

ŠTUDIJNÝ MATERIÁL

Z MULTIMEDIÁLNEHO CD

POLYMERÁZOVÁ REŤAZOVÁ REAKCIA

Multimedálny učebný text

Polymerázová reťazová reakcia

PCR

doc. RNDr. Mária Bauerová, PhD.

doc. Ing. Milan Turčáni, CSc.

RNDr. Radoslav Omelka

COMPACT
disc

PRÍNCÍPY A VYUŽITIE POLYMERÁZOVEJ REŤAZOVEJ REAKCIE.

Polymerázová reťazová reakcia (Polymerase Chain Reaction – PCR) patrí k najprogressívnejším molekulárno-biologickým metódam so širokým spektrom využitia v rôznych oblastiach biologického výskumu, ktorá umožnila rozvoj takých vedných disciplín ako humánna a veterinárna medicína, genetika človeka, rastlín a mikroorganizmov, archeológia, kriminalistika a pod. Mimoriadny význam metódy podporuje aj skutočnosť, že jej považovaná za najvýznamnejší objav 80-tych rokov.

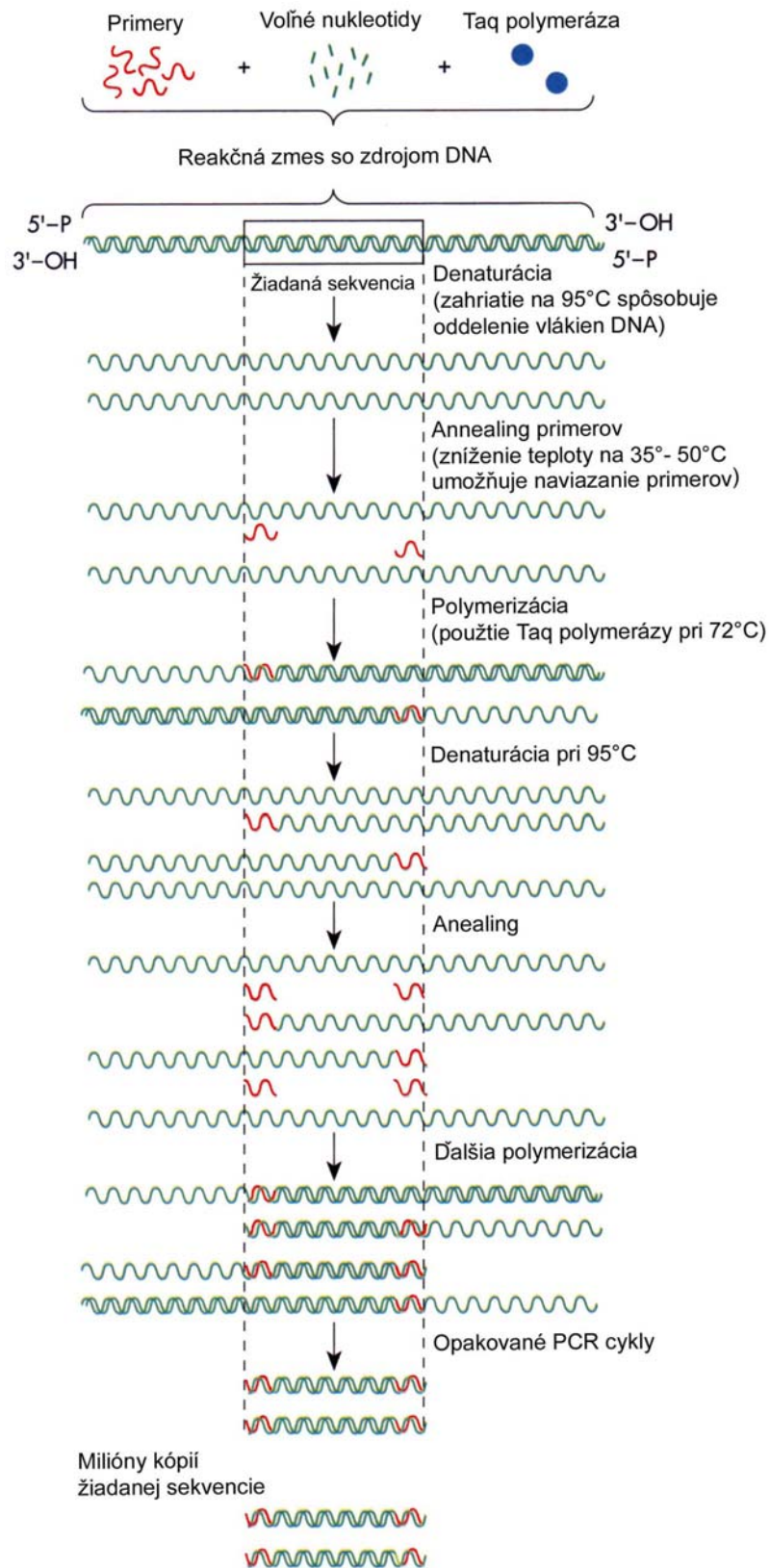
Autorom metódy je Karry Mullis z firmy Cetus, pričom do komerčnej podoby bola prepracovaná kolektívom vedeným Henry Erlichom. V roku 1985 bola poprvýkrát publikovaná praktická aplikácia metódy pri analýze ľudského β -globínového génu a diagnostiky kosáčikovej anémie. Prestížny časopis Science udelil v roku 1989 metóde titul – objav roka a v roku 1993 získal jej autor Nobelovu cenu za chémiu. PCR sa stala nepostrádateľnou takmer v každom biologickom laboratóriu, pričom sa neustále vyvíjajú nové typy PCR a objavujú nové možnosti jej aplikácie.

Princíp metódy:

Polymerázová reťazová reakcia umožňuje selektívne namnožiť - naamplifikovať požadovaný úsek DNA v skúmavke in vitro do miliónového počtu kópií. Autor PCR Mullis uvádza, že keď začneme pracovať s jedinou molekulou DNA, môžeme pomocou PCR za niekoľko hodín získať milión jej kópií. K amplifikácii potrebujeme skúmavku, potrebné chemikálie a vodný kúpeľ. Analyzovaná DNA môže pochádzať z rôznych zdrojov : z jedného ľudského vlasu, kvapky zaschnutej krvi, z mozgu múmie alebo 40 tisíc rokov starého mamuta zmrznutého v ľadovci. Metóda napodobňuje replikačný systém, ktorý existuje v každej bunke a realizuje sa pred bunkovým delením, keď dochádza ku zdvojeniu genetického materiálu. Zatiaľ čo pri replikácii in vitro sa replikuje celý chromozóm za vzniku dvoch identických kópií, pri PCR in vitro sa replikuje špecifický úsek DNA, ktorý vymedzujú krátke oligonukleotidy – primery, do miliónov kópií.

