

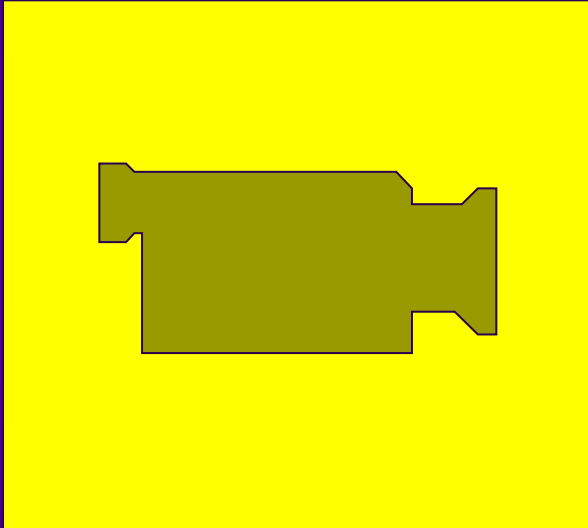
Polymerázová řetězová reakce



doc. RNDr. Milan Bartoš, Ph.D.

bartosm@vfu.cz

Přírodovědecká fakulta MU, 2012



Obsah přednášky

- 1) Co je to PCR, princip, jednotlivé kroky**
- 2) Technické provedení PCR**
- 3) Fyzikální faktory ovlivňující PCR**
- 4) Chemické faktory ovlivňující PCR**

Polymerázová řetězová reakce

**Dnes nejrozšířenější metoda
molekulární biologie**



Kdo za to může ?



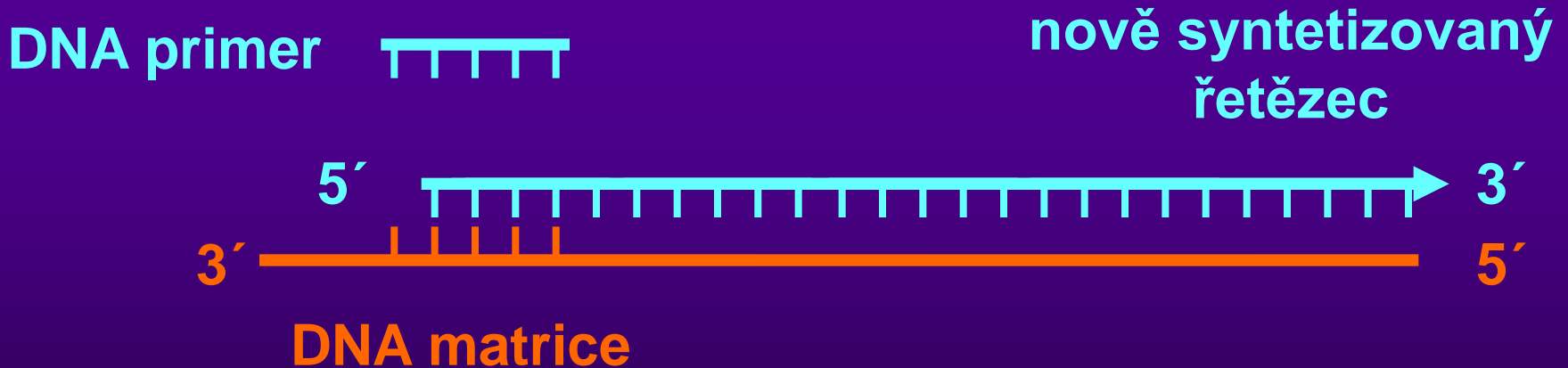
Kary Mullis 1985

Nobelova cena v roce 1993



Princip PCR

Polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction – PCR) umožňuje selektivní zmnožení (amplifikaci) určité oblasti DNA v podmínkách *in vitro*; a to procesem, který připomíná replikaci DNA *in vivo*



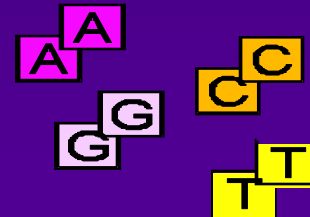
Komponenty PCR

*Thermus aquaticus, Thermococcus,
Thermophilus, Pyrococcus*

TAQ

puf
MgCl₂

DNA primery

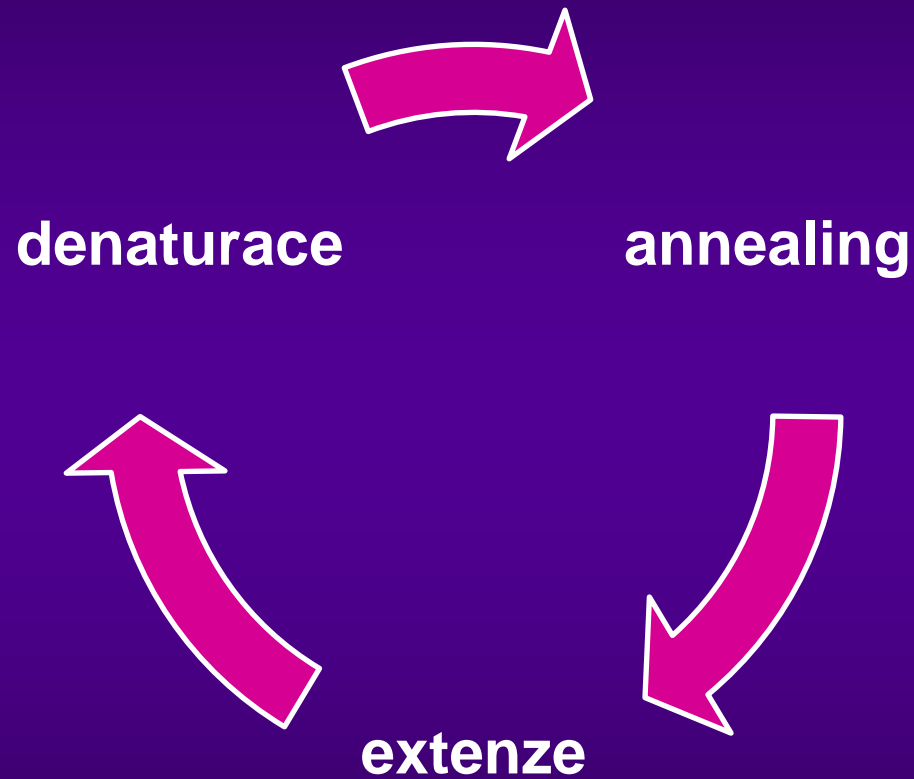


umělá syntéza

ssDNA

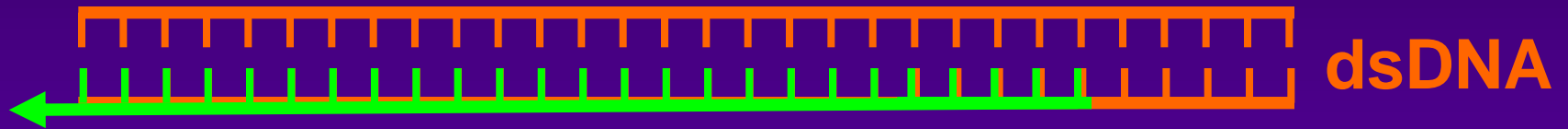
Denaturace 92-96°C

PCR probíhá v cyklech



1. PCR cyklus

1. denaturace (92-96°C)



