# 7. Polimeráz láncreakció

A polimeráz láncreakció (**PCR**) annyira fontos technika, hogy külön fejezetben foglalkozunk vele. PCR használatával DNS-szakaszokat tudunk felsokszorozni igen gyors és hatékony módon. Feltalálásakor szinte forradalmasította a molekuláris biológiát; az addig ismert és használt technikák jó részét vagy lecserélték, vagy alternatívát kínáltak az új PCR-alapú technikák.

**7.1. A PCR elve**

A PCR elve nagyon egyszerű: a kétszálú DNS-szakaszt (hődenaturációval) egyszálúsítjuk, majd megszintetizáltatjuk mindkét szál komplementer párját. Ezt ciklikusan ismételve exponenciális módon felszaporítható a kiválasztott DNS-szakasz. A reakciót katalizáló polimeráz enzim tulajdonsága, hogy működéséhez kell egy dupla szálú DNS-rész is, ahonnan a polimerizáció el tud indulni. Ezt a tényt kihasználhatjuk arra, hogy kizárólag csak az a DNS-szakasz sokszorozódjon fel, amelyiket mi szeretnénk.

A polimerizációs reakció folyamata a következőképp néz ki: ha egy egyszálú DNS-szakasz ismert részével komplementer szakaszt (ún. **primert**) készítünk, akkor az megfelelő körülmények között az adott komplementer szekvenciához be fog kötődni (a hibridizáció midig a bázispárosodás szabályainak megfelelően zajlik, adeninnel szemben timin, citozinnal szemben guanin található). Ha DNS-dependens **DNS-polimerázt** és dezoxi-nukleotid-trifoszfátokat (**dNTP**) adunk a fenti reakcióelegybe, akkor a feltapadt primer 3’ végétől elkezdődik a komplementer lánc **polimerizációja**. A polimerizációs reakciót egy idő után leállítjuk, a két szálat (új és régi) szétválasztjuk (például **hődenaturációval**). A képződött új szálhoz tervezett komplementer primert (melynek szekvenciája megegyezik a régi szál egy rövid szakaszának a szekvenciájával) is hozzáadjuk a rendszerhez, a második polimerizációs reakcióban az eredeti szállal (vagy egy részével) azonos szekvenciájú termék polimerizálódik.

Beláthatjuk, hogy ezt elvben folytathatjuk a végtelenségig; ha minden polimerizációs/hődenaturációs ciklus után újra hozzáadjuk a kétféle primert és az enzimet (a hődenaturáció tönkreteszi az enzimek többségét), és újrafuttatjuk a reakciót, minden lépésben **duplázódni** fog a templátként szolgáló szakasz komplementere. Mivel az állandóan ismétlődő bemérés igen körülményes és munkaigényes lenne, ezért a reakció kezdetekor nagyon sok, mindkét szállal komplementer primert és **hőstabil polimerázt** teszünk a reakcióelegybe, minek következtében a **két komplementer szál egyszerre szintetizálódik**. Nem kell semmi mást csinálni, csak a hőmérsékletet ciklikusan változtatni, hogy minden ciklusban duplázódjon az adott DNS-szakasz. Nézzük részletesen a körülményeket:

1. Ha dupla szálú templátunk van, akkor **94-95 ºC**-ra fel kell fűtenünk a reakciócsöveket, hogy a DNS széttekeredjen (**denaturáció**).

2. A mintákat lehűtjük arra a hőmérsékletre (45–65 ºC), ahol a specifikus primerek megtalálják a komplementer szekvenciájukat, de még nem képesek arra, hogy aspecifikus helyre kötődjenek. (Alacsonyabb hőmérsékleten egymással nem komplementer DNS-szakaszok is képesek aspecifikusan kapcsolódni.) Elvben itt az eredeti DNS két szála is visszakapcsolódhatna, mégsem ez történik, két ok miatt: egyrészt a templát DNS hosszú, sokáig tart, amíg a pontos párosodást megtalálja, másrészt primerből sokkal több van, hamarabb találja meg valamelyikük a komplementer szekvenciát. Ezt a kapcsolódási hőmérsékletet angolul „**annealing temperature**”-nek hívjuk, a **reakció specifitását** elsősorban ez határozza meg.

3. A primerek bekapcsolódása után szinte azonnal elkezdődik a **polimerizáció**. Hogy a polimerizáció megfelelően gyorsan haladjon, a reakció hőmérsékletét fel szokták vinni az enzim működési optimumára (**72-74 ºC**). A felsokszorozni kívánt szakasz hosszának függvényében a reakciót melegítéssel leállítjuk (visszatérés az 1. pontra), ilyenkor szétválik a DNS két lánca, hogy aztán az annealing temperature-ra lehűtve ismét primerek tapadhassanak hozzájuk és újrakezdődhessen a polimerizáció (7-1. ábra).

