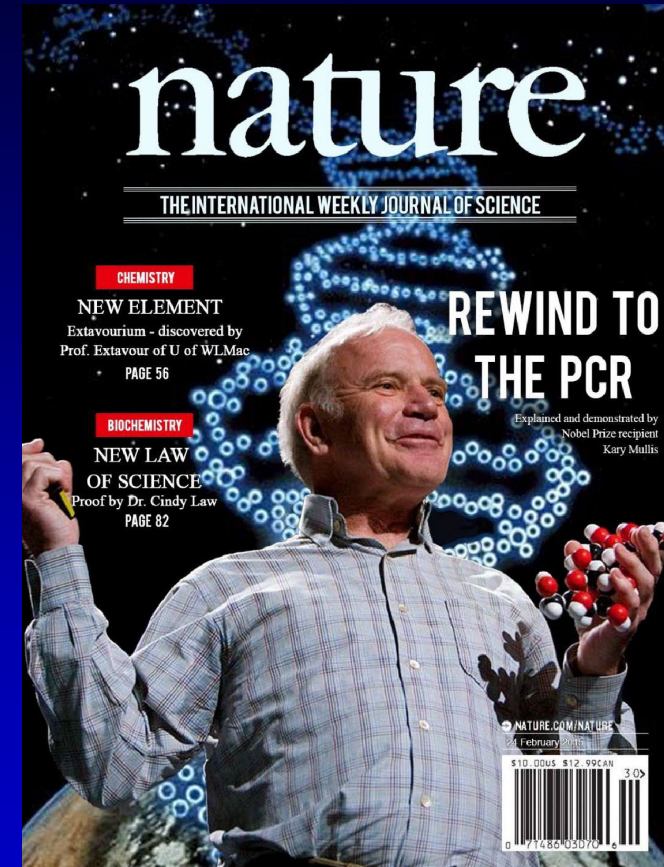


# Polymerázová řetězová reakce (PCR)

- 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

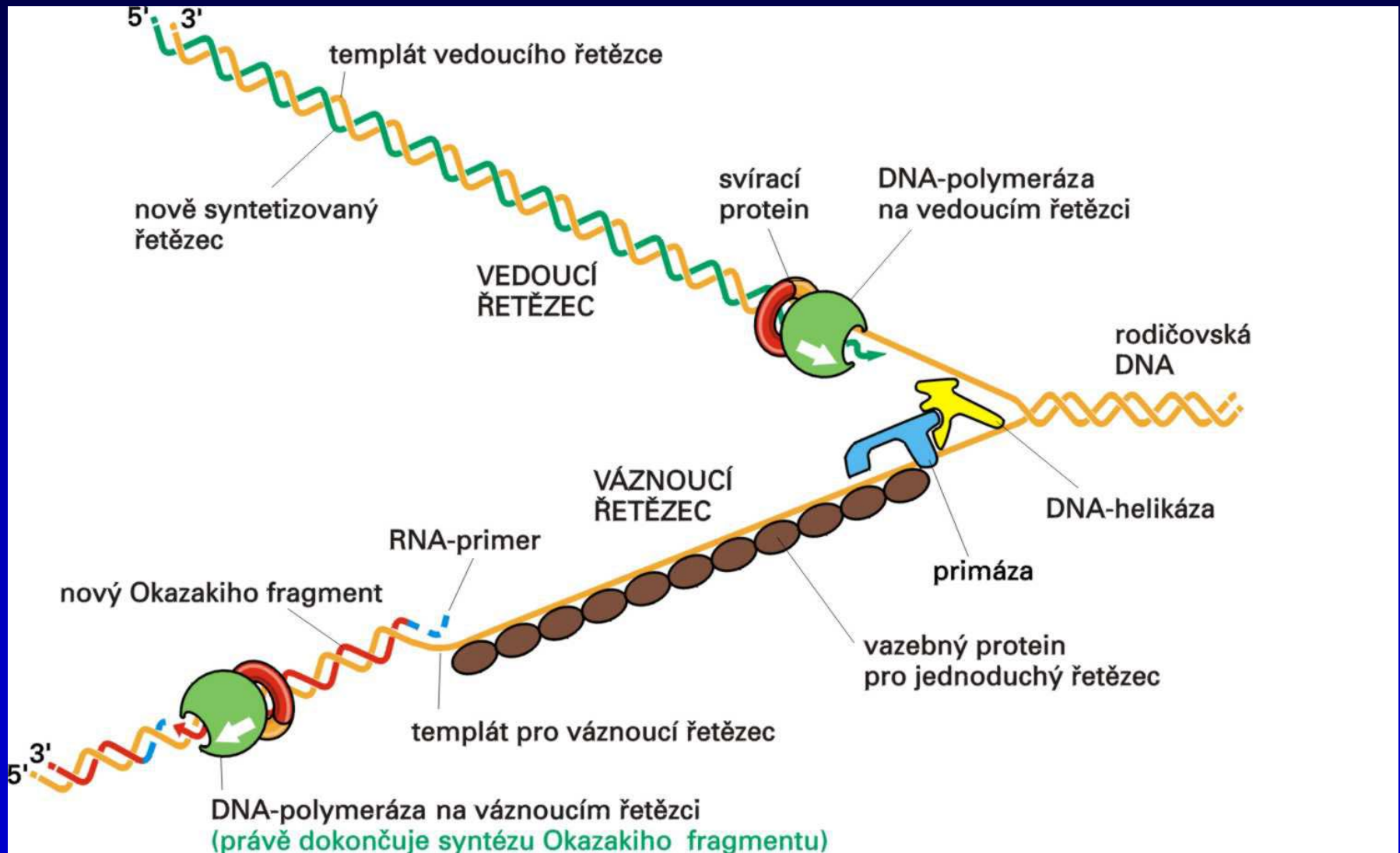


# Počet nově syntetizovaných molekul dsDNA při jednotlivých cyklech PCR

$$2^n$$

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

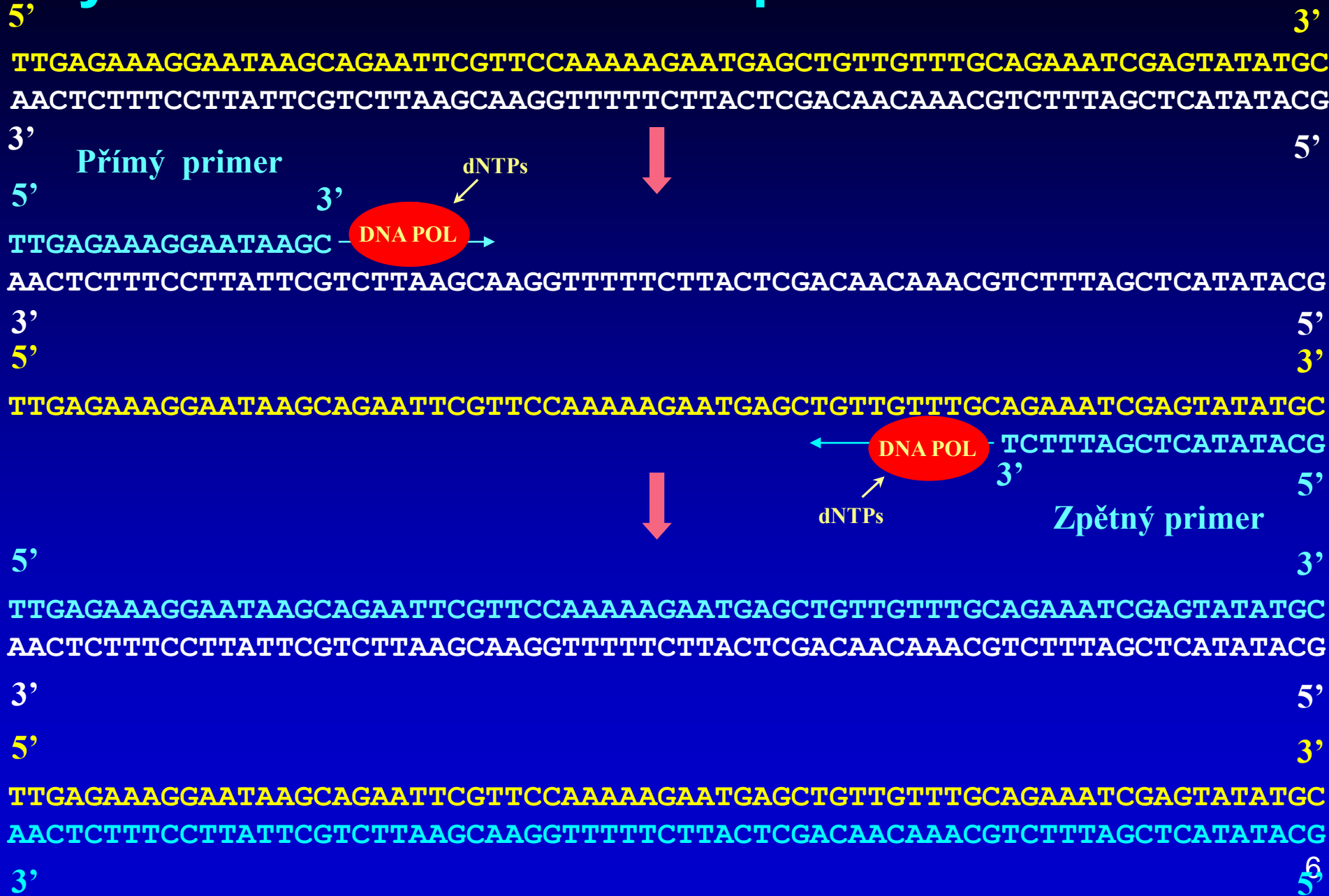




# Replikace DNA *in vitro* vyžaduje pouze jeden enzym

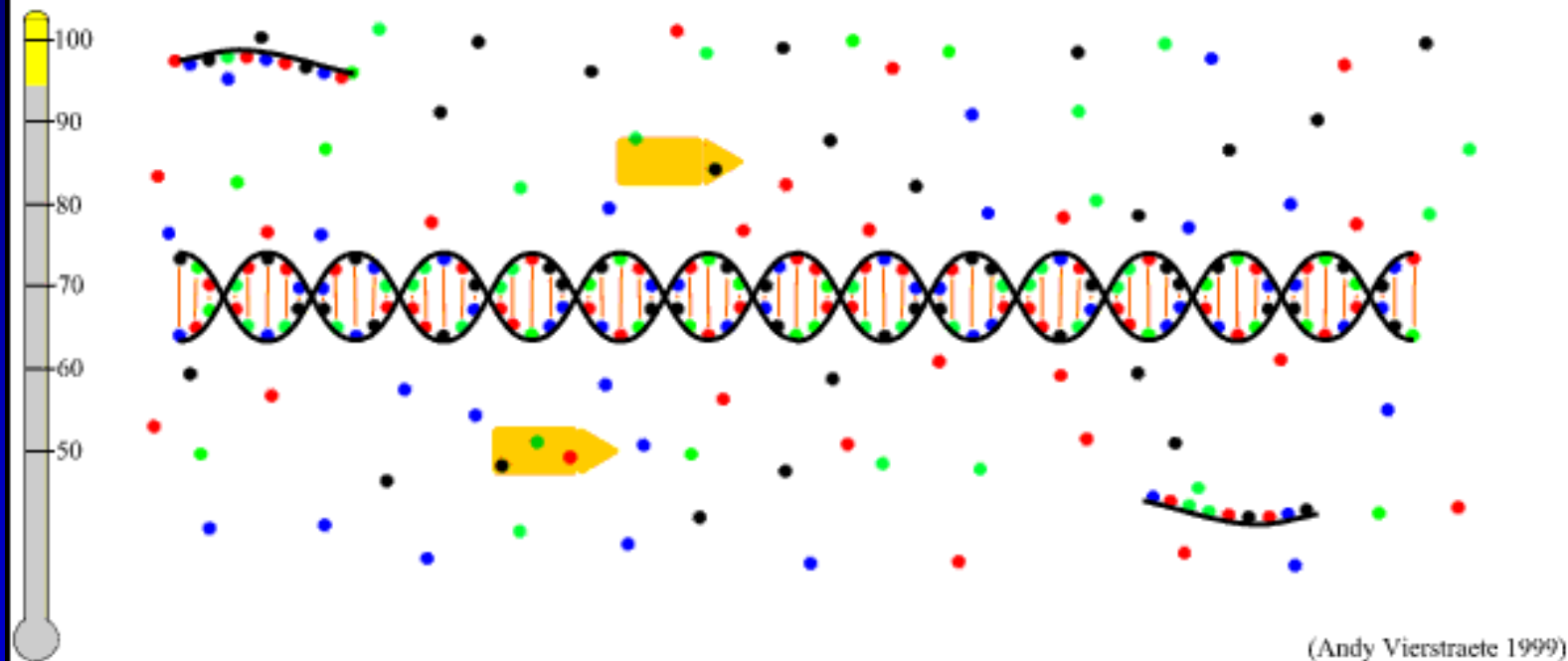
- **Reakční směs obsahuje:**
  - ◆ **Templátovou nukleovou kyselinu** (DNA nebo RNA).
    - ◆ Množství DNA jako výchozího materiálu je velmi nízké: obvykle postačuje méně než 1  $\mu\text{g}$  genomové DNA, teoreticky postačuje jedna molekula.
