

DEBRECENI EGYETEM
ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR

MOLEKULÁRIS BIOLÓGIAI MÓDSZEREK

Szerkesztette
DOMBRÁDI VIKTOR



DEBRECENI EGYETEM
ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR

MOLEKULÁRIS BIOLÓGIAI MÓDSZEREK

egyetemi jegyzet

Szerkesztette
DOMBRÁDI VIKTOR

Debreceni Egyetemi Kiadó
Debrecen University Press
2016

Írták:

Andirkó István, Aradi János, Bakó Éva, Balázs Margit, Benkő Szilvia,
Biró Sándor, Borbély Jánosné, Csortos Csilla, Dombrádi Viktor, Erdődi Ferenc,
Farkas Ilona, Fehér Zsigmond, Góth László, Győri Zoltán, Hartman Zsolt,
Horváth V. Gábor, Kókai Endre, Miklós Ida, Nagy László, Oros Melinda,
Pettkó-Szandtner Aladár, Puskás László, Scholtz Beáta, Sipiczki Mátyás,
Szondy Zsuzsa, Töröcsik Dániel, Tózsér József

ISBN 978-963-318-015-0

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

Kiadta a Debreceni Egyetemi Kiadó Debrecen University Press
Felelős kiadó: Karácsony Gyöngyi
Készült a DE sokszorosítóüzemében, 2016-ban
Terjedelem: 36,00 A/5 ív

Tartalomjegyzék

Előszó.....	3
DNS izolálása	
<i>Bakó Éva</i>	5
Genomi DNS preparálása	
<i>Kókai Endre</i>	8
Plazmid DNS tisztítása	
<i>Kókai Endre</i>	10
RNS izolálása sejtekből és szövetekből	
<i>Scholtz Beáta</i>	11
Teljes RNS preparálása	
<i>Kókai Endre</i>	15
DNS vizsgálata agaróz gélelektroforézissel	
<i>Dombrádi Viktor</i>	17
Pulzáló (erőterű) gél elektroforézis	
<i>Sipiczky Máttyás és Miklós Ida</i>	24
Restrikciós analízis	
<i>Csortos Csilla</i>	32
DNS visszanyerése agaróz gélből	
<i>Fehér Zsigmond</i>	40
Deoxyoligonukleotidok kémiai szintézise	
<i>Aradi János</i>	42
Polimeráz láncreakció	
<i>Dombrádi Viktor</i>	53
Kvantitatív PCR	
<i>Scholtz Beáta</i>	65
Egy gén és a róla átíródó mRNS vizsgálata	
<i>Kókai Endre</i>	80
Humán DNS-polimorfizmus kimutatása PCR-rel	
<i>Fehér Zsigmond</i>	82
Transzgén egerek genotipizálása	
<i>Oros Melinda, Hartman Zsolt és Nagy László</i> ...	87
Ligáz láncreakció	
<i>Dombrádi Viktor</i>	91
Nukleinsav hibridizációs technikák	
<i>Biró Sándor és Dombrádi Viktor</i>	93
Nukleinsav próbák jelölése	
<i>Biró Sándor</i>	99
DNS próba jelölése és alkalmazása Southern hibridizációban	
<i>Kókai Endre és Dombrádi Viktor</i>	111
Klasszikus Southern hibridizáció	
<i>Biró Sándor</i>	113
Northern hibridizáció	
<i>Dombrádi Viktor</i>	116
Fluoreszcencia in situ hibridizáció (FISH)	
<i>Balázs Margit</i>	120
Komparatív genomiális hibridizáció (CGH)	
<i>Balázs Margit</i>	133

DNS-csip technológia	
<i>Puskás László</i>	141
Rekombináns DNS technológia	
<i>Csortos Csilla</i>	153
DNS könyvtárak készítése és szűrése	
<i>Csortos Csilla</i>	161
Escherichia coli transzformáció	
<i>Fehér Zsigmond</i>	166
Laboratóriumi alapműveletek M13 bakteriofággal	
<i>Fehér Zsigmond</i>	171
Streptomyces transzformáció	
<i>Biró Sándor</i>	175
Élesztő sejtek transzformálása	
<i>Miklós Ida</i>	179
Klónozott gének emlős sejtekbe való bejuttatása	
<i>Törőcsik Dániel és Nagy László</i>	182
Fehérje-fehérje kölcsönhatások kimutatása	
Élesztő két-hibrid rendszer	
<i>Pettkó-Szandtner Aladár és Horváth V. Gábor</i>	187
Fehérje-fehérje kölcsönhatások kimutatása	
Emlős két-hibrid rendszer	
<i>Benkő Szilvia és Nagy László</i>	197
DNS szekvenálás	
<i>Dombrádi Viktor</i>	203
Automatizált DNS szekvenálás	
<i>Góth László</i>	219
Mutáció kimutatási módszerek	
<i>Góth László</i>	229
Rekombináns fehérjék előállítása	
<i>Farkas Ilona</i>	236
Fehérjék vizsgálata SDS polyakrilamid gél elektroforézissel	
<i>Dombrádi Viktor</i>	251
Antipeptid antitestek előállítása és alkalmazása (Fehérjék azonosítására Western blottal)	
<i>Erdődi Ferenc</i>	259
Fehérje expresszió változásának kimutatása Western blot technikával	
<i>Szondy Zsuzsa</i>	267
Oligo-peptidszintézis	
<i>Andirkó István</i>	270
Fehérjék aminosav összetételének meghatározása, fehérjék szekvenálása	
<i>Tőzsér József</i>	274
Élelmiszerek aminosav összetételének meghatározása	
<i>Borbély Jánosné és Győri Zoltán</i>	282

ELŐSZÓ

Sokan úgy gondolják, hogy a molekuláris biológia legjellegzetesebb sajátása módszertanában rejlik. Valóban az új technikai megközelítések tették lehetővé a modern molekuláris biológia szemlélet kialakulását, ami mára már teljesen áthatja a biológia minden területét. Az angol nyelvű szakirodalomban sorra jelennek meg a molekuláris biológiai módszertani kézikönyvek és számos honlapon található módszertani leírások. Míg korábban ezeket a módszereket elsősorban a kutatók és Ph.D. hallgatók használták, napjainkra alkalmazásuk általánossá vált és bekerült az egyetemi alapképzésbe. Egy magyar nyelvű molekuláris biológiai gyakorlati jegyzet iránti igényt igyekezett kielégíteni az 1998-ban kiadott „Alapvető molekuláris biológiai módszerek” című munkánk, amelyet évek óta használnak a molekuláris biológus és molekuláris biológia iránt érdeklődő más szakos hallgatóink.

Időközben létrejött a Debreceni Egyetem és ezért az akkreditált molekuláris biológus oktatás most már nem önálló egyetemek, hanem egyazon egyetem különböző karai közötti együttműködés formájában zajlik. Nem csak az oktatás keretei változtak az elmúlt időszakban, hanem dinamikusan fejlődött a molekuláris biológia eszköztára is. Egyes módszerek népszerűsége csökkent, új technikai eljárásokat fejlesztettek ki és új gyakorlati fogásokat találtak a korábban már ismert feladatok megoldására. Oktatóink újabb és újabb gyakorlati feladatokat terveztek és vezettek be a képzésbe. Ezért szükségessé vált a jegyzet alapos átdolgozása és kiegészítése.

Megváltozott és kibővült a szerzői gárda és megnőtt a jegyzet anyaga is. Úgy gondoljuk, hogy most már nem csak a legalapvető módszerekről, hanem a legújabb eljárásokról is szólnunk, ezért a megújult tartalomnak megfelelő módon módosítottuk a jegyzet címét. Továbbra is megtartottuk a szerkesztés alapvető struktúráját, a nukleinsavak izolálásától haladunk a fehérjék expresszióján keresztül a fehérje vizsgálatok irányába. Minden fontosabb módszer leírását egy elméleti bevezetés előzi meg, és ezt követi a módszerrel kapcsolatos gyakorlati feladatok részletes leírása. Továbbra is maradtak olyan eljárások, amelyeket a speciális műszerigény miatt csak bemutató gyakorlaton ismertetünk, természetesen ezekhez nem tartozik gyakorlati feladat.

A nyomdai költségek csökkentése érdekében a szöveget egyes sorközzel a lehető legtömörebb formában tesszük közé. Az egyszerűbb áttekinthetőség érdekében áttértünk az oldalak folyamatos számozására és ennek megfelelően kiegészítettük a kötet elején található tartalomjegyzéket. Ezzel szemben az ábrák és táblázatok számozását a fejezeteken belül továbbra is külön-külön adjuk meg. Reméljük, hogy a formai módosítások hozzájárultak a jegyzet könnyebb felhasználáshoz.

A jegyzet megírásában a Debreceni Egyetem oktatói és az MTA Szegedi Biológiai Központjának munkatársai vettek részt. Minden szerző az általa művelt és jól ismert szakterületről írt. Az itt bemutatott kísérletek reprodukálhatóak, már kiállták a gyakorlat próbáját. A kéziratot kétszer is ellenőriztük, azonban minden bizonnyal maradtak még a jegyzetben kisebb javításra szoruló hibák. Azzal is tisztában vagyunk, hogy az egyes műveleteket a különböző hagyományoknak és az egyéni ízlésnek megfelelő módon változatos formában lehet elvégezni. Ezért a Szerzőkkel együtt kérem a tisztelt Olvasót arra, hogy ha a jegyzet megírásával vagy a kísérletek kivitelezésével kapcsolatban bármilyen javító szándéku megjegyzése lenne, azt számomra legyen szíves megküldeni. Ígérjük, hogy ezeket a javaslatokat a korábbi gyakorlatnak megfelelően igyekezünk a jegyzet újabb kiadásakor figyelembe venni.

Bár a jegyzet elsősorban a molekuláris biológus hallgatóknak készült reméljük, hogy hasznosan fogják forgatni más szakok hallgatói is, illetve azok a már végzett diplomások, akik munkájuk során kapcsolatba kerültek a molekuláris biológiával.

Debrecen, 2004. március 3.

Dr. Dombrádi Viktor
szerkesztő

Debreceni Egyetem
Orvos és Egészségtudományi Centrum
Orvosi Vegytani Intézet
Debrecen 4026
Bem tér 18/B
dombradi@jaguar.dote.hu

DNS IZOLÁLÁSA

Bakó Éva

A nukleinsavak izolálása a legtöbb molekuláris biológiai vizsgálat első lépése. A kereskedelemben többféle DNS tisztító „kit” kapható, ezek segítségével a DNS izolálása gyors és biztonságos, mivel a gyártó cégek garantálják a kit összetevőinek tisztaságát. A kitekhez mellékelt leírás minden esetben hasznos útmutatót ad a DNS izolálás gyakorlati kivitelezéséhez. A nukleinsavak izolálása természetesen kitek nélkül, hagyományos módszerekkel is történhet. Ezen alaptermék ismerete a molekuláris biológiai munkákhoz feltétlenül szükséges.

A tisztítás során a *sterilitás* alapvető fontosságú, mert a legkisebb mennyiségű idegen, szennyező DNS is komoly gondot okozhat a preparátum későbbi felhasználása során. Hosszú hónapok után derülhet csak ki, hogy az addig végzett munka hiábavaló volt, mert pl. egy genomi DNS könyvtárból egy szennyező DNS-t szűrtünk ki. Az izolálás és a DNS-sel való további munka során a sterilitás mellett ügyelnünk kell a következőkre:

- Az optimális *pH* érték pH 7-8. Savas közegben, ha a $pH < 5,5$ a DNS depurinálódása, szálasadás történhet. Lúgos, $pH > 10$ érték esetén a DNS denaturálódása, a kettős szál szétválása következhet be.
- Kerülni kell a DNS $\lambda < 300$ nm *UV* fényvel való besugározását, mert az a DNS szál módosításához (nicking), illetve kovalens keresztkötéshez vezethet.
- A DNS több millió bázispárt tartalmazó makromolekulája a *DNázok* általi enzimátikus hasítás mellett sérülhet *erőteljes mechanikai hatásra* is. Például keverés (vortexelés), és erőteljes „fel-le” pipettázás DNS-töréshez vezethet.
- Tárolásra genomi DNS esetén a $4\text{ }^\circ\text{C}$, plazmid DNS esetén a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ *hőmérséklet* az optimális.

A rendelkezésre álló DNS tisztítási módszerek közül az alkalmas eljárás kiválasztását a következő tényezők befolyásolják:

- az izolálandó nukleinsav fajtája (egyszálú, kétszálú DNS; genomi, plazmid DNS)
- a nukleinsav eredete (emlős, növény, egyéb eukarióta, prokarióta, vírus)
- a kiindulási anyag természete (teljes szerv, szövet, sejt kultúra, vér)
- a módszerrel szembeni elvárások (a nukleinsav mennyisége, tisztasága, tisztítási idő)
- további felhasználás igényei (pl. PCR, klónozás, blotolás, RT-PCR)

Célunknak és persze anyagi lehetőségeinknek megfelelően választhatjuk ki a megfelelő kit-et, vagy választhatjuk a hagyományos DNS izolálási technikát. Általánosságban elmondhatjuk, hogy tiszta, ép, sértetlen állapotú, nagymennyiségű nukleinsavat gyorsan szeretnénk kinyerni.

A DNS tisztítás alapvetően három lépésből áll: (1) a sejtek lízise, a DNS szolubilizálása, (2) a szennyező fehérjék, RNS és egyéb makromolekulák eltávolítása enzimek és/vagy kémiai módszerek segítségével, (3) további tisztítás és töményítés. Különböző laboratóriumokban más-más receptet használnak, de ezek között lényeges eltérés csak az (1) lépésben van attól függően, hogy a DNS-t milyen szövetből vagy sejt kultúrából izoláljuk.

1. Mintaelőkészítés, lízis és emésztés

A sejtek lízisére használt módszer erélyes kell legyen, hogy a kiindulási anyag komplex mátrixát megbontsa, de ugyanakkor kíméletes is kell legyen, hogy a nukleinsav ne sérüljön. A legegyszerűbb módszer a sejtek lizálására a hipotóniás sokk. A különböző biológiai membránok megbontására használhatunk még detergenset (pl. SDS), vagy enzimes emésztést (pl. proteináz K). Baktériumsejtek esetén szükséges lehet a sejtfal lizozimmal történő megbontása is. Bonyolultabb állati, vagy még inkább növényi szövetek esetén mechanikai módszert is alkalmazhatunk pl. a szövet folyékony N₂ - ben történő fagyasztása utáni, mozsárban való összetörésével. Ebben a lépésben a gyorsaság kritikus paraméter az endogén nukleázok működésének minimalizálása érdekében. Az emésztő pufferben lévő EDTA is ezt a célt szolgálja, mivel a DNázok működéséhez szükséges kétértékű fémionokat megköti. A szövetminta fagyasztás utáni felengedését és újra fagyasztását kerülni kell!

2. A nukleinsav extrahálása

A sejt kivonat nukleinsav tartalmának kinyerésére az oldószeres extrakció során fenol/ kloroform/ izoamil-alkohol elegyet használunk. A fenol hatékonyan denaturálja a fehérjéket és feltehetően egy részüket fel is oldja. A celluláris fehérjék és a proteináz K eltávolítása a DNS minta későbbi restrikciós hasítása miatt nagyon fontos. A kloroform is denaturálószer, ezen kívül az extrahálást követően stabilizálja a vizes és a szerves fázis közötti határt, ezzel megkönnyítve a vizes fázis eltávolítását. Az izoamil-alkohol a habképződést gátolja meg, nem feltétlenül szükséges az extrakcióhoz. A nukleinsavak a felső, vizes fázisba kerülnek, amely centrifugálással elválasztható a szerves fázistól. A vizes fázis pipettázással történő eltávolításakor ügyelni kell, hogy a két fázis között kialakult fehérjecsapadék réteg sértetlen maradjon, ne kerüljön fehérjeszennyeződés a nukleinsavat tartalmazó vizes fázisba. A kicsapódott fehérje nagy része ugyanis a szerves és vizes fázis határfelületére kerül. 100 µl-nél kisebb térfogatú mintát extrahálni nehéz, nagy a százalékos veszteség. Ilyen esetben a DNS mintát hígítjuk. Túl magas sókoncentráció esetén (>0,5 M) a fázisok felcserélődhetnek, vagyis a szerves oldószerek kerülnek felülre centrifugálás után. A szerves fázis sárgás színe alapján mindig könnyen azonosítható.

Az extrahálást jól működő vegyi fülkében, fokozott figyelemmel kell végezni. A bőrre került fenol komoly égési sérüléseket okoz. Az extraháláshoz használt fenol desztillált, mivel oxidációs termékei rongálják a DNS molekulát, és pufferrel (0,1 M Tris-HCl, pH 8,0) telített. Fontos, hogy a pH nagyobb legyen, mint 7 - 8, különben a DNS a szerves fázisba kerülne. Mivel ez az előkészítő munka hozzáértést igényel és veszélyes, érdemes a molekuláris biológiai munkákhoz ajánlott, drágább, de közvetlenül felhasználható fenolt beszerezni. A DNS extrakcióhoz használt elegy összetétele: 25 térfogat fenol, 24 térfogat kloroform és 1 térfogat izoamil-alkohol.

3. A DNS tisztítása

A DNS tisztítására/izolálására alkalmas módszerek

- Kromatográfias eljárások: gélszűrés, ioncserélő kromatográfia, affinitás kromatográfia, adszorpciós kromatográfia. Ez utóbbi azon alapszik, hogy a nukleinsavak szelektíven adszorbeálódnak szilikátok, vagy üveg felületére kaotróp sók jelenlétében. Alacsony sókoncentráció mellett a DNS az üveggyöngy felületéről könnyen eluálható.

- Centrifugálás: CsCl gradiens centrifugálással hatékonyan lehet izolálni pl. plazmid, vagy virális DNS-t. A centrifugálásnak közvetve szerepe van a különböző kromatográfiás elválasztásoknál is, mert a centrifugacsövekbe (ependorf cső) illeszthető kromatográfiás oszlopok elúciója igen gyakran centrifugálással történik.

- Szelektív kicsapás: a nagy sókoncentráció mellett végzett gyors alkoholos kicsapás jelentősen csökkenti a minta RNS tartalmát. A leggyakrabban használt só az ammónium acetát. Ammónium acetát helyett nátrium acetát is használható, az előbbi specifikusan a nagyobb DNS molekulákat csapja ki. Az olcsó NaCl viszont nem ajánlott, mivel rosszul oldódik etanolban, ezért a csapadék mellől nehéz lenne eltávolítani. A nukleinsavak etilalkohol, vagy izopropil-alkohol segítségével kicsaphatók az oldatból. Az alkohollal kicsapott és mosott DNS-t TE pufferben feloldva tárolhatjuk 4 °C-on, kb. 1 mg/ml koncentrációban. A DNS-t hosszabb ideig alkoholban, kicsapott formában a legbiztonságosabb tárolni.

- Enzimatiszítás: Ha szükséges, a maradék RNS szennyeződést eltávolíthatjuk úgy, hogy a mintához 0,1 % SDS-t és 1 µg/ml DNáz mentes RNázt adunk, majd 37 °C-on egy óráig inkubáljuk. Ezt követően a mintát újra extrahálni kell szerves oldószerrel és alkohollal kicsapni a fentiek szerint.

A DNS mellett közvetlenül jelenlévő fehérje denaturálásával a nukleinsav elveszíti kompakt szerkezetét, törékennyé válik. Ha nagy molekulatömegű DNS-t szeretnénk nyerni, például ha genomi DNS könyvtár készítésére akarjuk felhasználni a preparátumot, akkor a szerves oldószerrel és só eltávolítását nem alkoholos lecsapással, hanem dialízissel érdemes végezni. Nagy viszkozitása miatt legalább 24 órán át kell a DNS-t dializálni, minimum 100-szoros térfogatú TE pufferrel (10 mM Tris-HCl, pH 7,4, 1 mM EDTA) szemben, a puffert 1-2-szer cserélve.

A tisztított DNS minta tisztaságát és koncentrációját a hígított minta 260 és 280 nm-en mért abszorbanciája alapján ellenőrizhetjük. A 260 nm-en mért egységnyi abszorbancia 50 µg/ml DNS koncentrációnak felel meg. A tisztaság kritériuma, hogy a 260 nm-en mért DNS és a 280 nm-en mért fehérje abszorbancia értékek hányadosa >1,8 legyen. Egy 50 % fehérje, 50% DNS keverék abszorpciós hányadosa 1,5! A DNS tisztaságának és koncentrációjának ellenőrzésére másik, gyakran használt módszer az agaróz gélelektroforézis, mely a DNS fragmentek további tisztítására is lehetőséget ad.

GENOMI DNS PREPARÁLÁSA

Kókai Endre

A *Drosophila melanogaster* genomi DNS preparálást Ashburner (1989) leírása alapján, a következő módon végezze:

1. Gyűjtsön össze kifejtett gyümölcslegyeket és tegye őket 1-2 órára üres edénybe, így elkerülhetjük a tápcsatornájukban lévő emésztetlen élesztőgomba DNS-ének szennyezését. Altassa el étellel az élőlényeket és felhasználásig tárolja a kiindulási anyagot -70°C -on.
2. 40 db muslicát dörzsöljön el folyékony nitrogénnel lehűtött dörzscsészében. Felolvadás előtt adjon a mintákhoz 1ml kivonó puffert és folytassa a dörzsölést az oldattal. A mintát pipettázza Eppendorf csőbe.
3. Centrifugálja a mintát szobahőmérsékleten 800 g fordulaton 1 percig, hogy eltávolítsa a törmeléket.
4. A felülúszót tegye új Eppendorf csőbe és centrifugálja szobahőmérsékleten 8000 g fordulaton 5 percig.
5. A pallethez adjon 500 μl kivonó puffert és szuszpendálja fel pipetázással.
6. A szuszpenzióhoz adjon proteináz K enzimet 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ koncentrációban és 50 μl 10 % SDS oldatot. Keverje össze a cső tartalmát óvatos le-fel forgatással.
7. Inkubálja a mintát 37°C -on 45-60 percig.
8. Kétszer végezze el a fenol extrakciót az alábbiak szerint:
 - a. Kb. 550 μl kivonathoz adjon 500 μl fenolt majd keverje össze a csövet forgatással.
 - b. Centrifugálja az elegyet szobahőmérsékleten 10000 g fordulaton 5 percig a szerves, és a vizes fázis elkülönítésére.
 - c. Pipetázza a felső, vizes fázist tiszta Eppendorf csőbe. Ügyeljen arra, hogy a fázishatáron levő fehérje csapadékot ne érintse a pipetta hegyével.

A munka során ügyeljen arra, hogy a fenol erősen maró hatású anyag!
9. Adjon a mintához 500 μl kloroform / izoamil-alkohol, 24:1 térfogatarányú elegyét és végezze el egyszer az extrakciót a fenolos lépéshez hasonlóan.
10. A felső vizes fázishoz adjon NaCl oldatot 200 mM végkoncentrációban és 2 térfogat abszolút etanolt. Keverje össze a mintát forgatással.
11. A kicsapódott DNS-t centrifugálással (10000 g, 10 perc) gyűjtse össze szobahőmérsékleten.
12. Távolítsa el a felülúszót pipetával.
13. Mossa a DNS pelletet 500 μl 70 % etanollal.
14. Szárítsa a DNS-t vákuum centrifugában 10 percig.
15. Oldja fel a beszáradt DNS-t 100 μl TE pufferben, egy éjszakán át hagyja szobahőmérsékleten a mintát a tökéletes feloldódás érdekében.

Az így nyert DNS preparátum közvetlenül ellenőrizhető agaróz gél-elektroforézissel. Ismert mennyiségű DNS minta felvitele mellett megbecsülhető az ismeretlen minta koncentrációja. A tiszta preparátum csak nagy molekulatömegű genomi DNS-t tartalmaz. Az esetleges RNS szennyezés RNáz kezeléssel eltávolítható.

A preparátum pontos koncentrációjának meghatározását fotometriás módszerrel végezzük. 5 µl DNS oldat 595 µl TE pufferbe történő mérésével készítsen egy 120x-hígított oldatot. Határozza meg az oldat fényelnyelését TE pufferrel szemben 260 és 280 nm hullámhosszon. A 260 nm-en mért abszorbancia alapján a DNS koncentráció az alábbi módon számolható:

$$A_{260} * 50 \text{ mikrogramm / ml} * \text{hígítás}$$

Állapítsa meg a DNS tisztaságát az A_{260} / A_{280} arány alapján. (Ha $A_{260} / A_{280} > 1,8$ a DNS preparátum tisztának tekinthető).

Felhasznált anyagok és oldatok:

Dietil-éter

Folyékony nitrogén

Proteináz K törzsoldat 10 mg/ml

SDS oldat 10 %

NaCl törzsoldat 5 M

Kloroform / izoamil-alkohol, 24:1 térfogatarányú elegye

Etanol: 70 % ill. 100% abszolút alkohol

DNS kivonó puffer: 10 mM Tris HCl (pH: 7,5)
10 mM EDTA
60 mM NaCl
1,25 mM spermin
1,25 mM spermidin

TE puffer: 10 mM Tris HCl (pH: 8,0)
1 mM EDTA

Fenol oldat: 0,1 M Tris HCl (pH 7,6) pufferrel telített fenol
0,1 % hidroxikiolin

Irodalom

Michael Ashburner: *Drosophila*, A laboratory manual
Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989

PLAZMID DNS TISZTÍTÁSA

Kókai Endre

Plazmid DNS tisztítása baktériumsejtekből a rekombináns klónok analizéséhez, illetve a velük való további molekuláris biológiai munkákhoz alapvető fontosságú. A tisztítás során a plazmid DNS-t el kell választanunk többek között a gazdasejt fehérjétől és a kromoszómális DNS-től. Kis mennyiségű plazmid DNS kinyerésére több módszert dolgoztak ki, melyek közül az egyik leggyakrabban alkalmazott eljárás az alkalikus lízisen alapuló minipreparálás. Ekkor a plazmid DNS-t a plazmidot tartalmazó baktérium folyékony sejt kultúrájából nyerjük ki, a sejtek lízisét NaOH/SDS oldattal való kezeléssel érjük el. Az SDS kicsapja a baktériumfehérjéket, a NaOH emellett denaturálja mind a kromoszómális, mind a plazmid DNS-t.

A módszer a kromoszómális és a plazmid DNS eltérő renaturációs képességét használja ki. A kálium-acetáttal végezett semlegesítés a kis méretű cirkuláris plazmid DNS gyors renaturálódását okozza, mely így az oldatba kerül, a kromoszómális DNS nagy része viszont a baktériális fehérjékkel és az SDS káliumsóival együtt a csapadékban marad és centrifugálással eltávolítható. A felülúszóból a plazmid DNS-t etanolos kicsapással, vagy speciális, erre a célra kifejlesztett gyanták segítségével nyerhetjük ki és töményíthetjük. Ez utóbbira példa a következő tisztítási eljárás, melynek során a plazmid DNS szelektíven adszorbeálódik a gyantához, majd a szennyezések eltávolítása után az oszlopról kis ionerősségű oldattal, mint például TE pufferrel¹, vagy vízzel eluálható. A módszer alkalmas 15-20 µg plazmid DNS tisztítására *E. coli* tenyészetekből.

Plazmid preparálás a "QIAprep kit" felhasználásával

1. Gyűjtse össze 1-3 ml folyékony sejt kultúra sejtjeit centrifugálással (1perc 10000 g) Eppendorf csőben, majd szuszpendálja fel 250 µl P1 sejt szuszpendáló oldatban. A P1 oldathoz használat előtt adja hozzá a kit-ben található RNáz A oldatot.
2. A szuszpenzióhoz adjon hozzá 250 µl P2 sejt lízis oldatot, majd óvatosan keverje össze az elegyet.
3. Ezután adjon hozzá 350 µl N3 semlegesítő oldatot, majd néhányszor fordítsa le-fel az Eppendorf csövet.
4. Centrifugálja 10 percen keresztül szobahőmérsékleten 10000 g-vel a csöveket.
5. A felülúszót pipettázza át a QIAprep oszlopra.
6. Centrifugálja az oszlopot 30 másodpercig 10000 g-vel. Az átfolyó folyadékot távolítsa el.
7. Mossa az oszlopot 0.5 ml PB pufferrel és centrifugálja ismét 30 másodpercig 10000 g-vel. Az átfolyó mosó oldatot távolítsa el.
8. Mossa ismét az oszlopot 0.75 ml PE pufferrel. 30 másodperces centrifugálással 10000 g-vel távolítsa el a mosó folyadékot.
9. A maradék PE puffer eltávolítása érdekében újból centrifugálja a mintát 1 percig 10000 g-vel.
10. Helyezze az oszlopot egy új Eppendorf csőbe, amelynek előzőleg eltávolította a fedelét. Pipettázon 50 µl EB puffert az oszlop közepére, majd 1 perc várakozás után 1 perces centrifugálással eluálja a DNS-t az oszlopról.
11. A kapott nagy tisztaságú plazmidot -20°C-on tárolja.
(A kísérletben használt oldatok és a gyanta összetételéről a gyártó cég nem ad információt.)

¹ TE puffer: 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA

RNS IZOLÁLÁS SEJTEKBŐL ÉS SZÖVETEKBŐL

Scholtz Beáta

Védekezés az RNS degradációja ellen

Az RNS izolálás és az RNS-sel való munka egyik legfontosabb követelménye az RNS degradáció megelőzése illetve gátlása. A tiszta RNS lényegesen érzékenyebb a magasabb hőmérsékleten való tárolásra, mint a DNS. Ezért az RNS oldatot munka közben mindig jégen kell tartani, a magasabb hőmérsékleten való inkubálások idejét és az olvasztások-fagyasztások számát pedig minimalizálni kell. Hosszabb távon az RNS-t -20°C -n kell tárolni, az archivált RNS mintákat pedig célszerű 3M Na-acetáttal és etanollal kicsapni, és a csapadékot az etanollal együtt $-20^{\circ}\text{C}/-70^{\circ}\text{C}$ -n tárolni. Az RNS vizes oldatban spontán hidrolizálhat, és ezt a reakciót a divalens kationok katalizálják - az RNS-t tehát hosszabb távra ajánlott 0.1 mM EDTA-ban vagy TE pufferban oldani és tárolni. Az RNS degradációját azonban többnyire a különböző ribonukleáz enzimek (röviden RNázok) idézik elő, melyek mind a sejteken belül, mind pedig a laboratóriumi környezetben jelen vannak. Az RNázok, ellentétben a DNázokkal, aktivitásukhoz nem igényelnek divalens kationokat (Mg^{2+} , Ca^{2+} stb.), tehát keláló ágensekkel (EDTA) az RNázokat gátolni nem lehet. Ezen felül az RNázok aktivitásukat még hőkezelés, autoklavozás után is megőrzik. Az RNázok elleni védekezésnek két része van: az egyik az oldatok, eszközök, laboratóriumi környezet RNáz-mentességének biztosítása, illetve a megfelelő munkatechnika, amellyel elejét vesszük a minta RNázal történő beszennyezésének; a másik része pedig az RNS izolálás során a sejtekben jelenlevő endogén RNázok azonnali inaktiválása, hogy ne férhessenek hozzá az RNS molekulákhoz.

Az RNS munkához használt csövek és pipettahegyek vagy legyenek a gyártó által garantáltan RNáz mentesek, vagy pedig jól zárható zacskóban-dobozban tároljuk, és csak RNáz mentes csipesszel, kesztyűs kézzel, illetve a pipettorral érintjük hozzájuk. Az RNS-el való munka során fontos az állandó kesztyűviselés és a gyakori kesztyűcsere. Az üveg- és fémeszközök 4 órás 300°C -n történő égetése biztosíthatja az RNáz mentességet – egyéb eszközöket pl. RNaseZAP (Ambion) oldattal való áttörléssel tisztíthatunk. Az RNS elektroforéziséhez használt futtatókádat és géllöntő tálcát-fésűt RNáz-mentesíthetjük 10% SDS-ben egy éjszakán át történő áztatással, vagy fél órás 10% H_2O_2 -s áztatással, amit DEPC-es vízzel való öblítés követ. Oldatokat RNáz mentesíthetünk DEPC (diethyl-pirokarbonát) kezeléssel is – kivételt képeznek az amincsoportokat tartalmazó pufferek, pl. Tris és HEPES, mivel ezek kémiaailag reagálnak a DEPC-cel, és így nem marad az oldatban elegendő DEPC az RNázok inaktiválásához. A kezelés során az oldathoz DEPC-et adunk, 0.1% végkoncentrációban, majd több órán át kevertetjük szobahőn mágneses keverővel, végül pedig 45 percig autoklavozzuk. ***A DEPC illékony, potenciális karcinogén anyag, ezért csak vegyi fülke alatt nyissuk ki az üveget, és a kevertetést is fülke alatt végezzük!*** Mivel a polikarbonát pipettákat oldja, csak automata pipettorral, 1 ml-s pipettahegygel adagoljuk. A DEPC kovalensen módosíthatja (karboximetilálja) az RNS-t, ezért fontos a hosszabb autoklavozási idő betartása, melynek során a DEPC vízzé és etanollá bomlik, illetve nem ajánlott a DEPC koncentráció növelése.

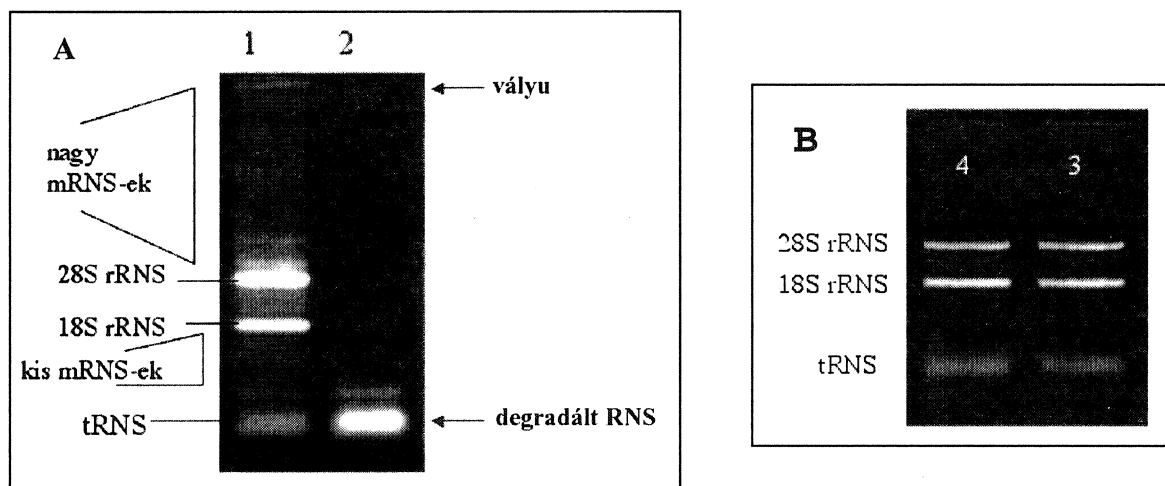
Az RNS izoláláshoz használt lizispufferek olyan anyagokat tartalmaznak (pl. guanidin izotiocianát), melyek azonnal inaktiválják az endogén RNázokat. A sikeres RNS izolálás első feltétele, hogy az izolálás előtti sejthalált minimalizáljuk. A pusztuló sejtekben ugyanis az RNázok degradálni kezdik az RNS-t és így az izolált RNS jelentős része további munkára alkalmatlan, degradált formában lesz jelen a preparátumban. A sejteket-szöveteket tehát az izolálás előtt jégen kell tárolni, maximum 30 percig, vagy folyékony nitrogénben lefagyasztani, vagy az Ambion által forgalmazott RNAlater oldatban tárolni, a gyártó utasításainak megfelelően.

A sikeres RNS izolálás második feltétele, hogy a sejteket, szöveteket a lízispuffer jelenlétében minél gyorsabban és tökéletesebben homogenizáljuk. Pusztán a lízispuffer hozzáadása nem feltétlenül biztosítja a gyors és egyenletes lízist, ezért mindig szükség van az egyidejű mechanikai homogenizálásra is. Sejtkultúrából származó sejtfal nélküli sejtek esetében elegendő a lizátumot vortexelni, vagy többször pipettázni. Sejtfallal rendelkező sejteket (növényi, élesztő, vagy bakteriális sejtek) célszerű üvegyöngyös homogenizálóval processzálni (pl. Biospec Products Inc. homogenizátorok), vagy pedig először a sejtfalat enzimesen emésztetni, és utána a sejteket lízispufferban vortexelni. A friss vagy RNAlater-ben tárolt szövetmintákat lízispuffer jelenlétében a megfelelő késes homogenizátorral (pl. Polytron) homogenizáljuk, a szövettörmelékét szűrővel eltávolítjuk, és a lizátumból az RNS izolálható. A keményebb szöveteket (fás növények, fonalas gombatelepek, vagy csont és porc) folyékony nitrogénben fagyasztjuk, majd fagyott állapotban porrá törjük, és a port lízispuffer jelenlétében homogenizátorral homogenizáljuk. A folyékony nitrogénben fagyasztott minták porrá törésénél nagyon lényeges hogy a minta fel ne olvadjon, tehát gondoskodni kell a minta és a vele kapcsolatba kerülő eszközök folyamatos hűtéséről.

Az RNS-mRNS izoláláshoz használt lízispufferek és kitek

A legmegbízhatóbb, a laboratóriumban készített oldatokat alkalmazó RNS izolálási módszer a Chomczynski-féle guanidin izotiocianátos lízis, melyet savas fenollal történő extrakció követ. Az első lépésben a sejtekhez-szövetmintához tömény guanidin izotiocianát oldatot adunk, és a megfelelő módon homogenizáljuk. A guanidin izotiocianát oldat nemcsak lizálja a sejteket, de egyszersmind az RNázok rendkívül hatékony gátlószere is. Mivel a lízispuffer bizonyos idő után elveszíti RNáz-gátló hatását, a készítés dátumát mindig fel kell jegyezni. Fontos, hogy inkább több mint kevesebb lízispuffert használjunk adott tömegű szövet, vagy adott számú sejt líziséhez, hogy az RNázok gátlása és a lízis minél gyorsabb és teljesebb legyen. A homogén lizátumhoz ezután egyenlő térfogatú savas pH-jú fenolt adunk, majd a mintát vortexelve vagy a csövet többször összerázva extraháljuk. Az így kapott vizes-fenolos emulzióhoz kloroform-izoamil alkohol keveréket adunk, a kirázást megismételjük, majd a mintát centrifugáljuk, hogy a szerves és vizes fázisok elváljanak egymástól. A centrifugálás végén a fenol-kloroform-izoamil alkohol elegy a csőben alul helyezkedik el (szerves fázis), felette található a kisebb fajsúlyú vizes-guanidinos fázis. A savas fenollal történő kirázás denaturálja és kicsapja a proteineket, az utána következő kloroform-izoamil alkoholos kirázás pedig elősegíti a szerves és a vizes fázis minél optimálisabb elválasztását a centrifugálás során. A kicsapódott proteinek az organikus és a vizes fázis határán (interfázis) sárgásfehér réteget alkotva helyezkednek el, míg a DNS az alsó, szerves fázisban és az interfázisban, az RNS pedig a felső, vizes fázisban található. Az RNS a felső vizes fázissal együtt pipettázással eltávolítható. A protein vagy DNS szennyezés bevitelt elkerülendő lényeges, hogy sem az interfázisból, sem a szerves fázisból ne kerüljön a pipettába, ezért a vizes fázisból mindig hátra kell hagyni valamennyit. A vizes fázisból az RNS kicsapható azonos térfogatú izopropanollal, vagy 2.5-3X térfogat etanollal, minimum két óras -20°C -n történő inkubálás után. A Chomczynski-féle guanidin izotiocianátos lízis során a vizes fázisban elegendő mennyiségű só van jelen, ezért a kicsapáshoz külön só hozzáadása nem szükséges. A kicsapás után az RNS csapadékot 4°C -n lecentrifugáljuk, a felülúszót gondosan eltávolítjuk, majd a csapadékot 75% -20°C -s etanollal mossuk. A mosás célja részben az, hogy a csapadékból a só nagy részét eltávolítsuk, illetve hogy az izopropanolt a sokkal illékonyabb etanollal helyettesítsük. Éppen ezért a mosás során lényeges, hogy a felülúszót mindig alaposan eltávolítsuk, a csapadékot a mosó-etanol hozzáadása után felvortexeljük és rövid ideig állni hagyjuk, mert az etanol csak így tud a csapadék részecskéi közé behatolni, és onnan a sót és izopropanolt kimosni. A mosás után a csapadékot ismét lecentrifugáljuk, majd a felülúszót pipettázással eltávolítjuk. A maradék

etanolt elpárologtatjuk: vagy úgy hogy a csövet nyitva a laborasztalon hagyjuk kb 10-15 percig, vagy pedig működő vegyifülke alatt 5 percig szárítjuk. Nagyon fontos, hogy az RNS csapadékot ne szárítsuk túl, mert akkor nehéz, vagy lehetetlen lesz újra feloldani – ezért vákuum centrifugában való szárítása tilos! A nem túlszártott RNS csapadék felszíne nedvesen csillog – ha túlságosan száraz, akkor matt fehér, és többnyire elválik a cső falától is. Az RNS csapadékhoz DEPC H₂O-t, 0.1 mM EDTA-t vagy TE puffert adunk, jégen inkubáljuk míg teljesen feloldódik, majd mennyiségét és minőségét spektrofotometriás méréssel és agaróz gélelektroforézissel ellenőrizzük. A tiszta RNS OD₂₆₀/OD₂₈₀ aránya 1.9-2.0; ez alatti érték protein vagy fenolszennyezést jelez. A nem degradált illetve a degradált RNS agaróz gélelektroforézis képét az 1. ábrán lehet összehasonlítani.



1. ábra. Guanidines lizissel és fenol-kloroform extrakcióval izolált totál RNS agaróz gélelektroforézis képe.

A/1. Jó minőségű, nem degradált RNS. A 28S riboszomális RNS csík intenzitása 1.6-2X-e a 18S rRNS csík intenzitásának. A 28S rRNS felett eléggé egyenletes méreteloszlással a nagyobb méretű mRNS-ek populációja festődött EtBr-dal. Néhány nagyobb mennyiségben termelődött RNS önálló csíkként látszik a 28S rRNS felett. A transfer RNS-ek (tRNS) a gél alján futnak. A/2. Majdnem teljesen degradálódott RNS. A 28S rRNS egyáltalán nem látszik, a 18S rRNS-ből is csak egy igen halvány csík látszik. A degradálódott RNS kis fragmentjei a tRNS-el egy vonalban futnak, a gél alján láthatók.

B/3-4. Részlegesen degradálódott RNS. A 28S és 18S riboszomális RNS csík intenzitása egyenlő (B/3), illetve a 18S rRNS csík intenzitása erősebb a 28S rRNS-énél (B/4).

A minőségellenőrzéshez nem szükséges formaldehides denaturáló gélt futtatni, egyszerű 0.8%, 1XTAE pufferos agaróz gél is megfelel. A gélöntéshez használt fésű legalább 0.5 cm széles legyen, az RNS-ből maximum 1 µg-t futtassunk, és a gélt lassan, kb. 50-60 volttal futtassuk szobahőmérsékleten. Az agaróz gélelektroforézis modern alternatívája az Agilent 2100 Bioanalyzer készülékkel használható kapilláris csippel történő analízis. Az Agilent csipről részletes leírást található az alábbi honlapon: <http://www.chem.agilent.com>. Habár drága, az Agilent analízis előnye, hogy igen kis mennyiségű RNS-t is pontosan detektál, illetve ugyanazon mintáról igen pontos kvantitatív és kvalitatív adatot is szolgáltat. Nagy érzékenysége miatt nemcsak totál RNS (és DNS), hanem mRNS és cDNS preparátumok kvantitatív és kvalitatív analízisére is alkalmas.

A totál RNS izolálásához ma már gyakrabban használják a Trizol oldatot vagy Tri-reagenst. Mindkét oldat tulajdonképpen guanidin izotiocianát és savas fenol stabilizált elegye ami az izolálást menetét jelentősen meggyorsítja. A lízis után a szerves-vizes fázis elválasztása ugyanúgy kloroform hozzáadásával történik, és az RNS-t a vizes fázisból alkoholos kicsapással nyerjük vissza. Egyéb kitek (pl. Qiagen RNeasy) a lizátumban jelenlevő RNS-t szilika-mátrixot hordozó oszlopokon kötik meg a megfelelő puffer jelenlétében, a proteineket és DNS-t mosással távolítják el, és a tiszta RNS-t a megfelelő pufferrel eluálják.

Az a strukturális jellegzetesség, hogy az mRNS-ek óriási többsége a 3' végen mintegy 200 nukleotid hosszú poliadenilát szakaszt hordoz, kihasználható az mRNS-k elkülönítésére a többi RNS-től. Ha az RNS keveréket egy olyan kromatográfiás oszlopon engedik át, mely szilárd fázishoz (általában cellulózhoz) kötött oligo(dT)-t tartalmaz, a poli(A) farok hibridizálódik az oligo(dT)-vel és kikötődik az oszlophoz. A nem kötött nukleinsavat kimosva, az mRNS eluálható az oszlopról. Ez a módszer az affinitás kromatográfia egy speciális esete. Az mRNS izolálásához számos kiváló kit áll rendelkezésre (Promega, Ambion).

Irodalom

Chomczynski and Sacchi (1987) Analytical Biochemistry 162:156-159

TELJES RNS PREPARÁLÁSA

Kócai Endre

A *Drosophila melanogaster* a klasszikus genetikai kutatások jól ismert modell szervezete. A genetikai háttér és a teljes genom szekvenciájának ismerete jó lehetőséget biztosít a gének funkciójának vizsgálatára. Ezen kísérletek elvégzésének fontos előfeltétele a nagy tisztaságú RNS preparálása. A számos lehetőség közül azt az egy lépéses módszert választottuk, amely TRIzol Reagens (GIBCO BRL) alkalmazásán alapul. Az így izolált RNS minta a továbbiakban alkalmas Northern blot analízisre, dot blot hibridizációra, poly (A)⁺ szelekcióra, *in vitro* translációra, RT PCR reakcióra és molekuláris klónozásra.

1. 30-40 db korábban 1 órahosszáig éheztetett, és elaltatott muslicát helyezzen folyékony nitrogénbe, majd kloroformmal öblített és folyékony nitrogénnel lehűtött dörzsöcsészében alaposan dörzsölje el a rovar testeket. Felolvadás előtt adjon a mintához 1ml TRIzol reagenst és folytassa a dörzsölést az oldattal. A mintát pipettázza Eppendorf csőbe.
2. Inkubálja szobahőmérsékleten a csövet 5 percig.
3. Adjon a mintához 0.2 ml kloroformot és kézben forgassa le-fel a csövet 15 másodpercig.
4. 3 percig hagyja állni a mintát szobahőmérsékleten.
5. Centrifugálja a homogenizátumot 4°C-on 12000 g fordulaton 15 percig.
Centrifugálás után három fázist különíthet el:

- alsó, piros, fenol-kloroformos fázis,
- középső, fehér fázis,
- felső, színtelen, vizes fázis.

A vizes fázis térfogata ~ 60%-a a homogenizáláshoz használt TRIzol térfogatának.

6. Pipettázza a felső vizes fázist egy új Eppendorf csőbe és adjon hozzá 0,5 ml izopropanolt.
7. Tartsa jégen a csövet 10 percig.
8. Centrifugálja 4°C-on és 12000 g fordulaton 10 percig.
9. Távolítsa el maradéktalanul a felülúszó vizes-izopropanolos oldatot.
10. Mossa az RNS pelletet 1 ml 75%-os etanollal.

Az RNS preparátum 75%-os etanolban 1 hétig tárolható 4°C-on és 1 évig -20°C-on.

11. Szárítsa be az RNS pelletet fülke alatt 5-10 percig. Ne szárítsa meg tökéletesen, mert az gátolja az RNS feloldódását.
12. Oldja fel az RNS-t 50 µl formamidban. Formamidban az RNS RN-áz hatástól mentesen tárolható -20°C-on.

Az RNS preparátum közvetlenül ellenőrizhető agaróz / formaldehid gélelektroforézisben. Ismert mennyiségű RNS minta felvitele mellett megbecsülhetjük a saját mintánk koncentrációját.

A pontos koncentráció meghatározását fotometriás módszerrel végezzük. Az RNS mintát hígítsa 120x –úgy, hogy 5 µl RNS oldat 595 µl 1 mM Na₂HPO₄ (pH 7.5) oldatba mér. Határozza meg az oldat fényelnyelését Na₂HPO₄ oldattal szemben 260 és 280 nm hullámhosszon. A 260 nm-en mért abszorbancia alapján az RNS koncentráció az alábbi módon számolható:

$$A_{260} * 40 \text{ mikrogram / ml} * \text{hígítás}$$

Az RNS tisztaságát az A₂₆₀ / A₂₈₀ arány alapján határozhatjuk meg. (Ha az A₂₆₀ / A₂₈₀ >1,9 az RNS preparátum tiszta).

Felhasznált anyagok és oldatok

Folyékony nitrogén

Kloroform

TRIzol Reagens (GIBCO BRL)

Izopropanol

Formamid

Etanol (75 %)

Na₂HPO₄ törzsoldat 1 M (pH 7.5)

Irodalom

D. Simms, P. E. Cizdziel, P. Chomczynski: TRIzol™ : A new reagent for optimal single-step isolation of RNA (1993) Focus^R 15, 99.

DNS VIZSGÁLATA AGARÓZ GÉL ELEKTROFORÉZISSSEL

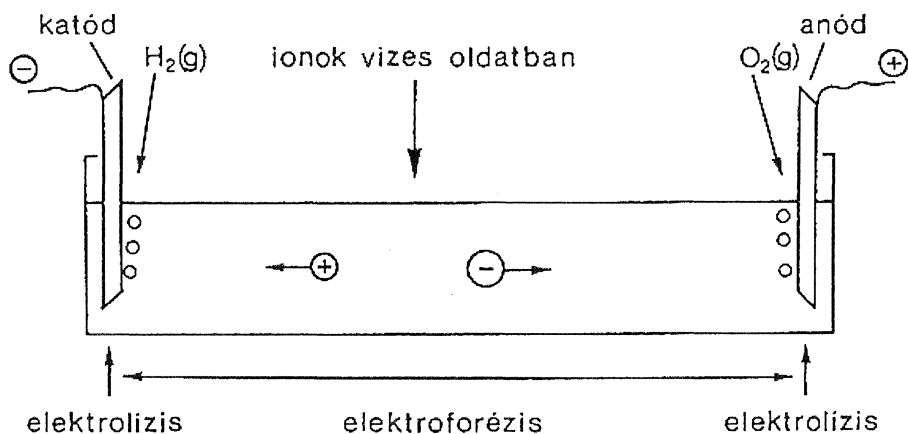
Dombrádi Viktor

Az elektroforézis elvi alapjai

Töltéssel rendelkező részecskék elektromos térben töltésüknek megfelelő irányban mozognak. A pozitív töltésű kationok a negatív katód, míg a negatív töltésű anionok a pozitív anód felé haladnak. Az elektródok felületéhez érve az ionok töltésüket elvesztik. Elválasztás-technikai szempontból az ionok áramlása az ún. *elektroforézis* a lényeges; az ionok semlegesítődése az *elektrolízis* másodlagos kísérőfolyamatnak tekinthető.

Az ionok vándorlási sebességét töltéssűrűségük és az alkalmazott feszültség- gradiens nagysága szabja meg. A feszültség-gradiens egyenesen arányos a két elektród közötti feszültségkülönbséggel és fordítottan arányos az elektródok távolságával. Az elektródok távolsága a készülék geometriájától függ; mivel az elektródok fix beépítésűek, ezt a tényezőt nem áll módunkban megváltoztatni. Szabályozható viszont az elektródokra kapcsolt egyenáramú áramforrás, illetve egyenirányító feszültsége. Minél nagyobb a feszültségkülönbség (egy bizonyos határig), annál gyorsabb az elválasztás, azonban arra is gondolni kell, hogy a nagy feszültséghez nagyobb áramerősség tartozik; ami a készülék felmelegedéséhez vezet. Nagyobb hőmérsékleten viszont gyorsabb a diffúzió, ami az elválasztás minőségét rontja. Ezért a készülék hűthetőségét és az alkalmazott puffer-rendszer ellenállását figyelembe véve olyan optimális feszültséget kell megválasztani, ami a lehető legrövidebb idő alatt megfelelő elválasztást biztosít.

Az ionok töltéssűrűsége egyenesen arányos a nettó-töltéssel és fordítva arányos a mérettel. A méret megadásakor számításba kell venni az adott ion hidratburkát is, mivel az ionhoz kötött vízréteg az ionnal együtt vándorol. A fenti szabály alól kivételt jelent a H^+ és OH^- , melyek mozgékonyasága a vártnál sokkal nagyobb. A nagy mozgékonyaság oka az, hogy vizes oldatban a töltés a hidrogénhíddal összekötött vízmolekulákon keresztül vándorol a H^+ , illetve OH^- aktuális elmozdulása nélkül. A fenti két ion nagy vándorlási sebessége miatt vizes oldatban a katódhoz a H^+ , az anódhoz a OH^- ér először. Ezért, és a puffer alkotórészek redoxpotenciálja miatt az elektroforézist kísérő elektrolízis során a katódon H_2 , az anódon O_2 gáz keletkezik. Bár ez a folyamat az elválasztás szempontjából mellékes, az elektródon buborékok formájában megjelenő gáz minden mérőműszer nélkül is bizonyítja, hogy a rendszeren áram folyik át, azaz nincs kontaktushiba (1. ábra).



1. ábra. Az elektroforézis elvi vázlata

Az ionok eltérő töltéssűrűségük miatt eltérő sebességgel mozognak az elektromos térben, ami lehetővé teszi elválasztásukat. Gyenge savak, ill. bázisok disszociációjának mértéke, és így a töltéssel rendelkező ionok kialakulásának mértéke, a közeg pH-jától függ. Ikerionos és poliionos anyagok esetében a pH nemcsak a vándorlás sebességét, de annak irányát is megszabja. Egy adott anyag ionjainak töltését és méretét komplexképzők segítségével is lehet módosítani. Ezért az elválasztást az alkalmazott puffer pH-ja és adalékanyagok jelenléte alapvetően befolyásolja.

Szabad-határfelületű elektroforézis

Az elektroforézist először A. Tiselius alkalmazta szérumfehérjék elválasztására. A közel azonos méretű és alakú fehérjéket állandó feszültségkülönbség mellett nettótöltésük szerint szeparálta. Úttörő munkásságáért 1948-ban megkapta a kémiai Nobel-díjat. Bár a Tiselius által alkalmazott eljárás elméleti jelentősége nem kétséges, gyakorlati alkalmazását hátráltatta, hogy a folyamat nyomon követése bonyolult analitikai eljárást igényelt és az elválasztás határfokát a szabad diffúzió jelentősen rontotta. Ezért a szabad-határfelületű elektroforézis nem válhatott rutin módszerré.

Zóna elektroforézis

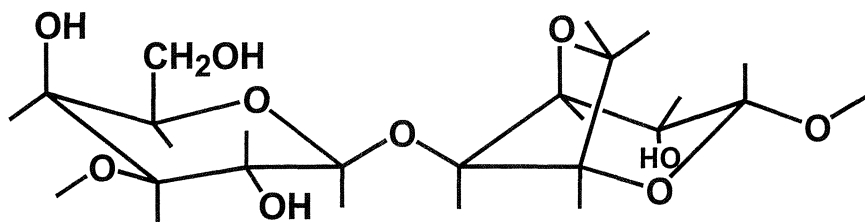
A szabad-határfelületű elektroforézis hátrányait úgy küszöbölték ki, hogy az elektroforézist ún. elektroforetikus hordozók által biztosított mechanikailag stabil mátrixban végezték. Hordozóként különböző porokat (pl. cellulóz), szűrőpapírt, különböző mesterséges membránokat (pl. cellulóz acetát) és géleket (pl. keményítő, agar, poliakrilamid) használtak. A hordozóban végzett elektroforézist *zóna elektroforézis*nek nevezték el. Zóna elektroforézis során az ionok mozgása a puffer oldattal átitatott hordozó pórusai között történik, ami a diffúzió hátrányos szerepét jelentősen csökkenti. A hordozók mechanikai stabilitása lehetővé teszi, hogy az elektroforézis befejezése után az elválasztott ionokat a hordozó teljes keresztmetszetében rögzítsék és megfelelő festési eljárással detektálják, ami az eredmények dokumentálhatóságát nagymértékben elősegítette. Ezen túlmenően lehetőség nyílt arra, hogy az elválasztott ionokat a hordozó megfelelő területéről eluáljuk, azaz az eredetileg analitikai célokra bevezetett eljárás preparatív módszerré fejleszthető.

A fenti kedvező tulajdonságok mellett a hordozó pórusméretétől és az elválasztandó ionok méretétől függően a hordozó *molekulaszűrő* hatással is rendelkezhet. Ha a pórusméret sokkal nagyobb az ionméretnél, ez a hatás nem érvényesül, ha azonban a pórusméret és az elválasztandó ionok mérete közel azonos, a hordozó pórusai az ionokra nézve szűrőhatással bírnak. A molekulaszűrő hatás lehetővé teszi, hogy a nettó töltés különbségén túl méretük szerint is elválasszuk az ionokat. A leghatékonyabb szeparálás a pórusmérethez közel álló méretű ionok esetében érhető el. A pórusméretet a gél anyagának megválasztásával, valamint a gélképző koncentrációjának és keresztköteleinek módosításával lehet a célnak megfelelően beállítani. A papír, cellulóz és cellulóz-acetát membrán nagy pórusméretű; az agar és agaróz gél közepes, a keményítő és poliakrilamid viszonylag kis pórusú hordozó.

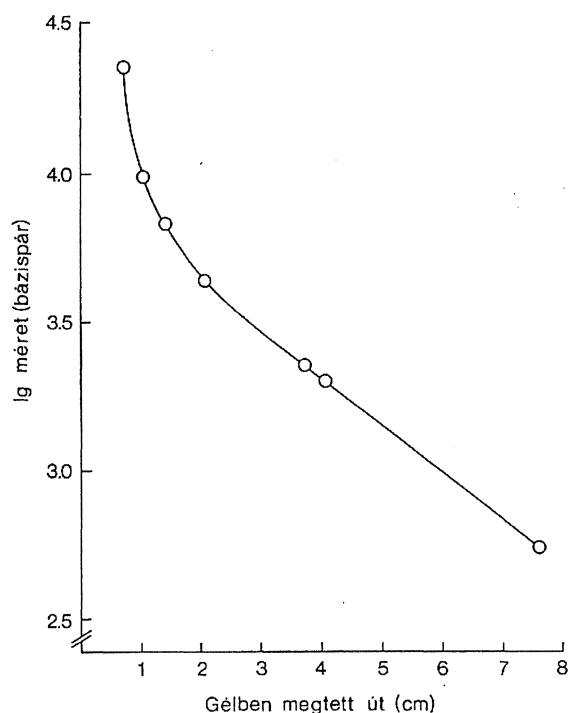
A méreten kívül az ion alakja is jelentősen befolyásolja a vándorlás sebességét. Ha egy adott gélben közel azonos nettótöltésű és molekulatömegű makromolekulákat futtatunk elektromos térben, akkor a globuláris (gömbszerű) ion gyorsabban mozog, mint a fibrilláris (pálcikaszerű) ion, ami azzal magyarázható, hogy a pálcika alakú részecskének először legkisebb keresztmértével kell a megfelelő elektród irányába beállni ahhoz, hogy a gél pórusain átjusson (az orientációs folyamat időigényes, a vándorlás sebességét csökkenti).

Agaróz gél elektroforézis

Az agaróz lineáris poliszacharid, melyet tengeri algából nyernek. A polimert alkotó diszacharid-egység képlete a következő:



A kereskedelemben kapható agaróz nem teljesen tiszta, más szénhidrátokat, sókat, sőt fehérjéket is tartalmazhat. Mivel az agaróz tisztasága nagymértékben befolyásolja az elválasztás minőségét és a DNS további felhasználhatóságát, újabban speciálisan DNS tisztításra alkalmas készítményeket hoznak forgalomba. Az agaróz kémiai módosításával olyan alacsony hőfokon olvadó agaróz származékot is előállítottak, ami elsősorban preparatív célokra alkalmazható. Az alacsony olvadáspontú agaróz egészen kis DNS darabkák (50-500 bázispár) elválasztására is alkalmas, azonban az agaróz géleket általában nagyobb méretű molekulák szeparálására alkalmazzák hatékonyan. A DNS vándorlási sebességét az agaróz gélben számos tényező befolyásolja. A DNS neutrális pH mellett negatív töltésű és az anód felé mozog. Az elektromos tér hatására a kettős hélixet alkotó DNS a méretének logaritmusával fordított arányban lévő sebességgel vándorol a gélben. Azaz a nagyobb DNS darabok lassabban, a kisebbek gyorsabban mozognak a korábban tárgyalt molekulaszűrő hatás miatt (2. ábra).



2. ábra. Kettősszálú DNS vándorlása 1 % agaróz gélben

A gél átlagos pórusmérete az agaróz koncentrációjától függ és megszabja, hogy a gél milyen méretű DNS darabokat tud hatékonyan szétválasztani. A DNS mozgékonyasága (M) és a gél koncentrációja (c) között a következő összefüggés írható fel:

$$\lg M = \lg M_0 - kc$$

ahol M_0 a szabad felületű elektroforézisben mérhető mozgékonyaság, k pedig a retenciós faktor, ami a gél tulajdonságától függ. Az agaróz koncentrációjának megválasztásához az 1. táblázat ad útmutatást.

1. táblázat. Az agaróz koncentráció és a gélben elválasztható DNS mérete közötti összefüggés

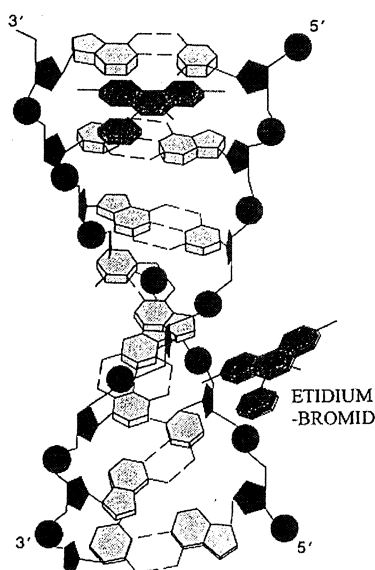
Agaróz koncentráció a gélben (%)	Hatékonyan elválasztható lineáris kettősszálú DNS mérettartománya (*kb)
2,0	0,1 - 2
1,5	0,2 - 3
1,2	0,4 - 6
1,0	0,5 - 8
0,7	0,8 - 10
0,5	1,0 - 30

*kb = kilobázispár

A DNS mérete mellett annak alakja is módosítja a vándorlás sebességét; a szuperhelikális, cirkuláris és lineáris DNS mozgékonyasága az elektroforézis körülményeitől (áramerősség, ionerősség) függő módon eltérő. Ezért célszerű a vizsgálni kívánt DNS-hez hasonló szerkezetű ismert méretű DNS darabokból standardokat alkalmazni, és az ismeretlen mozgékonyaságát ehhez viszonyítani. Az ismeretlen DNS méretének megállapításához legtöbbször a λ fág HindIII restrikciós enzimmal történő emésztésével nyert fragmentumait használják. Az emésztés eredményeként 23,3 kb; 9,42 kb; 6,56 kb; 4,36 kb; 2,32 kb; 2,03 kb; 0,56 kb és 0,13 kb méretű fragmentumok keletkeznek (a legkisebb legtöbbször olyan gyengén festődik, hogy nem látszik a gélben). Ezt a standard sorozatot használtuk a 2. ábra elkészítésekor. Újabban népszerűvé vált az ún. „1 kb-os létra” alkalmazása. Ez többszörösen egymáshoz ligált 1018 bázispár hosszúságú DNS darabok sorozata, amelyben megtalálható a vektor 1636 bp méretű sávja is. Egy tipikus létra 1018, 1636, 2036, 3054, 4072, 5090, 6108, stb méretű sávokból áll.

Az 1. táblázatban feltüntetett méreteknél nagyobb DNS minták hagyományos eljárással nem választhatók szét agaróz gélben. Ha azonban a futtatás során megváltoztatjuk az elektromos tér irányát, egészen nagy DNS molekulák is elválaszthatók egymástól. (lásd A pulzáló erőterű gélelektroforézis című fejezetet).

A gélben lévő DNS-t ethidium-bromiddal festik. A festék molekulái beékelődnek a DNS bázispárjai közé. A kötött ethidium-bromid 302 és 366 nm-en ultraibolya sugárzást nyel el és 550 nm-es vöröses narancsszínű fluoresszcens fényt bocsát ki. Tehát a DNS-hez kötött festék UV fényben láthatóvá válik. A festék interkalálódását a kettősszálú DNS bázispárjai közé a 3. ábra mutatja. A DNS festését legtöbbször az elválasztás után végzik, azonban meggyorsítható a detektálás oly módon, hogy az etidium bromidot már a gél készítésekor belekeverjük a gél anyagába. **Az etidium bromid karcinogén, a vele való munka és a feleslegessé váló hulladék megsemmisítése nagy körültekintést igényel!**

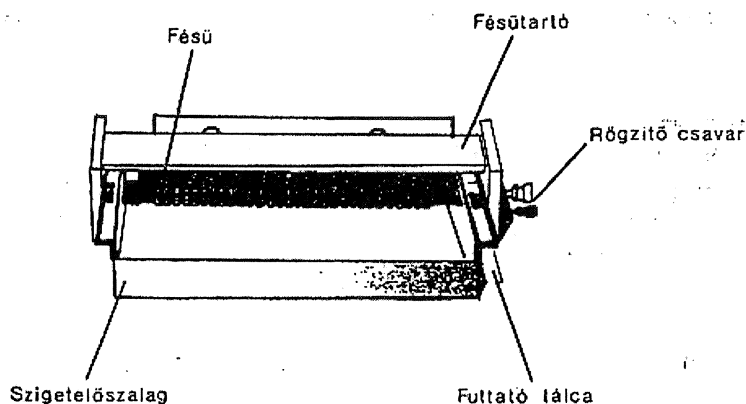


3. ábra. DNS festése etidium-bromiddal

A kísérlet kivitelezése

Agaróz gél készítése

A futtató tálca két végét szigetelő szalaggal folyásmentesen zárja le és helyezze a tálcát vízszintes felületre. Helyezze a tálcába a mintafelvivő fésűt és rögzítse a fésűt a műanyag csavar enyhe(!) meghúzásával (4. ábra).



4. ábra. Agaróz gél öntéséhez előkészített futtatótálca

Készítsen 80 cm^3 puffert 8 cm^3 TBE gélpuffer törzsoldat² 10-szeres hígításával. A hígításhoz kétszer desztillált vizet használjon.

250 cm^3 -es Erlenmeyer-lombikba mérjen ki $0,8 \text{ g}$ agarózt. Öntse az agarózra a 80 cm^3 10-szeres hígítású TBE puffert és a lombik száját papírvattával lazán tömje be. Oldja fel az agarózt forrásig történő melegítéssel, és gyakori rázogattással. A jó oldat vízszerű, áttetsző, sűrűbb agaróz-szemcséket nem tartalmaz. Hűtse le az agaróz oldatot kb. 60°C -ra és buborékmentesen öntse az előkészített futtató tálcába. Az agaróz gél 30-40 perc alatt szilárdul meg.

² Gélpuffer: Nagy pufferkapacitása miatt a TBE (Tris-borát-EDTA) puffert használják leggyakrabban analitikai vizsgálatokhoz. Általában koncentrált törzsoldatot készítenek, amit felhasználás előtt desztillált vízzel tízszeres térfogatra hígítanak. A TBE törzsoldat 450 mM Tris-borátot és 10 mM EDTA-t tartalmaz (pH 7,5-7,8).

Készítsen 600 cm³ elektroforézis puffert a TBE törzsoldat 10-szeres hígításával és öntse a futtató kádba. Óvatosan húzza ki a fésűt a gélből és távolítsa el a ragasztószalagot a tálca két végéről. Helyezze a gélt a futtató kádba (vigyázzon a gél nehogy lecsússzon a tálcáról!), és ha szükséges, öntsön rá annyi elektroforézis puffert, hogy az kb. 1 mm-es rétegben fedje el a gélt.

Gélelektroforézis

Ha a gél elkészítése jól sikerült 30 mintafelvívő vályú áll rendelkezésre. (Ha a vályúk közül néhány megsérült, ezeket hagyja üresen!) A gél szélén lévő 1. és 2. vályúba ne vigyen fel mintát. A 3. vályúba mikropipetta segítségével pipetázzon 10 µl standard oldatot³, majd a következő vályúkba vigyen fel 10 µl és 20 µl ismeretlen DNS mintát növekvő mintaszám szerint⁴. A minták nagy sűrűségük miatt a vályú alján gyűlnek össze. A diffúzió elkerülése érdekében igyekezzen a mintafelvitelt gyorsan elvégezni. Jegyezze fel, hogy mely vályúba mely ismeretlen került. Az ismeretlenek felvitele után a következő vályúba pipetázzon 20 µl standard oldatot.

Zárja le a futtató kádat az elektromos csatlakozókat tartalmazó fedővel. A vezetékeket csatlakoztassa a tápegységhez. Az úgynevezett "mini" gélelektroforetikus készülékkel optimális sebességű elválasztást, 1-2 kb nagyságú DNS minták esetében 5 V/cm feszültségeséssel lehet elérni, ami azt jelenti, hogy kb. 90 V feszültséget kell biztosítani. Az elektroforézist 90 V konstans feszültséggel 1-1,5 óráig végezze. Amikor a jelzőfesték a vályú és a gél széle közti út kb. 2/3-át megtette, kapcsolja ki az áramforrást és húzza ki a banándugókat a stabilizátorból.

A gél festése

Vegyen fel gumikesztyűt és minden ethidium-bromiddal kapcsolatos munkát kesztyűs kézzel végezzen! Emelje fel a tank tetejét és a gélt a futtató tálcával együtt óvatosan emelje a festő kádba. Öntsön kb. 400 cm³ 0,5 µg/cm³ hígított ethidium-bromid festő oldatot⁵ a kádba úgy, hogy az a gélt teljesen ellepje, és fedje le a kádat. A festés sötét helyen (pl. zárható szekrényben) szobahőmérsékleten 30-40 percig tart. Emelje ki a festő kádból a tálcán lévő gélt és helyezze a mosó kádba, majd öblítse le a gélt 2x400 cm³ desztillált vízzel. (A festő oldat újra felhasználható, öntse vissza sötét üvegbe!) Gyorsabb detektálást biztosít, ha a gél öntésekor a gélpufferbe oldjuk fel a 0,5 µg/cm³ koncentrációjú etidium bromidot. Ekkor a festék interkalálódása már az elválasztás során megtörténik, így nincs szükség külön festési lépésre. Ha ezt a módszert választjuk, természetesen már a gélöntés pillanatától kezdve alkalmazni kell az etidium bromid kezelésére vonatkozó óvintézkedéseket. Arra is gondolni kell, hogy a festék kifut a gélből, ami a puffer elszennyeződéséhez és nem teljesen egyenletes festési intenzitáshoz vezet. Végül ezzel a módszerrel a fel nem használt festék veszendőbe megy (nem hasznosítható újra).

A festési módszer megválasztásakor tehát mérlegelnünk kell a gyorsaságból adódó előnyöket és az ezzel járó nagyobb szennyezés veszélyt, a képminőség romlását és a veszélyes hulladék megsemmisítésével járó többletmunkát is.

³ Standard oldat: A HindIII enzimmal emésztett λfág DNS-t vagy az ún. 1 kb létra komponenseit mintapufferrel és gélpufferrel olyan arányban kell összekeverni, hogy összetétele megfeleljen a minták összetételének és a DNS koncentrációja 0,5 mg/ml legyen. Így 10 µl standard oldatban 5 µg DNS-t vihet a géltre.

⁴ A mintapuffer a gélpufferrel azonos összetételű, azonban 66,6 % szacharózt és 0,4 % brónfenol kék festéket is tartalmaz.

⁵ Festő oldat: A festéshez 10 mg/cm³ koncentrációjú ethidium-bromid törzsoldatból 20000-szeres hígítással 0,5 µg/cm³ festő oldatot kell készíteni a tízszer hígított TBE pufferben. A festő oldatot sötét üvegben kell tárolni. Óvatosan kezelje, mert az *ethidium-bromid karcinogén*. Csak kesztyűben dolgozzon vele és minden ethidium-bromid tartalmú anyagot (gél, kesztyű, oldat) az erre a célra kijelölt gyűjtőedényben gyűjtsön!!

A gél vizsgálata

A DNS sávok detektálása UV átvilágító asztalon történik. Ha a hagyományos fényképezési eljárást követi az UV fény bekapcsolása előtt zárja be a sötét szoba ajtaját és vegyen fel védőálarcot. Helyezze a gél az átvilágító lapra és zárja rá a védő fedelet. Kapcsolja be az UV fényt az asztalon lévő kapcsolóval és oltsa le a szobai világítást. Az UV fényben láthatóvá válnak a gélben lévő DNS sávok. Polaroid kamerával fényképezze le a gél képét. A felvételhez narancsszínű színszűrőt és 667 számú Polaroid filmet használjon. Jól felszerelt laboratóriumokban manapság már videó kamerával ellátott denzitométerrel történik a detektálás és az eredmények elektronikus rögzítése. Az utóbbi lehetővé teszi az adatok elektronikus továbbítását, tárolását és nyomtatását. A számítógépes technika segítségével megvalósítható a kép manipulálása (kontraszt, színintenzitás, méret beállítása), azonban ne feledkezzünk meg arról, hogy valódi dokumentációs értéke csak az eredeti felvételeknek van. A vizsgálat után a gél az etidium-bromid tartalmú szilárd hulladék gyűjtésére rendszeresített tárolóba tegye!

Az etidium bromid tartalmú minták megsemmisítése

A kísérlet elvégzése után feltétlenül gondoskodni kell karcinogén festékanyag megsemmisítéséről. 100 ml szennyezett oldathoz 100 mg elporított aktív szenet adunk. Az oldatot kb. 1 óra hosszáig szobahőmérsékleten tartjuk és néha összerázzuk. Ezután az oldatot Whatman No.1 szűrőpapíron történő szűréssel tisztítjuk meg az aktív széntől. A szűrőpapírt és a rajta visszamaradt etidium bromiddal szennyezett aktív szenet műanyag zacskóban a szilárd etidium bromid hulladék tárolására rendszeresített konténerben gyűjtjük. Az etidium bromid megsemmisítése égetéssel történik.

A gélek alapján a következő információk nyerhetők:

(1) A DNS sávok helyzete és intenzitása felvilágosítást ad a *minta tisztaságáról*. Ha a várt sáv(ok) mellett további sáv(ok) is észlelhetők, ez a minta szennyezettségére utal. A várt és extra sávok intenzitása a szennyezés mértékéről ad tájékoztatást. Elképzelhető, hogy a szennyezés a minta degradációjának eredménye, ilyenkor a vártnál kisebb méretű extra sávok jelennek meg. Az aspecifikus módon degradálódott DNS nem ad jól elkülöníthető sávokat, a gélen széles mérettartományban detektálható festődés. Hasonlóan elmosódott sávot okozhat mRNS szennyezés is.

(2) Ha a minta DNS pontos koncentrációját nem ismerjük, a sáv(ok) intenzitásából következtethetünk a felvitt minta *körülbelüli koncentrációjára*. Ilyenkor célszerű a mintából különböző térfogatokat felvinni egymás melletti vályúkba és a festődés intenzitását ismert mennyiségű DNS-t tartalmazó sávok intenzitásával összehasonlítani

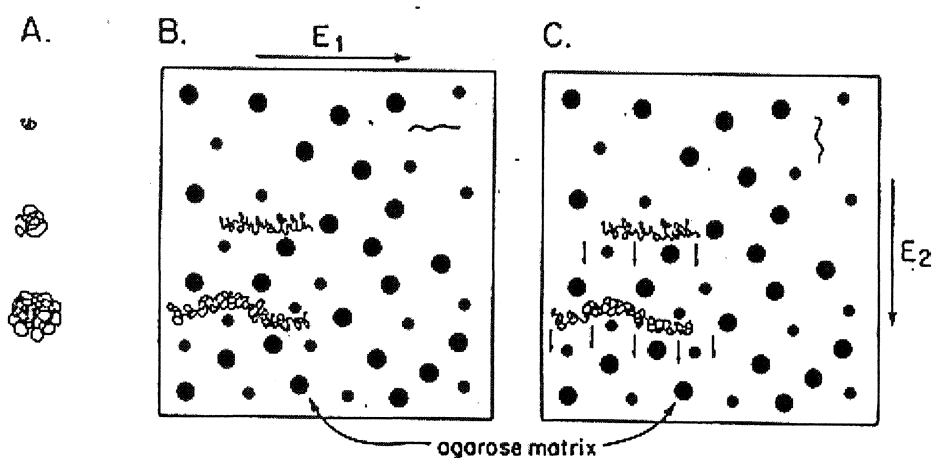
(3) A 2. ábrán látható összefüggés alapján lehetőség van az ismeretlen DNS darab *méretének meghatározására*. Ehhez ismert méretű (standard) DNS minták mozgékonyásával kell az ismeretlen anyag mozgékonyágát összehasonlítani.

PULZÁLÓ (ERŐTERŰ) GÉLELEKTROFORÉZIS

Sipiczki Máttyás és Miklós Ida

A hagyományos gélelektroforézis során a DNS molekulák egy kocsonyás közegben vándorolnak állandó elektromos erőtér hatására. A leggyakrabban használt kocsonyasító anyag az agaróz, az agar egyik szolubilis frakciója. Gél állapotban az agaróz változó vastagságú és hosszúságú nyalábokat képez, amelyek szabálytalan térbeli hálózatot hoznak létre. A nyalábok között kisebb-nagyobb üregek, hézagok maradnak, amelyeken keresztül a DNS molekulák vándorolhatnak. A vándorlásra alkalmas tér mérete függ az agaróz koncentrációjától. Az átlagos "pórusméret" 36 nm-től (4%-os agaróz) 230 nm-ig (0.45%-os agaróz) terjed. A nyalábok belsejében is előfordulnak akkora hézagok, amelyek átmérője lehetővé teszi a DNS molekula átcsúszását.

Az elektroforézishez általában a DNS molekulák vizes oldatát használjuk. Ilyenkor "relaxált" állapotban vannak (1A. ábra). Az elektromos erőtérben azonban "kiegyenesednek" és az erővonalakkal párhuzamosan rendeződnek el (1B. ábra). Ebben az állapotban viszonylag könnyen mozoghatnak a gél üregeinek hálózatában. Mozgásukat a nádasban haladó siklóéhoz hasonlíthatjuk. A sikló feje (a DNS molekula egyik vége) keresi az utat a nádszálak (a gél nyalábjai) között, amit azután a sikló teste (a molekula többi része) kigyózva követ. A gélben történő haladás sebessége számos tényezőtől függ. Például a gél koncentrációjától, a puffertől, a hőmérséklettől és természetesen az elektromos erőtértől (v.ö. Agaróz gél elektroforézis fejezet). Konstans erőteret használva a 20 kb-nál nagyobb DNS molekulák mozgásának sebessége már alig tér el egymástól, így ezek nem is válnak szét. Feltételezések szerint ennek az oka az, hogy a 20 kb-nál nagyobb molekulák nagyjából azonos átmérőjű "kiegyenesedett" térszerkezetet vesznek fel az elektromos erőtérben (1B. ábra).



1. ábra. DNS molekulák elválasztása pulzáló gélelektroforézissel

A. Elektromos erőtérrel kívül a DNS molekulák véletlenszerűen feltekeredett (random coil)

állapotban vannak. Tegyük fel, hogy a három molekula mérete felülről lefelé 5, 50 és 500 kb.

B. A molekulák alakjának változása és vándorlásuk elektromos erőtérben.

C. A molekulák vándorlása az előző erőtér megszüntetése és egy arra merőleges másik erőtér egyidejű létrehozása után.

Az erőtér hatására bekövetkező "kiegyenesedés" reverzibilis. Az erőtér megszüntével a molekula visszanyeri az eredeti (relaxált) térszerkezetét. A visszaalakulás gyorsasága függ a molekula méretétől: a nagyobb tömegű, azaz hosszabb molekulák lassabban nyelik vissza az

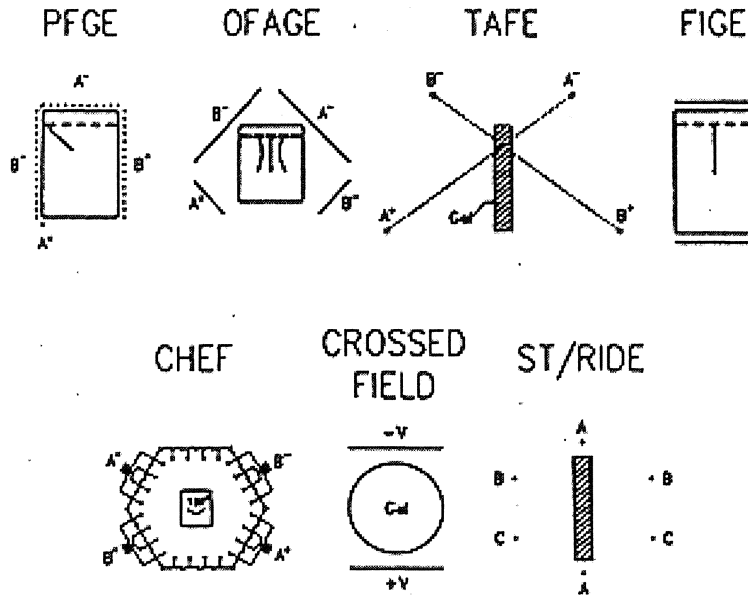
eredeti alakjukat. Ezt a jelenséget lehet felhasználni arra, hogy a nagyméretű molekulákat is szétválasszuk. A módszer lényege, hogy a molekulákat egy erőterben kiegyenesítjük, majd az erőteret megszüntetjük. Azonban azonnal létrehozunk egy másik erőteret, mégpedig az előzőre valamilyen szögben. Az új erőter is hat a molekulákra, arra kényszerítve azokat, hogy az előbbi "kiegyenesedésüket" feladják és az új erőter pólusainak megfelelő irányba próbáljanak rendeződni. A kisméretű molekuláknál ez gyorsan bekövetkezik, a méret növekedésével azonban egyre nehezebben megy. Minél nagyobb a molekula, annál hosszabb időre van szüksége az új orientáció felvételéhez, vagyis annál később mozdulhat el az új erőterben (*1C ábra*). Egy idő után az új erőteret is megszüntetjük és visszatérünk az elsőhöz. Ez a váltás is azzal jár, hogy a molekulák átrendezik a térszerkezetüket. A nagyobb molekuláknak ez megint lassabban megy, vagyis egyre nagyobb lesz a lemaradásuk a kisebb molekulákhoz képest. A két erőteret egymással váltogatva elérhető, hogy akár megabázisokban kifejezhető hosszúságú, azaz kromoszómaméretű DNS molekulákat is szétválasszunk. Az erőter váltakoztása miatt ezt a módszert pulzáló gél elektroforézisnek vagy pulzáló erőterű gél elektroforézisnek (pulsed field gel electrophoresis: PFGE) szokás nevezni. Természetesen az ilyen elválasztásokhoz sokkal több időre van szükség mint a hagyományos, azaz konstans elektromos térben történő elektroforézishez. A kísérlet akár több napig is tarthat.

A módszer kidolgozása óriási metodikai előrelépést jelentett. Azonnal felkeltette a nagy műszergyártó cégek érdeklődését, és menten megindult a verseny az egyre jobb készülékek fejlesztése és a piac megnyerése érdekében. Ma számos kitűnő berendezés vásárolható, amelyek mind a fenti elven alapulnak, de a műszaki megoldás részleteiben és a felhasználhatósági területben jelentősen eltérnek egymástól. Az 1. táblázat tartalmazza a legismertebbek felsorolását.

1. táblázat. Pulzáló gélelektroforézis-rendszerek

Megnevezés	Rendszer
PFGE	Pulsed field gradient gel electrophoresis
OFAGE	Orthogonal field alternation gel electrophoresis
TAFE	Transverse alternating field electrophoresis
FIGE	Field inversion gel electrophoresis
CHEF	Contour clamped homogeneous electric field
RGE	Rotating gel electrophoresis Crossed-field gel electrophoresis
Rotaphor	Rotating electrodes gel electrophoresis
Waltzer	Crossed field gel electrophoresis
PACE	Programmable autonomously controlled electrodes
ZIFE	Zero integrated field electrophoresis
ST/RIDE	Simultaneous tangential/rectangular inversion decussate electrophoresis

A felsorolt rendszerek elsősorban nem abban különböznek, hogy mekkora molekulákat lehet a segítségükkel szétválasztani. Sokkal inkább abban, hogy a DNS molekulák egyenes vagy ívelt pályán futnak, milyen gyorsan válnak szét, milyen az egyes mérettartományokban a módszer feloldóképessége és a gél mekkora hányada ad értékelhető eredményt. A 2. ábrán láthatjuk a gyakrabban használt rendszerek készülékeinek néhány fontos jellemzőjét.



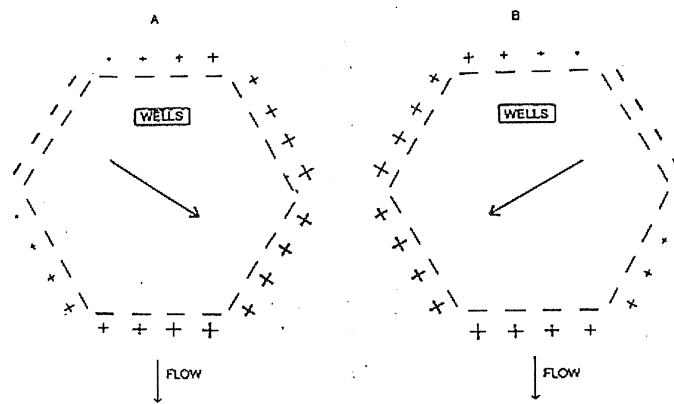
2. ábra. A gyakrabban használt pulzáló gél elektroforézis-rendszerek sematikus ábrája.

CHEF (counter clamped homogeneous electric field) gélelektroforézis-rendszer

A rendszer elve

Az egyik legelterjedtebb rendszer a Bio-Rad által gyártott CHEF, amely többféle változatban készül (CHEF-DRII, CHEF-DRIII, CHEF-MAPPER). Előnye a többi rendszerrel szemben az, hogy homogén erőteret alakít ki a gélben. Az erővonalak a gélben mindenhol párhuzamosan futnak. Ezt a hatszögben elhelyezett összesen 24 elektród biztosítja. A hatszög két, egymással szemben elhelyezkedő elektródsora adja a negatív és a pozitív pólust (3. ábra). Ha csak ez a két elektródsor működne, a közöttük feszülő erővonalak nem lennének homogénen egyenesek. A pólusokat összekötő tengelytől kifelé haladva egyre erősebben íveltek lennének. Ezt az íveltséget szünteti meg a készülék a maradék négy oldal elektródjai segítségével. Mégpedig úgy, hogy azokra is feszültséget bocsát, de változó mértékűt. Az utóbbinak köszönhetően a két pólus közötti térben a feszültség sávonként, de egyenletesen változó. Ezt érzékeltetik a 3. ábrán az egyre kisebb + jelek. A készülék vezérlőegysége érzékeli az egyes elektródoknál a mindenkorai feszültségértékeket, és szükség esetén módosítja a rájuk bocsátott feszültséget, hogy fenntartható legyen a homogén erőter a gél minden pontján.

Vegyük észre, hogy a 3. ábra két részből áll: az egyik rész mutatja az egyik, a másik rész pedig a másik alaphelyzetet. Ezek váltakoznak egymással az elektroforézis során. Tengelyeik 120°-ot zárnak be egymással. A CHEF-DRII rendszerben nincs lehetőség más szög beállítására. A CHEF-DRIII viszont olyan vezérlőegységgel rendelkezik, amelyik az oldalsó elektródokra bocsátott feszültség módosításával módosíthatja a tengelyek irányát, azaz az általuk bezárt szöget. A homogén erőter és a pulzusok szögeinek változtathatósága alkalmassá teszi a CHEF-DRIII rendszert arra, hogy vele DNS molekulákat választhassunk szét a 100 nukleotidos és a 10 megabázisos mérethatárok közötti tartományban. A felbontás (elválasztás) finomsága a többi paraméter (pl. agarózkoncentráció, puffer, feszültség, pulzusidő, hőmérséklet, stb.) megválasztásától függ.



3. ábra. Feszültségkapcsolás (voltage clamping) a CHEF-DRII rendszerben.

A. Relatív elektród feszültségek az A csatorna működése esetén. B. Relatív elektród feszültségek a B csatorna működése esetén. A DNS molekulák futásának irányát a FLOW feliratú nyíl mutatja. A mintákat a WELLS felirattal jelzett vályúba helyezjük.

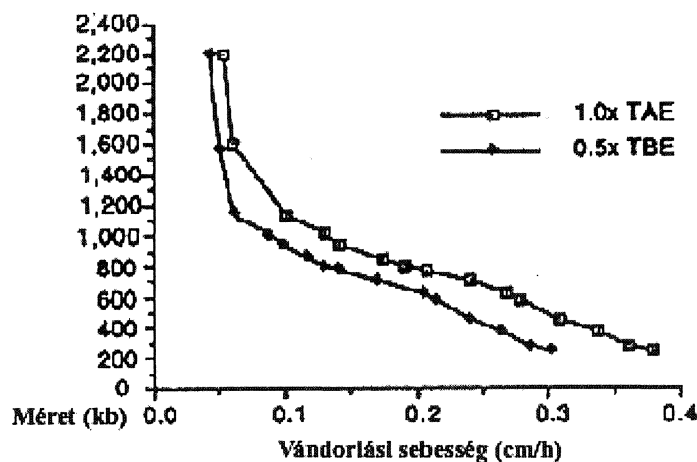
Az elválasztás hatékonysága és a futtatási paraméterek közötti összefüggés

Az agaróz koncentrációja

Az agaróz koncentrációját általában 0,5 és 1,5 % között szoktuk megválasztani. A magasabb koncentrációknál élesebb sávokat kapunk, viszont nem tudjuk szétválasztani a nagyobb molekulákat. 1,0 %-os gélben a 3 megabázisnál nagyobb molekulák már nem válnak szét. Ha ennél hosszabbak a DNS molekulák, válasszunk alacsonyabb koncentrációt. Viszont ne csodálkozzunk, ha a sávok viszonylag diffúzak lesznek.

A puffer koncentrációja és hőmérséklete

A készülékekhez a gyártó cég hűtőegységet is biztosít, aminek a segítségével szabályozhatjuk a puffer hőmérsékletét a futtatás során. Magasabb hőmérsékletnél a DNS molekulák gyorsabban haladnak a gélben, de diffúzabb sávokat hoznak létre. Egy biztonságosan használható és még elég éles sávokat biztosító hőmérséklet a 14°C. A leggyakrabban használt pufferek a 0,5x TBE (tris-borát) és az 1,0x TAE (tris-acetát). A 4. ábrán látható, hogy ezekben a pufferekben miként függ a vándorlási sebesség a molekulák méretétől. Vegyük észre, hogy a TAE puffer gyorsabb vándorlást tesz lehetővé.



4. ábra. A DNS molekulák mobilitása kétféle pufferben

A feszültség

A DNS molekulák vándorlása gyorsabb, ha magasabb a feszültség illetve térerősség. Azonban a gyorsabb vándorlás itt is azzal jár, hogy a sávok elmosódottabbak lesznek. További fontos összefüggés figyelhető meg a DNS molekulák mérete és az elválasztásukra alkalmas térerősség között. A nagyobb molekulákat alacsonyabb térerősség mellett tudjuk finomabban szétválasztani. Magas térerősségnél előfordulhat, hogy a nagyobb molekulák be sem lépnek a gélbe. Mindezeket figyelembe véve, célszerű, ha kompromisszumot kötünk: a nagyobb molekulák (>3 megabázis) szétválasztásához használjunk alacsonyabb térerőt és futtassunk sokáig.

A kapcsolási vagy pulzusidő

Az erőterek váltakoztatásakor nem mindegy, hogy mekkora időtartamonként történik a váltás az egyik erőtérrel a másikra. Ugyanis minden váltásnál a DNS molekulák arra kényszerülnek, hogy átorientálják magukat a régi erőtérrel az újra. A nagyobb molekuláknak ehhez több idő kell. Ahhoz, hogy a nagyobb molekulák is haladhassanak a gélben, hosszabb pulzusidőket vagy más szóval fázisidőket kell biztosítanunk, azaz ritkábban kell váltakoztatnunk az erőtereket. Minél nagyobbak a szétválasztandó molekulák, annál hosszabb pulzusidőket célszerű alkalmazni. A hosszabb pulzusidő azonban azzal jár, hogy a kisebb molekulák sávjai egymásra torlódnak, sőt esetleg el sem válnak egymástól.

Az erőterek közötti szög

A CHEF-DRII rendszerben az egymással váltakozó erőterek 120°-os szöget zárnak be. 1 mb méretig ez a szög alkalmas a jó hatásfokú szétválasztáshoz, mivel csak az ennél nagyobb mérettartományban kezd érzékennyé válni a módszer a szög nagyságára. A CHEF-DRIII rendszerben az erőterek szögét 90 és 120° között tetszés szerint állíthatjuk be. A szög csökkentése növeli a molekulák vándorlási sebességét a gélben. A növekedés nagyobb mértékű az 1 mb-nál nagyobb molekuláknál mint az annál kisebbeknél. Az utóbbiak esetében előfordulhat, hogy kisebb szögeknél egymásra zsúfolódnak a sávjaik.

A futtatási idő

A futtatási időt célszerű tapasztalati alapon megválasztani, mivel az egyéb paraméterek többé-kevésbé már meghatározzák, hogy mennyi ideig kell futtatni ahhoz, hogy jól látható sávok jöjjenek létre. A rövidebb futtatás természetesen élesebb sávokat ad, de nem biztos, hogy azok elegendően elkülönülnek egymástól. Hosszabb futtatás esetén diffúzabbak lesznek a sávok, de nagyobb távolságra fognak elhelyezkedni egymástól.

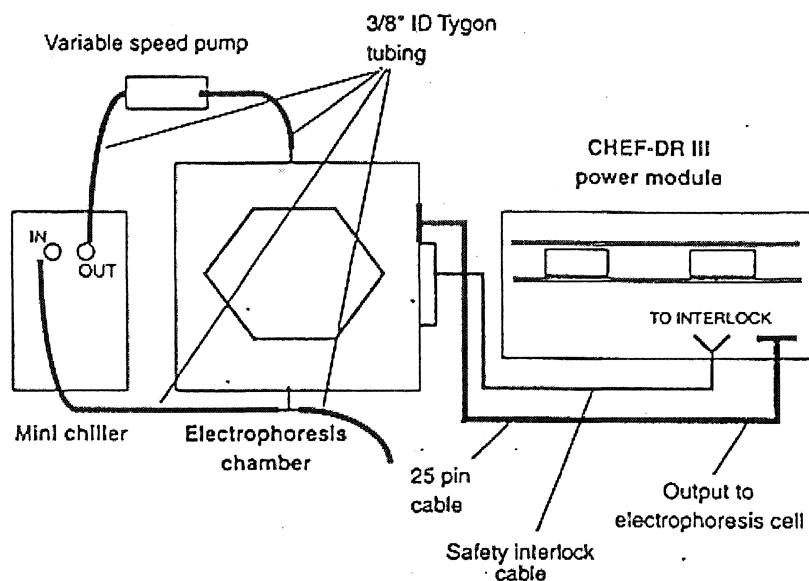
A 2. táblázat segíthet annak megválasztásában, hogy milyen paraméterekkel kezdjünk el dolgozni. A táblázat adatait azonban tekintsük tájékoztató jellegűnek, és a segítségükkel elvégzett egy-két futtatás tapasztalatai alapján próbáljuk meg magunk megtalálni a feladat szempontjából optimális feltételeket.

2. táblázat. Javasolt futtatási feltételek

	Futtatási paraméterek a DNS molekulák méretének függvényében			
	1-100 kb	0,1-2,0 mb	2-4 mb	>4 mb
agaróz	1,0-1,2 %	0,8-1,2 %	0,6-1 %	0,5-0,8 %
puffer	0,5x TBE	0,5x TBE	1,0x TAE	1,0x TAE
hőmérséklet	14°C	14°C	14°C	14°C
feszültség	6-9 V/cm	4,5-6 V/cm	2-3 V/cm	1,5-2,5 V/cm
pulzusidő	0,05-10 sec	10-200 sec	200-1800 sec	10-60 min
futtatási idő	2-15 h	15-30 h	24-72 h	72-144 h
erőterek szöge	120°	120°	120°, 106°	106°

A Bio-Rad laboratories CHEF-DRIII készülékének használata

A készülék négy fő részből áll (5. ábra): vezérlő vagy tápegység (power module), elektroforézis-kád vagy -kamra (Electrophoresis chamber), hűtőegység (Mini chiller) és pufferpumpa (Variable speed pump).



5. ábra. A CHEF-DRIII rendszer vázlatos rajza

A vezérlőegység

A vezérlőegységen programozhatja be a futtatás paramétereit. Az elülső oldalán (front paneljén) a felső sorban két "display" látható. Ezek fogják mutatni a beállított paramétereket. Az alsó sorban található a beállításához szükséges gombok. Két csoportba lettek szétosztva. A baloldali első gomb felett a BLOCK felirat látható. Mellette sorban az INITIAL SW TIME (kezdő pulzusidő), FINAL SW TIME (befejező pulzusidő) és a RUN TIME (futtatás ideje) következik. Kicsivel távolabb két gomb egyike felett a RAISE, a másik a felett pedig a LOWER felirat látszik. Amikor a készüléket bekapcsolja, a felsorolt gombok feletti display-en az egyes számnak kell világítania, ami azt jelenti, hogy az első beállítási blokk az aktív. Ha nem így történik, akkor a RAISE és LOWER alatti gombokat kell nyomkodni addig, amíg az egyes szám meg nem jelenik. Miután az egyes szám már látható, elkezdheti a futtatás paramétereinek a beállítását. Ezek lesznek az egyes számú blokkal történő futtatás paramétereit. Kezdje a kezdeti pulzusidővel. Nyomja meg a BLOCK alatti gombot, majd pedig az INITIAL SW TIME alatti gombot is. Ezt követően az előbb már említett RAISE és LOWER felirat alatti gombokat addig nyomkodja, amíg a baloldali display-en meg nem jelenik a beállítani kívánt érték (pl. 100 sec). Ezután nyomja be a FINAL SW TIME alatti gombot, és ennél is állítsa be a kívánt értéket a RAISE és LOWER gombok segítségével. Végül hasonló módon állítsa be a futtatási időt is a RUN TIME és a RAISE valamint a LOWER gombokat használva. A többi paraméter beállításához a jobb oldali gombcsoportot és a felettük levő display-t veheti igénybe. A feszültség (térerő) beállítása érdekében nyomja be a VOLTS/CM alatti gombot, majd a panel jobb szélén látható RAISE és LOWER gombokat nyomkodja, amíg a felettük levő display-en láthatóvá nem válik a kívánt érték. Hátra van még az erőterek közötti szög, amit az INCLUDED ANGLE feliratú gombbal és a jobboldali RAISE illetve LOWER gombokkal lehet beállítani. A sorban még két további gomb látható. Az ACTUAL CURRENT nem beállításra szolgál. Lenyomásával csak azt tudja

megnézni, hogy a tápegység mekkora áramerősséget kapcsol a futtató kádra. A PAUSE START RUN arra szolgál, hogy segítségével elindítsa a beállított paraméterekkel történő futtatást. A program elindulása után a baloldali display fogja mutatni, hogy mennyi idő (órában kifejezve) van még hátra a futtatás befejezéséig. A jobboldali display-en a mindenkori áramerősség lesz látható milliamperben.

Ha egy másik futtatást is tervez beprogramozni, ne nyomja le a PAUSE START RUN gombot, hanem helyette használja a BLOCK feliratút. A baloldali display-en ekkor megjelenik az egyes szám. Nyomja meg a baloldali RAISE gombot is, amitől a display-en látható szám kettesre változik, jelezve, hogy most a kettesszámú futtatási paraméterek (blokk) beállítása következik. A már ismert módon állítsa be ezeket is. A vezérlőegység még egy blokkra ad lehetőséget, így a memóriájába összesen háromféle futtatást táplálhat be.

A futtatás a beprogramozott futtatási idő leteltekor leáll. Azonban lehetősége van a félbeszakítására is. Ehhez nyomja le a PAUSE START RUN gombot és tartsa lenyomva 3-4 másodpercig. A leállásról két rövid hangjelzésből értesül, és abból, hogy a jobboldali display OFF feliratot mutat. A PAUSE START RUN újabb lenyomásával a futtatás újra beindul, de a program elejétől. A futó programot úgy is félbe lehet szakítani, hogy utána ne az elejétől induljon ismét, hanem ott folytatódjon, ahol megszakadt. Ezt úgy érheti el, hogy a PAUSE START RUN gombot csak rövid időre nyomja meg. Ekkor leáll a futtatás (szünet üzemmódba kerül), és csak akkor folytatódik (kerül vissza a menet üzemmódba), ha újra megnyomja a gombot.

A futtatókád és a puffer cirkuláltatása

A futtatókádba hatszög alakban elrendezve láthatók az elektródok. A hatszög közepére kell helyezni a gélt, mégpedig a kád aljában látható lyukak által meghatározott orientációban. A lyukakba rögzítő sarkok nyomhatók. Ezek fogják tartani a gélt. A gél behelyezése után, a kádat öltse fel 2 liter pufferrel. A kád fedelének visszahelyezése után kapcsolja be a készüléket, majd a pumpát is. A pumpát 1liter/perc-re állítsa. A cirkuláció sebességét egyébként célszerű minél magasabbra állítani, hogy biztosítható legyen a gél minél hatékonyabb hűtése a futtatás során. Az utóbbi érdekében a pumpa és a kád közé rendszerint iktasson be egy hűtőegységet is (5. ábra), amelyen állítható a hőmérséklet.

A kísérlet kivitelezése

Saccharomyces cerevisiae kariotípusának meghatározása CHEF-DRIII készüléken

Főtenyészet készítése

Oltson le friss élesztőnövedékből steril kaccsal YPL (1% élesztőkivonat, 1% pepton, 2% glükóz) tápfolyadékba és inkubálja 26 °C-on rázatva 1 éjszakát.

