

# **1.1. POLIMERÁZ LÁNCREAKCIÓ (PCR)**

**(A DNS mesterséges lemásolása a sejten kívül,  
„kémcsőben” = „in vitro”)**

# Sejt: önfenntartó és önmagát sokszorozó „gépezet”

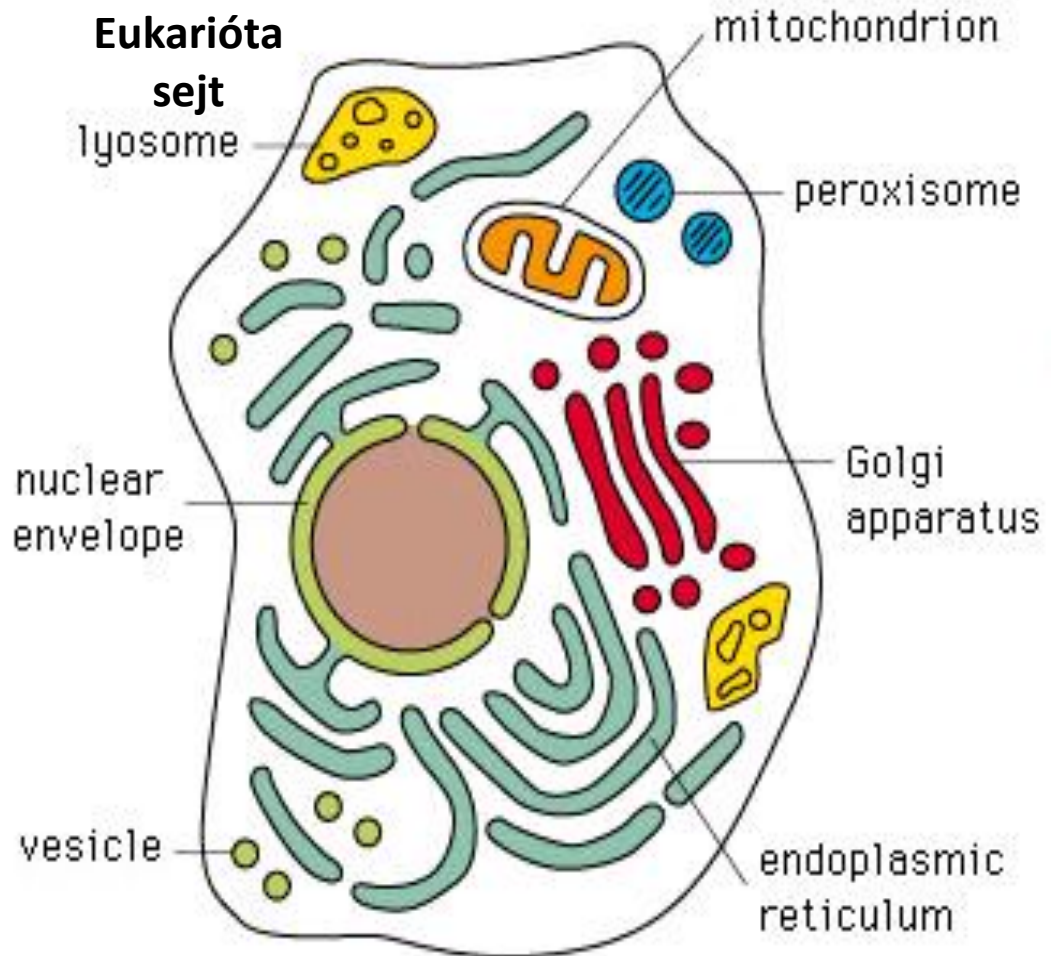
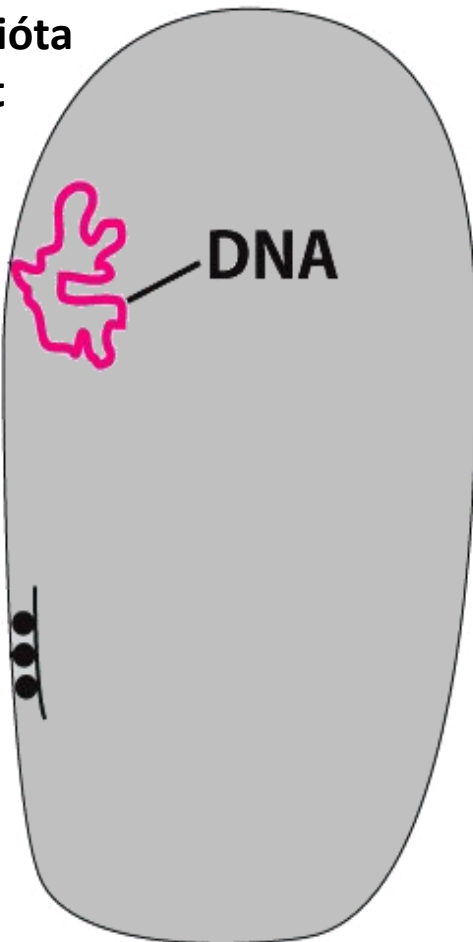
**DNS:** „könyvtár”, a sejt felépítésére vonatkozó információt tárolja

**RNS:** az információ szállításában és feldolgozásában vesz részt

**Fehérjék:** a DNS-ben kódolt információ alapján felépülő gépezetek, a sejtben zajló folyamatok motorjai.

**Membránok:** határoló- és „munkafelületek” (lipidek ~ zsírszerű anyagok)

**Prokarióta sejt**



# A DNS lemásolása (replikáció) és átírása (transzkripció)

Mit lehet csinálni a DNS-sel? → Megőrizni és felhasználni, vagyis lemásolni és a DNS-ről RNS átírásán keresztül fehérjéket előállítani.

