12. A REKOMBINÁNS DNS TECHNOLÓGIA ELVI ALAPJAI.

Vektorok, rekombináns DNS és molekuláris klónozás. Restrikciós enzimek. Genomikus és cDNS-könyvtárak. PCR.

A fejezetet Szabad János egyetemi tanár állította össze, módosította Lippai Mónika.

BEVEZETÉS

Az öröklődés alapja a DNS-ben tárolt genetikai információ. A szakemberek régi célja a DNS funkciójának megismerése, felhasználása DNS-en alapuló diagnosztikára, gyakorlati feladatok megoldására. A 12. fejezet a rekombináns DNS technológia („génsebészet") elméleti alapjaival foglalkozik. Áttekintjük a restrikciós enzimek, a vektorok és a molekuláris klónozás elvi alapjait, a géntárak jellemzőit, valamint a polimeráz láncreakciót (a PCR-t).

Úgy tűnhet, hogy minden ember teste nagyon sok DNS-t tartalmaz. Az ember (haploid) genomját kb. $3x10^9$ bázispár (bp) alkotja, ami egyetlen sejtben is 93,5 cm hosszú, és az emberi test kb. 10^{14} sejtből áll. Azonban kis számolással kiderül, hogy még egy teljes emberi testből izolált összes genom-DNS is az egyedi szekvenciák bármelyikéből csak nagyon csekély, mindössze kb. ~1 nanomolnyi DNS-t tartalmaz, amely biokémiai kísérletek kivitelezéséhez nem elegendő. Emellett a magasabbrendű élőlények DNS-e nagyon sokféle szekvenciából áll, de a mindennapok gyakorlatában a DNS vizsgálatához és molekuláris biológiai felhasználásához általában nem a teljes genomra, hanem csak egy-egy rövid DNS-szakaszra van szükség. Abból viszont akkora mennyiségre, amennyivel a különféle feladatok megoldhatóak. Fontos cél volt tehát olyan módszerek kidolgozása, amelyekkel viszonylag rövid DNS szakaszok sokszorozhatóak meg tetszőleges mennyiségben.

Vektorok és a molekuláris klónozás

Amint azt a baktériumok genetikájával foglalkozó fejezet említette, a defektív fágok és a szexdukciót lehetővé tevő F' plazmid DNS-e is *rekombináns*: egyszerre alkotja fág- és baktérium-, illetve plazmid- és baktérium-DNS. A defektív fágok és az F' plazmidok segítségével egy-egy rövid bakteriális DNS-szakasz korlátlan mennyiségben sokszoros kópiában létrejöhet. Azaz teljesítik a fentebb megfogalmazott célt: egy-egy rövid DNS-szakasz tetszőleges mennyiségben történő szaporítását. Vajon használhatóak a fágok és a plazmidok másfajta eredetű DNS-szakaszok sokszorozására is?

Miután a DNS kémiai természete azonos a fágokban, a plazmidokban, a baktériumok kromoszómájában, az eukariótákban, vagy akár a mesterségesen szintetizált DNS esetében is, a fágokba és a plazmidokba építhető idegen DNS elvileg bármilyen forrásból származhat. A fágokat és a plazmidokat *vektornak* is nevezik: olyan DNS-molekuláknak, amelyek alkalmasak arra, hogy idegen eredetű DNS-szakasz épüljön beléjük, azt valamilyen gazdasejtbe juttassák és sokszorozzák. Ugyanis miközben a vektor DNS-e a gazdasejtben replikálódik, a bennük lévő idegen DNS velük együtt felszaporodik. Az idegen genetikai anyagot is hordozó vektorok DNS-e a rekombináns DNS jellegzetes példája: különböző eredetű DNS szekvenciákból áll. A rekombináns DNS-t előállító és felhasználó technikákat hívják rekombináns DNS technológiának (vagy közkeletűbb elnevezéssel génsebészetnek), ugyanazon DNS-szakasz nagyléptékű sokszorozását pedig (molekuláris) klónozásnak.

A restrikciós enzimek

A DNS manipulálásához olyan eszközökre is szükség van, amelyekkel a DNS-t reprodukálhatóan, jól meghatározott helyen lehet elvágni, hasítani. Az erre alkalmas génsebészeti eszközök a *restrikciós enzimek*.

12.1. táblázat. Néhány restrikciós enzim eredete és hasítási helye.

Mikroorganizmus	Az enzim[1]	A felismert szekvencia[2]
Haemophilus Aegyptius	*Hae*III	↓ 5'GGCC3' 3'CCGG5' ↑
Bacilus subtilis	*Bsu*RI	↓ 5'GGCC3' 3'CCGG5' ↑
Moraxella faj	*Msp*I	↓ 5'CCGG3' 3'GGCC3' ↑
Arthrobacter luteus	*Alu*I	↓ 5'AGCT3' 3'TCGA5' ↑
Diplococcus pneumoniae	*Dpn*II	↓ 5'GATC3' 3'CTAG5' ↑
Haemophilus Influenzae	*Hinf*I	↓ 5'GAN TC3' 3'CTN^{c}AG5' ↑
Escherichia coli RY13	*Eco*RI	↓ 5'GAATTC3' 3'CTTAAG5' ↑
Escherichia coli R	*Eco*RV	↓ 5'GATATC3' 3'CTATAG5' ↑
Bacillus stearothermophilus ET	*Bst*EII	↓ 5'GGTNACC3' 3'CCTN^{c}TGG5' ↑
Xanthomonas campestris	*Xcm*I	↓ 5'CCAN NTGG3' 3'GGTN^{c}N^{c}ACC5' ↑

[1] A restrikciós enzimeket azon baktériumok neve után nevezik el, amelyekből izolálták őket. Az I-V az ugyanabból a fajból származó különféle restrikciós enzimek jele. A nyilak azokat a helyeket jelölik, ahol a restrikciós enzim a DNS-t elvágja.

