



M Ű E G Y E T E M 1 7 8 2

A PCR ALAPJAI, MŰKÖDÉSE ÉS FELHASZNÁLÁSA

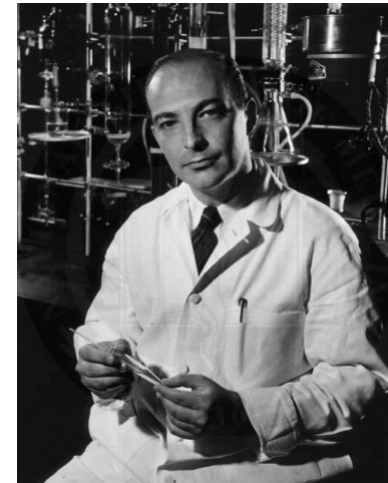
Készítette: Vízkei Márton, Jenei Robin, Nagy Áron

Bevezetés

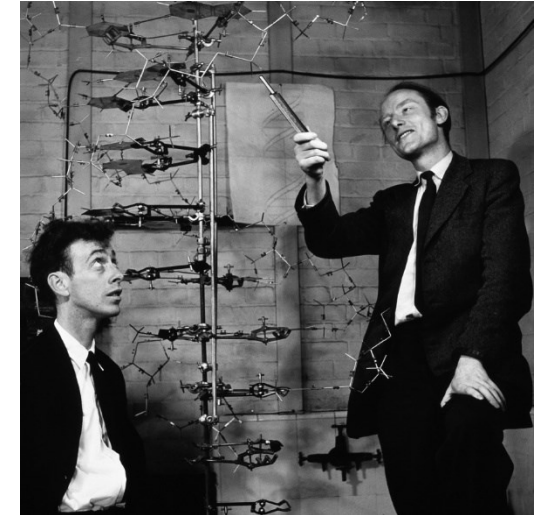
A PCR (polymerase chain reaction) lehetőséget ad arra, hogy a biológiai információt exponenciálisan amplifikáljuk, ami robbanásszerűen növelte az előrehaladásunkat a biológia számos területén a biokémiától a paleontológiáig. A PCR számos kutatási területeken megkerülhetetlen eszköz, érdemes tehát ismerni alapjait, működését, típusait és gyakorlati alkalmazásait.

Története I.

- Az első fontos, a módszer megalkotásához vezető felfedezés a DNS szerkezetének leírása volt
- James D. Watson és Francis Crick 1953
- DNS-polimeráz felfedezése, szintén kulcsfontosságú előrelépés
- Arthur Kornberg 1956



