

DEBRECENI EGYETEM
ORVOS- ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM
BIOLÓGIAI ÉS ÖKOLÓGIAI INTÉZET

BIOLÓGIAI GYAKORLATOK III.

Genetika, molekuláris biológia



DEBRECENI EGYETEM
ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR
BIOLÓGIAI ÉS ÖKOLÓGIAI INTÉZET

BIOLÓGIAI GYAKORLATOK III.
Genetika, molekuláris biológia

Debreceni Egyetemi Kiadó
Debrecen University Press
2016

Írta:

DR. FEHÉR ZSIGMOND
DR. SIPICZKI MÁTYÁS
DR. SZILÁGYI ISTVÁN
DR. SCHLAMMADINGER JÓZSEF
DR. SZESZÁK FERENC

Felelős szerkesztő:

DR. SIPICZKI MÁTYÁS
egyetemi tanár

Szerkesztette:

DR. FEHÉR ZSIGMOND

© Debreceni Egyetemi Kiadó Debrecen University Press,
beleértve az egyetemi hálózaton belüli elektronikus terjesztés jogát is

ISBN 978-963-318-195-9

Kiadta a Debreceni Egyetemi Kiadó Debrecen University Press
Felelős kiadó: Karácsony Gyöngyi
Készült a DE sokszorosítóüzemében, 2016-ban

A NEMI KROMATIN VIZSGÁLATA

Ismeretes, hogy a nők egyik X kromoszómája inaktiválódik¹, és mint ilyen, sötéten festődő heterokromatikus szemcséként tapad a magboríték belső felszínéhez. Ezt többféle néven is említik: Barr-test (az egyik első leíró neve alapján), női nemi kromatin (vagy sexchromatin), X kromatin. Kimutatásával tájékozódhatunk az X kromoszómák száma felől: mindig egy Barr-testtel kevesebbet találunk, mint ahány X kromoszómával a vizsgált személy rendelkezik. XX kariotípusú nőnél egy tüntethető fel, XY férfnál nincs. Klinefelter szindróma esetén (47,XXY) az alapvetően férfi fenotípus ellenére is láthatunk X kromatint, míg Turner szindrómás nőkben (45,X) nem. Triplo X-es nők sejtmagjaiban csakúgy, mint 48,XXX kariotípusú Klinefelter szindrómás férfiak esetén két Barr-test mutatható ki, stb. (1. ábra).



Egészséges nőkben (kariotípus 46,XX) és Klinefelter-szindrómás férfiakban (47,XXY vagy ritkán 48,XXYY) egy X-kromatin látható a sejtmagban.



Egészséges férfiakban (46,XY) és Turner-szindrómás nőkben (45,X) nem figyelhető meg Barr-test.



Triplo-X (47,XXX) nőkben (akik az esetek nagy részében normál fenotípusúak) és 48,XXX kariotípusú férfiakban két X-kromatin figyelhető meg.

1. ábra

X kromoszómák és Barr-testek számának összefüggése

A női nemi kromatin mellett ún. férfi nemi kromatint (Y kromatin, F body) is leírtak: az Y kromoszóma hosszú karjának élénk quinacrin-

¹ L. részletesen a Lyon-hipotézist az elméleti anyagban. Itt annyit tűnik csak célszerűnek megjegyezni, hogy jóllehet ma már ismert a gén-szinten nem 100%-os inaktiválódás ténye, ez a morfológiai képet nem befolyásolja.

fluoreszcenciája² interfázisos magban is látható XY nemi kromoszómális képlet esetén. (Tehát pl. egy 47,XXY kariótípusú Klinefelter szindrómás beteg sejtmagjaiban mind az X-, mind az Y kromatin kimutatható.) Ennek vizsgálata egyrészt dárگا fluoreszcens mikroszkópot igényel, így széles körben nem terjedt el, másrészt bizonyos fokú megbízhatatlansági tényezőt jelent, hogy az Y kromoszóma hosszú karjának tetemes része (amit génikusan üresnek tartanak) elveszhet bármiféle fenotípusos következmény nélkül, s ebben az esetben az Y kromatin sem mutatható ki.

Az X kromatin vizsgálatához célszerűen három helyről nyerhetünk anyagot: vérből, hajhagymából és a szájnyalkahártyáról. Mivel az elsőben a polymorphonuclearis granulocyták magján látható – az inaktívált X kromoszómát tartalmazó – ún. dobverő (drumstick) felismerhetősége, megítélhetősége nehezekebb és kevésbé megbízható, a második technikai feldolgozása kissé bonyolultabb, ezért gyakorlatilag majdnem mindig a szájnyalkahártya-kaparék vizsgálatát végzik. Elfeledkezni azonban a vérkenetben való kimutathatóságról sem szabad, ilyenek ugyanis rutinszerűen készülnek nagyon sok beteg kivizsgálása során.

Szájnyalkahártya-kaparék készítése előtt nagyon fontos, hogy a vizsgálandó személy ne fogyasszon forró ételt vagy italt. A Barr-test ugyanis csak élő sejtek magjában mutatható ki sikeresen és megbízhatóan, s a leforrás a felső sejtrétegben elhalásokhoz vezet. Fontos a megfelelő szájjüregi tisztaság (szükség szerint alapos öblögetés). Ezen kritériumok maximális betartása mellett is tudnunk kell, hogy a buccalis nyálkahártya felszínén nagyon sok baktérium tapad, s a felső rétegben sok az elhalt vagy pusztulófélben levő sejt. Mindezekről egy előzetes kaparással szabadulunk meg. A vizsgálati anyagvételre kiszemelt területet előemeljük. (Ehhez kívülről egy-két ujjal alátámasztjuk az orcát és a szájzugot hüvelykujjal rögzítve, amennyire lehet, kifordítjuk a pofanyálkahártyát. Célszerű, ha ezt a műveletet maga a vizsgált végzi.) Tiszta (megfelelő dezinficiensből elővett), száraz fém vagy műanyag³ spatulával erőteljesen, de nem túlságosan erősen lekaparjuk a mintavételi helyet és az így eltávolított lepedéket letöröljük az eszközzel. Ezután ugyanarról a helyről, de immár határozottabban nyomva a spatulát, vesszük a vizsgálandó minta anyagát és ezt egy előkészített tárgylemez

² Az „F body” elnevezés a „fluorescent body”-ból származik.

³ Jó eszköz használata elengedhetetlen a sikerhez. Ha a spatula kaparásra használt éle túlságosan lekerekített, alkalmatlan a mintavételre. Ha túlságosan éles a szél, felsértheti a szájnyalkahártyát. Műanyag eszköz alkalmazása – egyszerhasználatos mivolta és olcsósága okán is – javasolható, azonban ez törekeny, s egy ügyetlen és túlságosan erőteljes mozdulat után letört darab a légutakba kerülve vagy lenyelve katasztrófát okozhat. (Célszerű ezért a mintavétel során nem túlságosan hátrahajtatni a vizsgált személy fejét.)

tárgylemez közepére — nem túl vékony rétegben — szélesztjük. (A használt tárgylemez felületét előzetesen lehetővékonyan [!] tojásfehérje és glicerin 1:1 arányú keverékével be kell vonni a sejtek biztos tapadása érdekében.)

Az elkészült kenetet — a kiszáradásnak még a lehetőségét is elkerülve — azonnal fixálni kell. Erre a célra 95%-os etilalkoholt használunk. 15 perc után a készítmény festhető. (Ha azonban erre nincs közvetlen lehetőség, a preparátum az alkoholban hosszabb ideig — akár egy hétig — is eltartható.)

Festés előtt a kenetet előbb víztelenítjük abszolút (100%-os) etanolban történő 3 perces kezeléssel, majd 15 másodperces levegőn szárítással. Ezt rehidrálás követi: 5 perc 70%-os alkoholban, majd 2x5 perc desztillált vízben.

Maga a festés karbolfukszin oldatban (bázikus fukszin fenolt is tartalmazó vizes oldata⁴) 5–10 percig történik. (Az időtartam hossza függ a festéköldat frissességétől és kihasználtsági fokától.)

A festést differenciálás követi: az aspecifikusan kötött fukszint 1 perces 95%-os, és 1 perces 100%-os etilalkoholban való öblítéssel távolítjuk el. (Az eljárás elején alkalmazot etanol itt újra felhasználható.)

Száradás után olajimmerziós mikroszkópos vizsgálattal történik a kiértékelés. (Célszerű a sejtek helyét először kisebb nagyítással megkeresni. A kontraszt a mikroszkópba helyezett zöld fényszűrő segítségével fokozható.)

Az X kromatin pozitivitás határát általában 20%-nál húzzák meg (néhány szerző 30%-ot követel meg), azaz ha 100 ép, élő állapotban fixált sejt, nem túlzottan rögzös (mitózisba nem lépő), hanem meglehetősen egyenmű kromatinú magját vizsgálva legalább 20-ban egyértelműen látható a Barr-test, akkor ezt már a női nemi kromatin megléte jeleként fogadják el. A megítélésben és azonosításban a magboríték belső felszínéhez tapadás alapvető kritérium. Ugyanakkor annak eldöntése, hogy ez a kapcsolat valóban fennáll, csak bizonyos elhelyezkedés mellett lehetséges, ami az esetek kisebb hányadában érvényesül. Minél több sejtet számolunk meg, annál megbízhatóbb az eredmény, 100-nál kevesebből azonban semmiféle következtetést sem szabad levonni.

⁴ Fukszin törzsoldat:

3 g bázikus fukszin

100 ml 70%-os etilalkoholban

Sötét, hűvös helyen hosszú ideig (akár egy évig is) eltartható.

Festőoldat:

10 ml fukszin törzsoldat

90 ml 5%-os fenol (karbolsav) desztillált vízben

10 ml jégacet (tömény ecetsav)

10 ml 37%-os formaldehid vizes oldatban.

Kb. egy hónapig használható, ismételten is.

Mivel normális kariotípusú férfi sejtmagjaiban is láthatók alkalmasint olyan heterokromatikus szemcsék, amelyek könnyen Barr-testnek nézhetők, a negatív eredmény felső határát általában 10%-ban jelölik meg. Azaz, ha 100 magból 10-ben találtunk is olyan képletet, amit női kromatinnak véltünk, ez még mindig összeegyeztethető az X kromatin negativitással. Bármilyen kétes esetben kromoszómavizsgálattal kell tisztázni véglegesen a kérdést.

A női nemi kromatin vizsgálata előzetes tájékoztató módszerként könnyen, gyorsan és főleg olcsón kivitelezhető, akár egy háziorvosi rendelő laboratóriumi felszereltsége mellett is. Nemi differenciálódási zavarok előzetes klinikai diagnózisának megerősítésében vagy elvetésében, alkalomadtán a kért kromoszómavizsgálat indoklásában hasznos szerepet játszhat. Régebben kiterjedten használták női sportolók „szexvizsgálatára” is, a rajtengedélyek kiadásához. (Ma már modernebb eljárásokat alkalmaznak erre a célra.)

KROMOSZÓMAPREPARÁTUM KÉSZÍTÉSE ÉS VIZSGÁLATA

Tjio és Levan 1956-ban írta le, hogy az embernek (*Homo sapiens*) 46 kromoszómája van (minden testi sejtje magjában). Lejeune és munkatársai 1959-ben közölkék, hogy a Down szindróma alapja a 21-es kromoszóma triszómiája. E sorok írásának pillanatában ez utóbbi dátum óta 35 év telt el, és a citogenetikai módszerek mindennapos rutin laboratóriumi vizsgálatává váltak. Ehhez azt kell még hozzátennünk, hogy — a jelentős humán patológiai szerep miatt — az emberi kromoszómák vizsgálata vezette és vezeti ismereteink rohamos gyarapodását ezen a kutatási területen, mind metodikailag, mind a biológiai (és orvosilag) széles körben általánosítható adatok, következtetések szintjén.

Kromoszómapreparátum készítése megfelelően felszerelt laboratóriumot, a kiértékelés alapos szakértelmet igényel. Ennek megfelelően csakis ezen feltételek birtokában levő, speciális intézetek vállalkozhatnak kariotipizálásra. Ahhoz azonban, hogy minden orvos tudja, mikor kell, milyen problémák tisztázása érdekében célszerű, és mikor teljesen felesleges ilyen vizsgálatot kérnie, szükséges a megfelelő tájékozottság és ismeretanyag csakúgy, mint a vizsgálati minta szakszerű vételéhez és beküldéséhez, valamint a kapott lelet megértéséhez és értékeléséhez.

Mint minden — ebben az esetben relatíve — új, főleg pedig rohamosan fejlődő tudományág, a humán citogenetika sem kerülhette el a bizonyos fokú túlértékelést, az olyan eredmények produkálására vonatkozó igényt, amelyek elvileg kizártak. Az egy gén (vagy génpár) által determinált, monogénes (monolokuszos) öröklődő betegségben kromoszómaelváltozást nem várhatunk, a legnagyobb felbontású sávtechnikával sem! Nyilvánvaló, hogy pl. egy bázispár kicserélődése (pontmutáció) csak a DNS-ben tárolt információt változtatja meg, a kettős hélixnek még a makromolekuláris struktúráját sem, nemhogy egy kromoszóma fény- (vagy akár csak elektron-) mikroszkóppal látható darabkájának a szerkezetét. Ugyanez vonatkozik érdemben a poligénes rendszerek zavaraira is, amelyek génjei több kromoszóma különböző lokuszaira vannak elosztva. Mindezek tehát a hagyományos citogenetikai vizsgálatok számára megközelíthetetlenek. Ugyanakkor a legújabb, a szokásos értelmezés szerint immár nem csak kifejezetten kromoszóma vizsgálati módszerek — éppen e jegyzet elkészítésének idején — nyitnak új utakat nemcsak a kromoszómák, hanem az individuális gének sejszintű analíziséhez is (l. alább).

A hagyományos citogenetikai vizsgálatok fénymikroszkóppal történnek. Azok az elváltozások, amelyek nagyságrendje már eléri a

fénymikroszkópos feloldás alsó határát, minden esetben nagy számú gént érintenek. Ha csak ezek bizonyos átrendeződése történik a kromoszóma-rendellenesség (pl. reciprok transzlokáció, inverzió) miatt, de érdemi génállomány-vesztés vagy -többszörözés nem, akkor a citogenetikailag kimutatható elváltozás is lehet tünetszegény. Minden ellenkező esetben (pl. deléció, duplikáció, izokromoszóma képződés, hogy a számbeli anomáliákat már ne is soroljuk itt fel) általában igen látványos, többszörös fejlődési rendellenességgel vagy komplex működési zavarokkal társul a citogenetikailag is kimutatható aberráció.

Kromoszómákat hagyományosan metafázisában levő sejtekből nyerhetünk vizsgálat céljára. Ennek nemcsak az az oka, hogy a sejtciklus mitotikus fázisában válnak láthatóvá ezek a sejtalkotók, hanem technikai megfontolások is. Nevezetesen: már elég régen ismert, hogy a kolhicin (a *Colchicum autumnale*, az őszi kikerics alkaloidja) a mitózis metafázisában blokkolja a sejtosztódást anélkül, hogy a sejtciklusban való előrehaladással bármelyik egyéb stádiumban interferálna. Így alkalmazásával egy *in vitro* proliferáló sejtpopuláció tagjainak meglehetősen nagy hányada halmozható fel a vizsgálatra alkalmas állapotban. (Elvileg jobbak lennének a kevésbé kondenzált profázis kromoszómák, ilyenek nagyobb számban való nyérése azonban eleddig megoldatlan probléma.)

Mint a fentiekből kitűnik, aktívan osztódó sejtek szükségesek a vizsgálathoz. *In vivo* kevés olyan szövet található, ami ennek a kritériumnak megfelelhetne, s ráadásul az ilyenekből történő mintavétel általában olyan invazív beavatkozást igényel, ami lehetőleg mellőzendő (pl. csontvelő biopsia). Amióta ismertté vált, hogy bizonyos növényi lektinek mitogén hatással rendelkeznek, azóta rendelkezünk a vizsgált személynek igen kis kockázatot és megterhelést jelentő mintavételi és -feldolgozási eljárással.

A kromoszóma-elváltozások és a sejtek rosszindulatú elfajulása közötti összefüggések felismerése nyomán egyre nagyobb az igény onkológiai megbetegedésekben a citogenetikai feldolgozásra. Ilyen esetekben természetesen magából a tumorszövetből kell venni a mintát. Leggyakrabban leukaemiák vizsgálata során szükséges a kromoszóma analízis. Ezekben előfordul, hogy a peripheriás keringésben levő daganatsejtek — minden külön stimulálás nélkül — is osztódnak, a csontvelőből történő biopsiás mintavétel azonban csak ritkán kerülhető el.

A phytohaemagglutinin (ismert rövidítéssel: PHA), egy *Phaseolus vulgaris*-ből (bab) előállított lektin, ami a keringő vérben található T lymphocyták mitogén ágense. Ezzel akár teljes vérből kiindulva, akár izolált fehérvérsejt populáción alkalmazva a T sejtek blastos transzformációját válthatjuk ki, ami azt jelenti, hogy G_0 -ból G_1 stádiumba lépnek, nyugalmi

szakaszból proliferációs állapotba kerülnek, és a sejtciklusban előrehaladva jutnak el a mitózisig. Osztódás után a keletkezett utódsejtek is folytatják a szaporodást. Megfelelő tápfolyadékban 37 °C-on létrehozott tenyészetben (általában 72 óra alatt) elegendő alkalmas sejtet nyerhetünk akár már 1 ml-nél kevesebb vérből is.

A vérvételnek és -feldolgozásnak természetesen steril körülmények között kell történnie és olyan alvadásgátló (általában heparin) alkalmazása mellett, ami a későbbiekben nem zavarja a sejtenyésztést. Megfelelően zárható edényben (pl. műanyag centrifugacső) a vér egy napos postai szállítás után is sikerrel felhasználható, de célszerűbb és biztonságosabb a vizsgálandó személy beküldése a megfelelő citogenetikai laboratóriumba, ha ez egyáltalán lehetséges.

Könyökhajlatból szoktak bőrbiopsiás anyagot kicsípni, ha valamilyen egyéb szövetről is szükséges a kromoszómák vizsgálata (pl. mozaicizmus gyanúja esetén). Ebből a mintából a szokásos *in vitro* tenyésztési feltételek mellett fibroblastok nőnek ki a bőrálja kötőszövetéből.

Praenatalis kromoszómavizsgálatokhoz chorionboholyból vehető sejt minta a terhesség korai stádiumában (8.-10. hét), később (a 16. héttől) amniocentesissel kapott amnionfolyadékból centrifugálással ülepíthetők ki az abban úszó magzati sejtek. Ezek is alkalmasak *in vitro* tenyésztésre.

Amint azt a fentiekben említettük, bármilyen proliferáló sejtenyészetben (vagy a vizsgálandó személyből biopsiával közvetlenül vett és *in vitro* túlélő sejt populációban) a mitotikus sejtek *kolhicin* adagolásával (0,1 - 0,5 $\mu\text{g/ml}$) néhány (2 - 4) óra alatt annyira felszaporíthatók, hogy elegendő oszításban levő sejt legyen a vizsgálathoz.

Az így előkezelt sejtenyészet feldolgozásának következő lépése a *hypotoniás kezelés*. A tápfolyadékból kíméletes centrifugálással összegyűjtött sejteket 0,075 mólos KCl oldatban szuszpendálják és 37°C-on (vagy szobahőn) 20 percig állni hagyják. Ezen eljárás alatt egyrészt a sejtek, másrészt maguk a kromoszómák is duzzadnak; az előbbi megnöveli annak esélyét, hogy az egy metafázishoz tartozó képletek nagyobb területen oszoljanak szét, ne fedjék át egymást a későbbiekben a tárgylemezen, az utóbbi a majdani láthatóságot javítja.

A hypotonisalt sejteket igen kíméletes centrifugálással gyűjtik össze egy kónikus centrifugacsőben, a felülúszót majdnem teljesen leszívják (nagyjából a sejtekkel azonos mennyiségűt hagynak csak rajtuk), és a készítményt *fixálásnak* vetik alá: óvatos de alapos rázogató mellett metanol jégecet 3:1 arányú keverékét adják hozzá cseppenként. Ezt az eljárást (centrifugálás, felülúszó eltávolítás, újból fixálószer adagolása) 2-3-szor megismétlik.

Végül a metanol jégecet keverékével úgy hígítják fel a sejt-szuszenziót, hogy az enyhén opaleszkáljon. Ebből 1-1 cseppet hideg, nedves tárgylemezre cseppentenek ki (alkalmasint, a jobb szétterülés érdekében magasabbról), és a preparátumokat levegőn szárítják.

Festésre az esetek többségében Giemsa oldatot alkalmaznak. Napjainkban általában a *G-sávozás* módszerét választják, amihez 3-4 napos lemezeket használnak⁵.

