

Mikrobiális genetika

Géntechnológia

A molekuláris klónozás

- A molekuláris genetikai ismeretek alkalmazását jelenti a **géntechnológia** (genetikai mérnökség, genetikai manipuláció), amely az ismeretek birtokában a genetikai anyagot molekuláris szinten módosítja.
- **A klónozás** valamilyen DNS darab, sejt vagy egyed azonos változatainak több példányban való előállítását jelenti.
- A **rekombináns DNS** különböző eredetű inszert és hordozó DNS-t tartalmaz.
- A **molekuláris klónozás** nem más, mint egy specifikus inszertet tartalmazó rekombináns DNS felszaporítása megfelelő gazdasejtben (pl. *Escherichia coli*).

A modern géntechnológia

Ma a genetikán alapuló géntechnológia, a biotechnológia a gazdasági fejlődés egyik húzóágazata.

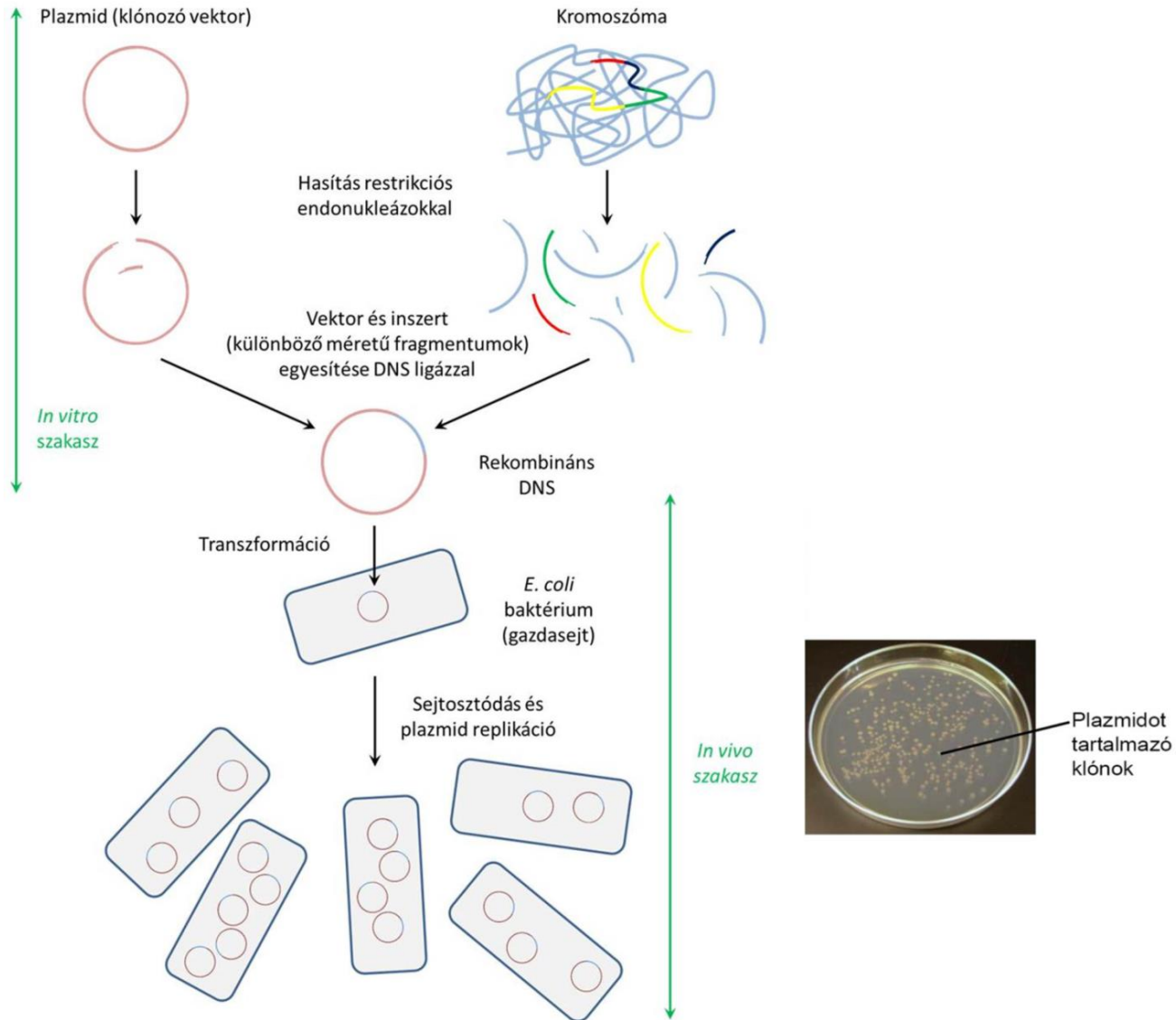
A **GMO** = **G**enetikailag **M**ódosított **O**rganizmusokat más néven transzgénikus élőlényeket génbevitellel állítják elő.

A DNS diagnosztika felhasználásával egyedek azonosíthatók és betegségek diagnosztizálhatók.

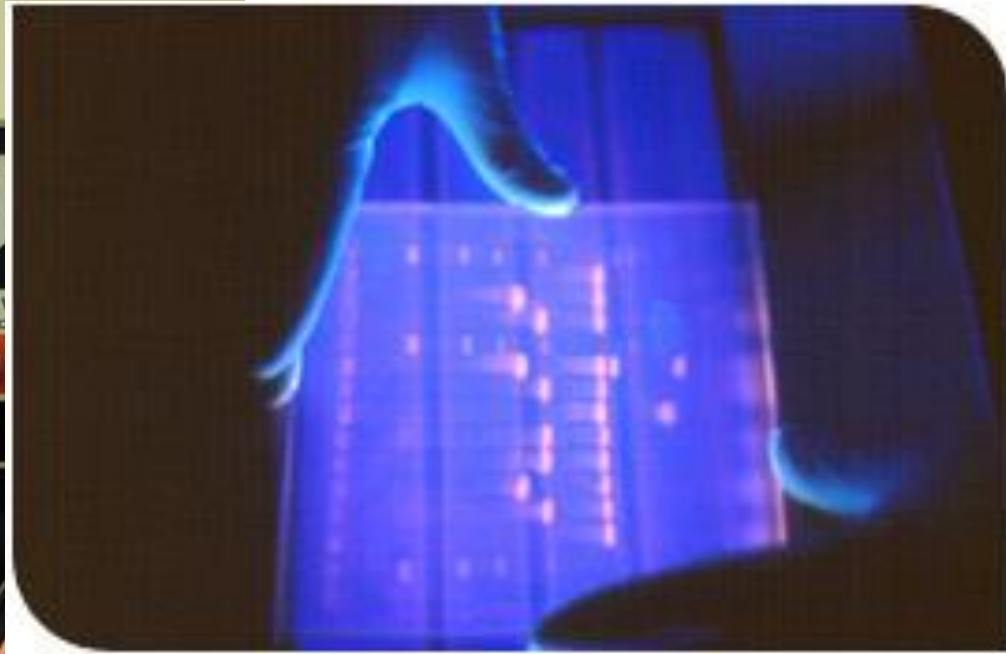
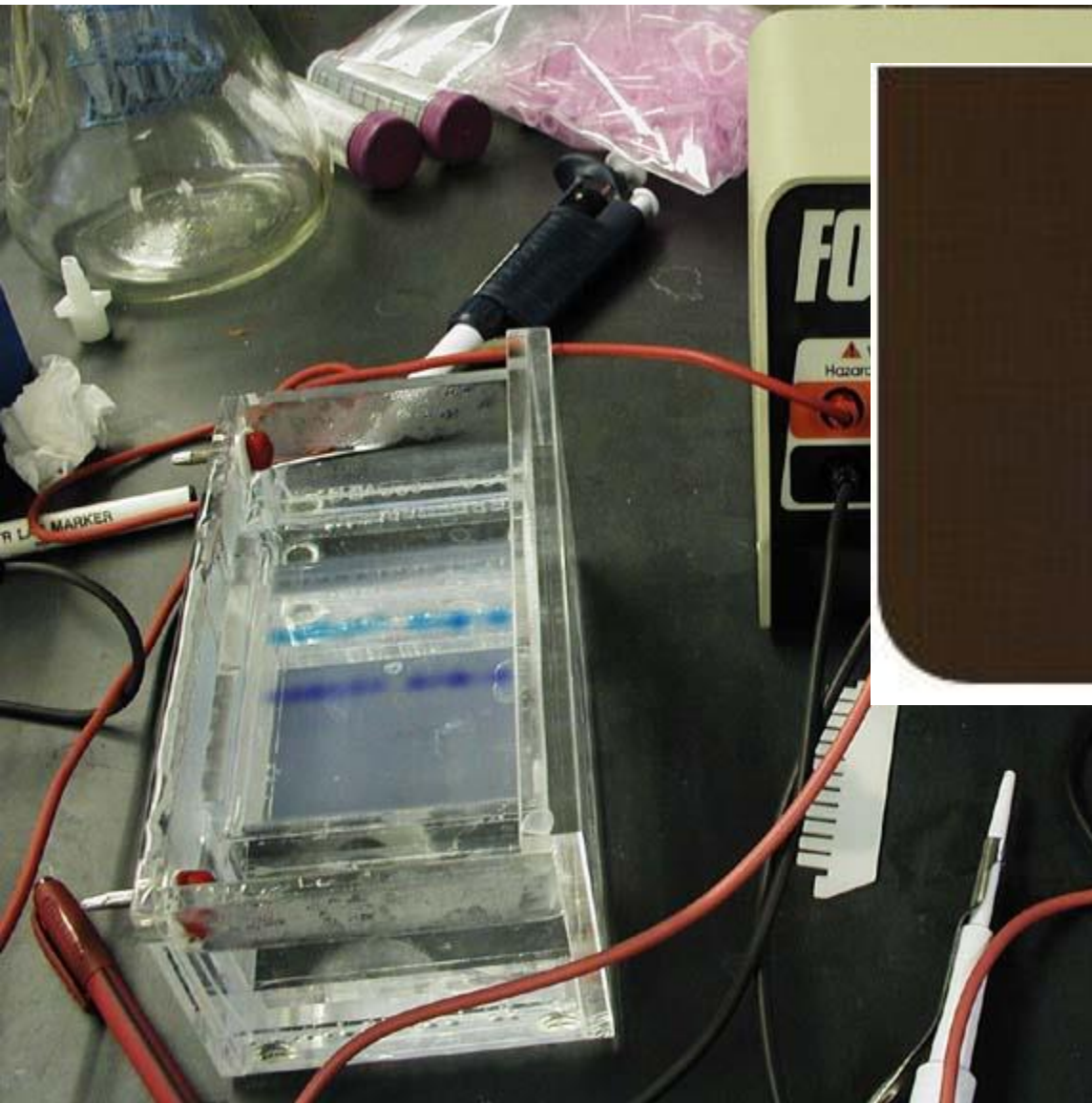
Céljai:

