

INTRODUKSJONGUIDE TIL PCR

Hva er PCR?

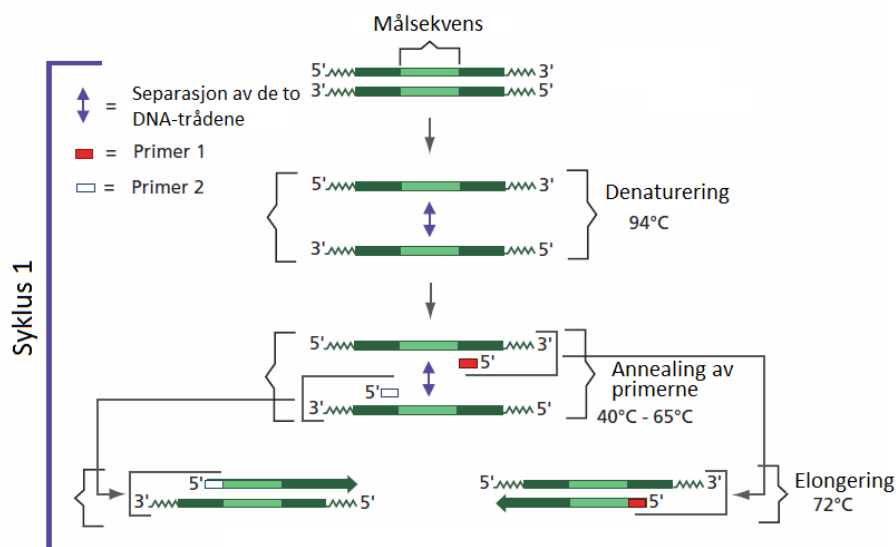
PCR (Polymerase Chain Reaction, eller polymerasekjedereaksjon på norsk) er en teknikk for å raskt lage mange kopier av en spesifikk DNA-sekvens *in vitro* (uten bruk av levende organismer).

Hva trenger jeg for å utføre PCR?

- DNA-templat – den isolerte, dobbeltrådede DNA-biten som skal kopieres opp.
- Primere – korte, syntetiske, enkelttrådede DNA-molekyler som binder endene av DNA-sekvensen som skal kopieres.
- **Taq** DNA polymerase – termostabilt (varmestabilt) enzym som syntetiserer DNA-kopier.
- Reaksjonsbuffer – for å sikre optimale forhold for polymerasen.
- Frie nukleotider (dNTP) – byggestenene (A, T, C og G) i DNA.
- PCR-maskin – en programmerbar termostatblokk som raskt varmer og kjøler prøvene i syklus av tre trinn som utgjør PCR-reaksjonen.

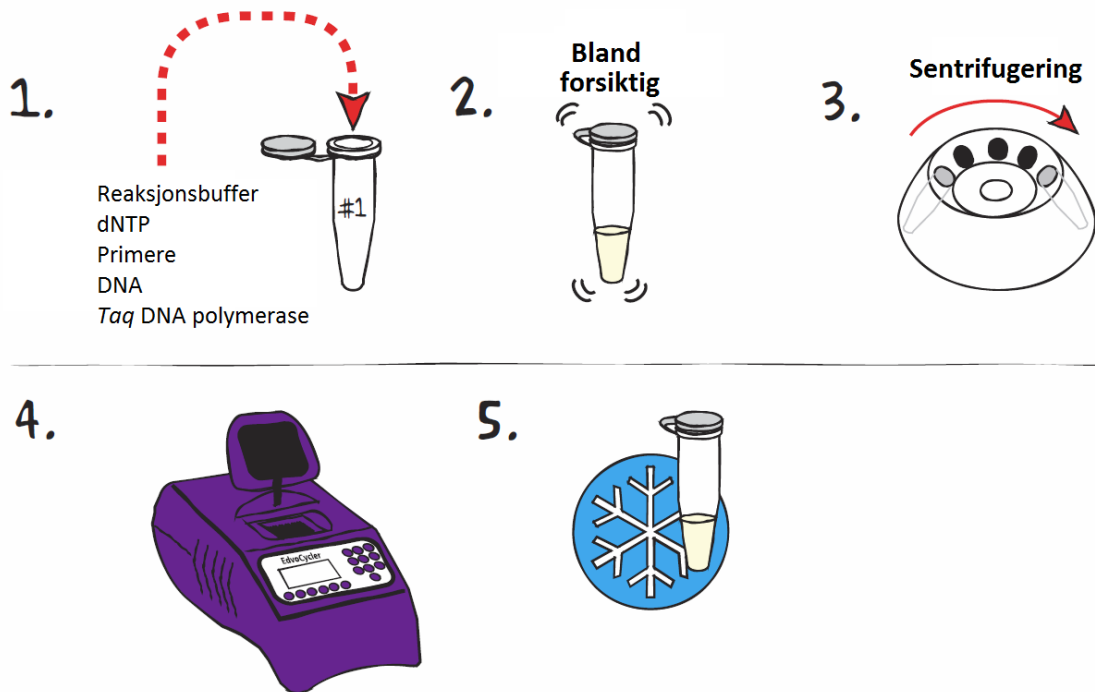
Hvordan kopieres DNA ved PCR?

