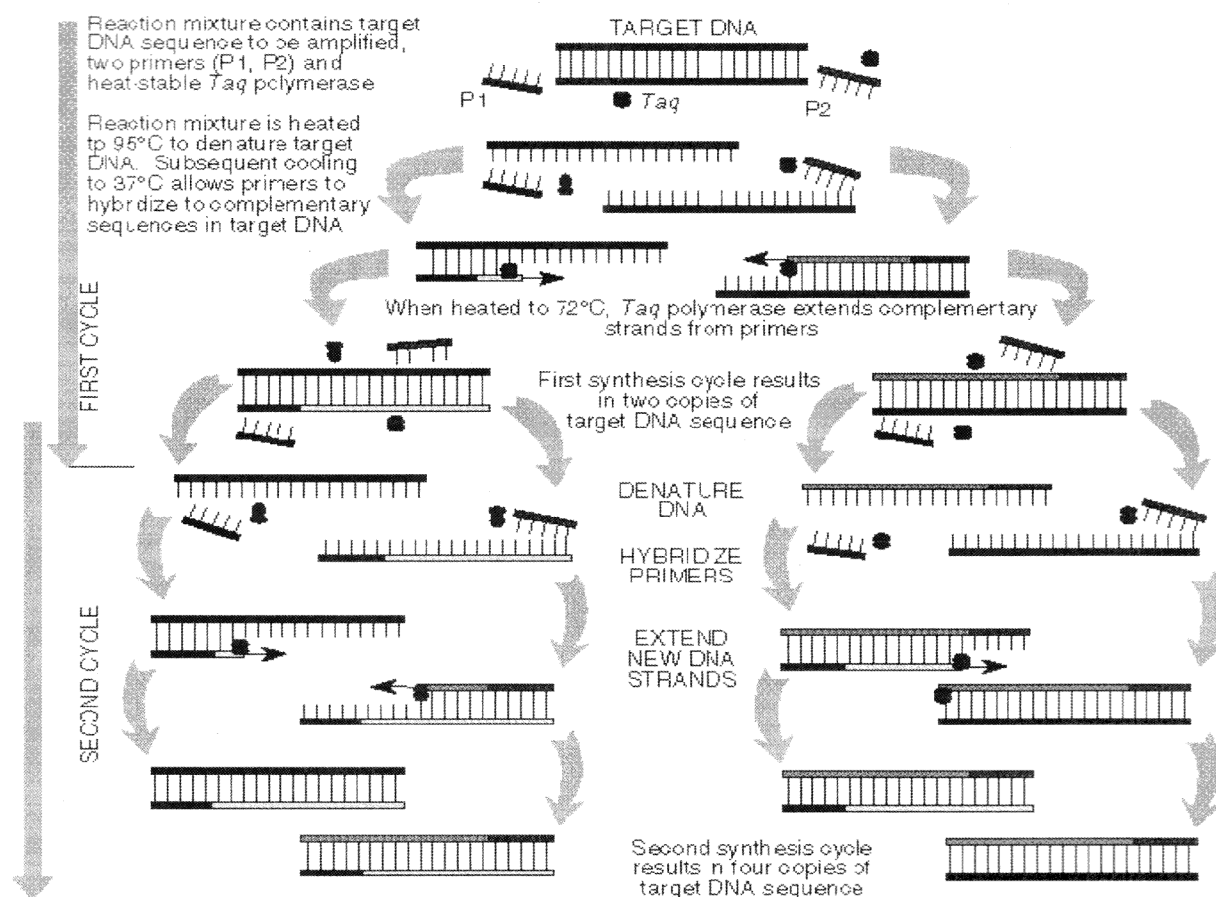


A mennyiségi polimerázláncreakció (qPCR)

A mennyiségi PCR: Real-Time és a Semi-Quantitative PCR

A Polimeráz láncreakció (PCR) egy olyan módszer, aminek a segítségével, egy hosszabb kétszálú DNSből egy rövidebb (általában 100-600 bázispár hosszú) DNS szakasz **exponenciális felszaporítását** teszi lehetővé. A PCR egy primer párt használ, mindkettő kb 20 nukleotid hosszú, melyek a cél DNS szakaszhoz kapcsolódnak a komplementer DNS szálon. Az újonnan keletkező szálak szintézise a primerektől indul, ezért csak a kívánt régiót másolja le. Miután elkészült ez a másolat, ugyanazok a primerek felszabadulnak, és újra használhatóak lesznek, ezután másolatot tudnak készíteni az eredeti DNS szálról, és a célszakasz első másolatáról, a PCR termékről is. Így már két minta áll rendelkezésre a másoláshoz, aminek az eredményeképpen már 4 kópia lesz. Így vezet exponenciális sokszorosításhoz.