(A *Q-sávozás* – quinacrinnal vagy quinacrin-mustárral – azonnal elvégezhető, de a vizsgálat drága fluoreszcens mikroszkópot igényel, és a preparátumok hosszabb idejű eltartása megoldatlan, míg a Giemsa-festettek gyakorlatilag korlátlan ideig raktározhatók.⁶)

A metafázisok értékelése elvileg történhetne közvetlen mikroszkópos vizsgálattal is, ez azonban a legnagyobb gyakorlatú szakember számára sem megnyugtató módszer. Ezért általában arra szorítkoznak, hogy egy-egy metafázis technikai alkalmasságát ítélik csak meg közvetlenül a mikroszkópban, s a megfelelőkről fényképet készítenek. A fotókból az egyes kromoszómák képét kivágják, majd a (sáv)idiogramban lefektetett elvek (2. ábra) szerint rendezik azokat és egy – alkalmasint a szokásos beosztással előnyomott – papírlapra ragasztják fel őket. Az egy metafázishoz tartozó kromoszómák így kapott képe a *rendezett karyogram*.

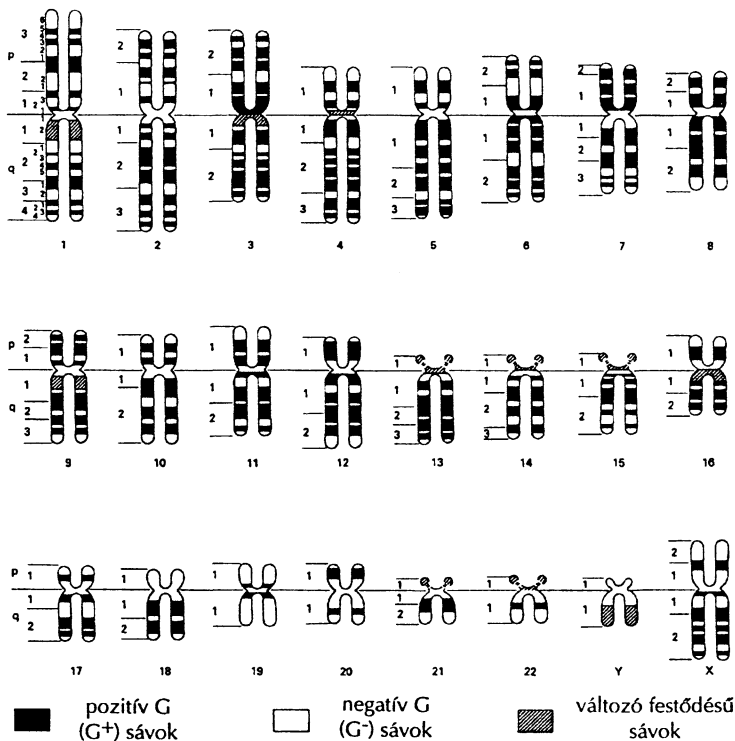
Több karyogram analízise alapján (ha szükséges: ismételt, más szövettípusú minták tanulmányozása után) írják le a vizsgált személy kromoszómaképletét egyezményes jelekkel, azaz meghatározzák az illető *karyotypusát*. (Az angolszász szakirodalomban – azaz gyakorlatilag a világ orvosi irodalmában – karyotypuson értik, karyotypusként közlik az egyénre jellemző rendezett karyogram képet is, nem csak az itt említett, az *1. táblázat*ban részletezett egyezményes jelekkel leírt formát.)

Jelenleg a Párizsi Nomenklatura (1971) elvei szerinti sávidiagramot alkalmazzák általános használatra. Különleges technikákkal nagyobb felbontás (= több sáv) is létrehozható a kromoszómákon, mindezek igényelhetik az alsávokra osztást és az ezeknek megfelelő jelölési rendszer alkalmazását.

Hogy a kariotipizálással kapott eredmény minden gyakorló orvos számára olvasható legyen, az alkalmazott egyezményes jeleket és írásmódot

⁵ A lemezeket 2 órán át 60 °C-on 2xSSC oldatban (0,3 M NaCl + 0,03 M trinátriumcitrát) tartják, majd ionmentes desztillált vízzel leöblítik. Ezt követően 2–10 másodpercre 37 °C-os (0,25%-os) tripszin oldatba mártják, majd újabb desztillált vizes öblítés után 5–10 percig festik 5%-os (pH 6,8) Giemsa oldatban.

⁶ Sikerült már ilyen, akár egy évtizednél is öregebb készítményekből – PCR módszerrel – szekvencia-meghatározásra elegendő mennyiségű DNS-t kinyerni.



2. ábra
A humán idiogram

Az ábrán az emberi kromoszómák sávidiagramja látható, Giemsa sávtechnikával festve. Minden kromoszómapárból csak egy van feltüntetve, a mitózis metafázisának megfelelően, két, még szét nem vált testvérkromatida formájában. A képen a kromoszómák úgy vannak elrendezve, hogy centromérjeik egy magasságba esnek, s a rövid kar mutat felfelé. Az egyes sávok jelölése csak az 1. kromoszómánál van feltüntetve: a kétjegyű szám első jegy a régiót, a második magát a sávot jelöli. Pl.: Az 1. kromoszóma rövid karja disztális végének elnevezése: 1p36. (A kifejlesztés alatt álló nagyfelbontású sávozás már három v. négy számjegyű jelöléseket igényel.)

táblázatokban foglalják össze. Egy ilyen mutat be az *1. táblázat*, amit néhány példával egészít ki, illusztrál a *2. táblázat*.

A fentebb említett modern eljárások közül leggyakrabban a FISH-t (fluorescent in situ hybridization) alkalmazzák. A megfelelő, gén- vagy kromoszóma-specifikus DNS próbát alkalmas fluoreszcens jelöléssel látják el (vagy ilyen megkötésére teszik képessé, pl. biotinálással), és pozitív nukleinsav-hibridizálási eredmény esetén ennek helye – fluoreszcens mikroszkóppal – pontosan azonosítható az illető kromoszómá(ko)n. Bizonyos esetekben ehhez a vizsgálathoz nincs is szükség metafázis készítményre: interfázisos magban is kimutatható a vizsgált gén megléte vagy hiánya, avagy pl. egy kromoszóma(részlet) tri- ill. monoszómiája.

Ugyanez igaz a még újabb *in situ* PCR (polymerase chain reaction) technikára is. Ezek a modern eljárások megteremtették az „interfázisos citogenetika” bevezetésének alapjait, ami immár nem igényel proliferáló sejteket és lényegesen kisebb mintából szolgáltat sokkal gyorsabban laboratóriumi eredményt. (Nem hallgathatjuk el azonban, hogy ezek a technikák jóval drágábbak a fentiekben leírt hagyományosnál, és számos, szigorú kritériumok szerint választott kontrollt is be kell állítani az ál-negatív vagy ál-pozitív eredmények kiszűrésére.)

A gyakorlaton rendelkezésre álló idő alatt a fent ismertetett eljárás – értelemszerűen – nem kivitelezhető. Kész metafázis preparátumok vizsgálata és karyogram fotókból a kromoszómák képének kivágása, idiogram (l. *2. ábra*) szerinti rendezése (azaz karyotypizálási diagnosztika) az, amire lehetőség nyílik.

A metafázis preparátumok egy része emberi daganatokból származó, *in vitro* tenyésztett sejtekből készült. Ezekre a nagyfokú és igen változatos aneuploidia jellemző, valamint struktúrális rendellenességek. Más részük egér eredetű, úgyszintén aneuploid. Megfigyelhető ezeken az egér kromoszómák eltérő alakja: telocentrikusak. Természetesen normál, Giemsa-sávozott humán anyag is szerepel a demonstráltak között.

1. táblázat
A kariotípusokban használt jelölések

Jelölés	Értelmezés
A - G	Kromoszómacsoportok jelölése (a Denveri Nomenklatura szerint)
1 - 22	Az egyes autoszómák számozása
X és Y	Nemi kromoszómák
ace	Acentrikus fragment
b	Törés (break)
cen	Centromér(a)
chi	Kiméra
ct	Kromatid
del	Deléció
der	Kromoszóma derivátum
dic	Dicentrikus kromoszóma
dir	Direkt
dmin	Double minute
dup	Duplikáció
end	Endoreduplikáció
fra	Törékeny (fragilis) hely
h	Heterokromatikus terület, kromoszómarészlet. Más értelmezésben és használatban: másodlagos befűződés
hsr	Homogéneen festődő régió
i	Izokromoszóma
ins	Inszerció
inv	Inverzió
mar	Marker kromoszóma
mat	Anyai eredet
mos	Mozaicizmus
p	Rövid kar
pat	Apai eredet
Ph vagy Ph ¹	Philadelphia kromoszóma (újabbban csak a Ph jelölést alkalmazzák)
pter	Rövid kar terminális (telomérikus) szakasza
q	Hosszú kar
qter	Hosszú kar terminális része
r	Gyűrűkromoszóma
rec	Rekombináns kromoszóma
rep	Reciprok transzlokáció

rob	Robertson-féle transzlokáció
s	Szatellita
SCE	Testvérkromatid kicserélődés (sister chromatid exchange)
t	Transzlokáció
ter	Terminális (telomérikus) kromoszómarész
tri	Tricentrikus kromoszóma
var	Variáns (eltérő) vagy heteromorph kromoszóma
ismételt jel	Az ezzel jelölt kromoszómarész duplikációja
-	-tól -ig
,	A kromoszómaszám elválasztása a többi jeltől, ill. ezek egymástól való elválasztása
;	Két, transzlokációban részes kromoszóma(részlet) elválasztása
:	Törés(pont)
::	Törés és újraegyesülés(i pont)
?	Kérdéses azonosítás kromoszóma vagy kromoszómastruktúra vonatkozásában
()	t után zárójelben állnak a transzlokációban résztvevő kromoszómák vagy -részletek
/	Különböző kariotípusú sejtvonalak leírásának elválasztása kromoszóma mozaicizmus esetén
+	Kromoszóma jele előtt: extra kromoszóma, a jelzett kromoszómából eggyel több található. Kromoszómacsoport betűjele előtt: az illető csoportban egy (közelebből nem azonosított) extra-kromoszóma van.
+	Közvetlenül egy kromoszómarészlet jele után: az illető kar megnyúlt, a megfelelő rész megnagyobbodott.
-	Kromoszóma jele előtt: az illető kromoszóma hiányzik. Kromoszómacsoport betűjele előtt: az illető csoportban egy kromoszóma hiánya
-	Közvetlenül egy kromoszómarészlet jele után: az illető kar megrövidült, a megfelelő részlet megkisebbedett
*	Utalás arra, hogy a jel előtt álló kromoszóma(részlet) leírása szövegben (vagy lábjegyzetben) bővebben megtalálható

2. táblázat Humán kariotípusok

(Néhány fontosabb példa az 1. táblázatban felsoroltak alkalmazására)

46,XX	Normál (diploid) női kariotípus
46,XY	Normál (diploid) férfi kariotípus
45,X	Aneuploidia (hypodiploidia): 45 kromoszóma, a nemi kromoszómák közül csak egy X kromoszóma van meg (Turner szindróma)
47,XXX	Triplo-X
47,XXY	Aneuploidia (hyperdiploidia): 47 kromoszóma, a nemi kromoszómák között egy számfeletti X van (Klinefelter szindróma)
47,YY	Aneuploidia (hyperdiploidia): 47 kromoszóma, a nemi kromoszómák között egy számfeletti Y van
48,XXXY	Aneuploidia (hyperdiploidia): 48 kromoszóma, a nemi kromoszómák között két számfeletti X van (Klinefelter szindróma)
47,XX,+21	Aneuploidia (hyperdiploidia): 47 kromoszóma, XX (normális női) nemi kromoszómaképlet, számfeletti
21-es	kromoszóma, azaz a 21-es autoszóma triszómiája (Down szindróma)
47,XY,+21	Aneuploidia (hyperdiploidia): 47 kromoszóma, XY (normális férfi) nemi kromoszómaképlet, számfeletti
21-es	kromoszóma, azaz a 21-es autoszóma triszómiája (Down szindróma)
47,XX,+13	Aneuploidia (hyperdiploidia): 47 kromoszóma, XX (normális női) nemi kromoszómaképlet, számfeletti
13-as	kromoszóma, azaz a 13-as autoszóma triszómiája (Patau szindróma)
47,XY,+18	Aneuploidia (hyperdiploidia): 47 kromoszóma, XY (normális férfi) nemi kromoszómaképlet, számfeletti
18-as	kromoszóma, azaz a 18-as autoszóma triszómiája (Edwards szindróma)
46,XY,del(5)(p13)	46 kromoszóma, XY (normális férfi) nemi kromoszómaképlettel. Az egyik 5-ös kromoszóma rövid karjának terminális deléciója, az 5p13-as sávnál letörve

- 46,XX,t(2;8)(p13;q12) 46 kromoszóma, XX (normális női) nemi kromoszómaképlet. Reciprok transzlokáció az egyik 2-es és az egyik 8-as kromoszóma között, törési pont a 2-esen a rövid kar 13-as sávja (2p13), ill. a 8-ason a hosszú kar 12-es sávja (8q12)
- 46,XY, fra(X)(q27) 46 kromoszóma, XY nemi kromoszómaképlettel. Az X kromoszóma hosszú karján, a 27-es sávban (Xq27) törékenység
- 46,X,Xp- 46 kromoszóma, az egyik X rövid karjának deléciója (Turner szindróma)
- 46,X,i(Xq) 46 kromoszóma, az egyik X hosszú kar izo-kromoszóma; más szavakkal: X kromoszóma rövid kar monoszómia, hosszú kar triszómia (Turner szindróma)
- 46,X,r(X) 46 kromoszóma, az egyik X gyűrűkromoszóma (Turner szindróma)
- 46,XX/45,X Mozaicizmus, az egyik sejtvonal X monoszómiás (definíció szerint Turner szindróma, de – az aneuploid sejtek részarányától és az érintett szervektől függően – lehet többé-kevésbé tünetmentes)
- 46,XY,t(9;22) Diploid kromoszómaszám, XY (normális férfi) nemi kromoszómaképlet, (reciprok) transzlokáció az egyik 9-es és az egyik 22-es autoszóma között (Ph-pozitív chronicus myeloid leukaemia)
- 46,XX,t(9:22)(q34;q11) Diploid kromoszómaszám, XX (normális női) nemi kromoszómaképlet, (reciprok) transzlokáció az egyik 9-es (töréspont a hosszú kar 34-es sávjában) és az egyik 22-es (töréspont a hosszú kar 11-es sávjában) között. Ph-pozitív chronicus myeloid leukaemia. (Ugyanaz az elváltozás, mint a megelőző kario-típusban, de itt a töréspontok is pontosan azonosítottan vannak leírva.)

GENETIKAI PROBLÉMÁK I. (KLASSZIKUS GENETIKA)⁷

1. A retek alakja lehet hosszúkás ($S^H S^H$), kerek ($S^K S^K$) és ovális ($S^H S^K$). A hosszúkás és ovális alakúakat keresztezték. A keresztezésből származó utódok véletlenszerűen kereszteződnek egymással. Milyen fenotípus arány várható a véletlenszerű kereszteződésből származó generációban?

2. A lóbab szíklevelének színét meghatározó allélpár $C^Z C^Z$ homozigóta állapotban sötétzöld színt eredményez. A $C^Z C^S$ heterozigóta világoszöld és a $C^S C^S$ homozigóta sárga szíklevelű. Az utóbbi a csíranövény állapoton túl nem nevelhető fel, a klorofill teljes hiánya miatt. Egy sötétzöld és egy világoszöld szíklevelű növényt kereszteztek egymással. A kapott utódok között random (véletlenszerű) keresztezést végeztek. Milyen fenó- és genotípusú növényeket kaptak és milyen arányban?

3. A rágcsálók jellegzetes szőrzetszíne, az "agouti", úgy alakul ki, hogy a szőrszálak vége közelében sárga pigmentsáv húzódik. Nyulakban egy multiplex allélsor a következő fenotípusokat eredményezi: $E^D E^D$ és $E^D e$ genotípusok fekete szőrzetszínűek, az $E^D E$ heterozigóta fekete agouti foltokkal, az EE és Ee genotípusúak bundája teljes agouti és a homozigóta recesszív ee sárgásvörös.

Milyen fenó- és genotípusú utódok várhatók és milyen arányban az alábbi keresztezésekből származó első és második nemzedékben:

a.) $E^D E^D \times Ee$

b.) $E^D e \times ee$

4. A sertés normál, hasadt körmének kialakulását recesszív allél biztosítja (az mm genotípusú egyedek nyilvánul meg fenotípusosan is), a domináns allél (M) pedig az ún. csökött lábét. A fehér szőrzet kialakulását szintén domináns allél szabályozza (B), míg a fekete színűét a homozigóta recesszív (bb). Fehér, csökött lábú nőstény és fekete, hasadt körmű hím között végrehajtott keresztezésekből a következő utódokat kapták:

a.) 26 utódból mind fehér, csökött lábú. Milyen volt a nőstény valószínű genotípusa?

b.) 8 kismalac fehér, csökött lábú, 1 fehér, hasadt körmű. Milyen volt ebben a keresztezésben a nőstény valószínű genotípusa?

⁷ A jegyzetünkben szereplő feladatokat nagyrészt Perendy M., H. Nagy A.: Genetikai példatár (Medicina 1983.) c. művéből vettük át

5. Az előbbi példában vizsgált jelleg további analizisére fehér, csökkent lábú hímek és nőstények között hajtottak végre keresztezéseket. A következő utódmegoszlást kapták: 8 fehér, hasadt körmű; 7 fekete, csökkent lábú; 25 fehér, csökkent lábú; 3 fekete, hasadt körmű.

a.) Valamennyi fekete, csökkent lábú utódot (tesztelő keresztezést végezve) párosították. Milyen fenotípus arány várható ezekből a tesztelő keresztezésekben?

b.) Ha a keresztezésben szereplő fehér, csökkent lábú anyakocával végeznek tesztelő keresztezést, milyen fenotípusú utódok várhatók és milyen arányban?

6. A domináns K allél eredményezi az egerek kunkori farkát, a homozigóta recesszív allélpár (kk) pedig a szokásos, normális farkat. A homozigóta AA fenotípus szürke, agouti szőrzetű. A heterozigóta $A^S A$ sárga, a homozigóta $A^S A^S$ letális.

a.) Sárga egereket, melyek heterozigóta kunkori farkúak, egymás között kereszteznek. Milyen fenotípusarányok várhatók az utódok között?

b.) Milyen arányban várhatók $A^S AKk$ genotípusú utódok?

c.) Milyen geno- és fenotípusú utódok érik meg az ivarérett kort, és milyen arányban, ha a sárga utódok véletlenszerű (random) párosodását lehetővé teszi?

7. A spárgatök fehér színét domináns allél (A), a színes termését a recesszív allél (a) biztosítja. Homozigóta (aa) genotípus esetén egy másik gén domináns allélje (B) sárga színt alakít ki. Ha a genotípus bb — a B domináns allél hiányzik —, akkor a termés színe zöld lesz.

Milyen F_2 fenotípusokat vár és milyen arányban az AABB fehér termésszínű és aabb zöld termésszínű növények keresztezéséből?

8. Milyen fenotípusarányokat vár az F_1 tesztelő keresztezésből (homozigóta recesszívvel visszakeresztezve), ha az $F_1 \times F_1$ keresztezés eredményei:

- a.) 13:3; b.) 15:1; c.) 9:3:4;
d.) 12:3:1; e.) 1:2:1:2:4:2:1:2:1.

9. Egerekben a domináns C allél jelenlétére van szükség ahhoz, hogy a szőrzet színeződése kialakuljon. A pigmentszintézist biztosító gének közül az egyik (B) a fekete, a másik (bb) a barna szőrzetszínt biztosítja. Az episztatikus faktorra homozigóta (cc) egyed albinó (fehér fenotípusú). Homozigóta fekete nőtényt kereszteztek homozigóta albinó hímmel.

a.) Milyen fenotípusarány várható az F_1 és az F_2 nemzedékben?

b.) Ha az F_2 nemzedékbeli albinó egerek között random (véletlenszerű) párosodást tesznek lehetővé, milyen genotípus megoszlás várható utódaik között?

10. A spárgatök termésalakjának három változata – a korong, a hosszúkás és a kerek forma – ismert. Tiszta származéksorú korong alakú és hosszúkás termésű növények keresztezésekor az F_1 nemzedékben csak korong alakú termést kaptak. 80 db F_2 egyedből 30 kerek, 5 hosszúkás és 45 korong alakú termést hozott.

a.) Milyen fenotípusaránynak felel ez meg?

b.) Milyen típusú génkölcsonhatás eredményezheti ezt a megoszlást?

c.) Milyen utódmegoszlás várható, ha az F_2 nemzedék kerek fenotípusú egyedei között véletlenszerű keresztezést hajtanak végre?

11. Az ecetmuslica élénk piros (vermilion) szemszíne (v) és görbült szárnya (c) recesszív jelleg a vad típussal szemben. Élénk piros szemszínű nőtény és görbült szárnyú hím között végrehajtott keresztezésből származó utódok a következő fenotípus-kategóriába sorolhatók:

a nőtények $1/2$ része vad

$1/2$ része görbült szárnyú

a hímek $1/2$ része élénk piros szemszínű

$1/2$ része élénk piros szemszínű és görbült szárnyú

a.) Milyen genotípusú volt a keresztezésben szereplő nőtény?

b.) Milyen genotípusú volt a keresztezésben szereplő hím?

c.) Milyen genotípusúak az utód nőtények és hímek?

