

A PCR TECHNIKA ÉS ALKALMAZÁSI TERÜLETEI

Polimeráz láncreakció

Tetszőleges DNS-szakaszról (templát) rövid idő alatt korlátlan számú másolatot készíthetünk két iniciáló oligonukleotid (primer) és a DNS-polimeráz enzim segítségével. A reakció három lépcsőből áll.

- Elsőként a duplaszálú templát DNS szálait hődenaturációval elválasztjuk egymástól.
- A második lépésben a hőmérséklet csökkentésével lehetővé tesszük a primerek (oligók) templát DNS-hez kapcsolódását (annealing).
- A harmadik lépés során a polimeráz enzim az egyszálúvá denaturált templáthoz kapcsolódó primerek végeit meghosszabbítja (elongáció) és eközben elkészíti a templát DNS kiegészítő szálát.

Ha a denaturációs annealing és elongációs lépést ismétljük, a polimeráz az újonnan elkészített szálakat is templátként használja, és így a keletkezett DNS mennyisége exponenciálisan növekszik.

Az első kísérleteket *E. coli*-ból származó DNS polimeráz alegységgel végezték, amely azonban hevítéskor denaturálódott, így minden ciklushoz friss anyagra volt szükség. Ezért ma már a hőstabil pl. *Termus aquaticus*-ból nyert DNS-polimerázt (*Taq*-polimerázt) használják.

Szelektív módszer, előnye a hagyományos technikákkal szemben, hogy speciális DNS fragment, ezáltal egy adott organizmuscsoport illetve organizmus vizsgálatát teszi lehetővé. A speciális, kiválasztott DNS szekvencia amplifikációja enzimes reakciók ismétlődésével, in vitro körülmények között megy végbe. Minden egyes PCR ciklusban a DNS mennyisége a reakcióelegyben duplázódik, azaz 25-30 ciklus után 10^6 -szorosa a kezdeti DNS mennyiségnek. A reakció végterméke gélelektroforézissel vizsgálható.

Érzékeny módszer, néhány DNS kópia jelenléte esetén is kimutatható a keresett szekvencia. A módszer egyben univerzális is, így például a mikroorganizmusok bármely mintában detektálhatóak.

PCR alkalmazási területei

A PCR speciális alkalmazásával meghatározható a target DNS mennyisége környezeti mintákban. Mérhető a mikroorganizmusok száma, feltéve, hogy a target DNS kópiaszáma a sejten belül ismert. Detektálhatóak a kapcsolt gének csoportjai is, ezáltal a funkcionális vagy taxonómiai szempontból rokon mikroorganizmusok. Ez utóbbi esetben a primerek a DNS konzervált régiójához kapcsolódnak a 16S rDNS ill. 23S rDNS-en belül. PCR alkalmazásával a szennyezőanyagok degradációs útvonalai is vizsgálhatóak, pl. aromás gyűrűs vegyületek dioxigenáz enzimeit kódoló gének detektálhatóak. A PCR összekapcsolható reverz transzkriptáz reakcióval, ezáltal lehetővé téve mRNS-ek ezen keresztül mikroorganizmusok aktivitásának mérését.

PCR módszerrel létrehozhatóak egyszálú v. kétszálú hibridizációs DNS próbák, amelyeket környezeti minták vizsgálatára lehet használni. Radionukleotidokkal előállított próbák hibridizációját szcintillátorral kvantitatívan lehet analizálni. Egyszálú DNS próbát egy primer hozzáadásával lehet létrehozni, ez esetben aszimmetrikus amplifikáció játszódik le, ahol nincs szükség felfűtési szakaszra.

Enzimek termelődésének vizsgálata

Környezeti mintákban speciális enzimek termelődése vizsgálható a genomi DNS adott enzimet kódoló konzervált régiójára, vagy plazmidok szekvenciájára tervezett primerekkel.

