



www.esaunggul.ac.id

INTRUMENTASI BIOTEKNOLOGI

Program Studi Bioteknologi

Oleh: Seprianto, S.Pi, M.Si

Meeting 6

PCR Cabinet, Thermocycler (PCR Machine) and Real Time -PCR

Tujuan Perkuliahan

- Mahasiswa dapat mengidentifikasi dan mengetahui prinsip bekerjanya peralatan PCR : PCR Cabinet, Mesin PCR dan Real time PCR/qPCR
- Dapat Mengoperasikannya alat tersebut

Thermocycler (Mesin PCR)

- *Thermocyclers*, or thermal cyclers, are instruments used to amplify DNA and RNA samples by the polymerase chain reaction
- The thermocycler raises and lowers the temperature of the samples in a holding block in discrete, pre-programmed steps, allowing for denaturation and reannealing of samples with various reagents



Thermocycler (Mesin PCR)

Amplified genetic material can be used

- ✓ Cloning
- ✓ Sequencing
- ✓ Expression analysis
- ✓ Food Pathogen detection,
- ✓ And genotyping

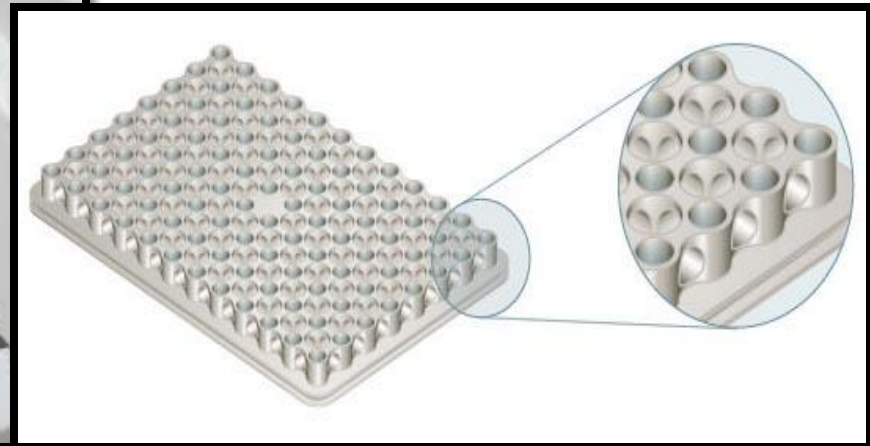


Thermocycler (Mesin PCR)

48 and 96 well block
Material : Peltier



Well Block



Thermocycler (Mesin PCR)

PCR reaction tubes

- Material Plastic polypropelene
- Volume : 200 ul
- DNase and RNase free
- Disposable



Mesin Thermal Cycler



Mesin Thermal Cycler Generasi I

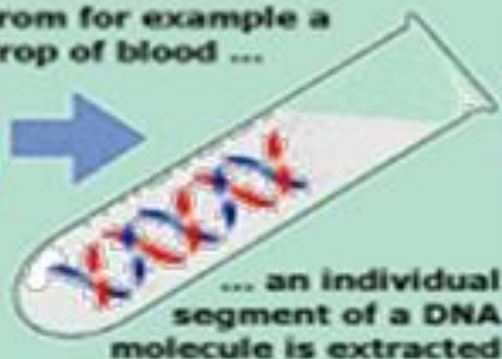


Mesin Thermal Cycler Generasi Terbaru

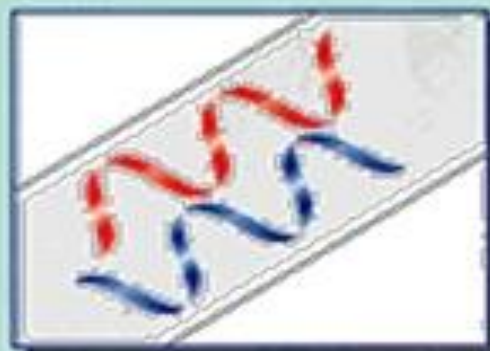


Mesin Real Time PCR

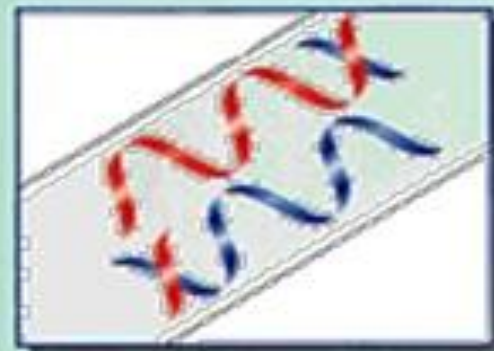
From for example a drop of blood ...



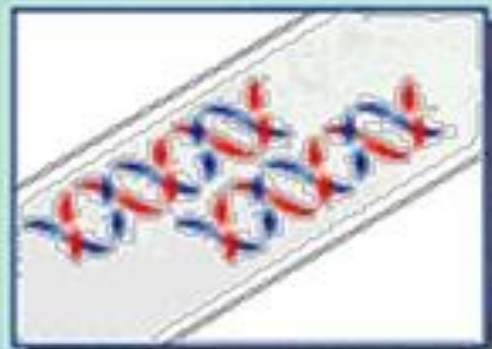
... an individual segment of a DNA molecule is extracted



By raising the temperature to about 90°C the strands are separated.



The temperature is lowered about 55°C and synthetic DNA fragments are added. These bind to the strands at the correct positions.

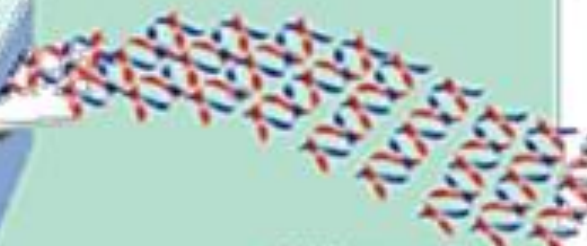


The temperature is now raised to about 70°C and the enzyme DNA polymerase which is added builds up two new complete copies of the DNA strands.

By cycling through the three temperatures the strands are separated and built up again.



The whole process works like a copying machine.



Millions of copies an hour ...

Reaction of PCR

GEN TARGET

P1 →

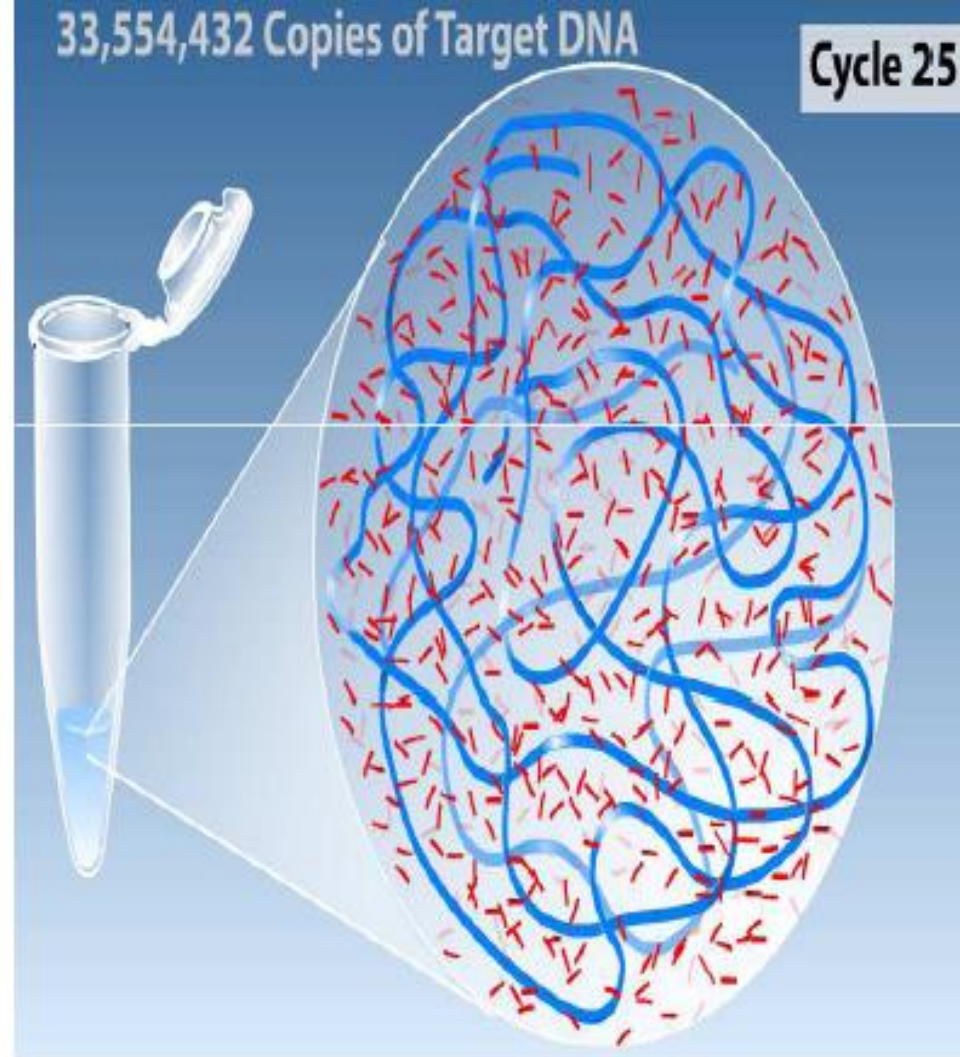
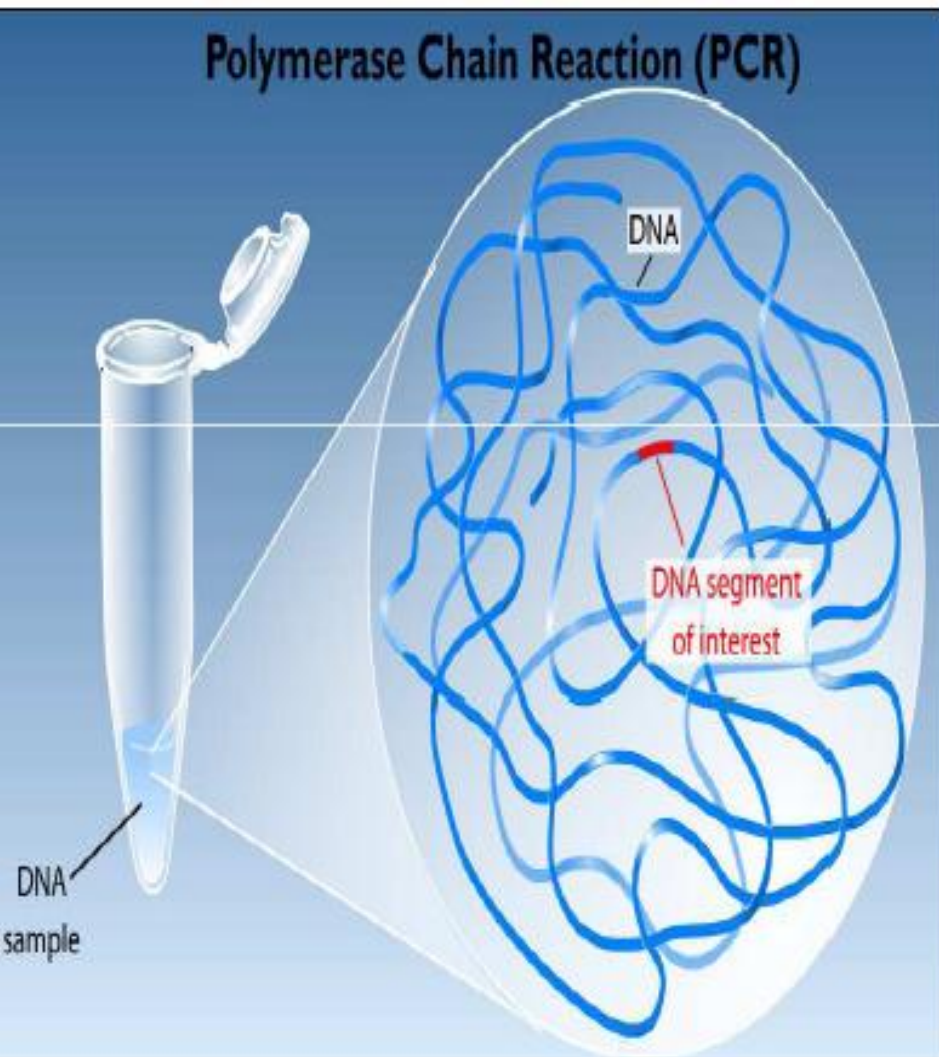


