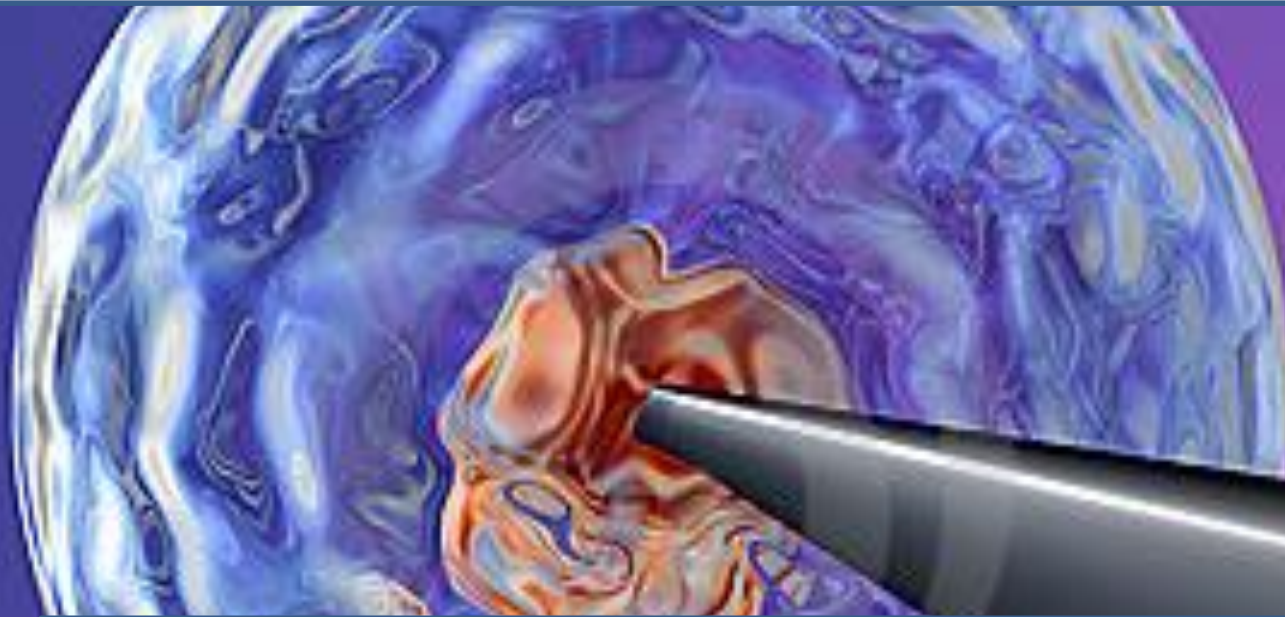


5. Molekuláris biológiai technikák



DNS szaporítás kémcsőben és élőben.
Klónozás, PCR, cDNA, RT-PCR, real-time-RT-PCR, Northern-, Southern-blotting, génexpresszió, FISH

5. Molekuláris szintű biológiai technikák

- DNS, RNS, fehérjék vizsgálatára, módosítására, manipulációjára, vizsgálatára alkalmas technikák
- Molekuláris biológiai, kémiai biológiai, genetikai, biokémiai, biofizikai alkalmazások
- Rekombináns DNS technika
 - Lehetővé teszi különböző eredetű DNS szakaszok összeillesztését – a genetikai kód univerzális
- DNS klónozás, amplifikáció
- Génszabászat (genetic engineering): A DNS kód módosítása

Rekombináns DNS technikák

- Különböző eredetű DNS szakaszok összekapcsolása
- **Restriktációs endonukleázok** - a DNS kettős szálát hasító enzimek, melyek a szálon belül hasítanak (vö.: exonukleázok)
 - Bakteriális eredetű enzimek
 - Eredetileg a baktériumok védekezési mechanizmusának részei
 - A baktériumok saját örökítőanyagukat „metilálással” védik a hasítástól

Rekombinációs DNS technikák

- **Restriktív endonukleázok :**

- Speciális szekvenciákat képesek felismerni és azok mentén hasítani
- Felismerési szekvenciák közt: ún. palindrom szakaszok (mindkét szálon 5' – 3' irányba olvasva ugyanaz a szekvencia)
- *Kis erek mentén lép sík ölén oda van a bányász rabja jaj baranyában a vadon élő kis pálnét nem keresik*



- Mindkét szálon hasítják a cukor-foszfát gerincet két adott nukleotid között

Rekombináns DNS technikák

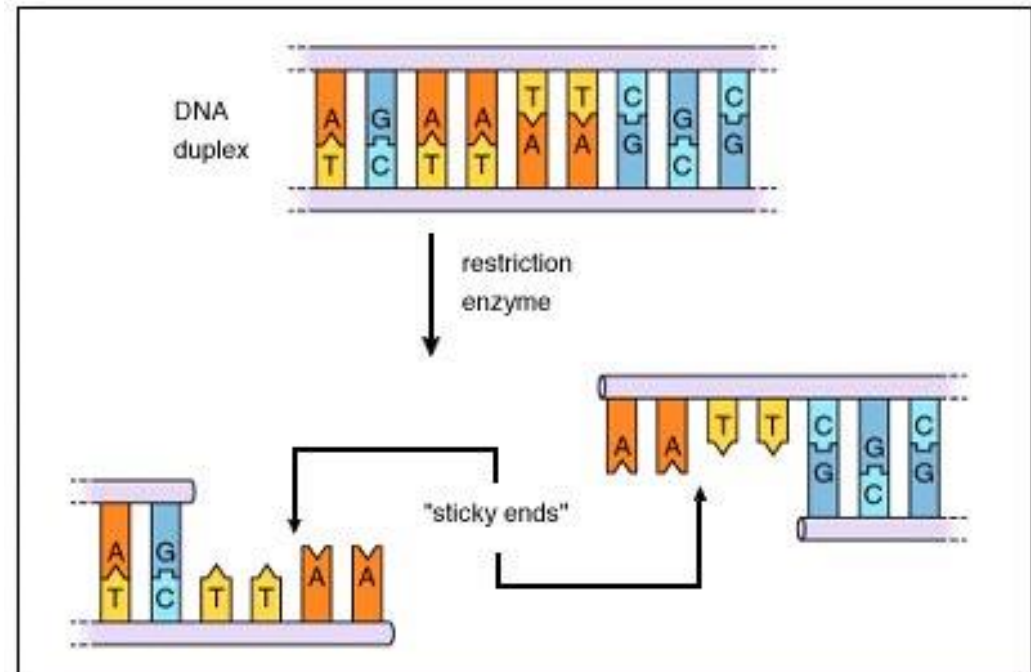
- **Restriktációs endonukleázok :**

- Kétféle hasítási mintázat

- Ragadós vég (kohézív)