- Diagnosztika
- Gyógykezelés
- Ellenanyagtermelés
- Mezőgazdaság

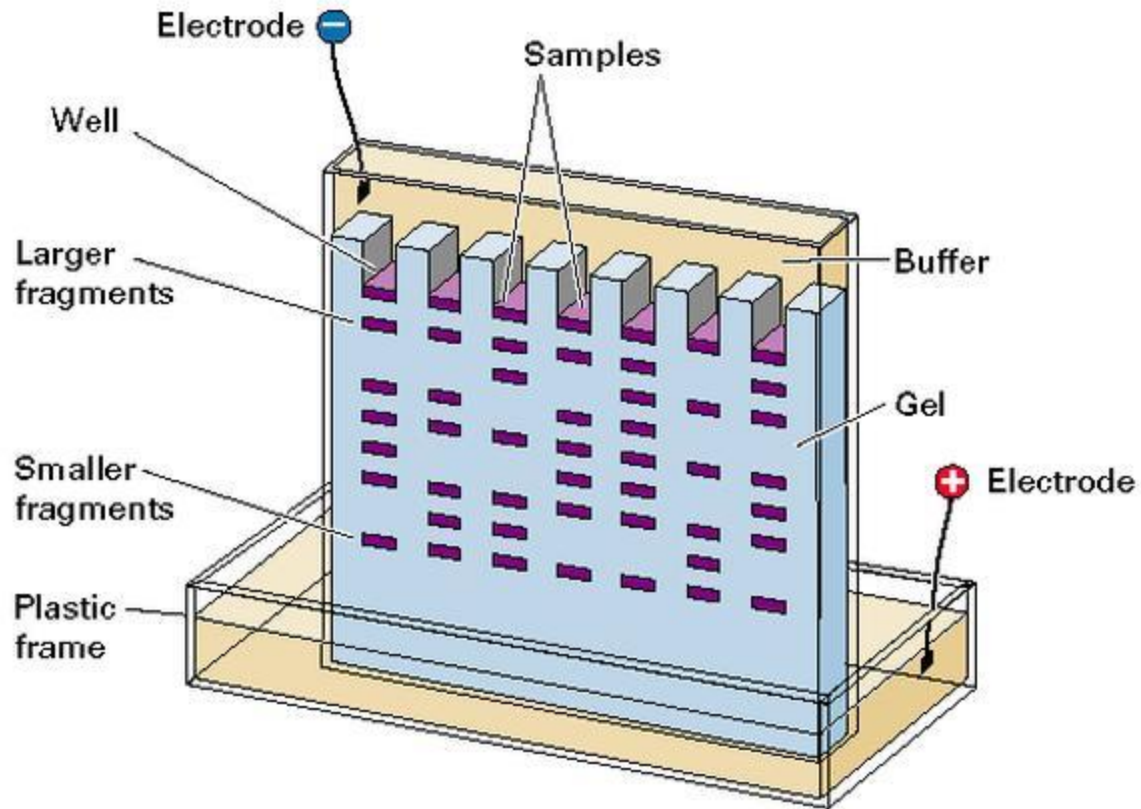
A molekuláris klónozás elvi vázlatja



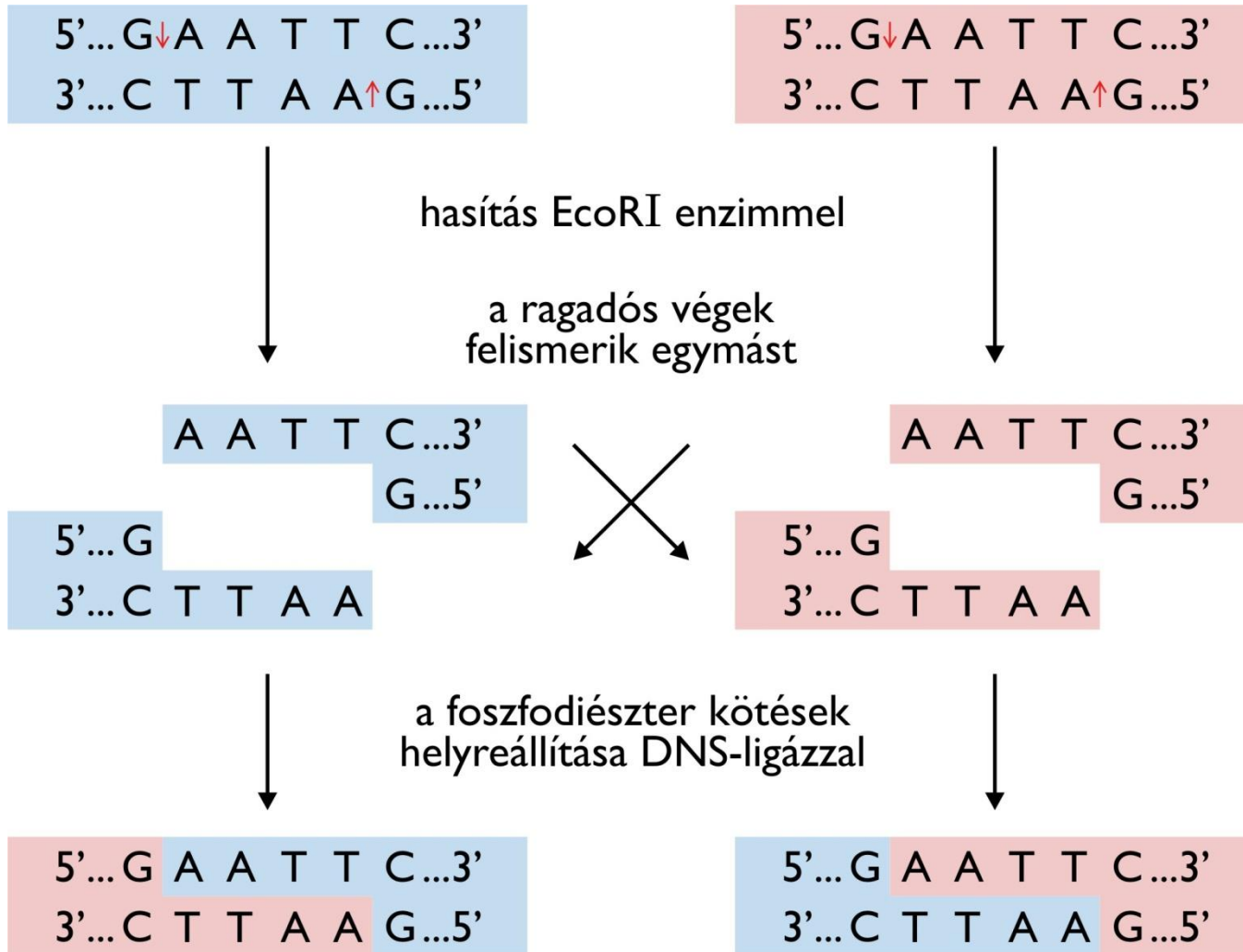
Horizontális gélelektroforézis



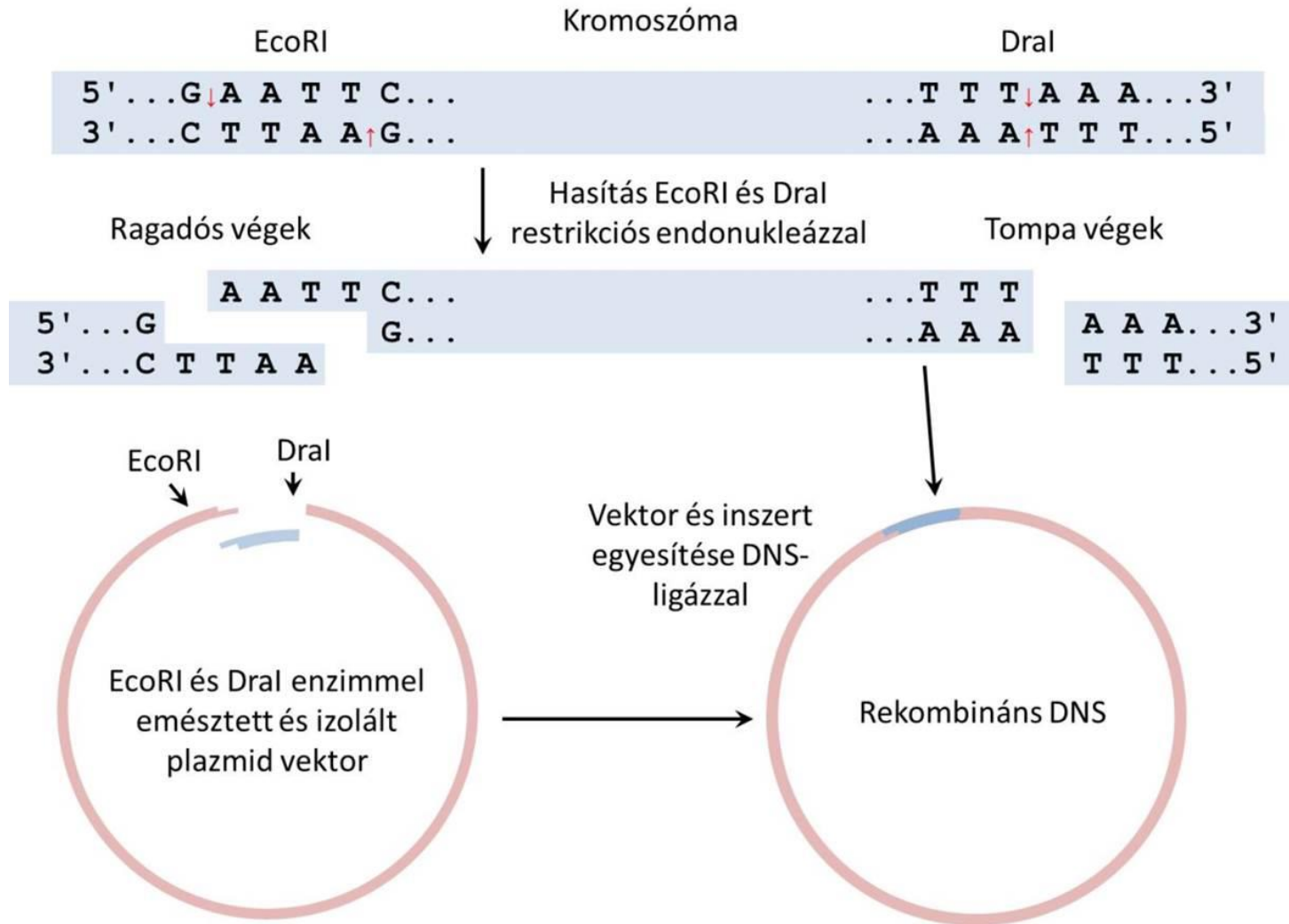
Vertikális gélelektroforézis



A tapadós végek összekapcsolása

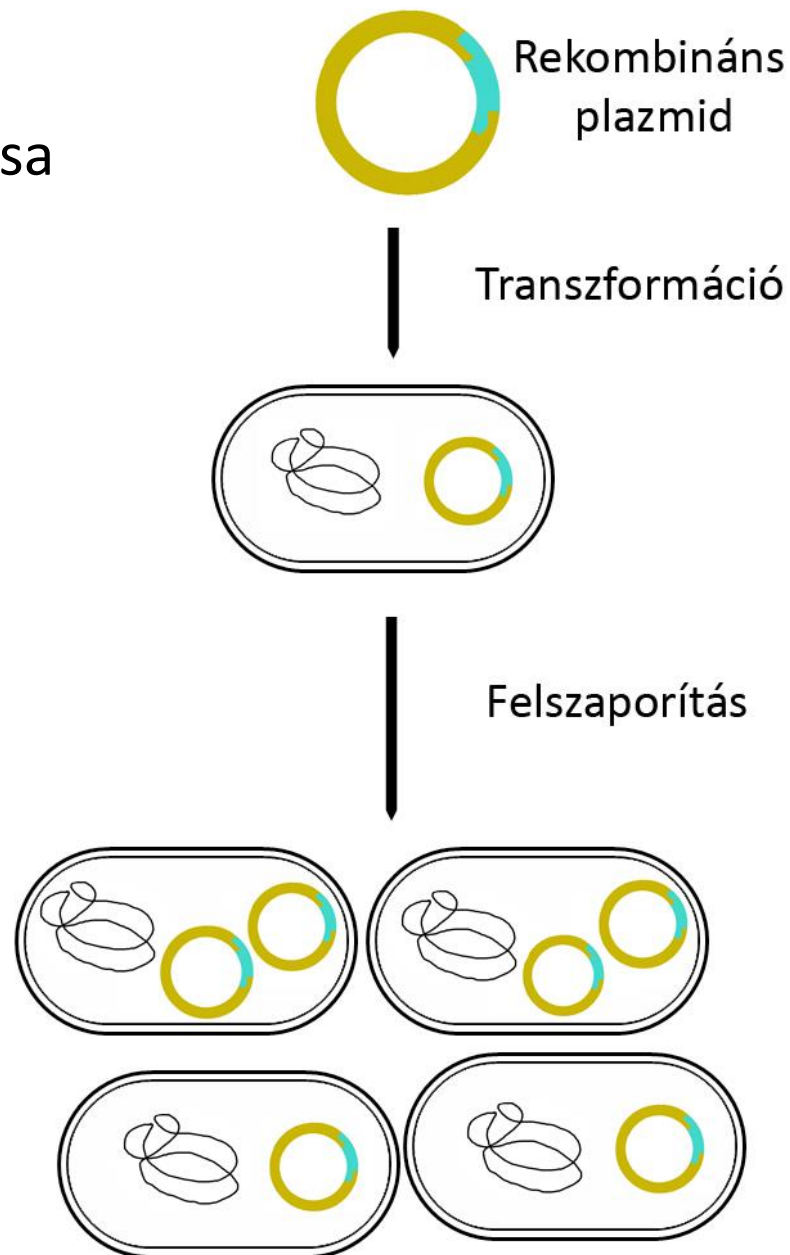
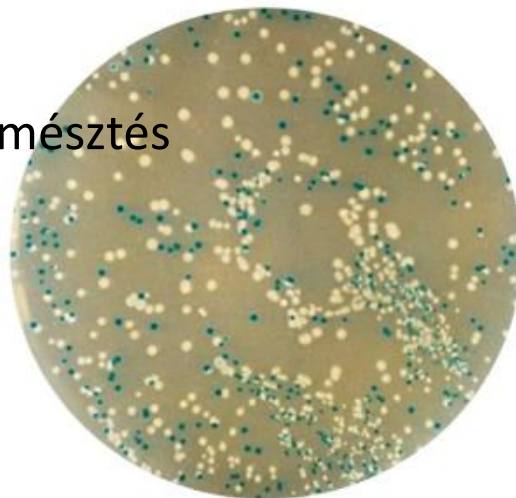


