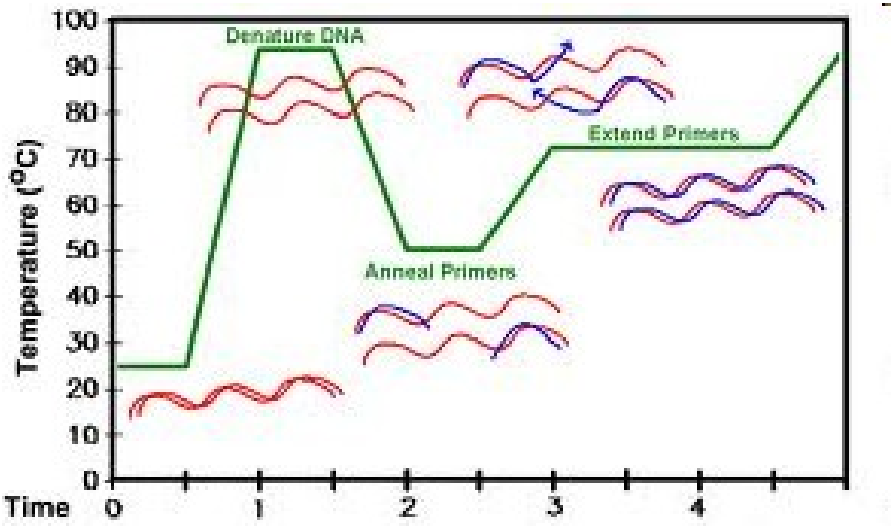
POLYMERÁZOVÁ

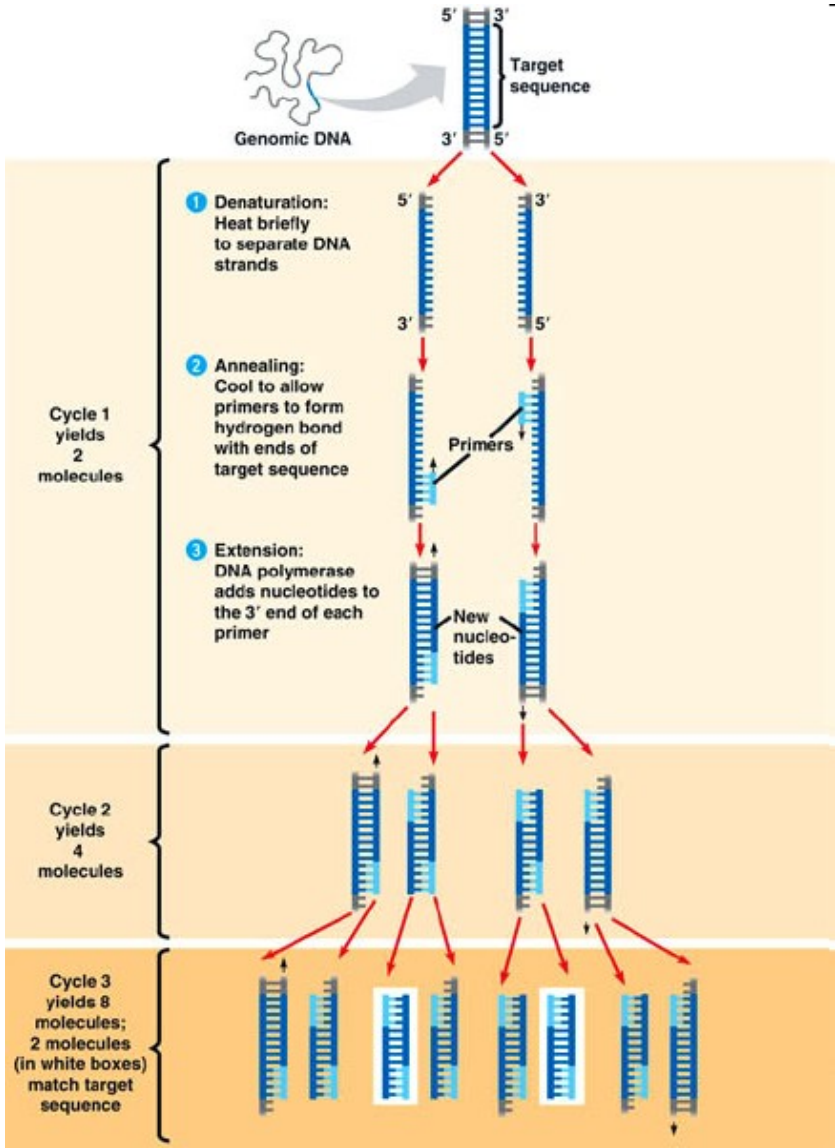
ŘETĚZOVÁ

REAKCE



POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE

Rychlé namnožení úseku DNA na principu *in vitro* replikace DNA.



1983 – Karry Mullis
(Cetus Corporation)
1993 – Nobelova cena za chemii

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

SLOŽENÍ REAKČNÍ SMĚSI

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

enzym	**5´→3´**	**3´→5´**
Taq	ano	ne
Tth	ano	ne
Pfu	ne	ano

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

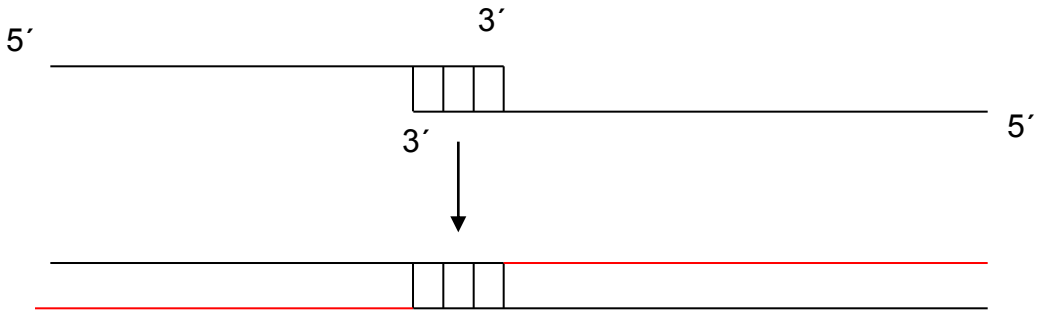
↓

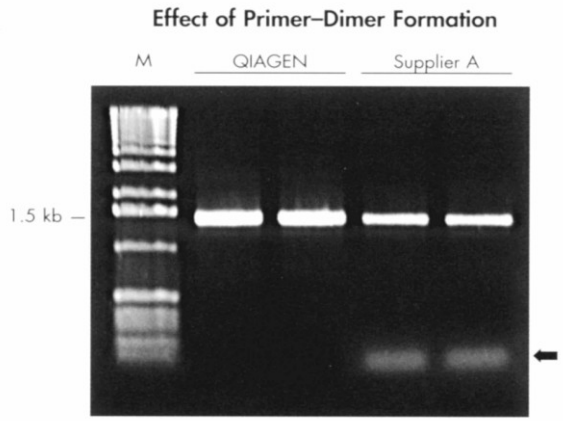
vyšší specifita reakce

SLOŽENÍ REAKČNÍ SMĚSI

- **Oligonukleotidové primery**

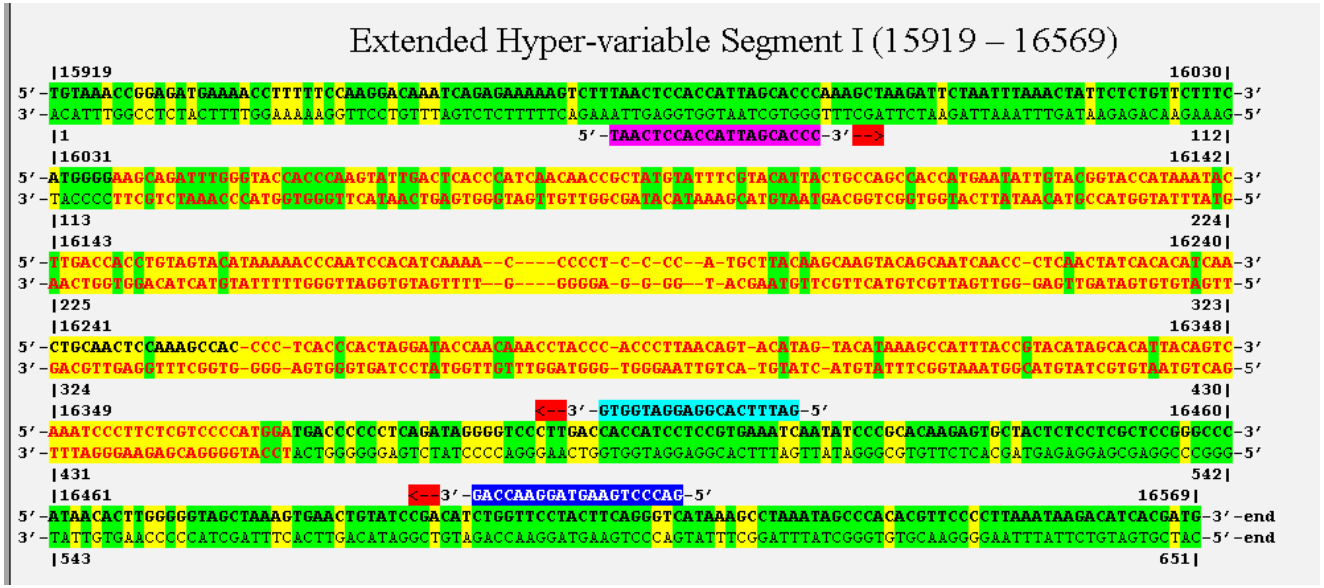
  koncentrace v reakční směsi 0.1 – 1.0 mM (optimalizace – qPCR)
  20 – 30 nukleotidů, CG ~ 40 - 60%, podobná Tm
  primery by neměly být vzájemně komplementární, hlavně na 3 konci





SLOŽENÍ REAKČNÍ SMĚSI

- **Oligonukleotidové primery**



tvorba nežádoucích sekundárních struktur (vlásenky), hlavně CG bohaté

Programy na návrh PCR primerů: Integrated Gene Technologies
Gene Script Primer Design
VizPrimer, CODEHOP, GeneFisher, Primer3, ...
BioMath (kalkulace Tm)

Komerční sety primerů pro modelové organismy: Roche
SABiosciences (Qiagen)

SLOŽENÍ REAKČNÍ SMĚSI

• **dNTP** (dTTP, dATP, dCTP, dGTP), ~ 200 μM každý (50 – 500 μM)

dUTP místo dTTP – jedna z metod prevence kontaminace
DNA s dUTP – degradace uracil-N-glykosylázou
přidána před zahájením reakce, inaktivace během prvního cyklu
nelze použít s polymerázami s „proofreading“ aktivitou (*Pfu*)

• **Templátová DNA**
Nemusí být známa kompletní sekvence, ale aspoň úseky pro návrh primerů
1 – 10 ng bakteriální DNA
0.1 – 1 ng plasmidové DNA
1 – 200 ng genomové DNA
2 μl cDNA / 50 μl

SLOŽENÍ REAKČNÍ SMĚSI

Mg^{2+} - nezbytné pro aktivitu polymeráz, zvyšují Tm
koncentrace pro *Taq* polymerázy 1.5 mM (200 μM dNTPs)
nutno optimalizovat (1 – 10 mM) nebo použít komerční pufr