DNA Amplification Using Polymerase Chain Reaction



1. Ábra. A Polimeráz láncreakció sematikus működési elve.

Ahhoz, hogy a duplaszálú DNS szálait elválasszuk, a hőmérsékletet meg kell emelni, minden egyes ciklusban, ezért jelentett hatalmas előrelépést a hőstabil DNS polimeráz felfedezése, melyet a *Thermus aquaticus* baktériumból izoláltak (Taq polymerase). Ez a faj hőforrásokban él, az enzimeje jól bírja a magasabb hőmérsékletet így nem szükséges mindig új enzimeket hozzáadni az elegyhez.

Néhány (legtöbbször úgy negyven) ciklus után elég pcr termék keletkezik ahhoz, hogy azt etídium bromidos festéssel agaróz gélen vizsgálhassuk. A továbbiakban szó lesz arról, hogy

miért csak félig kvantitatív (a legjobb esetben is) ez a módszer (2. ábra). A kezdeti DNS mennyiség és a termék mennyisége között legtöbbször kevés összefüggés van. A módszer leginkább arra alkalmas, hogy a szekvencia jelenlétét detektálhassuk.

Léteznek mRNS-en alapuló kutatások is. Ilyenkor, hogy a messenger RNS mennyiségét meghatározhassuk a polimeráz láncreakció segítségével, reverz transzkriptázzal mRNSből a kódoló DNS-t (cDNS) szintetizálunk, majd PCR segítségével feldúsítjuk és agaróz gélen megfuttatjuk. Régebben sok esetben ezzel a módszerrel próbálták a génaktivitás mértékét meghatározni. Azonban ez a módszer a sima DNS meghatározásánál is pontatlanabb, hiszen a folyamat egy újabb nem kvantifikálható lépéssel, a reverz transzkripció lépéssel hosszabb.

A Reverz Transzkripció PCR vizsgálatot sokszor RT-PCRnek is rövidítik, ami nem szerencsés, mert a valóban kvantitatív, real-time PCRrel (valós idejű polimeráz láncreakció).

