

Podstawy łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR)



Plan prezentacji

Podstawy biologii molekularnej

Podstawy PCR część I

Definicja PCR

Etapy PCR

Podstawy PCR część II

Definicja PCR w czasie rzeczywistym
(real time PCR)

Jakościowa PCR w czasie rzeczywistym

Ilościowa PCR w czasie rzeczywistym

Podstawy PCR część III

Definicja temperatury topnienia

Analiza krzywych topnienia

Po ukończeniu niniejszego szkolenia, uczestnik powinien umieć

Ogólnym celem tego modułu jest zrozumienie metod PCR stosowanych w systemach GeneXpert

Po zakończeniu szkolenia, uczestnicy będą w stanie:

- Wymienić składniki niezbędne w procesie PCR
- Wyjaśnić przebieg procesu PCR i opisać jego etapy
- Zdefiniować PCR w czasie rzeczywistym (2 możliwe znaczenia)
- Opisać krzywe uzyskiwane podczas PCR w czasie rzeczywistym, zdefiniować Ct
- Opisać, w jaki sposób PCR w czasie rzeczywistym pozwala na uzyskanie wyników ilościowych
- Zdefiniować temperaturę topnienia
- Wyjaśnić, w jaki sposób analiza krzywej topnienia pozwala na identyfikację bakterii opornych na leki

Podstawy łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) - I



Podstawy biologii molekularnej

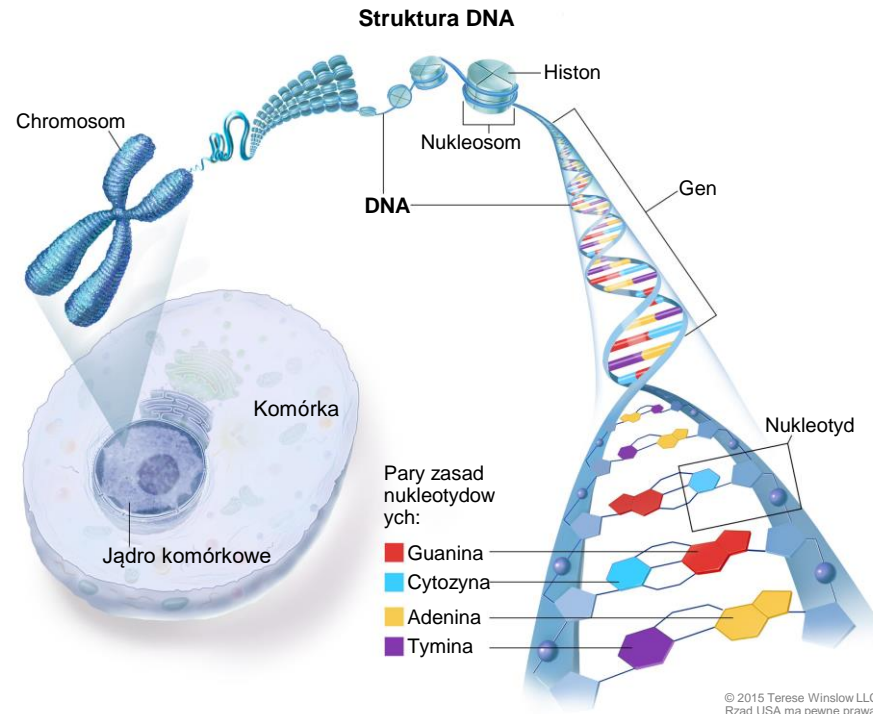
Szybkie przypomnienie



Podstawy biologii molekularnej

Informacja genetyczna zawarta jest w DNA

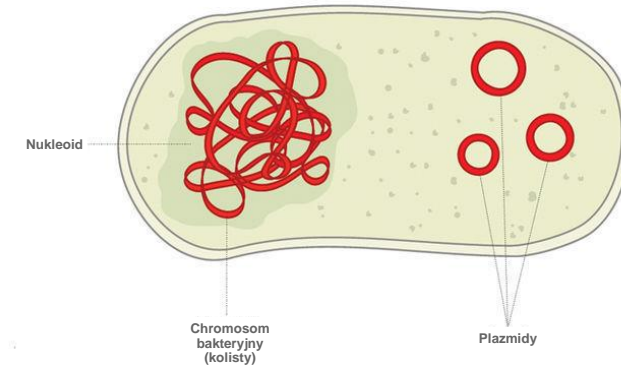
- DNA buduje podwójna helisa
- DNA koduje informację genetyczną (różne geny, różna informacja)
- DNA tworzy długie łańcuchy zwane chromosomami
- W jądrze komórki człowieka znajdują się 23 pary chromosomów



