



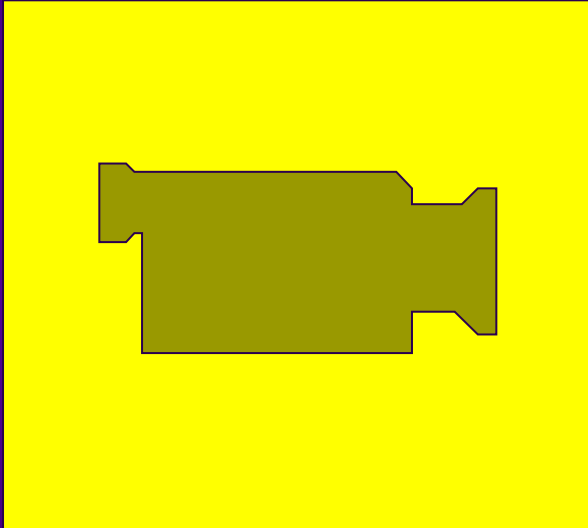
# Polymerázová řetězová reakce



*doc. RNDr. Milan Bartoš, Ph.D.*

*bartosm@vfu.cz*

*Přírodovědecká fakulta MU, 2013*



# ***Obsah přednášky***

- 1) Co je to PCR, princip, jednotlivé kroky**
- 2) Technické provedení PCR**
- 3) Fyzikální faktory ovlivňující PCR**
- 4) Chemické faktory ovlivňující PCR**

# ***Polymerázová řetězová reakce***

**Dnes nejrozšířenější metoda  
molekulární biologie**



# *Kdo za to může ?*



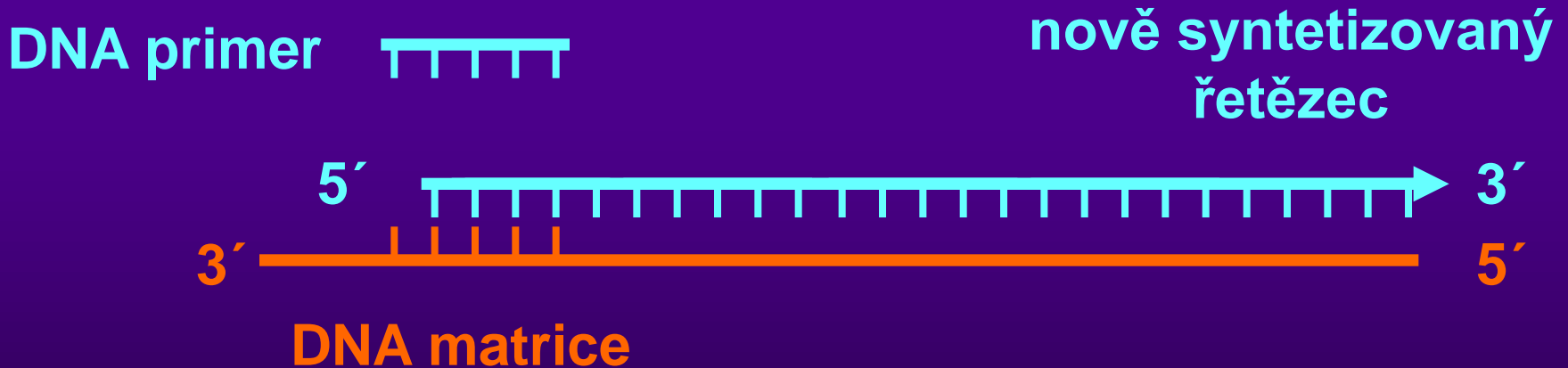
**Kary Mullis 1985**

**Nobelova cena v roce 1993**



# 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*



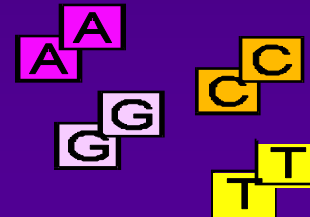
# Komponenty PCR

*Thermus aquaticus, Thermococcus,  
Thermophilus, Pyrococcus*

TAQ

puf  
MgCl<sub>2</sub>

DNA primery



umělá syntéza

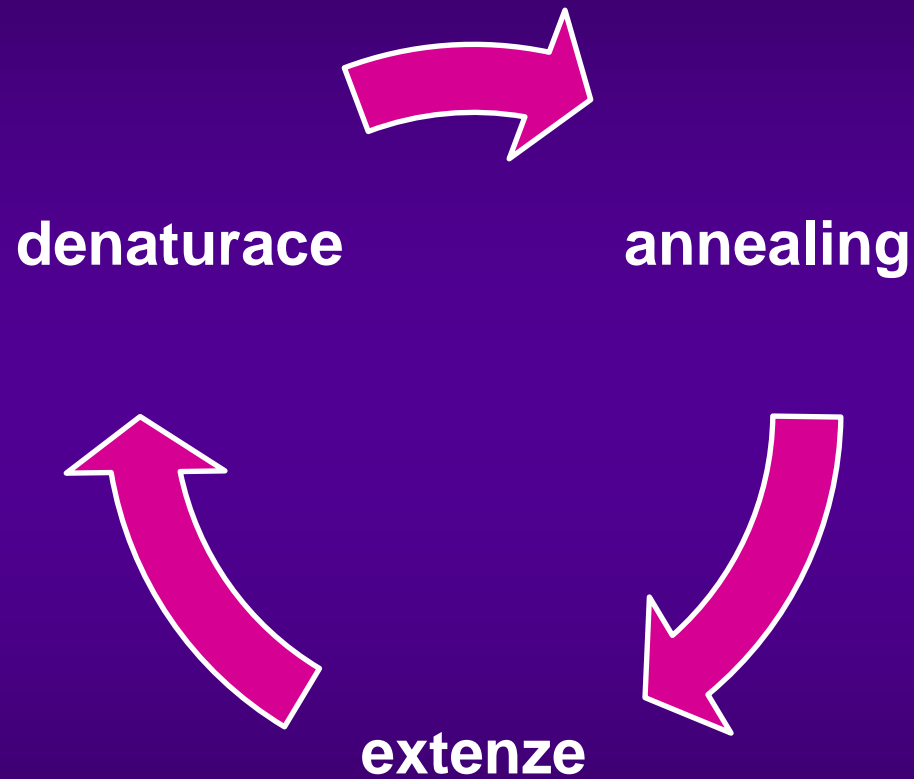


ssDNA

Denaturace 92-96°C

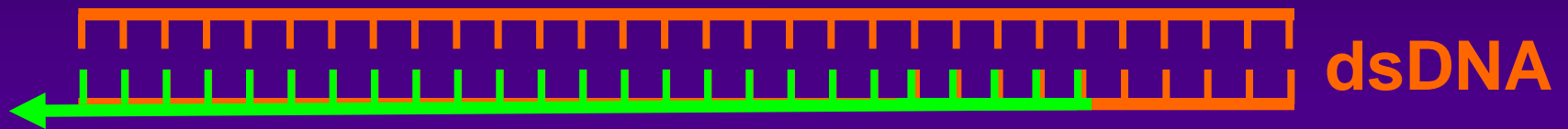


# *PCR probíhá v cyklech*



# 1. PCR cyklus

1. denaturace (92-96°C)



