

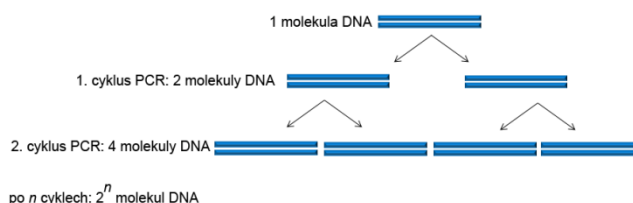
POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE (PCR)

Polymerázová řetězová reakce (PCR, z anglického Polymerase Chain Reaction) je metoda rychlého zmnožení (amplifikace) vybraného úseku DNA.

- Množený (amplifikovaný) úsek DNA je ohraničen tzv. primery (oligonukleotidy), což jsou fragmenty DNA o 20 - 25 nukleotidech, které si díky své komplementaritě přisedají právě ke koncům vybraného úseku. Od přisedlých primerů probíhá syntéza DNA.
- Samotnou syntézu provádí termostabilní DNA polymeráza, izolovaná nejčastěji z bakterie *Thermus aquaticus*, odtud označení Taq polymeráza. Jelikož je tento enzym termostabilní, uchovává si svou aktivitu i přes několikeré působení teploty blížíící se teplotě varu.
- Při reakci je využíváno cyklických změn teplot, které umožňují denaturaci DNA (její rozvolnění na jednořetězce), přisedání primerů a syntézu DNA.

Princip PCR

Při PCR je využíváno podobného principu, na jakém dochází k syntéze DNA během replikace DNA v buňce. Tzn., DNA polymeráza k jednořetězcovému úseku DNA syntetizuje druhý, komplementární řetězec, přičemž se při svém startu potřebuje „odrazit“ od krátkého oligonukleotidu, který je díky své komplementaritě navázán na templátový, jednořetězcový úsek. Tak vzniká z jednořetězcové molekuly dvouřetězcová, která je následnou denaturací separována na dvě jednořetězcové molekuly, které jsou v dalším kole DNA polymerázou opět doplněny na dvouřetězcové. Tyto kroky se při PCR cyklicky opakují, takže teoreticky např. z původně jedné molekuly DNA po 32 cyklech vzniká 1 miliarda molekul DNA.

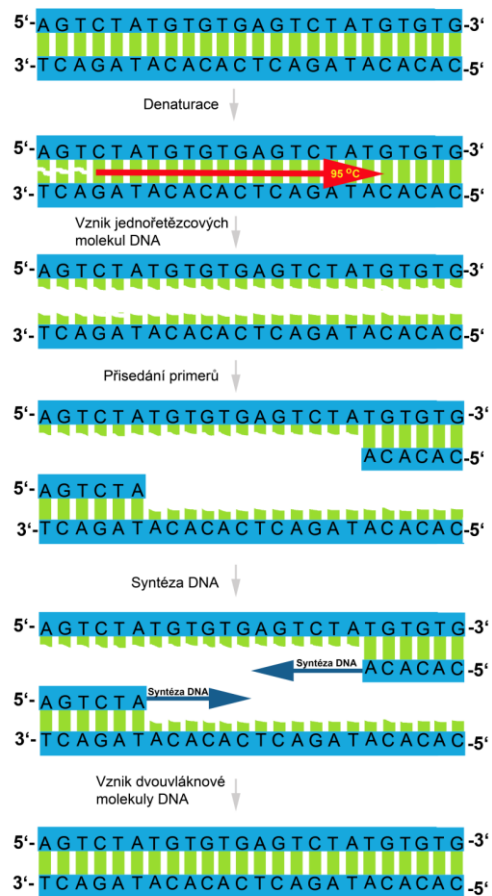


Využití PCR

- amplifikace DNA
- detekce DNA o určité sekvenci ve vzorku (s pomocí využití primerů specifických k dané sekvenci), např. ve forenzní genetice či molekulární diagnostice
- kvantifikace na hladině DNA či transkripce

Reakční fáze při PCR

1. **Denaturace** – dvouřetězcová (dvouvláknová) molekula DNA se po dobu 20 - 30 sekund zahřívá na teplotu 94 - 98 °C. Při této teplotě dochází k rozrušení vodíkových můstků v dvouřetězcové molekule DNA a k rozvolnění této dvoušroubovice. Vznikají tak dvě jednořetězcové (jednovláknové) molekuly DNA, na které mohou v dalším kroku nasednout primery.
2. **Nasednutí primerů** - teplota se sníží na 50 - 65 °C, což umožňuje nasednutí primerů na specifická místa DNA. Na dvouvláknové úseky DNA/primer se váže DNA polymeráza.
3. **Syntéza DNA** - teplota použitá v této fázi závisí na použité DNA polymeráze. Nejběžnější Taq polymeráza má optimum aktivity při 72 - 80 °C. V tomto kroku dochází k samotné syntéze DNA. Ve směru od 5' konce ke 3' konci přirůstá vlákno DNA komplementární k původní molekule DNA.