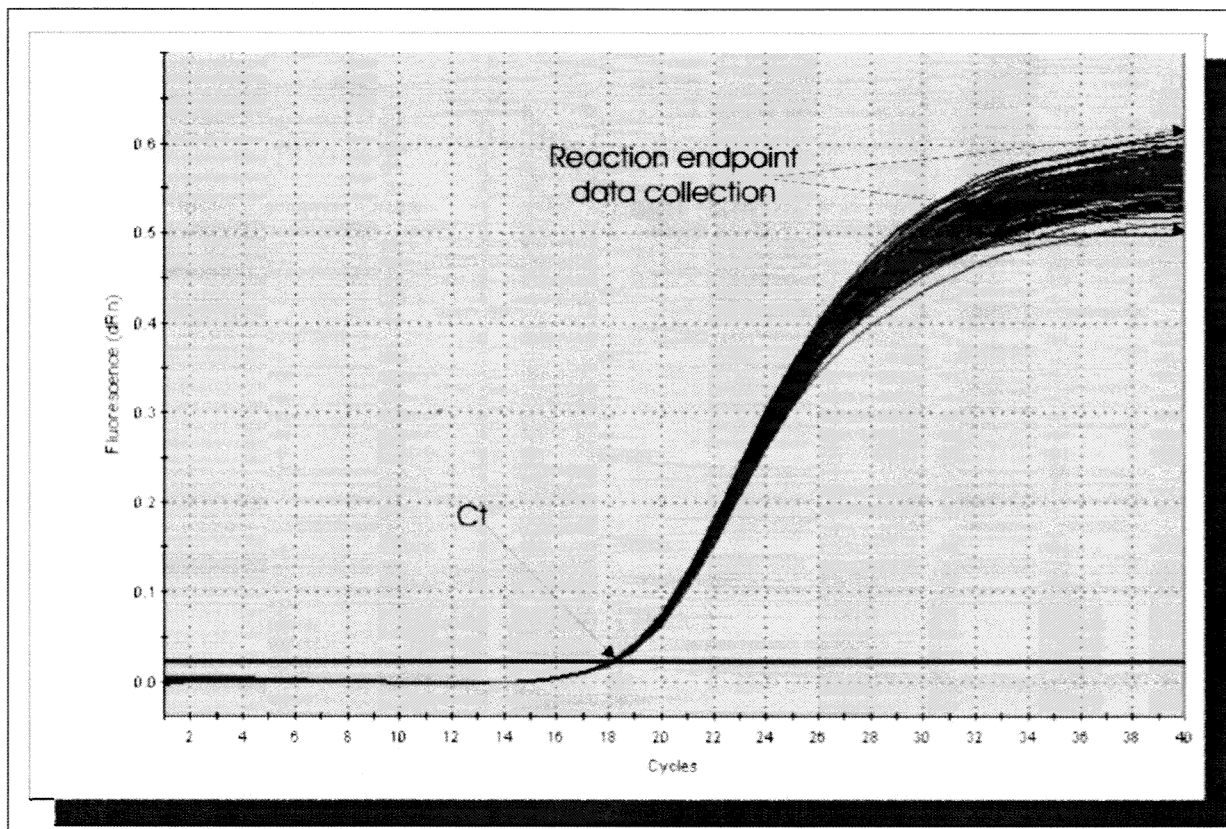
A valós idejű polimeráz láncreakció technika (PCR) széles körben használatos DNS mennyiségi vizsgálatára, mert a célszekvencia feldúsítása nagyobb érzékenységgű mérést tesz lehetővé, mint más módszerekkel. A mennyiségi polimeráz reakció (QPCR) során a feldúsított termékhez fluoreszcens intenzitást társítunk egy fluoreszcens jelzőmolekulával.

A két fő módszert alkalmazzák, melyek között a különbség az időpont, amikor az eredeti templát mennyiség kiszámolásához szükséges fluoreszcens jelet megmérjük. Ez lehet a reakció végén (semi-quantitative, sQPCR) vagy akkor, amikor az még tart (real-time, valós idejű, rtPCR). A reakcióvégi sQPCR esetében a fluoreszcens adatokat akkor gyűjtjük, amikor a reakció már befejeződött, általában 30-40 kör után, és a végső fluoreszcencia adatból számoljuk vissza az eredeti templát mennyiséget. Ezzel a módszerrel, akárcsak az etídium bromidos módszerrel, némileg inkonzisztens eredményeket kapunk. Az utolsó 20 dúsítási ciklusban számos molekula található már az elegyünkben, és a különböző makromolekulák egymást akadályozhatják a működésben, az utolsó PCR reakciók határfoka nagyon lecsökkenhet. Egy optimalizált reakcióban, a célszekvencia mennyisége nagyjából megduplázódik minden dúsítási körben, azonban ez az utolsó körökben már nem lesz igaz. Polimeráz inaktivitás, inhibitorok aktivitásának fokozódása szokott a leggyakrabban problémát okozni.

Bár ez a jelenség természetesen mintáról mintára változik, az tudható, hogy a végső fluoreszcens értékek 1. nagyot szórnak, 2. nem a kiindulási templát mennyiségtől függenek.

Az egyes ábrán szépen nyomon követhető, hogy ugyanolyan mintákból, ugyanolyan beállításokat alkalmazva milyen különböző eredményeket kaphatunk, ami jól mutatja a módszer korlátozott felhasználási lehetőségeit. Manapság már csak olyan diagnosztikai vizsgálatokban alkalmazzák a módszert, ahol adott DNS régiókat akarnak kimutatni, vagy adott génaktivitást jelző mRNS-t szeretnének detektálni, annak mennyiségétől függetlenül.

A valós idejű, vagy real-time QPCR egy lényegesen érzékenyebb és jobban megismételhető módszer, ahol a fluoreszcens aktivitást minden körben megméri. Ezzel lehetővé válik a templát mennyiségi mérése a korai ciklusok alatt is, ahol a molekula agglomeráció még nem zavarja a szekvencia duplázódást, így pontosabban tudunk az eredeti szekvencia mennyiségére, így pl. génaktivitásra következtetni.



