

POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE (POLYMERASE CHAIN REACTION) PCR

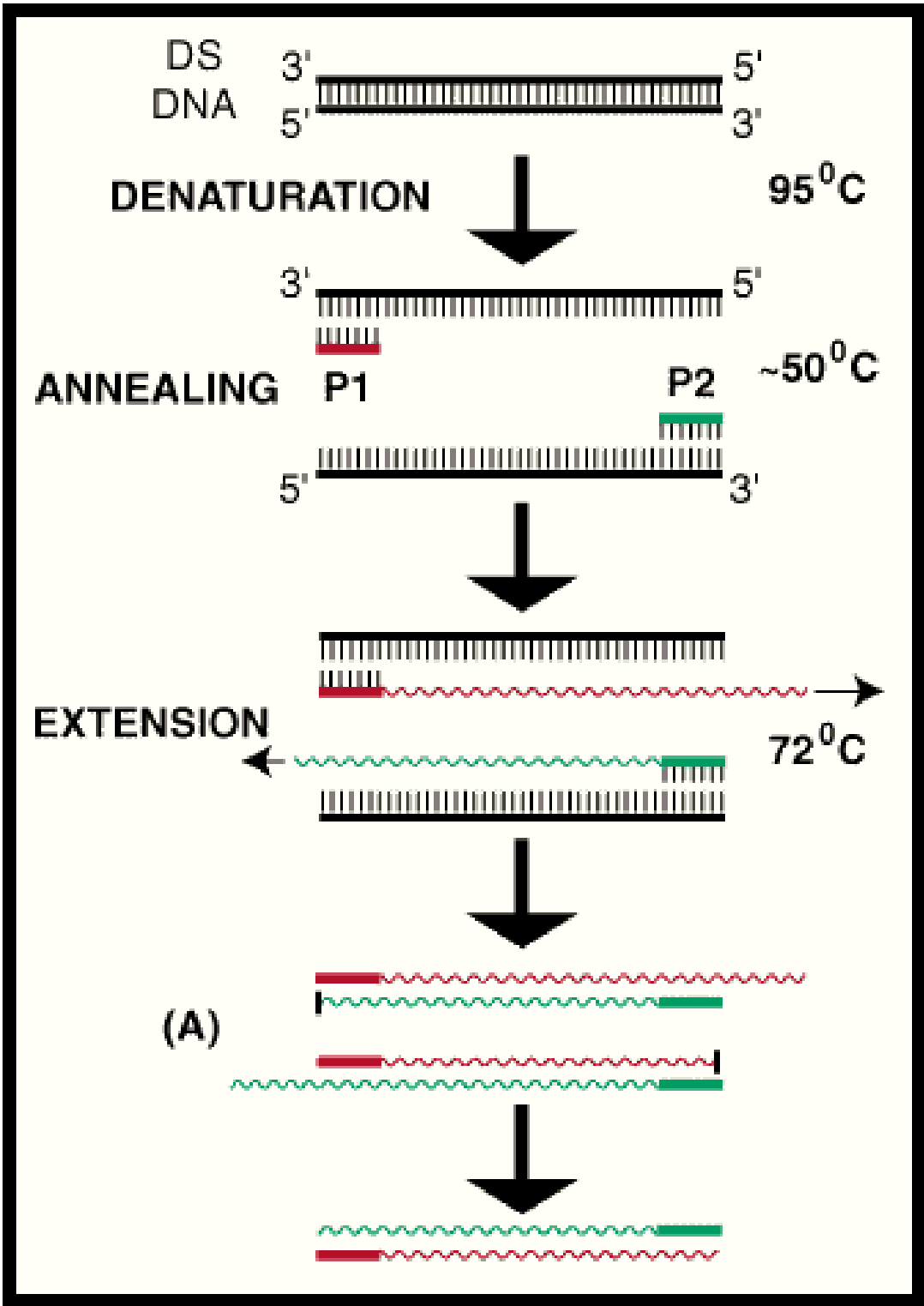
PCR umožňuje získat specifickou DNA sekvenci

