

PCR

Reakcja łańcuchowa polimerazy, PCR (z ang. polymerase chain reaction)

ANIMACJA - <https://www.youtube.com/watch?v=iQsu3Kz9NYo>

Reakcja łańcuchowa polimerazy DNA, metoda cyklicznego powielania łańcuchów DNA. Metoda pozwalająca na szybkie i selektywne zwielokrotnienie wybranej sekwencji DNA. Oparta na enzymatycznym zwielokrotnieniu fragmentu DNA ograniczonego dwoma oligonukleotydowymi starterami komplementarnymi do przeciwnych nici DNA badanej sekwencji.

PCR to metoda cyklicznego powielania łańcuchów DNA przeprowadzana w termocyklerze.

termocykler- urządzenie które zawiera blok grzejny, umożliwia precyzyjną i sprawną zmianę temperatury w trakcie trwania reakcji PCR (patrz etapy reakcji PCR)

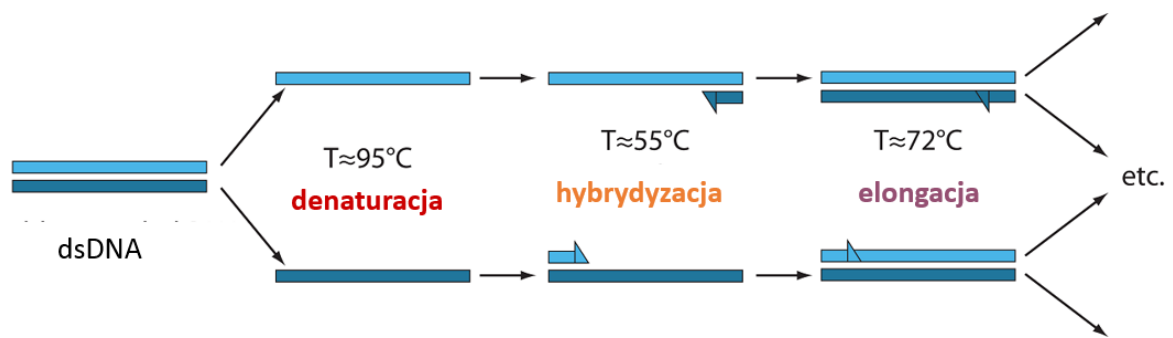
Substraty reakcji PCR:

- ✓ **DNA matrycowe** – może nim być DNA genomowe, lub cDNA uzyskane w procesie odwrotnej transkrypcji z mRNA
- ✓ **startery (primery)** - są komplementarne do sekwencji DNA oskrzydających fragment informacji, którą chcemy namnożyć. W reakcji wykorzystujemy **parę starterów** w której jeden, *starter F (forward)* tworzy *nić komplementarną do nici 3' — 5' (nić matrycowa, która bierze udział w transkrypcji)*, natomiast *starter R (reverse)* do *nici biegnącej od 5' do 3' (nić kodująca)*.
- ✓ **nukleotydy**
- ✓ **polimeraza DNA** – wiąże się do kompleksu starter-DNA i katalizuje syntezę nowej nici DNA
- ✓ **bufor** – zapewnia odpowiednie środowisko reakcji
- ✓ **jony magnezu** – są kofaktorem dla enzymu

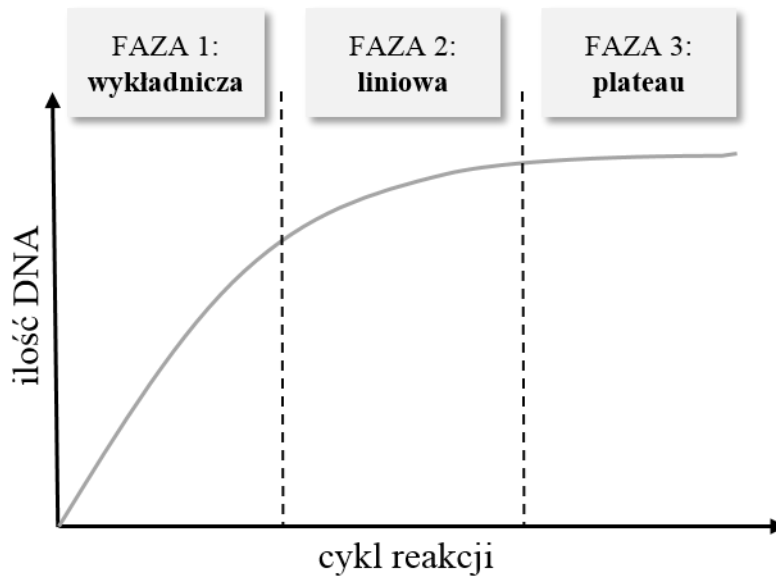
ETAPY reakcji PCR:

1. **Denaturacja** - w wysokiej temperaturze (zwykle około 95°C) dochodzi rozdzielania podwójnej nici DNA na dwie. Jest to wynik pęknięcia wiązań wodorowych pomiędzy zasadami azotowymi (purynami i pirymidynami).
2. **Hybrydyzacja** primerów (starterów) (annealing) - w temperaturze niższej, ściśle określonej dla danej pary starterów (najczęściej przedział pomiędzy 45-65°C), następuje ich asocjacja do matrycy czyli tworzenie odcinków dwuniciowych: starter-cząsteczek DNA.
3. **Elongacja** – (zwykle około 72°C) właściwa synteza DNA, polimeraza DNA rozpoczyna syntezę nici komplementarnej do matrycy. Podwyższenie temperatury do około 72°C powoduje przyłączenie się polimerazy DNA do miejsca asocjacji starterów z matrycą DNA.

Po zakończeniu pierwszego cyklu reakcji następuje kolejny cykl czyli: denaturacja, przyłączanie starterów oraz synteza nici DNA. Liczba cykli wynosi około $n=35$. Przyrost produktu PCR w czasie = 2^n gdzie n -liczba cyklu



Ryc. 1. Schemat reakcji PCR



Ryc. 2. Fazy reakcji PCR.

FAZY reakcji PCR:

1. Wykładnicza: gwałtownie przyrastająca. Przy wydajności reakcji 100% dochodzi do podwojenia produktu w każdym cyklu. Reakcja jest bardzo **specyficzna i dokładna**.

2. Liniowa: poszczególne składniki reakcji zostają wyczerpane, reakcja spowalnia swój przebieg, produkty reakcji ulegają degradacji, enzym zaczyna tracić swoją aktywność. Faza ta charakteryzuje się **dużą zmiennością**

3. Plateau: ustabilizowany poziom, punkt końcowy reakcji, **nie są tworzone nowe PCR produkty**.

Real-time PCR

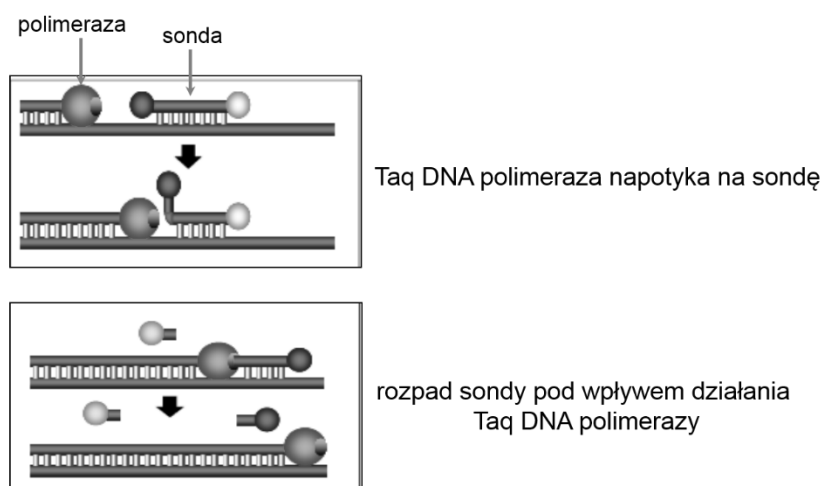
Real-time PCR jest to reakcja łańcuchowa polimerazy DNA z analizą ilości produktu w czasie rzeczywistym

- czuła i szybka metoda analityczna
- bazuje na konwencjonalnej metodzie PCR
- wykorzystuje **techniki fluorescencyjne**
- **kinetyka reakcji stale kontrolowana**
- pozwala na oszacowanie ilości produktu na początku reakcji

Sonda TaqMan - jest oligonukleotydem o długości 20-30 nukleotydów. Zawiera ona na końcu 5' fluorescencyjny **barwnik reporterowy** (ang. reporter dye), którego spektrum emisji jest tłumione przez inny barwnik fluorescencyjny pełniący rolę **wygaszacza** (ang. quencher)