**Transzkripció: RNS átirat készítése a DNS-ről.**

Lényegében a DNS-ben kódolt információ kinyerése fehérjék előállítása (fehérje szintézis) céljából.

Két lépésben:

1. Átírás (transzkripció) DNS-ről mRNS-re.
2. Fehérjeszintézis (lefordítás, traszláció) mRNS-ről fehérjére (aminosav lánkra).

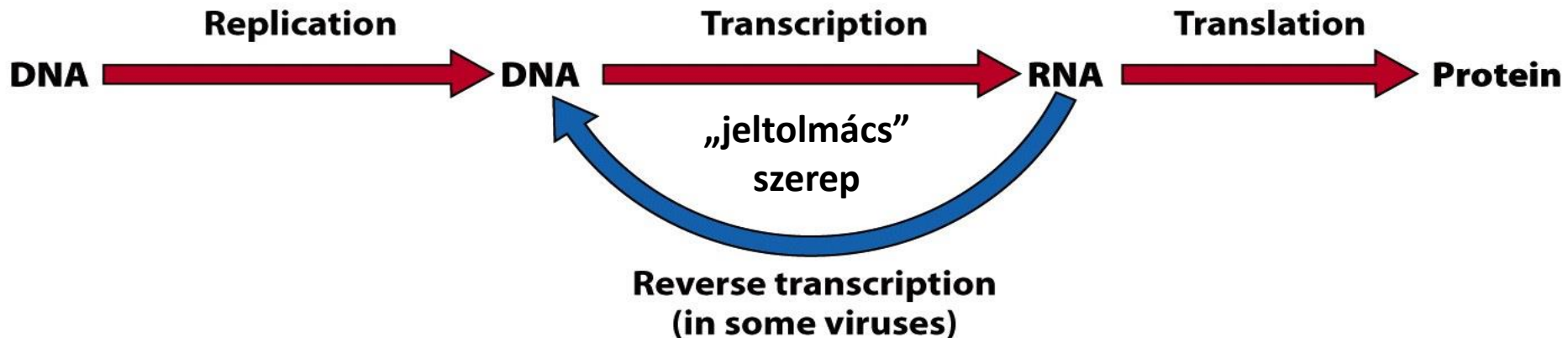
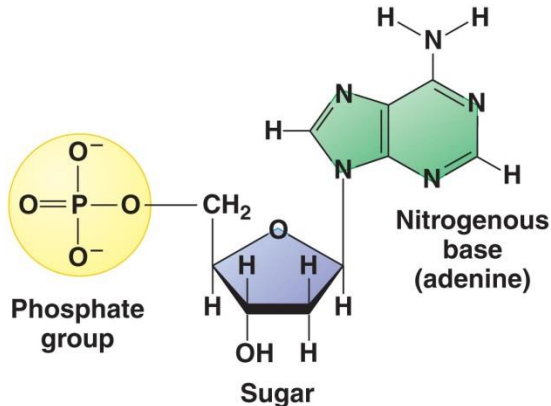


Figure 7-3 Microbiology, 7/e  
© 2008 John Wiley & Sons

~ úrhajózáshoz hordozó rakéta

**Az RNSeK közvetítő molekulák a DNS leolvasás és a fehérje felépítés között.**

# A DNS szerkezete



4 építőkö: A, G, T, C → „A 4 **bázis**”

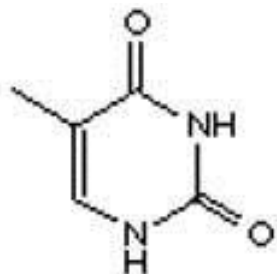
Nukleotid: „Bővített alapegység” a 4 építőkö valamelyikével

„Bővített alapegység” = Cukor-foszfát alaplánc.

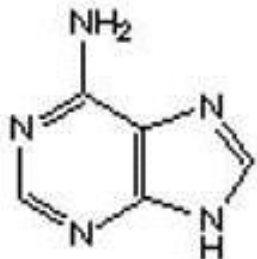
A DNS-nek iránya van.

Egy nukleotid a 4 közül (dAMP)

Hogyan kódolják az építőkövek az információt?

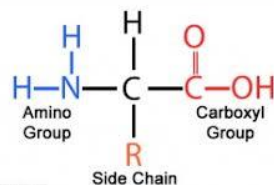


Thymine (T)

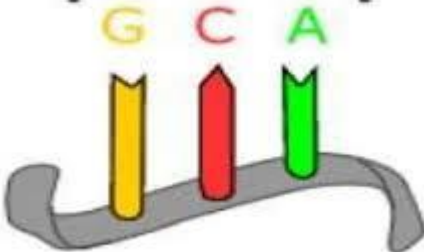


Adenine (A)