2. annealing (45-72°C)

primární produkty

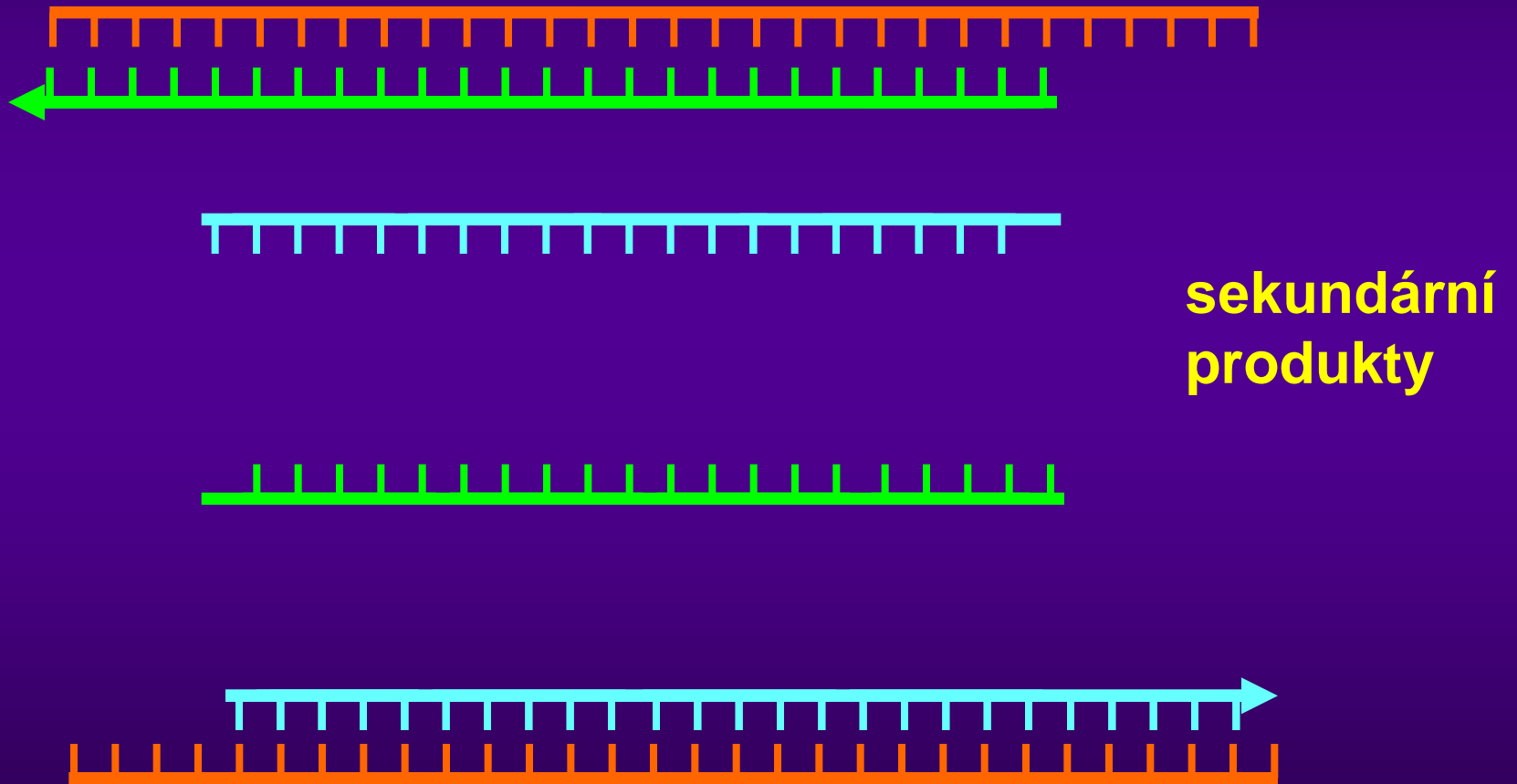
3. extenze (72°C)





