

POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)

KUNCI KEPADA PENGUJIAN DIAGNOSTIK

Disediakan oleh:

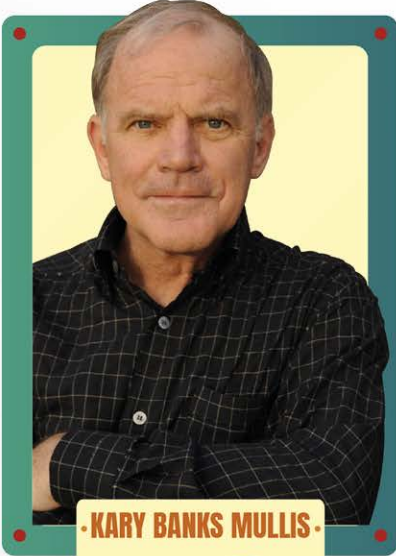
Nur Hasmi Abdul Multalib dan Afiqah Fasihah Abdul Rahim
Makmal Veterinar Zon Utara, Bukit Tengah
Institut Biodiversiti Veterinar Kebangsaan, Jerantut



Pada awal tahun 2020, Malaysia telah digemparkan dengan kemunculan satu wabak yang menjadi ancaman kesihatan besar kepada kesihatan awam dan menjejaskan pelbagai industri, termasuklah industri penternakan di Malaysia. Wabak ini telah dikenal pasti berpunca daripada sejenis Virus Corona (CoV) yang berpotensi menyebabkan jangkitan salur pernafasan akut dan telah dinamakan oleh Pertubuhan Kesihatan Sedunia (WHO) sebagai COVID-19. Dengan tularnya wabak COVID-19, istilah *Reverse Transcriptase- Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) telah mula dikenali dalam kalangan masyarakat sejagat. RT-PCR atau juga dikenali sebagai Ujian Tindak Balas Berantai Polimerase Transkripsi merupakan satu kaedah pengujian menggunakan teknik molekular diagnostik. Kaedah ini menjadi kaedah pengujian awal yang wajib bagi mengenal pasti individu yang telah dijangkiti COVID-19. Jadi, mari kita kenali, apa itu PCR dengan lebih dekat.



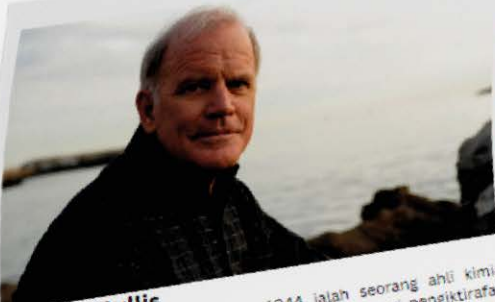
Sejarah PCR



KARY BANKS MULLIS



PCR adalah satu teknik pengujian molekular diagnostik terulung dalam bidang biologi molekular yang pertama kalinya dibangunkan oleh saintis Kary Banks Mullis pada tahun 1985. Ciptaan ini telah memenangi hadiah Nobel dalam bidang kimia pada tahun 1993. PCR secara amnya adalah proses sintesis dan amplikasi DNA secara in-vitro menggunakan "*thermostable DNA polymerase*". Taq *polymerase* yang diasingkan daripada bakteria termofilik ekstrim, iaitu *Thermus Aquaticus* merupakan jenis DNA polimerase yang digunakan dalam teknik PCR bagi amplifikasi DNA. Bakteria *Thermus Aquaticus* yang boleh hidup pada suhu melebihi 80°C awalnya dijumpai pada tahun 1969 di Taman Negara Yellowstone, Amerika Syarikat. Hanya pada tahun 1976, Taq polimerase berjaya diasing dan dikenal pasti oleh Thomas Brock, seorang ahli biologi daripada Universiti Indiana, Amerika Syarikat. Disebabkan kelebihan enzim DNA polimerase ini mampu menahan suhu yang tinggi di dalam proses PCR, ianya kini menjadi salah satu teras kepada teknik PCR yang dibangunkan oleh Kary B. Mullis.



