

Polymerázová řetězová reakce (PCR)

- Zavedení PCR v roce 1983 (Kary Mullis)
 - ◆ Publikace
 - ◆ Nobelova cena
- Metoda pro mnohonásobné zmnožení (amplifikaci) specifického úseku DNA in vitro založená na principu replikace.
- K opakující se enzymové syntéze komplementárních řetězců vybraných úseků dvouřetězcové DNA dochází po připojení dvou primerů vázajících se na protilehlé řetězce DNA tak, že jejich 3'-OH-konce směřují proti sobě.
- PCR umožňuje získat požadovanou zcela specifickou sekvenci bez klonování.



- PCR využívá základních rysů replikace (enzymatické syntézy) DNA:
 - ◆ Jako templát slouží ssDNA, podle níž je syntetizován komplementární řetězec.
 - ◆ K zahájení reakce je zapotřebí primer, který se připojuje na komplementární úseky DNA. Tím je zároveň vymezen úsek DNA, který bude amplifikován.
 - ◆ Jako templáty pro syntézu mohou sloužit oba řetězce dsDNA, po předchozí denaturaci.
- Primery se vybírají tak, aby se připojovaly k místům ohraničujícím z obou stran amplifikovaný úsek.
- Teoreticky lze získat 2^n řetězců (kopií).
- Předpoklady pro zavedení PCR
 - ◆ Syntéza oligonukleotidů
 - ◆ Vlastní myšlenka (K. Mullis)
 - ◆ Teplotně stabilní DNA polymeráza
 - ◆ Automatické termocyklery

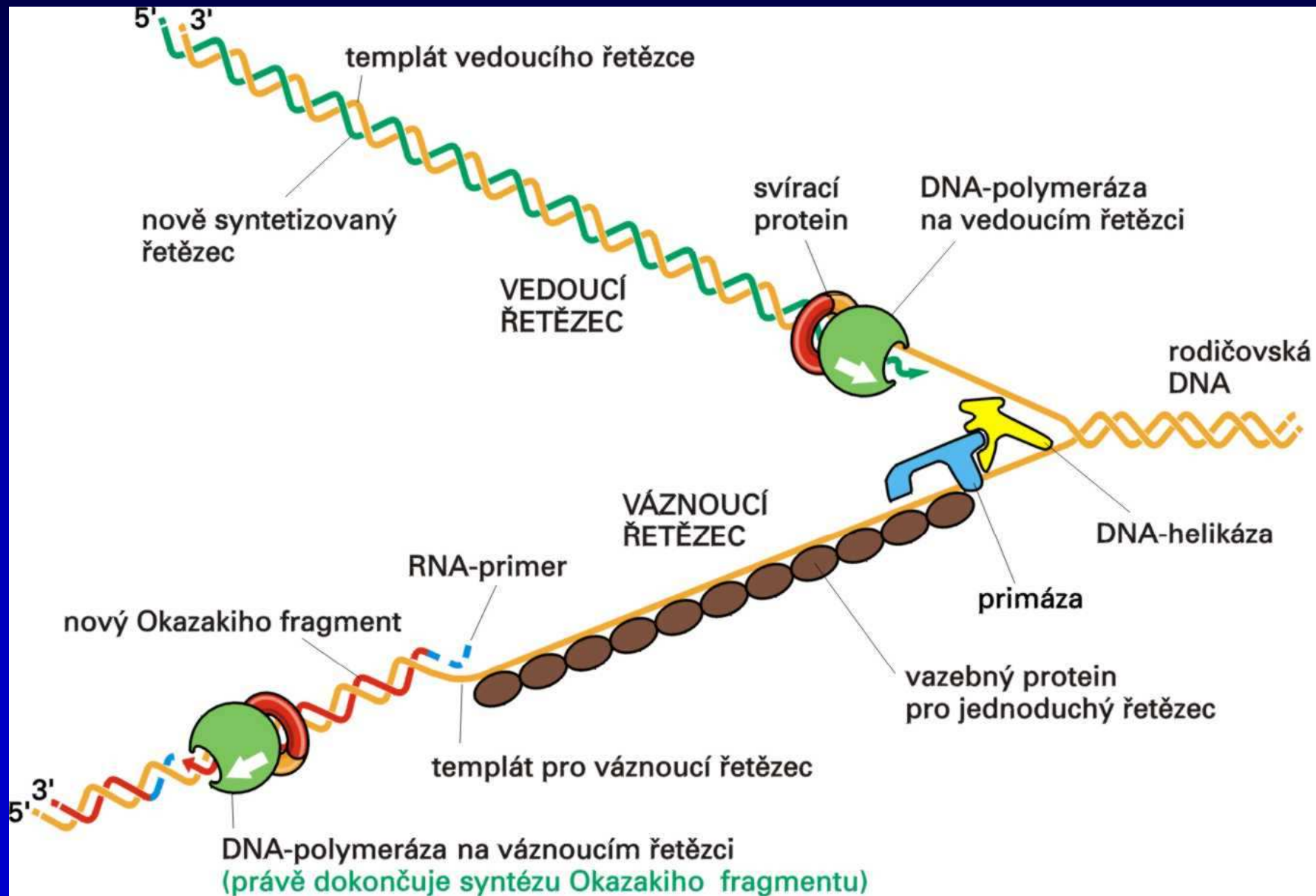


Počet nově syntetizovaných molekul dsDNA při jednotlivých cyklech PCR

$$2^n$$

Cyklus číslo	Počet nových dvouřetězcových molekul
1	1
2	3
3	7
4	15
5	31
6	63
7	127
8	255
9	511
10	1 023
11	2 047
12	4 095
13	8 191
14	16 383
15	32 767
16	65 535
17	131 071
18	262 143
19	524 287
20	1 048 575
21	2 097 151
22	4 194 303
23	8 388 607
24	16 777 215
25	33 554 431
26	67 108 863
27	134 217 727
28	268 435 455
29	536 870 911
30	1 073 741 823

Replikace DNA *in vivo* vyžaduje mnoho enzymů



Replikace DNA *in vitro* vyžaduje pouze jeden enzym

- **Reakční směs obsahuje:**
 - ◆ **Templátovou nukleovou kyselinu (DNA nebo RNA).**
 - ◆ Množství DNA jako výchozího materiálu je velmi nízké: obvykle postačuje méně než 1 µg genomové DNA, teoreticky postačuje jedna molekula.
 - Kvalita templátu ovlivňuje výsledek PCR.
 - Velké množství RNA může vázat ionty Mg²⁺
 - znečištěný templát může obsahovat inhibitory PCR
 - ◆ Zdroj: mikroorganismy, buňky z tkáňových kultur, tělní tekutiny, bioptické vzorky, stěry, vlasy, atd...
- **Primery.** Chemicky syntetické oligonukleotidy o velikost 10 - 30 nukleotidů.
- **dNTP** ve formě Na⁺ nebo Li⁺ solí
- **Mg²⁺ ionty** tvoří rozpustný komplex s dNTP a vytvářejí substrát, který rozpoznává DNA polymeráza.
- **Termostabilní DNA polymerázu**, která odolává teplotám až 98 °C.
 - ◆ Taq *Thermus aquaticus*
 - ◆ Tth *Thermus thermophilus*
 - ◆ Tma *Thermotoga maritima*
 - ◆ Pfu *Pyrococcus furiosus*
 - ◆ Pwo *Pyrococcus woesei*

Syntéza obou řetězců u specifické sekvence

5' TTGAGAAAGGAATAAGCAGAATTCGTTCCAAAAGAATGAGCTGTTGTTTGCAGAAATCGAGTATATGC 3'
AACTCTTTCCTTATTCGTCTTAAGCAAGGTTTTTCTTACTCGACAACAAACGTCTTTAGCTCATATACG 5'

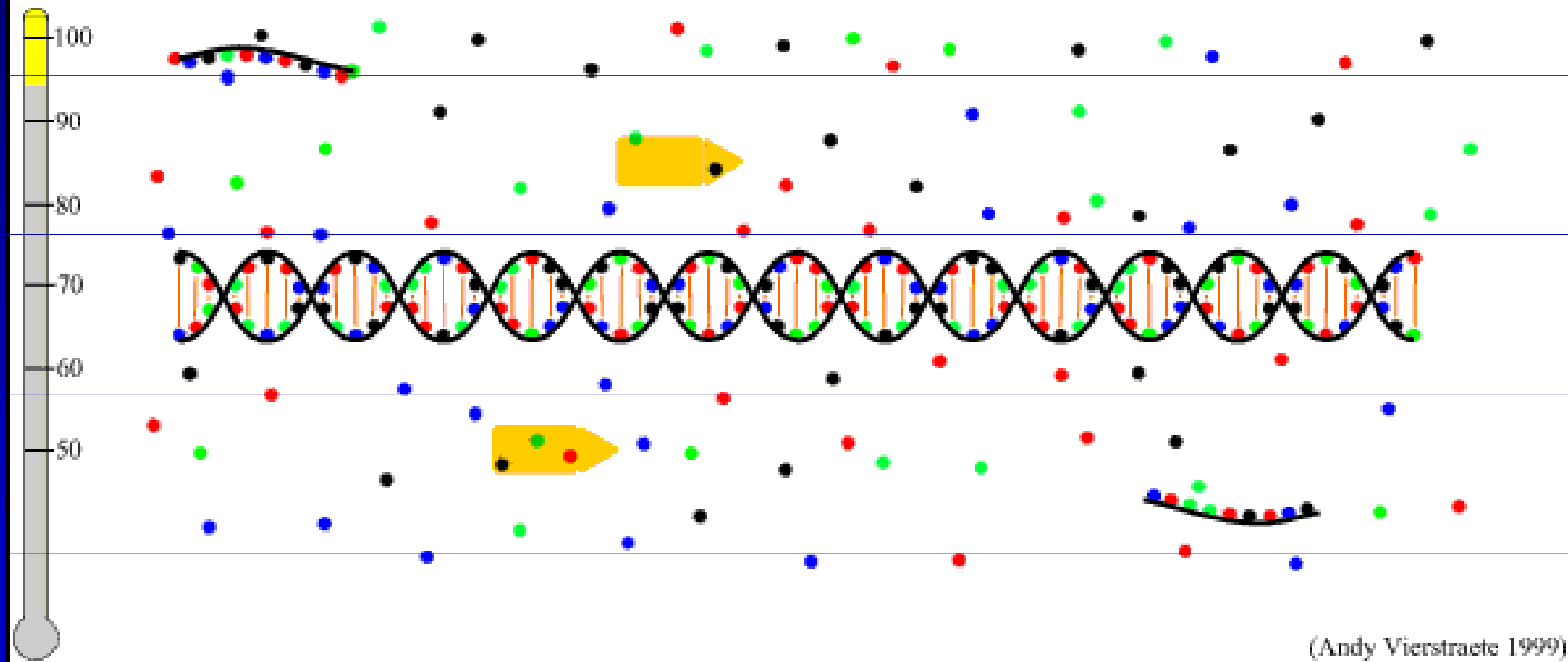
3' Příčný primer 5' dNTPs
5' TTGAGAAAGGAATAAGC - DNA POL →
AACTCTTTCCTTATTCGTCTTAAGCAAGGTTTTTCTTACTCGACAACAAACGTCTTTAGCTCATATACG 5'

3' 5'
5' TTGAGAAAGGAATAAGCAGAATTCGTTCCAAAAGAATGAGCTGTTGTTTGCAGAAATCGAGTATATGC 3'
← DNA POL - TCTTTAGCTCATATACG 5'
dNTPs Zpětný primer

