

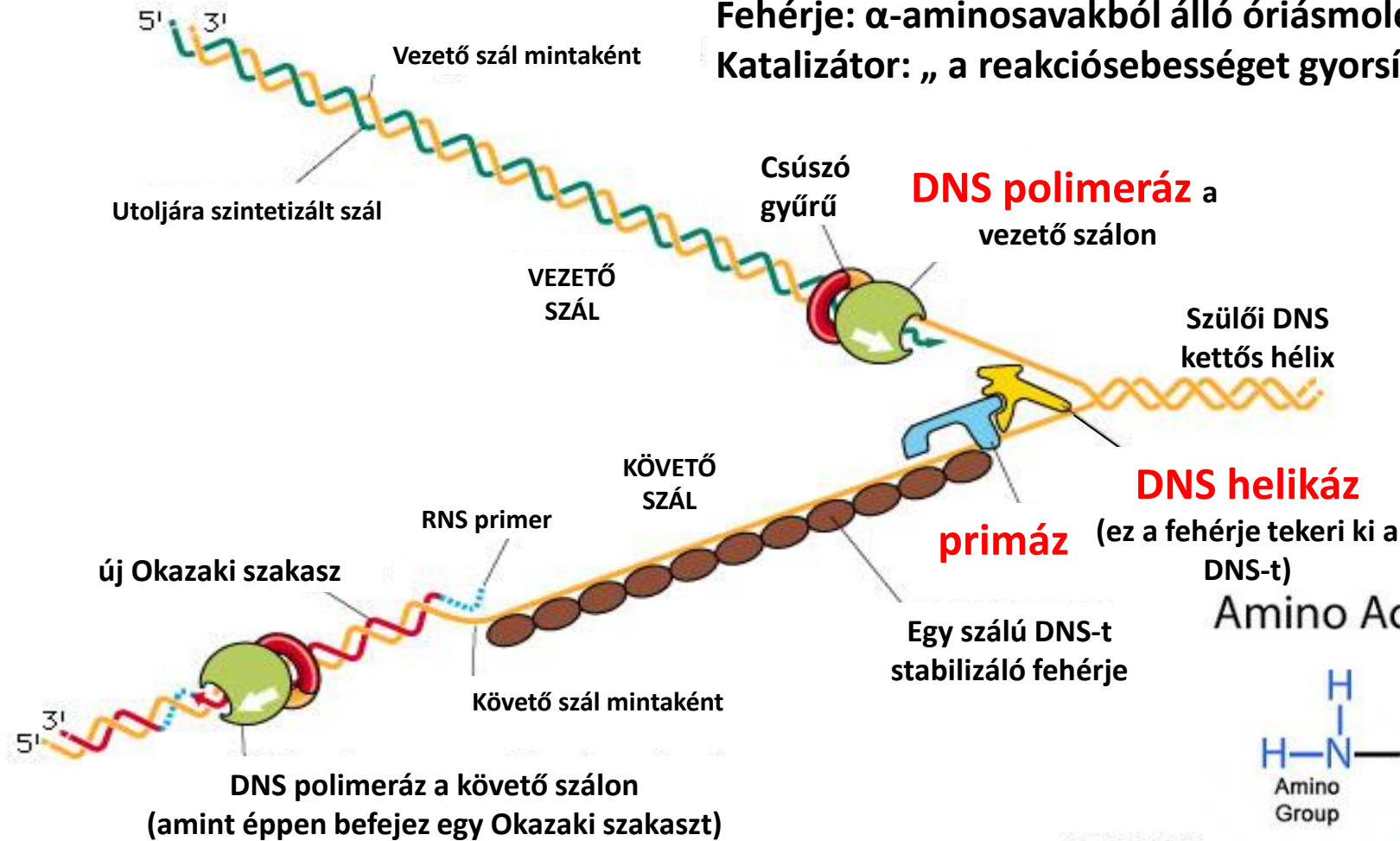
1.1. POLIMERÁZ LÁNCREAKCIÓ (PCR)

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

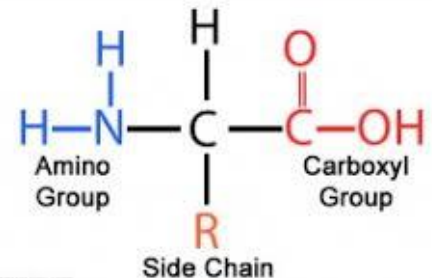
A DNS másolása (DNS replikáció) a sejtben

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: α -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!