← P2



PRODUK PCR: 490 pb

Amplifikasi DNA Target dalam Genom Organisme



Prinsip PCR

- Merupakan metode untuk amplifikasi potongan DNA secara in vitro pada daerah spesifik yang dibatasi oleh dua buah primer oligonukleotida.
- Mampu memperbanyak sebuah urutan 10⁵-10⁶ kali lipat dari jumlah nanogram dari DNA template.
- Proses ini mirip dengan proses replikasi DNA secara in vivo yang bersifat semi konservatif.

Prinsip PCR

- Pada setiap n siklus PCR sempurna akan diperoleh 2^n DNA target.

Misal: DNA target (template) awal = 1 molekul, maka setelah 30 siklus, DNA target akan berjumlah 2^{30} molekul = 1.073.741.824 molekul.

- Pada umumnya terdiri atas 3 tahap yaitu:
 1. Denaturasi DNA (Denaturation)
 2. Penempelan primer (Annealing)
 3. Reaksi polimerisasi (Elongation)

Prinsip PCR

DNA Amplification Using Polymerase Chain Reaction

Reaction mixture contains target DNA sequence to be amplified, two primers (P1, P2) and heat-stable *Taq* polymerase

Reaction mixture is heated to 95°C to denature target DNA. Subsequent cooling to 37°C allows primers to hybridize to complementary sequences in target DNA

When heated to 72°C, *Taq* polymerase extends complementary strands from primers

First synthesis cycle results in two copies of target DNA sequence

DENATURE DNA

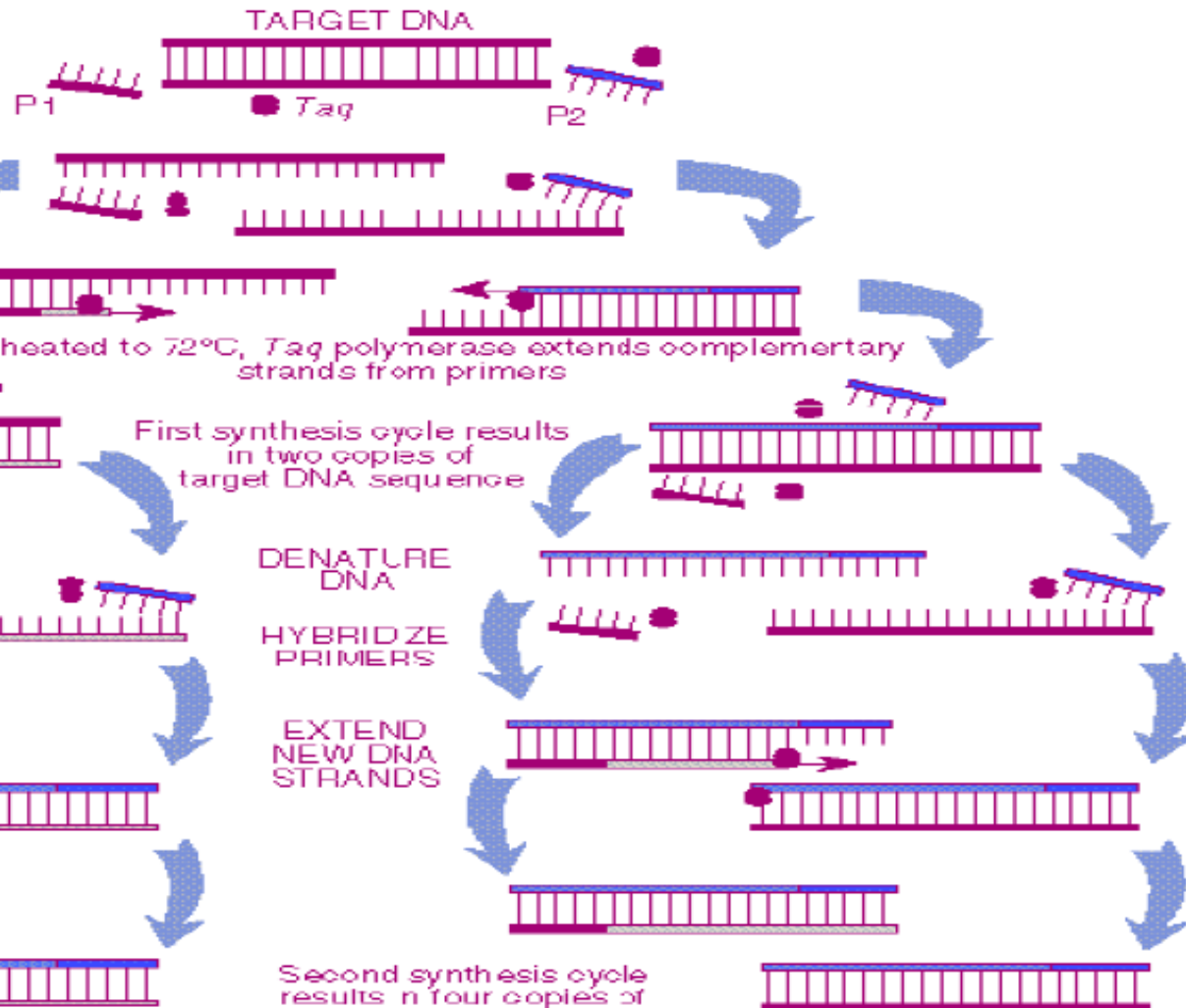
HYBRIDIZE PRIMERS

EXTEND NEW DNA STRANDS

Second synthesis cycle results in four copies of target DNA sequence

FIRST CYCLE

SECOND CYCLE

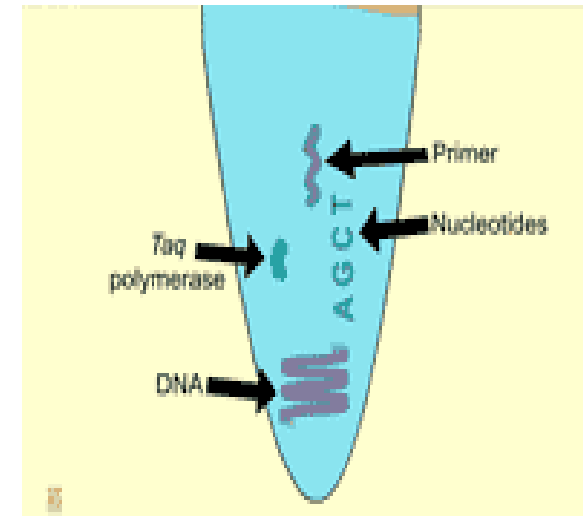


Tujuan PCR

- Amplifikasi fragmen DNA
- Isolasi fragmen DNA / gen
- Deteksi organisme/fragmen DNA/gen
- Kuantifikasi jumlah DNA/RNA
- Studi level ekspresi gen (Real time-PCR)

