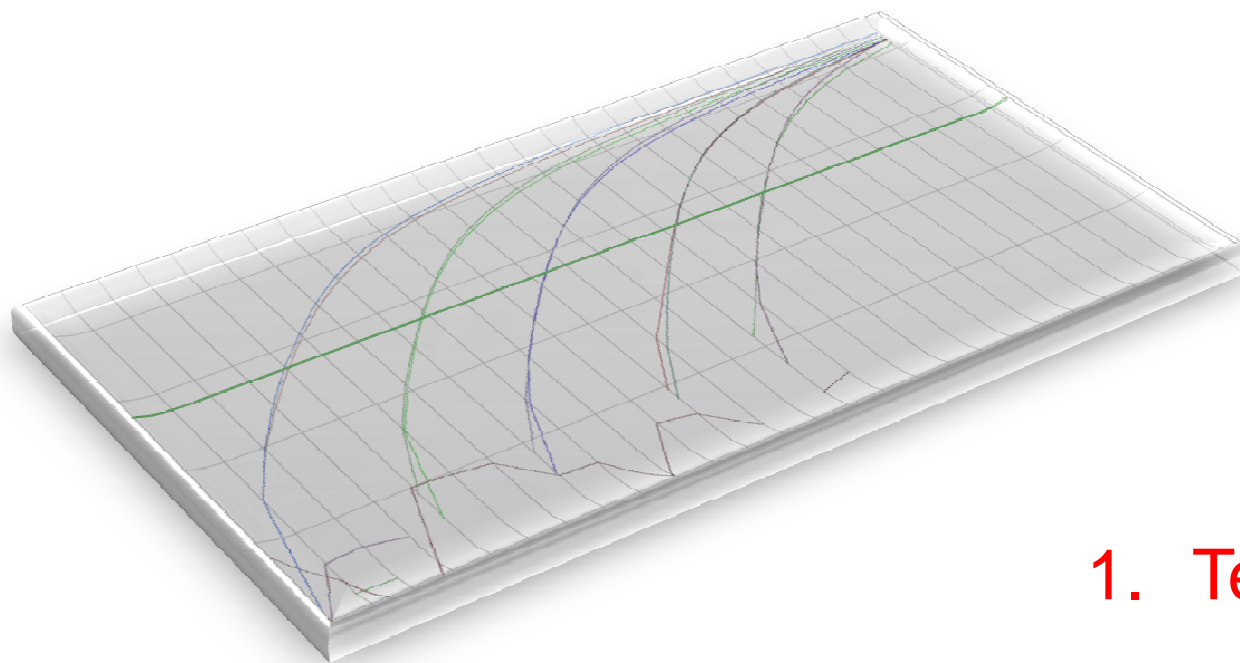


ÚVOD DO KVANTITATIVNÍ REAL-TIME PCR

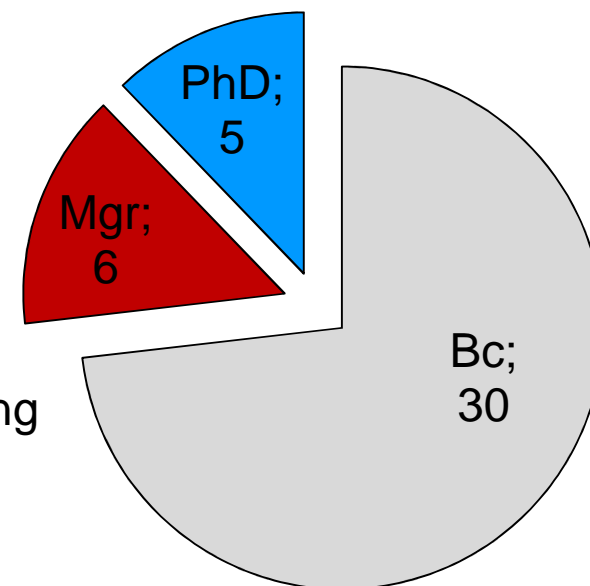


1. Teorie PCR

Organizace

Přednášky

14.12.	13:00	Úvod do PCR
15.12.	13:00	Kvantifikační strategie a analýza dat
16.12.	13:00	Instrumentace, fluorescenční barviva a sondy
17.12.	8:00	Design sond a primerů, aplikace, troubleshooting



Cvičení – 3 identické seminární skupiny – přihlašování prostřednictvím ISu;

4.1.-7.1.2010

11.1.-14.1.2010

21.1.-24.1.2010

Kontakt:

Petr Vaňhara pvanhara@gmail.com

Sabina Ševčíková sevcik@med.muni.cz

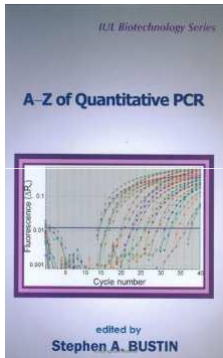
Zdeněk Ručka rucka@sci.muni.cz

☎ 5 49 49 77 80 ILBIT A3

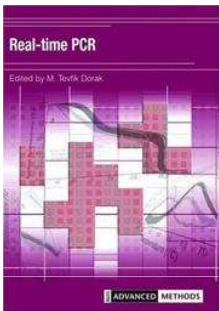


<http://www.gene-quantification.info/>

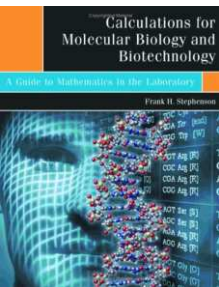
Google™



- Bustin SA: **A-Z of quantitative PCR**. IUL Biotechnology Series, Vol. 5, La Jolla, California, 2004-2006



- Dorak T: **Real Time PCR**. BIOS Advanced Methods, Taylor & Francis Group, NY, 2007



- Stephenson FH. **Calculations for Molecular Biology and Biotechnology: A Guide to Mathematics in the Laboratory**. Academic Press 2003.

atd.

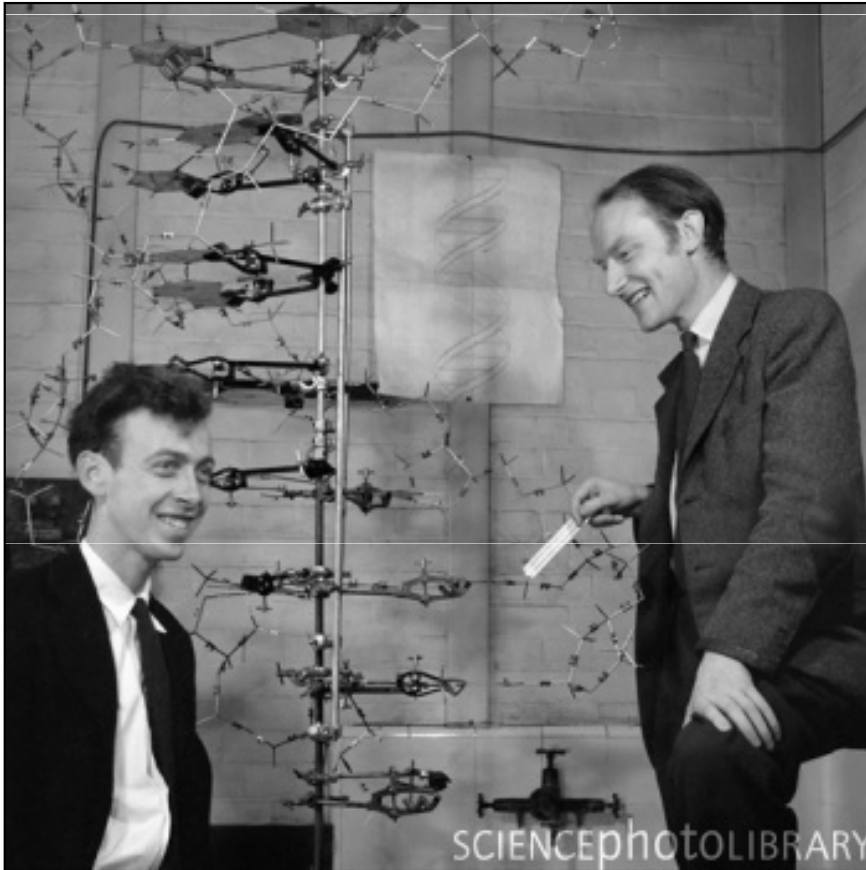
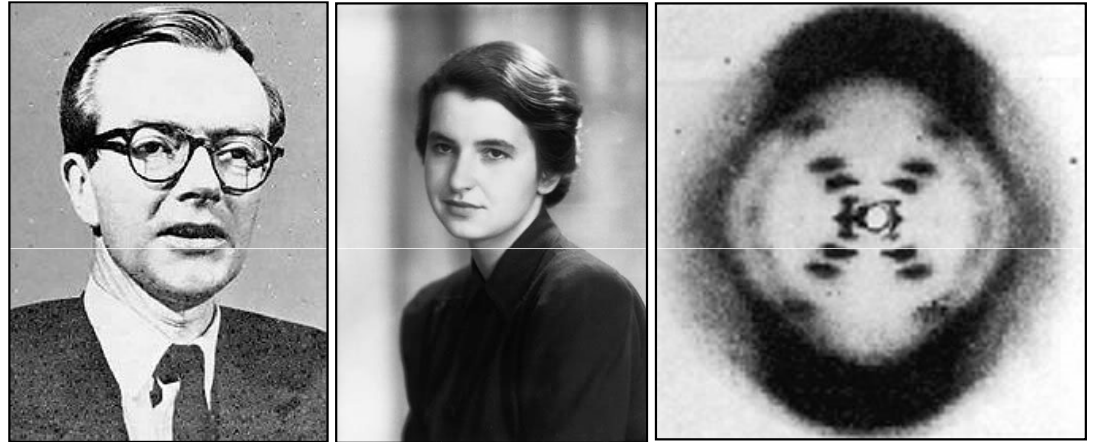
Molekulární technologie

1952	Elektroforéza
1967	<ul style="list-style-type: none">• Rekombinantní DNA• Objev DNA ligázy
1969	FISH
1970	<ul style="list-style-type: none">• Restrikční endonukleázy• Reverzní transkriptáza
1972	Klonování
1973	In vitro konstrukce bakteriálního plazmidu
1975	Southern blot
1977	Sekvenování DNA
1980	Koncept RFLP
1981	Western blotting
1982	<ul style="list-style-type: none">• Manipulace s genomem Drosophily – P elementy• Whole genome shotgun

1984	Pulzní gelová elektroforéza
1985	<ul style="list-style-type: none">• PCR• DNA fingertyping
1987	<ul style="list-style-type: none">• YACs• Místně cílená mutageneze
1988	Taq Polymeráza ChIP
1990	BLAST
1992	BACs
1995	Microarrays
1998	RNAi
2002	UCSC Genome Browser
2003	DNA assembly programs
2004	Anotace genů – ENSEMBL
2005	<ul style="list-style-type: none">• Projekt HapMap• Ligační sekvenování
2006	Celogenomové metylační mapy
2007	miRNA
2009	Next Generation Sequencing

What about DNA?

- Maurice Wilkins-James Watson-Francis Crick-Rosalin Franklin, 1953
- Nobelova cena Wilkins-Watson-Crick, 1962
- model dsDNA



King's College London

Jakým způsobem bez použití PCR:

1. zjistíte, zda pacient nese nějakou, klinicky významnou, bodovou mutaci, která např. určuje jeho další léčbu?
2. zjistíte, který ze dvou genů je v nějaké tkáni (např. nádorové) exprimován více než druhý ?
3. stanovíte druh patogenní bakterie ve vzorcích z nemocného pacienta?
4. zastoupení leukemických buněk v krvi pacienta před a po léčbě?



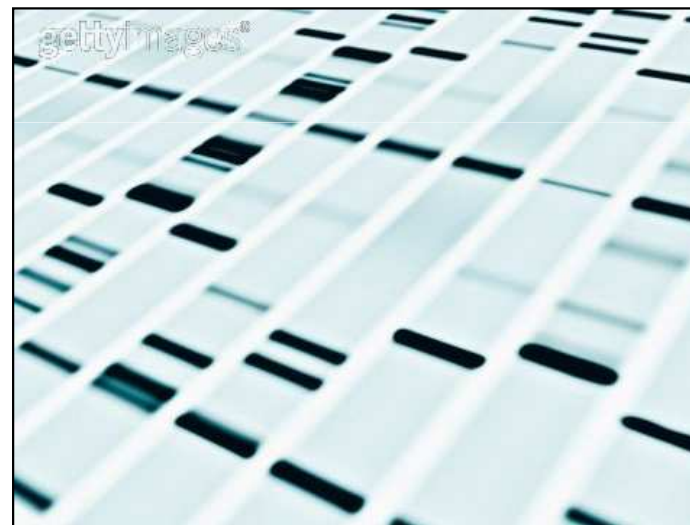
South

North
Flow



Kultivace, biochemické analýzy
PCR

Cytogenetické vyšetření





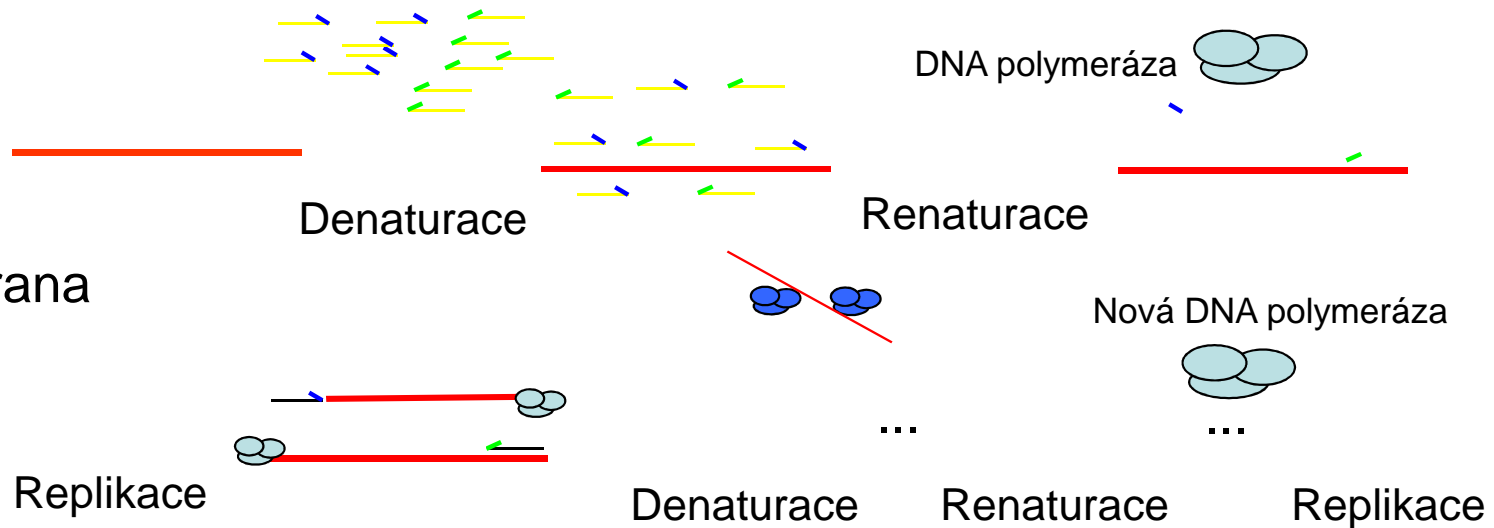
Kjell Kleppe



Har Gobind Khorana

Studies on polynucleotides XCVL. Repair Replication of Short Synthetic DNA's as catalysed by DNA polymerases.

Kleppe K., Ohtsuka E., Kleppe R., Molineux I., Khorana H. G. (1971): J.Mol.Biol.56,341-361.



Práce popsala některé parametry reparativní replikace – účinnost replikace, minimální délky primerů a templátu, sekundární struktury atd.

Proč se nerozšířila tato metoda už v 70.letech?

Extrémně nákladná syntéza oligonukleotidů, nedokonalé sekvenování, termolabilita a nákladná purifikace DNA polymeráz...

Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia.

The logo for the journal Science, featuring the word "Science" in a red serif font and the acronym "MAAS" in a blue sans-serif font to its right.

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. *Science*. 1985 Dec 20;230(4732):1350-4.

Two new methods were used to establish a rapid and highly sensitive prenatal diagnostic test for sickle cell anemia. The first involves the primer-mediated enzymatic amplification of specific beta-globin target sequences in genomic DNA, resulting in the exponential increase (220,000 times) of target DNA copies. In the second technique, the presence of the beta A and beta S alleles is determined by restriction endonuclease digestion of an end-labeled oligonucleotide probe hybridized in solution to the amplified beta-globin sequences. The beta-globin genotype can be determined in less than 1 day on samples containing significantly less than 1 microgram of genomic DNA.

