

# Molekularno-biološke metode u patologiji

## Nukleinske kiseline

Nukleinske kiseline otkrio je švicarski liječnik Friedrich Miescher još 1869. godine u leukocitima gnojnih rana, ali im je biološko značenje bilo nepoznato. Izolirani spoj nazvao je “nuklein” odakle potječe ime nukleinske kiseline. Godine 1944. američki znanstvenik Oswald Avery je prvi pokazao u eksperimentima na bakterijama, da se geni sastoje od nukleinskih kiselina., a James Watson i Francis Crick 1953. godine opisali su trodimenzionalnu strukturu molekule DNA i mogući mehanizam njezine replikacije. Analizirajući fotografije što su ih Rosalind Franklin i Maurice Wilkins snimali difrakcijom x-zraka na kristalima molekula DNA, predložili su strukturu molekule koji se u bitnim crtama pokazao uglavnom točnim. Glavne osobine tog modela su (slika 1):

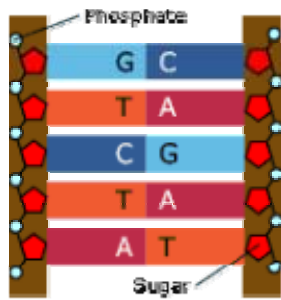


Dva su spiralna polinukleotidna lanca smotana oko zajedničke osi, a lanci se protežu u suprotnim smjerovima.

Nukleotidi su purinske i pirimidinske baze smještene u unutrašnjosti uzvojnice, dok su fosfatne grupe i šećerne jedinice smještene u vanjskom dijelu molekule.

Spiralna se struktura ponavlja nakon deset nukleotida u svakom lancu u intervalima od 3,4 nm.

Dva lanca povezuju vodikove veze. Adenin je uvijek sparen s timidinom, a gvanin s citozinom i upravo ta specifičnost pri sparivanju baza je najvažniji funkcionalni čimbenik



Slika 1. Kostur DNA molekule je građen s vanjske strane od šećera i fosfatnih grupa, dok se nukleotidne baze nalaze s unutrašnje strane.

dvostruke uzvojnice. Slijed baza duž polinukleotidnog lanca je nositelj genetičke informacije.

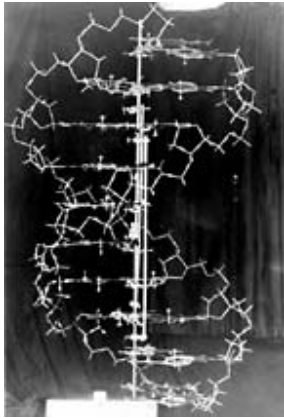
Ovaj oblik restrikcije je temeljni za kopiranje DNA: DNA uzvojnica se prvo "razvuče" u dva duga lanca s okosnicom šećernih i fosfatnih grupa, dok slobodne baze "strše" iz njih poput zubaca na češlju.

Svaki lanac uzvojnice postaje kalup za sintezu novog komplementarnog lanca. Biološka mašinerija unutar stanice dodaje odgovarajuće, komplementarne slobodne baze na podijeljenu molekulu i istovremeno provjerava ("proof-read") rezultat, da bi pronašla i popravila greške. Nakon kopiranja, nastaju dvije identične kopije originalne molecule.

Kodirajuće regije u lancu DNA, GENI, čine samo dio od ukupne količine DNA. Regije DNA koje su izvan kodirajućih regija nazivaju se INTRONI. Prije se smatralo da su nevažni, da predstavljaju "genetsko smeće", no danas biolozi i genetičari smatraju da introni imaju važnu ulogu u aktivaciji i regulaciji izražaja gena.

### Slika 1: Uzvojnica DNA

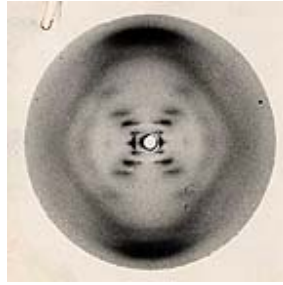
Ovo otkriće jedno je od najvažnijih otkrića u povijesti biologije i pokazalo je put za razumijevanje funkcije gena na molekularnoj razini.



Originalni DNA model (J. Watson i F. Crick, 1952.)

A

B



Fotografija 51, difrakcija X-zraka na DNA molekuli B tipa. R. Franklin i M. Wilkins, 1951.

C.



James Watson Francis Crick

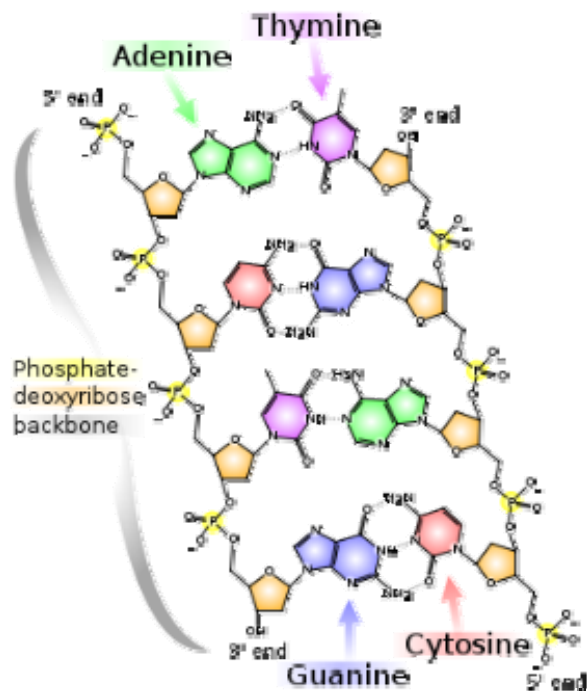


Maurice Wilkins



Rosalind Franklin

**Slika 2.** James Watson i Francis Crick (A), Maurice Wilkins ( B) i Rosalind Franklin (C), znanstvenici zaslužni za otkriće strukture i funkcije DNA molekule (Nobelova nagrada 1962. godine za fiziologiju i medicinu).



**Slika 3.** Kemijska struktura molekule DNA

### Sastav i struktura nukleinskih kiselina

Postoje dvije glavne vrste nukleinskih kiselina: DNA ( deoksiribonukleinska kiselina) i RNA (ribonukleinska kiselina). Obje su sastavljene od lanca podjedinica nazvanih nukleotidi, od kojih svaki sadrži dušične baze (purinske ili pirimidinske) šećer pentozu (ribozu ili deoksiriboza) i fosfatne grupe. U molekuli DNA pentoza je deoksiriboza, a u RNA je riboza. Obje nukleinske kiseline sadrže purinsku dušičnu bazu adenin (A) i gvanin (G) i pirimidinsku citozin (C). Druga pirimidinska baza u molekuli DNA je timin (T), a u molekuli RNA je uracil (U). Dušične baze međusobno su povezane vodikovim vezama. G-C nukleotidi povezani su s tri vodikove veze a A-T s dvije. Iako su vodikove veze relativno slabe, veliki broj veza u molekuli DNA osigurava stabilnost dvostruke uzvojnice. U Tablici 1 i na slici 3. su prikazani svi kemijski elementi nukleinskih kiselina. Purinske i pirimidinske baze u DNA nose genetičku informaciju, dok šećerne i fosfatne skupine imaju strukturnu ulogu.