2. annealing (45-72°C)

primární produkty

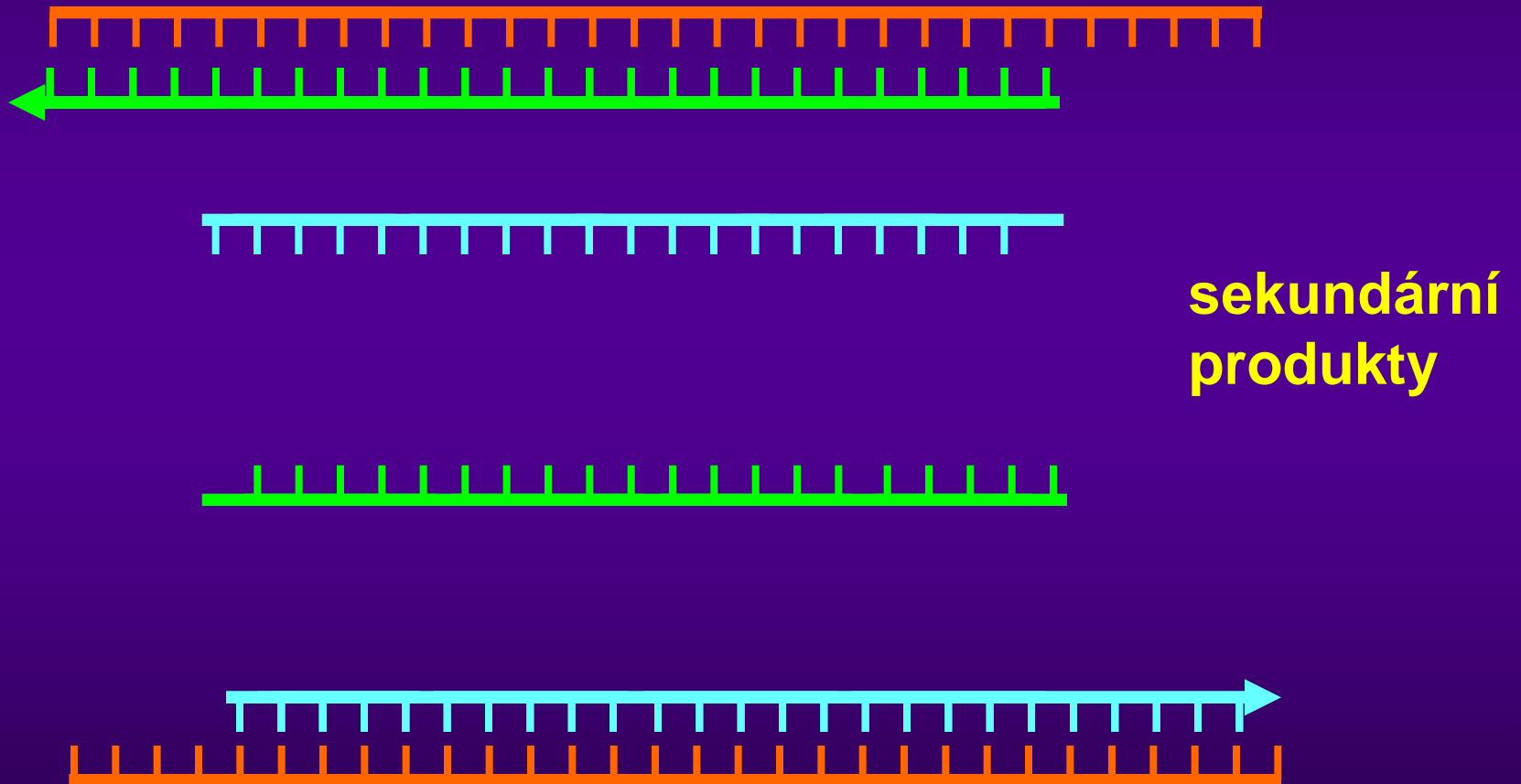
3. extenze (72°C)