Komponen-Komponen PCR

- DNA Template
- Primer
- DNA Polimerase (Taq Polimerase)
- Deoxynucleoside triphosphates (dNTPs)
- Larutan buffer
- Kation divalen (misal: Mg^{2+})



Komponen-Komponen Penting dalam Replikasi DNA

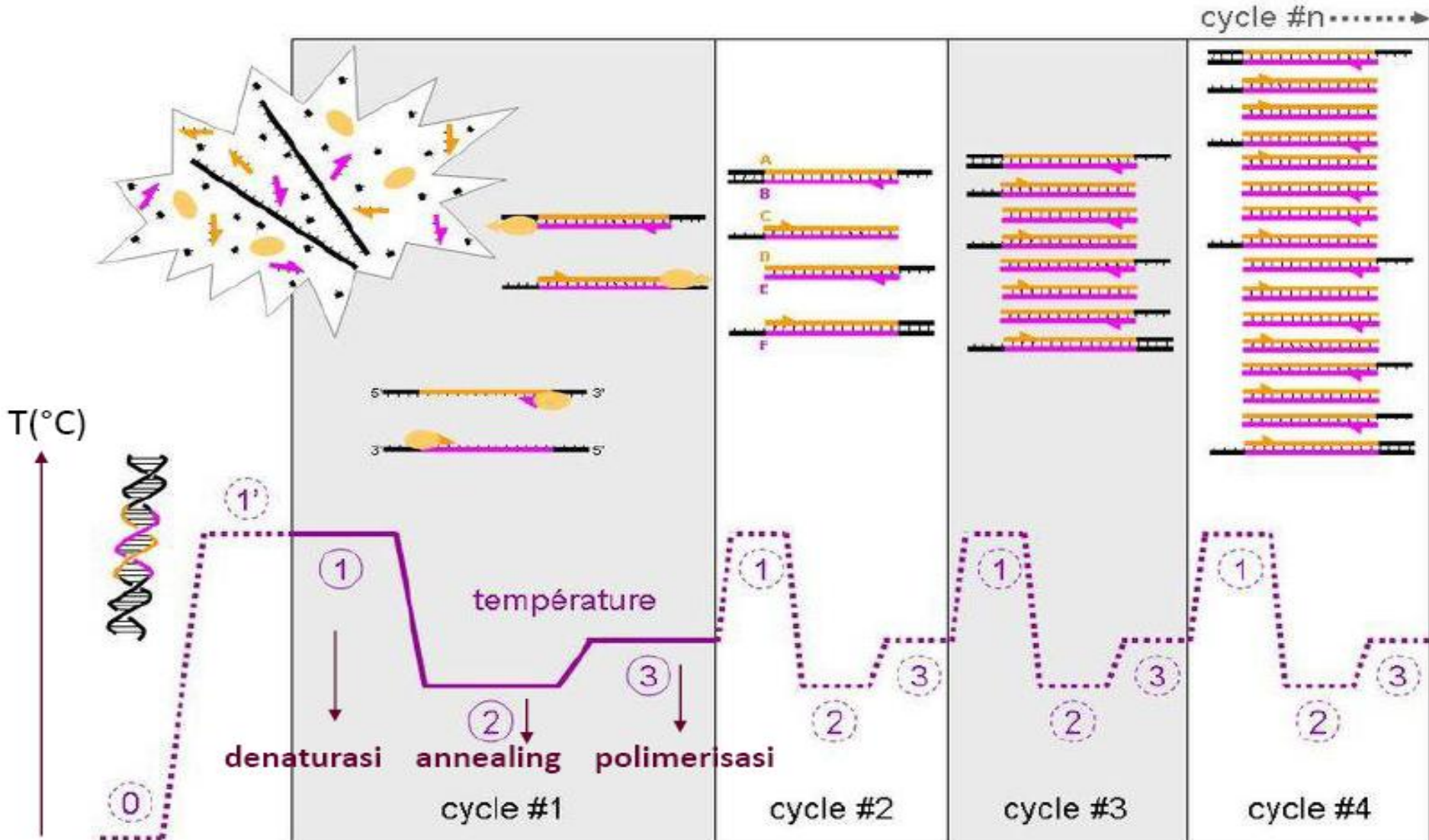
- a. **DNA cetakan** : molekul DNA yang akan direplikasi
- b. **Molekul deoksiribonukleotida** : dATP, dTTP, dCTP, dan dGTP
- c. **DNA Polimerase** : enzim yang mengkatalisis proses polimerisasi nukleotida menjadi untaian DNA
- d. **DNA primase** : enzim yang mengkatalisis sintesis primer untuk memulai replikasi DNA
- e. **DNA helikase dan DNA girase** : enzim yang membuka ikatan untaian DNA induk & berperan dalam mencegah aktivitas supercoiling.
- f. **Single Strand Binding Protein (SSB)** : molekul protein yang menstabilkan untaian DNA yang sudah terbuka
- g. **DNA ligase** : enzim yang menggabungkan fragmen-fragmen DNA (fragmen okazaki)

Komponen-Komponen Penting dalam Replikasi DNA

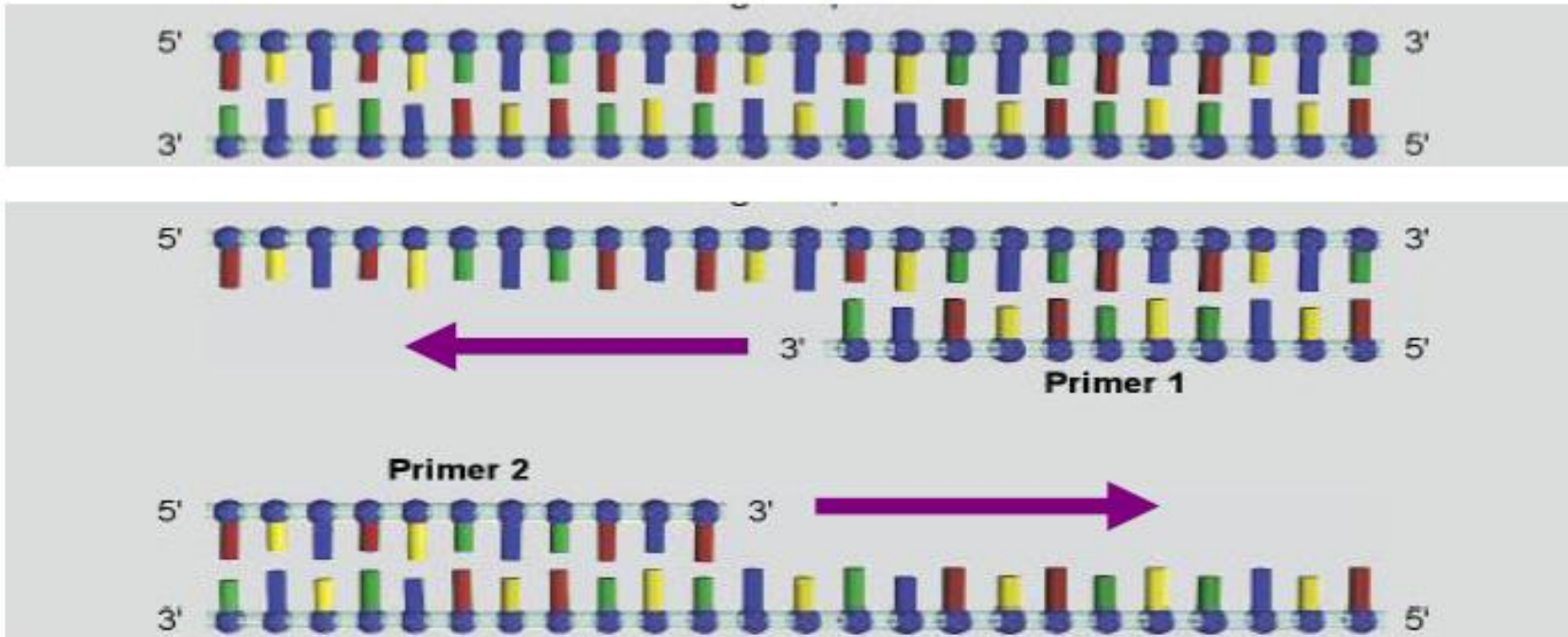
Suggested Variable Values for Standard PCR

Reaction Volume	100 μ L
Taq Polymerase	2- 2.5 U
Primers	0.1 - 1.0 μ M each
dNTPs	0.2 mM each
Salt	6 - 50 mM KCl or (NH ₄) ₂ SO ₄
Mg ⁺⁺	1.5 - 5.0 mM MgCl ₂ or MgSO ₄
Buffer	Tris-HCl 10 - 50 mM, pH 7.5 - 9.0
Template	10 ² - 10 ⁵ copies
Source	"PCR Primer: A Laboratory Manual" 1995

Siklus PCR



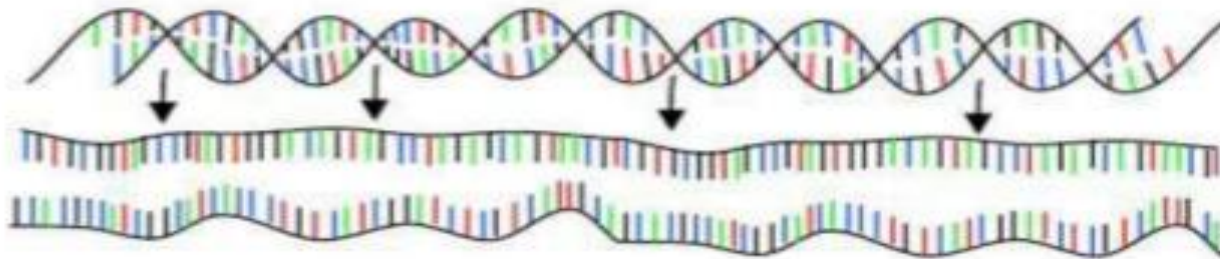
Primer Untuk PCR



5' -TACTTTGAGGTTATCGATTTAGCAAGCGATGCAACCATTACTGATCGA-3'