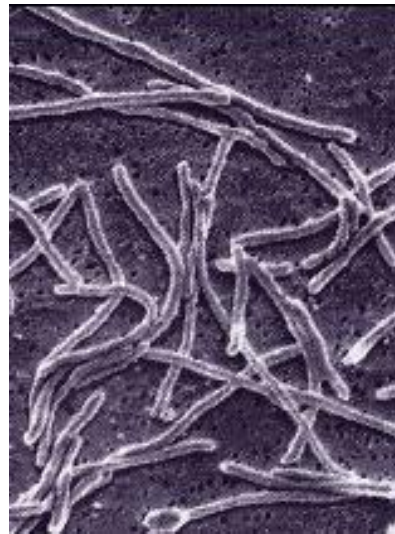
A DNS másolást viszont nekünk is enzimmel – **DNS polimerázzal** – kell megoldanunk.

A DNS másoláshoz – a PCR reakcióhoz szükségünk van:

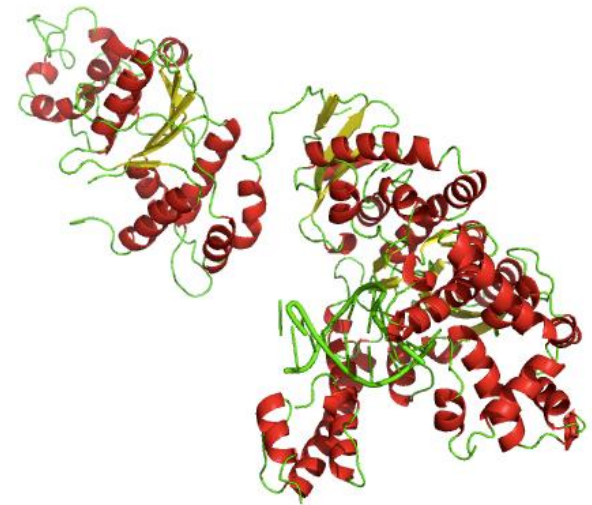
- Egy termosztátra.
- Egy HŐSTABIL enzimre.
- Megfelelő reakció közegre (pufferre és Mg^{2+} kofaktorra az enzim működéséhez).
- Alapanyagra a DNS felépítéséhez: nukleotidok (dATP, dTTP, dGTP, dCTP).
- A másolás kezdetőpontjainak kijelölésére. Ehhez a **primereket** használjuk.



PCR készülék – a termosztát



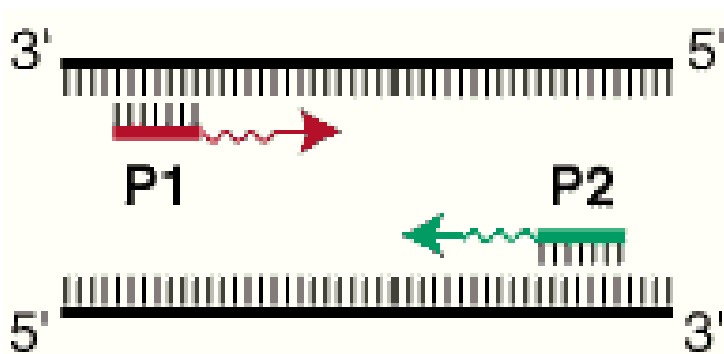
Thermus aquaticus (Taq)
Baktérium, hőforrások,
Yellowstone N. Park



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.)



