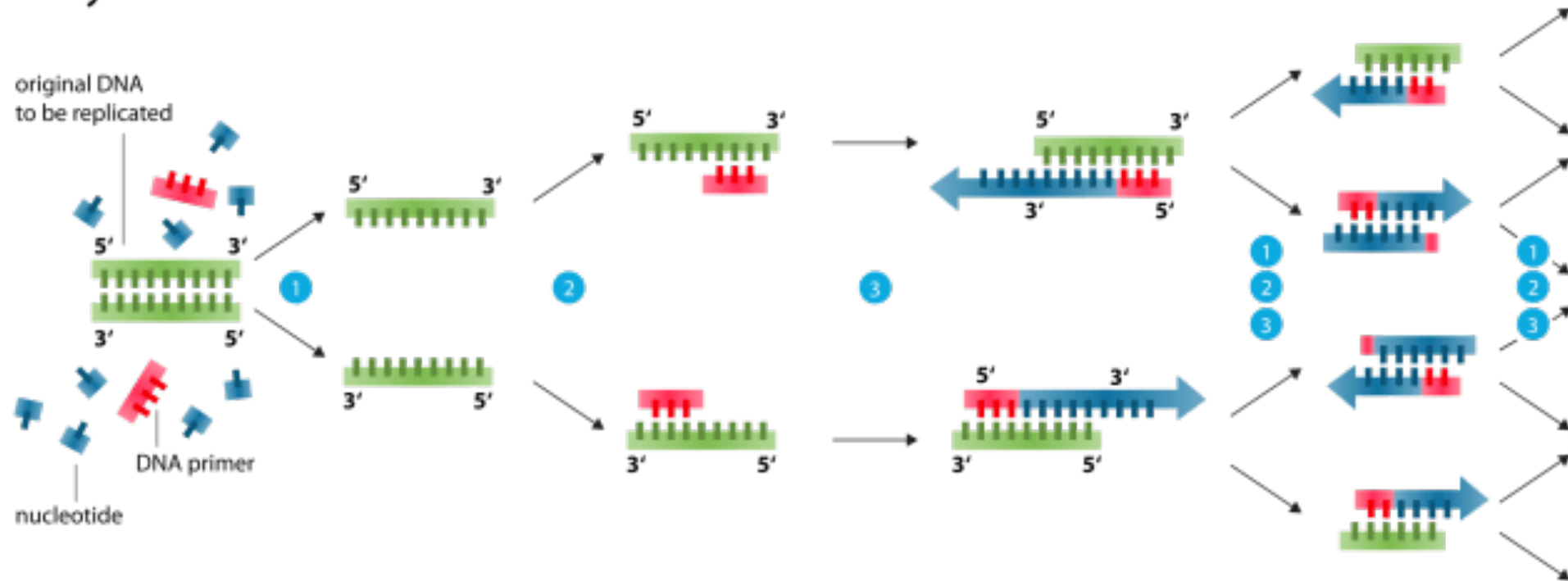


PCR metody

# Princip PCR

## Polymerase chain reaction - PCR



- 1 **Denaturation** at 94-96°C
- 2 **Annealing** at ~68°C
- 3 **Elongation** at ca. 72 °C

