

## PCR - polymerázová řetězová reakce (princip metody)

PCR umožňuje získat požadovanou sekvenci bez klonování, navíc zcela specifickou. PCR využívá základních rysů replikace DNA:

Jako templát slouží ssDNA, podle níž je syntetizován komplementární řetězec.

K zahájení reakce je zapotřebí primer, který se připojuje na komplementární úseky DNA.

Tím je zároveň vymezen úsek DNA, který bude amplifikován.

Jako templáty pro syntézu mohou sloužit oba řetězce dsDNA, po předchozí denaturaci.

Primery se vybírají tak, aby se připojovaly k místům ohraničujícím z obou stran amplifikovaný úsek. Teoreticky lze získat  $2^n$  řetězců (kopií), což vede k nesmírně rychlé amplifikaci původní molekuly.

### *Provedení reakce*

Výchozím materiálem pro PCR je DNA obsahující sekvenci určenou k amplifikaci. Tuto sekvenci není nutné izolovat - výběr zajistí primery. Jako vzorek je možné použít i biologický materiál (DNA není nutné purifikovat).

Množství DNA jako výchozího materiálu je velmi nízké: obvykle postačuje méně než 1 mg genomové DNA, teoreticky postačuje jedna molekula.

Reakční směs obsahuje:

1. DNA 50 ng - 1  $\mu$ g  
mikroorganismy, tkáňové kultury, tělní tekutiny, biotické vzorky, stěry, vlasy, atd.
2. Primery. Primery pro PCR mívají velikost 10 - 40 bp s obsahem GC mezi 40% - 70%. 3' konec primeru nesmí být komplementární k žádné části sebe sama (self-complementarity). Primer nesmí obsahovat palindromy a tvořit stabilní sekundární struktury. Oba primery by měly mít přibližně stejný obsah GC a podobnou teplotu annealingu ( $T_a$ ). K navrhování primerů se používají počítačové programy, z nichž některé jsou volně dostupné.
3. dNTP ve formě Na nebo Li solí, koncentrace v reakci je 0,1 - 0,2 mM.
4.  $Mg^{+}$  ionty. Přítomnost  $Mg$  iontů v reakci je nezbytná, jejich množství závisí na množství DNA a dNTP v reakci. V jejich nepřítomnosti se netvoří žádný produkt, v nadbytku vznikají nespecifické produkty. Optimální koncentrace se stanovuje experimentálně pro každý pár primerů zvlášť.
5. DNA polymerázu  
*Taq*     *Thermus aquaticus*  
*Tth*     *Thermus thermophilus*  
*Tma*     *Thermotoga maritima*

### *Princip:*

1. denaturace 95 °C (separace řetězců)
2. připojení primerů (30 - 65 °C) teplota určuje specifčnost a závisí na sekvenci primeru.  $T_a = T_m - 5$  °C
3. polymerační reakce (65 - 75 °C)
4. nově syntetizované řetězce slouží jako templáty pro další cyklus

Cyklické střídání teplot jednou založené směsi zajišťuje průběh reakce PCR, provádí se v termocyklerech, většinou se provádí 25 - 60 cyklů. Jako polymeráza se používá *Taq* DNA polymeráza z *Thermus aquaticus*, která odolává teplotě 94 °C.

## Protokol PCR

Detekce genu pro: .....

Režim termocykleru:

Složky reakční směsi	Zásobní koncentrace	Výsledná koncentrace	Množství přidané do 25 $\mu$ l 1 vzorek	Množství přidané do $\mu$ l ..... vzorků
<b>Deionizovaná sterilní H<sub>2</sub>O</b>				
<b>Pufř pro PCR bez MgCl<sub>2</sub></b>	10 $\times$	1 $\times$		
Pufř pro PCR s 15mM MgCl <sub>2</sub>				
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	25 mM / 50 mM	1,5 mM		
<b>dNTP</b>	10 $\times$ / 5 mM	1 $\times$ / 200 $\mu$ M		
BSA / želatina				
<b>Primer F</b>	100 $\mu$ M / 10 $\mu$ M	0,4 $\mu$ M		
<b>Primer R</b>	100 $\mu$ M / 10 $\mu$ M	0,4 $\mu$ M		
<b>Taq DNA-polymeráza</b>	5 U $\mu$ l <sup>-1</sup>	1 U		
<b>Templátová DNA</b>		50 ng		

## ŘEŠENÍ PROBLÉMŮ PŘI STANDARDNÍ PCR

Problém	Možná příčina	Doporučení
Nevzniká produkt	Nevyvážená reakce	<ul style="list-style-type: none"> <li>Kontrola koncentrace jednotlivých složek</li> </ul>
	Teplotní podmínky	<ul style="list-style-type: none"> <li>Kontrola nastavení cyklů</li> </ul>
	Nízká koncentrace templátu	<ul style="list-style-type: none"> <li><b>Zvýšit koncentraci templátové DNA</b></li> </ul>
	Koncentrace primeru nebo jeho sekvence	<ul style="list-style-type: none"> <li>Optimalizovat koncentraci primeru</li> <li>Navrhnout primer s novou sekvencí</li> </ul>
	Ruzné faktory	<ul style="list-style-type: none"> <li><b>Testovat reakci s pozitivní kontrolou a funkčními primery</b></li> <li>Začít s novými roztoky, H<sub>2</sub>O a enzymem</li> </ul>
	Nízká kvalita templátu (degradovaný, kontaminovaný, obsahující inhibitory)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Použít primery, které amplifikují kratší úseky</li> <li>Přidat pomocné látky (DMSO)</li> <li><b>Optimalizovat koncentraci Mg<sup>2+</sup></b></li> <li>Připravit nový templát</li> <li><b>Zamezit častému zmrazování a rozmrazování templátu</b></li> </ul>
	Nízká účinnost polymerázy	<ul style="list-style-type: none"> <li>Používat pozitivní kontrolu</li> <li><b>Zvýšit počet cyklů</b></li> <li>Zvýšit koncentraci enzymu</li> <li><b>Použít jinou polymerázu</b></li> </ul>
Produkt není čistý	Vzniká sekundární amplifikační produkt	<ul style="list-style-type: none"> <li>Kontrola koncentrace složek reakce</li> <li>Optimalizovat koncentraci Mg<sup>2+</sup></li> <li>Optimalizovat koncentraci primerů</li> <li><b>Snížit počet cyklů</b></li> <li><b>Smížit koncentraci templátu</b></li> </ul>
Vznikají četné nesespecifické produkty	Nesespecifická vazba primeru	<ul style="list-style-type: none"> <li><b>Použít vyšší teplotu T<sub>a</sub></b></li> <li>Optimalizovat koncentraci primerů</li> <li>Použít „hot start“</li> <li><b>Narhnout nové primery</b></li> </ul>