Mintakészítés

1. Centrifugálja le a sejteket (Beckman centrifugában; 2500rpm 5 perc). Kb 4×10^9 sejt szükséges.
2. Távolítsa el a felülúszót és mossa a sejteket desztillált vízzel, majd újabb centrifugálást követően 50mM EDTA 10mM Tris (pH 7.5)-val.
3. Szuszpendálja el a sejteket 200 μ l 50mM EDTA 10mM Tris-ben
4. Adjon a sejtuszpenzióhoz 200 μ g/ml Zymoliázt, keverje össze és helyezze 37 °C-ra.
5. Adjon hozzá a sejtuszpenzióval egyenlő mennyiségű 40-45 °C-os 1,5 % low melting agarózt (SIGMA A-9414). Az agarózt melegítse addig, amíg víztiszta lesz. Ezután helyezze 40-45 °C-os termosztátba.

6. Keverje össze a sejtszuszpenziót az agarózzal. Figyeljen rá, hogy alapos legyen az összekeverés és ne maradjon buborék benne.
7. Pipettázza az agarózzal összekevert szuszpenziót a kiöntő formába és hagyja állni 15 percig 4 °C-on.
8. Helyezze a mintákat 50mM EDTA 10mM Tris-ben, inkubálja a mintákat 37 °C-on 6-8 órán át.
9. Távolítsa el a szferoplasztáló oldatot és mossa a mintákat 0,05 M EDTA-val.
10. Adjon a mintákhoz proteináz enzimes oldatot. (50mM EDTA 10mM Tris pH 7.5 1% lauril sarcosine sodium salt, 0,5 mg/ml Proteinase K) Inkubálja a mintákat 50 °C-on egy éjszakán át.
11. Másnap távolítsa el az oldatot a mintákról és mossa a mintákat 1x TE-vel 50°C-on, majd ismételje meg a mosást kétszer, szobahőmérsékleten. Az így kimosott minták akár azonnal felhasználhatók futtatáshoz, ha pedig néhány hónapig konzerválni szeretné 0.5M-os EDTA-ban 4°C-on tarthatók.

Gélöntés.

Készítsen 1%-os agaróz (Biorad 162-0126) gél 0,5×TBE pufferben.

Mérjen bele az 1g agarózt 100 ml 0,5 ×TBE-be és melegítse mikrohullámú sütőben addig, amíg víztiszta lesz. Töltse utána 0,5×TBE-vel, ha elpárolgott, majd hagyja lehűlni 40-50 °C-ra. Közben helyezze a fésűt a kiöntőformába. Ha lehűlt az agaróz, öntse bele a formába és hagyja állni 20-30 percig. A gél megszilárdulása után óvatosan távolítsa el a fésűt. A minta betöltése. A mintákat vágja félbe és alkohollal leégetett spatula segítségével tegye őket a vályúkba.

Elektroforézis

1. Helyezze az agaróz gélét a pufferrel töltött futtató kádba. A 0,5× TBE puffert már korábban öntse bele a kádba, hogy legyen ideje lehűlni 14-16 °C-ra. A puffert mindig frissen hígítsa 10×TBE törzsoldatból Milli-Q vízzel.
2. Állítsa be a futtatási paramétereket a CHEF DR III vezérlő egységén.

Block 1		Block 2	
Initial SW.time	60 sec.	Initial SW.time	90 sec.
Final SW. time	60 sec.	Final SW. time	90 sec.
Run time	15 h	Run time	9 h
Volt/cm	6	Volt/cm	6
Angle	120	Angle	120
		Start	

A gél festése.

Helyezze a gélét 0,5µg/ml etidium-bromid oldatba. *Az etidium-bromid mérgező, ezért gumikesztyű és védőköpeny használata közelező!* 30 perc festődés után tegye a gélét desztillált vízbe. 1-2 óra állás után helyezze a gélét a transzilluminátorra és világítsa meg UV-fénnyel. *Az UV-sugárzás káros, így szemüveg vagy védősisak használata kötelező!*

Kiértékelés. Adott futtatási paraméterek mellett a sávok száma és mintázata jellemző az adott fajra. Optimális elválasztás esetén a sávok száma megegyezik a kromoszómák számával.

RESTRIKCIÓS ANALÍZIS

Csortos Csilla

Az ötvenes évek elején amerikai kutatók megfigyelték, hogy egyes baktériumtörzsek bakteriofág fertőzéssel szemben ellenállóak. W. Arber bizonyította elsőként, hogy a rezisztencia egy enzimrendszernek köszönhető, amely szelektíven felismeri az idegen DNS molekulát és azt tönkrereszi, kisebb darabokra szabdalja. Az enzimrendszer a baktérium saját kromoszomális DNS-ét egy metilcsoport bevitelével módosítja, és ezáltal megvédi a hasítástól. Különböző baktériumtörzsekből számos ilyen enzimet izoláltak, melyek összefoglaló neve: *restrikciós endonukleázok* vagy röviden *restrikciós enzimek*. A DNS meghatározott szakaszát, szekvenciárészletét ismerik fel a restrikciós enzimek.

A restrikciós endonukleázok három típusát ismerjük. Az I. és III. típusok molekuláris biológiai technikák szempontjából kevésbé jelentősek, míg a II. típusú restrikciós enzimek ma már nélkülözhetetlenek. Legfontosabb sajátásaik:

- (1) csak endonukleáz aktivitásuk van (a metilálást egy másik enzim végzi, minden II. típusú restrikciós enzimnek van egy módosító, a metilálást végző enzimpárja),
- (2) mindig azonos módon, meghatározott helyen, az adott enzimre jellemző felismerési szekvencián belül vagy annak közelében hasítják a DNS-t (*1. táblázat*),
- (3) működésükhöz Mg^{2+} , szükséges, ATP-t nem igényelnek.

Az ismert restrikciós enzimek száma ma már több száz, kereskedelmi forgalomban közel százféle kapható. Elnevezésük eredetükre utal, pl.:

<i>Eco</i> RI	<i>E</i> =	nemzetség <i>Escherichia</i>
	<i>co</i> =	faj <i>coli</i>
	R =	törzs RY13
	I =	elsőként izolált endonukleáz

Az azonos szekvenciát felismerő és azonos hasítási helyű restrikciós enzimeket *isoschizomereknek* nevezzük (pl. *SacI-SstI*). Azokat az enzimeket, amelyeknek csak a felismerési szekvenciájuk azonos, de hasítási helyük különböző, *neoschizomereknek* nevezzük (pl. *SmaI-XmaI*).

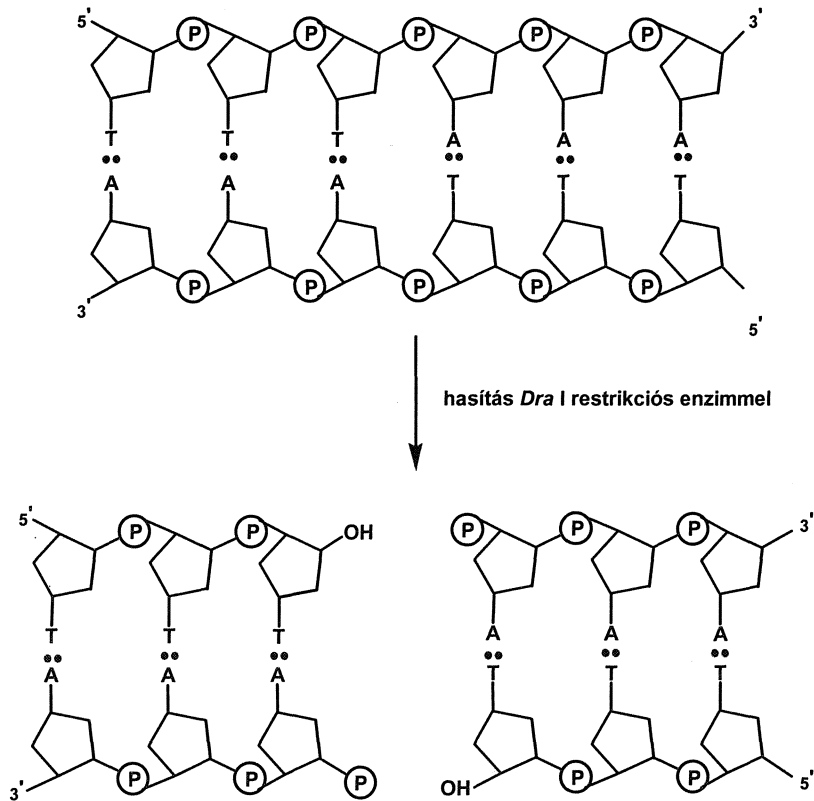
1. táblázat. Néhány restriktív enzim és isoschizomerjének felismerési szekvenciája

ENZIM	ISOSCHIZOMER	FELISMERÉSI SZEKVENCIA *1*2
<i>Aat</i> II	-	GACGT↓C
<i>Bam</i> H I	-	G↓GATCC
<i>Bgl</i> II	-	A↓GATCT
<i>Cvn</i> I	<i>Bsu</i> 36 I	CC↓TNAGG
<i>Dra</i> I	<i>Aha</i> III	TTT↓AAA
<i>Eco</i> R I	-	G↓AATTC
Hae III	<i>Bsu</i> R I <i>Pal</i> I	GG↓CC
<i>Hind</i> III	-	A↓AGCTT
<i>Kpn</i> I	-	GGTAC↓C
<i>Nco</i> I	<i>Bsp</i> 19 I	C↓CATGG
<i>Nde</i> I	-	CA↓TATG
<i>Not</i> I	-	GC↓GGCCGC
<i>Nsi</i> I	<i>Ava</i> II <i>Eco</i> T22 I <i>Mph</i> 1103 I	ATGCA↓T
<i>Pst</i> I	-	CTGCA↓G
<i>Pvu</i> I	<i>Exo</i> R II	CGAT↓CG
<i>Rsa</i> I	-	GT↓AC
<i>Sac</i> I	<i>Sst</i> I	GAGCT↓C
<i>Sma</i> I	-	CCC↓GGG
<i>Ssp</i> I	-	AAT↓ATT
<i>Sst</i> II	<i>Sac</i> II	CCGC↓GG
<i>Xho</i> I	<i>Pae</i> R7 I	C↓TCGAG
<i>Xma</i> I	<i>Cfr</i> 9 I	C↓CCGGG
<i>Xmn</i> I	<i>Asp</i> 700 I	GAANN↓NNTTC

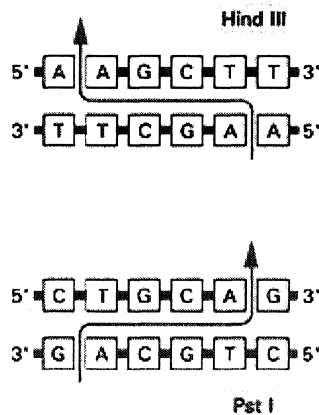
*¹A nyíl a hasítás helyét jelöli.

*²Az N jelölés bármelyik nukleotidot jelenthet.

A restrikciós enzimek a felismerő helyen belül a DNS mindkét szálán katalizálják a foszfodiészter kötés hidrolízisét. A keletkező két DNS darab a hasítás helyén általában foszfátcsoportot tartalmaz az 5' végen és hidroxilcsoportot a 3' végen. Kivétel pl. az *NciI* enzim, amely 3'-fosztát és 5'-hidroxil végződést hoz létre.



A legtöbb restrikciós enzim felismerő szekvenciája 4 vagy 6 nukleotidból áll, de akár 8-10 nukleotidos felismerés is előfordul néhány enzim esetében. A felismerés alapja a palindroma, fordított ismétlődés, a DNS két szálának bázissorrendje középponti szimmetriát mutat. A hasítás történhet a DNS két szálának azonos helyén, a felismerési szekvencia középpontjában, mint a fenti példában is. Ilyenkor két kettős szálú DNS-t kapunk "tompá" végződéssel. Más enzimek nem a középpontban, hanem attól távolabb, de a felismerési szekvencián belül hasítják a DNS két szálát szimmetrikusan. A keletkező két DNS végén ilyen módon rövid, egyszálú szakasz alakul ki akár 5' (*Hind III*), akár 3' (*Pst I*) végződéssel, az enzimtől függően:



A restriktív enzimek aktivitásának egysége, 1U, azt az enzimmennyiséget jelenti, amely 1 µg tiszta DNS-t 60 perc alatt teljes mértékben emészt optimális körülmények között. A restriktív emésztés hatékonyságát befolyásoló legfontosabb tényezők: a hőmérséklet, a DNS minta tisztasága, a reakcióelegy pufferének összetétele. Ha nem biztosítjuk az optimális körülményeket, az egyaránt eredményezhet kis hatásfokú hasítást, vagy az enzim felismerő képességének csökkenését. Az utóbbi esetben jelentkezik az ún. "star" aktivitás, vagyis az enzim nemcsak a pontos felismerő szekvenciáknál hasít.

(1) *Hőmérséklet.* A legtöbb restriktív enzim hőmérsékleti optimuma 37°C. Ez nem tárolási optimumot jelent. A restriktív enzimeket, mivel hőre érzékeny fehérjék, glicerin tartalmú pufferben, - 20°C-on tároljuk. Szobahőmérsékleten, vagy ennél magasabb hőmérsékleten az enzim fokozatosan veszíti el aktivitását.

(2) *Az enzim mennyisége.* 1-5 U/µg DNS arányt érdemes alkalmazni. Mivel az enzim csak a felismerési helyen hasít, nem okoz problémát, ha némi feleslegben alkalmazzuk. Ha túl kevés az enzim, az emésztési idő növelésével a hatékonyság nem növelhető számottevően, mert az inkubálás közben az enzim aktivitása folyamatosan csökken. Az enzim térfogataránya az emésztési közegben 1/10-nél ne legyen nagyobb, mert az enzim tároló pufferében lévő glicerin gátolhatja az aktivitást.

(3) *A DNS minta tisztasága és eredete.* Részlegesen tisztított DNS minták hasítása kisebb hatásfokú, mert a szennyező anyagok (pl. szerves oldószerek, fehérje, SDS) gátolhatják az enzimaktivitást.

A restriktív hasítás hatékonyságát az is befolyásolja, hogy a felismerési szekvencia milyen közel helyezkedik el DNS molekula végéhez (2. táblázat). Igen gyakori, hogy polimeráz láncreakcióhoz (PCR) olyan primert terveznek, amely valamely restriktív enzim felismerési szekvenciáját tartalmazza, így a termék egyszerű szubklónozását teszi lehetővé restriktív kezelés után. Az ilyen primer tervezésénél két dologra kell ügyelni: (1) a PCR reakció termékének belső szekvenciájából hiányozzon ez a felismerési hely, (2) a primer 5' végén néhány indifferens nukleotid szükséges ahhoz, hogy az enzim hatékonyan tudjon működni.

2. táblázat. Restriktív enzimek hatékonysága oligonukleotidokon

ENZIM	OLIGONUKLEOTID*	HASÍTÁS HATÉKONYSÁGA 2 ÓRA ALATT (%)
<i>Bam</i> H I	<u>C</u> GGATCCG	10
	CG <u>C</u> GGATCC <u>G</u> CG	>90
<i>Bgl</i> II	<u>C</u> AGATCTG	0
	GA <u>A</u> AGATCT <u>T</u> C	75
<i>Sma</i> I	CCCGGG	0
	<u>C</u> CCCCGGGG	0
	CCCC <u>C</u> GGGGG	10
	TCCCC <u>C</u> GGGGGA	>90

*Azokat a nukleotidokat, amelyek nem tartoznak a felismerési szekvenciához, aláhúzással jelöltük.

Akár *E. coli*-ből, akár emlős szövetből, vagy sejtvonalból is származik a hasítandó DNS minta, előfordulhat, hogy a felismerési szekvencia valamelyik nukleotidja metilálva van, ami a restriktív hasítást gátolhatja. A hordozó baktériumtörzs kiválasztásánál ezért mindig gondosan ügyelni kell arra, hogy az ne tartalmazzon metiláló enzimet. Eukarióta genomi DNS metiláltsága pedig jól feltérképezhető olyan isoschizomer enzimek segítségével, amelyek érzékenysége a metiláltságra különböző.

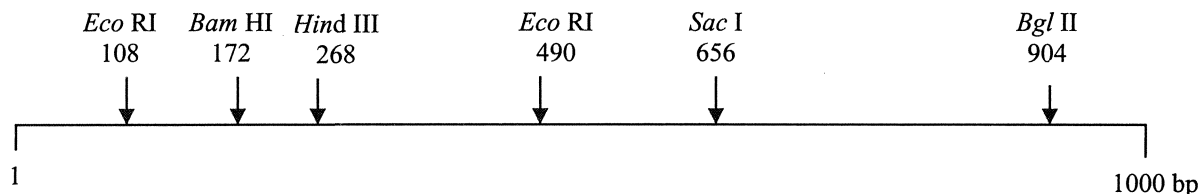
(4) *A reakcióelegyben alkalmazott puffer összetétele.* Minden restriktív enzim működéséhez Mg^{2+} szükséges. A DNS preparátumokat rendszerint EDTA tartalmú oldatban tároljuk, ami a nukleázok kofaktoraként működő kétértékű fémionokat, így a Mg^{2+} -ot is megköti. Ezen kívül az egyes enzimek más-más pH és ionerősség mellett mutatnak maximális aktivitást. Általában a restriktív puffer mindig tartalmaz magnézium-kloridot, ez elengedhetetlen, nátrium- vagy kálium-kloridot, Tris-HCl-t az adott pH biztosítására, β -merkaptoetanol vagy ditiotreitolt és BSA-t, ez utóbbiak az enzim stabilizálását szolgálják. Egyes enzimek nagyon érzékenyek a nátrium- vagy káliumionok koncentrációjára, mások szélesebb ionerősség határok között is jól működnek. A kereskedelemben kapható restriktív enzimeket a megfelelő pufferrel együtt (rendszerint 10-szeres töménységben) szállítják és az optimális enzimműködéshez szükséges reakciókörülményeket is megadják. A különböző cégek más-más jelöléssel (pl. számozás, vagy betűjelek), de általában 4-5 féle puffert alkalmaznak. A katalógusokban megtalálható ezek összetétele, amelynek ismerete akkor igazán fontos, ha ugyanazt a DNS mintát többféle enzimmel szeretnénk hasítani.

A restriktív enzimeket szinte kivétel nélkül minden molekuláris biológiai technikában alkalmazzák, mint pl.

- (1) plazmidok, bakteriofág klónok restriktív térképének elkészítése,
- (2) genomi DNS kisebb darabokra hasítása elektroforézis és Southern blot analízis előtt,
- (3) Southern és Northern blot analízishez jelölhető DNS próbák előállítása,
- (4) szubklónozásra alkalmas DNS molekulák előkészítése.

Restriktív térképezés

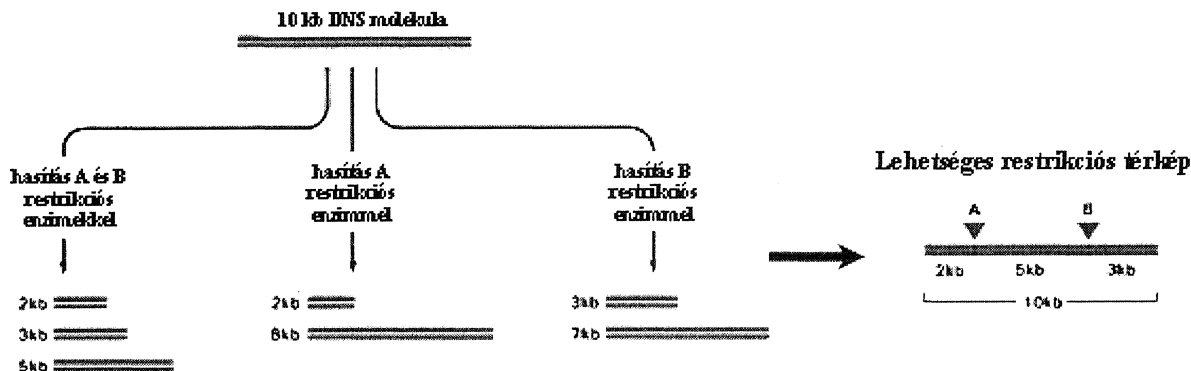
Egy adott DNS molekula lehetséges restriktív hasítási helyeinek összessége a molekula restriktív térképe. Megmutatja a DNS molekulában a restriktív hasítások helyét és egymáshoz viszonyított helyzetét. A térkép lehet a DNS sematikus ábrája, ahol méretarányosan jelölik a hasítási helyeket,



vagy a hasítási helyeket különböző szempontok szerint csoportosító táblázat (pl. az enzimeket ábécé sorrendbe állítva, vagy a DNS bázisainak számozása szerint):

RESTRIKCIÓS ENZIM:	HASÍTÁSI HELYEK SZÁMA:	HASÍTÁSI HELY:
<i>Bam</i> HI	1	172
<i>Bgl</i> II	1	904
<i>Eco</i> RI	2	108,490
<i>Hind</i> III	1	268
<i>Sac</i> I	1	656

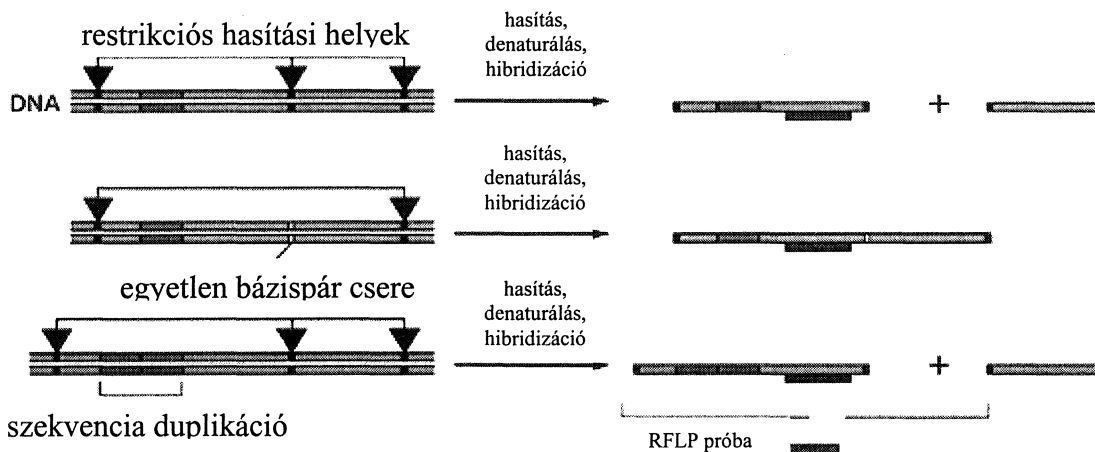
Ismeretlen szekvenciájú DNS-t különböző restriktív enzimekkel egyenként és kombinálva hasítunk, majd a keletkezett DNS darabok méretét agaróz gélelektroforézissel határozzuk meg. Ezzel a módszerrel elkészíthető a DNS restriktív térképe :



Ismert szekvencia esetében a térképezés computer program segítségével történik. A restriktív térkép szükséges a DNS szubklónozásához, rekombináns molekulák elemzéséhez és segítséget nyújthat szekvenálási stratégia kidolgozásához is.

RFLP

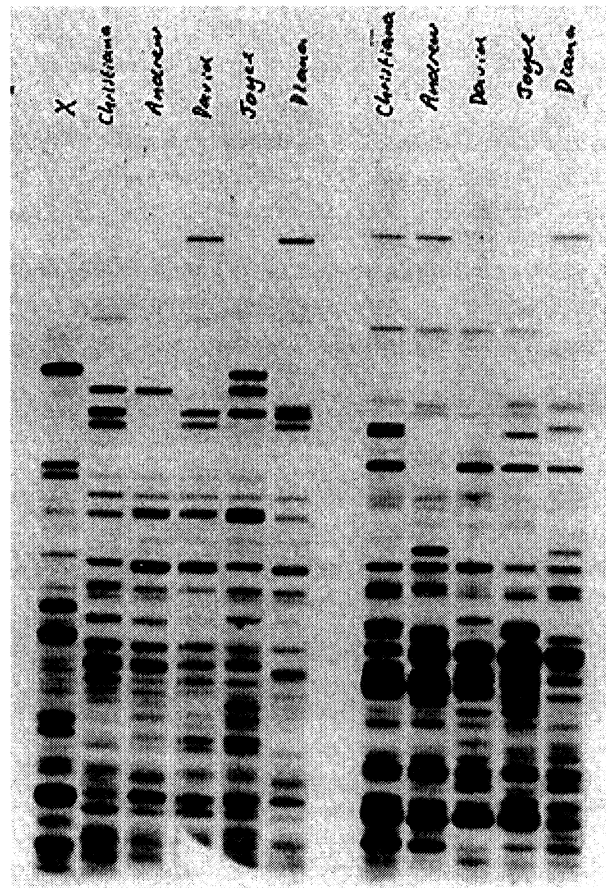
A DNS Southern blot segítségével történő vizsgálata bizonyítékot szolgáltat egy adott gén jelenlétére, ill. megfelelően megválasztott próbák és előzetes restriktív hasítás segítségével kimutathatóvá válnak az adott génben bekövetkező mutációk is. Feltételezhető, hogy több mint 300 olyan gén van, amely kapcsolatba hozható emberi betegségekkel. Amennyiben ezek mutációja egy restriktív hely megváltoztatásával (megjelenésével vagy eltűnésével) jár, a restriktív fragmentum hosszának megváltozása (Restriction Fragment Length Polimorphism = RFLP) lehetőséget biztosít a mutáció kimutatására:



A kimutatás másik feltétele, hogy a vizsgálni kívánt gén (esetleg közvetlen mellette elhelyezkedő kapcsolt gén) kimutatására alkalmas próba (RFLP marker) álljon rendelkezésre. A humán genom program előrehaladtával ezek száma napról napra növekszik.

DNS ujjlenyomat

Vannak olyan kísérleti megközelítések is, amikor a próba nem egy jól meghatározott génhez, hanem egy nagy variabilitást mutató repetitív DNS szakaszhoz kötődik. Ilyenkor a hibridizáció során számos, az adott egyedre, ill. rokonaira jellemző sávot kapunk, amit A. Jeffreys javaslatára DNS ujjlenyomatoknak (DNS fingerprint) neveznek. A DNS ujjlenyomat felhasználható igazságügyi orvosi vizsgálatokban. Egy 1985-ös bírósági ügy alapján az ujjlenyomatot elfogadják rokonsági viszony felderítésére.



1. ábra Családi kapcsolat felderítése DNS ujjlenyomat segítségével

Az 1. ábrán X jelöli egy idegen, nem a családba tartozó személy mintáját, és két különböző próba felhasználásával láthatók a névvel jelzett családtagok DNS ujjlenyomatai. A kísérlet eredménye bizonyítja, hogy Andrew a vizsgált család tagja. Hasonló eljárás alkalmazható bűnügyek felderítésére is, amire 1988 óta van precedens.

A kísérlet kivitelezése

Steril eszközöket és oldatokat használjon a gyakorlat során. Eppendorf csőbe mérjen:

x µl	DNS minta (0,1-2 µg DNS vízben vagy TE (10 mM Tris-HCl, pH 7,4, 1 mM EDTA) pufferben, 1-5 µl térfogatban)
1 µl	10X restrikciós puffer (minősége a kísérletben használt restrikciós enzimtől függ)
8-x µl	H ₂ O
1 µl	restrikciós enzim (1-5 U/ µg DNS)

A pipettázást nagy körültekintéssel végezze, hiszen nagyon kis térfogatokkal dolgozik. A folyadék pipettahegyből való kiengedésekor a pipettahegyet érintse az Eppendorf cső alsó részéhez. Minden egyes pipettázáshoz használjon tiszta pipettahegyet. A reakcióelegyet gondosan keverje össze, de ügyeljen arra, hogy a minta ne kenődjön el a cső teljes felületén. Az esetlegesen mégis a cső falára került cseppeket rövid ideig tartó (5-10 másodperc) centrifugálással gyűjtse össze. Inkubálja a reakcióelegyet 37°C-on 1 órán át. Ezután adjon minden mintához 2,5 µl 5X (5-szörös töménységű) mintafelvívő puffert (0,25 % brómfenolkék, 40 % szacharóz vizes oldata). A minta ezután 4 °C-on tárolható, vagy azonnal továbbvihető agaróz gélelektroforetikus vizsgálatra.

Ha nagyobb mennyiségű DNS-t akar hasítani, akkor a fenti reakcióelegyet arányosan, tetszőlegesen növelheti. Ugyanazon DNS minta kétféle enzimmel való hasításának módja az enzimekhez szükséges puffertől függ. Ha azonos a puffer, vagy nagyon hasonló összetételű (pl. az egyik 50, a másik 75 mM NaCl-t tartalmaz), akkor a két enzimmel egyidőben végezheti az inkubálást, de ügyelni kell az elegy glicerin koncentrációjára. Az enzim(ek) térfogata soha ne haladja meg a teljes reakcióközeg 20 %-át! Amennyiben a két puffer összetétele eltér, akkor a két enzimmel csak egymás után emésztheti a DNS-t. Vagy kiegészíti az elegyet a szükséges pufferösszetevővel a második enzim hozzáadása előtt, vagy teljes puffercserét hajt végre alkoholos kicsapással, illetve kromatográfiával

DNS VISSZANYERÉSE AGARÓZ GÉLBŐL

Fehér Zsigmond

A molekuláris biológiai laboratóriumban mindennapos igény az, hogy restrikciós enzimmel való emésztés után egy meghatározott méretű DNS fragmentumot a többitől elkülönítsünk, izoláljunk. A többféle lehetséges módszer közül kettőt, talán a legelterjedtebbeket fogjuk megismerni a gyakorlat során, a többi módszernek csak az elvét ismertetjük.

DNS kinyerése agaróz gélből mikroméretű üvegyöngyök segítségével

- (1) Az etídiumbromiddal festett agaróz gélt helyezze UV-transzilluminátorra, s a kívánt fragmentumot tartalmazó csíkot vágja ki a gélből borotvapengét használva. 2-3 párhuzamosan futtatott mintából egyszerre is kivághatja ugyanazt a csíkot. A géldarabkát tegye mikrocentrifugacsőbe. **Feltétlenül használjon UV-szemüveget, vagy pajszot, és viseljen gumikesztyűt!** Mérlegesen mérje le a géldarabka tömegét.
- (2) A gélszelet tömegének 2,5-3-szorosát kitevő tömény (6M) NaI⁶ oldatot mérjen hozzá. Pl. 0,4 g tömegű géldarabhoz 1 ml-t. (0,4 g-nál nagyobb géldarabkát vagy kisebb darabokra kell vágni, vagy pedig nagyobb csövet kell használni.)
- (3) A géldarabkát tartalmazó csövet helyezze 50°C-os vízfürdőbe 5 percre, ill. addig, amíg az agaróz fel nem oldódik. Semmiképp ne tartsa 15 percnél tovább a vízfürdőben.
- (4) 5 µg-nál kevesebb DNS-hez adjon 5 µl üvegyöngy-szuszpenziót, minden további 0,5 µg-ra további 1 µl-t. 0,5-1 ml végtérfogatnál ajánlatos 10 µl-t használni. (A fehér színű üvegyöngy-szuszpenziót vagy üvegtejet előzőleg kémcsőkeverővel gondosan fel kell szuszpendálni.) Összekeverés után 5-15 percig hagyja szobahőmérsékleten állni. Ebben a lépésben a DNS megkötődik a mikroméretű üvegyöngyök felszínén. 1 ml-nél nagyobb térfogat esetén célszerű 15 percig várni, időnként felrázni a szuszpenziót, vagy folyamatosan enyhe rázatást alkalmazni.
- (5) 30 másodperces centrifugálással (16 000 fordulat/perc)⁷ ülepitse az üvegyöngyöket, majd szuszpendálja 200-700 µl mosópufferben, melynek összetétele 10 mM TRIS-HCl pH 8,0, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 50% etanol. Ezt a „mosást” még kétszer ismételje meg. Ebben a lépésben az üvegyöngyökhöz kötve marad a DNS. A mosás után alaposan szívja le a mosópuffert és 5-10 percig szobahőmérsékleten szárítsa az üledéket, mert az etanol nyomok zavarják az elúciót.
- (6) Az üledéket szuszpendálja fel TE pufferben. Olyan mennyiséget válasszon, ami a további munkához megfelelő DNS koncentrációt nyújt (pl. 1-2 µg-ra 10-20 µl). Egy általános szabály: használhat kétszer annyi TE-t, mint a felhasznált üvegtej mennyisége. Ezzel a DNS-t eluálja az üvegyöngyökről.
- (7) 30 másodperces centrifugálással ülepitse az üvegyöngyöket, a DNS-t tartalmazó felülúszót pedig gondosan szívja le. Az izolált DNS fragmentumot -20°C-on tárolja.

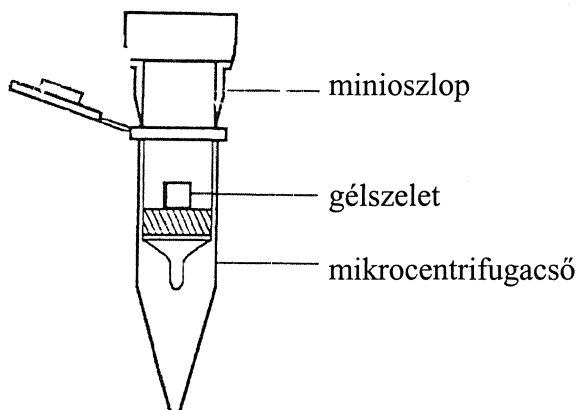
A leírt módszer jól alkalmazható a DNS-be be nem épült nukleotidok és szerves oldószerrel eltávolítására, plazmid DNS tisztításra és DNS minták koncentráálására is. A módszerhez szükséges anyagok rendszerint készlet (kit) formájában elérhetők. A legismertebb kitek egyike a GeneClean, gyártója: QBIogene. Ügyeljen arra, hogy egyes kitek csak TRIS-acetát (TAE) pufferben futtatott gélek esetében alkalmazhatók!

⁶ Ha 200-500 bp méretű fragmentumot izolálunk, ajánlatos 1/200 térfogat 10%-os ecetsavval 6,0 és 6,5 közötti értékre savanyítani a NaI oldat pH-ját, mert ilyen körülmények között hatékonyabb a DNS-kötés.

⁷ Általában elég az asztali mikrocentrifuga maximális fordulatszámát használni.

DNS kinyerése agaróz gélből centrifugálható minioszlop segítségével

- (1) A minioszlop mosása. Mérjük rá az oszlopra 100 μ l TE puffert, majd helyezük bele egy 1,5 ml-es mikrocentrifugacsőbe. Centrifugáljuk 10 másodpercig maximális fordulatszámmal, majd a centrifugacső alján összegyűlt puffert távolítsuk el.
- (2) Az etidiumbromiddal festett agaróz gélt helyezük UV-transzilluminátorra, s a kívánt fragmentumot tartalmazó csíkot vágjuk ki a gélből borotvapengét használva. 2-3 párhuzamosan futtatott mintából egyszerre is kivághatjuk ugyanazt a csíkot. Ügyeljünk arra, hogy a DNS csíkon kívül ne vágjunk ki sok agarózt. A géldarabkát tegyük rá a minioszlopra. (Egy géldarabka 0,1 és 0,3 g közötti tömegű lehet.) ***A gélből való kivágáshoz feltétlenül használjunk UV-szemüveget, v. pajzsot, s viseljünk gumikesztyűt!***
- (3) A minioszlopot helyezük bele egy 1,5 ml-es mikrocentrifugacsőbe és centrifugáljuk 10 percig maximális fordulatszámmal. A centrifugacső alján összegyűlt DNS nem tartalmaz etidiumbromidot és felhasználható restrikciós hasításhoz, ligáz reakcióhoz, jelöléshez, stb.
- (4) Mikropipetta segítségével mérjük le a DNS térfogatát. Ha az 20 μ l-nél kevesebb, az egészet, vagy összesen maximum 10-20 μ l-t 1/5 térfogat brómfenolkékkel keverve vigyünk fel agaróz géltre. Elektroforézis után próbáljuk megítélni a kivonás hatásfokát, összehasonlítva a csíkok intenzitását az eredeti plazmid hasítási képével.



1. ábra: Minioszlop mikrocentrifugacsőbe helyezve

Egyéb módszerek

Ha nem áll rendelkezésére üvegtejet tartalmazó kit, vagy minioszlop, akkor elektroelúció révén lehet kinyerni a DNS-t. Ilyenkor helyezze dializáló zsákba a gélszeletet kis mennyiségű (néhány tized ml) elfő-pufferrel, majd az egészet tegye gélelektroforézisre használt tankba úgy, hogy a puffer ellepje. Feszültséget kapcsolva a tankra futtassa ki a gélből a DNS fragmentumot, amely így belefut a dializáló zsákon belül levő pufferbe. (A DNS helyzetét lehetőleg UV-lámpával ellenőrizze). A pufferben oldott DNS-hez adjon 1/10 térfogat Na-acetátot, majd 2 térfogat -20°C -os etanollal csapja ki, mossa 70% etanollal, és a kívánt mennyiségű TE-ben vegye fel.

Egy alternatív módszer, aminek itt csak az elvére utalunk, azon alapul, hogy agaróz gélelektroforézis közben az izolálni kívánt sáv elé pozitív töltésű csoportokat tartalmazó DEAE-papírt helyezünk a fragmentum futásának útjába, azt a DEAE-papírba futtatjuk, majd a rajta megkötődött DNS-t magas sókoncentrációjú oldattal eluáljuk.

DEZOXYOLIGONUKLEOTIDOK KÉMIAI SZINTÉZISE

Aradi János

A nukleinsavak szerkezetének felderítésével szinte egy időben elkezdődtek az erőfeszítések a nukleinsavak kémiai szintézisére. Az ötvenes évek elején Michelson és Todd publikálták az első cikkeket melyekben 2' és 3' nukleotidokat polimerizáltak, először vegyes 3'-5' és 2'-5' kötéseket produkálva.

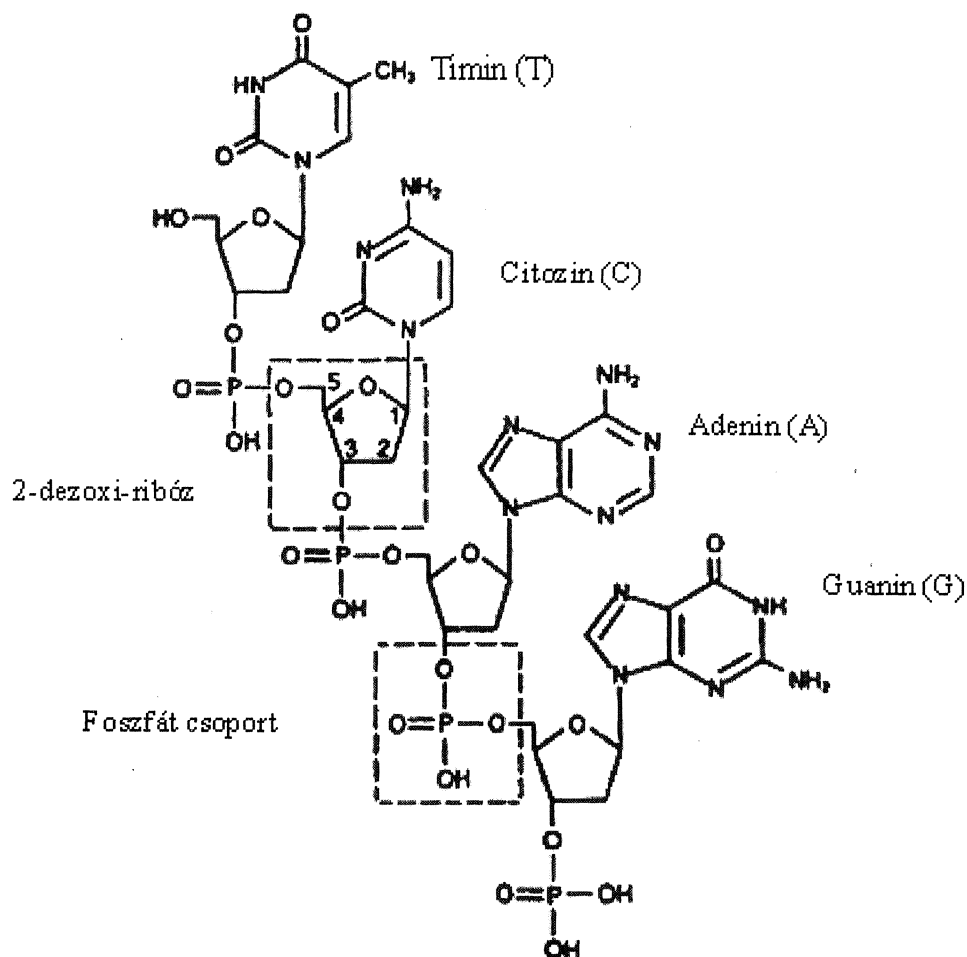
Minőségi változást hozott a nukleinsavak kémiai szintézisének kutatásában a DCC (N,N'-diciklohexil karbodiimid) típusú kondenzáló ágensek kifejlesztése. A karbodiimidek piridines, sőt vizes piridines közegben is képesek voltak foszfátésztereket alkoholos hidroxillal jó hozammal kondenzálni, ezért adott szekvenciájú oligonukleotidok szintéziséhez ideális kondenzáló ágensnek tűntek. Már az ötvenes évek végére Khorana laboratóriuma vezette a szakterületet. Kutatásai első, az éppen kibontakozó molekuláris biológia szempontjából is értékes eredménye, a 64 lehetséges triplet szintézise, valamint ismétlődő szakaszokat tartalmazó hosszabb oligomerek előállítását volt. Ezeket a vegyületeket sikerrel használták a genetikai kód megállapítására, illetve az eddigi eredmények megerősítésére. Khorana tevékenységének csúcsa az alanin specifikus tRNS génjének szintézise, melyet 1970-ben publikált munkatársaival. Ez volt az első kémiai úton szintetizált gén, mely egy 77 nukleotid hosszú DNS szakasz volt. Habár Khorana munkáját Nobel díjjal jutalmazták, a tudományos közvélemény még ebben az időben is csak mérsékelt lelkesedéssel fogadta ezeket a nagyszerű eredményeket. Többször elhangzott a kérdés, elérünk-e valaha oda, hogy kémiailag szintetizált oligonukleotidokra szükségünk lesz a mindennapok kutatásában? A helyzet a restriktív endonukleázok felfedezésével, tehát már a hetvenes évek elején, alapvetően megváltozott. A DNS, a hatalmas makromolekula, jól definiált helyeken hasíthatóvá vált. Nagy távlatok nyíltak meg a molekuláris biológia előtt, óriási tempóban fejlődött a *genetic engineering* és hirtelen megnőtt az igény adott szekvenciájú oligonukleotidok iránt.

A Khorana és munkatársai által kidolgozott eljárás az ún. *foszfodiészter* módszer volt. Ennek az immár klasszikus eljárásnak a lényege az, hogy olyan nukleotidokat kapcsol össze piridines közegben DCC segítségével melyek a foszfáton nem tartalmaznak kémiai védőcsoportot, csak a bázison és a pentózon. A módszer nagyon munkaigényes, minden lépés után izolálni kell az oligomert. Hosszabb oligomerek szintézise csak enzimatiszta lépések beiktatásával lehetséges. A diészter szintézis lassúsága és munkaigényessége miatt nem volt alkalmas arra, hogy a fokozatosan emelkedő igényt kielégítse. Már a hatvanas évek végén megjelentek az első publikációk az ún. *foszfortriészter* módszer alkalmazásáról Letsinger laboratóriumából. Ennél a módszernél a foszfát is tartalmaz védőcsoportot (a kémiailag védett monomer egy foszfodiészter), így a kondenzációs termék lipofil, és egyszerű szerves oldószeres extrakcióval izolálható, tisztítható. A módszer 1980-ra versenyképessé vált. Az oligonukleotid szintézis harmadik fő módszere szintén Letsinger laboratóriumából indult ki. Ez a *foszfit-triészter* módszer, melynek napjainkban használt változata az ún. *foszforamidit* módszer, bázison védett nukleozid foszforamiditek tetrazollal történő kapcsolását jelenti. Ez az eljárás nem foszfát-triésztereket produkál a kondenzáció első lépésében, hanem foszfit-triésztereket. A foszfit-triészterek enyhe oxidációval foszfáttá oxidálhatók. A módszer óriási előnye a közel 100 %-os kapcsolási hozam. A történeti hűség kedvéért érdemes megemlíteni, hogy a nyolcvanas évek elején próbálkozások történtek adott szekvenciájú oligonukleotidok enzimatiszta szintézisére is.

Az utóbbi két kémiai módszer szilárd fázishoz kötött formában is alkalmazható. A nyolcvanas évek közepétől megjelentek az automatizált oligonukleotid szintetizáló készülékek, melyek mostanra teljes mértékben kielégítik a molekuláris biológiai kutatás igényeit. A jegyzet további részében kizárólag a foszforamidit módszer automatizált változatával fogunk foglalkozni a Pharmacia Biotechnológiai Cég GENE ASSEMBLER PLUS készülékét használva.

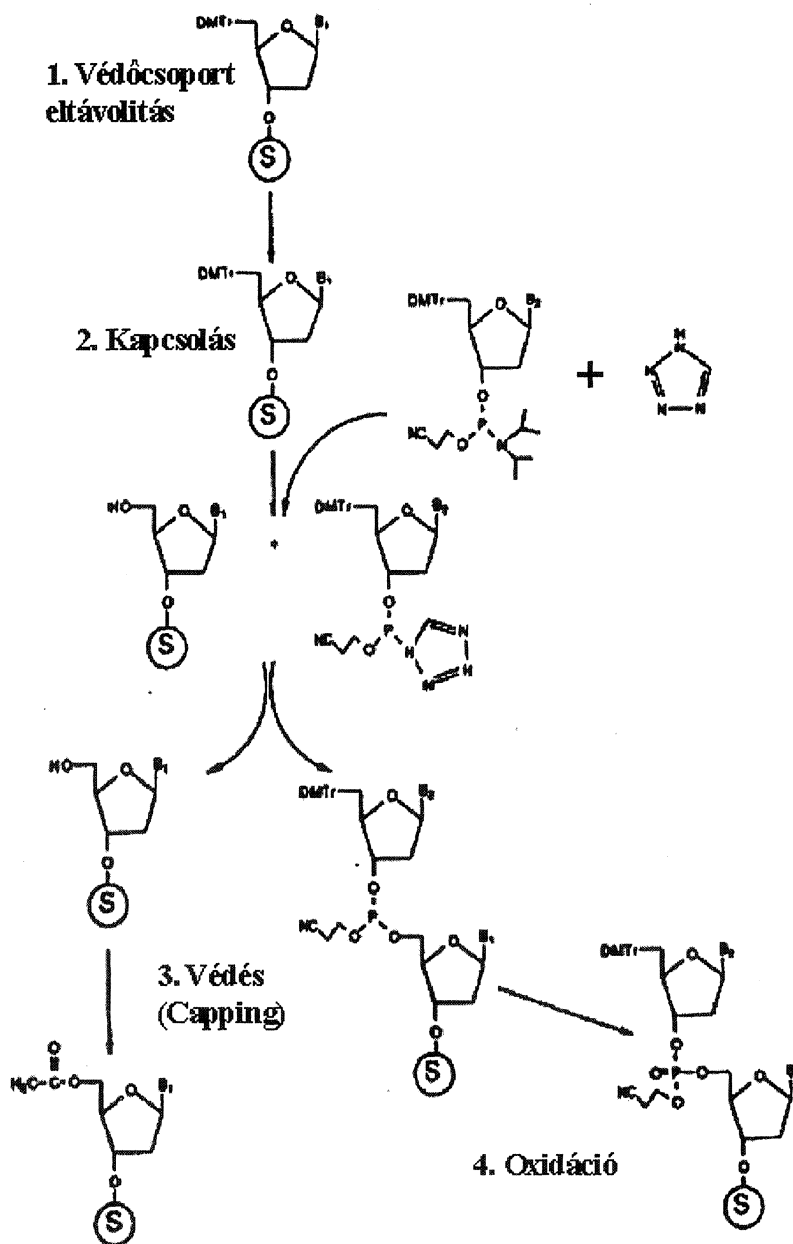
Elméleti háttér

Az 1. ábrán a DNS szerkezet felelevenítésére bemutatjuk egy 3' végen foszforilált, a négy közöséges bázist tartalmazó, deoxy-tetranukleotid kémiai szerkezetét.



1. ábra. Egy 3'végen foszforilált, négy közöséges bázist tartalmazó, deoxitetranukleotid szerkezete

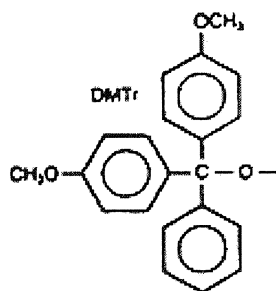
A szilárd fázisú foszformidit (foszfít triészter) oligonukleotid szintézis kémiai alapjai



2. ábra. A szilárd fázisú foszforamidit oligonukleotid szintézis egy ciklusa

A szilárd fázisú kémiai oligonukleotid szintézis során az oligonukleotidokat 3'-5' irányban szintetizáljuk (tehát nem úgy, ahogy a biológiai DNS szintézis történik). Ez a tény a 2. ábrán bemutatott sémából is kiderül. Az első (3'-végi) nukleozid szilárd fázishoz van kötve. A hordozó anyaga leggyakrabban kontrolált pórusú üveg (CPG) vagy polistiren alapú műgyanta. Természetesen, négyféle hordozó (későbbiekben support) szükséges. A szintetizálandó oligonukleotid 3' végének megfelelő supportot kell választani (A, G, C vagy T).

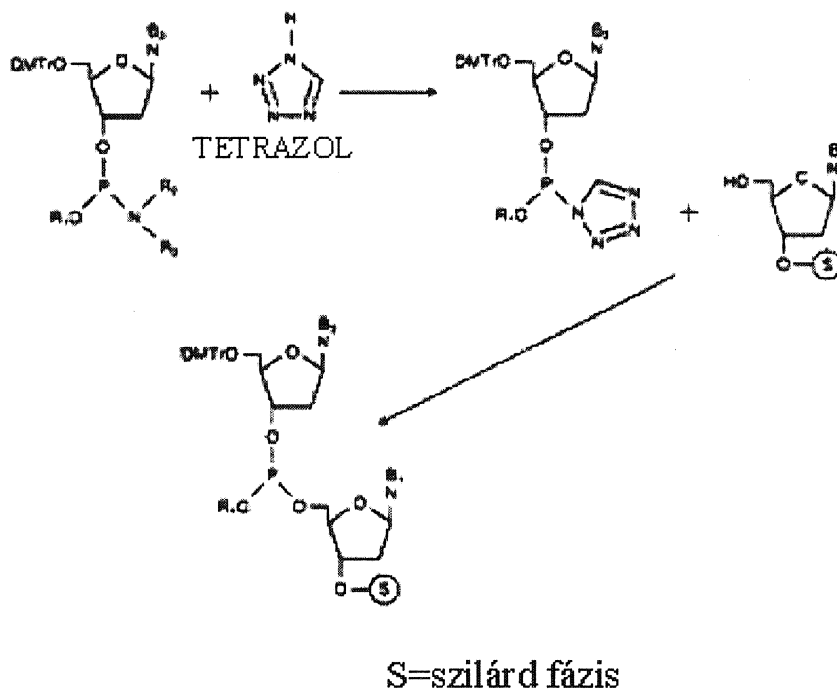
A szintézis ciklus első fő lépéseként a supporthoz kötött védett dezoxynukleozidról eltávolítják a 4,4'-dimetoxi tritil (DMTr) csoportot, mely savra érzékeny éterkötéssel kapcsolódik az immobilizált nukleozidhoz. Ez a lépés (Aktiválás, *Deprotection* a 2. ábrán) egy enyhe savas hidrolízis, ami a diklóretánban oldott di- vagy triklórecetsavval történik. A 4,4'-dimetoxi tritil csoport szerkezete a 3. ábrán látható.



3. ábra. A 4,4'-dimetoxi tritil csoport szerkezete

A DMTr védőcsoport savas hidrolízise során keletkező tercier alkohol élénk narancs vörösszínű, mennyisége spektrofotometriásan mérhető. Az automata szintetizáló készülékek egy átfolyó küvetával mérik e termék mennyiségét. Ebből az adatból a készülék szoftvere automatikusan számítja a kapcsolás hatásfokát.

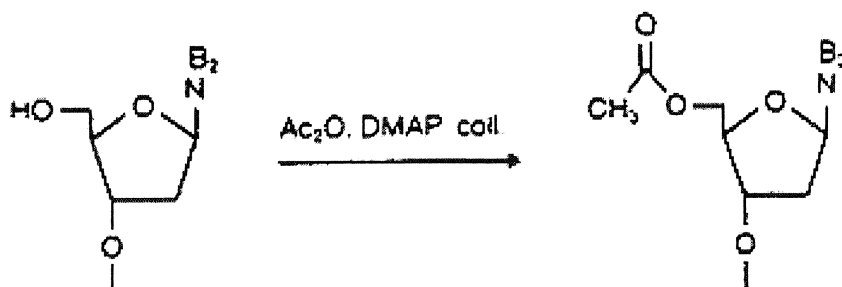
A szintézis ciklus második fő lépése a kapcsolás (*Coupling*). Az előző lépésben detritilált deoxynukleozid (későbbi lépésekben nukleotid) szabad 5' hidroxiljához kapcsolódik a nukleotid tetrazolit. A szintézishez használt - kereskedelemben beszerezhető - védett monomer egy foszforamidit (a foszfit egy szekunder aminnal - rendszerint di-izopropilaminnal - képez foszforamiditet). A foszforamidit forma stabilis vegyület, viszonylag jól tárolható. Ezt közvetlenül a reakció előtt, mintegy a kapcsolás részeként, tetrazoliddá konvertáljuk, tetrazol segítségével. Ez a termék reagál az 5' hidroxillal. A folyamat a 4. ábrán részleteiben is látható.



4. ábra. A kapcsolás folyamata

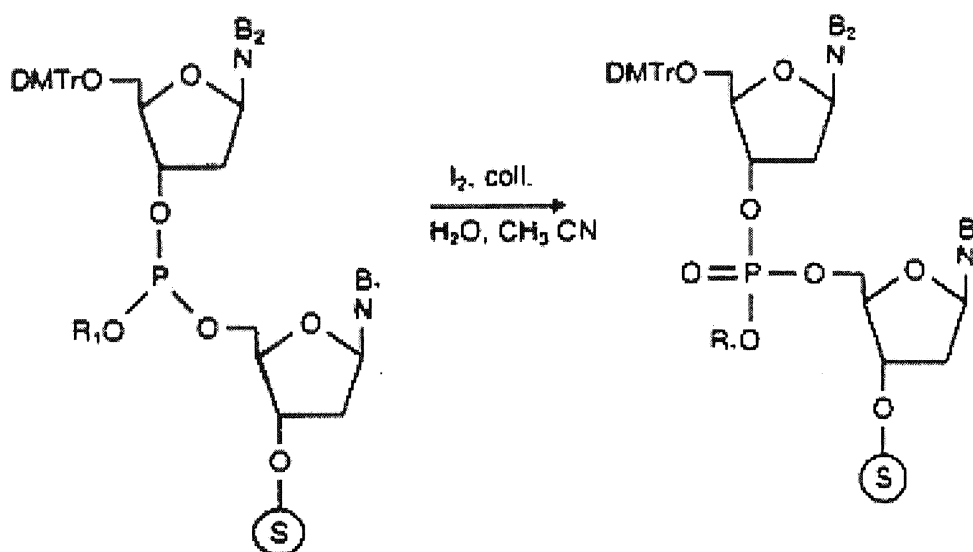
A foszforamidit kémia óriási előnye a háromértékű foszfor nagy reaktivitása. Ebben az állapotban a foszfor atom elektron deficiens és készségesen reagál minden elektron donor csoporttal pl. hidroxillal. Hátránya ennek a reakciótípusnak, hogy a víz is szerepelhet elektrondonorként. Ennek következtében a folyamatnak teljesen vízmentes közegben kell végbemennie.

A szintézis ciklus harmadik fő lépése a blokkolás (*Capping*). Ebben a lépésben történik a nem reagált szabad 5' hidroxilok 100%-os acetilálása (5. ábra). Ha ez nem történne meg, a nem kapcsolódott 5' hidroxilok egy későbbi szintézis ciklusban nem a kívánt szekvenciának megfelelő nukleotiddal reagálnának, így fals szekvenciák is képződhetnének. A *capping* biztosítja, hogy fals szekvenciák nem szintetizálódnak. A nem tökéletes kapcsolás eredményeként tehát nem hibás szekvenciák, csak rövidebb de helyes szekvenciájú oligomerek szintetizálódnak. Tekintve, hogy mennyiségük nem jelentős, a legtöbb molekuláris biológiai célra megfelel a szintetizált oligomer további tisztítás nélkül.



5. ábra. Nem reagált 5' végek blokkolása (*capping*)

A szintézis ciklus negyedik fő lépése az oxidáció (6. ábra). Ez a lépés a foszfítot, a természetes nukleotidokra jellemző, foszfát csoporttá oxidálja. A reagens vizes acetonitrilben oldott Jód.



6. ábra. Foszfít triészter oxidációja foszfát triészterre

Az itt felsorolt fő lépéseken kívül természetesen jelentősek az egyes fő reakciókat elválasztó mosások, melyek dikloretánnal és acetonitrillel történnek. A mosások feladata, hogy eltávolítsák az előző reakcióból visszamaradó, a következő lépést zavaró, reagenseket és melléktermékeket.

Mindezen lépések egy kis reaktorcsőbe zárt, 10x7 mm-es oszlopban elhelyezett szilárd fázisú hordozó felületén történnek (support). A reagenseket egy precíziós perisztaltikus pumpa szállítja a reagens üvegekből. A motorizált szelepeket és a perisztaltikus pumpát egy számítógép irányítja. A foszforamiditek, tetrazol és az acetonitril felett száraz argon atmoszférát kell biztosítani.

Védőcsoportok és szilárd hordozó

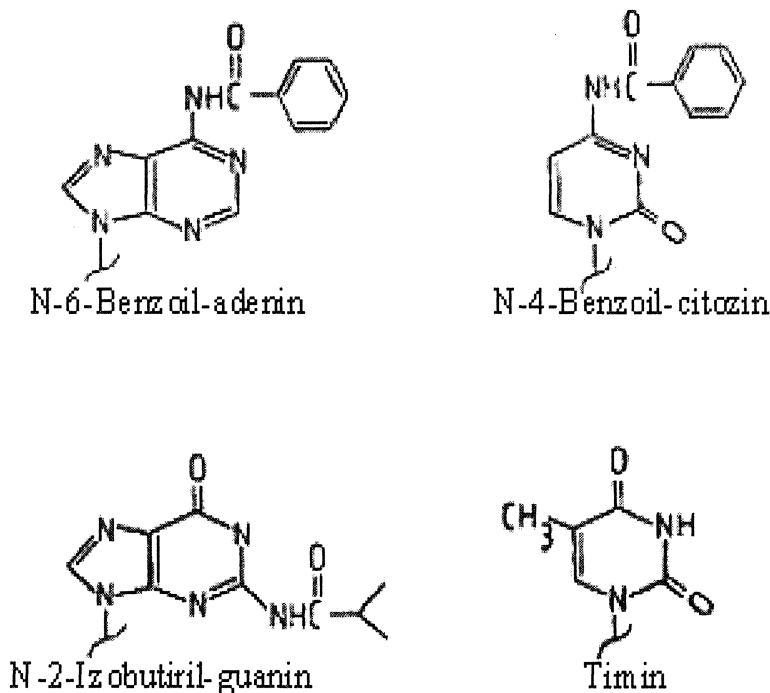
Az oligonukleotid szintézis reakcióinak bemutatása során már nyilvánvalóvá vált, hogy a reagáló nukleotid monomereket, valamint a 3' véget alkotó szilárd fázishoz kötött nukleozidokat védőcsoportokkal kell ellátni. Ezen ideiglenesen kapcsolt védőcsoportoknak két szerepe van:

1. megakadályozni a nemkívánatos reakciókat,
2. fokozni a hidrofil nukleotidok szerves oldószerekben való oldhatóságát.

A következő reaktív csoportokat kell megvédeni:

1. 5' hidroxil csoportok,
2. a bázisok primer aminjai,
3. foszfor atom hidroxil csoportja.

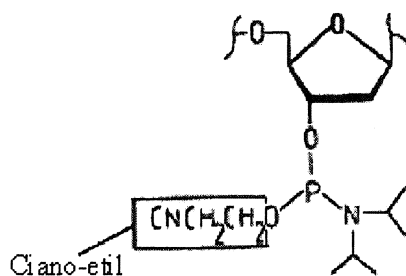
Az 5' hidroxil védőcsoportjáról, a DMTr csoportról már megemlékeztünk (3. ábra). Fontos hangsúlyozni, hogy ez a védőcsoport savlabil éter-kötéssel kapcsolódik a nukleotidhoz ellentétben a primer amin és foszfor védőcsoportjaival. Így szintézis közben szelektíven eltávolítható (ez az egyik oka a 3'-5' szintézis irányának). Itt kell megjegyezni, hogy a ribo-oligonukleotidok szintézisének a 2' hidroxilcsoportot is védeni kell. Az amino csoportok védelme, amid formában történik. Ezek a védőcsoportok a szintézis folyamán stabilisak, csak a szintézis végén koncentrált ammóniával való kezeléssel távolítandók el. Számos védőcsoportot kidolgoztak; a 7. ábrán az un. standard amiditek bázisai láthatók (a timinen nincs védőcsoport!). Az utóbbi néhány évben a standard amiditeken kívül forgalomba kerültek un. PAC (fenoxiacetil) amiditek is melyek labilisabb, könnyebben eltávolítható védőcsoportokat tartalmaznak.



7. ábra. Standard amiditek bázisainak védőcsoportjai

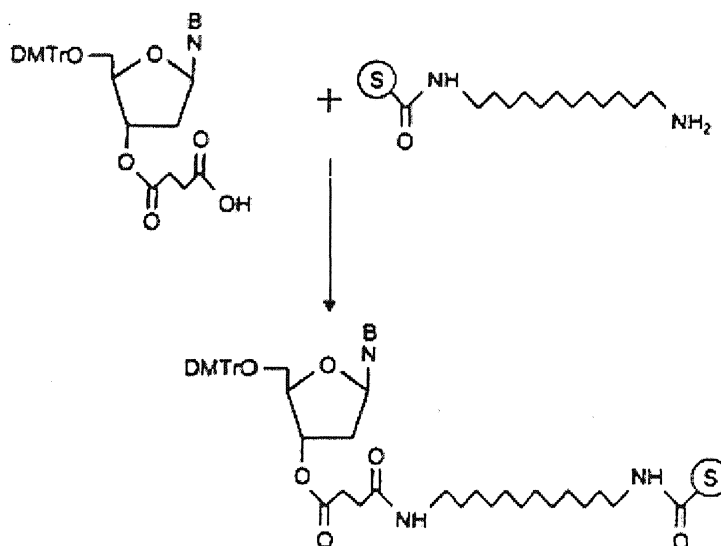
A foszfit triészter módszernél a foszforon levő hidroxil csoport β -cianoetil csoporttal van védve (8. ábra), melyet a szintézis végén ammóniás kezeléssel távolíthatunk el. A foszfor

továbbá N,N-diizopropil csoportot is hordoz mely közvetlenül a kapcsolás előtt (aktíválás) tetrazoliddá alakul.



8. ábra. Foszfít csoport védelme

A szilárd hordozó lehet üveg (CPG), polisztirol, szilika, cellulóz. A hordozóhoz a kezdő (3') védett nukleozid egy karon (*spacer*) keresztül kapcsolódik (9. ábra). Az oligomer eltávolítása a hordozóról szintén ammóniás kezeléssel, a szintézis végén, történik. A szilárd hordozó grammonként 20-50 fmol védett nukleozidot tartalmaz.



9. ábra Polisztirol alapú, hordozóhoz kapcsolt nukleozid

Új oligonukleotid felhasználási lehetőségek és új kihívások az oligonukleotid szintézis területén

Az oligonukleotidok molekuláris biológiai, biotechnológiai és terápiás felhasználása egyre növekszik. A leggyakoribb felhasználási terület az oligonukleotidok primerként való alkalmazása. Nagyszámú primert igényel az általánosan elterjedt polimeráz láncreakció. Egyre nagyobb az oligonukleotidok diagnosztikai alkalmazása, ahol legtöbbször szintén primer funkciót látnak el. A nagyszámú, különböző szekvenciájú primerek előállítására már alkalmatlanok voltak az egyszerre egy-két oligomert szintetizáló készülékek, ezért olyan gépeket szerkesztettek melyek akár ötven primert is készítenek egyszerre a reagenseket egyszerűen rácsepegtetve a műanyag csőben elhelyezett szilárd hordozóra.

Az oligonukleotid szintézis fejlesztő laboratóriumok megoldották az oligonukleotidok fluoreszcens festékekkel történő jelölését, így ez lehetővé tette a kvantitatív PCR megjelenését, és a különböző fluoreszcens mikroszkópiás technikák kiterjesztését oligonukleotidokkal történő jelölésre.

Újabb felhasználási területet jelent az RNS interferencia felfedezése és *in vitro* kutatási célú alkalmazása. Igaz, itt közvetlenül RNS oligonukleotidok az aktív ágensek, de ezeket igen gyakran szintetikus DNS templátról másolják, megfelelő RNS polimerázzal.

További felhasználási területet jelent az aptamer technika kifejlesztése. Az aptamerek olyan rövid, rendszerint kémiaiilag szintetizált RNS vagy DNS oligonukleotidok, melyek, másodlagos szerkezete alkalmas a célzott molekula, pl. protein, felismerésére.

Az antiszensz oligonukleotidok kutatási célú alkalmazása elterjedt, és néhány antiszensz oligonukleotid jelenleg a klinikai kipróbálás fázisában van. Ez a technika újabb kihívásokat jelentett a szintetikus oligonukleotidok kémiaja számára. Így meg kellett oldani a nukleáz rezisztens foszforotioát internukleotid kötések szintézisét, és a mg-os szintézis adagokat kilogrammos méretekké kellett alakítani. Napjainkban már olyan oligonukleotid szintetizáló készülékek vannak forgalomban, melyek egy szintézisben több kg oligonukleotidot képesek előállítani.

Az antiszensz oligonukleotidokon kívül számos más mechanizmussal ható oligonukleotid alapú gyógyszer van kifejlesztés alatt, melyek várhatóan a következő években jutnak el a gyakorlati alkalmazásig. Ez azt is jelenti, hogy az oligonukleotid szintézis a biotechnológia egy önálló új ágát képezi a közeljövőben.

A kísérlet kivitelezése

A foszforamidit módszer kondenzációs lépése abszolút vízmentes körülmények biztosítását igényli. Ezért a tetrazol és az amiditek acetonitriles oldata, valamint az acetonitril, mintegy 10 % (térfogat) vízelvonó ágenszt (Molecular sieve 0.3 nm, Merck vagy Aldrich) kell hogy tartalmazzon. A fenti oldatok felett a készülék kis nyomású száraz argon atmoszférát biztosít. A vízmentes körülmények biztosítása érdekében szokja meg a gyors határozott mozdulatokat, hogy fenti higroszkópos anyagjaink minél rövidebb ideig érintkezzenek a külső atmoszférával.

A készülék beindítását a megfelelő reagensek megfelelő helyre történő csatlakoztatásával kell kezdeni. A készülék alsó reagens tároló szintjén hat számozott teflon cső van, ezekhez kell csatlakoztatni sorrendben a diklóretánt, detritiláló oldatot, acetonitrilt (szárító ágens, argon atmoszféra), oxidáló oldatot, *capping A* oldatot és *capping B* oldatot. A felső reagens tároló szinten van az amiditek és a tetrazol oldat helye. Mind az öt oldat tartalmazzon 10 % szárító ágenszt, és argon atmoszféra alatt kell lennie (ez utóbbit egy argon palack biztosítja, mely a készülékbe beépített reduktoron keresztül kapcsolódik a megfelelő üvegekbe).

Az amiditek 0,1 M -os oldatát kell használni, a tetrazol oldata telített, 0,5 M -os. Ez azt jelenti, hogy standard amiditek használata esetén az amiditek koncentrációja: A-amidit 82 mg/ml, T-amidit 71 mg/ml, G-amidit 80 mg/ml, C amidit 80 mg/ml. A tetrazol oldat készítése: 2000 mg tetrazolt kell oldani 58 ml száraz acetonitrilben. A szárító ágenszt csak az anyagok teljes feloldódása után adja a reagensekhez. Az amiditek és a tetrazol is rendkívül drága és nem tárolható oldott állapotban hosszabb ideig, ezért csak a készülék szoftvere által számított térfogatú oldatokat készítse el.

Az egyes reagensekbe merülő vékony teflon csövek végére kis porózus teflon hengereket kell húzni, melyek megszűrik az oldatokat és oldószereket, eltávolítva a szárító ágens esetleges törmelékét.

A reagensek és oldószerek csatlakoztatása után kapcsolja be a készüléket és a számítógépet. Az argon palackot megnyitva állítsa be az argonnyomást, majd a szoftver irányítását követve adja meg a szintetizálni kívánt szekvenciát, és indítsa be a szintézist. Meg kell jegyezni, hogy a készüléken két extra hely van kémiaailag módosított nukleotidok beépítésére (pl. inozin, 5-brom deoxyuridin stb.). A készülék két reaktort tartalmaz, így két szekvenciát lehet bevinni egyszerre, melyeket egymás után készít el a készülék. A szintézis adatait tárolja, kérésre kinyomtatja.

A készülék standard reaktora két különböző töltet mennyiségű supporttal használható 0,2 μ molossal és 1,3 μ molossal. Beszerezhető 10 mmolos reaktor is. Molekuláris biológiai célokra minden esetben elegendő a 0,2 μ molos oszlop használata. Az oligomer hosszától függően 200-800 μ g oligomer szintetizálható ezen az oszlopon.

A szoftver

A GENE ASSEMBLER PLUS szoftvere rendkívül egyszerű, könnyen kezelhető, a következő fő menüket tartalmazza:

Sequence Editor, Run Synthesis, Utilities, Purge/Cal, Method Editor.

A *Sequence Editor* lehetővé teszi a szintetizálandó szekvenciák bevitelét, azok manipulálását, alkalmas arra, hogy azonos pozícióba többféle bázist (wobble) beírjunk (és természetesen szintetizáljunk). Alkalmas a szekvencia adatok tárolására is.

A *Run Synthesis* irányítja a szintézist. Menetközben számítja és mutatja az egyes kapcsolások eredményességét. Alacsony kapcsolási százaléknál (ez megválasztható) leállítja a szintézist. A szükséges reagens mennyiségeket kalkulálja. A szintézis végeztével lehetőséget kínál az utolsó tritil csoport fennhagyására, vagy hidrolizására.

A *Utilities* a szekvenciák tárolására használt diszkek speciális előkészítésére ad lehetőséget. Továbbá a szekvencia file-ok manipulálását másolását, nyomtatását végzi.

A *Purge/Cal* használható a készülék csöveinek reagensekkel való feltöltésére, a készülék mosására kikapcsolás előtt. A pumpa kalibrálása is ezzel a menüvel végezhető el. Minden új szintézis sorozat előtt célszerű újra kalibrálni a pumpát.

A *Method Editor* alkalmas arra, hogy a standard módszert megváltoztassuk és saját elképzelésünk szerint más programot adjunk a készüléknek. Lehetséges a kapcsolási fázis megnyújtása, ezzel bizonyos mennyiségű amiditet megtakaríthatunk. Az eredeti program módosításával foszforotionát internukleotid kötés kialakítására, 5' végre amino csoport helyezésére vagy foszfortriészter kémiájú szintézisre is lehetőség nyílik.

Post-szintetikus tennivalók

A szintézis végeztével még messze van attól, hogy tiszta oligonukleotid oldata legyen. Az első lépés az oligonukleotid lehasítása az oszlopról és a védőcsoport eltávolítása (*deprotection*). Ez a következőképpen történik.

1. Vegye ki a kis műanyag oszlopot a reaktorból és helyezze egy Eppendorf csőbe (peremével felfelé), melybe előzőleg 1 ml 33 %-os ammóniumhidroxidot pipettázott.

2. Centrifugálja a csövet 3000 rpm-el 2 percig, így az oszlopa, mely kovalensen kötve tartalmazza az oligonukleotidot, jól telítődik tömény ammónium-hidroxiddal.

3. Standard amiditek használata esetén tartsa az oszlopot tartalmazó Eppendorf csövet 16 órán át 55 °C-on. Ez csak úgy oldható meg biztonságosan, ha a csövet egy nyomásálló tartályba helyezi, melybe 33 %-os ammoniumhidroxidot önt. Így a csövön kívül belül azonos nyomás alakul ki. Nyomásálló, légmentesen záró csavaros csövekben is történhet a *deprotection*. Megjegyzendő, hogy PAC amiditek használata esetén egy éjszakán át szobahőfokon lezajlik a reakció (*deprotection*).

4. A megfelelő idő letelte után nyissa fel a lehűtött tartályt, és az oszlopba tűt szűrve helyezze azt egy másik Eppendorf csőbe és centrifugálja mint előbb. Az oszlopból kicentrifugálódott kevés ammóniás oligonukleotid oldatot egyesítse az inkubációs csőben maradtal. Így közel 1 ml oligonukleotid oldatunk van koncentrált ammóniában, mely ezen kívül tartalmazza a védőcsoportok hidrolízis produktumait.

A tiszta oligomer kinyerése az ammóniás oldatból többféleképpen történhet:

1. Áteresztetheti az ammóniás oldatot a Pharmacia által forgalmazott NAP oszlopon. Ez lényegében egy kis speciális tisztaságú Sephadex G-25 gélszűrő oszlop. Hátránya, hogy az oszlopot 10 mM NaOH, 0,5 M NaCl oldattal kell ekvilibrálni. Tehát ebben kapja meg az oligonukleotidot.

2. Anioncserélő HPLC oszlopon tisztítható a teljesen védőcsoport-mentes (*deprotected*) oligonukleotid.

3. Denaturáló poliakrilamid gélelektroforézissel rendkívül tiszta, homogén oligonukleotidot lehet preparálni. Hátránya ennek a módszernek, hogy legalább 70 % veszteséggel jár.

4. Amennyiben az utolsó tritil csoportot nem távolítja el az oligonukleotidról (a Run Synthesis menü ezt megkérdezi) az oligomer fordított fázisú oszlopra jól köthető és onnan tisztán eluálható. A tritil csoport csak azon az oligonukleotid populáción van rajta mely teljes hosszúságú, hiszen a rövidebbek (a nem reagáltak) a *capping* során acetilálódtak az 5' hidroxilon és ez az acetil csoport lehidrolizálódik az ammóniás kezelés során. Ez a különbség (tritilált teljes hossz és rövidebb nem tritilált) jelentősen befolyásolja az oligonukleotidok hidrofobicitását, így kötődését a fordított fázisú oszlopon, ami jó elválasztást biztosít. Ne felejtse el, hogy az ammóniás kezelés nem távolítja el a tritil csoportot. A fordított fázisú kromatográfia után, a tritil csoport 30 percig szobahőfokon történő 80%-os ecetsav kezeléssel lehidrolizálható. Az ecetsavas kezelés csak 30 percig tartson, ne tovább!

5. Az ammóniás oligonukleotid oldatból legkönnyebben alkoholos vagy butanolos kicsapással nyerheti ki az oligonukleotidot.

a. 100 μ l ammóniás oligonukleotid oldathoz adjon Eppendorf csőben 1,1 ml n-butanolt, nagyon gondosan keverje össze, majd centrifugálja 14 000 rpm-el 3 percig. Felülúszót öntse le, a csapadékot szuszpendálja 100 μ l vízben, majd ismételtén csapja ki, mint előbb. A második csapadékot vákuumban szárítsa meg és oldja a megfelelő pufferben (ha marad oldhatatlan anyag ez a védőcsoportok maradéka, nem okoz problémát, centrifugálással távolítsa el).

b. 400 μ l ammóniás oligonukleotid oldathoz adjon 2 μ l 1 M $MgCl_2$ oldatot és 40 μ l 10 M ammóniumacetát oldatot, majd 950 μ l hideg etanolt. Összekeverés után tartsa 30 percig $-20^\circ C$ -on, ezután centrifugálja 8 percig 14 000 rpm-el. A csapadékot 100 μ l vízben szuszpendálja, majd csapja ki n-butanollal (mint fent).

6. A kicsapott oligonukleotid jól tisztítható vékonyrétegen, szilikagélen (preparatív vékonyréteg nem jó!), n-propanol/koncentrált ammonia/víz (55:35:10) futtató elegyben. A leglassabban vándorló sáv a tiszta oligomer, ez lekaparható és tisztán eluálható. A módszer analitikai célokra is alkalmas. Ezzel a módszerrel ellenőrizheti leggyorsabban a szintetizált oligonukleotid tisztaságát.

Szintetikus oligonukleotidok hosszabb tárolására legalkalmasabb az ammóniás oldat. Ha megtisztított oligonukleotidot kíván hosszabb ideig tárolni (hónapokig) érdemes legalább 8-as pH-jú oldatban eltenni. Így nem hasadnak le az alacsonyabb pH-ra érzékeny purin bázisok, főleg az adenin.

Oligonukleotid oldatok koncentrációjának mérése

Ha pontosan meg akarja határozni az oligonukleotid oldatok koncentrációját legjobb, ha perklorásvval elroncsolja és mérjük a foszfor tartalmát. A módszer megbízható és pontos, de munka és anyagigényes. Csak kivételes esetekben kell ehhez a módszerhez folyamodnunk, főleg ha kémiaailag módosított származékokról van szó, melyek moláris abszorpciós koeficiense nem ismert. Legegyszerűbb, ha a 260 nm-en mért abszorpció alapján számolnak az oligonukleotidok mennyiségét. Az irodalomban 1 A_{260} egység (U) oligonukleotidot 25-332 μ g-nak számítanak. Általában elfogadható, ha egy átlag összetételű oligonukleotid esetén 1 A_{260} U-t 30 μ g-nak tekintünk. Ha különleges bázis-összetételű (egyik bázisból az átlagnál sokkal több van) oligonukleotidunk van egyszerűen a következő moláris abszorpcios koeficiens értékeket (A_{260} U/mmol) vehetjük figyelembe dA = 15.4, dC = 7.4, dG = 11.5, dT = 8.7. Számos szoftver van forgalomban melyek a szekvencia és a bázisok kölcsönhatásai alapján számítják a molekulára vonatkozó moláris abszorpciós koeficienseket. Továbbá vannak speciális fotométerek (pl. Pharmacia GeneQuant) melyek a beadott szekvencia alapján a mért abszorpcióból közvetlenül számolják az oligonukleotid koncentrációt.

Irodalom

1. Gait, M.J., Oligonukleotid synthesis, a practical approach, IRL Press Limited, Oxford 19.
2. Letsinger, R.L., Finnan, J.L., Heavner, G.A. and Lunsford, W.B., J. Am. Chem. Soc. 97, 3278-3279 (1975).
3. Beaucage, S.L. and Caruthers, M.H., Tetrahedron Lett. 22, 1859-1862 (1981).
4. Ugelstad, J., Mörk, P.C., Kaggerud, K.H., Ellingsen, T. and Berge, A. Adv. Colloid and Interface Sci. 13, 101-140 (1980).

POLIMERÁZ LÁNCREAKCIÓ

Dombrádi Viktor

A polimeráz láncreakció (angol nevének Polymerase Chain Reaction kezdőbetűi alapján röviden PCR) felfedezését K. Mullis 1985-ben jelentette be az Amerikai Humán Genetikai Társaság konferenciáján. Az elmúlt időszakban ez az egyszerű eljárás forradalmasította a molekuláris biológia eszköztárát és szemléletét. Ma már egy ismert DNS szekvencia alapján bármely molekuláris biológiai laboratóriumban néhány nap alatt elő lehet állítani a kérdéses szekvenciának megfelelő DNS mintát. Ez óriási előrelépést jelent a genom projektek felhasználói számára, hiszen a genetikai információ az elektronikus lekérdezés után közvetlenül felhasználható a kísérletes munkában.

Az először leírt alapreakció típusát többször módosították, és újabb ötletekkel egészítették ki, így a PCR számos helyen felhasználhatóvá vált a molekuláris biológiai kutatásban és az orvosi diagnosztikában. Az alábbiakban felsorolunk néhány tipikus alkalmazást: DNS próbák előállítására hibridizációhoz, módosított DNS előállítására (irányított mutáció), klónozás, cDNS előállítására, DNS szekvenáláshoz minta előkészítése (aszimmetrikus PCR), illetve genetikai betegségek kimutatására, fertőzést okozó élőlények detektálására betegtől vett mintából, igazságügyi orvostani vizsgálatok, rokonsági viszonyok felderítése, evolúciós vizsgálatok (ősi minták vizsgálata) stb.

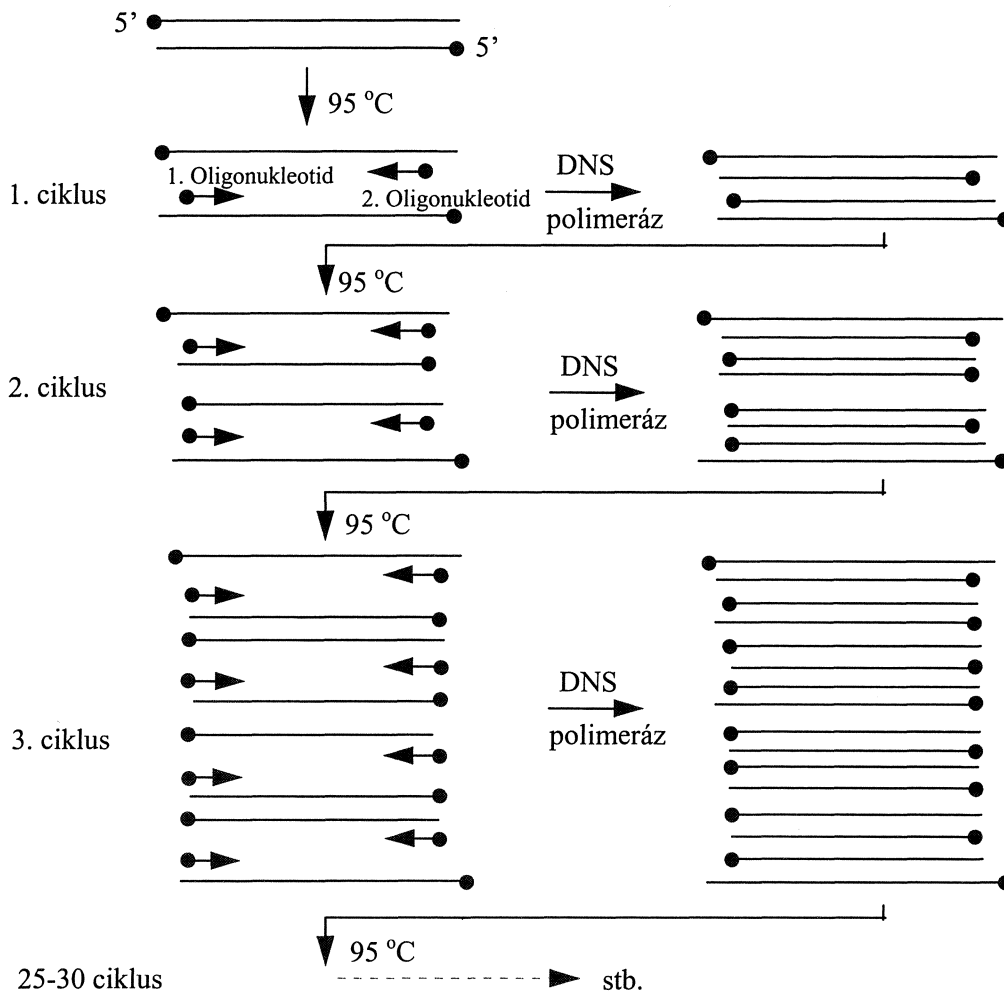
Jegyzetünkben először leírjuk a PCR alapelvét és egy egyszerű kísérleti elrendezés megvalósítását, majd bemutatunk néhány különleges technikát (az RT-PCR-t külön fejezetben tárgyaljuk), és végül ismertetjük a hasonló elveken alapuló ligáz láncreakciót.

A PCR elve

A PCR alapelve egyszerű, csak sokáig nem jöttek rá. Mullis az oligonukleotidok felhasználására irányuló vizsgálatai közben döbönt rá arra, hogy ha a DNS-függő polimeráz reakciót két megfelelő oligonukleotid primer jelenlétében többször megismétli az eredeti DNS szekvencia egy része megsokszorozható. Ehhez egy kettősszálú DNS targetre, egy DNS polimerázra és két olyan oligonukleotid primerre van szükség amelyek a DNS két különböző szálával hibridizálnak úgy hogy 3'-végük egymással szembenéz (1. ábra).

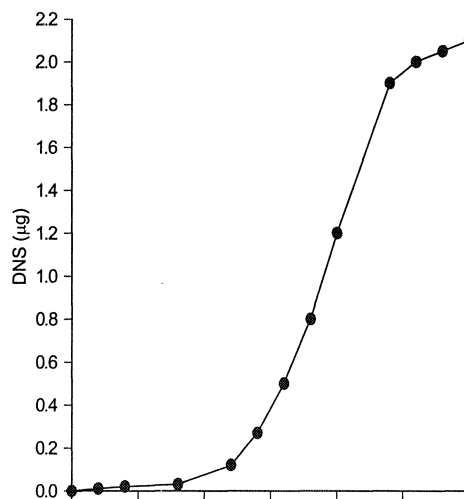
A reakció lépései a következők:

- (1) A kettősszálú DNS denaturálása hőkezeléssel (95 °C-on).
- (2) A targettel komplementer két oligonukleotid hibridizálása az egyes DNS szálakhoz úgy, hogy az egyikük az egyik, másikuk a másik szálhoz kötődjön. A kapcsolat stabilizálásához az elegyet le kell hűteni és az oligonukleotidokat nagy feleslegben kell alkalmazni.
- (3) Új DNS szálak szintézise dNTP és DNS polimeráz segítségével. (Az első ciklusban szintetizált szálak hossza nem egységes.)
- (4) A ciklus megismétlése. Ekkor a sokszorozandó DNS szakasz megduplázódik. A 3. ciklusban megjelennek azok a kettős szálak, melyeket az oligonukleotidok 5' végei határolnak. Mivel az *egységes hosszúságú termékek* száma exponenciálisan növekszik kb. 20 ciklus után ezek lesznek döntő többségben.



1. ábra. A polimeráz láncreakció (PCR) elve

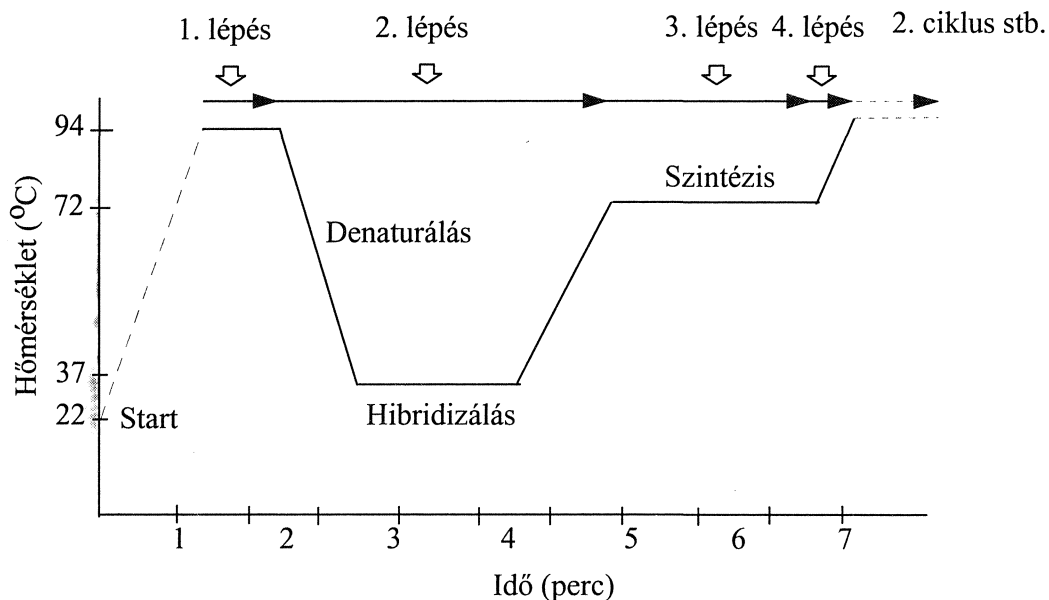
A módszerrel a DNS kb. 10^6 -szoros sokszorozása érhető el. Egy idő után az exponenciális növekedés leáll, ez az úgynevezett *plató effektus* (2. ábra).



2. ábra. A PCR ciklusszáma és a DNS kitermelés közötti összefüggés

A plató létrejötte valószínűleg azzal magyarázható, hogy a DNS oly mértékben koncentráldódik a közegben, hogy gyakoribb a hosszú szálak renaturálódása mint az oligonukleotiddal történő hibridizáció. A plató kialakulása után várható a nonspecifikus másolatok felgyülemzése, ezért még a plató előtt abba kell hagyni a láncreakciót. Ha további sokszorozás szükséges célszerű a termék 1000-10000- szoros hígítása után egy újabb PCR reakciót elvégezni.

Kezdetben a PCR reakcióban az *E. coli* DNS polimeráz I proteolitikus fragmentjét, az úgynevezett Klenow-fragmentet használták, ami nem rendelkezik exonukleáz aktivitással. Ez egy hőérzékeny fehérje, így minden egyes hődenaturálási lépés után friss enzimet kellett adni a közeghez. További hátránya volt, hogy a reakciót 37 °C-on hajtották végre, és így gyakori volt a fals hibridizáció, ami a kitermelést rontotta. A fenti problémák megoldásában segített a *T. aquaticus* DNS polimeráza, a *Taq* polimeráz (kereskedelmi nevén AmpliTaq) bevezetése 1988-ban. Ez az enzim hőstabil, felezési ideje 92,5° C-on 130 perc. Optimális számára a 75-80 °C hőmérsékleti tartomány, ahol átviteli száma 150 nukleotid/s. Alacsonyabb hőmérsékleten is alkalmazható, pl. 70°C-on az átviteli szám 60 nukleotid/s; de még 55°C-on is 24 nukleotid/s. Ez az újítás lehetővé tette az enzim egyszeri beadását a reakciósorozat elején, ami egyszerűbbé tette a reakció automatizálását. Egy tipikus AmpliTaq PCR hőmérséklet profilját mutatja be a 3. ábra.



3. ábra. Egy tipikus PCR ciklus hőmérséklet profilja

Egy tipikus PCR ciklus a következő lépésekből áll:

- (1) Denaturálás 92-95 °C-on.
- (2) Primerek hibridizálása az oligonukleotidok olvadáspontjától függő hőmérsékleten ($T_m - 3$ °C-on).
- (3) DNS szintézis 72°C-on.
- (4) Újabb hődenaturálás.

Ezt követi a ciklus többszöri ismétlése.

Az automatizálás technikai megvalósítására két lehetőséget kísérleteztek ki. Az egyik lehetőség a minta mozgatása különböző hőmérsékletű vízfürdők között (robotszerű megoldás); a másik a mintatartó fűtése-hűtése (hőciklus rendszer). A gyakorlatban az utóbbi terjedt el. A fűtést fűtőszállal, a hűtést félvezető Peltier-elemmel oldották meg. A legújabb készülékeket fűthető tetővel gyártják. Ez a módosítás meggátolja az elpárolgott víz kondenzálódását a lezárt

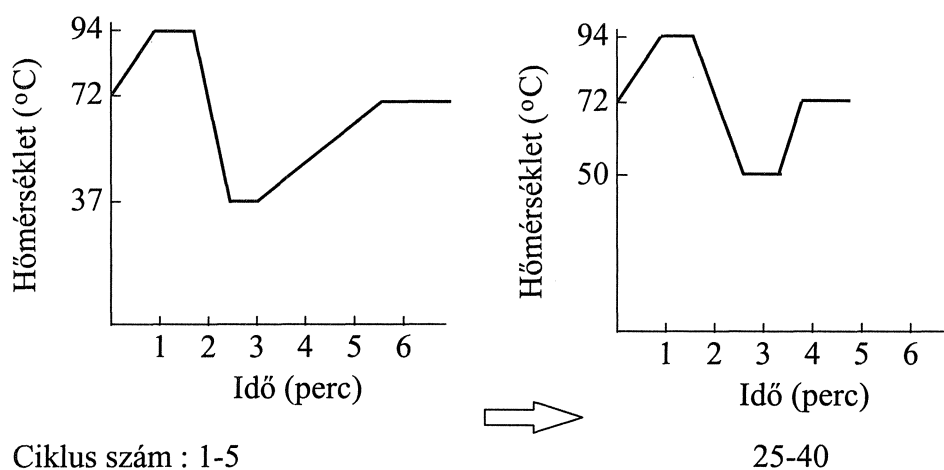
ependorf cső kupakjában, ami elejét veszi a reakcióközeg koncentrációjának, illetve beszáradásának. A régebbi berendezésekben a közeg elpárolgását a felszínére cseppentett olajréteg gátolja meg.

Optimalizálás

Nem létezik olyan recept, amely minden PCR reakcióban tökéletesen működne. Ezért a kísérletek elkezdésekor a legelső feladat az optimális reakciókörülmények megállapítása. A sokszorozás a target DNS-től és az oligonukleotidoktól függő módon különböző hatékonysággal játszódhat le egy adott készülékben. Csak a körülmények optimalizálása után várhatunk specifikus és jó kitermelésű reakciót. Az alábbiakban felsoroljuk azokat a legfontosabb tényezőket, amelyek megszabják a reakció hatékonyságát. [Szögletes zárójelben a leggyakrabban használt értékeket tüntettük fel.]

(1) A 20-30 nukleotid hosszúságú primereket úgy kell megtervezni, hogy ne tartalmazzanak belső hurkot, a G-C tartalmuk kb. 50% és a 3'-végük lehetőleg G vagy C legyen, valamint a 3'-végen nagyfokú legyen a target DNS szekvenciával való komplementaritás. Az egyes primerekben ne alakuljanak ki hurkok a belső komplementer szekvenciák következtében. A primer pár tagjai se legyenek egymással komplementerek és a T_m értékük közel essen egymáshoz. Ma már egyszerű computer programok teszik lehetővé a fenti szempontokat figyelembe vevő pontos tervezést.

Tervezhetőek degenerált, vagy a target szekvenciával nem teljesen komplementer oligonukleotidok is, ilyenkor azonban az 1-5 ciklus profilját célszerű módosítani (4. ábra). A lassú felmelegítéssel kihasználható az enzim alacsonyabb hőmérsékleten is jelentős aktivitása a primer megnyújtására, még a T_m ponton bekövetkező disszociációja előtt. Az így meghosszabbított primer már magasabb hőmérsékleten is stabilan kapcsolódik a target szekvenciához, ahol az enzim jó hatékonysággal elvégezheti az új DNS szál szintézisét. Miután felszaporodnak a végükön a primert is tartalmazó kópiák, a további ciklusokban alkalmazható a megszokott hőmérséklet profil.



4. ábra. A target szekvenciával nem teljesen komplementer (degenerált) oligonukleotid primerek esetén javasolt PCR hőmérséklet profilok

(2) Be kell állítani az optimális reakció közeget; a Mg^{2+} koncentrációt [1.5 mM], az enzim mennyiséget [2,5 U], a pH-t [8.4] és végül az adalékanyagok pld. DMSO, formamid, BSA, glicerin, $(NH_4)_2SO_4$, KCl, zselatin koncentrációját [50 mM KCl; 100 mg/ml zselatin] is optimalizálni kell.

(3) Nagy tisztaságú dNTP oldatokat [20-200 mM] kell használni. Szuboptimális dNTP koncentráció javítja a másolás hűségét.

(4) Elvileg egyetlen kettősszalú DNS molekula elegendő a másolás beindításához, de ekkor magasabb ciklusszám és szükség esetén ismételt láncreakció sorozat szükséges [a target DNS mennyisége általában 0,1-1 µg].

(5) Rendkívüli fontos a szennyezések és keresztszennyezések elkerülésére. Nem kívánatos a szennyező DNS sokszorosítása!

Még optimális körülmények között végrehajtott PCR esetében is számolni kell a következő problémákkal:

(1) A Taq polimeráz nem rendelkezik ellenőrző (proof reading) aktivitással, így a beépítési hibák száma 1/5000 nukleotid körül mozoghat ciklusonként. Ez a hiba akkor válik jelentőssé, ha a terméket klónozás után szekvenálják. Célszerű a teljes PCR termék közvetlen szekvenálása (ahol a hibás kópiák aránya magas target DNS koncentráció esetén elhanyagolható) vagy több klón ellenőrzése. A probléma kiküszöbölhető a *Pyrococcus furiosus* (Pfu) hőstabil DNS polimeráz alkalmazásával, ami rendelkezik 3'-5' exonukleáz (proof reading) aktivitással.

(2) Előfordulhat a primerek aspecifikus kötődése, ami különösen a specifikus target hiányában figyelhető meg és félrevezető eredményt szolgáltat.

(3) A primerek összekapcsolódásával úgynevezett primer dimer keletkezhet.

(4) A PCR alkalmazásának korlátot szab az a tény, hogy csak akkor használható, ha már van megbízható szekvencia információnk vagy a nukleinsav, vagy a fehérje szintjén. A genom programok előrehaladtával ez a probléma egyre inkább az adatok megbízhatóságára korlátozódik, sajnos az adatbázisokban még ma is sok a pontatlan nukleinsav szekvencia.

A PCR alkalmazásai

A PCR előnye óriási sokszorozó képességében rejlik. Vannak olyan alkalmazások, amikor pontosan ezt a lehetőséget aknázzák ki. Önmagában is nagy előrelépést jelentett, hogy sokkal kevesebb DNS mintára van szükség egy adott diagnosztikai teszthez, egy bűnügy megoldásához vagy egy kutatási feladat elvégzéséhez. A diagnosztikában legtöbbször fertőző ágensek (vírusok és baktériumok) kimutatására használható fel a PCR. A módszer érzékenységére jellemző, hogy akár néhány fg mennyiségű idegen DNS is detektálható. A primerek megfelelő megválasztásával nemcsak a fertőző anyag jelenléte, hanem annak minősége is detektálható. Például ily módon különbség tehető a fertőzést okozó HIV vírus variánsok között. A PCR és speciális kivitelezését jelenti a vizsgálandó szövetminta, illetve sejtpreparátum in situ vizsgálata. A vizsgálati mintát ilyenkor egy mikroszkóp tárgylemezére helyezik, és összekeverik a megfelelő reagensekkel. A tárgylemez fűtése és hűtése segítségével a lemezen játszatták le a polimeráz láncreakciót. Ily módon nemcsak a vizsgált DNS mennyisége, hanem annak lokalizációja is meghatározható.

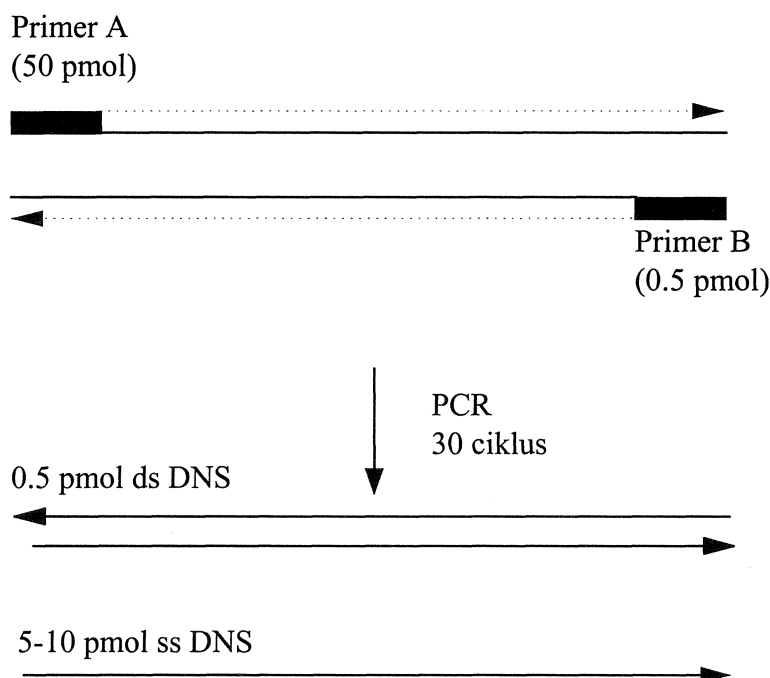
A módszer leírásából kitűnik, hogy a PCR csak a kettősszalú DNS megsokszorozására alkalmas. Ez azonban nem jelenti azt, hogy csak DNS minták kimutatására használható. A kvantitatív PCR fejezetben leírjuk azt, hogy az mRNS hogyan alakítható át kettősszalú cDNS-é és mennyisége hogyan határozható meg PCR segítségével. A fehérjék detektálásában is kihasználható a PCR hatalmas érzékenysége, ha azt az immundetektálás specifikusával ötvözzük (immuno PCR). Ennek lényege az, hogy a specifikus antitesthez egy jól ismert kettősszalú DNS darabot kötnek, majd az antitest-antigén reakció lejátszódása után a jelet PCR segítségével erősítik.

A PCR felhasználható mutációk detektálására is. Azon kívül, hogy megfelelő mennyiségű mintát biztosít a hagyományos vizsgálatokhoz a megfelelő pozícióban elhelyezett primer párok segítségével közvetlenül is észlelhető a termékeke méretének megváltozása, illetve

a várt reakció elmaradása. Ily módon jelentősebb gén átrendeződések (deléció, inzerció és rekombináció) detektálható, mint ahogyan azt a mutáció analízis című fejezetben részletesen ismertetjük. Pont mutáció detektálására jól alkalmazható a ligát láncreakció (LCR, lásd később), illetve a DNS szekvenálás. Ez utóbbi megvalósításához is felhasználhatjuk a PCR reakciót egyszálú DNS targetek előállítására céljából.

A PCR szerepe a DNS szekvenálásban

Mind kétszálú, mind egyszálú DNS szekvenálása megoldható, de a szekvenáláshoz célszerű egyszálú DNS-t előállítani, ugyanis ennek szekvenálási reakciója sokkal érzékenyebb. Az egyszálú DNS előállításának egyik megvalósítási lehetősége az *aszimmetrikus PCR* (5. ábra).