For å utføre PCR blandes DNA-sekvensen som skal kopieres opp (målsekvensen i DNA-templatet) med DNA-primere, nukleotider og *Taq* polymerase i en reaksjonsbuffer. Reaksjonsblandingen varmes til 94 °C for å denaturere det dobbeltrådede DNAet (dvs. separere de to trådene). Deretter kjøles prøven til 45-60 °C som er tilstrekkelig for at primerne kan basepare med målsekvensen i DNA-templatet. Dette trinnet kalles «annealing». Til slutt økes temperaturen til 72 °C som er optimal temperatur for *Taq* polymerasen som syntetiserer en ny DNA-tråd med målsekvensen ved å forlengere primerne. Disse tre trinnene (denaturering, annealing og elongering) utgjør en PCR-syklus som doubler mengden av den ønskede DNA-sekvensen på mindre enn 5 minutter. For å produsere nok DNA for videre analyse gjentas PCR-syklusen 20-40 ganger.



Figur 1. Trinnene i en PCR-syklus. De to DNA-trådene i templatet separeres ved 94 °C (denaturering) før temperaturen senkes for at primerne skal binde målsekvensen (annealing). Deretter kopieres målsekvensen ved at polymerasen syntetiserer nytt DNA i forlengelsen av primerne.

Oppsett av en PCR-reaksjon trinn-for-trinn



- Sett et 0,2 ml PCR-rør på is eller i et kjølespann og tilsett reaksjonsbuffer, nukleotider (dNTP-mix), primere, DNA-templat og *Taq* DNA-polymerase. NB! I våre PCR-forsøkssett (778371 PCR-basert DNA fingerprinting og 778333 PCR-basert analyse av DNA-profiler) tilsettes reaksjonsbuffer, polymerase, og nukleotider i form av en såkalt PCR EdvoBead. Sett opp reaksjonen ifølge forsøksbeskrivelsen til det enkelte forsøket.
- Bland godt ved å pipettere opp og ned gjentatte ganger eller flikke på røret med fingeren.
- Sentrifuger kort for å samle hele volumet i bunnen av røret.
- Skru på PCR-maskinen og velg ønsket program. Sett i prøvene og start programmet. Standard syklusbetingelser for en PCR-reaksjon er gitt under:

Trinn	Temperatur	Tid	
Innledende denaturering	94 °C	3-5 minutter	
Denaturering	94 °C	15-60 sekunder	20-40 sykler
Annealing	45-65 °C	30-60 sekunder	
Elongering	72 °C	1 min/kilobase DNA	
Avsluttende elongering	72 °C	5-10 minutter	
Eventuell kjøling	4 °C	∞	

- Ta prøvene ut av PCR-maskinen og sett dem på is. Gå videre med analyse av PCR-produktene ved agarosegelelektroforese.