**Primární produkty nás
nezajímají !**

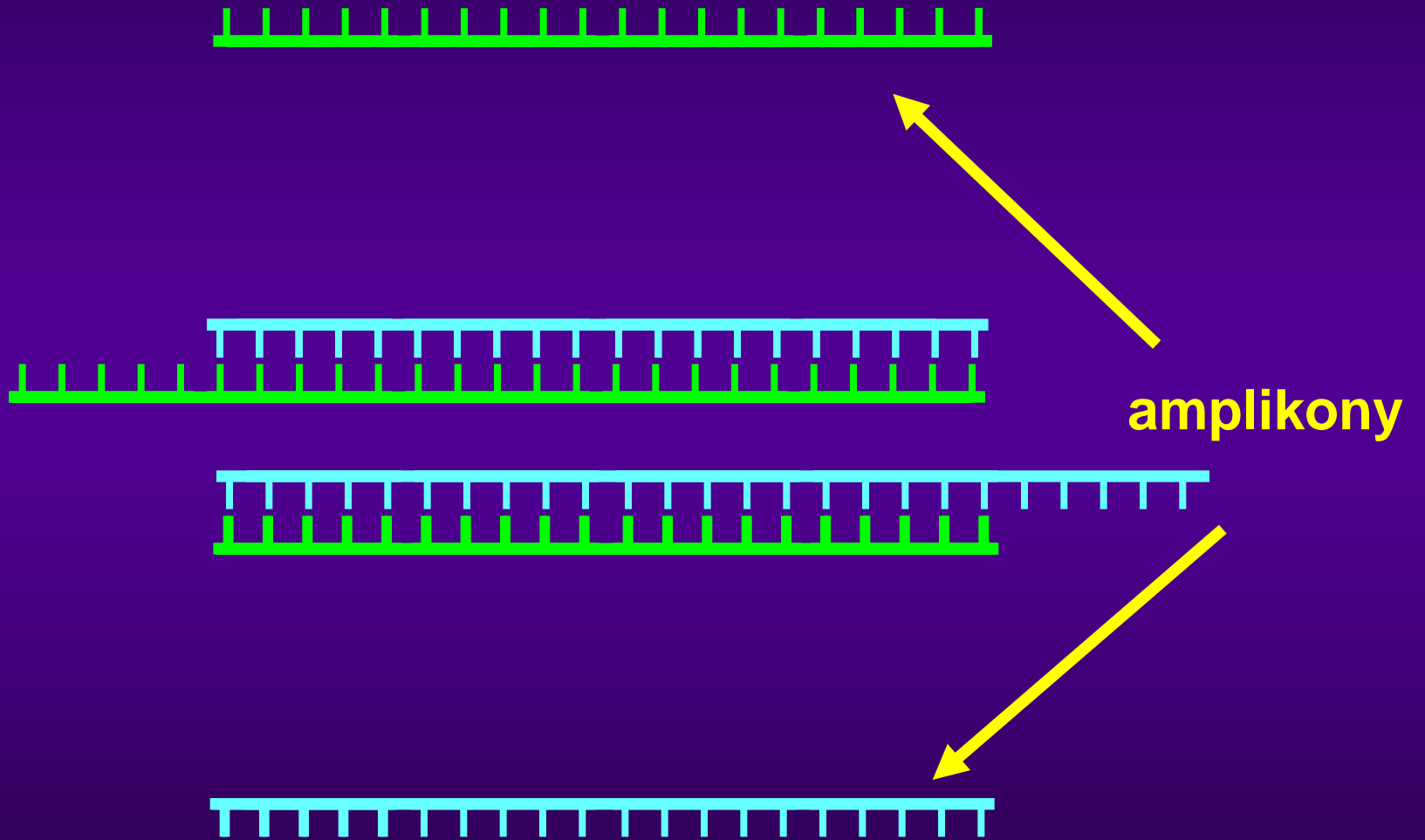
2. PCR cyklus



**Jenže sekundární
produkty nás taky
nezajímají !**



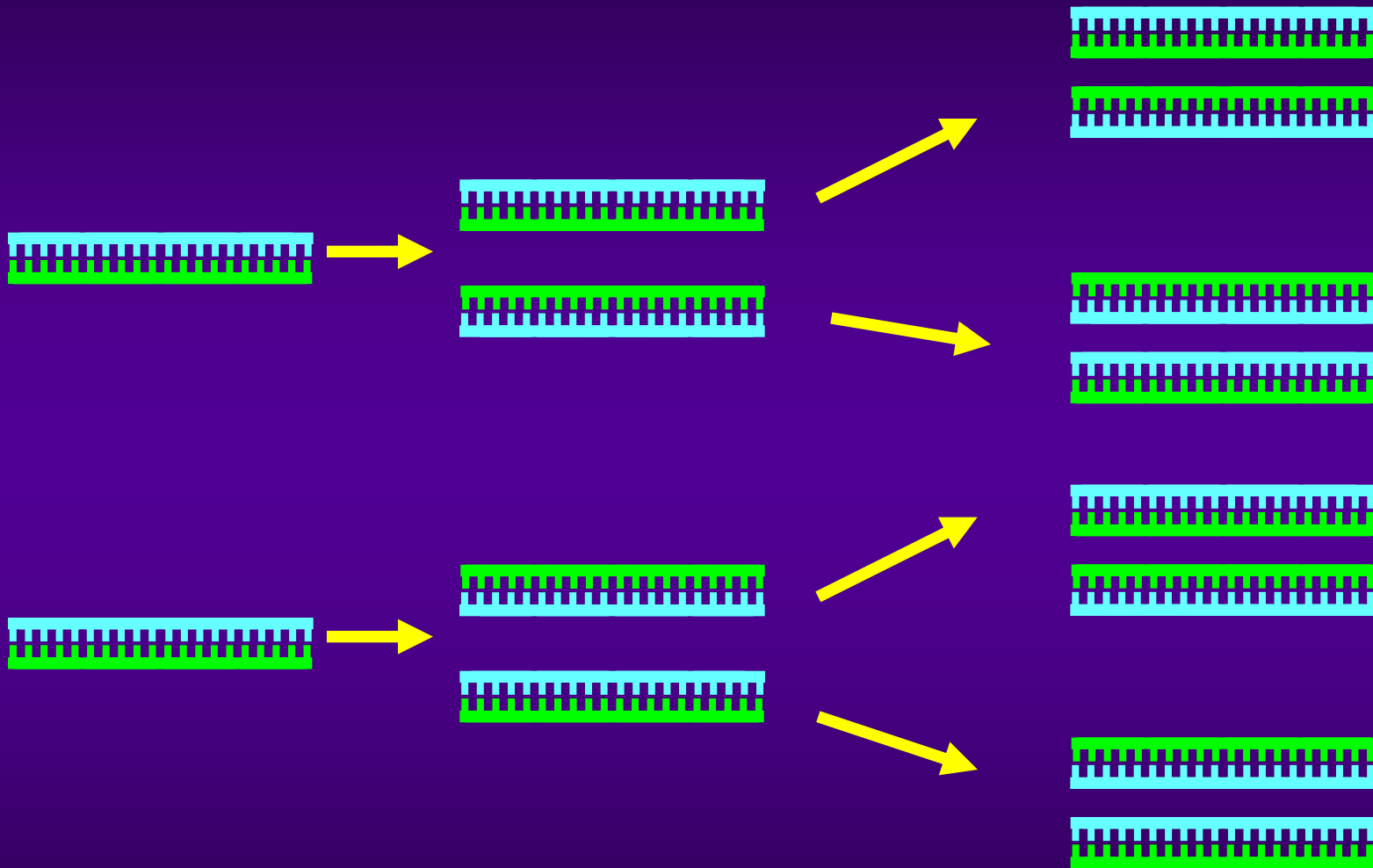
3. PCR cyklus



A teď se podívejte, jak rychle se amplikony „množí“, tedy amplifikují.



Další cykly



Z každé molekuly ampliconu vznikají dvě nové
Počet ampliconů vzrůstá geometricky

„Zázrak“ amplifikace

- **Každý amplikon je složen ze dvou řetězců = dvě matrice, které se v dalším cyklu zase zdvojí**
- **Počet amplikonů extrémně vzrůstá oproti počtu primárních a sekundárních produktů**
- **Po několika cyklech už amplikony v reakčních produktech naprosto dominují**
- **Primární a sekundární produkty tvoří jen minoritní složku ve výsledných produktech PCR**

Množení amplikonů

Cyklus č.	Primární	Sekundární	Amplikony	Celkem (pro X =1)
0	0	0	0	1
1	2	0	0	2
2	2	2	0	4
3	2	4	2	8
4	2	6	8	16
5	2	8	22	32
Obecně	$2x$	$x(2n-2)$	$(2^n-2n)x$	$(2^n)x$

X = počet matric na počátku, n = počet cyklů

Množení amplikonů – pověst o vzniku šachové hry



Výtěžek PCR

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



**A teď nás čeká šílené
počítání! ☹**

Výtěžek PCR - příklad

Kolik cyklů PCR musíte použít, aby bylo možno detekovat amplikony o velikosti 500 bp vzniklé z jedné kopie dsDNA ?

Zařízení (transluminátor) detekuje 5ng DNA.