(v X-hez kötött, c autoszómális)

12. Színtévesztő nő és normál színlátású férfi házasságából egy színtévesztő 47 kromoszómás XXY-os Klinefelter-szindrómás fiú született.

- Milyen ivari kromoszómákat tartalmazott a petesejt és a spermium, amelyek egyesüléséből az említett fiúgyermek származott?
- Barr-test számlálást végeztek mind a szülők, mind a gyermek nyálkahártya-sejtjeiben. Melyik szülő sejtjeihez hasonló citológiai képet mutatnak az előbbi fiúgyermek sejtjei?
- A példában említett szülőpárnak 46 kromoszómás XY-os fiúgyermek születik. Mennyi a valószínűsége annak, hogy színtévesztő lesz?

13. Az Ayrshire szarvasmarhákban a mahagoni-fehér szín a C^M génnel kapcsolatos, mely a bikákban domináns, az üszőkben pedig recesszív. A vörös-fehér színkombináció C^R génje az üszőkben domináns és a bikáknál recesszív.

- Milyen feno- és genotípusarány várható az F_1 és az F_2 nemzedékben, ha vörös-fehér hímet és mahagoni-fehér tehenet kereszteznek?
- Egy mahagoni-fehér tehen vörös-fehér borjat ellik. Milyen ivarú a borjú?
- Milyen genotípusú nem lehetett a b.) pontban említett borjú?

14. A paradicsom kerek termésalakját meghatározó allél (O) domináns az ovális (o) formát meghatározóval szemben. Ugyancsak domináns a sima terméshéj (P) a hamvassal (p) szemben. Az F_1 nemzedék heterozigóta egyedeit a homozigóta recesszív egyedekkel visszakeresztezve az alábbi eredményt kapták:

sima,kerek	sima,ovális	hamvas,kerek	hamvas,ovális
24	246	266	24

- Milyen kapcsolási viszony volt az F_1 -ben az allélformák között? Írja fel az F_1 nemzedék egyedeinek pontos genotípusát!
- Mennyi a rekombinációs % a két gén között?

15. Két recesszív gén (r_1 és r_2) a nyulak rövid, bársonyos szőrzetét biztosítja. E fenotípus rövid elnevezése "rex". Különböző géntípusú, homozigóta rex nyulak keresztezéséből származó F_1 nemzedékbeli heterozigóták tesztelő keresztezéséből 64 rex és 6 normál utód származott.

- a.) Hogyan oszlanak meg a fenotípuskategóriák között a 70 utód, ha független kombinálódást tételezünk fel?
- b.) Igazolják-e az adatok az r_1 és az r_2 gének közötti kapcsoltságot?
- c.) Milyen fenó- és genotípusú az F_1 nemzedék?
- d.) Milyen volt a tesztelő keresztezésben szereplő másik egyed geno- és fenotípusa?
- e.) Számolja ki az r_1 és az r_2 térképtávolságát!

16. A patkány IV. kromoszómáján lokalizált a rövid göndör szőrzetet és a hosszú orrot meghatározó allél, mely homozigóta recesszív formában (kk) alakítja a fenti fenotípust. Ugyanebben a kapcsolási csoportban van az st gén, mely homozigóta recesszív állapotban rövid, vastag farkot eredményez. A domináns allélek normál szőrzet- és farkhosszúságot biztosítanak. A k és st lokuszok között 30 térképegységnyi távolság van.

Milyen fenotípusú utódok várhatók és milyen arányban a következő genotípusú heterozigóták egymás közötti kereszteződéséből?

- a.) $k\ st \quad k\ st$ b.) $+ \ st \quad + \ st$ c.) $k\ st \quad + \ st$
 $+ \ + \times \ + \ +$ $k \ + \times \ k \ +$ $+ \ + \times \ k \ +$

(+ a domináns vad allélformát jelzi)

17. Tiszta származék sorú (beltenyésztett) egerek között ismert a hosszú farkú (100 mm) és a rövid farkú (50mm) változat. Ha ezeket keresztezik egymással, utódaik egyöntetűen köztes (75 mm) farkméretűek lesznek.

a.) Milyen a legegyszerűbb genetikai formula a farkhossz öröklésmenetének értelmezésére?

b.) F_1 -beli egereket egymás között keresztezve, az alábbi formákat kapták az F_2 nemzedékben:

farkhossz:	50	62	75	88	100 mm
egyedszám:	5	20	30	20	5 db

Hogyan módosítja ennek alapján az a.) kérdésre adott válaszát?

c.) Milyen a valószínű genotípusa az öt F_2 kategória egyedeinek?

18. Egy férfi heterozigóta Bb egy autoszómális génre nézve és hordoz egy recesszív X-hez kötött d allélt. Mi a valószínűsége, hogy a spermiuma bd lesz?

- (a) 0; (b) 1/2; (c) 1/4; (d) 1/8; (e) 1/16

19. Egy szülészetben négy újszülöttet véletlenül összecserélnek. Az újszülöttek ABO vércsoportja azonban ismert:

- 1: 0
- 2: A
- 3: B
- 4: AB

Meghatározták a szülők vércsoportját is:

- a: AB x 0
- b: A x 0
- c: A x AB
- d: 0 x 0

Állapítsa meg, hogy melyik szülőpárhoz melyik újszülött tartozik.

20. A genetikusoknak sikerült fenntartaniuk 3 humán-egér hibrid sejtvonalat. A sejtvonalak rendelkeznek az egér összes kromoszómájával és bizonyos kromoszómákkal az ember genomjából. A táblázat mutatja, hogy melyik sejtvonalt mely emberi kromoszómákat őrzött meg.

Hibrid sejtvonalt	Emberi kromoszómák							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A	+	+	+	+	-	-	-	-
B	+	+	-	-	+	+	-	-
C	+	-	+	-	+	-	+	-

Ezután megvizsgálták, hogy 5 különböző emberi enzim közül melyik enzim melyik sejtvonaltban mutatható ki. Az enzimeket jelöljük α , β , γ , δ és ε betűkkel. Az alábbi eredményre jutottak:

α	megtalálható	a C sejtvonalban
β	"	mind a háromban
γ	"	B-ben és C-ben
δ	"	B-ben
ε	sehol sem mutatható ki.	

Milyen következtetéseket lehet levonni arra vonatkozólag, hogy melyik enzim génje melyik emberi kromoszómán található?

CSALÁDFA-ELEMZÉS

A családfa készítése a genetikus egyik legfontosabb segédeszköze az örökletes betegségekkel kapcsolatban felmerülő konkrét problémák megoldásában. Bár a molekuláris genetika modern, kifinomult módszereket fejlesztett ki, a családfa-elemzés továbbra is megőrizte értékét a humángenetikában. Mivel célszerűen megtervezett keresztezések – amint az a kísérletes genetikában szokásos – embereken nem hajthatók végre, a humángenetikusnak legalábbis vizsgálatai kezdetén az adott jelleg egyes családokban való megjelenéséről gyűjtött adatokra kell alapoznia ismereteit. A családfa készítésénél a genetikus a tanácsot kérő család tagjainak vizsgálatára, ill. az elhalt és személyesen meg nem vizsgálható rokonokról kapott szóbeli információkra támaszkodik.

A családfa felrajzolásának egyezményesen kialakult szabályai vannak (3. ábra).

A nemzedékeket római számokkal jelöljük, a családfa legfelső sorában a legősibb (I.), alján az utolsó generáció található. Az egyes nemzedékekben az egyéneket arab számok azonosítják (a számok balról jobbra növekednek, egy-egy szülőpár utódai között ez egyúttal születési sorrendet is jelent). Így a családfán szereplő minden egyed azonosítható egy számmal, pl. IV/5. A betegeket (jelleghordozókat) a szimbólum sáfrányzásával jelöljük. A probandust⁸ vagy propositust (ha nő, probanda vagy proposita) nyíl mutatja. A családfák vizsgálata alapján következtetni tudunk arra, hogy az illető betegség (vagy jelleg) milyen öröklődésmenetet követ, és ennek alapján fel tudjuk mérni az utódok érintettségének (megbetegedésének) kockázatát (valószínűségét).





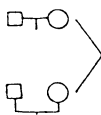


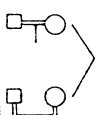


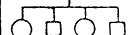



Az autoszomális domináns öröklésmenet jellemzői:

Ha a dominancia szabályos és teljes, a domináns tulajdonság minden nemzedékről nemzedékre átadódik (nincs nemzedékugrás). A jelleg férfiakban és nőkben azonos gyakorisággal jelenik meg. A jelleghordozóknak legalább egyik szülője mindig érintett.

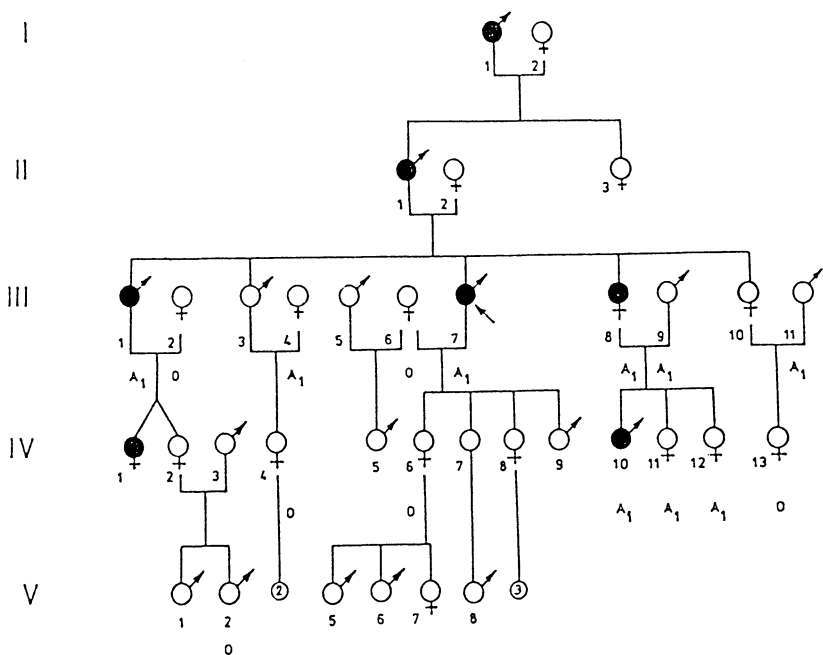
A jelleget nem mutató testvérek és rokonok utódai között a tulajdonság nem bukkan fel. Ha a szülők egyike érintett, az utódok 50% valószínűséggel öröklik a domináns gént, és így mutatják a jelleget. Ha a domináns gén penetranciája 100%-nál kisebb, előfordul, hogy a tulajdonság átugrik egy

⁸ Probandus vagy propositus: az a személy, aki miatt a családot feltérképezték és a családfát elkészítették.

generációt (és így egy személy, aki a családfa alapján heterozigóta kell, hogy legyen, nem mutatja a jelet). L. a 4. ábrán bemutatott családfát.

	Nő		Abortusz, halvaszületés
	Férfi		Kétpetējű ikrek
	Házasság		Egypetējű ikrek
			Petējűség kérdéses
	Vérrokonok házassága		Betegek, jellegghordozók
			Heterozigóta egyedek
	Utódok		Konduktor
	Összevontan ábrázolt utódok		Probandus (propositus)

3. ábra
Családfa készítésnél használatos jelzések



4. ábra

Körm-patella szindróma családfája

A kórképet a rendellenességek egész szövedéke jellemzi, ezek azonban nem túl súlyosak, és az élettartamot és a fertilitást nem befolyásolják. A körm érintettsége változó, elszíneződéstől a körm teljes hiányáig. A patellák rendszerint hiányoznak, esetleg csökevényesek. Gyakran a könyök is rendellenes. A szindrómát szabályos öröklődésű domináns gén okozza.

Az autoszomális recesszív öröklésmenet jellemzői:

Az autoszomális recesszív módon öröklődő tulajdonságok a két nemben azonos gyakorisággal jelennek meg. A tipikus családfán betegeket (jelleghordozókat) csak néhány (gyakran csak egy) szülőpár gyermekei között találunk. Az érintett gyermekek csaknem kizárólag egészséges (heterozigóta) szülőktől származnak, akkor is, ha a betegség nem letális. Ez alól kivétel, ha a tulajdonság gyakori az adott populációban, vagy rokonházasság(ok) fordul(nak) elő (l. alább).

A recesszív jelleg nemzedékugrásokkal öröklődik, tehát váratlanul bukkan fel olyan családokban, ahol a felmenő ági rokonok két vagy három (esetleg több) nemzedékében sem látunk elváltozást.

Két heterozigóta házassága esetén az utódok megbetegedésének valószínűsége $1/4$. A ritka recesszív gének esetében ezért egy-egy szülőpár utódai között ismétlődik a tulajdonság.

Ha egy recesszív jelleget mutató személy homozigóta egészséges egyénnel lép házasságra, gyermekeik fenotípusosan egészséges heterozigóták lesznek.

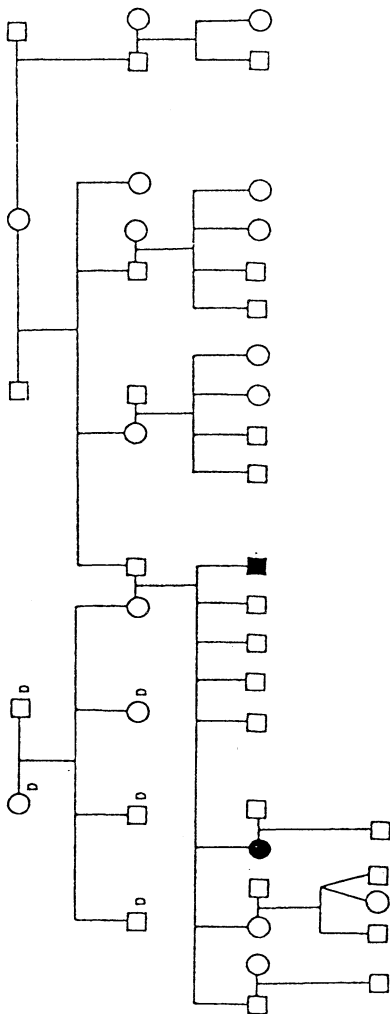
Ha mindkét szülő érintett, valamennyi gyermekük homozigóta és jelleghordozó kell legyen.

Ha egy jelleghordozó házastársa heterozigóta hordozója ugyanazon recesszív gének, utódaiknak átlagosan a fele érintett lesz, s így a családja a domináns öröklésmenet családfájához fog hasonlítani (kvázi-domináns lesz).

Mivel a rokonok nagyobb valószínűséggel hordozzák ugyanazt a recesszív gént, mint a rokonságban nem lévők, ezért a vérrokonok házasságából nagyobb gyakorisággal várható recesszív jelleget mutató gyermekek születése. (5. és 6. ábra)

Intermediér öröklésmenet:

A dominancia és recesszivitás mesterséges és némiképp önkényes fogalmak. Mivel a fenotípusra vonatkoznak, nagymértékben függenek azoktól a módszerektől, amivel a fenotípust vizsgáljuk. Ha az alkalmazott módszerek elég érzékenyek, a recesszív gén hatását a heterozigótákban is ki lehet mutatni. Tovább bonyolítja a képet, hogy a „domináns” gén hatása eltérő lehet homo- és heterozigóta állapotban (mind kvalitatív, mind kvantitatív lehet a különbség).



5. ábra

Familiáris mediterrán láz családfája

A tünetcsoportért egy recesszív gén felelős, amely elsősorban szefárd zsidókban, örményekben és egyes arab közösségekben fordul elő, másutt a gén meglehetősen ritka. A kórkép tünetei három csoportba sorolhatók: (1) a savós hátyák gyulladása (mell- és hashárgyulladás), (2) (zületi fájdalmak, és (3) amyloidosis (specifikus fehérjéből álló aggregátum lerakódása a szövetekben). A betegek szenvedhetnek a három kardinális tünet valamelyikében, ill. ezek bármilyen kombinációjában (változó expresszivitás). Azok a betegek, akikben az amyloidosis kifejlődik, veséjük működéséktelelné válása miatt meghalnak, de jelentős hányaduk megéri a reprodukzív kort.

„Nemhez kötött” öröklődés:

Nemhez kötöttek az ivari kromoszómákon lokalizált gének öröklődését nevezték; ezek a gének is lehetnek dominánsak vagy recesszívek. Nemhez kötött helyett helyesebb X-hez, ill. Y-hoz kötött öröklődésről beszélni.

Y kromoszómához kötött öröklődés esetén nő nem mutathatja a tulajdonságot, míg az érintett férfiaknak minden fiúgyermeké jelleghordozó lesz. Ilyen génről – a hím irányú nemi differenciálódást elindító, Y kromoszómán levő génen kívül – nincs megbízható adatunk, bár az ún. szőrös fül (vagy mókus-fül) nevű elváltozást régebbi tankönyvek Y-hoz kötöttek tartották.

X-hez kötött öröklődés

Nőben az X-hez kötött gének lehetnek dominánsak és recesszívek. Férfiakban, mivel csak egy X kromoszómájuk van (tehát hemizigóták az X kromoszómán levő génekre nézve), ezek a gének mindig kifejeződnek, függetlenül attól, hogy nőkben dominánsként vagy recesszívként viselkednek. Az X-hez kötött öröklődés ismerve az apáról fiúra történő géntadás hiánya.

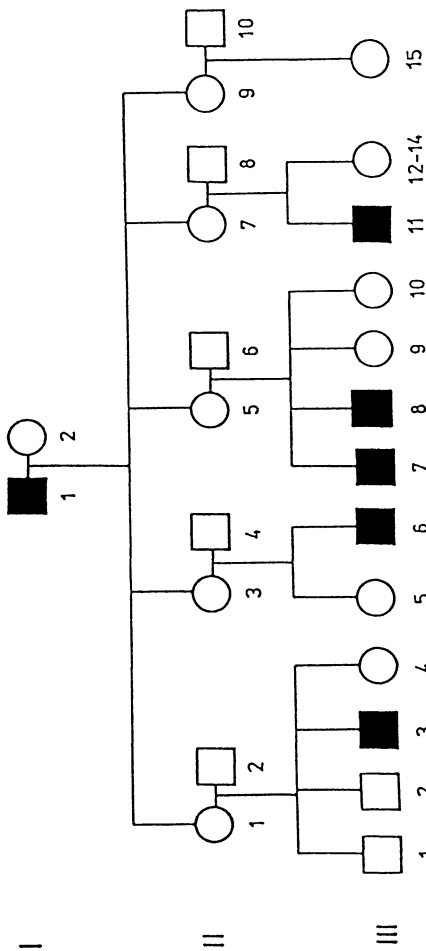
X-hez kötött recesszív gének

Az érintett férfi minden fia egészséges, lányai mind heterozigóták (konduktorok). Ezen heterozigóta nők fiúgyermekéi 1/2 valószínűséggel öröklik a gént és mutatják a jelleget.

Az érintett férfiaknak gyakran van jelleghordozó fiútestvérük vagy nagybátyjuk (anyai nagybátyjuk 1/2 valószínűséggel öröklő a recesszív gént a heterozigóta nagyanyától). L. a 7. és 8. ábrán bemutatott családfákat.

X-hez kötött domináns gének

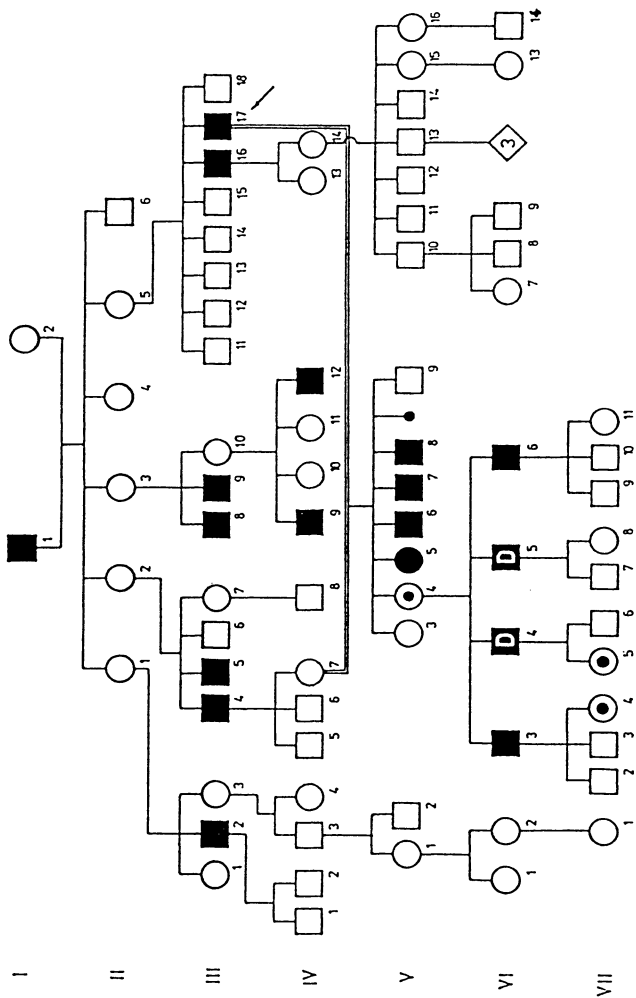
Felületes megtekintésre a családfa egy autoszomális domináns gén öröklésmenetére hasonlít. A döntő különbség az, hogy ha a gén X-hez kötött, a férfiak nem örökítik át fiaikra, de minden leányuk jelleghordozó lesz. Mivel ez véletlenül is előfordulhat, az X-hez kötött domináns öröklésmenet megállapítására csak akkor van lehetőségünk, ha a családfán kellő számban találunk olyan szülőket, akiknek a gyermekei között a jelleg előfordul.



