

## 7. Polimeráz láncreakció (PCR)

Sokszor láthatjuk különböző helyszínelős TV filmsorozatokban, hogy bejön egy fehérköpenyes alak, aki azt mondja, hogy összehasonlította a DNS -t és ez és ez jött ki belőle. Mit is vizsgálnak ilyenkor a DNS-en és hogyan? Ezzel foglalkozik ez az előadás.

A címben a láncreakció szót még mindenki csak-csak megérti. A polimeráz szó korábban a DNS polimeráz enzimmél került elő. A kettő együtt a DNS polimeráz egy speciális alkalmazását jelenti. (A PCR a cím angol megfelelőjének rövidítése, a polimerase chain reaction helyett áll.)

### Mi is ez a folyamat tulajdonképpen?

Ez egy sokszorozó folyamat, a lényege az, hogy egy parányi mennyiségű DNS-t sokszor egymás után lemásoltatnak. Minden egyes másolásnál két kópia keletkezik. Tehát ha  $n$ -szer lemásoltatjuk az adott DNS szakaszt, akkor  $2^n$  kópia keletkezik. A folyamatot ciklikusan ismételve minden egyes ciklusban megduplázódik a DNS molekulák száma. (Tehát 10 ciklus után 1024, 20 ciklus után kb.  $\approx 10^6$ , 30 ciklus után kb.  $\approx 10^9$  darab lesz..) Ilyen módon a nagyon kevés eredeti DNS-ből olyan nagy mennyiséget lehet kapni, ami már észlelhető, vizsgálható. Egy tamponnal letörölt 10-20 DNS molekula nem elég a vizsgálathoz, de ha a PCR-rel felszaporítják, akkor akár tízmilligrammos mennyiséget is kaphatunk. Ezt már észlelhető mennyiség, a laboratórium tudja kezelni, vizsgálni, összehasonlítani.

Története: 1983-ban valósították meg először. K. Mullis Nobel-díjat is kapott a felfedezésért. Akkor ez a folyamat még nagyon kezdetlegesen zajlott le, lassan ment, és minden ciklusban újabb vegyszereket kellett hozzáadni. Ma már ez sokkal gyorsabban megy, adagolások nélkül. (Kitekintés: Amerikában, ha felvesznek egy kutatót egy céghez, ő tisztességes fizetést kap a munkájáért, de aláírja, hogy minden eredményének hasznosítási joga a cég tulajdonát képezi. Különleges esetnek számít, hogy Mullis cége, miután igen nagy bevételre tett szert a PCR eljárás és a megfelelő berendezések értékesítéséből, külön juttatott tízezer dollárt a kutatónak)

A PCR technikával egy viszonylag rövid, kb. 10000 bázispárnyi DNS szakaszt tudnak felszaporítani. (tárgyaltuk, hogy egy baktérium plazmidba kb. ennyi idegen DNS-t csomagolhatunk.) Tehát nem egy egész kromoszóma szerelvényről, hanem annak egy kis szakaszáról van szó.

### Mire alkalmas a PCR?

- Személyazonosításra, genetikai ujjlenyomat készítésre. Két, vagy több DNS mintát össze lehet hasonlítani abból a szempontból, hogy ugyanahhoz a személyhez, vagy különböző személyekhez tartoznak. A PCR kis DNS darabokat eredményez, és ezeknek a kis daraboknak a nagyságát, mintázatát hasonlítják össze. A módszert apasági és családkutatási vizsgálatoknál is fel lehet használni.

- Orvosi téren pl. örökletes, genetikai betegségeket lehet felderíteni. Megvizsgálják, hogy a kérdéses génszakasz az egészséges, vagy a beteg személyekével azonos.
- Mutációkat, pontmutációkat lehet kimutatni. Azt a bizonyos génszakaszt, ahol a mutációt gyanítják, felszaporítják olyan mennyiségre, hogy azután a bázissorrendet meg tudják határozni belőle.
- Fertőző betegségeket lehet kimutatni már nagyon korai stádiumban. Ez az emberek és állatok esetében is nagyon fontos lehet. (Pl. ha a határon élőállatokat akarnak behozni, arról sürgősen el kell dönteni, hogy fertőzött vagy sem. Ha fenn áll a fertőzés gyanúja, akkor karanténba zárják az állatokat. Az állatokat hetekig nem lehet eladni, és etetni is kell. Ez komoly gazdasági kár. De ha pl. az állat orrváladékából mintát vesznek és bevizsgálják a PCR-rel, akkor másnapra meg lehet mondani, hogy az állat az adott betegséggel fertőzött-e vagy sem.
- Lehet ősi mintákat is vizsgálni az eljárással pl.: mamutokat, múmiákat, Ötzi (az Alpok Ötztal völgyéből fagyottan előkerült kőkori ember) DNS-ét.