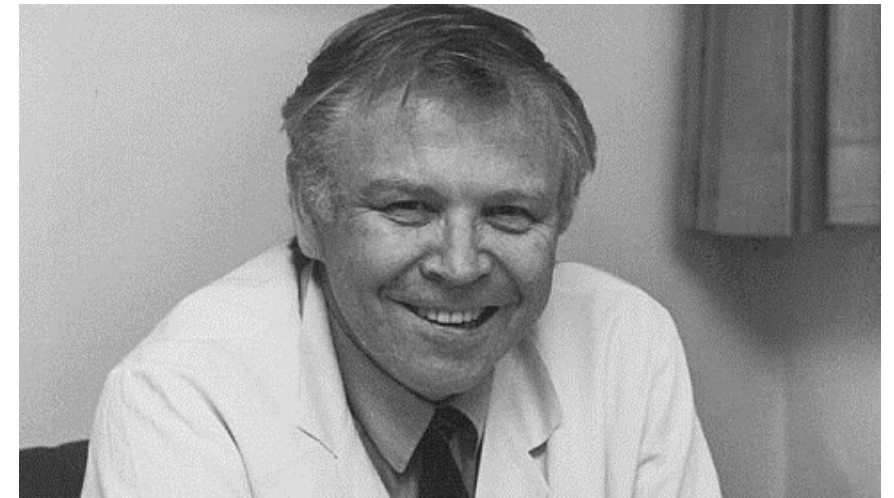
www.jbc.org



www.sciencehistory.org

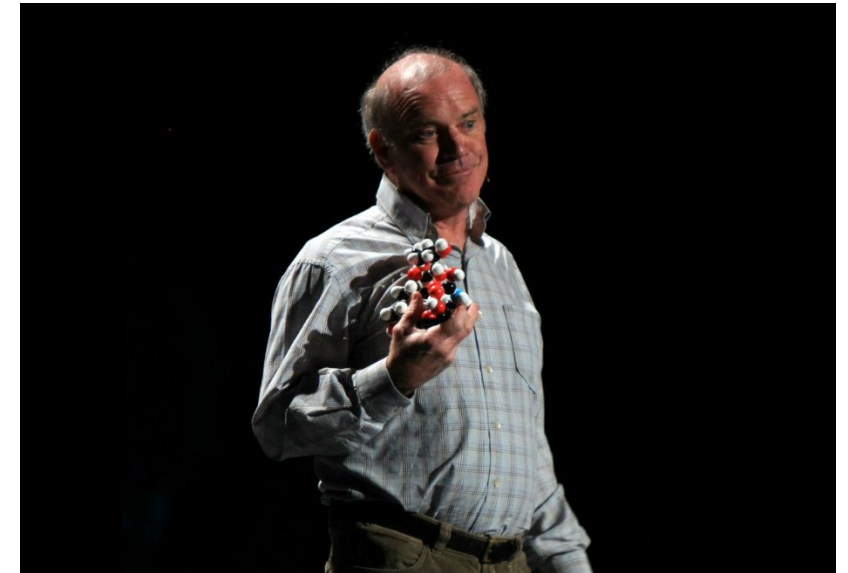
Története II.

- Magát a PCR mögötti tudományos koncepciót Kjell Kleppe írta le 1969-ben
- A PCR ekkor még nem volt a gyakorlatban is alkalmazható
- A primerek szükséges mennyiségben nem voltak előállíthatóak
- Polimeráz enzimeket nem lehetett a megfelelően tisztítani



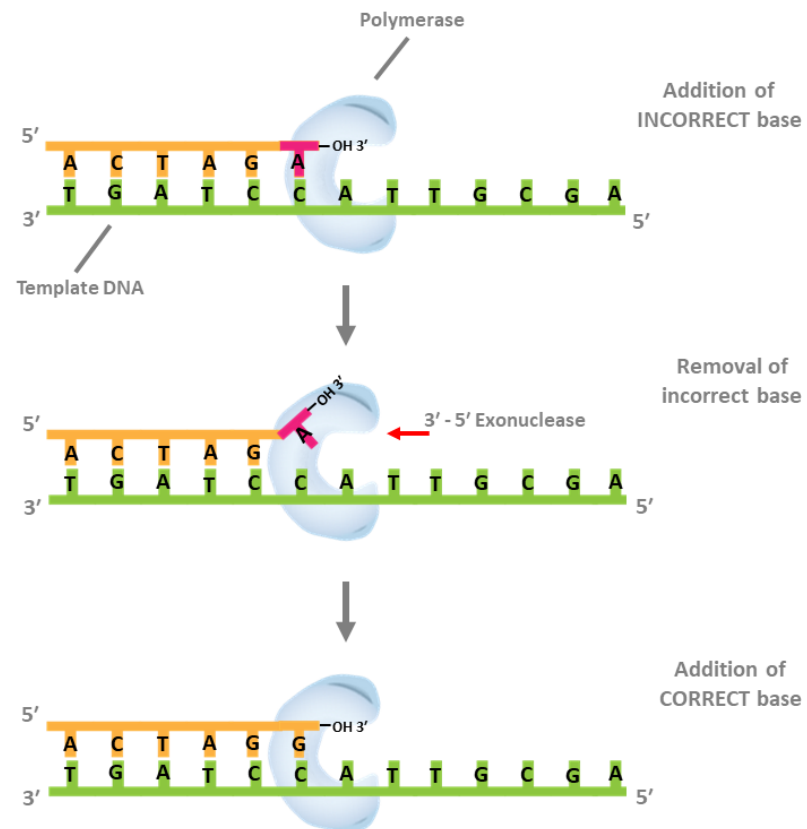
Története III.

