

MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE

2. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Náplň praktik

1. Izolace DNA

- z buněk bukové sliznice - izolační kit MACHEREY-NAGEL

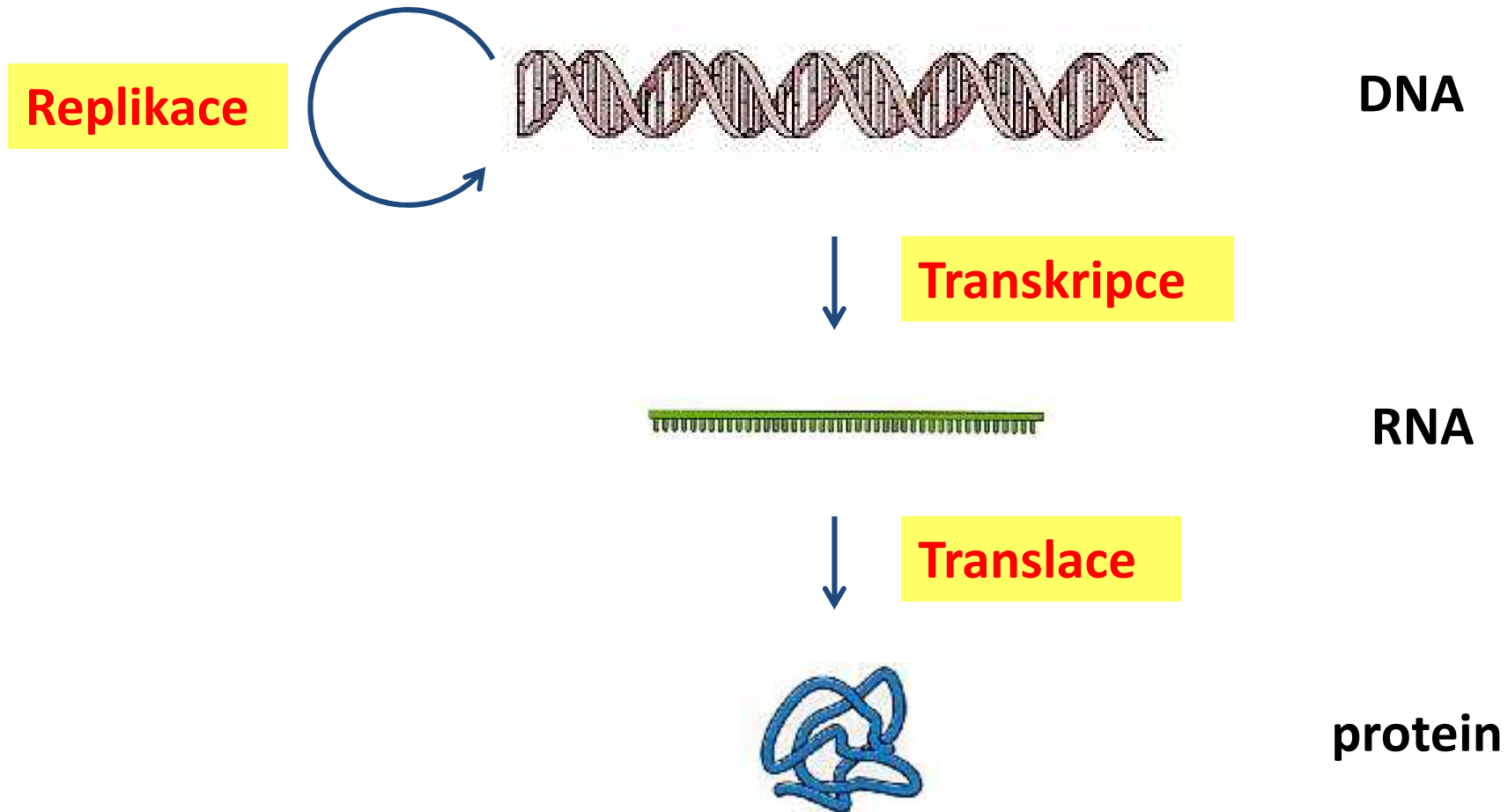
2. PCR

- polymerázová řetězová reakce (templát gDNA)

