



---

# **MODUL POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)**

**Program studi sarjana kedokteran**



**MODUL  
POLYMERASE CHAIN  
REACTION (PCR)  
FK-UMPR**

---

# Polymerase Chain Reaction (PCR)=DNA Photocopier

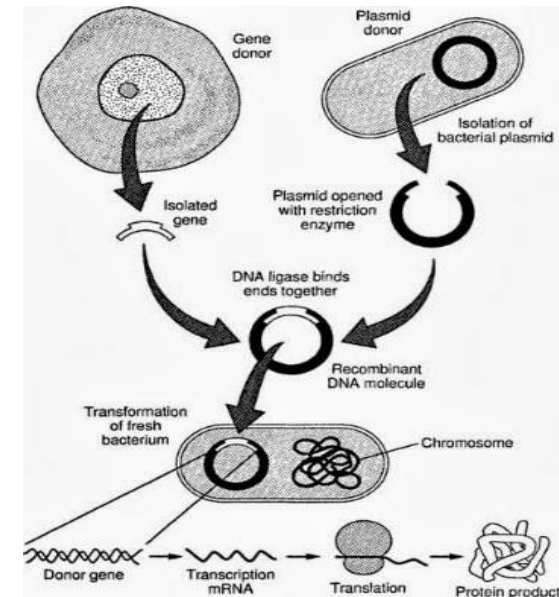
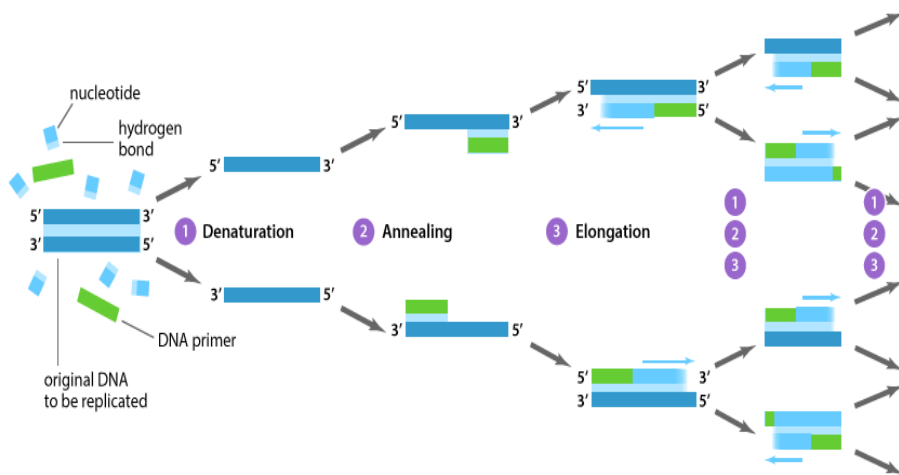
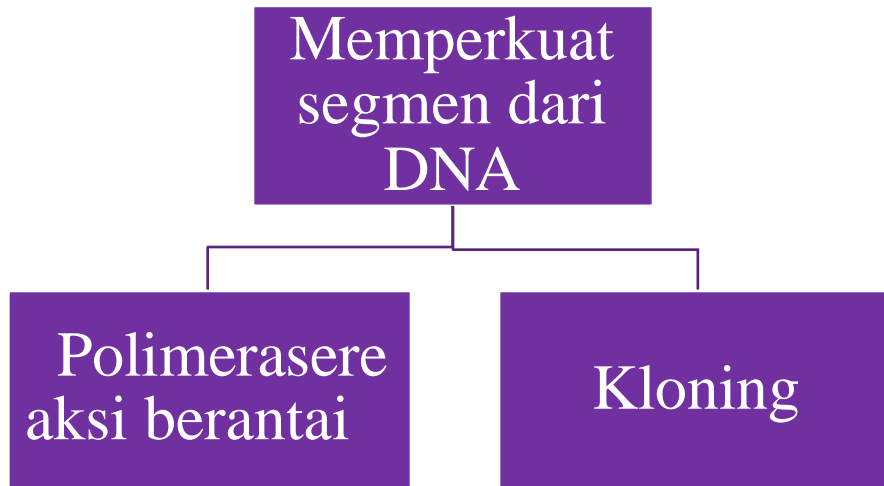




# DNA amplification:

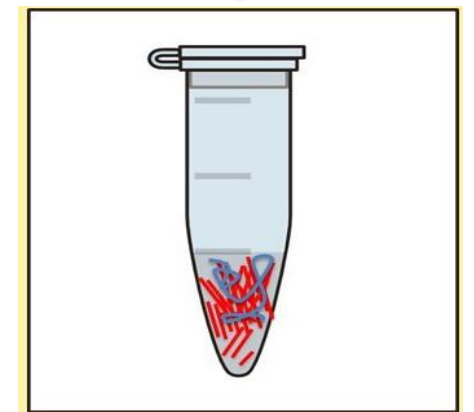
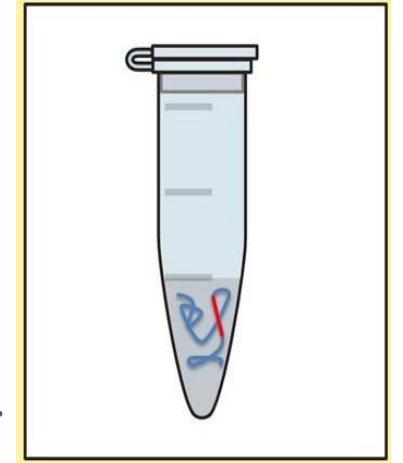
- Di laboratorium ditemukan sampel DNA, namun jumlah DNA tidak cukup dianalisis.
- Setelah ekstraksi DNA, kita ingin mempelajari bagian tertentu dari suatu gen untuk melakukan pengurutan.
- Bagaimana mengatasi masalah ini?

- Solusinya adalah dengan melakukan amplifikasi dari bagian dari DNA
- Terutama ada dua metode:



# PCR-Polymerase Chain Reaction:

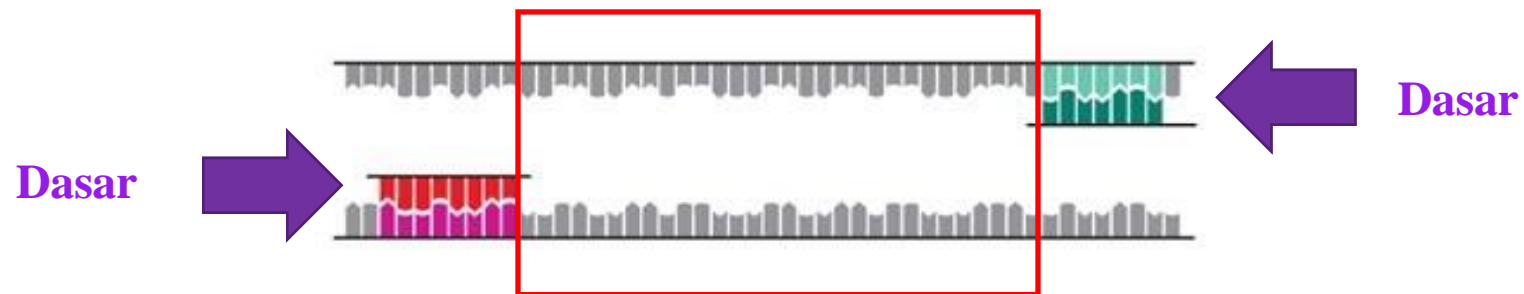
- PCR adalah sarana untuk **memperkuat sepotong DNA tertentu**.  
→ **Memperkuat**= membuat banyak salinan segmen DNA.
- PCR dapat membuat miliaran salinan rangkaian target DNA dalam waktu singkat.
- Ini adalah sebuah **versi laboratorium** Replikasi DNA dalam sel.  
→ ***secara in vitro***” karena terjadi di dalam tabung reaksi sedangkan ***secara alami***” menandakan terjadi dalam sel hidup.



