

PHI
PCR



Cvičení č. 1

Amplifikace genu pro 16S rRNA z lyzátu kultury neznámé bakterie



CO NÁS DNES ČEKÁ...

- 1) Zásady bezpečné práce v mikrobiologické laboratoři
- 2) Teoretický úvod k metodě PCR
- 3) Seznámení se s protokolem
- 4) Samostatná práce v laboratoři dle protokolu
- 5) Příklady a diskuse

POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE (PCR)

Dnes nejrozšířenější a pravděpodobně nejdůležitější metoda molekulární biologie!

PCR umožňuje selektivní **zmnožení (amplifikaci) určité oblasti DNA** v podmínkách *in vitro*; a to procesem, který připomíná replikaci DNA *in vivo*

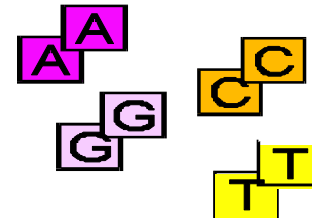


KOMPONENTY PCR

Thermus aquaticus, Thermococcus, Thermophilus, Pyrococcus

TAQ

puf^r MgCl₂



DNA primery



umělá syntéza

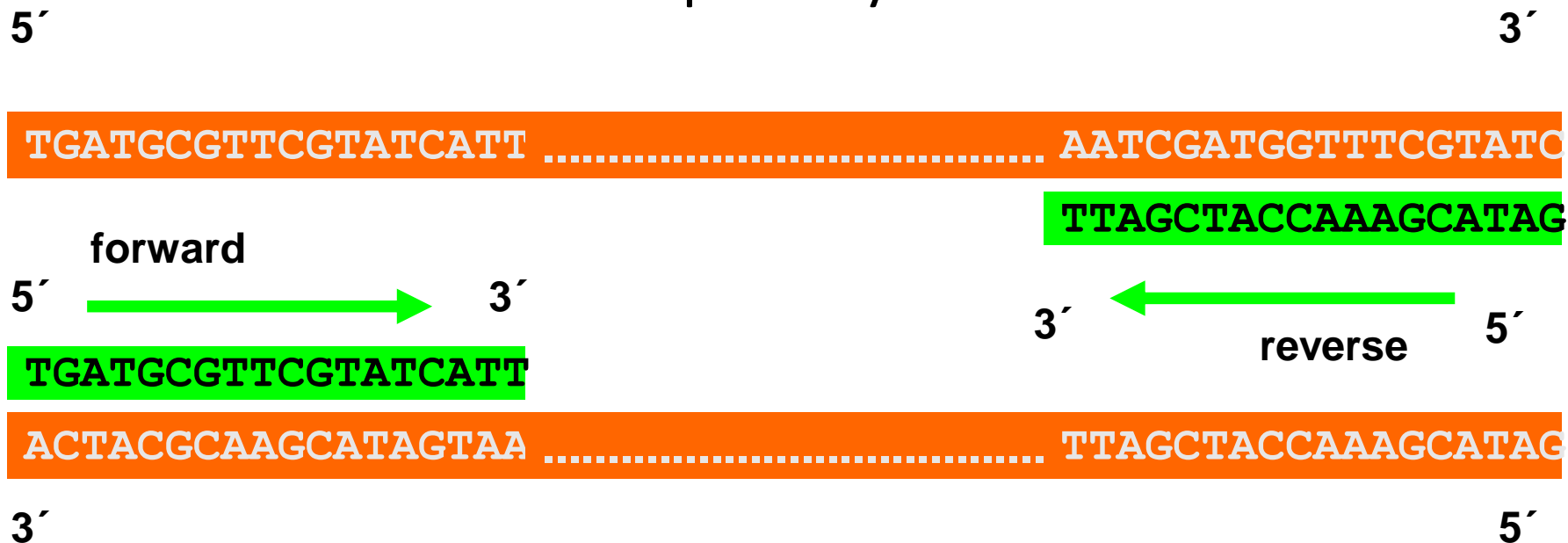


ssDNA

Denaturace 92-96°C

JAK SPRÁVNĚ ZAPSAT PRIMERY

Ačkoli na schématu leží primery takto:



