

Polymerázová řetězová reakce

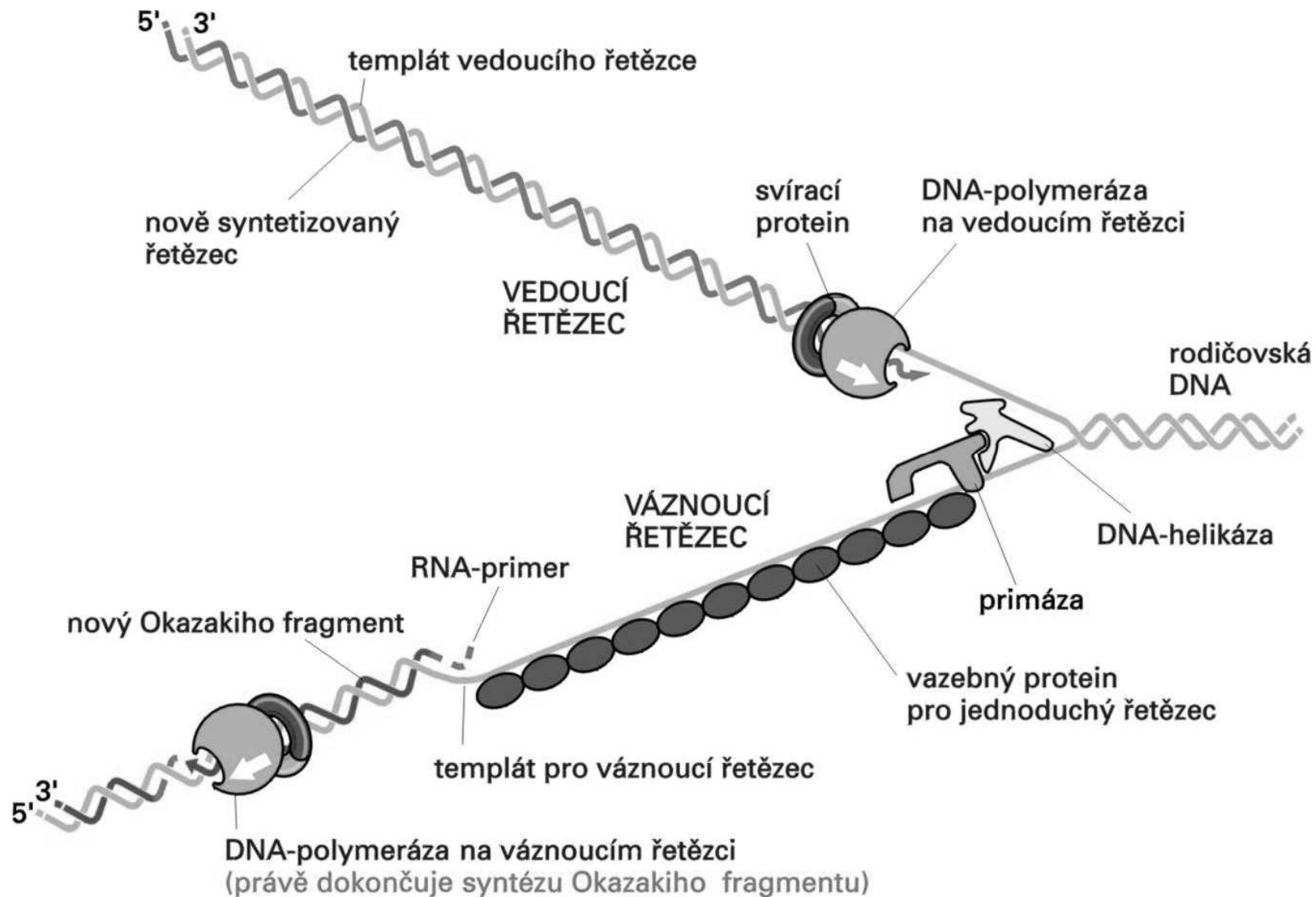
PCR (Polymerase Chain Reaction)

Princip PCR

- Zavedení PCR v roce 1983 (Kary Mullis)
 - ◆ Publikace
 - ◆ Nobelova cena
- Metoda pro mnohonásobné zmnožení (amplifikaci) specifického úseku DNA in vitro založená na principu replikace.
- K opakující se enzymové syntéze komplementárních řetězců vybraných úseků dvouřetězcové DNA dochází po připojení dvou primerů vázajících se na protilehlé řetězce DNA tak, že jejich 3'-OH-konce směřují proti sobě.
- PCR umožňuje získat požadovanou zcela specifickou sekvenci bez klonování.

- PCR využívá základních rysů replikace (enzymatické syntézy) DNA:
 - ◆ Jako templát slouží ssDNA, podle níž je syntetizován komplementární řetězec.
 - ◆ K zahájení reakce je zapotřebí primer, který se připojuje na komplementární úseky DNA. Tím je zároveň vymezen úsek DNA, který bude amplifikován.
 - ◆ Jako templáty pro syntézu mohou sloužit oba řetězce dsDNA, po předchozí denaturaci.
- Primery se vybírají tak, aby se připojovaly k místům ohraničujícím z obou stran amplifikovaný úsek.
- Teoreticky lze získat 2^n řetězců (kopií).
- Předpoklady pro zavedení PCR
 - ◆ Syntéza oligonukleotidů
 - ◆ Vlastní myšlenka (K. Mullis)
 - ◆ Teplotně stabilní DNA polymeráza
 - ◆ Automatické termocyklery

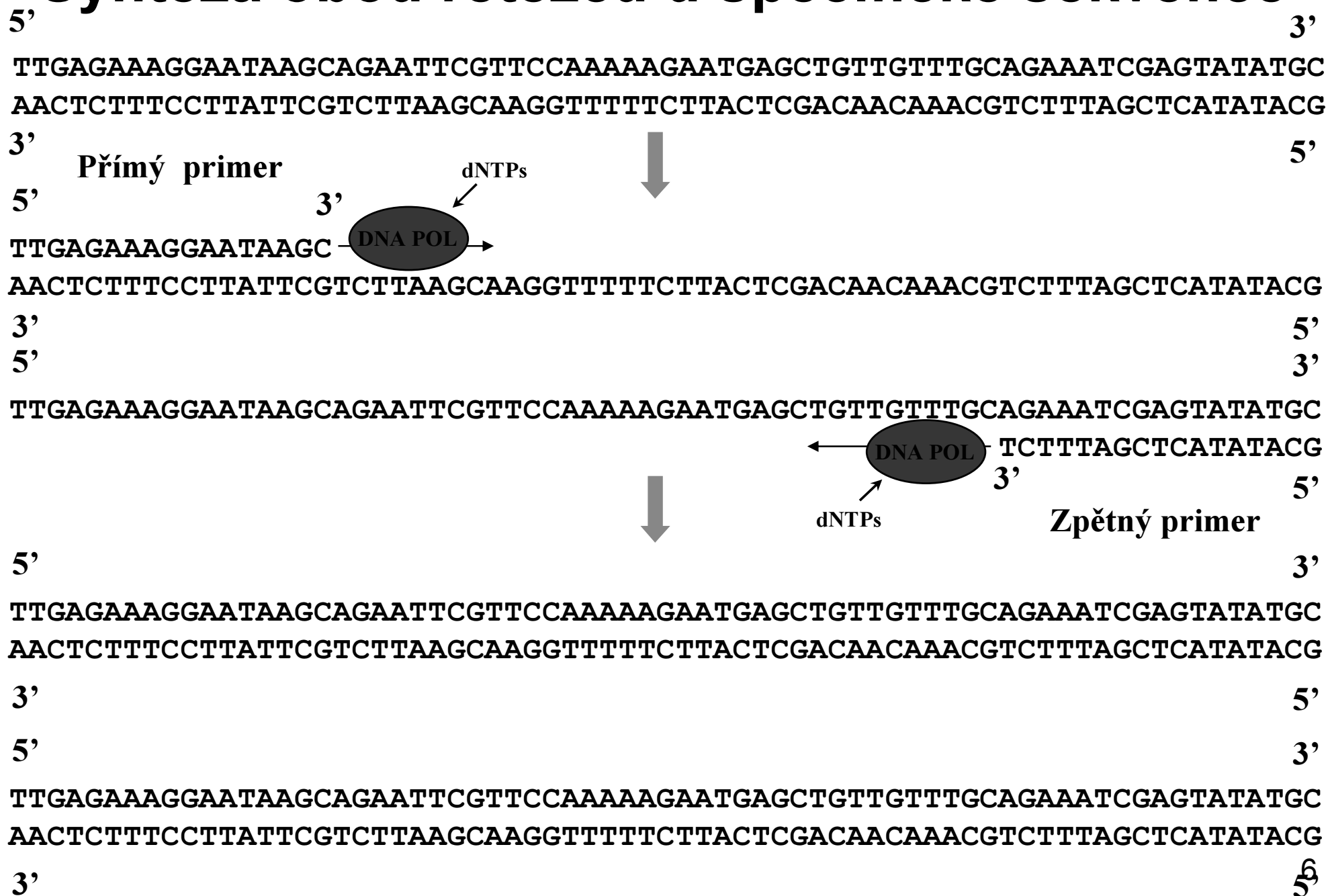
Replikace DNA *in vivo* vyžaduje mnoho enzymů



Replikace DNA *in vitro* vyžaduje pouze jeden enzym

- **Reakční směs obsahuje:**
 - ◆ **Templátovou nukleovou kyselinu** (DNA nebo RNA).
 - ◆ Množství DNA jako výchozího materiálu je velmi nízké: obvykle postačuje méně než 1 μg genomové DNA, teoreticky postačuje jedna molekula.
 - Kvalita templátu ovlivňuje výsledek PCR.
 - Velké množství RNA může vázat ionty Mg^{2+}
 - znečištěný templát může obsahovat inhibitory PCR
 - ◆ Zdroj: mikroorganismy, buňky z tkáňových kultur, tělní tekutiny, bioptické vzorky, stěry, vlasy, atd...
- **Primery.** Chemicky syntetické oligonukleotidy o velikost 10 - 30 nukleotidů.
- **dNTP** ve formě Na^+ nebo Li^+ solí
- **Mg^{2+} ionty** tvoří rozpustný komplex s dNTP a vytvářejí substrát, který rozpoznává DNA polymeráza.
- **Termostabilní DNA polymerázu**, která odolává teplotám až 98 °C.
 - ◆ Taq *Thermus aquaticus*
 - ◆ Tth *Thermus thermophilus*
 - ◆ Tma *Thermotoga maritima*
 - ◆ Pfu *Pyrococcus furiosus*
 - ◆ Pwo *Pyrococcus woesei*

Syntéza obou řetězců u specifické sekvence



REAKČNÍ PODMÍNKY PCR

1. Počáteční denaturace DNA. Důležitá je kompletní denaturace templátu, obvykle postačuje zahřátí směsi na 2 – 5 min / 95 °C. V případě, že dojde pouze k částečné denaturaci, molekuly DNA velice rychle renaturují a to vede k nespecifické vazbě primerů („self-priming“) a možným falešným výsledkům.

Vlastní řetězová reakce:

30×

2. Denaturační krok (separace řetězců) : 94 – 95 °C / 20 – 45 s, záleží na objemu reakce, tloušťce stěn zkumavek. Nedostatečně denaturovaná DNA neumožňuje přístup primerům, naopak příliš dlouhá denaturace snižuje aktivitu DNA polymerázy (stabilní cca 2 hod / 98 °C).
3. Připojení primerů (55 - 65 °C / 30 – 90 s) teplota určuje specifičnost a závisí na T_m primeru a templátu. Pro oba primery by měla být T_m podobná. Ta se optimalizuje v teplotním gradientu nebo se stanovuje empiricky.
4. Prodlužování primeru (polymerační reakce) při standardní PCR probíhá při 72 °C / 45 – 90 s. Taq DNA polymeráza syntetizuje DNA při této teplotě rychlostí cca 60 bází/s. Nově syntetizované řetězce slouží jako templáty pro další cyklus.

Cyklické střídání teplot jednou založené směsi zajišťuje průběh reakce PCR, provádí se v termocyklerech, většinou se provádí 25 - 35 cyklů.

5. Závěrečná extenze se provádí obvykle po posledním cyklu (72°C / 5 min) a slouží k dokončení syntézy a renaturaci jednořetězcových produktů.

REAKČNÍ PODMÍNKY PCR

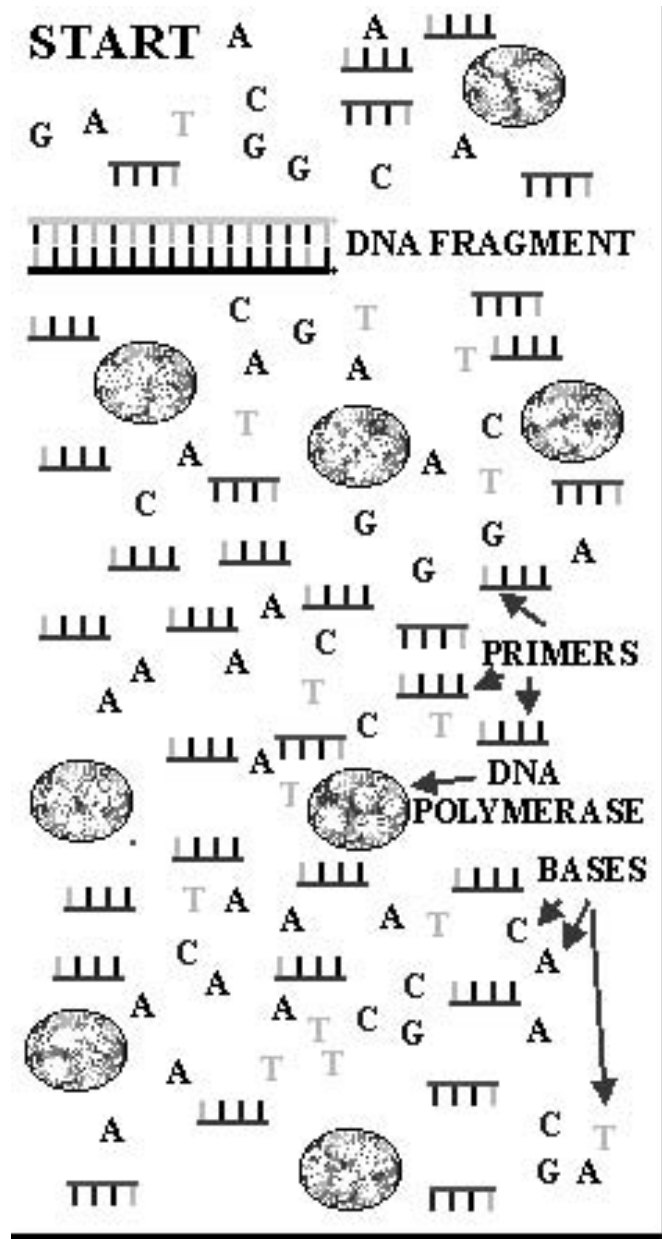
Denaturace vzorku DNA
Pro oddělení jednořetězců
(94 °C, 5 min)

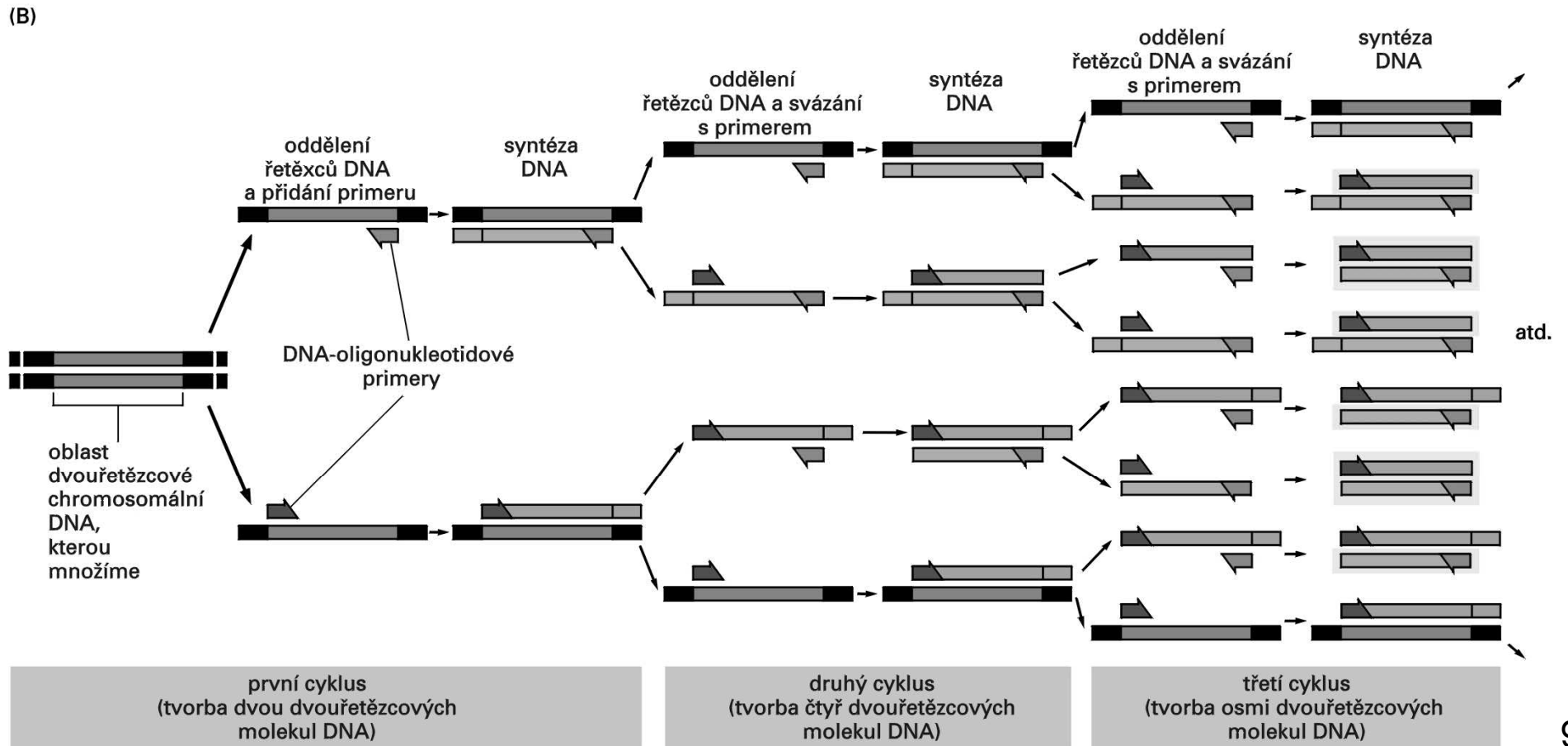
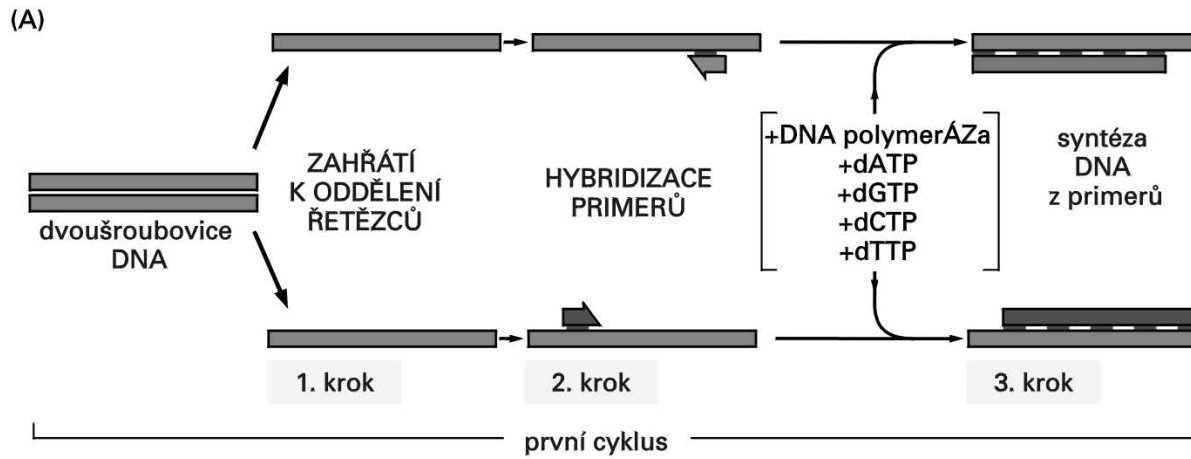
Připojení primerů
na řetězce DNA
(30 - 65 °C, 1 min)

Denaturace pro separaci
řetězců DNA
(94 °C, 30 s)

25 – 35 ×

Syntéza nových řetězců
DNA polymerázou
(72 °C, 45s - 2 min)





Počet nově syntetizovaných molekul dsDNA při jednotlivých cyklech PCR

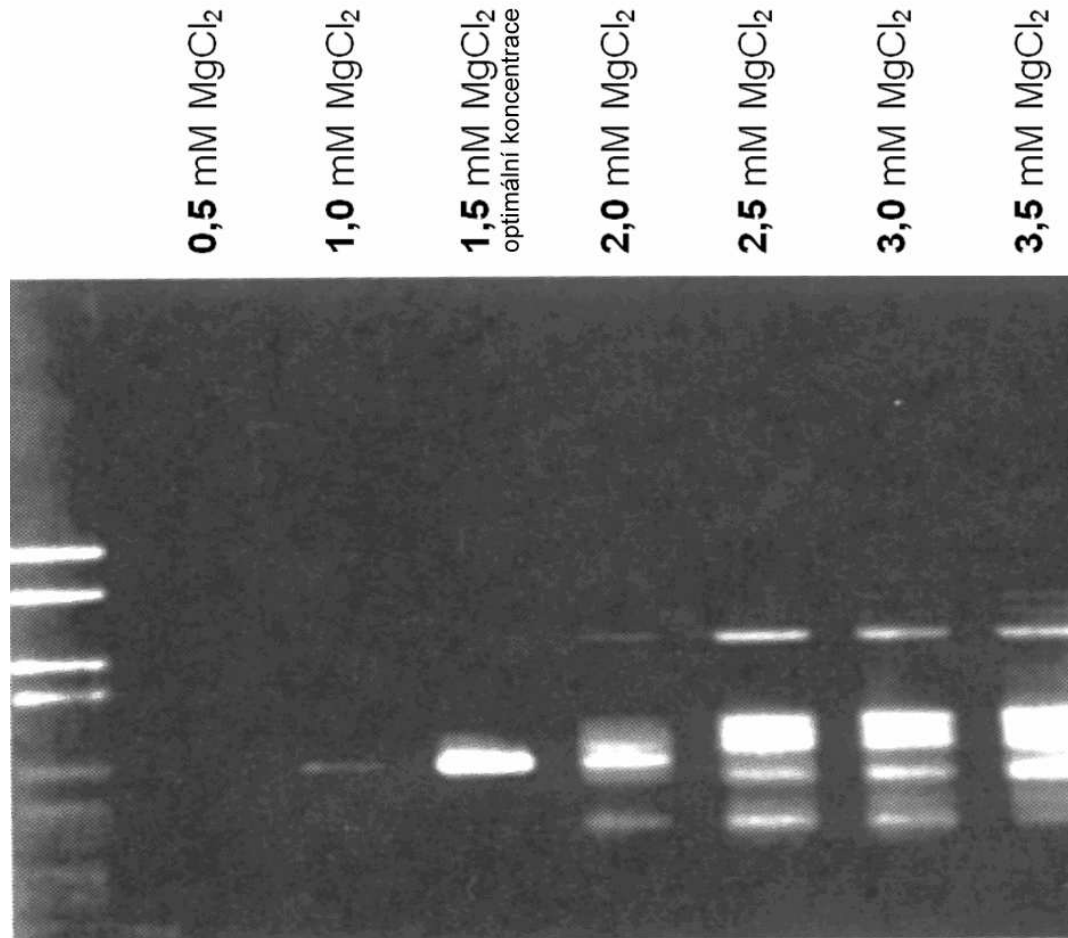
$$2^n - 1$$

Cyklus číslo	Počet nových dvouřetězcových molekul
1	1
2	3
3	7
4	15
5	31
6	63
7	127
8	255
9	511
10	1 023
11	2 047
12	4 095
13	8 191
14	16 383
15	32 767
16	65 535
17	131 071
18	262 143
19	524 287
20	1 048 575
21	2 097 151
22	4 194 303
23	8 388 607
24	16 777 215
25	33 554 431
26	67 108 863
27	134 217 727
28	268 435 455
29	536 870 911
30	1 073 741 823

KONCENTRACE JEDNOTLIVÝCH SLOŽEK PŘI STANDARNÍ PCR REAKCI

- **DNA.** Pro standardní PCR se doporučuje následující množství DNA podle velikosti templátu:
 - ◆ lidská genomová DNA: 100 - 500 ng
 - ◆ bakteriální DNA: 1 – 10 ng
 - ◆ plazmidová DNA: 0,1 – 1 ng
- **Primery.** Sekvence a koncentrace primeru významně ovlivňuje výsledek PCR.
 - ◆ Optimální koncentrace je mezi 0,1 a 0,6 μM .
 - ◆ U některých systémů může vyšší koncentrace (až 1 μM) zlepšit výsledky.
 - ◆ Nižší koncentrace vede k předčasnému vyčerpání primerů a snížení výtěžku.
- **dNTP.** Výsledná koncentrace se může pohybovat v rozmezí 50 – 500 μM (pro každý nukleotid)
 - ◆ Nejběžnější koncentrace dNTP je 200 μM . Při zvýšení koncentrace dNTP je třeba zvýšit koncentraci Mg^{2+} iontů.

- **MgCl₂**. Volné Mg²⁺ ionty ovlivňují aktivitu enzymu a zvyšují hodnotu T_m u dsDNA.
 - ◆ Pro dosažení nejlepšího výsledku vždy stanovujeme koncentraci Mg²⁺ experimentálně.
 - ◆ Optimální koncentrace může kolísat od 1 mM do 5 mM.
 - ◆ Nejčasteji používaná koncentrace je 1,5 mM (pro 200 μM dNTP).



- **DNA polymeráza.**

- ◆ Obvyklá koncentrace je 0,5 – 2,5 jednotek / 50 μ l.

- **pH** je dané reakčním pufrům, obvykle odpovídá pH 8,3 – 9,0.

- **Přídavné látky** mohou v některých případech ovlivnit účinnost a specifčnost PCR reakce. Jejich vliv se obvykle určuje experimentálně:

- ◆ albumin z bovinního séra (BSA) (100 ng/50 μ l)

- ◆ dimetylsulfoxid (DMSO) (2- 10 % v/v) – redukce nespecifické vazby primeru

- ◆ detergenty (Triton X-100, Tween 20)

- ◆ betain (0,5 – 2 M)

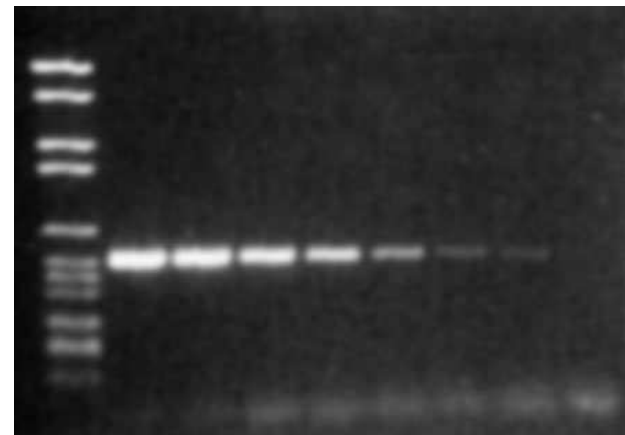
- ◆ želatina

- ◆ glycerol (1 – 5 % v/v)

- ◆ spermidin

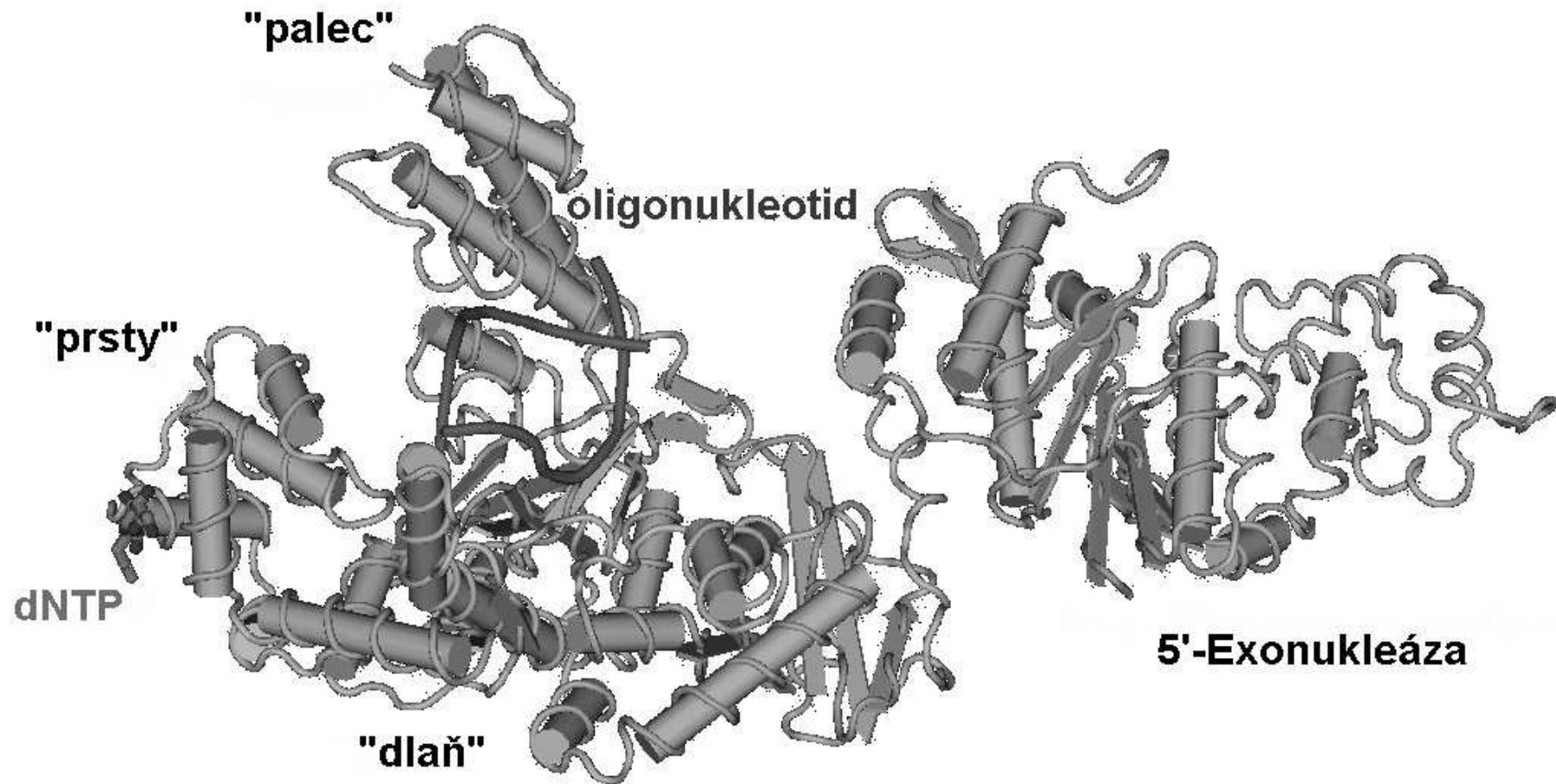
- ◆ protein 32 genu fága T4

optimalizace PCR přídavnými látkami:



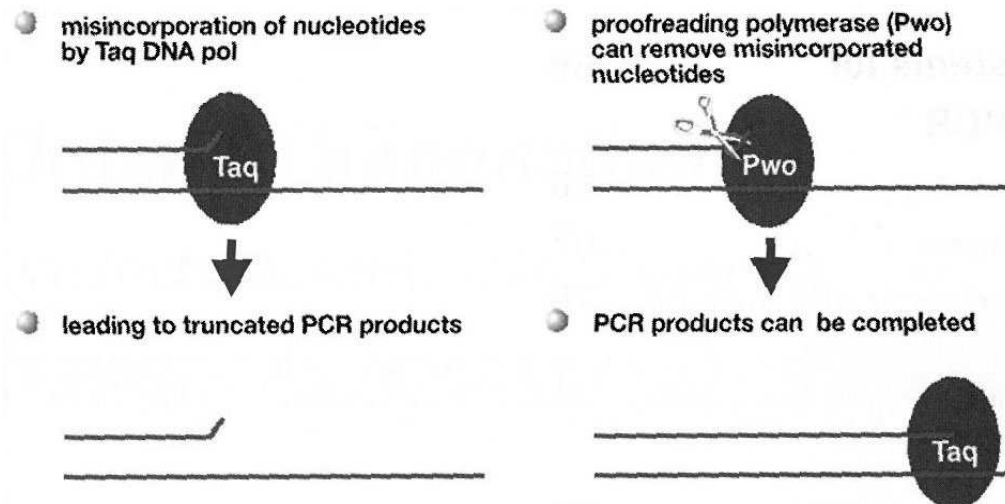
- **Minerální olej** – zabraňuje vypařování během reakce

Struktura *Taq* DNA polymerázy



BEZCHYBNOST SYNTÉZY

- Replikace s Taq DNA-polymerázou neprobíhá bezchybně, DNA-polymeráza příležitostně zařazuje do nově syntetizovaných řetězců chybné (nekomplementární) nukleotidy.
 - ◆ Buňka má schopnost tyto báze odstraňovat opravnými mechanismy.
 - ◆ *In vitro* Taq DNA-polymeráze tato vlastnost chybí.
- Frekvence chybného začleňování za podmínek amplifikace *in vitro* je asi 2×10^{-4} .
- Chybné začleňování je důležité, pokud jsou PCR produkty klonovány, neboť každý klon je odvozen z jedné molekuly DNA. Chybně začleněné báze (mutace) potom obsahuje celé potomstvo.
- Řešení problému: použití dvojice DNA polymeráz, z nichž jedna má opravné mechanismy (proofreading).