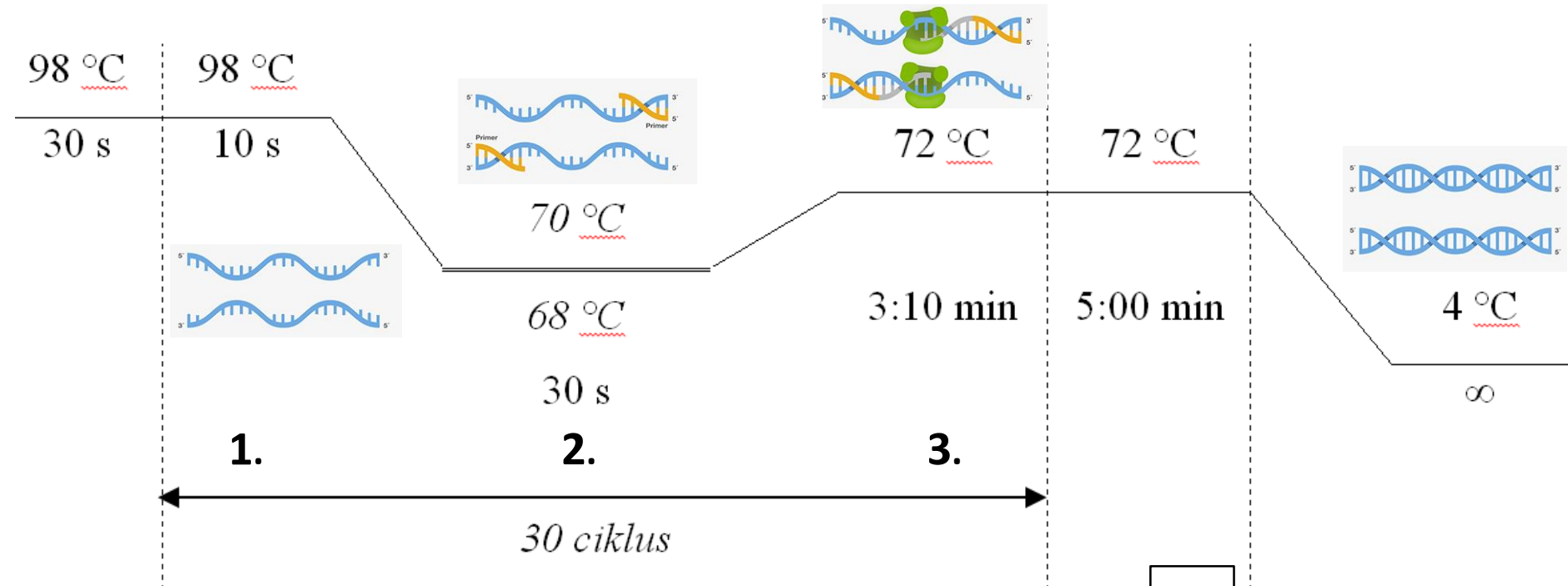
P1, P2: primerek
Miért kettőt használunk?

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

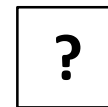
A sejtben a DNS másolás minden lépése enzimekkel zajlik.

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

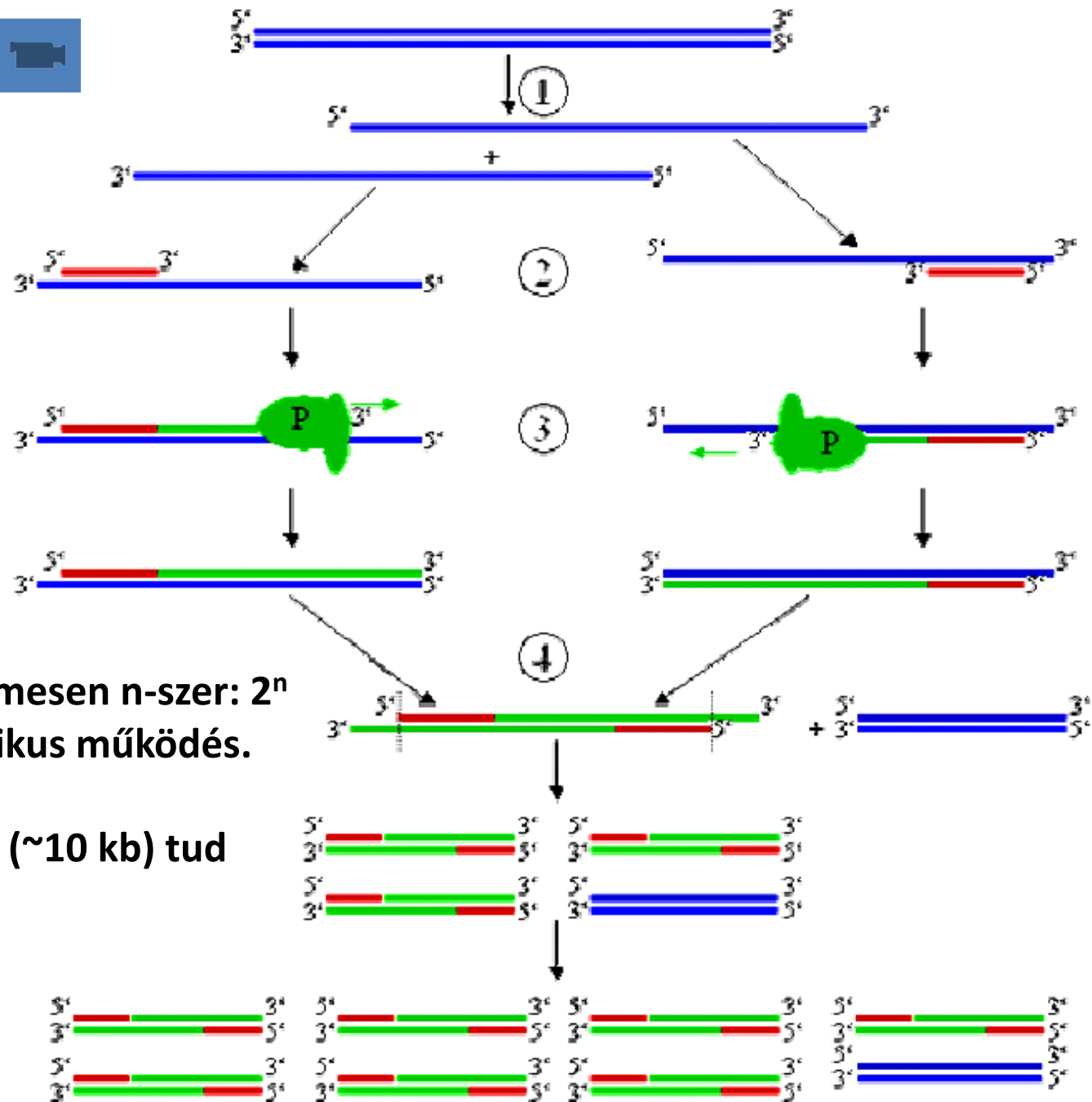
1. Denaturálás: 92-98 °C-on a DNS szálai szétválnak.
Időtartama: indításnál ~5 perc, a későbbiekben 30-120 mp
 2. Primerek kapcsolódása (annealing): 50-70 °C-on, 30-120 mp
 3. DNS szintézis: a DNS polimeráz szintetizálja a komplementer szálát, 72 °C-on, időtartama a génszakasz hosszától függ (~ 1000 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**