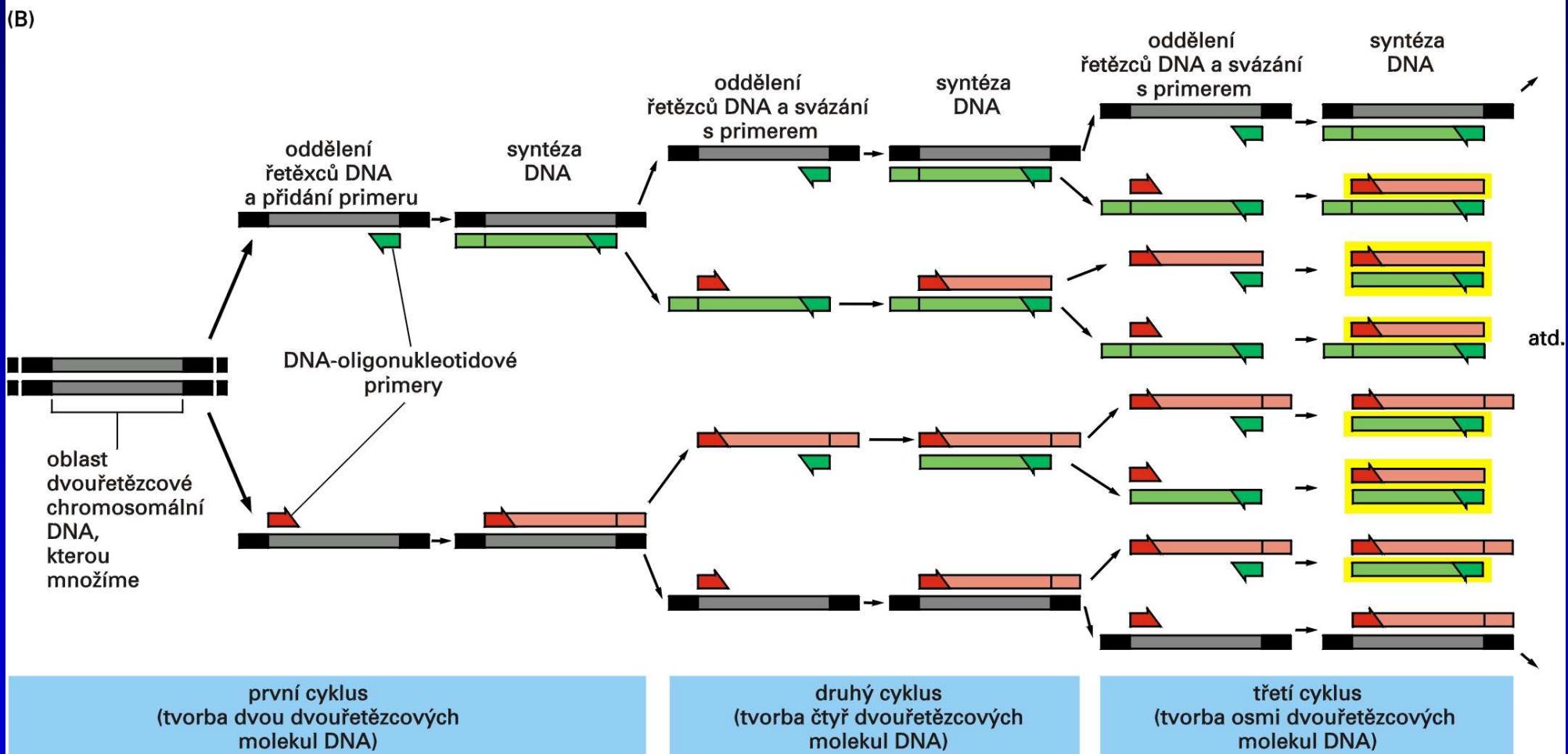
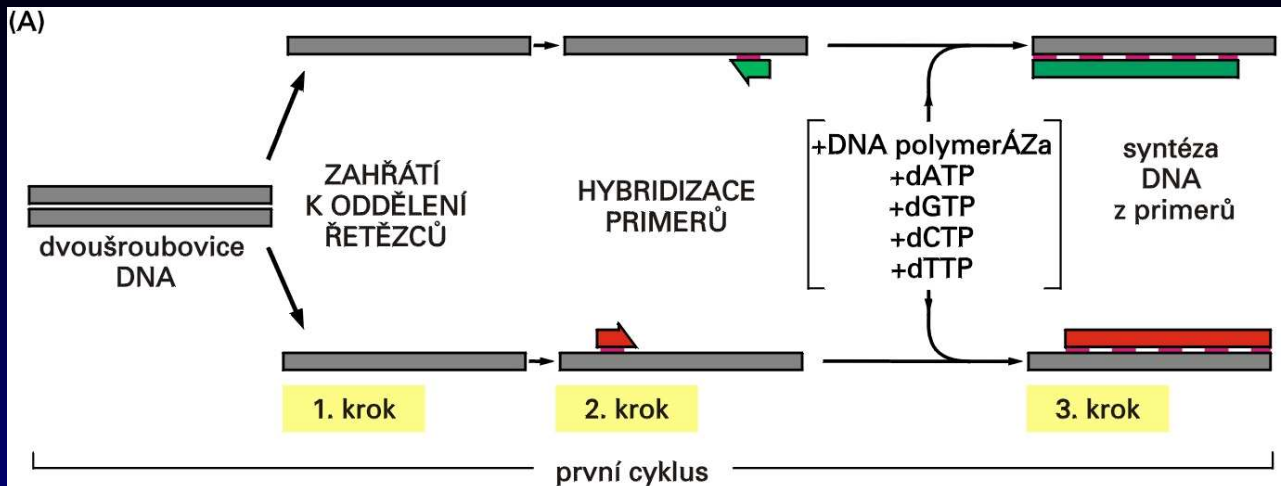
5' 3'
TTGAGAAAGGAATAAGCAGAATTCGTTCCAAAAGAATGAGCTGTTGTTTGCAGAAATCGAGTATATGC
AACTCTTTCCTTATTCGTCTTAAGCAAGGTTTTTCTTACTCGACAACAAACGTCTTTAGCTCATATACG 5'

3' 5'
5' TTGAGAAAGGAATAAGCAGAATTCGTTCCAAAAGAATGAGCTGTTGTTTGCAGAAATCGAGTATATGC 3'
AACTCTTTCCTTATTCGTCTTAAGCAAGGTTTTTCTTACTCGACAACAAACGTCTTTAGCTCATATACG 5'

PCR : Denaturation 94°C



(Andy Vierstraete 1999)



REAKČNÍ PODMÍNKY PCR

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 („self-priming“) a možným falešným výsledkům.

Vlastní řetězová reakce:

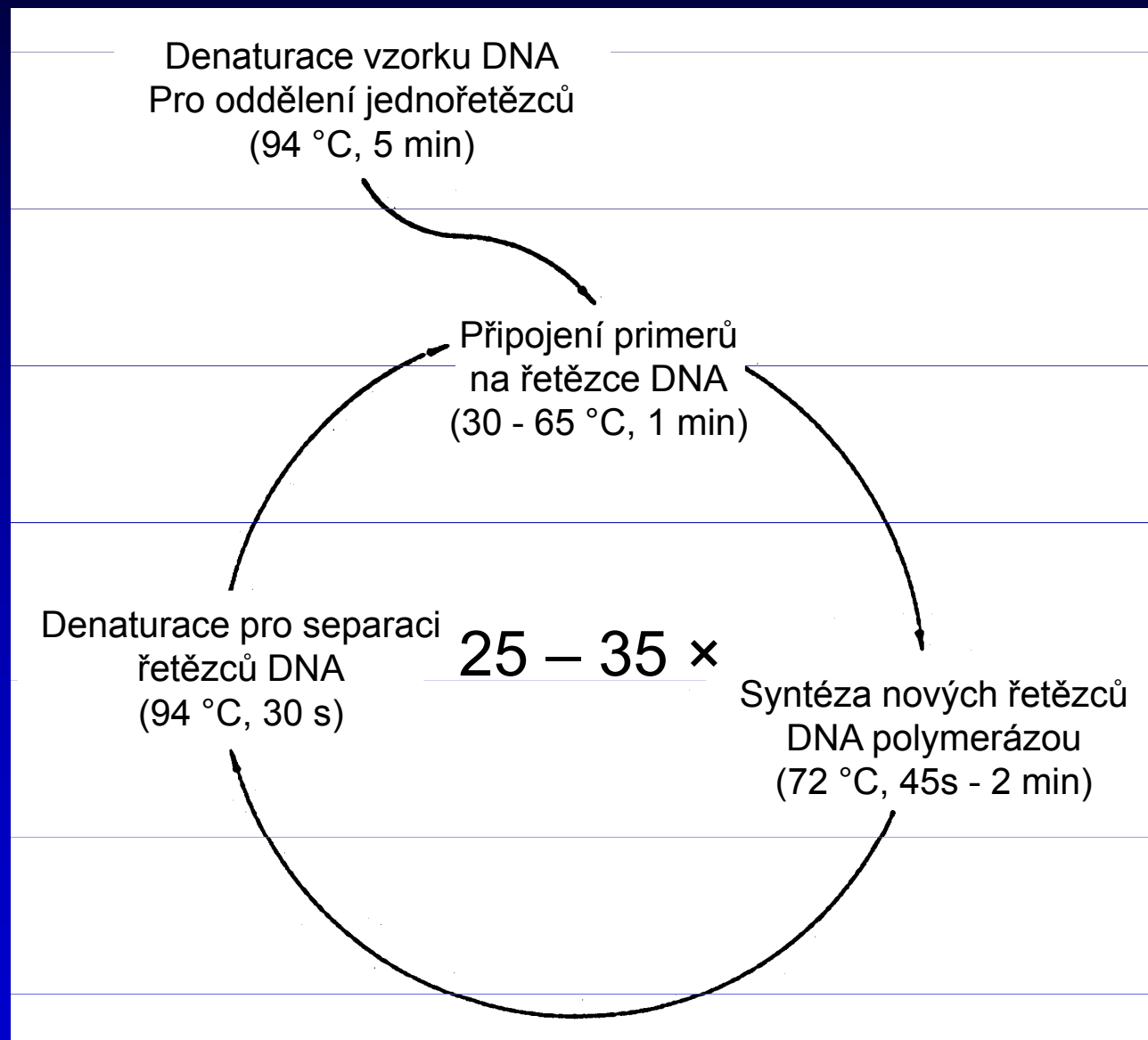
30x

2. Denaturační krok (separace řetězců) : 94 – 95 °C / 20 – 45 s, záleží na objemu reakce, tloušťce stěn zkumavek. Nedostatečně denaturovaná DNA neumožňuje přístup primerům, naopak příliš dlouhá denaturace snižuje aktivitu DNA polymerázy (stabilní cca 2 hod / 98 °C).
3. Připojení primerů (55 - 65 °C / 30 – 90 s) teplota určuje specifičnost a závisí na T_m primeru a templátu. Pro oba primery by měla být T_m podobná. Ta se optimalizuje v teplotním gradientu nebo se stanovuje empiricky.
4. Prodlužování primeru (polymerační reakce) při standardní PCR 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.

Cyklické střídání teplot jednou založené směsi zajišťuje průběh reakce PCR, provádí se v termocyklerech, 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.

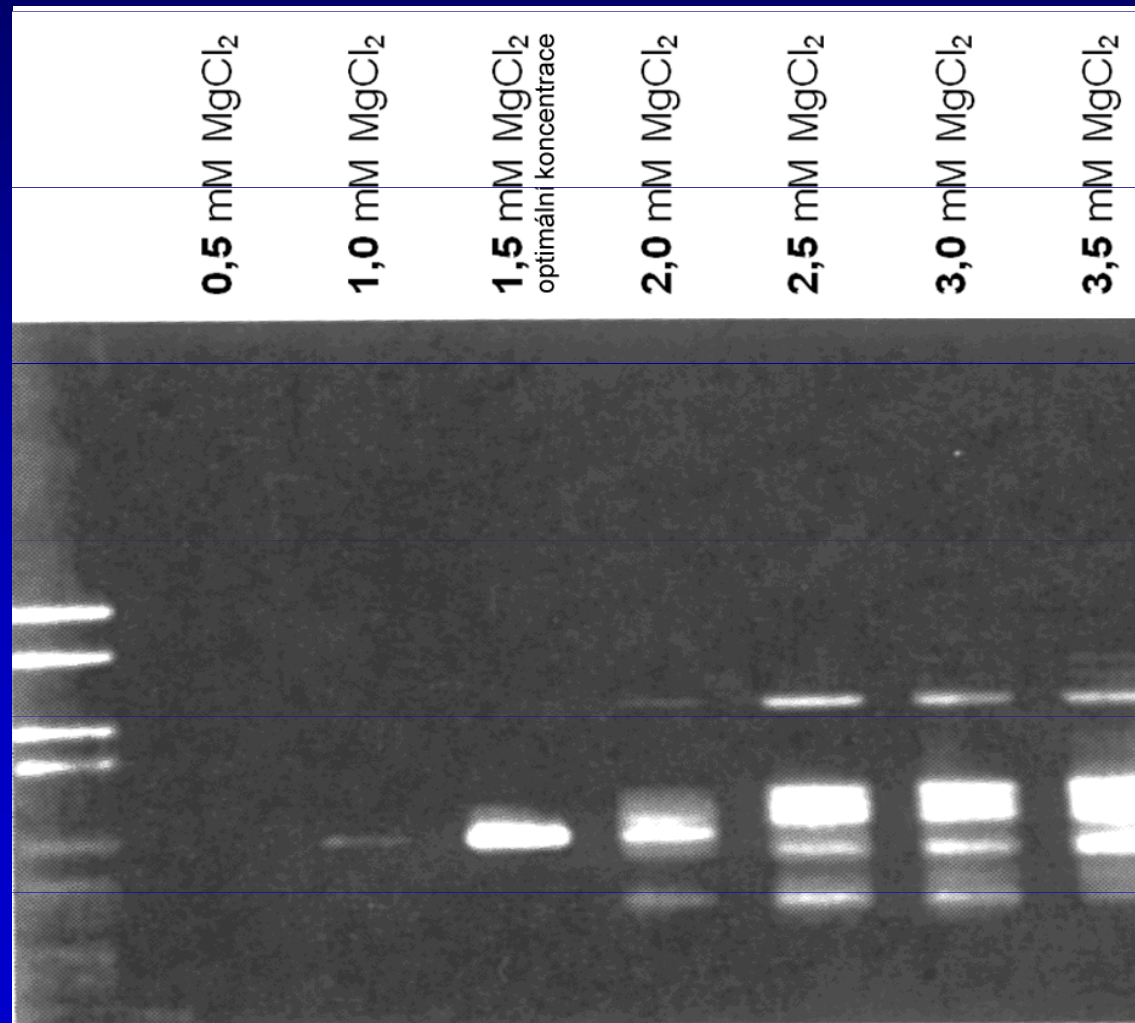
REAKČNÍ PODMÍNKY PCR



KONCENTRACE JEDNOTLIVÝCH SLOŽEK PŘI STANDARNÍ PCR REAKCI

- **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 μM .
 - ◆ U některých systémů může vyšší koncentrace (až 1 μM) zlepšit výsledky.
 - ◆ Nižší koncentrace vede k předčasnému vyčerpání primerů a snížení výtěžku.
- **dNTP.** Výsledná koncentrace se může pohybovat v rozmezí 50 – 500 μM (pro každý nukleotid)
 - ◆ Nejběžnější koncentrace dNTP je 200 μM . Při zvýšení koncentrace dNTP je třeba zvýšit koncentraci Mg^{2+} iontů.

