

Metoda: Polymerázová řetězová reakce – PCR

Nikola Hatová, ZL2

Školitelé: PharmDr. Eva Šimečková

Princip:

Základním principem polymerázové řetězové reakce (PCR) je opakující se denaturace dvouřetězové DNA (deoxyribonukleové kyseliny) a následná renaturace osamocených řetězců specifickými oligonukleotidy (jednovláknové řetězce nukleové kyseliny dlouhé nejvýše několik desítek bazí), které jsou komplementární k cílovému místu na DNA. Tyto oligonukleotidy slouží následně jako primery pro syntézu nového řetězce DNA. Amplifikace (zmnožení) DNA probíhá v opakujících se cyklech, které mají 3 kroky. Prvním krokem je denaturace, při které se DNA zahřeje na teplotu kolem 95 °C, rozpadnou se vodíkové můstky mezi vlákna DNA, čímž se dvouvláknová DNA (dsDNA) rozdělí na 2 vlákna (ssDNA). Následuje annealing, který probíhá při teplotách kolem 50-60 °C. V tomto kroku molekuly jednořetězové DNA po ochlazení opět renaturují a primery (což jsou řetězce nukleové kyseliny, dlouhé několik bazí, které slouží jako počáteční místo replikace DNA) nasedají na specifická místa DNA. Třetím krokem PCR je elongace, což je syntetická fáze, která probíhá při teplotě mezi 65-75 °C. Oligonukleotidy, které dosedly na jednořetězovou DNA (templát) v předchozím kroku, slouží v tomto kroku jako primery pro DNA-polymerázu (nejběžněji Taq-polymeráza), a dochází zde k samotné syntéze DNA.

Uplatnění metody:

PCR má řadu možných využití. V medicíně se používá k diagnostice infekčních onemocnění, kdy ve vyšetřovaném vzorku pátráme po určité známé sekvenci typické například pro určitou bakterii nebo virus. Dále se využívá k diagnostice vrozených geneticky podmíněných nemocí, kdy hledáme opět předem známou sekvenci DNA zodpovědnou za danou vadu ve vzorku buněk.

Úskalí metody:

Úskalím této metody může být nedostatečná denaturace DNA. V případě, že dojde pouze k částečné denaturaci, molekuly DNA velmi rychle renaturují, a to vede k nespecifické vazbě primerů a možným falešným výsledkům. Nedostatečně denaturovaná DNA tak neumožňuje přístup primerům. Naopak příliš dlouhá denaturace snižuje aktivitu DNA polymerázy (DNA polymeráza je stabilní cca 2 hodiny při 95 °C). Dalším problémem může být kontaminace. Jelikož má PCR vynikající citlivost, může být ovlivněna kontaminací i jedinou molekulou DNA. Pro minimalizaci falešně pozitivních výsledků se doporučuje například používání jednorázových rukavic, separace používaných PCR reagensů od templátové DNA a PCR produktů a precizní volba pozitivních a negativních kontrol.

Přístrojové vybavení:

PCR probíhá v přístroji termocykler, který je navržený tak, aby dokázal během několika sekund zvyšovat nebo snižovat teplotu o několik desítek stupňů celsia. Reakční směs pro PCR se napipetuje do malé PCR zkumavky, která se vloží do termocykleru. V přístroji se reakce obvykle provádí ve 30 cyklech, které tvoří 3 fáze (denaturace, annealing a elongace).

Odběr a transport:

Odběr vzorku musí být prováděn ve sterilním prostředí, aby se zamezilo kontaminaci biologického materiálu. Pro odběr vzorku se používají doporučené odběrové soupravy a při odběru se nesmí

používat rukavice s talkem (klouzkem), protože inhibuje PCR reakci. Vzorky se nesmí odebírat do transportního média a nesmí se používat fixace. Odebírá se jen periferní a nesrážlivá krev do antikoagulantu EDTA. Dále se k vyšetření používají například stěry z nosohltanu, pochvy, močové trubice anebo vzorky stolice, sputa a moči. Biologický materiál se do laboratoře transportuje v co nejrychlejší době při 4 °C.