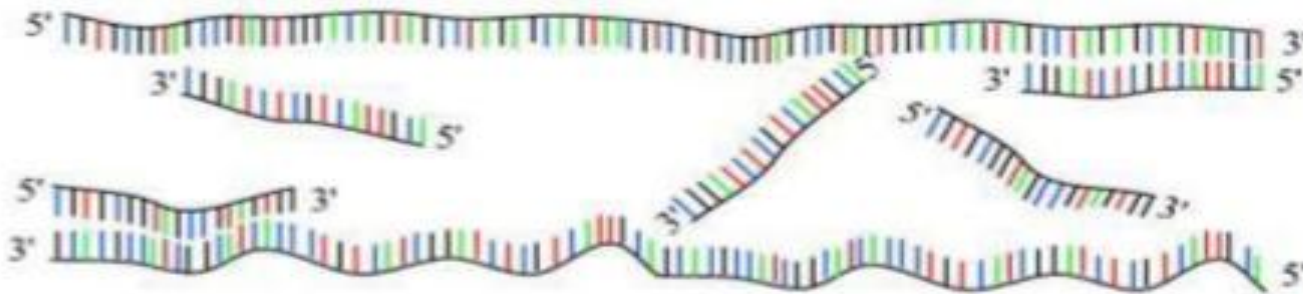
3' -ATGAAACTCCAATAGCTAAATCGTTCGCTACGTTGGTAATGACTAGCT-5'

PRIMER ?



Step 1 : denaturation

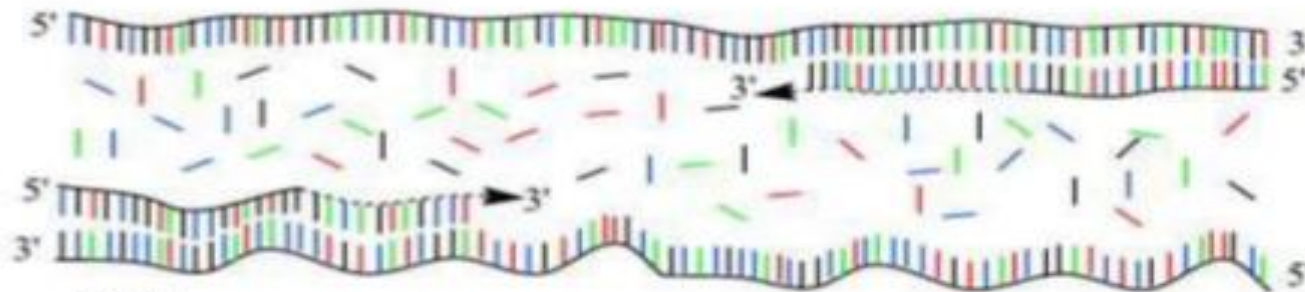
1 minut 94 °C



Step 2 : annealing

45 seconds 54 °C

forward and reverse primers !!!