- **MgCl₂**. Volné Mg²⁺ ionty ovlivňují aktivitu enzymu a zvyšují hodnotu T_m u dsDNA.
 - ◆ Pro dosažení nejlepšího výsledku vždy stanovujeme koncentraci Mg²⁺ experimentálně.
 - ◆ Optimální koncentrace může kolísat od 1 mM do 5 mM.
 - ◆ Nejčasteji používaná koncentrace je 1,5 mM (pro 200 μM dNTP).



■ DNA polymeráza.

- ◆ Obvyklá koncentrace je 0,5 – 2,5 jednotek / 50 μ l.

■ pH je dané reakčním pufrem, obvykle odpovídá pH 8,3 – 9,0.

■ 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 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

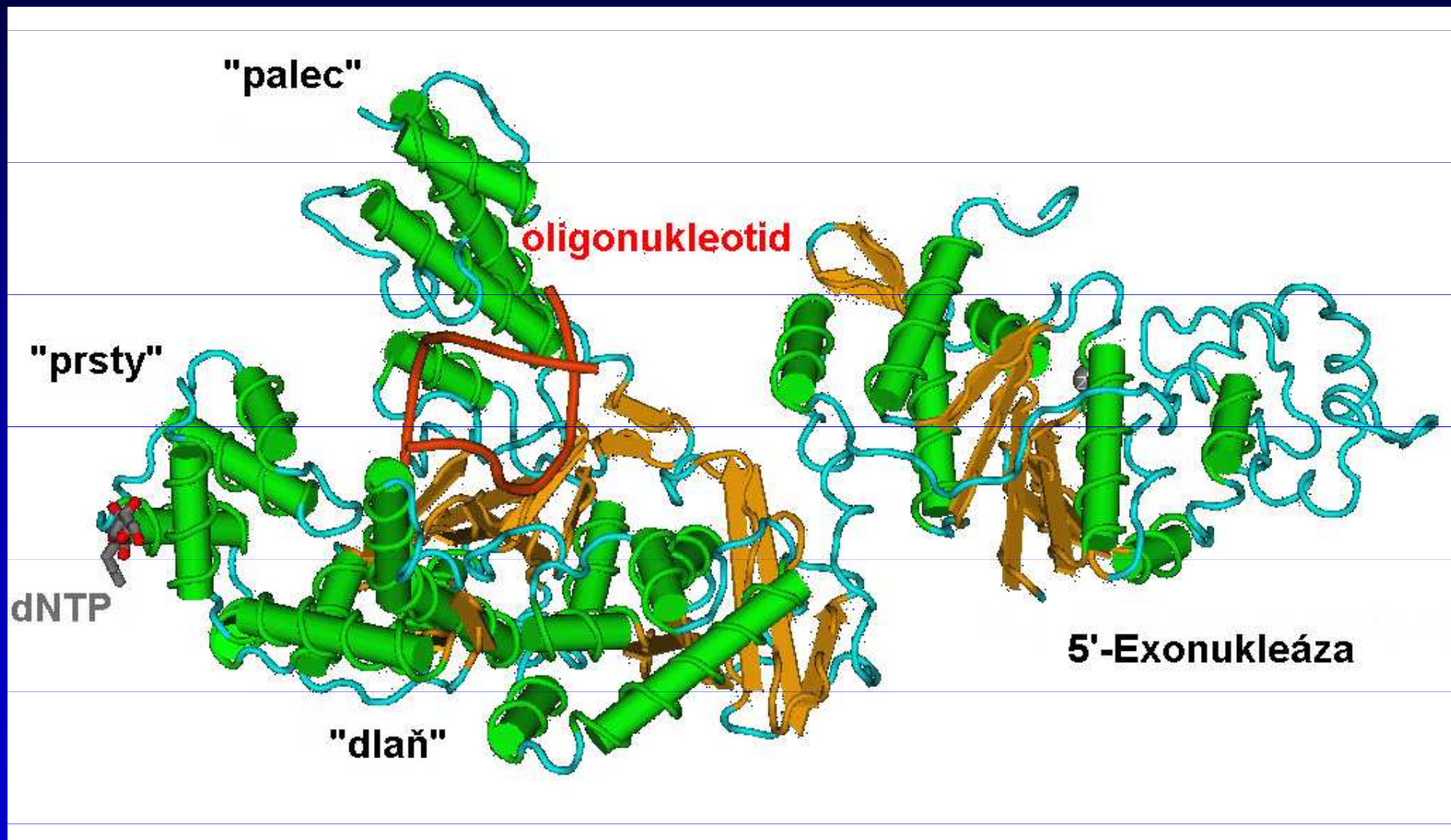
- ◆ protein 32 genu fága T4

optimalizace PCR přídavnými látkami:



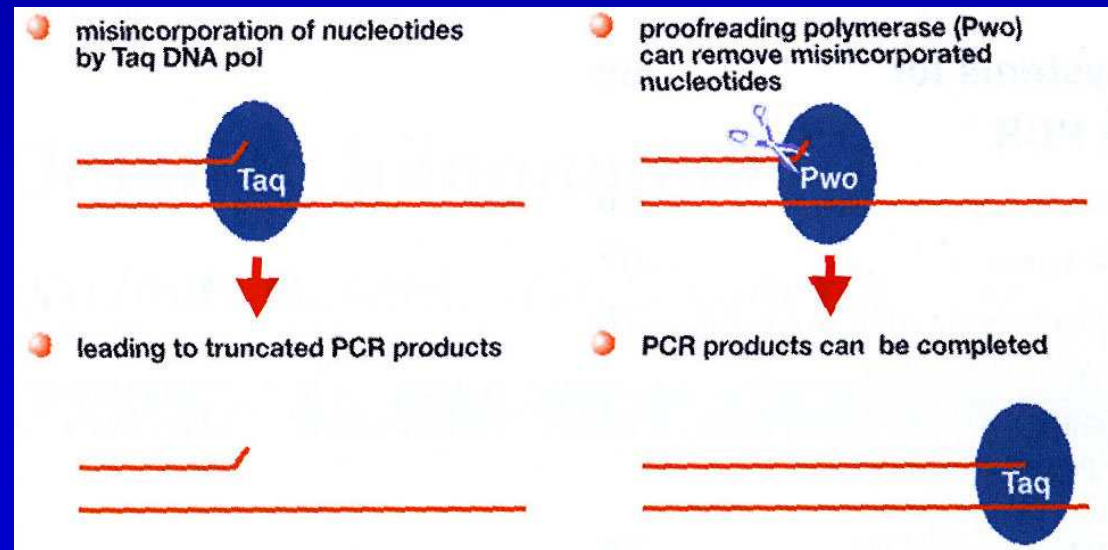
■ Minerální olej – zabraňuje vypařování během reakce

Struktura *Taq* DNA polymerázy



BEZCHYBNOST SYNTÉZY

- Replikace s Taq DNA-polymerázou neprobíhá bezchybně, DNA-polymeráza příležitostně zařazuje do nově syntetizovaných řetězců chybné (nekomplementární) nukleotidy.
 - ◆ Buňka má schopnost tyto báze odstraňovat opravnými mechanismy.
 - ◆ *In vitro* Taq DNA-polymeráze tato vlastnost chybí.
- Frekvence chybného začleňování za podmínek amplifikace *in vitro* je asi 2×10^{-4} .
- Chybné začleňování je důležité, pokud jsou PCR produkty klonovány, neboť každý klon je odvozen z jedné molekuly DNA. Chybně začleněné báze (mutace) potom obsahuje celé potomstvo.
- Řešení problému: použití dvojice DNA polymeráz, z nichž jedna má opravné mechanismy (proofreading).



Stanovení teploty pro připojení primeru

- Teplota pro připojení primeru (annealing temperature) zkr. T_a . Teplota používaná pro teplotní hybridizaci molekul primeru a matricové DNA in vitro. Optimální teplota pro připojení primeru při PCR se vypočítá podle vztahu:

$$T_a = 0,3 \times T_m^{\text{Primer}} + 0,7 \times T_m^{\text{Produkt}} - 25$$

kde T_m^{Primer} je hodnota T_m nejméně stabilního páru primer-matrice a T_m^{Produkt} je hodnota T_m amplifikačního produktu.

- Orientačně lze vypočítat T_a podle vztahu:

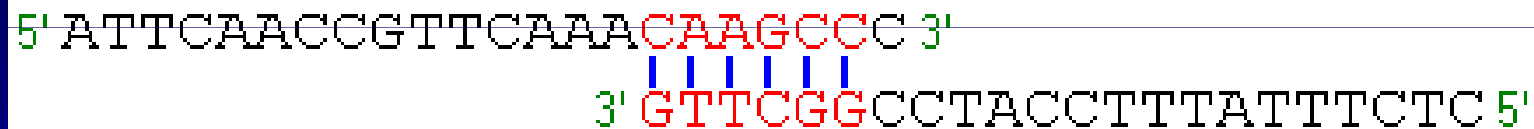
$$T_a = 2(A+T) + 4(G+C) - 5 \text{ °C} = T_m - 5 \text{ °C}$$

NÁVRH PRIMERŮ PRO STANDARDNÍ PCR

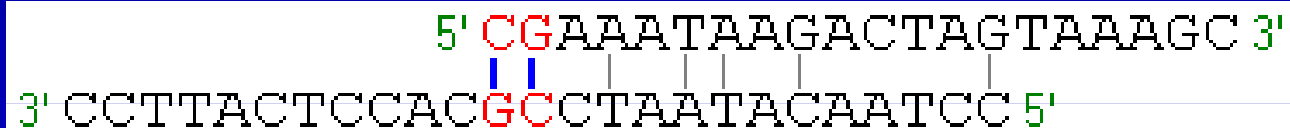
- ◆ 18 – 25 bází dlouhé
- ◆ neobsahují vnitřní sekundární struktury
- ◆ obsahují 40 – 60 % G+C
- ◆ mají rovnoměrnou distribuci oblastí bohatých na G/C a A/T páry
- ◆ nejsou komplementární navzájem na 3'-koncích, takže nevytvářejí navzájem nebo samy se sebou duplexy
- ◆ na matricové DNA nemají falešná vazebná místa
- ◆ mají T_m teplotu 55 – 65 °C

PŘÍKLADY STRUKTUR VYTVÁŘENÝCH PRIMERY, KTERÉ JE NUTNÉ ZOHLEDNIT PŘI JEJICH NÁVRHU

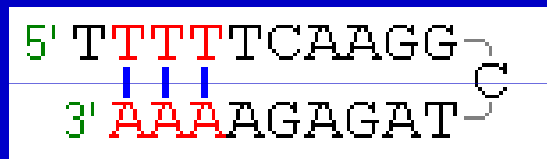
- Chybně navržená dvojice primerů, která vytváří stabilní duplex na 3'-konci:



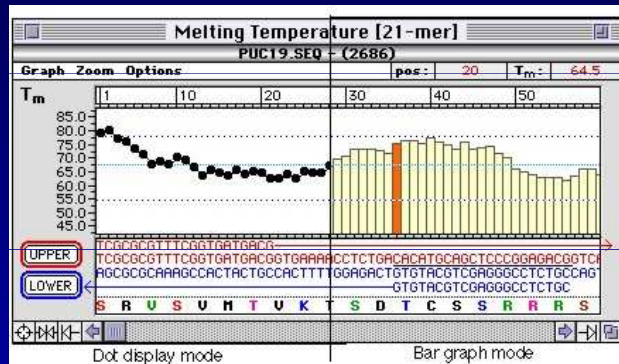
- Správně navržená dvojice primerů, která vytváří pouze málo stabilní duplex na 5'-konci; na 3'-konci je G nebo C zaručující stabilní párování s templátem:



- Chybně navržený primer, vytvářející vlásenku:



Pro návrh primerů se obvykle používá specializovaný software (některý je volně dostupný na internetu).