Základní optimalizace PCR

Složka	Nižší stringence	Vyšší stringence
Teplota pro připojení primeru	↓	↑
MgCl ₂	↑	↓
KCl	↑	↓
Enzym, Primer	↑	↓
Formamid	↓	↑

- Zpravidla se optimalizuje
 - ◆ Teplota pro připojení primeru v termocykleru s teplotním gradientem
 - ◆ Koncentrace MgCl₂

Stanovení teploty pro připojení primeru

- Teplota pro připojení primeru (annealing temperature) zkr. T_a . Teplota používaná pro teplotní hybridizaci molekul primeru a matricové DNA in vitro. Optimální teplota pro připojení primeru při PCR se vypočítá podle vztahu:

$$T_a = 0,3 \times T_m^{\text{Primer}} + 0,7 \times T_m^{\text{Produkt}} - 25$$

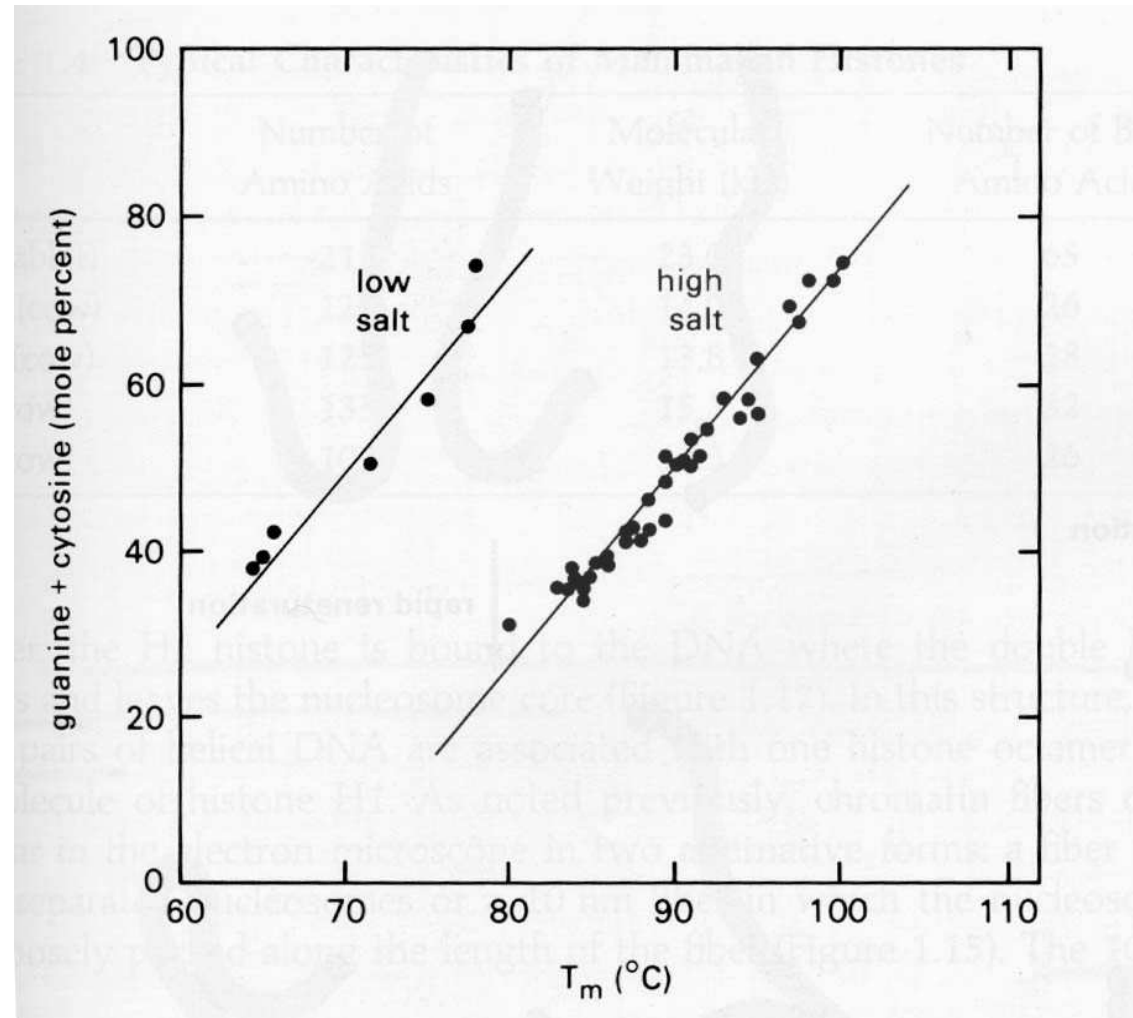
kde T_m^{Primer} je hodnota T_m nejméně stabilního páru primer-matrice a T_m^{Produkt} je hodnota T_m amplifikačního produktu.

- Orientačně lze vypočítat T_a podle vztahu:

$$T_a = 2(A+T) + 4(G+C) - 5 \text{ °C} = T_m - 5 \text{ °C}$$

Hodnota T_m

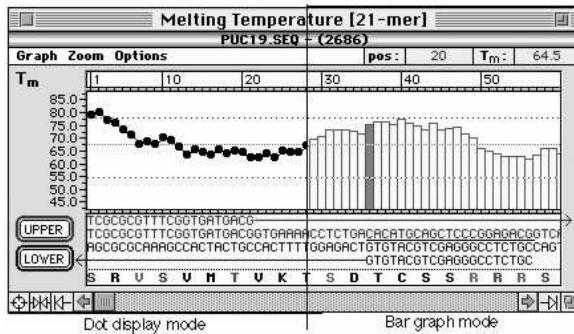
- T_m závisí na třech základních faktorech:
 - ◆ Zastoupení bází
 - ◆ Složení roztoku
 - ◆ Koncentrace solí
 - ◆ pH
 - ◆ Délka molekuly DNA



NÁVRH PRIMERŮ PRO STANDARDNÍ PCR

- ◆ 18 – 25 bází dlouhé
- ◆ neobsahují vnitřní sekundární struktury
- ◆ obsahují 40 – 60 % G+C
- ◆ mají rovnoměrnou distribuci oblastí bohatých na G/C a A/T páry
- ◆ nejsou komplementární navzájem na 3'-koncích, takže nevytvářejí navzájem nebo samy se sebou duplexy
- ◆ na matricové DNA nemají falešná vazebná místa
- ◆ mají T_m teplotu 55 – 65 °C

Pro návrh primerů se obvykle používá specializovaný software (některý je volně dostupný na internetu).



Current Oligo
pCBlu3.seq

Sequence Length: 1842

Current Oligo (+ strand)
5' CCCGCTGATGAAATGCTCATC 3'
Length: 21-mer
5' Position: 1373
T_m: 72.1 °C
ΔG (25 °C): -42.7 kcal/mol
Degeneracy: 1
P.E.#: 492
1/E: 5.30 nmol/A₂₆₀
34.0 μg/A₂₆₀

Current Oligo (- strand)
5' GATGAGCATTTCATCAGGCGGG 3'
P.E.#: 537
1/E: 4.80 nmol/A₂₆₀
31.7 μg/A₂₆₀

Selected Primers
pCBlu3.seq

pCBlu3:269U21 Upper Primer
5' CGGCCAGATCTGGTACCCA 3'
Length: 21-mer
5' Position: 269
T_m: 76.9 °C
ΔG (25 °C): -46.1 kcal/mol
Degeneracy: 1
P.E.#: 542/542
1/E: 5.12 nmol/A₂₆₀
33.1 μg/A₂₆₀

pCBlu3:817L21 Lower Primer
5' TACCGGTTGGACTCAAGACG 3'
Length: 21-mer
3' Position: 817
T_m: 69.5 °C
ΔG (25 °C): -41.4 kcal/mol
Degeneracy: 1
P.E.#: 502/502
1/E: 4.89 nmol/A₂₆₀
32.0 μg/A₂₆₀

Lower Primer False Priming Sites
M13MP18

Lower Primer - M13MP18:6310L19 (positive strand)
Priming efficiency of the perfect match is 428 (above the threshold)

Priming efficiency: 428 (above the threshold)
5'(6328) GGTTTTCCAGTCACGACG (6310)3'
3'(6328) ccaaaagggtcagtgctgc (6310)5'

Priming efficiency: 205 (above the threshold)
5'(6328) GGTTTTCCAGTCACGACG (6310)3'
3'(626) agcaaatggtc--tgcgc (610)5'

Priming efficiency: 194 (above the threshold)
5'(6328) GGTTTTCCAGTCACGACG (6310)3'
3'(808) gtaatatggtcagtcctgc (790)5'

Priming efficiency: 185 (above the threshold)
5'(6328) GGTTTTCCAGTCACGACG (6310)3'
3'(5125) tctaagtggtcagtg-tgc (5108)5'

Priming efficiency: 121
5'(6328) GGTTTTCCAGTCACGACG (6310)3'
3'(5989) agaaaagtggtc-gctctgc (5971)5'

Lower Primer - M13MP18:6310L19 (negative strand)
Priming efficiency of the perfect match is 428 (above the threshold)

Priming efficiency: 76
5'(6328) GGTTTTCCAGTCACGACG (6310)3'
3'(5744) ccaaaaagcgggaac tgc (5762)5'

PCR
pCBlu3.seq

Optimal Annealing Temperature: 58.3° (Max: 72.0°)

	Position and Length		T _m [°C]	GC [%]	P.E.#
Product	1352		88.0	51.3	-----
Upper Primer	37	21	72.2	47.6	452
Lower Primer	1368	21	79.9	57.1	506

Product T_m - Upper Primer T_m: 15.8
Primers T_m difference: 7.6

	Concentration		Terminal stability of the Lower Primer is too high.
Upper Primer	200.0	nM	
Lower Primer	200.0	nM	
Monovalent Cation	50.0	mM	
Free Mg[2+]	0.7	mM	

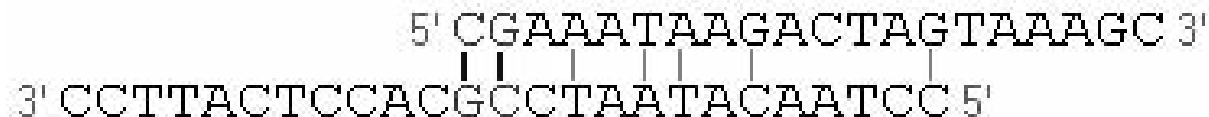
Total Na[+] Equivalent: 155.8

PŘÍKLADY STRUKTUR VYTVÁŘENÝCH PRIMERY, KTERÉ JE NUTNÉ ZOHLEDNIT PŘI JEJICH NÁVRHU

- Chybně navržená dvojice primerů, která vytváří stabilní duplex na 3'-konci:



- Správně navržená dvojice primerů, která vytváří pouze málo stabilní duplex na 5'-konci; na 3'-konci je G nebo C zaručující stabilní párování s templátem:



- Chybně navržený primer, vytvářející vlásenku:



„HOT START“ PCR

- „Hot-start“ PCR významně ovlivňuje specifičnost, citlivost a výtěžek reakce
- Princip:
 - ◆ Při „hot-start“ PCR jsou určité složky reakční směsi odděleny od ostatních, dokud teplota ve zkumavce nepřekročí optimální teplotu pro připojení primeru (obvykle 55 ° - 65 °C).
 - ◆ DNA polymeráza je v této nekompletní reakční směsi nefunkční.
 - ◆ Nedochozí k prodlužování nespecificky navázaných primerů během doby než je dosažena teplota T_a .

■ Separace důležitých složek reakční směsi je dosažena některým z následujících způsobů:

◆ **Manuálně**

- ◆ Některé složky jako DNA polymeráza nebo Mg^{2+} jsou vynechány v původní reakční směsi a přidány manuálně po dosažení teploty $> 70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nevýhodou je možnost kontaminace a možná ztráta reprodukovatelnosti.

◆ **Fyzikální separace**

- ◆ Reakční komponenty jsou rozděleny do dvou směsí, které jsou odděleny bariérou (vosková přepážka, nebo voskové korálky obsahující $MgCl_2$). Během počáteční denaturace vosk roztaje a umožní smíchání reakčních složek.

◆ **Protilátky proti DNA polymeráze**

- ◆ Přídavek teplotně nestabilních protilátek umožní počáteční inaktivaci polymerázy.

◆ **Chemická modifikace polymerázy**

- ◆ Přídavek teplotně nestabilních látek, které se vážou na určité aminokyselinové zbytky blokují enzym (ten je potom při pokojové teplotě inaktivní). K aktivaci enzymu dochází při počáteční denaturaci („FastStart Taq DNA polymeráza“).

◆ **Další inhibitory**

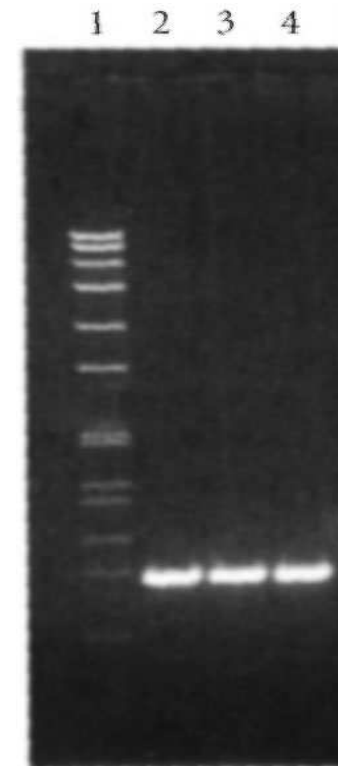
- ◆ např. oligonukleotidy specificky se vážající na polymerázu

DETEKCE AMPLIFIKOVANÉHO PRODUKTU PCR

1. Stanovení fyzikální velikosti produktu gelovou elektroforézou (agaróza, polyakrylamid). Detekce obarvením a pozorování pod UV světlem.
2. Štěpení produktu restričními enzymy a posouzení spektra vznikajících restričních fragmentů (PCR-RFLP)
3. Elektroforetická separace produktů za specifických podmínek pro detekci sekvenčních polymorfizmů
 - ◆ DGGE – denaturační gradientová gelová elektroforéza
 - ◆ SSCP – analýza polymorfizmu konformace jednořetězcových forem

Příklad standardní gelové elektroforézy s produkty PCR v agarózovém gelu.

1 = hmotnostní st.
2 - 4 = produkty PCR



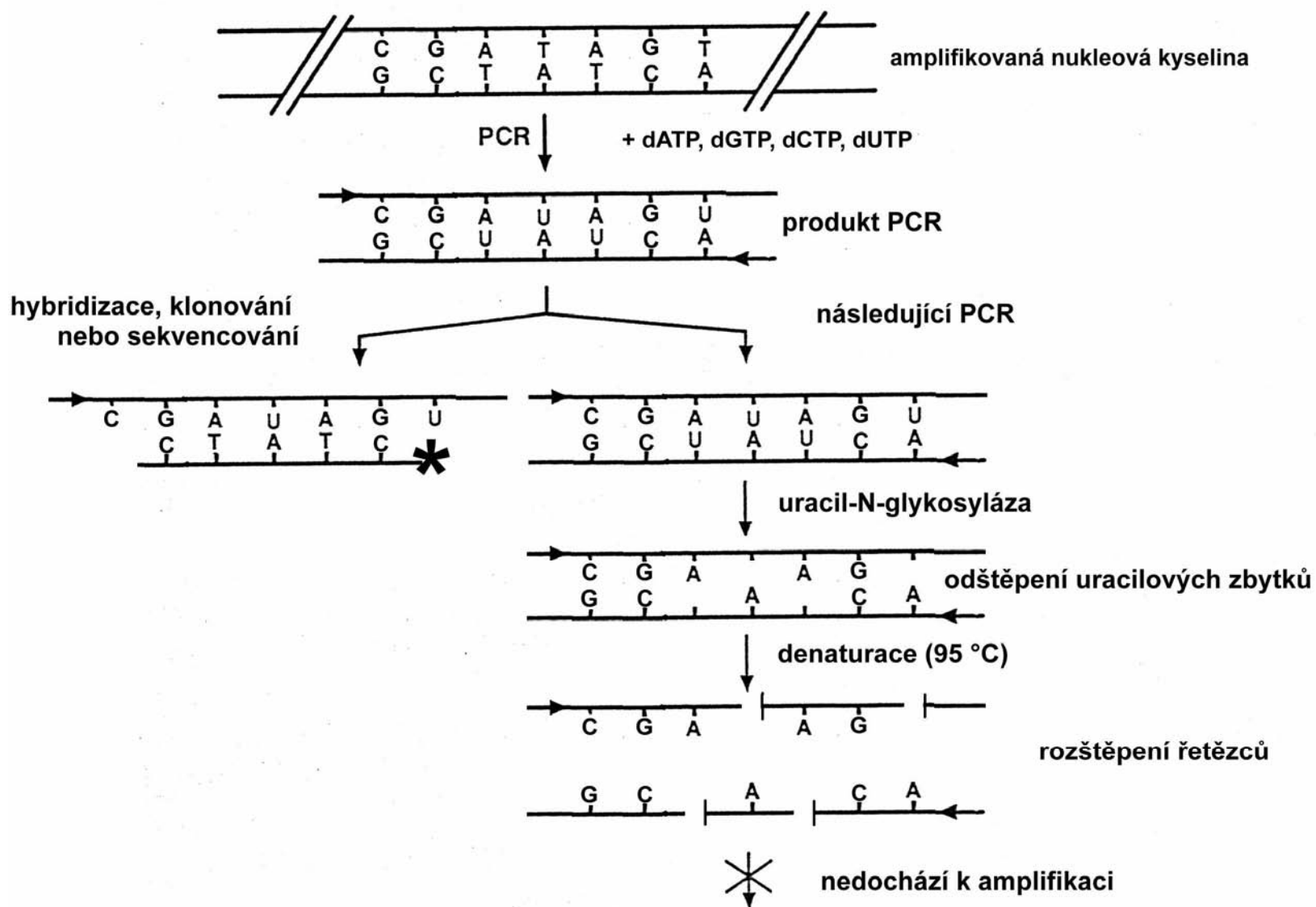
DETEKCE AMPLIFIKOVANÉHO PRODUKTU PCR

4. hybridizací s neradioaktivně značenou sondou komplementární k části sekvence amplifikovaného úseku a detekcí enzymoimunoanalýzou v mikrotitrační destičce (PCR-EIA/ELISA), hybridizační sonda může být následně amplifikována (PCR-OLA)
5. imobilizací PCR-produktů na membráně a tečkovou hybridizací se značenými alelově-specifickými oligonukleotidy (ASO) nebo zpětnou tečkovou hybridizací s různými ASO imobilizovanými na membráně,
6. hybridizací na DNA-čipech,
7. stanovením sekvence DNA.

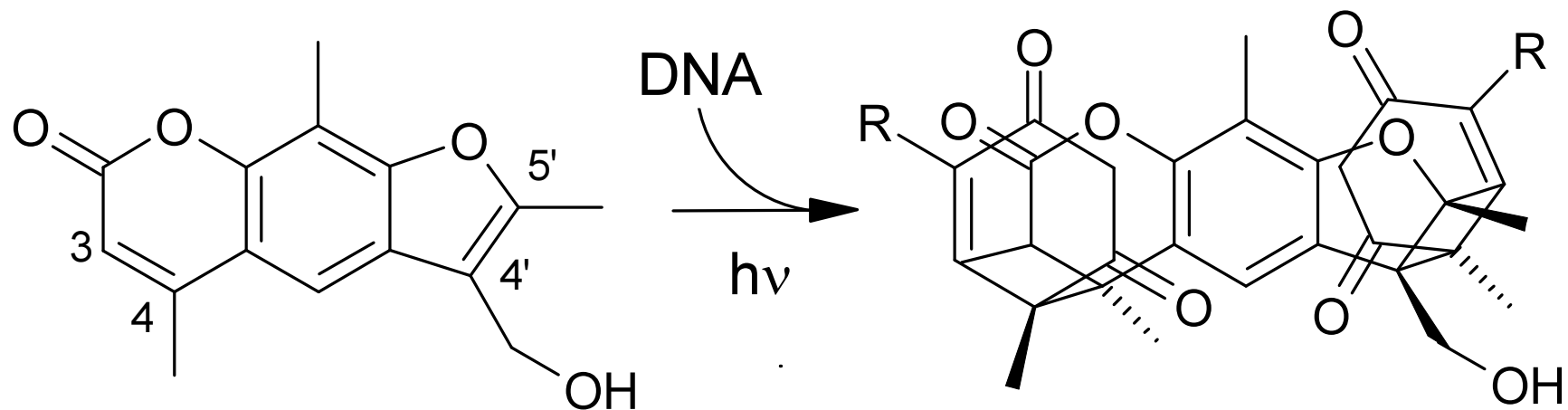
Kontaminace při PCR

- Vynikající citlivost PCR může být ovlivněna kontaminací i jedinou molekulou exogenní nebo neznámé DNA.
- Pro minimalizaci falešných pozitivních výsledků je doporučeno:
 - ◆ používání autoklávovaných roztoků
 - ◆ fyzikální separace používaných PCR-reagencií od templátové DNA a PCR-produktů
 - ◆ příprava reagencií i vzorků do alikvotních částí
 - ◆ používání UV-světla k odstranění exogenních nukleových kyselin na pracovní ploše
 - ◆ používání jednorázových rukavic
 - ◆ přidávání DNA do reakce jako poslední
 - ◆ pečlivá volba pozitivních, negativních a vnitřních kontrol
- Vyloučení kontaminace je důležité zejména tam, kde je potřeba použít vysokého počtu amplifikačních cyklů, aby bylo dosaženo požadovaného produktu
 - ◆ nízkokopiových templátů DNA
 - ◆ degradovaných vzorků.
- V případě pochybností je nejlepším přístupem opakování experimentu s úzkostlivou pozorností k detailům a kontrolám.
- Jako zdroj kontaminace DNA je nejčastěji uváděn:
 - ◆ přenos kontaminující DNA z dříve amplifikovaných produktů PCR,
 - ◆ vzájemná kontaminace zdrojových materiálů,
 - ◆ kontaminace plazmidem z rekombinantního klonu, který obsahuje cílovou sekvenci.

Jako prevence před přenosem kontaminující DNA je v reakční směsi rutinně používána náhrada dTTP za dUTP. Následným působením uracil-N-glykosylázy na reakční směs před zahájením amplifikace.



- Alternativně lze amplifikační produkty PCR inaktivovat fotochemicky pomocí derivátů psoralenu nebo isopsoralenu,
- Furokumarinové sloučeniny interkalují se mezi páry bází DNA.
- Pokud jsou tyto látky excitovány UV-světlem o vlnové délce 320-400 nm, kovalentně se vážou na nukleové kyseliny a tvoří cyklobutanové adukty s pyrimidinovými bázemi, které blokují reakci s DNA-polymerázou



ŘEŠENÍ PROBLÉMŮ PŘI STANDARDNÍ PCR

Problém	Možná příčina	Doporučení
Nevzniká produkt	Nevyvážená reakce	■ Kontrola koncentrace jednotlivých složek
	Teplotní podmínky	■ Kontrola nastavení cyklů
	Nízká koncentrace templátu	■ Zvýšit koncentraci templátové DNA
	Koncentrace primeru nebo jeho sekvence	■ Optimalizovat koncentraci primeru ■ Navrhnout primer s novou sekvencí
	Různé faktory	■ Testovat reakci s pozitivní kontrolou a funkčními primery ■ Začít s novými roztoky, H ₂ O a enzymem
	Nízká kvalita templátu (degradovaný, kontaminovaný, obsahující inhibitory)	■ Použít primery, které amplifikují kratší úseky ■ Přidat pomocné látky (DMSO) ■ Optimalizovat koncentraci Mg ²⁺ ■ Připravit nový templát ■ Zamezit častému zmrazování a rozmrazování templátu

ŘEŠENÍ PROBLÉMŮ PŘI STANDARDNÍ PCR

Problém	Možná příčina	Doporučení
Nevzniká produkt	Nízká účinnost polymerázy	<ul style="list-style-type: none">■ Používat pozitivní kontrolu■ Zvýšit počet cyklů■ Zvýšit koncentraci enzymu■ Použít jinou polymerázu
Produkt není čistý	Vzniká sekundární amplifikační produkt	<ul style="list-style-type: none">■ Kontrola koncentrace složek reakce■ Optimalizovat koncentraci Mg^{2+}■ Optimalizovat koncentraci primerů■ Snížit počet cyklů■ Snížit koncentraci templátu
Vznikají četné nespecifické produkty	Nespecifická vazba primeru	<ul style="list-style-type: none">■ Použít vyšší teplotu T_a■ Optimalizovat koncentraci primerů■ Použít „hot start“■ Narhnout nové primery

VYUŽITÍ METODY PCR

1. Základní výzkum

- ◆ izolace genů nebo jejich částí
- ◆ sekvencování DNA
- ◆ mutageneza in vitro
- ◆ modifikace konců DNA
- ◆ analýza (selekce) klonů z genových knihoven
- ◆ příprava značených sond

2. Aplikovaný genetický výzkum

- ◆ prenatální diagnostika (dědičných chorob)
- ◆ detekce mutací v genech
- ◆ studium polymorfizmu genů (např. RAPD)
- ◆ populační genetika

3. Využití v klinických disciplínách

- ◆ detekce patogenních mikroorganismů (baktérií, virů, prvoků, hub)
- ◆ identifikace onkogenů
- ◆ typizace nádorů
- ◆ stanovení pohlaví

4. Využití v praxi

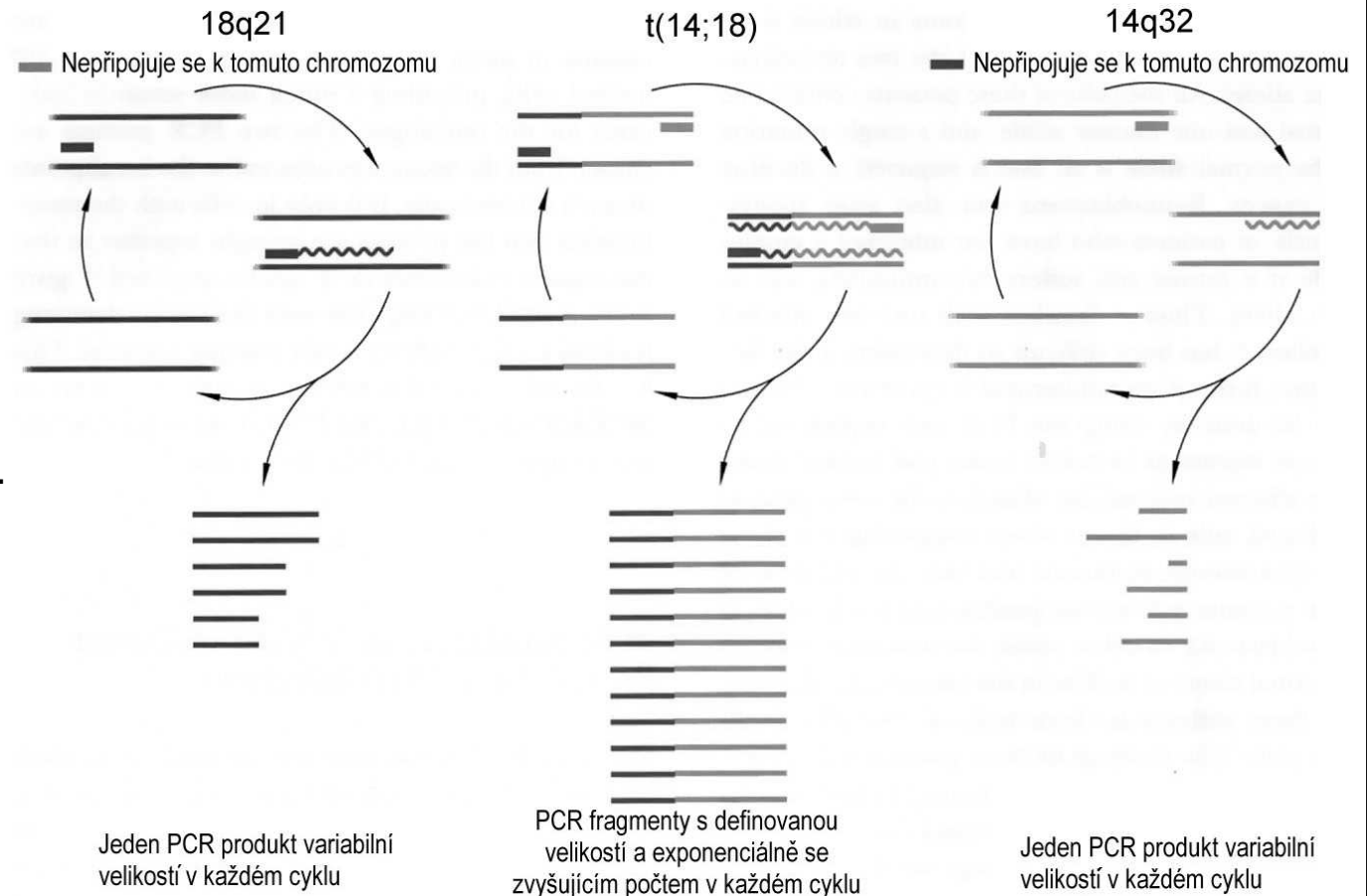
- ◆ archeologie
- ◆ soudnictví
- ◆ kriminalistika

PCR amplifikace se používá k detekci bakteriálních a virových infekcí

- Konvenční diagnostické metody jsou založeny na schopnosti vypěstovat organismy v kultuře nebo detekovat jejich přítomnost v pacientu za použití protilátek.
 - ◆ vyžaduje několik týdnů (mykobakterie)
 - ◆ někdy metoda málo citlivá (protilátky)
- Zvláštní význam má PCR při diagnostice virů, např. HIV.
 - ◆ Cílem je detegovat infikované buňky na pozadí mnohonásobně početnějších neinfikovaných buněk.
 - ◆ Detekce odhalí HIV inkorporované v buňkách. Přítomnost virové RNA naznačuje aktivní infekci, a to lze prokázat provedením PCR za použití cDNA jako templátů vytvořených pomocí RT z RNA infikovaných buněk.
- U tuberkulózy je pomocí PCR prokazován některý z vysoce konzervativních genů (sekvencí) mykobakterií pomocí primerů připravených k těmto sekvencím. Amplifikovaný fragment je pak hybridizován se sondami vysoce specifickými pro daný kmen (druh). Tímto postupem je možno detekovat i jen 10 bacilů v 10^6 eukaryotických buněk.

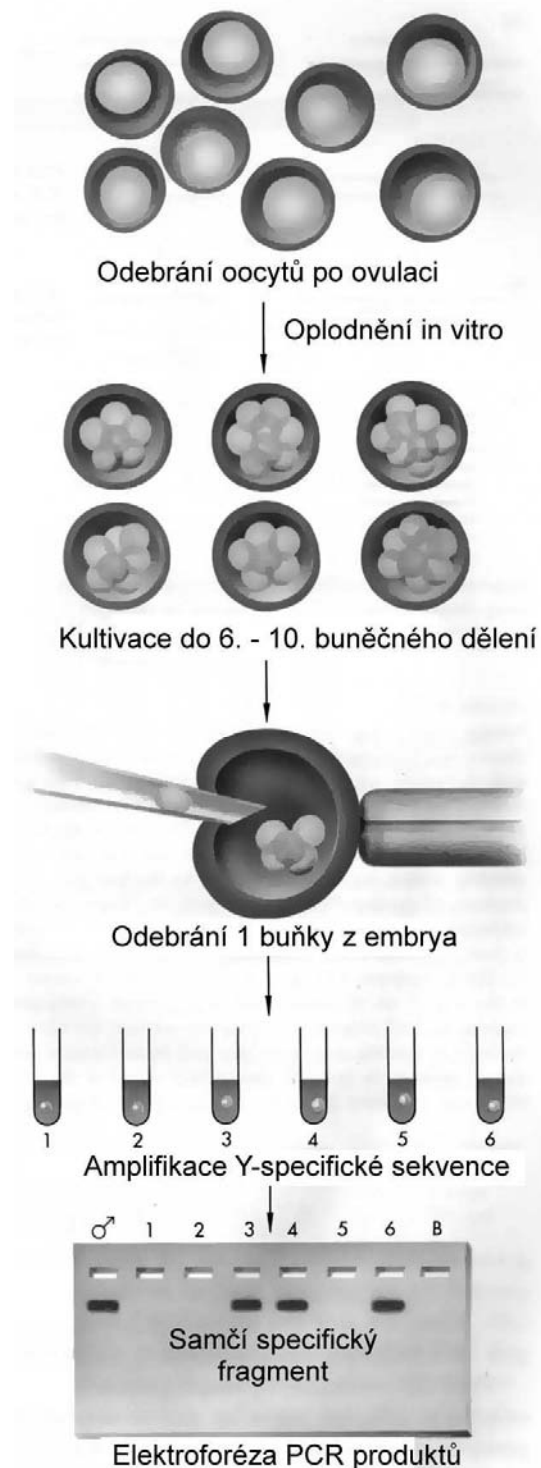
PCR je používána k monitorování terapie rakoviny

- Některé formy rakoviny vznikají jako výsledek chromozomových translokací týkajících se známých genů. Např. existuje translokace mezi chromozomy 14 a 18 u folikulárního lymfomu.
- Techniky PCR jsou schopny detekovat jedinou buňku z 10^6 normálních buněk, tedy daleko citlivěji než hybridizační metody.
- Dva PCR primery se vyberou ze sekvencí sousedících s místy zlomu na každém chromozomu. Pak pouze v buňkách, kde proběhla translokace, dojde k amplifikaci a vznikne fragment konstatní délky.
- Podobná strategie byla použita k detekci leukemií za použití mRNA jako výchozího materiálu. To má výhodu v tom, že mRNA představuje již amplifikační produkt daného genu genomové DNA.