Zapsat je musíte takto:

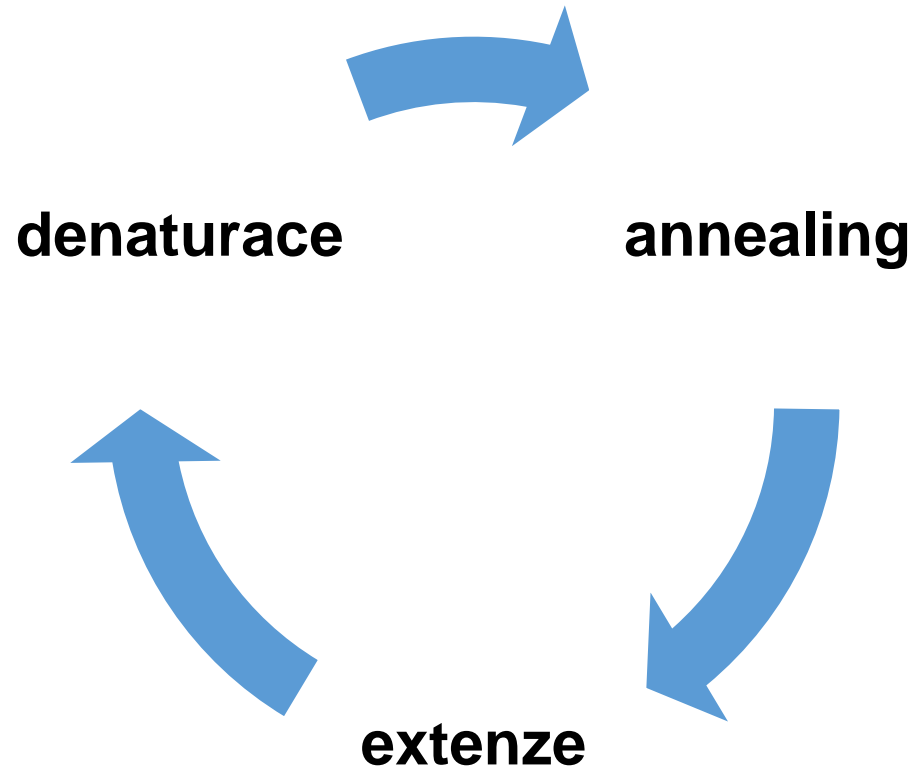
forward

5' - TGATGCGTTCGTATCATT - 3'

reverse

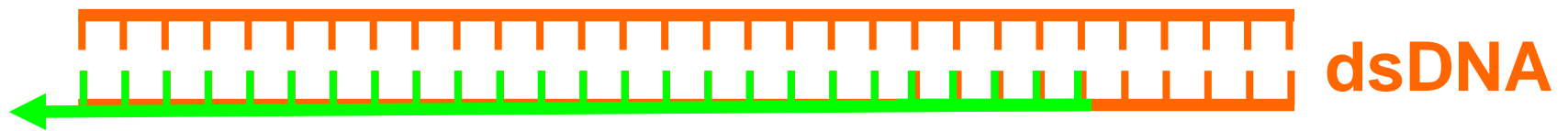
5' - GATACGAACCATCGATT - 3'

PCR PROBÍHÁ V CYKLECH



1. PCR CYKLUS

1. denaturace (92-96°C)