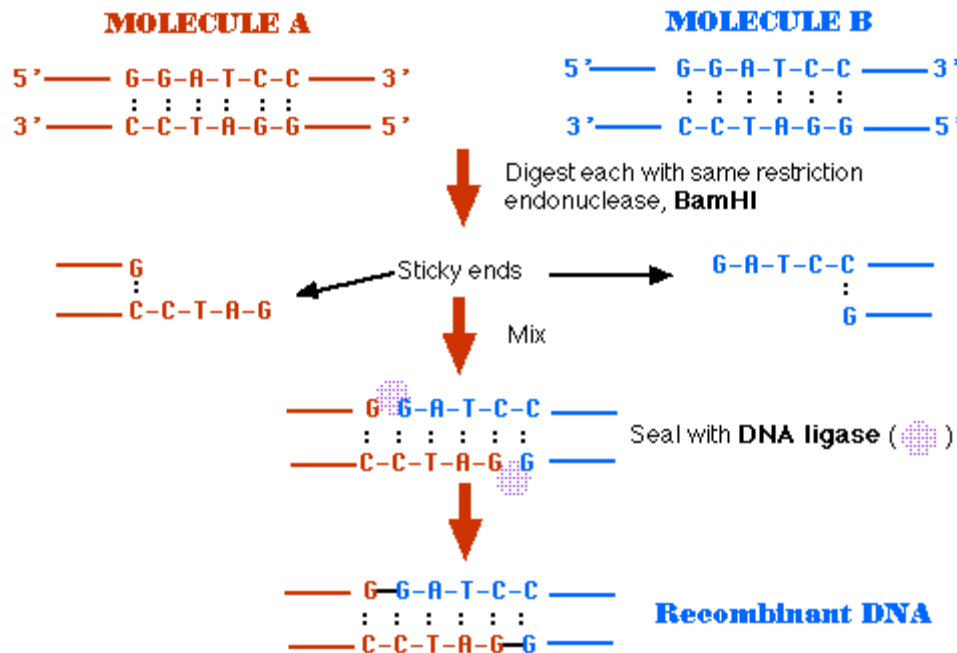


- Tompa vég



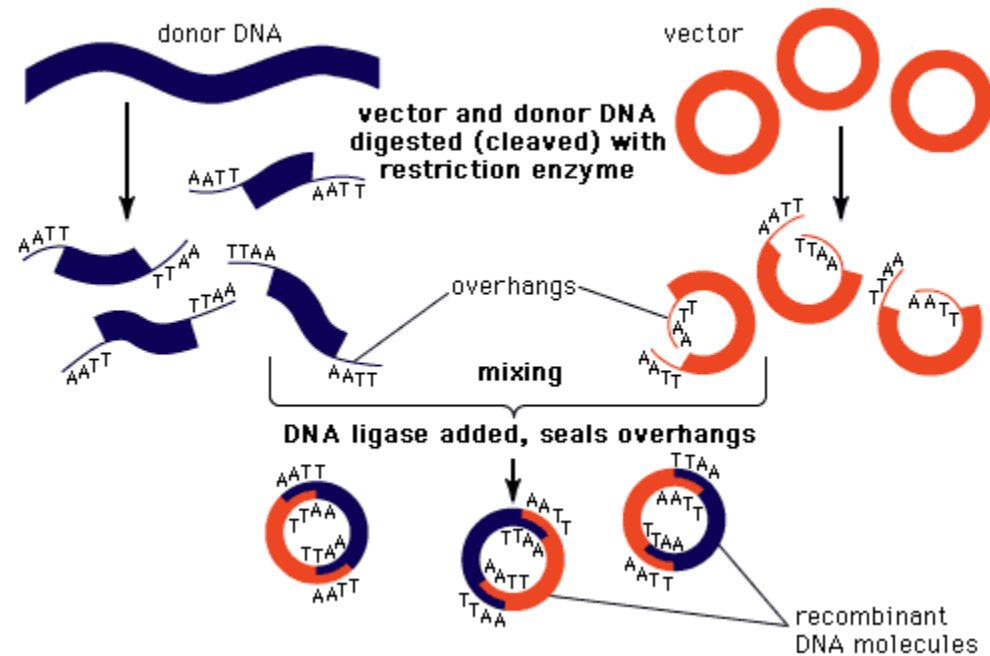
Rekombinációs DNS technikák

- Új DNS szakasz beillesztése:
 - Mesterséges / természetes, izolált idegen DNS
 - A végekre restrikciós felismerési szakaszt tartalmazó linker beépítése
 - Hasítás restrikciós endonukleázzal (ugyanolyannal, mint azt, ahova be akarjuk illeszteni – komplementer „ragadós végek”)



Rekombináns DNS technikák

- **Klónozás: az idegen DNS bejuttatása egy hordozóba**
 - Idegen DNS : *inzer*t
 - Hordozó DNS: *vektor*
 - A vektort és az inzeret ugyanazzal a restrikciós enzimmal kezeljük
 - A keletkező „ragadós” végeken át hibridizáltatjuk, majd DNS ligázzal összekapcsoljuk



Rekombinációs DNS technikák

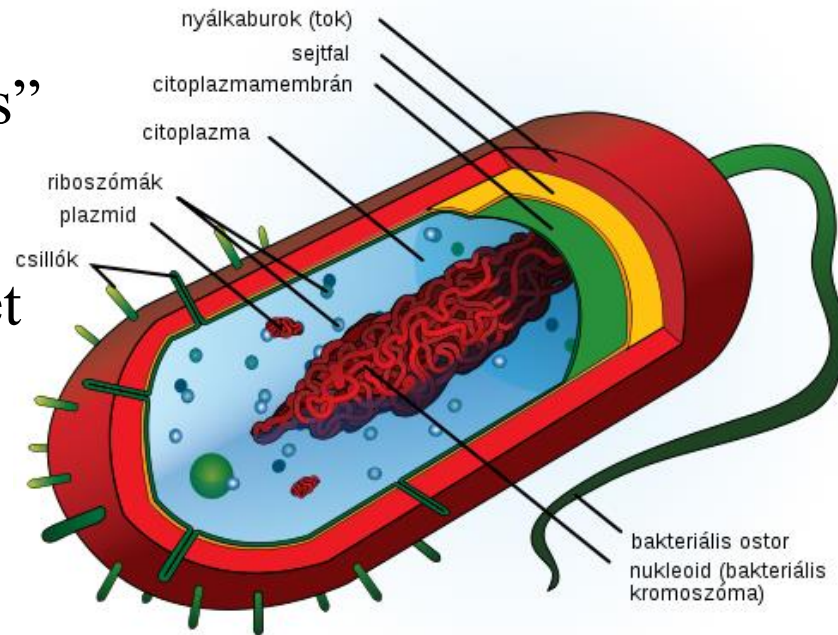
vektorok

- Plazmid (cirkuláris DNS)
- Fág (λ -fág, baktériumvírus)
- Kozmid (fág cos-szekvencia + plazmid)