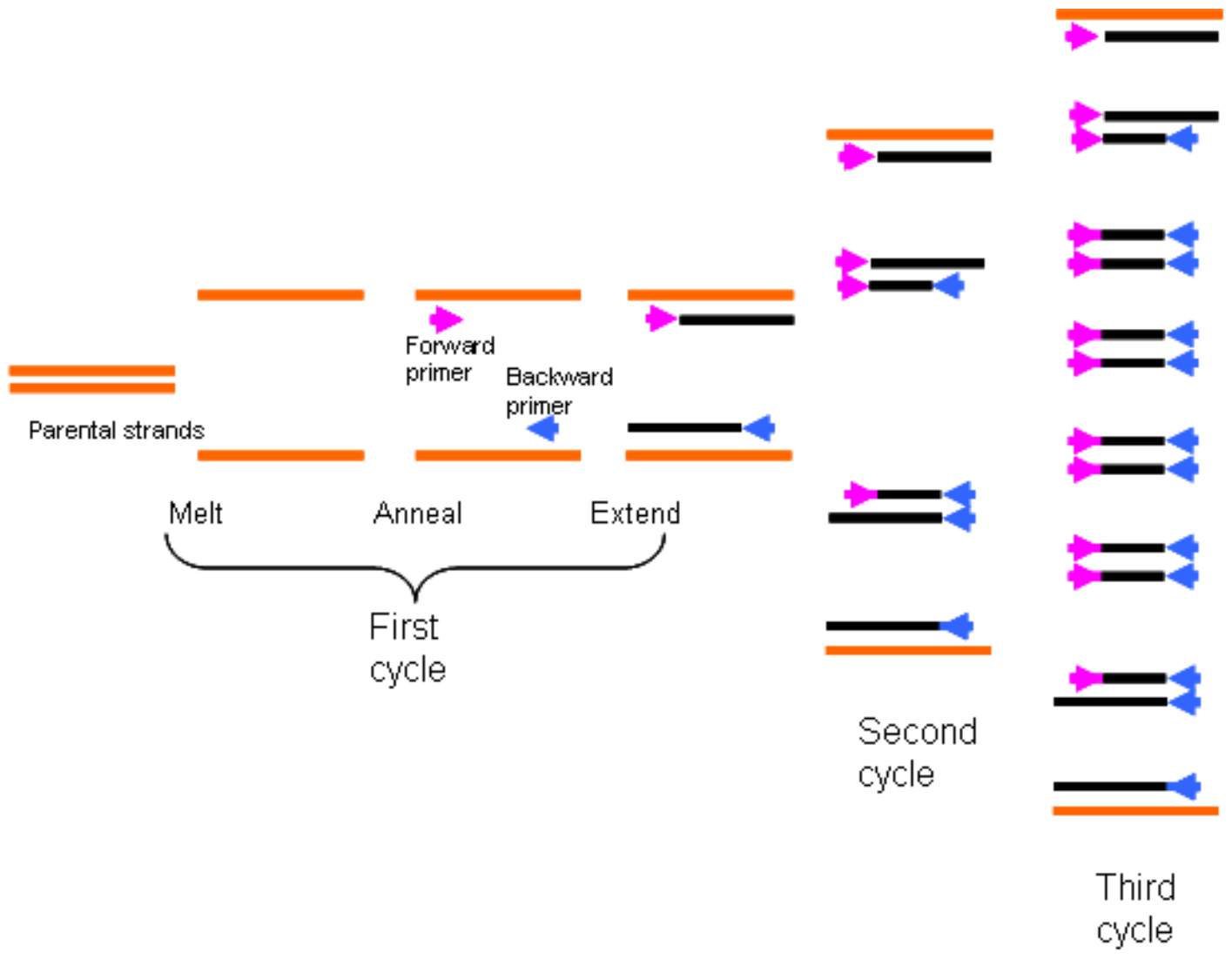
1983 – Kary Mullis (1993 – Nobelova cena)

Metoda pro mnohonásobné zmnožení (amplifikaci) specifického úseku DNA *in vitro* založená na principu (enzymatické syntézy) replikace DNA.