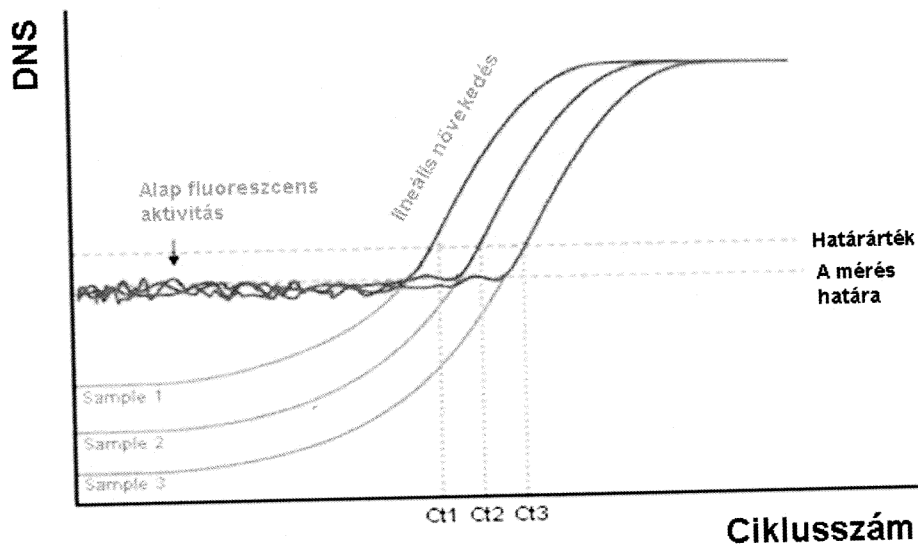
2. Ábra. 96 teljesen egyforma minta teljesen azonos beállítású QPCR futásának összehasonlítása. Látható, hogy a 20. ciklus után az adatok elkezdnek szórni.

A folyamat során egy fluoreszcens aktivitású molekulát (mint a **duplaszálú DNShez kötődő SYBR Green**) használunk, hogy a szekvencia sokszorosítását nyomon tudjuk követni. Minden egyes körben a fluoreszcencia mértékének növekedése arányos a ciklus kezdeti templátkoncentrációjával, és a gép ezeket az adatokat folyamatosan gyűjtve analizálja. Az eredményt végül a fluoreszcens aktivitást a ciklusszám függvényében ábrázoló grafikonról olvashatjuk le (3. Ábra). Ezt korrigáljuk a kezdőponti fluoreszcens értékkel (ezt alapvonal korrigációnak hívjuk), majd a határértéket ezen érték fölé, de még a lineáris növekedés vége alá állítjuk be (3. Ábra). Azt az amplifikációs ciklust ahol a fluoreszcens eredmény átlépi a határértéket „Ct”-nek vagy határciklusnak hívjuk. A határciklusszám közvetlenül összefügg a kezdeti koncentrációval. Minél nagyobb a kezdeti DNS templátmennyiség, a Ct annál hamarabb érjük el.

Az MxPro programcsomag meghatározza a határciklust néhány, felhasználó által megadott paraméter segítségével. Ha hagyományos hígítási sort is futtatunk a meghatározandó mintával együtt, akkor a szoftver összehasonlítja majd a CT értékeket, és így fogja meghatározni a mintánkban lévő DNS kezdeti mennyiségét. Ezt **abszolút** értékmeghatározásnak nevezzük.

Ha nem ismert koncentrációjú mintákat futtatunk, akkor csak **relatív** összehasonlítás válik lehetővé, vagyis pontos értéket nem kapunk, csak sorba rendezhetjük a mintáinkat a mennyiség alapján.

Az abszolút és relatív értékmeghatározásra a legjobb példa, ha a testmagasság megmérésére (mint a skálával összehasonlítás során végzett abszolút értékmeghatározás) vagy a tornasorra (a testmagasság alapján magasabb alacsonyabb sorrendbe rendezett relatív értékmeghatározás) gondolunk.



3. Ábra. A fluoreszcens mérés és a rtQPCR működési elve. A kezdeti koncentrációt a Ct, vagyis a határciklus elérésének idejéből számoljuk ki. Attól függően, hogy ismert koncentrációjú, vagy ismeretlen koncentrációjú mintákat vetünk össze, abszolút, vagy relatív értékhatározásról beszélünk.

