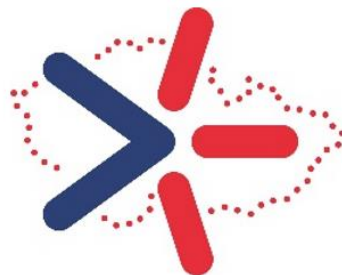




Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU



Národní
plán
obnovy



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE

Miloslava Fojtová

Molekulární komplexy chromatinu, Mendlovo centrum genomiky a proteomiky rostlin,
CEITEC MU

Národní centrum pro výzkum biomolekul, PŘF MU

fojtova@sci.muni.cz



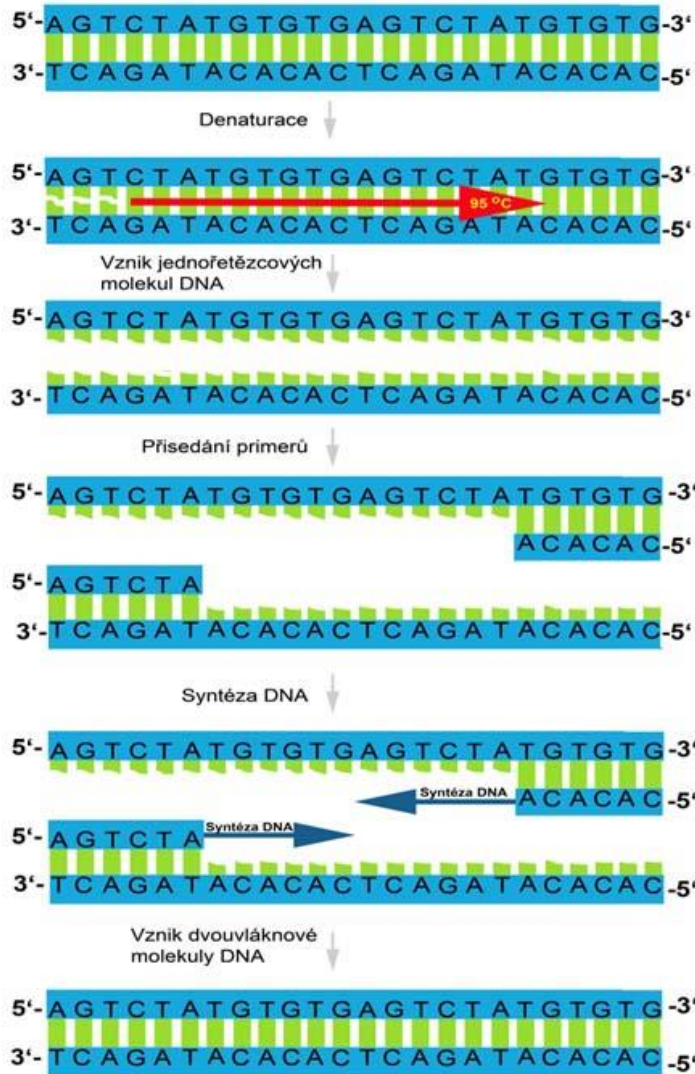
CEITEC

Central European Institute of Technology
BRNO | CZECH REPUBLIC

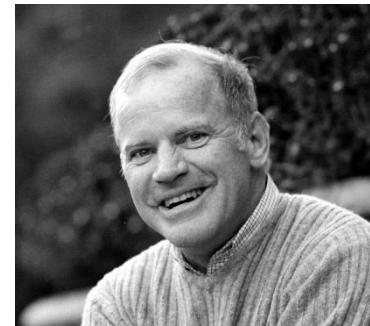
M U N I
S C I

POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE

Rychlé namnožení úseku DNA na principu *in vitro* replikace DNA.



1983 – Kary Mullis (1944-2019)
(Cetus Corporation)



1993 – Nobelova cena za chemii



dostupné na: <https://labguide.cz/metody/pcr/>

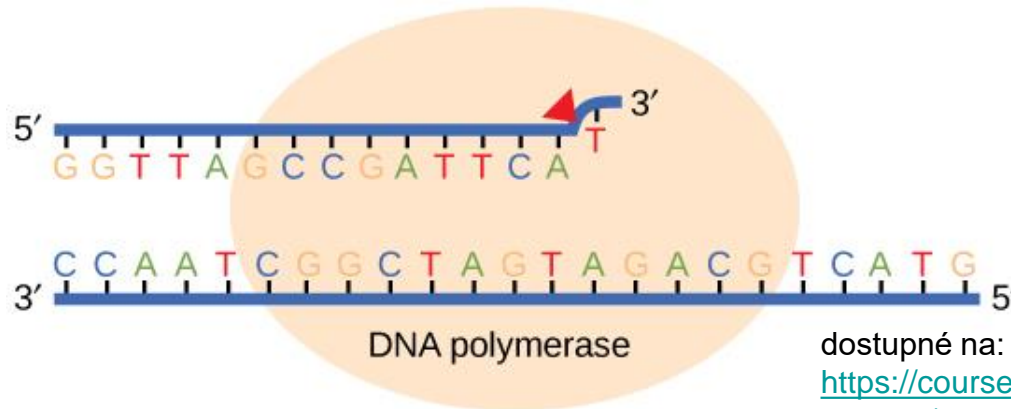
[vid 13.6.2023]

Dostupné na:
https://www.washingtonpost.com/local/obituaries/kary-mullis-unconventional-nobel-laureate-who-unlocked-dna-research-dies-at-74/2019/08/12/e6391612-bbed-11e9-b3b4-2bb69e8c4e39_story.html
[vid 13.6.2023]

Dostupné na:
<https://www.karymullis.com/pcr.sh.html>
[vid 13.6.2023]

CO NAPIPETUJEME DO MIKROZKUMAVKY

- Termostabilní DNA polymeráza

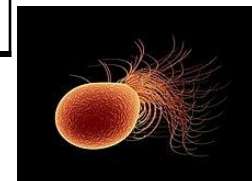
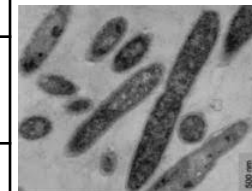


dostupné na:

<https://courses.lumenlearning.com/wm-biology1/chapter/reading-proofreading-dna/>

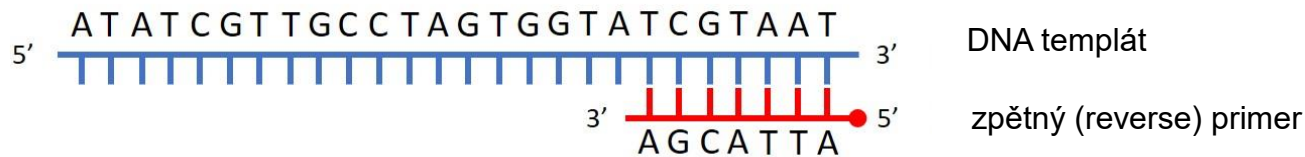
[vid 13.6.2023]

enzym	organismus (opt. teplota)
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i> (65-70 °C)
<i>Tth</i>	<i>Thermus thermophilus</i> (65 °C)
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i> (100 °C)



CO NAPIPETUJEME DO MIKROZKUMAVKY

• Oligonukleotidové primery

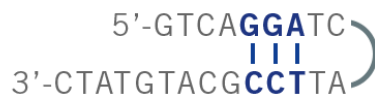


dostupné na: <https://toptipbio.com>
[vid 13.6.2023]

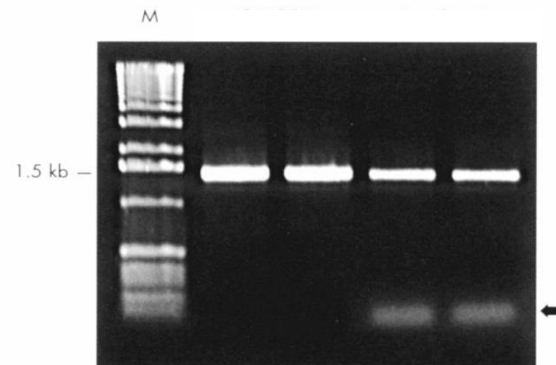
Cross dimer



Hairpin



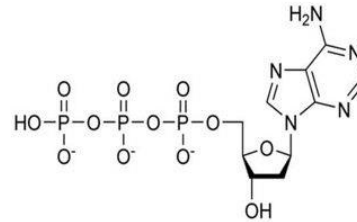
Effect of Primer-Dimer Formation



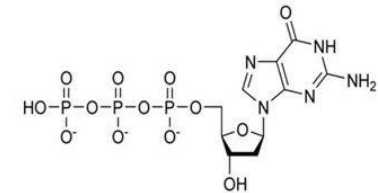
dostupné na: <https://the-dna-universe.com/>
[vid 13.6.2023]

CO NAPIPETUJEME DO MIKROZKUMAVKY

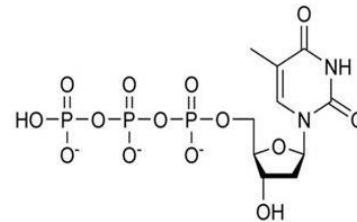
- směs dTTP, dATP, dCTP, dGTP



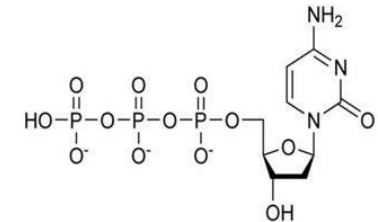
Deoxyadenosine triphosphate (dATP)



Deoxyguanosine triphosphate (dGTP)



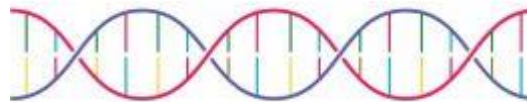
Deoxythymidine triphosphate (dTTP)



Deoxycytidine triphosphate (dCTP)