Rekombináns DNS technikák

Plazmid- mint vektor

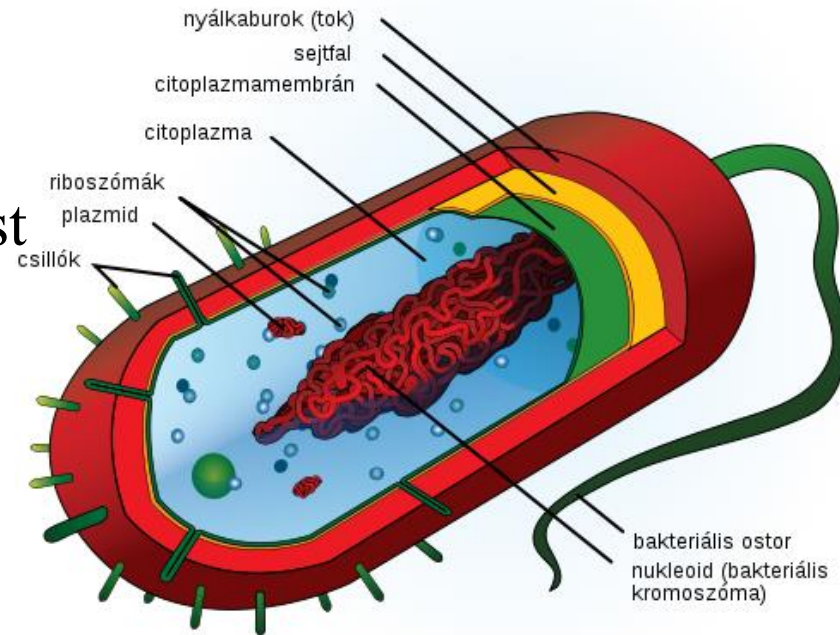
- Baktériumokban, archeákban
- Járvulékos DNS, a „kromoszómális” DNS-től független
- Nem esszenciális a gazdaszervezet szempontjából, ugyanazon fajon belül, hiányozhat is, de akár több kópiában is jelen lehet
- Cirkuláris DNS
- Egyetlen replikációs origója van



Rekombináns DNS technikák

Plazmid- mint vektor

- A kromoszómától függetlenül replikálódhat
- Akár fajok közti információátadást is lehetővé tesz
- Bizonyos tulajdonságokat kódolhat, pl. antibiotikum rezisztenciáért felelős géneket hordoz



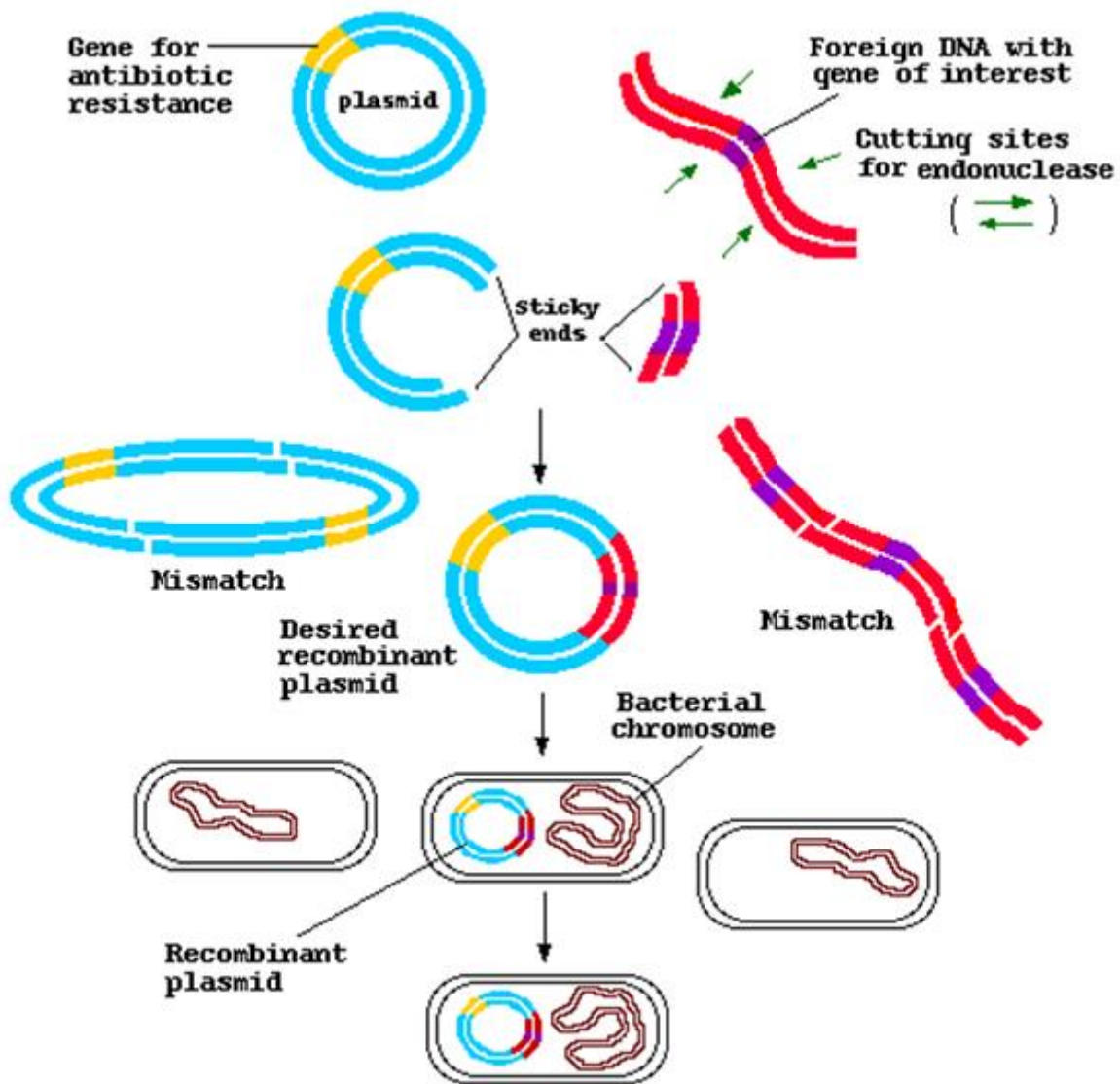
Inzert és plazmid
kezelése restrikciós
enzimmal

Ragadós végek
összeillesztése, majd
ligázal összekötése

Elválasztás: pl.
méretkizárással

Rekombináns plazmid
bejuttatása sejtekbe

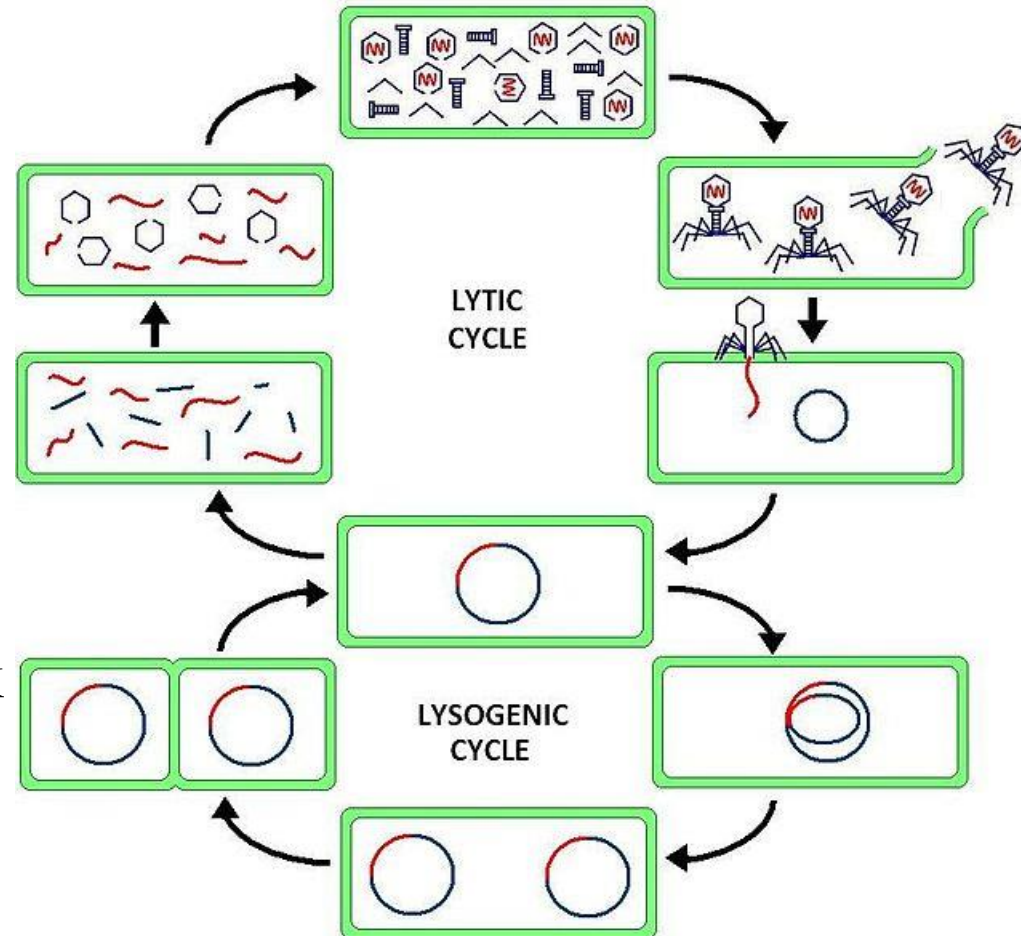
Kiméra plazmidot felvett
sejtek szelektálása a
plazmid egyéb
génjeinek segítségével