**Tablica 1.** Kemijski elementi strukture DNA i RNA

	<b>DNA</b>	<b>RNA</b>
<b>Purini</b>	<b>Adenin</b>	<b>Adenin</b>
	<b>Gvanin</b>	<b>Gvanin</b>
<b>Pirimidini</b>	<b>Citozin</b>	<b>Citozin</b>
	<b>Timin</b>	<b>Uracil</b>
<b>Pentoze</b>	<b>2-Deoksiriboza</b>	<b>Riboza</b>
	<b>Fosfatna grupa (PO<sub>4</sub><sup>2-</sup>)</b>	<b>Fosfatna grupa (PO<sub>4</sub><sup>2-</sup>)</b>

Pentoza svake nukleotidne jedinice vezana je preko svog prvog ugljikovog atoma na dušičnu bazu (stvarajući nukleozid), a istovremeno preko svog petog ugljikovog atoma na fosfatnu grupu. Nukleotidi u DNA i RNA spojeni su zajedno fosfodieterskom vezom koja uključuje 5`-fosfatnu grupu jedne jedinice i 3`-hidroksilnu grupu novo nastale jedinice.

Dva polinukleotidna lanca koji tvore molekulu DNA su antiparalelni. Počevši od jednog kraja molekule pa dalje, nukleotidi jednog lanca spojeni su zajedno 3`-5`-fosfodieterskim vezom, dok su komplementarni nukleotidi drugog lanca spojeni 5`-3`-fosfodieterskom vezom.

Kostur molekule nukleinske kiseline se stvara ponavljanjem sekvenci pentoza i fosfatnih grupa koje su jednake u svim molekulama. Ono što razlikuje jednu molekulu DNA ili RNA od druge molekule je specifični redosljed purinskih i pirimidinskih baza prisutnih u lancu nukleotida, te ukupni broj nukleotida (veličina molekule).

## Replikacija DNA

Jedno od suštinskih svojstava genetskog materijala je njegova sposobnost replikacije, a dvostruka uzvojnica DNA predstavlja replikativni oblik svih poznatih gena. Način na koji molekula DNA zadovoljava zahtjeve replikacije proizlazi iz specifičnosti sparivanja dušičnih baza. Ako je poznat sljed baza u jednom lancu u paru, automatski se određuje sljed baza u drugom lancu, stoga je jasno da jedna polovina molekule (jedna od dvije uzvojnice) sadrži sve neophodne informacije za stvaranje cijele molekule. Na primjer, ako se zna da je sljed baza duž jednog polinukleotidnog lanca DNA

- A G T A C G A T- tada komplementarni sljed u drugom lancu mora biti
- T C A T G C T A-

Zato, ako se dvostruka uzvojnica odmoti, svaki odvojeni polinukleotidni lanac može djelovati kao kalup za stvaranje novog komplementarnog lanca. Rezultat je uvijek isti: dvije identične dvostruke uzvojnice tamo gdje je prije bila jedna. Upravo to svojstvo komplementarnog vezanja odnosno sposobnost jednolančane molekule DNA da “traži” sebi komplementarnu jednolančanu DNA čini zapravo osnovu svih suvremenih metoda molekularne biologije.

## Izolacija DNA

Primjena molekularno-bioloških metoda u analizi humanog genoma ili genoma bakterija i virusa ovisi o izolaciji kvalitetne (inaktne i pročišćene) DNA. Humana DNA se može izolirati iz pune krvi (leukocita), tkiva, urina, primarnih staničnih kultura, arhivskog materijala tkiva uklopljenog u parafin. Protokoli za izolaciju temelje se na sljedećim postupcima:

1. liziranje stanica
2. uklanjanje staničnih proteina, RNA i drugih makromolekula ( ugljikohidrati, lipidi, fosfolipidi), kemijskom ekstrakcijom ( fenol-kloroform) ili enzimskim reakcijama (proteinaza K, RNaza),
3. izdvajanje DNA taloženjem, pomoću alkohola ( aps. etanol)

#### 4. otapanje DNA u TE (Tris-EDTA) puferu, pH 8,0

Ovo su osnovni “klasični” laboratorijski postupci, koji su temelj cijelog niza komercijalnih metoda, koje se mogu uspješno automatizirati.

## Izolacija RNA

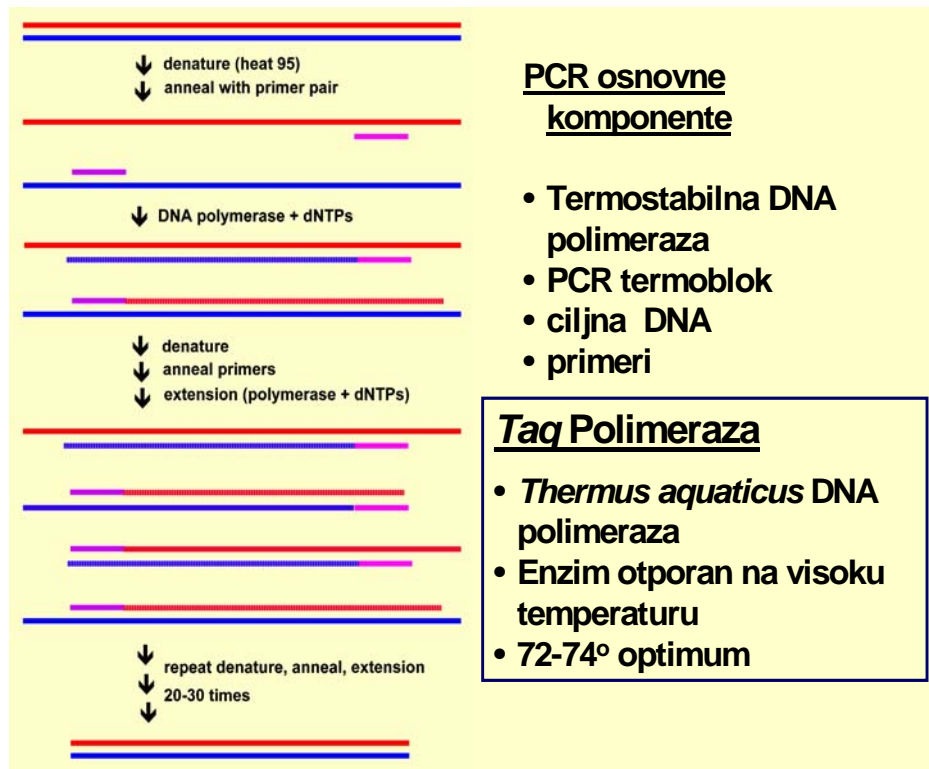
Temeljni uvjet za analize ekspresije gena i veličine transkripta (mRNA) je izolacija i priprema RNA visote čistoće i integriteta. Poteškoće u izolaciji intaktne RNA čini kontaminacija s ribonukleazama (RNase) vrlo aktivnim i stabilnim enzimima koji razgrađuju RNA. Zato je preduvjet za uspješnu izolaciju RNA inaktivacija ribonukleaza prisutnih na laboratorijskom priboru i u standardnim kemikalijama. Sav pribor, epruvete, nastavke za automatske pipete, potrebno je tretirati s 0,1% otopinom dietilpirokarbonata (DEPC) nekoliko sati i zatim DEPC ukloniti autoklaviranjem. Reagens i vodu također treba obraditi s otopinom DEPC i autoklavirati. Princip djelovanja DEPC je kovalentno vezanje i inaktiviranje Rnaza.