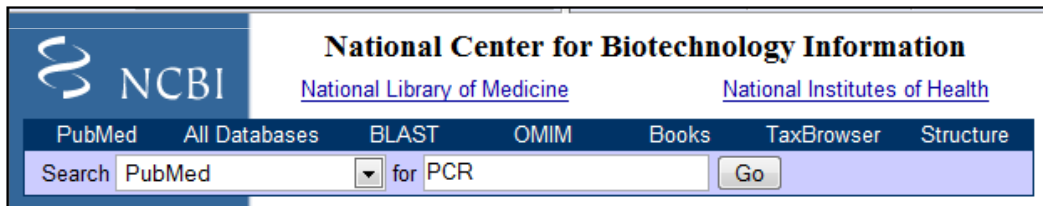
Kary B. Mullis



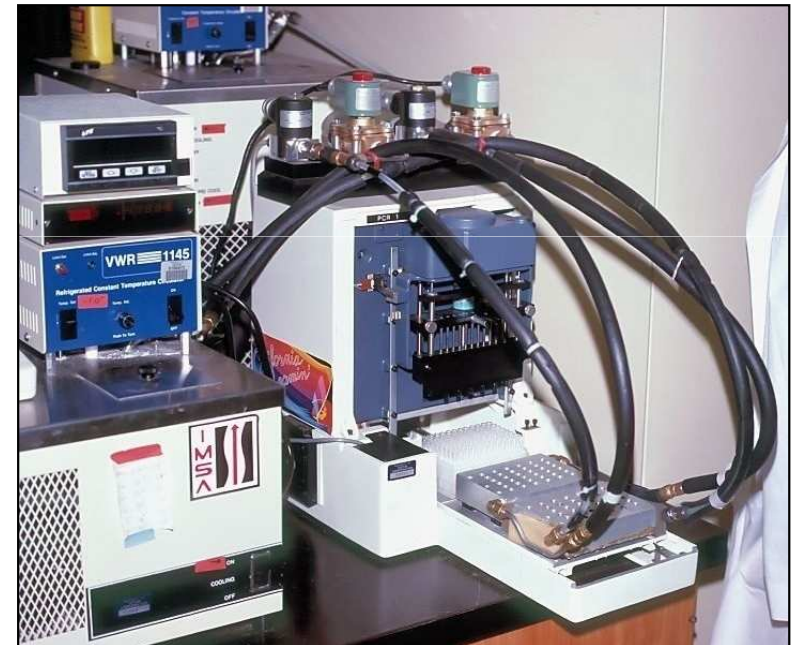
Nobelova cena za chemii
1993



- Použití termostabilní DNA polymerázy
- Rozvedení konceptu navrženého K. Kleppem
- Obrovský boom PCR díky technologickému pokroku



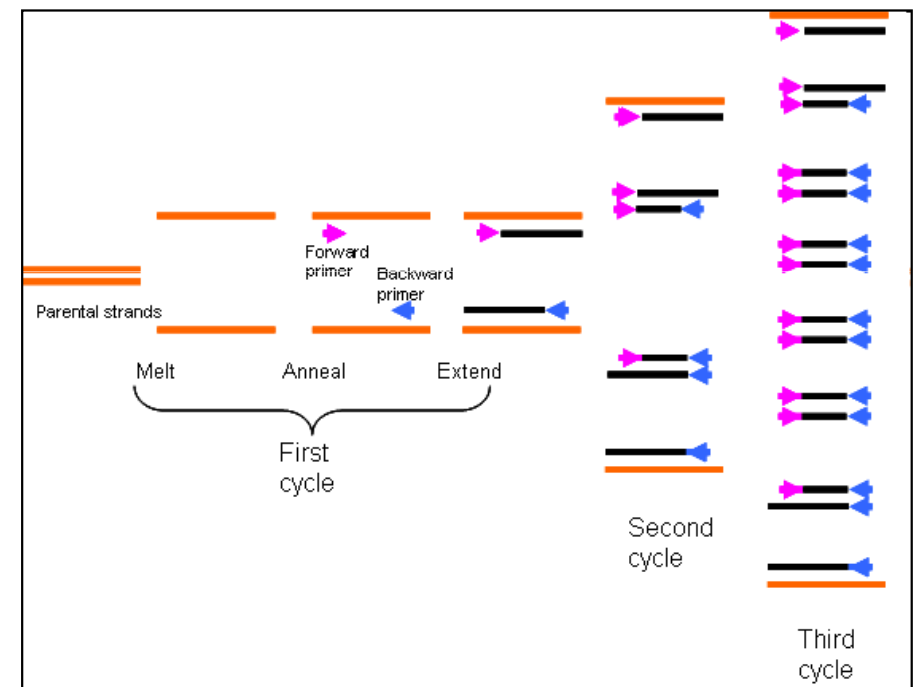
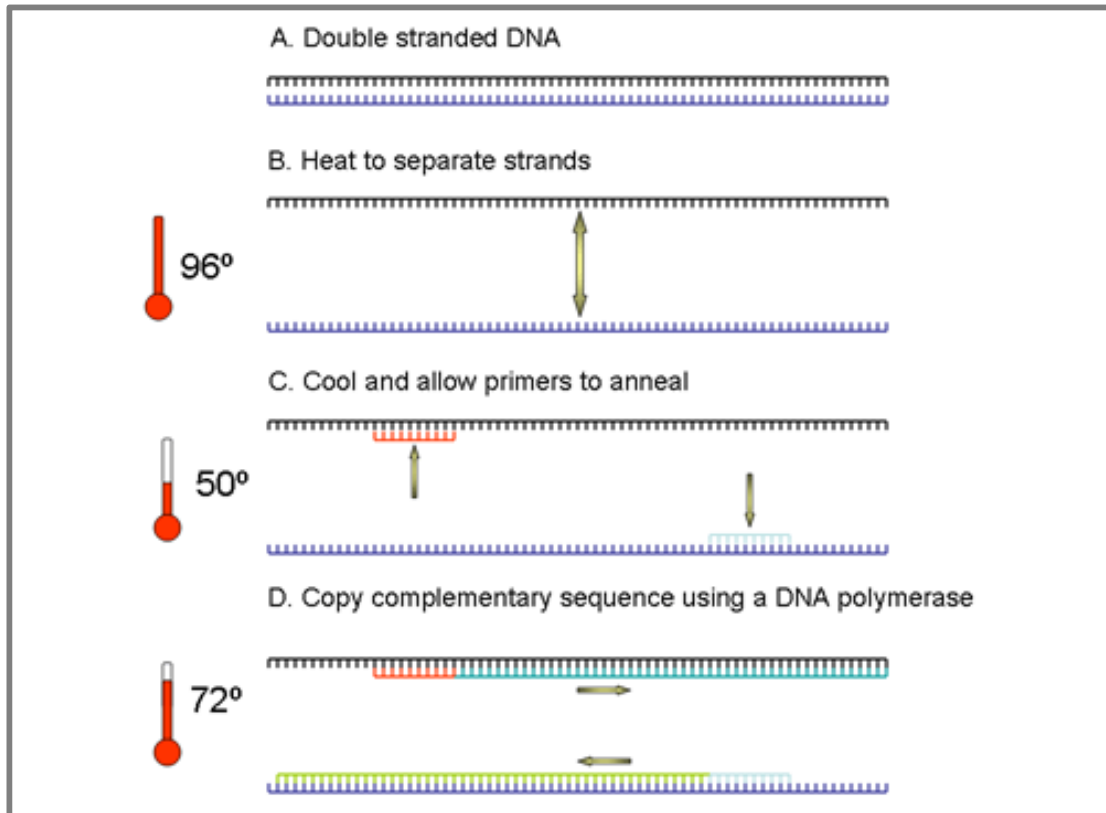
- 363 629 článků k 27.11.2008
- 399 022 k 1.12.2009
- 399 919 k 14.12.2009



PCR

Cyklické střídání fází denaturace, annealingu a extenze jednoduchou změnou teploty reakční směsi

Polymeráza využívá syntetické primery ohraničující amplifikovaný úsek DNA



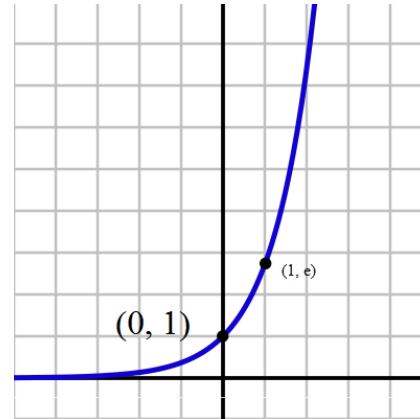
PCR

Exponenciální proces

Amplikon, templát

Amplifikace $(y) = N \times 2^n$

N = počet molekul templátu, n počet cyklů PCR



Otázka:

1. Jedna molekula DNA je amplifikována v 25 cyklech. Teoreticky, kolik molekul amplikonu (y) je vytvořeno?
2. Počáteční množství molekul templátu je $N=600$. Kolik molekul amplikonu je vytvořeno?
3. Reakce je provedena v 100 μl . Kolik molekul amplikonu bude přítomno v 1 nl (0,001 μl)?

Odpověď:

1. $2^{25} = 33\,554\,432$
2. $600 \times 2^{25} = 2 \times 10^{10}$
3. 2×10^{10} ve 100 μl
→ **v 0,001 μl bude 2×10^5 (200 000) molekul amplikonu**

KONTAMINACE JE PROBLÉM

Jediná molekula DNA může způsobit velké problémy

(forenzní genetika, rutinní screening a diagnostika, GMO...)

Otázka:

2 ng lidské genomové DNA byly použity jako templát pro PCR. Výsledkem je 100 ng DNA o délce 242bp. Jaká je míra amplifikace?

Odpověď:

1. Určení počtu kopií obsažených v daném množství DNA (2 ng genomové DNA; předpokládáme haploidní genom)

haploidní genom 3×10^9
průměrná MW báze: 660 g/mol

$$\rightarrow m = \frac{N}{N_A} M_w$$

$$m \text{ [pg]} = \frac{3 \cdot 10^9}{6,023 \cdot 10^{23}} \cdot \frac{1}{10^{12}}$$

množství DNA obsahující jednu kopii:

$$m \text{ [pg]} = 3,3 \text{ pg}$$

počet kopií ve 2ng DNA: cca 600 (606)

2. Určení hmotnosti 242bp. fragmentu

hmotnost (m) 242bp fragmentu:

$$m [\text{pg}] = \frac{242 \times 660}{6,023 \times 10^{23}} \times 10^{12}$$

$$m [\text{pg}] = 2,7 \times 10^{-7} \text{ pg}$$

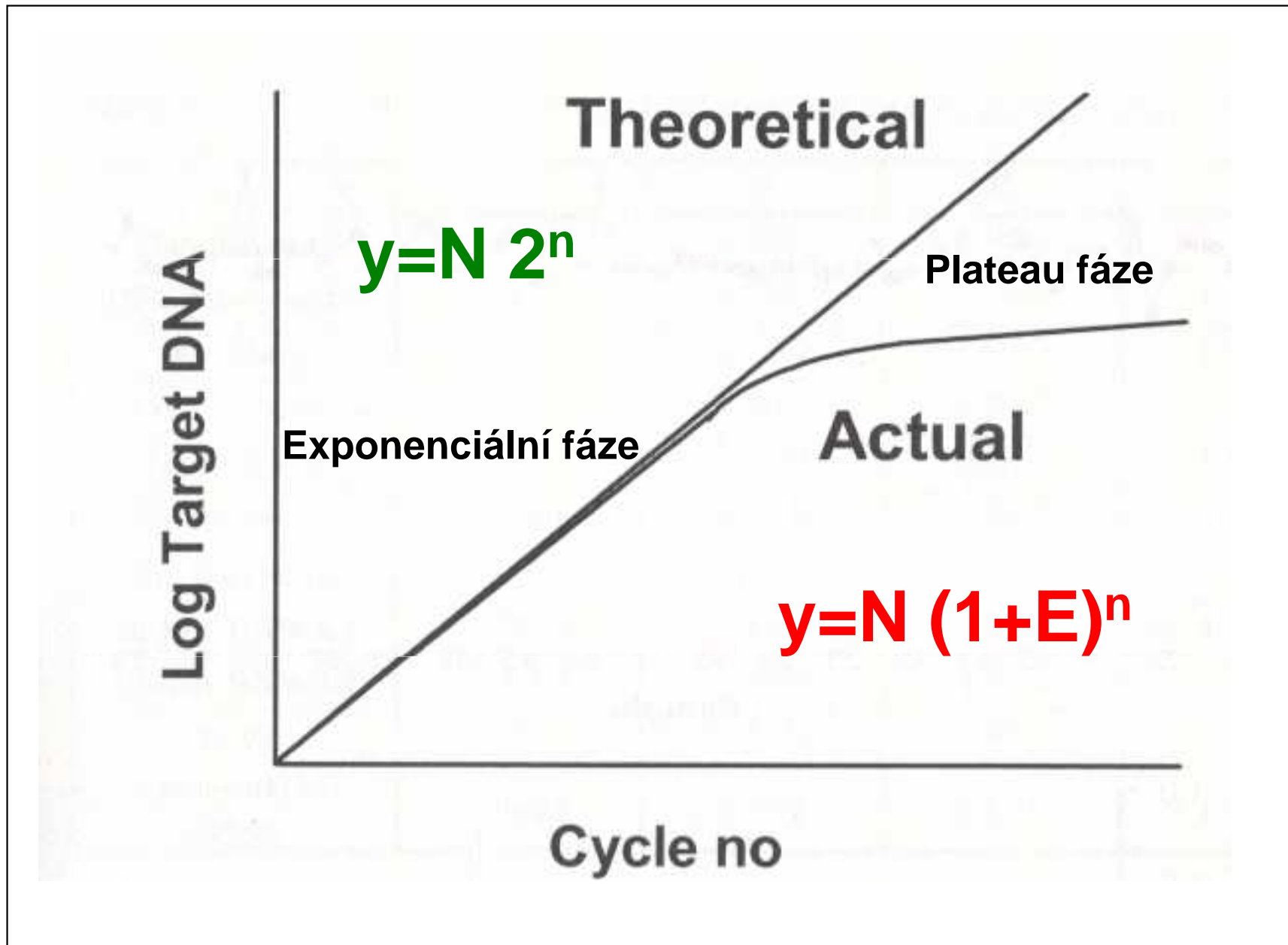
počet kopií ve 100ng amplifikované DNA:

$$n = \frac{100 \text{ ng} \times 10^3}{2,7 \times 10^{-7} \text{ pg}} \quad m [\text{pg}] = 3,7 \times 10^{11} \text{ kopií}$$

