

# Základy molekulární biologie

## Cvičení 4

Polymerázová řetězová reakce  
Transformace

# POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE

## (POLYMERASE CHAIN REACTION) PCR

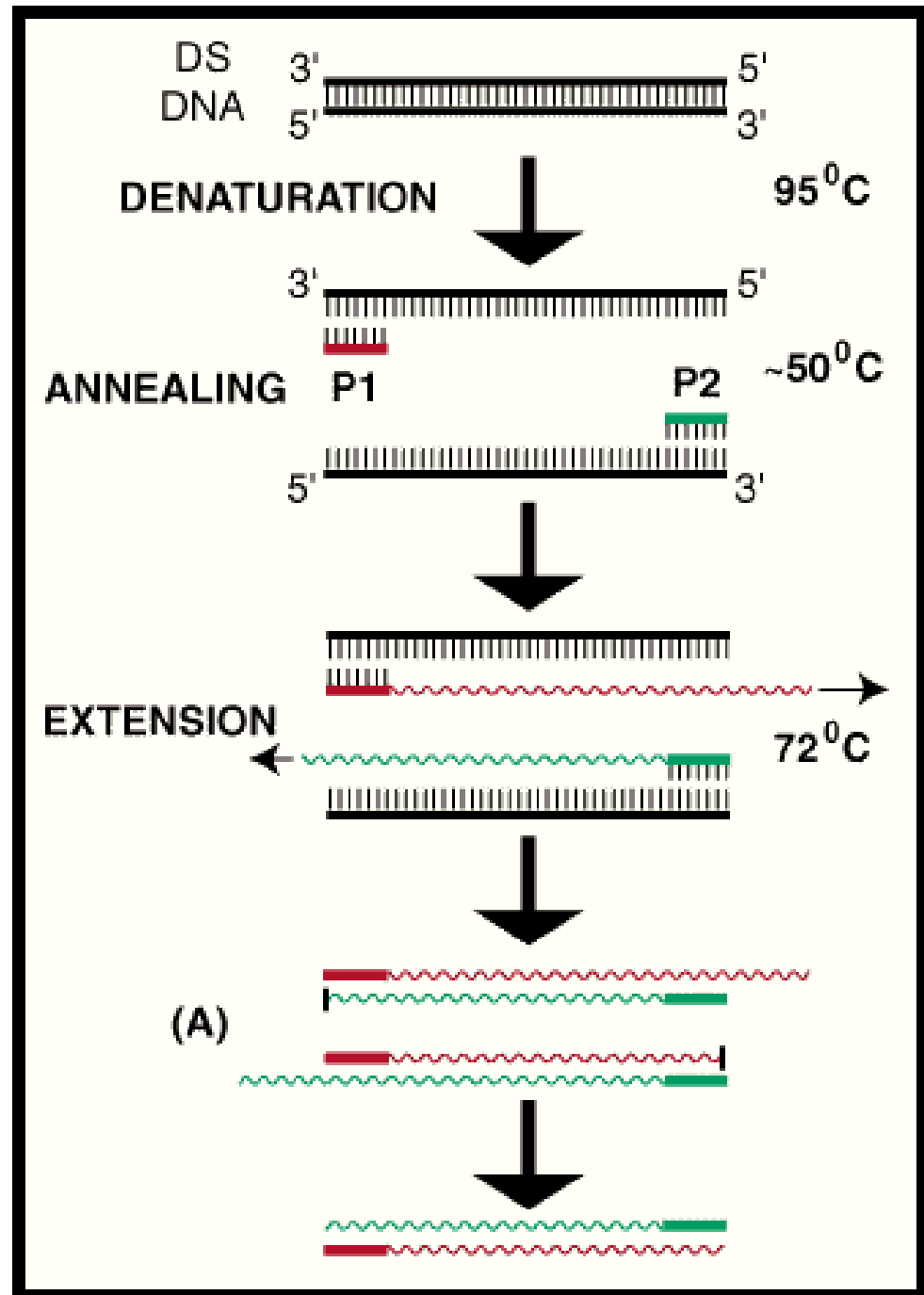
- PCR umožňuje získat specifickou DNA sekvenci ve velkém množství
- 1983 Kary Mullis (1993 objev PCR oceněn Nobelovou cenou za chemii)
- Metoda pro mnohonásobné zmnožení (amplifikaci) specifického úseku DNA *in vitro* založená na principu **replikace DNA** (enzymatické syntézy)
  