      - Kvalita templátu ovlivňuje výsledek PCR.
      - Velké množství RNA může vázat ionty  $\text{Mg}^{2+}$
      - 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  $\text{Na}^+$  nebo  $\text{Li}^+$  solí
- **$\text{Mg}^{2+}$  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*

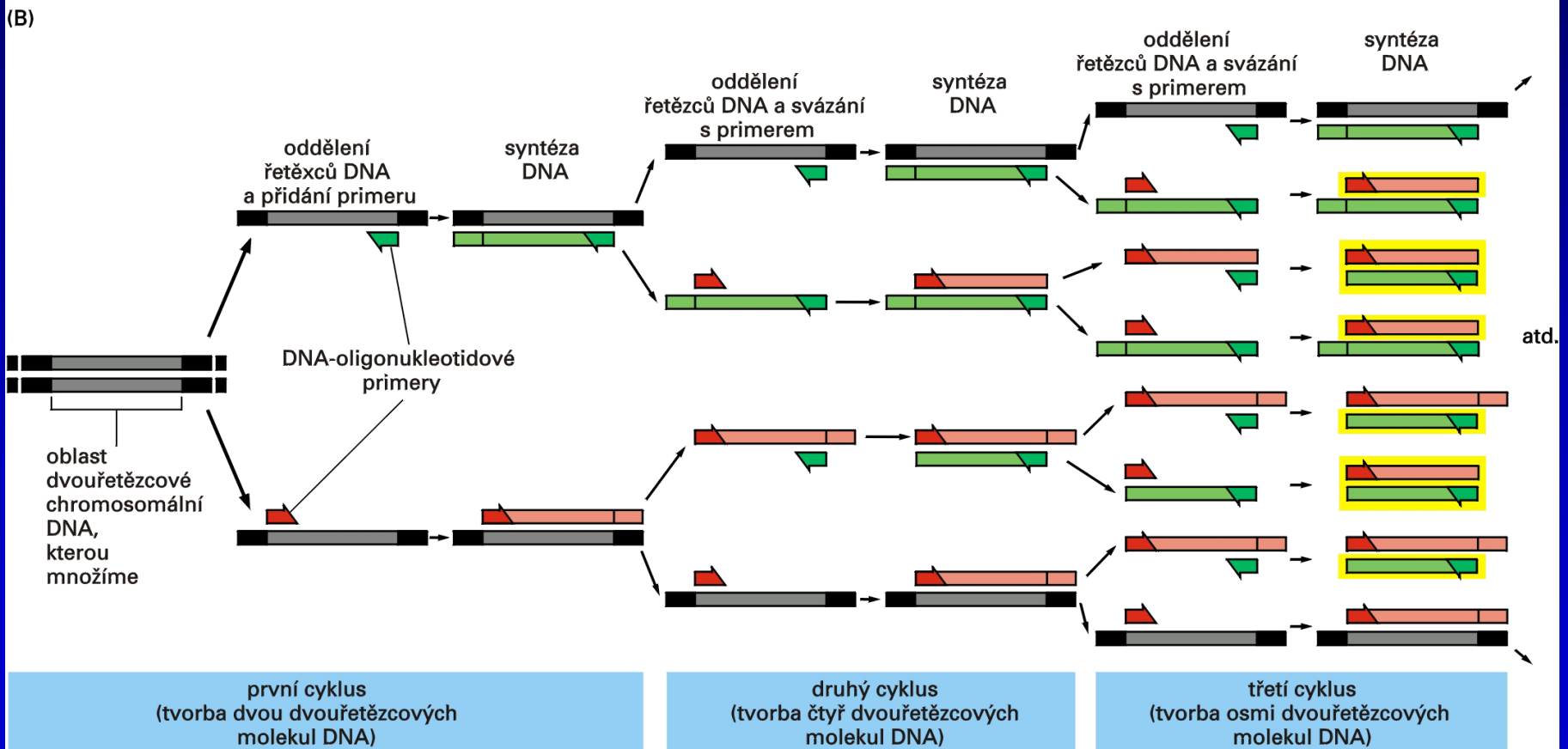
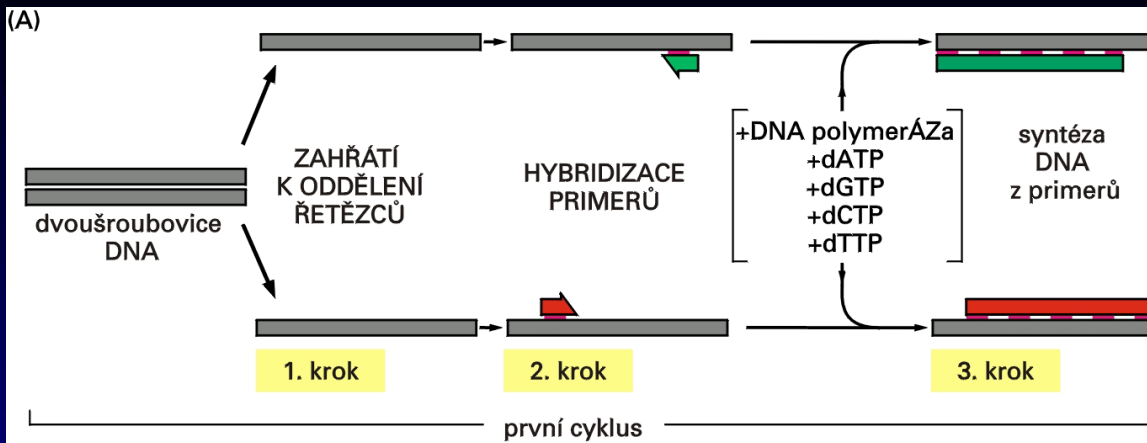
# Syntéza obou řetězců u specifické sekvence



PCR :

Denaturation 94°C







# 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 nescifické vazbě primerů („self-priming“) a možným falešným výsledkům.

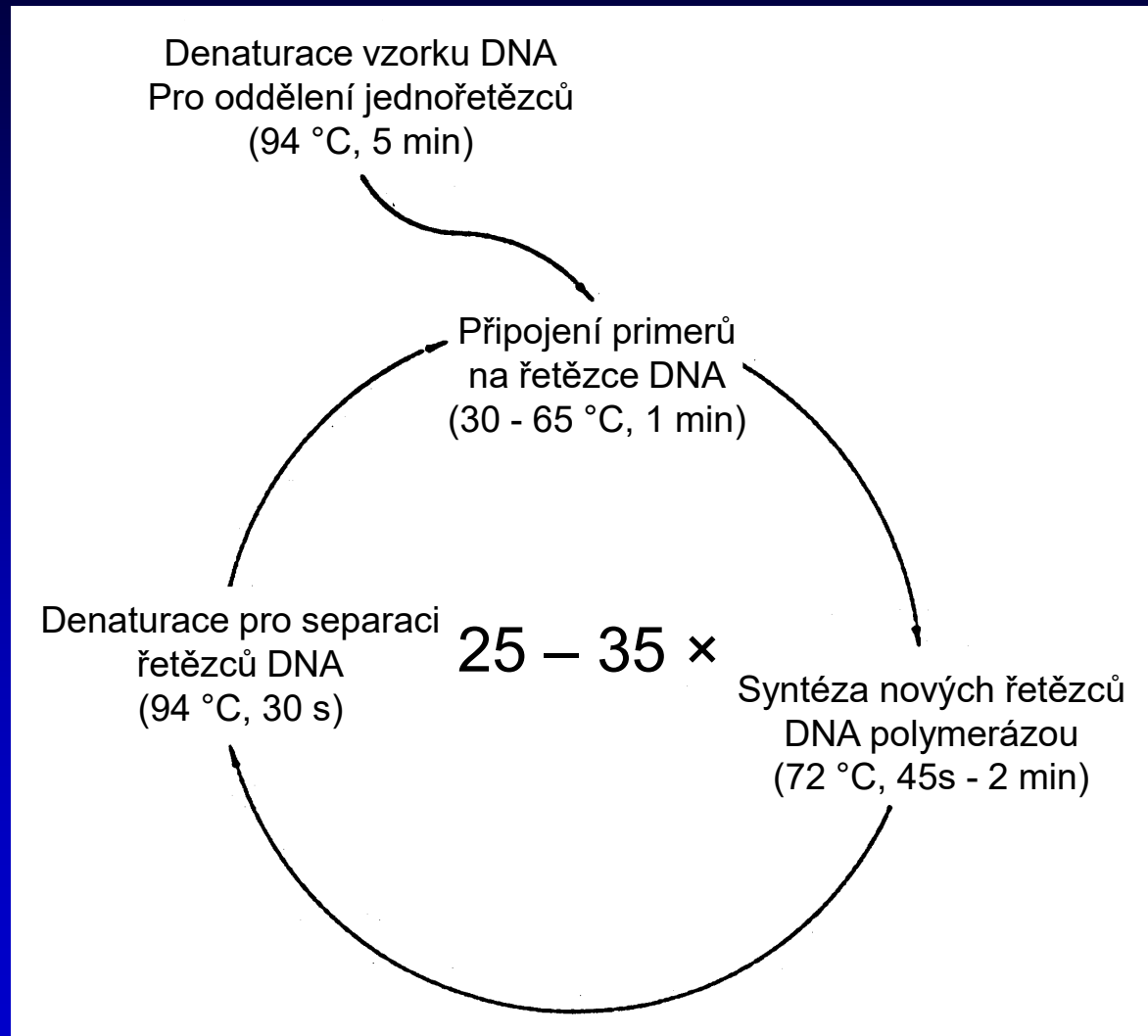
## Vlastní řetězová reakce:

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.

