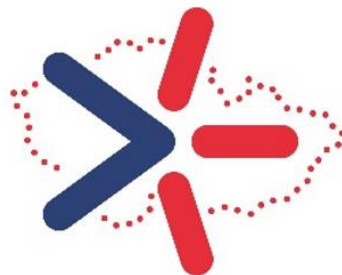




Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU



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



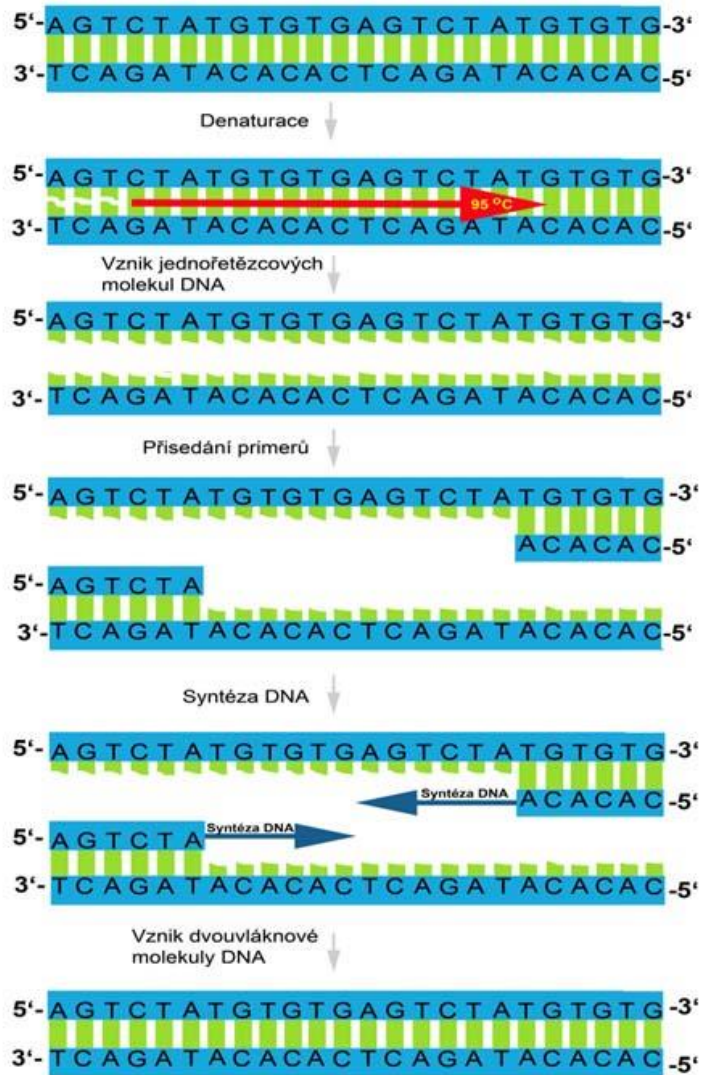
CEITEC

Central European Institute of Technology
BRNO | CZECH REPUBLIC

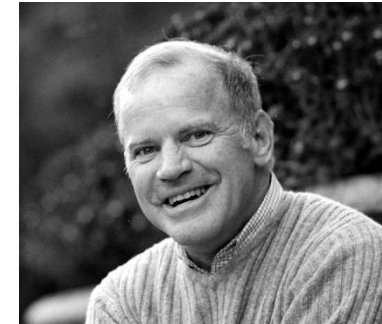
MUNI
SCI

POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE

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



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

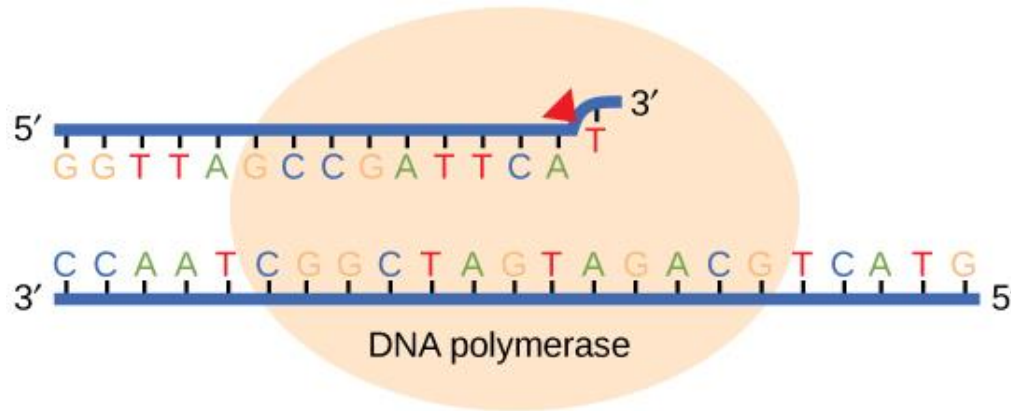


1993 – Nobelova cena za chemii

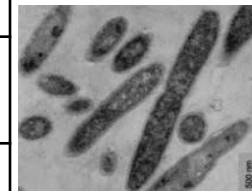


CO NAPIPETUJEME DO MIKROZKUMAVKY

- Termostabilní DNA polymeráza

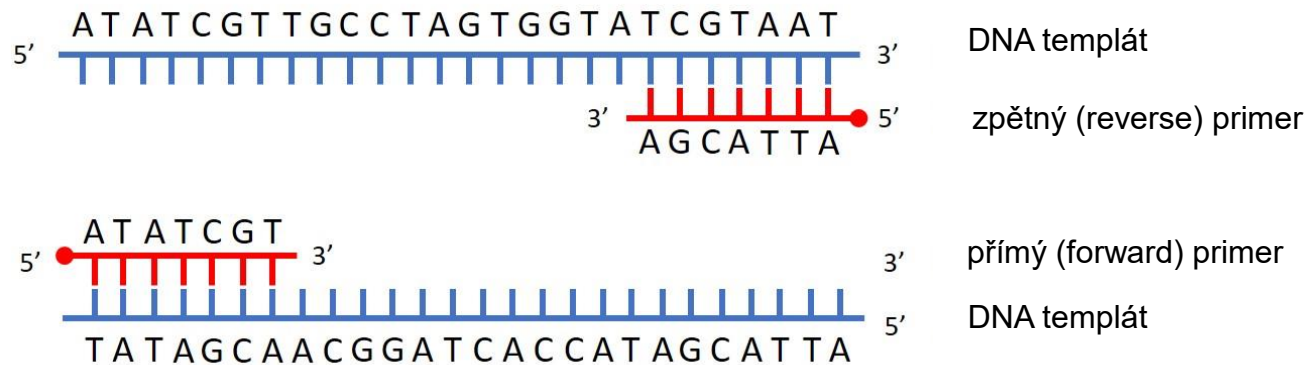


| enzym | organismus (opt. teplota) |
|------------|-------------------------------------|
| <i>Taq</i> | <i>Thermus aquaticus</i> (65-70 °C) |
| <i>Tth</i> | <i>Thermus thermophilus</i> (65 °C) |
| <i>Pfu</i> | <i>Pyrococcus furiosus</i> (100 °C) |



CO NAPIPETUJEME DO MIKROZKUMAVKY

• Oligonukleotidové primery

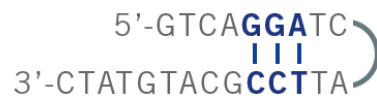


<https://toptipbio.com>

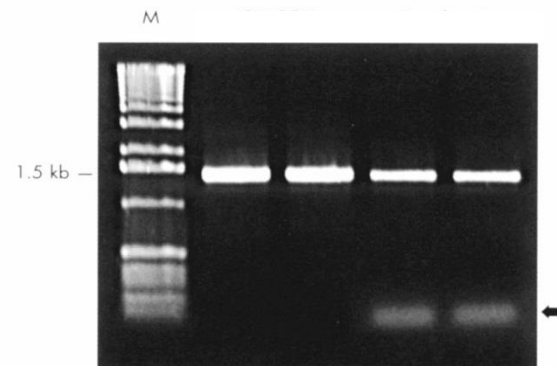
Cross dimer



Hairpin



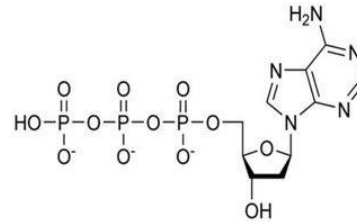
Effect of Primer-Dimer Formation



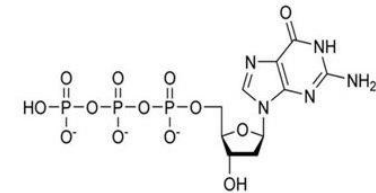
<https://the-dna-universe.com/>

CO NAPIPETUJEME DO MIKROZKUMAVKY

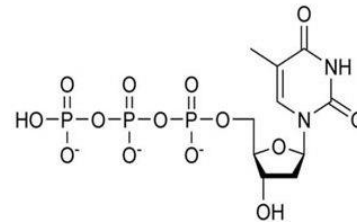
- směs dTTP, dATP, dCTP, dGTP



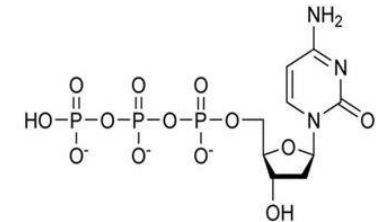
Deoxyadenosine triphosphate (dATP)