7-1. ábra

http://2.bp.blogspot.com/\_tUQhsS1XUW8/TUBpry3jMII/AAAAAAAAAhk/PRjQkj0Cnsw/s1600/Biofreaks+-+GGS+LIVE+PCR+-+reaction+scheme.jpg

2013.09.13.

Az utolsó ciklus után rendszerint még egy hosszabb polimerizációs lépést is alkalmaznak, (72 ºC, 5 perc), amely során az esetleg csonkán maradt szálak is kiegészülhetnek.

A fenti leírásból kiderül, hogy a reakció komponenseinek bemérését követően a láncreakció során semmi mást nem kell csinálnunk, mint a hőmérsékletet ciklikusan változtatni. A **PCR-készülék** igazából nem más, mint egy, a **hőmérsékletét gyorsan változtatni tudó termosztát**. Többféle PCR-készülék-típus van:

1. A hagyományos, ún. **termoblokkos** PCR-készülékek többnyire 0,2 ml-es vagy 0,5 ml-es mikrocentrifuga-csöveket, és/vagy 96-lyukú PCR-plate-eket képesek kezelni (7-2. ábra). Hogy a minta hőleadása és hőfelvétele megfelelően gyors legyen, speciális, vékony falú csöveket érdemes a kísérletekhez használni. A készülék kapacitásától és az amplikon hosszától függően egy tipikus PCR-reakció 1,5–3 óra alatt le szokott játszódni.

2. A másik fontos készüléktípusban a minták vékony **üvegkapillárisokban** vannak, hogy gyorsabban átvegyék a külső hőmérsékletet. A kapillárisok egy **tárcsán forognak**, a hőátadás nem termoblokkon keresztül, hanem a tárcsát körülvevő levegőn keresztül történik (7-3. ábra). Ez utóbbi módszerrel a minták hőmérséklete sokkal gyorsabban változtatható, a PCR-reakció teljes hossza rövid amplikonok esetén akár 20-30 percre csökkenthető.

7-2. ábra

http://www.ridge2000.org/seas/images/lab\_thermocycler.jpg

2013.09.13.

7-3. ábra

http://216.74.34.73/m/37/Article/RocheApplied\_Lightcycler\_Lightcycler\_img.jpg

2013.09.13.

**7.2. Exponenciális szaporodás**

Tekintsük a hosszú, dupla szálú DNS-templát két szálát két geometriai „egyenesnek”, amelyeknek a 2-2 vége hosszan tekergőzik a végtelenbe. Az első reakció következtében a két egyenesünk mellé szintetizálódott két „félegyenes” is, amelyeknek egyik végét meghatározzák az adott primerek 5’ végei, a másik végük pedig addig polimerizálódik, amíg csak hagyjuk (bizonytalan, hogy milyen hosszú lesz). A második ciklusban már ezekről a félegyenesekről is keletkezik komplementer szál, de az új szálaknak mindkét vége, ezáltal a hossza is meghatározható (a két primer közti szakasz). További ciklusoknál mind a félegyenesek, mind a szakaszok száma növekszik, de a félegyeneseké (amik templátjai az eredeti egyenesek, számuk változatlan) **lineárisan**, a szakaszoké (templátjaik a félegyenesek és a szakaszok, számuk egyre nő), **exponenciálisan**. Az exponenciális szaporodás annyira túlnövi a lineárisat, hogy egy tipikus PCR-reakció **20-30 ciklusa** után az eredeti templátok és a „félegyenesek” mennyisége elhanyagolható lesz a szakaszokéhoz képest (7-4. ábra). Ha X darab kettős szálú egyenesem volt kezdetben, és 100%-os hatékonysággal működik a reakció, akkor két ciklus után X darab kettős szálú szakaszom keletkezik. Az ezt követő minden ciklusban a szakaszok száma duplázódik, tehát n ciklust követően X·2n-2 darab szakaszunk keletkezett Ezeket a „szakaszokat” hívjuk **PCR-terméknek**, gélen megfuttatva ideális esetben csak ez a homogén, egy csíkban futó DNS-fragment látszik.

7-4. ábra

http://enfo.agt.bme.hu/drupal/sites/default/files/pcr\_0.png

2013.09.13.

A PCR hatásfoka többnyire csak **elméletben 100%**, a valóságban ennél alacsonyabb (90-100%). Ráadásul a termékek száma csak az első néhány ciklusban növekszik exponenciálisan, egy idő után kezdenek elfogyni a primerek, a dNTP-k és a reakciót katalizálni képes szabad enzimek. Ráadásul az enzimek egy része is tönkremehet a hőmérséklet-ingadozástól. Ezért az exponenciális növekedés lelassul, végül leáll; többnyire azelőtt, mielőtt az összes beprogramozott ciklus lefutna. Ebből következik, hogy nagy ciklusszám esetén a ciklussorozat végén a termékek száma gyakorlatilag **független** az eredetileg a mintához adott **templátok számától**, inkább függ a termék hosszától, a primerek, a dNTP-k és az enzim mennyiségétől.