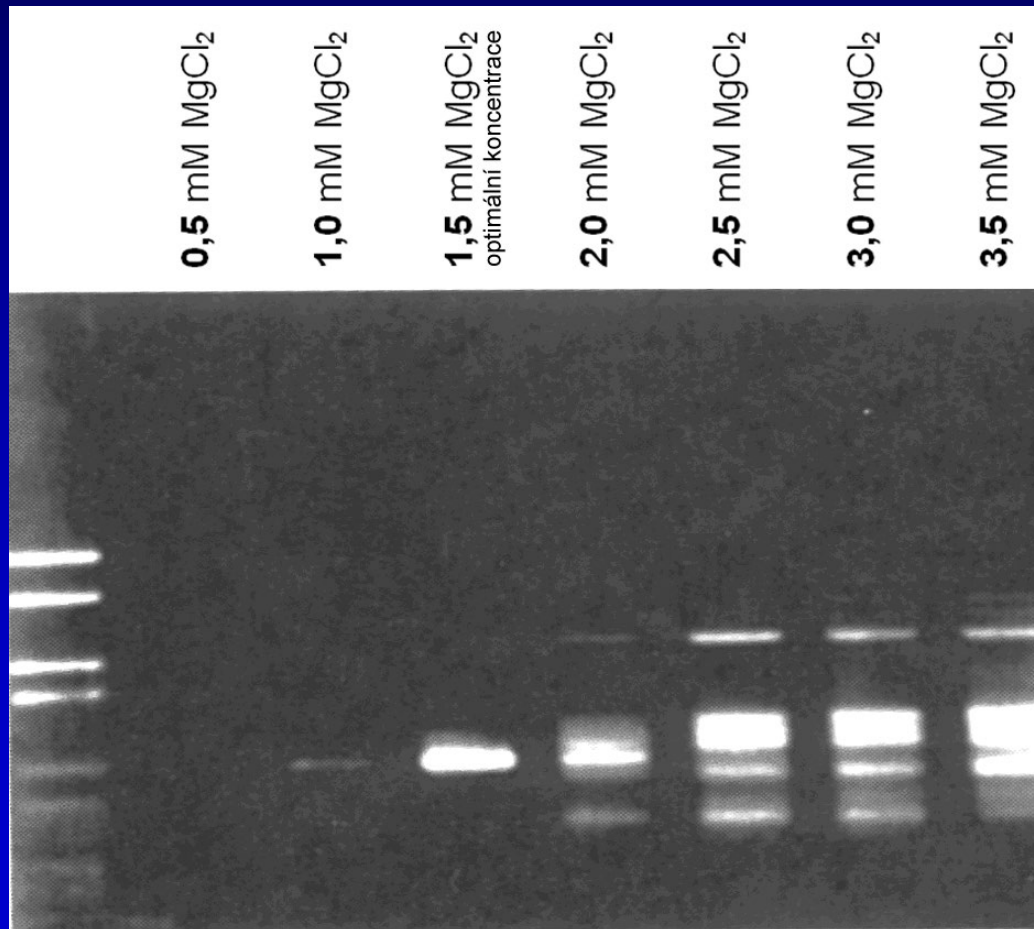
# REAKČNÍ PODMÍNKY PCR



# 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  $\mu\text{M}$ .
  - ◆ U některých systémů může vyšší koncentrace (až 1  $\mu\text{M}$ ) zlepšit výsledky.
  - ◆ 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.

- **MgCl<sub>2</sub>**. Volné Mg<sup>2+</sup> ionty ovlivňují aktivitu enzymu a zvyšují hodnotu T<sub>m</sub> u dsDNA.
  - ◆ Pro dosažení nejlepšího výsledku vždy stanovujeme koncentraci Mg<sup>2+</sup> 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  $\mu$ l.

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

## ■ Přídavné látky mohou v některých případech ovlivnit účinnost a specifčnost PCR reakce. Jejich vliv se obvykle určuje experimentálně:

- ◆ albumin z bovinního séra (BSA) (100 ng/50  $\mu$ l)

- ◆ dimetylsulfoxid (DMSO) (2- 10 % v/v) – redukce nespecifické vazby primeru

- ◆ detergenty (Triton X-100, Tween 20)

- ◆ betain (0,5 – 2 M)

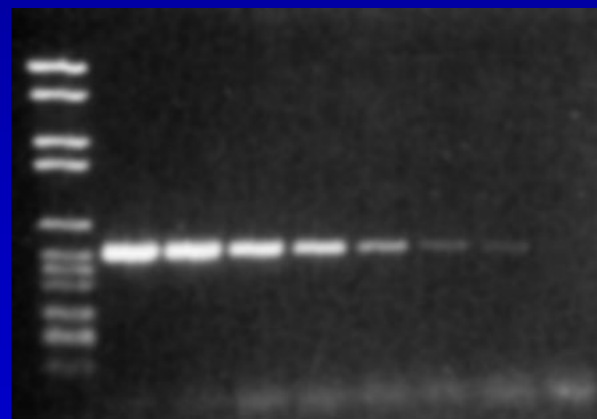
- ◆ želatina

- ◆ glycerol (1 – 5 % v/v)

- ◆ spermidin

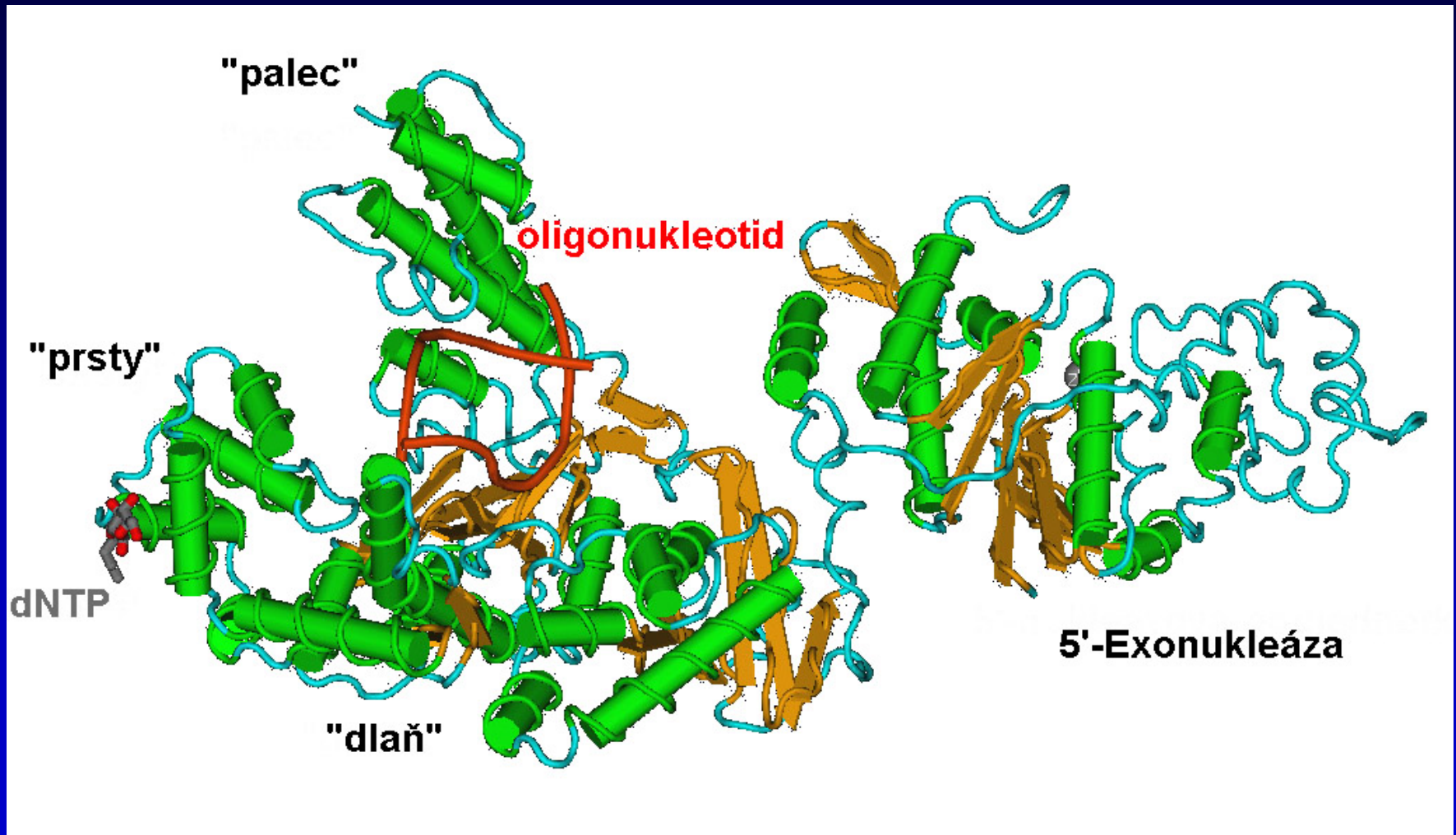
- ◆ protein 32 genu fága T4

optimalizace PCR přídavnými látkami:



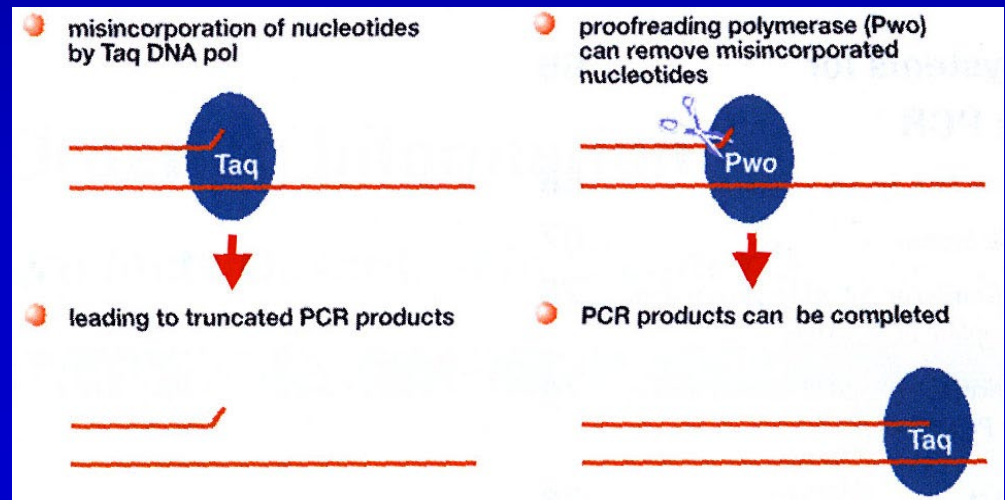
## ■ Minerální olej – zabraňuje vypařování během reakce

# 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  $2 \times 10^{-4}$ .
- 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  $T_m^{\text{Primer}}$  je hodnota  $T_m$  nejméně stabilního páru primer-matrice a  $T_m^{\text{Produkt}}$  je hodnota  $T_m$  amplifikačního produktu.