[2] N = az A, G, C vagy T bázisok valamelyike, amely a komplementer (N^c) bázissal párosodik.

A restrikciós enzimek a baktériumok természetes endonukleázai, a fágfertőzések elleni védekezés eszközei. A molekuláris technikákban felhasználható restrikciós enzimek többsége ún. *palindrom szekvenciát* ismer fel és ott is vágja el a DNS-t (a palindromok oda és visszafelé olvasva ugyanazt jelentik, ebben az esetben persze mindkét szálon 5'→3' irányba, azaz ellentétesen olvasva). A restrikciós enzimek hasítóhelyeit restrikciós helyeknek nevezik. Több száz különféle ilyen palindrom szekvencia van (12.1. táblázat). Ugyanazt a palindrom szekvenciát többféle restrikciós enzim is felismerheti. Vannak olyan restrikciós enzimek, amelyek négyes palindromokat ismernek fel, mások ötösöket, hatosakat, nyolcasokat és van néhány olyan is, amely ugyan specifikus, de nem palindrom szekvenciát ismer fel (12.1. táblázat).

A restrikciós enzimek egy részével végzett kezelés – emésztés - után úgynevezett *ragadós végek* (sticky end) képződnek: olyan, néhány nukleotidból álló egyszálú, túlnyúló DNS szakaszok, amelyek könnyen párosodnak a komplementer szakasszal. A ragadós végeket ezért nagyon jól lehet DNS-darabok összekapcsolására, például idegen DNS vektorokba illesztésére használni. De vannak olyan restrikciós enzimek is, amelyek úgy vágják el a DNS-t, hogy a *végek tompák* (blunt end), vagyis nem képződnek ragadós végek. Ezek nehezebben kapcsolhatóak össze egy másik DNS-darabbal, de bizonyos esetekben ezekre az enzimekre van szükség.

Klónozás vektorokba

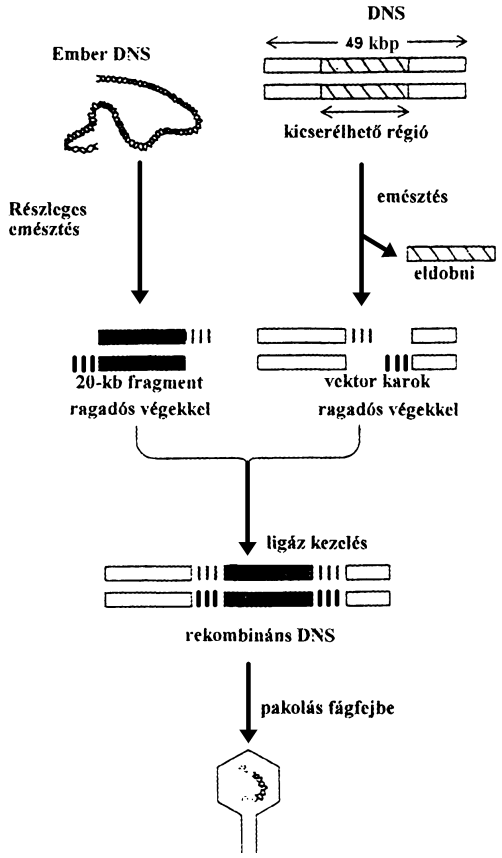
A klónozás molekuláris biológiai eljárásként azt jelenti, hogy egy adott DNS-darabot baktériumokban történő sokszorosítás során nagy számban állítanak elő, azért, hogy a különféle vizsgálatokhoz, eljárásokhoz megfelelő mennyiségben álljon rendelkezésre. A klónozott DNS-t először szilárd táptalajon kialakuló fág tarfolt (plakk) vagy baktérium-kolónia tartalmazza, az egyes plakkokból vagy klónokból folyadék-közegben lehet tovább növelni a kívánt DNS mennyiségét.

1. Klónozás λ fágba

A λ fág DNS-éből eltávolíthatóak azok a gének, amelyek a fág mérsékelt jellegét, azaz a genomba épülését biztosítják (ezek egy blokkban vannak), helyükre pedig idegen DNS illeszthető (12.1. ábra). A rekombináns DNS-t hordozó λ fág virulens fágként viselkedik, és litikus ciklusok során megsokszorozza az idegen DNS-t.

