



**ELEMENTE DE GENETICA ȘI
BIOTEHNOLOGIA PLANTELOR**

LP 5

Reacția de PCR

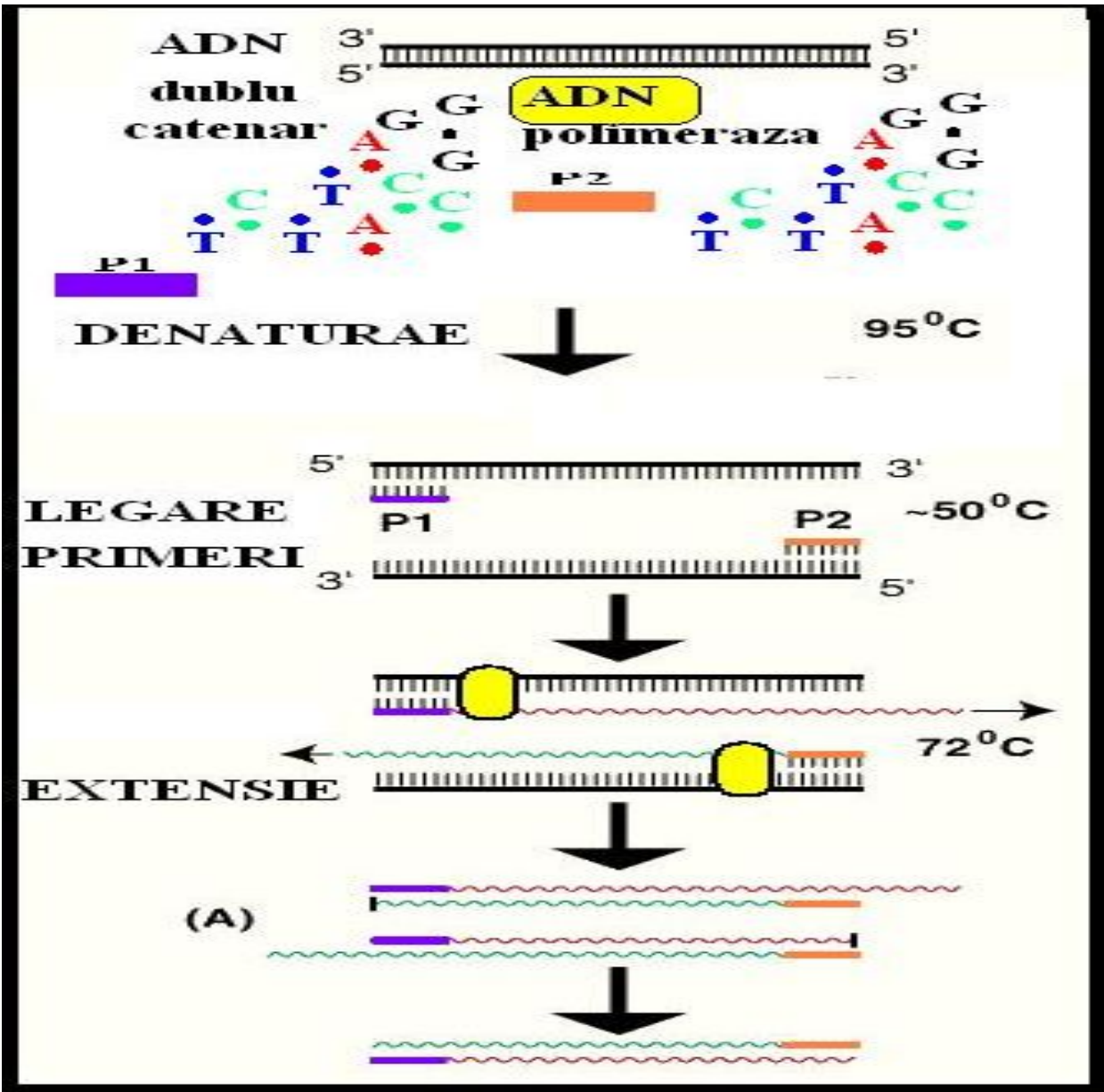
REACTIA DE POLIMERIZARE ÎN LANT (PCR)