- Replikace DNA *in vivo* vyžaduje mnoho enzymů
- Replikace DNA *in vitro* vyžaduje pouze jeden enzym

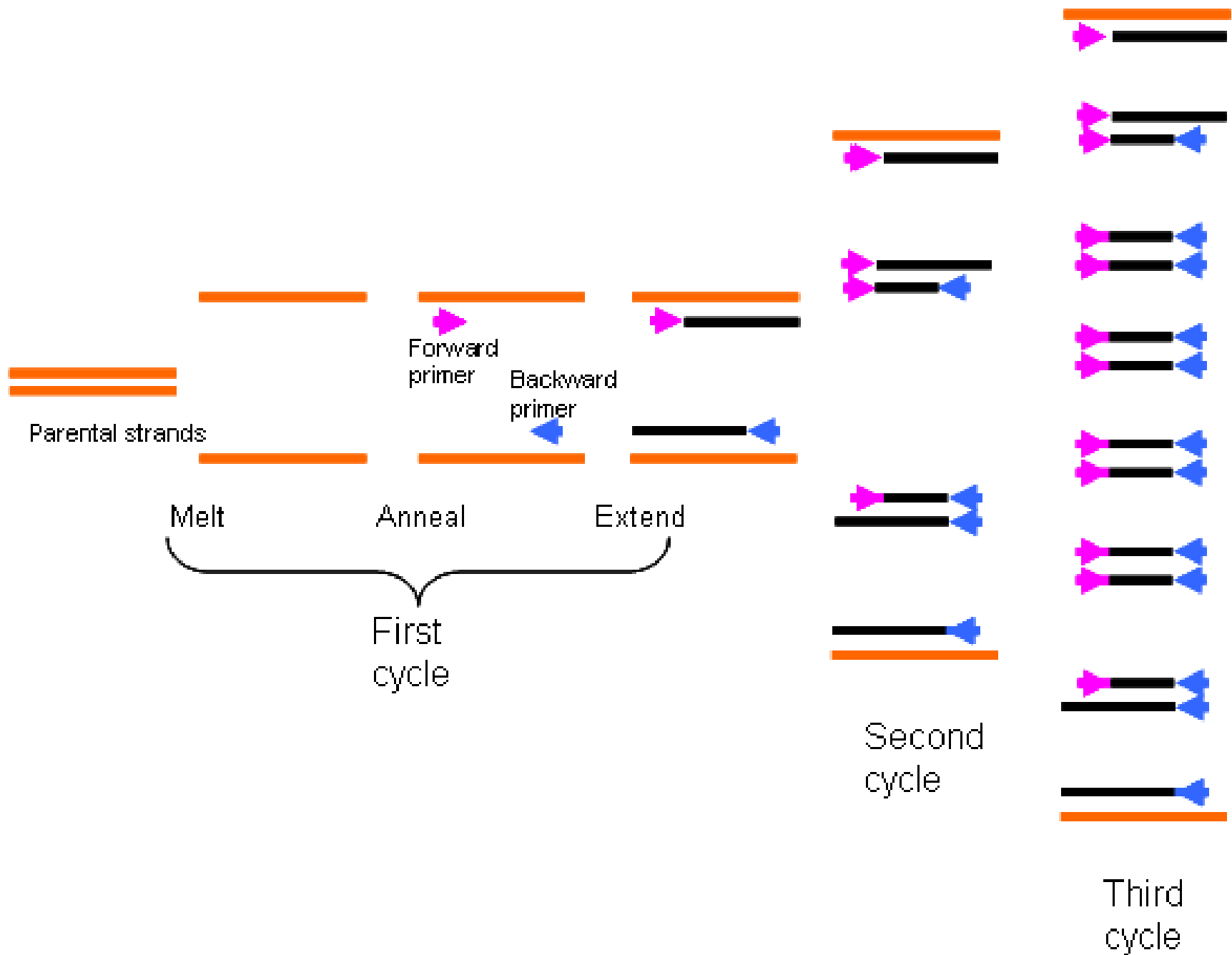


# PCR

cyklus:

