

PCR introduktion

Polymerase Chain Reaction (PCR) er en af de mest udbredte molekylærbiologiske teknikker i dag og er helt uundværlig i mange situationer. PCR udnytter et af naturens egne enzymer, DNA-polymerase, til at opformere en bestemt DNA-sekvens. Med PCR er det altså nemt og hurtigt at skabe millioner af kopier af så lidt som én DNA-streng.

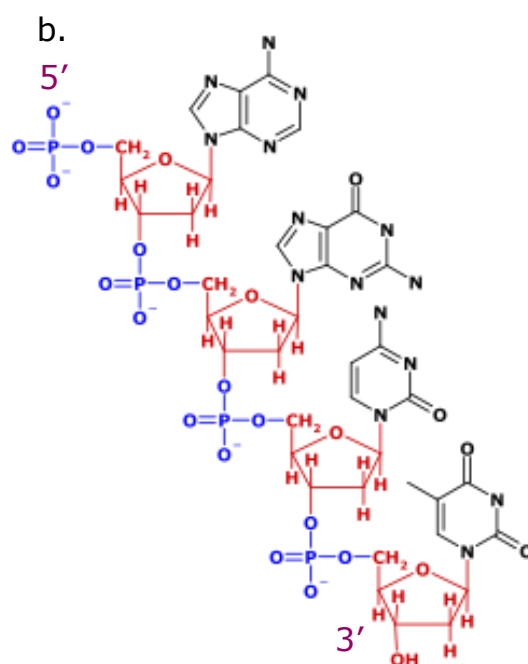
Ideen med PCR er at foretage et antal gentagne cyklusser, hvor en udvalgt DNA-sekvens kopieres og dermed i teorien fordobles i antal for hver cyklus. Ligesom i naturen kan DNA-polymerase kun kopiere DNA, hvis der er korte fragmenter kaldet primer af komplementær (Se figur 1) DNA til stede. Primerne binder til DNA'et der, hvor kopieringen skal begynde.

DNA består af to komplementære strenge, der løber i hver sin retning modsat hinanden. Derfor vil DNA-polymerase i PCR også kopiere de to strenge i hver sin modsatte retning. Dette indebærer, at der skal bruges to forskellige primere - én til start af kopiering af hver af de to strenge. DNA-polymerase bygger nemlig udelukkende en ny streng op i retningen fra 5' til 3'. Den streng, enzymet bruger som skabelon, skal altså gå modsat, dvs. fra 3' til 5' (Se figur 2).



Figur 1 a. Her ses DNA-streng siges at have en retning, da hvert nukleotid har en 3'- og en 5'-ende. Nukleotiderne sættes altid sammen 3'-5', og derfor vil hver DNA-streng også have en 3'- og en 5'-ende, der peger modsat hinanden. Strenge er komplementære, da de kan basepare med hinanden.

b. Her ses strukturen af enkelt strengen DNA. Af den ses hvordan fosfatgruppen på 5' enden af et nukleotid er forbundet til 3' enden af det næste nukleotid. Hvert nukleotid består af en fosfatgruppe (blå), en deoxyribose (rød) og en base (sort).



Faserne i en PCR-cyklus: Hver cyklus er delt op i tre forskellige faser, der har hver deres temperatur og varighed (se figur 1).

1. **Opvarmning (denaturering af DNA) - Initiering**

Det dobbeltstrengede DNA, der skal bruges som skabelon i reaktionen, skal først denatureres ved høj temperatur (ca. 95 °C) nogle sekunder. Her vil hydrogenbindingerne, der forbinder de to komplementære strenge brydes, mens de enkelte strenge holdes intakte

