



Reakcja PCR

Roman Zieliński
Biologia medyczna, lekarski
2018/2019

Zasada reakcji PCR

Reakcja PCR (*replikacja in vitro*) obejmuje denaturację DNA, przyłączenie starterów (annealing) i syntezę nowych nici DNA (elongacja).


- 1. Denaturacja:**
rozplecenie nici DNA, temp. 94°C.
- 2. Annealing:**
przyłączenie starterów, temp. 50-70°C.
- 3. Elongacja (amplifikacja):**
wydłużanie łańcucha DNA, temp. 72°C.

Powielany fragment – matryca DNA

Startery to jednoniciowe oligonukleotydy (10-25 bp), komplementarne do danego fragmentu DNA, umożliwiają przyłączenie polimerazy DNA

Polimeraza DNA syntetyzuje nowy łańcuch komplementarny do matrycy wykorzystując nukleotydy zawarte w mieszaninie reakcyjnej.

Specyfika reakcji zależy od temperatury przyłączania starterów, zbyt niska – starter przyłącza się do sekwencji niekomplementarnych, zbyt wysoka – starter się nie przyłącza.

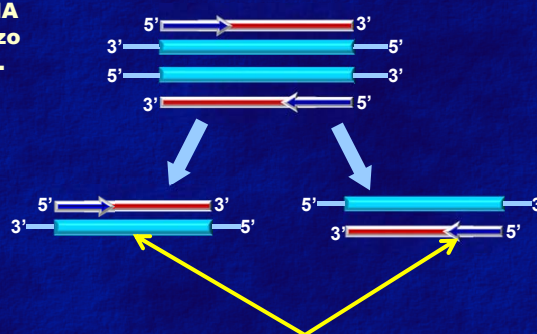


Zasada reakcji PCR

W wyniku pojedynczego cyklu PCR z każdej cząsteczki DNA powstają dwie nowe cząsteczki DNA. Rutynowo przeprowadza się 25-40 cykli.

Liczba kopii danej sekwencji DNA w reakcji PCR rośnie wykładniczo według wzoru 2^n (n: liczba cykli).

Cykl	Liczba kopii
1	2
2	4
3	8
10	1 024
20	1 048 576
30	1 073 741 824



Powstałe cząsteczki DNA są matrycami w następnym cyklu

W reakcji PCR wykorzystuje się odporną na wysoką temperaturę polimerazę z *Thermus aquaticus* (Taq) lub z *T. flavus* (Tfl).



Etapy reakcji PCR: czas i temperatura

Czas prowadzenia poszczególnych etapów waha się od 30 s do 150 s. Najdłuższy jest czas elongacji.

- Wstępna denaturacja: wstępne rozplecenie nici DNA: 94°C przez 3-5 min. Jednorazowo, nie powtarza się w kolejnych cyklach.

30-45 cykli obejmujących:

- denaturację – 94°C przez 30-60 s w zależności od metody;
- annealing czyli przyłączanie starterów – 36-70°C w zależności od temperatury topnienia starterów przez 30-60 s w zależności od metody;
- elongacja czyli wydłużanie łańcucha – 72°C przez 60-150 s w zależności od metody.

Końcowe procesy po zakończeniu wszystkich cykli:

- końcowe wydłużanie – pozwala dosyntetyzować końcowe fragmenty DNA, 72°C przez 5-10 min. w zależności od długości amplifikowanych sekwencji.
- 4°C – ustawia się po zakończeniu wszystkich reakcji, pozwala na pozostawienie prób w termocyklerze po zakończeniu reakcji.



Warunki reakcji PCR: temperatura topnienia

Temperatura topnienia DNA to temperatura, w której połowa cząsteczek jest zdenaturowana.

Temperatura przyłączania starterów (annealing) zależy od temperatury topnienia. Dlatego projektując warunki reakcji PCR należy zacząć do określenia temperatury topnienia starterów.

Testowanie warunków przyłączania starterów na ogół zaczyna się od $T_m \pm 5^\circ\text{C}$.

