

OSNOVNI PRINCIPI PCR METODE I NJENA PRIMENA U KLINIČKOJ PRAKSI

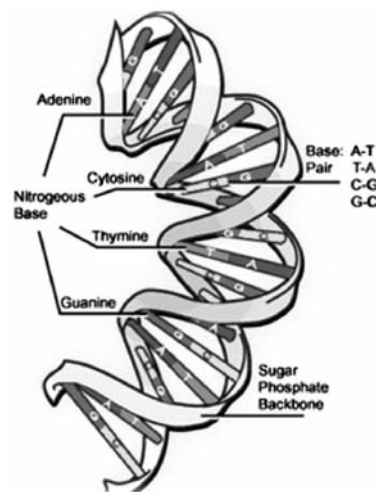
Marija Živković

UVOD

PCR (Polymerase Chain Reaction - Lančana reakcija polimeraze) predstavlja najznačajnije otkriće na polju molekularne biologije i molekularne patologije u poslednjih 20 godina. U biomedicinskim naukama uspešno se koristi za bazična genetska istraživanja, brzu i preciznu dijagnozu bolesti (pre svega naslednih i infektivnih), praćenje terapijskih efekata lekova, kao i u sudskoj medicini (1, 2). U osnovi PCR metode je biohemijska reakcija koja omogućava *in vitro* umnožavanje (amplifikaciju) određenog fragmenta dezoksiribonukleinske kiseline (DNK) i u suštini je imitacija sinteze DNK (replikacija) koja se normalno odvija u svim živim organizmima (3).

DNK je složeno makromolekularno jedinjenje sastavljeno od velikog broja monomernih jedinica koji se nazivaju nukleotidi. Svaki nukleotid sastavljen je od molekula šećera dezoksiriboze (pentoza), purinske (adenin ili guanin) ili pirimidinske baze (citozin ili timin) i molekula fosforne kiseline. U molekulu DNK nukleotidi su međusobno povezani kovalentnim fosfodiastarskim vezama između OH grupe fosforne kiseline vezane za 5C atom pentoze i OH grupe na 3C atomu odgovarajuće pentoze drugog nukleotida. Otuda svaki lanac DNK ima svoju polarnost - 5' i 3' terminalni deo lanca. Prema Watson-Crick-ovom modelu, sva ćelijska DNK sastoji se od dva vrlo dugačka spiralna polinukleotidna lanca izvijana oko zajedničke ose koji formiraju heliks. Lanci su orijentisani u suprotnim smerovima - naspram 5' kraja jednog lanca je 3' kraj drugog lanca, zbog čega se kaže da su antiparalelni (Slika 1). Purinske i pirimidinske baze lanaca DNK su međusobno spojene kovalentnim vodoničnim vezama koje spajaju dva lanca po tipu komplementarnosti, pri čemu je adenin (A) uvek spojen sa timinom (T) dvogubom vezom, dok se guanin (G) vezuje sa citozinom (C) trogubom vezom. Posledica komplementarnog sparivanja baza je da svaki lanac molekula DNK sadrži sekvencu nukleotida komplementarnu sekvenci suprotnog lanca u heliksu. Ovaj princip sparivanja baza je najvažniji za replikaciju DNK, jer svaki od lanaca pri kopiranju služi kao matrica za sintezu suprotnog komplementanog lanca. Proces replikacije DNK je složen mehanizam u kome glavnu ulogu ima enzim DNK-polimeraza na kome je zasnovana PCR metoda. DNK-polimeraza katalizuje stvaranje fosfodiastarske veze u rastućem nukleotidnom lancu novosintetisane DNK. DNK-polimeraza otkrivena je 1955. godine od strane