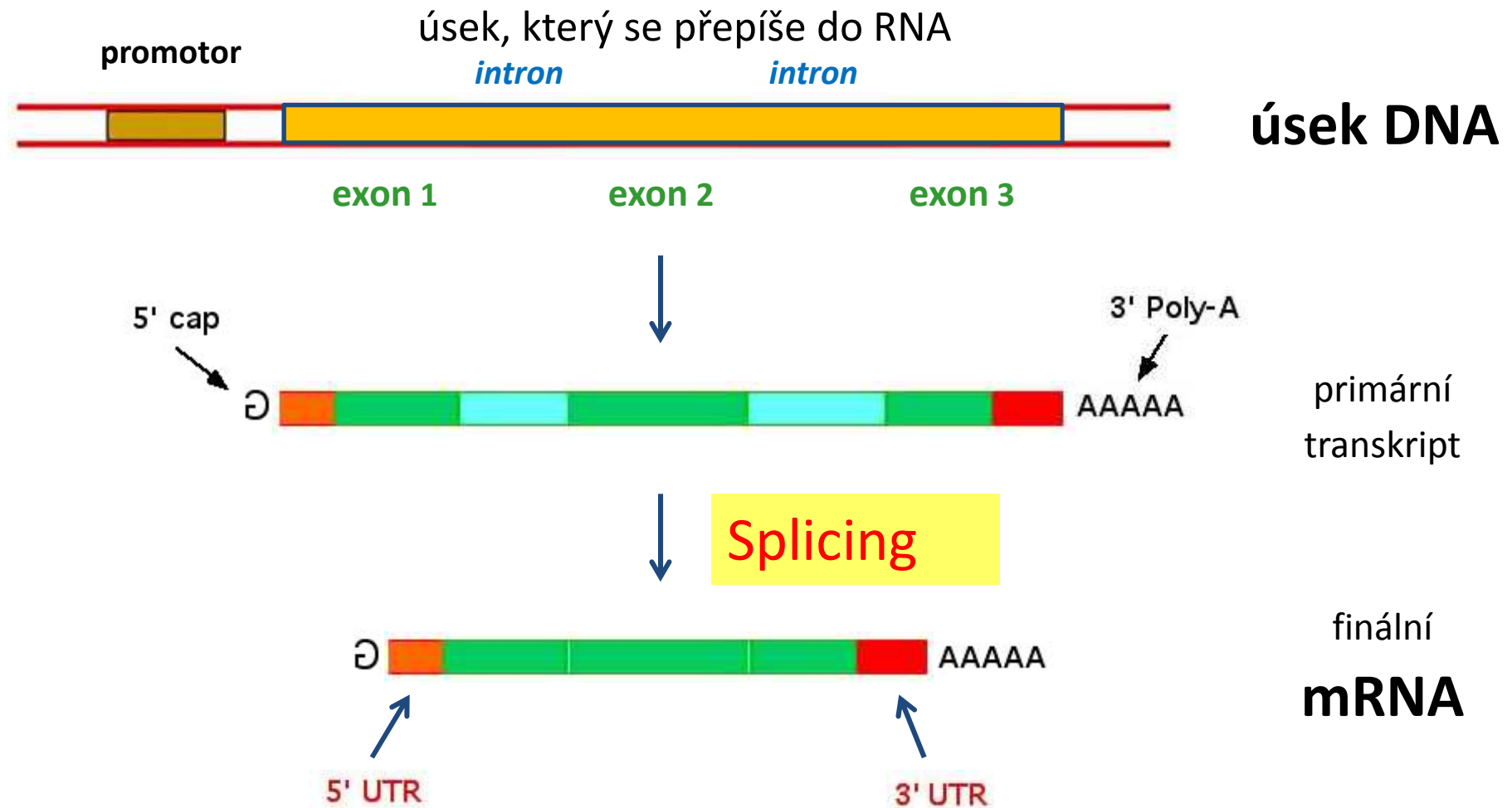
3. Restrikční štěpení + elektroforéza

+ interpretace výsledků

Centrální dogma molekulární biologie



Struktura genu



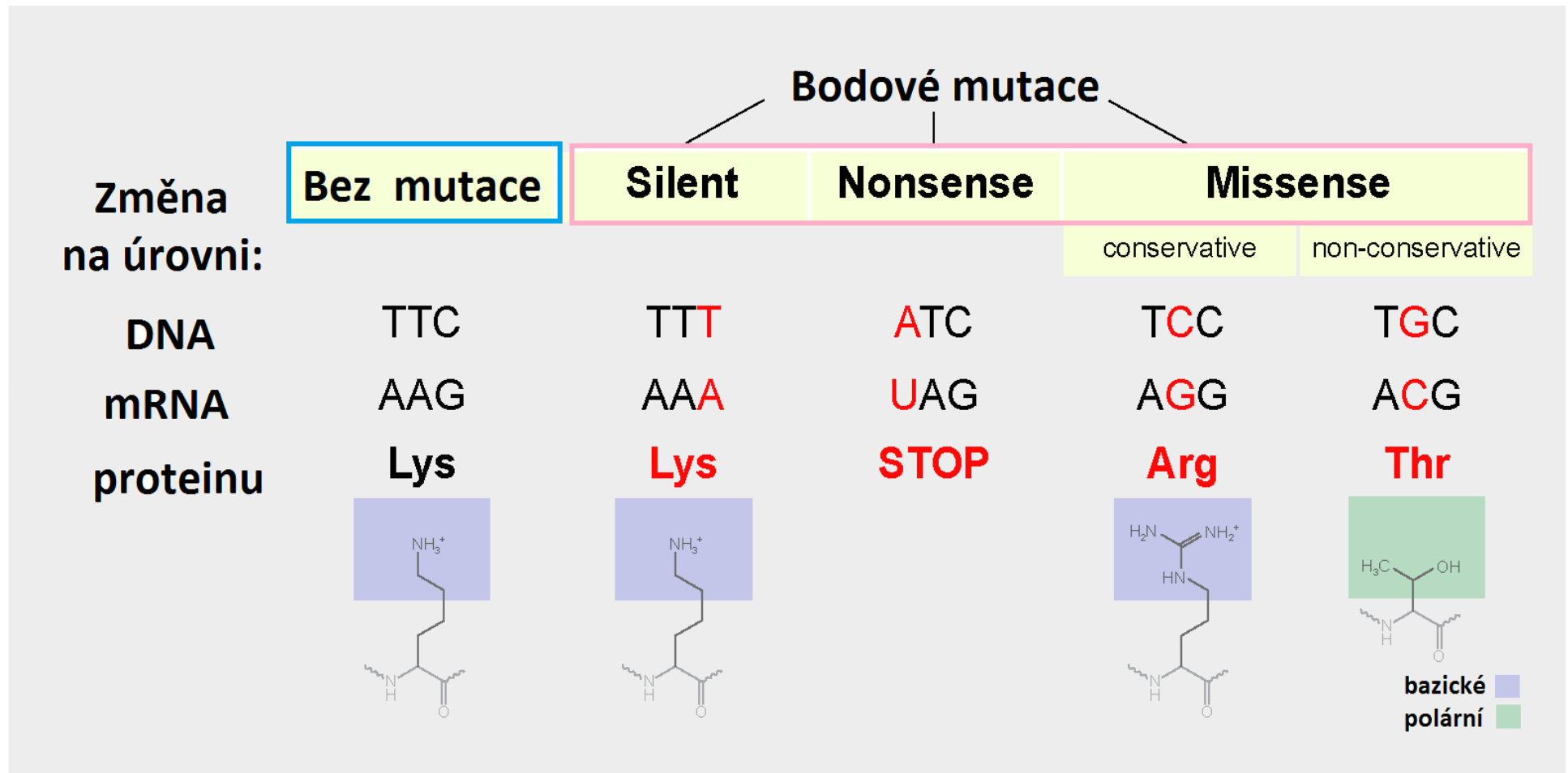
Genové mutace

Inzerce - zařazení **nadbytečných** nukleotidových párů

Delece - **ztráta** jednoho nebo více nukleotidů původní sekvence

} **posun čtecího rámce**
(tzv. *frameshift mutation*)

Substituce – **záměna** jednoho nebo více nukleotidů původní sekvence



SNP (single nucleotide polymorphism)

termín mutace má hanlivý příděch = něco špatného

faktor V Leiden = "bodová mutace, substituce"

dnes se preferuje termín jednonukleotidový polymorfismus

SNP *snip*

různé varianty v sekvenci existující relativně často v populaci (>1%)

International HapMap Project – cíl: zmapovat tyto variace

dva nepříbuzní lidé sdílí 99,5% DNA sekvence

u lidí popsáno k dnešku asi **1 500 000 SNP**

Jaké důsledky může mít SNP?

záleží na poloze...