Például pJP4-es plazmidből nyert primerekkel végzett PCR-rel több különböző faj 2,4-dikloro-fenoxi-ecetsav degradatív potenciálja együttesen becsülhető.

Az éppen expresszálandó fehérjék vizsgálatára alkalmas a néhány perc élettartamú mRNS-ek RT-PCR-rel történő amplifikálása.

Mikrobiális diverzitás vizsgálata

16S rDNS amplifikációjával, majd restriktions fragmenthossz-polimorfizmus módszerével és a specifikus sávok szekvenálásával környezeti minták mikrobiális diverzitása vizsgálható. A 16S rDNS szekvenciákat a konzervált régiókra tervezett univerzális primerekkel lehet amplifikálni.

A PCR termékek tovább vizsgálhatóak denaturáló gradiens gél elektroforézissel (DGGE) illetve hőmérséklet gradiens gél elektroforézissel (TGGE), melynek során a különböző A+T illetve G+C tartalomnak megfelelően válnak el a kétszálú DNS-ek egyszálúvá.

Nested-PCR és multiplex-PCR eljárásokkal vizsgálható egy környezeti minta mikrobiális közössége.

DNS fingerprint készítése PCR-rel

Számos eljárás létezik mikroorganizmus DNS fingerprint készítésére baktériumok identifikálására, alfajok meghatározására izolált mikrobákból. Ilyen módszer, pl. az AP-PCR, amelynek egy 10 bázis hosszúságú random primerrel a mikrobiális genom több szekvenciája amplifikálódik, és standard körülmények esetén az adott mikroorganizmusra jellemző komplex DNS sávminta jelenik meg a gélen.

Gyakrabban alkalmazott eljárás a repetitív szekvenciákra tervezett (általában 20 bázis hosszúságú) primerekkel végzett amplifikáció, melynek során szintén fajra jellemző DNS ujjlenyomat látható az elektroforetikus képen. (Ilyen módszerek, pl. a REP, a repetitív intergén palindrom szekvenciákra tervezett PCR.)

DNS mennyiségi meghatározása PCR-rel

Ismert mennyiségben a környezeti mintához adott kontroll templáttal és külön primerrel végzett PCR-rel a vizsgálni kívánt target szekvencia és a belső standard templát együtt amplifikálható, majd a termékek gél elektroforézissel elválaszthatóak. A sávok intenzitása denzitóméterrel összehasonlítható, kalibrációs görbe alapján pedig a templát mennyiségére lehet következtetni.

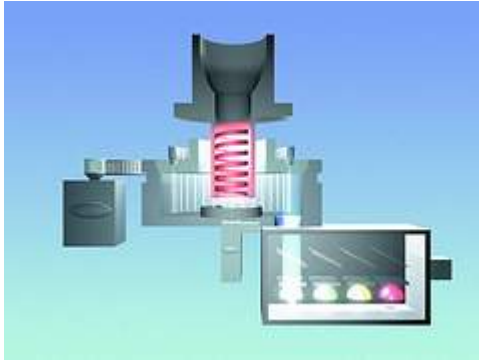
Másik lehetőség DNS kvantifikálására a HPLC-vel történő meghatározás, a meghatározandó minta addícióját követően.

A Real-time PCR technika bemutatása a LightCycler™ System működésén keresztül:

ultragyors, real-time, on-line detektálású kvantitatív PCR rendszer

A műszer működési elve:

A **LightCycler™** egy csúcsmínőségű Rodenstock fotométerrel kombinált gyors thermocycler, melyben a fűtés és hűtés szabályozása forró és hideg levegő váltakozó alkalmazásával történik. A hőátadó közeg alacsony tömege miatt, ezzel az eljárással rendkívül nagy hőátadási sebesség érhető el (20°C/sec). A rendszer ugyanakkor reakcióedényként bórszilikát kapillárisokat használ, melyekben a nagy felszín/térfogat arány miatt nagyon hatékony a hőátadás. Az alkalmazott hőátadó közeg és a bórszilikát kapillárisok együttesen teszik lehetővé az ultra-gyors ciklusváltásokat.