- Az első megvalósítható PCR módszert Kary Mullis alkotta meg aki Cetus Corporation technikusaként az oligonukleotidok nagy mennyiségű gyártásának megvalósításán dolgozott
- 1985-ben már minden feltétel adott volt a gyakorlati alkalmazáshoz
- Az egyik leggyakrabban használt technika
- 560.000 publikációban szerepel a PubMed-ben



DNS-polimerázok a PCR-ban

- A DNS polimeráz enzimek egy DNS templátra képesek komplementer DNS-szálat szintetizálni az élő sejtekben
- Hibajavítás
- Fidelitás
- Processzivitás
- Nukleotid specifikusság



Escherichia coli DNS polimeráz I

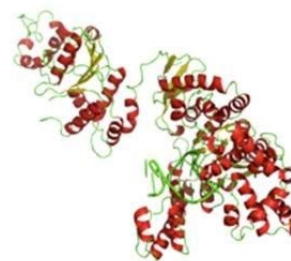
- Klenow fragment
- Ciklusban pótolni kellett



Taq polimeráz

- az első és a mai napig legismertebb enzim
- hőstabilitásának hála több cikluson keresztül is lehetséges volt az amplifikáció

Habitat of
Thermus aquaticus



Structure of Taq Polymerase

Pfu polimeráza és Vent polimeráz

- *Pyrococcus furiosus*
- stabilabb és a fidelitása is nagyobb 3'-5' endonukleáz aktivitása miatt
- *Thermococcus litoralis*
- eddig említettekénél hőstabilabb, de fidelitása elmarad a Pfu polimerázétól



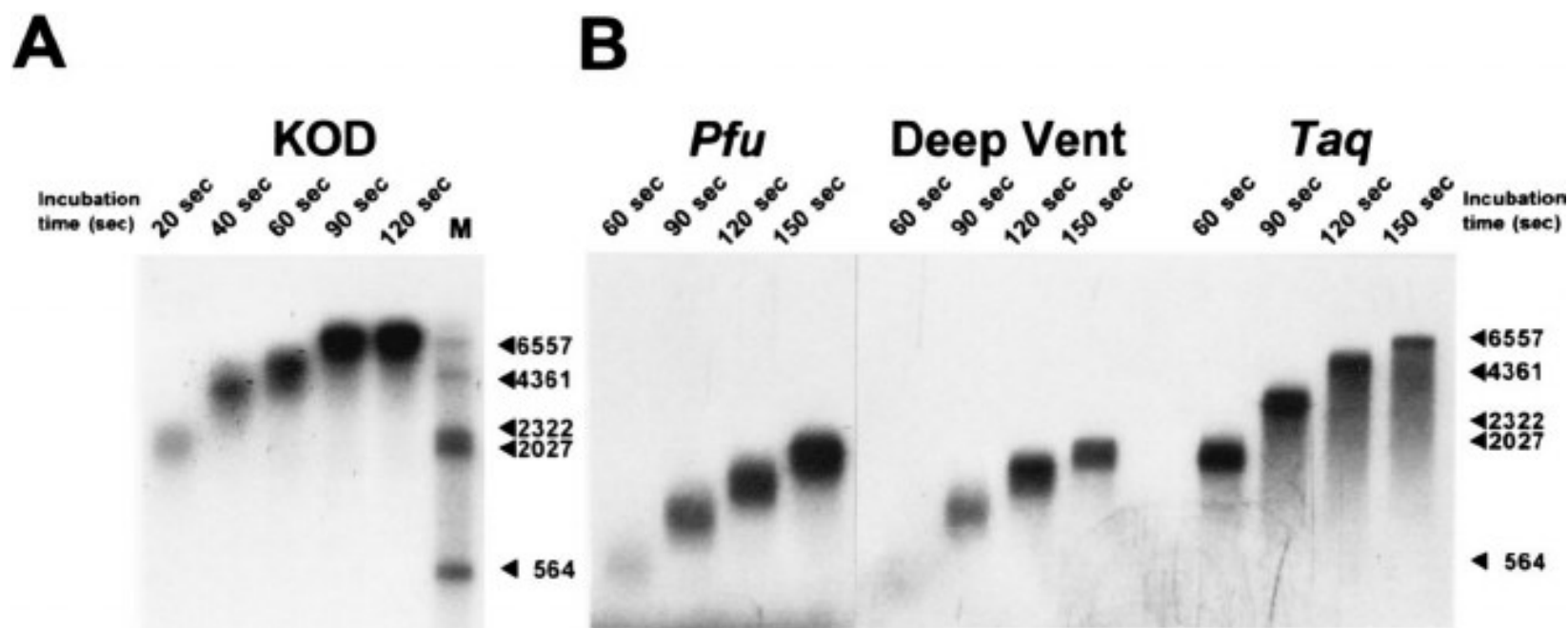
LA-PCR

- A PCR hosszan tartó pontosságát tovább lehetett növelni
- Mutáns Taq polimeráz és egy 3'-5' aktivitású ősbaktérium polimeráz keverék