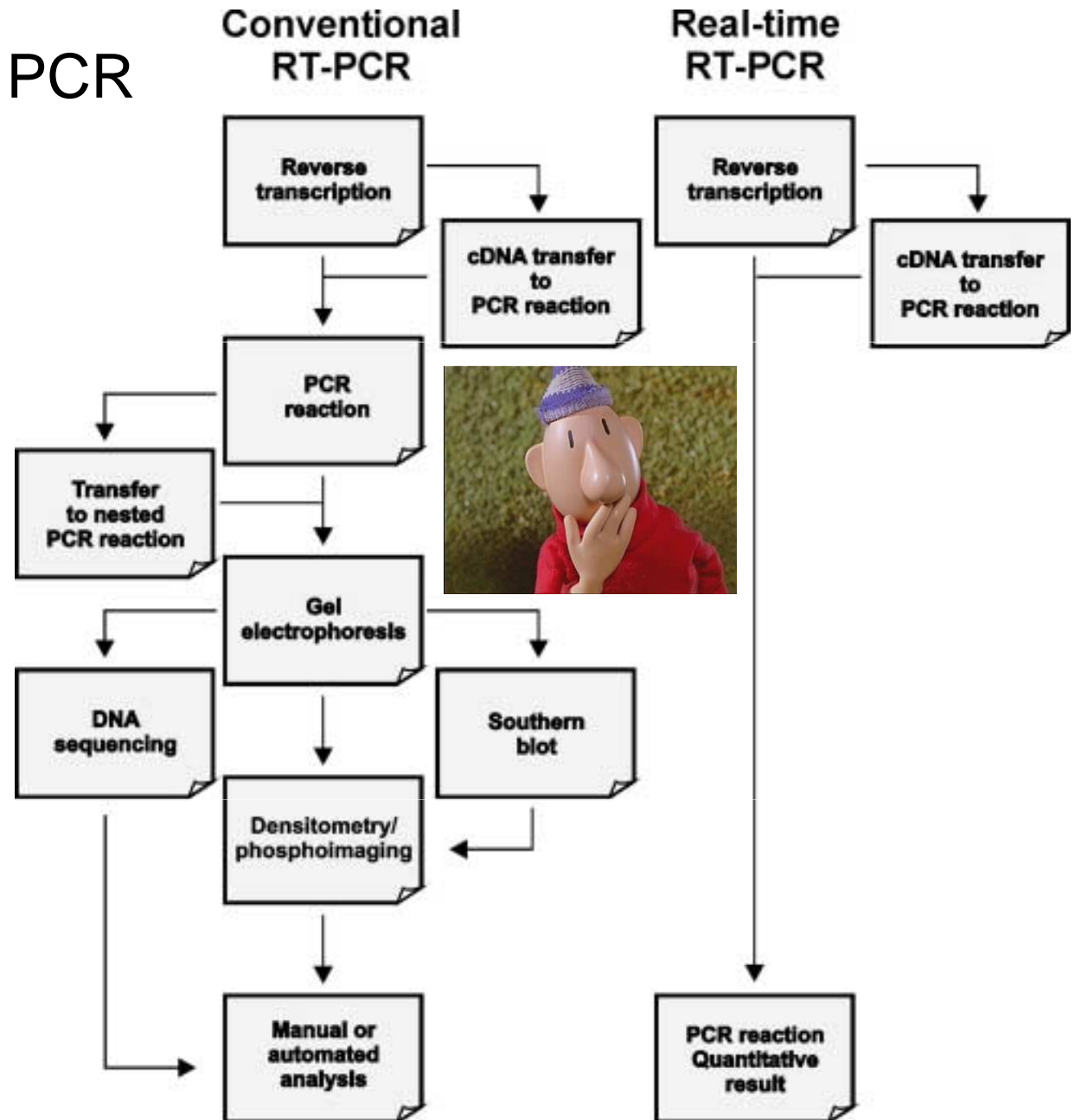
3. Určení míry amplifikace

$$y = \frac{3,7 \times 10^{11}}{600} = 6,2 \times 10^8$$

Bylo dosaženo $6,2 \times 10^8$ nárůstu množství amplikonu



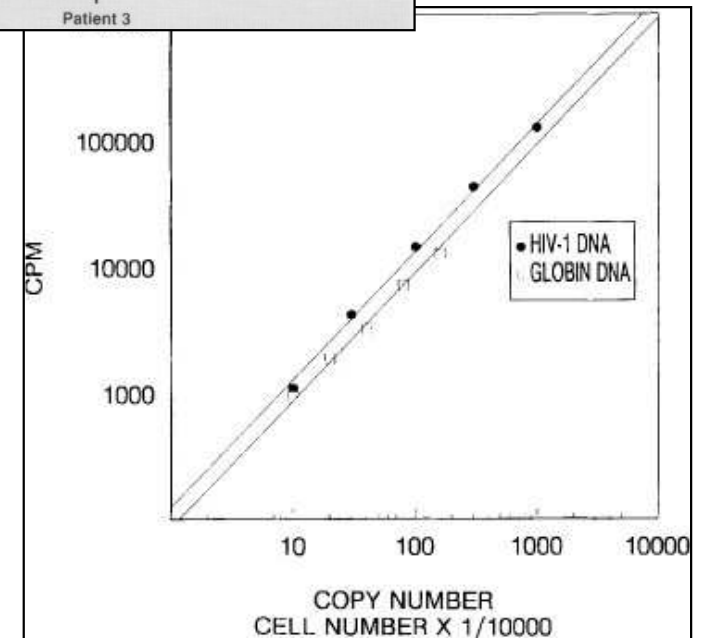
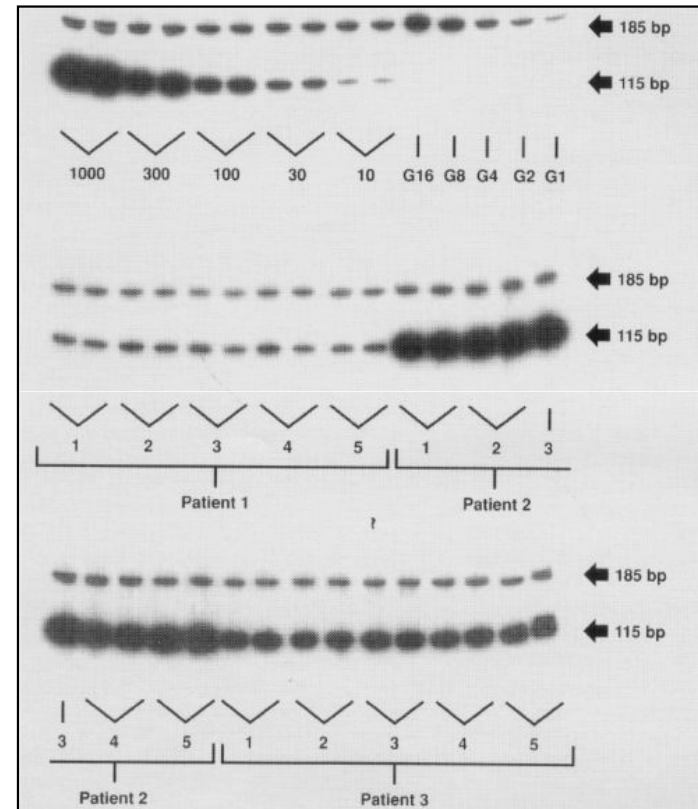
Konvenční vs. Real-Time PCR



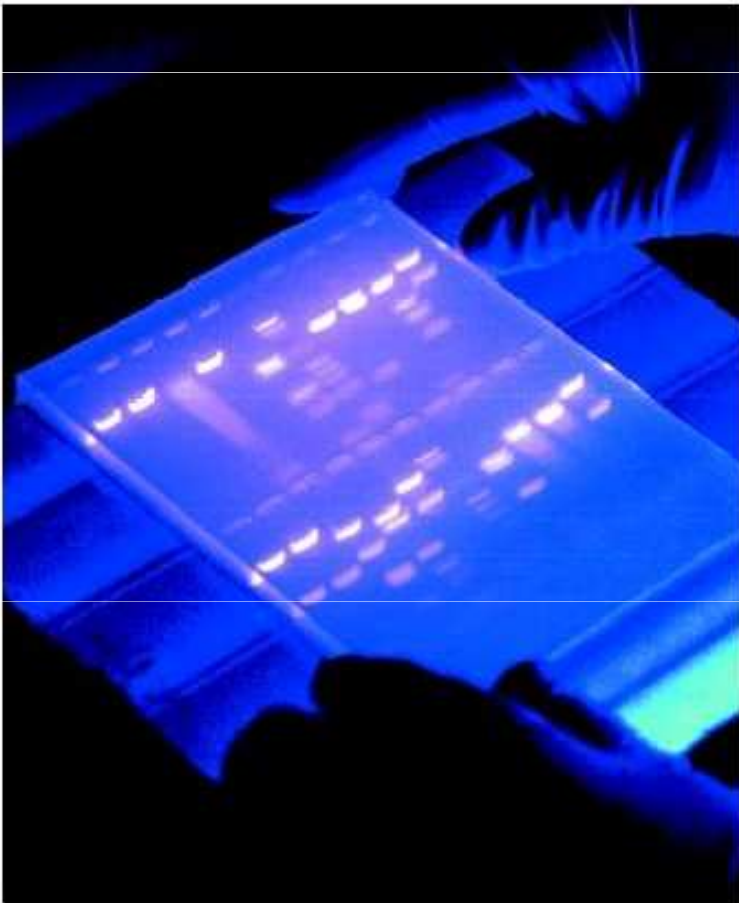
Konvenční kvantitativní PCR

- „End point“ stanovení

- Kvalitativní odpověď YES/NO
- Extenzivní validace, kontroly
- Denzitometrie
- Minimální rozptyl v parametrech reakce má obrovský vliv na množství amplikonu
- Interní heterologní kontrola (housekeeping gene)
- Syntetický standard
- Kompetitivní PCR
- *Viral load* u HIV+ pacientů
- Výskyt minimální reziduální choroby u onkologických pacientů



Zásadní omezení – gelová elektroforéza



- Nízká přesnost
- Nízká citlivost
- Malý dynamický rozsah – pouze 2log.
- Nízké rozlišení, založené pouze na délce amplikonu
- Není automatizovaná
- Výstup není numerický – subjektivní hodnocení
- EtBr – neváže se na DNA pravidelně
- Post PCR zpracování - kontaminace

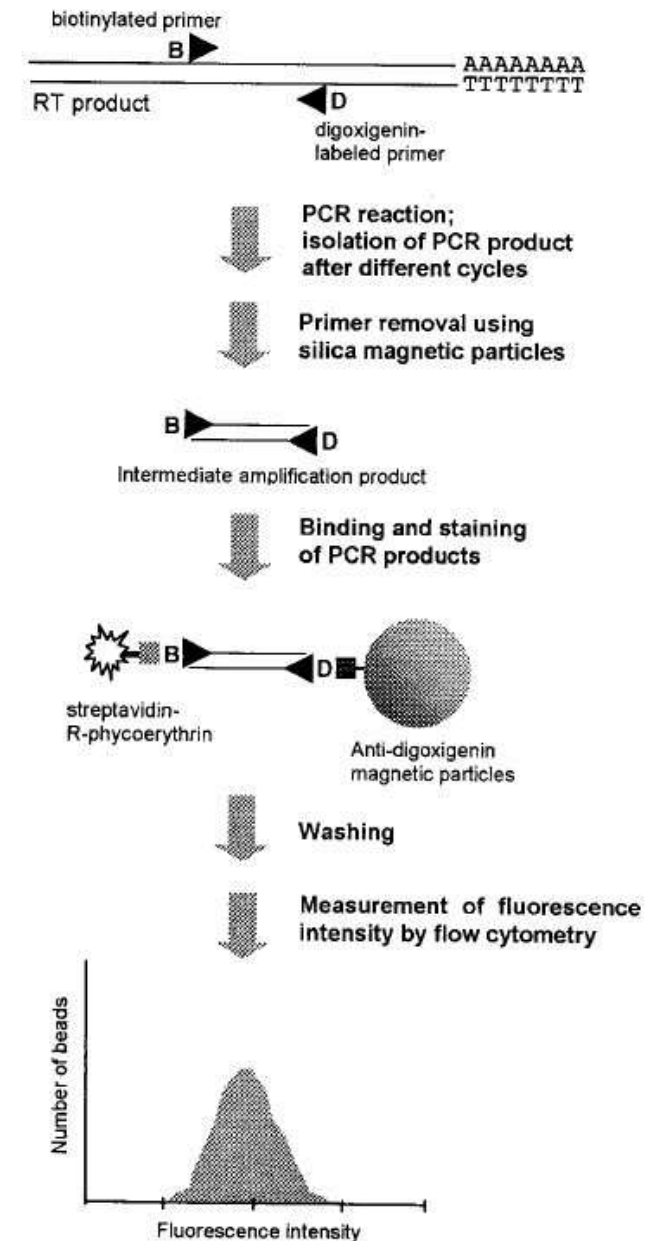
Průtoková cytometrie

Clinical Chemistry 46:8
1057-1064 (2000)

Molecular Diagnostics
and Genetics

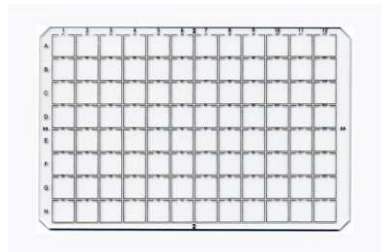
Flow Cytometric Analysis of Reverse Transcription-PCR Products: Quantification of p21^{WAF1/CIPI} and Proliferating Cell Nuclear Antigen mRNA

NIELS WEDEMEYER,* WOLFGANG GÖHDE, and THOMAS PÖTTER

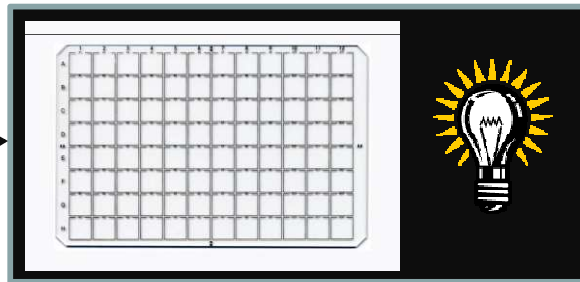


Chemiluminiscence

PCR → DNA



Denaturace a hybridizace se specifickou sondou



• Chemiluminiscence

Intenzita chemiluminiscenčního signálu v závislosti na množství amplifikované DNA

PCR $\xrightarrow{\text{Biotinylované primery}}$ Biotinylovaný amplikon

$\xrightarrow{\text{Streptavidin + magnetické částice}}$

Separace chemiluminiscence



Fluorescence correlation spectroscopy

Proc. Natl. Acad. Sci. USA
 Vol. 93, pp. 12805–12810, November 1996
 Biochemistry

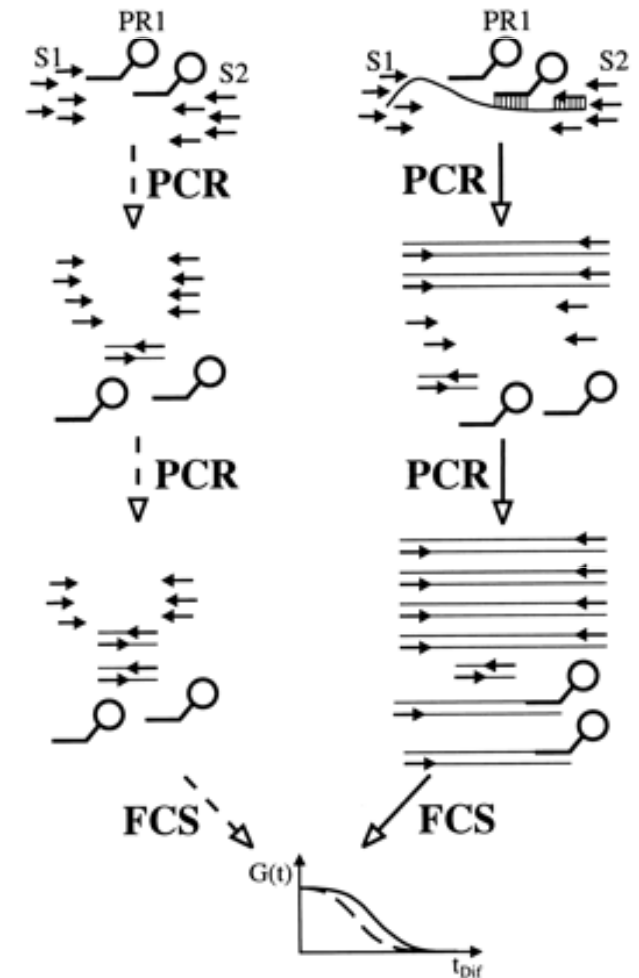
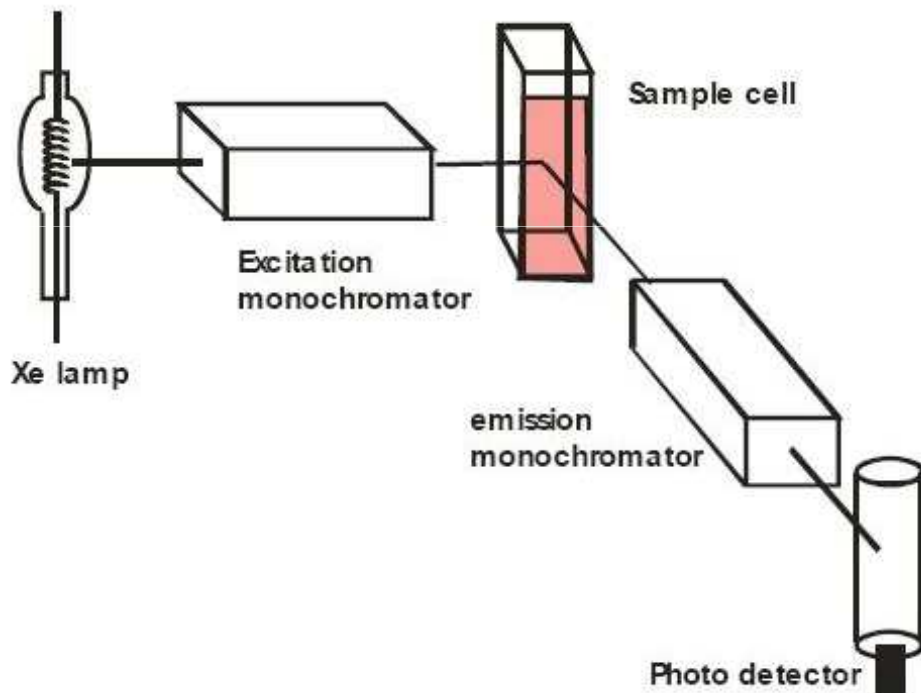
Fluorescence correlation analysis of probe diffusion simplifies quantitative pathogen detection by PCR