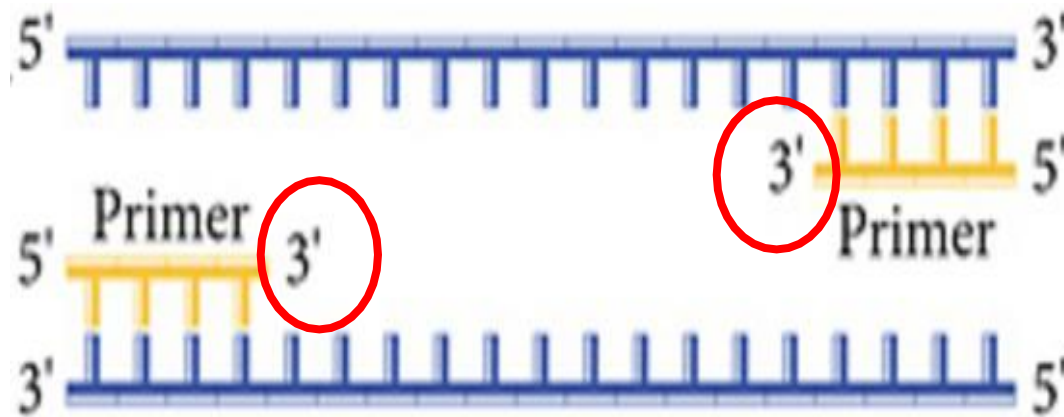


# Amplification of a specific target sequence:

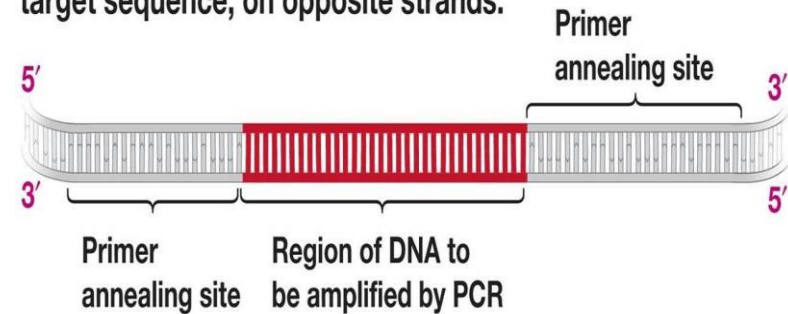
- PCR tidak menyalin seluruh DNA dalam sampel. Ia hanya menyalin **urutan yang sangat spesifik** kode genetik dari DNA templat, yang ditargetkan oleh primer PCR.
- Diperlukan pengetahuan tentang beberapa informasi sekuens DNA yang mengapit fragmen DNA untuk dapat diamplifikasi (**DNA sasaran**).



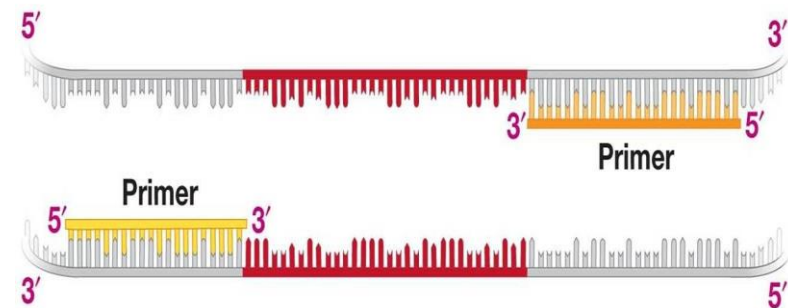
- Dari informasi ini dua primer oligo nukleotida sintetik dapat disintesis secara kimia masing-masing melengkapi rangkaian DNA kesisi 3'DNA target, satu oligo nukleotida untuk masing-masing dua untai DNA (DNA polimerase hanya dapat menambahkan nukleotida ke gugus 3'-OH yang sudah ada sebelumnya).



(a) PCR primers must bind to sequences on either side of the target sequence, on opposite strands.

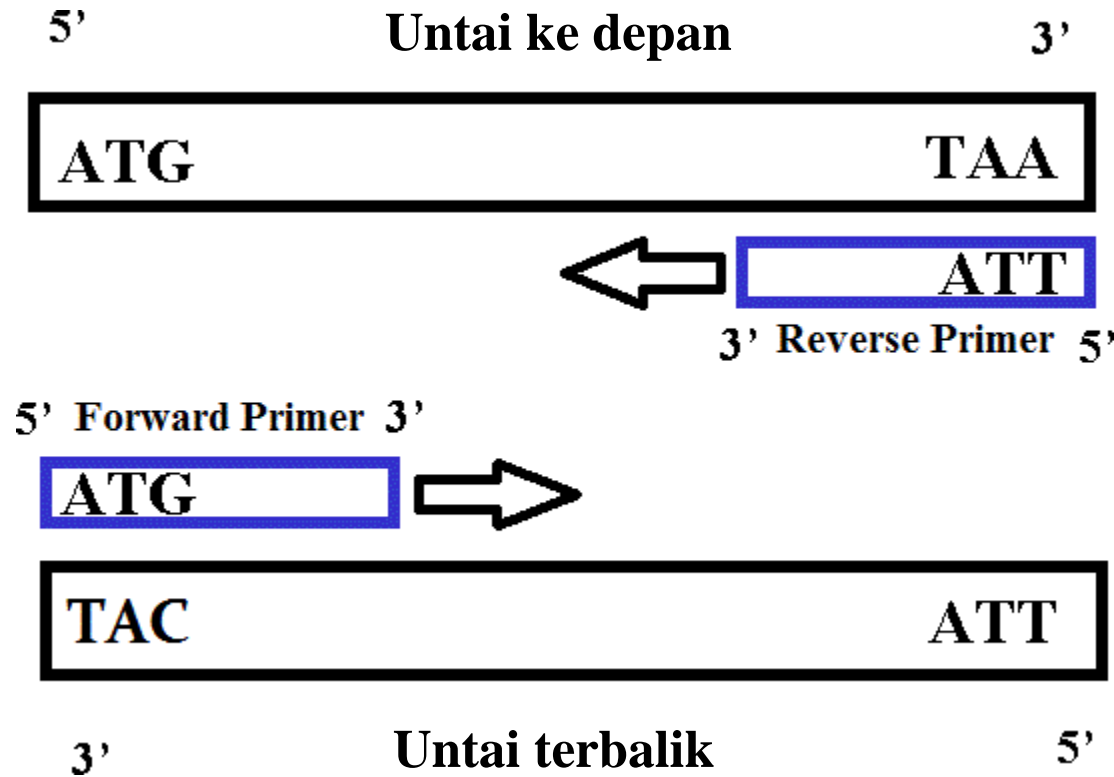


(b) When target DNA is single stranded, primers bind and allow DNA polymerase to work.