7. ábra

„Színvakság” (vörös-zöld színévesztés) családfája

A jelleget az X kromoszóma hosszú karjának disztális részén található gén okozza. Az érintettek (főként férfiak, I. populációgenetika) a vörös és zöld színt nem tudják megkülönböztetni.



8. ábra

X-hez kötött ichthyosis családfája

Az ichthyosiform: dermatosisek olyan örökletes bőrbetegségek, amelyeket pikkelyes hámlás jellemez. Különböző típusaik autoszomális domináns, autoszomális recesszív, ill. X-hez kötött öröklésmenetet mutatnak. A családfa az X-hez kötött recesszív gén öröklődésének jellegzetességeit mutatja.

POPULÁCIÓGENETIKA ÉS A FENILTIOKARBAMID ÍZÉRZÉS VIZSGÁLATA

A populációgenetika tárgyát, ismeretkörét, az ideális és reális populáció fogalmát, a Hardy-Weinberg törvényt és egyéb elméleti részeket illetően a megfelelő tankönyvekre és jegyzetekre utalunk. Ezek tudott voltát feltételezve, e helyen bevezetésül csak néhány ismétlés jellegű megjegyzést tűnik célszerűnek megtenni a valószínűségszámítás ismert alapfogalmairól (a teljesség és a matematikai szakszerűség igénye nélkül).

A valószínűség jele: P . Amire vonatkozik, azt utána írjuk zárójelben, vele egy sorban. (A továbbiakban nem csak a P -t, hanem a p -t is használni fogjuk, ezért már itt hangsúlyoznunk kell, hogy a P -t a valószínűség jeleként, míg a p -t a domináns allél előfordulási gyakoriságának [értelmezhető valószínűségként is] jeleként használjuk.)

Valamely esemény valószínűsége:

$$P = \frac{\text{a kedvező esetek száma}}{\text{összes esetek száma}}$$

A valószínűség számszerű értéke 0 és 1 között változhat, mindig törtben fejezzük ki. Értelemszerűen 0 a valószínűsége a lehetetlen, 1 a biztos eseménynek. Különösen a mindennapos orvosi gyakorlatban szokás a valószínűséget (valaminek a bekövetkezési esélyét) százalékban kifejezni, mert ez a legtöbb páciens számára érthetőbb, megfoghatóbb, szemléletesebb, elfogadhatóbb. (Pl. genetikai tanácsadáson, ha egy recesszíven öröklődő betegség ismétlődési kockázatát a családban 1/4-nek adják meg, ez így némi magyarázatot igényelhet a legtöbb laikus számára, míg a 25%-ot mindenki megérti.) Ez az eljárás azonban bármilyen számítás szempontjából elvileg helytelen, és természetesen működésképtelen is, az esetleg százalékban megadott értékeket mindig át kell alakítani törtté. Példa valós, statisztikai felmérésekből ismert populációs gyakoriságok használata esetén, valószínűségi értékek megadására: legyen az Rh^- személyek részaránya a népességben 16%, akkor annak a valószínűsége, hogy ebből a populációból véletlenül választva Rh^- személy kerül elénk, $P(Rh^-) = 0,16$.

Független események együttes előfordulásának valószínűsége (ahol az egyik esemény bekövetkezése független a másik bekövetkeztétől):

$$P(A \text{ és } B) = P(A) \times P(B)$$

Mutassuk be egy egyszerű (és hagyományos) példán a fentieket! Közismert a kockadobás, akár mint szerencsejáték is. Mi a valószínűsége pl. annak, hogy 6-ost dobjunk? $P(6) = 1/6$. (Az összes lehetséges eset száma hat, ezek között a kedvező [kívánatos] esemény egyszer fordul elő.)

Ugyanez vonatkozik természetesen a többi szám dobásának valószínűségére is. Ha az összes dobási lehetőség valószínűségét összeadjuk, 1-et kapunk eredményül. Teljes eseményrendszerről beszélünk, ha minden lehetséges esetet figyelembe veszünk. Ennek tagjai valószínűségi értékeinek összege mindig 1-et ad eredményül.⁹ Ezt a szabályt használhatjuk valószínűségszámításnál próbaként is, teljes eseményrendszer vizsgálatánál ellenőrizhetjük, hogy valóban minden lehetőséget megvizsgáltunk-e.

Ha annak a valószínűségét keressük, hogy 1-est vagy 2-est dobjunk, a kedvező esetek száma megnő, a külön-külön vett valószínűségeket össze kell adnunk:

$$P(1 \text{ vagy } 2) = 1/6 + 1/6 = 2/6$$

Legyen most az a feltételünk, hogy elsőre dobjunk 1-est, másodjára pedig 2-est! Az esetek 1/6-ában várható, hogy a kívánt 1-es lesz az első dobásunk, és ezen eseteknek szintén 1/6-ában, hogy 2-es következzen. A független események együttes bekövetkezésének fenti törvénye alapján:

$$P(1 \text{ majd } 2) = 1/6 \times 1/6 = 1/36$$

Ha úgy szabjuk meg a feltételt, hogy fordított sorrendben is kaphatjuk a két számot, ezzel a kedvező eseteket kettőzzük meg:

$$P(1 \text{ majd } 2 \text{ vagy } 2 \text{ majd } 1) = 1/6 \times 1/6 + 1/6 \times 1/6 = 2/36$$

a keresett valószínűség.

⁹ Kockadobásnál értelemszerűen nem lehet más eredmény, mint hogy valamilyen számot dobjunk: a kocka sem a levegőben nem áll meg, sem leesve az egyik élén vagy csúcsán nem kerül nyugalmi helyzetbe, szükségszerűen valamilyik számot mutatja; a hat szám teljes eseményrendszert alkot.

Végezhetjük természetesen két kockával is a dobásokat, és itt úgy tehetjük fel a kérdést, hogy mi a valószínűsége az elsővel 1-es, a másodikkal 2-es dobásának. Az iménti megfontolás szerint itt is 1/36-ot kapunk, ha pedig mindegy, hogy melyikkel dobunk 1-est és melyikkel 2-est, akkor – szintén a fentiekhez hasonlóan – 2/36 az ilyen együttes dobás valószínűsége.

Ennek felel meg két különböző genotípusú egyed keresztezése, pl. homozigóta domináns homozigóta recesszívvel: $AA \times aa$ és $aa \times AA$, ha nincs kikötve, hogy melyik legyen a nő- és melyik a hímnemű.

Populációgenetikai számításokban egy lokusz kétféle allélje gyakoriságának (és ami ezzel számszerűen egyezik: előfordulási valószínűségének) jelölésére hagyományosan a p -t és q -t használjuk: p a domináns és q a recesszív allélre vonatkozik.

$$p + q = 1,$$

mert ha csak kétféle allél lehetséges, ezek együtt teljes eseményrendszert alkotnak. Három allél esetén:

$$p + q + r = 1$$

A genotípusok gyakorisága: homozigóta domináns p^2 , heterozigóta $2pq$, homozigóta recesszív q^2 , mert

$$P(p \text{ és } p) = p \times p = p^2,$$

$$P(p \text{ és } q \text{ vagy } q \text{ és } p) = p \times q + p \times q = 2pq,$$

$$P(q \text{ és } q) = q \times q = q^2.$$

$$\text{Más írásmóddal: } P(AA) = p^2, P(Aa) = 2pq \text{ és } P(aa) = q^2.$$

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1,$$

mert egyrészt $(p + q)^2$ -ről van szó, és $p + q = 1$, másrészt a homozigóta domináns, heterozigóta és homozigóta recesszív egyedek alkotják a populációt, két allél esetén más genotípus (és az ezek által meghatározott fenotípus) nem lehet, azaz teljes eseményrendszerrel állunk szemben.

Három allél esetén a genotípusok gyakoriságát a

$$\begin{aligned} & (p + q + r)^2 = \\ & = p^2 + 2pq + 2pr + q^2 + 2qr + r^2 = 1 \end{aligned}$$

összefüggés adja meg.

A p -t és q -t értelmezhetjük úgy is, hogy egy populációból, egy génpár vonatkozásában a domináns allél véletlenszerű kiválasztásának valószínűsége p , a recesszív q . Ugyanígy: homozigóta domináns egyed véletlenszerű kiválasztásának valószínűsége p^2 , heterozigótáé $2pq$, homozigóta recesszív q^2 .

Mivel a homozigóta domináns és heterozigóta egyedek fenotípusa – tiszta dominancia esetén – nem különbözik egymástól, populációs vizsgálatokban legtöbbször a homozigóta recesszívek gyakoriságát állapíthatjuk meg, azaz a q^2 értékét (feltéve természetesen, hogy a populáció egyensúlyban van), s mindenféle gén- vagy genotípus gyakorisági számítást ebből kiindulva vezethetünk le.

A különböző típusú keresztezések (embernél: házasságok) valószínűsége (gyakorisága) a független eseményekre vonatkozó fenti törvényszerűségek alapján írható fel. Ne feledjük el azonban, hogy míg pl. homozigóták keresztezésekor a domináns ill. recesszív egyedek saját csoportjukon belüli párosítása csak egyféleképpen lehetséges: $AA \times AA$ ill. $aa \times aa$, addig a két csoport közötti párválasztásban egyformán valószínű az $AA \times aa$ és $aa \times AA$ hímnemű \times nőnemű párosítás. Az utódok geno- (és feno)-típusai várható arányának meghatározásában a mendeli genetika törvényszerűségei az irányadók.

A humán populációgenetikai vizsgálatok egyik legismertebb, nagyon egyszerű, a gyakorlatban is könnyen bemutatható példajaként a feniltiokarbamid (PTC) ízézés szolgál. Ezt az anyagot az emberek egy része keserűnek érzi, míg mások ízetlennek mondják. Az ízérzőképesség öröklődő tulajdonság, a PTC ízére való érzékenységet egy külön génpár felelős: a domináns allél határozza meg a PTC-ízérzőképességet, a recesszív ennek hiányát. Ezek szerint a homozigóta domináns és a heterozigóta genotípusú egyedek érzik a PTC keserűségét, míg a homozigóta recesszívek nem.

A vizsgálat kivitele

PTC oldat: 1,3 g feniltiokarbamidot kell feloldani 1000 ml desztillált vízben (= tömény oldat; szobahőn telített oldat), majd ebből 11 tagú, 2-es léptékű hígítási sort készíteni. Ennek utolsó tagja (a törzsoldathoz képest 2^{-11} koncentrációjú) kapja a 12-es sorszámot, az egy fokkal töményebb a 11-est, és így tovább. Az eredeti tömény oldat az 1-es.

A vizsgálat során mindig a legnagyobb hígítású, azaz a 12-es jelű oldattal kezdünk. Alaposan megtisztítjuk (megmosatjuk, szárazra töröljük) a vizsgálandó egyén kézhatát, és erre cseppentjük a tesztelt oldatot. Két cseppnyit viszünk a bőrfelszínre, ezt a vizsgált lenyalja, és közli, hogy volt-e

ízérése, s ha igen, milyen jellegű. A maradékot szűrőpapírral gondosan leitatjuk. Nem kell előre közölni, hogy milyen jellegű ízérzetre számítunk, csak a spontán értékelésre támaszkodjunk. Ha a vizsgált személy nem érez semmilyen ízt, a 11-es oldattal folytatjuk a tesztelést, s mindaddig haladunk a töményebb oldatok irányában, amíg elérünk a keserű érzés jelentkezéséig. Ekkor, kontrollként, desztillált vizet cseppentünk a bőrfelszínre, amit nem szabad keserűnek éreznie a páciensnek. Ha mégis, akkor vagy a PTC-oldat maradékának eltávolítása volt elégtelen, vagy bizonytalan jellegű az ízérés. Előfordulhat, hogy a szájüregben maradt a használt oldatból annyi, ami meghamisítja az eredményt. Ha ennek gyanúja merül fel, egy-két korty vizet kell itatni a vizsgálttal. A desztillált vízre adott negatív válasz után újra az előbbi PTC-oldatból cseppentünk ízlelésre, majd váltogatjuk a desztillált vizet és a PTC-t. Adott töménységnél akkor tekintjük pozitívnak az eredményt, ha négy esetből legalább háromban jelezte a keserű ízt a vizsgált, a vizet pedig mindig ízetlennek mondta. Igen gyakori, hogy a pozitív eredményt végülis csak az első jelzésnél egy fokozattal töményebb oldat esetén rögzíthetjük.

Természetesen a vizsgált személy sohasem tudhatja, hogy mit cseppentünk a kézhátára, ezért a PTC oldatsort ill. a desztillált vizet tartalmazó üvegeknek a háta mögött kell lenniük, az alkalmazott pipetták, szemcseppentők, szívószálak (vagy egyéb eszközök) – ha a szeme elé kerülhetnek – teljesen egyformák legyenek.

Ha valaki folyamatosan az ízérés hiányáról számol be, az 1-es jelű (tömény) oldatig juthatunk, de nem-érzőnek tekinti az e vizsgálattal foglalkozó szerzők többsége már azt is, aki a 2-es (2^{-1} -szeres töménységű) oldatnál jelez ízérzést, mondván, hogy itt nem valódi érzésről, hanem a tömény oldat közvetlen kémiai hatásáról van szó. A töményebb PTC-oldat csíp is, ezt ízérzetnek vélheti a páciens. (Sokan a 2^{-2} -szeres töménységnél is kétlík a jelzett ízérés valódiságát.)

A fentiek elvégzése után – különösen, ha az eredmény negatív – tájékozódni szoktak a vizsgált általános ízérzőképességéről is, édes, savanyú, sós és keserű (természetesen nem feniltiokarbamid!) anyagok megízleltetésével. Ismeretes ugyanis az általános ízvakság, mely esetben az egyén semmiféle ízt sem érez, így a PTC-ét sem, az ilyen ember azonban nem sorolható a PTC-t nem érzők közé, hiszen akár homozigóta domináns is lehet ebben a vonatkozásban, de – a génkölcönhatások körébe utalható jelenség (szupplementer génhatás) miatt – ez a genotípusa nem jut érvényre a fenotípusában.

Tanulságos a gyakorlaton annak megfigyelése, hogy az ízérzőképesség milyen tág érzékenységi határok között szóródik. A többség a vizsgálati sor

7.-10. tagja között jelzi a keserű ízt, ritka, aki már a 11.-nél, néhányan pedig csak a 6. vagy 5.-nél. Semmilyen összefüggés nincs az érzékenységbeli különbségek és a – valószínűsíthető – genotípusok között. A biztosan heterozigóták csoportjában (érezőknek nem érzőkkel kötött házasságából született ízérzők) is megvan a szóródás, azaz a genotípus expresszivitása a különböző egyéneknél más és más lehet. (Ennek okai nyilvánvalóan a génikus környezet eltéréseiben rejtezhetnek.) Egy ember élete során nem mutat jelentős ingadozást az érzékenység, sőt, akár stabilnak is tekinthető, ha eltekintünk a különböző időpontokban használt vizsgálati oldatok esetleges töménységi pontatlanságaitól, vagy a használt vegyszer szennyezettségének lehetőségétől.

Mivel a PTC-ízérzést egyetlen génpár örökíti, alkalmas génfrekvencia vizsgálatok végzésére. Ízérzők a homozigóta dominánsok és a heterozigóták, nem-érzők a homozigóta recesszívek. (Nincsenek pontos adataink arra nézve, hogy milyen egyéb kémiai anyagokra terjed ki az érzékenység. A feniltiokarbamid nem természetes anyag. Néhány, úgyszintén mesterséges struktúranalógiáról kimutatták a hasonló viselkedést, de a természetes keserű anyagok nem ebbe a körbe tartoznak.) Igaz, az emberi populációkra – mint minden más reális populációra sem – nem érvényesek az ideális populáció kritériumai, melyek előfeltételei a populációgenetikában tárgyalt összefüggések és törvényszerűségek érvényességének. De – mai tudásunk szerint – sem az ízérzőképesség, sem annak a hiánya semiféle szelekciós előnnyel vagy hátránnyal sem jár, a párválasztásban sem játszik szerepet, így ebben a vonatkozásban az emberi népesség elég jól megközelíti az ideális populáció feltételeit.

L.H. Snyder vizsgálta nagyobb, 3643 személyt magában foglaló mintán a PTC ízérzést. 70,2% volt érző, 29,8% nem-érző. Mivel ez utóbbiak a homozigóta recesszívek, arányuk, $q^2 = 0,298$. Innen: $q = 0,546$, ami a recesszív gén gyakorisága a Snyder által vizsgált populációban. Mivel $p + q = 1$, tehát $p = 1 - q$, innen $p = 0,454$ a domináns gén gyakorisága. Figyeljük meg: a recesszív gén előfordulási aránya a populációban nagyobb, mégis a domináns fenotípus a gyakoribb!

Jelöljük a domináns allélt T -vel, a recesszívet t -vel! Ennek megfelelően $P(TT) = p^2$, $P(Tt) = 2pq$ és $P(tt) = q^2$. Vizsgáljuk meg, hogy a valóságban talált értékek mennyire felelnek meg az elméleti eloszlásnak! Snyder eredményeit ugyanis táblázatos formában is rendelkezésünkre állnak:

Házasság típusa	Családok száma	Utódok száma		Nem-érzők aránya
		Érző	Nem-érző	
Érző x érző	425	929	130	0.122
Érző x nem-érző	289	483	278	0.365
Nem-érző x nem-érző	86	5	218	0.978

Milyen arányban várhatók elméletileg nem-érző (azaz homozigóta recesszív) utódok az érzők egymás között kötött házasságaiból?

A házasság típusa	A házasság valószínűsége	Az utódok genotípusa és valószínűsége		
		TT	Tt	tt
	$P(TT \times TT) = p^2 \cdot p^2 = p^4$	p^4		
	$P(TT \times Tt) = p^2 \cdot 2pq = 2p^3q$	p^3q	$+ p^3q$	
	$P(Tt \times TT) = 2pq \cdot p^2 = 2p^3q$	p^3q	$+ p^3q$	
	$P(Tt \times Tt) = 2pq \cdot 2pq = 4p^2q^2$	p^2q^2	$+ 2p^2q^2$	$+ p^2q^2$

Az ilyen típusú házasságok valószínűsége: $p^4 + 4p^3q + 4p^2q^2$. A homozigóta recesszív utódok valószínűsége: p^2q^2 .

A homozigóta recesszívek aránya:

$$\frac{p^2q^2}{p^4 + 4p^3q + 4p^2q^2} = \frac{q^2}{p^2 + 4pq + 4q^2} = \text{(Itt vegyük észre, hogy a nevezőben } p + 2q \text{ négyzete van.)}$$

$$= \left(\frac{q}{p+2q} \right)^2 = \left(\frac{q}{1-q+2q} \right)^2 = \left(\frac{q}{1+q} \right)^2 \quad (p=1-q)$$

Ezt behelyettesítve q értékével 0,124-et kapunk, ami meglepően jól egyezik a talált 0,122-vel.

Nézzük meg azt, hogy az érzők és nem-érzők között kötött házasságokból elméletileg milyen arányban várhatók nem érző utódok.

A házasság típusa	A házasság valószínűsége	Az utódok genotípusa és valószínűsége	
		Tt	tt
$P(TT \times tt) = p^2 \cdot q^2 = p^2 q^2$		$p^2 q^2$	
$P(Tt \times tt) = 2pq \cdot q^2 = 2pq^3$		pq^3	+ pq^3
$P(tt \times TT) = q^2 \cdot p^2 = p^2 q^2$		$p^2 q^2$	
$P(tt \times Tt) = q^2 \cdot 2pq = 2pq^3$		pq^3	+ pq^3

Ezen típusú házasságok valószínűsége: $2p^2q^2 + 4pq^3$. Az ilyen házasságokból származó homozigóta recesszívok aránya:

$$\frac{2pq^3}{2p^2q^2 + 4pq^3} = \frac{pq^3}{p^2q^2 + 2pq^3} = \frac{pq}{p^2 + 2pq} = \frac{q}{p + 2q} = \frac{q}{1 - q + 2q} = \frac{q}{1 + q}$$

Ide behelyettesítve a q értékét az eredmény 0,353, ami még jól egyezik a valóságban talált 0,365-ös értékkel.