Amino Acid Structure



codon



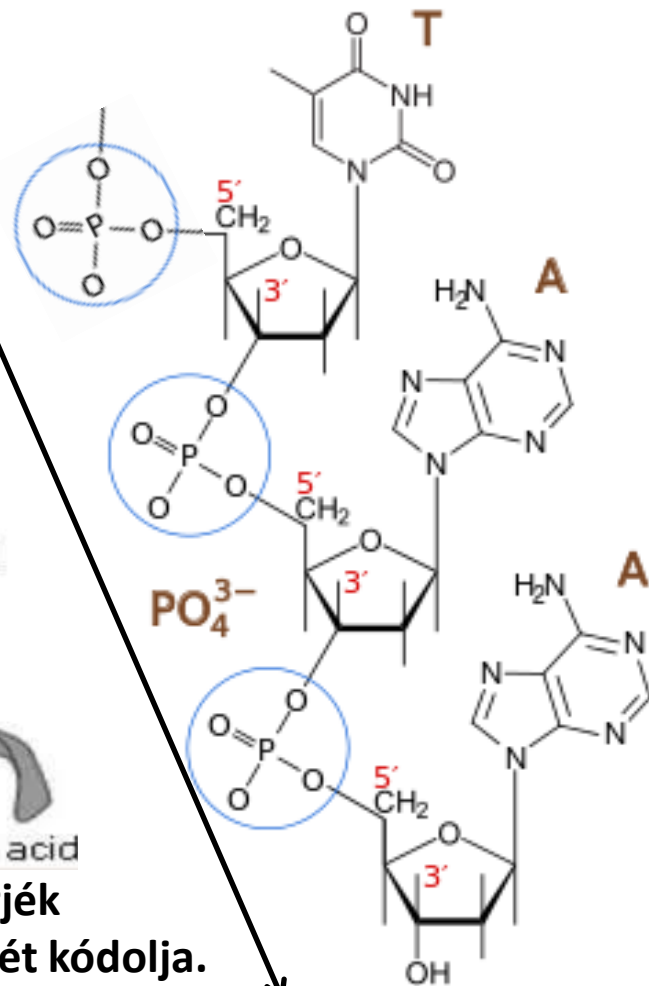
1 codon = 1 amino acid

A DNS a fehérjék

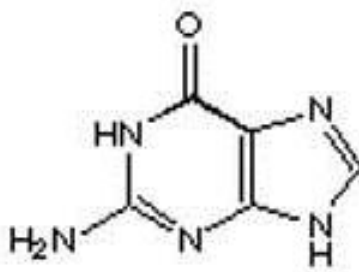
(és RNS-ek) felépítését kódolja.

3 bázis = a kód alapegysége (kodon) 3'

1 kodon ~ egy aminosav



Cytosine (C)



Guanine (G)

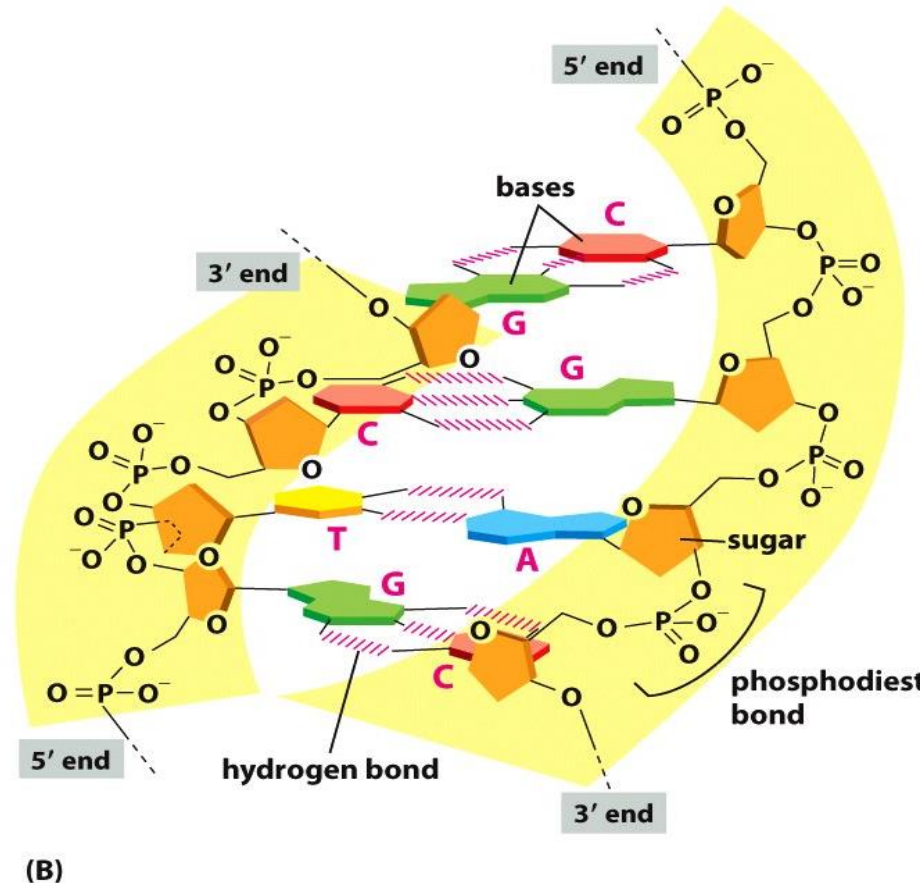
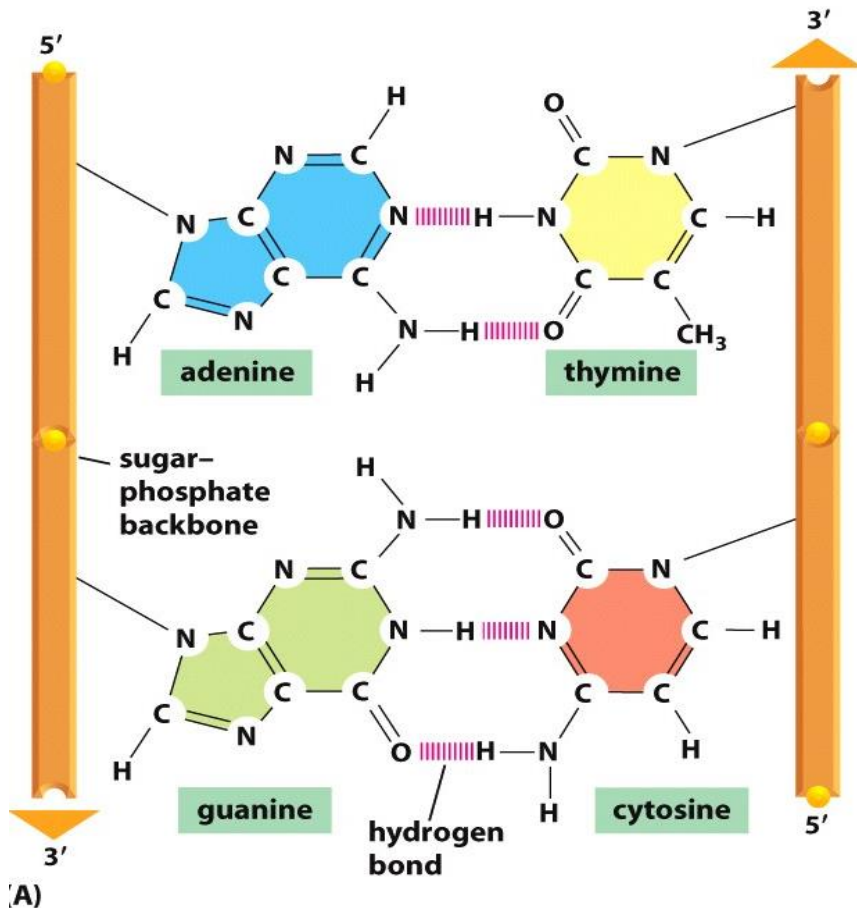
A DNS-t felépítő 4 bázis

