

Polimeráz láncreakció a géntechnológia nélkülözhetetlen eszköze

László Éva

Babeş-Bolyai Tudományegyetem, Kolozsvár

A polimeráz láncreakció (PCR) napjaink molekuláris biológiai (genetikai) kutatásának nélkülözhetetlen eszköze, amely forradalmasította nemcsak a géntechnológiában addig használt módszereket, de a molekuláris biológia szemléletét is. Jelen dolgozat ismerteti a PCR elvét, technikai kivitelezését, valamint a PCR néhány alkalmazási területét, elsősorban molekuláris biológiai kutatás és diagnosztika terén.

Bevezetés

A polimeráz láncreakció (Polymerase Chain Reaction – PCR) segítségével lehetőség nyílik a DNS specifikus megsokszorozására. A módszer annyira érzékeny, hogy akár egyetlen DNS molekulából kiindulva, a további vizsgálatokhoz elegendő mennyiségű DNS-t lehet előállítani.

A polimeráz láncreakció elvi lehetőségét Khorana már 1971-ben felvetette, de a PCR technika kidolgozása Kary Mullis érdeme. 1984 óta a PCR technika forradalmasította a molekuláris biológiai kutatásokat és a kutató laboratóriumok nélkülözhetetlen eszközévé vált.

Napjainkban széles körben használják a kutatásban, az orvosi diagnosztikában, a kriminalisztikában, az őslénytanban, a régészetben, az evolúció molekuláris szintű vizsgálatában stb. A PCR technikához szükséges DNS minta nagyon változatos forrásból származhat. A minta lehet emberi, állati, növényi, bakteriális vagy virális eredetű. Elegendő egy csepp vér, egy hajszál, egy néhány sejtből álló szövetdarab ahhoz, hogy a PCR-hez megfelelő mintát lehessen előkészíteni. A minta kora, sőt, a tisztasága sem bír különösebb jelentőséggel. Több millió éves kőületekből is sikerült DNS-t kinyerni PCR segítségével.

A dolgozat ismerteti a PCR technika főbb alkalmazásait a molekuláris biológiai kutatások, valamint az orvosi diagnosztika terén. Fontos kihangsúlyozni azt a tényt, hogy a PCR technika a biológiai tudományok minden területén alkalmazható, megbízható, pontos és gyors eredményeket biztosít.

1. A DNS molekula felépítése és replikációja

A DNS (dezoxiribonukleinsav) molekula két egymással szemben elhelyezkedő polinukleotid láncból épül fel, amelyek egy képzeletbeli közös tengely körül spirálisan feltekerednek, létrehozva a kettős szálú DNS-re (ds DNS – double stranded DNA) jellemző α -hélixet. A hélix egy csavarulata 3,4 nm, és csavarulatonként megközelítőleg 10 bázispárt tartalmaz. A DNS bázisai lehetnek purinbázisok, guanin és adenin és pirimidinbázisok, timin és a citozin (1,2). Annak ellenére, hogy a különböző bázisok sorrendje a DNS szálon belül eltérő,

a dsDNS átmérője állandó, 2 nm, ugyanis az egyik szál purin bázisa mindig a másik szál pirimidin bázisával kapcsolódik és fordítva. Így adenin-timin, timin-adenin, citozin-guanin, guanin-citozin bázispárosodások jöhetnek létre, vagyis a két szál egymással komplementer (1,2,3,4).