Amplifikácia DNA v PCR je cyklický proces, v ktorom sa 20-40 krát opakujú tri kroky: denaturácia dvojvláknovej chromozomálnej DNA, hybridizácia – pripojenie primerov a polymerizácia – syntéza nových vlákien (obr.1). Požadovaný úsek, ktorý chceme amplifikovať, identifikujeme pomocou primerov. Primery (syntetické jednovláknové oligonukleotidy dĺžky 17 - 30 báz) svojou polohou vymedzujú amplifikovaný úsek na molekule DNA, pričom prvý primer (+ orientácia) sa viaže na jedno vlákno DNA, druhý (- orientácia) sa viaže na vlákno komplementárne v denaturovanej DNA. Termostabilná DNA polymeráza potom predlžuje obidva primery a syntetizuje nové vlákna DNA. V jednom cykle (t.j. v troch vyššie uvedených krokoch) sa teda počet molekúl DNA zdvojnásobí. V každom nasledujúcom cykle slúži pôvodný templát a podľa neho nasyntetizované kópie ako predlohy pre vznik ďalších produktov reakcie, ktoré pribúdajú geometrickým radom. Výsledkom je amplifikácia pôvodného počtu kópií cieľového úseku DNA 2^n krát (kde n znamená počet cyklov). Skutočnosť však úplne nezodpovedá matematickému modelu, empiricky zistená efektívnosť cyklu sa pohybuje medzi 60 % až 85 %. Prakticky to znamená, že po 30 - 40 cykloch je možné dosiahnuť amplifikácie 10^5 - 10^6 , a teda z pôvodných napr. niekoľko desiatok či stoviek kópií DNA je možné získať rádovo pikogramy až nanogramy cieľovej sekvencie, čo je dostatočné množstvo pre detekciu, prípadne pre ďalšie spracovanie (restrikčnú analýzu, klonovanie, sekvenovanie).

Polymerázová reťazová reakcia sa uskutočňuje vtedy, ak sú v reakčnom prostredí prítomné nasledovné zložky: termostabilná DNA polymeráza, tlmivý roztok, deoxyribonukleozidtrifosfáty (dNTP-dATP, dGTP, dCTP, dTTP), primery a templátová DNA.



Obr. 1: Amplifikácia DNA pomocou PCR

Základné zložky PCR.

DNA-polymeráza

Termostabilná DNA polymeráza je kľúčovým enzýmom celého procesu. Jej aktivita pri vysokých teplotách PCR podstatne ovplyvňuje výťažok reakcie. Pôvodne sa na amplifikáciu DNA používal Klenowov fragment DNA polymerázy I z *Escherichia coli*, ktorý bolo nutné pridávať do reakčnej zmesi v každom cykle, pretože sa vysokou teplotou pri denaturácii inaktivoval.

Zdokonalenie metódy PCR umožnil objav termostabilných DNA polymeráz izolovaných z termofilných baktérií, ktoré si zachovávajú aktivitu dostatočne dlho aj pri vysokých teplotách. DNA polymerázy pre svoju polymerizačnú činnosť vyžadujú templátovú DNA, špecifické primery, deoxynukleozidtrifosfáty (dNTP), Mg^{2+} ióny a tlmivý reakčný roztok. Najznámejšia a najpoužívanejšia je *Taq* DNA polymeráza izolovaná z termofilnej baktérie *Thermus aquaticus*. Je odolná voči teplotám do $95^{\circ}C$, reakčné optimum vykazuje v intervale $70 - 80^{\circ}C$. V PCR reakčnom roztoku si zachováva asi 50% svojej aktivity po 130 min. pri $92,5^{\circ}C$, 40 min. pri $95^{\circ}C$, 5 - 6 min. pri $97,5^{\circ}C$. 60% aktivity si udrží po 50 PCR cykloch v prípade, ak denaturácia je $95^{\circ}C$ 20 sek. v každom cykle. *Taq* DNA polymeráza nemá 3'-5' opravnú exonukleázovú aktivitu, čo spôsobuje chyby pri polymerizácii, predovšetkým jednobázové substitúcie. Frekvencia chybné zaradených nukleotidov je relatívne vysoká (asi 10^{-4} na cyklus), ale znížením koncentrácie nukleotidov, horčíkových iónov, zvýšením teploty hybridizácie a skrátením doby polymerizácie je možné túto hodnotu znížiť asi 10 krát. Doporučená koncentrácia *Taq* DNA polymerázy je medzi 1 - 2,5 U na 100 μ l reakčnej zmesi, pri optimálnych hodnotách ostatných parametrov. Príliš vysoká koncentrácia enzýmu vedie k akumulácii nešpecifických produktov, pri nízkej koncentrácii nezískame dostatočné množstvo žiadaného produktu. Pre činnosť polymerázy je dôležitá určitá koncentrácia Mg^{2+} iónov. Pri optimalizácii amplifikačnej reakcie je treba zohľadniť fakt, že dNTP môžu viazať Mg^{2+} ióny a tým inhibovať reakciu.

Okrem *Taq* DNA polymerázy sú komerčne dostupné aj iné termostabilné DNA polymerázy. Stoffelovej fragment DNA polymerázy vykazuje lepšiu teplotnú stabilitu, je aktívny pri nižších koncentráciách K^{+} a vo veľkom rozpätí koncentrácie Mg^{2+} . VENT_RTM DNA polymeráza izolovaná z *Thermococcus litoralis* má 3' - 5' exonukleázovú aktivitu, preto pracuje s chybou 5 - 15x menšou než *Taq* polymeráza. Je vhodná najmä pre presnú syntézu dlhších úsekov (niekoľko kilobáz). Po hodinovej inkubácii pri $95^{\circ}C$ si zachováva až 90 % svojej aktivity. Podobne *Pfu* polymeráza (*Pyrococcus furiosus*) sa vyznačuje vyššou presnosťou i termostabilitou. Termofilná *rTth* DNA polymeráza (*Thermus thermophilus*) má okrem polymerázovej aktivity v prítomnosti Mg^{2+} iónov aj reverznu transkriptázovú aktivitu v prítomnosti Mn^{2+} iónov, čo umožňuje realizáciu reverznej transkripcie RNA a následnú amplifikáciu cDNA v PCR (RT-PCR).

Reakčný tlmivý roztok

Štandardný reakčný roztok obsahuje 50 $mmol.l^{-1}$ KCl, 10 $mmol.l^{-1}$ Tris-HCl (pH=8,5 pri $25^{\circ}C$) a 1,5 $mmol.l^{-1}$ $MgCl_2$. Ďalej reakčná zmes obsahuje 200 μ mol. l^{-1} zmes deoxynukleozidtrifosfátov (dNTP - dATP, dCTP, dGTP, dCTP), 0,1-0,01 μ mol. l^{-1} primery a 1 - 2,5 U DNA polymerázy. Koncentrácia Mg^{2+} iónov má najvýraznejší vplyv na špecifitu amplifikácie. Za optimálnu sa považuje koncentrácia 1 - 2 $mmol.l^{-1}$ (pre 200 μ mol. l^{-1} dNTP a 1 - 2 U enzýmu). Nadbytok Mg^{2+} vedie k akumulácii nešpecifických produktov, nízka koncentrácia redukuje alebo úplne eliminuje výťažok reakcie. dNTP a chelatačné činidlá (napr. EDTA) prítomné v roztoku viažu ióny horčíka, preto optimálnu koncentráciu Mg^{2+} je treba stanoviť empiricky pre každý templát a pár primerov. Innis a kol. (1990) odporúča koncentráciu Mg^{2+} o 0,5 - 1,0 $mmol.l^{-1}$ vyššiu ako je koncentrácia dNTP. Optimálna koncentrácia nukleotidov sa pohybuje v rozsahu medzi 50 až 200 μ mol. l^{-1} , nadmerná koncentrácia vedie k vyššej miere chybné

zaradených nukleotidov (*thermodynamic infidelity*). Približne 50% dNTP zostáva v reakcii po 50 amplifikačných cykloch.