Prvi korak u izolaciji RNA je liza stanica s reagensima koji u isto vrijeme inhibiraju RNaze ( 4M gvanidin tiocijanatom). RNA se zatim odijeli od ostalih staničnih makromolekula (DNA i proteini) različitim postupcima, ovisno o primjenjenoj metodi (ultracentrifugiranje u gradijentu CsCl, ekstrakcija RNA s fenolom i kloroformom i precipitacija s izopropanolom). Klasična metoda za izolaciju RNA je izolacija s kiselim gvanidin-tiocijanatom i fenol-kloroform ekstrakcijom koju su preporučili Chomczynski i Sacchi 1987 god. I izolacija RNA je danas dostupna širokom krugu laboratorija ponudom manje i više složenih komercijalnih kitova.

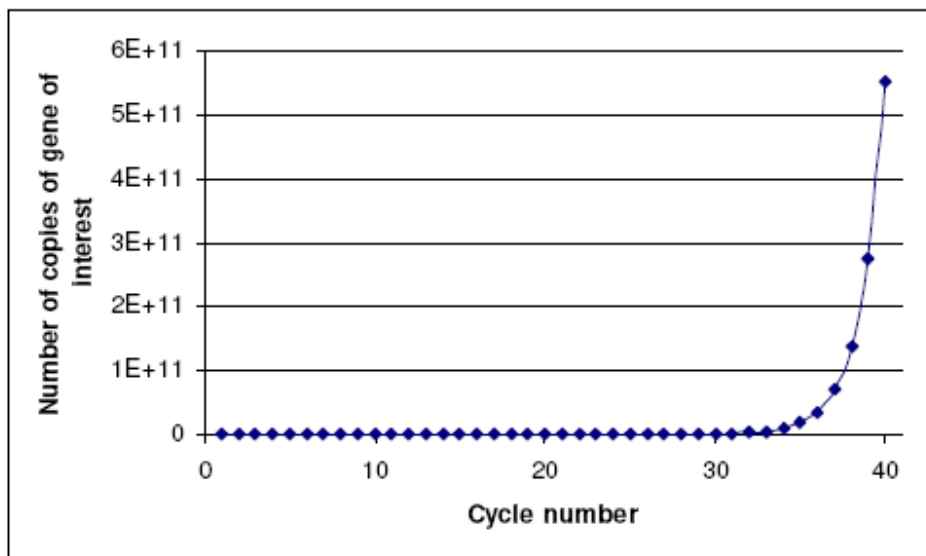
## PCR- polimerazna lančana reakcija

**PCR - polimerazna lančana reakcija** (engleski: **Polymerase Chain Reaction**) je metoda kojom se relativno kratki dio DNA umnožava u veliki broj identičnih kopija. Godine 1983. Kary Mullis je otkrio i opisao metodu kojom se *in vitro* umnožava DNA bez kloniranja i to iz malih količina DNA. Za to otkriće je 1993. godine dobio Nobelovu nagradu za kemiju. Ova metoda je izvršila presudni utjecaj na primjenu molekularno-bioloških metoda u znanstvenim istraživanjima, a osobito u novom području molekularne dijagnostike, gdje su prepoznate sve prednosti ove metode u razvoju dijagnostičkih testova u mikrobiologiji, virusologiji, dijagnostici nasljednih bolesti, dijagnostici neoplastičnih i malignih bolesti, izboru usmjerenih «pametnih» lijekova, u praćenju terapija i odgovora na terapiju, u forenzičkim i identifikacijskim dokazivanjima. Metoda je u osnovi vrlo jednostavna. Ciljni dio DNA molekule koju se želi umnožiti određuje se kratkim oligonukleotidnim sekvencama- primerima, koji su komplementarni krajevima ulomka DNA od interesa. Ovi primeri su pokretači serije reakcija pomoću enzima DNA polimeraze, koja na kalupu jednog lanca DNA sintetizira novi, komplementarni lanac, pri čemu veličina sintetiziranog dijela DNA molekule odgovara dužini koju omeđuju izabrani primeri. Na slici 4. prikazana je shema PCR metode.



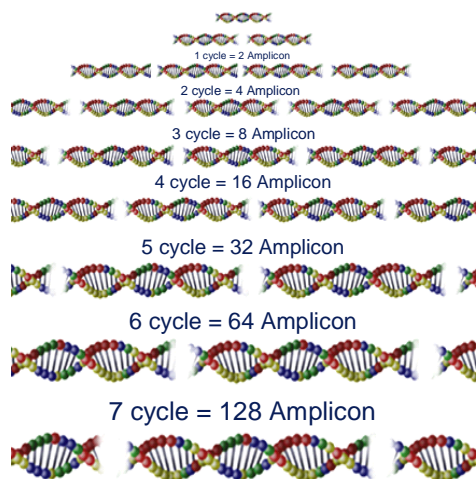


**Slika 4.** Dvostruki lanac DNA molekule se razdvoji zagrijavanjem na 94°C kroz 3 min. Tijekom hlađenja na 50 – 60°C primeri se komplementarno vežu (annealing) i Taq polimeraza započinje sintezu komplementarnih lanaca (extension) dodavanjem komplementarnih baza. Prosječna PCR reakcija se odvija u 30 do 35 ciklusa.



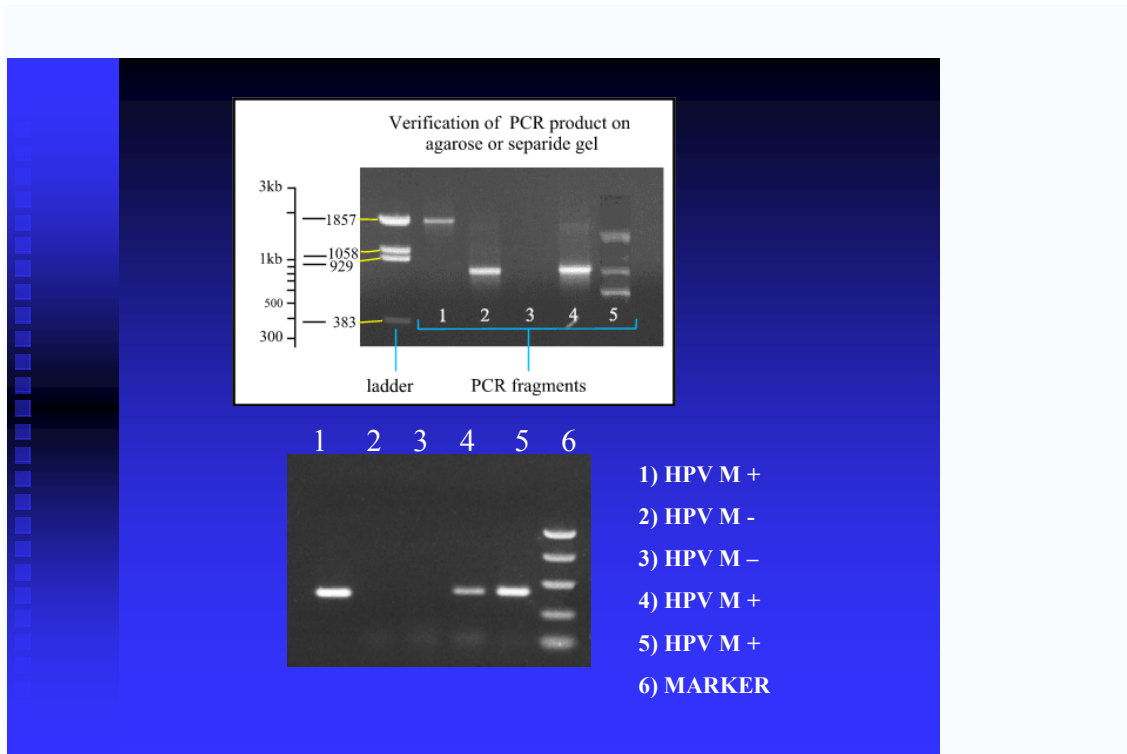
Slika 5. Broj kopija DNA molekule u odnosu na broj ciklusa.