Step 3 : extension

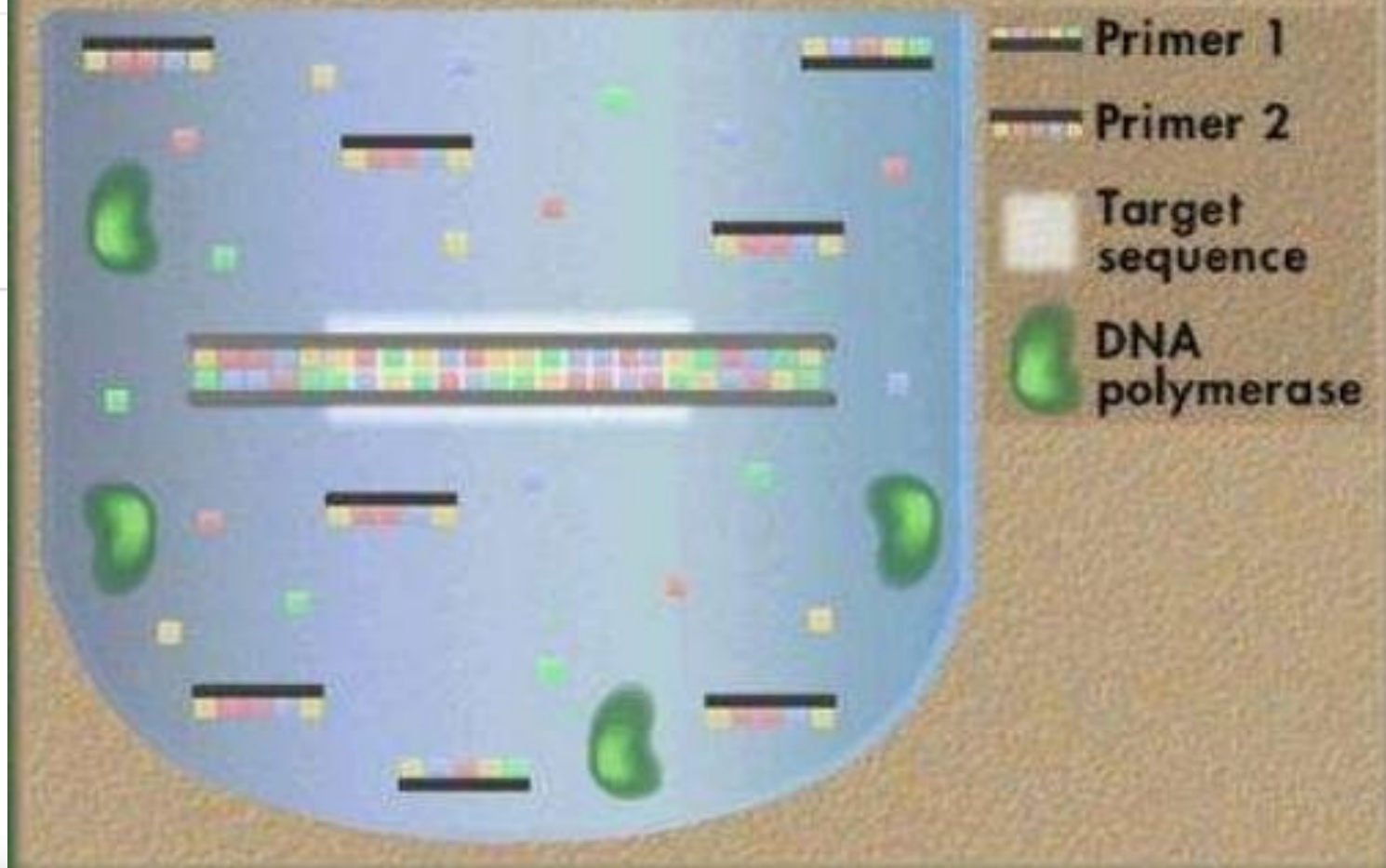
2 minutes 72 °C

only dNTP's

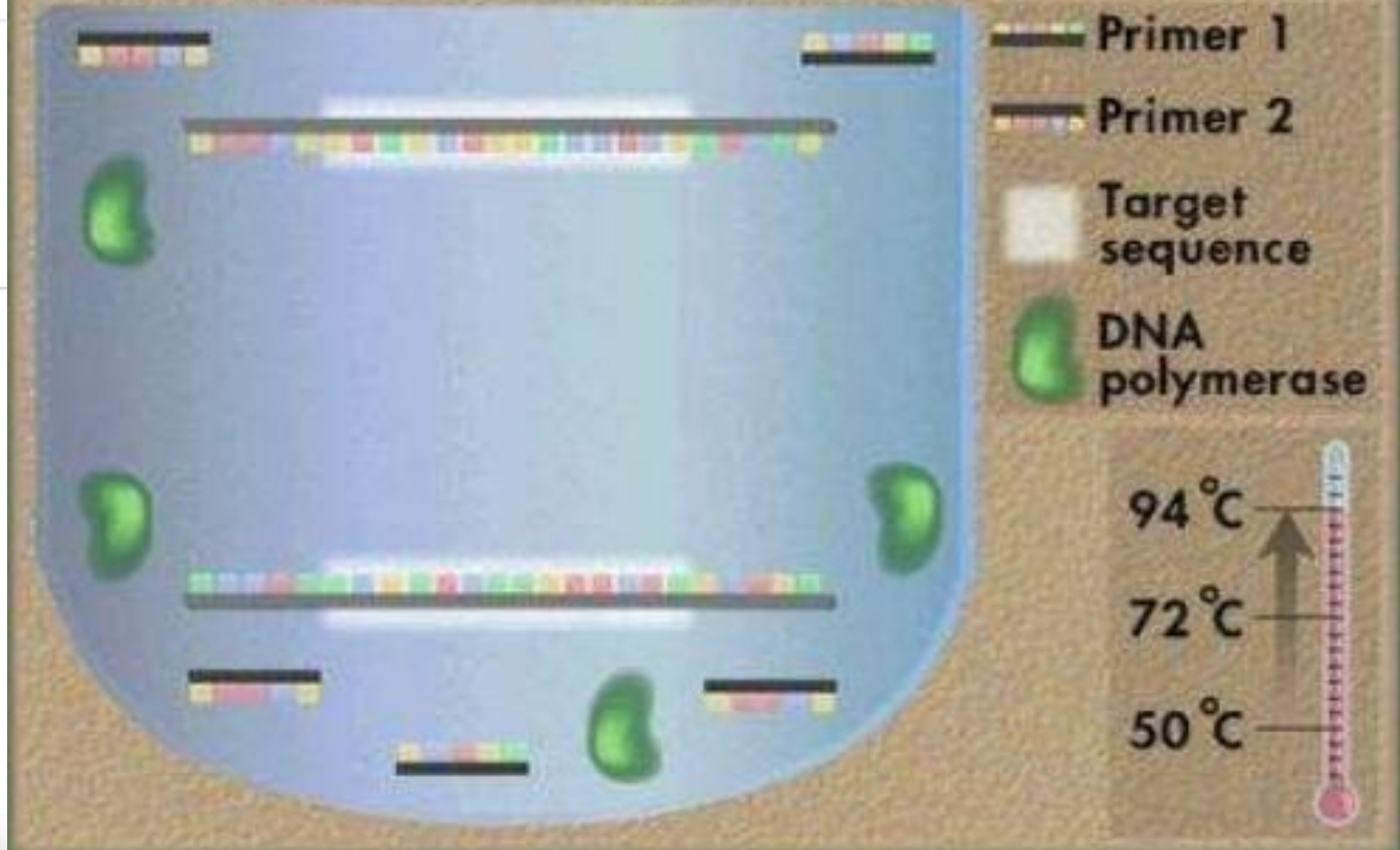
1. Denaturasi DNA

- Selama proses denaturasi, DNA untai ganda akan membuka menjadi DNA untai tunggal.
- Suhu tinggi menyebabkan putusannya ikatan hidrogen diantara 2 basa nitrogen yang komplemen.
- Tahap ini berlangsung sekitar 1-2 menit.
- Denaturasi biasanya dilakukan antara suhu 90-98 °C.

Contents of PCR Reaction



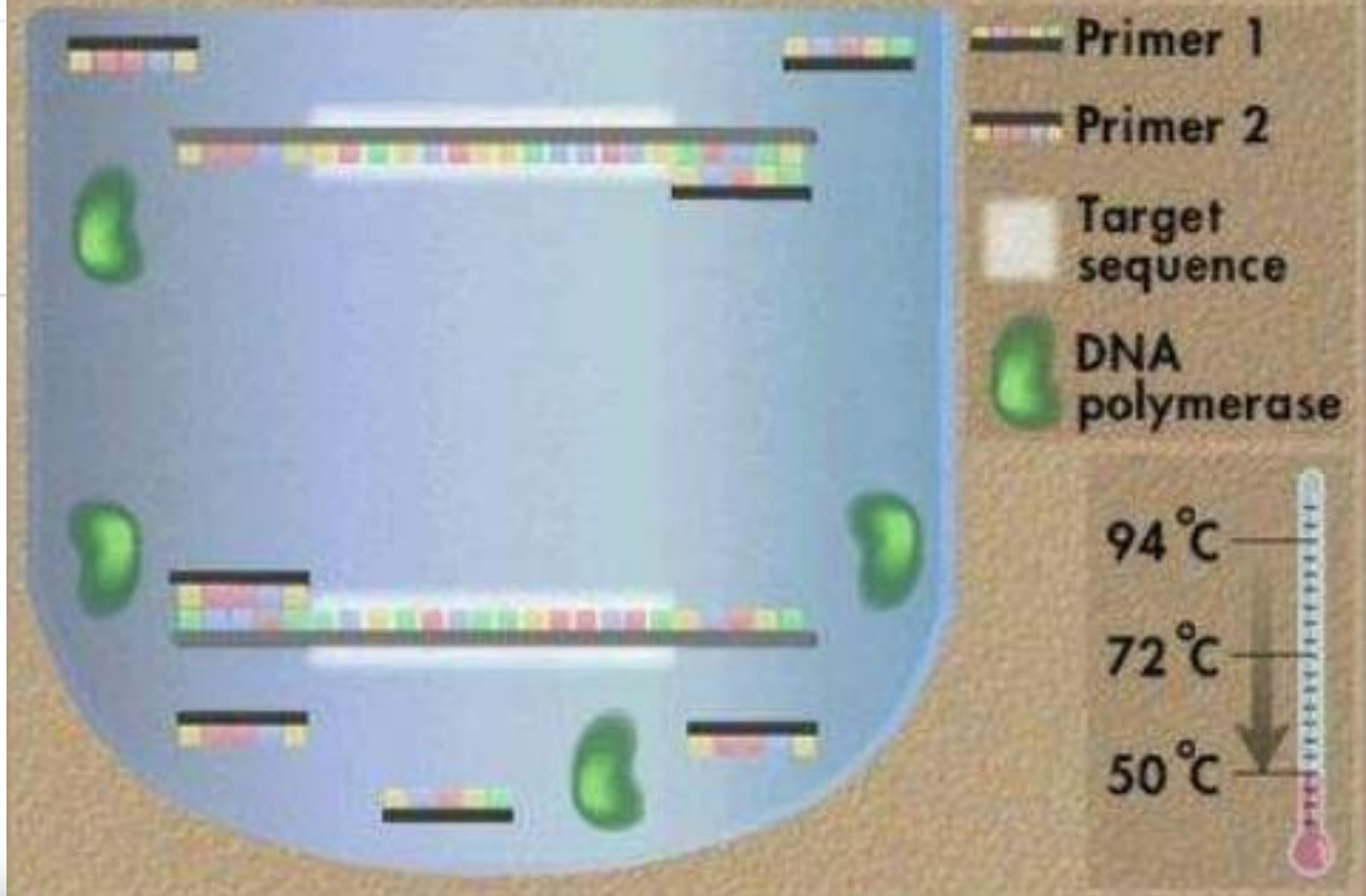
Denaturation



2. Penempelan Primer (*Annealing*)

- Pada tahap *annealing*, primer akan menuju daerah spesifik yang komplemen dengan urutan primer.
- Ikatan hidrogen akan terbentuk antara primer dengan urutan komplemen pada template selama 1-2 menit.
- Proses ini biasanya dilakukan pada suhu 45-60 °C.
- Selanjutnya, DNA polimerase akan berikatan sehingga ikatan hidrogen tersebut akan menjadi sangat kuat dan tidak akan putus kembali apabila dilakukan reaksi polimerisasi selanjutnya, misalnya pada suhu 72 °C.

