

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA SOCIÁLNÍ A KLINICKÉ FARMACIE



BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

VZNIK, VÝVOJ A PERSPEKTIVY PCR

Vedoucí diplomové práce: doc. PhDr. František Dohnal, CSc.

Studijní program: Zdravotnická bioanalýtika

HRADEC KRÁLOVÉ, 2016

Trnčáková Veronika

Poděkování

Ráda bych poděkovala docentu PhDr. Františku Dohnalovi, CSc. za odborné vedení práce, cenné rady a vstřícnost při konzultacích. Děkuji také Mgr. Filipu Vrbackému za pomoc při kontrole mé práce.

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové 11. 5. 2016

.....

Obsah

1. Úvod	6
1.1 Cíl a metodika rešeršní práce	7
2. Historický vývoj medicíny	8
2.1 Raný rozvoj genetiky a přední osobnosti oboru.....	8
2.2 Převratný objev DNA.....	10
2.3 Počátky klonování genů a polymerázové řetězové reakce.....	14
3. Molekulárně-biologická diagnostika	15
3.1 Etické a právní aspekty molekulárně-biologické diagnostiky	15
3.2 Molekulárně biologická diagnostika	17
3.3 Mutace a jejich význam	19
3.4 Odběr materiálu a metody izolace DNA	20
3.5 Izolace a purifikace DNA.....	21
4. Metoda PCR – Polymerázová Řetězová Reakce	22
4.1 Vznik PCR	22
4.2 Princip PCR.....	22
4.3 Směs pro PCR reakci	24
4.4 Základní kroky při provádění PCR	25
4.5 Navržení primerů	25
4.6 Průběh PCR.....	26
4.7 Modifikace PCR.....	27
4.7.1 Kvantitativní PCR	28
4.7.2 Multiplex PCR	32
4.7.3 PCR kolonií.....	33
4.7.4 Nested PCR	33
4.7.5 „Přistávací“ (touchdown) PCR	34
4.7.6 Reverzně – transkriptázová PCR (RT-PCR).....	34
4.7.7 Digitální PCR.....	35
4.8 Vyhodnocení PCR.....	35

5. Metoda PCR v současném zdravotnictví a vědě.....	36
5.1 Uplatnění PCR v klinické diagnostice	36
6. Perspektivy	40
7. Závěr	41
8. POUŽITÉ ZKRATKY	
9. SEZNAM TABULEK	
10. SEZNAM OBRÁZKŮ	
11. POUŽITÁ LITERATURA	
12. PŘÍLOHA Č.1	

1. ÚVOD

Lidská genetika, nauka o lidské dědičnosti, je vědou o přenosu dědičných znaků, zvláště s přihlédnutím k dědičným nemocem. Historie lidské genetiky jako vědy začíná na přelomu 19. a 20. století znovuzobjevením Mendelových zákonů a důkazem, že se dají aplikovat i na lidi.

Slavní objevitelé a vědci patří v národě obyčejně a po právu k uctívaným osobnostem. Ne však vždy to platí beze zbytku. Pro naši národní historii má fakt objevu genetiky a jeho autora zvláštní význam, ale najdeme v ní i období s nevalnou až hořkou příchutí.

Objev Gregora Johanna Mendela se nejprve nesetkal v jeho době s pochopením a zájmem a pomalu upadal v zapomnění. Jeho zásluhy mu byly přiznány až po smrti. A ani potom, v návaznosti na peripetie našich národních dějin, nebyla jeho osobnost příliš připomínána a když ano, tak jen v úzkých odborných kruzích (https://cs.wikipedia.org/wiki/Gregor_Mendel, [cit. 2016-04-28]).

Naštěstí se ve druhé polovině 60. let, i v souvislosti s uvolněním domácích politických poměrů s dopadem do oblasti vědeckého bádání, uskutečnil pozvolný „návrat“ k Mendelovi, jež iniciovalo zejména Moravské zemské muzeum v Brně. Naplno se pak oprávněně účtě G.J. Mendelovi dostalo po revoluci v roce 1989.

Ráda bych, aby odkaz objevitele a zakladatele genetiky, rozvinutí jeho myšlenek v současné době, vyplynul i z obsahu mé práce.

Myslím si, že genetika je jednou z nejdůležitějších, ne-li přímo nejdůležitější z teoretických věd, díky níž můžeme popsat jakoukoliv živou soustavu. Proto byl objev genetiky a později i objev DNA (deoxyribonukleová kyselina) podle mého názoru největšími objevy 19. a 20. století. U genetické informace je počátek každé živé soustavy na tomto světě. Tato myšlenka je pro mě fascinující, proto jsem se vydala touto cestou za poznáním této zázračné molekuly.

Bakalářskou prací jsem chtěla nastínit historický vývoj objevu genetiky i nejdůležitější molekuly - DNA. Aby se mohl dále rozvíjet výzkum v oblasti genetiky, bylo nezbytné vynalézt další metody, které by nám pomohly pracovat s molekulou DNA. Takovouto metodou se stala právě polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction – PCR).

1.1 Cíl a metodika rešeršní práce

Tématika bakalářské práce vychází z mého širšího zájmu o problematiku lidské genetiky. Cílem bakalářské práce je jednak zachytit předpoklady a okolnosti vzniku vědy o přenosu dědičných znaků, jednak zaznamenat proces postupného etablování a rozhodujících vývojových mezníků oboru molekulární biologie s vazbou na problematiku polymerázové řetězové reakce (Polymerase Chain Reaction - PCR). To vše přitom v kontextu dějin medicíny a historického vývoje přírodovědného poznání. Obsahově se práce zaměřuje na objasnění metod vzešlých na základě objevu DNA jako zásadního kvalitativního obratu a posunu v medicínské diagnostice. Cílem práce je rovněž objasnění podílu významných osobností na rozvoji oboru.

V návaznosti na tento metodický postup je dalším cílem práce zachycení současného spektra užití metody PCR a jejich možných perspektiv a s tím související vymezení místa a úlohy v medicíně současnosti a budoucnosti.

Vzhledem k vymezenému cíli práce jsem zvolila následující metodický postup. Na základě prostudování dostupných pramenů k dějinám medicíny, zdravotnictví a vztažných přírodních věd (s důrazem na tituly zachycující vývoj v českých a československých podmínkách) se zaměřuji na vymezení hlavních mezníků vzniku a vývoje oboru a hlavní rysy procesu jeho pronikání do celé zdravotnické oblasti. Snahou přitom je zachytit osobnosti a děje, které se ať už přímo nebo zprostředkovaně - na základě koncipování směrů vědecké činnosti - zasloužily o rozvoj sledovaného oboru. Dalším nezbytným úsekem koncipování mé bakalářské práce bylo studium literatury k problematice PCR tak, aby část práce splňovala roli obsahového vyústění, zachycující současné spektrum, možnosti a význam metody PCR.

2. HISTORICKÝ VÝVOJ MEDICÍNY

V polovině 19. století formuloval Gregor Mendel (1822-1884, převor augustiniánského kláštera v Brně) zákony, kterými světu vysvětlil dědičnost biologických znaků. Tyto zákony vycházely z předpokladu, že dědičné vlastnosti organismů řídí jednotka nazvaná gen, která je přítomna v buňce. První zákon pojednává o uniformitě první generace potomků. Při křížení 2 homozygotů vzniknou potomci genotypově i fenotypově jednotní. Druhým je zákon o náhodné segregaci genů do gamet. Při křížení 2 heterozygotů může být na potomky předána každá ze dvou alel se stejnou pravděpodobností. Třetím zákonem je zákon o nezávislé kombinovatelnosti alel. Při zkoumání 2 alel současně dochází k pravidelné segregaci. Jeho objev však předběhl dobu a absence pro nás dnes řady základních znalostí jako jsou chromozomy, geny nebo meiotické dělení znesnadňovala pochopení jeho teorie. Teprve na počátku 20. století několik vědců (Hugo de Vries, Carl Correns a Erich von Tschermak) nezávisle na sobě potvrdili správnost Mendelových zákonů. Znovuobjevení Mendelových zákonů v roce 1900 je považováno za zrod genetiky, vědy, která se snaží objasnit, co jsou to geny a jak fungují v organismu (KOČÁREK, 2007) (*Molekulární medicína a biotechnologie: soubor přednášek*, 2008) (BROWN, 2007) (<http://www.genetika-biologie.cz/zakony-dedicnosti>, [cit. 2016-04-28]).

2.1 Raný rozvoj genetiky a přední osobnosti oboru

Mendelova pravidla dědičnosti, která mezitím upadala v zapomenutí znovuobjevili Němec Carl Erich Correns, Rakušan Erich Tschermak von Seysennegg a Holanďan Hugo de Vries. Zajímavé přitom je, že se tak událo nezávisle na sobě, v podstatě ve stejné době a podkladem k tomu byly Mendelovy studie vydané tiskem v letech 1866 – 1909.

C. E. Correns (pokládán za jednoho ze zakladatelů experimentálního výzkumu dědičnosti), svého času profesor botaniky na univerzitě v Tübingenu upozornil na Mendelovy studie z roku 1899 nazvané Mendelova pravidla chování potomstva křížených odrůd.

Jeho kolega Erich Tschermak se podobně jako Mendel věnoval pokusům s křížením hrachu. Také on v této souvislosti upozornil na zásluhu G. J. Mendela jako objevitele zákonitostí dědičnosti.

Konečně, zásluhy Mendela ocenil holandský botanik Hugo de Vries, profesor ve Würzburgu. K rozvoji učení o dědičnosti nejvíce přispěl svou dvousvazkovou prací *Teorie mutace* z let 1901 -1903 (SCHOTT, 1994) (DUNN, 2003).

V prvních třiceti letech existence se genetika rozvíjela překvapivě rychle. V roce 1903 přišel W. Sutton s myšlenkou, že jsou geny lokalizovány na chromozomech a v roce 1910 tuto myšlenku experimentálně potvrdil T.H. Morgan. Následně Morgan rozvíjel s jeho spolupracovníky postupy mapování genů a do roku 1922 předložili komplexní analýzu relativních poloh více než 2000 genů čtyř chromozomů octomilky obecné, *Drosophila melanogaster* (KOČÁREK, 2007) (BROWN, 2007) (SCHOTT, 1994) (NIKLÍČEK, 1985).

Faktem zůstává, že molekulární podstata genu nebyla vědcům známa až do 40. let 20. století. Teprve na základě experimentů Averyho, MacLeoda a McCartyho z roku 1944 a experimentů Hersheyho a Chaseové z roku 1952 byl přijat fakt, že deoxyribonukleotidová kyselina (DNA) představuje genetický materiál. Do té doby se předpokládalo, že funkci genů mají proteiny. Poznání úlohy DNA bylo pro genetický výzkum zásadním stimulem k rozvoji genetiky, ke kterému přispěla celá řada slavných biologů jako Dellbrück, Chargaff, Crick a Monod. Během čtrnácti let v letech 1952 až 1966 byla objasněna struktura DNA, byl rozluštěn genetický kód a byly popsány procesy transkripce a translace (KOČÁREK, 2007) (BROWN, 2007).



Gregor Johann Mendel

Na tomto místě mi dovoluji uvést několik životopisných dat vědce světového významu, původem z našich zemí, jehož osobnost a význam byly z různých důvodů a v různých dobách zamlčovány nebo přinejmenším nedoceny. Byl přírodovědcem, převorem brněnského kláštera augustiniánů a zakladatelem genetiky. Studoval filozofii v Olomouci, teologii v Brně ale i matematiku a přírodní vědy na vídeňské univerzitě. Učil na gymnáziu ve Znojmě a také na německém reálném gymnáziu v Brně. Od roku 1868 se plně věnoval své funkci převora augustiniánského kláštera v Brně (DUNN, 2003) (https://cs.wikipedia.org/wiki/Gregor_Mendel, [cit. 2016-04-28]).