# Princip PCR

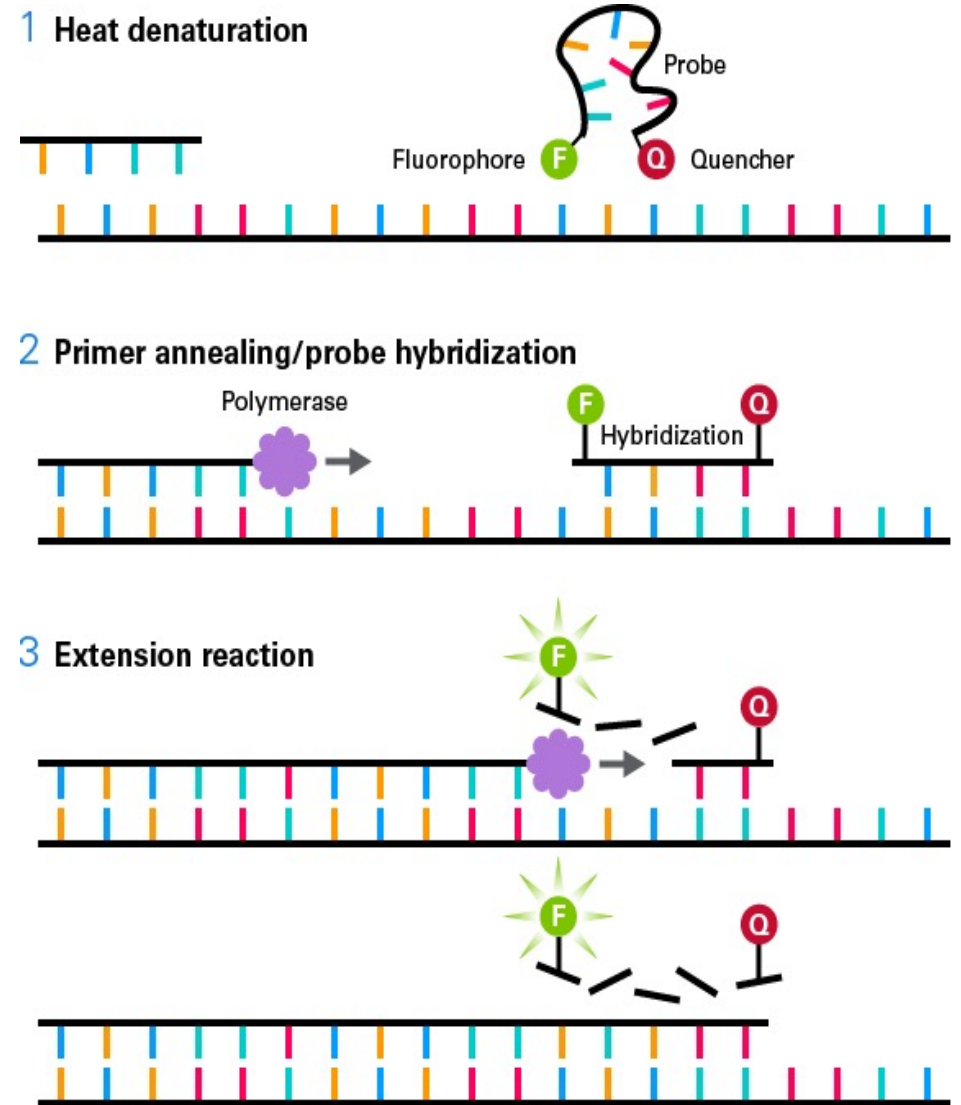
- [https://www.youtube.com/watch?v=a5jmdh9AnS4&ab\\_channel=AmoebaSisters](https://www.youtube.com/watch?v=a5jmdh9AnS4&ab_channel=AmoebaSisters)
- [https://www.youtube.com/watch?v=hO3mTqrEeq8&ab\\_channel=2MinuteClassroom](https://www.youtube.com/watch?v=hO3mTqrEeq8&ab_channel=2MinuteClassroom)
- [https://www.youtube.com/watch?v=wBrNbbAIAFo&ab\\_channel=AMBOSS%3AMedicalKnowledgeDistilled](https://www.youtube.com/watch?v=wBrNbbAIAFo&ab_channel=AMBOSS%3AMedicalKnowledgeDistilled)

# Aplikace PCR

- identifikace a charakterizace infekčních agens
- přímá detekce mikroorganismů ve vzorcích pacientů
- identifikace mikroorganismů pěstovaných v kultuře
- detekce antimikrobiální rezistence
- zkoumání kmenové příbuznosti patogenu zájmu
- genetický fingerprinting (forenzní aplikace/testování otcovství)
- detekce mutace (vyšetřování genetických chorob)
- klonování genů
- PCR sekvenování