# Polymerázová řetězová reakce

PCR (Polymerase Chain Reaction)

1

## Princip PCR

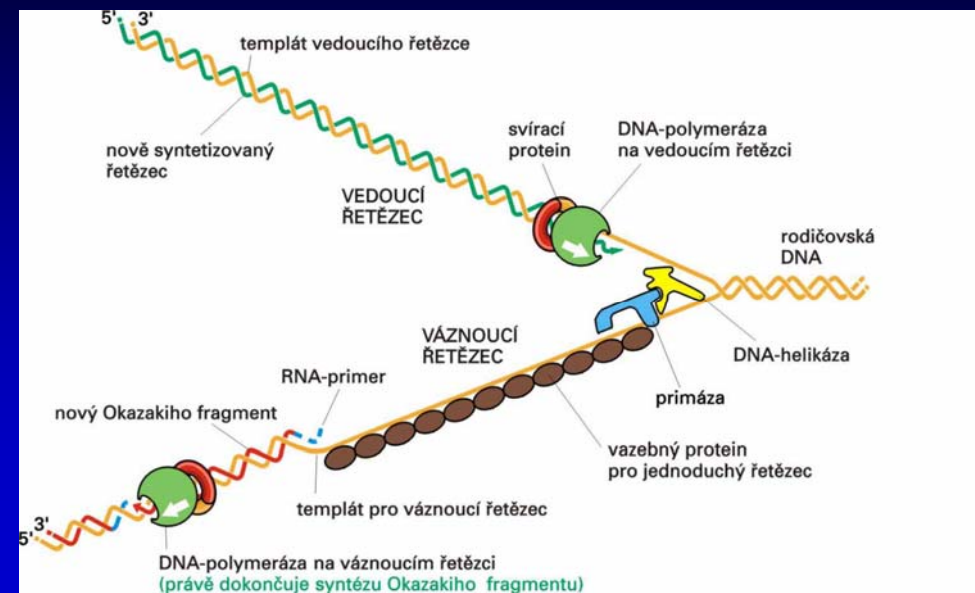
- Zavedení PCR v roce 1983 (Kary Mullis)
  - ◆ Publikace
  - ◆ Nobelova cena
- Metoda pro mnohonásobné zmnožení (amplifikaci) specifického úseku DNA in vitro založená na principu replikace.
- K opakující se enzymové syntéze komplementárních řetězců vybraných úseků dvouřetězcové DNA dochází po připojení dvou primerů vázajících se na protilehlé řetězce DNA tak, že jejich 3'-OH-konce směřují proti sobě.
- PCR umožňuje získat požadovanou zcela specifickou sekvenci bez klonování.

2

- PCR využívá základních rysů replikace (enzymatické syntézy) DNA:
  - ◆ Jako templát slouží ssDNA, podle níž je syntetizován komplementární řetězec.
  - ◆ K zahájení reakce je zapotřebí primer, který se připojuje na komplementární úseky DNA. Tím je zároveň vymezen úsek DNA, který bude amplifikován.
  - ◆ Jako templáty pro syntézu mohou sloužit oba řetězce dsDNA, po předchozí denaturaci.
- Primery se vybírají tak, aby se připojovaly k místům ohraničujícím z obou stran amplifikovaný úsek.
- Teoreticky lze získat  $2^n$  řetězců (kopií).
- Předpoklady pro zavedení PCR
  - ◆ Syntéza oligonukleotidů
  - ◆ Vlastní myšlenka (K. Mullis)
  - ◆ Teplotně stabilní DNA polymeráza
  - ◆ Automatické termocyklery

