

## Optimalizace multiplex PCR

Matěj Pospíš<sup>a</sup>, Petr Michálek<sup>a</sup>, Branislav Ruttkay-Nedecký<sup>b</sup>, Pavel Kopel<sup>b</sup>, Libuše Trnková<sup>b</sup>, Ondřej Zítka<sup>a,b</sup>, Vojtěch Adam<sup>a,b</sup>, René Kizek<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Ústav chemie a biochemie, Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika

<sup>b</sup> Středoevropský technologický institut, Vysoké učení technické v Brně, Technická 10, 616 00 Brno, Česká republika

### Optimization of multiplex PCR

Multiplex PCR is one of the many variants routinely performed by polymerase chain reaction (PCR). Its advantage is especially rapid detection of a large number of products in one reaction using multiple primer sets. Optimization of the multiplex PCR protocol is important also for genes of metallothionein isoforms, so that we can carry out the amplification of more than one DNA sequence. Necessary part of this process is the adjustments in temperature during the reaction steps and also intervention with the changes in the concentration of individual reagents and different combinations or the amount of each primer.

**Přijato k publikování:** 20. 6. 2014

**Klíčová slova:** metallothionein, multiplex PCR, protokol multiplex PCR

### Úvod

Multiplex PCR je jednou z mnoha variant rutinně prováděné polymerázové řetězové reakce (PCR). Její předností je především rychlá detekce velkého počtu produktů v jedné reakci za použití několika sad primerů. Ačkoliv princip reakce samotné se neliší od standardního protokolu PCR, správné a efektivní použití metody však vyžaduje její důkladné plánování.

Předmětem naší práce byla optimalizace protokolu multiplex PCR pro geny isoforem metalothioneinu, tak abychom mohli provádět amplifikaci více než jedné sekvence DNA.

### Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce (PCR) byla vyvinuta v roce 1983 doktorem Kary B. Mullisem, v biotechnologické firmě Cetus Corporation (Emeryville, Kalifornie, USA). V roce 1993 byla Kary B. Mullisovi udělena Nobelova cena za chemii za tento důležitý objev, který způsobil naprostou revoluci na poli molekulární biologie<sup>1</sup>. Metoda je díky svému charakteru velmi široce uplatnitelná v mnoha vědeckých disciplínách, např. ve forenzní medicíně, kriminalistice, biotechnologických aplikacích, prenatální diagnostice, a stala se rutinní procedurou i v

mnoha dalších odvětvích. Její využití je možné právě díky citlivosti a přesnosti, kdy dokáže odhalit i jedinou molekulu DNA ve vzorku<sup>2</sup>.

Základním principem metody je zmožnění nukleových kyselin nebo jejich částí. Celou metodu lze rozdělit do několika dílčích kroků. Prvním z nich je denaturace. V tomto kroku se DNA po dobu 30 sekund zahřívá na teplotu 94-98°C, neboť při této teplotě dochází k rozvolnění DNA dvoušroubovice vlivem porušení vodíkových můstků<sup>3</sup>. Vzniknou tak dvě samostatná vlákna DNA, zvaná templátová, na která mohou v dalším kroku (annealing) nasednout primery, což jsou krátké úseky DNA o velikosti oligonukleotidů (nejčastěji 18-25 bp), které jsou komplementární k templátové DNA. Teplota je následně snížena na 50-65°C, dle teploty tání konkrétních primerů<sup>4</sup>. Aby PCR správně proběhla, je potřeba pro každou reakci navrhnout specifické primery, neboť tyto primery jsou navrhovány vždy pro určitý úsek v templátové DNA. Kdyby totiž nasedaly i na jiné úseky, nebyla by amplifikace efektivní, jinak řečeno vznikaly by nespecifické produkty. V dalším kroku (elongace, neboli prodlužování) se pak od primeru F (forward) nebo R (reverse) začíná syntetizovat komplementární vlákno

(od 3'-konce primeru). Poté následuje poslední krok – terminace – kdy dochází k případnému dosyntetizování nukleotidů na templátová vlákna. Takto jsme z templátové DNA získali 2 molekuly DNA, které se dají v dalším cyklu rozložit znovu na templátovou DNA a celý cyklus se zopakuje. Tímto nám po opakovaných cyklech vznikají produkty, sloužící zároveň jako templáty pro další cyklus. Teoretický výtěžek se po 30-35 cyklech může pohybovat kolem 1 miliardy molekul DNA<sup>5</sup>.