Ogólne zasady działania real-time PCR z wykorzystaniem sond TaqMan:

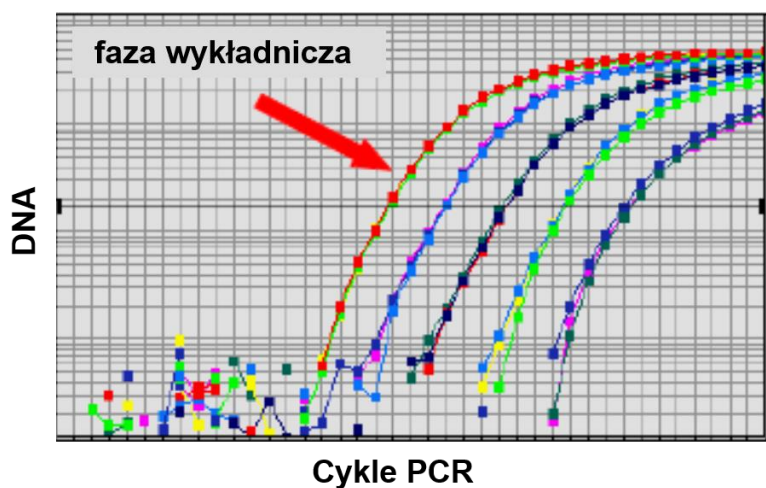
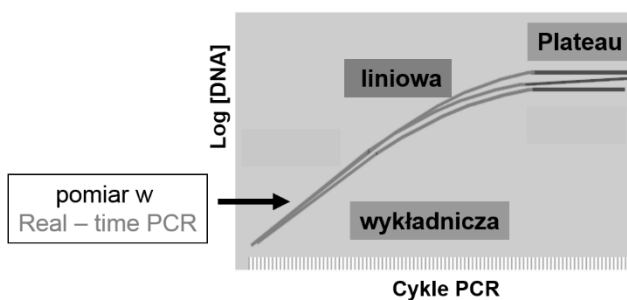
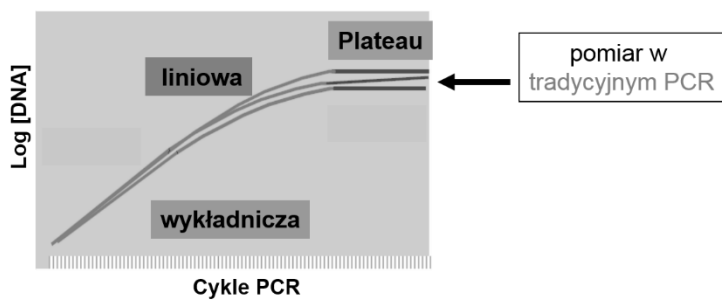
- monitorowanie przyrostu liczby kopii badanej sekwencji w czasie rzeczywistym możliwe jest dzięki **sondą oligonukleotydowym znakowanym fluorochromami**
- **fluorochromy** są wzbudzone światłem o określonej długości fali (laser) a wyemitowana energia jest wykryta i zmierzona przez spektrofлуorymetr
- **termocykler**, kontrolujący temperaturę, jest sprzężony ze **spektrofлуorymetrem**
- **spektrofлуorymetrem** pozwala na oszacowanie ilości kopii badanego fragmentu DNA (im silniejsza fluorescencja, tym więcej kopii DNA)



Zastosowanie real-time PCR:

1. analiza ilościowa ekspresji genów
2. diagnostyka bakteriologiczna
3. diagnostyka wirusologiczna
4. pomiar uszkodzonego DNA
5. pomiar skuteczności terapii antywirusowej
6. detekcja patogenów
7. genotypowanie – określanie SNP-ów

PCR vs real-time PCR



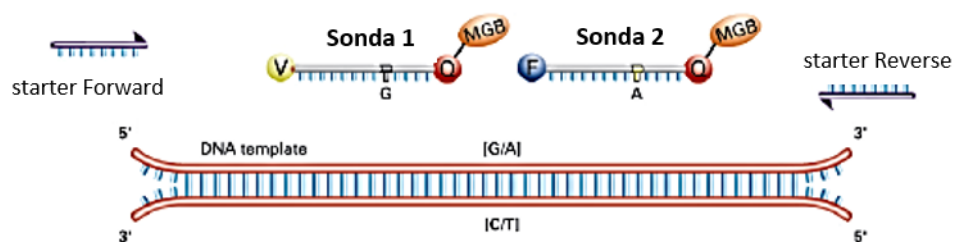
Genotypowanie – badanie SNP

Polimorfizm pojedynczego nukleotydu, SNP (single nucleotide polymorphism) to zjawisko zmienności sekwencji DNA, przejawiające się zmiennością pojedynczego nukleotydu.