A klónozás során a λ fág DNS-t a *Bam*HI restrikciós enzimmel emésztik. Az emésztés után három különböző méretű DNS-fragment képződik: az ún. bal kar, a jobb kar és egy mintegy 20 kb (kilobázispár) hosszú középső fragment. Ez a középső fragment cserélhető ki kb. 20 kb hosszúságú idegen DNS-re. A karokat újra összekapcsolják, de most már az idegen DNS-el, majd a ligáz enzimmel ligálják a fragmenteket. A ligálás nyomán képződött DNS-hez fágfehérjéket adnak, hogy a DNS a fágfejbe pakolódhasson. A folyamat végén csak a rekombináns DNS-ből képződnek fertőzőképes fágok: a csak fágkarokat vagy a csak idegen DNS-t tartalmazó DNS-darabok nem megfelelő méretűek, így nem szerelődik össze a fágfej.

Az elegyet baktériumpázsitra viszik, amelyen a fertőzőképes fágok szaporodnak. Minden egyes fág utódfágjai egy-egy tarfoltot (plakkot) képeznek a baktériumpázsiton. A λ fág ugyan csak 20 kb-nyi idegen DNS-szakaszt tud befogadni, de vannak olyan fágok is, amelyek akár 100 kbp klónozására is alkalmasak!

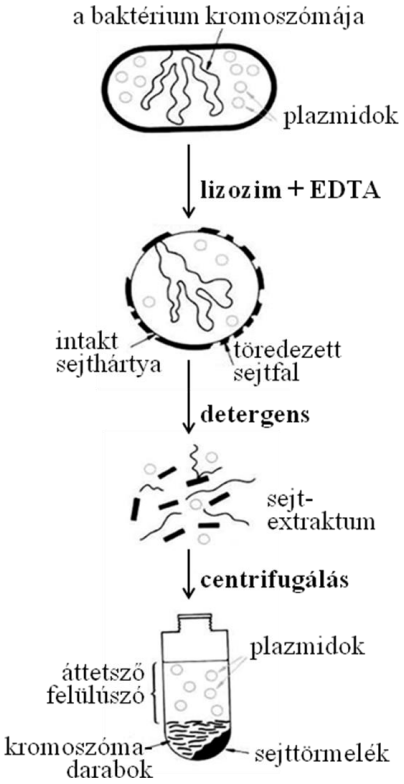


12.1. ábra. A mérsékelt fágok vektorként használhatóak a molekuláris klónozásban: segítségükkel idegen eredetű DNS-szakaszokat lehet sokszorozni.

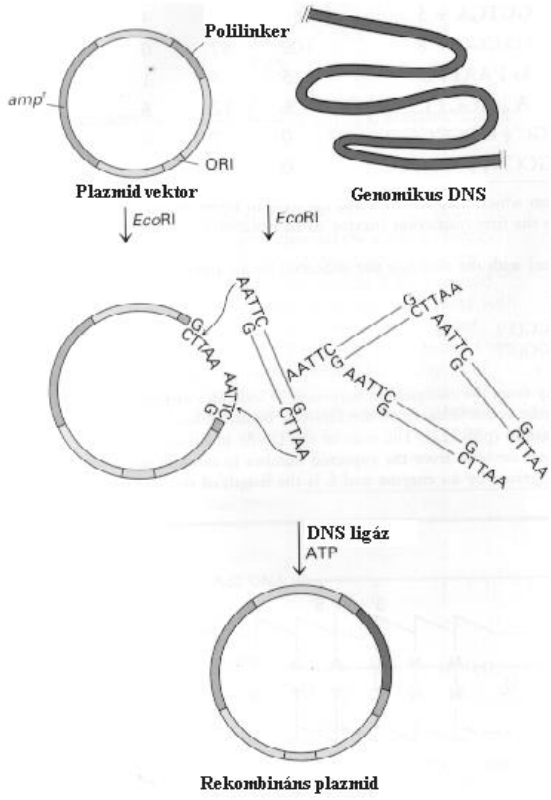
2. Klónozás plazmidba

A plazmidokat egyszerűen lehet izolálni: a baktériumokat feltárják, majd centrifugálással elválasztják a kromoszomális DNS-t a plazmidoktól. A kromoszomális DNS a sejthártyához rögzül, ezért az elpusztult baktérium sejtfal-darabjaival együtt a cső aljára ülepedik (12.2. ábra). A molekuláris biológiában használt plazmidok egy vagy több rezisztenciagént is tartalmaznak (ahogy erről már volt szó, ezek a plazmidok rezisztenciát biztosítanak az őket hordozó baktériumoknak egy adott antibiotikummal szemben). A plazmidokat a restrikciós enzimek valamelyikével fel lehet nyitni, és miután idegen eredetű DNS-t építenek bele, ismét gyűrűvé lehet őket zárni (12.3. ábra). A plazmidok felnyitására általában olyan restrikciós enzimet használnak, amelynek mindössze egyetlen felismert (restrikciós) helye van a plazmidban. A klónozásra használt plazmidokban mesterségesen sok különböző, egy kópiában jelen lévő restrikciós helyet „zsúfolnak" egymás mellé, ezt polilinker régiónak vagy MCS-nek (multiple cloning site) nevezik.

Egy idegen, ismeretlen szekvenciájú DNS plazmidba építésére két megoldás kínálkozik.



12.2. ábra. A plazmid-izolálás sémája.