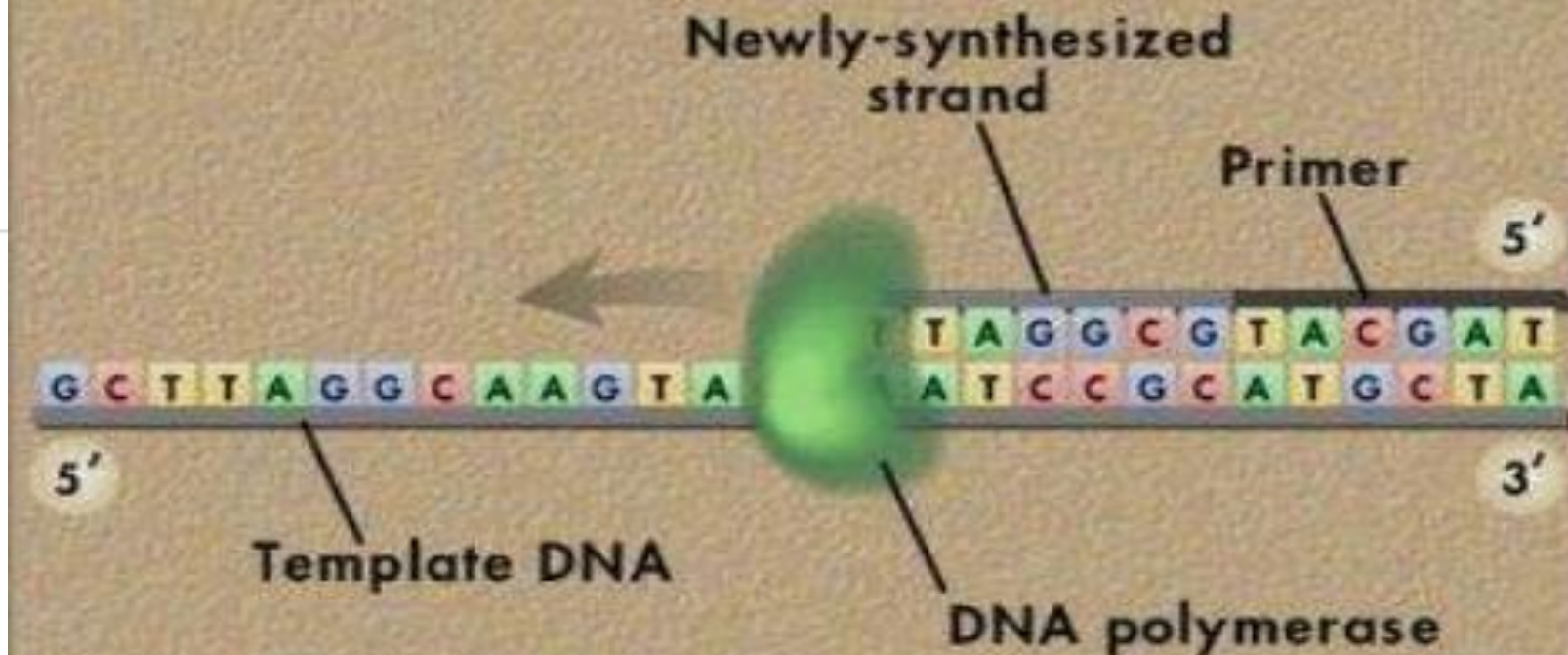
Annealing Primers



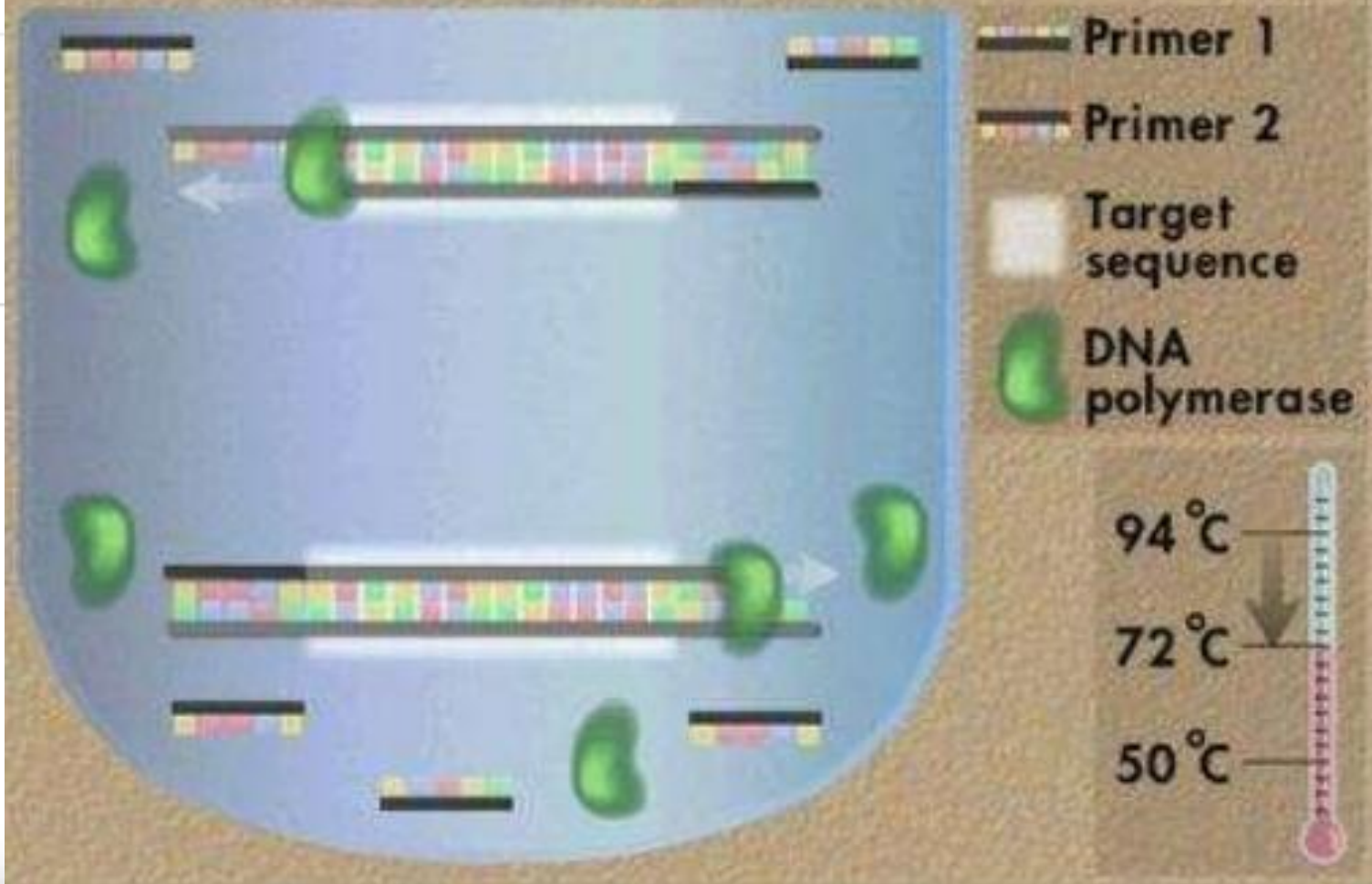
3. Reaksi Polimerisasi (*Elongation*)

- Reaksi polimerisasi terjadi pada suhu 72 °C.
- Primer yang telah menempel tadi akan mengalami perpanjangan pada sisi 3'nya dengan penambahan dNTP yang komplemen dengan template oleh DNA polimerase.
- Durasi tahap ini biasanya 1 menit.

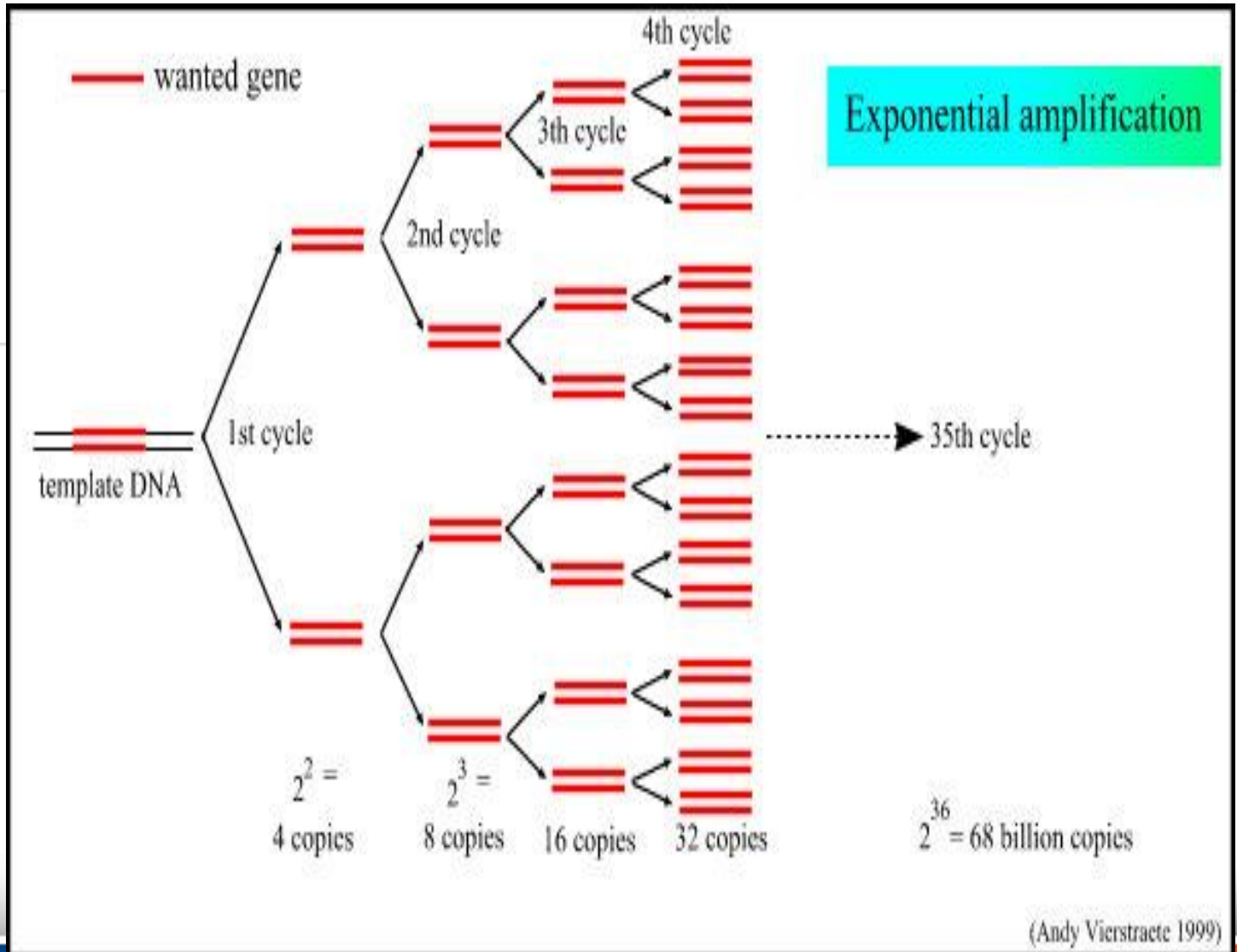
Direction of DNA Synthesis



DNA Synthesis



Polymerase Chain Reaction



PCR Cabinet

Main Features

- Greater protection against contamination from the ambient environment and cross-contamination within the main chamber.
- High quality polyester pre-filter and main HEPA filter with a typical efficiency of >99.99% at 0.3 microns.
- Built-in UV lamp with timer to facilitate decontamination between PCR cycles



Why PCR Cabinet

- ❖ it is essential to prevent possible contamination of the PCR reaction.
- ❖ Reagents should be prepared in the reagent preparation area and transferred to the sample preparation area through a pass box or inside closed containers
- ❖ The tubes should be transferred to the amplification area, again through a pass box or in a closed container
- ❖ Reagent temperature maintained in cold conditions

Why PCR Cabinet

```
graph LR; A[Reagent Preparation] --> B[Sample Preparation]; B --> C[Amplification];
```

