

Ligázová řetězová reakce

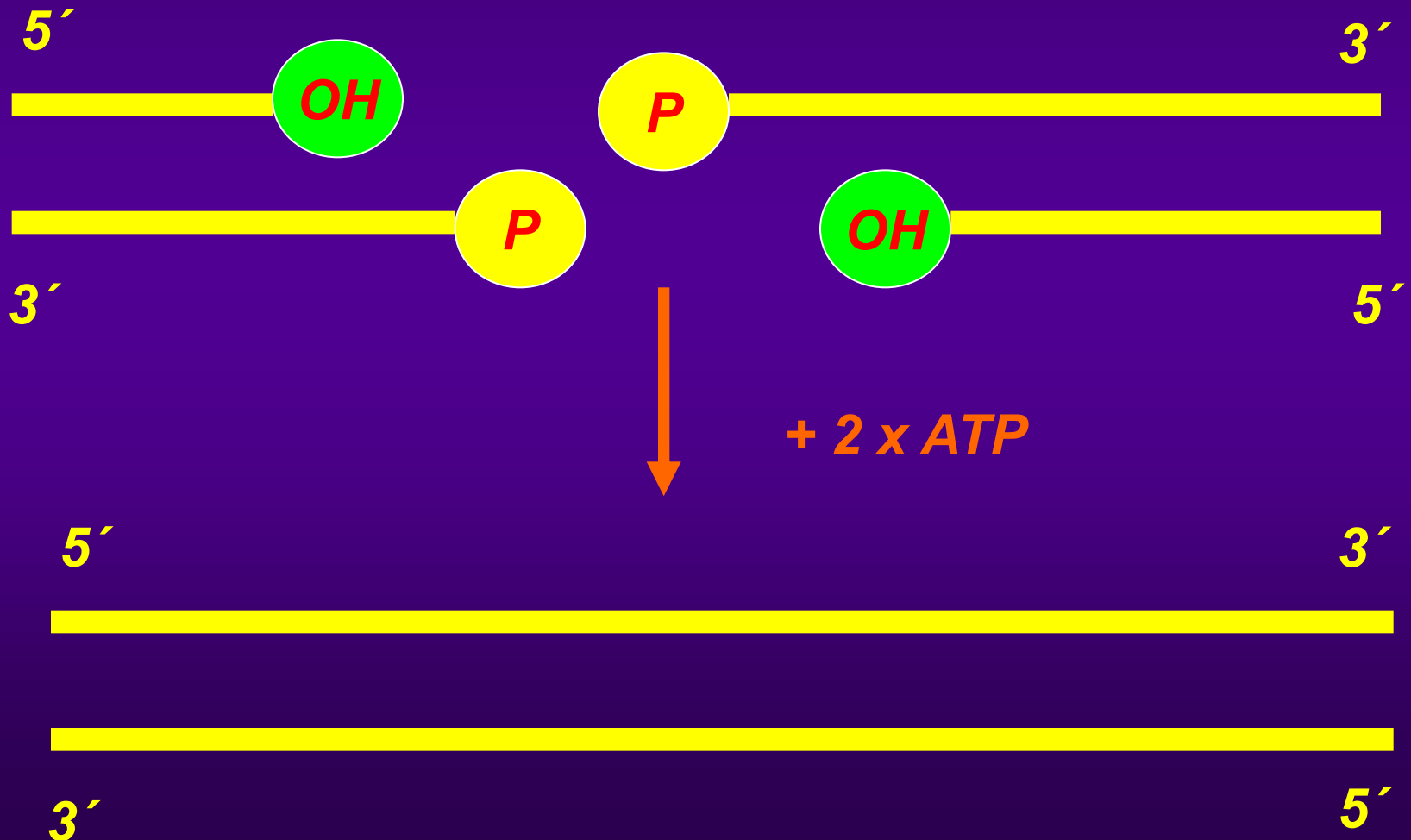
- **Ligace oligonukleotidových sond, pokud dojde k jejich vazbě na cílovou sekvenci DNA**
- **Vyžaduje 4 oligonukleotidy (LCR-primery)**
- **Dva oligonukleotidy specificky hybridizují k jednomu a dva k protilehlému řetězci**