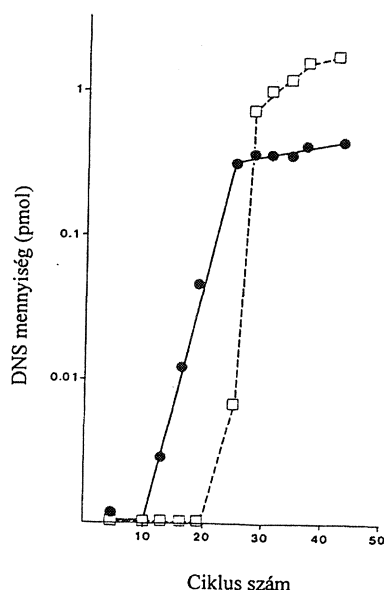


5. ábra. Az aszimmetrikus PCR elve. Az A és B primer aránya 100:1. Ennek megfelelően a termékben az egyes szálú DNS (ssDNS) sokkal több mint a kettős szálú DNS (dsDNS)

Az aszimmetrikus PCR lényege az, hogy a primereket nem 1:1 arányban alkalmazzuk, hanem az egyik primert 100 szoros feleslegben visszük be a reakcióközegbe. Ilyenkor a PCR sokszorozás addig tart, amíg a kisebb koncentrációjú primert el nem használódik, ezt követően csak a feleslegben jelenlévő primer működik, így a szintézis egyszálú termékhez vezet. Az egyszálú DNS felhalmozódása a PCR reakció későbbi szakaszában figyelhető meg (6. ábra).

Az egyszálú DNS agaróz gélelektroforézissel elválasztható a kétszálú DNS-től. Így megoldható a reakció kitermelésének ellenőrzése is. Meg kell jegyezni, hogy a gél ethidium bromidos festése nem tekinthető kvantitatívan értékelhető eljárásnak, mert az egy- és kétszálú DNS másképpen festődik.

A kvantitatív analízishez célszerű radioaktívan jelzett oligonukleotid primert használni, vagy a gélről Southern-blottot készíteni. Az oligonukleotidok és dNTP eltávolítása után elvégezhető a szekvenálási reakció, pl. a kisebb koncentrációban alkalmazott primer felhasználásával. Célszerű a szekvenálási reakciót Taq polimeráz jelenlétében magasabb reakció hőmérsékleten elvégezni. Mivel az itt leírt eljárás csak *in vitro* lépésekből áll előnyösen alkalmazható a teljes szekvenálási folyamat automatizálására.



6. ábra. Egyszálú DNS előállítás aszimmetrikus PCR reakcióban. A primerek aránya 50:0,5 pmol. □ egyszálú DNS, ● kétszalú DNS

Irányított mutagenézis

A PCR primerek és a target DNS szekvenciája nem kell hogy szükségszerűen 100 %-ig komplementer legyen, különösen a primerek 5'-végén van lehetőség eltérő szekvenciák beépítésére. Ezek a szekvenciák a sokszorozított DNS részévé válnak, és maguk is sokszorozódnak a target DNS szekvenciához kapcsolódva. Ez teremti meg a DNS *in vitro* manipulálásának (mutagenézisének) lehetőségét. A tudatos mutagenézistől meg kell különböztetni a hibás beépülés következményeként létrejövő random mutációt, ami nem kontrolálható, ezért kerülendő.

Új restrikciós hely kiépítése

PCR segítségével a sokszorozott szekvencia végére olyan restrikciós helyet építhetünk be, amely a természetes DNS-ben nem fordul elő. Ez akkor előnyös, ha a termék végét restrikciós enzim kezeléssel "ragadósá" akarjuk tenni, pl. ligálás és klónozás céljából. Megfigyelték, hogy nem elegendő a kívánt restrikciós enzim felismerési szekvenciáját az oligonukleotid 5'-végéhez szintetizálni, a hatékony hasítás érdekében további 1-3 szomszédos nukleotid beépítése is szükséges. (vö. 7. ábra). A reakcióban célszerű a 4. ábra bemutatott hőmérsékleti profilok követése.



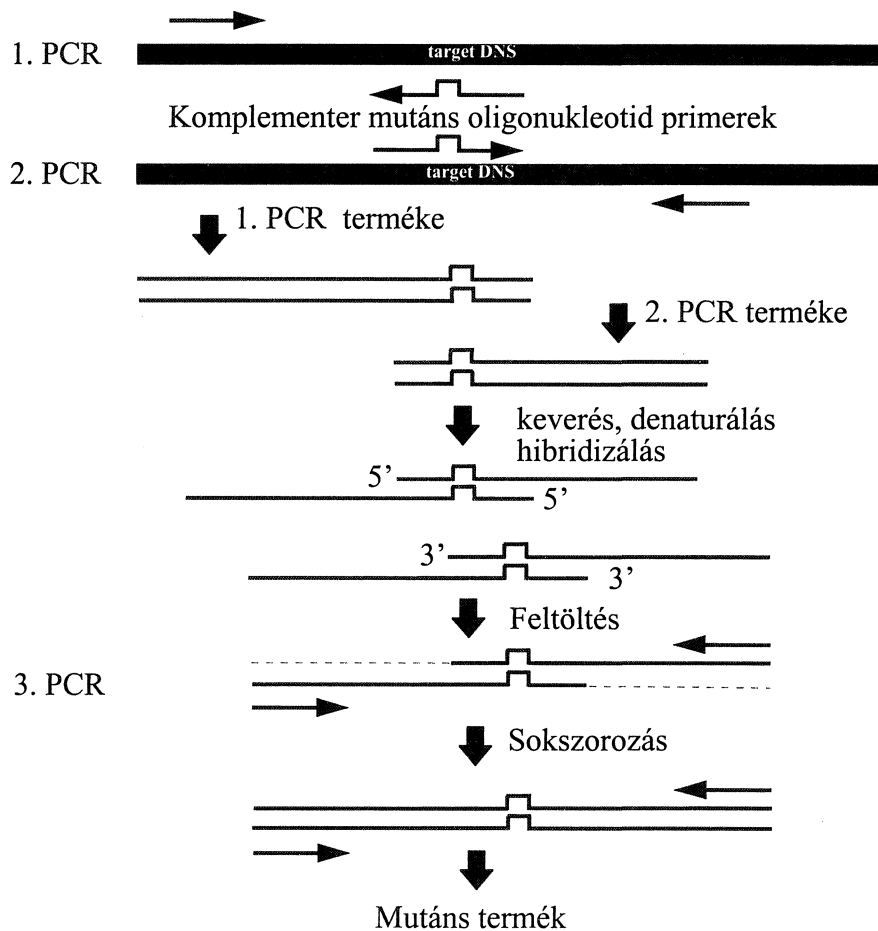
7. ábra. EcoRI restrikciós hely létrehozása PCR segítségével. Az ábrán az egyik oligonukleotid primer target DNS-el komplementer része és a restrikciós helyet tartalmazó túlnyúló 5'-vége látható

G-C kapocs készítése

A PCR reakció egyik primerjének 5'-végére G és C gazdag mesterséges szekvencia illeszthető. Ez erős hidrogénhid kapcsolatot hoz majd létre a PCR reakció során keletkező mesterségesen megnyújtott termék egyik végén. A PCR termék a natív DNS szakaszhoz képest stabilabban kapcsolódik össze. Denaturáló gradiens gélelektroforézis során a PCR termék nem esik szét a G-C kapocs nélküli (normális) DNS széteséséhez szükséges denaturálószer koncentráció mellett. A két DNS szál összekapcsolása felhasználható pontmutációk detektálásának érzékenyebbé tételére (lásd a Mutációanalízis c. fejezetben).

Pontmutáció létrehozása

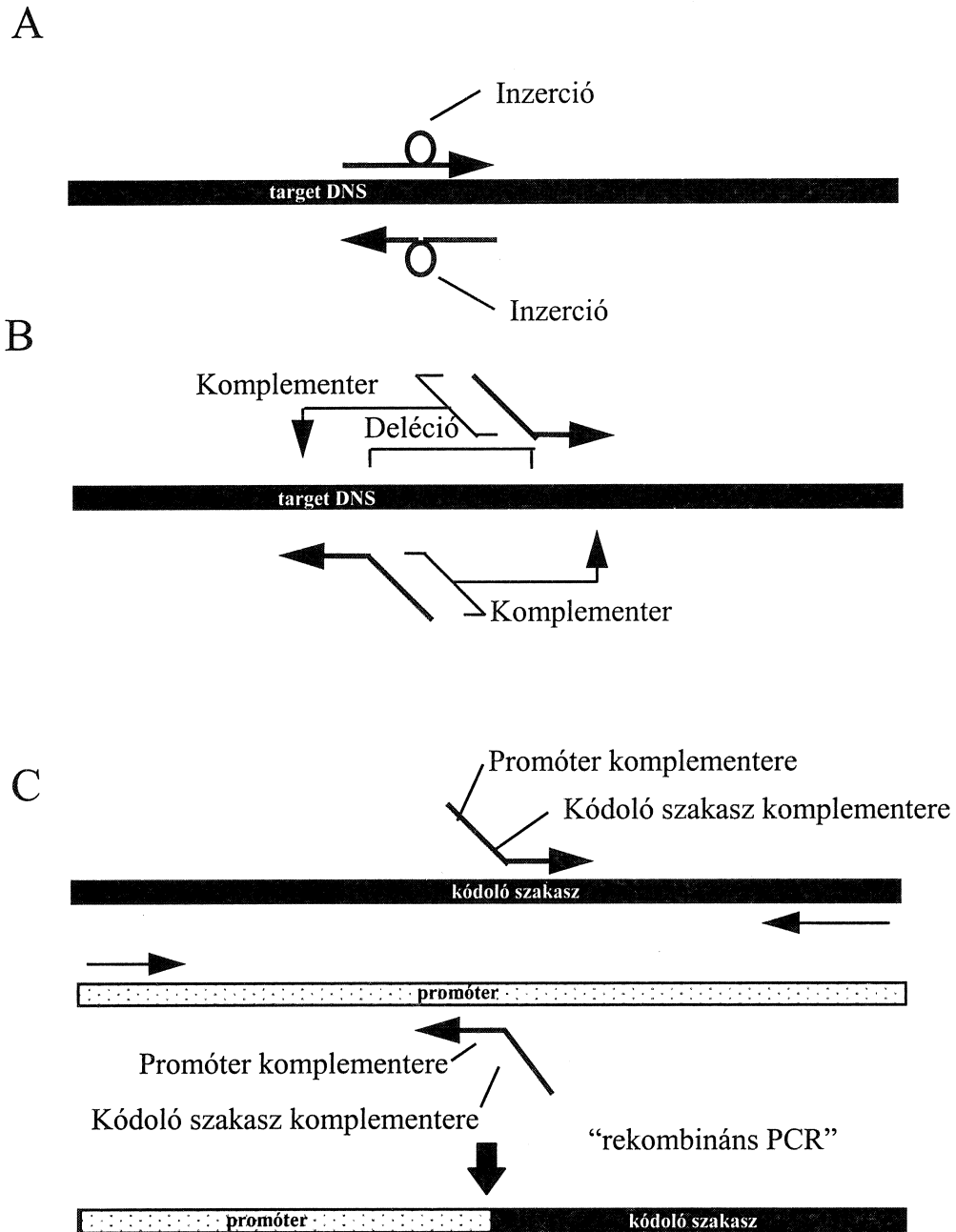
Az oligonukleotidban tudatosan beépíthetünk egy, a target szekvenciával nem komplementer nukleotidot, és így jól meghatározott helyen pontmutációt idézhetünk elő (8. ábra). Az eljáráshoz 4 darab (2-2 pár) oligonukleotid szükséges; ezek közül 2 komplementer, és azonos helyen tartalmazza a mutációnak megfelelő nukleotidcseréket. A mutagenézis első lépéseként két külön PCR reakciót kell végezni (1. és 2. PCR), amelyek a kiválasztott gén egyik, ill. másik oldalán megrövidített mutáns termékeket adnak. Az oligonukleotidok és a feleslegben lévő dNTP eltávolítása után a két terméket összekeverik, denaturálják, majd renaturálják. Kis valószínűséggel az 1. és 2. PCR reakciók termékei egymással hibridizálódnak a komplementer mutáns primer szakaszon keresztül. Ezen hibridek 3'-vége polimeráz enzimmal feltölthető, majd egy 3. PCR reakcióban a teljes mutáns génszakasz sokszorosítható a második (külső) primerpár felhasználásával.



8. ábra. Pontmutáció létrehozása PCR technikával. A mutációt okozó nukleotid cserét a primert jelző nyíl megtörése mutatja

Géntechnológiai manipulációk

Az előbb ismertetett stratégia tovább fejleszthető inzerációs és deléciós mutánsok, valamint rekombináns (kimera) DNS előállítására (9. ábra).



9. ábra. PCR felhasználása a DNS szekvencia módosítására. Inzerció (A) és deléció (B) előidőzése, illetve rekombináns DNS előállítása (C). A nyilak az oligonukleotid primereket jelzik. Minden esetben 3 különböző PCR reakciót kell végezni a 6. ábrán bemutatott módon.

A. Inzerció úgy építhető be, hogy a két komplementer primer belsejébe egy hurkot alkotó inzerációt szintetizálnak. A kezdeti PCR reakciókat (1. és 2. PCR a 8. ábrán) alacsonyabb hőmérsékleten kell végezni, ahol a hurok még nem nyílik szét, majd 4-5 ciklus után a hibridizációs hőmérsékleten megemelik úgy, hogy a hurok felnyílik és csak az inverziót tartalmazó target szekvenciák sokszorozódnak tovább (vö. 4. ábra).

B. *Deléció* úgy hozható létre, hogy a 4 primer közül egyik sem teljesen komplementer egymással, azonban van egy olyan primer pár, melynek 5'-végére a target szekvenciától független, egymáshoz viszonyítva viszont komplementer régiót építenek be.

C. *Rekombináció* létrehozásához a középső primerek túlnyúló 5'-vége az összekapcsolódó DNS szakaszokkal komplementer. A 9. C ábrán bemutatott rekombinációval egy promoter régió és egy független kódoló régió összekapcsolását lehet megvalósítani.

Az 1. és 2. PCR termékek tisztítása, és összekeverése után elvégzik a denaturálás és renaturálás lépéseit, majd a komplementer primer szakaszok hibridizációja révén létrejött mutáns szálak 3'-végének feltöltése után létrejön a kívánt módosítást tartalmazó új DNS kettős szál. Az így előállított kettős szálú DNS egy harmadik PCR reakcióban sokszorozható (vö. 8. ábra).

Módosított nukleotidok beépítése

A szintetikus oligonukleotid primer nemcsak természetes nukleotidokat, hanem azok módosított változatait is tartalmazhatja. Így a sokszorozott DNS végére beépíthető jelzett nukleotid (pl. biotinált dUTP), módosított nukleotid (pl. 7-deaza dGTP az oligonukleotidon belüli belső hurok elkerülése érdekében), vagy egy nukleotid analóg (pl. dITP degenerált primerben).

Részben vagy egyáltalán nem ismert DNS szekvenciák sokszorozása

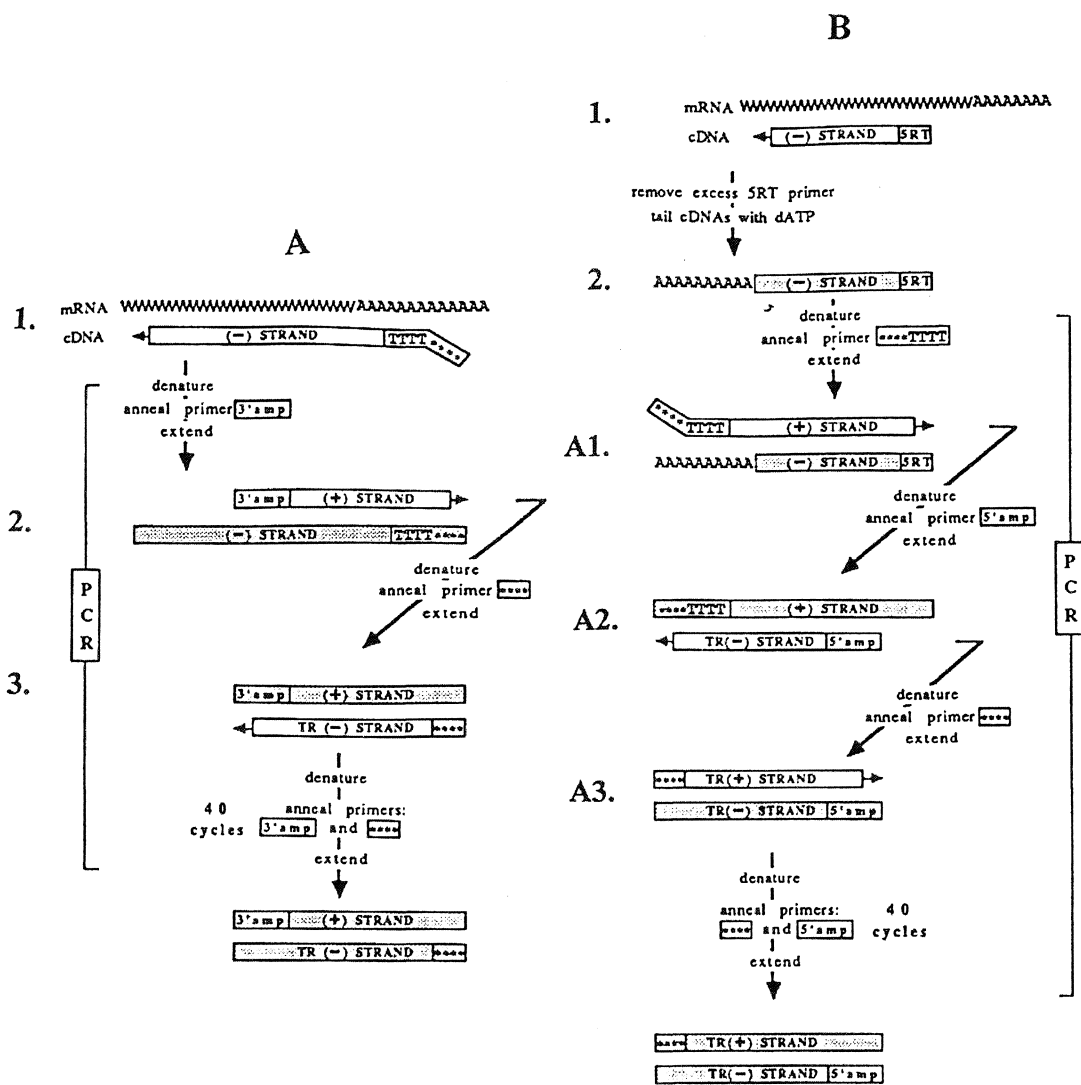
A sikeres PCR előfeltétele a szekvencia legalább kis részének előzetes ismerete. Ez a követelmény megkerülhető oly módon, hogy a sokszorozandó DNS egyik vagy mindkét végére általunk ismert adapter szakaszt erősítünk. Ezen szakasz ismeretében az általunk közrefogott ismeretlen szekvenciájú DNS sokszorozása is megvalósítható.

cDNS végek gyors erősítése (RACE = Rapid Amplification of cDNA Ends)

Sokszor megesik, hogy egy cDNS klón nem tartalmazza a megfelelő mRNS teljes szekvenciáját. Az 5'-vég hiányozhat azért, mert a reverz transzkripció túl korán leállt. A 3'-vég alternatív poliadenilálás miatt válhat rövidebbé. Mindkét vég megrövidülhet rekombináció, részleges degradáció és egyéb műhibák miatt, amik sajnos még a kereskedelemben kapható cDNS könyvtárakban is gyakran előfordulnak. Így a klón szekvenálásával csak részszekvencia határozható meg. A hiányzó szekvencia információ megszerzését teszi lehetővé a RACE.

A 3'-vég sokszorozása mRNS-ből (10A ábra) azon alapul, hogy az érett mRNS 3' végén poliA farkkal rendelkezik. Az eljárás a következő lépésekből áll: (1) cDNS szintézise reverz transzkriptázzal poliT és **** adapter szekvenciát tartalmazó kisegítő primerrel. (2) A komplementer szál szintézise a már megismert szekvencia részlet alapján tervezett primerrel (3'amp). (3) PCR a 3'amp és a **** adapter primer pár segítségével.

Az 5'-vég sokszorozása mRNS-ből (10B ábra) bonyolultabb, hiszen a cDNS hiányzó végén nem található ismert szekvencia. Ezt úgy lehet megkerülni, hogy a cDNS 5'-végére egy mesterséges "poliA farkot" szintetizálunk. Az eljárás lépései a következők: (1) cDNS szintézise a megismert szekvencia alapján készített primer (5RT) és reverz transzkriptáz felhasználásával. (2) Mivel az 5'-végen nem található hosszú konszenzus szekvencia mesterséges poliA farkot kell rá erősíteni terminális transzferáz enzimmel. Innentől a technika analóg a 3'-vég sokszorozásával (A1-A3). Az utóbbi lépésekben elvileg az 5RT primert is felhasználhatnák, azonban a nagyobb specifitás érdekében érdemes egy másik ismert szekvencia részlet alapján szintetizált 5' amp primert alkalmazni.



10. ábra. A RACE elve.

(A) A 3'-vég gyors sokszorozása. Az mRNA preparátumból TTTT**** primer és reverz transzkriptáz segítségével szintetizálják a -cDNS szálát, majd a 3' amp és **** primerekkel végzett PCR segítségével sokszorozzák az ismert szekvencia részlet és a poliA farkok közötti ismeretlen szakaszt.

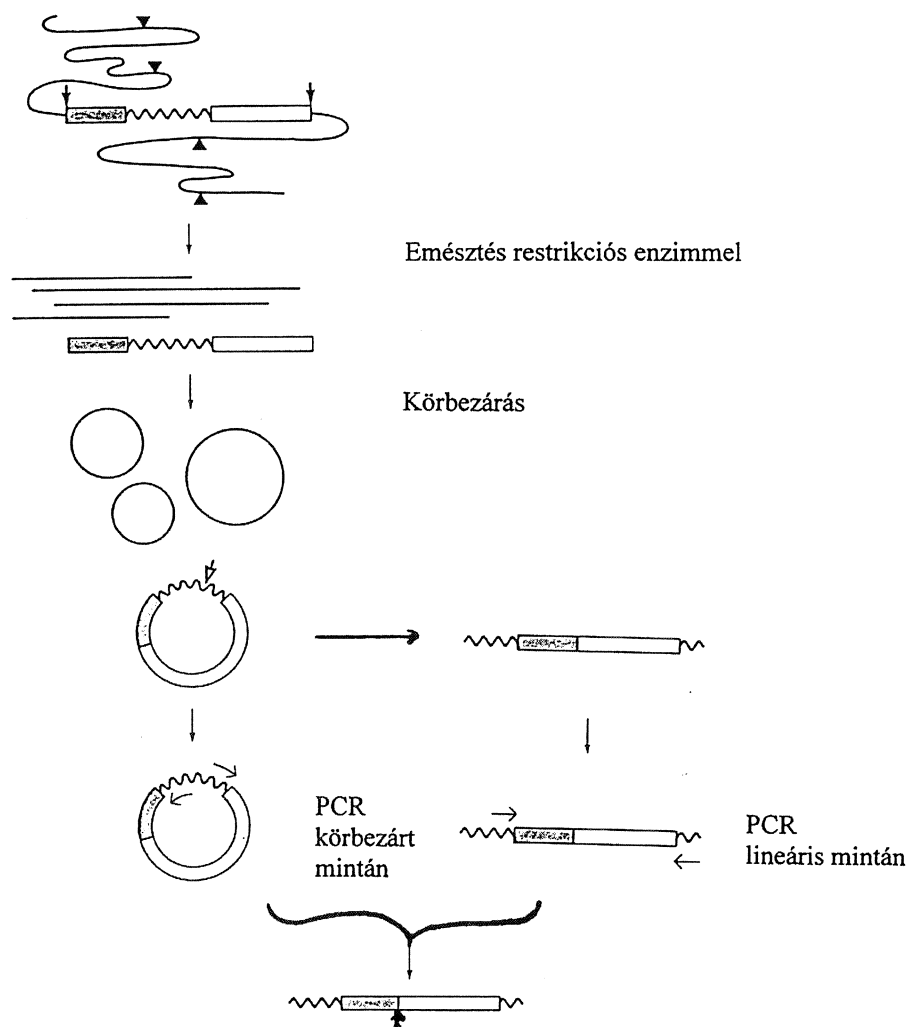
(B) Ha az 5'-véget nem ismerjük az 5RT primer felhasználásával előállított -cDNS szál 5'-végére először egy mesterséges "poli A farkot" kell szintetizálni, ezután az (A) pontban leírt lépések következnek. Mindkét eljárás végén közel 10^6 cDNS kópia nyerhető, amely a **** adapter és az ismert 3' amp illetve 5' amp szekvenciák között hordozza az ismeretlen cDNS darabot. Két adapter szekvencia közötti DNS sokszorozása. Politén kromoszómából kivágott DNS darab sokszorozása (helyspecifikus gének izolálása)

Szomszédos DNS szakaszok sokszorozása. Inverz PCR, avagy kúszás a kromoszóma mentén

Amennyiben ismerjük egy adott gén szekvenciáját lehetőségünk van a szomszédos szakaszok sokszorozására (11. ábra). Ehhez a következő lépéseket kell elvégezni: (1) Restriktions enzimmel hasítják a DNS preparátumot. Olyan enzimet kell használni, amely az ismert gént nem hasítja. (2) Hígítás és ligálás segítségével restriktions fragmentumok cirkularizálhatók. (3) PCR reakció a cirkuláris DNS mintáról az ismert szekvencia alapján tervezett 2 primerrel, vagy a gyűrű hasítása az ismert szekvencián belül hasító restriktions enzimmel, majd az előbbivel azonos

PCR reakció a lineáris templáton. Mindkét eljárás eredményeként a két szomszédos szekvenciát tartalmazó termék keletkezik, amelyek tartalmazzák az (1) pontban leírt restrikciós enzim felismerő helyét. Ez a szekvencia részlet jelzi a két szomszéd határát. (4) A határon hasító restrikciós enzimmel való szétvágás után a sokszorozott DNS hibridizációs próbaként használható. Az eljárás azt az egyszerű elvet használja ki, hogy a körnek nincs vége!

A fenti példával illusztráltuk a PCR sokoldalúságát. A fejlesztés még koránt sem zárult le, újabb és újabb technikákat vezetnek be különleges és speciális problémák megoldására. Mindez azt bizonyítja, hogy a Mullis által felfedezett egyszerű sokszorozási reakció döntő befolyást gyakorolt a molekuláris biológia módszertanára.



11. ábra. Inverz PCR.

Egy ismert DNS szakasz (hullámos vonal) melletti ismeretlen szomszédos szekvenciák (sötét és világos téglalapok) azonosítása. A kísérlet megvalósítására elvileg két lehetőség van, vagy a körbezárt DNS darabon, vagy a körbezárás után egy restrikciós enzimmel (világos fejű nyíl) linearizált DNS darabon végzik el a PCR-t. (A PCR lineáris target DNS-el általában jobb hatásfokkal megy végbe.) Mindkét eljárás eredménye azonos, a két egymás mellett elhelyezkedő szomszédos DNS darabok sokszorozódása. A két szakasz határát a daraboláshoz használt restrikciós enzim (fekete hegyű nyilak) hasítási helye jelzi

KVANTITÍV PCR

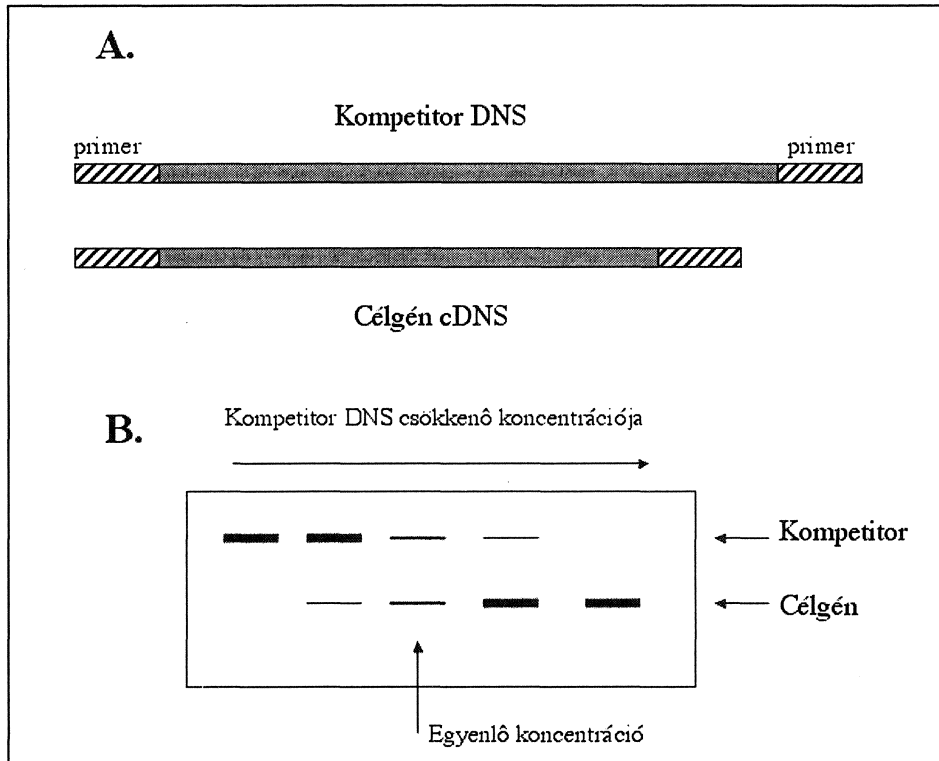
Scholtz Beáta

Az RNS kvantitálás módszerei

Az RNS mennyiség kvantitatív meghatározásához öt módszer terjedt el szélesebb körben: Northern analízis, *in situ* hibridizáció, RNase protection assay, microarray és reverz transzkripció PCR. A Northern hibridizáció az egyetlen, amely a transzkript mennyiségén túl információt nyújt annak méretéről - ezáltal az RNS minta minőségéről, az esetleges degradációról is -, valamint az alternatív splicing eredményeként keletkezett transzkript változatok jelenlétét is kimutatja. Az *in situ* hibridizáció komplikált módszere lehetővé teszi annak megállapítását, hogy egy sokféle sejttypusból álló szövetminta mely sejtjeiben termelődik az adott RNS. Az RNase protection assay segítségével igen pontosan azonosítható a transzkript első vagy utolsó nukleotidája, az exon/intron határok, illetve az assay alkalmas nagyon hasonló méretű, Northern blotton el nem különíthető rokon szekvenciájú RNS molekulák specifikus detektálására is. A microarray segítségével több ezer transzkript mennyiségének egyidejű nyomonkövetése lehetséges. Ezen négy módszer közös hátulütője azonban, hogy nem eléggé érzékenyek – sokszor csak hozzávetőlegesen tükrözik a biológiai folyamatok során bekövetkezett génexpressziós változásokat. A reverz transzkripció PCR (RT-PCR) során az RNS mintákat először *in vitro* konvertálni kell cDNS-sé reverz transzkriptáz enzim segítségével, mivel a PCR-ban használható hőstabil DNS-polimerázok csak DNS-templáton képesek működni. A reverz transzkripció után következő PCR amplifikációs szakasz miatt az RT-PCR rendkívül kis mennyiségű RNS-t is képes detektálni, valamint lehetővé teszi a transzkript változatok és homológ RNS-ek specifikus detektálását is.

Reverz transzkripció PCR (RT-PCR)

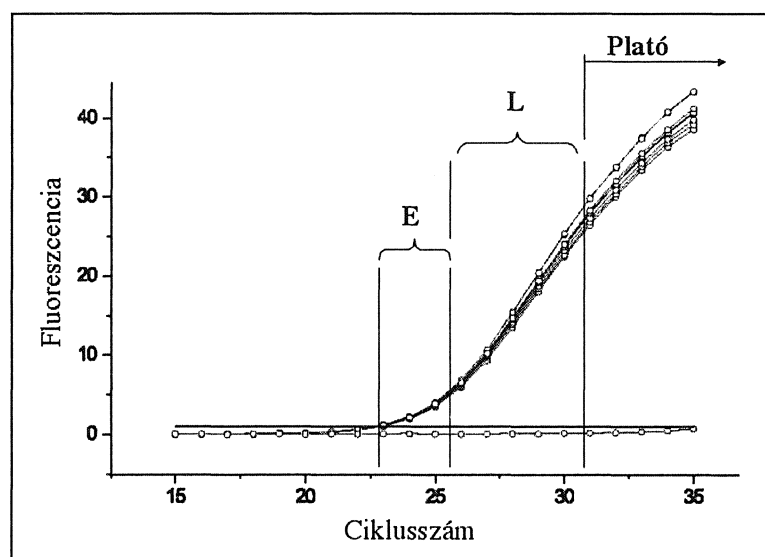
Az egyszerű RT-PCR alig kvantitatív – a PCR sajátosságai miatt általában csak “nagyon kevés – sokkal több”, vagy “nincs jelen – jelen van” jellegű megállapításokat lehet tenni egy adott mRNS-ről a különböző minták összehasonlítása során. Az RT-PCR pontatlanságának egyik forrása a detektálás módja – az általánosan használt agaróz gélelektroforézis, és a PCR végtermék (DNS) megfestése etidium-bromiddal nem biztosít elég jó felbontást a pontos méréshez. Éppen ezért fejlesztették ki a kompetitív RT-PCR-t, amely már pontosabb mérést tesz lehetővé. Ennek során az RNS mintát több csőbe osztják szét, és egy ismert koncentrációjú referencia RNS molekula különböző hígításait keverik a csövekhez. A referencia RNS molekula majdnem teljesen azonos a vizsgálandó mRNS-sel, tehát ugyanazokkal a primerekkel amplifikálható, de a detektálás során pl. kis méretbeli különbség alapján megkülönböztethető a vizsgálandó mRNS-től. Ha az egyik templát nagy feleslegben van jelen, a másik templát alig amplifikálódik a kompetíció miatt – 1:1-hez közeli arány esetén azonban mindkét templát közel azonos mértékben amplifikálódik, és jól detektálható agaróz gélelektroforézissel. A kívülről hozzáadott referencia RNS koncentrációja ismeretében következtetni lehet a vizsgálandó RNS mennyiségére (1. ábra). A kompetitív RT-PCR nem egyszerű technika, sok optimalizálást igényel, és meglehetősen nagy hibát mutat, még ha a referencia ill. target RNS azonos mennyiségben van is jelen. Mind az egyszerű, mind a kompetitív RT-PCR esetében a mérési hiba fő forrása az, hogy a PCR végtermékek mennyiségét hagyományosan a 30-40. ciklus után mérik, azaz akkor, amikor a reakció már a plató fázisba került. A vizsgálatok kimutatták, hogy ugyanazzal a cDNS mintával a PCR-t többször megismételve, a PCR végtermék mennyisége meglehetősen szórást mutat az egyes kísérletekben – vagyis a PCR termék mennyisége nem tükrözi megbízhatóan az eredeti mintában jelenlevő templát cDNS mennyiségét.



1. ábra. Kompetitív RT-PCR

- A. A kompetitor DNS és a célgén cDNS szerkezetének összehasonlítása*
B. Az RT-PCR végtermék agaróz gélelektroforézis képe, EtBr-dal festve

A PCR reakció-körülményei csak a korai ciklusok során optimálisak; ekkor figyelhető meg a PCR termék mennyiségének exponenciális növekedése a ciklusszám függvényében. A későbbi ciklusok során több tényező is közrejátszik abban, hogy a PCR-t gátolja, és ezért a PCR termék mennyiségének növekedése először lineárisává válik, majd gyakorlatilag megáll, azaz a plató fázisba kerül (2. ábra); illetve további ciklusok során megfigyelhető a PCR termék degradációja is.



2. ábra A PCR fázisai : termékmennyiség (fluoreszcencia) vs. ciklusszám
E= exponenciális fázis, L= lineáris fázis

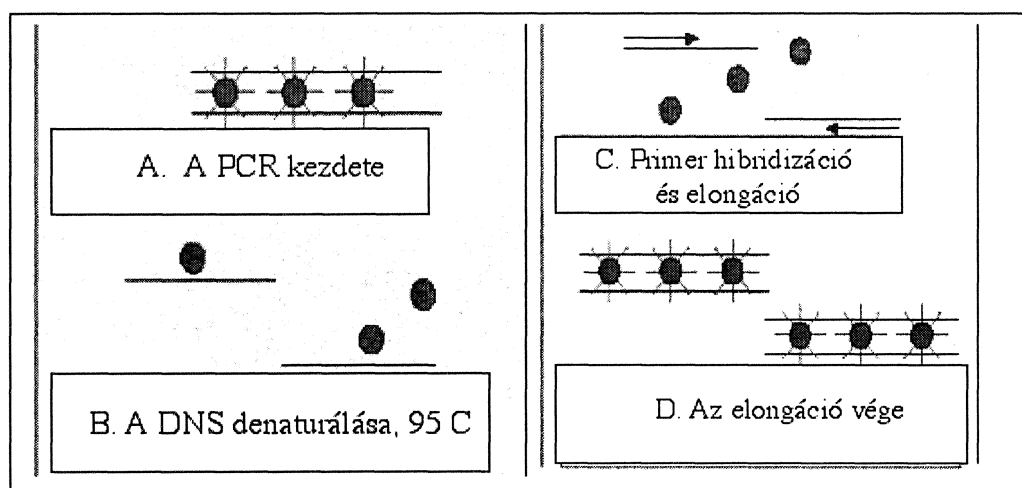
A PCR-t a késői ciklusok során gátló tényezők:

- 1) a szubsztrátok (primerek, dNTP) elhasználása,
- 2) a DNS polimeráz hőinaktiválása, limitáló koncentrációja,
- 3) a megnőtt pirofoszfát koncentráció gátolja a DNS polimerázt.

A PCR korai ciklusai során, az exponenciális fázisban azonban ezek a gátló tényezők nem érvényesülnek, és kimutatható, hogy a PCR végtermék mennyisége ezekben a ciklusokban arányos a templát cDNS mennyiségével. Éppen ezért a pontos méréshez szükséges az exponenciális fázis azonosítása - amely különböző mintákban más-más ciklusszámnál jelentkezik -, majd a PCR termék kvantitálása ebben a fázisban. Ezt teszik lehetővé a real-time kvantitatív PCR-készülékek, melyek minden egyes ciklus végén detektálják és kvantitálják a PCR terméket (real-time, azaz folyamatos, egyidejű nyomonkövetése a reakciónak). A ciklusszám-termékmennyiség függvényt a PCR 30-40 ciklusára a mérőműszerek szoftvere rögzíti, majd a PCR végén a görbe alakjából a felhasználó azonosíthatja az exponenciális fázist.

DNS/cDNS aspecifikus detektálása real-time rendszerben

A real-time kvantitatív RT-PCR során a mérőműszerek fluoreszcencia jelet detektálnak, melynek intenzitása arányos a PCR termék mennyiségével. A PCR során keletkezett DNS termék kétféle módon detektálható: szekvenciától függetlenül (aspecifikusan) illetve szekvencia-specifikusan. Az aspecifikus detektálás bármely kettős szálú DNS molekulát detektál a reakció során, míg a szekvencia-specifikus detektálás különbséget tesz a keresett szekvencia, illetve a primer-dimerek vagy nem-specifikus amplifikációs termékek között. Aspecifikus detektálásra leggyakrabban a SYBR Green festéket használják, amely képes interkalálódni a kettős szálú DNS-be (3. ábra). A DNS-sel komplexet képező festékmolekulák 497 nm-en gerjeszthetők, és 520 nm-n fluoreszcens jelet bocsátanak ki – a DNS-hez nem kötődő, szabad festékmolekulák fluoreszcenciája ennek csak századrésze.

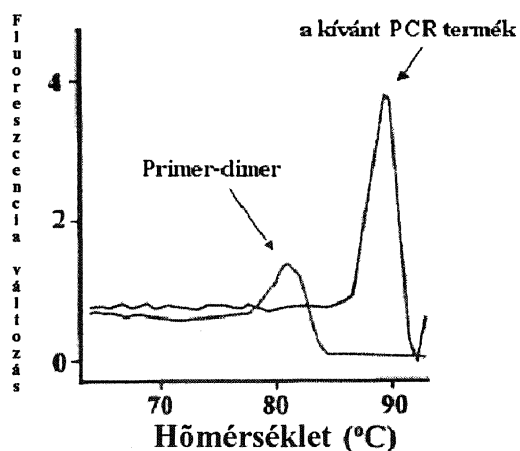


3. ábra. SYBR Green I detektálás

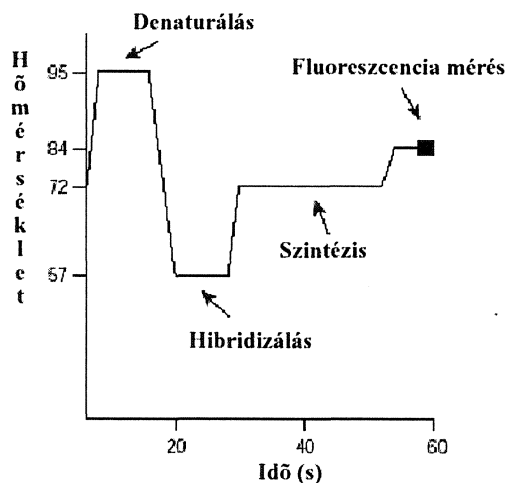
A. A PCR kezdetén a SYBR Green I festék kötődik a kettős szálú DNS templáthoz és fluoreszkál. B. A DNS denaturálása után a DNS- SYBR Green komplex felbomlik és a festék fluoreszcenciája századrészére csökken. D. Az elongáció végén, az újonnan szintetizált kettős szálú DNS-hez ismét kötődik a SYBR Green, és intenzíven fluoreszkál.

Mivel a festék az aspecifikus PCR termékeket éppúgy detektálja, mint a keresett cDNS szekvenciát, a sikeres SYBR Green mérés kritikus feltétele a reakció optimalizálása. Az optimalizálás során a PCR reakció-körülményeket úgy módosítják, hogy a primer-dimerek képződése, illetve nem-specifikus amplifikáció ne legyen lehetséges. Az optimalizálás eredményessége az úgynevezett olvadási görbe analízissel ellenőrizhető.

Ennek során a PCR végén (30-40 ciklus után) a reakcióelegyet 40 °C-ról lassan 95°C-ra melegítik, és közben folyamatosan mérik a fluoreszcenciát. Egy adott hőmérséklet elérésénél (olvadáspont) a PCR termék kettős szálú DNS-e egyszálú DNS-sé denaturálódik, és a SYBR Green festék disszociál róla. A DNS-SYBR Green komplex felbomlása a fluoreszcencia meredek csökkenésével jár együtt (4. ábra).



4. ábra. A kívánt PCR termék azonosítása



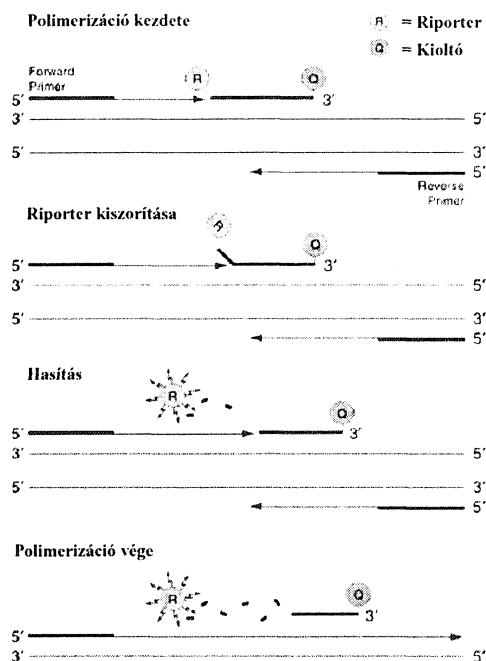
5. ábra. Fluoreszcencia mérése

Mivel minden DNS molekulának a hosszától és szekvenciától függően más az olvadáspontja, a primer-dimereket is tartalmazó reakcióelegyeknél több fluoreszcencia-csúcs detektálható. Ezzel szemben ideális esetben csak egyetlen fluoreszcencia-csúcs detektálható, amely a specifikus PCR-terméknek felel meg. Az esetek egy részében azonban a különböző DNS molekulák olvadási görbéje nem válik el elég jól egymástól, ezért az olvadási görbe analízis csak gélelektroforézissel kombinálva ad megbízható eredményt. A pontos SYBR Green mérés másik, az optimalizálást kiegészítő módja az úgynevezett "negyedik szegmens"-ben történő detektálás. A fluoreszcens jel mérése általában a PCR ciklus harmadik szegmensében, azaz az elongáció végén történik meg. Ezen a hőmérsékleten azonban a primer-dimerek és aspecifikus amplifikációs termékek jelentős része is kettős szálú lehet, vagyis hozzájárulhat a SYBR Green fluoreszcens jel nagyságához. A negyedik szegmens mérés esetében azonban az elongáció után minden ciklusba beiktatnak egy 2 másodperces 80-85°C-s lépést, és a ciklus fluoreszcens jelét ekkor mérik – ezt a hőmérsékletet úgy választják ki, hogy csak a specifikus PCR-termék maradjon kettős szálú DNS formájában (az előzetes olvadási görbe analízisek alapján)(5. ábra).

DNS/cDNS szekvencia-specifikus detektálása real-time rendszerben

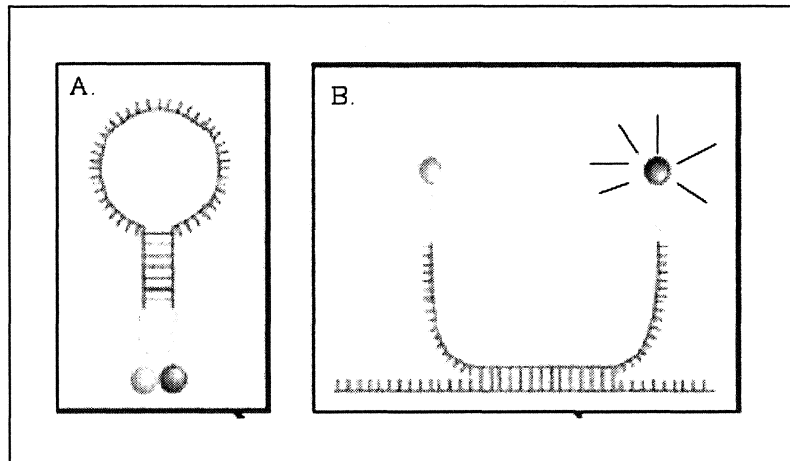
A DNS szekvencia-specifikus detektálásához szükség van a két primerre, valamint a fluorofort és quencher hordozó oligodeoxinukleotidra, amelyet próbának nevezünk. A rendszer specificitását a SYBR Green-detektáláshoz képest nagy mértékben megnöveli, hogy fluoreszcens szignál keletkezésének előfeltétele, hogy a primerek közötti rövid DNS-szakaszhoz a próba is hibridizáljon. A fluoreszcens szignál keletkezési mechanizmusa alapján

megkülönböztetünk hidrolízis próbákat és hibridizációs próbákat. A hidrolízis próbák, melyeket a márkanév után TaqMan próbának is neveznek, általában 5' végükön hordozzák a kovalensen kapcsolt fluorofort, 3' végükön pedig a szintén kovalensen kapcsolt quencher (6. ábra). Amíg a fluorofort és quencher egyazon próba-molekulán, egymás közelében vannak, a fluorofor saját fluoreszcenciája nem vagy alig detektálható. A fluorofor molekula a próbán a műszer által kibocsátott fény hatására gerjesztődik, de az alapállapotba való visszatéréskor kibocsátott energiát a quenchernek adja át FRET mechanizmus révén – a quencher pedig a felesleges energiától egy más hullámhosszú fluoreszcens sugárzás révén szabadul meg. A PCR amplifikáció során a Taq polimeráz először megkezdte a DNS szintézist a primer szabad 3'OH végétől indulva. Amikor azonban a Taq polimeráz elér a próbához, 5'-3' exonukleáz aktivitása miatt elkezdte azt hidrolizálni, azaz nukleotidokká bontani.



6. ábra. TaqMan próba

Az első, 5' végen levő nukleotiddal együtt a fluorofor is lehasad a próbáról, azaz elkerül a quencher közeléből. Ennek következtében a fluorofor detektálható fluoreszcenciája több százszorosára nő. A PCR előrehaladtával egyre több próbamolekula hidrolizál és a reakcióelegy fluoreszcenciája egyre nő, a ciklusszám függvényében először exponenciálisan, majd kvázi-lineárisan, végül pedig a reakció platófázisba kerül. A 3' véghez kapcsolt quencher olyan kovalens módosítást jelent, hogy a Taq polimeráz nem képes a próba 3' végétől kezdeni a szintézist, azaz a próba nem funkcionálhat primerként. A hibridizációs próbák legelterjedtebb típusai a molekuláris villogó próbák (molecular beacon), illetve a skorpió próbák (scorpion probe). A molekuláris villogók középső része a detektálni kívánt DNS-sel komplementer, két vége pedig egymással komplementer, illetve a 3' és 5' véghez kovalensen kapcsolódik a fluorofor és a quencher (7. ábra). A célszekvencia hiányában a próba a számára energetikailag kedvező hajtű (hairpin) konformációt veszi fel, vagyis két vége egymással hibridizál, a próba középső része pedig egyszálú marad. Ebben a konformációban a fluorofor és a quencher egymás közelében van, a fluorofor által kibocsátott gerjesztési energia átadódik a quenchernek, a quencher pedig hőszugárzás formájában szabadul meg a felesleges energiától, vagyis a fluorofor saját fluoreszcenciája nem detektálható. A célszekvencia jelenlétében azonban a próba számára energetikailag kedvezőbb a célszekvenciával történő hibridizálás – a hairpin kiegyenesedik, a fluorofor és a quencher elkerül egymás közeléből és a fluorofor detektálható fluoreszcenciája több százszorosára nő.

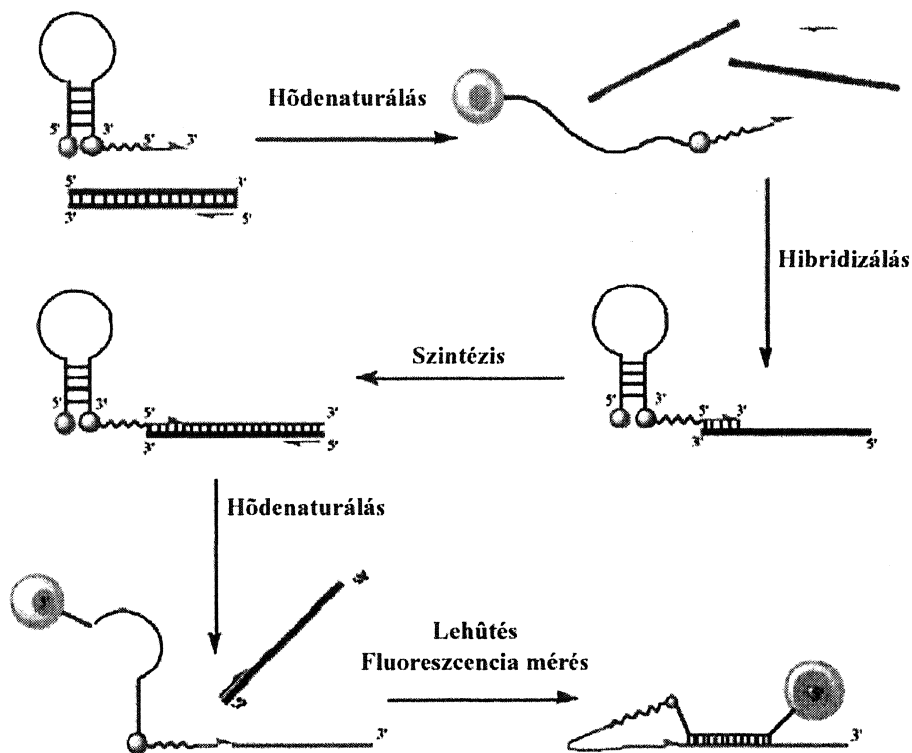


7. ábra. Molekuláris villogó próba szerkezete

Molekuláris villogó próba a target szekvencia hiányában – nincs fluoreszcencia.
 Molekuláris villogó próba a target szekvencia jelenlétében, megfelelő hőmérsékleten –
 intenzív fluoreszcencia.

Mivel a molekuláris villogókban használt quencher más mint a TaqMan próbákhoz használt quencher, az energiáttranszfer mechanizmusa is különbözik. Ebből következik, hogy a TaqMan próbákkal ellentétben a molekuláris villogókban a fuoescencia elnyeléséhez nem elegendő, hogy ugyanazon próbamolekulán legyen a közelében kell lenniük.

A skorpió próba tulajdonképpen egy PCR primer és egy molekuláris villogó fúziója (8. ábra).



8. ábra. A skorpió próbák működési mechanizmusa

A molekuláris villogó a skorpió próba 5' végén helyezkedik el, és a primerhez egy linkerrel keresztül kapcsolódik, ami megakadályozza, hogy a Taq polimeráz a molekuláris villogó szekvenciáját is replikálja. A PCR amplifikáció során, amint a célszekvencia megszintetizálódott, a molekuláris villogó hairpinje kiegyenesedik, és a fluorofor fluoreszcenciája többszörösére nő. A skorpió próbák egyik előnye, hogy egymolekulás rendszerben van a primer-próba, ami a próba-célszekvencia nagyobb stabilitását, végső soron pedig gyorsabb reakciókinetikát eredményez, valamint a keletkezett szignál is erősebb, mint akár a TaqMan próbákkal, akár molekuláris villogókkal. Másrészt a skorpió próbákkal a PCR a polimeráz enzim optimális hőmérsékletén végezhető (kb. 72°C), szemben a hidrolízis próbákkal használt alacsonyabb hőmérsékletnél (60-62°C), amely viszont az 5'-nukleáz optimális aktivitásához szükséges.

A hibridizációs próbák közös előnye, hogy akár egy nukleotidás szekvencia különbség is energetikailag kedvezőtlené teszi a célszekvenciával való hibridizálást, vagyis a próbák megmaradnak a nem fluoreszkáló hairpin konformációban. Ezért a hibridizációs próbák széles körben használatosak a pontmutációk és SNP-k rendkívül érzékeny kimutatására és kvantitálására.

Kvantitatív real-time PCR

Az RNS izolálás módszereiről a jegyzet egy másik fejezetében található részletes leírás. Mivel a kvantitatív real-time PCR (továbbiakban: QPCR) során a mRNS-ből csak egy igen rövid, alig 100 bp-os szakaszt detektálunk és mérünk, bármely rokon gén, amely a mért szakasszal nagyfokú homológiát mutat, vagy pedig az RNS-t szennyező genom DNS (gDNS) tudunkon kívül ugyanúgy templátja lehet a reakciónak, mint a keresett cDNS. A homológ gének okozta mérési hiba a gondos QPCR tervezéssel védhető ki. Egy TaqMan próbát használó assay-nél primerek és próba olyan génszakaszon legyenek, amely egyedi szekvencia, és a géncsalád többi tagjában nem fordul elő. A homológ génekről BLAST analízissel (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) szerezhethetünk információt, illetve bizonyos homológiákat az Ensembl Genom Browser adatbázisában (<http://www.ensembl.org>) is megtalálunk. A homológ gének szekvenciáját többszörös alignment (CLUSTALW, <http://clustalw.genome.jp>) segítségével egymás mellé rendezve világosan azonosíthatók a nagyfokú homológiát mutató régiók, amelyek kerülendők, ha génspecifikus QPCR assay-t szeretnénk tervezni. A gDNS-szennyezés okozta mérési hibát nehezebb kivédeni. Ha az assay egy exonon belül van, ugyanúgy fogja a gDNS-t is detektálni mint a cDNS-t – ez ellen elvileg azzal védekezhetünk, hogy az assay-t exon-intron határra tervezzük. Ha az exon-intron határ akár valamelyik primeren, akár a próbán fut keresztül, a primer vagy próba hibridizációja nem lesz elég stabil az intront is tartalmazó gDNS-en, és a gDNS rossz templát lesz a QPCR számára. A problémát az jelenti, hogy léteznek egyexonos gének, illetve hogy nagyon sok processzált pszeudogén van a genomban - ezek intronokat nem tartalmaznak, és bár mRNS nem termelődik róluk, a gDNS-ben templátként szolgálhatnak a QPCR számára. Ezért tehát ajánlatos az RNS-t DNáz kezelésnek alávetni a QPCR előtt, hogy a gDNS szennyezést nagymértékben csökkentjük. A DNáz kezelésről részletes tájékoztatást ad az Ambion honlapja (<http://www.ambion.com/techlib/tips/dnase1demystified.html>) a "Technical Resources/The RNA files" címszó alatt. A gDNS okozta pozitív mérési hibán kívül hamis negatív QPCR eredményt kaphatunk, ha az assay-t szekvenálási hibát tartalmazó szekvencia-adat alapján terveztük, illetve ha az assay régiójában nem várt alternatív splicing lehetséges. A szekvenálási hiba meglehetősen gyakori a GenBank file-okban – ezt felismerve az NCBI megkezdte az úgynevezett referencia-szekvenciák (RefSeq) összeállítását a GenBank adatbázisában, melyekben igyekeznek ezeket a hibákat megtalálni és kiküszöbölni. Ha ez a

szekvencia nem áll rendelkezésre, a tervezés során célszerű elkerülni a BLAST/CLUSTALW analízis alapján bizonytalan szekvenciájú régiókat. Az egyes gének esetében az alternatív splicing lehetőségéről a szakirodalom, a RefSeq file (GenBank), illetve az Ensembl adatbázis adhatnak tájékoztatást. A QPCR tervezés általánosan használt szoftverei: Primer Express™ (Perkin Elmer), Oligo 6. (Molecular Biology Insights Inc.), és Primer3 (freeware, http://www.broad.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi), az tervezés részleteiről pedig Vandesompele et al. 2002. és az Applied Biosystems honlapja (<http://www.appliedbiosystems.com>) nyújtanak összefoglalót.

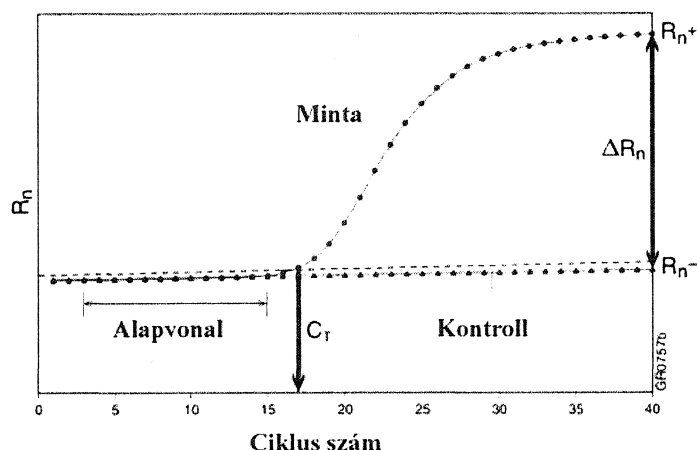
A reverz transzkripció a QPCR előtti kritikus lépés, mivel hatékonysága jelentősen befolyásolhatja a mRNS mérhetőségét a mintában. Általánosságban elmondható, hogy a két lépéses RT-QPCR a hatékonyabb – ebben az esetben külön enzimet használunk a reverz transzkripcióhoz (leggyakrabban MMLV-RT-t), illetve a PCR-hoz (Taq polimeráz). A reverz transzkripcióhoz háromféle primer választható:

- a) random hexamer, amely 6 nukleotida hosszú, random szekvenciájú oligodeoxinukleotidák keveréke,
- b) OligodT, amely a mRNS poli-A farkához hibridizál,
- c) génspecifikus reverz primer.

A random hexamerrel vagy oligodT-vel végzett RT előnye, hogy a keletkezett cDNS mintában elvileg minden mRNS reprezentálva van, tehát egy cDNS mintából többféle mRNS is kvantitálható. A random hexamerek hátránya, hogy a riboszomális RNS-ekhez is hibridizálnak, ami a reverz transzkripció hatékonyságát csökkentheti, és a tapasztalatok szerint a ritka mRNS-ek detektálását gátolja. Az oligodT primerek hátránya, hogy a reverz transzkripció a mRNS 3' végétől kezdődik, és a reverz transzkriptáz sokszor nem jut el a mRNS 5' végéig, ami a 3' végtől távolabb elhelyezkedő QPCR assay-k esetében hátrányos lehet. Legérzékenyebbnek a génspecifikus reverz primerek tűnnek – természetesen figyelembe kell venni, hogy a reverz transzkripció alacsonyabb (< 50 °C) hőmérsékletén a kb. $T_m=60^\circ\text{C}$ primerek nemcsak a 100%-ban komplementer régiókhöz fognak hibridizálni (vagyis a priming nem teljesen génspecifikus), de még így is ez a leghatékonyabb és legolcsóbb a három lehetőség közül.

A QPCR kiértékelése

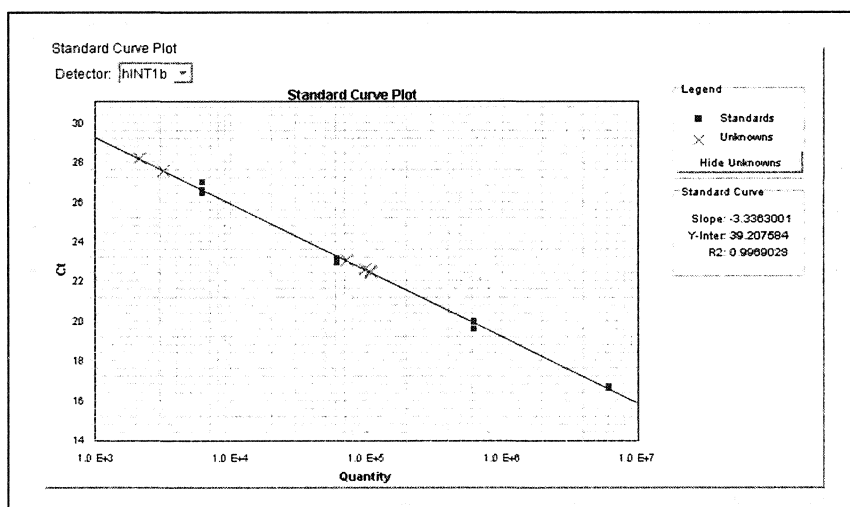
Mint már korábban említettük, a PCR kísérletekben a kiindulási templát mennyisége és a PCR termék mennyisége közötti log-lineáris összefüggés csak a PCR exponenciális fázisában áll fenn, és csak akkor, ha a PCR hatékonysága közel 100%. A QPCR korai ciklusokban a reakcióelegynek egy minimális saját fluoreszcenciája mérhető csak, amit háttér-fluoreszcenciának nevezünk – ez definíció szerint a korai ciklusok során mért fluoreszcenciák átlagértéke (baseline). Természetesen ezek a ciklusok is az exponenciális fázisba tartoznak, de detektálható eredményt még nem adnak. Egy bizonyos ciklusszám után azonban a reakcióelegy fluoreszcenciája a háttérnél magasabb lesz, ahogy egyre több PCR termék keletkezik. A minták/kísérletek összehasonlíthatósága érdekében a templátmennyiség kvantitálásához azt a legkorábbi ciklusszám-értéket használjuk, melynél a reakcióelegy fluoreszcenciája a háttérnél szignifikánsan magasabb. A szignifikáns különbséget egy küszöbérték (threshold) megadásával biztosítjuk – a küszöbérték minimum a háttér-fluoreszcencia 10 x SD értékének felel meg. A templátmennyiség tehát abból a legkorábbi ciklusszám-értékből ($C_T = \text{threshold cycle}$) határozható meg, amikor a reakcióelegy fluoreszcenciája először eléri/meghaladja a küszöbértéket (9. ábra).



9. ábra. A QPCR kvantitálásához használt paraméterek grafikus ábrázolása

Az ABI QPCR készülékek SDS szoftvere minden egyes mintára a $\Delta R_n \sim C_n$, vagy a $\lg \Delta R_n \sim C_n$ összefüggést ábrázolja grafikusán, ahol a ΔR_n az "n"-edik ciklusban mért fluoreszcencia (R_n^+) és a háttér-fluoreszcencia (R_n^-) különbsége: $\Delta R_n = (R_n^+) - (R_n^-)$. A küszöbérték korrekt meghatározása a pontos mérés egyik kritikus pontja. A küszöbérték minden összehasonlított mintánál az exponenciális fázisban kell hogy legyen. A szoftver a küszöbértéknél magasabb fluoreszcenciát mutató, de még az exponenciális fázishoz tartozó 3-6 ciklusból extrapolálva számítja ki a $C_T - t$. A $\lg \Delta R_n \sim C_n$ összefüggés ezen pontjaira egyenest illeszt, és az egyenes és a küszöbérték-vonal metszéspontja adja meg azt a töredék ciklusszámot, ami a C_T . Minél magasabbra állítjuk a küszöbértéket, annál kevesebb adatpont (ciklus) van az exponenciális fázisból a küszöbérték felett, ami megnöveli a lineáris regresszió (egyenes-illesztés) hibáját, és pontatlan C_T megállapításhoz vezet. Ebből következően alapvetően fontos, hogy minél alacsonyabbra állítsuk be a küszöbértéket.

A QPCR adatok kiértékelésére két alapvető módszert használnak: abszolút kvantitálást és relatív kvantitálást. A *relatív* kvantitálásról (más néven $\Delta \Delta C_T$ módszer) részletes információ található a Livak et al. (2001) cikkben. Az *abszolút* kvantitálás során ismert koncentrációjú templátból (standard) hígítási sort készítünk, a C_T -t minden hígításra QPCR-rel meghatározzuk, és az így kapott $C_T \sim$ kópiaszám összefüggés alapján a vizsgálandó minta C_T -jéből a kópiaszám meghatározható (10. ábra).



10. ábra. QPCR standard hígítási sor : C_T vs. kópiaszám függvény

A legkönnyebben kezelhető standard a szintetikus egyszálú oligodeoxinukleotid (ssDNS), vagy *amplikon*, amely a két primer által amplifikált rövid szakasz szekvenciáját hordozza. A szintetikus ssDNS amplikon nagy előnye, hogy stabil, sokáig tárolható a degradálódás veszélye nélkül, és ugyanaz a standard hígítási sor nagyon sok mérés összehasonlításához elegendő. A különböző hígításokhoz tartozó C_T és $\lg\Delta R_n$ lineáris összefüggést mutat – az egyenes meredeksége a PCR reakció hatékonyságát jellemzi. Közel 100%-os hatékonyság esetén az egyenes meredeksége -3.3 ; - az 1. táblázatból látható, hogy a meredekség változása milyen PCR-hatékonyságot takar - természetesen a nagymértékben eltérő meredekség ($3.2 > m$, vagy $m > 3.4$) pontatlan mérést eredményez. Az amplikon amplifikációjának hatékonysága azonban nem feltétlenül egyezik meg a vizsgált minta amplifikációjának hatékonyságával, hiszen az amplikon tiszta, szintetikus templát, míg a cDNS PCR gátlókat is tartalmazhat – ez a fajta kvantitálás tehát pontatlan mérést eredményezhet, ha a két PCR hatékonysága lényegesen különbözik.

1. táblázat. A QPCR standard hígítási sor C_T vs. k piaszám függvény meredekségének összefüggése a PCR hatékonyságával és az amplifikáció mértékével.

Meredekség	Amplifikáció	Hatékonyság
-3.60	1.8957	0.8957
-3.55	1.9129	0.9129
-3.50	1.9307	0.9307
-3.45	1.9492	0.9492
-3.40	1.9684	0.9684
-3.35	1.9884	0.9884
-3.30	2.0092	1.0092
-3.25	2.0309	1.0309
-3.20	2.0535	1.0535
-3.15	2.0771	1.0771
-3.10	2.1017	1.1017

Az abszolút kvantitálás másik módszere, a *lineáris regressziós PCR* (LinRegPCR) alapján azonban a mRNS mennyisége pontosabban meghatározható, ha a PCR log-lineáris (exponenciális) szakaszára illeszthető lineáris regressziós egyenes meredekségét és y-tengely metszéspontját meghatározzuk (11. ábra). A PCR kinetikáját leíró egyenlet szerint ugyanis

$$N_C = N_0 \times (E+1)^C$$

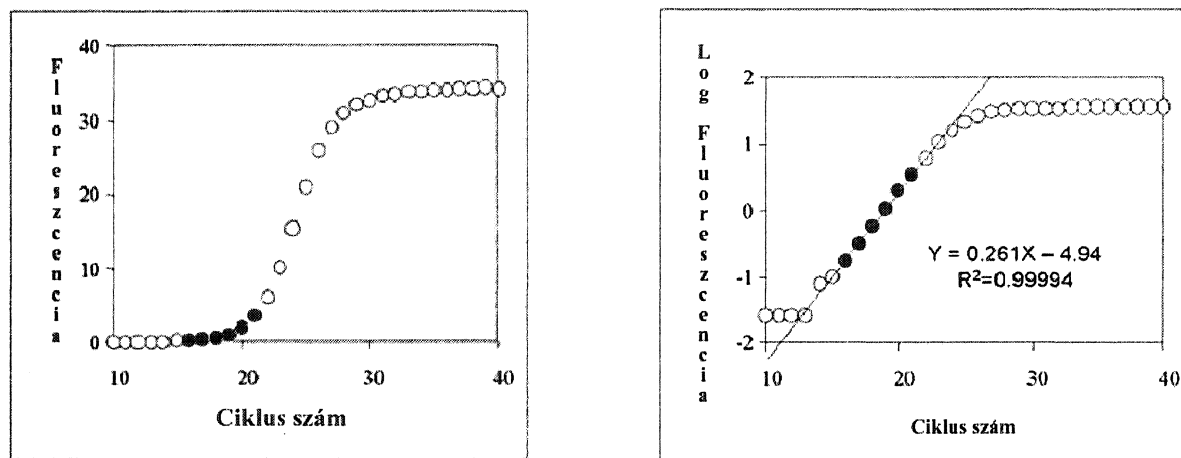
ahol N_C az adott ciklusszámnál (C) mért kópiaszám (vagy az azt helyettesítő fluoreszcencia), N_0 a kiindulási templátmennyiség (a 0. ciklusban), és E a PCR hatékonysága ($0 \leq E \leq 1$, $E=1$ a 100%-os hatékonyság). Az egyenletet linearizálva

$$\lg N_C = \lg N_0 + \lg(E+1) \times C,$$

vagy QPCR készülékkel mérhető fluoreszcenciaként kifejezve,

$$\lg \Delta R_n = \lg \Delta R_0 + \lg(E+1) \times C_n$$

ahol $\lg N_0$ a $C_n \sim \lg \Delta R_n$ összefüggésre illeszthető lineáris regressziós egyenes y-tengely metszéspontja. Ez esetben természetesen a kiindulási templátmennyiséget fluoreszcenciaként kifejezve kapjuk meg, de a standard hígítási sort hasonlóképpen analizálva, és a $\Delta R_0 \sim$ kópiaszám összefüggést használva a minta abszolút cDNS kópiaszáma is meghatározható. Az egyenes meredeksége = $\lg(E+1)$, amiből a PCR reakció hatékonysága is kiszámolható – ez az érték minőségi kontrollként használható, és az átlagosnál szennyezettebb minták kiszűrhetőek vele. A LinRegPCR algoritmusát emailen keresztül megkérhető a bioinfo@amc.uva.nl címen, (subject:LinRegPCR). A módszerről részletesebben a Ramakers et al. (2003) cikkben lehet olvasni.



11. ábra. A QPCR kvantitatív analízise LinRegPCR segítségével. A bal oldali ábra a ΔR_n vs C_n összefüggést ábrázolja egy mintában, míg a jobb oldali ábra a $\lg \Delta R_n$ vs C_n összefüggést ábrázolja.

A QPCR adatok normalizálása

A standard hígítási sor segítségével meghatározott abszolút kópiaszám általában kevés információt hordoz, hiszen csak az adott csőben jelenlevő cDNS mennyiséget adja meg, melynek biológiai relevanciája bizonytalan. A csőben jelenlevő cDNS mennyiségét számos tényező határozza meg: az adott mRNS mennyisége a totál RNS-ben, a cDNS szintézis (reverz transzkripció) hatékonysága, a koncentrációmérés pontossága és pipettázási hibák; a QPCR során mért fluoreszcenciát pedig a pipettázási hibák, a QPCR assay minősége és a PCR hatékonysága is befolyásolja. Éppen ezért a minták összehasonlíthatósága érdekében többszörös normalizálásra van szükség. A PCR összeméréséből adódó pontatlanságokat a készülék szoftvere automatikusan korigálja, a mintákban jelenlevő belső referencia festék fluoreszcenciája alapján. Ez a referenciafesték lehet a ROX, melyet a PCR master mixhez keverünk, vagy a jelölt próba TAMRA quencher, melynek szintén van saját fluoreszcenciája. Elméletileg akár a ROX, akár a TAMRA egyenlő mennyiségben van jelen a különböző mintákban, tehát normalizálásra használhatók. A biológiai szempontból releváns normalizálás a belső referencia gének mRNS kópiaszámával történik. Ezek a referencia-mRNS-ek ugyanabból a sejtől-szövetből származnak mint a vizsgált mRNS, és ugyanúgy átestek az RNS-izolálás ill. reverz transzkripció procedúráján, tehát használatukkal a legtöbb kísérleti hiba/variáció korigálható, valamint közös viszonyítási alapot jelentenek a különböző minták számára. Fontos feltétel viszont, hogy a referencia-mRNS-ek mennyisége a kezelések hatására az összehasonlított mintákban ne változzon. A normalizálásra használható gének

panelja minden kísérleti rendszerben más lehet, ezeket tehát egy több gént magába foglaló listából kell kísérletesen kiválasztani. A potenciális normalizáló gének egyfajta listája és a méréshez használható primerek részletesen megtalálható a Vandesompele et al. (2002) cikkben. Még mielőtt a vizsgálandó mRNS-t mérnénk, az előkísérletekben minden mintában megmérjük a potenciális normalizáló gének expresszióját SYBR Green I technológiával, és a mintákat összehasonlítjuk. Azok a gének lesznek normalizálásra alkalmasak, melyek expressziós szintje *egymáshoz képest* nem változik a kezelések hatására, a különböző mintákban – természetesen ekkor feltételezzük, hogy a gének nem ko-regulálódnak. A mintákban a gének páronkénti összehasonlítását és az adatok feldolgozását a geNorm algoritmus automatikusan elvégzi (letölthető a <http://medgen31.ugent.be/jvdesomp/genorm/> honlapról). A hasonló elven működő BestKeeper[©] szoftverrel szintén automatikusan azonosíthatók a normalizálásra alkalmas gének, kiszámolható a normalizáló faktor, illetve további adatanalízis is végezhető (letölthető a <http://www.wzw.tum.de/gene-quantification/bestkeeper.html> honlapról). A pontos normalizáláshoz célszerű 2-3 normalizáló gén expresszióját nyomonkövetni a mintákban, és a normalizáló mRNS-ek kópiaszámának mértani középértékét használni normalizáló faktorként a számításokban. Fontos megjegyezni, hogy a normalizáláshoz még mindig általánosan használt GAPDH gén expressziója a tapasztalatok szerint meglehetősen variábilis, ezért normalizálásra ritkán alkalmas. Többen javasolják a 18S rRNS mennyiség vagy a totál RNS mennyiség alapján történő normalizálást. A problémát ezzel kapcsolatban többek között az jelenti, hogy a rRNS-ek mennyisége a különböző mintákban nem arányos a mRNS-ek mennyiségével; hasonlóképpen, mivel a totál RNS nagy részét a riboszomális RNS-ek adják, a totál RNS mennyisége sem tükrözi pontosan a minta mRNS tartalmát.

A QPCR általános paraméterei és optimalizálása

A QPCR-t általában 96-lyukú (vagy 384-lyukú) platen futtatják, mivel az összehasonlítandó minták száma egy kísérletben általában nagy, és ilyen mintaszámnál ez a formátum könnyebben kezelhető, mint az önálló csövek. Mivel a QPCR-t is ugyanezen platen kell összemérni és futtatni, különleges, ún. optikai plate-et használunk hozzá. A reverz transzkripcióhoz maximum 100 ng totál RNS-t használunk mintánként, de ha a mérendő RNS-ek nagyobb mennyiségben vannak jelen, ez csökkenthető. Az RNS minta koncentrációját elegendő az OD₂₆₀ alapján kiszámolni – habár nem ez a legpontosabb mérési módszer, a mérés pontatlanságából adódó hibát a normalizáló faktorialább kiegyenlítjük. Az RT reakció összetevői egy mintára (5 µl végtérfogat):

- 1 µl =100 ng totál RNS (100 ng/µl, DEPC H₂O-ban oldva)
- 1 µl 5X reverz transzkriptáz puffer
- 0.5 µl 100 mM DTT
- 1 µl 2.5 mM 4 dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP egyenlő arányú keveréke)
- 0.025 µl reverz transzkriptáz, pl. Superscript II (Invitrogen)
- 0.015 µl 100 µM reverz primer (az RNS szekvenciával komplementer!)
- 1.46 µl H₂O

A pipettázási hibák miatt egy 96-lyukú plate-re 105 mintára való RT reakcióelegyet (master mix) kell összemérni.

Az RT reakció paramétere

42°C - 30 perc

72°C – 5 perc

4°C – tárolás.

cDNS formájában a minta sokkal stabilabb, és -20°C-n tárolható.

Plate térkép

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

NTC	S1	S1	S1	S2	S2	S2	S3	S3	S3	S4	S4
S4	S5	S5	S5	R1	R1	R1	NAC1	R2	R2	R2	NAC2
R3	R3	R3	NAC3	R4	R4	R4	NAC4	R5	R5	R5	NAC5
R6	R6	R6	NAC6	R7	R7	R7	NAC7	R8	R8	R8	NAC8
R9	R9	R9	NAC9	R10	R10	R10	NAC10	R11	R11	R11	NAC11
R12	R12	R12	NAC12	R13	R13	R13	NAC13	R14	R14	R14	NAC14
R15	R15	R15	NAC15	R16	R16	R16	NAC16	R17	R17	R17	NAC17
R18	R18	R18	NAC18	R19	R19	R19	NAC19	R20	R20	R20	NAC20

NTC = no template control, negatív kontroll minta, RNS-t nem tartalmaz.

NAC = no amplification control, negatív kontroll minta, reverz transzkriptázt nem tartalmazott, a gDNS szennyezésből eredő szignál mérhető vele

S1-S5 = standard hígítási sor, az ampikon különböző hígításai; S1= 10 amól/μl, S2= 1 amól/μl, S3= 0.1 amól/μl, S4= 0.01 amól/μl, S5= 0.001 amól/μl.

R= mérendő RNS minta.

A QPCR összetevői egy mintára

14.025 μl H₂O

2 μl 10X Taq polimeráz puffer

2.4 μl 25 mM MgCl₂

1 μl 2.5 mM 4dNTP

0.075 μl 100 μM forward primer

0.06 μl 100 μM reverse primer

0.2 μl 20 μM TaqMan próba,

0.125 μl Taq polimeráz (pl. Promega)

5 μl cDNS

A pipettázási hibák miatt egy 96-lyukú plate-re 105 mintára való RT reakcióelegyet (master mix) kell összemérni.

A PCR általános paramétere

95°C – 5 min

40 ciklus:

95°C – 15 sec

60°C – 1 min

A QPCR optimalizálásának célja, hogy a C_T -hez tartozó fluoreszcens jel (R_n^+) és a háttér-fluoreszcencia (R_n^-) különbsége minél nagyobb legyen az adott QPCR assay-re (minél nagyobb ΔR_n), illetve hogy a C_T minél korábbi ciklusnál legyen, mivel ezek érzékenyebb és pontosabb kvantitatív mérést eredményeznek.

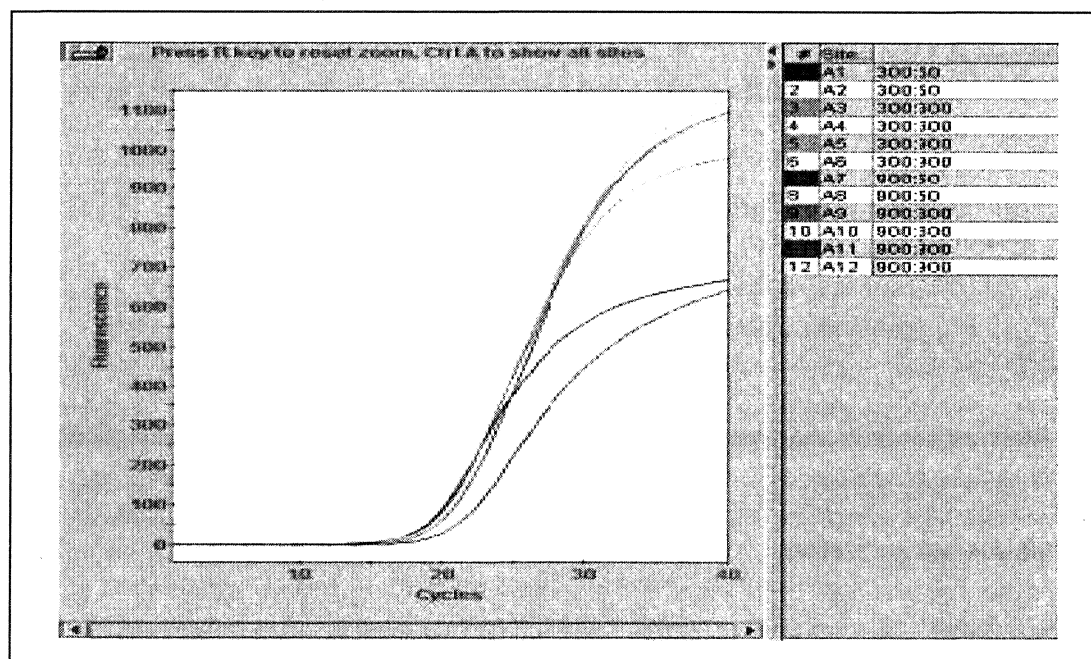
Az optimalizálást egyféle amplikon koncentrációnál (vagy adott RNS/cDNS templátmennyiségnél) végezzük, és általában négy paramétert változtatunk:

1. Primerek koncentrációja, 50 nM – 500 nM végkoncentráció között
2. $MgCl_2$ koncentráció, TaqMan assay esetében 1-8 mM végkoncentráció között, SYBR GreenI assay esetében 1.5-6 mM végkoncentráció között
- 3 Primerek aránya: 50 – 300 – 900 nM között, primerenként (50/300, 50/900, 300/900 párosítással)(12. ábra)
4. Próba koncentrációja: 50-125 nM végkoncentráció között

A primerek és $MgCl_2$ koncentrációjának változtatása a C_T -t általában nem érinti, de a ΔR_n -t megváltoztathatja. Túl magas primer ill. $MgCl_2$ koncentráció megnövelheti az aspecifikus hibridizáció illetve a primer-dimer képződés valószínűségét, a túl alacsony koncentrációk pedig negatív eredményhez vezethetnek. A primerek arányának változtatásával akár $2^\circ C$ T_m különbséget is ki lehet egyenlíteni – mint a 12/B. ábra mutatja, nemcsak a ΔR_n , de a C_T is jelentősen változhat. Ugyanígy a próba koncentráció változtatása is befolyásolja a ΔR_n és a C_T értékét is.

rev/forw	50 nM	300 nM	900 nM
50nM	50/50	300/50	900/50
300 nM	50/300	300/300	900/300
900 nM	50/900	300/900	900/900

12/A. ábra. A primerek arányának optimalizálásához használt mátrix.



12/B. ábra. A primer-arány változtatásának hatása a QPCR paramétereire.

Irodalom

A részletesebb tájékozódáshoz elsősorban az 1. és 2. cikket ajánlott elolvasni. Nagyon hasznos információkkal, és további web-linkekkel szolgál a Technische Universität München QPCR honlapja, Michael Pfaffl kurátorsága alatt: <http://www.wzw.tum.de/gene-quantification/>

Bustin SA (2000): Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrin* 25: 169-193

Bustin SA (2002): Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrin* 29:23-29

Vandesompele J, De Paepe A and Speleman F (2002): Elimination of primer-dimer artifacts and genomic coamplification using a two-step SYBR Green I real-time RT-PCR. *Analytical Biochemistry*

Ball TB, Plummer FA and HayGlass KT (2003): Improved mRNA quantitation in LightCycler RT-PCR. *Int Arch Allergy Immunol* 130:82-86

Pruitt KD, Tatusova T and Maglott DR (2003): NCBI Reference Sequence Project: update and current status. *Nucl Acids Res* 31(1): 34-37

Livak KJ and Schmittgen TD (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 25:402-408

Broude NE (2002): Stem-loop oligonucleotides: a robust tool for molecular biology and biotechnology. *TRENDS in Biotechnology* 20(6):249-256.

Ramakers C, Ruijter JM, Lekanne Deprez RH and Moorman AFM (2003): Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci Letters* 339:62-66.

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A and Speleman F (2002): Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* 3(7):research0034.1-0034.11 (online publication)

Ezen kívül érdemes rendszeresen olvasni az interneten a független QPCR fórumot, melynek tagjai a kérdésekre is rendkívül segítőkészen szoktak reagálni: <http://groups.yahoo.com/group/qpcrlistserver/>.

A következő fejezetekben ismertetjük a PCR. elven alapuló kísérletek részletes leírását

EGY GÉN ÉS A RÓLA ÁTÍRÓDÓ mRNS JELLEMZÉSE

Kókai Endre

A *Drosophila* genom szekvenciájának ismerete lehetővé teszi a géneket kódoló DNS szakaszok közvetlen sokszorosítását genomi DNS-ről, polimeráz láncreakcióban (PCR). RNS preparátumot használva templátként, reverz transzkriptáz RT-PCR módszerrel, meggyőződhetünk arról, hogy az adott gén tartalmaz-e intront. A gyakorlat során a *Drosophila* CG4362 jelű gén szekvenciáját vizsgáljuk. A *Drosophila* genetikai kutatások nagy múltra tekintenek vissza, számos génnek megfelelő cDNS kereskedelmi forgalomban megvásárolható. Kontroll templátként az LP08055 (Invitrogen) jelű cDNS-t használhatjuk a PCR kísérlethez.

PCR reakció

Templát nukleinsavak

1. *Drosophila melanogaster* (Oregon R) törzs genomi DNS preparátum
2. pozitív kontroll: Klónozott CG4362 cDNS preparátum
3. negatív kontroll: A reakcióelegyet templát DNS nélkül állítjuk össze, a térfogatot vízzel egészítjük ki 20,0 µl-re.

Primerek

1. *DmVig* h.-5'-ATG Nde I: 5' GGCTCATATGAAGTACCTGCTCAGCATGAC 3'

2. *DmVig* h.-3'-Not I: 5' CCCTGCGGCCGCAGTTCGTTGAATTTAGTC 3'

(A vastag betűkkel jelzett szekvencia részletek komplementerek a target szekvenciával. Az 5'-végükön található extra nukleotidok új restrikciós hasítási helyek beépítésére szolgálnak.)

Reakció közeg

MgCl ₂ (2 mM)	1,6 µl
PCR puffer (1 X)	2,0 µl
dNTP (0,2 mM)	0,4 µl
primer 1-2 (0,4 µM – 0,4 µM)	2,0 µl
Taq polimeráz (2 U)	0,4 µl
H ₂ O	12,6 µl
cDNS/genomi DNS (0,3 µg)	1,0 µl
	20,0 µl

PCR hőmérsékleti profil

94°C	2	perc	}	5 ciklus
92°C	0,3	perc		
55°C	0,5	perc		
72°C	1	perc		
92°C	0,3	perc	}	30 ciklus
65°C	0,5	perc		
72°C	1	perc		
72°C	10	perc		

RT-PCR reakció

Templát nukleinsavak

1. *Drosophila melanogaster* (Oregon R) törzs totál RNS preparátum
2. pozitív kontroll: Klónozott CG4362 cDNS preparátum
3. negatív kontroll: A totál RNS preparátumot alkalmazzuk a PCR reakcióban, az RT reakció kihagyásával. Így győződünk meg arról, hogy a totál RNS preparátum nem tartalmaz genomi DNS szennyezést.

Primerek: A PCR reakcióval azonos primereket használunk (lásd fent).

Reakció közegek

RT reakció:

végkoncentráció	térfogat
RNS (2 µg)	(x µl)
H ₂ O	10-x µl
oligo(dT) (2.8 µM)	1 µl
<hr/>	
70°C	5 perc

RT puffer (1 X)	5,0 µl
dNTP (0,5 mM)	1,25 µl
H ₂ O	6,75 µl
M-MLV RT (200 U)	1,0 µl
<hr/>	
	25 µl
37°C	1 óra

PCR reakció:

végkoncentráció	térfogat
MgCl ₂ (3 mM)	3,0 µl
PCR puffer (1 X)	2,5 µl
dNTP (0.2 mM)	0,5 µl
primer 1-2 (0,4 µM – 0,4 µM)	2,0 µl
Taq polimeráz (2 U)	0,4 µl
H ₂ O	11,6 µl
cDNS (0,3 µg)	5,0 µl
<hr/>	
	25 µl

A hőmérsékleti profil az előző feleletben leírtakkal azonos.

A PCR és RT-PCR reakciók termékeit 1% agaróz gélben végzett gélelektroforézissel vizsgáljuk. Határozza meg a gén és a cDNS méretét és számolja ki az intron(ok) méretét.

Internetes oldalak

Genomi DNS és cDNS szekvenciák

<http://flybase.bio.indiana.edu> web oldalon a CG15031 gén kód alapján található meg.

Az oligonukleotid tervezéshez felhasználható programok

<http://web.mit.edu/mmcmanus/www/home1.2files/OligoCalc.html>

<http://micro.nwfsc.noaa.gov/protocols/oligoTMcalc.html>

HUMÁN DNS-POLIMORFIZMUS KIMUTATÁSA PCR-REL

Fehér Zsigmond

Az emberi genomban sok helyen, szinte minden kromoszómán található tandem⁸ ismétlődő rövid szekvenciák. Az ismétlődés példányszáma különböző egyéneknél különböző lehet, és a homológ kromoszómákon is többnyire egymástól eltérő. Így egy adott kromoszomális lokusznak a populációban többféle állapota (úgy is mondhatjuk, hogy többféle allélje) lehetséges, attól függően, hogy az ismétlődő szekvencia hány példányban található rajta. E szekvenciákat, melyek az emberi DNS-polimorfizmus jellemző példái, két nagy csoportra osztjuk. Ha az ismétlődő szekvencia 2-9 bp hosszúságú, mikroszatellitának⁹, 10 és 60 bp közötti méret esetén variábilis példányszámú tandem ismétlődéseknek (*Variable Number Tandem Repeats, VNTR*) nevezték el¹⁰. Adott kromoszomális lokuszon elhelyezkedő VNTR kimutatása polimeráz láncreakcióval olyan módszer alapjául szolgál, mely specifikus genetikai marker kimutatásával személyazonosításra alkalmas. (Az RFLP-n alapuló azonosítás és a DNS-fingerprinting klasszikus változata¹¹ is informatív módszerek, velük szemben azonban a PCR technikának az az előnye, hogy kevesebb DNS-t használ és nem szükséges hozzá radioaktív próba.)

A személy-specifikus DNS marker kimutatását egy konkrét példán mutatjuk be. A D1S80 lokusz az 1-es emberi kromoszómán található. Egy 16 bázispárnyi szekvencia ismétlődik 14-41 példányban. Eddig összesen 29 féle allélt azonosítottak¹², melyek 435 féle különböző genotípust képezhetnek. (Ezek a számok jól jellemzik a lokuszra jellemző magas fokú polimorfizmust.) Az ismétlődő szekvenciák előtti és utáni régióhoz hibridizáló primert választva PCR-rel amplifikálni lehet két DNS-fragmentumot a két homológ 1-es kromoszómáról. A PCR termékeket nagy felbontású poliakrilamid gélen ezüstoffestéssel vizsgálva, s összehasonlítva megfelelő méret-markerekkel meg lehet állapítani, hánszoros ismétlődést tartalmaznak (1. ábra). A gyakorlaton a kisebb felbontású és kevésbé érzékeny, de a hallgatói laboratórium körülményei között egyszerűbben kivitelezhető *agaróz gél-elektroforézist* fogunk végezni és a PCR terméket etidiumbromiddal detektáljuk.

A kaukázusi nagyraszba tartozóknál (fehérekénél) a D1S80 allélek közül a 18- és a 24-szeres ismétlődésű a leggyakoribb, amerikai feketéknél (afrikai amerikaiaknál) a 21-es 22-es 28-as és 34-es allélek is gyakoriak.

A vizsgálathoz használt emberi DNS származhat vérből (fehérvérsejtekből), szájnyálkahártya sejtekből, spermából, stb., elvileg bármely biológiai anyagból, melyből DNS izolálható. Egy reakcióhoz legalább 2,5-10 nanogramnyi DNS szükséges. A gyakorlat során, mivel kevésbé érzékeny módon végezzük a detektálást, egy nagyságrenddel nagyobb mennyiségből (200 ng) indulunk ki.

A vizsgálattal megállapítható, hogy a tesztelt biológiai minta származhatott-e egy konkrét személytől (pl. bűncselekmény gyanúsítottjától) vagy sem. Vérégi kapcsolat (pl. apaság) megállapítására is használható, mivel a gyermek a szülő egyik allélját örökli. Négy különböző populáció esetén meghatározták az allélek gyakoriságát (*1. táblázat*). Így ha meghatározunk egy genotípust, a táblázat alapján kiszámítható annak a gyakorisága. A két leggyakoribb allélt hordozó (18,24) heterozigóták gyakorisága pl. $2(0,238)(0,348) = 16,6\%$. Két ritka allél esetén azonban (pl. 19,32) a heterozigóta-gyakoriság $0,013\%$. Ez azt jelenti, hogy minden hatodik embernek lehet 18/24-es genotípusa, de 19/32-es csak 7700-ból egynek.

⁸ Az ismétlődő szekvenciák közvetlenül egymás után helyezkednek el. (L. még tandem kerékpár.)

⁹ Másik elnevezése: Simple Sequence Length Polymorphism (SSLP)

¹⁰ Másik elnevezése: miniszatellita

¹¹ L. Genetika jegyzet (2003) 18. fejezet

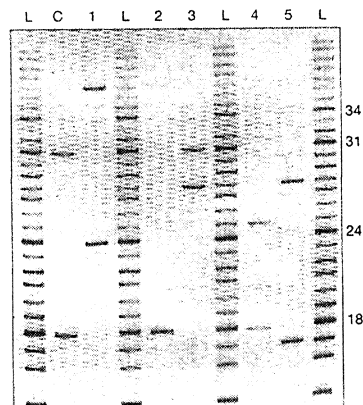
¹² Ezek közül 27 gyakoribb allél 14-41 közé esik, a többi 41-nél magasabb példányszámú.

Ezek a számértékek azt jelzik, hogy ha a vizsgált anyag és egy konkrét személy genotípusa egyezik, 16,6% ill. 0,013% a valószínűsége, hogy a biológiai minta más személytől származik, tehát 83,4%, ill 99,987%-os valószínűséggel származik a vizsgált személytől. (Természetesen a „klasszikus” polimorf markerekkel, mint a vércsoport, HLA és további DNS markerek használatával a személy-azonosítást még biztosabbá lehet tenni.) Ha a biológiai minta és a vizsgált személy genotípusa eltérő, akkor természetesen 100%-os biztonsággal kizárható, hogy az illetőtől származzon a minta.

1.táblázat : A *DIS80* allélek gyakorisága négy különböző populációban

Allele	Allele Frequency (n = number of alleles typed)			
	U.S. Caucasian (n = 400)	African American (n = 400)	U.S. Hispanic (n = 400)	Japanese (n = 178)
14	—	—	0.003	—
15	—	—	—	—
16	—	—	0.003	0.045
17	—	0.048	0.013	0.006
18	0.238	0.098	0.263	0.146
19	0.010	0.003	0.005	0.017
20	0.040	0.033	0.020	—
21	0.018	0.115	0.025	0.017
22	0.030	0.088	0.028	0.022
23	0.008	0.023	0.003	—
24	0.348	0.193	0.318	0.219
25	0.040	0.023	0.055	0.011
26	0.015	0.008	0.010	0.006
27	0.013	0.013	0.008	0.034
28	0.063	0.153	0.050	0.090
29	0.053	0.055	0.055	0.051
30	0.008	0.008	0.055	0.146
31	0.080	0.048	0.058	0.124
32	0.013	0.005	0.003	—
33	0.003	0.005	—	0.017
34	0.003	0.073	0.008	0.011
35	0.003	—	—	—
36	0.005	0.003	—	—
37	0.008	—	0.003	—
38	—	—	0.005	—
39	—	—	—	0.017
40	0.003	0.003	0.010	—
41	—	—	—	0.006
>41	0.005	0.010	0.005	0.017

Az egyes alléleknek megfelelő PCR termékek hossza a következő képlettel számítható:
 $115 + 14 + (n-1) * 16 + 32$. Ennek alapján a 18-as allél 433 bp, a 24-es 529, a 28-as 593, a 31-es 641, a 34-es 689 bp méretű.



1. ábra *DIS80* PCR termékek detektálása poliakrilamid gélen ezüsfestéssel.
 L: „Allél-létra”: minden egyes allélra jellemző csíkot tartalmaz 14-től 41-ig. A leggyakoribb allélok vastagabb csíkkal szerepelnek. C: kontrol DNS, 18, 31 allélek; 1: 24, 37 allélek, 2: 18,18; 3: 28, 31; 4: 18,25; 5: 17,28; Az egyes alléleket az ismétlődések számával jelölik.

A kísérlet kivitelezése

A változat

A PCR kísérlethez humán DNS templátot használunk. Egy 28 és egy 29 nukleotid hosszúságú primerrel amplifikáljuk a szóban forgó polimorf kromoszomális régió DNS-ét. Jégben álló 0.5 ml-es mikrocentrifugacsőbe mérjük össze az anyagokat. A reakció összetétele és a bemérések sorrendje a következő:

Bemérendő mennyiség		Végkoncentráció
Steril desztillált víz:	57,5 µl	-
10x PCR puffer*	10,0 µl	1x
dNTP mix**	10,0 µl	200 µM
RedTaq DNS polimeráz (1 E/ µl)	2,5 µl	2,5 egység/100 µl
1. számú primer	5,0 µl	1 µM
2. számú primer	5,0 µl	1 µM
Humán DNS templát (20 µg/ml)	10,0 µl	200 ng/100 µl

* 100 mM Tris-HCl (pH 8.3), 500 mM KCl, 11 mM MgCl₂, 0.1 % zselatin

** (dATP,dGTP,dCTP,dTTP, egyaránt 2 mM koncentrációban)

Pipetázzunk óvatosan és finoman. Ha az összemérést befejeztük, keverjük össze az oldatokat 50 µl-re állított mikropipettába történő 2-3-szori felszívással. Az összemérendő komponenseket mindig jégen kell tartani! Végül a reakciókeverék felszínére rétegezzünk 50 µl paraffinolajat a párolgás megakadályozására. Még egy hasonló reakciókeveréket állítunk össze egy másik vizsgálni kívánt DNS-sel. Ezután behelyezzük a mintákat a PCR készülékbe (thermal cycler), melyet a következő paraméterekre programoztuk:

1 perc 94°C (denaturáció)
1 perc 65°C (primerek hibridizációja)
1 perc 72 °C (DNS szintézis)
30 cikluson át

A program kb. 2,5 órán át tart, ezért célszerű a gyakorlat elején elindítani a reakciót. A program végeztével a mikrocentrifugacsöveket -20°C-on tároljuk a következő heti gyakorlatig.

B változat

A vegyszereket, reagenseket forgalmazó cégek a napi munka megkönnyítésére összeállítanak ún. PCR-mixeket, melyek tartalmazzák a Taq DNS polimerázt, a nukleozid-trifoszfátok keverékét és a puffert. Ilyen PCR-mix felhasználásával a fenti recept a következőképpen módosul:

	1 csőre	4 csőre
PCR-mix	10 μ l	40 μ l (már benne van a csőben, ehhez kell hozzáadni az alábbi összetevőket!)
2. Steril desztillált víz	6 μ l	24 μ l
3. 1. primer (20 μ M)	1 μ l	4 μ l
3. 2. primer (20 μ M)	1 μ l	4 μ l
5. Humán DNS (200 ng)	2 μ l	-
Összesen:	20 μ l	72 μ l

A piros színű PCR-mix tartalmazza a négyféle nukleozid-trifoszfátot, a Taq polimerázt és a PCR puffert. Ha láthatóan nem keveredett el egyenletesen, pipetázással óvatosan keverjük össze a reakciót. Ha 4 csőre összemértük az összes PCR-reakcióban közös komponenseket, mérjük szét 3 x 18 μ l-t 3 másik csőbe, s az eredeti csőben is maradjon 18 μ l. Ezután mérjük be a csőenként különböző humán DNS mintákat, 2-2 μ l-t. A párolgás megakadályozására rétegezzünk 20-20 μ l paraffinolajat mindegyik PCR-reakciókeverékre. Jól zárjuk le a csöveket és helyezzük a PCR készülékbe.

Futtassuk a reakciót az alábbi programmal:

94 °C 2 perc kezdeti denaturáció
94 °C 45 másodperc denaturáció
65 °C 45 másodperc hibridizáció
72 °C 1 perc DNS szintézis
35-40 cikluson át

A kísérlethez felhasznált oligonukleotid primerek szekvenciája

D1S80A: 5'-GAA ACT GGC CTC CAA ACA CTG CCC GCC G-3'

D1S80B: 5'-GTC TTG TTG GAG ATG CAC GTG CCC CTT GC-3'

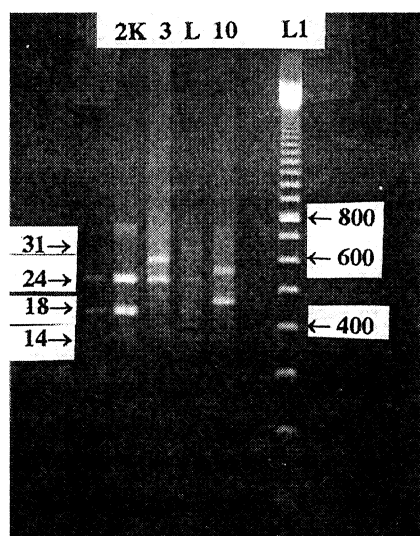
Elektroforézis

– A következő gyakorlaton 2 %-os agaróz gélen megfuttatjuk a méret-markerek kíséretében. A 20 µl PCR termékből elég 16 µl-t felvinni, hogy a géltre vitt paraffinolaj mennyiségét csökkentjük.