**7.3. A reakcióelegy összetétele**

A hagyományos, termoblokkos készülékben a PCR-reakciót többnyire 0,2 vagy 0,5 ml-es, vékony falú mikrocentrifuga-csövekben, vagy direkt erre a feladatra tervezett 96-lyukú plate-ekben végzik. A PCR-reakció térfogata többnyire igen kicsi (25–100 µl), hogy a folyadék a hőmérséklet-változásokat gyorsan követni tudja. A magas hőmérsékletből adódó intenzív párolgás és kicsapódás elkerülésére vagy ásványolajat cseppentenek a reakcióelegy tetejére, vagy még magasabb hőmérsékletre (105 ºC) fűtik a csövek tetejét (ez utóbbi olyan készülékekben lehetséges, amelyek fűthető tetővel rendelkeznek). A reakcióelegyet például Tris puffereli (pH: 8,3–8,8 szobahőmérsékleten), ionerősségét KCl biztosítja (50 mM). A dATP, dGTP, dTTP és dCTP koncentrációit egységesen 200-250 µM köré szoktuk beállítani. Egy reakciócsőbe 0,5–2,5 U (unit) hőstabil polimerázt adunk (ez körülbelül 2-10·1012 db enzimmolekulát jelent csövenként). A primerek koncentrációja páronként 0,1 és 0,5 µM között optimális. Nagyobb primerkoncentráció aspecifikus feltapadást (mispriming) okozhat. A templát koncentrációját is alacsonyan (pikogrammos nagyságrendben) kell tartani, hogy ne merüljön ki hamar a reakcióelegy. (Magas templátkoncentrációnál nagyon hamar elfogyna a primerek és a dNTP-k mennyisége, az exponenciálisan növekvő termékek nem tudnák megfelelően túlnőni a lineárisan szaporodó „félegyeneseket”.)

**7.4. Primerek tervezése**

A primereket körültekintően kell terveznünk, hogy működőképes és specifikus legyen a reakciónk. A primerek ideális hossza 20 nukleotid körül van (18–25), ennél rövidebb vagy hosszabb primerek aspecifikus feltapadást eredményezhetnek. Primerek tervezésénél a legfontosabb szempont, hogy a két primer feltapadási hőmérséklete (olvadási hőmérséklet, melting temperature, Tm) hasonló legyen.

Ha megoldható, igyekezzünk olyan primereket tervezni, amelyek változatos nukleotidszekvenciájúak, a guaninok és citozinok mennyisége hasonló a timinek és az adeninek mennyiségéhez (GC arány ~40–60%), komplementer szekvenciák hiánya miatt sem magukkal (hairpin), sem a másik primerrel (primer dimer) nem tudnak összetapadni. Ajánlatos a repetitív szekvenciák kerülése. A primerek 3’ végén jó, ha C vagy G található, de érdemes kerülni a CG vagy GC végeket.

Hogy megkönnyítsük az optimális primerpár tervezését, érdemes **primertervező segédprogramokat** használnunk, amelyek közül több online is hozzáférhető. Ha komplex genomi mintákat használunk templátnak, a primer szekvenciák specifikusságát érdemes **DNS-adatbázissal történő összehasonlítás** (pl. BLAST) útján ellenőrizni.

A primerek **3’ vége nagyon pontosan** kell, hogy **illeszkedjen** a templát DNS-re, de az **5’ vég** igen **változatos lehet**; az eredeti templát DNS-től jelentősen eltérő szakaszokat, például restrikciós endonukleáz-hasítóhelyeket tervezhetünk ide. A 3’ végek szigorú meghatározottságát pontmutációk vizsgálatánál használhatjuk fel.

**7.5. A PCR alkalmazási területei, feltételei**

Mi mindenre lehet használni a PCR-technikát? Nézzük a legfontosabb példákat röviden:

- Genetikai manipulácó (klónozás, irányított mutagenezis)

- Adott élőlények jelenlétének kimutatása (bakteriális, virális fertőzések)

- Szekvenciaanalízis (szekvenálás „lineáris” PCR-rel)

- Mutációk, polimorfizmusok kimutatása (öröklődés, genetikai betegségek, apasági vizsgálat)

- Mennyiségi vizsgálatok (specifikus DNS- vagy RNS-szintek mérése)