A folyamat részletes tárgyalása előtt ismételjük át a DNS néhány tulajdonságát.

Szemléletesen a DNS cipzárként képzelhető el, és a cipzár két fele szétválasztható. A két oldalt közepén gyenge hidrogénkötések kapcsolják össze, a bázispárok között kettő vagy három hidrogénhíd jön létre. Ezek kis energiájú, gyenge kötések és könnyen felbonthatók. Elég, ha felmelegítjük 90-95 fokra, máris szétnyílik. A DNS stabil anyag, ezen a hőmérsékleten nem károsodik, csak szétválik két szimpla szálú DNS-re. Ezt nevezik a **DNS olvadásának**, illetve olvadáspontjának.

#### **A technikához szükséges:**

- Az alap DNS, ebből 1 nanogram elegendő, ( $1 \text{ ng} = 10^{-9} \text{ gram}$ ). A mintavételezésnél nagyon steril, DNS mentes eszközöket, pl. tamponokat használnak.
- Kell hozzá 2 db primer (kb. 20 bázisnyi oligonukleotid, ld. később.)
- Szükséges a DNS polimeráz enzim, ami a DNS másolását végzi. Ennek az enzimnek hőállónak, gyorsnak és pontosnak kell lennie. A hőállóság, azért fontos, mert a 90-95 fokos hőmérséklet minden ciklusban előfordul, és sok enzimfehérje ettől már inaktiválódik. Fontos a gyorsaság is, azaz minél gyorsabban menjen végbe az adott DNS szakasz szintézise. A pontosság alatt a másolási hibák, a bázistévesztések minél kisebb számát értjük. A legmodernebb eljárásoknál már olyan DNS polimeráz enzimet használnak, amit két különböző mikrobának a DNS polimerázából állítottak össze, így egyesíthető a három fontos tulajdonság.
- Négy féle nukleotid, amelyekből a DNS felépül.
- Puffer oldat, ami a megfelelő kémiai környezetet biztosítja.

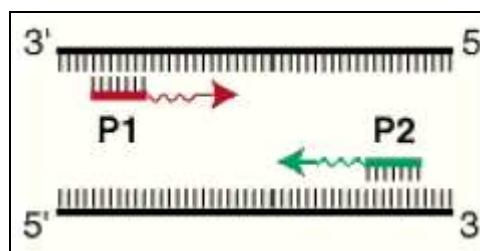
A folyamat apró, 0,2 cm<sup>3</sup>-es, szinte gyufaszál méretű csövekben zajlik. A kis méret azért is jó, mert gyorsan lehet változtatni a hőmérsékletet.

### **Primerek**

A primerek rövid, egyes szálú DNS darabkák, amelyekkel megcímkézzük a sokszorosítandó génszakasz két végét. A DNS polimeráz innen indítja az új darab szintézisét. Mindkét szálra külön primert kell illeszteni, a génszakasz 3' végére. (= primer pár).

A primerek bázissorrendje komplementer módon illeszkednek az alap DNS-hez.

A primereket a DNS ismeretében számítógéppel megtervezik, és laboratóriumban szintetizálják.



1. ábra: Primerek

A primer megtervezését szoftverekkel végzik. Ma már vannak olyan adatbankok, ahol több ezer primer bázissorrendjét és lehetséges alkalmazásait tárolják. A primer tervezés, még inkább az elkészítés ma már szolgáltatás lett. Meg lehet rendelni cégektől, akik rövid idő alatt x összegért szállítják a primer párt.