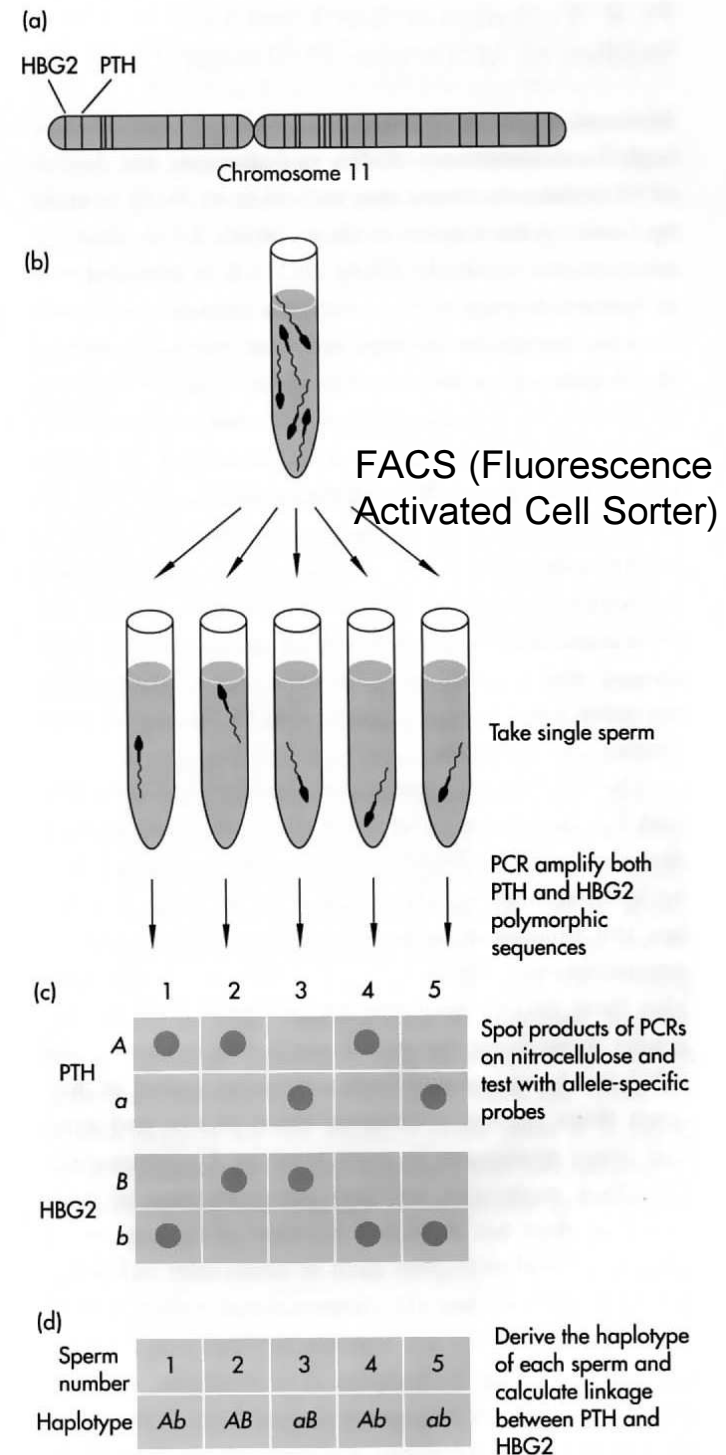
PCR je používána ke stanovení pohlaví u prenatálních buněk

- Širokou oblastí využití PCR je prenatální diagnostika obecně.
- Pro choroby děděné na X-chromozomum které postihují pouze samce, je stanovení pohlaví prvním krokem. To je možné proto, že samci nesou pouze jeden X a jeden Y chromozom, obsahující jedinečné sekvence.
- Při oplození *in vitro* se odebere jedna buňka z rané zygoty pomocí mikromanipulátoru, vyizoluje se DNA a ta se podrobí amplifikaci pomocí specifických primerů. Prokáže se amplifikační fragment. Výsledku se pak využívá v genetickém poradenství při výběru samičích embryí pro implantaci.



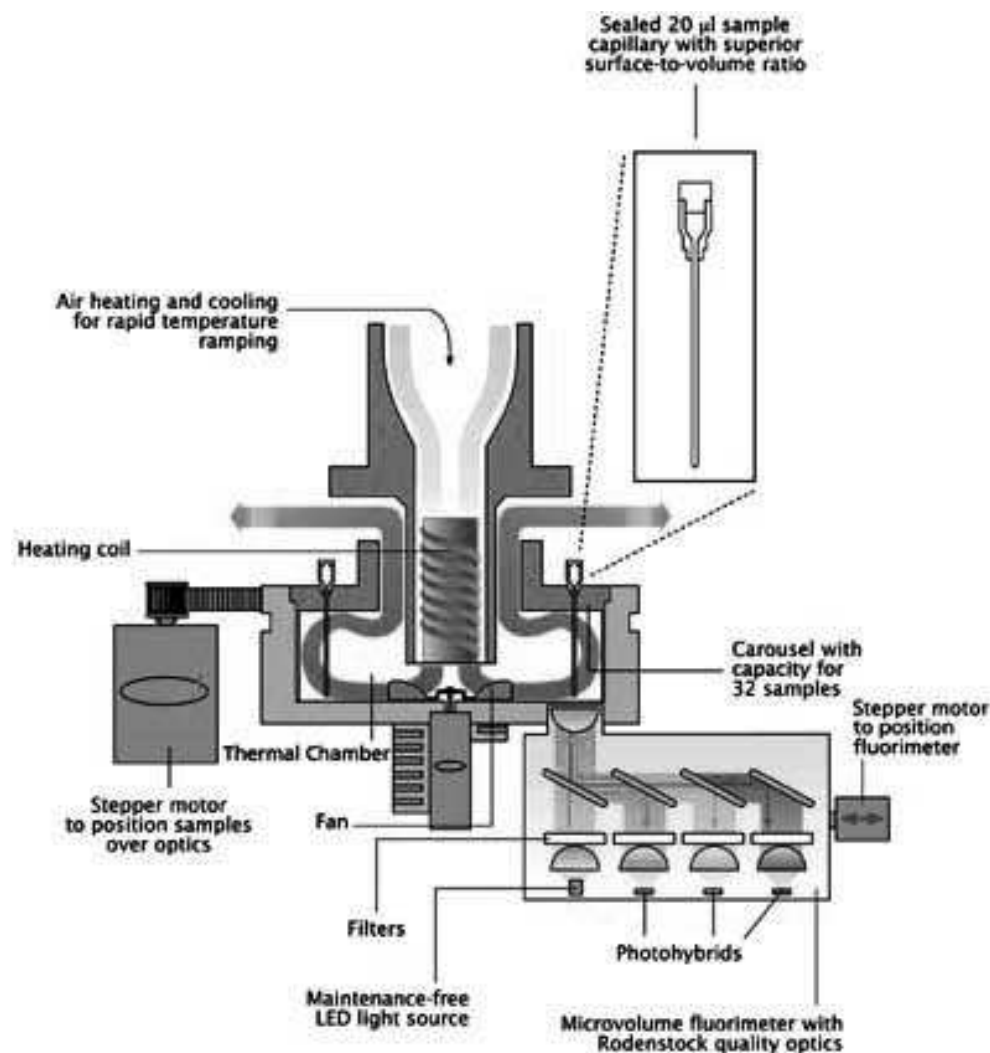
Analýza genové vazby s využitím jednotlivých spermíí

- a) Polohy lokusu genu pro paratyroidní hormon (PTH) a lokusu Gg-globinového genu (HBG2) se nacházejí na krátkém rameni lidského chromozomu 11.
- b) Jednotlivé spermie se přenesou do zkumavek, amplifikace obou lokusů proběhne současně za použití dvou sad primerů
- c) Reakční produkty se nanesou na nitrocelulózový filtr a jsou testovány probami specifickými pro každou ze čtyř možných alel, *A* a *a* pro PTH a *B* a *b* pro HBG2. Výsledek hybridizace je vizualizována autoradiograficky.
- d) Z autoradiogramu lze odečíst haplotypy každé ze spermíí, z nich pak vypočítat frekvenci rekombinace mezi oběma lokusy a stanovit genetickou vzdálenost mezi nimi.



Kvantitativní PCR (qPCR)

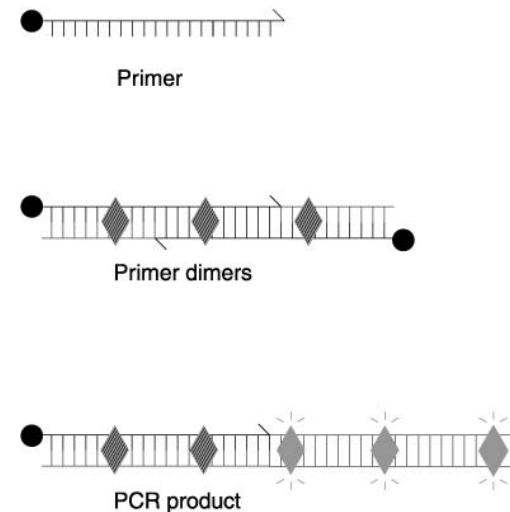
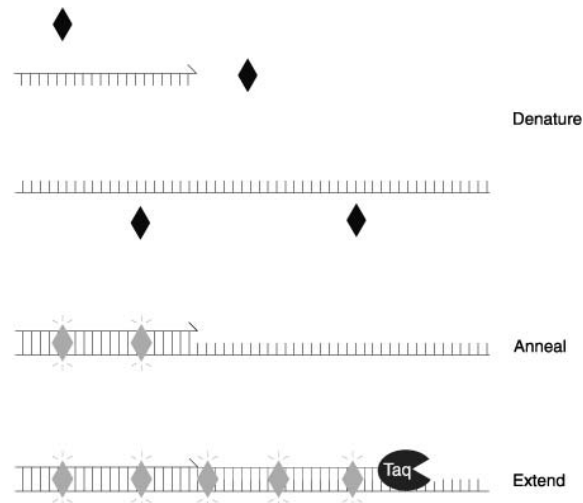
- Polymerázová řetězová reakce sledovaná v reálném čase (real-time PCR, online PCR, kinetic PCR, quantitative PCR, zkr. Q-PCR).
- Varianta PCR umožňující přímou kvantifikaci PCR-produktu v reálném čase
- provádí se prostřednictvím detekce a kvantifikace fluorescenčního signálu ve speciálním přístrojovém zařízení, které umožňuje
 - ◆ cyklické střídání teplot
 - ◆ detekci fluorescence
 - ◆ monitorování postupu PCR v reálném čase bez nutnosti detekovat PCR-produkty elektroforeticky



Metody kvantitativní detekce produktu

- Pro kvantitativní detekci produktu v průběhu qPCR existují následující metody:
 - ◆ Na DNA se vázající interkalační barviva
 - ◆ **SYBR green I**
 - ◆ Na menší žlábek dsDNA se vázající barviva
 - ◆ **BEBO**
 - ◆ Technologie využívající fluorescenční výměny
 - ◆ dvakrát fluorescenčně značené sondy vázající se na střední část amplifikovaného produktu
 - **TaqMan**
 - **Molekulární majáky**
 - **QZyme**
 - ◆ jedenkrát fluorescenčně značené sondy nebo primery
 - **FRET**
 - **LUX**
 - **PNA**
 - ◆ dvakrát fluorescenčně značené primery
 - **AmpliFluor**
 - **Scorpions**

Na DNA se vážající interkalační barviva

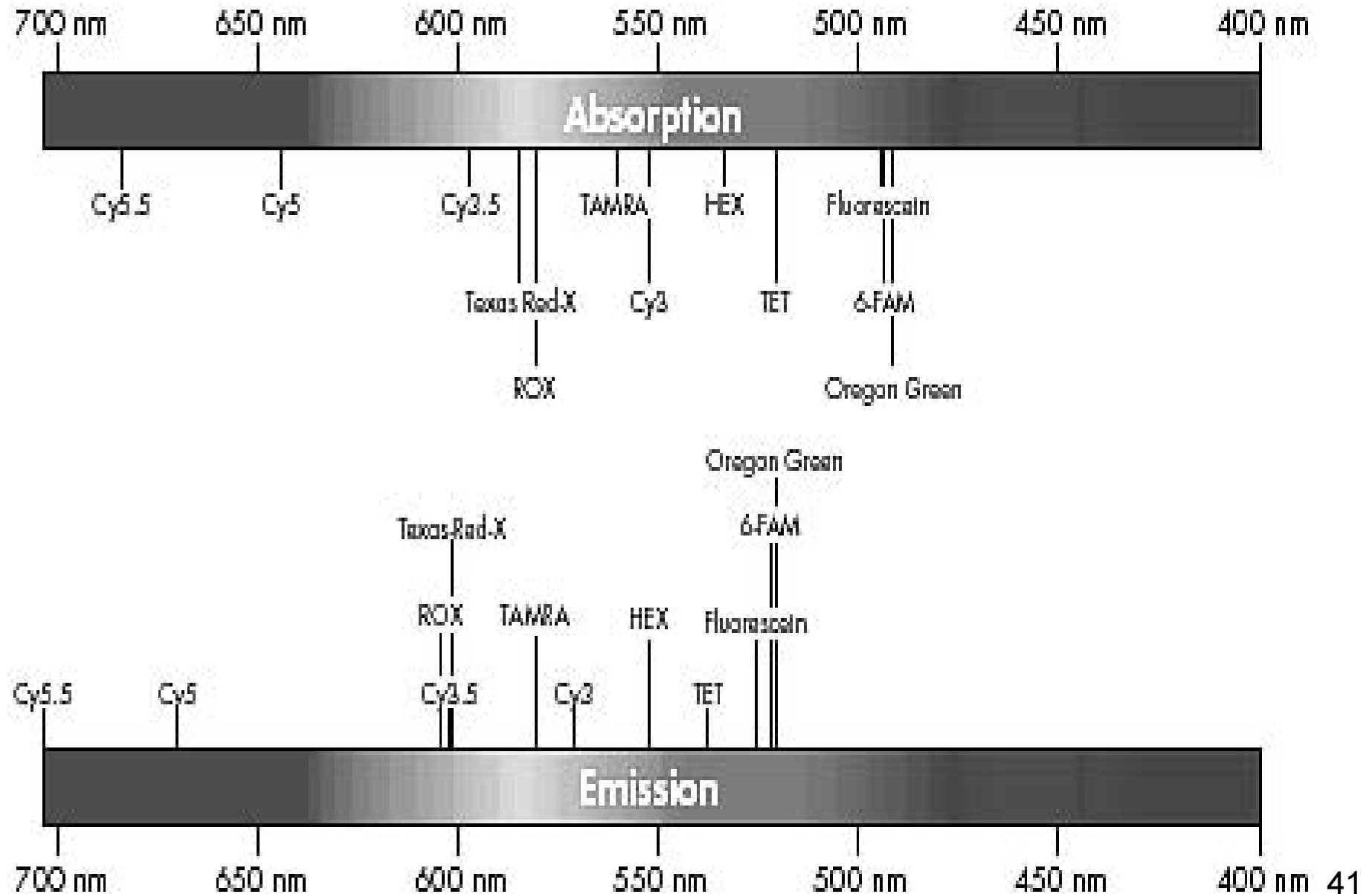


- Pro kvantifikaci amplikonů se běžně používají fluorescenční kyaninová barviva **SYBR® Green**, která fluoreskují po vazbě na dsDNA.
- Fluorescence SYBR green I je po vazbě na DNA až 1000× vyšší
- Fluorescenční signál se zvyšuje se vzrůstajícím množstvím PCR-produktu.
- Signál se měří na konci elongace nebo kontinuálně.
- Na DNA se vážající barviva nemohou být použita u mnohonásobných reakcí
- Hlavním omezením je nemožnost odlišení nespecifických produktů.
- Nespecifické signály tvořené dimery primerů mohou být zhašeny při použití primerů značených specifickými fluorofory.

Fluorescenční výměny při qPCR

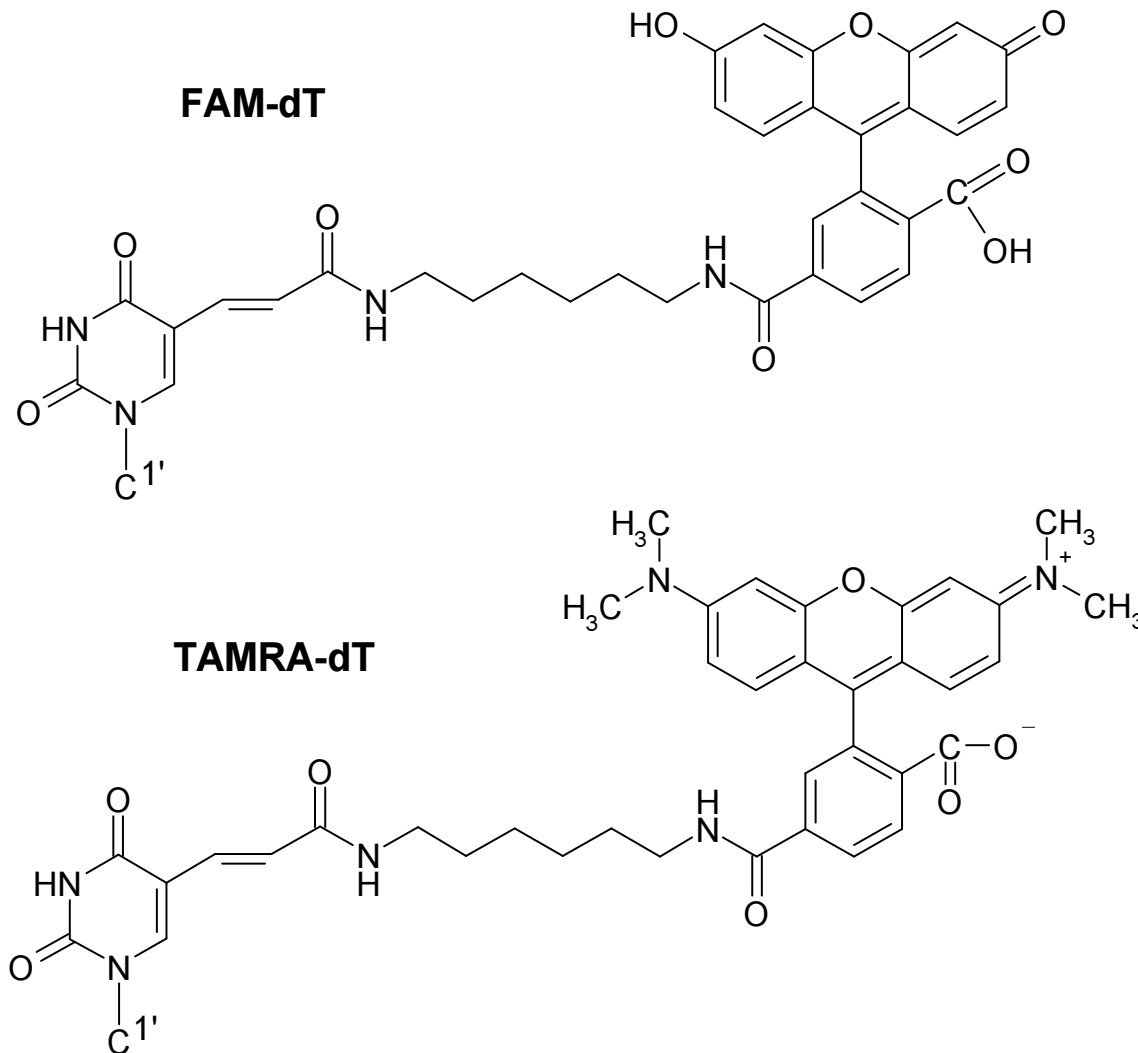
- Pro značení primerů a hybridizačních sond se používají specifické molekuly fluoroforů
 - ◆ emitují světlo určité vlnové délky po předchozí absorpci světla odlišné vlnové délky
 - ◆ emitovaná vlnová délka světla je vždy vyšší než absorbovaná
- Dvojitě fluorescenčně značené sondy obsahují kromě fluoroforu také zhášec
 - ◆ molekula, která přijímá energii z fluoroforu ve formě světla a způsobuje její rozptýlení
 - ◆ ve formě světla s vyšší vlnovou délkou
 - ◆ ve formě tepla
 - ◆ k dosažení optimálního zhášení je třeba, aby se absorpční spektrum zhášeče překrývalo s emisním spektrem fluoroforu.
- V současné době existuje mnoho fluroforů určených pro jednobarevné nebo vícebarevné mnohonásobné detekce polymorfních sekvencí

Absorpční a emisní spektra fluoroforů



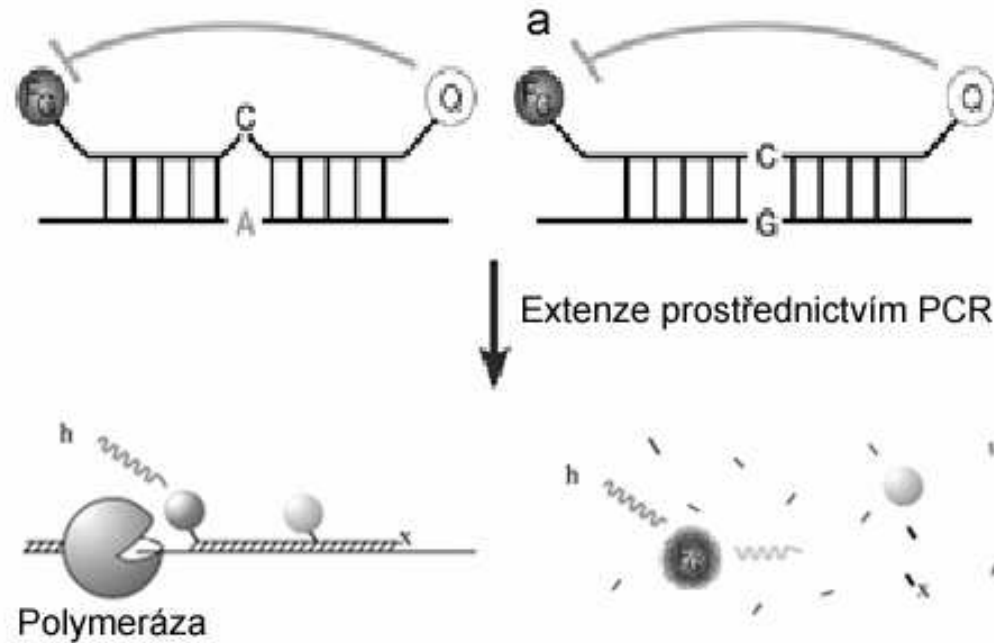
■ Jedna z nejčastěji používaných dvojic fluoroforů při metodách FRET

- ◆ donorový fluorofor FAM (6-karboxyfluorescein)
- ◆ akceptorový fluorofor TAMRA (5-karboxytetrametylrhodamin).



TaqMan technologie

- Hybridizační metoda, kterou využívá kvantitativní PCR např. pro detekci bodových mutací
- Oligonukleotid s fluorescenční značkou a zhášedčem se váže na vnitřní část amplifikované sekvence
- Pokud primer vytváří homoduplex (a), je rozložen 5'-exonukleázovou aktivitou DNA-polymerázy a vznikne fluorescence



TaqMan.exe

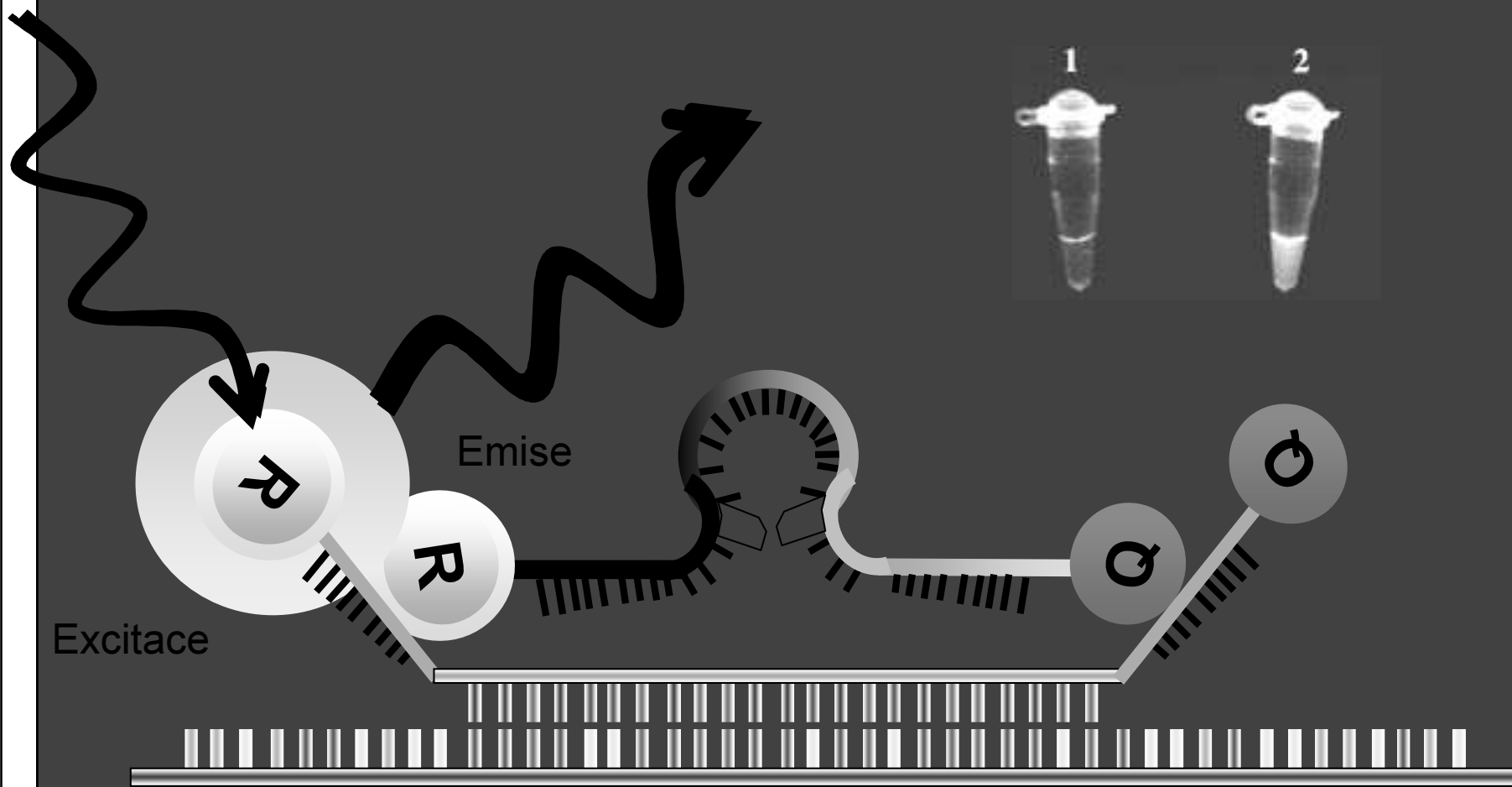
Molekulární „majáky“ (Beacons™)

- Oligonukleotidové sondy detekující přítomnost nukleové kyseliny v homogenním roztoku
- Obsahují vnitřně zhášený fluorofor, jehož fluorescence je obnovena po vazbě na cílovou sekvenci
- Vytvářejí sekundární strukturu vlásenky se smyčkou
 - ◆ Smyčka má komplementární sekvenci k cílové molekule
 - ◆ Krátká stopka je tvořena obrácenou repeticí
 - ◆ Stopka není homologická s cílovou molekulou
 - ◆ Udržuje v těsné blízkosti na koncích připojený fluorofor a zhášec
 - ◆ Hybridní forma s templátem je stabilnější než volná forma₄₄



- Použití
 - ◆ Jeden z nejcitlivějších chemizmů pro detekci SNP
 - ◆ Monitorování kvantitativní PCR
 - ◆ Detekce mRNA v živých buňkách
- Výhody
 - ◆ Vysoká specifita k cílové sekvenci
 - ◆ Může být levný při screeningu jednoho cílového místa
 - ◆ Možnost volby fluoroforu (i multiplex)
- Nevýhody
 - ◆ Obtížný design
 - ◆ Specifické pouze k jedinému cílovému místu
 - ◆ Drahé při testování jednoho cíle v malém počtu experimentů
- Aplikace
 - ◆ Detekce jednonukleotidových mutací v genech
 - ◆ Detekce transgenních organizmů
 - ◆ Detekce virů (HIV aj.)