A PCR elméletéből következik és a fenti példákból látszik, hogy bármiféle genetikai szennyeződés nagyban ronthatná a reakció specifitását, hamis pozitív eredményeket produkálva. Ebből következik, hogy a PCR-reakcióhoz használt eszközöknek és oldatoknak kontamináció mentesnek kell lenniük. Mindig új, RN-áz- és DN-áz-mentes, steril, lehetőleg szűrővel ellátott pipettahegyeket és hasonlóan tiszta oldatokat használjunk a munkához. Tiszta gumikesztyűben, tiszta, dekontaminált laborasztalon, tiszta pipettával rakjuk össze a reakciókat (többnyire jégben hűtött csövekbe). A reakciócsöveket csak a kimérés/bemérés idejére hagyjuk nyitva. A törzsoldatokat alikvotokban tároljuk. Lehetőleg mindig rakjunk össze egy templát DNS nélküli negatív kontrollt, hogy lássuk, volt-e kontamináció. Kontamináció esetén érdemes először a steril desztillált vizet lecserélni (ez a legolcsóbb), de ha a kontamináció megmaradt, legjobb, ha minden oldatból újat használunk a jövőben. Hatósági bizonyítványok kiadására jogosult, ún. akkreditált laboratóriumokban az előírások még szigorúbbak. Külön helyiségben, gyakran steril elszívófülke alatt rakják össze a PCR-reakciót. Kesztyűn kívül szájmaszk és fejvédő használata is kötelező, a szellőzést is speciális úton biztosítják. A mintákat nem itt, hanem egy külön helyiségben sokszorosítják és futtatják, nehogy az esetlegesen kiszabaduló DNS a levegőbe jutva beszennyezhesse a jövőbeli mintákat.

**7.6. Hőstabil polimerázok**

Honnan származnak a hőstabil polimerázok? A hőforrásokban élő baktériumok fehérjéi igen hőstabilak, így a DNS-polimerázuk is. Legáltalánosabban a ***Thermus aquaticus*** baktérium ún. **Taq polimerázát** alkalmazzák PCR-reakciókhoz. A Taq polimeráznak nincs exonukleáz aktivitása, ezért katalízise gyors (több mint 1000 nukleotid épül be a láncba percenként), processzivitása nagy (nem nagyon disszociál a DNS-ről a polimerizáció közben). Az exonukleáz-aktivitás hiányának ára van: Átlagosan minden 45-ezredik nukleotidot elrontja, nem a komplementer nukleotid épül be az új láncba. Olyan esetekben, amikor hosszú DNS-szakaszt akarnak felerősíteni, vagy nagyon fontos a fidelitás, más polimerázt szoktak használni. A **Pfu polimeráz** a *Pyrococcus furiosus* baktériumból nyerhető ki. **3’-5’ exonukleáz aktivitása** miatt sokkal ritkábban ront, átlagosan csak minden 380-ezredik nukleotidnál. Használják még a *Thermococcus litoralis* baktérium ún. **Vent polimerázát**, mely fidelitásban az előző kettő között van (neki is van 3’-5’ exonukleáz-aktivitása), viszont hőstabilitása meghaladja az előző kettőét (95 ºC-on fél-életideje 7 óra).

Mivel szeretnénk gyorsan, de egyben minimális hibával dolgozni, nagyon hőstabil polimerázok segítségével, a biotechnológiai cégek igyekeznek ennek az elvárásnak eleget tenni. Árusítanak olyan **enzimkoktélokat**, melyekben megfelelő arányban többféle hőstabil polimeráz található. Egy másik megoldás, hogy rekombináns úton, különböző polimerázokból származó domének fúziójával, vagy bizonyos tulajdonságok mutáció során történt megváltoztatásával hoznak létre teljesen új tulajdonságokkal rendelkező polimerázokat. Ezek a **rekombináns polimerázok** már precízek, gyorsak, hőstabilak.

A PCR-reakciók specifikusságát rontó egyik hibaforrás, hogy az első melegítési lépés során még a DNS teljes széttekeredése előtt a primerek esetleg aspecifikusan odakapcsolódnak az éppen szétnyíló részekhez, és megkezdődik róluk a polimerizáció. Az így létrejött hosszú primerek aztán a későbbi ciklusokban már könnyen hozzákapcsolódhatnak a DNS-hez, iniciálják az aspecifikus polimerizációt, rontva ezzel a kívánt reakció specifikusságát. Hogy ezt elkerüljük, érdemes ún. **Hot Start** hőstabil polimerázokkal dolgozni. A polimeráz ilyenkor vagy az előre elkészített PCR-csőben, egy viaszszigetelés alatt található (ezt a módszert ma már ritkán használják), vagy egy antitest hozzákapcsolásával van az aktív centruma gátolva. A lényeg az, hogy az enzim az első melegítési lépés során még nem tudja kifejteni katalizáló szerepét. Egy hosszabb **(5-10’) 95 ºC**-os melegítés után a viasz megolvad és az enzim a reakciótérbe kerül, vagy az enzimhez kapcsolt antitest irreverzibilisen **hődenaturálódik**, leválik az enzimről, ezáltal az enzim katalízisének nincs további akadálya.