Rekombináns DNS technikák

Fág- mint vektor

- Bakteriofág, baktériumra veszélyes vírus
- λ -fág, cos-szekvencia
- Cirkuláris DNS
- Lizogén és lítikus fázis
- Könnyebben bejut a sejtekbe, mint a plazmidok
- A kimérát becsomagolják a fehérjeburokba



Rekombináns DNS technikák

Kozmid - mint vektor

- Plazmid (antibiotikum rezisztencia) + a fágok *cos*-szekvenciája – akár emlős sejtekbe is bejuttatható
- *Cos*-szekvencia: 200 kbázis hosszú DNS, a végén 12 bázis egyszálú
- sokkal hosszabb DNS szakaszok beépítésére alkalmas, mint a plazmid
- A *cos*-szekvenciánál hasadhat – linearizáció – csomagolás a fág burkába
- A plazmid tulajdonság miatt **antibiotikum rezisztencia géneket** is visz magával, a fág tulajdonság miatt könnyebben jut be a sejtekbe

Rekombináns DNS technikák

Eukarióta gének bakteriális expressziója

- Génekben exonok, intronok is vannak (splicing)
- RNS szerkesztés nincsen a prokariótákban
- A kész mRNS-ről DNS-t készítenek (**cDNS - complementary DNA**)
- **Reverz transzkriptáz** (RNS dependens DNS polimeráz)

Rekombináns DNS technikák

cDNS szintézise, klónozása

- A legtöbb mRNS végén poliA szekvencia
- oligoT szekvenciát adnak hozzá (primer)
- Reverz transzkriptáz előállítja a komplementer egyszálú DNS-t = cDNS (fel is lehet sokszorozni, ld. később)
- Bázissal lebontják az mRNS-t (DNS ellenáll)
- DNS polimerázzal előállítják a komplementer szálát
- A szintézist követően a kettős szálú cDNS-t beillesztik egy vektorba = expressziós vektor

Rekombináns DNS technikák

Rekombináns DNS gének eukarióta expressziója

- Gyakran a baktériumok nem képesek a velük termeltetett fehérjék poszt-transzlációs módosítására
- Muszáj eukarióta sejtekkel termeltetni
- Bejuttatás (transzfekció) : citózissal, mikroinjektálással, vírussal, elektromos stimulussal, CRISPR
- Alacsony százalékban (2%), de beépül a kromoszómákba – rekombináció pl. cos-szekvenciánál
- Retrovírussal még hatékonyabb (elősegíti a beépülést a kromoszómákba)

Rekombináns DNS technikák

Rekombináns DNS technológia alkalmazása

- Génterápia: genetikai betegségek kezelése (pl. cisztás fibrózis)
- Rekombináns fehérjék nagy mennyiségű termelése baktériumokkal (pl. inzulin - olcsó, gyors)
- Fúziós fehérjék, ún. riporter gének (pl. GFP)
- Génkiütés, génbevitel



DNS szaporítás kémcsőben

- **Polymerase chain reaction (PCR) – Kary Mullis (1983)**
 - DNS szakaszok felsokszorozása (amplifikáció)
 - Kell ismerni a felsokszorozni kívánt szakasz melletti részek szekvenciáját (lehet mesterségesen is megtoldani), hogy ezek komplementerét használjuk primerekként
 - Hozzávalók: primerek, dNTP-k, hőstabil DNS polimeráz (Taq polimeráz, hőforrásokban élő baktériumból)
 - Ismétlődő ciklusok