KOD1

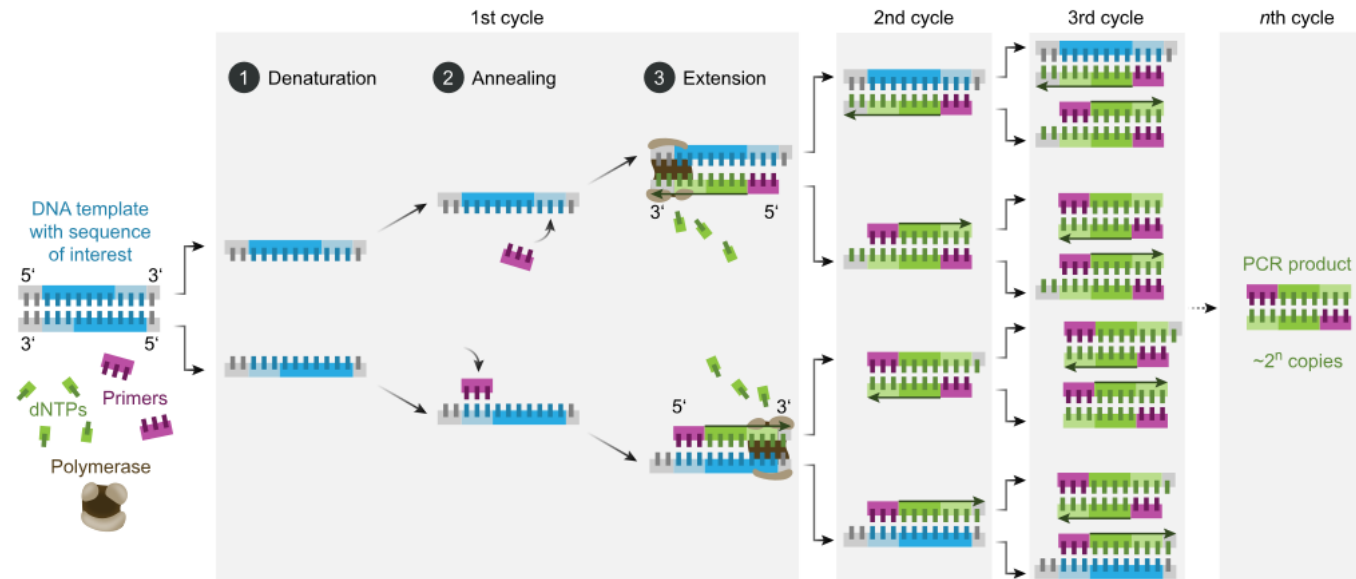
Thermococcus kodakarensis

KOD1 DNS-polimeráz a korábbiaknál is gyorsabb és pontosabb szintézisre képes



PCR mechanizmusa

- „Molekuláris fénymásolás”
- Adott RNS vagy DNS szakaszt másol le és szaporít fel



PCR-hez szükséges molekulák

- Sablonmolekula- RNS vagy DNS
- Két Primer

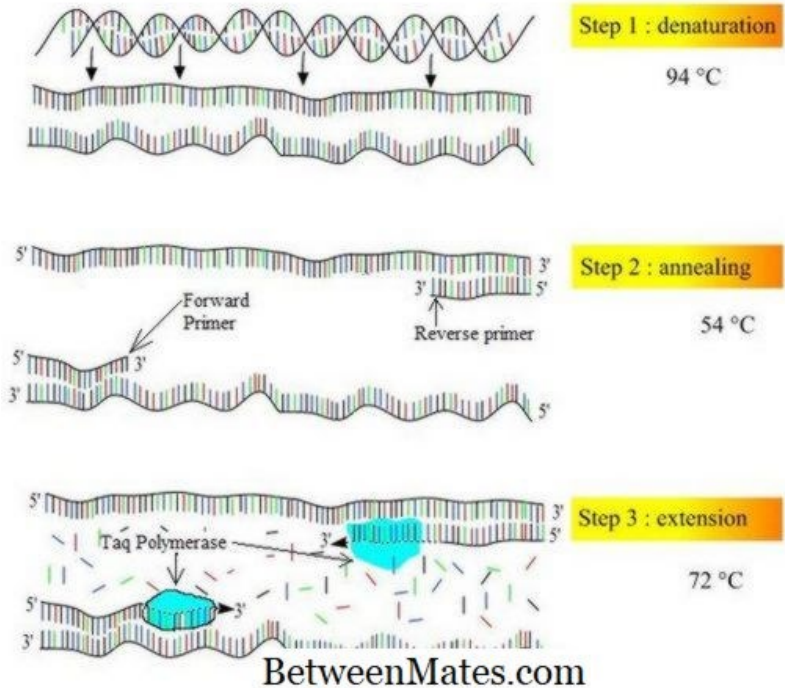
Primerek

- A vizsgálandó DNS-darab mindkét oldalán lévő nukleotidszekvenciák duplikátumai
- Nukleotid-sorrendjüket ismerni kell!
- Laborban előállíthatók vagy megvásárolhatók