Kornberg-a, koji je prvi pokazao da se molekuli DNK mogu sintetisati *in vitro* u sistemu koji sadrži ekstrakt bakterije *Escherichia coli* i 4 radioaktivno obeležena nucleotida (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) (4). Glavni problem bio je pronaći efikasniji način za analizu DNK produkcijom dovoljne količine sekvenci od interesa u *in vitro* uslovima. Američki naučnik Kery Mullis je 1983. godine došao na ideju da bi se ponavljanjem procesa sinteze DNK pomoću dve suprotno orijentisane oligonukleotidne sekvence (prajmeri) koje ograničavaju željenu sekvencu i enzima DNK polimeraze, broj molekula DNK mogao umnožiti i do milijardu puta. Prvobitni PCR eksperimenti izvođeni su sa polimerazom izolovanom upravo iz *Escherichia coli* i zahtevali su ponovo dodavanje enzima posle svakog ciklusa umnožavanja DNK u PCR reakcionu smešu; razlog je bio termolabilnost enzima iznad 94°C, temperature koja je potrebna za inicijalnu denaturaciju DNK. Napredak u razvoju PCR metode i njeno izvođenje, kakvo se danas radi, omogućilo je otkriće termostabilne DNK-polimeraze, izolovane iz bakterije *Thermus aquaticus* (2).



Slika 1. Watson - Crickov model dvolančanog molekula DNK

PRINCIPI IZVOĐENJA PCR METODE

Osnovni princip PCR metode je selektivna amplifikacija jedne željene sekvence DNK molekula (gen ili deo gena) milion do milijardu puta bez prethodnog izolovanja iz mase DNK molekula prisutnih u uzorku. Takva sekvencu zove se ciljna sekvencu (2). Proces izvođenja PCR-a može se podeliti u 3 koraka: izolacija DNK ili RNK iz uzorka i priprema PCR smeše, zatim PCR reakcija, i na kraju identifikacija PCR produkata.

IZOLACIJA DNK ILI RNK MOLEKULA IZ UZORKA I PRIPREMA PCR SMEŠE

Pre PCR reakcije potrebno je izvršiti izolovanje molekula DNK ili RNK iz uzorka koji sadrži ciljne sekvence. Biološki materijal koji se koristi za analizu može biti bilo koje tkivo ili ćelija, a najčešće su korišćeni leukociti periferne krvi, serum, amnionska tečnost, horionske čupice, tkivo uzeto biopsijom ili autopsijom, tkivo fiksirano u parafinu ili formalinu, urin, semena tečnost, sputum, cerebrospinalna tečnost, koren kose, mrlje od krvi, semene tečnosti ili pljuvačke. Pre izolovanja, neophodno je izvršiti prečišćavanje i koncentrovanje ćelija da bi se smanjio volumen iz koga se izoluje DNK ili RNK (1). Najčešće korišćena metoda za izolaciju DNK je ekstrakcija fenol-hloroformom (5), dok se za izolaciju RNK koriste kisela ekstrakcija, mikroadaptacija izolovanja RNK na gradijentu cezijum-hlorida i izolovanje iRNK (RNK sa poliA repom). Izbor metode treba da bude takav da, zavisno od prirode biološkog materijala, čistoća, homogenost i sadržaj DNK u uzorku budu optimalni: prednost imaju brze i jednostavne procedure za pripremu uzorka koje smanjuju rizik od kontaminacije i povećavaju dijagnostičku pouzdanost (1). Danas su u upotrebi kitovi za brzu izolaciju DNK i RNK koji omogućavaju izolaciju za nekoliko sati sa velikim stepenom čistoće.

Uzorci sadrže faktore inhibicije koji smanjuju efikasnost i produktivnost PCR reakcije i mogu biti različitog porekla.

Krv se najčešće koristi kao biološki materijal za izolaciju DNK, tako da uzorke treba pripremati sa antikoagulansima (EDTA ili Na - citrat). Porfirinske komponente iz krvi inhibiraju aktivnost Taq polimeraze, zbog čega se vrši liziranje eritrocita i selektivno taloženje leukocita pri izolovanju.

Urin sadrži veliki broj supstanci koje inhibiraju reakciju, pa se preporučuje pravljenje serijskih razblaženja, da ne bi došlo do razblaženja koncentracije infektivnog agensa koji se ispituje.