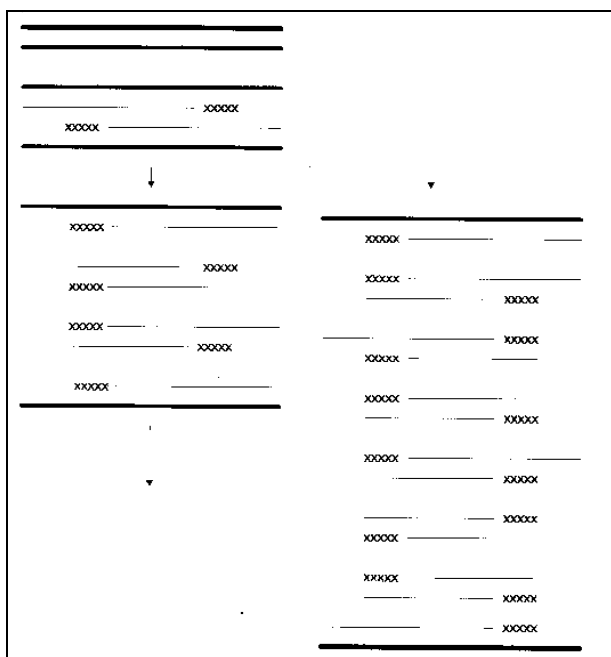
Ahhoz, hogy a genetikai információt továbbítani lehessen, szükség van a DNS molekula minél pontosabb megkettőződésére; ez a replikáció. A replikáció a szemikonzervatív modell szerint történik. A ds DNS két szála elválik egymástól, és a régi szál mentén új DNS szál szintetizálódik. Az így keletkezett ds DNS molekula egyik lánc a régi, modellül szolgáló lánc, míg a másik az újonnan szintetizálódott lánc. A szintézist a DNS-dependens-DNS polimeráz enzimek katalizálják. A DNS polimerázok közös tulajdonsága, hogy nagy pontossággal végzik a DNS lánc szintézisét (tulajdonképpen a primer 3'-OH csoportjának nukleofil támadását katalizálják a beépülő nukleozid-trifoszfát legbelső, α -foszfátján), de a szintézis megkezdéséhez szükségük van egy néhány nukleotidból álló primerre. Ez a primer legtöbbször monokatenáris RNS (ribonukleinsav) és szintézisét egy primáz nevű enzim katalizálja (1,2,3,4).

Miután a DNS polimeráz befejezte a szintézist, kivágja az RNS primert és a keletkezett rést feltölti dezoxiribonukleotidokkal.

2. A PCR technika elve

A PCR technika tulajdonképpen a DNS szál sokszorozott replikációja in vitro körülmények között. Ha a DNS-t 92-95°C-ra hevítjük, a DNS denaturálódik, a két lánc szétválik. Megfelelő primereket és DNS polimerázt alkalmazva a DNS bizonyos része (a primerek által közrefogott rész) felszaporítható (1,2,3,4,5,6,7). Ha a folyamatot többször ismétljük, nagy számú, általunk keresett DNS szakaszt nyerhetünk (1. ábra).

Az első olyan DNS szakasz, amely mindkét végén a primereket tartalmazza a harmadik ciklus során jelenik meg. Az általunk keresett DNS szakaszok mennyisége exponenciálisan nő a ciklusok során. Addig amíg a harmadik ciklusban csak 2 ilyen molekulánk volt, addig a harmincadik ciklus után már 268.435.456 DNS molekula áll a rendelkezésünkre.



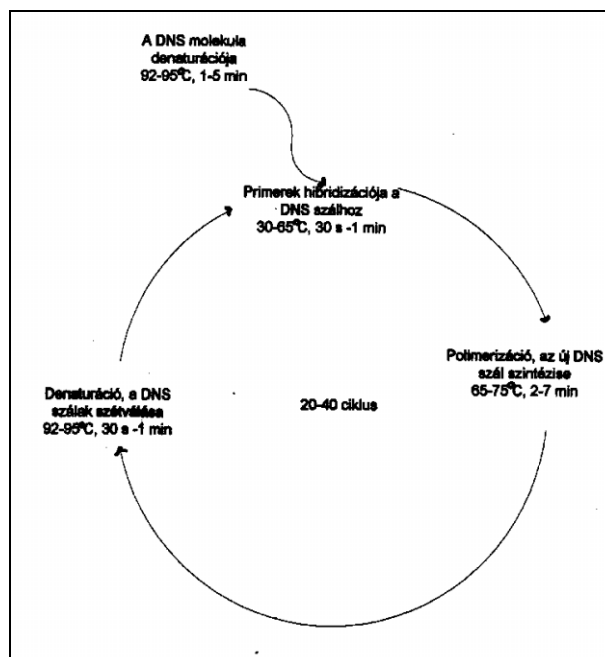
1. ábra

A polimeráz láncreakció. A denaturációt a primerek megkötése, majd a polimerizáció követi. Az első kívánt hosszúságú célmolekulák a 3. ciklus során jelennek meg. A vastag vonal a templát (minta) DNS-t, a vékony vonal a szintetizáló DNS-t, az xxxx pedig a primert jelöli.