# Why we need two primers ?



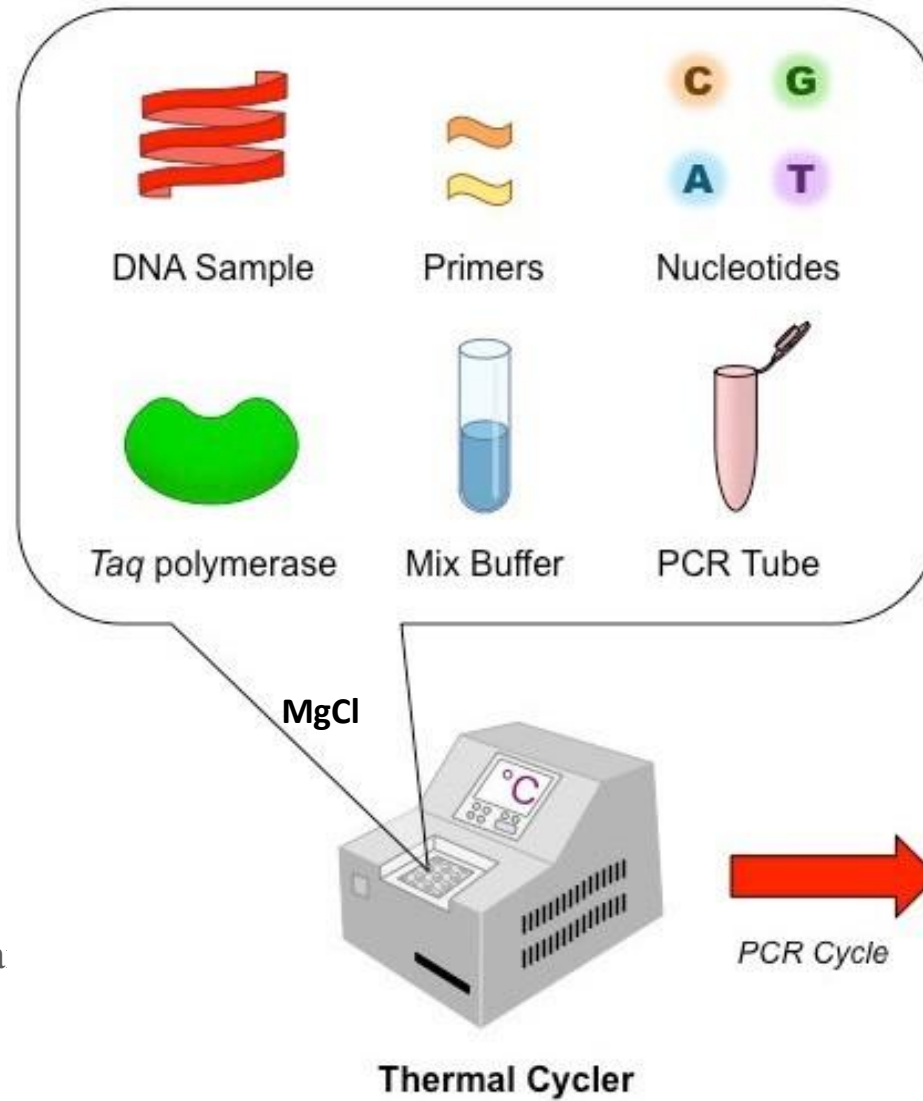
- Dalam reaksi PCR yang Anda butuhkan **dua primer** untuk memperkuat urutan target:

→ **Primer ke depan**, yang memiliki urutan untai DNA depan yang sama dan **berikatan** dengan untai balik komplementer.

→ **Primer terbalik**, yang memiliki urutan untai DNA terbalik yang sama dan **berikatan** dengan untai depan komplementer.

\*Jika hanya ada satu primer, hanya satu untai DNA untai ganda yang akan di amplifikasi pada reaksi PCR.

# Components of PCR



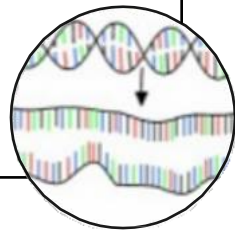
Reagen tambahan mungkin disertaka

# The PCR Cycle :

- PCR berlangsung dalam TIGA langkah berbeda yang Diatur oleh **Suhu:**

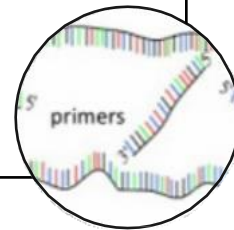
- DNA cetakan beruntai ganda adalah didenaturasi dengan pemanasan, biasanya hingga  $95^{\circ}\text{C}$ , untuk

**Denaturasi:**  
( $95^{\circ}\text{C}$ )



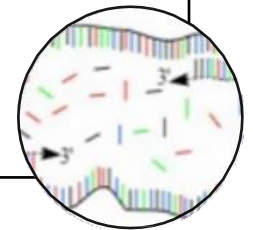
- Reaksi dengan cepat didinginkan sampai suhu anil untuk memungkinkan oligonukleotida primer untuk

**\*\*anil:**  
( $50-65^{\circ}\text{C}$ )



- Reaksi dipanaskan sampai suhu, biasanya  $72^{\circ}\text{C}$  sintesis DNA yang efisien oleh DNA