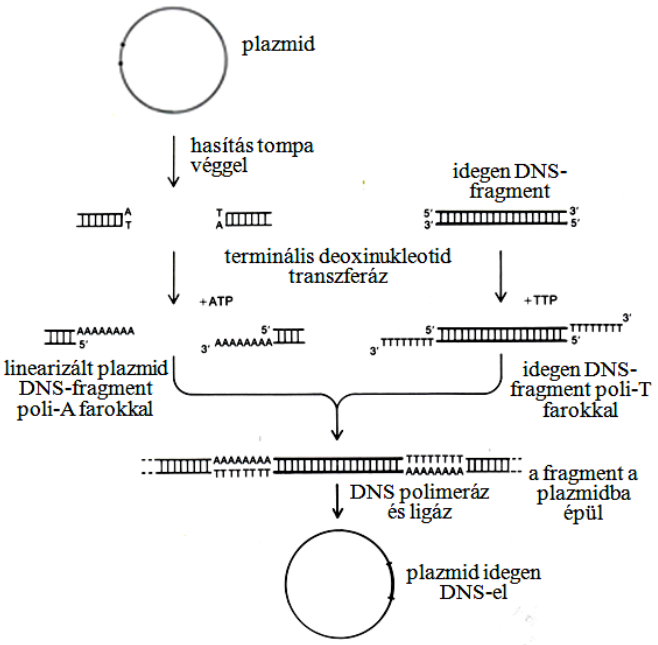


12.3. ábra. Idegen DNS beépítése plazmidba EcoRI restrikciós enzim által generált ragadós végekkel. A polilinker olyan rövid DNS szakasz, amely különféle, egy példányban jelen lévő restrikciós helyeket tartalmaz.
amp^R: ampicillin rezisztenciát biztosító gén; ORI: a plazmid saját replikációs kezdőontja (origója).

(i) Klónozás ragadós véggel: ahogy fentebb már szó volt róla, sok restrikciós enzim a hasítás során ragadós végeket képez (12.1. táblázat és 12.3. ábra). Miután a plazmidokba hatékonyan maximum ~15 kb idegen DNS klónozható, az idegen DNS-t olyan enzimmel kell emészteni, hogy kb. 15 kb-os DNS-fragmentek képződjenek (például rövidebb ideig tartó, ezért nem minden restrikciós helyet elhasító részleges emésztéssel). A plazmidot ugyanazzal a restrikciós enzimmel emésztik, egyetlen helyen, mint az idegen DNS-t (a felnyitott plazmidot linearizált plazmidnak is nevezik).

A plazmid és a klónozandó DNS ragadós végei párosodhatnak, lehetőséget teremtve az idegen DNS beépülésére a plazmidba (12.3. ábra). A DNS-oldathoz ligáz enzimet adnak, hogy összekapcsolják a szabad DNS-végeket. A plazmidok baktériumsejtekbe transzformálhatóak: Ca^{2+} ionok jelenlétében egymillióból kb. 1-10 baktérium veszi fel a plazmidot a közegből. A plazmidot tartalmazó baktériumok valamilyen antibiotikumra rezisztensek lesznek, és utódsejtjeik kolóniákat képeznek antibiotikum jelenlétében is (az egy telepet alkotó baktériumok egyetlen sejt utódsejtjei.)

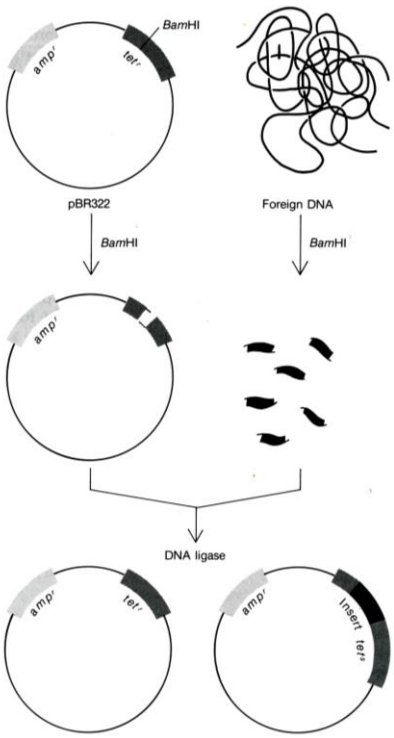
(ii) Klónozás tompa véggel: A klónozandó DNS-t nagysebességű turmixgéppel vagy ultrahanggal fragmentekre aprítják (ezek az eljárások nem ragadós, hanem tompa véget generálnak), vagy olyan restrikciós enzimmel emésztik, amely tompán vág. A fragmentek közül elektroforézissel kiválasztják és izolálják a kb. 15 kb méretűeket. A tompa végű fragmentek plazmidba illesztésére két lehetőség kínálkozik. **(1) A tompa végű ligálás** során a plazmidokat is tompa véget képező restrikciós enzimekkel nyitják fel (12.1. táblázat). A tompa végekhez illeszkedő idegen DNS szakasz a ligáz-kezelés után a plazmidok részévé válhat (bár ez a folyamat jóval kisebb hatékonysággal megy végbe, mint a ragadós végek összekapcsolódása). **(2)** Az aprítás során képződő DNS szakaszok 3' végeire **rövid poli-T szekvenciákat**, a linearizált plazmidok 3' végeire pedig **poli-A szekvenciákat**, lényegében előre gyártott ragadós végeket



12.4. ábra. DNS beépítése poli-A/poli-T farkakkal.