© 2015 Terese Winslow LLC
Rząd USA ma pewne prawa

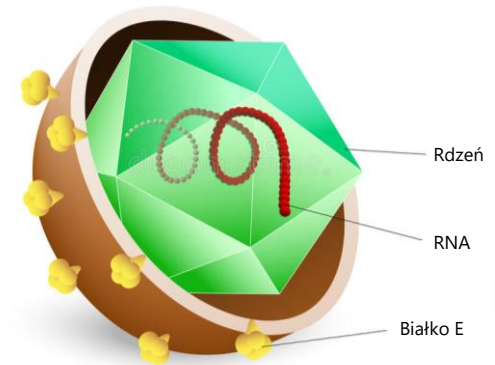
Materiał genetyczny bakterii

- Informacja genetyczna bakterii jest zakodowana w DNA
- Większość bakterii ma genom składający się z pojedynczej kolistej cząsteczki DNA umiejscowionej w obszarze zwanym nukleoidem (nieograniczonym błoną)
- Pozachromosomalne elementy genetyczne, takie jak plazmidy lub bakteriofagi, często warunkują oporność na czynniki przeciwbakteryjne, produkcję czynników zjadliwości lub inne funkcje.



Materiał genetyczny wirusów

- Wirus to mały pasożyt, który nie może się samodzielnie namnażać. Wykorzystuje do tego maszynę komórki gospodarza.
- Genom wirusów może mieć różne formy: RNA lub DNA, jedno- lub dwuniciowego, liniowego, kolistego lub nawet segmentowanego



Z: Wirus zapalenia wątroby typu C

Elementy budulcowe DNA

DNA budują 4 nukleotydy

- A = Adenina
- T = Tymina
- C = Cytoszyna
- G = Guanina

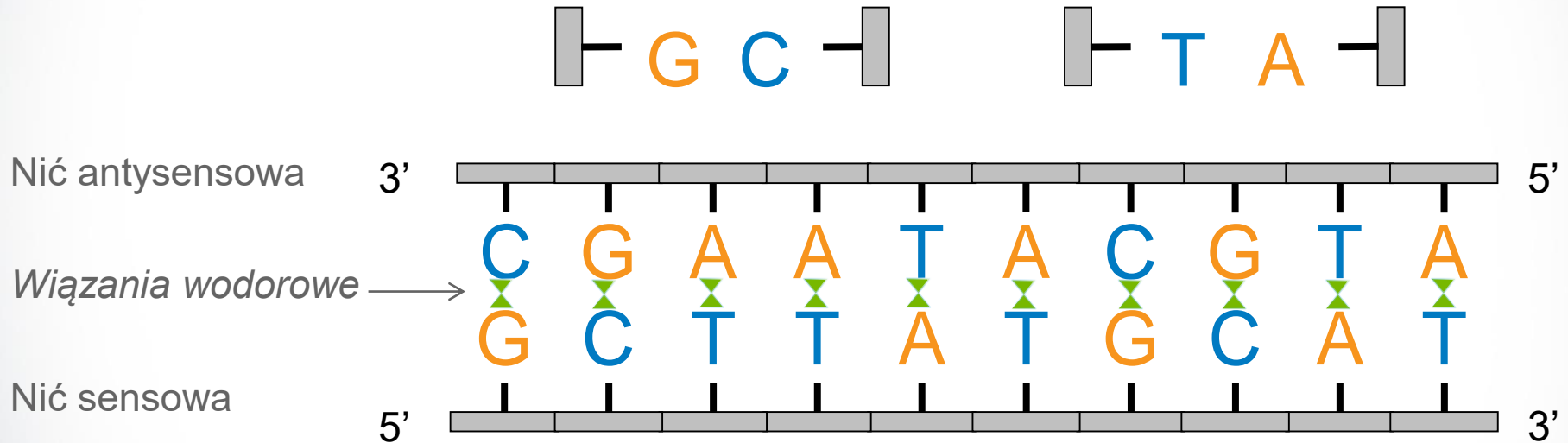


4 zasady są połączone, tworząc sekwencję (pojedynczą nić DNA)