A LightCycler™ teljesítménye: 30-40 PCR ciklus 20-30 perc alatt, detektálással.

A bórszilikát kapillárisok egyidejűleg szignál-gyűjtő optikai elemként is szolgálnak, a száloptikához hasonlóan vezetve és a kapilláris hegyére

koncentrálva a reakció során keletkező fényjeleket, lehetővé téve a mikrotérfogatú minták fluoreszcens monitorozásához elegendő fénykibocsátást.

A minták a mintatárcsába kerülnek, mely 32 kapillárist képes egyszerre befogadni. A mintatárcsa a mintabetöltéshez a műszerből kiemelhető.

A **LightCycler™ System** tartozéka egy felhasználóbarát szoftverrel ellátott PC is, ami biztosítja az analízis egyszerű és pontos kivitelezését. A műszer a Windows NT / 2000 operációs rendszer alatt működő PC-n keresztül üzemeltethető.

A hőciklusok alatt az egyes kapillárisokban lezajló reakció monitorozása on-line úgy történhet meg, hogy egy precíziós léptető motor a (zárt) kapillárist, adott időközönként, a mintatárcsa elforgatásával, pontosan a fluoriméter optikája fölé juttatja, a fluoreszcencia mérése céljából.

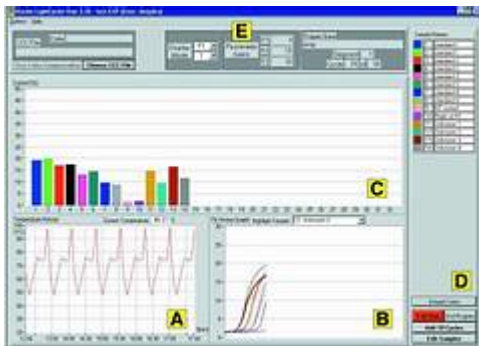
A fluoriméterben egy maintenance-free LED fényforrás (470 nm) valamint három (530 nm, 640 nm, 710 nm) szűrő található, ez utóbbiak háromszínű azaz multiplex detektálást, tesznek lehetővé.

A szoftver minden mérési pontban real-time megjeleníti a fluoreszcens jeleket. A mintából érkező jelek mérése tehát olyankor történik, amikor a kapilláris az optikai egység fölé kerül. A hőciklusok alatt a fluoreszcencia minden kapillárisban ciklusonként mérhető, a mért értékek a képernyőn azonnal megjelennek és minden ciklus után tovább íródnak (kinetikus görbe). A keletkező adatokat a számítógép a további elemzéshez tárolja.

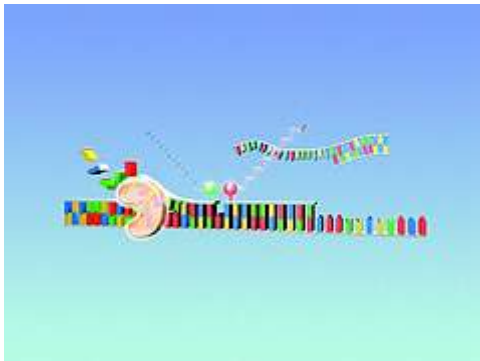
Detektálási technikák:

A rendszer alkalmas szinte az összes real-time detektálási technológia felhasználására, így SYBR-Green, FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer), TaqMan, Molecular Beacon, Scorpion, stb alkalmazások is futtathatóak rajta.

A **LightCycler™ System**-et leggyakrabban a következő két detektálási technikával használják.