Írányított klónozás

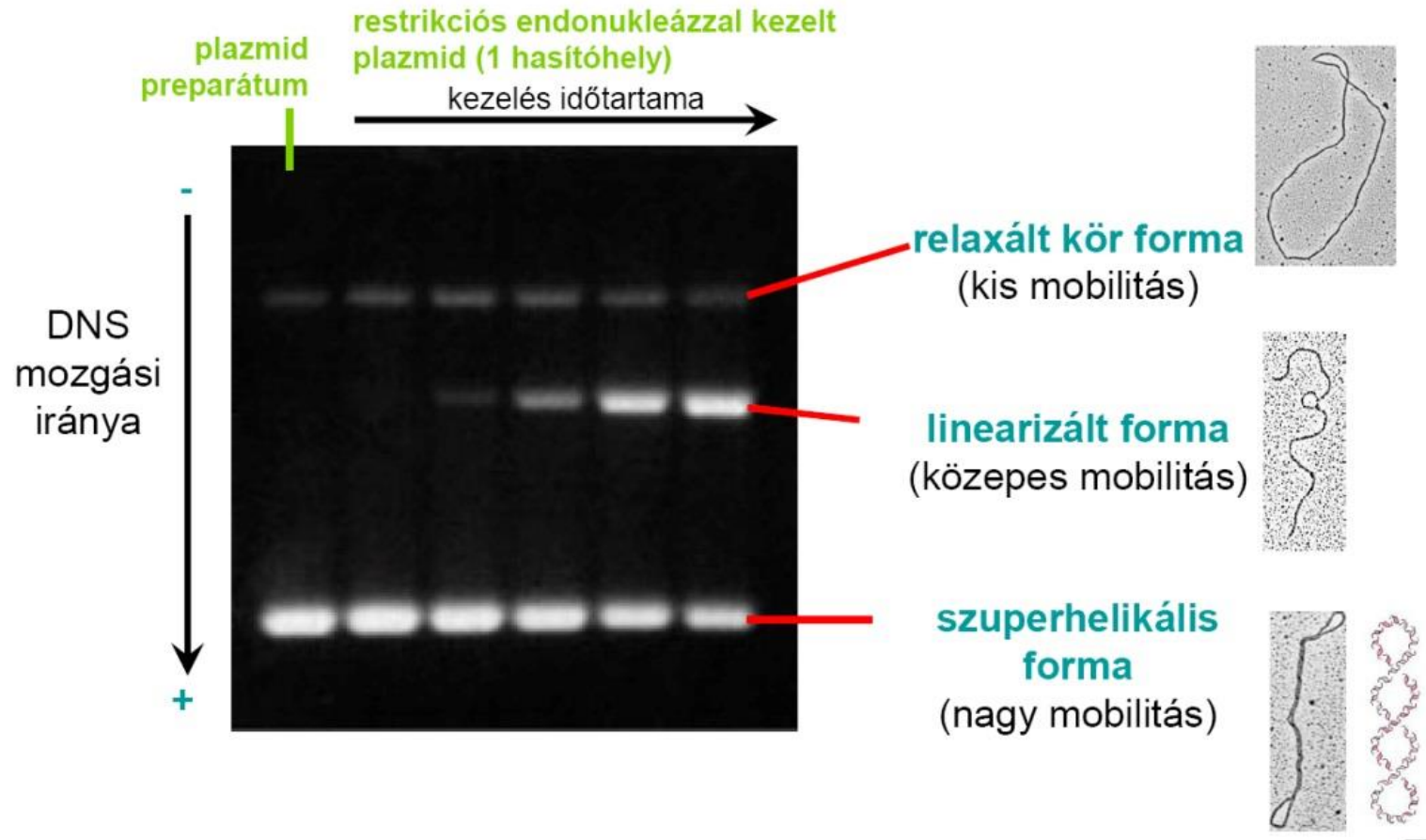


Transzformáció

- Elektroporációval
- Kompetenssé tett sejtek hősokkolása
- Szelekció a plazmidra általában antibiotikummal
- Szelekció az inszertre
 - Inszerciós inaktiváció: antibiotikum rezisztencia elvesztése
 - „kék-fehér szelekció”
 - PCR
 - Restriktív elmésztés
 - Szekvenálás

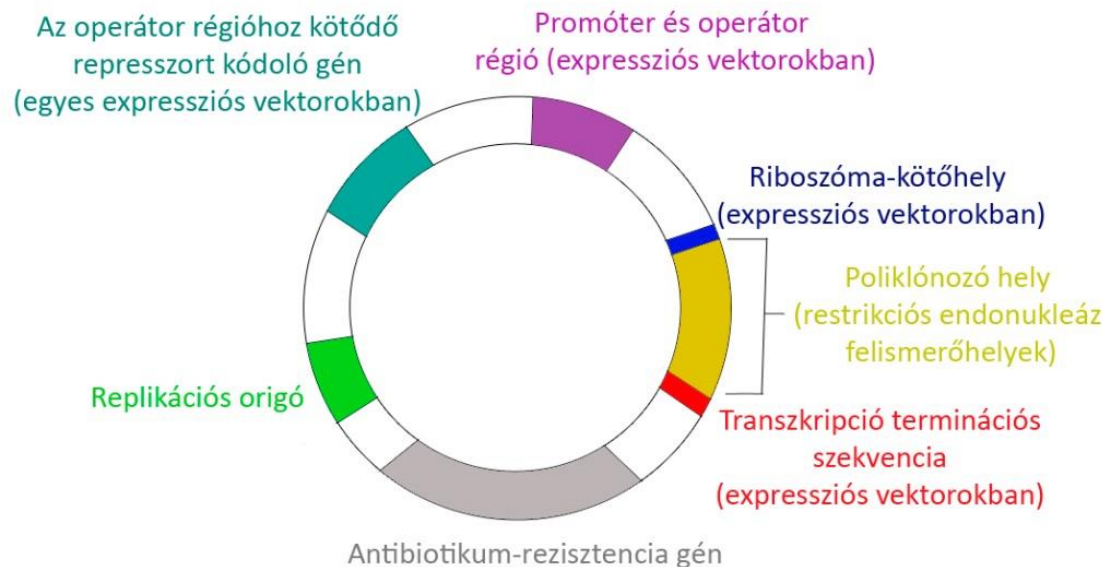


Plazmid vizsgálata

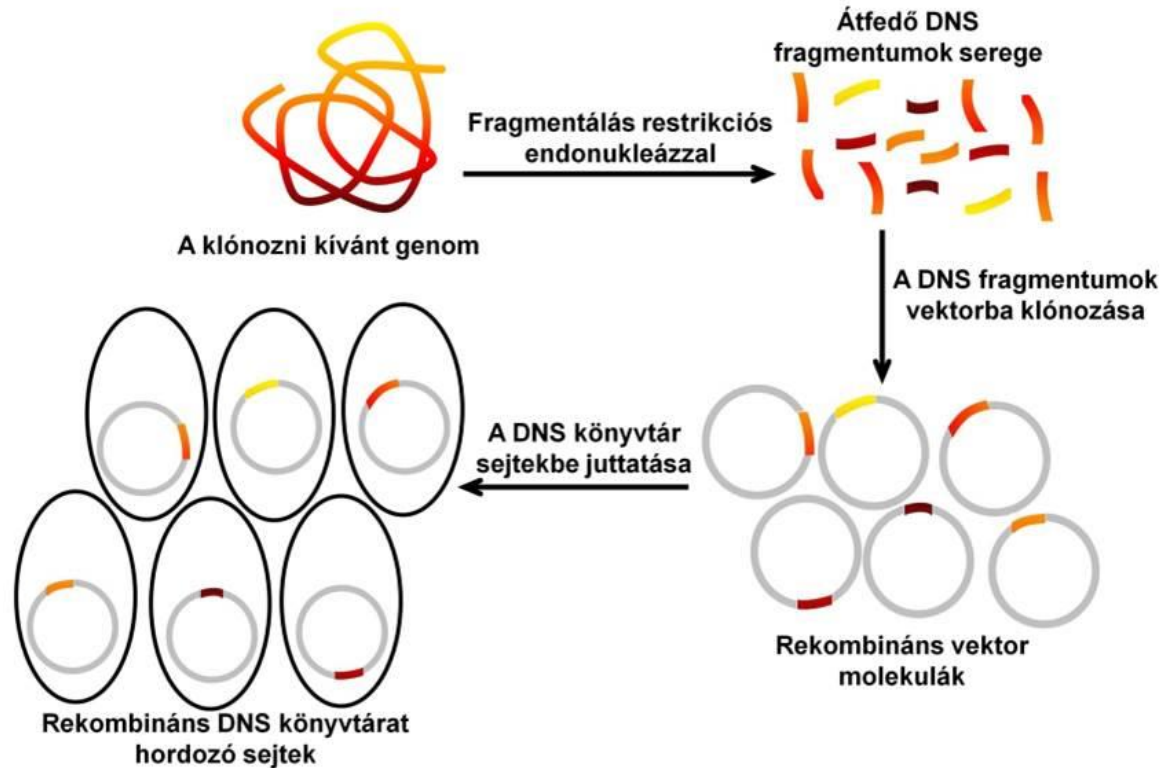


Plazmid vektorok

- Általában *E. coli*-ban fenntartható
- Nem esszenciális gének elhagyása – méret csökkentés
- Nagy kópiaszám (pl. pUC vektorcsalád 500-700)
- **MCS** (*multiple cloning site*) vagy polilinker: akár 20-nál is több restriktációs hely
- Szelekciós markerek



Genomiális DNS könyvtárak



A teljes genom feldarabolása után a kapott darabok vektorokban tárolhatóak.