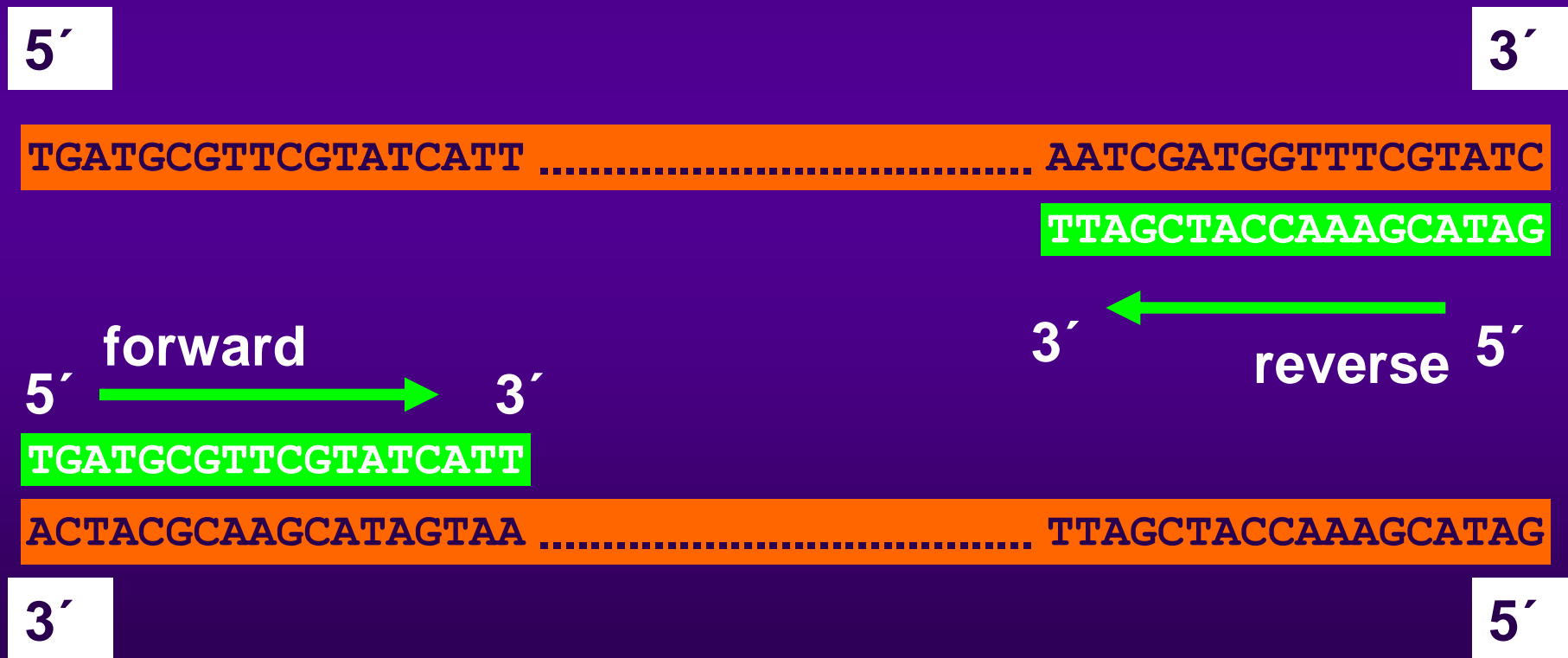
Výtěžek PCR - řešení

Musí proběhnout alespoň 34 cyklů

**Řešení je uvedeno v samostatném souboru
ve Wordu**

Délka a specifičnost amplikonů

je dána pozicí primerů na cílových sekvencích DNA-matrice

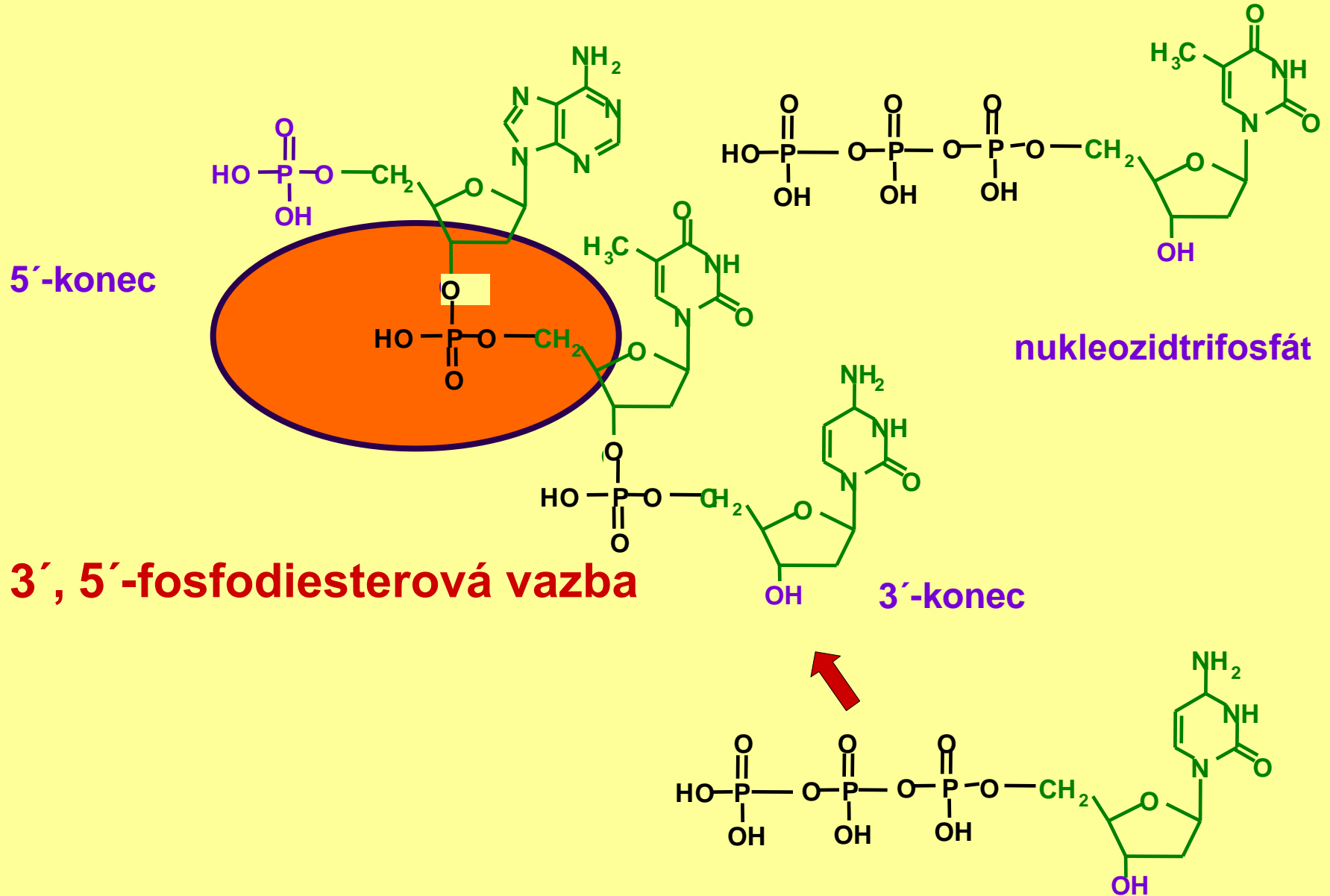


„Syntéza DNA probíhá jen ve směru $5' \rightarrow 3'$ “. Tak to příroda stvořila!

Tedy primery musí začínat $5'$ -koncem a končit $3'$ -koncem. Na $3'$ -konci je OH skupina, ke které se připojuje vstupující dNTP



Narůstání nukleotidového řetězce



Primer forward

- musí svým 3'- koncem směřovat „dovnitř“ budoucího amplikonu
- je komplementární ke „spodnímu“ řetězci
- ale má sekvenci „horního“ řetězce

5'

3'

TGATGCGTTCGTATCATT AATCGATGGTTTCGTATC

5' forward → 3'