Obrázek 1 - Gregor Johann Mendel - 20.7. 1822 Hynčice (Heinzendorf) – 6. 1. 1884 Brno

2.2 Převratný objev DNA

Snad největším objevem 20. století, který značně zasáhl nejen do vývoje medicíny byl objev dvoušroubovicové struktury DNA v roce 1953. Za tímto poznáním stojí Francis Crick a James Watson, kteří tímto objasnili roli DNA v přenosu genetické informace za pomoci práce od Rosalind Franklin, která metodou rentgenové krystalografie objasnila molekulární strukturu DNA. To poté otevřelo mnoho dalších možností pro výzkum této důležité struktury (KOČÁREK, 2007) (PORTER, 2013) (DAHM, R. Discovering DNA: Friedrich Miescher and the Early Years of Nucleic Acid Research, 2008).

Roku 1869 izoloval švýcarský chemik Johann Friedrich Miescher (1844-1895) látku tvořící buněčné jádro, kterou pojmenoval „nuklein“. Miescher využil pro své experimenty poněkud netradičního materiálu – obvazů nasáklých hnisem, které získával z nemocnic. Ukázalo se však, že šlo o velmi vhodnou volbu, protože hnis obsahuje velké množství bílých krvinek, z jejichž jader lze DNA velmi dobře izolovat. Miescher zjistil, že stejná sloučenina se vyskytuje také v jádrech spermií i oocytů (KOČÁREK, 2007) (DAHM, R. The First Discovery of DNA, 2008) (DAHM, R. The Discovery of DNA, Circa 1869, 2008).

Objev DNA nezbudil větší pozornost. Předpokládalo se, že tato látka má v buněčném jádře pouze stavební význam a udržuje celistvost chromozomů. Teprve v roce 1928 provedl anglický mikrobiolog Fred Griffith sérii velmi zajímavých experimentů. Pokoušel se zjistit, čím je podmíněna patogenita bakterií *Streptococcus pneumoniae*, které jsou obalené pouzdrém z hlenu. Griffith měl k dispozici kulturu těchto opouzdřených bakterií a současně také kulturu neopouzdřených bakterií, které nevyvolávaly žádné onemocnění. K rozvoji infekce nedošlo, ani když pokusným myším podal opouzdřené bakterie, které usmrtil varem. Když však aplikoval zvířatům směs neškodných neopouzdřených bakterií s usmrcenými opouzdřenými buňkami, myši poté onemocněly a zemřely. Griffith ujistil, že v jejich krvi se vyskytují živé opouzdřené tedy patogenní formy. Výsledek pokusu vedl k domněnce, že buňky patogenních opouzdřených bakterií musí v sobě obsahovat zvláštní látku, která způsobuje přeměnu neboli transformaci neopouzdřených buněk na buňky opouzdřené. Přitom touto látkou nemohla být bílkovina, protože všechny proteiny byly denaturovány varem. Griffith však nemohl podstatu tohoto „transformačního principu“ blíže objasnit.

Ve 40. letech zaujaly Griffithovy studie amerického lékaře Oswalda Theodora Averyho (1877-1955) a jeho blízké spolupracovníky. Podařilo se jim prokázat, že „transformační látkou“ přítomnou v suspenzi usmrcených bakterií je DNA. Tak byl na světě jeden z prvních důkazů, že hlavním materiálním nosičem genetické informace jsou nukleové kyseliny (KOČÁREK, 2007).

V březnu roku 1953 britský molekulární biolog a biochemik Francis Harry Compton Crick a jeho americký kolega James Dewey Watson formulovali v Cavendishově laboratoři v Cambridgi (Velká Británie) společně svou hypotézu o molekulární struktuře chromozomů sestávajících z „dvojitě spirály DNA“. Objevili, že kyselina deoxyribonukleová (DNA), vysokomolekulární polynukleotid, je nosičem genetické informace. Dokázali vysvětlit chemický mechanismus, kterým buňka může předat své biologické vlastnosti při buněčném dělení (KOČÁREK, 2007) (SCHOTT, 1994).

Ve své přednášce u příležitosti získání Nobelovy ceny 10. 12. 1962 řekl James Dewey Watson: „Prvním úkolem biologie bylo poznat způsob replikace genů a způsob, kterými geny řídí syntézu proteinů. To znamenalo, že bylo nutno vysvětlit strukturu genů. Tenkrát se zdál být tento cíl pro genetiky nedosažitelný...“ Watson-Crickův model dvojité spirály znamenal rozhodující průlom k rozluštění genetického kódu. DNA je podle Watsona a Cricka tvořena dvěma vlákny složenými z purinových a pyrimidinových bází, deoxyribózy a zbytků kyseliny fosforečné. Adenin se páruje s thyminem a guanin s cytosinem, proto jsou uvedené báze komplementární. Je v ní



zakódována genetická informace, která se při zdvojování DNA předává do dceřiných buněk (KOČÁREK, 2007) (SCHOTT, 1994).

Model dvojité spirály DNA, polynukleotidu, jehož základní stavební jednotky sestávají z nukleových bází (SCHOTT, 1994).

Obrázek 2- Model dvojité spirály DNA

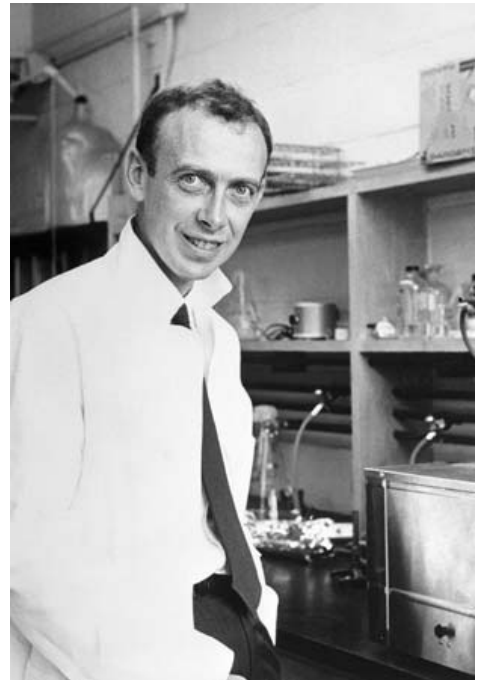
James Dewey Watson (vlevo), narozen v roce 1928 a Francis Harry Compton Crick (vpravo) narozen v roce 1916, kteří v roce 1959 navrhli model struktury DNA ve tvaru dvojité spirály (Watson-Crickův model DNA), jsou profesory chemie a biologie na Harvardské univerzitě v Bostonu (SCHOTT, 1994).



Obrázek 3 - J.D.Watson a F.H.C.Crick

James Dewey Watson

Americký biochemik, narozen 6. 4. 1928 v Chicagu. Univerzitní studia absolvoval v Chicagu, Indianě a Kodani. V roce 1950 uveřejnil promoční dizertaci o bakteriofágu. V následujících letech působil na univerzitě v Cambridge, v California Institute of Technology a také na Harvardské univerzitě. Centrem jeho výzkumné práce se stala především biochemie DNA. Prostorová struktura molekuly DNA je dodnes označována jako „Watson-Crickův model“. Za objevné poznatky v této oblasti molekulární genetiky získali J. D. Watson a britští vědci F.H.C. Crick a Maurice Hugh Frederic Wilkins v roce 1962 Nobelovu cenu za fyziologii a medicínu. Jejich zásluha spočívá v tom, že objasnili mechanismus reprodukce genové molekuly (SCHOTT, 1994).



Obrázek 4 - James Dewey Watson

Francis Harry Compton Crick

Anglický biochemik a genetik narozen 8. 6. 1916 v Northamptonu. Crick pracoval v oblasti molekulární biologie a genetiky. Spolu se svým kolegou J. D. Watsonem vyvinuli v roce 1953 model prostorového uspořádání molekuly DNA. Tímto modelem můžeme objasnit přenos nezměněné genetické informace, ale i mutace na molekulární úrovni DNA, způsobené změnami pořadí nukleotidů (SCHOTT, 1994).



Obrázek 5 - Francis Harry Compton Crick

2.3 Počátky klonování genů a polymerázové řetězové reakce

Po letech aktivity a objevování následovalo období klidu, zklamání, kdy se někteří molekulární biologové domnívali, že všechno podstatné už bylo objeveno a vysvětleno. Experimentální postupy konce 60. let minulého století nebyly dostatečně propracované a neumožňovaly gen detailně prozkoumat (BROWN, 2007).

V letech 1971 až 1973 se v genetickém výzkumu zase začalo něco vytvářet, a to díky tzv. revoluci v experimentální biologii. Byla vyvinuta zcela nová metodologie, která umožňovala realizaci dříve neproveditelných experimentů. Tyto metody byly souhrnně nazvané technologie rekombinantní DNA nebo také genové inženýrství a odstartovaly novou éru genetiky. Umožňovaly rychlé a účinné sekvenování DNA a tím pomohly určit struktury jednotlivých genů. V 90. letech 20. století tyto postupy vyvrcholily impozantními projekty zaměřenými na sekvenování genomu včetně projektu zaměřeného na sekvenování lidského genomu, který byl dokončen v roce 2000. V jeho čele stál po určitou dobu i James Watson, který ho charakterizoval jako „poslední krok na naší cestě k poznání sebe sama na molekulární úrovni“. Vědcům umožňovaly výzkum regulace jednotlivých genů, na jejichž základě mohli pozorovat souvislosti mezi odchylkami regulace genů a vznikem onemocnění, například rakoviny. Vznik moderní biotechnologie umožnil využívat geny k výrobě proteinů, potřebných pro medicínu a průmyslovou výrobu (BROWN, 2007) (PORTER, 2013).

V 80. letech bylo nepředstavitelné, že by se po rozruchu vyvolaném revolucí v oblasti klonování objevila další, právě tak nebývalá a převratná metoda. Mezi vědci, kteří se zabývají výzkumem DNA se traduje, že polymerázová řetězová reakce je výsledkem náhlé inspirace, nápadu, který měl Kary Mullis jednoho večera roku 1985 při cestě autem podél pobřeží Kalifornie. Přišel na výjimečně jednoduchou metodu, která klonování genů doplňuje. PCR usnadnila řadu postupů, rozšířila možnosti analýzy DNA a umožnila molekulárním biologům nalézt nové aplikace v oblastech vzdálených tradiční medicíně, zemědělství a biotechnologii. Archeogenetika, molekulární ekologie a analýza DNA v soudním lékařství jsou tři z nových disciplín, které se formovaly v návaznosti na objev PCR. Dovolují molekulárním biologům studovat evoluci lidského druhu, klást si otázky, jak se změna životního prostředí odráží v biosféře, nebo bojovat proti kriminalitě. Čtyřicet let po revoluci v oblasti genetického klonování se stále můžeme těšit z nových objevů (BROWN, 2007) (MULLIS, 1990).

3. MOLEKULÁRNĚ-BIOLOGICKÁ DIAGNOSTIKA

3.1 Etické a právní aspekty molekulárně-biologické diagnostiky

Není pochyb, že molekulárně genetickými objevy otevřelo lidstvo Pandořinu skříňku, uvnitř které se skrývají naděje slibující výrazný pokrok i obavy z možného zneužití. Důkazem jsou nejen polemiky o klonování a transgenozí organismů, ale také rozporné reakce na výsledky studia lidského genomu. Každým dnem stoupá objem poznatků o lidských genech a zřejmě není příliš daleko doba, kdy bude zcela objasněn jejich význam a také jejich vzájemné interakce. Přinese to nesporný pokrok v diagnostice lidských nemocí (KOČÁREK, 2007).