- v kódující oblasti genů
 - synonymní substituce (*stejná AK*)
 - nesynonymní substituce
 - missense (*jiná AK*)
 - nonsense (*Stop*)
- v nekódující oblasti genů
- v oblasti mezi geny

Oblast zájmu - sekvence

```
ATATTAATTGGTTCCAGCGAAAGCTTATTTATTTATTTATTATCATGAAATAACTTTGCA
AATGAAAACAATTTTGAATATATTTTCTTTCAGGCAGGAACAACCCATGATCAGAGCAG
TTCAACCAGGGGAAACCTATACTTATAAGTGGAACATCTTAGAGTTTGATGAACCCACAG
AAAATGATGCCAGTGCTTAACAAGACCATACTACAGTGACGTGGACATCATGAGAGACA
TCGCCTCTGGGCTAATAGGACTACTTCTAATCTGTAAGAGCAGATCCCTGGACAGGCCAG
GAATACAGGTATTTTGTCCCTTGAAGTAACCTTTCAGAAATTCTGAGAATTTCTTCTGGCT
```

exon 10

G1691A

"Leidenská mutace" (faktor V Leiden)

1691 G>A

Faktor V Leiden

rs6025

- v kódující oblasti genu

- nesynonymní substituce

- missense

FV wild type

CTG GAC AGG **CGA** GGA ATA CAG AGG GCA

Leu-Asp-Arg-**Arg**-Gly-Ile-Gln-Arg-Ala

FV Leiden

CTG GAC AGG **CAA** GGA ATA CAG AGG GCA

Leu-Asp-Arg-**Gln**-Gly-Ile-Gln-Arg-Ala

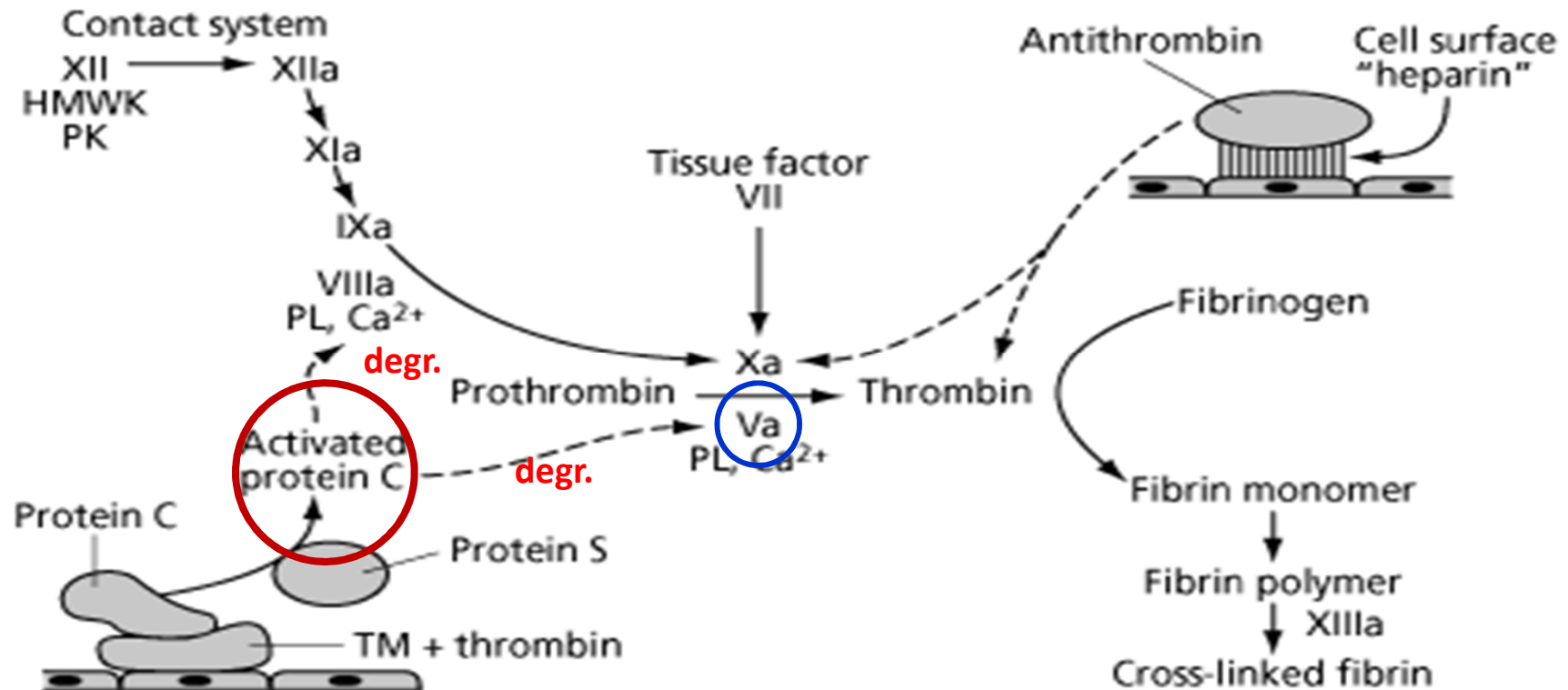
Arg506Gln

506 Arg>Gln

R506Q

506 R>Q

Vztah protein C – hemokoagulační kaskáda



PCR – polymerázová řetězová reakce

PCR = *Polymerase Chain Reaction*

- publikováno v r.1985 – Kary Banks Mullis a kol.,
r. 1993 – *Nobelova cena*
- umožňuje *in vitro* amplifikaci (zmnožení) vybraného úseku templátové DNA, který je ohraničen tzv. **primery**
- nejpoužívanější technika v oboru molekulární biologie
- vlastní PCR probíhá v cyklech (**řetězení cyklů** – odtud řetězová reakce) v termocykleru
- reakční objem 15 – 100 μ l



PCR – polymerázová řetězová reakce

1. templát DNA – dsDNA

! Pozor na kontaminaci jinou DNA!

množství - teoreticky 1 molekula (Irsko, USA)
- prakticky 20 ng/μl DNA

2. dNTP = dATP, dGTP, dCTP, dTTP – směs deoxynukleotidtrifosfátů

stavební kameny, z nichž se syntetizuje nový řetězec DNA

3. primery

17 –25 nukleotidové oligomery

ve směru 5' - 3' kopírovaného vlákna - forward (upstream) a reverse (downstream)

komplementární k cílové DNA × nekomplementární vůči sobě

specifické pro amplifikovanou sekvenci, podobná teplota anealingu

4. DNA polymeráza

- enzym katalyzující polymeraci deoxyribonukleotidů podle DNA templátu

Taq polymerasa - izolovaná z *Thermus Aquaticus* (nativní nebo klonovaná v *Escherichia*

