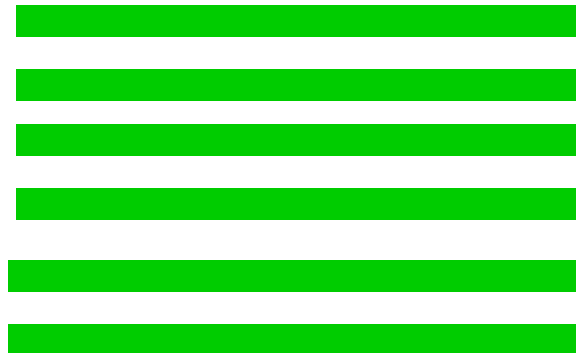


$T_m = 58^\circ\text{C}$

30 cyklů PCR

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

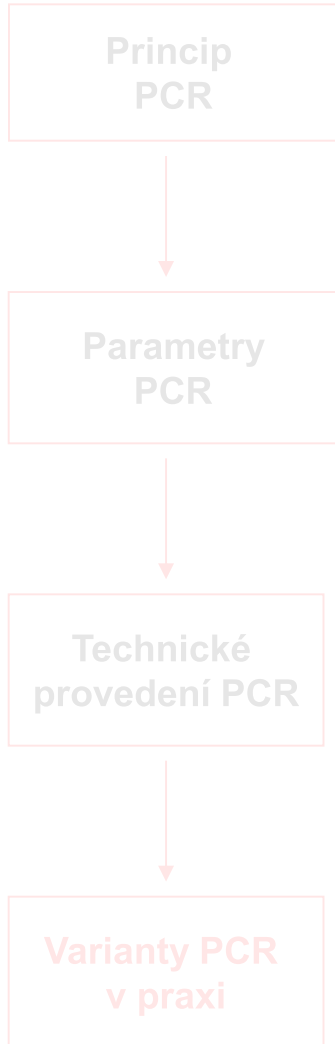