TGATGCGTTCGTATCATT

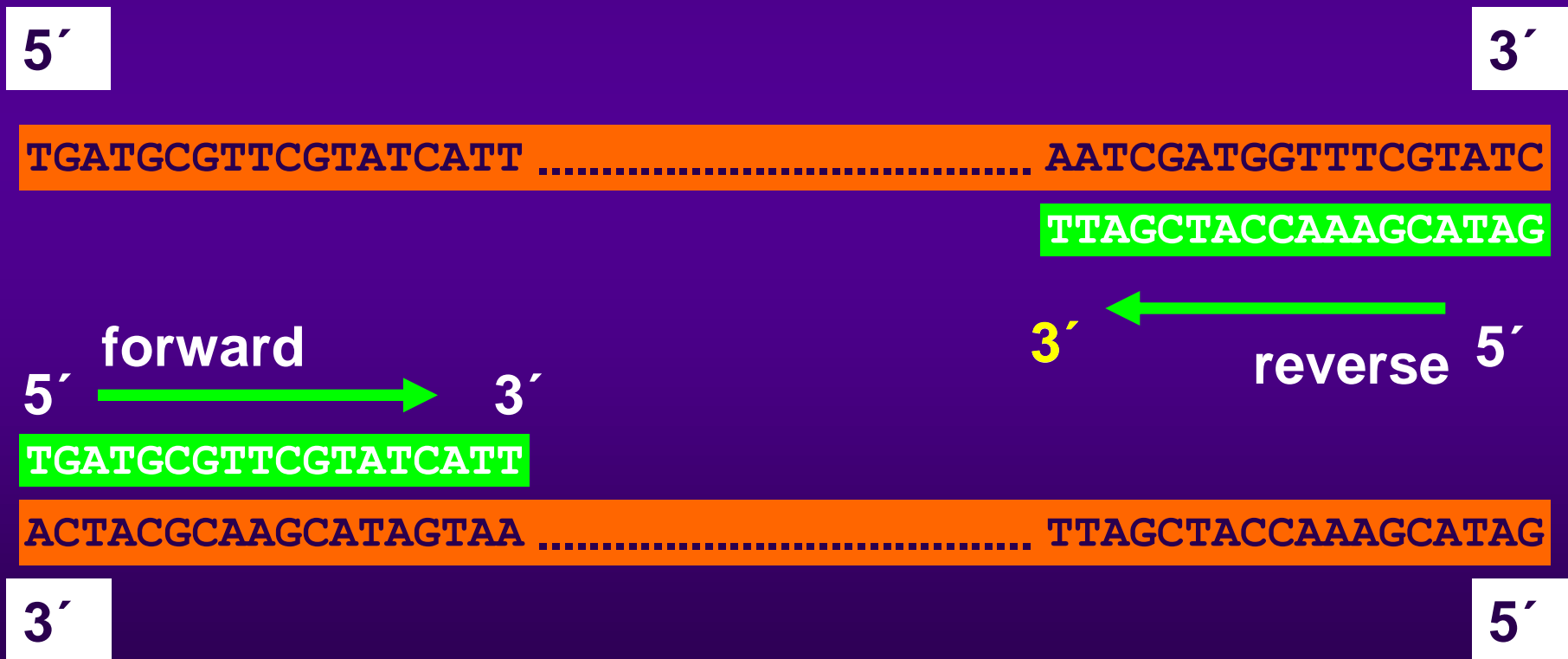
ACTACGCAAGCATAGTAA TTAGCTACCAAAGCATAG

3'

5'

Primer reverse

- musí svým 3'- koncem směřovat „dovnitř“ budoucího amplikonu
- je komplementární k „hornímu“ řetězci
- ale má sekvenci „dolního“ řetězce



POZOR !!!

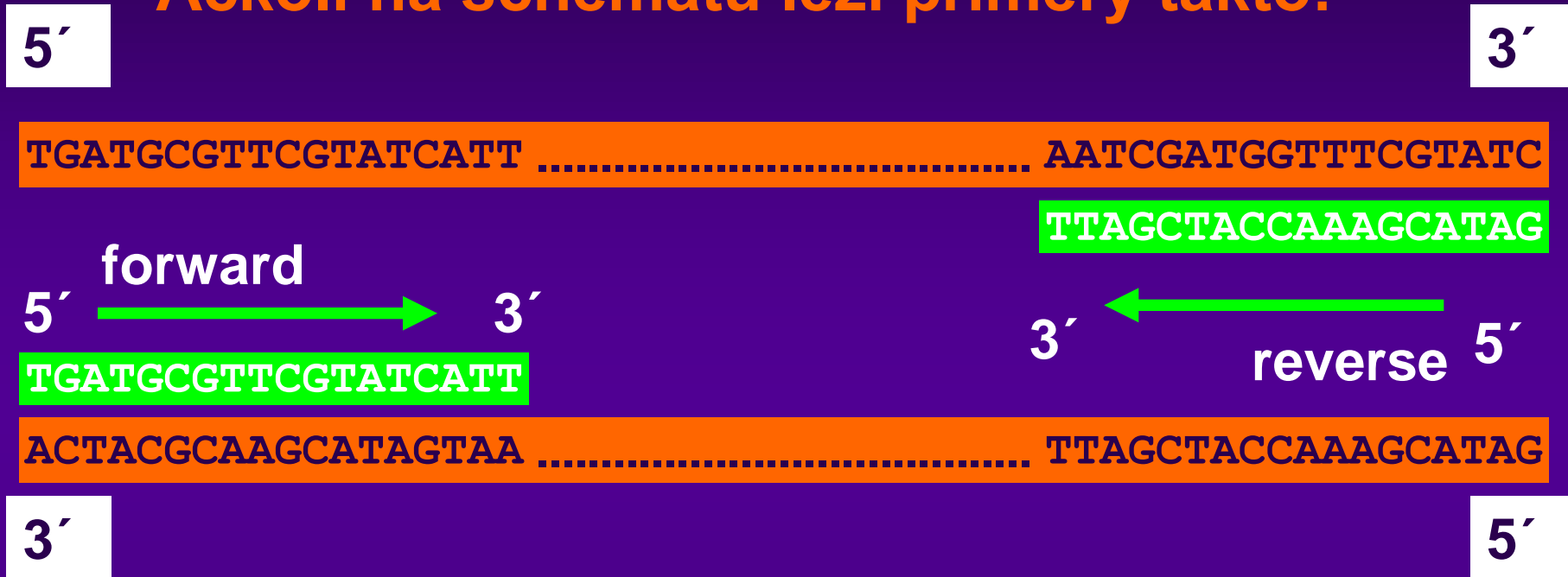
**Primery se zapisují ve směru
 $5' \rightarrow 3'$, tedy 5' - konec nalevo a
3' - konec napravo**

**Platí to jak pro primer forward (kde
je to jednoduché), tak pro primer
reverse – podívejte se na další
snímek, jak to dopadne !!!**



Jak zapsat primery „na papír“

Ačkoli na schématu leží primery takto:



Napsat „na papír“ je musíte takto:

forward

5' - TGATGCGTTCGTATCATT - 3'

reverse

5' - GATACGAACCATCGATT - 3'

A co když se spletu ?



Podívejte se, co se stane



Když napíšete primer reverse takto

reverse

5' - AATCGATGGTTTCGTATC - 3'

- syntéza z obou primerů bude probíhat ve stejném směru
- nebude docházet k amplifikaci

5'

3'



3'

5'

Když napíšete primer reverse takto

reverse

5' - CTATGCTTTGGTAGCTAA - 3'

- polymerace z takového primeru nemůže probíhat, řetězce nejsou antiparalelní

5'

3'

TGATGCGTTCGTATCATT AATCGATGGTTTCGTATC

TTAGCTACCAAAGCATAG

forward

5' → 3'

reverse
← 3' 5'

TGATGCGTTCGTATCATT

AATCGATGGTTTCGTATC

ACTACGCAAGCATAGTAA TTAGCTACCAAAGCATAG

3'

5'



**A teď zase nějaká
otázka! ☹**

Návrh primerů - příklad

Napište sekvenci primerů, které by mohly amplifikovat vyznačenou část daného úseku dsDNA

- znáte sekvenci jen jednoho z řetězců
- primery pište ve směru 5' - 3'

5' - TGA TGC AAA GTT CGC TCA GGT ACG ATT CCC
AAA TGT GGA GCT TAG TCG ATG ATG GGC AAA
TCT GTG ATT ATC CGA CGT CCC ATG TGC GTC
AAA TGC CGT AGG ACC CTA TTT TGA CGT CCT
GCT GGT ACG CAT CAT CCC TGG TGA CGT CCT
ACG TGC TGC GCT CGC ACG ATG CGT ACG AAC
GCT CGT CGG - 3'

Jak dlouhý bude vzniklý amplikon ?