Primery

Primery sú syntetické jednovláknové oligonukleotidy komplementárne k templátovému vláknu DNA. Počas hybridizácie primery svojou polohou na templátovej DNA vymedzujú žiadanú sekvenciu, ktorá bude amplifikovaná. Pri návrhu primerov je potrebné dodržať niekoľko základných požiadaviek :

- * musia byť navrhnuté tak, aby hybridizovali na jednotlivých reťazoch svojimi 3' koncami oproti sebe a tak ohraničili úsek určený na amplifikáciu,

- * dĺžka primerov sa pohybuje v rozmedzí 18 – 25 báz; u kratších primerov je pomerne vysoká pravdepodobnosť hybridizácie s inými miestami templátu, u dlhších potom reasociácia trvá pomerne dlho a jej teplota musí byť vyššia, čo nie je vždy výhodné,

- * teplota topenia (T_m) obidvoch primerov by mala byť rovnaká alebo čo najviac podobná a dostatočne vysoká, aby zabezpečila hybridizáciu v rozsahu teplôt okolo 45°C-60°C, ale zároveň uchovala hybrid stabilný pri teplote polymerizácie (72 °C),

- * obsah G a C by mal byť zhodný a mal by sa pohybovať v rozsahu 40-60 % ,

- * primery by mali byť prísne komplementárne k sekvencii templátu na 3' konci primeru (počiatok polymerizácie), na 5' konci naopak môžu byť modifikované. Doporučuje sa, aby 3' koniec obsahoval 2 - 3 guanínové alebo cytozínové nukleotidy. Na druhej strane primery nesmú byť navzájom komplementárne, pretože vznikajú tzv. primer-diméry,

- * primery nesmú obsahovať sekundárne štruktúry, predovšetkým na 3' konci,

- * pri výbere miesta hybridizácie na templáte DNA je výhodné zvoliť na jeho 5' konci prvú, alebo druhú polohu aminokyselinového kodónu, lebo v týchto miestach čítacieho rámca je vyššia pravdepodobnosť konzervácie bázy.

Výber správnej sekvencie primerov je podmienkou pre úspešný priebeh amplifikačnej reakcie, chybný návrh sekvencie primerov vedie k úplne neúčinnnej alebo nešpecifickej amplifikácii. Navrhovanie primerov v súčasnosti uľahčujú viaceré počítačové programy, ktoré sú dostupné buď komerčne (napr. program OLIGO) alebo na internete (napr. PRIMER 3,).

Optimálna koncentrácia primerov sa pohybuje v rozmedzí 0,1-0,5 $\mu\text{mol.l}^{-1}$. Vyššie koncentrácie spôsobujú tvorbu nešpecifických produktov a zvyšujú pravdepodobnosť tvorby primer-dimérov.

Teplota a čas annealingu - hybridizácie primerov s komplementárnym miestom na templáte, závisia od bázevého zloženia, dĺžky a koncentrácie primerov. Teplota annealingu (T_A) by mala byť o 5 – 10 °C nižšia ako T_m (teplota topenia) hybridu primer-templát.

Optimálnu T_A vypočítame podľa vzorca :

$$T_A\text{-opt} = 0,3.(T_m\text{-primeru}) + 0,7.(T_m\text{-produktu}). 14,9$$

Pre primery od 14 - 24 báz sa teplota topenia vypočíta podľa vzorca:

$$T_m = 2(A + T) + 4(G + C)$$

kde A, T, G, C sú počty príslušných nukleotidov v primeri.

Pre dlhšie oligonukleotidy, ako aj pre T_m produktu je potrebné použiť vzorec:

$$T_m = 60 + 0,41(\%G + C) - 500/n$$

kde %G + C znamená percentuálne zastúpenie G a C v oligonukleotide, n znamená jeho dĺžku (počet báz).

Optimálna TA sa určuje hlavne empiricky a od vypočítanej sa môže líšiť o $\pm 3^{\circ}\text{C}$ až 7°C .

Primery za určitých podmienok tvoria tzv. primer-diméry t. j. dvojláknové fragmenty, ktorých veľkosť je približne taká ako suma veľkostí oboch primerov. Presný mechanizmus ich tvorby nie je celkom objasnený. Primer-diméry sa objavujú, ak jeden primer je predlžovaný viac ako druhý, ak je málo iniciačného templátu a veľa PCR cyklov. Tvorbu primer-dimérov možno minimalizovať použitím nižšej koncentrácie primerov a enzýmu.

Templátová DNA

Zdrojom DNA pre amplifikáciu môže byť odobratá krv alebo krvné škvrnky, chlповé cibulky, ejakulát (spermie), sliny, nosný hlien, tuk, rôzne druhy tkanív, dokonca bunky embryí a v niektorých prípadoch aj fosilný biologický materiál. Množstvo templátovej DNA potrebnej pre amplifikáciu sa pohybuje od nanogramového po mikrogramové množstvo. PCR je možné uskutočniť pri použití templátovej DNA z jednej bunky, na druhej strane pri prekročení určitej koncentrácie DNA účinnosť PCR klesá.

PCR umožňuje použiť DNA v rôznom stupni čistoty, je však samozrejmé, že čistota DNA zvyšuje špecifitu reakcie. Výhodou PCR (v klinickej diagnostike a kriminalistike) je to, že nevyžaduje absolútne čistú DNA, preto je možné použiť aj hrubé bunkové lyzáty (Tween 20, SDS, proteináza K). Pri izolácii DNA z krvi je nevyhnutné odstrániť porfyrínové zlúčeniny ako hemoglobín alebo hematín, ktoré inhibujú PCR. Podobne PCR inhibuje aj melanín, ktorý sa môže uvoľniť z buniek chlpov počas lýzy. Nemenej dôležité pri izolácii DNA je odstránenie chelatačných činidiel ako EDTA, ktoré viažu Mg^{2+} ióny potrebné pre amplifikačnú reakciu a iónových detergentov (SDS), ktoré inhibujú *Taq* polymerázu.

Okrem DNA je možné ako templát použiť aj RNA na dôkaz gémovej expresie, pričom sa využíva *rTth* polymeráza s reverzno-transkriptázovou aktivitou v prítomnosti Mn^{2+} a s DNA polymerázovou aktivitou v prítomnosti Mg^{2+} . Po reverznej transkripcii sa ióny Mn^{2+} eliminujú pridaním chelatačného činidla EDTA, potom sa doplnia primery, MgCl_2 a *rTth* polymeráza môže realizovať svoju polymerázovú aktivitu.

