

POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE

PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION) 1983

Význam: **PCR** umožňuje získat požadovanou specifickou DNA sekvenci bez klonování.

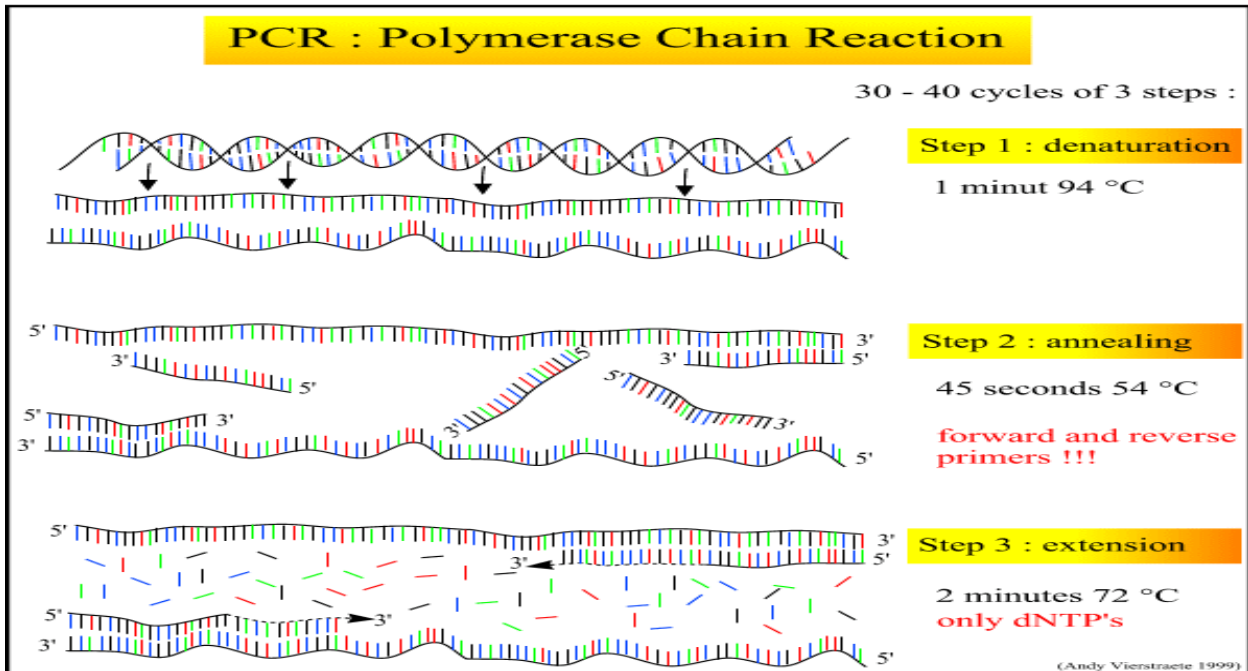
➤ Princip standardní PCR: Po připojení dvou primerů ke komplementárním sekvencím ssDNA řetězce probíhá syntéza specifického úseku DNA *in vitro*.

➤ **PCR** využívá základních rysů replikace DNA:

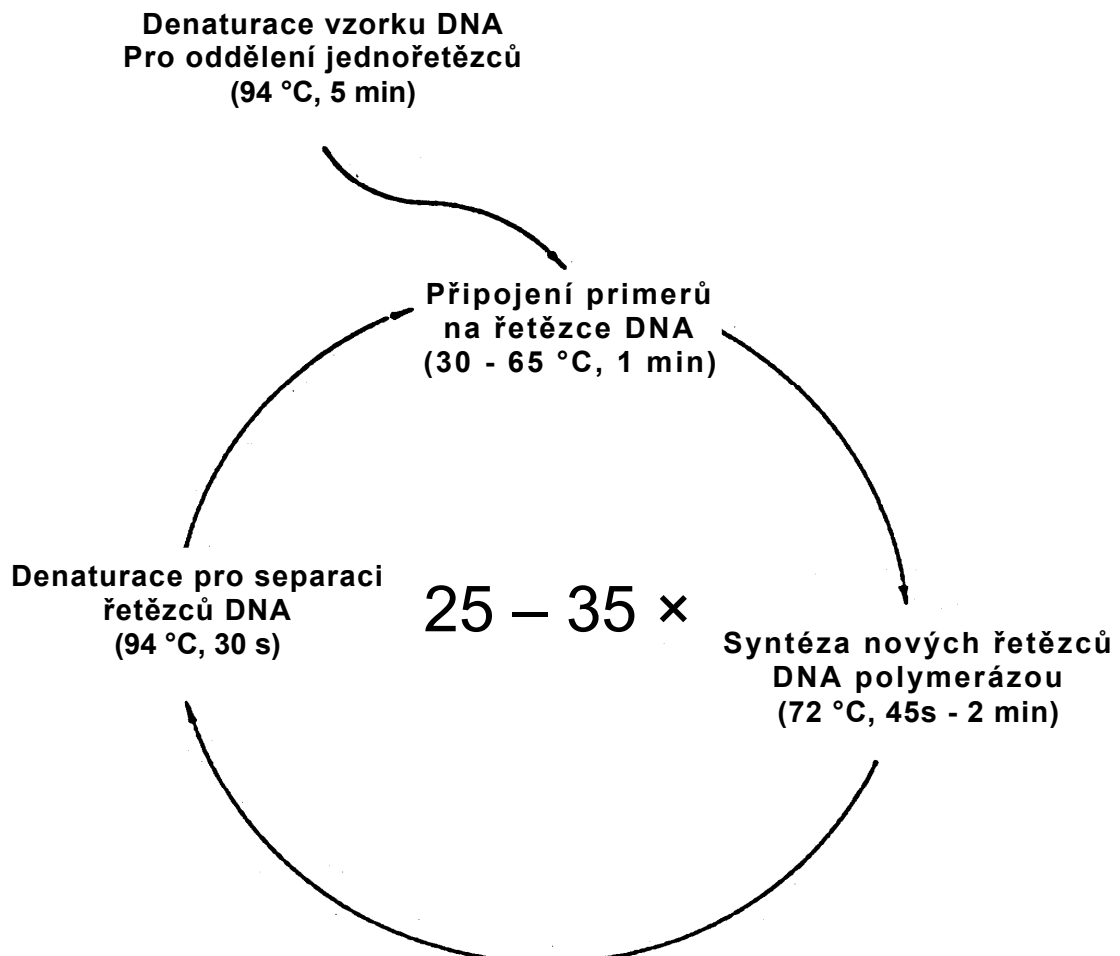
- Jako templát slouží ssDNA (původně dsDNA po předchozí denaturaci).
- Komplementárně navázaný primer vymezuje úsek DNA, který bude amplifikován.
- Enzymatická syntéza za katalytického účinku DNA polymerázy

➤ Teoreticky lze získat 2^n řetězců (kopií) amplifikovaného úseku DNA.

Polymerace



REAKČNÍ PODMÍNKY PCR



REAKČNÍ SLOŽKY v PCR směsi

- **Templátová nukleová kyselina (DNA nebo RNA).** Množství - méně než 1 μg , závisí obvykle na její velikosti. 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.** Syntetické oligonukleotidy (10 – 30 nt).
- **dNTP** (dATP, dGTP, ...) ve formě Na^+ (Li^+) solí
- **Mg^{2+} ionty** tvoří rozpustný komplex s dNTP, který rozpoznává DNA polymeráza. Mg^{2+} ionty ovlivňují aktivitu enzymu.
- **Termostabilní DNA polymeráza**, rezistentní k 98 °C.
 - *Taq* *Thermus aquaticus*
 - *Tth* *Thermus thermophilus*
 - *Pwo* *Pyrococcus woesei*

REAKČNÍ PODMÍNKY V TERMOCYKLERU standardní PCR

- 1. Počáteční denaturace DNA: 95 °C / 2 – 5 min.**
rychlá renaturace DNA,- nespecifické vazby primerů
falešné výsledky.
- 2. Denaturační krok: 94 – 95 °C / 20 – 45 s** (separace
řetězců)
nedostatečně denaturovaná DNA brání přístupu primerům,
dlouhá doba denaturace snižuje aktivitu DNA polymerázy
(stabilní cca 2 hod / 98 °C).
- 3. Připojení primerů (55 - 65 °C / 30 – 90 s)** teplota určuje
specifičnost reakce. Připojovací teplota T_a se optimalizuje
v teplotním gradientu. ($T_a \sim T_m$)

Orientačně lze vypočítat T_a podle vztahu:

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

- 4. Prodlužování primeru** probíhá při 72 °C /45 – 90 s. *Taq*
DNA polymeráza syntetizuje cca 60 bází/s. Nově
syntetizované řetězce slouží jako templáty pro další
cyklus. 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.