**Primární produkty nás  
nezajímají !**

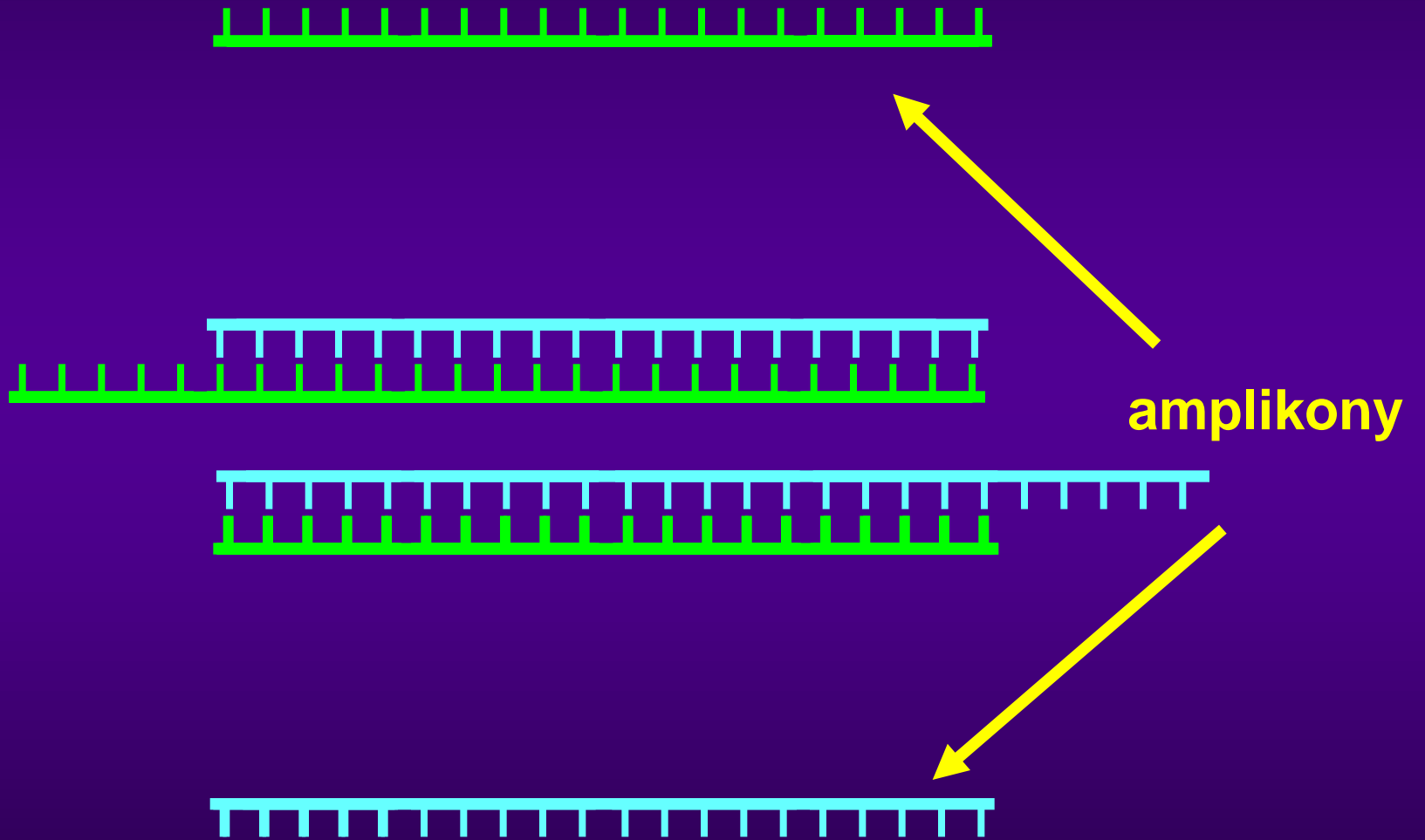
## 2. PCR cyklus



**Jenže sekundární  
produkty nás taky  
nezajímají !**



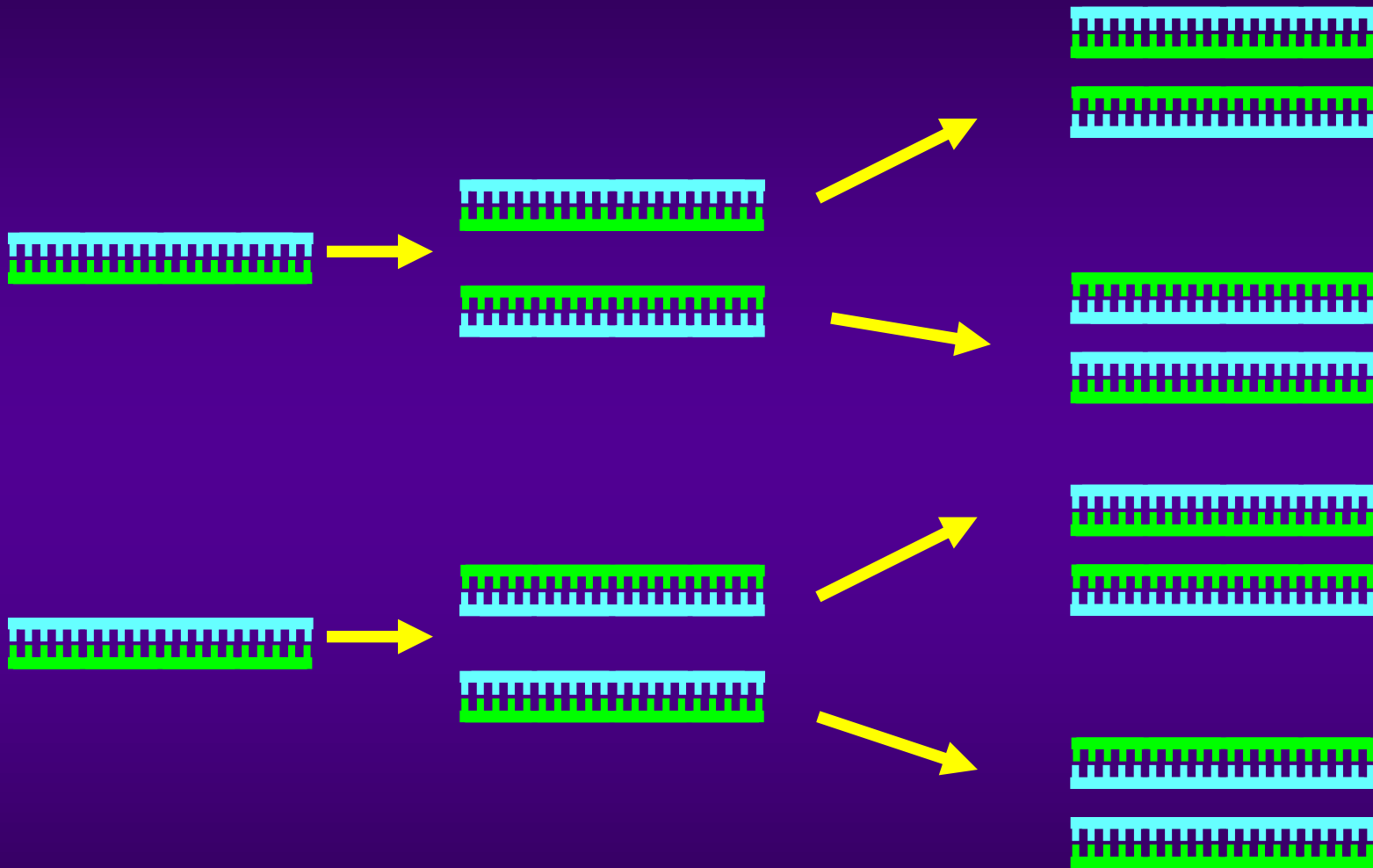
# 3. PCR cyklus



**A teď se podívejte, jak rychle se amplikony „množí“, tedy amplifikují.**



# Další cykly



Z každé molekuly ampliconu vznikají dvě nové  
Počet ampliconů vzrůstá geometricky



# **„Zázrak“ amplifikace**

- **Každý amplikon je složen ze dvou řetězců = dvě matrice, které se v dalším cyklu zase zdvojí**
- **Počet amplikonů extrémně vzrůstá oproti počtu primárních a sekundárních produktů**
- **Po několika cyklech už amplikony v reakčních produktech naprosto dominují**
- **Primární a sekundární produkty tvoří jen minoritní složku ve výsledných produktech PCR**