(amplification / *Mycobacterium* / primer extension / tetramethylrhodamine / titration)

NILS G. WALTER*, PETRA SCHWILLE, AND MANFRED EIGEN†

Department of Biochemical Kinetics, Max Planck Institute for Biophysical Chemistry, Am Fassberg, D-37077 Göttingen, Germany

Contributed by Manfred Eigen, August 26, 1996



Real-time Fluorescence Based PCR & Reverse Transcription PCR

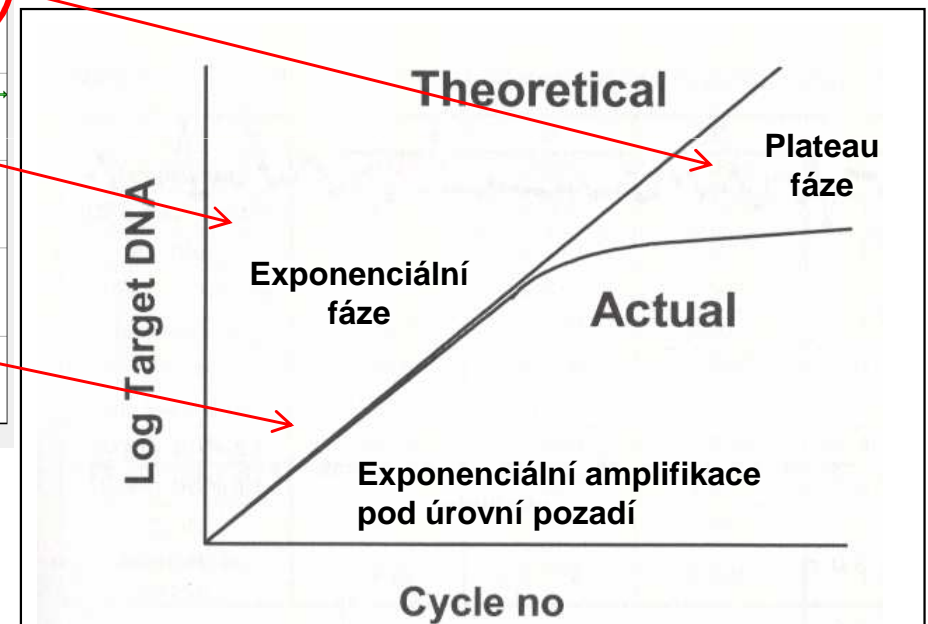
Kvantitativní vztah mezi

Množstvím PCR produktu (amplikonu) a intenzitou fluorescence

- Účinnost PCR musí být u všech vzorků stejná
- Amplifikační práh (Ct) musí ležet v exponenciální fázi (lineární část křivky)

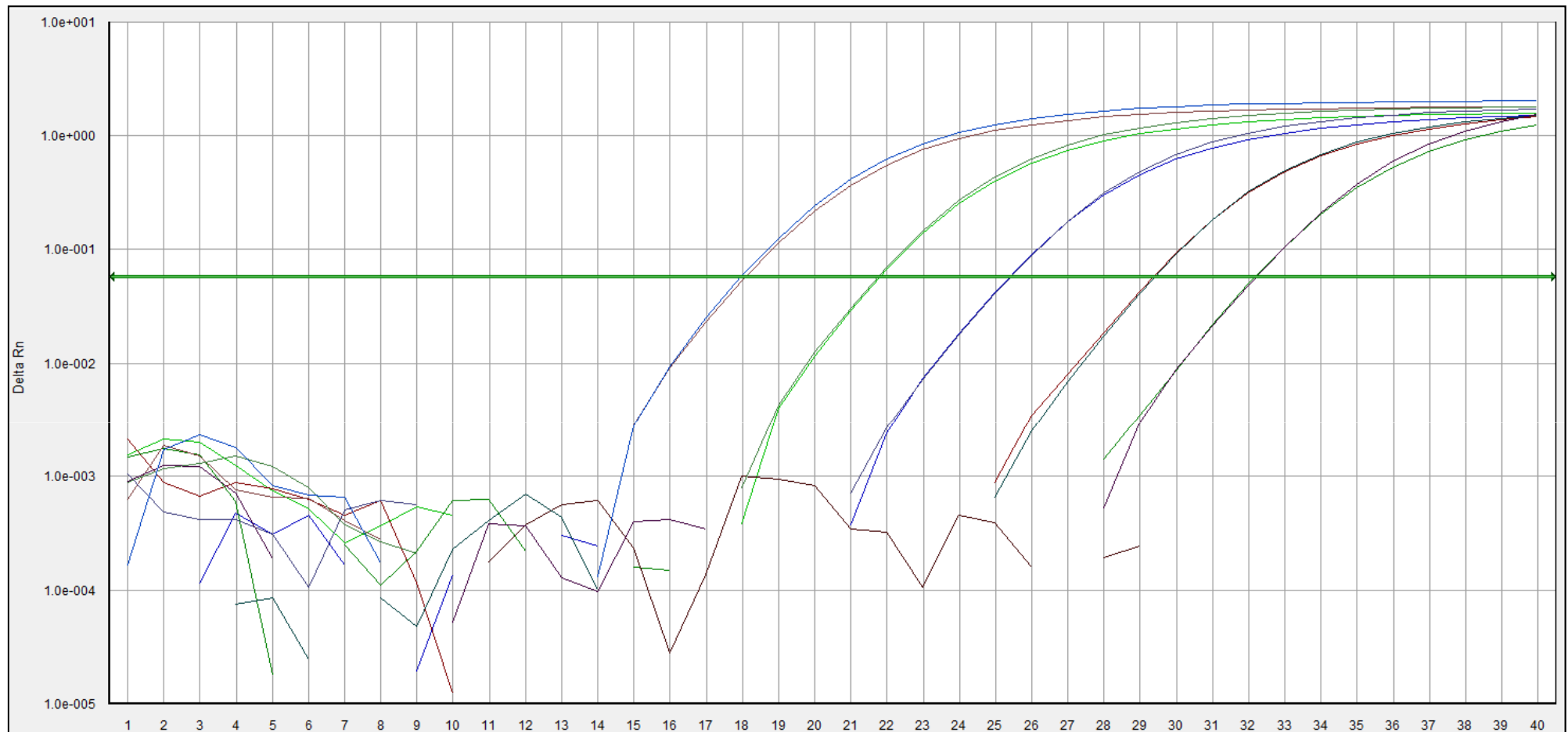


„end point“



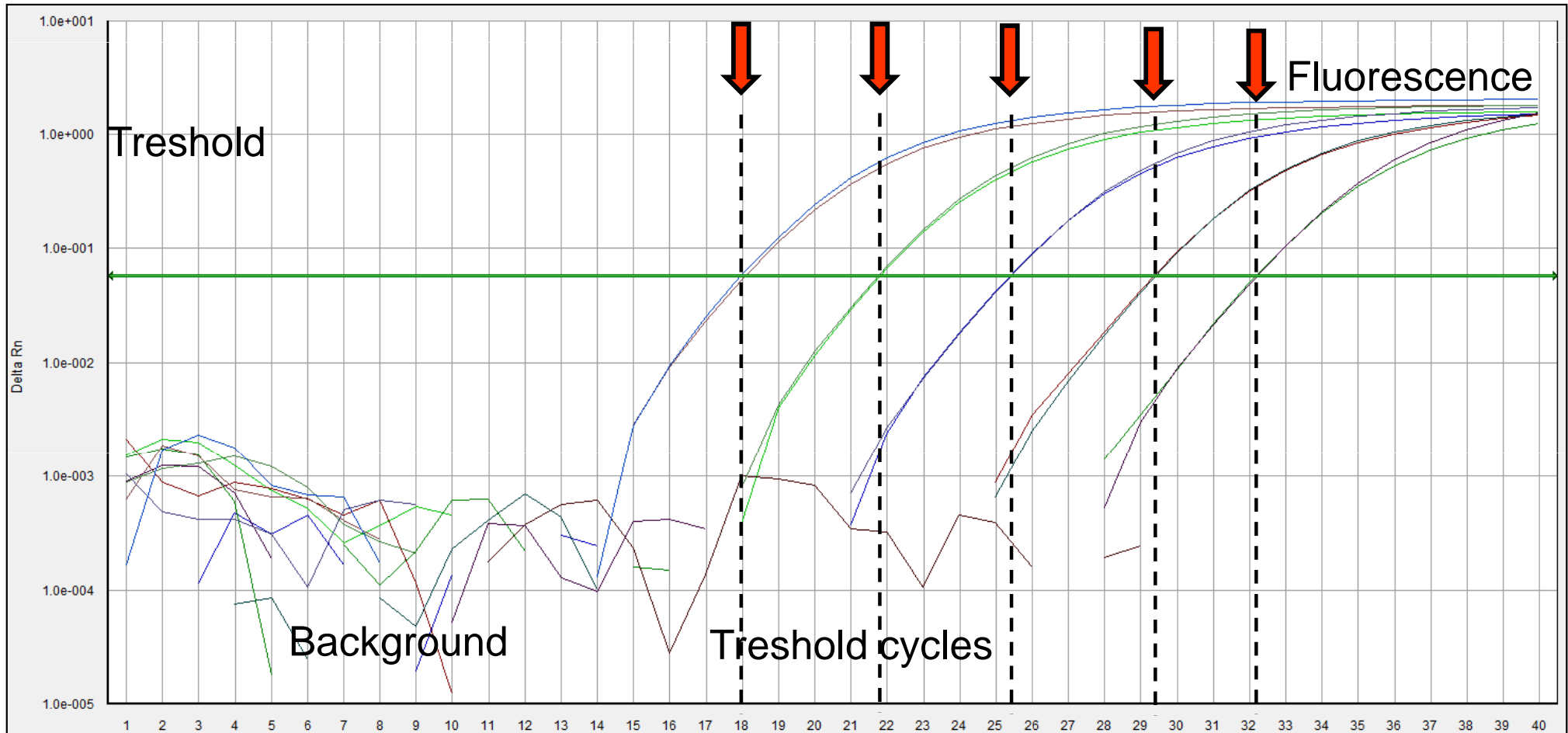
Real-time Fluorescence Based PCR

Fluorescence **R** je zajištěna např. vazbou fluorescenčního interkalačního barviva na DNA, použitím hydrolyzační sondy atd. Fluorescence reportérového fluoroforu může být normalizována vůči pasivnímu fluoroforu (Rox) - **R_n**. Změnu fluorescence v čase vůči pozadí udává **ΔR_n** . ($\Delta R_n = R_n^+ - R_n^-$).



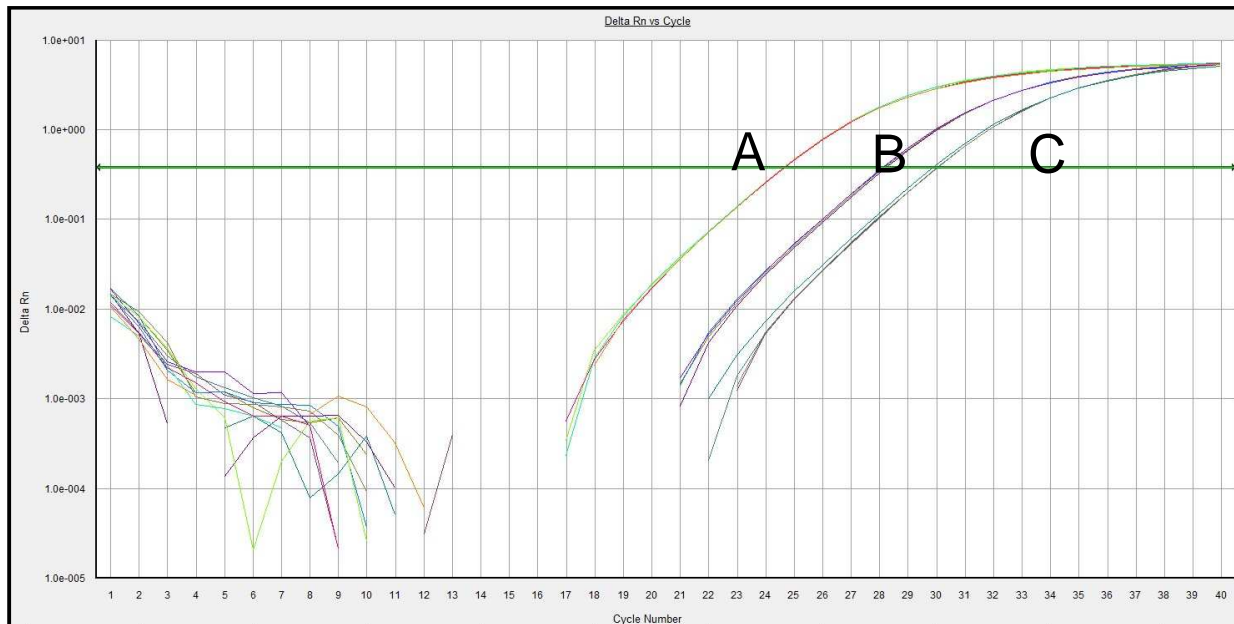
Treshold cycle „Ct“

- určený na základě hodnoty fluorescence pozadí
- kvantitativní výstup pro každý vzorek



Treshold cycle „Ct“

- počáteční množství kopií templátu
- definovaný v exponenciální fázi PCR
- stejná účinnost PCR ve všech reakcích
- účinnost štěpení fluorogenní sondy nebo vazby fluoroforu na DNA
- citlivost detekce
- čím menší Ct tím větší počet kopií templátu na začátku reakce



A > B > C

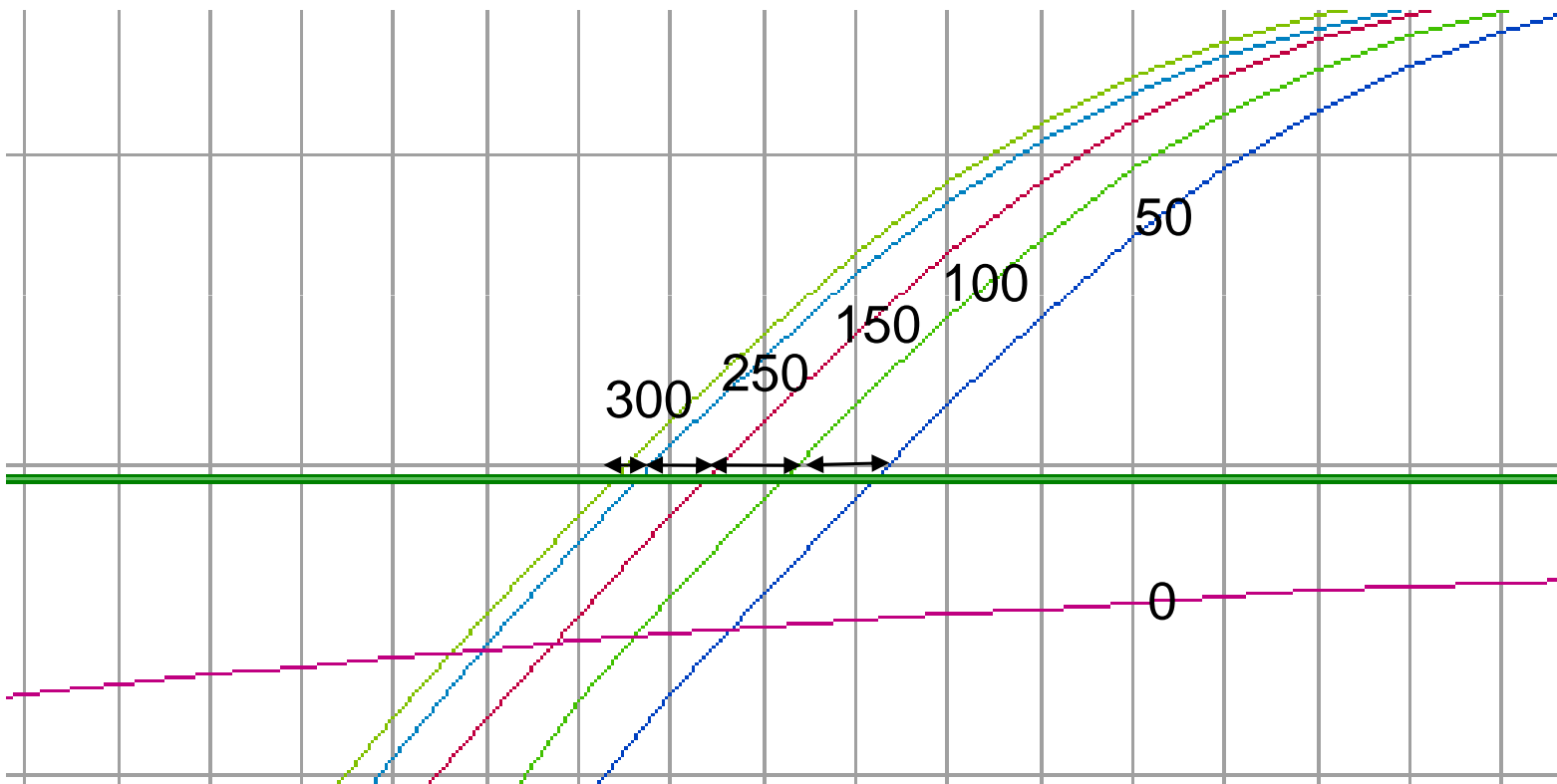
Treshold cycle „Ct“

- rozdíl 1 Ct – dvojnásobné množství templátu $2^1 = 2$
- kolika cyklům odpovídá odpovídá 10ti násobný rozdíl v množství templátu?