Již dnes jsou možnosti molekulárně-biologických analýz, které se k vyšetření geneticky podmíněných onemocnění využívají, velmi široké. Pokrok v poznání lidského genomu umožňuje nejen postsymptomatické testování (tzn. diagnózu choroby po vzniku jejích příznaků neboli symptomů), ale také presymptomatické testování, které umožňuje zjistit příslušné mutace nebo riziko choroby ještě před jejím nástupem. Presymptomatická vyšetření mají význam zejména u chorob, které se rozvíjejí až během života člověka, například Huntingtonova choroba, nádorová onemocnění, srdeční a cévní choroby nebo některé formy cukrovky. Díky včasnému vyšetření je v mnoha případech možné nástupu choroby zamezit nebo jej alespoň významně oddálit (případ většiny civilizačních chorob). Mnozí odborníci se obávají, zda jedinci, u nichž se prokáže zvýšené riziko vzniku určité nemoci, nebudou geneticky diskriminováni. Otázkou zůstává, jak bude postupovat zaměstnavatel, který se dozví, že jeho zaměstnanec s velkou pravděpodobností onemocní nádorovou chorobou, anebo má geneticky podmíněnou hypercholesterolemii, která povede k brzkému infarktu myokardu. Jak se budou k takovým osobám chovat pracovníci pojišťoven, když budou požádáni o uzavření životního pojištění? Nebude zjištění náchylnosti k určité chorobě „Kainovým znamením“, které člověka na vždy vyřadí ze společnosti? Nejen v historické, ale také i v současné společnosti vede honba za ziskem k cynickému opovrhování lidskou důstojností (KOČÁREK, 2007).

Jedinou obranou proti genetické diskriminaci je ochrana osobních dat a výsledků vyšetření všech pacientů. Každý pacient má právo o genetické vyšetření požádat, ale také má právo ho odmítnout. Pokud je to možné, provádějí se presymptomatické genetické testy až po dosažení právní způsobilosti osoby. Výjimkou jsou klinicky závažné stavy, kdy včasná diagnóza nemoci umožní stanovení prognózy a v některých případech i účinnou léčbu. Pokud je pacient v dětském věku, lze výsledek testu sdělit jeho zákonným zástupcům. Po dosažení 18 let však pouze samotnému pacientovi, který sám uváží, zda o něm bude informovat další osoby (KOČÁREK, 2007) (*Molekulární medicína a biotechnologie: soubor přednášek*, 2008).

Některé další etické a právní aspekty se týkají spíše lékařů v genetických poradnách, lze však předpokládat, že s mnohými etickými problémy budou konfrontováni také pracovníci v molekulárně-biologických laboratořích. Závažnou otázkou je například snaha některých firem patentovat určité poznatky o lidském genomu nebo dokonce některá konkrétní molekulárně-biologická vyšetření. V praxi by např. „patent“ na určitou molekulárně-biologickou analýzu znamenal, že by vyšetření určité mutace mohla provádět pouze ta laboratoř, která draze zaplatí držiteli patentu za udělení licence. Pokud by se v budoucnosti podařilo takové praktiky prosadit, znamenalo by to mnohonásobné zdražení molekulárně-biologických vyšetření. Pak si jen těžko můžeme představit, že by zdravotní pojišťovny byly schopny proplatit výlohy za tyto analýzy všem pacientům, kteří je potřebují nebo požadují. Tak by se molekulárně-biologická vyšetření stala záležitostí hrstky bohatých klientů, kteří jsou ochotni za tyto analýzy zaplatit. Spolu s tím by se také snížil počet genetických pracovišť (KOČÁREK, 2007) (*Molekulární medicína a biotechnologie: soubor přednášek*, 2008).

Kromě finančních problémů kolem genetických vyšetření se stále častěji objevují etické a právní otázky týkající se prenatálních vyšetření, klonování, asistované reprodukce, genové terapie, genetické modifikace lidských embryí a spousty dalších sporných témat. Je však těžké hledat obecně platná doporučení, která by vedla k zastavení všech negativních trendů a která by vedla k správným řešením. Genetika ani molekulární biologie nejsou samy o sobě vědami společenskými či etickými. Jde o nauky, které přinášejí určité zásadní znalosti o podstatě některých fascinujících přírodních zákonitostí, jimiž se řídí lidský organismus. Jen na člověku však záleží, jak s těmito poznatky naloží a jaký osud si vybere (KOČÁREK, 2007) (*Molekulární medicína a biotechnologie: soubor přednášek*, 2008).

3.2 Molekulárně biologická diagnostika

Pro stanovení konečné genetické diagnózy nebo výši rizika pro další rodinné příslušníky pacienta je zpravidla nutné provést větší počet vyšetření. V mnoha případech mají rozhodující význam výsledky z molekulárně-biologických analýz, které umožní velmi citlivě odhalit poruchu již na základě rozboru úseku DNA ze vzorku pacienta. Uvedené postupy se často souhrnně označují jako DNA-diagnostika, i když toto pojmenování není zcela přesné. V některých případech se totiž k analýzám využívá také ribonukleová kyselina (RNA) a někdy lze mutaci odvodit i z odchylek ve struktuře a složení proteinu, či z jeho změněné funkce (KOČÁREK, 2007).

Podobně jako u ostatních laboratorních vyšetření předchází molekulárně-biologické analýze indikace od lékaře. Obecně pod tímto pojmem rozumíme jakýkoli důvod či soubor okolností vyžadující určitý léčebný zákrok nebo diagnostický postup. Přeneseně se termínem indikace označuje i žádanka od lékaře, v níž je uvedeno, které vyšetření má být provedeno. Indikační žádanka by současně měla obsahovat i stručnou informaci o obtížích pacienta nebo ostatní patologické nálezy, které zdůvodňují provedení analýzy (KOČÁREK, 2007).

Je žádoucí, aby všechna genetická vyšetření indikoval pouze atestovaný lékař z genetické poradny, který dobře zná význam prováděných analýz. Znamená to, že i lékaři z ostatních oddělení by měli své podezření na geneticky podmíněnou nemoc konzultovat s genetikem, který zváží všechny nálezy a pokud to pokládá za účelné, zajistí odběr vzorků a indikuje genetické vyšetření. Tak dosáhneme přesnějšího zacílení molekulárně-biologických testů a vyloučíme tak neodůvodněné odběry, které by pacienta zbytečně zatěžovaly a zvyšovaly jeho obavy z výsledků vyšetření (KOČÁREK, 2007).

Stejně jako ostatní laboratorní vyšetření lze i molekulárně-biologické analýzy rozdělit do tří fází:

- 1) Preanalytická fáze zahrnuje přípravu pacienta, odběr biologického materiálu a jeho doprava do laboratoře, předzpracování a uchování vzorku do doby analýzy (zpravidla izolace DNA popřípadě RNA a skladování vzorku v mrazících boxech).
- 2) Analytická fáze zahrnuje provedení samotné analýzy, výpočet výsledků a odvození dalších hodnot z nashromážděných souborů a dat. V případě molekulárně-biologické diagnostiky jde zpravidla o zjištění nebo vyloučení mutací na úrovni DNA, které jsou zodpovědné za příslušné patologické změny.
- 3) Postanalytická fáze zahrnuje interpretaci výsledků a jejich předání lékaři, který vyšetření požadoval. Znamená to, že o výsledku každého vyšetření je třeba sepsat přehlednou a jasně formulovanou zprávu, která slouží lékaři jako podklad pro stanovení diagnózy nebo rizika postižení u ostatních členů rodiny. V případě, že hledaná mutace nebyla zjištěna, bývá výsledek analýzy vodítkem pro další vyšetření (KOČÁREK, 2007).

Výsledková zpráva by měla obsahovat:

- základní údaje o pacientovi, které uvedl lékař na žádance jako je jméno, rodné číslo, číslo zdravotní pojišťovny
- stručné údaje o metodě, kterou byla provedena analýza (název metody, stručný protokol, charakteristika použitých reagensů, v molekulární biologii zejména specifikaci použitých sond a primerů)
- příslušný nález neboli výsledek analýzy vyjádřený slovním popisem i zápisem podle mezinárodně platné nomenklatury (například mezinárodně platná nomenklatura vyjadřující změny chromozomů nebo charakter mutací)

Pro efektivní komunikaci je žádoucí, aby se kontakt mezi genetickou poradnou a laboratoří neomezil pouze na výměnu indikací a zpráv, ale aby byly všechny složitější případy prodiskutovány. Na většině pracovišť se konají pravidelné schůzky lékařů z genetické poradny spolu se zástupci laboratoří. Domlouvají se indikace nových vyšetření, diskutují se výsledky již provedených analýz a možnosti dalších diagnostických postupů (KOČÁREK, 2007).

3.3 Mutace a jejich význam

Již roku 1901 dokázal holandský badatel Hugo de Vries, že genetická informace není neměnná. Za určitých podmínek může dojít k její změně tzv. mutaci. Některé mutace jsou náhodné a dochází k nim například chybami při výrobě nové molekuly DNA. Četnost mutací se však výrazně zvyšuje působením některých chemických látek, virů nebo fyzikálních faktorů, které označujeme jako mutageny. Obecně lze za mutagenní považovat všechny faktory, které chemicky mění strukturu DNA nebo vyvolávají zlomy nebo jiné přestavby jejích molekul. Následkem jejich působení může dojít k výměně, ztrátě, nebo naopak ke zmnožení některých úseků DNA. Fatální účinky má často i odstranění jediného nukleotidu nebo jeho výměna za nukleotid s jinou chemickou bází. Dochází tak ke změně genetické informace a hrozí nebezpečí, že příslušný protein bude syntetizován podle nesprávného „návodu“. Mutovaný gen často vytváří defektní protein, jehož aktivita je snížena nebo je protein zcela nefunkční. Někdy se mutace nemusí projevit změnou složení nebo aktivity proteinu, ale v míře jeho syntézy. To znamená, že proteinový produkt je funkční, ale vytváří se v abnormálně nízkém nebo abnormálně vysokém množství (KOČÁREK, 2007).

Působením mutací vznikají nové formy daného genu, které poté ovlivňují projev příslušného znaku. Mnohé mutace jsou škodlivé, neboť způsobují závažná geneticky podmíněná onemocnění, těžké vývojové vady, poruchy metabolismu, snížení reprodukčních schopností pacienta, nebo dokonce úplnou sterilitu. Jsou známy také tzv. letální mutace, které jsou příčinou úmrtí jedince ještě před narozením, ve stadiu embrya nebo plodu. Mutace některých genů mohou způsobovat vznik nádorů (KOČÁREK, 2007).

3.4 Odběr materiálu a metody izolace DNA

K vyšetření mutací zodpovědných za určité postižení je potřeba odebrat pacientovi vzorek tkáně, ze které pak izolujeme DNA. K tomuto účelu lze v zásadě využít jakýkoliv materiál obsahující buňky s ještě zachovanými jádry. Přesto je třeba dodržovat určitá omezení, pravidla a doporučení vyplývající z charakteru vyšetřované choroby a z předpokládaného cíle vyšetření. Důležité je i etické hledisko, podle něhož nesmí odběr vzorku představovat pro pacienta nadměrnou zátěž, ať už fyzickou či psychickou (KOČÁREK, 2007).

Vyšetření můžeme rozdělit do dvou skupin na prenatální a postnatální. Prenatální slouží k vyšetření plodu před narozením a postnatální vyšetření umožňují diagnostikovat mutaci i jedince po narození. Často se provádí u novorozenců, ale některé vady jsou diagnostikovány až v dospělosti (KOČÁREK, 2007).