# A DNS szerkezete

DNS: a fehérjék felépítését kódoló „könyvtár”. Az információt a 4 bázis sorrendje kódolja. Nem kölcsönöz, csak helyben olvasást biztosít.

A könyvek be vannak csukva → kettős szál hidrogén – kötésekkel összetartva.

Lemásolásához vagy leolvasásához a könyvet „ki kell nyitni”. → a két szálát szét kell választani.

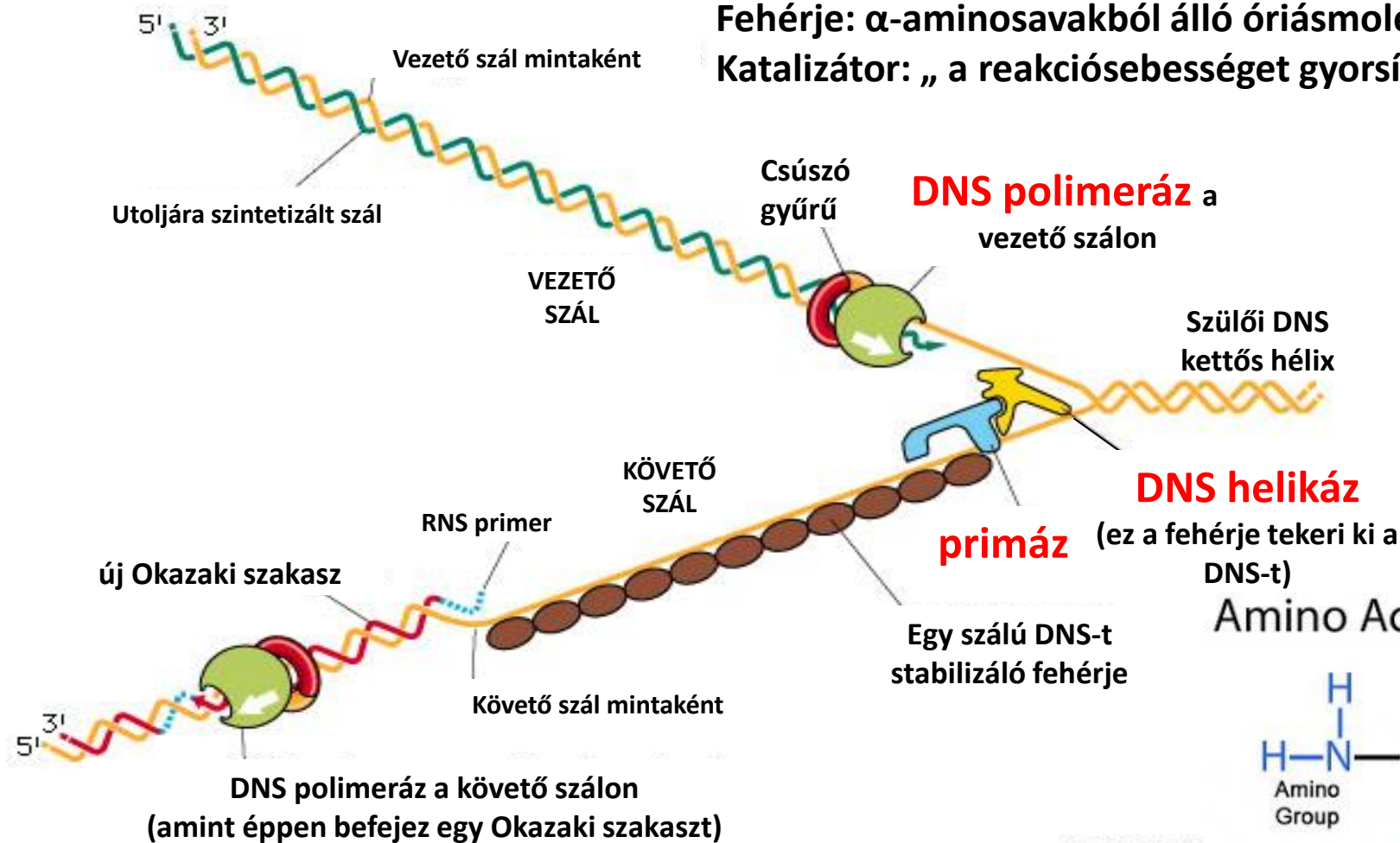




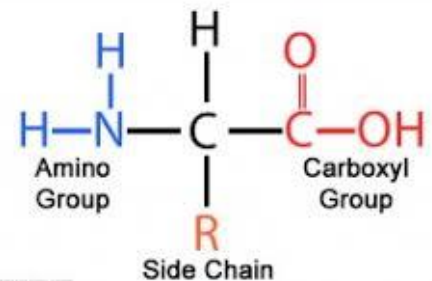
# A DNS másolása (DNS replikáció) a sejtben

A sejt szaporodásához van rá szükség. A DNS lemásolását a sejt osztódása követi. A sejtben ezt a folyamatot (szálak szétválsztása és másolás) **enzimek** végzik. Enzim: **fehérje, katalizátor**, a sejtben zajló biokémiai folyamatok kivitelezője.