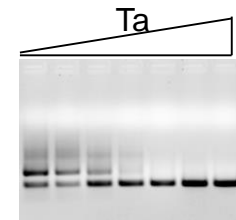
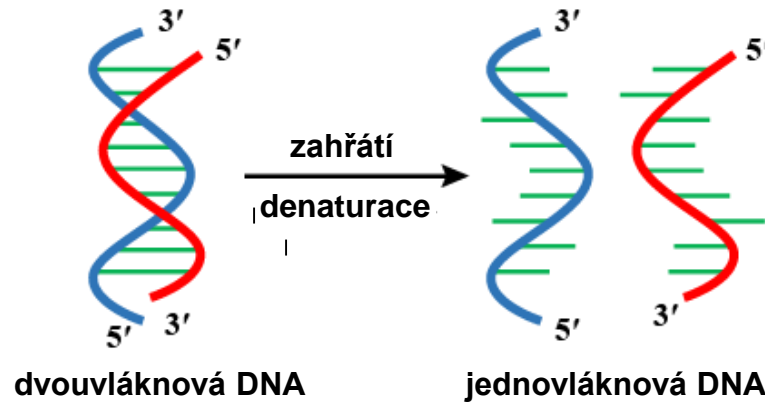
- **Templátová DNA**

Nemusí být známa kompletní sekvence, ale aspoň úseky pro návrh primerů

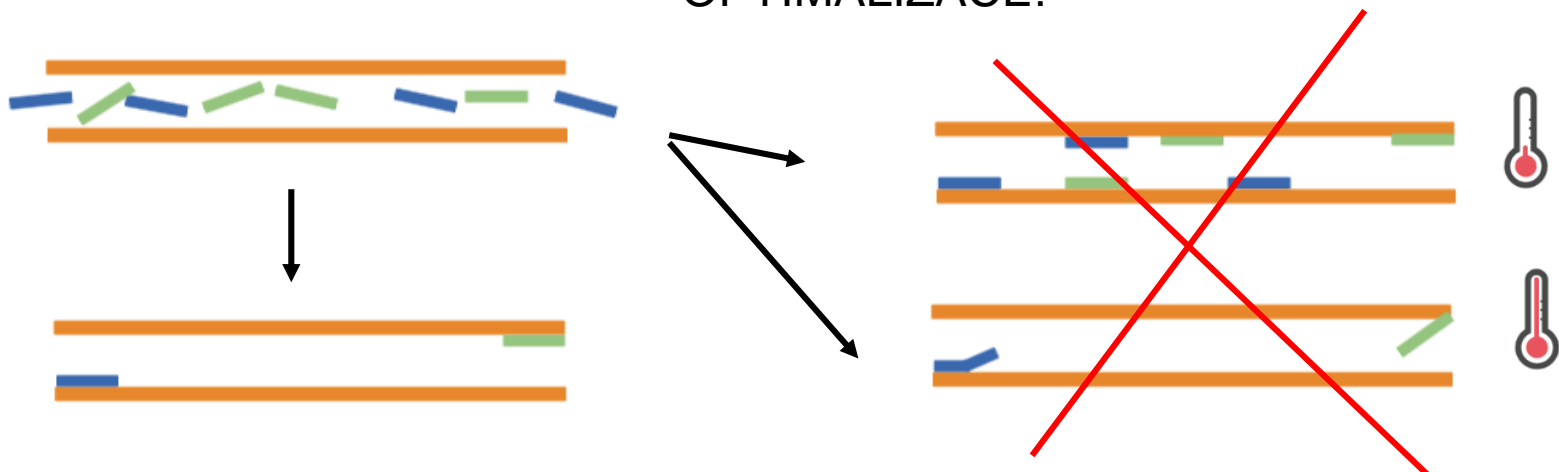


JAK TO BĚŽÍ

- Denaturace 95 °C (92 – 98 °C)



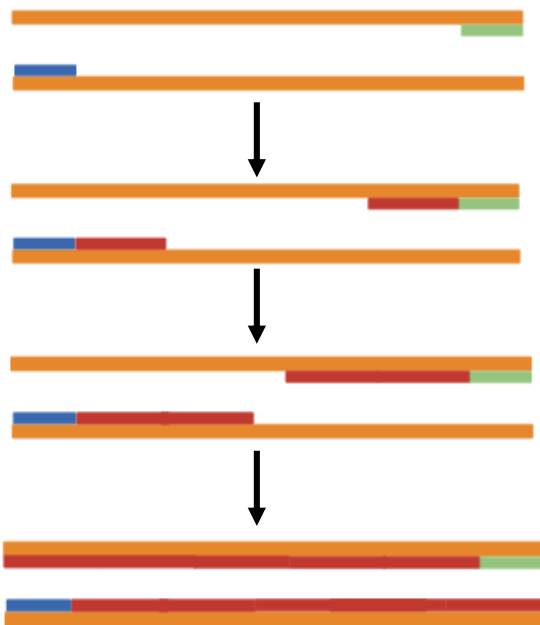
- Nasedání (hybridizace) primerů 50 - 55 °C
OPTIMALIZACE!



JAK TO BĚŽÍ

- Syntéza DNA 72 °C (70 – 74 °C)

Created with BioRender.com



Počet cyklů: 25 – 35, vždy negativní kontrolu!!!
faktor zmnožení 2^n - exponenciální průběh

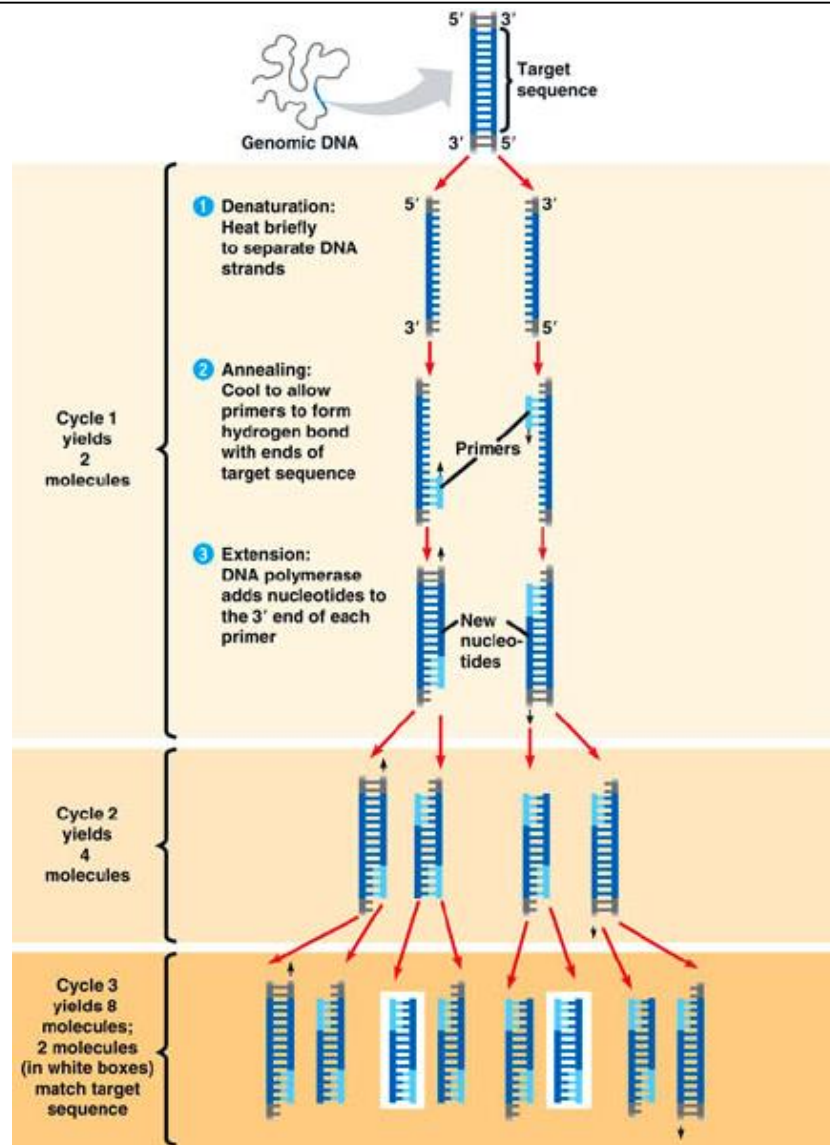
Cyklery



dostupné na:

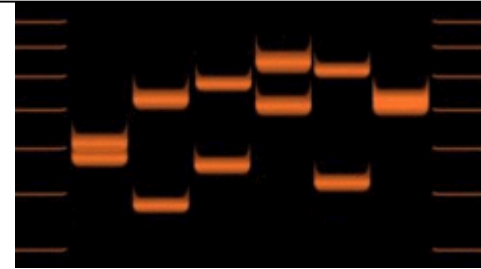
<https://www.sciencedirect.com/topics/chemistry/chain-reaction-step>⁷

[vid 13.6.2023]



JAK TO UDĚLAT KVANTITATIVNĚ

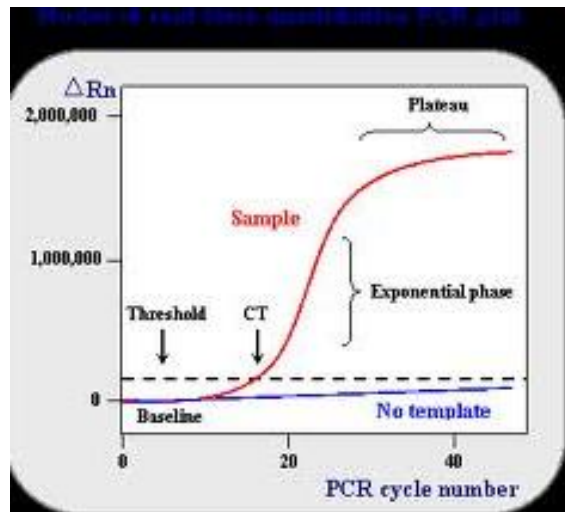
Klasická PCR – odpověď ANO - NE



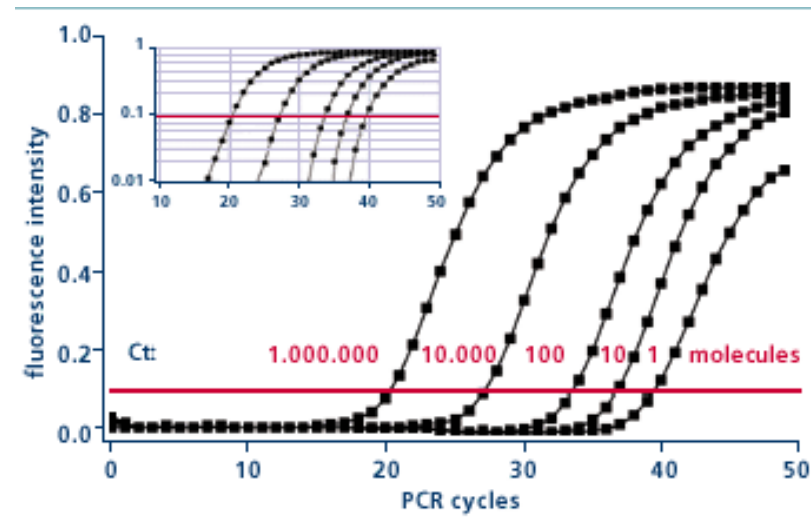
dostupné na: https://en.wikipedia.org/wiki/Variable_number_tandem_repeat
[vid 9.6.2023]

qPCR - současná amplifikace a detekce produktu v přítomnosti **fluorescenční látky**