Current Oligo
pCBlu3.seq

Sequence Length: 1842

Current Oligo (+ strand)

5' CCCGCCTGATGAATGCTCATC 3'
Length: 21-mer
5' Position: 1373
T_m: 72.1 °C
ΔG (25 °C): -42.7 kcal/mol
Degeneracy: 1
P.E.#: 492
1/E: 5.30 nmol/A₂₆₀
34.0 μg/A₂₆₀

Current Oligo (- strand)

5' GATGAGCATTTCATCAGGCGGG 3'
Length: 21-mer
5' Position: 537
T_m: 69.5 °C
ΔG (25 °C): -41.4 kcal/mol
Degeneracy: 1
P.E.#: 502/502
1/E: 4.89 nmol/A₂₆₀
32.0 μg/A₂₆₀

Selected Primers
pCBlu3.seq

pCBlu3:269U21 Upper Primer

5' CGGCGCCAGATCTGGTACCCA 3'
Length: 21-mer
5' Position: 269
T_m: 76.9 °C
ΔG (25 °C): -46.1 kcal/mol
Degeneracy: 1
P.E.#: 542/542
1/E: 5.12 nmol/A₂₆₀
33.1 μg/A₂₆₀

pCBlu3:817L21 Lower Primer

5' TACCGGGTTGGACTCAAGACG 3'
Length: 21-mer
3' Position: 817
T_m: 69.5 °C
ΔG (25 °C): -41.4 kcal/mol
Degeneracy: 1
P.E.#: 502/502
1/E: 4.89 nmol/A₂₆₀
32.0 μg/A₂₆₀

Lower Primer False Priming Sites
M13MP18

Lower Primer - M13MP18:6310L19 (positive strand)
Priming efficiency of the perfect match is 428 (above the threshold)

Priming efficiency: 428 (above the threshold)

5'(6328) GGTTCCTCCAGTCACGACG (6310)3'
3'(6328) ccaaaaagggtcagtgctgc (6310)5'

Priming efficiency: 205 (above the threshold)

5'(6328) GGTTCCTCCAGTCACGACG (6310)3'
3'(626) agcaaaagggtcagtgctgc (610)5'

Priming efficiency: 194 (above the threshold)

5'(6328) GGTTCCTCCAGTCACGACG (6310)3'
3'(808) gtaataagggtcagtgctgc (790)5'

Priming efficiency: 185 (above the threshold)

5'(6328) GGTTCCTCCAGTCACGACG (6310)3'
3'(5125) tctaagtggtcagtg-tgc (5108)5'

Priming efficiency: 121

5'(6328) GGTTCCTCCAGTCACGACG (6310)3'
3'(5989) agaaaagggtcagtgctgc (5971)5'

Lower Primer - M13MP18:6310L19 (negative strand)
Priming efficiency of the perfect match is 428 (above the threshold)

Priming efficiency: 76

5'(6328) GGTTCCTCCAGTCACGACG (6310)3'
3'(5744) ccaaaaagcgggaactgc (5762)5'

PCR
pCBlu3.seq

Optimal Annealing Temperature: 58.3° (Max: 72.0°)

	Position and Length	T _m [°C]	GC [%]	P.E.#
Product	1352	88.0	51.3	-----
Upper Primer	37 21	72.2	47.6	452
Lower Primer	1368 21	79.9	57.1	506

Product T_m - Upper Primer T_m: 15.8
Primers T_m difference: 7.6

	Concentration	
Upper Primer	200.0	nM
Lower Primer	200.0	nM
Monovalent Cation	50.0	mM
Free Mg[2+]	0.7	mM

Total Na[+] Equivalent: 155.8

Terminal stability of the Lower Primer is too high.

„HOT START“ PCR

- „Hot-start“ PCR významně ovlivňuje specifičnost, citlivost a výtěžek reakce
- Princip:
 - ◆ Při „hot-start“ PCR jsou určité složky reakční směsi odděleny od ostatních, dokud teplota ve zkumavce nepřekročí optimální teplotu pro připojení primeru (obvykle 55 ° - 65 °C).
 - ◆ DNA polymeráza je v této nekompletní reakční směsi nefunkční.
 - ◆ Nedochází k prodlužování nespecificky navázaných primerů během doby než je dosažena teplota T_a .

■ Separace důležitých složek reakční směsi je dosažena některým z následujících způsobů:

◆ **Manuálně**

- ◆ Některé složky jako DNA polymeráza nebo Mg^{2+} jsou vynechány v původní reakční směsi a přidány manuálně po dosažení teploty $> 70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nevýhodou je možnost kontaminace a možná ztráta reprodukovatelnosti.

◆ **Fyzikální separace**

- ◆ Reakční komponenty jsou rozděleny do dvou směsí, které jsou odděleny bariérou (vosková přepážka, nebo voskové korálky obsahující $MgCl_2$). Během počáteční denaturace vosk roztaje a umožní smíchání reakčních složek.

◆ **Protilátky proti DNA polymeráze**

- ◆ Přídavek teplotně nestabilních protilátek umožní počáteční inaktivaci polymerázy.

◆ **Chemická modifikace polymerázy**

- ◆ Přídavek teplotně nestabilních látek, které se vážou na určité aminokyselinové zbytky blokuje enzym (ten je potom při pokojové teplotě inaktivní). K aktivaci enzymu dochází při počáteční denaturaci („FastStart Taq DNA polymeráza“).

◆ **Další inhibitory**

- ◆ např. oligonukleotidy specificky se vážající na polymerázu

DETEKCE AMPLIFIKOVANÉHO PRODUKTU PCR

1. Stanovení fyzikální velikosti produktu gelovou elektroforézou (agaróza, polyakrylamid). Detekce obarvením a pozorování pod UV světlem.
2. Ověření specifičnosti produktů
 - Štěpení produktu restričními enzymy a posouzení spektra vznikajících restričních fragmentů (PCR-RFLP)
 - Sekvencování
3. Detekce kvantitativní – v reálném čase

Příklad standardní gelové elektroforézy s produkty PCR v agarózovém gelu.

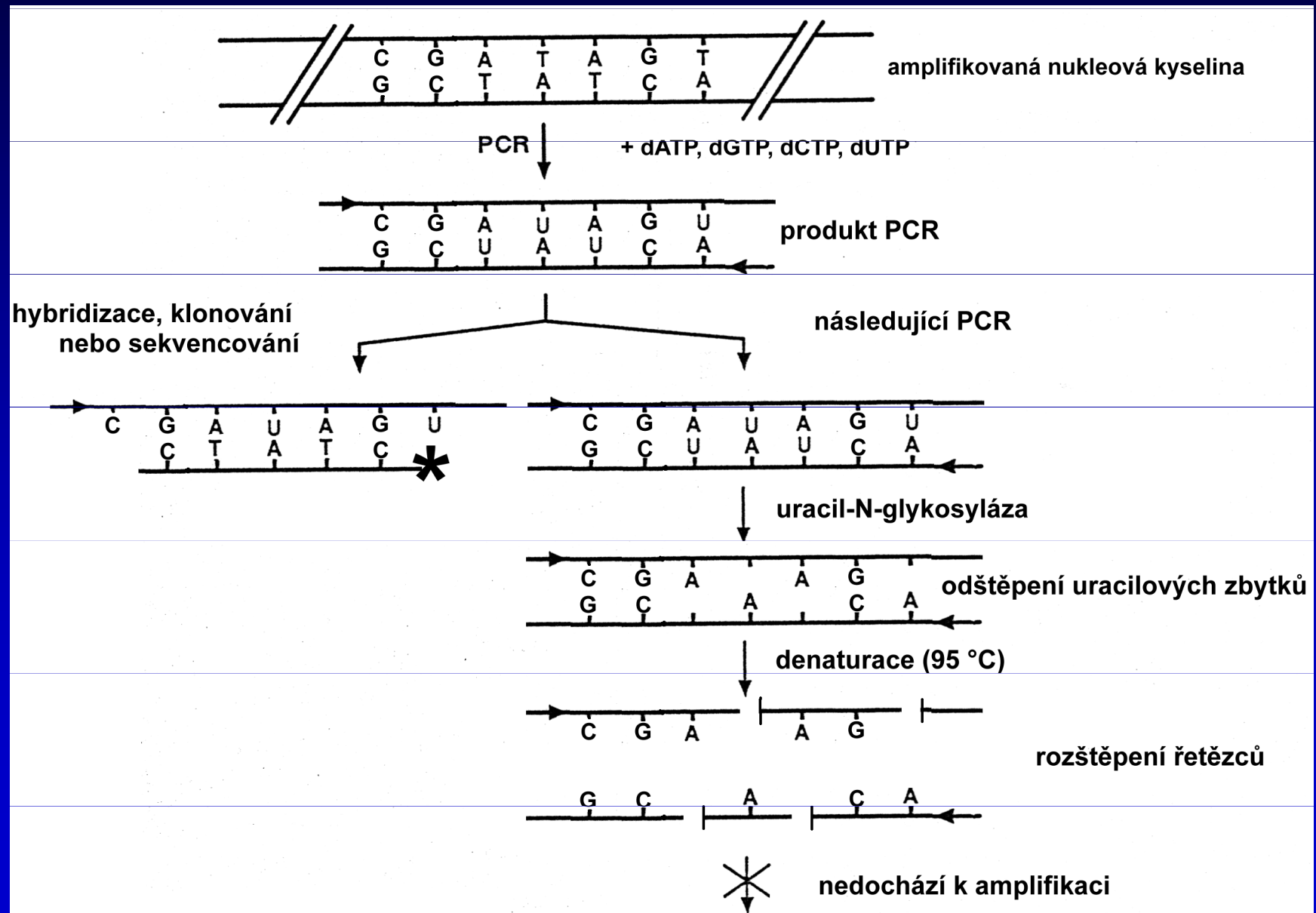
1 = hmotnostní st.
2 - 4 = produkty PCR



Kontaminace při PCR

- Vynikající citlivost PCR může být ovlivněna kontaminací i jedinou molekulou exogenní nebo neznámé DNA.
- Pro minimalizaci falešných pozitivních výsledků je doporučeno:
 - ◆ používání autoklávovaných roztoků
 - ◆ fyzikální separace používaných PCR-reagencií od templátové DNA a PCR-produktů
 - ◆ příprava reagensů i vzorků do alikvotních částí
 - ◆ používání UV-světla k odstranění exogenních nukleových kyselin na pracovní ploše
 - ◆ používání jednorázových rukavic
 - ◆ přidávání DNA do reakce jako poslední
 - ◆ pečlivá volba pozitivních, negativních a vnitřních kontrol
- Vyloučení kontaminace je důležité zejména tam, kde je potřeba použít vysokého počtu amplifikačních cyklů, aby bylo dosaženo požadovaného produktu
 - ◆ nízkokopiových templátů DNA
 - ◆ degradovaných vzorků.
- V případě pochybností je nejlepším přístupem opakování experimentu s úzkostlivou pozorností k detailům a kontrolám.
- Jako zdroj kontaminace DNA je nejčastěji uváděn:
 - ◆ přenos kontaminující DNA z dříve amplifikovaných produktů PCR,
 - ◆ vzájemná kontaminace zdrojových materiálů,
 - ◆ kontaminace plazmidem z rekombinantního klonu, který obsahuje cílovou sekvenci.

Jako prevence před přenosem kontaminující DNA je v reakční směsi rutinně používána náhrada dTTP za dUTP. Následným působením uracil-N-glykosylázy na reakční směs před zahájením amplifikace.