Teplotný režim a počet cyklov

Teplotný režim ovplyvňuje úspešnosť amplifikácie a výťažok PCR produktu. Dvojláknová DNA musí byť v prvom kroku každého cyklu denaturovaná, aby sa primery počas annealingu mohli špecificky naviazať na komplementárne miesto templátu. Doporučovaná teplota denaturácie je $90 - 95^{\circ}\text{C}$, vo väčšine prípadov sa osvedčila denaturácia pri 94°C jednu minútu, prípadne 95°C 30 sekúnd. Vyššia teplota denaturácie sa odporúča pre DNA s vyšším obsahom C - G párov. V prvom alebo v niekoľkých počiatočných cykloch prebieha denaturácia dlhšiu dobu, napr. 5 min.

Teplota annealingu (TA) - hybridizácie primerov a templátu, závisí od nukleotidového zloženia primerov, ich dĺžky a koncentrácie. Uvedenú teplotu je možné vypočítať podľa už uvedených vzorcov pre konkrétne sekvencie primerov a dané reakčné podmienky. Takto vypočítaná TA je však len orientačná, optimálnu TA je potrebné stanoviť empiricky.

Polymerizácia - syntéza produktu prebieha spoľahlivo v rozsahu $60 - 75^{\circ}\text{C}$, pričom sa štandardne využíva teplota 72°C . Annealing a polymerizácia prebiehajú počas 30 sek. – 2 min., výnimku tvoria syntézy dlhších fragmentov (viac ako 1kb), kde sa vyžaduje predĺženie času polymerizácie (1 min. na 1 kb).

Teplotný režim sa pred PCR naprogramuje do automatických programovateľných prístrojov - termocyklov, ktoré zabezpečujú striedanie teplôt v krátkych časových úsekoch. Celá amplifikačná reakcia sa v termocykleri uskutoční v priebehu 1 – 4 hod.

Optimálny počet cyklov závisí od koncentrácie jednotlivých zložiek PCR a pohybuje sa v rozsahu 25 – 35 cyklov. Nedostatočný počet cyklov má za následok nízky výťažok amplifikácie, na druhej strane príliš veľa cyklov zvyšuje pravdepodobnosť nešpecifických produktov.

Špecifita amplifikácie

Špecifitu amplifikačnej reakcie určuje predovšetkým správny výber primerov. Hoci primery dlhšie ako 18 báz by mali teoreticky zaistiť dostatočnú špecifitu amplifikovaného úseku, niekedy vznikajú nežiadúce produkty. Príčinou tvorby nešpecifických produktov môže byť:

- nešpecifická hybridizácia primerov (*mispriming*), ktorú možno obmedziť znížením koncentrácie primerov, Mg^{2+} , množstva enzýmu a zvýšením T_A ,
- aktivita polymeráz pri laboratórnej teplote, kedy templátová DNA nie je denaturovaná a primery sa na templát pripájajú nešpecificky. Tento jav účinne eliminuje tzv. horúci štart (*hot start*), pri ktorom sa polymeráza pridá (alebo aktivuje napr. pridaním $MgCl_2$) do reakčnej zmesi až po denaturácii templátu, keď sú vlákna DNA úplne separované. Pri tzv. studenom štarte sa *Taq* polymeráza reverzibilne inhibuje pomocou väzby s monoklonálnou *TaqStart* protilátkou. Účinkom denaturačnej teploty sa väzba rozruší a polymeráza môže syntetizovať príslušné úseky DNA. Avšak najjednoduchším spôsobom eliminácie nešpecifických produktov je udržiavanie PCR mixu pred denaturáciou pri nízkych teplotách a predhrievanie termocyklera na teplotu denaturácie pred vložením vzoriek.

Špecifitu polymerizácie je možné, najmä v dôležitých prípadoch, zvýšiť použitím tzv. vnútorných primerov (*nested priming*), ktoré zabezpečujú amplifikáciu vnútorného úseku cieľovej sekvencie či už v ďalšej PCR, alebo priamo v jednej spoločnej PCR s pôvodným vonkajším párom. Teplotný režim je upravený tak, aby najskôr hybridizovali len vonkajšie primery a v ďalších cykloch naopak len vnútorné primery.

Kontaminácie v PCR

Vysoká citlivosť PCR spôsobuje aj nežiadúci jav – možnosť kontaminácie, pretože na amplifikáciu nežiadúceho produktu stačí jedna molekula cudzej DNA. Najčastejším zdrojom kontaminácie sú produkty predchádzajúcej reakcie, alebo sa navzájom kontaminujú vzorky v jednej sérii. Riziko kontaminácie je možné znížiť dodržiavaním nasledovných opatrení:

- separovať priestory pre izoláciu templátovej DNA, prípravu PCR a analýzu produktu PCR,
- pracovať v priestoroch, ktoré je možné vyžiarit' UV svetlom,
- používať jednorázový materiál (rukavice, sterilné mikroskúmavky a špičky s filtrom),
- reagenty uchovávať v malých častiach, v ideálnom prípade na jedno použitie,
- vyhýbať sa tvorbe aerosólov (skúmavky pred otvorením krátko centrifugovať),
- používať negatívnu kontrolu (bez DNA), ktorá slúži na monitorovanie kontaminácie,
- DNA do reakčnej zmesi pridať na záver a ihneď uzatvoriť skúmavku,
- výnimočne je možné použiť enzým uracil N-glykozyláza (UNG), ktorý depurinuje deoxyuridínové nukleotidy. Do reakčnej zmesi sa pridá dUTP (miesto dTTP), tzn. že PCR produkt bude obsahovať uracil miesto tymínu. Pred novou reakciou stačí pridať enzým UNG, ktorý predchádzajúce PCR produkty zdegraduje pri zachovaní templátu a inaktivuje sa prvou denaturáciou.

Identifikácia a analýza produktov PCR

Produkta PCR analyzujeme elektroforeticky. Výber typu nosiča – gélu (agaróza alebo polyakrylamid) závisí od veľkosti fragmentov, ktoré chceme separovať. Vizualizácia fragmentov je možná pomocou transiluminátora s UV žiarením. Veľkosť produktu zistíme

pomocou štandardných DNA markerov molekulových hmotností. Na podrobnejšie preskúmanie produktu využívame restriktívnu analýzu, sekvenčné metódy a hybridizáciu so špecifickou sondou – rádioaktívne alebo enzymaticky značenou.

