

# Kopiera DNA med hjälp av PCR-metoden

Niklas Dahrén



# PCR-metoden

- ✓ **PCR=** Polymerase chain reaction.
- ✓ **Kopiera upp specifika DNA-sekvenser:** Med hjälp av PCR kan vi välja ut de områden i DNA:t (t.ex. STR-områden eller specifika gener) som vi vill titta närmare på och kopiera upp dessa DNA-områden/DNA-sekvenser i väldigt stora mängder. Vi kan efter kopieringen köra våra kopierade DNA-områden i en elektrofores (gelelektrofores eller kapillärelektrofores), som sorterar dessa utifrån storlek, och sedan analysera resultatet.
- ✓ **När PCR-metoden kom på 80-talet så revolutionerade** det bl.a. kriminaltekniken eftersom det nu räckte med ytterst små mängder DNA från brottsplatsen för att kunna göra en DNA-analys.
- ✓ **Nobelpriset för PCR-metoden:** Kary Mullis fick nobelpriset i medicin 1993 för hans uppfinning av PCR-metoden.

# Användningsområden

- ✓ **Kriminalteknisk DNA-analys:** Binda en misstänkt till en brottsplats.
- ✓ **Faderskapstest:** Ta reda på om en viss person är barnets pappa.
- ✓ **Medicinsk DNA-analys:** Diagnosticera genetiska sjukdomar och upptäcka virus- och bakterieinfektioner.

# En modern PCR-apparat



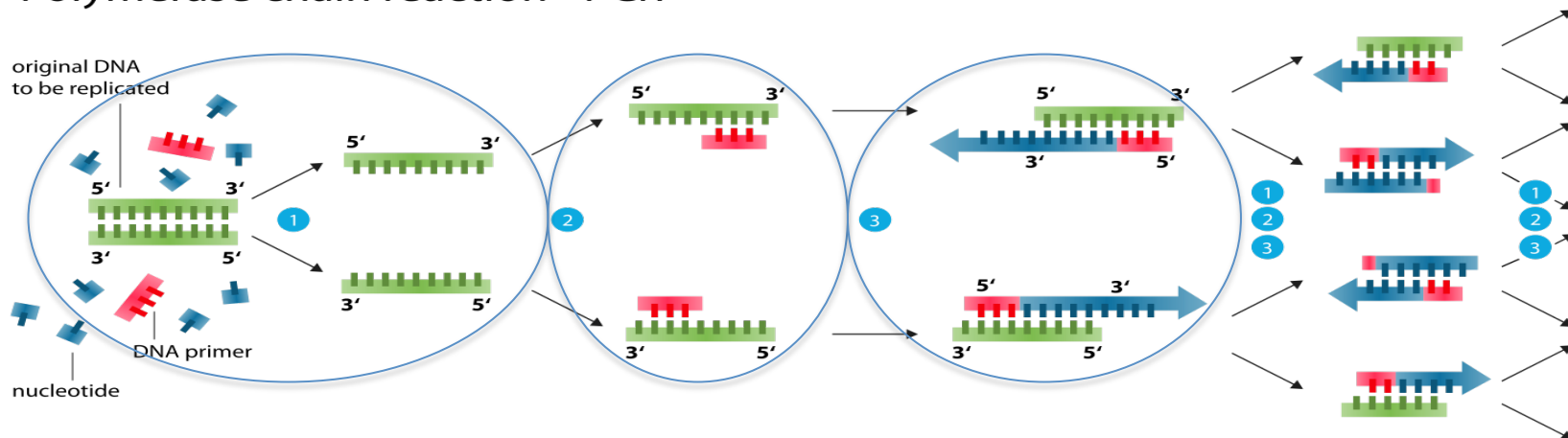
Bildkälla: "PCR masina kasutamine" by Karl Mumm - Own work. Licensed under CC BY-SA 3.0 via Wikimedia Commons - [http://commons.wikimedia.org/wiki/File:PCR\\_masina\\_kasutamine.jpg#mediaviewer/File:PCR\\_masina\\_kasutamine.jpg](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:PCR_masina_kasutamine.jpg#mediaviewer/File:PCR_masina_kasutamine.jpg)

