

DNS amplifikáció, PCR

DNS amplifikálás: DNS szakasz megsokszorozása

PCR: Polimeráz láncreakció (Polymerase chain reaction)

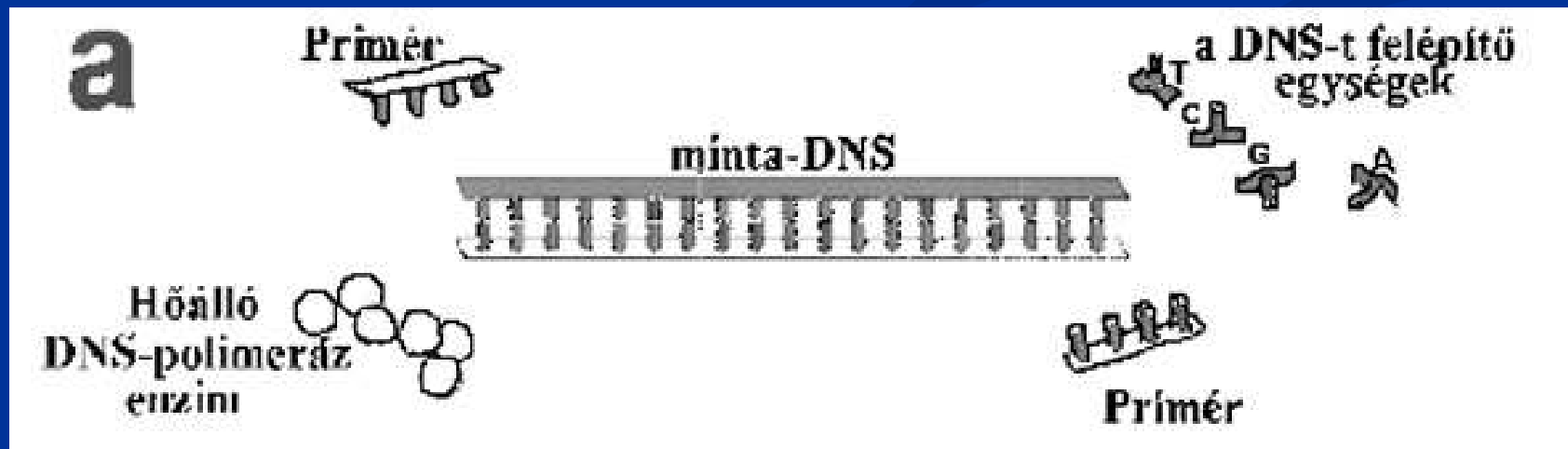
- *in vitro* nukleinsav megsokszorozó eljárás
- Feltétele: a DNS szakasz két végén 15-30 bázispár ismert legyen
- Enzimes reakció: DNS-polimeráz
- 1 DNS molekuláról néhány óra alatt több mint egymilliárd másolat készíthető