# Množení amplikonů

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

$X$  = počet matric na počátku,  $n$  = počet cyklů

# *Množení amplikonů – pověst o vzniku šachové hry*



# Výtěžek PCR

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>



**A teď nás čeká šílené  
počítání! ☹**

# *Výtěžek PCR - příklad*

**Kolik cyklů PCR musíte použít, aby bylo možno detekovat amplikony o velikosti 500 bp vzniklé z jedné kopie dsDNA ?**

**Zařízení (transluminátor) detekuje 5ng DNA.**

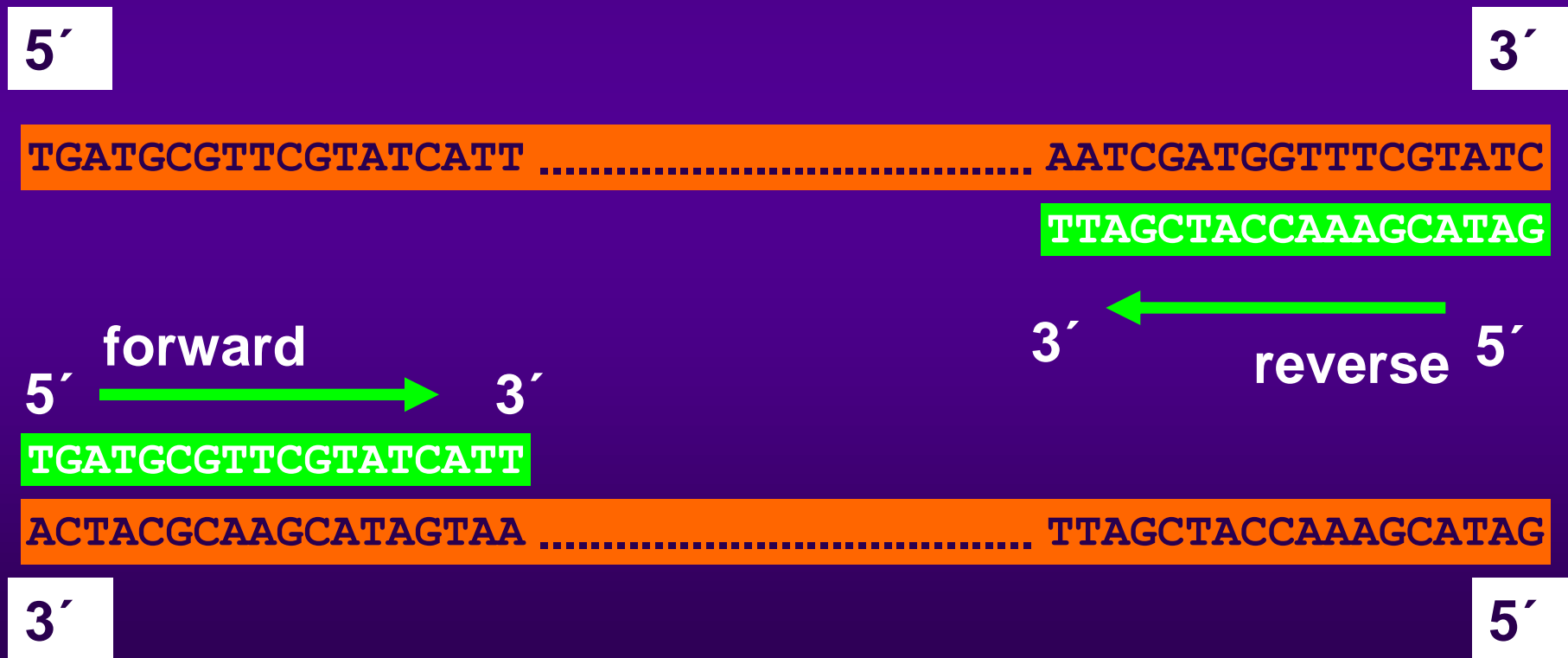
# *Výtěžek PCR - řešení*

**Musí proběhnout alespoň 34 cyklů**

**Řešení je uvedeno v samostatném souboru  
ve Wordu**

# Délka a specifičnost amplikonů

je dána pozicí primerů na cílových sekvencích DNA-matrice



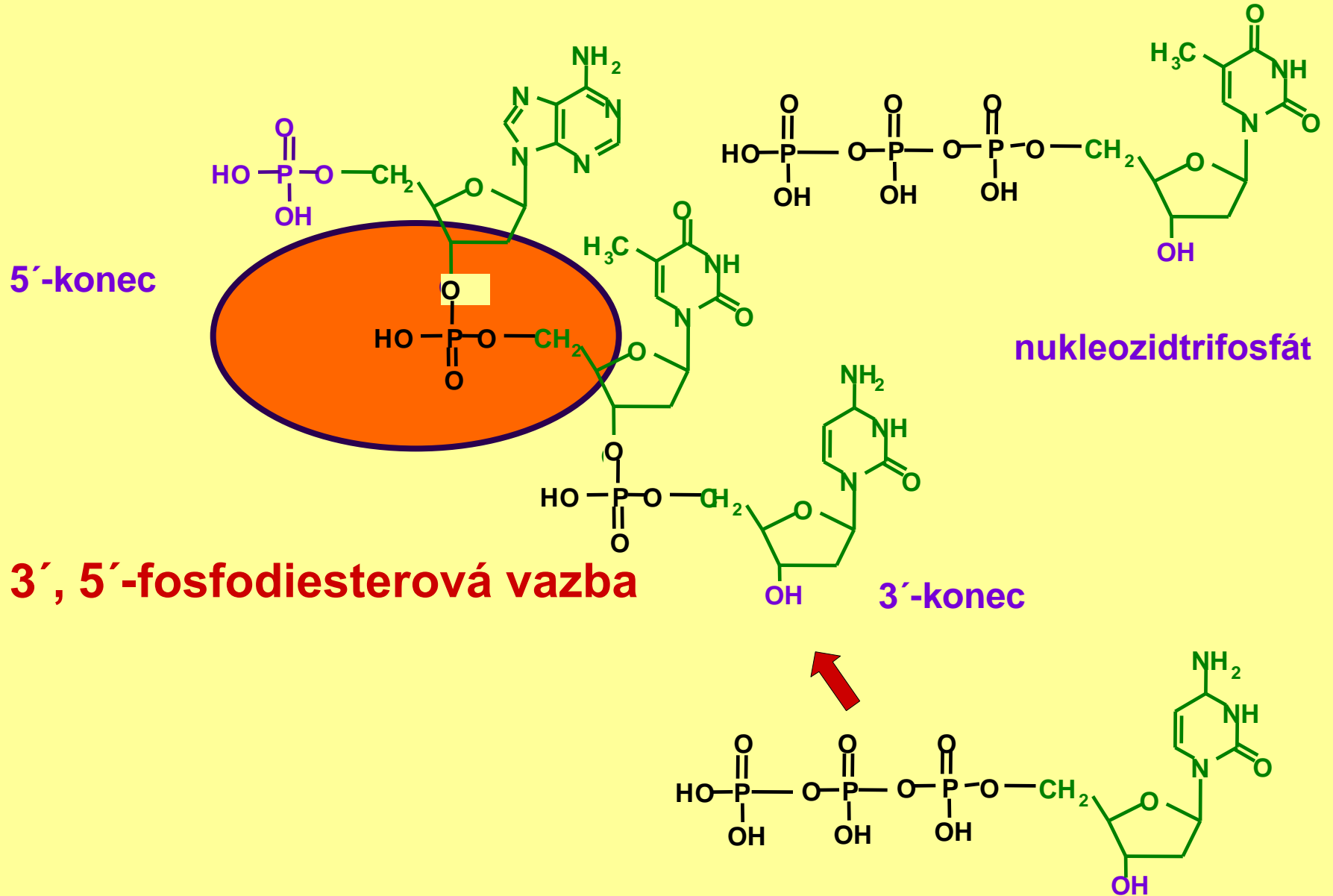


**„Syntéza DNA probíhá jen ve směru  $5' \rightarrow 3'$ “. Tak to příroda stvořila!**

**Tedy primery musí začínat  $5'$ -koncem a končit  $3'$ -koncem. Na  $3'$ -konci je OH skupina, ke které se připojuje vstupující dNTP**



# Narůstání nukleotidového řetězce



# Primer forward

- musí svým 3'- koncem směřovat „dovnitř“ budoucího amplikonu
- je komplementární ke „spodnímu“ řetězci
- ale má sekvenci „horního“ řetězce

5'

3'

TGATGCGTTCGTATCATT ..... AATCGATGGTTTCGTATC

5' forward → 3'