A mintákat a következőképpen készítjük el. A PCR termékhez nem szükséges brómfenolkék tennünk, mivel a RedTaq polimerázzal bevitt piros festék révén nyomon követhető lesz a minta felvitelkor és a futás során.

1. minta: 20 µl PCR termék (1. sz.)
2. minta: 15 µl „allél-létra” (méret-marker) 2,5x hígítás
5 µl brómfenolkék
3. minta: 20 µl PCR termék (2. sz.)
4. minta: 15 µl „100 bp létra” (méret-marker) 15x hígítás
5 µl brómfenolkék

A mintákat ebben a sorrendben felvisszük a 2%-os agaróz géltre, melyet 0,5x Tris-borát-EDTA¹³ (TBE) pufferben futtatunk 100-120 V feszültséggel, mindaddig, míg a brómfenolkék legalább a gél 4/5 részéig el nem ért. Ezután a gélt az UV transzilluminátorra helyezve megvizsgáljuk, esetleg lefényképezzük. A méret-markereket használva állapítjuk meg a vizsgált DNS minták alléloszétételét. Egy hasonló kísérlet eredményét láthatjuk a 2. ábrán.



2. ábra: DIS80 PCR termékek detektálása etidiumbromiddal 2% agaróz gélen

2K, 3 és 10: humán DNS minták. 2K: 18,24-es allélek, 3: 24, 28-as allélek, L: „allél-létra”, 14, 18, 24, 31, 34-es allélek, 10: 20, 26-os allélek, L1: 100 bp „létra”

¹³ 0,5xTBE: 0,45 M Tris-borát, 0,001 M EDTA

TRANSZGÉN EGEREK GENOTIPIZÁLÁSA

Oros Melinda, Hartman Zsolt és Nagy László

A genetikailag módosított egerek (transzgén vagy Knock Out egerek) genotipizálását farok DNS izolálás után PCR reakcióval végezzük.

Genomi DNS izolálás

Farokvágás-egérjelölés

Az egereket nem szerint szétválogatjuk és egyenként éter segítségével elaltatjuk őket. Az egerek fülét megjelöljük, s a farkából egy kb. 0.5 cm hosszú darabot vágunk le.

Az egerek jelölése:

1.	1 vágás a jobb fülön
2.	1 vágás a bal fülön
3.	egyenes vágás a jobb fülön
4.	egyenes vágás a bal fülön
5.	1 vágás mindkét fülön
6.	2 vágás a jobb fülön
7.	2 vágás a bal fülön
8.	jelöletlen

A levágott farokvégeket 1.5 ml-es Eppendorf csőbe tesszük.

DNS izolálás

A genomi DNS izolálására számos módszer létezik. Itt két módszert írunk le: az első (A) egy meglehetősen új módszer, amely egyszerű, gyors, kényelmes (fenol nélküli) és megbízható, a második (B) egy kicsit talán idejétmúlt (fenol/kloroform), de szintén megbízható. A farkból izolált DNS-ből PCR amplifikáció és gélelektroforézis után az egerek genotípusai meghatározhatóak.

A, Módszer

- 1, A kb. 0.5 cm-es farkdarabhoz 600 μ l TNES puffert és 35 μ l Proteináz K-t (10 mg/ml) adunk hozzá.
- 2, Egy éjszakán át (8-24 h) 55°C-on inkubáljuk.
- 3, A cső tartalmához 166.7 μ l 6 M-os NaCl oldatot adunk és 15 sec-on keresztül erőteljesen összerázzuk.
- 4, A cső tartalmát centrifugáljuk (10 min, szobahő, 12,000-14,000 x g).
- 5, A felülúszót (kb.750 μ l) egy új Eppendorf csőbe tesszük és hozzáadunk ugyanennyi hideg 95%-os etanolt. Erőteljesen összerázzuk (kézzel), amíg a fehér színű csapadék szemmel látható lesz.
- 6, A cső tartalmát centrifugáljuk (3 min, szobahő, 12,000-14,000 x g).
- 7, A felülúszót leöntjük és a csapadékhoz 500 μ l hideg 70%-os etanolt adunk hozzá.
- 8, Ismét centrifugáljuk (3-5 min, szobahő, 12,000-14,000 x g).
- 9, A felülúszót eltávolítjuk és a csapadékot hagyjuk megszáradni szobahőn.
- 10, A csapadékot ezután 100-500 μ l TE pufferben szuszpendáljuk. A térfogat a pelletmérettel legyen arányos.
- 11, Ezt követően 10 min-en keresztül 65°C-on tartjuk, hogy a DNS tökéletesen feloldódjon.
- 12, A DNS mennyiségét és tisztaságát fotometrálassal meghatározzuk és 4°C-ra tesszük a további felhasználásig.

B, Módszer

1, Az Eppendorf csőben lévő kb. 0.5 cm-es farkdarabhoz hozzáadjuk az alábbi oldatokat:

+200 µl egérfarok puffer;

+15 µl (10 mg/ml) Proteináz K.

2, Egy éjszakára 55°C-ra tesszük, hogy a fehérjék elbomoljanak. Erre a PCR készüléket használjuk (104-es labor, 22-es program).

Az inkubálás során a mintákat jó, ha kézzel megrázogatjuk.

3, A megemésztett farkakat jól összerázzuk és 10 percig 14,000 x g-vel centrifugáljuk (közben új csöveket számozunk).

4, A felülúszót a csövekbe pipettázzuk és hozzáadjuk az alábbi oldatot:

+ 200 µl fenol:kloroform (1:1).

5, 3 perc extrahálás;

6, 5 perc centrifugálás; 14,000 x g (közben új sorozat Eppendorf csövet számozunk).

7, A felső fázist az új csövekbe tesszük és hozzáadunk 200 µl kloroformot.

8, 3 perc extrahálás;

9, 5 perc centrifugálás 14,000 x g-vel (közben 2 új sorozat Eppendorf csövet számozunk);

A csövekbe pipettázzuk az alábbi oldatokat:

1. sor: 20 µl 3 M-os Na-acetát, pH 4,5;

+ 400 µl 96%-os hideg (-20°C) etanol;

2. sor: 150 µl 70%-os hideg etanol.

10, A centrifugálás után a felső fázist leszívjuk és a 3 M-os Na-acetátot és a 96%-os hideg etanolt tartalmazó csövekbe tesszük (1. sor cső).

11, Összerázzuk és a kicsapódó genomi DNS-t kipipettázzuk, majd áttesszük a 70%-os hideg etanolba (2. sor cső).

12, 20 perc inkubálás szobahőn, majd az etanolt leöntjük és leszívjuk;

+ 150 µl 70%-os etanol, 20 perc inkubálás szobahőn.

13, Az etanolt minél tökéletesebben leszívjuk, és megvárjuk, míg az esetlegesen benne maradt folyadék is elpárolog (kb. 5-10 perc);

+ 50 µl TE puffer.

14, Egy éjszakára 55°C-ra tesszük, hogy a DNS feloldódjon (PCR készülék 22-es program).

PCR reakció

A beoldódott DNS-ből 3 µl-t előre megszámozott PCR csőbe pipettázunk, és jégre rakjuk. A többi összetevőből szintén jégen Master Mixet készítünk, a következők szerint (érdemes rászámolni, pl. 3 mintányival többet mérünk össze):

Összetevő	Törzsoldat	Mennyiség/reakció (µl)
PCR puffer	10x tömény	2
MgCl ₂	25 mM	1,5
Primer 1	10 mM	1
Primer 2	10 mM	1
Primer 3	10 mM	1
dNTP	25 mM	2
Taq Polymerase	5 U/ml	0,25
Desztillált víz		8,25

Ebből az elegyből 17 µl-t mérünk rá a már kimért DNS-re. A mintákat a PCR készülékbe tesszük. A program lejártá után a mintákat megfuttatjuk.

Gélelektóforézis

Gélkészítés

A futtatáshoz 1%-os agarózgél készítünk:

- 0,5 g agaróz;
- + 50 ml 1x tömény TAE puffer.

- Gázlámg felett felfőzzük, majd vízcsap alatt 50-60°C-osra lehűtjük;
- + 10 µl ethidium-bromid.
- Gélöntőkádba öntjük (beletesszük a fésűt);
- hagyjuk megdermedni (hűtőben gyorsabb);
- ha megdermedt, kivesszük a fésűt és a gél a futtatókádba tesszük.

Mintaelőkészítés

- Kivesszük a PCR készülékből a mintákat;
- +1 µl Loading puffer.
- Pipettával óvatosan elkeverjük, ügyeljünk, hogy buborékot ne csináljunk;
- és felvisszük a gél zsebeibe.

Futtatás

- Ha minden mintát felvittünk, feltesszük a futtatókád tetejét úgy, hogy a minták a pozitív (piros) pólus felé futnak.
- Csatlakoztatjuk a tápegységhez;
- beállítjuk a feszültséget 80-100 V-ra, és kb. 35-40 percig futtatjuk;
- az eredményt az Alpha Imagerrel értékeljük.

Oldatok

TNES puffer:

10 mM Tris, pH 7.5
400 mM NaCl
100 mM EDTA
0.6% SDS

"6 M" NaCl: Telített NaCl sóoldat,
tárolása (használat előtt) 37°C-on

TE puffer:

10 mM Tris, pH 8.0
1 mM EDTA

Egérfarok puffer (Tail buffer, TB):

1 litererhez: 60.57 g Tris
37.22 g EDTA
5.84 g NaCl
10 g SDS

50x tömény TAE puffer:

1 literhez,; 242 g TRIS, pH 8.5
57.1 ml jégcet
37.2 g EDTA

Loading puffer:

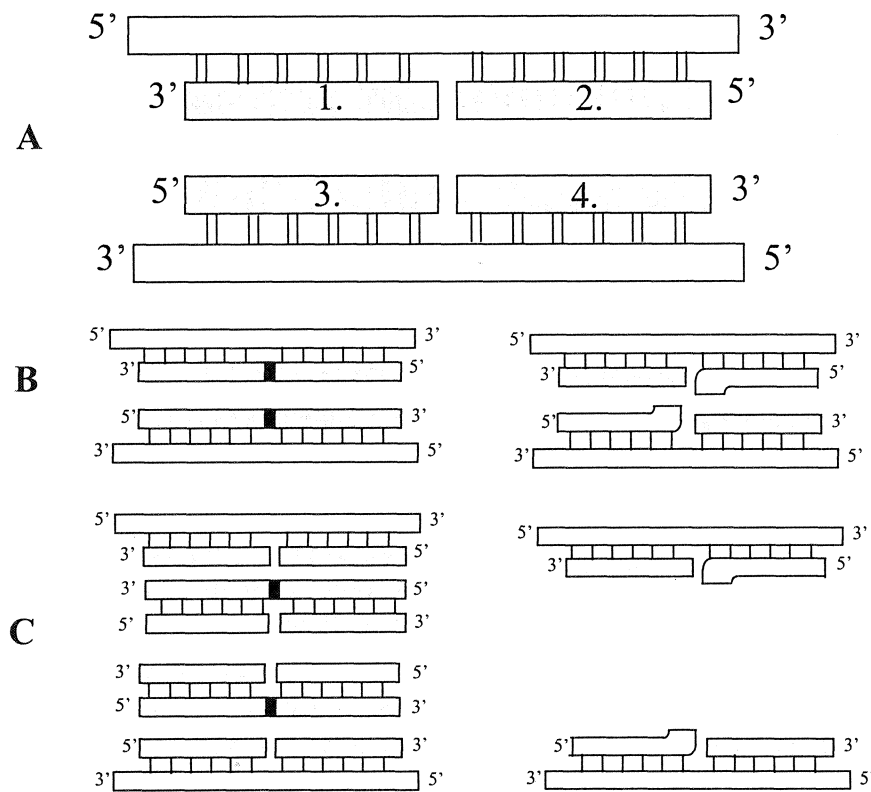
10 ml-hez: 2 g Ficoll 400
0.372 g EDTA
0.1 g SDS
25 mg brómfenolkék

LIGÁZ LÁNCREAKCIÓ

Dombrádi Viktor

Az ligáz láncreakciót (angol elnevezésének rövidítéséből LCR = Ligase Chain Reaction) a PCR helyettesítésére javasolják diagnosztikai céllal. A *Thermus thermophilus* (Tth) vagy *Pyrococcus furiosus* (Pfu) hőstabil ligáz enzimek felfedésére tette lehetővé az új eljárás bevezetését (1988). A reakció kivitelezéséhez a hagyományos PCR készülék használható. Bár az LCR elve új, a PCR-hez való hasonlóság és a készülékek azonossága miatt az eljárás lényegét itt mutatjuk be.

A módszer segítségével eldönthető, hogy egy ismert szekvenciájú DNS szakasz a vizsgált mintában jelen van-e, illetve, hogy történt-e mutáció a vizsgált ponton. Ehhez 4 db oligonukleotid kell, melyek párosával a target DNS egy-egy szálához hibridizálnak úgy, hogy 3' OH és 5' foszfát csoportjuk egymás mellett legyenek a templáton (1. ábra). Az ilyen oligonukleotidokat a ligáz képes összekötni. Ha a target szekvenciákban különbség van az érintkezési ponton akkor a ligálás nem történik meg.



1. ábra. A ligáz láncreakció (LCR) elve.

Az ábra felső része (A) a négy oligonukleotid (1-4.) tervezését szemlélteti. A gyors detektálást biztosítja az 1. és 2. oligonukleotidok jelzése. Például az 1. 3'-végére biotint, a 2. 5'-végére alkalikus foszfátot kötnek. Az oligonukleotidok találkozási helyén van a vizsgálni kívánt mutációs pont.

Az első ligáz reakció eredményei láthatók az ábra (B) részén. Ha nem következett be mutáció a ligálás sikeres, ahogy azt a sötét mezők érzékeltetik az ábra bal oldalán. Mutáció, pld. deléción esetén a ligálás nem játszódik le. Ezt érzékelteti az ábra jobb oldala.

Az ábra alján (C) a következő ciklus hibridizációs lépését látjuk. Az ábra azt szemlélteti, hogy a ciklus megismétlésével csak a vad típusú DNS esetében szaporodik fel a ligálás terméke

A korábban megismert PCR stratégia analógiája alapján az LCR lépései a következők:

- (1) Kettős szálú DNS hődenaturálása.
- (2) Két oligonukleotid pár hibridizálása.
- (3) Ligáz reakció, az oligonukleotid párok összekapcsolása.

A folyamat többszöri megismétlésével jelentősen felszaporítható a sikeres ligálási reakció terméke. Amennyiben a szekvencia megfelel az oligonukleotidoknak két hosszabb oligonukleotid keletkezik, melyek száma minden ciklusban megduplázódik. Így 10^5 - 10^6 -szeres sokszorozás érhető el. A megfelelő oligonukleotidok összekötődését úgy lehet detektálni, hogy az egyik oligonukleotid végére egy kötő csoportot (pl. biotint) a másik oligonukleotid végére pedig egy enzimet (pl. alkalikus foszfatázt) kötnek. A biotin-sztreptavidin kötés révén a biotínált oligonukleotidok kiköthetők egy szilárd felülethez. A felülethez kötve csak azok a termékek adják az alkalikus foszfatázra jellemző színreakciót, amelyek ligálása lezajszódott.

A közvetlen detektálhatóság előny a PCR-rel szemben. Azonban itt is megvan a lehetősége a műtermék kialakulásának, ugyanis kis valószínűséggel az oligonukleotidok templát távollétében is ligálódhatnak. Az így létrejött termék ezután exponenciálisan szaporodik ugyanúgy, mintha templáttól függő módon jött volna létre.

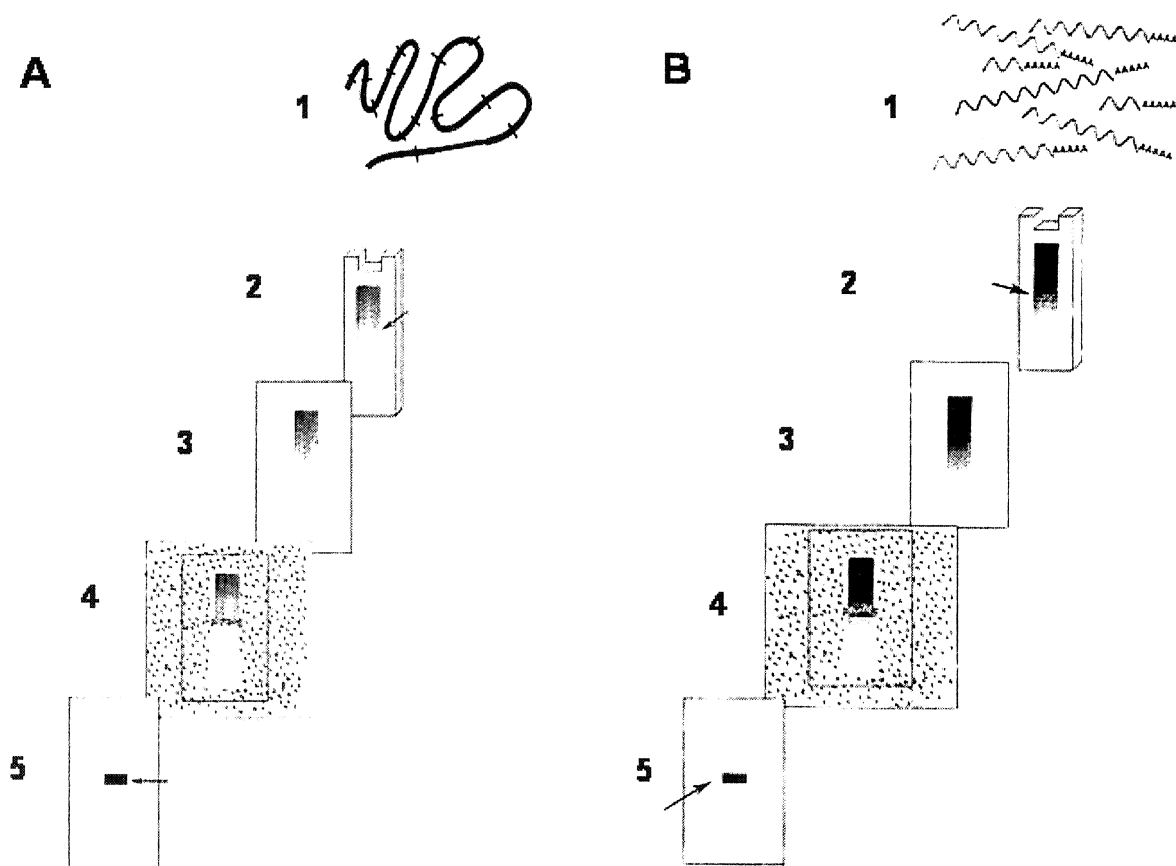
Elképzelhető, hogy a diagnosztikában az LCR a PCR vetélytársa lesz, azonban egyéb alkalmazásokban nem képes azt helyettesíteni.

NUKLEINSAV HIBRIDIZÁCIÓS TECHNIKÁK

Biró Sándor és Dombrádi Viktor

A Southern és Northern blot elve

A blotolás (blotting) eredeti angol jelentése pacázás, ami arra utal, hogy egy membrán felszínén található nukleinsav foltot vizsgálunk. Az eljárás a nukleinsavak szekvencia specifikus hibridizációján alapul. Mint ismeretes a komplementer szekvenciájú nukleinsav szálak egymáshoz hidrogén hidakkal kapcsolódnak és a kapcsolódás specifitása lehetővé teszi, hogy megfelelő módon jelzett nukleinsav próbákkal az általunk keresett génfragmentumot vagy mRNS-t detektáljuk. A genomi DNS vizsgálatára Southern 1975-ben vezette be a később róla elnevezett blotolási eljárást. Úttörő munkásságát Nobel-díjjal jutalmazták. Később vezették be az RNS vizsgálatára alkalmas módszert, amit Northern blotnak neveztek. Az elnevezésben rejlő ellentétes égtájak ellenére a két eljárás között sok hasonlóság figyelhető meg (1. ábra).



1. ábra A Southern (A) és Northern (B) blot lényege

Az ábra mindkét részén nyíllal jelöltük az általunk vizsgálni kívánt DNS darab, illetve mRNS pozícióját az agaróz gélben, illetve a membránon. A számok magyarázata a szövegben található.

Southern blot (1. A ábra):

1. A genomi DNS hasítása restrikciós enzimmal. A DNS feldarabolására nem elsősorban azért van szükség, mert a következő lépés, az agaróz gélelektroforézis nem

alkalmas nagyon nagy méretű DNS darabok szeparálására, hanem sokkal inkább azt a célt szolgálja, hogy nagyobb feloldású, gén szintű információt nyerjünk. Az eljárással ugyanis azonosítható az általunk keresett gén, vagy annak egy része.

2. *A gén darabok méret szerinti elválasztása agaróz gélelektroforézissel.* (A módszert részletesen ismertetjük a DNS vizsgálata agaróz gél elektroforézissel című fejezetben.) A gélben való futtatás során a DNS darabok a molekulaszűrő hatás következtében elválnak egymástól. A DNS sávok etidium bromid festéssel tehetők láthatóvá, azonban a gél gyenge mechanikai sajátságai nem teszik lehetővé, hogy hibridizációval közvetlenül analizáljuk a benne található sávokat.

3. *A DNS mintázat átvitele membránra.* A fent említett problémát úgy oldották meg, hogy a DNS sávokat egy jól kezelhető membrán felületére vitték át. Közben a DNS sávok sokkal kisebb felületen oszlanak meg, így a minta koncentrációja nő. Ez a tulajdonképpeni blotolási lépés. A transzfer előtt (vagy közben) denaturálják a kettős szálú DNS-t, majd rögzítik a mintázatot.

4. *Hibridizálás.* A membrán aspecifikus kötőhelyeinek lefedése után (prehibridizálás) az általunk keresett génre specifikus próbát öntünk a membrán felszínére és megfelelő körülményeket biztosítunk a szekvencia specifikus hibridizáció lejátszódásához.

5. *Detektálás.* A feleslegben lévő próba eltávolítása után a próba jellegétől függő eljárással a membrán felszínén kimutatható a vizsgálni kívánt gént tartalmazó DNS sáv.

Northern blot (1. B ábra)

1. Tekintettel arra, hogy a vizsgálni kívánt mRNS szálak mérete megfelelő nem szükséges azok emésztéssel történő további darabolása. Ezzel szemben el kell végeznünk az mRNS denaturálását, annak érdekében, hogy a következő lépésben a molekulák alakja ne befolyásolja a méret szerinti szétválasztást.

2. Az mRNS szálakat denaturáló körülmények között szeparáljuk agaróz gélelektroforézissel.

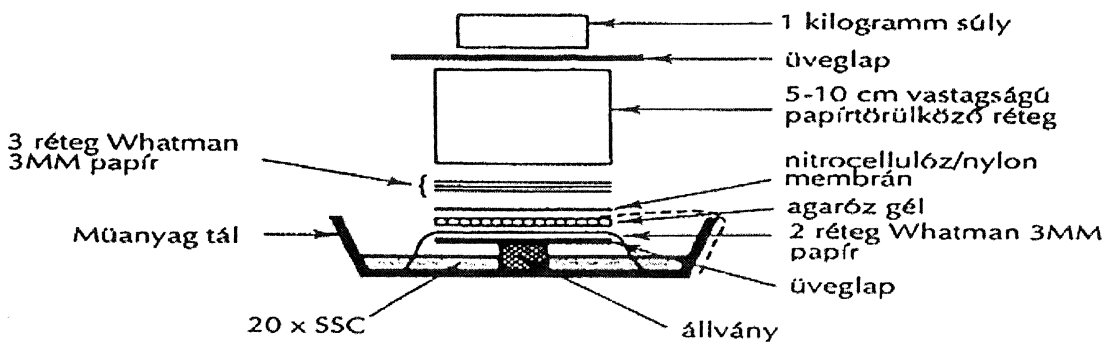
3. A sávok membránra történő átvitele után nem szükséges további denaturációs lépés elvégzése, elegendő a mintázat fixálása.

4. A prehibridizálás és hibridizálás, valamint

5. A keresett sáv detektálása a Southern blot esetében már ismertetett módon történik. Természetesen a Northern blot minden egyes lépése közben ügyelnünk kell az RN-áz mentes körülmények betartására. A fent említett néhány különbségtől eltekintve a Northern blot kivitelezése hasonlít a Southern blotéhoz, így a két eljárás egyes lépéseit az alábbiakban közösen tárgyaljuk.

Transzfer módszerek

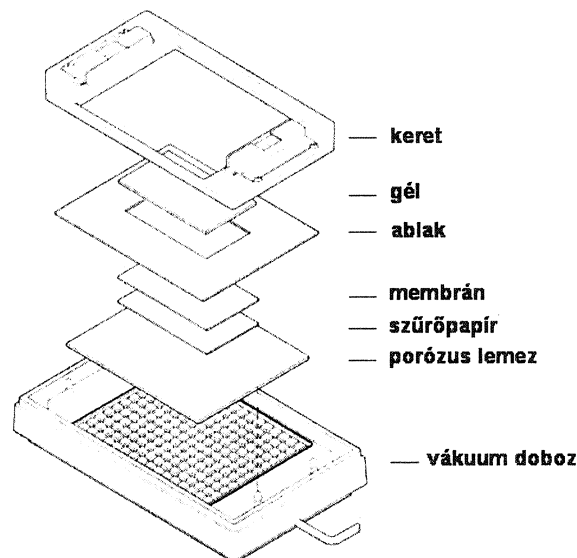
A nukleinsav sávok agaróz gélből membránra történő átvitelére több eljárást dolgoztak ki. A klasszikus módszer a kapilláris erőt használja ki a folyadék mozgatására (2. ábra). A nagy sótartalmú oldatot (20xSSC) Whatman 3MM szűrőpapír csík vezeti az agaróz gélhez és a gélre fektetett membránra a felette található papírtörülköző réteg szívó hatása révén mosódnak át a sávok.



2. ábra Kapilláris transzfer

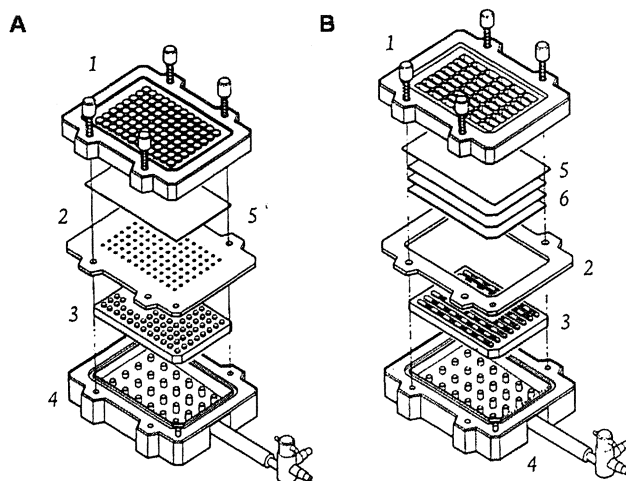
A módszer nagy előnye egyszerűsége, olcsósága és megbízhatósága. Miközben a szűrőpapír réteg telítődik a puffer oldattal folyamatosan elveszíti nedvszívó képességét és végül a transzfer automatikusan leáll. Az eljárás egyetlen hátránya az időigény, megvalósításához általában egy éjszaka (kb10 óra) szükséges.

A transzfer folyamatának meggyorsítására több lehetőség is kínálkozik. A folyadék áramlását nyomással vagy szívással lehet elősegíteni, a DNS vándorlását pedig elektromos feszültséggel lehet gyorsabbá tenni (elektroblot). A lehetőségek közül leggyakrabban a vákuum transzfert alkalmazzák (3. ábra). A módszer gyorsasága mellett külön előnyt jelent az, hogy a transzfer oldatot közvetlenül a gél felszínére pipettázhatjuk, és ily módon jelentősen csökkenthetjük az anyagigényt.



3. ábra Vákuum transzfer berendezés

A blottolás még jobban felgyorsítható oly módon, hogy kihagyjuk a méret szerinti szeparálás lépését. Ekkor az eredeti elnevezésnek megfelelően közvetlenül cseppentjük fel a nukleinsav foltokat a membránra. A folt alakjától függően szoktak beszélni *dot blot* eljárásról, amikor is kör alakú foltokat hozunk létre, illetve *slot blot*-ról amikor lekerekített sarkú téglalap alakú foltokat készítünk. A slot blot foltjainak alakja emlékeztet a gélelektroforézissel nyerhető sávokra. A foltok szabályos elhelyezését a megfelelő alakúra kivágott maszk nyílásai biztosítják, a gyorsaságot vákuum szívó ereje teszi lehetővé (4. ábra). Ezek a módszerek nem adnak információt a target nukleinsav méretéről, csak a keresett gén illetve transzkript gyors kimutatására alkalmasak. Megfelelő kalibrálással a módszer felkantitativvé tehető.



4. ábra. Dot blot (A) és salot blot (B) berendezések.
 1. mintafelvívő maszk, 2. elválasztó keret, 3. alátét lap, 4. szívó aljzat, 5. membrán,
 6. szűrőpapír lapok

A membrán megválasztása

Elsőként *nitrocellulóz* membránt használtak blotolásra. A nitrocellulóz jól köti a DNS-t, azonban mechanikai stabilitása korlátozott, ami nem teszi lehetővé a membrán többszöri lemosását és újrahibridizálását. Külön problémát jelent a nitrocellulóz tűzveszélyessége, ami miatt a 80 °C-on történő fixálási lépést levegő mentes környezetben, vákuum alatt kell végezni. Ezeket a hátrányokat küszöbölte ki a nagy mechanikai stabilitással rendelkező *nylon* membrán bevezetésével, azonban a nylon DNS kötő képessége kisebbnek bizonyult. A legjobb membrán alapanyag a kémiaileg módosított *pozitív töltéseket hordozó nylon*, ami stabilitása mellett nagy nukleinsav kötő kapacitással is rendelkezik.

Depurinálás és denaturálás

Bár a blotolási eljárások célja az, hogy a membránon az agaróz gélben található sávszerkezet pontos mása alakuljon ki, ezt a feltételt nem mindig lehet teljesíteni. A sávok méretkülönbségükből adódóan különböző sebességgel vándorolnak. Így rövid transzfer idővel átmásolhatók a kisebb sávok, miközben a nagyobb sávok átvitele még nem történik meg. A hosszú transzfer idő sem kívánatos, ugyanis a membrán DNS kötő képessége ellenére másik oldalán bekövetkezik a DNS kimosódása. Tehát hosszú transzfer idő esetében jól láthatóvá válnak a nagyobb méretű sávok, miközben a kisebb méretűek elhalványulnak. A probléma megoldására vezették be a depurinálás lépését. Ha a DNS-t savas közegben inkubáljuk purin bázisai véletlenszerűen leszakadnak, és a módosítás helyén bekövetkezik a cukor-foszfát gerinc megszakadása is. Ezért ha a gélt a transzfer előtt savas oldatban áztatjuk a különböző helyzetű sávokban lévő DNS fragmentumok kisebb darabokra töredeznek. A depurinálás után el kell végezni a gél semlegesítését, majd a kettős-szálú DNS lúgos közegben történő denaturálását. Ezután a sávokban levő DNS darabok az eredeti méretüknek megfelelő helyen, de a lecsökkent valódi méretüknek megfelelő sebességgel jutnak át a membránra. A denaturálásra azért van szükség, hogy a későbbi hibridizáció során a jelzett nukleinsav próba hidrogén-hidakat képezhessen az egyes-szálú target molekulákkal. A kivitelezés egy újabb variációját jelenti a lúgos közegben végzett alkalikus transzfer, ami egyben biztosítja a DNS denaturációját is.

Fixálás

A membrán felszínére vitt nukleinsav sávok mintázatát kovalens kötéssel kell rögzíteni. Korábban ezt a membrán kiszáradását követően a membrán 2-3 óra hosszáig 80 °C-on tartásával oldották meg. Mint már említettük nitrocellulóz membrán alkalmazásakor különösen ügyelni kellett a tűzveszélyre. Ezeket a membránokat csak vákuum excikkátorban a levegő kiszívása után lehetett felmelegíteni. Ha nylon, illetve módosított nylon membránnal dolgozunk természetesen nincs szükség a vákuum excikkátor alkalmazására. Egy másik fixálási lehetőséget biztosít az UV fényel történő megvilágítás és a kémiai kötések fotokémiai kialakítása. Erre a célra külön berendezéseket gyártottak, amelyekben az UV fény hullámhossza optimális és intenzitása, valamint a megvilágítás hossza (azaz a besugárzás energiája) szabályozható. A legbiztonságosabb megoldás az, ha mindkét eljárást alkalmazzuk. Fixálás után a száraz membrán több napig tárolható, illetve közvetlenül felhasználható.

Prehibridizálás

Felhasználás előtt a membránt újra meg kell nedvesíteni. Erre a legjobb megoldás az, hogyha a membránt 6xSSC oldat felületére helyezjük és megvárjuk míg magába szívja a nedvességet. Ezután a membránt már be is meríthetjük az oldatba.

A háttér zaj lecsökkentése érdekében meg kell gátolnunk a próba aspecifikus kötődését a membrán reaktív kötőhelyeihez. Ezért indifferens DNS tartalmú és nagy sűrűségű prehibridizációs oldattal előinkubálják a membránt (prehibridizáció). A prehibridizáló oldat készítésére felhasználható a lazac vagy hering spermájából készített genomi DNS, de megfelelő a sokkal olcsóbb tyúkvérből kinyert DNS is. Figyelnünk kell arra, hogy az indifferens DNS-t mechanikai módszerekkel (pld. felmelegítéssel és kis átmérőjű injekciós tűn keresztül történő fel-leszívással) kisebb darabokra tördeljük.

A prehibridizálás ugyanazon berendezésben és ugyanazon körülmények között végezzük, mint a hibridizálást. Alkalmazhatunk vízfürdős rázógépet, amelynek vízterébe legtöbbször külön dobozban nylon zacskóba forrasztva helyezük a membránt és a prehibridizáló oldatot. Sokkal biztonságosabb és anyagtakarékosabb azonban a szorosan záró üvegcsövek befogadására alkalmas légtermosztátos hibridizációs kamra. A csöveket fedő műanyag kupak sokkal biztonságosabban nyitható és zárható mint a nylonzacskó. Mivel a membrán az üvegcső falához simul kisebb térfogatú oldat is elegendő folyamatos mosáshoz, amit a csövek folyamatos forgatásával biztosítunk. A prehibridizációt legalább 3 óra hosszáig kell végezni, gyakori az egy éjszakán át történő prehibridizáció.

Hibridizálás

Hibridizálásra az általunk vizsgálni kívánt nukleinsav szekvenciájával jelentős fokú hasonlóságot mutató DNS, RNS esetleg oligonukleotid próbát használhatunk. A próba jelölése lehet radioaktív, flouoreszens vagy enzimes. Különböző jelölési módszerek kivitelezéséről és alkalmazási lehetőségeiről „A nukleinsav próbák jelölése” című fejezetben adunk tájékoztatást. A jelölt próbát denaturálás után a prehibridizációs oldathoz kell adni, majd a membrán felszínére öntve az oldatot elkezdjük a hibridizálást. A hibridizálást addig végezzük, amíg a membránhoz kötött és az oldatban lévő próba között be nem áll az egyensúly. Ez általában néhány órát vesz igénybe.

A hibridizáció körülményeit a próba és a target szekvencia egymáshoz való viszonya szabja meg. Általános szabály, hogy a próba és a target között kialakuló duplex olvadáspontja (T_m) alatt kell dolgozni. Amennyiben nem ismert pontosan a szekvencia azonosság mértéke célszerű hogy a hibridizációt alacsonyabb szigorúsági fok mellett végezzük, majd több egyre

növekvő szigorúságú mosással folyamatosan távolítjuk el a gyengébben kötődött próba molekulákat a membránból.

A kettős szálú nukleinsavak (DNS vagy RNS homoduplex, illetve DNS-RNS heteroduplex) olvadáspontját és ezzel a hibridizációs körülmények szigorúságát szabályozni tudjuk az oldat só koncentrációjával valamint szerves oldószer hozzáadásával. Általános szabály, hogy magas só koncentrációjú szerves oldószer nem tartalmazó oldattal enyhe hibridizációs körülményeket biztosíthatunk, és ennek megfelelően alacsonyabb só koncentráció és szerves oldószer (pld. formamid) jelenlétében szigorú hibridizációs körülményekről beszélhetünk. A szigorúság mértéke és az oldatok hőmérséklete között mindig egyenes arányosság áll fenn. A legszigorúbb hibridizációs körülmények csak a teljes mértékben komplementer nukleinsav szálak közötti kapcsolódást engedik meg. Ilyenkor a T_m közelében kell dolgozni.

Mosás

A mosás célja a feleslegben lévő, a membránhoz kötött nukleinsavhoz nem kötődő próba eltávolítása. Először is öntsük le a hibridizáló oldatot a membránról és őrizzük meg, ugyanis ez az oldat (különösen nem-radioaktív jelzés esetén) ismételten felhasználható. Ezután tömény sóoldattal öblítsük le a membránt és kezdjük el a mosási folyamatot. A korábban már említett okok miatt célszerű a mosást enyhe körülmények között (magas só koncentráció, alacsony hőmérséklet) elkezdni, majd a mosás szigorúságát fokozatosan növelni. A membránhoz tapadt radioaktív próba mennyiségét kézi számlálóval lehet követni. Minden egyes mosási lépés után célszerű annak hatékonyságát ellenőrizni.

Detektálás

A detektálási módszer a próba jelölésétől függ. Korábban egyeduralkodó volt a radioaktív jelölés. Legtöbbször ^{32}P , ^{33}P vagy ^{35}S β sugárzó izotópokat használtak, és ezek kimutatását autoradiográfiával oldották meg. Manapság egyre inkább tér hódítanak a nem radioaktív jelölési módszerek. A közvetlen fluorescens jelölést kis érzékenysége miatt csak ritka esetben használják, sokkal hatékonyabbak az indirekt és enzimes jelölések. Az utóbbiak közül is nagyon kedvelt a kemilumineszcencián alapuló módszer az úgynevezett ECL. Az enzim által katalizált reakció során keletkező fényfelvillanást fotólemezen lehet rögzíteni. Amennyiben a detektálás során erős háttérrel, illetve túl sok sávot látunk célszerű a mosást magasabb szigorúsági fokon végezni, és az eredményt újra regisztrálni. Így egy olyan adatsort kapunk, amely megmutatja a próbánkkal kisebb, illetve nagyobb szekvencia azonosságot mutató sávokat és foltokat.

Az is elképzelhető, hogy a már egy próbával alaposan letesztelt membránt egy másik próbával is meg kívánunk vizsgálni. Ekkor a membrán felületéről le kell mosni az első próbát, amit leggyakrabban 0,1 % SDS oldatban 5 percig történő főzéssel szoktak megoldani. A membrán többszöri felhasználásának egyik feltétele a mechanikai stabilitás a másik feltétel a próbák reverzibilis kötődése. Az utóbbi csak akkor biztosítható, ha a membránunkat folyamatosan nedves állapotban tartjuk. Ezért nagyon fontos a membránok kiszáradásának elkerülése!

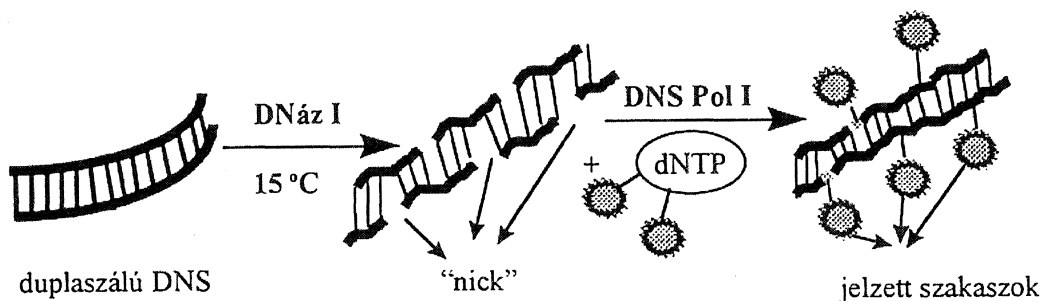
NUKLEINSAV PRÓBÁK JELÖLÉSE

Biró Sándor

A hibridizálásban használatos nukleinsav próbák jelölésére ma már számos izotópos és nem radioaktív módszer áll rendelkezésünkre. A legfontosabb és leggyakrabban alkalmazott eljárásokat foglalom röviden össze az alábbiakban.

Kettősszalú DNS jelölése nick translációval

A "nick" szó jelentése bevágás, bemetszés, s itt a rendkívül alacsony koncentrációban alkalmazott DNáz I enzim által, a kettősszalú DNS molekulában véletlenszerűen létrehozott bemetszésekre utal. A transláció szó jelentése itt eltolás, áthelyezés, s arra utal, hogy az eljárás során a DNáz I által létrehozott bemetszés a DNS polimeráz I enzim működése következtében az eredeti helyéről eltolódik. A DNáz I által létrehozott bemetszések ugyanis szabad 3'-véget hoznak létre, amelyeknél a DNS polimeráz I enzim a mintaként szolgáló szál komplementerét kezdi szintetizálni, miközben 5'>3' irányban maga előtt exonukleáz aktivitásával az 5'-végi nukleotidokat eltávolítja. Ezáltal ezeken a szakaszokon a régi DNS szál újonnan szintetizáltra cserélődik. Amennyiben α -pozícióban jelölt prekursor dezoxiribonukleotidokat (dNTP) használunk, az újonnan szintetizált szál jelölt lesz. Az eljárás kettősszalú DNS molekulák uniformizált jelölésére szolgál. A jelölt nukleotidok mindkét szálba beépülnek. Az eredeti eljárás ^{32}P -jelölt nukleotidokkal való jelölést ír le, de más radioaktívan (^{33}P , ^{35}S) vagy nem radioaktívan (Fluorescein-11-dUTP, biotin, digoxigenin) jelölt nukleotidok, illetve nukleotid analógok is beépíthetők (1. ábra).



1. ábra. A nick transláció elve. A DNáz I bemetszést követi a DNS polimeráz I (DNS Pol I) reakció, ami jelzett nukleotidokat épít be a DNS szálba.

Mivel az eljárás során megtörténhet, hogy a már beépült jelölést is lecseréljük, a beépülés határfoka limitált. Általában az összes jelölt nukleotidnak nem több mint 40-60 százaléka épül be. Magas specifikus aktivitású (3000 Ci/mmol) ^{32}P -jelölt dNTP-t használva a próba specifikus aktivitása azonban így is magas, elérheti a 10^8 cpm/ μg DNS értéket.

A nick transláció kivitelezése

1. Mérje össze az alábbi komponenseket:

jelöletlen dNTP elegy	10 μl (tipikusan 3 jelöletlen nukleotid 20-20 nmol mennyiségének elegye)
nick translációs puffer	5 μl (10 x koncentrációjú)
jelölendő DNS TE pufferben	x μl
$[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dNTP (3000 Ci/mmol)	5 μl (jelölt nukleotid)
enzim elegy	5 μl (DNS polimeráz I és DNáz I)
DNáz mentes víz	25- x μl

2. Inkubálja az elegyet 15 C°-on 60 percig.
3. Állítsa le a reakciót 5 µl 0,2 M EDTA oldattal.

Mivel a beépülés határfoka változó, ezért célszerű meghatározni a beépülés mértékét, illetve eltávolítani a be nem épült radioaktív prekuzort.

A beépülés határfokának meghatározása DE81 ioncserélő papírral

A módszer azon alapul, hogy a DNS sokkal erősebben kötődik a DE81 ioncserélő papírhoz, mint a nukleotidok.

1. 20 µl TE-hez adjon 2 µl mintát a reakcióelegyből.
2. A hígított mintából 4 x 5 µl-t cseppentsen 1 cm átmérőjű Whatman DE81 ioncserélő papírkorongra.
3. 2 korongot szárítson meg infravörös lámpa alatt.
4. A másik 2 korongot mossa 2 x 5 percig 2 x SSC-ben, öblítse le desztvízzel és mossa etanolban 5 percig, majd szárítsa meg őket.
5. Szcintillációs oldatban mérje meg a korongok radioaktivitását.
6. A mosott korongokban a DNS-be beépült radioaktivitást, a nem mosott korongokon pedig az összes radioaktivitást mérheti. A kettő hányadosa adja a beépülés mértékét.

A beépülés határfokának meghatározása triklór ecetsavas (TCA) kicsapással

Az eljárás alapja az, hogy a nukleinsavak TCA-val kicsaphatók, míg a nukleotidok oldatban maradnak.

1. Vegyen a reakcióelegyből mintát (0,5 -1 µl) és hígítsa 20 µl 20 mM EDTA-val (pH = 8,0).
2. A hígított elegyből 10-10 µl-t adjon két Eppendorf csőbe előre kimért 200 µl 20 mM EDTA és 50 µl hordozó DNS (pl. 100 µg/ml borjú tímusz DNS) oldatához.
3. Mindkettőből cseppentsen ki 10-10 µl-es részleteket az összes radioaktivitás méréshez két nitrocellulóz membránda- rabra.
4. A maradékhoz adjon 2-2 ml 10 %-os TCA-t, s jégfürdőn hagyja állni 15 percig.
5. Vákuum szűrje a csapadékot nitrocellulóz filterre, s mossa hatszor 2 ml 10 %-os TCA-val.
6. Határozza meg a 3. lépésben vett minták és az 5. lépésben nyert mosott csapadék radioaktivitását, s számolja ki a beépülés határfokát.

A próbába be nem épült nukleotidok eltávolítása Sephadex G-50 kromatográfiával

A be nem épült nukleotidok eltávolítása ennél a jelölési módnál ajánlatos, mivel a be nem épült hányad viszonylag magas, s emiatt a hibridizáció során a háttér is magas.

Ekkor a próbát egy kicsiny, pl. 1 ml-es Eppendorf pipettahegyben öntött Sephadex G-50 oszlopon bocsátja át, amikor is a be nem épült kis molekulatömegű jelölt nukleotid az oszlopról csak sokkal később eluálható, mint a nagyobb molekulatömegű jelölt DNS. A kísérlet elvégezhető hagyományos elúcióval is, de manapság inkább a módszer egy centrifugálással kombinált gyors változatát használjuk.

1. Készítsen egy 1 ml-es Eppendorf pipettahegyben TE-pufferrel ekvibrált Sephadex G-50 oszlopot a következőképpen. Egy 1 ml-es Eppendorf pipettahegy végébe helyezzen steril üvegyapotot vagy vattadugót. Töltse meg a pipettahegyet TE-pufferrel ekvibrált Sephadex G-50-nel. Helyezzen egy 1,5 ml-es Eppendorf centrifugacsövet egy 15 ml-es kónikus centrifuga csőbe s ebbe állítsa bele a Sephadex oszlopot. 1600 g-vel centrifugálja 5 percig, majd az oszlop tömörödése miatt ismét töltse fel Sephadex G-50-nel. Ismételje meg a centrifugálást. Cserélje ki az Eppendorf centrifugacsövet. 50 µl TE puffert az oszlopra felvive centrifugálás után ellenőrizze, hogy az oszlopról 50 µl körüli folyadék jön le.

2. Vigye fel az oszlopra a jelölési reakcióelegyet, s tiszta Eppendorf csövet használva centrifugálja az előbbieik szerint. Az Eppendorf csőben a be nem épült nukleotidtól elválasztott jelölt próba gyűlik össze.

A próbába be nem épült nukleotidok eltávolítása a jelölt DNS szelektív kicsapásával

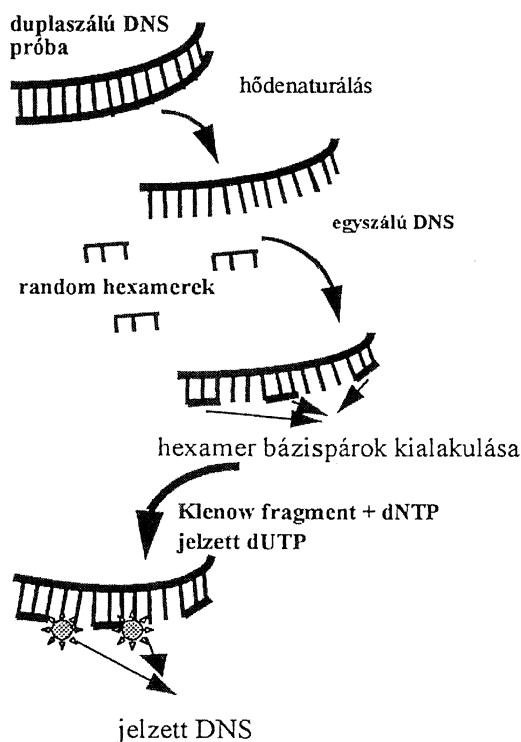
A DNS etanolos lecsapásával is elválaszthatja a jelölt DNS-t a be nem épült nukleotidtól.

1. Adjon 1 térfogat 4 M ammónium acetátot (pH= 4,5) a reakcióelegyhez, s keverje össze.
2. Adjon hozzá 4 térfogat etanolt, és tartsa -70 C°-on legalább 30 percig.
3. A minta kioldása után centrifugálja 15 percig maximális fordulattal (kb.12000 rpm) szobahőmérsékleten Eppendorf centrifugában, majd a felülúszót óvatosan öntse le.
4. Mossa az üledéket szobahőmérsékleten 0,5 ml 0,67 M pH = 4,5 ammónium acetát, 67 % alkohol oldattal , majd centrifugálja, s a felülúszót öntse le.
5. Mossa az üledéket 90 %-os alkohollal, és szárítsa meg.
6. A próbát oldja TE pufferben.

Mivel a jelölt próba kettősszálú, hibridizáció előtt hődenaturálni kell (pl. 95 C°-on 5-10 percig történő inkubálással).

Nukleinsavak jelölése random szekvenciájú oligonukleotid primerek felhasználásával

Az eljárás azon alapul, hogy amennyiben egyszálú nukleinsavhoz rövid oligonukleotidok kötődnek, azok a nukleinsavon mint templáton a DNS polimerázok számára a szintézist iniciáló primerként szolgálnak. Így módon a komplementer szál megszintetizálható. Amennyiben az oligonukleotidok szekvenciája véletlenszerű, a templáton több helyen is megtapadnak, s az 5'-végi szekvencia kivételével, a teljes templát lemásolódik (2.ábra). Ha a szintézis során valamelyik nukleotid az α -pozícióban jelölt, nagy specifikus aktivitású próbák állíthatók elő.



2. ábra. DNS jelölése random szekvenciájú hexamer bázispárok kötődése a templáthoz oligonukleotidok segítségével. Hődenaturálás után a jelzett nukleotidot (pld. jelzett dUTP-t) a DNS polimeráz I Klenow fragmentuma (Klenow fragment) segítségével építik be az újonnan szintetizált szálba.

Random oligonukleotidként kezdetben mesterségesen szintetizált hexamereket használtunk, újabban ezeket oktamerekkel és nonamerekkel helyettesítik.

Az alkalmazott DNS polimeráz a templáttól függ, RNS templát esetén RNS függő DNS polimeráz (reverz transzkriptáz), illetve DNS templát esetén az *E. coli* DNS polimeráz I enzim egy olyan fragmentuma (az ún. Klenow fragment), amely nem rendelkezik 5' > 3' exonukleáz aktivitással. Az 5' > 3' exonukleáz aktivitás hiánya azért fontos, mert ez az enzim így nem képes az újonnan szintetizált szál eltávolítására (ld. nick transláció), s így nagyobb specifikus aktivitású próba állítható elő.

Mivel templát csak egyszálú nukleinsav lehet, a jelölés előtt a kettősszálú DNS-t denaturálni kell.

Ezzel a módszerrel nagyon kis mennyiségű templát (25 ng) jelölhető igen nagy specifikus aktivitással (10^9 cpm/ μ g DNS), nagyon rövid idő alatt (5-30 perc). Mivel a beépülés határfoka is magas, általában nincs szükség a be nem épült nukleotidok eltávolítására sem. Amennyiben ez mégis szükséges, a beépülés határfoka, ill. a nem inkorporálódott nukleotidhányad a nick translációnál leírt módon meghatározható, ill. eltávolítható.

Egy tipikus jelölési reakció lépései

1. Mérje össze az alábbi komponenseket:

Jelölendő DNS (25 ng) TE pufferben	10 μ l
Oligonukleotid primer keverék	5 μ l
Steril desztillált víz	16 μ l
Denaturálás 95 C°-on, 5 perc.	

2. Centrifugálással gyűjtse az oldatot a cső aljára, s szobahőmérsékleten adja hozzá az alábbi oldatokat:

Jelöletlen nukleotidok (250 μ M)	4-4 μ l
Reakció puffer	5 μ l
Jelölt nukleotid ([α - ³² P]dATP, 3000 Ci/mmol)	5 μ l
Klenow fragment	2 μ l

3. Óvatosan keverje össze, majd centrifugálással gyűjtse az oldatot a cső aljára, s inkubálja 37 C°-on 10 percig.

4. Állítsa le a reakciót 5 μ l 0,2 M EDTA-val.

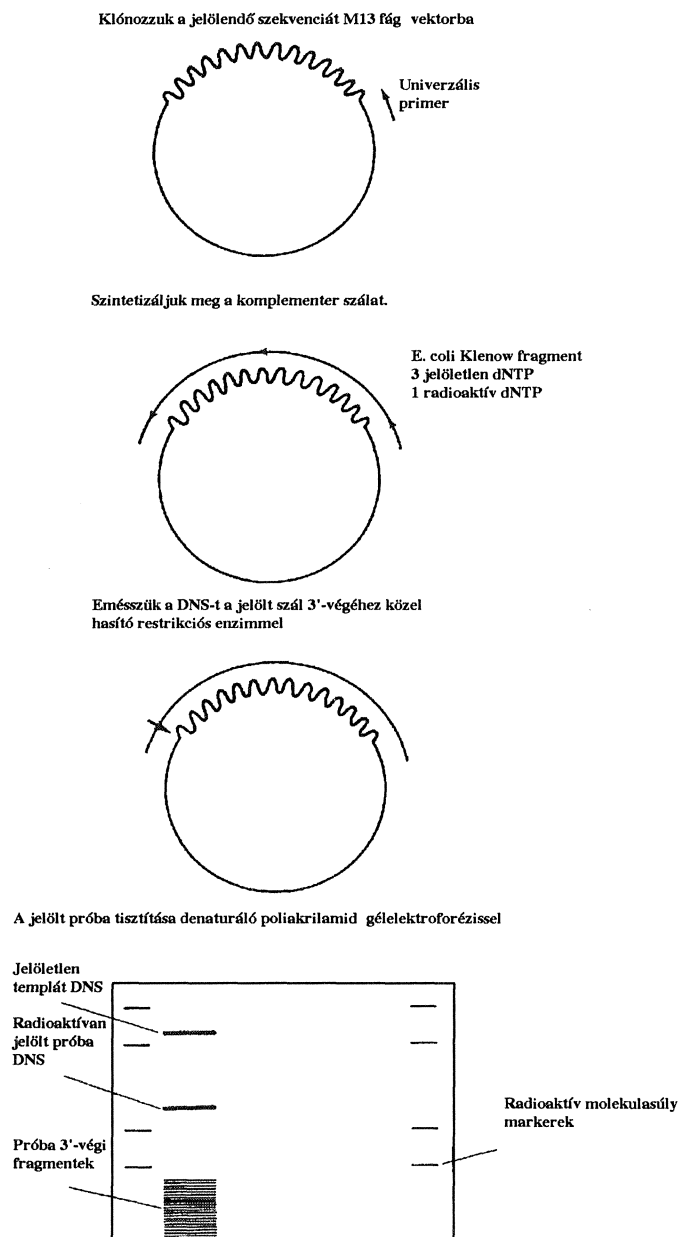
Az így jelölt próba további tisztítást általában nem igényel. A beépülés hatékonyságát az előző fejezetben ismertetett eljárásokal lehet meghatározni. A hibridizációban való felhasználás előtt természetesen szükség van a próba denaturálására.

Egyszálú nukleinsav próbák előállítása

Az egyszálú próbák használata több szempontból is előnyösebb a hagyományos kettősszálú próbáknál. Ilyenkor ugyanis nem áll fenn a jelölt próba két szála közötti hibridizáció lehetősége, ami növeli a detektálás érzékenységét. Ez különösen egymástól távoli fajok homológ génjeinek detektálása esetén jelentős. Ugyancsak előnyös használatuk S1 nukleáz térképezéskor, ahol DNS-RNS hibridek vizsgálata a cél, s nem kell a DNS-DNS hibridek keletkezésével számolni, illetve azok keletkezését gátló reakciókörülményeket alkalmazni. Az egyszálú próbák segítségével a transzkripcióra kerülő szál is könnyen azonosítható.

Egyszálú DNS próba szintézise M13 fág vektorba (vagy phagemid vektorba) klónozott DNS fragmentumról

Az eljárás során a rekombináns M13 bakteriofághoz rövid oligonukleotidot hibridizálnak, s ezt primerként használva a klónozott DNS fragmentum komplementerét megszintetizálják. A primer általában a poliklónozó hely melletti *lac Z* génnel homológ. Ezt az oligonukleotidot több cég is forgalmazza univerzális primer néven. Az eljárás lépéseit az 3. ábrán mutatjuk be. A komplementer szálát Klenow fragmenttel szintetizáljuk. A reakció során valamelyik dezoxi-ribonukleotid α -helyzetben jelölt, pl. ^{32}P -vel. A prekursor nukleotidok koncentrációjának megválasztásával olyan reakciókörülményeket alkalmazunk, hogy parciálisan duplaszálú DNS molekulát kapjunk. Ezt a terméket emésztjük egy olyan restriktív enzimmel, amelynek felismerőhelye vagy a klónozott fragmentumon belül, vagy közvetlenül utána található. A próba a templáttól és az emésztés során keletkezett rövid jelölt fragmentumoktól denaturáló poliakrilamid gélelektroforézissel elválasztható. A módszerrel 10^9 cpm/ μg DNS specifikus aktivitás érhető el.



3. ábra. Egyszálú DNS próba szintézise

A jelölési reakció kivitelezése

1. Mérje össze a következő komponenseket:

egyszálú templát DNS (0,5 pmol)	1 µg
univerzális primer	5 pmol
10 x Klenow puffer	3 µl
és desztvízzel egészítse ki	20 µl -re

2. Az elegyet vízfürdőn melegítse fel 85 C°-ra, és hagyja lassan lehűlni 37 C°-ra. Ekkor a primer a templáthoz kötődik.

3. Adja a reakcióelegyhez a következő oldatokat:

0,1 M dithiotreitol	2 µl
[α- ³² P]dATP (3000 Ci/mmol, 10 µCi/µl, 16 pmol)	5 µl
4 µM dATP (jelöletlen)	1 µl
20 mM dCTP, dGTP, dTTP	1 µl

4. Összekeverés után vegyen ki 0,5 µl mintát és adja 20 µl 20 mM EDTA-hoz. Tegye félre a beépülés mértékének meghatározásához.

5. Adjon a reakció elegyhez 5 egység Klenow fragmentet és inkubálja szobahőmérsékleten 30 percig.

6. Ismét vegyen mintát a beépülés monitorozására a 4. lépés szerint.

7. Adjon az elegyhez 1 µl 20 mM jelöletlen dATP-t s inkubálja szobahőn további 20 percig. A dATP koncentrációjának jelentős megemelése biztosítja, hogy a megkezdett láncszintézisek tovább folytatódva túlhaladjanak a kiválasztott restrikciós enzim felismerési helyén.

8. Ezalatt az idő alatt határozza meg a beépülés mértékét TCA precipitációval.

9. Inaktiválja a Klenow enzimet 68 C°-on 10 percig, s állítsa be a reakcióelegy NaCl koncentrációját az emésztéshez kiválasztott restrikciós enzimnek megfelelően.

10. Emésztse a DNS-t 20 egység restrikciós enzimmel 1 óráig (lásd Restrikciós analízis c. fejezetet).

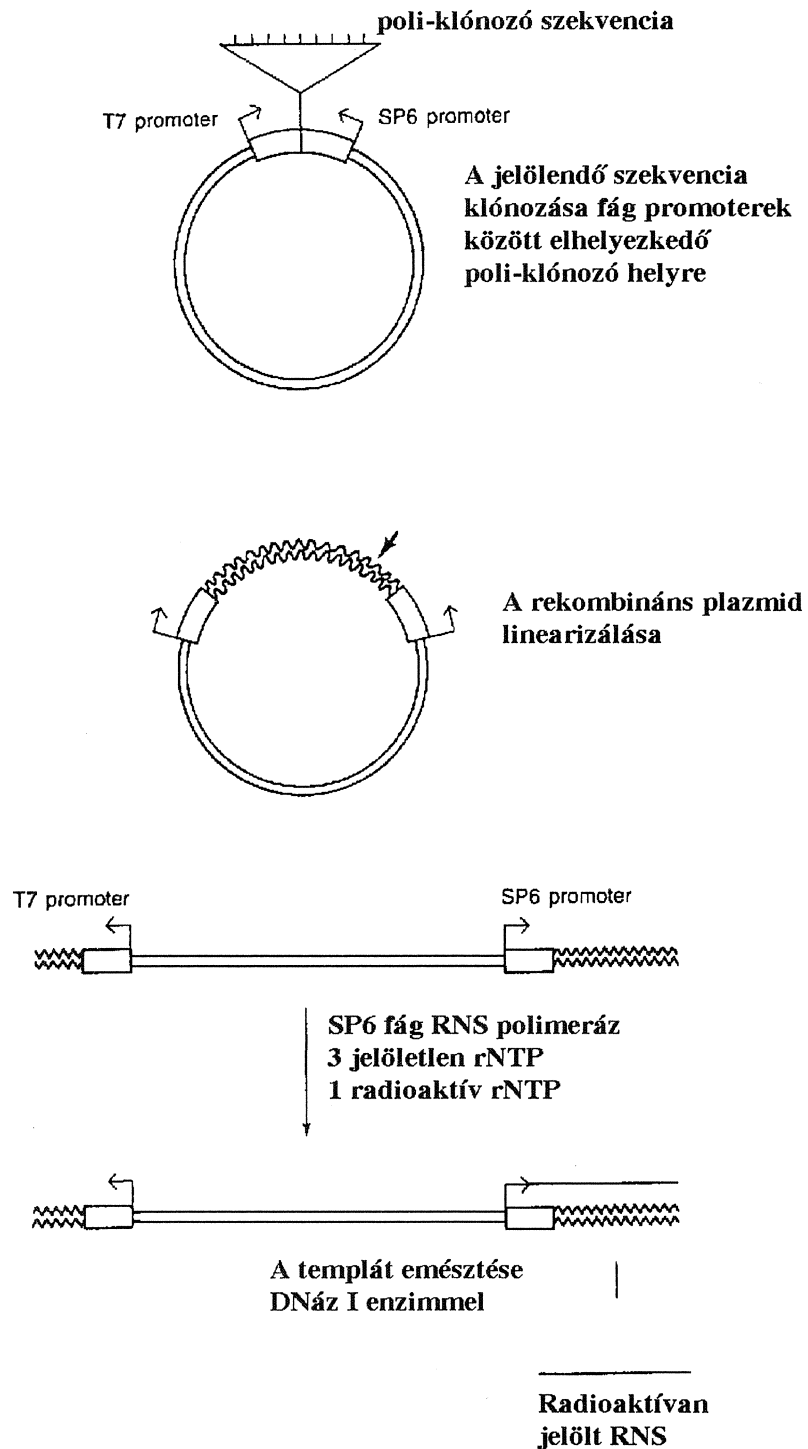
11. Tisztítsa a DNS-t fenol/kloroform extrakcióval.

12. Futtassa a mintát denaturáló poliakrilamid gélen.

13. Határozza meg a jelölt fragmentum pozícióját autoradiográfiával, s izolálja a jelölt fragmentumot a gélből.

RNS próba szintézise *in vitro* transzkripcióval bakteriofág promoterekről

Az eljárás olyan plazmid vektorok használatán alapszik, amelyekben a poliklónozó hely két oldalán, a klónozó helyek felé mutató orientációban *Salmonella typhimurium* SP6, *E. coli* T7 vagy T3 bakteriofágok promoter szekvenciái találhatóak. Ezen promoterek legfontosabb jellemzője, hogy nagy hatásfokkal átíródó, un. erős promoterek, s a hozzájuk tartozó DNS függő RNS polimeráz nagy specifitással, csakis ezekről képes a transzkripció elindítására. Így, amennyiben egy alkalmas restrikciós enzimmel linearizáljuk a plazmidot, *in vitro* transzkripció során az RNS szintézis a promoterről indulva minden esetben a lineáris molekula végén fejeződik be, s a szintetizálódó RNS a klónozott DNS fragmentum egyik szálának komplementere. Ezek a próbák a hagyományos nick translációval vagy random iniciációval jelölt duplaszálú DNS próbákkal szemben az egyszálú DNS próbáknál említett előnyökön túlmenően további előnyökkel is rendelkeznek. Ezek közül különösen jelentős, hogy a próba a templát DNS-től DNáz I emésztéssel megszabadítható, feleslegessé téve a nehézkes elektroforetikus tisztítást. Előny továbbá, hogy az RNS hibridek nagyobb stabilitása miatt a szignál erősebb mint a hasonló specifikus radioaktivitású DNS próba esetén. Az eljárás lépéseit a 4. ábrán mutatjuk be.



4. ábra. RNS próba szintézise

A jelölési reakció kivitelezése

1. Készítsen 2 pmol linearizált templát DNS-t a klónozott fragmentumot tartalmazó rekombináns plazmid emésztésével. A restriktions emésztés teljes végbemeneteléről gélelektroforézissel győződjön meg. Célszerű olyan enzimet választani, amely tompa véget ad. Ha ez nem lehetséges, (elsősorban a túlnyúló 3'-vég esetében) a túlnyúló véget Klenow enzimmal töltse fel. Végül tisztítsa a fragmentumot fenol/kloroform kezeléssel és alkoholos lecsapással.

2. Mérje össze a reakcióelegyet szobahőmérsékleten a következő sorrendben:

RNáz mentes desztillált víz	0,4 μl
Templát DNS (kevesebb mint 1 μl)	0,2 pmol
(27g 3 kb plazmid DNS kb 1 pmolnal felel meg)	
1 M dithiotreitol	0,1 μl
rATP, rUTP, rCTP (5-5 mM)	1 μl
10 x transkripció puffer	1 μl
RNáz inhibitor (10 egység)	0,5 μl
BSA (V. frakció, Sigma) 2 mg/ml	0,5 μl
[α- ³² P]rGTP (3000 Ci/mmol, 10 μCi/μl)	5 μl
DNS függő RNS polimeráz (10 egység)	1 μl

és inkubálja az alkalmazott enzimnek megfelelő hőmérsékleten 1-2 óráig (37 C°-on *E. coli* T7 és T3 polimerázok, ill. 40 C°-on *S. typhimurium* SP6 polimeráz használata esetén).

3. Ezután adjon az elegyhez 1 μl RNáz mentes DNáz I enzimet, s inkubálja 37 C°-on 15 percig.

4. Adjon hozzá 100 μl RNáz mentes vizet, s tisztítsa az RNS-t fenol/kloroform extrakcióval.

5. A vizes fázist vigye át tiszta csőbe s adjon hozzá 20 μl 5 M ammónium acetátot, majd 250 μl jéghideg etanolt. Tartsa -20 C°-on 30 percig, s centrifugálja le a DNS-t.

6. Szárítsa meg a csapadékot, oldja fel 100 μl vízben, adjon hozzá 200 μl jéghideg etanolt, s tárolja felhasználásig -70 C°-on. Felhasználás előtt ebből a próba ammónium acetát hozzáadásával újra kicsapható.

A DNS lánc végének jelölése

Az eddigiekben olyan jelölési módszereket tárgyaltunk, amelyekben a jelölés DNS vagy RNS polimerázok működésének eredményeként részben vagy teljes egészében újonnan szintetizált nukleinsav molekulákba épül be, s ennek megfelelően a jelölés eloszlása a molekulában egyenletes. Az alábbiakban röviden olyan jelölési eljárásokat tárgyalunk, amelyekben a detektálható szignált a polinukleotid lánc végéhez kapcsoljuk.

Kettősszalú DNS fragmentum 3'-végének jelölése Klenow enzimmel

Az eljárás olyan DNS restrikciós fragmentumok jelölésére alkalmas, amelyek 5' túlnyúló véggel rendelkeznek. Ilyenkor az enzim a fragmentum 3'-végi hidroxil csoportjához köti az újonnan beépülő nukleotidokat. A reakciót kivitelezhetjük egyetlen radioaktívan jelölt nukleotiddal. Ilyenkor a jelölt nukleotid megválasztása függ az alkalmazott restrikciós enzimtől. Mint az alábbi egyenlet mutatja, *EcoRI* enzimmel emésztett DNS esetén a jelölt nukleotid dATP kell legyen:



Amennyiben a jelölt nukleotid mellett a másik 3 nukleotidot is hozzáadjuk a reakcióelegyhez, akkor tulajdonképpen végfeltöltési reakció játszódik le.

A fenti reakcióban a DNS molekula mindkét szálának 3'-vége jelölődik. Ha a DNS molekula két végén kettős emésztés eredményeként eltérő restrikciós hasítóhelyek találhatók, alkalmasan megválasztott enzimek és jelölt nukleotid felhasználásával lehetséges csak az

egyik szál specifikus jelölése is. (Pl. *Bam*HI és *Hind*III kettős emésztés esetén [α - 32 P]dGTP az egyik, [α - 32 P]dATP a másik szálát jelöli.)

Egy tipikus jelölési reakció lépései

1. Emésszen 1 μ g DNS-t 25 μ l pufferben.
2. Adjon hozzá 10 μ Ci (3000 Ci/mmol) megfelelően megválasztott jelölt dNTP-t.
3. Adjon hozzá 1 egység Klenow enzimet és inkubálja szobahőmérsékleten 15 percig.
4. Állítsa le a reakciót 5 percig 70 C $^{\circ}$ -on való inkubálással.
5. Távolítsa el a be nem épült jelölt nukleotidot a korábbiakban leírtak szerint (Sephadex G-50 kromatográfia vagy alkoholos lecsapás).

DNS 5'-végének jelölése T4 polinukleotid kinázzal (PNK)

A T4 PNK mind egyszálú, mind kettősszálú DNS molekula 5'-végének jelölésére használható. A reakcióban a nukleotid a radioaktív foszfor izotópot γ -helyzetben kell tartalmazza, mivel az enzim a reakció körülményektől függően vagy a szabad 5'-hidroxil csoportot kapcsolja a γ -helyzetű foszfát csoportot, s nukleozid difoszfát keletkezik, vagy pedig cserereakciót katalizál az 5'-végi foszfát és a γ -helyzetű foszfát között.

Szabad 5'-hidroxil csoport található általában a mesterségesen szintetizált oligonukleotidok végén, illetve létrehozható a DNS restrikciós fragmentumok defoszforilálásával. Erre a célra bakteriális eredetű vagy borjú bél alkalikus foszfatáz (calf intestine alkaline phosphatase = CIAP) használnak. Az utóbbi előnye, hogy hővel inaktiválható. A reakciók megtervezésekor vegyük figyelembe, hogy 1,6 \times 10 6 kb lineáris DNS kb 1 pmol 5'-(illetve 3'-) végnek felel meg.

A jelölési reakció kivitelezése

1. Mérje össze az alábbi komponenseket:

5'-defoszforilált DNS szubsztrát (10 pmol)	29 μ l
10 x kináz puffer	5 μ l
[γ - 32 P]ATP (3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml)	15 μ l
T4 PNK (10 egység/ μ l)	1 μ l
steril desztillált víz	4 μ l

és inkubálja 37 C $^{\circ}$ -on 30 percig.

2. Állítsa le a reakciót 2 μ l 0,5 M EDTA-val.

3. Határozza meg a beépülés mértékét és távolítsa el a be nem épült radioaktív nukleotidot a korábban már ismertetett módon.

DNS 3'-végének jelölése terminális dezoxinukleotidil transzferázzal (TdT)

Az enzim mind egyszálú, mind kétszálú DNS molekulák 3'-hidroxil csoportjához további mononukleotidokat tud hozzákapcsolni. Így amennyiben azok α -helyzetben radioaktívan jelöltek, a DNS 3'-vége jelölődik. A reakcióelegytől függően vagy homopolimer fark jön létre, vagy (3'-deoxi nukleotid alkalmazásakor) egyetlen jelölt nukleotid kapcsolódik a molekulához.

A jelölési reakció lépései

1. Mérje össze a következő reakcióegyenletet:

5 x TdT puffer	4 μ l
DNS szubsztrát (2 pmol 3'-vég)	1 μ l
[α ³² P]dNTP (3000 Ci/mmol)	2 μ l
TdT (20 egység/ μ l)	1 μ l

2. Inkubálja 37 C°-on 1 óráig.

3. Állítsa le a reakciót 10 percig 70 C°-on való inkubálással.

4. Határozza meg a beépülés mértékét és távolítsa el a be nem épült nukleotidot a már ismert módon.

Az eddig leírt legfontosabb és leggyakrabban használt radioaktív jelölési módok skálája korántsem tekinthető teljesnek. Ezekon kívül még számos más jelölési eljárás ismert. Végezetül fel szeretném hívni a figyelmet egy egyre gyakrabban használatos eljárásra (anélkül, hogy elvi, vagy metodikai részletekkel szolgálnék, hisz ez a jegyzet egy másik fejezetében megtalálható). Ez a DNS próbák jelölése polimeráz láncreakcióban (PCR).

Nukleinsav próbák nem radioaktív jelölése

A molekuláris biológia elmúlt évtizedekben tapasztalt rendkívül gyors fejlődése kétségtelenül elválaszthatatlan és elképzelhetetlen a fentebb leírt hagyományos, nagy érzékenységű nukleinsav jelölési és detektálási módszerek nélkül. Széleskörű elterjedésük azonban egyre inkább kikövetelte hasonló érzékenységű, alternatív, *nem radioaktív detektálási módszerek* kidolgozását, hiszen a radioaktív izotópok használatának számos hátrányos következménye van.

(1) Egyes izotópok rövid felezési ideje.

(2) Az izotópok egészségkárosító és környezetszennyező hatásai.

(3) Emiatt szükséges a kezelési/alkalmazási, tárolási és megsemmisítési rendszabályok szigorú betartása és ellenőrzése.

Napjainkban már számos, a radioaktív detektáláshoz hasonló érzékenységű nemradioaktív eljárás áll rendelkezésre. Ezek legtöbbször a nukleinsav próbák jelölése a már jól ismert radioaktív jelölési eljárásokhoz hasonlóan történik, azzal a különbséggel, hogy radioaktívan jelölt nukleotid helyett valamilyen nem radioaktív nukleotid analógot építünk be a próbába (nick translációval, vagy random iniciált DNS szintézissel, egyszálú DNS próba szintézisekor M13 vektorban vagy egyszálú RNS próba szintézise során bakteriális promoterekről), illetve kapcsolunk a molekula végéhez valamelyik végjelölési eljárással.

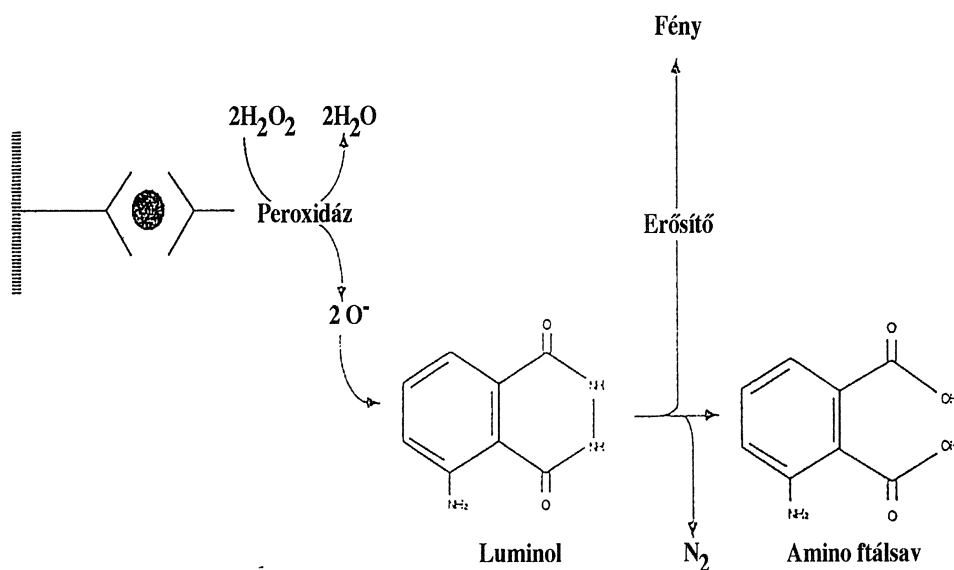
Fluoreszcens jelölés

Fluoreszcensen jelölt nukleotidanalógokat (pl. fluorescein-11-dUTP) építhetünk be a próbába, melyeket a gerjesztéskor kibocsájtott fény alapján detektálunk. A fluoreszcencia intenzitása az etidium bromidos festéshez hasonló módon fényképezéssel rögzíthető és kvantifikálható.

Nukleinsav jelölése enzim fehérjével

Az eljárás azon alapszik, hogy a nukleinsav próbához olyan enzimet kötünk (közvetlenül, vagy közvetve), amelynek aktivitása könnyen detektálható. Erre a célra leggyakrabban torma peroxidázt (Horse Radish Peroxidase: HPR) és alkalikus foszfatázt

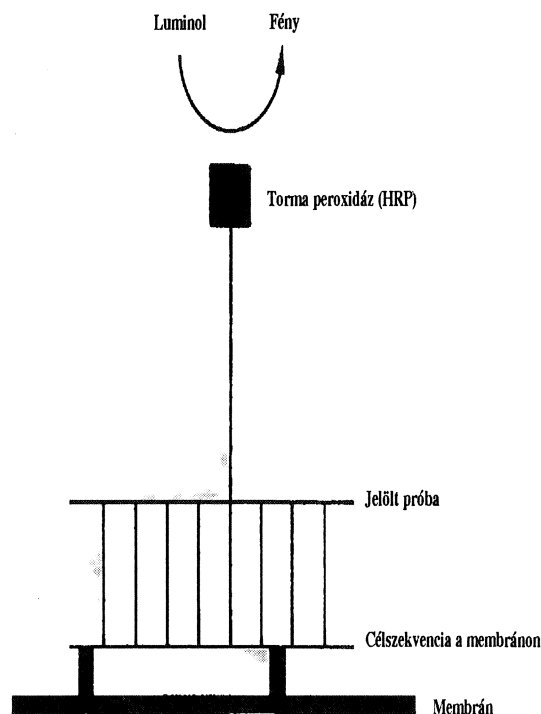
használnak. Mindkét enzimnek ismeretesek és használatosak kemilumineszcencián alapuló (5. ábra) illetve színes csapadékképzésen alapuló detektálási lehetőségei.



5. ábra. A peroxidáz enzim kemilumineszcenciás kimutatása

Közvetlen jelölési módszer

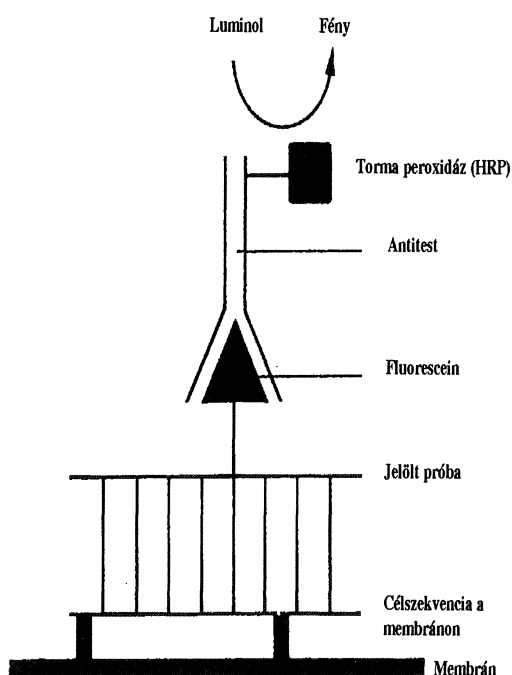
Ebben a jelölési eljárásban a próbához (denaturált DNS-hez vagy egyszálú DNS-hez illetve RNS-hez) vagy az eltérő töltés alapján, vagy valamilyen kémiai reakcióval, közvetlenül kapcsoljuk az enzimet, amelyet a hibridizáció után detektálunk (6. ábra).



6. ábra. Peroxidázzal közvetlenül jelölt próba detektálása

Közvetett jelölési módszer

Valamilyen hapténnel módosított nukleotidot építünk be, vagy kapcsolunk a nukleinsav próbához. A leggyakoribb ilyen haptén a digoxigenin, biotin és a fluorescein-11-dUTP. A beépített haptének nagy érzékenységgel detektálhatók valamilyen enzimmel konjugált ligandummal. Ez a ligandum a biotin esetében avidin vagy streptavidin, melyek szinte a kovalens kötés erősségével kapcsolódnak a biotinhoz, illetve digoxigenin és fluorescein-11-dUTP esetében monoklonális vagy poliklonális antitestet (7. ábra).



7. ábra. Peroxidázzal közvetve jelölt próba detektálása. A fluoreszcinnel közvetlenül jelölt próbához peroxidázzal konjugált antifluorescein antitestet kötődik.

Az alábbi fejezetekben ismertetjük a hibridizáción alapuló kísérletek kivitelezését.

DNS PRÓBA JELÖLÉSE ÉS ALKALMAZÁSA SOUTHERN HIBRIDIZÁCIÓBAN

Kókai Endre és Dombrádi Viktor

DNS próba jelölése

A kísérlet során a keresett génnek megfelelő cDNS-ből restriktív enzimekkel kihalásított, a hibridizáció szempontjából specifikus DNS fragmentumot használunk próbaként. A meghasított cDNS darabjait agaróz gélelektroforézis segítségével választjuk el egymástól, és etidium bromidos festés után a gélből izoláljuk a megfelelő méretű sávot. A jelölést a random primerek módszerével az ún. Rediprime kit segítségével végezzük. A kit tartalmazza a reakcióhoz szükséges komponenseket (enzim, puffer, random oligonukleotidok és nukleotidok a DNS szintéziséhez). Nekünk csak a jelzett nukleotidot és a jelölendő DNS-t kell a reakció közeghez biztosítani. Munkánk során ^{32}P -vel jelzett radioaktív dCTP-t használunk. Ha a jelölendő DNS rövid (néhány száz bázispár hosszúságú) a hatékonyság növelése érdekében a random oligonukleotidok mellé célszerű a target szekvenciára specifikus oligonukleotid primereket is adni a közeghez.

A próba készítés céljából agaróz gélelektroforézissel elválasztott cDNS darabot Blocktherm készülékben $100\text{ }^\circ\text{C}$ -on 5 percig denaturálja, majd hűtse le $37\text{ }^\circ\text{C}$ -ra. $37\text{ }^\circ\text{C}$ -on 30 μl kétszer desztillált steril vízben oldja fel a Rediprime kit komponenseit. Adjon hozzá 5 μl [$\alpha\text{-}^{32}\text{P}$] dCTP izotópot 1-1 μl specifikus oligonukleotid primert, és indítsa el a reakciót 15 μl denaturált jelölendő DNS-t tartalmazó oldattal. Összekeverés után a jelölést 1 óra hosszáig $37\text{ }^\circ\text{C}$ -on végezze. *Munkája során kövesse az izotóp kezelésére vonatkozó szabályokat!* 1 óra leteltével higítsa a közeget deszt. vízzel 200 μl -re.

A reakció hatékonyságának ellenőrzésére pipettázzon 2 μl mintát szcintillációs számláló edénybe, és határozza meg radioaktivitását. A maradék oldatot tisztítsa Sephadex G-25 M oszlopon. Az előre előkészített kis oszlopra vigye fel a mintát, és centrifugálással (max. 3000 rpm fordulatszámon) hajtja keresztül a tölteten a folyadékot. Az oszlop aljára helyezett Eppendorf csőben fogja fel a tiszta jelzett próbát. A reakció során feleslegben maradt radioaktív dezoxiribonucleotid visszamarad a gélben. Ezután 2 μl mintát ismét pipettázzon számláló csőbe a radioaktivitás méréshez. A tisztítás utáni és előtti beütésszám hányadosából megállapíthatja a jelölés hatékonyságát. A tisztítás után mért adatból kiszámíthatja a próbával bevihető összes radioaktivitás értékét is. A próbát denaturálja 5 percig $100\text{ }^\circ\text{C}$ -os homokfürdőben és felhasználásig tárolja jégen.

Southern blot

Az agaróz gél előkészítése

A restriktív enzimekkel emésztett genomi DNS fragmentumokat 1% agaróz gélben végzett elektroforézissel választjuk el. A gél képét etidium bromidos festéssel tesszük láthatóvá és szkenneléssel dokumentáljuk az eredményt. Ezután *depurinálás* céljából a gél rázassa 0,25 M koncentrációjú sósav oldat alatt 10-15 percig. A közeg pH változását a jelzőfesték kék színének sárgára való változása jelzi. Ezután távolítsa el a sósav oldatot és steril desztillált vízzel kétszer öblítse le a gél. Ezután következik a DNS *denaturálása*. Öntsön a gélre 0,5 M NaOH és 1,5 M NaCl tartalmú oldatot és óvatosan rázassa 30 percig. Ekkor megfigyelheti a jelzőfesték kék színének visszaállását.

Vákuum transzfer

Vágjon ki a gél oldalainál kb. 0,5 cm-rel nagyobb Hybond-N⁺ pozitív töltésű nylon membránt és állítsa össze a blottoló készüléket a Nukleinsav hibridizációs technikák c. fejezetben található 3. ábra szerint. A vákuumpumpát úgy állítsa be, hogy az a blottolás

folyamán 250-400 Hgmm vákuumot biztosítson. 60-90 percig több részletben öntsön 10 x SSC oldatot a gél felszínére. Ügyeljen arra, hogy a művelet során a gél felülete ne száradjon ki. A transzfer során a jelzőfesték jól látható módon átkerül a membránra. A transzfer befejezése után grafit ceruzával jelölje be a membránon a gél pozícióját és a mintafelvívó vályuk helyét. UV átvilágító asztalon vizsgálja meg a gél-maradványt illetve a membránt és ellenőrizze a transzfer hatékonyságát.

Fixálás

A membránt helyezze két steril szűrőpapírlap közé és inkubálja 80°C-on 30 percig szárítószekrényben, majd 245 nm hullámhosszú UV fénnel 1200 µJ/cm² energia sűrűség mellett két cikluson keresztül besugárzással is kösse a DNS-t a membránhoz. Hibridizálásig a membrán szárazon tartható.

Prehibridizálás

Nedvesítse meg a membránt 6x SSC oldattal, majd helyezze egy hibridizáló csőbe. A törzsoldatok összemérésével steril körülmények között készítse el a prehibridizáló oldatot.

Végkoncentráció	<u>Törzsoldat</u>	Térfogat
6 x SSC	20 x	6 ml
5 x Denhardt oldat	50 x	2 ml
0,5 % SDS	10 %	1 ml
100 µg/ml denaturált hering sperma DNS	10 mg/ml	200 µl
50 % Formamid	100%	10 ml
<u>H₂O</u>		800 µl
		20 ml

Öntsön a csőbe 6 ml prehibridizáló oldatot, majd légfűtéses hibridizációs kamrában állandó forgatás mellett legalább 3h-ig 42 °C-on végezze el a prehibridizációt .

Hibridizálás

A denaturált próba hozzáadása után 42 °C-on 1 éjszakán át kb. 12 óráig végezze a hibridizációt. Öntse le a hibridizáló oldatot és tárolja -20 °C-on az izotóp tároló hűtőszekrényben.

Mosás

2xSSC oldattal öblítse le a membránt, és a hibridizációs kamrában végezze el a következő mosási lépéseket.

1 x 15 perc szobahőmérsékleten	2x SSC 0,1 % SDS	8 ml
1 x 15 perc szobahőmérsékleten	2 x SSC 0,1 % SDS	50 ml
2 x 30 perc 42 °C	0,1 x SSC 0,25 % SDS	50 ml

Autoradiográfia

A mosott membránt forrassa nylon tasakba és ragasztószalaggal rögzítse az autoradiográfias kazetta hátsó falához. Sötét szobában helyezzen röntgen filmet a membránra, zárja be a kazettát és kb. 24 óráig tartsa hideg szobában. Hívja elő, fixálja, mossa és szárítsa meg a filmet. Az agaróz gélről korábban készített felvételen található sávokhoz illessze hozzá a megsötétedett sávot majd határozza meg a pozitív DNS sáv méretét a molekulatömeg standardok segítségével.

KLASSZIKUS SOUTHERN HIBRIDIZÁCIÓ

Biró Sándor

Amint a korábbi fejezetekből is kiderült, a Southern blot többféleképpen is elvégezhető. Itt a még ma is talán leggyakrabban használt eredeti kapillaritáson alapuló blotolási eljárást, s a legtipikusabb hibridizációs körülményeket írom le. Az eljárás nitrocellulóz és nylon membrán alkalmazásakor egyaránt használható. A radioaktív próba eltávolítása után, a filter újra felhasználható.

1. Emésszen meg megfelelő mennyiségű DNS-t 20-50 mikroliteres reakcióközegben. Ugyancsak készítse el a megfelelő molekulásúly markereket is, és elektroforetizálja a mintákat a megfelelő agaróz gélben a korábbi fejezetekben leírtak szerint. *A szükséges DNS mennyisége a genom komplexitásától függ. Plazmid DNS-ből 0,1 mikrogrammnál kevesebb DNS is intenzív szignált ad, míg emlős genomiális DNS-ből 10 mikrogramm is szükséges.*
2. Elektroforézis után fotózza le a gélt. *Célszerű egy műanyag vonalzót is a géllal együtt fényképezni, ami később megkönnyíti a fragmentek méretének meghatározását. Ugyanezt a célt szolgálja, ha a hibridizációban a molekulásúly markerekkel homológ jelölt DNS-t is használ.*
3. Helyezze a gélt egy műanyag tálcába, öntsön rá 500 ml 0,2 N sósavat és enyhe mozzgatás közben (pl. un. rocking platen) kezelje 10 percig. *Sósavas kezeléskor a purin bázisok egy része leszakad, s a depurinált bázisoknál az ezt követő lúgos kezeléskor a DNS lánc elhasad, ami a keletkező kisebb fragmentumok hatékonyabb transzferét eredményezi. Ennek megfelelően, ha a DNS fragmentumok 1 kb-nél kisebbek, ez a lépés elmaradhat, míg 10 kb-nél nagyobb fragmentumok esetén a kezelést 20 percig is folytathatja.*
4. Öntse le a savat, s néhányszor öblítse steril desztillált vízzel a gélt. *A savas kezelés megtörténtét a brómfenol kék festék színének sárgává változása jelzi.*
5. Adjon a gélhez 500 ml denaturáló oldatot (az oldatok összetétele a leírás végén található) és 15 percig inkubálja enyhe mozzgatás közben. Ismétlje meg ezt a lépést újabb 500 ml denaturáló oldattal. *A brómfenol kék ismét kék színű lesz jelezve a denaturálási lépés megtörténtét.*
6. Öntse le a denaturáló oldatot, s helyezze a gélt 500 ml neutralizáló oldatba. Enyhe mozzgatás közben inkubálja 30 percig.
7. Pontosán mérje le a gél méretét, s vágjon ki egy mindkét irányban 3 mm-rel kisebb nylon membránt.
8. Helyezze a membránt először 1 percre vízbe, majd 5-10 percre 20 x SSC oldatba. *A gél és a membrán kezelésekor mindig viseljen kesztyűt, mert a keze zsírszennyeződése a membránra kerülve a transzfer akadályozza, az esetleges nukleázok pedig a DNS-t bontják.*
9. Vágjon ki 5 db, a membrán filternek megfelelő méretű Whatman 3 MM papírt, és mintegy 10 cm rétegvastagságot adó mennyiségű, ugyanilyen méretű adszorbens papírt (pl. papírtörülközőből).
10. Állítsa össze a "transzfer piramist" a Nukleinsav hibridizációs technikák c. fejezetben található 2. ábrán látható módon, az alábbiak szerint. Öntsön 500 ml 20 x SSC oldatot egy nagy műanyag tálba. Fektessen rajta keresztül egy a tálnál hosszabb, de keskenyebb üveglapot. Vágjon ki 2 db, a gélméretnél néhány cm-rel szélesebb, és olyan hosszúságú Whatman 3 MM papírt, ami az üveglap két oldalán beleér a pufferbe. Helyezze el a papírlapokat az üveglapon oly módon, hogy a tálban lévő pufferbe lógjanak bele. Nedvesítse át őket a pufferrel, s pipettával hengerelve távolítsa el a levegőbuborékokat a két papírlap közül. Helyezze rá a gélnket, s távolítsa el az esetlegesen a gél és papír

között megrekedt légbuborékot. Ezután a géltre egyetlen precíz, határozott mozdulattal tegye rá a membránt, lehetőleg úgy, hogy levegőbuborék ne maradjon a gél és a membrán között. Amennyiben mégis maradt, távolítsa el a légbuborékokat, de vigyázzon, hogy a membrán pozícióját ne változtassa!!! Helyezzen a membránra 2-3 pufferrel megnedvesített, majd pedig 2-3 száraz, gélméretre vágott Whatman 3 MM papírt, és 5-10 cm rétegvastagságban adszorbens papírt. Végül helyezzen egy üveglapot az egész piramis tetejére, s nyomassa le 0,5-1 kilogrammnyi súllyal.

11. Néhány óráig (célszerűen egy éjszakán át) végezze a DNS fragmentumok transzferálását, majd bontsa le a piramist a membránig.
12. Golyós tollal, vagy puha ceruzával jelölje be a membrán orientációját a gélen, s csipesszel emelje le a membránt, s öblítse le 2 x SSC-vel. Szűrőpapír között a filterről itassa le a folyadékot. Nitrocellulóz filter esetén szűrőpapír között fixálja a DNS-t vákuum kemencében 80 C°-on 2 óráig. A nylon membránt csomagolja háztartási fóliába, s UV fényel pár percig megvilágítva a filter DNS-t kötő oldalát, a DNS-t kovalensen kösse a membránhoz. *Erre a célra UV transzilluminátort, de közönséges germicid lámpát is használhat.*
13. Helyezze a filtert egy hibridizációs csőbe, s a gél és cső méretétől függően adjon hozzá 5-10 ml prehibridizációs oldatot. A prehibridizációt legalább 2-3 óráig végezze, hibridizációs kamrában, 42 C°-on. *A prehibridizáció célja a membrán aspecifikus DNS-kötő kapacitásának blokkolása.*
14. Készítse elő a jelölt próbát. (Amennyiben a próba kétszálú DNS, denaturálja forró vízfürdőn, 5 percig, majd azonnal hűtse le jégen. Radioaktív próbából általában 10⁶ cpm/ml aktivitást használunk.) Adja a jelölt próbát a hibridizációs oldathoz.
15. A hibridizációs csőből öntse ki a prehibridizációs oldatot, öntse a membránra a jelölt próbát tartalmazó hibridizációs oldatot, s hibridizálja 42 C°-on legalább 10-12 óráig.
16. Öntse le a hibridizációs folyadékot, s mossa a membránt az alábbiak szerint.
 - 2 x SSC/0,1 % SDS - 5 perc, szobahőmérsékleten
 - 2 x SSC/0,1 % SDS - 15 perc, szobahőmérsékleten
 - 0,5 x SSC/0,1 % SDS - 15 perc, szobahőmérsékleten
 - 0,1 x SSC/0,1 % SDS - 15 perc, szobahőmérsékleten
 - 0,1 x SSC/0,1 % SDS - 30 perc, 42 C°

A hibridizáció során a jelölt próba és a membránhoz kötött DNS között kialakuló hibrid stabilitása, azaz a próba felkötődésének erőssége a köztük lévő homológia függvénye. Minél nagyobb a homológia, és minél hosszabb a próba, annál erősebb a kötődése, s annál nehezebben mosható le a membránról. A fenti többlépcsős mosás során, az ionerősség csökkenése és a hőmérséklet emelése lépésről lépésre egyre inkább csak a nagyobb stabilitású hibridek fennmaradását teszi lehetővé. Éppen ezért, különösen akkor, ha a homológia foka egy heterológ hibridizációban nem ismeretes, célszerű az egymást követő mosások között a próba detektálását (17. pont) elvégezni.

17. Szűrőpapír lapok között a filtert szárítsa meg, és detektálja a hibridizáló csíkokat. *Ez radioaktív próba esetén autoradiográfiával történik. Célszerű erősítő screen-t használni. ³²P jelölés esetén a filtert csomagolja háztartási műanyag fóliába. ³⁵S jelöléskor viszont a film emulziós oldala közvetlenül érintkezzen a filterrel. Nem radioaktív jelölés esetén (digoxigenin, biotin vagy fluoreszcein jelölt nukleotid analógok) a detektálást a gyártó előírása szerint végezze.*

A Southern blot fenti módon való elvégzése a leggyakoribb feladatok esetén megfelelő eredményt ad. Nem lehetett célja ennek a rövid leírásnak a technika sokféle változatának a részletes tárgyalása. Ezek megtalálhatók a gyártó cégek leírásaiban, a különböző laboratóriumi kézikönyvekben, és az eredeti közleményekben.

Szükséges oldatok

<i>Denaturáló oldat:</i>	1,5 M NaCl 0,5 M NaOH
<i>Neutralizáló oldat:</i>	3 M NaCl 0,5 M TRIS-HCl, pH=7,4
<i>20 x SSC:</i>	3 M NaCl 0,3 M Na-citrát
<i>Prehibridizációs oldat:</i>	25 mM KPO ₄ pH=7,4 5 x SSC 5 x Denhardt oldat 50 % formamide
<i>50 x Denhardt oldat:</i>	1 % ficoll Ms: 400 000 Dalton 1 % bovin serum albumin fraction V 1 % polivinil pirrolidon 5 mg/ml denaturált salmon sperm DNS
<i>Hibridizációs oldat:</i>	ugyanolyan összetételű, mint a prehibridizációs oldat, de tartalmazza a jelölt próbát is.

NORTHERN HIBRIDIZÁCIÓ

Dombrádi Viktor

Az mRNS kis stabilitása miatt számos esetben könnyebb a róla átírt cDNS-t analizálni (pld. RT-PCR). Teljes RNS vagy mRNS preparátumok közvetlen vizsgálatával is meghatározható egy specifikus mRNS mérete Northern blot segítségével. Az RNS molekulák méret szerinti elválasztása denaturáló szer jelenlétében történik. Az agaróz gélen kialakult RNS mintázat nitrocellulóz vagy pozitív töltésű nylon membránra vihető át a korábban ismertetett kapilláris, vákuum vagy elektromos blotolási technikák egyikével. A prehibridizálás, hibridizálás, mosás és autoradiográfia technikai szempontból a Southern blothoz hasonlóan valósítható meg. Az alábbiakban részletesebben tárgyaljuk a denaturáló körülmények közötti elválasztás lényegét, majd ismertetjük az eljárás egy gyakran alkalmazott változatának gyakorlati kivitelezését. Ne feledjük, hogy a kísérletek során fontos az RNS preparálás című fejezetben leírt óvintézkedések betartása az RNáz mentes körülmények biztosítására!

Denaturáló agaróz gélelektroforézis

A DNS-hez hasonló módon (lásd DNS vizsgálata agaróz gélelektroforézissel c. fejezetet) teljes RNS vagy mRNS (poliA+RNS) preparátumok is szétválaszthatók agaróz gélelektroforézissel azonban a méret szerinti szeparálás csak denaturáló szerek jelenlétében valósítható meg. A gyakorlatban kétféle denaturáló eljárás terjedt el: a glioxál/dimetilszulfoxid (DMSO) és a formaldehid kezelés. Az előbbi technikailag nehezebb kivitelezni, de általában élesebb sávokat biztosít. Az sem elhanyagolható szempont, hogy a formaldehid mérgező.

A. RNS elektroforézise glioxál és dimetilszulfoxidos denaturálás után

Az elektroforézist 3-4 V/cm feszültség mellett 10 mM pH 7,0 foszfát pufferben kell végezni a puffer tartályok folyamatos kevertetése és a puffer pumpával történő keringetése közben. A jó kevertetés a pH stabilizálását biztosítja az elektroforézis közben, ami azért fontos, mert a glioxál már enyhén lúgos közegben (pH>8,0) disszociál az mRNS-től. Ha nincs mód a keringetésre, legalább 30 percenként cserélni kell az elektroforézis puffert. Az elválasztás előtt az mRNS-t 50°C-on 1 óráig denaturálják 0,5 M glioxál és 50% DMSO jelenlétében. Mivel a glioxál reagálna az etidium bromiddal nem használhatunk etidium bromid tartalmú gélt. Az RNS festése az elektroforézis után történik. Teljes RNS preparátumokban jól láthatóak a 18S és 28S riboszomális RNS sávok, melyek kalibrációhoz is használhatók (méretük 2366 és 6333 nukleotid).

B. RNS elektroforézise formaldehid tartalmú gélben

A minta denaturálását 65°C-on 15 percig 2,2 M formaldehid és 50% formamidban (és nem jelenlétében!) végzik. Az agaróz gél 20 mM MOPS (pH 7,0), 8 mM acetát, 1 mM EDTA puffert és 2,2 M formaldehidet tartalmaz. A futtatást 5 mV/cm feszültség eséssel lehet végezni és nincs szükség a puffer folyamatos kevertetésére. Ajánlatos viszont 1-2 óra futtatás után az anód és katód puffertartály tartalmát összekeverni a pH kiegyenlítése céljából. A gél festése a korábban leírt módon történik. Ügyeljünk arra, hogy formaldehidben a DNS gyorsabban fut mint az RNS, ezért DNS standard nem használható a méret meghatározáshoz.

A Northern blot gyakorlati kivitelezése

Az alábbiakban totál RNS vizsgálatát írjuk le formaldehides denaturálás, módosított nylon membrán és ^{32}P -vel jelzett cDNS próba felhasználásával. Egy átlagos gyakorisággal előforduló mRNS kimutatásához elegendő 10-20 μg totál RNS elektroforézise, azonban alacsony szinten kifejeződő génről származó, ún. ritka mRNS kimutatása sokszor még 100 μg totál RNS-ből sem lehetséges. Az utóbbi esetben érdemes poli dT-Sepharose-on dúsított mRNS preparátummal próbálkozni, illetve az RT-PCR módszert alkalmazni.