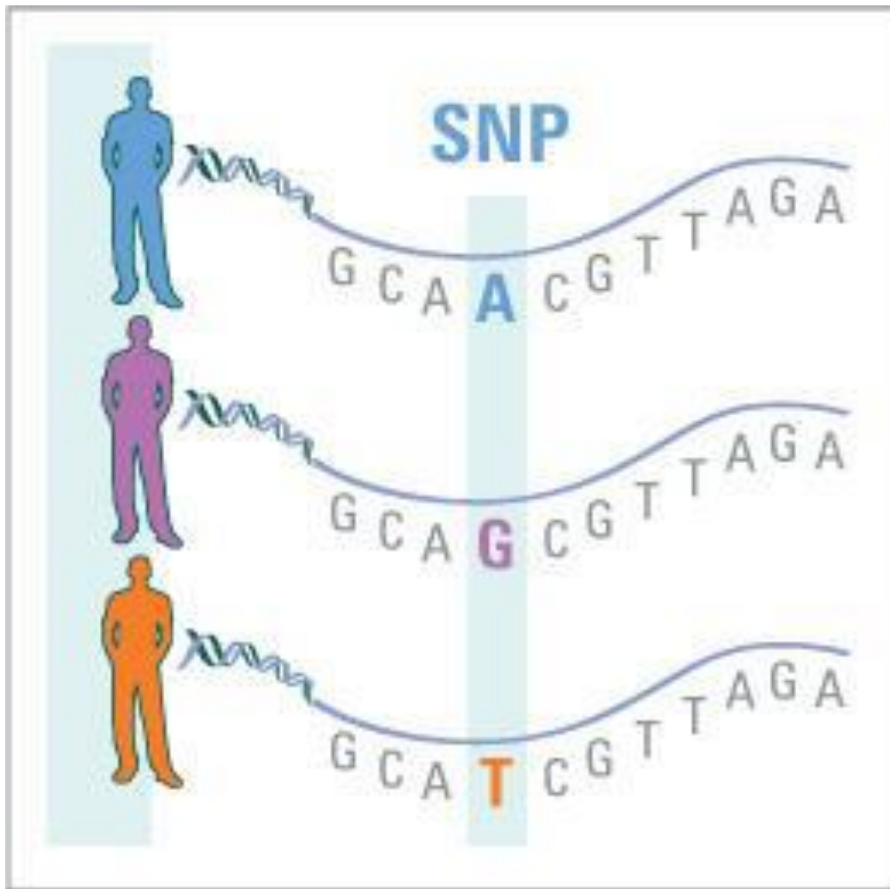
- Jelenlétét - ha megjelenik, igazolni lehet pl. fertőzéseket
- Mintázatát – azonos primerek különböző DNS-ekből különböző hosszúságú szakaszokat fognak közre, és szaporítanak - ezek méreteloszlása egyénenként nagyon jellemző = „genetikai ujjlenyomat”
- Bázissorrendjét – tökéletes azonosításra, illetve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