Faktori inhibicije u DNK preparatima mogu biti jonski deterđenti, proteinaza K koji denaturišu Taq polimerazu i zato moraju biti uklonjeni iz uzorka fenol - hloroformskom ekstrakcijom i etanolskom precipitacijom. Fenol ima isti efekat i zato i on mora biti uklonjen rastvorom hloroform - izoamil alkohola. Soli koje su prisutne u različitim rastvorima koji se koriste za izolaciju DNK mogu precipitirati sa DNK ili inhibirati reakciju polimerizacije, zbog čega se vrši ispiranje DNK taloga i eliminacija soli pomoću 70% etanola. Uzorak DNK može biti kontaminiran tuđom DNK (eksperimentatori ili druga lica) ili produktima PCR smeše iz prethodnih reakcija.

Posle izolovanja DNK iz biološkog materijala treba

pripremiti PCR smešu i optimizovati njene sastojke. U sastav PCR smeše ulaze: DNK uzorak, rastvori prajmera, gradivni blokovi - nukleotidi (dNTP), joni magnezijuma (Mg^{2+}), taq polimeraza, pufer, dejonizovana sterilna voda (ddH_2O).

Rastvori prajmera prave se tako da prajmeri budu u ekvimolarnim koncentracijama, dok se koncentracije modifikuju prema koncentraciji dNTP-a. Optimalna količina prajmera zavisi od dužine amplifikovanog fragmenta i teorijski odgovara koncentraciji koja je neophodna za amplifikaciju 2 - 4 μg produkta. Prajmeri se uvek u smešu dodaju u velikom višku. Generalna pravila za dizajn prajmera su: dužina od 14 - 40 nukleotida sa GC sadržajem 40-75%, sličan sastav i dužina, slična temperatura topljenja i specifičnost za datu ciljnu sekvencu. Prajmeri ne smeju da sadrže komplementarne 3' krajeve da ne bi došlo do međusobne hibridizacije. *Rastvori dNTP - a* moraju biti ekvimolarni za svaki od 4 nukleotida i pH neutralni. Najčešće korišćena koncentracija dNTP-a je 20 - 200 μM svakog nukleotida u finalnoj PCR smeši. *Joni Mg^{2+}* su neophodni za PCR reakciju, jer se vezuju za nukleotide koji se jedino u formi kompleksa sa jonima Mg^{2+} mogu ugraditi u rastući lanac tokom elongacije. Koncentracija jona Mg^{2+} određuje se tek kada se optimizuju druge komponente i varira od 0,5 do 5 mM. Taq polimeraza zahteva optimizaciju količine koja se dodaje u smešu i kreće se od 0,5 do 2,5 jedinica. Povećanje koncentracije enzima može dovesti do greške pri ugradnji nukleotida. *Pufer* se koristi za održavanje odgovarajuće pH sredine u smeši. Najoptimalnija pH sredina je 7. Finalna zapremina PCR smeše kreće se od 25 do 50 μL . Postupak pripreme smeše vrši se na ledu u mikrotubi. Da bi se rastvor DNK bolje rastvorio preporučuje se inkubacija u vodenom kupatilu na 37°C preko noći. Ovako rastvorena DNK dodaje se u PCR smešu, a količina koja se dodaje zavisi od koncentracije DNK u dobijenom uzorku koja se određuje merenjem spektrofotometrom na određenoj talasnoj dužini i preračunava se. Reakciona smeša pripremljena u mikrotubi postavlja se u PCR aparat (1). U cilju prevencije kontaminacije uz svaku PCR reakciju uključuju se i odgovarajuće kontrole za detekciju lažno pozitivnih i lažno negativnih rezultata.

PCR REAKCIJA

Osnovna odlika PCR aparata je brza, automatizovana, ciklična i precizna promena temperature od 30 do 40 puta pod kontrolom mikroprocesora, koja je neophodna za izvođenje reakcije polimerizacije (3). Jedan ciklus PCR reakcije čine faza denaturacije DNK matrice, faza hibridizacije prajmera i faza elongacije.

Faza denaturacije

U ovoj fazi raskidaju se vodonične veze između 2 komplementarna lanca DNK molekula, što se postiže inkubacijom na 95°C tokom 3-5 minuta; cilj je da kompletna DNK bude denaturisana i dobijeni jednolančani molekuli.