VYUŽITÍ METODY 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

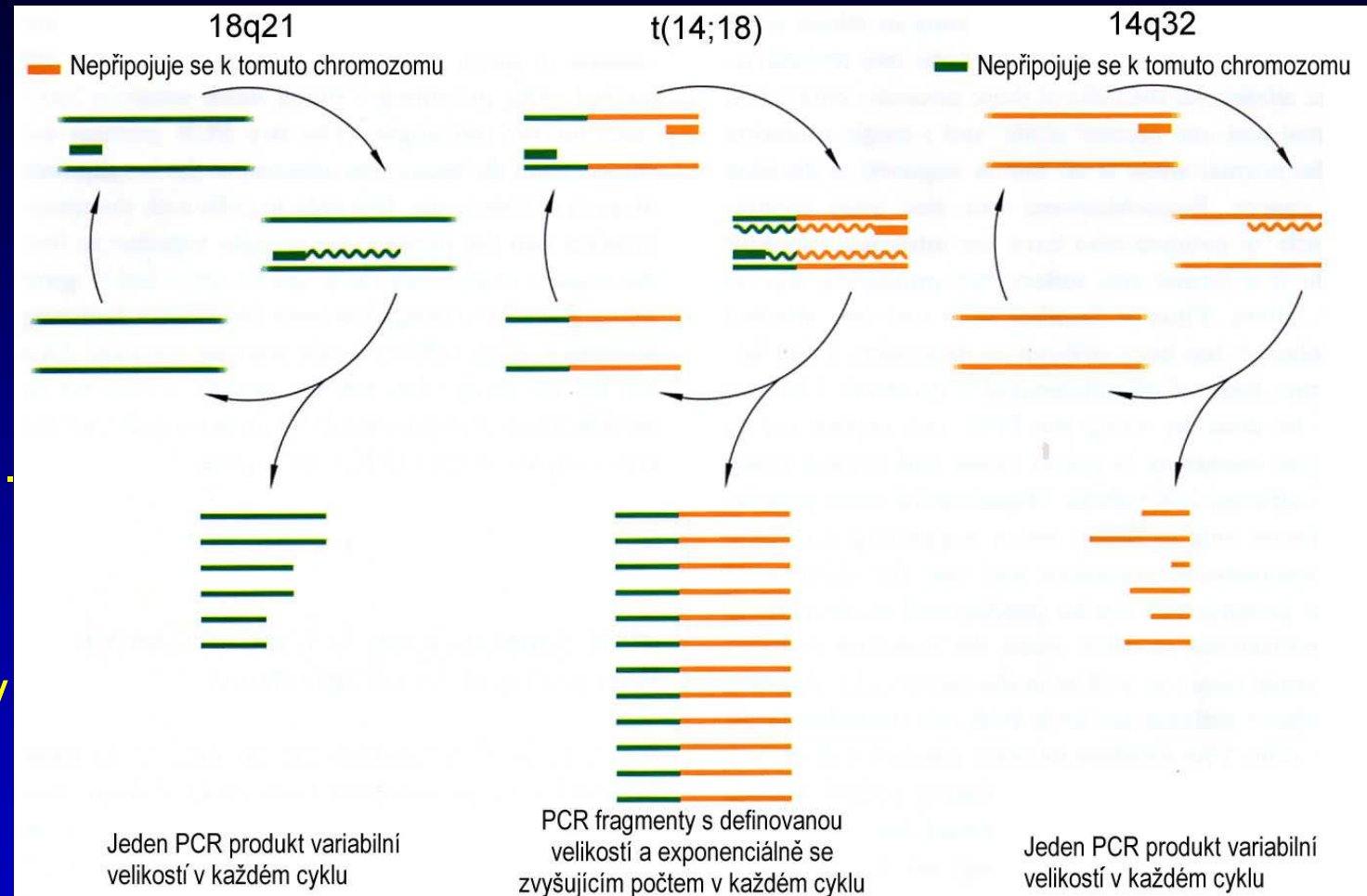
- ◆ archeologie
- ◆ soudnictví
- ◆ kriminalistika

PCR amplifikace se používá k detekci bakteriálních a virových infekcí

- Konvenční diagnostické metody jsou založeny na schopnosti vypěstovat organismy v kultuře nebo detekovat jejich přítomnost v pacientu za použití protilátek.
 - ◆ vyžaduje několik týdnů (mykobakterie)
 - ◆ někdy metoda málo citlivá (protilátky)
- Zvláštní význam má PCR při diagnostice virů, např. HIV.
 - ◆ Cílem je detegovat infikované buňky na pozadí mnohonásobně početnějších neinfikovaných buněk.
 - ◆ Detekce odhalí HIV inkorporované v buňkách. Přítomnost virové RNA naznačuje aktivní infekci, a to lze prokázat provedením PCR za použití cDNA jako templátů vytvořených pomocí RT z RNA infikovaných buněk.
- U tuberkulózy je pomocí PCR prokazován některý z vysoce konzervativních genů (sekvencí) mykobakterií pomocí primerů připravených k těmto sekvencím. Amplifikovaný fragment je pak hybridizován se sondami vysoce specifickými pro daný kmen (druh). Tímto postupem je možno detekovat i jen 10 bacilů v 10^6 eukaryotických buněk.

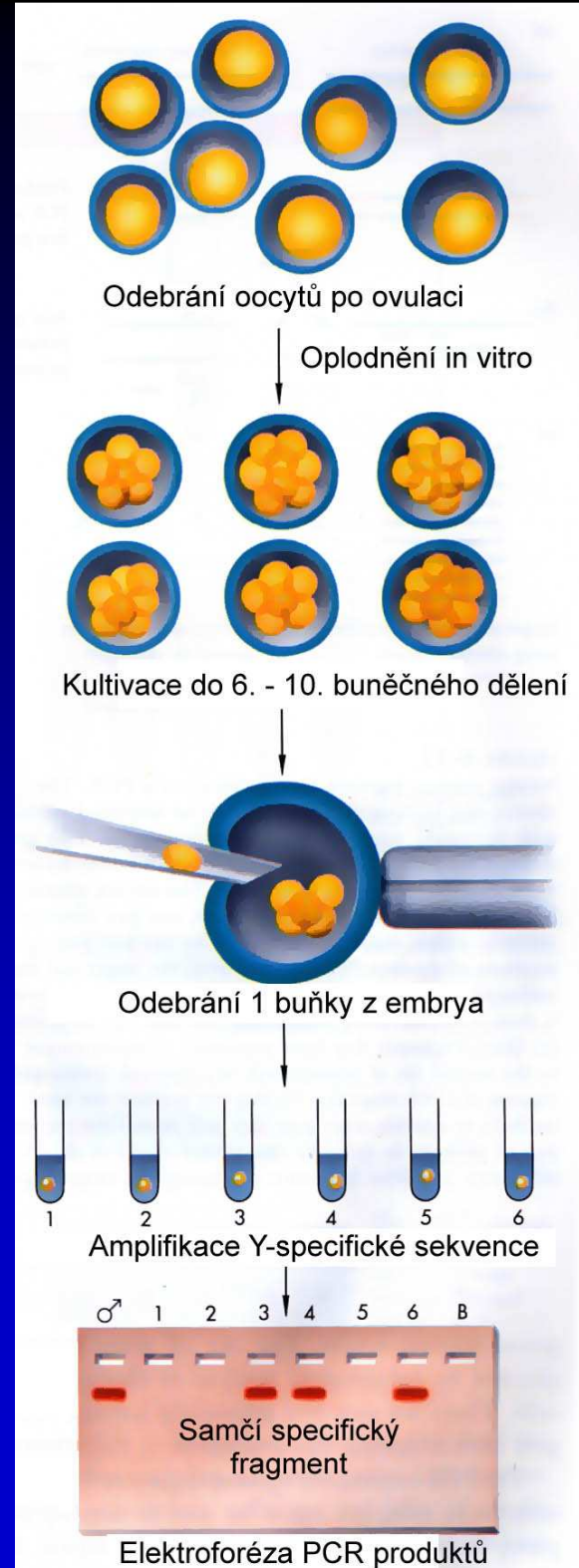
PCR je používána k monitorování terapie rakoviny

- Některé formy rakoviny vznikají jako výsledek chromozomových translokací týkajících se známých genů. Např. existuje translokace mezi chromozomy 14 a 18 u folikulárního lymfomu.
- Techniky PCR jsou schopny detekovat jedinou buňku z 10^6 normálních buněk, tedy daleko citlivěji než hybridizační metody.
- Dva PCR primery se vyberou ze sekvencí sousedících s místy zlomu na každém chromozomu. Pak pouze v buňkách, kde proběhla translokace, dojde k amplifikaci a vznikne fragment konstatní délky.
- Podobná strategie byla použita k detekci leukemií za použití mRNA jako výchozího materiálu. To má výhodu v tom, že mRNA představuje již amplifikační produkt daného genu genomové DNA.



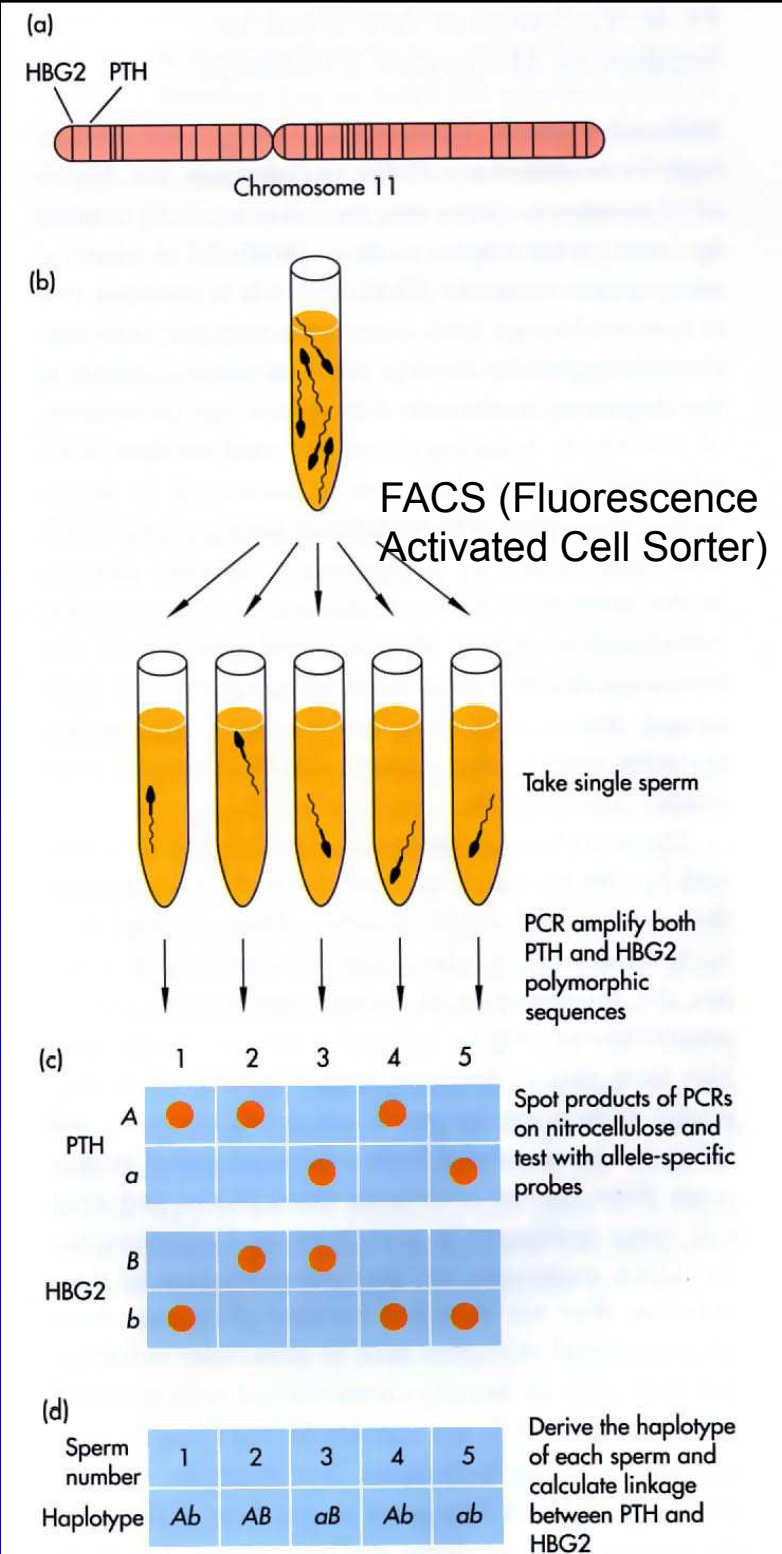
PCR je používána ke stanovení pohlaví u prenatálních buněk

- Širokou oblastí využití PCR je prenatální diagnostika obecně.
- Pro choroby děděné na X-chromozomum které postihují pouze samce, je stanovení pohlaví prvním krokem. To je možné proto, že samci nesou pouze jeden X a jeden Y chromozom, obsahující jedinečné sekvence.
- Při oplození *in vitro* se odebere jedna buňka z rané zygoty pomocí mikromanipulátoru, vyizoluje se DNA a ta se podrobí amplifikaci pomocí specifických primerů. Prokáže se amplifikační fragment. Výsledku se pak využívá v genetickém poradenství při výběru samičích embryí pro implantaci.