3

## Replikace DNA *in vivo* vyžaduje mnoho enzymů



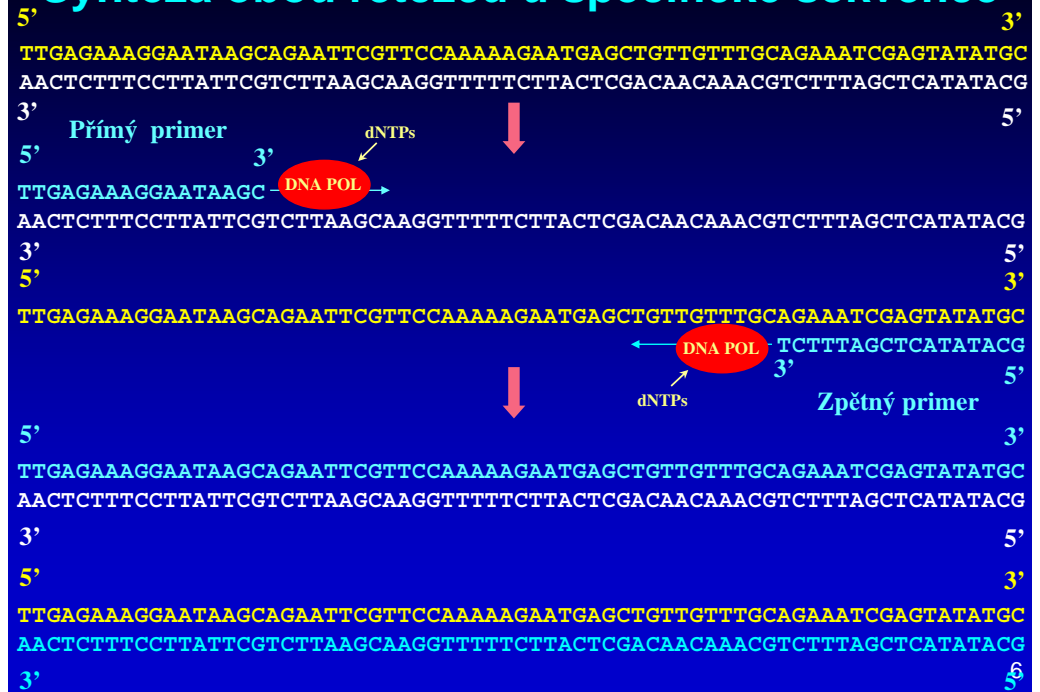
4

# Replikace DNA *in vitro* vyžaduje pouze jeden enzym

- **Reakční směs obsahuje:**
  - ◆ **Templátovou nukleovou kyselinu** (DNA nebo RNA).
    - ◆ Množství DNA jako výchozího materiálu je velmi nízké: obvykle postačuje méně než 1 μg genomové DNA, teoreticky postačuje jedna molekula.
      - Kvalita templátu ovlivňuje výsledek PCR.
      - Velké množství RNA může vázat ionty Mg<sup>2+</sup>
      - znečištěný templát může obsahovat inhibitory PCR
    - ◆ Zdroj: mikroorganismy, buňky z tkáňových kultur, tělní tekutiny, bioptické vzorky, stěry, vlasy, atd...
- **Primery.** Chemicky syntetické oligonukleotidy o velikost 10 - 30 nukleotidů.
- **dNTP** ve formě Na<sup>+</sup> nebo Li<sup>+</sup> solí
- **Mg<sup>2+</sup> ionty** tvoří rozpustný komplex s dNTP a vytvářejí substrát, který rozpoznává DNA polymeráza.
- **Termostabilní DNA polymerázu**, která odolává teplotám až 98 °C.
  - ◆ Taq *Thermus aquaticus*
  - ◆ Tth *Thermus thermophilus*
  - ◆ Tma *Thermotoga maritima*
  - ◆ Pfu *Pyrococcus furiosus*
  - ◆ Pwo *Pyrococcus woesei*

5

# Syntéza obou řetězců u specifické sekvence



# REAKČNÍ PODMÍNKY PCR

1. Počáteční denaturace DNA. Důležitá je kompletní denaturace templátu, obvykle postačuje zahřátí směsi na 2 – 5 min / 95 °C. V případě, že dojde pouze k částečné denaturaci, molekuly DNA velice rychle renaturují a to vede k nespecifické vazbě primerů („self-priming“) a možným falešným výsledkům.

## Vlastní řetězová reakce:

2. Denaturační krok (separace řetězců) : 94 – 95 °C / 20 – 45 s, záleží na objemu reakce, tloušťce stěn zkumavek. Nedostatečně denaturovaná DNA neumožňuje přístup primerům, naopak příliš dlouhá denaturace snižuje aktivitu DNA polymerázy (stabilní cca 2 hod / 98 °C).
3. Připojení primerů (55 - 65 °C / 30 – 90 s) teplota určuje specifickou závislost na T<sub>m</sub> primeru a templátu. Pro oba primery by měla být T<sub>m</sub> podobná. Ta se optimalizuje v teplotním gradientu nebo se stanovuje empiricky.
4. Prodlužování primeru (polymerační reakce) při standardní PCR probíhá při 72 °C / 45 – 90 s. Taq DNA polymeráza syntetizuje DNA při této teplotě rychlostí cca 60 bází/s. Nově syntetizované řetězce slouží jako templáty pro další cyklus.

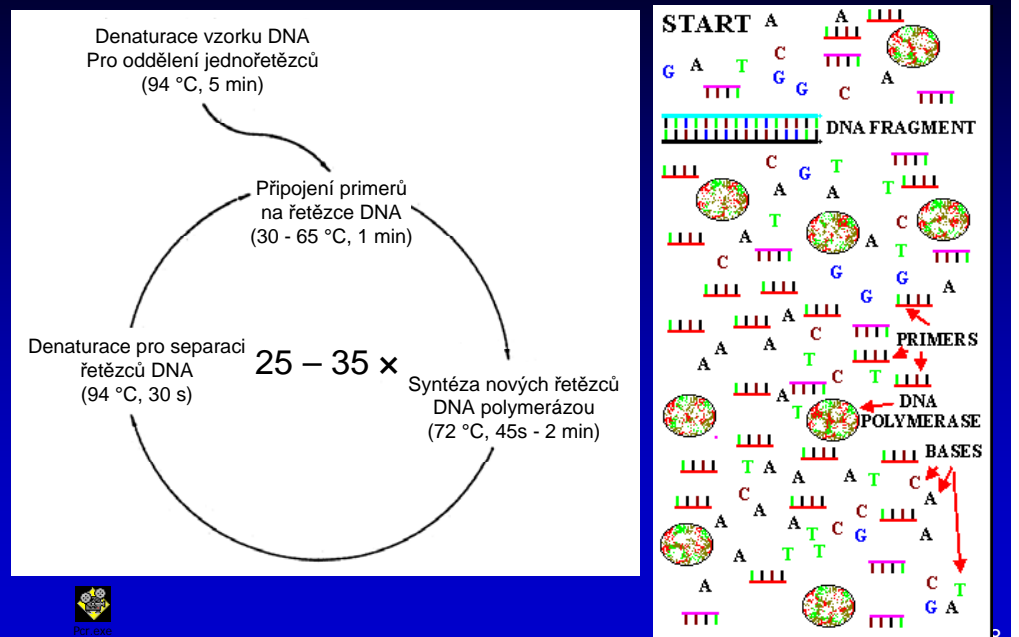
Cyklické střídání teplot jednou založené směsi zajišťuje průběh reakce PCR, provádí se v termocyklerech, většinou se provádí 25 - 35 cyklů.