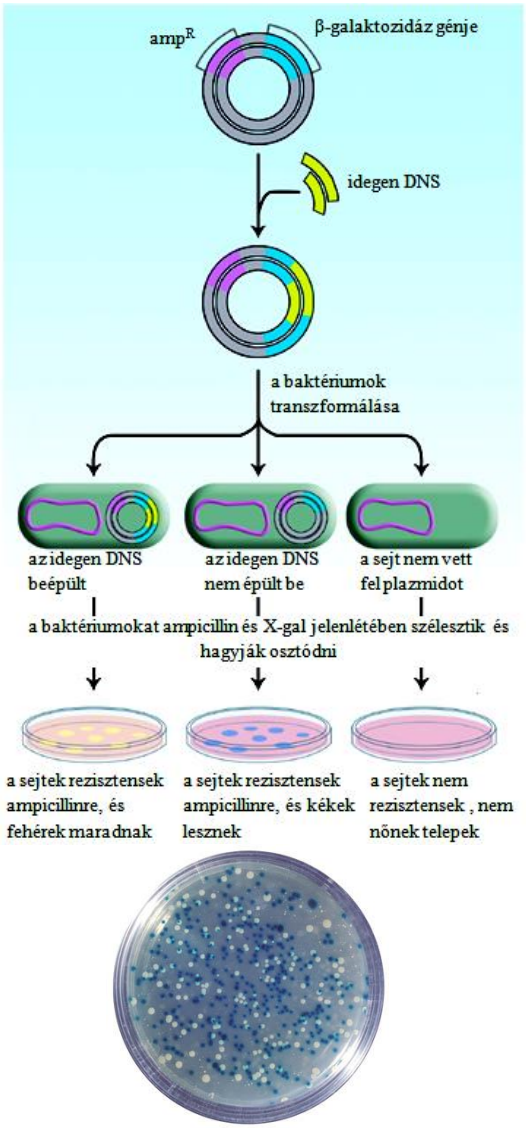
kapcsolnak. Az idegen DNS beépülésekor a komplementer poli-A és poli-T szekvenciák így ragadós végként is viselkednek és párosodnak. A fennmaradó réseket DNS polimerázzal töltik ki, a DNS-szálakat ligálják, a plazmidokat baktériumokba transzformálják (12.4. ábra).

A poli-A/poli-T farkakkal történő klónozás kivételével a ligálás során a plazmidok végei általában egymással is összekapcsolódhatnak. Vagyis a plazmidot tartalmazó, antibiotikum-rezisztens baktériumoknak nem mindegyike hordoz olyan plazmidot, amely idegen DNS-t is tartalmaz. Egy lehetséges (bár ma már kevésbé alkalmazott, de érdekes) megoldás a valóban rekombináns plazmidok izolálására olyan plazmidok használata, amelyek **két rezisztenciagént is tartalmaznak**. Ilyen pl. a pBR322 plazmid, a klónozásra elsőként használt plazmidok egyike, amely az ampicillin és a tetraciklin rezisztenciagéneket (*amp*^{r} és *tet*^{r}) egyaránt hordozza (12.5. ábra). A pBR322-ben a *Bam*H1 restrikciós hely a *tet*^{r} génben van. Az idegen DNS beépülésekor a *tet*^{r} gén elromlik, és a baktériumok elvesztik a tetraciklinnel szembeni rezisztenciát, de továbbra is rezisztensek ampicillinre. Viszont a csak „üres" plazmidot tartalmazó baktériumok tetraciklinre és ampicillinre is rezisztensek. Így tehát megkülönböztethetőek az idegen DNS-t tartalmazó és idegen DNS-t nem tartalmazó plazmidot hordozó baktériumok (12.5. ábra).



12.5. ábra. A két rezisztenciagént tartalmazó plazmidokkal különbség tehető idegen DNS-t nem hordozó és idegen DNS-t is hordozó plazmidok között.

Másik, ma is gyakori megoldás a **kék-fehér szelekció.** Itt a polilinker régiót a β–galaktozidáz enzim szekvenciájába építették be, úgy, hogy az ily módon beékelődött néhány többlet-nukleotid ellenére működőképes enzim képződhet. A β–galaktozidáz a laktóz bontásáért felelős enzim, amely a színtelen laktóz-analóg X-gal vegyületet is képes hasítani, kék csapadék képződése közben. Ha az idegen DNS beékelődik a polilinker helyre, már nem képződhet β–galaktozidáz. Ezért a plazmidot hordozó baktérium utódai által létrehozott telep fehér marad X-gal hozzáadása után is. Ezzel szemben az „üres", idegen DNS-t nem tartalmazó plazmidokról képződik β–galaktozidáz, az őket hordozó baktériumok kékre színeződő kolóniákat alkotnak.



12.6. ábra. Fent: a kék-fehér szelekció lényege. Lent: a valóságban egy Petri-csészére mindhárom fajta baktérium kerülhet (de természetesen csak a plazmidot is tartalmazó baktériumok tudnak telepet alkotni).