A valós idejű QPCR alkalmazási területe folyamatosan bővül: a génexpressziós kutatásoktól, a génexpresszió mérésén át az SNP (single nucleotid polimorfizm) analízis, allél vizsgálat, GMO tesztelés, virion monitoring (pl. HIV fertőzöttek esetében) vagy egyéb patogének kimutatása.

Balesetvédelem

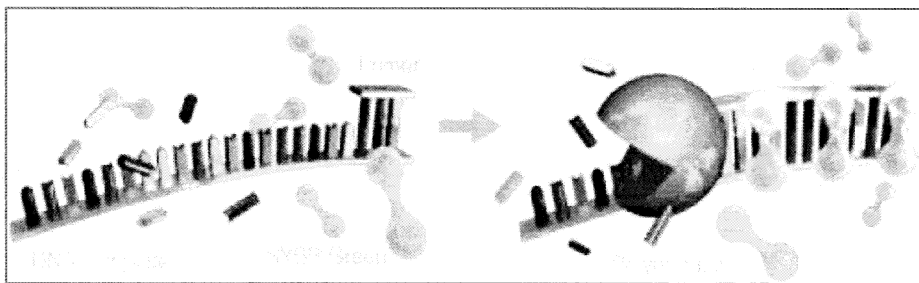
A PCR reakció érzékenysége miatt előfordulhat, hogy az amplifikáció nem a templátnak szánt DNS mintáról, hanem szennyezésként véletlenül bevitt DNS-ről történik. Ezért fontos, hogy megfelelő körültekintéssel, steril eszközökkel, oldatokkal és gumikesztyűben végezzük a kísérletet. Mindig szükséges egy negatív kontroll alkalmazása, melybe nem teszünk templát DNS-t. Akkor tekintjük az oldatainkat "tisztának" (nem szennyezettnek), ha az előbbinél nem kapunk PCR terméket. Különösen fontos mindez a humán mintákon végzett kísérletek esetében, hiszen itt nagyobb a szennyezés veszélye. A PCR minták összemérése maximális koncentrációt igényel. Vigyázzunk, nehogy véletlenül kiöntsük az összeméréshez szükséges reagenseket (Master Mix, Faststart SYBR Green Mix) és primereket. Ezen anyagok beszerzése rendkívül költségigényes, ezért óvatosan bánjunk velük. Az összemérés után következhet a minták PCR-be helyezése. Vigyázzunk, a PCR készülék felsőfűtő blokkja forró. Működés közben, illetve közvetlenül utána se fogjuk meg! Az agaróz gél elektroforézisre (Lásd első gyakorlat), fotózásra vonatkozó szabályokat feltétlenül tartsuk be. A gél fotózása UV transzilluminátorral történik. A gép előtt lévő műanyag lapon keresztül szabad ellenőrizni a mintát! Az UV károsítja a szivárványhártyát és a kötőhártya gyulladásához hasonló tünetek léphetnek fel, ha nem vigyázzunk.

A laborban használatos eszközök



1 ábra: RT-PCR készülék (Agilent Technologis)

A kvantitatív vizsgálat a DNS-szakaszok mennyiségét is képes mérni. A fluorescens festékekkel jelölt alkotórészek intenzitása alapján, a jelet detektálva, minden ciklus végén mérhetjük a képződött DNS mennyiségét. Ezen technikát nevezzük „valós idejű” (real-time) PCR-módszernek (Bernard – Wittwer, 2002). A PCR-technika alkalmas az RNS vizsgálatára is, mely számos esetben igen lényeges egyes sejtek, szövetek funkciójának megítélése szempontjából – elsősorban a *messenger* RNS (mRNS) kimutatása lényeges. A mintából izolált RNS-t reverz transzkriptáz segítségével cDNS-formába írjuk át, majd végrehajtjuk az amplifikációt (rt-PCR). Jelenleg a tumordiagnosztikában elterjedt ez a módszer. Mindezen módszerek igen érzékenyek, és rendkívüli gondos kivitelezést igényelnek. Az általunk használt RT-PCR készülék Stratagene Mx3000P.