Návrh primerů – řešení

Primer forward

5' – AAA GTT CGC TCA GGT ACG – 3'

Primer reverse

5' – CGT ACG CAT CGT GCG AGC – 3'

Amplikon bude mít délku 171bp

Vlastnosti primerů I

- **zodpovědné za specifičnost PCR**
- **délky 14 až 40 nukleotidů**
- **obsah G+C od 40% do 75%**
- **primery by měly být navrženy tak, aby se jejich cílové sekvence nacházely v konzervativních oblastech sledovaného genomu**
- **3'- konce jednoho primeru by měly obsahovat takové sekvence nukleotidů, které nejsou komplementární k sekvencím druhého primeru**
- **pokud z primerů vznikají tzv. dimery, znesnadňuje to annealing**

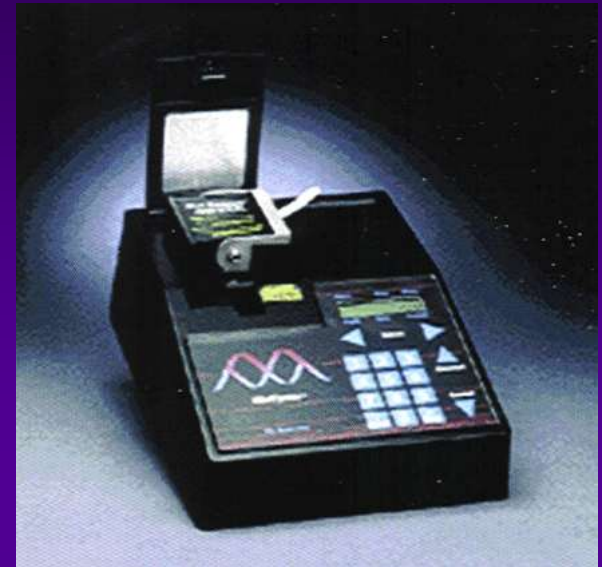
Vlastnosti primerů II

- **žádné palindromy**
- **žádné sekundární struktury**
- **ne nebalancované rozložení domén bohatých na G/C a A/T**
- **použití sekvencí oligo (dT) a poly (dC) ve struktuře primerů nemá na jejich funkci vliv**
- **5' - konec primeru je méně citlivý k modifikacím**
 - **restrikční místa, GC-svorky, sekvence promotoru**
- **koncentrace v rozsahu 0,1 - 1,0 μ M**

Technické provedení PCR

Termocyklery

➤ mikroprocesorem kontrolované zařízení, které obsahuje kovové reakční bloky **vyhříváné a chlazené polovodiči** (Peltierova pumpa), **vodou**, **vzduchem** nebo **mikrovlnami**

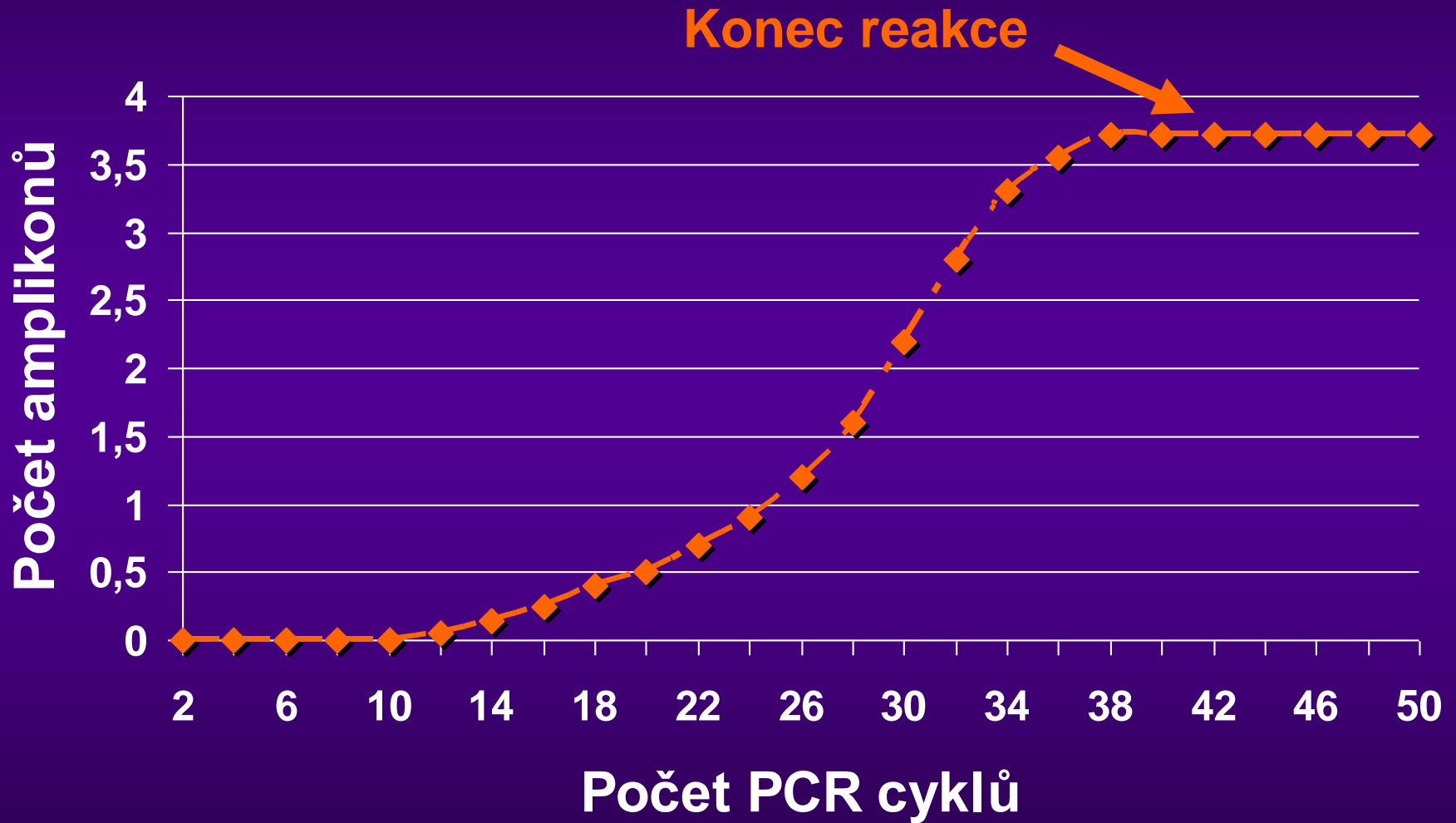


Termocyklery dokáží automaticky rychle měnit teplotu v reakčních blocích mezi třemi základními teplotami PCR cyklu

Vlastnosti termocyklerů

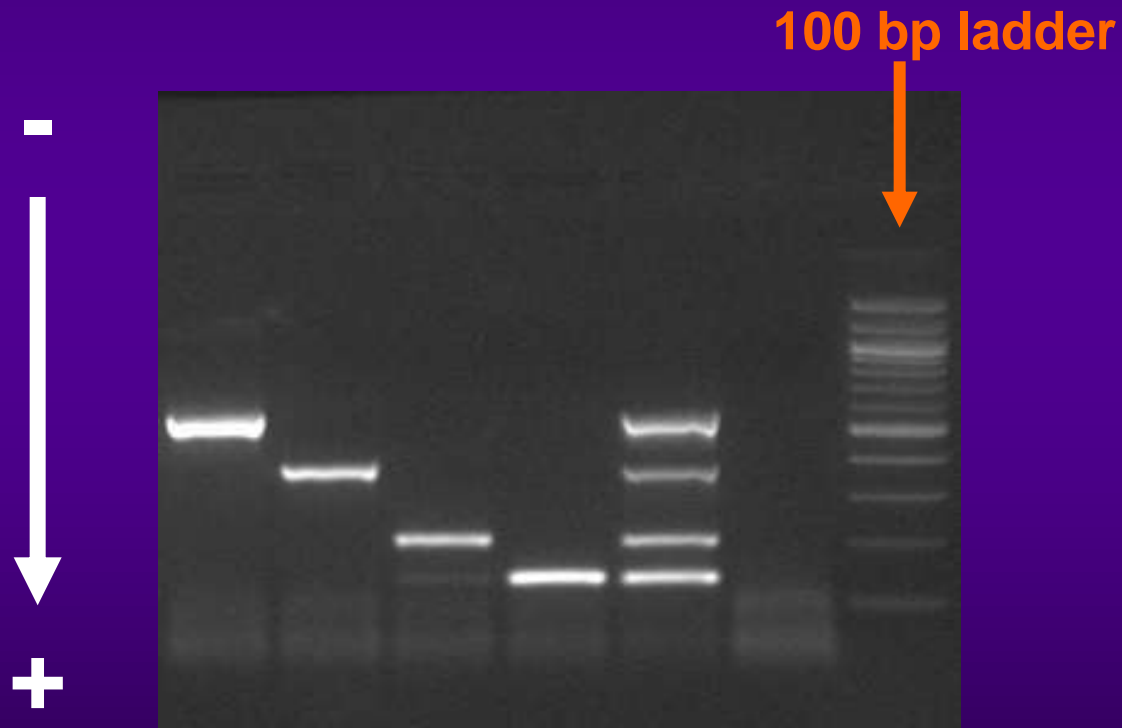
- 1) Vysoká přesnost teploty v reakčním bloku, uniformita a reprodukovatelnost teplotního profilu v reakčním bloku**
- 2) Uniformita a srovnatelnost teplotních profilů mezi jednotlivými reakčními bloky**
- 3) Minimální „přestřelování“ teplot při zahřívání a nebo chlazení**
- 4) Vysoká reprodukovatelnost jednotlivých amplifikačních cyklů**