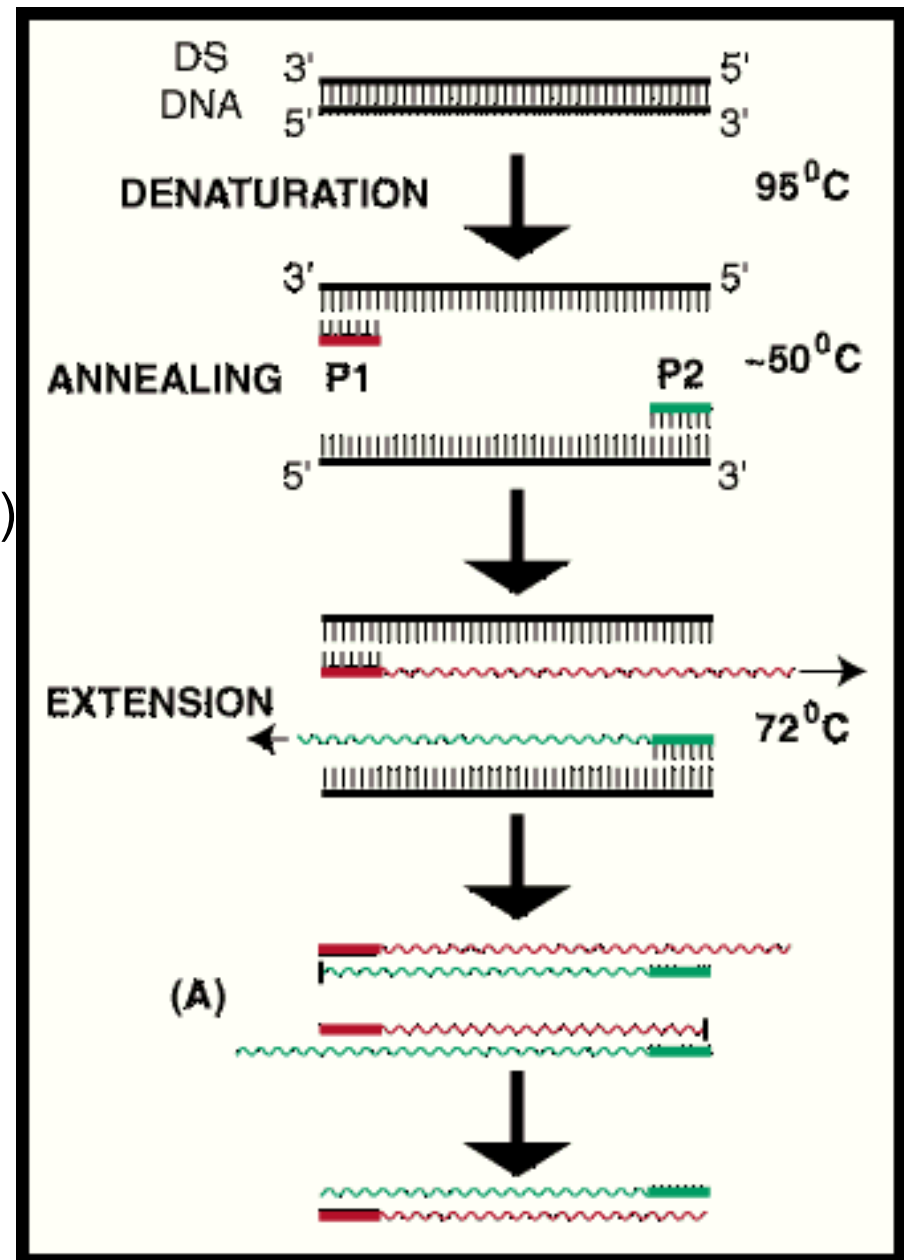
A DNS szál denaturációja 95 °C-on

Lehűtés 50-60 °C-ra, primerek hozzáadása (max. 50 bázis)

A primereket nagy feleslegben adjuk hozzá (két DNS szál nem re-hibridizál)

Melegítés 72 °C-ra, a termostabil polimeráz elkészíti mindkét szálon a komplementer szakaszt

A DNS szál denaturációja 95 °C-on, indul újra az egész



PCR

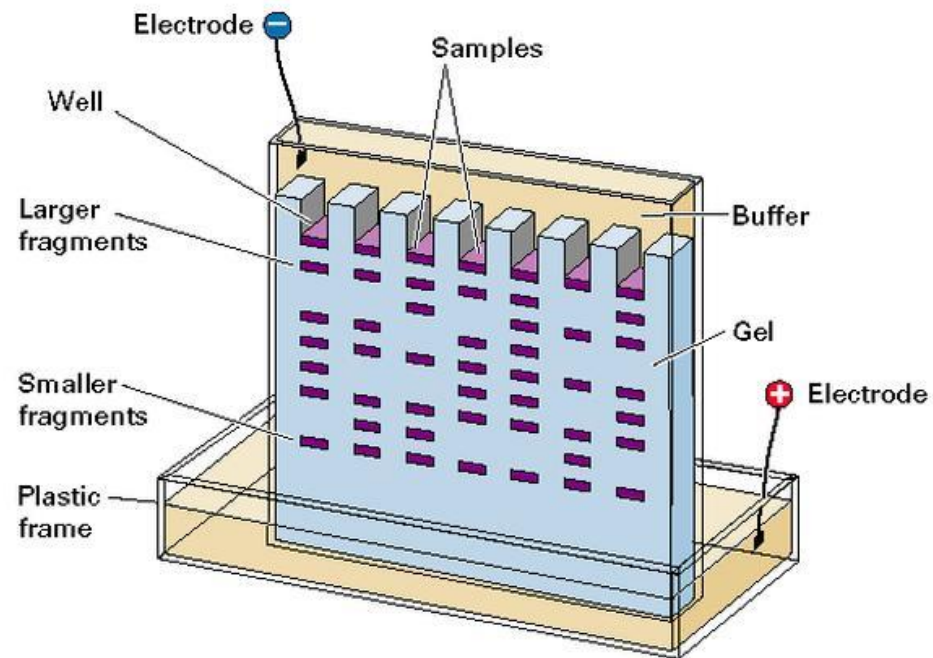
- Rengeteg kópia rövid idő alatt (exponenciális növekedés, 2^n , n = ciklusok száma)
- A sokszorozandó gén / DNS szakasz szekvenciáját nem kell tudni (csak a szomszédos szakaszokét)
- A sokszorozandó DNS akár 10 kb (kilo bázis) is lehet
- Csak az a DNS fog amplifikálódni, mely a primerek közt van

A DNS elválasztása, hibridizálás, Southern blot

- A DNS feldarabolásakor keletkezett fragmensek nemcsak klónozásra, hanem azonosításra is alkalmasak
- Több restrikciós enzimet alkalmazva különböző fragmenseket kaphatok (más hasítási mintázat, fingerprint)

A DNS elválasztása, gélelektroforézis

- A feldarabolt kettősszalú DNS-t denaturálják (egyenes, csak a töltés/méret számít)
- A DNS negatív töltésű, elektromos áramot alkalmazva a fragmensek a pozitív pólus felé indulnak el az agaróz gélen
- Az egyes fragmensek vándorlási sebessége a mérettől függ (a nagyobbak lassabban haladnak)