Fehérje:  $\alpha$ -aminosavakból álló óriásmolekula.  
Katalizátor: „ a reakciósebességet gyorsító” molekula.



## Amino Acid Structure



# A DNS mesterséges másolása a sejten kívül

## Polimeráz láncreakció (polymerase chain reaction, PCR)

Sejten kívüli, „in vitro” folyamat.

Mi magunk végezzük speciális kémcsövekben.

Miért láncreakció?

A DNS lemásolása enzimesen n-szer:

$2^n$  kópia keletkezik → ciklikus működés,

Exponenciális növekedése a DNS másolatoknak.

Mit kell hozzá csinálnunk?

0. Vegyünk egy tetszőleges DNS szakaszt. Ehhez jelöljük ki a szakaszon a másolás kezdeti és végpontját!
1. Válasszuk el egymástól a két DNS szálát.
2. Másoljuk le a kívánt DNS szakaszt.
3. Tekerjük újra össze a két DNS szálát.
4. A kívánt DNS mennyiség eléréséig ismételjük az 1-3. lépéseket!



**Kary Mullis, 1983**  
**(Nobel-díj: 1993)**

Megj.: Mullis cége – ahol dolgozott – szerzett nagy bevételt a felfedezésből, a kutató számára csak a Nobel-díj hozta meg a megfelelő anyagi elismerést.

A sejtben a DNS másolás minden lépése enzimekkel zajlik.

De mi használhatunk fűtést a DNS kitekeréséhez és hűtést a visszatekeréshez!

A DNS másolást viszont nekünk is enzimmel – **DNS polimerázzal** – kell megoldanunk.

A DNS másoláshoz – a PCR reakcióhoz szükségünk van:

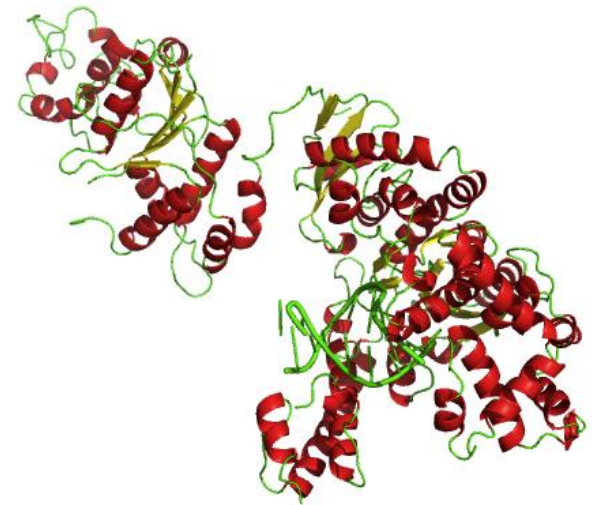
- Egy termosztátra.
- Egy HŐSTABIL enzimre.
- Megfelelő reakció közegre (pufferre és  $Mg^{2+}$  kofaktorra az enzim működéséhez).
- Alapanyagra a DNS felépítéséhez: nukleotidok (dATP, dTTP, dGTP, dCTP).
- A másolás kezdetőpontjainak kijelölésére. Ehhez a **primereket** használjuk.



PCR készülék – a termosztát



*Thermus aquaticus* (Taq)  
Baktérium, hőforrások,  
Yellowstone N. Park

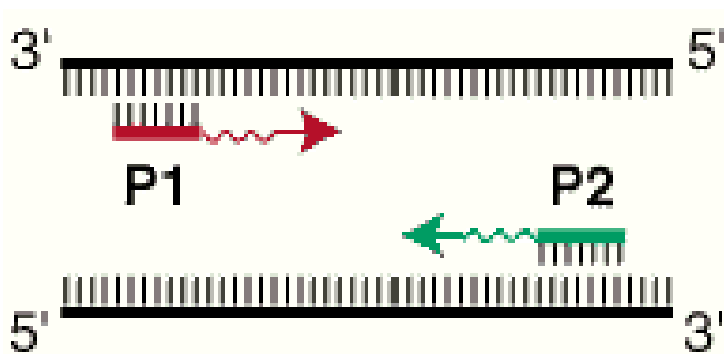


Taq polimeráz  
Egy hőstabil enzim.  
(Elsőként 1976-ban izolálták.)



## 0. A másolás kezdőpontjainak kijelölése → Primerek

- A primerek olyan rövid, egyes szálú DNS darabkák, amelyekkel „megcímkézzük” a sokszorosítandó génszakasz két végét. A DNS polimeráz innen „folytatja” az új lánc szintézisét. Mindkét szálra külön primert kell illeszteni, a génszakasz 3' végére (= primer pár).
- A sejtben történő DNS másoláshoz is kellenek primerek, mert a DNS polimeráz nem képes nélkülük megkezdeni a másolást.
- A sejtben a primerek rövid RNS szakaszok, de a PCR reakcióhoz DNS primereket használnak, mert ezek stabilabbak.
- Komplementer módon illeszkednek a másolandó DNS-hez.
- A primereket a DNS ismeretében (adatbankok) megtervezik és laboratóriumban szintetizálják. (Meg lehet rendelni.)