Deoxyguanosine triphosphate (dGTP)



Deoxythymidine triphosphate (dTTP)



Deoxycytidine triphosphate (dCTP)

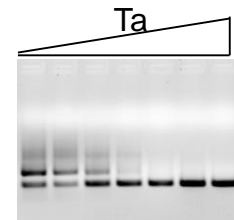
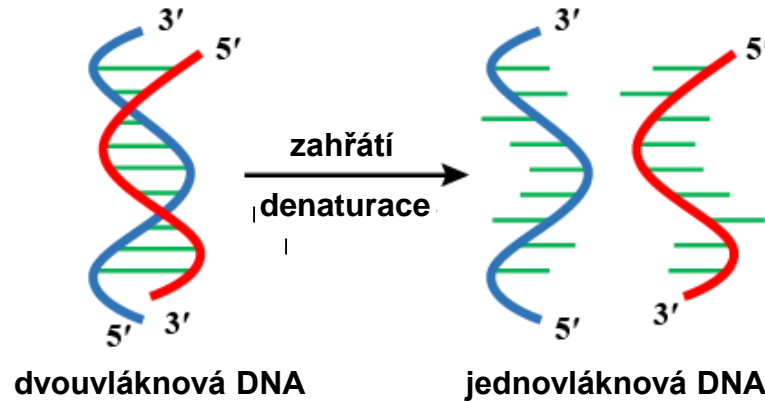
- **Templátová DNA**

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

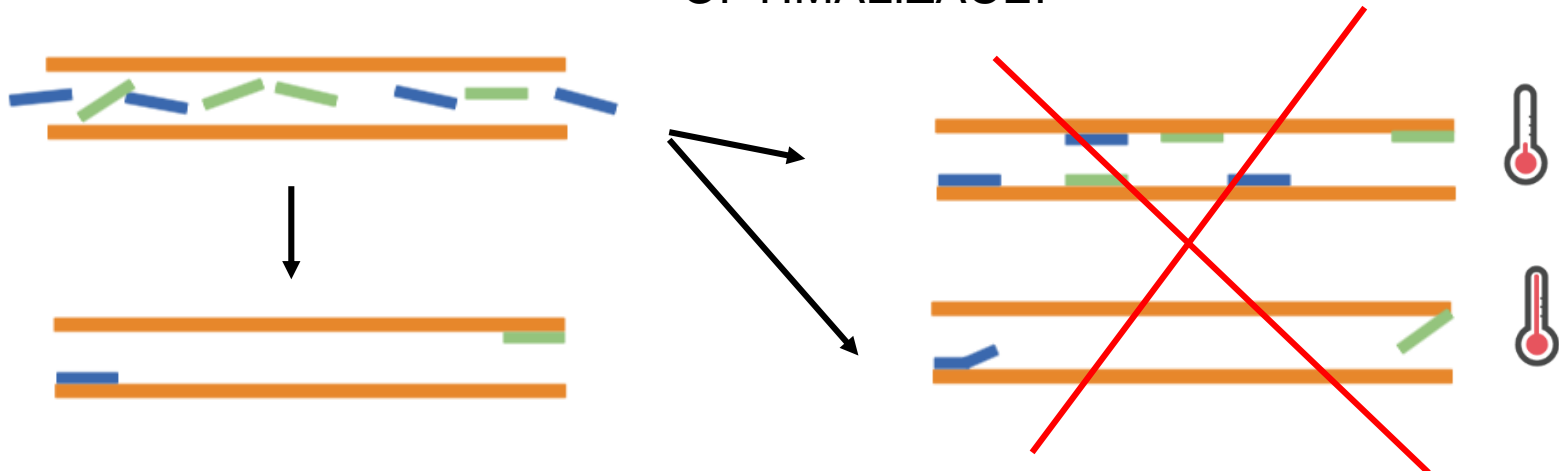


JAK TO BĚŽÍ

- Denaturace 95 °C (92 – 98 °C)

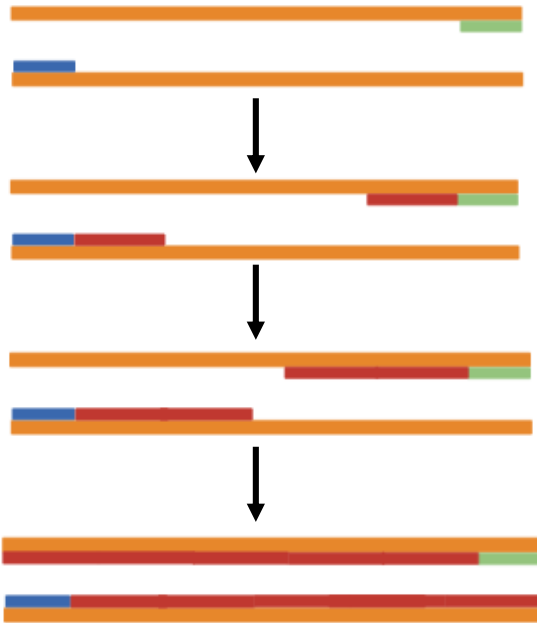


- Nasedání (hybridizace) primerů 50 - 55 °C
OPTIMALIZACE!



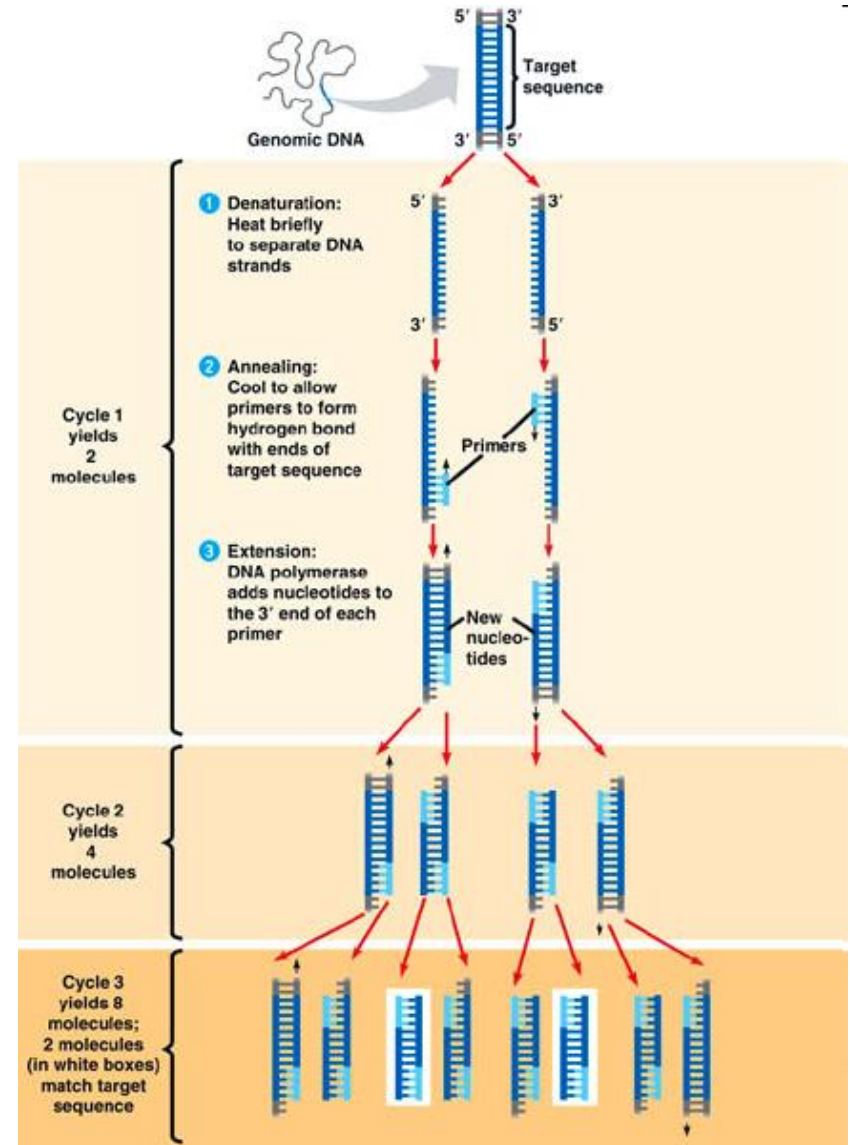
JAK TO BĚŽÍ

- Syntéza DNA 72 °C (70 – 74 °C)