Replikace DNA *in vivo* vyžaduje mnoho enzymů
Replikace DNA *in vitro* vyžaduje pouze jeden enzym

Teoreticky lze získat 2^n řetězců (kopií).





PCR – Enzymatická syntéza

1. Jako **templát** slouží ssDNA, podle níž je syntetizován komplementární řetězec (**PCR produkt - amplikon**).
2. K zahájení reakce je zapotřebí **primer**, který se **připojuje** na komplementární úseky DNA. Tím je zároveň vymezen úsek DNA, který bude amplifikován.
K enzymatické syntéze PCR produktu dochází po připojení dvou primerů vzájemných se na protilehlé řetězce DNA tak, že jejich **3'-OH**-konce směřují proti sobě.
3. Jako templáty pro syntézu mohou sloužit **oba řetězce dsDNA**, po předchozí denaturaci.

PCR – Složení reakční směsi

1. Templátová nukleová kyselina (DNA).

Množství DNA jako výchozího materiálu je velmi nízké: obvykle postačuje méně než **1 μg 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^+ nebo Li^+ solí

4. Mg^{2+} 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)

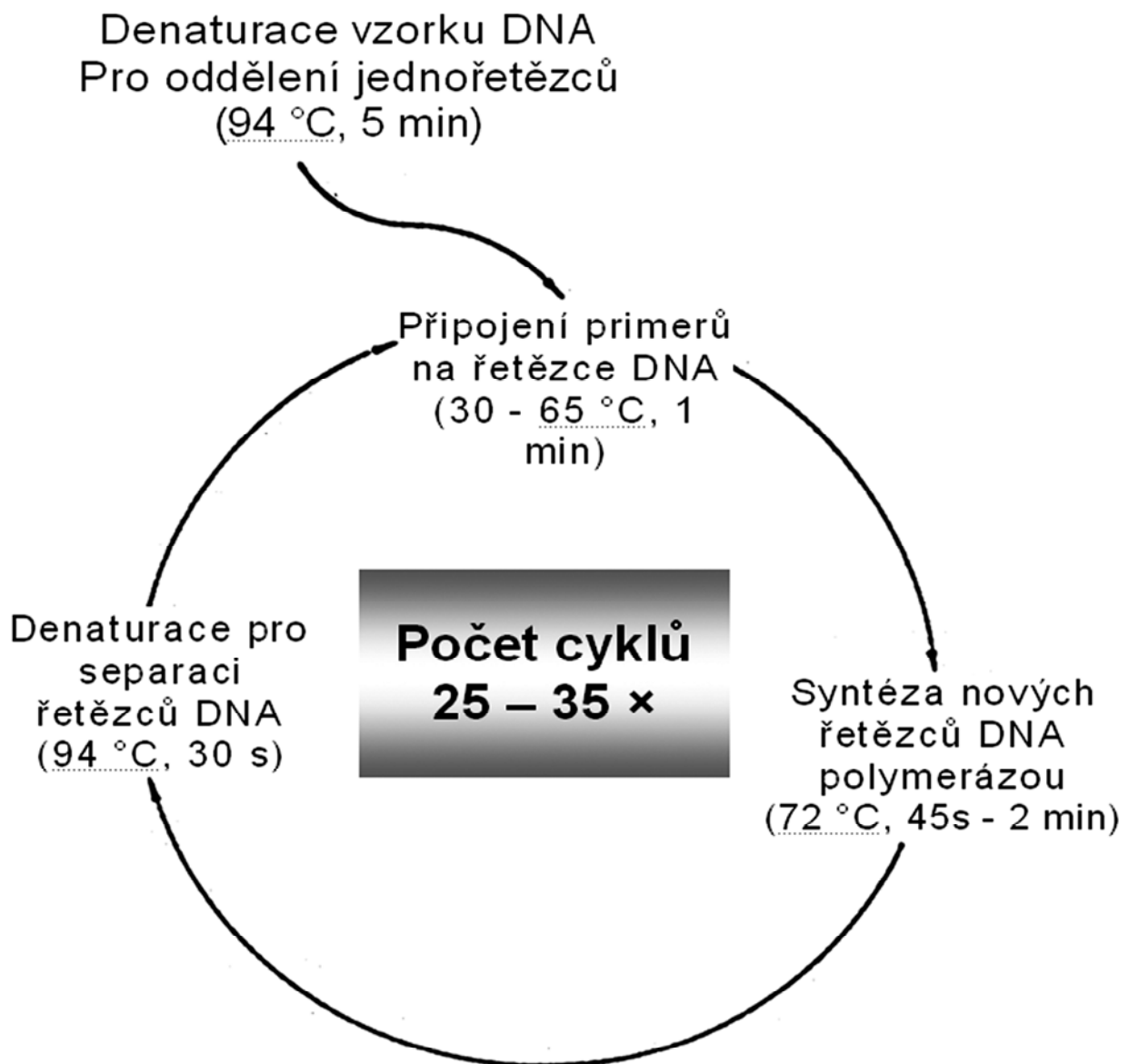
Tth *Thermus thermophilus* (5'-exonukleáza) delší úseky