Aplikácie PCR

PCR predstavuje metódu, ktorá sa úspešne realizuje v molekulárno-biologických laboratóriách v nadväznosti s požiadavkami praxe. Jej výhodou je exaktnosť, vysoká citlivosť, reprodukovateľnosť a pomerne jednoduchá praktická realizovateľnosť. Metóda sa využíva v nasledovných oblastiach biologického výskumu:

Humánna medicína

V tejto oblasti sa PCR využíva predovšetkým pri diagnostike geneticky podmienených chorôb. V súčasnosti existuje okolo 5000 monogénových chorôb spôsobených mutáciou v jednom gène. Stačí teda zámena jedného nukleotidu na vznik abnormality, ktorá vyvoláva vážnu ochorenie. PCR bola poprvýkrát použitá na diagnostiku *kosáčikovej anémie*. Dôsledkom bodovej mutácie (zámena T za A) v β -globínovom gène vzniká defektný hemoglobín, ktorý u homozygotov spôsobuje chudokrvnosť. Naproti tomu heterozygoti sú chránení pred maláriou, pretože kosáčikové erytrocyty sú pre pôvodcu ochorenia – plasmodium menej vhodné.

Huntingtonova chorea je veľmi závažné psychotické ochorenie prejavujúce sa celkovým zborštením centrálného nervového systému. Ide o genetickú chorobu s dominantným typom dedivosti (nosič je súčasne aj obeťou), ktorá sa prejaví až v strednom veku.

Duchennova myopatia vzniká zmenou v jednom z najväčších ľudských génov kódujúcom svalovú bielkovinu dystrofin. Gén sa nachádza na chromozóme X, jeho nositeľkami sú ženy, postihnutí jedinci mužského pohlavia už v detskom veku zomierajú na nefunkčnosť dýchacích svalov.

Cystická fibróza je recesívne ochorenie, ktoré je spôsobené deléciou troch báz (v bielkovine chýba fenylalanín) v gène pre bielkovinu CFTR (transmembránový regulátor cystickej fibrózy), ktorá reguluje transport chloridových iónov v membránach pľúc a čriev. Choroba je frekventovaná najmä v západných krajinách, kde pripadá 1 postihnuté na 2000 narodených detí. Postihnutí jedinci sa dožívajú 20-40 rokov a trpia po celý život pľúcnymi infekciami a nedostatkom tráviacich enzýmov vzhľadom na porušený črevný epitel.

PCR sa uplatňuje v prenatalnej diagnostike týchto ochorení, pričom sa analyzuje DNA zo vzoriek plodovej vody. Výhodou predstavuje malé množstvo vzorky potrebnej na analýzu.

PCR umožňuje včasnú detekciu niektorých ochorení spôsobených vírusmi, ktoré sú ešte v latentnom stave (nevytvárajú vírusové častice) a v prípade sporných a nejasných sérologických analýz. Pomocou PCR sa deteovali : *vírusy chrípky A, B, C*, *vírus hepatitídy B* spôsobujúci hepatitídu a karcinóm pečene, *herpes simplex vírus*, *EBV vírus (Epstein-Barrovej vírus – mononukleózy a kofaktor onkogenézy)*, *HPV vírus (Human papilloma vírus – karcinóm krčku maternice)* a iné. PCR má svoje uplatnenie aj pri identifikácii HIV vírusu typu 1 najmä v prípade intermediárnych sérologických výsledkov a pri vyšetovaní detí narodených HIV pozitívnym matkám nakoľko protilátky od matky sú v krvi dieťaťa do 6-15 mesiacov od narodenia.

PCR umožňuje detekciu patogénnych baktérií v prípadoch nízkej citlivosti štandardných kultivačných metód, resp. obtiažnej kultivácie. Detekujú sa : *Mycobacterium tuberculosis* (pôvodca tuberkulózy), *Borrelia burgdorferi* (Lymfská borelióza prenášaná kliešťom), *Vibrio cholerae* (cholera), *Yersinia pestis* (mor), *Treponema pallidum* (syfilis), *E.coli* (hnačky), *Helicobacter pylori* (chronická gastritída a žalúdočný vred) a iné. V potravinách sa identifikujú patogénne baktérie, napr. *Salmonella typhimurium* spôsobujúca

salmonelózy a *Listeria monocytogenes*, ktorá zapríčiňuje aborty plodov a poruchy centrálnej nervovej sústavy. Okrem baktérií sa identifikujú huby a parazitické patogény: *Pneumocystis carinii* (pneumónia predovšetkým u pacientov s AIDS), *Trypanosoma brucei* (spavá nemoc), *Plasmodium falciparum* (malária). Nesporný je aj význam PCR pri detekcii nádorových ochorení.

Kriminalistika a súdne lekárstvo

Kriminalistika a súdne lekárstvo predstavuje ďalšiu oblasť využitia metódy. Analyzuje sa DNA z biologických stôp (krv, spermie, sliny) páchatel'ov trestných činov, pričom sa aplikuje metóda *DNA fingerprintingu* (odtlačku DNA). Metóda využíva existenciu variabilných úsekov DNA, ktoré sa opakujú v rôznom počte kópií na rôznych miestach genómu. Tieto VNTR sekvencie (variable number of tandem repeats) boli objavené v 80-tych rokoch v genóme vyšších organizmov, ich rozloženie po genóme je pre každého jedinca unikátne podobne, ako sú jedinečné odtlačky prstov využívané v daktyloskopii. Delia sa podľa veľkosti na minisatelity (10-viac bp) a mikrosatelity (2-4bp). Záznam fragmentov DNA pripomína čiarkový kód. Keďže fragmenty DNA detí sú kombináciou fragmentov oboch rodičov, metóda umožňuje aj dôkaz rodičovstva.

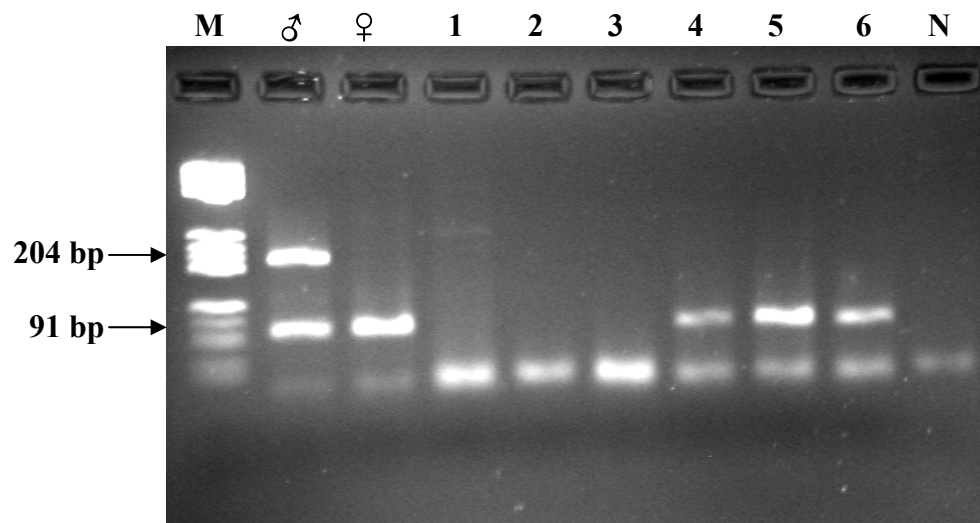
Poprvýkrát bola metóda DNA fingerprintingu použitá pri usvedčení páchatel'a závažného trestného činu v roku 1988 a postupne nahrádza metódu identifikácie jedinca na základe krvných skupín, ktorej výsledky neboli jednoznačné a vyžadovala si dobre zachované vzorky. Naproti tomu metódy založené na analýzach DNA dokážu analyzovať minimálne množstvo vzorky aj v degradovanom stave (škvrna na textílii, staré tkanivo v rozklade). Napr. touto metódou bolo dokázané, že pozostatky nájdené v lese pri Jekaterinburgu patria rodine zavraždeného cára Mikuláša.