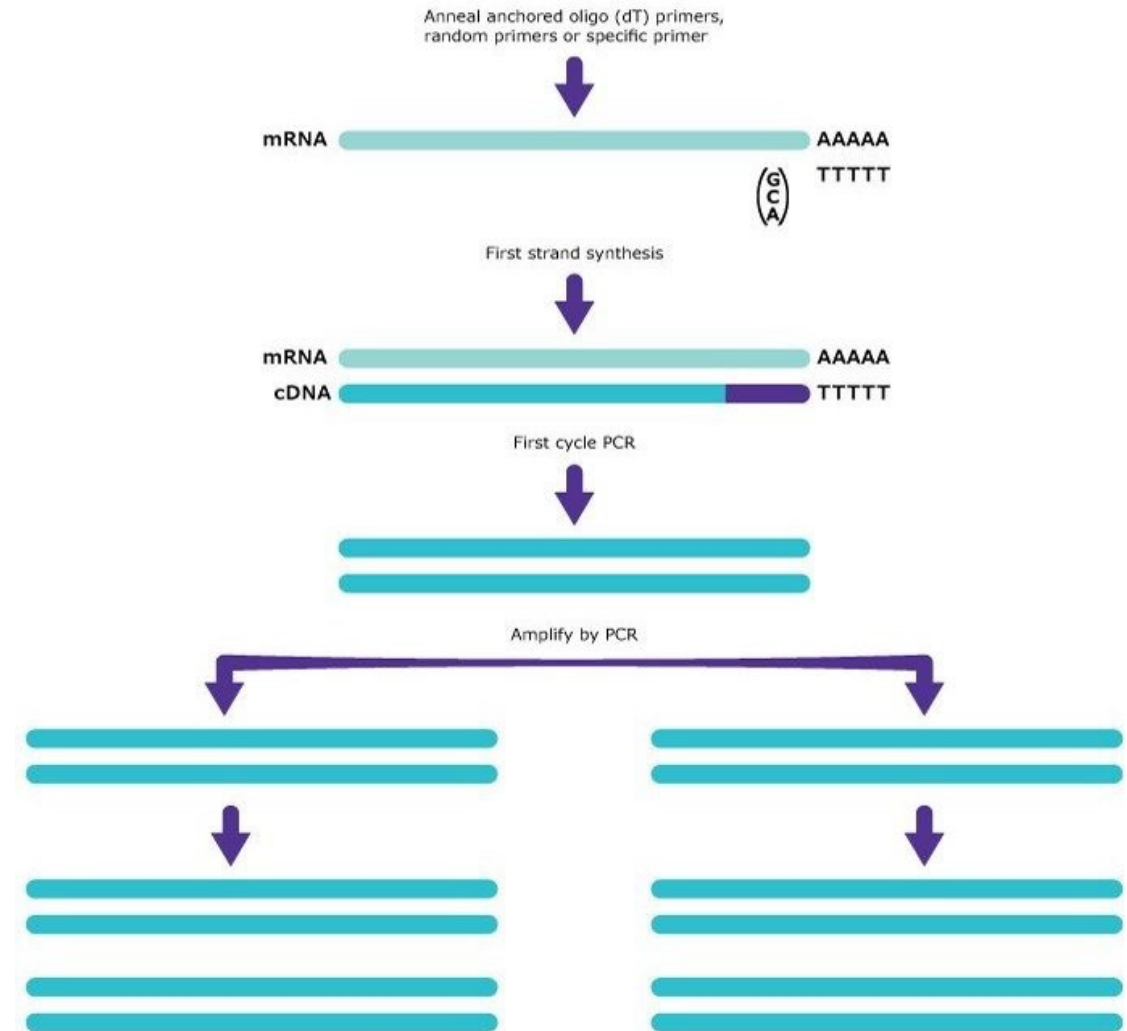
# Real time PCR (qPCR)

- Sledování amplifikace úseku DNA v reálném čase
- Metody kvantifikace
  - Nespecifické fluorescenční barviva interagující s dsDNA
  - Sekvenčně specifické fluorescenčně značené DNA sondy