5. Závěrečná extenze se provádí obvykle po posledním cyklu (72 °C / 5 min) a slouží k dokončení syntézy a renaturaci jednořetězcových produktů.

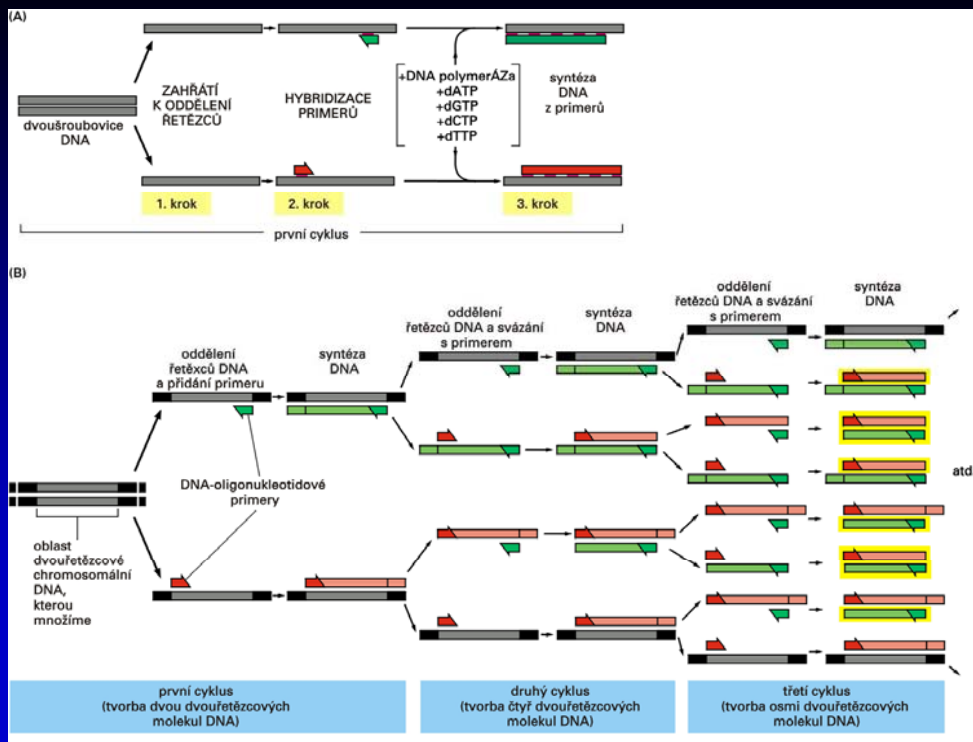
30x

7

# REAKČNÍ PODMÍNKY PCR



3



9

# Počet nově syntetizovaných molekul dsDNA při jednotlivých cyklech PCR

$$2^n - 1$$

Cyklus číslo	Počet nových dvouřetězcových molekul
1	1
2	3
3	7
4	15
5	31
6	63
7	127
8	255
9	511
10	1 023
11	2 047
12	4 095
13	8 191
14	16 383
15	32 767
16	65 535
17	131 071
18	262 143
19	524 287
20	1 048 575
21	2 097 151
22	4 194 303
23	8 388 607
24	16 777 215
25	33 554 431
26	67 108 863
27	134 217 727
28	268 435 455
29	536 870 911
30	1 073 741 823

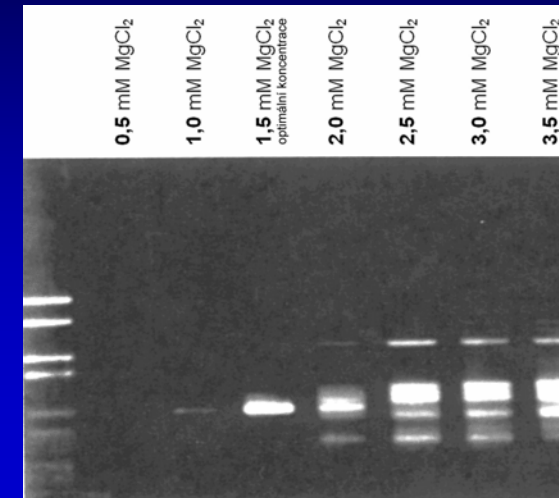
10

## KONCENTRACE JEDNOTLIVÝCH SLOŽEK PŘI STANDARNÍ PCR REAKCI

- **DNA.** Pro standardní PCR se doporučuje následující množství DNA podle velikosti templátu:
  - ♦ lidská genomová DNA: 100 - 500 ng
  - ♦ bakteriální DNA: 1 - 10 ng
  - ♦ plazmidová DNA: 0,1 - 1 ng
- **Primery.** Sekvence a koncentrace primeru významně ovlivňuje výsledek PCR.
  - ♦ Optimální koncentrace je mezi 0,1 a 0,6  $\mu\text{M}$ .
  - ♦ U některých systémů může vyšší koncentrace (až 1  $\mu\text{M}$ ) zlepšit výsledky.
  - ♦ Nižší koncentrace vede k předčasnému vyčerpání primerů a snížení výtěžku.
- **dNTP.** Výsledná koncentrace se může pohybovat v rozmezí 50 - 500  $\mu\text{M}$  (pro každý nukleotid)
  - ♦ Nejběžnější koncentrace dNTP je 200  $\mu\text{M}$ . Při zvýšení koncentrace dNTP je třeba zvýšit koncentraci  $\text{Mg}^{2+}$  iontů.