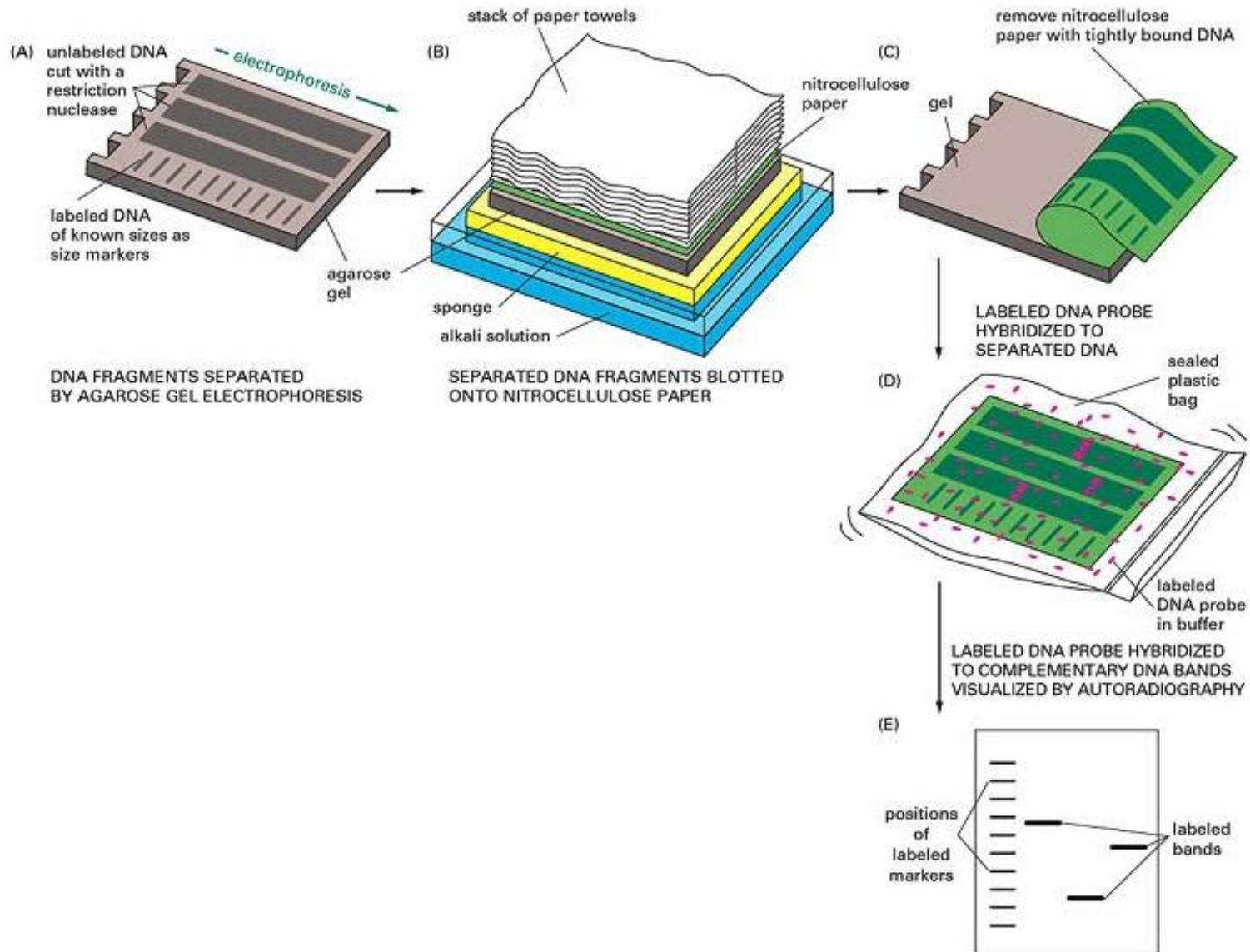


- Előhívás: a gélbe kevert interkalátorral

Southern blot – specifikus DNS szakaszok azonosítására

- Az elválasztott DNS-mintázatot *blottolják* egy membránra (átviszik a DNS-t)
- NaOH-s fürdővel szétszedik a kettős szálát (ha csak egy specifikus fragmensre vadásznak)
- Az immár egyszálú DNS fragmenseket fixálják a membránon (hő, vagy UV kezelés)
- A membránt belemártják egy oldatba, mely tartalmazza az azonosítani kívánt DNS szakasz jelölt (radioaktív, fluoreszcens) komplementerét (szintetikus próba)
- Hibridizáció
- Azonosítás (csak a jelölt próbával hibridizált DNS látszik)

Southern blot



Southern blott, alkalmazás

- DNS ujjlenyomat azonosításra
- Génkópiák azonosítása genomon belül
- Gének átöröklődésének vizsgálata
- Restriktációs helyek mutációjának azonosítása
- Génvariációk, géndiverzitás (allélek) azonosítása (gén-polimorfizmus)
- Egyes genetikai aberrációk okozta betegségek azonosítása (sarlósejtes vérszegénység, Huntington-kór)

Northern blotting, RNS elválasztás

Ma már nem nagyon használják, az RT-PCR kiszorította

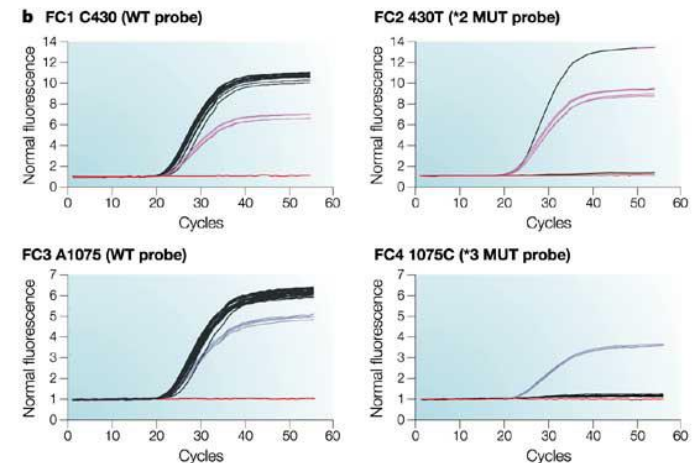
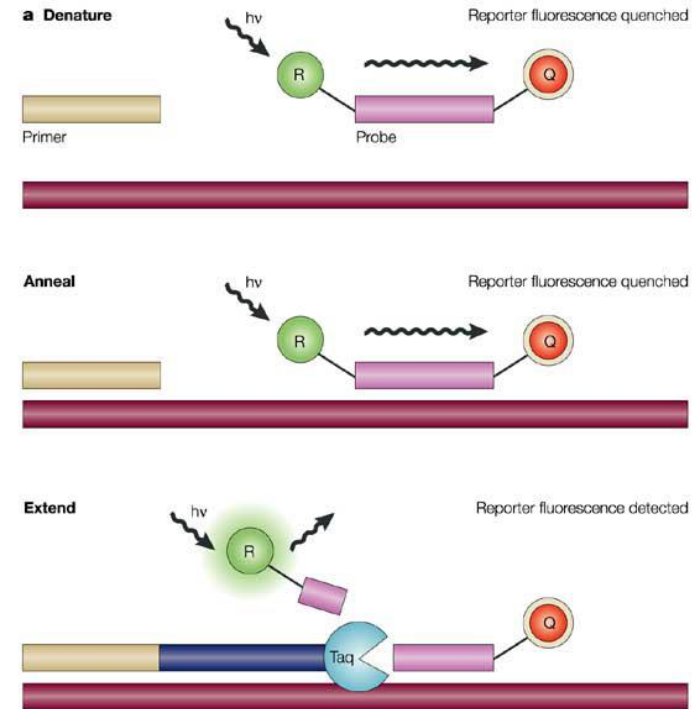
- Gélelektroforézissel elválasztott RNS átvitele a membránra
- Mivel az RNS egyszálú, nincsen szükség denaturációra
- Hasonló a Southern blothoz
- Választ adhat az alábbi kérdésekre:
- Az adott gén expresszálódik-e az adott körülmények között?
- Mennyire aktív az adott gén (mRNS átiratok mennyisége)?
- Milyen hosszúak az átiratok, van-e splicing?

RNS vizsgálata – RT-PCR

- RT: reverz transzkriptáz
- Enzim, ami RNS-t ír DNS-re
- cDNS: Complementary DNS, az mRNS-ről átírt ssDNS
- PCR-rel felszaporítható a kívánt szakasz (*amplikon*)
- Láthatóvá tétel: az amplikon elektroforézise + próba DNS
- A gélbe kevert etídium-bromid (interkalátor fluorofór) kapcsolódik a kettős szálú DNS-hez
- UV hatására világít - fotózható

Real time PCR - qPCR

- Kvantitatív-PCR
- Az amplifikáció nyomon követése, a kópiák (amplikonok) mennyiségének meghatározása
- Kell hozzá: primer és egy kettősen jelzett szekvencia-specifikus próba
- Kettősen jelzett próba: fluorofór + fluoreszcenciát kioltó rész (quencher)
- Amikor a polimeráz eléri a próbát lebontja azt, és a fluorofór bekapcsol (messze kerül a quencher-től)