Faza hibridizacije prajmera

U ovoj fazi temperatura se automatski snižava (varijacije idu od 42°C do 65°C) u intervalu od 20 sekundi do 1 minuta, kako bi se par prajmera strogo specifičnih za 3' kraj ciljne sekvence mogao vezati. Svaki prajmer pretražuje ceo genom i vezuje se za ciljnu sekvencu svojim 5' krajem na odgovarajućem lancu DNK koju pronalazi u nizu nukleotida, pri čemu oni služe kao graničnici definišući sekvencu koja se kopira, a neophodni su i za početak aktivnosti Taq polimeraze kojoj je potrebna inicijalna sekvenca oligonukleotida da bi otpočela polimerizaciju.

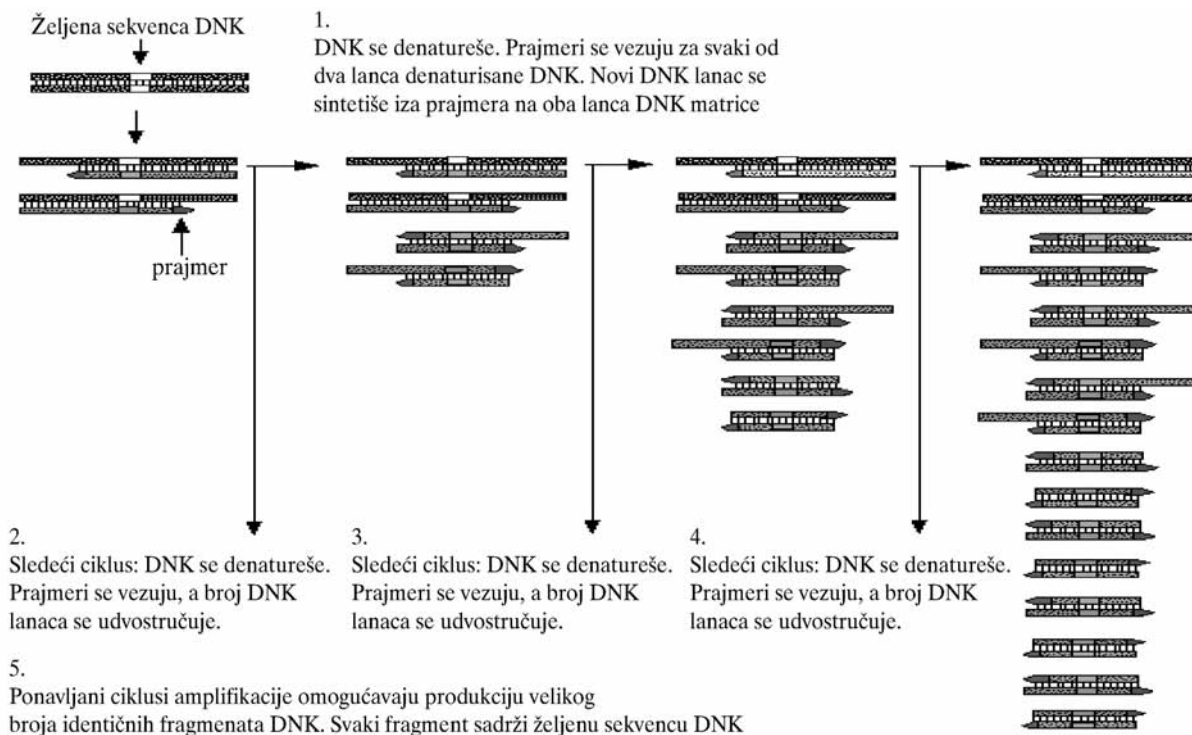
Faza elongacije prajmera

U ovoj fazi enzim sintetiše komplementaran lanac za svaki lanac ciljne sekvence koristeći slobodne nukleotide iz smeše. Sinteza se vrši u pravcu 3' - 5' i to od mesta gde se nalazi prajmer u jednom smeru na jednom lancu i u drugom smeru na drugom lancu DNK. U masi DNK molekula, kopira se samo DNK koja sadrži ciljne sekvence jer Taq polimeraza može da kopira samo one delove DNK koji imaju hibridizovane prajmere. Optimalna temperatura za termostabilnu

Taq polimerazu je 72°C, tako da se ova faza izvodi na toj temperaturi u trajanju od 20 sekundi do 2 minuta. Prosečna brzina ugradnje nukleotida je 35-100 sec (1, 6).