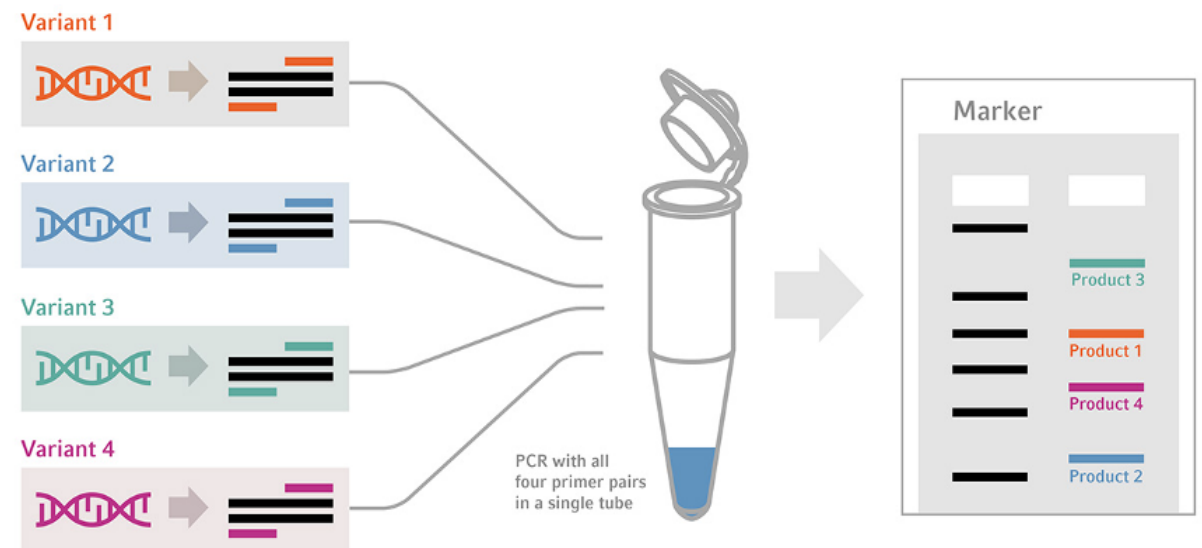
# Reverse-transcriptase PCR (RT-PCR)

- Využití reverzní transkriptázy k přepsání RNA do cDNA
- Následná amplifikace PCR
- Může probíhat jedno až dvoukrokově
- Možno spojit s qPCR



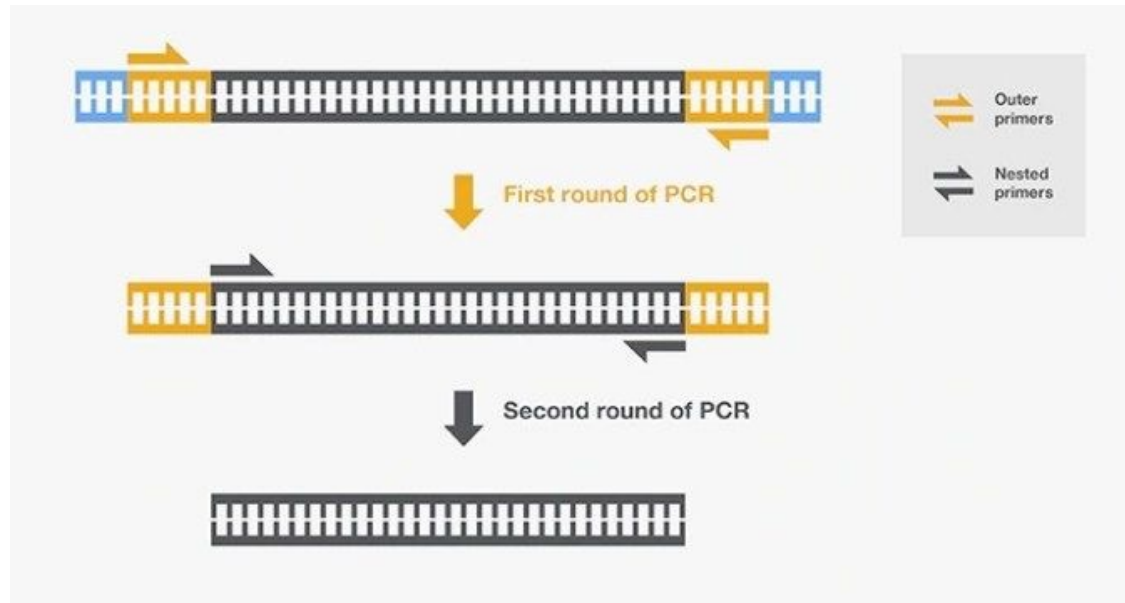
# Multiplex PCR

- Amplifikace několika DNA sekvencí naráz za použití specifických primerů pro každou sekvenci
- Hybridizace primerů s cílovou sekvencí při stejné teplotě
- Rozeznání rozdílných amplikonů
  - Rozdílná délka
  - Použití značených primerů