Technické provedení PCR



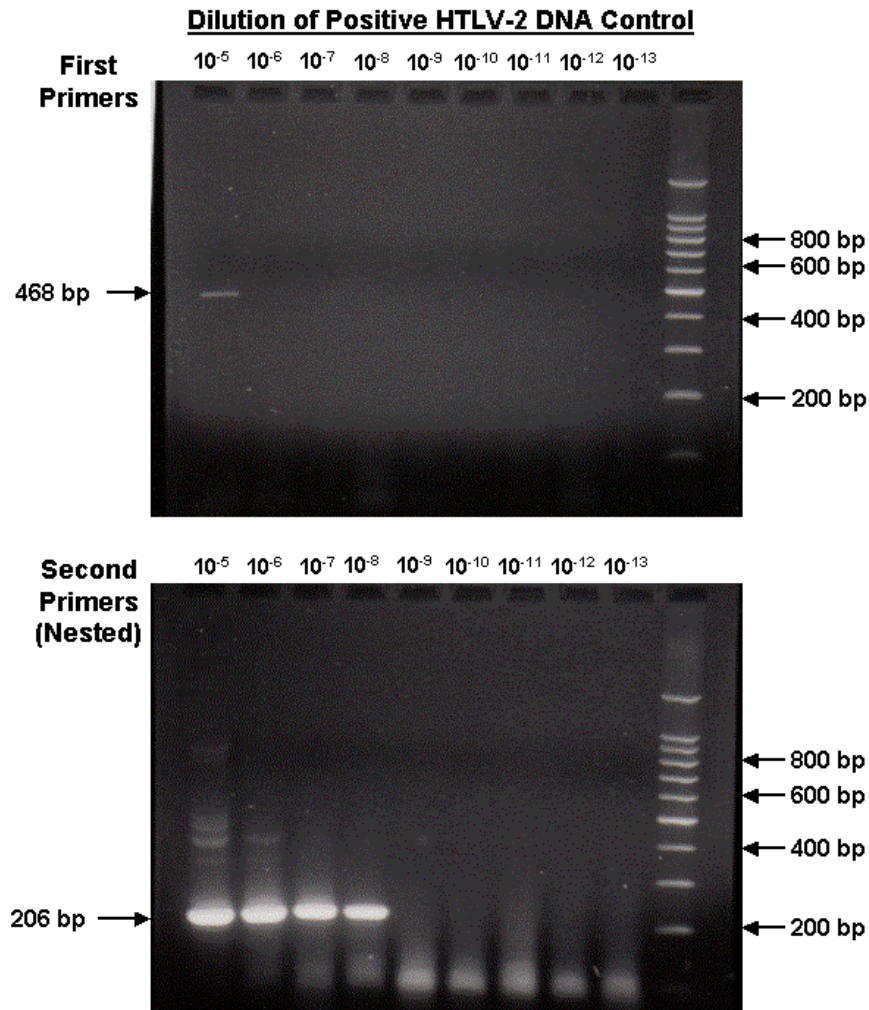
citlivost  
specifičnost

Varianty PCR  
v praxi

# Nested PCR/PCR