Molekulární majáky

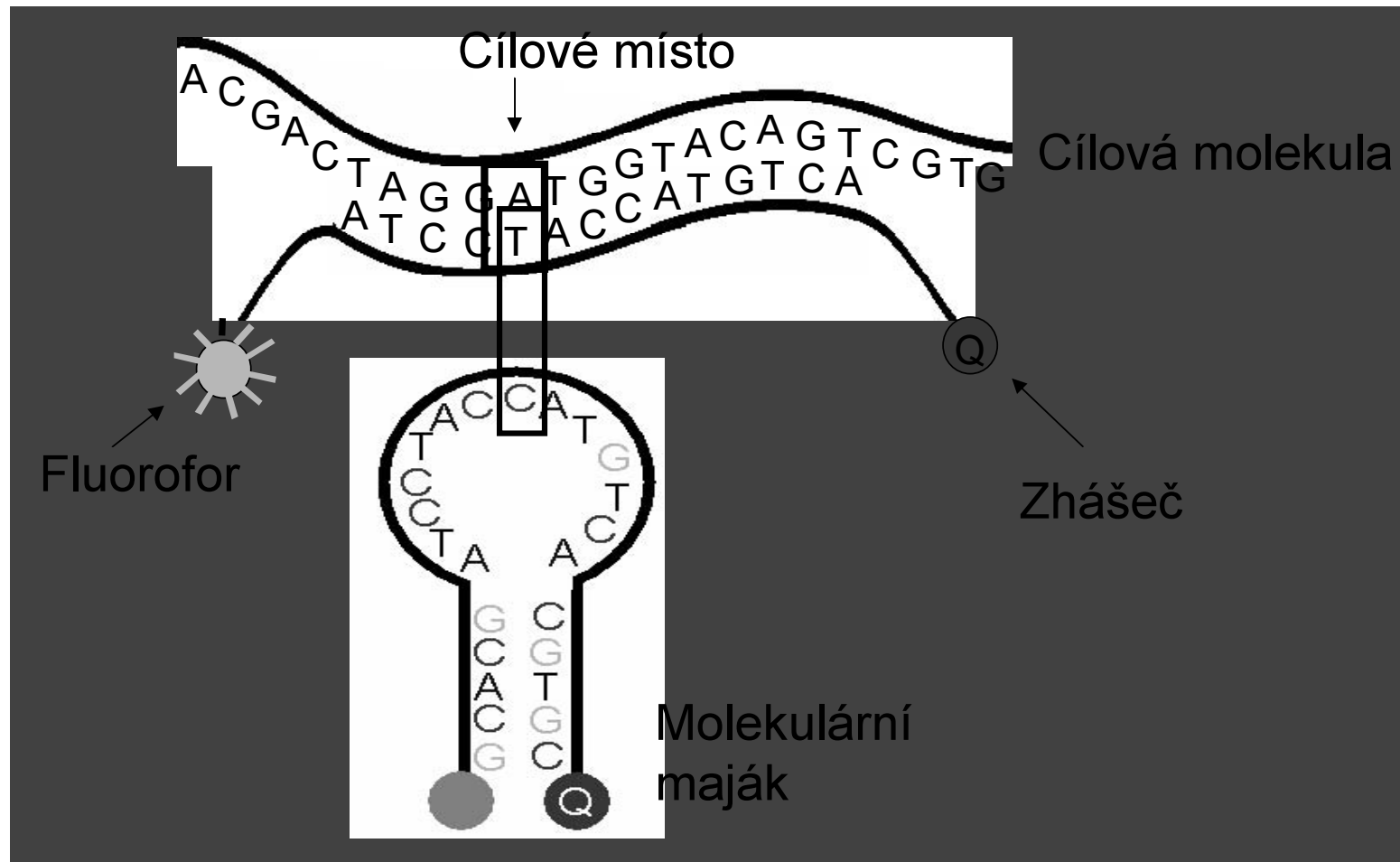


■ Příklad detekce SNP s více variantami sondy

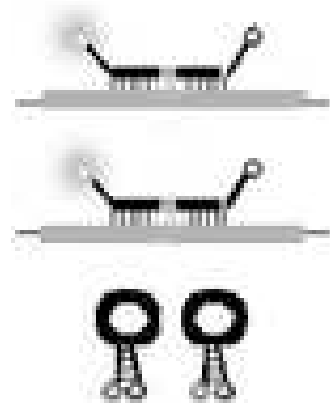
◆ systém vyžaduje duplikáty sond

◆ Jednobarevné

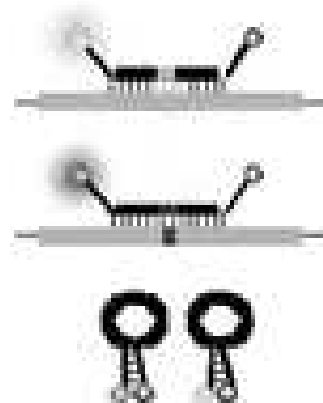
◆ Vícebarevné



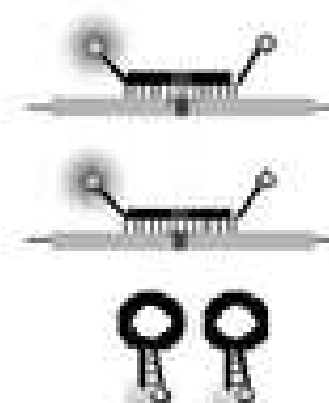
Homozygot
standardní typ



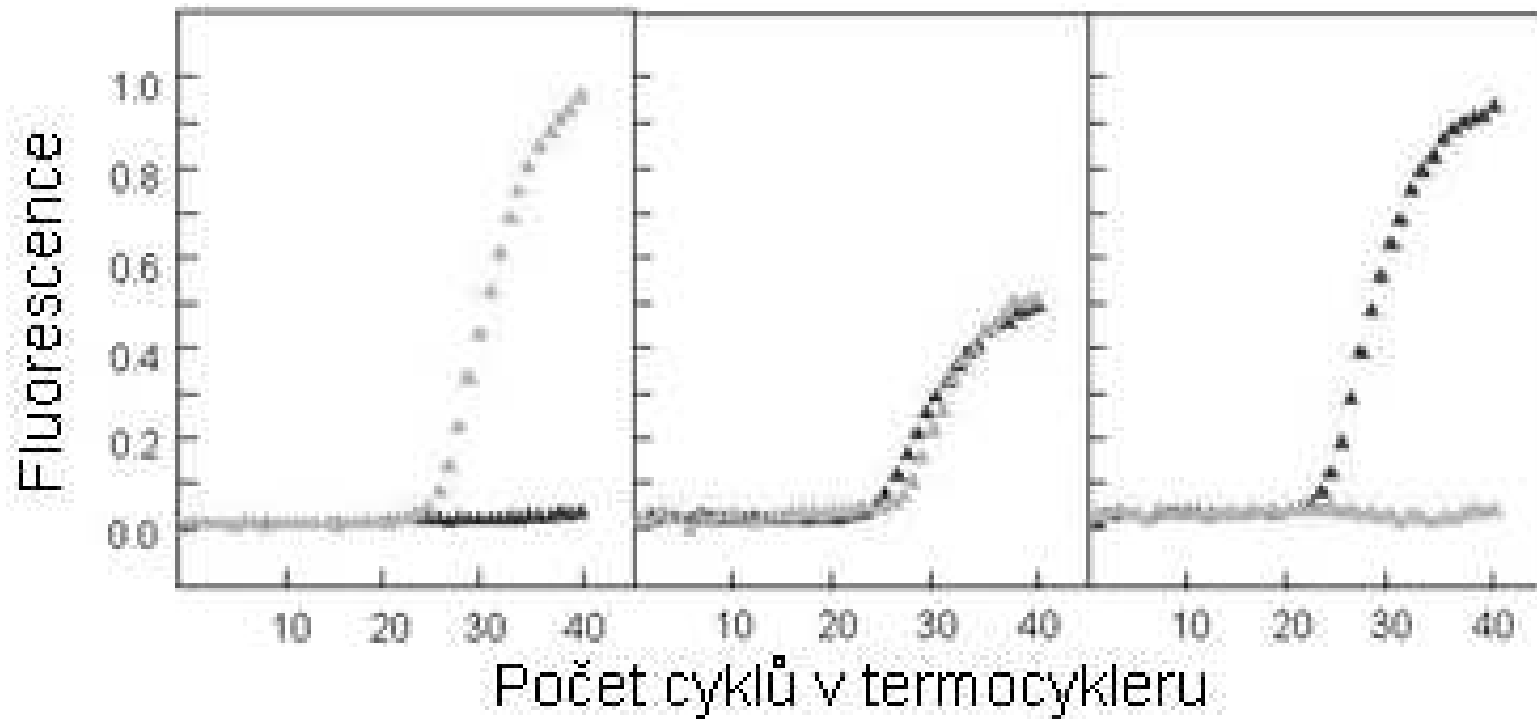
Heterozygot



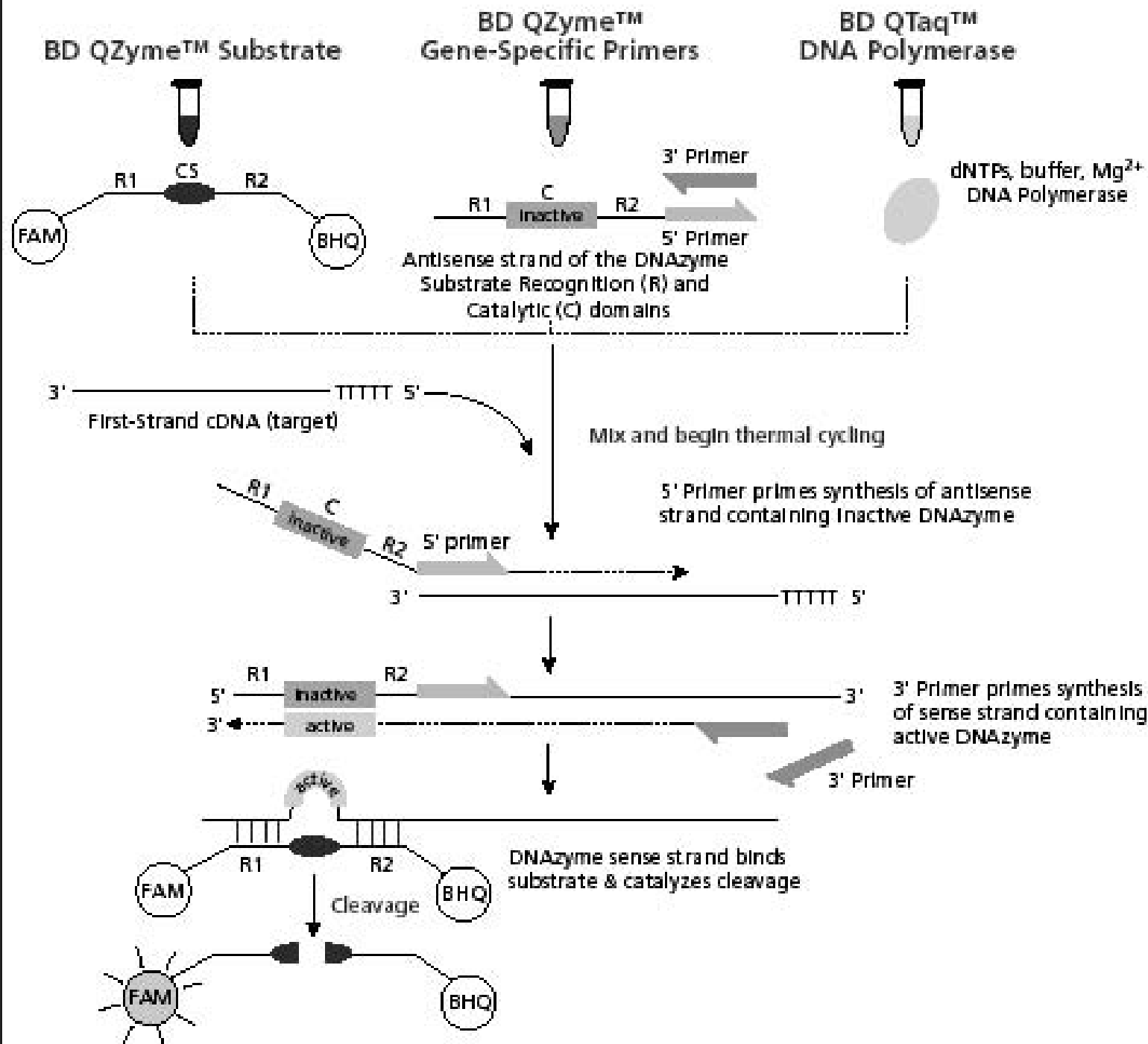
Homozygot
mutant



MoBe.exe

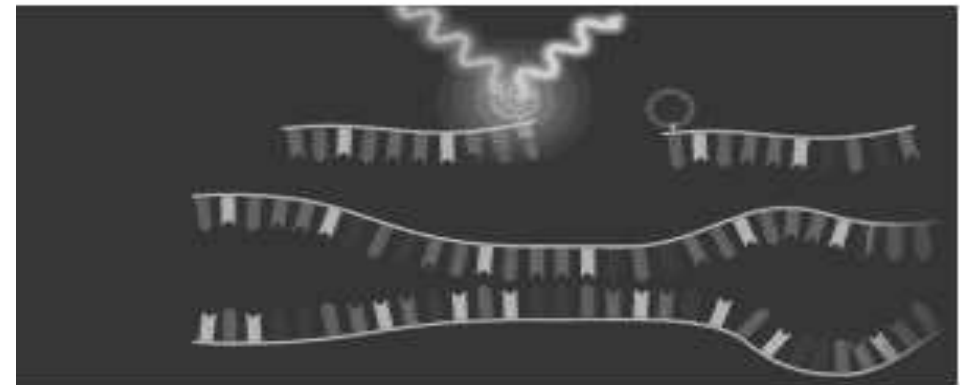
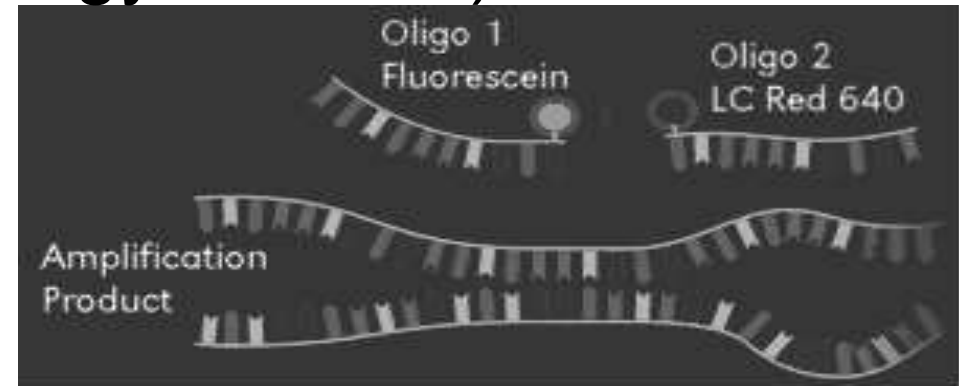


Technologie BD QZyme

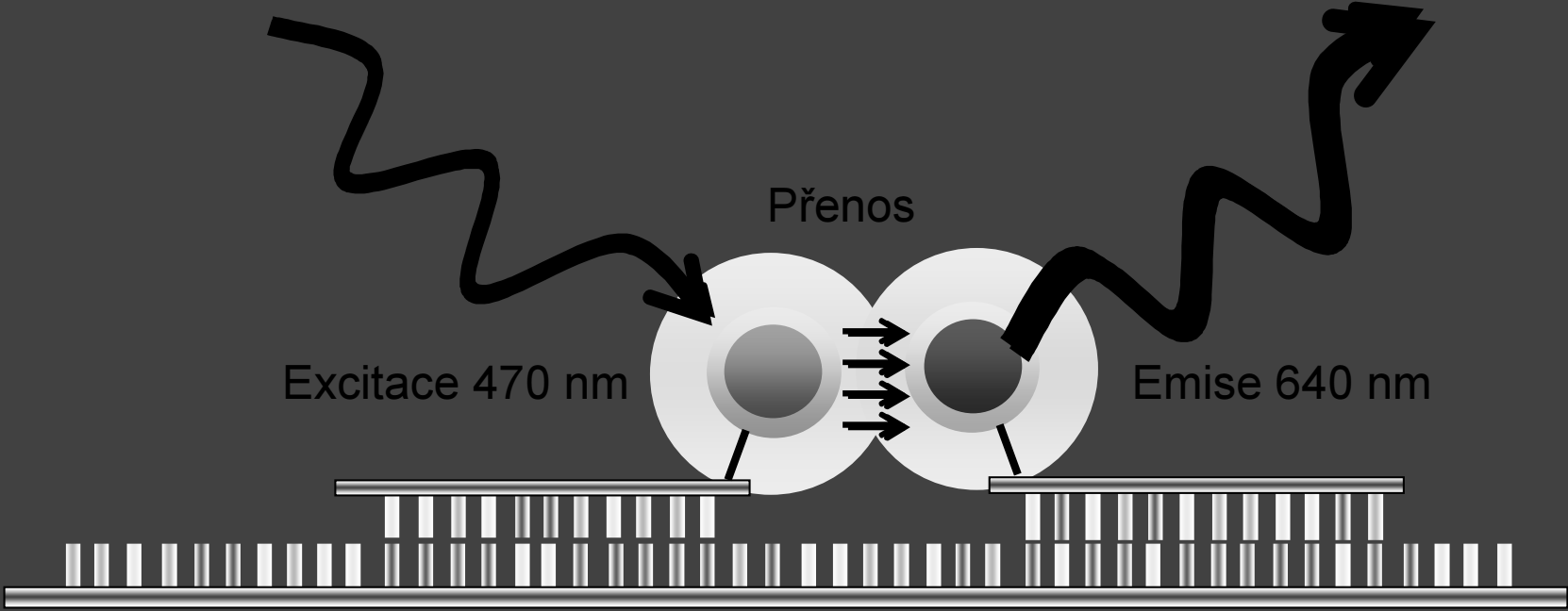


Technologie sond s přenosem energie fluorescenční rezonancí (FRET, Fluorescent Resonance Energy Transfer)

- FRET je excitovaný stav interakce dvou fluoroforů závislý na vzdálenosti, ve kterém je emise energie z jednoho fluoroforu (donoru) na 3'-konci první sondy spojená s excitací druhého (akceptoru) na 5'konci druhé sondy
- Přenos energie mezi ligandy se může uskutečnit na vzdálenost 10-100 Å (1-5 nukleotidů)
- Citlivost FRET (změny intenzity fluorescence) může detekovat změny vzdáleností 1-2 Å

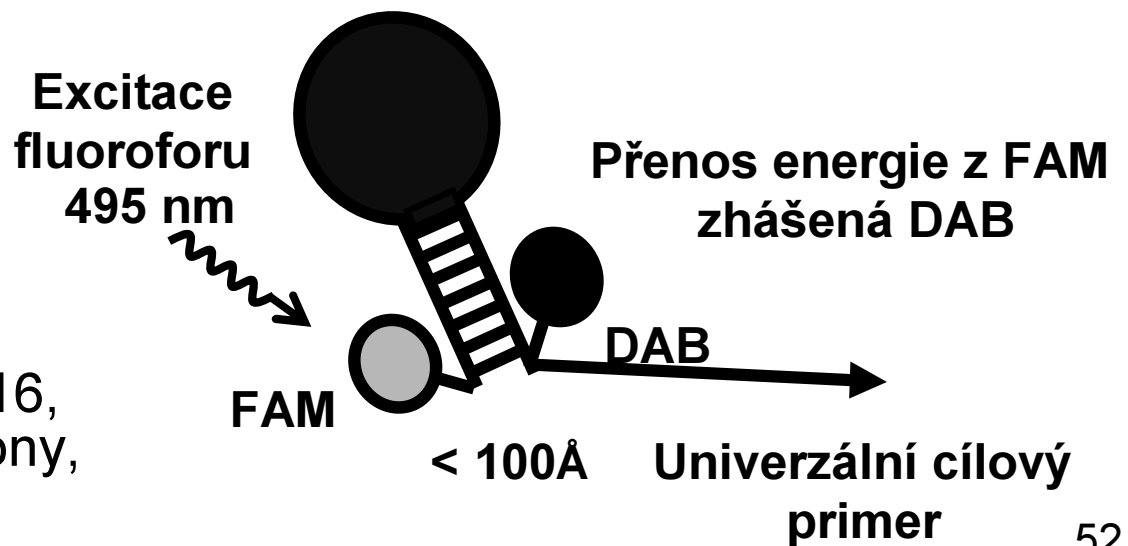


FRET sondy



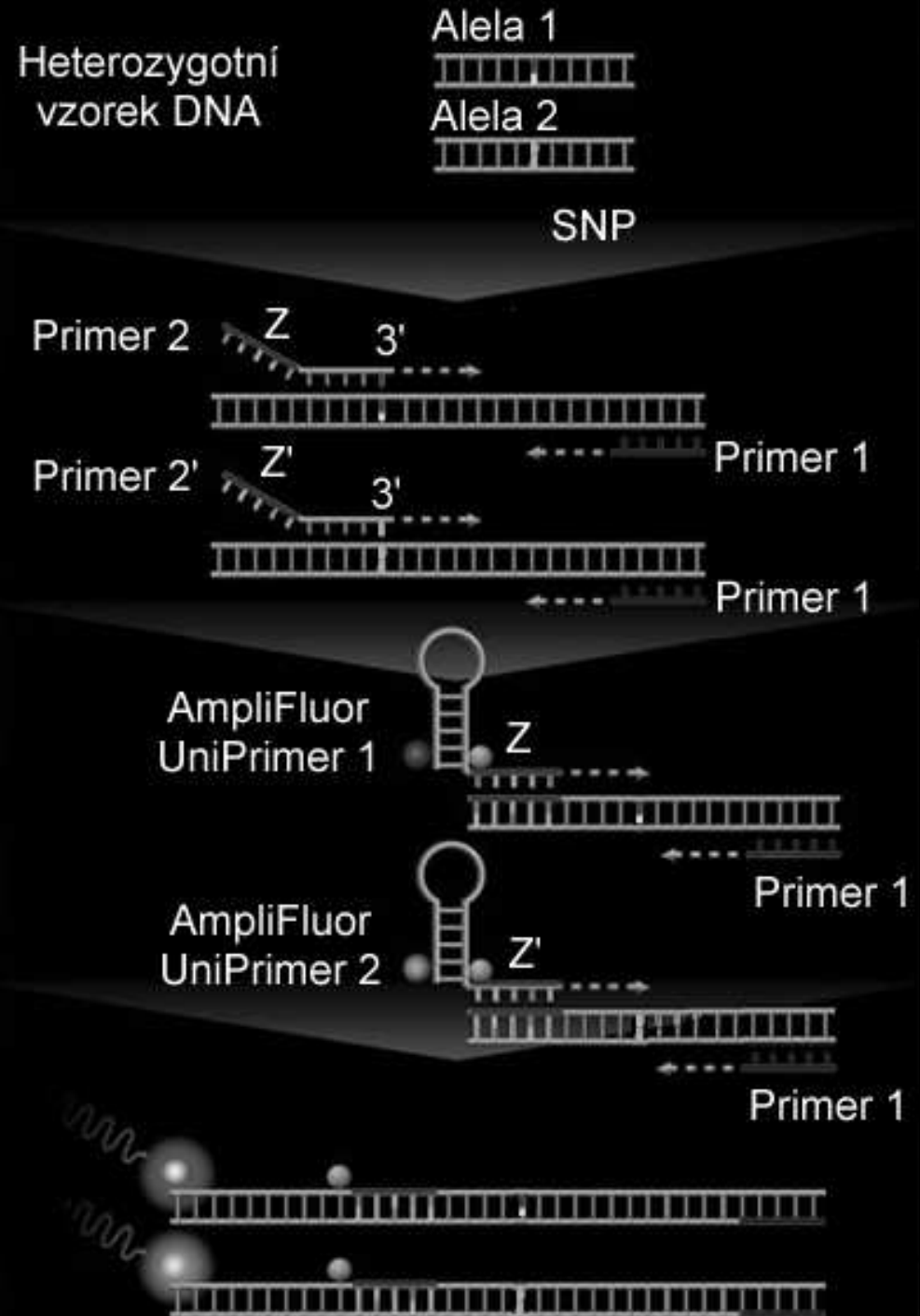
AmpliFluor™ Systém (univerzální primery)

- AmpliFluor je univerzální detekční systém umožňující amplifikaci a detekci v jedné reakční směsi
- Metoda je založená na inkorporaci fluorescenčně značeného primeru s vlásenkovou smyčkou
- Primer je navržen tak, že fluorescenční signál je tvořen pouze tehdy, když je porušena sekundární struktura primeru během jeho inkorporace do PCR produktu
- Nezačleněné primery vykazují extrémně nízkou fluorescenci
 - ◆ Není potřeba purifikovat produkt pro kvantifikaci
 - ◆ Ampli fluor primery jsou univerzální, pracují spolu s jinými PCR primery
- Využití
 - ◆ Q-PCR - vysoká přesnost
 - ◆ *In situ* PCR
 - ◆ Detekce SNP
 - ◆ Studium exprese (RT-PCR)
 - ◆ Multiplex reakce
 - ◆ Komerční kity
 - ◆ rRNA, *bax*, *bcl-2*, *fas* (apoptóza), HPV-16, PSA, β -aktin, interferony, interleukiny

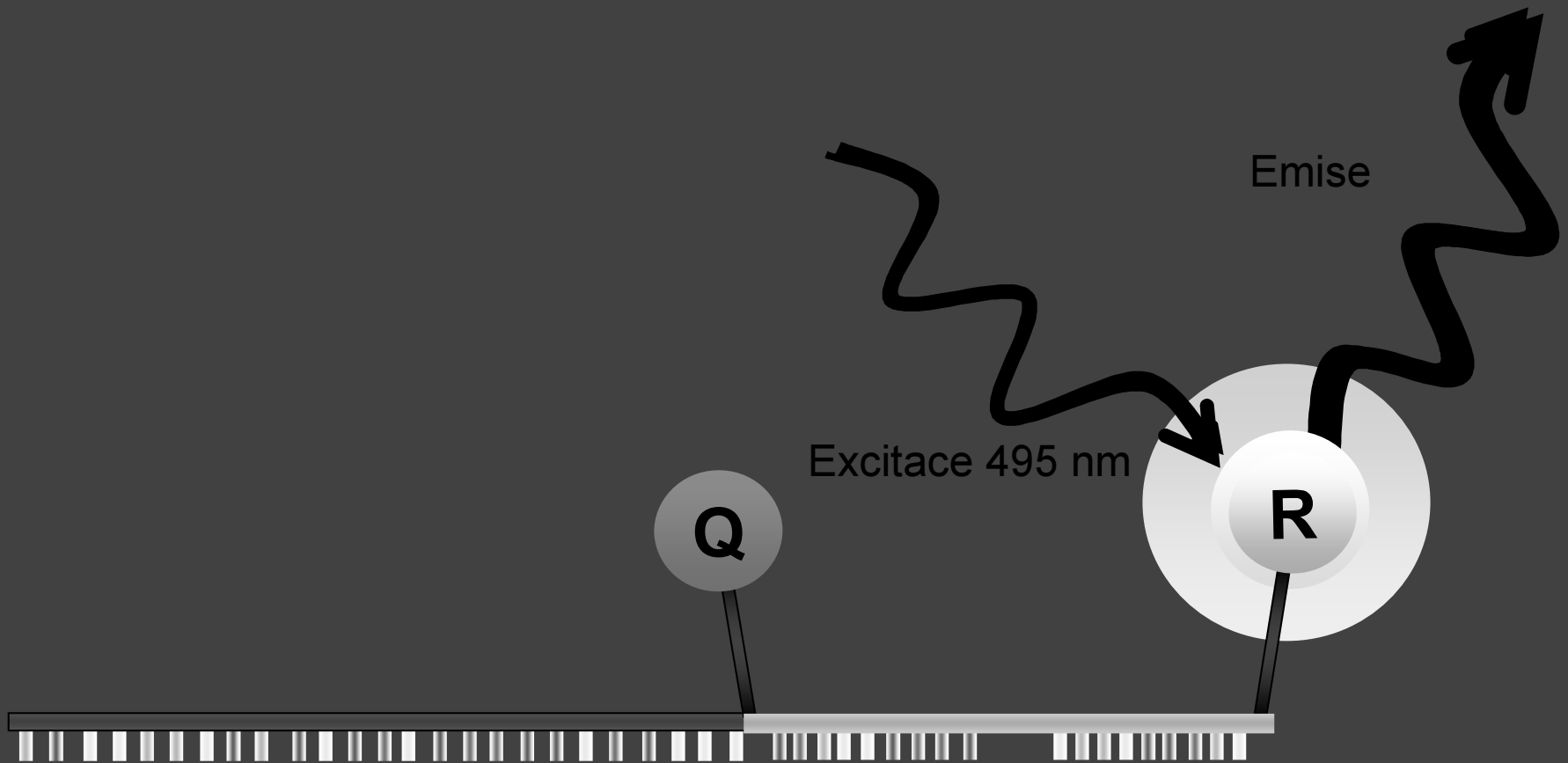


AmpliFluor

1. 1 – 2 cykly PCR amplifikace s primerem 1 a alelově specifickým primerem 2 s přídatnou sekvencí (Z) na 5'-konci
2. 30 cyklů s univerzálním AmpliFluor primerem, který je komplementární k sekvenci Z a s primerem 1
3. Během amplifikace druhý řetězec vytlačí strukturu AmpliFluor primeru a dojde k separaci fluoroforu a zhášeče, což umožní emisi fluorescence

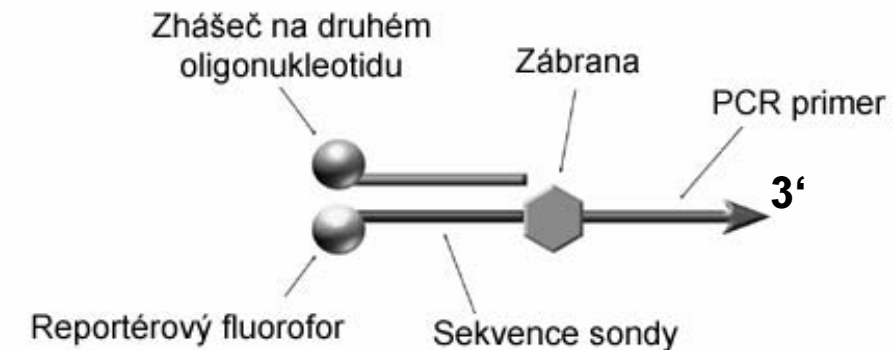


AmpliFluor sondy



Technologie „škorpiónů“ (Scorpions™)

- Škorpióny jsou bi-funkční molekuly obsahující PCR primer kovalentně vázaný k hybridizační sondě
- Molekula obsahuje na 5'-konci fluorofor, který interaguje se zhášečem redukujícím fluorescenci
- Po proběhnutí PCR dojde k intramolekulárnímu přeskupení a fluorofor a zhášeč jsou separovány, což vede ke vzniku světelného signálu ve zkumavce



Krok 1: Primer škorpiónu je prodloužen na matricové DNA



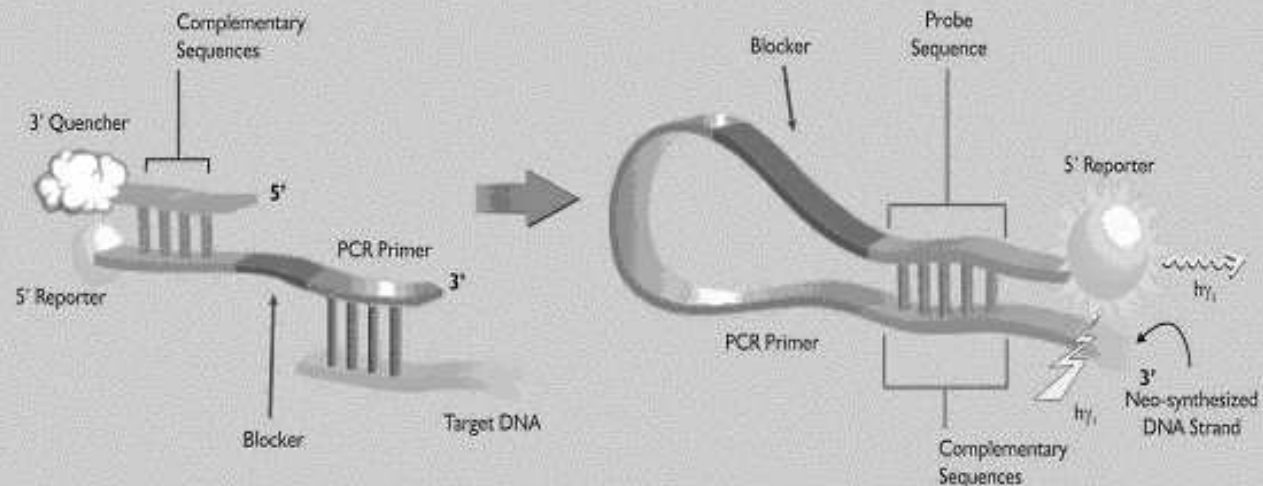
Krok 2: Prodloužený primer je denaturován a zhášeč diasociován



Krok 3: Po snížení teploty se prodloužený škorpión přeskupí a v cílovém místě se vytvoří fluorescence