Archeológia

Aplikácia techník molekulárnej biológie v archeológii umožnilo rozvoj novej vednej disciplíny molekulárnej archeoantropológie. Predmetom skúmania tejto disciplíny je DNA izolovaná zo zvyškov tiel dávnych ľudských populácií, ktorá poskytuje možnosť ďalšieho štúdia genetickej diverzity a evolúcie človeka, skúmania príbuzenských vzťahov, ako aj možnosti genetickej identifikácie jedincov, determinácie pohlavia (obr.2), či detekcie chorôb u vymretých populácií. Okrem ľudskej DNA sa analyzuje aj DNA z niekoľko tisíc rokov starých zvyškov rastlín a živočíchov a porovnáva sa so súčasne žijúcimi druhmi.

Na základe analýzy mitochondriálnej DNA z lebky neandertálc a porovnania s DNA súčasnej ľudskej populácie bola vytvorená „Teória o africkom pôvode človeka“. Teória predpokladá migráciu časti africkej populácie do všetkých kontinentov v období pred 200 tis. rokmi, tzn., že *Homo sapiens neanderthalensis* nie je náš priamy predchodca, ale slepá vývojová línia.

Pomocou PCR bolo napr. dokázané, že DNA extrahovaná zo 17 miliónov rokov starých fosílnych zvyškov magnólie obsahuje sekvencie príbuzné sekvenciám súčasných magnólií.



Obr.2: Determinácia pohlavia pomocou PCR zo vzoriek kostí jedinca z pohrebiska z 8.-9. storočia (podľa Kollárika a kol., 2002).

M - marker molekulej hmotnosti pBR322/Hae III

N - negatívna kontrola

♂ - amplifikovaná DNA z mužskej krvi

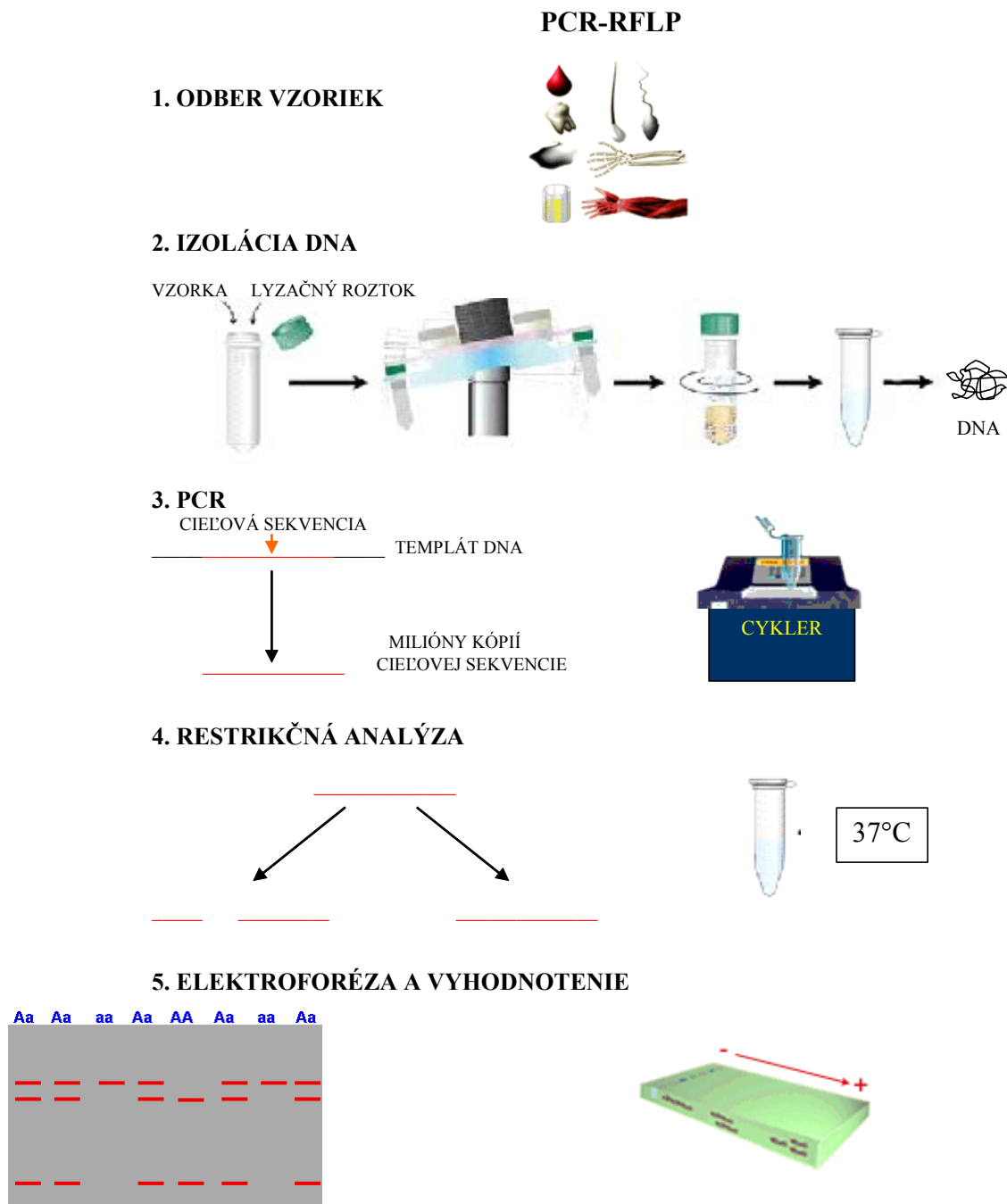
♀ - amplifikovaná DNA zo ženskej krvi

4 - 6 vzorky DNA jedinca zo včasno-stredovekého pohrebiska identifikované ako vzorky ženského pohlavia. Amplifikovali sa špecifické sekvencie na X chromozóme (91 bp) a Y chromozóme (204 bp)

Genetika hospodárskych zvierat

V tejto oblasti sa identifikujú a analyzujú špecifické gény alebo anonymné genetické markery pre dôležité produkčné (kvalita mäsa, mlieka, vlny) a reprodukčné vlastnosti (počet narodených mláďat) hospodárskych zvierat, predovšetkým ošípaných, hovädzieho dobytku a oviec. Detekujú sa vírusové a bakteriálne ochorenia a predispozícia ku vzniku genetických chorôb. S pribúdajúcim počtom identifikovaných markerových génov sa ukazujú nové efektívne metódy šľachtenia na základe markerovo-podporovanej selekcie.