## Amplifikacija ciljne DNA molekule



Ciklus	Broj kopija
1	2
2	4
3	8
4	16
5	32
6	64
20	1,048,576
30	1,073,741,824

Slika 6. prosječan broj ciljnih kopija DNA molekule ovisi o broju amplifikacijskih ciklusa.



Slika 7. Elektroforetska analiza PCR produkata na agaroznom gelu.

Polimerazna lančana reakcija odvija se u uređaju koji automatski i precizno kontrolira promjene temperature tijekom ciklusa amplifikacije (PCR termoblok). Taj uređaj zagrijava i hladi reakcijsku smjesu u epruvetama ( 0,2 ml) koje se nalaze u termobloku i osim kontrole temperature, termoblok kontrolira i dužinu trajanja pojedinih dijelova ciklusa amplifikacije.



Slika 8. Uređaja za PCR (PCR termoblok)

Sve što je potrebno za PCR je:

- Termostabilna DNA polimeraza
- Uzorak DNA ( 50 do 100 nanograma u prosjeku) koja će biti kalup za kopiranje komplementarnog DNK lanca-niza;
- Dva odgovarajuća oligonukleotidna primera
- Reakcijski pufer
- Nukleotidi: adenin, timin, citozin i gvanidin (A, T, C i G)
- 

Osnovni parametri svih PCR protokola su:

1. Inicijalno denaturiranje DNA u trajanju od 3 od 5 minuta na temperaturi od 94°C.

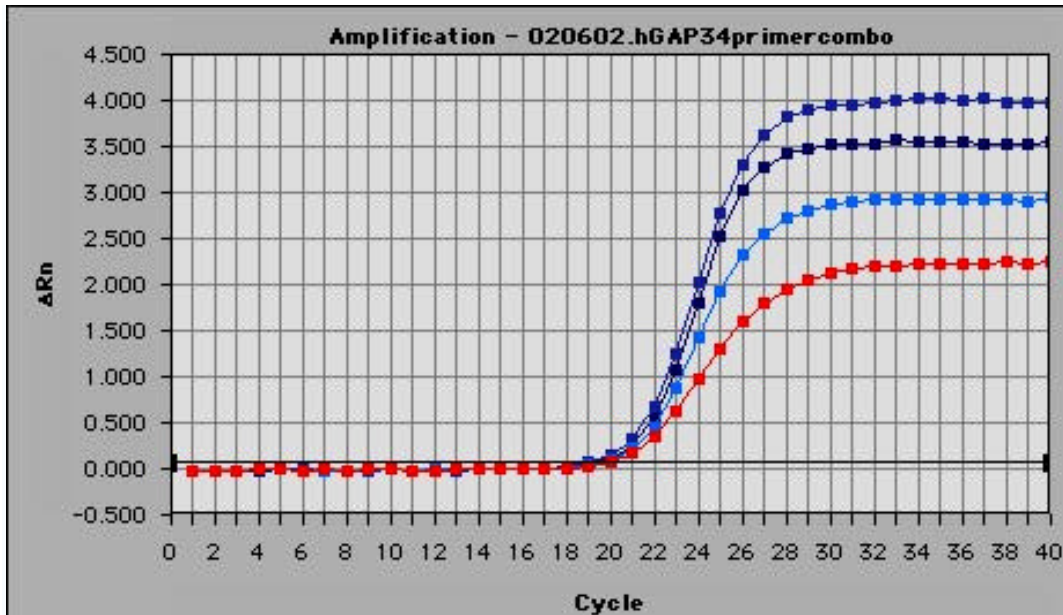
Pritom se razdvajaju sparni lanci DNA koji služe kao kalupi za amplifikaciju

2. Hibridizacija primera na komplementarne odjeljke DNA ( annealing).

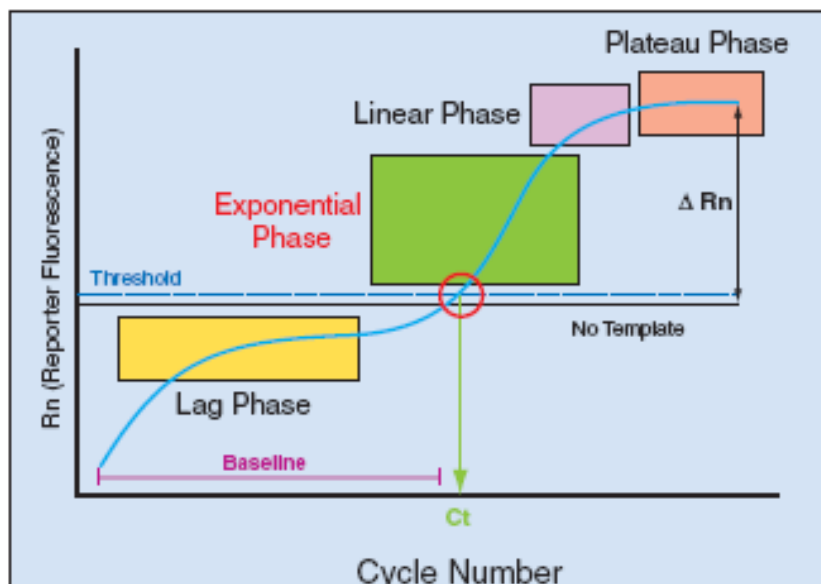
U tom procesu će temperatura biti snižena na prosječno 55°C ( 50 – 60 °C) da bi se oligonukleotidni primeri vezali na komplementarne razdvojene lance DNA.

3. Sinteza komplementarnog lanca ( extension) na temperaturi od 72°C.

To je optimalna temperatura za djelovanje termostabilne Taq-polimeraze. Pritom će polimeraza ugrađivati nove komplementarne nukleotide sve dok ne stigne do drugog primera. Pošto se na obadva lanca odvija sinteza, u jednom ciklusu amplifikacije će se broj DNA molekula udvostručiti. Postupak možemo u cjelosti ponavljati i na taj način broj novonastalih molekula DNA će se uvećavati geometrijskom progresijom ( 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64,...). Zbog dinamike odvijanja PCR reakcije, prosječni PCR protokol se odvija u 30 do 40 ciklusa. Nakon 40 ciklusa pojavljuje se tzv.»fenomen platoa«, kada dolazi do zasićenja ( ili potroška reaktanata), tako da se gubi efikasnost reakcije ( Slika 9 i 10).