Projektując startery należy je tak dobrać, aby ich temperatury topnienia nie różniły się znacząco.

5' — **AGCTAAGGCCTAGCGTAGCCT** — 3'

- Liczba nukleotydów: 21
- Liczba nukleotydów z G+C: 12
- Procent G+C: 57%

$$T_m = 81.5 + 16.6 (\log \text{Na}^+) + \frac{41 \sum \text{G+C}}{\text{długość}} - \frac{600}{\text{długość}}$$

$$T_m = 81.5 + 16.6 (\log 0.05) + \frac{41 \times 12/21}{600/21}$$

$$T_m = 81.5 + 16.6 (-1.3) + 23.43 - 28.57$$

$$T_m = 54.78 \approx 55^\circ\text{C}$$



Warunki reakcji PCR: składniki

Do przeprowadzenia reakcji PCR niezbędna jest matryca DNA oraz elementy niezbędne do przeprowadzenia reakcji.

Matryca DNA

- Matrycą jest DNA, który wyizolowany został z organizmu.
- Do reakcji dodaje się 10-100 ng w zależności od metody.

Startery

- Startery są niezbędne do zainicjowania reakcji replikacji *in vitro*.
- Są to krótkie, jednoniciowe odcinki DNA (10-25 bp).
- Startery projektuje się na podstawie sekwencji, która będzie amplifikowana.
- Startery powinny zawierać >50% zasad z GC.
- Stężenie starterów wynosi 0.3-1 μM

dNTP (nukleotydy)

- Nukleotydy: ATP, GTP, CTP, TTP niezbędne do tworzenia DNA. Stężenie każdego wynosi 200 μM .
- Polimeraza DNA: 0.75-1U polimerazy TAQ (*Thermus aquaticus*) lub Tfl (*T. flavus*).

Bufory

- Bufor dla polimerazy: 20 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ i 50 mM Tris-HCl, dostarczany z polimerazą jako roztwór 10x lub 20x stężony.
- MgCl_2 : 1.5-2.0 mM, kofaktor polimerazy, podnosi specyfikę reakcji.

Objętość

- 10-50 μl , uzupełnia się wodą do ostatecznej objętości.



Warunki reakcji PCR: składniki

Do przeprowadzenia reakcji PCR niezbędna jest matryca DNA oraz elementy niezbędne do przeprowadzenia reakcji.

Matryca DNA

- Matrycą jest DNA, który wyizolowany został z organizmu.
- Do reakcji dodaje się 10-100 ng w zależności od metody.

Startery

- Startery są niezbędne do zainicjowania reakcji replikacji *in vitro*.
- Są to krótkie, jednoniciowe odcinki DNA (10-25 bp).
- Startery projektuje się na podstawie sekwencji, która będzie amplifikowana.
- Startery powinny zawierać >50% zasad z GC.
- Stężenie starterów wynosi 0.3-1 μM

dNTP (nukleotydy)

- Nukleotydy: ATP, GTP, CTP, TTP niezbędne do tworzenia DNA. Stężenie każdego wynosi 200 μM .
- Polimeraza DNA: 0.75-1U polimerazy TAQ (*Thermus aquaticus*) lub Tfl (*T. flavus*).

Bufory

- Bufor dla polimerazy: 20 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ i 50 mM Tris-HCl, dostarczany z polimerazą jako roztwór 10x lub 20x stężony.
- MgCl_2 : 1.5-2.0 mM, kofaktor polimerazy, podnosi specyfikę reakcji.

Objętość

- 10-50 μl , uzupełnia się wodą do ostatecznej objętości.



Startery: projektowanie

Aby powielić cały gen należy zaprojektować startery na jego początek i koniec.

W bazach danych zawsze podawane są sekwencje nici sensownych od końca 5' do 3'.



Sekwencje starterów podaje się od końca 5' do 3':

- Starter 1: 5'AAGGCTGA3'
- Starter2: 5'CGATTCCG3'



**Centre for Evolution, Genomics
and Biomathematics, e-Gene**



prof.romanzielinski@gmail.com

<https://www.matgen.pl>