V oblasti analýzy genetických markerov hospodárskych zvierat sa využíva predovšetkým metóda *PCR-RFLP*, ktorá je kombináciou polymerázovej reťazovej reakcie (*PCR*) a polymorfizmu dĺžky reštrikčných fragmentov (*Restriction Fragment Length Polymorphism - RFLP*). Metóda *RFLP* je založená na schopnosti reštrikčných endonukleáz rozoznávať špecifické sekvencie (tzv. cieľové miesto) na dvojvláknovej DNA a zároveň štiepiť obidve vlákna v rozpoznanej sekvencii. *PCR-RFLP* umožňuje detekciu mutácií (polymorfizmov) v amplifikovanej DNA. *PCR* produkt sa štiepi vhodným reštrikčným enzýmom a analyzuje elektroforeticky. Keďže v dôsledku mutácie (polymorfizmu) vzniká alebo zaniká štiepne miesto pre reštrikčnú endonukleázu, detekuje sa rôzny počet fragmentov alebo ich rôzna veľkosť. Schéma postupu pri realizácii *PCR-RFLP* je uvedená na obr.3.

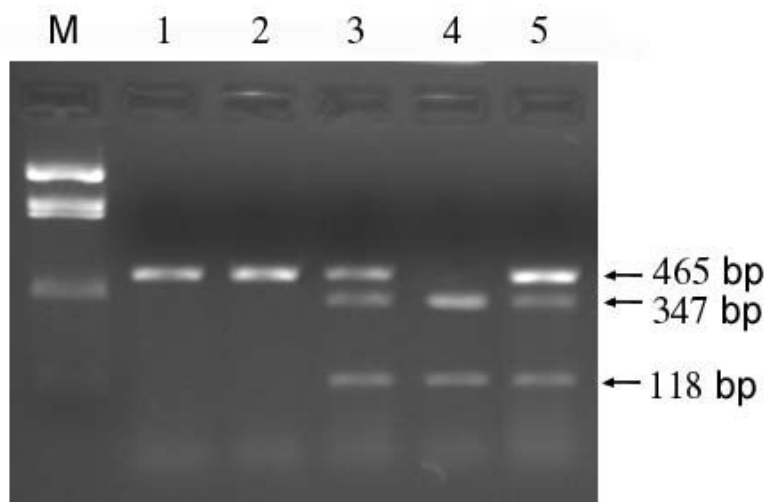


Obr. 3 : Schéma postupu pri realizácii PCR-RFLP

V genetike hospodárskych zvierat sa PCR-RFLP využíva napríklad na:

- analýzu tzv. markerových génov kvality mäsa u ošípaných (*RYS 1*, *RN*, *KIT*, *PIT1*, *HFABP*, *LEP* a *LEPR*), mlieka u hovädzieho dobytku (*kapa-kazeín*, *beta-laktoglobulín*) a reprodukčných vlastností (*ESR*, *PRLR*, *RBP4*)
- identifikáciu geneticky podmienených ochorení (*BLAD*, *DUMPS*, *citruinémia*)

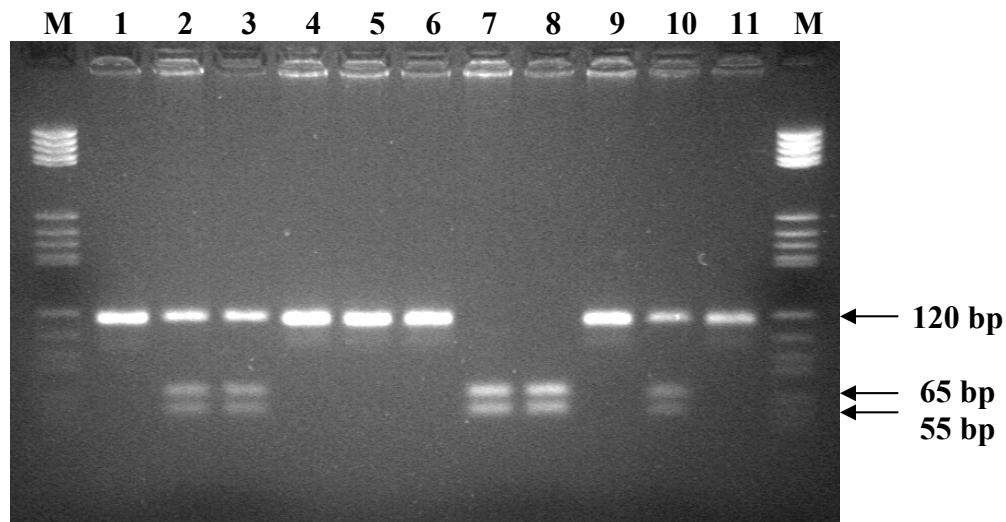
Jedným z perspektívnych markerových génov kvality mäsa u ošípanej je gén *LEP*, kódujúci hormón leptín, ktorý zohráva dôležitú úlohu v energetickom metabolizme. Bola dokázaná asociácia polymorfizmu C/T v polohe 3469 *LEP* génu s hrúbkou chrbtovej slaniny. Pomocou PCR-RFLP je možné zistiť predispozíciu ošípaných k tvorbe určitej hrúbky chrbtovej slaniny a získané informácie využiť v šľachtiteľskom procese na zvýšenie podielu chudého mäsa (obr.4).



Obr. 4.: Analýza genetického polymorfizmu *LEP* génu ošípanej pomocou PCR-RFLP (podľa Bábellová a kol., 2002)

- M – marker molekulovej hmotnosti pBR322/HaeIII
1,2 – genotyp TT – ošípané s veľkou hrúbkou chrbtovej slaniny
3,5 – genotyp CT - ošípané intermediárne (heterozygoti)
4 – genotyp CC - ošípané s malou hrúbkou chrbtovej slaniny

Gén pre estrogénový receptor (*ESR*) kóduje proteín patriaci ku skupine transkripčných faktorov, ktorý sprostredkováva pôsobenie samičích pohlavných hormónov – estrogénov v rôznych tkanivách mozgu, mliečnej žľazy a reprodukčných orgánov. Polymorfizmy v *ESR* géne u ošípanej ovplyvňujú plodnosť – počet narodených mláďat vo vrhu (obr.5). Plodnosť patrí medzi najdôležitejšie ekonomické vlastnosti v chove hospodárskych zvierat, preto možnosť rýchlej a spoľahlivej identifikácie jedincov schopných produkovať viac mláďat vo vrhu sa nesporne prejaví v efektívnosti v ekonomiky chovu ošípaných.



Obr. 5: Analýza genetického polymorfizmu *ESR* génu ošípanej pomocou PCR-RFLP (podľa Omelku a kol., 2001)

M - marker molekulovej hmotnosti pBR322/Hae III

1, 4, 5, 6, 9, 11 - genotyp AA (nižší počet mláďat vo vrhu)

2, 3, 10 - genotyp AB (intermediárne genotypy - heterozygoti)

7, 8 - genotyp BB (vyšší počet mláďat vo vrhu)

PCR umožňuje analýzu DNA už vo ranných štádiách ontogenézy, napr. u embryí vo fáze blastocysty, čo je možné využiť napr. pri *včasnom určovaní pohlavia – sexdeterminácii*. Embryá sa špeciálnym prístrojom – mikromanipulátorom rozdelia na dve časti, z ktorých jedna sa pripravuje na embryo-transfer a druhá časť sa analyzuje pomocou PCR.