PCR lépései

- Denaturáció: A spirál szálait 90-96 °C-ra hevítve ki kell tekerni és szét kell választani
- Hibridizáció/Annealing: primerek bekötnek a komplementer bázisokhoz
- DNS szintézis: polimerázok új szálakat szintetizálnak

PCR : Polymerase Chain Reaction

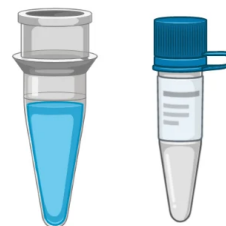
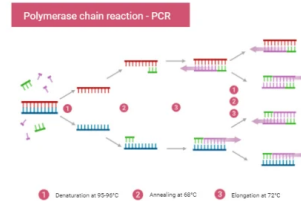


PCR típusai

- Kvantitatív PCR technikák
- Kvalitatív PCR technikák
- Hagyományos PCR
- Multiplex PCR
- Beágyazott-félbeágyazott PCR
- Standard PCR

Types of PCR with definition and uses

1. AFLP PCR
2. Allele-specific PCR
3. Alu PCR
4. Assembly PCR
5. Asymmetric PCR
6. COLD PCR
7. Colony PCR
8. Conventional PCR
9. Digital PCR (dPCR)
10. Fast-cycling PCR
11. High-fidelity PCR
12. Hot-start PCR
13. In situ PCR
14. Intersequence-specific (ISSR) PCR
15. Inverse PCR
16. LATE (linear after the exponential) PCR
17. Ligation-mediated PCR
18. Long-range PCR
19. Methylation-specific PCR (MSP)
20. Miniprimer PCR
21. Multiplex-PCR
22. Nanoparticle-Assisted PCR (nanoPCR)
23. Nested PCR
24. Overlap extension PCR
25. Real-Time PCR (quantitative PCR or qPCR)
26. Repetitive sequence-based PCR
27. Reverse-Transcriptase (RT-PCR)
28. Reverse-Transcriptase Real-Time PCR (RT-qPCR)
29. RNase H-dependent PCR (rhPCR)
30. Single cell PCR
31. Single Specific Primer-PCR (SSP-PCR)
32. Solid phase PCR
33. Suicide PCR
34. Thermal asymmetric interlaced PCR (TAIL-PCR)
35. Touch down (TD) PCR
36. Variable Number of Tandem Repeats (VNTR) PCR



PCR Type	Target	Application	Advantages	Disadvantages
Conventional	DNA	• Amplification and detection of DNA sequences	<ul style="list-style-type: none"> • Easiest of the PCR types to perform • Low cost of equipment and supplies 	<ul style="list-style-type: none"> • Normally produces only qualitative results • Requirement for postamplification analyses increases time and labour as well as risk of cross-contamination and human error • Products should be confirmed by probe hybridization or sequencing
Real Time	DNA	• Amplification, detection and quantification of initial copy number of nucleic acid target	<ul style="list-style-type: none"> • Rapid potential for relative or absolute target sequence quantification • Usually eliminates requirement for postamplification analyses • Increased specificity because probes or melting curves are used • Totally closed tube analyses creates less potential for cross-contamination 	<ul style="list-style-type: none"> • Requires more expensive equipment and reagents • Less flexibility in primer and probe selection • Less amenable to other downstream product confirmation analyses, such as sequencing due to small amplicon size
Multiplex	DNA	• Simultaneous amplification and detection of two or more different DNA sequences (can be performed as a conventional or realtime procedure)	<ul style="list-style-type: none"> • Amplification of multiple target sequences in a single reaction reduces time and labour requirements 	<ul style="list-style-type: none"> • Less flexibility in primer selection • Requires significant optimization • Generally has lower sensitivity and specificity
Nested	DNA	• Amplification and detection of DNA using external and internal primer sets in sequential steps	<ul style="list-style-type: none"> • Potentially more sensitive • Decreases the potential for nonspecific amplification 	<ul style="list-style-type: none"> • More likely to produce false positives due to carryover of products from first amplification step • An additional room for sample preparation after the first amplification step is needed
Reverse Transcriptase (RT)	mRNA, rRNA, viral RNA	• Amplification and detection of RNA	<ul style="list-style-type: none"> • Amplification of all RNA types 	<ul style="list-style-type: none"> • RNA is sensitive to degradation • Added RT step may increase time and costs as well as potential for contamination