Gélelektroforézis

1. Az előkészületek fontos eleme az RNáz mentes körülmények biztosítása. A korábban ismertetett elővigyázatossági rendszabályok mellett érdemes elvégezni a gélelektroforetikus készülék öblítését 3% H_2O_2 oldattal, amit DEPC-kezelt vizes mosás követ.

2. A formaldehid tartalmú 1% agaróz gél öntéséhez keverjen össze

0,5 g agarózt és

36 ml DEPC-kezelt desztillált vizet

majd mikrohullámú sütőben készítse el az agaróz gélt. Ezután hűtse le kb 60°C -ra és adjon hozzá

5 ml 10x MOPS/EDTA puffert és

9 ml cc (37%) formaldehid oldatot

és öntse ki a gélt a megfelelően előkészített futtató tálcára a DNS vizsgálata agaróz gélelektroforézissel c. fejezetben ismertetett módon. A gél 30-40 perc múlva szilárdul meg.

3. A minta felvitele előtt adjon 1 μl 40 E/ μl Promega gyártmányú RNáz inhibitor a futtató pufferhez (1x MOPS/EDTA) és 20-30 percig 50V-on végezzen előfuttatást.

4. Közben denaturálja az RNS mintát. 20 μl formamidban oldott kb. 20 μg RNS tartalmú mintához adjon

7,2 μl cc. formaldehid oldatot és

8,8 μl RNáz mentesített deszt. vizet.

10 percig inkubálja a mintát 60°C -on, majd egészítse ki

4 μl 10x MOPS/EDTA pufferrel és

4 μl RNS mintapufferrel

majd vigyen fel maximum 40 μl mintát az előfuttatott gélre.

5. Futtassa a gélt 50V feszültséggel fél órán keresztül majd 60 V feszültséggel további egy órán keresztül. Futás közben mágneses keverőkkel folyamatosan kevertesse a puffertartályok tartalmát a pH kiegyenlítés érdekében.

6. Futtatás után egy üvegládában 45 percig rázóasztalon végzett rázatással kb. 500 ml 10x SSC oldattal mossa ki a gélből a formaldehidet.

7. A gél egy részét (amelyen a felvitt minták mellett megtalálható a standardok sávja) fesse meg etidium bromiddal és ellenőrizze az RNS mennyiségét illetve elválasztását UV átvilágító asztalon.

Northern transzfer

1. A klasszikus Southern blot című fejezetben bemutatott kapilláris transzfer technikával blottolja az RNS-t pozitívan töltött nylon membránra 1 éjszakán keresztül (10-12 h).

2. A gél (maradvány) megfestésével ellenőrizze a transzfer hatásfokát. 0,5 M ammónium acetát oldattal történő 2x20 perc rázatással öblítse a gélt és fesse meg etidium

bromiddal. A transzfer sikeres megvalósítására utal, ha a gélben csak kevés nukleinsav maradt vissza (a blottolást megelőző kontrol vizsgálathoz képest).

3. Az RNS mintázat rögzítésére két fixálási eljárást lehet használni, legbiztonságosabb ezek kombinációja. Először a nylon membránt 2 db Whatman 3MM szűrőpapír között és 80°C-os szárítószekrényben inkubálja 30 percig. Ezután 245 nm-es UV fényel kösse az RNS-t a membránhoz 0,2-1 J/cm² fényenergia felhasználásával. A membránt közvetlenül felhasználható vagy 4°C-on tárolható.

Hibridizáció

1. Nedvesítse be a száraz membránt 6xSSC oldat felszínén történő úsztatással illetve bemelegítéssel.

2. Az előhibridizálást forgódobos hibridizáló kamrában 42°C-on 5 ml oldatban legalább 2 óra hosszúra végezze. A prehibridizáló oldat összetétele a következő:

5x SSC

5x Denhardt oldat

0,1% SDS

50% formamid

100 μ g/ml denaturált hering sperma DNS vagy csirke vér DNS.

3. 100°C-os homokfürdőben 10-ig denaturálja a ³²P-jelzett cDNS próbát (10⁸-10⁹ dpm/ μ g) a radioaktív anyagok kezelésére vonatkozó óvintézkedések betartásával.

4. Adja a próbát a prehibridizáló oldathoz és állandó forgatás mellett 20-30 óráig végezze a hibridizálást 42°C-on.

5. Öntse le a radioaktív próbát tartalmazó hibridizáló oldatot egy biztonságos tároló edénybe, majd 2x5 percig mossa a membránt szobahőmérsékleten 50 ml 2x SSC oldattal.

6. A próba méretétől és a target mRNS valamint a próba szekvenciák homológiájától függően a membrán mosását különböző szigorúsági fokon lehet végezni. Ha a homológia foka nem ismert pontosan, célszerű a kisebb szigorúsági fokon kezdeni, majd (autoradiográfia után) fokozhatjuk a mosás szigorúságát.

Kis szigorúságú mosás: 10ml 0,2x SSC; 0,1% SDS szobahőmérséklet,
2x5 percig.

Közepes szigorúságú mosás: 10 ml 0,2x SSC; 0,1% SDS 42°C,
2x15 percig.

Nagy szigorúságú mosás: 10 ml 0,1x SSC; 0,1% SDS 68°C,
2x15 percig.

Autoradiográfia

Az utolsó mosás után forrassa a nedves membránt légbuborék-mentesen egy nylon zacskóba, kézi számlálóval ellenőrizze radioaktivitását, majd helyezze egy kazettába és sötét szobában borítson rá egy röntgenfilmet. A hibridizáció hatékonyságától függően 1-7 nap után hívja elő a filmet és a feketedés alapján értékelje az mRNS méretét és mennyiségét. A méret meghatározását elősegíti, ha radioaktív standardokat használ, de legtöbbször megfelelő a gélben futtatott standardok etidium bromidos festése után készített kalibrációs görbe vagy a riboszomális RNS alapján történő kiértékelés is.

Szükséges oldatok

<i>10x MOPS/EDTA puffer:</i>	0,5 M MOPS 0,01 M EDTA pH 7,0
<i>A puffer:</i>	1,47 ml 10x MOPS/EDTA puffer 3,53 ml DEPC kezelt deszt.víz
<i>RNS minta puffer:</i>	1,61 ml A puffer 25 mg xylén cianol 25 mg brómfenolkék 2 g szacharóz 890 μ l 37% formaldehid oldat 2,5 ml formamid
<i>20x SSC:</i>	175,3 g NaCl 88,2 g nátriumcitrát 800 ml deszt.víz pH 7,0 beállítása 10 NaOH-dal kiegészítve 1 L-re deszt.vízzel
<i>50x Denhardt oldat:</i>	5 g Ficoll (Type 400) 5 g polivinilpirrolidin 5 g marha szérum albumin (Fraction V) 500 ml deszt.víz

FLUORESZCENCIA IN SITU HIBRIDIZÁCIÓ (FISH)

Balázs Margit

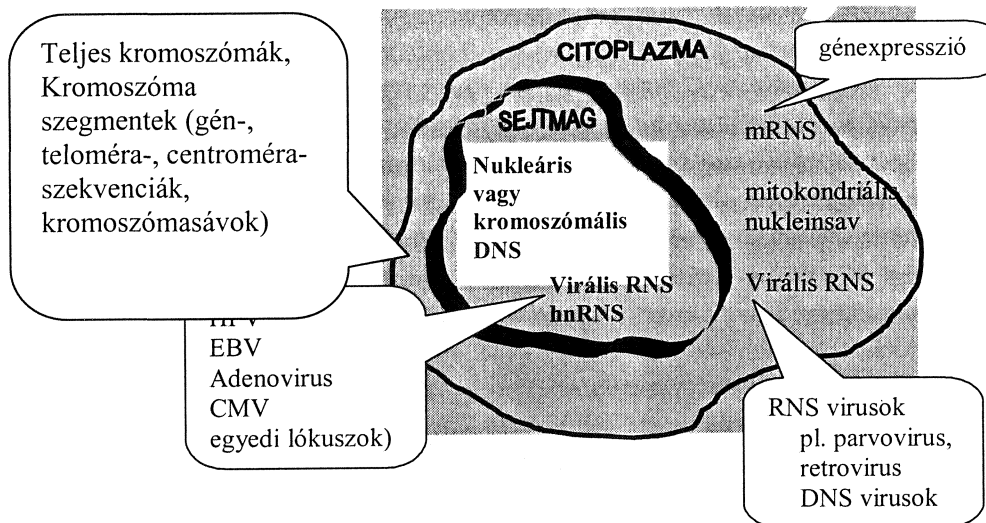
A nukleinsav *in situ* hibridizáció módszerrel specifikus DNS szekvenciák tehetővé láthatóvá morfológiailag ép kromoszómákon, interfázisos sejtekben és szöveti metszeteken. A módszerrel minden olyan sejt vagy szövet tanulmányozható, melyben a DNS degradáció nem indult el. Jelenleg a legegyszerűbb és leggyorsabb molekuláris detektálási eljárás a nagy méretű genetikai eltérések (kromoszómák számbeli eltérései, transzlokációk, géndelációk és amplifikáció) kimutatására.

Az *in situ* hibridizáció módszertani fejlődése több mint negyedszázada kezdődött el. Pardue és Gall (1969) voltak az elsők akiknek sikerült radioaktív izotóppal jelzett DNS próba hibridizációját kimutatni citológiai preparátumokon. A radioaktív izotópokkal történő DNS-hibridizáció érzékenysége elég nagy, akár egyetlen kópiában előforduló gén(ek) kimutatására is alkalmas, azonban ennek az eljárásnak érzékenysége mellett számos hátránya van. Az izotópos módszer kivitelezése nemcsak veszélyes, hanem komplikált és lassú (a hibridizációs szignál megjelenítéséhez szükséges autoradiográfia expozíciós ideje több hetet is igénybe vehet), továbbá a radioaktív detektálási módszer térbeli feloldóképessége gyenge, egyidejűleg csak 1 szekvencia eltéréseit figyelhetjük meg. Az említett hátrányok ösztönözték a kutatókat a nem izópos jelzési eljárásokon alapuló detektálási módszerek kifejlesztésére.

Dan Pinkel és Joe Gray 1988-ban vezette be a fluoreszcens jelzésen alapuló eljárást, amire jellemző hogy kevésbé komplikált, nem veszélyes, gyors és ma már akár mind a 24 kromoszóma számbeli és strukturális eltérése kimutatható egyetlen kísérlet során. Kezdetben a DNS- próbákat (DNS-szondákat) biotinnal jelzett nukleotidokkal konjugálták és a hibridizált DNS-próbákat fluoreszcens festékkel (fluoreszcein-izotiocianát: zöld fluoreszcencia, rhodamin-izotiocianát: piros fluoreszcencia) jelzett avidinnal vizualizálták. Ezt követően a fluoreszcens detektálási eljárások számos újabb lehetőséggel bővültek és szinte naponta jelennek meg a FISH érzékenységét növelő újabb és újabb jelzési technikák. A FISH-sel a diagnosztikus és prognosztikus jelentőséggel bíró genetikai rendellenességek rövid idő alatt (1-24 óra) kimutathatók, függetlenül a tumorsejtek proliferációs hajlamától, mivel az eljárás interfázisban lévő sejteken is megvalósítható.

A géntechnológia kialakulása és rohamos fejlődése a FISH alkalmazásának robbanásszerű elterjedését eredményezte. Napjainkban ez a molekuláris genetikai módszer az alapkutatás mellett egyes klinikai laboratóriumokban, már Magyarországon is a rutindiagnosztika részévé vált. Kariotípus analízis során a kromoszómák számbeli és strukturális eltéréseinek kimutatására, a genetikai betegségek terápiát követő monitorozására, sugárkárosodás által indukált kromoszómális eltérések gyors kimutatására, génamplifikációk és géndelációk detektálására egyaránt alkalmazzák. Jelentős szerepe van a géntérképezésben, a géntranszkripció és expresszió, valamint a kromatin organizációjának és struktúrájának tanulmányozásában is.

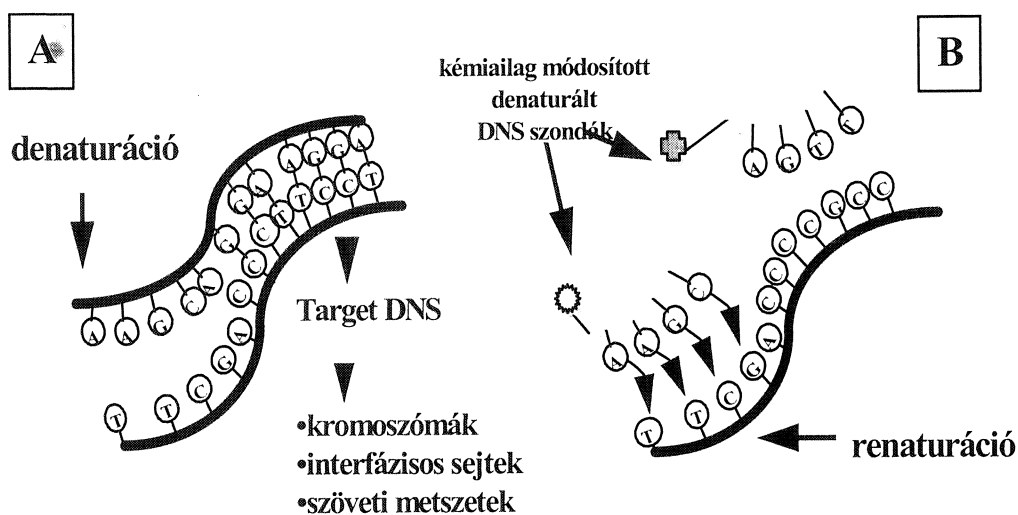
Az *in situ* hibridizáció target molekulája nemcsak komplementer DNS molekulák lehetnek, hanem RNS is, így RNS-DNS és RNS-RNS hibridizációt is megvalósítható. Az 1.-es ábra az *in situ* hibridizáció targeteit szemlélteti. A hibridizált molekula kimutatható fluoreszcens és nem-fluoreszcens jelzési technikákkal.



1. ábra Az *in situ* hibridizáció target molekulái

A fluoreszcencia *in situ* hibridizáció alapelve

A specifikus DNS szekvenciák kimutatása *in situ* hibridizációval a DNS azon tulajdonságán alapul, hogy megfelelő denaturálási körülmények között (pH, magas hőmérséklet, kémiai környezet) a target DNS kettősspirál szerkezete megbomlik és így hozzáférhetővé válik az ugyancsak denaturált, DNS-próbák számára (2. ábra). A renaturálás során (37 °C, pH 7, optimális kémiai környezet biztosítása) a DNS-próba a szekvenciájának megfelelő komplementer nukleinsav szekvenciát a target DNS mintában felismeri és hozzákötődik. A kísérleti körülményeket úgy kell optimalizálni, hogy a hibridizáció során a DNS-próbák meg tudják találni a specifikus kötőhelyet, a komplementer szekvenciákat.

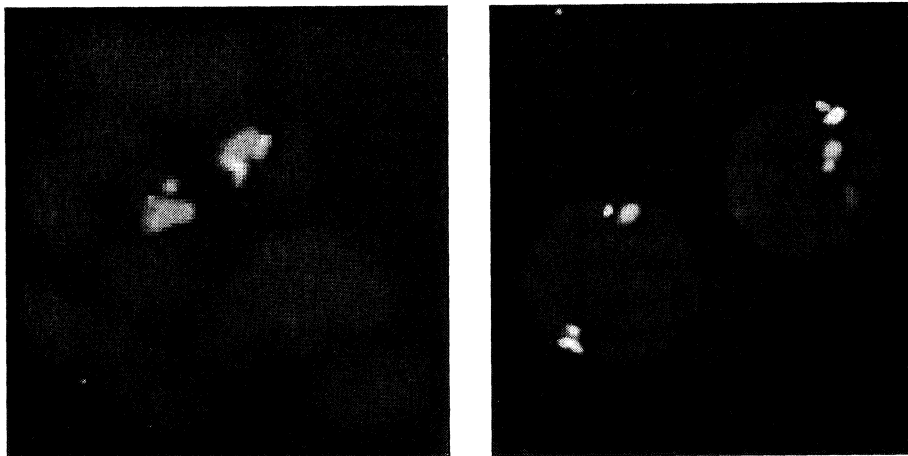


2. ábra. A fluoreszcencia *in situ* hibridizáció elvi vázlatja

A., A denaturálás (pH=7, 70-75 °C, 70% formamid, 2XSSC¹⁴) során a kettősszalú target DNS molekulák egyszálúvá válnak. B., A renaturáció alatt (pH=7.0, 37 °C, 10% dextrán szulfát, 50% formamid, 2XSSC) az ugyancsak denaturált, egyszálú, jelzett DNS szondák a komplementer target szekvenciához kötődnek. A ⊕ és ☆ különböző nukleotid módosításokat (pl. biotin és digoxigenin) jelölnek

¹⁴ 1XSSC= 0.15 M NaCl, 0.015 M NaCitrate, pH=7.0

A jelzett DNS-próbák rövid (200-500 bázispár hosszúságú) hisztokémiai úton detektálható nukleotid prekuzorral (biotin, digoxigenin stb.) jelölt DNS fragmentek. A közvetlenül fluorofórral konjugált nukleotidok (pl., fluoreszcein-dUTP vagy Texas Red dUTP) alkalmazásával a detektálás ideje lényegesen lerövidül, a hibridizációt követően akár már 2 óra múlva fluoreszcens mikroszkóppal értékelhető az eredmény. Normál sejtek kromoszómáin a hibridizációt követően a DNS specifikus szonda szekvenciájának megfelelő kromoszóma-szegmenteken egy-egy fluoreszkáló szignál látható, míg a normál, interfázisos sejtmagokban két fluoreszkáló pont jelenik meg (3. ábra).



3. ábra FISH lokusz és centroméra specifikus próbákkal normál kromoszómákon és interfázisos sejtmagokban

A FISH –t befolyásoló fontosabb paraméterek

Az *in situ* hibridizáció sikerét a target DNS fixálása, tárolása és kora mellett nagy mértékben befolyásolják a denaturálási és renaturálási körülmények, mint a denaturálási hőmérséklet, pH, formamid és monovalens kationok koncentrációja, a jelzett DNS próba fragment hosszúsága, koncentrációja, dextrán-szulfát és a poszthibridizációs körülmények.

Denaturálási hőmérséklet

A hibridizációs reakciót megelőzően a target DNS-t denaturálni kell. A denaturáló közegként a szerves oldószerek közül a formamid bizonyult a legalkalmasabbnak. A hibridizáció szigorúságát (stringency) alapvetően a denaturáló oldat ionösszetétele, a formamid koncentrációja és a hőmérséklet határozza meg. Optimális szekvenciapár-képződés a DNS olvadási hőmérséklete (T_m : melting point) alatt 15-20 °C-al alakul ki. A denaturáló oldat formamid koncentrációjának és az oldat ionerősségének változtatásával a denaturálási hőmérséklet befolyásolható. Alacsony ionerősségnél a hibridizáció sebessége nagyon lelassul, a magas só koncentráció viszont a nem specifikus kötődések valószínűségét növeli meg. A renaturálás pH 5-9 intervallumban független a pH-tól. Optimális a pH 6.5-7.5 tartomány és a 20-50 mM foszfát puffer alkalmazása. Az alábbi összefüggés segítségével az olvadási hőmérséklet kiszámítható:

$$T_m = 81,5 + 16,6 \log[Na^+] + 0,41 (\%G/C) - 0,63 (\% \text{ formamid}) - \{300 + 200 [Na^+]\} / N$$

ahol Na^+ a nátrium-ion moláris koncentrációja (0.165 M- 0.4 M), és G/C a guanin + citozin százalékos aránya a hibridizált molekulában, a % formamid az oldószer koncentrációja a denaturáló oldatban, N a bázispárok hossza a hibridben. Emlős DNS-ben a GC kb. 40%, de ez a genomális lokalizációtól jelentősen függ.

Formamid

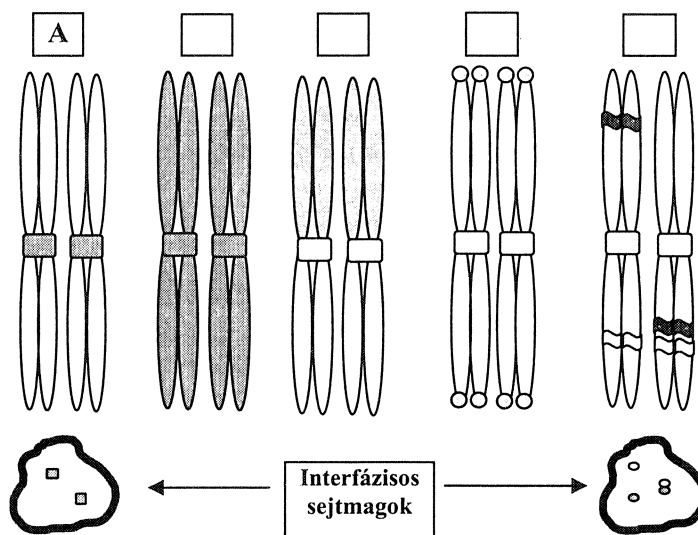
A DNS denaturálási hőmérséklete 0.01-0.2 M Na⁺ koncentrációnál 90-100 °C között van. Ilyen magas denaturálási hőmérsékleten a sejtek és a kromoszómák morfológiája jelentős károsodást szenved. Az olvadási hőmérséklet jelentősen csökkenthető szerves, denaturáló oldószerek alkalmazásával. 50%-os formamid, 2XSSC koncentráció mellett a DNS denaturáció 70-75 °C-on, a renaturáció 30-45 °C-on létrejön.

A jelzett DNS próba mérete és koncentrációja

A DNS renaturációjának mértéke négyzetesen arányos a DNS próba fragment hosszával. Így maximális hibridizáció intakt próbával lenne megvalósítható, azonban *in situ* hibridizáció során a DNS próbának először a komplementer target DNS-hez kell diffundálnia, ezért a próbaként szolgáló DNS méretét csökkenteni kell. Ez a jelzési eljárások során egyrészt a DNáz-I koncentrációjának helyes megválasztásával, másrészt a DNS ultrahangos darabolásával valósítható meg. FISH-nél a 200-500 bp fragment tartomány a legoptimálisabb. A renaturáció során a DNS specifikus próba mindig feleslegben van a target DNS mennyiségéhez viszonyítva. Koncentrációját a target szekvencia mérete valamint a hibridizációs jel detektálása során keletkezett fluoreszcens jel-zaj (háttér fluoreszcencia) aránya határozza meg. A hibridizációs elegyben centroméra specifikus próbák lokalizálására 1-4 ng, míg repetitív szekvenciákat nem tartalmazó kis méretű lókuszek lokalizálására 10-20 ng DNS próba mennyiség optimális. Az 1 kb-nál kisebb target szekvenciák hibridizációval történő megjelenítésére a próba-penetráció biztosítása sokszor 100 -200 ng DNS alkalmazását teszi szükségessé. A renaturációs elegyben (ún. master mixben) a nagy koncentrációban (10%) alkalmazott *dextránszulfátnak* a szerepe az, hogy a DNS koncentrációját lokálisan megemelje, így a hibridizáció hatáskörét növelje.

A DNS specifikus szondák típusai

A rekombináns DNS technológia megjelenésével és a nukleinsav szegmentek mikroorganizmusokban történő amplifikálásának lehetőségével a FISH -szondák tárháza folyamatosan bővül. A 4. ábra különböző DNS specifikus szondák lokalizációját és megjelenésük mintázatát mutatja kromoszóma preparátumon és interfázisos sejtekben a hibridizációt követően.



4. ábra. DNS specifikus szondák kromoszómális lokalizációja és megjelenésük kromoszóma preparátumon és interfázisos sejtekben a hibridizációt követően. A. Centroméra specifikus próbák, B teljes kromoszómát festő próbák, C kromoszóma kar specifikus próbák, D teloméra és szubteloméra specifikus próbák, E lókuszes specifikus próbák. Az A és C típusú DNS próbák interfázisos sejtekben is alkalmazhatók.

Az *in situ* hibridizációnál alkalmazott szondák kiválasztásánál alapvető jelentőségű, hogy a target DNS-t hogyan detektáljuk. Mindez több tényezőtől függ:

1.) a target DNS szekvencia nagyságától (a gén méretétől, a nagyobb méretű génekhez több próba fragmentum kötődik, ezért a fluoreszcens jel is nagyobb, nem igényel pl. amplifikációt);

2.) függ attól, hogy a target DNS szekvencia ismétlődik-e vagy nem (unique szekvenciákhoz való kötődéskor a jel kisebb, sokszor szükség van amplifikálásra, amit az indirekt jelzés tesz lehetővé);

3.) a DNS próba méretétől (elméletileg a nagyobb méretű próbák több jelzett molekulát tartalmaznak, de a hibridizációs elegyben a próbák optimális mérete 250-500 bázispár, mivel a nagyobb próbák penetrációja a komplementer target szekvenciához nehezebb, vagy olyan méretű agregátumokat képez, melyek a hibridizáció hatásfokát jelentősen lerontja, értékelhetetlenné teszi a hibridizációt a megnövekedett háttér fluoreszcencia miatt).

A *centroméra specifikus* DNS-szondák voltak az első olyan DNS szondák, melyeket sikeresen alkalmaztak nemcsak kromoszóma preparátumokon, hanem interfázisos sejtmagokban is a számbeli eltérések kimutatására. Ezek a DNS próbák a tandem, ismétlődő alphoid vagy satelita-szekvencia családhoz tartoznak és a kromoszómák heterokromatin régióihoz kapcsolódnak. Ezeket a szekvenciákat megjelenítő DNS-próbákat kisméretű insertek formájában általában plazmid vektorokba építik be és a plazmid preparálási protokollok valamelyikével (pl. alkalikus lízis) állítják elő. Ezekkel a centroméra specifikus DNS-próbákkal a kromoszómák számbeli eltérései mutathatók ki interfázisos sejtmagokban vagy természetesen kromoszóma preparátumokon.

A *lókusz specifikus* DNS-próbák a nevükben jelzett célpontot azonosítják, így onkogének amplifikációja, onkoszuppresszor gének deléciónja, kromoszóma szegmentek transzlokációja detektálható a tumorsejtek mesterséges környezetben történő manipulálása nélkül. Az egy kópiában expresszálandó, repetitív szekvenciákat nem tartalmazó génekhez kapcsolódó klónozott DNS mérete az 1 kb-tól az 1 Mb-ig terjedhet. A FISH sikeresen kivitelezhető kis méretű, plazmid eredetű DNS szondákkal is. Az egyedi szekvenciák mikroszkópos megjelenítésére a nagyobb inzerteket hordozó *cosmidok* (~ 40 kb) mellett egyre nagyobb tért hódít az ún. mesterséges kromoszómáknak az alkalmazása. Ilyenek a BAC (bacterial artificial chromosomes), PAC (P1 filamentous phage artificial chromosomes; ~100 kb), valamint YAC (yeast artificial chromosomes; ~ 1 Mb). Ezekből a klónokból nyert DNS-próbák legnagyobb előnye, hogy mivel lényegesen nagyobb target szekvenciát fognak át, nagyobb méretű fluoreszcens szignált is szolgáltatnak. Ezzel a hibridizáció hatásfokát és pontosságát nagymértékben növelik.

A nagyobb méretű insertekkel nyert DNS próbák (> 10kb) alkalmazása kezdetben problémát okozott, mert általában a teljes genomban jelenlévő repetitív szekvenciákat (Alu és LINES) is tartalmazták, így a hibridizáció eredménye a nem specifikus hibridizáció miatt nehezen volt értékelhető. Ezeknek a DNS-szondáknak a közvetlen alkalmazása magas fluoreszcens háttérrel és nagyszámú nem specifikus szignált eredményezett, ugyanakkor a lókusz-specifikus jeleket csak nehezen vagy egyáltalán nem lehetett látni. A nem specifikus kötődés és a fluoreszkáló háttér jelentősen csökkenthető, ha a DNS próbákat a denaturálást követően együtt inkubálták jelzetlen genomális DNS-el (human placenta DNS, Cot1 DNS, vagy hering sperma DNS), melyek telítik a repetitív szekvenciákat, így azok a hibridizáció során a target DNS számára már nem hozzáférhetőek.

A 10 Mb-nál nagyobb vagy a teljes genomot átfogó szekvenciák lokalizálása DNS próbák komplex keverékével és a következő fejezetben tárgyalt komparatív genomális hibridizációval (CGH) valósítható meg.

Teljes kromoszómák azonosítására áramlási citométerrel szortírozott ún. *kromoszóma-festő* könyvtárak (painting probes) alkalmazhatók. Napjainkban ezt egyre inkább felváltják a PCR-ral történő amplifikálási eljárások. A kromoszómákból mikroszkóp alatt kimetszett DNS-darabok ugyancsak növelik a DNS próbák tárházát.

Kisméretű mutációk FISH-sel történő detektálása klónozott DNS-szondákkal nem oldható meg. Ennek elsősorban a fluoreszcens mikroszkóp feloldóképessége szab határt (1 kb mérete ~ 0.34 μm és az optikai feloldóképesség az alkalmazott hullámhossz-tartományban ~ 0.3 μm). Több amplifikálási eljárás kombinálásával a detektálható legkisebb target mérete jelentősen befolyásolható (lásd később).

A DNS próbák jelzése

A hagyományos DNS jelölési eljárások mellett (lásd a Nukleinsav próbák jelzése című fejezet) számos polimeráz láncreakción (PCR) alapuló eljárást dolgoztak ki speciálisan FISH alkalmazások céljára.

A FISH-próbák PCR-ral történő előállításának kidolgozása a kilencvenes évek kezdetére tehető. A primerek megtervezésénél több lehetőség között lehet választani. Az egyik módszernél olyan human specifikus Alu-repetitív szekvenciákat használnak, melyek átlagosan 4 kb távolságra vannak egymástól. Az Alu-szekvenciákon alapuló DNS próba jelzési eljárásnak az a hátránya, hogy az Alu-szekvenciák eloszlása nem véletlenszerű, sokkal gyakoribbak a G-sávzás alapján a halványabb-sávokhoz tartozó kromoszóma szakaszokon. Így előfordulhat, hogy az Alu-PCR-al nyert FISH szignál nem szükségszerűen reprezentatív a target szekvenciára. Teljes kromoszómák azonosítása áramlási citométerrel szortírozott DNS könyvtárak alkalmazásával valósítható meg (painting probes), mint azt a fentiekben már említettem. Alig néhány éve dolgoztak ki a kromoszómát festő DNS-szondák PCR-ral történő előállítását valamint a normál kromoszómákból mikroszkóp alatt kimetszett ("microdissection") DNS szubrégiók PCR amplifikálásával klónozás mentes DNS próbák generálását.

1. Táblázat DNS próbák, jelzési stratégiák

Genomiális DNS CGH analízishez	Nick transláció DOP-PCR
Áramlási citométerrel szortírozott vagy mikrodisszekcióval nyert kromoszómák és kromoszóma szegmentek, YACs	DOP-PCR
Cosmidok, BACs, PACs	Nick transláció Primed labeling
plasmidok	Nick transláció Primed labeling
In situ jelzés, kémiai jelzés	PCR, Kémiai jelzési módszerek

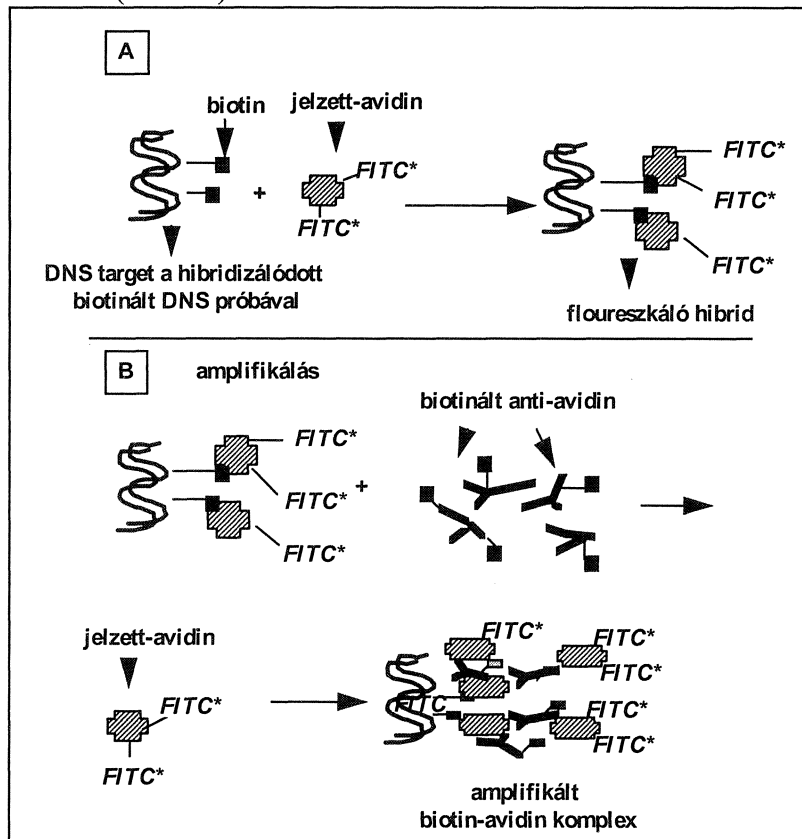
Telenius és munkatársai vezették be a FISH próbák előállítására ma leggyakrabban alkalmazott ún. *degenerate oligonucleotid-PCR* (DOP-PCR) módszert. Ezzel a templát méretétől függő DNS fragment amplifikálható. A DOP-PCR sikerrel alkalmazható a teljes genomiális DNS fluoreszcens jelzésére, aminek a comparative genomiális hibridizációban van jelentősége. Segítségével a tumor szövet kimetszett, kicsiny darabjából, az alig néhány sejtet

tartalmazó mikroszkópos metszetből genetikai térképezés valósítható meg egyetlen hibridizációból, megabázis szintjén.

A DNS szekvenciák *in situ* lokalizálása a PRimed IN Situ jelzési módszerrel (PRINS) oldható meg, melynek során a DNS szekvenciák *in situ* szintézise valósul meg a tárgylemezen fixált sejtpreparátumokon, kromoszómákon vagy szöveti metszeteken. Az alkalmazott jelöletlen primerek a detektálandó DNS szekvenciára specifikusak. A reakció elegy a primerek mellett jelölt és jelöletlen nukleotidok elegyét, valamint Taq-polimerázt tartalmaz. Mindamellett, hogy a target sejteken ezzel a módszerrel DNS próbák nélkül detektálhatók a primer által meghatározott DNS szekvenciák, a reakció során olyan mennyiségben keletkezik a szintézis terméke, hogy a PRINS DNS próba előállítására is alkalmas. A hibridizáció eredményének detektálása hasonló a többi jelzési eljáráshoz. A táblázat a DNS specifikus próbák jelzési stratégiáit foglalja magába.

A hibridizálódott DNS próbák detektálása

A hibridizációt követően a kémiaiilag módosított DNS próbák kimutatása direkt vagy indirekt jelzési eljárással (biotin vagy DIG-dNTP-k) vizualizálhatók. A biotinált próbák detektálása a biotinnak az avidinhez történő nagy affinitású kötődésén alapul. Amennyiben az első lépésben a fluoreszcens szignál kicsi vagy nem látható biotinált-anti-avidin-IgG-vel, majd ismételt újabb fluoreszcensen jelzett avidin alkalmazásával az eredeti szignál sokszorosára erősíthető (5. ábra).



5. ábra. Biotinnal jelzett DNS próba jelzése és amplifikálása fluorofórral
A. a biotin nagy affinitással kötődik a jelzett avidinhez és a DNS próba szekvenciájának megfelelő helyen fluoreszkáló szignálok láthatók a target sejten.
B. Ha a jel intenzitása kicsi vagy nem látható, biotinnal jelzett anti-avidinnal, majd egy újabb fluoreszkáló avidin réteggel a fluoreszcens szignál intenzitása jelentősen megnövelhető, így a hibridizálódott próba jól láthatóvá válik.

A fluorofórok önmagukban is alkalmas hapténnek bizonyultak, így FITC-jelzett egér-anti-fluoreszcein-IgG-vel további, szignál amplifikáció érhető el. Ennek elsősorban a repetitív szekvenciákat nem tartalmazó DNS próbák detektálásánál van jelentősége.

A digoxigeninnel jelzett próbák fluorofórral konjugált antidigoxigeninnel immunhisztokémiai úton jeleníthetők meg. A FISH kezdetekor a fluoreszcein volt az egyetlen választási lehetőség. Ma már fluorofórok sorozatát szintetizáltak (2. táblázat). Különböző fluorofórok egyidejű alkalmazása lehetőséget szolgáltat különböző DNS szekvenciákra specifikus DNS próbák egyidejű alkalmazására is. Természetesen ez a fluorofórokra specifikus fluoreszcens szűrők ill. szűrőkombinációk alkalmazását teszi szükségessé. Ezen a területen a legnagyobb előrelépést az ún. multi-fluor FISH jelenti, ennek kidolgozása Ward és munkacsoportjának (1996) nevéhez fűződik.

2. táblázat. A FISH módszerhez alkalmazott fluorofórok és DNS festékek gerjesztési és emissziós maximumai

Fluoreszcens festék	Gerjesztési maximum (nm)	Emissziós maximum (nm)
<i>Fluorofórok</i>		
AMCA	350	450
Cascade Blue	377, 398	422
Spectrum Aqua	433	480
CY2	489	506
FITC, FluorX	495	519
Spectrum Green	509	538
TRITC	544	572
CY3	552	565
Spectrum Orange	559	588
Spectrum Red	587	612
Texas Red	589	615
CY5	648	665
<i>DNS festékek</i>		
DAPI	359	461
Hoechst 33258	346	460
Chromomycin A3	430	570
Propidium iodide	340, 536	617

A FISH érzékenységét tovább növelte a nem régen bevezetett ún. biotin-tiramid amplifikálási rendszer. Biotinált próbák esetén a detektálási reakció első lépésében a peroxidáz konjugált anti-biotin antitestet hozzákötik a biotinhoz, majd ezt követi a biotin vagy fluorokrómval jelzett tiramid alapú peroxidáz szubsztráttal történő reakció. Így a szignál mérete és a detektálás érzékenysége nagyságrenddel megnő.

A standard citogenetikában a kariotípus analízis a kromoszómákra karakterisztikus sávozás minőségétől függ. Az esetek többségében azonban sávozásra alkalmas, nagy felbontású metafázisokat nehéz preparálni. Különösen vonatkozik ez "solid" tumorokra, ahol a metafázis minősége mellett számos, sokszor a klasszikus módszerrel nem interpretálható kromoszómális elváltozás is jelen van. Ezzel magyarázható, hogy eddig teljesen automatizált

kromoszóma kariotipizálási, kizárólag komputervezérelt, az emberi segítséget nélkülöző módszert nem sikerült kidolgozni. Egy vagy két festő "painting" próba párhuzamos hibridizációja csak korlátozott információt szolgáltat a kromoszómák strukturális változásairól és nem biztos, hogy a kiválasztott próba éppen a megbetegedésre karakterisztikus kromoszóma aberrációt fogja megjeleníteni. Mindezeket a gondokat összegezte és megoldotta Speicher módszere, ami epifluoreszcencia szűrők sorozatát és specifikus komputer programot alkalmazó technika (színes kariotipizálás, lásd később). A multi-color-FISH egy kombinációs jelzési stratégián alapul, ezzel a jelzési és detektálási eljárással (spectral karyotyping) sikerült mind hematológiai mind *solid* tumorok teljesen automatizált kariotipizálását megoldani.

A fluoreszcencia *in situ* hibridizáció alkalmazása az alap kutatásban és a klinikai diagnosztikában

Géntérképezés

A FISH egyik legjelentősebb alkalmazási területe a géntérképezés. Kezdetben a klónozott szekvenciák lokalizálására kromoszóma preparátumokat alkalmaztak, ennek a módszernek a feloldása 1-2 Mb. Sok esetben problémát jelentett a FISH-sel párhuzamosan jó minőségű sávozást nyerni. Lichter és munkatársai ezt úgy küszöbölték ki, hogy bevezették az ún. "fraction length from the p terminus: Flpter" fogalmat. A hibridizálódott próba pozícióját úgy határozták meg, mint a kromoszóma teljes hosszának azon százalékát, ami a kromoszóma rövid karjától mérhető. Természetesen a "fractional length"-t a sávokra nehéz pontosan átkonvertálni. Ezen jelentősen segített annak felismerése, hogy a DAPI a giemsa sávozáshoz hasonló sávozási képet szolgáltat. Így a FISH-sel párhuzamosan alkalmazott kis koncentrációjú (50-20 ng/ml) DAPI festéssel a sávok pontosan beazonosíthatók, különösen jó felbontású sávozásos kromoszóma kép nyerhető a DAPI festők digitális képanalízissel történő kiértékelésével. A FISH során hibridizálódott próba közvetlenül, a DAPI sávozott képen vizualizálható.

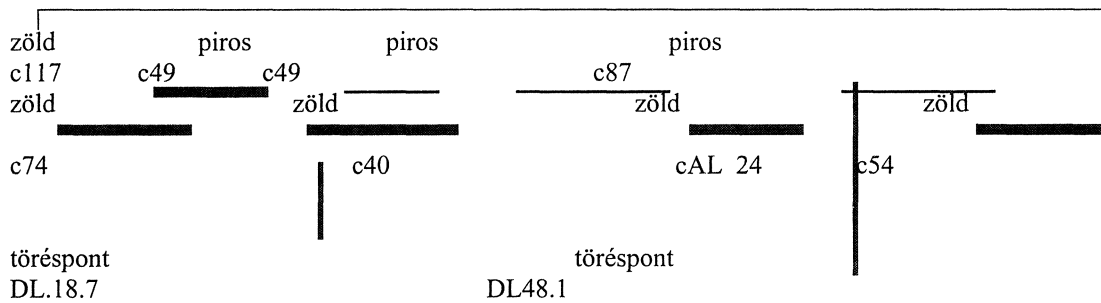
Különböző DNS próbák különböző fluorofórral történő sorrendfüggő azonosítása a kromoszómákon egyszerűen megoldható. A feloldóképesség tetszőlegesen változtatható a target kromatin kondenzáltsági fokával. Mivel a kromatin lényegesen kevésbé kondenzált interfázisban, mint metafázisban, ezért interfázisban a próbák egymástól kb. 50 kb távolságban detektálhatók, mindez metafázisos kromoszómákon megközelítőleg 1 Mb (Trask 1989). A feloldóképesség még tovább növelhető fehérjementes DNS szálak (fibre) target DNS-ként történő alkalmazásával. Számos protokolt dolgoztak ki arra, hogy hogyan lehet hibridizációra alkalmas DNS szálakat tárgylemezen fixálni. *Cosmid* vagy plasmid eredetű próbákkal a DNS szálon a feloldóképesség $0.33\mu\text{m kb}^{-1}$.

A "*FibreFISH*" (FISH kifestített, tárgylemezre fixált DNS szálon) segítségével, melyet interfázisos sejtekből nyernek megfelelő kezelést követően, ha azt komputer vezérelt képképző rendszerrel kombinálják, 1-400 kb közötti tartományban kvantitatív géntérképezés valósítható meg.

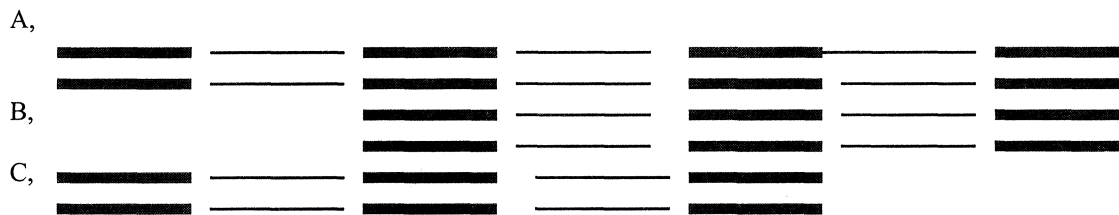
Természetesen az analízis sikerének alapvető feltétele a DNS szálak minősége mellett, jó felbontású fluoreszcens mikroszkóp és nagy felbontású CCD kamera alkalmazása. Az eredmények kiértékelése hasonló az CGH kiértékeléséhez, amit egy másik fejezetben részletezünk. Az 6. ábra a Duchenne muscularis dystrophia (DMD) gén térképezésre, a génen belüli deléciók kimutatására alkalmas *cosmid* DNS próbák tervezését és a két szekvencia deléciójára jellemző fluoreszcens jelek sematikus megjelenését szemlélteti.

I.

392 kb



II.



6. ábra. Az ábra I. része a FibreFISH-sel feltérképezett töréspontokat, míg a II. része a komputer vezérelt mikroszkópos analízis sematikus ábráját szemlélteti.

A kísérleti kivitelezés során a kozmid próbákat egészséges egyénből (A) és betegből (B vagy C) származó DNS szálakra párhuzamosan hibridizálva, a töréspontokra jellemző helyeken az alternatív (zöld-piros-zöld stb.) fluoreszcens szignálok megszakadnak, vagy a kontrolhoz viszonyítva hiányoznak, jelezve a dystrophingén alterációt. Legtöbb esetben a próbákat úgy tervezik meg, hogy azok átfednek, így a hibridizációs szignál a piros és zöld színkeveredés miatt narancssárga lesz, ezzel a megoldással a szekvenciák pontosabb genomiális lokalizációja határozható meg.

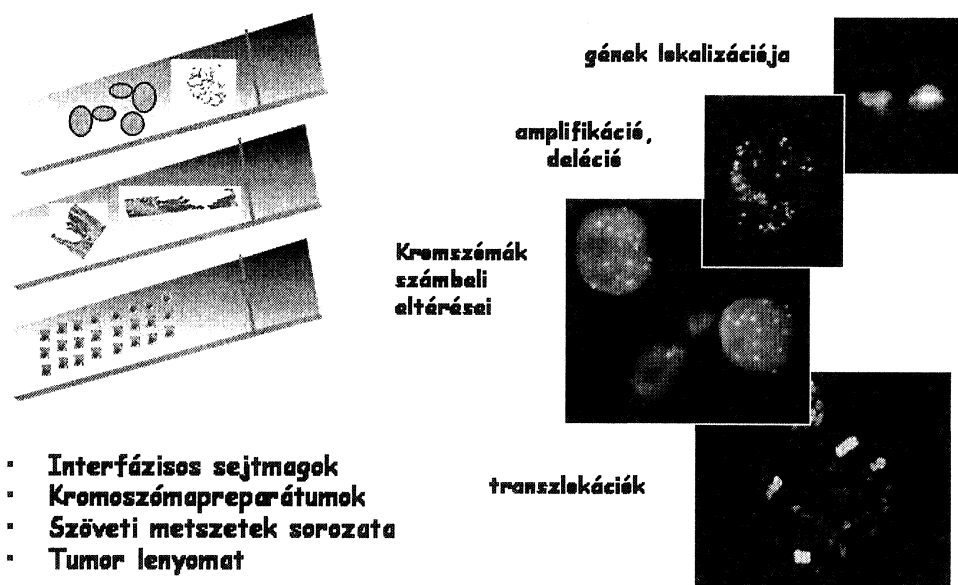
Színes kariotipizálás (color karyotyping), a FISH művészete

A kromoszóma festés elnevezést először Dan Pinkel alkalmazta abból a célból, hogy jellemezze az áramlási citométerrel szeparált kromoszóma könyvtárat, amivel a hibridizációt követően a fluoreszcens mikroszkópban a kromoszóma és a jellegzetes strukturális eltérések láthatóvá váltak. Az első teljes kromoszómát festő próbákat a National Laboratory Gene Library project keretében Los Alamosban és a Lawrence Livermore National Laboratory-ban (USA) készítették és alkalmazták. Ezek a DNS próbák már kezdetben is alkalmasak voltak arra, hogy kromoszómális eltéréseket azonosítsanak, az analízis nem igényelt gyakorlott citogenetikust. Párhuzamosan egy vagy két kromoszóma jellegzetes eltérése volt analizálható. Ma már egyetlen hibridizációból mind a 24 kromoszómán megjelenő transzlokáció és aneuploidia detektálható olyan esetekben is amikor a kromoszóma preparátum minősége a sávozásos analízishez nem megfelelő. Mindez *multicolor FISH-sel* valósítható meg. Négy fluorofór szimultán kombinálásával és a spektrális eltérések analízisére kifejlesztett képalkotó mikroszkóp alkalmazásával a kromoszómákon található eltérések szinte pillanatok alatt értékelhetők és azonosíthatók. A kromoszómák ilyen jellegű analízise az automatizált kariotipizálás területén forradalmi jelentőségű. A kezdeti kísérletek is számos meglepő eredményt szolgáltatottak mind a genom organizációját, mind az egyes betegségek jellegzetes kromoszómális eltéréseit illetően. Továbbá ezekkel a DNS festő próbákkal lehetőség van arra is, hogy a különböző fajokból származó kromoszóma preparátumokon történő hibridizációt

követően felvilágosítást kapjunk a konzervatív kromoszóma szekvenciákra, az evolúció során kialakult újra rendeződésükre.

Klinikai alkalmazások

A FISH módszer rutindiagnosztikában történő bevezetése jelentős előrelépést jelentett azon genetikai eltérések felismerésében, melyek a tumor progresszió során lépnek fel. A lehetséges klinikai alkalmazásokat foglalja össze a 7. ábra.



7. ábra. A FISH klinikai alkalmazásának lehetőségei citogenetikai eltérések kimutatására

A FISH módszer új távlatokat nyitott a citogenetikában. Ma már az Amerikai Egyesült Államokban a prenatális diagnosztikában elfogadott DNS próba kit-eket Magyarországon is alkalmaznak, ezekkel a magzati rendellenességek (pl. Down syndroma) 1 nap alatt 2-5 ml magzatvízből származó sejteken megvalósítható. Ugyanez a citogenetikai analízis a standard citogenetikai módszerrel kb.15-20 ml magzatvizet és 2-4 hetet igényel. Interfázisos magzatvízsejteken már sikerrel alkalmazták a FISH-t kromoszómális triszómiák (13-as, 18-as, 21-es) valamint más számbeli kromoszóma eltérések (pl. sex kromoszómák esetén az XO, XXX, XYY, XXY) detektálására.

A kromoszómák számbeli eltéréseinek kimutatása mind a hematológiai mind a solid tumorok genetikai analízisében prognosztikai jelentőségű. A 3. táblázat a rutindiagnosztikában is alkalmazható genetikai eltérések FISH-sel történő detektálási lehetőségeit foglalja össze.

A FISH klinikai minták analízisére történt bevezetése óta nemcsak megsokszorozódott a rendelkezésre álló genetikai ismeretek mennyisége, hanem számos új diagnosztikus és prognosztikus jelentőséggel bíró információ is napvilágra került. Így pl. prostata tumorok centroméra specifikus szondákkal történő tanulmányozása során FISH-sel kimutatták, hogy a 7-es kromoszóma triszómiája az esetek 85 %-ban rossz prognózist jelent, ennél a kromoszómális eltérésnél a betegek túlélése kevesebb, mint 3 év.

3. Táblázat A DNS specifikus próbák típusai és a rutin diagnosztikában alkalmazott molekuláris citogenetikai analízisek

DNS próbák eredete	DNS próbák típusai	méret	FISH technika	A kimutatható kromoszóma alterációk típusai
kromoszómák	Áramlási citométerrel szortírozott	> 1Mb	kromoszóma festő (teljes vagy kar), multicolour FISH, 24 színű kariotipizálás	transzlokáció marker kromoszómák
kromoszóma szegmentek	Mikrodisszekcióval előállított			
Klónozott gének vagy DNS szekvenciák	YACs, PACs, BACs	< 1 Mb	lókusz specifikus, gén-, centroméra-teloméra- és szubteloméra régiók	mikrodeléciók amplifikációk számbeli eltérések transzlokációk
	Kozmidok	< 0,1 Mb		
	Fágok	< 0,05Mb		
	Plazmidok	< 0,01Mb		
	RNS próbák	< 0,01Mb	génexpresszió	
Tisztított DNS sejtekből és szövetekből	Genomiális DNS	> 1 Gb	Komparatív genomiális hibridizáció (CGH)	amplifikációk és deléciók a teljes genomban

Nagyszámú hólyagtumor FISH analízise alapján úgy tűnik, hogy a 7-es és 11-es kromoszómák monoszómiája, a 9p21 lókusz deléciója prognosztikai értékű. Az acute myeloid leukémiára jellemző 7-es monoszómia és 8-as triszómia kimutatásában a FISH és a klasszikus, sávozáson alapuló citogenetikai módszerek igen jó korrelációt mutatnak. Sőt a standard citogenetikával diploidnak karakterizált AML-es esetekben FISH-sel kimutatható volt a 8-as kromoszóma triszómiája. Hasonlóan megbízható a chronikus lymphoid leukémiára (CLL) jellemző 12-es triszómia FISH-sel történő detektálása, sőt a 12-es kromoszóma triszómiája 2,6-szer gyakrabban volt kimutatható interfázisú sejtekben, mint konvencionális citogenetikával.

Ma már Magyarországon is a rutindiagnosztikában számos területen alkalmazzák a FISH-t kromoszómális rendellenességek kimutatására a diagnózis pontos megállapítása érdekében.

Ajánlott irodalom

Balázs M, Ádány R.: Molekuláris morfológiai módszerek a laboratóriumi medicinában
Lege Artis Med. 2001;11:8.340-345. (Összefoglaló Közlemény)

Donnenfeld AE, Lamb AN. Cytogenetics and molecular cytogenetics in prenatal diagnosis. *Clin Lab Med.* 2003;23(2):457-80.

FISH technology, Springer Lab Manuals (Eds: Rautenstrauss BW, Liehr T) Springer-Verlag Berlin, 2002.

Mathew S, Raimondi SC. FISH, CGH, and SKY in the diagnosis of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Methods Mol Biol.* 2003;220:213-33. Review.

Swansbury J. Solving problems in multiplex FISH. *Methods Mol Biol.* 2003;220:235-43. Review.

Internetes oldalak

[http://genome.ucsc.edu/Assembly of draft human genome](http://genome.ucsc.edu/Assembly%20of%20draft%20human%20genome)

[http //www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/Entez/Human genes and disease \(OMIM\) and medical literature](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/Entrez/Human%20genes%20and%20disease%20(OMIM)%20and%20medical%20literature)

[http //www.molgen.mpg.de/-cytogen/Cloned DNA sequences covering all human chromosomes](http://www.molgen.mpg.de/~cyto-gen/Cloned%20DNA%20sequences%20covering%20all%20human%20chromosomes)

[http //www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/View of chromosomes and maps and loci with links to NCBI.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/View%20of%20chromosomes%20and%20maps%20and%20loci%20with%20links%20to%20NCBI)

KOMPARATÍV GENOMIÁLIS HIBRIDIZÁCIÓ (CGH)

Balázs Margit

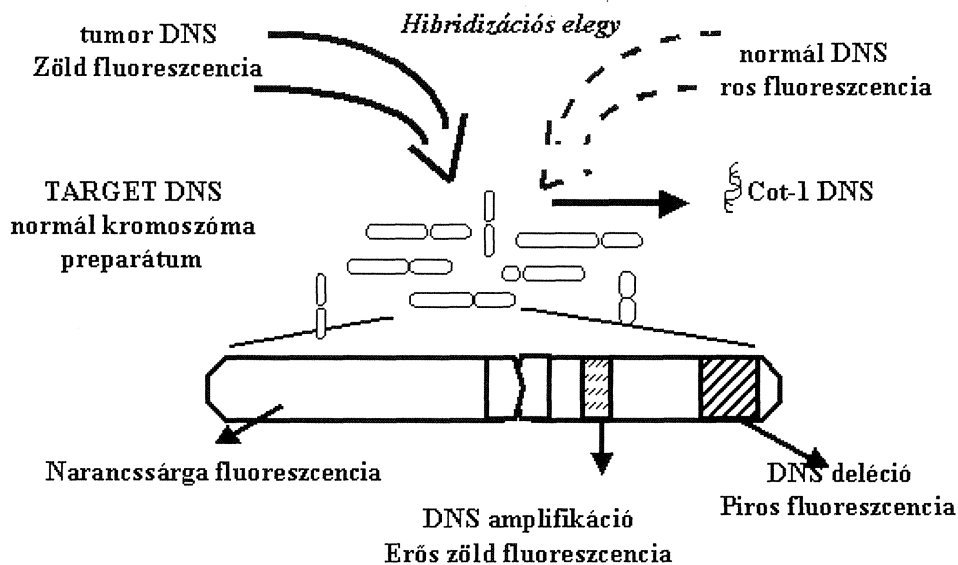
A komparatív genomiális hibridizáció (CGH) a fluoreszcencia *in situ* hibridizáció elvén alapuló molekuláris genetikai módszer, melyet 1992-ben Kallioniemi és munkatársai dolgoztak ki. CGH-el a tumor sejtek genomjában előforduló kromoszómális eltérésekről (relatív DNS-amplifikációkról és -deléciókról) nyerünk információt. Ezzel a módszerrel a tumor genomban nemcsak ismert génamplifikációk és géndeléciók detektálhatók, hanem ismeretlen genetikai eltérések (DNS többletek és hiányok) is kimutathatók, valamint a CGH technikával lehetőség van a tumor sejtekben talált genetikai eltérések kromoszómális szintű feltérképezésére is normál kromoszóma preparátumokon. Egyetlen CGH kísérletből a tumor genomban előforduló valamennyi mega bázis nagyságrendű genetikai alteráció detektálható. A standard citogenetikával szemben a DNS kópiaszám eltérések meghatározásához nincs szükség a tumorsejtekből kromoszóma preparátumok előállítására. A friss szöveti minták mellett archív, formalin-fixált paraffinba ágyazott szövetek genetikai analízise is megoldható, így lehetőség van a retrospektív vizsgálatokra is. A CGH segítségével tumorok sorozatának kromoszómális szintű vizsgálata valósítható meg anélkül, hogy a tumorsejteket mesterséges körülmények között manipulálnánk és így az eredeti genetikai eltéréseket esetleg *in vitro* körülmények között megváltoztatnánk.

A komparatív genomiális hibridizáció elve

A CGH a fluoreszcencia *in situ* hibridizáció (ld. előző fejezet) elvén alapul, az alapvető különbség az, hogy ennél a módszernél a target DNS minden esetben normál sejtekből izolált kromoszóma preparátum, amit phytohaemagglutinin-nal stimulált peripheriás limfocitákból nyernek standard citogenetikai módszerekkel. A DNS próbák fluoreszcens festékekkel nick-translatióval jelzett tumor (teszt DNS) illetve normál (referencia DNS) sejtekből izolált DNS-t tartalmaznak. A CGH reakció során a hibridizációs elegy három DNS komponenst tartalmaz (1. ábra),

- 1.) a tumor sejtekből nyert DNS-t (zöld fluoreszcencia: fluoreszcein-izotiocianát: FITC),
- 2.) a normál sejtekből nyert DNS-t (piros fluoreszcencia: tetrametilrodamin-izotiocianát:TRITC) és
- 3.) jelöletlen Cot-1 DNS-t. A Cot-1 DNS segítségével a tumor és normál DNS-ben jelenlévő repetitív szekvenciák hatékony szuppressziója érhető el.

A Cot-1 DNS-el meggátolható, hogy a centromérák tandem ismétlődő szekvenciáihoz történő kötődés miatt (pl. 1q12, 9q12, 16q12, 19cen) ezek a régiók intenzív fluoreszcenciát mutassanak, ez u.i. lehetetlenné tenné a kvantitatív analízist (lásd később).

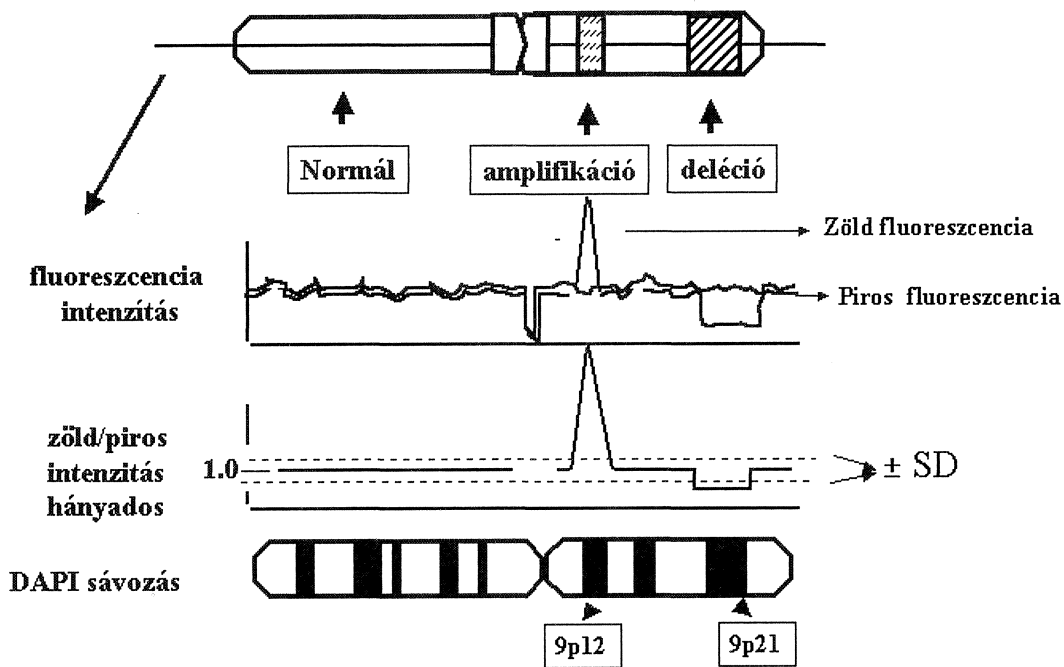


1. ábra. A komparatív genomiális hibridizáció sematikus ábrázolása. A különböző fluoreszcens festékekkel jelzett tumor és referens DNS-ek és Cot-1 DNS-ek normál metafázisú kromoszómákhoz történő kohibridizációját komputervezérelt képanalízis követi. (Kallioniemi et al. *Cancer Biology*, 4. 41-46. 1993)

A CGH módszernél a hibridizációs és a hibridizációt követő kísérleti körülmények hasonlóak a FISH-nél leírtakhoz. A renaturáció során a FITC-dUTP-jelzett tumor DNS és TRITC-dUTP jelzett normál DNS a normál target kromoszómákhoz kötődik. Azokon a kromoszómális szakaszokon, melyeken a normál és tumor DNS kötődése azonos, egyenes narancssárga fluoreszcencia figyelhető meg a piros és a zöld mikroszkópos felvételek egymásra vetítését követően. Ha a vizsgált tumor DNS-ben egy adott DNS szakaszon a normál DNS-hez viszonyítva DNS többlet van (pl. amplifikáció miatt) a target kromoszóma megfelelő szakaszán ezt a zölden fluoreszkáló tumor-DNS többlet kötődése miatt, erős zöld fluoreszcencia jelzi. A tumoros sejtekben teljesen deletált DNS hiánnyal jellemezhető kromoszómális szakaszok pirosan fluoreszkálnak.

Tekintettel arra, hogy a CGH hibridizációs és mosási körülmények hasonlóak a FISH-hez ezeket itt csak röviden említjük meg. A CGH módszernél a tárgylemezre fixált kromoszóma preparátumot a denaturáló oldatban 70-75 °C-on denaturálják, majd a sejtek dehidrációját és a lemez száradását követően az ugyancsak denaturált jelzett DNS-eket és Cot-1 DNS-t tartalmazó hibridizáló elegyet a targetre cseppentik, fedőlemezzel lefedik és 48-72 óráig nedves kamrában hibridizálják. A nem kötődött DNS-ek lemosását követően a lemezeket megszárazítják és a kromoszómákat antifade¹⁵-ben oldott DAPI-val (200 ng/ml) jelölik. A DAPI egy kéken fluoreszkáló DNS festék, ami preferenciálisan kötődik a DNS AT bázispárjaihoz és itt erős kék fluoreszcenciát mutatva a kromoszómák jellegzetes sávozásos mintázatát hozza létre. Ezt kihasználva a kromoszómák a DAPI sávozás alapján viszonylag könnyen azonosíthatók (2. ábra).

¹⁵ Anti-fade: olyan vegyületek (pl. a parafenilén diamín dihidroklorid), melyek megakadályozzák a fluoreszcens festékek elhalványodását, gyors kiégését, amit a nagy intenzitású gerjesztőfény okoz.

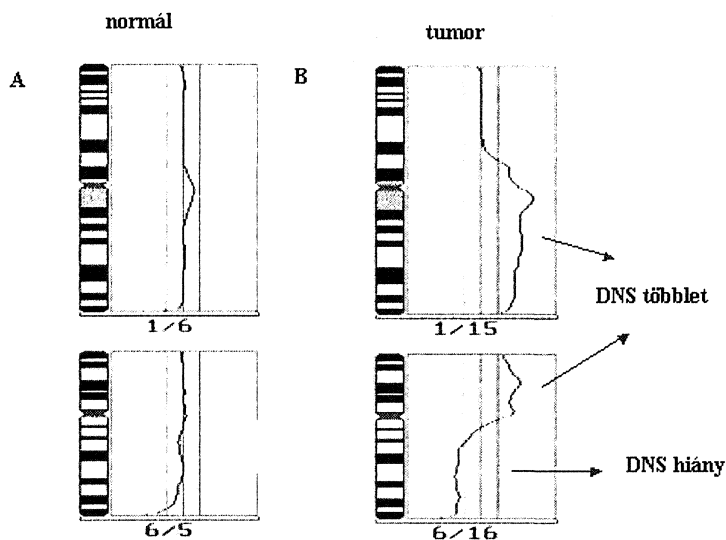


2. ábra. Számítógép vezérelt CGH képanalízis sematikus ábrája. A zöld és piros fluoreszcencia intenzitás arányok a kromoszómák hossz tengelye mentén meghatározva minden kromoszómára külön-külön jellegzetes ún. kromoszóma profilt szolgáltatnak. Ez alapján a sávozás segítségével a genetikai hibák feltérképezhetők.

A DAPI sávozás minősége a megfelelően alkalmazott hibridizációs körülmények mellett oly mértékben finomítható, hogy a normál kariotípus mintegy 20% pontossággal automatikusan megszerkeszthető. A sávozások alapján a genetikai eltéréseknek a DNS szekvenciákhoz történő hozzárendelésével az adott tumorra jellemző genetikai aberrációk feltérképezhetők. Ezzel a módszerrel a detektálható legkisebb eltérés (többszörös amplifikáció esetén) megközelítőleg 1 Mb, de inkább a 10-20 Mb eltérések mutathatók ki.

A fluoreszcencia intenzitások vizualizálása megfelelően kiválasztott gerjesztési (külön-külön minden fluoroforra szelektív gerjesztési szűrő) és emissziós szűrőkkel (a képek esetleges eltolódása miatt egyetlen emissziós szűrőblokk) felszerelt fluoreszcens mikroszkóppal lehetséges. A teszt (tumor) és a referencia-DNS (normál) fluoreszcencia intenzitásainak pixelről-pixelre történő összehasonlításával történik a tumor DNS-ben jelenlévő genetikai kiegyensúlyozatlanságok (genetic imbalances) meghatározása.

A CGH eredmények kiértékelésénél az alapfeltételezés az, hogy a kötődött tumor és normál DNS mennyisége a két mintában jelenlévő DNS koncentrációjával arányos.



3. ábra. CGH kromoszóma profilok normál DNS-ek-normál DNS-el valamint tumor DNS-ek normál DNS-sel és tumor DNS-sel történő kohibridizációját követően.

A 3 ábra olyan CGH eredményt ábrázol, ahol normál sejtekből származó DNS-t hibridizáltunk referencia és teszt DNS-ként is. A 3A ábrán az 1-es és a 6-os kromoszómák sávozásos képe mellett a normál-normál hibridizációra jellemző ún. zöld/piros intenzitás profil látható, azaz a kromoszóma hossz tengelye mentén az intenzitás arány megközelítőleg 1-gyel egyenlő. Az ábrán a kromoszómák alatti számok közül az első szám a megfelelő kromoszóma azonosító száma (jelen esetben az 1-es és a 6-os), míg a második szám az átlagolt, homológ kromoszómák számát adja meg (az 1-es kromoszómánál 6, 6-os kromoszómánál 5 független vizsgálatot végeztek). A 3B ábra olyan CGH DNS profilokat mutat be, ahol a teszt-DNS malignus melanoma sejtekből preparált DNS, a referencia-DNS normál sejtekből preparált DNS volt. A kromoszóma profilok szemléletesen mutatják azokat a kromoszómákat illetve kromoszóma szegmenteiket, melyek a normáltól eltérően DNS többlettel vagy DNS hiánnyal rendelkeznek a tumor genomban. Az ábrán nyíllal jelöltük a tumor genomban DNS többletet mutató kromoszómális szakaszokat, melyek a 1p24-1qter valamint a 6p amplifikációját jelentik. Ugyanakkor egyértelműen látszik a 6q deléciója. Ahhoz, hogy kvantitatív, megbízható és reprodukálható eredményeket nyerjünk, a piros és zöld fluoreszcencia intenzitások pontos meghatározása szükséges. Alapvetően fontos továbbá a képanalízissel kapcsolatos olyan eljárások alkalmazása, amelyek lehetővé teszik a különböző sejtekből nyert kromoszómákról kapott digitalizált felvételeknek az összeadását és átlagolását. Ennek célja, hogy az átlagolással a homológ kromoszómákról szerzett információk statisztikai hitelességét alátámasszuk. Ezért a kvantitatív, számítógép-vezérelt, nagy felbontású CCD kamerával felszerelt fluoreszcencia képtovábbító rendszer alkalmazása a CGH analíziseknél elengedhetetlen követelmény.

A CGH képanalízis

1. FITC, TRITC és DAPI fluoreszcencia képek (imagek) felvétele.
2. Háttér fluoreszcencia korrekció kromoszómák szegmentálása a DAPI imagek alapján.
3. Optikai "elmozdulások: optical shift" korrekciója.
4. Kariotípus megadása a DAPI-sávzás és a hibridizáció (színes kariotípus) alapján.
5. A kromoszómák hossz tengelyének pontos megállapítása.
6. Zöld-piros fluoreszcencia intenzitás arányok kiszámítása.
7. Egyedi kromoszóma profilok ábrázolása.
8. Homológ kromoszóma profilok átlagolása.

Mivel a tumor DNS-ben jelenlévő DNS amplifikációk és deléciók detektálása a FITC/TRITC fluoreszcencia intenzitások arányának meghatározásán alapul/ szükség van a FITC és TRITC imagek fluoreszcencia intenzitásának normalizálására. Ez több módszerrel is megoldható, az egyik legelterjedtebben alkalmazott eljárás során a kromoszómák minden egyes pontjára (pixelére) jellemző zöld fluoreszcenciát reprezentáló intenzitás értéket automatikusan egy hisztogramban ábrázolják, majd meghatározzák a hisztogramra jellemző statisztikai átlag értéket (C_f). A FITC imagehez tartozó, a háttérre jellemző, azaz a szegmentációs maszkon kívüli pixel értékeket egy másik hisztogramban ábrázolják és ennek a hisztogramnak is meghatározzák a statisztikai átlagértékét (B_f). A korrigált háttér FITC (M_f) intenzitás az alábbiak szerint automatikusan kerül kiszámításra:

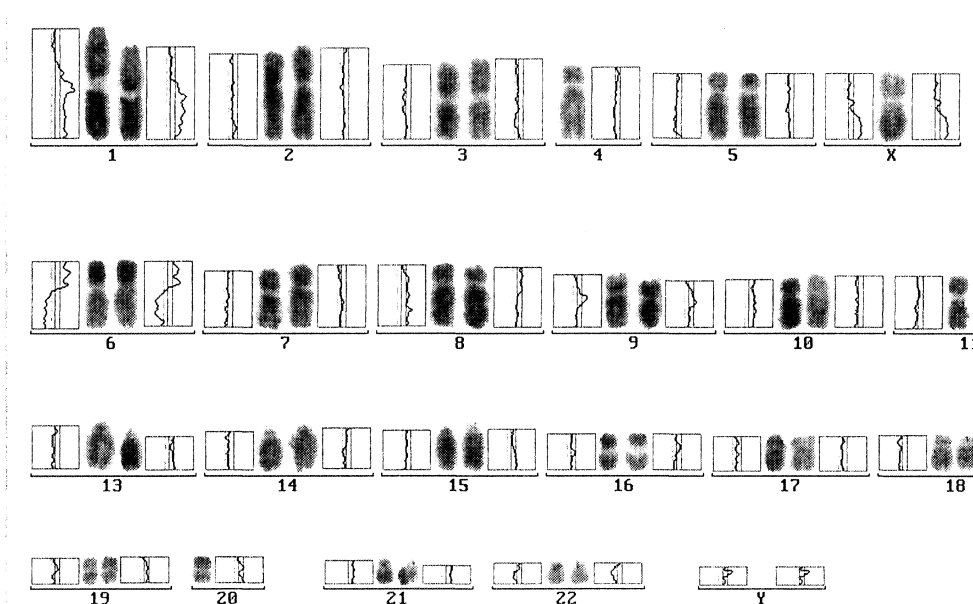
$$M_f = C_f - B_f$$

az adott x és y pozíciókra vonatkoztatva a fluoreszcencia intenzitások az alábbiak szerint korrigálhatók:

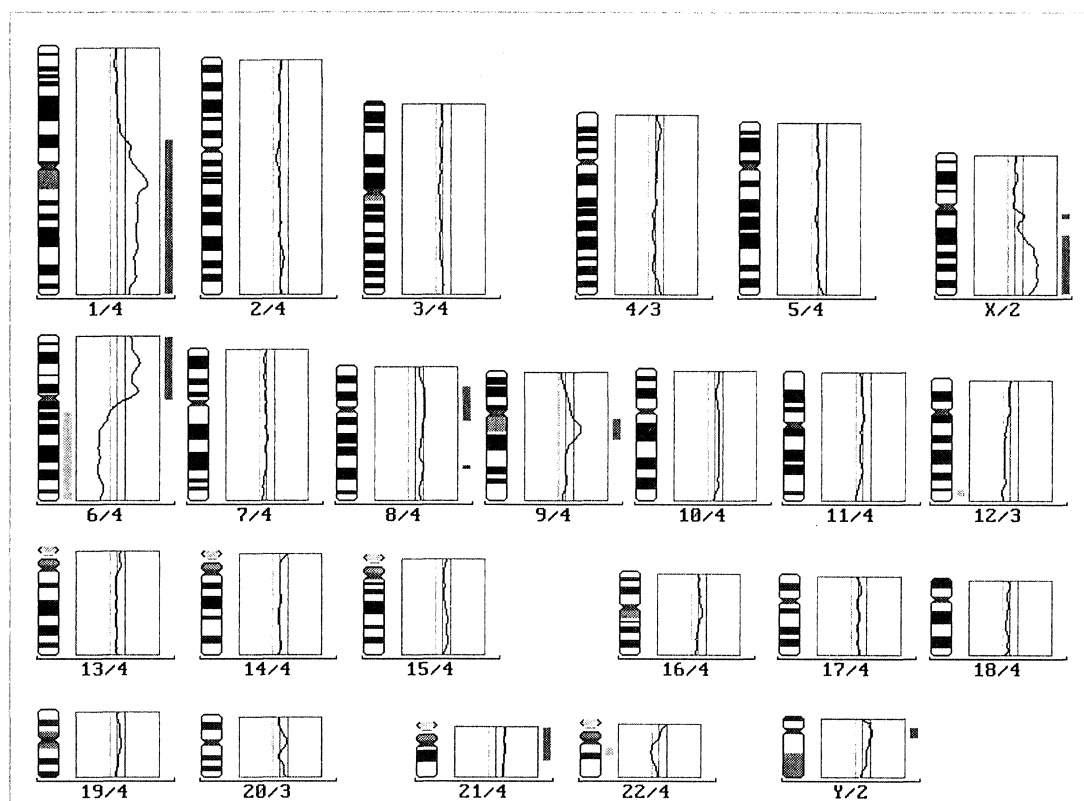
$$M_f(x,y) = C_f(x,y) - B_f$$

Hasonló módon analizálják a piros fluoreszcenciájú referencia DNS hibridizációját megjelenítő fluoreszcens képeket is.

Az elméleti összes zöld/piros fluoreszcencia intenzitás arány 1, mivel a hibridizáció során a teszt és a referens DNS koncentrációja azonos volt. Azonban a teszt DNS-ben előforduló DNS többlet vagy hiány miatt ez a szám a kromoszómák pixelről pixelre történő analízise során a teszt-DNS-ben meglévő genomiális eltérések miatt eltér egytől. A fluoreszcencia intenzitás amplifikáció vagy DNS többlet esetén > 1 deléció illetve DNS hiány esetén < 1 . A normál DNS-el azonos DNS szakaszokra az arány megközelítőleg egy, ami a 4. ábrán a 2-5, 7-16, 18-22 és Y kromoszómák példáján látható. Az 1q, 6p (vö. 3. C és D ábra), és az Xq amplifikációra utaló eltérést mutat és deléció figyelhető meg a 6q területen (vö. 3.D ábra). Az előbb említett eltérések sokkal szemléletesebben láthatók az 5. ábrán, ahol már nemcsak egyetlen sejt kromoszómaáinak CGH profilja látható, hanem több homológ kromoszóma átlag értékei vannak feltüntetve.



4. ábra. CGH kromoszóma profilok tumor DNS (malignus melanóma) és normál referens DNS hibridizációját követően.



5. ábra. Melanómára jellemző genetikai eltérések kromoszómális lokalizációjának meghatározása CGH-el. A kromoszóma profilok alatti második szám az átlagoláshoz felhasznált képek számát jelenti. A nyilak jellegzetes amplifikációkat (1q, Xq, 6p) és deléciókat (6q).

A profilok mellé rendelt sávozásos kromoszómák az eltérések genetikai feltérképezésében játszanak szerepet. Az átlag CGH profilokon megjelenő eltéréseket azonosíthatjuk a kromoszómák sávozásos kariogramjához rendelt táblázatokból. A genetikai analízis további lépéseiben a CGH-el megabázis szintjén feltárt genetikai eltéréseket FISH-el, specifikus DNS próbákkal interfázisos sejtmagokban vagy kromoszóma preparátumokon is detektálhatjuk.

A CGH módszer előnyei és korlátai

Előnyök

Egyetlen hibridizáció során a tumor genom DNS kópiaszám elváltozásai (DNS többletek, DNS hiányok, génamplifikációk és géndelációk) normál kromoszóma preparátumokon kimutathatók.

CGH analizáló software alkalmazásával az eltérések kromoszómális szinten feltérképezhetők.

DOP-PCR-al kombinálva igen kis mennyiségű DNS genetikai analízise is megvalósítható.

Archív minták CGH analízisével retrospektív, célzott tanulmányok végezhetőek.

Standard citogenetikai technikával nem analizálható daganatok kromoszómális eltéréseiről is szerezhető információ.

Korlátok

Általában 10-20 Mb nagyságú deléciók (DNS hiányok) és amplifikációk (DNS többletek) mutathatók ki, kisebb szekvenciákat (kb. 1Mb) átfogó DNS többletek csak többszörös (5-10-szeres) génamplifikációknál detektálhatók.

A normál sejt (normál DNS) kontamináció nem haladhatja meg az analizálandó mintában a 40%-ot.

Strukturális eltéréseket nem lehet ezzel a technikával kimutatni.

A CGH technika tehát alkalmas arra, hogy a különböző stádiumú daganatok (pl. premalignus leziók, invazív tumorok és metasztázisok) analízisével a tumorok kialakulását és progresszióját genetikai eltérések alapján kövessük nyomon, valamint, hogy a tumorra jellemző genetikai hibákat azonosítsuk. Az elmúlt néhány évben CGH-el számos tumortípus esetén sikerült a tumor típusra jellemző, gyakran előforduló genetikai eltéréseket felismerni. Konzisztens genetikai eltéréseket és többszörösen amplifikált szekvenciákat találtak számos daganatban: pl. agy-, colon-, prosztata-, emlő- tumorokban, a melanoma egyes altípusaiban stb. Több száz glioblasztoma tumor CGH analízisével kimutatták, hogy a 7-es kromoszóma többlete és a 10-es deléciója jellegzetes elváltozás erre a daganat típusra. Emlőtumorokban az ismert kromoszómális alterációk mellett (mint pl. ERB-B2 [17q12] onkogénamplifikáció vagy a 17p [p53] deléció) korábban ismeretlen, de gyakori genetikai aberrációként jelent meg a 20q régió amplifikációja, ami úgy tűnik egy igen fontos onkogén jelenlétével lehet kapcsolatos hiszen más tumor típusok esetén is gyakori genetikai eltérésként detektálták CGH-el. Emlőtumorra jellegzetes további DNS többleteket írtak le az 1-es, 8-as, 17-es, valamint deléciót 13q kromoszóma szakaszokon.

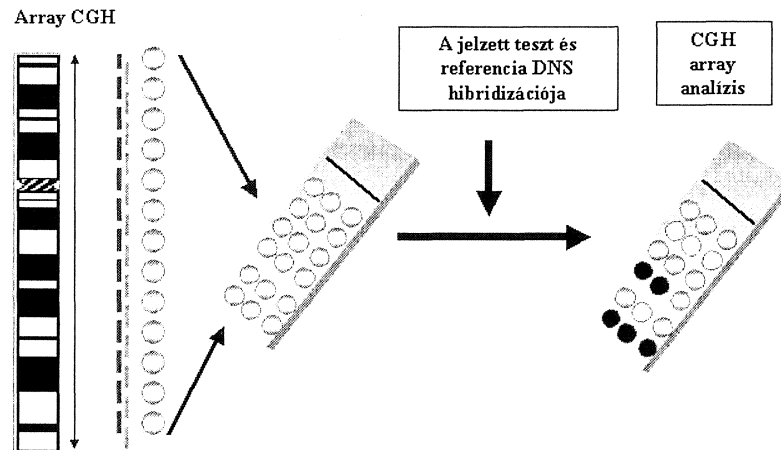
A CGH-el talált eltérések nem random kromoszómális alterációk, hanem tumor típusal és tumor stádiummal összefüggő eltérések. Információt szolgáltatnak olyan DNS specifikus szondák kidolgozására, melyek a hatékonyabb diagnózist célozzák meg. CGH eredmények ismeretében lehetőség van célzott FISH szondák kifejlesztésére, melyek relevanciáját egyetlen kísérlet során akár több száz tumorból származó mintán (tissue array) lehet tesztelni.

CGH microarray módszer

A CGH felbontásának javítását és technika hátrányainak kiküszöbölését célozta meg a 90-es évek végén kidolgozott CGH array módszer. A tárgylemezre normál metafázisos kromoszómák helyett klónozott DNS szekvenciák ezreit rögzítik (BAC és YAC klónok). Mintegy 30000 CGH-arrayre alkalmas BAC és YAC klónt sikerült eddig előállítani. A CGH array hibridizáció teljesen azonos elven alapul, mint a kromoszómális CGH metodika, alkalmazásával a CGH felbontása a próba méretének megfelelően lecsökkenthető. A CGH mikroarray technika alapja lehet

- 1.) cDNS alapú array CGH és
- 2)genomiális DNS alapú array CGH (mátrix CGH név alatt is ismert technika).

cDNS alapú array CGH-módszert először 1999-ben Pollack és mtsai írták le. Ez a CGH array technika a konvencionális cDNS mikroarray-t alkalmazza targetként (6. ábra). Amint ez az ábrából kiderül ennek a módszertani megközelítésnek az óriási előnye az, hogy átfogó analízisre ad lehetőséget nemcsak a génkópiaszámok eltéréseire, hanem, egyúttal a gének expressziójára vonatkozóan is, hiszen ugyanaz az array mRNA hibridizációra is alkalmas.



6. ábra A CGH array technika sematikus ábrázolása

A CGH array technika alkalmazásának korlátai

A target cDNS szekvenciák mérete nem túlságosan nagy (0,5-2 kb), így a genomiális DNS hibridizációja sokszor gyenge, hiszen a genomiális DNS együttesen tartalmazza az intron és exon szekvenciákat.

A kereskedelemben kapható cDNS array-knél előfordul a hibás génhozzárendelés, aminek számos oka lehet és inkonzisztens eredményt szolgáltat.

Az array CGH módszernél target DNS-nek genomiális DNS-t alkalmaznak, ezt a módszert először Solinas-Toldo és munkatársai írtak le és Pinkel és munkatársai fejlesztették tovább. A target DNS genomiális klónokból nyerhető. A legelterjedtebben a „yeast artificial chromosomes” (YAC: 0,2-2 Mb), BAC (kb 300 kb) P1 (kb. 70-100 kb), PAC (130-150 kb) és cosmid (30-45 kb) klónokat alkalmaznak, ezek lényegesen pontosabb információt adnak, mint a kisméretű cDNS alapú CGH array-k, a hibridizáció sokkal egységesebb és reprodukálhatóbb.

Irodalom

Knuutila S, Bjorquist AM, Autio K, Tarkkanen M, Wolf M, Monni O, Szymanska J, Larramendy ML, Tapper J, Pere H, El-Rifai W, Hemmer S, Wasenius VM, Vidgren V, Zhu Y. DNA copy number amplifications in human neoplasms: review of comparative genomic hybridization studies. *Am J Pathol.* 1998;152:1107-1123.

Knuutila S, Aalto Y, Autio K, Bjorquist AM, El-Rifai W, Hemmer S, Huhta T, Kettunen E, Kiuru-Kuhlefelt S, Larramendy ML, Lushnikova T, Monni O, Pere H, Tapper J, Tarkkanen M, Varis A, Wasenius VM, Wolf M, Zhu Y. DNA copy number losses in human neoplasms. *Am J Pathol.* 2000;155:683-694.

Pinkel, D., Graves, R., Sudar, D., Clark, S., Poole, I., Kowbel, D., Collins, C., Kuo, W.L., Chen, C., Zhai, Y., Dairkee, S.H., Ljung, B.M., Gray, J.W., Albertson, D.G. High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet* 20:207-211, 1998.

Yuko Sugiyama, Kazuo Sugiyama, Yasuo Hirai, Futoshi Akiyama, Katsuhiko Hasumi, Microdissection is essential for gene expression profiling of clinically resected Cancer Tissues *Am J Clin Pathol* 2002;117:109-116.

Albertson D. and Pinkel D. Genomic microarrays in human genetic disease and cancer *Hum. Mol. Genet.* 2003; 12: 145-152.

DNS-CSIP TECHNOLOGIA

Puskás László

A humán genom projekt keretében ma már korlátlan hozzáférési lehetőség van a gének szekvenciáit és lokalizációját tartalmazó adatbázisokhoz, nagyban segítve ezzel a kromoszóma rendellenességek felderítését, a génexpressziós mintázat szisztematikus meghatározását, mely nemcsak a sejtek normális működésének megértése szempontjából nagyon fontos, hanem hozzájárul olyan új gének azonosításához, melyek adott betegségcsoportra markerként jellemzőek és terápiás szempontból potenciális gyógyszer-célpontok lehetnek. A huszadik század második feléig a gének funkciójának és szabályozásának tanulmányozása egyedi gének lépésről lépésre történő vizsgálatán alapult. Tekintve, hogy egyre több organizmus genomjának szekvenciája vált és válik teljesen vagy részlegesen ismertté, számos új technika fejlődött ki, melyek a génfunkciók szisztematikus analizisét teszik lehetővé. A technikák közül egyik nagykapacitású, könnyen automatizálható módszere a DNS-csip technológia, mely forradalmasította a molekuláris biológiát, a funkcionális genomikát és napjainkban a klinikai diagnosztikai módszereket is.

Nukleinsavak kimutatása hibridizációs technikákkal

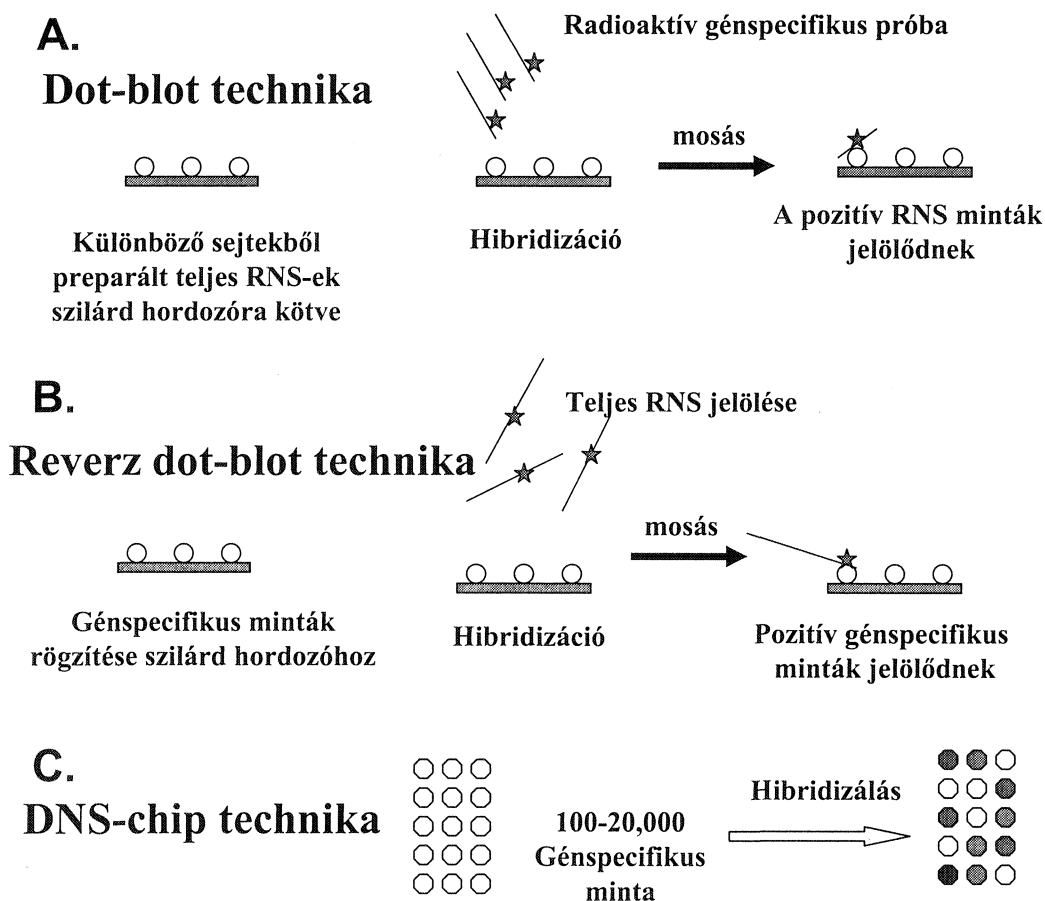
A különböző organizmusokban jelenlevő adott nukleinsavak kimutatása nélkülözhetetlen, ha azok tulajdonságait, szerepét, kölcsönhatásait vizsgálni kívánjuk. A genomok szekvenciameghatározása mellett az egy környezeti körülmények között megnyilvánuló génaktivitásokat, a genetikai variánsok jellemzését, mutációk felderítését vagy adott génszakaszok jelenlétét feltáró technológiák a DNS szerkezetének felderítése után folyamatosan fejlődtek. Szinte mindegyik ilyen kimutatási módszer a DNS azon tulajdonságán alapszik, hogy két komplementer szála a bázispárosodás törvényei alapján oldatban megtalálja egymást, kiegészülnek, hibridizáció történik. Az egyszálú nukleinsavak specifikus kölcsönhatása tehát nemcsak az élet alapja, hanem az egyes szekvenciák kimutatásának központi eleme.

Fontos felfedezés volt Gillespie és Spiegelman megfigyelése 1965-ben, akik leírták, hogy a denaturált DNS szálak (a széttekert kettős spirál) erősen kötődnek nitrocellulóz papírhoz és a kikötődött egyszálú DNS szakaszok nem képesek újraegyesülni. Ugyanakkor viszont hibridizálni tudnak komplementer egyszálú nukleinsavval, mint amilyen az RNS molekula. Ez a megfigyelés volt az alapja a szilárd hordozóhoz kikötődő és különböző technikákkal megjelölt nukleinsavak (egyszálú DNS-ek, RNS-ek) kimutatására szolgáló technológiáknak. Southern 1975-ben ³²P izotópot használt oldatban lévő DNS molekulák jelölésére, amelyek a nitrocellulóz papíron megtalálva komplementer DNS szakaszokat odakötődtek és így a specifikus kölcsönhatást ki tudta mutatni. A szilárd hordozóhoz (jelen esetben a nitrocellulóz papírhoz) kikötődött nukleinsavakat mintának, az ahhoz kapcsolódó, oldatban levő egyszálú nukleinsavakat próbának nevezünk. Ezt a megközelítést továbbfejlesztve Kafatos és munkatársai 1979-ben több apró foltban vittek fel különböző génekre jellemző DNS molekulákat nitrocellulóz papírra, úgy, hogy minden folt egy fajta mintát tartalmazott. Mivel több pontot vittek fel egy felületre, ezért a hibridizáció során egyetlen lépésben több DNS jelenlétét is tudták vizsgálni (1.A ábra). Egy szilárd hordozóra meghatározott sorrendben, mintázatban felvitt pontokat array-eknek, vagy lapkáknak nevezünk. A „dot-blot” technikának is elnevezett módszerrel megállapítható például, hogy több baktérium törzs közül, melyek tartalmaznak egy antibiotikum rezisztenciát meghatározó gént. A különböző baktériumtörzsből izolált DNS-t egyenként foltokba kikötve, arra egy izotóppal jelölt béta laktamáz génpróbával hibridizálva, majd a nem kötődő molekulákat lemosva megállapítható, hogy melyik baktériumtörzs hordozta a penicillin lebontásáért felelős

enzimet kódoló gént. Tehát a dot-blot technika arra a kérdésre tud választ adni, hogy egy sorozat biológiai mintában (ismeretlen nukleinsav populációkban), egy adott, ismert szekvenciájú nukleinsav szakasz vagy annak homológja megtalálható-e vagy sem. A nukleinsav lehet egy DNS szakasz, egy gén, vagy RNS molekula, egy gén termék.

A „reverz dot-blot” technika során a próba és a minta molekulák fordítva szerepelnek. Ebben az esetben egy biológiai mintából nyerünk nukleinsavat, azt jelöljük meg izotóppal (próba) és majd az fog az oldatból kikötödni a megfelelő komplementer nukleinsavat tartalmazó foltra (1.B ábra). A szilárd hordozón található foltok vagy arra egy sorozat ismert szekvenciájú génre jellemző egyszálú (hibridizációra alkalmas) DNS szakaszt tartalmaz (minta), amihez a biológiai mintából kivont és megjelölt teljes nukleinsav állomány (DNS vagy RNS) megfelelő homológ szakaszai fognak hibridizálni. Ebben az esetben a baktérium antibiotikum rezisztencia példánál maradván arra a kérdésre kereshetjük a választ, hogy egy baktériumban melyik rezisztenciáért felelős gén található, vagyis több gén jelenlétét is ellenőrizni tudjuk.

A DNS-csip technológia valójában egy olyan reverz dot-blot technika, ahol a felcseppentett ismert szekvenciájú nukleinsav minták, foltok száma több száz, ezer, akár több tízezer is lehet (1.C. ábra). A DNS-csip technológia tehát egy olyan hibridizáción alapuló nukleinsav kimutatási eljárás, ahol egyetlen kísérletben, hibridizációs lépésben több ezer különböző gén, nukleotid eltérés, RNS jelenlétéről és mennyiségéről kaphatunk információt.



1. ábra. A dot-blot (A), reverz dot-blot (B) és DNS-csip technológia (C) egyes lépései: (1) minták szilárd hordozóhoz történő rögzítése, (2) jelölt próbák előállítás, azok (3) hibridizálása, a nem kötődött próbák lemosása és (4) a pozitív minták előhívása.

Az első nagyobb reverz dot-blot arrayt 1989-ben Saiki és munkatársai készítették el, akik szintetikus oligodezoxinukleotidokat kötöttek ki nitrocellulóz nejlon membránhoz, melyek a *HLA gén (human lymphocyte antigen)* mutáns alléljainak komplementer szekvenciáit tartalmazták. Array-üket, miniatűr természete miatt, DNS-csipnek vagy géncsipnek is nevezték, azonban a maiakhoz hasonló nagysűrűségű DNS-csipeket csak nyolc évvel később fejlesztették ki a Stanford Egyetemen.

A DNS-csip technológia kialakulását az automatizálás, a miniatürizálás, új szilárd hordozók használata, a fluoreszcens jelölési és detektálási módszerek, valamint az egyre több szekvenciát tartalmazó szekvencia adatbankok jelenléte és kidolgozása tette lehetővé. Sokak egybehangzó véleménye szerint a DNS-csip technológia olyan léptékű ugrást eredményezett a molekuláris géntechnológia területein, ami a félvezető csipek elterjedésének hatásához hasonlítható a mikroelektronikában. Mindkét területen az egységnyi idő alatt elvégezhető műveletek - egyedi hibridizációk - számának hihetetlen nagyságú megnövekedése eredményezte a forradalmi változást.

DNS-csipek

A DNS-csipeket méretük és a hordozón található DNS molekulák nagysága szerint csoportosíthatjuk.

Makroarray-eknek nevezzük azokat a néhány száz, legfeljebb ezer génspecifikus mintát tartalmazó többnyire nitrocellulóz membránt, ahol a felcseppentett minták átmérője nagyobb, mint 300 mikrométer. A nukleinsav jelölésére ebben az esetben szinte mindig izotóp jelölést használnak, a specifikusan kikötődött próbák mennyiségét pld. autoradiográfiával határozzák meg. Jelenleg kevésbé használatos technika, azonban néhány esetben az, amikor például célzott géncsoportok aktivitását követik alkalmas nagyobb szűrővizsgálatok elvégzésére. A szilárd hordozóra felvitt DNS minták általában hosszú (>400 nt) cDNS molekulák felsokszorozott termékei (A cDNS-ek mRNS templátról készült DNS molekulák, amelyeket reverz transzkriptáz enzim szintetizál. A cDNS-ek a genom aktív szakaszait reprezentálják). A makroarray-ek készítése legtöbbször nem igényel automata csipkészítő robotot és bonyolult kiértékelő rendszert.

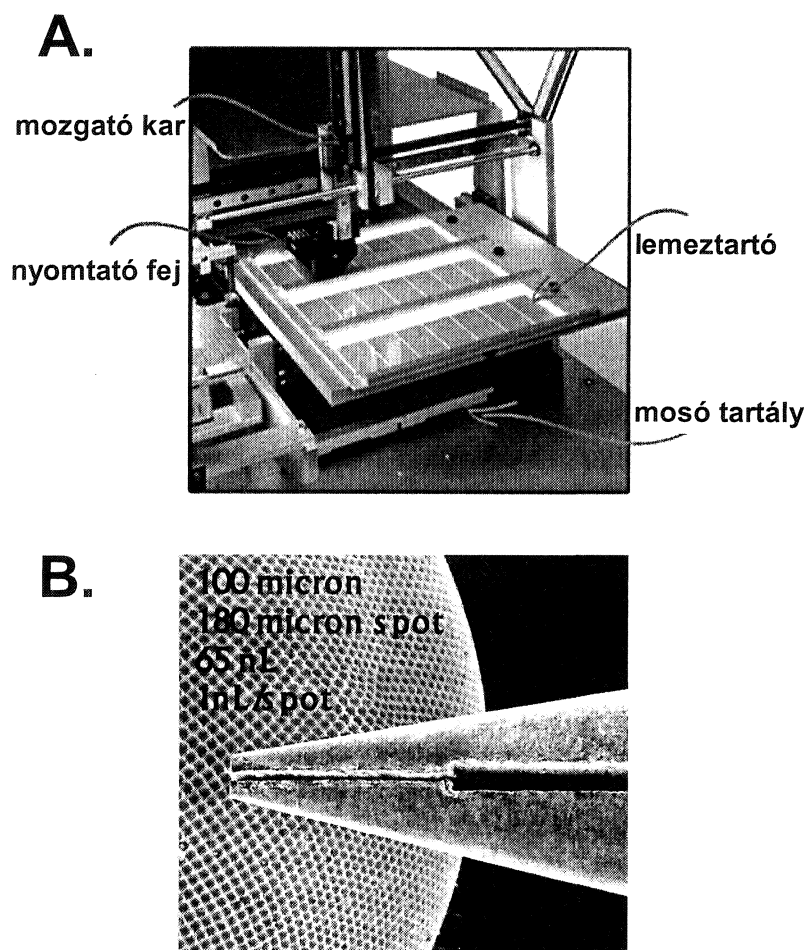
Mikroarray-ek azok a DNS-csipek, ahol a felcseppentett minták mérete 300, mikrométer alatti, a felvitt mintaszám több ezer, elérheti a több tízezret is. A mikroarray-ek elkészítéséhez nem hajlékony nitrocellulóz membránt, hanem átlátszó kémiaiilag aktivált mikroszkóplemezt használnak és a felcseppentés nagy precizitással robot segítségével történik. A próbák jelölésére fluoreszcens festékeket használnak. Ennek előnye, hogy több próba hibridizációját is elvégezhetjük egyetlen csipen több eltérő spektrális tulajdonságú fluoreszcens festék használatával, ami a próbák közötti közvetlen összehasonlítást teszi lehetővé. A mikroarray-ek leolvasása konfokális (páztázó) lézerszkennelrel történik, ami nagy felbontású (1-2 μm) és nagy érzékenységgel képes meghatározni a hibridizált, fluoreszcens próba mennyiségét. A mikroarray-ek felületén nagy sűrűségben felsokszorozott hosszabb cDNS molekulák vagy rövidebb szintetikus oligonukleotidok vannak kihorgonyozva. Az oligonukleotidok vagy a felületen *in situ* készülnek el hagyományos vagy módosított oligonukleotid kémia alapján, vagy az előre megszintetizált oligonukleotidokat a cDNS-ekhez hasonlóan egy robot viszi fel.

Az *in situ* szintézissel elkészített oligonukleotid alapú mikroarray-eket DNS-csipeknek vagy géncsipeknek is nevezik. Tehát szigorú értelemben az irodalom a DNS-csipek alatt csak a fotolitográfiával vagy az elektronikát is igénybevevő módszerekkel elkészült génlapkákat hívja, azonban ez mind a hazai, mind a nemzetközi irodalomban összemósódott. (Falus András és Raskó István javasolták, hogy a DNS-csipeket, mikroarray és makroarray-eket közösen génlapkának nevezzék).