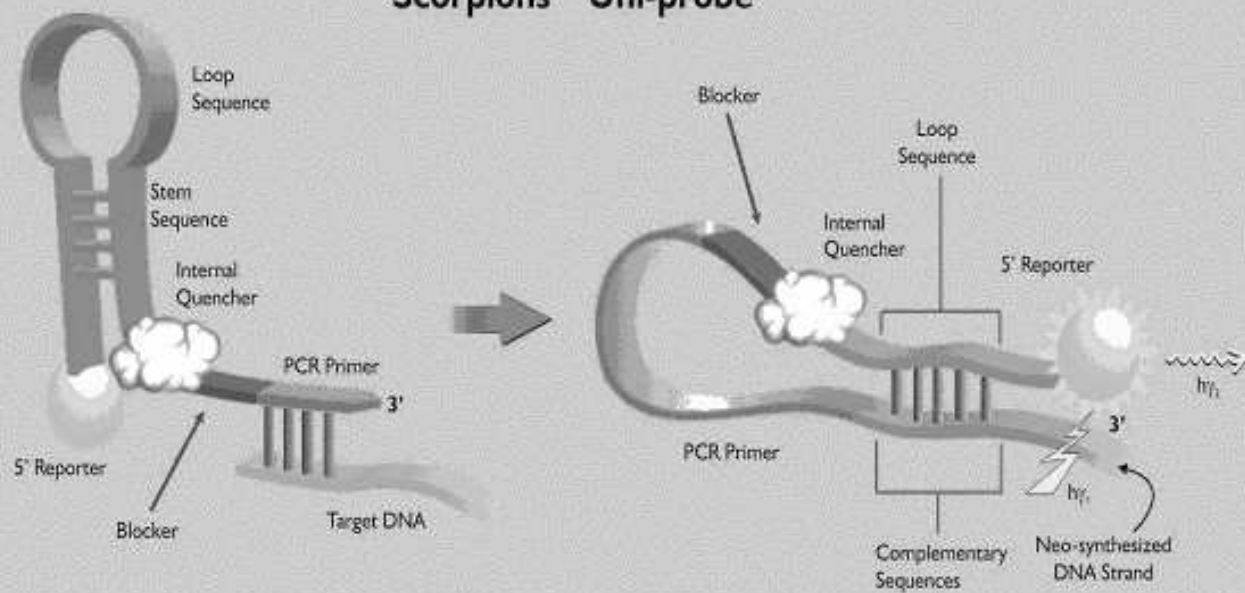
Scorpions™ Bi-probe



1 Quenching of the fluorescence.

2 Emission of the fluorescence.

Scorpions™ Uni-probe



1 Quenching of the fluorescence.

2 Emission of the fluorescence.

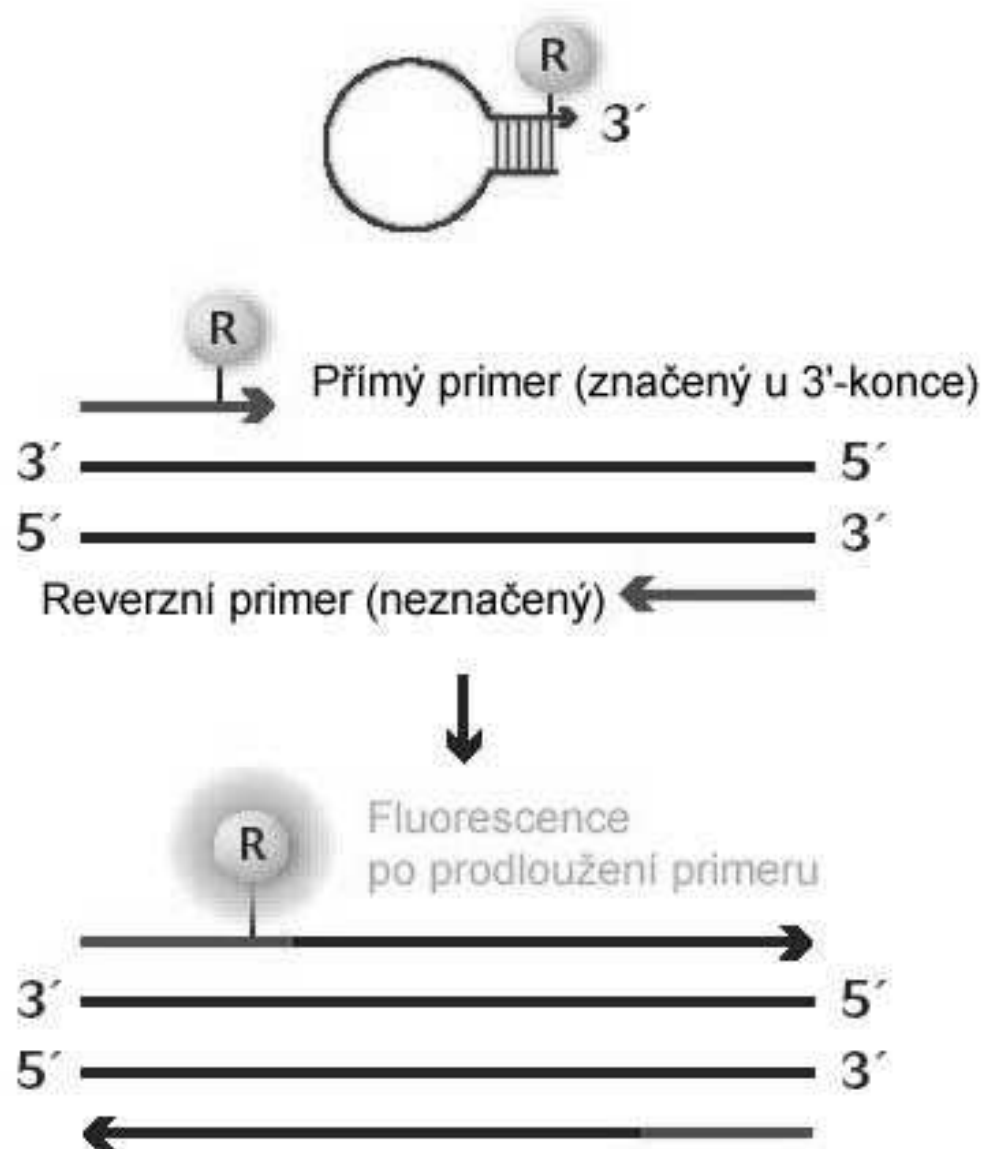
Scorpions.exe

Využití „škorpiónů“

- Škorpióny jsou vylepšením TaqMan a molekulárních majáků
 - ◆ Kombinují sondu a primer v jedné sekvenci
 - ◆ Vysoce specifické
 - ◆ Zhášená sonda vykazuje nízké pozadí
 - ◆ Sonda vidí prodloužení produktu jejího vlastního primeru – konformační přeskupení uvnitř jedné molekuly
 - ◆ Design sekvence je snazší než u molekulárních majáků
 - ◆ Využití při Q-PCR, genotypizaci a haplotypizaci

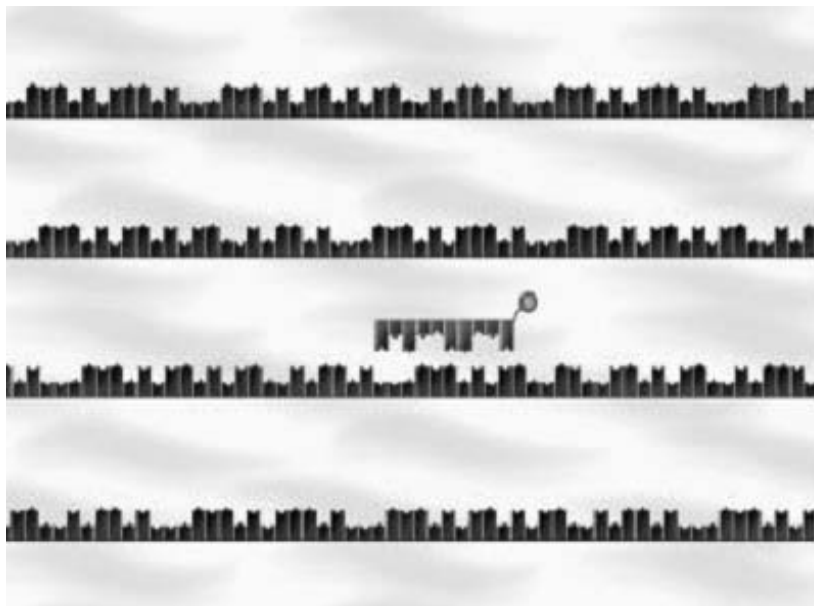
Technologie LUX™ (Light Upon eXtension)

- LUX využívá dva primery, z nichž pouze jeden je značený
- Zhášení primeru je zajištěno sekundární strukturou (vlásenkou) a přítomností páru dG-dC nebo dC-dG na 3'-konci
- Primery se snadno navrhují
- 3'-konec značeného primeru detekuje SNP
- Možnost využít různé fluorescenční značky

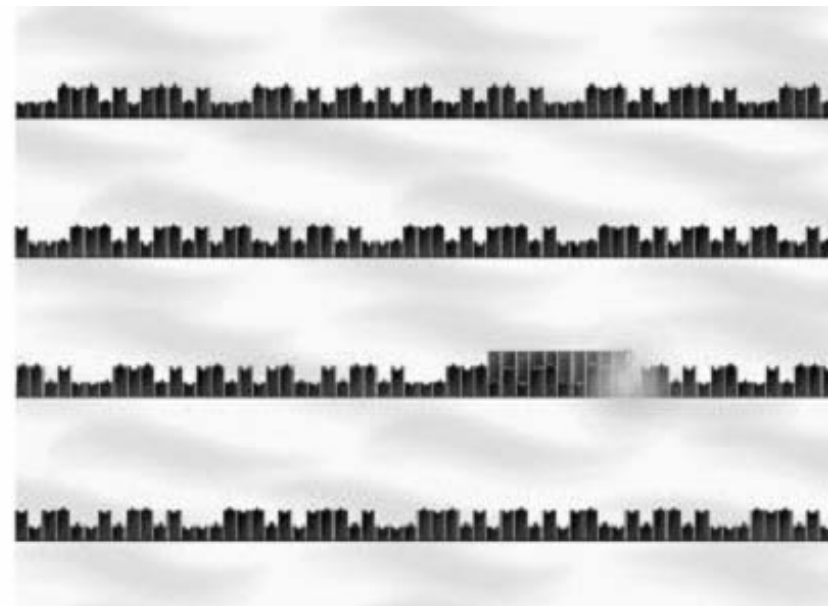


Sondy Light-up

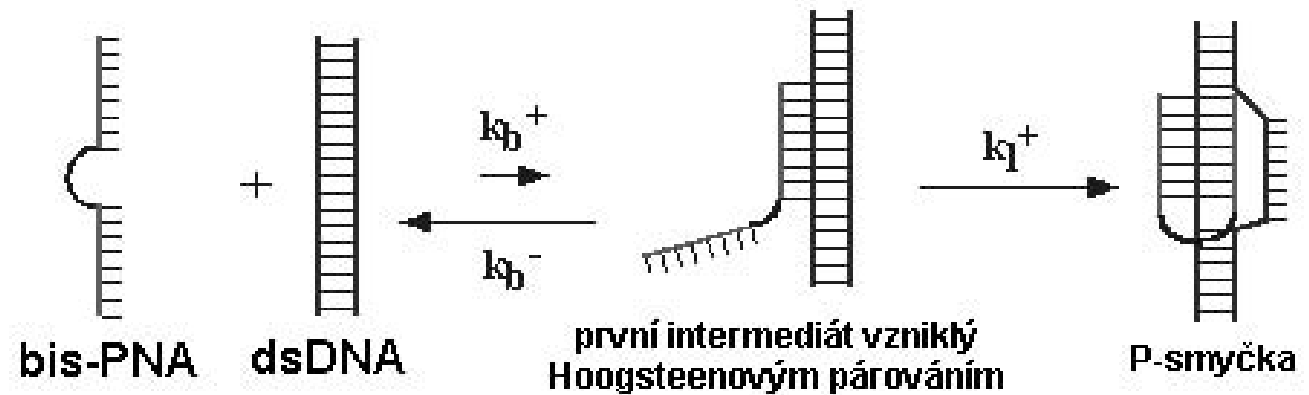
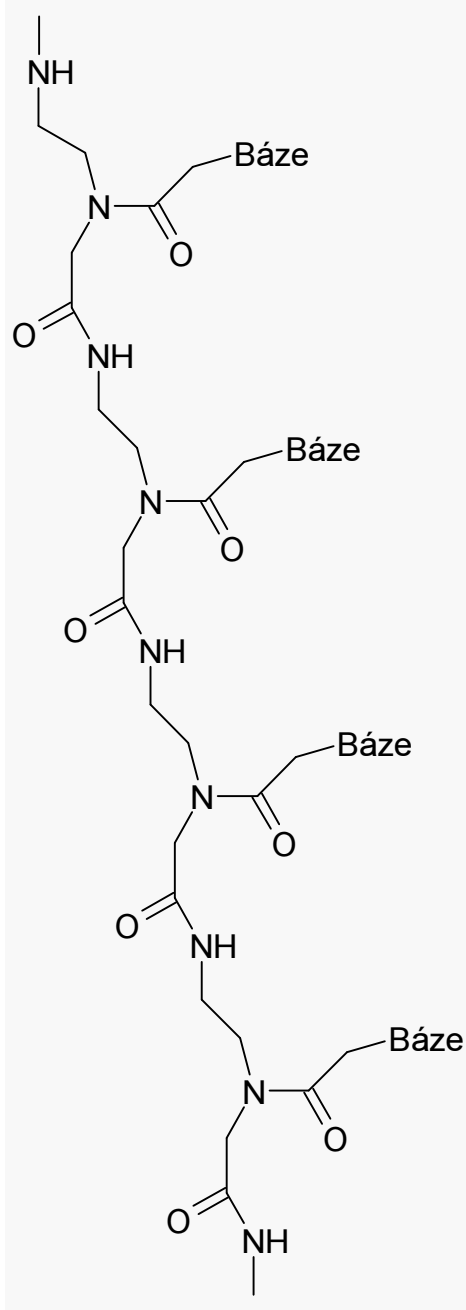
- Slouží pro specifickou detekci sekvencí nukleových kyselin v homogenním roztoku.
- Jsou připraveny z
 - ◆ Analogu nukleových kyselin – PNA (**P**eptide **N**ucleic **A**cid)
 - ◆ Asymetrického kyaninového barviva, které po vazbě na DNA 50× intenzivněji fluoreskuje
- Fluorescence je pozorovatelná za optimálních podmínek pouhým okem
- Peptidová nukleová kyselina (PNA) je analog nukleových kyselin, ve kterém je nahrazená cukr-fosfátová kostra pseudopeptidovým řetězcem.
- PNA se váže komplementárně k DNA a RNA Watson-Crickovým párováním bází a tvoří vysoce stabilní duplexy.
- Interakce PNA:DNA je více selektivní než DNA:DNA nebo RNA:RNA a může ji destabilizovat pouhý jeden chybný pár bází už při 20°C, z toho důvodu je vhodná pro detekci SNP hybridizací.



Light-up.exe



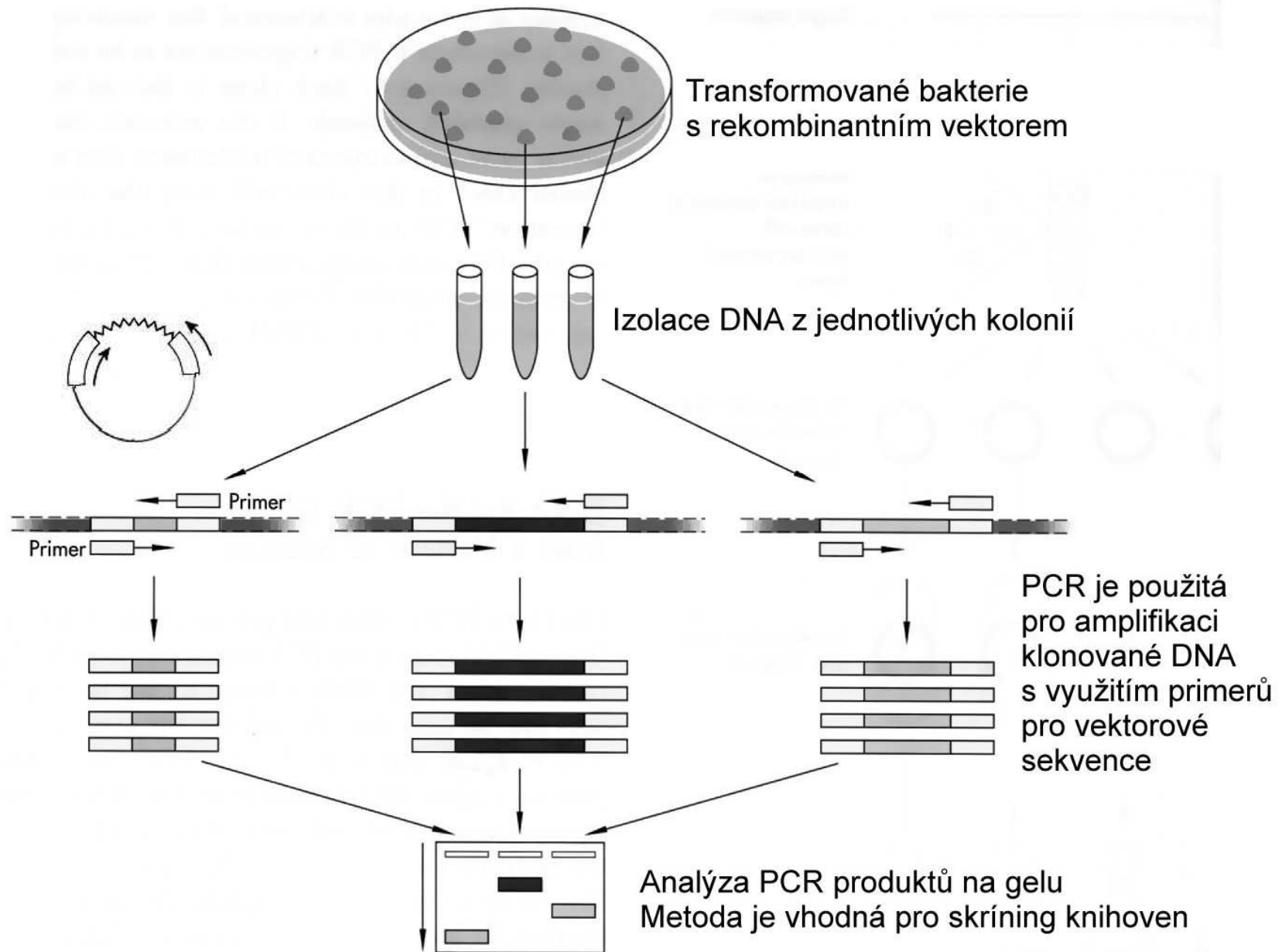
Invazivní bis-PNA sondy tvořící triplex s DNA



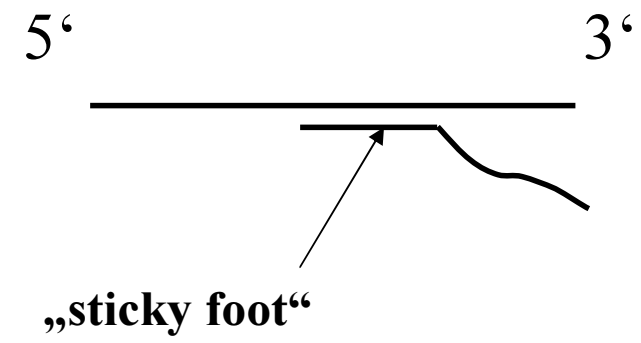
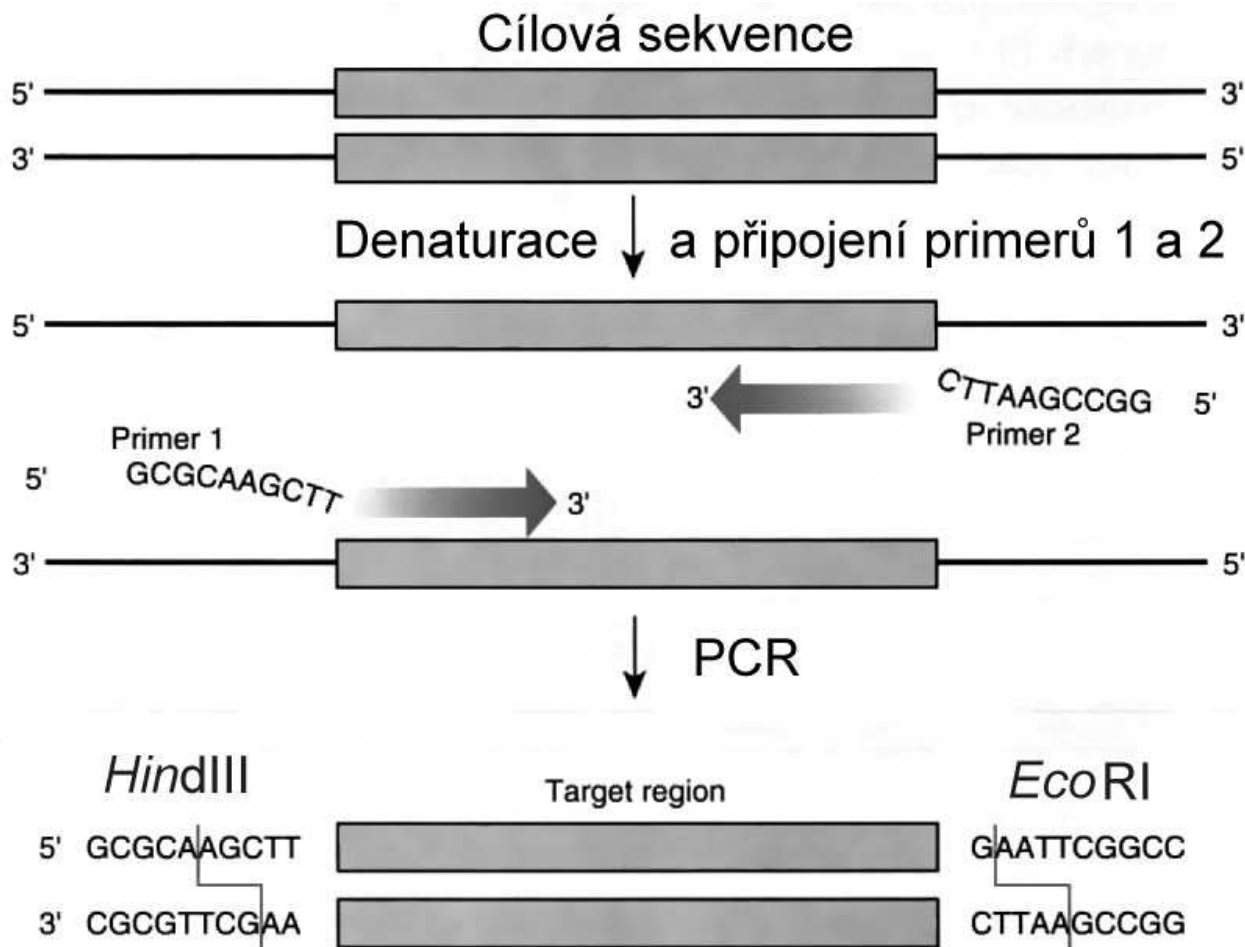
PNA – peptidová nukleová kyselina

Modifikace PCR používané při analýze genomu

Amplifikace sekvencí klonovaných ve vektorech



Modifikace konců DNA, expression cassette PCR (EC-PCR) Připojení sekvencí prostřednictvím 5'-konců primerů



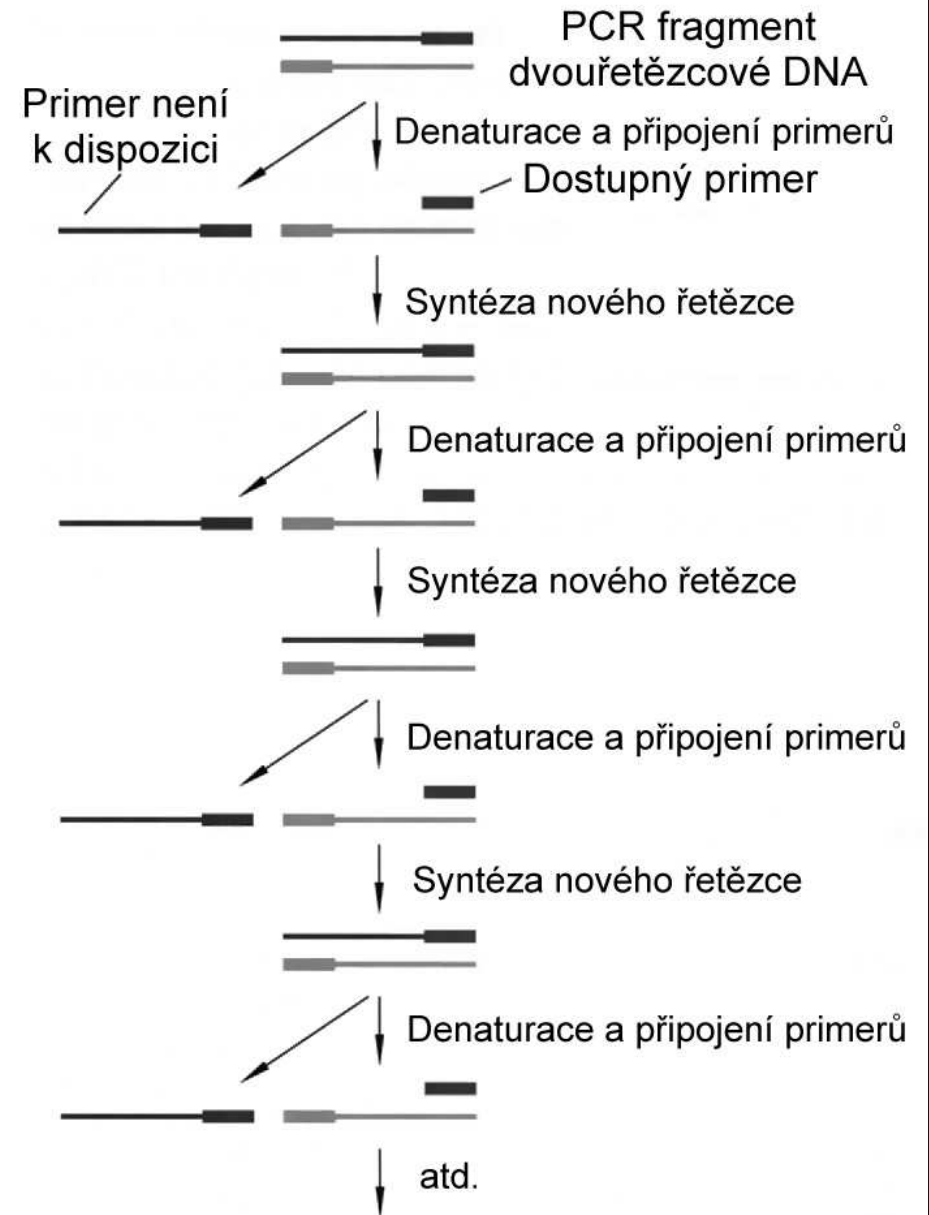
- Přidávané sekvence
 - ◆ RE místa
 - ◆ Promotory
 - ◆ Terminátory
 - ◆ Translační signály

Asymetrická PCR



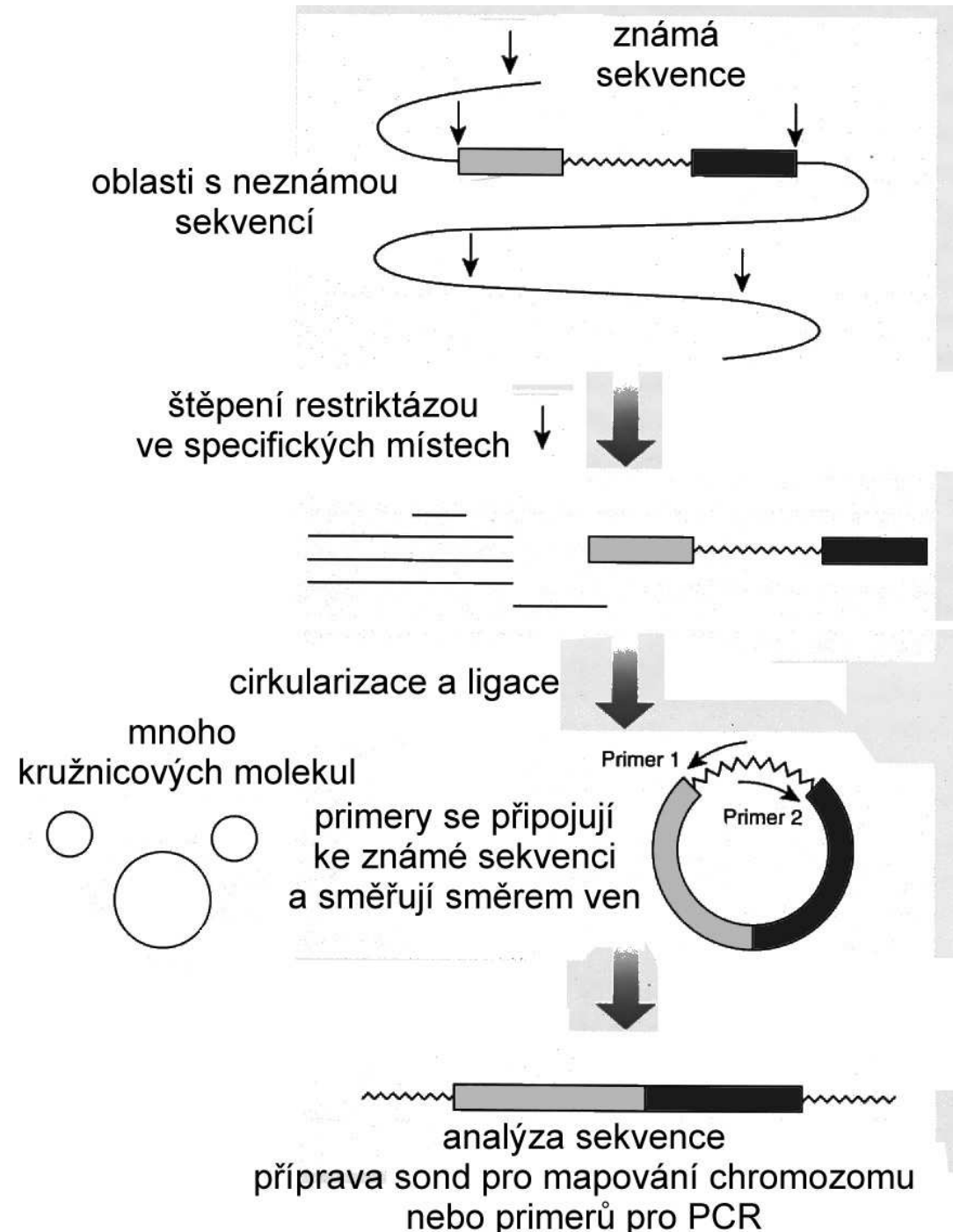
Cycseqpc.exe

- Podobně jako jiné DNA, lze produkty PCR sekvencovat.
- Templátem pro Sangerovu metodu jsou ssDNA. Pro jejich přípravu se používá se technika označovaná jako asymetrická PCR, při níž jsou tvořeny preferenčně ssDNA.
- Standardní PCR se založí s tím rozdílem, že výchozí koncentrace primerů se liší faktorem 100 (tj. jeden z primerů je ve 100 x vyšší koncentraci než druhý).
- Dvouřetězcové DNA fragmenty se tvoří až do doby, než se jeden z primerů nevyčerpá.
- Druhý primer pak dále syntetizuje pouze jeden z řetězců - i když se tento tvoří spíše lineárně než exponenciálně rychlostí, je jeho množství postačující pro sekvencování.

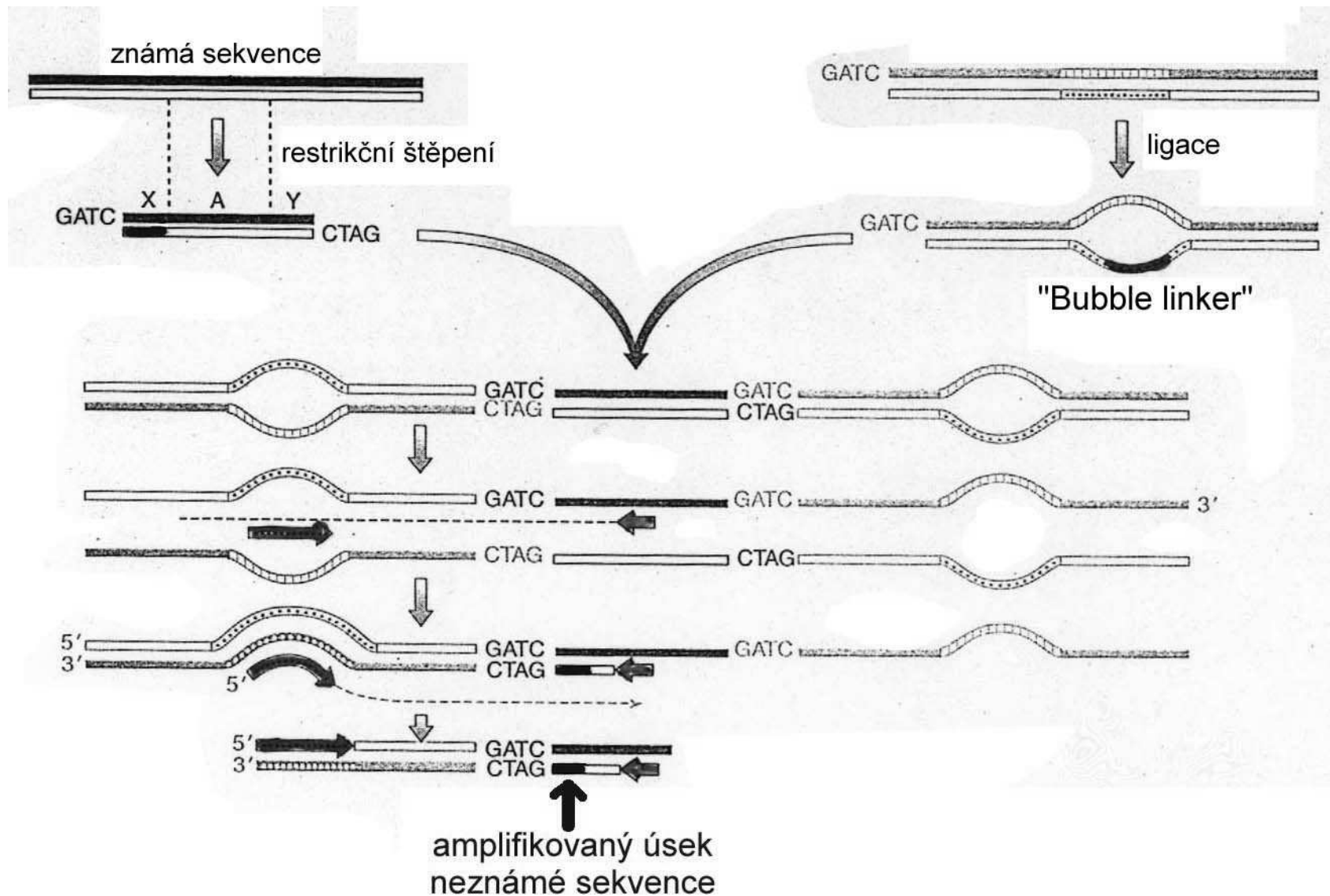


Obrácená PCR (I-PCR)

PCR umožňující
amplifikovat úseky DNA
o neznámé sekvenci
ohraňené na obou
stranách DNA se známou
sekvencí.



