

Basisprincipes van polymerasekettingreactie (PCR)



Agenda

Basisprincipes van moleculaire biologie

Basisprincipes PCR, deel I

Definitie van PCR

De fasen van PCR

Basisprincipes PCR, deel II

Definitie van realtime PCR

Kwalitatieve realtime PCR

Kwantitatieve realtime PCR

Basisprincipes PCR, deel III

Definitie van smeltemperatuur

Analyse smeltcurve

Leerdoelen

De algemene doelstelling van deze module is om u inzicht te geven in de PCR-methoden die worden gebruikt bij de GeneXpert

Aan het einde van de opleiding kunt u:

- De elementen van het PCR-proces opnoemen
- Het PCR-proces uitleggen en de stappen van PCR omschrijven
- 'RT-PCR' definiëren (2 mogelijke betekenissen)
- De RT-PCR-curven omschrijven; de Ct definiëren
- Uitleggen hoe met RT-PCR kwantificering kan worden verricht
- Smelttemperatuur definiëren
- Uitleggen hoe met behulp van smeltcurveanalyse antimicrobiële resistentie kan worden geïdentificeerd

Basisprincipes van polymerasekettingreactie (PCR) - I



Basisprincipes van moleculaire biologie

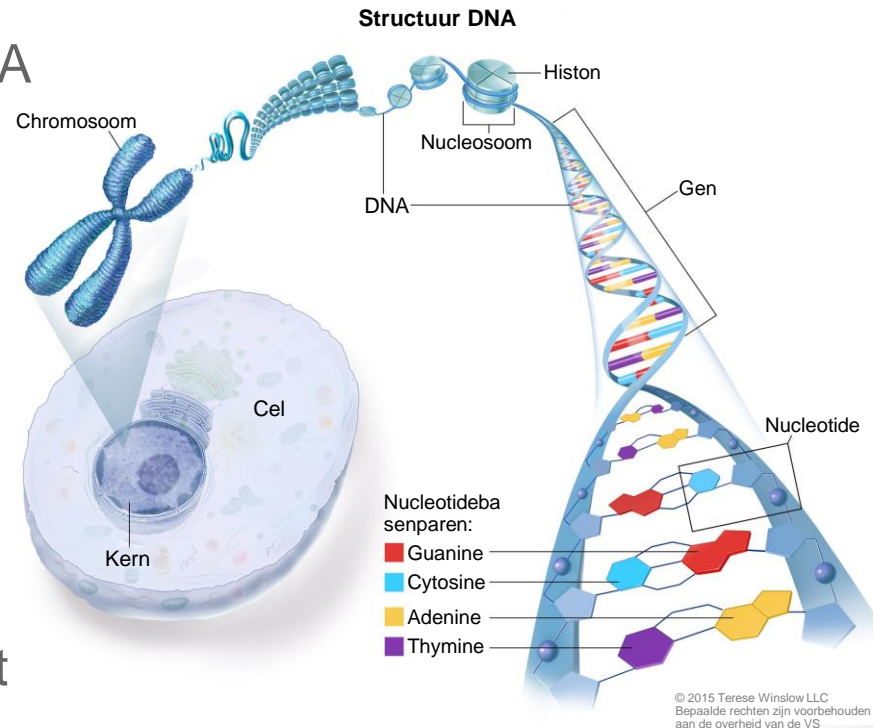
Een snelle opfrisser



Basisprincipes van moleculaire biologie

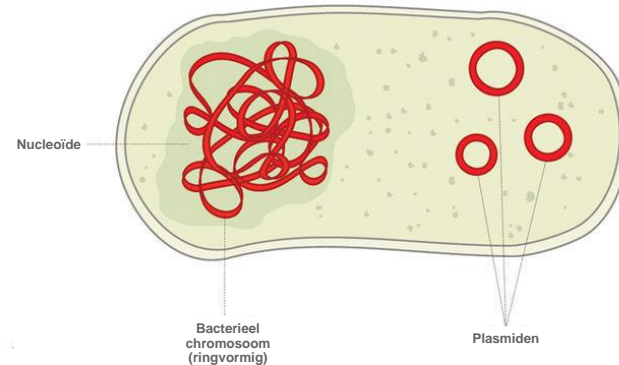
Genetische informatie opgeslagen in DNA

- DNA is opgebouwd als een dubbele helix
- DNA codeert de genetische informatie (verschillende genen, verschillende informatie)
- DNA is ingedeeld in lange ketens, genaamd chromosomen
- De kern van menselijke cellen bevat 23 chromosomenparen