Na kraju 1. ciklusa dobijaju se 2 parcijalno duplirana lanca DNK koja sadrže ciljnu sekvencu, ali i dodatnu DNK. Na kraju 2. ciklusa formiraju se 4 parcijalno duplirana lanca DNK dok se na kraju 3. ciklusa dobijaju 2 molekula DNK koja sadrže samo ciljnu sekvencu i 6 molekula DNK koja sadrže pored ciljne i dodatnu DNK. Tokom daljih ciklusa broj molekula DNK koji sadrže samo ciljnu sekvencu raste eksponencijalno (Slika 2). Nakon 30 ciklusa, kao konačni produkt PCR reakcije dobija se preko milijardu čistih ciljnih sekvenci (6). Posle poslednjeg ciklusa, vrši se inkubacija 5-15 minuta na 72°C, kako bi došlo do kompletiranja parcijalno elongiranih produkata - ovaj postupak naziva se finalna elongacija, posle čega je smeša spremna za analizu (1). Optimalni broj ciklusa je 25-35 i zavisi od početne koncentracije molekula DNK u slučaju da su svi ostali parametri optimalni i ne bi trebalo da prelazi 40.

Na nižim temperaturama i pri kraćem vremenu denaturacije dolazi samo do parcijalnog razdvajanja molekula DNK, tako da se vrlo brzo mogu ponovo uspostaviti vodonične veze između komplementarnih lanaca. Visoke temperature i duže vreme denaturacije oštećuju DNK i povećavaju ugradnju tzv. "pogrešnih nukleotida" i smanjuju aktivnost enzima.



Slika 2. Lančana reakcija polimerizacije

Najkritičniji korak u optimizaciji PCR-a je izbor temperature za hibridizaciju prajmera sa matricom ili temperature topljenja (T_m). T_m se definiše kao temperatura na kojoj 50% molekula DNK disocira, pri čemu je za raskidanje GC baznih parova potrebna veća temperatura u odnosu na AT parove (3). Temperatura i vreme hibridizacije optimizuju se u zavisnosti od baznog sastava, dužine i koncentracije prajmera, direktno su proporcionalni i utvrđuju se empirijski za svaki par prajmera. Temperatura faze elongacije zavisi od enzima i utvrđuje se, takođe, empirijski (1).

IDENTIFIKACIJA PCR PRODUKATA

Posle PCR reakcije vrši se identifikacija amplifikovanog produkta procesom elektroforeze na gelu.

Elektroforeza na agaroznom gelu je horizontalna elektroforeza koja se vrši na agarozu - polisaharidu, čija je osnovna jedinica disaharid - agarobioza. Agarozu posle rastvaranja, kuvanja i laganog hlađenja formira gustu mrežu sa porama koje variraju od 100 do 300 nm, zavisno od koncentracije rastvora agaroze (1).

Elektroforeza na poliamidakrilnom gelu je vertikalna elektroforeza. Poliamidakrilni gel (PAGE) je baziran na ko - polimerizaciji akrilamida i bis - akrilamida. PAGE je jedna od najboljih metoda koja se koristi za razdvajanje i vizuelizaciju nukleinskih kiselina. Prednosti PAGE-a u odnosu na agarozni gel su veća rezolucija (moguće je razdvojiti molekule DNK čija je razlika u dužini samo nekoliko baznih parova), visoka čistoća uzorka i veća brzina izvođenja.

Prilikom pripreme gela određuje se njegova gustina, odnosno veličina pora (bunarića), od čije veličine zavisi razdvajanje molekula DNK različitih dužina. Gušći gel bolje razdvaja bliske fragmente DNK male dužine, dok ređi gel služi za razdvajanje velikih fragmenata. Pripremljeni gel potapa se u kadicu za elektroforezu u kojoj se nalazi odgovarajući pufer (provodnik). Uzorci koji se analiziraju prvo se pomešaju sa puferom za nalivanje uzoraka (engl.