Nejčastěji postnatálně vyšetřovaným materiálem jsou leukocyty neboli bílé krvinky z periferní krve, kterou můžeme snadno odebrat ze žíly. Alternativně lze pro molekulárně-biologická vyšetření použít i jiných materiálů. V nouzi lze DNA získat např. z tzv. krevních papírků. Jinou možností získání vzorků je neinvazivní odběr epitelových buněk z ústní sliznice. Jiným materiálem může být vlasový kořínek, který lze použít pro získání DNA. V určitých případech lze také biologicky vyšetřit přítomnost cizí nukleové kyseliny v organismu. Analýzu můžeme zaměřit na konkrétní virovou DNA nebo RNA nebo DNA bakterie popřípadě jiného mikroorganismu. Odebírá se většinou periferní krev, ale může být dodán i jiný materiál jako je mozkomíšní mok, sekrety dýchacích cest a bronchoalveolární výplachy, moč, výtěry, biopsicky odebrané tkáně (KOČÁREK, 2007) (*Molekulární medicína a biotechnologie: soubor přednášek*, 2008).

3.5 Izolace a purifikace DNA

Prvním krokem při izolaci DNA je lýza buněk. V případě leukocytů rozrušíme membránu buněk pomocí detergentu. V praxi se používá například Triton X-100 nebo SDS (z anglického sodium dodecylsulphate, doddecyl sulfát sodný). Po destrukci buněčných membrán se do pufru uvolňuje DNA. Pufř kromě detergentu obsahuje také ethylendiaminotetraoctovou kyselinu (EDTA), která vyváže vápenaté ionty, které aktivují nukleázy – enzymy, které štěpí nukleové kyseliny. Izolování DNA probíhá fenol/chloroformovou metodou nebo metodou využívající adsorpci DNA na silikátový povrch. Tato metoda je novější a v dnešní době je v praxi více využívána. Oproti fenol/chloroformové metodě je tato metoda rychlejší a bezpečnější. V přítomnosti chaotropních solí dochází k připojení DNA na povrch silikátu. Po zředění roztoku se DNA ze silikátových kuliček opět uvolňuje. Po izolaci vzorku DNA je nutné ho uložit do hlubokomrazícího boxu při teplotě -70°C (Kočárek, 2007).

4. METODA PCR – POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE

4.1 Vznik PCR

V letech 1983 – 1985 vyvinuli Mullis, Faloon a Saiki enzymovou techniku, která se nazývá polymerázová řetězová reakce – PCR (Polymerase Chain Reaction). Kary Banks Mullis je molekulární biolog a biochemik, pracující u biotechnologické společnosti Cetus Corporation (Emeryville, California) a je držitelem Nobelovy ceny za chemii z roku 1993 (KOČÁREK, 2007) (*PCR Topics: Usage of Polymerase Chain Reaction in Genetic and Infectious Diseases, 1991*) (KŘEMEN, STRÍBRNÁ, 1998) (POSPÍŠILOVÁ, 2013)

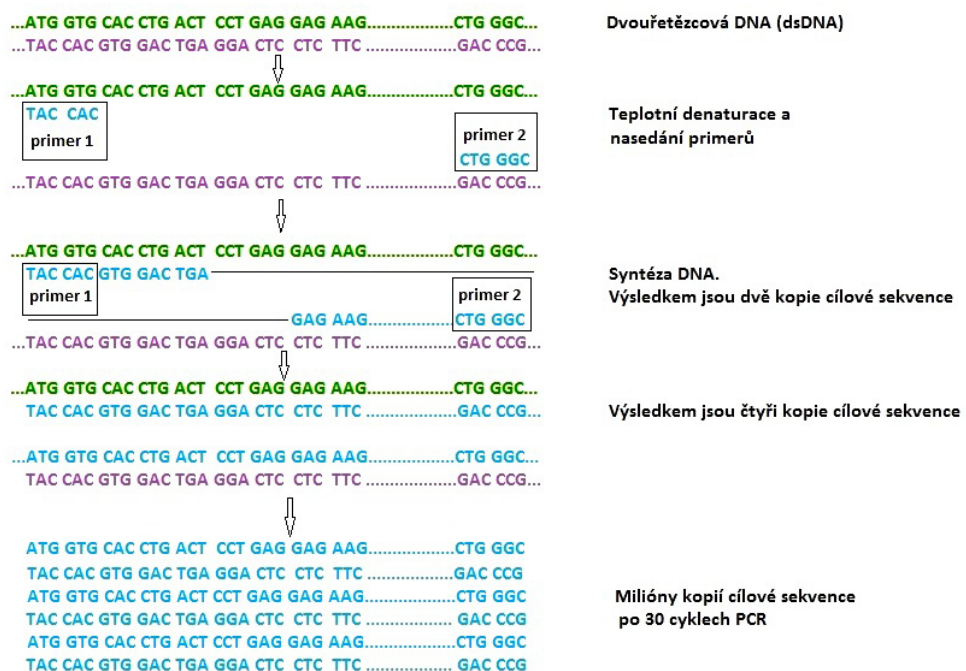
(http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1993/mullis-lecture.html, [cit. 2016-04-28]).

Původní PCR metoda byla pomalá a velmi pracná, a proto hned po její publikaci společnost Cetus Corporation vyvinula značné úsilí k její automatizaci. Metoda byla poprvé publikována v roce 1985, další následovaly vzápětí. Patentována byla v roce 1987 – K. B. Mullis a v lednu 1989 dala společnost souhlas ke spolupráci s firmou Hoffman – LaRoche na vývoj *in vitro* produktů a služeb, založených na PCR technologii v oblasti lidské diagnostiky. Společnost Roche Molecular Systems nakonec PCR patent a s ním spojené technologie v roce 1991 odkoupila od Cetus Corporation za tři sta miliónů amerických dolarů (ROHOŇ, 2009) (KŘEMEN, STRÍBRNÁ, 1998) (POSPÍŠILOVÁ, 2013).

4.2 Princip PCR

Polymerázová řetězová reakce dnes představuje jednu z nejpoužívanějších, ne-li vůbec nejpoužívanější, techniku v oblasti molekulární biologie. Její plastičnost a specifická umožňuje její využití v oborech biologie a medicíny od sebe značně vzdálených. PCR se používá každý den k diagnostice nemocí, identifikaci bakterií a virů nebo při určení pachatele v kriminálních činech (MAZURA, 2001) (<http://learn.genetics.utah.edu/content/labs/pcr/>, [cit. 2016-04-28])

Princip PCR je založen na replikaci nukleových kyselin, což je základní molekulární proces všech živých organismů. Je to metoda, která umožňuje amplifikovat (tj. zmnožit) specifický úsek nukleové kyseliny, např. DNA. PCR vychází z malého množství DNA, které je přidáno do reakční směsi spolu s volnými nukleotidy. Nukleotidy jsou stavební kameny, ze kterých je poskládána molekula DNA. Amplifikovaný genový úsek (amplikon) je ohraničen dvojicí krátkých oligonukleotidových řetězců (primerů) o velikosti 15-30 nukleotidů, z nichž každý je komplementární k sekvenci na protilehlých řetězcích úseku cílového genu, který chceme zmnožit. Primery slouží v reakci jako startovací místa pro exponenciální DNA replikaci, která je katalyzována enzymem DNA polymerázou. K syntéze DNA se používají termostabilní polymerázy izolované z termofilních organismů jako je například Taq DNA polymeráza z *Thermus aquaticus* odolávající vysokým teplotám, při nichž DNA denaturuje. To umožňuje, aby reakce mohla probíhat opakovaně formou cyklů. PCR je proces, při kterém se v závislosti na teplotě reakční směsi střídají tři kroky, které vyžadují různé rozmezí teplot. Tyto kroky umožňuje automatizovat zařízení nazývané termocykler, kde se teplota mění automaticky v naprogramovaných časových intervalech. Postupným opakováním procesu se exponenciálně vytváří až miliarda kopií vybraného úseku genu DNA. Vlastní proces PCR trvá přibližně 2 hodiny (ŠMARDA, 2005) (SLABÝ, 2015) (KŘEMEN, STRÍBRNÁ, 1998) (POSPÍŠILOVÁ, 2013).



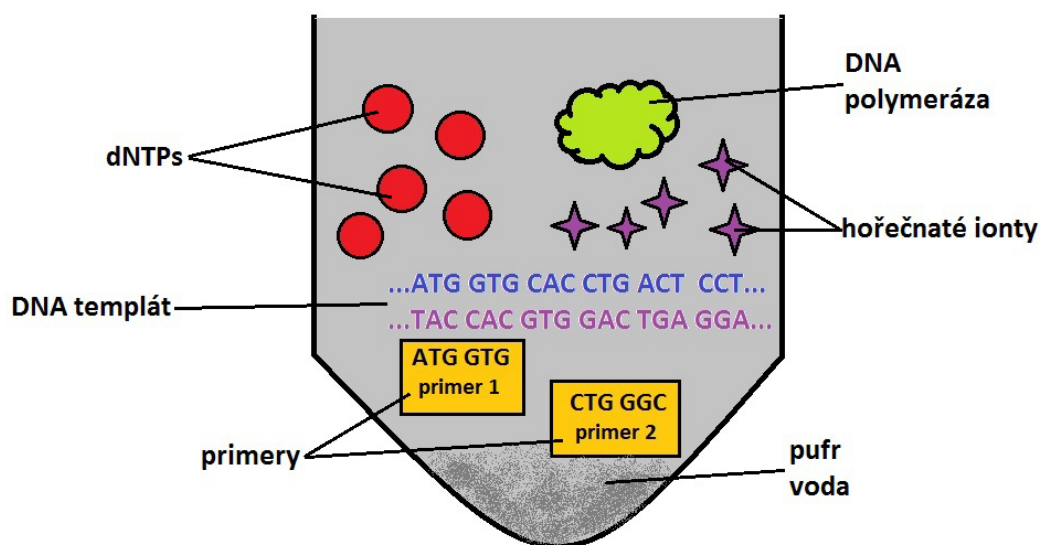
Obrázek 6 - Schéma exponenciální amplifikace DNA metodou PCR (autorská tvorba)

4.3 Směs pro PCR reakci

Standartní PCR se nejčastěji provádí v reakční směsi o objemu 25 – 100 μ l, složení směsi je následující:

- DNA templát – cílový úsek, který má být amplifikován z biologického vzorku. Množství je 100 ng a méně (pg klonované DNA)
- primer – krátký úsek DNA, který identifikuje cílový úsek na základě komplementarity bazí, specificky hybridizuje k DNA, čímž umožní replikaci vyčleněného úseku. Používají se dva primery A a B o koncentraci 0,25 mmol/l.
- Taq DNA – polymeráza – enzym, umožňující replikaci označeného úseku. Množství je 1 – 2 U jednotky.
- dNTP – deoxyribonukleotidtrifosfát, základní stavební jednotka pro nově syntetizované vlákno. Koncentrace ve směsi 200 mmol/l jednotlivých dNTPs.
- MgCl₂ – hořečnaté ionty nezbytné pro správný chod reakce, koncentraci je nutné optimalizovat pro každou reakci, 0,5 – 3 mmol/l.
- pufr – udržuje optimální vnitřní prostředí reakce, používá se 50 mmol/l KCl, 10 mmol/l Tris – HCl (pH 8,4 při 37°C)
- deionizovaná voda do konečného objemu

Reakční směs se převrstvuje minerálním olejem, aby se zabránilo vypařování vzorku z mikrokumavky (ROHOŇ, 2009) (KŘEMEN, STRÍBRNÁ, 1998).



Obrázek 7 - Směs pro PCR reakci v mikrokumavce (autorská tvorba)

4.4 Základní kroky při provádění PCR

- 1) krok: znalost sekvence DNA v amplifikovaném úseku (prostřednictvím DNA databází nebo pomocí vlastního sekvenování)
 - 2) krok: navržení správné sekvence primerů, které ohraničí námi požadovaný úsek
 - 3) krok: komerční výroba primerů
 - 4) krok: výpočet optimální teploty primerů, návrh složení a profilu PCR reakce
 - 5) krok: provedení PCR reakce
 - 6) krok: kontrola reakce na elektroforéze (ELFO) nebo sekvenování
- (<http://labguide.cz/metody/pcr/>, [cit. 2016-04-28]).