Reagent
Preparation

Sample
Preparation

Amplification

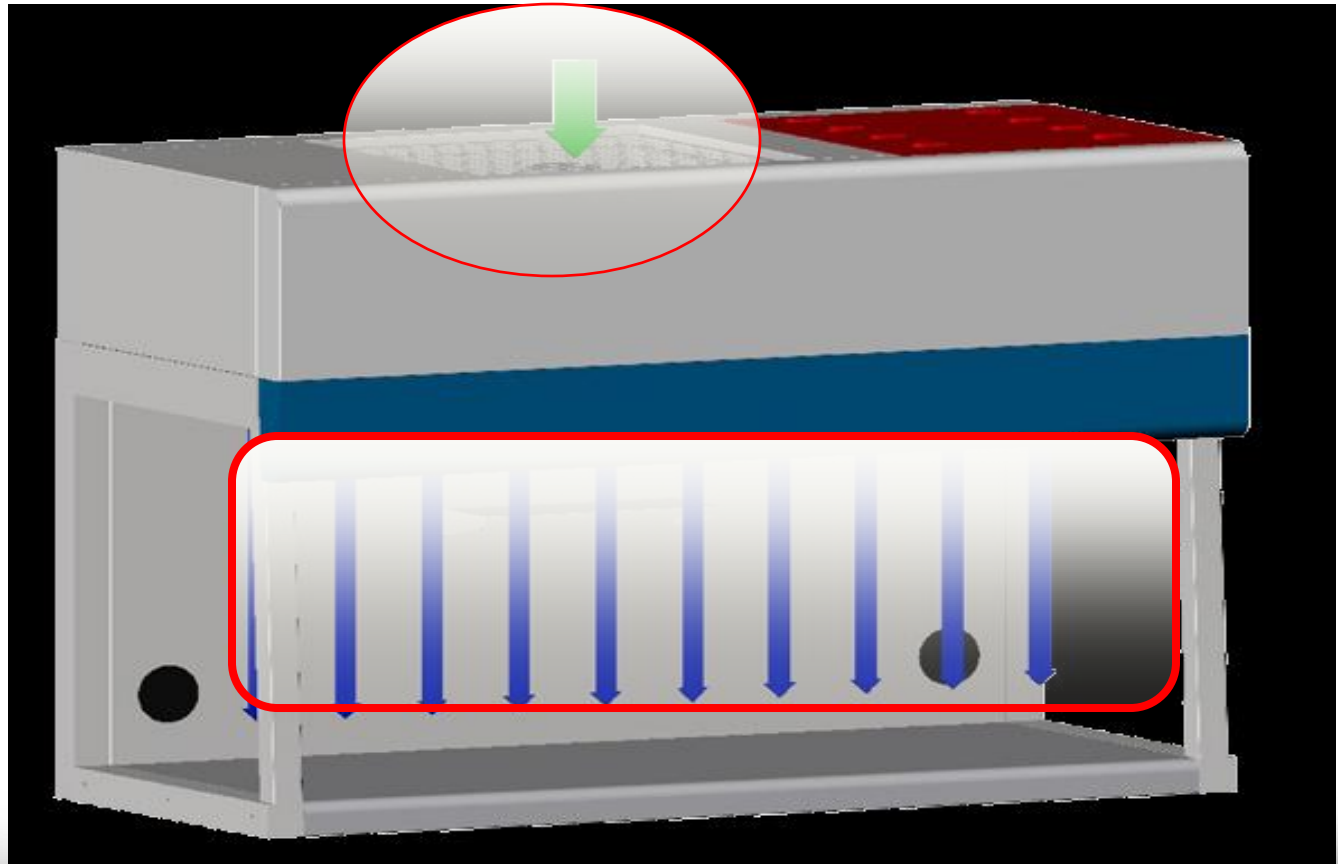
Component of PCR cabinet

➤ UV Decontamination Technology



Component of PCR cabinet

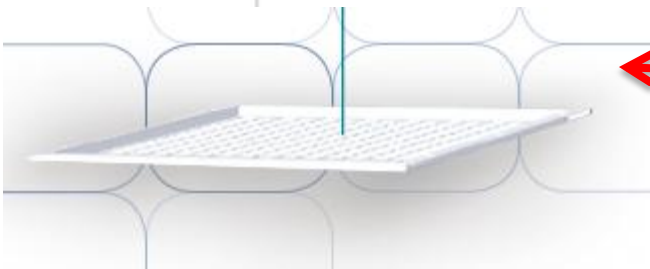
➤ HEPA-Filtered Laminar Airflow



Component of PCR cabinet

➤ Pre-Filters

An additional disposable pre-filter traps large particles in the inflow air prior to reaching the main filter, protecting against damage and prolonging filter life.



Component of PCR cabinet

➤ Control System



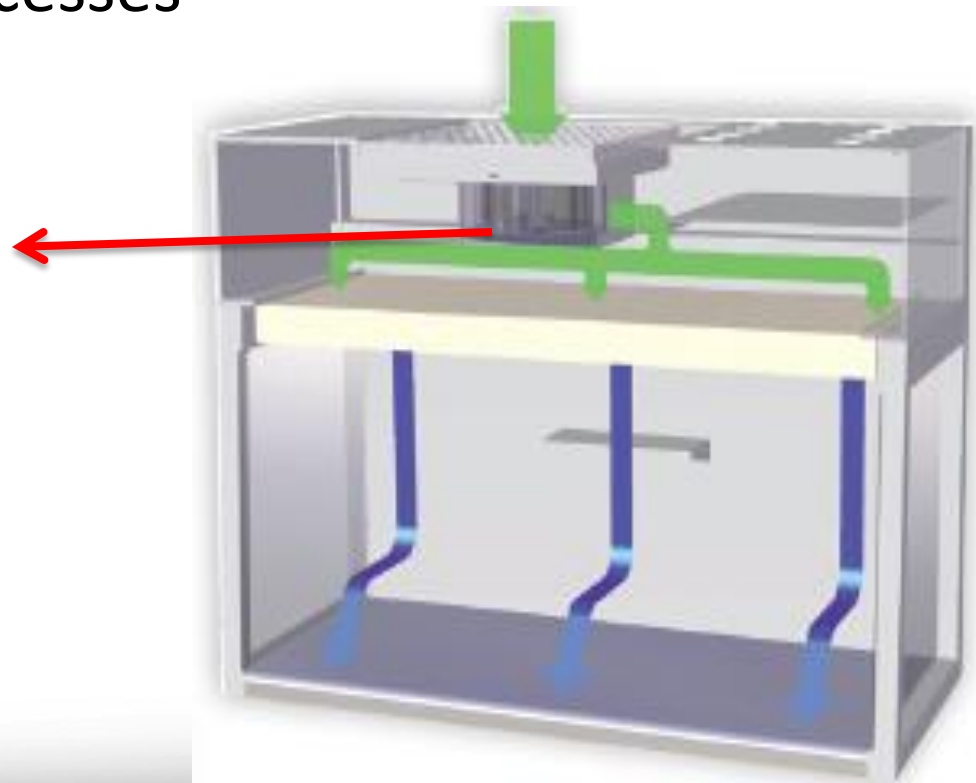
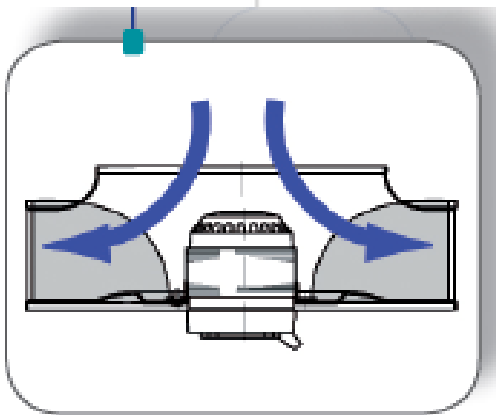
0.6 m (2') models are equipped with rocker switches for blower, light and UV



Component of PCR cabinet

➤ Blower

To provide and accommodate a large flow of air or gas to various processes



Macam-Macam PCR

- 1. Real Time PCR**
- 2. RT-PCR**
- 3. Nested PCR**
- 4. Multiplex-PCR**
- 5. dan lain-lain**



Real Time PCR (qPCR)

- Teknik ini digunakan untuk mengamplifikasi sekaligus kuantifikasi jumlah target molekul DNA hasil amplifikasi tersebut.
- Cara kerja : DNA yang telah diamplifikasi dihitung setelah diakumulasikan dalam reaksi secara real time sesudah setiap siklus amplifikasi selesai. Dengan ada probe yang berflorescence yang di tangkap oleh DNA –binding dye (SYBR green) ada suhu annealing.

Real Time PCR (qPCR)

Step 1:

Primers and probe bind to target DNA.

Step 2:

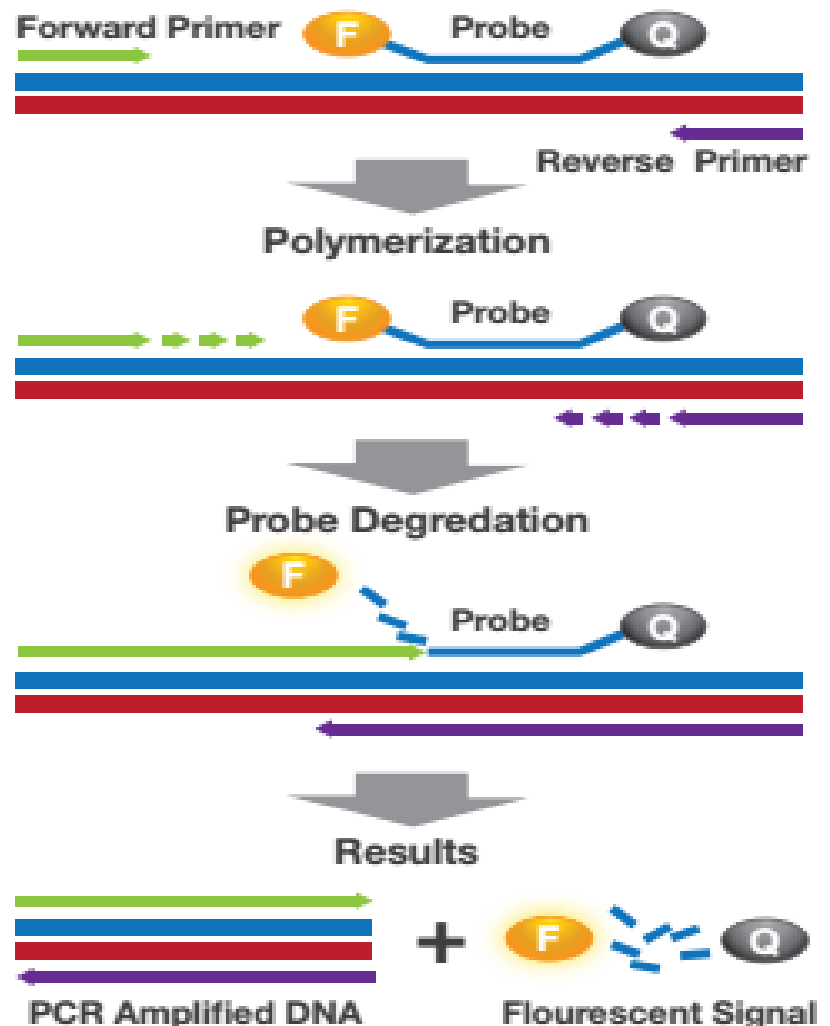
PCR occurs, primers are extended on forward and reverse DNA strands.