Slika 9. Na slici je prikazana dinamika PCR reakcije. Do 20. ciklusa koncentracija PCR produkta je vrlo niska. Između 20. i 28. ciklusa reakcija poprima linearni, pa logaritamski rast, da bi oko 35. ciklusa došlo do formiranja tzv. «platoa». U tom dijelu PCR reakcija nije više efikasna.



Slika 10. Dinamika PCR reakcije

### Osnovni program PCR reakcije izgleda ovako:

Broj ciklusa : 30

DENATURIRANJE	94°C	2 do 5 min
VEZANJE PRIMERA (ANNEALLING)	55°C	30-60 s
SINTEZA (ELONGACIJA DNA LANCA)	72°C	30 – 120 s (ovisno o duljini PCR produkta)
ZAVRŠNA SINTEZA.	72°C	5 – 7 min (završno djelovanje polimeraze ).

HLADENJE: Reakcija će konačno biti ohlađena na 4°C.

### **Laboratorijska iskustva rada sa PCR-om - napomene**

**Denaturacija:** Denaturiranje je vrlo brz proces koji počinje već na temperaturi od 70°C, međutim, sve komponente u PCR reakciji trpe zbog povećane temperature. Aktivnost polimeraze se može smanjiti, nukleotidi se mogu denaturirati, a primer se također djelomično mogu denaturirati. To su dovoljni razlozi da se postupak denaturacije dešava onoliko kratko koliko je to za postupak neophodno. Ustvari dovoljno je i vrijeme od desetak sekundi da se dva polinukleotidna lanca DNA duplog helixa razdvoje. Problem je tehničke prirode zbog nemogućnosti da se u klasičnim PCR uređajima postigne u kratkom vremenu precizno podešavanje temperature u termobloku.

**Temperatura vezanja primera:** Ona se računa prema primeru koji ćemo upotrebljavati.. Za izračunavanje temperature vezanja primera postoje različite formule. Klasična formula se temelji na sadržaju nukleotida GC i AT.

$$Tm = 4 X (\text{broj } G + \text{broj } C) + 2 X (\text{broj } A + \text{broj } T)$$

Ova formula je primjenljiva samo za primere dužine do 30 baza.

**Kvaliteta DNA :** Poželjno je da je izolirana DNA što kvalitetnija. Ipak, nekada PCR funkcionira optimalno iako nemamo «najoptimalniji» materijal u obradi.

**Faktor umnožavanja:** U PCR postupku se teoretski DNA molekula iz ciklusa u ciklus udvostručuje. Međutim, realno je faktor umnožavanja od ciklusa do ciklusa od 1,6 – 1,7, (znači faktor nije 2 sto se teoretski očekuje). Umnožavanje je na početku PCR prilično

niske efikasnosti. Jedan od bitnih uzroka je početna mala koncentracija DNA. U središnjem dijelu procesa umnožavanja broj kopija DNA raste linearno, da bi pri kraju reakcije razina umnožavanja ponovno drastično pala (« plato efekt ») jer je umnožavanje u značajnoj mjeri inhibirano od strane nastalih pirofosfata, denaturiranih nukleotida i rehibridiziranog PCR produkta.

**Količina DNA :** Teoretski dovoljna je jedna jedina molekula DNA. Ipak, u praksi je potrebno najmanje 100 do 1000 molekula DNA da bi PCR reakcija krenula. Izračunavanje broja molekula DNA u izolatu nije precizno. Pomoći će nam sljedeće okvirne proporcije: 100 000 molekula DNA odgovara otprilike 0,5 pg plazmidne DNA, ili 300 ng humane genomske DNA. U većini slučajeva ove količine mogu biti bitno drugačije. Optimalna količina DNA je manja količina DNA.

**Pufer:** Taq polimeraza ima maksimum aktivnosti pri pH vrijednosti iznad 8. U puferu se nalaze soli KCl (do 50 mM) ili pak  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (do 20mM). Najznačajniji je  $\text{MgCl}_2$ ; enzim treba za aktivnost slobodni  $\text{Mg}^{2+}$ . Optimalna koncentracija je između 0,5 i 2,5 mM. Koncentracija  $\text{Mg}^{2+}$  utječe na vezanje primera, razdvajanje nizova pri denaturiranju, specifičnost produkta, stvaranje primer- dimera, te na vjernost kopiranja.

**Koncentracija nukleotida:** U standardnim protokolima preporučena koncentracija nukleotida je 200  $\mu\text{M}$ .

**Polimeraze:** Klasična polimeraza za PCR je Taq – DNA polimeraza izolirana iz bakterije *Thermus aquaticus*, koja živi u termalnim vodama, a stabilna je na visokim temperaturama od oko 70°C. Ovo «čudo» od enzima ima maksimalnu aktivnost (djelotvornost) pri temperaturi od 74°C i pH 8. Prosječna efikasnost sinteze DNA je oko 2800 nukleotida/min.

Uobičajeno je da se u reakcijskoj smjesi (jedna epruveta) od 50 ul koristi jedna jedinica (unit) Taq polimeraze.