Bakteriális mesterséges kromoszóma (BAC): 300 kb, F-plazmid alapú

Élesztő mesterséges kromoszóma (YAC): több Mb, rekombinálódhat

Lambda-fág vektorok: 15 kb, stabilan fenntartható

Kozmid vektorok: 45 kb, bejuttatás fágfertőzéssel, plazmidként tisztítható

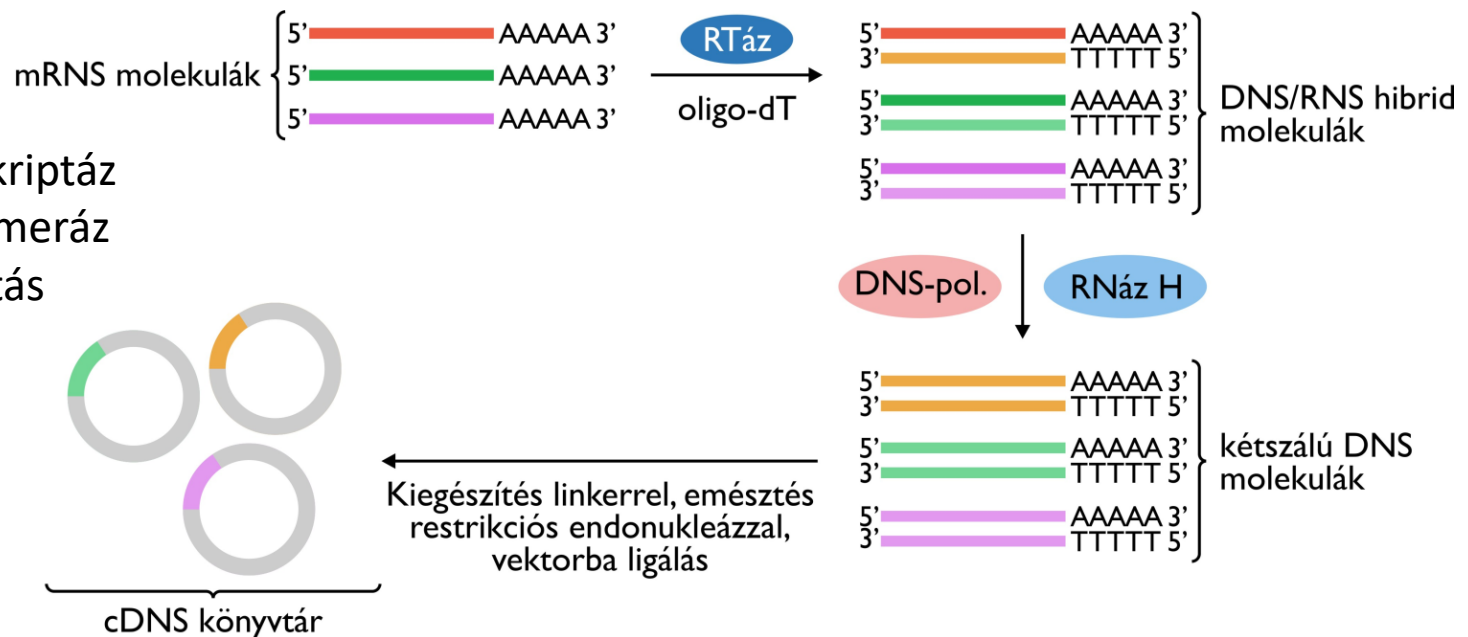
cDNS (*complementary* DNS) könyvtárak

- cDNS: intronmentes kódoló szekvenciák, csak az aktuálisan transzlálódó gének
- egy adott sejttípusban egy adott pillanatban kifejeződő fehérjéket kódoló érett mRNS-ek szekvenciái
- DNS formájában
- a tárolt információ szűrhető

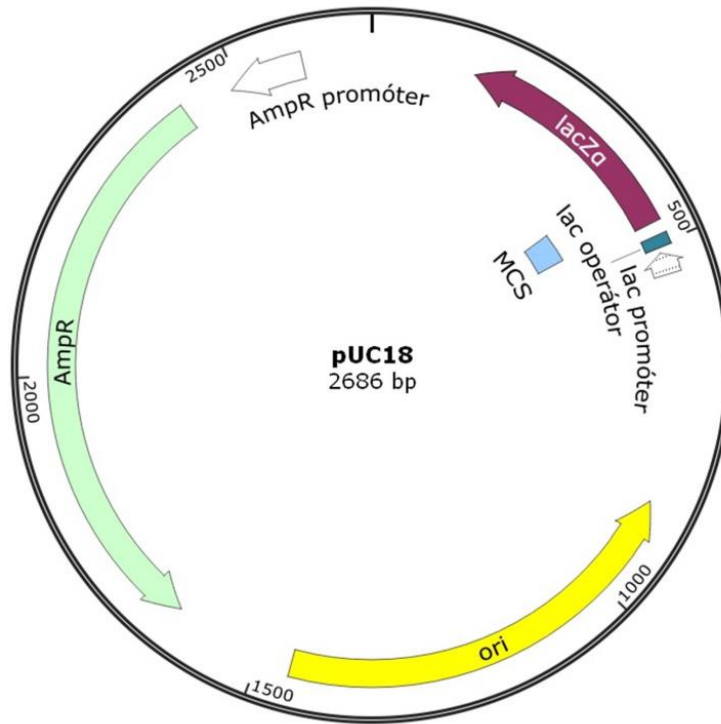
Rtáz: reverz transzkriptáz

DNS-pol.: DNS polimeráz

Rnáz H: RNS lebontás



Klónozó vektorok



Klónozó vektor (pUC18)

HindIII PstI XbaI SmaI SacI
AAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCCGGGTACCGAGCTCGAATTC
SphI SalI BamHI KpnI EcoRI

pUC18 poliklónozó hely (MCS)

- MCS: multi klónozó hely
- ori: replikációs origó a független replikációhoz
- *lac* promóter: indukálható promóter
- ampicilin rezisztencia

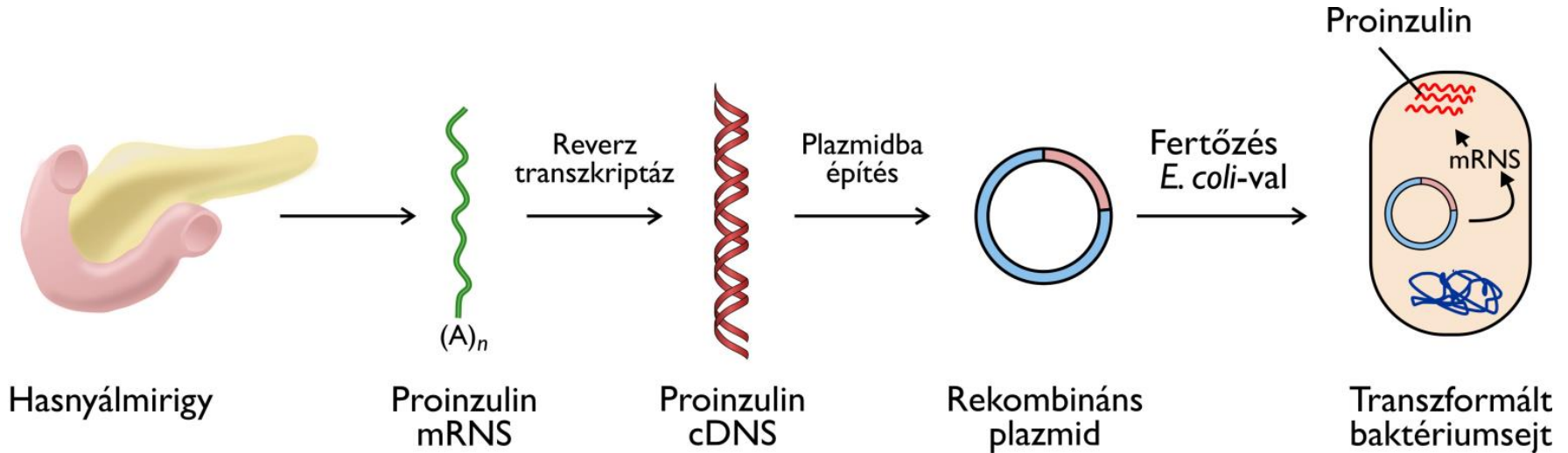
Expressziós vektorok

Az inszertből a transzformált sejtben fehérje íródik át. Fehérje termeltetésre, szerkezet, funkció, interakció vizsgálat.

- Különböző promóterek a klónozó hely előtt
 - Erős vagy gyenge promóter, lehet szövetspecifikus
 - Indukálható vektor



Izulin termeltetése baktérium sejtben



A baktérium sejtben csak az intronmentes cDNS szekvenciáról képződhet megfelelő transzkriptum.

Gének terápiás célú, mesterséges expresszáltatása

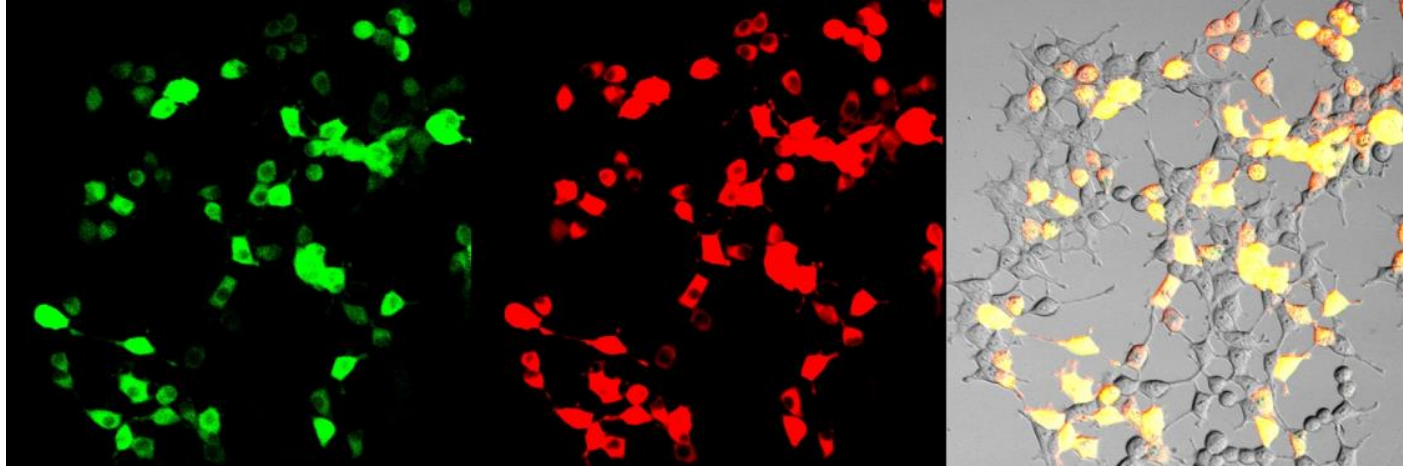
Tipikus rekombináns gyógyszerek

- protein-hormonok
- vakcina-antigének
- antitestek
- citokinek
- növekedési faktorok
- véralvadási faktorok



Rekombináns inzulint termelő bioreaktor

Fúziós fehérjék



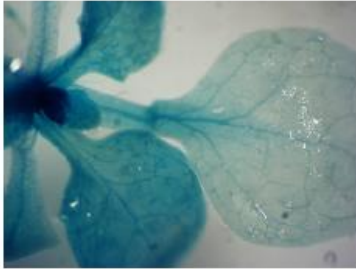
Két fehérje sejtben belüli kolokalizációja



GFP az
*Aequoria
victoria*-ból

- Egy gén expressziójának (csak promóter + riporter gén), illetve a fehérje citoplazmán belüli lokalizációjának követésére (promóter + riporter gén + ORF). Ez transzlációs egységet alkot.
- Riporter gén: **GFP** (*Green Fluorescence Protein*), egy zöld színben fluoreszkáló fehérje, vagy változatai(pl. **YFP**: sárga, **CFP**: ciánkék színű), más molekulák (pl. **DsRed**: vörös) vagy **β -galaktozidáz**.