11

- **$\text{MgCl}_2$ .** Volné  $\text{Mg}^{2+}$  ionty ovlivňují aktivitu enzymu a zvyšují hodnotu  $T_m$  u dsDNA.
  - ♦ Pro dosažení nejlepšího výsledku vždy stanovujeme koncentraci  $\text{Mg}^{2+}$  experimentálně.
  - ♦ Optimální koncentrace může kolísat od 1 mM do 5 mM.
  - ♦ Nejčasteji používaná koncentrace je 1,5 mM (pro 200  $\mu\text{M}$  dNTP).

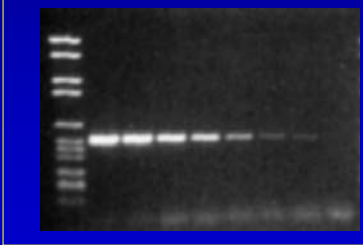


12



- **DNA polymeráza.**
  - ◆ Obvyklá koncentrace je 0,5 – 2,5 jednotek / 50  $\mu$ l.
- **pH** je dané reakčním pufrům, obvykle odpovídá pH 8,3 – 9,0.
- **Přidatné látky** mohou v některých případech ovlivnit účinnost a specifčnost PCR reakce. Jejich vliv se obvykle určuje experimentálně:
  - ◆ albumin z bovinního séra (BSA) (100 ng/50  $\mu$ l)
  - ◆ dimetylsulfoxid (DMSO) (2- 10 % v/v) – redukce nespecifické vazby primeru
  - ◆ detergenty (Triton X-100, Tween 20)
  - ◆ betain (0,5 – 2 M)
  - ◆ želatina
  - ◆ glycerol (1 – 5 % v/v)
  - ◆ spermidin
  - ◆ protein 32 genu fága T4

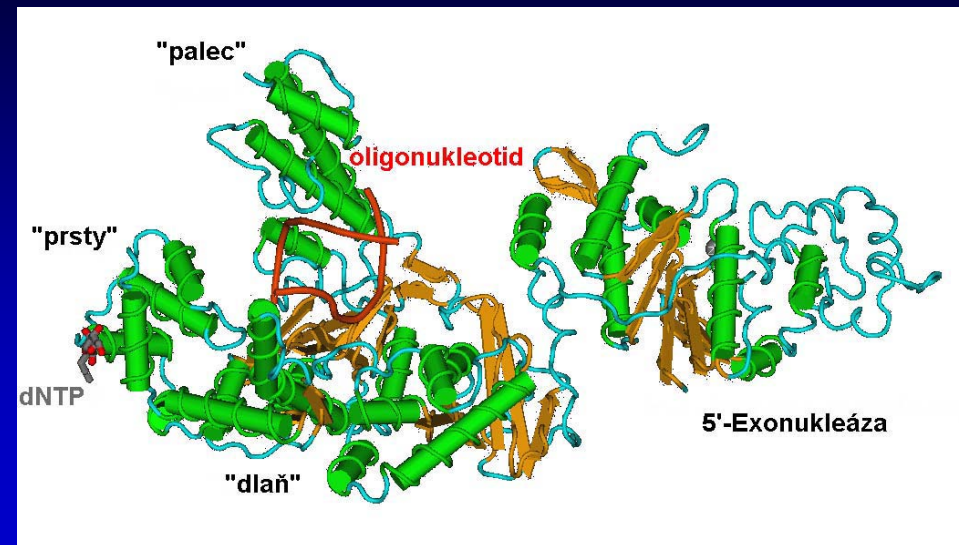
optimalizace PCR přidatnými látkami:



- **Minerální olej** – zabraňuje vypařování během reakce

13

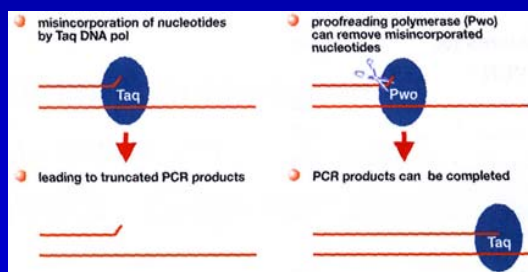
## Struktura Taq DNA polymerázy



14

## BEZCHYBNOST SYNTÉZY

- Replikace s Taq DNA-polymerázou neprobíhá bezchybně, DNA-polymeráza příležitostně zařazuje do nově syntetizovaných řetězců chybné (nekomplementární) nukleotidy.
  - ◆ Buňka má schopnost tyto báze odstraňovat opravnými mechanismy.
  - ◆ *In vitro* Taq DNA-polymeráze tato vlastnost chybí.
- Frekvence chbného začleňování za podmínek amplifikace *in vitro* je asi  $2 \times 10^{-4}$ .
- Chybné začleňování je důležité, pokud jsou PCR produkty klonovány, neboť každý klon je odvozen z jedné molekuly DNA. Chybně začleněné báze (mutace) potom obsahuje celé potomstvo.
- Řešení problému: použití dvojice DNA polymeráz, z nichž jedna má opravné mechanismy (proofreading).