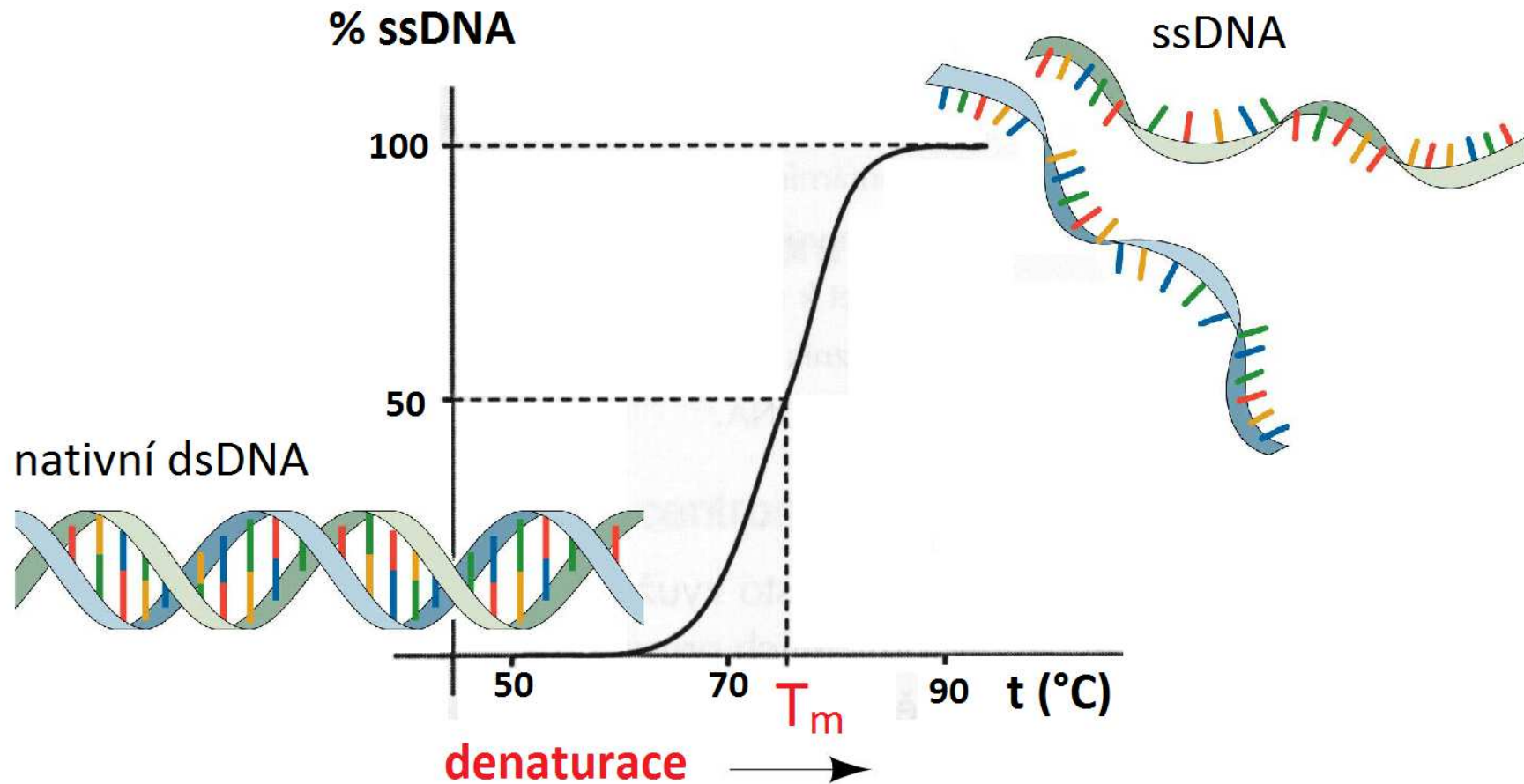
coli - rekombinantní) = termostabilní, T opt. 75°C, 150 b/s, nad 90°C není aktivní

5. pufr = prostředí vhodné pro aktivitu polymerasy,

složení lze ovlivnit výtěžek i specifitu reakce (+ Mg²⁺)

Denaturace a renaturace DNA

- dsDNA velmi stabilní \Rightarrow vodíkové vazby

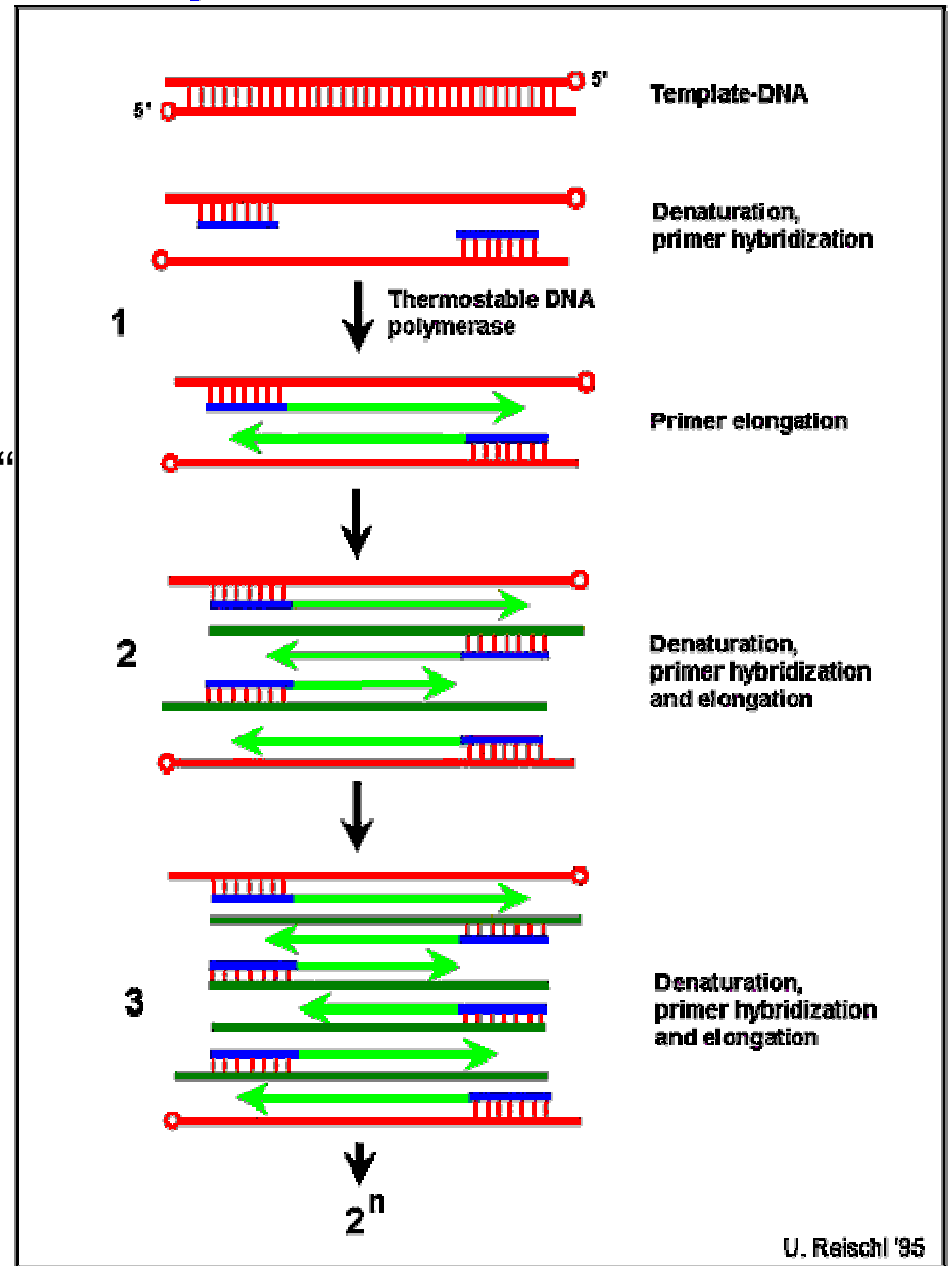


- kromě nukleotidového složení DNA závisí T_m na dalších faktorech
- pH, iontová síla roztoku, přítomnost kationtů, ...