Reakční pufr

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

REAKČNÍ PODMÍNKY

- ***Denaturace*** 95 C (92 – 98 °C), 15 s pro krátké fragmenty (do ~1 kb)
  30 – 60 s pro dlouhé fragmenty
  delší časy – aktivace polymerázy, inaktivace glykosylázy
  Denaturace dvouvláknové DNA

- ***Nasedání (hybridizace) primerů*** 50 - 55 C (podle Tm duplexu DNA:primer)
  OPTIMALIZACE!
  20 - 30 s

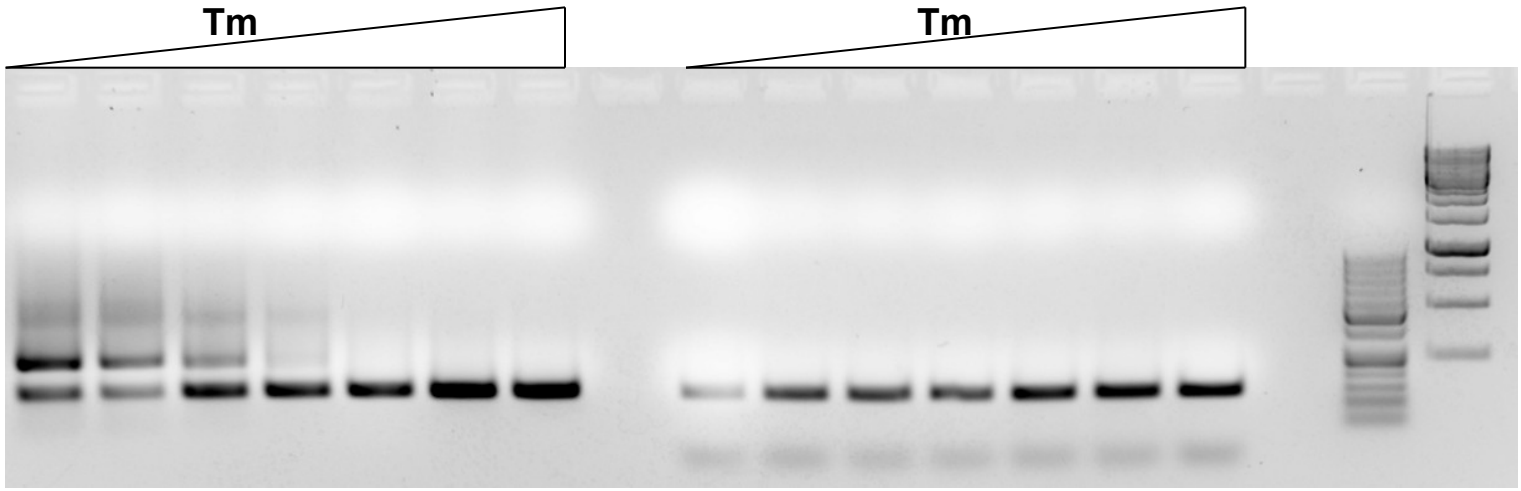
- ***Syntéza DNA*** 72 °C (70 – 74 C)
  doba závislá na délce fragmentu (do 1 kb 30 – 60 s
  6 – 10 kb až 10 min)

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

Cyklery

OPTIMALIZACE TEPLOTY NASEDÁNÍ PRIMERŮ

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

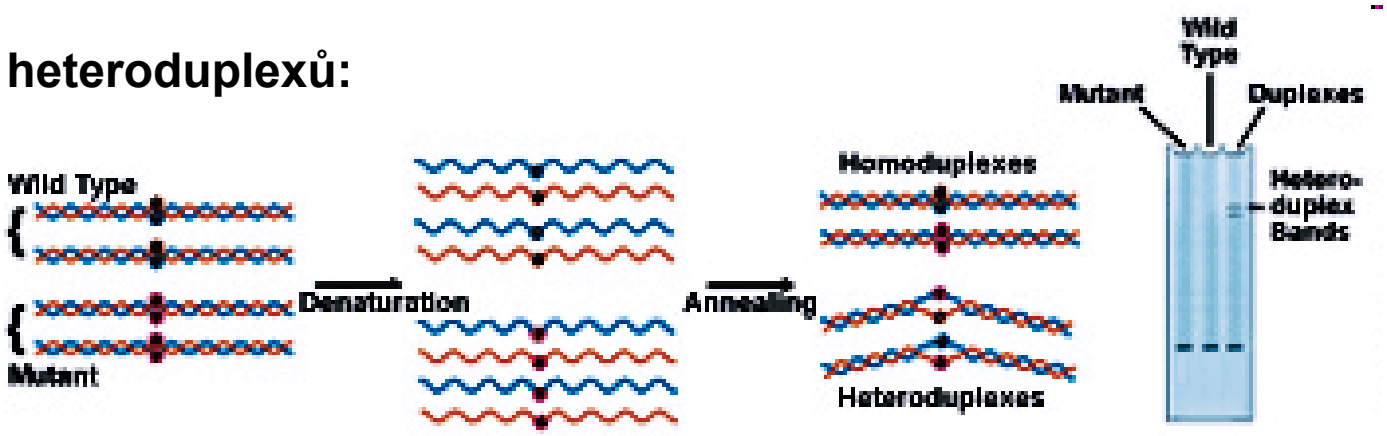


Kontrola všech parametrů PCR – qPCR – kalibrační křivka - účinnost reakce

TYPY PCR

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

Analýza heteroduplexů:

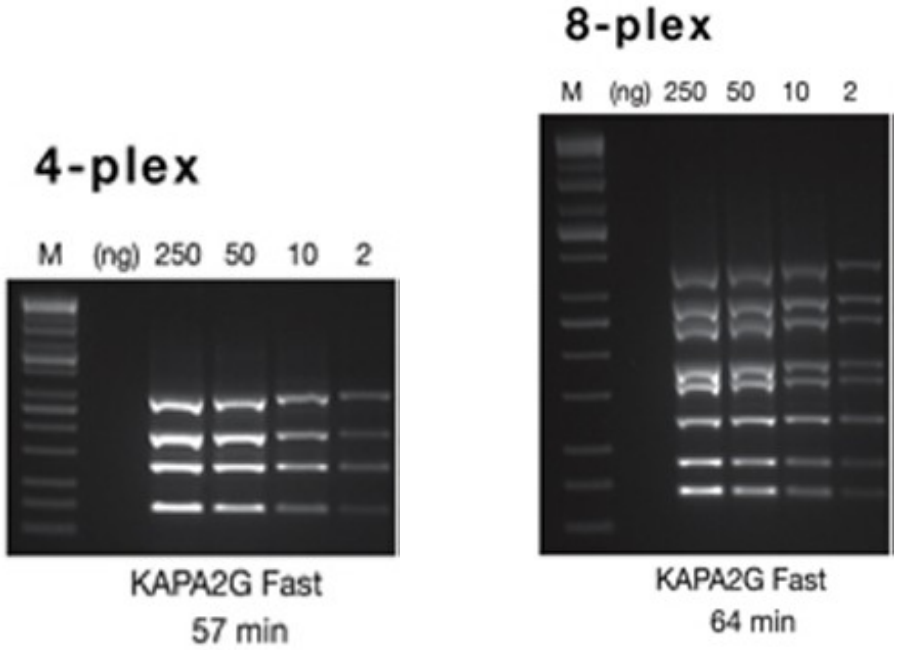


https://www.nationaldiagnostics.com/electrophoresis/article/heteroduplex-analysis

Asymetrická PCR: preferenční syntéza jednoho vlákna (jeden z primerů v nadbytku).
Vzniká ssDNA – sekvenování.

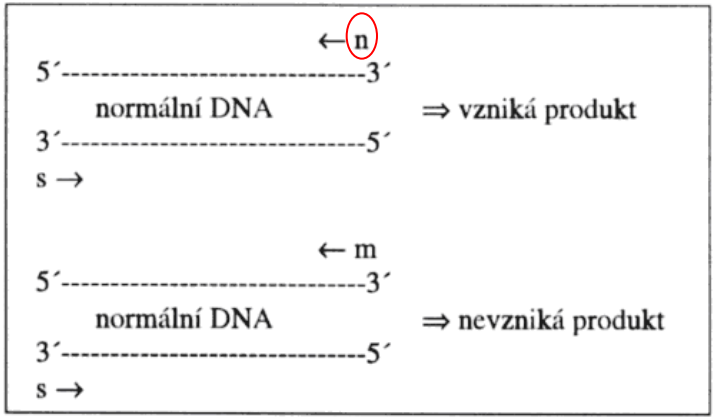
TYPY PCR

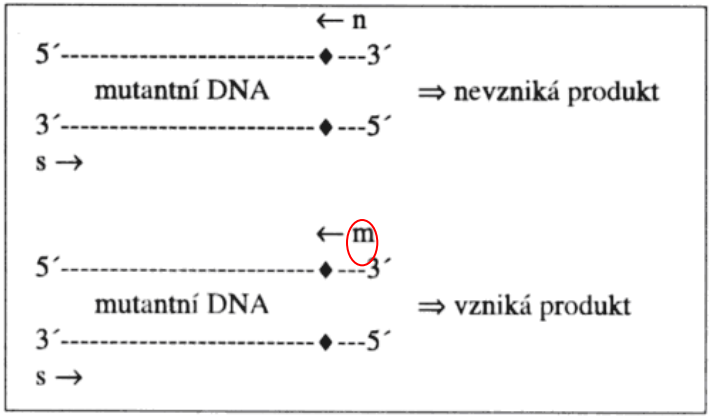
Multiplexová PCR: testování více delecí / bodových mutací v jedné reakci
komplikovaná optimalizace (návrh primerů)
hlavně v kvantitativním uspořádání s různými fluorescenčními barvami
Diagnostika delecí v genu pro dystrofin: 11 exonů na 3´konci v jedné reakci
7 exonů na 5´konci v jedné reakci



TYPY PCR

Alelově specifická PCR: využití alelově specifických primerů
detekce bodových mutací a krátkých delecí