Kromě standardního protokolu PCR se v průběhu let objevilo množství jeho variant. Jedny z nejvíce používaných metod jsou PCR v reálném čase (real-time PCR, qPCR)<sup>6</sup>, kdy za přítomnosti sondy můžeme sledovat přírůstky požadovaného produktu reakce, reverzní transkripční PCR (reverse transcription PCR, RT-PCR)<sup>7</sup>, sloužící jako velice citlivý a výkonný nástroj pro detekci a kvantifikaci exprese mRNA, Touchdown PCR (TD-PCR)<sup>8</sup>, která díky temperování vede ke snížení nespecifické amplifikace, Nested PCR s využitím dvou sad primerů a mnoho dalších.

### *Multiplex PCR*

Je modifikace PCR, ve které amplifikujeme dvě či více sekvencí DNA. Tato PCR se skládá ze stejných kroků jako konvenční PCR, kromě toho, že je v každé reakci použito několik sad primerů. Mnohočetná PCR vyžaduje méně času a úsilí při amplifikaci několika cílových úseků než při uniplex PCR. Přestože multiplex PCR poskytuje potenciální úsporu času, protože umožňuje současně detekci několika cílů, k získání všech produktů je potřeba významné optimalizace pro dosažení stejné účinnosti a citlivosti. Proto musí být dodržována opatření při navrhování primerů, aby nedocházelo k negativním interakcím, a je třeba pečlivě stanovit nejlepší poměr koncentrací jednotlivých primerů a reagensů<sup>9</sup>. Primery, které jsou použity při multiplex PCR, nesmí být vzájemně komplementární, měly by mít podobnou teplotu hybridizace a délka produktů namnožených vybranými primery by měla být odlišitelná při separaci na elektroforéze. Nicméně velké rozdíly ve velikostech produktů nejsou žádoucí, neboť zapříčiňují přednostní amplifikaci

kratších úseků a delší fragmenty se nemusí amplifikovat vůbec. Poprvé tuto metodu popsal Chamberlain v roce 1988. Poté se metoda úspěšně aplikovala při testování delecí, či jiných různých mutací DNA<sup>10</sup>, dále pak u RT-PCR<sup>11</sup> a využití našla také při odhalování infekčních nemocí způsobených viry<sup>12,13</sup>, bakteriemi<sup>14</sup> a parazity<sup>15</sup>.

### *Metalothionein*

Metalothioneiny tvoří skupinu intracelulárních proteinů bohatých na cystein o nízké molekulové hmotnosti, objevenou roku 1957 v koňské slezině<sup>16</sup>, jejichž exprese a indukce je spojována s ochranou proti poškození DNA, oxidativnímu stresu a apoptóze. Mnoho výzkumů však dokládá výsledky o tom, že můžeme pozorovat zvýšenou expresi MT v mnoha typech tumorů, například prsu, tlustého střeva, ledvin, jater, plic, nosohltanu, vaječníků, prostaty, slinné žlázy, varlat, štítné žlázy a močového měchýře<sup>17</sup>. Výskyt byl zaznamenán jak u bakterií, tak u kvasinek, hub, rostlin a zvířat a jedná se o vůbec nejhojnější skupinu zinek vázajících intracelulárních proteinů v eukaryotických buňkách. Skládají se z 61-62 aminokyselin a dvou globulárních domén. 20 cysteinů v každé molekule je schopno vázat sedm zinečnatých nebo kademnatých iontů, případně až 12 iontů mědi. U savců jsou známy 4 izoformy. MT-1 a MT-2 se nachází u savců ve všech tkáních, s nejhojnějším výskytem v játrech a jejich exprese je indukovaná vnějšími faktory, jakými jsou právě těžké kovy a oxidativní stres. Rychlost přepisu těchto genů je velmi zvýšena při oxidativním stresu, zánětu a za přítomnosti zinku nebo kadmia. MT zde pracuje jako velmi výkonný zhášec hydroxylových radikálů a je schopen nahradit funkci superoxididismutázy<sup>18</sup>. MT-3 a MT-4 jsou omezeny na určitá místa, kdy MT-3 je exprimován převážně v mozku a nervové tkáni a MT-4 v epitelálních buňkách pokožky<sup>19,20</sup>.