- rychlejší (bez elektroforetické detekce produktu)
- spolehlivé výsledky
- citlivá detekce

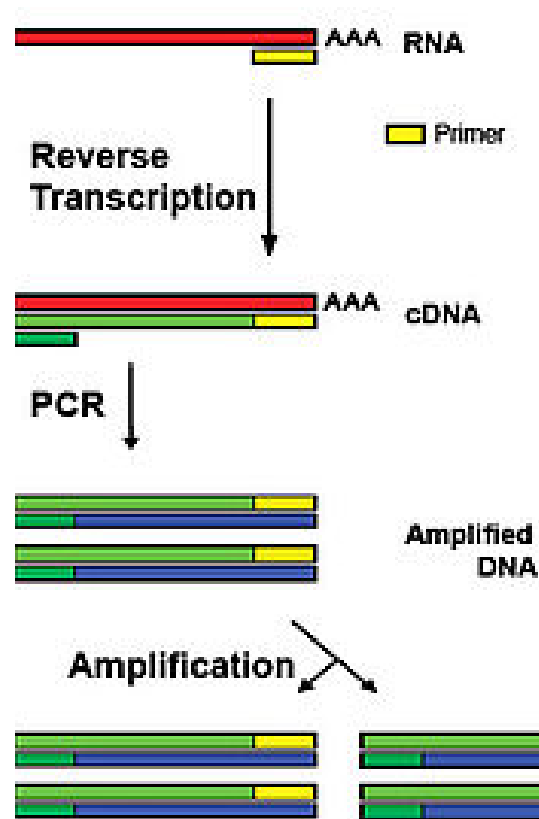


dostupné na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
[vid 9.6.2023]



dostupné na: <http://www.bio-equip.cn/>
[vid 9.6.2023]

LZE KVANTIFIKOVAT NEJEN DNA, ALE I RNA



KVALITA RNA!!!

oligo(dT)₁₂₋₂₀
random hexa - nonamery
specifický primer(y)

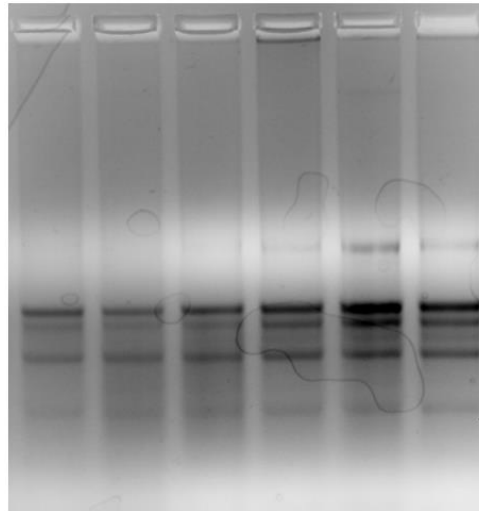
sekvenčně-specifické primery

dostupné na: <https://www.quora.com/What-does-reverse-transcriptase-PCR-do>
[vid 9.6.2023]

KVALITA TEMPLÁTU (RNA)

Analýza transkripce genů – izolace mRNA (smír 0.5 – 800 kb, většina 1.5 – 2 kb)

Celková RNA – bandy 18S, 25S rRNA



roslinná RNA (*A. thaliana*)
© Miloslava Fojtová

KVALITA TEMPLÁTU (RNA)

Bioanalyzář (Agilent) - elektroforetická separace na mikročipech

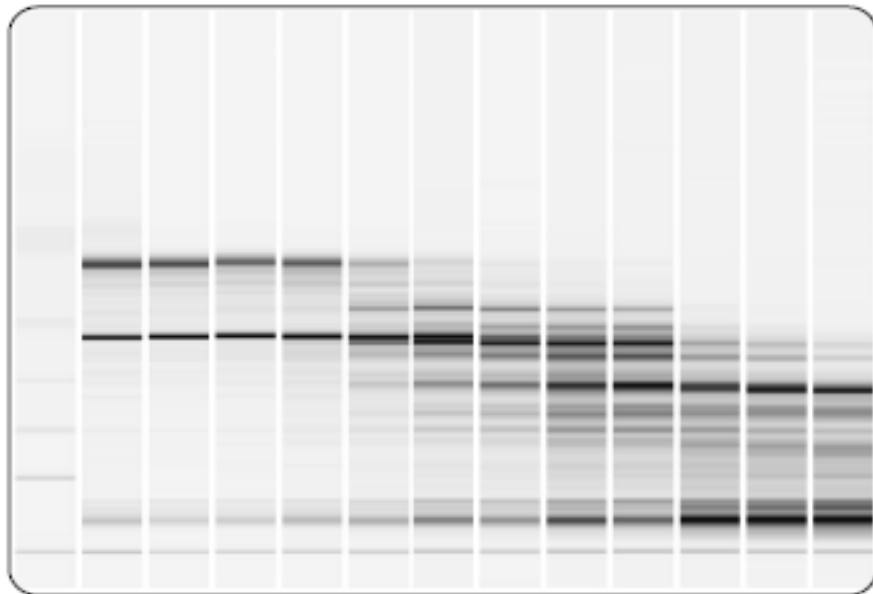


Figure 1
A total RNA sample was degraded for varying times and the resulting samples were analyzed on the Agilent 2100 bioanalyzer using the Eukaryote Total RNA Nano assay. A shift towards shorter fragment sizes can be observed with progressing degradation.

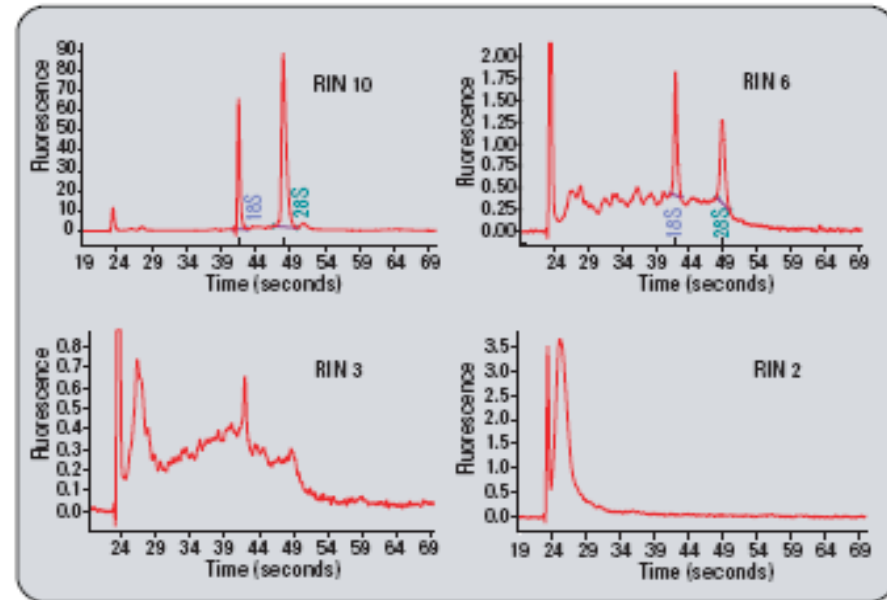


Figure 2
Sample electropherograms used to train the RNA Integrity Number (RIN) software. Samples range from intact (RIN 10), to degraded (RIN 2).

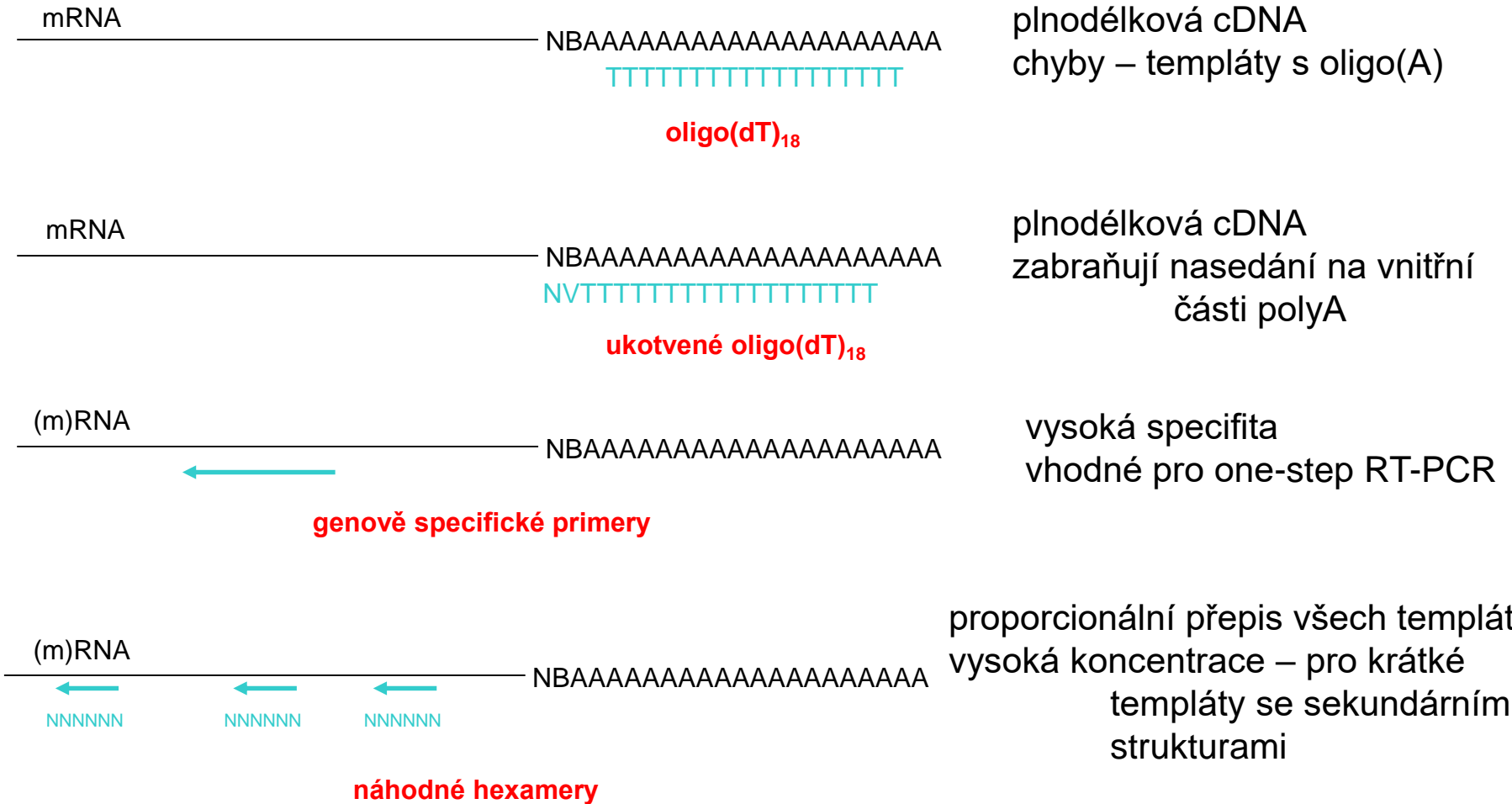
RIN (RNA Integrity Number)