Co se děje uvnitř termocykleru ?



Výsledek PCR

záznam z elektroforézy v agarózovém gelu



Faktory ovlivňující PCR

Faktory fyzikální

- 1) **Počáteční denaturace**
- 2) **Připojení primerů**
- 3) **Syntéza nukleotidových řetězců**
- 4) **Počet cyklů**
- 5) **Závěrečná extenze**

Faktory chemické

- 1) **Množství Taq polymerázy**
- 2) **Reakční pufr**
- 3) **Množství dNTP**
- 4) **Primery**
- 5) **Objem PCR reakce**
- 6) **Kvalita DNA**

Fyzikální procesy ovlivňující PCR

- 1) Počáteční denaturace**
- 2) Připojení primerů**
- 3) Syntéza nukleotidových řetězců**
- 4) Počet cyklů**
- 5) Závěrečná extenze**

Počáteční denaturace

- **jednorázové zahřátí PCR směsi na teplotu 94-96°C po dobu přibližně 3-5 minut**
- **dokonalá denaturace genomové DNA a odbourání všech struktur, které by bránily připojení primerů k cílovým sekvencím**
- **následné připojení primerů je velmi efektivní**
- **nesmí být příliš dlouhá - poškození řetězců DNA a ničení Taq polymerázy**

Horký start

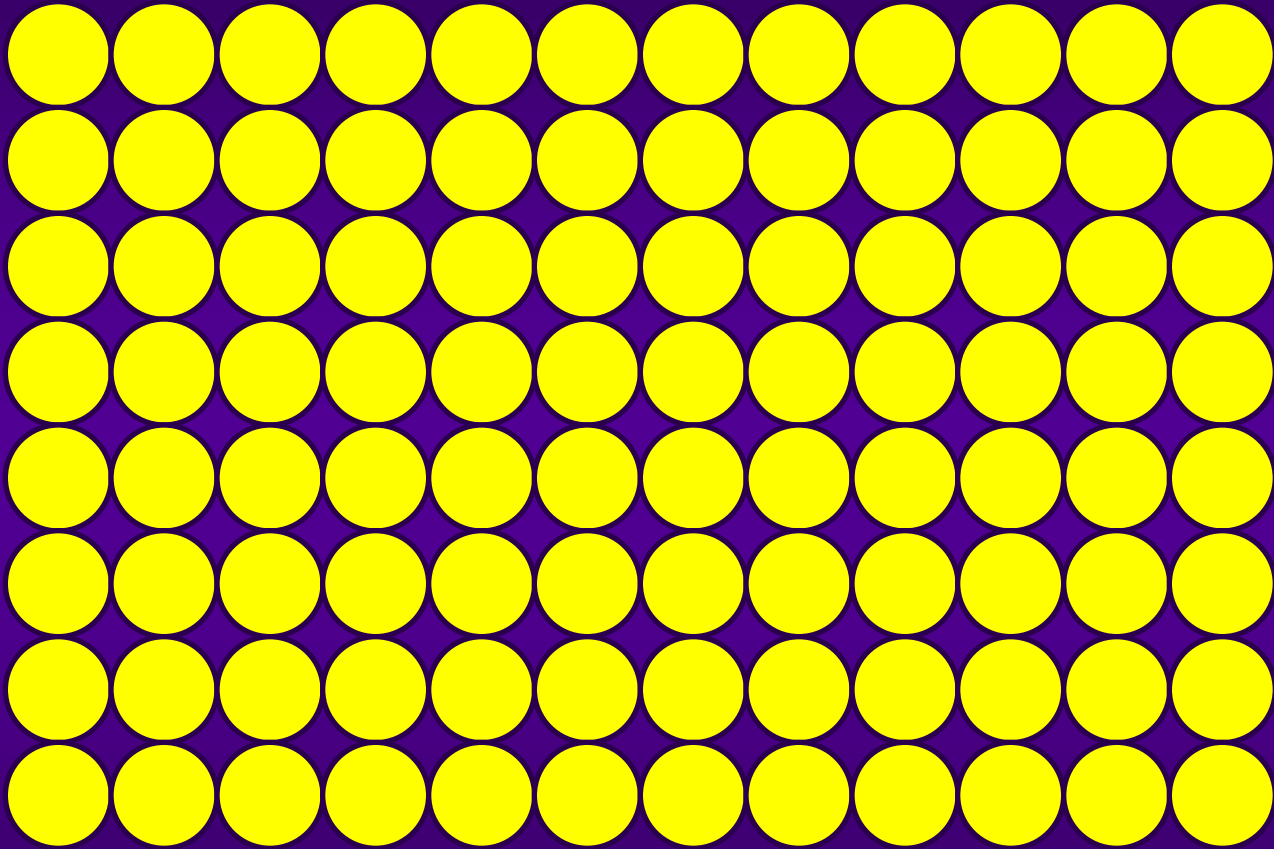
- **denaturace po dobu 10-15min,**
 - **termolabilní komplex s jiným proteinem**
 - **rekombinantní připojení haptenu**
 - **wax na rozhraní PCR směsi a Taq polymerázy**
 - **Taq polymeráza zalitá v agaróze ve víčku PCR zkumavky**

Připojení primerů - annealing

- **rozhodující pro specifičnost**
- **připojení primerů závisí na teplotě, době annealingu, koncentraci matrice, koncentraci primeru**
- **vysoká teplota = primery se nepřipojí**
- **nízká teplota = vznikají nespecifické produkty**