TGATGCGTTCGTATCATT

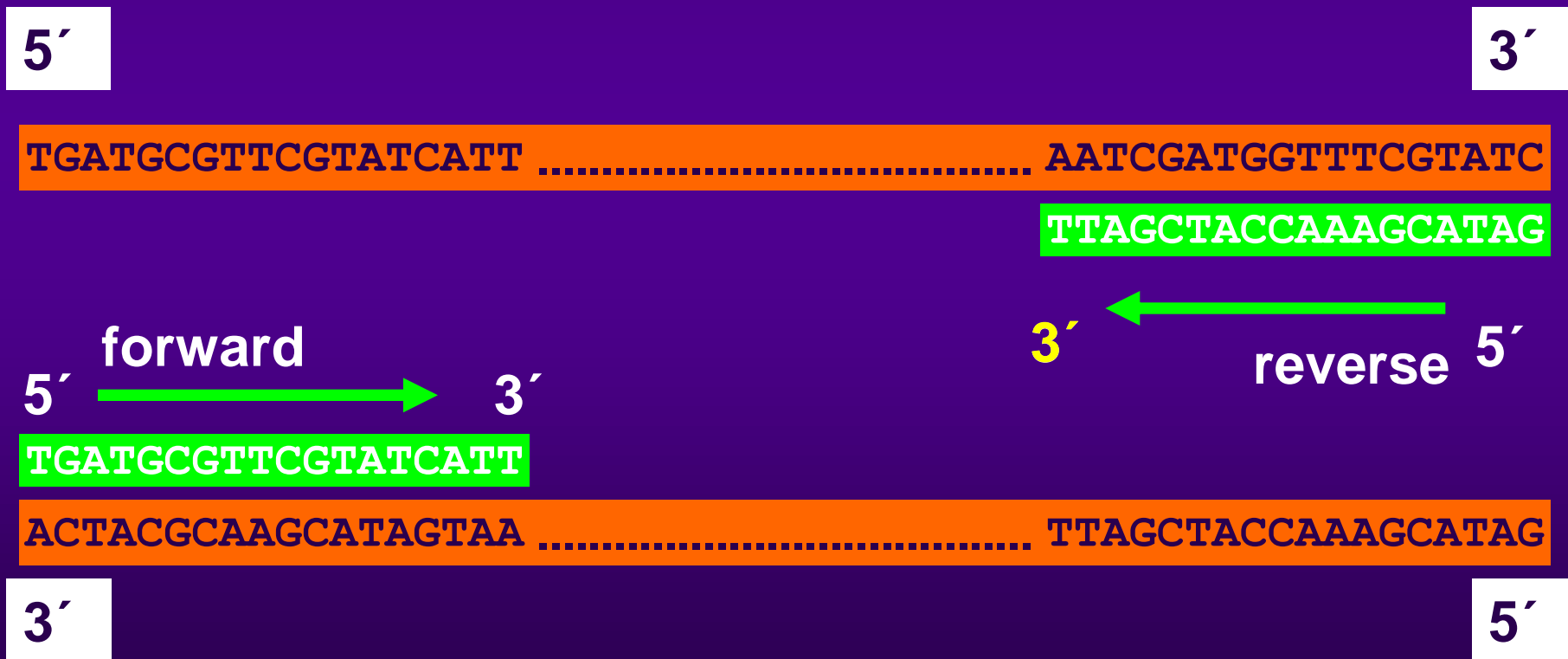
ACTACGCAAGCATAGTAA ..... TTAGCTACCAAAGCATAG

3'

5'

# Primer reverse

- musí svým 3'- koncem směřovat „dovnitř“ budoucího amplikonu
- je komplementární k „hornímu“ řetězci
- ale má sekvenci „dolního“ řetězce



**POZOR !!!**

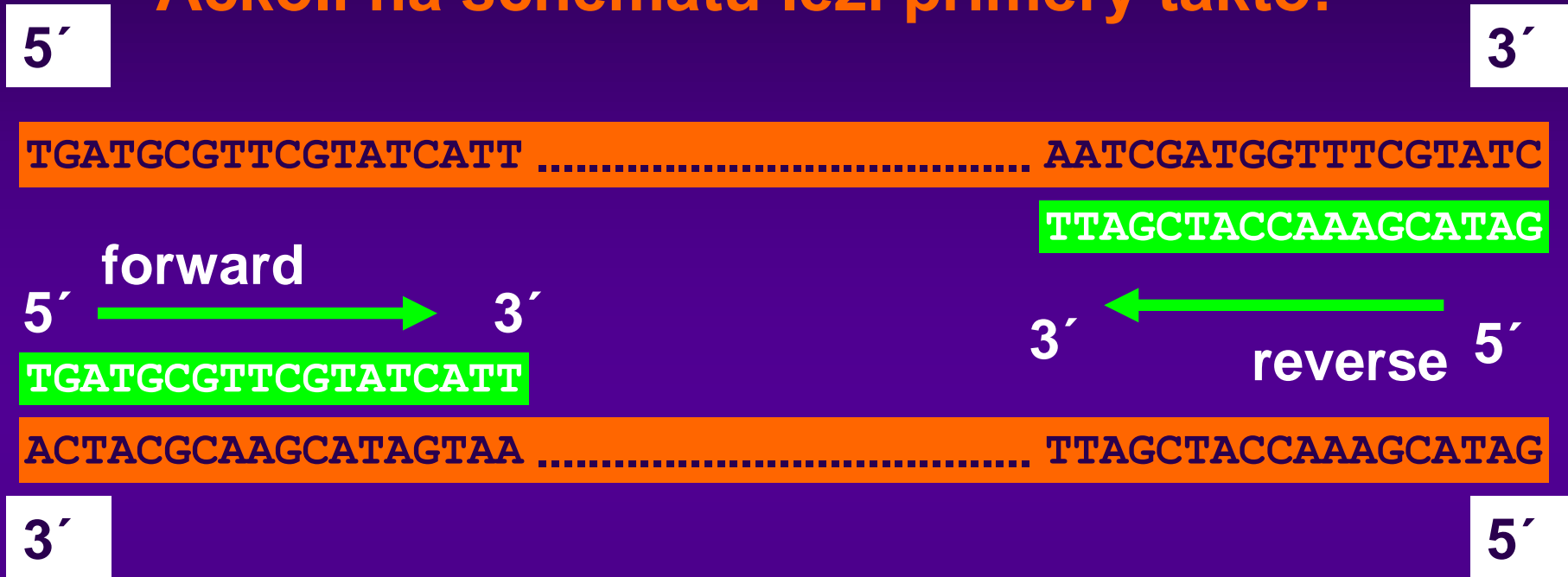
**Primery se zapisují ve směru  
 $5' \rightarrow 3'$ , tedy 5' - konec nalevo a  
3' - konec napravo**

**Platí to jak pro primer forward (kde  
je to jednoduché), tak pro primer  
reverse – podívejte se na další  
snímek, jak to dopadne !!!**



# Jak zapsat primery „na papír“

Ačkoli na schématu leží primery takto:



Napsat „na papír“ je musíte takto:

forward

5' - TGATGCGTTCGTATCATT - 3'

reverse

5' - GATACGAACCATCGATT - 3'

**A co když se spletu ?**



**Podívejte se, co se stane**



# Když napíšete primer reverse takto

reverse

5' - AATCGATGGTTTCGTATC - 3'

- syntéza z obou primerů bude probíhat ve stejném směru
- nebude docházet k amplifikaci

5'

3'