Tyto kroky se cyklicky opakují. Pro dostatečnou amplifikaci původní molekuly DNA obvykle postačuje 30 cyklů. PCR probíhá v zařízení zvaném termocykler, které je zkonstruováno tak, aby dokázalo během několika sekund zvýšit nebo snížit teplotu o několik desítek stupňů Celsia.

Základní kroky při provádění PCR

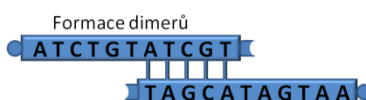
1. krok: Znalost sekvence DNA v amplifikovaném úseku (prostřednictvím DNA databází či na základě vlastního sekvenování)
2. krok: Navržení sekvence primerů
3. krok: Komerční výroba primerů
4. krok: Výpočet optimální teploty primerů, navržení složení a profilu reakce
5. krok: Provedení reakce
6. krok: Kontrola reakce na elektroforéze (ELFO), případně purifikace reakčního produktu a sekvenování

Primery

Primery jsou krátké oligonukleotidy (20 – 25 nt), které jsou komplementární k sekvenci na koncích amplifikovaného úseku. Tzn., že při PCR po denuraci dvouřetězcové molekuly nasedají na konce amplifikované oblasti. Primery jsou jedním z klíčových komponent pro správný výsledek PCR.

Délka a sekvence primerů:

- Primery jsou obvykle 20-25 nt dlouhé.
- Primery v daném páru musí mít srovnatelný počet GC:AT párů. Upřednostňujeme primery s 50 - 60% obsahem GC nebo AT párů.



- Sekvence mezi oběma primery nesmí být výrazně komplementární, protože by se primery v reakci párovaly mezi sebou a méně nebo případně vůbec by nenedaly ke komplementární sekvenci v templátové DNA (vznikaly by tzv. dimery).



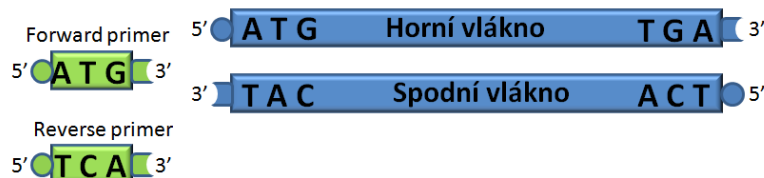
- Rovněž nesmí být komplementarita v rámci sekvence primeru. Došlo by ke vzniku vlásenky (viz. obr.) či jiných sekundárních struktur a primer by tak nefungoval.
- Vždy je bezpodmínečně nutné, aby nasedání primerů bylo bezchybné alespoň v 3' oblasti primeru.

Navržení primerů

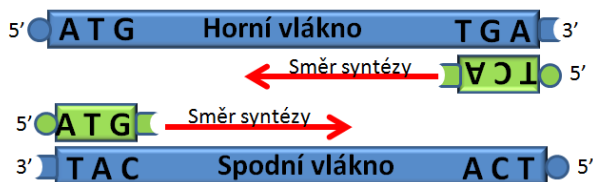
Pro standardní PCR navrhujeme primery v párech – přední, tzv. „forward“ primer a zadní tzv. „reverse“ primer. Primery můžete navrhnout pomocí některého ze softwarů volně dostupných na internetu nebo si je velmi snadno můžete navrhnout „ručně“.

Při navrhování primerů je třeba si uvědomit, že v běžném zápisu sekvence DNA se zapisuje horní vlákno z dvouřetězcové molekuly DNA, a to ve směru 5'→3'.