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 specifčnost 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.**
- 5. Závěrečná extenze se provádí obvykle po posledním cyklu (72°C / 5 min) a slouží k dokončení syntézy a renaturaci jednořetězcových produktů.**

Proces amplifikace



PCR - 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 μM** .

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.

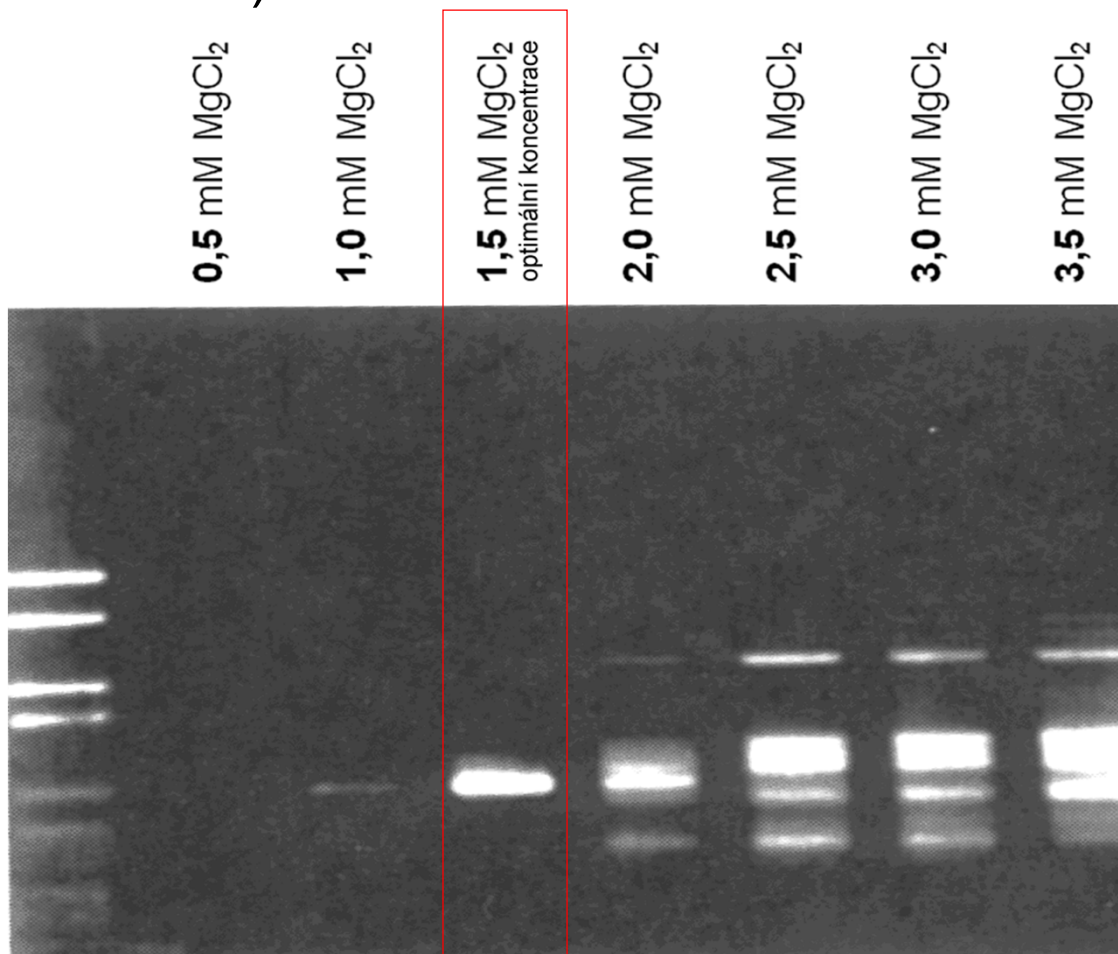
PCR – optimalizace koncentrace MgCl_2

MgCl_2

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

Pro dosažení nejlepšího výsledku vždy stanovujeme koncentraci Mg^{2+} experimentálně.

Optimální koncentrace může kolísat od **1 mM** do **5 mM**. Nejčastěji používaná koncentrace je **1,5 mM** (pro 200 mM dNTP).



PCR – optimalizace reakce

DNA polymeráza.

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

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

Příklad složení pufru pro PCR:

10 mM Tris; pH 8.3

50 mM KCl

1,5 mM MgCl₂

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)

Minerální olej – zabraňuje vypařování během reakce

PCR – 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:


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

kde 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


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





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

Or, upload FASTA file Soubor nevybrán.

Range

	From	To	
Forward primer	<input type="text"/>	<input type="text"/>	 Clear
Reverse primer	<input type="text"/>	<input type="text"/>	

PCR product size	<input type="text" value="70"/>	<input type="text" value="1000"/>		
# of primers to return	<input type="text" value="10"/>			
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"/> 

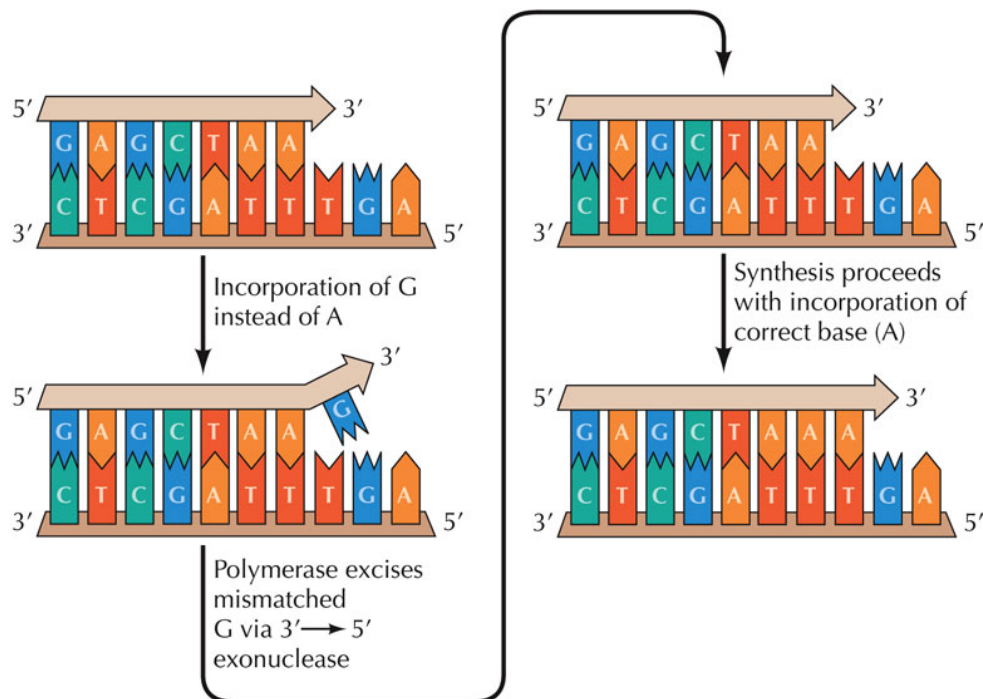
Specificity check	<input checked="" type="checkbox"/> Enable search for primer pairs specific to the intended PCR template 
Search mode	<input type="text" value="Automatic"/> 
Database	<input type="text" value="Refseq mRNA"/> 
Organism	<input type="text" value="Homo sapiens"/> <small>Enter an organism name, taxonomy id or select from the suggestion list as you type. </small>

- netvoří sekundární struktury, nejsou komplementární navzájem, nemají více vazebných míst na DNA, ...