Source: The United States Environmental Protection Agency (EPA), Quality Assurance/Quality Control Guidance for Laboratories Performing PCR Analyses on Environmental Samples, October 2004

Kvantitatív PCR

- Más néven Real-time PCR
- Megmutatja mennyi DNS van egy mintában
- Adott DNS szegmens kimutatására is jó

Kvalitatív PCR

- Gyors, egyszerű és olcsó
- Kimutatható, hogy egy egyén újrafertőződött-e egy rokon kórokozóval

PCR	VERSUS	QPCR
PCR is a technique in biotechnology that allows the analysis of a short sequence of DNA by amplifying a selected segment of DNA		QPCR is a technique in biotechnology that allows the detection, characterization, and quantification of nucleic acids for various applications
Qualitative technique		Quantitative technique
The product is detected by the agarose gel electrophoresis		The product can be detected in each amplification cycle
The data is collected at the end of the reaction		The data is collected during the exponential phase of the reaction
Has a very poor resolution		Has a very high resolution
Uses ethidium bromide to stain the product		Uses fluorescent dyes to detect the product
A more time-consuming method		Less time-consuming
RT-PCR is the type of PCR that uses RNA as the template		RT-qPCR is the type of qPCR that uses RNA as the template
Used to detect the presence or absence of certain genomic fragments		Used to quantify a particular fragment in a sample