- Primery se navrhují podle sekvence horního vlákna, tj. sekvence, která se při běžném zápisu DNA používá. Sekvence předního („forward“) primeru je totožná se sekvencí běžně zapisovaného, tj. horního vlákna. Přední primer umožňuje syntézu horního vlákna podle templátového spodního vlákna.
- Zadní („reverse“) primer se navrhuje jako komplementární sekvence k hornímu vláknu, která je navíc v reverzní orientaci, tzn., že je zapisovaná ve směru 3'→5'. Takže při navrhování sekvence reverse primeru podle horního řetězce, musíme číst sekvenci primeru odzadu. Reverse primer umožňuje syntézu dolního vlákna podle templátového horního vlákna.
- Při navrhování sekvence primeru musíme mít na paměti, že oba primery musí mít aspoň přibližně stejnou teplotu nasedání. Teplotu nasedání primerů lze ovlivnit samotnou sekvencí primerů, resp. GC/AT obsahem a délkou primerů.



Nasedání primerů a směr syntézy



Teplota nasedání primerů (teplota „annealing“): Od délky primerů a počtu GC párů se odvíjí teplota nasedání primerů.

- Čím větší délka a vyšší obsah GC párů, tím je teplota nasedání vyšší (viz. příložená tabulka).
- Teplota nasedání primerů musí být dostatečně vysoká, aby nedošlo k nesespecifickému nasedání primerů k templátové DNA, pokud by ale byla příliš vysoká, primery by nenasedaly vůbec.
- Je třeba, aby teplota nasedání byla optimální pro oba primery a obsah GC párů v obou primerech byl srovnatelný, tzn., aby byla srovnatelná teplota nasedání obou primerů.
- Pro výpočet teploty primerů můžete použít některý ze softwarů volně dostupný na internetu nebo můžete použít níže příloženou tabulku.

Objednání a výroba primerů: na trhu existuje několik výrobců či dodavatelů primerů, u kterých lze syntézu primerů objednat.

Ředění primerů: Primery přicházejí od výrobce v lyofilizovaném (vysušeném) stavu a je třeba naředit. Při ředění postupujeme takto:

1. Zkumavku s primerem nejprve krátce centrifugujeme.
2. Primer naředíme na koncentraci 100 pmol/μl (tj. 0,1 mM). Pro ředění používáme sterilní vodu, přednostně používáme špičky s filtrem. Množství vody se odvíjí od množství primeru, které bylo dodáno a které je definováno množstvím molů v protokolu, který výrobce zasílá spolu s primerem. Např. pokud je výtěžek 21,9 nmol, toto množství rozpustíme v 219 μl vody a získáme tak 0,1 mM roztok. Při ředění primeru postupujeme tak, že do zkumavky s primerem přidáme dané množství vody, zkumavku uzavřeme a důkladně zvortexujeme. Získáme tak 0,1 mM (100 pmol/μl) zásobní roztok primeru.
3. Zásobní roztok dále ředíme 10x, tj. do 90 μl vody přidáme 10 μl zásobního roztoku. Získáme tak 10 μM (10 pmol/μl) pracovního roztoku. Roztoky s primery jsou skladovány v -20 °C.

Teplota nasedání primerů pro daný počet bazí a GC párů													
bp	Počet GC párů												
	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
16	39	41	43	25	47	49	51	53	55	57	59		
17	43	45	47	49	51	53	55	57	59	61	63	65	
18	45	47	49	51	53	55	57	59	61	63	65	67	67
19	47	49	51	53	55	57	59	61	63	65	67	69	71
20	49	51	53	55	57	59	61	63	65	67	69	71	73
21	51	53	55	57	59	61	63	65	67	69	71	73	75
22	53	55	57	59	61	63	65	67	69	71	73	75	77
23	55	57	59	61	63	65	67	69	71	73	75	77	79
24	57	59	61	63	65	67	69	71	73	75	77	79	81
25	59	61	63	65	67	69	71	73	75	77	79	81	83

Objem a složení reakce

Objem reakce: ve většině případů se reakce připravuje v objemu 25-ti μl , ale může se připravovat i v jiných objemech jako 50 μl nebo 100 μl . V některých případech, jako je třeba metoda Klontest, kdy testujeme velké množství vzorků a chceme šetřit materiálem pro PCR a postačuje menší množství produktu, můžeme reakci provádět i v 10 μl .

Složení reakce: Reakci tvoří tyto komponenty:

Templátová DNA: množství templátové DNA může být nepatrné, příliš velké množství DNA naopak způsobuje v reakci problémy, jako např. nespecifické nasedání primerů.