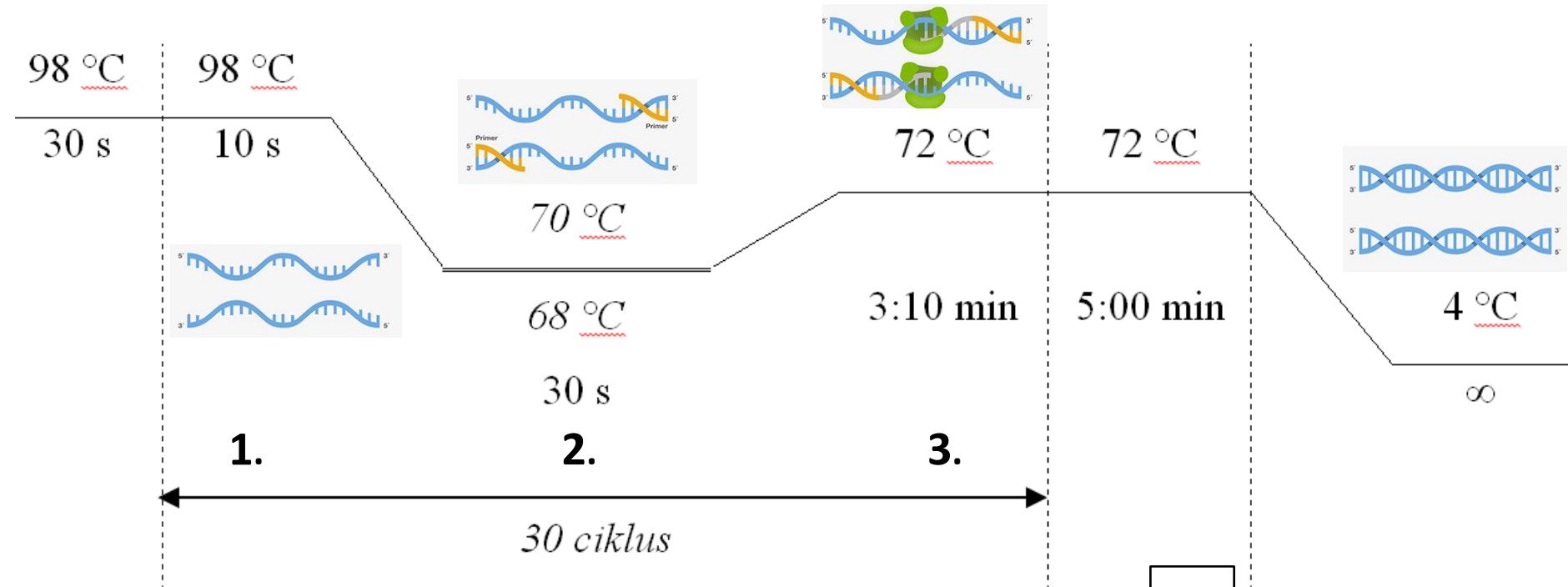
P1, P2: primerek  
Miért kettőt használunk?

# 1-3.: a polimeráz láncreakció (PCR) másolási (duplikációs) ciklusai

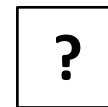
A sejtben a DNS másolás minden lépése enzimekkel zajlik.

De mi használhatunk fűtést a DNS kitekeréséhez és hűtést a visszatekeréshez!

A DNS másolást viszont nekünk is enzimmel – **DNS polimerázzal** – kell megoldanunk.



1. DNS kitekerése = a két szál elválasztása
  2. Primerek betapadása = a másolás kezdőpontjainak kijelölése
  3. DNS szintézis = a két szál lemásolása
- [1. + 2. + 3.] = 1 ciklus



Kibírja ezt a DNS?  
És az enzim?  
Miért kell több ciklus?  
Mik azok a primerek?

# A duplikációs ciklus



D:\Dropbox\  
ok\Biotech TTA\0:

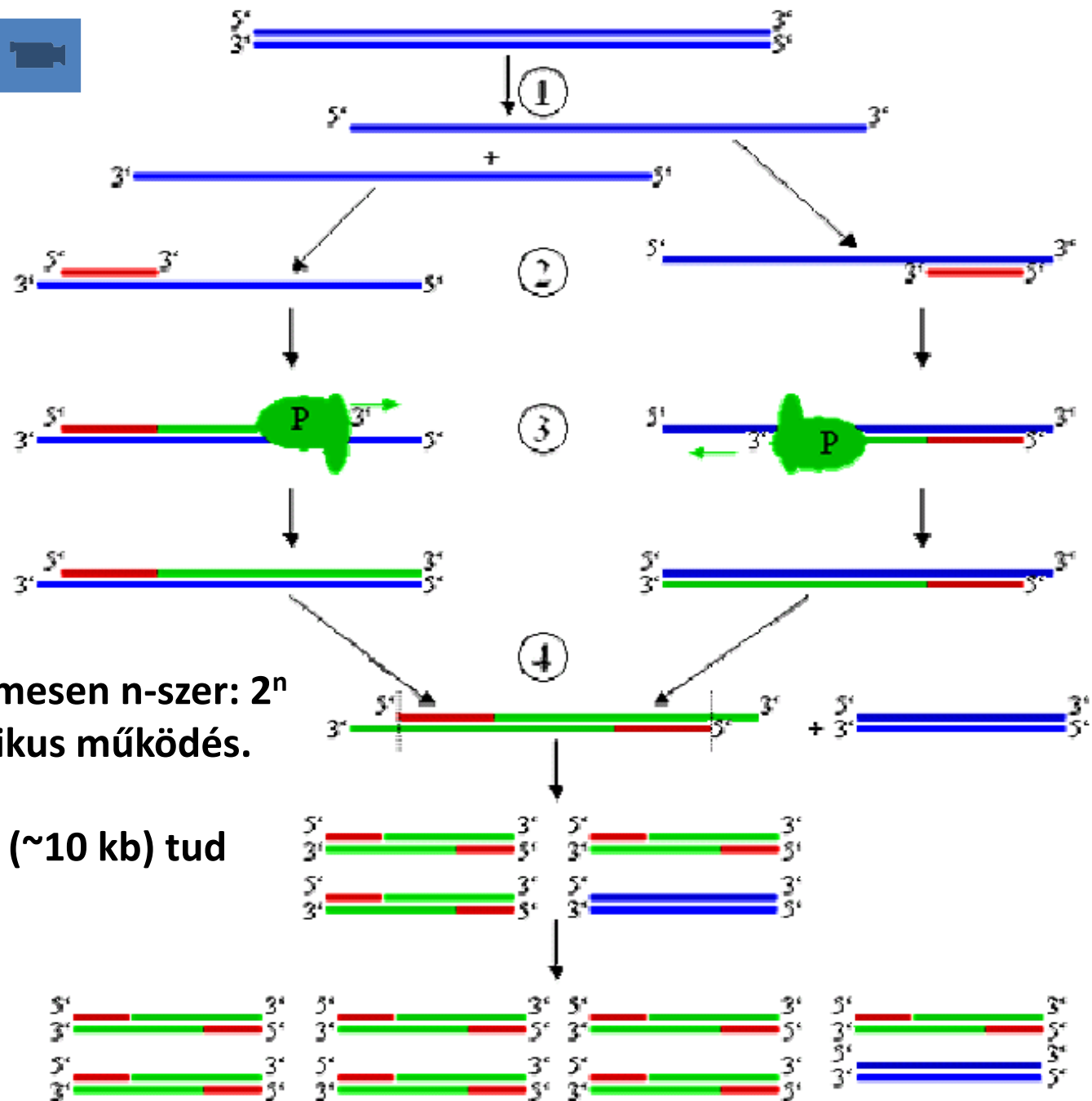
1. Denaturálás: 92-98 °C-on a DNS szálai szétválnak.  
Időtartama: indításnál ~5 perc, a későbbiekben 30-120 mp
  2. Primerek kapcsolódása (annealing): 50-70 °C-on, 30-120 mp
  3. DNS szintézis: a DNS polimeráz szintetizálja a komplementer szálát, 72 °C-on, időtartama a génszakasz hosszától függ (~ 1000 bp/perc)
- Egy ciklus időtartama 5-10 perc, a kiértékelhető eredményhez 20-30 ciklusra van szükség