A polimerizációs reakció speciális PCR csövekben megy végbe, ezek kis térfogatú, vékony falú műanyag csövek. A reakcióközeg tartalmazza a mintaként szolgáló DNS molekulát, az általunk tervezett, mesterségesen szintetizált primereket, dezoxiribonukleozidokat (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), a DNS polimerázt, valamint az enzim optimális működését biztosító anyagokat.

3. A PCR technika kivitelezése

A reakció közeget tartalmazó csöveket először 92-95°C-ra hevítjük, ekkor a kettős szálú DNS denaturálódik, majd 30-65°C-ra hűtjük. Ezen a hőmérsékleten a primerek hozzákötődnek a DNS molekula velük komplementer részéhez. Következik egy újabb felmelegítés 65-75°C-ra, ekkor történik meg a DNS szál szintézise a DNS polimeráz enzim hatására. Ez a leghosszabb időt igénylő lépés (2-7 perc). Ez után következik egy újabb ciklus, újabb denaturálás, majd primer kötődés, DNS szintézis és így tovább (2. ábra); általában 20-40 ciklust alkalmaznak. A módszerrel kb. 10^6 sokszorozás érhető el. Az exponenciális növekedés egy idő után leáll, ekkor célszerű a terméket hígítani 1000-10000x, és egy újabb reakciósorozatot indítani (3,6,7).



2. ábra

A PCR ciklus során végbemenő események. A DNS-t először felmelegítjük, hogy a molekula denaturálódjon, majd következik a primerek hibridizációja a megfelelő DNS szakaszokhoz, valamint az új szál szintézise.

Kezdetben a PCR-hez az Escherichia coli DNS polimeráz I. szubtilizin emésztéssel nyert fragmentjét, a Klenow fragmentet használták (3,6), de ez nem biztosított jó hatásfokot, mert az enzim hőérzékenysége miatt minden ciklus után újabb enzimmennyiséget kellett adagolni.

Napjainkban egyre több hőstabil enzimet alkalmaznak. A leggyakrabban használt ilyen enzim a Thermus aquaticus baktérium DNS polimeráz enzime, (termálvizekben él) a Taq DNS polimeráz (8,9,10), valamint a különböző kereskedelmi társaságok által forgalmazott géntechnológiai úton módosított formája (AmpliTaq). Ennek előnye, hogy az enzim működési optimuma 75°C körül van és másodpercenként kb. 150 nukleotid szintézisére képes. Preparatív célokra alkalmazzák még a Pyrococcus furiosus nevű baktériumból izolált Pfu DNS polimeráz, a Thermococcus litoralis-ból izolált Vent, valamint a Pyrococcus woesei-ből izolált Pwo enzimeket, (3,5,6) stb. melyek sokkal kevesebb hibával dolgoznak, mint a Taq polimeráz.

Taq polimerázzal kb. 1000 bázispár nagyságú DNS szakaszt tudunk szintetizálni, a kevesebb hibával dolgozó DNS polimerázok használatával pedig hosszabb termékek szintézise válik lehetővé, akár 40000 bázispár nagyságú DNS szakaszt is tudunk készíteni (5).

A hőszabályozást a PCR készülék biztosítja. Az automatizálásnak két lehetősége van (3,6). Az egyik az, amikor a mintákat a megfelelő hőmérsékletű vízfürdők között mozgatják (robotszerű

megoldás), a másik, jobban elterjedt megoldás pedig a mintatartó szabályozott fűtése-hűtése (hőciklus = thermocycler).

3.1. Optimalizálás

A PCR technikák esetében nem létezik olyan recept, amely minden esetben alkalmazható lenne. Tekintve, hogy nagyon széles körben elterjedt, sokféle felhasználást ismerő technikáról van szó, a megadott hőmérséklet- és idő értékek csak tájékoztató jellegűek.

A jó hatásfok elérése érdekében mindig a kívánalmaknak megfelelően kell megtervezni a primereket és optimalizálni kell a reakció körülményeit.