Primery: obvyklá koncentrace každého z primerů v reakci je 0,1-1 μM (tj. 0,1-1 $\text{pmol}/\mu\text{l}$). Tzn., pokud máme připravený pracovní roztok 10 $\text{pmol}/\mu\text{l}$ (tj. 10 μM) (viz. část o ředění primerů), pro 25 μl reakci použijeme 0,25-2,5 μl z obou primerů. Množství primerů musí být optimální. Příliš vysoká koncentrace vede k nespecifickému nasedání primerů na templátovou DNA nebo párování primerů navzájem. Příliš nízká koncentrace primerů může vést k nedostatečnému množství produktu.

dNTP směs: je směs dATP, dCTP, dGTP a dTTP. Obvyklá koncentrace každého dNTP v reakci je 200 μM (0,2 mM). Množství použité dNTP směsi se odvíjí od koncentrace zásobního roztoku. Většinou je zásobní roztok dNTP směsi o koncentraci 10 mM pro každý dNTP. Tedy pokud připravujeme 100 μl PCR reakci, použijeme 2 μl 10 mM dNTP, u 25 μl reakce použijeme 0,5 μl dNTP.

MgCl₂: obvyklá koncentrace je 1,5 mM. MgCl₂ je nutný pro procesivitu a přesnost Taq polymerázy. Koncentrace MgCl₂ se odvíjí od koncentrace dNTP a platí, že pro specifitu reakce koncentrace MgCl₂ musí převyšovat koncentraci dNTP. Pokud máme koncentraci jednotlivých dNTP 200, 400, 600 nebo 800 μM , koncentrace MgCl₂ musí být 1,5, 2, 3, 4 nebo 5 mM. Nicméně poměr MgCl₂/dNTP lze v určitých případech pozměňovat (viz. odstavec o reakčních problémech), kdy pro zvýšení specifity reakce zvyšujeme koncentraci MgCl₂, a to až k 5 mM, přičemž koncentraci dNTP držíme stále na stejné úrovni. Někteří výrobci Taq polymerázy dodávají MgCl₂ zahrnuté do reakčního pufru.

Reakční pufr: obvyklé složení je 50 mM KCl a 10 mM Tris-HCl, pH 8,3. Reakční pufr jsou dodávány spolu s Taq polymerázou jako 10x koncentrované. Tzn. pro 25 μl reakci použijeme 2,5 μl dodaného pufru. Reakční pufr dodá reakci potřebnou koncentraci solí a potřebné pH. Koncentrace solí ovlivňuje specifitu reakce, protože ovlivňuje specifitu nasedání primerů. U některých výrobců reakční pufr obsahuje rovnou i 1,5 mM MgCl₂.

H₂O: voda musí být sterilní a purifikovaná. Vodou doplňujeme reakci na požadovaný objem.

Všechny komponenty jsou skladovány v -20 °C.

Reakce

Reakce se obvykle provádí ve 30 cyklech. Každý cyklus je tvořen denaturací, nasedáním primerů a syntézou. Cyklickou reakci předchází úvodní denaturace a ukončuje závěrečná extenze.

Obecně: ÚVODNÍ DENATURACE [DENATURACE-NASEDÁNÍ PRIMERŮ-EXTENZE]_{30x} ZÁVĚREČNÁ EXTENZE

Úvodní denaturace: je důležitá především u genomové DNA, a to vzhledem k její délce. Dostatečná délka úvodní denaturace zajistí, že dvouvlákna DNA jsou pro reakci plně rozpletena. Provádí se při teplotě 95 °C po dobu 3 - 5 min. Při dalších cyklech PCR stačí již krátké časy denaturace, protože v reakci je již přítomná templátová DNA vzniklá z prvního cyklu reakce, která bývá o dostatečně krátké velikosti a je tedy snadno denaturovatelná.

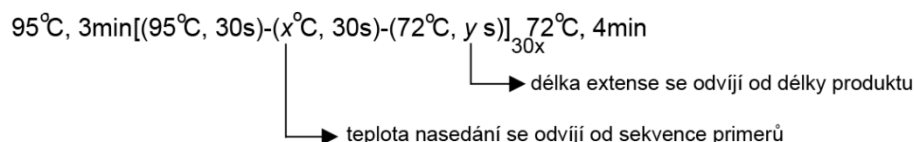
Denaturace: se provádí při 95 °C 0,5 – 1 min

Nasedání primerů („annealing“) – teplota závisí na sekvenci primerů (viz. tabulka). Doba nasedání je obvykle 30 s, ale může se dle potřeby měnit. Zvýšením doby nasedání primeru můžeme zvýšit výtěžek reakce, ale zároveň také můžeme snížit specifitu nasedání primerů, a naopak.