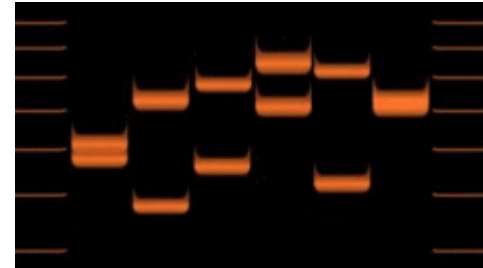
Počet cyklů: 25 – 35, vždy negativní kontrolu!!!
faktor zmožení 2^n - exponenciální průběh

Cyklery



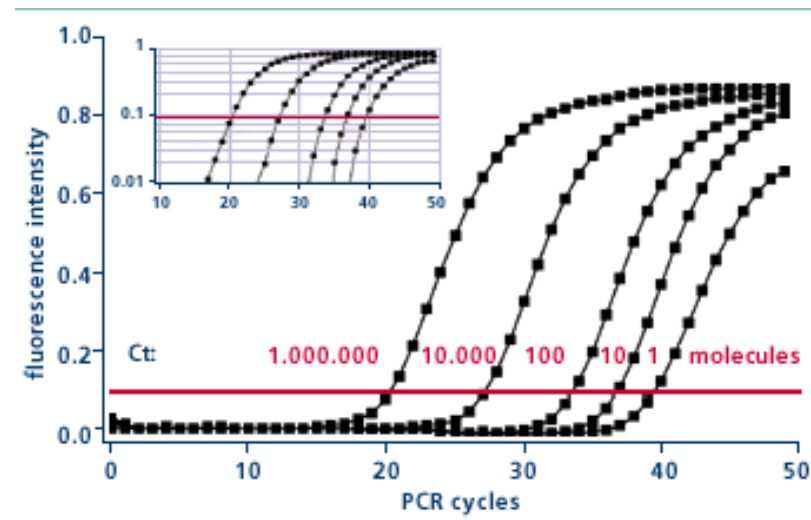
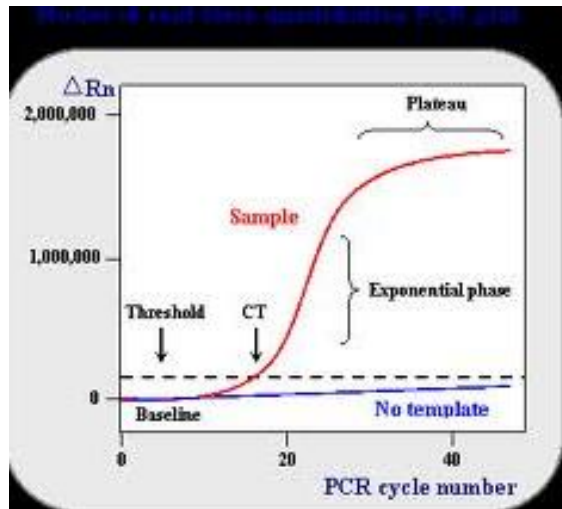
JAK TO UDĚLAT KVANTITATIVNĚ

Klasická PCR – odpověď ANO - NE



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

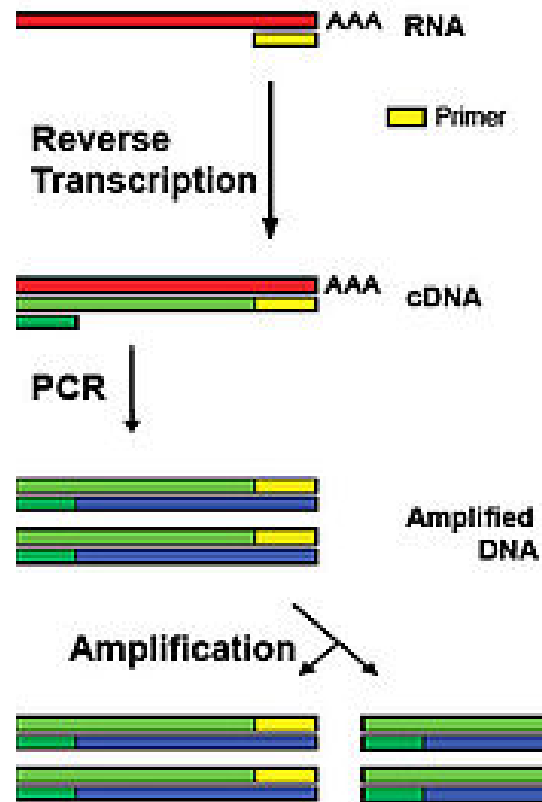
- rychlejší (bez elektroforetické detekce produktu)
- spolehlivé výsledky
- citlivá detekce



<http://www.bio-equip.cn/>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

LZE KVANTIFIKOVAT NEJEN DNA, ALE I RNA



KVALITA RNA!!!

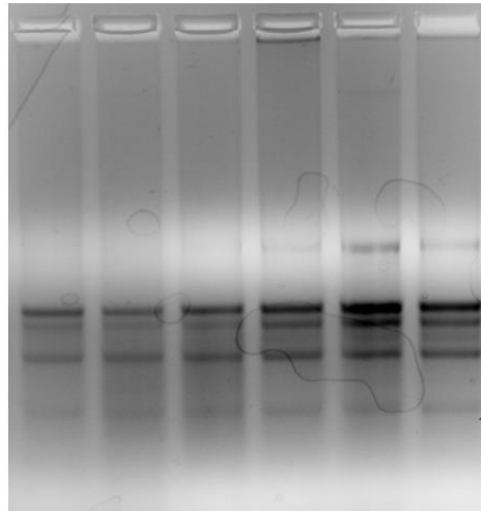
oligo(dT)₁₂₋₂₀
random hexa - nonamery
specifický primer(y)

sekvenčně-specifické primery

KVALITA TEMPLÁTU (RNA)

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

Celková RNA – bandy 18S, 25S rRNA



rostlinná RNA (*A. thaliana*)

KVALITA TEMPLÁTU (RNA)

Bioanalyzér (Agilent) - elektroforetická separace na mikročipech

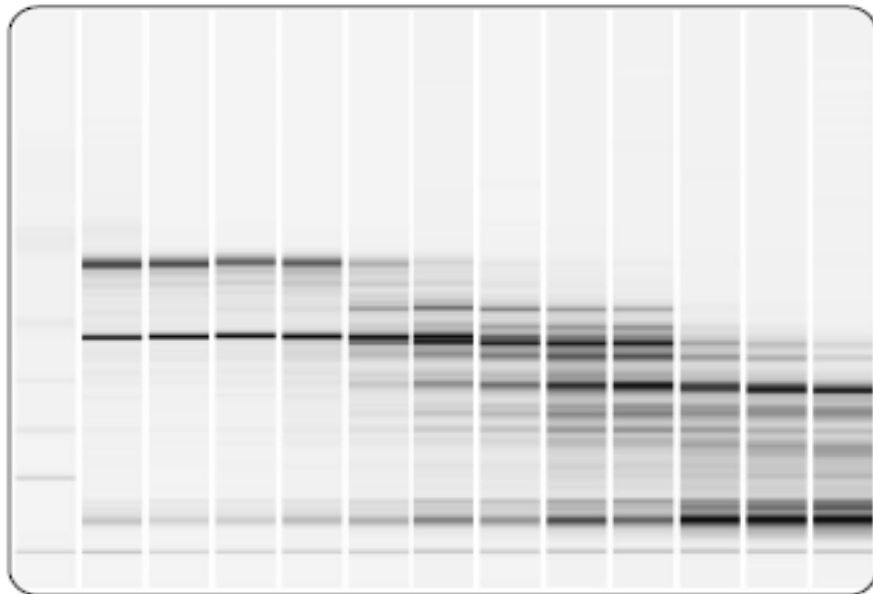


Figure 1
A total RNA sample was degraded for varying times and the resulting samples were analyzed on the Agilent 2100 bioanalyzer using the Eukaryote Total RNA Nano assay. A shift towards shorter fragment sizes can be observed with progressing degradation.