**Perpanjangan:**

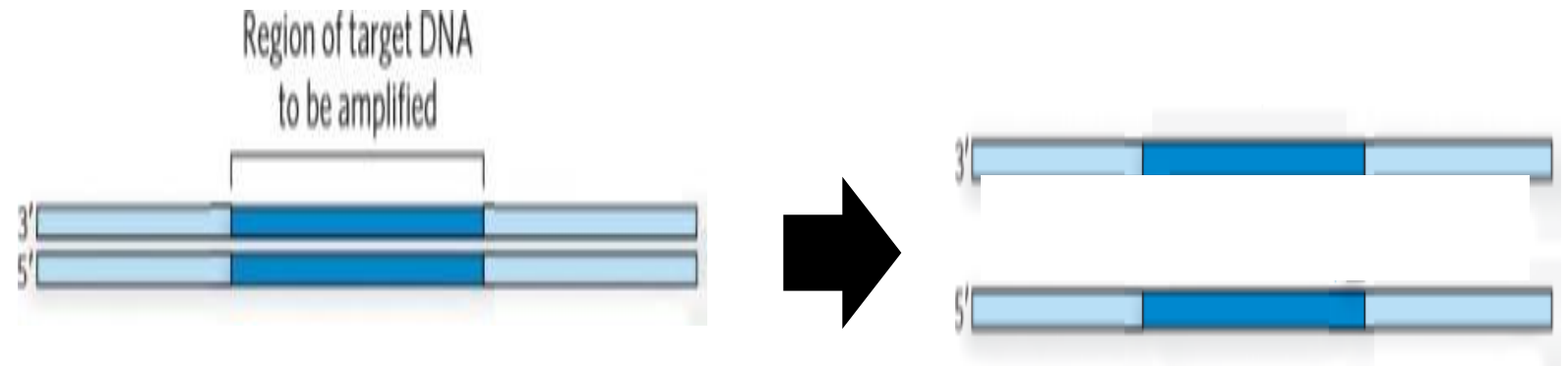


# 1. Denaturation:

- DNA cetakan beruntai ganda didenaturasi dengan pemanasan, biasanya menjadi **95°C**, untuk memisahkan DNA beruntai ganda (**Mengapa?**).

## Langkah 1

(94–97 °C)

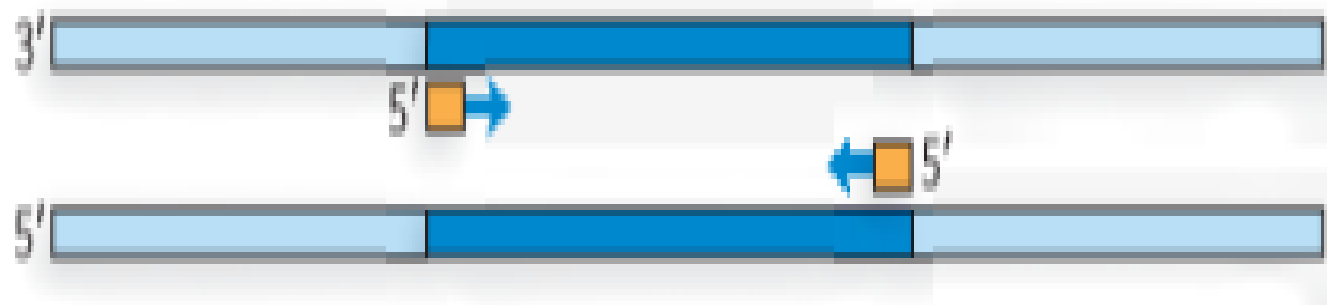


## 2. Annealing:

- Reaksinya cepat **di dinginkan sampai suhu anil primer**(50-65 °C) untuk memungkinkan primer oligonukleotida berhibridisasi menjadi templat beruntai tunggal.
- Primer hanya akan dianil pada sekuens yang saling melengkapi (deretan target).
- Apa jenis obligasinya?

### Langkah 2

(50–65 °C)



# 3. Extension:

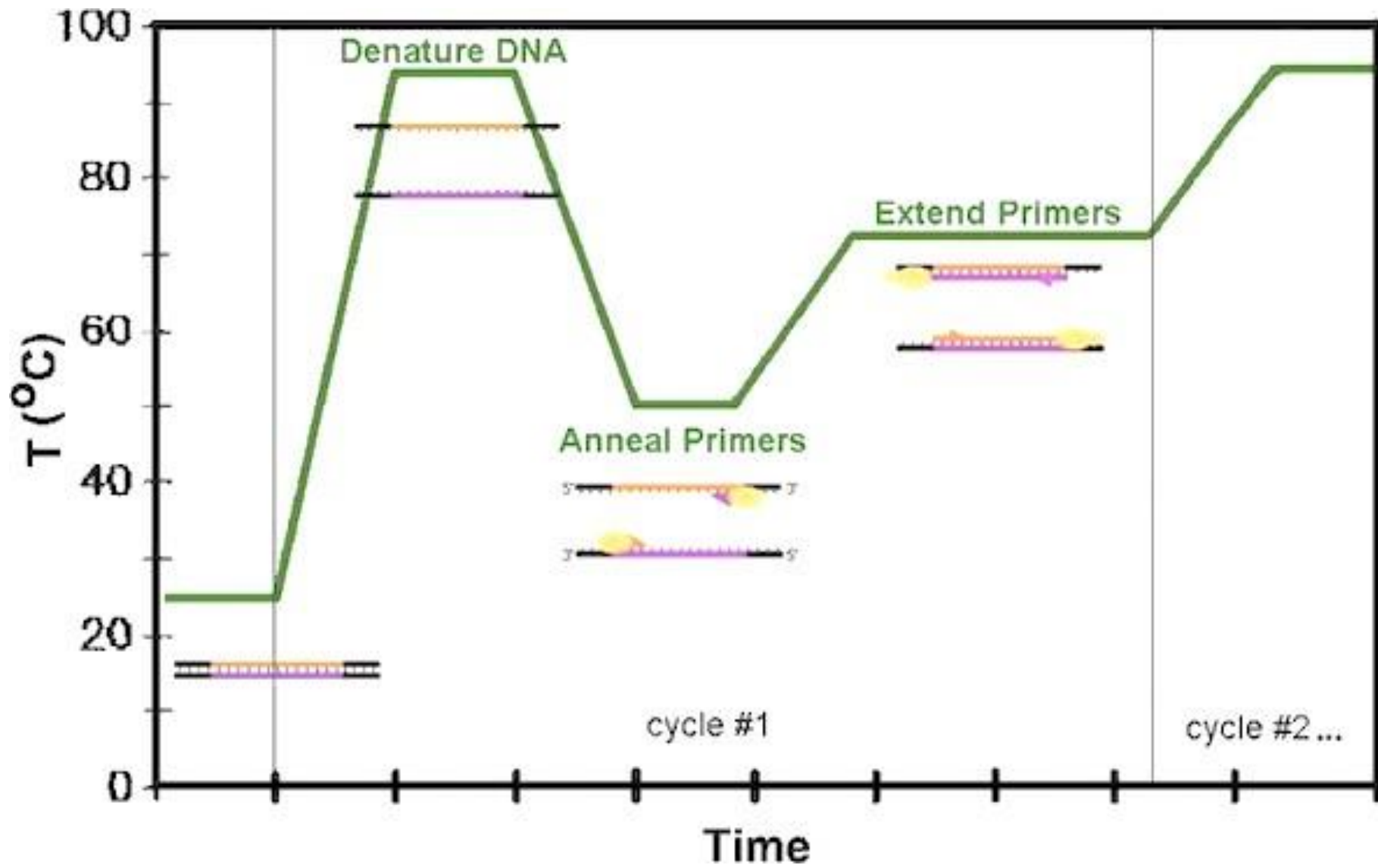
- Reaksinya adalah **dipanaskan** ke suhu tergantung pada **DNA polymerase** digunakan.
- **Biasanya** suhu **72°C** digunakan dengan enzim ini.
- Artinya suhu 72°C adalah ..... DNA polimerase optimum.
- Pada langkah ini DNA polymerase **mensintesis DNA baru** untai yang saling melengkapi dengan cetakan DNA