**Ligace termostabilní DNA-ligázou
(z *Thermus aquaticus*)**

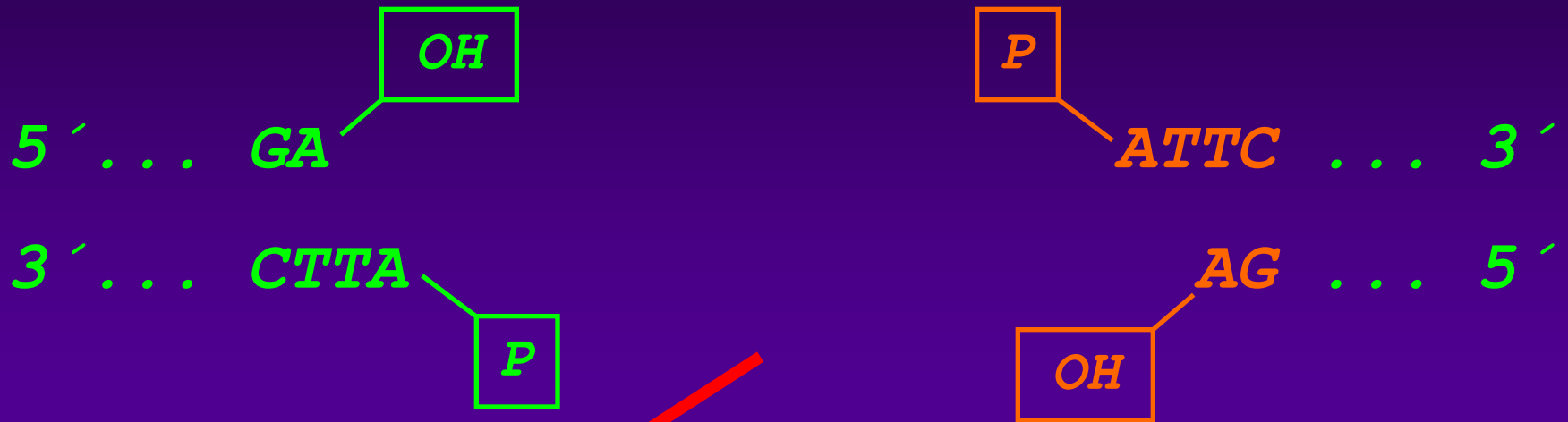


Zopakujme si, co je to ligace

T4 DNA ligáza (E. coli infikované bakteriofágem T4)



