Temat 5

ŁAŃCUCHOWA REAKCJA POLIMERAZY (PCR – Polymerase Chain Reaction)

Odkrycie Kary'egoMullisa (1983 rok), nagrodzony Nagrodą Nobla (1993r).

PCR jest enzymatyczną metodą powielania specyficznych sekwencji DNA in vitro (amplifikacja). Technika ta pozwala na szybkie wykrycie, amplifikację i identyfikację znikomych ilości kwasów nukleinowych.

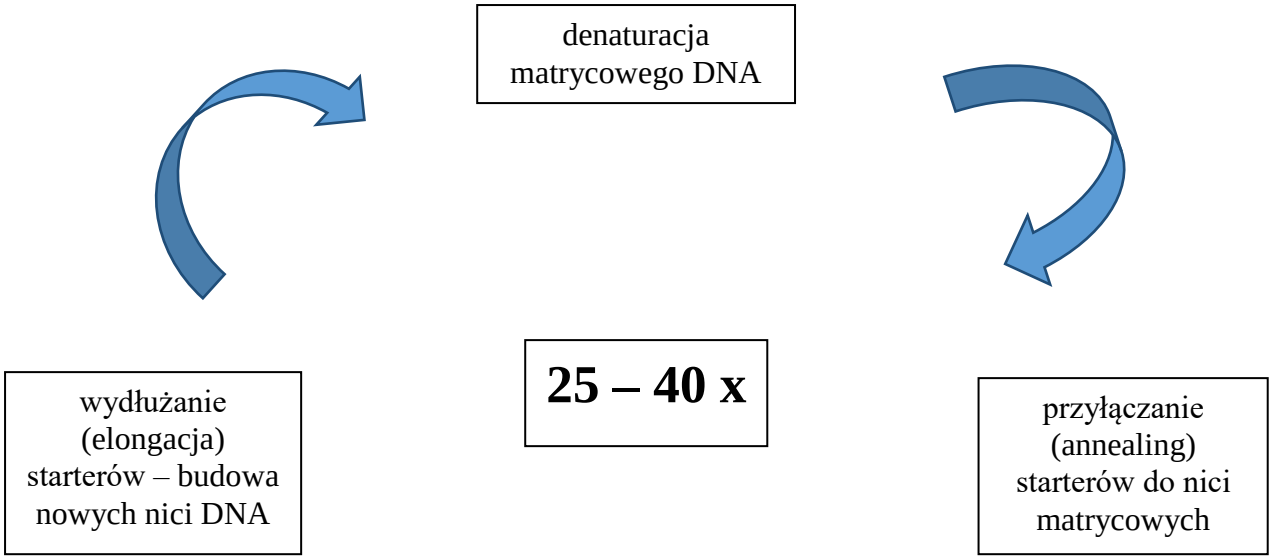
Cechy reakcji PCR:
- szybkość
- wydajność
- selektywność
- czułość
- prostota wykonania

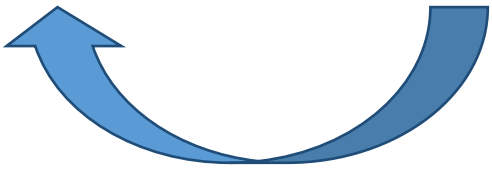
Do wykonania wystarczy śladowa ilość DNA – mniej niż 1µl.

Reakcja przebiega w termocyklerze przy użyciu mieszaniny reakcyjnej. Termocykler jest urządzeniem, zdolnym do szybkich, cyklicznych zmian temperatury. Aby rozpocząć łańcuchową reakcję polimerazy, należy wyizolować oraz oczyścić fragment DNA będący przedmiotem zainteresowania. Niezbędne do rozpoczęcia reakcji są startery (krótkie fragmenty DNA, komplementarne do sekwencji okalającej fragment, który będzie powielany).
Skład wspomnianej mieszaniny reakcyjnej:

1. Matryca – fragment DNA, który będzie powielany
2. Startery – wyznaczają miejsce amplifikacji
3. Trifosforany deoksynukleotydów – substraty, które służą do budowy nowych nici
4. Polimeraza DNA – enzym termostabilny, katalizuje przebieg reakcji
5. Bufor – zapewnia odpowiednie środowisko reakcji (pH, sila jonowa)

Etapy reakcji PCR





1. **DENATURACJA** (92 – 96 °C/ 15 s) – rozplecenie podwójnej helisy matrycowego DNA. Dochodzi do rozerwania wiązań wodorowych między komplementarnymi zasadami. Powstają dwa pojedyncze łańcuchy.