**7.7. A PCR-reakció specifitása**

A reakciót nem csak a primerek és az enzim minőségével tudjuk befolyásolni. Észrevették, hogy bizonyos **adalékanyagok** hozzáadásával jelentősen nőhet a kitermelés, vagy a reakció specificitása. Nem mindegyik adalékanyagnak ismerik a hatásmechanizmusát. A leggyakrabban használt adalékanyagok a **DMSO** (dimetil-szulfoxid), a betaine, a **DTT** (ditiotreitol), a BSA (marha vérszérumából származó albumin) és a glicerin. Nagyon rosszul működő, vagy aspecifikus terméket adó reakciók is szinte varázsütésre megjavulhatnak, ha valamelyik komponenst optimális koncentrációban alkalmazzuk (akár többféle komponenst is lehet alkalmazni egyidejűleg).

Egy már meglévő primerpár esetén a PCR-reakció specifitását legjobban az annealing temperature optimális beállításával, vagy változtatásával tudjuk elérni. Az optimális hőmérsékleten történő, specifikus PCR-reakcióra két módszert dolgoztak ki:

1. Az egyik az ún. **touch-down módszer**. Ennek során az első két ciklusban a kapcsolódási hőmérsékleteket 2-3 fokkal a primerek Tm-e fölé tesszük. Ilyenkor semennyi, vagy csak nagyon kevés primer fog betapadni, de azok nagyon specifikusan csak azokra a helyekre, amelyekkel tökéletes a komplementaritás. A következő két ciklusban 0,5 fokkal lejjebb visszük az annealing temperature-t. Most már nagyobb eséllyel tapadnak be a primerek, de azok is nagyobb számban a már elkészült specifikus amplikonokra. Ezután is 2 ciklusonként megyünk egyre lejjebb a kapcsolódási hőmérséklettel, egészen a Tm-ig, vagy az alá 1-2 fokkal. A többi ciklust már ezen a végső kapcsolódási hőmérsékleten pörgetjük, egészen a reakció végéig. Azokon a hőmérsékleteken, ahol már a primerek épp, hogy be tudnak tapadni, felszaporodik a specifikus PCR-termék, ezért az alacsonyabb hőmérsékleten ez sokkal jobban fel fog erősödni, mint az esetleges aspecifikusak.

2. A másik **gradiens PCR-készülék** alkalmazása. Ez a módszer valójában mindössze arra való, hogy hamar megtaláljuk az optimális primertapadási hőmérsékletet. A gradiens PCR-készülékekben nyolc oszlopban összesen 96 mintát tudunk elhelyezni. Az első és az utolsó oszlopban külön beállítható az annealing temperature, a köztük lévő oszlopokban pedig ez egy kvázi lineáris grádiens szerint változik. Ennek következtében minden oszlopban más-más kapcsolódási hőmérséklettel fut a PCR-reakció. Egyszerre 12 identikus csőben kell végeznünk a PCR-t, minden oszlopba 1-1 csövet helyezve. A termékeket gélen megfuttatva meg tudjuk állapítani, hogy melyik az a kapcsolódási hőmérséklet, ahol már elég nagy mennyiségben megjelenik a termékünk, de a reakció még specifikus (nincsenek extra csíkok a gélen). A jövőben mindig azt az annealing temperature-t kell majd alkalmaznunk az adott primerpárra.

**7.8. Extra szakaszok beépítése**

A PCR-terméknek a két végére szükség szerint extra, **általunk meghatározott** rövid **DNS-szekvenciákat** készíthetünk. Ezek a plusz szakaszok **új tulajdonságokkal** ruházzák fel a keletkezett PCR-terméket: ezek a szakaszok lehetnek restrikciós enzimek felismerőhelyei, promóter-régiók, extra aminosavak kodonjai stb. Ezt úgy oldjuk meg, hogy a primerek komplementer részei elé szintetizáltatjuk a szükséges nukleotidokat. Mivel csak a primerek 3’ végén szükséges a tökéletes illeszkedés, az **5’ végére** tervezhetünk gyakorlatilag **bármilyen szekvenciát**. Mivel a PCR-reakció során a primerek a termékek szerves részeivé válnak, ezért a primerek extra szekvenciáival is ez történik. Ha hosszabb extra szakaszra van szükség, több egymást követő PCR-rel lehet lépésről lépésre hosszabbítani az eredeti szekvenciát (7-5. ábra).

7-5. ábra

Leggyakrabban restrikciós endonukleáz-hasítóhelyeket szoktak a PCR termékek végére tervezni, melyek a keletkezett termékek klónozását segítheti elő. Ilyenkor többnyire nem elég kizárólag a felismerést szolgáló 6-8 nukleotiddal hosszabb primert tervezni, mert az enzimek igénylik, hogy egy hosszabb szakasz belsejében legyen a felismerőhely. Ha csak 2-3 nukleotiddal hosszabb primereket tervezünk, az többnyire elég szokott lenni ahhoz, hogy a PCR-termékben az endonukleáz felismerje, és elhasítsa a restrikciós helyeket.