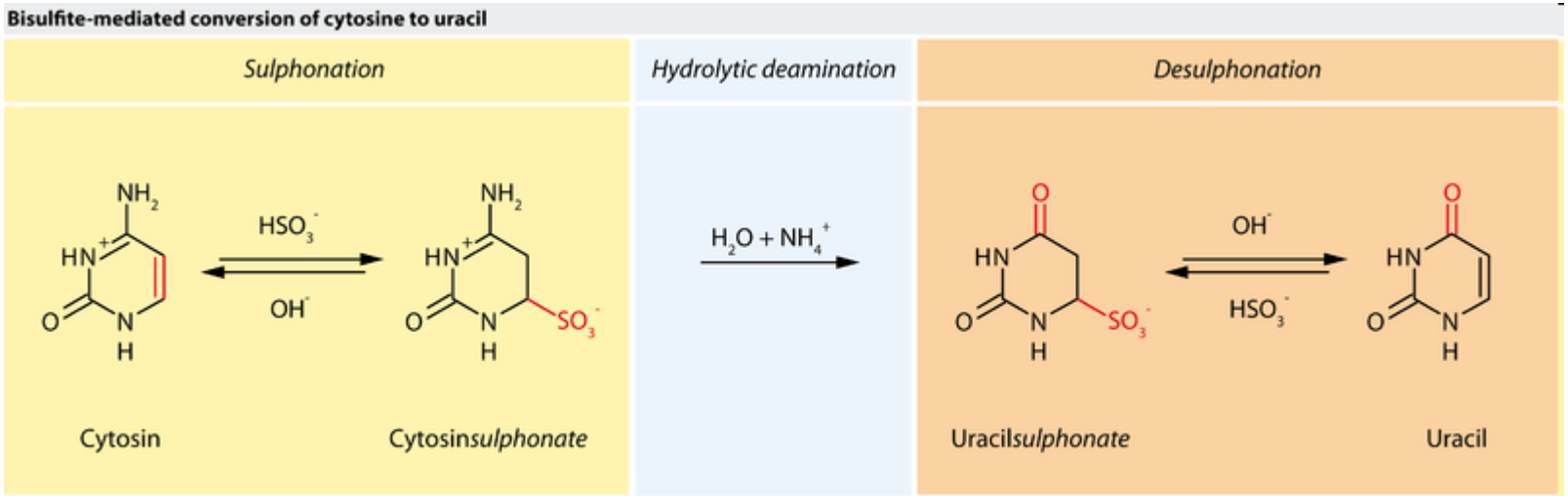


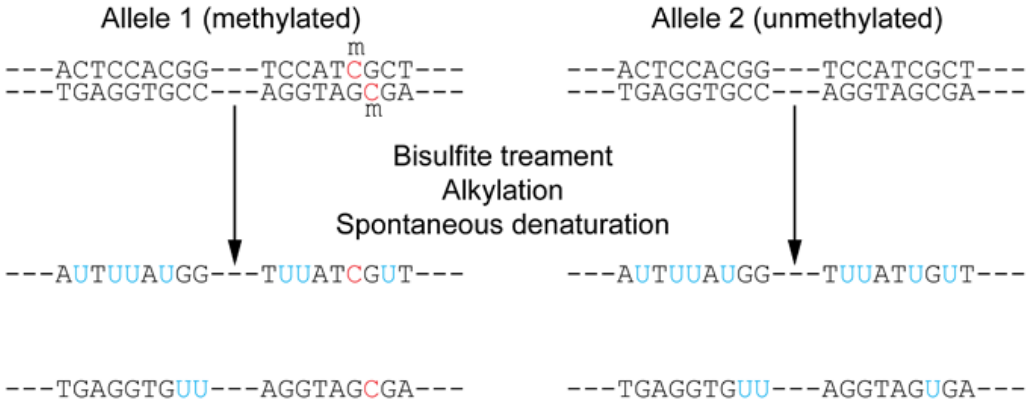
n – „normální“ primer
m - „mutantní“ primer
s – společný primer

http://www.lf2.cuni.cz/projekty/prusa-dna/newlook/defa6.htm

TYPY PCR

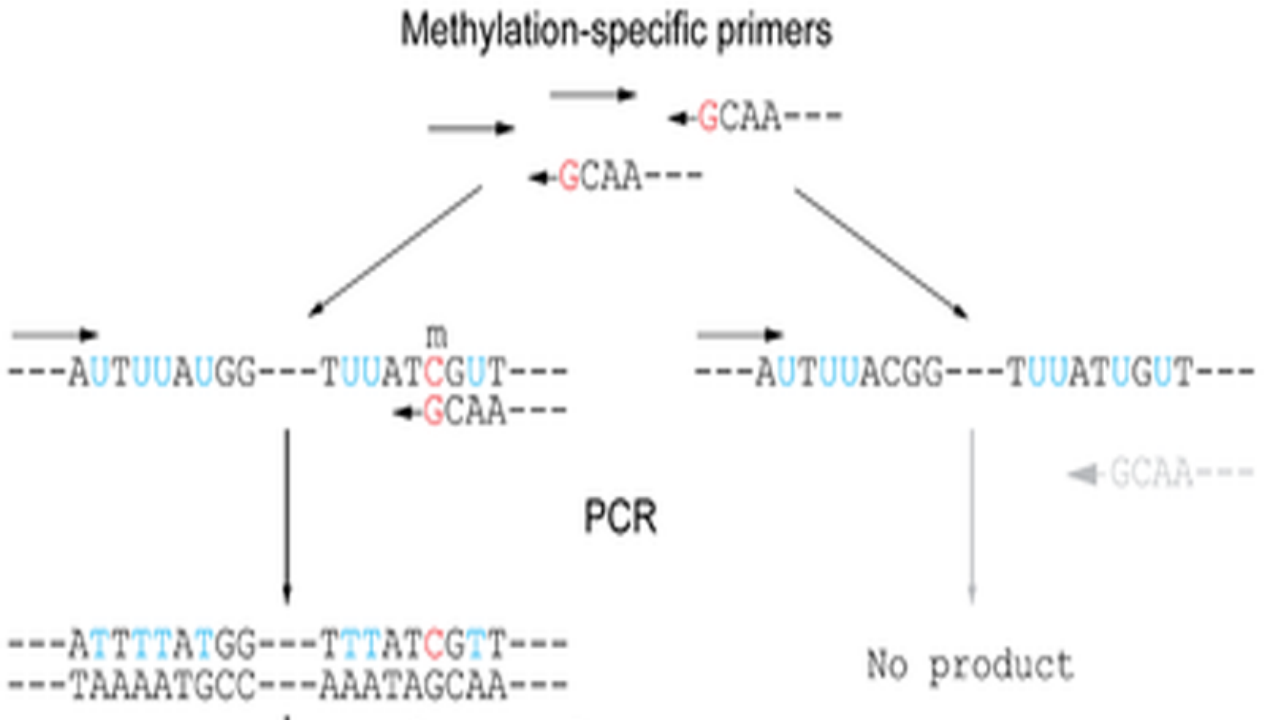
Metylačně specifická PCR – konverze nemetylovaných cytosinů bisulfitem





TYPY PCR

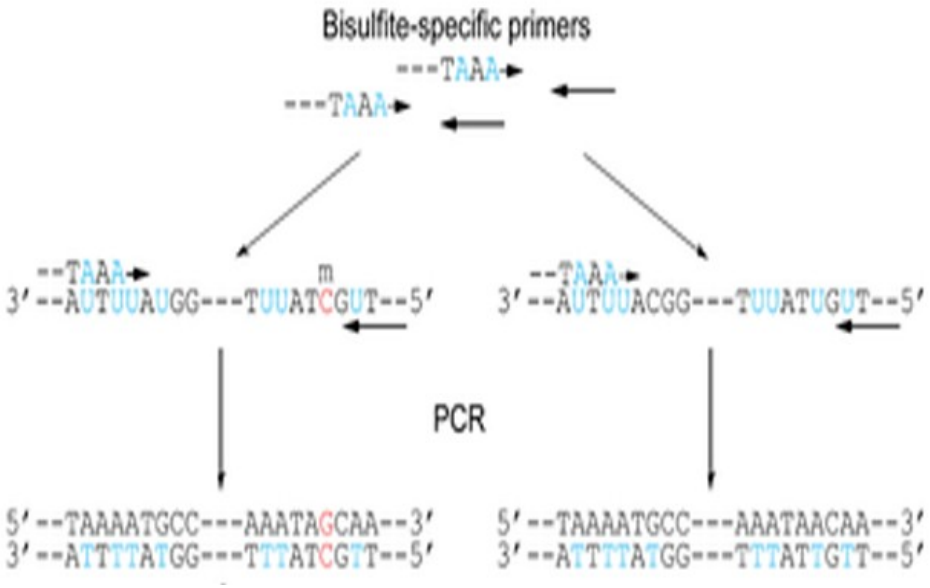
Metylačně specifická PCR – konverze nemetylovaných cytosinů bisulfitem
každé vlákno po konverzi se amplifikuje zvlášť



TYPY PCR

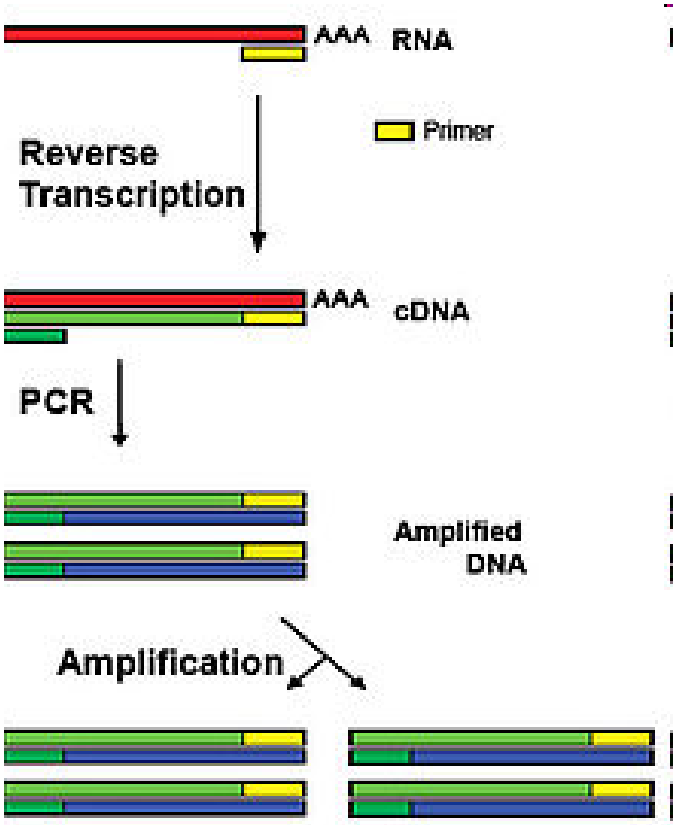
Metylačně NEspecifická PCR DNA po reakci s bisulfitem

metylačně nespecifické primery



Sekvenování (analýza metylovaných cytosinů)
analýza HRM (high resolution melting)
analýza RE s C v rozpoznávací sekvenci
SSCP

RT - PCR



KVALITA RNA!!!

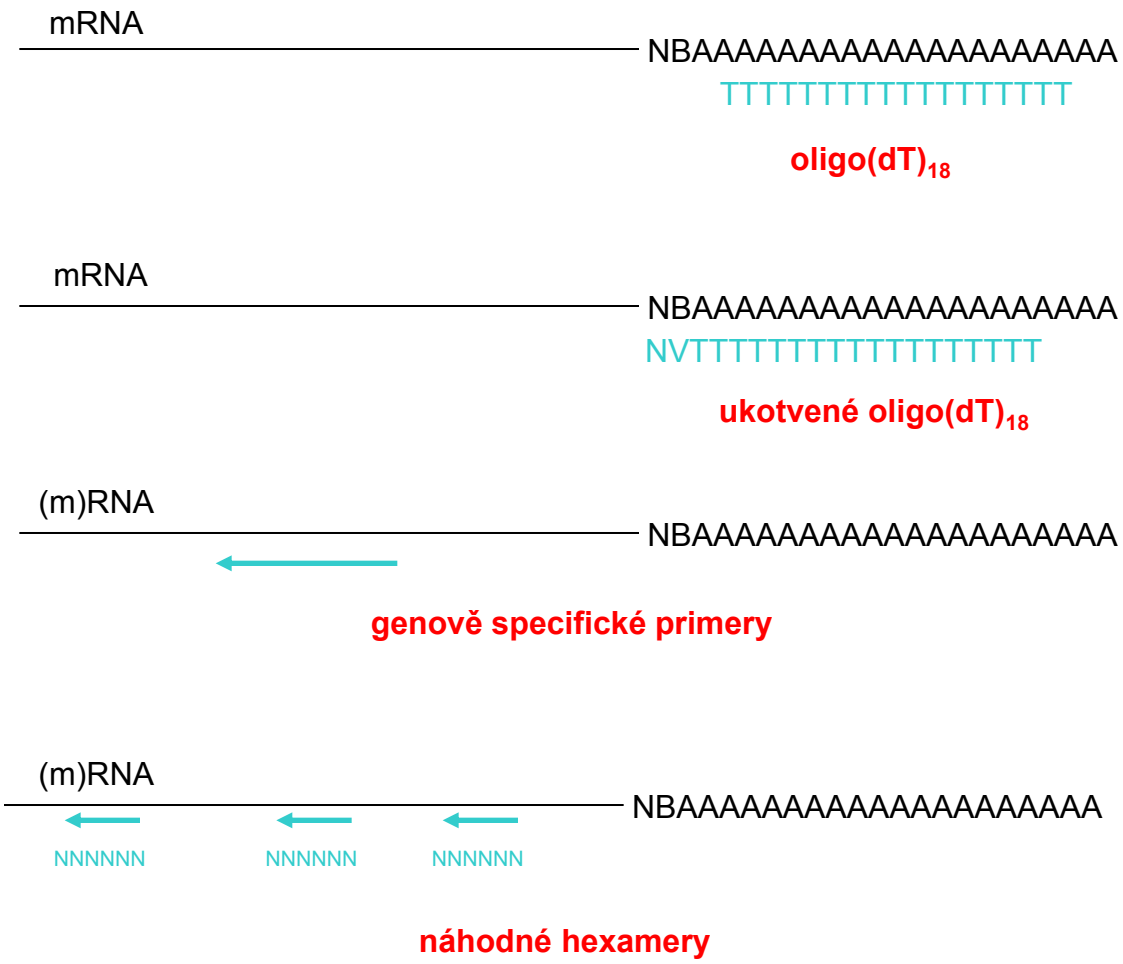
oligo(dT)$_{12-20}$
random hexa - nonamery
specifický primer(y)