A PCR reakciók megtervezésének egyik kulcslépése a primerek megtervezése. Ezek olyan 20-30 oligonukleotidot tartalmazó darabok kell legyenek, amelyek nem tartalmaznak belső hurkot, egymással nem komplementerek, de specifikusan kapcsolódnak a DNS molekula megfelelő szakaszához és denaturálódásuk megközelítőleg azonos hőmérsékleti tartományban történjen (3,5,6,11,12). Továbbá fontos a reakcióközeg Mg^{2+} és dNTP (dezoxiribonukleotid) koncentrációja, és meghatározó értékű a megfelelő enzim mennyiség, az enzim működéséhez szükséges pH optimum, valamint a DNS minta tisztasága. Ajánlatos steril körülmények között dolgozni az idegen DNS-el való szennyeződés elkerülése végett (3,6).

3.2. Hibalehetőségek

Bármilyen körülmintően tervezzük is meg a reakció körülményeit, mindig számolni kell az esetleges hibákkal. Így például előfordulhat a primerek aspecifikus kötődése a DNS mintához, vagy primer dimerek képződhetnek, az eredményünket idegen DNS szennyeződés meghamisíthatja stb. Egy másik gyakori probléma az, hogy a Taq polimeráz viszonylag sok hibát követ el működése során. A beépítési hibák száma ciklusonként 1/5000 nukleotid körül mozoghat. Mindezek a nagyobb hűséggel dolgozó Pfu, Pwo, Vent stb. DNS polimerázok alkalmazásával küszöbölhető ki (3,5,6).

4. A PCR technika felhasználása

A PCR technikát széles körben alkalmazzák a kutatásban, az orvosi diagnosztikában, néhány millió éves minták genetikai analizésében, a paleontológiában, a régészetben, a kriminalisztikában és így tovább.

Ilymódon a PCR technika nagy szolgálatot tesz az emberiségnek és előbb utóbb a rutin eljárások közé sorolhatjuk. Amellett, hogy a molekuláris biológia és genetika nélkülözhetetlen eszköze, beláthatatlan lehetőségeket rejt magában a tudomány minden területén. Alkalmazása csak akkor hatékony, ha már ismerjük az illető DNS szakasz bázis

szekvenciáját, és tervezhetünk olyan primereket, amelyek csak a kívánt szakaszhoz kötődnek specifikusan.

4.1. Irányított mutagenézis PCR segítségével

A molekuláris biológiai (géntechnológiai) kutatásokban nagyon gyakran van szükség a DNS in vitro manipulációjára. Az irányított mutagenézis nagyon egyszerűen megvalósítható a PCR technika segítségével.

Ha a primerek és a target (cél) DNS szekvenciája nem 100%-ban komplementer, az új DNS 5' végén kis eltéréseket tartalmaz, alkalmunk nyílik arra, hogy új restrikciós hasítóhelyet vigyünk be a molekulába (3,5,6). Ugyancsak a PCR segítségével, több primert használva, lehetőségünk van arra, hogy pontmutációt (egyetlen nukleotid megváltozása), inzerciót (egy vagy több nukleotid beékelődése), deléciót (egy vagy több nukleotid kiesése) hozunk létre a DNS-ben. Ugyanakkor módosított nukleotidokat (pl. 7-deaza-dGTP – a belső hurok elkerülése érdekében), radioaktívan vagy fluoreszcensen jelzett nukleotidokat, nukleotid analógokat (dideoxinukleotidokat, inozin-trifoszfátot stb.) vihetünk be, vagy pedig rekombináns molekulákat (3,5,6) állíthatunk elő (pl. riporter gének).

4.2. Aszimmetrikus PCR technika

A DNS szekvenálására jelenleg használt Sanger féle dideoxi módszer kivitelezéséhez egyszálú DNS-re van szükség. Kis mennyiségű DNS mintából kiindulva szükség van a minta felszaporítására. Ez egy speciális PCR technika, az ún. aszimmetrikus PCR segítségével történik. A módszer lényege az, hogy a primereket nem 1:1 arányban alkalmazzuk mint a normál PCR esetében, hanem az egyik primert kb. 100 szoros feleslegben adjuk hozzá a mintához. Elindítva a reakciót, egy ideig mindkét szál sokszorozódik, de miután a kisebb mennyiségben levő primer elfogyott, csak az a szál fog tovább sokszorozódni, amelyhez a nagyobb mennyiségben adott primer kapcsolódik. Így a 30-40. ciklus után a reakcióközegben már az egyszálú DNS lesz számottevő mennyiségben. Az így kapott egyszálú DNS közvetlenül felhasználható a szekvenálási reakciókhoz (3,5,6,13,14,15,16).