15

## Základní optimalizace PCR

Složka	Nižší stringence	Vyšší stringence
Teplota pro připojení primeru	↓	↑
MgCl <sub>2</sub>	↑	↓
KCl	↑	↓
Enzym, Primer	↑	↓
Formamid	↓	↑

- Zpravidla se optimalizuje
  - ◆ Teplota pro připojení primeru v termocykleru s teplotním gradientem
  - ◆ Koncentrace MgCl<sub>2</sub>

16

## Stanovení teploty pro připojení primeru

- Teplota pro připojení primeru (annealing temperature) zkr.  $T_a$ . Teplota používaná pro teplotní hybridizaci molekul primeru a matricové DNA in vitro. Optimální teplota pro připojení primeru při PCR se vypočítá podle vztahu:

$$T_a = 0,3 \times T_m^{\text{Primer}} + 0,7 \times T_m^{\text{Produkt}} - 25$$

kde  $T_m^{\text{Primer}}$  je hodnota  $T_m$  nejméně stabilního páru primer-matrice a  $T_m^{\text{Produkt}}$  je hodnota  $T_m$  amplifikačního produktu.

- Orientačně lze vypočítat  $T_a$  podle vztahu:

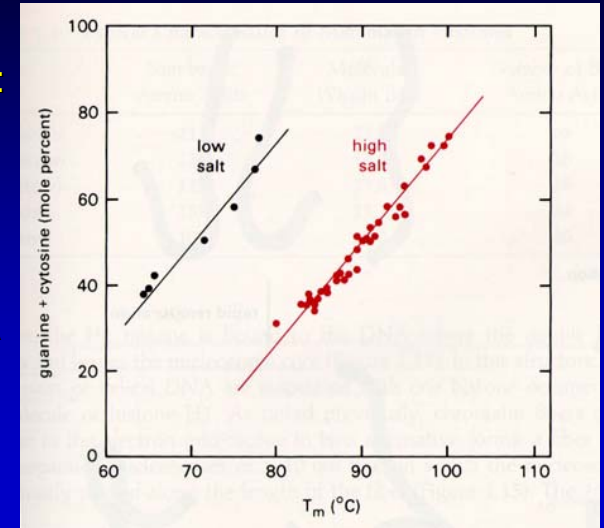
$$T_a = 2(A+T) + 4(G+C) - 5 \text{ °C} = T_m - 5 \text{ °C}$$

17

## Hodnota $T_m$

- $T_m$  závisí na třech základních faktorech:

- Zastoupení bází
- Složení roztoku
  - Koncentrace solí
  - pH
- Délka molekuly DNA



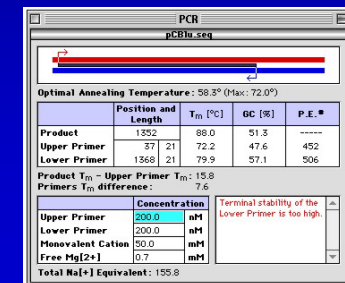
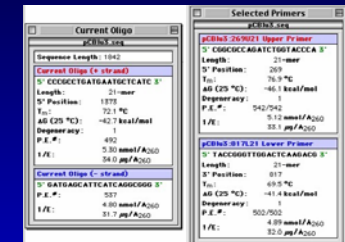
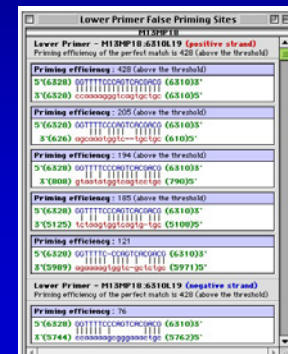
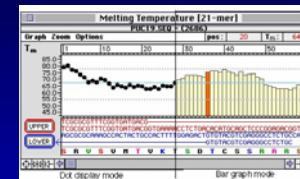
18

## NÁVRH PRIMERŮ PRO STANDARDNÍ PCR

- 18 – 25 bází dlouhé
- neobsahují vnitřní sekundární struktury
- obsahují 40 – 60 % G+C
- mají rovnoměrnou distribuci oblastí bohatých na G/C a A/T páry
- nejsou komplementární navzájem na 3'-koncích, takže nevytvářejí navzájem nebo samy se sebou duplexy
- na matricové DNA nemají falešná vazebná místa
- mají  $T_m$  teplotu 55 – 65 °C

19

Pro návrh primerů se obvykle používá specializovaný software (některý je volně dostupný na internetu).

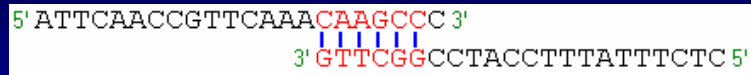


20

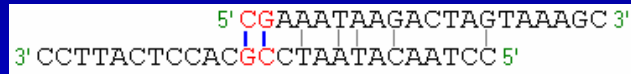


## PŘÍKLADY STRUKTUR VYTVÁŘENÝCH PRIMERŮ, KTERÉ JE NUTNÉ ZOHLEDNIT PŘI JEJICH NÁVRHU

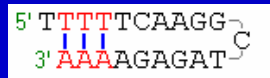
- Chybně navržená dvojice primerů, která vytváří stabilní duplex na 3'-konci:



- Správně navržená dvojice primerů, která vytváří pouze málo stabilní duplex na 5'-konci; na 3'-konci je G nebo C zaručující stabilní párování s templátem:

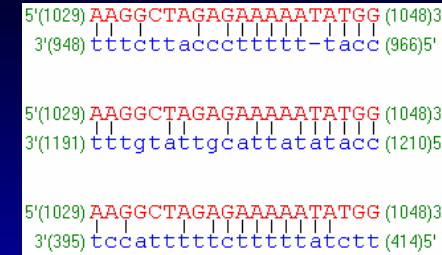


- Chybně navržený primer, vytvářející vlásenku:



21

- Nesprávně navržený primer s falešnými vazebnými místy na templátové DNA:



- Správně navržený primer, který nemá falešná vazebná místa na templátu:



22

## „HOT START“ PCR

- „Hot-start“ PCR významně ovlivňuje specifičnost, citlivost a výtěžek reakce
- Princip:
  - ◆ Při „hot-start“ PCR jsou určité složky reakční směsi odděleny od ostatních, dokud teplota ve zkumavce nepřekročí optimální teplotu pro připojení primeru (obvykle 55 ° - 65 °C).
  - ◆ DNA polymeráza je v této nekompletní reakční směsi nefunkční.
  - ◆ Nedochozí k prodlužování nespecificky navázaných primerů během doby než je dosažena teplota  $T_a$ .