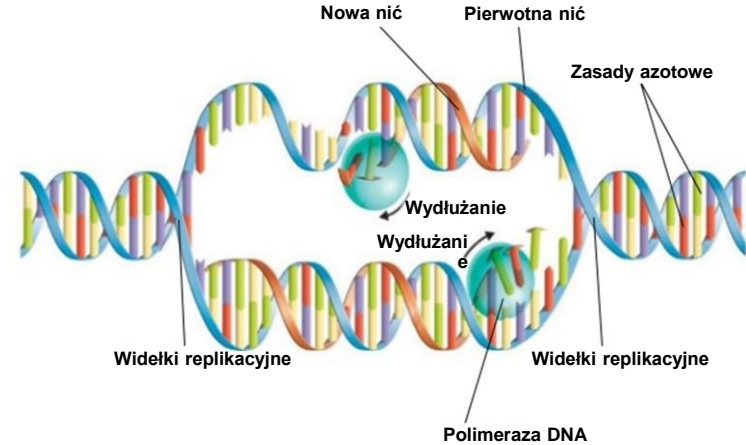
Podstawy biologii molekularnej

DNA jest na ogół dwuniciowy i tworzy pary w unikalny sposób:



Replikacja DNA

- Nowy DNA jest produkowany przez enzymy nazywane **polimerazami DNA**. Syntetyzują one DNA tylko w kierunku 5' do 3'.
- Kolejny enzym nazywany prymazą tworzy **starter** RNA, który pozwala rozpocząć pracę polimerazie.
- Kiedy tylko starter RNA zostaje zsyntetyzowany, polimeraza DNA rozbudowuje go, dodając kolejne nukleotydy i tworząc nową nić DNA, komplementarną do nici matrycowej.



Copyright Pearson Prentice Hall

Definicja PCR

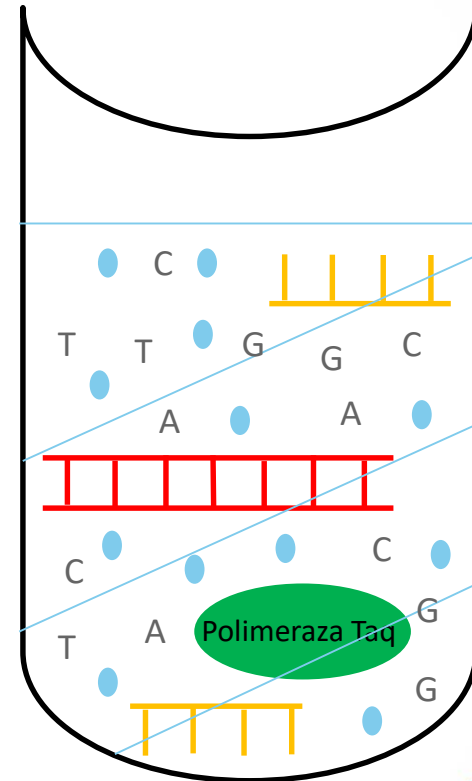


Czym jest PCR?

1. PCR (**Polymerase Chain Reaction**) to **reakcja łańcuchowa**, w efekcie której powstają liczne kopie specyficznej sekwencji DNA znajdującej się w próbce.
2. Amplifikacja DNA jest możliwa dzięki **powtarzanym cyklom termicznym**
3. Liczne kopie specyficznej sekwencji **podwaja się** po każdym cyklu
4. Po czterdziestu cyklach pojedyncza sekwencja zostaje namnożona do około 2 bilionów kopii

Składniki biorące udział w reakcji PCR

- **Matryca DNA** (gen wirusa, bakterii lub człowieka)
- **dNTP** (mieszanina wszystkich czterech nukleotydów wymaganych do budowy nowych nici DNA: A, T, C, G)
- **Startery** (oligonukleotydy składające się z około 20 nukleotydów, które zwiążą się z docelowym fragmentem DNA)
- **Polimeraza** (naturalna termostabilna polimeraza Taq, która jest aktywna w temperaturze optymalnej około 70°C)
- **Bufor** (Mg²⁺, Tris-HCl, Triton: zapewnia optymalne warunki do działania polimerazy)