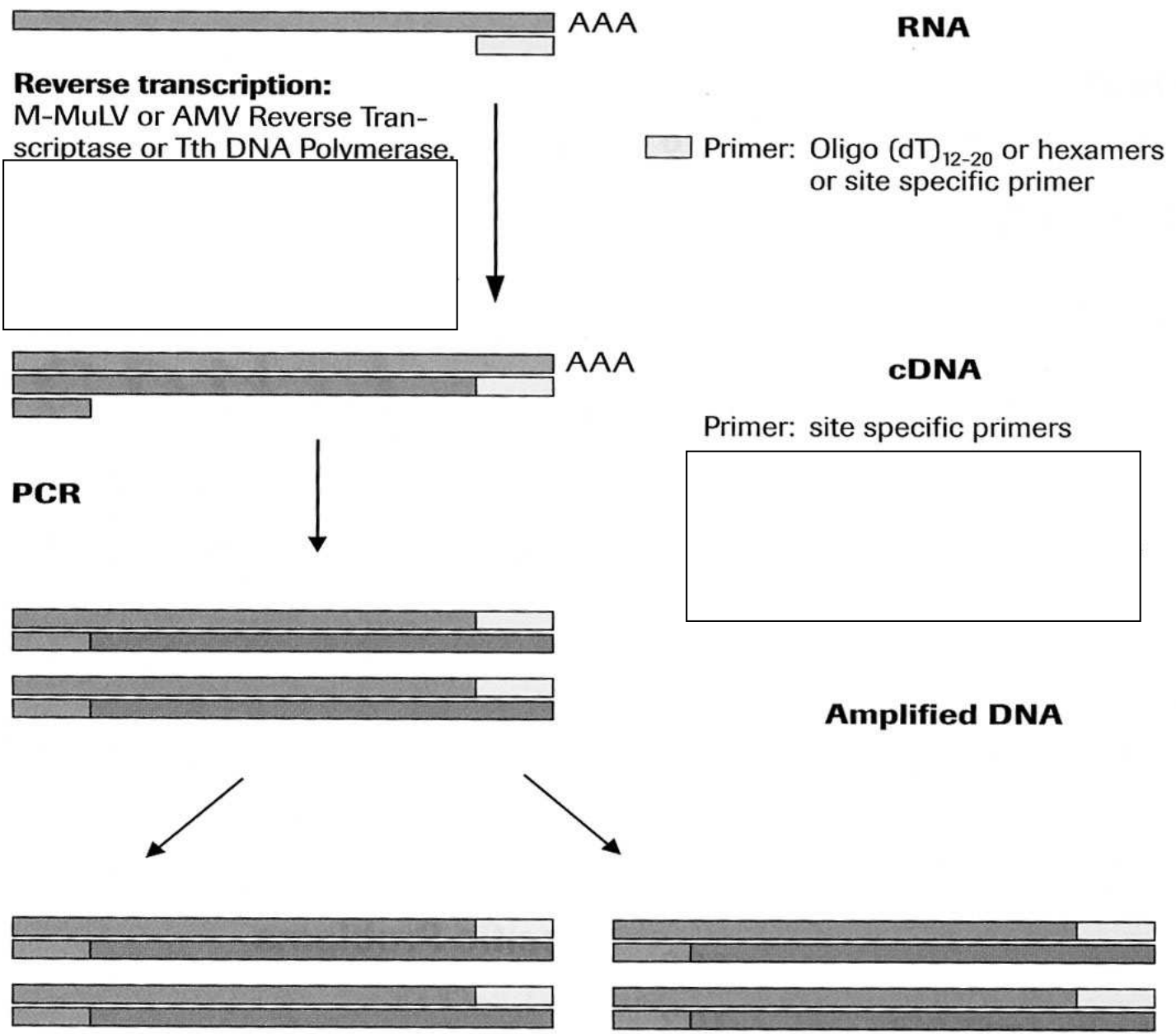
Využití adaptorů pro PCR amplifikaci neznámé sekvence



Zpětná (reverzní) PCR (RT-PCR) detekce sekvencí na RNA

- RNA nemůže sloužit jako templát pro PCR.
- Produkty RT-PCR se tvoří, jestliže je izolovaná RNA nejdříve převedena na cDNA pomocí retrovirové zpětné transkriptázy
 - ◆ M-MuLV = Moloney murine leukemia virus
 - ◆ AMV = avian myeloblastosis virusa poté amplifikována pomocí PCR se dvěma specifickými primery.
- Nevýhody: Zpětná transkriptáza je termolabilní a obvykle nefunkční nad 42°C. Navíc v některých případech znemožňuje převod RNA na cDNA, zejména při složité sekundární struktuře RNA.
- Současná technika:
 - ◆ Termostabilní Tth DNA polymeráza z *Thermus thermophilus* je schopná převést RNA na DNA (RNA dependentní DNA polymerázová aktivita) za přítomnosti Mn²⁺ iontů při 72°C.
 - ◆ Pomocí stejného enzymu je poté prováděna PCR reakce.
- Použití:
 - ◆ mRNA
 - ◆ virové genomy (např. hepatitis C virus, virus chřipky, pikornaviry)

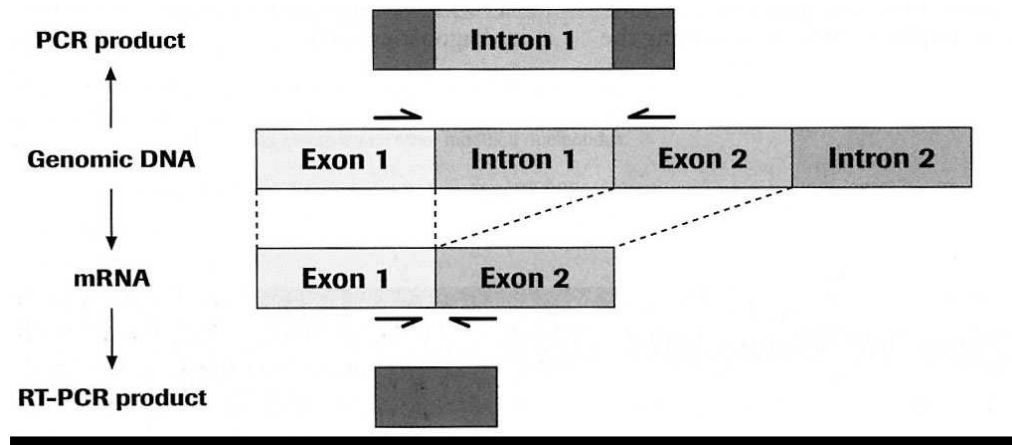
Princip RT-PCR



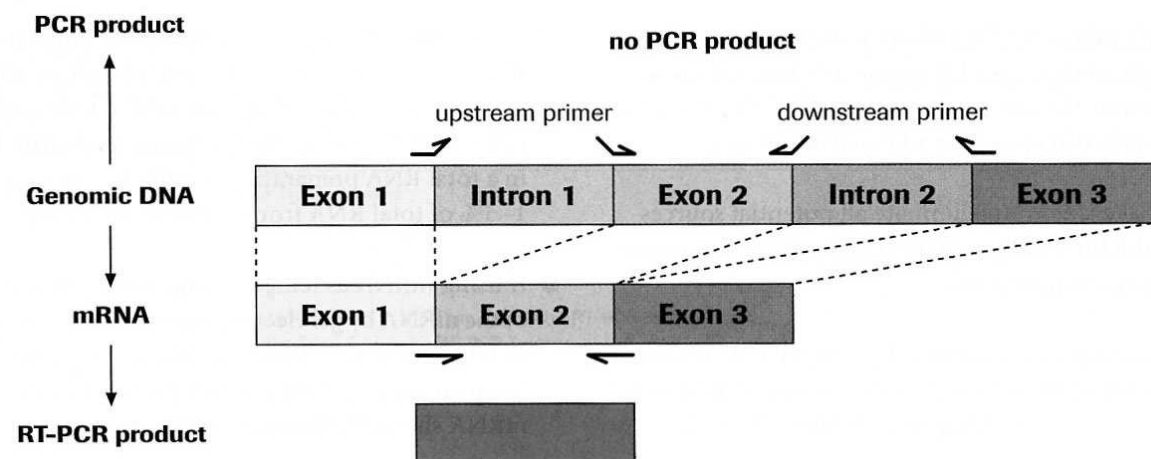
Návrh primerů pro RT-PCR

- RT-PCR amplifikace mRNA vyžaduje dvojici specifických primerů.
- Primery můžeme navrhnout tak, abychom odlišili produkty vznikací při RT-PCR a při standardní PCR s genomovou DNA.
- Dva přístupy pro návrh primerů:

- ◆ Primery, které se připojují k sekvenci 2 exonů na obou stranách určitého intronu. Amplifikační produkt z genomové DNA je větší než produkt RT-PCR.



- ◆ Primery komplementární k sekvenci na spojení exon/exon. Takové primery neamplifikují genomovou DNA.

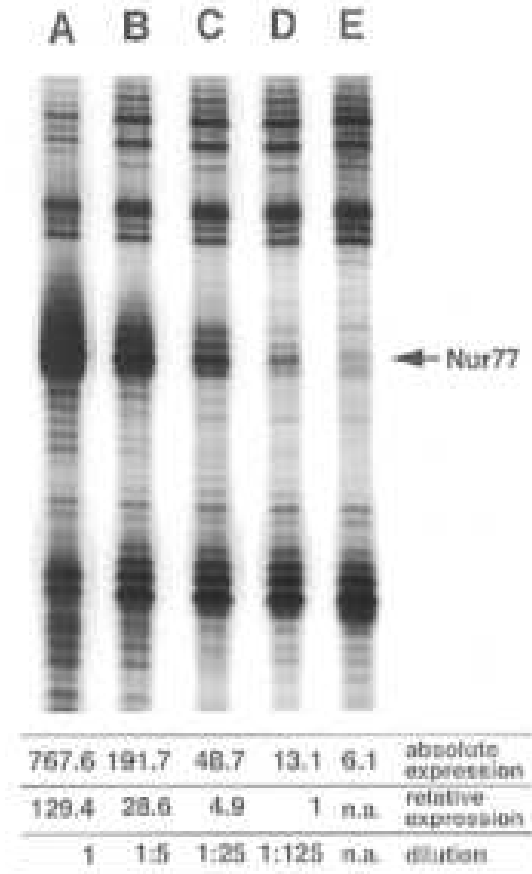


Uspořádání RT-PCR reakce

- **Jednokroková RT-PCR**
 - ◆ *Tth* DNA polymeráza
 - ◆ dvojice primerů
 - ◆ syntéza cDNA za přítomnosti Mn^{2+}
- **Výhody:**
 - ◆ rychlost
 - ◆ není riziko kontaminace
 - ◆ vyšší citlivost (probíhá při vyšší teplotě)
- **Dvoukroková RT-PCR**
 - ◆ První krok: zpětná transkriptáza + oligo(dT)
 - ◆ Druhý krok: Taq DNA polymeráza + dvojice primerů
- **Výhody:**
 - ◆ umožňuje optimalizovat zvláště zpětnou transkripci a zvláště PCR
 - ◆ umožňuje syntézu dlouhých produktů (až 14 kb)

DD-PCR, Differential Display-PCR

- V genomech obratlovců existuje cca 100 000 strukturních genů
- V jednotlivých tkáních je exprimováno pouze malé procento z nich
- DD-PCR slouží pro studium úrovně exprese genů
 - ◆ v různých tkáních
 - ◆ při patologických procesech
- Princip:
 - ◆ Vzorek RNA je převeden na cDNA pomocí RT-PCR
 - ◆ s oligo-dT primerem, který má na 3'-konci dvě degenerované báze:
5' TTTTTTTTTTTTMMN 3' , kde
M = A, G nebo C; N = jakýkoli dNTP)
 - ◆ druhý primer je směsný náhodný 8-10mer tvořený náhodnými sekvencemi
 - ◆ Pro odhalení co největšího počtu mRNA mohou být využity různé sady druhého náhodného primeru
 - ◆ RT-PCR se provádí s radioaktivně značenými oligonukleotidy
 - ◆ Rozdílně exprimované mRNA jsou detekovány na autoradiogramu

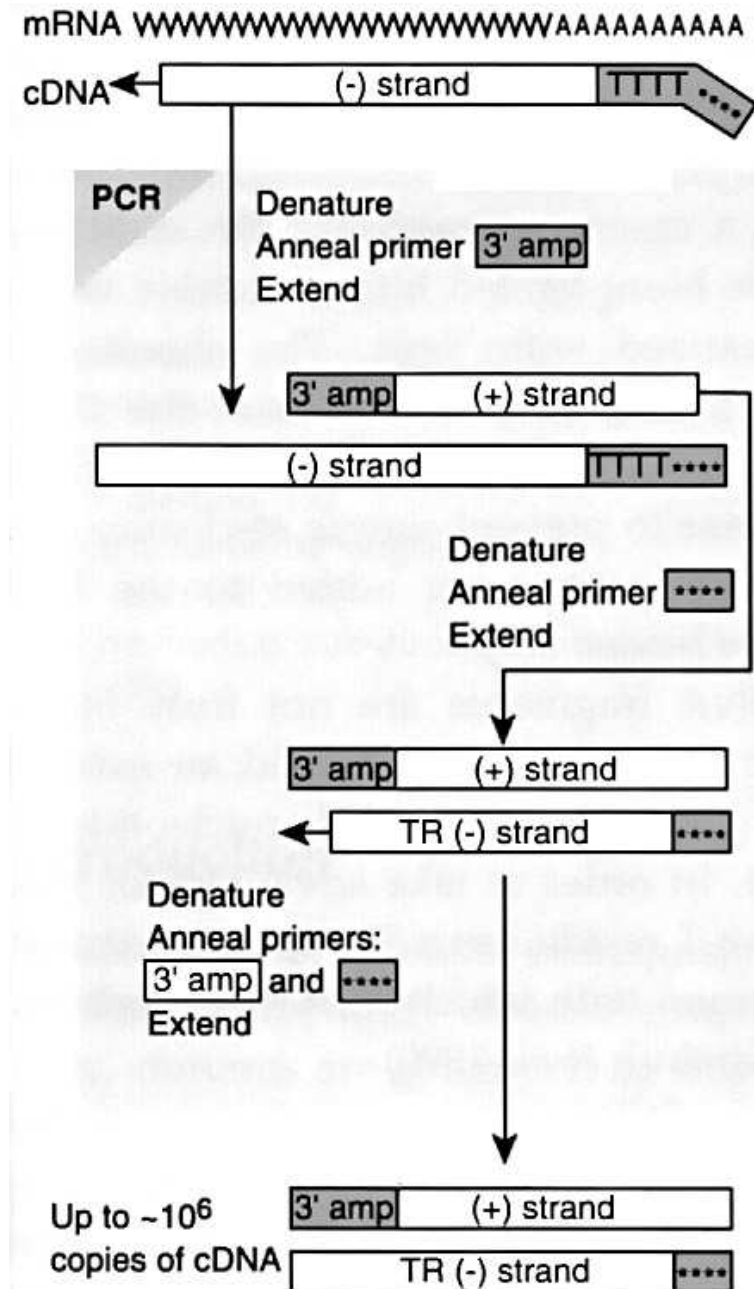


RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends)

- Rychlá amplifikace konců cDNA (RACE) je technika založená na PCR vyvinutá k usnadnění klonování cDNA o úplné délce s 5' a 3' konci poté, co byla stanovena část sekvence cDNA jinými metodami.
- Syntéza cDNA z mRNA o úplné délce není pomocí reverzní transkripce snadná.
- Pomocí RACE se amplifikuje kratší úsek od jednoho konce (3' nebo 5') a ze střední části o známé sekvenci.
 - ◆ 3' RACE
 - ◆ 5' RACE

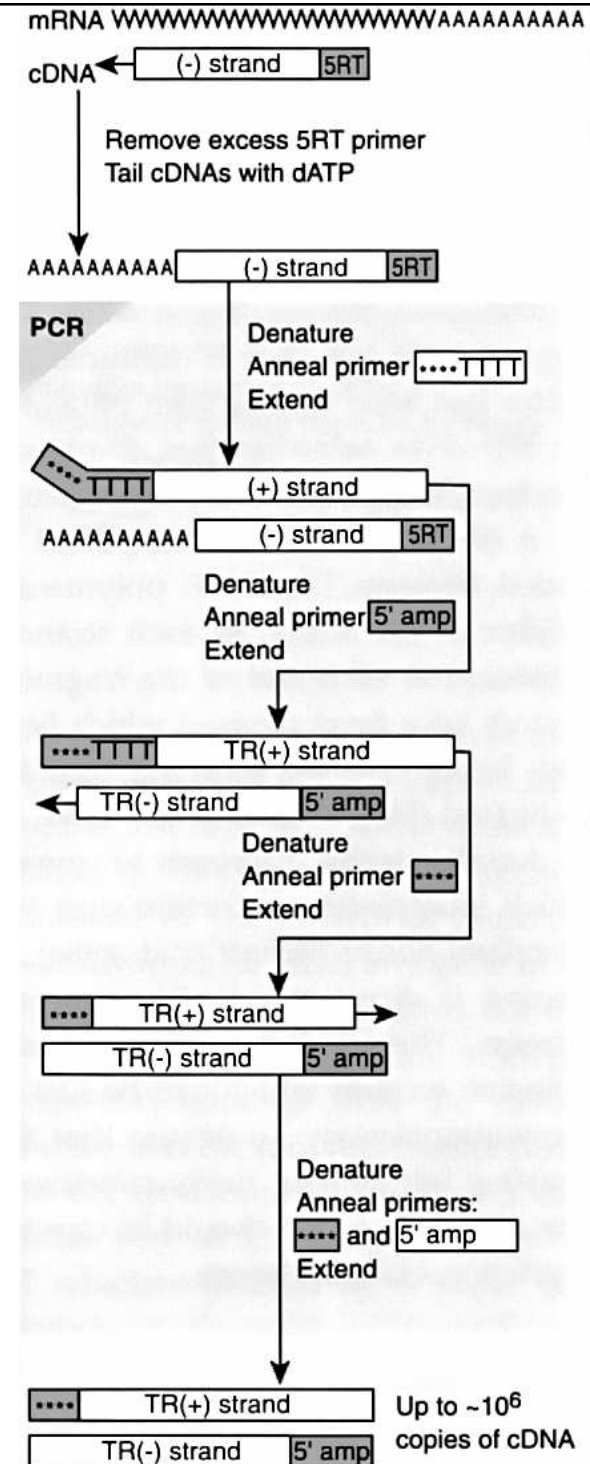
3' RACE

- Využívá výhody přirozeného poly(A) konce na mRNA jako místa pro zahájení PCR amplifikace.
- Při reverzní transkripci od 3' konce je první řetězec cDNA iniciován u poly(A) pomocí oligo-dT hybridního kotvícího primeru.
 - ◆ 17 oligo-dT zbytků navázaných na 17-mer adaptor
 - ◆ má T_m vyšší než samotný oligo(dT17)
 - ◆ je vhodné, když nese restrikční místa pro následné klonování
- Amplifikace je docílena bez další purifikace, za využití PCR kotvícího primeru a uživatelem navrženého specifického primeru ve vnitřní části mRNA, která je cílem další analýzy.



5' RACE

- První řetězec cDNA je nasyntetizován z celkové poly(A) RNA za použití prvního genově-specifického primeru (SP1) pomocí AMV RT a deoxynukleotidového mixu.
 - ◆ První řetězec cDNA je purifikován od neinkorporovaných nukleotidů a primeru SP1
- Reakční produkt první reakce (cDNA) je pak prodloužen pomocí terminální transferázy, která přidá homopolymerní konec dA na 3' konec cDNA
- cDNA s napojeným koncem je pak amplifikována PCR s použitím druhého genově-specifického primeru SP2, oligo dT-kotvícího primeru a Taq polymerázy – stejným systémem jako u 3' RACE.
- Pokud je to třeba, získaná cDNA může být dále amplifikována s použitím druhé PCR s využitím nested (sousedního) primeru SP3 a PCR kotvícího primeru.



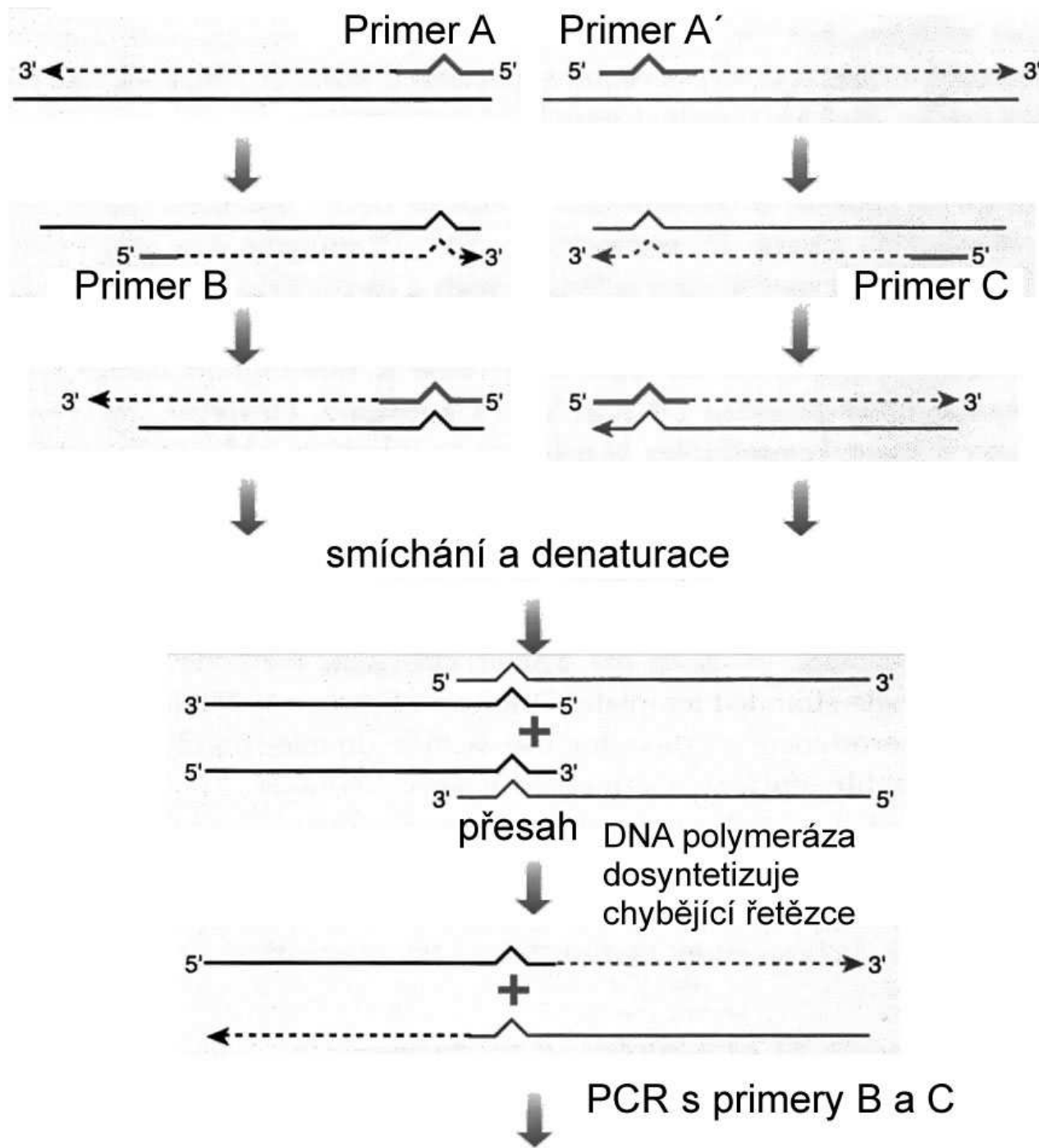
Degenerovaná PCR

- Využívá pro amplifikaci směsi degenerovaných primerů
- Používá se, jestliže nevíme, která z variant sekvence se může v genomu vyskytovat
 - ◆ Kolísavé sekvence
 - ◆ Sekvence předpokládané na základě zpětné translace z proteinového motivu
 - ◆ Degenerace je zajištěna při syntéze primeru. Není nutné objednávat zvlášť všechny varianty
- Příklady využití:
 - ◆ Vyhledání sekvence DNA na základě sekvence aa stanovené u proteinu
 - ◆ Vyhledání a klonování homologických genů např. člověka a myši
 - ◆ Hledání a studium genových rodin s určitou strukturní podobností
 - ◆ Fylogenetické a evoluční studie: hledání a srovnávání ortologních genů

	Trp	Asp	Thr	Ala	Gly	Gln	Glu	
5'	TGG	GAY	ACN	GCN	GGN	CAR	GA	3'
		T	G	G	G	G		
		C	A	A	A	A		
			T	T	T			
			C	C	C			

Výsledkem je 256 variant primeru

Overlap extension PCR má využití v mutagenезi

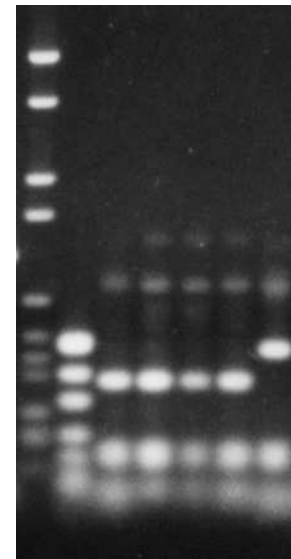
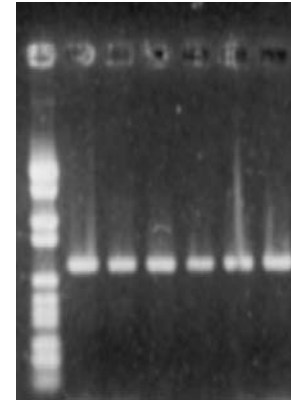


Modifikace PCR používané v diagnostice

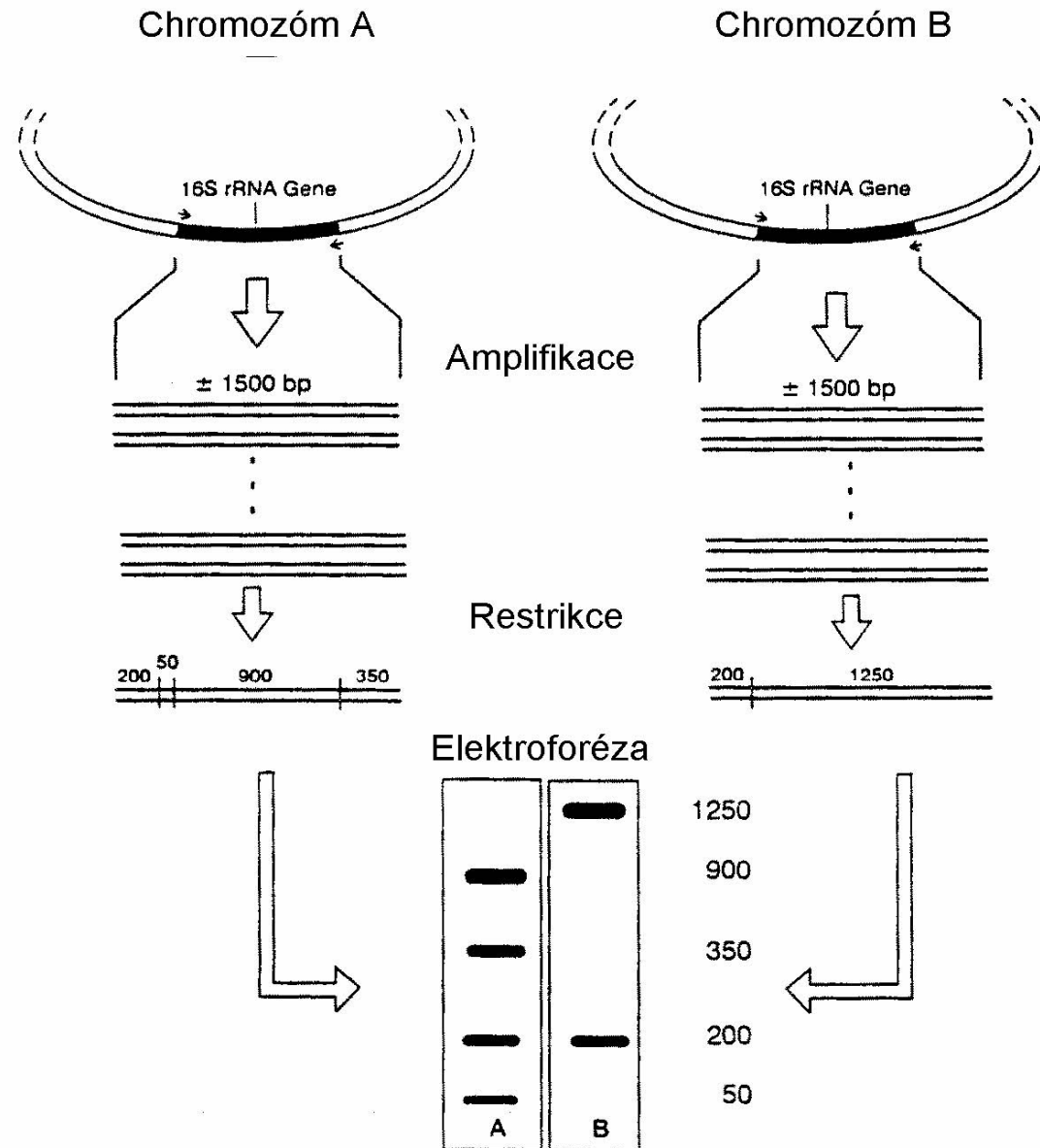
- PCR metody nabízejí následující výhody:
 - ◆ rychlost
 - ◆ je potřeba malé množství buněk

PCR-RFLP

- Amplifikace známé sekvence se dvěma specifickými primery
 - ◆ Cílová sekvence (obvykle určitého genu) o délce 1 až 2 kb je amplifokována při vysoce stringentních podmínkách.
 - ◆ Výsledkem amplifikace jsou amlikony (PCR produkty o stejné délce) detekované elektroforeticky
- Amlikony jsou štěpeny restriční endonukleázou se 4 bp rozpoznávacím místem a poté opět analyzovány pomocí elektroforézy
- Separace fragmentů DNA v agarózovém nebo polyakralamidovém gelu.
- Srovnání restričních fragmentů amplifikované DNA u různých vzorků.



PCR-RFLP fingerprinting ilustrovaný na příkladu genu pro 16S rRNA (rDNA-RFLP)

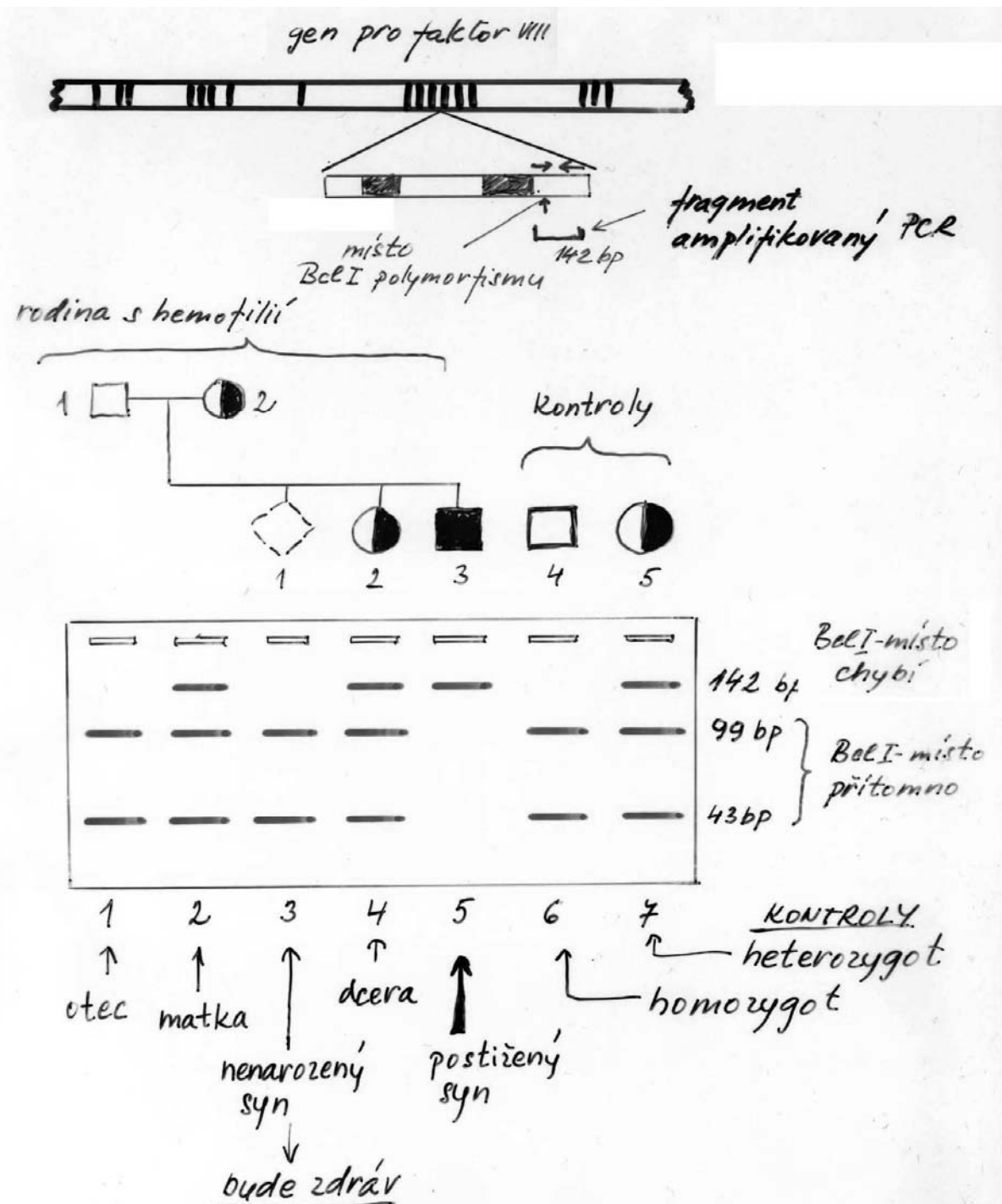


→ : Univerzální primery komplementární k vysoce konzervativním oblastem na koncích genu pro 16S rRNA

Pozn.: V závislosti na volbě primeru může být provedena PCR-RFLP analýza jakéhokoli genu

Prenatální diagnóza hemofilie pomocí PCR-RFLP

- V analyzované oblasti DNA mohou být až tři místa *BclI*, přičemž jedno z těchto míst v intronu 18 je polymorfní.
- Fragment DNA o délce 142 bp obklopující polymorfní místo *BclI* je nasyntetizován s pomocí oligonukleotidových primerů.
- Normální alela má *BclI* místo a proto je fragment štěpen na 99 + 43 bp fragmenty
- Polymorfní místo může
 - ◆ chybět na obou chromozomech (5),
 - ◆ přítomné na jednom a chybět u druhého (2,4,7)
 - ◆ nebo být přítomné na obou (1,3,6).

