

Metoda: Polymerázová řetězová reakce

Studentka: Beáta Szabóová, ZL2

Princip

Při PCR je využíváno podobného principu jako při syntéze DNA během replikace DNA v buňce:

1. DNA polymeráza přisedá k jednořetězcovému úseku DNA. Při svém startu se potřebuje „odrazit“ od krátkého oligonukleotidu (primeru - což je fragmenty DNA o 20 – 25 nukleotidech), který je díky své komplementaritě navázán na templátový, jednořetězcový úsek. Syntéza probíhá od místa navázaného primeru.
2. Samotnou syntézu provádí termostabilní DNA polymeráza, izolovaná nejčastěji z bakterie *Thermus aquaticus*, odtud označení Taq polymeráza. Jelikož je tento enzym termostabilní, uchovává si svou aktivitu i přes několikeré působení teploty blížíící se teplotě varu při probíhající reakci. DNA polymeráza nasyntetizuje druhý, komplementární řetězec
3. Při syntéze vzniká z jednořetězcové molekuly dvouřetězcová.
4. Při reakci je využíváno cyklických změn teplot, které umožňují denaturaci DNA (tím se vzniklé dvouřetězce rozvolní na dvě jednořetězcové molekuly). V dalším kole syntézy DNA polymerázou opět doplněny na dvouřetězcové.
5. Tyto kroky se při PCR cyklicky opakují, takže teoreticky např. z původně jedné molekuly DNA po 32 cyklech vzniká 1 miliarda molekul DNA.

Uplatnění metody

- zmnožení DNA (může se provést analýza i z příliš malého vzorku)
- detekce DNA o určité sekvenci ve vzorku (s pomocí využití primerů specifických k dané sekvenci), např. ve forenzní genetice či molekulární diagnostice
- identifikace osob

Úskalí metody

Příliš velké množství DNA způsobuje v reakci problémy (nespecifické nasedání primerů).

Nyní se místo klasické PCR využívá tzv. Real-time PCR (kvantitativní PCR), která umožňuje měření množství produktu v průběhu amplifikace.

Přístrojové vybavení

Reakce probíhá v PCR cycleru

Reakce se obvykle provádí ve 30 cyklech. Každý cyklus je tvořen denaturací, nasedáním primerů a syntézou. Cyklickou reakci předchází úvodní denaturace a ukončuje závěrečná extenze.

Obecně reakce běží jako:

Úvodní denaturace [Denaturace – Nasedání primerů – Extense]_{30x} Závěrečná extense

Odběr a transport vzorků

- Správný odběr musí být proveden asepticky (za sterilních podmínek) z důvodu možnosti kontaminace biologického materiálu.
- Odebírají se takové vzorky, v nichž se patogen v předpokládané fázi onemocnění může vyskytovat.
- Používají se výhradně beztalkové rukavice. Talek (mastek) inhibuje PCR reakci.
- Používají se odběrové soupravy E-Swab.
- Gynekologické vzorky by neměly obsahovat příměs krve a hlenu.
- Odebírají se např. vzorky stolice, moč, sputum, výtěr z pochvy, urethry nebo nosohltanu
- Všechny typy vzorků se transportují co nejdříve do laboratoře, již odebraný materiál je vhodné uchovávat v lednici (2 – 8 °C).