KONCENTRACE JEDNOTLIVÝCH SLOŽEK ve standardní PCR

- **Množství DNA.** doporučení:
 - lidská genomová DNA: 100 - 500 ng
 - bakteriální DNA: 1 – 10 ng
 - plazmidová DNA: 0,1 – 1 ng
- **Primery.** Optimální koncentrace je **0,1 a 0,6 μM** . U některých systémů může být vyšší koncentrace (až **1 μM**). Nižší koncentrace vede k předčasnému vyčerpání primerů a snížení výtěžku.
- **dNTP.** Výsledná koncentrace **50 – 500 μM** (pro každý nukleotid) Medián je **200 μM** . Při zvýšení koncentrace dNTP je třeba zvýšit koncentraci Mg^{2+} .
- **MgCl_2 .** Pro dosažení nejlepšího výsledku vždy stanovujeme koncentraci Mg^{2+} **experimentálně**. Optim. konc. Se může nacházet od **1 mM do 5 mM**. Nejčasteji používaná koncentrace je **1,5 mM** (pro 200 μM dNTP).

- **DNA polymeráza** je **0,5– 2,5 jednotek / 50 μ l**.
- **pH** je dané reakčním **pufrem**, obvykle je **pH 8,3 – 9,0**.
- **Přídavné látky** ovlivňují účinnost a specifčnost PCR
- 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**
- **Minerální olej** – zabraňuje vypařování během reakce

Optimalizace:

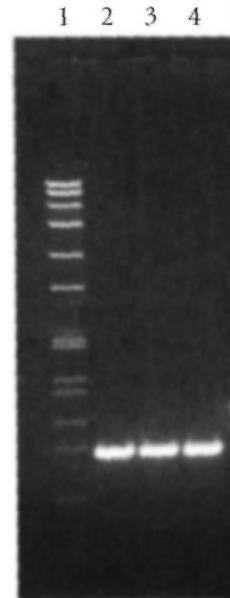
- | |
|---|
| <ol style="list-style-type: none"> 1. gradient T_a 2. gradient koncentrací $MgCl_2$ 3. počet cyklů 4. při multiplex PCR <ul style="list-style-type: none"> ● nejdříve každý pár zvlášť, poté dohromady ● upravit množství jednotlivých primerů |
|---|

DETEKCE AMPLIFIKOVANÉHO PRODUKTU PCR

1. Stanovení fyzikální velikosti produktu gelovou elektroforézou (agaróza, polyakrylamid). Detekce obarvením etidiumbromidem a pozorování pod UV světlem.

Příklad standardní gelové elektroforézy s produkty PCR (amplikony) v agarózovém gelu.

1 = hmotnostní standard
2 - 4 = produkty PCR



2. Štěpení produktu restrikcími enzymy a posouzení spektra vznikajících restrikcími 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.
4. Detekce produktu hybridizací se značenou sondou (po elektroforéze nebo *in situ*)

Modifikace PCR používané v diagnostice Multiplex PCR (mnohonásobná PCR)

Při multiplex PCR je použito více párů specifických primerů.

Dochází k amplifikaci více cílových sekvencí při jedné reakci.

Použití a výhody:

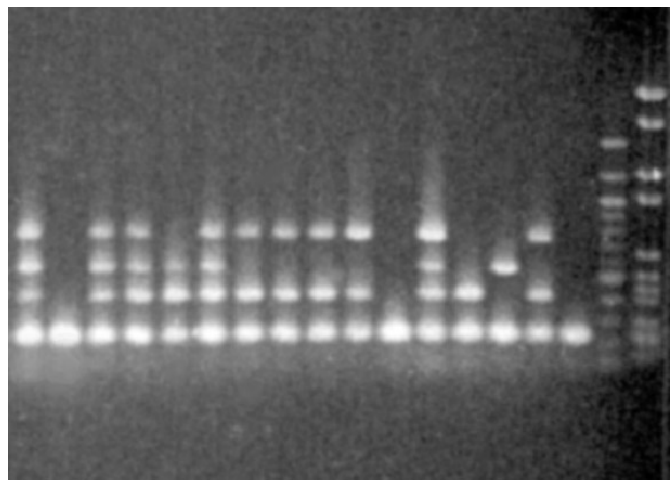
- Vyhledávání změn na dlouhých úsecích DNA
- Testování vzájemně nesouvisejících oblastí na DNA
- Amplifikace vnitřních kontrol současně se vzorky
- Nižší cenové náklady než při samostatných amplifikacích

Používané aplikace:

- Detekce specifických toxinů produkovaných některými organizmy (*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 →



