

Metoda: Polymerázová řetězová reakce

Linda Repková, Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví, 2. ročník

Princip:

Polymerázová řetězová reakce neboli PCR je účinná metoda, při které dochází ke kopírování úseku DNA. Tato metoda je schopna vyrobit miliony kopií úseku DNA během pár hodin, což umožňuje získat dostatečné množství vzorku pro určitou analýzu. Ze všeho nejdříve je třeba izolovat DNA ze vzorku. To se děje za pomoci přístroje anebo se provádí manuálně. Poté je potřeba si připravit reakční směs. Ta se skládá ze synteticky připravených primerů, DNA, kterou jsme si předtím izolovali ze vzorku a z tzv. mastermixu, který obsahuje směs nukleotidů, DNA polymerázu, hořčičnaté ionty a vodu. Do jedné zkumavky si napipetujeme požadované množství směsi, kromě izolované DNA. Promícháme ve vortexu a tuto směs rozpipetujeme do mikrozukmavek na PCR a nakonec přidáme testovanou DNA. Takto připravené mikrozukmavky vložíme do termocykleru, ve kterém probíhají cykly. Samotné PCR se skládá ze tří kroků. Prvním krokem PCR je tzv. denaturace neboli separace cílové DNA. Vzorek DNA se zahřeje na teplotu 95 °C, čímž dojde k rozvolnění dvoušroubovice DNA na dvě samotná vlákna (díky vysoké teplotě se rozpadnou vodíkové můstky mezi vlákna DNA). Druhým krokem je hybridizace. Dochází při něm k navázání primerů na DNA. Používají se dva primery-jeden na každé separované vlákno. Dojde tedy k získání dvou samostatných DNA vláken se sekvencemi, které jsou označeny primery. K navázání primerů dochází při teplotě 40-60 °C. Poslední krok se nazývá elongace. Teplota se opět zvyšuje na 65-75 °C. Dochází k vytvoření dvou identických kopií DNA díky nukleotidům, které se přidávají k navázaným primerům pomocí DNA polymerázy a tím vytváří nové vlákno DNA. Celý tento cyklus se opakuje a vytváří se tak další kopie DNA. Reakce se většinou opakuje ve 30 cyklech.

Uplatnění metody:

Nejčastěji se PCR využívá k diagnostice různých onemocnění. V současné době se hojně používá pro určení positivity či negativity u pacientů s podezřením na COVID-19. Dále se PCR může využít k sekvenování DNA či analýze genů a v neposlední řadě také ke zmožení určitého úseku DNA.

Úskalí metody:

Přidáním příliš velkého množství DNA do směsi může v reakci způsobovat problémy-nespecifické nasedání primerů.

Za nevýhodu by se dala také považovat izolace DNA ze vzorku, která předchází samotnému PCR, pokud se musí provádět manuálně – je to velmi pracné a může tak při případných nezkušenostech laboranta být i časově náročná.

Přístrojové vybavení:

Reakce skládající se ze tří kroků probíhá v termocykleru. Tento přístroj je schopný měnit teplotu dle reakce, která právě probíhá.

Odběr a transport:

Odběr vzorku by měl probíhat za sterilních podmínek, aby nedošlo ke kontaminaci biologického materiálu. Důležité je odebírat vzorek na PCR v beztalkových rukavicích. Odebírají se různé typy vzorků (krev, mozkomíšní mok, plodová voda, výtěr z nosu, nosohltanu, sputum.) ve kterých se předpokládá,

že se v nich bude vyskytovat patogen. Odběr krve se provádí nejlépe na lačno, do zkumavek s K3EDTA. Výtěry se posílají na sterilním tamponu bez transportní půdy. Vzorek se uchovává při teplotě 2-8 °C. Je nutné vzorky poslat do laboratoře co nejdříve a vyšetřit obvykle do 12-24 hodin po odběru.