4.3. Klónozás

Klónozáskor egy meghatározott DNS darabot plazmid (cirkuláris DNS molekula, amely a baktérium sejtbe bejutva a sejt genomjától függetlenül képes szaporodni) segítségével beviszünk egy baktérium sejtbe. A baktérium sejt sorozatos osztódásával olyan telep keletkezik, amelynek sejtjei genetikailag teljesen azonosak a kiinduló sejtrel, tehát a telepet alkotó sejtek, a kiinduló sejt klónjai (3,6).

Ahhoz, hogy ellenőrizzük, hogy a klónozás sikeres volt-e, ténylegesen a kívánt szekvenciát tartalmazza-e a baktérium sejtek, több módszert lehet használni, de az egyik legegyszerűbb a PCR.

A baktérium telepekből DNS-t izolálunk és az általunk keresett szekvenciát felszaporítjuk PCR segítségével. Tulajdonképpen nem is szükséges a DNS izolálása, elegendő ha a telepekből származó sejteket bevisszük a reakcióközegbe, ugyanis a PCR során használt magas hőmérséklet szétroncsolja a sejtfaalat és szabaddá teszi a DNS-t. A PCR-ből származó mintákat gélelektroforézisnek vetjük alá, és ha az általunk keresett szekvencia megtalálható a baktérium sejtben, a gél megfelelő pontján azonosíthatjuk a rá jellemző sávot (3,5,6).

4.4. A hírvivő ribonukleinsav vizsgálata RT-PCR technikával

Nemcsak a DNS, hanem az mRNS (hírvivő ribonukleinsav) is vizsgálható PCR segítségével. Ahhoz, hogy az mRNS-t tudjuk vizsgálni, először át kell írni DNS-re reverz transzkriptáz enzimet használva. Az így keletkezett DNS az ún. cDNS (komplementer DNS). A reverz transzkriptáz által katalizált reakció és a PCR egyetlen kémcsőben elvégezhető, ez az ún. RT-PCR (reverz transzkriptáz-PCR). Megfelelő kalibrálással a módszert kvantitatív célokra is lehet alkalmazni (3,5,6).

4.5. PCR technika alkalmazása diagnosztikai célokra

Kisméretű deléciók és inserciók kimutathatók PCR segítségével abban az esetben, ha olyan primereket tervezünk, amelyek közrefogják a mutáció helyét. Diagnosztikus értékű lehet a PCR elmaradása is, a primer kötődési helyének mutációja miatt (13,17,18,19,20).

Pontmutációk is kimutathatók, ha a PCR során keletkezett termékeket denaturáló gradiens gélelektroforézisnek vetjük alá. A pontmutáció következtében a kettős szálú DNS denaturálódási paraméterei megváltoznak, más denaturálószer koncentrációnál válik el a két szál egymástól a normál molekulához viszonyítva. Tekintve, hogy a denaturáció után a gélben való vándorlása lelassul, el lehet különíteni a normál gént a mutáns géntől (3).

A PCR segítségével nagyon gyors választ lehet adni arra, hogy az illető gén megtalálható-e a klinikai mintába vagy sem. Így könnyen azonosíthatók olyan fertőző ágensek, amelyek kitenyésztése és azonosítása esetleg heteket vehet igénybe. A PCR-t sikerrel alkalmazták számos vírus (pl. a herpes simplex vírus, Epstein-Barr-vírus, HIV - humán immunodeficiencia vírus, kanyaróvírus stb.), baktérium (a tuberkulózist okozó *Mycobacterium tuberculosis*, a nemi betegséget okozó *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia*, *Treponema pallidum* stb.)

és parazita (pl. *Trypanosoma*, *Leishmania*, *Toxoplasma* stb.) esetében (4,21,22).