- Orientačně lze vypočítat  $T_a$  podle vztahu:

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



# NÁVRH PRIMERŮ PRO STANDARDNÍ PCR

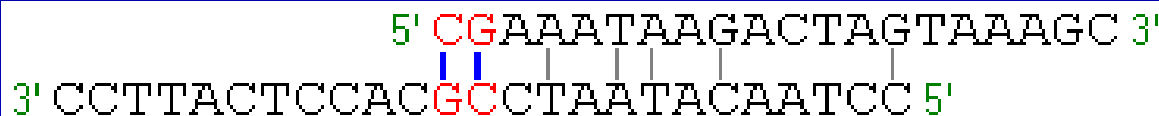
- ◆ 18 – 25 bází dlouhé
- ◆ neobsahují vnitřní sekundární struktury
- ◆ obsahují 40 – 60 % G+C
- ◆ mají rovnoměrnou distribuci oblastí bohatých na G/C a A/T páry
- ◆ nejsou komplementární navzájem na 3'-koncích, takže nevytvářejí navzájem nebo samy se sebou duplexy
- ◆ na matricové DNA nemají falešná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



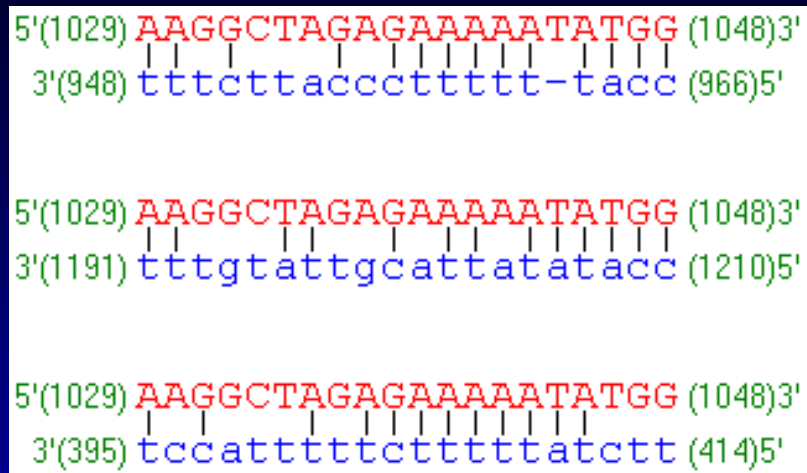
- Správně navržená dvojice primerů, která vytváří pouze málo stabilní duplex na 5'-konci; na 3'-konci je G nebo C zaručující stabilní párování s templátem:



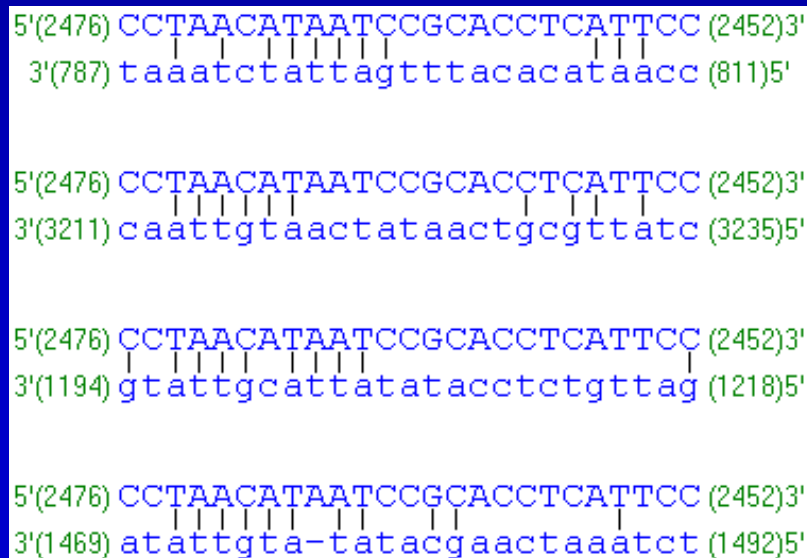
- Chybně navržený primer, vytvářející vlásenku:



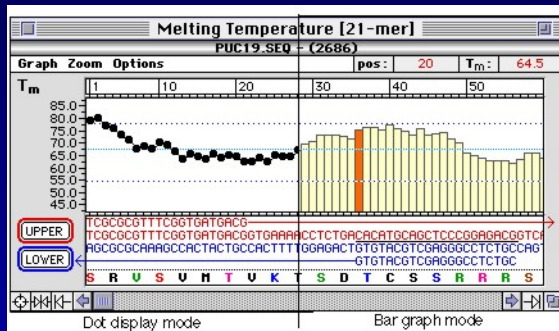
- Nesprávně navržený primer s falešnými vazebnými místy na templátové DNA:



- Správně navržený primer, který nemá falešná vazebná místa na templátu:



# 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' CCCGCTGATGAATGTCATC 3'  
Length: 21-mer  
5' Position: 1373  
T<sub>m</sub>: 72.1 °C  
ΔG (25 °C): -42.7 kcal/mol  
Degeneracy: 1  
P.E.#: 492  
1/E: 5.30 nmol/A<sub>260</sub>  
34.0 μg/A<sub>260</sub>

**Current Oligo (- strand)**

5' GATGAGCATTATCAGGCG66 3'  
P.E.#: 537  
1/E: 4.80 nmol/A<sub>260</sub>  
31.7 μg/A<sub>260</sub>

**Selected Primers**  
pCBlu3\_seq

**pCBlu3:269U21 Upper Primer**

5' CGGCGCCAGATCGGTACCCA 3'  
Length: 21-mer  
5' Position: 269  
T<sub>m</sub>: 76.9 °C  
ΔG (25 °C): -46.1 kcal/mol  
Degeneracy: 1  
P.E.#: 542/542  
1/E: 5.12 nmol/A<sub>260</sub>  
33.1 μg/A<sub>260</sub>

**pCBlu3:817L21 Lower Primer**

5' TACCGGTTGGACTCAAGACG 3'  
Length: 21-mer  
3' Position: 817  
T<sub>m</sub>: 69.5 °C  
ΔG (25 °C): -41.4 kcal/mol  
Degeneracy: 1  
P.E.#: 502/502  
1/E: 4.89 nmol/A<sub>260</sub>  
32.0 μg/A<sub>260</sub>

**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) ccaaaaaggctcagtgctgc (6310)5'

Priming efficiency: 205 (above the threshold)

5'(6328) GGTTCCTCCAGTCACGACG (6310)3'  
3'(626) agcaaatggctc--tgctgc (610)5'

Priming efficiency: 194 (above the threshold)

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

Priming efficiency: 185 (above the threshold)

5'(6328) GGTTCCTCCAGTCACGACG (6310)3'  
3'(5125) tcctagtgctcagtg--tgctgc (5108)5'

Priming efficiency: 121

5'(6328) GGTTCCTCCAGTCACGACG (6310)3'  
3'(5989) agaaaaggctc--gctcgc (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) ccaaaaagcgggaac tgc (5762)5'

**PCR**  
pCBlu3\_seq

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

	Position and Length	T <sub>m</sub> [°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<sub>m</sub> - Upper Primer T<sub>m</sub>: 15.8  
Primers T<sub>m</sub> 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**

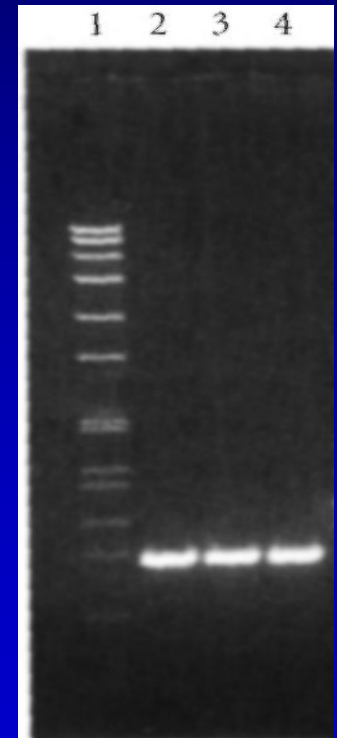
- ◆ např. oligonukleotidy specificky se vážající na polymerázu

# DETEKCE AMPLIFIKOVANÉHO PRODUKTU PCR

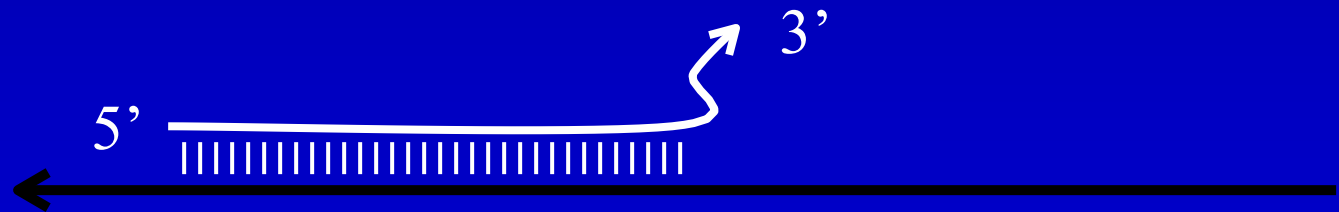
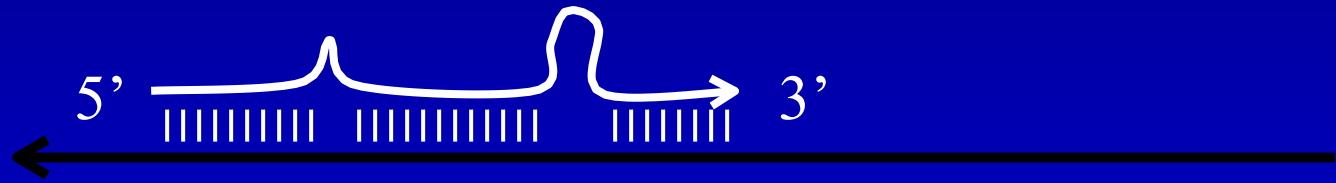
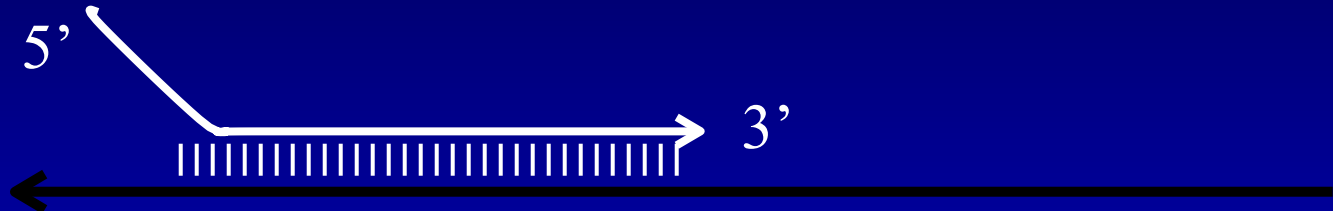
1. Stanovení fyzikální velikosti produktu gelovou elektroforézou (agaróza, polyakrylamid). Detekce obarvením a pozorování pod UV světlem.
2. Ověření specifičnosti produktů
  - Štěpení produktu restričními enzymy a posouzení spektra vznikajících restričních fragmentů (PCR-RFLP)
  - Sekvencování
3. Detekce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

Příklad standardní gelové elektroforézy s produkty PCR v agarózovém gelu.