# ”Ingredienser” som behövs för att kunna kopiera DNA:t i en PCR-apparat

- ✓ **Taq-polymeras (DNA-polymeras):** Taq-polymeras liknar DNA-polymeraset och används för att bygga de nya DNA-strängarna (göra kopiorna). Detta enzym tål dock hög värme mycket bättre än DNA-polymeras och fungerar därför bra i de höga temperaturer som vi måste ha i vår PCR-apparat. Taq-polymeraset har forskare tagit från den värmetaliga bakterien *Thermus aquaticus*.
- ✓ **DNA-nukleotider:** Dessa är byggstenarna som behövs för att bygga de nya DNA-strängarna. Taq-polymeraset sammanfogar dessa med varandra när strängarna byggs.
- ✓ **Primers:** Korta nukleotidsekvenser (ca 20 nukleotider) som binder till utkanten av de områden vi ska kopiera (t.ex. till utkanten av olika STR-områdena eller till specifika gener). Dessa fungerar som startpunkter så att DNA-polymeraset vet vart kopieringen ska starta. Det är viktigt att ha primers som är väldigt specifika för de områden vi vill kopiera, annars är risken att våra primers binder till många ställen i DNA-molekylerna och att vi därmed får ett felaktigt resultat.
- ✓ **Buffertlösning:** Stabiliserar pH-värdet på rätt nivå och innehåller bl.a. magnesium som behövs för att DNA-polymeraset ska fungera optimalt.

# PCR-metoden sker i 3 temperatursteg

## Polymerase chain reaction - PCR



- 1 **Denaturation** at 94-96°C
- 2 **Annealing** at ~68°C
- 3 **Elongation** at ca. 72 °C

1. Denaturering, ca 94-96 grader.
2. Annealing, ca 53-68 grader.
3. Elongering, ca 72 grader.

# PCR-reaktionen sker i 3 temperatursteg som vanligtvis upprepas i 20-40 cykler

- ✓ **Denaturering vid ca 94-96 grader:** Den höga temperaturen gör att vätebindningarna mellan DNA-strängarna försvagas och att de båda DNA-strängarna därmed separerar från varandra. I våra celler är det enzymet "Helikas" plus flera andra enzymer som sköter denna ganska komplicerade process. Utanför cellerna är det betydligt lättare att få denna process att fungera genom att höja temperaturen på detta sätt.
- ✓ **Annealing vid ca 53-68 grader:** Vid denna temperatur fäster våra specifika primers till utkanten av de områden vi ska kopiera. Denna temperatur kan skilja sig åt beroende på vilka primers vi använder oss av (storleken av dessa och även nukleotidsekvensen i dessa påverkar eftersom många G-C innebär fler vätebindningar). För hög temperatur innebär att våra primers har för mycket rörelseenergi och därmed har svårt att binda. För låg temperatur kan innebära att våra primers binder ospecifikt (kan fastna "lite överallt").
- ✓ **Elongering vid ca 72 grader:** Vid denna temperatur arbetar Taq-polymeraset som allra effektivast. Taq-polymeraset kopierar de utvalda områdena genom att sammanfoga nukleotider med varandra med originalsträngarna som mall.

# Äldre PCR-apparater bestod av 3 vattenbad med olika temperaturer!



Bildkälla: "PCR masina kasutamine" by Karl Mumm - Own work. Licensed under CC BY-SA 3.0 via Wikimedia Commons - [http://commons.wikimedia.org/wiki/File:PCR\\_masina\\_kasutamine.jpg#mediaviewer/File:PCR\\_masina\\_kasutamine.jpg](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:PCR_masina_kasutamine.jpg#mediaviewer/File:PCR_masina_kasutamine.jpg)



# Tips på filmklipp att titta på:

- ✓ <https://www.youtube.com/watch?v=iQsu3Kz9NYo>  
(animation).
- ✓ [https://www.youtube.com/watch?v=jZ7Hr\\_QRpQs](https://www.youtube.com/watch?v=jZ7Hr_QRpQs)  
(film från Högskolan i Dalarna).

Se gärna fler filmer av Niklas Dahrén:

<http://www.youtube.com/Kemilektioner>

<http://www.youtube.com/Medicinlektioner>