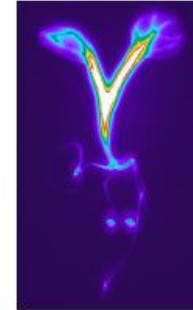
Transzgénikus élőlények fúziós fehérjékkel



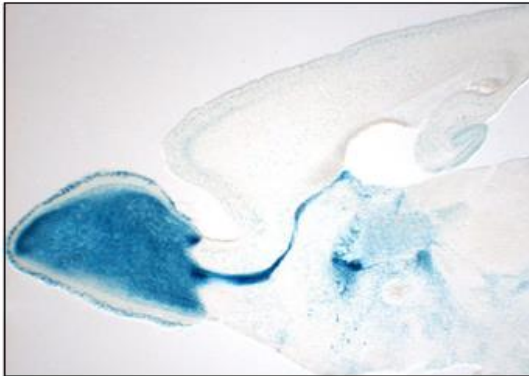
GUS riporter gén működése
Arabidopsis növényben



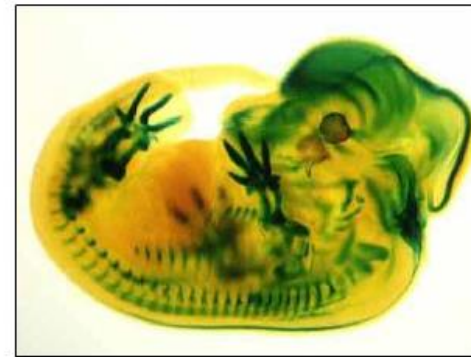
GFP riporter gén és
Drosophila



liciferáz és *Arabidopsis*



Mash1 expresszió felnőtt egér agyában.
 β -galaktozidáz (*lacZ*) riporter géne,
Mash1::lacZ transzgenikus egér

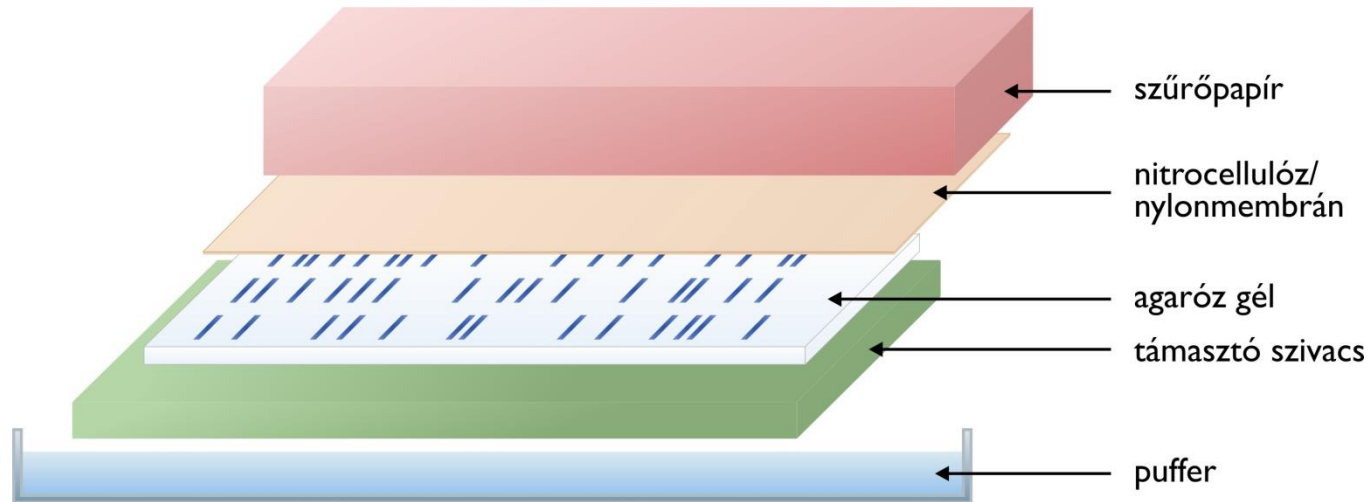


β -galaktozidáz aktivitás jelzi a
noggin géne működését

Hibridizációs technikák

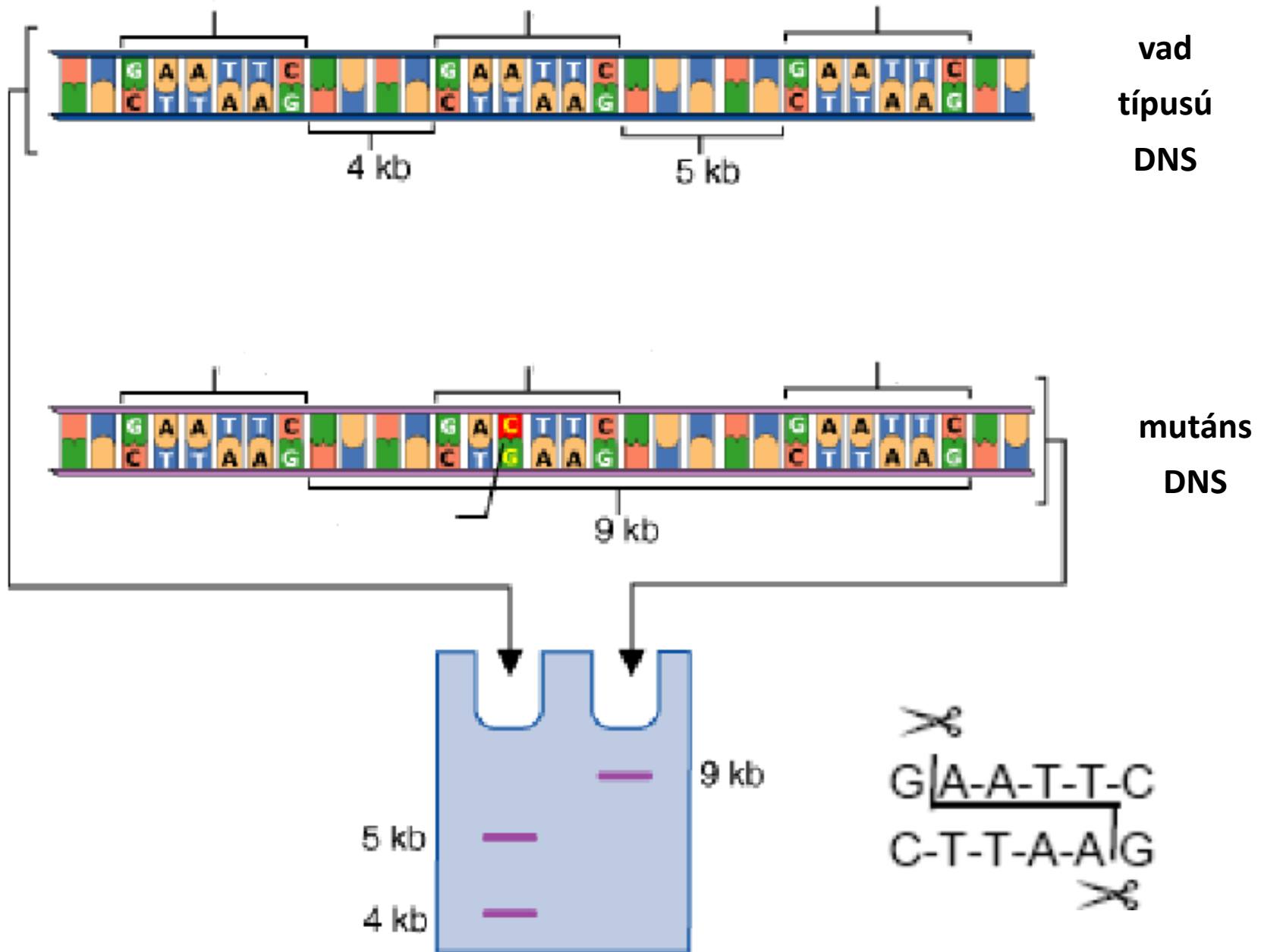
- biológiai mintából vagy génekönyvtárból lehet kimutatni egy adott DNS vagy RNS szakaszt
- nincs feltétlenül szükség szekvenálásra (mutációt azonosítása)
- a DNS két szálának komplementaritásán és reverzibilis denaturációján-renaturációján alapszik a minta (templát) és a próba között
- a minta jelölt DNS vagy RNS
- automatizált szilárdfázisú oligonukleotid szintézissel (szintetizátorban) állítanak elő
- fehérjék azonosítása ellenanyaggal

Southern-blot technika

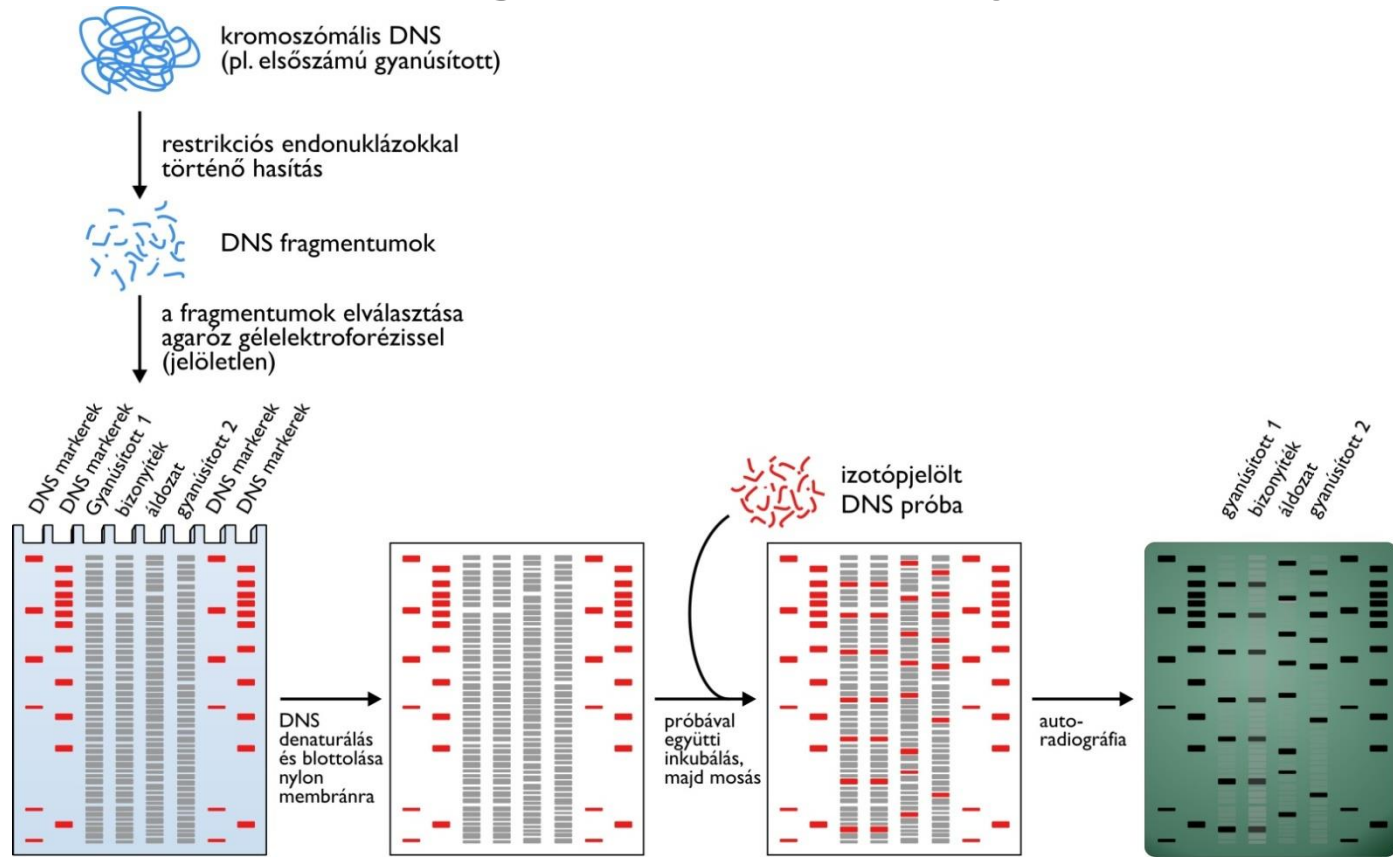


- speciális **DNS szakaszok** kimutatására szolgál egy komplex DNS mintában
- a gén mérete vagy szerkezetbeli megváltozása is kimutatható
- az emésztett DNS mintát agaróz gélelektroforézissel szétválasztják
- majd egy nitrocellulóz- vagy nylonmembránra „blottolják” (a gél törékeny)
- A lenyomaton *in situ* denaturálják a DNS-t, majd hibridizálják egy radioaktív vagy fluoreszcens módon jelölt próbával