## Langkah 3

(72 °C)

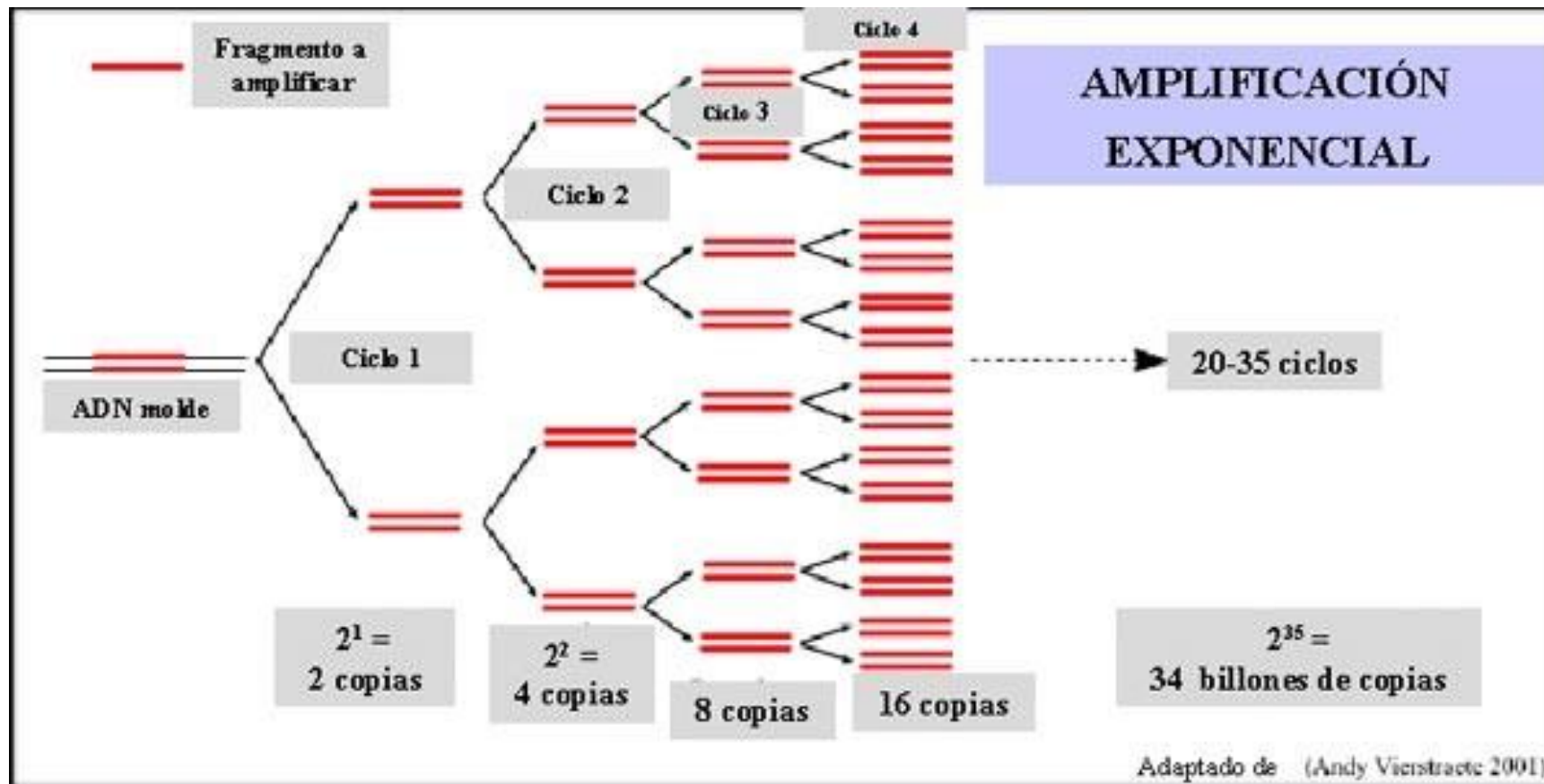




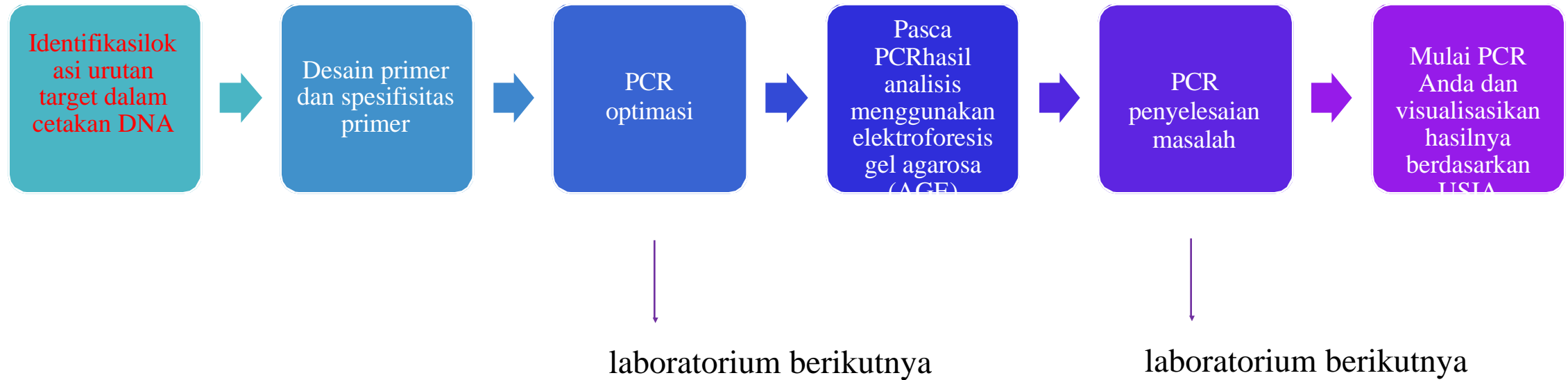


Satu X 25 siklus

- Pada akhir reaksi PCR, urutan spesifik akan terakumulasi dalam miliaran salinan (**amplikon**).
- Hanya dalam 20 siklus, PCR dapat menghasilkan sekitar satu juta ( $2^{20}$ ) salinan target.



# Performing PCR steps :



# Example:

- Anda ingin belajar **mutasi pada gen DLG3** dan bagaimana kaitannya dengan memori:
  1. Temukan urutan gen dari situs web mana pun, misalnya Ensembl.
  2. Tentukan wilayah target Anda.