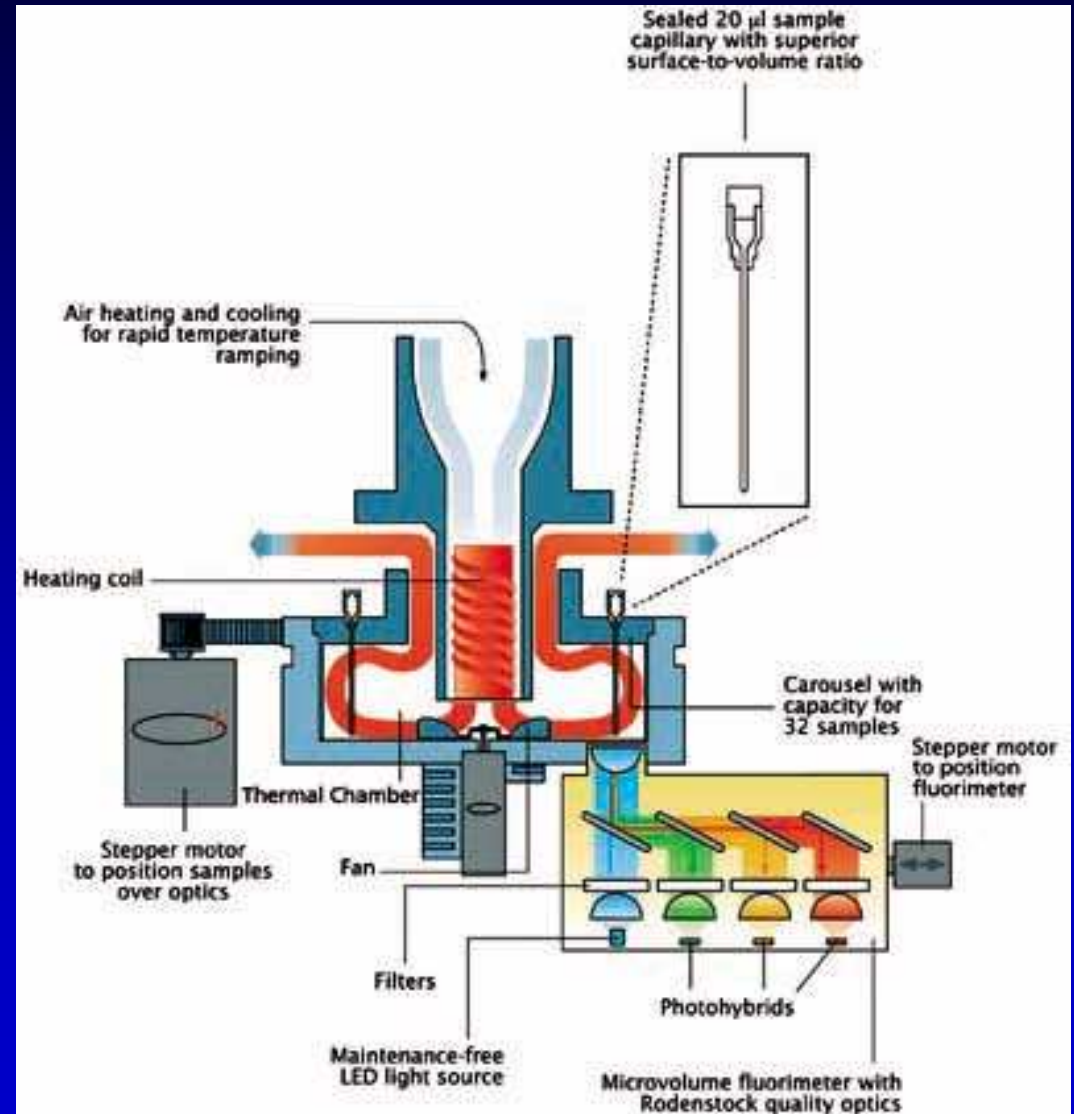
Analýza genové vazby s využitím jednotlivých spermií

- Polohy lokusu genu pro paratyroidní hormon (PTH) a lokusu G γ -globinového genu (HBG2) se nacházejí na krátkém rameni lidského chromozomu 11.
- Jednotlivé spermie se přenesou do zkumavek, amplifikace obou lokusů proběhne současně za použití dvou sad primerů
- Reakční produkty se nanesou na nitrocelulózový filtr a jsou testovány probami specifickými pro každou ze čtyř možných alel, *A* a *a* pro PTH a *B* a *b* pro HBG2. Výsledek hybridizace je vizualizována autoradiograficky.
- Z autoradiogramu lze odečíst haplotypy každé ze spermií, z nich pak vypočítat frekvenci rekombinace mezi oběma lokusy a stanovit genetickou vzdálenost mezi nimi.

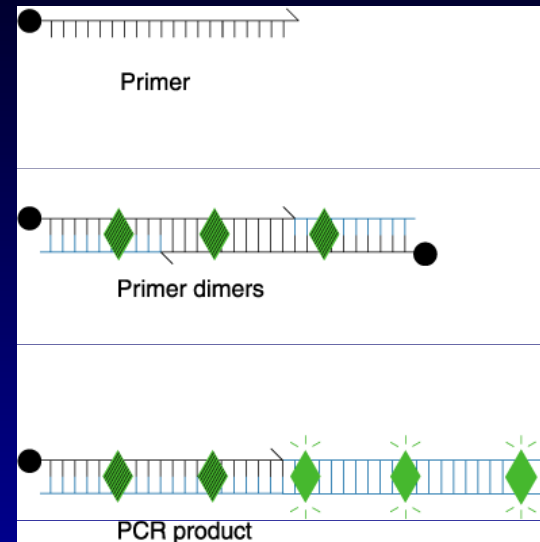
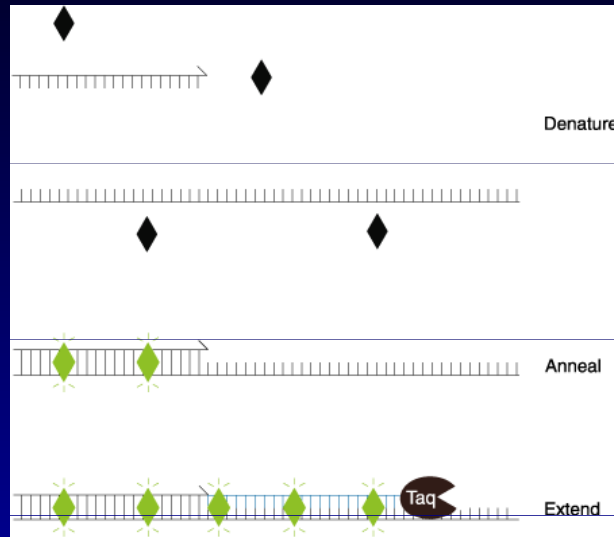


Kvantitativní PCR (qPCR)

- Polymerázová řetězová reakce sledovaná v reálném čase (real-time PCR, online PCR, kinetic PCR, quantitative PCR, zkr. Q-PCR).
- Varianta PCR umožňující přímou kvantifikaci PCR-produktu v reálném čase
- provádí se prostřednictvím detekce a kvantifikace fluorescenčního signálu ve speciálním přístrojovém zařízení, které umožňuje
 - ◆ cyklické střídání teplot
 - ◆ detekci fluorescence
 - ◆ monitorování postupu PCR v reálném čase bez nutnosti detekovat PCR-produkty elektroforeticky



Na DNA se vázající interkalační barviva



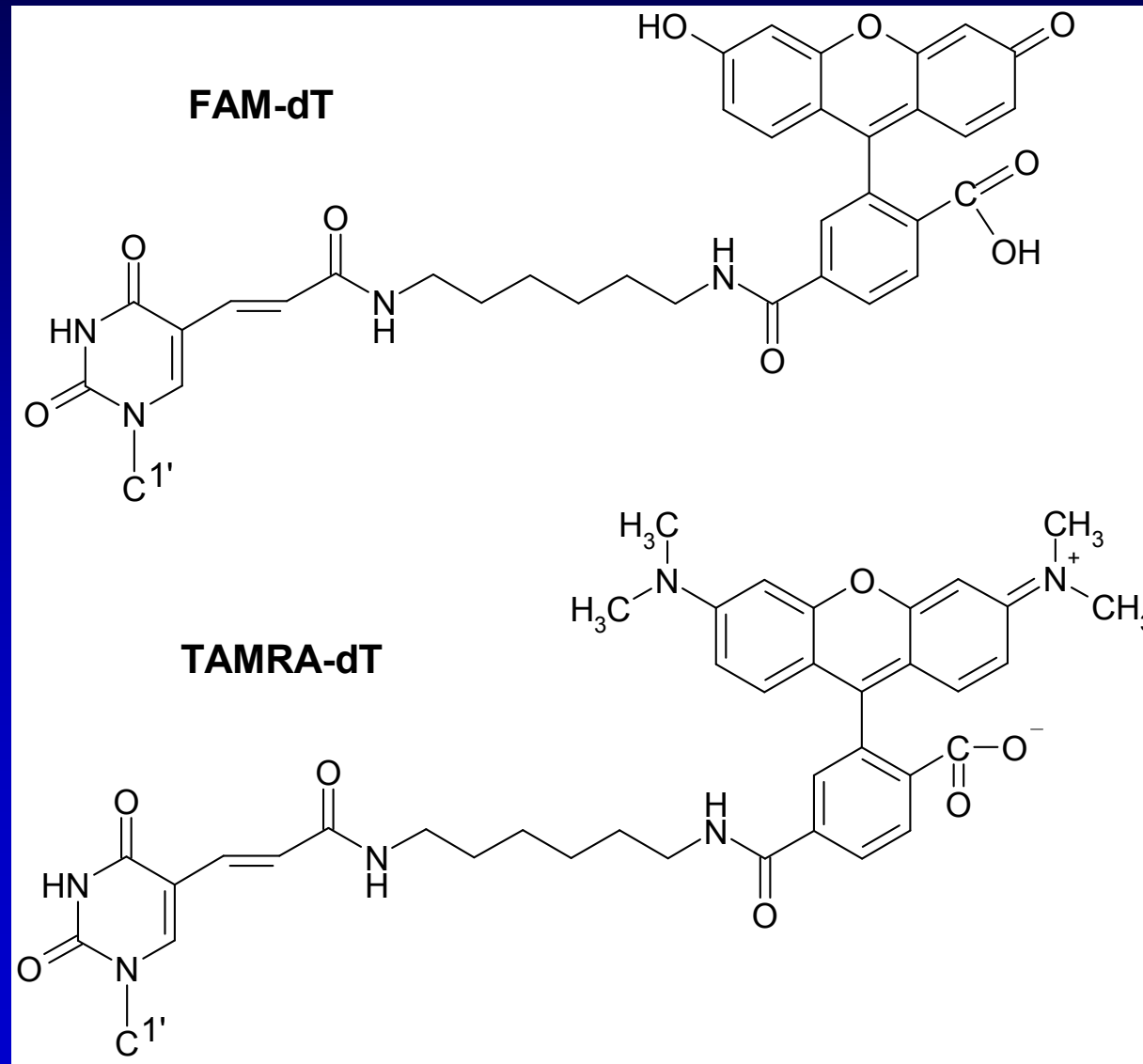
- Pro kvantifikaci ampliconů se běžně používají fluorescenční kyaninová barviva **SYBR® Green**, která fluoreskují po vazbě na dsDNA.
- Fluorescence SYBR green I je po vazbě na DNA až 1000× vyšší
- Fluorescenční signál se zvyšuje se vzrůstajícím množstvím PCR-produktu.
- Signál se měří na konci elongace nebo kontinuálně.
- Na DNA se vázající barviva nemohou být použita u mnohonásobných reakcí
- Hlavním omezením je nemožnost odlišení nespecifických produktů.
- Nespecifické signály tvořené dimery primerů mohou být zhašeny při použití primerů značených specifickými fluorofory.

Fluorescenční výměny při qPCR

- Pro značení primerů a hybridizačních sond se používají specifické molekuly fluoroforů
 - ◆ emitují světlo určité vlnové délky po předchozí absorpci světla odlišné vlnové délky
 - ◆ emitovaná vlnová délka světla je vždy vyšší než absorbovaná
- Dvojitě fluorescenčně značené sondy obsahují kromě fluoroforu také zhášec
 - ◆ molekula, která přijímá energii z fluoroforu ve formě světla a způsobuje její rozptýlení
 - ◆ ve formě světla s vyšší vlnovou délkou
 - ◆ ve formě tepla
 - ◆ k dosažení optimálního zhášení je třeba, aby se absorpční spektrum zhášeče překrývalo s emisním spektrem fluoroforu.
- V současné době existuje mnoho fluoroforů určených pro jednobarevné nebo vícebarevné mnohonásobné detekce polymorfních sekvencí