(předpokládáme 100% účinnost PCR)

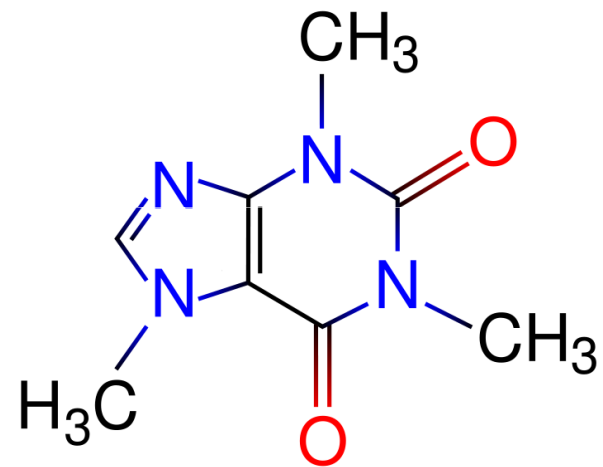
$$2^n = 10$$

$$n = \log_{10} / \log_2 = 3,32$$



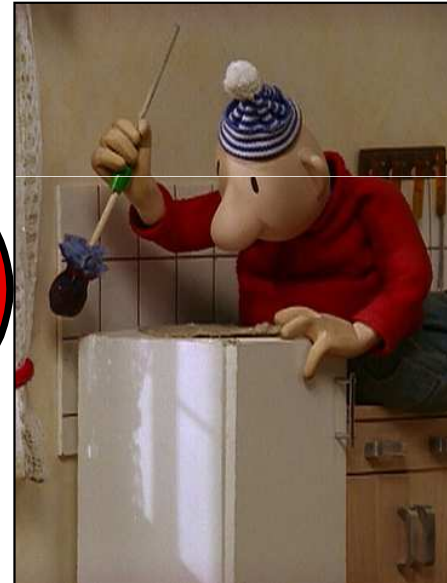
c [ng/μl]	Ct
50	28,16
100	27,16
150	26,66
250	26,06
300	25,66

Přestávka



(Kofein)

Faktory ovlivňující qPCR



Koncentrace Mg^{II+} (Mn^{II+})

- Kritický faktor pro DNA polymerázy

- Např. Tth (*Thermus thermophilus* HB-8) Mn^{II+} (3-6mM)

Taq (*Thermus aquaticus*) Mg^{II+} (3-4mM)

- Některé polymerázy preferují určitou formu Mg^{II+} , mimo $MgCl_2$ např. $MgSO_4$ nebo $Mg(OAc)_2$

Koncentrace primerů

- obvykle 100-900nM

- ne vždy poskytuje ekvimolární koncentrace nejlepší výsledek

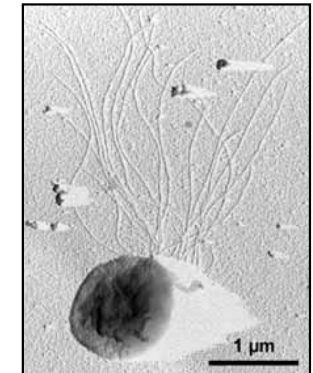
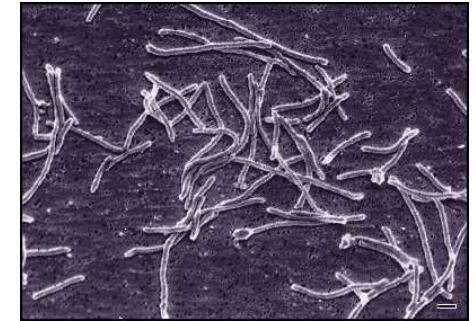
Koncentrace sondy

- obvykle 100-400nM

- volba sondy podle typu analýzy a žádaného výstupu (genová exprese, SNP, absolutní kvantifikace...)

DNA polymerázy

- Vyžadují 3'OH primer
- Teplotní stabilita - nejvyšší katalytická účinnost mezi 70-80°C
- Výrazná ztráta aktivity při nižších teplotách
 - např. Taq při 37°C má pouze 10% své normální aktivity
- *Fidelity*, maximální amplifikovatelná délka amplikonu
- bakteriální Taq *Thermus aquaticus*
- nízká *fidelity* - absence 3' > 5' exonukleázové aktivity (proofreading)
- Archeální enzymy
 - *Thermococcus* sp. (*T. gorgonarius*, *litolaris*, *kodakaraensis*)
 - Tgo, Vent, Pfx
 - *Pyrococcus* sp. (*P. furiosus*)
 - Pfu, Deep Vent



DNA polymerázy a PCR

Jméno	3'>5' Exoaktivita	Zdroj	Poznámka
Taq	-	<i>Thermus aquaticus</i>	Poločas rozpadu v 95°C - 1,6 hod.
Pfu	+	<i>Pyrococcus furiosus</i>	Nejmenší error-rate
Vent (Tli)	+	<i>Thermococcus litoralis</i>	Poločas rozpadu v 95°C - 7 hod.

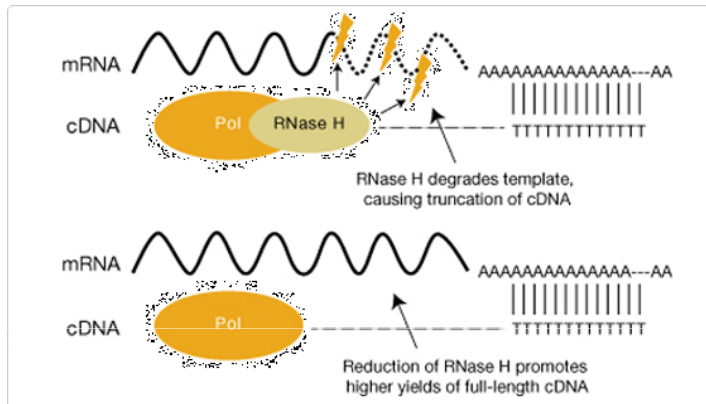
- Zajištění 3' > 5' exonukleázové aktivity zvyšuje specifitu reakce
- Některé aplikace (TaqMan) vyžadují 5' > 3' exonukleázovou aktivitu polymerázy (odbourání sondy, in vivo RNA primerů při syntéze Okazakiho fragmentů), jiné aplikace (molekulární majáky, scorpions) naopak vyžadují polymerázy bez nukleázové aktivity

RT PCR

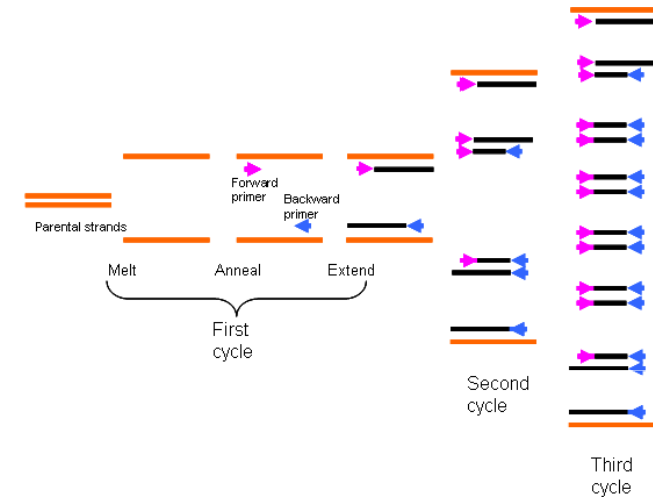
Reverse Transcription PCR

- dvě na sebe navazující enzymatické reakce

Reverzní transkripce



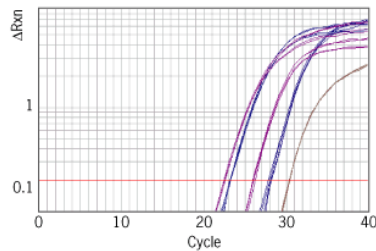
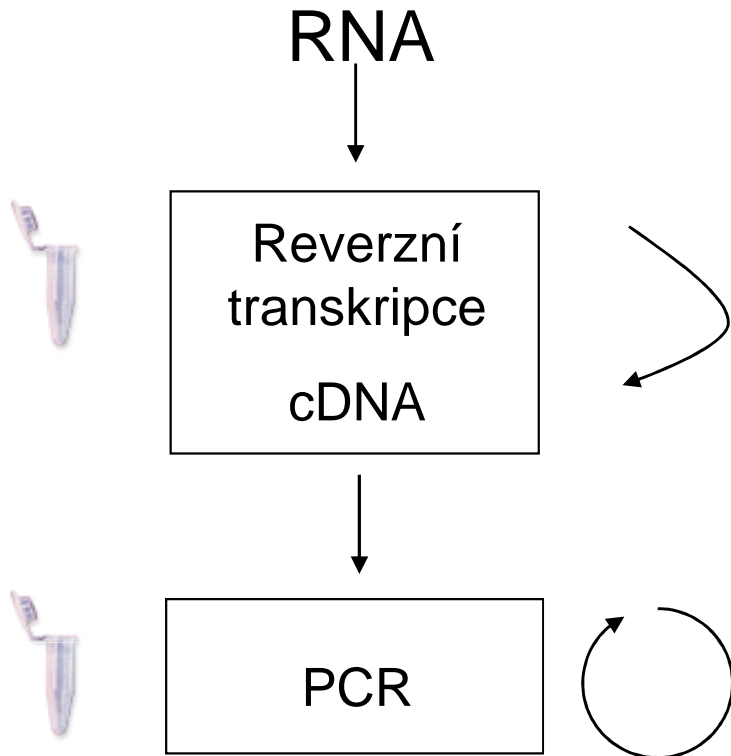
PCR



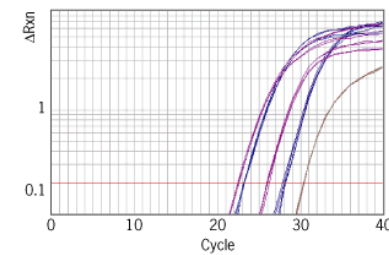
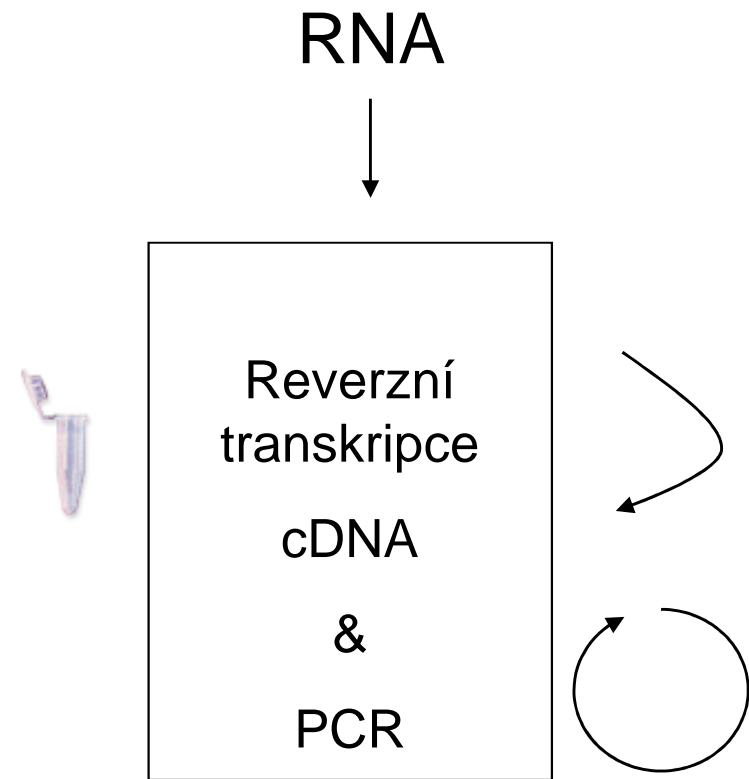
- mnohonásobně citlivější než např. northern/dot blot, RNase /S1 protection assays, nebo ISH

- exprese mRNA, detekce a kvantifikace virů atd.

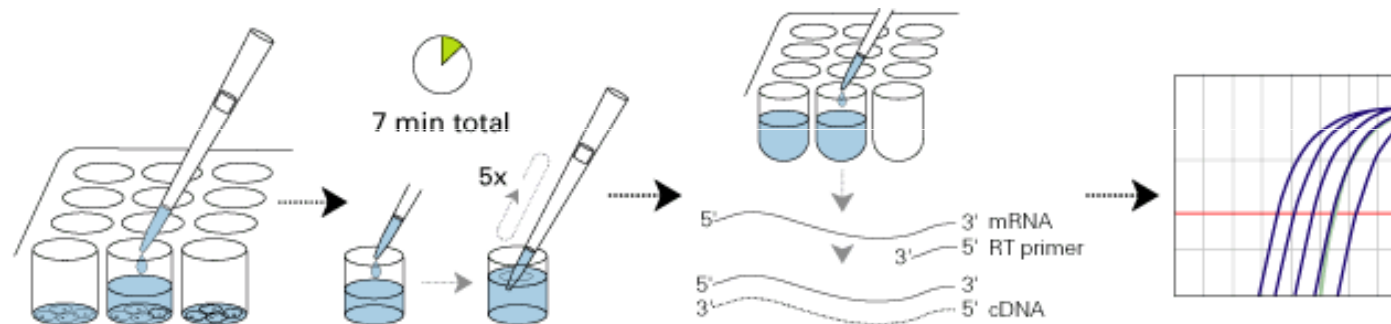
„two step“ RT-PCR



„one step“ RT-PCR



„Cells to Ct“ approach



Cell Lysis

1. Remove culture media. Wash cells with PBS.
2. (Optional) Dilute DNase I into Lysis Solution
3. Add Lysis Solution and mix 5 times
4. Incubate for **5 min** at **room temp** (19–25°C)
5. Add Stop Solution and mix 5 times
6. Incubate for **2 min** **room temp**

Reverse Transcription (RT)

1. Assemble an RT master mix and aliquot into reaction tubes/plates
2. Add lysate (up to 45%) and mix thoroughly
3. Run the RT thermal cycle

Real-Time PCR

1. Assemble a PCR cocktail and aliquot into reaction tubes/plates
2. Add cDNA (up to 45%) and mix thoroughly
3. Run the PCRs in a real-time PCR instrument

Figure 1. Samples are Ready for RT-PCR in Just 7 Minutes. The TaqMan® Gene Expression Cells-to-CT™ Kit requires only 7 minutes at room temperature to release nucleic acids into a cell lysate solution. No centrifugation is needed, and the solution is compatible with RT and real-time PCR (optional DNase treatment included).

One step **nebo** two step PCR?