A DNS-csipeken akár több százezer oligonukleotid minta is elkészülhet egyenként $20 \mu\text{m}^2$ -nyi területen. A próba jelölése egy fluoreszcens festékekkel történik. A DNS-csipek hibridizációjához, leolvasásához speciális célműszerek szükségesek, a DNS-csipeket csak központi üzemekben gyártják, egyedi és laboratóriumban történő sorozatgyártása nem vagy csak nehézkesen megoldott.

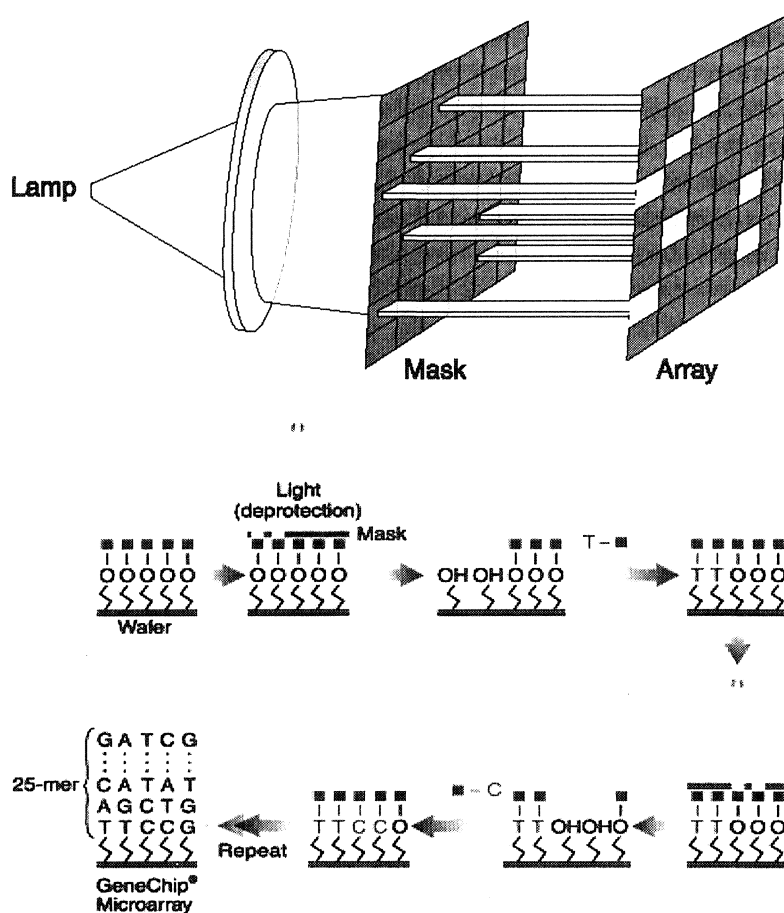
DNS-csipek gyártása

A makroarray-ek készítését akár lemez blottoló készülékkel, kézi felcseppentéssel is el lehet végezni, azonban nagyobb számú makroarray és több, mint 100 minta esetében a mikroarray-ekhez hasonlóan cseppentő robotot használnak. A mikro- és makroarray-ek esetében a hosszabb cDNS alapú mintákat vagy mechanikusan vagy a tintasugaras nyomtatókból ismert „ink-jet” módszerrel viszik fel. A mechanikus felvitelt egy robot végzi el nagy pontossággal. A nyomtatófej 4-32 finoman megmunkált tűt tartalmaz, mely vékony kapilláris csatornájába veszi fel a DNS-t tartalmazó mintát (2.B. ábra) és a mikroszkóp lemezhez érintve a felületi feszültség és a kapilláris erő meghatározta nagyságú cseppet (1-10 nl és kb. 100-250 μm átmérőjű) hagyja a felületen (2.A. ábra). Az ink-jet technológia elektromos áram hatására ejt le egy nagyon pontosan meghatározott nagyságú cseppecskét, tehát nem ér a mikroszkóplemez felületéhez, ami egységes morfológiájú pontokat eredményez. Oligonukleotid alapú mikro- és makroarray-ek hasonló technikákkal is készíthetők.



2. ábra. A mechanikus csip nyomtató robot (A) és a nyomtatótű elektronmikroszkópos képe és nyomtatási paraméterei (B).

A DNS-csipen vagy géncsipeken az oligonukleotid minták *in situ* szintetizálódnak. Tehát ahelyett, hogy egyenként vinnék rá és rögzítenék az előre szintetizált DNS szálakat, a próbákat a szilárd hordozó felületén hozzák létre. Ezt két féleképpen lehet megvalósítani. Az első technika, amelyet az Affymetrix cég dolgozott ki és, amely az első DNS-csipeket is eredményezett *fotolitográfiai* eljárásról alapszik. A technológia kulcslépése egy olyan fényérzékeny védőcsoport kifejlesztése volt, melyet mind a négy nukleotidhoz hozzákötve, azokat fény segítségével képesek eltávolítani, az egységet aktiválni. Az oligonukleotid mátrixát számítógéppel tervezett *perforált maszkok sorozatával* fedik le, ahol a lyukak bizonyos elrendezésben fordulnak elő. Egy rövid UV fényrel történő megvilágítás után a lyukaknak megfelelő pozíciókban a fényérzékeny védőcsoportok leválnak az alsó rétegről és pl. aktivált timidint („T”) adva, megfelelő kapcsoló reagensek segítségével ezeken a pontokon az első nukleotid „T” lesz (3. ábra).



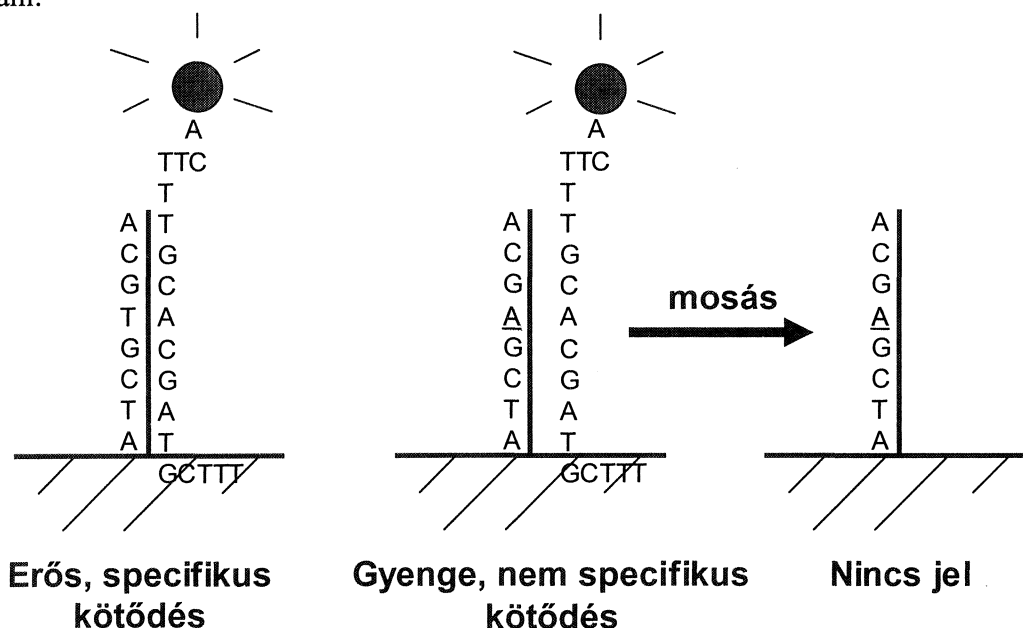
3. ábra. A DNS-csip vagy géncsip fotolitográfiai módszerével történő előállítás. A módszer lényege egy fényáteresztő maszk, amely pozícióspecifikusan perforált, és egy fényérzékeny védőcsoport (az ábrán a nukleotidok feletti kis téglázat jelenti).

Egy második perforált maszk a guanozin („G”), a harmadik a citozin („C”) és a negyedik a adenozin („A”) elemek helyét fogja meghatározni a készülő oligonukleotid első pozíciójában. Minthogy a rétegenként adagolt nukleotidbázisok szintén tartalmazzák a fényérzékeny csoportot, a folyamat folytatható. Könnyen belátható, hogy a DNS-csip mátrixában található összes oligonukleotid egy pozíciójának, nukleotidjának szintéziséhez 4 perforált maszkra van szükség, tehát például egy 25 nukleotid hosszúságú oligomer kialakításához $4 \times 25 = 100$ szintetikus lépés szükséges.

A DNS-csipek elkészítésének legújabb módszere elektroforézisen alapszik. A DNS-csipek mátrixát, génspecifikus minták sorozatát egy-egy olyan elektronikus cellasorozat reprezentálja, amely egyedileg áram alá köthető. A fotolitográfiával megegyezően itt is lépésenként szintetizálják a mátrixban az oligonukleotidok egyes nukleotidjait. Ebben az esetben azonban nincs szükség maszkra, az adott nukleotid eloszlást (pld. első pozícióban a „T” kialakítását) nem fény, hanem elektromos áram által létrehozott savas közeg katalizálja. A savérzékeny védőcsoport eltávolítás és az azt követő aktivált „T”-vel történő kapcsolás hozza létre az első nukleotidot. Az áram számítógéppel vezérelt pozicionálása és a ciklusonként alkalmazott reagensek hozzák létre 30-40 nukleotid hosszúságú oligonukleotid mintákat. Ezzel a módszerrel a jelenlegi technikákkal maximum 10.000 különböző mintát tartalmazó DNS-csip készíthető el.

Jelölt próbák készítése, hibridizáció, DNS-csipek leolvasása

DNS mutációk, nukleotid eltérések, deléciók, inzerciók, transzlokációk detektálására genomi DNS-t illetve egyes szakaszait polimeráz lánreakció (PCR) segítségével felsokszorozzuk. A reakcióelegybe fluoreszcens festékkel vagy izotóppal jelölt nukleotid trifoszfátot rakunk, amit a DNS polimeráz beépít a felsokszorozott DNS termékekbe. Az így megszintetizált és jelölt kétszálú DNS-t denaturáljuk, majd a DNS-csip felületére cseppentjük, ahol minden egyes mintaponttal kölcsönhatásba tud lépni. A komplementaritás alapján a homológ szakaszok megtalálják egymást. A hibridizációs körülményeket és a minták hosszát úgy is beállíthatjuk, hogy csak az adott szekvenciájú minták kötődhessenek a próbákhoz és így akár egyetlen nukleotid eltérés (pld. mutáció) is kimutatható (4. ábra). Több száz illetve ezer mutáció egy lépésben történő kimutatásának jelenleg egyik legnagyobb korlátja a mutációkat tartalmazó DNS szakaszok specifikus amplifikációja. A meglehetősen hosszadalmas próba előkészítést a jelenleg fejlesztés alatt álló érzékenyebb jelölési és kimutatási stratégiák (pld. speciális tömegspektroszkópiát felhasználó eljárások) fogják felváltani.



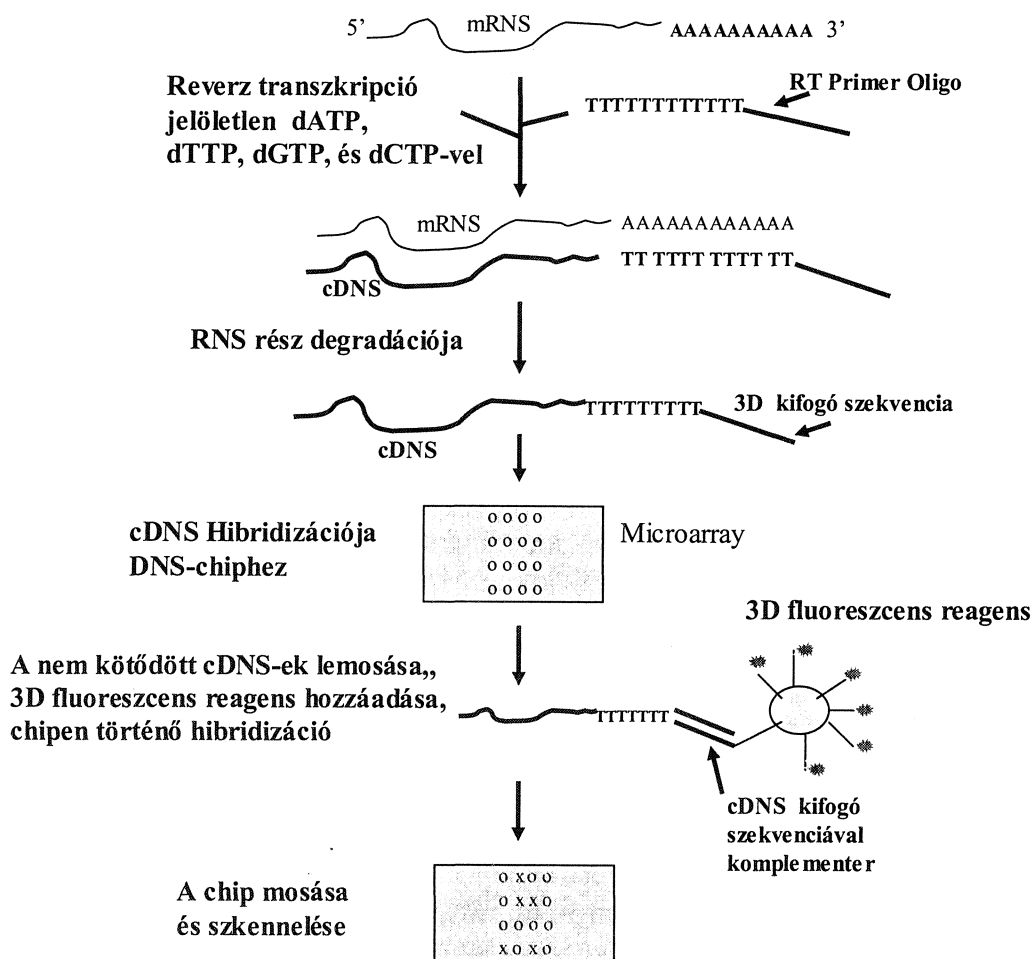
4. ábra. Nukleotid eltérés detektálása DNS-csip technikával. A specifikus, teljes komplementer szakaszok kötődésük után a fluoreszcens vagy izotóp jel a szilárd hordozóhoz kötődve marad, míg a nem specifikusan kötődött jelölt próbák lemoshatók.

A DNS-csipek legfőbb felhasználási területe a génkifejeződés (génexpresszió) monitorozása, vagyis az RNS mennyiségi meghatározása különböző állapotú biológiai objektumokból. Az egy adott állapotú sejt vagy szövet mRNS populációját *transzkriptomnak* nevezzük. A humán genom kb. 35.000 génjének aktivitását (transzkriptom vizsgálatát) akár már egy vagy két hibridizációs lépésben DNS-csipek segítségével képesek vagyunk követni. A jelölt próbák elkészítéséhez az RNS molekulákat cDNS-sé „írjuk át” (reverz transzkripció) reverz transzkriptáz enzim segítségével. A reverz transzkripció során a reakcióelegybe fluoreszcens festékkel jelölt dCTP vagy TTP építőköveket is hozzáadunk, melyeket a reverz transzkriptáz a folyamatosan szintetizálódó cDNS molekulákba építi be. A reverz transzkriptáz (ugyanúgy, mint a DNS polimeráz a DNS szintéziskor) rövid oligonukleotidokat, *primereket* igényel, ahonnan 5'-3' irányban a cDNS szálak szintézise indul. Eukarióta szervezetekből nyert RNS jelölését legtöbbször poli(T) primerrel, prokariotákból nyert RNS jelölését random (kevert) nukleotidokat tartalmazó primerrel (N₆-N₉) végzik.

Egy tipikus DNS-csip kísérlethez kb. 50-150 µg teljes RNS jelölése szükséges. Legtöbb alkalmazáskor, például biopsziák, kis szövetrégiók vizsgálatakor azonban nem áll rendelkezésünkre ilyen mennyiségű RNS. Ekkor vagy minta- vagy jelsokszorozással tudjuk a kívánt fluoreszcens jelerősséget elérni. Mintasokszorozás esetében a kiindulási RNS mennyiségét növeljük meg, például olyan módszerrel, ami az *in vitro transzkripciót* használja. A cDNS molekulák szintézisekor olyan primert használnak, ami egy vírus RNS polimeráz enzim promóterét tartalmazza. Így a reverz transzkripcióval megszintetizált cDNS molekulák mindegyike hordozza a promótert. RNS polimeráz és fluoreszcens festékkel jelölt UTP vagy CTP jelenlétében új, de már jelölt RNS molekulák szintetizálódnak. Az így elkészített, jelölt RNS mennyisége 100-200 szorosa lehet a kiindulási (még nem átírt) RNS-hez képest. Ezt a módszert használják a géncsipek esetében is, és mivel az *in vitro* transzkripció során az RNS lineárisan sokszorozódik (a PCR technika exponenciális sokszorozásával ellentétben), ezért ez az eljárás csak minimálisan torzítja a kiindulási RNS minta összetételét. Ebben az esetben akár 1-2 µg teljes RNS is elegendő.

A jelsokszorozási vagy jelamplifikációs eljárások a csiphez már kötődött kis mennyiségű minták fluoreszcens intenzitását erősítik fel. Kevésbé munkaigényesek és mivel nem történik mintasokszorozás, ezért a kiindulási minta összetétele egyáltalán nem változik. Ez a stratégia szolgáltatja a legmegbízhatóbb eredményeket, amikor kis mennyiségű mintából indulunk ki. A jelölés lényege, hogy két lépcsős hibridizálás során a csipre már bekötődött cDNS molekulákhoz egy 350-900 fluoreszcens festéket tartalmazó gömbszerű óriásmolekula kötődik, így egy hibridizációs eseményt 350-900 festékmolekula emissziója követ, ami az érzékenységet két nagyságrenddel megnöveli. A stratégia egyes lépéseit az 5. ábra szemlélteti. A hagyományos jelölési technikákkal szemben itt a reverz transzkripció során csak jelöletlen dNTP-eket használnak és a fluoreszcens jel a második oligonukleotid hibridizációkor kötődik ki, tehát nem épül be közvetlenül az első lépésben szintetizált cDNS molekulákba. Ezzel a technikával már 1 µg alatti teljes RNS is jelölhető, ami igen fontos kis biológiai vagy klinikai minták vizsgálata esetén.

Mind a hagyományos, mind a jelamplifikációs eljárásokor a hibridizáció előtt az RNS:cDNS hibrid molekula RNS részét lúgos kezeléssel degradálják, csak az egyszálú cDNS molekulákkal (jelölt próba) történik a hibridizáció. A hibridizáció 6-16 óráig meghatározott hőmérsékleten 10-100 µl-es térfogatban történik mikroszkóp fedőlemez alatt, vagy speciális hibridizációs automatákban fedőlemez nélkül. Az automatákban a hibridizációs elegy keringetése a DNS-csipen egyenletes próbaeloszlást tesz lehetővé a csip felületén.



5. ábra. Jelamplifikációs eljáráson alapuló jelölési stratégia, amely egy több száz fluoreszcens molekulát tartalmazó gömbszerű molekulát használ (3D fluoreszcens reagens). Az első lépésben egy olyan cDNS molekulát hozunk létre, melynek 3'-vége egy második lépésben a 3D fluoreszcens reagens komplementer oligonukleotid részéhez kapcsolódni tud. Ez a második hibridizációs lépés szolgáltatja a fluoreszcens jelet.

A hibridizáció során a komplementer szakaszok megtalálják egymást és a komplementer szakaszok hosszától függően ez a kölcsönhatás különböző hőmérsékleten zajlik le. Ezért a hibridizációs hőmérséklet (és a hibridizációs puffer összetétele) határozza meg a hibridizáció specifikusságát. Magasabb hőmérsékleten csak a nagyobb szakaszokon történik hibridizáció. Ezért rövidebb oligonukleotidokat tartalmazó DNS-csipek esetében a hibridizáció mindig alacsonyabb hőmérsékleten történik.

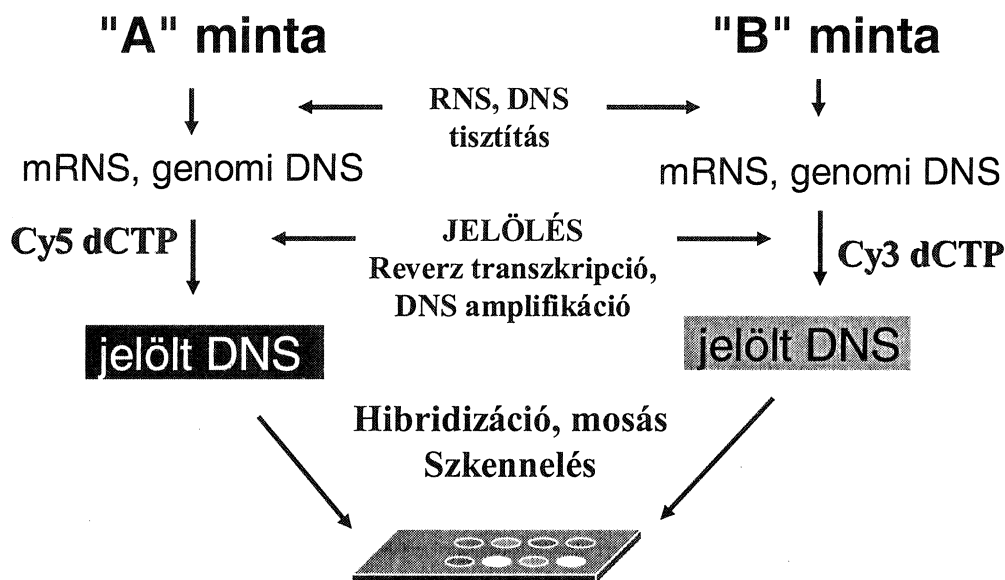
A hibridizáció után a nem vagy csak gyengén kötődött cDNS molekulákat egy mosási lépésben eltávolítjuk. A mosás erősségével szintén tudjuk a hibridizáció specificitását változtatni. A mosott, majd szárított DNS-csipeket egy nagyfelbontású lézerszkennelőkben olvassuk le, ami a beépült és a felületre kikötődött fluoreszcens intenzitásokat határozza meg. A szkennelők a különböző fluoreszcens festékek számától (1-3) függően 1-3 db képfájlt eredményez, amit egy speciális szoftver kiértékel: minden egyes felcseppentett mintaterületen meghatározza a világító pixelek számát, ami arányos a hibridizált ill. beépült fluoreszcens molekulák számától, ami arányos például a kikötődött cDNS-ek számától és így az adott gén aktivitásától. A program meghatározza a helyi háttér értékeket is, amit kivon a mintaterület megfelelő értékeiből, meghatározza a statisztikailag szignifikáns mintapontokat, amikkel később különböző műveleteket végez.

A DNS-csipek alkalmazásai

A DNS-csipek mind a genom mind a transzkriptom globális vizsgálatára felhasználhatók. A genom nukleotideltéréseinek (mutációk, egy nukleotidnyi polimorfizmusok - SNP) vizsgálata mellett nagyobb kromoszóma eltérések (deléciók vagy amplifikációk) is nyomon követhetőek.

A kromoszóma sávok analízisén alapuló technikák hasznosnak bizonyulnak az átrendeződések kimutatására, azonban kevésbé informatívak a potenciális amplifikációs helyek felderítésében. Ezen felül ez a technika a metasztázisok nyomonkövetésére kénytelen sejtkultúrák vizsgálatokat elvégezni, melyek időigényesek és félrevezetőek lehetnek a tényleges áttétek vizsgálata szempontjából. A DNS-csipekkel történő összehasonlító genomi hibridizáció (comparitive genomic hybridization, CGH) gyors és sejtkultúrákat nélkülöző módszer, mely a citogenetikai vizsgálatoknál pontosabb információkat szolgáltat az esetleges kromoszóma átrendeződésekről és amplifikációkról (lásd az előző fejezetben).

Nagy áttörést eredményezett a két fluoreszcens festékkel történő jelölési módszer bevezetése a DNS-csip technikában a genomi és a génexpressziós vizsgálatokban (6. ábra). Így lehetővé válik két biológiai minta (kezelt-kezeletlen, beteg-egészséges, primer daganat-áttét, két különböző szövet stb.) összehasonlítása egy kísérlet során.



6. ábra. Két fluoreszcens festékkel történő próbajelölés. Genomi DNS és mRNS jelölésére is alkalmazható. Egy kísérletben összevethető kezelt-kezeletlen, beteg-egészséges, primer daganat-áttét, két különböző szövet, két különböző organizmus genomi illetve génexpressziós profilja.

A két fluoreszcens festékkel jelzett DNS mintán alapuló genomi hibridizációs eljárás nem igényli a tumor áttétek izolálását és egy egyszerű kísérleti eljárás során sok adattal szolgál a rákos sejtek genomikus egyensúlyáról, a mono- esetleg poliszómiákról, az amplifikációkról és a deléciókról. A kísérlet során a tumoros szövetből származó DNS-t egy zölden fluoreszkáló festékkel (Cy3), míg a normális szövetmintából származó DNS-t egy másik, pirosan fluoreszkáló festékkel (Cy5) jelöljük és együtt olyan DNS csipre hibridizáljuk, mely nagyszámú azonosított gén cDNS-ét, vagy genomikus DNS fragmenteket tartalmaz üvegfelületre rögzítve. Lézer szkennelést követően a színbeli különbségek számítógépes háttér segítségével kiértékelhetők, a Cy3/Cy5 arány meghatározható, melynek

értéke utal az adott genomi rész/gén deléciójára, amplifikációjára. Az úttörő munkát Pinkel és munkatársai végezték 1998-ban, akik bakteriális mesterséges kromozómákat (BAC) illetve a 20-as kromozómából származó genomikus DNS fragmenteket kötöttek nagyszámban üvegfelületre. Ma már olyan csipeket is használnak, melyre cDNS fragmentek vannak kikötve. Ennek az az előnye, hogy a transzkripcionálisan aktív régiókra összpontosít.

Annak ellenére, hogy a DNS csipeken alapuló CGH módszer nem alkalmas a kis, génen belüli mutációk felderítésére, mégis új megoldást kínál az eddig alkalmazott citogenetikai vizsgálatokra, hiszen rendkívül jól alkalmazható nagyszámú mintának az egész genomra kiterjedő együttes analizisére. Csekély mennyiségű, akár paraffinban archivált vizsgálati anyagból is igen jó minőségű jelölt próba nyerhető. A vizsgálatok eredményei pedig a jelenleg elérhető, jelentős mennyiségű információt tartalmazó adatbázisok segítségével könnyen analizálhatók, a kísérletekben azonosított gének kromoszómális elhelyezkedése egyszerűen meghatározható.

A mutációk, nukleotideltérések azonosítását olyan mikroarray-ekkel vagy géncsipekkel végzik, amelyek rövid oligonukleotid mintákat tartalmaznak. Az oligonukleotid minták szekvenciái komplementerek a mutációt hordozó, fluoreszcens genomi próbákkal, melyek hibridizáció és szkennelés után detektálhatók (lásd 4. ábra). A nukleotid eltérést tartalmazó genomi részeket a jelölés előtt PCR segítségével felsokszorozzák. Olyan DNS-csipek is készíthetők, melyek egy adott gén, például a HIV proteáz génjének minden egyes nukleotidját meghatározzák („szekvenáló csipek”), így fontos információt adhatnak egyes törzsekről, gyógyszerérzékenységükről. Ebben az esetben átfedő oligonukleotid minták a lehetséges összes nukleotid eltérést tartalmazzák az adott pozíciókban. A hibridizációs mintázatuk szolgáltatja a szekvencia információt.

Olyan DNS-csipeket is kidolgoztak, melyek általános szekvenálásra is felhasználhatók, mert olyan 8 nt hosszú oligonukleotidokat (vagy módosított változataikat, melyek erősebb és specifikusabb hibridizációt tesznek lehetővé, pld. poliamidnukleinsav (PNA) vagy „locked nucleic acid” (LNA) alapúak) tartalmaznak, melyek az összes nukleotid variációt tartalmazzák ($4^8=65536$ db különböző oligonukleotidot). Természetesen csak rövidebb és ismétlődő szekvenciáktól mentes DNS részek szekvenálhatók ezekkel a csipekkel. Az ilyen szekvenálás bonyolult szoftveres és speciális műszeres háttérrel igényel. Az ember mitokondriális DNS-ét, amely 16569 bázispárból áll, olyan DNS-csippel vizsgálható, amelyen több mint 100.000 oligonukleotid van. A mitokondriális DNS mutációi, nukleotid eltéréseinek alapján származási viszonyokra deríthetünk fényt, anyai öröklést mutató betegségeket prognosztizálhatunk és az igazságügyi orvostanban is felhasználhatók.

A DNS-csipek egyik új alkalmazási területe a DNS metilációjának kimutatása. A normálistól eltérő metilációs mintázat a CpG szigetekben az egyik legkorábbi és legáltalánosabb genetikai eltérés, mely a malignus szövetekben tapasztalható. A gének széles spektrumának túlműködését, illetve hibás működését vonhatja maga után. Aberráns metilációs mintázatot mutathatnak bizonyos tumorerő esetében a promóter régió kivételével olyan CpG-gazdag szabályzó elemek is, melyek a gének kódoló régiójában, azaz az intronokban helyezkednek el. A tumor sejteket általában a tumor-szupresszor molekulák hipermetilációja, míg ezzel ellentétben az egész DNS molekula hipometilációja jellemzi. Ez az általános hipometiláltság már viszonylag korán, jóval a tényleges tumor kifejlődése előtt detektálható. A hipometiláció és a megemelkedett génexpresszió közötti összefüggés számos onkogén esetében is megfigyelhető. Az egész genomra kiterjedő, nem génspecifikus megközelítéssel többször is kimutatták, hogy a metilációs mintázat tumorról tumorra változhat, azaz tumorspecifikus. Az egész genomra kiterjedő metilációs mintázat (amint ez a génexpressziós mintázatnál is igaz) egy molekuláris ujjlenyomatként jellemzi az adott sejtet, szövetet, betegséget, így ennek ismerete alkalmassá teszi ezt a módszert is arra, hogy új tumor osztályokat határozhassunk meg, illetve újonnan diagnosztizált betegségeket már meglévő

osztályokba soroljunk. Az utóbbi években az egész genomra kiterjedő metilációs mintázat analizésére olyan módszer született, mely alkalmas nagyszámú minta egyidőben való tesztelésére. A DNS-csipek alkalmazása a metilációs helyek felderítésében hasonló elven alapul, mint a nukleotid eltérések detektálása. A DNS nátrium-biszulfittal történő kezelése után a metilált citozinokat érintetlenül hagyja, míg a nem metiláltakat uracillá konvertálja, így ez a nukleotideltérés alkalmas DNS-csipen történő specifikus kimutatásra (kikötött oligonukleotid minta az adott pozícióban guanozin - metilált citozinnal komplementer - illetve adenozin – az uracillal komplementer - található.).

A DNS-csipeket legelterjedtebben a génkifejeződés vizsgálatára, a transzkriptom meghatározására használják. Az egyik és legegyszerűbb felhasználási területe a szöveti génkifejeződés vizsgálata. Egy szövetmintából kivont, majd megjelölt RNS-t hibridizálva a DNS-csipekhez, a világító pontok arról adnak információt, hogy abban a szövetben éppen milyen gének voltak aktívak. Ehhez a kísérlethez elegendő egyetlen fluoreszcens festés és hibridizálás. A leginformatívabb kísérletek azonban azok, ahol két fluoreszcens festéssel jelölnek és differenciált génexpressziós mintázatra: változásokra, különbségekre összpontosítanak. Ezeket a vizsgálatokat két nagy csoportra különíthetjük.

Az egyik során eltérő szövetből (vagy biológiai objektumból) származó génaktivitásokat hasonlítanak össze. Ilyen volt például az a tanulmány, ahol az oszteoklasztok és az oszteoblasztok génexpressziós különbségeit vetették össze. Azonosítottak egy olyan gént, mely csak az oszteoklasztokban fejeződött ki, és később kiderült, hogy más szövetekben nem. Így ez a gén később egy oszteoporózis elleni gyógyszer kifejlesztésének célpontjává válhatott, mivel ennek a génterméknek a gátlása az oszteoklasztok pusztulásához vezetett.

Az összehasonlító génexpressziós vizsgálatok másik és gyakrabban alkalmazott módszere az, amikor ugyanazt a szövetet vagy biológiai mintát eltérő állapotokban hasonlítják össze. Gyógyszer vagy farmakológiai vizsgálatokban kezeletlen szövet, sejtkultúra génexpressziós képét összehasonlítva egy gyógyszerrel, hatóanyaggal kezelt szövettel vagy sejttel, meghatározhatóak azok a gének, melyek a gyógyszer hatására aktiválódnak vagy éppen csökkent aktivitást mutatnak. Ezek a gének szerepet játszhatnak a gyógyszer hatásmechanizmusában vagy rámutathatnak azokra a tényezőkre, melyek éppen a gyógyszer mellékhatásaival, toxicitásával hozható összefüggésbe. Egy másik legkézenfekvőbb alkalmazási terület a patológiai elváltozások, betegségek molekuláris hátterének felderítése. Kontroll, egészséges szövethez viszonyíthatunk például egy rákos szövetet. Azonosíthatóak az egészségeshez képest eltérő kifejeződésű gének, melyek közül gyógyszer-célpontok, általános biokémiai utak vagy éppen olyan összetett tulajdonságok is meghatározhatók, mint amilyen az áttétképződés vagy a tumorok kemoterápiás kezeléssel szembeni érzékenysége. Természetesen ilyen bonyolult kérdések megválaszolására nem elegendő néhány DNS-csip vizsgálat és néhány markergén felderítése. Ezekben az esetekben több tíz, esetleg száz beteg és egészséges szövet génexpressziós mintázatát határozzák meg és bonyolult statisztikai módszerekkel csoportosítják. Klaszterezési eljárásokkal például olyan áttétképződésre hajlamosító géncsoportok határozhatók meg, melyek az egészséges szövetben és az áttétre nem hajlamos esetekben például alacsonyabban fejeződnek ki, amíg a fokozott áttétre hajlamos mintákban emelkedett mRNS szintet detektálunk. Ilyen összehasonlító nagy tanulmányok jelentek meg például leukémiák, melanomák, pajzsmirigy karcinómák, mellrákok csoportosítására. Hollandiában először megjelent a klinikai diagnosztikai eszközök között egy olyan DNS-csip, mely néhány száz gondosan összeválogatott gén kifejeződésének megállapításával mellrákok csoportosítására alkalmas és jóslást ad azok áttétképződési hajlamára, így fontos információt szolgáltat a beteg kemoterápiás vagy sebészeti beavatkozásának eldöntésében. Jelenleg a Szegedi Biológiai Központ Funkcionális Genomika Laboratóriumában melanoma-specifikus DNS-csip kifejlesztésén dolgoznak.

A DNS-csipek génexpressziós vizsgálatai szinte minden területen felhasználhatók, ahol génkifejeződés különbség található. Így baktériumok, gombák biotechnológiailag fontos új biokémiai utjai, gyógyszerrezisztenciát kódoló gének, betegségre jellemző génmarkerek, betegségért felelős vagy azokra hajlamosító gének, ismeretlen hatásmechanizmusú hatóanyagok, természetes anyagok, diéták hatásai, tanulással kapcsolatos gének, genetikailag módosított modell állatok molekuláris hátterei (és még oldalakon keresztül lehetne folytatni) deríthetők fel.

Jelen fejezet csak a DNS-csipekkel foglalkozik, de meg kell említenünk, hogy más csipek is léteznek. A proteom (az adott pillanatban egy adott állapotú sejtben jelen lévő fehérjék) vizsgálatára fehérje-csipeket használnak, míg léteznek olyan mikroarray-ek is, ahol a kikötött, kölcsönható vegyületek kis molsúlyú kémiai anyagok.

A DNS-csipek csak a transzkriptom változásainak detektálására alkalmasak, tehát ez a technika csak a génaktivitásra, a biológiai mintában levő mRNS-ek szintjének vizsgálatára korlátozódik és nem ad felvilágosítást a fehérjekifejeződésről, azok aktivitásáról, másodlagos módosításairól. Ezért a kapott eredményeket mindig a transzkriptom szemszögéből elemezzük. A DNS-csipekkel kapott eredményeket javasolt más, lehetőleg nem hibridizáció alapuló eljárással is alátámasztani, mint például valós idejű PCR segítségével, de egyéb hibridizációs módszerek is (mint például Northern-blot vagy *in situ* hibridizáció) is megerősítő információt adhatnak.

A DNS-csipek egyre elterjedtebben használják szinte a biológia és az orvostudomány minden területén: onkológiában, mikrobiológiában, neurobiológiában, fejlődésbiológiában, pszichiátriában, diagnosztikában, igazságügyi orvostanban és olyan új átfogó irányzatokban, mint amilyen például a funkcionális genomika, toxikogenomika és farmakogenomika. A DNS-csipek első kifejlesztését még alig több mint egy évtizede tették meg, de máris forradalmasította a molekuláris biológia minden területét. Várható, hogy a közeljövőben új technikai, diagnosztikai megoldások és alkalmazási területek fognak megnyílni és elterjedni.

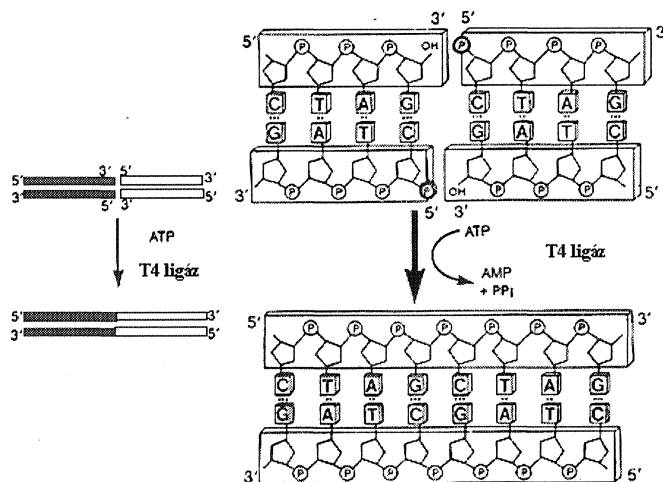
REKOMBIN DNS TECHNOLÓGIA

Csortos Csilla

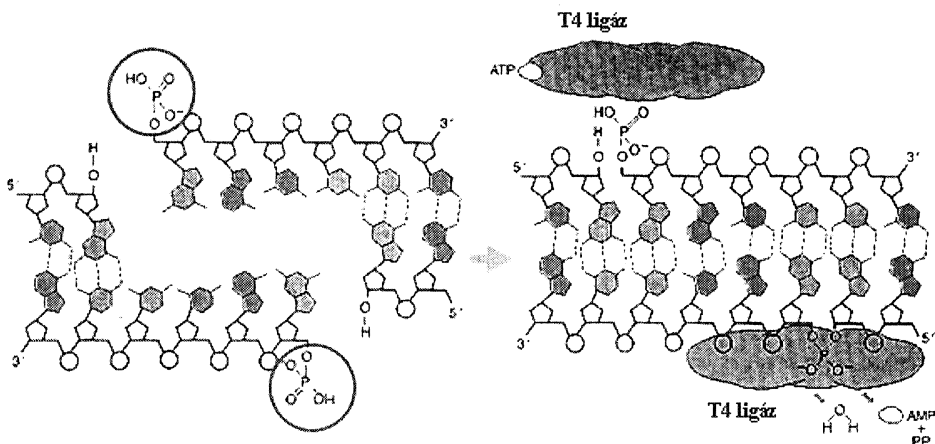
Rekombináns DNS előállítása

A restrikciós endonukleázokkal nyert DNS darabok összekapcsolhatók. A DNS ligáz enzimek (T4, illetve T7 bakteriofág ligáz, vagy *E.coli* ligáz) a megfelelő végződésű DNS molekulákat foszfodiészter kötással kapcsolják össze és így új, ún. rekombináns DNS molekulákat lehet *in vitro* létrehozni. A laboratóriumi gyakorlatban főleg a T4 DNS ligázt alkalmazzuk, mely ATP felhasználásával katalizálja a foszfodiészter kötés kialakulását a kettős szálú DNS 5' foszfát- és 3' hidroxil csoportja között ragadós egyszálú, és tompa, kétszálú végek esetén is. A ligálási reakciók hőmérsékleti optimuma 12-25 °C között van, mivel magasabb hőmérsékleten a végek kisebb valószínűséggel találkoznak, túl alacsony hőmérsékleten pedig a ligáz enzim nem aktív.

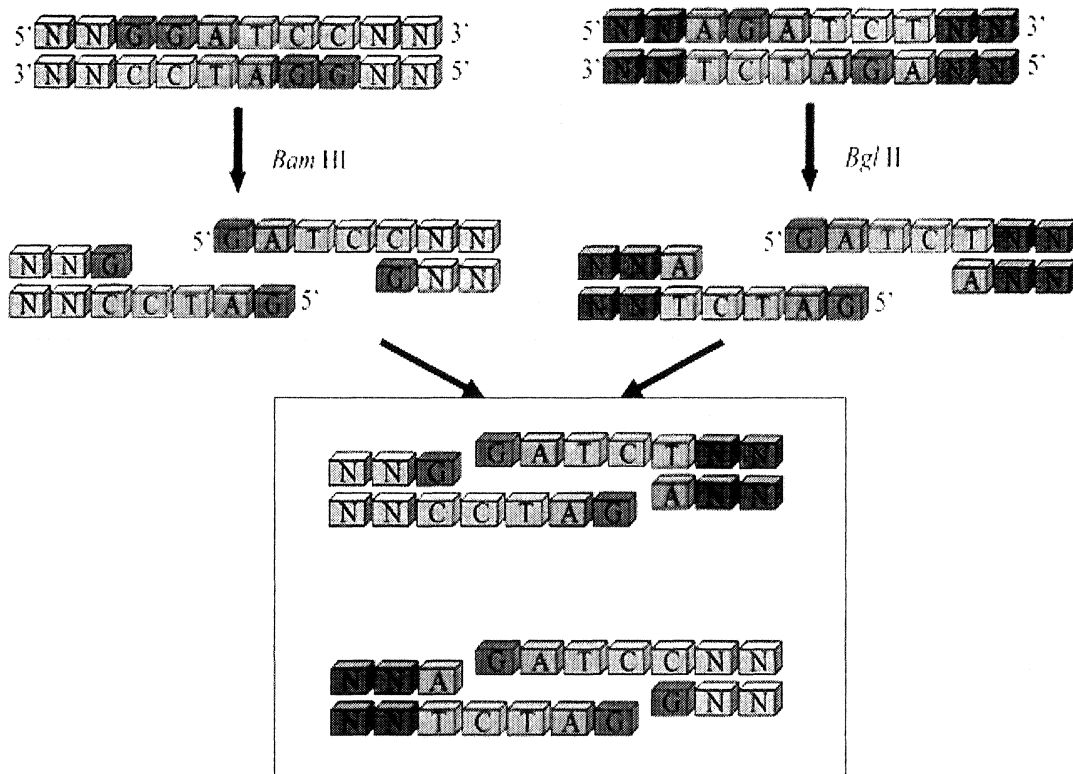
A tompa végződés előnye az, hogy különböző restrikciós enzimmel előállított darabok illeszthetők össze. A ligálás határfoka viszont alacsony, mert nem kívánt termékek is keletkezhetnek, valamint a ligáz enzimnek is kisebb az esélye, hogy két DNS molekulát térben éppen megfelelő pozícióban találjon.



Tapadós végű DNS molekulák csak abban az esetben kapcsolhatóak össze, ha az egyszálú végek egymás komplementerei. A két DNS molekulát a komplementer bázisok között kialakuló hidrogénkötések együtt tartják, megkönnyítve ezzel a ligáz enzim működését.



A komplementaritás legegyszerűbben úgy biztosítható, ha az összekapcsolandó DNS molekulákat azonos restriktív enzimmel kezeljük a ligálás előtt. Különböző felismerési hellyel rendelkező enzimek is létrehozhatnak azonos végződést, ami lehetővé teszi az eredményes ligálást. A rekombináns DNS azonban már nem lesz újra hasítható ugyanazokkal az enzimekkel, mert a palindroma szekvenciát tönkretesszük. Ilyen enzimpár pl. a *Bgl* II és a *Bam* HI.



Más szempontokat is figyelembe kell venni akkor, ha a klónozendó fragmentet és a vektort is csak *egyféle restriktív enzimmel* emésztettük. A visszazáródás elkerülése érdekében az egyik DNS molekula (általában a vektor) 5' végeiről a foszfátcsoportot el kell távolítani. Erre a célra egy foszfátáz enzimet, az ún. Calf Intestinal Phosphatase -t (CIP) használjuk. Habár ebben az esetben a vektor és az inzert ligálásakor a DNS molekulák mindkét orientációban csak az egyik szálon kapcsolódhatnak össze, az így kapott nyitott cirkuláris konstruktot is hatékonyan transzformálhatjuk kompetens *E. coli* sejtekbe, melyet a baktérium DNS “repair” rendszere később kijavít.

Legnagyobb hatékonysággal a *két különböző restriktív enzimmel* kialakított ragadós végek ligálását végezhetjük. Ebben az esetben az inkompatibilis végek miatt a linearizált vektor nem tud önmagával összezáródni, és a pozitív rekombinánsokban az inzert csak egyfajta orientációban kapcsolódhat a vektorhoz a felhasznált restriktív helyek konzerválódása mellett.

Tapadós, de egymással nem komplementer végződésű DNS molekulák összeillesztése is lehetséges, ha tompa véget hozunk létre úgy, hogy az egyszálú, tapadós véget vagy feltöltjük DNS polimerázzal, vagy pedig exonukleázzal emésztjük.

A ligálási közeget az enzim hozzáadása után kis térfogatban (10 μ l), minimum 6-8 órán keresztül 16°C-on, vagy szobahőmérsékleten 30-60 percig inkubáljuk. Általánosságban azt mondhatjuk, hogy egy átlagos hosszúságú linearizált, ragadós végű plazmid esetén (3 kb) 10 μ l ligálási közeg 20-40 ng plazmid DNS-t és ugyanilyen koncentrációjú inzertet tartalmazzon. Ajánlatos azonban az 1:10, 10:1 vektor:fragment koncentrációarányú kontroll

reakciók összeállítása is. CIP enzimmel kezelt vektor alkalmazásakor a kezelés hatékonyságának ellenőrzéséhez kezeletlen vektort tartalmazó ligálási reakciót is összeállítunk. A ligálás hatékonyságát *E. coli* sejtek transzformálásával ellenőrizhetjük.

A ligálási reakciók vizsgálatakor minden transzformálási kísérlet összeállításakor további kontrollokra is szükség van:

1. a kompetens *E. coli* sejtek DNS nélküli transzformációja, majd antibiotikumot tartalmazó és nem tartalmazó táptalajra szélesztése. Így ellenőrizhető a kompetens *E. coli* életképesége, illetve az, hogy a táptalajban levő antibiotikum hatásosan gátolja-e a plazmidot nem tartalmazó sejtek növekedését.

2. a kompetens *E. coli* sejtekhez ismert koncentrációjú cirkuláris DNS-t adva a DNS felvétel hatékonyságát, az *E. coli* „kompetensségét” ellenőrizhetjük.

A kísérlet eredménye a ligálás hatékonyságától és a sejtek kompetenciájától egyaránt függ. E kettő kombinációja sokszor (különösen tompa végek ligálásakor) kis hatásfokot eredményezhet.

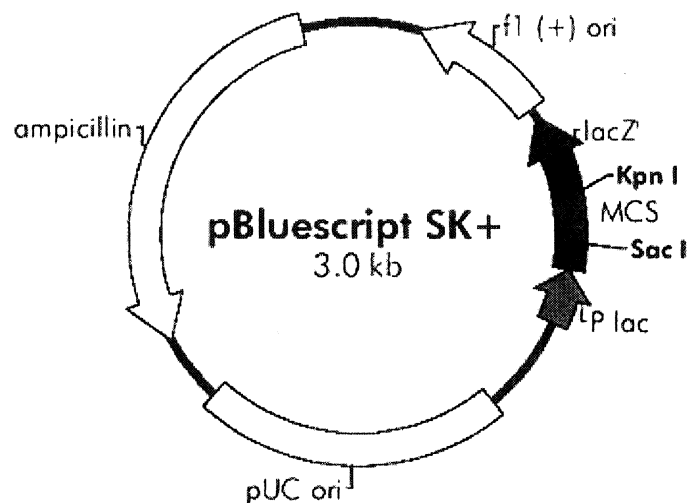
Klónozó vektorok

A molekuláris biológiában vektornak nevezzük azokat a DNS molekulákat, amelyek a szekvenciájukba épített idegen DNS-t képesek *E. coli*, vagy egyéb sejtbe juttatni.

Plazmid vektorok: a legegyszerűbb bakteriális eredetű vektorok. 1-20 Kb méretű cirkuláris DNS molekulák, amelyek a baktérium kromoszómájától függetlenül replikálódnak. A plazmid vektorok felhasználása a legszéleskörűbb. A plazmid vektorok átlagosan 4000 bp méretű inzertet képesek befogadni, legfontosabb szerkezeti sajátosságaik:

1. A replikációjukat lehetővé tévő specifikus szekvencia, *ori*.
2. Szelekcióra alkalmas tulajdonságot hordozó gén, pl. antibiotikum rezisztencia.
3. Klónozáshoz alkalmas szekvencia, klónozási hely (cloning site) amely több, egyedi restrikciós hasítási helyet tartalmaz.

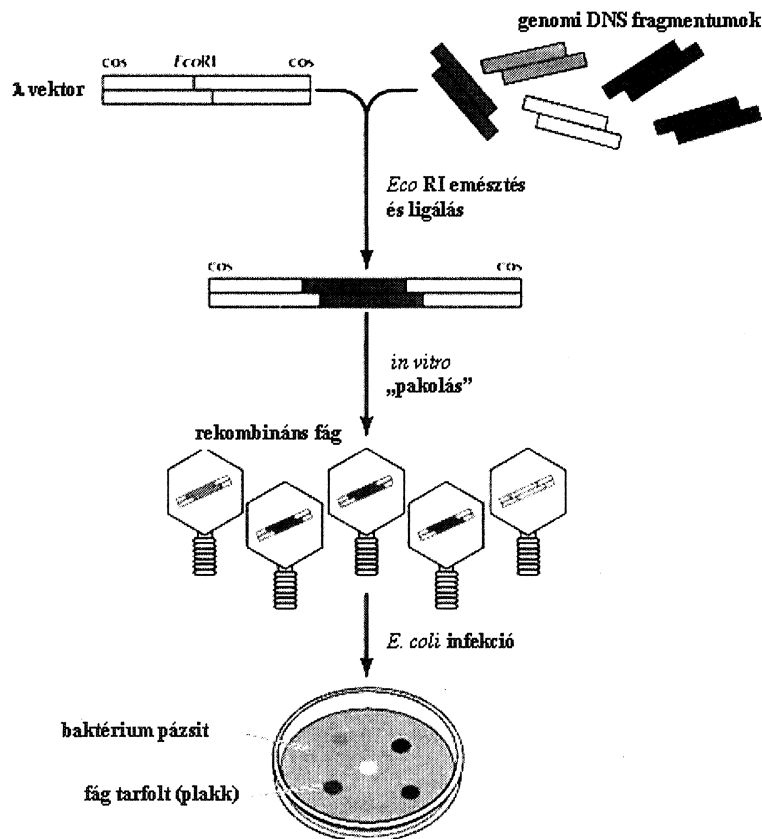
Az alábbi ábra egy széleskörűen alkalmazott plazmid restrikciós térképét és fontos szerkezeti elemeit mutatja.



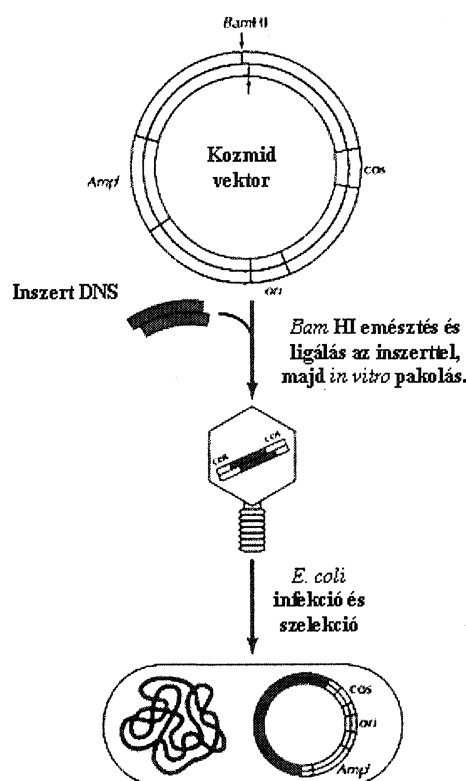
Fág vektorok: λ fág származékok, lineáris vektorok. A fág lítikus növekedéséhez a λ genom középső harmada nem esszenciális, idegen DNS-sel helyettesíthető. A rekombináns fág DNS-t a vektor *cos* régióját felhasználva *in vitro* folyamatban fág fehérjékbe csomagolják („pakolás”), és az így mesterségesen létrehozott fág részecskékkal *E. coli* sejteket fertőznek. Előnyei a plazmid vektorokkal szemben:

1. nagyobb inzertet képes befogadni, átlagosan 20000 bp,
2. a baktériumsejtek fág vektorral történő fertőzése nagyobb hatékonyságú (100%-os), mint a plazmidok transzformációja.

Genomi és cDNS könyvtárak elterjedt hordozói. A következő ábra egy genomi DNS fragmentumainak fág vektorba történő klónozását mutatja be.



Kozmid vektorok: hibrid plazmid/fág vektorok, amelyek 40-60000 bp-nyi inzertet képesek befogadni és a fág vektorokhoz hasonlóan DNS könyvtárak hordozására alkalmasak. A kozmid egy olyan plazmid vektor, amelybe a λ fág *cos* régiója van beépítve (a „pakoló” rendszer ezt a szekvenciát ismeri fel). A linearizált vektort nagyméretű inzert DNS-sel ligálják. A pakoló sejt kivonat enzimeit csak az egymástól ~50 Kb-nyira lévő *cos* szekvenciákat tekintik λ fág genomnak, ezeket pakolják a λ fág fehérjékbe. Ezáltal az inzertek méret szerinti szelekciója is megtörténik. A fágokkal *E. coli* sejteket fertőznek, ahol a bejutott DNS már nagyméretű plazmidként viselkedik.



Élesztő vektor: élesztő, vagy más eredetű DNS élesztő sejtekbe történő bevitelére alkalmas cirkuláris/lineáris vektorok, melyek többsége baktérium sejtekben is szaporítható.

A DNS könyvtárak készítéséhez alkalmazott pYAC (yeast artificial chromosome) vektor inzert nélkül baktériumban replikációra képes. A vektor inzertet tartalmazó lineáris változata élesztősejtbe transzformálható és ott stabilan fenntartható. Az *E. coli* plazmid vektorra jellemző sajátságokon kívül élesztőben funkcióképes centromérát, replikációs origót és szelekciós markert tartalmaz. Az inzert DNS mérete akár 400-1000 Kb is lehet. (Lásd a Rekombináns fehérjék előállítását c. fejezetben.)

Rekombináns plazmid DNS szaporítása

A rekombináns plazmidot élő sejtben szaporítják. Erre a célra az *E. coli* baktérium igen alkalmas, mert egy viszonylag egyszerű, jól ismert genetikai környezetet nyújt. Az *E. coli* az idegen plazmid DNS-t sajátjának tekinti, a rekombináns plazmid így az élő sejtben, a plazmid vektortól függően alacsony vagy magas kópiaszámmal replikálódik. Az *E. coli* sejtek száma optimális körülmények között 22 percenként duplázódik.

A rekombináns plazmidot transzformálással juttatják az *E. coli* sejtbe. A hatékony transzformálás feltételei:

1. megfelelő befogadó szervezet
2. replikációra képes hordozóvektor és
3. a rekombináns plazmidot befogadó sejtek megkülönböztetésére alkalmas módszer.

A baktérium sejteket legegyszerűbben sókezeléssel (CaCl_2) lehet kompetenssé, transzformálásra alkalmassá tenni. Maga a transzformálás a rekombináns plazmid és a kompetens sejtek elegyének alacsony-magas-alacsony ($4 \rightarrow 42 \rightarrow 4$ °C) hőmérsékleten történő inkubálását jelenti, amelynek eredményeként a rekombináns DNS bejut a sejtbe.

A plazmid vektor szelekciós génje révén a rekombinánsot tartalmazó sejtek azonosíthatóak. Leggyakrabban a valamilyen antibiotikum rezisztenciát biztosító gén (a gén

által kódolt fehérje az antibiotikumot hatástalanítja), mely a befogadó *E. coli* sejtben nincs jelen. A transzformálás után a sejteket rövid ideig (kb. 1 óra) antibiotikum nélküli tápoldatban növesztve a rekombináns tartalmozó sejtekben kifejlődik az antibiotikum rezisztencia.

Ezután a sejteket az adott antibiotikumot tartalmazó táptalajon szélesztve az „üres” (plazmid vektort nem tartalmazó) sejtek elpusztulnak.

Rekombináns plazmidot tartalmazó baktérium telepek azonosítása

Az inzert nélküli vektort, illetve a rekombináns plazmidot tartalmazó baktérium telepek többféle módszerrel is elkülöníthetőek, mint pl.:

1. restrikciós elemzés,
2. α -komplementáció,
3. inzeriós inaktiválás
4. hibridizációs szűrés (ld. Kolónia hibridizáció).

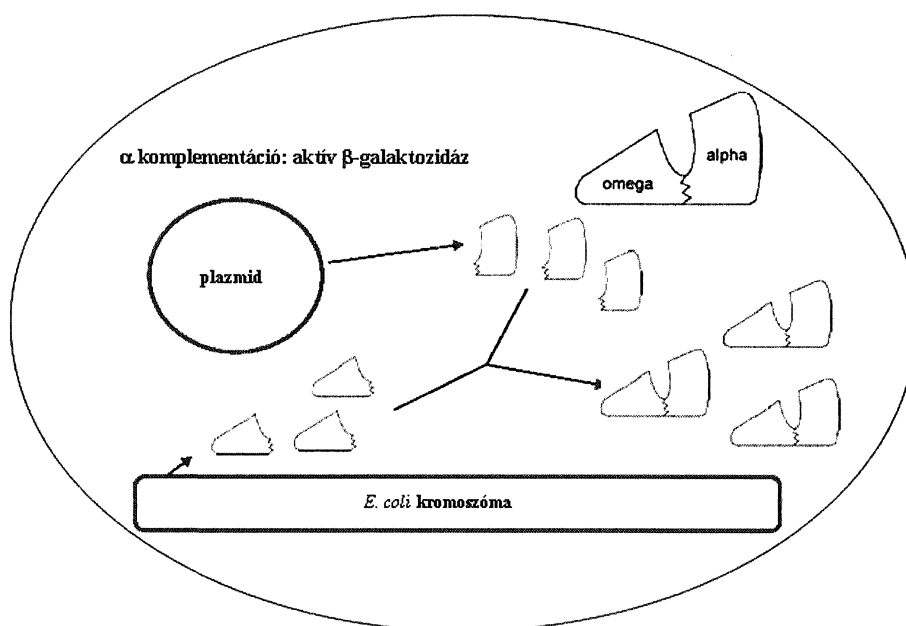
Restrikciós elemzés

Egyástól független, transzformált baktérium telepek kis térfogatú (1-3 ml) tenyészetéből plazmid DNS-t izolálnak. A DNS mintákat restrikciós enzimmal, vagy enzimekkel emésztik, majd agaróz gélelektroforézissel a termékeket elválasztják. A hasítási termékek mintázata az agaróz gélen a vektor esetében előre megjósolható, a rekombináns DNS-é ettől különböző.

α -komplementáció

Számos vektor (mint pl. pSK) hordoz egy rövid *E. coli* DNS szakaszt, a β -galaktozidáz gén (*lacZ*) egy részét, amely részben regulációs, részben kódoló szekvencia, az enzim N-terminálisának első 146 aminosavát kódolja. A vektort befogadó sejt a β -galaktozidáz C-terminálisát termeli. Az enzim vektor kódolta N-terminális és a sejt kódolta C-terminális része önmagában nem aktív, de aktív enzimmé képesek asszociálódni, ez az α -komplementáció. Kromogén szubsztrát (pl. X-gal) tartalmú táptalajon IPTG indukciót követően az aktív enzimet tartalmazó sejtek telepei színesek lesznek.

A vektor *lacZ* génjének promotere után található a klónozási hely. Az inzertet tartalmazó plazmidból nem származik olyan N-terminális fragmentum, amely képes lenne az α -komplementációra. Ezért az ilyen sejtelepeken nincs aktív β -galaktozidáz, a telepek színtelenek maradnak.



Inzerció inaktiválás

Ez a módszer csak akkor alkalmazható, ha a vektorban két különböző antibiotikum rezisztencia gén is van. A DNS inzertet az egyik gént megszakítva ligáljuk a vektorba. Transzformálás után a sejteket olyan táptalajon növesztjük, amely a nem hasított rezisztencia gének megfelelő antibiotikumot tartalmazza. A kifejlődött telepeket „átmásoljuk” a másik, az inzertálással esetlegesen inaktívvá tett rezisztencia gének megfelelő antibiotikumot tartalmazó táptalajra, amelyen csak az inzert nélküli plazmidot tartalmazó sejtek nőnek fel.

Az így fenotípusuk alapján elkülönített sejtekből rövid idő alatt (10-12 óra) nagy mennyiség szaporítható. A viszonylag kis méretű cirkuláris rekombináns plazmid könnyen tisztítható a befogadó sejt saját kromoszóma DNS-étől elválasztható.

A kísérlet kivitelezése

Ligálási reakció

1. Az alábbi táblázat szerint állítsa össze a ligálási elegyeket.

	#1	#2	#3
DNS inzert (Eco RI tapadós végződéssekkel)	x µl	--	--
pSK vektor (Eco RI hasított)	1 µl, foszfatáz kezelt	1 µl, foszfatáz kezelt	1 µl, foszfatáz kezelés nélkül
Steril víz	8-x µl	8 µl	8 µl
10x ligáz puffer	1 µl	1 µl	1 µl
T4 DNS ligáz (10 U/µl)	0,3 µl	0,3 µl	0,3 µl

2. Inkubáljuk az elegyet szobahőmérsékleten 1 órán át, vagy 16 °C-on egy éjszakán keresztül.

3. Transzformálhatunk azonnal, vagy a ligált DNS-t –20 °C-on tárolhatjuk a felhasználásig.

Kompetens *E. coli* sejtek preparálása

1. XL1-Blue sejteket 2 ml LB (+20 mM MgSO₄) tápoldatba oltunk agar lemezről és egy éjszakán át 37 °C-on rázatva növesztjük.

2. A sejteket friss tápoldatban 1:100 arányban (2 ml sejt kultúra 200 ml LB-be) hígítjuk és 37 °C-on rázatva tovább növesztjük A₆₀₀~0,4 eléréséig.

3. A sejteket 10 percig jégen inkubáljuk.

4. A sejteket előhűtött, steril csövekben centrifugálással (4 °C, 4000 rpm, 10 perc) összegyűjtjük. A felülúszót elöntjük, a centrifugacsövet papírvattával kiszárítjuk, ügyelve arra, hogy a sejteket ne érintsük.

5. A sejteket óvatosan reszuszpendáljuk 40 ml jéghideg TB pufferben és 10 percig állni hagyjuk jégen.

6. Mint 4. pont.

7. A sejteket reszuszpendáljuk 5 ml jéghideg TB pufferben és hozzáadunk steril glicerint 15 %-os végkoncentrációban, óvatosan keverjük össze. A frissen felhasznált sejtekhez nem kell glicerint adni.

8. Előhűtött, steril Eppendorf csövekbe osszuk a sejteket 0,2-0,5 ml-es térfogatokra és fagyasszuk, tároljuk –80 °C-os mélyhűtőben.

***E. coli* sejtek transzformálása**

1. A kompetens sejteket jégen felolvasztjuk.
2. 200 µl kompetens sejt/reakció kimérése előhűtött Eppendorf csövekbe.
3. A DNS-t hozzámérjük a sejtekhez és óvatosan összekeverjük.
 - 1.) pSK vektor, hasítás nélkül (transzformálás kontrollja), 1 ng, 0.5 µl
 - 2.) PP2A/pSK plazmid, hasítás nélkül (transzformálás kontrollja), 1 ng, 0.5 µl
 - 3.) ligálási reakció #1, 10 µl
 - 4.) ligálási reakció #2, 10 µl
 - 5.) ligálási reakció #3, 10 µl
 - 6.) DNS nélküli kontroll
4. 40 perc inkubálás jégen.
5. Hőkezelés: 42 °C 1 perc
jég 2 perc
6. Minden mintához adunk 0,8 ml előmelegített LB tápoldatot és 15 ml-es kémcsőben 37 °C-on rázatva (240 rpm) 1 órán át tenyésztjük a sejteket.
7. Szilárd, 100 µg/ml ampicillint tartalmazó LB agar lemezekre szélesztünk
 - 100 µl 100 mM IPTG-t (23,8 mg/ml víz)
 - 100 µl 2 %-os X-Gal-t (20 mg/ml dimetil-formamid)és a lemezeket szobahőmérsékletre „előmelegítjük”.
(Készíthetünk olyan LB agar táptalajt is, amely tartalmazza az IPTG-t és az X-Gal-t.)
8. A sejteket (0,1-0,2 ml-es mennyiségben) az LB Amp/IPTG/Xgal agar táptalajon szélesztjük, megvárjuk, míg a folyadék a táptalajba beszívódik. A kész plazmidok esetében (1-2. transzformálás) 1:10 arányú hígítás után szélesszünk 0,1 ml-t. A 6. transzformálási minta egy részét antibiotikumot nem tartalmazó LB agar táptalajra is szélesztjük.
9. Inkubálás 37 °C-on egy éjszakán át.

A TB puffer összetétele

10 mM Pipes (Piperin-N,N'-bis-2-etánszulfonsav)
55 mM MnCl₂
15 mM CaCl₂
250 mM KCl

FIGYELEM: A pH-t 6,7-re állítjuk 5 M KOH-dal a MnCl₂ hozzáadása előtt, majd hozzáadjuk a MnCl₂-ot és ultraszűrővel sterilizáljuk. A Pipes nem sterilizálható magas hőmérsékleten!

DNS KÖNYVTÁRAK KÉSZÍTÉSE ÉS SZÜRÉSE

Csortos Csilla

Egy adott gén izolálása bármely szervezetből első meggondolásra a tú keresése a szénakazalban hasonlatot juttatja eszünkbe, ha biokémiai szemlélettel közelítjük meg a kérdést. A DNS molekulák kémiai felépítésének következtében bármely, akár csak 2000 bp-nyi fragment biokémiai módszerrel megkülönböztethetetlen egy másik, hasonló méretű fragmenttől. Szerencsére a molekuláris biológia módszereivel ez a probléma áthidalható. Egy adott genomot reprezentáló genomi DNS vagy mRNS mintából ún. könyvtárat lehet készíteni, amelyből a keresett gént különböző hibridizációs technikák alkalmazásával ki tudjuk választani.

DNS könyvtár készítése

A könyvtárkészítés célja a teljes genomot reprezentáló DNS darabok olyan vektorba helyezése, amely egy befogadó sejtben önreplikációra képes. *E. coli*-ba transzformálva a könyvtárat elméletileg minden sejt különböző rekombináns vektort vesz fel, és ezzel a genomi DNS más-más fragmentjét hordozza. A könyvtár készítéséhez elegendő kb. 50 µg genomi DNS, ami 1 g szövetből izolálható, a kiválasztott rekombináns viszont tetszőleges mennyiségben előállítható.

A genomi DNS-ből előállított *genomi könyvtár* a kódoló (exon) és nem kódoló (intron) szekvenciákat, valamint a genomi DNS különböző szabályozó szekvenciáit egyaránt tartalmazza. A mRNS-ből készített *cDNS könyvtár* már csak a csupasz, intronok nélküli kódoló szekvenciát tartalmazza 5' és 3' nem kódoló szakaszok között, tehát a kódolt aminosav szekvencia közvetlenül megjósolható.

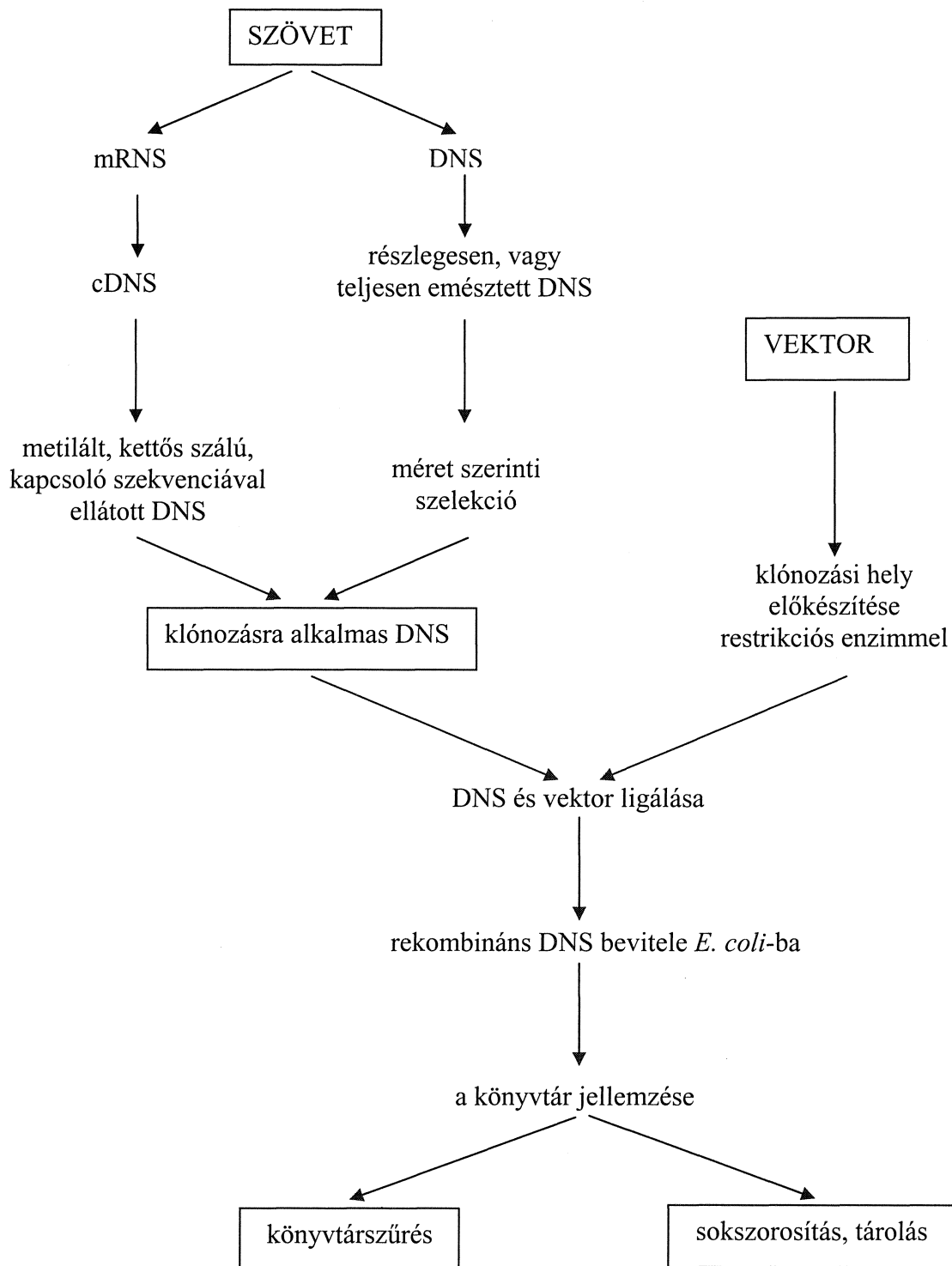
Az 1. ábra a genomi és cDNS könyvtárak készítésének folyamatát tekinti át.

A klónozásra alkalmas DNS előkészítése (méret, láncvégi kapcsoló szekvencia) a vektor minőségétől függ. A könyvtárat hordozó vektor kiválasztásakor két szempontot kell figyelembe venni.

- (1) A vektor milyen méretű inzertet képes befogadni? Nagyobb mérettel csökken a teljes genomot reprezentáló klónok száma.
- (2) Milyen hatékonysággal vihető be a vektor a gazdasejtbe?

A *plazmid vektorok* mindössze átlag 4000 bp méretű inzertet képesek befogadni, ezért könyvtárkészítésre ritkán szokták alkalmazni. A bakteriofág λ vektorok viszont ötször nagyobb méretű inzertet képesek befogadni és a fág infekció is hatékonyabb a plazmiddal történő mesterséges transzformálásnál. A λ vektorok készítésekor a fágból a nem eszenciális részeket kivágják, ennek a helyére kerül az inzert. Ez az inzert méret szerinti szelekciójával jár, a fág rendszer csak az eredeti mérettől maximum $\pm 10\%$ -ban eltérő rekombinánsokat fogadja el

A λ vektorokat elterjedten alkalmazzák DNS könyvtár hordozóként. A kozmid vektorok a plazmid és a λ vektorok tulajdonságait ötvöző hibrid vektorok. 40 Kb-nyi inzertet képesek befogadni, a gazdasejtbe fág infekcióval juttathatóak be és ott plazmidként szaporodnak.



1. ábra. A könyvtárkészítés fő lépései

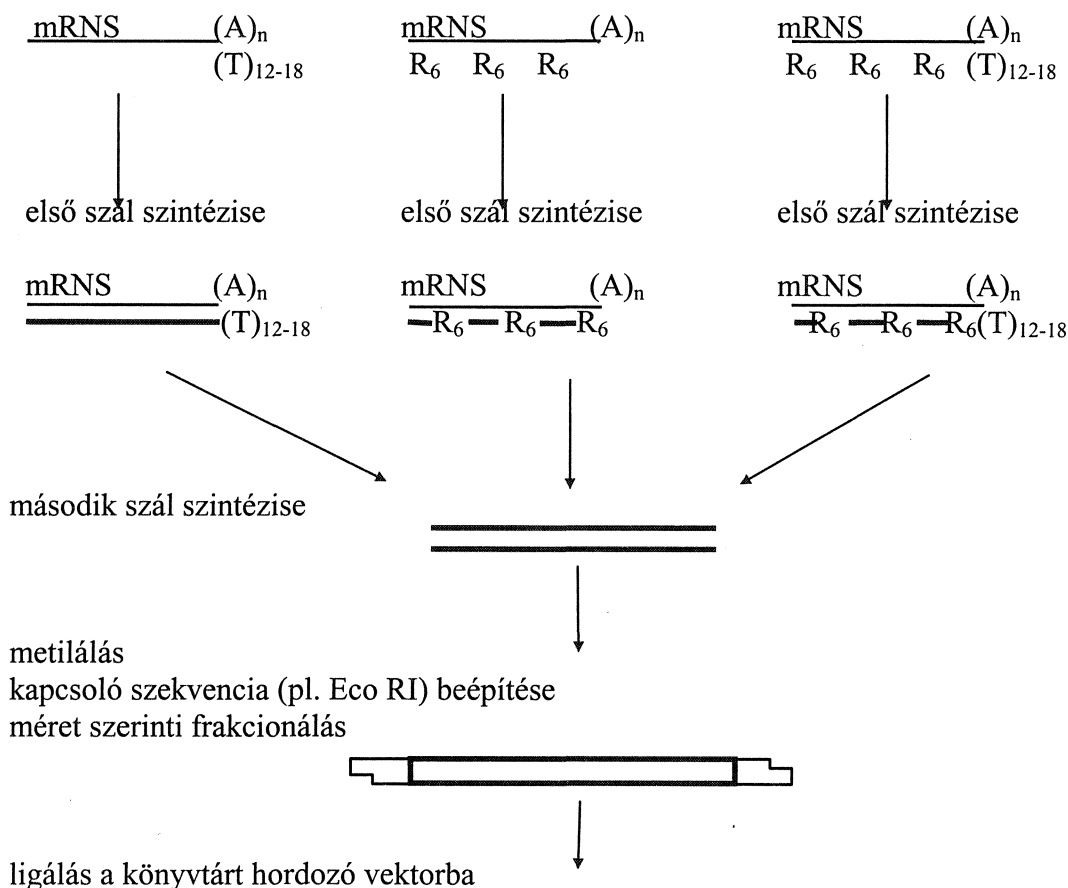
A mesterséges élesztő kromoszóma (YAC, yeast artificial chromosome) vektorok már megabázis nagyságrendű inzertet tartalmaznak. Az ilyen könyvtárat élesztő sejtekben tárolják (1. táblázat).

1. táblázat. DNS könyvtár hordozó vektorok összehasonlítása

Vektor	Inzert átlagos mérete (bp)	Haploid humán genomot reprezentáló klónok száma
Plazmid	4000	750000
Lambda	20000	150000
Kozmid	40000	75000
Élesztő mesterséges kromoszóma (YAC)	400000	7500

A **genomi DNS könyvtár** készítése során a restriktációs enzimmel emésztett genomi DNS méret szerinti frakcionálása (preparatív gélelektroforézissel, szacharóz gradiens centrifugálással stb.) a túl kicsi és a túl nagy méretű fragmentek eltávolítása miatt szükséges. Kis méretű fragmentek egymással ligálódva (összekapcsolódva) nehezen analizálható rekombináns eredményezhetnek. A nagy méretű darabok viszont bár beépülnek a vektorba, annak szaporodását nem engedik meg, ezzel fölöslegesen lekötik a vektor DNS-t.

A **cDNS könyvtár** készítésének legfontosabb lépése a kettős szálú DNS másolat előállítása a mRNS-ből. A 2. ábra erről a folyamatról ad áttekintést. A jó cDNS könyvtár előállításának a lehető legjobb minőségű mRNS preparátum a feltétele. Az utóbbi néhány évben a cDNS inzert preparálás módszere jelentősen egyszerűsödött és ezzel az előállított cDNS minősége is javult. Azonban még így is több átalakító enzimet felhasználó nehéz módszer, amelynek két fő lépése van.



2. ábra. cDNS előállítása mRNS-ből

A mRNS komplementer másolatát oligo dT, (T)₁₂₋₁₈, random hexamer, R₆ primerek vagy ezek együttes használatával szintetizálhatjuk.

1. Az mRNS átírása kettős szálú DNS-sé reverz transzkripcióval. Az átíráshoz alkalmazott primer lehet a mRNS 3' végén található poli. A régióval komplementer oligo dT (a 2. ábrán (T₁₂₋₁₈)-vel jelöltük), vagy tetszőleges 6 nukleotidból álló oligonukleotidok keveréke, un. random hexamer primer (az ábrán R₆ jelölés). Ez utóbbi primer elegy összetevői a mRNS más-más részével komplementerek.

2. A kettős szálú DNS előkészítése a hordozó vektorba történő ligáláshoz megfelelő kapcsoló szekvencia kialakításával, metilálással (a későbbi kezelések során a DNS-t így megvédheti bizonyos restrikciós enzimekkel való hasítástól, feldarabolódástól) és méret szerinti szelekcióval.

Akár a genomi, akár a cDNS könyvtár készítése igen munkaigényes és nagy gyakorlatot igényel. Akár 1 ppm rekombináns plazmid, vagy bakteriofág szennyezés jelenléte a könyvtárban súlyos következményekkel járhat. A kereskedelemben jó minőségű könyvtárak állnak rendelkezésre nagy választékban.

DNS könyvtár szűrése

A könyvtárszűrés célja a nagyszámú rekombináns klón közül a minket érdeklő klón kiválasztása. Mindenekelőtt azonban el kell dönteni, hogy milyen könyvtárat akarunk szűrni, a gént vagy a mRNS szekvenciát keressük. A cDNS könyvtárakból közvetlenül megkaphatjuk a mRNS szekvenciáját és ebből megjósolható az aminosav szekvencia. A genomi klónok regulátor és nemkódoló (intron) szekvenciát is tartalmaznak a kódoló (exon) szekvencia mellett.

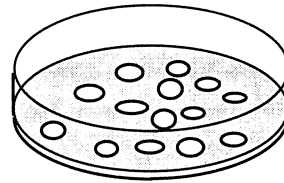
A következő eldöntendő probléma a vizsgálni kívánt klónok száma. Genomi könyvtár esetén teljesen mindegy, hogy a könyvtár milyen szövetből készült, a keresett gén két kópiája van jelen sejtenként ill. diploid genomként. Egy adott szekvencia előfordulási valószínűsége ugyanakkora, mint bármely más szekvenciáé az adott genomban. Általában egy emlős genomi könyvtár 1 millió bakteriofág klónja ill. 500 000 kozmid klónja szükséges egy adott szekvencia kiszűréséhez. Ha cDNS könyvtárat kívánunk szűrni, akkor a keresett gén mRNS-ét nagy mennyiségben expresszáló sejttypusból készült könyvtárat érdemes választani. A vizsgálandó klónok száma a keresett mRNS mennyiségi arányától függ. Erre az adott sejttypusban található fehérje mennyiségéből következtethetünk. Például, ha egy adott fehérje mennyisége a teljes sejtfehérje mennyiség 1 %-a, akkor rendszerint a teljes mRNS mennyiségének is kb. egy százaléka a fehérjének megfelelő mRNS.

A szűrés procedúra első lépése a könyvtár szélesztése, vagyis a könyvtárból megfelelő nagy számú sejt kolónia vagy fág plakk növesztése agaróz gélen, majd ezek transzferálása és fixálása nitrocellulóz membránra. A kiválasztás, a keresett klónt tartalmazó rekombináns detektálása történhet direkt hibridizációval, ha a keresett nukleotid szekvencia egy részletét ismerjük. Ha ez nem áll rendelkezésre, akkor indirekt módon detektálhatjuk a klónt, az abból expresszáldott fehérje valamilyen tulajdonságát felhasználva (immunoreaktivitás, enzimikus aktivitás). A 3. ábra a plakk hibridizáció folyamatát mutatja be. Ezzel homológ módszer a kolónia hibridizáció. Mindkét módszer lényege az, hogy a nitrocellulóz membránon megfelelő pufferek alkalmazásával a sejtek lízise után a DNS-t denaturáljuk, majd hőkezeléssel, vagy UV keresztkötéssel fixáljuk. Fontos, hogy a membránokat és az agaróz lemezeket egyértelműen, aszimmetrikusan jelöljük meg, hogy a pozitív eredményt adó klónokat később azonosítani tudjuk. A membránt ezután jelzett DNS vagy oligonukleotid próbával hibridizáljuk a Southern blot technikákban alkalmazott módszer szerint. A hibridizáció körülményeit a szerint kell megválasztani, hogy milyen méretű a jelzett próbánk, ill. a keresett szekvencia mennyire homológ a próbánkunkkal.

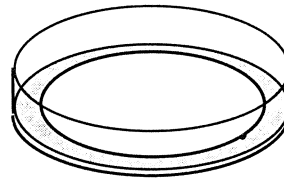
A könyvtárszűrést mindig több lépésben végezzük. Az első szűrésnél a plazmid vagy a fág sűrűsége az agaróz lemezen még olyan nagy, hogy gyakorlatilag folyamatosan lefedi az egész felületet. A pozitív jelet adó klónt nem tudjuk a környezetétől elkülöníteni, ezért az izolált kolóniákat ill. fágot újra kell széleszteni. Ekkor már az agaróz lemezen a kolóniák ill. plakkok olyan sűrűségben legyenek jelen, hogy egymástól jól elkülöníthetőek legyenek. A hibridizáció után a pozitív kolóniákat ill. fágokat újra kis sűrűségben szélesztjük és hibridizáljuk, ha minden egyes klón pozitív jelet ad, akkor a plazmid ill. fág DNS-t izolálhatjuk, restrikciós elemzéssel és szekvenálással jellemezhetjük.

DNS könyvtár szűrése történhet a keresett klón által kódolt fehérje elleni antitesttel is.

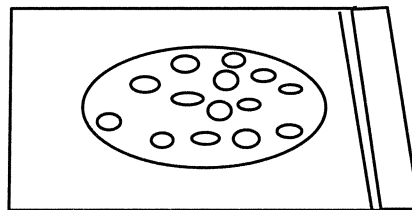
1. Rekombináns fágok növesztése agaróz lemezen.



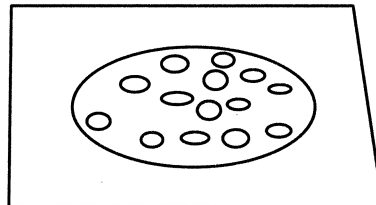
2. A fág plakkok átmásolása nitrocellulóz membránra.



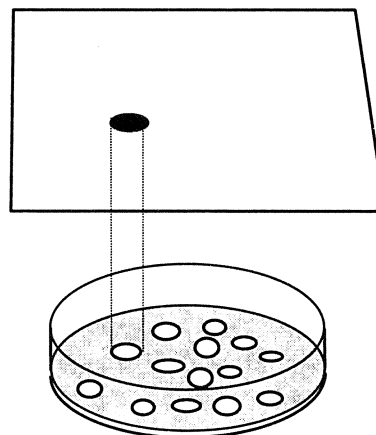
3. A denaturált DNS hibridizációja jelzett, pl. radioaktív próbával.



4. Autoradiogram készítése.



5. A pozitív jelet adó plakk azonosítása.



3. ábra. Plakk hibridizáció

ESHERICIA COLI TRANSZFORMÁCIÓ

Fehér Zsigmond

A genetikai transzformáció

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 magasabb rendű eukarióta sejteket csak laboratóriumban tudunk transzformálni. A bakteriális transzformáció mechanizmusát legjobban a *Streptococcus pneumoniae* (régébbi nevén *Pneumococcus*), a *Bacillus subtilis* és a *Haemophilus influenzae* esetében ismerjük. Az első kettő Gram-pozitív, utóbbi Gram-negatív baktérium.

A **Gram-pozitív** baktériumoknál a transzformációnak a következő lépéseit lehet elkülöníteni:

1. 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 faktor kölcsönhatásba lép egy membránreceptorral és lehetővé teszi, hogy a DNS felvétele megkezdődjön.

2. A DNS megkötődése a sejt felszínén.

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

3. 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 egy időben a DNS egyik szála megemésztődik.

4. A bejutott egyszálú DNS specifikus fehérjéhez kötődése.

5. A DNS integrációja a recipiens sejt kromoszómájába és a rajta levő gének expresszióira 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 szempontjából kedvezőtlen körülmények között jön létre, nem kell hozzá kompetencia-faktor. A sejtek külső membránjának bimbózásával vezikulumok alakulnak ki, melyek a DNS felvételét mediáló fehérjéket tartalmaznak. Ezek a vezikulumok a *transzformoszmák*. Csak a homológ (*Haemophilus*) DNS transzformál hatásosak, mert ebben gyakran előfordul egy 11 bp-nyi jelszekvencia, 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 enzimátikus kezeléssel a sejthatárt permeabilissá kell tenni a DNS számára. Ilyenkor mesterségesen kialakított kompetenciáról beszélünk.

***Escherichia coli* transzformációja**

A génebézési technikák kifejlesztésében nagy szerepe volt az *E. coli* transzformáció kidolgozásának. Ennek 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 l. 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 géneket hordozó plazmiddal való transzformálásra, ma enélkül a génebézés szinte elképzelhetetlen. A Ca^{2+} ionok és a hősokk hatására az *E. coli* sejtfelszín lipopoliszaharid rétege változásokat szenved. E változások csatornák, pórusok kialakulását eredményezik, elsősorban a külső és belső membrán találkozásának megfelelő területeken. Idegen eredetű DNS felvételével szemben a rendszer nem diszkriminál, ami a klónozásban való felhasználhatóság szempontjából előnyt jelent.

Azon *plazmidoknak*, melyeket az *E. coli* transzformációjára használunk, a legfontosabb jellemzői a következők: Autonóm, a kromoszomális DNS-től független replikációra képesek, egy vagy több antibiotikum-rezisztencia gént hordoznak. Mesterségesen konstruálták őket: replikációs origójuk (kezdőpontjuk) pl. egy colicint termelő plazmidról (ColE1), az antibiotikum-rezisztencia génjeik 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, így nincs szükség a kromoszómába való integrációra. Néhányszor tíz példányban vannak jelen egy sejtben, de chloramphenicolal gátolva a kromoszomális DNS replikációját a plazmidok felszaporíthatók, példányszámuk elérheti az ezret is 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 gyakorlatilag kétféleképpen adhatjuk meg:

- a/ A transzformánsok számát osztjuk a transzformáló plazmid DNS μg -ban kifejezett mennyiségével; vagy
- b/ a transzformánsok számát osztjuk az összes élő sejt számával.

Egy μg DNS-re optimális esetben 10^6 transzformáns esik, az összes élő *E. coli* sejtnek 0.1-1%-a transzformálódik (a baktériumtörzstől, a plazmidtól és a kísérleti körülményektől függően).

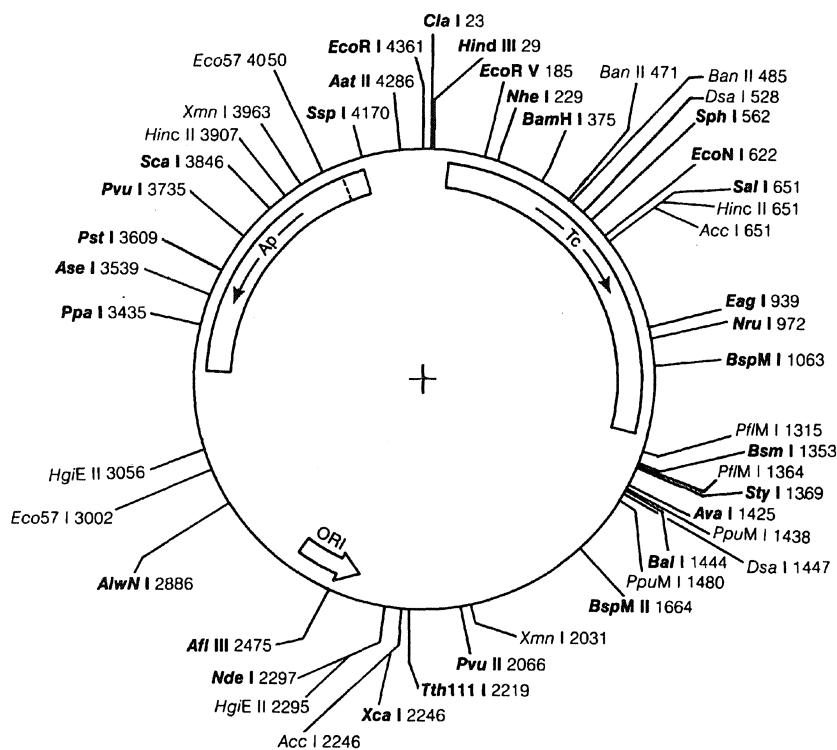
A transzformálásra használható *E. coli* törzsek legfontosabb jellemzői

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 nukleotid-szekvenciát 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. kromoszomális DNS, fragmentumokra 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 génszabványi technikák kifejlesztését (lásd a "Restriktív analízis" című fejezetet).

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

Az általunk használt HB101 jelű recipiens mindkét említett követelménynek megfelel ($hsdR^-$, $recA^-$). A gyakorlaton a pBR 322 jelű plazmidot fogja használni, melynek legfontosabb jellemzői a következők: mérete 4361 bázispár, hordozza az ampicillin- és tetraciklin-rezisztencia géneket (1. ábra). Az ilyen plazmidok alapvető fontosságú eszközei a génszabványi eljárásoknak.



1. ábra A pBR322 plazmid restriktív térképe

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

Vannak olyan prokarióták, ezek közé tartoznak a *Streptomycesek*, melyek transzformálásához enzimatikusan le kell bontani a sejtfalat, protoplasztokat kell képezni. (Részletesen l. a *Streptomyces* transzformáció c. gyakorlatot.) Ebből is kiderül, hogy minden baktériumfajnál más-más transzformációs eljárás a célravezető.

A kísérlet kivitelezése

1. A recipiens *E. coli* HB101-ből készítsen gazdag folyékony táptalajon exponenciális fázisú tenyészetet. (Ez azt jelenti, hogy a tenyészet 600 nm-en mért extinkciója [OD₆₀₀] 0,5 körüli. Más *E. coli* törzseknél ez az érték 0,3.)
2. Hidegen centrifugálja le a sejteket.
3. Szuszpendálás 20-30 ml hideg 0,1 M MgCl₂ oldatban.
4. Újabb centrifugálás.
5. Szuszpendálás 2-3 ml hideg 0,1 M CaCl₂-ban.
6. Inkubálás jégfürdőben (20 perctől 24 óráig terjedhet az inkubálási idő).
7. A sejtek hozzáadása a transzformáló DNS-hez. Steril műanyag centrifugacsövekben előre kimért 1, 10, 100 ng v. 1 µg pBR 322 plazmid DNS-t egyformán 10 µl térfogatban. Ezekhez mérjen hozzá 0,1 ml-t v. 2 cseppet a *coli* sejtsuszpenzióból automata pipettával (v. steril 1 ml-es üvegpipettával). Lesz olyan cső, amibe nem tesz DNS-t, ez a kontroll. (Készítsen egy olyan kontrollt is, amibe DNS-t tesz, de baktériumsejteket nem.)
8. Ezután a csöveket jégfürdőben inkubálja minimum 20 percig¹⁶.
9. 2 perc inkubálás 42°C-on (hősokk), majd 1-2 percre helyezze vissza jégre a sejteket.
10. Ezután adjon a sejtekhez 1 ml táptalajt és 37°C-os vízfürdőben inkubálja 20-30 percig, rázatás mellett. Ez az inkubáció az antibiotikum-rezisztencia gének minél jobb expressziója érdekében történik.
11. Szélesztés szelektív táptalajra. A sejtsuszpenziót vegye ki a vízfürdőből és steril pipettával 0,1 ml-t az előkészített ampicillin vagy tetraciklin tartalmú agar lemezre cseppentsen ki belőle, majd egy steril hajlított üvegbot segítségével szélessze a lemezen, amit közben bal kézzel forgat. A kontrollt is ugyanígy kezelje.

Az 1 µg DNS-t tartalmazó cső esetében készítsen 10-es léptékű hígítási sort 10⁻⁶-ig: Vegyen ki belőle 0,1 ml-t és mérjen hozzá egy steril csőbe kikészített 0,9 ml táptalajhoz. Ez a 10⁻² hígítás. A műveletet még 4x megismételve eljut a 10⁻⁶-os hígításig. A 10⁻²-es hígításból tegyen 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 inkubálja egy éjszakán át, s miután megjelennek rajtuk a telepek, helyezze hűtőszekrénybe. (Ez azért szükséges, hogy a következő gyakorlatig a telepek ne nőjenek túl nagyra.)

13. Az eredmények értékelése a következő gyakorlaton történik:

Számolja meg a transzformáns telepek számát és számítsa ki az 1 µg DNS-re eső transzformációs gyakoriságot. (Az 1, 10 és 100ng DNS-el transzformált sejtek esetében.)

Az 1 µg DNS-sel transzformált sejtek esetében az antibiotikum tartalmú lemezen megszámloljuk a transzformánsokat, ebből számítsa ki az összes transzformáns számát. Az antibiotikumot nem tartalmazó lemezen talált telepszámból pedig számítsa ki az összes élő sejt számot. A transzformánsok számát elosztva az élőszámmal megkapja a transzformációs gyakoriságot.

¹⁶ Amennyiben cél a magas transzformációs hatásfok, a 8. és 10. lépésben 1 órás inkubáció ajánlott.

Oldatok, táptalajok összetétele

E. coli tenyésztéséhez használt gazdag táptalaj:

YTB: 5 g élesztőkivonat, 5 g NaCl, 10 g trypton 1 literre, pH 7,0

A kompetens sejt előállításához használt steril oldatok:

100 mM CaCl₂

100 mM MgCl₂

A transzformánsok detektálására használt szelektív táptalaj:

Ampicillines YTA: 5 g élesztőkivonat, 5 g NaCl, 10 g trypton, 15 g agar 1 literre, pH 7,0. Petricsészére kiöntés előtt 100 mg/ml steril ampicillin oldatból adunk hozzá 100 µg/ml végkoncentrációban.

Alternatív módszerek *E. coli* transzformációjára

A fentebb leírt elterjedten használt klasszikus, ún. CaCl₂-hősokk módszer mellett van jó néhány alternatív módszer melyekkel magas transzformációs hatások érhető el. Ezekről részletes leírást és kivitelezésre alkalmas receptet az alább megadott kézikönyvben találnak.

– A Hanahan módszerrel 5×10^8 transzformáns/µg gyakoriság is elérhető, viszont többféle viszonylag különleges vegyszert kíván, és nagyfokú pontosságot igényel. A transzformációs puffer CaCl₂ mellett MES-t, MnCl₂-ot, KCl-ot és hexamincobalt-kloridot is tartalmaz.

– Az Inoue-módszerrel is elérhető $1-3 \times 10^8$ transzformáns, itt a nehézséget az okozza, hogy 18°C-on kell növeszteni hozzá a baktériumot. A transzformációs puffer CaCl₂-on kívül MnCl₂-ot, KCl-ot és PIPES-t is tartalmaz.

– Elektroporációhoz viszonylag könnyebb előkészíteni a sejteket, viszont költséges készüléket – elektroporátort – igényel.

Irodalom

Sambrook, J., Russell, D.W.: Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (2001)

LABORATÓRIUMI ALAPMŰVELETEK M13 BAKTERIOFÁGGAL

Fehér Zsigmond

Az M13 fág

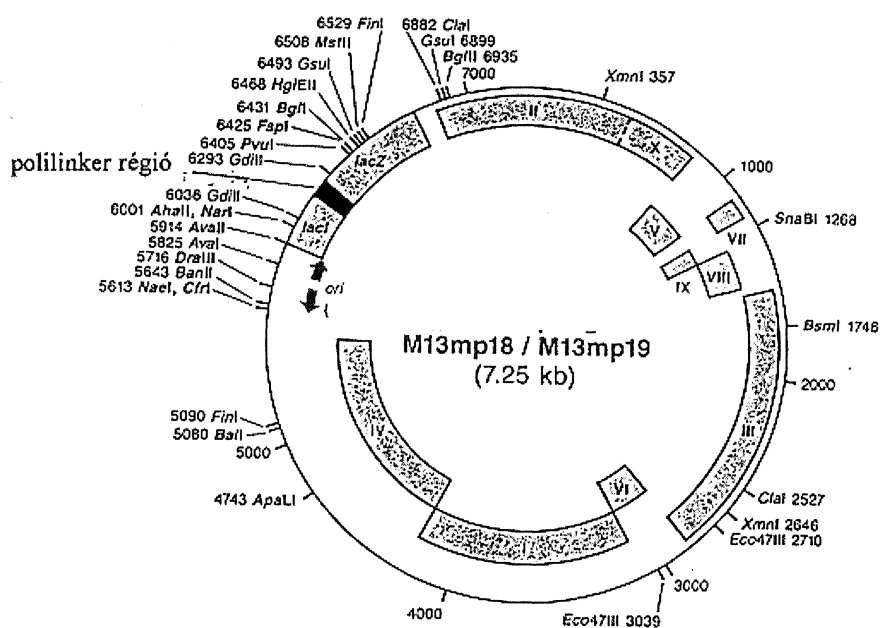
Az M13 fág az *Escherichia coli* baktérium fágja. (Közeli rokonai az f1 és fd fágok, melyekkel az M13 DNS-e magas szintű homológiát mutat.) F⁺ baktériumokat képes csak megfertőzni, mivel specifikusan a szex-pilushoz adszorbeálódik. Egyfonalas DNS-fág, cirkuláris DNS-molekulája 6400 nukleotid hosszúságú.

A fágészecske az ún. (+) DNS szálát tartalmazza, amely a megfertőzött sejten belül duplahelikális, ún. replikatív formává egészül ki (RF). Az RF kb. 200 kópiában van jelen sejtenként, és gördülő kerék mechanizmussal újabb (+) szálak szintetizálódnak róla. Eltérően a legtöbb bakteriofágtól, az M13 fágészecskék nem a sejten belül szerelődnek össze. A fág DNS-re akkor kerülnek rá a kapszid fehérjéi, amikor a fertőzött sejt membránján keresztül kiválasztja azt. A megfertőzött sejt nem pusztul el, csak növekedése lassul le. Baktériumpázsiton a fág nem valódi plakkokat (tarfoltokat) képez, hanem ún. turbid (zavaros) plakkokat, melyek a lelassult növekedés következményei. Folyékony tenyészetben is tovább növekednek a fertőzött sejtek, s a tápfolyadékban igen magas titert ér el a fág.

Az M13 fág mint speciális klónozó vektor terjedt el a molekuláris biológiai laboratóriumokban, elsősorban azért, mert segítségével viszonylag könnyen lehet egyfonalas DNS-hez jutni. M13 fág vektorokat használnak a következő célokra:

- DNS szekvencia meghatározása láncterminációs módszerrel
- Egy szálban jelölt hibridizációs próba előállítása
- Irányított mutagenézis

A fág genomban van egy intergénikus szekvencia, melybe a vektorok készítésekor kétfajta idegen szekvenciát építettek be (1. ábra).



1. ábra Az M13mp18 és M13mp19 bakteriofág vektorok restriktív térképe
Az ábra azokat a restriktív enzimeket tünteti fel, melyek a duplahelikális replikatív formát hasítják. A két vektor csak a polilinker régió orientációjában különbözik egymástól. A római számok a fág génjeit jelölik.

Az egyik ilyen beépített szekvencia a lac operon regulációs régiója és a β -galaktozidáz (lacZ) gén N-terminális 146 aminosavát kódoló része. Ez a géntermék komplementálni képes a gazdasejt F plazmidján levő defektív β -galaktozidáz gént. A komplementáció eredményeképpen aktív β -galaktozidáz keletkezik, amely az X-gal nevű szubsztrát hasításával kék színű plakkokat eredményez. A β -galaktozidáz indukciójára IPTG-t használunk.

A másik idegen szekvencia egy ún. polilinker régió (klónozó hely), amit a β -galaktozidáz N-terminális régiójába építettek be. Ez az inszerció önmagában nem inaktiválja a β -galaktozidázt, de minden további DNS fragmentum beépítése igen. Ezért az idegen DNS-t tartalmazó rekombináns DNS molekulák nem hasítják az X-gal-t, és színtelen plakkot kapunk (lásd a Klónozás című fejezetet).