převzato z: RNA Integrity Number (RIN) – Standardization of RNA Quality Control

dostupné na: www.agilent.com/chem/labonachip

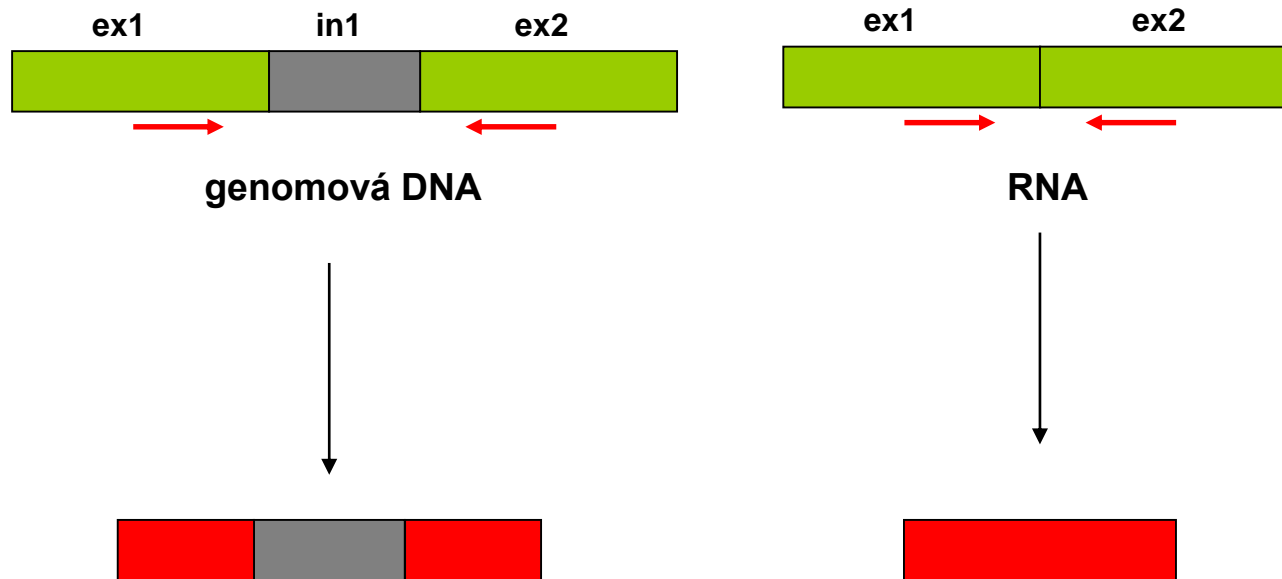
[vid 9.6.2023]

PRIMERY PRO RT



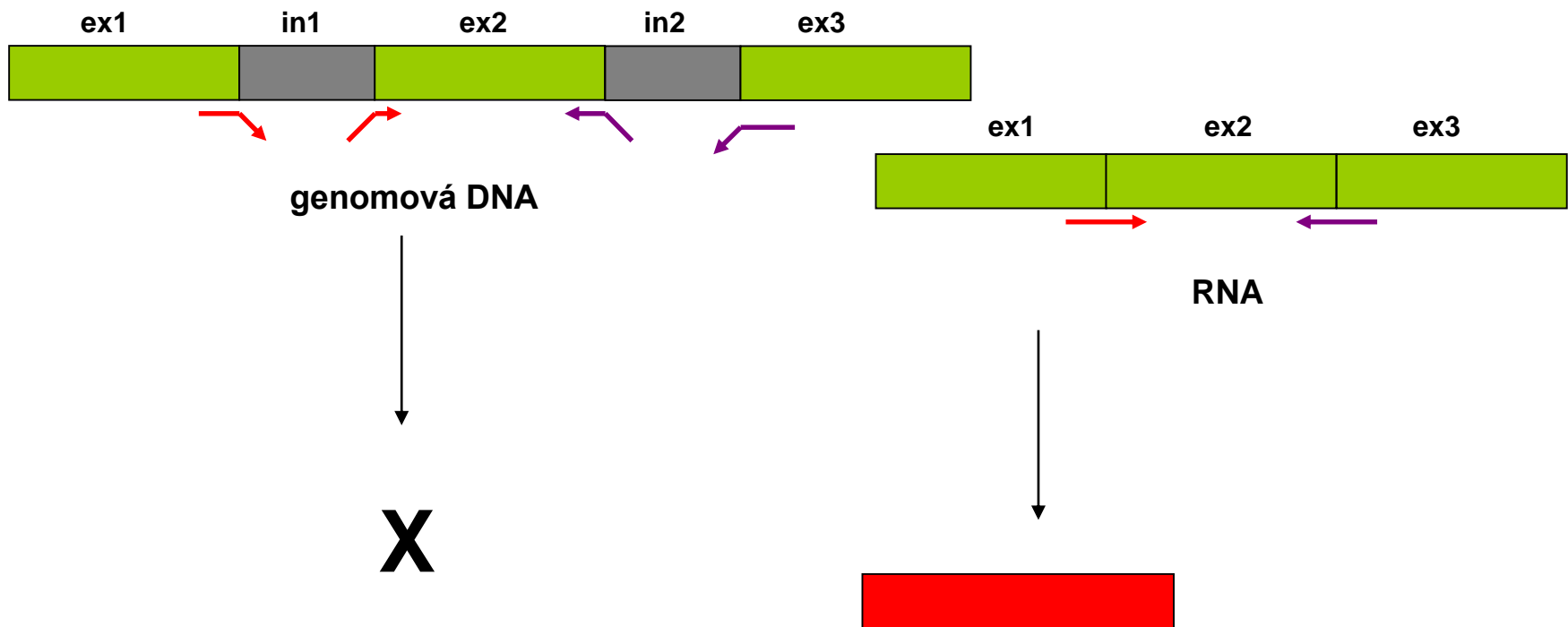
NÁVRH PRIMERŮ PRO RT-PCR

Primery ze sousedních exonů



NÁVRH PRIMERŮ PRO RT-PCR

Primery zasahují do sousedních exonů

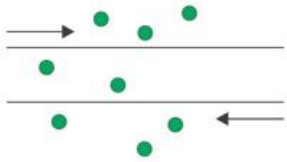


REVERZNÍ TRANSKRIPTÁZY

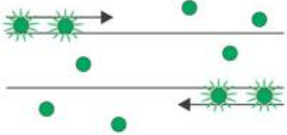
enzym	délka (kb)	teplotní optimum	citlivost	“difficult templates”	RNaseH	modif. nucleotidy
Transcriptor (Roche)	14	42-65	+++	+++	A	A
Expand (Roche)	14	42-50	++	+	N	A
AMV	12	42 (až 60)	++	+	A	A
M-MuLV	10	37	+	+(+)	A	A
<i>C. therm.</i>	3	60-70	++	+++	N	A
<i>Tth</i>	1	55-70	+	+	N	A

JAK TO UDĚLAT KVANTITATIVNĚ

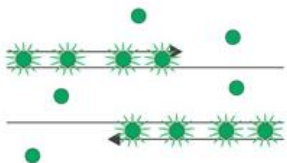
Annealing phase



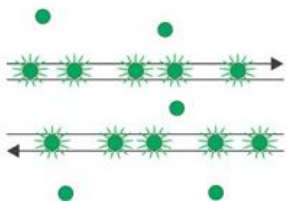
Extension phase (I)



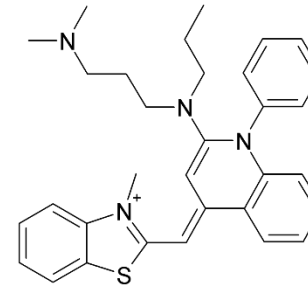
Extension phase (II)



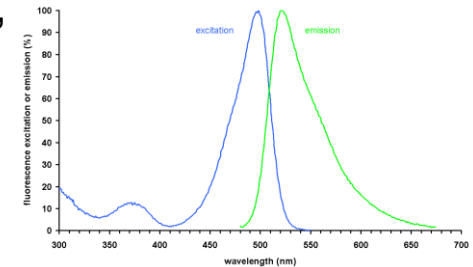
End of PCR cycle



SYBR Green I



- fluorescence výrazně roste po vazbě na dsDNA
- absorbuje modré světlo (497 nm), emituje zelené světlo (520 nm), detekce na konci každého cyklu