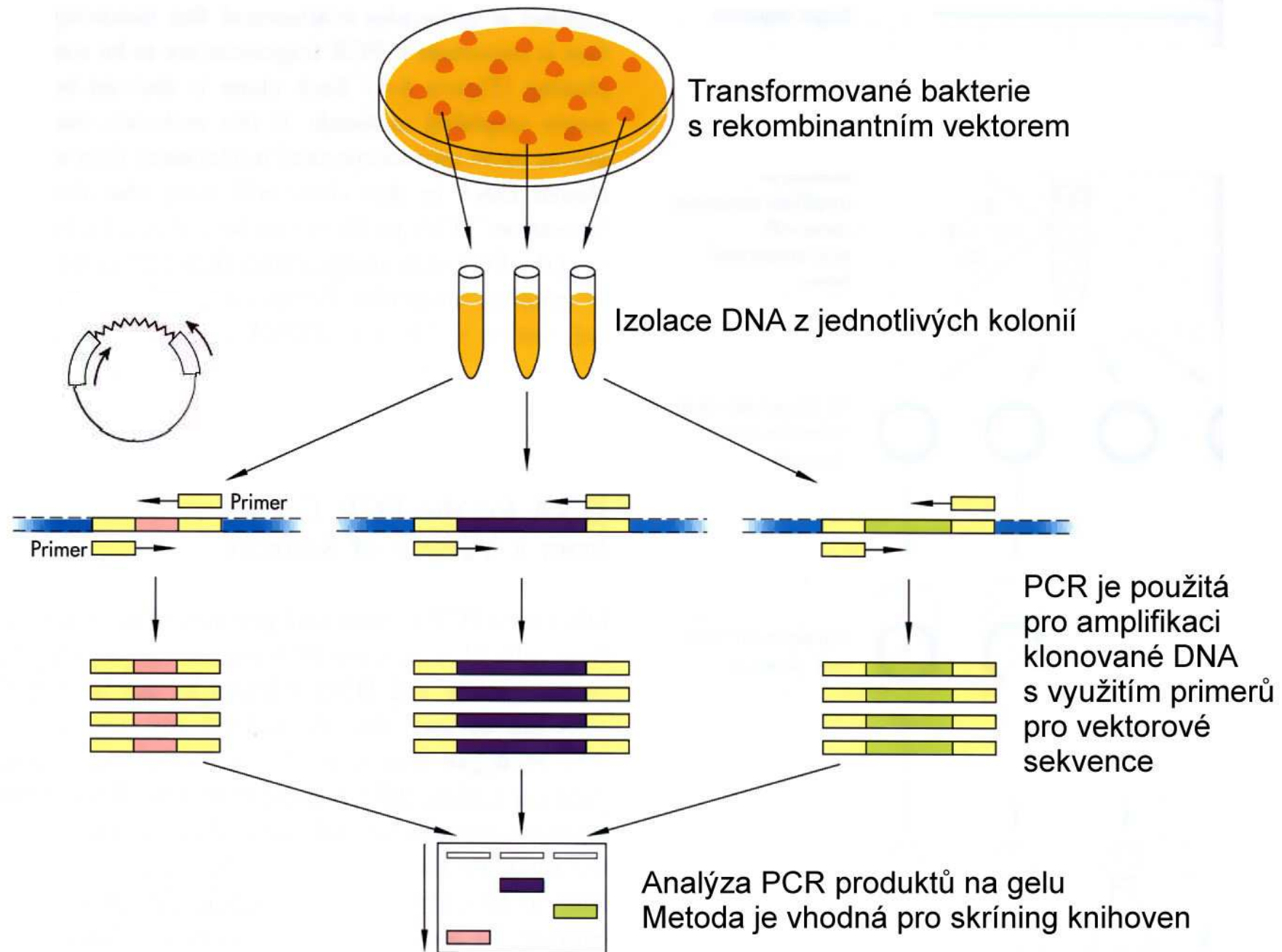
■ Jedna z nejčastěji používaných dvojic fluoroforů při metodách FRET

- ◆ donorový fluorofor FAM (6-karboxyfluorescein)
- ◆ akceptorový fluorofor TAMRA (5-karboxytetrametylrhodamin).



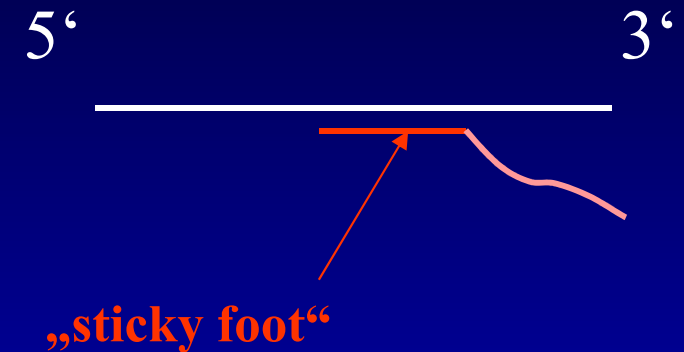
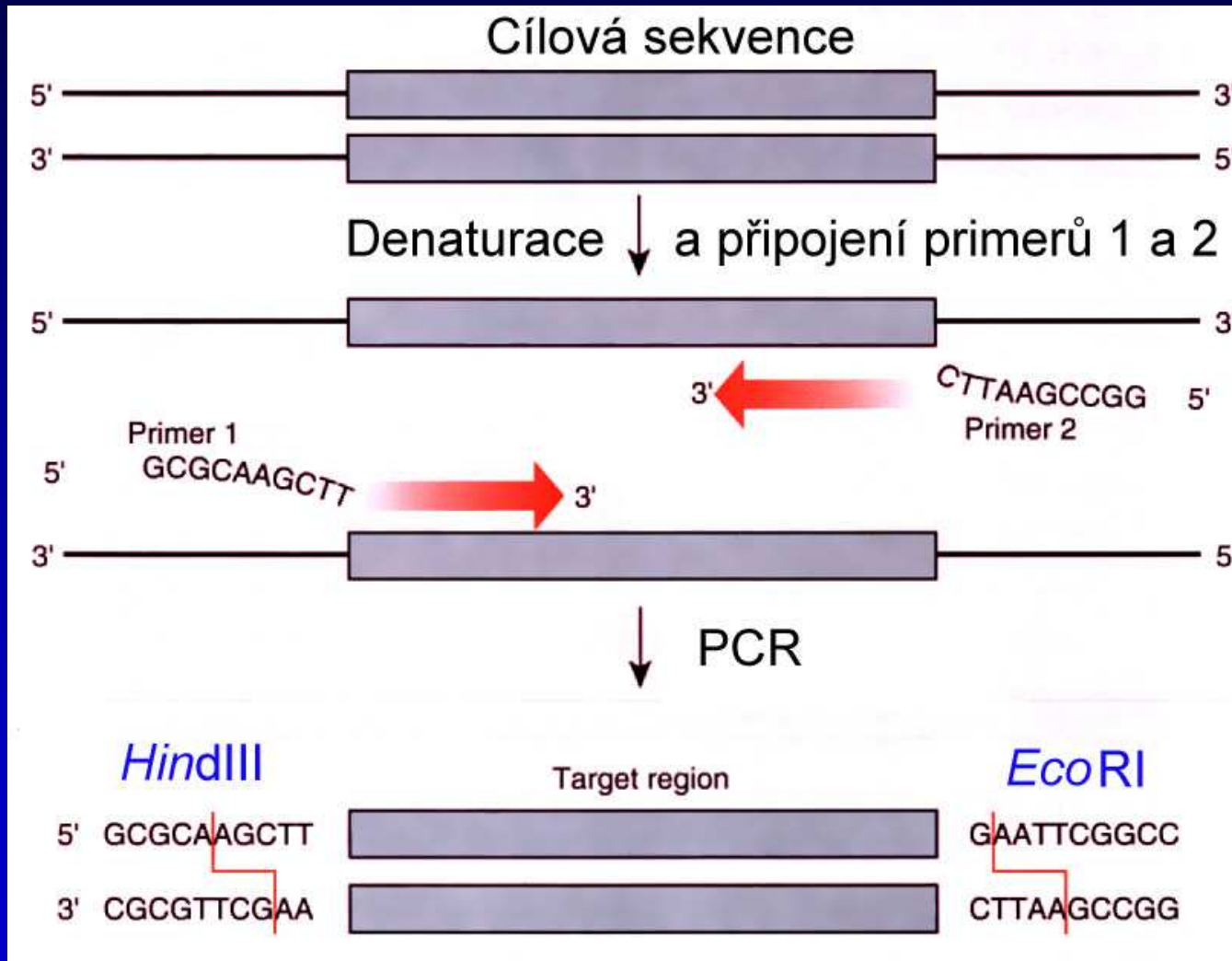
Modifikace PCR používané při analýze genomu

Amplifikace sekvencí klonovaných ve vektorech



Modifikace konců DNA, expression cassette PCR (EC-PCR)

Připojení sekvencí prostřednictvím 5'-konců primerů



■ Přidávané sekvence

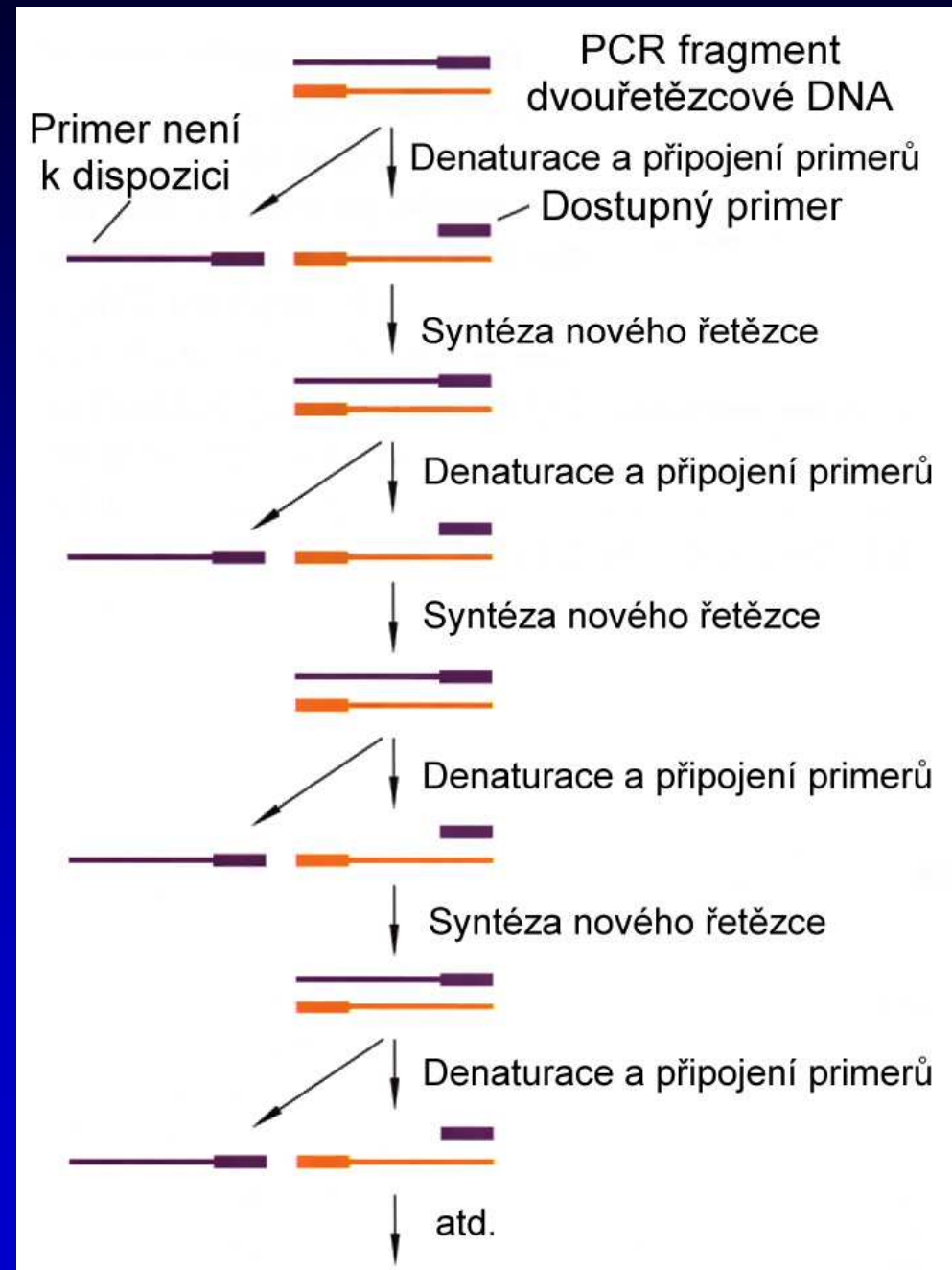
- ◆ RE místa
- ◆ Promotory
- ◆ Terminátory
- ◆ Translační signály