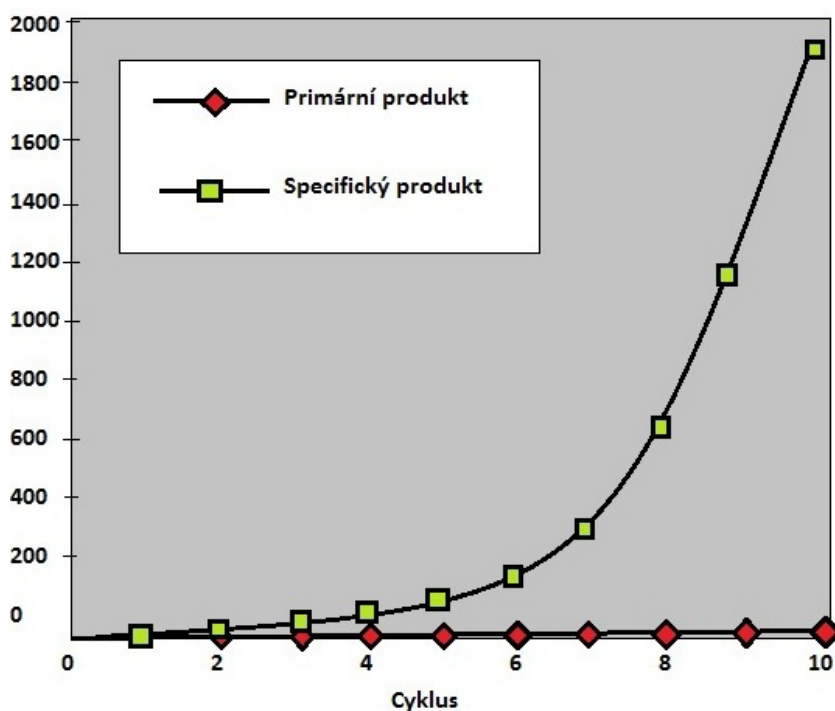
4.5 Navržení primerů

Primery jsou většinou dlouhé 20-25 nukleotidů. Sekvence mezi oběma primery nesmí být výrazně komplementární, protože by se mohly vzájemně navázat a vytvořit tak dimery, které by se nemohly navázat na komplementární sekvenci v templátové DNA. Primery také nesmí být komplementární vůči sobě, aby netvořily vlásenky či jiné sekundární struktury. Pro standardní PCR se navrhuje primery v párech – přední neboli „forward“ primer a zadní tzv. „reverse“ primer. Tyto primery se dají navrhnout pomocí softwarů běžně dostupných na internetu nebo si je můžeme vytvořit „ručně“. Při navrhování sekvence primerů musíme mít na paměti, že oba primery musí mít alespoň přibližně stejnou teplotu nasedání. Tu lze ovlivnit samotnou sekvencí, respektive obsahem CG/AT a také délkou primerů (LORENZ, 2012) (*PCR Topics: Usage of Polymerase Chain Reaction in Genetic and Infectious Diseases, 1991*) (<http://labguide.cz/metody/pcr/>, [cit. 2016-04-28]).

4.6 Průběh PCR

PCR probíhá ve třech základních krocích, které se opakují za sebou asi 25 – 30x. Celá reakce probíhá v přístroji – termocykler. Skládá se ze tří kroků:

1. Tepelná denaturace – proběhne tepelná denaturace templátové dvouřetězcové DNA (dsDNA), při čemž se molekula zahřeje na 94 – 98°C a dojde k přerušení vazeb mezi antiparalelními řetězci a vznikají jednovláknové matrice (ssDNA).
2. Vazba primerů – reasociace (annealing) – ochlazením na hybridizační teplotu 50 – 65 °C se vytvoří podmínky pro připojení primerů na základě komplementarity na 3' a 5' konci cílového úseku DNA. Asociací primerů se ohraničí amplifikovaná oblast ve směru od 3' konců na obou templátových řetězcích molekuly. Tato fáze trvá asi 30 – 60 sekund.
3. Extenze (elongace, polymerace) primerů – prodlužování primerů připojením dNTPs *Taq DNA-polymerázou* probíhá ve směru 5' → 3' na obou řetězcích při teplotě 72°C po dobu asi 30 – 60 sekund. Vzniklými produkty jsou řetězce dvouvláknové DNA, jejichž konce jsou ohraničeny 5' konci primerů a délka je dána vzájemnou vzdáleností primerů.
4. PCR se ukončí ochlazením inkubační směsi na teplotu 0 – 4 °C (ROHOŇ, 2009) (KŘEMEN, STRÍBRNÁ, 1998).



Tabulka 1- Exponenciální nárůst specifického produktu (autorská tvorba)

4.7 Modifikace PCR

Název	Zkratka	Charakteristika	Aplikace
Dvoukolová (nested) PCR	nPCR	Dvě na sebe navazující PCR. Druhá PCR s oběma primery (nested) nebo s jedním (seminested) lokalizovanými uvnitř amplikonu z první PCR.	Zvýšení sensitivity až o 3 log a specifčnost reakce (omezení nespecifických PCR amplikonů)
Multiplex PCR	MP-PCR	Několik sad primerů v jedné reakci	Amplifikace několika úseků genu nebo více genů současně
Asymetrická PCR		Pár primerů ve vzájemném molárním poměru 100:1	Produkce ssDNA, sekvenování nebo příprava ssDNA sond
Long Distance PCR	LD-PCR	Užití dvou typů polymeráz	Amplifikace dlouhých segmentů >12kb
Degenerovaná PCR		Použití směsi primerů s rozdílnou specifitou	Hledání nových genů nebo genových rodin
PCR ELISA	PCR ELISA	Hybridizace značených PCR amplikonů s imobilizovanou sondou	Detekce specifických sekvencí v PCR amplikonech
In situ PCR		Amplifikace DNA v jednotlivých buňkách fixovaných na podložním skle	Detekce specifického produktu v buňkách nebo v tkáních, prenatalní diagnostika, detekce virů
Hot start PCR		PCR směs je držena při vysoké teplotě před přidáním DNA polymerázy	Zvýšení specifčnosti, omezení nespecifického nasedání primerů
PCR délkových polymorfismů	AFLP	Amplifikace restrikčních fragmentů	DNA fingerprinting

Tabulka 2 - Modifikace PCR (POSPÍŠILOVÁ, 2013)

4.7.1 *Kvantitativní PCR*

V mnoha klinických případech (monitorování minimální reziduální nemoci, stanovení virové nálože) je důležité kvantitativní posouzení hledané specifické DNA. Metody kvantitativní polymerázové řetězové reakce (quantitative PCR, Q-PCR) je možné rozdělit do dvou skupin. V první je množství PCR produktu vyhodnocováno po ukončení reakce – end point Q-PCR. Tyto metody jsou založeny na různých principech kvantifikace. Nejpřesnější je metoda kompetitivní (soutěživá) PCR. Při kompetitivní PCR je jednou dvojicí primerů současně v jedné reakční směsi amplifikována vyšetřovaná cílová sekvence a také sekvence vloženého exogenního standardu (kompetitoru) o známém počtu kopií. Sekvence kompetitoru je zvolena tak, aby obsahovala stejná místa pro nasednutí primerů, ale aby délka zmnoženého úseku kompetitoru byla odlišná od délky amplifikovaného úseku ve vyšetřovaném vzorku. Titračním ředěním kompetitoru a přidáváním těchto snižujících se koncentrací kompetitorové DNA do konstantního množství DNA sledovaného vzorku dochází v reakční směsi k soutěžení o reakční komponenty a dostáváme dva PCR produkty s rozdílným vzájemným poměrem. Po elektroforetickém rozdělení je hledán bod ekvivalence, tedy bod rovnováhy, ve kterém je intenzita PCR produktu cílové sekvence a produktu kompetitoru stejná (ŠMARDÁ, 2005) (POSPÍŠILOVÁ, 2013).

Kvantitativní PCR metody využívající kompetitorovou DNA jsou dostatečně citlivé, ale jsou náročné na manuální přípravu. Výsledky mohou být zatížené větší chybou, a proto se uvedené metody v klinické praxi dnes téměř nepoužívají (POSPÍŠILOVÁ, 2013).

Ve druhé skupině provádíme kinetické sledování PCR produktu během celé reakce (kvantitativní PCR v reálném čase, real-time quantitative PCR, RQ-PCR) (POSPÍŠILOVÁ, 2013).

Fotooptické vybavení termocykleru a použité fluorescenční reakční komponenty umožňují sledovat amplifikaci v průběhu celé PCR reakce. Přídatným zařízením je zdroj excitační energie jako je halogenová lampa, laserový zdroj nebo vysokonapěťová LED dioda. Emitované záření po každém cyklu zaznamenává kamera a signál je softwarově vyhodnocován. Byly vyvinuty odlišné mechanismy, které jsou založeny na různých principech:

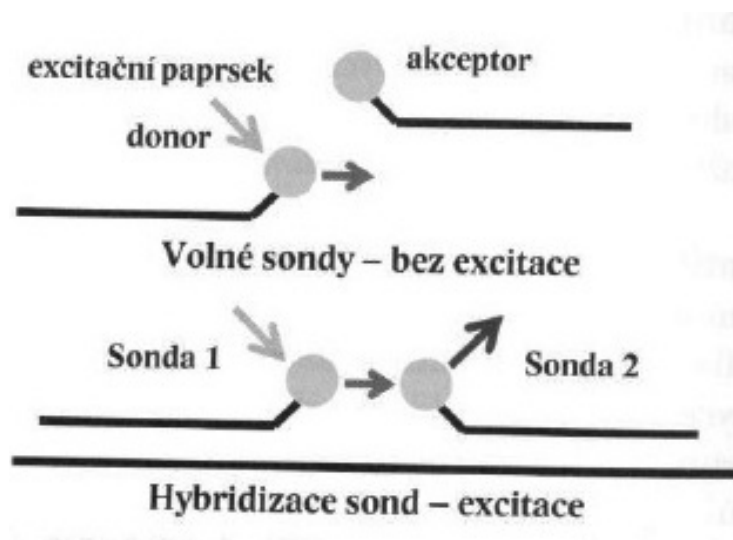
1. interkalační barviva – fluorochromy
2. hybridizační jednoduše značené sondy
3. hydrolyzační duálně značené sondy (TaqMan) (POSPÍŠILOVÁ, 2013).

Interkalační barviva

Prvním používaným fluorochromem pro RQ-PCR byl ethidium bromid ($C_{21}H_{20}N_3Br$), který se váže jen na dvouřetězcovou DNA (dsDNA). V každém dalším cyklu PCR, kdy dochází ke zdvojnásobení množství amplifikovaného úseku DNA je po vazbě barviva na dvouřetězcový kompletní PCR produkt a jeho excitaci měřena zvyšující se intenzita fluorescenčního záření. Dalším fluorochromem je SYBR Green I, který se také váže na dsDNA, ale dosahuje větší citlivosti a je méně toxický. Nevýhodou této metody je, že je vazba interkalačních barviv nespecifická, proto se mohou také navázat na dimery primerů, což může způsobovat zkreslení nárůstu fluorescence v reakční směsi a tudíž i nepřesnou kvantifikaci (ŠMARDA, 2005) (POSPÍŠILOVÁ, 2013) (BUSTIN, MUELLER, 2005).