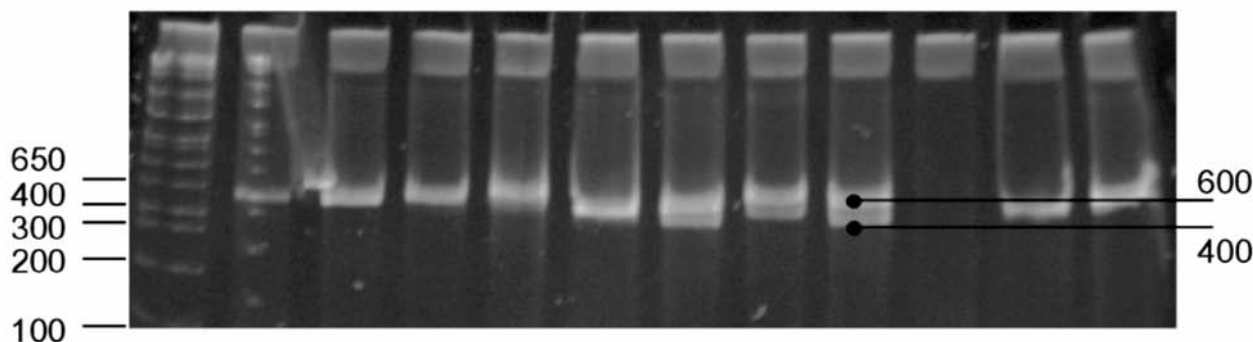
loading buffer), koji povećava gustinu uzorka (čime je omogućeno da DNK padne na dno bunarića), boje uzorak i omogućavaju praćenje elektroforeze. Posle toga uzorci se sipaju u bunariće na gelu (1 bunarić = 1 uzorak) i uključuje se struja odgovarajućeg konstantnog intenziteta. Pored uzoraka, nalivaju se i pozitivna i negativna kontrola i tzv. DNK markeri u posebne bunariće. DNK markeri (lenjiri) su isečene sekvence DNK poznatih dužina (broja baznih parova). Poređenjem brzine kretanja molekula DNK koji ispitujemo sa brzinom kretanja DNK poznatih dužina, elektroforezom procenjujemo veličinu DNK ciljne sekvence koja je predmet identifikacije. Na osnovu toga se može reći da li je ciljna sekvenca prisutna ili ne u ispitivanom uzorku (1).

Po završetku elektroforeze vrši se vizuelizacija razdvojenih fragmenata DNK bojenjem gela etidijum - bromidom ili srebro - nitratom. Etidijum - bromid je kancerogena supstanca koja se interkalira između lanaca DNK molekula i koja fluorescira kada se stavi pod UV svetlo. Etidijum - bromidni gel je najčešće upotrebljavan, ali nije trajan jer boja brzo izbledi, tako da se mogu čuvati samo 1-2 dana. Za trajno čuvanje gela koristi se bojenje srebro - nitratom (7), gde se fragmenti DNK vizuelizuju kao tamne trake golim okom na gelu. Ovako obojeni gel čuva se umotan u folije, zaštićeni od isušivanja u frižiderima na $+4^{\circ}\text{C}$ (Slika 3).

VRSTE PCR METODE

PCR može biti kvalitativan i kvantitativan. Kvalitativni PCR može biti standardni, RT - PCR, *in situ* PCR. Kvantitativni PCR je Real Time PCR (u realnom vremenu), koji može biti takođe standardni i RT - PCR.

Standardni PCR radi se uz korišćenje jednog para prajmera koji omogućava amplifikaciju ciljne sekvence i služi samo za detekciju njenog prisustva ili odsustva. Varijante su multipleks PCR i umreženi (nested) PCR. Multipleks PCR predstavlja simultanu PCR



Slika 3. *P. gingivalis* i *A. actinomycetemcomitans* identifikovane bojenjem sa etidijum - bromidom

amplifikaciju različitih sekvenci DNK uz korišćenje više parova prajmera. Umreženi PCR je dvofazna lančana reakcija polimerizacije, gde se produkt amplifikacije prve faze koristi kao matrica za umnožavanje manjeg dela amplikona, tj. ciljne sekvence sadržane u tom produktu pomoću drugog para prajmera koji su komplementarni ciljnim sekvencama unutar amplikona (1, 7).