One tube/two enzymes			Two tubes/two enzymes		
Feature	Advantages	Disadvantages	Feature	Advantages	Disadvantages
Reduced hands-on time	Fewer errors More rapid Higher throughput		Dedicated enzymes	Separate optimisation enhanced sensitivity	More pipetting errors
Less pipetting	Fewer errors		Multiple priming options	Separate cDNA pool Multiple targets	
Reagents added at start	Less contamination	No separate optimization	cDNA synthesis	Safer long term storage	
Higher temperature	Higher specificity	Target specific priming only			

Reverzní transkripce

- templát polyribonukleotidy i polydeoxyribonukleotidy
- syntéza DNA na základě RNA templátu - tzv. RDDP nebo DDDP aktivita (RNA/DNA directed DNA polymerase)
- replikace retrovirů (HIV)



Průběh RT

1. RDDP syntéza DNA řetězce podle RNA templátu
2. odbourání RNA, RNase H
3. DDDP syntéza druhého DNA řetězce

Reverzní transkripce

Primery

- endogenní náhodný priming – nežádoucí variabilita v PCR

- náhodné primery (hexamery, oktamery, dekamery)

- převažující frakce cDNA – rRNA, problematická determinace low copy targets
- nadhodnocuje množství mRNA vůči specifickým primerům

- oligo dT

- poly A mRNA
- histony nebo virové geny postrádají poly A
- nutná RNA o vysoké kvalitě (nefragmentovaná)
- „anchored oligo dT“

TTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
NNNNNNNNNAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

- specifické primery

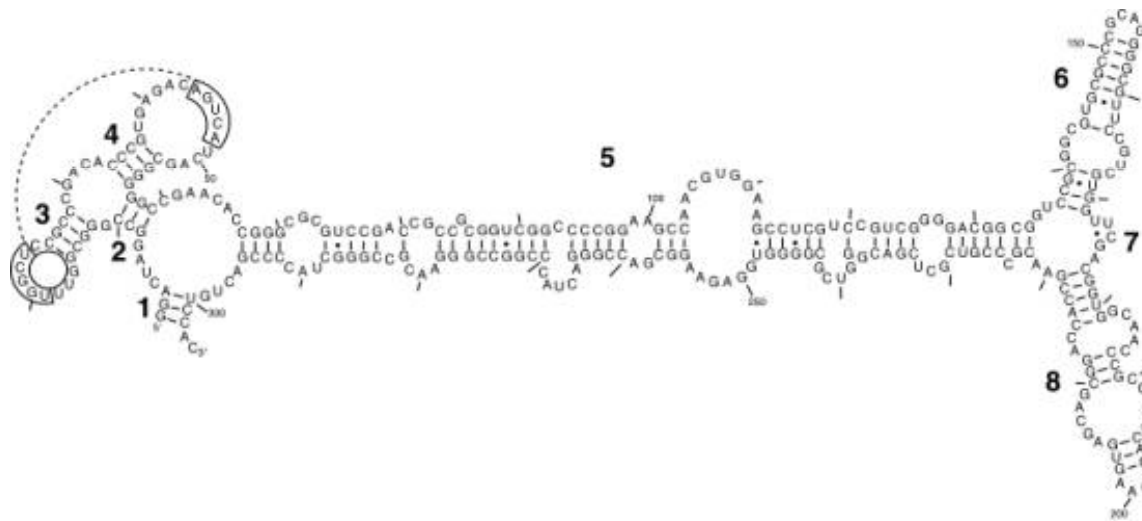
- nejvhodnější pro kvantifikaci
- separátní reakce pro jednotlivé stanovované sekvence

NTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
NNNNNNNNNAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Reverzní transkripce

Reverzní transkriptáza

- vysoké procento chyb (nemají proofreading)
- citlivost k sekundárním strukturám
 - způsobí terminaci polymerace nebo vynechání úseku sekundární struktury
- vysoká procesivita v případě malých amplikonů - krátké molekuly cDNA
- optimální reakční teplota 50-55°C
- dvojmocné ionty, Mn^{II+} , Mg^{II+}
 - fidelity



Reverzní transkripce

Aditiva

- optimalizace účinnosti RT
- ovlivňují termostabilitu enzymu nebo tvorbu sekundárních struktur templátu
- různé výsledky s různými enzymy a reakčními podmínkami

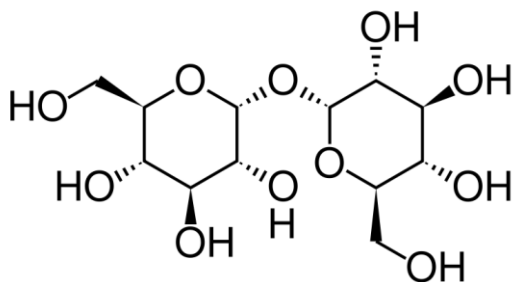
Trehalóza

0,6M/15% glycerol - brání tepelné inaktivaci enzymu

Zvyšuje enzymatickou aktivitu MMLV-RT při 60°C

Úspěšná syntéza řetězců o délce 10kb

Zvýšení specifiky odT primerů (Superscript II)



Betain (trimethylglycerin)

Osmoprotektant

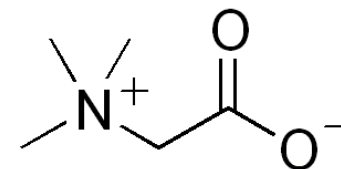
Stabilizace AT párů

Snížení termostability GC párů – snížení T_m

Kombinace 2M betainu a 0,6M trehalózy

Závislost na templázu a amplikonu

Optimalizace



Reverzní transkripce

RNáza H

degradace duplexu cDNA/RNA

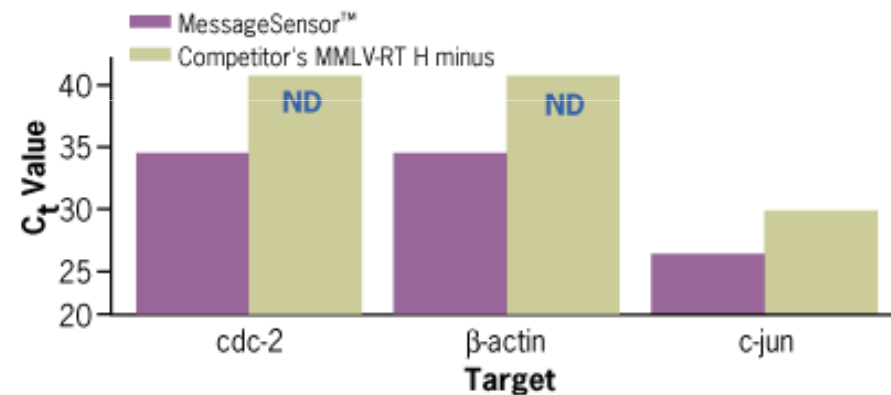
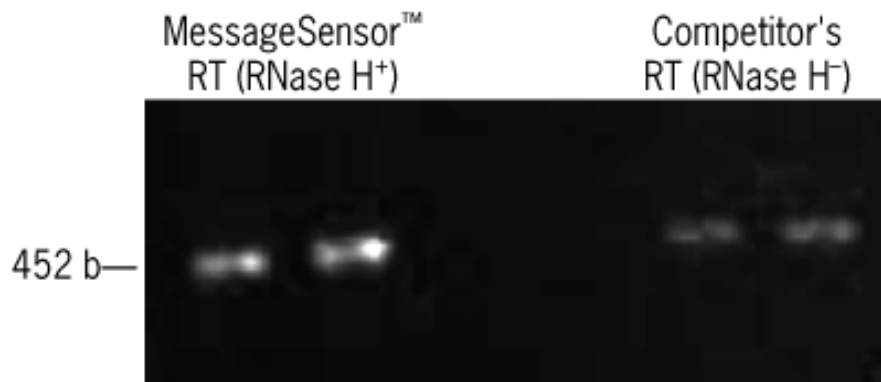
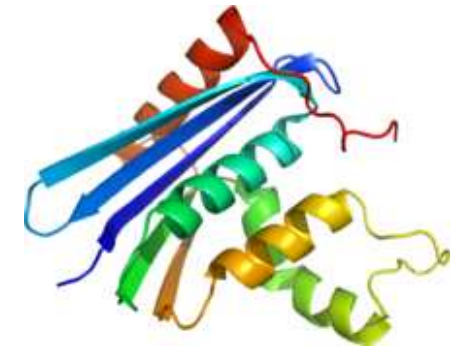
Kompetuje se syntetickou aktivitou RT (Degradace duplexu DNA primer/RNA proběhne

s větší pravděpodobností než extenze řetězce) = snížený výtěžek cDNA

Ale:

Zároveň je klíčová pro PCR

– neodbouraná RNA omezuje hybridizaci primerů a snižuje citlivost PCR

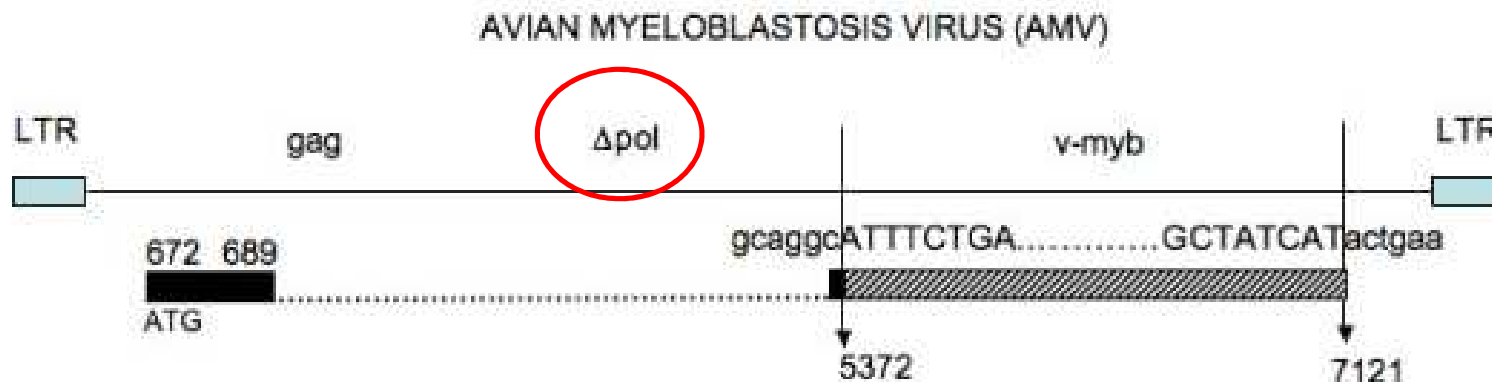


- tvrdé denaturační podmínky (97°C)

Reverzní transkripce

AMV (Avian myeloblastosis virus) RT

- Syntéza DNA z DNA nebo RNA templátu
- DNA primery, oktamery a delší jsou efektivnější než hexamery
- Nekompetitivně inhibovaná tRNA
- Optimální reakční teplota 42°C
- Modulární enzym
- *Thermoscript* (Invitrogen) – vyšší teplotní stabilita (65°C), redukováná aktivita RNázy H (tvorba cDNA knihoven)
- Četnost chyb $4,9 \times 10^{-4}$



Reverzní transkripce

MMLV (Moloney murine leukemia virus) **RT**

- Nižší aktivita RNázy H než v případě AMV-RT
- Termolabilní, optimum 37°C
- DNA i RNA primery, DNA primery 9-15bp vhodnější
- Modulární enzym
- Modifikované MMLV RT (redukce aktivity RNázy H, termostabilita)
 - *Superscript II* (Invitrogen), *Powerscript* (Clontech)
- Mg^{II+} - syntéza dlouhých cDNA
- *MessageSensor* (Ambion) – One step PCR, pro kvantifikace už od 500 fg RNA
 - RNase H +



Reverzní transkripce

DNA polymerázy s RT aktivitou

Tth (*Thermus thermophilus*), **Tfl** (*T. flavus*), **BcaBEST** (*Bacillus caldotenax*) -Takara

RDDP i DDDP aktivita

Vyšší termostabilita než RT

Vysoká četnost chyb (nemají 3' - 5' exonukleázovou aktivitu)

C. therm polymerase (Roche)

Klenowův fragment z *Carboxydotherrmus hydrogenoformus*

Vysoká teplotní stabilita a přesnost syntézy

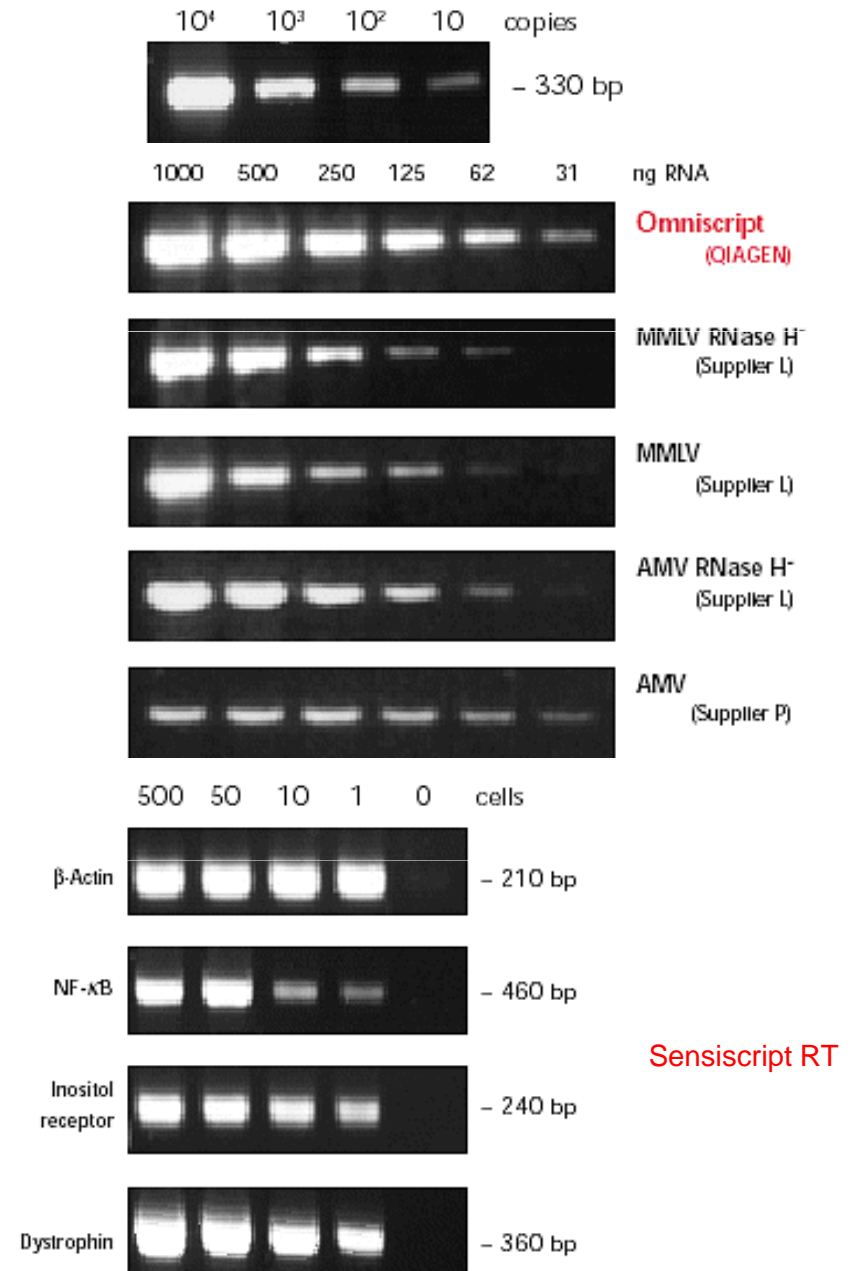
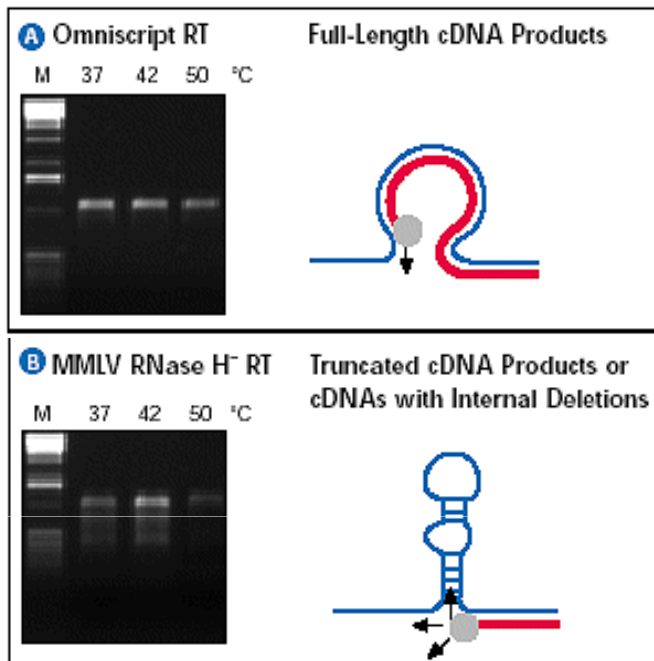
(četnost chyb poloviční ve srovnání s Tth)

Reverzní transkripce

Omniscript, Sensiscript RT (Qiagen)