Mechanismus ligace



samovolné připojení



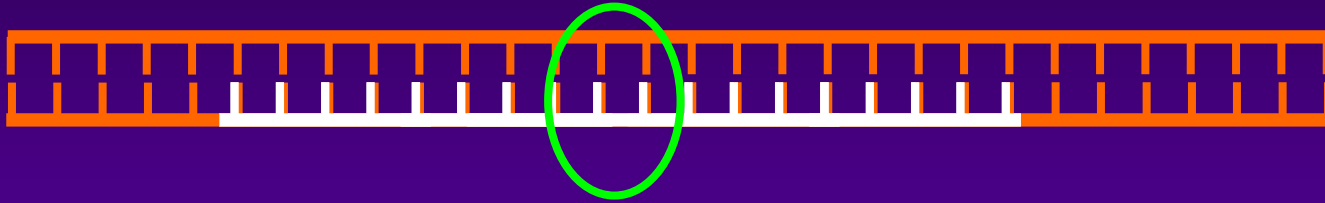
spojení ligázou

+ 2 x ATP



LCR probíhá v cyklech

Průběh ligázové řetězové reakce



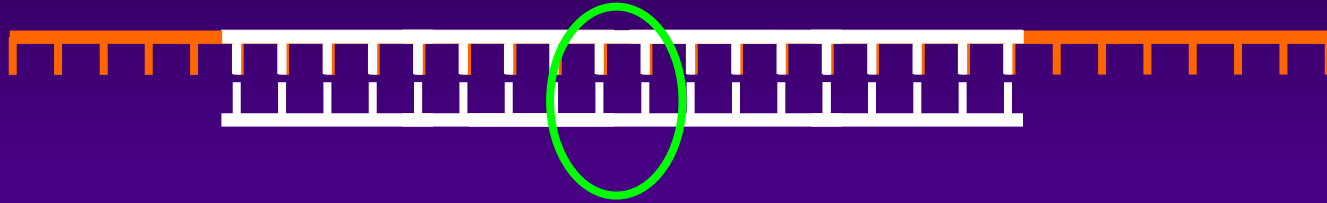
denaturace

hybridizace

ligace



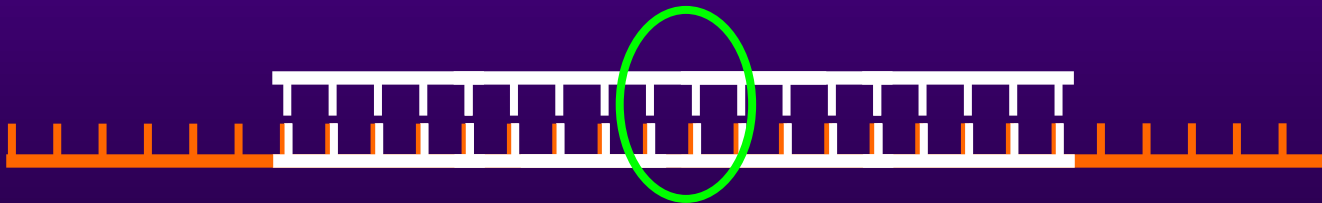
Průběh ligázové řetězové reakce



denaturace

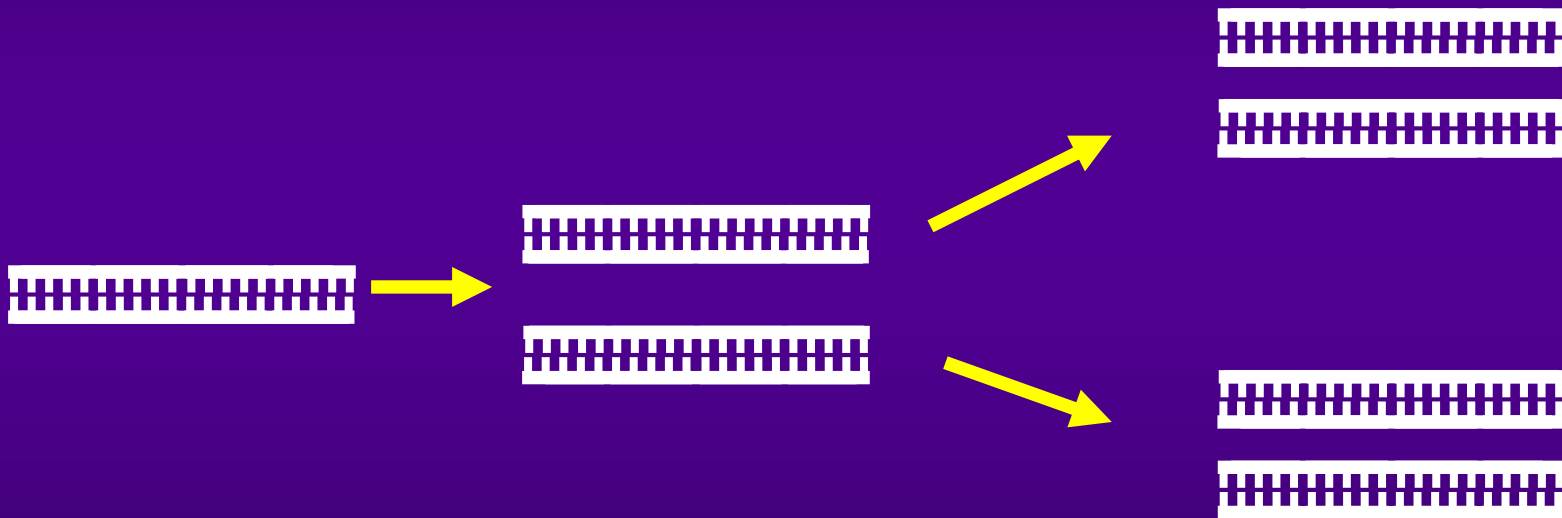
hybridizace

ligace



Důsledky obdobné jako u PCR

Z každé molekuly vznikají v každém cyklu dvě nové



Počet produktů LCR vzrůstá geometricky

Formáty ligázové řetězové reakce

- **Většinou kvalitativní**
- **Lze aplikovat i kvantitativně**
- **Standardní detekce na gelu**
- **Sonda může být značena např. biotinem, + fluoresceční značkou nebo digoxigeninem nebo alkalickou fosfatázou**
- **Detekce po zachycení na streptavidin fluorescenčně, barevnou reakcí nebo enzymaticky**

Příklady využití LCR

- **Již v roce 1993 použita k vysoce specifické detekci *Chlamydia trachomatis* (Dille et al. (1993): J Clin Microbiol. 31(3):729-31)**
- **Detekce kmenů *Lactococcus lactis* exprimujících nisinA a nisinZ (bakteriociny, E234) - hledání strukturních variant genu, rok 2006**
- ***Borrelia burgdorferi* (1991), *Neisseria gonorrhoeae* (1992), *Mycobacterium tuberculosis* (1993),**
- **Lidský papillomavirus (1990), HSV (1991, HIV (DNA, 1991)**

Více o aplikacích LCR

**Wiedmann et al. (1994): Ligase chain reaction (LCR)-overview and applications.
Genome Res. 3: S51-S64**