Extenze: se provádí při 72 °C, délka závisí na rychlosti polymerázy (informace od výrobce) a délce produktu. Obvykle, pokud je délka produktu 100 - 800 bp, extenze je 30 s, do 1,5 kb je extenze 1 min.

Závěrečná extenze: se provádí při 72 °C 4 min. Tato fáze zajistí, že všechny produkty jsou plně dosyntetizovány.

Pro většinu aplikací můžeme doporučit toto obecné schéma profilu PCR:



Příprava reakce

- Reakci připravujeme na ledu, tzn. všechny komponenty a reakční směsi máme na ledu, kromě Taq polymerázy. Taq polymerázu máme buď ve speciálním stojánku, který udržuje teplotu okolo $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ nebo ji vyndáme z mrazáku těsně před použitím a umístíme ji na led.
- Používáme preferenčně špičky s filtrem pro zamezení kontaminace.
- Používáme negativní a pozitivní kontrolu, pokud je to možné. V negativní kontrole použijeme místo testovaného vzorku vodu, tzn., negativní kontrola neobsahuje testovanou DNA. Pozitivní kontrola naopak obsahuje takovou DNA, která nám zajistí vznik požadovaného produktu.
- Pokud připravujeme více vzorků, připravíme si tzv. „master mix“. Tzn., pokud připravujeme 25 μl reakcí pro deset různých vzorků DNA, reakční směs si namícháme najednou pro všechny vzorky kromě DNA. Vždy počítáme s jednou reakcí navíc (někdy se stane, že kvůli nepřesnosti pipetování pro poslední vzorek není dostatek reakční směsi). Takže pokud budeme provádět reakci pro 10 vzorků DNA, počítáme reakční komponenty pro 11 vzorků. Takže např. místo 1 μl primeru (který bychom dávali na jednu reakci) přidáme do „master mixu“ 11 μl primeru, místo 2 μl dNTP směsi (kterou bychom dávali na jednu reakci) přidáme 22 μl dNTP směsi, atd. Připravenou reakci důkladně promícháme a rozpipetujeme do připravených PCR zkumavek, do kterých poté přidáme testovanou DNA.
- Pro PCR reakce používáme speciální, tenkostěnné zkumavky na PCR.

Příklad přípravy PCR reakce:

Komponenta (koncentrace)	Komponenta (finální koncentrace)
H ₂ O	18,6 μl
Templátová DNA	0,5 μl
10x PCR pufr (již s obsahem MgCl ₂)	2,5 μl (1x)
Primer 1 (10 μM)	1 μl (0,4 μM)
Primer 2 (10 μM)	1 μl (0,4 μM)
dNTP mix (10mM)	0,5 μl (0,2 mM)
Taq DNA polymeráza (5U/ μl)	0,125 μl (0,2U/ μl)
CELKEM	25 μl

Řešení problémů s PCR

Produkt v negativní kontrole:

- Způsobeno kontaminací buď při přípravě reakce nebo kontaminací přímo v některé chemikálii.

Žádný nebo slabý produkt:

- Snižte teplotu nasedání primerů
- Zvyšte koncentraci primerů nebo množství templátové DNA nebo Taq polymerázy.
- Změňte koncentraci KCl. Zvyšte koncentraci, pokud očekávaný produkt je kratší než 1 kb, nebo koncentraci snižte, pokud očekávaný produkt je delší než 1 kb.
- Přidejte BSA na koncentraci 0,1 - 0,8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.
- Zkontrolujte správnost sekvence primerů.
- Můžete zkusit kombinaci bodů 1-5.

Dlouhé nespecifické produkty:

- Snižte čas nasedání primerů.
- Zvyšte teplotu nasedání primerů.
- Snižte čas extense.
- Snižte teplotu extense na 62 – 68 $^{\circ}\text{C}$.
- Zvyšte koncentraci KCl 1,2x - 2x, ale zachovejte koncentraci MgCl_2 na 1,5 – 2 mM.
- Zvyšte koncentraci MgCl_2 na 3 - 4,5 mM ale zachovejte koncentraci dNTP stejnou.
- Použijte méně primerů nebo templátu nebo Taq polymerázy.
- Kombinujte body 1-7.

Krátké nespecifické produkty:

- Zvyšte čas nasedání primerů.
- Zvyšte teplotu nasedání primerů.
- Zvyšte čas extense.
- Zvyšte teplotu extense na 62 – 68 $^{\circ}\text{C}$.