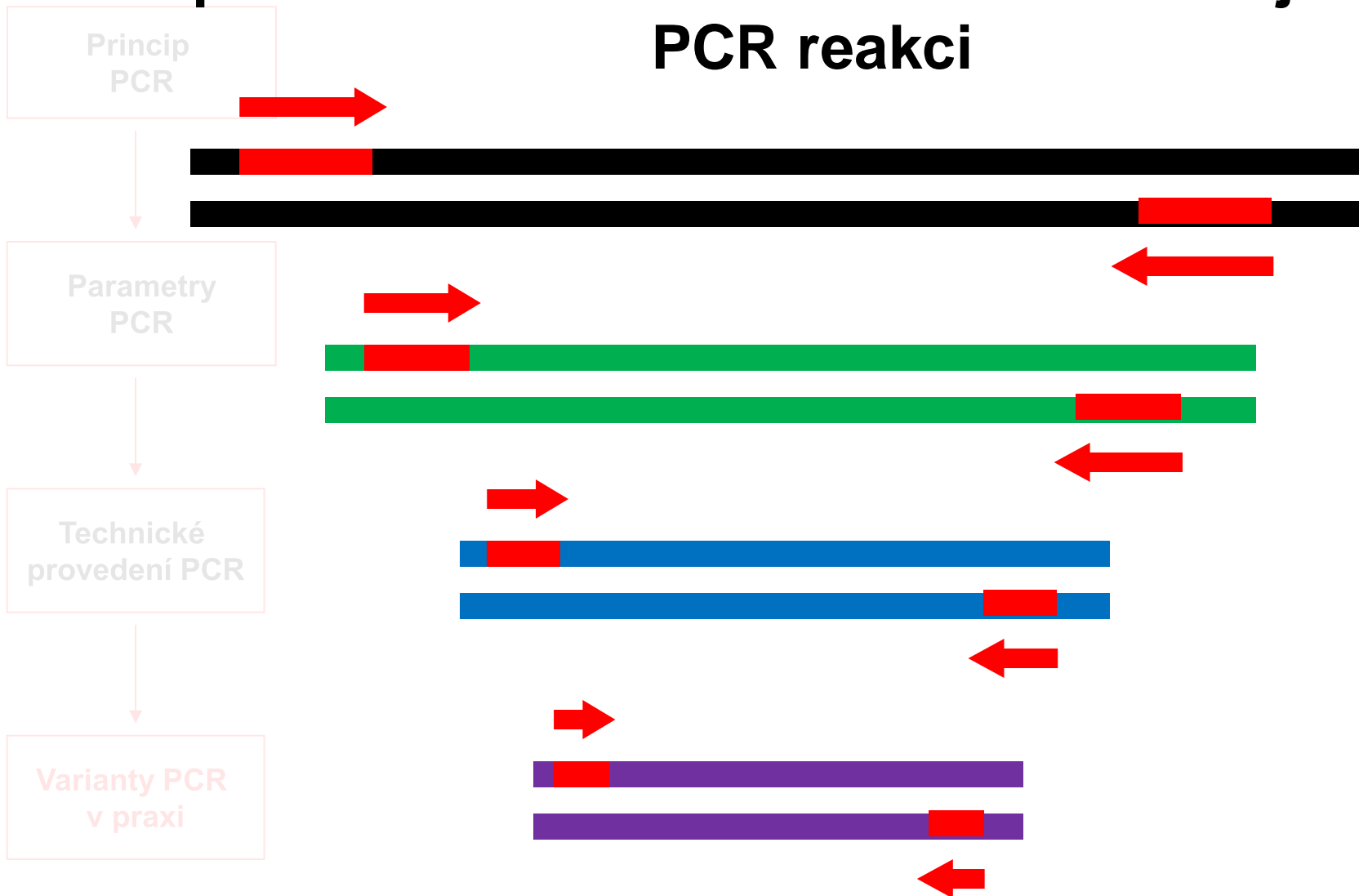


## IVP gag HTLV-2 PCR System Titration



# Multiplex PCR

## Amplifikace několika lokusů současně v jedné PCR reakci





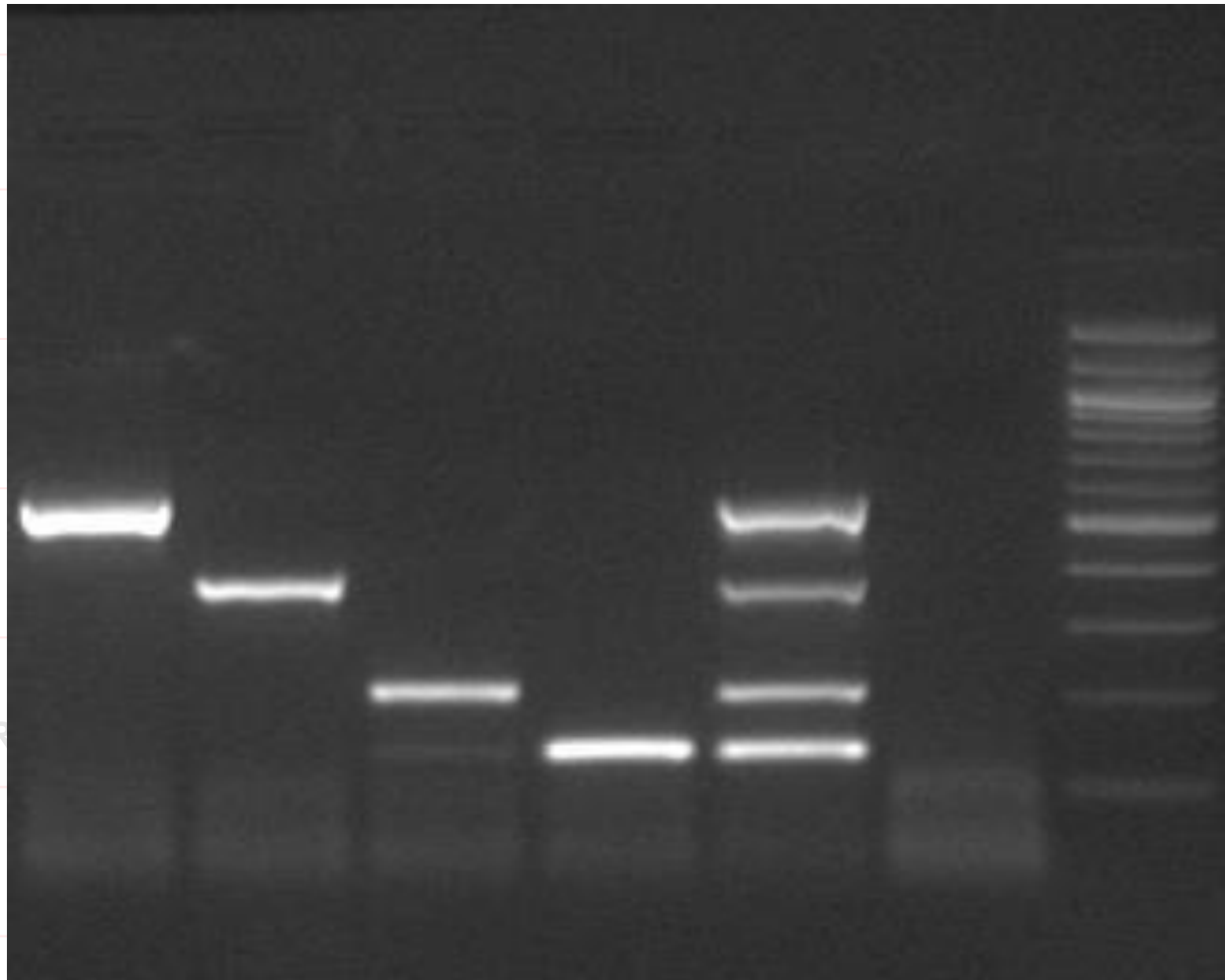