VYUŽITÍ METOD 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

ŘEŠENÍ PROBLÉMŮ PŘI STANDARDNÍ PCR

Problém	Možná příčina	Doporučení
Nevzniká produkt	Nevyvážená reakce	<ul style="list-style-type: none"> Kontrola koncentrace jednotlivých složek
	Teplotní podmínky	<ul style="list-style-type: none"> Kontrola nastavení cyklů
	Nízká koncentrace templátu	<ul style="list-style-type: none"> Zvýšit koncentraci templátové DNA
	Koncentrace primeru nebo jeho sekvence	<ul style="list-style-type: none"> Optimalizovat koncentraci primeru Navrhnout primer s novou sekvencí
	Ruzné faktory	<ul style="list-style-type: none"> Testovat reakci s pozitivní kontrolou a funkčními primery Začít s novými roztoky, H₂O a enzymem
	Nízká kvalita templátu (degradovaný, kontaminovaný, obsahující inhibitory)	<ul style="list-style-type: none"> Použít primery, které amplifikují kratší úseky Přidat pomocné látky (DMSO) Optimalizovat koncentraci Mg²⁺ Připravit nový templát Zamezit častému zmrazování a rozmrazování templátu
	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 Mg²⁺ Optimalizovat koncentraci primerů Snížit počet cyklů Smížit koncentraci templátu
Vznikají četné nesespecifické produkty	Nesespecifická vazba primeru	<ul style="list-style-type: none"> Použít vyšší teplotu T_a Optimalizovat koncentraci primerů Použít „hot start“ Narhnout nové primery

Zásady při přípravě PCR směsi a detekci PCR produktů

1. Při přípravě PCR směsi nejlépe v PCR-boxu je nutno používat ochranné rukavice
2. Směs připravit na ledu (obzvláště u složitějších reakcí a u reakcí o velkém počtu vzorků, které trvá déle namíchat). Polymeráza musí být vždy na ledu, ostatní reagenty se nechají roztát a případně po té se dají na led.
3. Pipety a plasty k tomu určené jsou vyčleněny pouze pro PCR.
4. První se pipetuje do zkumavky voda, jako poslední polymeráza
5. Používat deionizovanou vodu, ta je vysterilizovaná v čisté sklenici a následně rozpipetovaná do ependorfeček a uložena v mrazničce. Vodu po rozmražení používat jednorázově – po použití zbytek vyhodit.
6. Do reagentů a obzvláště primerů jít jen vhodnou sterilní špičkou, což zaručí, že se pipeta nedotkne stěny zkumavky.
7. Jako kontrolu čistoty reagentů vždy přidávat do jednoho vzorku vodu místo DNA – negativní kontrola.
8. Malé objemy pipetovat pod hladinu, vizuálně kontrolovat správný objem v pipetě.
9. Místnost, určená pro PCR reakce, je pravidelně svícena UV zářením a pracovní plochy se omývají dezinfekcí. Zde **nikdy** nepracovat s PCR produkty.
10. Detekce amplifikovaných sekvencí se provádí v jiné místnosti, vybavené pro elektroforézu.

Protokol pro standardní PCR

Název:

Program č.

Režim PCR: (T_{den} 94 °C /60 s; T_a = 57°C/60 s; T_{ext} 72°C / 60 sec;

Poř. Slož.	Složky	Zásobní koncentrace	Výsledná koncentrace v 25 μ l	Množ. μ l na jeden vzorek (25 μ l objem)	Množství μ l na 8. vzorků
1.	H ₂ O (sterilní deion.)				
2.	Pufř pro PCR	10 \times			
3.	MgCl ₂	50 mM (25 mM)			
4.	BSA	10 mg/ml			
5.	Primer F	100 pmol/ μ l			
6.	Primer R	100 pmol/ μ l			
7.	dNTP	10 \times (2mM každý)			
8.	Taq polymeráza	5 U/ μ l			
9.	Matricová DNA	různá μ g/ml			
Velikost PCR produktu: 300 (bp)					
ELFO: Gel 1,5%		ELFO pufř: 1 \times TAE	Režim: 5 V/cm	Velik. standard: 100 bp (BioLabs) 100 – 1500 bp	

M1: H₂O, primery, dNTP

M2: H₂O, pufř, MgCl₂, Taq DNA polymeráza

Templátová DNA se do zkumavky přidává naposledy:

Pro závěrečný protokol bude třeba znát koncentraci izolované DNA plazmidu pUC18.