1. Denaturace
2. Nasednutí primerů
3. Syntéza DNA





# PCR – Enzymatická syntéza

- Jako **templát** slouží ssDNA, podle níž je syntetizován komplementární řetězec (PCR produkt - amplikon). Jako templáty pro syntézu mohou sloužit oba řetězce dsDNA, po předchozí denaturaci.
- K zahájení reakce je zapotřebí **primer**, který se připojuje na komplementární úseky DNA (templát)
- Primery - vymezí úsek DNA, který bude amplifikován
  - poskytnou volné 3'-OH-konce k zahájení polymerace
- K enzymatické **syntéze PCR** produktu dochází po připojení dvou primerů vzájemně se na protilehlé řetězce DNA tak, že jejich 3'-OH-konce směřují proti sobě.
- Amplifikace DNA probíhá exponenciálně
- PCR probíhá v zařízení zvaném **termocykler**, které je zkonstruováno tak, aby dokázalo během několika sekund zvýšit nebo snížit teplotu o několik desítek stupňů Celsia

# PCR – Složení reakční směsi

## 1. Templátová nukleová kyselina (DNA).

Množství DNA jako výchozího materiálu je velmi nízké: obvykle postačuje méně než **1 mg genomové DNA**,

Kvalita templátu ovlivňuje výsledek PCR.

**znečištěný templát může obsahovat inhibitory PCR**

Zdroj: mikroorganismy, buňky z tkáňových kultur, tělní tekutiny, bioptické vzorky, stěry, vlasy, atd...

## 2. Primery. Syntetické oligonukleotidy o velikost 18 – 25 nt.

## 3. dNTP ve formě Na<sup>+</sup> nebo Li<sup>+</sup> solí

## 4. Mg<sup>2+</sup> ionty tvoří rozpustný komplex s dNTP a vytvářejí substrát, který rozpoznává DNA polymeráza.

## 5. Termostabilní DNA polymeráza, která odolává teplotám až 98 °C.

*Taq* *Thermus aquaticus* (5`-exonukleáza)

*Tth* *Thermus thermophilus* (5`-exonukleáza) delší úseky

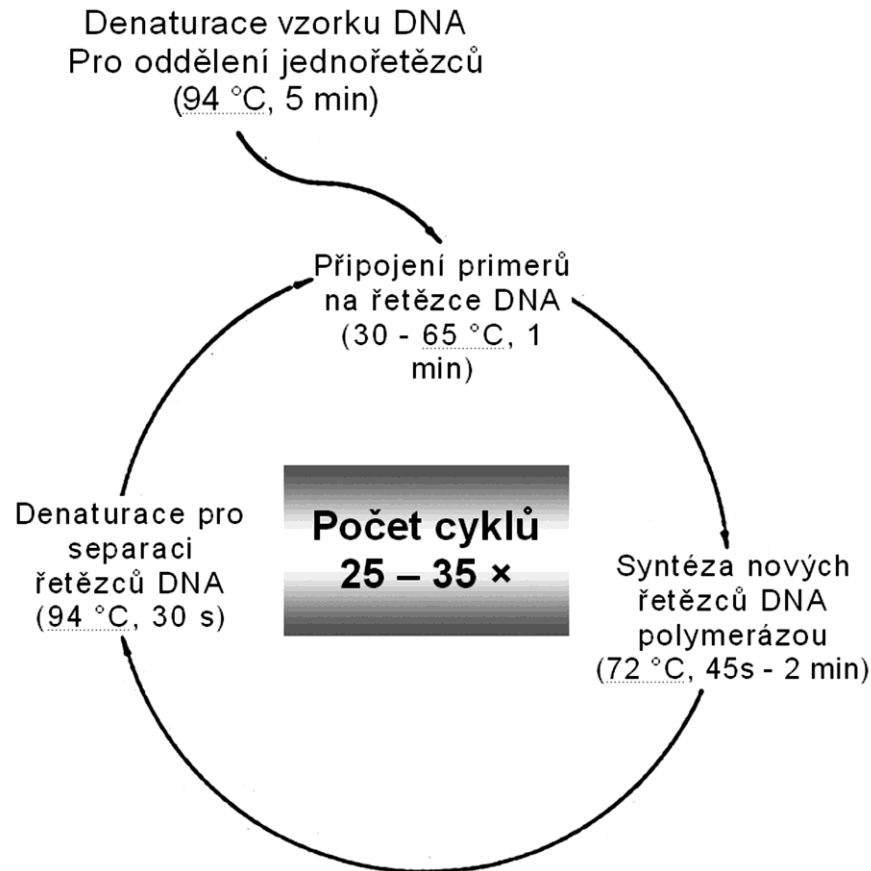
*Pwo* *Pyrococcus woesei* (3`-exonukleáza)

# PCR - Podmínky standardní PCR reakce

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 a možným falešným výsledkům.
2. Denaturační krok (oddělení řetězců): 94 – 95 °C / 20 – 45 s. Nedostatečně denaturovaná DNA neumožňuje přístup primerům, naopak příliš dlouhá denaturace snižuje aktivitu DNA polymerázy (~ 2 hod / 98 °C).
3. Připojení primerů (55 - 65 °C / 30 – 90 s) teplota určuje specifičnost a závisí na  $T_m$  primeru a templátu. Ta se optimalizuje v teplotním gradientu.
4. Prodlužování primeru (syntéza PCR produktu) 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.