1 = hmotnostní st.  
2 - 4 = produkty PCR



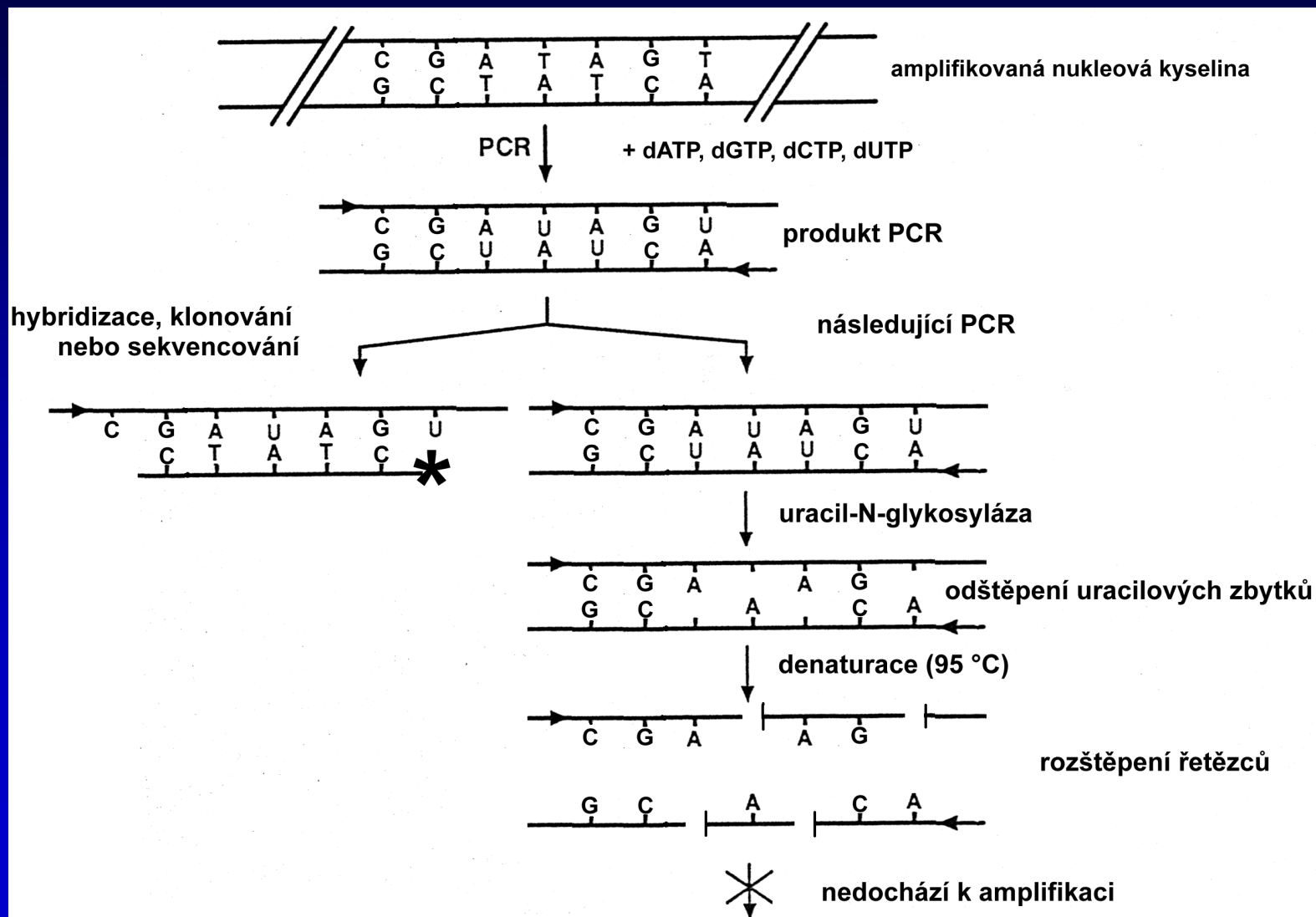
# Kdy je primer ještě primerem?



# 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 reagencií 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

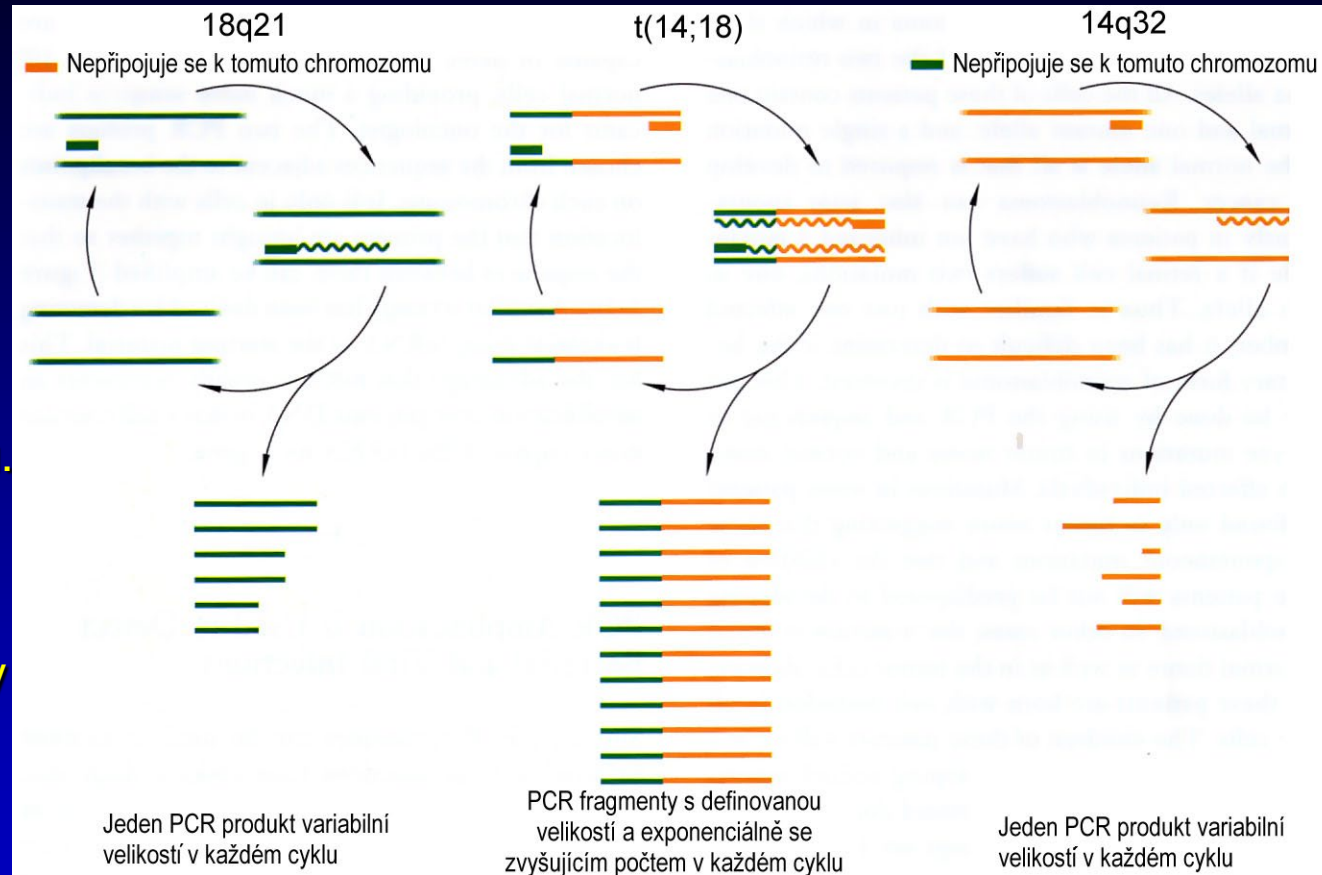
- ◆ archeologie
- ◆ soudnictví
- ◆ kriminalistika

# 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.

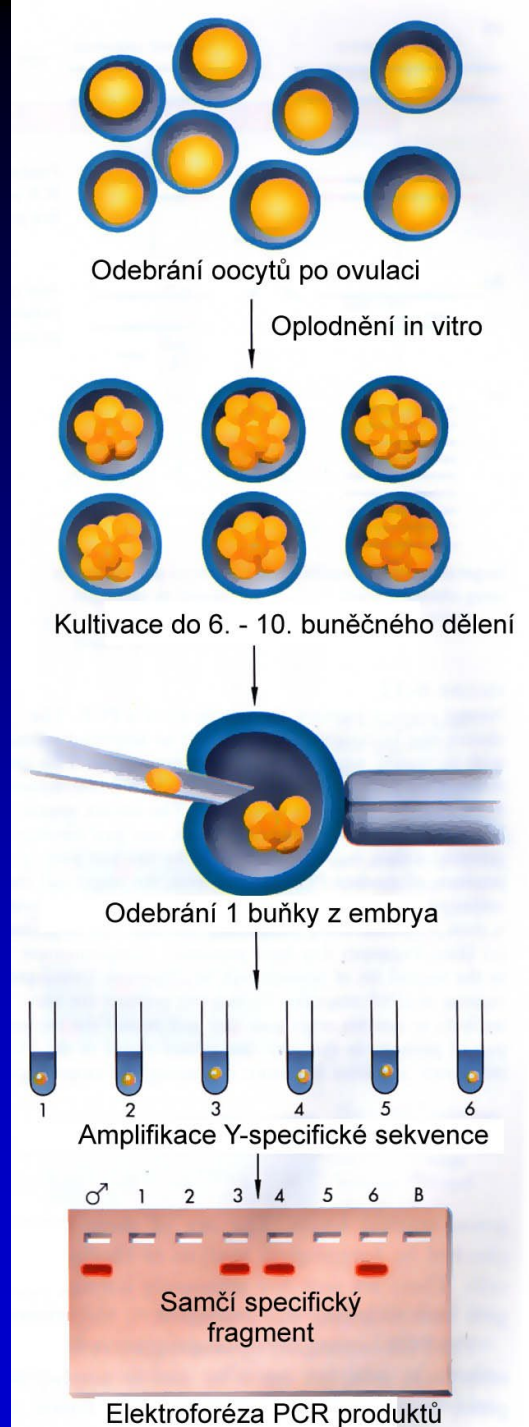
# PCR je používána k monitorování terapie rakoviny

- 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 konstantní 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.