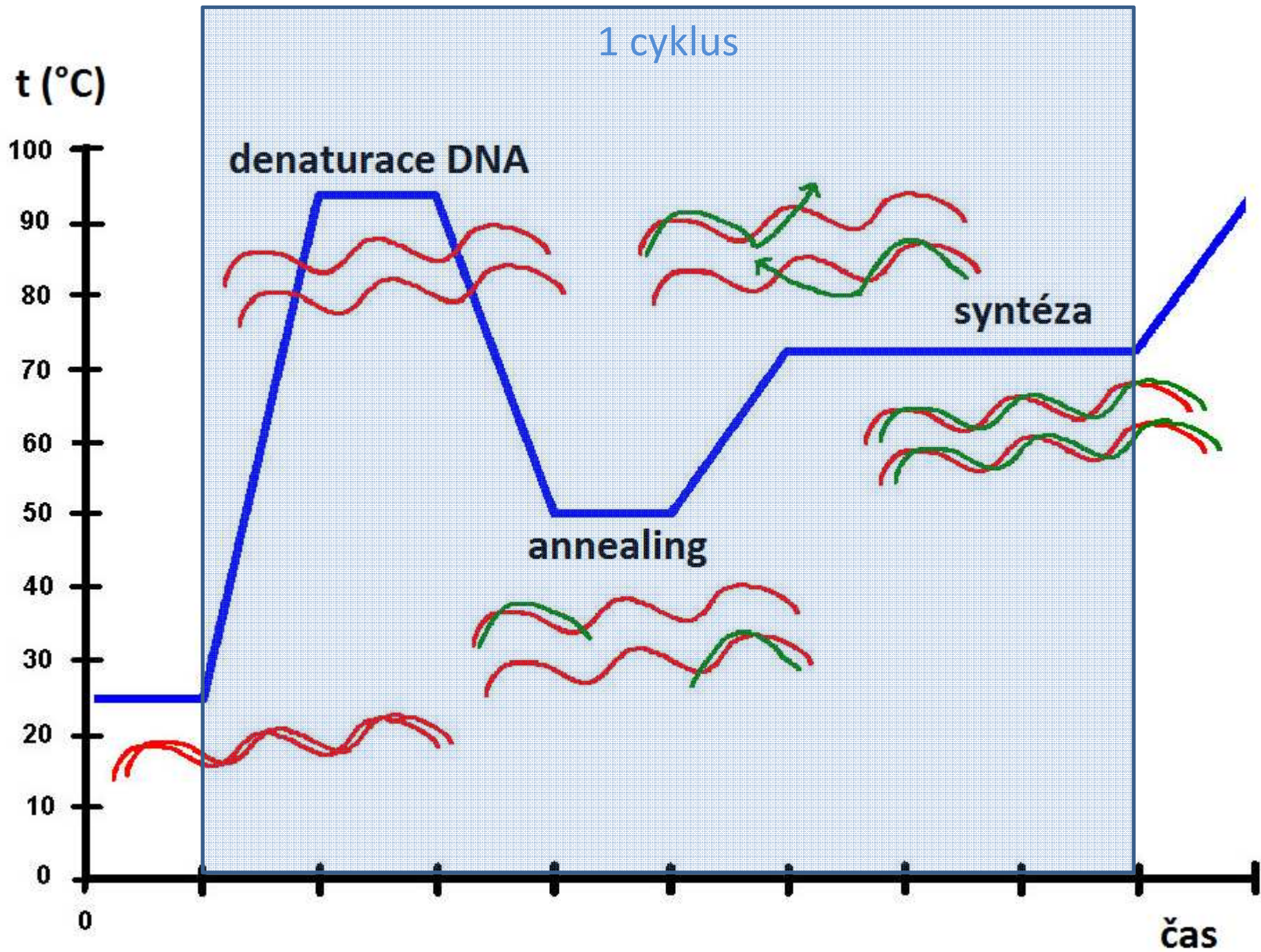
Polymerase chain reaction (PCR)

založena na cyklickém střídání teplot,
skládá se ze 3 kroků:

1. **Denaturace** = separace vláken
93 – 95°C
2. **Hybridizace**
nasednutí primerů - tzv. „annealing“
50 – 60°C
 $T_m = 2(A + T) + 4(C + G)$
3. **Syntéza** nových řetězců
72 – 75°C



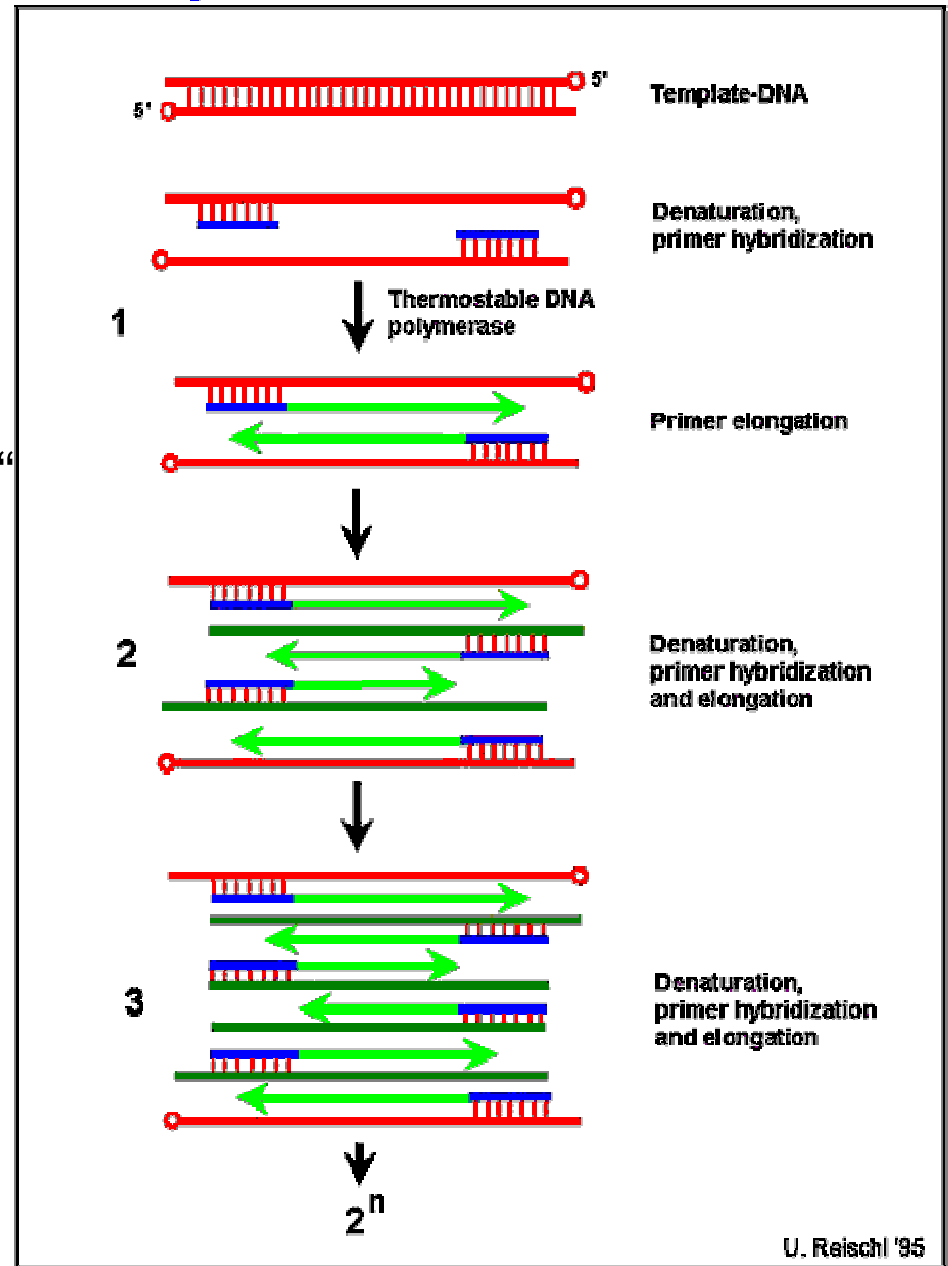
Všechny kroky se opakují, **řetězí**, 15 – 40x