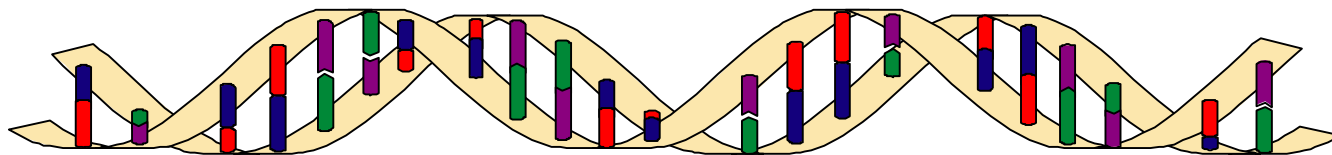


Etapy PCR



Pierwsza faza cyklu PCR - denaturacja

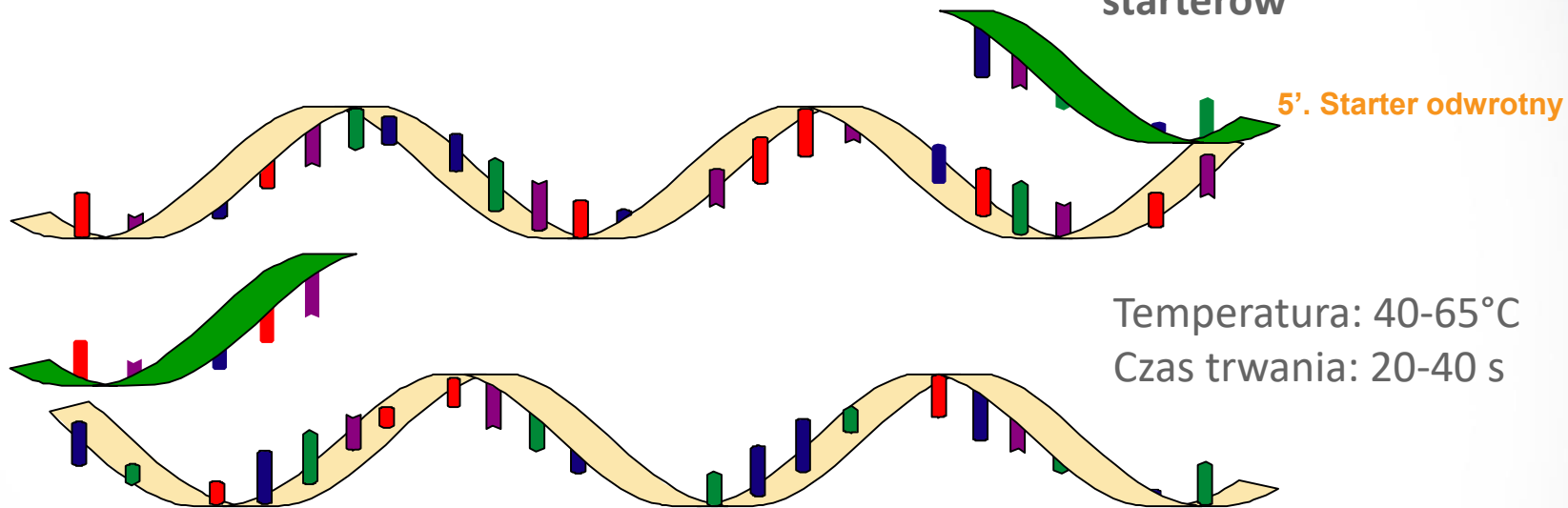
rozdzielenie nici DNA



- 90-95°C
- 20-30 s

Druga faza cyklu PCR - **hybrydyzacja**

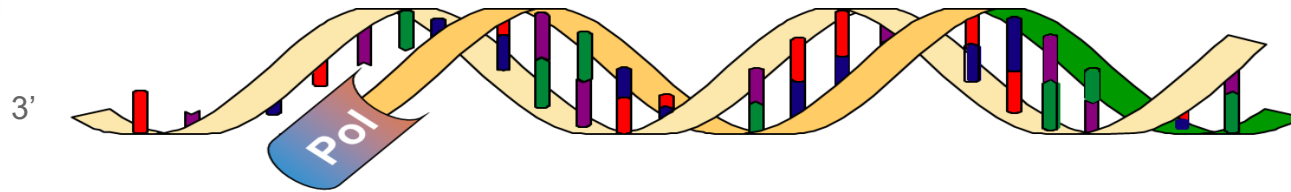
wiązanie specyficznych
starterów



5' Starter wiodący

Trzecia faza cyklu PCR - **elongacja**

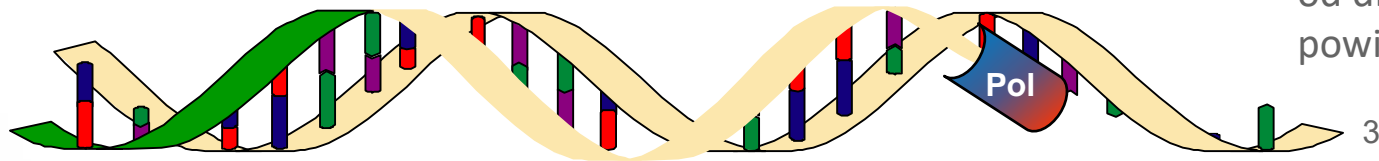
synteza nici DNA



5' Starter odwrotny

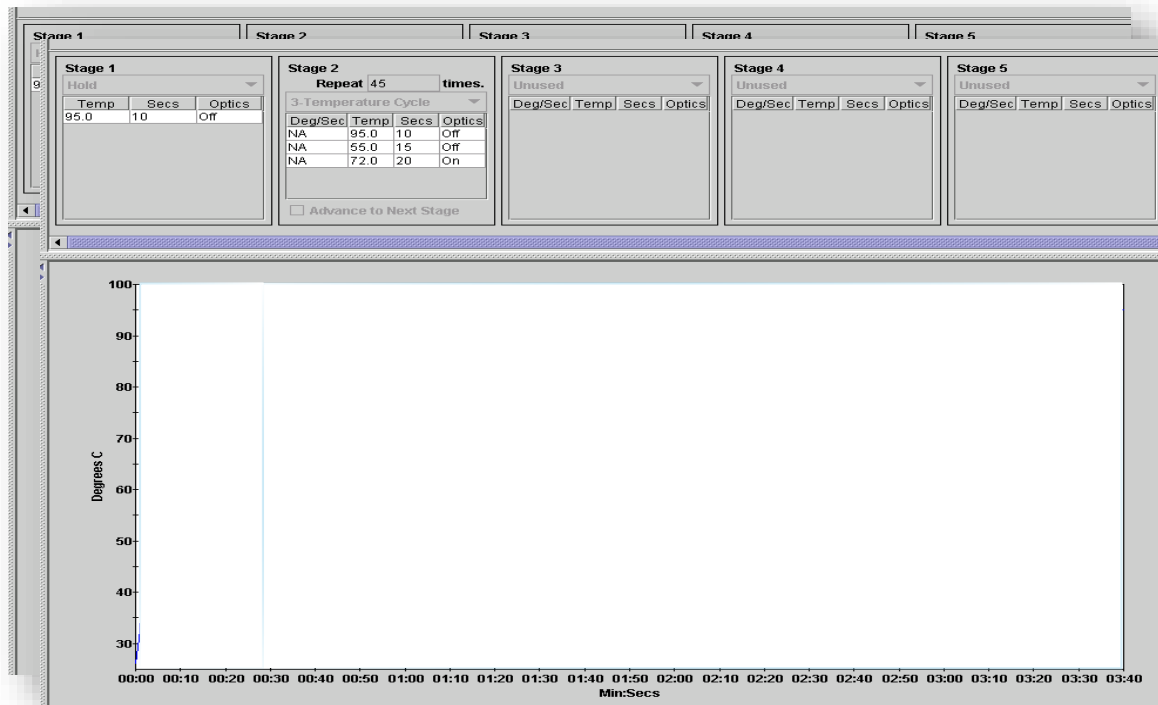
- 60-75°C

Czas trwania zależy od długości powielanej sekwencji



5' Starter wiodący