RT - PCR je adaptacija PCR metode kojom je omogućeno izučavanje molekula RNK. Pošto molekuli RNK ne mogu da služe kao matrica jer Taq polimeraza koristi isključivo jednolančani molekul DNK kao matricu, procesom reverzne transkripcije kod RT - PCR-a, RNK se konvertuje u komplementarni lanac DNK (cDNK). Ovom metodom se pomoću enzima reverzne transkriptaze celokupna genomska izolovana RNK prevodi u DNK. Prajmeri koji se koriste su specifični za ciljnu sekvencu na cDNK molekulu. Metoda je našla primenu, pre svega, u detekciji RNK virusa kakav je HIV virus. Primenom RT - PCR-a može se odrediti i količina iRNK. To je iskorišćeno u svrhu određivanja nivoa ekspresije gena, jer je upravo količina iRNK pokazatelj stepena aktivnosti nekog gena. Kvantifikacija produkata PCR smeše vrši se određivanjem količine ugrađenih obeleženih nukleotida ili prajmera (1).

In situ PCR je metoda koja omogućava sa visokom senzitivnošću lokalizaciju specifičnih sekvenci NK u okviru morfologije pojedinačnih ćelija. Pored standardnog postoji i *in situ RT - PCR*. Može se izvesti na bilo kom tkivnom preparatu (uzorci ćelijskih suspenzija, razmaz ćelija, presek tkiva) na mikroskopskoj pločici koja se postavlja u PCR aparat (1).

Real Time PCR omogućava kvantitativnu analizu dobijenog amplifikata u ispitivanom uzorku, npr. broj partikula virusa ili bakterija, kao i određivanje nivoa ekspresije određenog gena. Kod analize partikula infektivnog agensa u uzorku koriste se standardi sa već poznatim brojem partikula (10^2 , 10^3 ... 10^6). Komparacijom dobijenog amplifikata iz uzorka i poznatih standarda utvrđuje se broj partikula u ispitivanom uzorku. Primenom Real Time RT - PCR-a može se odrediti i nivo ekspresije gena (5).

PRIMENA PCR METODE U KLINIČKOJ PRAKSI

Detekcija infektivnih agenasa radi se kvalitativno i kvantitativno. Najčešće se vrši izolovanje i detekcija virusa i to: HCV i HBV virusa kod zapaljenskih promena na jetri i karcinoma jetre, HIV virusa kod rizičnih grupa, CMV kod infekcija ili disregulacije imunskog sistema, Humanog papiloma virusa kod inflamacije ili kancera genitalija, Epstein-Barr virusa

kod mononukleoznog sindroma, Herpes simplex virusa tipa I i II kod genitalnog herpesa. Precizna dijagnoza tuberkuloze vrši se PCR određivanjem bakterije *Mycobacterium tuberculosis*, Lajmske bolesti određivanjem prisustva *Borellia-e burgdoferi*. Identifikacija vrste *Chlamydia* radi se kod inflamatornih bolesti genitalija i steriliteta (5, 7).

Identifikacija mutacija radi se u cilju utvrđivanja naslednih bolesti prenatalno i postnatalno. Prenatalno se kao uzorak koristi amnijska tečnost i najčešće se detektuje cistična fibroza, hemofilija, trizomija 18. i trozomija 21. hromozoma. Postnatalna dijagnostika uključuje detekciju talasemije, hemohromatoze, Hantingtonove bolesti i Dišenove mišićne distrofije. U onkologiji se vrši detekcija onkogena i to: H - ras, p53, C - myc, K - ras i D2R (5).

Detekcija citokina i to interleukina 1, 4, 5, 6, 8 i 10, interferona - γ (INF - γ), tumor necrosis factor - α i β (TNF - α i TNF - β). U imunologiji se koristi i za HLA tipizaciju kod transplantacije organa (5).

Određivanje nivoa ekspresija gena se posebno koristi u onkologiji za procenu težine bolesti (5).

Identifikacija polimorfizama: Jedan gen može imati različitu formu koja nije posledica mutacije. Ovakvi polimorfizmi mogu biti razlog različite težine kliničke slike bolesti kod različitih pacijenata ili različitog odgovora na istu terapiju (5).