**7.9. Pontmutációk vizsgálata hagyományos PCR-rel**

Pontmutációk vizsgálatánál a primerpár egyik tagját mindig úgy tervezzük, hogy a **3’ nukleotid** éppen a **mutáns bázist** fedje (a primerpár másik tagja az első primerhez képest tetszőleges távolságban, helyezkedhet el). Ha ezen a helyen a bázisok nem komplementerek, a primer 3’ vége nem kapcsolódik a templát szálra. Ilyenkor a polimeráz nem képes a lelógó nukleotid 3’ végére újabb nukleotidot polimerizálni. Mivel tapasztalatok szerint **néha mégis leküzdi** ezt az akadályt, és még a mutáns primerrel is képződik PCR-termék, a következő finomítással lehet növelni a specificitást: a primerben a 3’ végétől számított **harmadik nukleotidot** elrontjuk. Ha az utolsó két nukleotid szépen kapcsolódik a templát-DNS-hez, akkor ennek az egy nukleotidnak a kapcsolódása nem oszt, nem szoroz, a polimeráz a primer végétől elindítja a polimerizációt (a reakció végén kapunk PCR-terméket). Ha viszont az utolsó bázis sem kapcsolódik (mutáció), akkor az 1. és a 3. nukleotid „lifegése” megakadályozza, hogy a 2. helyen lévő bázis kössön a komplementeréhez, a primer 3’ végének utolsó 3 nukleotidja nem fekszik majd fel a templát-DNS-re. Ezt az anomáliát a polimeráz már nem tudja kezelni, ilyenkor nem képes a 3’ véget hosszabbítani (a reakció végén nem kapunk PCR-terméket) (7-6. ábra).

7-6. ábra

**7.10. Degenerált PCR, multiplex PCR**

Ha ismert aminosav-sorrendű fehérjét kódoló, de ismeretlen nukleotid-sorrendű DNS-szakaszt szeretnénk felerősíteni, akkor a genetikai kódszótár segítségével ún. **degenerált primereket** tervezünk a felszaporítani kívánt DNS-szakasz két végére. Ezekben a primerekben adott helyeken többféle, vagy kevésbé specifikus nukleotidok vannak, ilyenkor végenként valójában nem egyféle, hanem **többféle primerből álló keveréket** adunk.

Gyakran előfordul, hogy anyag- és időtakarékossági célzattal egy csőben **egyszerre több PCR-reakciót** futtatunk. Ezt hívjuk **multiplex PCR**-nek. Ilyenkor a primerpárok több, egymástól eltérő hosszúságú amplikont szaporítanak fel. Ilyenkor még fokozottabban kell figyelnünk, hogy az **összes primer Tm-e hasonló** legyen, és hogy a primerek ne kapcsolódjanak egymással.

**7.11. Kvantitatív mérések PCR-rel**

Korábban már beszéltünk róla, hogy ideális esetben a PCR-termék minden ciklusban duplázódik. Ebből az következik, hogy ha megmérjük a PCR-termék mennyiségét és ismerjük a ciklusszámot, abból kiszámíthatjuk, mennyi DNS-em volt az eredeti mintában (valójában csak két minta DNS-darabszámának **összehasonlítását** tudom elvégezni). Ezt a gyakorlatban nagyon nehéz megoldani, hiszen a PCR-termékek szokásos módon történő (gélen futtatás, interkalálódó festékkel festés) **detektálásának küszöbe** már jóval a reakció **exponenciális szakasza felett** található, ahol már nem érvényes a ciklusonkénti duplázódás. Ezért korábban többféle, viszonylag bonyolult módszert alkalmaztak, például: Különböző **hígítási sorokat** készítettek a templátokból, majd a reakció közben 10-15 ciklus után 1-2 ciklusonként kapkodták ki a készülékből a csöveket. A megfuttatott PCR-termékek denzitásából, a hígítások és a ciklusszámok ismeretében lehetett következtetni az eredeti DNS mennyiségére. Mindezt lehetett finomítani **radioaktívan jelölt nukleotidok** használatával (sokkal alacsonyabb detektálási küszöb), vagy **különböző arányú primerek** adagolásával (amikor az egyik primer elfogyott, már csak a másik szálról történik átírás (**lineáris** **PCR**), ekkor már jóval lassabb és jobban mérhető lesz a DNS-mennyiség emelkedése).

**7.12. Kvantitatív mérések real-time PCR-rel**

A mennyiségi meghatározás egy elegáns megoldása az ún. **real-time PCR**. Ha a reakcióelegyhez a DNS két szála közé interkalálódó, és az interkalálódás következtében fluoreszkáló festéket teszünk, akkor a külső gerjesztés hatására létrejött fluoreszcencia mennyisége **egyenesen arányos** lesz a kettős szálú DNS, tehát az amplikon mennyiségével. A készülék kialakítása olyan, hogy a fluoreszcenciát a **PCR-reakció közben** is detektálni tudjuk (7-7. ábra).