1. A **SYBR® Green I** festék az etidium bromidhoz hasonlóan interkalálódó molekula amely a dupla szálú (ds) DNS-hez kötődik az amplifikáló elegyben. Bekötődve, adott monokróm fényvel indukálva 530 nm-s hullámhosszú fényt emittál. Az ebből keletkező mérhető fluoreszcens jel nagysága a PCR folyamán szaporodó dsDNS mennyiségével arányosan növekszik. Optimalizálásra kiválóan megfelel. Ez a megoldás nem igényel extra próbákat, ezért a relatíve olcsósága miatt népszerű.
2. A másik technika a **FRET**, amely **hibridizációs próbákat** használ. A normál PCR primerek mellett a PCR mix-hez két az amplifikátumra specifikusan bekötődő, festékekkel jelölt oligonukleotid próbát adnak, melyek az amplifikált fragmentum egy belső rövidebb szakaszának komplementerei. Az egyik próba 5' vége LightCycler™ Red fluorofór csoporttal jelölt, míg a másik próba 3' végén fluoreszcein jelölésű. A két próba a targethez hibridizálódva olyan közel kerül egymáshoz, hogy fluorofórjaik között létrejön a FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) folyamata. A FRET közben a donor-fluorofórt (a fluoreszceint) a LightCycler™ fényforrása gerjeszti. A gerjesztési energia egy része átadódik a LightCycler™ akceptor fluorofórjának, ami kétféle lehet: LightCycler™ Red 640 vagy LightCycler™ Red 700, melyekből az emittált fluoreszcencia megfelelő hullámhosszon mérhető és arányos a reakcióelegyben lévő specifikus targetszekvencia aktuális mennyiségével. A próbák specifikussága miatt tökéletesen alkalmas genotipizálásra, mivel pedig minden amplifikátumhoz csak egy próbapár kötődik, ezért pontos mennyiségi meghatározás végezhető vele.



Alkalmazások:

A **LightCycler™** készülék felhasználási területei:

- ultragyors PCR
- a PCR termékek real-time mennyiségi elemzése
- specifikus PCR termékek detektálása, azonosítása
- mutáció detektálás, genotipizálás olvadáspont analízis segítségével

- multiplex PCR, polimorfizmus vizsgálata

Mennyiségi meghatározás - kinetikus méréssel, nagy pontossággal:

A fluoreszcencia mérése minden ciklusban megtörténik, így láthatóvá válik a reakció kinetikája, ami informatívabb, mint a reakciótermék mennyisége a végpontban (telített reakció). Az a ciklusszám, amelyenél a szignál eléri a logaritmikus PCR fázist, a target DNS (RNS) kiindulási mennyiségének függvénye. Ennek ismeretében lehetséges a target kiindulási mennyiségének pontos mérése, akár a SYBR[®] Green I festék, akár a hibridizációs próba segítségével történik a detektálás.

Olvadáspon-analízis a PCR termékek elemzésére:

Minden DNS fragmentumra jellemző az olvadásponja (T_m), mely definíciószerűen az a hőmérséklet, melyen az adott DNS fragmens 50%-a egyszálú. Az olvadásponot leginkább befolyásoló tényezők: a fragmens G+C tartalma, valamint hossza. A LightCycler[™] készülék a hőmérséklet fokenkénti emelése közben képes folyamatosan monitorozni a keletkező fluoreszcenciát. Amikor a kapillárisban a hőmérséklet eléri a vizsgált fragmens T_m értékét, a fluoreszcencia emisszió hirtelen csökkenni kezd, az alkalmazott fluoreszcens technikától függően, vagy azért, mert a (duplaszál-specifikus) SYBR Green I leválik az amplikonról, vagy azért, mert a hibridizációs próbák az amplikonról leolvadva már nincsenek többé energiaátadásra alkalmas közelségben.

Mire használható az olvadáspon analízis?

genotipizálásra vagy mutáció detektálására, mivel a hibridizációs próba és a target közötti mismatch a T_m csökkenését okozza,

termékek megkülönböztetésére, mivel a rövidebb termékek (pl. primer-dimerek) T_m értéke alacsonyabb mint a specifikus fragmensé,

a termék azonosítására, a termékspecifikus T_m érték kimérésével.