RFLP – restrikciós fragmenthossz polimorfizmus

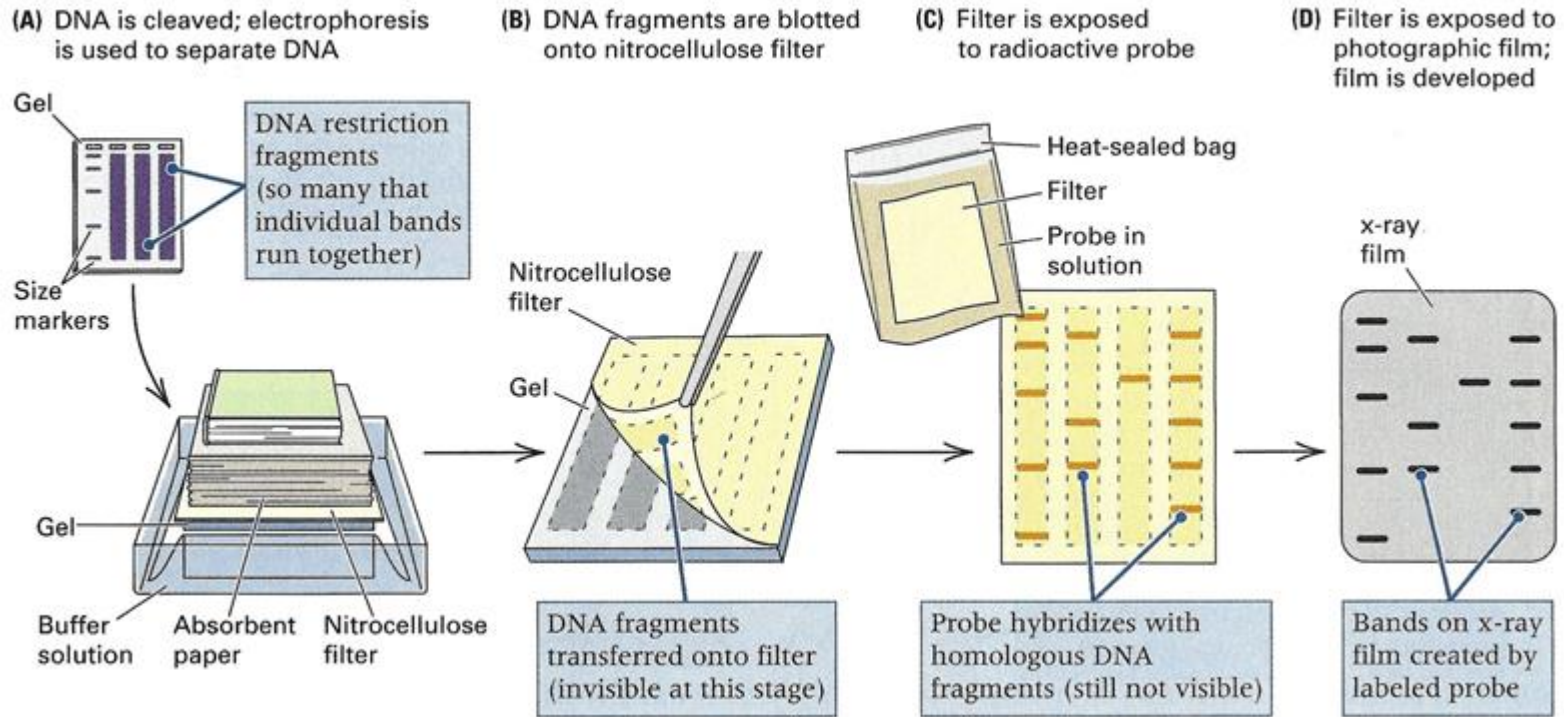


RFLP (restriktációs fragmentum hossz polimorfizmus)



- homológ DNS molekulák variációit (pl. SNP: *single nucleotide polymorphism*, kiejtve „sznip”) detektálása Southern-blot módszerrel
- teljes genomból indulnak ki, melyet restriktációs endonukleázokkal kezelnek
- a kapott mintázat egyénenként változik

Northern-blot

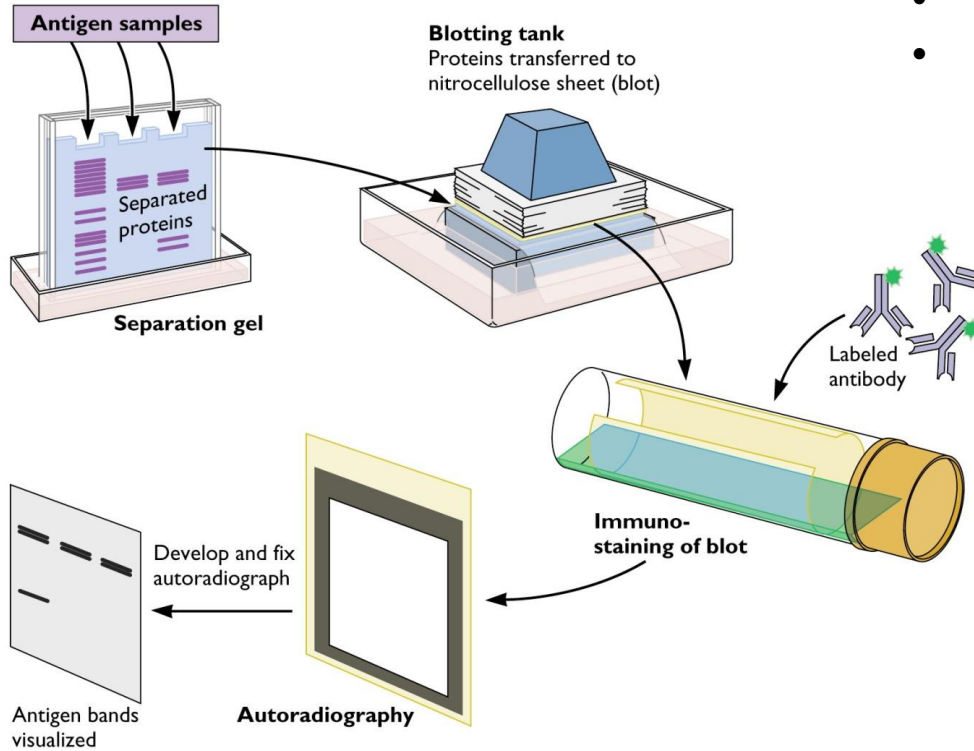


- RNS molekulákat analizálunk
- jóval nagyobb elővigyázatosságot igényel, mivel az RNS rendkívül bomlékony
- egy adott sejt pillanatnyi génexpressziós állapota és annak változása

Western blot

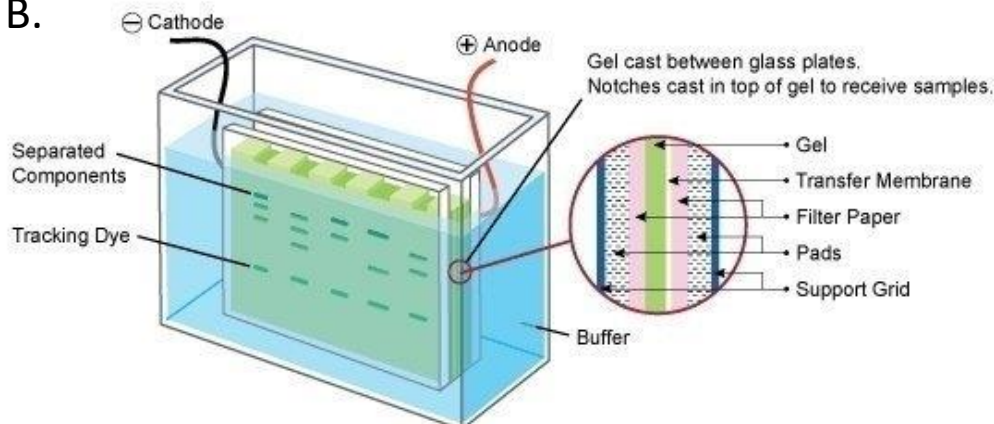
- SDS-PAGE szeparáló gélen szétválasztják – denaturáló gél
- nitrocellulóz membránra blottolás
- jelölés antitesttel – nyúl, kecske, egér által specifikusan termeltetve
 - A: hagyományos eljárás
 - B: Blottolás elektromos árammal
 - C: jelölés színreakcióvan

A.



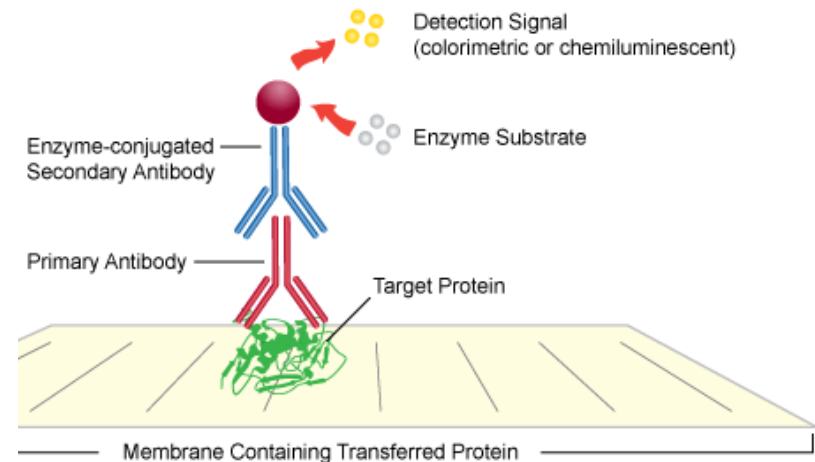
Western Blot Setup

B.