A replikatív formát a megfertőzött sejtekből izolálhatjuk. Ezt lehet klónozásra, idegen DNS beépítésére használni. A megfertőzött sejtek tápfolyadékából izolálható az egyfonalas DNS, ami pl. szekvencia-meghatározáshoz használható.

A gyakorlat során a bakteriofág elszaporítására használt *E. coli* gazdasejt, a JM 105 genotípusa: supE Δ (lac-proAB) hsdR17 F' traD36 proAB⁺ lacI^q lacZ Δ M15. Az M13 vektor replikatív formájával transzfekciót végzünk, ill. bakteriofág-szuspenzió titerét határozzuk meg lemezeléssel.

A fágmidok

Olyan vektorok, melyek egyesítik magukban a plazmidok és a fonalas bakteriofágok előnyös tulajdonságait. Ezek a molekulák hordoznak egy plazmid típusú (ColE1) replikációs origót és egy antibiotikum-rezisztencia gént, de emellett még bennük van egy fonalas bakteriofágból (pl. M13-ből) származó szekvencia, amely tartalmazza a fág DNS replikációjához és a fágreszecskek képzéséhez szükséges információt. Ezen vektorokkal is a hagyományos módon lehet idegen DNS-t klónozni. Ha azonban a plazmidot (fágmidot) hordozó gazdasejtet megfertőzzük a megfelelő fonalas bakteriofággal, annak replikációja átvált a "gördülő kerék" mechanizmusú, fág DNS-re jellemző replikációra, amely egyszálú DNS-kópiákat állít elő. Ezek aztán fágreszecskekbe csomagolódnak és kiválasztódnak a tápfolyadékba. Innen egyszerű módszerekkel izolálható az egyszálú DNS, amely közvetlenül használható templátként a szekvenálási reakcióban, mutagenézisre v. egyszálú próbák előállítására.

Széles körben elterjedt fágmidok pl. a pUC118/119, valamint a pBluescript.

A kísérletek kivitelezése

M13 fág lemezelése titer-meghatározás céljából

Bakteriofág-szuspenzió előállítása

1. Mérjen 2 ml YTB tápfolyadékot egy kupakos steril kémcsőbe. Tegyen hozzá 50 μ l gazdasejtet v. lemezelő sejtet. (Utóbbi a JM 105 egy éjszakán átnőtt tenyészet.)
2. Steril fogpiszkálóval vegyen fel egy plakkot, s a fogpiszkálót dobja a kémcsőben levő táptalajba.
3. Rázassa a kémcsövet 37°C-on 4-5 órán át.
4. 1 ml sejtuszuspenziót centrifugáljon le szobahőmérsékleten mikrocentrifugán 5 percig kb. 6000 rpm fordulatszámmal. A felülúszót vigye át egy steril kémcsőbe v. centrifugacsőbe. (A fáguszuspenzió 4°C-on vagy -20°C-on korlátlan ideig tárolható.)

Titer meghatározása

1. 3 ml SOB fedőagart mérjen ki 5 db kupakos steril kémcsőbe és tartsa 42°C-os vízfürdőben.
2. A fáguszuspenzióból készítsen 10-es léptékű hígítási sort 10⁻¹⁰-ig.
3. Mérjen ki 100-100 µl-t a 10⁻⁶, 10⁻⁷, 10⁻⁸, 10⁻⁹, 10⁻¹⁰-es hígításból egy-egy steril mikrocentrifugacsőbe, adjon hozzá 100 µl lemezelő sejtet.
4. Az előzőleg előkészített fedőagarhoz tegyen hozzá 40 µl X-gal-t (20 mg/ml, dimetilformamidban oldva) és 40 µl IPTG-t (100 mM) majd keverje össze. Ezután tegyen hozzá 200 µl megfertőzött baktériumot és ismét keverje össze.
5. A fedőagart öntse ki 37°C-on előmelegített YTA lemezre, 5 percig hagyja szobahőn állni, majd helyezze 37°C-os termosztátba. Másnapra megjelennek a plakkok. A plakkok számából és a hígításból következtethet a titerre (plakk-képző egység [pfu]/ml).

Transzfecció M13 fág replikatív formájával

1. Készítsen a gazda *E. coli*-ból kompetens sejtet a plazmid-transzformációs metodikához hasonlóan (lásd "*Escherichia coli* transzformáció" című fejezetet). Ossa szét a kompetens sejteket 50 µl-es adagokra.
2. Adjon hozzá minden csőhöz az M13 RF DNS megfelelő hígítását (5 ng bőven elegendő). Hagyja állni jégfürdőben 20-30 percig.
3. Készítsen elő steril kupakos kémcsöveket. Olvasszuk fel az SOB fedőagart és 3 ml-es adagokban mérje szét a csövekbe. Tartsa 42°C-os vízfürdőben későbbi felhasználásig.
4. A DNS-sel kezelt baktériumszuspenziót vesse alá hősokknak: 42°C-on 1,5 percig, majd 2 percig tartsa jégen.
5. Adjon hozzá 175 µl SOB táptalajt (Mg²⁺ nélkül). Óvatosan keverje össze.
6. Az előzőleg előkészített fedőagarhoz tegyen hozzá 40 µl X-gal-t (20 mg/ml, dimetilformamidban oldva) és 40 µl IPTG-t (100 mM) majd keverje össze. Tegyen hozzá a DNS-sel kezelt baktériumszuspenzióból 100 µl-t, majd 200 µl gazdasejtet és keverje össze.
7. A fedőagart öntse ki 37°C-on előmelegített YTA lemezre, 5 percig hagyja szobahőn állni, majd helyezze 37°C-os termosztátba. Másnapra megjelennek a plakkok. A vad típusú fág két plakkokat ad, míg a rekombináns fágok színteleneket.

Egyszálú és kétszálú M13 bakteriofág DNS előállítás kis mennyiségben

Fertőzze meg a gazdasejt tenyészetét ugyanolyan módon, ahogy azt a bakteriofáguszuspenzió előállításánál leírtuk (1-3. lépés). Centrifugálja le a megfertőzött sejteket egy 1,5 ml-es mikrocentrifugacsőben. Az üledékben található sejtekből a kétszálú DNS (RF) izolálása ugyanúgy végezhető el, mint egy plazmid "miniprep", míg a felülúszóból izolálható az egyfonalú fág DNS.

Kétszálú DNS (RF) izolálása

1. A lecentrifugált üledéket szuszpendálja fel kémcsőkeverő segítségével 100 µl jéghideg lizáló oldatban (50 mM glükóz, 10 mM EDTA, 25 mM Tris-HCl, pH 8,0). A minta jégen áll néhány percet a következő lépésig.
2. Adjon hozzá 200 µl frissen készített alkalikus SDS-t (0,2 N NaOH, 1% SDS). Keverje össze a cső többszöri "fejjel lefelé" fordításával. (Ezúttal nem kémcsőkeverővel.)
3. Tegyen hozzá 150 µl magas sókoncentrációjú oldatot (Elkészítése: 5M K-acetátból 60 ml, jégecet 11,5 ml, desztillált víz 28,5 ml. Ez az oldat K-ra nézve 3 M, acetátra nézve 5 M koncentrációjú). A lezárt centrifugacsövet "fejjel lefelé" 10 másodpercig kémcsőkeverővel kevertesse. Utána hagyja jégen állni 5 percig.

4. Centrifugálja le a sejttörmelékét mikrocentrifugával 5 percig, ha lehet 4°C-on. (A hidegen centrifugálás itt nem elengedhetetlen, történhet szobahőmérsékleten is.) A felülúszót gondosan szívja le mikropipettával, s vigye át egy új csőbe.
5. Adjon a lizátumhoz egyenlő térfogatú fenol-kloroform keveréket és rázza össze (használjon kémcsőkeverőt). 3 perc centrifugálás után a felső vizes fázist gondosan szívja le mikropipettával, s vigye át egy új csőbe.
6. Adjon hozzá egyenlő térfogatú kloroformot, majd ismét centrifugálás és a felső vizes fázis eltávolítása következik. Vigye át a lizátumot egy új csőbe.
7. Csapjon ki a DNS-t 2 térfogat 96%-os etanol hozzáadásával (2 percig álljon szobahőmérsékleten).
8. Centrifugálja le a csapadékot mikrocentrifugával 5 percig, majd öntse le a felülúszót.
9. Az üledéket szuszpendálja 1 ml hideg 70%-os alkoholban, majd ismét centrifugálja 5 percig. A felülúszó eltávolítása után levegőn szárítsa a nukleinsav-csapadékot.
10. Oldja fel a csapadékot 50 µl TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0 1 mM EDTA) oldatban, majd adjon 1 µl 1 mg/ml koncentrációjú RNáz-t az RNS eltávolítására. A DNS lefagyasztva tárolható.

A leírt technikát használják plazmidizolálásra is. (Ha a DNS tisztasága nem olyan fontos, pl. nem restriktions emésztéshez készül, a fenol-kloroform kezelés [5-6. lépés], v. az RNáz hozzáadása kihagyható.) 1 ml tenyészetből 0,5 µg RF nyerhető.

Egyszálú fág DNS tisztítása

1. A megfertőzött sejtek lecentrifugálása után maradt felülúszóból 1,2-1,3 ml-t vigyen át egy mikrocentrifugacsőbe. Adjon hozzá 200 µl 20% polietilén-glikolt (PEG 8000) 2,5 M NaCl-ban. Keverje össze óvatosan, majd hagyja állni 15 percig szobahőmérsékleten.
2. A kicsapódott fág-részecskéket centrifugálja le (5 perc 4°C-on). A felülúszót szívja le mikropipettával, majd 30 másodpercig centrifugálja újra és ismétlje meg a műveletet.
3. Az üledéket szuszpendálja fel 100 µl TE pufferben kémcsőkeverőt használva.
4. Adjon hozzá 50 µl Tris-pufferrel telített fenolt, és 30 másodpercig kevertesse kémcsőkeverővel. 1 percig szobahőn hagyja állni, majd ismétlje meg a keverést.
5. Centrifugálja 1 percig, majd a felső vizes fázist tegye hozzá 300 µl abszolút alkohol és 3 M Na-acetát 25:1 arányú keverékéhez. Keverés után 15 percig szobahőn hagyja állni.
6. A kicsapott DNS-t centrifugálja le 4°C-on 10 percig, mosssa 70%-os etanollal, majd szuszpendálja fel 50 µl TE pufferben. Utána -20°C-on tárolja. 1 ml tenyészetből 5-10 µg egyszálú DNS-t nyerhet.

Táptalajok összetétele

YTB táptalaj: 5 g élesztőkivonat, 5 g NaCl, 10 g trypton 1 literre, pH 7,0

SOB táptalaj: 5 g élesztőkivonat, 0,5 g NaCl, 20 g trypton 1 literre, pH 7,0
használat előtt adjon hozzá 5 ml 2M MgCl₂-ot

SOB fedőagar: SOB táptalajhoz tegyen 0,7% agart.

STREPTOMYCES TRANSZFORMÁCIÓ

Biró Sándor

A Streptomycesek Gram-pozitív, fonalas növekedésű, életciklusuk során komplex biokémiai és morfológiai differenciálódást mutató talajbaktériumok. Differenciálódásuk folyamán, melynek végén a legtöbb törzs spórát képez, igen változatos szerkezetű és funkciójú ún. szekunder metabolitokat termelnek. Ezek között jelentős számban találunk antibiotikumokat és más hasznos iparilag fontos kis molekulákat. Többek között ez magyarázza, hogy a Streptomycesek genetikai tanulmányozása és jellemzése az elmúlt két évtizedben alapjaiban megtörtént. Két *Streptomyces* törzs, a modellnek számító *S. coelicolor*, és egy antibiotikum termelő ipari törzs, a *S. avermitilis* genomi szekvenálása is befejeződött, és a szekvencia az alábbi internet címeken rendelkezésre áll (<http://www.sanger.ac.uk/projects/s.coelicolor>; <http://www.avermitilis.ls.kitasato-u.ac.jp>). Streptomycesekben a természetes génátadás különböző formái közül a sex-plazmid mediált konjugáció igen gyakori, bizonyos törzsekben generalizált transzdukció is előfordul, kromoszómális DNS felvétele transzformációval azonban nem ismeretes.

Az idegen DNS mesterséges bejuttatása az utóbbi évekig kizárólag protoplaszt polietilén glikol (PEG) indukált plazmid vagy cosmid által való transzformációjával, és fág mediált transzfekeciójával történt. Az utóbbi néhány évben, ezek mellett, a DNS bejuttatása elektroporációval, és *E. coli* valamint *Streptomyces* törzsek közötti intergeneric konjugációval, egyre jelentősebb szerepet kap.

A PEG indukált transzformáció plazmid DNS-sel igen jó, denaturált kromoszómális DNS-sel is elfogadható határfokú. A transzformáció határfoka kovalensen zárt cirkuláris DNS-sel (cccDNS) 10^6 - 10^7 transzformáns/mikrogramm plazmid DNS *Streptomyces lividans* és *S. coelicolor* esetén. Nyitott cirkuláris, vagy lineáris plazmid DNS ragadós végekkel 1-2 nagyságrenddel kevesebb transzformánst ad, míg a linearizált, ragadós véget nem tartalmazó plazmid egyáltalán nem ad transzformánst.

A plazmiddal történő transzformáció gyakoriságát befolyásoló paramétereket többen és több törzs esetén is vizsgálták. Befolyásolja a protoplaszt képzéshez használt tenyésztési fiziológiai állapota, a tenyésztés hőmérséklete, a regenerálás hőmérséklete, a regenerációs táptalaj összetétele, az alkalmazott protoplaszt szám, stb. Nyilvánvalóan, a megfelelő regenerálás fontos, de az optimális transzformáció és regeneráció feltételei nem feltétlenül azonosak. Az minden esetben fontosnak bizonyult, hogy a plazmid DNS-nek a protoplaszthoz való hozzáadása előtt a protoplasztokat mossuk, s a DNS hozzáadását gyorsan kell kövesse a polietilén glikol hozzáadása is, melynek valószínű oka, hogy a protoplasztokból nukleázok szabadulhatnak ki, melyek lebontják a plazmid DNS-t.

A protoplasztok fág DNS-sel történő transzfekeciója lényegében hasonló paraméterektől függ, mint a plazmiddal történő transzformáció, s a transzfekeciós gyakoriság is hasonló.

Kísérletünkben a transzformációt az egyik leggyakrabban alkalmazott *Streptomyces* plazmid vektorral, a pIJ702 jelű plazmiddal (1. ábra) végezzük, amely genetikai illetve szelekciós markerként a *mel* és *tsr* géneket hordozza. A thiostrepton rezisztencia Streptomycesekben jól szelektálható, míg a *mel* génbe történő génklónozás a melanin termelést szünteti meg, így a telepek környezetébe a pigment nem választódik ki, s ez alapján az inzertet hordozó transzformánsok gyakorisága becsülhető.

11. Számoljuk meg a protoplasztokat hemocitóméterben, s mintegy 4×10^9 protoplasztot tartalmazó aliquotot használjunk egy transzformáláshoz. (A protoplasztok lefagyasztva tárolhatók is.)

Transzformálás

12. Centrifugáljuk a protoplasztot (3000 ford/perc, 7 perc), öntsük le a felülúszót és szuszpendáljuk fel a protoplasztot a visszamaradó utolsó csepp pufferben a cső enyhe fricskázásával.

13. Adjuk hozzá a plazmid DNS-t, maximum 20 mikroliter pufferben.

14. Azonnal adjuk hozzá 0,5 ml 25 % PEG tartalmú P-puffert, s automata pipettában néhányszor felpipettázva keverjük össze a szuszpenziót.

15. 2-3 perc állás után adjuk hozzá 5 ml P-puffert, és centrifugáljuk a protoplasztot (3000 ford/perc, 7 perc).

16. Öntsük le a felülúszót, és a protoplasztot szuszpendáljuk újabb 1 ml P-pufferben.

17. Szélesszünk R2YE lemezekre 0,1 ml szuszpenziót és inkubáljuk 30 C° -on 20-24 óráig.

A transzformánsok szelektálása

18. Mikrohullámú sütőben kiolvasztott és $45\text{-}50\text{ C}^\circ$ -ra lehűtött soft nutrient agarhoz (SNA) adjuk thiostreptont 500 mikrogramm/ml koncentrációban.

19. Rétegezzük felül a transzformációs lemezeinket 2,5 ml SNA-val, és inkubáljuk további néhány napig, amíg a telepek spórát képeznek. Két nap után a transzformánsok telepei már láthatóak.

Táptalajok és pufferek:

Yeast extract-Malt extract (YEME) táptalaj:

Bemérések 1 l-hez

Difco yeast extract	3 g
Difco Bacto peptone	5 g
Oxoid Malt extract	3 g
Glukóz	10 g
Szaharóz	340 g

Autoklávozás után kiegészítendő az alábbi steril oldatokkal:

2,5 M $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	2 ml/liter (5mM)
20 % Glicin	25 ml/liter (0,5 %)

R2YE regenerációs táptalaj:

Bemérések 100 ml táptalajhoz:

Szaharóz	10,3 g
K_2SO_4	0,025 g
MgCl_2	1 g
Glükóz	1 g
Difco Casminoacids	0,01 g
Nyomelem oldat	0,2 ml
Difco yeast extract	0,5 g
TES puffer	0,573 g
Agar-agar	2,2 g

Autoklávozás után kiegészítendő az alábbi steril oldatokkal:

KH_2PO_4 (0.5%)	1 ml
$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (5 M)	0,4 ml
L-prolin (20%)	1,5 ml
NaOH (1M)	0,7 ml

Soft nutrient agar (SNA):

Bemérések 100 ml-hez

Difco Nutrient Broth Liofilizátum	0,8 g
Agar	0,3 g

Autoklávozás után kis térfogatokra osztani, újra autoklávozni és így tárolni.

Lizozim oldat:

Készítsünk 1 mg/ml lizozim oldatot P-pufferben, és sterilizzük 0,45 mikrométer pórusmértű membránon való átszűréssel.

P (protoplaszt)-puffer:

Bemérések 800 ml-hez

Szaharóz	103 g
K_2SO_4	0,25 g
$\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	2,02 g
Nyomelem oldat	2 ml

80 ml-es részletekben autoklávozni, és felhasználás előtt kiegészíteni az alábbi steril oldatokkal:

KH_2PO_4 (0.5%)	1ml
$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (3.68%)	10 ml
TES puffer (5.73% pH 7.2)	10 ml

Nyomelem oldat:

Bemérések 1 literhez

ZnCl_2	40 mg
$\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$	200 mg
$\text{CuCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	10 mg
$\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$	10 mg
$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10\text{H}_2\text{O}$	10 mg
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4\text{H}_2\text{O}$	10 mg

ÉLESZTŐSEJTEK TRANSZFORMÁLÁSA

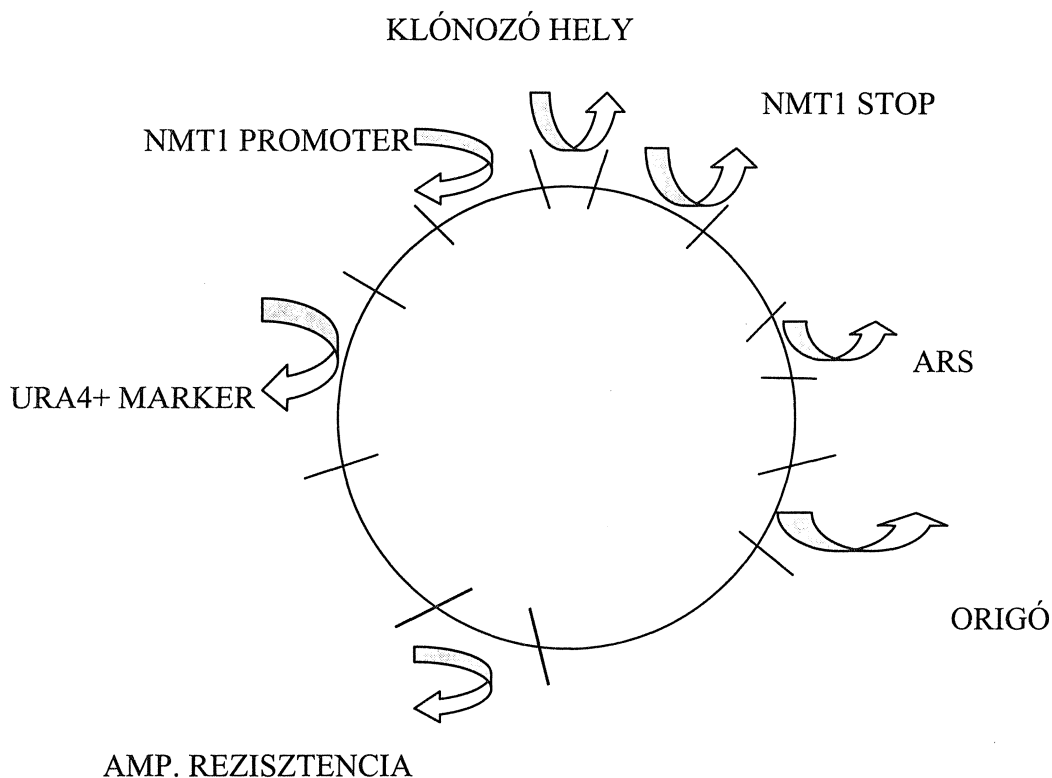
Miklós Ida

Elméleti háttér

A molekuláris biológia egyik legfontosabb módszere a sejtek transzformálása, melynek során speciális géneket juttatunk be egy sejtbe vagy szervezetbe. Ezek lehetnek pl. baktériumok, élesztőgombák, növények vagy állati sejtek, melyekben aztán a transzformáció következtében új tulajdonságok jelennek meg.

Ezen a gyakorlaton az élesztősejtek, pontosabban a *Schizosaccharomyces pombe* sejtek transzformációjával ismerkedünk meg. Ez a faj ugyanis több más élesztőfaj mellett igen kedvelt modellszervezete a molekuláris biológiai kutatásoknak. Főként azért, mert gyorsan szaporodik, s laboratóriumi kísérletekre rendkívül alkalmas. Ráadásul haploid, eukarióta sejtfelépítésű és sok génje mutat homológiát magasabb rendűek génjeivel.

A transzformáció során több problémát kell megoldani. Egyik az, hogy képes-e a sejt a külső, idegen DNS felvételére? Mivel az élesztősejteket kívülről vastag sejtfallal borítja, segítenünk kell ebben a sejtfallal eltávolításával (protoplasztos módszer) vagy átjárhatóvá tételével (alkáli kationos módszer). Másik probléma pedig a vizsgálandó gént hordozó plazmid bejutásának ellenőrzése. Ha bekerült a sejtbe, akkor képes-e ott stabilan fennmaradni és szaporodni? Képes-e a vizsgálandó gén által kódolt géntermék expresszállására? Ahhoz, hogy mindezekre alkalmas legyen, olyan élesztővektorokat használnak, melyek a vizsgálandó DNS fragment mellett speciális szekvenciákat is hordoznak (1. ábra). Ilyen speciális szekvenciák:



1. ábra: Egy vektor felépítése

1. Élesztő szelekciós marker a transzformáció sikerességének ellenőrzésére. Ez leggyakrabban a *S. pombe* $ura4^+$ génje. (Természetesen ebben az esetben a transzformálandó élesztő törzs $ura4^-$ allélt hordoz a kromoszómáján.)

2. Autonóm replikációhoz szükséges szekvencia. Többnyire a *S. pombe* $ars1^+$ szekvenciája. Jelenlétében a plazmid stabil és elég nagy kópiaszámot ér el.

3. Promóter régió (pl. *S. pombe* adh^+ , $nmt1^+$ promótere) az expresszióhoz.

4. Többszörös restrikciós hasító helyet tartalmazó szekvencia, (klónozó hely), a vizsgálandó gén beépítésére.

Az utóbbi időben a plazmidok egy olyan módosított változatát használják leggyakrabban, amelyek egyaránt alkalmazhatók élesztősejtekben és baktériumokban (ingázó vektorok). Ez azt jelenti, hogy a plazmid a fent említett szekvenciákon kívül még hordozza a bakteriális origót és szelekciós markert is (pl. ampicillin rezisztenciát okozó gént).

A kísérlet menete

Transzformálásokhoz az egyik leggyakrabban alkalmazott eljárás az Okazaki által kidolgozott alkáli-kationos módszer, amely jó hatékonyságú, gyorsan és könnyen kivitelezhető.

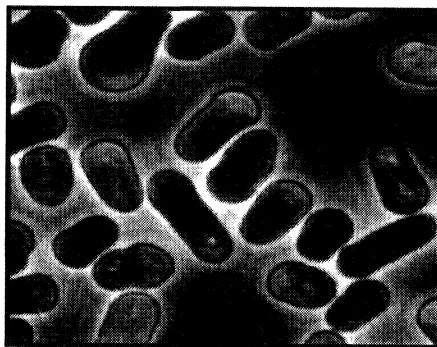
Előtenyészet készítése. Oltson be egy *S. pombe* $ura4^-$ telepet 5 ml YEL (komplett) tápfolyadékba és inkubálja 30°C -on rázatva.

(Az $ura4^-$ tulajdonság azt jelenti, hogy az $ura4$ gén mutációja miatt a törzs nem képes uracil szintézisére, tehát a sejtek csak akkor képesek szaporodni ha a táptalajból felvehetik azt.)

Főtenyészet készítése. Oltson be 0,5 ml előtenyészetet 100 ml MB (minimál) + uracilt tartalmazó tápfolyadékba. Inkubálja 30°C -on 1 éjszakán át.

Transzformálás.

Ellenőrizze a tenyészetet mikroszkóp alatt (2. ábra) és állapítsa meg a sejtsűrűséget, amely optimális esetben 5×10^6 és 2×10^7 sejt/ml között van.



2. ábra: Az *S. pombe* pálcika alakú sejtjei

Centrifugálja le a sejteket szobahőmérsékleten (3000 rpm 5 perc).

Mossa a sejteket 20 ml steril deszt. vízzel, majd pedig 20 ml 0,1 M litium-acetáttal (pH 4,9).

Szuszpendálja el a sejteket 0,1 M litium-acetátban (pH 4,9) úgy, hogy a végső sejtsűrűség 1×10^9 sejt/ml legyen.

Ossza szét a sejtsuszpenziót 100-100 μ l-ként Eppendorf csövekbe és inkubálja őket 60 percig szobahőmérsékleten.

Adjon a transzformálandó sejtekhez 1-1 μ g plazmid-DNS-t illetve egy másik Eppendorf csőhöz (negatív kontrol) pedig 10 μ l deszt. vizet és gyengén rázza össze őket.

Inkubálja 60 percig szobahőmérsékleten.

Adjon a szuszpenziókhoz 290-290 μ l 50%-os PEG 3350-oldatot és óvatosan keverje össze. Inkubálja 60 percig szobahőmérsékleten.

Végezze el a hősokk kezelést úgy, hogy az Eppendorf csöveket helyezze 43 °C-ra 15 percre.

Hagyja lehűlni az Eppendorf csöveket 10 percig szobahőmérsékleten.

Centrifugálja le a sejteket. (3000 rpm 5 perc).

Szuszpendálja el a sejteket 10 ml 1/2 YEL tápfolyadékba és inkubálja 60 percig szobahőmérsékleten erős rázatás mellett.

Szélesszen 100-100 μ l-t MB (minimál) táptalajra és inkubálja 30 °C-on 4 napig.

Értékelés. A csészéken megjelenő telepek transzformáns telepek, hiszen minimál táptalajon csak azok a sejtek képesek telepek képzésére amelyekbe bejutott az ura4 gén vad típusú allélját hordozó vektor. (Természetesen a negatív kontrollként használt csészéken nem jönnek létre telepek.)

Állapítsa meg a transzformálás hatékonyságát.

Táptalajok

YEL: 1% élesztőkivonat, 3% glükóz.

MB: 5g glükóz, 0,5g KH₂PO₄, 0,36g K-acetát, 0,5g MgSO₄ X 7H₂O, 0,1g NaCl, 0,1g CaCl X 2H₂O, 5g (NH₄)₂ SO₄, 100 μ l nyomelem oldat, 1ml vitamin keverék.

(Alfa,Fantes,Hyams,McLeod,Warbrick:Experiments with Fission Yeast, Cold Spring Harbor Laboratory Press 1993)

KLÓNOZOTT GÉNEK EMLŐS SEJTEKBE VALÓ BEJUTTATATÁSA

Törőcsik Dániel és Nagy László

Számos módszer ismert gének eukarióta sejtekbe való bejuttatására. A technikák három csoportba sorolhatóak:

- a., transzfekeció biokémiai módszerrel
- b., transzfekeció fizikai módszerrel
- c., vírus mediálta transzdukeció

A biokémiai módszereket, mint a kalcium–foszfát mediálta és a dietolaminoetil (DEAE)–dextrán mediálta transzfekeciók, közel 30 éve használjuk nukleinsavak sejtvonalakba történő bejuttatásához. A módszerek lényege, hogy a kémiai anyag komplexet képez a DNS-el, így elősegítve annak sejtekbe történő felvételét. Napjainkra egyre többféle sejtbe tudunk géneket sikeresen bejuttatni, kationos lipidek ún. liposzómák segítségével is.

A fizikai módszerek alábbi fajtái vannak széles körben elterjedve: partikulumok biolisztikus (lövedékhez hasonló) bejuttatása valamint direkt mikroinjekció – ezen technikák a sejtmembrán átlyukasztásával juttatják a DNS-t a sejtbe. Az elektroporáció során pedig elektromos impulzusokkal átmeneti pórusokat hozunk létre a plazmid membránon, melyeken keresztül bejuthat a nukleinsav.

Tranziens és stabil transzfekeció:

Tranziens transzfekeció során, a rekombináns DNS célsejtbe történő juttatásával a vizsgálni kívánt gén magas szintű, ám átmeneti kifejeződését tudjuk elérni. Ilyenkor a bejuttatott DNS-nek nem feltétlenül épül be a transzfekektált sejt genomjába. Tranziens transzfekeció a választandó, ha nagy számú mintát kell elemezni viszonylag kis idő alatt. A bejuttatott gén kifejeződését a sejtekben, azok lizátumaiban, általában 1-4 nappal a transzfekeció után vizsgálhatjuk.

Stabil vagy tartós transzfekecióval sejtklónokat hozhatunk létre, melyekben a bejuttatott gén beépül a kromoszómális DNS-be és onnan szintetizálódva jön létre korlátozott mennyiségben a vizsgálandó fehérje. Mivel a stabil transzfekeció hatékonysága (a transzfekektált sejtípustól függően) egy-két nagyságrenddel kisebb a tranziens transzfekecióéhoz képest, ezért kiemelt hangsúlyt kell fektetni a kevés, ám sikeresen transzfekektált sejtek beazonosítására, ún. szelekciós genetikai markerek segítségével. A marker jelen lehet vagy a rekombináns plazmidon, mely a vizsgálandó gént is tartalmazza, vagy pedig külön juttathatjuk be, melyet kotranszformációnak nevezünk. A szelekciós genetikai marker legtöbbször valamilyen antibiotikum (pl. aminopterin, G418, methotrexat, hygromycin B, mikofenolsav) rezisztenciáért felelős.

A transzfekciós módszerek egyszerű jellemzését tartalmazza az 1. táblázat.

1. táblázat: Transzfekciós módszerek

MÓDSZER	EXPRESSZIÓ		SEJT TOXICITÁS	SEJTTÍPUS
	tranziens	stabil		
1. Lipid mediált	+	+	változó	letapadó sejtek primer sejtvonalak sejtszuszpenziók
2.és3. Kalcium-foszfát mediált	+	+	nincs	letapadó sejtek (CHO, 293) sejtszuszpenzió
4. DEAE-dextrán mediált	+	-	van	BSC-1 CV-1 COS
5. Elektroporáció	+	+	nincs	sokféle
6. Biolisztikus	+	+	nincs	primer sejtvonalak szövetek, szervek növényi sejtek
7. Polybrene	+	+	változó	CHO kratinociták

Mind a tranziens mind pedig a stabil transzfekció sikerének tisztázásához elengedhetetlen a megfelelő kontrollok alkalmazása.

Kontrollok a tranziens expressziónál:

Negatív kontroll: Egy vagy két minta transzfektálása un. hordozó/vivő (olyan bakteriális vagy egyéb DNS, ami nem fejez ki RNS-t és fehérjét) DNS-sel és/vagy a pufferral, amiben a plazmidot vagy a bevivendő gént hígítottuk. Klasszikusan lazac sperma DNS-t vagy pedig a rekombináns előállításához használt vektort használjuk letapadó sejtek transzfekciójához a vizsgálandó gén nélkül. A transzfekció után nem szabad hogy a megkezelt sejtek felváljanak vagy lekerekedjenek.

Pozitív kontroll: Egy vagy két minta transzfektálása olyan plazmiddal, mely egy jól ismert fehérjét, (mint pl. chloramphenicol acetyl transferáz, luciferáz, E. coli β -galaktozidáz, zöld fluoreszcens fehérje) kódol. Ezen fehérjék expresszióját egy nagy aktivitású promoter (mint az emberi citomegalovírus promotere) szabályozza. Mivel az endogén szintjük alacsony, ezért a hozzájuk kapcsolódó jel intenzitásának növekedése a transzfekció sikere mellett szól.

Kontrollok a stabil expressziónál:

Negatív kontroll: Egy vagy két minta transzfektálása inert nukleinsavval, mint pl. lazac sperma DNS, a szelekciós markert kódoló gén hiánya mellett. A sejteket 2-3 hétig tartjuk a szelekciós ágens jelenlétében, ami hatására nem szabad egyetlen kolóniát sem látnunk, hiszen az ágens közömbösítésére a sejt nem képes a megfelelő gén hiányában.

Pozitív kontroll: Egy vagy két mintát transzfektálunk plazmával, mely a szelekciós markert (és csak azt) kódolja, majd a sejteket 2-3 hétig tartjuk a szelekciós ágens jelenlétében. Az életképes kolóniák száma jelzi a transzfekció hatékonyságát. Amennyiben a két azonos körülmények között transzfektált minta között különbség van a kolóniák számában az valamilyen gén toxikus termékére vezethető vissza, vagy ritka esetben olyan génre, mely túlélési előnyt biztosít.

Módszerek:

Lipid mediálta DNS transzfekció (Lipofekció)

Lipofekciónak nevezzük mindazon technikákat, mely során a transzfektálandó DNS lipiddel van körülvéve (liposzóma) és ez a lipidburok vagy közvetlenül kerül kapcsolatba a sejt membránjával, vagy pedig nem-receptor-mediálta endocitózissal jut be a sejtbe. A liposzómákban levő DNS - más transzfekciós módszerekhez hasonlóan-, itt is csak kis százalékban jut el a sejtmagba; mikroszkópos vizsgálatok alapján a DNS nagy része a sejtmembránhoz kapcsolódva marad. A módszer előnye azonban, hogy hatékonyabb mint például a polikationos precipitáció (kálcium-foszfát), és kevesebbe kerül mint az elektroporézis.

A lipofekció reagensei két nagy csoportba sorolhatóak, úgymint anionos és mint kationos liposzómák.

Az anionos liposzómák, melyeket az 1970-es években kezdtek használni, nem tudtak jelentős teret hódítani, részben a módszer időigényessége, részben a reprodukálhatóság bizonytalansága miatt.

Ezzel szemben az 1980-as évek végétől egyre fontosabbá váltak a kationos lipidek a nukleinsavak bejuttatásban, azon tulajdonságuk alapján, hogy spontán kapcsolódni tudnak a DNS-hez, majd pedig fúzionálnak a membránnal. A DNS-lipid komplex létrejöttének alapja ionos kapcsolat a lipid erősen pozitív feji része és a DNS negatív töltésű foszfát csoportjai között. A kationos lipidek első generációja monokationos volt; fő hátrányuk, hogy toxikusak számos emlős és rovar sejtire valamint hatékonyságuk is igen kis fokú. A későbbi generációk már polikationosak, sokkal kisebb toxicitással és nagyobb fokú hatékonysággal.

Kálcium-foszfát mediálta transzfekció plazmid DNS-el

A DNS felvétele a sejtek által jelentősen növelhető, ha a nukleinsav kalcium foszfáttal alkotott koprecipitátum formájában van jelen. A módszer előnye a megbízhatóság, mind a sejtek stabil transzformációjában, mind pedig a klónozott DNS tranziens expressziójában.

A technikának számos változatát használják, melyek közül a leggyakoribb, hogy chloroquine kezeléssel és/vagy glicerol shockkal egészítik ki a protokollt. A gyenge bázikus tulajdonságú chloroquine meggátolja a DNS lizoszómális hidrolázok általi intracelluláris degradációját, azonban alkalmazását nagyban limitálja erős toxicitása. Hasonló a probléma a glicerol kezeléssel is. A transzformáció hatékonyságának növelése végett szintén ajánlott a plazmid DNS tisztítása oszlop kromatográfiával.

Az alkalmazott protokollok fontos része a nátrium-butiráttal való kezelés. A nátrium-butirát hatásmechanizmusa nem ismert, bár tudjuk, hogy gátolja a hisztonok deacetilációját és így feltételezhető, hogy a hisztonok hiperacetilálásán keresztül, mintegy előkészíti a transzfektálandó DNS-t a transzkripcióra.

Kálcium-foszfát mediálta transzfekció nagy molekulású genomikus DNS-el

Emlős sejtvonalak genomikus DNS-el történő transzfekciójával, majd a keresett gén kiválasztásával, sikeresen izoláltak emlős géneket (mint pl. onkogéneket, sejtfelszíni és intracelluláris fehérjéket kódoló géneket). A stabil transzfekció során a kromoszómális DNS-

be integrálódott keresett/vizsgálandó géneket a rájuk jellemző faj-specifikus ismétlődő DNS-szakaszok vagy egy kotranszfektált plazmid DNS segítségével ismerjük fel.

A módszer különösen jól alkalmazható stabil sejtvonalak létrehozására, melyben a transzfekciót követően a bejuttatott DNS beépül a „gazda” kromoszómális génjei közé.

Az alkalmazott protokoll elve megegyezik az előző pontban vázoltakkal.

Nagy hatékonyságú DEAE-dextrán mediálta transzfekció

Az 1950-es években elsőként alkalmazott transzfekciók során hiperozmotikus és polikationos fehérjéket alkalmaztak a DNS sejtekbe juttatásához. Az eredményesség azonban lehangoló volt, míg nem az 1960-as években poliovírus RNS, valamint SV40 és polyomavírus DNS sejtekbe történő juttatásához a DEAE-dextrán meg nem jelent. A protokollt kisebb módosításokkal azóta is elterjedten használják sejt kultúrák virális genommal és rekombináns plazmiddal történő transzfekciójához. Bár a DEAE-dextrán hatása részleteiben nem ismert, valószínűnek tűnik, hogy a pozitívan töltött nagy molekulású polimer mintegy hidat képez a negatív töltésű DNS és a szintén negatív töltésű sejt felszín között, majd a DEAE-dextrán/DNS komplex fagocitózissal bekerül a sejtbe. Az így létrejött egyre savasabb jellegű endoszómákból a DNS eddig ismeretlen módon kijut a sejt plazmába majd a magba transzportálódik.

A DEAE-dextrán mediálta transzfekció a kalcium-foszfát mediálta transzfekciótól három fontos szempontban tér el:

1. klónozott gének tranzien expresszálására és nem pedig sejtek stabil transzformációjára használható
2. míg pl. a BSC-1, CV-1 és COS sejtvonalakon megfelelően hatékonysággal használható, addig számos más sejtvonalon eredménytelen az alkalmazása
3. DEAE-dextrán mediálta transzfekció esetén kisebb mennyiségű DNS szükséges; nagyobb mennyiség gátló hatást fejthet ki

A DEAE-dextrán alapú protokollnak számos formája ismert. A legtöbb esetben a sejtek már egy előre elkészített DNS – DEAE-dextrán keveréket kapnak, míg más esetben először DEAE-dextránt, majd csak utána a DNS-t, abból a megfontolásból, hogy megpróbálják csökkenteni a toxikus hatását a DEAE-dextránnak, a DNS felvételt pedig fokozni. A használt DEAE-dextrán koncentrációjának megfelelő kiválasztása szintén fontos a hatékonyság szempontjából.

Segédanyagok, mint DMSO, chloroquine vagy glicerol használata akár 50-szeres növekedéshez is vezethet a transzfekció sikerességében, azaz a transzfektált sejt populáció akár 80 % -a is expresszálhatja a vizsgálandó gént.

Fontos észrevétel továbbá a DEAE-dextrán módszerrel kapcsolatban, hogy az így bejuttatott DNS mutációja jóval gyakoribb. Ez elsősorban olyan szekvenciákra igaz, melyeket olyan vektorokba klónoznak, melyek a transzfektált emlős sejtekben sokszorozódni képesek. A mutációk a legváltozatosabbak lehetnek (deléció, inzerció, bázis kicserélődés). Létrejöttükben fontos szerepet tulajdonítanak a bontó enzimeknek valamint a lizoszómák alacsony pH-jának és valószínűleg annak, hogy a kromatin struktúra károsodik a transzfektált DNS sejt magba történő bejutása során.

A DEAE-dextrán azonban nemcsak mint primer ágens jöhet szóba a transzfekciók esetében, hanem mint adjuváns is az elektroporáció hatékonyságának növelésében.

DNS transzfekció elektroporációval

Pulzáló elektromos mező segítségével számos emlős sejtbe, valamint baktériumba juttatható be DNS. Az elektroporáció jól alkalmazható sejtvonalakon, amelyek más módszerekkel nem transzfektálhatóak.

A transzfekció sikerességét számos tényező befolyásolja:

1. az alkalmazott elektromos mező erőssége: kisebb feszültség mellett a membrán nem változik meg kellően a DNS bejutásához, míg a nagyobb feszültség irreverzibilis károsodáshoz vezethet. A legtöbb sejtvonal esetén 250V/cm és 750V/cm tartomány használatos, melyet a sejtek 20-50 %-a él túl. Az elektromos impulzus hossza: az optimális hossz 20-100 msec között van.

2. hőmérséklet: a hatékonyság növelése szempontjából szerencsés a sejteket 1-2 percig inkubálni az elektroporációs kamrában, a feszültség rákapcsolása előtt

3. a DNS konformációja és koncentrációja: mind a tranziens és mind a stabil transzfekció esetében jobb eredmény érhető el lineáris DNS használata mellett; a megfelelő koncentráció 1 és 40 μ g/ml között van

4. a médium ionösszetétele: többszörös növekedés érhető el a hatékonyságban megfelelő puffer (pl. HEPES-puffer) alkalmazása mellett

Biolisztikus DNS transzfekció

A számos módszer és azok módosítása ellenére is vannak sejt kultúrák, szövetek, valamint sejten belüli organellek, melyek átjárhatatlanok az idegen DNS számára. A probléma elsősorban növényi sejtekre igaz. A megoldást az ún. „gén pisztoly” kifejlesztése jelentette (a Biolistics cég által - neve is innen származik) azáltal, hogy a DNS-el bevont fém partikulum, mint golyó tud átjutni a vastag sejt falon, bejuttatva így a DNS-t. Ez a technika forradalmasította a növénygenetikát.

A módszer hatékonyságát az alábbi tényezők befolyásolják:

1. sejt típus: a baktériumoktól a növényeken át, élő rágcsálók májsejtjéig sikerrel alkalmazható

2. sejt denzitás: pl. DNS sejtorganellekbe való bejuttatása esetén a kisebb sejtsűrűség a kedvező, míg bacillusok transzfektálásának a nagyobb denzitás kedvez

3. a kultúra médiuma: nagyobb ozmolaritás kedvez a hatékonyságnak; általában szorbitolt és/vagy mannitolt használnak 0.05 – 1.5 M-ig.

4. a „gén pisztoly” beállításai: a távolság a pisztoly és a célsejtek között; a lövedéket hajtó hélium nyomása

5. a lövedék fajtája: a volfrám lövedékek eltérő méretűek, és néhány sejtfeleség számára toxikusak, oxidációs hajlamuk miatt a DNS degradációja fokozott; az arany kevésbé toxikus és sokkal inkább előállítható belőle közel azonos méretű lövedékek, azonban a DNS-hez gyengébben kötődik és árban is drágább

6. a lövedék mérete: subcelluláris organellek esetén 0.6 μ m, emlős sejt kultúrák esetén 1.6 μ m ajánlott

DNS transzfekció polybrene-nel

Számos polikationt, így a polybrene-t is olyan sejtek transzfekciójához használjuk, melyekbe más módszerekkel nem tudjuk bevinni a DNS-t (pl. keratinociták). A polybrene DMSO jelenlétében segíti a DNS bejutását a transzfektálandó sejtbe. A DMSO szerepe a DNS felvételének elősegítésében nem ismert; valószínűleg részben a sejtmembránt permeabilizálja, részben pedig ozmotikus sokkot eredményez. A DMSO-t tranziens transzfekció esetén 25 %-os, míg stabil transzfekció esetén 15 %-os koncentrációban alkalmazzuk. Néhány protokollban a DMSO helyett 5-7 %-os NaCl-ot ajánlanak. Polybrene alkalmazása esetén sejttoxicitással nem kell számolni.

Plazmid DNS transzfektálása során a hatékonyság 15-ször nagyobb, mint a kalcium-foszfát mediált transzfekció során, azonban ez a különbség nem mutatkozik meg nagy molekulású DNS esetében.

FEHÉRJE-FEHÉRJE KÖLCSÖNHATÁSOK KIMUTATÁSA ÉLESZTŐ KÉT-HIBRID RENDSZER Pettkó-Szandtner Aladár és Horváth V. Gábor

A fehérje-fehérje kölcsönhatások alapvető jelentőségük a biológiai folyamatokban, mint például a replikáció, transzkripció, kiválasztás, jelátvitel és az anyagcsere. Ezért egy kiválasztott fehérje vizsgálatakor központi kérdés, hogy az mely más fehérjékkal lép kapcsolatba működése során. Ennek a kérdésnek megválaszolása - például az onkogének által kódolt fehérjék esetében - számos új információval szolgál a sejtciklus és a differenciáció folyamatának megértéséhez.

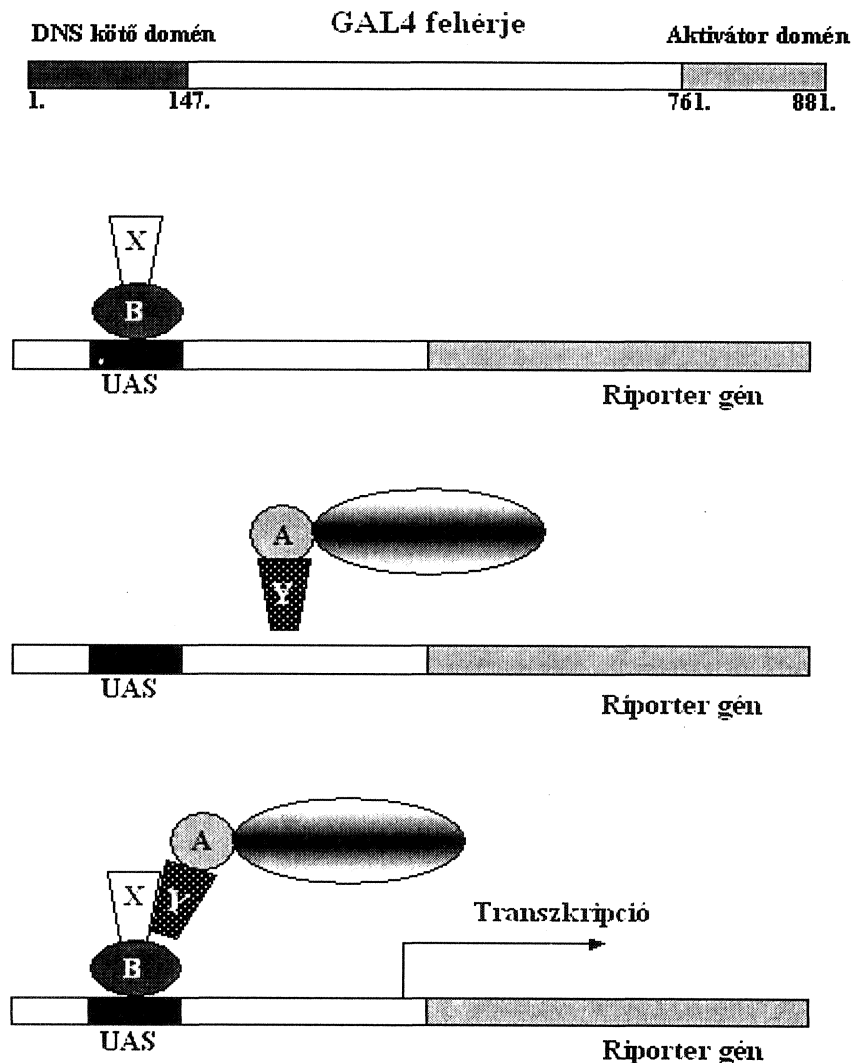
Jelentős hátránya számos fehérje-fehérje asszociáció kimutatására szolgáló módszernek (ilyenek például a ko-immunoprecipitáció, keresztkötés, együttes tisztítás gradiensen vagy kromatográfiás oszlopon), hogy a célfehérjével kölcsönható proteinek csak mint eltérő elektroforetikus mobilitású sávok azonosíthatóak poliakrilamid gélelektroforézis követően. Ezek a módszerek vagy izolált fehérje tisztítását igénylik, vagy olyan ellenanyag termeltetését, amely homológ vagy heterológ rendszerben képes az adott fehérjét kellő specifikussággal felismerni. A detektált fehérjék azonosítása, a kódoló gének megkeresése olyan idő- és munkaigényes lépéseket kíván, mint a fehérjék tisztítása aminosav sorrendjük meghatározásához, illetve ellenanyag készítéséhez, az aminosav sorrend ismeretében degenerált oligonukleotidok szintézise és cDNS könyvtárak tesztelése a polimeráz láncreakció (PCR) segítségével.

Az említett nehézségek leküzdésére olyan újabb módszereket fejlesztettek ki, melyek segítségével a célfehérjével kölcsönható proteinek kódoló gének azonnal izolálhatóvá válnak. Egy ilyen különösen hasznos technika az expressziós könyvtárak tesztelése jelölt célfehérje felhasználásával, mely hasonló a λ gt11 könyvtárak antitesttel történő vizsgálatához. Azonban ezeknek a módszereknek is megvannak a hátrányai: a fehérje kölcsönhatások kimutatása *in vitro* történik, általában nitrocellulóz filterek felületén. Ezért a kölcsönhatásoknak kellően stabilnak kell lenniük az alkalmazott pufferekben. Számos fehérje nem rendelkezik ilyen körülmények között a megfelelő tulajdonságokkal (oldhatóság, foszforiláció, szerkezet), továbbá a körülményeket minden célfehérje esetén optimalizálni kell a megfelelő jel-zaj arány eléréséhez. Ezen hátrányok kiküszöbölését teszi lehetővé az élesztő két-hibrid rendszer, mely módszert a fehérje-fehérje kölcsönhatások *in vivo* kimutatására gyakorlatilag egy időben, két kutatócsoportban (Roger Brent és Stanley Fields laboratóriumában) dolgozták ki.

Az élesztő két-hibrid rendszer

A módszer alapja az, hogy számos eukarióta transzkripciós aktivátor moduláris szerkezetű: a fehérjében jól elkülöníthető a gének promoterrégiójában elhelyezkedő szekvenciaelemeket megkötni képes DNS kötő régió és a transzkripciós komplex fehérjével kölcsönható aktivátor régió (1. ábra). Az élesztő GAL4 transzkripciós aktivátor fehérjében is jól elválasztható egymástól és a fehérje többi részétől az említett két domén. Míg a GAL4 fehérjében a két régió közötti kapcsolatot természetesen a fehérje köztes szakasza biztosítja, kimutatható transzkripciós aktivátor hatás akkor is, ha a két domén asszociációját másodlagos kötőerők (fehérje-fehérje kölcsönhatások) biztosítják. Ez az élesztő két-hibrid rendszer működésének alapja (1. ábra): olyan plazmid konstrukciókat készítünk, amelyek két hibrid fehérjét kódolnak. Az egyik fúziós hibrid fehérjében a GAL4 transzaktivátor DNS kötő doménjét egy X fehérjével, a másik fehérjében a GAL4 II. transzaktivátor doménjét egy Y fehérjével építjük össze. Ezekkel a plazmid konstrukciókkal olyan *Saccharomyces cerevisiae* törzset transzformálunk, melynek genomjában egy vagy több olyan szelekciós marker és

riporter gén (például a *HIS3*, *ADE2* és a *lacZ* gén) található, melyeknek regulátor régiója GAL4 kötőhelyet tartalmaz. A transzformációt követően a két fúziós fehérje termelése megkezdődik az élesztő sejtekben, önmagában azonban egyik sem képes a riporter gén expressziójának aktiválására: a DNS kötő motívumot tartalmazó azért nem, mert nincs aktivátor régiója (szerencsés esetben), az aktivátor régiót tartalmazó hibrid fehérje (bár kötődik az élesztő transzkripciós mechanizmus fehérjéihez az aktivátor doménon keresztül) pedig nem képes a specifikus DNS kötésre. A két vizsgált fehérje közötti kölcsönhatás azonban az asszociáció erősségétől függő mértékben képes visszaállítani a GAL4 transzaktivátor mindkét funkcióját, így aktiválja a riporter gén expresszióját, amit a géntermék aktivitásának mérésével lehet számszerűen jellemezni.



1. ábra. A GAL4 fehérje szerkezetének sematikus ábrája és az élesztő két-hibrid rendszer működési elve.

A GAL4 fehérjében feltüntettük a promoterben található szekvenciák (UAS) felismeréséért felelős DNS kötő domént (1-147. aminosav) és a transzkripciós komplex fehérjéivel kölcsönható aktivátor domént (761-881. aminosav). A két-hibrid rendszer működését ismertető ábrarészletben B-vel jelöltük a GAL4 fehérje DNS kötő, A-val a transzaktivációért felelős doménjét. Az aktivátor régióval asszociálódott, ellipszissel jelölt fehérjék a transzkripciós komplexet alkotják. A riporter gén esetünkben a *lacZ*.

A két-hibrid módszer felhasználásával lehetséges aktivátor domén könyvtárak vizsgálata abból a célból, hogy egy kiválasztott célfehérjével kölcsönható fehérjéket azonosíthassunk. Teljes genomikus vagy cDNS szekvenciákat klónozzunk olyan élesztő-*E.coli* ingázó vektorokba, melyek tartalmazzák a GAL4 aktivátor régióját kódoló DNS szakaszt. A megfelelő élesztőtörzs sejtjeit a célfehérje génjét tartalmazó konstrukcióval - mely a GAL4 DNS kötő doménjét is kódolja - és az aktivátor domént hordozó cDNS könyvtárral együttesen transzformálhatjuk, majd a szelektív minimál táptalajon kapott kolóniákban vizsgáljuk a riporter gén kifejeződését. A magas szintű génexpressziót mutató élesztőkolóniákból a cDNS könyvtár plazmidját kinyerhetjük és újra *E. coli*-ba transzformálva elegendő DNS-t tisztíthatunk a kölcsönható fehérjét kódoló gén nukleotid sorrendjének meghatározásához.

A két-hibrid rendszernek számos előnye van a bevezetőben említett hagyományos eljárásokkal szemben: az *in vivo* módszer előnye, hogy a fehérje-fehérje kölcsönhatások természetes, sejten belüli körülmények között alakulnak ki. Tisztított célfehérje, vagy a célfehérje ellen termeltetett ellenanyag nem szükséges a vizsgálathoz. Ha egy aktivátor domén könyvtárból pozitív élesztőkolóniákat izoláltunk, a célfehérjével kölcsönható proteint (vagy annak a kölcsönhatásért felelős régióját) kódoló gén (vagy génszakasz) azonnal izolálható és nukleotid sorrendje meghatározható. A két-hibrid rendszer érzékenyebb számos más biokémiai módszernél, így alkalmas gyenge vagy időleges kölcsönhatások kimutatására is. Ez annak köszönhető, hogy a riporter gén emelt szintű kifejeződése által eredményezett fehérjetermék (a β -galaktozidáz enzim) stabilitása magas az élesztősejtekben.

Természetesen a módszernek vannak hátrányai is: a célfehérjét kódoló gént izolálnunk kell a vizsgálat előtt, néhány fehérje nem mutat kellő stabilitást az élesztősejtekben a vizsgálat elvégzéséhez. Számos fehérje (például membránproteinek, sejtorganellumokba szállított fehérjék) csak deléciós mutáns formájában transzportálhatóak az élesztő sejtmagba, ahol a két-hibrid rendszer által detektálható kölcsönhatások kialakulnak. Toxikus fehérjék csak nagyon alacsony szinten termelhetők élesztőben, így ezek kölcsönhatásai rossz hatásokkal mutathatóak ki. Nem, vagy csak körülményes módon lehet olyan célfehérjéket vizsgálni, melyek önmagukban transzaktivátor hatásúak.

Mindezen hátrányok ellenére az élesztő két-hibrid rendszer olyan módszernek bizonyult, mely széles körben alkalmazható a fehérje-fehérje kölcsönhatások kimutatására, a mérések viszonylag gyorsan elvégezhetőek és az eredmények számszerű értéket nyújtanak a kölcsönhatások erősségéről.

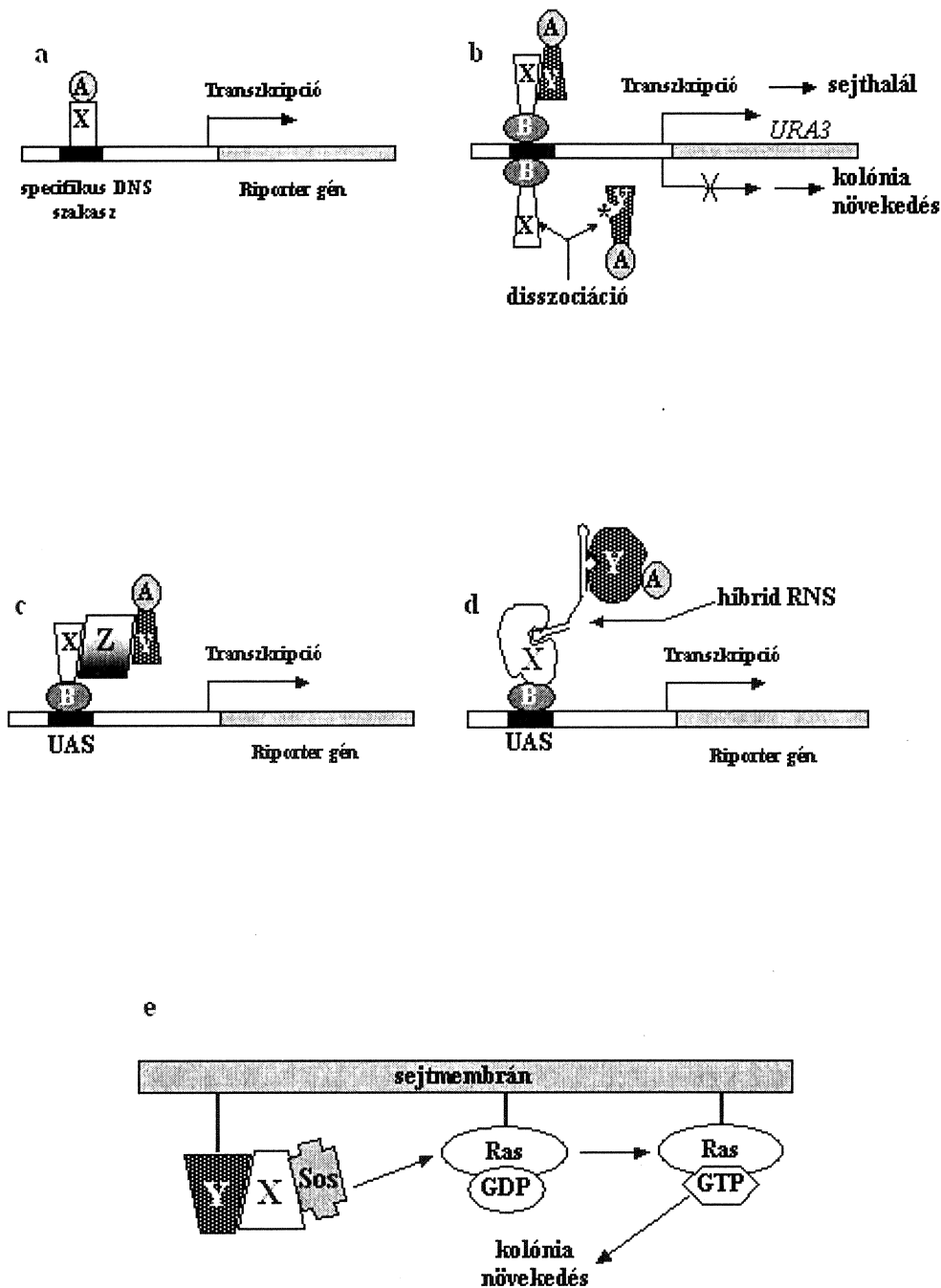
A két-hibrid rendszer változatai

Az elmúlt 10 évben az eredeti két-hibrid rendszer számos változatát dolgozták ki, melyeknek segítségével más biomolekulák kölcsönhatását is vizsgálhatjuk. Ezen módszerek közül a teljesség igénye nélkül említenénk meg a legfontosabbakat.

Az **egy-hibrid rendszer** (2a. ábra) alkalmazásával specifikus DNS-szekvenciát kötő fehérjék azonosíthatóak. Itt a GAL4 transzkripció faktor kötőhelyét cserélik a meghatározott DNS szakaszra és az adott fehérje (mely fúziós partnerként aktivátor domént is tartalmaz) DNS-kötő tulajdonságáról a riportergén transzkripciójának aktiválása ad információt. A módszer segítségével vizsgálható az is, hogy egy adott DNS kötő fehérje milyen promoterrégiók kötésére képes.

A **reverz két-hibrid rendszer** (2b. ábra) segítségével két fehérje asszociációját megszüntető faktorok vizsgálhatók. Ebben az esetben a szelekciós markergén az *URA3*, mely által kódolt enzim toxikus abban az esetben, ha a sejteket 5-fluoroorotátion növesztjük. Így a fúziós fehérjék közötti kölcsönhatás (mely indukálja az *URA3* gén átíródását) érzékenyíti teszi az élesztősejteket a fenti vegyületre. A fehérjepartnerekben előidézett mutációk, illetve

olyan más fehérjék, oligopeptidok vagy vegyületek, melyek disszociációt idéznek elő, az *URA3* expressziójának csökkenéséhez, fluoroorotát rezisztenciához és kolónia növekedéshez vezetnek.



2. ábra. Az élesztő két-hibrid rendszer változatai és működési elvük vázlata
 2a. ábra: az egy-hibrid rendszer DNS-fehérje kölcsönhatás vizsgálatára.
 2b. ábra: reverz két-hibrid rendszer a kölcsönhatást megszüntető tényezők analiziséhez.
 2c. ábra: három fehérje asszociációját detektáló három-hibrid rendszer.
 2d. ábra: három-hibrid rendszer a fehérje-RNS kölcsönhatás kimutatására.
 2e. ábra: a "Sos recruitment system" (SRS) citoplazmás két-hibrid rendszer.

A **három-hibrid rendszerek** esetében egy olyan harmadik partnert alkalmaznak, mely segít a kapcsolatot kialakítani az aktivátor domént (A) és DNS-kötő domént (B) tartalmazó

molekulák között. Ez lehet egy olyan oligopeptid, mely hídként köti össze a fúziós fehérjét (2c. *ábra*); enzim, mely által okozott modifikáció szükséges a kétfúziós partner asszociációjához vagy hibrid RNS molekula (2d. *ábra*). Az RNS három-hibrid módszer esetében a hibrid RNS egyik szakasza ismert RNS-fehérje kölcsönhatást létesít a DNS kötő domént tartalmazó fúziós fehérjével (ilyen, a gyakorlatban használt páros például az MS2 fág burokfehérje és az ezt kötő fág RNS szakasz); a hibrid RNS másik része a vizsgálat tárgya, amellyel asszociálódó fehérjét az aktivátor domént tartalmazó vektorba klónozott cDNS könyvtár tesztelésével kaphatjuk meg.

Mint látható, a fenti rendszerek alkalmazásával nemcsak fehérje-fehérje, hanem fehérje-DNS és fehérje-RNS kölcsönhatások is vizsgálhatók, analizálható számos olyan tényező (posztranszlációs modifikáció, sejtporomeabilis kismolekulájú vegyületek hatása), mely befolyásolhatja az asszociáció erősségét. A gyakorlatban az említett módszereket alkalmazzák más organizmusokban (prokarióta, emlős és növényi két-hibrid rendszerek) is. Az élesztő két-hibrid rendszer előzőekben említett hátrányai (a csalifehérje magas saját transzaktiváló képessége, a membránfehérjék vizsgálatának problémái, stb.) kiküszöbölésére az utóbbi években számos próbálkozás történt. Ezek eredményeként jöttek létre a különböző ***citoplazmás két-hibrid rendszerek*** (megkülönböztetendő az eredeti módszertől, ahol a két fehérje sejtmagban történő asszociációjáról ad információt a riportergén transzkripciójának aktiválása).

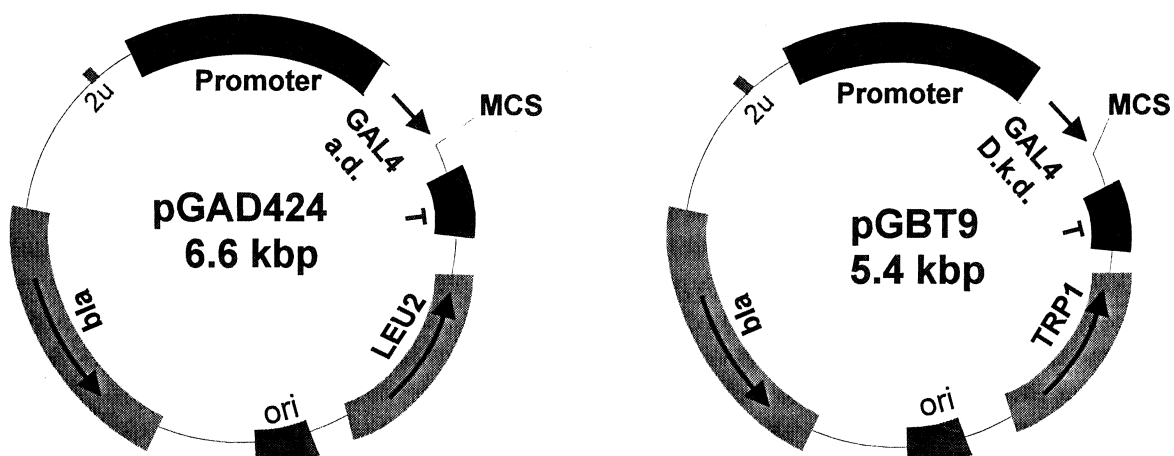
Ezen technikák közül a legkiforrottabb (2e. *ábra*) azon alapul, hogy a humán guanil nukleotid kicserélődési faktor (guanyl nucleotide exchange factor, GEF) hSos képes az élesztő Ras GEF hőmérséklet-érzékeny mutánst (Cdc25) komplementálni. Ehhez az szükséges, hogy a hSos fehérje a plazmamembránon helyezkedjék el, ahol aktiválja az élesztő Ras fehérjén a GDP-GTP cserét. A két kölcsönható fehérje közül az egyik (Y) fúziós partnerként az Src mirisztoilációs szignálját tartalmazza, így a plazmamembránba lokalizálódik, az ezzel kölcsönható X fehérjével fuzionált hSos tehát GEF aktivitása folytán komplementálja a *cdc25-2* mutációt, lehetővé téve a sejtnövekedést restriktív hőmérsékleten is. Ez a rendszer alkalmas cDNS könyvtárak tesztelésére is, a szükséges élesztőtörzs és vektorok a kereskedelemben is hozzáférhetőek (Stratagene).

Egy másik citoplazmás két-hibrid rendszer két, nem-funkcionális β -galaktozidáz deléciós mutánst használ fúziós partnerként. A hibrid fehérjék erős kölcsönhatása lehetővé teszi a komplementációt, így a β -galaktozidáz aktivitás helyreállítását. A módszer előnye, hogy közvetlen és a kölcsönhatás (melynek erőssége egyenesen arányos a mért enzimaktivitással) detektálása nem függ más sejtfunkcióktól.

A két-hibrid rendszerben használatos vektorok és élesztőtörzsek

A két-hibrid rendszer alapesetében a fehérje-fehérje asszociáció kimutatásához két olyan élesztő *expressziós vektor* szükséges, melyek felhasználásával a vizsgálandó fehérjét a GAL4 DNS kötő domén illetve az aktivátor domén szakaszokkal fúziós fehérje formájában termeltethetjük meg. Ezek a fúziós fehérjék az élesztő sejtmagba transzportálódnak és kölcsönhatásuk esetén a genomba integrált (vagy némely változat esetén külön plazmidban lévő) riportter gén kifejeződését indukálják.

Számos és különféle élesztő-*E.coli* ingázó vektort hoztak létre, általános tulajdonságaikat a pGBT9 és a pGAD424 vektorok példáján mutatjuk be (3. *ábra*). Mindkét plazmid képes mind *E. coli*, mind élesztősejtben replikálódni, mivel tartalmazzák a ColE1 és az élesztő 2 μ m plazmid replikációs origókat. A transzformáns baktériumsejtek ampicillin rezisztensek (a β -laktamáz fehérje termelése miatt), a transzformált élesztősejtek a *TRP1* és a *LEU2* gén kifejeződése következtében képessé válnak triptofánt és leucint nem tartalmazó minimál táptalajon is növekedni.



3. ábra. A pGBT9 és a pGAD424 két-hibrid vektorok felépítése.

P: *ADHI* csonka promoter, *GAL4 a.d.*: *GAL4* aktivátor domén, *GAL4 D.k.d.*: *GAL4* DNS kötő domén, T: *ADHI* terminátor, MCS: klónozó régió (multiple cloning sites), ori: *Col E1* replikációs origó, bla: β -laktamáz gén, 2 μ : élesztő 2 μ m plazmid replikációs origója.

A génexpressziót ezen két plazmidban az élesztő *ADHI* konstitutív promoterének csonka változata szabályozza, bár más vektorok esetében a magasabb kifejeződést biztosító teljes *ADHI* promoterrel, illetve indukálható promoterrel is találkozhatunk. A hibrid gén 5'-végén a pGBT9 plazmid esetében a *GAL4* DNS kötő doménjét kódoló, a pGAD424 esetében az aktivátor domént kódoló nukleotid szekvenciát találjuk. Ezt követően alakították ki a többszörös klónozóhelyet tartalmazó szakaszt (MCS), az itt hasító restriktív endonukleázok a vektorok DNS-ét csak ezen az egy helyen vágják el. A célfehérjét kódoló gént (vagy ennek egy szakaszát) a pGBT9 vektor ezen régiójába kell a megfelelő leolvasási keretben beépíteni, úgy, hogy az átíráskor keletkező termék egy teljes hosszúságú *GAL4* DNS kötő régió-célfehérje fúziós produktum legyen.

Mivel a keletkezett fúziós fehérjék nukleáris transzportja elengedhetetlen a két-hibrid rendszer működése szempontjából, ezt megfelelő sejtmagi lokalizációs szignállal (NLS) kell biztosítani. A *GAL4* DNS kötő doménjében található ilyen szignál, azonban az aktivátor doménben nem, így az elé, a pGAD424 megkonstruálásakor az SV40 T antigén nukleáris lokalizációs szignálját kódoló DNS szakaszt építették be.

A kölcsönhatások kimutatásához használt élesztőtörzsek sajátosságait a PJ-694A példáján keresztül mutatjuk be. A PJ69-4A genotípusa:

MATa, *ura3-52*, *his3-200*, *ade2*, *lys2-801*, *trp1-901*, *leu2-3, 112*, *gal4Δ*, *gal80Δ*,
LYS2::GAL1-HIS3, *GAL2-ADE2*
met2::GAL7-lacZ

A fehérje-fehérje kölcsönhatások kimutatására olyan élesztőtörzs használható, melyben legalább egy olyan riporter gén van, melynek expressziója a visszaállított *GAL4* aktivitástól függ (jelen esetben a *lacZ* gén). Ez oly módon valósítható meg, hogy a riporter gén szabályozó régiója tartalmazza a *GAL4* DNS kötő doménje által felismert szekvenciát (*GAL7*). A legtöbb használt élesztőtörzs nem csak a *lacZ* riporter gént, hanem legalább egy szelektív markergént (jelen törzsben két ilyen gén van, a *HIS3* és az *ADE2*) is tartalmaz *GAL4* rezponzív promoter szabályozása alatt (*GAL1* és *GAL2*). Ilyen törzsek alkalmazása teszi lehetővé cDNS könyvtárak vizsgálatát, ugyanis megfelelő szelektív minimál táptalaj alkalmazásakor csak azok az élesztő kolóniák képesek növekedni, melyekben a megfelelő erősséggel kölcsönható fehérjék a kellő mennyiségben termelődnek. A szelektív

markergének lehetővé teszik azt is, hogy egyes kölcsönhatások erősségét megbecsüljük az alapján, hogy a transzformált élesztősejtek milyen mértékben képesek növekedni szelektív (hisztidint illetve hisztidint és adenint nem tartalmazó) táptalajon.

Mivel a kölcsönhatások kimutathatósága a GAL4 transzkripció aktivátor funkciójának helyreállításától függ, ezért alapvető követelmény (legalábbis a GAL4 fehérjén alapuló rendszereknél), hogy az alkalmazott élesztőtörzs ne termeljen vad típusú GAL4 fehérjét (*gal4Δ* törzs). Egy másik fehérje termelése sem engedhető meg ezekben az élesztőkben. Ez a GAL80 fehérje, mely a vad típusú GAL4 represszoraként működik, és az aktivátor doménhez kötődve megakadályozza a galaktóz hasznosításáért felelős fehérjék termelését abban az esetben, ha az élesztőt glükóz tartalmú táptalajon növesztjük (azért, hogy elkerüljék a visszaillesztett GAL4 transzaktivátor hatás represszióját ezek a törzsek *gal80Δ* mutánsok).

Az alkalmazott élesztőtörzsnek legalább három, aminosav auxotrófiáért felelős mutációt kell még tartalmaznia. Ezek közül kettőt akkor használunk fel (a *trp1-901* és a *leu2-3,112* mutációkat), amikor a plazmidokból származó *TRP1* és *LEU2* géneket expresszáló, transzformált élesztősejteket növesztjük fel triptofánt és leucint nem tartalmazó táptalajon. A harmadik mutáció (*his3-200*) teszi lehetővé azt, hogy a *HIS3* gént szelekciós markerként használhassuk fel egy megfelelő (GAL4 által szabályozott) promoterral összekapcsolva. Az általunk használt törzsben még egy mutáció (*ade2*) illetve szelekciós markergén (*ADE2*) található, ennek felhasználásával erősen szelektív cDNS könyvtár tesztelést végezhetünk oly módon, hogy a transzformánsokat olyan táptalajra szélesztjük, melyből hiányoznak a triptofán, leucin, hisztidin aminosavak és nem tartalmaz adenint sem. Más törzsek esetében, melyek csak a *HIS3* szelekciós markergént tartalmazzák, a cDNS könyvtár tesztelésekor a szelektivitás növelésére a géntermék enzim kompetitív inhibitorát, a 3-aminotriazol alkalmazhatjuk 10-100 mM koncentrációban.

A kísérlet kivitelezése

Az p53 protein és SV40 T antigén kölcsönhatásának kimutatása két-hibrid módszerrel

Az alábbiakban ismertetjük két olyan fehérje kölcsönhatásának kimutatását az élesztő két-hibrid rendszerben, mely fehérjéket kódoló gének ismertek, és ezen fehérjék asszociációja más biokémiai módszerrel is bizonyított. A p53 tumor szuppresszor fehérje és az SV40 tumorvírus T antigénje közötti kölcsönhatás módosítja a p53 fehérje DNS-kötő képességét és transzkripciós regulátor funkcióját. A két-hibrid módszert szisztematikusan ezen fehérjék esetében alkalmazták először olyan mutációk azonosítására, melyek a fehérjék asszociációját számottevően módosítják (Li és Fields, 1993). A T antigén klónozásához használt vektort (pGAD3F) az aktivátor domént tartalmazó vektorok prototípusának tekinthetjük: felépítésében megegyezik az ismertetett pGAD424 vektorral, de mivel nem kereskedelmi forgalmazásra készült, ezért csak egy klónozó hellyel rendelkezik (Chien és mtsai, 1991).

PJ69-4A sejtek transzformációja pVA3 (pGBT9-p53) és pTD1 (SV40 T antigén pGAD3F aktivátor domén plazmidban) konstrukciókkal

1. Az YPAD¹⁷ szilárd táptalajon növesztett PJ69-4A sejtekből 10 ml YPAD tápoldatba oltson át, a kultúrát 30 °C-on, 250 rpm rázatás mellett 18 órán keresztül növesseze.
2. A felnőtt PJ69-4A kultúrából 5 ml-t 100 ml előzetesen 30°C-ra melegített YPAD tápoldathoz mérjen, az új kultúrát a fentiekkel megegyező körülmények között OD₆₀₀: 0.4-0.6 turbiditás értékig növesseze (3-4 óra).
3. A sejtuszpenziót steril 50 ml-es műanyag csövekben centrifugálja (5 perc, 2000g), a felülúszót öntse le, a sejteket 50 ml desztillált vízzel mossa. Újabb centrifugálást követően (5 perc, 2000g) a sejteket 1ml 0,1 M LiOAc oldatban (pH állítás nem szükséges, ha az oldat pH-ja 8,3-8,6 között van) szuszpendálja fel.
4. Az előzetesen tisztított plazmid DNS-ből 1-1 µg mennyiséget mérjen 1,5 ml-es Eppendorf csövekbe (a plazmid DNS koncentrációja 0,5-1 µg/µl legyen). Mivel minden kölcsönhatási vizsgálat során alkalmazni kell negatív kontrollokat, az alábbi párosításokat készítse el:

- a: pGBT9+pGAD424
- b: pGBT9+pTD1
- c: pVA3+pGAD424
- d: pVA3+pTD1

A plazmid DNS-hez adjon hozzá 80 µl élesztő szuszpenziót és 20 µl hordozó DNS¹⁸ oldatot. Az elegyet jól keverje össze, de ne alkalmazzon vortex keverőt.

5. A szuszpenzióhoz adjon 500 µl PEG-TE-LiOAc oldatot¹⁹, jól keverje össze (3-5 sec vortex), majd inkubálja 30 °C-on 30 percen keresztül.
6. A sejteket hősokkolja: 42 °C, 25 percen keresztül.

¹⁷ YPAD táptalaj és tápoldat: literenként 20g BACTO-pepton, 10g élesztőkivonat, 40 mg adenin hemiszulfát, 20g glükóz, a táptalajhoz 15-20g agar, pH: 5.8, autoklávozva.

¹⁸ Hordozó DNS: A jobb transzformációs gyakoriság eléréséhez szükséges. Hering vagy lazac sperma DNS-t old 1xTE (pH: 7.5) pufferben 2mg/ml koncentrációban, állandó keverés mellett, 18-20 órán keresztül. Az oldatot egyszeres térfogatú fenol-kloroform eleggyel, majd egyszeres térfogatú kloroformmal extrahálja és etanollal csapja ki. A csapadékot kétszer mossa 70 %-os etanollal, szárítsa és 1xTE pufferben oldja. A hordozó DNS-t a felhasználás előtt 7-8 percen keresztül 100 °C-on denaturálja, utána jégben gyorsan hűtse le.

¹⁹ PEG-TE-LiOAc oldat: külön sterilizáljon 50 %-os PEG 4000 oldatot (autoklávozással), 10xTE oldatot (pH: 7.5, autoklávozás) és 1M Li-acetát oldatot (filter sterilizálás, pH: 8.3-8.6). Közvetlenül a felhasználás előtt az oldatokat 8 (PEG):1 (10xTE):1 (LiOAc) arányban keverje össze.

7. A sejteket rövid ideig centrifugálja (30 sec, max. seb.), az élesztőt 1 ml steril vízben szuszpendálja fel, a szuszpenzióból 100 μ l-t szelektív (SD-Trp-Leu-His-Ade, SD-Trp-Leu-His) és nem szelektív táptalajra²⁰ (SD-Trp-Leu) szélesszen. A kolóniák 3-6 nap elteltével megfelelően nagyok lesznek új táptalajra történő szélesztéshez.

Kölcsönható fehérjéket termelő élesztőkolóniák azonosítása β -galaktozidáz aktivitás vizsgálatával

A szelektív táptalajon felnőtt élesztő telepekben meg kell vizsgálnunk a riporter gén kifejeződését. Ezt a legkönnyebben a géntermék enzimatis aktivitásának mérésével valósíthatja meg. A β -galaktozidáz enzim szubsztrátjaként a bakteriális munkákból már jól ismert X-gal-t, vagy folyadék fázisú mérések esetén az o-nitrofenil-galaktozidot (ONPG) használhatja. A mérést eredetileg szűrőpapírra transzferált élesztő telepekre írták le, de a feltárás bizonytalan hatásfoka miatt a technika módosított változatát javasoljuk.

1. Az SD-Trp-Leu-His-Ade lemezekben felnőtt telepek közül hármat 1,5 ml-es Eppendorf csőben, 500 μ l 15 %-os glicerin oldatban szuszpendáljon fel.
2. A szuszpenziót centrifugálja (1 perc, max. seb.), a felülúszót úgy távolítsa el, hogy a sejteken 10-15 μ l folyadék maradjon.
3. A sejteket tárja fel: 3 ciklusban, 1 ciklus: 1 perc cseppfolyós levegőben történő fagyasztás, 1 perc 37 °C-os felmelegítés vízfürdőben. A ciklusok között 10 sec vortex kevertetést végezzen.
4. A feltárt élesztősejtekhez 200 μ l Z puffer+X-gal²¹ oldatot adjon. A szuszpenziót 30°C-on inkubálja a kék szín megjelenéséig (1 órától 1-2 nap). A szuszpenziót időnként felkeverheti, a színreakció eredményének összehasonlítása is felkevert állapotban történjen.

β -galaktozidáz aktivitás mérése o-nitrofenil-galaktozid szubsztráttal

Hasonló módon feltárt élesztősejtek szuszpenziójában elvégezhető a β -galaktozidáz aktivitás kvantitatív meghatározása o-nitrofenil-galaktozid szubsztráttal is. Így információt nyerhet a célfehérjével kölcsönható fehérjék asszociációs erősségéről (ez inkább egy sorrend felállítására használható, mint konkrét asszociációs konstansok számítására), azonban nem szabad figyelmen kívül hagyni, hogy egy fehérje sejten belüli funkcióját gyengén vagy időlegesen kölcsönható fehérjék is számottevően módosítani tudják.

SD-Trp-Leu lemezen nőtt transzformáns élesztő telepekből oltson át 15 ml SD-Trp-Leu tápoldatba, a kultúrát 30 °C-on, 250 rpm rázatás mellett 16-18 órán keresztül növesse. A kultúrából 10 ml-t centrifugáljon le (5 perc, 2000g), a sejteket szuszpendálja 1 ml jéghideg Z pufferben (X-gal nélkül), mérje át 1,5 ml-es Eppendorf csövekbe. Centrifugálást követően (30 sec, max. sebesség) a felülúszót távolítsa el, a sejtledekekhez adjon 200 μ l üveggyöngyöt (élesztősejtek feltárására használt, 0,4-0,6 mm átmérőjű) és 250 μ l Z puffert. A sejteket tárja fel (3-szor 2 perc vortex, közben a mintákat 2 percig jégen hűteni, a 3. ciklust megelőzően

²⁰ Szintetikus minimál táptalajok (SD): Ezen élesztő táptalajok alapja az aminosav mentes élesztő nitrogén forrás (yeast nitrogen base w/o amino acids). Ebből literenként 6.7 g-ot használjon fel, az oldat pH-ját 5.8-ra állítsa be, majd autoklávozza (táptalaj esetében 15-20 g agarral). Mikor az oldat 50-55 °C-ra hűlt, adjon hozzá literenként 100 ml 10x törzsoldatot az aminosavakból és 50 ml 40 %-os glükóz oldatot. A táptalajhoz ekkor adhatja hozzá az előzetesen vízben 1 M koncentrációban feloldott és filter sterilizált 3-amino triazol oldatot is, a megfelelő végkoncentrációban.

²¹ Z puffer: 16.1 g Na₂HPO₄ x7H₂O, 5.5 g NaH₂PO₄ xH₂O, 0.75 g KCl, 0.246 g MgSO₄ x7H₂O literenként, pH: 7.0. Közvetlenül felhasználás előtt 100 ml Z pufferhez 0.27 ml β -merkaptó-etanolt és 1.67 ml 2 %-os X-gal oldatot adjon (dimetil-formamidban feloldva).

adjon a szuszpenzióhoz 500-500 µl jéghideg Z puffert). A feltárást követően a mintákat centrifugálja (10 perc, maximális sebesség, +4 °C), a felülúszót mérje új, jégben hűtött Eppendorf csövekbe.

Határozza meg a minták fehérjekoncentrációját: 2-5 µl-hez adjon 795-798 µl vizet és 200 µl Bradford reagenst. Tíz perces reakciót (szobahőmérséklet) követően mérje meg az oldatok abszorbanciáját 595 nm-en, fehérje helyett Z puffert tartalmazó mintával szemben. A koncentráció az előzetesen BSA vagy lizozim fehérjékre felvett kalibrációs görbék segítségével számítható ki.

100-150 mg fehérjét tartalmazó mintát (körülbelül 250 µl) egészítsen ki 800 µl-re Z pufferrel, adjon hozzájuk 160 µl szubsztrát oldatot (4mg/ml o-nitrofenil-galaktopiranozid Z pufferben feloldva), inkubálja a mintákat 30 °C-on szalmasárga szín megjelenéséig. A reakciót 400 µl 1M Na₂CO₃ oldattal állítsa le, a minták abszorbanciáját mérje 420 nm-en, fehérje helyett Z puffert tartalmazó mintával szemben. A β-galaktozidáz aktivitás az alábbi képlettel számolható:

$$\text{Aktivitás} = 1000 \times \text{OD}_{420} / (\text{mxt}),$$

ahol OD₄₂₀ a 420 nm-en mért abszorbancia,
m az élesztőfehérje mennyisége mg-ban
t a reakció időtartama percben.

Mivel egyes élesztőtörzsek (így az alkalmazott PJ69-4A) jól mérhető β-galaktozidáz aktivitással rendelkeznek, ezért főként gyenge kölcsönhatások kvantitálása esetén célszerű az üres vektorral transzformált sejtekből készített extrakt aktivitását meghatározni és a kapott értékkel a mért eredményeket módosítani a relatív különbségek növelése céljából.

Irodalom

Chien, C-T; Bartel, P; Sternglanz, R; Fields, S (1991) The two-hybrid system: A method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest
Proc. Natl. Acad. Sci USA **88**: 9578-9582.

Li B. és Fields S.(1993) Identification of mutations in p53 that affects its binding to SV40 large T antigen by using the yeast two-hybrid system
FASEB J. **7**: 957-963.

Az élesztő két-hibrid rendszerrel kapcsolatos technikák és gyakorlati tanácsok gyakran frissített leírása az alábbi honlapon található:

www.umanitoba.ca/faculties/medicine/biochem/gietz/Trafo.html

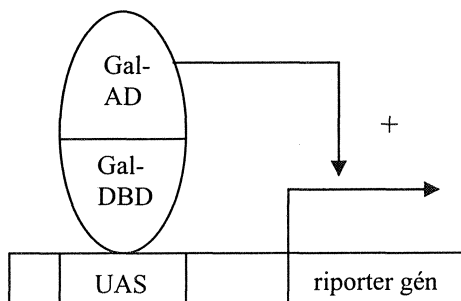
**FEHÉRJE-FEHÉRJE KÖLCSÖNHATÁSOK KIMUTATÁSA
EMLŐS KÉT - HIBRID RENDSZER
Benkő Szilvia és Nagy László**

ELMÉLETI HÁTTÉR

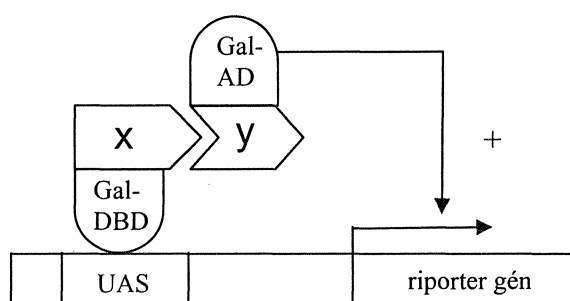
A két hibrid rendszerek napjainkban a legnépszerűbb és széles körben alkalmazott módszerek közé tartoznak a fehérje-fehérje kölcsönhatás vizsgálatok területén. Kiemelendő előnyei közé tartozik, hogy gyenge és átmeneti kölcsönhatások kimutatására is alkalmas, valamint az *in vitro* fehérje-fehérje kölcsönhatásokat vizsgáló rendszerekkel szemben (pl. GST-pull-down, kromatográfia) *in vivo* (sejten belüli) körülmények között vagyis a fehérje natív konformációs állapotában zajlanak a vizsgálatok.

A módszer akkor kezdett jobban elterjedni, amikor a transzkripció aktivátor fehérjék működését már jobban ismerték. Ezek az aktivátorok általánosan két funkcionális domént tartalmaznak: 1) egy DNS-kötő domént, amely a szekvencia-specifikus kötődést biztosítja a riportergén promóteréhez valamint 2) egy aktiváló domént, amely a transzkripció gépezet molekuláit a riportergén promóter régiójához vonja. Így a “két hibrid” kifejezés a rendszerben használt kiméra fehérjék ezen 2 csoportjára utal, egy DNS-kötő doménhez fuzionáltatott “x” fehérjére és egy transzaktiváló doménhez fuzionáltatott “y” fehérjére.

A két hibrid rendszer hagyományosabb típusa az élesztő két hibrid rendszer. Itt az élesztőből származó Gal4 fehérje 2 doménjének (1. ábra) (DNS-kötő-(Gal-DBD) ill. transzaktiváló domén (Gal-AD) azon tulajdonságát használják ki, hogy a két doménnek nem kell közvetlenül kapcsolódnia egymással a transzkripció létrejöttéhez, hanem közbeiktatott fehérjéken keresztül, pl. x és y fehérjék kapcsolódásán keresztül is beindulhat az átírás. Így “Gal-DBD-x” és “Gal-AD-y” fúziós fehérjék alkalmazásával vizsgálható “x” és “y” fehérje kölcsönhatása (2. ábra).



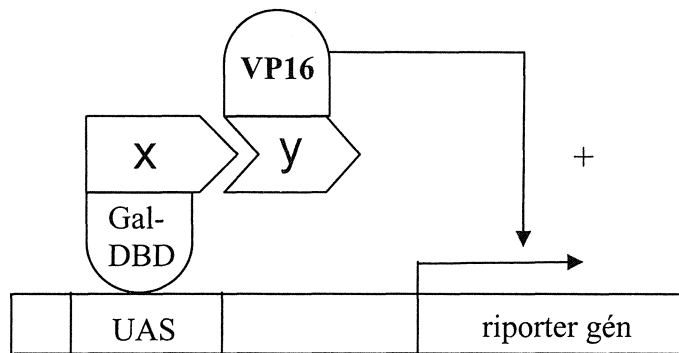
1. ábra. A Gal 4 hatásmechanizmusa



2. ábra. Hagományos élesztő két hibrid rendszer

Az élesztő két hibrid rendszer legáltalánosabb felhasználási területe a cDNS könyvtárak szűrése valamint még ismeretlen kölcsönható partnerek azonosítása. Az emlős két hibrid rendszerhez hasonlóan időigényesebb, s egyik nagy hátránya az ál pozitív eredmények nyerése. Ezért javasolt megerősítő vizsgálatok végzése, melyek közül az emlős két hibrid rendszer az egyik lehetőség.

Az emlős két hibrid rendszer az élesztő két hibrid továbbfejlesztett változata. Ebben a rendszerben ugyanis a meglehetősen gyenge Gal4-AD-t egy jóval erősebb transzaktiváló képességgel rendelkező fehérjére, a herpes simplex vírus VP16-ra cserélték. Így ebben a rendszerben a “Gal-DBD-x” és “VP16-y” fúziós fehérjék alkalmazásával vizsgálható “x” és “y” fehérje kölcsönhatása (3. ábra).



3. ábra. Emlős két-hibrid rendszer

Az emlős kettős hibrid rendszer előnyei közé tartozik, hogy különböző sejtvonalakra is alkalmazható és jobban tükrözi a természetes körülményeket (folding, poszttranszlációs módosítás), hátránya, hogy szűrésre nem alkalmas.

A kísérlet kivitelezése

1. Sejtek szélesztése

A gyakorlaton CV-1 (majom vese fibroblast) sejteket használunk. A transzfekeció hatékonysága érdekében kb. 60-70%-os konfluenciánál használjuk fel őket. A sejteket a transzfekeciót megelőző napon kiszélesztjük azért, hogy a sejteknek legyen idejük rendesen letapadni.

→ Számolja meg a sejteket, majd hígítsa ki őket $8 \times 10^5 / 10 \text{ ml}$ -re. Ebből a 48 lyukú plate-re 200 μl -t tegyen lyukanként.

2. Transzfekció

A) Kölcsönhatás vizsgálat

a) → Eppendorf csőbe mérje össze a következőket:

	Master Mix
β -galaktozidáz (1 μ g/ μ l)	7.7 μ l
MH100TK-luciferáz(1 μ g/ μ l)	9.6 μ l
1xPBS	271 μ l

	alap	1. Minta	2. Minta
Master Mix	45 μ l	195 μ l	
Gal-SMRT-ID-2 (1 μ g/ μ l)	-	1.3 μ l	
		45 μ l	120 μ l
CMX-VDR-1 (1 μ g / μ l)	0.6 μ l	0.3 μ l	-
VP-hRARa-LBD (1 μ g / μ l)	-	-	0.8 μ l
28 % DOTAP	45 μ l	45 μ l	120 μ l
táplódat	1800 μ l	1800 μ l	4800 μ l

b) → Eppendorf csőbe mérje össze a következőket:

	Master Mix
β -galaktozidáz (1 μ g / μ l)	10.3 μ l
MH100TK-luciferáz(1 μ g / μ l)	12.8 μ l
1xPBS	361 μ l

	alap	1. Minta	2. Minta
Master Mix	45 μ l	285 μ l	
Gal-SMRT-ID-2 (1 μ g / μ l)	-	1.27 μ l	
VP-hRARa-LBD (1 μ g / μ l)	-	1.27 μ l	
	-	45 μ l	210 μ l
CMX-VDR-1 (1 μ g / μ l)	0.6 μ l	0.2 μ l	-
CMX-hRXRa-LBD (1 μ g / μ l)	-	-	0.94 μ l
28 % DOTAP	45 μ l	45 μ l	210 μ l
táplódat	1800 μ l	1800 μ l	8400 μ l

B) Aktiválás vizsgálat

a) → Eppendorf csőbe mérje össze a következőket:

	Master Mix
β -galaktozidáz (1 $\mu\text{g} / \mu\text{l}$)	5.12 μl
MH100TK-luciferáz(1 $\mu\text{g} / \mu\text{l}$)	6.4 μl
1xPBS	180.5 μl

	alap	Minta
Master Mix	45 μl	120 μl
Gal-hRARa-LBD (1 $\mu\text{g} / \mu\text{l}$)	-	0.8 μl
CMX-VDR-1 (1 $\mu\text{g} / \mu\text{l}$)	0.6 μl	0.8 μl
28 % DOTAP	45 μl	120 μl
tápoldat	1800 μl	4800 μl

b) → Eppendorf csőbe mérje össze a következőket:

	Master Mix
β -galaktozidáz (1 $\mu\text{g} / \mu\text{l}$)	6.4 μl
MH100TK-luciferáz(1 $\mu\text{g} / \mu\text{l}$)	8 μl
1xPBS	226 μl

	alap	Minta
Master Mix	45 μl	195 μl
Gal-hRARa-LBD (1 $\mu\text{g} / \mu\text{l}$)	-	1.3 μl
CMX-VDR-1 (1 $\mu\text{g} / \mu\text{l}$)	0.6 μl	-
CMX-hRXRa-LBD (1 $\mu\text{g} / \mu\text{l}$)	-	1.3 μl
28 % DOTAP	45 μl	195 μl
tápoldat	1800 μl	7800 μl

- A DOTAP hozzáadása után 15 másodpercig (!) erőteljesen vortexelje a mintát, majd inkubálja 10 percig szobahőn. Ezután mossa bele a tápoldatba.
- Az oldatokból 200-200 μl -t tegyen a sejtekre.

3. Tápoldatsere, ligandkezelés

Transzfekció után 6-8 órával tápoldatot cserélünk és egyúttal elvégezzük a ligandkezelést is.

Példa a ligand hígítási sor elkészítésére.

→ Eppendorf csőbe mérje össze a következőket:

végkoncentráció	100pM	1nM	10nM	100nM	1μM
tápoldat	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
1 μl ligand	100nM	1μM	10μM	100μM	1mM

→ A sejtekről szívja le a tápoldatot, majd az előre elkészített hígítási sorból 200-200μl-t mérje a sejtekhez lyukanként.

4. Sejtek feltárása

A sejtek feltárása a transzfekciót követő 24-36 órával történik.

→ A sejtekről öntse le a tápoldatot, majd mossa kétszer 1xPBS-sel. Ezután adjon 40 μl 1x lízis puffert minden lyukhoz és rázassa a plate-et 2 órán át szobahőn (kémiai feltárás). 2 óra elteltével rakja -70°C-ra a plate-eket minimum 30 percre (mechanikai feltárás).

5. Mérések

a) β-galaktoszidáz mérés

A méréshez átlátszó, 96 lyukú plate-eket használjunk.

→ A sejtliázátumból mérjen 80 μl -t egy lyukba, s ehhez adjon 100 μl β-galaktoszidáz assay szubsztrátot. A kontroll mintához sejtliázátum helyett lízispuffert használjunk. Ezután inkubálja 37°C-on a plate-et a megfelelő színintenzitás eléréséig (30 perc-3 óra). Fotométerrel 405 nm-en mérje a fényelnyelést.

b) Luciferáz mérés

A méréshez fehér színű, 96 lyukú plate-eket használjunk.

→ A sejtliázátumból mérjen 20 μl -t egy lyukba, s ehhez adjon 50 μl luciferáz assay szubsztrátot (vagy a gép automatikusan injektál). A kontroll mintához sejtliázátum helyett lízispuffert használjon. A fényreakciót luminométerrel azonnal mérje.

6. Eredmények értékelése

Átlagolta a triplikátum értékeit, majd a kontroll átlagát vonja ki az egyes minták átlagából, végül az így korrigált luciferáz értéket ossza el a β -galaktozidáz átlagolt és korrigált értékeivel. A kapott eredmény a normalizálja luciferáz érték, a riporter génen zajló transzkripció normalizált értéke, és jellemző a vizsgált 2 fehérje (x, y) kölcsönhatására.

Ajánlott irodalom

Molecular Cloning Manual, Protein-Protein Interactions, 2002, Cold Spring Harbor Laboratory Press

Short Protocols in Molecular Biology, 1999, Published by John Wiley and Sons, Inc.

DNS SZEKVENÁLÁS

Dombrádi Viktor

A nukleinsavak szekvenálásának célja az, hogy megállapítsuk az egymást követő nukleotidok sorrendjét (amelyek csak a bázis milyenségében térnek el egymástól). Kettősszalú DNS esetében elvileg elegendő egyetlen szál szekvenciájának ismerete, a komplementer szál szekvenciáját a bázis párosodás szabályai alapján meg lehet jósolni.

Kezdetben az RNS szekvencia meghatározására dolgoztak ki módszereket, így a korai DNS szekvenálás is ezeket az eljárásokat követte. 1977-ben azonban egymástól függetlenül két olyan gyors DNS szekvenálási eljárást közöltek, amelyek a korábbi módszereket teljesen kiszorították. Manapság már az RNS-ek bázissorrendjét is a komplementer cDNS szekvenálásával határozzák meg.

