

Polymerázová řetězová reakce: princip metody a využití v molekulární patologii

Libor Staněk

Ústav patologie 1. LF UK a VFN, Praha

SOUHRN

Polymerázová řetězová reakce (PCR- polymerase chain reaction) je metoda rychlého a snadného zmnožení příslušného úseku DNA, která je založena na principu opakované replikace nukleových kyselin pomocí termostabilní polymerázy. Tato metoda má v oblasti molekulární biologie dodnes nezastupitelnou roli a představuje jednu ze základních metod analýzy DNA. V následujícím textu popisujeme základní principy PCR, její využití a význam zejména v oblasti patologie.

Klíčová slova: polymerázová řetězová reakce – amplifikace nukleových kyselin – primery – detekce amplikonu – reverzní transkripce

Polymerase chain reaction: basic principles and applications in molecular pathology

SUMMARY

Polymerase chain reaction (PCR) is a technology used for quick and easy amplifying DNA sequences, which is based on the principle of enzymatic replication of the nucleic acids. This method has in the field of molecular biology an irreplaceable role and constitutes one of the basic methods for DNA analysis. In the following article we describe the basic principles of PCR, and its importance especially in the field of pathology.

Keywords: polymerase chain reaction – nucleic acid amplification – primers – detection of amplicons – reverse transcription

Cesk Patol 2013; 49(3): 119–121

Polymerázová řetězová reakce (**PCR**) je biochemická a molekulárně biologická metoda, která slouží k enzymatické replikaci DNA *in vitro* (1–5). Touto metodou lze během opakovaných cyklů získat velké množství kopií příslušného úseku DNA, za použití příslušných reagensů, mezi něž patří analyzovaný úsek nukleové kyseliny (tzv. templát), dále primery (synteticky připravované oligonukleotidové fragmenty komplementární ke koncům sledovaného úseku templátové nukleové kyseliny), deoxyribonukleotid trifosfáty (dATP, dGTP, dCTP a dTTP) a DNA polymeráza, enzym, který generuje dceřiné fragmenty na podkladě komplementarity bází se sekvencí templátu. Nutností je dodržení základních parametrů, mezi něž patří denaturace dvoušroubovice templátu (ta je závislá na kvalitě izolované DNA), přítomnost Mg²⁺ monovalentních kationtů a také přítomnost pufrů (pomáhají ke stabilitě enzymů, podporují specifitější funkci enzymu a stabilizují Tm – *melting temperature*).

Výsledný produkt (**amplikon**) se následně vizualizuje např. pomocí gelové elektroforézy (viz dále). Amplikony vytvořené metodou PCR se ovšem využívají i pro jiné vysoce sofistikované metody či analýzy, jako je např. sekvenování DNA, nebo tvorba fylogenetických stromů.

Metoda PCR byla objevena americkým molekulárním biologem Kary Mullisem v roce 1983 (6), který za tento objev obdržel v roce 1993 Nobelovu cenu za chemii.

Objev metody PCR znamenal převratný objev v molekulární biologii. Do této doby byli výzkumníci při studiu nukleových kyselin a genů odkázáni na manipulačně velmi náročnou metodu *klonování genů* (7). Klonování genů spočívá ve vložení úseku DNA, který chceme klonovat, do kružnicové molekuly DNA (vektoru) za vzniku rekombinantní DNA. Tento vektor je transfekován pomocí elektroporace do hostitelské buňky zpravidla bakteriální, která se množí spolu s transfekovaným vektorem a s kopií genu, kterou nese. Po mnohonásobném dělení vzniká velké množství kopií neboli klonů příslušného genu. PCR se od klonování liší právě svou jedno-
duchostí. U metody PCR se nejedná o sérii manipulací, celá reakce je provedena v jediné zkumavce.

PRINCIP PCR

PCR je enzymová syntéza sloužící k selektivní amplifikaci vybraných oblastí molekuly DNA (Obr. 1). Můžeme amplifikovat jakoukoliv oblast molekuly DNA nebo konkrétní gen za předpokladu, že známe okrajové sekvence tohoto úseku. Příslušné úseky DNA, které se mají amplifikovat (namnožit), musí být ohraničeny na začátku a na konci tzv. **primery** (krátkými syntetickými oligonukleotidy DNA), jejichž přesný návrh a sekvencní složení předurčuje přesnost a úspěšnost celé PCR. PCR slouží k vytváření až mnoha milionů stejných kopií studovaného (označeného) úseku DNA o délce až tisíců nukleotidů (10 000 nukleotidů), což nám umož-

✉ Adresa pro korespondenci:

Mgr. Ing. Bc. Libor Staněk
Ústav patologie 1. LF UK a VFN
Študičkova 2, 128 00 Praha 2
tel.: 224 968 692
stanek.libor@seznam.cz