TGATGCGTTCGTATCATT ..... AATCGATGGTTTCGTATC

TTAGCTACCAAAGCATAG

forward

5' → 3'

3' ← 5'  
5' → 3'  
reverse  
reverse

TGATGCGTTCGTATCATT

AATCGATGGTTTCGTATC

ACTACGCAAGCATAGTAA ..... TTAGCTACCAAAGCATAG

3'

5'



# Když napíšete primer reverse takto

reverse

5' - CTATGCTTTGGTAGCTAA - 3'

- polymerace z takového primeru nemůže probíhat, řetězce nejsou antiparalelní

5'

3'

TGATGCGTTCGTATCATT ..... AATCGATGGTTTCGTATC

TTAGCTACCAAAGCATAG

forward

5' → 3'

reverse ← 5'  
reverse ← 5'

TGATGCGTTCGTATCATT

AATCGATGGTTTCGTATC

ACTACGCAAGCATAGTAA ..... TTAGCTACCAAAGCATAG

3'

5'



**A teď zase nějaká  
otázka! ☹**

# 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*

**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**

# ***Vlastnosti primerů I***

- **zodpovědné za specifičnost PCR**
- **délky 14 až 40 nukleotidů**
- **obsah G+C od 40% do 75%**
- **primery by měly být navrženy tak, aby se jejich cílové sekvence nacházely v konzervativních oblastech sledovaného genomu**
- **3'- konce jednoho primeru by měly obsahovat takové sekvence nukleotidů, které nejsou komplementární k sekvencím druhého primeru**
- **pokud z primerů vznikají tzv. dimery, znesnadňuje to annealing**

# ***Vlastnosti primerů II***

- **žádné palindromy**
- **žádné sekundární struktury**
- **ne nebalancované rozložení domén bohatých na G/C a A/T**
- **použití sekvencí oligo (dT) a poly (dC) ve struktuře primerů nemá na jejich funkci vliv**
- **5'-konec primeru je méně citlivý k modifikacím**
  - **restrikční místa, GC-svorky, sekvence promotoru**
- **koncentrace v rozsahu 0,1 - 1,0  $\mu\text{M}$**



# Technické provedení PCR

## Termocyklery

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



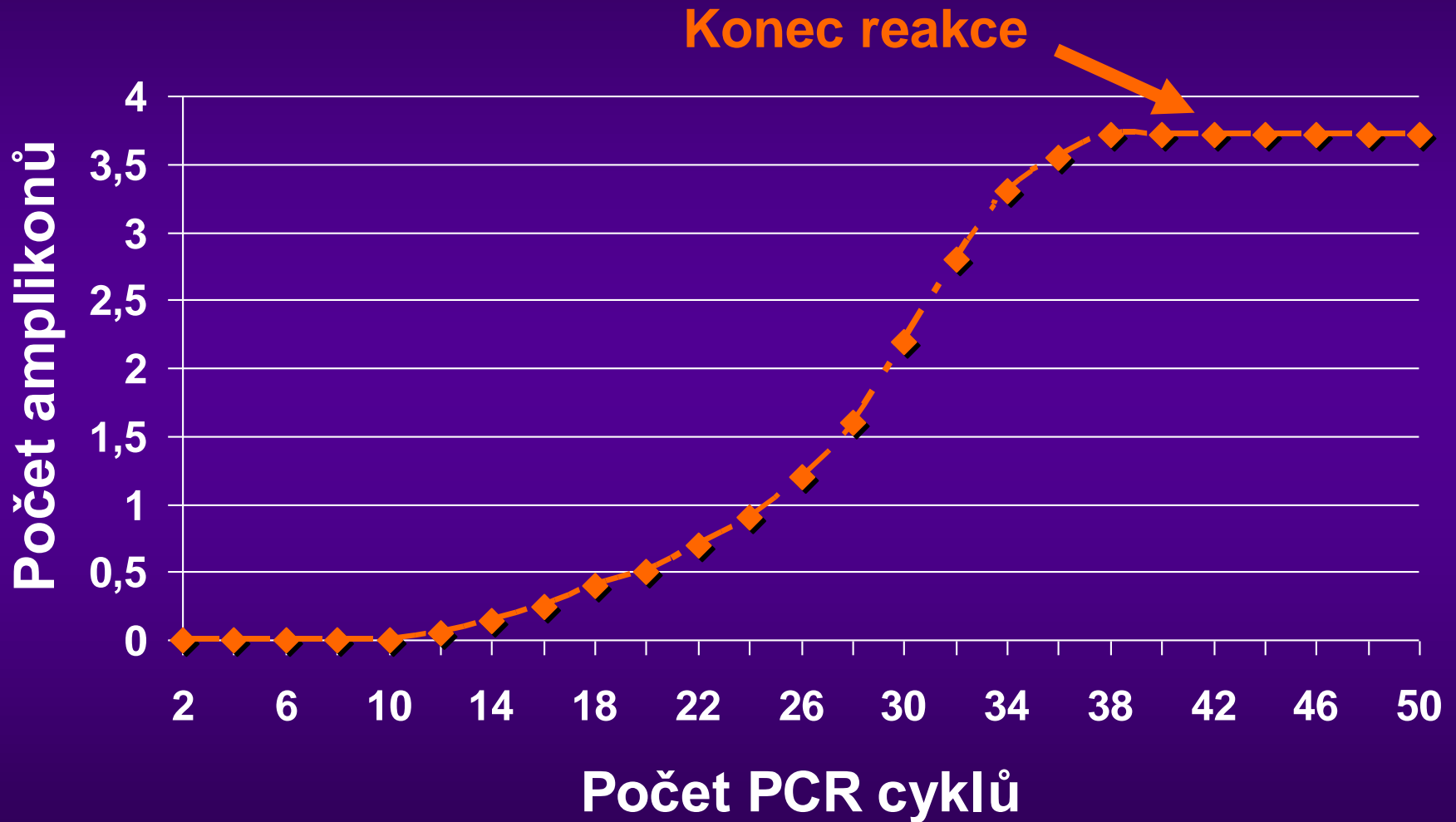
Termocyklery dokáží automaticky rychle měnit teplotu v reakčních blocích mezi třemi základními teplotami PCR cyklu