Step 3:

Probe is degraded as a result of polymerization and fluorescent signal is generated.

Step 4:

Target DNA is amplified and fluorescent signal can be measured and quantified.



Real Time PCR

PCR Konvensional	Real Time PCR
Sensitivitas rendah	Sensitivitas tinggi
Presisi rendah	Presisi tinggi
Tidak otomatis	Otomatis
Hasil tidak dalam bentuk angka	Data dikumpulkan dalam fase pertumbuhan eksponensial PCR
Ada tahapan setelah PCR	Tidak ada tahapan setelah PCR
Deteksi keberadaan DNA dilakukan pada akhir reaksi	Pengamatan dapat dilakukan saat reaksi berlangsung
Pengamatan keberadaan DNA hasil amplifikasi dilakukan di gel agarosa setelah dilakukan elektroforesis	Keberadaan DNA hasil amplifikasi dapat diamati pada grafik yang muncul sebagai hasil akumulasi fluoresensi dari probe (penanda)

RT-PCR (Reverse Transcriptase-PCR)

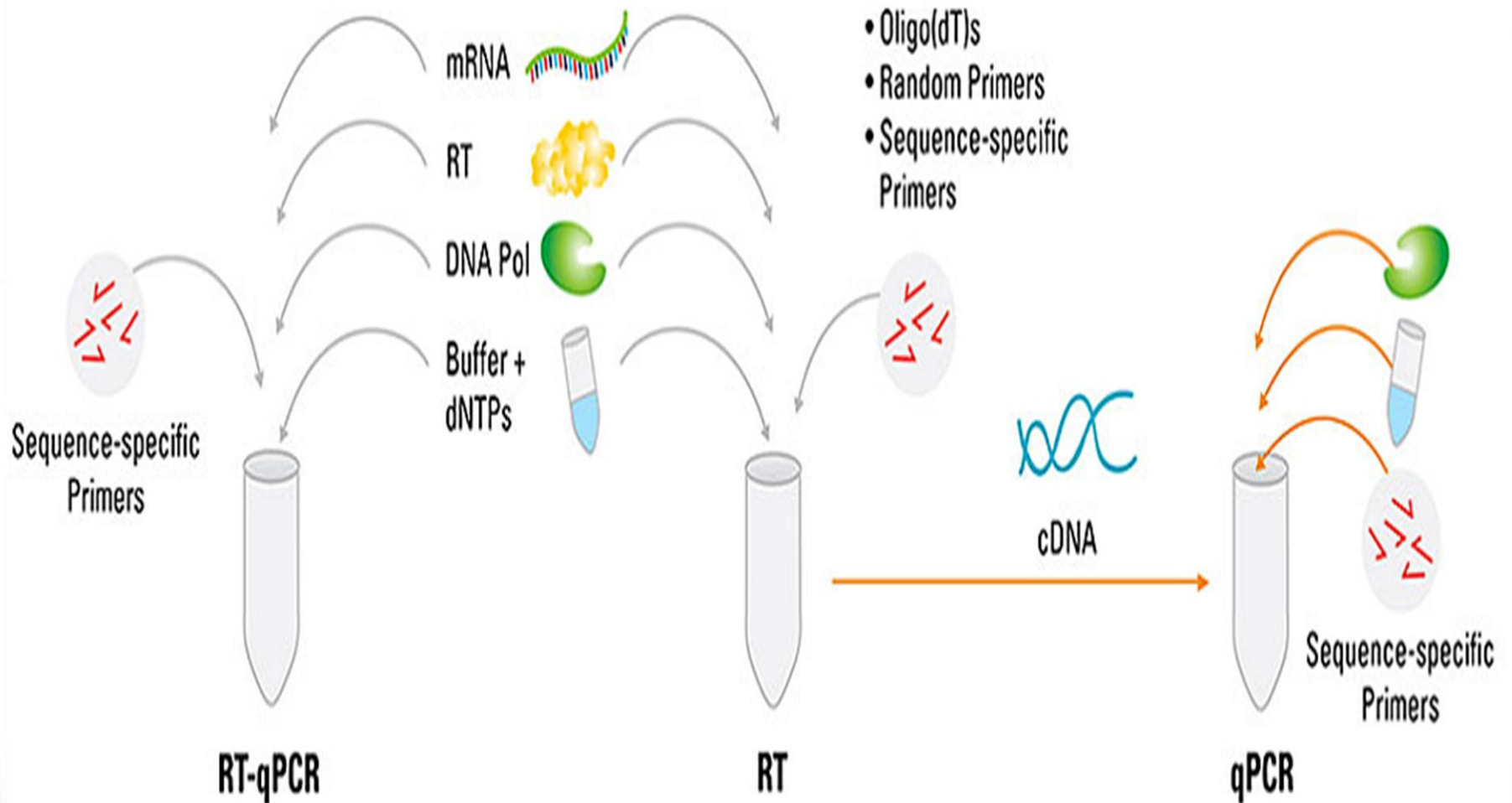
- Merupakan modifikasi dari PCR, dimana yang di amplifikasi berupa mRNA.
- Sampel yang digunakan bukan DNA melainkan RNA.
- Proses RT-PCR dibantu oleh enzim Reverse Transcriptase (dapat mensintesis DNA dengan cetakan RNA).
- RT-PCR penting digunakan sebagai alat diagnostik untuk mendeteksi dan menentukan serotipe virus, sebagai informasi untuk studi epidemiologi.

RT-PCR (Reverse Transcriptase-PCR)

Tahapan:

- RNA diubah dulu jadi DNA oleh enzim reverse transcriptase, yg disebut komplemen DNA (cDNA).
- Sintesis cDNA dari perpasangan antar gugus basa U dan A, serta G dan C.
- Dari cDNA dilipatgandakan segmen DNA yang mirip urutan basa nukleotidanya dengan RNA, hanya U diganti kembali ke T.
- Terjadi proses annealing untuk memasang primer untuk memperpanjang segmen cDNA.
- Setelah terbentuk segmen cDNA, baru kemudian masuk ke proses PCR biasa.

RT-PCR (Reverse Transcriptase-PCR)



One-Step

VS

Two-Step

Nested PCR

- Suatu teknik perbanyakkan (replikasi) sampel DNA menggunakan enzim DNA polimerase yang menggunakan 2 pasang primer untuk mengamplifikasi fragmen.
- Jika ada fragmen yang salah diamplifikasi, maka kemungkinan bagian tersebut diamplifikasi untuk kedua kalinya oleh primer yang kedua → sangat spesifik dalam melakukan amplifikasi.

Nested PCR

PCR Konvensional	Nested PCR
Digunakan 1 pasang primer	Digunakan 2 pasang primer, untuk meminimalkan kesalahan amplifikasi gen
Hasil fragmen DNA lebih panjang	Hasil fragmen DNA lebih spesifik (lebih pendek)
Waktu reaksi lebih sebentar, karena hanya dilakukan 1 kali reaksi PCR	Waktu reaksi lebih lama, karena dilakukan 2 kali reaksi PCR

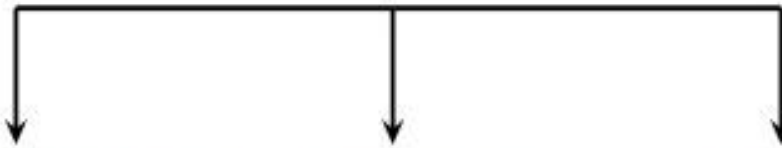
Multiplex-PCR

- Merupakan beberapa set primer dalam campuran PCR tunggal untuk menghasilkan amplikon dari berbagai ukuran yang spesifik untuk sekuens DNA yang berbeda.
- Dengan penargetan gen sekaligus, informasi dapat diperoleh dari reaksi tunggal yang tidak membutuhkan banyak reagen dan waktu.
- Temperatur annealing untuk masing-masing set primer harus dioptimalkan untuk bekerja dengan benar dalam reaksi tunggal, dan ukuran amplikon.
- Panjangnya pasangan basa harus cukup berbeda untuk membentuk pita yang berbeda ketika divisualisasikan dengan elektroforesis gel.

Kontrol Kualitas PCR

- Kontrol positif : cetakan atau sel yang pasti memberikan hasil positif (tabung berbeda)
- Kontrol negatif : tanpa cetakan atau sel (hasil harus negatif)
- Kontrol internal : DNA yang pasti memberikan hasil positif, dilakukan pada tabung sampel

Applications of PCR



Molecular Identification Sequencing

- Molecular Archaeology
- Molecular Epidemiology
- Molecular Ecology
- DNA fingerprinting
- Classification of organisms
- Genotyping
- Pre-natal diagnosis
- Mutation screening
- Drug discovery
- Genetic matching
- Detection of pathogens

Genetic Engineering

- Bioinformatics
- Genomic cloning
- Human Genome Project
- Site-directed mutagenesis
- Gene expression studies



**Thank
You!!!**

www.esaunggul.ac.id