sekvenčně-specifické primery

REVERZNÍ TRANSKRIPTÁZY

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

PRIMERY PRO RT



plnodélková cDNA
chyby – templáty s oligo(a)

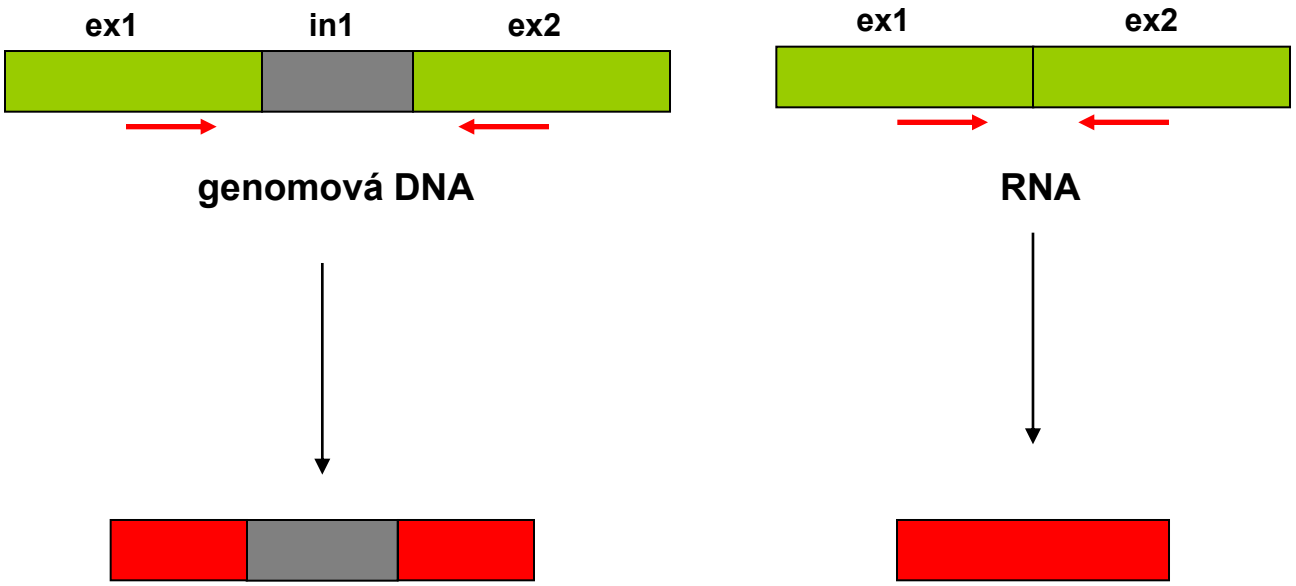
plnodélková cDNA
zabraňují nasedání na vnitřní části polyA

vysoká specifita
vhodné pro one-step RT-PCR

proporcionální přepis všech templátů
vysoká koncentrace – pro krátké templáty se sekundárními strukturami

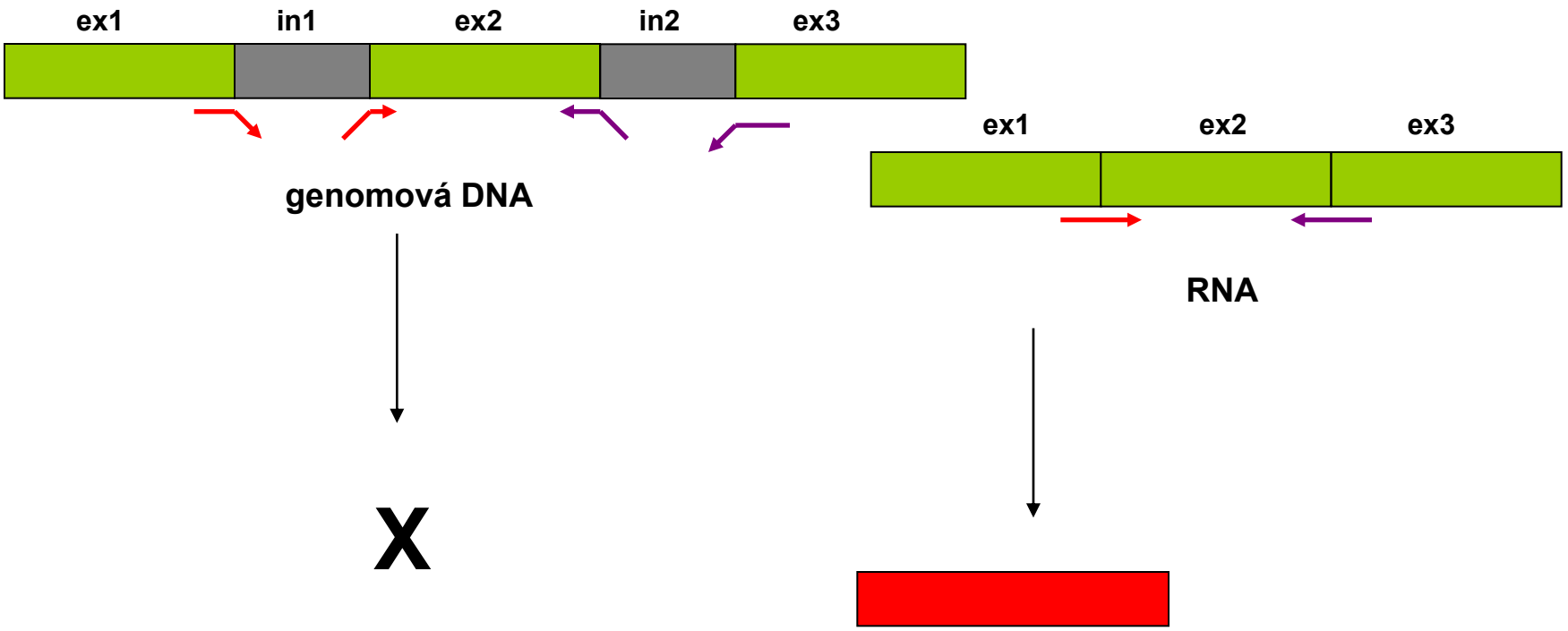
NÁVRH PRIMERŮ PRO RT-PCR

Primery ze sousedních exonů



NÁVRH PRIMERŮ PRO RT-PCR

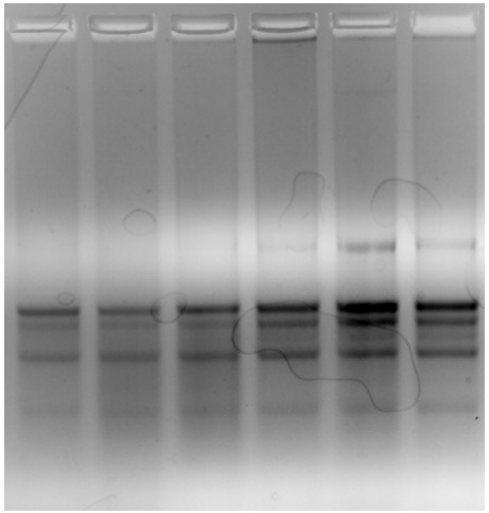
Primery zasahují do sousedních exonů



KVALITA TEMPLÁTU (RNA)

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

Celková RNA – bandy 18S, 28S rRNA



rostlinná RNA (*A. thaliana*)

KVALITA TEMPLÁTU (RNA)

Bioanalyzér (Agilent) - elektroforetická separace na mikročipech

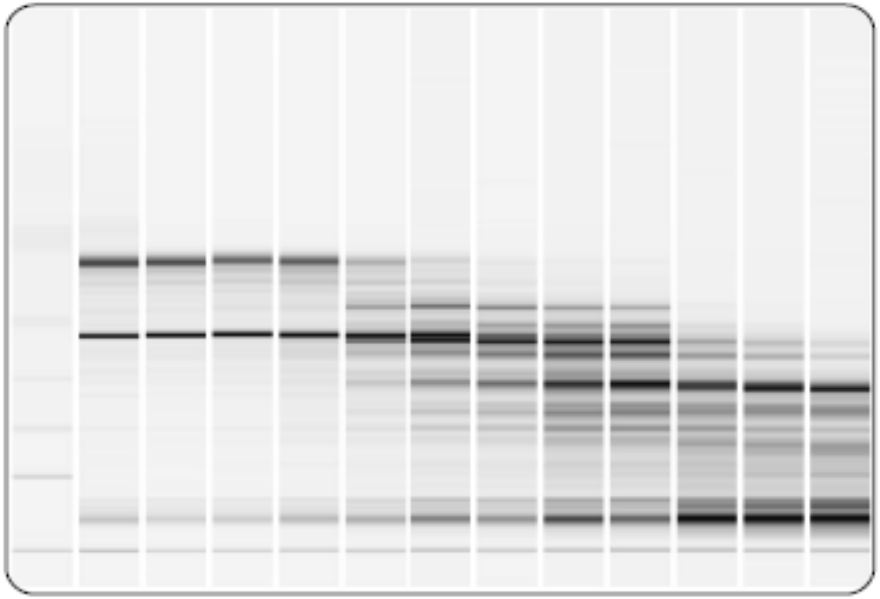


Figure 1
A total RNA sample was degraded for varying times and the resulting samples were analyzed on the Agilent 2100 bioanalyzer using the Eukaryote Total RNA Nano assay. A shift towards shorter fragment sizes can be observed with progressing degradation.