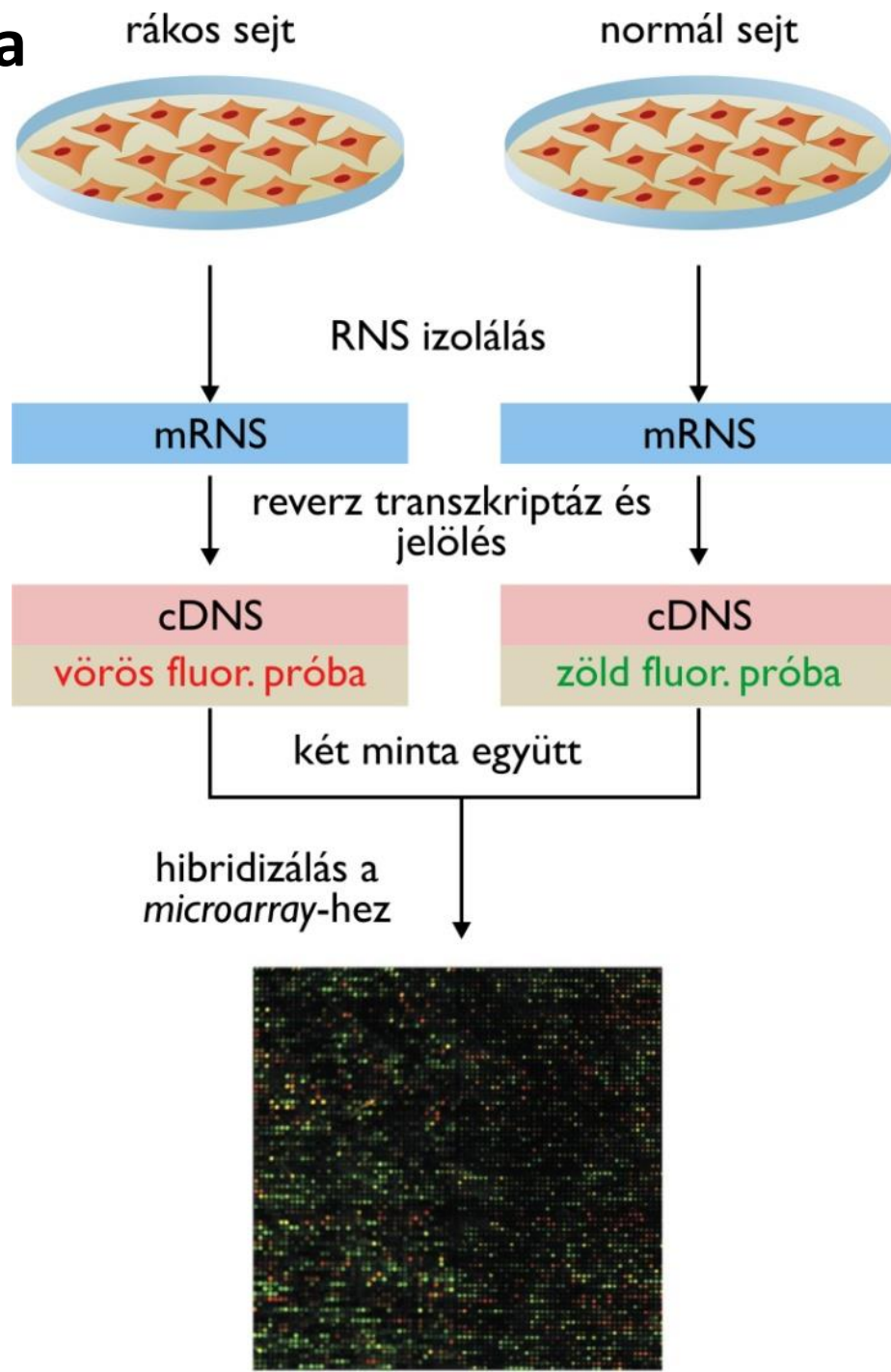
Detection in Western Blots

C.



DNS-chip (*microarray*) technika

- hibridizációs technikák legújabb változata
- szilárd hordozó (1-2 cm², pl. szilikon, üveg)
- **több 10000**, 20-5000 nukleotid hosszúságú **DNS próba**
- **a minta fluoreszcensmódon jelölt**
- génexpressziós változások, SNP-k, genetikai különbségek
- biológiai minták összehasonlítása

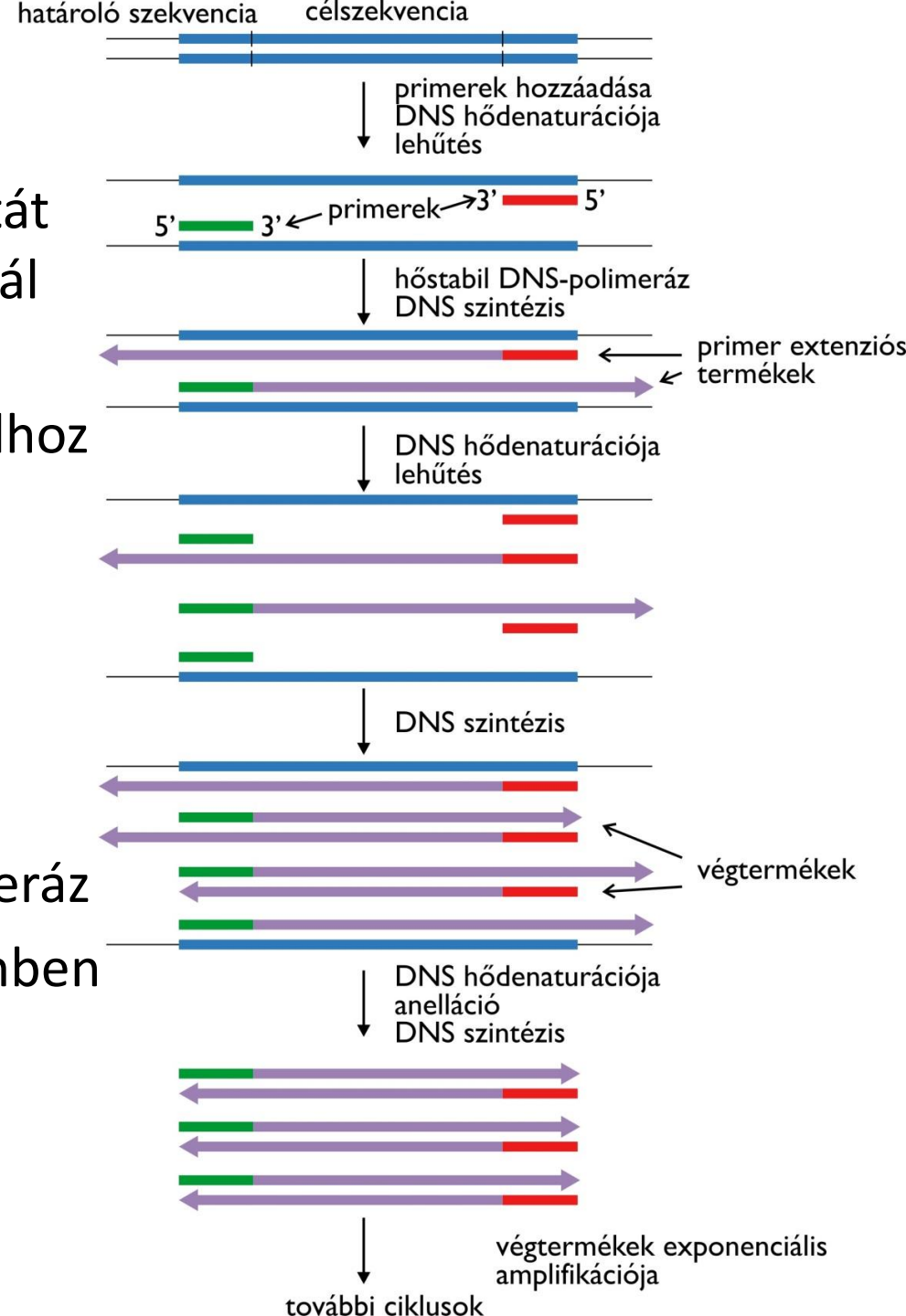


Polimeráz láncreakció (PCR)

- Kary Mullis 1983-ban fedezte fel, Nobel díjat kapott érte (1993-ban)
- egyetlen vagy kisszámú DNS-molekula meghatározott szakasza (célszekvencia) amplifikálható
- specifikusan kötődök primerekkel indul a reakció
- *in vitro* enzimatis reakció
- 100 bázispár és 10 kilobázispár közötti tartományba esik
- PCR termék szigorúan vett értelemben nem klón
- PCR oligók 5'-végére restrikciós hasítóhelyeket lehet beépíthetni
- A DNS-szekvenálása és mutagenézise is történhet PCR-rel
- amplifikáció fluoreszcens jelekkel történő valós idejű követésével kvantitatív PCR-t lehet végezni: génexpresszió követése
- nyomnyi mennyiségű DNS is amplifikálható
- archeológia, vírusok vagy mikrobák kimutatásá
- „DNS ujjlenyomat” - repetitív elemek közti egyéni eltérések

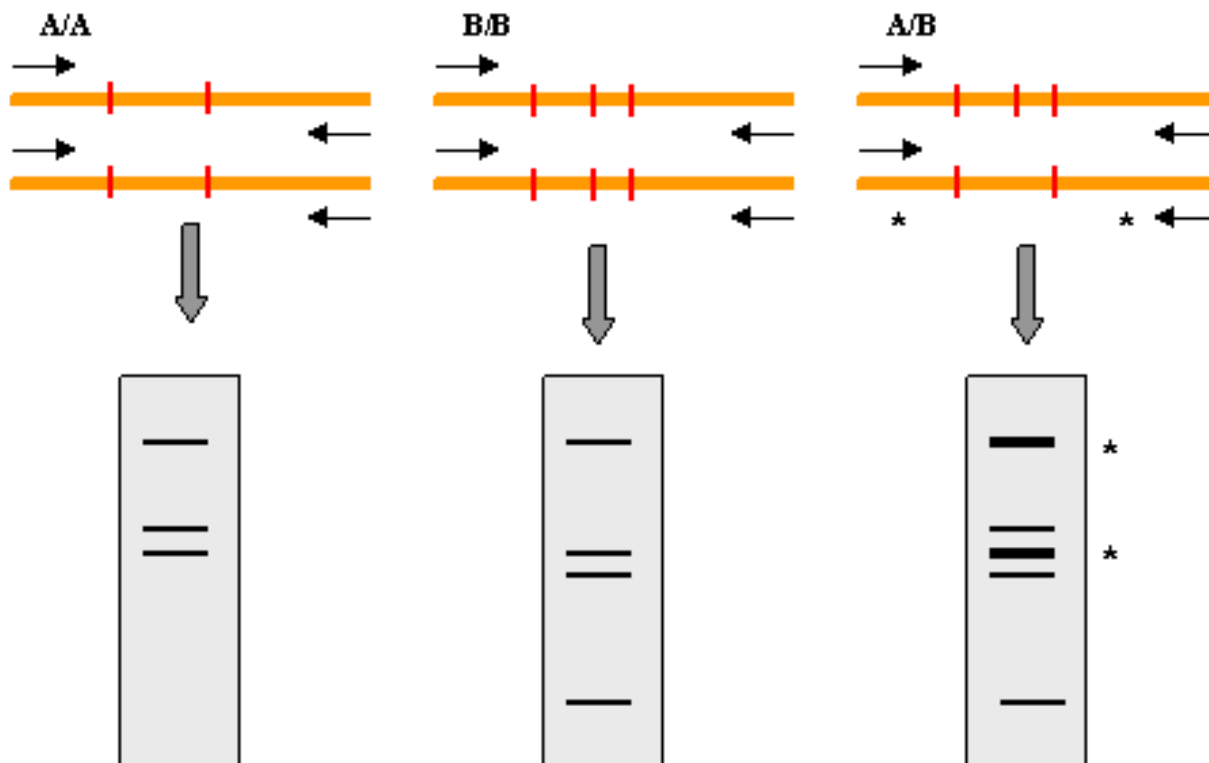
A PCR ciklus

- a templát DNS-t tartalmazó mintát 90°C fölé melegítve a két DNS szál elválk (denaturációs fázis)
- 50°C-on a primerek mindkét szálhoz hibridizálnak (anellálási fázis)
- 72°C-on szintetizálódik az új, komplementer DNS szál (polimerizációs vagy elongációs fázis)
- hőstabil polimeráz pl. Taq-polimeráz
- DNS-termék exponenciális ütemben szaporodik
- végtermék neve az amplikon

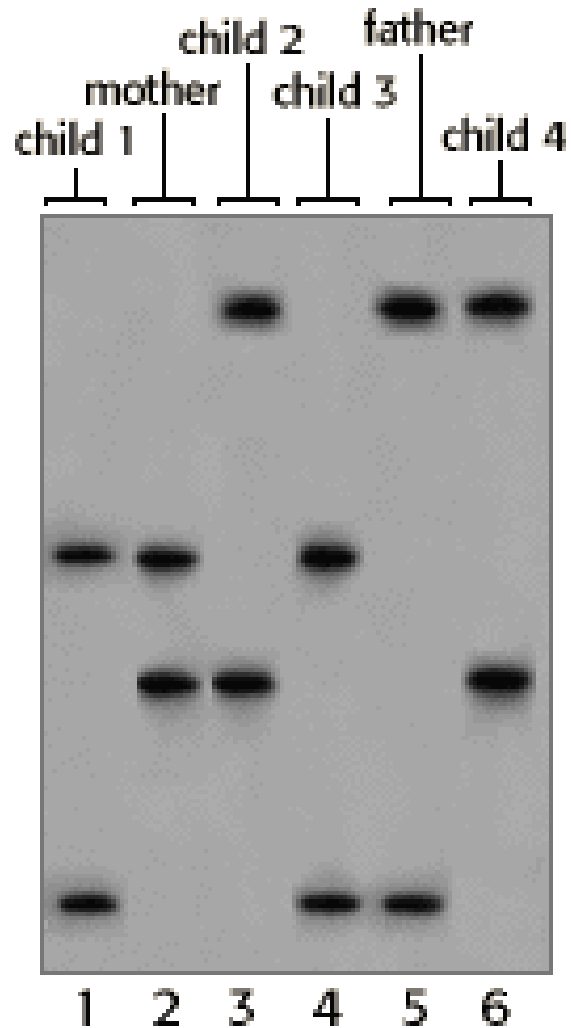


PCR-RFLP

- Vizsgálandó génszakasz PCR amplifikációja
- PCR termék hasítása allél-specifikus restrikciós endonukleázokkal
- Gélelektroforézis a hasítási mintázat (genotípus) azonosítására
- Akkor alkalmazható, ha a mutáció megváltoztatja egy restrikciós enzim hasítóhelyét



Apasági teszt



Minden gyermek az apától van?