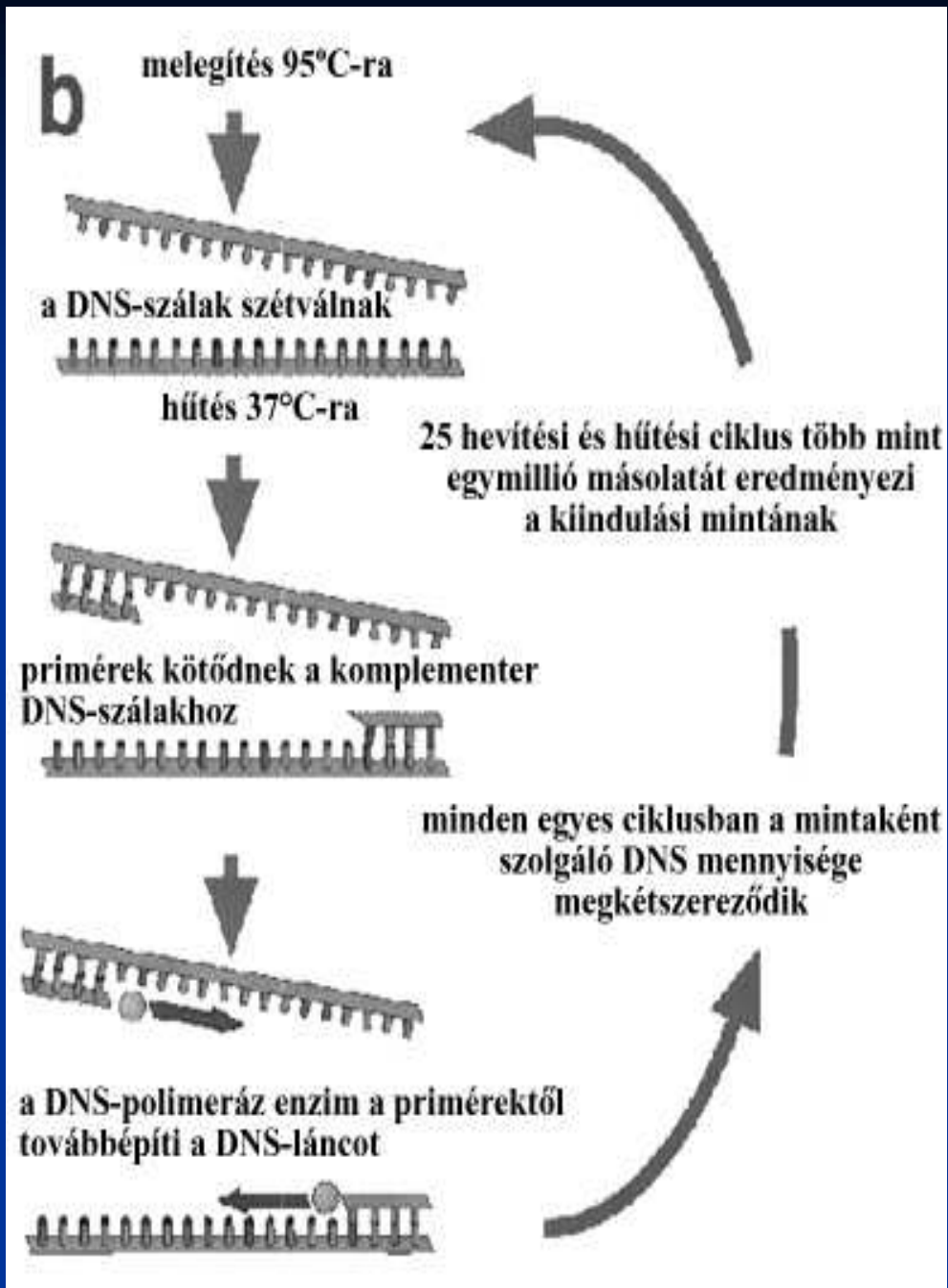
1984 Kary B. Mullis (Nobel díj – 1993)



A PCR-hez szükséges elemek:

- **Templát:** megsokszorozni kívánt DNS szakasz, az elején és a végén ismert bázissorrenddel.
- **Primerek:** az ismert végszekvenciákkal komplementer, 15-30 egységből álló oligonukleotidok.
- **Hőálló DNS-polimeráz**
- **Építőkövek:** dATP, dTTP, dGTP, dCTP