Kary B. Mullis

Dilahirkan pada 28 Disember 1944 ialah seorang ahli kimia Amerika yang memenangi Hadiah Nobel. Sebagai pengiktirafan terhadap penciptaannya terhadap teknik tindak balas rantai polimerase (PCR), beliau berkongsi Hadiah Nobel dalam Kimia 1993 bersama Michael Smith dan memperoleh Hadiah Jepun pada tahun yang sama [2] Penciptaan yang dibuat oleh Mullis membolehkan PCR menjadi teknik pusat dalam biokimia dan biologi molekular, yang diterangkan oleh The New York Times sebagai "biologi yang hampir asli dan penting, dalam dua zaman sebelum PCR dan selepas PCR".

Thermus aquaticus

Merupakan spesies bakteria yang dapat bertoleransi suhu tinggi, salah satu dari beberapa bakteria termofilik yang termasuk dalam kelompok *Deinococcus-Thermus*. Bakteria ini adalah sumber enzim tahan panas Taq DNA polimerase, salah satu enzim paling penting dalam biologi molekular kerana digunakan dalam teknik amplifikasi DNA tindak balas berantai polimerase (*polymerase chain reaction*, PCR).



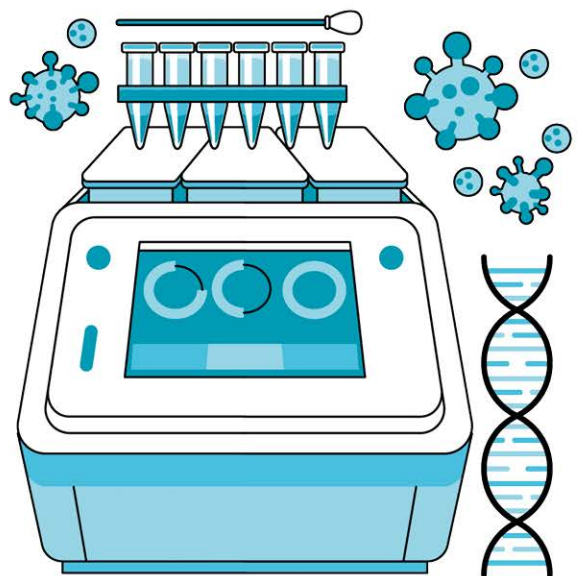
Apa itu *Polymerase Chain Reaction (PCR)*?

Teknik PCR adalah proses penghasilan jutaan hingga billion salinan selektif segmen di dalam DNA daripada hanya satu segmen DNA dalam masa yang singkat. DNA terdapat di dalam semua benda hidup, dan ini membolehkan hampir kesemua DNA benda hidup mampu untuk dianalisis dan diketahui genom atau asal usulnya. Hanya sejumlah kecil DNA diperlukan dan boleh digandakan secara eksponensial melalui rangkaian perubahan suhu menggunakan mesin *Thermal Cycler* seperti Rajah 1.



Rajah 1: Mesin *Thermal Cycler* PCR

Prinsip kerja mesin *Thermal Cycler* (juga dikenali sebagai mesin PCR atau alat PCR) ialah pengulangan kitaran untuk memperbanyakkan jumlah DNA (amplikon). Mesin PCR adalah instrumen khusus yang perlu dikendalikan oleh pengguna yang berpengalaman dan cekap. Beberapa persediaan perlu dilakukan pada peringkat awal sebelum memulakan pengujian menggunakan mesin PCR, melibatkan penggunaan alat lain seperti mikropipet, *vortex mixer*, kabinet bio-keselamatan, mesin emparan dan lain-lain.



PCR melibatkan 3 peringkat iaitu; (1) Denaturasi (*Denaturation*), (2) Penempelan primer (*Annealing*) dan (3) Pemanjangan (*Extension*). Perubahan suhu dalam ketiga-tiga peringkat ini melibatkan pemanasan dan penyejukan pada suhu yang spesifik berulang kali. Kitaran haba ini akan membenarkan tindak balas antara reaktan dan ianya adalah bergantung kepada suhu khusus bagi sesuatu peringkat dan sesuatu primer seperti dalam Rajah 2.

Istilah denaturasi sering juga dipanggil peringkat lebur. Peringkat ini berlaku dalam julat suhu 94°C hingga 96°C. Pada peringkat ini ikatan hidrogen DNA akan terputus dan DNA akan menjadi bebenang tunggal. Secara amnya, langkah ini dijalankan untuk jangka masa yang lama untuk memastikan semua bebenang DNA diasingkan. Pemisahan ini menyebabkan DNA menjadi tidak stabil dan sedia berfungsi sebagai templat ("penanda aras") untuk melekat pada primer.