Fluoreszcens *in situ* hibridizáció, FISH

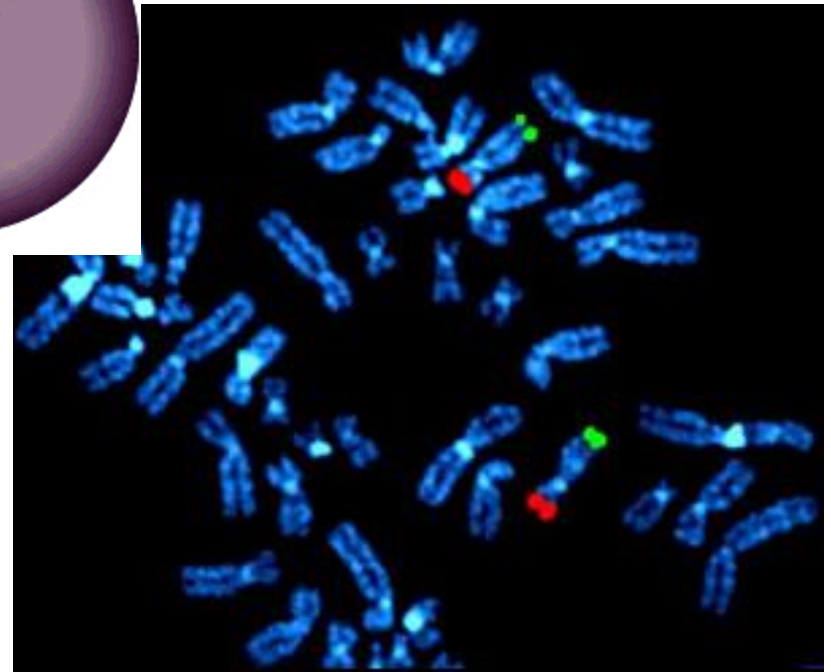
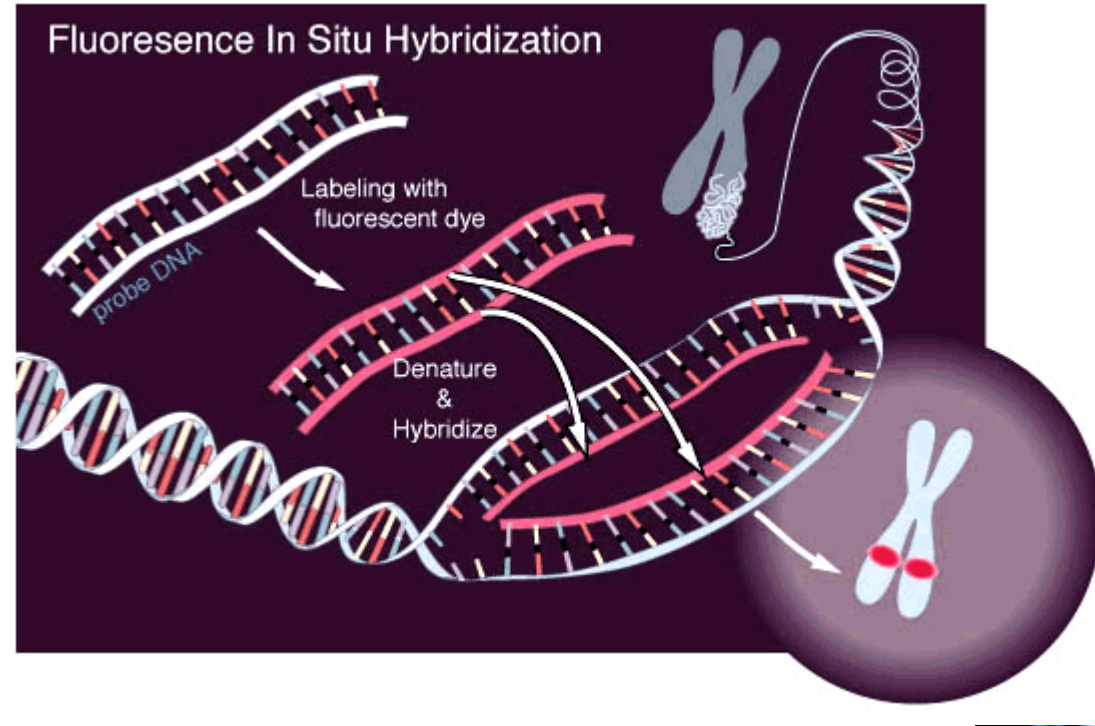
- Citogenetikai módszer
- Kromoszómák, és kromoszóma-szintű mutációk azonosítása, specifikus szakaszok helye, jelenléte, hiánya
- *In situ*, azaz sejten belül, akár interfázisban is
- Fluoreszcensen jelölt oligonukleotid próba, amely csak olyan DNS szakasszal hibridizál, amellyel magas fokú komplementaritást ad

Fluoreszcens *in situ* hibridizáció, FISH

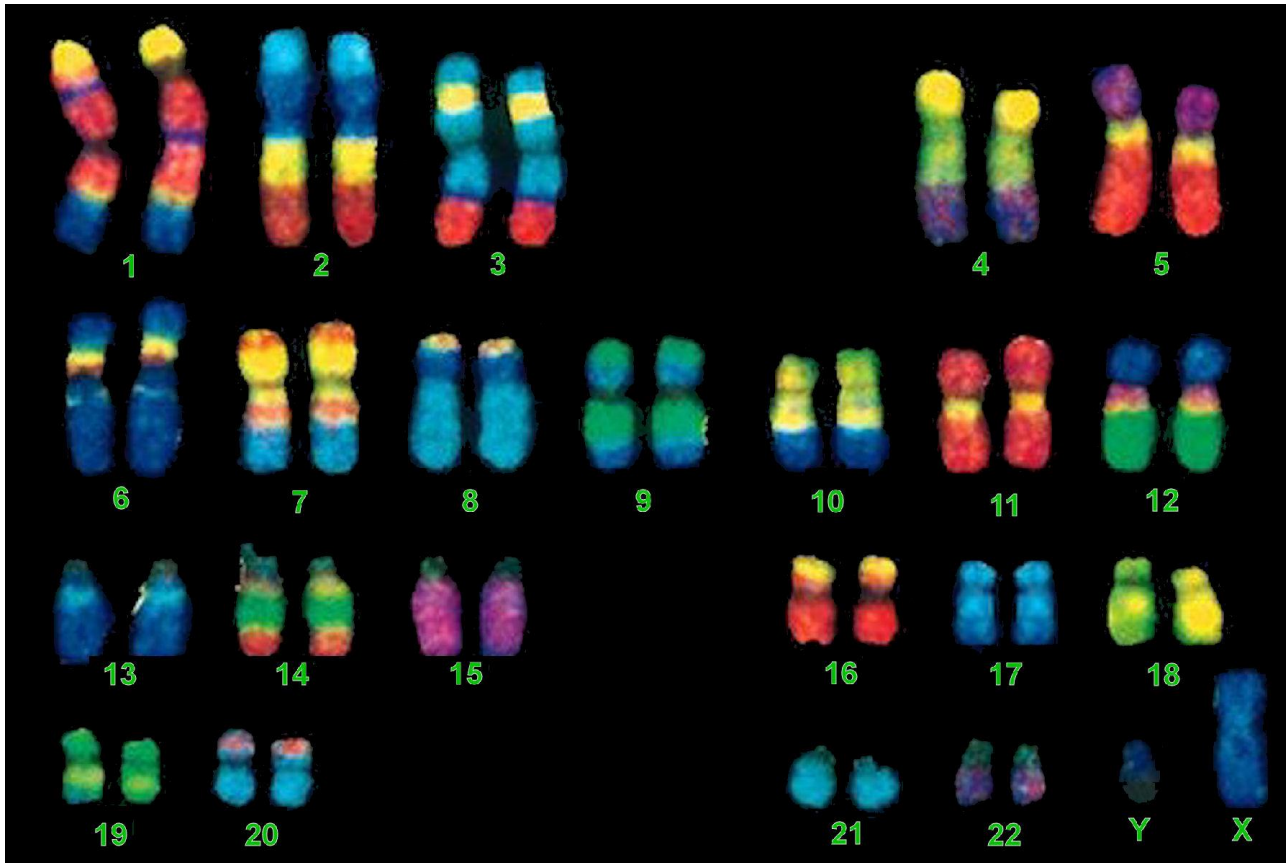
- Az oligonukleotid próbának elég hosszúnak kell lennie, hogy növelje a specificitást, de nem túl hosszúnak, ami lassítaná a hibridizációt
- Szintetikus oligonukleotidot jelzik (fluoreszcens, biotin, antigén)
- Kromoszóma-preparátum készítése (inter-, vagy metafázis), a kromoszómákat egy szubsztráton rögzítik (pl. üveg), denaturálják
- Hibridizáció
- Fluoreszcens mikroszkóp