Nejsou odvozeny od AMV RT nebo MMLV RT

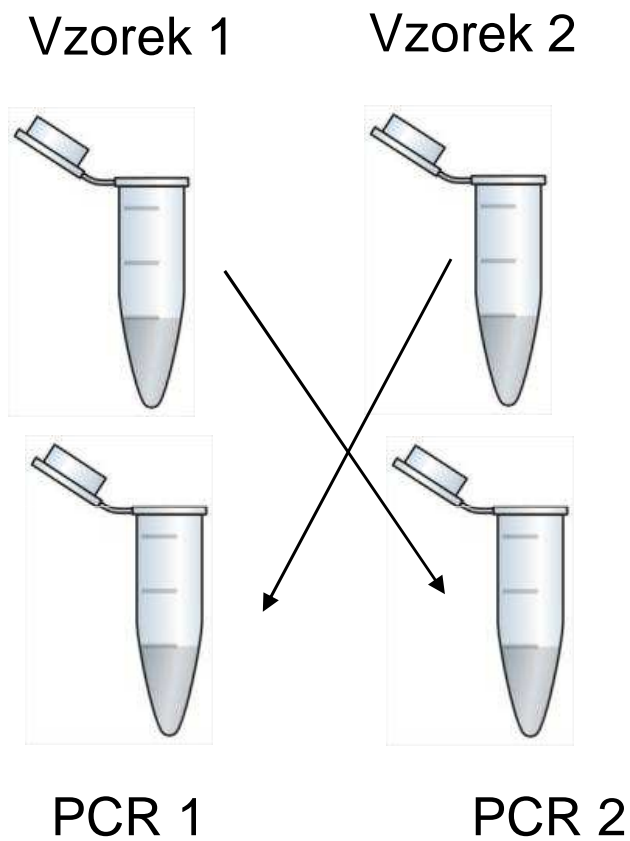
Obtížně transkribovatelné templáty



Kontaminace v PCR

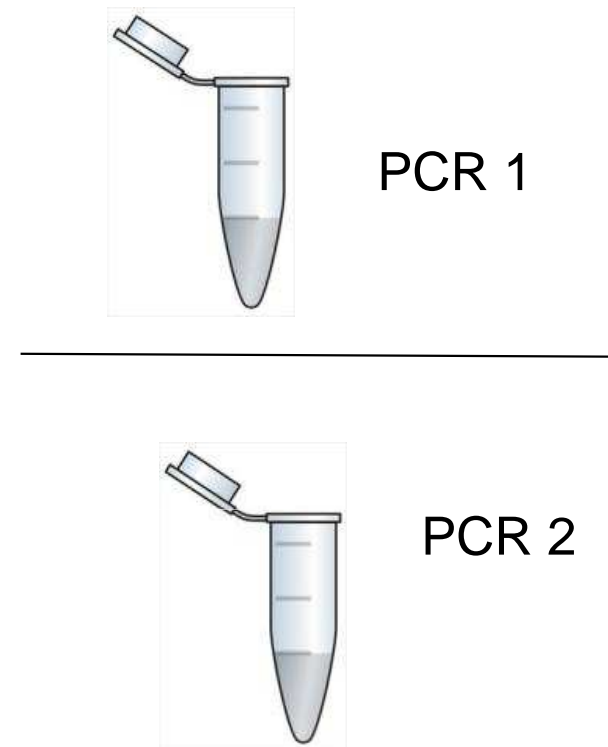
Cross contamination

Carry-over contamination



Vzájemná
kontaminace
vzorků

Přenos amplikonu
do dalších PCR



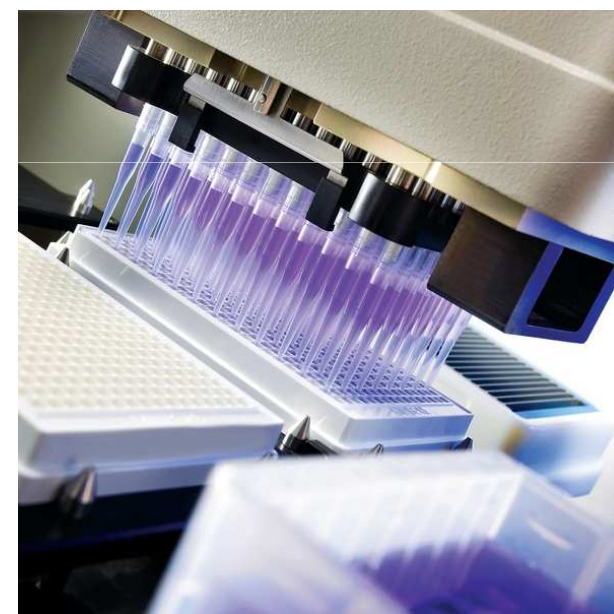
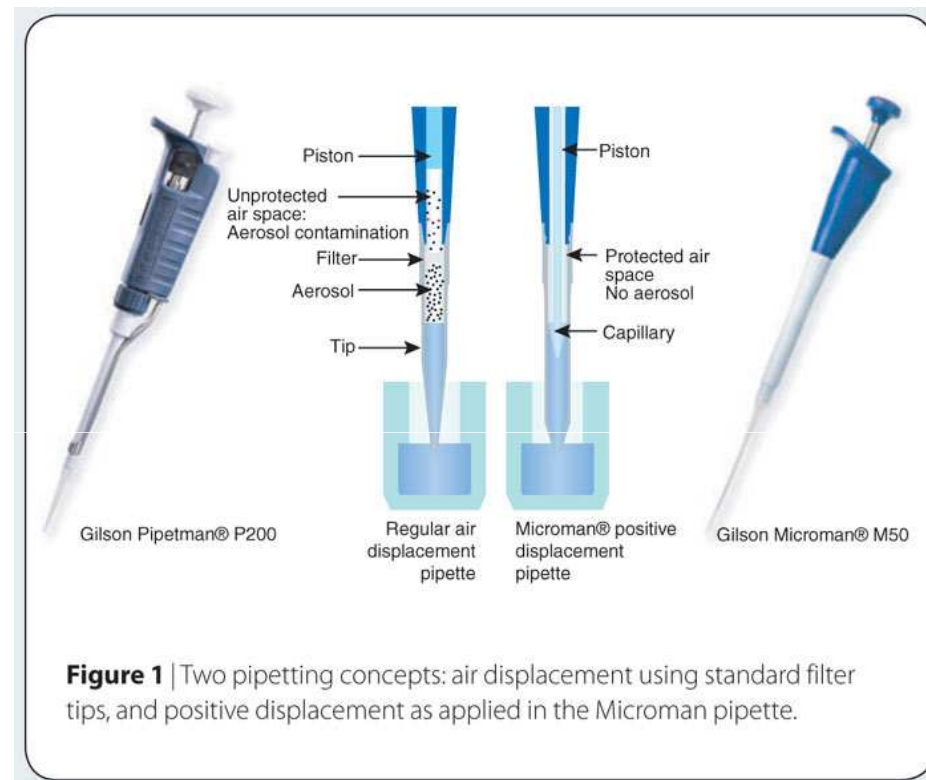
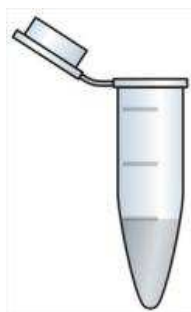
Kontaminace

Jak předejít kontaminaci

- Správná laboratorní praxe
- Plastik v „RNA/PCR“ kvalitě
- Automatizace



×



HotStart Taq

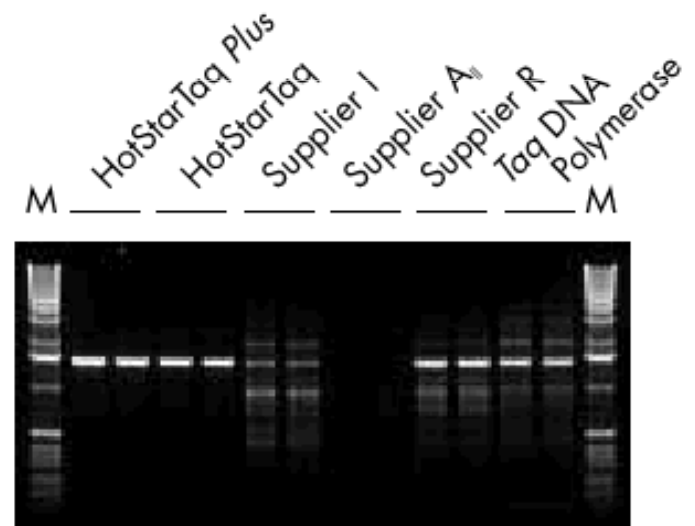
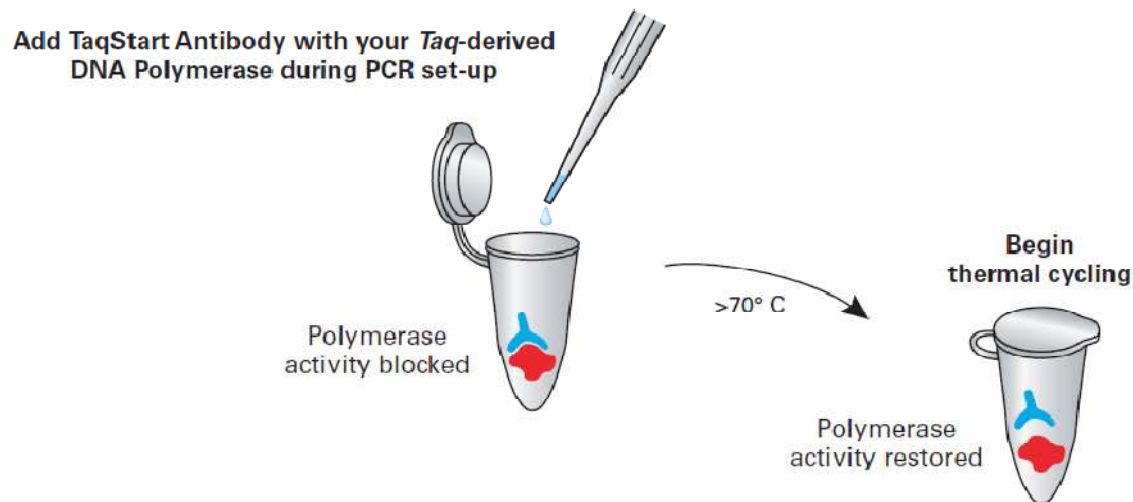
- Modifikace polymerázy (Chemická modifikace, MoAb)
- Upravená, teplotně senzitivní polymeráza

*Nucleic Acids Research, 2003, Vol. 31, No. 21 6139-6147
DOI: 10.1093/nar/gkg813*

Cold-sensitive mutants of Taq DNA polymerase provide a hot start for PCR

Milko B. Kermekchiev, Anatoly Tzekov and Wayne M. Barnes*

DNA Polymerase Technology Inc., 1508 South Grand Avenue, St Louis, MO 63104, USA and Department of Biochemistry and Molecular Biophysics, Washington University School of Medicine, 660 South Euclid Avenue, St Louis, MO 63110, USA



HotStart dNTPs

- Modifikace termolabilní tetrahydrofuranovou (THF) skupinou (cyklický ether)
- Brání extenzi a dimerizaci primerů
- Zvýšením teploty dojde k uvolnění THF a vzniku standardních dNTPs

Fig 1: Proposed activation mechanism of CleanAmp™ dNTPs

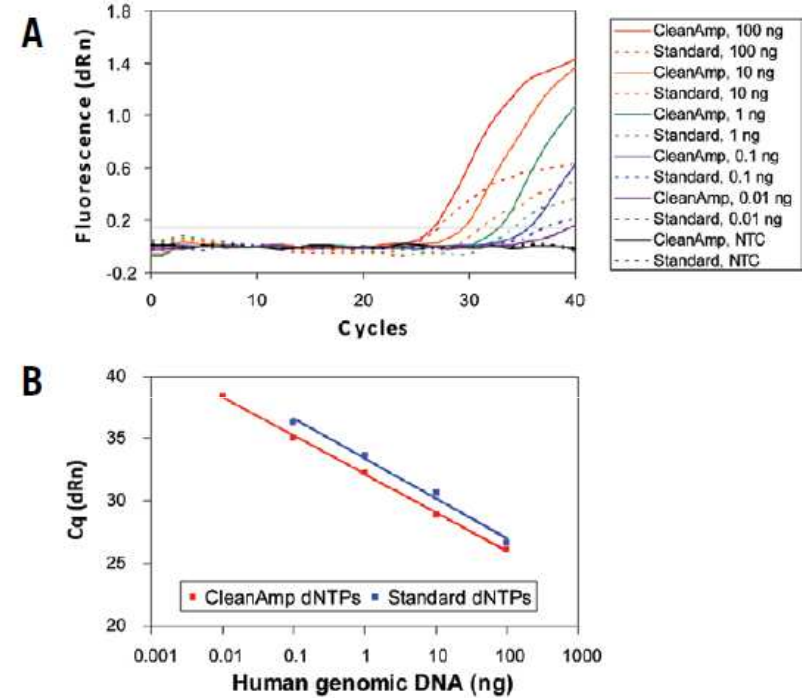
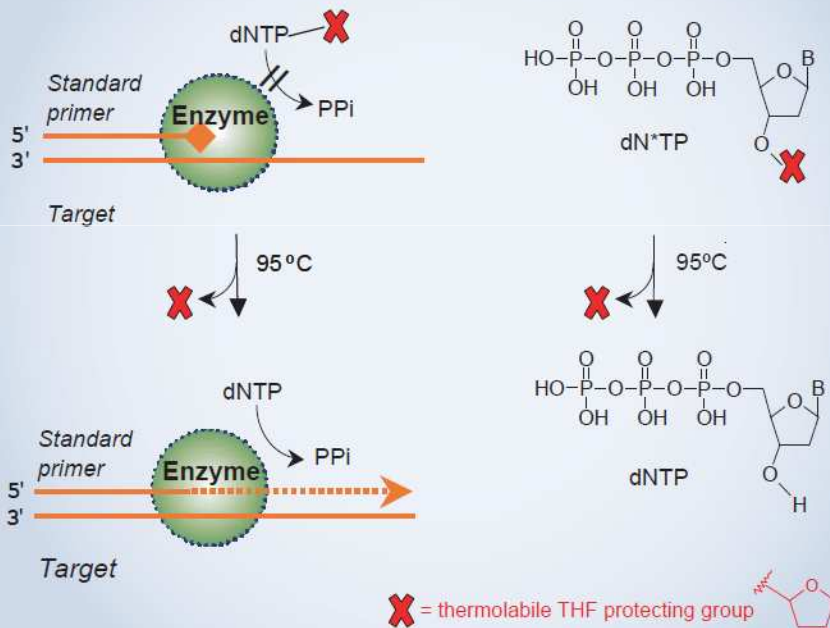


Figure 2. Comparison between standard dNTPs and CleanAmp™ dNTPs for amplification of a 187 bp target from human genomic DNA in quantitative PCR. Results are presented as an amplification plot (A) and a standard curve (B) with standard dNTPs: ($Y = -3.191 \cdot \text{LOG}(X) + 33.36$, Eff. = 105.8%) and CleanAmp™ dNTPs ($Y = -3.079 \cdot \text{LOG}(X) + 32.12$, Eff. = 111.2%).

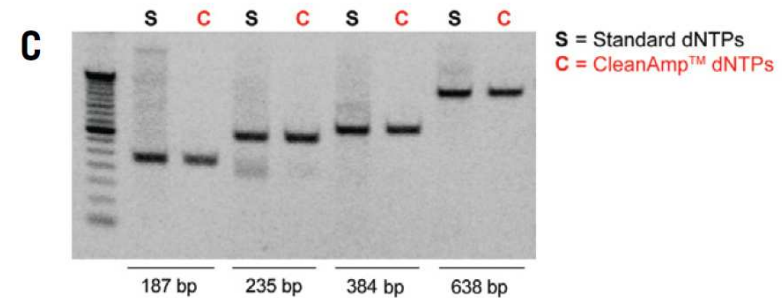


Figure 1. Comparison of (A) standard dNTPs and (B) CleanAmp™ dNTPs for amplification of a 235 bp target from human genomic DNA over a range of annealing temperatures. (C) Performance of standard and CleanAmp™ dNTPs for the amplification of four targets from human genomic DNA.