$$***T_a = (\text{počet G+C}) \times 4 + (\text{počet A+T}) \times 2***$$

Gradientový termocykler



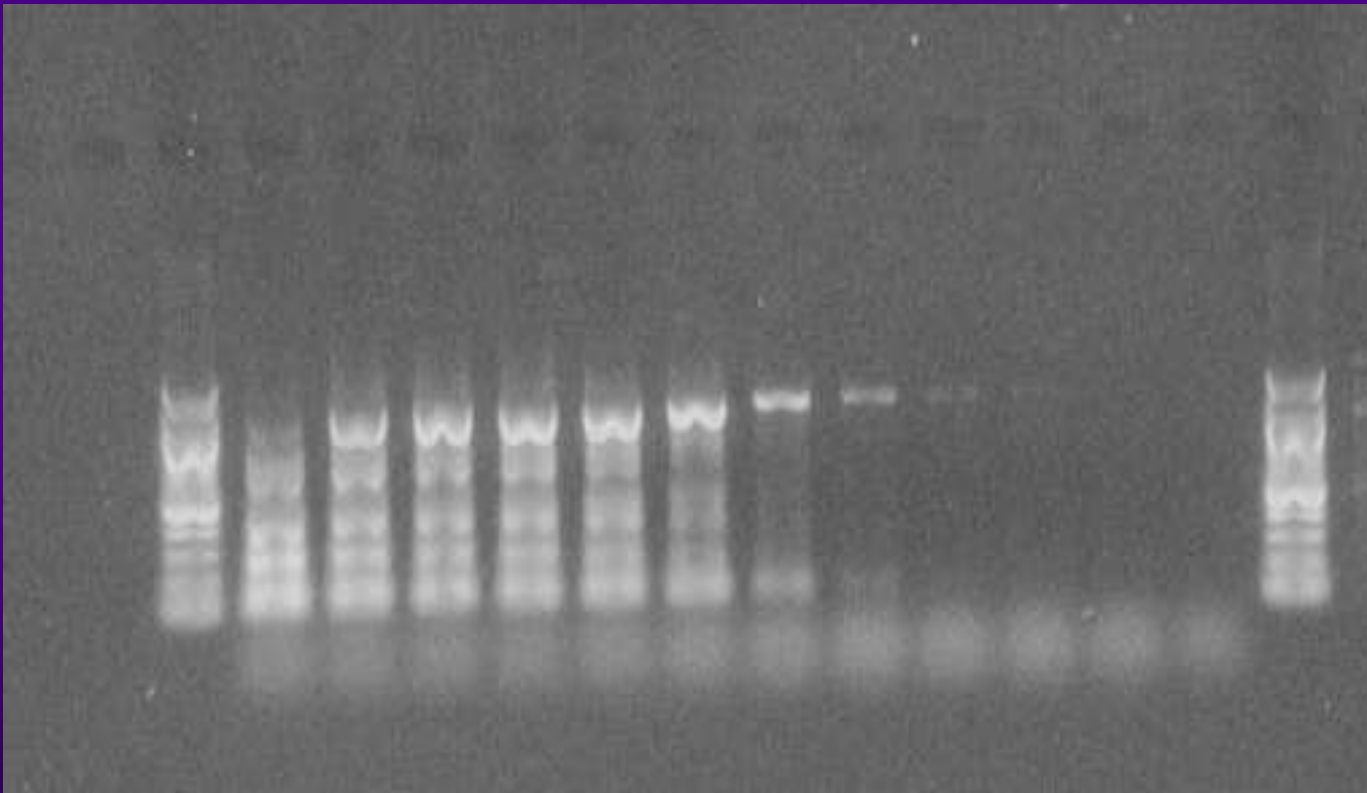
45°C

T_a

65°C

Záznam z gradientového termocykleru

teplota



Syntéza nukleotidových řetězců

- **probíhá při 72°C**
- **pro fragmenty o velikosti do 500bp se doporučuje ne delší než 20s**
- **pro fragmenty do 1,2 kbp asi 40s**
- **rychlost Taq polymerázy činí 150 připojených nukleotidů/sekundu**

Počet cyklů

- analytická PCR – ne více než 40
- nejčastěji 25-35 cyklů
- vyšší počet cyklů vznik nespecifických artefaktů
 - vyčerpávání komponent reakce
 - degradace polymerázy i DNA

Například při vyčerpání primerů se zbývající nukleotidy účastní syntézy nespecifických produktů, které vznikají po vzájemném annealingu již vzniklých amplikonů a výsledkem jsou delší amplifikační produkty vytvářející „šmouhy“ na elektroforetickém gelu

Závěrečná extenze

- **slouží k dokonalému dosyntetizování všech produktů**
- **probíhá po dobu 5-15 min. při 72°C**
- **poté je možné produkty amplifikace uschovat a následně analyzovat**

Chemické procesy ovlivňující PCR

- 1) Množství Taq polymerázy**
- 2) Reakční pufr**
- 3) Množství dNTP**
- 4) Primery**
- 5) Objem PCR reakce**
- 6) Kvalita DNA**

Množství Taq polymerázy

- 0,5-2,5 jednotky, což odpovídá 25-125 fmol enzymu
- zvýšená koncentrace Taq polymerázy v reakci snižuje specifitu
- v současné době je k dispozici řada různých Taq polymeráz a jejich směsí
- vysoká termostabilita a přesnost začlenění správného nukleotidu do struktury DNA (**tzv. fidelity**)
- fidelity je závislá na koncentraci volných Mg^{2+} a nukleotidů, na správném vybalancování podílu nukleotidů, na pH a podílu poškozené DNA v reakci

Reakční pufr

- kofaktor Taq polymeráz = ionty Mg^{2+} ve formě $MgCl_2$ nebo $MgSO_4$
- Koncentrace Mg^{2+} se pohybuje v rozmezí 0,5-5,0 mM (1,5 mM)
- Ionty ovlivňují aktivitu enzymu, zvyšují T_m dvoušroubovicové DNA a tvoří rozpustné komplexy s nukleotidy, což je proces nutný k inkorporaci nukleotidů do DNA

Množství dNTP

- závisí na délce amplifikačních produktů
- koncentraci Mg^{2+}
- koncentraci primerů
- nastavení teplotního profilu reakce
- Tím, že se nukleotidy vážou na Mg^{2+} , snižují hodnotu T_a
- Do struktury DNA jsou v podmínkách in vitro účinně začleňovány při koncentracích kolem $10 \mu M$, což jsou ale hodnoty nižší, než ty, které se používají při PCR ($100-200 \mu M$)

Objem PCR reakce

- **ovlivňuje výsledek v míře menší než faktory uvedené doposud**
- **objemy reakčních směsí 20 až 100 μ l**
- **PCR v kapilárách - reakční objemy až 10 μ l**

Kvalita DNA

- **jedním z rozhodujících faktorů**
- **přítomnost řady látek, které ovlivňují průběh PCR**
- **Čistota DNA ovlivňuje zejména citlivost**
- **V řadě případů působí jako negativní faktor už pouhé zmrazení vzorku, přičemž zvláště negativní je jeho opakované zamrazování a rozmrazování**
- **PCR je kompletně inhibována látkami jako jsou **heparin**, EDTA, porfyriny a jim podobné sloučeniny a ionty $H_xPO_4^{n-}$.**
- **homogenita vzorku a množství DNA vložené do reakce.**

Shrnutí

- 1) Co je to PCR, princip, jednotlivé kroky**
- 2) Technické provedení PCR**
- 3) Fyzikální faktory ovlivňující PCR**
- 4) Chemické faktory ovlivňující PCR**

PCR před a po



Kde si můžu přečíst více?

www.farmakogenomika.cz

**A ještě něco pro ty, kteří rádi
počítají**



Příprava primerů - příklad

V jakém množství rozpustíte lyofilizovaný vzorek primerů, aby jeho koncentrace byla $100\mu\text{M}$?

Vzorek obsahuje $138,6\ \mu\text{g}$ primeru

**Molekulová hmotnost tohoto primeru
(o délce 18 nukleotidů) je $5\ 119$**

Příprava primerů – řešení

ve 271μl

Použití primerů – příklad

Jaké množství primeru ze zásobního roztoku 100 μ M napipetujete do PCR reakce o objemu 20 μ l jestliže chcete do reakce dát 10pmol primeru ?

Použití primerů – řešení

1M roztok 1mol částic / litr (1 μ mol částic / μ l)

1mM roztok 1nmol částic / μ l

1 μ M roztok 1pmol částic / μ l

100 μ M roztok 100pmol částic / μ l

10pmol částic 0,1 μ l