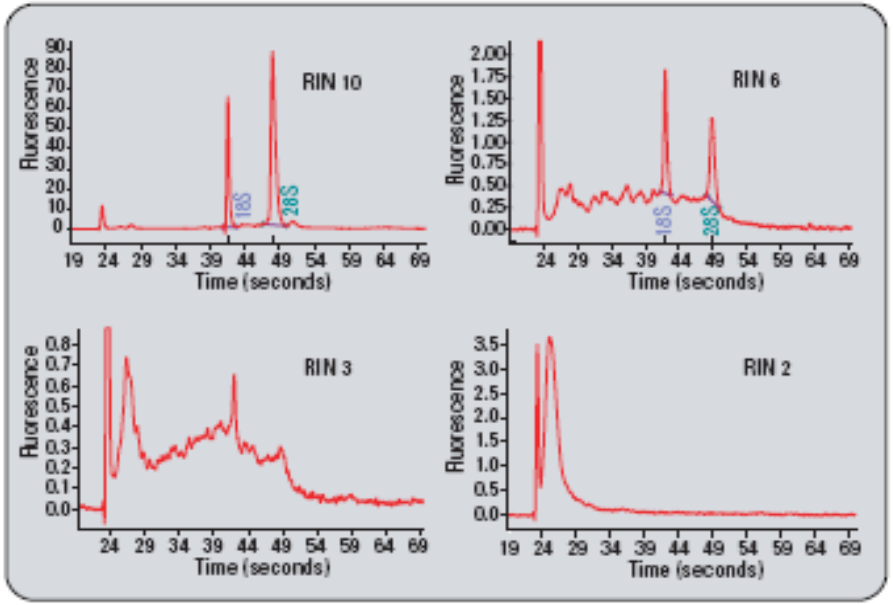


Figure 2
Sample electropherograms used to train the RNA Integrity Number (RIN) software. Samples range from intact (RIN 10), to degraded (RIN 2).

RIN (RNA Integrity Number)

JEDNOKROKOVÁ RT-PCR

Reverzní transkripce a PCR v jedné reakci

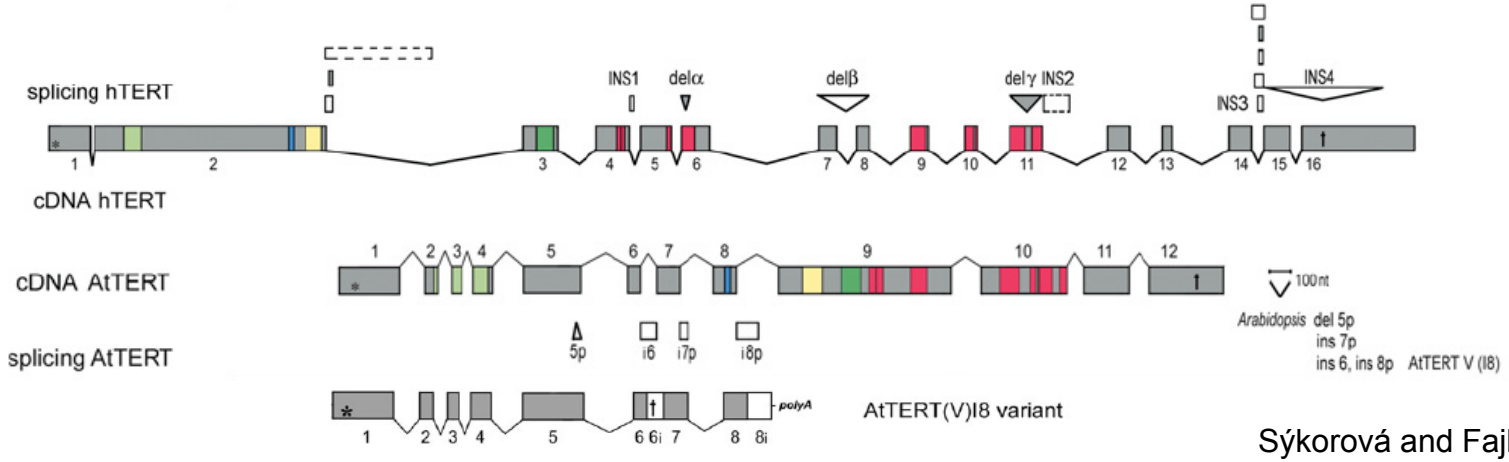
Vysoce kvalitní RNA, množství do reakce musí být stanoveno empiricky
(dle množství transkriptu a použitého enzymu)

Sekvenčně specifické primery

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

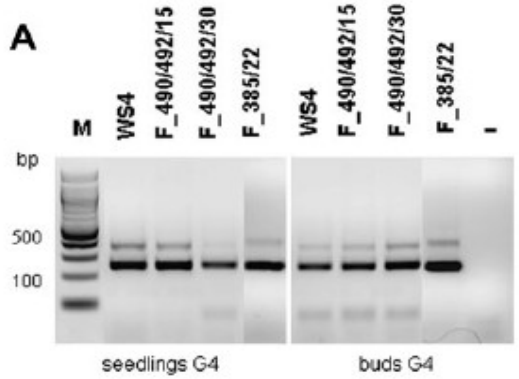
ALTERNATIVNÍ SESTŘIH A JEHO ANALÝZA

Z jednoho genu vzniká více (izo)forem proteinů
Při sestřihu - odstřižení exonů, ponechání intronů



Sýkorová and Fajkus, 2009

RT-PCR
qRT-PCR
microarray analýzy

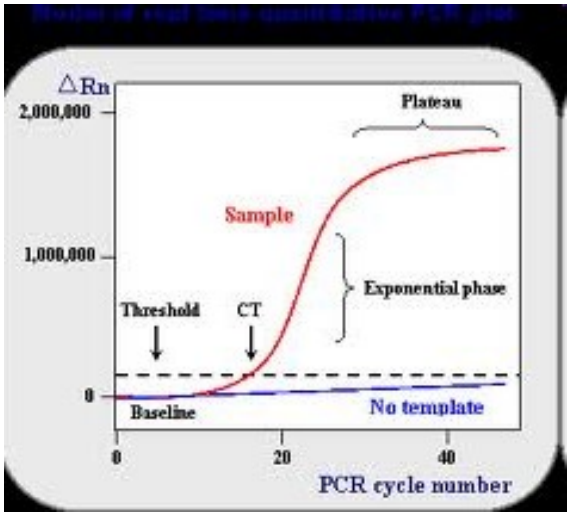


Fojtová et al., 2011

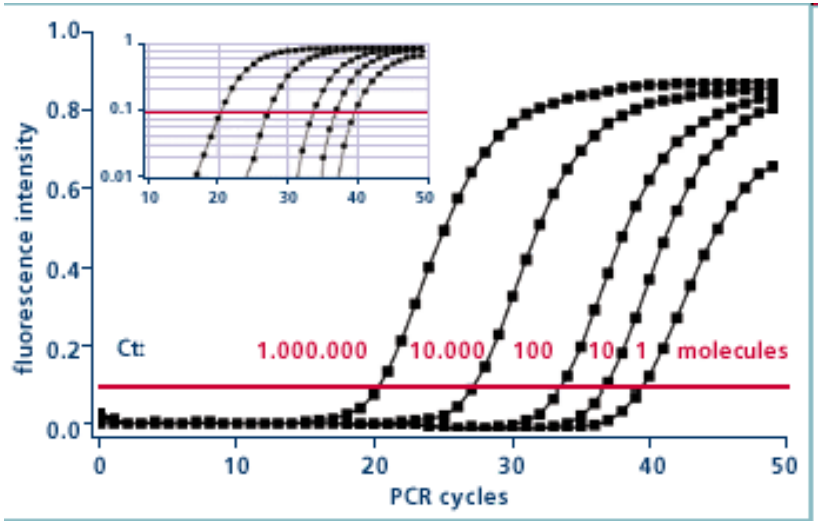
KVANTITATIVNÍ RT-PCR

Současná amplifikace a detekce produktu v přítomnosti fluorescenční látky

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



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

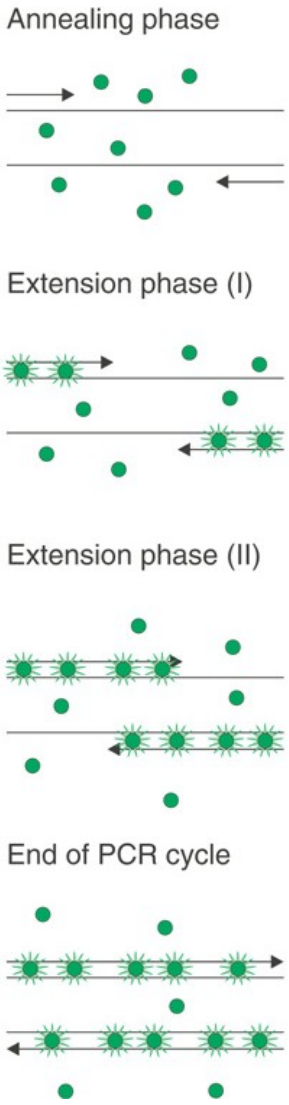


http://www.bio-equip.cn/

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

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

SEKVENČNĚ NESPECIFICKÁ ANALÝZA



Van der Velden et al., Leukemia 2003

SYBR Green I

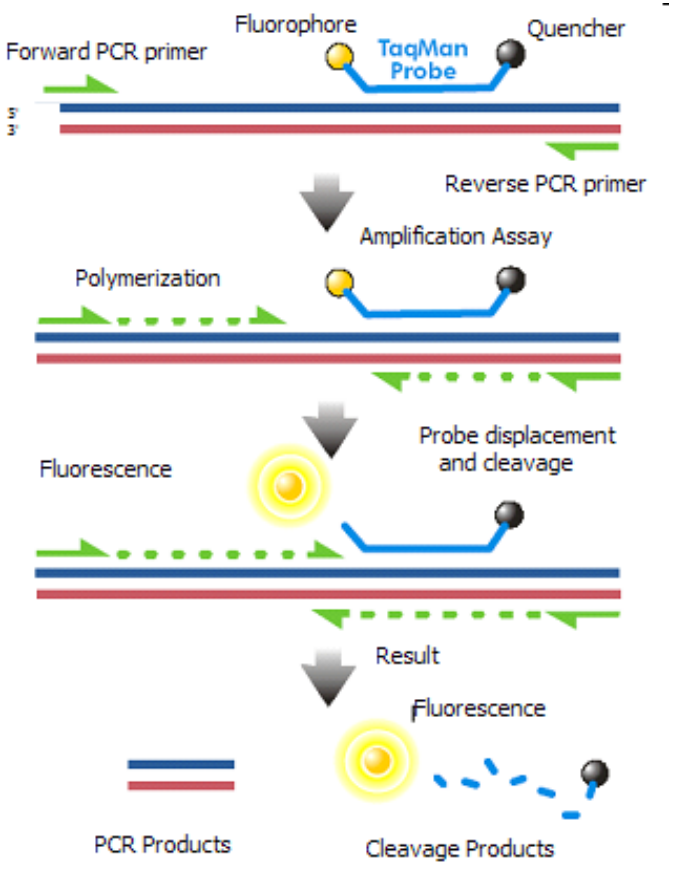
- fluorescence výrazně roste po vazbě na dsDNA
- signál při 530 nm, detekce na konci každého cyklu
- relativně snadný návrh primerů a optimalizace PCR
- pozor na nespecifické produkty (dimery primerů)!!!
  - vždy na konci melting analýza
  - detekce fluorescence za vyšší teploty

- RT s oligo-dT nebo random nonamery, analýza více genů z jedné cDNA

- hand-made mixy s hot start polymerázou (náročné na přesnost pipetování – reproducibilita)
- komerční mixy – přidávají se pouze primery a templát
- reakce v multiplikátech (nejméně triplikáty), biologické repliky