Peringkat penempelan primer adalah proses selepas denaturasi. Primer melekat pada bahagian DNA templat yang merupakan pelengkap kepada urutan asas. Peringkat ini dijalankan pada suhu kira-kira 45°C hingga 60°C bergantung kepada primer yang digunakan. Suhu yang tidak tepat menyebabkan kegagalan primer untuk melekat pada templat DNA. Tempoh peringkat ini ialah 1-2 minit.

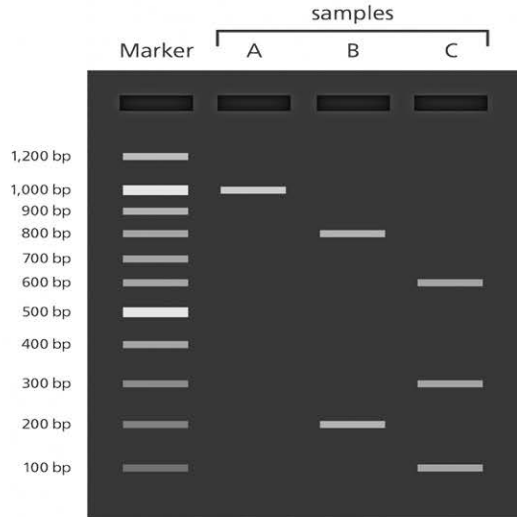
Seterusnya, proses pemanjangan adalah proses selepas penempelan primer. Suhu untuk proses ini bergantung kepada jenis DNA polimerase yang digunakan. Dengan enzim *Taq-polimerase*, suhu biasanya sekitar 76°C.



Rajah 2: Tindak balas reaksi berantai polimerase

Komponen PCR dan hasil tindak balas PCR

Untuk menjalankan pengujian PCR, beberapa komponen diperlukan iaitu templat DNA, primer, *Deoxynucleoside triphosphates* (dNTPs), *Buffer PCR*, Magnesium klorida (MgCl₂) dan juga enzim DNA polimerase. Hasil keputusan tindak balas PCR biasanya divisualisasikan menggunakan elektroforesis gel (Rajah 3). Elektroforesis gel adalah teknik di mana serpihan DNA ditarik melalui matriks gel oleh arus elektrik dan ia memisahkan serpihan DNA mengikut saiz. Tangga DNA standard biasanya disertakan supaya saiz serpihan dalam sampel PCR boleh ditentukan. Serpihan DNA dengan ukuran yang sama membentuk "jalur" pada gel, yang boleh dilihat oleh mata jika gel diwarnai dengan pewarna pengikat DNA.



Rajah 3: Hasil tindak balas PCR yang divisualisasi menggunakan proses elektroforesis gel.

Aplikasi dan manfaat teknik PCR

Teknik berasaskan PCR dapat diaplikasikan dalam pelbagai bidang termasuklah penyelidikan dan diagnostik veterinar. Antara teknik dan aplikasi PCR adalah klon organisma melalui PCR, penjujukan DNA, kajian susur galur evolusi keturunan, pengenalpastian mutasi dan penyakit genetik, diagnosis ujian diagnostik, sains forensik dan pelbagai lagi seperti dalam Rajah 4.



Penyelidikan Genetik



Makanan dan Pertanian



Rajah 4: Aplikasi Teknik PCR

Melalui aplikasi PCR di dalam bidang sains veterinar, analisis genetik penyakit berjangkit daripada ternakan juga amat mudah dilaksanakan dan ini dapat membantu mendiagnosis dan membendung penularan penyakit berjangkit seperti jangkitan virus dengan cepat. Teknik ini juga diperlukan untuk mendiagnosis penyakit yang sukar untuk dikesan dan mengambil masa yang sangat lama jika dianalisis menggunakan teknik konvensional. Sebagai contoh, diagnosis jangkitan bakteria *Mycobacterium tuberculosis* melalui teknik mikrobiologi mengambil masa lebih panjang berbanding dengan teknik PCR. Selain daripada itu, teknik PCR juga membolehkan saintis untuk membuat pengolahan genetik bagi tujuan mempertingkatkan kualiti baka ternakan dari segi penghasilan sumber daging, telur atau susu meningkatkan kerintangan ternakan kepada parasit dan iklim setempat.