### **Závěr**

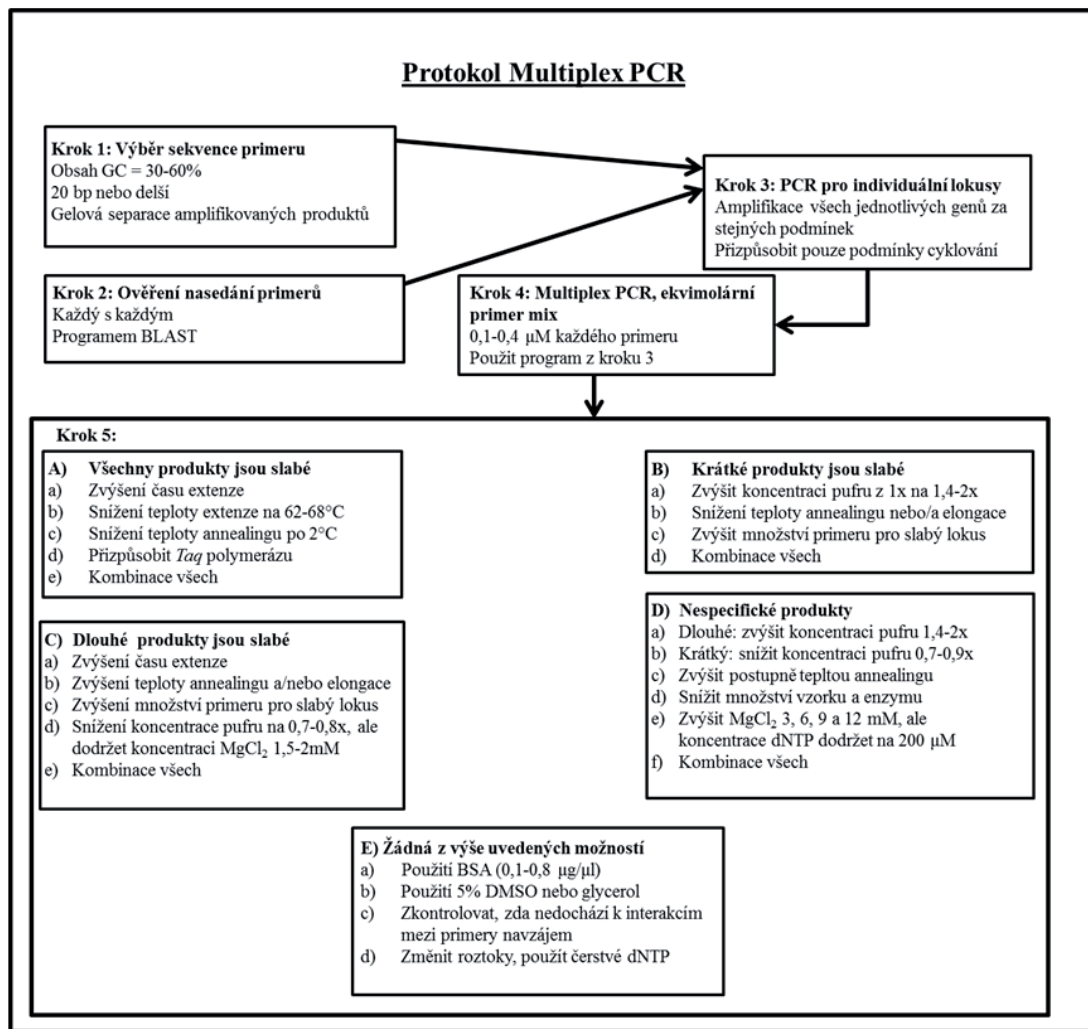
Navržení a optimalizace multiplex PCR protokolu pro geny různých forem metalothioneinu, kdy je vytvořena vhodná kombinace primerů a také změna koncentrací jednotlivých reagensů PCR kitu, je vhodná pro paralelní detekci čtyř