Genetikai polimorfizmus vizsgálata PCR-rel

- 3 milliárd bázispár az emberi DNS-ben (99.9%-ban azonos)
- 0.1%-nyi különbség elegendő az egyedek megkülönböztetéséhez
- **Genetikai polimorfizmus:** a DNS adott helyén található variációk a populáción belül



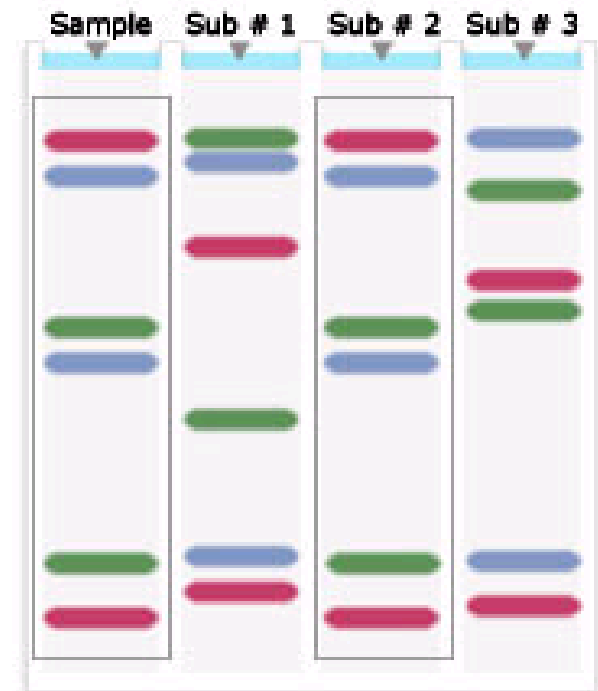
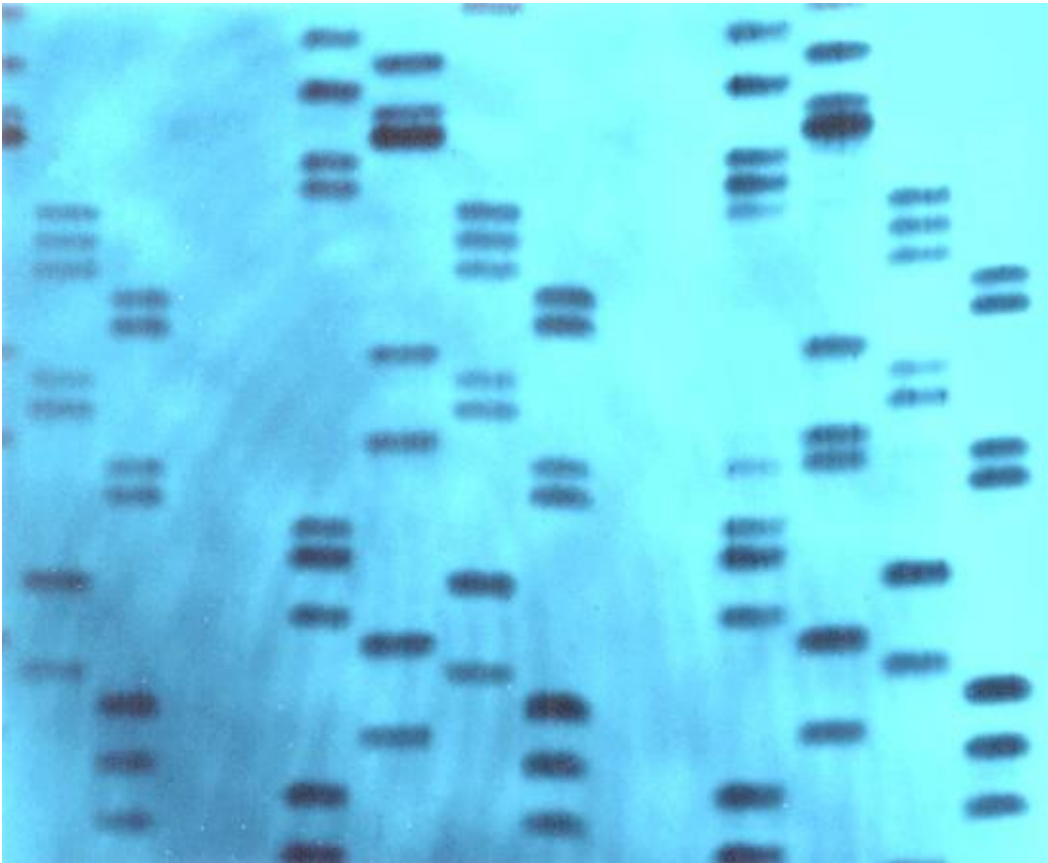
- Specifikus primerek tervezhetők
- Amelyek csak az egyik gén változattal teljesen komplementerek
- Így csak teljes egyezés esetén játszódik le megfelelő mértékben a PCR reakció (= a DNS lemásolása)
- A genetikai polimorfizmus vizsgálat alkalmas a rokonsági viszonyok feltérképezésére (apasági vizsgálat)