Chybovost PCR

Taq polymeráza – chyba s frekvencí 2×10^{-4}

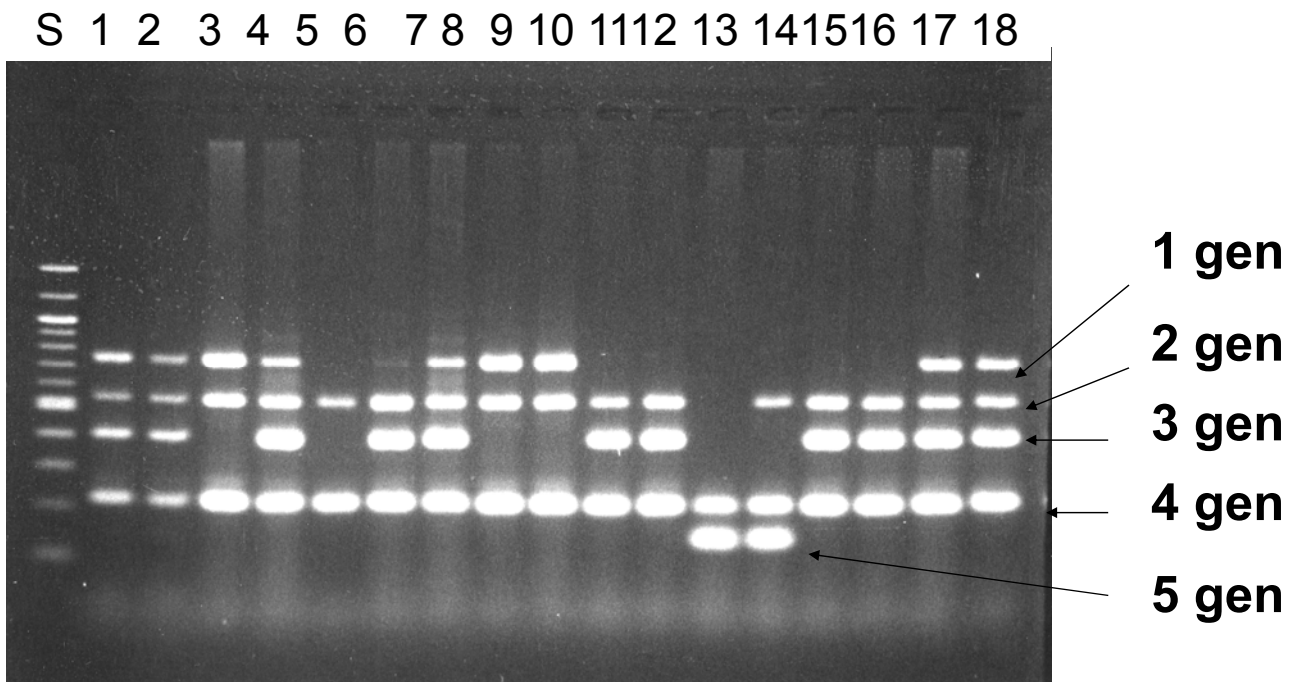
- problém při klonování DNA → mutace
- buňka má opravné mechanismy
- In vitro - použití dvojice DNA polymeráz, z nichž jedna má schopnost proofreading



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



PCR - využití metod PCR

1. Základní výzkum

izolace genů nebo jejich částí

sekvencování DNA

mutageneze 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

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

Složení PCR reakce:

destilovaná voda	16,5 ul
10x PCR pufr	2,5 ul
10mM směs dNTP	0,5 ul
20uM forward primer	2 ul
20uM reverse primer	2 ul
100 ng plazmidové DNA	1 ul
<u>Taq polymeráza (5U/ul)</u>	<u>0,5 ul</u>
celkem	25 ul