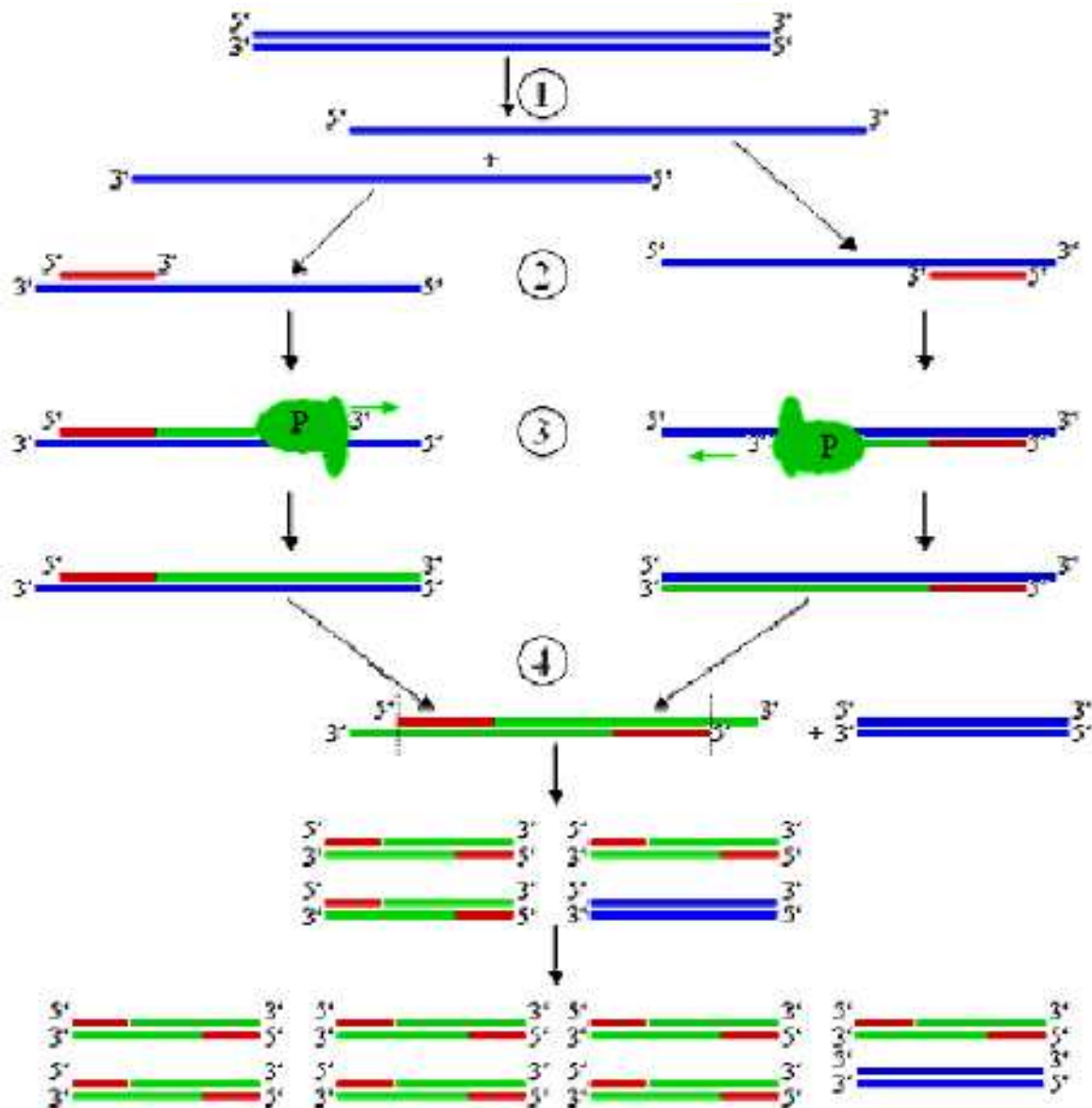
### **Hogy néz ki a duplikációs ciklus?**

1. Denaturálás 92-94 °C-on, a DNS szálai szétválnak. Indításnál ez 5 perc, később 30-120 másodperc.
2. Primerek kapcsolódása (annealing): 50-70 °C-on 30-120 másodpercig. (Amíg a magas hőmérsékleten vannak, addig a primerek sem tudnak odakötődni. A hőmérséklet tartomány azért ilyen tág, mert az optimum a használt primer tulajdonságaitól függ. A hosszú DNS darabkák hosszabb, a rövidebbek rövidebb idő alatt találják meg a helyüket.
3. DNS szintézis: a DNS polimeráz szintetizálja a komplementer szálát 72°C-on, ideje a génszakasz hosszától függ (a sebesség  $\approx$  1000 bázispár/perc)

Egy ciklus időtartama 5-10 perc, kiértékelhető eredményhez 20-30 ciklusra van szükség.

A folyamat során 3 különböző hőmérséklet váltakozik ciklikusan. A hőmérséklet gyors váltását a mintatartók kis térfogata teszi lehetővé. A teljes időszükséglet  $\sim$ 20-30 x 5-10 perc azaz több óráig is eltart.

(szemléltető Flash animáció található a [www.oktatas.ch.bme.hu-n](http://www.oktatas.ch.bme.hu-n))



2. ábra: A duplikáció folyamata

### Mit kezdünk a felszaporított DNS-sel?

- Megvizsgáljuk a jelenlétét. Ha a fertőző betegségeket akarunk kimutatni, akkor azt nézzük meg, hogy egy bizonyos DNS szakasz jelen van-e vagy sem.

- Mintázatát. Az embernek nagyon hosszú és bonyolult a DNS-e. Ezen belül vannak nagyon „konzervatív” szakaszok, melyek minden emberben egyformák, pl. a hemoglobin bázissorrendje az minden embernél teljesen azonos.