PCR se provádí se v termocyklerech, v 25 - 35 cyklech.

# Proces amplifikace



- Pokud by na začátku byla ve vzorku pouze jediná molekula DNA, po 32 cyklech teoreticky dostaneme až 1 miliardu nasyntetizovaných molekul DNA



# Optimalizace složek PCR

**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  $\mu\text{M}$** .
- Nižší koncentrace vede k předčasnému vyčerpání primerů a snížení výtěžku.

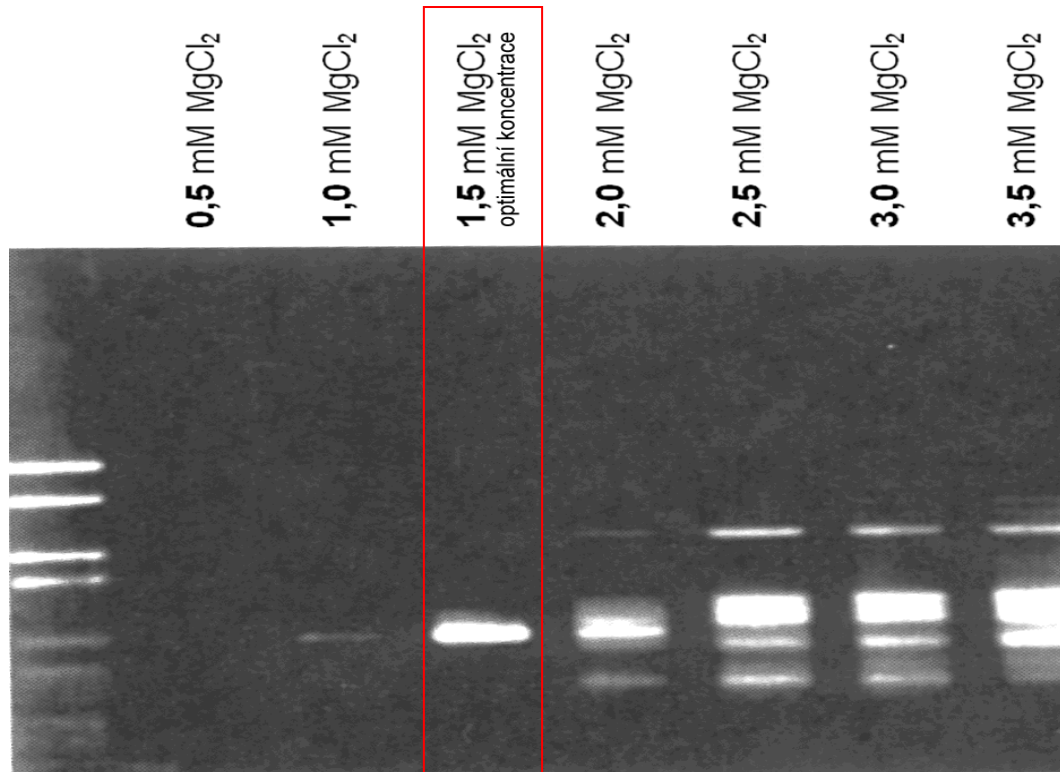
**dNTP** - výsledná koncentrace se může pohybovat v rozmezí 50 – 500  $\mu\text{M}$  (pro každý nukleotid)

- Nejběžnější koncentrace dNTP je 200  $\mu\text{M}$ . Při zvýšení koncentrace dNTP je třeba zvýšit koncentraci  $\text{Mg}^{2+}$  iontů.

# Optimalizace koncentrace $\text{MgCl}_2$ v PCR reakci

Volné  $\text{Mg}^{2+}$  ionty ovlivňují aktivitu enzymu a zvyšují hodnotu  $T_m$  u dsDNA.

- Pro dosažení nejlepšího výsledku vždy stanovujeme koncentraci  $\text{Mg}^{2+}$  experimentálně.
- Optimální koncentrace může kolísat od **1 mM** do **5 mM**.
- Nejčastěji používaná koncentrace je **1,5 mM** (pro **200 mM dNTP**).