# Nested PCR

- Modifikace PCR pro zvýšení přesnosti a specificity
- Dva PCR běhy s dvěma sety primerů
- První set primerů ohraničuje ten druhý





# High fidelity PCR

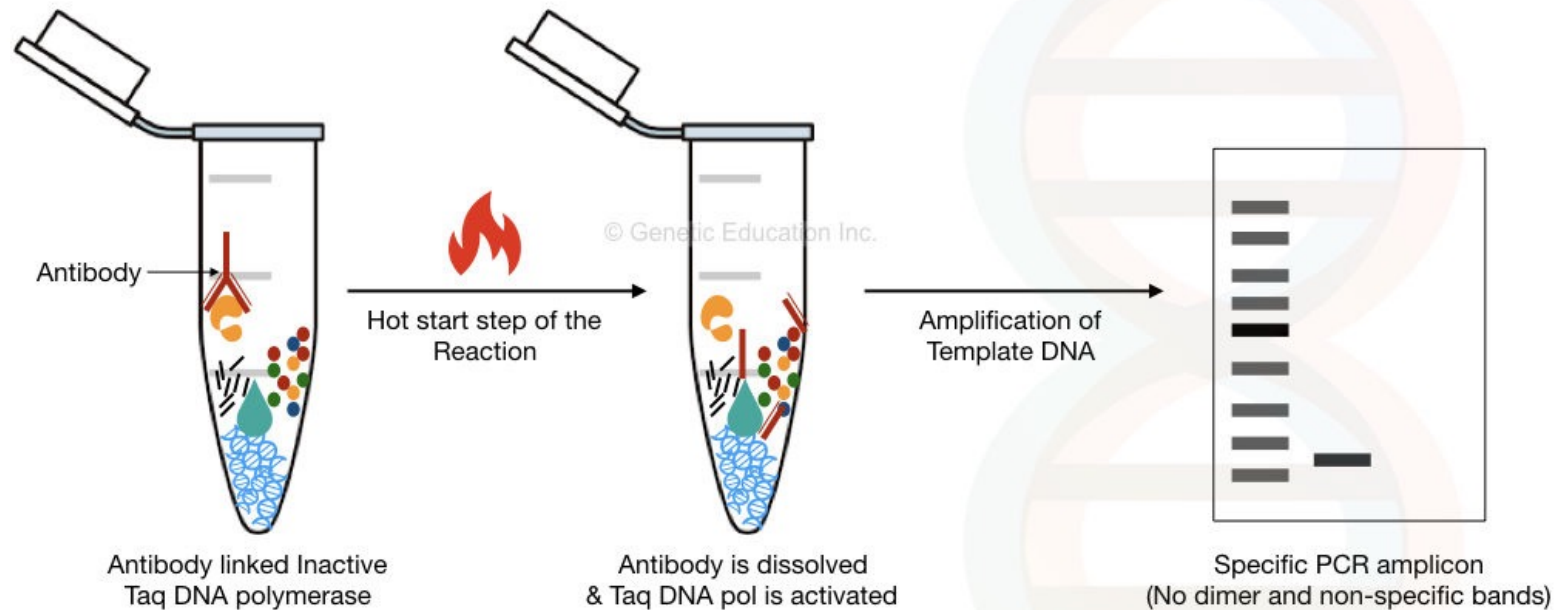
- PCR s nízkou mírou chybovosti
- Přesná polymeráza schopná oprav za pomoci 3'-5' exonukleázové aktivity
- Vhodné pro aplikace vyžadující velmi přesnou amplifikaci genu

# Fast PCR

- rychlost PCR závisí na řadě faktorů
- Taq DNA Polymerase ~ 1 kb/min
- enzymy schopné provádět fast PCR 2-6 kb/min
- nemá vliv na výtěžek

# Hot Start PCR

- snižuje přítomnost nežádoucích produktů a dimerů primerů
- ovlivnění DNA polymerázy, použití modifikovaných dNTP, fyzické přidání 1 z činidel po denaturaci
- zvýšení citlivosti detekce pomocí PCR