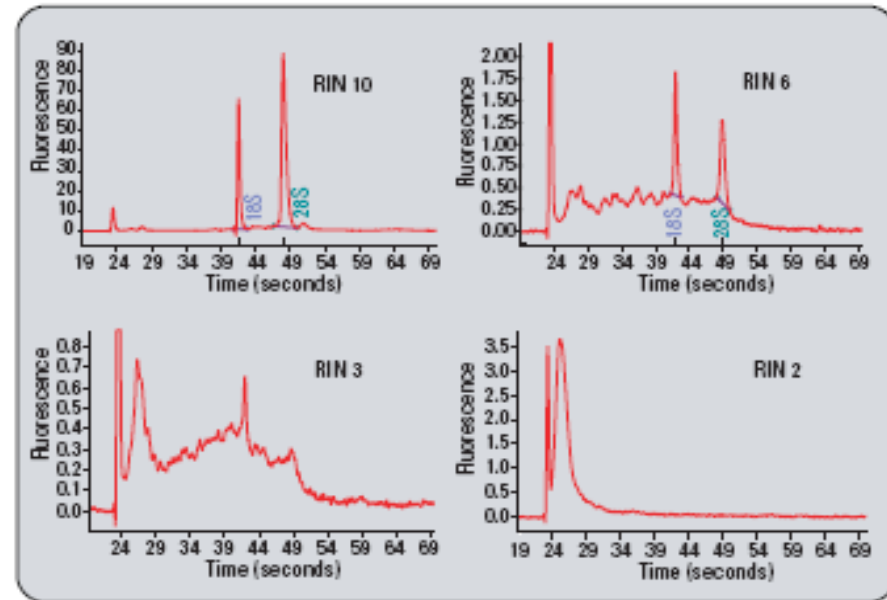
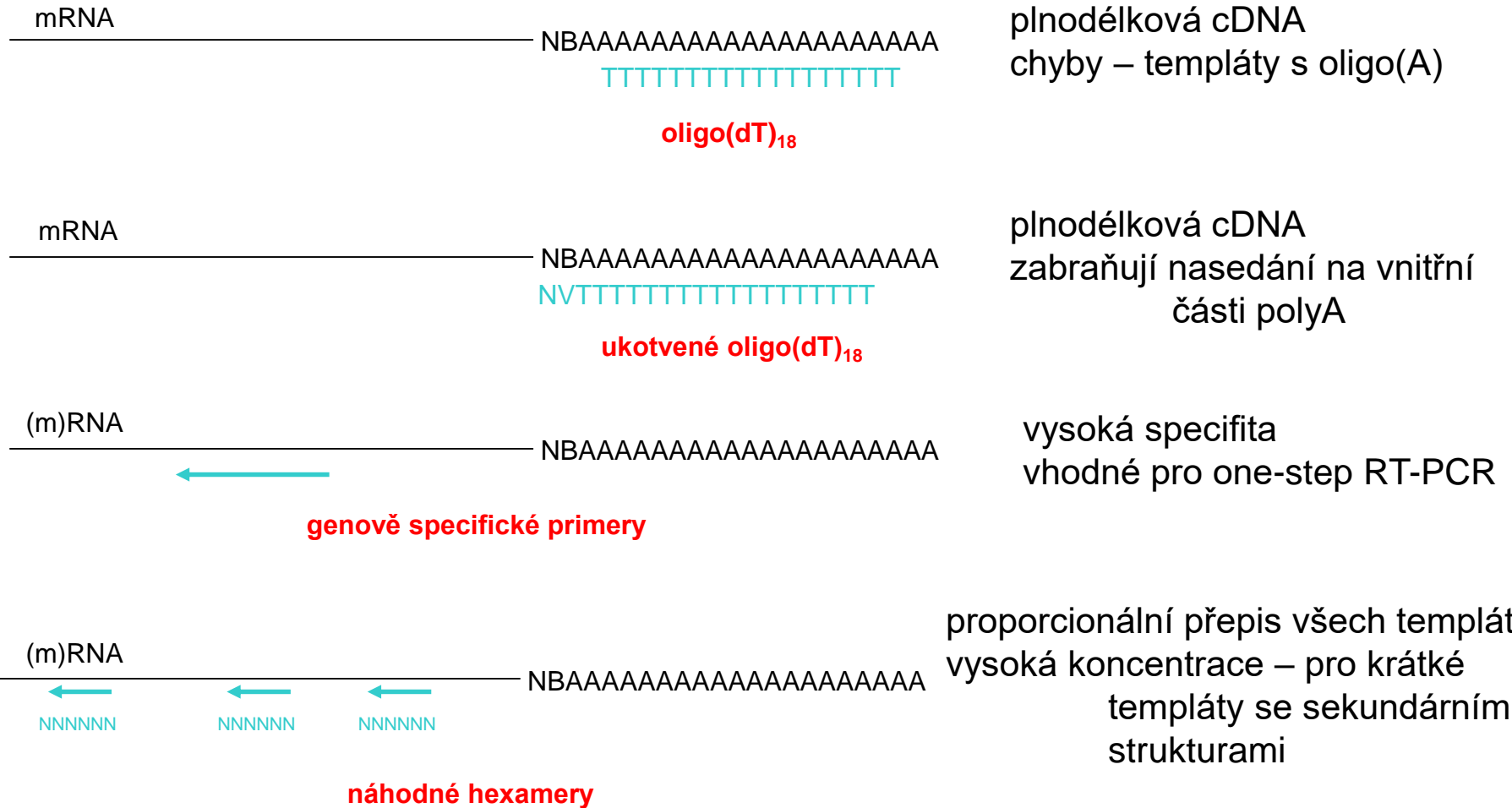


Figure 2
Sample electropherograms used to train the RNA Integrity Number (RIN) software. Samples range from intact (RIN 10), to degraded (RIN 2).

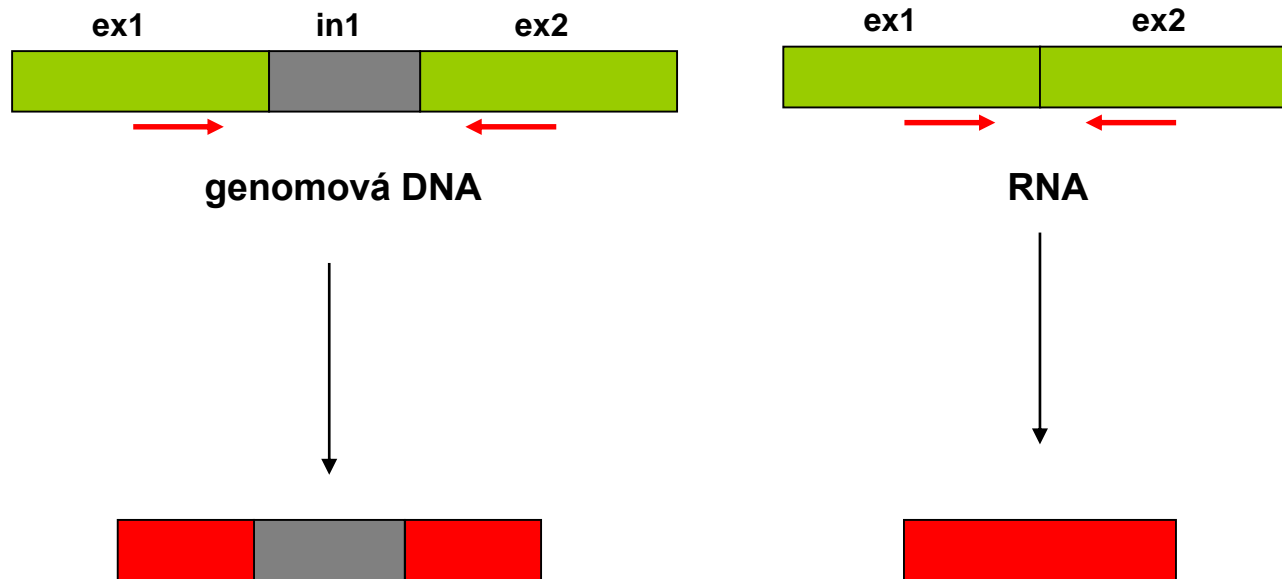
RIN (RNA Integrity Number)