A Perkin-Elmer Corp. által kidolgozott TaqMan módszerrel még pontosabban meghatározható a minta DNS tartalma. Lényege, hogy egy, a két végén festékkel ellátott próba kapcsolódik a PCR termékhez a szekvencián belül. Amikor a két jelzés közel van egymáshoz, azaz ép próbákban, az egyik festék (signal) által emittált fluoreszcens fényt a próba másik végéhez kapcsolt festék (quencher) képes elnyelni. A 3' végén módosított próbát a Taq polimeráz nem képes meghosszabbítani. A templát amplifikációja során a próba 5' végével találkozó Taq polimeráz bázisról bázisra lebontja a próbát, a próba két végén levő festék távol kerül egymástól, és a signal jelzés emissziója detektálhatóvá válik. Az emisszió lineáris növekedését a kezdeti ciklusokban standard görbéhez lehet viszonyítani, és a kiindulási DNS mennyiséget lehet számolni.

Hasonló megoldás a DNS mennyiségi meghatározásában a SYBER Green fluoreszcens festék emissziójának vizsgálata. Ez a festék a kétszálú DNS-hez képes kapcsolódni, és minden ciklus végén mérve, a keletkezett termék aktuális mennyiségével arányos jelet ad. Előnye még ennek a Real-Time PCR módszernek, hogy az amplifikáció végén olvadási görbék felvételével pontosan ellenőrizhető a specifikus termék jelenléte, így könnyen optimalizálható az eljárás.

PCR alkalmazása igen elterjedt az orvosi diagnosztikában, genetikai betegségek kimutatásában, fertőzést okozó, patogén mikroorganizmusok detektálásában, igazságügyi orvosi vizsgálatoknál.

Az alkalmazás korlátai

A PCR alkalmazása környezeti mintákban nehézségekbe ütközik, mert a DNS polimerázt kémiai és fizikailag egyaránt gátolják a talaj komponensei, mint pl. talajkolloid szemcsék, amelyek egyrészt fizikailag gátolják a DNS és primer kapcsolódását, valamint stabilizálják a primer-dimer kapcsolatot. Szervetlen és szerves anyagok egyaránt kifejthetnek kémiai gátló hatás, pl. vastartalmú vegyületek, huminsavak. Ezért a reakció kivitelezéséhez nagyon tiszta DNS-re van szükség, és a mérés kvantitatívvá tételéhez speciális módszer szükséges. Kevés minta esetén nem jól reprodukálható az eredmény. A módszer hátránya ezen felül még, hogy mivel a DNS target keverékben van jelen, ezért eltérő lehet az amplifikációs hatékonysága (Pepper and Dowd, 2002).

Általános PCR protokoll

A standard 100•l-es PCR reakcióelegyet (összetételét a következő Táblázat mutatja) jégen tartott 0,5 vagy 0,2 ml-es polipropilén csövekbe kell összemérni. A csövek minősége rendkívül fontos a megfelelő hőátadás szempontjából. A 3. táblázat tartalmazza a standard PCR reakcióelegy összetevőit.

3. Táblázat Standard PCR reakcióelegy

Komponens	Mennyiség (•l)
H ₂ O	61,5-66,5
10x reakció puffer *	10
dNTP (1,25 mM)	16
Primer 1 (0,1 •g/•l)	1,0
Primer 2 (0,1 •g/•l)	1,0
Templát DNS	5-10
Taq (5 U/•l)	0,5
	• 100 •l

* A reakció puffer összetétele: 100 mM Tris-HCl (pH 8,3), 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂ 0,01 % zselatin.

Általános PCR hőmérsékletprogram

1. Denaturáció: 94 °C, 1,5 min
2. Primertapadás: 55-60 °C, 1min
3. Lánchosszabbítás: 72 °C, 1 min

25 ciklust követően 7-10 percig tartja 72 °C-on majd az enzimes reakciót 4 °C-ra hűtve állítja le.