Polymerase chain reaction (PCR)

založena na cyklickém střídání teplot,
skládá se ze 3 kroků:

1. **Denaturace** = separace vláken
93 – 95°C
2. **Hybridizace**
nasednutí primerů - tzv. „annealing“
50 – 60°C
 $T_m = 2(A + T) + 4(C + G)$
3. **Syntéza** nových řetězců
72 – 75°C



Všechny kroky se opakují, **řetězí**, 15 – 40x

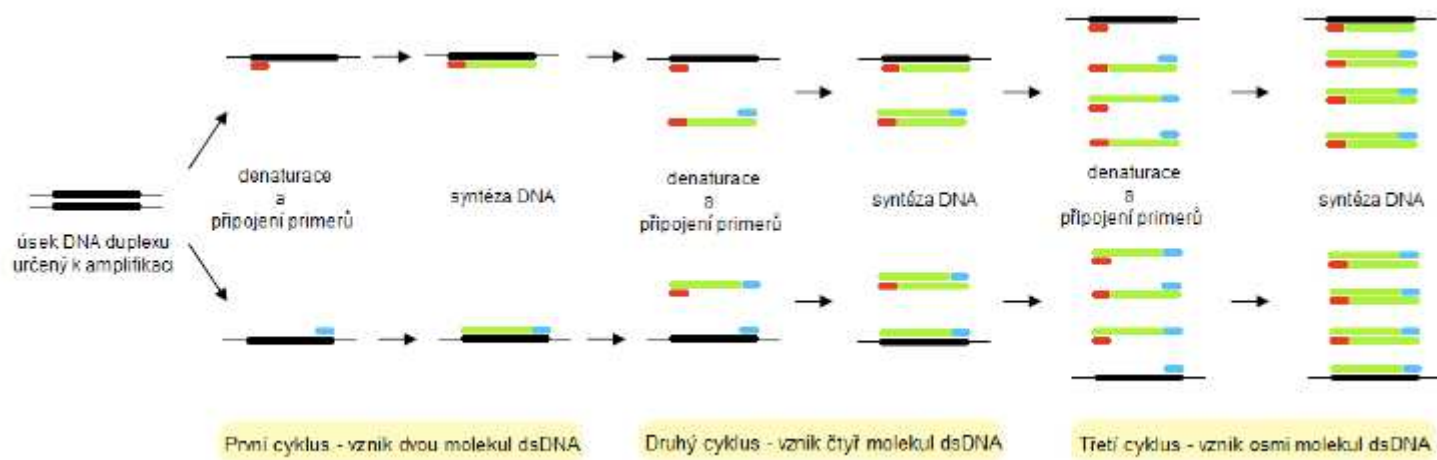
PCR

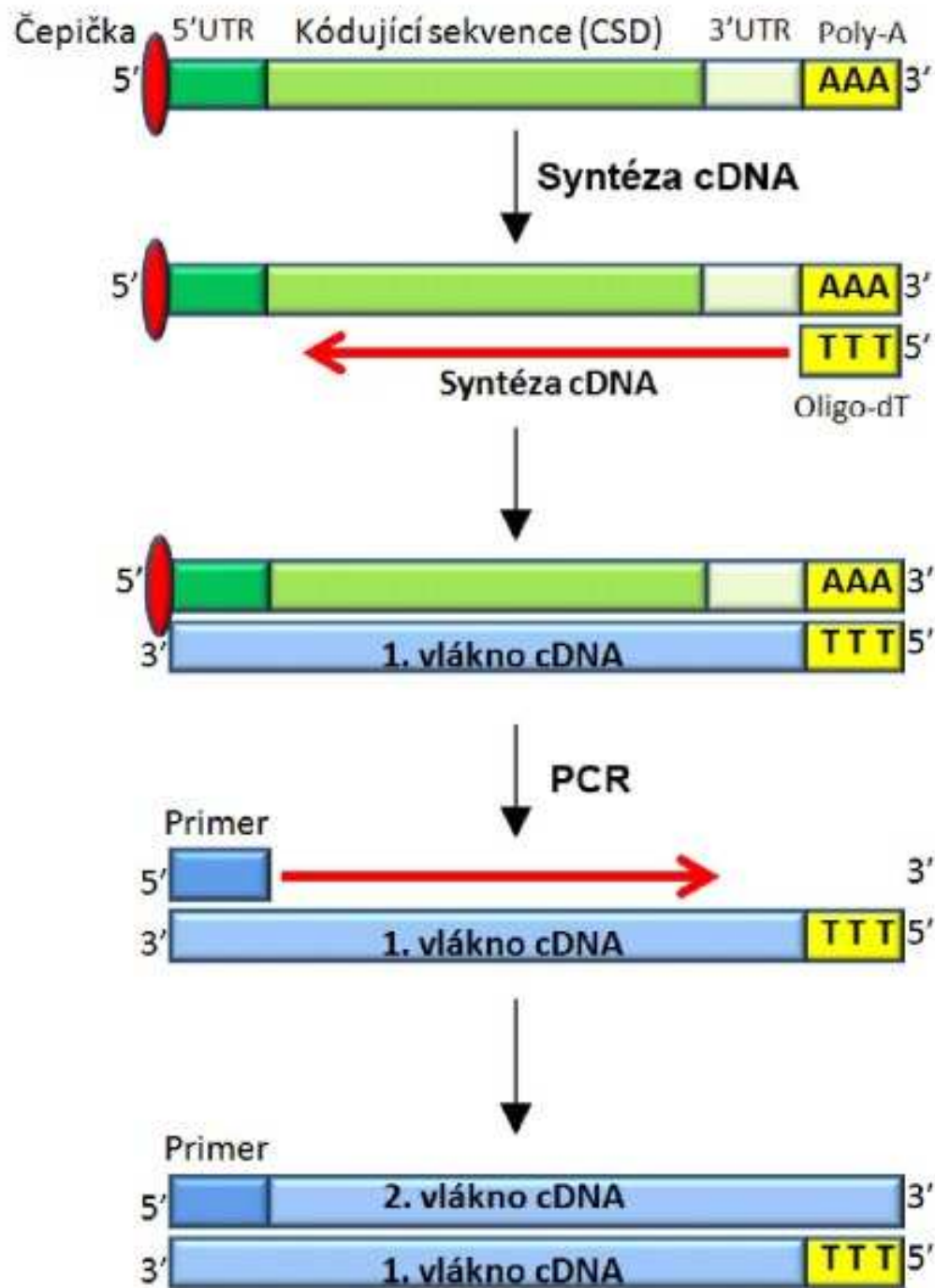
q□ založena na cyklickém střídání teplot, skládá se z několika kroků:

1. denaturace dsDNA zvýšením teploty reakční směsi na 94 – 98 °C (20 – 45 s) oddělení řetězců
2. Připojení primerů k ssDNA templátu snížením teploty na 30 – 65 °C (po dobu 30 – 90 s) - tzv. „annealing“
3. nastolení podmínek vhodných pro samotnou replikaci zvýšením teploty na 72 – 75 °C (45 – 90 s)

q□ doba trvání jednotlivých cyklů závisí na délce replikovaného fragmentu a na typu polymerasy

q□ jednotlivé cykly se ve stejném sledu opakují zpravidla 30 – 35 x



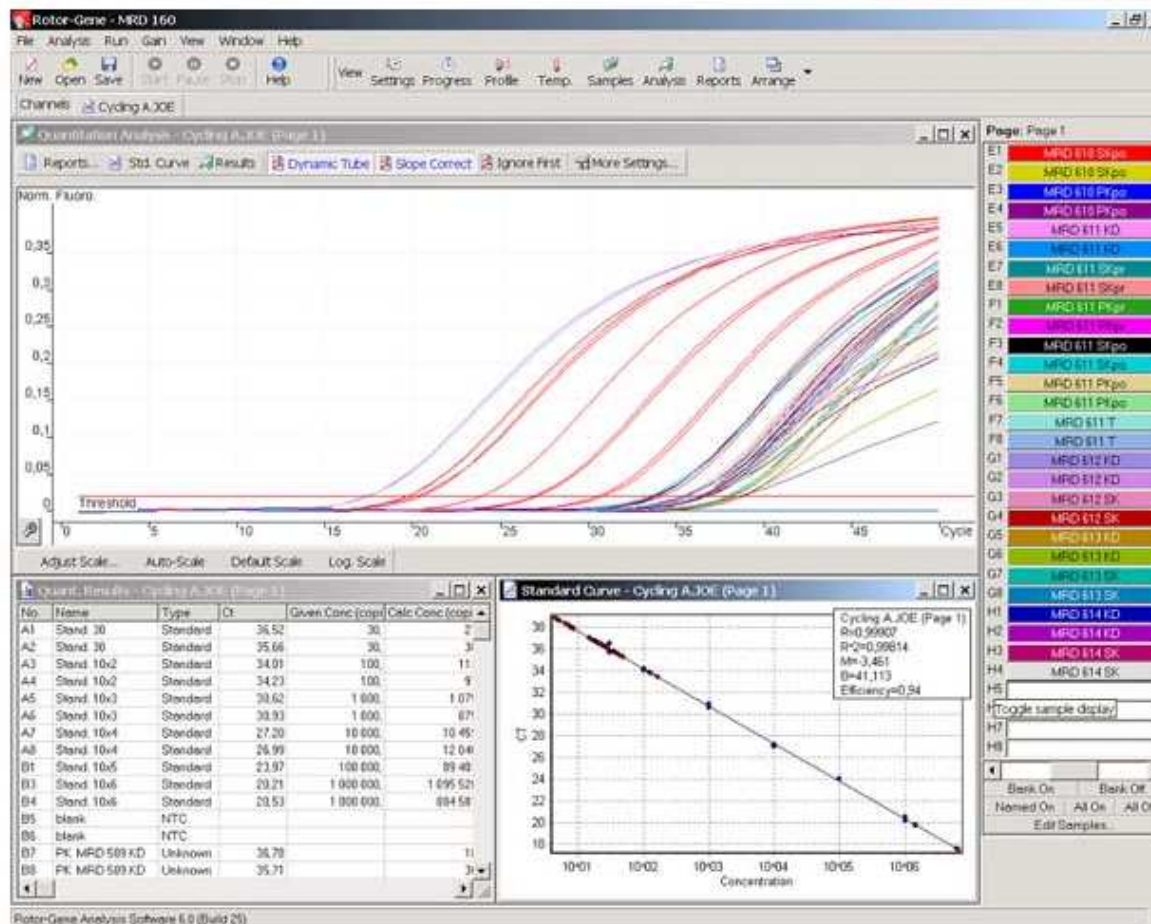


í, tzv.

- Hot start
- LD-PCR –
- Příprava asymetri
- RT-PCR
- Real-tim

Real time PCR

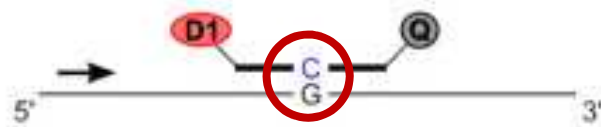
- počet cyklů nutných k náběhu exponenciální fáze
 - je funkcí **počtu DNA templátů** na počátku celého děje - **kvantifikace**



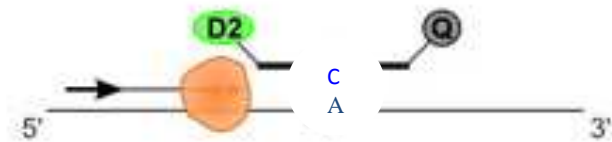
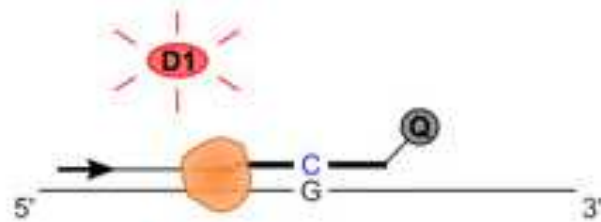
Příklad real-time RT-PCR záznamu absolutní kvantifikace genové exprese karcinoembryonálního antigenu, včetně standardizační křivky (RotorGene 3000, Corbett Research).