# Multiplex PCR

Princip  
PCR

Parametry  
PCR

Technické  
provedení PCR

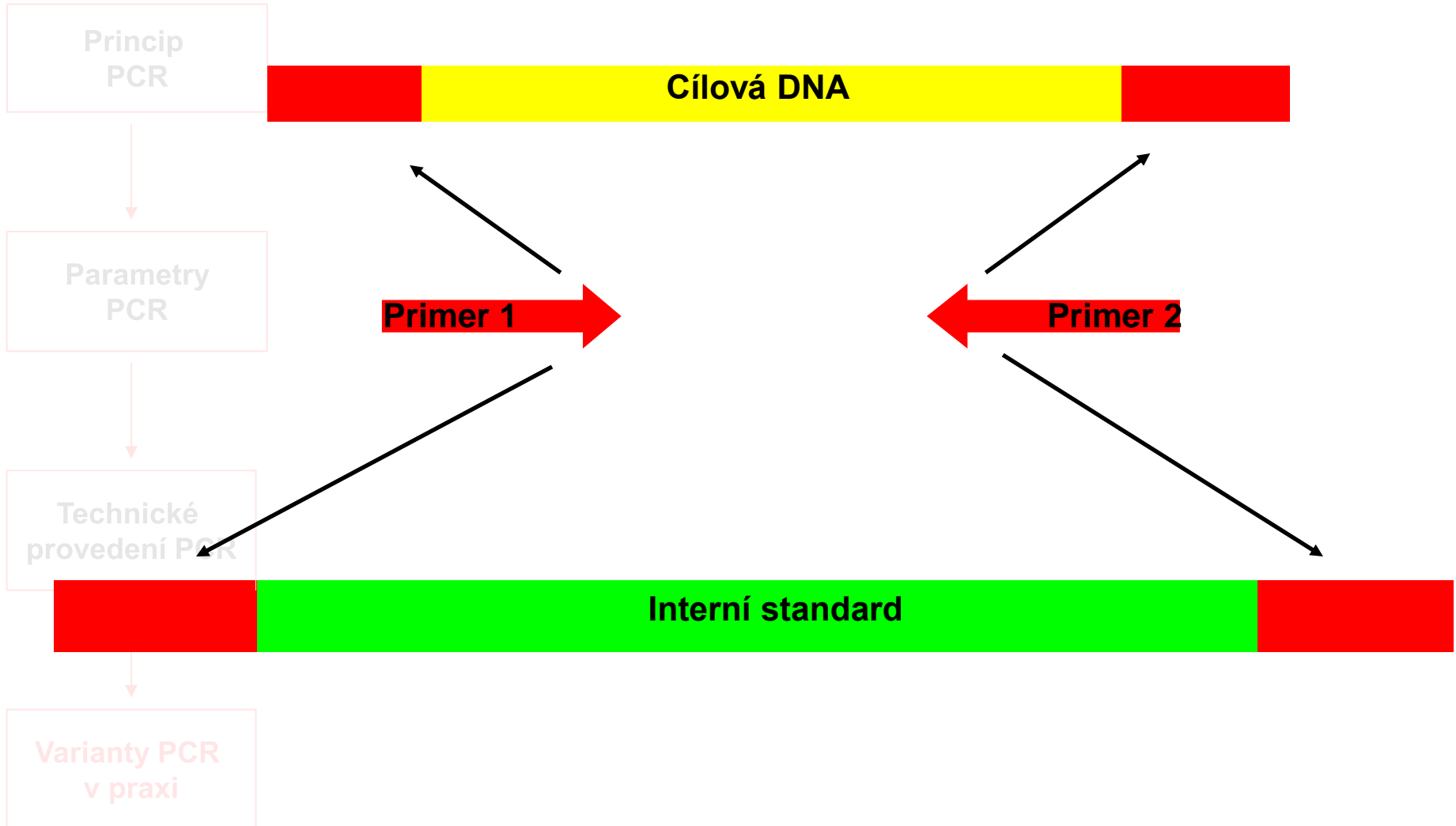
Varianty PCR  
v praxi