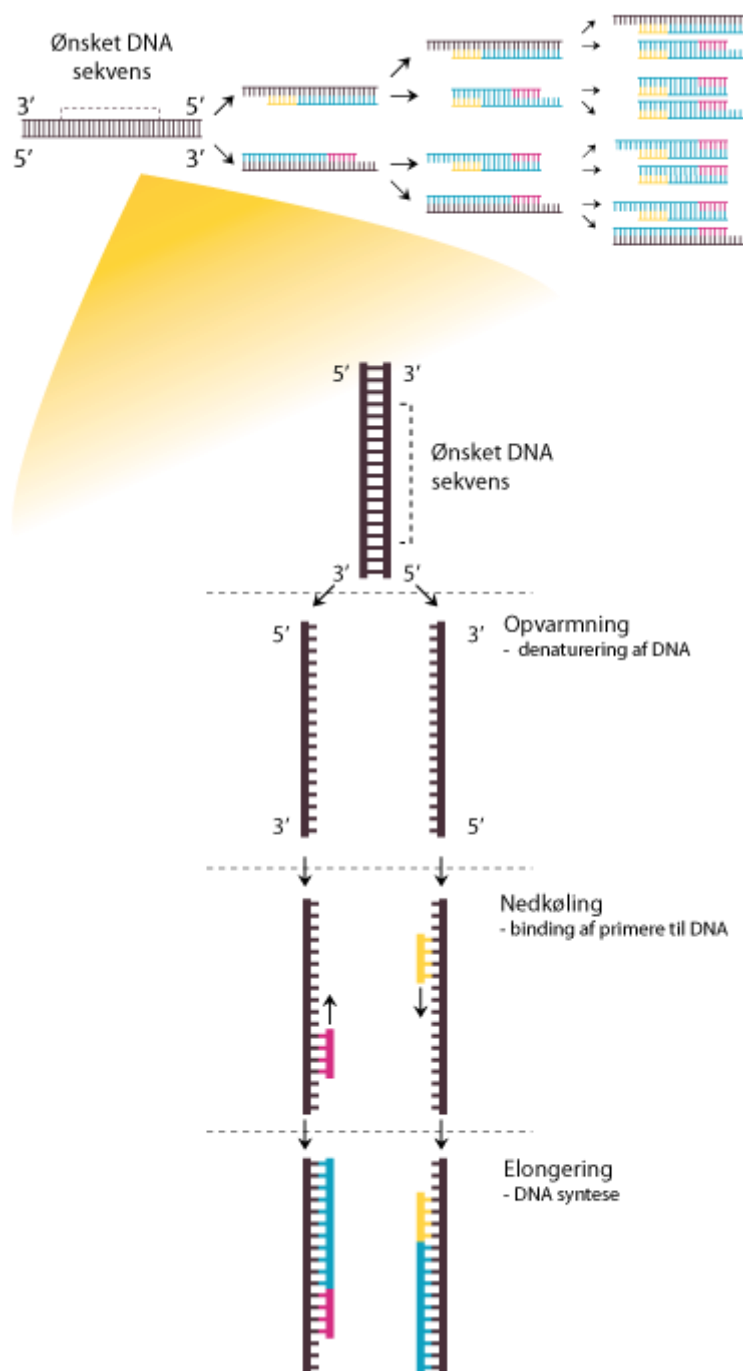
2. **Nedkøling (binding af primere til DNA) - Annealing**

Temperaturen sænkes til omkring 60 °C, hvor de tilsatte primere vil kunne binde til deres komplementære sekvenser på det enkeltstrengede DNA.

3. **Elongering (dannelse af de nye, komplementære DNA-strenge)**

Temperaturen hæves til 72 °C, hvor DNA-polymerase binder til primerne ved startstederne og bygger videre på de nye, komplementære DNA-strenge. DNA-polymerasen fortsætter, så længe temperaturen ikke hæves, og så længe der stadig er skabelon-DNA den kan kopiere videre på. Varigheden af trinnet beregnes derfor, så cyklussen først genstarter, når hele den ønskede DNA-sekvens er forlænget (elongeret).

Man kan desuden danne "kunstigt" DNA til gensplejsninger ved hjælp af PCR. Dette DNA er især brugt hvis man ønsker at gensplejse en organisme. Ved hjælp af særlige primere kan det desuden lade sig gøre at sætte to stykker DNA sammen. F.eks. kunne man sætte genet der koder for et ønsket protein sammen med et gen, der koder for grønt fluorescerende protein (GFP). På den måde bliver proteinet selvlysende, og man kan se det inde i cellen. Denne metode til sammensætning af DNA kaldes fusions-PCR og forklares ikke nærmere her.



Figur 2. Opkopieringen af en DNA-sekvens med PCR ved tilsætning af primere (gul og rød), der binder til startstedet for kopieringen på hver af de to DNA-strenger. Binding af primere afgør hvilken DNA-sekvens, der skal opkopieres fra den tilgængelige skabelon-DNA.