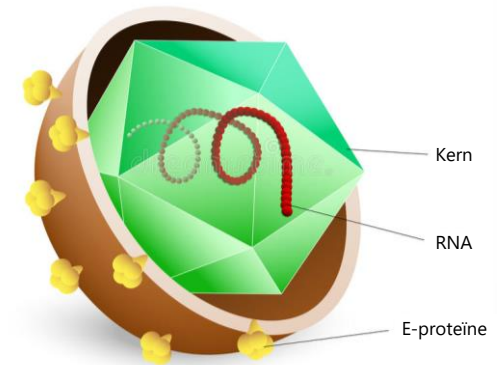
Genetisch materiaal in bacteriën

- Genetische informatie in bacteriën is gecodeerd in DNA
- De meeste bacteriën hebben een genoom dat bestaat uit één ringvormig DNA-molecuul, dat zich in een gebied bevindt dat de nucleoïde wordt genoemd (niet omsloten door een membraan)
- Extrachromosomale genetische elementen zoals plasmiden en bacteriofagen bepalen vaak de resistentie tegen antimicrobiële middelen, de productie van virulentiefactoren of andere functies.



Genetisch materiaal in virussen

- Een virus is een kleine parasiet die zich niet zelfstandig kan voortplanten. Het is daarvoor afhankelijk van de mechanismen van de gastheercel.
- Viraal genoom wordt in verschillende vormen aangetroffen: RNA of DNA, met één of twee strengen, lineair, ringvormig of zelfs gesegmenteerd



Vb.: Hepatitis C-virus

DNA-bouwstenen

DNA bestaat uit 4 nucleotiden

- A = adenine
- T = thymine
- C = cytosine
- G = guanine

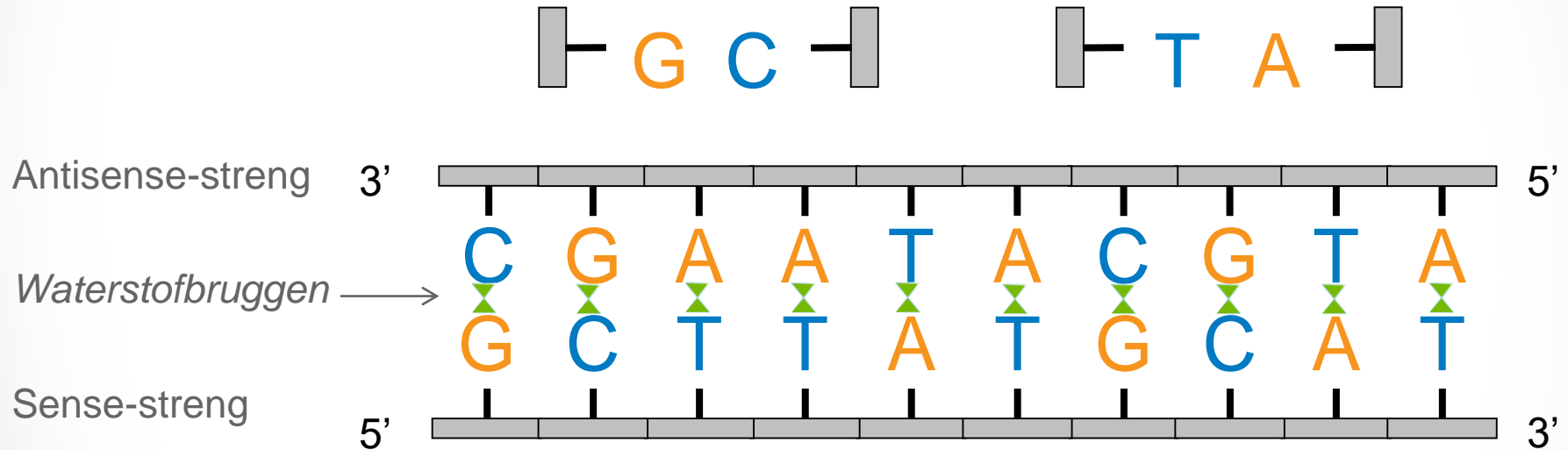


De 4 basen worden aaneengekoppeld tot een sequentie (een enkelvoudige DNA-streng)