2. ábra: SYBR Green festék

A SYBR® Green I festék az etidium bromidhoz és az akrídium narancshoz hasonlóan interkalálódó (beépülő) molekula, amelynek jellegzetessége, hogy a dupla szálú (ds) DNS-hez kötődik az amplifikáló elegyben. Bekötődve, adott monokróm fényel indukálva 530 nm-s hullámhosszú fényt emittál (kibocsát, kisugároz). Az ebből keletkező mérhető fluoreszcens jel nagysága arányosan növekszik a PCR folyamán egyre növekvő dsDNS mennyiségével. A

festék nagyon jól alkalmazható optimalizálásra. Alkalmazása nem igényel extra próbákat, ezért a relatíve olcsósága miatt népszerű.



3. ábra: Hallgatói PCR készülék

A bevezetőben leírt technika alkalmazására kiválóan megfelel a készülék. Tetszőleges DNS-szakaszról (templát) rövid idő alatt korlátlan számú másolatot készíthetünk két iniciáló oligonukleotid (primer) és a DNS-polimeráz enzim segítségével. A reakció három lépcsőből áll. Elsőként a duplaszálú templát DNS szálait denaturációval elválasztjuk egymástól. A második lépésben a hőmérséklet csökkentésével primerek (oligók) bekötődnek a templát DNS-hez (annealing). A harmadik lépés során a polimeráz enzim az egyszálúvá denaturált templáthoz kapcsolódó primerek végeit meghosszabbítja (elongáció) és eközben létrehozza a templát DNS kiegészítő szálát. A gyakorlat során használt PCR típusa TC-E-48D. A Balesetvédelem részben említett előírások erre a készülékre is vonatkoznak.

Fluoreszcencia detektálása .

A PCR készülék alkalmazásának egyik eleme a fluoreszcens detektálási technikák, melyek magukban foglalják a hidrolációs próbákat (ilyen a TaqMan® próba, illetve a Scorpion), a Hibridizációs próbákat (ilyen a Molecular beacon), a DNS kötő festékeket igénylő próbákat (ilyen a SYBR® Green). A TaqMan® próba lényege abban rejlik, hogy az oligonukleotid, egy fluorofór (riporter) és egy quencher (kioltó) festékkel van jelölve. A riporter festék emissziója csak akkor detektálható, amikor a DNS- polimeráz lehasítja azt az extenziós lépésben. A Molecular beacon lényege, hogy szabad, intakt állapotában önmagához hibridizáló oligonukleotid (ilyenkor nincs fluoreszcencia kibocsátás) 5' végén riporter molekulával, 3' végén pedig egy kioltó molekulával rendelkezik. A target (cél) szekvenciához hibridizálva konformációváltozást szenved és ennek következtében fluoreszcencia kibocsátás következik be. A SYBR® Green interkalálódó, a kettősszálú DNShez, annak kis árkába kötődő fluoreszcens festék. Hátránya, hogy nem szekvencia specifikus, ez azt jelenti, hogy ugyanúgy kötődik a kialakuló primer dimerekhez, ezenkívül a hibás primer kötődés mellett kialakuló kettősszálú DNS lánchoz is.

1. Feladat: PT-PCR összemérés, futtatás.

Az általunk vizsgált minták azonnal látható eredményességét RT-PCR segítségével, anélkül elemezni tudjuk, hogy gélelektroforézist alkalmaznánk. Ez az egyik nagy előnye ennek a készüléknek. A minták összemérésénél ugyanúgy szükségünk van templát DNS-re, primerekre, Taq polimeráz enzimre, steril desztillált vízre és egy Master Mix-hez hasonló összetételű reagensre.