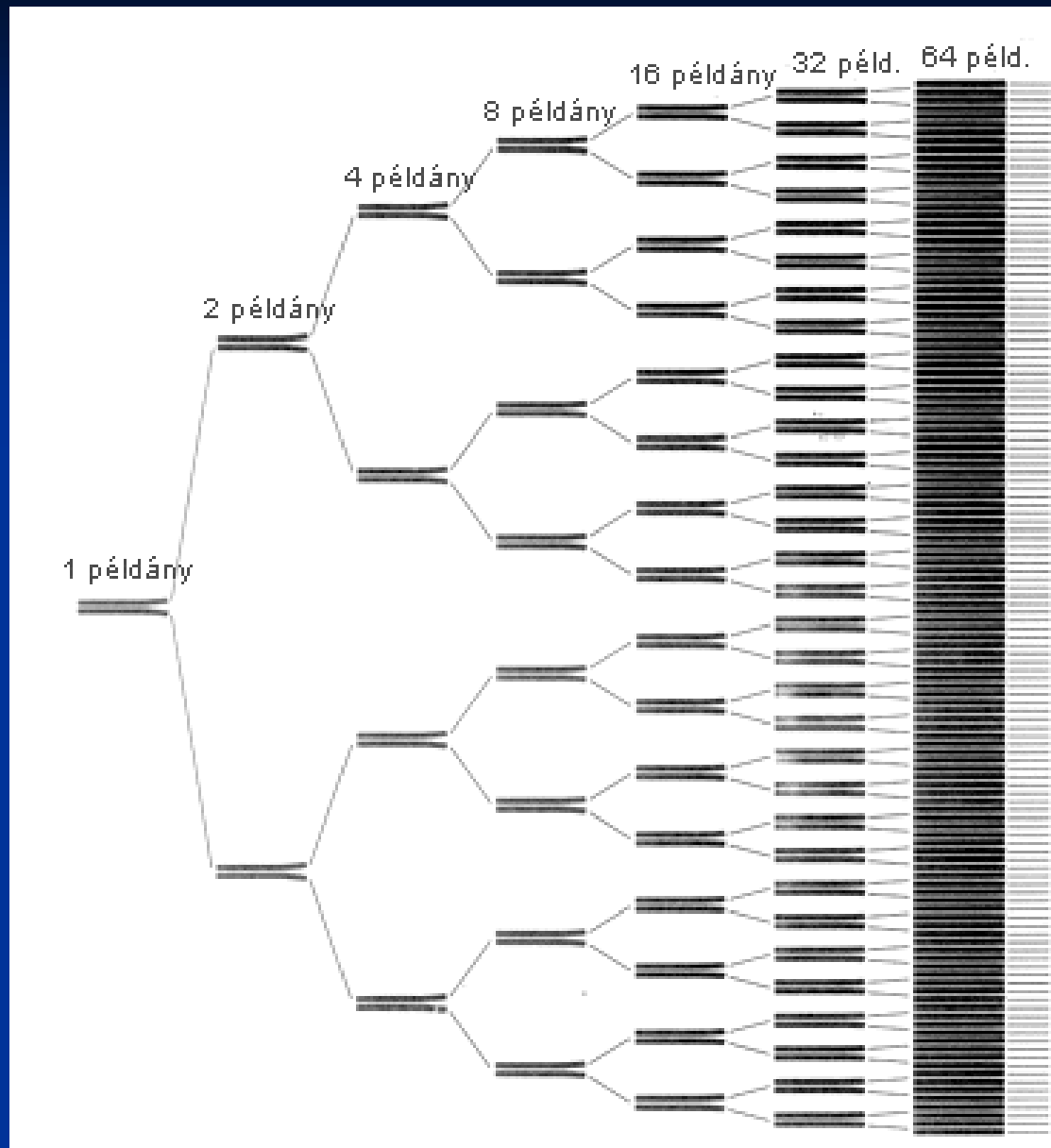




1 ciklus mechanizmusa:

- 1) **Denaturálás:** DNS egyszálúsítása, az enzim így tud kötődni.
- 2) **Primer tapadás:** az enzimnek szüksége van az indítószekvenciára. Két primer szükséges, hogy mindkét szálon folyhasson a szintézis.
- 3) **Láncnövekedés:** DNS polimerázzal

A ciklust 25-30-szor hajtják végre a gyakorlatban



- Minden ciklus után megduplázódik a DNS mennyisége
- Exponenciális növekedés:
- $2^{30} = 1$ milliárd

A reakció gyakorlati megvalósítása

A primerket és a dezoxinukleotidokat nagy feleslegben alkalmazzuk

- Automatizált készülék
- Hőmérsékletprogramot valósít meg
 - Gyorsan
 - Pontosan
- Denaturálás 95-98°C: 0,5-1,5
- Primer tapadás 37-60°C: 0,5-1 perc
- Szintézis 72°C: kb. 1 perc
- Utolsó ciklus után: 4°C-on tartás az enzimes reakció leállításához



- Hőálló DNS-polimeráz: *Taq*-polimeráz
 - Termálvizekben élő *Thermus aquaticus*ból nyerik
- Reakció végterméke agaróz gélelektroforézissel tisztítható és vizsgálható

A PCR előnye:

- Egyszerű
- Gyors
- Olcsó
- Szelektív: specifikus primerek alkalmazása miatt csak a kívánt szakasz erősödik fel, így egy meghatározott szekvencia keresésére alkalmas
- Érzékeny: akár egyetlen DNS molekula is megsokszorozható és így detektálható

A PCR alkalmazásai

- Orvosi diagnosztikában:
 - Genetikai betegségért felelős szekvenciák felderítése
 - Fertőzést okozó mikroba keresése rá jellemző szekvencia alapján
- Igazságügyi orvostan: DNS minta alapján történő azonosítás
- Molekuláris evolúció kutatás: rokon fajok DNS-ében található különbségek feltárása
- Human Genom project: szekvenciák keresése

Alkalmazásával a mennyiségi korlátok megszűntek