isoforem metalothioneinu. Díky tomu se usnadní práce, ušetří čas (opakování PCR) a finanční prostředky (množství PCR kitu na každou reakci). Zároveň dochází ke zvýšení efektivity procesu, neboť omezíme chybu lidského faktoru z hlediska úspěšné detekce daných genů pro různé isoformy metalothioneinu během jediné reakce.

### Optimalizace Multiplex PCR

The authors declare they have no potential conflicts of interests concerning drugs, products, services or another research outputs in this study.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE „uniform requirements“ for biomedical papers.



**Obrázek 1:** Protokol optimalizace multiplex PCR.  
Upraveno podle <sup>4</sup>

Tato práce byla financována ze zdrojů SIX CZ.1.05/2.1.00/03.0072.

### Literatura

1. Rabinow P., Making PCR: A Story of Biotechnology, University of Chicago Press, 1996.
2. Livak K. J., Schmittgen T. D.: Methods, 25, 402 (2001).

3. Suchman E.: (2011).
4. Henegariu O., Heerema N. A., Dlouhy S. R., Vance G. H., Vogt P. H.: *Biotechniques*, 23, 504 (1997).
5. Raclavsky V.: (2003).
6. Logan J. M. J., Edwards K. J., *An Overview of PCR Platforms*, Caister Academic Press, 32 Hewitts Lane, Wymondham Nr 18 0ja, Uk, 2009.
7. Bustin S. A.: *Journal of Molecular Endocrinology*, 25, 169 (2000).
8. Korbie D. J., Mattick J. S.: *Nature Protocols*, 3, 1452 (2008).
9. Markoulatos P., Siafakas N., Moncany M.: *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 16, 47 (2002).
10. Chamberlain J. S., Gibbs R. A., Ranier J. E., Nguyen P. N., Caskey C. T.: *Nucleic Acids Research*, 16, 11141 (1988).
11. Crisan D.: *Annals of Clinical and Laboratory Science*, 24, 355 (1994).
12. Heredia A., Soriano V., Weiss S. H., Bravo R., Vallejo A., Denny T. N., Epstein J. S., Hewlett I. K.: *Clinical and Diagnostic Virology*, 7, 85 (1996).
13. Markoulatos P., Samara V., Siafakas N., Plakocefalos E., Spyrou N., Moncany M. L. J.: *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 13, 99 (1999).
14. Hendolin P. H., Markkanen A., Ylikoski J., Wahlfors J. J.: *Journal of Clinical Microbiology*, 35, 2854 (1997).
15. Harris E., Kropp G., Belli A., Rodriguez B., Agabian N.: *Journal of Clinical Microbiology*, 36, 1989 (1998).
16. Simes D. C., Bebianno M. J., Moura J. J. G.: *Aquatic Toxicology*, 63, 307 (2003).
17. Cherian M. G., Jayasurya A., Bay B. H.: *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 533, 201 (2003).
18. Andrews G. K.: *Biochemical Pharmacology*, 59, 95 (2000).
19. Haq F., Mahoney M., Koropatnick J.: *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 533, 211 (2003).
20. Coyle P., Philcox J. C., Carey L. C., Rofe A. M.: *Cellular and Molecular Life Sciences*, 59, 627 (2002).



Článek je volně šiřitelný pod licencí Creative Commons (BY-NC-ND). Musí však být uveden autor a dokument nelze měnit a používat pro komerční účely.