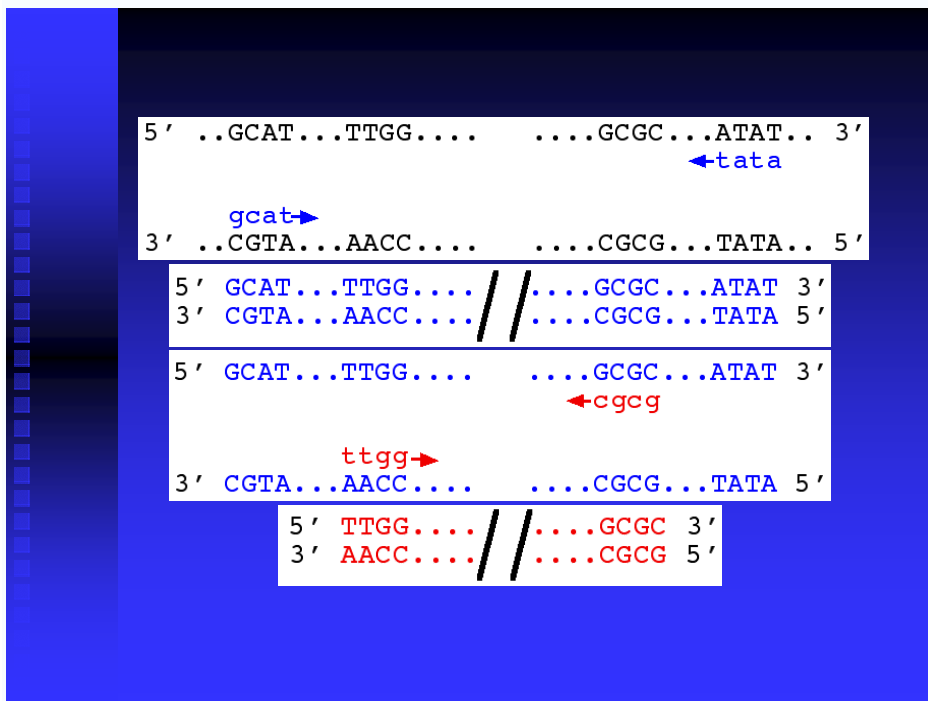
## Nested PCR – PCR u dva stupnja

U slučajevima kada raspoložemo s vrlo malim količinama DNA, može se desiti da efikasnost umnožavanja nije visoka i nakon 40 ciklusa provjerom na agaroznom gelu, ne možemo uočiti PCR produkt. Povećavanjem broja ciklusa ne možemo više povećati broj kopija i zato što nakon otprilike 40. ciklusa udio pogrešnih hibridiziranja (krivo sparenih fragmenata) naglo raste, tako da će rezultat biti jedna nejasna mrlja nekorisna za očitavanje. Znanstvenici su se dosjetili kako da poboljšaju ovu metodu na način da se i vrlo male količine DNA mogu uspješno umnožiti. Metoda se zove **nested PCR**.

Neobično ime za vrlo jednostavan postupak. Metoda se temelji na primjeni dvostrukog PCR-a.

1. Načini se prvi PCR postupak s malom količinom DNA.
2. PCR produkt iz prve PCR reakcije koristi se kao kalup za novi PCR.

PCR reakcijska smjesa se ponovo načini na isti način kao i za prvi PCR, jedino primeri nisu isti. U odnosu na primere iz prvog PCR-a, novi primeri su smješteni unutar PCR produkta prve reakcije. Otuda i eng.naziv «nested» koji se može slobodnije prevesti i kao «ugnježdjeni», unutarnji primeri (slika 9). Ovom metodom moguće je dokazati vrlo male početne količine DNA, a najviše se koristi u analizama malih količina cDNA (transkribiranih RNA molekula) u dokazivanju niske ekspresije gena u ispitivanom tkivu.



**Slika 11.** Princip «nested» PCR-a: Plavom bojom su označeni primeri prve PCR reakcije i prvi PCR produkt; crvenom bojom su označeni nested (unutrašnji) primeri i drugi, manji PCR produkt.

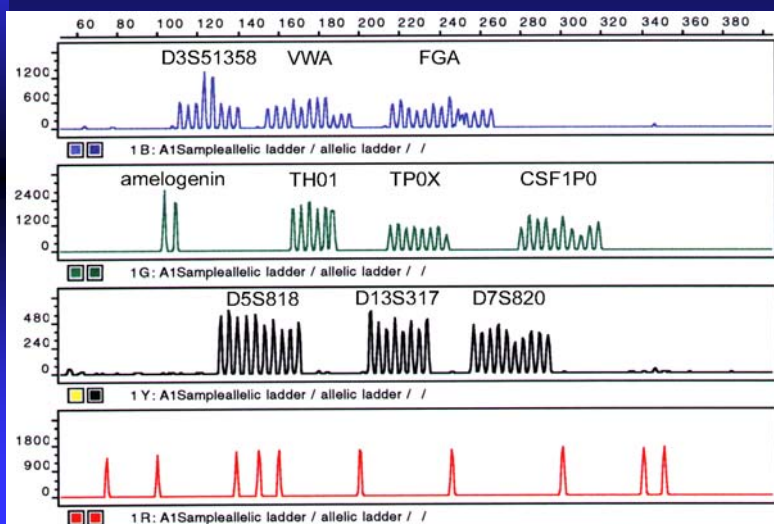


## Multiplex PCR

Ova aplikacija PCR-a predstavlja mogućnost da se načini istovremena analiza više segmenata istog uzorka DNA u jednoj epruveti, koristeći više parova primera. Metoda je odgovor na pitanje- ako želimo u istom uzorku izolirane DNA učiniti više amplifikacija, možemo li jednostavno u reakciju dodati više parova primera? Chamberlain je 1988. godine prvi pokazao da je to moguće – koristio je šest parova primera i uspješno je načinjena multiplex amplifikacija.

U slučaju manjeg broja fragmenata za uspješno očitavanje biti će nam dovoljna i njihova različita dužina koju uočavamo na običnom agaroznom gelu, metodom elektroforeze. U slučaju značajnijeg porasta broja fragmenata pomoći će nam označavanje primera različitim fluorescentnim bojama i razdvajanje PCR produkta metodom kapilarne elektroforeze (Slika 12.). Također, veliki broj amplificiranih fragmenata se može dokazati metodama hibridizacije na pločicama ili na specijalno pripremljenim hibridizacijskim membranama (strip tehnologija). Kod ove metode najteže je načiniti optimizaciju uvjeta PCR reakcije. Jedan od osnovnih uvjeta je da primeri moraju imati slične optimalne temperature za vezanje (podjednaka dužina i GC sastav). Ova metoda, ako je dobro postavljena, je vrlo informativna i uglavnom se koristi u identifikaciji (identifikacija humanih ostataka, forenzika, dokazivanje očinstva) i tipizaciji sustava s multiplim alelima na lokusima (tipizacija HLA).

## PRIMJER MULTIPLEX-PCR ANALIZE



**Slika 12.** Primjer multiplex (višestrukog) PCR-a. Umjesto na gelu, multipli PCR produkti prikazani su metodom kapilarne elektroforeze, kao niz pikova, jer je rezolucija ovom metodom puno veća ( na gelu bi se vidjela samo duža, kontinuirana mrlja, bez pravih vrpce).

## Primjena PCR metode

Mogućnosti primjene PCR-a u ovom trenutku su neograničene. U svakom slučaju PCR će još dugo vremena biti u molekularnoj biologiji metoda izbora. PCR metoda se primjenjuje kao osnovna metoda ili kao metoda koja treba osigurati dovoljnu količinu DNA za daljnje analitičke postupke kao što su sekvenciranje, kloniranje, hibridiziranje. Posebno je propulzivno područje molekularne medicine, gdje se PCR koristi u dijagnostici nasljednih i stečenih bolesti, malignih bolesti, infektivnih bolesti, u prenatalnoj medicini, u praćenju efikasnosti molekularno usmjerene terapije, u farmakogenetici i forenzici.

## Daljnji razvoj PCR tehnika

Na osnovama PCR metode razvijeno je niz novih postupaka koji su prilagođeni potrebama eksperimentalnih zahtjeva i razinama osjetljivosti i specifičnosti samog eksperimentalnog ili analitičkog modela. Najznačajnije inovacije su:

### **RT- PCR (Reverse transcription -PCR)**

RT-PCR je metoda u kojoj je polazni genetski materijal molekula RNA. Budući se zbog svoje strukture ( uracil umjesto timina) ne može direktno amplificirati pomoću DNA polimeraze, u prvom koraku reakcije RNA se prepíše (transkribira) pomoću enzima **reverzne transkriptaze** u komplementarnu DNA

(cDNA) i zatim je cDNA dovoljna da bude kalup za amplifikaciju segmenta RNA od interesa. Područje primjene je vrlo veliko. Na primjer, na ovaj način se može dokazati transkripcija jednog gena u točno određenom tkivu ili stanici.