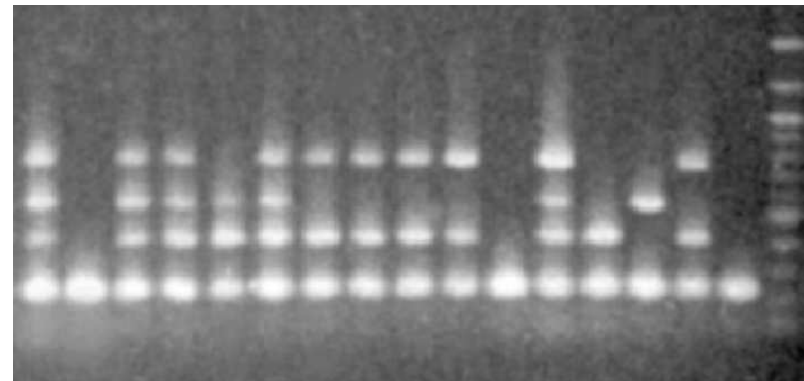


Mnohonásobná PCR (multiplex PCR)

- Při multiplex PCR je použito více párů specifických primerů.
- Dochází k amplifikaci více cílových sekvencí při jedné reakci.
- Použití a výhody:
 - ◆ Vyhledávání změn na dlouhých úsecích DNA
 - ◆ Testování vzájemně nesouvisejících oblastí na DNA
 - ◆ Amplifikace vnitřních kontrol současně se vzorky
 - ◆ Nižší cenové náklady než při samostatných amplifikacích
- Používané aplikace:
 - ◆ Detekce specifických toxinů produkovaných některými organismy (*Clostridium difficile*, *Staphylococcus aureus*) - může být detekováno až 7 různých genů kódujících toxiny.
 - ◆ Detekce více genů kódujících rezistenci k různým antibiotikům.
 - ◆ Detekce více druhově specifických genů - identifikace organismů
 - ◆ Ko-amplifikace vnitřních kontrol

Příklad detekce lyzogenie
v genomu bakterie
Staphylococcus aureus
pomocí multiplex PCR

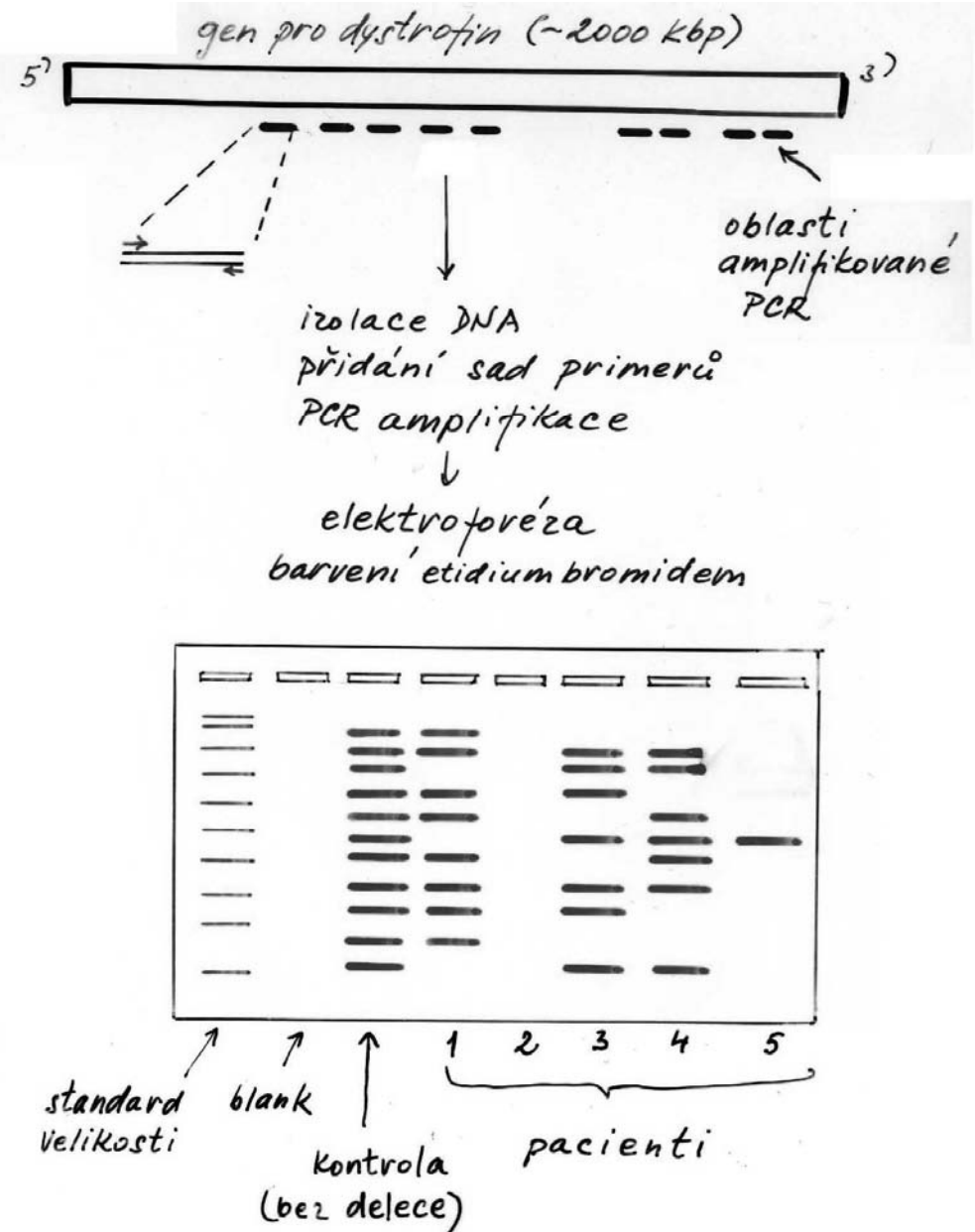
profág serol. skupiny A →
profág serol. skupiny F →
profág serol. skupiny B →
vnitřní kontrola →



Příklad použití multiplex PCR pro analýzu mutací v jednom genu

Diagnóza Duchennovy muskulární dystrofie za použití mnohonásobné PCR k detekci deletovaných exonů

- V genu pro dystrofin o délce 2000 kbp je navrženo celkem 9 úseků určených k amplifikaci.
- Tyto úseky představují části genu, které bývají nejčastěji postiženy delecí.
- Vzorky DNA z pacienta jsou amplifikovány za současného použití sady devíti primerů v jedné reakci a produkty jsou separovány na elektroforéze a barveny EB.
 - ◆ Pacient 1 má 1 delecí, pacient 2 má velkou delecí asi 1000 kbp. Ostatní mají více různých delecí.

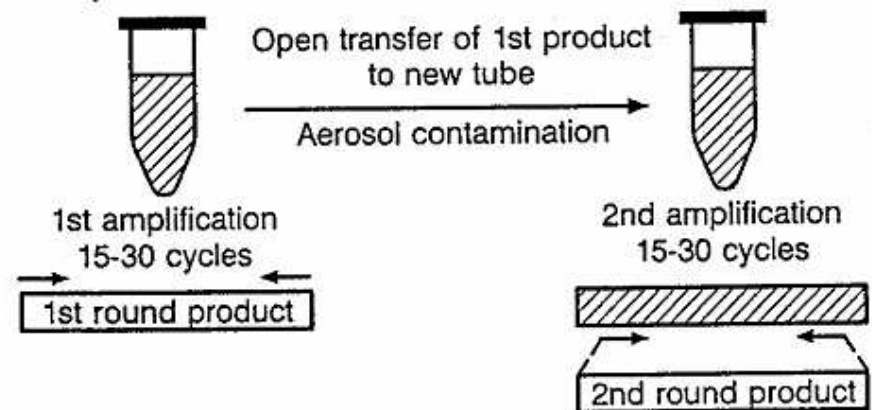


Odstupňovaná PCR

- Při PCR pomocí vnějších a vnitřních primerů („nested“ PCR) se amplifikace provádí ve dvou krocích. Metoda má oproti standardní PCR velmi vysokou citlivost. Používají se 2 modifikace:

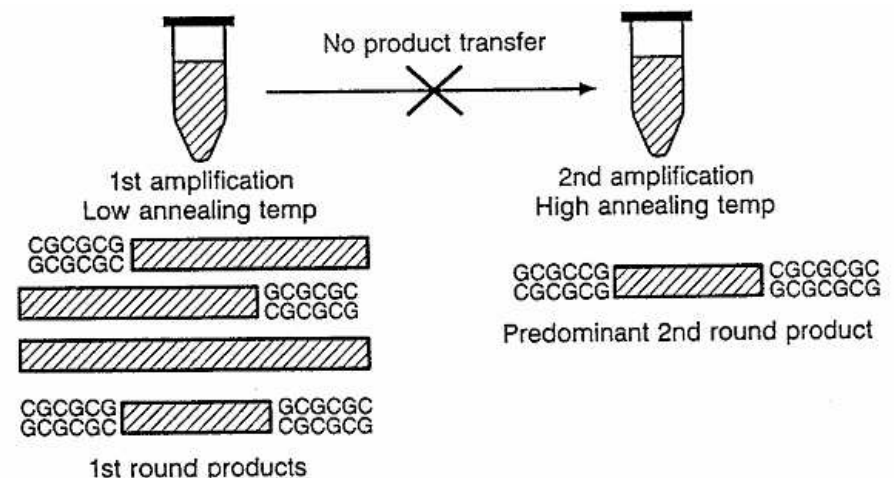
- ◆ **Dvoukroková**

- ◆ První kolo zahrnuje 15-30 cyklů amplifikace s jedním párem vnějších primerů.
- ◆ Potom je reakce převedena do druhé zkumavky a prováděna amplifikace zahrnující opět 15-30 cyklů s párem vnitřních primerů.



- ◆ **Jednokroková**

- ◆ První kolo amplifikace s jedním párem primerů se provádí při nestrídných podmínkách (nižší teplota pro připojení primerů) s 10-15 cykly.
- ◆ Následuje reamplifikace zahrnující 15-30 cyklů při stringentních podmínkách s vnitřními primery, při které se ověří specifita amplifikace z prvního kola.



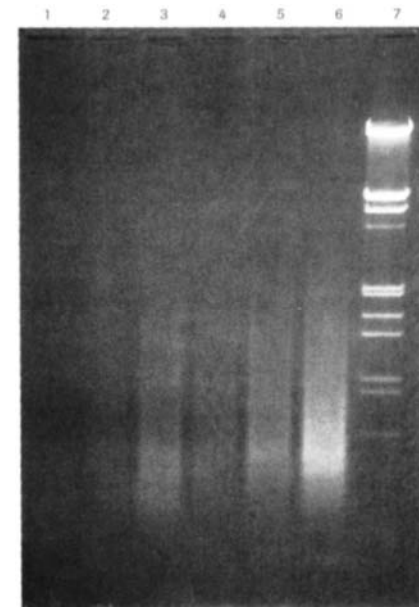
Alelově specifická PCR (AS-PCR)

- Využití
 - ◆ Pro detekci bodových mutací v genomech
 - ◆ detekce homozygotního a heterozygotního stavu v klinických disciplínách
- Je prováděna ve dvou nebo více paralelních reakcích
 - ◆ V první reakci je horní primer komplementární ke standardní sekvenci
 - ◆ V další reakci k mutantní nebo polymorfní sekvenci
 - ◆ Spodní primer je v obou reakcích stejný
- Předpokládá se, že k elongaci dojde pouze tehdy, pokud jsou primer a cílová sekvence plně komplementární.
- Uvažujeme-li homozygotní stav, k amplifikaci bude docházet pouze v jedné reakci.
- Metoda byla popsána nezávisle pod různými označeními a využívá dva odlišné přístupy.
 - ◆ První přístup je založen na chybějící elongaci v důsledku chybného párování bází na 3'-konci primeru.
 - ◆ amplifikaci nedostupný mutační systém (ARMS),
 - ◆ PCR-amplifikace specifických alel (PASA)
 - ◆ alelově specifická amplifikace (ASA).
 - ◆ Ve druhém přístupu se chybné párování nachází ve střední části sekvence primeru a brání tak hybridizaci primeru k cílovému místu v případě, že se v templátové DNA vyskytuje.
 - ◆ kompetitivní připojení oligonukleotidu (COP).
- Pro snazší odlišení heterozygotního stavu v jediné reakci je používána varianta označená jako PCR-amplifikace více specifických alel (PAMSA) nebo dvojitý ARMS.
 - ◆ Jeden z alelově-specifických primerů obsahuje na 5'-konci přídatný úsek několika nekomplementárních nukleotidů, a tak mohou být amplifikační produkty obou alel rozlišeny na základě své délky.
- Metoda je obecně velmi citlivá na optimalizaci experimentálních podmínek reakce, zejména 84 koncentrace jednotlivých reagentů a templátové DNA.

PCR s degenerovanými oligonukleotidovými primery (DOP-PCR)

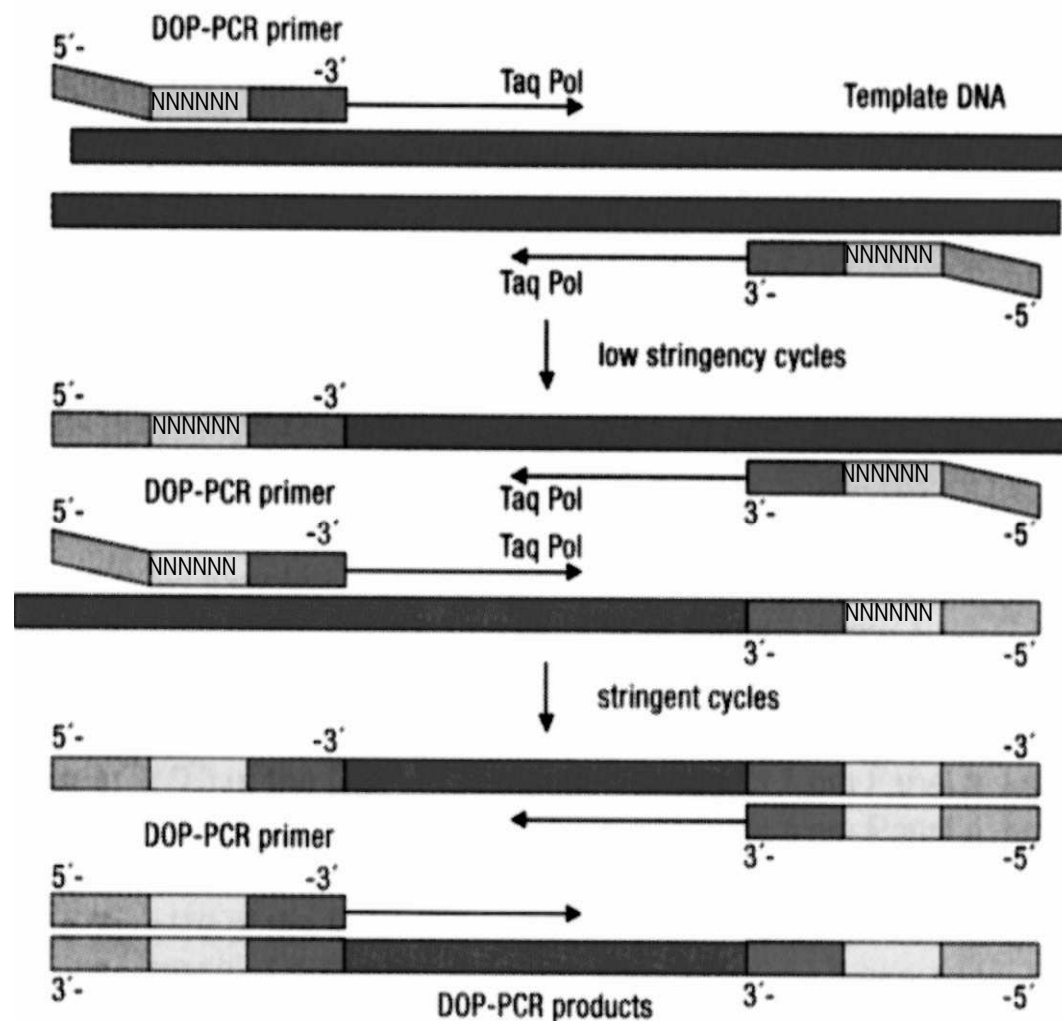
- DOP (degenerate oligonucleotide primer) PCR slouží pro uniformní náhodnou amplifikaci DNA pokud je k dispozici pouze **malé množství vzorku**.
- Další postupy (klonování, značení, hybridizace, následná PCR) mohou být potom **provedeny účinněji**.
- DOP-PCR se používá jako první krok při:
 - ◆ hybridizaci in situ
 - ◆ srovnávací genomové hybridizaci (CGH)
 - ◆ přípravě DNA fragmentů frakcionovaných podle velikosti pro další hybridizace
 - ◆ analýzu DNA ze špatně kultivovatelných organismů
 - ◆ analýzu nebo klonování stopových množství DNA

Amplifikace DOP-PCR vede ke vzniku různě dlouhých DNA fragmentů, které jsou viditelné na agarózovém gelu obarveném etidiumbromidem ve formě šmouhy.



DOP-PCR

- DOP-PCR primery mají definované sekvence na 5'- a 3'-koncích a náhodnou hexamerovou sekvenci mezi těmito definovanými konci.
- Prvních 5 cyklů DOP-PCR probíhá při velmi nízké stringenci.
- Dalších 35 cyklů probíhá při vyšší teplotě pro připojení primerů.
- Za stringentnějších podmínek je materiál vytvořený při prvních cyklech amplifikován preferenčně, protože obsahuje kompletní primerovou sekvenci na obou koncích. Na jiných místech se DOP-primer při stringentních podmínkách neváže.



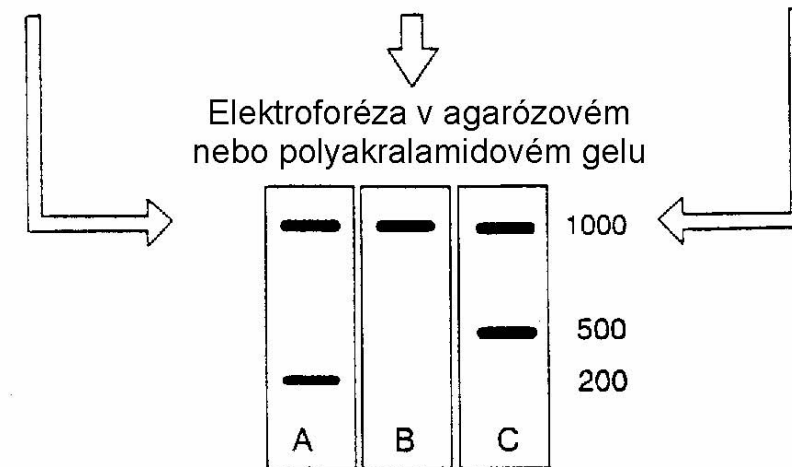
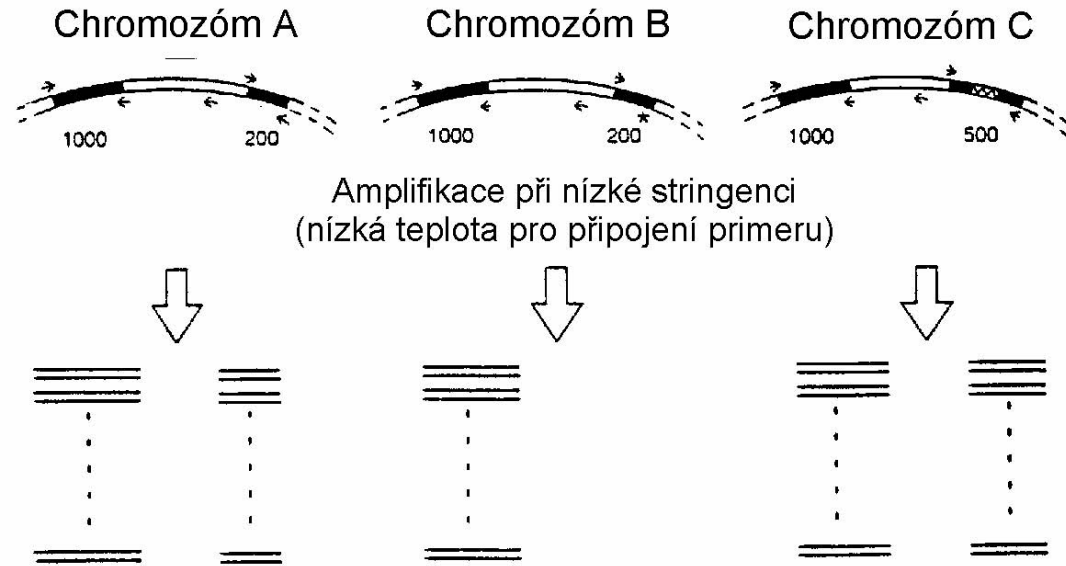
Náhodně amplifikovaná DNA

- Náhodná amplifikace využívající jeden nebo více primerů s neznámou homologií k cílové sekvenci DNA
- Vzniká více ampliconů s různou velikostí a rozdílným molárním množstvím, nevyžaduje se proto štěpení restrikcí endonukleázami
- Úspěšná, rychlá a jednoduchá technika pro DNA fingerprinting popsaná nezávisle pod různými označeními:
 - ◆ AP-PCR (arbitrarily primed PCR fingerprinting)
 - ◆ RAPD (randomly amplified polymorphic DNA)
 - ◆ DAF (DNA-amplified fingerprinting)
 - ◆ MAAP (multiple arbitrary amplicon profiling)
 - ◆ PCR-mediated genotyping
- Princip metody:
 - ◆ Metoda používá obvykle jeden krátký primer (8 - 10 bp nebo M13).
 - ◆ Teplota pro připojení primeru je mnohem nižší než teoretická hodnota T_a .
 - ◆ Za těchto podmínek dochází k nasedání primeru s vysokou pravděpodobností na více místech na obou řetězcích chromozomální nebo plazmidové DNA.
 - ◆ Obvykle se vyskytne několik míst pro připojení primeru umožňujících nasednutí primerů 3' konci k sobě, která se vyskytují na protilehlých řetězcích, a nejsou od sebe příliš vzdálená.
 - ◆ Výsledkem je amplifikace mnoha fragmentů s různou délkou (max. 2000 bp).

Náhodně amplifikovaná DNA

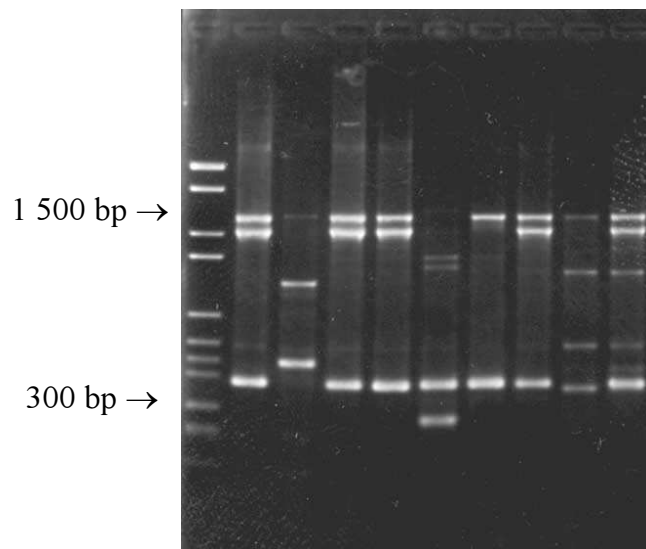
- Použití:
 - ◆ Rychlá typizace většiny izolátů mikroorganismů
 - ◆ Typizace genomové rostlinné DNA z různých kultivarů
 - ◆ Taxonomické studie a identifikační postupy
 - ◆ Analýza mikrosatelitů
 - ◆ AP-PCR může být kombinována s DGGE nebo SSCP analýzou.
 - ◆ Produkty AP-PCR slouží pro přípravu hybridizačních sond používaných při binární typizaci
 - ◆ Metoda má vyšší diskriminační schopnost než PCR 16S-23S mezerníkových oblastí, ale nižší než Rep-PCR.
- Nevýhody:
 - ◆ Nízká reprodukovatelnost mezi laboratořemi.
 - ◆ Částečné zvýšení reprodukovatelnosti je možné provedením reakce s různým ředěním DNA. Výsledek ovlivňují plazmidy přítomné v izolované DNA.

Náhodně amplifikovaná DNA (AP-PCR)



- : Primer (stejný primer použitý jako přímý i reverzní)
- : Amplifikovaná oblast
- * : Nedochozí k připojení primeru v důsledku mutace
- ☒ : Inzerce 300 bp

Příklad elektroforézy
s AP-PCR produkty



Analýza mezerníkových oblastí mezi repeticemi (Interrepetitivní-PCR, Rep-PCR)

- Technika pro analýzu celého chromozómu využívající přítomnosti repetitivních elementů v bakteriálních nebo eukaryotických genomech.
- Princip metody:
 - ◆ Amplifikace známé sekvence, vyskytující se v genomu ve více kopiích (repetice, IS elementy, mezerníky, VNTR)
 - ◆ Pro získání DNA fingerprintu je třeba kompletní chromozomální DNA podobně jako u AP-PCR, ačkoli jsou amplifikovány pouze malé části chromozómu.
 - ◆ Primery jsou navrhovány tak, aby se připojovaly přímo ke koncovým, konzervativním oblastem repeticí.
 - ◆ vzniká více amplikonů o různé velikosti, nevyžaduje se proto štěpení restrikcními endonukleázami
- Nejčastěji je interrepetitivní PCR používána u prokaryot:
- Je třeba navrhnou konsenzní sekvenci primeru a zvolit nižší teplotu pro připojení. 3' konce primeru směřují směrem k mezerníkovým oblastem tak, aby se neamplifikovala samotná repetice.
- Jelikož se mezerníkové oblasti mezi repeticemi liší svou délkou, při amplifikaci vzniká směs různě dlouhých amplikonů (fragmentů DNA), které dávají jedinečný fingerprint
- V závislosti na zvolené repetici je možné získat specifický fingerprint pro druhy (tRNA-interrepetitivní PCR) nebo kmeny (ERIC, REP, BOX a IS6110 interrepetitivní PCR).

TYPY REPETICÍ V PROKARYOTICKÝCH GENOMECH

A. Polynukleotidové sekvence a tandemové repetice

- ◆ Trinukleotid TGG – nejčastější trinukleotid *E. coli* (součást penta nebo oktanukleotidů).
- ◆ Nonamer AAGTGCGGT (uptake signal sequence –USS) *H. influenzae* - 1465 kopií.
- ◆ Tandemově opakované polynukleotidové sekvence (GTG)_n nebo (GCC)_n - vysoce repetitivní u *E. coli*, *S. typhimurium* a *Shigella* sp.
- ◆ Short tandemly repeated repetitive (STRR) sequences - heptanukleotidová opakování u sinice *Calothrix*.
- ◆ Major polymorphic tandem repeat (MPTR) - polymorfní 10-bp DR u *Mycobacterium tuberculosis* a dalších mykobakterií.

B. Krátké roztroušené repetitivní sekvence (kratší než 50 bp)

- ◆ REP (repetitivní extragenové palindromatické sekvence) 33-40 bp, obrácené repetice typu palindromů; 500 - 1000 REP u *E. coli*.
- ◆ PU (palindromic units) u *E. coli* a *S. typhimurium*.
- ◆ Mnohokopiový 26-mer (nGREP) u *Neisseria* sp.
- ◆ Mnohokopiový 24-mer DR element u *Mycobacterium bovis* (38 kopií).

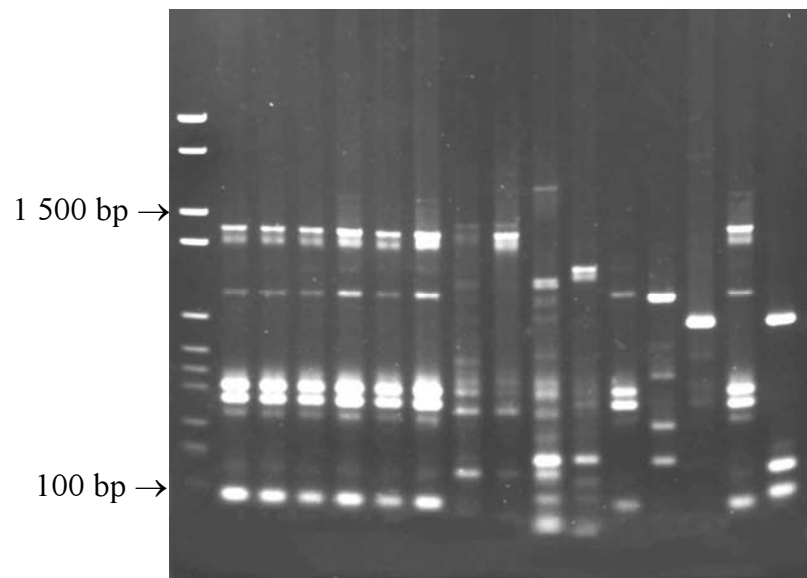
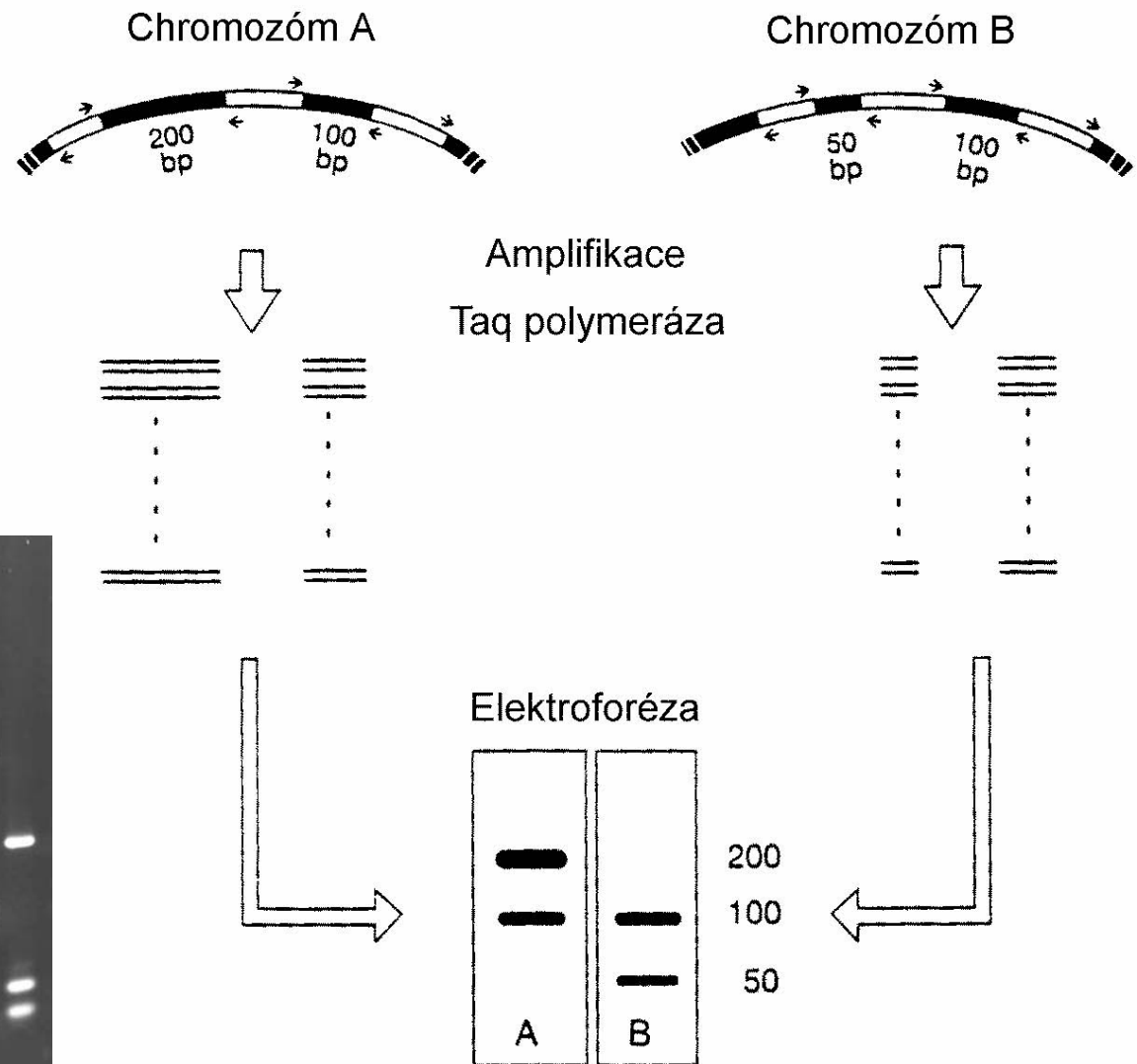
C. Dlouhé roztroušené repetitivní elementy (větší než 50 bp)

- ◆ Intergenic repeat unit (IRU)
- ◆ Enterococcal repetitive intergenic consensus (ERIC) 124-127 bp nebo zkrácené formy. Chromozomová lokalizace se liší u kmenů a druhů. ERIC-like sekvence přítomné v 30 – 150 kopiích v celé bakteriální říši.
- ◆ RLEP (545 - 1063 bp) u *Mycoplasma leprae* 28 (0,6% genomu).
- ◆ Mx-REP u *Myxococcus xanthus* - 87 pb jádrová sekvence.
- ◆ Dr-REP (SARK) u *Deinococcus radiodurans*. Element o variabilní délce (150-192 bp).
- ◆ RepMP1-2, SDC1 (150 bp – 1 kb) u *Mycoplasma pneumoniae*, v genomu 8-10 kopií.
- ◆ RepMP2-like u *Staphylococcus*

D. Mosaikové repetitivní elementy

- ◆ Bacterial Interspersed Mosaic Elements (BIME) – (kombinace REP a sedmi dalších repetitivních motivů).
- ◆ REP MP - 1 300 bp element ohraničený kratšími repetitivními sekvencemi u *M. pneumoniae*.
- ◆ BOX elementy – 154 bp rozptýlené repetitivní elementy přítomné v 25 kopiích u G+ (*Streptococcus pneumoniae*).