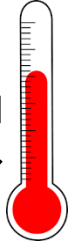
**Segmen yang ingin Anda perkuat ada di kotak merah**

5' CATGCGATAAGAGTGATTGAGGT **CCACCATGTTATCATGCGATAAGAGTGATTGAGGI** CCACCATGTTATCATGCGATAAGAGTGATTGAGGT 3'  
3' GTACGCTATTCTCACTAACTCCA **GGTGGTACAATAGTACGCTATTCTCACTAACTCCA** GGTGGTACAATAGTACGCTATTCTCACTAACTCCA 5'

3. Rancang primer menggunakan alat desain primer, misalnya Primer3, lalu kirimkan ke perusahaan mana pun yang akan mensintesisnya.
4. Pastikan area yang ingin diteliti berada di antara primer (daerah yang akan diteliti sebaiknya berada di antara primer maju dan mundur).
5. Periksa spesifisitas primer dengan BLAST.
6. Optimalkan PCR Anda dan pemecahan masalah.
7. Mulai PCR.

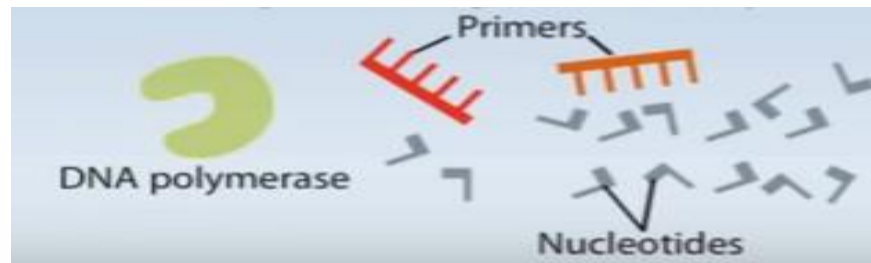
# Start your PCR !

## 1. Denaturasi:

95 °C 

5' CATGCGATAAGAGTGATTGAGGT **CCACCATGTTATCATGCGATAAGAGTGATTGAGGT CCACCATGTTATCATGCGATAA**GAGTGATTGAGGT 3'

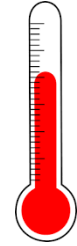
3' GTACGCTATTCTCACTAACTCCA **GGTGGTACAATAGTACGCTATTCTCACTAACTCCA GGTGGTACAATAGTACGCTATT**CTCACTAACTCCA 5'



# Start your PCR !

## 2. Anil:

58 °C



5' CATGCGATAAGAGTGATTGAGGT CCACCATGTTATCATGCGATAAGAGTGATTGAGGT CCACCATGTTATCATGCGATAAGAGTGATTGAGGT 3'  
3' GGTGGTACAATAGTACGCTATT 5'

5' CCACCATGTTATCATGCGA 3'  
3' GTACGCTATTCTCACTAACTCCA GGTGGTACAATAGTACGCTATTCTCACTAACTCCA GGTGGTACAATAGTACGCTATTCTCACTAACTCCA 5'

Primer ke  
depan: 5' CCACCATGTTATCATGCGA 3'

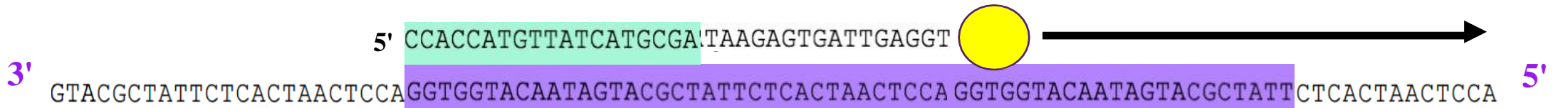
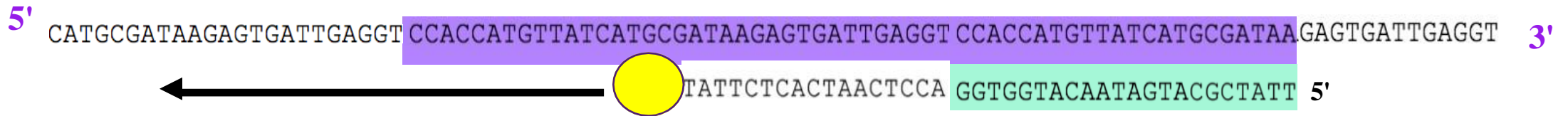
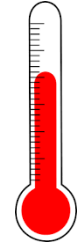
Primer terbalik: 3' GGTGGTACAATAGTACGCTATT 5'



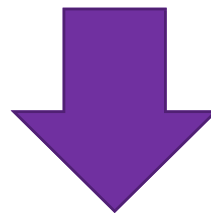
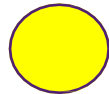
# Start your PCR !

## 3. Perpanjangan:

72 °C

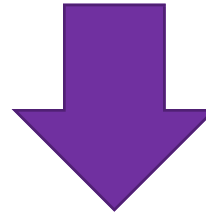


Taq DNA polimerase

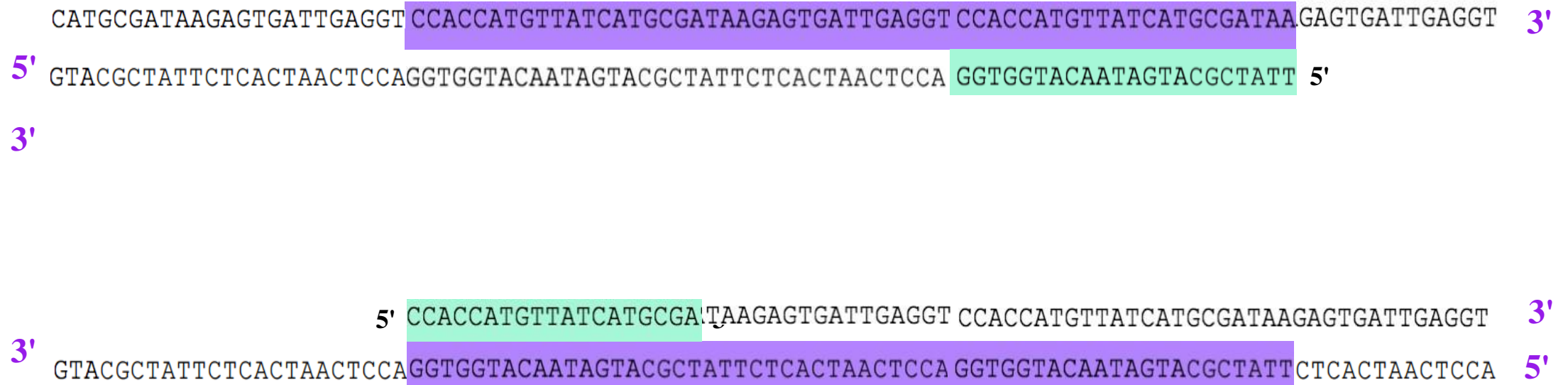
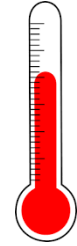


# Start your PCR !

## 3. Perpanjangan:



72 °C



Siklus #1:  
1 DNA diamplifikasi menjadi 2 DNA

# Siklus

## 2

### 1. Denaturasi

5' CATGCGATAAGAGTGATTGAGGT CCACCATGTTATCATGCGATAAGAGTGATTGAGGT CCACCATGTTATCATGCGATAAGAGTGATTGAGGT 3'  
3' GTACGCTATTCTCACTAACTCCA GGTGGTACAATAGTACGCTATTCTCACTAACTCCA GGTGGTACAATAGTACGCTATT 5'