Az egyetlen lényeges eltérés a valóság és elmélet között a nem-érzők egymás közötti házasságainál található: ha mindkét szülő homozigóta recesszív, akkor frigyükből csakis nem-érző gyermekek szülehetnek. Ezzel szemben a 86 házaspárból álló csoportban a 223 gyermek közül 5 PTC ízézőnek bizonyult. Tanulságos a lehetséges okok megfontolása.¹⁰ (1) Láttuk az eljárás kivitelezéséről írott részben, hogy van valamelyes bizonytalanság a

¹⁰ A rendelkezésre álló forrásból sajnos nem derül ki, hogy az öt PTC-ízéző gyermek hány családból származott a vizsgált mintában és mennyi idős volt. A lehetséges okok megvilágításában ez nem elhanyagolható szempont lenne.

besorolásban. Előfordulhat, hogy egy vizsgált személy a kétszeres hígítású oldatot keserűnek jelezte, de ezt nem tekintették valódi ízésnek. (2) Különösen nehéz az ízés megítélése igen kicsiny gyermekek és csecsemők esetén. Náluk a nyelvgyökre szokták cseppenteni a PTC-oldatot, s a tiltakozásból, fintorokból, felsírásból, esetleg öklendezésből következtetnek annak kellemetlen ízű voltára. Ez azonban nem bizonyítéka a keserű íz érzésének, öklendezhet egy gyermek a nyelv hátsó részének (és alkalmasint a garatnak) az ingerlése miatt is. (3) Egyes esetekben kérdéses lehet az apaság is: előfordulhat, hogy az ízésért felelős domináns allél nem a törvényes apától származik.

A számított és ténylegesen kapott értékek ismertetett igen jó egyezése egyúttal bizonyíték arra, hogy a tulajdonság öröklődéséért egy génpár (egy lokusz kétféle allélja) a felelős. Több olyan emberi öröklődő jelleget ismerünk, amelyről az itt leírtakhoz hasonló vizsgálatokkal és gondolatmenettel bizonyították, hogy egy lokusz alléljai alakítják ki.

A feniltiokarbamid-ízérzésnek egyébként különösebb gyakorlati jelentősége nincs. Egyes szerzők felhívták a figyelmet arra, hogy bizonyos pajzsmirigy-megbetegedések gyakorisága eltérő volt az érzők és nem-érzők között, ez azonban nem nyert bizonyítást bármiféle oki összefüggés lehetsége szintjén. Egy időben használták a PTC ízés vizsgálatát apasági keresetek elbírálásában, mint több közül az egyik örökletes bélyeget. Elméletileg csakúgy, mint Snyder bemutatott adatai alapján nyilvánvaló, hogy ennek eredményét csak bizonyos kombinációk esetén vehette figyelembe a bíróság, az esetek többségében nem. Amióta sokkal objektívebb és egyéni azonosítást lehetővé tevő fenotípusos bélyegek meghatározása vált lehetővé (HLA rendszer, DNS fingerprinting, stb.), ez a megközelítési mód kikerült az igazságügyi orvostani gyakorlatból.

Akár a PTC-ízérzést, akár valamilyen egyéb öröklődő jelleget vizsgálunk a populációban, sohasem szabad elfeledkeznünk arról, hogy megbízható statisztikai kiértékelésre csak kellően nagy egyedszámú minta alkalmas. Optimális az lenne, ha egy adott populáció minden egyes tagját tesztelni tudnánk, ez azonban általában lehetetlen. Mint említettük, Snyder vizsgálatait 3643 személyen végezte. Ez az egyedszám elég nagy volt ahhoz, hogy az elméleti és a valóságban kapott értékeket összehasonlíthattuk. Elegendőnek tűnik egy ilyen nagyságú minta egy (közepes nagyságú) város, esetleg egy megye népessége génfrekvenciájának meghatározásához is (eltekintve itt most attól a kérdéstől, hogy mennyiben tekinthető ez a sokaság valóban egy populációnak). Súlyos hiba volna azonban, ha pl. azt állítanánk, hogy az idézett felmérés alapján az Amerikai Egyesült Államokban (Snyder ott dolgozott) a PTC-ízérzésért felelős domináns allél gyakorisága 0,454.

Sohase felejtük el azt sem, hogy — összehasonlítva a velük együtt élő többségi népességben meghatározott adatokkal — bizonyos kisebb csoportokban, amelyek valamilyen etnikai, vallási, stb. közösséghez tartoznak, jelentősen eltérő géngyakoriságok találhatóak! Ennek a ténynek a genetikai epidemiológiában rendkívül nagy jelentősége van.

GENETIKAI PROBLÉMÁK II. (POPULÁCIÓGENETIKA)

1.) A cysticus fibrosis (muscoviscidosis) recesszíven öröklődő betegség. Angol adatok szerint gyakorisága 1:2000. Vajon hány heterozigóta hordozója van e betegség génjének Nagy-Britanniában, ha az ország bennszülött lakosságát egy popu-lációnak tekintjük és számát 50 millióra kerekítjük?

2.) Mekkora valószínűséggel születhet egy Rh-pozitív férfi és Rh-negatív nő házasságából Rh-negatív gyermek? (Európában az Rh-negativitás gyakoriságát 16%-ra kerekítjük.)

3.) Egy populációban a férfiak 60 %-a $Xg(a^+)$ vércsoportú. Ez a vércsoport domináns jelleg, szemben az $Xg(a^-)$ -val, ami recesszív. Ha $Xg(a^-)$ apák és $Xg(a^+)$ anyák házasságából származó gyermekeket vizsgálunk az adott populációban, a fiúk ill. a lányok hány százaléka lesz várhatóan $Xg(a^-)$?

4.) A "színavakság" X-hez kötött recesszív jelleg. Alapjában véve a kifejezés helytelen, mert a teljes színavakság igen ritka, a "színavakok" tulajdonképpen szintévesztők (csökkent színérzékenység egy alapszínre: protanómia esetén vörösre, deuteranómiában zöldre), ill. egy színre érzéketlenek (protanopia = vörös-vakság, deuteranopia = zöld-vakság).

a.) Európában a férfiak kb. 8 %-a "színavak". Ezen érték alapján milyen gyakorisággal várhatunk "színavak" nőket földrészünkön?

b.) A tényleges érték nem azonos a most számítottal, hanem kb. 0,4 %. Megmagyarázható-e ez azzal a ténnyel, hogy a protanop és protanomal férfiak gyakorisága 0,02, a deuteranopok és deuteranomáloké 0,06?

5.) A Tay-Sachs betegség (idiotia amaurotica infantilis) recesszív öröklődésű (I. Genetika jegyzet 229-230.o.). Gyakorisága az Egyesült Államokban az askenázik között 1:5000, a nem-askenázik esetén 1:500 000. Mekkora a recesszív gén gyakorisága az askenázi és a nem-askenázi népességben?

6.) Az előző példában említett askenázi populációba tartozó két egyén kíván egymással házasságot kötni, akik nem rokonai egymásnak. Mekkora a valószínűsége, hogy Tay-Sachs betegségben szenvedő gyermekük szülessen, ha

a) egyikük rokonságában sem fordult még elő ez a kórkép

b) egyikük testvére ebben a betegségben halt meg?

c) mindkettőjüknek 2-2 testvére szenvedett Tay-Sachs kórban?

7.) Ha a 6. kérdésben felsorolt a), b) ill. c) esettel kerülne szembe mint gyakorló orvos, mi volna az állásfoglalása, tanácsa?

8.) San Franciscóban 4028 feketebőrű vizsgálata során 351-ben találtak sarlósejtes jelleget. Ha elfogadjuk, hogy valós populáció reális adatával állunk szemben, mekkorára tehetjük az "S-hemoglobin gén" gyakoriságát San Francisco feketebőrű népességében, és milyen gyakorisággal születhetnek sarlósejtes vérszegénységben szenvedő csecsemők ebben a populációban?

9.) Egy rozsföldön minden húszezredik növény albinó a recesszív a alléllal való homozigótáság miatt. Ha egyensúlyi populációról van szó, mekkora a recesszív allél, ill. a heterozigóta növények gyakorisága?

10.) Egy véletlenszerűen párosodó populációban $p=0,9929$ és $q=0,0071$. Mójában áll a heterozigóták számának meghatározása: 20000-ből 400. Egyensúlyban van-e ez a populáció? Mennyinek kellene lennie a heterozigóták számának a genetikai egyensúly állapotában?

11.) Egy populáció reprezentatív mintájában a következő genotípusarányokat találták: 210 AA : 50 Aa : 20 aa. Adja meg az A és a allélok gyakoriságát! Egyensúlyban van-e a populáció?

12.) Az A allél $p= 0,6$, mutációs rátája $u= 0,0004$. Ha ez az egyensúlyi gyakoriság, melyet visszamutálás tart fenn, ez utóbbinak mennyi a gyakorisága?

13.) Egy recesszív letális allél gyakorisága 0,0001. Mekkora ennek a várható gyakorisága az 500. nemzedék után, ha sem mutáció, sem migráció nem történik?

14.) Hány nemzedék szükséges ahhoz, hogy egy recesszív letális gén gyakorisága kizárólag a szelekció révén 0,0001-ről 0,00001-re csökkenjen?

AZ INDUKÁLT ENZIMSZINTÉZIS VIZSGÁLATA

A környezethez való minél jobb alkalmazkodásban különféle stratégiákat és ezeken belül számos mechanizmust használ az élővilág. Prokarióta sejtek anyagcsere-szabályozásának két alapvető mechanizmusa ismert: a gén- és az enzim-szinten történő reguláció. Az előbbi a transzkripció szabályozását jelenti. Mivel a frissen szintetizálódó mRNS-hez még annak elkészülte előtt kapcsolódnak a riboszómák, a génikus információ átírása és a transláció szorosan és mechanikusan kapcsoltnak tekinthető. Számos esetben egy-egy enzim mennyiségének meghatározásával állítja be – indítja meg vagy állítja le – a prokarióta sejt valamelyik anyagcsereút aktivitását, ahol ennek működésére nincs állandóan szükség. Ezt leggazdaságosabban az illető enzim mRNS-e szintézisének szabályozásával éri el: csak szükség esetén termel nemcsak egy fehérjét, hanem az annak információját hordozó RNS-t is. Ez a típusú szabályozási képesség nyilván előnyt jelentett a törzsejlődésben.

További evolúciós eredménynek (és nyereségnek) tekinthetjük azt a jelenséget, hogy az egy metabolikus úthoz tartozó (azt megvalósító) enzimek közös szabályozás alatt állnak, aminek fizikai egysége az operon (ritkábban, a genomban „lazább” elrendeződésű, funkcionális változatában: a regulon). Az operonális szabályozás elvét *Escherichia coli*-ban fedezte fel Jacob és Monod, a tejcukor (laktóz) hasznosításában szereplő enzimek szintézisének tanulmányozása nyomán. Ezek (β -galaktozidáz, galaktozid permeáz és tiogalaktozid transzacetiláz) génikus információja a *lac* operon három struktúrgénjében (*Z*, *Y* és *A*) található, amelyek transzkripciója a *lac P* génről indul, ha a *lac O*-hoz nem kapcsolódik a *lac I* által meghatározott represszor fehérje, és ugyanakkor kellő mennyiségben jelen van aktív katabolit aktivátor protein (CAP). Az operonról egyetlen policisztronális mRNS-t ír át az RNS polimeráz, amiről a translációban a három említett, különféle fehérje szintetizálódik. Ezekre az enzimekre – értelemszerűen – abban az esetben van szüksége az *E. coli* sejtnek, ha a környezetében megjelenik a tejcukor, ami természetes élőhelyén csak akkor fordul elő, amikor a gazdaszervezet (édes) tejet fogyaszt.

Alaphelyzetben a *lac* operon represszált állapotban van: nem történik rajta transzkripció. A laktóz megjelenése a sejt környezetében, és bejutása a

citoplazmába — megfelelő feltételek fennállása esetén — indukálja a β -galaktozidáz (és a két másik) enzim szintézisét. (Az együttes indukció alapja az egyetlen közös mRNS.) Alapvetően a következő mechanizmus révén valósul meg a jelenség: A *lac* represszor allosztérikus fehérje, amely csak addig képes a operátor génhez kapcsolódni és ezáltal a *lac* operon transzkripcióját gátolni, amíg hozzá egy kis molekulájú ligand (egy effektor): az induktor nem kapcsolódik. Fiziológias körülmények között ez a molekula a tejcukorból átalakuló allo-laktóz. Ismeretesek azonban mesterséges induktorok is, amelyek előnye, hogy a sejt nem metabolizálja őket. Ilyen pl. az IPTG (izopropil- β -D-tiogalaktozid), ami 5×10^{-4} moláris végkoncentrációban maximális indukáló hatást fejt ki. Kísérletünkben ezt használjuk.

Fiziológias körülmények között csakúgy mint tenyészetben a tejcukrot az *E. coli* szén- és energiaforrásként hasznosítja. A β -galaktozidáz ezt a diszaharidot glükózra és galaktózra hasítja. Aktivitásának kimutatása kísérletes vizsgálatokban azon alapszik, hogy nem csak a laktózt, hanem egy mesterséges szubsztrátot, az ONPG-t (o-nitrofenil- β -D-galaktopiranozid) is képes bontani. Ebből a színtelen vegyületből a galaktóz lehasításával o-nitrofenol szabadul fel, ami sárga. Ennek a színnek az intenzitása a 420 nm-en mért fényelnyeléssel adható meg, és ez — bizonyos határok között — egyenesen arányos az elbontott ONPG molekulák számával, ami pedig (megfelelő időegységre számítva) az enzim aktivitásával. Standard körülmények között az aktivitás az enzimmolekulák számával arányos, ebből következően kísérletesen a termelt enzim mennyiségét az E_{420} értékkel jellemezhetjük. (Az operonhoz tartozó másik két enzim meghatározása nehézkesebb feladat, a galaktozid permeáz aktivitásának kimutatására indirekt módszert alkalmazunk a permeabilitás vizsgálatát célzó gyakorlaton.)

Ismeretes, hogy a szőlőcukor metabolizmusát (glikolízis, citrátkör, terminális oxidáció), mint a disszimilációban alapvetően legfontosabb energianyerő bontó (katabolikus) folyamatot az *E. coli*-ban konstitutív enzimek viszik végbe. Ezek folyamatosan és magas aktivitással található meg a sejtben. Minden egyéb szénhidrát hasznosítása ebbe a metabolikus útba torkollik bele, ami azt is jelenti, hogy ezek felvétele és bontása csak akkor lehet gazdaságos a sejt számára, ha glükóz nem áll rendelkezésére. Ugyanis az olyan enzimek szintézise, amelyek az egyéb szénhidrátok felvételéhez és a glikolitikus folyamatba csatornázásához szükségesek, plusz energiát és anyagot (aminosavakat) igényel, míg az alapot jelentő enzimpláncrea mindenképpen szükség van. Így érthetővé válik, hogy a transzkripció szabályozás szintjén egy olyan mechanizmus is kifejlődött, ami a glükóz abszolút elsőségét biztosítja bármilyen egyéb szénhidráttal szemben. Ez a katabolit represszió jelensége, amely pl. a *lac* operon esetén

annak indukált állapotában is lehetetlenné teszi transzkripcióját (ugyanúgy, ahogyan bármilyen egyéb katabolikus operonét is). Megfelelő koncentrációjú glükóznak a környezetben való jelenléte és ennek nyomán felvétele az *E. coli* sejtbe lecsökkenti az adenilát cikláz aktivitását (l. a permeabilitási gyakorlatnál, Biológiai gyakorlatok II. 45-46. o.). Ez az intracelluláris cAMP koncentráció rendkívül alacsony szintjéhez vezet. Mivel a katabolikus operonok promotor génjén történő transzkripció iniciáláshoz (és ennek megfelelő frekvenciával való fenntartásához) szükséges a CAP kötődése, amely allosztérikus protein csak cAMP kapcsolódása után képes hatásának kifejtésére, a glükóz az összes katabolikus operon transzkripcióját egyidejűleg represszálja az iniciálásra kifejtett pozitív hatás elmaradása révén.

Enzimindukációs kísérlethez a gyakorlaton *E. coli* K12 vad típusú sejteket használunk (exponenciális növekedési fázisban). A hallgatóság a munka kezdetére kapja kézhez a tenyészetet, valamint az IPTG-t a kívánt mennyiségben tartalmazó lombikot (jelzése: I). A *lac* operon indukciója úgy történik, hogy az induktor oldatát tartalmazó lombikba 20,0 ml baktérium-szuspenziót mérünk be. Ez a kísérlet 0. perce, ekkor indítjuk el a stopperórát. Egy erőteljes összerázás után mintát veszünk, majd a lombikot behelyezzük a 37°C-os vízfürdőbe, amely rázóberendezéssel van ellátva, és a rázatást azonnal elindítjuk. Mintavételekkel győződünk meg a β -galaktozidáz szintézis előrehaladásáról és ennek üteméről. A kísérlet 10. percében 5,0 - 5,0 ml-nyi indukált tenyészetet mérünk át két másik lombikba, amelyek közül az egyik glükózt (jelzés: G), a másik chloram-phenicolt (jelzés: C) tartalmaz. Folytatjuk a rázatást, és a továbbiakban ebből a két lombikból is veszünk mintákat, az alábbi táblázat szerint. Az átmérések és a mintavételek idejére (de csak arra, a lehető legrövidebb megszakítással) a rázatást leállítjuk, egyébként folyamatosan fenntartjuk.

A maradék *E. coli* tenyészetből 5,0 ml-t egy olyan lombikba öntünk, amelyik nem tartalmaz induktort, és ezt is behelyezzük a vízfürdős rázóba a kísérlet 0. percében. Ez az indukátlan kontroll (jelzése pl.: 0). Ebből csak a rázatás végén veszünk mintát.

Glükóz hozzáadásával a katabolit repressziót demonstráljuk, a chloramphenicolos tenyészetben pedig ezen antibiotikum fehérjeszintézist felfüggesztő hatását mutatjuk ki.

A kísérlethez széles szájú lombikokat használunk, amelyekben a tenyészeteket 37 °C-os vízfürdőben rázatjuk. Mivel az *E.coli* az emberi bélflóra tagja, számára optimális a 37 °C. Megfelelő oxigénellátásra van szükségük a sejteknek ahhoz, hogy anyagcseréjük a kísérlet szempontjából kielégítő legyen, ezt a célt szolgálja a nyitott lombik és a rázatás.

0,5 ml-s mintákat veszünk (az alábbiak szerint) olyan kémcsövekbe, amelyeket előzőleg megfelelően megjelöltünk, s amelyekbe 0,1-0,1 ml CTAB/chloramphenicol oldatot előre bemértünk. Figyeljünk arra, hogy a baktériumszuszpenziót azonnal és alaposan keverjük el az oldattal! Az utóbbi vegyület prokarióta (típusú) riboszómákon a transláció folyamatában az elongációt gátolja. Azaz hatására egy polipeptidlánc szintézise azonnal leáll, mielőtt ez az antibiotikum bejut a sejtbe és ott a megfelelő koncentrációt eléri. Ez néhány másodperc alatt megtörténik. Így a mintavétel pillanatában gátolva a további enzimszintézist, a β -galaktozidáz aktivitás, vagyis az enzim mennyiségének aktuális szintjét határozhatjuk meg a tenyészetben úgy, hogy lehetőséget kapjunk a rázatás befejezéséig a minták összegyűjtésére, és együttes további feldolgozására. (A β -galaktozidáz elég stabil enzim ahhoz, hogy a közben szükségszerű várakozás ideje alatt még szobahőn se lépjen fel említésre méltó veszteség.) A CTAB (cetil-trimetil-ammoniumbromid) hatása a permeabilitást vizsgáló gyakorlatról ismert (Biológiai gyakorlatok II. 41. o). Mint detergens a sejtmembrán lipid kettősrétegének feloldásával az ONPG szabad, bármilyen permeabilitási barriertől független beáramlását teszi lehetővé a sejtekbe, azaz biztosítja, hogy a reakcióban kifejlődő színintenzitás valóban a β -galaktozidáz aktivitással legyen egyenesen arányos.

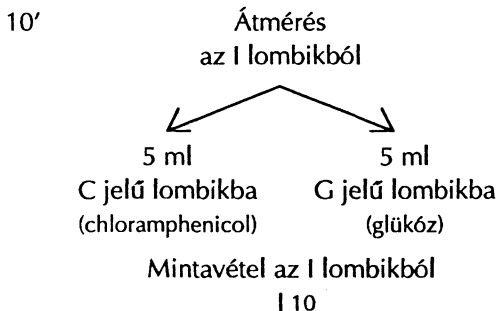
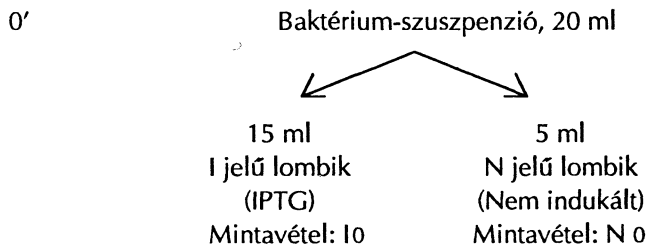
A kísérlet itt következő mintavételi tervéhez előljáróban a következő megjegyzéseket kell fűznünk. Párhuzamos minták vétele nagy mértékben megnöveli az eredmények megbízhatóságát. Több tényező akadályozza, hogy megfelelő számú próbát vegyünk, mindenképpen törekednünk kell azonban arra, hogy legalább két-két párhuzamost nyerjünk minden időpontban. Fizikailag lehetetlen, hogy ez pontosan abban a pillanatban történjék meg, amit az alábbi séma diktál, ám mivel az enzimindukció kinetikájára vagyunk kíváncsiak, amit a megfelelő görbéről olvasunk le, nem az a fontos, hogy egy előre eltervezett időpontban másodpercnyi pontossággal vegyünk mintát, hanem sokkal inkább az, hogy a mintavétel tényleges időpontját rögzítsük, és az ehhez tartozó enzimaktivitási értéket a grafikonon valóban az aktuális pillanathoz tartozóan ábrázoljuk. Ugyanez a megfontolás érvényes az átmérések időpontjára is.