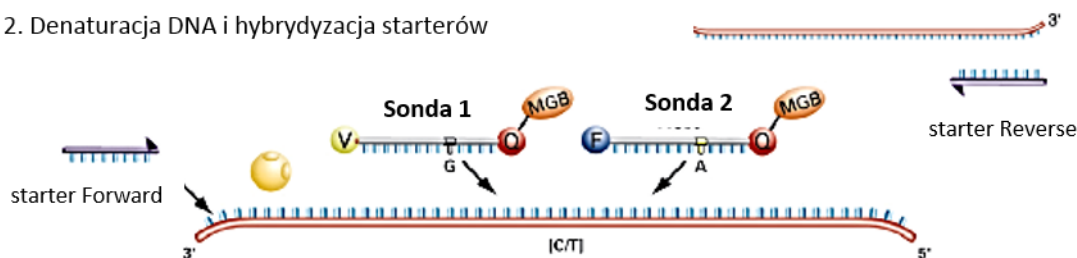
- używamy pojęcia polimorfizmu gdy badane SNP są obecne są u **więcej niż 1% populacji ludzkiej**
- SNP stanowią ok. **90%** całej zmienności występującej w ludzkim genomie
- występują **co 100-300 nukleotydów**

Genotypowanie pozwala na detekcję SNP z wykorzystaniem sond TaqMan.

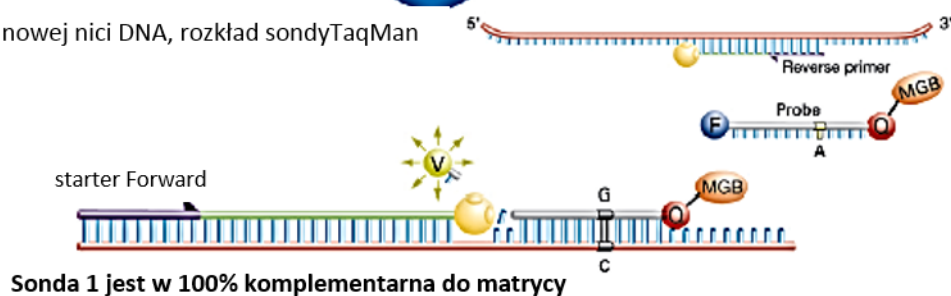
1. Inicjacja reakcji



2. Denaturacja DNA i hybrydacja starterów



3. Synteza nowej nici DNA, rozkład sondy TaqMan



Ryc. 4. Schemat reakcji genotypowania. (Applied Biosystems)

Porównanie metod: PCR, real-time PCR, genotypowanie.

	PCR	rt-PCR	genotypowanie
Pomiar jakościowy/iłościowy	jakościowy/iłościowy	iłościowy	jakościowy
Primery TAK/NIE	TAK	TAK	TAK
Sonda TaqMan TAK/NIE, jeśli jest jedna/dwie	NIE	TAK jedna	TAK dwie
Czułość metody wysoka/niska	niska	wysoka	wysoka
Detekcja produktu (W jaki sposób?)	elektroforeza agarozowa	spektrofluorymetr	spektrofluorymetr
Detekcja produktu (W jakiej fazie?)	plateau	wykładniczej	wykładniczej

Elektroforeza agarozowa

Elektroforeza agarozowa opiera się na właściwościach DNA które jest kwasem o ładunku wypadkowym ujemnym i w polu elektrycznym „migruje” do elektrody dodatniej.

- technika wizualizacji kwasów nukleinowych
- polega na rozdzielaniu fragmentów DNA według ich wielkości
- określenie wielkości cząsteczek przez porównanie drogi migracji z fragmentami o znanej wielkości (tzw. markerów)
- pozwala na oczyszczanie DNA
- jest techniką prostą, szybką i stosunkowo taną

Do wizualizacji DNA stosuje się bromek etydyny (toksyczny) lub znaczniki fluorescencyjne (nietoksyczne).