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)

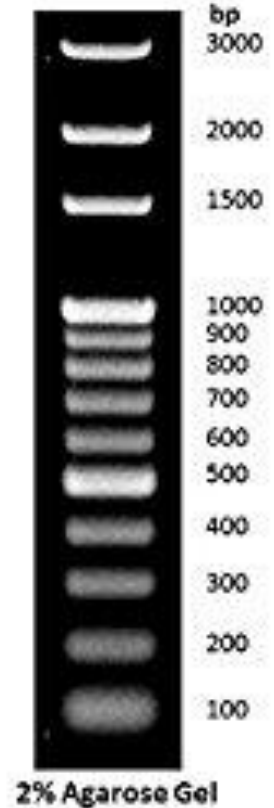
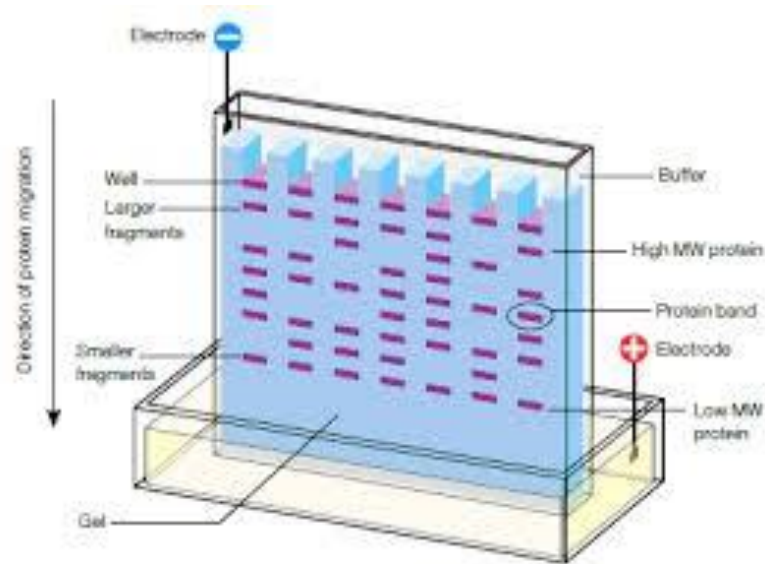
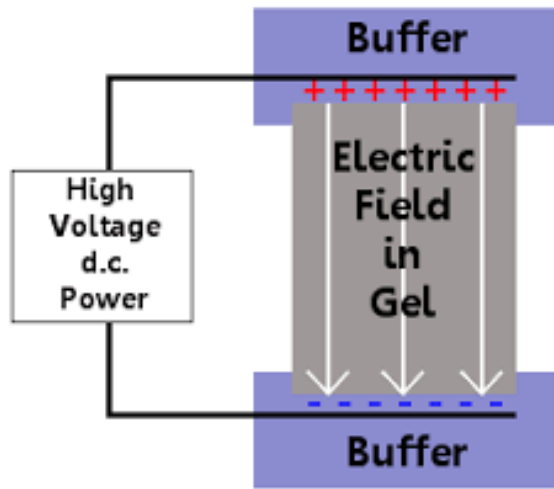
-



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 helyezük 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.