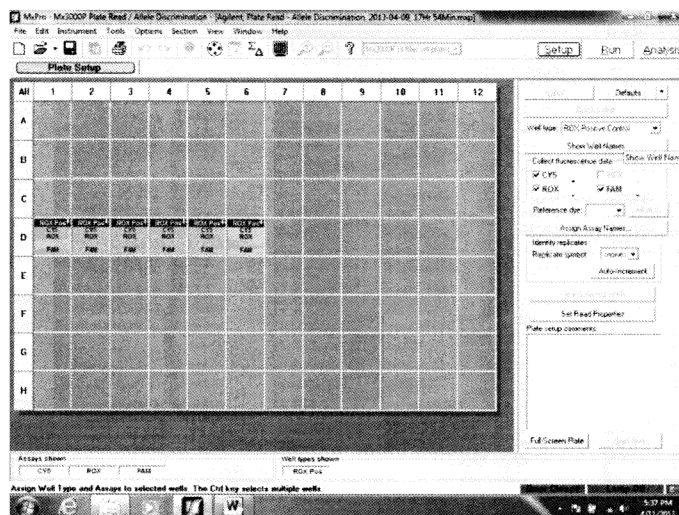
Szükséges eszközök és anyagok: PCR cső, pipetta, olló, DNS minta, primerek (Forward, Reverse), steril desztillált víz, Faststart SYBR® Green Mix,

Az Összemérés menete:

- Vegyünk elő 2 db PCR csövet.
- Mérjük bele a következő anyagokat, úgy hogy a végtérfogat 40 µl legyen

Anyagok	1 cső (H)	1 cső (T)	3 cső (-kontroll)
DNS	5 µl	5 µl	-
Forward primer	2 µl	2 µl	2 µl
Reverse primer	2 µl	2 µl	2 µl
Faststart SYBR® Green Mix	25 µl	25 µl	25 µl
Steril desztillált víz	6 µl	6 µl	11 µl
Σ:	40 µl	40 µl	40 µl

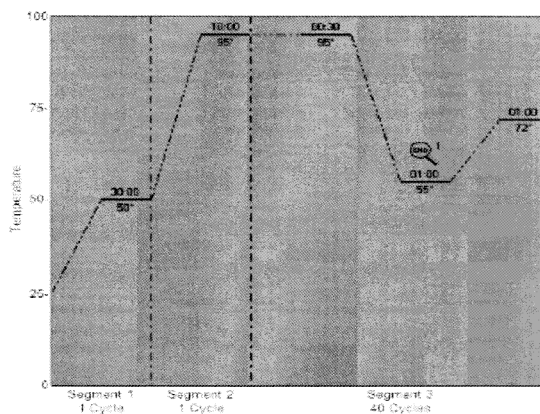
- Állítsuk be a méréshez szükséges paramétereket! Jegyezzük fel magunknak.



4.ábra: Mérés beállítása

- Állítsuk be a készüléken a következő programot.

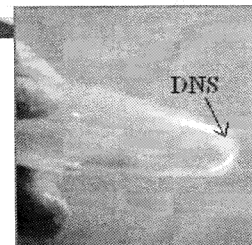
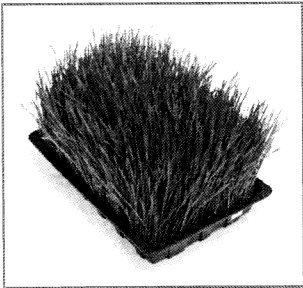
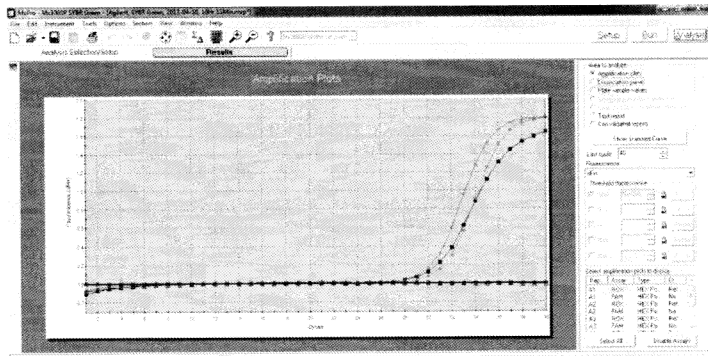
1. 95 °C → 5 min
2. 94 °C → 45s
2. 72 °C → 45s
2. 61 °C → 45s
3. 60 °C → 5 min



5.ábra: RT-PCR program

- Értékeljük a kapott eredményt!

2. Feladat: Totál DNS kivonás dohány, illetve árpa növényből.



Ahhoz, hogy a növényi minták DNS-ét feltárjuk, erre számos kit állhat rendelkezésünkre. Nagy előnyük, hogy minden lehetséges eszközt és anyagot tartalmaznak, amire szükségünk lehet a kivonás és tisztítás során. Illetve használatukkal időt is spórolhatunk. Azonban ezek rendkívül költségesek. A gyakorlat során általunk használt kivonó oldatot (puffert) saját kezűleg készítjük el. A puffer a következő összetevőkből adódik össze, 1M NaOH, 1 M NaCl, EDTA.