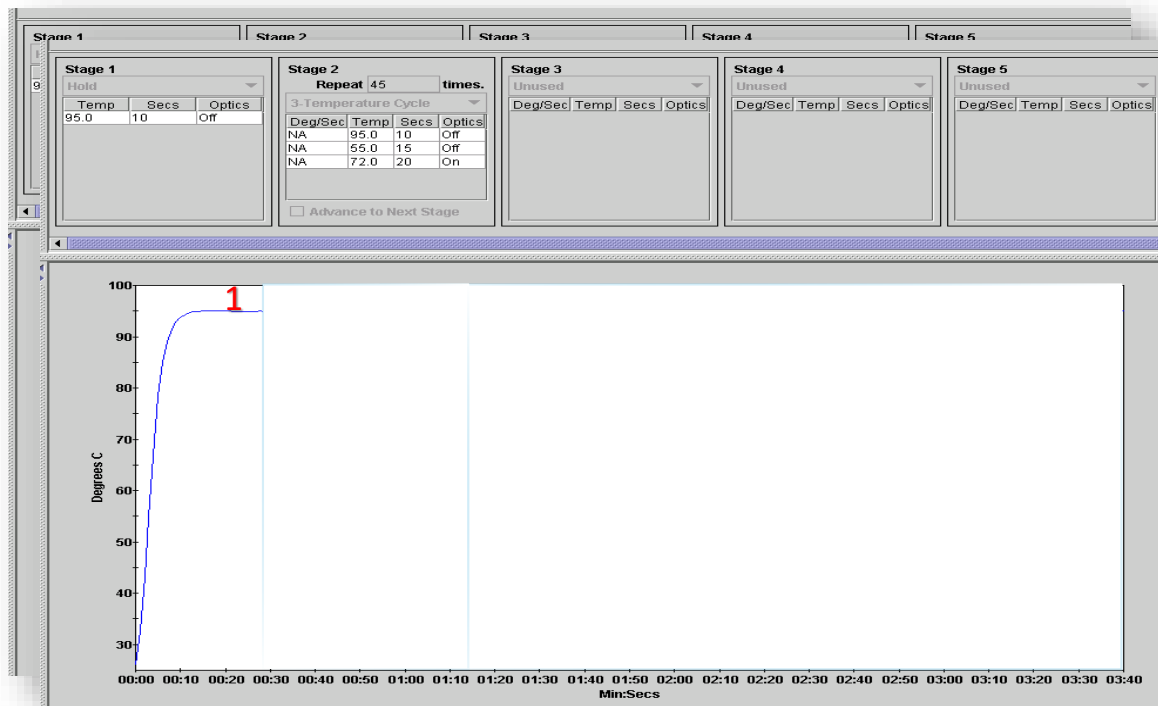
Profil termiczny cyklu PCR



1. Denaturacja

Uwaga: PCR zwykle obejmuje 30 do 40 cykli

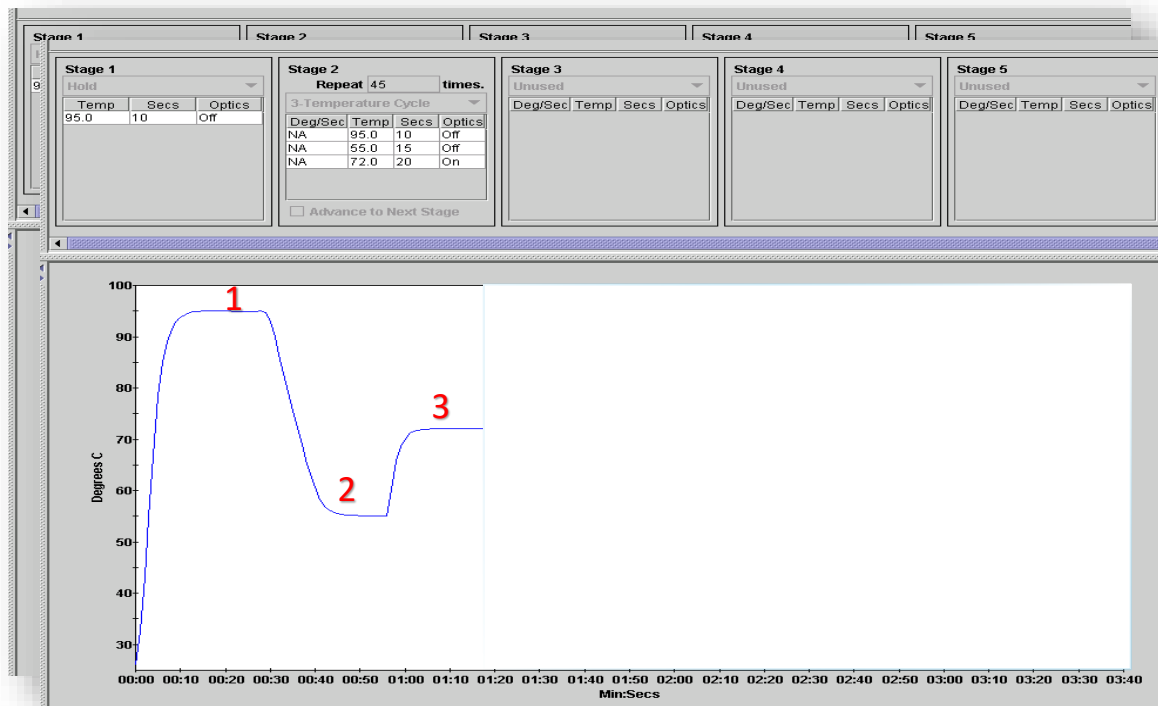
Profil termiczny cyklu PCR



2. Hybrydyzacja

Uwaga: PCR zwykle obejmuje 30 do 40 cykli

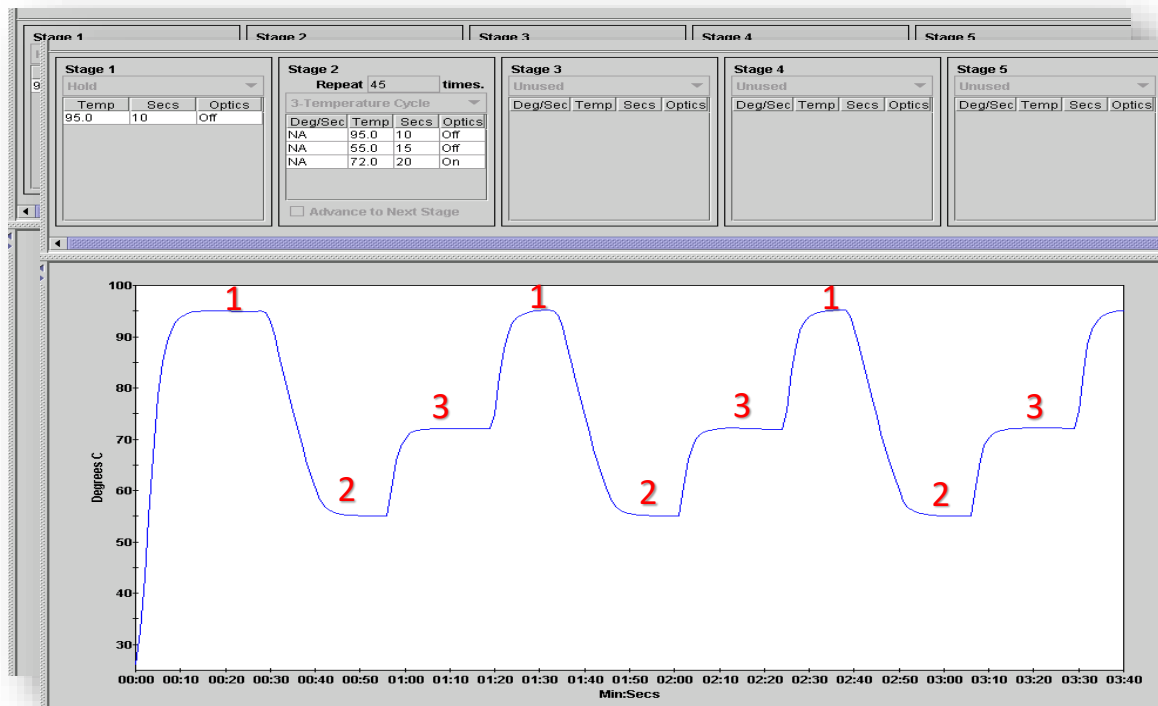
Profil termiczny cyklu PCR



3. Elongacja

Uwaga: PCR zwykle obejmuje 30 do 40 cykli

Profil termiczny cyklu PCR



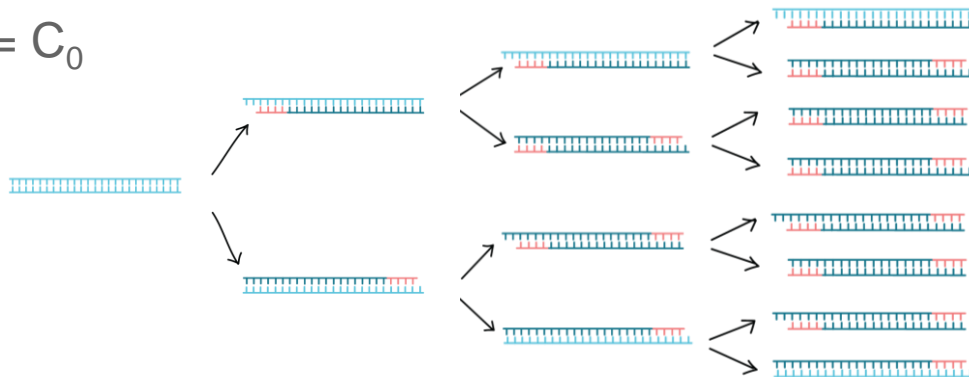
1. Denaturacja
2. Hybrydyzacja starterów
3. Elongacja

Uwaga: PCR zwykle obejmuje 30 do 40 cykli