PRIMERY PRO RT



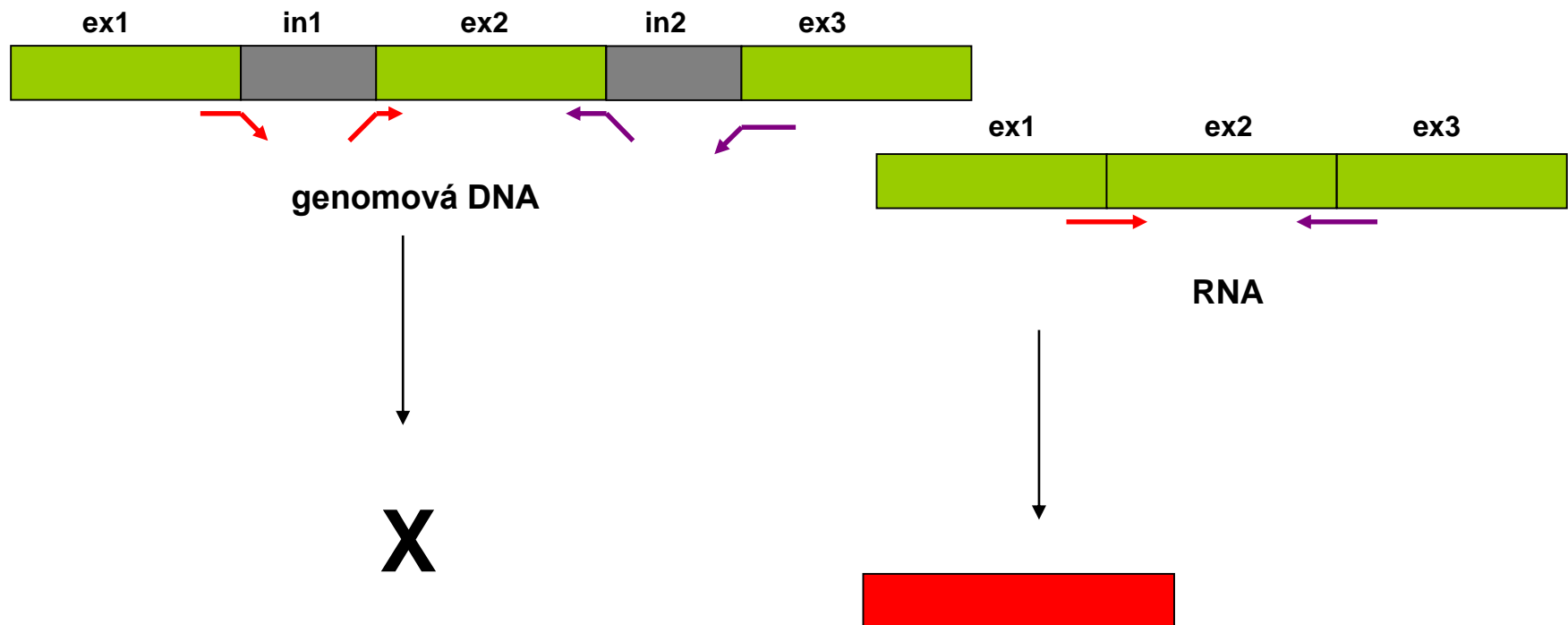
NÁVRH PRIMERŮ PRO RT-PCR

Primery ze sousedních exonů



NÁVRH PRIMERŮ PRO RT-PCR

Primery zasahují do sousedních exonů

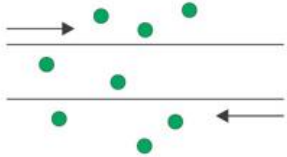


REVERZNÍ TRANSKRIPTÁZY

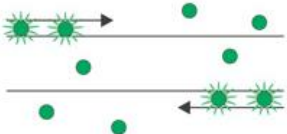
| enzym | délka (kb) | teplotní optimum | citlivost | “difficult templates” | RNaseH | modif. nucleotidy |
|----------------------|------------|------------------|-----------|-----------------------|--------|-------------------|
| Transcriptor (Roche) | 14 | 42-65 | +++ | +++ | A | A |
| Expand (Roche) | 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

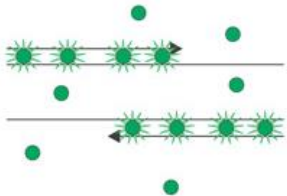
Annealing phase



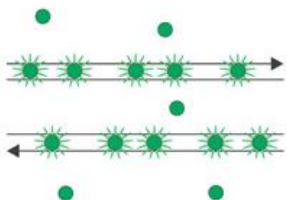
Extension phase (I)



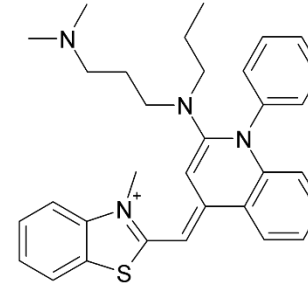
Extension phase (II)



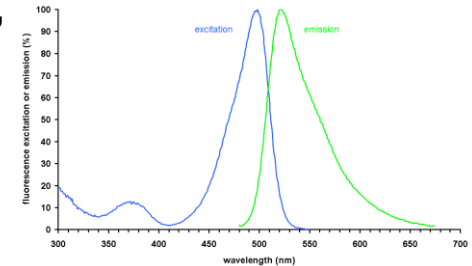
End of PCR cycle



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

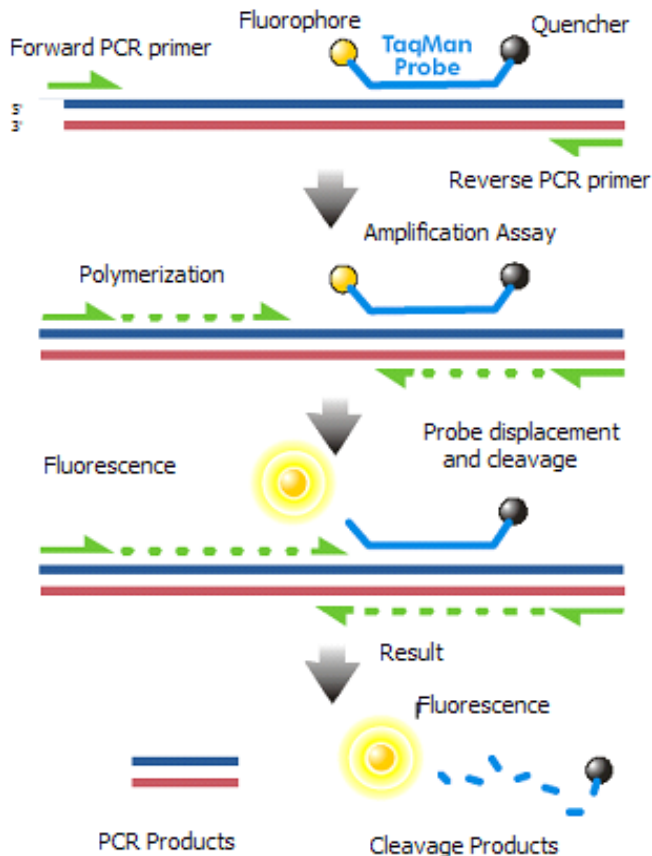
Hydrolytické próby

- 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*)