Eksponencijalna amplifikacija nakon reverzne transkripcije je metoda visoke osjetljivosti koja omogućuje da se vrlo mali broj RNA molekula uspješno detektira.

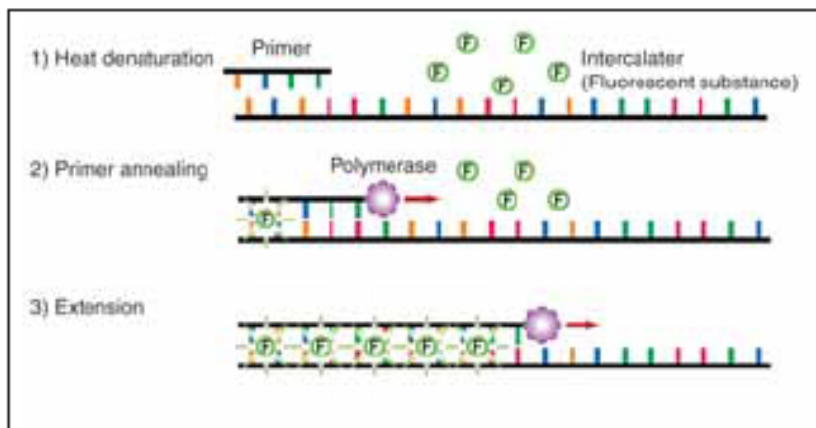
RT-PCR je našao široku primjenu u dijagnostici genetskih bolesti, a posebno u analizama ekspresije gena u različitim tkivima. RT-PCR se koristi u postupcima kloniranja gena eukariota u prokariote. Budući geni eukariota sadrže introne koji su prisutni u intronima, ali ne i u vjesničkoj RNA (mRNA), cDNA koja se generira u RT-PCR postupku je identična DNA molekuli koja će biti, nakon transkripcije, prevedena u odgovarajući protein. Ovaj postupak se primjenjuje u proizvodnji specifičnih, visoko pročišćenih i rekombinantnih proteinskih molekula.

RT-PCR se često koristi u dijagnostici neoplastičnih bolesti koje u podlozi imaju kromosomske translokacije. U tim slučajevima RT-PCR metoda je optimalni izbor za detekciju novonastalih hibridnih transkripata. U molekularnoj dijagnostici RT-PCR se koristi za dokazivanje RNA virusa ( virus hepatitisa C, HIV, virusi influenze A).

## Real-time PCR

**Real-time PCR** ( PCR u «realnom» vremenu) je postupak koji se temelji na standardnom PCR-u. Isti su neophodni uvjeti: dobro izolirana DNA, optimalno izabrani primeri za reakciju i optimizirani svi stupnjevi PCR reakcije ( denaturacija, izbor i uvjeti vezanje primera, sinteza DNA-elongacija komplementarnog DNA lanca). Osnovna razlike i veliko tehnološko unapređenje je uvođenje simultanog sustava za detekciju PCR produkta. Nekoliko je paralelnih pristupa:

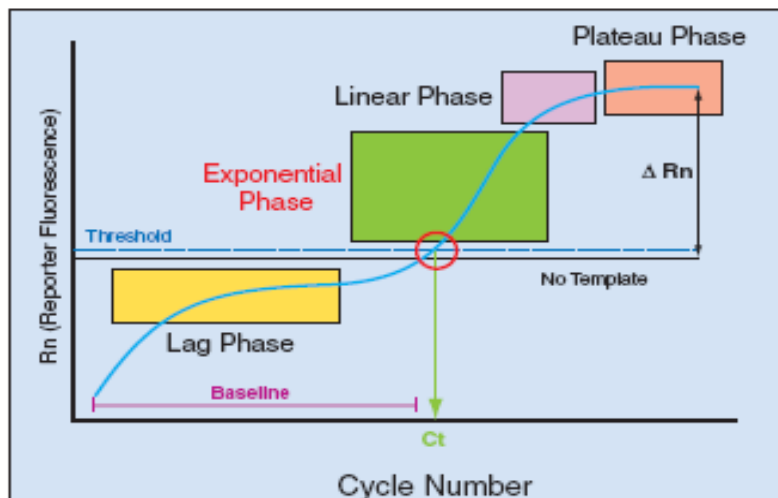
1. Primjena kemijskog spoja ( npr. SYBER GREEN) koji se može ugraditi između nukleotida dvostruke uzvojnice DNA i pri tome emitira fluorescenciju. U slobodnoj formi spoj ne emitira svjetlo, tako da je taj efekt iskorišten za praćenje porasta fluorescencije u svakom ciklusu PCR-a, što je indirektna mjera za količinu nastalog PCR produkta ( Slika 13).
2. Primjena primera obilježenih fluorescentnim spojevima, tako da se amplifikacija DNA prati preko ugradnje primera u PCR produkt, a zapravo se generira porast intenziteta fluorescencije.
3. Primjena standardnih primera i specijalnih proba koje su komplementarne segmentu ciljne regije DNA, a obilježene su različitim kombinacijama spojeva koji emitiraju svjetlosnu energiju i spojeva koji blokiraju takvo djelovanje. Tijekom PCR reakcije dinamika odnosa ovih spojeva se mijenja, tako da se kao krajnji efekt mjeri porast energije zračenja u obliku fluorescentne svjetlosti. Primjeri za takav pristup su FRET sustav koji je razvila tvrtka ROCHE Diagnostics i TaqMan probe američke tvrtke Applied Biosystems.



**SYBR® Green Intercalator Detection Method**

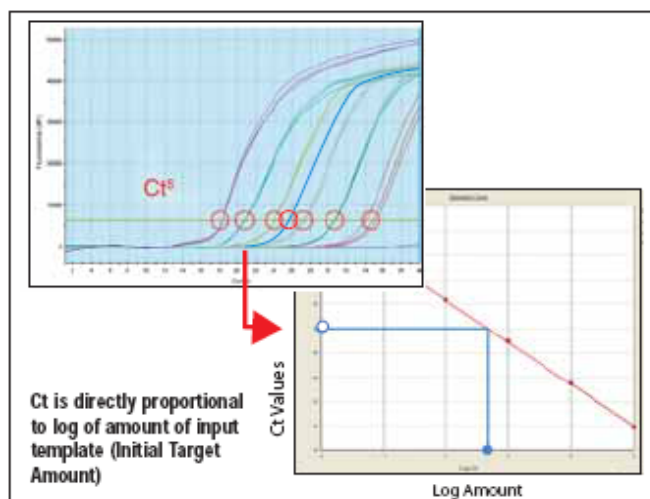
Slika 13. Metoda detekcije nastalog PCR produkta ugradnjom fluprescentnog spoja SYBER Green.

U tipičnoj reakciji, PCR produkt nastaje eksponencijalno. Budući da treba nekoliko ciklusa da bi se umnožilo dovoljno DNA kopija, krivulja odnosa intenziteta fluorescencije prema broju ciklusa pokazuje sigmoidalni oblik. U kasnim ciklusima supstrati reakcije (DNA, dinukleotidi, enzim) bivaju iscrpljeni, PCRprodukt se više ne udvostručuje i krivuljeprelazi u ravan oblik – «plato». Točka na krivulji kada se intenzitet fluorescencije naglo povećava, obično nekoliko standardnih devijacija iznad bazne linije, naziva se granični ciklus (the threshold cycle (Ct value)). ( Slika 14.)