7-7. ábra

http://www.b2b.invitrogen.com/etc/medialib/en/images/ics\_organized/brands/molecular-probes.Par.91270.Image.400.351.1.g001355-gif.gif

2013.09.16.

A real-time PCR-készülékekben található valamilyen monochromális fényt kibocsátó fényforrás, és egy fluoreszcens detektor. A jobb készülékek már több hullámhosszon is képesek gerjeszteni, illetve detektálni az emittált fényt. A hagyományos PCR-készülékekhez hasonló műszerekben a reakcióelegy valamilyen átlátszó kupakú mikrocentrifuga-csőben, vagy átlátszó fóliával fedett 96-lyukú PCR-plate-ben található, a gerjesztés és a detekció is az átlátszó felületen keresztül történik. Vannak olyan készülékek is, amelyekben a minták átlátszó kapillárisokba kerülnek. A kapillárisok felülete nagyobb, üvegfala hőáteresztőbb, mint a műanyag centrifugacsöveké. Az ilyen készülékekben a hőmérséklet-változtatás megfelelő hőmérsékletű levegő befúvásával történik. A gyors hőcserét a kapillárisok folyamatos, gyors forgatása teszi lehetővé. Ilyenkor a PCR-reakció specifitását növelheti a nagyon rövid (mindössze 5-10 másodperces) betapadási hőmérséklet (annealing temperature) alkalmazása.

A PCR-reakció **exponenciális fázisában** a különböző minták fluoreszcenciája összehasonlítható, belőlük az eredeti DNS-mennyiségek aránya mérhető. A valóságban ez egy kicsit másképp történik: Megnézik, hogy egy minta fluoreszcenciája mikor ér el egy adott **küszöbértéket** (treshold) és feljegyzik az ehhez tartozó **ciklusszámot** (Ct). A két összehasonlítandó minta **Ct értékeinek különbségéből** (ΔCt) számolható az eredeti minták **DNS-aránya**. Ha például X minta Ct értéke 3-mal nagyobb, mint Y-é (ΔCt=3), akkor Y mintában 23=8-szor annyi DNS volt eredetileg, mint az X-ben (7-8. ábra). A PCR hatékonysága persze nem 100%-os. Az éles kísérletek előtt hígítási sort használva minden **primerpárra** meghatározhatjuk az adott körülmények között a **reakció hatásfokát**. Ezt az értéket is figyelembe kell vennünk, ha a pontos arányokra kíváncsiak vagyunk. Általában minimum 90%-os hatékonyságot tekintünk elfogadhatónak, ha ennél alacsonyabb, akkor többnyire a primereket le kell cserélni.

7-8. ábra

http://www.virologyj.com/content/figures/1743-422X-7-232-9-l.jpg

2013.09.13.

A real-time PCR-reakció esetében különösen **fontos a specifitás**. Aspecifikus termékek esetén torzulna a mérés. A specifitás növelésére több lehetőség van. Az egyik a reakció körülményeinek és a primerek tulajdonságainak standardizálása. Az esetek többségében a hosszú denaturációs kezdő lépés (94 °C, 3 perc) után **kétlépcsős ciklusokat** alkalmazunk:

1. 94 °C, 15 sec: ezalatt denaturálódnak az amplikonok

2. 60 °C, 60 sec: Ezen a hőmérsékleten betapadnak a primerek (mindkettő Tm-e 59±1 °C), és megtörténik a polimerizáció (az enzim optimuma 72-74 °C, az általunk használt **szuboptimális hőmérsékleten** a polimerizáció sebessége jóval kisebb).

A felsokszorosítandó szakasz igen rövid, többnyire 60–200 bázispár hosszú, hogy a szuboptimális hőmérsékleten is rövid idő alatt végigérjen az enzim. A primerek tervezéséhez minden esetben számítógépes segédprogramokat kell használnunk, hogy az **matematikai algoritmusai** segítségével ki tudja nekünk választani az adott szakasz kimutatásához szükséges legoptimálisabb primerpárt.

A reakció specifitását kétféleképp tudjuk ellenőrizni. Az egyik módszer, hogy a reakcióterméket gélen megfuttatjuk. A másik módszer kevésbé idő- és munkaigényes: a PCR-ciklusok befejezése után a PCR-terméket nagyon **lassú hőmérséklet-emeléssel** melegítjük fel. Amikor a termék eléri a rá jellemző **olvadási hőmérsékletet**, a két szál elválik egymástól, a fluoreszcencia hirtelen csökken. A melegítés során detektálható fluoreszcencia kirajzol egy **olvadási görbét** („melting curve”), melynek deriváltjáról könnyen leolvasható az olvadási hőmérséklet. Mivel a különböző PCR-termékek olvadási hőmérséklete nagy valószínűséggel más és más, több PCR-termék aspecifikus felszaporodása esetén többcsúcsú derivált görbét kapnánk. Ha csak **egy csúcsot kapunk**, az a reakció **specifikusságát** jelzi.