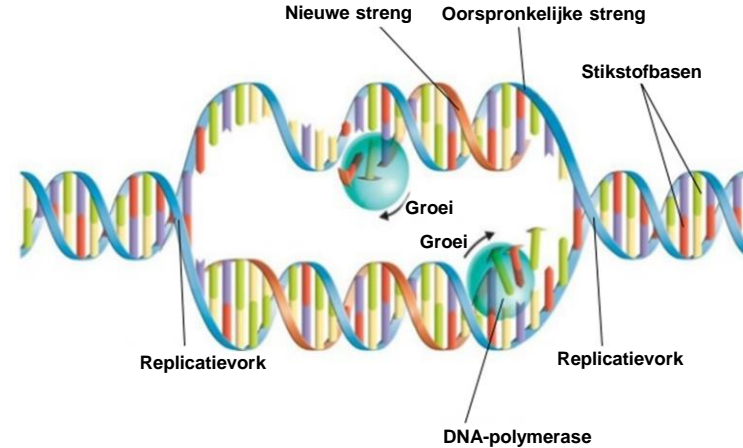
Elementaire moleculaire biologie

Het meeste DNA heeft twee strengen en vormt op een unieke wijze paren:



DNA-replicatie

- Nieuw DNA wordt gemaakt door enzymen die **DNA-polymerasen** worden genoemd. Deze synthetiseren DNA uitsluitend in de richting van 5' naar 3'.
- Een ander enzym dat primase heet, maakt een **RNA-primer** om de polymerase te primen.
- Als de RNA-primer eenmaal op zijn plaats zit, wordt deze door DNA-polymerase 'geëlongeerd', door een voor een nucleotiden toe te voegen om een nieuwe DNA-streng te vormen die complementair is aan de template-streng.



Copyright Pearson Prentice Hall

Definitie van PCR

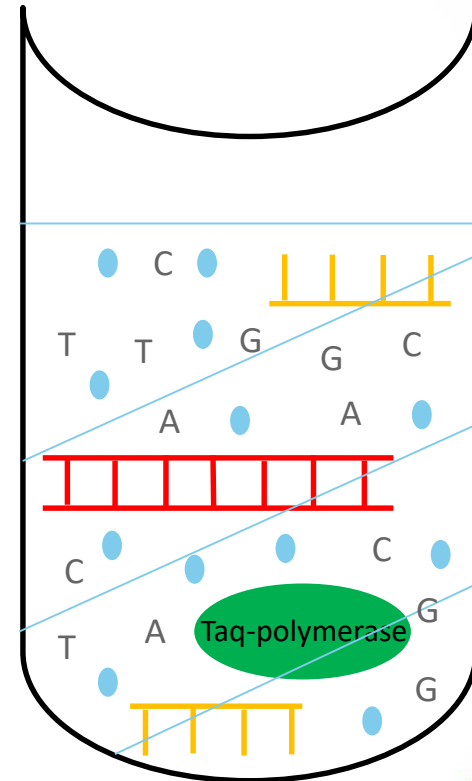


Wat is PCR?

1. PCR (**Polymerase Chain Reaction**, polymerasekettingreactie) is een **kettingreactie** waarbij meerdere kopieën worden gemaakt van een specifieke DNA-sequentie die aanwezig is in het monster.
2. DNA-amplificatie vindt plaats door **herhaalde thermische cycli**
3. Het aantal kopieën van de specifieke sequentie **verdubbelt** zich bij elke cyclus
4. Na veertig cycli zijn van één exemplaar circa 2 biljoen kopieën gemaakt

Bestanddelen van een PCR-reactie

- **DNA-template** (van virus, bacterie of menselijk gen)
- **dNTP's** (een mengsel van alle vier de nucleotiden die nodig zijn voor het opbouwen van nieuwe DNA-strengen: A, T, C, G)
- **Primers** (oligonucleotiden van circa 20 nucleotiden, die aan het doel-DNA worden gehybridiseerd)
- **Polymerase** (natuurlijke thermisch stabiele taq-polymerase die kan werken bij een optimale temperatuur van circa 70 °C)
- **Buffer** (Mg²⁺, tris-HCl, triton: biedt de optimale omstandigheden voor de werking van de polymerase)