2. **ANNEALING** (45-65 °C) – tworzenie odcinków dwuniciowych, składających się z przygotowanych starterów – cząsteczek DNA komplementarnych do sekwencji DNA oskrzydlających gen mający ulec namnożeniu

3. **ELONGACJA** (72°C) – zachodzi właściwa synteza DNA i tym samym amplifikacja pożądanego genu. Polimeraza dobudowuje kolejne nukleotydy do starterów – następuje synteza nici komplementarnych do nici matrycowej. Kierunek syntezy: 5'→ 3'. Reakcja ta trwa zwykle 30 sekund.

Powyższy cykl jest powtarzany do momentu osiągnięcia w badanej próbce odpowiedniej ilości produktu DNA. Próbki po zakończonej reakcji nanieść na żel agarozowy, uprzednio krótko zworteksować.

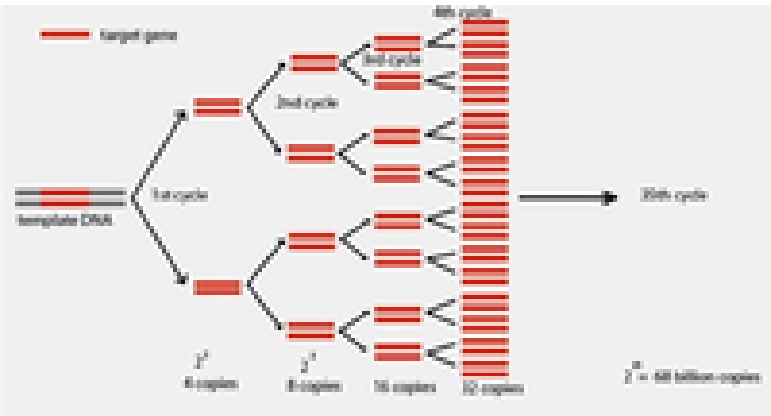
Zastosowanie PCR:
- badanie ekspresji genów
- wykrywanie kwasów nukleinowych patogenów: wykrywanie obecności i określanie stężenia wirusów i bakterii w surowicy
- genotypowanie
- wykrywanie GMO w paszach i żywności

Technika PCR stosowana jest w kilku różnych odmianach. Najczęściej stosowaną odmianą jest tzw. PCR w czasie rzeczywistym (Real- Time PCR). Pozwala na monitorowanie ilości produktu reakcji w czasie jej trwania, co odróżnia ją od klasycznej reakcji PCR. Dzięki temu cała procedura analizy jest stosunkowo szybka i pozwala wyeliminować etap szacowania produktu po zakończeniu reakcji. Umożliwia ona także wgląd w kinetykę reakcji, a co za tym idzie pozwala na oszacowanie ilości produktu na początku reakcji, co jest niemożliwe w konwencjonalnej metodzie PCR. Ponadto dzięki temu, że amplifikacja kwasów nukleinowych i detekcja produktu odbywa się w jednym zamkniętym naczyniu, ryzyko zanieczyszczenia badanej próby jest minimalne.

Monitorowanie przyrostu liczby kopii badanej sekwencji w czasie rzeczywistym możliwe jest dzięki znakowaniu starterów, sond oligonukleotydowych lub produktów amplifikacji

cząsteczkami zdolnymi do fluorescencji (fluorochromami). Używane metody znakowania wykazują odmienny poziom fluorescencji w połączeniu z badanym fragmentem DNA lub po prostu z fragmentami dwuniciowymi, dzięki czemu fluorescencja każdej próbki jest proporcjonalna do ilości zsyntetyzowanego produktu (im silniejsza fluorescencja, tym więcej kopii). Mierząc fluorescencję próbek po każdym cyklu reakcji można monitorować jej przebieg.

Ilościowy PCR pozwala również obliczyć początkową liczbę kopii badanego fragmentu DNA, jaka była obecna w próbce przed reakcją. W tym celu wykorzystuje się moment, w którym poziom fluorescencji barwnika przekroczy próg nazywany cyklem granicznym (Ct, z ang. *treshold cycle*) lub cyklem kwantyfikacji (Cq, z ang. *quantification cycle*). Im wcześniej poziom fluorescencji wzrósł do poziomu, który umożliwia wiarygodny odczyt, tym większa była początkowa ilość kopii badanej sekwencji w próbce na początku reakcji. W celu zbadania liczby kopii badanej sekwencji w próbie sporządza się serię rozcieńczeń roztworu o znanym stężeniu i liczbie kopii DNA, wyznacza się według nich krzywą standardową i mając dany punkt Ct na podstawie krzywej standardowej szacuje się liczbę cząsteczek.



Rysunek 1. Amplifikacja DNA