A β -galaktozidáz aktivitás mérése.

Valamennyi mintát 37 °C-os vízfürdőbe állítjuk, majd 0,5-0,5 ml ONPG oldat hozzáadása után 10 percig inkubáljuk. A reakciót 1,0 ml (1 mólos) Na_2CO_3 oldat hozzáadásával állítjuk le. A színintenzitást 420 nm hullámhossznál mérjük spektrofotométerben, vak ellen, és az extinkció (abszorbancia) értékeket olvassuk le.

3. Táblázat: A kísérlet menete

Idő



15' Mintavétel I, C és G jelű lombikokból
I15, C15, G15

20' Mintavétel I, C és G jelű lombikokból
I20, C20, G20

25' Mintavétel I, C, G és N jelű lombikokból
I25, C25, G25, N25

A mintavételek között rázatással biztosítjuk a baktériumtenyészet megfelelő levegőztetését. Összesen 13 mintánk lesz, párhuzamosok vétele esetén 26. N0 minta vétele esetleg elhagyható, mivel várhatóan azonos lesz I0-lal. Ne feledkezzünk meg a vakhoz történő mintavételről, ezt a rázás kezdetén ajánlatos megtenni.

A 10 perces inkubációs idő csak tájékoztató adat, ez a tenyészet sűrűségétől és egyéb tényezőktől függően általában 5 és 15 perc között változhat. Rendkívül fontos viszont, hogy valamennyi minta inkubációs ideje pontosan azonos legyen. Ezt úgy érzük el, hogy az ONPG bemérése meghatározott sorrendben és időközrel (pl. 15 másodpercenként) történik, a nátrium-karbonáttal való leállítást ugyanezt a sorrendet és intervallum-időt követi. Hogy aktuálisan mennyi a kívánatos inkubációs idő, az egyszerűbben úgy állapítható meg, ha a sor elejére az I25 és I10 mintákat állítjuk. Az elsőnél várjuk a legerősebb színintenzitást: ez ne legyen mérhetetlenül nagy. Az utóbbi annak az időpontnak felel meg, amelyben az átmérések történtek, innen vált szét az indukált tenyészet részeinek sorsa: legyen ennek a színintenzitása már szabad szemmel megítélve is jól mérhető érték.

Még a fotometriás mérés előtt, egyszerű megtekintéssel igyekezzünk meggyőződni a kísérlet sikerességéről. Érdemi sárgulást az indukált tenyészetből a 0. percben vett I0 mintában nem észlelünk: ez bizonyítja, hogy nem maga az IPTG hozza létre a színt. Az idő előrehaladtának megfelelően az indukált tenyészetből vett mintasor egyre intenzívebb sárga színt mutat. Ugyanakkor a glükózt ill. chloramphenicolt kapott tenyészetekben az indukált enzimszintézis szemlátomást leáll, nincs észlelhető különbség a 15. és a 25. percben vett minták sárga színének erőssége között. A nem indukált tenyészetből a 25. percben vett minta ugyanolyan negatív kell legyen, mint az indukció 0. percéből származó próba, azaz nem a meghatározott körülmények között történő rázatás vonja maga után az enzimindukciót.

Mivel a fotométer küvettájába nem víztiszta oldatot, hanem zavaros szuszpenziót teszünk, a detektorra jutó fény mennyiségét nemcsak a sárga szín erőssége, hanem a baktériumok által okozott fényszóródás is befolyásolja, csökkenti. Ezért rendkívül fontos a megfelelő „vak” ellen történő mérés, ami ezt a hatást kiküszöböli. Ebbe mindazokat a komponenseket összemérjük, amelyek a mintákban szerepelnek (0,1 ml CTAB/chloramphenicol + 0,5 ml *E. coli* szuszpenzió + 1,0 ml Na_2CO_3 + 0,5 ml ONPG), de az enzim bontó hatásának érvényesülését megelőzzük a nátrium-karbonát és az ONPG fordított sorrendű beméréseivel. Erre a vak-ra nullázunk a fotométert (ennek a fényátbocsátását 100%-nak, extinkcióját [E] 0-nak véve), majd mérjük ellene a mintákat. (Ha a tenyészet túl sűrű, előfordulhat, hogy a vakra nullázás nem sikerül. Ilyen esetben ezt is, a mintákat is desztillált víz ellen mérjük le, s mindegyik minta E_{420} mért adatából levonjuk a vak értékét. — A vak elleni méréssel is tulajdonképpen

ezt a levonást végezzük el, sokkal kényelmesebben.)

A párhuzamos minták mérési adatait — ha megbízhatóaknak vélhetők, azaz nem térnek el egymástól túlságosan — átlagoljuk és így tüntetjük fel a grafikonon, a levélteli időpontok középértékének megfelelően.

Milliméterpapírra rajzoljuk meg az enzimindukció kinetikai görbéjét! Az abszcisszán az idő, az ordinátán a 420 nm-en mért extinkció, az E_{420} szerepeljen!

Figyeljük meg, hogy a görbe úgy illeszthető legjobban a kapott pontokhoz, ha feltételezzük, hogy a sejtenkénti enzimmennyiség csak egy bizonyos késlekedési idő után kezd el emelkedni, mígnem az enzimszintézis üteme — először lassabban majd egyre gyorsabban növekedve — a későbbiekben elér egy maximális szintet, s ettől kezdve (közel) egyenletessé (a görbe egyenessé) válik.

(A kezdeti történéseket nagy pontossággal vizsgáló kísérletekben az említett késlekedés okaként egyrészt azt állapíthatták meg, hogy az induktor molekuláknak a sejtbe jutása és ott a megfelelő koncentráció elérése időigényes, ha nem is jelentősebb hosszúságú folyamat [1 percen belül lezajlik], másrészt a transzkripció megindulása és az első [négy, egymással azonos alegységből álló] aktív β -galaktozidáz enzimmolekulák megjelenése között kell szükségszerűen bizonyos időigénnyel számolnunk. Mindez nagyjából azt jelenti, hogy az enzimaktivitás a kísérlet 2. percétől kezd el növekedni, s a hozzávetőlegesen egyenletes, az adott körülmények között maximális ütemét legkorábban az 5. percetől veszi fel.)

Úgy tekinthetjük az indukált enzimszintézis előrehaladását, hogy az a kísérlet 10. percére már elérte az adott körülmények között lehetséges maximumát. Így az abban előidézett gátlás megnyilvánulása jól érzékelhetőnek várható a 10. percben adott glükóz ill. chloramphenicol hatására. A szőlőcukor — a fentiekben ismertetett mechanizmus szerint — a transzkripció iniciálását szünteti meg (az alkalmazott feltételek mellett helyesebb, ha azt mondjuk, hogy jelentős mértékben csökkenti). Mindazon RNS polimeráz molekulák azonban, amelyek már mRNS-t szintetizálnak a *lac* operonon, ezt befejezhetik, a meglévő *lac* mRNS-ről a transláció tovább folyhat mindaddig, amíg ezek a molekulák — néhány perc alatt — le nem bomlanak. (A *lac* mRNS felezési ideje mintegy 1,5 perc.) Ennek megfelelően a glükóz hatására az indukció korai kinetikájának mintegy a megfordítottja jelentkezik a görbén: az enzimszintézis üteme egyre csökken. (A kísérlet adott körülményei között a teljes gátlás, a görbe vízszintesbe fordulása nem várható el, elméletileg ennek kellene bekövetkeznie.)

A chloramphenicol hatása gyakorlatilag azonnali. Ott állítja le a polipeptid lánc elongációját, ahol az éppen tart. Ennek megfelelően az ezzel

az antibiotikummal kezelt tenyészetben a β -galaktozidáz szintézise azonnal leáll, az ezt ábrázoló görbe vízszintes (az abszcisszával párhuzamos) lefutásúvá válik. (Mint említettük, ezt a hatást használjuk ki a mintavétel során nyert sejtszuszpenzióban az adott pillanatnak megfelelő enzimszint rögzítésére.)

KOMPLEMENTÁCIÓS TESZT ÉLESZTŐVEL

A *Saccharomyces cerevisiae* (élesztő) genetikailag igen jól jellemzett eukarióta mikroorganizmus. Haploid sejtjei 17 kromoszómát tartalmaznak, melyek mindegyikén sok genetikai lokuszt ismerünk. Az élesztő genetikai vizsgálatát az tette lehetővé, hogy életciklusának szexuális szakasza is van. Ez azt jelenti, hogy a haploid sejteknek kétféle "párosodási típusú" (nemű) formája van: \underline{a} és α .

Az ellentétes párosodási típusú sejtek képesek egymással összeolvadni, így létrejön egy diploid zigóta. A zigóták mitotikusan osztódnak és diploid (vegetatív) utódokat képeznek, amelyek a haploidokkal azonos módon vegetatívan szaporodhatnak. A diploidok (káliumacetát tartalmú sporulációs táptalajon) meiózison mehetnek át, melynek eredményeképpen négy haploid spóra keletkezik egy aszkuszban. A négy aszkospórát együtt tetrádnak nevezzük. A négy spórából kettő \underline{a} , kettő pedig α párosodási típusú, amelyek ismét képesek diploid zigóták létrehozására.

Az ellentétes párosodási típusú spórákból diploidot laboratóriumi körülmények között is létrehozhatunk.

Ismert, hogy az egyes aminosavak bioszintézisét több enzimből álló enzimláncolat végzi, ahol az egyik enzim terméke a következő enzim szubsztrátja. Általában véve igaz, hogy minden enzimet más-más gén határoz meg, melyek más-más kromoszómális lokuszon helyezkednek el. Ezek az egy aminosav bioszintéziséért felelős gének tulajdonképpen egymást kiegészítő – komplementer – gének (v. pszeudoallélek).

Például egy haploid élesztő mutáns különböző HIS gének mutációja miatt lehet hisztidin-igényes. A hisztidin bioszintézise 10 lépésben történik, tehát 10 különböző enzimaktivitás játszik benne szerepet. Ezek közül egynek a kiesése már auxotrófiát (aminosav-igényes fenotípust) eredményez.

Élesztőnél létrehozhatunk diploidot bármely két haploid mutáns törzsből, melyek azonos fenotípusiak, jelen esetben hisztidin igényesek (és természetesen ellentétes "neműek"). Ha a diploid prototróffá válik (nem igényel hisztidint), akkor a diploid-képzésben használt partnerek különböző mutáns gént tartalmaznak. Ha viszont a diploid auxotróf marad, a haploid szülők azonos génben hordozzák a mutációt. Tulajdonképpen ez a komplementációs teszt lényege.

A hisztidin bioszintézisében szereplő 10 enzim-aktivitásért 7 gén felelős, ezeket HIS1, HIS2, HIS7 szimbólumokkal jelöljük. (A gének és enzimek számbeli különbségének oka: a HIS4 gén által kódolt enzim három különböző enzimaktivitással rendelkezik, egy közti lépést pedig nem

ismerünk. A HIS gének mutáns alléljeit kisbetűvel – his – jelöljük.) Ha például egy α , his4 és egy a , his3 genotípusú élesztőből diploidot képezünk, az prototróf lesz, hiszen lesz benne egy-egy intakt, ún. vad típusú allél a HIS3 és HIS4 génekből. A diploid genotípusa a következő:

$$\frac{\alpha, \text{HIS3}, \text{his4}}{a, \text{his3}, \text{HIS4}}$$

A leírt jelenséget nevezzük génkomplementációnak. Ha a két szülő azonos génben mutáns, természetesen a diploid homozigóta lesz a mutáns génre és így auxotróf marad.

A komplementációs tesztnek vannak korlátai is. Nem minden esetben használható ugyanis annak megállapítására, hogy két mutáció azonos vagy különböző génben van-e. Erre példa az *intragénikus komplementáció* esete. Ez alapvetően különbözik az intergénikus komplementációtól, amin az eddigiekben leírt komplementációs teszt alapszik. Olyan enzimek esetén fordul elő, melyek két vagy több azonos polipeptidláncból épülnek fel (multimerek). Az nyilvánvaló, hogy a két vad típusú allélt tartalmazó homozigóták aktív enzimet szintetizálnak, míg a két azonos mutáns gént tartalmazó homozigóták inaktívat ("homo-multimerek"). A két különböző mutációt hordozó heterozigótákban az enzim részleges vagy teljes aktivitással rendelkezhet. E "heteromultimer"-ekben a két különböző mutáns polipeptid valamilyen módon kompenzálja egymás hibáját. Az eredmény egy funkcióképes multimer enzim.

A gyakorlat kivitelezése

A gyakorlaton elvégzendő komplementációs teszthez a következő haploid élesztő-mutánsokat használjuk fel:

Szám	Genotípus
1.	α , his1
2.	a , his2
3.	α , his3
3/a.	a , his3
4.	a , his4
7.	α , his7

A kísérlethez egy Petri csészébe kiöntött minimál agar lemezt (táptalajt) használunk.

A szénforrásként glükózt, nitrogénforrásként $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -ot, továbbá szervesetlen sókat, nyomelemeket, vitaminokat tartalmaz.

Fordítsuk a Petri csészét aljával felfelé és rajzoljunk rá filctollal egy 3 oszlopból és 3 sorból álló "sakktablát". A három oszlop tetejére írjuk fel az α párosodási típusú törzsek számát (1, 3, 7), a három sor elejére pedig az α párosodási típusúakét (2, 3a, 4).

Vegyük az egyes törzseket tartalmazó kémcsöveket, a "ferdéket", a platinakacsal vegyünk le belőlük sejteket, és a megfelelő számú oszlop v. sor négyzetébe húzzunk egy apró vonást vele, ügyelve arra, hogy a táptalaj felszíne ne sérüljön. (A platinakacs használatát és a steril munka szabályait a gyakorlatvezető bemutatja.) Végeredményben minden négyzetben két vonásnak kell lennie egymás mellett, amelyek két különböző párosodási típusú élesztő törzsből származnak. Ezután minden négyzetbe cseppentsünk 1-1 csepp steril fiziológiás sóoldatot, és leégetett kacsal vagy steril fogpiszkálóval keverjük össze a sejteket, ügyelve arra, hogy a folyadék szomszédos négyzetre ne kerüljön át! Amíg meg nem szárad, ne mozgassuk a lemezt!

Egy héti szobahőn v. 30 °C-os termosztátban inkubáljuk a lemezeket, majd értékeliük, mely mutánsok komplementálják egymást, s melyek nem.

4. táblázat

Gén-enzim összefüggések az élesztő hisztidin-bioszintézisében

Kromoszóma száma	Gén	Enzim
V.	HIS1	ATP-foszforibozil-transzferáz
III.	HIS4B	Foszforibozil-ATP-pirofoszfohidroláz
III.	HIS4A	Foszforibozil-AMP-ciklohidroláz
IX.	HIS6	BBM-II.* izomeráz
II.	HIS7	Enzim(ek), amelyek a következő átalakítást végzik: BBM-III.** \Rightarrow imidazol-glicerol-foszfát + AICAR ***
XV.	HIS3	Imidazol-glicerol-foszfát-dehidratáz
IX.	HIS5	Hisztidinol-foszfát-aminotranszferáz
VI.	HIS2	Hisztidinol-foszfátáz
III.	HIS4C	Hisztidinol-dehidrogenáz

Az enzimek sorrendje az általuk katalizált reakciók sorrendjét tükrözi. (A táblázatot szemléltető céllal állítottuk össze.)

* BBM-II.: N-(5'-foszforibozil-formimino)-5-amino-1-(5"-foszforibozil)-4-imidazol-karboxamid

** BBM-III.: N-(5'-foszforibozil-formimino)-5-amino-1-(5"-foszforibozil)-4-imidazol-karboxamid

*** AICAR: 5-amino-imidazol-4-karboxamid ribonukleotid

ESHERICHIA COLI TRANSZFORMÁCIÓJA

A genetikai transzformáció az a folyamat, mely során a sejt külső környezetéből DNS-t vesz fel, ennek következtében genotípusa megváltozik, s az újonnan szerzett jelleget a sejt tovább örökíti. A baktériumoknál a transzformáció természetes körülmények között is végbemenő információátviteli folyamat, míg egyszerűbb és magasabbrendű eukarióta sejteket csak laboratóriumban tudunk transzformálni. A bakteriális transzformáció mechanizmusát legjobban a *Streptococcus pneumoniae* (régőbbi nevén *Pneumococcus*), a *Bacillus subtilis* és a *Haemophilus influenzae* esetében ismerjük. Az első kettő Gram-pozitív, utóbbi Gram-negatív baktérium.

A Gram-pozitívoknál a transzformációnak a következő lépéseit lehet elkülöníteni:

a/ Kompetencia-állapot kialakulása.

Ez a sejtnek azt a fiziológiai állapotát jelöli, melyben képes DNS felvételre. A kompetencia-állapot kialakulásáért egy fehérjetermészetű kompetencia-faktor felelős, melyet a sejtek kiválasztanak a közegbe. A kompetencia-faktor kölcsönhatásba lép egy membránreceptorral és lehetővé teszi, hogy a DNS felvétele megkezdődjön.

b/ A DNS megkötődése a sejt felszínén.

A kötődést követően membránhoz kötött endonukleázok belehasítanak a duplaszálú DNS-be és nagy (10-30 kb) fragmentumokra szabdalják.

c/ A DNS felvétele a sejtbe.

Ez a fázis akkor kezdődik, amikor a DNS hozzáadott külső DNáz emésztéssel szemben már rezisztenssé válik. A membránon való áthaladással egyidőben a DNS egyik szála megemésztődik.

d/ A bejutott egyszálú DNS egy specifikus fehérjéhez kötődése.

e/ A DNS integrációja a recipiens sejt kromoszómájába. A rajta levő gének expresszióra kerülése.

A transzformáló egyszálú DNS beépül a baktériumkromoszóma homológ régiójába úgy, hogy a recipiens DNS egyik szálát helyettesíti, heteroduplex képződik. Ezt a folyamatot a RecA-val ekvivalens fehérje katalizálja.

A Gram-negatív *Haemophilus influenzae* esetén az előbbtől kissé eltérő a transzformáció mechanizmusa. A kompetencia a szaporodás számára kedvezőtlen körülmények között jön létre, nem kell hozzá kompetenciafaktor. A sejtek külső membránjának bimbózásával vezikulumok alakulnak ki, melyek a DNS felvételét mediáló fehérjéket tartalmaznak. Ezek a vezikulumok a *transzformozómák*. Csak a homológ (*Haemophilus*) DNS transzformál hatásosan, mert ebben gyakran előfordul egy 11 bp-nyi jelsekvencia, amit a fehérjék felismernek. Ezért a rendszer idegen DNS-sel szemben diszkriminál. A DNS a felvétel alatt kétszálú marad, de csak az egyik szál vesz részt rekombinációban a kromoszómával.

A vázolt mechanizmusok a természetes körülmények között transzformálható baktériumoknál fejlődtek ki az evolúció során. Minden egyes lépés lebonyolításában specifikus fehérjemolekulák vesznek részt, melyek egy részét már ismerjük. Ezekben az esetekben a transzformáció azonos fajú (homológ) lineáris, kromoszómális eredetű DNS-sel történik.

Vannak olyan prokarióták is, melyek természetes körülmények között nem transzformálhatók, mint pl. az *Escherichia coli* és a *Streptomycesek*. Ahhoz, hogy ezek a prokarióták transzformálhatók legyenek, speciális kémiai és/vagy enzimatikus kezeléssel a sejthatárt permeábilissá kell tenni a DNS számára. Ilyenkor mesterségesen kialakított kompetenciáról beszélünk.

A génebézési technikák kifejlesztésében nagy szerepe volt az *E. coli* transzformáció kidolgozásának. Ennek a lényege a következő: az exponenciális növekedési fázisban levő sejteket CaCl_2 oldatban szuszpendáljuk, 0°C -on együtt inkubáljuk a transzformálni kívánt plazmid DNS-sel, rövid időre (2 perc) 42°C -ra melegítjük fel, majd szelektív táptalajra szélesztjük. (Részletesen I. alább.) A 42°C -os inkubálást hősokknak nevezzük, a DNS felvétele ennek során megy végbe.