Ugyancsak sikerrel alkalmazzák a technikát rákos sejtek detektálásában is (18,19,20,23). Bizonyos genetikai betegségek esetében lehetővé teszi a gyors diagnózis felállítását.

A PCR technika forradalmasította a molekuláris biológia szemléletmódját és eszköztárát, új lehetőségeket biztosítva az élővilág mélyreható megismeréséhez, valamint az emberiséget sújtó bizonyos betegségek gyors, megbízható és pontos diagnosztizálásához.

Míg 1985-ben csak 5 tudományos cikk foglalkozott a PCR technikával, addig 1990-ben már laboratóriumok ezrei alkalmazták. A jövőben a PCR technika használata rutinszerűvé válik a tudomány számos területén, újabb és újabb alkalmazásaival pedig jelentős kutatási eredményekhez juthatunk.

Irodalom

1. Stryer, L.: *Biochemistry*, Freeman & Co., New York, 1995.
2. Schleif, R.: *Genetics and Molecular Biology*, Johns Hopkins University Press, Baltimore, 1993.
3. Fésüs, L.: *Biokémia és molekuláris biológia*, Nyomdaipari Szolgáltató KKT., Debrecen, 1999.
4. Kiss, M.: *Lege Artis Medicinae*, 5 (12), p. 1108-1113, 1995.
5. *Multimedia Methods in Molecular Biology*, Chapman & Hall Electronic publishing division, London, 1996.
6. Dombrádi, V.: *Alapvető molekuláris biológiai módszerek*, Debreceni Orvostudományi Egyetem, Debrecen, 1998.
7. Mullis, K., Faloona, F., *Meth. Enzymol.*, 55: 335-350, 1987.
8. Chien, A., D.B. Edgar, and J.M. Trela, *J. Bacteriol.*, 127:1550-1557, 1976.
9. Saiki, R.K., D.H. Gelfand, S. Stoffel, S.J. Scharf, R. Higuchi, G.T. Horn, K.B. Mullis, and H.A. Erlich, *Science*, 239: 487-491, 1988.
10. Eckert, K.A., and T.A. Kunkel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 9253-9257, 1989.
11. Lathe, J., *J. Mol. Biol.*, 183: 1-12, 1985.
12. Lee, C. C., S. Wu, R.A. Gibbs, R.G. Cook, D.M. Muzny, and C.T. Caskey, *Science*, 239: 1288-1291, 1988.
13. Wong, C., C.E. Dowling, R.K. Saiki, R.G. Higuchi, H.A. Erlich, and H.H. Kazazian, *Nature*, 330: 384-386, 1987.
14. Gyllenstein, U.B., and H.A. Erlich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 7652-7656, 1988

15. Innis, M.A., K.B. Myambo, D.H. Gelfand, and M.A.D. Brow, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 9436-9440, 1988.
16. Scharf, S.J., G.T. Horn, and H.A. Erlich, Science, 233: 1076-1087, 1988.
17. Yandell, D.W., T.A. Campbell, S.H. Dayton, R. Petersen, D. Walton, J.B. Little, A. McConkie-Rosell, E.G. Buckely, and T.P. Dryja, N. E. J. Med., 321: 1689-1695, 1989.
18. Burmer, G.C., and L.A. Loeb, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 2403-2407, 1989.
19. Neri, A., D.M. Knowles, A. Greco, F. McCormick, and R. Dalla-Favera, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 9268-9272, 1989.
20. Neubauer, A., B. Neubauer, and E. Liu, Nuc. Acid Res., 18: 993-998, 1990.
21. Laurence, F., C. Rouzioux, F. Veber, C. Jacomet, V. Courgnard, S. Blanche, M. urgard, C. Griscelli, and C. Brechot, Lancet, ii: 538-541, 1988.
22. Brisson-Noel, A., D. Lecossier, X. Nassif, B. Giquel, V. Levy-Frebault, and A. J. Hance, Lancet, ii: 1069-1071, 1989.
23. Kawasaki, E.S., S.S. Clark, M.Y. Coyne, S.D. Smith, R. Champlin, O.N. Witte, and F.P. McCormick, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 5698-5702, 1988.