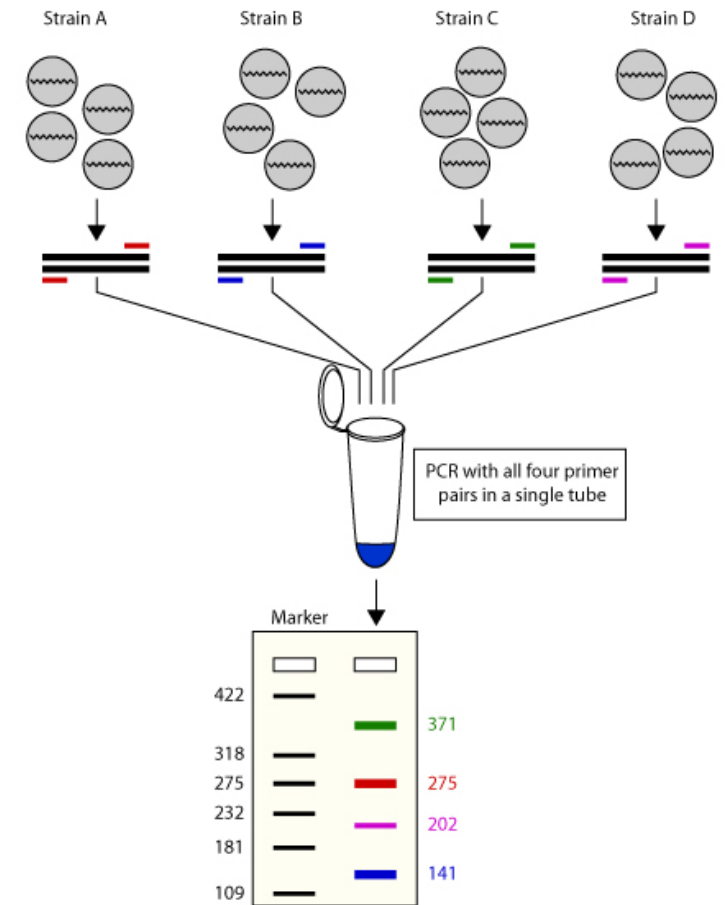
Visit www.pediaa.com

Hagyományos PCR

- Szokásos PCR eljárás
- Primerek specifikusan kötnek 2 DNS szállal

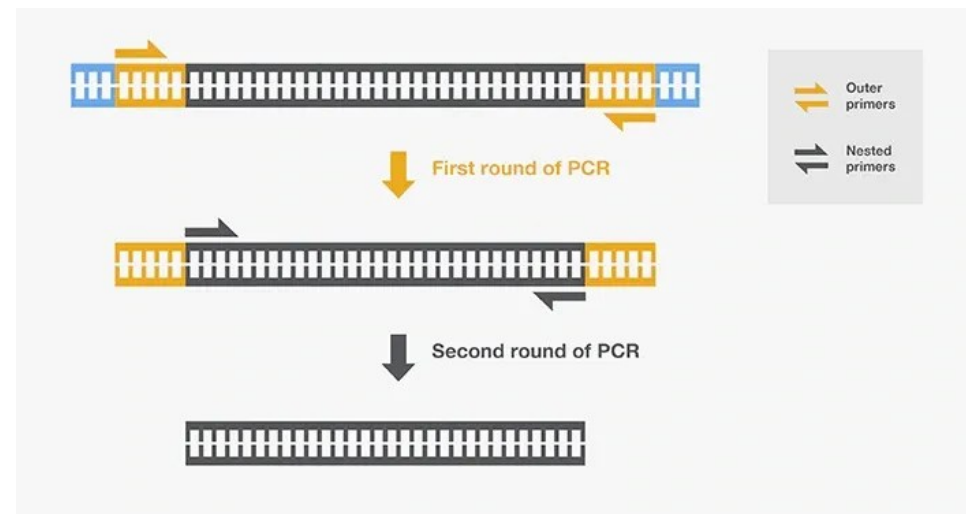
Multiplex PCR

- Egyetlen mintában különböző kórokozókat mutat ki
- Exonikus/intronikus szekvencia azonosítására szolgál specifikus génekbe
- Bázispár-hosszúságnak különbözőnek kell lennie
- Ezt a technikát vírusos/bakteriális és egyéb fertőző ágensek kimutatására használják



Beágyazott-félbeágyazott PCR

- két primer-készletet használnak egyetlen lókuszontra
- Az első készlet egy amplifikált szekvencia
- a második készlet pedig komplementer az első szekvenciához, amely rövidebb lesz, mint az első amplifikált termék
- Célja a nem várt primer kötőhelyek felerősítéséből eredő szennyeződések csökkentése



Standard PCR

- Egyszerű, hatékony és érzékeny
- Egy primerpárral végzik
- Kvantitatív/félkvantitatív-real time PCR Fluoreszcens festékek jelölésre

PCR Alkalmazása

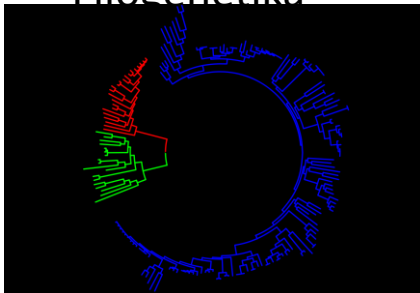
- Mikrobiológiában



- Orvoslás



- Filogenetika



Fogyasztói Genetika?



Bűnügyi nyomozás



Élelmiszerek és a mezőgazdaság



Mikrobiológiában

- A PCR számos környezeti hatás megismerését teszi lehetővé, különösen a mikroorganizmusokhoz kötött folyamatokat. PCR által meghatározhatóak konkrét mikroorganizmusok, illetve azok mennyisége. Előnye más módszerekhez képest, hogy kis mennyiségű mikroorganizmusok is meghatározhatóak. A vizek és az élelmiszerek egészségügyi minőségét gyakran ezzel állapítjuk meg.

Fogyasztói Genetika?

- PCR elérhetővé tette, hogy bárki tesztelje a genomját és ez egy új ágazat kialakulását is magával hozta. Egy ágazat, amely személyre szabott ajánlatokat nyújt nekünk a genomunk alapján. Például ilyen a nutrigenomics, amely megtudja nekünk mondani, hogy milyen típusú élelmiszert nutrient lenne célszerű fogyasztanunk.