23

- Separace důležitých složek reakční směsi je dosažena některým z následujících způsobů:

### ◆ Manuálně

- ◆ Některé složky jako DNA polymeráza nebo  $Mg^{2+}$  jsou vynechány v původní reakční směsi a přidány manuálně po dosažení teploty  $> 70$  °C. Nevýhodou je možnost kontaminace a možná ztráta reprodukovatelnosti.

### ◆ Fyzikální separace

- ◆ Reakční komponenty jsou rozděleny do dvou směsí, které jsou odděleny bariérou (vosková přepážka, nebo voskové korálky obsahující  $MgCl_2$ ). Během počáteční denaturace vosk roztaje a umožní smíchání reakčních složek.

### ◆ Protilátky proti DNA polymeráze

- ◆ Přídavek teplotně nestabilních protilátek umožní počáteční inaktivaci polymerázy.

### ◆ Chemická modifikace polymerázy

- ◆ Přídavek teplotně nestabilních látek, které se vážou na určité aminokyselinové zbytky blokují enzym (ten je potom při pokojové teplotě inaktivní). K aktivaci enzymu dochází při počáteční denaturaci („FastStart Taq DNA polymeráza“).

### ◆ Další inhibitory

- ◆ např. oligonukleotidy specificky se vážající na polymerázu

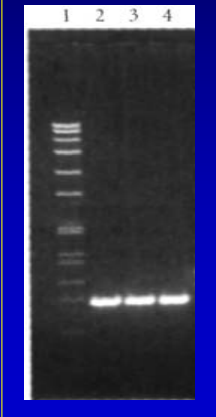
24

## DETEKCE AMPLIFIKOVANÉHO PRODUKTU PCR

1. Stanovení fyzikální velikosti produktu gelovou elektroforézou (agaróza, polyakrylamid). Detekce obarvením a pozorování pod UV světlem.
2. Štěpení produktu restrikcími enzymy a posouzení spektra vznikajících restrikcími fragmentů (PCR-RFLP)
3. Elektroforetická separace produktů za specifických podmínek pro detekci sekvenčních polymorfizmů
  - ◆ DGGE – denaturační gradientová gelová elektroforéza
  - ◆ SSCP – analýza polymorfizmu konformace jednořetězcových forem

Příklad standardní gelové elektroforézy s produkty PCR v agarózovém gelu.

1 = hmotnostní st.  
2 - 4 = produkty PCR



25

## DETEKCE AMPLIFIKOVANÉHO PRODUKTU PCR

4. hybridizací s neradioaktivně značenou sondou komplementární k části sekvence amplifikovaného úseku a detekcí enzymoimunoanalýzou v mikrotitrační destičce (PCR-EIA/ELISA), hybridizační sonda může být následně amplifikována (PCR-OLA)
5. imobilizací PCR-produktů na membráně a tečkovou hybridizací se značenými alelově-specifickými oligonukleotidy (ASO) nebo zpětnou tečkovou hybridizací s různými ASO imobilizovanými na membráně,
6. hybridizací na DNA-čipech,
7. stanovením sekvence DNA.