SEKVENČNĚ SPECIFICKÁ ANALÝZA

Využití oligonukleotidových sond komplementárních k PCR produktu
Vysoce specifická analýza



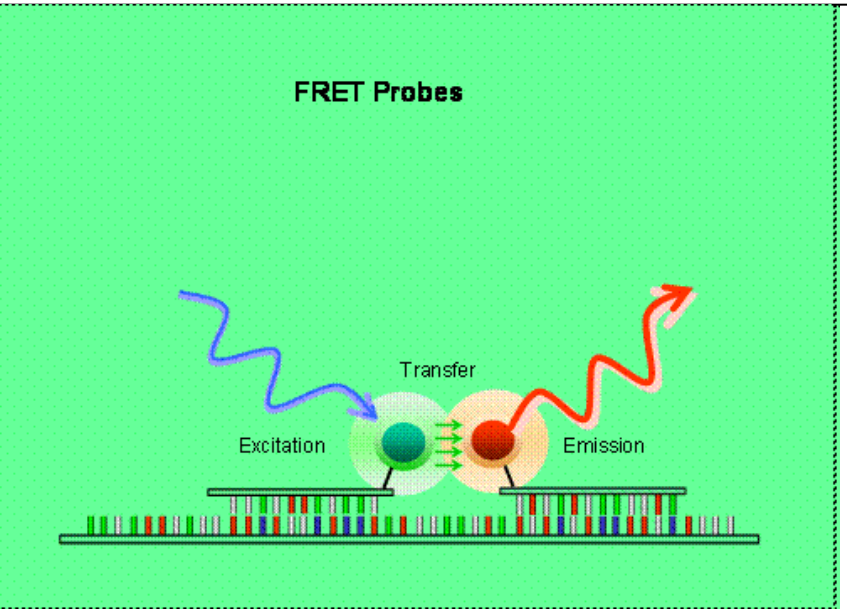
Hydrolytické próby

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

TaqMan próby:

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

SEKVENČNĚ SPECIFICKÁ ANALÝZA



Hybridizační próby

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

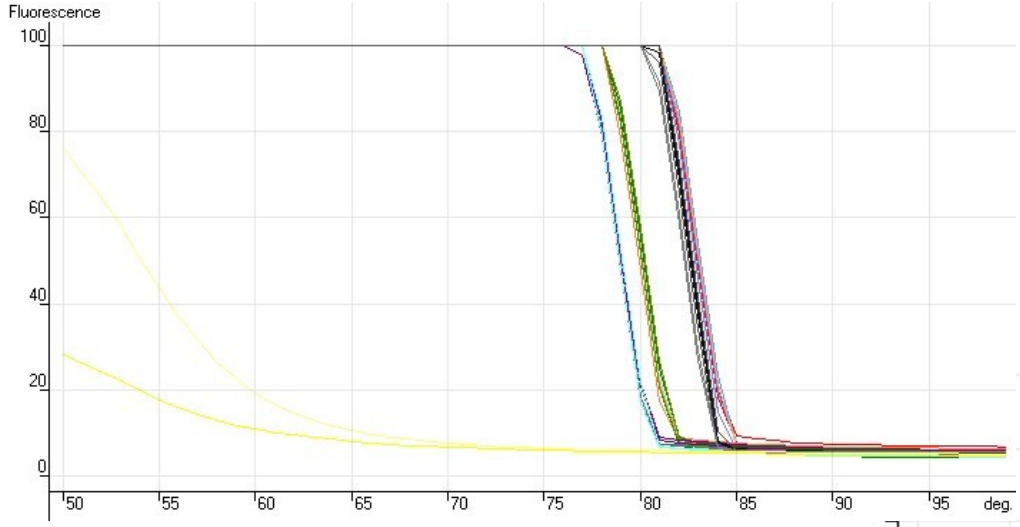
FRET – fluorescence resonance energy transfer

Výhoda: próby jsou během PCR stabilní

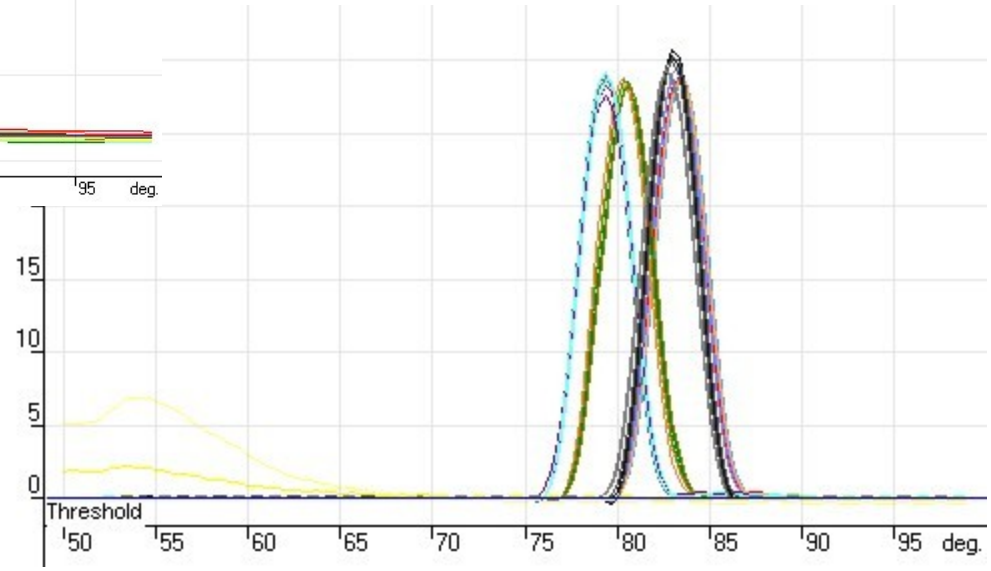
ANALÝZA „MELTING CURVE“

SYBR Green I analýza – specifita produktu PCR

- pomalé zahřívání PCR produktu na 95 C
- prudký pokles fluorescence při teplotě kolem Tm



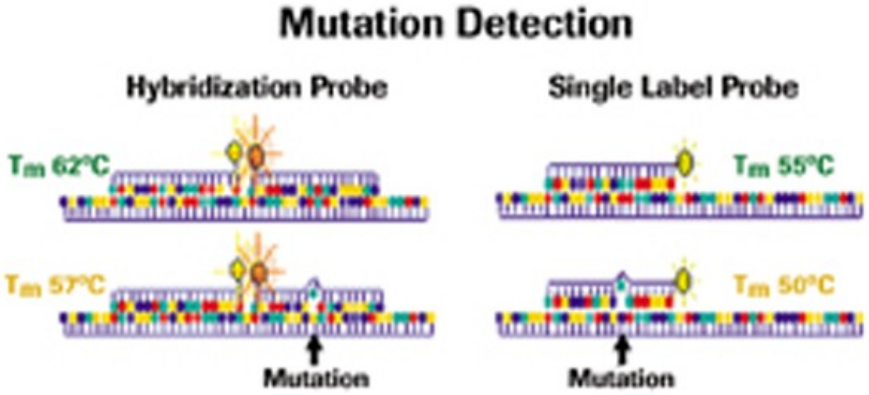
Pokud jsou přítomny nespecifické produkty – další píky

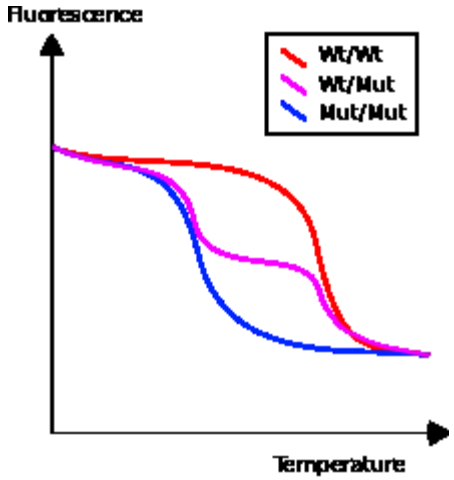


ANALÝZA „MELTING CURVE“

Analýza s hybridizačními a „single“ próbami – detekce SNP a genotypování

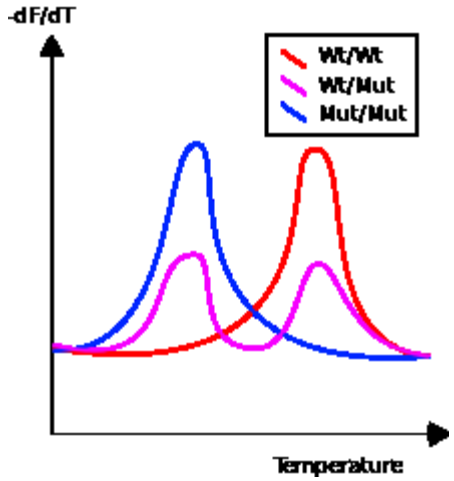
•





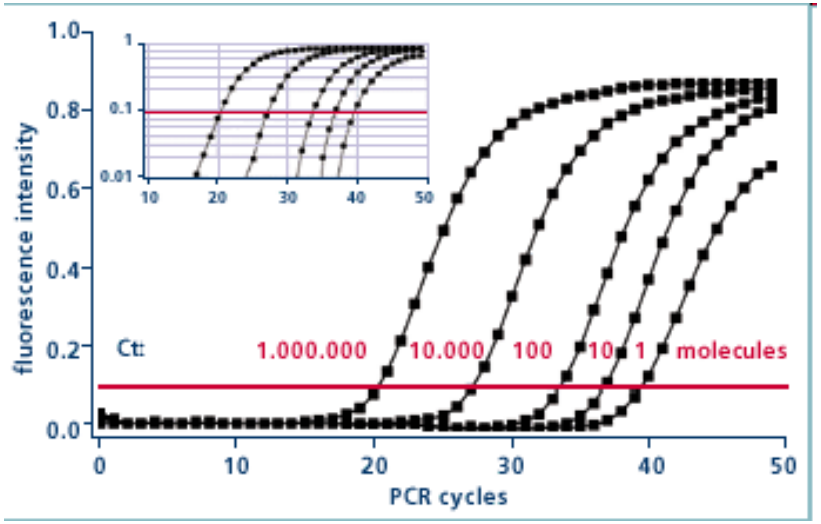
pomalé snižování teploty (0.1 – 0.2 C / s)
kontinuální měření fluorescence

- derivační pík při vyšší teplotě pro wt alelu (plně komplementární k hybridizační próbě)
- derivační pík při nižší teplotě pro mutantní alelu
- oba typy píků pro heterozygotní vzorky



