

PCR

łańcuchowa reakcja polimerazy (ang. *Polymerase Chain Reaction* - PCR) jest to metoda pozwalająca na powielanie konkretnych odcinków DNA w warunkach laboratoryjnych. Została ona odkryta przez Kary'ego Mullisa w 1980 roku i od tego czasu opracowano już wiele jej ulepszeń oraz modyfikacji. Jedną z takich odmian jest tzw. real-time PCR, czyli inaczej PCR w czasie rzeczywistym, zwany również kinetyczną reakcją PCR (ang. *kinetic PCR*) lub ilościową reakcją PCR (ang. *quantitative PCR* lub *quantitative fluorescent PCR*). Nie należy jej jednak mylić z RT-PCR (ang. *Reverse Transcription*), w której jako matrycę stosuje się nici mRNA.

Real-time PCR umożliwia jednoczesne namnażanie DNA oraz monitorowanie ilości produktów powstających podczas kolejnych cykli (amplikonów). Po raz pierwszy została ona zaprezentowana przez zespół Higuchi'ego z Roche Molecular Systems and Chiron. Dzięki dodatkowi bromku etydy (EtBr) oraz przeprowadzeniu reakcji pod ultrafioletem udało się im wzbudzić fluorescencję barwnika i tym samym zwizualizować oraz nagrać proces amplifikacji.

W skład mieszaniny reakcyjnej standardowej reakcji PCR wchodzi oligonukleotydowe primery, nukleotydy stanowiące substraty reakcji, bufor zapewniający właściwe środowisko, jony magnezu niezbędne do właściwego funkcjonowania enzymów oraz termostabilna **polimeraza DNA** – posiadająca zdolność do tworzenia nowych odcinków DNA z wykorzystaniem matrycy DNA oraz primerów. Powszechnie stosowane są Taq DNA polimeraza (*Thermus aquaticus*) oraz Pfu DNA polimeraza (*Pyrococcus furiosus*), która zapewnia wysoką wierność przy replikacji. Oba te enzymy są odporne na wysokie temperatury i dzięki temu mogą przetrwać kolejne cykle reakcji PCR. Po fazie

namnażania podwójne nici DNA muszą bowiem ulec denaturacji w 95°C, aby w ten sposób umożliwić primerom przyłączenie się do jednoniciowych cząsteczek i tym samym rozpocząć nowy cykl. Teoretycznie, w każdym etapie liczba cząsteczek powinna ulec podwojeniu, jednak po fazie początkowej, charakteryzującej się logarytmicznym wzrostem następuje tzw. faza eksploatacyjna (faza plateau) będąca wynikiem zużywania się reagentów. Oznacza to, że liczba cząsteczek produktu może wzrosnąć tylko do pewnej wartości granicznej, a zjawisko to uniemożliwia określenie wyjściowej zawartości DNA na podstawie ilości produktu końcowego.

Dzięki zjawisku **fluorescencji** real- time PCR pozwala śledzić proces namnażania się DNA w czasie rzeczywistym i tym samym oznaczyć ilości produktu w fazie jego wykładniczego wzrostu.

Źródło: <http://www.e-biotechnologia.pl/>