A technikát 1970 óta használják világszerte *E. coli* sejtek antibiotikum-rezisztencia génetek hordozó plazmiddal való transzformálásra, ma enélkül a génebézés szinte elképzelhetetlen. A Ca^{++} ionok és a hősokk hatására az *E. coli* sejt felszín lipopoliszaharid rétege változásokat szenved. E változások csatornákat, pórusokat kialakulást eredményeznek, elsősorban a külső és belső membrán találkozásának megfelelő területeken. Idegen eredetű DNS felvételével szemben a rendszer nem diszkriminál, ami a klónozásban való felhasználhatóság szempontjából előny jelent.

Azon plazmidoknak, melyeket az *E. coli* transzformációjára használunk – a legfontosabb jellemzői a következők: Autonóm – a kromoszómális DNS-től független – replikációra képesek, egy vagy több antibiotikum-rezisztencia gént hordoznak. Mesterségesen konstruálták őket: replikációs origójuk (kezdőpontjuk) pl. egy colicint termelő plazmidról, az antibiotikum-rezisztencia géneik R plazmidokról származnak. Transzformáló hatásukat csak szuperhelikális, illetve relaxált cirkuláris formában képesek kifejteni, linearizálva nem transzformálnak.

A *coli* transzformáció a többi bakteriális transzformációs rendszerrel összehasonlítva tulajdonképpen speciális eset, amennyiben a bevitt plazmidok önálló replikációra képesek, ez biztosítja fennmaradásukat ill. osztódáskor az utódsejtekbe való átkerülést, s nincs szükség a kromoszómába való integrációra. Néhányszor tíz példányban vannak jelen egy sejtben, de kloramfenikollal gátolva a kromoszómális DNS replikációját a plazmidok felszaporíthatók, példányszámuk elérheti az ezret sejtenként. A transzformánsok szelekciója azon alapszik, hogy a DNS-t felvett sejtek képesek növekedni antibiotikum tartalmú táptalajon is, ahol a nem transzformált sejtek elpusztulnak.

A transzformáció gyakoriságát kétféleképpen adhatjuk meg:

a/ A transzformánsok számát osztjuk a transzformáló plazmid DNS μg -ban kifejezett mennyiségével;

b/ A transzformánsok számát osztjuk az összes élő sejt számával.

Egy μg DNS-re optimális esetben 10^6 transzformáns esik, az össz élő *E. coli* sejteknek 0,01-0,20 része, azaz 0.1-1%-a transzformálódik (a baktériumtörzstől, a plazmidtól és a kísérleti körülményektől függően).

A transzformálásra használható *E. coli* törzsek legfontosabb jellemzői:

a/ Nem termelhet olyan endonukleázt, mely a "nem saját" DNS-t felismeri és hasítja. Tehát a restriktív endonukleázt kódoló génben mutánsnak kell lennie a recipienseknek! (Ezt így jelölik: hsdR⁻.)

A restriktív-modifikációs rendszerek a prokarióta szervezetekre jellemzőek. Két különböző enzimből állnak, melyek azonos nukleotidszekvenciát ismernek fel a DNS-en. A modifikációs metiláz a felismerési szekvencia valamely bázisát metilálja. A restriktív endonukleáz ugyanezen a szakaszon a DNS mindkét szálát elhasítja, de csak akkor, ha a felismerési szekvencia nem metilált. Ennek a hasításnak az az eredménye, hogy a

behatoló idegen DNS – legyen az fág, plazmid v. kromoszómális DNS – fragmentekre hull szét (mivel általában nincs megfelelően metilálva), ezzel inaktiválódik, majd teljesen lebontják más enzimek. A sejt saját DNS-e – a metiláció miatt – védve van a nukleáz hatással szemben. Azok a restriktív endonukleázok, melyek specifikusan hasítják a DNS-t, a molekuláris biológusok fontos munkaeszközévé váltak, és lehetővé tették a génebeszeti technikák kifejlesztését.

b/ Előnyös, ha a recipiens a rekombinációs funkciókban is mutáns, mert így a bevitt plazmidok nem fognak a kromoszómális DNS-sel rekombinációba lépni. (Ez a *recA* mutáció jelentősége.)

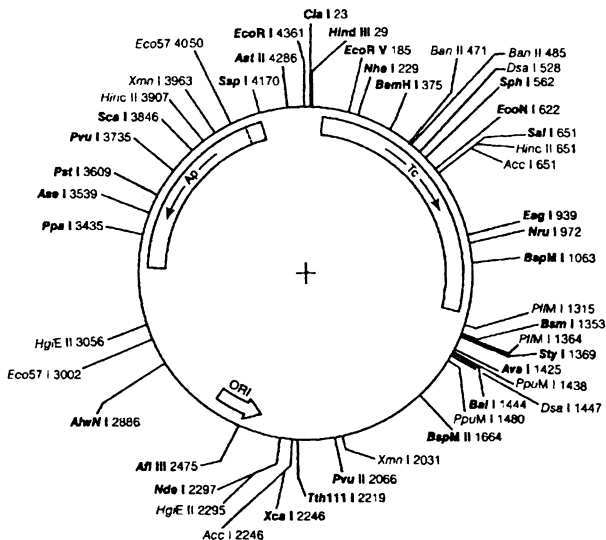
Az általunk használt HB101 jelű recipiens mindkét említett követelménynek megfelel (*hdsR⁻*, *recA*).

A gyakorlaton a pBR 322 jelű plazmidot fogjuk használni, melynek legfontosabb jellemzői a következők: mérete 4361 bázispár, hordozza az ampicillin- és tetraciklin-rezisztencia géneket (9. ábra). Az ilyen plazmidok alapvető fontosságú eszközei a génebeszeti eljárásoknak, melyekről az előadások keretében fognak hallani.

Vannak olyan prokarióták – ezek közé tartoznak a *Streptomycesek* – melyek transzformálásához enzimatikusan le kell bontani a sejtfalat. Ez lizozimmal történik, s az így kapott fal nélküli sejteket protoplasztoknak nevezzük. A protoplasztokat együtt inkubálják a transzformáló DNS-sel Ca^{++} jelenlétében, majd polietilén-glikollal (PEG) kezelik. A PEG kezelésnek döntő szerepe van a DNS felvételében. Ebből is láthatjuk, hogy minden baktérium-fajnál más-más transzformációs eljárás a célravezető.

A gyakorlaton elvégzendő transzformációs kísérlet a következő:

1. A recipiens *E. coli* HB101-ből gazdag folyékony táptalajon exponenciális fázisú tenyészetet készítünk.
2. Hidegen lecentrifugáljuk a sejteket.
3. Szuszpendálás hideg 0,1M $MgCl_2$ oldatban (20-30 ml-ben).
4. Újabb centrifugálás.
5. Szuszpendálás 0,1 M hideg $CaCl_2$ -ban, 2-3 ml-ben.
6. Inkubálás jégfürdőben (20 perctől 24 óráig terjedhet az inkubálási idő). Ebben a formában kapják meg a kompetens sejteket a gyakorlat elvégzéséhez.



9. ábra

A pBR322 plazmid restrikciós térképe

Az egyetlen hasítóhellyel rendelkező enzimek vastag betűvel vannak jelölve. Az enzim neve utáni szám az illető hasítóhelynek az EcoRI helytől való távolságát jelzi bázispárokban. Ap: ampicillin-, Tc: tetraciklin-rezisztencia gén, ORI: replikációs origó

7. A sejtek hozzáadása a transzformáló DNS-hez. Steril műanyag centrifugacsövekbe előre kimértünk 1, 10 nanogramm v. 1 μg pBR 322 plazmid DNS-t egyformán 10 μl térfogatban. Ezekhez mérjük hozzá 0,1 ml-t v. 2 cseppet a *coli* sejtuszuspenzióból automata pipettával (v. steril 1 ml-es üvegpipettával). Lesz olyan cső, amibe nem teszünk DNS-t, ez a kontroll. (Készítünk egy olyan kontrollt is, amibe DNS-t teszünk, de baktériumsejteket nem.)

8. Ezután a csöveket jégfürdőben inkubáljuk minimum 10-20 percig.

9. 2 perc 42 °C (hősokk).

10. Ezután hozzáadunk a sejtekhez 1 ml táptalajt és 37 °C-os vízfürdőben inkubáljuk 20-30 percig. Ez az inkubáció az antibiotikum-rezisztencia gének minél jobb expressziója érdekében történik.

11. Szélesztés szelektív táptalajra.

A sejtuszpenziót kivesszük a vízfürdőből és steril pipettával belőle 0,1 ml-t az előkészített ampicillin vagy tetraciklin tartalmú agar lemezre cseppentünk ki, majd egy steril hajlított üvegbot segítségével szélesztjük a lemezen, amit közben bal kézzel forgatunk. A kontrollt is ugyanígy kezeljük.

Az 1 μg DNS-t tartalmazó cső esetében 10-es léptékű hígítási sort készítünk 10^{-5} -ig a következőképpen:

Kivesszünk belőle 0,1 ml-t és hozzámérjük egy steril csőbe kikészített 0,9 ml táptalajhoz. Ez a 10^{-2} hígítás. A műveletet még 4x megismételve eljutunk a 10^{-6} -os hígításig. A 10^{-2} -es hígításból tegyünk 0,1 ml-t ampicillines lemezre, a 10^{-6} -os hígításból szintén 0,1 ml-t antibiotikumot nem tartalmazó lemezre.

12. A lemezeket 37 °C-on inkubáljuk egy éjszakán át, s miután megjelennek rajtuk a telepek, hűtőszekrénybe helyezzük. (Ez azért szükséges, hogy a következő gyakorlatig a telepek ne nőjenek túl nagyra.)

13. Értékelés a következő gyakorlaton:

Megszámoljuk a transzformáns telepek számát és kiszámítjuk az 1 μg DNS-re eső transzformációs gyakoriságot. (Az 1 és 10 nanogram DNS-el transzformált sejtek esetében.)

Az 1 μg DNS-sel transzformált sejtek esetében az antibiotikumtartalmú lemezen megszámloljuk a transzformánsokat, ebből kiszámítjuk az összes transzformáns számát. Az antibiotikumot nem tartalmazó lemezen talált telepszámból pedig kiszámítjuk az összes élő sejt számát. A transzformánsok számát elosztva az élőszámmal megkapjuk a transzformációs gyakoriságot.

DNS HASÍTÁSA RESTRIKCIÓS ENDONUKLEÁZOKKAL

A gyakorlattal kapcsolatos elméleti anyag bővebben megtalálható a Biokémiai genetika jegyzet 4. fejezetében.

A restrikciós endonukleázok kettősszálú DNS-t hasító bakteriális eredetű enzimek. Egyik csoportjuk, a II. típusú restrikciós endonukleázok, meghatározott helyeken hasítják a DNS-t, ezért rendkívül fontos eszközzé váltak a molekuláris biológiában. Segítségükkel a DNS specifikus darabokra, ún. *restrikciós fragmentumokra* vágható. A restrikciós fragmentumok méretének meghatározásával következtetni lehet a hasítóhelyek egymáshoz viszonyított távolságára a DNS-en, így szerkeszthetők a *restrikciós térképek*.

A restrikciós endonukleázok nagy része a felismerési szekvenciát a két láncon különböző helyen hasítja, ezért 1-4 nukleotid hosszúságú, egyszálú, vagy ún. "ragadós" végek jönnek létre, melyek komplementer bázisokat tartalmaznak. Különböző eredetű, de azonos restrikciós endonukleázzal hasított DNS fragmentumok ligáz enzimmal összekapcsolhatók, így rekombináns DNS molekulák hozhatók létre *in vitro*. Ezt az eljárást fel lehet használni specifikus DNS szakaszok felszaporítására v. klónozására. A klónozás során DNS szakaszokat önálló replikációra képes plazmidokba vagy bakteriofágokba (vektorokba) építik be, majd az így létrehozott rekombináns molekulákat bejuttatják egy gazdaszervezetbe (pl. *Escherichia coli*-ba).

A vázolt folyamat két fontos lépését fogjuk a gyakorlatok során közelebbről megismerni. Ezen a gyakorlaton különböző DNS mintákat fogunk restrikciós endonukleázzal emésztetni, majd a keletkezett DNS fragmentumokat agaróz gél-elektroforézissel választjuk el egymástól. Egy másik alkalommal egy vektor plazmid *E. coli*-ba való transzformálását végezzük el.

Az agaróz gél-elektroforézis a különböző méretű DNS fragmentumok elválasztására szolgál. Rövidebb fragmentumok gyorsabban vándorolnak az elektromos erőterben mint a hosszabbak. A vándorlás távolsága fordítottan arányos a molekulaméret logaritmusával. Ha ismert méretű fragmentumok vándorlási távolságát meghatározva felvesszünk egy kalibrációs görbét, ezzel egy ismeretlen fragmentum méretét meghatározhatjuk vándorlási távolsága alapján. Agaróz gél-elektroforézis az alapja a Southern-hibridizációval végzett specifikus szekvencia-kimutatásnak (I. Biokémiai genetika 4.10 ábra). A restrikciós endonukleázok aktivitásának egysége az az enzimmennyiség, amely 1 óra alatt 37 °C-on 1 µg lambda fág DNS-t teljesen megemészt. Az emésztéshez szükséges puffer pH-ja 7,4-8,0 közötti, 10 mM MgCl₂-ot tartalmaz, az optimális NaCl koncentráció enzimenként változik.

A gyakorlat kivitelezése

Mivel a gyakorlat időigényes, összesen kb. 2,5 órát igényel, a kivitelezést minél hamarabb el kell kezdeni!

A gyakorlat során a következő DNS minták emésztését fogjuk elvégezni: *E. coli* kromozómális DNS, lambda fág DNS, pBR322 plazmid DNS. Az emésztéshez használt restriktációs endonukleázok: *Eco* RI, *Hin* dIII, *Bsp* RI.

Tálcánként a fenti DNS mintákból egyet emésszünk egy restriktációs endonukleázzal. A reakcióelegyet a következő sorrendben mérjük össze automata mikropipetta segítségével egy 1,5 ml-es mikrocentrifugacsőbe (a mikropipetta használatára kérjen útmutatást a gyakorlatvezetőtől):

10 μ l DNS (restriktációs pufferben)

10 μ l enzim (restriktációs pufferben)

Mindkét beméréshez használjunk tiszta pipettahegyet! Ügyelni kell arra, hogy a bemért anyagok összekeveredjenek, s a cső aljára kerüljenek. Erre a legbiztosabb módszer, ha keverés után mikrocentrifugába helyezzük a csövet és néhány másodpercig forgatjuk. (A centrifugacsöveket egymással szemben helyezzük el!)

Az összemérés után a reakciót 37 °C-ra helyezzük 1-2 órára. (A gyakorlat időtartamára.)

Készítsünk egy-egy emésztetlen kontrollt is a háromféle DNS-t használva: ezekbe az enzim helyett desztillált vizet teszünk. (Csak minden második tálcánál kell elkészíteni, és nem szükséges 37 °C-on inkubálni.)

Az inkubáció végétével 5 μ l brómfenolkék-szaharóz-EDTA oldatot adunk a reakcióhoz. A festék fogja jelezni a front helyzetét az elektroforézis során, a szaharóz a minta sűrűségét növeli, az EDTA pedig a Mg^{++} ionok megkötésével leállítja az enzimreakciót.

A minták felvitelét agaróz géltre a következő gyakorlaton végezzük el. Addig a DNS mintákat -20 °C-os mélyhűtőben tároljuk. A géltre való felvitel előtt a *Hin* dIII-mal emésztett lambda fág DNS-t tegyük 3 percre 60 °C-os vízfürdőbe.

Ezután következik a minták felvitel az agaróz géltre. Helyezzük az agaróz gélt hordozó tálcát az elektroforézis tankba úgy, hogy a puffer ellepje. Mikropipettával óvatosan mérjük be a mintákat a gélen látható mintahelyekre ("zsebekbe"). A minta nagyobb sűrűsége folytán lesüllyed a zseb aljára. Vigyázzunk, hogy a pipetta hegyével ne érnünk hozzá a gélhez! A mintákat a következő sorrendben vigyük fel:

1. *E. coli* kromoszómális DNS, emésztetlen
2. *E. coli* kromoszómális DNS, *Eco* RI emésztés
3. *E. coli* kromoszómális DNS, *Bsp* RI emésztés
4. Lambda fág DNS, emésztetlen
5. Lambda fág DNS, *Hin* dIII emésztés
6. Lambda fág DNS, *Bsp* RI emésztés
7. pBR322 plazmid DNS, emésztetlen
8. pBR322 plazmid DNS, *Eco* RI emésztés
9. pBR322 plazmid DNS, *Bsp* RI emésztés.

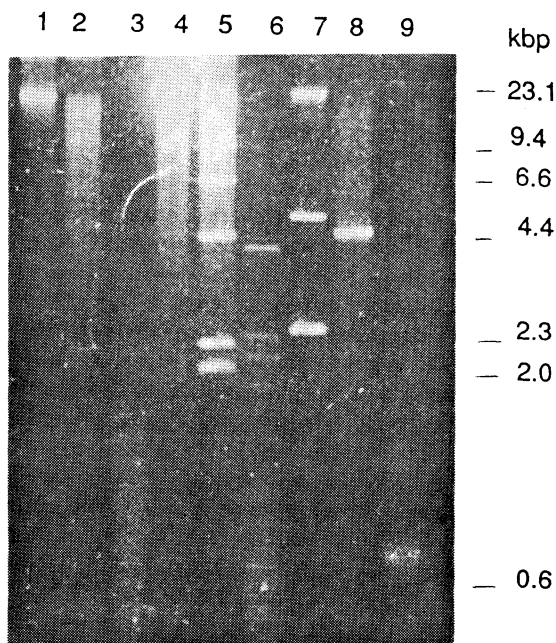
Ezután visszahelyezzük a készülék tetejét és bekapcsoljuk a tápegységet. Ügyeljünk a futtatás irányára, a DNS a pozitív pólus felé vándorol! Használjuk ki a tápegység által megengedett legnagyobb áramerősséget és feszültséget, azaz maximum 200 V és 200 mA-t.

A futtatás ideje 90-120 perc. Ezután a gélt óvatosan kivesszük a futtató tálcából és UV lámpára (transzilluminátor) helyezzük. Mivel a gél ethidium-bromidot tartalmaz, a szétválasztott DNS fragmentumok csíkjai vörösen fognak fluoreszkálni az UV fényben. Az UV lámpát tilos bekapcsolni úgy, hogy a védőtető nincs rajta!

Az agaróz gél-elektroforézis értékelése:

1. minta: Az emésztetlen *E. coli* kromoszómális DNS egyetlen magas molekulatömegű csíkot ad.
2. minta: Az *Eco* RI enzim (felismerőhelye: GAATTC) igen sok fragmentumot hoz létre az *E. coli* kromoszómális DNS-ből. Ha az emésztés teljesen sikerült, ezek a fragmentumok folyamatosan kitöltik a gélt, nem alkotnak diszkrét csíkokat, hiszen rendkívül sokféle különböző méretű fragmentum jön létre. Ha az emésztés részleges, akkor a DNS egy része az 1. mintának megfelelő magas molekulatömegű csíkban marad.
3. minta: A *Bsp* RI enzim (felismerőhelye: GGCC) sokkal több helyen hasítja az *E. coli* kromoszómális DNS-t, mint az *Eco* RI. Ezért az átlagos fragmentumméret kisebb lesz, mint az előző hasításnál: a gél felső felében nem látunk DNS-t, mivel a kisebb fragmentumok mind a gél alsó felébe vándorolnak.

A lambda fág az *E. coli* bakteriofágja. Lineáris duplaszálú DNS molekulája van. Két végén azonban van egy-egy 12 nukleotid hosszúságú egyszálú szakasz, melyek egymásnak komplementerei. A két "ragadós vég" egymással H-kötéseket képezve cirkulárisá teszi a 48.502 bázispár hosszúságú molekulát. A "ragadós végek" denaturációját végezzük el, amikor 60 °C-on inkubáljuk a DNS-t az elektroforézis előtt.



10. ábra

A DNS minták gélelektroforetikus képe

1: *E. coli* kromoszómális DNS, emésztetlen; 2: *E. coli* kromoszómális DNS, *Eco* RI emésztés; 3: *E. coli* kromoszómális DNS, *Bsp* RI em.; 4: λ fág DNS, emésztetlen; 5: λ fág DNS, *Hin* dIII em.; 6: λ fág DNS, *Bsp* RI em.; 7: pBR322 plazmid DNS, emésztetlen; 8: pBR322 plazmid DNS, *Eco* RI em.; 9: pBR322 plazmid DNS, *Bsp* RI em. Jobb oldalon a λ fág DNS *Hin* dIII emésztéssel kapott fragmentumainak mérete van feltüntetve kilobázis-párban (kbp).

4. minta: Az emésztetlen lambda DNS egyetlen magas molekulatömegű csíkot ad.

5. minta: A lambda DNS-en 7 AAGCTT felismerőhely van a *Hin* dIII enzim számára. Ennek megfelelően 8 fragmentumot kellene látnunk. Mivel kettő közülük túl kicsi, általában 6-ot v. 7-et látunk. A fragmentumok méretei (felülről lefelé) kilobázispárban (kbp):

23,1
9,4
6,6
4,4
2,3
2,0
0,6
0,1

Ezeket a fragmentumokat gyakran használják molekulaméret - standardként is.