Praćenje terapijskog efekta određenih lekova u hematologiji: Korišćenjem PCR metode moguće je na molekularnom nivou odrediti o kom tipu leukemije je reč i pratiti odgovor na određenu terapiju. Najnoviji podatak je da se PCR-om može pratiti terapijski efekat leka kod prisustva Filadelfija hromozoma (translokacija 9/22), koji smanjuje mogućnost nastanka ove mutacije (5).

Proizvodnja lekova: PCR metode našla je široku primenu u farmaceutskoj industriji i genskoj terapiji, koja predstavlja budućnost u lečenju mnogih bolesti (5).

Kriminologija i sudska medicina: PCR se koristi za utvrđivanje očinstva i u dokaznim postupcima pred sudom. Svi ljudi se međusobno razlikuju na DNK nivou. Posebna klasa genskih lokusa sadrži kraće ili duže nizove nukleotida, ponovljene od nekoliko puta do hiljadu puta. Broj ponovljenih sekvenci je različit za svaku osobu, jer se radi o izuzetno polimorfnim genima. Ovakvi genski lokusi označeni su kao uzastopni ponovci različitog broja ili VNTR_s (*Variable Number Tandem Repeats*) i uključuju HLA - DQ lokus, LDLR (*low density lipoprotein receptor*), GYPA (*glycophorin A*), HBGG (*hemoglobin G gamaglobulin*), D7S8 i GC (*group specific component*). Kod utvrđivanja očinstva potrebno je da se broj

ponovljenih sekvenci deteta poklopi u određenom procentu sa brojem istih ponovljenih sekvenci oca. U kriminologiji se koristi za utvrđivanje pripadnosti odgovarajućeg dokaznog materijala (krv, dlaka, izlučevine) sa mesta zločina osobi za koju se sumnja da je počinilac. U sudskoj medicini se koristi i za identifikaciju posmrtnih ostataka (3, 5).

ZAKLJUČAK

Skoro sve metode koje se koriste danas u kliničkoj praksi su indirektno metode. PCR je jedina direktna metoda pored mikrobioloških metoda koja dokazuje prisustvo genoma određenog infektivnog agensa u organizmu ili gena koji je predmet ispitivanja.

PCR je visoko specifična metoda, jer je par prajmera po ciljnoj sekvenci specifičan samo za odgovarajući fragment DNK. Iz jedne ciljne sekvence može se dobiti preko milijardu kopija koje omogućavaju njenu identifikaciju i merenje. Za ispitivanje ciljne sekvence nije neophodna velika količina DNK niti visoki kvalitet DNK uzorka. Detekcija ciljne sekvence može se obaviti za jedan dan, što je velika prednost u identifikaciji onih infektivnih agenasa kojima je potrebno po nedelju dana za rast na odgovarajućoj podlozi kao što je bacil tuberkuloze.

PCR ima široku primenu u biomedicinskim naukama i gotovo da nema oblasti naučnog istraživanja u kojoj nije našla primenu.

LITERATURA

1. Romac S, Vukosavić S, Stojković O, Čuljković B. PCR u kliničkoj dijagnostici. Beograd, Biološki fakultet u Beogradu, 1999.
2. PCR (kompjuterski program). MS - DOS verzija. Kragujevac, Medicinski fakultet u Kragujevcu, 2007.
3. Farkas DH. DNA simplified: The Hitchhiker's guide to DNA. San Diego: Academic Press, 1993.
4. Koraćević D, Bjelaković G, Đorđević V, i sar. Biohemija. Niš: Savremena administracija, 1996.
5. Milićević R. Tehnike molekularne biologije. Pedijatrijski dani Srbije i Crne gore; 2003 Sept 17 - 19; Niš, Srbija i Crna gora.
6. Lančana reakcija polimerizacije (videozapis). Kragujevac: Medicinski fakultet u Kragujevcu, 2007.
7. Milićević R. Identifikacija mikroorganizama u dentalnom plaku, salivi i tkivu parodontijuma u slučajevima juvenilne i adultne parodontopatije PCR tehnikom (specijalistički rad). Beograd: Biološki fakultet u Beogradu, 2006.