7-9. ábra

http://www.malariajournal.com/content/figures/1475-2875-6-41-2-l.jpg

2013.09.13.

Ha magát a reakciót szeretnénk specifikusabbá tenni, arra is van mód. A felszaporítandó szakasz közepére tervezünk az egyik szállal komplementer, harmadik oligonukleotidot (ún. **TaqMan próbát**) is. A TaqMan próba a polimerizációban nem vesz részt, viszont két nukleotidja meg van jelölve egy-egy fluoreszcens festékmolekulával. Az egyik molekulát a real-time PCR-készülék fényforrása gerjeszteni képes, a másik festék („quencher”) viszont közelsége miatt elnyeli az első festék kibocsátott fényét (**rezonancia-energiatranszfer)**. A PCR-reakció során a primerekkel együtt a TaqMan próba is betapad a templátra. Amikor a polimeráz működése közben elérkezik a TaqMan próbához, leemészti azt a DNS-ről, minek következtében a nukleotidjai felszabadulnak. A két különböző festéket tartalmazó nukleotid az oldatban messze kerül egymástól, ezért a rezonancia-energiatranszfer többé nem következik be: a készülék gerjesztésére az egyik festék látható fényt bocsát ki. Minden ciklusban duplázódik a fluoreszcens jel, amit a műszer érzékelni tud. Ez a fluoreszcencia csak akkor jelenik meg, ha az adott DNS-szakasz polimerizálódik, míg az interkalálódó fluoreszcens festékek esetében az aspecifikus polimerizációt nem tudtuk volna elkülöníteni a specifikustól (7-10. ábra).

7-10. ábra

http://www.foodsafetywatch.com/public/images/1050b.gif

2013.09.13.

**7.13. Pontmutáció kimutatása real-time PCR-rel**

Csakúgy, mint a hagyományos PCR-rel, real-time PCR-rel is lehetséges pontmutációk kimutatása. A módszer nagy előnye, hogy megspórolható a gélelektroforézis és a gélfestés idő- és munkaigényes procedúrája. A real-time PCR-nek van egy olyan speciális változata, amelyet elsősorban nem mennyiségi kimutatásra, hanem pontmutációk felderítésére alkalmaznak. Ebben az esetben TaqMan próba helyett ún. „**molecular beacon**” (molekuláris fáklya) kapcsolódik a felsokszorosítani kívánt szakasz középső részéhez. A molekuláris beacon speciális, **25–35 hosszúságú oligonukleotid**: a középső része a templát DNS-sel, a két vége viszont egymással komplementer. Amikor a molekuláris beacon a templát DNS-hez kapcsolódik, akkor a két vége nem kapcsolódik, egymástól távol vannak. Ha a **két végére** a TaqMan próbánál már megismert fluoreszcens festékek lettek kapcsolva, akkor a nagy távolság miatt közöttük nincs rezonancia-energiatranszfer, a külső fényforrással gerjesztett festék adott hullámhosszon **fluoreszkál**, amit mérni tudunk. Minél több amplikonunk keletkezik, annál több molecular beacon próba közepe tud ráülni a komplementer DNS-szálra, annál nagyobb lesz a fluoreszcencia minden ciklusban, közvetlenül az annealing után. Azok molecular beaconök, amelyek nem találnak komplementer DNS-templátot, ilyenkor egy más alakot vesznek fel: a **végeik hibridizálódásával „hajtű”** (hairpin) alakba rendeződnek, a két festék közel kerül egymáshoz. Ilyenkor létrejön a fluoreszcens rezonancia-energiatranszfer, a gerjesztett festék fluoreszcenciáját a másik festék (quencher) elnyeli, ezekről a molekulákról nem tudunk fluoreszcens fényt detektálni (7-11. ábra). A reakció előrehaladtával egyre kevesebb önmagával tapadó molecular beacon marad az annealing során, a detektálható fluoreszcencia ciklusról ciklusra nő. A polimerizáció optimális hőmérsékletén (72 ºC-on) molecular beacon ledisszociál a templát szálról, nem akadályozza a polimerizációt. (A TaqMan próbával ellentétben a molecular beacon nem degradálódik a reakció során.)

A molecular beacon elkészíthető úgy is, hogy a két állapota (templáthoz kötődő vs. önmagával kapcsolódó) közötti **energiakülönbség** termodinamikailag **igen csekély**. Ez esetben a molekuláris beacon csak egy picivel szeret jobban kapcsolódni a templát DNS-hez, mint saját magához. Ha viszont a templát-DNS megfelelő szakasza akár egyetlen szakaszban is eltér a molecular beaconétől (**pontmutáció**), ez utóbbi inkább saját magával kapcsolódik, és a PCR-reakció folyamán **nem bocsát ki jelet**. A pontmutációk kimutatásának ez egy igen gyors és elegáns, de (a molecular beacon magas ára miatt) korántsem olcsó módja.

7-11. ábra

http://www.bio.davidson.edu

2013.09.16.