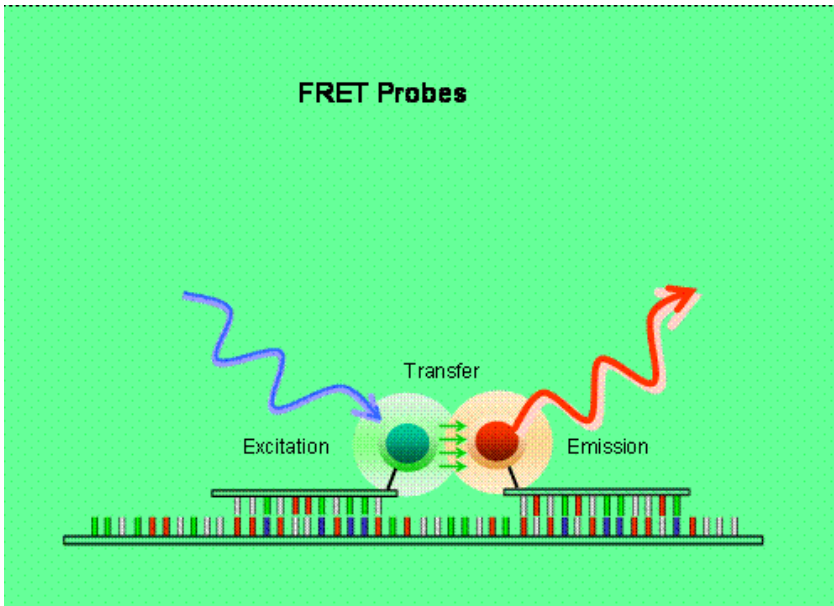


JAK TO UDĚLAT KVANTITATIVNĚ

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

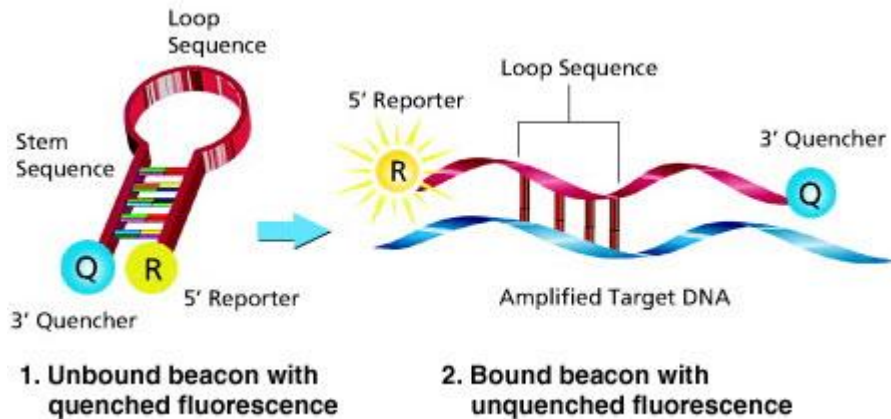


JAK TO UDĚLAT KVANTITATIVNĚ

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

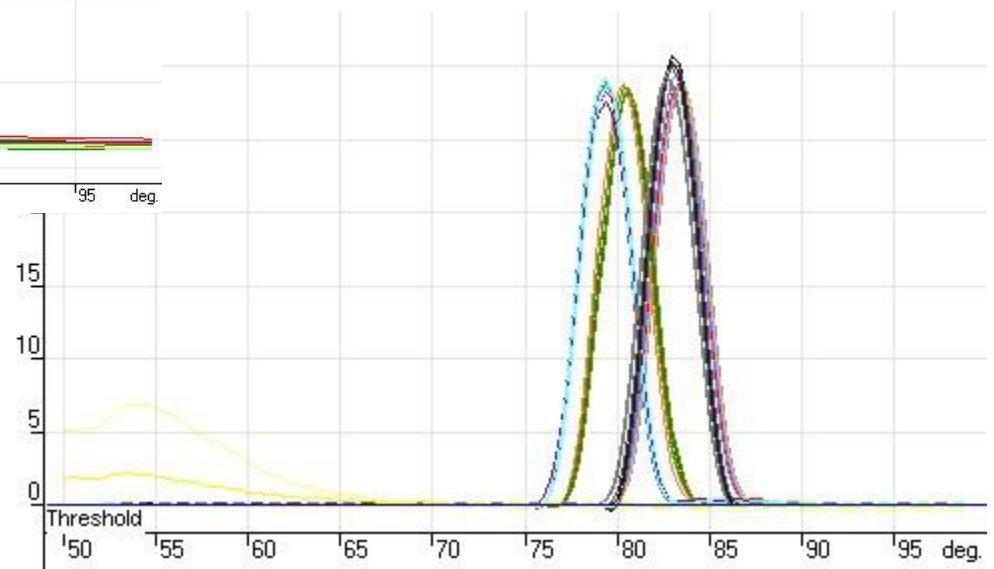
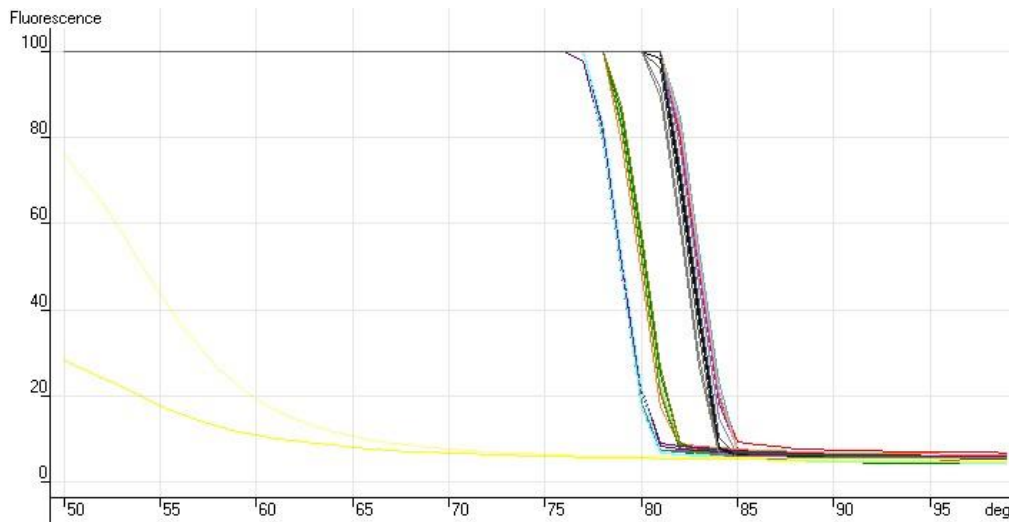


Sigma-Aldrich

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

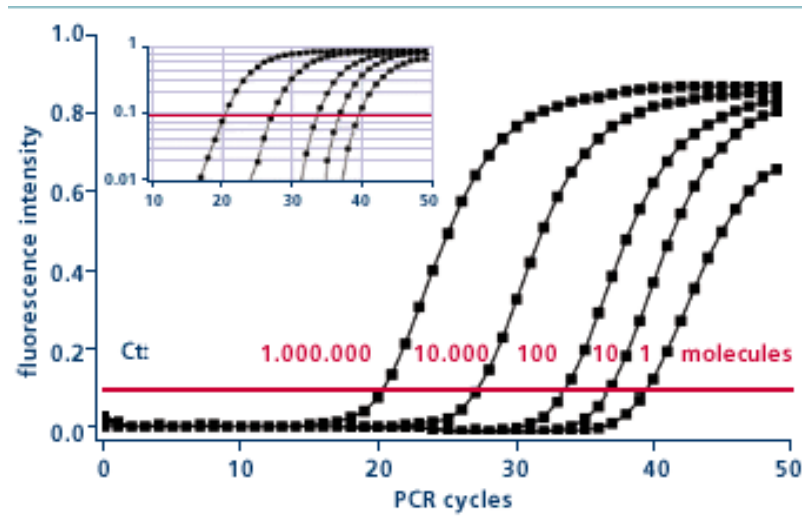


JAK TO UDĚLAT KVANTITATIVNĚ

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

nižší koncentrace templátu – vyšší Ct

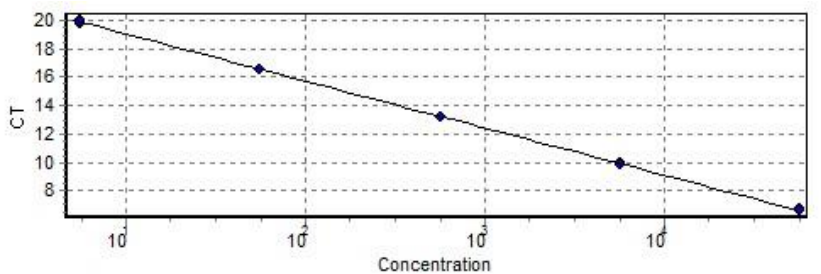
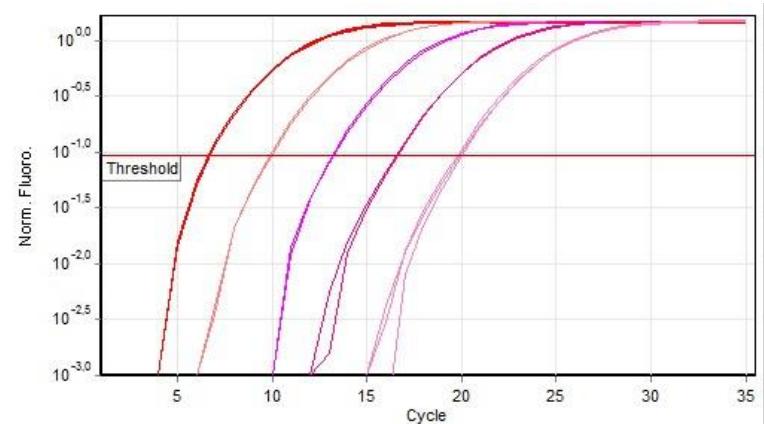
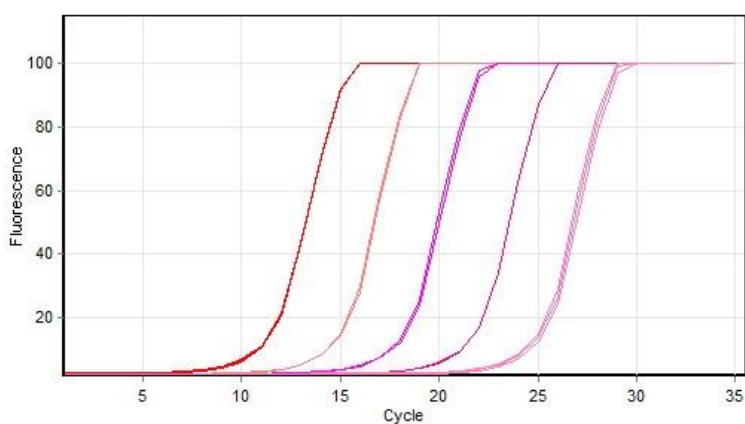
vyšší koncentrace templátu – nižší Ct



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

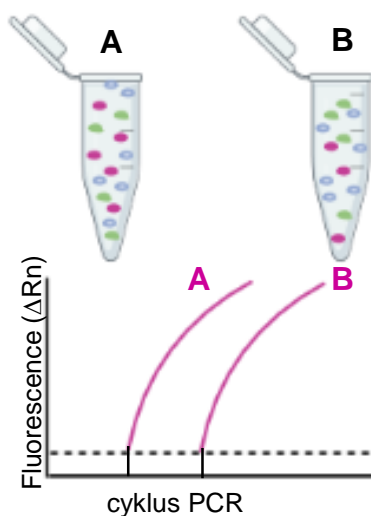


| | |
|-------------------------|----------------------------------|
| Reaction efficiency (*) | 1,00413 (* = $10^{(-1/m)} - 1$) |
| M | -3,31208 |
| B | 22,34521 |
| R Value | 0,99991 |
| R ² Value | 0,99981 |

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

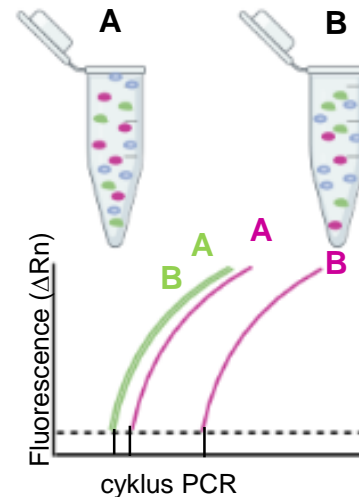
JAK TO UDĚLAT KVANTITATIVNĚ

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)