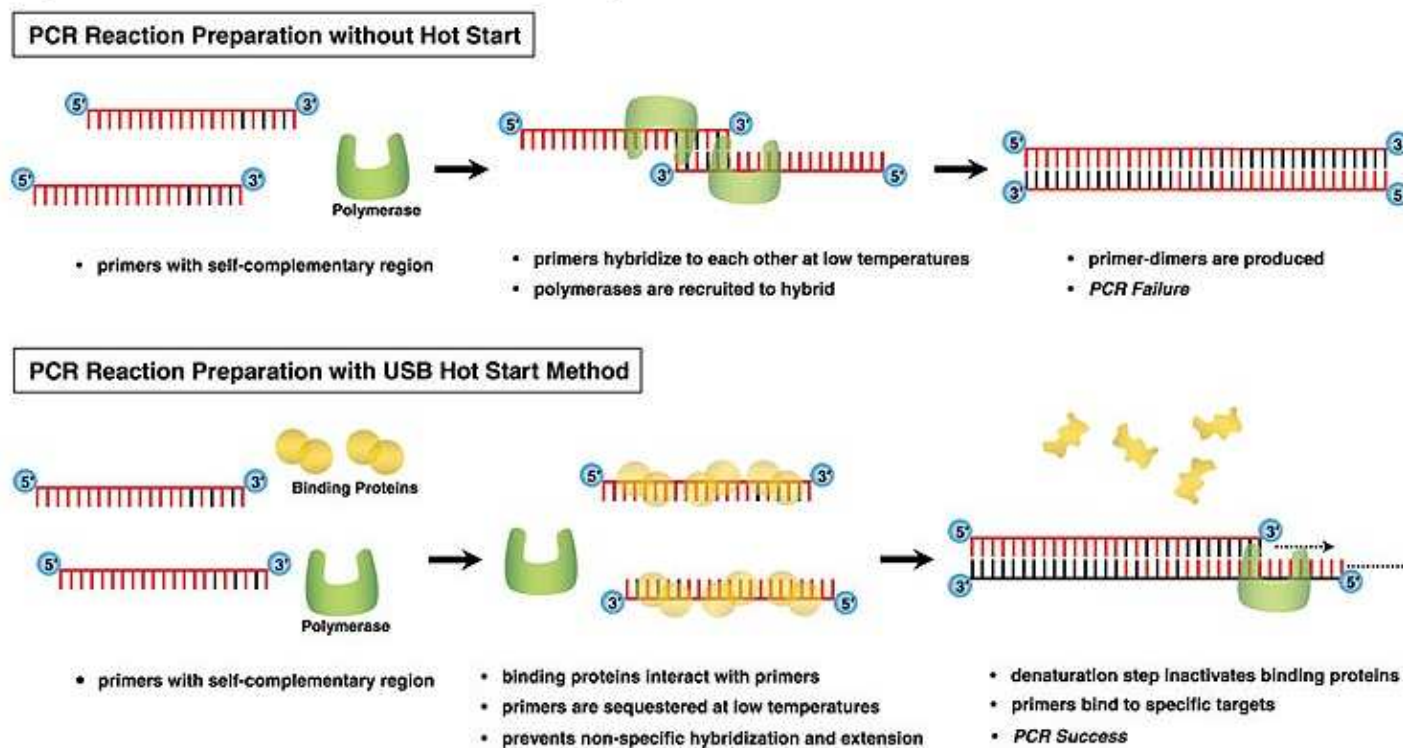
Alternativní HotStart přístupy

- Fyzické oddělení jednotlivých reakčních složek
- Vyvázení nebo chemická modifikace primerů

An alternative hot start technique for PCR in small volumes using beads of wax-embedded reaction components dried in trehalose

S.Kajjalainen, P.J.Karhunen^{1,2}, K.Lalu¹ and K.Lindström

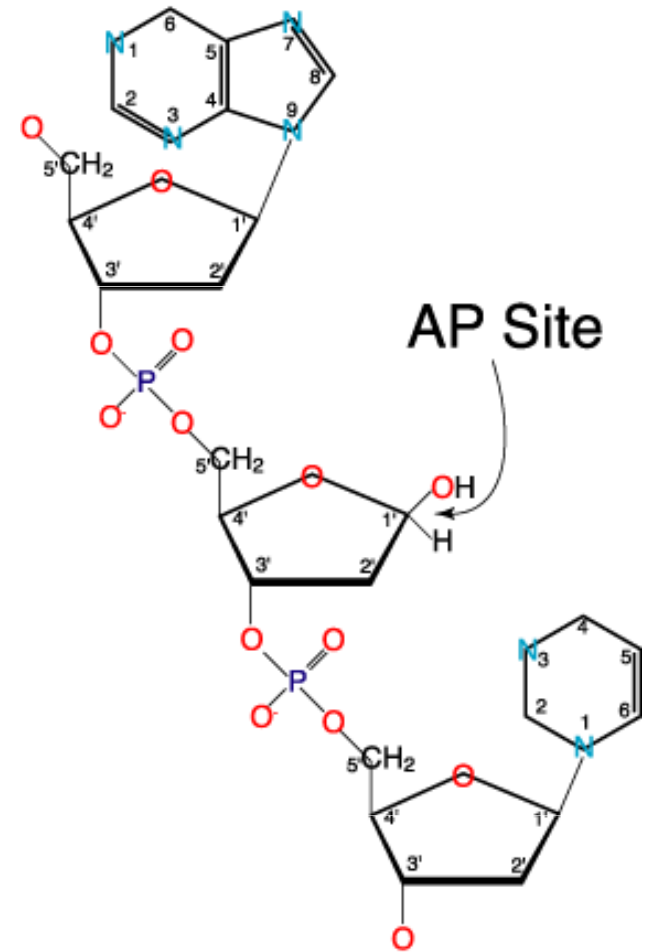
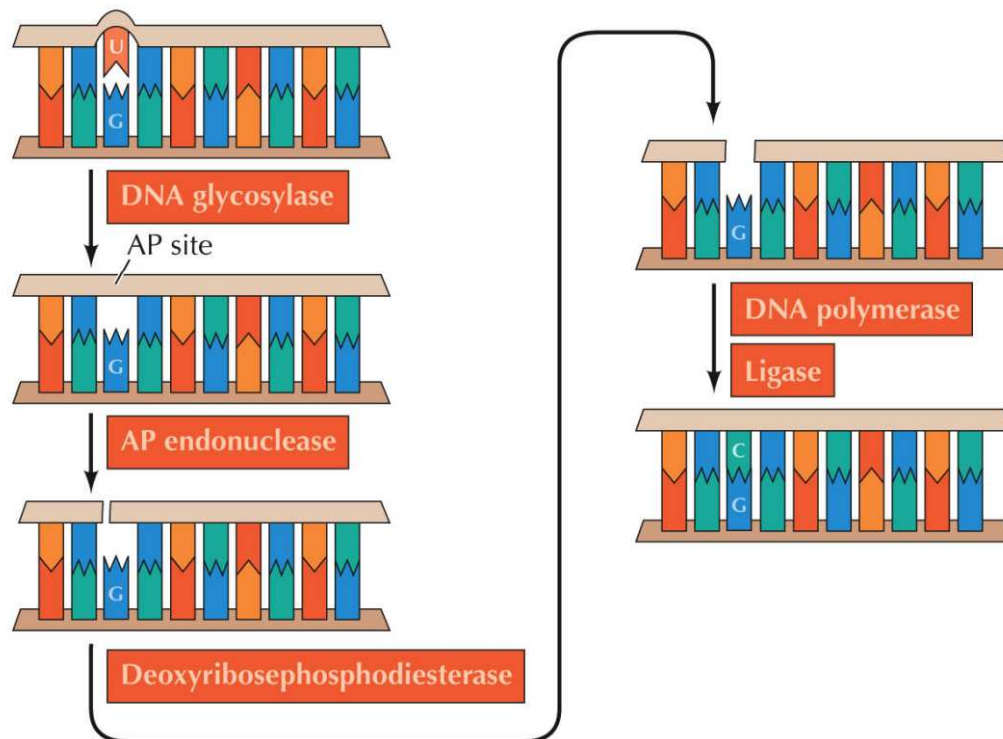
Fig. 1. USB HotStart-IT Method: Primer Sequestration



Uracil-DNA-glykosidáza (UNG)

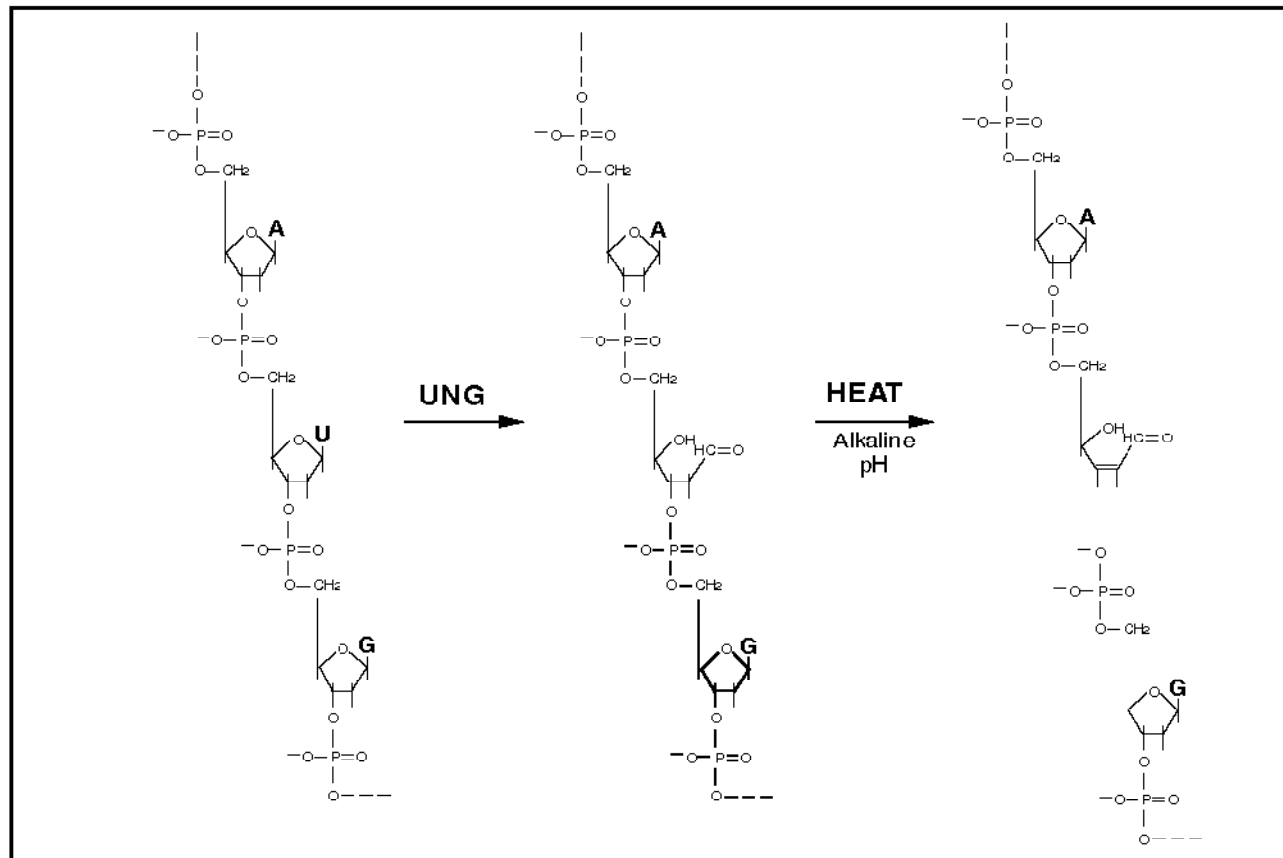
- odstraňuje uracil z DNA
- zahajuje bazovou excizní reparaci – dochází k odštěpení poškozené báze (deaminovaný cytosin) a vzniku AP místa (apurinové, apyrimidinové místo)

DNA containing U formed by deamination of C



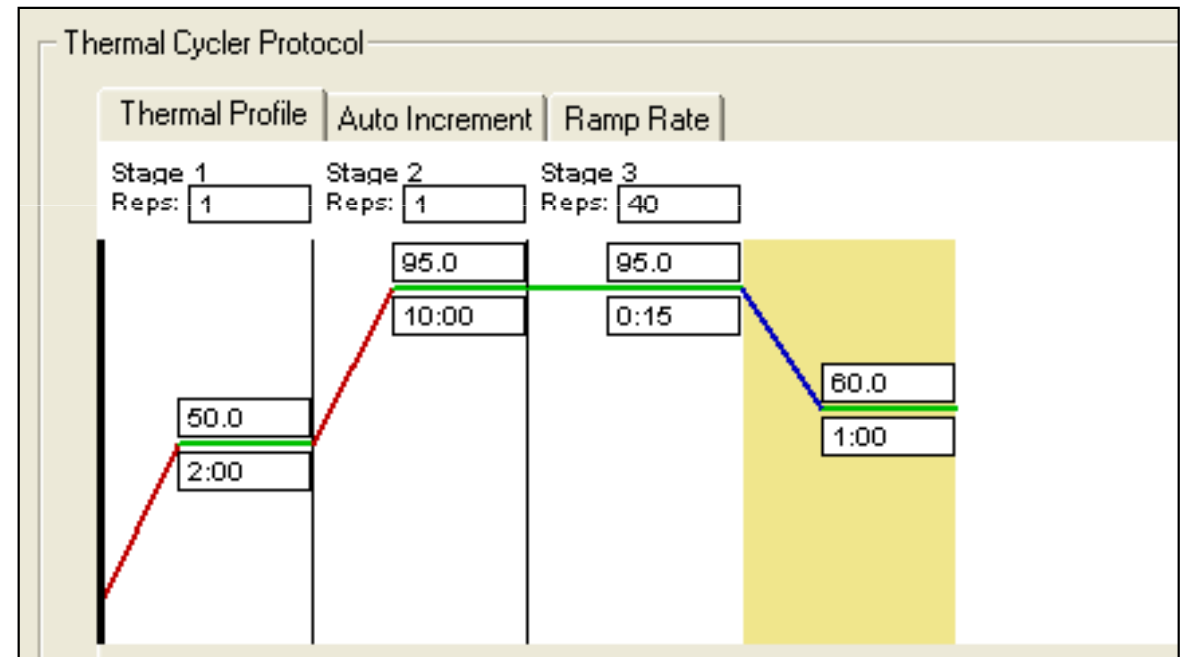
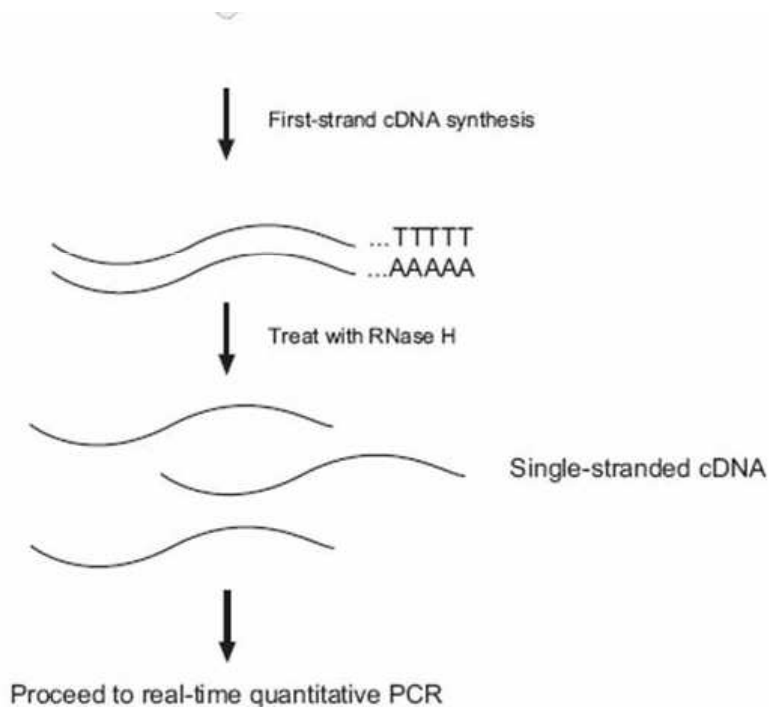
Uracil-DNA-glykosidáza (UNG)

- Pokud reakční PCR směs obsahuje dUTP místo dTTP, výsledný amplicon bude obsahovat „U“ místo „T“
- UNG rozpozná místa v DNA, která obsahují „U“ a štěpí je za vzniku AP místa
- DNA obsahující AP místa je termolabilní
- Lze tak zabránit „carry over“ kontaminaci – PCR produkt nemůže být reamplifikovaný



Uracil-DNA-glykosidáza (UNG)

- Použitím UNG a vhodné směsi dNTP, lze zabránit „carry over“ kontaminacím v laboratoři
 - PCR produkt nemůže být reamplifikovaný
- Vlastnosti DNA obsahující „U“ místo „T“:
 - dU mají stejnou schopnost hybridizace jako dT
 - lze ji použít i pro dideoxy-NTP sekvenování
 - PCR fragment lze přímo klonovat do UNG⁻ kmenů



Shrnutí

Po dnešní přednášce:

- umíte si popsat kinetiku PCR
- znáte rozdíl mezi *end-point* a *real-time PCR*
- víte, co to je R , R_n , ΔR_n , C_t
- rozumíte vztahu mezi C_t a množstvím amplikonu
- umíte popsat a rozhodnout se, kdy použít One Step a Two Step PCR
- víte, co to jsou DNA polymerázy a reverzní transkriptázy, znáte jejich charakteristiku i průběh reverzní transkripce
- víte, co to znamená HotStart PCR a UNG a jak předejít případným kontaminacím