Hybridizační jednoduše značené sondy (HybProbes)

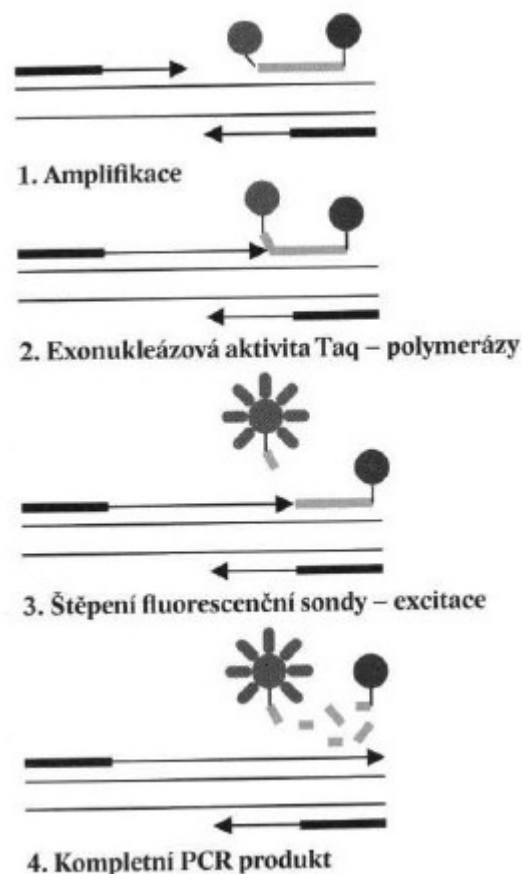
Tento princip využívá fluorescenčního rezonančního přenosu energie (FRET) mezi dvojicí těsně přilehlých specifických oligonukleotidových sond. Tento mechanismus studoval a popsal německý fyzikální chemik Theodor Foerster (1910-1974) již ve čtyřicátých letech dvacátého století. Proto se někdy tento přenos označuje jako Foersterův (POSPÍŠILOVÁ, 2013) (ŁACZMAŃSKA, 2009).



Obrázek 8 - Princip FRET systému s excitací fluorochromu pouze při hybridizaci sond v těsné blízkosti (POSPÍŠILOVÁ, 2013)

Hydrolyzační sondy

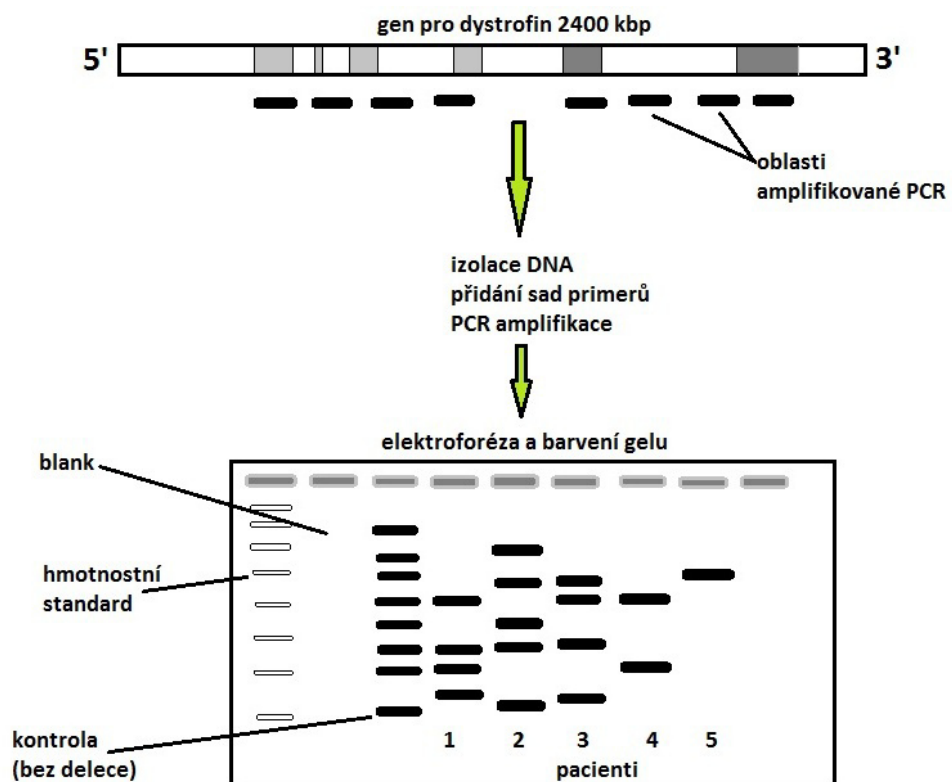
V případě systému hydrolyzačních sond je využíváno 5'-exonukleázové aktivity enzymu Taq DNA polymerázy. Do PCR reakce je vkládána specifická jednořetězcová oligonukleotidová sonda, značení dvěma fluorochromy (TaqMan sonda). Energie fluorescenčního barviva na 5'-konci sondy je pohlcována neboli zhášena molekulou zhášecího barviva na 3'-konci. Pokud jsou obě barviva v těsné molekulární vzdálenosti, FRET je potlačen. Během syntézy PCR produktu je sonda odštěpována Taq DNA polymerázou, která se posunuje po DNA řetězci. Tak se dostávají oba fluorochromy ze svého kontaktu a fotooptický systém zaznamenává nárůst fluorescence odpovídající emitovanému světlu rozštěpené TaqMan sondy (POSPÍŠILOVÁ, 2013) (ŁACZMAŃSKA, 2009) (NAVARRO, 2015).



Obrázek 9 – Systém TaqMan značené sondy s excitací fluorochromu pouze po odštěpení sondy (POSPÍŠILOVÁ, 2013)

4.7.2 Multiplex PCR

Mnohonásobná PCR je taková varianta, kdy je do reakční směsi přidáno několik párů primerů rozpoznávajících několik rozdílných cílových sekvencí, což umožní detekci několika genů současně v jedné reakční směsi. Reakční podmínky je nutno empiricky, krok za krokem optimalizovat. Hlavní výhodou této varianty jsou nižší cenové náklady než při samotných amplifikacích. Proto se využívá při vyhledávání změn na dlouhých úsecích DNA, testování vzájemně nesouvisejících oblastí na DNA a zejména pro amplifikaci vnitřních kontrol současně se vzorky (ŠMARDA, 2005) (*PCR Topics: Usage of Polymerase Chain Reaction in Genetic and Infectious Diseases, 1991*).



Obrázek 10- Diagnóza Duchennovy muskulární dystrofie (autorská tvorba)

Příkladem využití mnohonásobné PCR je diagnóza Duchennovy muskulární dystrofie, kdy se provádí detekce deletovaných exonů v DNA. V dystrofinovém genu o délce 2 400 kbp je navrženo celkem 9 úseků určených pro zmnožení. Tyto úseky představují části genu, které jsou nejčastěji postiženy delecí. Vzorky DNA z pacienta jsou amplifikovány za současného použití sady devíti primerů v jedné reakci a výsledné produkty jsou elektroforeticky separovány (ŠMARDA, 2005) (*PCR Topics: Usage of Polymerase Chain Reaction in Genetic and Infectious Diseases, 1991*).

4.7.3 *PCR kolonií*

Tato PCR je vhodná pro přípravu DNA z klonovaných inzertů v plazmidových nebo fágových vektorech, popřípadě screening genových knihoven a stanovení velikosti i orientace inzertu. Pro tuto PCR jsou potřebné univerzální primery komplementární k vektorovým sekvencím na obou stranách klonovacího úseku. Během PCR je zmnožen jakýkoliv inzert bez ohledu na jeho sekvenci. Postup je takový, že se připraví reakční směs obsahující všechny potřebné složky, její rozdělení do PCR-zkumavek, následné přenesení části bakteriální nebo kvasinkové kolonie párátkem do reakční směsi a roztřepání buněk. Buňky lyzují během denaturačního cyklu. Amplifikace začíná v prvním cyklu s nižší teplotou pro připojení primeru. Pokračuje postupným zvyšováním o 1 až 2°C v následujících cyklech až na optimální teplotu (ŠMARDA, 2005).

4.7.4 *Nested PCR*

Odstupňovaná PCR neboli PCR využívající vnější a vnitřní primery. V porovnání se standardní PCR je tato metoda vysoce citlivá a umožňuje detekovat i jedinou molekulu templátové DNA. Typicky se provádí ve dvou krocích. První amplifikační krok zahrnuje 15-30 cyklů s jedním párem tzv. vnějších primerů. V tomto kroku vznikne produkt, který je převeden do nové zkumavky pro druhý amplifikační krok za pomoci páru vnitřních primerů. Druhý krok zahrnuje dalších 15-30 cyklů a po jeho dokončení se produkt detekuje za pomoci elektroforézy (LORENZ, 2012) (ŠMARDA, 2005).

4.7.5 „Přistávací“ (*touchdown*) PCR

Pokud při PCR vzniká více nespecifických produktů, než bychom chtěli, lze jejich tvorbu omezit pomocí tzv. *touchdown* PCR. V prvních cyklech se využívá vyšší teploty, než je optimální teplota pro zvolené primery. Primery budou sice hůře nasedat na templářovou DNA, tudíž výtěžek reakce bude nižší, ale budou nasedat velmi přesně a proto se bude vytvářet pouze specifický produkt. V dalších cyklech se teplota postupně snižuje. Nadbytek specifického produktu zajistí specifičnost reakce (ŠMARDA, 2005).

4.7.6 Reverzně – transkriptázová PCR (*RT-PCR*)

Reverzní transkriptáza má nezastupitelný význam také při analýze RNA. Její sekvenci lze prostřednictvím reverzní transkripce přepsat do cDNA (complementary cDNA) a takto připravenou cDNA zmožít pomocí PCR. Reverzní transkriptáza je DNA polymeráza, která dle molekuly RNA syntetizuje DNA. Metoda se využívá zejména v těchto případech:

- a) Analýza genové exprese na základě identifikace mRNA.
- b) Vyšetření geneticky podmíněných onemocnění založených na změně v sekvenci mRNA.
- c) Vyšetření onemocnění vyvolaného RNA-viry. Diagnostika rubivirů, viru hepatitidy typu C a G

(KOČÁREK, 2007) (<http://labguide.cz/metody/pcr/>, [cit. 2016-04-28]).

4.7.7 Digitální PCR

Hlavní výhodou digitální PCR je možnost absolutní kvantifikace, aniž bychom museli sestavit kalibrační křivku. Digitální PCR je založená na rozdělení analyzovaného vzorku do velkého množství dílčích vzorků. To se provádí buď za pomoci miniaturních čipů, kdy je vzorek rozdělen pomocí mikrokapilár do řady malých komůrek, nebo je ze vzorku vytvořena emulze olejových mikrokapek. Následně probíhá v každé komůrce nebo mikrokapce standardní PCR, takže získáváme tisíce až několik desítek tisíc parciálních kvalitativních výsledků na bázi fluorescence. Na rozdíl od tradiční PCR kvantifikace cílové sekvence v případě digitální PCR prakticky nezávisí na počtu cyklů. Umožňuje tak zcela absolutní kvantifikaci (HRSTKA, 2014).

4.8 Vyhodnocení PCR

Na základě vyhodnocení nárůstu fluorescence software RQ-PCR analýzy sestavuje amplifikační křivky u jednotlivých reakcí. V části amplifikačních křivek odpovídající fázi exponenciální je prokládána přímka, která představuje prahovou hladinu významnosti tzv. threshold. Interpretace výsledku kvantitativního vyšetření může mít různou podobu. Při absolutní kvantifikaci jsou amplifikované testované vzorky porovnávány se standardní křivkou sestavenou na základě zmnožení DNA o známém absolutním počtu kopií sledovaného genu – tzv. standardní DNA. Při relativní kvantifikaci jsou analyzovány změny genové exprese v daném materiálu vztažené ke kalibrátorovému vzorku jako je například srovnání odběru pacienta před a po ukončení terapie a výsledek je udáván jako vzájemný poměr nebo násobek – relativní číslo. Aby bylo možné vzorky porovnávat mezi sebou, musí se provést tzv. normalizace vzorků. K normalizaci vzorků slouží kvantifikace některého z vhodně zvolených kontrolních genů tzv. housekeeping genes. Normalizace minimalizuje variabilitu způsobenou rozdílnou kvalitou a kvantitou biologického materiálu, izolačními metodami, degradací nukleových kyselin a také odhaluje přítomnost inhibitorů polymerázy (POSPÍŠILOVÁ, 2013) (BUSTIN, MUELLER, 2005).