# ***Vlastnosti termocyklerů***

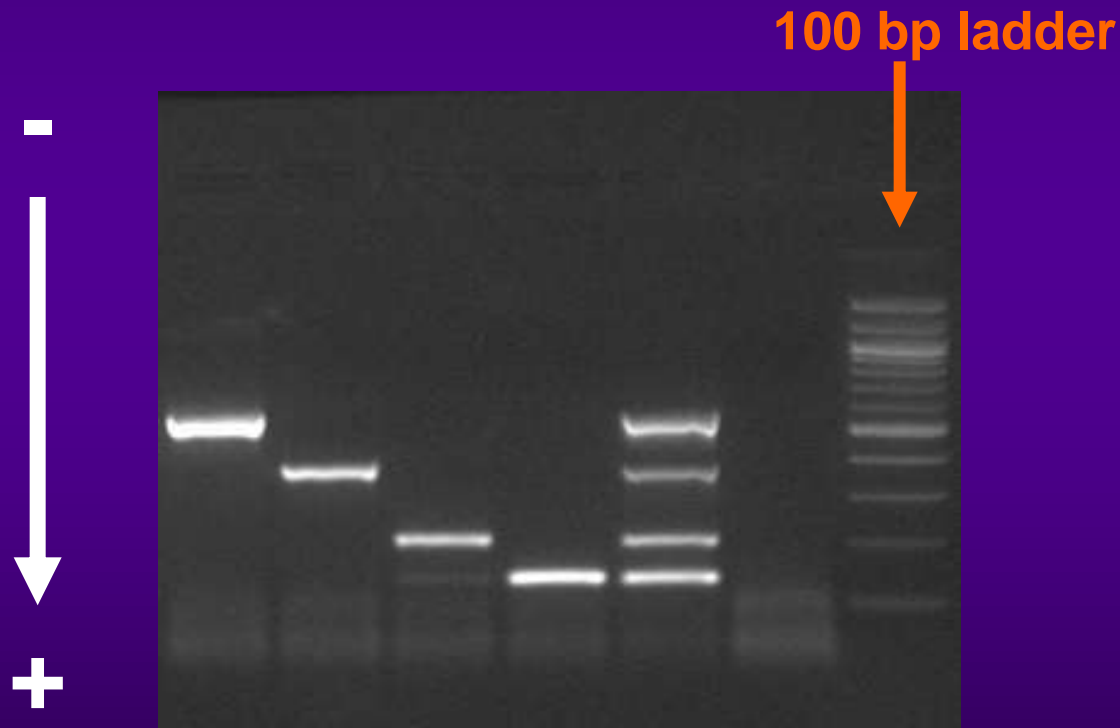
- 1) Vysoká přesnost teploty v reakčním bloku, uniformita a reprodukovatelnost teplotního profilu v reakčním bloku**
- 2) Uniformita a srovnatelnost teplotních profilů mezi jednotlivými reakčními bloky**
- 3) Minimální „přestřelování“ teplot při zahřívání a nebo chlazení**
- 4) Vysoká reprodukovatelnost jednotlivých amplifikačních cyklů**

# Co se děje uvnitř termocykleru ?



# Výsledek PCR

záznam z elektroforézy v agarózovém gelu



# ***Faktory ovlivňující PCR***

## **Faktory fyzikální**

- 1) Počáteční denaturace**
- 2) Připojení primerů**
- 3) Syntéza nukleotidových řetězců**
- 4) Počet cyklů**
- 5) Závěrečná extenze**

## **Faktory chemické**

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

# ***Fyzikální procesy ovlivňující PCR***

- 1) Počáteční denaturace**
- 2) Připojení primerů**
- 3) Syntéza nukleotidových řetězců**
- 4) Počet cyklů**
- 5) Závěrečná extenze**

# ***Počáteční denaturace***

- **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**

# ***Horký start***

- **denaturace po dobu 10-15min,**
  - **termolabilní komplex s jiným proteinem**
  - **rekombinantní připojení haptenu**
  - **wax na rozhraní PCR směsi a Taq polymerázy**
  - **Taq polymeráza zalitá v agaróze ve víčku PCR zkumavky**

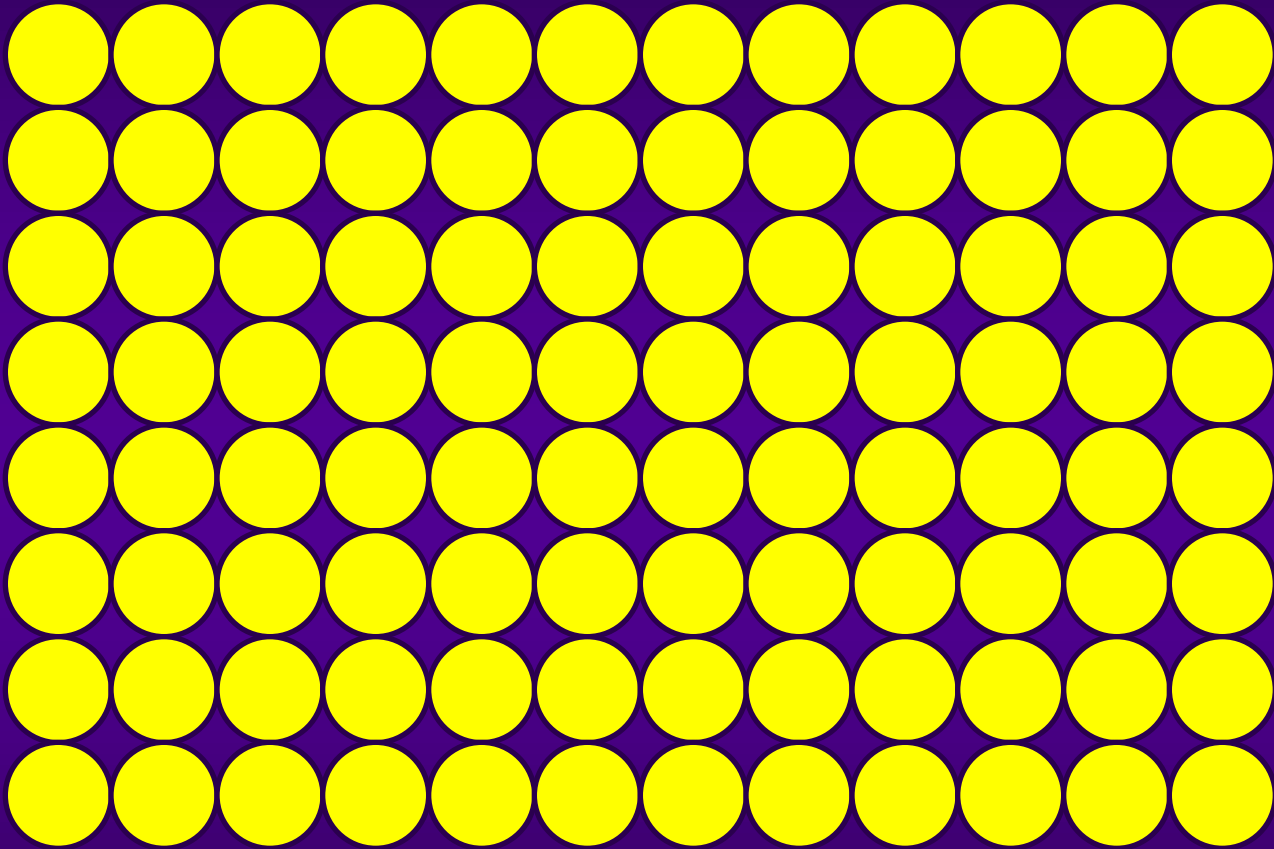
# ***Připojení primerů - annealing***

- **rozhodující pro specifičnost**
- **připojení primerů závisí na teplotě, době annealingu, koncentraci matrice, koncentraci primeru**
- **vysoká teplota = primery se nepřipojí**
- **nízká teplota = vznikají nespecifické produkty**