Interrepetitivní PCR



→ Konsenzní primery směřující 3' koncem z rep. oblastí

□ Repetitivní element

■ Oblast mezi repeticemi (amplifikovaná)

Využití interrepetitivní PCR u eukaryot

- U eukaryotických genomů se amplifikují markery označené jako
 - ◆ inverzní sekvenčně značené repetice (ISTR)
 - ◆ primery komplementární např. k rozptýleným vysokokopiovým retrotranspozonům.
 - ◆ amplifikace mezi jednoduchými repetitivními sekvencemi (ISSR)
 - ◆ amplifikační reakce s jedním primerem (SPAR)
 - ◆ primery homologické k sekvencím SSR v rostlinných genomech
- Pro zahájení amplifikace je navržen primer odvozený ze samotné repetitivní sekvence a ten umožňuje amplifikaci jedinečných sekvencí oddělujících jednotlivé SSR.
- Pro zamezení překrývání primerů mohou být prodlouženy o jedinečnou genomovou sekvenci ohraničující repetici.
- Primery navržené z tetranukleotidových repeticí, např. (GATA)₄, dávají lepší výsledky než dinukleotidové nebo trinukleotidové.
- Určitým vylepšením metody interrepetitivní PCR je fluoroforem zdokonalená interrepetitivní PCR (FERP), která používá primerů značených na 5'-konci fluorescenční látkou, rozdělení produktů PCR v nedenaturujícím polyakrylamidovém gelu a digitální zpracování otisků DNA.
- Další obměnou je automatická laserová fluorescenční analýza (ALFA), při které se rovněž používají 5'-koncově fluorescenčně značené PCR-primery a produkty PCR jsou rozděleny v denaturujícím polyakrylamidovém gelu na automatizovaném sekvenátoru, což značně zlepšuje rozlišení a reprodukovatelnost.

Alu-PCR

- PCR je používána k amplifikaci DNA sekvencí specifických pro člověka, představuje velmi jednoduchý prostředek k charakterizaci a amplifikaci právě jen lidské DNA.
- Metoda používá primery pro repetitivní sekvence, které jsou inzertovány na mnoha místech genomu. Z těchto elementů jsou Alu-sekvence (opakování) přítomny v množství 900 000 kopií v lidském genomu.
- Tato 300-bp *Alu*-repetice je velmi variabilní, ale obsahuje sekvenci, která je specifická pro člověka. Připraví se dva primery, každý pro jeden směr, přičemž se využije nejvíce konzervativních úseků těchto sekvencí.
- Primery nelze použít společně, neboť vzájemně hybridizují. Sekvence *Alu* však mohou být přítomny na DNA v obou směrech, takže primery se používají samostatně.
- Lidské sekvence se budou amplifikovat, pokud leží mezi sousedními *Alu*-repeticemi, které jsou umístěny (orientovány) v opačných směrech. Tvoří se různý počet fragmentů lidské DNA v závislosti na velikosti lidské DNA v buněčné linii. Tato technika je často používána pro "odhalení" lidské DNA od ostatních DNA.

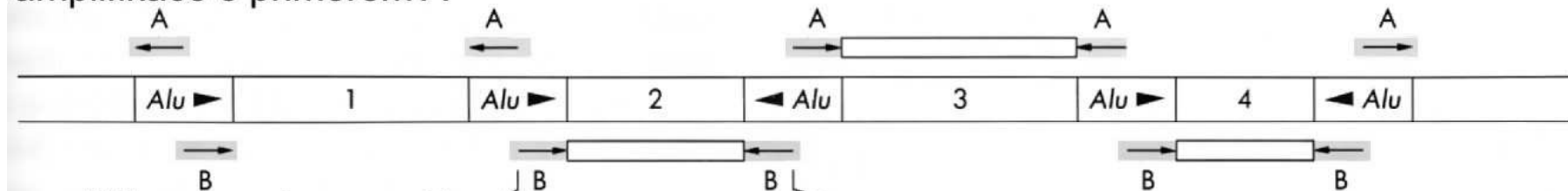
Alu-PCR

Primer A 3' AACGTCACTCGGCTCTA 5'

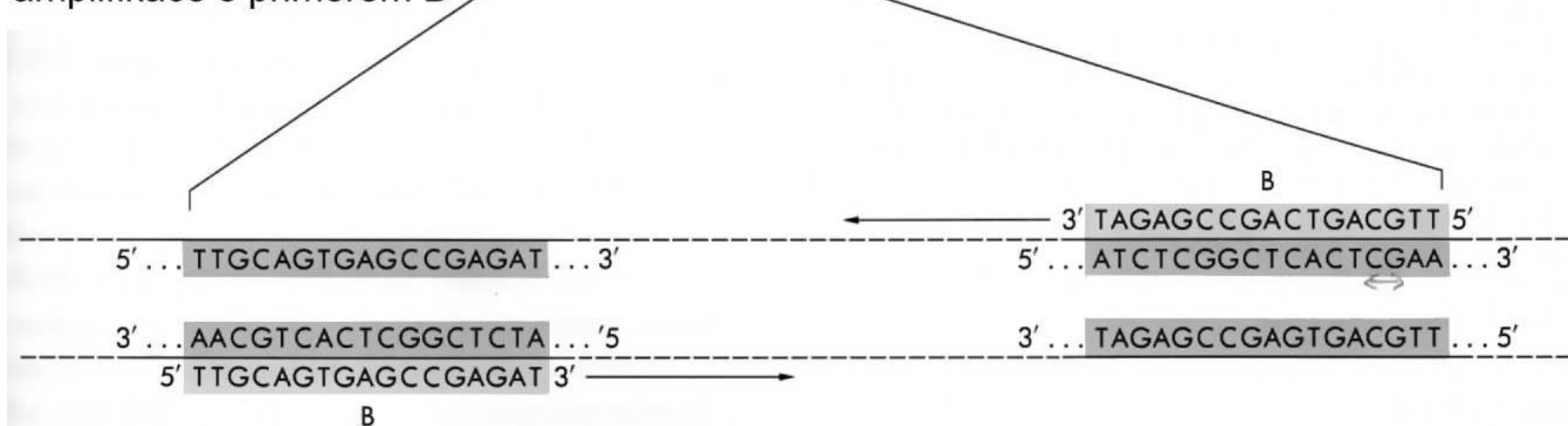
Část Alu sekvence
jedinečná pro primáty
5' ... TTGCAGTGAGCCGAGAT ... 3'
3' ... AACGTCACTCGGCTCTA ... 5'

Primer B 5' TTGCAGTGAGCCGAGAT 3'

amplifikace s primerem A

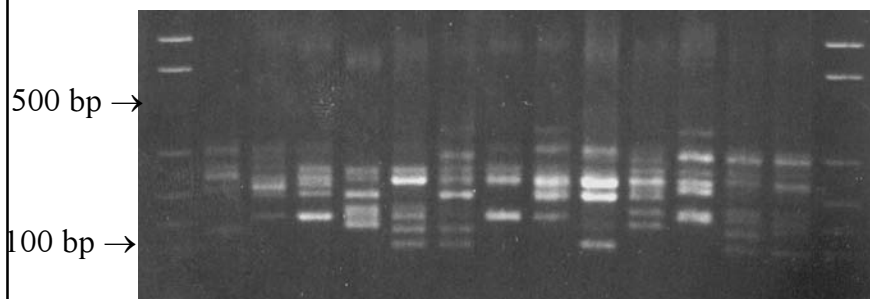


amplifikace s primerem B

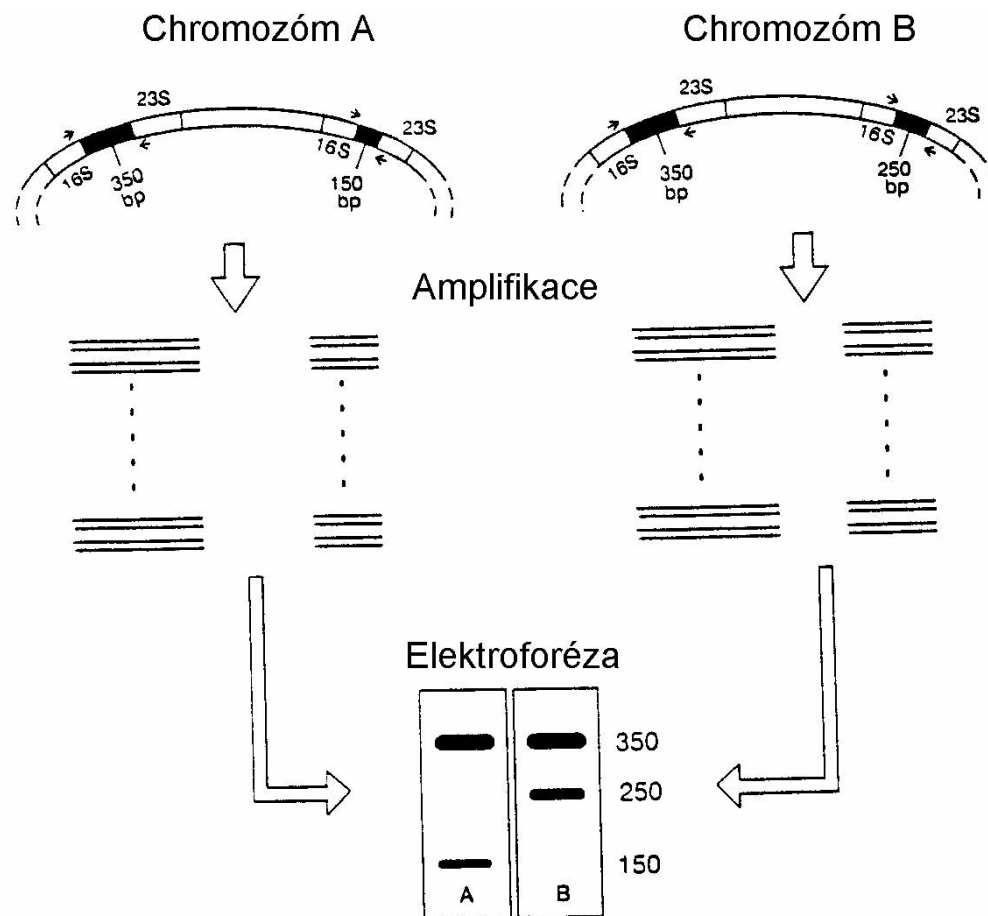


Analýza mezerníkových oblastí v rDNA (RS-PCR, PCR-ribotypizace)

- U prokaryot obsahují rDNA operony geny pro všechny tři typy rRNA (16S, 23S a 5S).
- Geny pro 16S a 23S rRNA jsou odděleny mezerníkovou oblastí, která se liší délkou v závislosti na druhu (od 278 bp u mykobakterií do do 2 kb u borrelií). Navíc u většiny Eubakterií se vyskytuje více kopií rDNA operonu, u nichž se vyskytují menší rozdíly v délce mezerníků.



U *Staphylococcus aureus* se nachází v genomu 6 *rrn* operonů, všech 6 mezerníků mezi 16S a 23S rRNA se může lišit svou délkou.



→ : Univerzální primery komplementární k vysoce konzervativním oblastem ohraničujícím mezerník mezi 16S a 23S rDNA

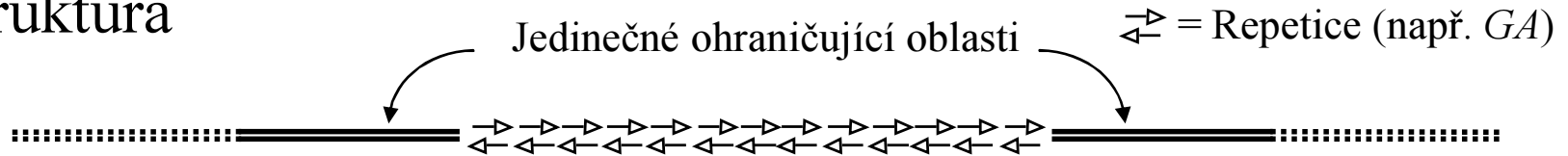
■ : rRNAmezerníková oblast

Polymorfizmus délky jednoduchých repetitivních sekvencí (SSLP-PCR)

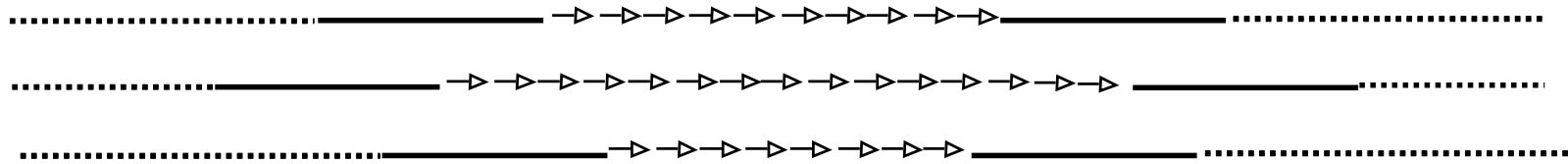
- Jednoduché repetitivní sekvence (SSR) jsou tandemové repetice o délce 2 až 10 bp (např. mikrosatelity) přítomné v eukaryotických genomech s četností až 80.
- V důsledku mutací nebo rekombinace se počet těchto repeticí může zvýšit nebo snížit.
- Primery pro tuto metodu jsou navrhovány tak, aby se připojovaly oblastem ohraničujícím SSR.
 - ◆ Tyto ohraničující sekvence bývají konzervativní pouze v rámci druhu a proto je nutné navrhovat pro každý druh novou sadu primerů.
- Jelikož je mezi jedinci počet repeticí značně variabilní, výsledkem amplifikace je vznik různě dlouhých PCR produktů, které jsou separovány na polyakrylamidové nebo agarózové gelové elektroforéze s vysokým rozlišením.
- Rozdílů v délce fragmentů genomové DNA podmíněné přítomností SSR se používá k odlišení blízce příbuzných jedinců a k detekci vztahů mezi nimi zejména v genetice populací.

Příklad amplifikace mikrosatelitů

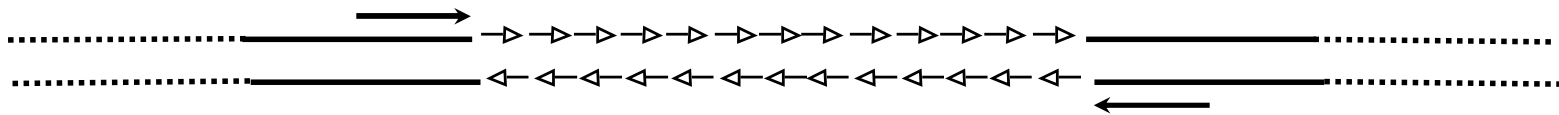
➤ Struktura



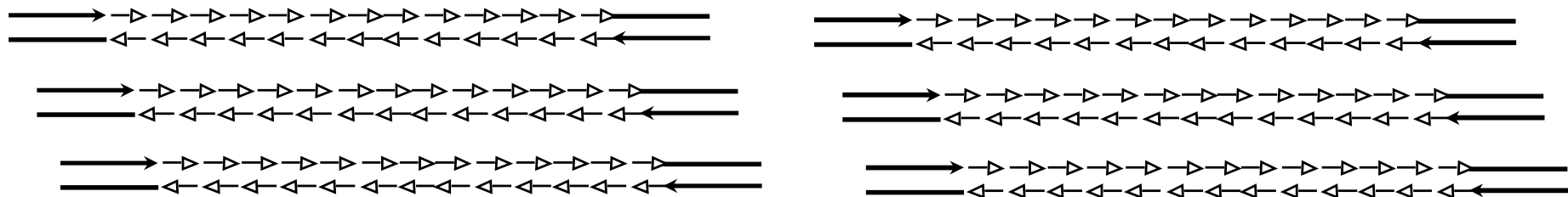
➤ Počet repeticí je velice variabilní mezi jedinci



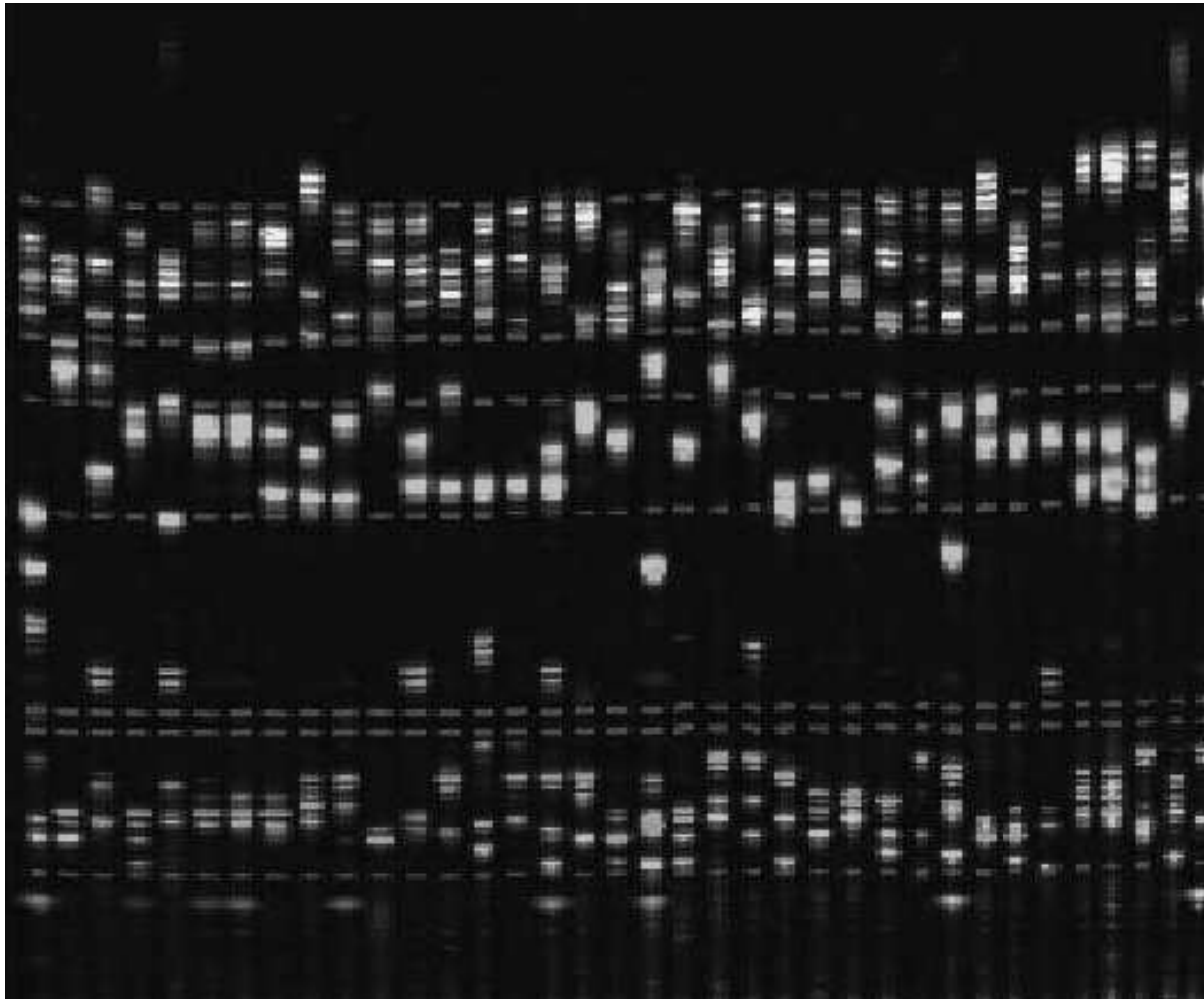
Návrh pimerů (\rightleftharpoons) komplementárních k ohraničujícím sekvencím



Amplifikace repeticí pomocí PCR



Multiplex PCR-SSLP



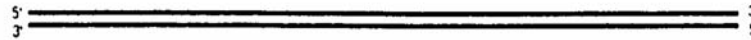
Fluorescenční
značení primerů
pro amplifikaci
mikrosatelitů
umožňuje
amplifikaci
několika lokusů

AFLP - Polymorfismus velikostí amplifikovaných fragmentů (Amplified Fragment Length Polymorphism)

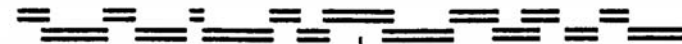
- Selektivní amplifikace určitého souboru fragmentů DNA vytvářeného štěpením restriční endonukleázou. Polymorfismus je založen na ztrátě nebo získání restričních míst.
- Metoda využívající kroky restrikce jednou nebo dvěma restričními endonukleázami a ligace genomové DNA se speciálně navrženými adaptory s následnou amplifikací pomocí jednoho nebo dvou selektivních primerů.
- Nevyžaduje znalost sekvence.
- Technicky i finančně náročnější ale spolehlivější než RAPD.
- Další používaná označení: SRFA (primer dependent selective restriction fragment amplification), IRS-PCR (infrequent restriction site amplification).

Schema obvyklého postupu AFLP

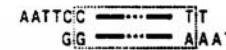
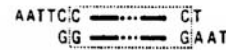
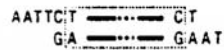
1. Purifikace chromozomální DNA



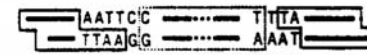
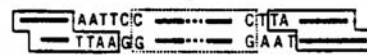
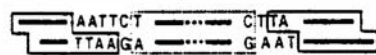
2. Štěpení chromozomální DNA EcoRI a MseI



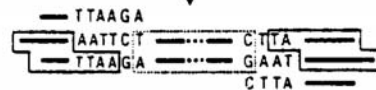
Soubor restričních fragmentů



3. Ligace s adaptory



4. Selektivní amplifikace se značenými primery



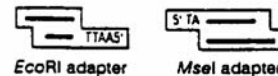
AMPLIFICATION : +

-

-

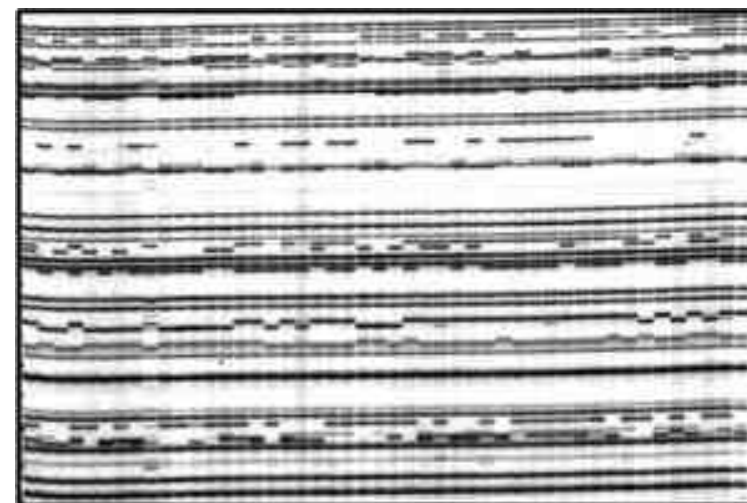
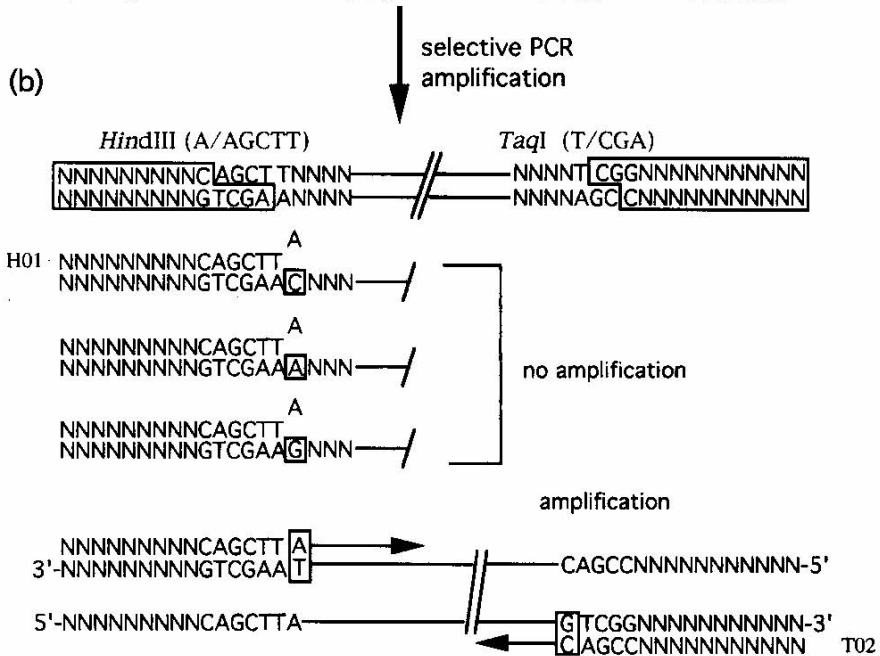
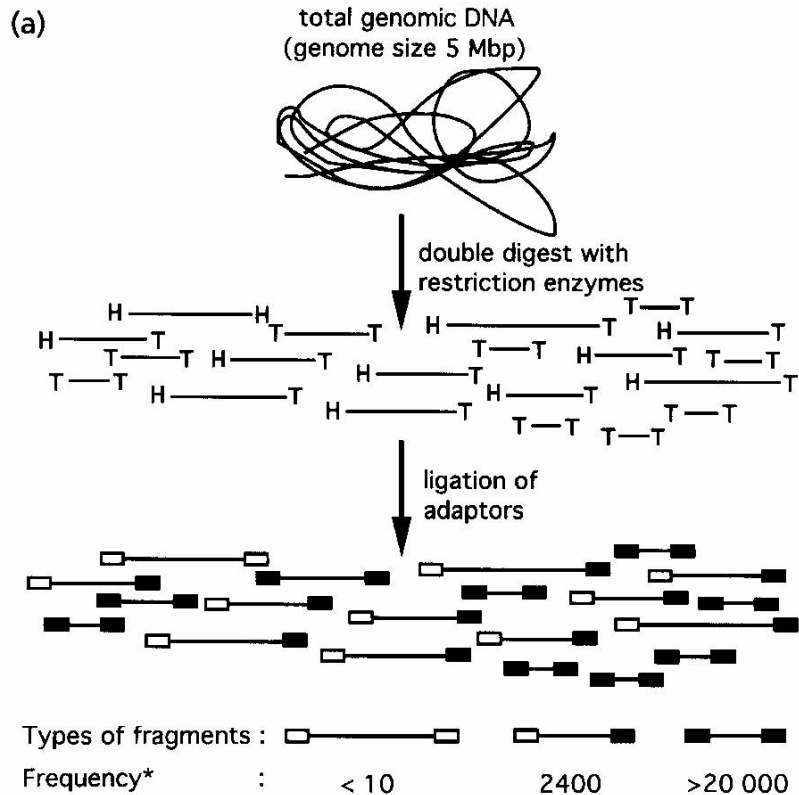
5. Elektroforéza amplifikačních produktů

^a ds oligonucleotides with an overhang complementary to the restriction site overhangs.



^b EcoRI primer : complementary to (EcoRI adapter + EcoRI restriction site + T)
MseI primer : complementary to (MseI adapter + MseI restriction site + G)

Black box : mismatch of 3' end of primer



In situ PCR (PCR *in situ*, in cell PCR)

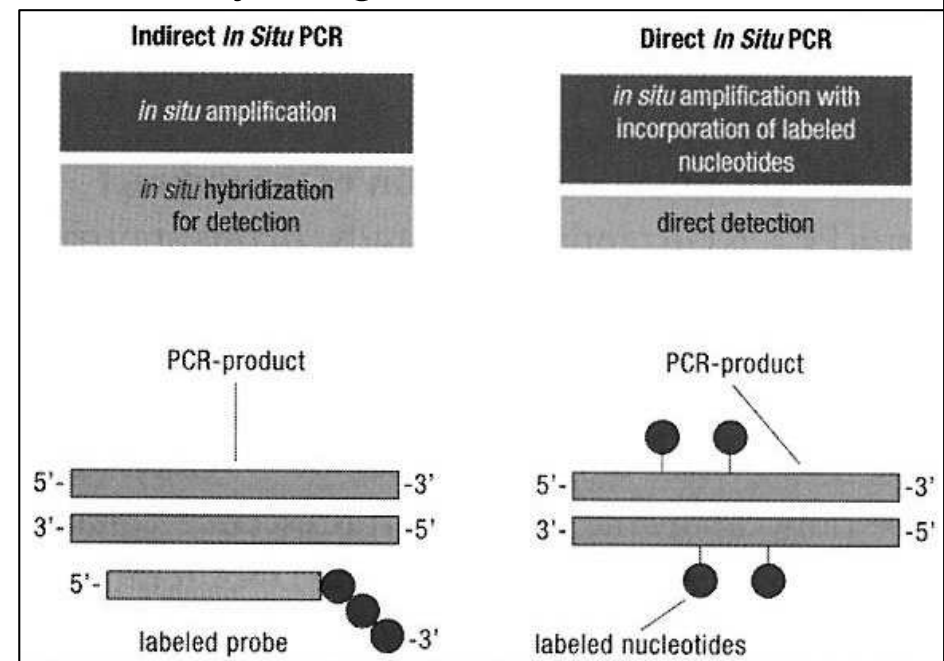
- Hybridizace *in situ* (ISH) umožňuje lokalizaci určité sekvence NK uvnitř jednotlivých buněk, ale vykazuje nízkou detekční aktivitu.
- Konvenční PCR vyžaduje nutnost tkáně nebo buňky destruovat a izolovat NK, nelze asociovat výsledek amplifikace ke specifickému histologickému typu buněk.
- *In situ* PCR kombinuje vysokou citlivost PCR s cytologickou lokalizací sekvencí poskytnutou ISH

- ◆ PCR *in situ* hybridization
- ◆ in cell PCR
- ◆ PCR driven ISH

- ◆ umožňuje asociovat výsledek amplifikace ke specifickému histologickému typu buněk
- ◆ umožňuje korelovat výsledek s histopatologickými rysy nebo množstvím buněk, obsahujících cílovou sekvenci

- Specifické sekvence jsou uvnitř buňky amplifikovány, čímž se zvýší počet kopií natolik, že je lze snadno detekovat

- ◆ pomocí ISH (nepřímá *in situ* PCR)
- ◆ imunochemicky (přímá *in situ* PCR)



Příprava vzorku pro *in situ* PCR

- Fixace buněk nebo tkáně – zachování morfologie (paraformaldehyd)
- Permeabilizace - přístup PCR reagentů k NK (detergenty, proteázy)
 - ◆ průběh PCR
 - ◆ v buněčných suspenzích
 - ◆ v cytocentrifugačních preparátech
 - ◆ pod mikroskopickým sklem
- Detekce intracelulárních produktů
 - ◆ ISH
 - ◆ Imunochemicky (protilátky proti DIG-11-dUTP, fluorescein-dUTP, 3H-CTP)
- *In situ* PCR má aplikace jak ve výzkumu, tak v diagnostice:
 - ◆ detekce virových nebo provirových NK (HIV, CMV, HBV, HSV-2)
 - ◆ chromozomální přeskupení, translokace, hledání jednokopiových genů
 - ◆ mapování nízkokopiových chromozomálních sekvencí v metafázických chromozomech
 - ◆ detekce nízkokopiových mRNA a virových RNA