Amplifikovaný úsek DNA se analyzuje elektroforeticky na agarozovém gelu a ke zviditelnění se používá ethidiumbromid. K průkazu bodových mutací v produktu PCR slouží elektroforéza v gradientu denaturující látky a sekvenování (KŘEMEN, STRÍBRNÁ, 1998).

5. METODA PCR V SOUČASNÉM ZDRAVOTNICTVÍ A VĚDĚ

5.1 Uplatnění PCR v klinické diagnostice

PCR umožňuje zjistit v infikovaném biologickém vzorku přítomnost velmi malých množství virové nebo bakteriální DNA. Proto nachází široké uplatnění v rychlé mikrobiologické diagnostice u řady infekčních onemocnění, zejména těch, jejichž původci se zdlouhavě a obtížně kultivují na běžných kultivačních mediích (*Treponema pallidum*, chlamydie, mykobakterie, borrelie, legionelly atd.) (ŠMARDKA, 2005) (*PCR Topics: Usage of Polymerase Chain Reaction in Genetic and Infectious Diseases, 1991*) (KŘEMEN, STRÍBRNÁ, 1998).

PCR a následná analýza amplifikovaných sekvencí jsou důležité při identifikaci osob v kriminalistice při potvrzování rodičovství v paternitních sporech a při typizaci u biologického materiálu (DNA-fingerprinting). Výhodou této metody je potřeba minimálního množství biologického vzorku, postačující je jediný vlas, kapka krve nebo spermatu, potu či slin nebo jediný otisk prstu (KŘEMEN, STRÍBRNÁ, 1998).

Vzhledem k vysoké stabilitě DNA lze amplifikaci a analýzu provádět i ve vzorcích, jejich stáří může být až několik tisíců let. To zahrnují antropologické a paleozoologické studie (KŘEMEN, STRÍBRNÁ, 1998).

Širokého uplatnění dosáhla PCR v prenatální diagnostice dědičných onemocnění, kde poskytuje přímou informaci o eventuálním postižení plodu matky. Významně časově zkrátila detekci bodových mutací, které jsou velmi častou příčinou těchto chorob. Materiálem k vyšetření DNA jsou buňky amniové tekutiny nebo choriových klků (KŘEMEN, STRÍBRNÁ, 1998).

Pomocí PCR lze také z minimálního počtu buněk amplifikovat sekvence DNA specifické pro pohlaví plodu matky. Markerem chromozomu Y je repetitivní sekvence Hae 3,4 v molekule DNA (KŘEMEN, STRÍBRNÁ, 1998).

V onkologii slouží PCR k detekci mutací některých genů, u nichž předpokládáme vztah k maligní transformaci buňky. Například uvedu aktivaci onkogenů (protoonkogen ras je aktivován bodovými mutacemi uvnitř kodonů 12,13 a 61) nebo inaktivaci onkosupresorových genů (u kolorektálního karcinomu genu p53 a u retinoblastomu genu RB-1). Přetrvávání nádorové choroby po provedené terapii lze prokázat detekcí tzv. minimálního rezidua nádorové choroby (ŠMARDÁ, 2005) (*PCR Topics: Usage of Polymerase Chain Reaction in Genetic and Infectious Diseases, 1991*) (KŘEMEN, STRÍBRNÁ, 1998).

U hematologických maligních onemocnění se PCR reakce a RNA-PCR uplatňuje zejména při zjišťování chromozomálních translokací, jako je translokace mezi chromozomy 14 a 18 u non-Hodgkinových lymfomů nebo translokace mezi chromozomy 9 a 22 u chronické myeloidní leukemie (KŘEMEN, STRÍBRNÁ, 1998).

PCR detekce molekulárních markerů nádorových buněk u hematolog. onemocnění

Obecně platnou výhodou molekulární diagnostiky je vysoká citlivost metody a rychlost dostupnosti výsledku. Nádorové buňky je možné detekovat pomocí PCR technik, pokud jsou tyto buňky dobře odlišitelné specifickými aberacemi na úrovni DNA tzv. molekulární markery. Jako molekulární markery u některých hematologických malignit jsou označovány fúzní geny, vznikající specifickými chromozomálními translokacemi v maligních buňkách. Za pomoci molekulárního průkazu nádorových buněk u jednotlivých onemocnění je možné diagnózu potvrdit, vyvrátit nebo upřesnit (diferenciální diagnostika) a je tak možné včas zahájit vhodně cílenou terapii (POSPÍŠILOVÁ, 2013).

Molekulární marker	Lokalizace	Diagnóza
BCR/ABL1	t(9;22) (q34;q11)	Chronická myeloidní leukemie (CML), Akutní lymfoblastická leukémie (ALL)
PRV - 1	19q13.12-2	Polycythaemia vera
Bcl-2/IgH	t(14;18) (q32;q21)	Folikulární lymfom (FL)
c-myc/IgH	t(8;14) (q24;q32)	Burkittův lymfom (BL)

Tabulka 3- Nejčastěji detekované molekulární markery nádorových buněk u hematologických malignit (POSPÍŠILOVÁ, 2013)

PCR lze také uplatnit ve virologii, kde se používá k diagnostice infekce HIV,

HTLV-1 a HTLV-2 (Human T-lymphotropic virus 1 a 2 – viry lidské T-lymfocytární leukemie), k průkazu a typizaci lidského papilomaviru HPV (Human Papilloma Virus), jako možného původce některých nádorů, dále k průkazu původců hepatitid (zejména viru hepatitidy B – HBV) (ŠMARDA, 2005) (*PCR Topics: Usage of Polymerase Chain Reaction in Genetic and Infectious Diseases, 1991*) (KŘEMEN, STRÍBRNÁ, 1998).

V diagnostice HIV/AIDS se dá technikou PCR zjistit infekce postihující jednu ze 100 000 buněk. Metoda poskytuje spolehlivou informaci o infekci i v období séronegativity, kdy se infekce v séru ještě nedá prokázat. U dětí narozených HIV-pozitivním matkám slouží PCR k odlišení jedinců se skrytou infekcí HIV od novorozenců, kteří získali protilátky od matky přestupem placentární bariérou a nemusí být nositeli viru. V časných fázích infekce HIV se dají pomocí RNA-PCR zachytit velmi malá množství virové RNA v buňkách i ve virionech, které cirkulují v krvi infikované osoby. V kombinaci s automatizovanou fluorescenční sekvencí se RNA-PCR využívá k zachycení bodových mutací ve virové RNA během antivirové chemoterapie. Včasné odhalení těchto mutací, které jsou příčinou rezistence na chemoterapeutikum nás upozorní na nutnost změny v léčebné terapii. RNA-PCR se také používá v diagnostice hepatitidy C a dalších onemocněních zapříčiněných RNA viry (ŠMARDA, 2005) (KŘEMEN, STRÍBRNÁ, 1998).

Využití PCR při detekci patogenů u hematologických pacientů

Vysoká citlivost PCR je využívána při detekci cizorodé DNA infekčních agens (patogenů), které mohou představovat u hematologických pacientů v období imunosuprese závažnou komplikaci léčby (POSPÍŠILOVÁ, 2013).

Patogen	Nejčastější klinická projev	Testovaný biologický materiál	Způsob detekce	Poznámka
Herpes simplex virus 1a 2	opary, vřídky	periferní krev, likvor, stěry z postižených oblastí	real-time PCR	detekce HSV v tekutině získané BAL ¹ může odhalit pneumonii
Varicella-zoster virus	plané neštovice, pásový opar, onemocnění CNS	likvor, stěry z postižených oblastí	real-time PCR	testováno při neurologické symptomatologii
Epstein-Barr virus	post-transplantační lymfoproliferativní onemocnění	periferní krev	real-time PCR	závažná infekce vzácná
Lidský cytomegalovirus	pneumonie, enteritida	periferní krev, BAL, likvor	real-time PCR	nutné sledovat virovou nálož v přesně stanovených intervalech, dynamika nárůstu je indikací k zahájení léčby
Lidský herpesvirus	encefalitida, exantém	periferní krev, BAL, likvor	real-time PCR	sledována hladina virové nálože
Adenoviry	cystitida, pneumonie, hepatitida	periferní krev	multiplex PCR	sekvence jednotlivých subtypů se velmi liší, proto je nutné často pro jejich detekci použít pro každý subtyp specifické primery
<i>Pneumocystis jirovecii</i>	pneumonie	BAL	nested nebo real-time PCR	použitím nested PCR dochází k mnohonásobnému zvýšení citlivosti

Tabulka 4- Přehled nejdůležitějších patogenů u oslabených pacientů detekovaných pomocí PCR (POSPÍŠILOVÁ, 2013)

¹ BAL – bronchoalveolární laváž

6. PERSPEKTIVY

PCR je významným nástrojem pro detekci odchylek v sekvenci nukleových kyselin. Znalost povahy mutací je důležitá především pro správnou diagnostiku a zahájení terapie. V literatuře bylo popsáno mnoho technik pro odlišení standardních alel od mutantních, ale to je pouze malá část tohoto širokého potenciálu PCR technik. PCR je neocenitelným nástrojem pro celou řadu analýz prováděných v základním nebo aplikovaném výzkumu a také v praxi (ŠMARDA, 2005).

Myslím si, že do budoucna bude tato technika důležitou součástí běžné laboratoře, jakožto nástroj k rychlé diagnostice. Bude možná také nástrojem k objasnění dosud nepoznaných nemocí.

S dobou se také mění velikost použitých nástrojů a pomůcek k PCR. Dnešní PCR se v moderních laboratořích provádějí v miniaturních čípech, za použití mikrokapek reagensů a usiluje se o zjednodušení vyhodnocení PCR. Dnešní metody umožňují absolutní kvantifikaci. Představa, že by se do budoucna takto malá množství ještě zmenšovala, je pro laika zcela nepředstavitelná.

Možná, že se také postupem času tato metoda přesune z laboratoří do praxe, například k určení pachatele kriminálního činu přímo na místě činu, k určení patogenů přímo v ordinacích lékařů nebo k rychlému určení diagnózy. Bude možno určit kvasinkovou nebo houbovou infekci během několika minut, místo časově náročné kultivace na agaru. Snížením nákladů do budoucna bude PCR přístupnější a její využití v klinické praxi bude větší a samozřejmé.

7. ZÁVĚR

Od dob geniálního objevitele zákonitostí přenosu dědičných znaků Gregora Johanna Mendela urazilo vědecké poznání genetiky nesmírně zajímavou a plodnou cestu. Polozapomenuté a znovuobjevené poznatky pracovitého brněnského řeholníka se staly doslova živnou půdou pro řadu vědeckých badatelů. Snad nejvýznamnějším milníkem na této cestě bylo pak poznání a rozluštění úlohy DNA. Léta vývoje vědeckého poznání se přitom odvíjely na bázi nástupu nových technologií, přístrojové techniky a metodologie zkoumání.

Dnešní stav a možnosti v oblasti diagnózy, definice příčin a souvislostí, pochopení stavu, perspektiv a způsobů možné léčby vychází z poznání, že většina patologických stavů je následkem změn normálních biologických procesů, které mohou být způsobeny prostřednictvím infekce, vlivem vnějšího prostředí, vrozenou nebo získanou změnou v genomu, případně kombinací těchto faktorů (*Molekulární medicína a biotechnologie: soubor přednášek*, 2008).