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

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

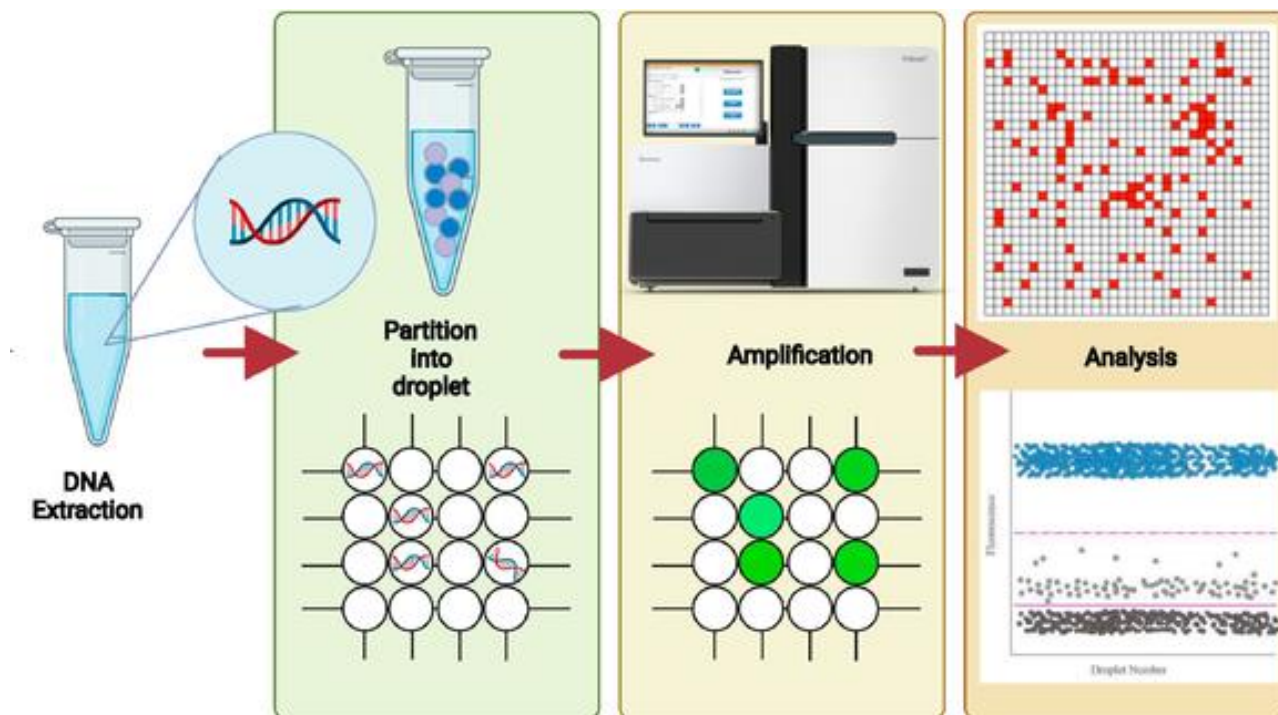
$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(B) - \Delta Ct(A)$$

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

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.



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

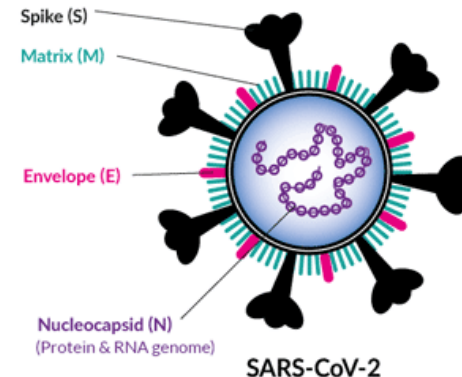
gen E (iontové kanály; infekčnost)

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)

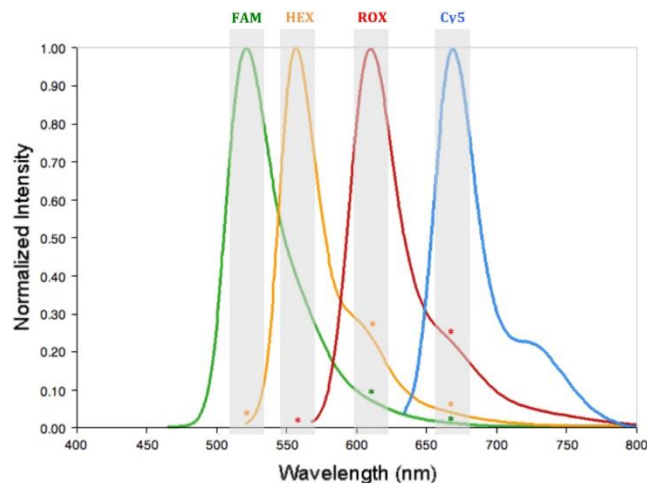


K ČEMU TO JE

- V medicíně
diagnostika SARS-CoV-2

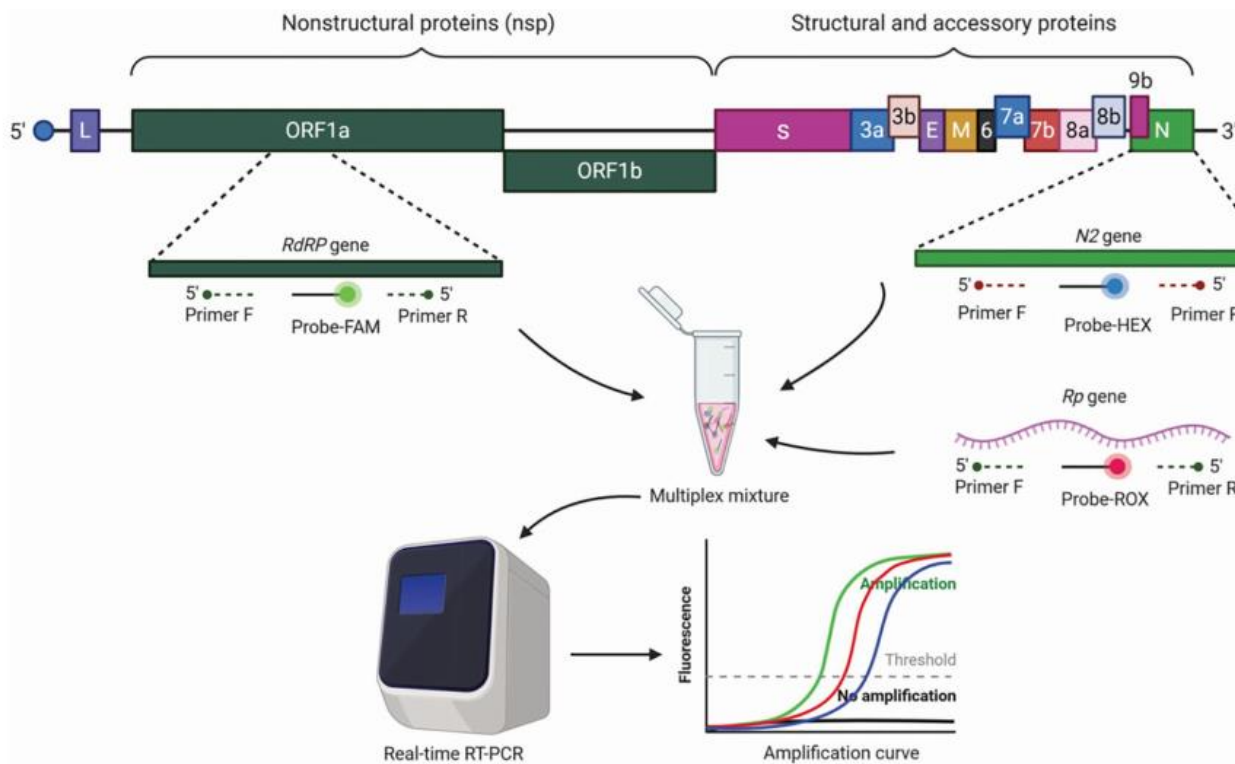
Příklady testů:

- 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)