- relativně snadný návrh primerů a optimalizace PCR
- pozor na nespecifické produkty (dimery primerů)!!!
 - vždy na konci melting analýza
 - detekce fluorescence za vyšší teploty
- hand-made mixy s hot start polymerázou (náročné na přesnost pipetování – reproducibilita)
- komerční mixy – přidávají se pouze primery a templát
- reakce v multiplikátech (nejméně triplikáty), biologické repliky

JAK TO UDĚLAT KVANTITATIVNĚ

Využití oligonukleotidových sond komplementárních k PCR produktu
Vysoce specifická analýza

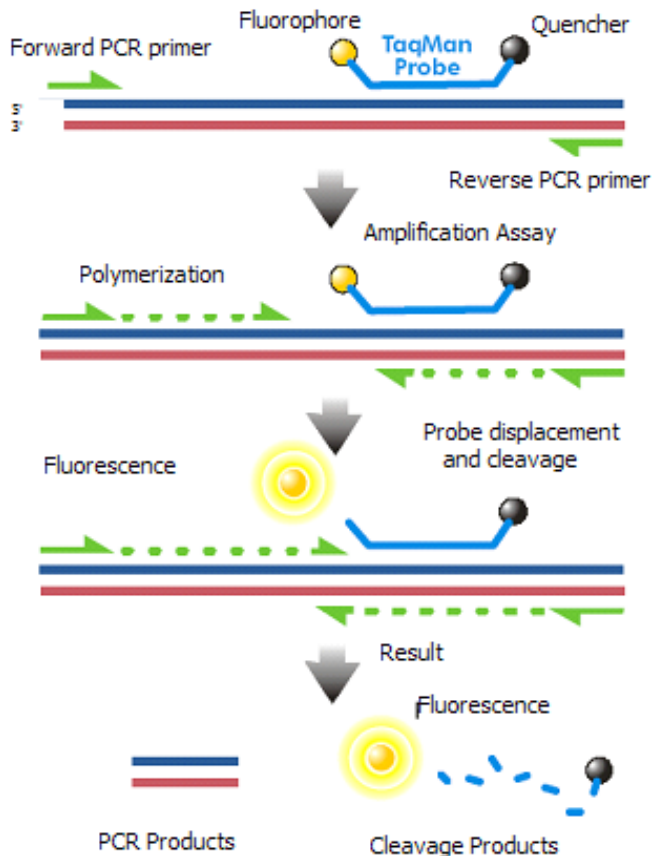
Hydrolytické próby

- reportérový fluorofor v blízkosti zhášedce
- během amplifikace – hydrolýza próby
 - oddělení fluorochromu a zhášedce
 - detekce fluorescence
- během PCR exponenciálně roste množství volných fluoroforů

TaqMan próby:

Firemní knihovny

Validované sady (primery + próba) pro kvantifikaci transkripce v modelových organismech (člověk, myš, krysa, primáti, *Drosophila*, *Caenorhabditis elegans*, *Arabidopsis*)

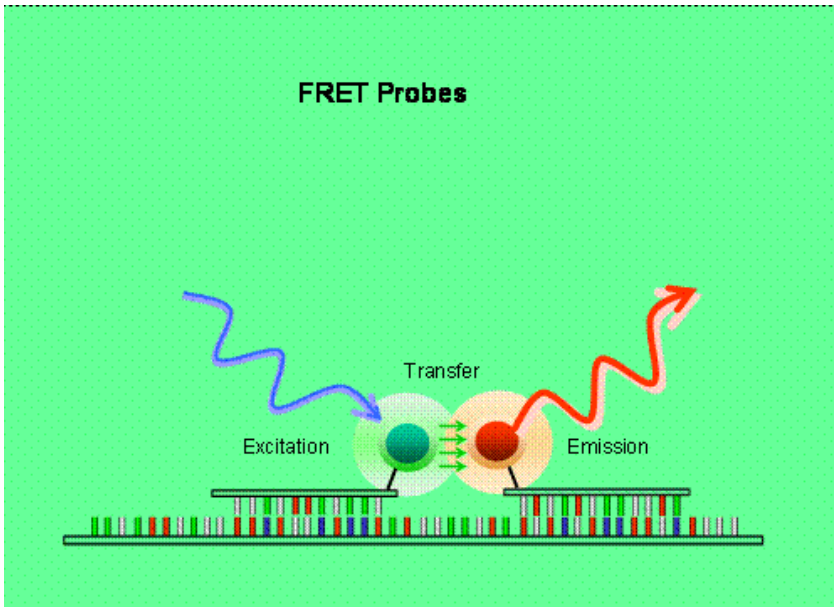


JAK TO UDĚLAT KVANTITATIVNĚ

Využití oligonukleotidových sond komplementárních k PCR produktu
Vysoce specifická analýza

Hybridizační próby

- dvě próby, jedna značená (3') donorovým fluorochromem (fluorescein), druhá (5') akceptorovým fluorochromem, homologní k vnitřní části amplifikovaného úseku
- po hybridizaci – próby v těsné blízkosti
- fluorescein je excitován modrým světlem – emise zeleného světla – emitované světlo excituje akceptorový fluorochrom – detekce
- amplifikace – může hybridizovat více prób
 - vyšší signál detekované fluorescence
- próby jsou během PCR stabilní



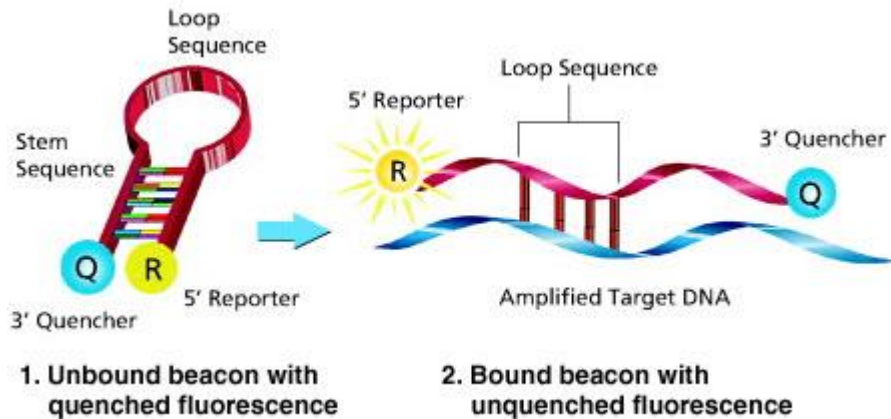
dostupné na: <https://www.sequencereferral.com/Technology.html>
[vid 9.6.2023]

JAK TO UDĚLAT KVANTITATIVNĚ

Využití oligonukleotidových sond komplementárních k PCR produktu
Vysoce specifická analýza

Molekulární majáky

- jednořetězcové oligonukleotidy
- krátké koncové sekvence komplementární
- jednořetězcový úsek komplementární k cílové sekvenci
- po hybridizaci k DNA – delší a stabilnější hybrid než kmen sondy (v tom je např. jeden nekomplementární oligonukleotid) - emise fluorescence



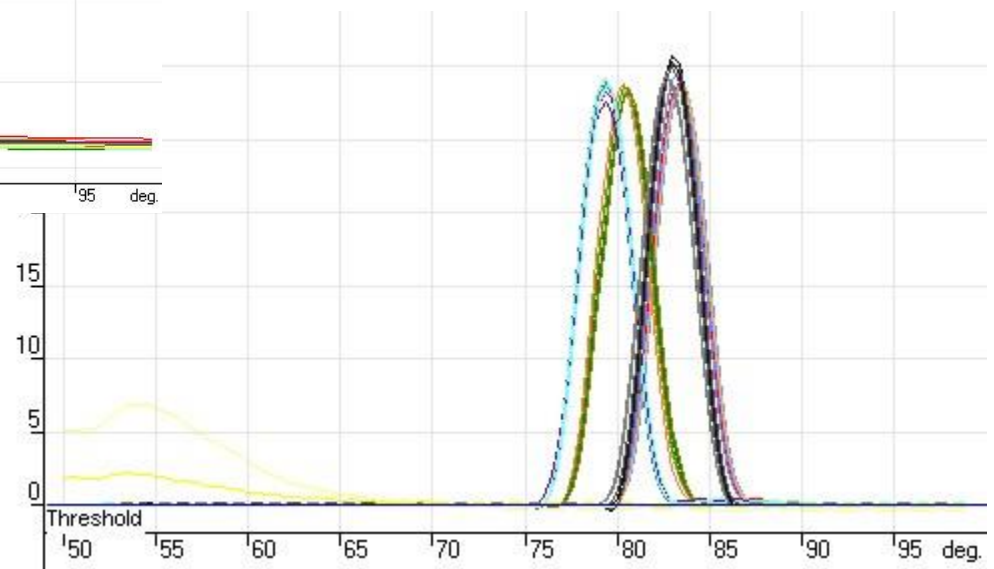
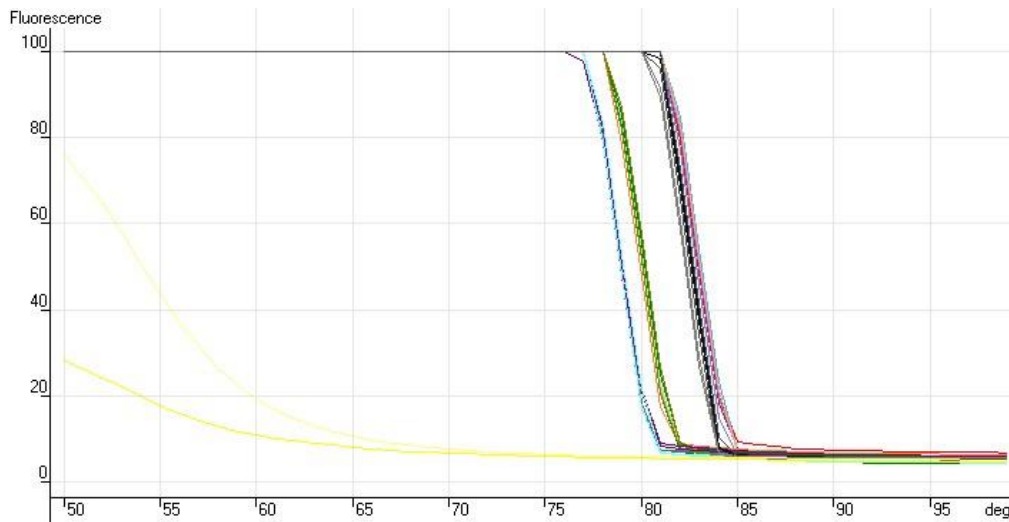
Sigma-Aldrich

dostupné na: <https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/technical-documents/technical-article/genomics/qpcr/molecular-beacons>
[vid 9.6.2023]