Pochopení patologických stavů na molekulární úrovni je možné pouze za předpokladu, že umíme pozorovat, analyzovat a definovat „normální“ biologický proces a máme možnost porovnání studované odchylky s normou. U dědičně podmíněných onemocnění je primární příčinou mutace DNA, která zásadně mění vlastnosti produktu u zmutovaného genu. Jednotlivé molekulární složky buňky nejsme bohužel schopni třídít okem ani jinými nástroji, které máme k dispozici. Jedním z cílů molekulární biologie je proto „sestavení katalogu“ všech základních druhů molekul přítomných v buňkách. Nezbytným předpokladem pro sestavení takového molekulárního katalogu je vývoj a aplikace experimentálních metod, které nám umožňují jednotlivé druhy molekul zkoumat (*Molekulární medicína a biotechnologie: soubor přednášek*, 2008).

Nedílnou součástí těchto experimentálních metod je i technika polymerázové řetězové reakce, která významně ovlivnila zacházení s molekulou DNA a umožnila v návaznosti na ni vznik dalších důležitých metod ke studování lidského genomu.

8. POUŽITÉ ZKRATKY

zkratka	význam zkratky	český význam
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>	polymerázová řetězová reakce
DNA	<i>deoxyribunucleotid acid</i>	deoxyribonukleotidová kyselina
dsDNA	<i>double-stranded DNA</i>	dvouřetězcová DNA
ssDNA	<i>single-stranded DNA</i>	jednovláknová DNA
dNTPs	<i>deoxyribonucleotide triphosphate</i>	deoxyribonukleotidtrifosfát – základní stavební jednotky pro nově syntetizované vlákno DNA
kbp	<i>kilo base pairs</i>	tisíc párů bází
cDNA	<i>complementary DNA</i>	DNA syntetizovaná podle RNA
RNA	<i>ribonucleic acid</i>	ribonukleová kyselina
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>	dodecylsírán sodný
EDTA	<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>	ethylendiaminotetraoctová kyselina
ELFO	<i>electrophoresis</i>	elektroforéza
FRET	<i>fluorescence resonance energy transfer</i>	fluorescenční rezonanční přenos energie
RQ-PCR	<i>real-time quantitative PCR</i>	kvantitativní PCR v reálném čase
RT-PCR	<i>reverse transcription PCR</i>	reverzně-transkriptázová PCR
mRNA	<i>messenger RNA</i>	mediátorová RNA
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>	virus lidské imunitní nedostatečnosti
HTLV	<i>Human T-lymphotropic virus</i>	vir lidské T-lymfocytární leukemie
HPV	<i>Human Papilloma Virus</i>	lidský papilomavirus
HBV	<i>Hepatitis B virus</i>	vir hepatitidy B

9. SEZNAM TABULEK

Tabulka 1- Exponenciální nárůst specifického produktu (autorská tvorba).....	26
Tabulka 2 - Modifikace PCR (POSPÍŠILOVÁ, 2013).....	27
Tabulka 3- Nejčastěji detekované molekulární markery nádorových buněk u hematologických malignit (POSPÍŠILOVÁ, 2013)	37
Tabulka 4- Přehled nejdůležitějších patogenů u oslabených pacientů detekovaných pomocí PCR (POSPÍŠILOVÁ, 2013).....	39

10. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 - Gregor Johann Mendel - 20.7. 1822 Hynčice (Heinzendorf) – 6. 1. 1884 Brno	10
https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/a/ab/Gregor_Mendel_with_cross.jpg/225px-Gregor_Mendel_with_cross.jpg	
Obrázek 2 - Model dvojité spirály DNA	12
http://www.3dmoleculardesigns.com/3DMD-Files/DNA-Discovery/DNA-Photos/Photo-Gallery/3DMDDNADiscoveryKitonstand.jpg	
Obrázek 3 - J.D.Watson a F.H.C.Crick	12
http://www.pbs.org/wgbh/nova/assets/img/before-watson-crick/image-01-large.jpg	
Obrázek 4 - James Dewey Watson	13
http://media-2.web.britannica.com/eb-media/17/20917-004-530A47A1.jpg	
Obrázek 5 - Francis Harry Compton Crick.....	13
https://s-media-cache-ak0.pinimg.com/236x/78/26/d1/7826d1f598a36aa6acc72bf394952fb1.jpg	
Obrázek 6 - Schéma exponenciální amplifikace DNA metodou PCR (autorská tvorba)	23
Obrázek 7 - Směs pro PCR reakci v mikrozkušavce (autorská tvorba)	24
Obrázek 8 - Princip FRET systému s excitací fluorochromu pouze při hybridizaci sond v těsné blízkosti (POSPÍŠILOVÁ, 2013)	30
Obrázek 9 –Systém TaqMan značené sondy s excitací fluorochromu pouze po odštěpení sondy (POSPÍŠILOVÁ, 2013).....	31
Obrázek 10- Diagnóza Duchennovy muskulární dystrofie (autorská tvorba)	32

11. POUŽITÁ LITERATURA

BROWN, T. A. *Klonování genů a analýza DNA: úvod*. 1. české vyd. V Olomouci: Univerzita Palackého, 2007. xviii, 389 s. ISBN 978-80-244-1719-6.

BUSTIN, Stephen A.; **MUELLER**, Reinhold. Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. *Clinical Science*, 2005, 109.4: 365-379.

DAHM, R. Discovering DNA: Friedrich Miescher and the Early Years of Nucleic Acid Research. *Human Genetics*, 01, 2008, vol. 122, no. 6. pp. 565-81 ProQuest Central. ISSN 03406717. DOI <http://dx.doi.org/10.1007/s00439-007-0433-0>.

DAHM, R. The Discovery of DNA, Circa 1869. *The Scientist*, 12, 2008, vol. 22, no. 12. pp. 84-84,11 ProQuest Central. ISSN 08903670.

DAHM, R. The First Discovery of DNA. *American Scientist*, Jul, 2008, vol. 96, no. 4. pp. 320-323,325-327 ProQuest Central. ISSN 00030996.

DUNN, Peter M. Gregor Mendel, OSA (1822-1884), Founder of Scientific Genetics. *Archives of Disease in Childhood.Fetal and Neonatal Edition*, 11, 2003, vol. 88, no. 6 ProQuest Central. ISSN 13592998. DOI <http://dx.doi.org/10.1136/fn.88.6.F537>.

HRSTKA, R., et al. Development of PCR methods and their applications in oncological research and practice. *Klinická onkologie: časopis České a Slovenské onkologické společnosti*, 2014, 27: S69.

KOČÁREK, Eduard. *Molekulární biologie v medicíně*. Vyd. 1. Brno: Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů v Brně, 2007. 218 s. ISBN 978-80-7013-450-4.

KŘEMEN, Jaromír a **STRÍBRNÁ**, Jana. *Techniky molekulární biologie a jejich využití v medicíně*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 1998. 117 s. ISBN 80-7184-504-3.

ŁACZMAŃSKA, Izabela; **PESZ**, Karolina; **ŁACZMAŃSKI**, Łukasz. Application of selected methods based on the polymerase chain reaction in medical molecular diagnostics. *Adv Clin Exp Med*, 2009, 18: 85-92.

LORENZ, T. C. Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. *J. Vis. Exp.* (63), e3998, doi:10.3791/3998 (2012). Dostupné z: <http://www.jove.com/video/3998/polymerase-chain-reaction-basic-protocol-plus-troubleshooting>

MAZURA, Ivan et al. *Speciální metody molekulární biologie*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2001. 101 s. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. ISBN 80-246-0258-X.

Molekulární medicína a biotechnologie: soubor přednášek. 1. vyd. Praha: Galén pro 1. LF UK v Praze, ©2008. 188 s. ISBN 978-80-7262-535-2.

MULLIS, Kary B. The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction. *Scientific American* [online]. 1990, **262**(4), 56-65 [cit. 2016-04-25]. DOI: 10.1038/scientificamerican0490-56. ISSN 00368733. Dostupné z: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/scientificamerican0490-56>

NAVARRO, E., et al. Real-time PCR detection chemistry. *Clinica chimica acta*, 2015, 439: 231-250.

NIKLÍČEK, Ladislav a **ŠTEIN**, Karel. *Dějiny medicíny v datech a faktech*. 1. vyd. Praha: Avicenum, 1985. 374 s, s. 225.

PCR Topics: Usage of Polymerase Chain Reaction in Genetic and Infectious Diseases. Berlin: Springer, 1991. 11, 258 s.

PORTER, Roy. *Dějiny medicíny: od starověku po současnost*. V českém jazyce vyd. 2. Praha: Prostor, 2013. 809 s., [24] s. obr. příl. Obzor; sv. 82. ISBN 978-80-7260-287-2.

POSPÍŠILOVÁ, Šárka et al. *Molekulární hematologie*. 1. vyd. Praha: Galén, ©2013. xix, 316 s. ISBN 978-80-7262-942-8.

ROHOŇ, Peter a kol. *Molekulární biologie v hematoonkologii - od základních vyšetřovacích metod ke klinické praxi*. 1. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2009. 127 s. Skripta. ISBN 978-80-244-2224-4.

SCHOTT, Heinz. *Kronika medicíny*. 1. vyd. Překlad Zdeněk Bureš. Praha: Fortuna Print, c1994. Edice Kronik. ISBN 8085873168, s. 344.

SLABÝ, Ondřej et al. *Molekulární medicína*. Praha: Galén, ©2015. xx, 598 s. ISBN 978-80-7492-121-6.

ŠMARDA, Jan et al. *Metody molekulární biologie*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2005. 188 s. ISBN 80-210-3841-1.

<http://learn.genetics.utah.edu/content/labs/pcr/>, [cit. 2016-04-28]

<http://labguide.cz/metody/pcr/>, [cit. 2016-04-28]

http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1993/mullis-lecture.html, [cit. 2016-04-28]

<http://www.genetika-biologie.cz/zakony-dedicnosti> , [cit. 2016-04-28]

https://cs.wikipedia.org/wiki/Gregor_Mendel , [cit. 2016-04-28]

12. PŘÍLOHA Č. 1

Informovaný souhlas pacienta (doporučený text)

Informovaný souhlas pacienta s molekulárně-biologickým vyšetřením genu pro

_____ (doplnit název choroby, specifikaci genu)

PACIENT

1) Já _____ (plné jméno a rodné číslo) souhlasím, aby mně bylo odebráno 10 ml krve na molekulárně-biologické vyšetření mutací v genu/genů* _____.

Souhlasím s tím, že vzorky izolované DNA mohou být skladovány i několik let v závislosti na pokroku výzkumu v této oblasti. Potvrzuji, že jsem byl poučen/obdržel/četl * informace o významu detekce mutací pro _____ (doplněte název onemocnění). Měl jsem dostatek času hovořit o této problematice s níže podepsaným lékařem.

Souhlasím / nesouhlasím* s tím, že výsledky mých testů mohou být podstoupeny, v rámci výzkumu i evropským/světovým* konsorciím pro výzkum této/těchto chorob. Potvrzuji tímto, že má účast na výzkumných projektech, v nichž budou analyzovány moje vzorky DNA, je dobrovolná.

Souhlasím/nesouhlasím* s případným zapsáním mé osoby do registru nemocných s _____ (doplněte název onemocnění).

2) Akceptuji to, že mně budou/nebudou* sděleny výsledky genetického testování. Pokud však budoucí výzkum objeví některé další zásadní informace o možnosti genetického vyšetření u _____ (uveďte název onemocnění) chci/nechci* být o těchto testech a možnostech informován.

PODPIS PACIENTA _____ DATUM _____

LÉKAŘ

Potvrzuji, že jsem výše podepsanou osobu informoval o cílech i podmínkách vyšetření a že výsledky tohoto molekulárně-genetického testu nebudou sděleny třetí straně bez souhlasu vyšetřovaného.

JMÉNO LÉKAŘE: _____

ADRESA LÉKAŘE: _____

IČZ, odbornost: _____

Fax, telefon a e-mail: _____

PODPIS LÉKAŘE _____ DATUM _____

* nehodící se škrtněte, u nezletilých vyplní tento formulář jejich rodiče nebo zákonný zástupce (1).