# A duplikáció folyamata

A primerekkel kijelölt DNS szakasz másolatok száma exponencionálisan növekszik!

A DNS lemásolása enzimesen n-szer:  $2^n$  kópia keletkezik → ciklikus működés.

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



# Mit kezdünk a felszaporított DNS-sel?

## ➤ **Megvizsgáljuk a**

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

## ➤ **Felhasználjuk**

- Sokszor a PCR reakció az első lépés egy fehérje mesterséges, sejten kívüli (pl. gyógyászati célú) előállításához.
- Vagy a mesterségesen előállított fehérje további módosításához, mesterséges mutáció létrehozásához.

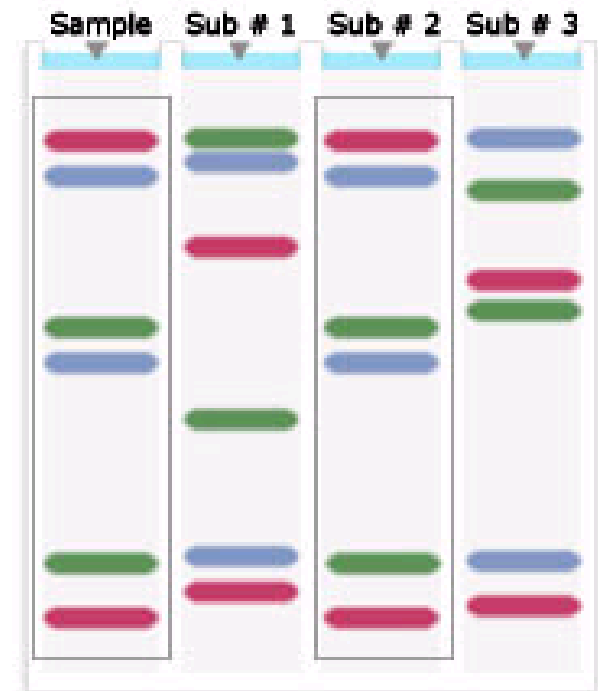
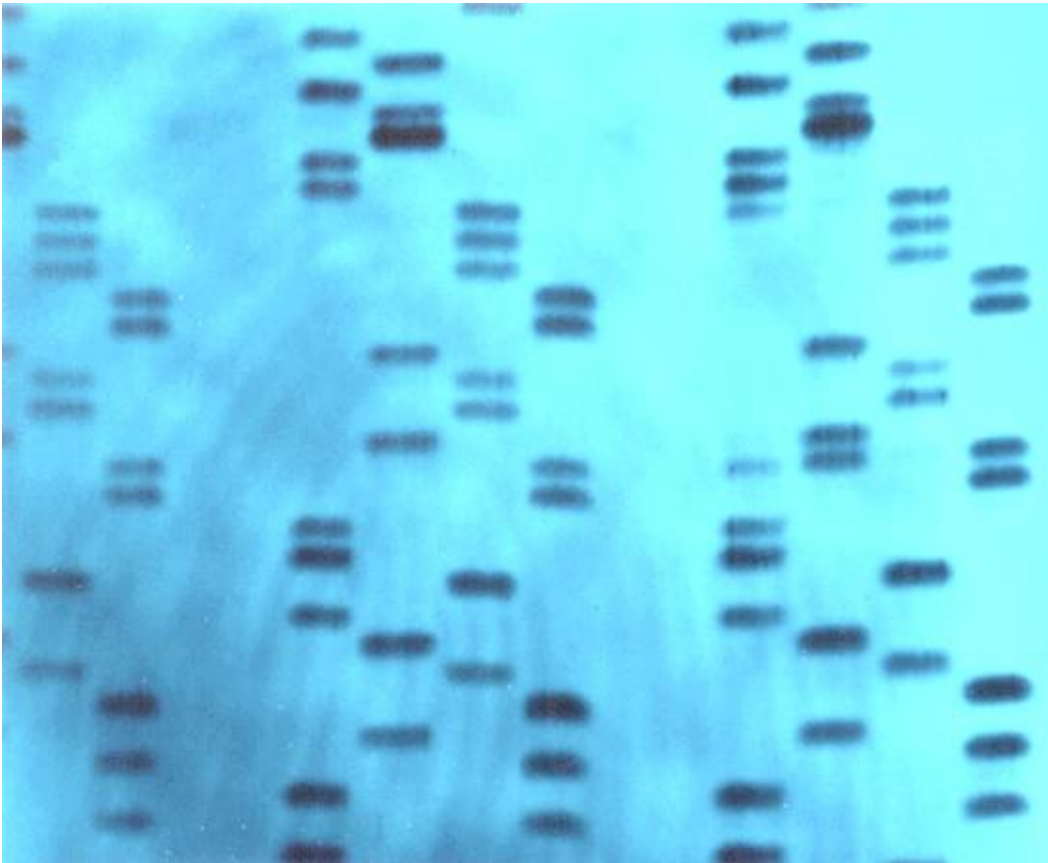