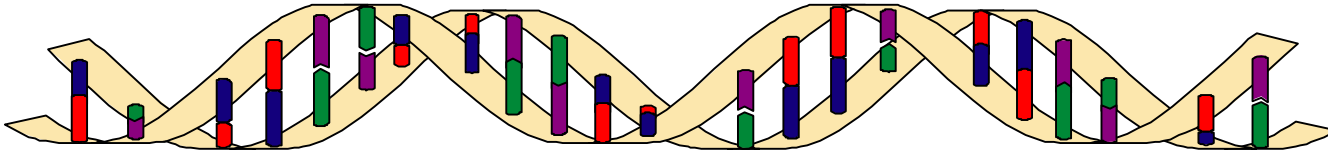


De fasen van PCR



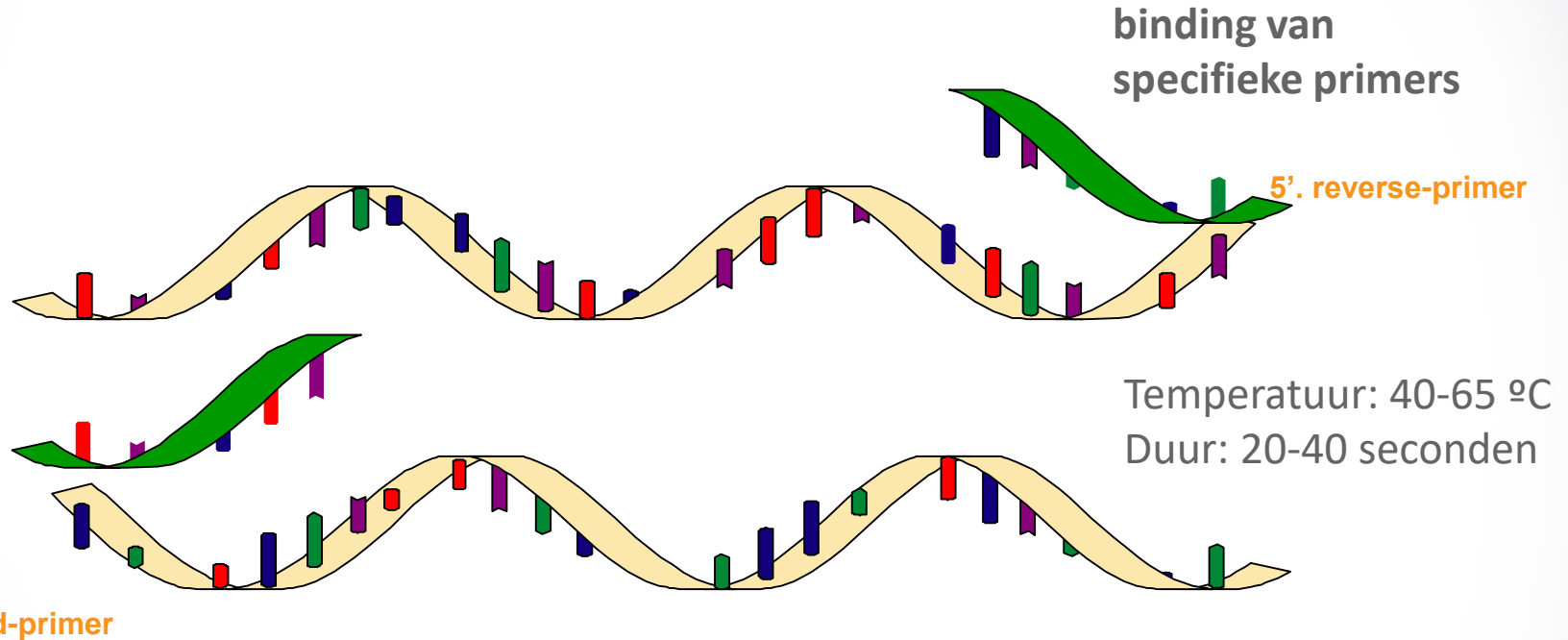
De eerste fase van een PCR-cyclus - denaturatie