Asymetrická PCR



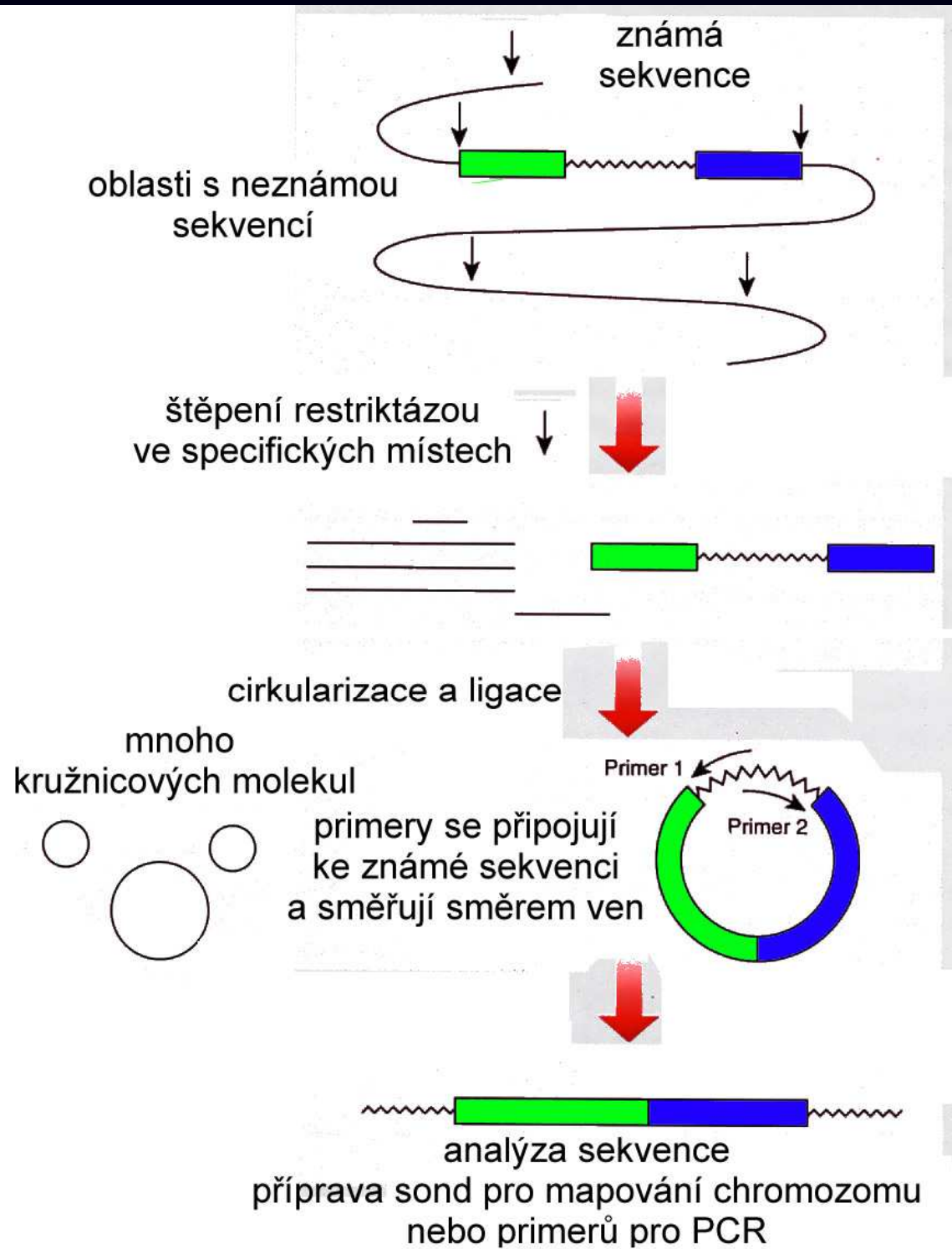
Cycseqpc.exe

- Podobně jako jiné DNA, lze produkty PCR sekvencovat.
- Templátem pro Sangerovu metodu jsou ssDNA. Pro jejich přípravu se používá se technika označovaná jako asymetrická PCR, při níž jsou tvořeny preferenčně ssDNA.
- Standardní PCR se založí s tím rozdílem, že výchozí koncentrace primerů se liší faktorem 100 (tj. jeden z primerů je ve 100 x vyšší koncentraci než druhý).
- Dvouřetězcové DNA fragmenty se tvoří až do doby, než se jeden z primerů nevyčerpá.
- Druhý primer pak dále syntetizuje pouze jeden z řetězců - i když se tento tvoří spíše lineárně než exponenciálně rychle, je jeho množství postačující pro sekvencování.



Obrácená PCR (I-PCR)

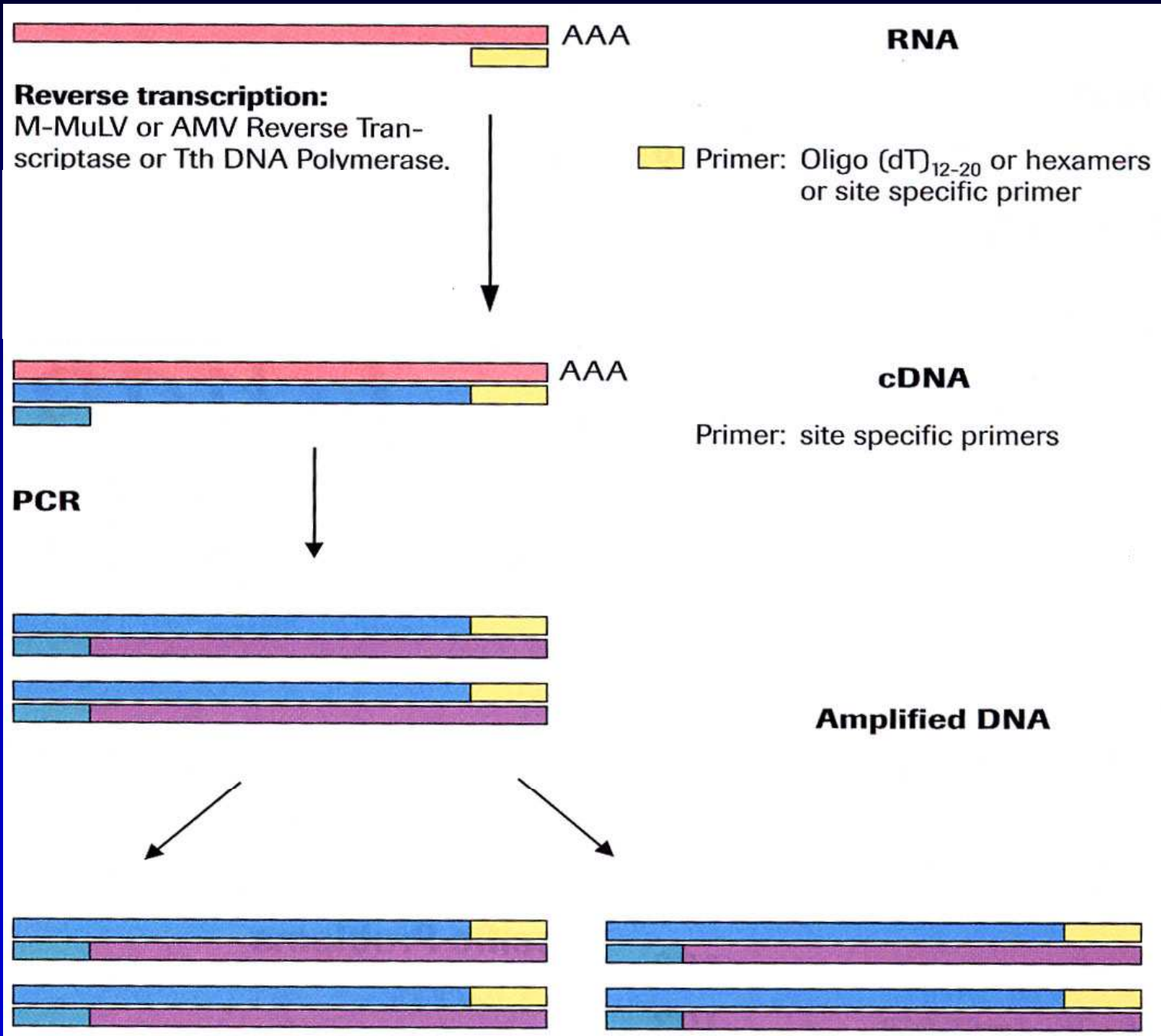
PCR umožňující
amplifikovat úseky DNA
o neznámé sekvenci
ohraňené na obou
stranách DNA se známou
sekvencí.



Zpětná (reverzní) PCR (RT-PCR) detekce sekvencí na RNA

- RNA nemůže sloužit jako templát pro PCR.
- Produkty RT-PCR se tvoří, jestliže je izolovaná RNA nejdříve převedena na cDNA pomocí retrovirové zpětné transkriptázy
 - ◆ M-MuLV = Moloney murine leukemia virus
 - ◆ AMV = avian myeloblastosis virusa poté amplifikována pomocí PCR se dvěma specifickými primery.
- Nevýhody: Zpětná transkriptáza je termolabilní a obvykle nefunkční nad 42°C. Navíc v některých případech znemožňuje převod RNA na cDNA, zejména při složité sekundární struktuře RNA.
- Současná technika:
 - ◆ Termostabilní Tth DNA polymeráza z *Thermus thermophilus* je schopná převést RNA na DNA (RNA dependentní DNA polymerázová aktivita) za přítomnosti Mn^{2+} iontů při 72°C.
 - ◆ Pomocí stejného enzymu je poté prováděna PCR reakce.
- Použití:
 - ◆ mRNA
 - ◆ virové genomy (např. hepatitis C virus, virus chřipky, pikornaviry)

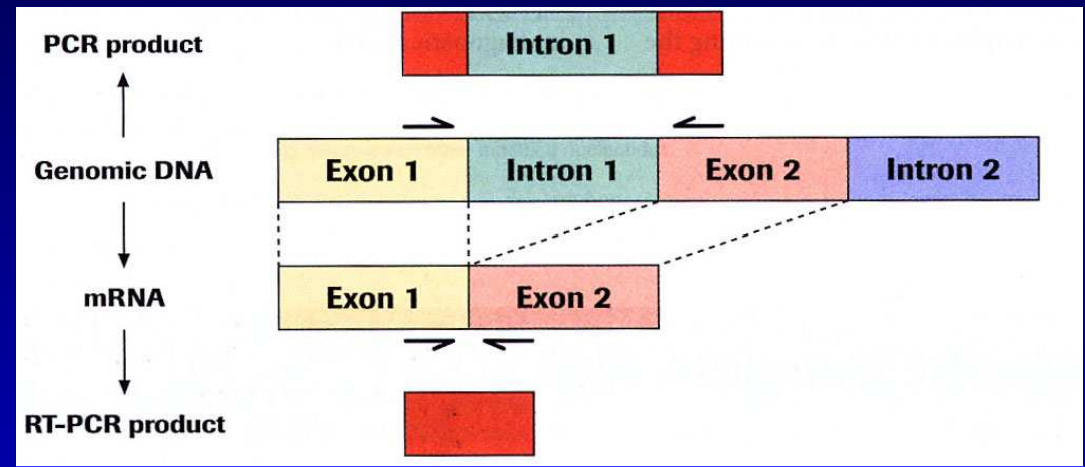
Princip RT-PCR



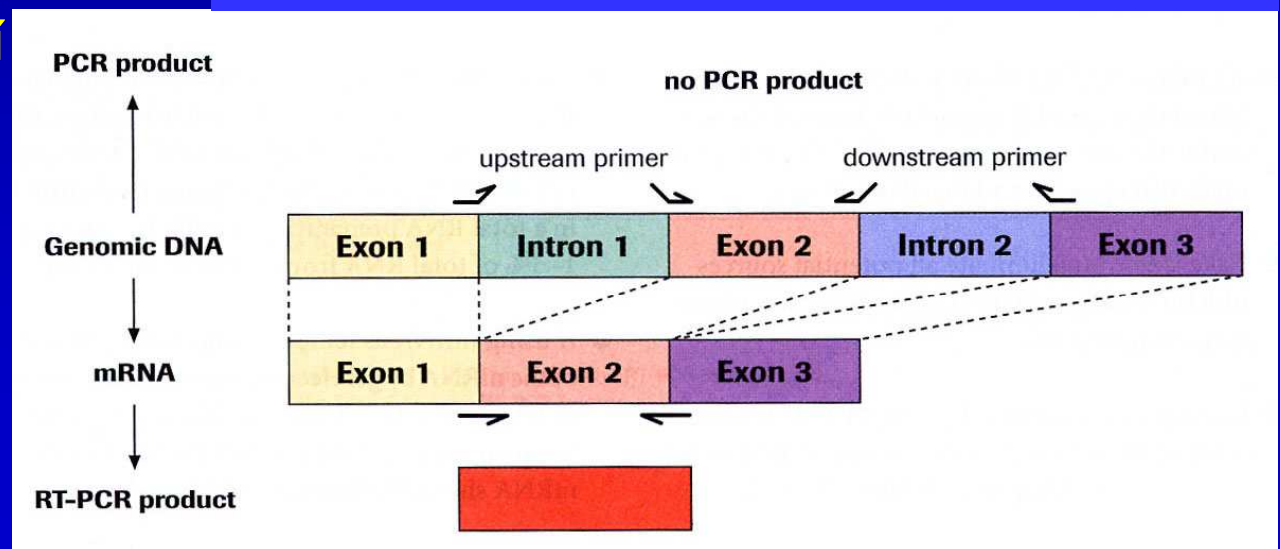
Návrh primerů pro RT-PCR

- RT-PCR amplifikace mRNA vyžaduje dvojici specifických primerů.
- Primery můžeme navrhnout tak, abychom odlišili produkty vznikací při RT-PCR a při standardní PCR s genomovou DNA.
- Dva přístupy pro návrh primerů:

- ◆ Primery, které se připojují k sekvenci 2 exonů na obou stranách určitého intronu. Amplifikační produkt z genomové DNA je větší než produkt RT-PCR.



- ◆ Primery komplementární k sekvenci na spojení exon/exon. Takové primery neamplifikují genomovou DNA.



Uspořádání RT-PCR reakce

■ Jednokroková RT-PCR

- ◆ *Tth* DNA polymeráza
- ◆ dvojice primerů
- ◆ syntéza cDNA za přítomnosti Mn^{2+}

■ Výhody:

- ◆ rychlost
- ◆ není riziko kontaminace
- ◆ vyšší citlivost (probíhá při vyšší teplotě)

■ Dvoukroková RT-PCR

- ◆ První krok: zpětná transkriptáza + oligo(dT)
- ◆ Druhý krok: Taq DNA polymeráza + dvojice primerů

■ Výhody:

- ◆ umožňuje optimalizovat zvláště zpětnou transkripci a zvláště PCR
- ◆ umožňují syntézu dlouhých produktů (až 14 kb)