5' CCACCATGTTATCATGCGATAAGAGTGATTGAGGT CCACCATGTTATCATGCGATAAGAGTGATTGAGGT 3'

3' GTACGCTATTCTCACTAACTCCA GGTGGTACAATAGTACGCTATTCTCACTAACTCCA GGTGGTACAATAGTACGCTATTCTCACTAACTCCA 5'



### 2. anil

5' CATGCGATAAGAGTGATTGAGGT CCACCATGTTATCATGCGATAAGAGTGATTGAGGT CCACCATGTTATCATGCGATAAGAGTGATTGAGGT 3'  
3' GGTGGTACAATAGTACGCTATT 5'

5' CCACCATGTTATCATGCGATAAGAGTGATTGAGGT CCACCATGTTATCATGCGATAAGAGTGATTGAGGT 3'  
3' GGTGGTACAATAGTACGCTATT 5'



5' CCACCATGTTATCATGCGA 3'  
3' GTACGCTATTCTCACTAACTCCA GGTGGTACAATAGTACGCTATTCTCACTAACTCCA GGTGGTACAATAGTACGCTATT 5'

5' CCACCATGTTATCATGCGA 3'  
3' GTACGCTATTCTCACTAACTCCA GGTGGTACAATAGTACGCTATTCTCACTAACTCCA GGTGGTACAATAGTACGCTATTCTCACTAACTCCA 5'

# Siklus 2

## 3.Perpanjangan

5' CATGCGATAAGAGTGATTGAGGT CCACCATGTTATCATGCGATAAGAGTGATTGAGGI CCACCATGTTATCATGCGATAA GAGTGATTGAGGT 3'  
 3' GTACGCTATTCTCACTAACTCCA GGTGGTACAATAGTACGCTATTCTCACTAACTCCA GGTGGTACAATAGTACGCTATT 5'

5' CCACCATGTTATCATGCGA TAAGAGTGATTGAGGT CCACCATGTTATCATGCGATAA GAGTGATTGAGGT 3'  
 3' GGTGGTACAATAGTACGCTATTCTCACTAACTCCA GGTGGTACAATAGTACGCTATT 5'

5' CCACCATGTTATCATGCGATAAGAGTGATTGAGGT CCACCATGTTATCATGCGATAA 3'  
 3' GTACGCTATTCTCACTAACTCCA GGTGGTACAATAGTACGCTATTCTCACTAACTCCA GGTGGTACAATAGTACGCTATT 5'

5' CCACCATGTTATCATGCGA TAAGAGTGATTGAGGT CCACCATGTTATCATGCGATAA GAGTGATTGAGGT 3'  
 3' GTACGCTATTCTCACTAACTCCA GGTGGTACAATAGTACGCTATTCTCACTAACTCCA GGTGGTACAATAGTACGCTATTCTCACTAACTCCA 5'

# Siklus 3


5' CCACCATGTTATCATGCGA TAAGAGTGATTGAGGT CCACCATGTTATCATGCGATAA 3'  
 3' GGTGGTACAATAGTACGCTATTCTCACTAACTCCA GGTGGTACAATAGTACGCTATT 5'

5' CCACCATGTTATCATGCGA TAAGAGTGATTGAGGT CCACCATGTTATCATGCGATAA 3'  
 3' GGTGGTACAATAGTACGCTATTCTCACTAACTCCA GGTGGTACAATAGTACGCTATT 5'

**Urutan sasaran** Muncul setelah tiga siklus dan mulai terakumulasi



**Setelah 30 siklus:**  
 $2^{30}$  salinan DNA target!!

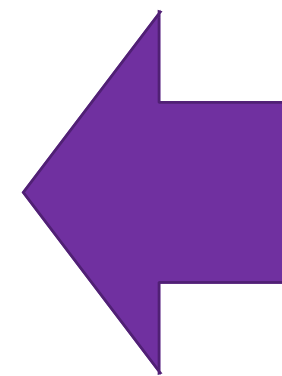
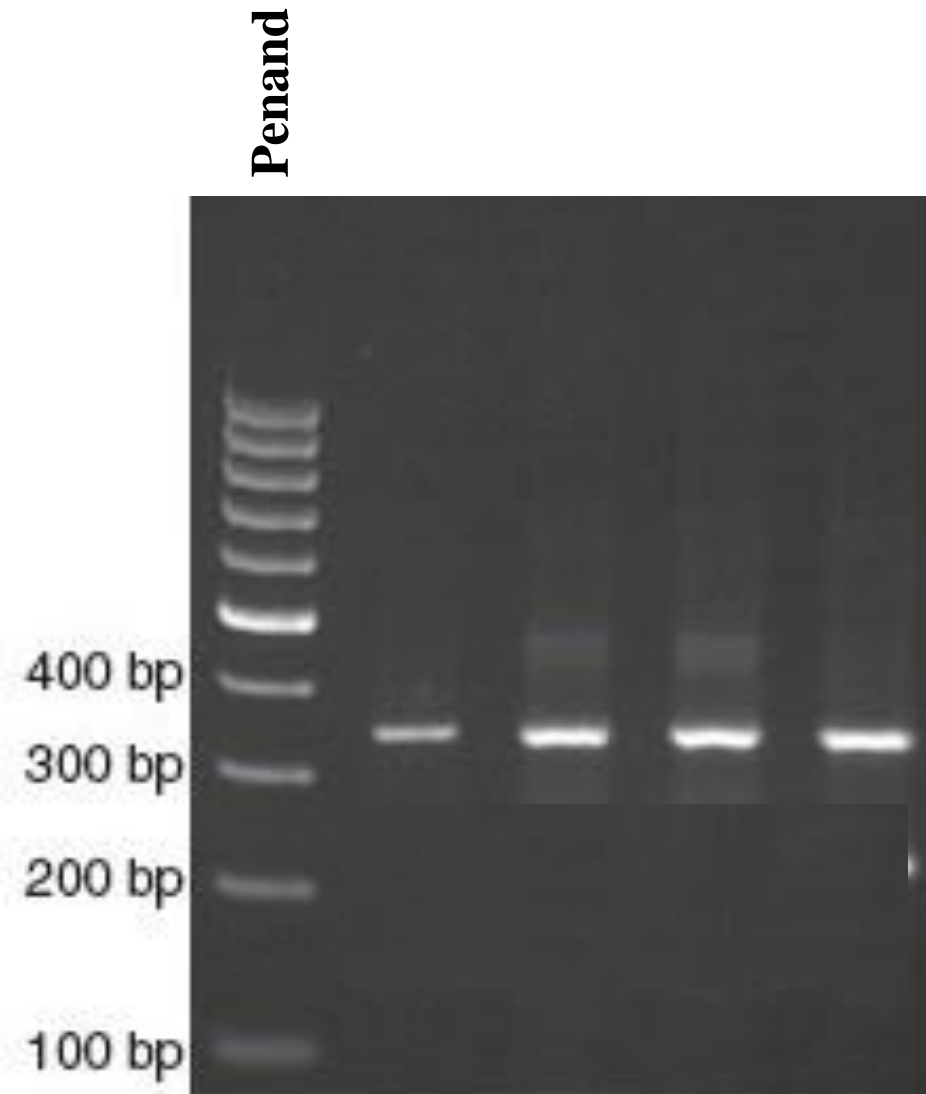