# Optimalizace podmínek PCR reakce

## DNA polymeráza

- Obvyklá koncentrace je **0,5 – 2,5 jednotek / 50 ml**.

## pH

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

**Příklad složení pufru pro PCR:**

- 10 mM Tris; pH 8.3**
- 50 mM KCl**
- 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>**

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

- **albumin z bovinního séra (BSA)** (100 ng/50 µl)
- **dimetylsulfoxid (DMSO)** (2- 10 % v/v) – redukce nespecifické vazby primeru
- **detergenty** (Triton X-100, Tween 20)

**Minerální olej** – zabraňuje vypařování během reakce

# Optimalizace teploty

Teplota pro připojení primeru (**annealing** temperature) - zkr.  $T_a$

Teplota používaná pro teplotní hybridizaci molekul primeru a matricové DNA in vitro.

Orientačně lze vypočítat  $T_a$  podle vztahu:

$$T_a = 2(AT) + 4(GC) - 5 \text{ °C} = T_m - 5 \text{ °C}$$

(AT je počet AT-párů a GC je počet GC-párů v sekvenci)

$$T_a = 0.3 \times (T_m \text{ of primer}) + 0.7 \times (T_m \text{ of product}) - 25$$

# Návrh primerů

- Netvoří sekundární struktury
- Nejsou komplementární navzájem
- Nemají více vazebných míst na DNA

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>

Enter accession, gi, or FASTA sequence (A refseq record is preferred) [?](#) [Clear](#)

Range

Forward primer  From  To  [?](#) [Clear](#)

Reverse primer

Or, upload FASTA file  Soubor nevybrán.

PCR product size

# of primers to return

Primer melting temperatures ( $T_m$ )

Min	Opt	Max	Max $T_m$ difference
<input type="text" value="57.0"/>	<input type="text" value="60.0"/>	<input type="text" value="63.0"/>	<input type="text" value="3"/> <a href="#">?</a>

Specificity check  Enable search for primer pairs specific to the intended PCR template [?](#)

Search mode  [?](#)

Database  [?](#)

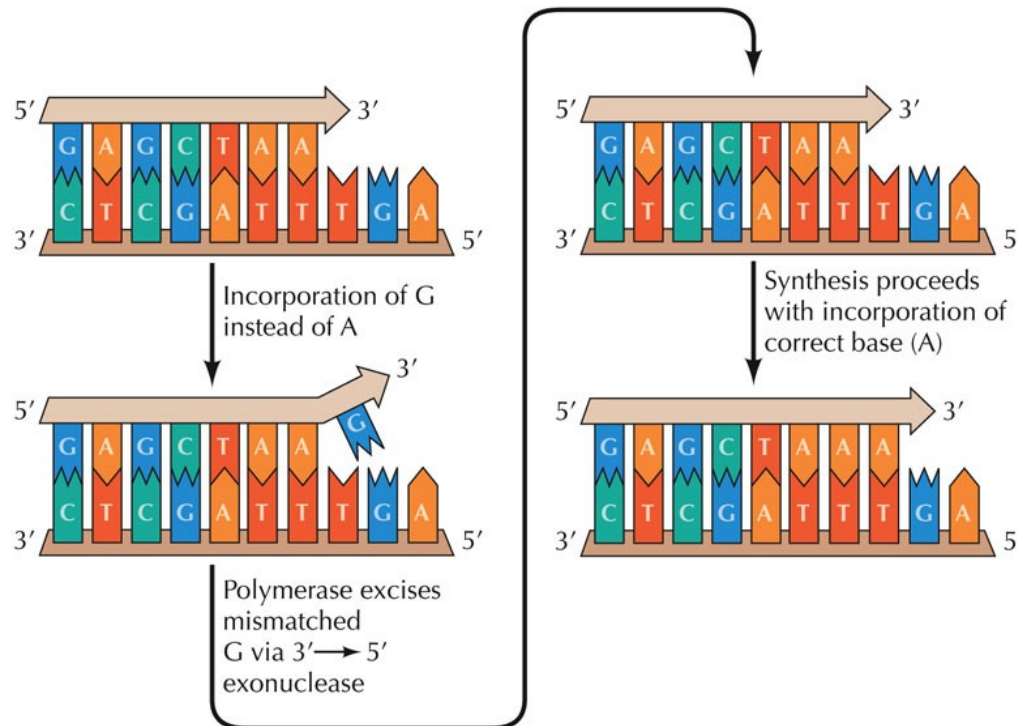
Organism

Enter an organism name, taxonomy id or select from the suggestion list as you type. [?](#)