De vannak olyan szakaszok is, melyek személyenként eltérőek, változatosak. Személyazonosításhoz ezekre a szakaszokra irányítják a primereket. A primerek megkeresik a velük komplementer DNS szakaszokat. Azonos (személytől származó) DNS esetén ugyanazokra a helyekre kötődnek, a közébezárt szakaszok hossza azonos. Különböző

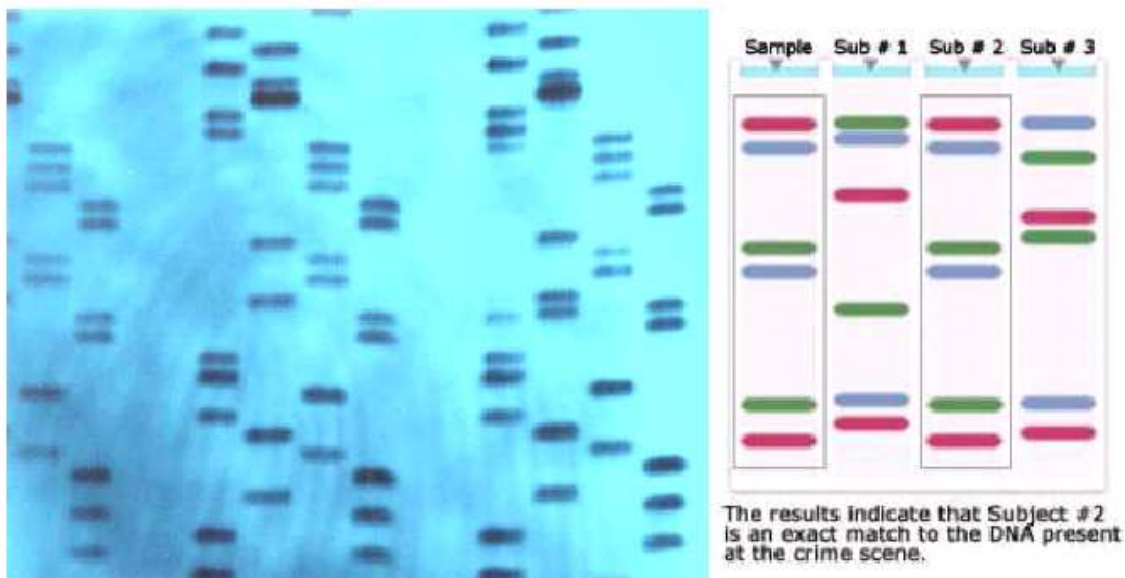
személyeknél viszont a primerek máshol találják meg a nekik megfelelő helyet a DNS-en, a közbezárt szakasz hossza az eltérő lesz. A közbezárt szakaszok hosszát hasonlítják össze (ld alább), a sokszorosított DNS szakaszok hossza együttesen a személyre jellemző jellegzetes mintázatot alkot, ezt nevezik genetikai ujjlenyomatként. A elég sok szakaszból áll a genetikai ujjlenyomat, akkor nagyon egyedi, csak az egypetűjű ikreknél azonos.

Az összehasonlításnál azonos primer párokat kell használni.

- Bázissorrendjét - tökéletes azonosításra ill. pontmutációk kimutatására alkalmas.

### Genetikai ujjlenyomat, elektroforézis

A felszaporított DNS darabkák méretének összehasonlítását elektroforézissel végzik. Az elektroforézis lényege: egy vékony, kb. 2 mm vastagságú gélréteg felső szélére felvisszük a sokszorosított DNS darabkákat tartalmazó oldatokat. A géltre elektromos feszültséget kapcsolunk. Ettől az egyes DNS molekulák az elektromos erőter hatására lefelé kezdenek vándorol-



#### 4. ábra: DNS-mintázatok- elektroforézis

ni. Vándorlási sebességük a méretüktől függ. A kis DNS darabkák gyorsabban vándorolnak, előreszaladnak, a nagyobb DNS szakaszok lassabban vándorolnak lefelé, lemaradnak. Amikor a legelső leért a gél aljára akkor valamilyen festéssel megfestik és megvizsgálják a mintázatot. Minden felvitt minta függőlegesen egy-egy csíksorozatot ad. Minden csík egy bizonyos méretű DNS darabnak felel meg, fölülről lefelé csökkenő méretben. A baloldali gélfelvételen láthatunk teljesen azonos és kis eltéréseket mutató sorozatokat is. Ha az egyezések mellett csak egy-két eltérés észlelhető, akkor a minták valószínűleg vérrokonoktól származtak.

A jobb oldali elvi grafikán egy nemi erőszak tettesének testvadászat DNS alapján történő azonosítását láthatjuk. A tetthelyen vett minta genetikai ujjlenyomata a 2. számú gyanúsítottéval egyezik, a tettes azonosítható. Az ilyen azonosításokat a bíróságok akkor fogadják el bizonyítékként, ha elég sok sáv (= DNS darab) egyezik. A legmodernebb eljárásoknál kilenc szakasz egyezését vagy eltérését vizsgálják.