- Snižte koncentraci KCl 0,7 - 0,8x, ale zachovejte koncentraci MgCl₂ na 1,5 – 2 mM.
- Zvyšte koncentraci MgCl₂ na 3 - 4,5 mM ale zachovejte koncentraci dNTP stejnou.
- Použijte méně primerů nebo templátu nebo Taq polymerázy.
- Kombinujte body 1-7.

MODIFIKACE PCR

- **hot-start PCR** – zvyšuje specifitu reakce, tím, že je využita speciálně upravená, tzv. hot-start polymeráza, která pro svou aktivizaci vyžaduje aktivační teplotu, tj. teplotu okolo 95°C. Při PCR, obvykle během zahřívání vzorku na teplotu počáteční denaturace, může docházet k nescifickému nasedání primerů na templátovou DNA, a pokud je použita standardní Taq polymeráza, mohou z takto nescificky nasednutých primerů vznikat nescifické PCR produkty. Proto enzym, který je využit při hot-start PCR, je za nízkých teplot, na rozdíl od běžných polymeráz, zcela neaktivní. Enzym se aktivizuje až v průběhu reakce, tj. při počáteční denaturační teplotě. Odpadá tedy riziko vzniku PCR produktu z nescificky nasednutých primerů při nízkých teplotách v průběhu přípravy reakce. Dalším způsobem hot-start PCR je přidání polymerázy až po první denaturaci.
- **touchdown PCR** – využívá postupně se snižující se teploty nasedání primerů. V počátečních cyklech je teplota nasedání vysoká, čímž brání nescifickému nasedání primerů, ale postupně se v dalších cyklech snižuje. Při dostatečně nízké teplotě dochází k nasedání primerů na specifická místa a vzniká PCR produkt. Ačkoliv se teplota nasedání primerů může v dalších cyklech ještě dále snižovat, specifický produkt, který vznikl v předcházejících cyklech, zajistí po zbytek reakce vznik pouze specifických produktů.
- **nested PCR** – slouží pro zvýšení specifity reakce, kdy se využívají dva páry primerů. Jeden pár vnějších primerů a jeden pár vnitřních primerů. Vnitřní primery nasedají na sekvenci, která je ohraničena vnějšími primery. Nejprve se provede reakce s vnějšími páry primerů a vzniklý produkt je využit jako templát pro reakci s vnitřními primery. Kombinací dvou párů primerů se zvýší pravděpodobnost amplifikace pouze daného, specifického úseku.
- **inverzní PCR** – je využívána pro izolaci a identifikaci neznámé sekvence, uvnitř níž leží známá sekvence. DNA je štěpená restričním enzymem, který ovšem nesmí štípat uvnitř známé sekvence. Získané fragmenty se poté ligací cirkularizují. Vzniklé cirkulární formy jsou štěpeny restričním enzymem štěpícím ve známé sekvenci, čímž se molekula linearizuje. Úseky známé sekvence se při linearizaci dostávají na konce molekuly. Neznámá sekvence leží uprostřed molekuly. Známa sekvence na koncích molekuly poté slouží jako templátová sekvence pro PCR.
- **asymetrická PCR** – slouží k produkci preferenčně jednoho vlákna, např. pro sekvenování. Vzniku jednoho vlákna je nejčastěji docíleno poměrem primerů, který je 1:50 až 1:100.

- **multiplex PCR** – metoda využívá v jedné reakci více než jeden pár primerů, které se váží k různým úsekům templátové DNA. Reakce tedy běží s více primery nejednou, vzniká více různých produktů, které potom analyzujeme.
- **kvantitativní real-time PCR** – metoda kvantifikace DNA či kvantifikace transkripce. Kvantifikace je na základě fluorescence, a to buď pomocí fluorescenčního substrátu, který se zabudovává do dvouřetězcového PCR produktu v průběhu reakce nebo se využívá speciálních fluorescenčně značených sond.
- **RT-PCR** – PCR, kdy se jako templát využívá cDNA, tj. molekula DNA vzniklá přepisem RNA pomocí reverzní transkriptázy. Využívá se při vyhodnocování genové exprese.
- **alelově-specifická PCR** – na základě sekvence primerů se tato metoda využívá k identifikaci mutací v sekvenci DNA. Na základě změny v sekvenci, se primery váží/neváží k templátové sekvenci a tím produkt vzniká/nevzniká, což udává přítomnost/ nepřítomnost dané mutace v testované sekvenci.
- **mutageneze pomocí PCR** – metoda se využívá ke vnášení změn do sekvence DNA připravovaného PCR produktu, a to pomocí pozměněné sekvence primerů (na jejich 3' konci).