scheiding van DNA-strengen



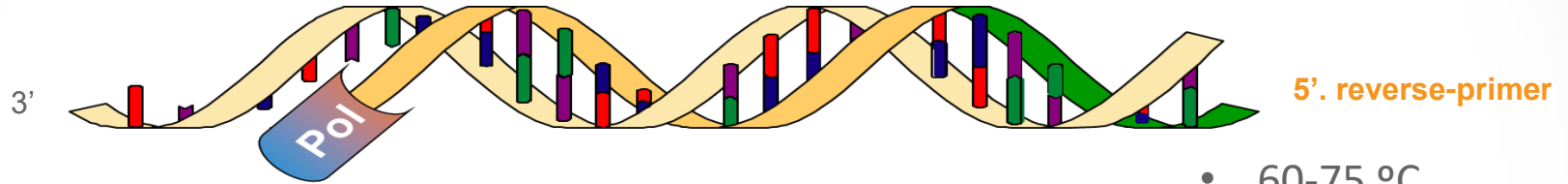
- 90-95 °C
- 20-30 s

De tweede fase van een PCR-cyclus - hybridisatie



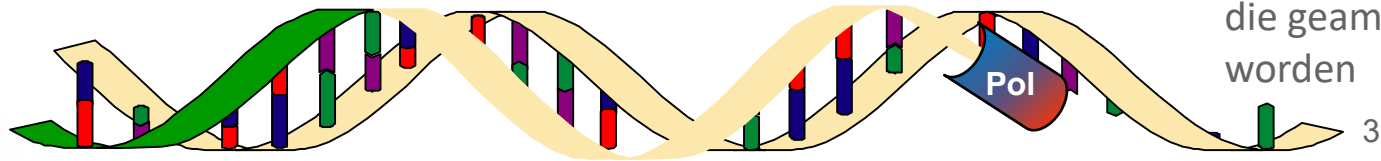
De derde fase van een PCR-cyclus - **elongatie**