Szükséges eszközök és anyagok: 1,5 ml-s eppendorf cső, steril homogenizáló pálcá, pipetta, eppendorf tartó műanyag doboz, Lysis puffer, izopropanol, 1 M TRIS

A kivonás lépései:

- Vesszünk egy eppendorf csövet és belepipettázunk 200 μ l-t a lysis pufferből, amíg kimérünk mérlegel 0,02 g növényi mintát, a puffert 60 C°-os vízfürdőbe tesszük (Vigyázzunk, nehogy leforrázzuk a kezünket!)
- Kivesszük az eppendorf csövet a vízfürdőből, beletesszük a növényi mintát és visszahelyezzük 5 percre a vízfürdőbe.
- Kivesszük az eppendorf csövet a vízfürdőből, vesszünk egy steril homogenizáló pálcát és az eppendorf csőbe helyezve, azt folyamatosan körkörös kevergetve egy vortexen (keverő) szétdörzsöljük a mintát.
- Visszatesszük a mintát újra a vízfürdőbe 10 percre.
- Kivesszük a mintát és az eppendorf csőbe pipettázunk 20 μ l-t az 1 M TRIS oldatunkból.
- Ezt követően 10 másodpercig vortexeljük a mintát.
- Ezután 6 percig 12.000 fordulaton centrifugáljuk a mintát.
- Vesszünk egy tiszta eppendorf csövet és belepipettázunk 90 μ l hideg (-20 C°-os) izopropanolt és szintén 90 μ l-t a centrifugálást követően a mintánk felülúszó (legfelső réteg) részéből.
- Vortexeljük a mintát 30 másodpercig.
- Centrifugáljuk a mintát 4 percig 14.000 fordulaton.
- A felülúszót egy határozott mozdulattal leöntjük róla, az eppendorf cső oldalán maradt felesleget egy kéztörölő papírral felitatjuk.

- Az eppendorf cső alján maradt pallethez, (DNS) 100 µl desztillált vizet adunk, ebben újra oldatba vesszük fel a DNS-t.
- A mintánk DNS tartalmát és tisztaságát spektrofotométerrel ellenőrizzük.

3.Feladat: PCR összemérés, futtatás hallgatói készüléken.

Polimeráz láncreakció a DNS molekula egy meghatározott darabjának felszaporítására alkalmas módszer. A megfelelő DNS mennyiséget viszonylag rövid idő alatt elérjük, de az eredmények ellenőrzése nem történik meg azonnal, itt gélelektroforézist alkalmazva ellenőrizzük a mintánkat. További hátrányt jelenthet egy RT-PCR-rel szemben, hogy viszonylag pontatlan, kis érzékenységű, csak méret alapú elválasztást tesz lehetővé, az etidium bromid nem használható mennyiségi meghatározásokra. Természetesen így is nagyszerű „találmány”, amely nagyban megkönnyíti a molekuláris biológia illetve biotechnológia területén alkalmazott technikák kivitelezését.

Szükséges eszközök és anyagok: 1.5 ml-s eppendorf cső, pipetta, eppendorf tartó műanyag doboz, steril desztillált víz, forward primer, reverse primer, Master Mix, DNS minta

Az Összemérés menete:

- Vegyünk elő 2 db PCR csövet.
- Mérjük bele a következő anyagokat, úgy hogy a végtérfogat 50 µl legyen.

Anyagok	1 cső (H)	2 cső (-kontroll)
DNS	5 µl	-
Forward primer	5 µl	5 µl
Reverse primer	5 µl	5 µl
Master Mix	25 µl	25 µl
Steril desztillált víz	10 µl	15 µl
Σ:	50 µl	50 µl

- Állítsuk be a készüléken a következő programot. (Írjuk le lépésről lépésre hogyan történik mindez!)
 3. 95 °C → 5 min
 4. 94 °C → 45s
 3. 72 °C → 45s
 4. 61 °C → 45s
 5. 60 °C → 5 min
- Helyezzük be a készülékbe a csöveket.
- Indítsuk el a programot.