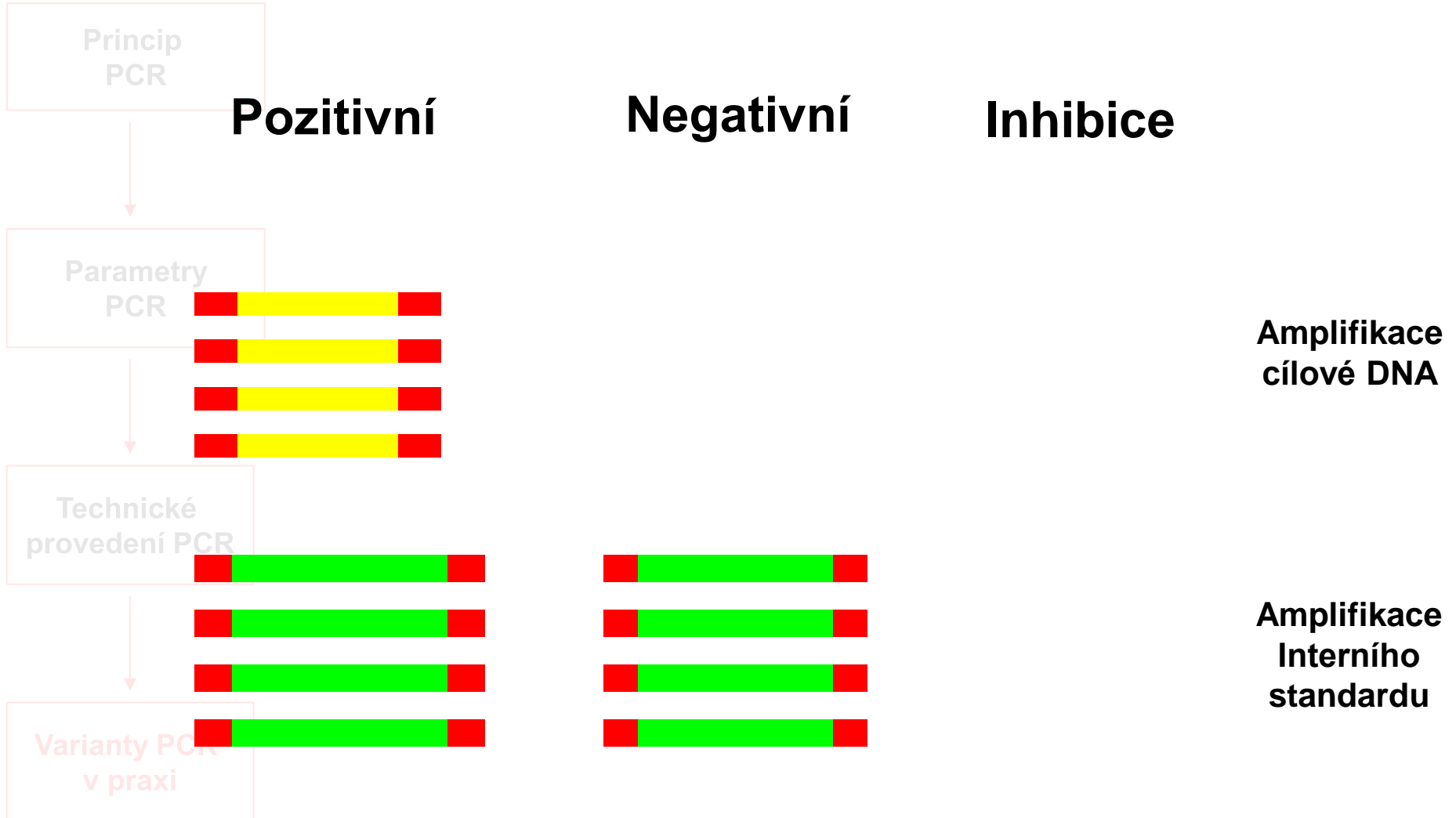
**Strategy for the detection and differentiation of Mycobacterium avium species in isolates and heavily infected tissues**