Synthese DNA-streng



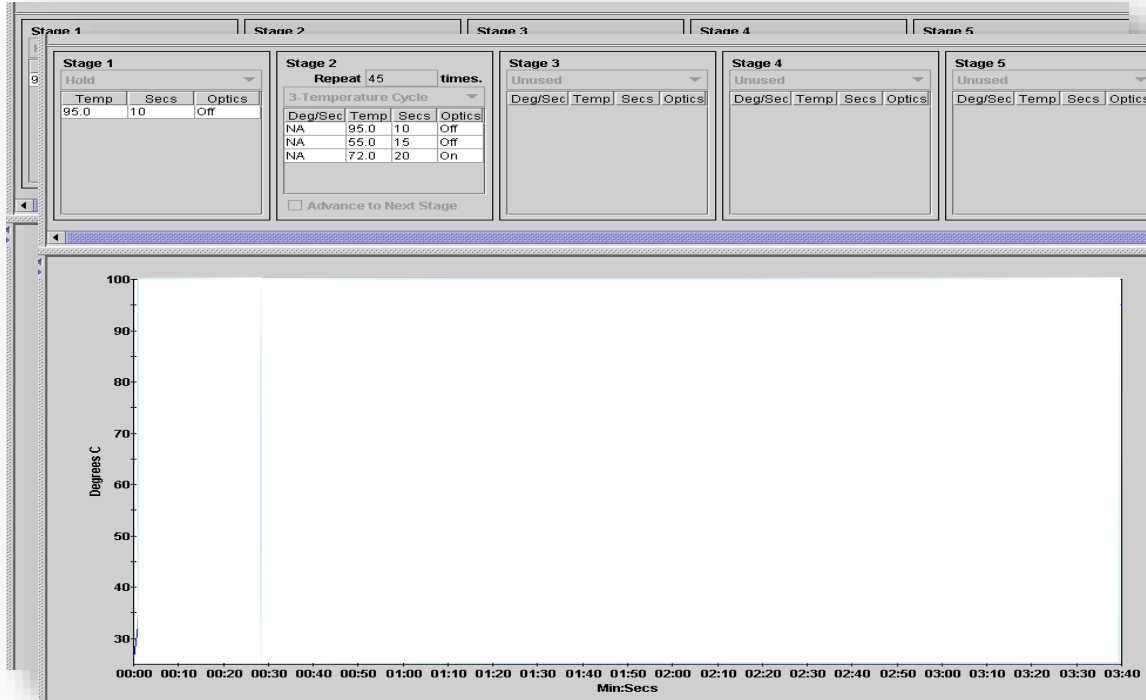
- 60-75 °C

De duur hangt af van de omvang van de sequentie die geamplificeerd moet worden



5' forward-primer

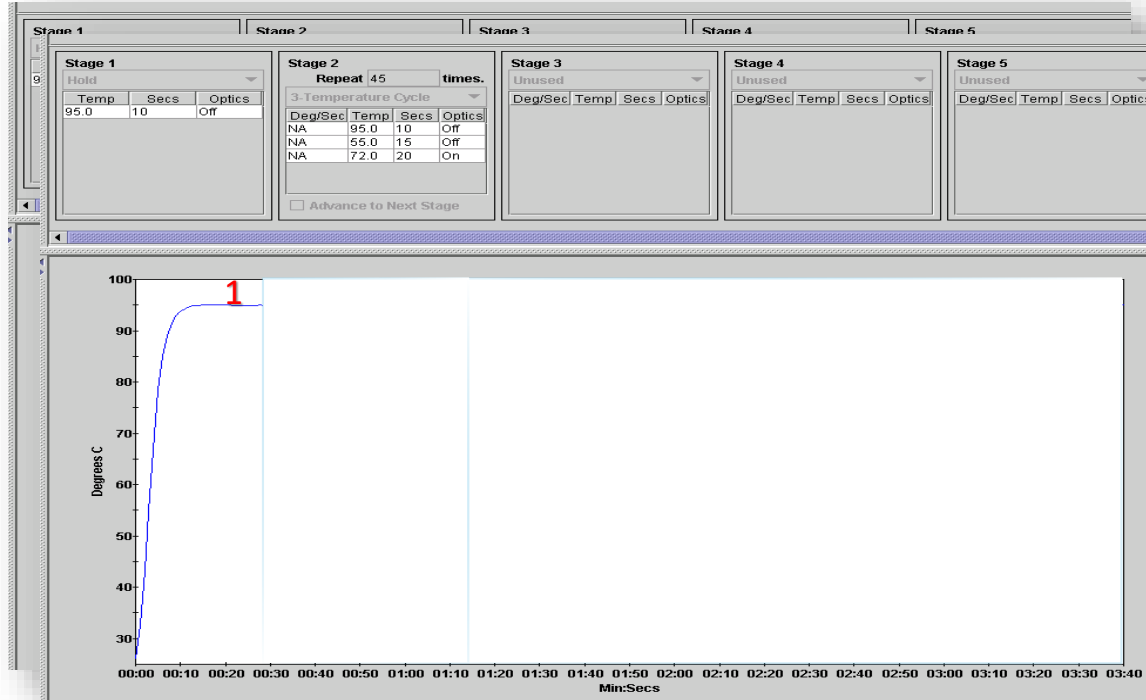
Thermisch profiel van PCR-cycli



1. Denaturatie

Opmerking: een PCR bestaat gewoonlijk uit 30 tot 40 cycli

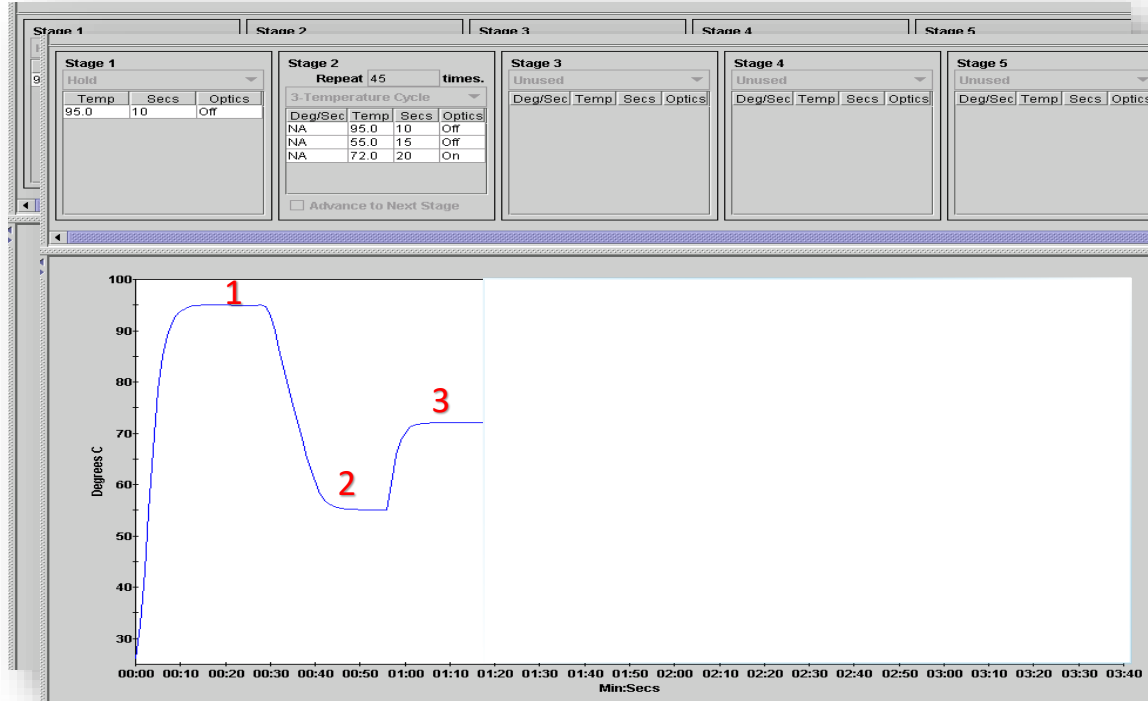
Thermisch profiel van PCR-cycli



2. Hybridisatie

Opmerking: een PCR bestaat gewoonlijk uit 30 tot 40 cycli

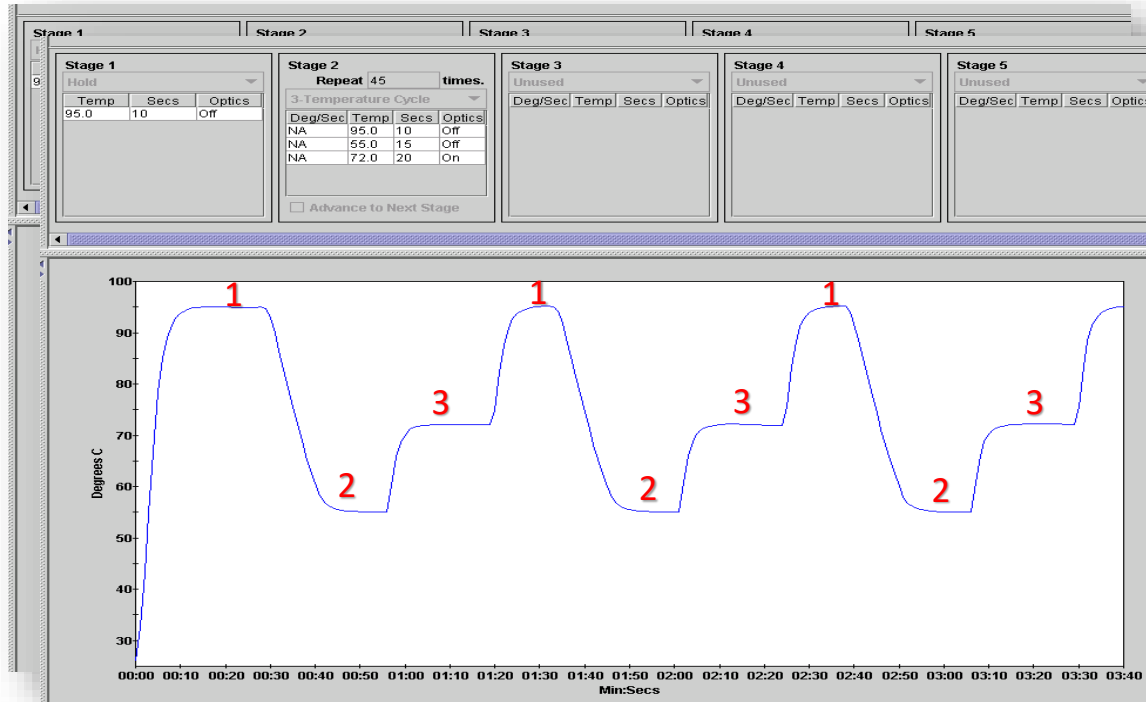
Thermisch profiel van PCR-cycli



3. Elongatie

Opmerking: een PCR bestaat gewoonlijk uit 30 tot 40 cycli

Thermisch profiel van PCR-cycli



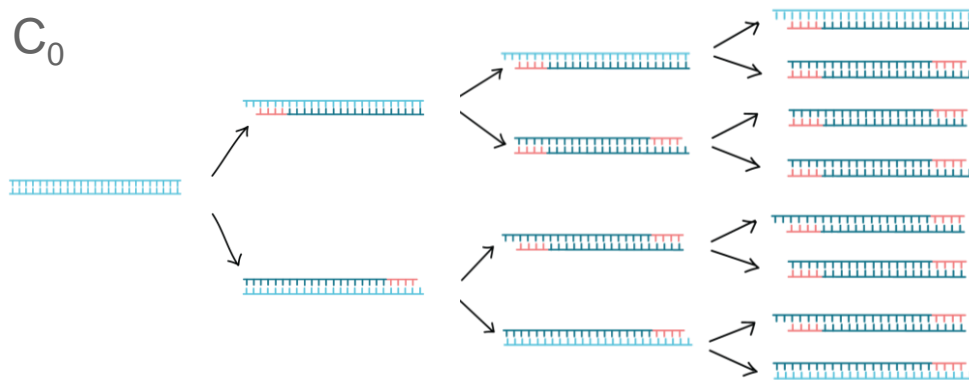
1. Denaturatie
2. Hybridisatie
3. Elongatie

Opmerking: een PCR bestaat gewoonlijk uit 30 tot 40 cycli

Aantal DNA-kopieën verkregen door PCR

