

1.1. POLIMERÁZ LÁNCREAKCIÓ (PCR)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

A DNS in vitro sokszorosítása

Szükséges:

- Az „alap” DNS, ~1 ng (nanogramm, 10^{-9} g) elég
- 2 primer (10-20 bázisnyi oligonukleotid, ld kés bb)
- DNS polimeráz enzim (h álló, gyors, pontos)
- Nukleotidok - a DNS felépítéséhez
- Pufferoldat - a megfelelő kémiai környezetet biztosítja.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

4

= a DNS in vitro sokszorosítása

A DNS lemásolása enzimesen n-szer: 2^n kópia keletkezik
→ ciklikus m kódés

K. Mullis 1983 (Nobel-díj: 1993)

Csak egy rövid szakaszt (~10 kb) tud sokszorosítani.

A DNS „olvadása”: magas h mérsékleten (90 - 95 fok) a kett s szálú DNS szálai szétválnak (a hidrogén-kötések a bázisok között elengednek)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

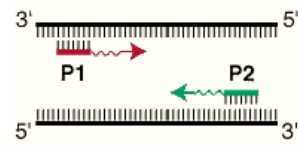
2

Primerek

A primerek olyan rövid, egyes szálú DNS darabkák, amelyekkel „megcímkézzük” a sokszorosítandó génszakasz két végét. A DNS polimeráz innen „folytatja” az új lánccsintézisét. Mindkét szálra külön primert kell illeszteni, a génszakasz 3' végére (= primer-pár).

Komplementer módon illeszkednek az „alap” DNS-hez.

A primereket a DNS ismeretében (adatbankok) megtervezik és laboratóriumban szintetizálják. (Meg lehet rendelni.)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Mire alkalmas a PCR?

Parányi mennyiség DNS vizsgálatára.

- Személyazonosítás: „genetikai ujjlenyomat”, a két DNS mintát azonos módon feldarabolják (RE) és a darabokat sokszorosítják. Minél több azonos darabot találnak, annál biztosabb az azonosság. (B ngyi, apasági vizsgálatok)
- Örökletes, genetikai betegségek, mutációk kimutatása
- Fert z betegségek kimutatása (a baktériumok, vírusok kimutatása nagyon korai stádiumban)
- si DNS vizsgálata (mamut, fáraók, Ötzi)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

3

A duplikációs ciklus



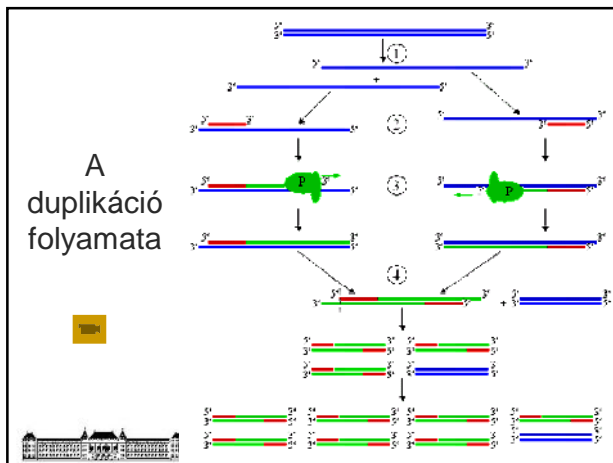
1. Denaturálás: 92-94 °C-on a DNS szálai szétválnak. Id tartama: indításnál ~5 perc, a kés biekben 30-120 mp
2. Primerek kapcsolódása (annealing): 50-70 °C-on, 30-120 mp
3. DNS szintézis: a DNS polimeráz szintetizálja a komplementer szálát, 72 °C-on, id tartama a génszakasz hosszától függ (~ 1000 bp/perc)

Egy ciklus id tartama 5-10 perc, a kiértékelhet eredményhez 20-30 ciklusra van szükség



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

6



Mit kezdünk a felszaporított DNS-sel?

Megvizsgáljuk a

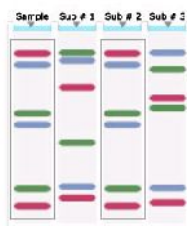
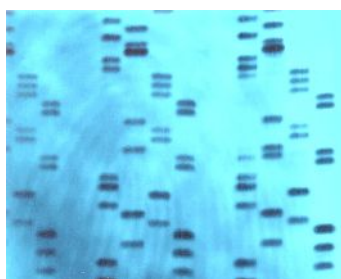
- Jelenlétét - ha megjelenik, igazolni lehet pl. fert. zéseket
- Mintázatát – azonos primerek különböző DNS-ekb. különböző hosszúságú szakaszokat fognak közre, és szaporítanak - ezek méreteloszlása nagyon jellemző = „genetikai ujjlenyomat”
- Bázissorrendjét – tökéletes azonosításra, illetve pontmutációk kimutatására alkalmas



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

8

DNS-mintázatok - elektroforézis



The results indicate that Subject #2 is an exact match to the DNA present at the crime scene.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

9