Az úgynevezett **expressziós vektorok** nem csak az idegen DNS sokszorosítására, hanem fehérjetermeltetésre is alkalmasak. Ehhez a beépített DNS-nek *nyitott leolvasási keretnek* (ORF-nek) kell lennie, a plazmid pedig a transzkripciót szabályozó, aktiválható *promóter-szakaszt*, bakteriális *riboszóma-kötőhelyet* és *transzkripció-terminációs helyet* is tartalmaz. Az expressziós vektor legtöbbször lehetővé teszi a termelődő fehérje tisztítását is, úgy, hogy vele együtt, ugyanabban a leolvasási keretben valamilyen más, specifikus affinitása alapján később izolálható fehérje vagy rövid peptid is kifejeződik. A képződő rekombináns fúziós fehérjét a feltárt baktérium összes fehérjéi közül ezen kapcsolat (pl, enzim-szubsztrát vagy más kötődés) alapján nagy tisztaságban elő lehet állítani, és például ellenanyag termeltetésére is fel lehet használni.

Genomkönyvtárak

Ha kellő számban készítenek olyan plazmidokat vagy fágokat, amelyek valamely faj DNS-ének egy-egy rövid szakaszát tartalmazzák, génkönyvtár (géntár) állítható elő. **A genomkönyvtár** olyan vektorok gyűjteménye, amelyek bár kis szakaszokban és különböző vektorokban, de *valamely faj teljes genomját tartalmazza*. A genomkönyvtárat alkotó rövid DNS-szakaszok bármelyike könnyen izolálható, tetszőleges mennyiségben sokszorozható, használható különféle célokra.

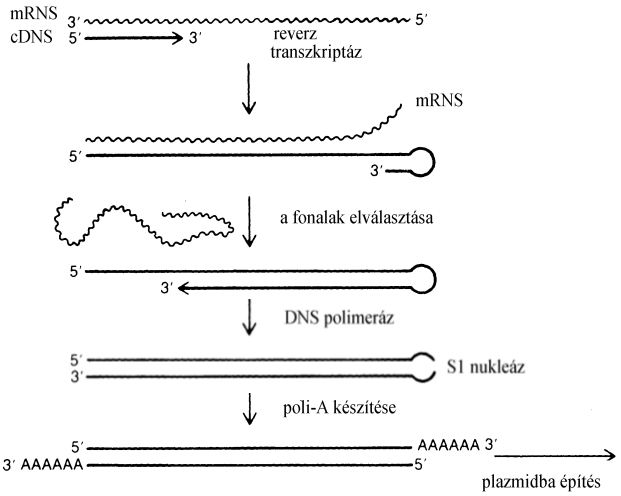
A nagy genommal rendelkező eukarióta fajok genomkönyvtárait nagyobb befogadó-képességű vektorokban tartják fenn. A ***cosmidok*** hibrid fág-plazmid vektorok, amelyek a λ–fág fejébe pakolódásához szükséges rövid szekvencián (*cos*) és a baktériumba jutáshoz szükséges fágfehérjéken kívül bakteriális plazmid-szekvenciákat is tartalmaznak. Az idegen DNS-darabok (kb. 35 kb) fágfejekben, transzdukcióval jutnak a baktériumba, ott azonban már kényelmesen, plazmidként lehet őket fenntartani. A ***BAC***-ok (bacterial artificial chromosome, mesterséges baktérium-kromoszóma) F-plazmidon alapulnak, és ugyan csak egyszeres kópiában vannak jelen a baktériumban, de akár 300 kb DNS stabil fenntartására is alkalmasak, és eukarióta sejtekben is átíródhat róluk fehérje. Gyakran alkalmazzák őket arra, hogy az igen nagyméretű emlős géneket baktériumokban tartsák fenn, de átmenetileg emlőssejtekben kifejeztessék. A ***YAC***-ok már eukarióta vektorok, mesterséges élesztő-kromoszómák (yeast artificial chromosome); tartalmaznak élesztő telomer, centromer és replikációs kezdőpont-szekvenciát. Akár egymillió (1 Mb) DNS-t is befogadhatnak, és az élesztősejtekben önálló kromoszómaként lehet fenntartani őket.

A cDNS-könyvtárak

Az eukarióta genomnak legtöbbször csak néhány százalékát teszik ki gének: a genom zömét a gének közötti ún. intergénikus DNS-szakaszok alkotják. Ráadásul az eukarióta gének általában tartalmaznak intronokat, amelyek sokszor nagyon hosszúak. A gének promóterei sem íródnak át a transzkripció során. Az intergénikus, intron és promóter szekvenciák ismerete sok vizsgálat során nem szükséges, gyakran elegendő az mRNS-nek megfelelő DNS-szekvencia – ha például a cél a fehérje természetének megértése, vagy a fehérje aminosav-szekvenciáját érintő különböző mutációk hatásának vizsgálata.