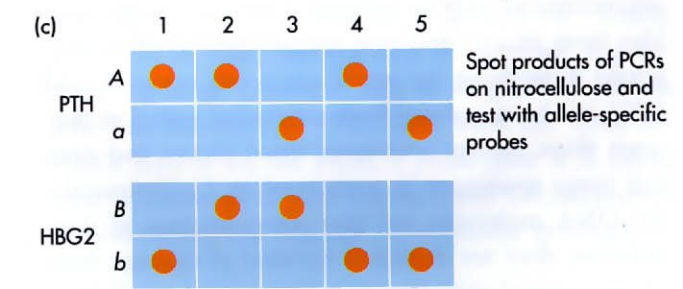
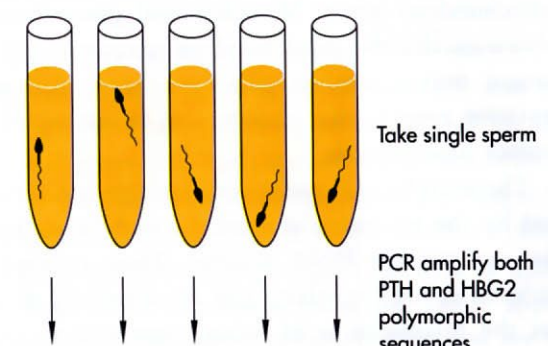
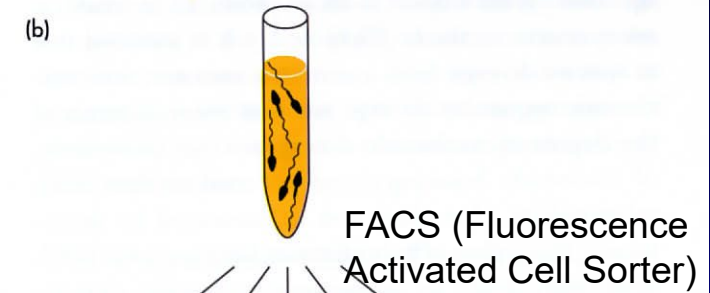
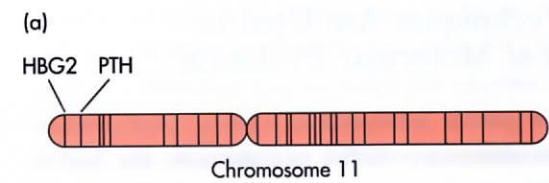
# PCR je používána ke stanovení pohlaví u prenatálních buněk

- 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 popodorbí amplifikací 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



(d)

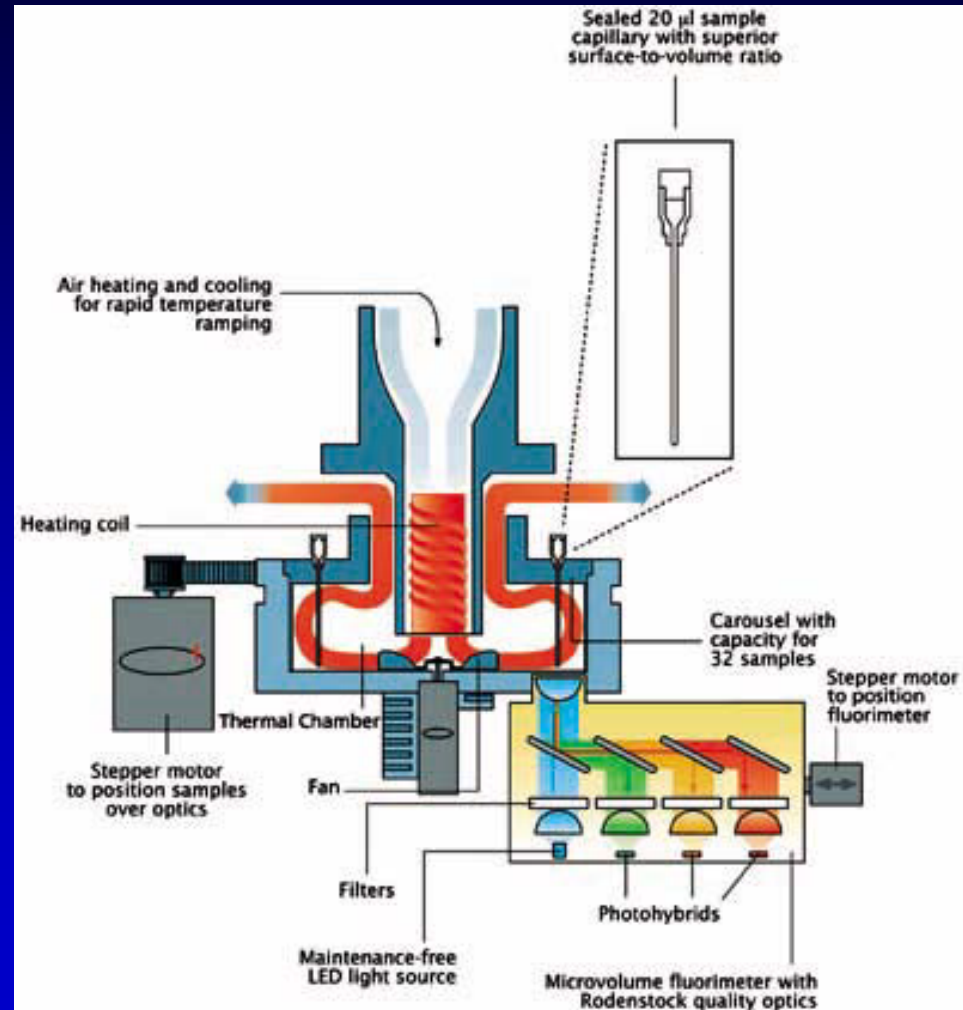
Sperm number	1	2	3	4	5
Haplotype	Ab	AB	aB	Ab	ab

Derive the haplotype of each sperm and calculate linkage between PTH and HBG2

- a) Polohy lokusu genu pro paratyroidní hormon (PTH) a lokusu Gg-globinového genu (HBG2) se nacházejí na krátkém rameni lidského chromozomu 11.
- b) Jednotlivé spermie se přenesou do zkumavek, amplifikace obou lokusů proběhne současně za použití dvou sad primerů
- c) 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.
- d) Z autoradiogramu lze odečíst haplotypy každé ze spermií, z nich pak vypočítat frekvenci rekombinace mezi oběma lokusy a stanovit genetickou vzdálenost mezi nimi.

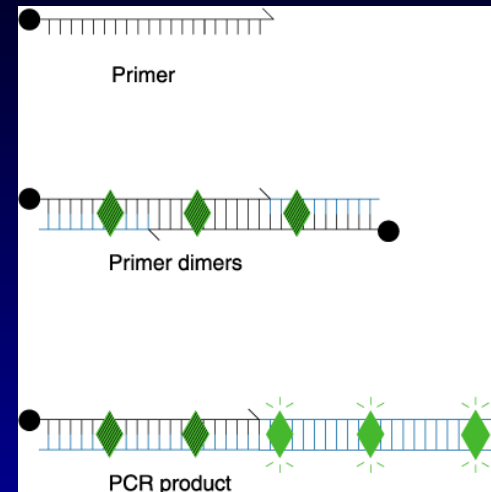
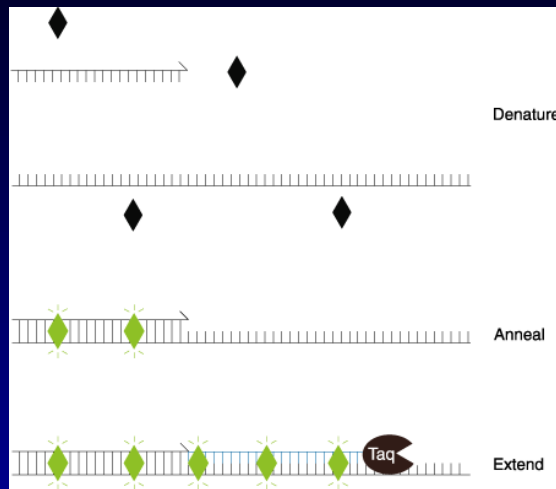
# Kvantitativní PCR (qPCR)