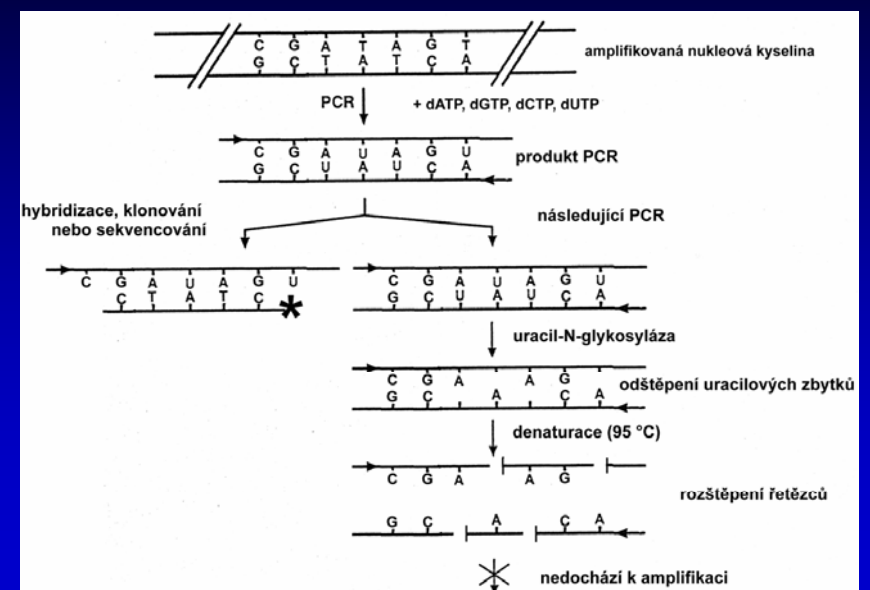
26

## Kontaminace při PCR

- Vynikající citlivost PCR může být ovlivněna kontaminací i jedinou molekulou exogenní nebo neznámé DNA.
- Pro minimalizaci falešných pozitivních výsledků je doporučeno:
  - ◆ používání autoklávaných roztoků
  - ◆ fyzikální separace používaných PCR-reagencií od templátové DNA a PCR-produktů
  - ◆ příprava reagií i vzorků do alikvotních částí
  - ◆ používání UV-světla k odstranění exogenních nukleových kyselin na pracovní ploše
  - ◆ používání jednorázových rukavic
  - ◆ přidávání DNA do reakce jako poslední
  - ◆ pečlivá volba pozitivních, negativních a vnitřních kontrol
- Vyloučení kontaminace je důležité zejména tam, kde je potřeba použít vysokého počtu amplifikačních cyklů, aby bylo dosaženo požadovaného produktu
  - ◆ nízkokopiových templátů DNA
  - ◆ degradovaných vzorků.
- V případě pochybnosti je nejlepším přístupem opakování experimentu s úzkostlivou pozorností k detailům a kontrolám.
- Jako zdroj kontaminace DNA je nejčastěji uváděn:
  - ◆ přenos kontaminující DNA z dříve amplifikovaných produktů PCR,
  - ◆ vzájemná kontaminace zdrojových materiálů,
  - ◆ kontaminace plazmidem z rekombinantního klonu, který obsahuje cílovou sekvenci.

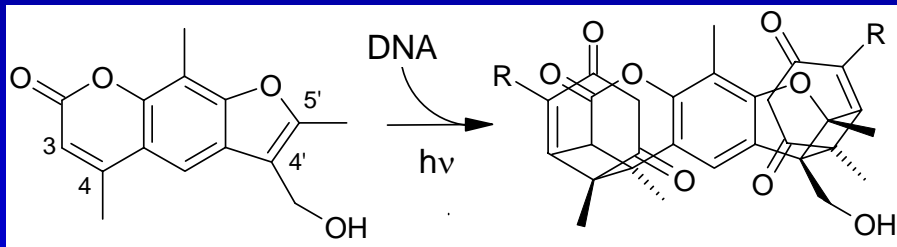
27

Jako prevence před přenosem kontaminující DNA je v reakční směsi rutinně používána náhrada dTTP za dUTP. Následným působením uracil-N-glykosylázy na reakční směs před zahájením amplifikace.



28

- Alternativně lze amplifikační produkty PCR inaktivovat fotochemicky pomocí derivátů psoralenu nebo isopsoralenu,
- Furokumarinové sloučeniny interkalují se mezi páry bází DNA.
- Pokud jsou tyto látky excitovány UV-světlem o vlnové délce 320-400 nm, kovalentně se vážou na nukleové kyseliny a tvoří cyklobutanové adukty s pyrimidinovými bázemi, které blokují reakci s DNA-polymerázou



29

## ŘEŠENÍ PROBLÉMŮ PŘI STANDARDNÍ PCR

Problém	Možná příčina	Doporučení
Nevzniká produkt	Nevyvážená reakce	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Kontrola koncentrace jednotlivých složek</li> </ul>
	Teplotní podmínky	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Kontrola nastavení cyklů</li> </ul>
	Nízká koncentrace templátu	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Zvýšit koncentraci templátové DNA</li> </ul>
	Koncentrace primeru nebo jeho sekvence	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Optimalizovat koncentraci primeru</li> <li>■ Navrhnout primer s novou sekvencí</li> </ul>
	Různé faktory	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Testovat reakci s pozitivní kontrolou a funkčními primery</li> <li>■ Začít s novými roztoky, H<sub>2</sub>O a enzymem</li> </ul>
	Nízká kvalita templátu (degradovaný, kontaminovaný, obsahující inhibitory)	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Použít primery, které amplifikují kratší úseky</li> <li>■ Přidat pomocné látky (DMSO)</li> <li>■ Optimalizovat koncentraci Mg<sup>2+</sup></li> <li>■ Připravit nový templát</li> <li>■ Zamezit častému zmrazování a rozmrazování templátu</li> </ul>

30

## ŘEŠENÍ PROBLÉMŮ PŘI STANDARDNÍ PCR

Problém	Možná příčina	Doporučení
Nevzniká produkt	Nízká účinnost polymerázy	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Používat pozitivní kontrolu</li> <li>■ Zvýšit počet cyklů</li> <li>■ Zvýšit koncentraci enzymu</li> <li>■ Použít jinou polymerázu</li> </ul>
Produkt není čistý	Vzniká sekundární amplifikační produkt	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Kontrola koncentrace složek reakce</li> <li>■ Optimalizovat koncentraci Mg<sup>2+</sup></li> <li>■ Optimalizovat koncentraci primerů</li> <li>■ Snížit počet cyklů</li> <li>■ Snížit koncentraci templátu</li> </ul>
Vznikají četné nescifické produkty	Nescifická vazba primeru	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Použít vyšší teplotu T<sub>a</sub></li> <li>■ Optimalizovat koncentraci primerů</li> <li>■ Použít „hot start“</li> <li>■ Navrhnout nové primery</li> </ul>

31

## VYUŽITÍ METODY PCR

- Základní výzkum**
  - ◆ izolace genů nebo jejich částí
  - ◆ sekvencování DNA
  - ◆ mutagenéza in vitro
  - ◆ modifikace konců DNA
  - ◆ analýza (selektce) klonů z genových knihoven
  - ◆ příprava značených sond
- Aplikovaný genetický výzkum**
  - ◆ prenatální diagnostika (dědičných chorob)
  - ◆ detekce mutací v genech
  - ◆ studium polymorfizmu genů (např. RAPD)
  - ◆ populační genetika
- Využití v klinických disciplínách**
  - ◆ detekce patogenních mikroorganismů (baktérií, virů, prvoků, hub)
  - ◆ identifikace onkogenů
  - ◆ typizace nádorů
  - ◆ stanovení pohlaví
- Využití v praxi**
  - ◆ archeologie
  - ◆ soudnictví
  - ◆ kriminalistika

32