JAK TO UDĚLAT KVANTITATIVNĚ

SYBR Green I analýza – specifita produktu PCR

- pomalé zahřívání PCR produktu na 95 °C
- prudký pokles fluorescence při teplotě kolem T_m

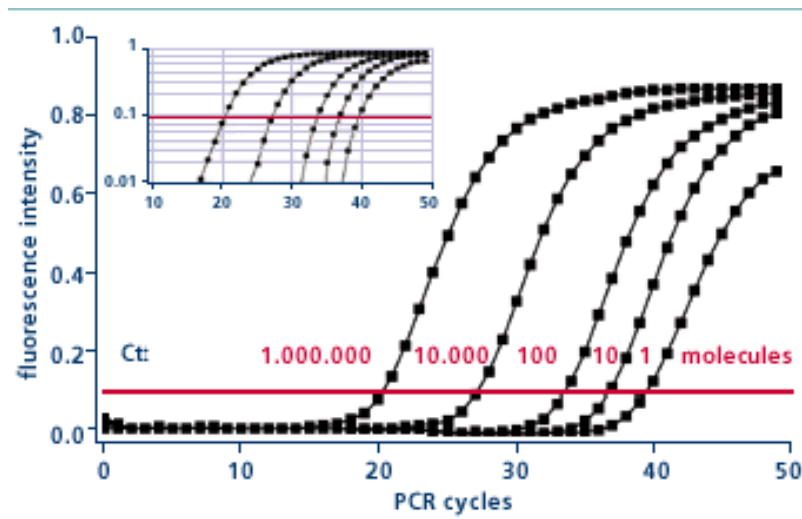


JAK TO UDĚLAT KVANTITATIVNĚ

Ct (CP) – cyklus, ve kterém fluorescence stoupne nad detekční limit přístroje závisí na počáteční koncentraci templátu:

nižší koncentrace templátu – vyšší Ct

vyšší koncentrace templátu – nižší Ct

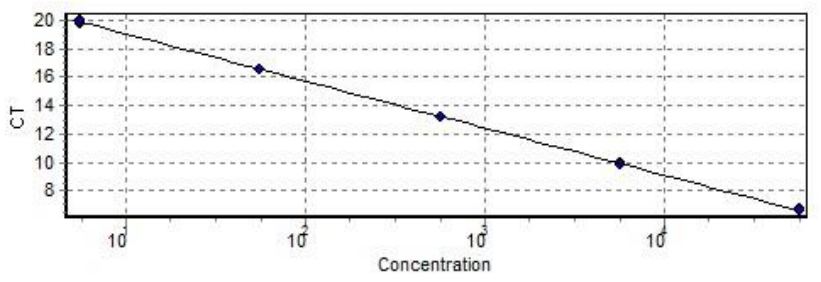
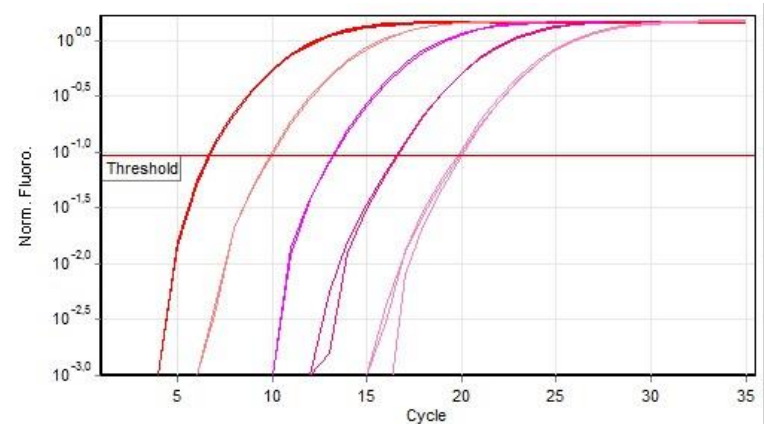
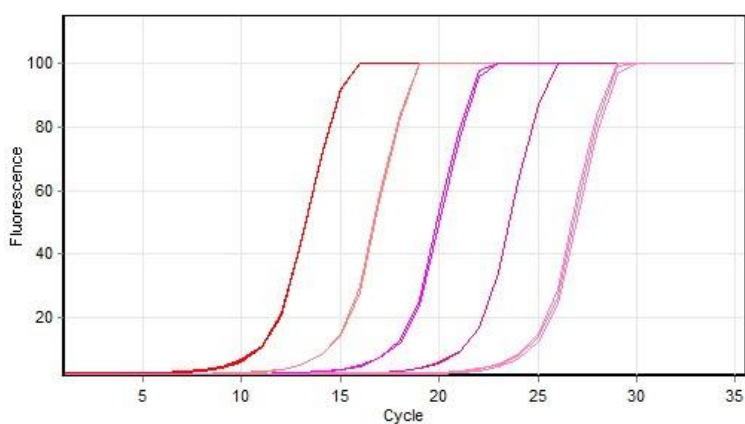


dostupné na: <https://www.bio-equip.cn/enshow1equip.asp?equipid=1180>
[vid 9.6.2023]

JAK TO UDĚLAT KVANTITATIVNĚ

Absolutní kvantifikace - koncentrace DNA je vyjádřena v absolutních čísle (počet kopií, $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)

KALIBRAČNÍ KŘIVKA – vzorky standardů o známé koncentraci

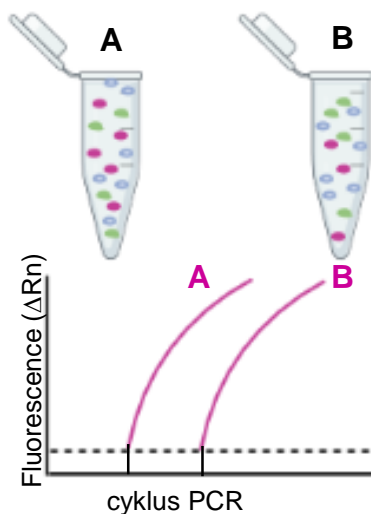


Reaction efficiency (*)	1,00413 (* = $10^{(-1/m)} - 1$)
M	-3,31208
B	22,34521
R Value	0,99991
R ² Value	0,99981

R – korelační koeficient (% dat v souladu se statistickou hypotézou)
 B – „intercept“, teoretické množství kopií detekovatelné v 1. cyklu
 M – sklon (směrnice) přímky, zásadní pro výpočet efektivity reakce optimálně -3.332
 Reakční efektivita 1 – faktor amplifikace 2

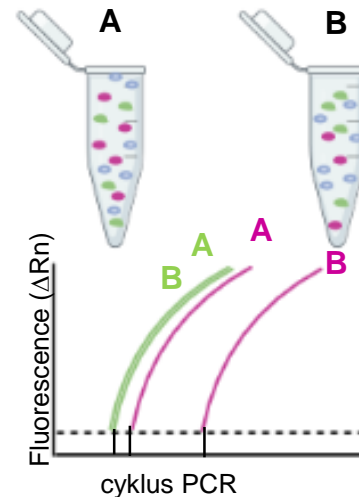
JAK TO UDĚLAT KVANTITATIVNĚ

Relativní kvantifikace - srovnání množství transkriptu mezi více vzorky
vztažené k transkripci referenčního genu
(konstantní množství ve všech analyzovaných vzorcích)



$$\Delta Ct = Ct(GOI)B - Ct(GOI)A$$

Studovaný gen (GOI)
Referenční gen (REF)



$$\Delta Ct(A) = Ct(GOI)A - Ct(REF)A$$

$$\Delta Ct(B) = Ct(GOI)B - Ct(REF)B$$

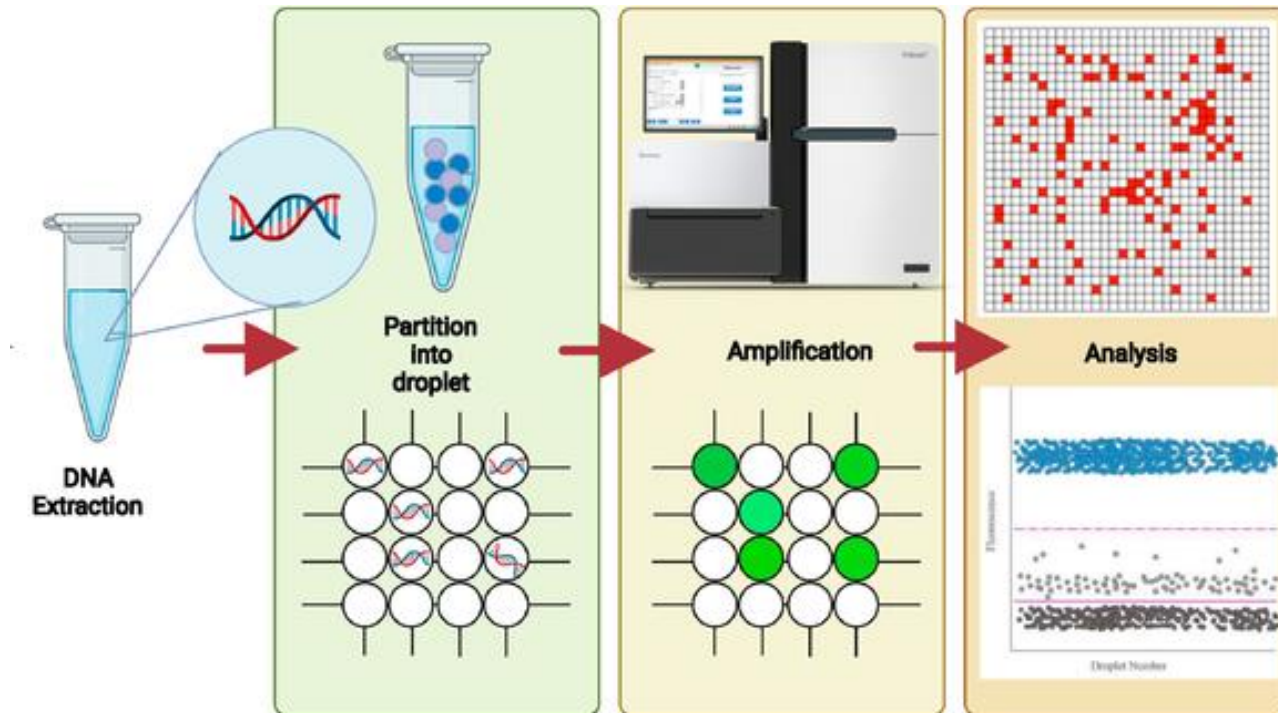
$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(B) - \Delta Ct(A)$$

$$R = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

JAK TO UDĚLAT KVANTITATIVNĚ

Emulzní PCR – nejsou třeba žádné standardy ani reference!
Poměr negativních reakcí vs. celkový počet reakcí.
Lineární závislost mezi koncentrací cílové DNA a signálem.