- 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



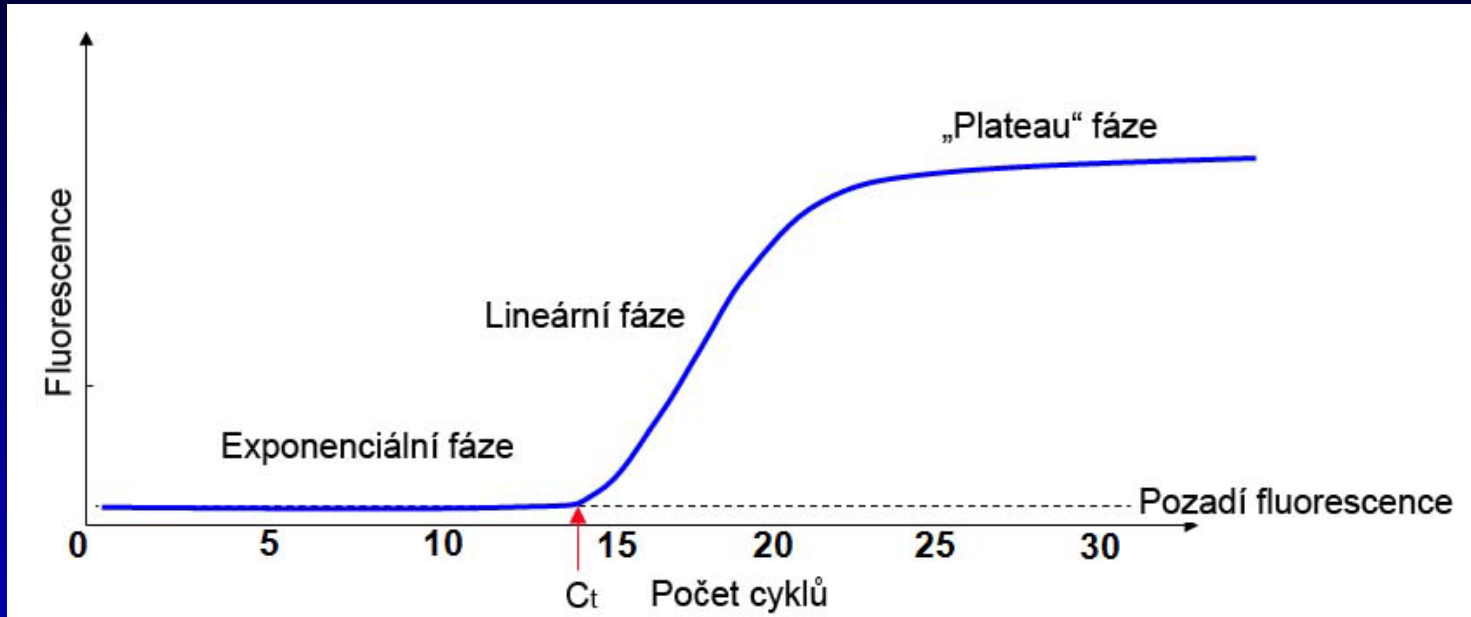


# Na DNA se vázající interkalační barviva

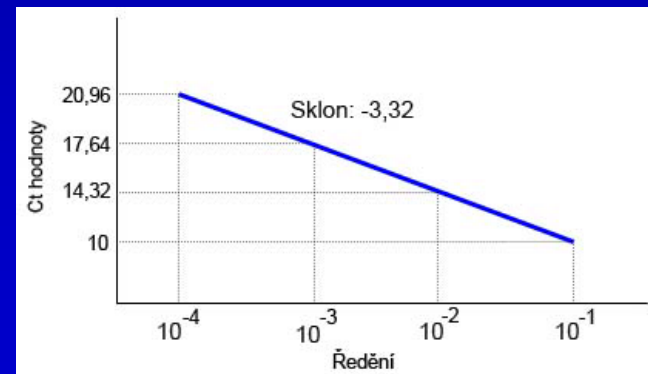


- Pro kvantifikaci ampliconů se běžně používají fluorescenční kyaninová barviva **SYBR® Green**, která fluoreskují po vazbě na dsDNA.
- Fluorescence SYBR green I je po vazbě na DNA až 1000× vyšší
- Fluorescenční signál se zvyšuje se vzrůstajícím množstvím PCR-produktu.
- Signál se měří na konci elongace 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 zhaseny při použití primerů značených specifickými fluorofory.

# Kvantifikace prostřednictvím qPCR



Ct – cycle of treshold

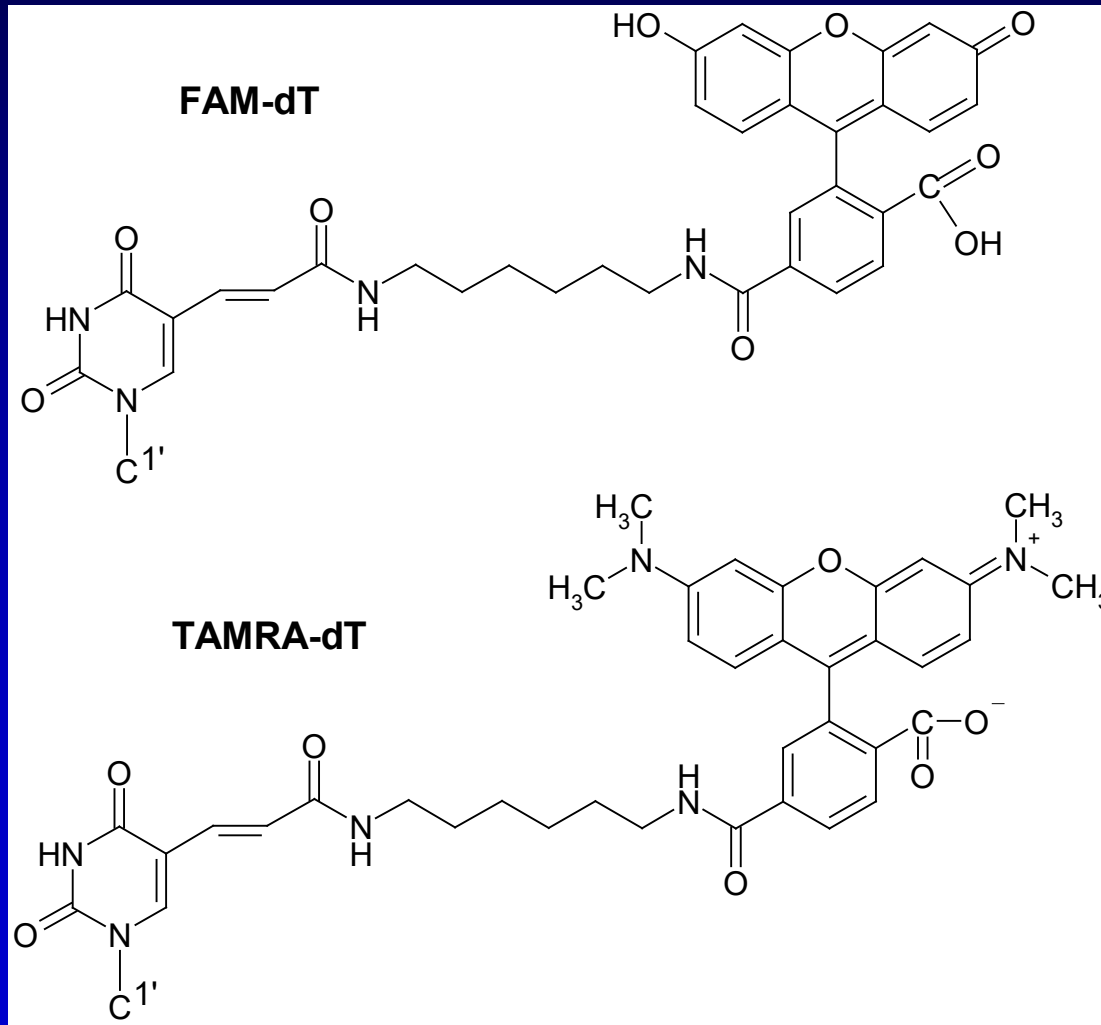


# Fluorescenční výměny při qPCR

- 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

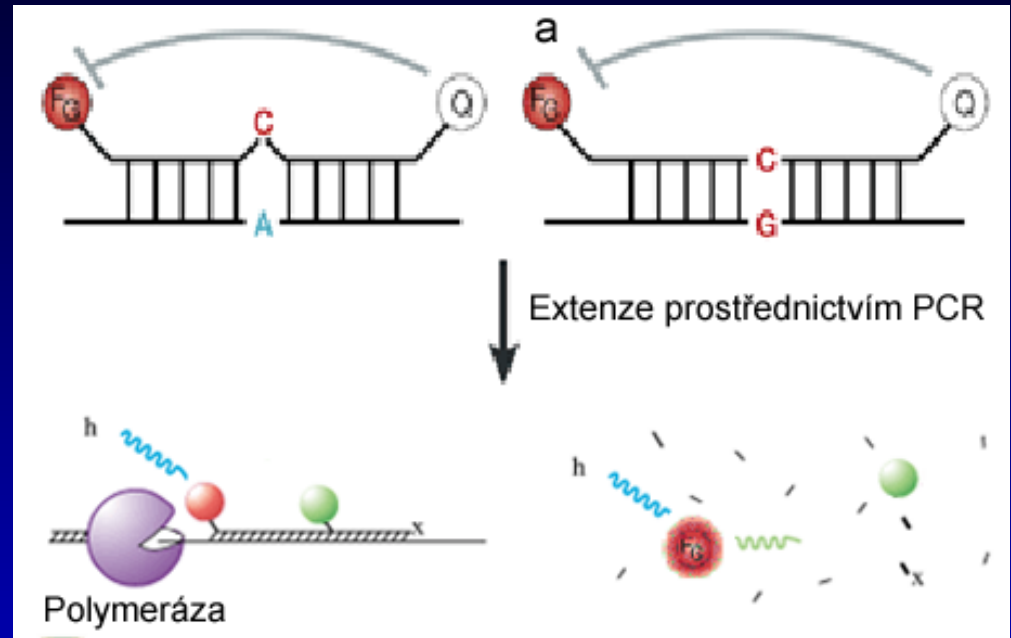
# ■ Jedna z nejčastěji používaných dvojic fluoroforů při metodách FRET

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



# TaqMan technologie

- Hybridizační metoda, kterou využívá kvantitativní PCR např. pro detekci bodových mutací
- Oligonukleotid s fluorescenční značkou a zhášedčem se váže na vnitřní část amplifikované sekvence
- Pokud primer vytváří homoduplex (a), je rozložen 5'-exonukleázovou aktivitou DNA-polymerázy a vznikne fluorescence

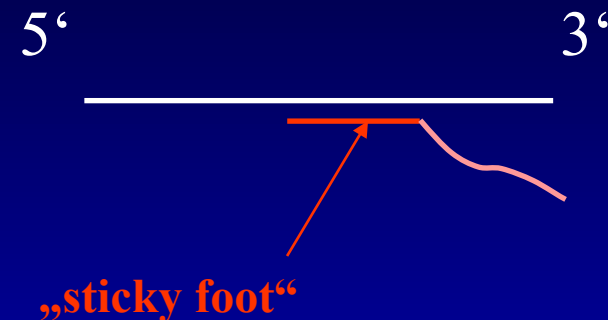
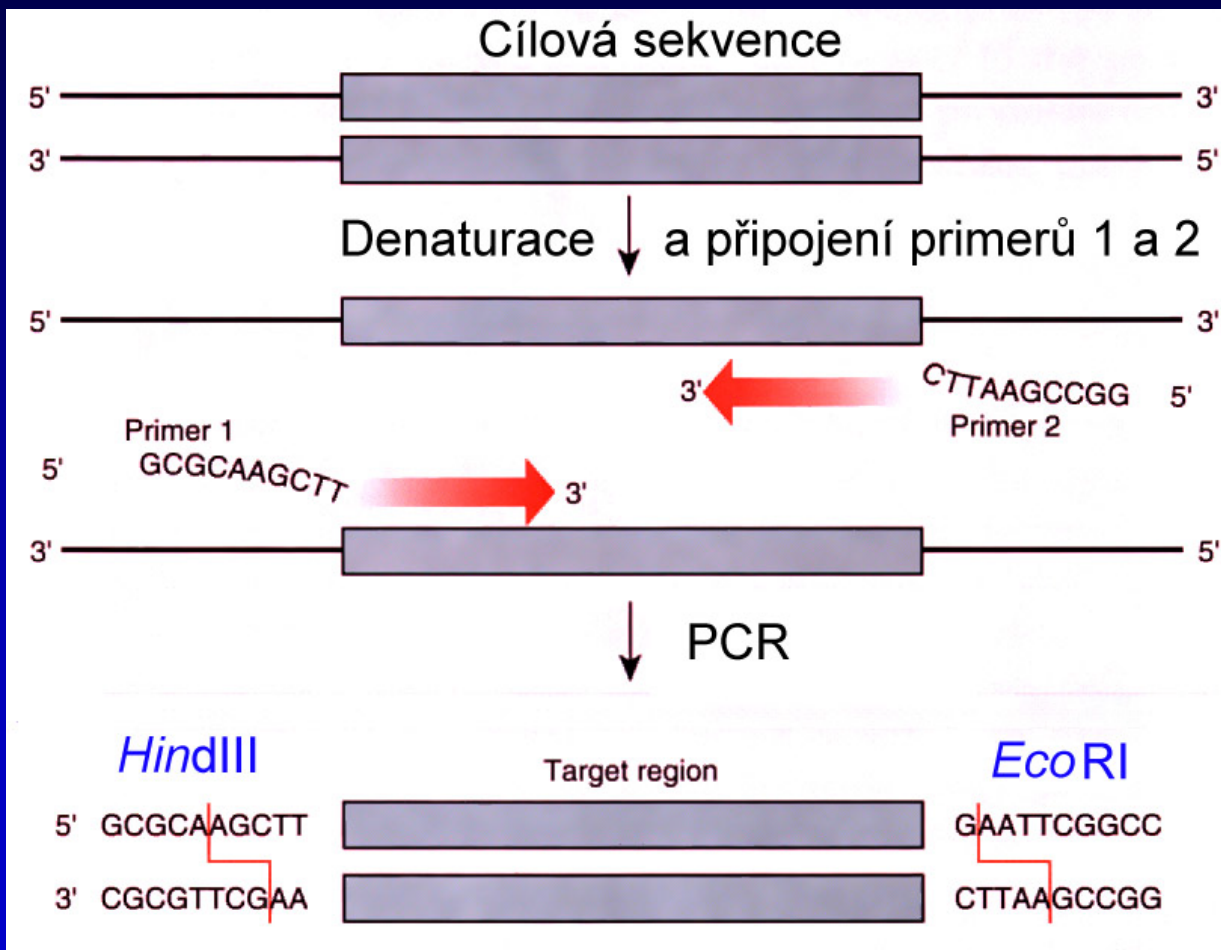