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

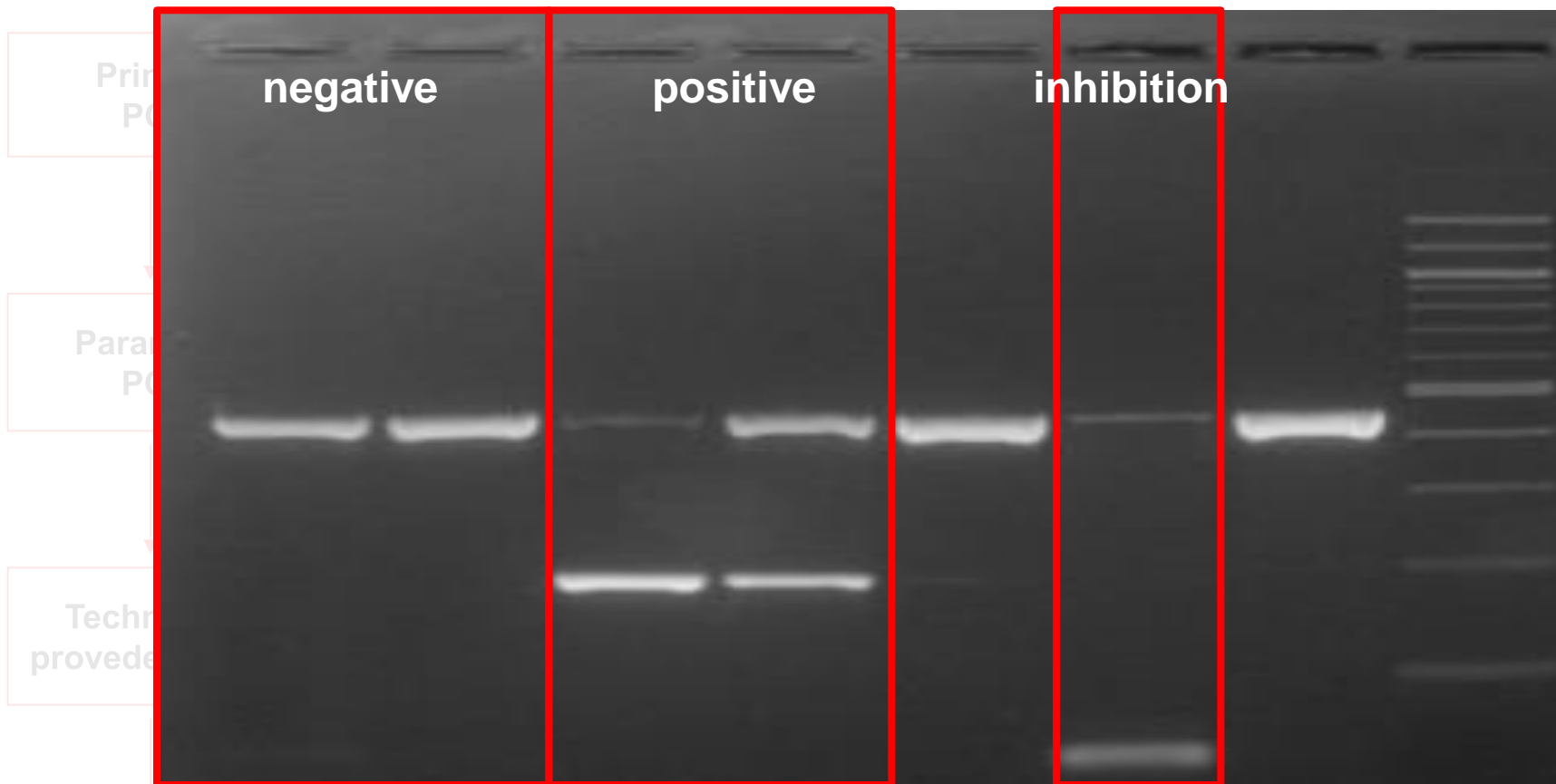
# Kompetitivní PCR



# Kompetitivní PCR



# Kompetitivní PCR



Varianty PCR  
v praxi

# Reverzně transkripční PCR