Liczba kopii DNA uzyskiwanych w PCR

– **Teoretycznie**, liczba kopii docelowego DNA podwaja się z każdym cyklem, co oznacza współczynnik wydajności PCR $E = 2$

- Stężenie wyjściowe (0 cykli) = C_0
- Po pierwszym cyklu: $C_0 \times 2$
- Po 2 cyklach: $C_0 \times 4$
- Po 3 cyklach: $C_0 \times 8$
- **Po n cyklach: $C_0 \times 2^n$**



– **W rzeczywistości**, takie tempo replikacji nie może być utrzymane wiecznie i szybkość podwajania spada, a później replikacja zatrzymuje się całkowicie

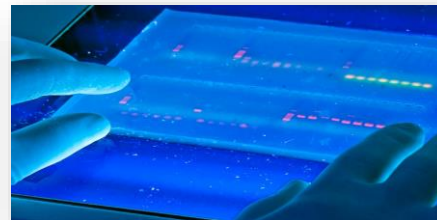
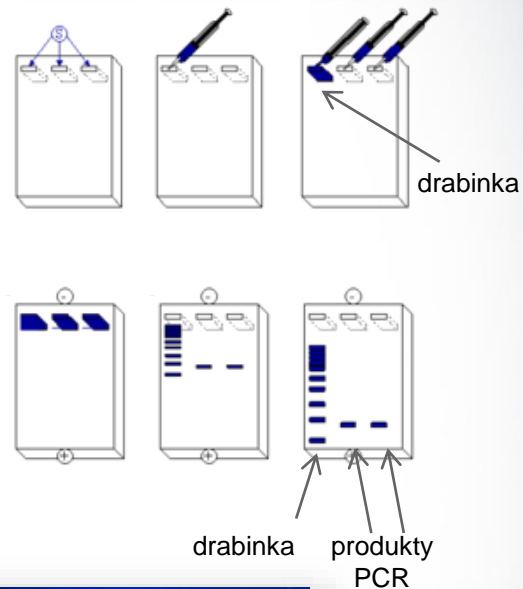