# GC-Rich PCR

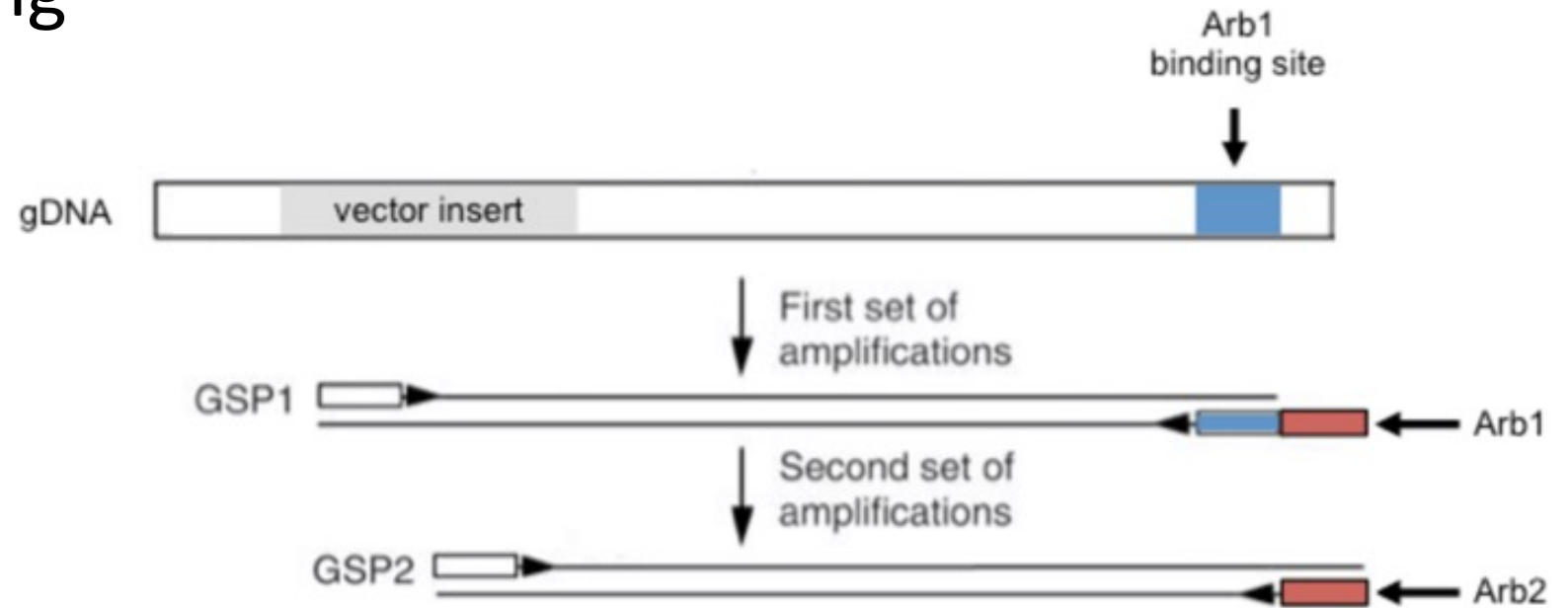
- Taq DNA polymeráza + Tgo DNA polymeráza
- umožňuje velmi efektivně amplifikovat obtížné templáty, jako jsou cíle bohaté na GC
- doporučeno TA klonování
- semikvantitativní analýza, genotypizace a vyhledávání a klonování sekvence kandidátního genu s vysokým obsahem GC

# Long-range PCR

- amplifikace délek DNA, které nelze typicky amplifikovat pomocí rutinních PCR metod nebo činidel
- 30 kb a více
- usnadňuje amplifikaci delších fragmentů DNA a také oblastí bohatých na GC

# Arbitrary Primed PCR

- využití primerů, jejichž nukleotidová sekvence je libovolně zvolena
- DNA fingerprinting



# Děkujeme za pozornost.

## PCR Protocol

Get the reagents



Prepare the mix



Set up conditions



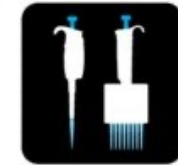
Analyze the gel



Negative result



Cry



**PIPETTE**



**CRY**



**REPEAT**