Princip: naředění a kompartmentalizace molekul templátové DNA a všech složek PCR do tisíců nanolitrových mikroreakcí (v emulzi voda - olej).
Ideálně – každá kapka obsahuje max. jednu molekulu templátu.



dostupné na: <https://www.intechopen.com/>

[vid 9.6.2023]

K ČEMU TO JE

- V medicíně

diagnostika – prenatální testování

- časná diagnostika nádorů
- identifikace/kvantifikace hladin virů a bakterií (hepatitidy, herpetické viry, respirační viry, mykobakterie, bakteriální meningitidy, borelie, helicobacter,.....)

Diagnostika SARS-CoV-2 – detekce virové RNA RT-PCR

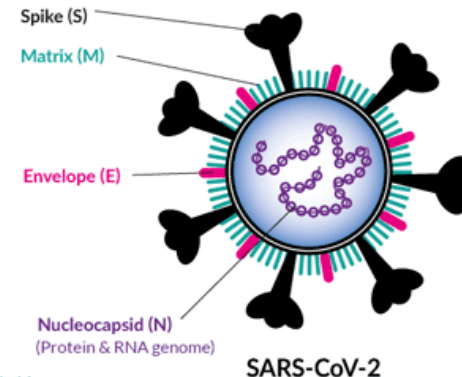
gen E (iontové kanály; infekčnost)

gen S (trimery, vstup do hostitelské buňky)

gen N (vazba k virové RNA, stabilizuje „beads on string“ konformaci)

gen M (abundantní, přes interakci s E proteinem - zakřivení membrány virového obalu)

gen RdRP (potvrzující PCR)



dostupné na: <https://www.invivogen.com>

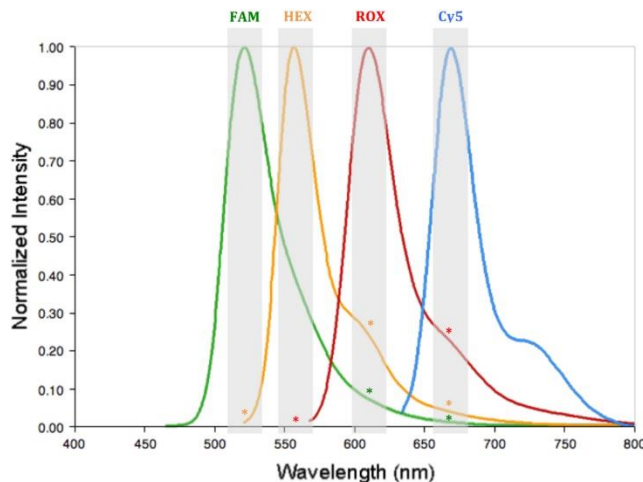
[vid 13.6.2023]

K ČEMU TO JE

- V medicíně
diagnostika SARS-CoV-2

Příklady testů:

- Kit na jedнокrokovou PCR (RT + amplifikace)
multiplexové uspořádání: jedna barva – virový gen primární screening (gen E)
druhá barva – virový gen sekundární screening (RdRP)
třetí barva – kontrola, housekeeping (referenční) gen
(lidský gen – RP, ribonukleáza P, procesování tRNA)

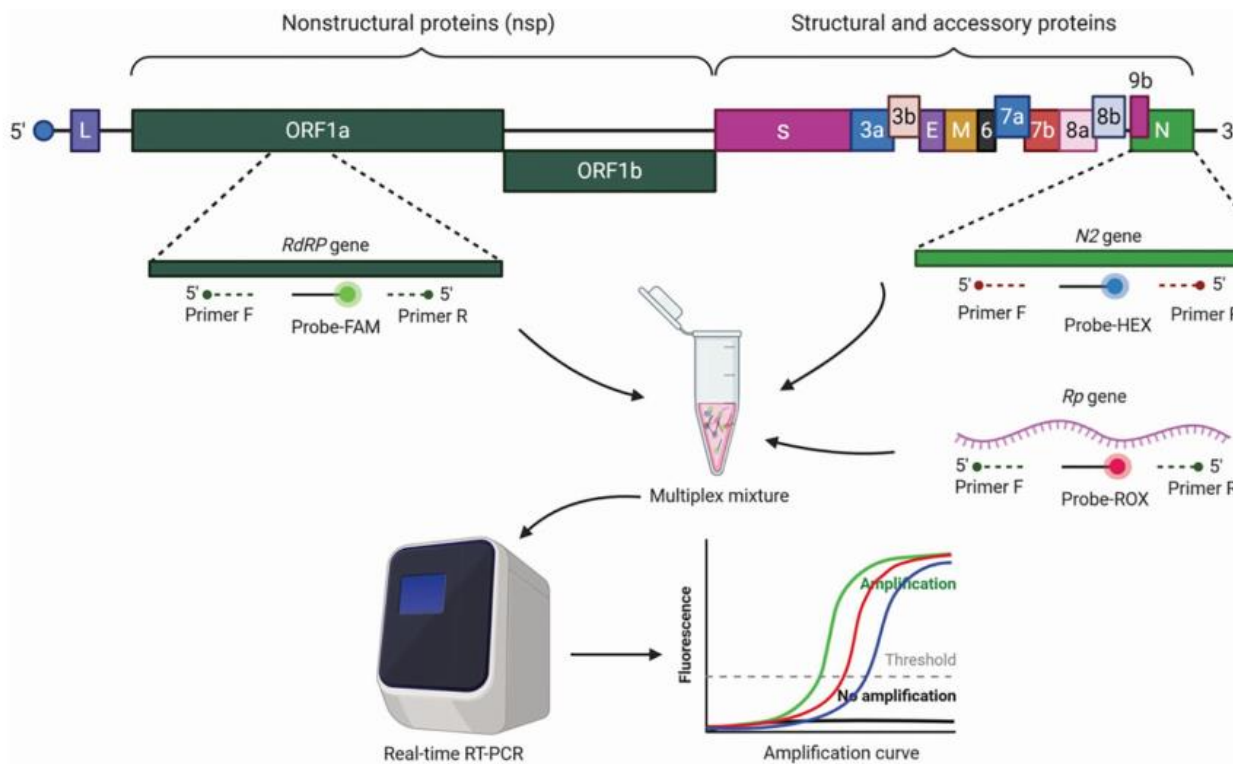


dostupné na: <https://www.caister.com/hsp/supplementary/pcr-troubleshooting/c6f2.html>

[vid 13.6.2023]

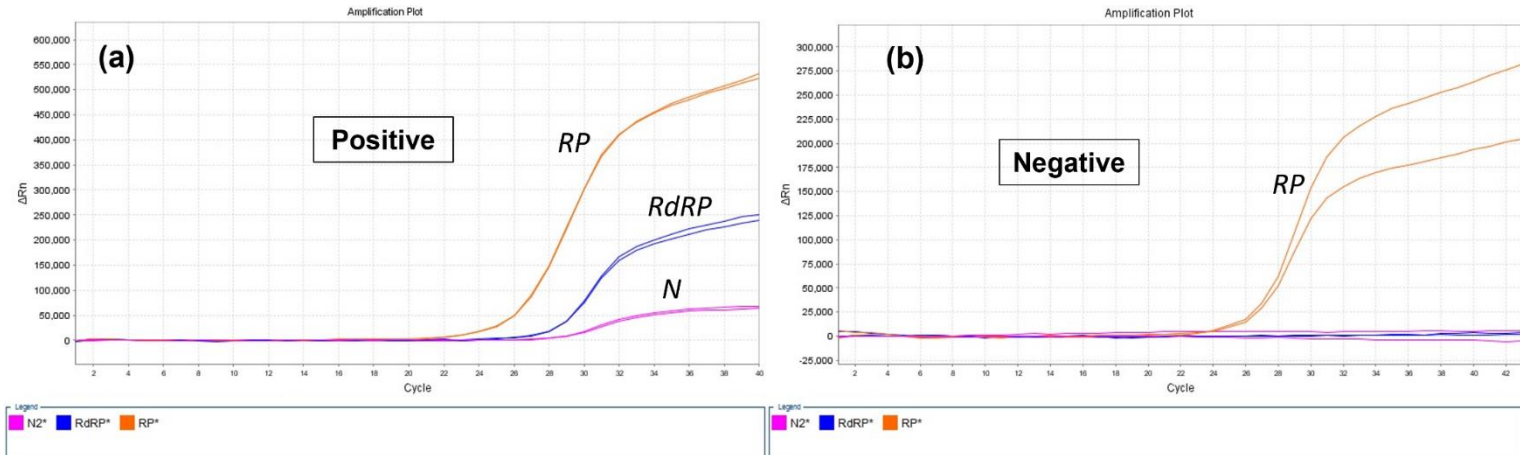
K ČEMU TO JE

- V medicíně
diagnostika SARS-CoV-2



K ČEMU TO JE

- V medicíně
diagnostika SARS-CoV-2



převzato z: Tombuloglu et al., Sci Rep. 2022
<https://doi.org/10.1038/s41598-022-06977-z>

HEX (533 nm excitation
and 559 nm emission)

N

FAM (495 nm excitation
and 520 nm emission)