**Bagaimana Anda akan memastikan bahwa urutan target Anda diperkuat? Sangat penting untuk mengetahui ukuran produk**

**Anda, mengapa?**

**→ Ukuran urutan target kami adalah 350 bp**

# AGE results



**Urutan sasaran**





## PCR advantages:

- Kesederhanaan, metodologi yang lebih mudah, sensitif, prosedur operasi standar yang divalidasi secara luas serta ketersediaan reagen dan peralatan

## PCR application:

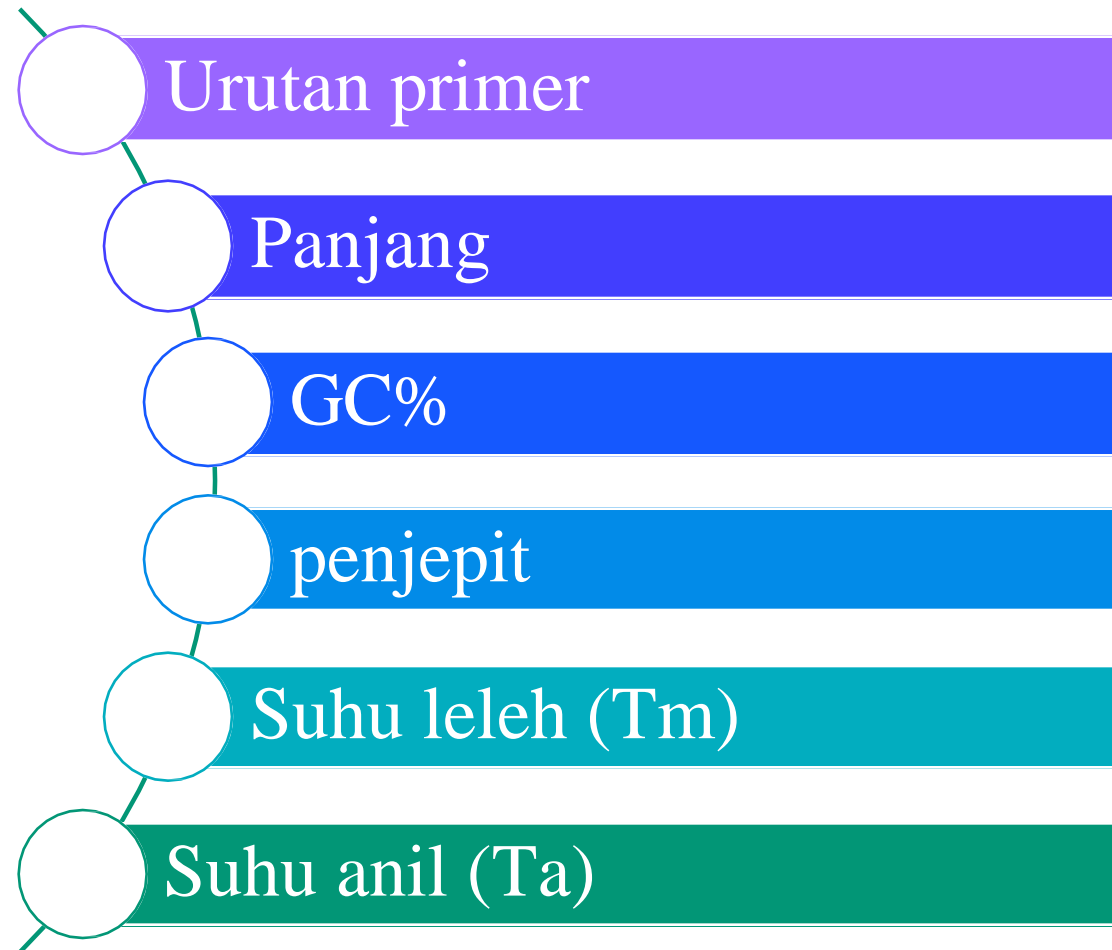
- Genotipe.
- RT-PCR.
- Kloning.
- Deteksi mutasi.
- Pengurutan.
- mikroarray.
- Forensik.
- Pengujian garis ayah.



# PCR Optimization:

- Tidak ada satu set kondisi yang optimal untuk semua reaksi PCR.
- Lab selanjutnya.

# Primer Design Guidelines:





# Primer Design Guidelines:

## 1. Urutan primer:

- Harus melengkapi urutan mengapit wilayah target.
- Menghindari:
  - Urutan komplementer antar primer.
  - Ulangi (misal: ATATATAT) ❑ salah prima.
  - Berjalan (misal: AGCGGGGAT) ❑ salah prima.
  - Ketidakcocokan di akhir 3'.
  - Lintas Homologi.

## 2. Panjang primer:

- Secara umum diterima bahwa panjang primer yang optimal adalah **18-25 hal.**
- Tidak terlalu panjang dan tidak terlalu pendek



# Primer Design Guidelines:

## 3. Konten GC:

- **GC%** =Jumlah G dan C dalam primer sebagai persentase dari total basa.
- Seharusnya 40-60%.

## 4. penjepit GC:

- Kehadiran basa G atau C di dalam **lima pangkalan terakhir** dari ujung 3' primer.
- Tidak lebih dari 2 G atau C.

5' -CAACATAATAGCGACAACA**CTAGA**-3'



# Primer Design Guidelines:

## 5. Suhu leleh ( $T_m$ ):

- Apa itu  $T_m$ ?
- Suhu leleh di kisaran **50-60 °C** umumnya memberikan hasil terbaik.
- Perbedaan maksimum antara pasangan primer adalah **5°C**.
- $T_m$  primer dapat dihitung dengan rumus berikut:

$$T_m = [(G + C) \times 4] + [(A + T) \times 2]$$

## 6. Suhu Anneal ( $T_a$ ):

- Suhu leleh primer merupakan perkiraan stabilitas hibrid DNA-DNA dan sangat penting dalam menentukan suhu annealing.
- Tergantung langsung pada panjang dan komposisi GC primer.
- **Terlalu tinggi  $T_a$**  □ menghasilkan hibridisasi primer-templat yang tidak mencukupi.
- **Terlalu rendah  $T_a$**  □ menyebabkan produk non-spesifik yang disebabkan oleh tingginya jumlah ketidakcocokan pasangan basa.





# Now... you should be able to answer the following questions:

- Bagaimana amplifikasi akan dilakukan?
- Bagaimana Anda menentukan urutan target Anda?
- Bagaimana amplifikasinya spesifik untuk segmen tertentu?
- Apa saja persyaratan untuk membawa PCR?