A retrovírusokból származó reverz transzkriptáz enzim az mRNS alapján szintetizál ún. *komplementer DNS-t, cDNS-t* (12.7. ábra). A teljes cDNS-t, vagy annak egyes szakaszait vektorokba lehet klónozni, éppen úgy, mint bármelyik DNS-fragmentet. A gyakorlatban mRNS-eket izolálnak valamelyik fajból, általában csak valamelyik szervéből vagy adott fejlődési stádiumából. A következő lépésben az mRNS-ek alapján reverz transzkriptázzal cDNS-eket szintetizáltatnak, amelyeket aztán vektorokba klónoznak (12.7. ábra). A *cDNS-könyvtár* valamilyen sejt- vagy szövetféleségből származó különféle cDNS-eket, vagy cDNS szakaszokat tartalmazó vektorok összessége.

A cDNS-ek kisebb méretűek, ezért ezen könyvtárak fenntartása során általában a könnyebben kezelhető plazmidokat vagy λ fágokat alkalmazzák, amelyekbe ~15 kb illetve ~20 kbp-nyi idegen DNS klónozható.



12. 7. ábra. Módszer cDNS készítésére.

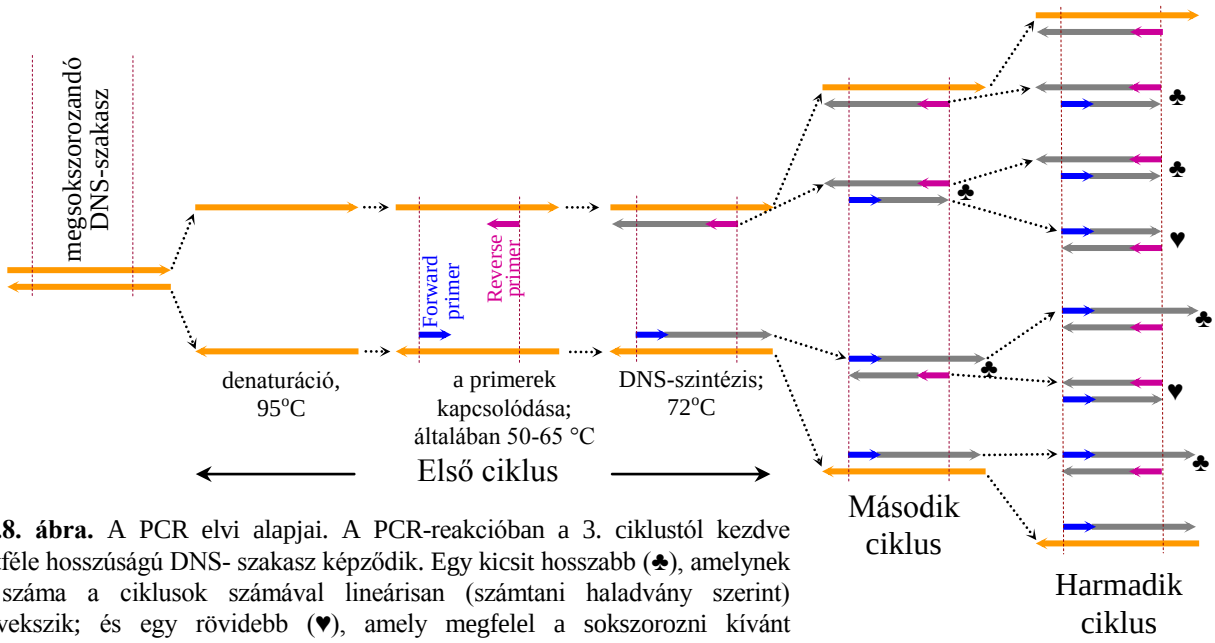
PCR, polimeráz láncreakció

A DNS-szakaszok vektorba történő klónozását követően tekintélyes mennyiségű DNS állítható elő baktériumok „közreműködésével". Ugyanakkor az 1983-ban Kary Mullis által kifejlesztett *polimeráz láncreakcióval* (angolul polymerase chain reaction, PCR) bármely (maximum ~20 kb méretű) DNS szakasz viszonylag nagy mennyiségű mintája készíthető el *in vitro*, „kémcsőben", gyorsan, egyszerűen és olcsón (Mullis teljesítményét 1993-ban Nobel-díjjal jutalmazták). A PCR akkor alkalmazható, ha a megsokszorozandó DNS-szakasz szekvenciája, vagy legalább annak egy részlete ismert.

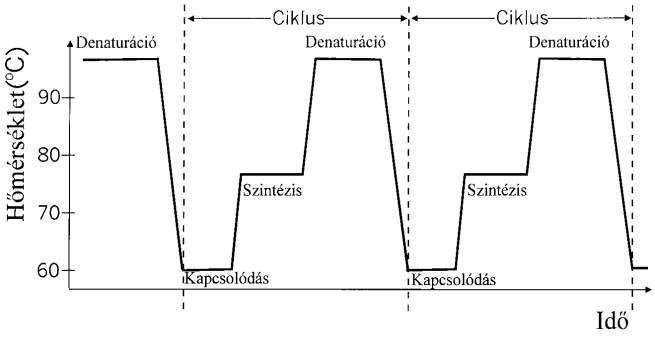
A PCR kezdetekor kevés DNS-mintát (bizonyos körülmények között akár csak néhány molekula is elég!) tesznek egy Eppendorf-csőbe, amely tartalmazza az alkalmas puffert, valamint dATP-t, dTTP-t, dGTP-t és dCTP-t, a DNS építőelemeit. A folyamat kulcsa a hőstabil DNS-polimeráz enzim, amely akár 95°C-ot is elvisel és utána is aktív marad (az eredeti Taq DNS-polimerázt a *Thermophilus aquaticus* nevű, extrém hőtűrő képességű, hőforrásokban élő baktériumból izolálták). A csőbe tesznek még nagy feleslegben primereket. A primerek általában 20-40 nukleotidból álló szintetikus, egyszálú DNS-oligonukleotidok. Az 5' vagy *forward primer* a sokszorozandó DNS-szakasz 5' végével, míg a 3' vagy *reverz primer* a 3' véggel komplementer (12.8. ábra).