DNA fingerprinting hospodárskych a domácich zvierat sa uplatňuje v šľachtiteľskej praxi pri testovaní pôvodu najmä hovädzieho dobytku, koní a psov.

Genetika rastlín

V oblasti genetiky kultúrnych rastlín sa PCR (DNA fingerprinting) aplikuje na identifikáciu, diferenciaciu a charakterizáciu rastlinných genotypov, predovšetkým na rozlíšenie rastlinných druhov, resp. jednotlivých genotypov v rámci druhu alebo poddruhu. Využívajú sa jednak náhodné primery, ale aj špecifické, pomocou ktorých sa amplifikuje úsek známeho génu. Napr. na identifikáciu druhov cereálií sa využívajú *5S rRNA primery*, pomocou ktorých sa amplifikujú vysokokonzervatívne úseky – tzv. spacers – medzigénové oblasti. Nakoľko sa jednotlivé druhy cereálií líšia veľkosťou PCR produktov (napr. jačmeň –

Bauerová, M., Turčáni, M., Omelka, R.: Polymerázová reťazová reakcia. Vysokoškolský učebný text, FPV UKF v Nitre, 2004

320bp, kukurica – 280bp, ovos – 235bp, ryža – 400bp pšenica – 315bp), je možné PCR využiť na identifikáciu neznámej vzorky, resp. zmesi rôznych vzoriek.

Primery pre *gény zásobných proteínov* sa využívajú na rozlíšenie kultivarov pšenice (primery pre gliadínové gény) alebo jačmeňa (primery pre hordéinové gény). *Gény pre gluteníny* sa využívajú ako DNA markery technologickej kvality tvrdej pšenice.

Mikrosatelity predstavujú ďalší zdroj genetických markerov pre napr. obiloviny. Pre genóm jačmeňa je charakteristický „motív“ (AT)_n, pre ryžu (GGC)_n, pšenicu (CAG)_n a (CAA)_n.

Okrem toho sa PCR využíva na identifikáciu patogénov spôsobujúcich ochorenia u rastlín. Ide napr. o huby rodu *Fusarium* napádajúcich obilniny a trávy, *Peronospora tabacina* u tabaku alebo *Colletotrichum graminicola*, ktorá spôsobuje hnedú škvrnitosť obilnín. Nemenej dôležitá je identifikácia génov rezistencie voči patogénom, napr. voči *hrdzi trávovej* u jačmeňa alebo voči *múčnatke* u rajčiaka.

Zoznam literatúry:

Bábelová, A., Vašíček, D., Bauer, M., Bauerová, M.: Detekcia Hinf I polymorfizmu v leptínovom géne ošípanej metódou PCR-RLFP. Zborník z III. vedeckej konferencie doktorandov FPV UKF v Nitre, 28.3. 2002, s.213-215

Barve, M.P., Haware, M.P., Sainani, M.N., Ranjekar, P.K., Gupta, V.S.: Potential of microsatellites to distinguish four races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* prevalent in India. *Theor Appl Genet* 102, 2001, s.138-147

Bauerová, M.: Princípy a aplikácie polymerázovej reťazovej reakcie. Habilitačná práca. 1998.

Bolstein, D., White, R.L., Skolnik, M., Davis, R.W.: Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *Amer.J.Hum.Genet.*, 32, 1980, s.314-331

Bodmer, W., McKie, R.: *Kniha človeka*. Columbus Praha, 1997

Caetano-Anollés, G., Bassam, B.J. - Gresshoff, P.M., 1991A: DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonukleotide primers. *BioTechnology*, 9, 1991, s. 553-557

Eckert, K.A., Kunkel, T.A.: The fidelity of DNA-polymerase and the polymerases used in PCR. In: *Polymerase chain reaction I: A practical approach*, IRL Press, Oxford, 1991

Erlich, H.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J.: Recent advances in the Polymerase Chain reaction. *Science*, 252, 1991, s.1643-1651

Gelfand, D.H.: Taq polymerase. In: Erlich, H.A., *PCR technology: Principles and applications for DNA amplification*, Stockton Press New York, 1989, s.17-22

Bauerová, M., Turčáni, M., Omelka, R.: Polymerázová reťazová reakcia. Vysokoškolský učebný text, FPV UKF v Nitre, 2004

Higuchi, R.: Rapid, efficient extraction for PCR from cells or blood. *Amplifications*, 2, 1989, s.1-3

Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J.: PCR protocols. Academic press, 1990, s. 482

Jiang, Z.H., Gibson, J.P.: Genetic polymorphisms in the leptin gene and their association with fatness in four pig breeds. *Mammalian Genome*, 10, 1999, s. 191-3

Kollárik, J., Bauerová, M., Vondráková, M., Omelka, R.: Izolácia a amplifikácia DNA z historického kostrového materiálu. Zborník z III. vedeckej konferencie doktorandov FPV UKF v Nitre, 28.3. 2002, s.216-220

Longo, M.C., Berninger, M.S., Hartley, J.L.: Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reaction. *Gene*, 93, 1990, s. 125-128

Morgante, M., Olivieri, A.M.: PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics, *Plant J.*, 3, 1993, s.175-182

Nanda, S.K., Jain, S.K.: In vitro nucleic acid amplification systems. *Curr. Sci.*, 66, 1994, s.421-429

Omelka, R., Bauerová, M., Laurinčík, J.: Optimalizácia metódy PCR-RFLP na detekciu Pvu II polymorfizmu estrogénového receptora u ošípaných. Zborník z II. vedeckej konferencie doktorandov FPV s medzinárodnou účasťou. Edícia *Prírodovedec* č.66, Nitra 2001, s.279-283

Paabo, S., Gifford, J.A., Wilson, A.C.: Mitochondial DNA sequences from a 7000- years old brain. *Nucleic Acids Res.*, 16, 1988, s.9775-87

Palmirotta, R., Verginelli, F., Di Tota G., Battista, P., Cama, A., Caramiello, S., Capasso, L., Mariani-Constantini, R.: Use of a Multiplex Polymerase Chain Reaction Assay in the Sex Typing of DNA Extracted from Archaeological Bone. *International Journal of Osteoarchaeology* 1997, 7, s. 605-609

Rothschild, M., Jacobson, C., Vaske, D., Tuggle, C., Wang, L., Short, T., Eckardt, G., Sasaki, S., Vincent, A., McLaren, D., Southwood, O., van der Steen, H., Mileham, A., Plastow, G.(1996): The estrogen receptor locus is associated with a major gene influencing litter size in pigs. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 93, s. 201-205

Weising, K., Winter, P., Huttel, B., Kahl, G.: Microsatellite Markers for Molecular Breeding. *Journal of Crop Production* 1, 1998, s. 113-143

Zhao, X., Kochert, G.: Phylogenetic distribution and genetic mapping of a (CGG)_n microsatellite from rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Mol. Biol.* 21, 1993, s. 607-614