# Chybovost PCR

Taq polymeráza – chyba s frekvencí  $2 \times 10^{-4}$

- problém při klonování DNA → mutace
- buňka má opravné mechanismy
- In vitro - použití dvojice DNA polymeráz, z nichž jedna má schopnost proofreading

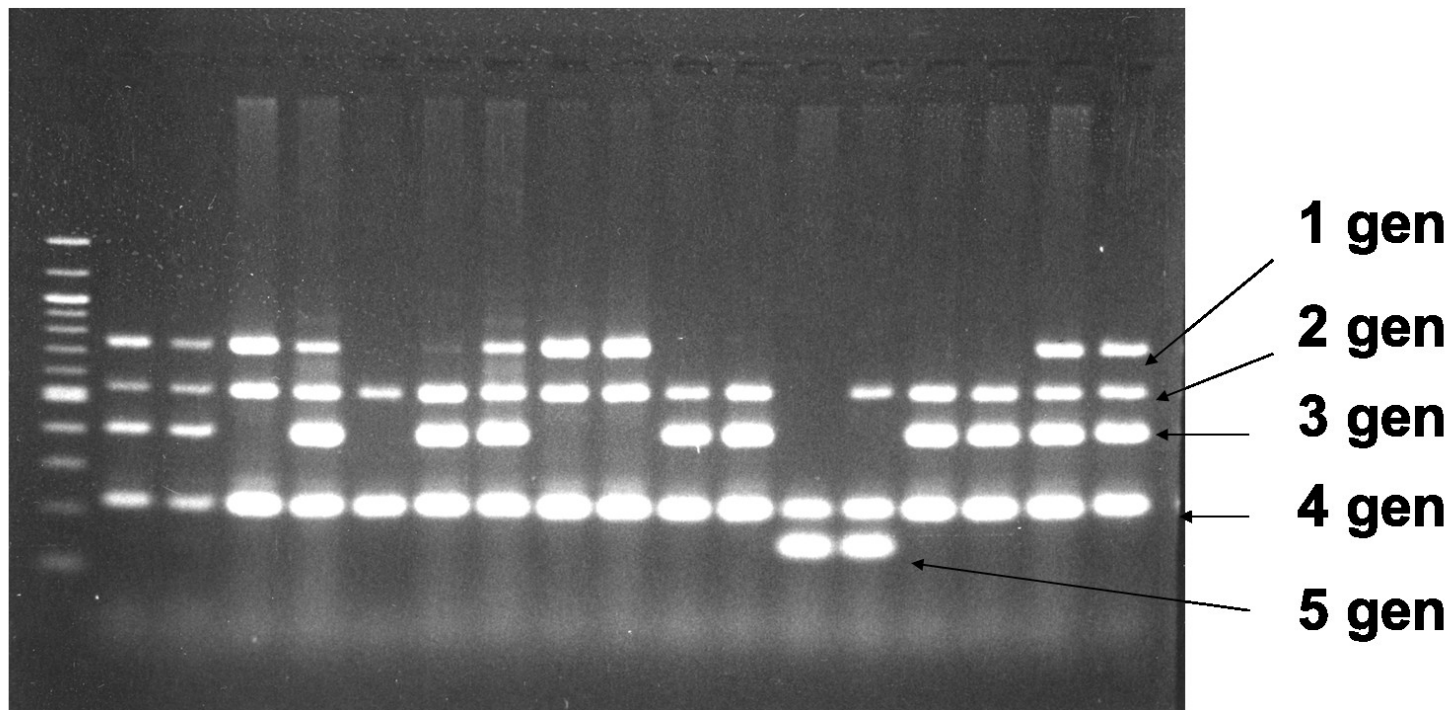


# Multiplex PCR (mnohonásobná PCR)

Při použití více párů specifických primerů, dochází k amplifikaci více cílových sekvencí v jedné reakci.

- stanovení několika mikroorganismů v jediné reakci

S 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18



# Využití metod PCR

- **Základní výzkum**

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

- **Aplikovaný genetický výzkum**

prenatální diagnostika (dědičných chorob), detekce mutací v genech, studium polymorfizmu genů, populační genetika

- **Využití v klinických disciplínách**

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

- **Využití v praxi**

Archeologie, soudnictví, kriminalistika, potravinářství