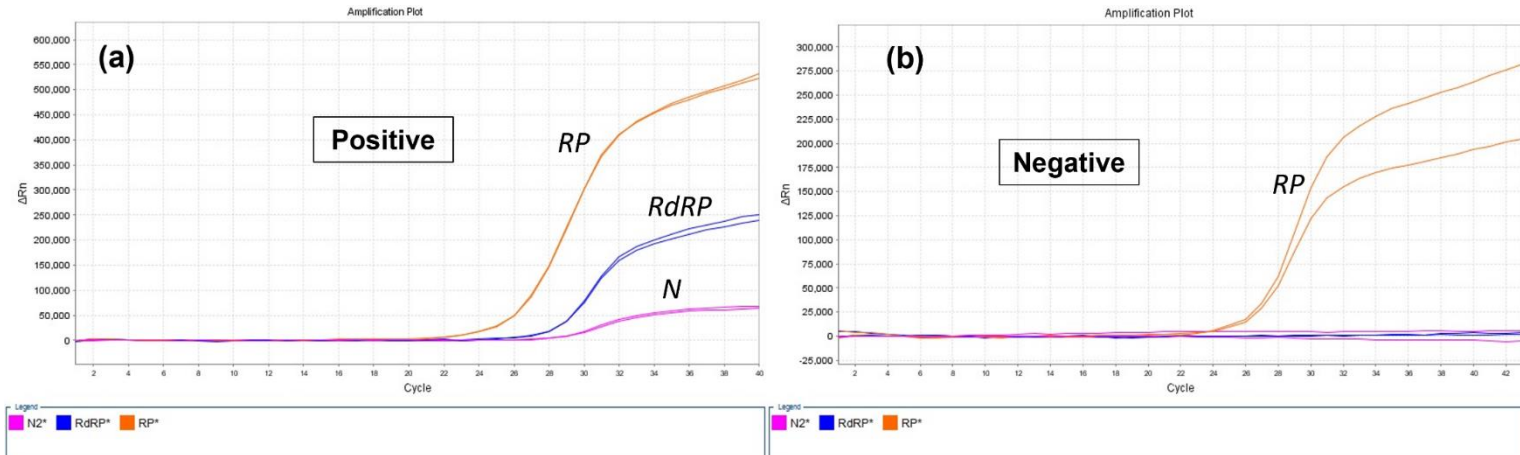
K ČEMU TO JE

- V medicíně
diagnostika SARS-CoV-2



K ČEMU TO JE

- V medicíně
diagnostika SARS-CoV-2



Tombuloglu et al., Sci Rep. 2022

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

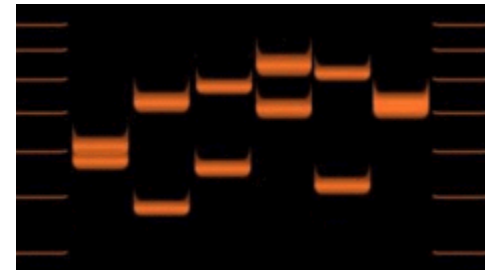
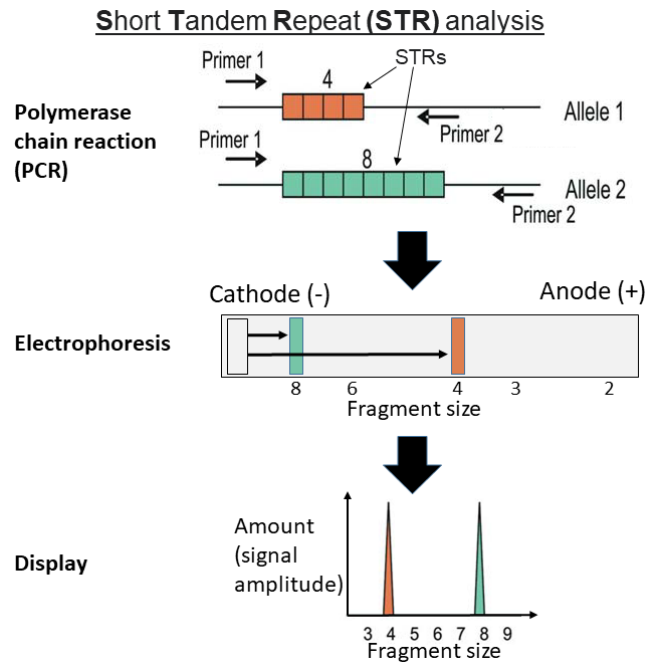
DNA fingerprinting – jednoznačné určení osoby

– určování otcovství (příbuznosti)

Repetitivní vysoce variabilní úseky

variable number tandem repeats (VNTR)

short tandem repeats (STR; mikrosatelity, minisatelity)



Délky VNTR alel u 6 osob

K ČEMU TO JE

- V kriminalistice

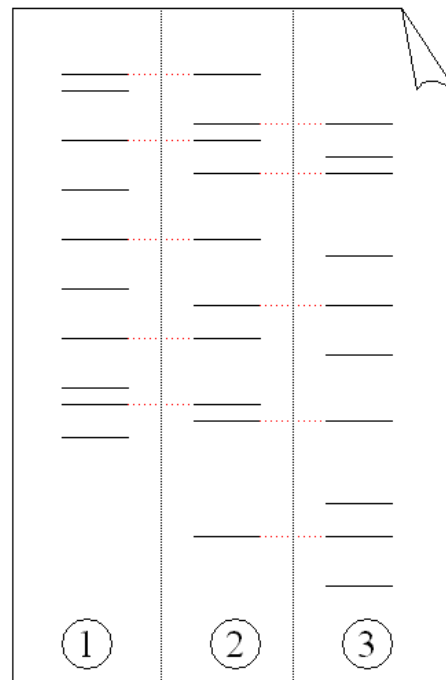
DNA fingerprinting – jednoznačné určení osoby

– **určování otcovství (příbuznosti)**

Repetitivní vysoce variabilní úseky

variable number tandem repeats (VNTR)

short tandem repeats (STR; mikrosatelity, minisatelity)



1 – otec
2 – dítě
3 – matka

K ČEMU TO JE

- V kriminalistice

DNA fingerprinting – jednoznačné určení osoby

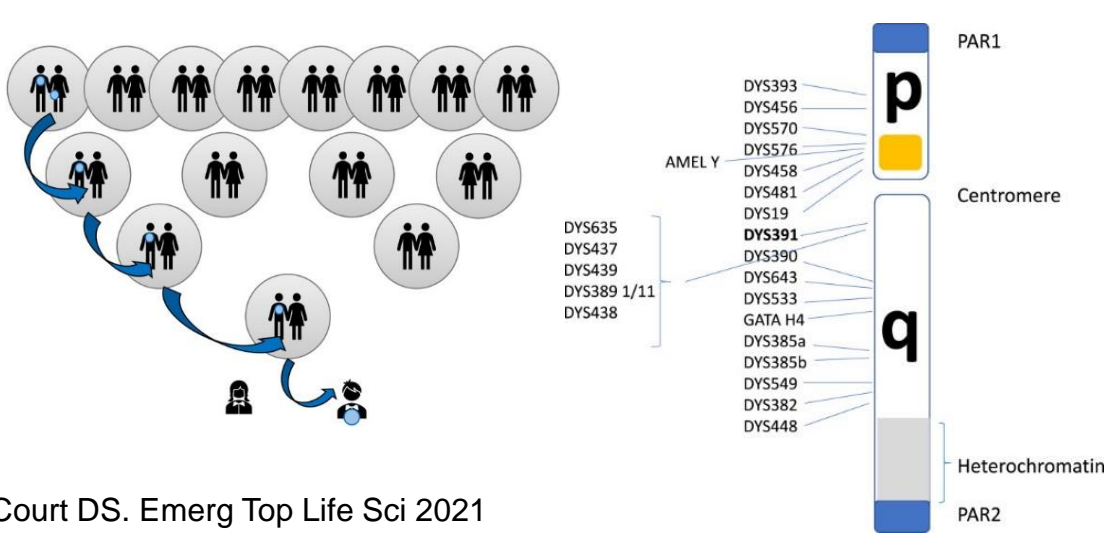
– **určování otcovství (příbuznosti)**

Repetitivní vysoce variabilní úseky

variable number tandem repeats (VNTR)

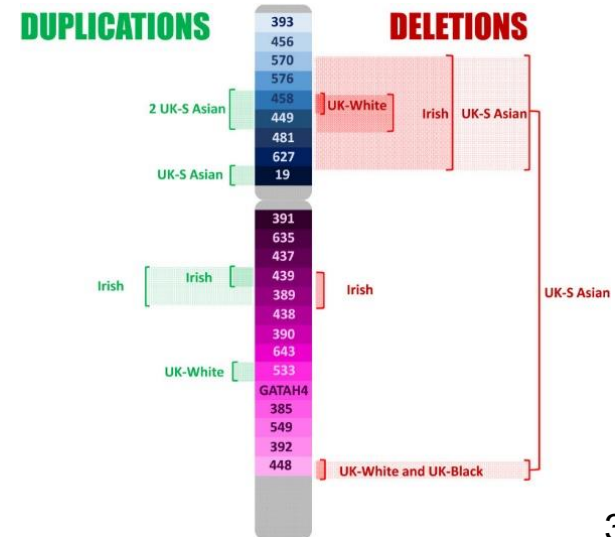
short tandem repeats (STR; mikrosatelity, minisatelity)

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



Court DS. Emerg Top Life Sci 2021

rutině 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

Děkuji za pozornost

PCR Bad Karma Hypothesis:

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.



<https://www.youtube.com/watch?v=x5yPkkCLads>