– **In theorie** wordt het aantal kopieën van het target-DNA bij elke cyclus verdubbeld, wat betekent dat de PCR-rendementsfactor $E = 2$

- Beginconcentratie (0 cycli) = C_0
- Na één cyclus: $C_0 \times 2$
- Na 2 cycli: $C_0 \times 4$
- Na 3 cycli: $C_0 \times 8$
- **Na n cycli: $C_0 \times 2^n$**



– **In de praktijk** kan deze replicatiesnelheid niet eindeloos worden gehandhaafd en wordt de verdubbeling minder dan een verdubbeling, tot er ten slotte helemaal geen replicatie meer plaatsvindt

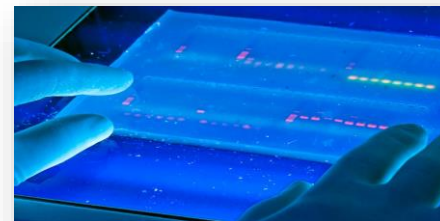
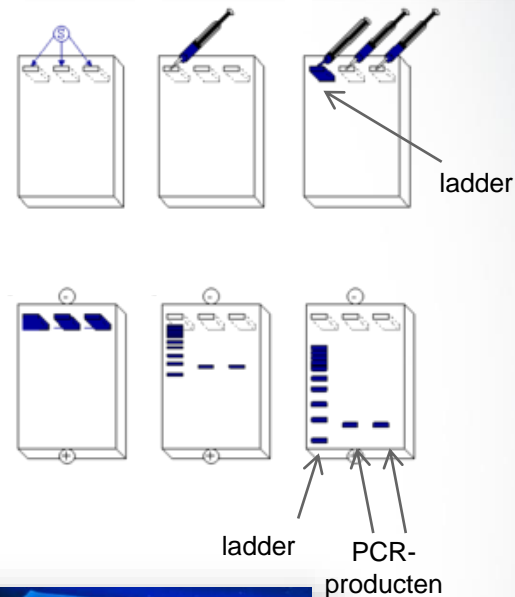
Factoren die van invloed zijn op het PCR-rendement

- Testontwerp (fabrikant)
 - Ontwerp primer/probe
 - Type DNA-polymerase
 - Kwaliteit van reagentia
 - Mastermix
 - Omstandigheden PCR-cycli: temperatuur en duur van de fasen
- Analyse vooraf (laborant)
 - Kwaliteit van reagentia in verband met vervoers- en opslagomstandigheden
 - Kwaliteit monster: aanwezigheid van PCR-remmers

Productdetectie op eindpunt

Bij klassieke PCR wordt de detectie verricht op het eindpunt (einde van PCR)

1. Een mengsel van fragmenten met bekende afmetingen (de ladder) wordt ter referentie aangebracht in een agarosegel om de afmetingen van de PCR-producten te berekenen.
2. Het PCR-product wordt ook in de gel aangebracht
3. Er wordt een elektrisch veld toegepast, waardoor negatief geladen moleculen richting de positieve pool bewegen
4. De beweging van het PCR-product hangt af van de afmetingen
5. Het DNA wordt gekleurd met behulp van ethidiumbromide, zichtbaar onder een uv-lamp
6. Als het target waar we naar zoeken aanwezig is in het monster, is er een PCR-product van de verwachte afmetingen aanwezig





Dank u.

www.Cepheid.com