6. minta: A *Bsp* RI több mint 50 helyen hasítja a lambda DNS-t, ezért sok rövid fragmentumot láthatunk.

A pBR322 plazmid vektor, amely *E. coli*-ban replikálódik, duplaszálú, cirkuláris DNS molekula, mérete 4361 bp.

7. minta: Az emésztetlen pBR322 plazmid 3 csíkot ad: legfelül a kromozómális DNS, ami szennyezésként van jelen a preparátumban, alatta a plazmid nyílt cirkuláris (relaxált) alakja, majd legalul a szuperhelikális (supercoiled) forma. Néha lehet látni a lineáris formát is, ami az utóbbi két csík között helyezkedik el. (l. még Biokémiai genetika 4.9 ábra B, C)

8. minta: Az *Eco* RI-nek egy felismerőhelye van a plazmidon, ezért azt az enzimátikus hasítás linearizálja. A gélen egy csík látható, ha az emésztés teljes.

9. minta: A *Bsp* RI 22 helyen hasítja a pBR322 DNS-t.

A fluoreszkáló DNS csíkok sötétszobában narancs v. vörös szűrő alkalmazásával fényképezhetők.

SEJTALKOTÓK KINYERÉSE SŰRŰSÉGI GRADIENS CENTRIFUGÁLÁSSAL

A sejtek szerkezetének és működésének megértéséhez nélkülözhetetlen, hogy annak szerkezeti elemeit – a sejtorganellumokat, mint amilyen a sejtmag, vagy a mitokondriumok – egymástól elválasztva, tiszta állapotban kinyerve tudjuk tanulmányozni. Ez teszi lehetővé kémiai összetételük meghatározását, ill. működésük vizsgálatát olyan körülmények között, amikor az egyéb sejtalkotók kölcsönhatásait kizárjuk.

A sűrűségi gradiens centrifugálás (továbbiakban SGC) a biológiai és biokémiai kutatásban igen gyakran és sokféle módon alkalmazott eljárás. Centrifugálás közben a centrifugácóban egymás fölött valamely ún. gradiens alapanyagok különböző koncentrációjú rétegei foglalnak helyet. Gradiens alapanyagként olyan anyagokat használunk, melyekből nagy töménységű, tehát nagy fizikai sűrűségű oldatok készíthetők. A cső fenekén foglal helyet a legsűrűbb réteg, centrifugálás közben ez van a centrifuga tengelyétől legtávolabb. A cső teteje (azaz a centrifuga tengelye) felé haladva a gradiens alapanyag koncentrációja – és ezzel együtt sűrűsége – csökken. Ezt nevezzük sűrűségi gradiensnek. A sűrűségi gradiens használata hatásosabbá teszi a különböző komponensek szétválasztását. Alkalmazásával több, akár 3-4 frakciót is nyerhetünk egyszerre, míg a közönséges centrifugálással legfeljebb kettőt (egy üledéket és egy felülúszót).

A módszer két, egymástól eltérő alapelven nyugodhat.

a) Valamely több komponensből álló rendszert azon az alapon bontunk alkatrészeire, hogy a komponensek ülepedési sebessége és ülepedési állandója eltér egymástól. (Az ülepedési állandót adott hőmérsékleten több tényező határozza meg: a partikulum és a közeg sűrűségének különbsége, a partikulum alakja, tömege, sűrűlódása a közeggel szemben, ill. a közeg belső sűrűlódása, lásd a fizika megfelelő fejezetét). Ilyenkor a SGC legalsó rétegének sűrűsége is kisebb, mint a szétválasztandó alkatrészek sűrűsége. A mintát a gradiens fölé rétegezzük. A sűrűség növekedése következtében centrifugálás közben a részecskék egyre fokozódó ellenállásba ütköznek, különböző sebességgel fognak a cső feneké felé vándorolni. A centrifugálás befejezése után a különböző részecskék a cső különböző magasságában foglalnak majd helyet, így különböző frakciókba gyűjthetők.

b) Az ún. egyensúlyi (izopiknikus) sűrűségi gradiens centrifugálás azon alapszik, hogy itt a sűrűségi gradiens nehéz komponenseinek fizikai sűrűsége nagyobb, mint a szétválasztandó alkatrészek bármelyikének sűrűsége. Ennél az eljárásnál a centrifugálást addig folytatjuk, amíg minden szétválasztandó részecske eléri a gradiens azon rétegét, melynek sűrűsége saját sűrűségével megegyezik. Az ülepedés ekkor leáll. Így a frakcionálás alapjául a részecskék

egyetlen paramétere szolgál: azok fizikai sűrűsége. A módszer igen alkalmas a különböző makromolekula-féleségek elválasztására és analízisére. Szétválaszthatók egymástól pl. a DNS és RNS, különböző bázisösszetételű DNS féleségek, ugyanazon DNS (pl. plazmid) suprahelikálisan sodort és relaxált formája, eltérő fehérjetartalmú nukleoproteidek, stb. A centrifugálás rendszerint nagy fordulatszám mellett, (30 000 ford/perc fölött) 40-60 óráig tart. A gradienst gyakran nem is formálják előre, az a 100 000–450 000 x g-n spontán kialakul. Gyakran a mintát sem a gradiens fölé rétegzik, hanem hozzákeverik a gradiens alapoldathoz. Menet közben a centrifugacsőben elfoglalt pozíciótól függően a részecskék részben lefelé, részben felfelé vándorolnak, amíg a saját fizikai sűrűségüknek megfelelő rétegbe nem érnek. Az erre a célra használt két gradiens alapanyag a céziumklorid és a metrizamid (lásd alább). Igen kíméletes, hatékony, de az ultracentrifuga és a használatos vegyszerek miatt igen drága eljárások.

A fordulatszámától függően a sűrűségi gradiens centrifugálás sokféle szeparálási feladat megoldására alkalmas.

♣ Vannak olyan SGC módszerek, melyekkel magas fordulatszám mellett (25 000-65 000 ford/perc, mely kb. 60 000-450 000 x g nehézségi gyorsulásnak felel meg) különböző makromolekulákat (enzimek, hormon receptorok, nukleinsav féleségek) választhatunk szét egymástól.

♣ 10 000-20 000 ford/perc (kb. 20 000-50 000 x g) alkalmazásával különböző sejtalkatrészeket választhatunk szét egymástól. Ilyenek pl. a riboszómák, riboszóma alegységek, ill. poliszómák, mitokondriumok, lizoszómák, kloroplasztok, sejtmag, Golgi-anyag stb.

♣ 2000-4000 ford/perc gyorsasággal (1000-5000 xg) különböző sejtféleségeket lehet egymástól elválasztani (pl. baktériumok, algák, csontvelő és vérszövetek, stb.)

A gradiens térfogatok is igen különbözőek lehetnek. Makromolekulák szétválasztásához 2-3 ml térfogatú gradienseket használnak, míg pl. preparatív sejtfrakcionálásnál, ahol a kapott frakciókat még további, anyagigényes vizsgálatokhoz használják fel, a gradiens térfogata nagy (akár több száz ml) lehet.

A *gradiens alapanyagok* olyan anyagok, melyekből tömény, nagy sűrűségű oldatok készíthetők. Fontos, hogy kémiaileg közömbösek legyenek, a frakcionálható anyaggal ne lépjenek reakcióba, azoktól utólag könnyen el lehessen őket elválasztani.

Szaharóz. A legáltalánosabban használt gradiens alapanyag, kb. 1,4 g/cm³ sűrűségig lehet belőle oldatot készíteni.

Céziumklorid. 1,7-1,8 g/cm³ sűrűségig is lehet belőle oldatot készíteni. Hátránya, hogy drága és a tömény oldatok ion erőssége nagy.

Metrizamid. Jódtartalmú szerves vegyület [2-(3-acetamido-5-N-metilacet-amido-2,4,6-tri-jodobenzamido)-2-deoxy-D-glükóz]. Kb. 1,4 g/cm³-ig lehet belőle oldatot készíteni. Nagy előnye, hogy nem elektrolit természetű. Töményebb oldatai viszkózusak, ezért nehézkes vele dolgozni.

Glicerín. Csak kb. 1,17 g/cm³-ig használható.

Használják a fentiekén kívül jól oldható fehérjéket (szérum albumin) és poliszaharidokat (ficoll) is.

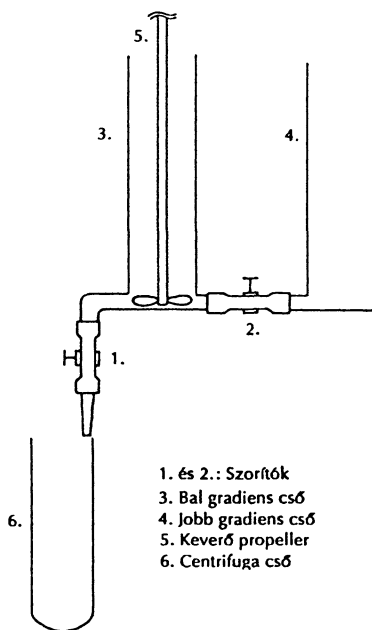
Gradiens-profil. A sűrűségi gradiens lehet szakaszos és folyamatos. A szakaszos sűrűségi gradiensben előre elkészített különböző töménységű alapoldatokat rétegezzük egymásra, a gradiensben tehát a sűrűség lépcsősen változik. A folyamatos gradiensben a sűrűség fokozatosan változik. Ha a változás egyenletes, akkor lineáris sűrűségi gradiensről beszélünk.

Gradiensek készítésének módjai. Szakaszos gradienst készíthetünk az oldatok óvatos egymás fölé, vagy egymás alá pipettázásával, ill. injekciózásával. Folyamatos lineáris gradienst fogunk készíteni a gyakorlaton (lásd alább). Különböző elektronikus és mechanikus berendezések használatosak a gradiensek előállításához. Ezek megbízhatóbb, reprodukálhatóbb profilú gradienseket szolgáltatnak.

Frakciószedés. Nagyobb térfogatú gradienseknél általában a felszínről történő leszívást alkalmazzuk (pipettával, vagy automatikusan mozgatott szívornyával). Ha a centrifugálás során nem keletkezik üledék, a leszívás történhet a cső fenekéről is. Kisebb műanyag csövek fenekére megfelelő állványban lyukat lehet fúrni és a kicsöpögő folyadékból gyűjtünk frakciókat. Igen jól reprodukálható eredményeket ad az a módszer, melynél a gradiens alsó, legsűrűbb rétegénél is sűrűbb folyadékot nyomunk a centrifugacsőbe a gradiens alá és a frakciókat a cső tetjéről gyűjtjük a megfelelő csatlakozók segítségével.

Sejtalkotók kinyerése májszövetből.

Sűrűségi gradiens készítése. A gradiens-készítő edény kifolyócsövéből az esetlegesen bennmaradt folyadékot kiitatjuk a kifolyócsőkhöz illesztett szűrőpapírral, majd az 1. és 2. szorítókat elzárjuk (11. ábra). A 3. edénybe a töményebb, 60% szaharózt tartalmazó homogenizáló pufferből bemérünk 4,4 ml-t (a fejezetben megadott minden koncentrációérték vegyes %: tömeg/térfogat). Óvatosan megnyitjuk a 2. szorítót, hogy az összekötő csőből kiűzzük a levegőt, majd a szorítót zárjuk. Utána a 4. edénybe pipettázunk 4,6



11. ábra
 Egyszerű gradienskészítő berendezés vázlata

a cső belső falához. Közepes fordulatszámmal megindítjuk a keverőt. Óvatosan megnyitjuk az 1. szorítót, majd a lehető legrövidebb időn belül a 2. szorítót. A centrifugacsövek helyes feltöltési ideje kb. 10 perc. A gradienskészítő működése a közlekedő edények elvén alapul. A hígabb oldat hozzáfolyását a keverő sebessége is befolyásolja, a sebesség növelésével a hozzáfolyás lassul. Közepes fordulatszámmal kezdünk, majd azt a gradiens összeállítása folyamán fokozatosan csökkentjük. Az elkészült gradienseket mérlegesen kiegyensúlyozzuk 8,3% szaharózos homogenizáló puffer hozzáadásával.

Az egér májának kivétele, szövethomogenizátum készítése. Az egér fejét gyors mozdulattal levágjuk, hasüregét megnyitjuk, a májat – lehetőleg egy

egy darabban – kivesszük, majd 8,3% szaharózt tartalmazó homogenizáló pufferben leöblítjük a szõrszálak eltávolítása céljából.

A homogenizáló puffer összetétele:
50 mM Tris-HCl, pH 7,5
25 mM KCl
3 mM Magnézium acetát

A májat 2-3 mm-es darabokra vágjuk és Potter–Elvehjem dugattyús homogenizátorba tesszük, melynek teflon dugattyúját fúrómotor hajtja kb. 3000 ford/perc sebességgel. Hozzáadunk 2 ml 8,3% szaharózos homogenizáló puffert és a dugattyúval 8 letolást végzünk, miközben a homogenizátor csöve jégfürdőbe merül. A májparenchyma sejtek legnagyobb része feltáródik, a sejtorganellumok viszonylag épen maradnak. A homogenizátumot tölcsérbe helyezett 4 réteg gézre öntjük, majd a homogenizátort a fenti puffer 1 ml-ével utána öblítjük a tölcsérbe. A homogenizátumot át-szűrjük a kötõszöveti rostok és feltáratlan foszlányok eltávolítása céljából.

Mintafelvitel, centrifugálás. A szûrt szuszpenzióból 0,6 ml mintát rétegzünk óvatosan a sűrűségi gradiens felszínére. A szuszpenzió maradékát kontrollként félretesszük. A csöveket kilendülõfejes asztali centrifugában 6000 ford/perc gyorsasággal centrifugáljuk 15 percig.

Jól összeállított gradiens esetén a centrifugacsövet kiemelve a következõ rétegeket látjuk: A felsõ, mintának megfelelõ réteg részben feltisztult. Alatta sűrűbb, hús-színû opaleszcenciát látunk, mely fokozatosan halványodik. A gradiens alsó rétege és a „párna” határán egy igen sűrű, piszkossárga, részben véres gyûrű foglal helyet. A párna víztiszta. A csõ fenekén találjuk a nem túl szembeötlõ, áttetszõ üledéket.

Frakciószedés. A sûtűségi gradiensben kapott frakciókban borostyánkõsav-dehidrogenáz aktivitás mérés útján mutatjuk ki a mitokondriumokat. Erre azért van szükség, mert fajlagos reakció nélkül a mitokondriumok az egyéb vezikulum jellegû sejtalkotóktól (pl. lizoszómák) nem különböztethetõk meg. Ezen túlmenõen a sejtek feltárása folyamán nagy mennyiségû membrán-foszlány keletkezik. A foszlányok spontán vezikulumokká záródnak. A homogenizátum tele lesz másodlagosan keletkezett, a sejtben eredetileg jelen nem volt hólyagcsákkal is. Az enzimaktivitás méréshez a frakciók leszedése elõtt 20 számozott Wasserman csõbe bemérünk 0,1-0,1 ml glükózt. Az elsõ csõbe bemérünk 0,6 ml 5x felhígított, nem frakcionált májhomogenizátumot. A gradiens felszínérõl automata pipettával 0,6 ml-es frakciókat szívunk le, ezeket a 2. Wasserman csõtõl

kezdve adjuk a glükózhoz. A frakciószedést addig folytatjuk, amíg az üledékről minden folyadékot le nem szívunk.

Az üledéket a következőképen kezeljük: ujjbegynyi papírvatta pamacsot *enyhén* benedvesítünk homogenizáló pufferrel, majd azzal a centrifugacső belső falát tisztára töröljük. Különösen fontos ez a centrifugacsőnek abban a magasságában, ahol a sűrű, feltáratlan sejteket tartalmazó törmelék-frakció volt. Ezen művelet közben fontos, hogy a cső fenekén lévő üledékhez ne érjünk hozzá, és a papírvatta pamacs ne legyen annyira nedves, hogy folyadék folyhassék hozzá az üledékhez. Utána 0,6 ml 15% szaharózos homogenizáló puffert mérünk a csőbe, ebben az üledéket egy tiszta üvegbottal elhomogenizáljuk, majd átvisszük a soron következő Wasserman csőbe, mint utolsó frakciót. A frakciók zavarosságának mértékét szemre megbecsüljük és a jegyzőkönyvben $\emptyset - + + + +$ jelöléssel rögzítjük.

Borostyánkősav-dehidrogenáz aktivitás mérése 0,4 ml reagens hozzáadása után a korábban tanultak szerint történik (Biológiai gyakorlatok II. 18-20. o.). Az inkubáció folyamán különösen az első két frakció hús-színe mélyül, mutatván, hogy a mitochondriumok nem, vagy csak alig lépnek be a gradiensbe. A frakciószám növekedésével ez az elszíneződés egyre gyengül. A törmelék-gyűrű mutathat még gyenge pozitivitást, az üledék áttetszően fehér, az enzimaktivásra jellemző barnás színt nem mutat. Az enzimaktivitást is becsüljük meg szemre és a jegyzőkönyvben $\emptyset - + + + +$ jelöléssel rögzítjük.

Mikroszkópos vizsgálat. A Wasserman csövekből tiszta üvegbottal 1-1 kis csepp mintát tárgylemezre viszünk, egy kis csepp metilzöld oldattal a fedőlemez hegyének segítségével összekeverjük, majd lefedve, immerziós objektívvel vizsgáljuk. (A metilzöld bázikus festék, amely a DNS-hez interkalációs mechanizmussal is kötődik, lásd Biol. gyak. II. 9. és 12. o.).

A frakcionálatlan kontrollban a nagy mennyiségű, kisebb-nagyobb vezikulum tűnik szembe. Ezek nagyobb része színtelen, kisebb részük vöröses-barna. Ezek a mitokondriumok, a színeződés a borostyánkősav-dehidrogenáz aktivitás jele. Az enzimaktivitást mutató hólyagok mérete az intakt májsejtekben látott mitokondriumoknál jóval nagyobb lehet, a mitokondriumok a sejtek feltáródása után vizet vesznek fel, megduzzadnak. Láthatunk a kontrollban nagy számú, metilzölddel megfestődött, sejtekből kiszabadult, granuláris szerkezetet mutató sejtmagot. Láthatók feltáratlan sejtek, vörösvértestek, rostos elemek, továbbá hajszálér endotel sejtek.

Az első két frakcióban a borostyánkősav-dehidrogenáz pozitív vezikulumok, azaz a könnyű és nehéz mitokondriumok jelenléte a meghatározó. Itt sejtmagokat alig-alig látunk. Láthatunk számos kicsi, erősen

fénytörő, színtelen vezikulumot, továbbá a láthatóság határán lévő halvány, igen élénk Brown mozgást végző részecskéket.

A 4. frakciótól lefelé a mitokondriumok fokozatosan eltűnnek, a jelenlévő vezikulumokat nem tudjuk az alkalmazott módszerekkel felismerni.

A „párna” fölötti frakcióban részben, vagy teljesen feltáratlan májparenchyma sejteket látunk. Jelen van változó, néha nagymennyiségű vörösvértest és változatos, nem jól meghatározható törmelék. Ebben a frakcióban már elég sok zöldre festődő sejtmagot is látunk, gyakrabban sejteken belül, mint kívül.

Az üledékben található a sejtekből kiszabadult sejtmagok. Ez a frakció sem csupa sejtmagból áll, vörösvértestek, rostos elemek és hajszálér hámsejtek szennyezik. Egyetlen preparatív lépésben nem várható ennél hatékonyabb tisztítás.

Kérdések:

1. Mi a jelentősége a sejtorganellumok preparatív kinyerésének?
2. Mik a sejtfrakcionálás fő lépései?
3. Mik a sűrűségi gradiens centrifugálás előnyei?
4. Milyen fő frakciók keletkeznek a májsejt homogenizátum sűrűségi gradiens centrifugálása során?
5. Miért alkalmaztuk a frakciók vizsgálata során a borostyánkősav-dehidrogenáz aktivitás citokémiai reakcióját?
6. Miért alkalmaztuk a frakciók vizsgálata során a metilzölddel való festést?

Tartalomjegyzék

A nemi kromatin vizsgálata. (Dr. Schlammadinger József)	3
Kromoszómapreparátum készítése és vizsgálata. (Dr. Schlammadinger József)	7
Genetikai problémák I. – Klasszikus genetica. (Dr. Sipiczki Máttyás)	17
Családfa-elemzés. (Dr. Szilágyi István)	24
Populációgenetika és a feniltiokarbamid ízézés vizsgálata. (Dr. Schlammadinger József)	33
Genetikai problémák II. – Populációgenetika. (Dr. Szilágyi István)	43
Az indukált enzimszintézis vizsgálata. (Dr. Schlammadinger József)	45
Komplemetációs teszt élesztővel. (Dr. Fehér Zsigmond)	53
<i>Escherichia coli</i> transzformációja (Dr. Fehér Zsigmond)	56
DNS hasítása restrikciós endonukleázokkal (Dr. Fehér Zsigmond)	62
Sejtalkotók kinyerése sűrűségi gradiens centrifugálással (Dr. Szeszák Ferenc)	67