# Mire alkalmas a PCR?

- Parányi mennyiségű DNS vizsgálatára.
  - Személyazonosítás: „genetikai ujjlenyomat” → két összehasonlítani kívánt DNS mintát azonos módon feldarabolnak, majd a darabokat PCR-rel sokszorozítják. Ezek méreteloszlása egyénenként nagyon jellemző. Minél több azonos darabot találnak, annál biztosabb az azonosság. (Bűnügyi, apasági vizsgálatok)
  - Örökletes, genetikai betegségek, mutációk kimutatása
  - Fertőző betegségek kimutatása (a baktériumok, vírusok kimutatása nagyon korai stádiumban)
  - Ősi DNS vizsgálata (mamut, fáraók, Ötzi)

# Személyazonosítás DNS mintázatok segítségével (elektroforézis)

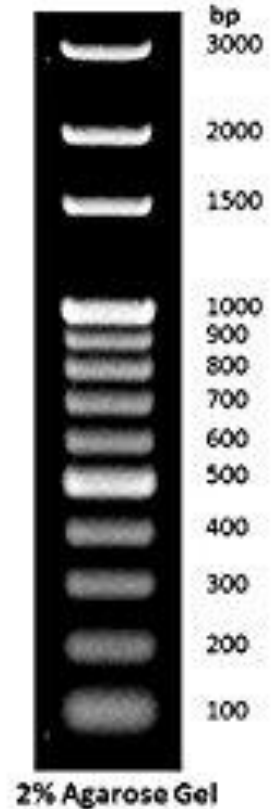
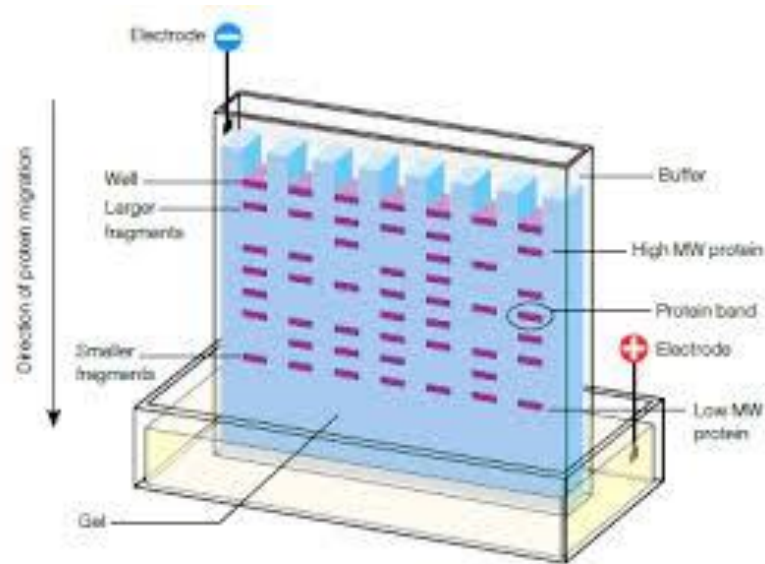
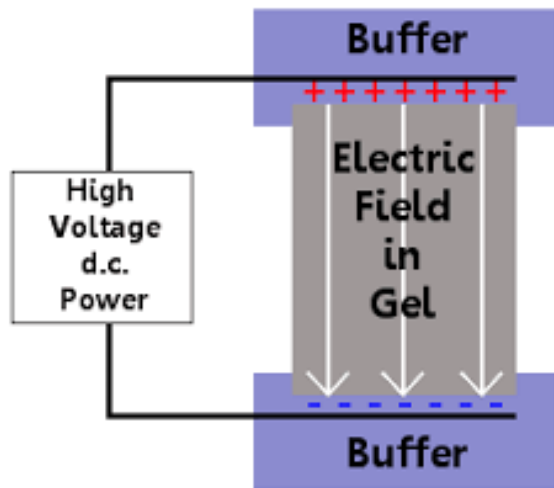
-



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

+

# Hogyan működik az elektroforézis?



- A DNS a foszfát csoportok jelenléte miatt negatív töltésű.
- Ha a mintát gélbe helyezzük és egyenáramot kapcsolunk rá,
- majd ezt vizes (pufferes) közegbe helyezve zárjuk az áramkört → a DNS a pozitív pólus felé vándorol.
- A kisebb szakaszok gyorsabban, a nagyobbak lassabban vándorolnak. → elválaszthatók.
- Ha van egy viszonyítási pontunk a szakaszok méretéhez (referencia), akkor azok hozzávetőleges méretét is meghatározhatjuk.