Bűnügyi nyomozás

- Rengeteg bűnözőt azonosítanak a PCR-nak köszönhetően, illetve rengeteg bizonyítékot is nyújt ezen bűnözők elítéléséhez, például vér, haj, sperma, avagy pollen és föld minta formájában. DNS „Ujjlenyomatok” felállítása (avagy DNS profilok), rokonok azonosítása, mind lehetséges a PCR-nak köszönhetően.
- Mohák vizsgálata



Filogenetika

- Törsz fejlődési analitika különböző forrásokat használva például haj mintából. Feltérképezhető vele állatok genetikája és ezáltal segíthet megőrzésükben is

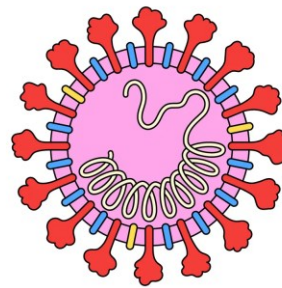
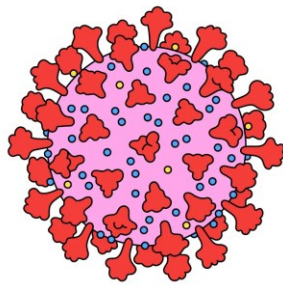
Élelmiszerek és a mezőgazdaság

- GMO génmódosítást is lehetővé teszi mivel segítségével a DNS-t feltérképezve célzottan javíthatunk rajta.



PCR Legfontosabb Alkalmazása

Segít felvenni a harcot a vírussal. A PCR az egyik legmegbízhatóbb módszer a vírussal fertőzött személyek azonosítására. A PCR teszt polimeráz láncreakción alapuló teszt, mely a vírus RNS-ét mutatja ki. A mintákat minden esetben: az orrban, illetve a garatban található nyálkahártyáról veszik. Egy bizonyos RNS teszi egyedivé ezt a vírust, így alkalmas arra, hogy általa a vírus jelenlétét bizonyítsák. A vizsgálatot molekuláris biológiai módszerekkel végzik. Ezek valójában nukleinsav-amplifikációs (felsokszorozó) módszerek, amelyek közül a PCR, azaz a polimeráz-láncreakció a legelterjedtebben használt. Valójában még a PCR is csak egy gyűjtőnév, ami sok lehetőséget foglal magába. Leginkább valós idejű, reverz transzkripció PCR-t végzik. A vírus RNS-ének jól meghatározott, specifikus szakaszát vagy szakaszait felsokszorozzák és kimutathatóvá tesszük. A vírus több szakaszának együttes vizsgálatával, növelhető a kimutatás specificitása és szenzitivitása is. Ráadásul a detektálást a felsokszorozással egy időben végzik, így a kiértékelés lényegesen gyorsabbá válhat.



- A módszerhez a vírus RNS-e szükséges. Mivel a vírus RNS-ét akarjuk kimutatni, ezt a PCR reagensjei számára hozzáférhetővé kell tennünk a mintából. Nagyon leegyszerűsítve: a vírus RNS-e jelen lehet nagyjából szabadon a sejteken belül, de jelen lehet a víruson belül, a vírus pedig a sejten belül. Ez a sok minden, ami körülveszi az RNS-t, gyakorlatilag akadályt képez, így a PCR nem tud végbemenni. Valahogyan ki kell szabadítani az RNS-t. Erre sokféle RNS-izolálási módszert használhatunk, ami történhet kézzel vagy gépekkel, automatizálva is. Ilyen mennyiségű gépre, reagensre, műanyag árura soha nem volt még szükség. A gyártóknak úgy kellett volna sokszorosára növelni kapacitásaikat, hogy őket is sújtotta a járvány hatása. A reagensok, műanyagok, automaták elérhetősége korlátozott és akadozó volt, és jelenleg is problémát okoz. Így olyan PCR-tesztek fejlesztése is megindult, amelyek nem igénylik az előzetes RNS-izolálást, hanem a mintából közvetlenül végezhetőek. Sőt, nem PCR-alapú vizsgálatok is előtérbe kerültek.
- A PCR-hez szükséges reagensok. A diagnosztikai PCR-eket kereskedelmi forgalomban kapható kitékkel végzik. Ezek megfelelő tesztelésen estek át, és egy erre kijelölt szakmai szervezet engedélyezte a használatukat.
- Maga a PCR egy gépben zajlik. Egy bizonyos teszt adott gépeken futtatható, azzal kompatibilis, illetve arra vizsgálták. Ebben a gépben meghatározott számú mintát (96, de akár 384) lehet egyszerre vizsgálni, ami adott ideig tart. Így minél több mintát akarunk egy időegység (például 1 nap) alatt vizsgálni, annál több gép kell.

Források

Képek:

www.sciencehistory.org

www.jbc.org

www.sciencenorway.no

www.researchgate.net

www.microbenotes.com

hu.weblogographic.com

www.premierbiosoft.com

www.microbeonline.com