Detekce FV Leiden – TaqMan sondy

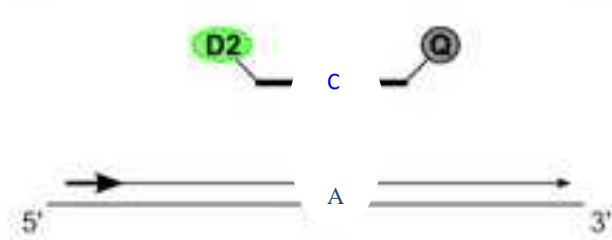
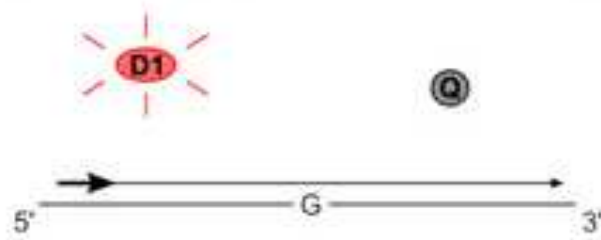
Hybridization



Extension



Completed




Probe cleavage: signal


Probe displacement: no signal

D1 : Dye 1

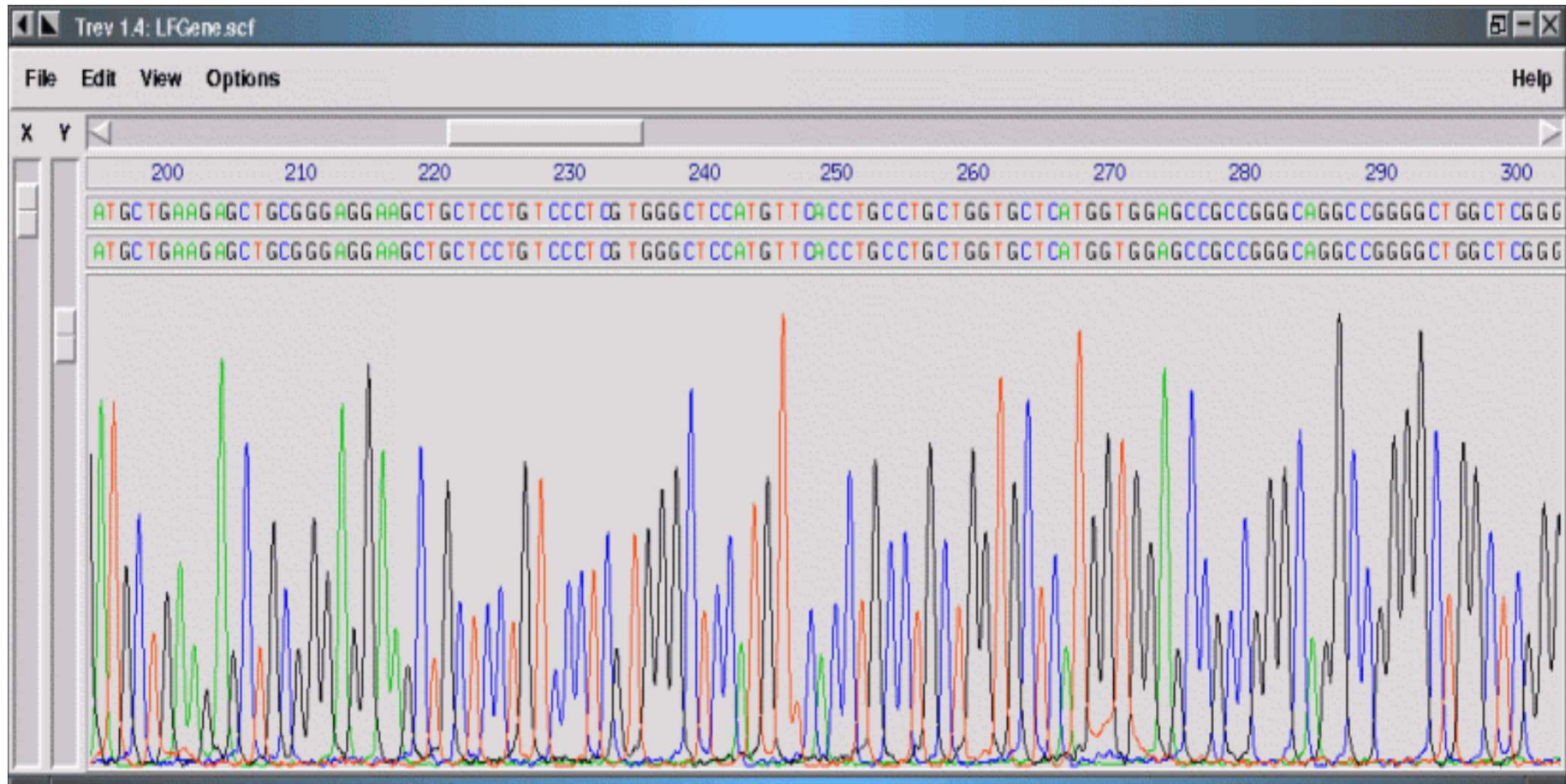
D2 : Dye 2

Q : Quencher

 : DNA polymerase

 : Forward primer

Sekvenace DNA



Polymerázová řetězová reakce – pracovní návod

Pracujte v rukavicích (powder-free)!

Některé kroky se budou provádět na ledu.

Příprava **master mixu**

→ vše, co je společné, se napipetuje nejdříve
dohromady pro všechny zamýšlené PCR reakce

Do **1,5 ml eppendorfky** si připravíte master mix pro 10 PCR reakcí, každá bude o celkovém objemu reakční směsi 20 ml (19 ml master mixu + 1 ml vzorku DNA)

	ml	
voda	155 + 4	
PCR pufr (10x)	20	
Mg ²⁺	5	
dNTP	4	
forward primer (F)	2	
reverse primer (R)	2	
Taq polymeráza	2	<i>enzym – skladuje se v mrazáku !</i>
vzorek DNA	10	<i>vzorek se bude přidávat později, až do jednotlivých PCR zkumavek</i>

→ zvortexujte, následně krátce zcentrifugujte, držte na ledu

Příprava PCR - vzorky

- vzorek DNA, nechte ho při pokojové teplotě pomalu roztát
- do platíčka **10 PCR zkumavek**, do každé **19 μ l master mixu + 1 μ l vzorku DNA**
- **4 různé vzorky** (DNA izolovaná v průběhu minulých praktik) v **dubletech** (tj. každý vzorek se bude zpracovávat 2x)
- **pozitivní +K**
 - + 1 μ l vzorku DNA z označené zkumavky
- **negativní kontrola -K**
 - jen master mix, tuto zkumavku je vhodné zavřít hned po rozpipetování master mixu



Zkumavky vložte do bloku termocykleru a spusťte přednastavený program.

Parametry PCR:

1) úvodní denaturace:	95°C - 5 min
2) 35 cyklů:	95°C - 15 s, 60°C - 15 s, 72°C - 30 s
3) 72°C - 7 min	
4) 4°C - do nekonečna	