RdRP

ROX (578 nm excitation
and 604 nm emission)

RP

K ČEMU TO JE

- V kriminalistice

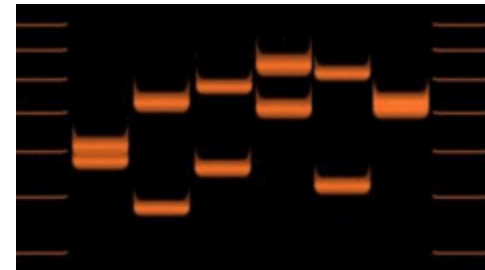
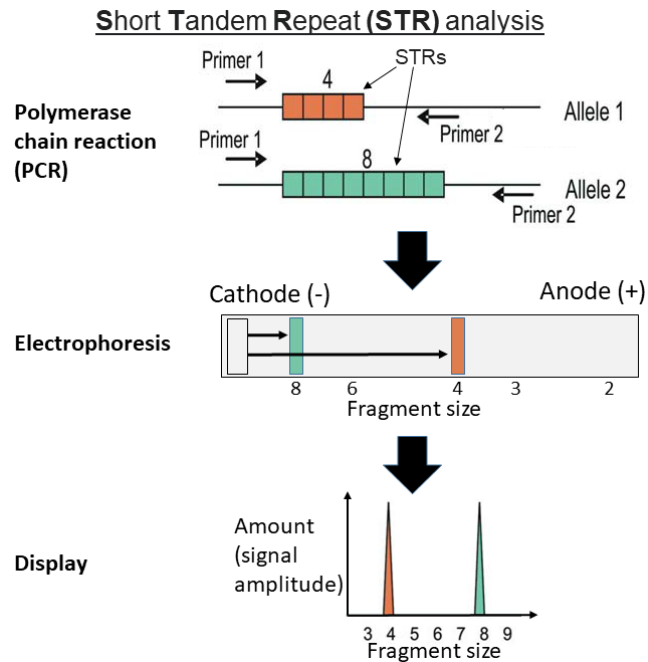
DNA fingerprinting – jednoznačné určení osoby

– určování otcovství (příbuznosti)

Repetitivní vysoce variabilní úseky

variable number tandem repeats (VNTR)

short tandem repeats (STR; mikrosatelity, minisatelity)



Délky VNTR alel u 6 osob

dostupné na: https://en.wikipedia.org/wiki/Variable_number_tandem_repeat
[vid 9.6.2023]

K ČEMU TO JE

- V kriminalistice

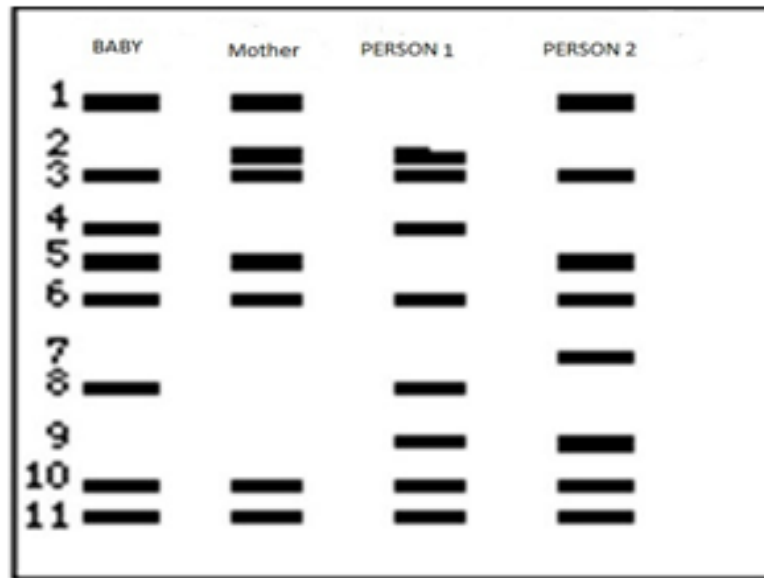
DNA fingerprinting – jednoznačné určení osoby

– **určování otcovství (příbuznosti)**

Repetitivní vysoce variabilní úseky

variable number tandem repeats (VNTR)

short tandem repeats (STR; mikrosatelity, minisatelity)



dostupné na: <https://byjus.com/question-answer/from-the-given-dna-fingerprint-result-identify-who-is-the-father-of-the-baby-person/>

[vid 13.6.2023]

K ČEMU TO JE

- V kriminalistice

DNA fingerprinting – jednoznačné určení osoby

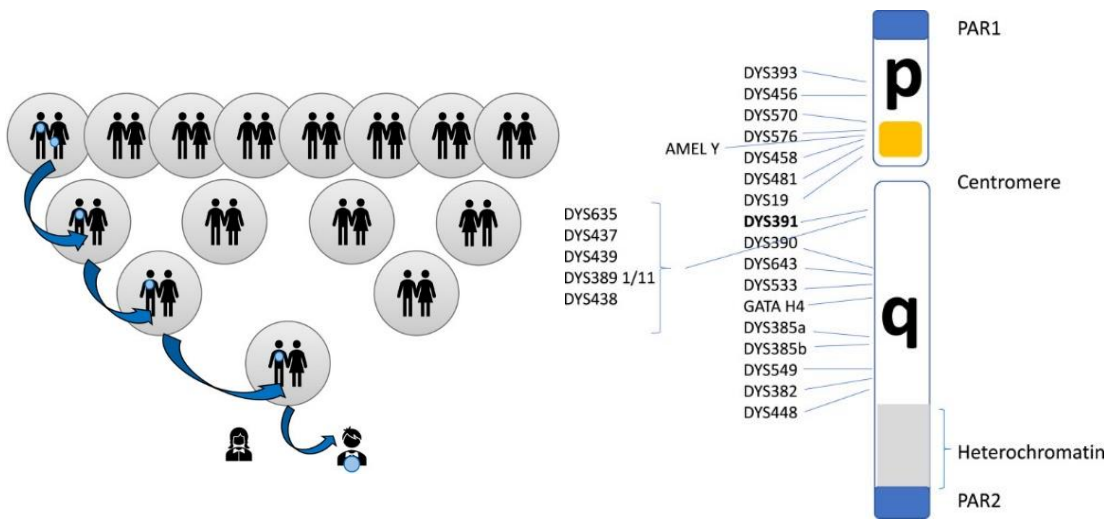
– **určování otcovství (příbuznosti)**

Repetitivní vysoce variabilní úseky

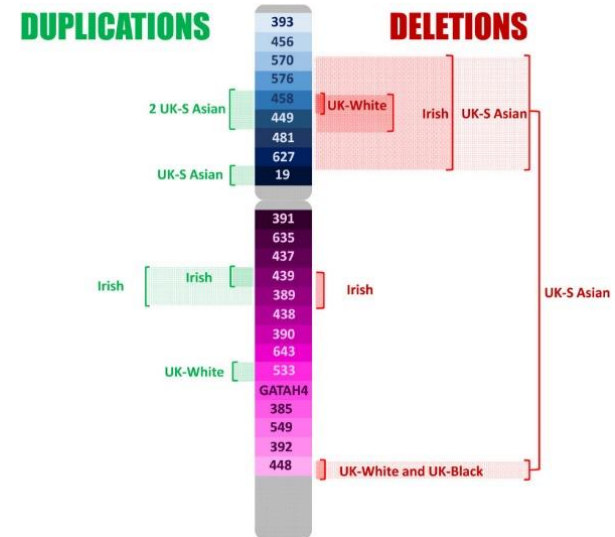
variable number tandem repeats (VNTR)

short tandem repeats (STR; mikrosatelity, minisatelity)

Haplotyp Y chromozómu (sada STR alel) – přenáší se z otce na syna



rutinně využívané STR



duplikace a delecce v UK a Irsku (3654 hodnocených)

K ČEMU TO JE

- **V potravinářství**

stanovení přítomnosti patogenů (*Salmonella* sp., *Campylobacter* sp.)
alergenů (oříšky, celer, lepek, sója)

transgenní organismy



Bt kukuřice

gen z bakterie *Bacillus thuringiensis*
toxin hubí zavíječe kukuřičného
nižší obsah mykotoxinů

↓ **37 % používání pesticidů**



Zlatá rýže

vyšší obsah beta karotenu
oblasti s chronickým nedostatkem vit. A
prevence slepoty

↑ **22 procent výnosy**



Rezistence vůči herbicidům

nadprodukce enzymu
mutantní (rezistentní) enzym
enzym rozkládající herbicid

X

zdravotní rizika
rezistence plevelů

Ilustrační obrázky

Dostupné na: <https://bezpecnostpotravin.cz/pozor-na-pestovani-bt-kukurice-u-statnich-hranic/>

<https://www.environewsnigeria.com/golden-rice-2-said-carry-high-likelihood-risks-without-substantial-benefits/>

<https://www.agromanual.cz/cz/clanky/ochrana-rostlin-a-pestovani/>

[plevele/technologie-herbicidni-tolerance-plodin-k-herbicidum](#)

Děkuji za pozornost

PCR Bad Karma Hypothesis (<https://www.chemicalforums.com/index.php?topic=10097.0>):

Background:

This is basically the “God is punishing you” hypothesis. It sometimes gains a great deal of favor.

Symptoms:

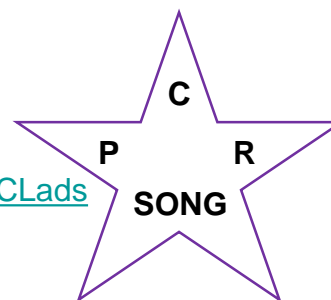
- i) All rational explanations have been exhausted and yet PCR still is not working for you.
- ii) Persistent feelings of guilt (if you are a Catholic, this symptom could be misleading).

Tests and solutions:

- i) Try bungee jumping. If you survive, God must not be too hacked-off at you.
- ii) Atone for your sins and start over at the top of the flow chart.
- iii) If you end up here next time, have someone watch you next time you set up your PCR reactions.



dostupné na: <https://www.youtube.com/watch?v=x5yPkxCLads>
[vid 13.6.2023]



dostupné na: <https://www.ebay.com.au/itm/133604446130>
[vid 13.6.2023]