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



# *Gradientový termocykler*



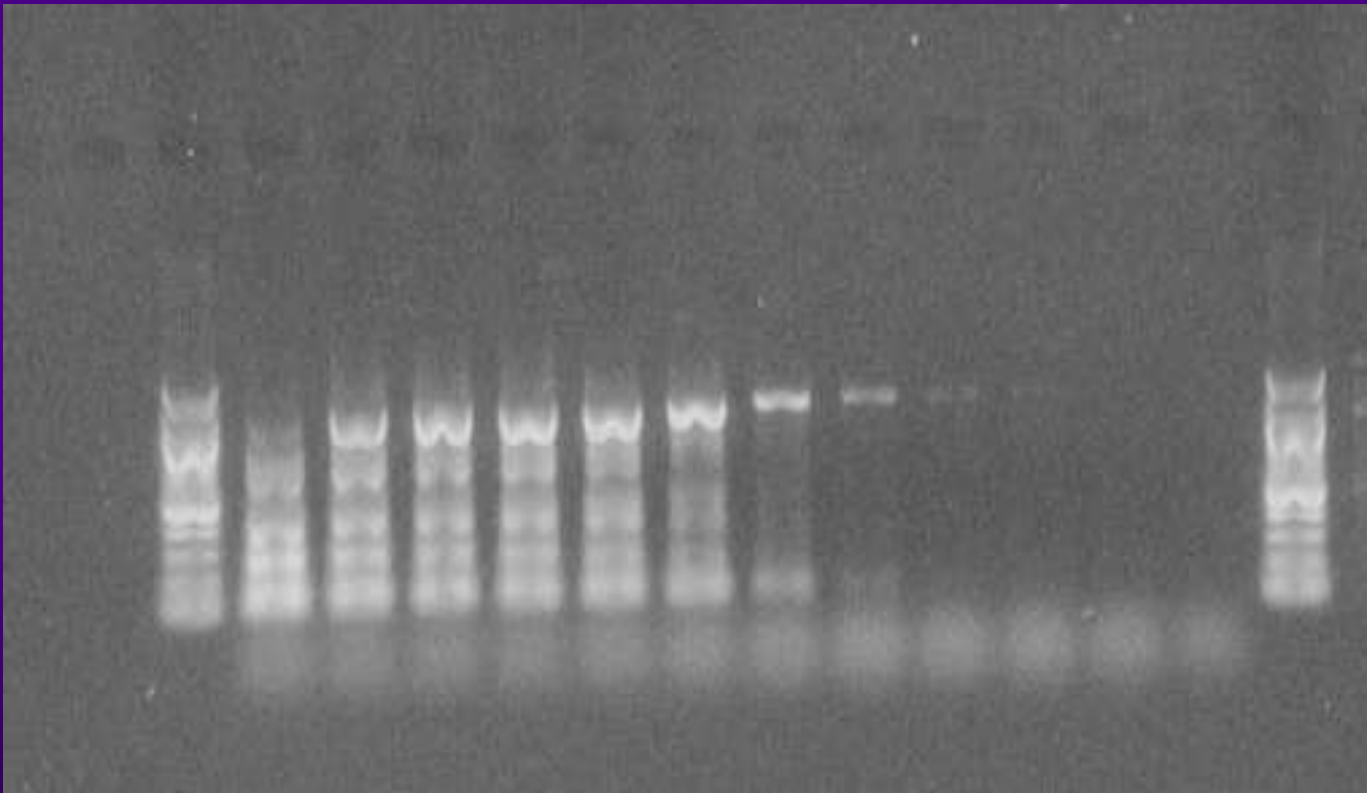
**45°C**

**Ta**

**65°C**

# Záznam z gradientového termocykleru

*teplota*



# ***Syntéza nukleotidových řetězců***

- **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

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

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

# ***Závěrečná extenze***

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

# ***Chemické procesy ovlivňující PCR***

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

# ***Množství Taq polymerázy***

- **0,5-2,5 jednotky, což odpovídá 25-125 fmol enzymu**
- **zvýšená koncentrace Taq polymerázy v reakci snižuje specifitu**
- **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)**
- **fidelity je závislá na koncentraci volných  $Mg^{2+}$  a nukleotidů, na správném vybalancování podílu nukleotidů, na pH a podílu poškozené DNA v reakci**

# *Reakční pufr*

- 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  $T_m$  dvoušroubovicové DNA a tvoří rozpustné komplexy s nukleotidy, což je proces nutný k inkorporaci nukleotidů do DNA



# *Množství dNTP*

- závisí na délce amplifikačních produktů
- koncentraci  $Mg^{2+}$
- koncentraci primerů
- nastavení teplotního profilu reakce
- Tím, že se nukleotidy vážou na  $Mg^{2+}$ , snižují hodnotu  $T_a$
- Do struktury DNA jsou v podmínkách in vitro účinně začleňovány při koncentracích kolem  $10 \mu M$ , což jsou ale hodnoty nižší, než ty, které se používají při PCR ( $100-200 \mu M$ )

# ***Objem PCR reakce***

- **ovlivňuje výsledek v míře menší než faktory uvedené dopsud**
- **objemy reakčních směsí 20 až 100  $\mu$ l**
- **PCR v kapilárách - reakční objemy až 10  $\mu$ l**

# Kvalita DNA

- jedním z rozhodujících faktorů
- přítomnost řady látek, které ovlivňují průběh PCR
- Čistota DNA ovlivňuje zejména citlivost
- V řadě případů působí jako negativní faktor už pouhé zmrazení vzorku, přičemž zvláště negativní je jeho opakované zamrazování a rozmrazování
- PCR je kompletně inhibována látkami jako jsou **heparin**, EDTA, porfyriny a jim podobné sloučeniny a ionty  $H_xPO_4^{n-}$ .
- homogenita vzorku a množství DNA vložené do reakce.

# ***Shrnutí***

- 1) Co je to PCR, princip, jednotlivé kroky**
- 2) Technické provedení PCR**
- 3) Fyzikální faktory ovlivňující PCR**
- 4) Chemické faktory ovlivňující PCR**

# PCR před a po



***Kde si můžu přečíst více?***

**[www.farmakogenomika.cz](http://www.farmakogenomika.cz)**

**A ještě něco pro ty, kteří rádi  
počítají**



# *Příprava primerů - příklad*

**V jakém množství rozpustíte lyofilizovaný vzorek primerů, aby jeho koncentrace byla 100 $\mu$ M ?**

**Vzorek obsahuje 138,6  $\mu$ g primeru**

**Molekulová hmotnost tohoto primeru  
(o délce 18 nukleotidů) je 5 119**



# *Příprava primerů – řešení*

*ve 271μl*

## *Použití primerů – příklad*

**Jaké množství primeru ze zásobního roztoku 100 $\mu$ M napipetujete do PCR reakce o objemu 20 $\mu$ l jestliže chcete do reakce dát 10pmol primeru ?**

# *Použití primerů – řešení*

**1M roztok ..... 1mol částic / litr (1 $\mu$ mol částic /  $\mu$ l)**

**1mM roztok ..... 1nmol částic /  $\mu$ l**

**1 $\mu$ M roztok ..... 1pmol částic /  $\mu$ l**

**100 $\mu$ M roztok ..... 100pmol částic /  $\mu$ l**

**10pmol částic ..... 0,1 $\mu$ l**