A PCR lépései: három különböző hőmérsékleten lejátszódó folyamat ismétlődik ciklusosan (12.9. ábra).

1. Felmelegítik az Eppendorf-csövet kb. 95°C-ra, hogy a DNS denaturálódjon.
2. Lehűtik a csövet arra a hőmérsékletre, ahol a primerek kapcsolódhatnak a komplementer DNS-szekvenciákkal (*annealing*).
3. Újra felmelegítik a csövet 72°C-ra, arra a hőmérsékletre, amely optimális a *Taq* polimeráz működéséhez. A *Taq* polimeráz a primerek 3' végéhez kapcsolódva és onnan elindulva a templát DNS-szál alapján megszintetizálja a komplementer szálat. Egy PCR-ciklus során a DNS kettős spirálok száma megkétszereződik (12.8. ábra).



12.8. ábra. A PCR elvi alapjai. A PCR-reakcióban a 3. ciklustól kezdve kétféle hosszúságú DNS- szakasz képződik. Egy kicsit hosszabb (♣), amelynek a száma a ciklusok számával lineárisan (számtani haladvány szerint) növekszik; és egy rövidebb (♥), amely megfelel a sokszorozni kívánt szakasznak, és amelynek száma az elkövetkező ciklusok során exponenciálisan (mértani haladvány szerint) növekszik.



12.9. ábra. A PCR-ciklusok mindegyike során három esemény ismétlődik különböző hőmérsékleten. Egy ciklus mindössze egy vagy néhány percig tart.

A polimeráz láncreakció ciklusai ismétlődnek (12.9. ábra), egy ciklus mindössze maximum néhány percig tart. A megsokszorozódó DNS kettős spirálok száma a ciklusok előrehaladtával exponenciálisan nő.

A PCR módszerével sok DNS szintetizálható csupán néhány templát DNS-molekula alapján, általában 25-30 ciklus alatt. A PCR-t kereskedelmi forgalomban kapható, programozható készülékekkel végzik, és mára sokféle változatát dolgozták ki. *A reverz PCR (RT-PCR)* során például egy adott szövetből vagy sejtféleségből izolált mRNS-minta alapján először reverz transzkriptáz enzim szintetizál cDNS-eket, majd megfelelően megtervezett primerekkel a kívánt cDNS, vagy annak egy szakasza felszaporítható az összes többi cDNS közül. Ezzel a módszerrel könnyen kimutatható sok közül egy adott mRNS jelenléte, azaz információt nyerhetünk az mRNS-t kódoló gén aktivitásáról a mintát alkotó sejtekben.

A módszer kvantitatívvá tehető az úgynevezett *Q-PCR (quantitative PCR)*, vagy más kifejezéssel *real time PCR*-rel. Ezzel az eljárással a PCR-reakció nemcsak az összes ciklus végrehajtása után, a képződött termékek elemzésével analizálható, hanem folyamatában is követhetővé válik, és sokkal pontosabban meghatározható, összehasonlítható a különféle templátok mennyisége a kiindulási reakcióban.

A PCR napjainkra teljesen hétköznapi és viszonylag olcsó módszerré vált. A „klasszikus” klónozási módszerek azonban továbbra is jelen vannak a molekuláris biológiai gyakorlatban: egyrészt még mindig olcsóbbak, másrészt a hőstabil polimeráz pontossága *in vitro* körülmények között csökken a sokszorozandó DNS-szakasz hosszával. Harmadrészt pedig a PCR-reakcióhoz ismerni kell legalább a pontos határoló szekvenciát a primerek megtervezéséhez, míg a vektorok segítségével történő klónozáskor elegendő az alkalmas restrikciós helyek ismerete.

ÖSSZEFOGLALÁS

A defektív fágok és az F’ plazmidok mutatták meg, hogy idegen DNS rövid szakaszait lehet klónozni és tetszőleges mértékben felszaporítani. A restrikciós enzimek alkalmas eszközök a DNS jól meghatározható helyen történő és reprodukálható vágására. A fágokat, plazmidokat és a mesterségesen kifejlesztett egyéb vektorokat széles körben használják a rekombináns DNS technikában, a génsebészetben. A PCR, a közelmúltban kifejlesztett eljárás *in vitro* teszi lehetővé a klónozást, és egyre szélesebb körben alkalmazott molekuláris klónozási technika, nemcsak a molekuláris biológiában, hanem az orvosi gyakorlatban is. A klónozott DNS felhasználási lehetőségeiről a következő fejezet ismertet példákat.