FISH

Fluorescence In Situ Hybridization



FISH

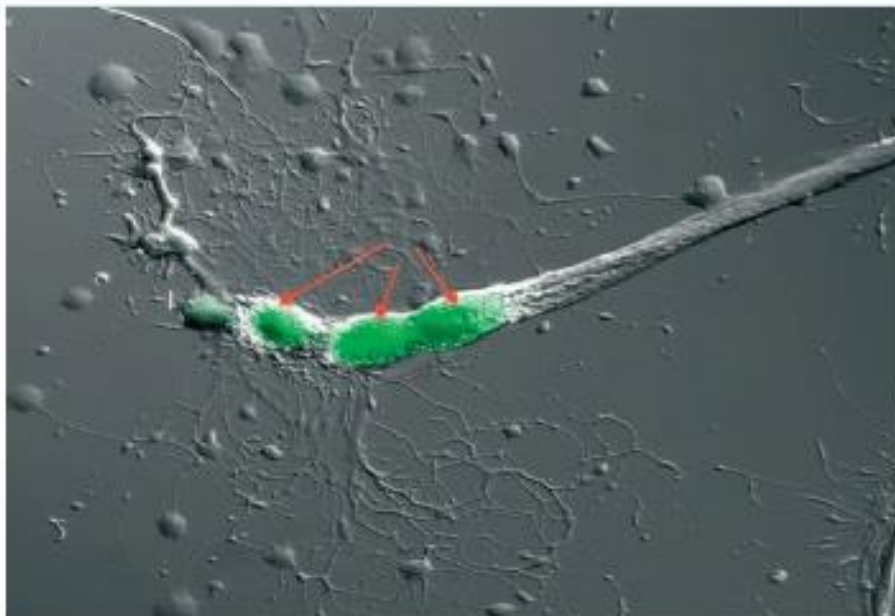
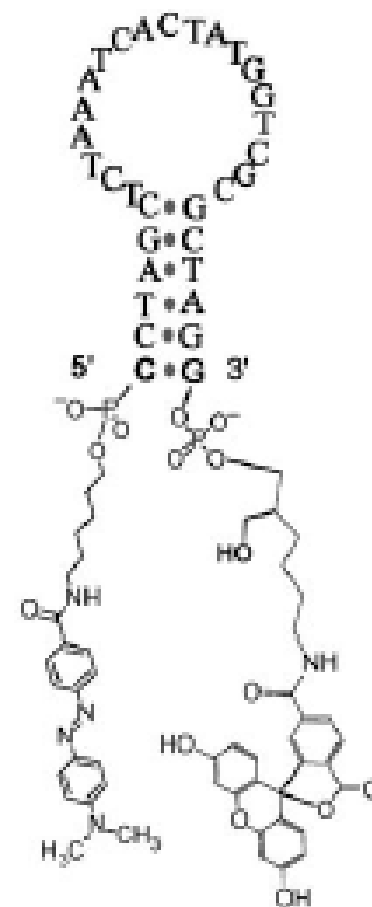
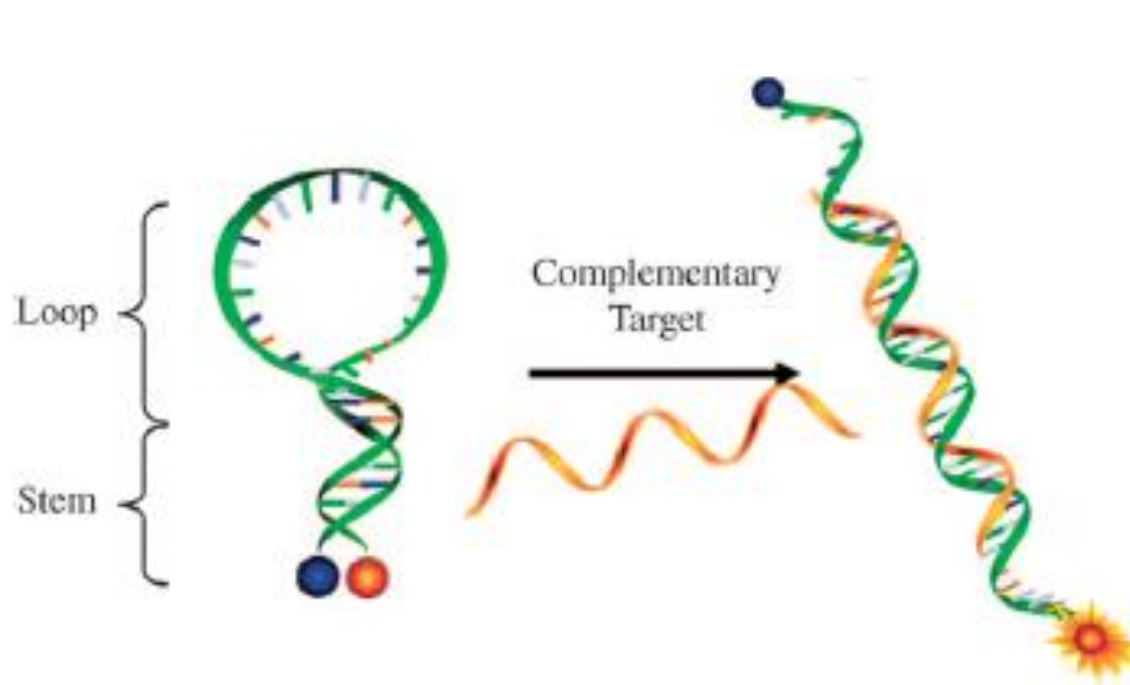


FISH alkalmazás

- Faj azonosítás (patogén baktériumok)
- Genetikai eredetű fejlődési rendellenességek szűrése (pl. Down szindróma)
- Génkópiák azonosítása
- Rezisztens baktérium-sejtvonalak azonosítása
- Génszabályzó pl. miRNS helyek azonosítása
- *in vivo* génexpresszió (mRNS) pl. molecular beacon-nel
– génkifejeződés tér/időbeli követése

Molecular beacon

- Szintetikus (tervezett) egyszálú oligonukleotid
- Hajtű mintázat
- Önmagával hibridizálódó nyakrész (stabilitás, szekvencia-specifitás - nem lehet túl hosszú)
- Felismerésért felelős hurok rész (komplementer szekvencia)
- 3' és 5' végeken fluorofór és quencher



- Idegsejt axon terminálisa
- Ingerületátvivő anyag expressziójáért felelős mRNS kimutatása