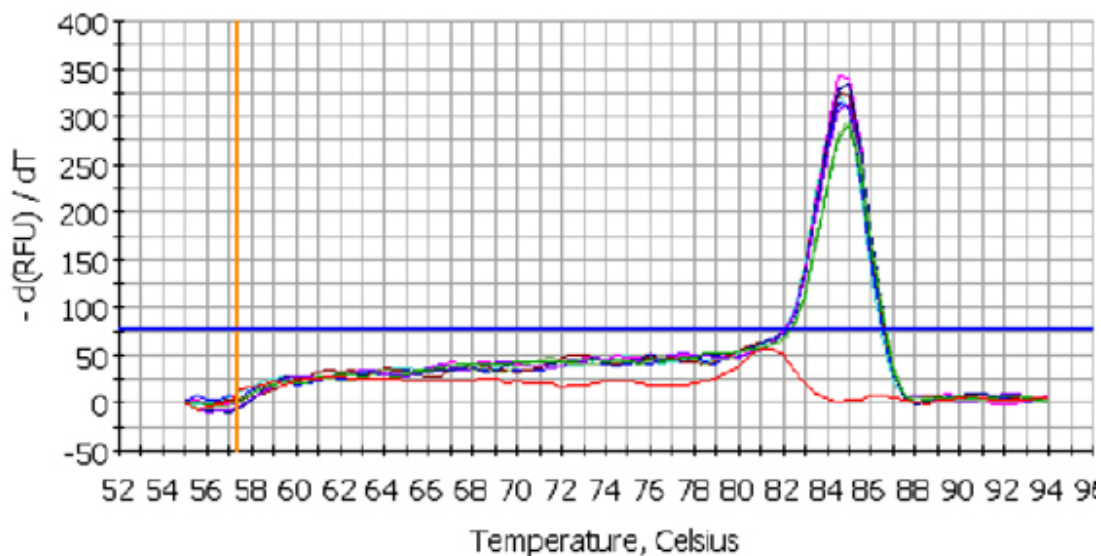
Slika 14. Intenzitet fluorescencije u odnosu na broj ciklusa i granični ciklus (prag)  $C_t$  (označen crvenom kružnicom).

Grafički prikaz odnosa  $C_t$  vrijednosti prema koncentraciji DNA kalupa je linearan, tako da usporedba  $C_t$  vrijednosti između različitih reakcija (uzoraka) omogućava izračunavanje koncentracije određene ciljne nukleinske kiseline (DNA ili RNA). Nagib pravca predstavlja mjeru PCR učinkovitosti. (Slika 15.)



Slika 15. Grafički prikaz odnosa  $C_t$  vrijednosti prema koncentraciji DNA kalupa. Osnova za kvantifikaciju startne nukleinske kiseline.

Pojedini Real-time uređaji omogućuju korisnicima da nakon završetka PCR reakcije, u postupku koji se zove krivulja taljenje DNA (melting curve) generiraju dodatne podatke o specifičnosti PCR produkta i mogućoj pojavi primer-dimera. Primer-dimeri nastaju kada je količina DNA uzorka jako mala, primeri su u suvišku i zbog nespecifičnosti, vežu se jedni na druge generirajući nespecifični PCR produkt. (Slika 16.)

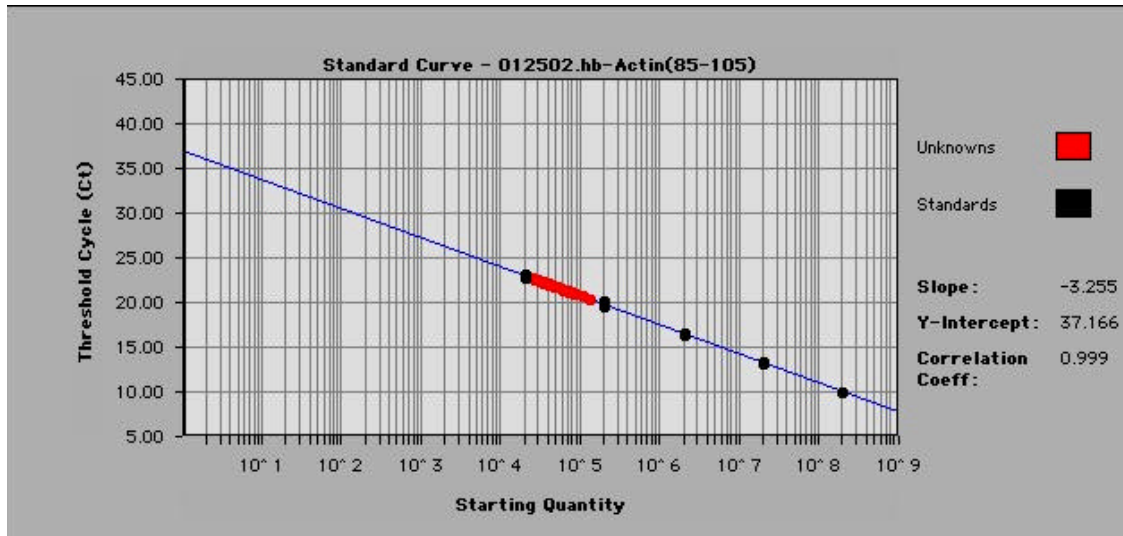


Melt Peak: Data 10-Mar-03 1259 ed.opd

Slika 16. Krivulja taljenja pokazuje veliku specifičnost PCR reakcije. Svi analizirani uzorci svrstavaju se u okviru iste krivulje.

### Real Time PCR kvantifikacija

PCR produkti mogu se apsolutno kvantificirati pomoću standarda ili relativno, usporedbom s kontrolnim genom. Za apsolutnu kvantifikaciju koja se temelji na standardnoj krivulji, za izradu krivulje mogu se koristiti plazmidna DNA ili drugi oblici DNA, uz uvjet da je apsolutna koncentracija svakog standarda poznata. Pri tome je važno napomenuti da učinkovitost PCR reakcije bude u istom rangu za standard i za testirani uzorak (Slika 17).



Slika 17. Standardna krivulja načinjena pomoću kontrolnog gena b-aktina.

Učinkovitost PCR reakcije kod pročišćene DNA može biti veća u odnosu na kompleksni uzorak mješavine nukleinskih kiselina iz biološkog uzorka. U takvim slučajevima je relativna kvantifikacija pogodniji i jednostavniji model jer zahtjeva simultano mjerenje ekspresije housekeeping gena ili kontrolnog gena da bi se normalizirala vrijednost ekspresije ispitivanog gena. Ipak izbor odgovarajućeg kontrolnog gena može prouzročiti probleme jer ne mora biti ujednačeno eksprimiran u cijelom uzorku. Ovakvi problemi mogu se izbjeći izborom grupe housekeeping gena i normalizacijom u odnosu na sve njih, da bi se izbjegao efekt varijabilnosti.