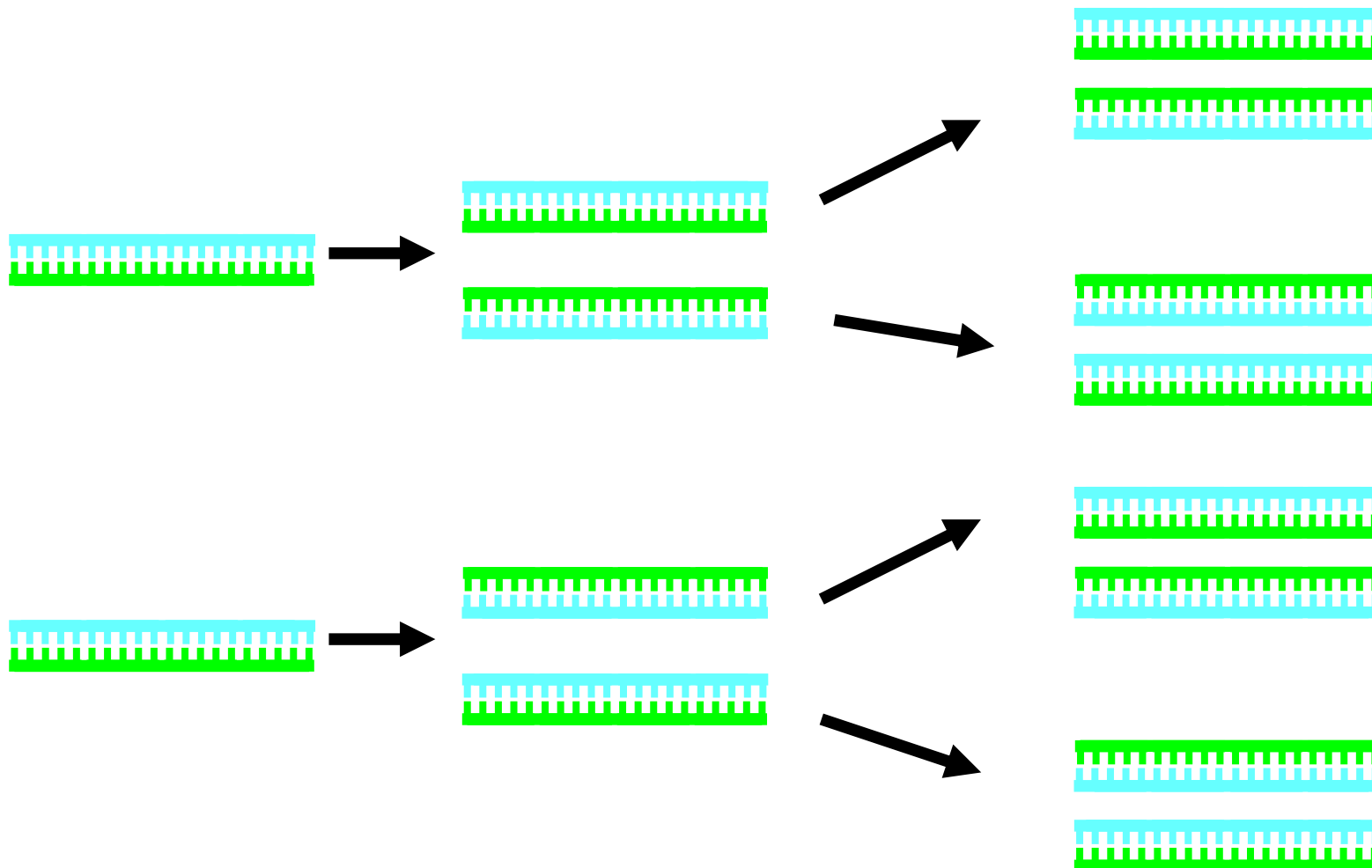
2. annealing (45-72°C)

primární produkty

3. extenze (72°C)



DALŠÍ CYKLY



Z každé molekuly ampliconu vznikají dvě nové
Počet ampliconů vzrůstá geometricky

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

VÝTĚŽEK PCR

Cyklus č.	Primární	Sekundární	Amplikony	Celkem
10	2	18	1 004	1 024
20	2	38	10 485 438	1 024 ²
30	2	58	~ 1.1 x 10 ⁹	1 024 ³
40	2	78	~ 1.1 x 10 ¹²	1 024 ⁴
50	2	98	~ 1.1 x 10 ¹⁵	1 024 ⁵

Výpočet Tm a Ta primerů: Tm calculator

5F: 5' - AGAGTTTGATYMTGGCTCAG - 3'

519R: 5' - GTATTACCGCGGCKGCTG - 3'

F1 5' - ATG CCC TTT TCC CTG CGT AC - 3'

R1 5' - GCC TTC CAC CTT GGT CGC - 3'

PŘÍKLADY ANEB TROCHA POČÍTÁNÍ NIKOHO NEZABIJE



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.

PŘÍKLAD: NÁVRH PRIMERŮ

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