Czynniki wpływające na wydajność PCR

- Opracowanie testu (producent)
 - Projekt starterów/sond
 - Rodzaj polimerazy DNA
 - Jakość odczynników
 - Mieszanka reakcyjna
 - Warunki PCR: temperatura i długość trwania poszczególnych etapów
- Przedanalizacyjne (technik laboratoryjny)
 - Jakość odczynników, związana z transportem i warunkami przechowywania
 - Jakość próbki: obecność inhibitorów PCR

Wykrycie produktu w punkcie końcowym

W klasycznym PCR, wykrywanie produktu odbywa się w punkcie końcowym (po zakończeniu PCR)

1. Mieszanina fragmentów o znanych rozmiarach (tzw. drabinka) jest nanoszona na żel agarozowy, jako punkt odniesienia do obliczenia wielkości produktów PCR.
2. Produkt PCR jest także nanoszony na żel
3. Przykładane jest stałe pole elektryczne, które powoduje, że ujemnie naładowane cząsteczki wędrują w stronę bieguna dodatniego
4. Produkt PCR wędruje zależnie od rozmiaru
5. DNA jest barwiony za pomocą bromku etydyny i oglądany w świetle lampy UV
6. Jeżeli szukana sekwencja docelowa znajduje się w próbce, obecny jest produkt PCR oczekiwanej wielkości.





Dziękujemy.

www.Cepheid.com