TaqMan.exe

# Modifikace PCR používané při analýze genomu



# Modifikace konců DNA, expression cassette PCR (EC-PCR) Připojení sekvencí prostřednictvím 5'-konců primerů



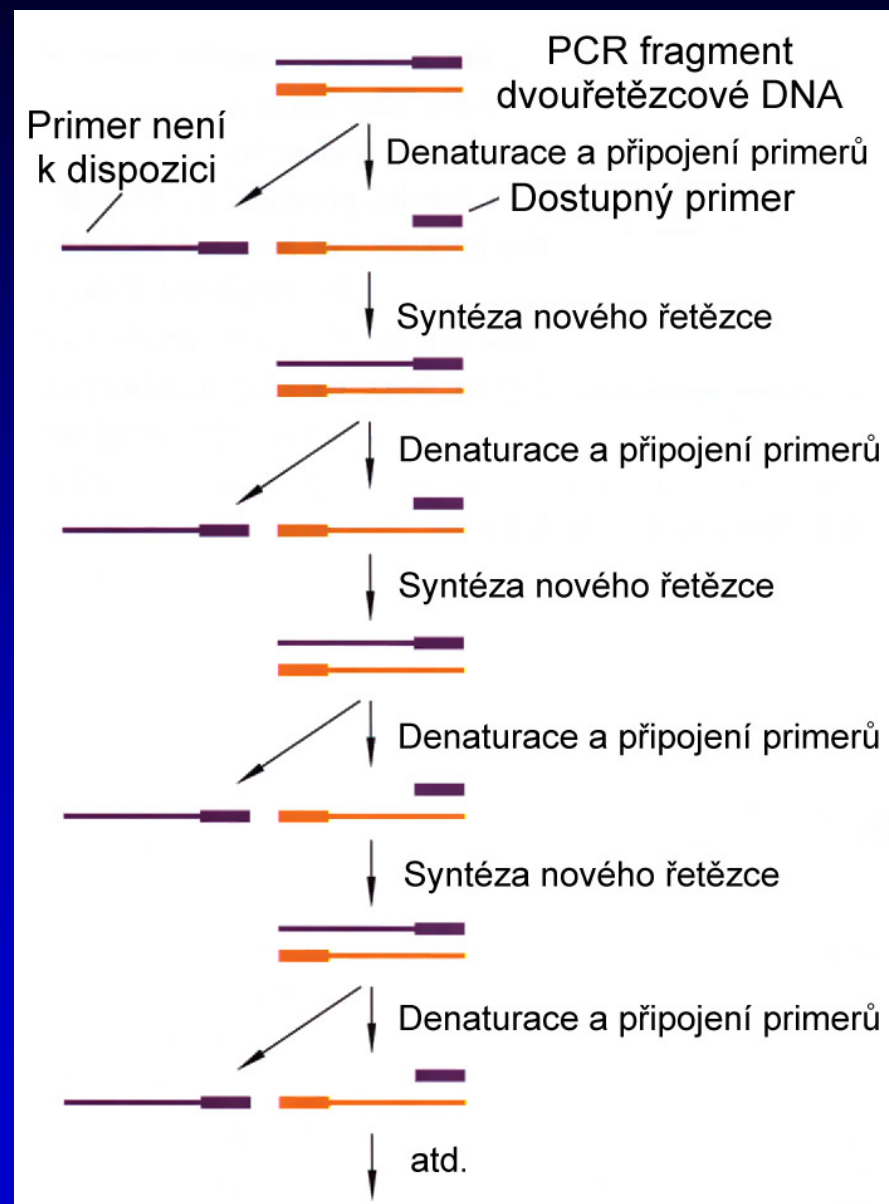
- Přidávané sekvence
  - ◆ RE místa
  - ◆ Promotory
  - ◆ Terminátory
  - ◆ Translační signály

# Asymetrická PCR



Cycserpc.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 rychlostí, je jeho množství postačující pro sekvencování.



# 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)

# 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)

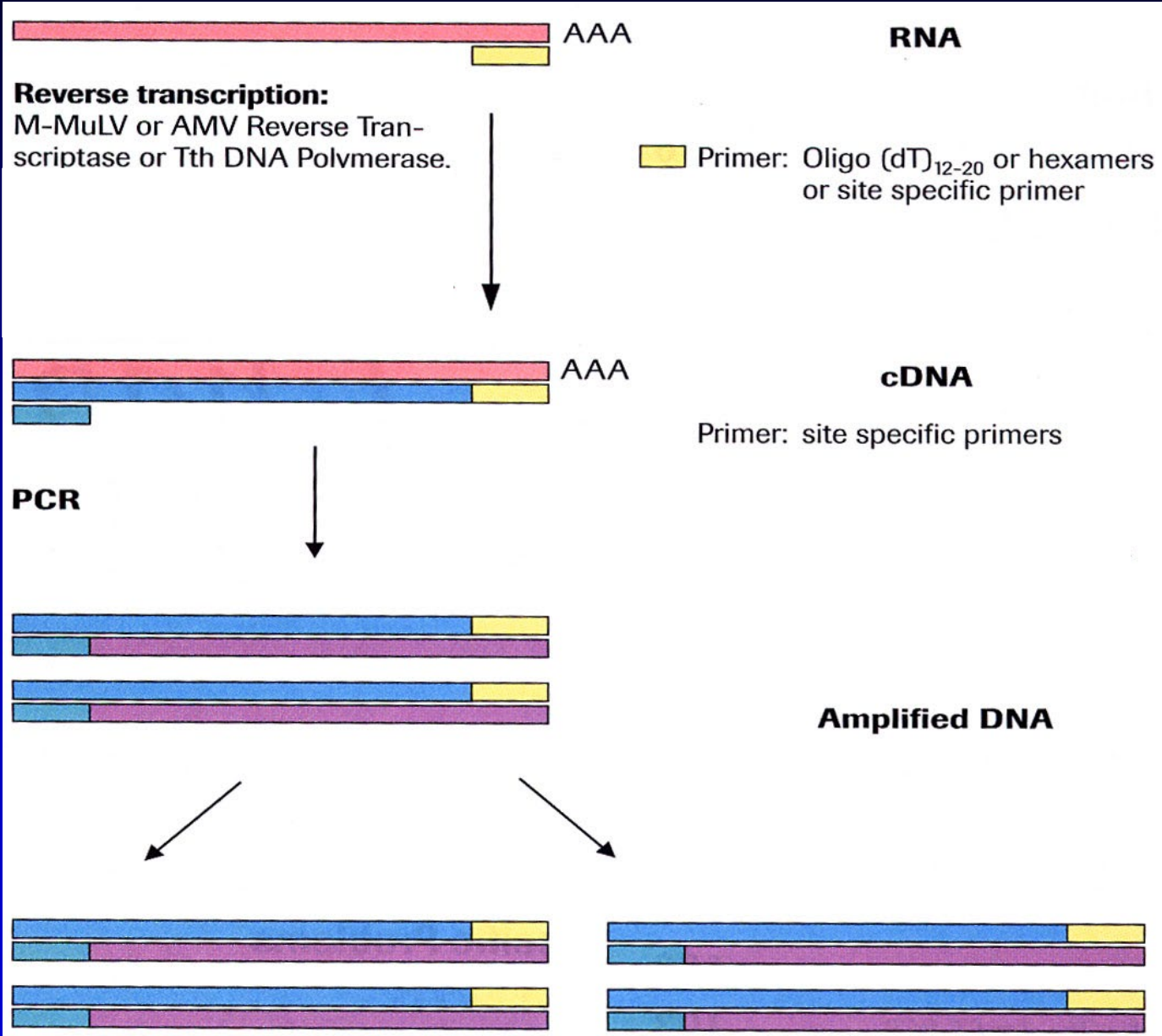
## ■ Dvoukroková RT-PCR

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

## ■ Výhody:

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

# Princip RT-PCR



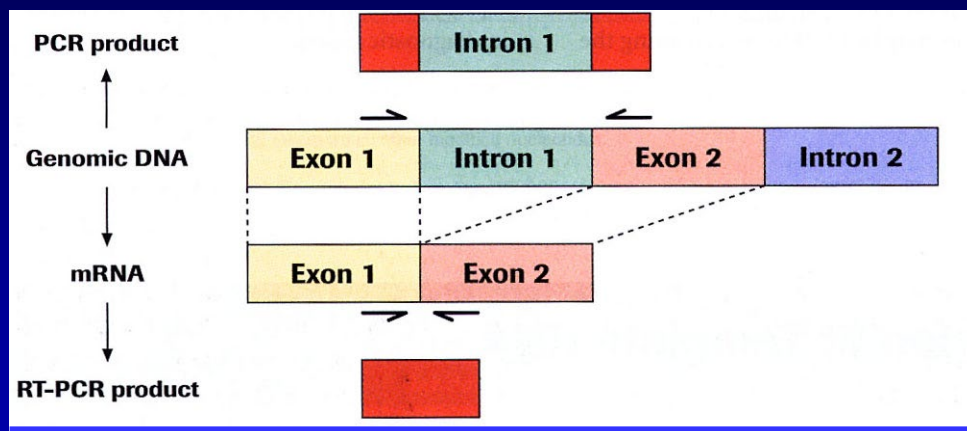


# Návrh primerů pro RT-PCR

- 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.