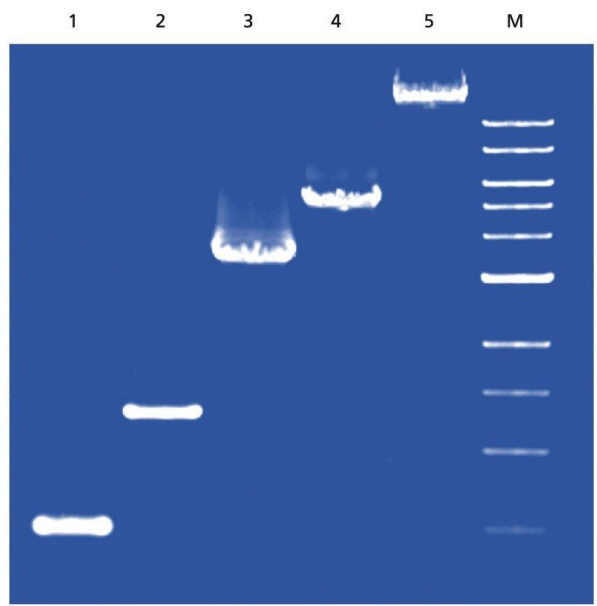
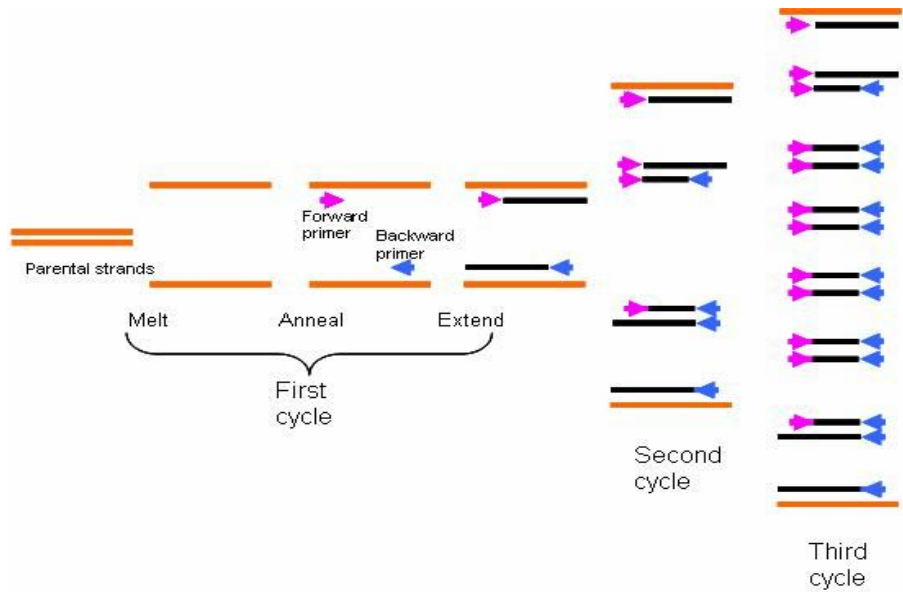
Ce este PCR

- Reacția de polimerizare în lanț (PCR = Polymerase Chain Reaction) este o metodă de amplificare enzimatică *in vitro* a unei anumite secvențe de ADN. Această tehnică a fost descoperită în anul 1983 de către Kary Mullis care a și primit în anul 1994 premiul Nobel pentru această descoperire.
- Reacția PCR se bazează pe selectarea unui fragment de ADN – prin intermediul a două secvențe denumite primeri, și amplificarea acestui fragment prin cicluri repetate de sinteză de ADN.

Principiul reacției

- ◆ Reacția PCR se bazează pe selectarea unui fragment de acid nucleic, cu ajutorul primerilor concepuți astfel încât secvența lor, să fie complementară cu fiecare capăt al secvenței și amplificarea acestui fragment prin cicluri repetate de sinteza de DNA.
- ◆ Primerii, dNTP-urile și celelalte componente ale reacției, inclusiv matricea DNA, sunt amestecate și tuburile de reacție sunt plasate într-un thermal cycler, care trece reacția printr-o succesiune de etape ce se desfășoară la temperaturi diferite și perioade de timp diferite.
- ◆ Fiecare ciclu de reacție cuprinde trei pași: topirea, la 95°C, hibridizarea, la o temperatură variabilă funcție de primer și sinteza noii catene ADN, la 72°C.
- ◆ Fiecare ciclu PCR dublează teoretic cantitatea de secvențe ale matricei în reacție.





Componenetele reactiei PCR

Primerii

- dimensiunea primerilor să fie cuprinsă între 10-30 bp ;
- primerii să aibe un procent molar de guanină + citozină cuprins între 40-60% ;
- primerii să nu fie complementari între ei la capatul 3' astfel încât să nu formeze dimeri ;
- valoarea T_m a primerilor să permită atașarea la temperatura de 50°-60°C
- să existe o distribuție echilibrată a domeniilor bogate în A/T și G/C
- primerii să nu prezinte structuri secundare interne

Enzimele

• Kary Mullis a folosit în primele sale reacții PCR fragmentul Klenow al ADN-polimerazei I de la *Escherichia coli* pentru a cataliza extensia primerilor. Această enzimă este inactivată termic în timpul etapei de denaturare din ciclul PCR și de aceea trebuie adăugată enzimă proaspătă în fiecare ciclu al procesului.

• Ulterior au fost introduse enzime termostabile care catalizează sinteza unor lanțuri polinucleotidice lungi formate din deoxinucleotide trifosfat.

• Sinteza ADN-ului începe întotdeauna de la capatul 5' și se desfășoară în direcția 3', nucleotidele atașându-se la gruparea liberă 3' –hidroxil a primerului și formează o catenă complementară cu matrita.

Matrița ADN

- Reacția PCR este direct influențată de calitatea matriței ADN introduse.
- Integritatea ADN matriță este și ea importantă pentru succesul unei reacții PCR. Anterior polimerizării, se recomandă verificarea electroforetică a dimensiunii și integrității ADN matriță.

MgCl₂

- Ionii Mg²⁺ formează complexe solubile cu deoxinucleotidtrifosfații, formând astfel substratul recunoscut de ADN polimerază .
- Concentrația optimă de MgCl₂ variază între 1mM -5mM. Excesul ionilor de Mg²⁺ în reacția PCR poate determina atașări nespecifice ale primerilor.

Deoxinucleotidtrifosfați (dNTP)- dCTP, dGTP, dATP, dTTP

- În reacție trebuie introduse cantități echimolare din toate cele patru tipuri de molecule pentru a micșora riscul unei polimerizări eronate.
- Concentrația finală recomandată este de 50-500mM pentru fiecare dNTP. Concentrația dNTP trebuie corelată cu concentrația ionilor Mg²⁺.