DNS-szekvenálás

- **DNS-szekvenálás** az a folyamat, melynek során meghatározzák a DNS molekula nukleotidsorrendjét
- **Sanger-féle láncterminációs (enzimatis) módszer:** **Frederick Sanger 1977-re** dolgozta ki, 1980-ban Nóbeldíjat kapott érte.
- **Automata fluoreszcens szekvenálás,** Leroy Hood nevéhez fűződik, felgyorsította a Sanger-féle szekvenáló reakciók kivitelezését.

Maxam-Gilbert féle kémiai hasítás módszere

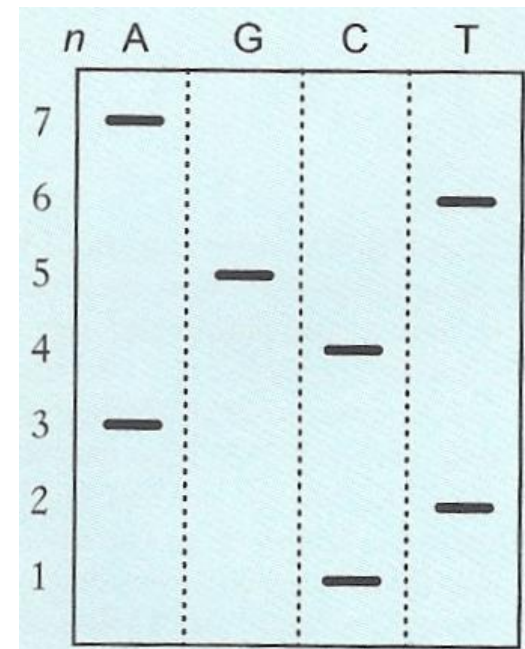


- Eredetifoszfátcsoportok eltávolítása alkalikus foszfatáz kezeléssel
- 5'OH végre nukleotid kináz enzimmal vitték fel az ATP radiokatív terminális foszfát csoportját

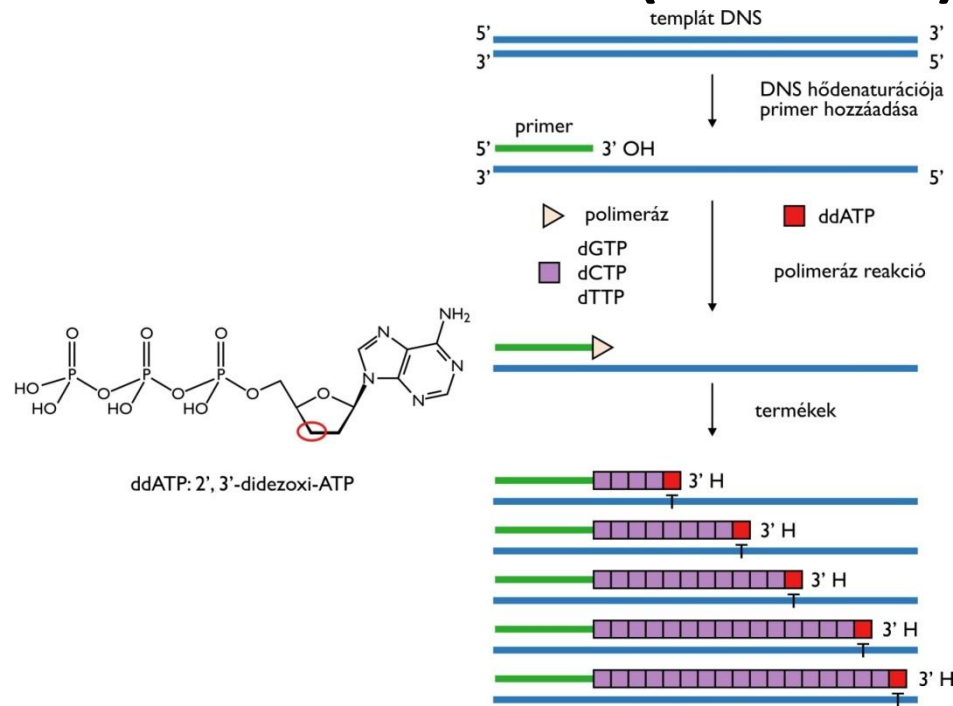
- A polinukleotid elegyet negyfelé osztják és 4 külön kémiai közegben specifikusan hasítják a 4 bázis mellett (az adott bázist módosítják pl. metilálással és kihalad a molekulából)
- Ha a bemutatott oktánukleotiddal elvégezzük a négyféle hasítást, a következő fragmenteket:

- Hasítás A mellett: $^{32}\text{P}\text{-GCT}$
 $^{32}\text{P}\text{-GCTACGT}$
- Hasítás G mellett: $^{32}\text{P}\text{-GCTAC}$
- Hasítás C mellett: $^{32}\text{P}\text{-G}$
 $^{32}\text{P}\text{-GCTA}$
- Hasítás T mellett: $^{32}\text{P}\text{-GC}$
 $^{32}\text{P}\text{-GCTACG}$

- detektálás: PAGE (poliakrilamid gél elektroforézis)



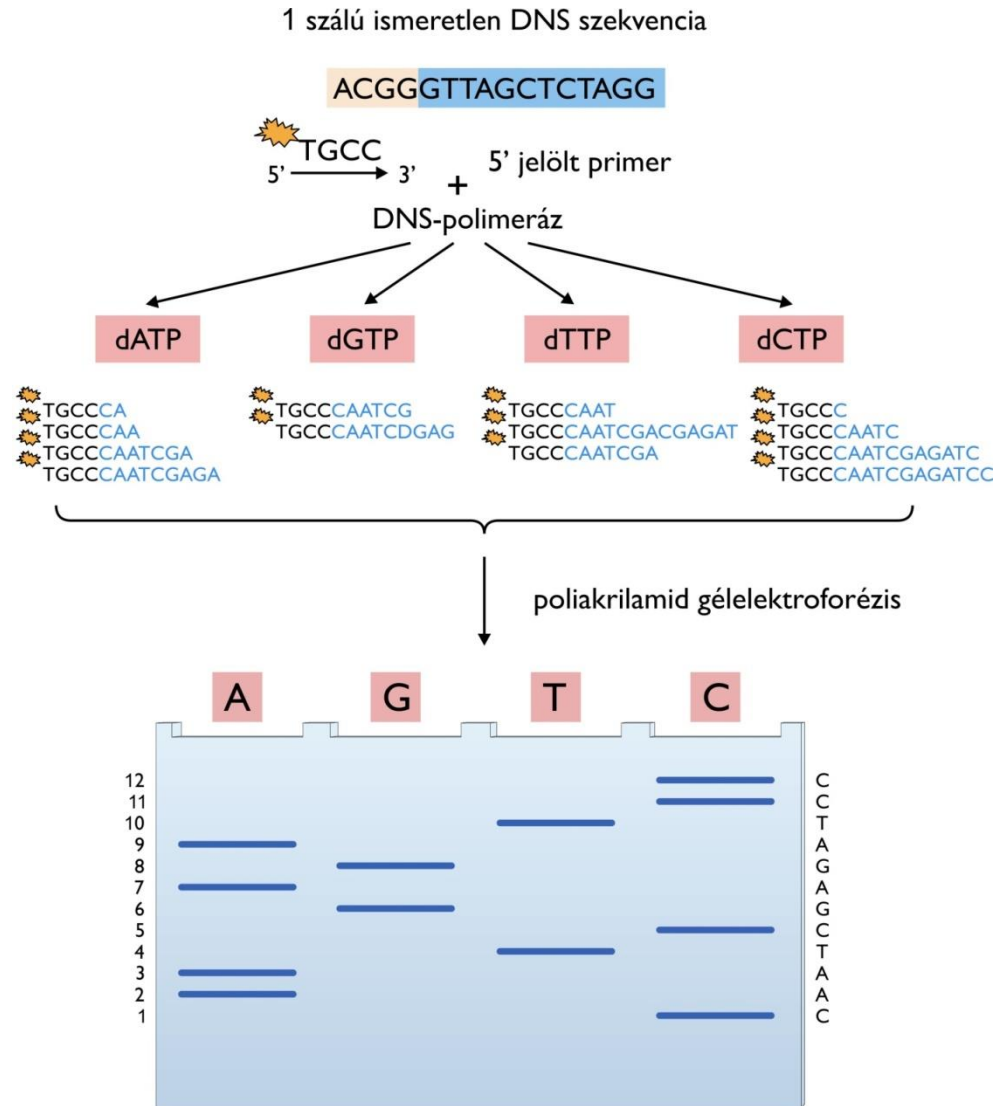
A Sanger-féle lánctermínációs (didezoxi-) szekvenálás



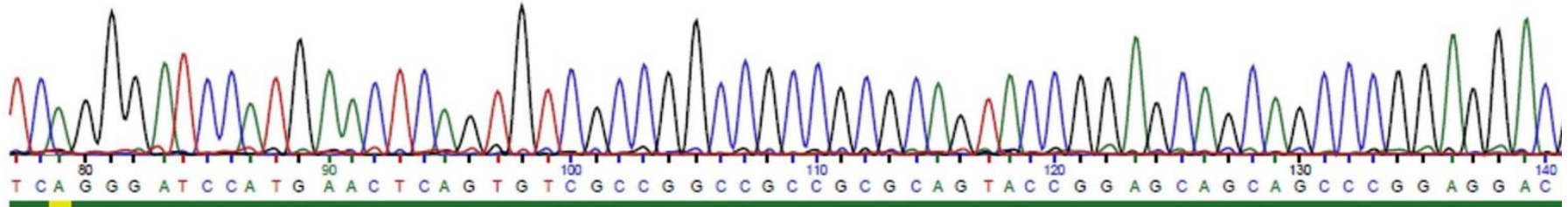
- DNS-t magas hőmérsékleten denaturálják
- templát szálhoz szekvenáló oligonukleotidot párosítanak
- négy párhuzamos szekvenáló reakciót állítanak össze, melyhez különböző didezoxinukleotid-trifoszfát (ddNTP) molekulát kevernek – leállítja a reakciót
- reakció során különböző hosszúságú új DNS-szakaszok keletkeznek végükön ddGTP, ddCTP, ddTTP vagy ddATP molekulával

Szekvenáló létra

- max. 1000 nukleotid hosszúságú láncok
- eredetileg poliakrilamid gélen
- előhívás α -³²P-dATP vagy α -³⁵S izotóppal jelölt dCTP-vel, autoradiográfiával



Automata fluoreszcens szekvenálás



- PCR készülékben zajlik a láncszintézis, ezáltal kevesebb templáttal lehet indítani a reakciót
- fluoreszcens festéket alkalmaznak
- A fluorofórt vagy a ddNTP-kre vagy a szekvenáló primerekre lehet bevinni
- egy reakcióelegy, négyféle fluoreszcens festékekkel jelölt didezoxi-nukleotidokkal
- kapilláris gélelektroforézissel választják szét
- kapilláris gélelektroforézissel választják szét
- kromatogram (másnéven szekvenogram)
- egyszerre 96 minta analizálható 900-1000 nukleotidig