METODY KVANTIFIKACE

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

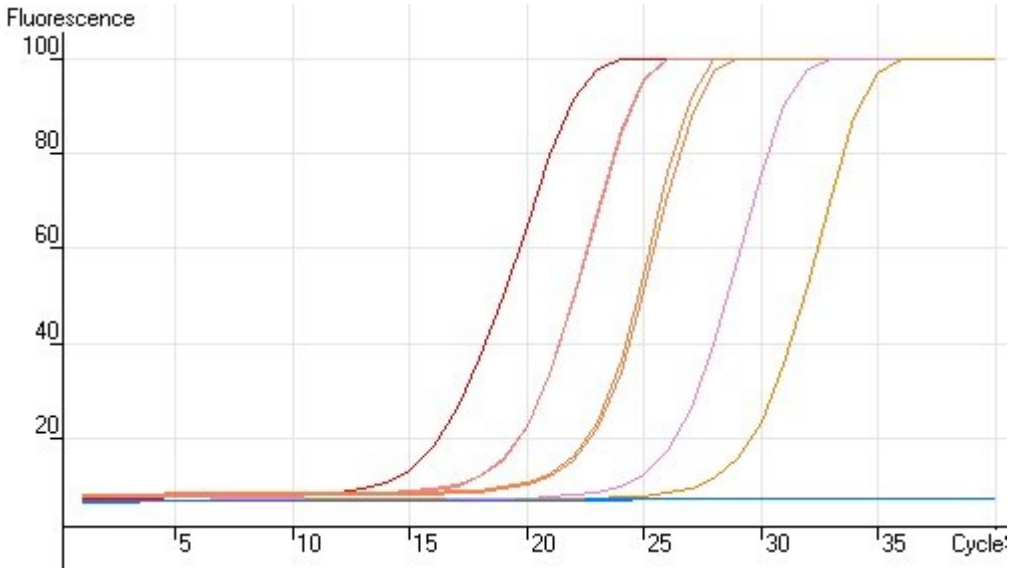


http://www.bio-equip.cn/

ABSOLUTNÍ KVANTIFIKACE

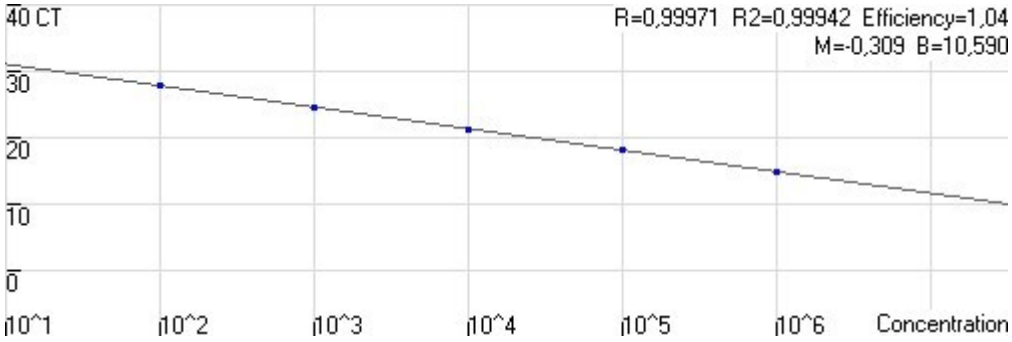
Koncentrace templátu je vyjádřena v absolutních číslech
(kopie, μg/μl)

KALIBRAČNÍ KŘIVKA – vzorky standardů o známé koncentraci



ABSOLUTNÍ KVANTIFIKACE

KALIBRAČNÍ KŘIVKA – vzorky standardů o známé koncentraci



R – korelační koeficient (% dat v souladu se statistickou hypotézou)
B – „intercept“, teoretické množství kopií detekovatelné v 1. cyklu
M – sklon (směrnice) přímky, zásadní pro výpočet efektivity reakce
Optimální parametry: M = -3.332

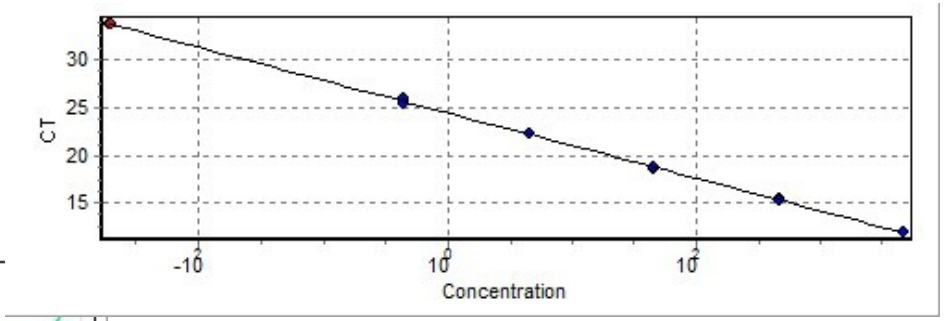
E = 1 ($E = (10^{-1/M}) - 1$)

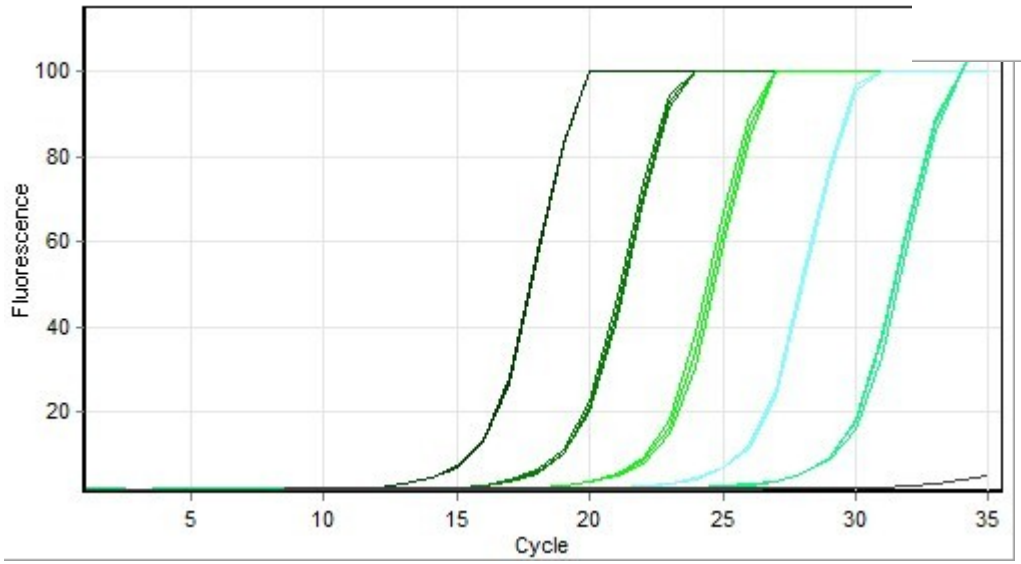
amplifikace 2

KALIBRAČNÍ KŘIVKA - OPTIMALIZACE PCR

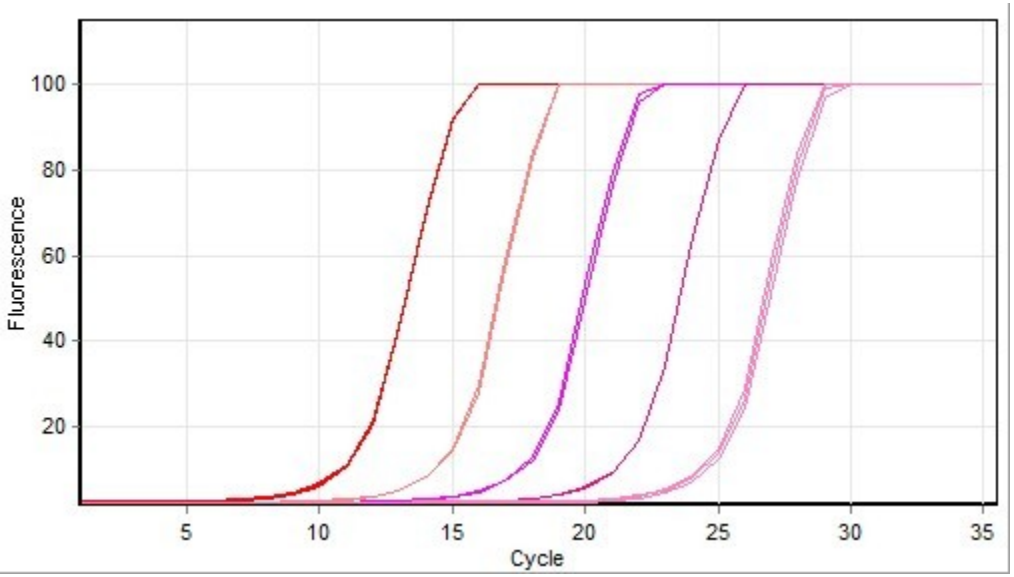
Kalibrační křivka s parametry blížícími se optimu – optimální podmínky PCR

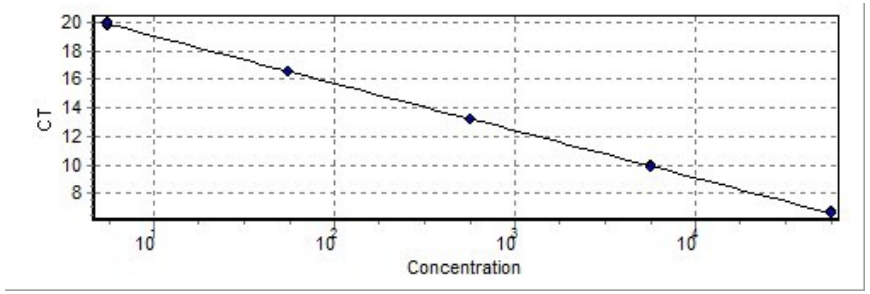
- návrh primerů
- teplota nasedání primerů
- časy
- koncentrace primerů

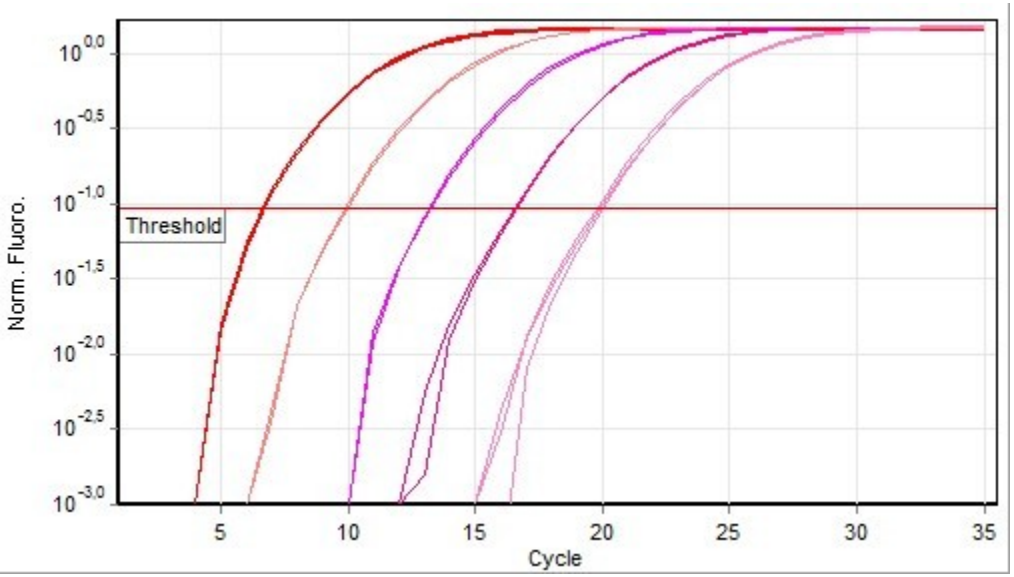




Reaction efficiency (*)	0,96336 (* = 10^(-1/m) - 1)
M	-3,41298
B	24,42021
R Value	0,99963
R^2 Value	0,99926







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

ABSOLUTNÍ KVANTIFIKACE

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

RELATIVNÍ KVANTIFIKACE

Srovnání množství transkriptu mezi více vzorky relativně k transkripci referenčního genu

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

Bez korekce na efektivitu reakce:

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

$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ (vzorek) – ΔCt (kontrola, kalibrátor)

ΔCt (vzorek) = Ct(analyzovaný gen) – Ct(referenční gen)

ΔCt (kontrola) = Ct(analyzovaný gen) – Ct(referenční gen)

Korekce na efektivitu reakce:

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

Ct(kontrola) – Ct(vzorek)

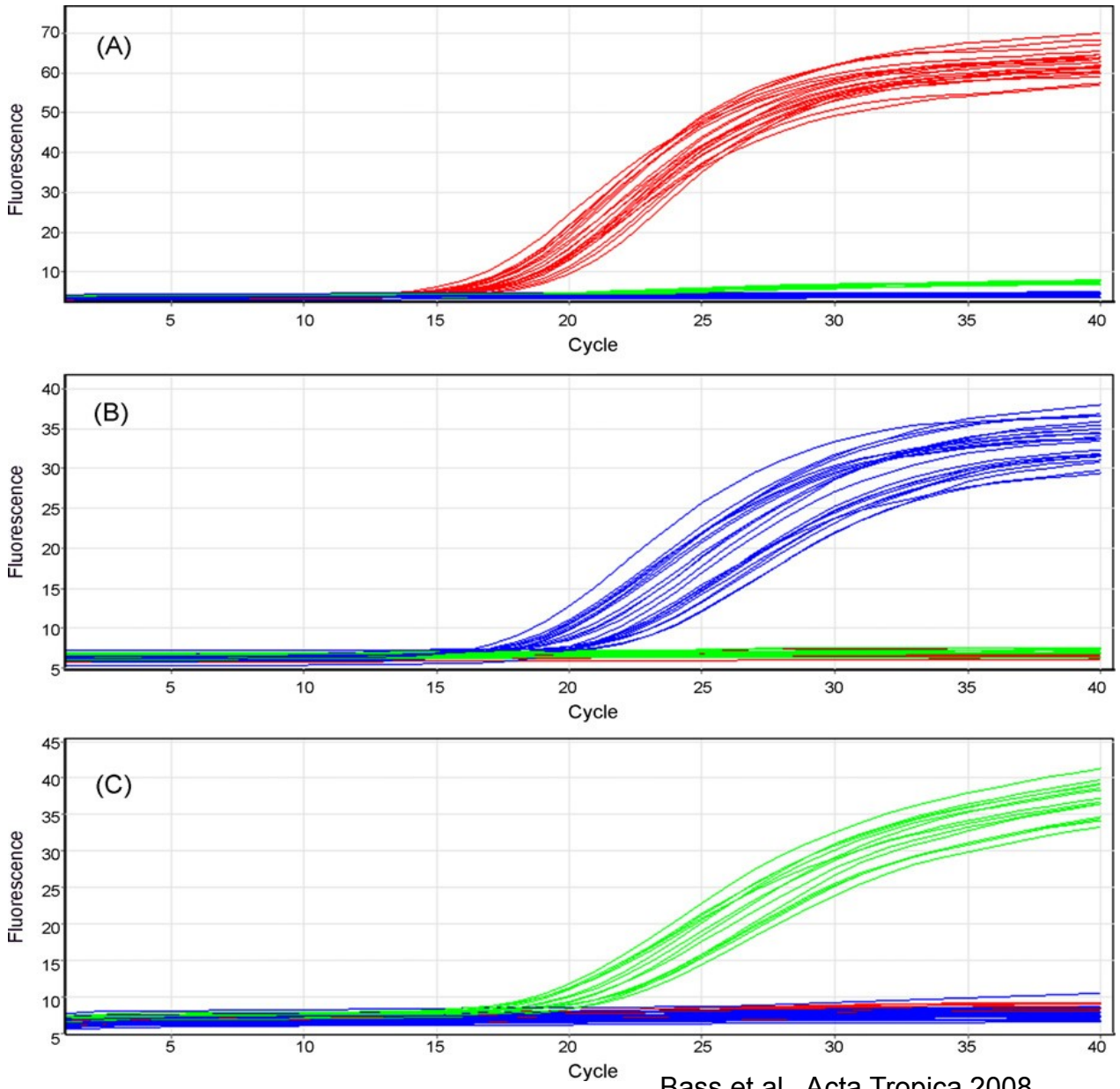
Ct(kontrola) – Ct(vzorek)

RELATIVNÍ KVANTIFIKACE

Příklad výpočtu

	ubq	AtTERT	ΔCt	ΔΔCt	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
seedl.	16.32	25.94	9.62	0	1
0.p.	13.79	21.68	7.89	-1.73	3.32
1.p.	14.55	22.80	8.25	-1.37	2.58
3.p.	20.53	29.31	8.78	-0.84	1.79
5.p.	17.29	26.77	9.48	-0.14	1.11
old	18.49	27.88	9.39	-0.23	1.17

MULTIPLEX qPCR



VIC yellow (530nm excitation and 555nm emission)

Cy5 green (470nm excitation and 510 emission)

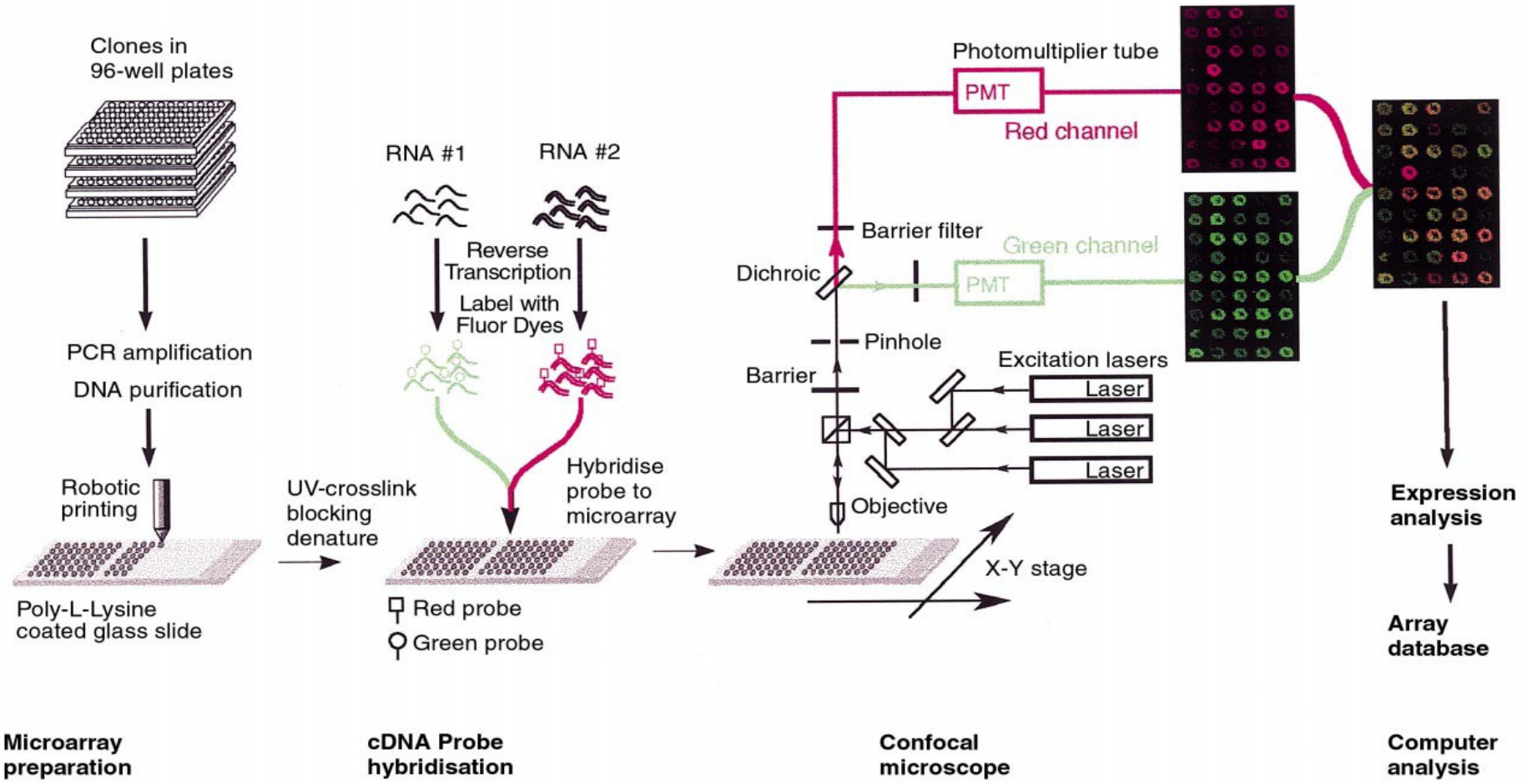
FAM red (625nm excitation and 660 nm emission)

Bass et al., Acta Tropica 2008

cDNA MICROARRAYS

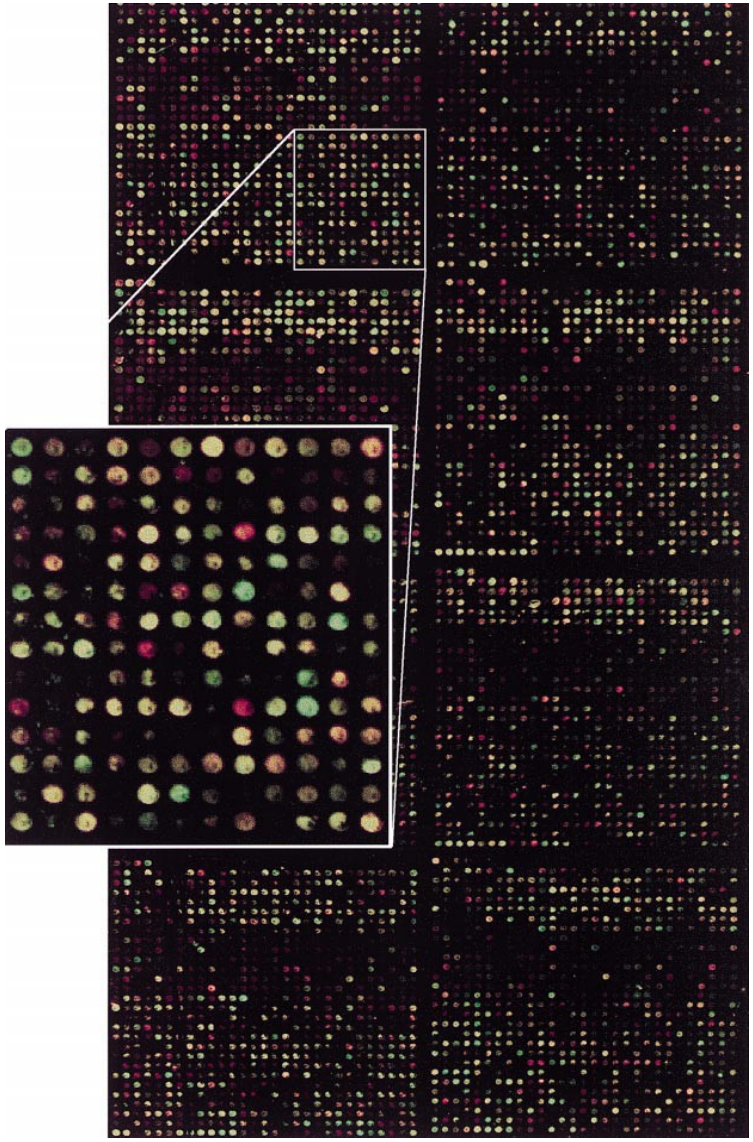
http://www.youtube.com/watch?v=VNsThMNjKhM

cDNA MICROARRAYS



Going and Gusterson, Eur. J. Cancer 1999

cDNA MICROARRAYS



Going and Gusterson, Eur. J. Cancer 1999