



## Instrukcja do ćwiczeń „Podstawy Biotechnologii”

Technologia Żywności i Żywienie Człowieka

r II

s. IV

Ćwiczenie 4.

Reakcja PCR

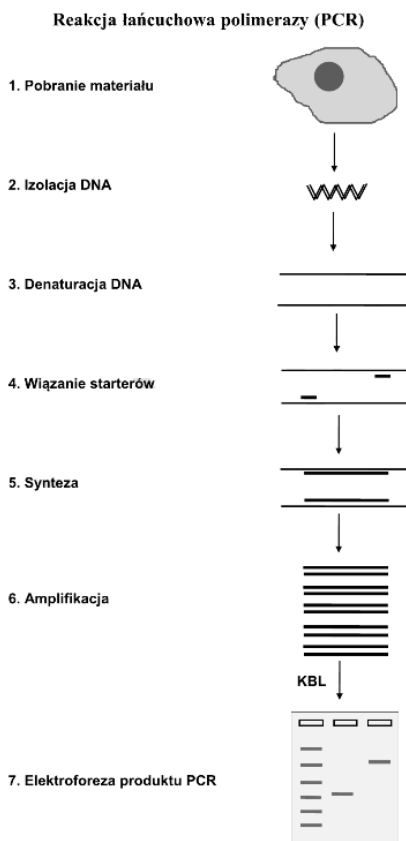
prowadzący

dr inż. Wojciech Sawicki

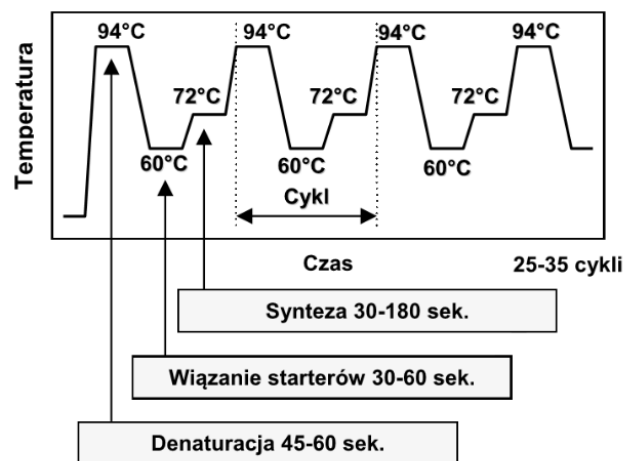
W drugiej połowie lat 80-tych Kary Mullis i jego współpracownicy z Cetus Corporation opracowali metodę PCR, czyli łańcuchową reakcję polimerazy (ang. *polymerase chain reaction*). Technika ta znalazła zastosowanie praktyczne w każdej dziedzinie nauk przyrodniczych.

Technika ta umożliwia produkcję dużej liczby specyficznych fragmentów DNA. Pozwala to w krótkim czasie na amplifikację *in vitro* unikalnego regionu pojedynczej cząsteczki DNA w ilościach, które są wystarczające by mogły być użyte m.in. do klonowania, sekwencjonowania, czy analizie restrykcyjnej itp.

W reakcji PCR następuje enzymatyczna amplifikacja (powielanie) fragmentu DNA *in vitro*, który leży pomiędzy dwoma regionami o znanej sekwencji. Sama reakcja składa się z wielu cykli syntezy DNA z wykorzystaniem dwóch starterów (primerów) flankujących określony odcinek DNA. Startery mają różne sekwencje i są komplementarne do sekwencji leżących na przeciwległych niciach DNA.



### Schemat reakcji PCR



R. Słomski (red.). *Analiza DNA teoria i praktyka*, Poznań 2008

ISBN 978-83-7160-496-6, © Copyright by Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, Ryszard Słomski, Poznań 2008

Aby przeprowadzić reakcję PCR niezbędne są następujące reagenty:

1. Jednoniciowa matryca DNA.
2. Para starterów (sekwencji oligonukleotydów komplementarnych do końców zdefiniowanej sekwencji matrycowego DNA).
3. Trojfosforany deoksyrybonukleotydów (dNTP)

#### 4. Enzym polimeraza DNA.

Każdy cykl reakcji składa się z trzech etapów (ryc):

1. **Termiczna denaturacja** powielanego DNA (temp. 94 - 95°C) w obecności nadmiaru każdego z oligonukleotydów i czterech dNTP.
2. **Hybrydyzacja primerów** do sekwencji komplementarnej z matrycą w temperaturze 40 - 60°C przez 20 do 40 sekund.
3. **Wydłużanie startera** od końca 3' przez sukcesywne dosyntetyzowanie dNTP w temperaturze 72°C. Proces ten jest katalizowany przez polimerazę DNA.

### PROTOKÓŁ WYKONANIA PCR /identyfikacja *Listeria monocytogenes*/

1. Wszystkie komponenty reakcji należy rozmrozić tuż przed wykonywaniem analizy. Enzym – polimerazę Taq – należy przechowywać w -18°C / -22°C do momentu dodawania go do mieszaniny reakcyjnej.
2. Po rozmrożeniu komponentów reakcji należy je wymieszać w celu ujednoczenia stężenia komponentów.
3. Reakcję PCR wykonuje się w probówkach typu Eppendorf 0.2 mL. Mieszanina reakcyjna ma objętość 25µL/próbę.

Uwaga: Komponenty reakcji należy dodawać w podanej kolejności.

| Reagent                 | Ilość na jednostkową reakcję (25µL) w µL | Stężenie końcowe |
|-------------------------|--|------------------|
| 2.5 mM dNTP mix         | 2.0                                      | 2.5 mM każdy     |
| 25 mM MgCl <sub>2</sub> | 0.5                                      | 1-4 mM           |
| Bufor                   | 2.0                                      | 1X               |
| P1                      | 0.75                                     | 10pM             |
| P2                      | 0.5                                      | 10pM             |
| Taq                     | 1.0                                      | 1U/1µL           |
| H <sub>2</sub> O        | 13.25                                    | -                |
| DNA                     | 5.0                                      | 10pg - 1µg       |

4. Po sporządzeniu mixu reakcyjnego dla badanej próby dodajemy po 5µL badanego DNA – patrz tabelka.
5. Probówki zamykamy i przenosimy do termocyklera.

#### Używane startery

|             |                          |  |                 |
|-------------|--------------------------|--|-----------------|
| <b>Mar1</b> | ggg CTT TAT CCA TAA AATA | Identyfikacja gatunkowa / gen <b>iap</b> | <b>453 p.z.</b> |
| <b>Mar2</b> | TTg gAA gAA CCT TgA TTA  |  |                 |

Cocolin L., Manzano M., Cantoni C., Comi G. 1997. A nested PCR method to detect *Listeria monocytogenes* in artificially contaminated blood specimens. *Research in Microbiology*. Vol. 148(6), pp. 485-490.

[http://dx.doi.org/10.1016/S0923-2508\(97\)88346-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0923-2508(97)88346-5)

### REAKCJA PCR

Termocykler ustawiamy na następujący program:

|                               |                      |            |
|-------------------------------|----------------------|------------|
| <b>Wstępna denaturacja</b>    | <b>95°C - 3 min.</b> | } 35 cykli |
| <b>Denaturacja</b>            | 94°C - 30 sek.       |            |
| <b>Przyłączanie starterów</b> | 62°C - 30 sek.       |            |
| <b>Wydłużanie DNA</b>         | 72°C - 30 sek.       |            |
| <b>Końcowe wydłużanie</b>     | 72°C - 5 min.        |            |