DNS szekvenálási módszerek

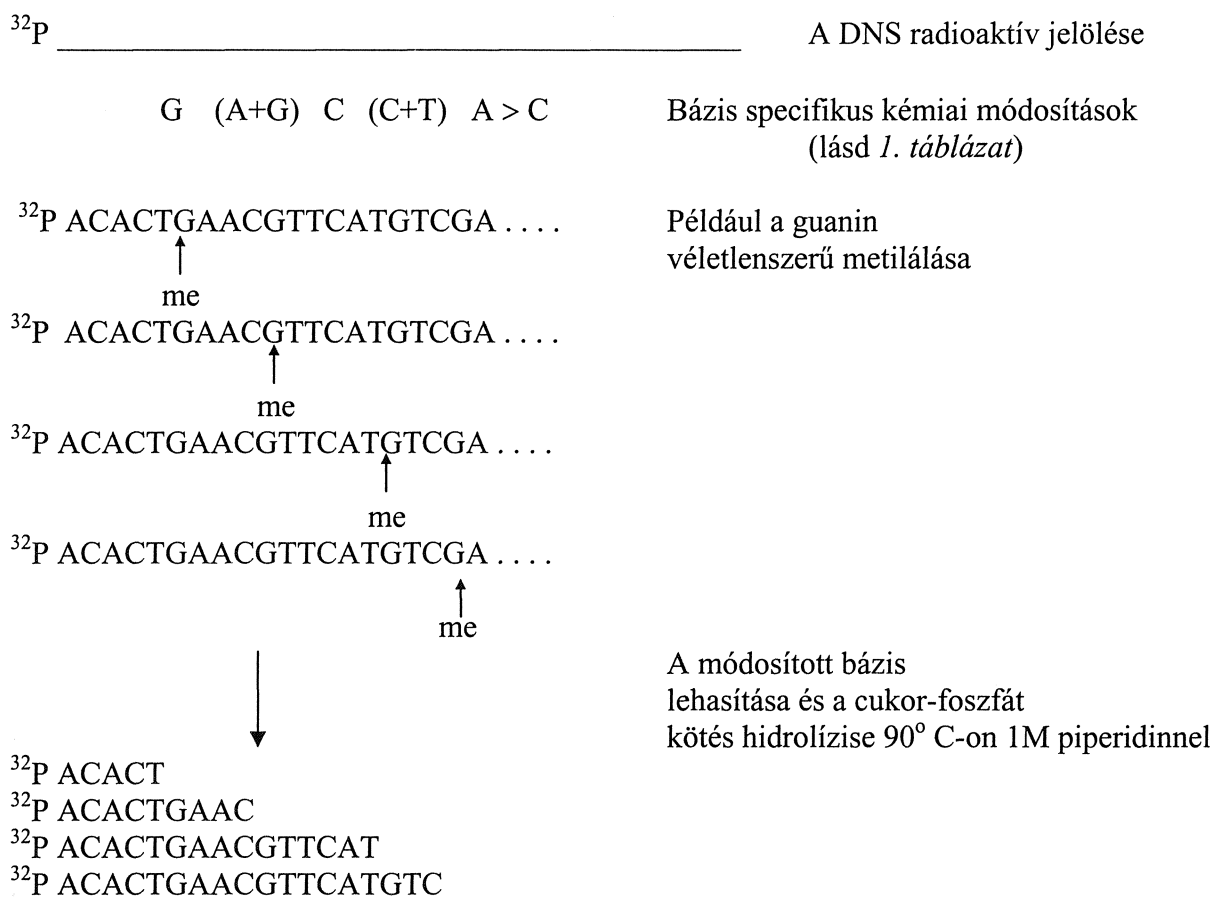
Maxam-Gilbert-féle kémiai eljárás

A módszer lényege az, hogy különböző bázis, ill. báziscsoport specifikus kémiai reakciókkal a bázisokat módosítják (*1. táblázat*), majd a módosított bázis melletti foszfodiészter kötést hasítják. A kémiai reakciók körülményeit úgy kell megválasztani, hogy a kezelés során egy DNS molekulában véletlenszerűen csak egy kémiai módosítás következzen be. Így a hasítás után egy olyan DNS sorozatot kapunk, melynek minden tagja a reakcióra specifikus bázis előtt fejeződik be, úgy ahogy azt a *1. ábra* a G melletti hasítás példáján mutatja. A szekvenálási reakció előtt az egyszálú DNS egyik végét meg kell jelölni. Például az 5' véget alkalikus foszfatázzal defoszforilálják, majd [$\gamma^{32}\text{P}$] ATP és polinukleotid kináz segítségével foszforilálják (*1. ábra*). A módosítás és hasítás után a DNS darabok méret szerinti szétválasztását denaturáló poliakrilamid gélelektroforézissel lehet megoldani. A jelzett DNS darabok detektálása autoradiográfiával történik (ugyan úgy mint ahogyan a Sanger-féle eljárás során, lásd később).

1. táblázat. Bázis specifikus DNS módosítási reakciók

1.

Bázis	Kémiai módosítás
G	az n ₇ metilálása dimetil szulfáttal a C ₈ – N ₉ közti kötést érzékennyé teszi bázikus hasítással szemben
A + G	A purin gyűrű nitrogénjeinek protonálásával a piperidin formiát savas közegben meggyengíti az N–glikozidos kötést és elősegíti a depurinálási reakciót
C + T	A pirimidin gyűrűt hidrazinnal fel lehet hasítani, ami öt tagú gyűrűvé történő visszazáródás után eltávolítható
C	1,5 M NaCl jelenlétében csak ez a bázis reagál számottevő mértékben a hidrazinnal
A > C	90° C-on 1,2 M NaOH elsősorban az A, másodsorban a C bázist hasítja le



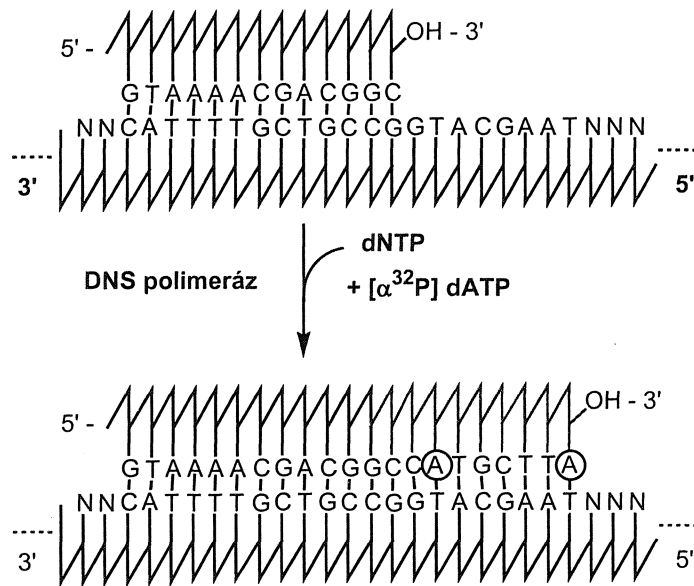
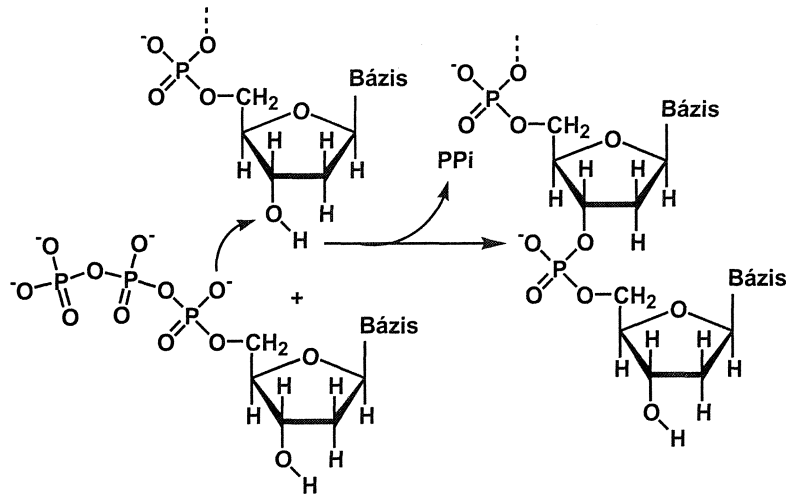
A fragmentumok elválasztása denaturáló poliakrilamid gél elektroforézissel és detektálása autoradiográfiával

1. ábra. A Maxam-Gilbert-féle kémiai DNS szekvenálás elve

A kémiai eljárás előnye, hogy az ismeretlen DNS szekvenciája közvetlenül vizsgálható. A módszer szekvenáláson kívül felhasználható DNS-fehérje kölcsönhatások kimutatására is. Bevezetésekor még nem álltak rendelkezésre megfelelő DNS polimerázok, viszont a reakciókhoz szükséges vegyszerek a kereskedelemben beszerezhetők voltak. Ezért kezdetben a Maxam-Gilbert módszert széles körben alkalmazták. Hátránya, hogy a kémiai reakciókat pontosan kontrollált körülmények között kell végrehajtani, és hogy előzetesen el kell végezni a DNS jelölését. Napjainkban már csak különleges esetben használják, a Sanger-féle eljárás kiegészítésére.

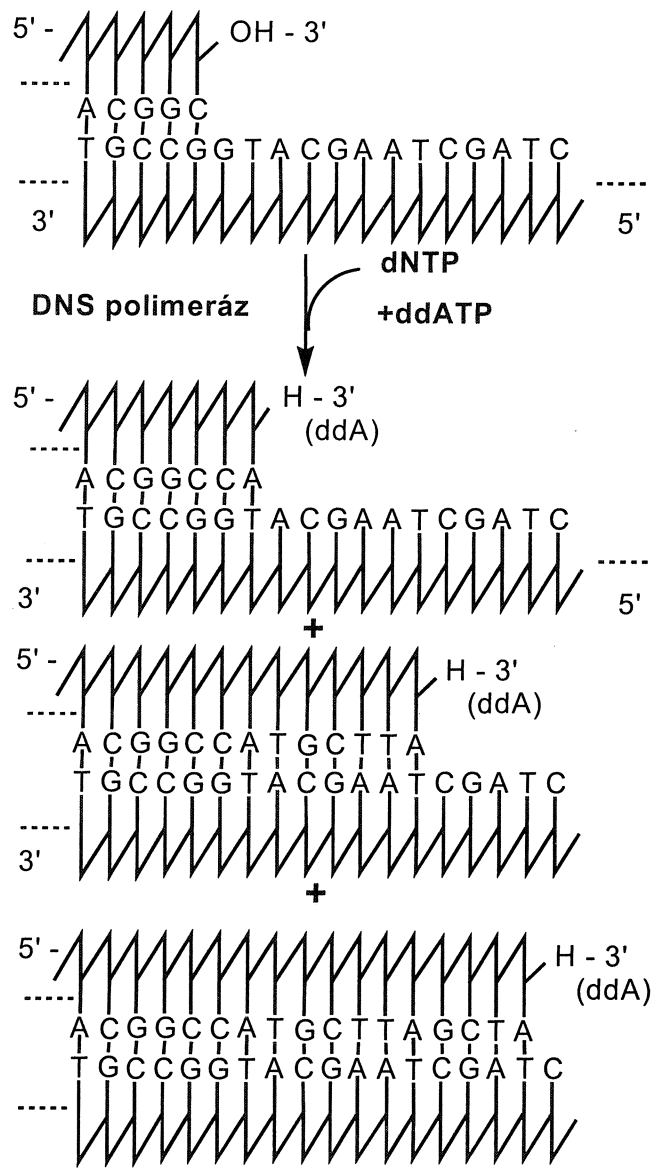
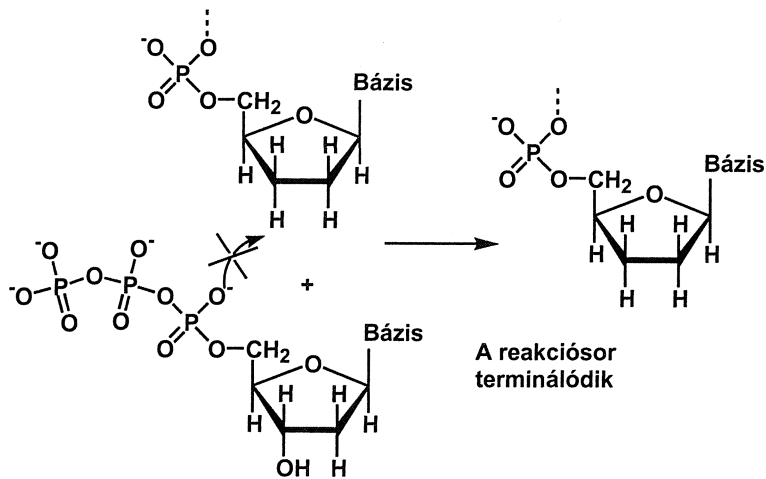
Sanger-féle láncterminálison alapuló eljárás

A módszer a templátfüggő DNS polimerázok azon képességét használja ki, hogy ha egy megfelelő primer a DNS templáthoz hibridizál annak 3' végét (a templát szekvenciájának komplementereként) dNTP felhasználásával képesek tovább építeni (2. ábra).



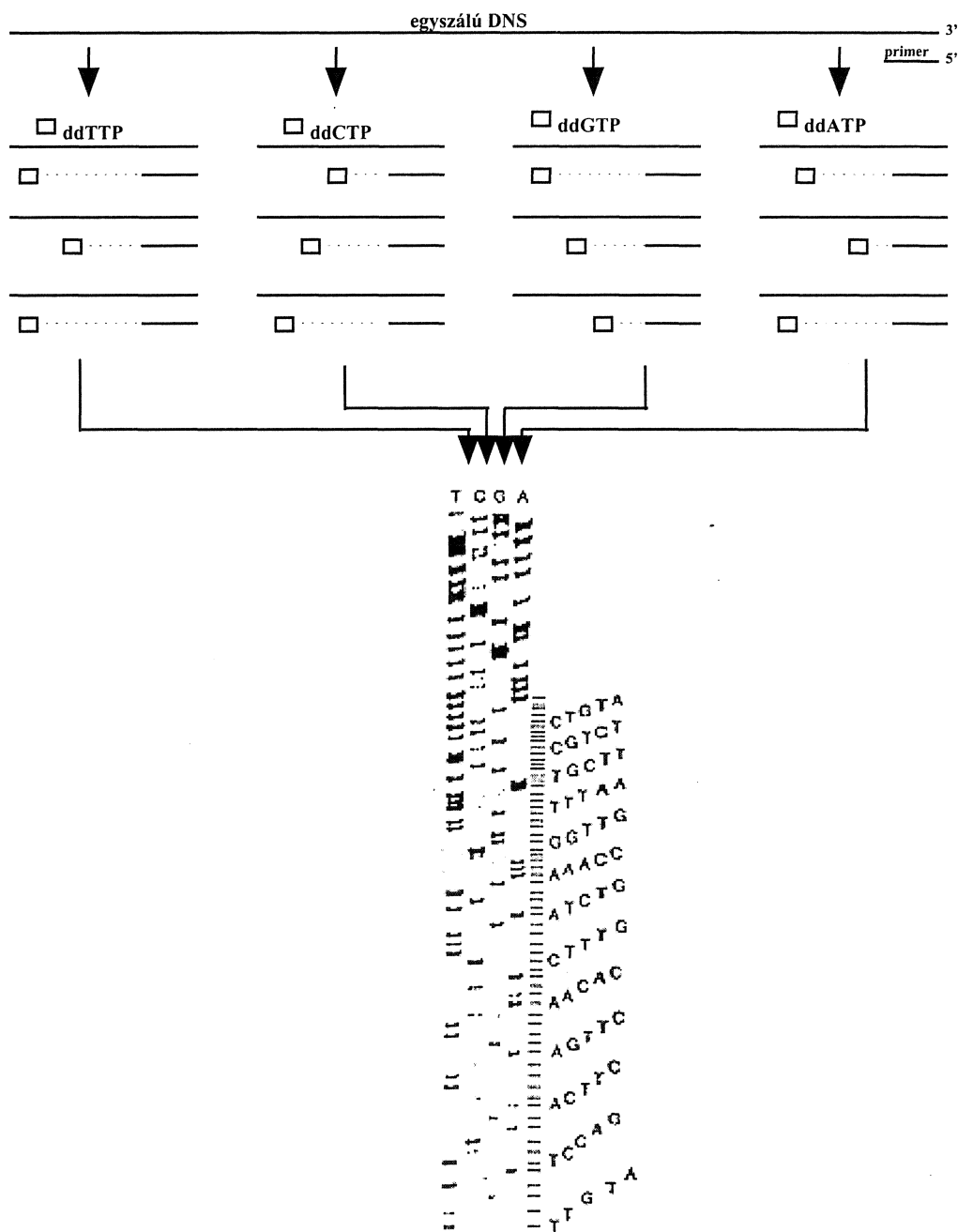
2. ábra. Jelölés és lánchosszabbítás templát függő DNS polimeráz és radioaktívan jelzett dATP felhasználásával. Vastag vonal mutatja a frissen szintetizált DNS szálát. A radioaktív jelzést a bekarikázott bázishoz tartozó cukor-foszfát kötés hordozza

Amennyiben valamelyik dNTP jelzett (pld. [α³²P]dATP), akkor a frissen szintetizált DNS szál is tartalmazni fogja a radioaktív jelzést. Ez a *jelölés* lépése. Ha az egyik dNTP-t úgy módosítjuk, hogy az 3' helyzetben nem tartalmaz hidroxil csoportot (2'-3'-didezoxinukleozid-trifoszfát, ddNTP) ennek beépülése után a DNS szintézise nem folytatódhat. Ez a *láncterminalás* lépése (3. ábra).



3. ábra. Láncterminálás didezoxi ATP (ddATP) felhasználásával. A DNS szintézis a didezoxinukleotid beépülése miatt a target szekvenciában található T bázis után megáll mivel a komplementer nukleotid (ddA) 3' végén nincs OH-csoport.

A láncterminálást mind a négy nukleotid didezoxi változatával el kell végezni, így négy olyan reakcióelegyet kapunk, amelyek specifikusan a T, C, G és A pozíciókban végződnek. A dNTP és ddNTP arányát úgy kell megválasztani, hogy a terminálási lépés véletlenszerűen játszódjon le, és a reakcióelegyben különböző hosszúságú frissen szintetizált és jelzett DNS szálak alakuljanak ki. A reakció elegy komponenseinek szétválasztását denaturáló poliakrilamid gélelektroforézissel lehet megoldani. A jelzett DNS fragmentumok autoradiográfiával detektálhatók. A filmről a felvitel sorrendjét figyelembe véve alulról felfelé leolvasható a DNS szekvenciája 5'→3' irányban (4. ábra).



4. ábra A Sanger-féle DNS szekvenálás elve

A módszer előnye egyszerűsége, megbízhatósága és automatizálhatósága. Hátránya, hogy nem közvetlenül az ismeretlen DNS szekvenciáját, hanem annak komplementerét vizsgálja. Elképzelhető, hogy a másolás során hibás beépülés történik, ami az eredményt meghamisíthatja. Megfelelő reakció körülmények között azonban a hibás beépülés aránya elhanyagolható, és ha elegendő templát DNS-ből indulunk ki a hiba gyakorlatilag nem detektálható. Egy másik probléma lehet, hogy a szeparálás során a frissen szintetizált DNS szál nem denaturálódik teljes mértékben (különösen a G-C gazdag régiókban) így szeparálási műtermékek keletkezhetnek, amelyek szekvenciájának leolvasása nem pontos. Ez utóbbi problémát, amit *gélkompresszió*nak neveznek módosított dNTP (dITP vagy 7-deaza-dGTP) alkalmazásával lehet korrigálni. A templátban esetleg kialakuló hurkokat (ugyancsak a G-C gazdag régiókban) magasabb hőmérsékleten működő polimeráz enzim (Taq polimeráz) alkalmazásával lehet elkerülni.

DNS szekvenálási stratégiák

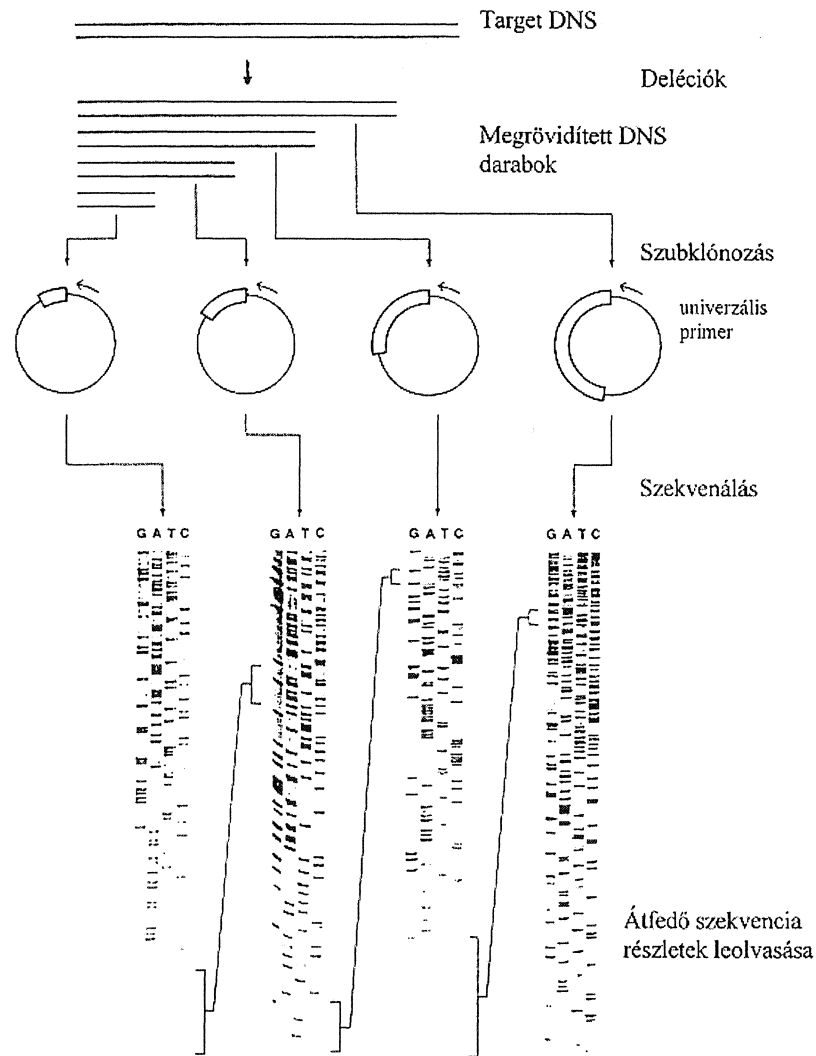
Kezdetben a szekvenálás célja új DNS szekvenciák megismerése volt. Ekkor rendkívül nagy gondot kellett fordítani a szekvencia megbízhatóságára. A szekvencia leolvasását legalább két független személynek kellett elvégeznie, és amennyiben nehezen leolvasható szakaszt találtak, vagy a két leolvasás egymással nem egyezett meg, az ellentmondásokat új reakció végrehajtásával kellett feloldani. Szinte minden esetben szükségessé vált a DNS mindkét szálának szekvenálása.

A DNS adatbankok információtartalmának növekedése lehetővé teszi, hogy a már ismert szekvenciákat ellenőrizzük, illetve azok módosulatait kutassuk. Erre természetes mutációk analízise, illetve mesterségesen géntechnológiával előállított minták ellenőrzése során van szükség. Ekkor elegendő egyetlen DNS szál rövid szakaszának szekvenálása egyetlen egy szekvenálási reakcióval.

Az egy reakcióval leolvasható szekvencia részlet korlátozott hossza (400-600 bázispár) miatt a teljes DNS szekvencia meghatározására vagy egy ismert szekvencia részletből kiinduló *irányított*, vagy *véletlenszerű* (random) reakciók sorával oldható meg. A legcélravezetőbb stratégia megválasztását a konkrét feladat és a helyi lehetőségek szabják meg. Irányított szekvenálás

Az ismeretlen szekvenciájú DNS sorozatos deléciója

Az eljárás lényege az, hogy a target DNS-t több külön-külön végzett reakcióban megrövidítik, úgy hogy az ismeretlen szekvenciák hosszabb-rövidebb részleteit tartalmazó fragmentumokat nyerjenek. Ezen DNS darabok mindegyikét megfelelő szekvenáló vektorba ültetik (szubklónozás) majd a szekvenciákat egy, a vektorra jellemző *univerzális primer* segítségével határozzák meg. A primerrel minden esetben csak 400-600 bázispár hosszúságú szakaszt lehet leolvasni, azonban a deléció következtében az ismeretlen DNS-nek más-más szakaszai kerülnek a primer hibridizációs helyének közelébe, így számos szubklón szekvenálásával és az átfedő szakaszok azonosításával a teljes ismeretlen DNS szekvencia meghatározható (5. ábra).



5. ábra. Irányított szekvenálás sorozatos deléciók segítségével

A deléciók létrehozására három független módszert dolgoztak ki.

A BAL 31 exonukleáz a kettős szálú lineáris DNS 3' végét fokozatosan lebontja, majd az egyszálú szakaszt is eliminálja. Az első lépés a vizsgálandó DNS linearizálása egy restriktív enzimmel. Ezután következik a BAL 31 emésztés, amit különböző ideig végeznek. Így az enzim a target szekvenciát és a vektor szekvenciát is különböző mértékben csonkítja. Mivel a csonka emésztett vektor már nem használható ezt egy újabb restriktív enzimmel kell kivágni. Az így előállított fragmentum sorozatot újra egy szekvenáló vektorba kell helyezni, és a vektorra jellemző univerzális primerrel lehet az átfedő szekvencia részleteket meghatározni.

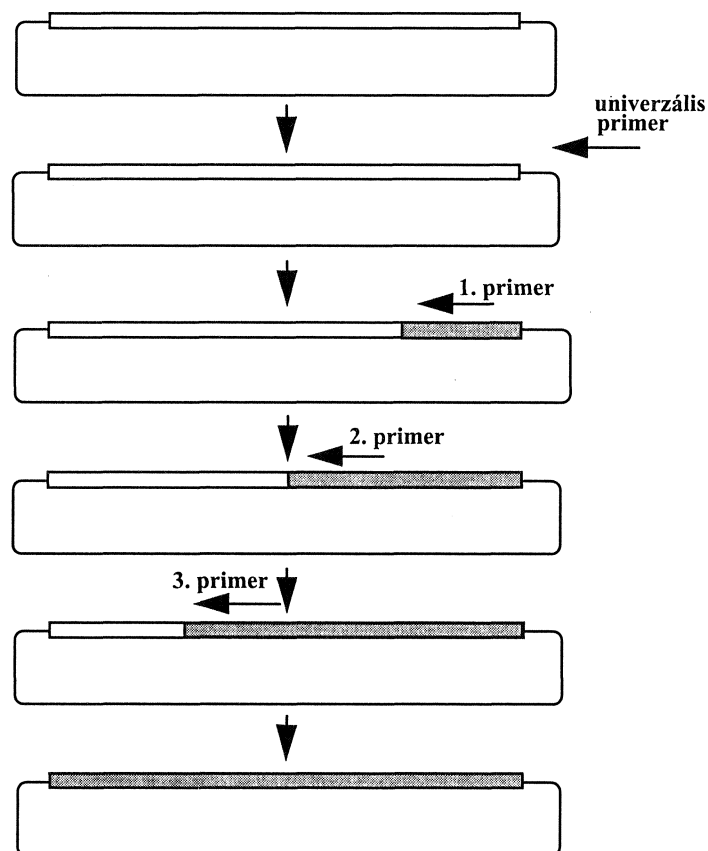
DN-áz I enzim Mg^{2+} jelenlétében a kettősszálú DNS-nek csak egyik szálát hasítja (bevágást végez), azonban átmeneti fémionok (pld. Mn^{2+}) jelenlétében mindkét szál hidrolízise bekövetkezik. Ekkor kis hatékonysággal random módon játszódik le a hasítási reakció. Cirkuláris DNS-t szoktak kiindulási anyagként használni, ugyanis ennek hasítása kicsivel jobb hatásfokkal történik. A DN-áz I kezelés után egy olyan restriktív enzim kezelést is el kell végezni, ami a primer kötőhely és a hozzá közel eső ismeretlen DNS szekvencia között hoz létre hasítást. Ezzel az eljárással különböző méretű target szekvencia részleteket nyerhetünk, amelyek továbbra is a vektorhoz kapcsolódnak. A vektor összezárása után elvégezhető a szubklonozás, majd a szekvenálás a vektorra jellemző univerzális primer felhasználásával.

Az exonukleáz III tompa végű vagy túlnyúló 5' végű kettős szálú DNS-ről az 5' helyen lévő nukleotidokat hasítja le, de a 3' túlnyúló vég az emésztésnek ellenáll. Ezt úgy lehet kihasználni, hogy egy olyan restriktív enzimet választunk, amely tompavéget vagy 5' túlnyúló véget hoz létre, és a vektort az ismeretlen DNS szekvencia után hasítja. Ezzel együtt használunk egy második restriktív enzimet is amely az első után, de a primer kötőhely előtt hasít, és 3' túlnyúló véget hoz létre (az így létrejött hasítási helyet az exonukleáz nem támadja meg). A linearizálást követően különböző idejű exonukleáz kezelés következtében a DNS egyik oldala fokozatosan rövidül, és egy olyan sorozatot jön létre, melyben a vektorhoz kötött target szekvencia különböző hosszúságú darabjai vannak jelen. A vektor visszazárása után, a vektorra jellemző univerzális primerrel elvégezhető a DNS szekvenálása.

Mindhárom eljárás végén azonosítani kell a szekvenciák átfedéseit, majd a szekvencia részletek összeolvasásával kapjuk meg a teljes vizsgálandó szekvenciát. Az eljárások előnye, hogy egyetlen univerzális primer elegendő az összes reakcióhoz. A három eljárás közül legelőnyösebb az exonukleáz III kezelés. Igaz, hogy ekkor több enzimre is szükség van, azonban ezek a reakciók egyetlen kémcsőben gyorsan és hatékonyan elvégezhetők.

Egymást követő oligonukleotidok szintézise

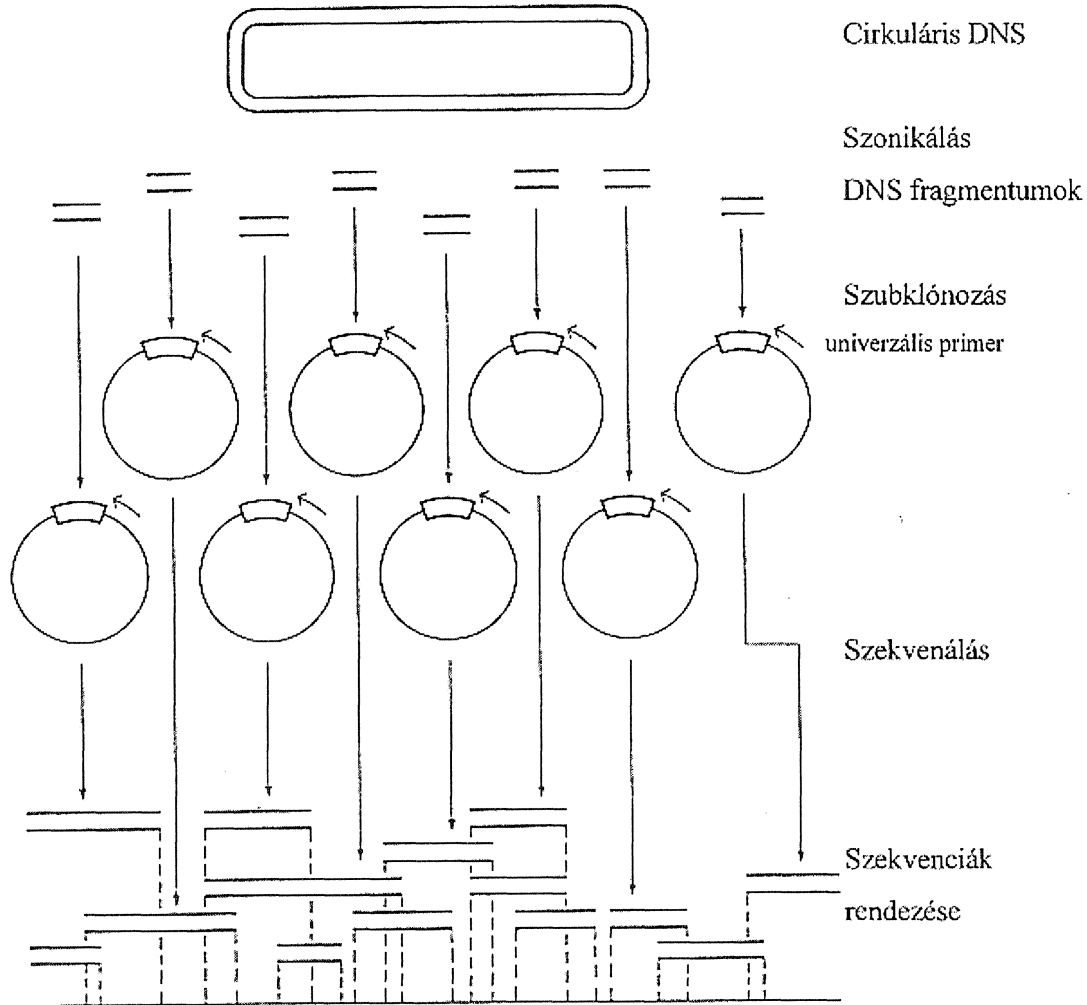
A teljes DNS szekvencia meghatározható oly módon is, hogy több oligonukleotid primert alkalmazunk. Az első reakciót a vektorra jellemző univerzális primerrel végezzük, a további oligonukleotid primereket (pld. 1., 2., és 3. a 6. ábrán) az újonnan meghatározott DNS szekvenciák alapján tervezzük. Ügyelni kell arra, hogy a tervezéskor a szekvencia jól olvasható, biztosan meghatározott részleteit használjuk fel.



6. ábra. Irányított szekvenálás oligonukleotid primer sorozattal. A fekete oszlopok a már ismert szekvencia részleteket jelölik.

Random szekvenálás

A tisztított target DNS-t körbezárják, majd aspecifikus módon kisebb darabokra hasítják. A daraboláshoz felhasználható egy gyakori felismerési hellyel rendelkező restriktions enzim, a DN-áz I mangán ionok jelenlétében, ill. a szonikálás. Mivel a szonikálás teljesen szekvenacia független és hatékony eljárás, leggyakrabban ezt használják. A darabolás után méret szerint szelektálják a 500-800 bázispár méretű fragmentumokat. Az egyes fragmentumok szubklónozása után egyetlen univerzális primerrel elvégezhető a szekvenciák meghatározása. A részszekvenciákat egy komputerbe táplálják, amely az átfedő szakaszok felismerése után a szekvenciákat rendszerezi, és összeállítja a teljes ismeretlen nukleotid sorrendet (7. ábra).



7. ábra. A random szekvenálás elve

A különböző szekvenálás stratégiák megválasztásakor figyelembe kell venni a rendelkezésünkre álló eszközöket és anyagokat, valamint a kutatás további folytatásának menetét. Random szekvenálás csak nagy teljesítményű számítógép segítségével képzelhető el. A sorozatos oligonukleotid szintézishez szükség van egy szintetizáló berendezésre. A random szekvenálással rövid idő alatt nagymennyiségű információ gyűjthető, de a hiányzó részek megállapítása hatványozottan több időt igényel. A szekvenáláshoz előállított oligonukleotidok más célra (pld. PCR) is felhasználhatók. A deléciók létrehozása viszonylag olcsó, de időigényes eljárás. Csak ez a módszer alkalmazható, ha a vizsgálandó DNS repetitív szekvenciákat tartalmaz. A random szekvenáláshoz, ill. deléción alapuló irányított szekvenáláshoz előállított szubklónok a további kutatás során is felhasználhatók.

Egy élőlény teljes genomjának szekvenálására irányuló genom programokban ma már a random módszert részesítik előnyben. Ezt a szekvenálási reakciók automatizálására és a számítástechnika ugrásszerű fejlődése tette lehetővé.

Gyakorlati megfontolások

A Sanger-féle DNS szekvenáláshoz felhasználható az *E. coli* DNS polimeráz I Klenow fragmentuma, a Taq DNS polimeráz (AmpliTaq), kis hatékonysággal használható a reverz transzkriptáz (DNS templáttal), végül jól alkalmazható a T4 DNS polimeráz kémiai módosított változata (Sequenase), ill. géntechnológiával módosított változata (Sequenase 2.0). A korábban előszeretettel használt Klenow fragmentumot és a kis hatékonyságú reverz transzkriptázt kiszorították a géntechnológiai módszerekkel előállított enzimek. A polimerázok közül nagyfokú processzivitása és jelentős sebességű polimerizációs képessége miatt a Sequenase változatai a legelőnyösebbek egyes szálú DNS minta szekvenálására. Mind a kémiai módosítás (Sequenase version 1.0), mind a genetikai manipuláció (Sequenase version 2.0) célja az enzim exonukleáz aktivitásának megszüntése. A Taq DNS polimeráz magasabb hőmérsékleten működik, és különösen a PCR-rel kapcsolt automatikus szekvenálási eljárásokban használják kettős szálú DNS minták vizsgálatára. A felhasználható enzimek legfontosabb tulajdonságait a 2. táblázat foglalja össze.

2. táblázat. Templát függő DNS polimerázok összehasonlítása

Enzim	Klenow fragment	Sequenase	AmpliTaq
Eredet	<i>E. coli</i> polimeráz I	T4 DNS polimeráz	Taq DNS polimeráz
Módosítás	proteolízis szubtilizinnel	kémiai módosított vagy rekombináns fehérje	természetes vagy rekombináns fehérje
Molekulatömeg	76 kDa	92 kDa	94 kDa
Exonukleáz aktivitás	nincs	nincs	nincs
Fémion igény	Mg ²⁺	Mg ²⁺	Mg ²⁺
pH optimum	8,4	7,7	8,3
Hőmérséklet optimum	37° C	37° C	72° C
Alkalmazás	DNS jelölés	szekvenálás	PCR, szekvenálás

Mind egyes szálú, mind kettős szálú DNS szekvenálható. Az egyes szálú DNS-hez az oligonukleotid hatékonyan hibridizál ami nagyobb érzékenységgű reakciót tesz lehetővé. A kettős szálú DNS-t előzőleg denaturálni kell, és ügyelni kell arra, hogy a renaturáció ne rontsa nagyon a hibridizáció lehetőségét. A denaturálás lúggal illetve magas hőmérsékleten oldható meg (az utóbbi esetben AmpliTaq enzimet kell használni). Elsősorban kettős szálú plazmidokat szekvenálását végzik ilyen eljárással. Általános szabály, hogy ekkor nagyobb mennyiségű templátot kell biztosítani a reakcióhoz mint az egyes szálú DNS szekvenálásakor.

Fontos a DNS tisztasága. Legjobb szekvencia leolvasás CsCl-etidium bromid gradiens centrifugálással tisztított templáttal érhető el. Újabban leírtak olyan plazmid minipreparálási eljárásokat és létrehoztak olyan ketteket, amelyek gyorsan és egyszerűen biztosítják a szekvenálásra alkalmas DNS mintát. A DNS preparátumokból mindenképpen el kell távolítani a ribonukleinsav szennyezést és a DNS polimeráz inhibitorokat.

A primerek lehetnek jelölt, vagy jelületlen szintetikus oligonukleotidok. Általában 18-25 nukleotidot tartalmaznak, G-C tartalmuk átlagos (kb. 50 %) és a target szekvenciával 100 %-os komplementaritást mutatnak. Alkalmazhatunk a szekvenáló vektorhoz hibridizáló ún. univerzális primert, ill. a target szekvenciához hibridizáló speciális primert. Ritkábban felhasználhatók lötyögős (nem teljesen komplementer) oligonukleotidok is, azonban mindig nagy gondot kell arra fordítani, hogy a primer 3' vége jól hibridizáljon a target szekvenciához.

A dNTP és ddNTP arányát úgy kell megszabni, hogy a terminálisi reakció véletlenszerűen játszódjon le. Alkalmazhatunk jelzett és módosított dNTP-t. A jelzés lehet fluoresszcens, vagy radioaktív. Az utóbbi esetben α -helyzetben található ^{32}P , ^{33}P ill. ^{35}S használható jelölésre. A ^{35}S előnye, hogy felezési ideje hosszabb, béta sugárzása kisebb energiájú, így élesebb sávokat eredményez autoradiográfia után. Módosított dNTP például a dITP és a 7-deaza-dGTP amelyek a gélkompreszió megszüntetésére használhatók.

A kísérlet kivitelezése

A kísérletek során összehasonlíthatja az egyes szálú illetve kettős szálú DNS szekvenálásával nyerhető eredményeket. Egyes szálú target DNS-ként a Sequenase enzim ellenőrzésére gyárilag előkészített M13 vektorba helyezett kontroll DNS-t használunk, míg a kettős szálú DNS szekvenálását a Bluescript pKS⁺ vektor példáján mutatjuk be. A két eljárás nagyon hasonlít egymásra azzal a különbséggel, hogy a kettős szálú templát esetén szükség van a denaturálás lépésére is.

Kettős szálú DNS denaturálása

A denaturálás NaOH hozzáadásával történik. Ezt követi a közeg semlegesítése, majd a denaturált DNS etilalkohollos kicsapása. Végül az etilalkoholt el kell párologtatni, ugyanis gátolná a szekvenálási reakciót. Egy mikrokémcsőben

4 μg Bluescript pKS⁺ DNS-t tartalmazó oldathoz adjon

4 μl 1M NaOH oldatot amely 1 mM EDTA-t is tartalmaz.

20 μl -re egészítse ki a térfogatot kétszer desztillált steril vízzel, majd alaposan rázza össze az elegyet Vortex keverővel és inkubálja szobahőmérsékleten 5 percig.

Ezután helyezze a mikrokémcsövet olvadó jégbe és adjon az elegyhez 2 μl jéghideg 2M ammónium acetát oldatot, melynek pH-ját korábban tömény ecetsavval 5,4-re állította. A semlegesítés után gyorsan pipettázzon 55 μl jéghideg abszolút alkoholt az elegyhez és alaposan rázza össze. A denaturált DNS kicsapását 15 perc 0° C-on, majd 15 perc -20° C-on történő hűtéssel tegye teljesé. A DNS csapadékot hideg szobában (4° C) 15 percig 16 000 g centrifugálással gyűjtse össze. A kémcső alján összegyűlt DNS ekkor gyakorlatilag még nem látható. Öntse le a folyadékot a csapadékról, majd óvatosan adjon 100 μl jéghideg 70 %-os alkoholt a kémcsőbe a DNS csapadék mosására. Óvatosan rázza össze a kémcsövet, majd ismétlje meg a centrifugálást két percig. Öntse el az alkoholos folyadékot és Speedvac készülékben vákuum alatt 10 percig szobahőmérsékleten szárítsa meg a csapadékot. A megszáradt DNS kis fehér foltként jelenik meg a kémcső alján. Ez a minta közvetlenül szekvenálható, illetve 1-2 napig -70° C-on tárolható.

Hibridizálás

A denaturált kettős szálú DNS-t oldja fel 6 μl kétszer desztillált vízben. Egy másik mikrokémcsőben 5 μl egyes szálú kontroll DNS mintához (ami 1 μg DNS-t tartalmaz) adjon 1 μl kétszer desztillált vizet.

Az így előállított két 6 μl DNS tartalmú oldathoz külön-külön adjon 2 μl ötszörösére hígított szekvenáló reakció puffert és 2 μl 1 pmol/ μl koncentrációju szekvenáló primert.

Az egyes szálú kontroll DNS-hez a -40 jelű primert, a Bluescript pKS⁺ DNS-hez pedig a T3 vagy T7 jelű oligonukleotid primert használja.

A reakcióelegyet helyezze 65° C-os vízfürdőbe 2 percig, majd lassan hűtse le 35 °C-ra úgy, hogy egy főzőpohárba kimért kb. 100 ml 65° C-os vízben kb. 30 percig szobahőmérsékleten tartja a két mintát. A lehűlés közben lejátszódik a primer és a target DNS hibridizációja. A lehűlés után helyezze a mintákat 0° C-ra, hogy megakadályozza a kettős szálú DNS renaturációját és az oligonukleotid primer kiszorulását.

Szekvenálási reakció

Miközben a minták hűlnek jelöljön meg mintánként 4 mikrokémcsövet a leállító elegyben található didezoxinukleotid nevének megfelelő A, C, G és T betűkkel. Célszerű a jelölést a cső kupakjára írni, mert innen nehezebben kopik le. A jelöléssel összhangban mérjen 2,5-2,5 µl ddATP, ddCTP, ddGTP illetve ddTTP tartalmú leállító elegyet a csövekbe. Zárja le a kémcsöveket és helyezze őket készenlétbe a láncterminálási lépéshez.

1:5 arányban hígítsa meg a jelölő elegyet (például 1 µl elegyhez adjon 4 µl kétszer desztillált vizet). Közvetlenül a szekvenálási reakció előtt hígítsa meg a Sequenase enzimet jéghideg hígító pufferrel nyolcszoros térfogatra (például 1 µl enzimhez adjon 7 µl hígító puffert). Hígítás után az eredeti Sequenase törzsoldatot azonnal helyezze vissza a -20° C-os mélyhűtőbe. Legyen tekintettel arra, hogy az enzim hőérzékeny és a szekvenáló vegyszerkollekció legdrágább komponense. Mindig csak annyi enzimet hígítson amennyi kísérleteihez feltétlenül szükséges. A hígított enzimet félórán belül használja fel!

Miután elvégezte a fenti előkészületeket, helyezze a korábban kimért és megjelölt leállító oldatokat tartalmazó kémcsöveket 37° C-ra, és így készüljön fel a láncterminálásra. Miközben ezek a kémcsövek 37° C-ra melegszenek végezze el a jelölési reakciót.

10 µl hibridizáltatott, lehűtött DNS-primer elegyhez adjon

1 µl 0,1 M DTT-t

2 µl hígított jelölő oldatot

0,5 µl [³⁵S] dATP-t és

2 µl hígított Sequenase DNS polimerázt, majd inkubálja az elegyet szobahőmérsékleten 5 percig.

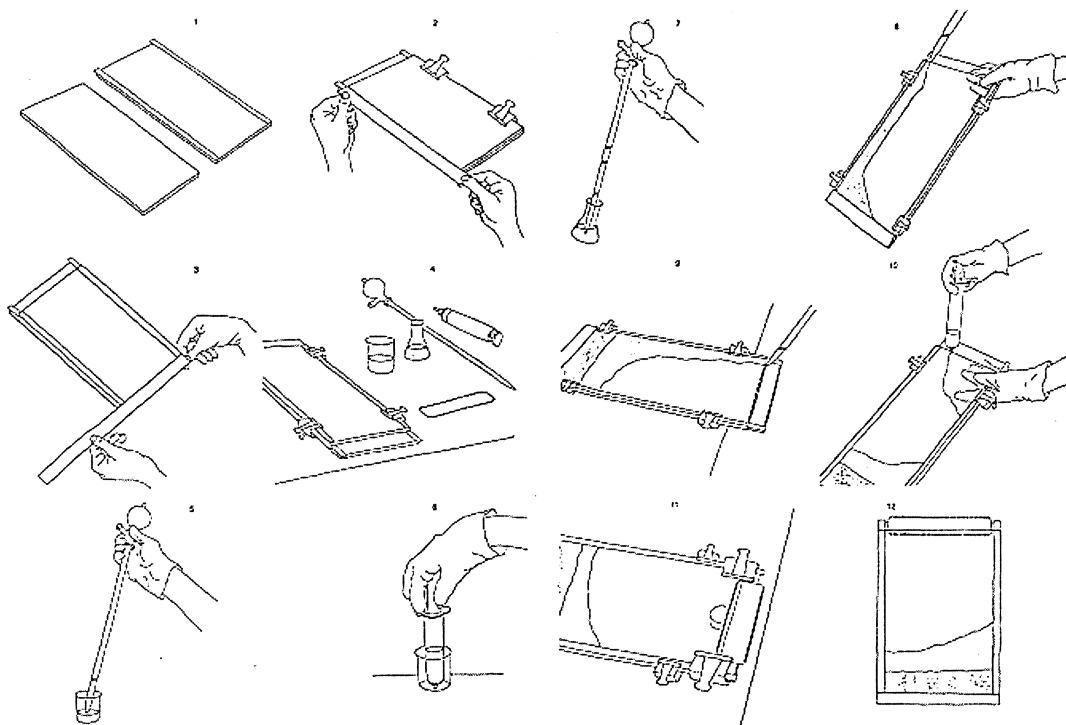
Az inkubálási idő leteltével az elegyből mérjen egymásután négyszer 3,5 µl részletet a 37 °C-on tartott 4 lánctermináló elegyhez. 5 percig 37° C-on végezze a láncterminálási reakciót, majd állítsa le a szekvenálást 4 µl Stop oldattal. Az így leállított reakció elegyek -20° C-on néhány napig tárolhatók.

Denaturáló gél elektroforézis

A radioaktívan jelzett DNS darabokat denaturáló poliakramid gél elektroforézissel választják szét. Denaturálószerként legtöbbször karbamidot használnak, amit ki lehet egészíteni formamiddal. Jobb elválasztás biztosítható ferde, vagy gradiens gélek alkalmazásával. A gyakorlatban puffer gradiens gélt használunk, melynek alsó régiójában a sókoncentráció magasabb. Ennek következtében alul a feszültesítés kisebb, így a vándorlási sebesség csökken. A gradiens tehát "tömöríti" a nagyobb mozgékonyágú kisebb molekulatömegű fragmentumokat, így a gél hosszabb szakasza használható leolvasásra. A mintákat nagyfelületű, de vékony (0,4 mm) poliakrilamid gélben urea jelenlétében magas hőmérsékletre (45-50° C) szeparálják.

A poliakrilamid gél öntése

A nagyméretű gél elkészítésére a különböző cégek által gyártott különböző készülékektől függően más-más eljárást kell alkalmazni. Az egyik ilyen lehetőséget foglalja össze a 8. ábra. A gélöntés lépései a következők:



8. ábra. Poliakrilamid gél öntése DNS szekvenáláshoz

1. A mosószeres vízzel, desztillált vízzel, majd 96 %-os etilalkohollal alaposan letisztított üveglapokat tisztított felszínükkel felfele helyezze az asztalra. A tisztított műanyag távtartó léceket helyezze el a hosszabb üveglap két szélén.

2. A két üveglapot fordítsa egymásra úgy, hogy a tisztított oldalak egymás felé nézzenek. Csipeszeléssel, illetve szükség esetén az oldalak szigetelő-szalaggal való leragasztásával zárja le az üveglapok oldalát.

3. Az üveglap alját ragasztószalaggal zárja le. (Egy másik gyakran használt eljárás szerint a gél aljának tömítését a nehéz géloldatból előállított poliakrilamid réteggel végzik.)

4. Készítse elő az alsó és felső géloldatokat. Az alsó géloldathoz mérjen be 15 ml nehéz géloldatot, 15 μ l 25 % AMPER oldatot és adjon hozzá 15 μ l N,N,N',N'-tetrametil-etiléndiamint (TEMED), majd keverje össze az elegyet. A felső gél készítéséhez mérjen össze 80 cm³ könnyű géloldatot, 80 μ l 25 %-os AMPER-t és 80 μ l TEMED-et egy külön edényben. Ezt is keverje össze.

5. A gradiens elkészítéséhez először szívjon fel hasas pipettába (vagy egy nagy méretű injekciós fecskendőbe) 10 cm³ felső géloldatot (ami színtelen), majd 12 cm³ nehéz géloldatot (ami kék színű).

6. Egy 50 cm³-es fecskendőbe szívj fel a felső géloldat nagy részét, és készítse elő a gél öntéshez.

7. 2-3 légbuborékot engedjen át a pipetán, ami elegendő az alsó és felső géloldatok enyhe összekeverésére.

8. Az üveglapokat kb. 45°-os szögben, ferdén tartva engedje a lapok közé a gradiens keveréket a pipetából.

9. Az üveglapok dőlésszögét fokozatosan csökkentse.

10. A fecskendőből óvatosan rétegezze a felső géloldatot a gradiens felé. Kerülje a buborékképződést.

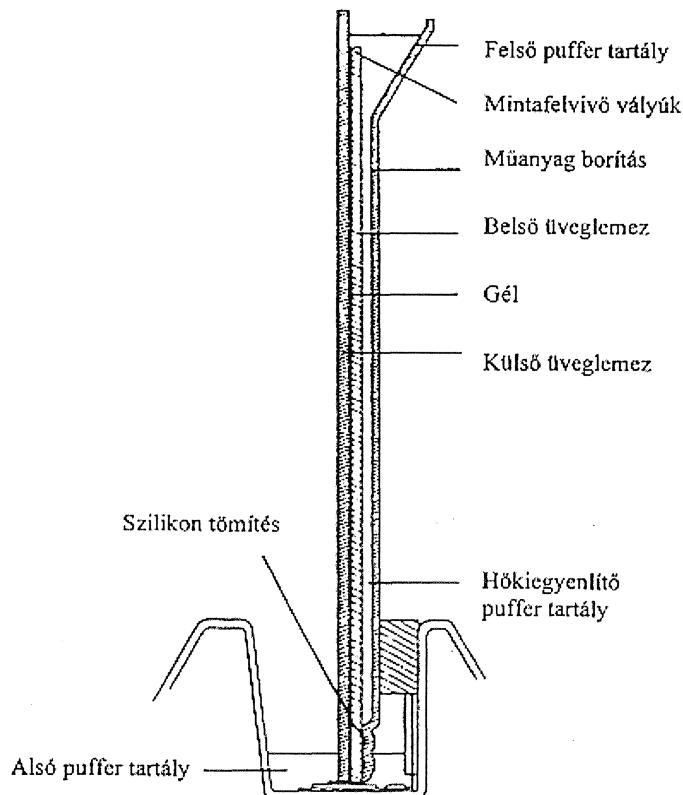
11. Helyezze be a fésűt légmentesen a két üveglap közzé és csipeszekkel rögzítse helyzetét.

12. Legalább egy óra hosszáig tartsa a gélt közel vízszintes helyzetben. Ez alatt lejátszódik a polimerizációs reakció és a gél megszilárdul.

A pipetából és a fecskendőből mossa ki az akrilamid tartalmú oldatot, mielőtt még megszilárdul. Az előkészített géllap maximum 1 napig tárolható.

Gél elektroforézis

Az előkészített géllap oldalairól távolítsa el a csipeszeket illetve a ragasztószalagot, majd helyezze a gélt az elektroforetizáló készülékbe a 9. ábrán feltüntetett módon. Az egyenletes hőelosztás biztosítása érdekében, a készülékében az egyik puffer tartály az üveglap mögött helyezkedik el (lásd 9. ábra), vagy egy nagyméretű fémlapot erősítenek az üveglap felületére.



9. ábra. A DNS szekvenáló elektroforézis készülék vázlata

Vegye ki az üveglapok közül a műanyag fésűt és öblítse le elektroforézis pufferrel a gél felületét. A fésű kialakítására két lehetőség van. A hagyományos fűrészfog alakú fésű fogai beleérnek a gélbe, így kihúzás után a fogak helye biztosítja a felvívó vályúkat. Az újabban bevezetett cápafog alakú fésűk egyenes oldalát kell a gél felszínéhez illeszteni a polimerizáció előtt, majd a fésűt meg kell fordítani és a fogakat 1/2-1 mm-re bele kell nyomni az egyenes gél felszínébe. Ekkor a fogak közötti nyílás hozza létre a mintafelvívő vályúkat. Töltse fel az alsó és a felső géltartályokat az elektroforézis pufferrel, és mossa tisztára a felvívó vályúkat egy gumiballonhoz csatlakoztatott Pasteur pipetával vagy egy nagyméretű injekciós fecskendővel. Távolítsa el a felesleges poliakrilamid darabokat amik a minta felvitelét akadályoznák.

A minta felvitele előtt célszerű egy fél órás előfuttatást végezni kb. 90 watt teljesítmény mellett. Ekkor a gél felmelegszik, ami azért előnyös mert kiküszöböli a DNS esetleges renaturációját.

A mintákat közvetlenül felvitel előtt 1,5 percig 75 °C-on inkubálja a DNS denaturálása érdekében. Miközben a minták melegszenek, alaposan mossa ki a felvívó vályúkat elektroforézis

pufferrel és távolítsa el a gélből kidiffundáló karbamidot, ami a minta felvitelt megnehezítené. Ez után négy egymás mellett lévő vályúba mikropipettával vigyen fel 2,5-2,5 µl mintát A, C, G, T sorrendben. A diffúzió kiküszöbölésére igyekezzen a mintákat gyorsan, de térfogat veszteség nélkül a géltre felvinni. Több sorozat esetén se vigyen fel egyszerre 16 mintánál többet. Jegyzőkönyvében rögzítse a minták sorrendjét és az elektroforézis kezdetének időpontját.

A minta felvitele után 75 W-tal kezdje el az elektroforézist. Várja meg, míg a minták mindegyike behatol a gélbe, majd növelje a teljesítményt 90 W-ra. Az elektroforézist kb. 2000 V feszültség különbség mellett két óra hosszúra végezze. Ha hosszabb szekvencia leolvasását szeretné elvégezni két óra elteltével szakítsa meg az elektroforézist és friss vályúkba ismételtén vigyen fel a mintákat a korábban leírt módon. Ezután folytassa az elektroforézist még kb. két óráig, amikor is az először felvitt minták felső jelzőfestéke, illetve a másodszor felvitt minták alsó jelzőfestéke eléri a gél alját. Ekkor kapcsolja ki a stabilizátort és fejezze be az elektroforézist.

Elektroforézis után az alsó gélpuffer tartalmazza a szekvenálási reakcióban feleslegben maradt radioaktív dNTP-t, illetve a radioaktívan jelzett DNS fragmetumok egy részét, ezért ezt a radioaktív hulladékgyűjtőbe gyűjtse!

Fixálás

Válasza szét a gélt közrefogó két üveglapot úgy, hogy a gél az egyik lapon maradjon. Géllal felfelé helyezze az üveglapot egy nagyméretű fotótálba és öntsön rá annyi fixáló oldatot, hogy az a gélt 1-2 mm-rel ellepje. Az urea és a minta pufferben található szacharóz eltávolítása érdekében a gélt 10 % metanol, 10 % ecetsav tartalmú oldatban kb. fél óráig fixálja elszívó fülkében.

A gél szárítása

Emelje ki a fixáló fürdőből az üveglapot a rajta lévő géllal együtt és helyezze a laborasztal felszínére. Óvatosan fektessen a géltre egy ív Watmann 3MM szűrőpapírt és simítsa a gél felszínéhez, úgy hogy a gél a papírhoz tapadjon. Válasza le a gélt az üveglapról, és a papírt fordítsa az asztallapra, úgy hogy a gél felfelé nézzen. Takarja be a gél felszínét műanyag fóliával, majd vágja le a gél azon felesleges részeit, ahol nem található DNS minta. Szárítsa meg a gélt vákuum-szárító berendezésben 80 °C-on 1-2 óráig. A szárítás után távolítsa el a műanyag fóliát és β számlálóval ellenőrizze a száraz gél radioaktivitását. Sikeres szekvenálási reakció és szeparálás után a beütés szám 10-20 cps (beütés másodpercenként).

Autoradiográfia

A szárított gél felszínére sötét szobában helyezzen röntgen filmet. az autoradiográfiát röntgen kazettában szobahőmérsékleten 1-2 napig végezze. A film előhívása és szárítása után olvassa le a DNS szekvenciáját, és hasonlítsa össze eredményét az irodalmi adatokkal. Ellenőrizze a leolvasás pontosságát, ugyanis a tapasztalat szerint a legtöbb szekvenálási hiba pontatlan leolvasásból adódik!

Szükséges oldatok

Stop oldat

95 % formamid, 20 mM EDTA, 0,05 % bromfenolkék és 0,05 % xilolcianol FF. Az EDTA leállítja a polimeráz reakciót, a formamid denaturálja a DNS-t és a festékek az elválasztás során jelzik a DNS mozgását.

Gélpuffer (10 x TBE)

A törzsoldathoz 108 g Tris bázist, 55 g borsavat és 9,3 g EDTA-dinátriumsót oldjon fel kb. 700 cm³ kétszer desztillált vízben, majd a térfogatot egészítse ki 1 dm³-re. Az oldat pH-ja 8,3; ha az alkotó részek megfelelő tisztaságúak elegendő a pH ellenőrzése, nincs szükség a kívánt érték külön beállítására.

Elektroforézis puffer (TBE)

Tömény 10x TBE törzsoldatból tízszeres hígítással állítjuk elő.

Ammónium perszulfát (AMPER)

A só 25 %-os oldatát frissen kell készíteni. eppendorf csőbe tegyen kb. 0,1-0,2 g ammónium perszulfátot majd gyorsmérlegesen mérje le a tömegét, és a tömeg négyszeresének megfelelő térfogatú kétszer desztillált vízben oldja fel a sót enyhe rázogatózás közben.

Akrilamid törzsoldat

A 30 % akrilamid-biszakrilamid oldat 19:1 arányban tartalmazza az akrilamidot és biszakrilamidot. 142,5 g akrilamidot és 7,5 g biszakrilamidot oldjon fel kétszer desztillált vízben és a térfogatot egészítse ki 500 cm³-re. Az oldat 4 °C-on, sötét üvegben 1 hónapig tárolható. *Az akrilamid neurotoxin, bemérésekor viseljen gézmaszkot és gumikesztyűt! Az akrilamid törzsoldattal minden munkálatot gumikesztyűvel végezzen!*

Könnyű géloadat

500 cm³ oldat készítéséhez mérjen össze 100 cm³ akrilamid törzsoldatot, 200 cm³ kétszer desztillált vizet és 25 cm³ gélpuffer törzsoldatot, majd folyamatos keverés közben oldjon fel benne 230 g karbamidot. (Az oldás legalább 2-3 órát vesz igénybe.) A tiszta oldatot egészítse ki 500 cm³-re, szűrje át Milipore HA típusú 0,45 µm pórusméretű szűrőlapon. Sötét üvegben 4 °C-on tárolja az oldatot.

Nehéz géloadat

100 cm³ akrilamid törzsoldat, 125 cm³ tömény gélpuffer törzsoldat és 100 cm³ kétszer desztillált víz elegyében oldjon fel 230 g karbamidot és 50 g szacharózt folyamatos kevergetés közben. Az oldatot egészítse ki 500 cm³-re, szűrje át Milipore HA típusú 0,45 µm pórusméretű szűrőlapon és adjon hozzá egy spatulahegynyi brómfenolkék indikátort. A festék elkeverése után a kékszínű oldatot sötét üvegben 4 °C-on tárolja.

AUTOMATIZÁLT DNS SZEKVENÁLÁS

Góth László

Az elmúlt években a manuális és radioaktív jelöléssel dolgozó DNS szekvenálást fokozatosan váltották fel a DNS szekvenálás automatizált eljárásai. Ezen eljárások valójában csak mechanizált eljárások, mivel a kutató manuális munkáját továbbra is igénybe veszik. Ettől függetlenül a továbbiakban az automata DNS szekvenálás kifejezést fogom használni.

Az automata DNS szekvenátorok főbb jellemzői: a fluorszcens jelölés és detektálás, a DNS fragmentek molekulatömeg szerinti elválasztása poliakrilamid gél vagy kapilláris elektroforézissel és a kromatogramok értékelése számítógépes programok segítségével.

DNS jelölési módok

A DNS jelölésére fluoreszcens festékeket alkalmaznak, és az elválasztás végén a jelölt fragmenteket lézer fényvel megvilágítva (a fluoreszcens festéket gerjesztjük), az emittált fényt fényérzékelővel történő detektálása után a kapott elektromos jelet értékelhetjük. Ha például a négy ddNTP- mindegyikét különböző fluoreszcens festékkel jelöljük és négy különböző színű fényt érzékelő detektort alkalmazunk, akkor a manuális szekvenálásnál alkalmazott 4 sáv helyett 1 sávban is elvégezhető az elektroforetikus szétválasztás.

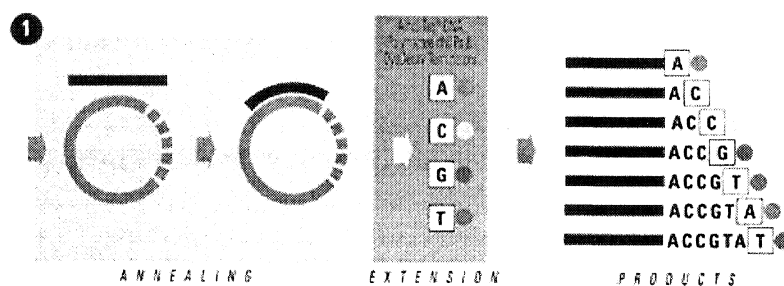
A jelölési módszerek közül a következő három terjedt el

A terminátor (ddNTP) jelölése (Dye Terminator Labeling)

A különböző dNTP-eket különböző fluoreszcens festékekkel jelöljük. Ekkor a ddNTP egyidejűleg lánclezáró és detektálási feladatot is ellát (1. ábra).

Ennek az eljárásnak az előnyei:

1. különböző primerhez, szekvenálási feladatokhoz széles körben,
2. a négy szekvenálási reakció egy csőben végezhető és a futatáshoz is csak egy sáv szükséges (nem négy),
3. a primer jelzéshez képest kevesebb pipettázás szükséges, ami révén kisebb a hibalehetőség.



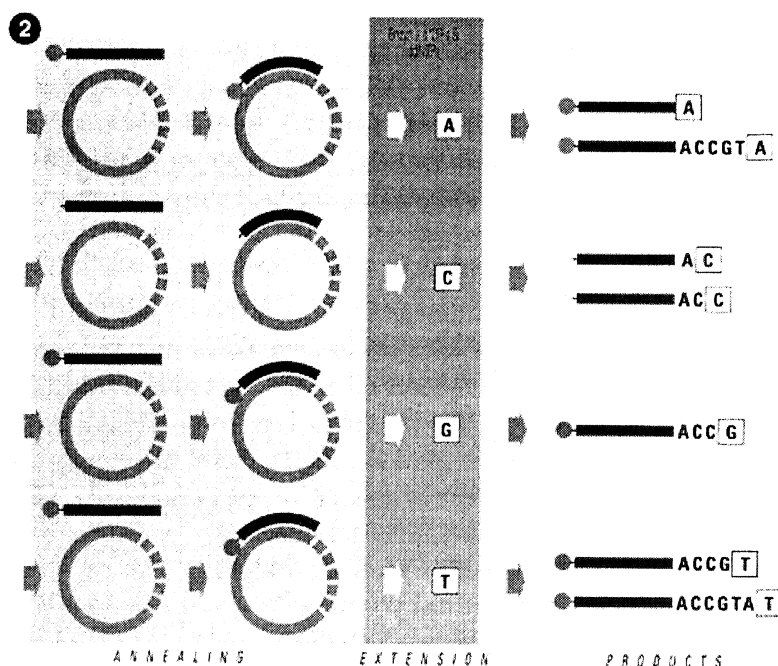
1. ábra. ddNTP jelölés

A primer jelölés (Dye Primer Labelling)

Ezen eljárásnál a primert jelöljük négy különböző fluoreszcens festékkel és a szekvenálási reakciót ennek megfelelően négy különböző csőben vitelezzük ki. A négy különböző csőben kivitelezett szekvenálási reakció termékeit egyesítve az elválasztás már egy csőben megvalósítható (2. ábra).

Az eljárás előnyei:

1. jelölt primerek nagy választékát kínálják már a gyártók,
2. a jel intenzitása nagyobb mint ddNTP jelölésekor,
3. hosszabb az olvasható szekvencia, mint ddNTP jelülésnél.



2. ábra. Primer jelölés

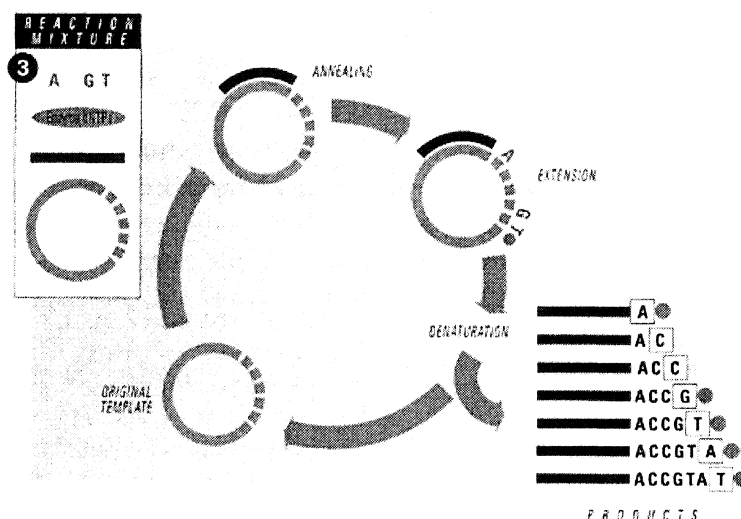
A ciklusos szekvenálás (Cycle Sequencing)

A PCR reakció és a szekvenálási reakció ötvözése. A szekvenálási reakcióban keletkező fragmenteket a PCR reakcióval amplifikáljuk. Ehhez az eljáráshoz mindkét típusú jelölés (ddNTP és primer) alkalmazható (3. ábra).

A DNS polimeráznak itt a következő további kritériumoknak is meg kell, felelnie, ne legyen sem 3' sem 5' exonukleáz aktivitása és aktív maradjon többszöri 94-96 °C-ra történő melegítés után is. Az exonukleáz aktivitás kikapcsolható, ha genetikai manipuláció során eltávolítják az enzim gén 5-ös exonját. További követelmény, hogy a nukleotid kompresszió kiküszöbölését szolgáló 7-deaza dGTP és α -tio dNTP -vel is tudjon működni.

A ciklusos szekvenálás előnyei:

1. nem olyan érzékeny a templát DNS tisztaságára és mennyiségére, mint az előző két eljárás,
2. egyszerűbb protokollt igényel,
3. a magasabb hőmérséklet miatt kisebb az esélye a szekvenáló enzim működését gátló másodlagos szerkezetek kialakulásának,
4. a magas hőmérséklet csökkenti a primer nem specifikus helyre történő bekapcsolódását,
5. a kétszálú DNS egyszálúsításához nem szükséges alkáli /lúgos denaturáció,
6. azonos protokoll használható a kétszálú és egyszálú DNS-hez.



3. ábra. Ciklikus szekvenálás

A fenti három szekvenálási eljárás után a termékek 24cm-es poliakrilamid gélben történő elválasztásakor 400-450 bp hosszúságú termékek szekvenciája határozható meg.

Melyik eljárást válasszuk?

A helyes választás templát függő, minden templáthoz megválasztható az optimális szekvenálási eljárás például PCR termék szekvenáláshoz primer jelölésnél és ddNTP jelölésnél egyaránt az AmpliTaq-os szekvenálást javasolják. Heterozigota kimutáshoz főként a primer jelölést és AmpliTaq valamint Sequenase enzimés szekvenálás javasolható.

A fenti kérdés megválaszolásának megkönnyítésére forgalmaznak Core Sequencing Kit-et, amely a primer jelölési és ddNTP jelölési eljárások reagenseit tartalmazza, vagy olyan kit-et, amely a ciklusos szekvenálás reagenseit előre elkészített keverék formájában tartalmazza. Egy további lehetőség a nagytisztaságú, egyszálú DNS nyeréséhez a szilárd fázisú Dynabeads (szuper paramágneses) részecskékkel történő DNS templát nyerés.

A szekvenálást befolyásoló tényezők

A következő néhány bekezdés azokat a kritikus faktorokat tárgyalja, amelyek hatása nagy jelentőségű a DNS szekvencia helyes, könnyen értékelhető leolvasásához.

A templát

A templát megfelelő mennyisége és minősége az egyik legfontosabb szempont, és ennek figyelmen kívül hagyása okozza a legtöbb hibát. Például ilyen hiba lehet:

- a. túl rövid a meghatározható/olvasható szekvencia,
- b. nagy az alapzaj emiatt nem különíthető el a templát nukleotid és zaj jele,
- c. nagyon kicsi a templát jele vagy nincs is jel.

A hibákat okozhatja: fehérje, RNS, DNS szennyeződés, só-, reagens-, médium-, sejt maradvány. Ebben az esetben a templátot tovább kell tisztítani. A szekvenálás előkészítésére nem ajánlható templát tisztítási eljárások: alkáli lizis, CsCl kötés, forralás, üveg/szilika gyöngy adszorbeió.

Az alkalmazott DNS mennyiségét két határ determinálja. Ha túl sok a templát, akkor a kezdeti csúcsok nagyon erősek (magasak), amelyek azután hirtelen haloványodni kezdenek. Ha túl kevés a DNS a csúcsok gyengék, kicsik lesznek és megkülönböztethetelenek az

alapzajtól. PCR termékénél az eljárásoktól függően 20 ng - 1000 ng, egyszálú DNS-nél és kozmid-nál 0.5- 2.0 µg, kétszálú DNS-nél 1-5 µg. az ajánlott templát DNS mennyiségéhez:

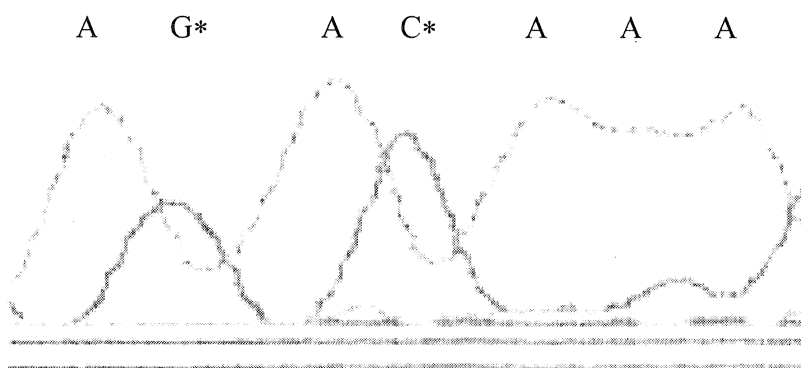
A templát DNS szekvenciája

A sok (emlősöknél több mint 62 %) GC-t tartalmazó templátot nehéz szekvenálni a másodlagos (G→C és C→G) kötések, inverz ismétlődések és palindromok kialakulása miatt. Egyes szerzők szerint 5 % DMSO(dimetilszulfoxid) adása javíthat a szekvenálási reakción, míg más szerzők hosszabb protokollokat (denaturálás, hot start PCR) javasolnak ilyen esetekben. A DMSO alkalmazásakor ügyelni kell, hogy ennek koncentrációja az 5 %-ot és a denaturáció a 95 °C-ot ne haladja meg.

Az AT-ben gazdag szekvencia szintén nehezíti a szekvenálást. Ha egymásután több A vagy T van akkor az első nagy míg a többiek kicsi csúcsot produkálnak, és akár a zajtól is megkülönböztethetetlenek lesznek. Sok egymásután következő T esetében az első nagyon nagy míg a következők válla van. Ha a primer sok AT-t tartalmaz, akkor a hosszát úgy célszerű növelni, hogy ezek aránya csökkenjen.

Az ismétlődő DNS szekvenciák közül a hosszúak (több száz-ezer bázispár) hasonló problémát okozhat mint a CG-ben gazdag szekvenciák. Homolog ismétlődéseknél (egy fajta bázis) általában 10 felett jelentkezik a probléma. Ekkor a szekvenáló enzim hibázik (slipping), és nukleotid(ok) marad(nak) ki.

Kialakulhatnak a szintézis után is másodlagos szerkezetek, amelyek szintén elválasztási/szekvenálási problémát okoznak, a mobilitás megváltozása révén. Ennek kiküszöbölése módosított nukleotidok alkalmazásával, pld. α-tio dNTP-vel, illetve 7-deza dGTP-vel kísérhető meg.



A 4. ábra a mobilitás megváltozás miatti kompressziót mutatja be a szekvenciában. A G és C* nukleotidok nem a várt helyen jelentek meg*

PCR termékek szekvenálása

Az automata szekvenálás nagy előnye, hogy a gén tetszőleges helyéről PCR segítségével nyert termékek szinte közvetlenül vagy kis manipulációval már szekvenálhatók. A PCR reakcióhoz használt primerek szekvenálási primerként használhatók, de a PCR reakcióban fokozottan ügyelni kell, hogy nem specifikus termékek ne képződjenek. Ha a PCR reakcióban nem specifikus termékek is képződnek, akkor a következő eljárások közül választhatunk:

1. A PCR termék agaróz gélelektroforézise, majd a kérdéses sáv kivágása és visszanyerése a gélből. Ez végezhető saját reagensekkel vagy gyári kit-el.

2. Nested PCR.

3. Tisztítás mágneses gyöngyökkel.

A PCR reakció után a termék tartalmaz: PCR primereket, dNTP-eket, enzimet és puffer komponenseket. Ezeket szintén el kell távolítani, mivel a jelölést (dNTP-k) és a ciklusos

szekvenálást befolyásolhatják. A fenti módszerekkel a PCR termék tisztításakor ezek is eltávolíthatók, de ha ezeket nem kell alkalmazni, akkor megfelelő molekulaszűrőjú mikro oszlopokkal ez hatásosan elvégezhető.

A PCR reakció termékek szekvenálásához a mindkét típusú (primer és ddNTP) jelölés valamint a ciklikus szekvenálási eljárás is használható.

A primer

A primer szintén sokszor (az esetek 5 %-ban) lehet hibaforrás. Ügyelni kell a tisztaságára, megfelelő koncentrációjára és arra. Hogy csak a kívánd templát, szakasszal tudjon hibridizálni, másodlagos szerkezet különösen a 3' végen ne alakuljon ki, általában 18-24 bázis hosszúságú legyen végül olvadáspontja 55-65 °C között legyen.

A reagensek

A legjobb a friss reagensek használata, a fluoreszcens vegyületeket óvjuk a fénytől, ne tároljuk őket automatikus leolvasztású fagyasztóban, csak a meghatározás előtt vegyük ki és jégen engedjük őket kiolvadni.

A szeparáló gél és a szekvenáló készülék

A gél két órával az elektroforézis előtt készítenendő és 24 óráig használható. Az ennél öregebb gél lassan degradálodni kezd.

Egy 24 cm-es, 6%-os gélben az elektroforézis mintegy 26 W energiát igényel. A kezdő feszültség 1300-1400 V, amely ezután emelkedni fog. A futatási hőmérséklet általában 40 °C. Ügyeljünk a szekvenálási reakciónak megfelelő készülék program beállítására.

Szeparálás kapilláris elektroforézissel

Az automata szekvenátorok újabb generációja a szekvenálási reakcióban keletkezett, különböző nagyságú DNS fragmentek elválasztására nem poliakrilamid gélelektroforézist, hanem kapilláris elektroforézist használ. A kapilláris elektroforézis az elektro-endozmozis jelenségét használja ki. Ez a szeparálás jóval hatékonyabban mint a gélelektroforézis és rövidebb idő alatt, jobban szabályozható körülmények között megy végbe. A legújabb készülékek már több kapillárisal (4) dolgoznak, ami jelentősen megnöveli a készülék kapacitását. A programozható mintavétel a készüléket alkalmassá teszi az éjszakai (walk away) üzemmódra is.

Egyes DNS szekvenátorok már mutáció kimutatási rendszer (DNS Mutation Detection System), Genetic Analyzer néven kerülnek forgalomba (5. ábra), utalva többszintű felhasználási lehetőségeikre (fragment analízis, mutáció azonosítás, heterozigóta keresés).

Az automata szekvenátor főbb részei

A mintaadagoló és pumpa rendszer

48-96 minta tárolását és a kapillárisba való jutatását automatikusan az Autosampler végzi, a pumpa rendszer segítségével. Ugyanezen pumpa rendszer végzi a gél, puffer bejutatását is.

A szeparáló rendszer

A kapilláris, amelyben a különböző DNS-ek molekulatömegük alapján elektromos térben elválasztódnak. Egy kapilláris mintegy 100 injektálásra használható és speciális géllal van töltve. Hossza 40-60 cm és átmérője 74 µm. A kapilláris vége előtt (36/50cm-re a elejétől) van az optikai ablak. Itt a kapilláris fényáteresztő.

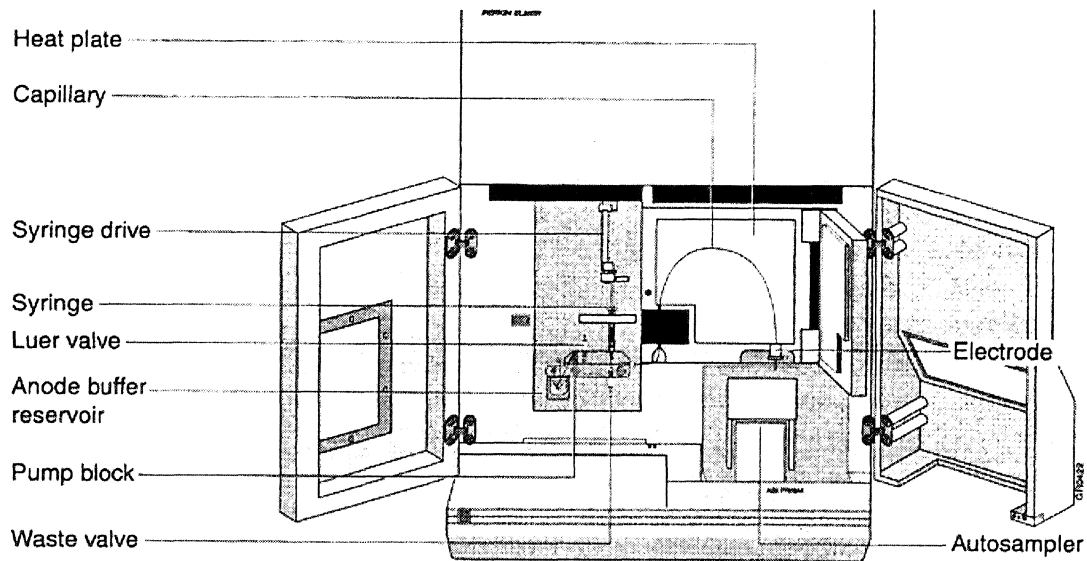
Az elektródok platinából készültek. A negatív töltésű DNS a katódtól(-) az anód(+)- felé vándorol. Az elektroforézis termosztált köpenyű kapillárisban történik általában 40 °C-on.

A detektáló rendszer

A fluoreszcensen jelölt DNS detektálása lézer fényvel történő gerjesztés után az emittált fény detektálásán alapszik. A lézer fényt nagy feszültségű lézer generátor szolgáltatja. A gerjesztés után emittált fényt egy optikai rendszer továbbítja az optikai felbontó rendszerbe (difrakciós rács) és ezután a CCD optikai érzékelőbe. Az optikai érzékelő a fényjeleket elektromos jelekké alakítja, amely azután analizálhatók.

A software

A készülék software vezényli a készülék működését (előkészítés, mintabevitel, elektroforézis) és analizálja a kapott szekvencia képet.



5. ábra. Genetikai analizátor (automata szekvenátor).

Heat plate: melegítő rész,

Capillary: a kapilláris,

Syringe drive: fecskendő mozgató,

Syringe: fecskendő,

Luer valve: többállású szelep,

Anode buffer reservoir: anód puffer tartó, Pump block: folyadék továbbító,

Waste valve: végtermék eltávolító szelep,

Electrode: elektród,

Autosampler: automata mintaadagoló.

A DNS szekvencia meghatározása

A szekvencia meghatározás magába foglalja a szekvencia analízis paramétereinek definiálását, a kapott szekvencia értékelését, és a hibakeresést.

Az analízis kezdőpontjának determinálása és az analízis időtartama

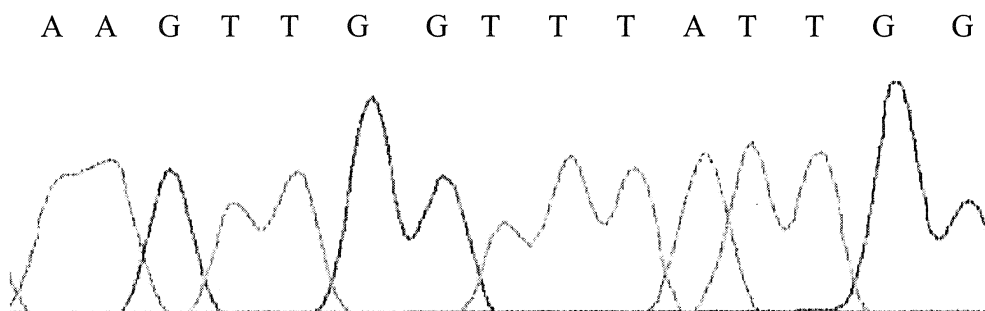
Az analízis software a kezdőpontot úgy definiálja, hogy megkeresi az első fluoreszcens csúcsot és ha az ablak időben (az az idő, amely alatt a következő DNS sávnak meg kell jelenni a detektáló zónában) egy következő DNS sáv követi, akkor az első csúcsot definiálja a detektálás kezdőpontjának. Az első csúcs 60-70 perccel az elektroforézis indítása után jelenik meg egy 24 cm-es gélnél, hosszabb gélnél természetesen később.

A készülék minden 10 sec-ban végez egy scan-nelést (detektál mind a négy hullámhosszon), amely 6 sec-ig tart. Így egy perc alatt 10-szer detektál.

A kezdőpont kijelölését a gél hibái, a pufferek frontja, feleslegben lévő fluoreszcens terminátorok zavarják. A detektáláshoz/értékeléshez a paramétereket úgy kell megválasztani, hogy a kiértékelő (detektáló) ablak előtt mindig azonos időben egy DNS sáv haladjon el, ez az optimális bázis távolság, amelyet a software fogadni/értékelni tud. A gél egyenletessége biztosítja ezt. Eltérést okozhat a nem megfelelő puffer, túl frissen vagy túl régen készített gél, fluoreszcens foltok a gélen, ha a gél nem megfelelően polimerizálódott és szűk csatornák képződtek, vagy egyik sávból minta/só jutott a másikba. Ezen utóbbit úgy lehet kiküszöbölni, hogy az első sávba felvisszük a mintát és rövid elektroforézissel a gélbe vándoroltatjuk, ezután a következő sávot juttatjuk így a gélbe. Természetesen a gélibák nem jelentkeznek a gyárilag előállított kapilárisokban.

A jól olvasható szekvencia jellemzői:

1. van csúcs
2. nincsen benne kompresszió
4. minden nukleotid jól definiált csúcsot ad
5. a csúcs jelentősen magasabb mint a zaj

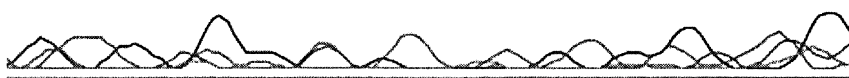


6. ábra. Jól olvasható nukleotid szekvencia

A nukleotid szekvencián látható, gyakori problémák

1. Nincs szekvencia
2. Csak a zajos alapvonal látható, a keresett szekvenciát jelentő csúcsok nincsenek, vagy a zajjal azonos/kisebb nagyságúak. Ennek a jelenségnek a leggyakoribb okai: a szekvenálási primer nem kötődött a cél szekvenciához, valamelyik reagens hiányzik vagy nem működik, a ciklusos szekvenálás nem működik, ill stabil másodlagos szerkezetek alakultak ki a templáton.

N C N N N A N N N G N G
330

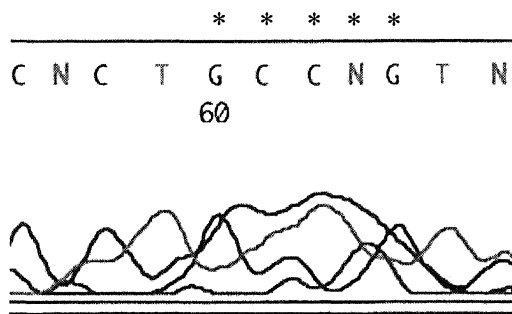


7. ábra. Nincs szekvencia, nagyon kicsik a csúcsok, nagy a zaj.

3. Több nukleotid egy pozícióban

Ha a templátban másodlagos szerkezetek alakulnak ki, akkor ezek a fragmentek eltérő sebességgel fognak vándorolni. Ilyen esetben látható, hogy különböző nagyságú DNS fragmentek szinte azonos sebességgel mozognak az elválasztás során. Ez a szekvencián azt eredményezi, hogy egy nukleotid pozícióban kettő vagy esetleg három nukleotid is látható. Az elválasztó közeg mintha összenyomódott (kompresszió) volna. Ennek az enyhébb formája, amikor két nukleotid csak nagyon közel kerül egymáshoz.

Ezt a jelenséget a képződő lánc végén a hajtúszerű hurok konfigurációk okozzák, és megszüntetése a korábban említett speciális módosított nukleotidok alkalmazásával lehetséges.



8. ábra. A *-al jelölt bpozíciókban több(2-4) nukleotid található

A zaj

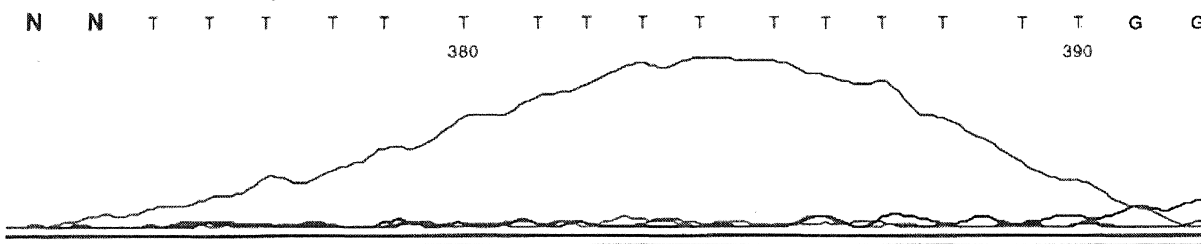
A zaj nagymértékben tudja csökkenteni a szekvencia olvashatóságát, különösen kicsi jelek esetén. A 'zajos' szekvenciát eredményezheti: nem kellő tisztaságú templátnál az, olyan anyagok, amelyek a szekvenálási reakció inhibitorai, a szennyezők lehetnek: kis molekulájú fehérjék, RNS, DNS. A leggyakoribb ok a templát nem kellő tisztasága. Ekkor úgy tűnik, mintha nagyon sok helyen heterozigóta lenne a templát. Különösen sok egymás utáni azonos nukleotid esetén az szekvenáló enzim ugrik (slipping) és ekkor nukleotid maradhat ki a szekvencián.

Téves leállítás (STOP)

Egy nukleotid pozícióban több esetenként mind a négy nukleotid csúcsa jelenik meg. Ennek fő oka a G,C-ben gazdag részek által kialakított másodlagos szerkezetek, amelyeket az enzim a templát végének vél ezért leáll, és a további nukleotidok hozzákötése a DNS szálhoz nem történik meg. Ennek kiküszöbölésére ajánlható: más eljárást választani, az ellenkező irányból történő szekvenálás, növelni a denaturációt, más helyen kötődő szekvenáló primer használata.

Széles vörös (T) csúcsok

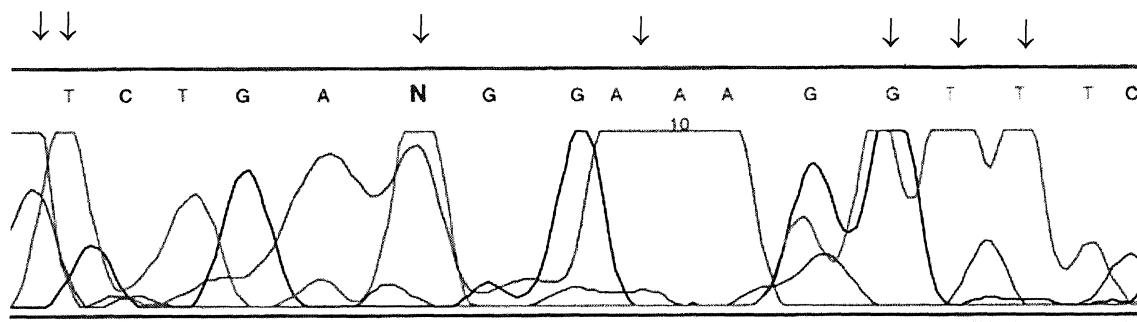
Különösen a szekvencia első harmadában széles több bázison áttartó óriás T csúcs. Ez egy artifaktum, amelynek kialakulása kellően nem tisztázott.



9. ábra. Széles vörös csúcsok sok egymás utáni helyen

Óriás csúcsok

A szekvencia főként első részén nagyon nagy csúcsok láthatók, amelyek alatt időnként az igazi szekvencia olvasható. Ennek a jelenségnek az oka a fel nem használt és el nem távolított fluoreszcens ddNTP.



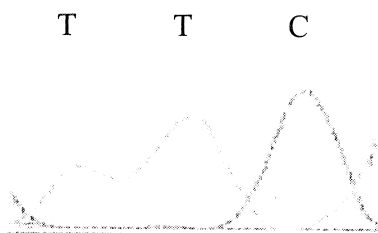
10. ábra. A ↓-al jelölt helyeken óriás csúcsok alakultak ki

Különböző csúcs nagyságok

A szekvencián az egyes csúcsok nem azonos nagyságúak és az azonos nukleotidok is különböző nagyságúak a szekvencia különböző részein. Ez a jelenség akkor okoz problémát, amikor a csúcs olyan kicsi lesz, hogy nehéz megkülönböztetni a zajtól. A jelenség ismerete a heterozigótáság megállapításánál nagyon fontos, mivel heterozigótáknál a két különböző nukleotid csúcsa azonos helyen eltérő nagyságú szokott lenni.

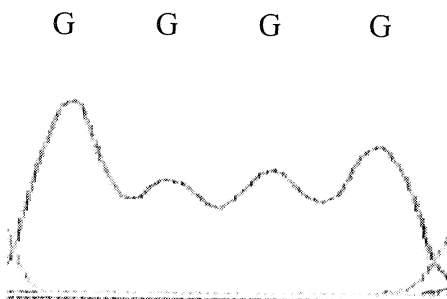
A következőkben néhány ismert gyakorlati jelentőségű példát mutatok be:

1. G utáni C kicsi lesz. Ez különösen látszik, ha több C követi a G-t.
2. Kettő vagy több T után a C nagyon nagy.



11. ábra. Két T utáni nagy C

3. Négy vagy több egymás utáni G esetében a harmadik kicsi lesz.



12. ábra. 4 G esetén a harmadik kicsi

MUTÁCIÓ KIMUTATÁSI MÓDSZEREK

Góth László

Mutációk és a betegségek kapcsolata

Betegségért/szindrómáért felelős mutáció

A cisztikus fibrózis génben a három nukleotid deléciója az 508-as pozícióban lévő fenilalanin hiányát okozza ($\Delta F508$) és a fehérje (klorid csatorna működése) csökkent működése révén az egész szervezetre kiható következményekkel jár (cisztikus fibrozis megbetegedés).

Benignus polimorfizmus

A kimutatott mutációnak 'nincs' klinikai relevanciája. Azonban az is lehetséges, hogy a klinikai relevanciákat még nem ismerjük, vagy még nem tudtuk kapcsolatba hozni a mutációval. A kataláz enzim hiányát okozó mutációk már ismertek voltak, de a klinikai tünetek hiánya miatt benignus polimorfizmusnak tartották őket. A klinikai tünetek ismeretében viszont már a szindrómáért felelős mutációként tartjuk nyilván őket. A benignus polimorfizmust genetikai értelemben akkor is használjuk, amikor olyan mutációt(kat) takar, amelyek genetikailag még nem mutathatók ki azon egyéneknél akiknél a klinikai relevanciák megtalálhatók.

Kockázati (risky) mutáció.

Olyan mutáció, amely a betegség kialakulását nem okozza, de a betegség kialakulásához hozzájárul a jelenléte. A trombózis hajlam ("készség") nagyobb azoknál az egyéneknél, akik a véralvadás V-ös faktorának Leiden-típusú mutációját hordozzák. A mutáció szűrési eljárások során keressük a betegséget/szindrómát okozó mutációt, vagyis a mutáció \Rightarrow elváltozás / betegség kapcsolatot derítjük fel

Mutáció szűrési módszerek

Linkage analízis

Eltérő DNS polimorfizmusokat keresünk a beteg és a kontroll DNS-ében. Ezt az eljárást akkor alkalmazzuk, amikor a betegség ismert, de ennek sem a génje sem a gén mutációja nem ismert. Az eljárás során a genomi DNS-t például különböző restrikciós enzimekkel emésztjük és a kapott fragmentek nagyságszerinti eloszlást vizsgáljuk. Keressük azokat az eseteket, amikor a kontroll és beteg DNS fragment polimorfizmusa eltérő. Ha ez az eltérés minden betegnél kimutatható akkor ez a módszer már a diagnosztikához felhasználható, annak ellenére, hogy sem a gént sem annak mutációját nem azonosítottuk.

Ismert mutáció kimutatása

Ezt a vizsgálatot annak eldöntésére végezzük, hogy az illető a kérdéses megbetegedésben szenved-e vagy annak kockázatát hordja-e a génszerkezetében. Ez a leggyakrabban használt eljárás, amit több példán keresztül (cisztikus fibrozis, izomdisztrófiák, véralvadási faktorok...) is részletesen tárgyalunk.

A betegségért felelős mutáció keresése

A vizsgálat során keressük az adott betegségben szenvedők adott génjében azt/azokat a mutációkat, amelyek csak a betegeknél mutathatók ki.

A betegségért felelős mutáció(k) keresési stratégiája

Az ismert gén ismeretlen mutációjának kimutatására a nukleotid szekvencia analízis (szekvenálás) tűnhet a legjobb megoldásnak. A szekvenálás azonban több tízezres nukleotid hosszúságnál technikailag is nehezen valósítható, nagyon költséges lenne, és természetesen a teljes gén izolálását igényelné. Ehelyett a következő stratégiát alkalmazzuk.

1. A gén adott szakaszait (exon és határoló intronok egy része, 5' és 3' végek) PCR reakcióval amplifikáljuk.

2. Az így nyert DNS-ben mutáció szűrési eljárásokkal mutációt keresünk/mutatunk ki.

3. A mutációt nukleotid szekvencia analízissel azonosítjuk.

4. Vizsgáljuk, hogy a talált mutáció benignus polimorfizmus vagy a betegségért felelős mutáció

5. Vizsgáljuk a mutáció hatását a DNS szekvenciára, aminosav összetételre, fehérje szerkezetre, és keressük a megváltozott fehérje által okozott biokémiai- klinikai- eltérések magyarázatát.

Mutáció szűrési eljárások

Denaturáló grádiens gél elektroforézis (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis: DGGE) és hőmérséklet grádiens gél elektroforézis (Temperature Gradient Gel Electrophoresis)

Ezeknél az eljárásoknál a kétszálú DNS-t denaturállással (denaturáló ágens: urea, formamid, hőmérséklet) egyszálúsítjuk. Grádiens gélben a vad és mutáns egyszálú DNS-ek összetételüknek következtében eltérő konformációt (alakzatot) vesznek fel és ez a gélben különböző vándorlási sebességüket eredményezi. Az elválasztás hatékonyságát a gél grádiense tovább növeli. Egy nukleotid cseréje például a T_M (olvadáspont)-ben akár 1 – 6 °C különbséget is eredményezhet.

A denaturáló grádiens gél elektroforézis lépései a következők. Elektroforézis: denaturáló grádiens gélben, majd a DNS detektálása (ethidium bromid, ezüstözési technikával) és értékelés. A módszer érzékenysége növelhető, ha egyik primerhez guanin-citozinban gazdag szekvenciát (GC kapocs) kapcsolunk. A módszerrel akár 1000 bp nagyságú fragmentben 1 nukleotidcsere is kimutatható, de hátránya, hogy speciális készüléket igényel a grádiens kialakításához.

Egyszálú DNS konformációs változatai (Single Strand Conformational Polymorphism: SSCP)

Az elektroforézis előtt a DNS –t egyszálúsítjuk denaturáló körülmények között magas hőmérsékleten urea, formamid jelenlétében. Ezután gyors hűtéssel ezt az állapotot fenntartjuk és poliakrilamid gélben választjuk el a mutáns és a vad allélokot. A mutáns DNS eltérő szekvenciája miatt eltérő konformációt vesz fel és eltérő alakja miatt eltérően fog vándorolni.

Az SSCP kivitelezése: a DNS egyszálúsítása, PAGE elektroforézis, majd detektálás radioaktív, vagy ezüstözési eljárással. Az ethidium-bromidos festés nem alkalmas egyszálú DNS detektálására.

Különös műszert nem igényel, de az optimális feltételek (hőmérséklet-futtatási-, denaturálási- idő, gél összetétel, minta koncentráció) empirikus megválasztást igényelnek minden mintához és mutációhoz. A 200 bp alatti PCR termékek esetén 80 – 90 % hatékonyságú. Hátrányai: az eseti körülményeket ki kell választani, nehézkes a hatékony egyszálúsítás, és metastabil konformerek képződhetnek, amelyek a kiértékelést nehezíthetik.

Heteroduplex analízis

Olyan körülményeket alakítunk ki, hogy a vad – vad*, mutáns – mutáns* homoduplex dimereken kívül vad – mutáns* és vad* – mutáns heteroduplex –ek is ki tudjanak alakulni. Az utóbbiak mivel nem teljesen komplementerek, nem illeszkednek pontosan egymáshoz, így nagyobb térfogatúak lesznek, aminek következtében lassabban fognak vándorolni.

A heteroduplex analízis kivitelezése: hőkezelés: magas hőmérsékleten ahol egyszálúsítás történik, majd lassan hűtjük le az elegyet, hogy a heteroduplexek is kialakuljanak. Ezután poliakrilamid gélelektroforézist végzünk speciális MDE (Mutation Detection Enhancement) gélben, és a DNS-t láthatóvá tesszük (ethidiumbromid, ezüstözés, Sybro-Gold).

A módszer érzékenysége 200 – 600 bp esetén 80%-os. A módszer hátránya az, hogy speciális (drága) gélt igényel, a heterozigotáság mutatható ki közvetlenül (heteroduplex csak ekkor tud kialakulni), míg homozigotáság csak "manipuláció" után detektálható.

Heteroduplexek vágása

(Cleavage Fragment Length Polymorphism: CFLP)

Mutáció esetén a nem illeszkedő (nem komplementer) heteroduplexek a nem komplementer helyen vágási helyet produkálnak, amit különböző módszerekkel lehet kimutatni.

a. Kémiai módszerrel történő vágás: a hidroxilamin – a citozint, az ozmiumtetraoxid – a timint módosítja, ezután a mellettük lévő foszfodiészter kötés piperidinnel vágható. A módszer nagy hatékonyságú (~ 100 %), de toxikus anyagokat igényel a módosításhoz és a vágáshoz.

b. Enzimatis (bakteriofág endonukleáz) módszerrel történő DNS vágás a nem komplementer helyeken. Az így kapott DNS fragmenteket elektroforézissel választjuk szét. A mutáció itt is vágási helyet tehet tönkre, aminek eredménye a kevesebb fragment, vagy vágási helyet hozhat létre, ami viszont több fragmentet eredményez. 100 – 1 500 bp esetén 70– 80 % -os a módszer érzékenysége. Az eljárás hátránya az, hogy nem specifikus.

c. Speciális enzimmel (Cleavase I a) történő vágás (Cleavage Fragment Length Polymorphism: CLFP). A cleavase I a egy olyan endonukleáz, amely a hajtűszerű hurkoknál hasítja a DNS –t. Mutáció esetén megváltozik a hajtűszerű hurkok száma, azaz a vágási helyeké, ami eltérő számú fragmentben jelentkezik az elektroforézis után.

Mismatch binding proteinek kötődésén alapuló eljárás

Az *E.coli* DNS javító rendszerének mutS proteinjé kötődik a kétszálú DNS –en a nem illeszkedő (mutáns) nukleotidokhoz. Ez a kötődött enzim megnöveli a DNS tömegét (DNS + mutS) és módosítja alakját is, ami jelentősen megváltozott vándorlási sebességét fog eredményezni a gélanalízis során. Új eljárás, amely heteroduplexek kimutatására alkalmas.

Protein Truncation Test (PTT)

A mutáció fehérje szinten történő detektálása; trunkált: csökkent értékű azaz kisebb hosszúságú, vagy normál hosszúságú, de a feladata végzésére nem alkalmas fehérje kimutatására irányul. Jól használható ha a mutáció egy STOP kodont generál (UAA, UAG, UGA, UGG) és rövidebb hosszúságú peptid – protein képződik, amit detektálunk.

A PTT teszt lépései: Hosszú (1-3 kb) PCR termék előállítás jelzett (biotin*) primerrel, majd ennek átírása RNS-sé és ezután az RNS transzlációja peptiddé/fehérjévé. A

képződött fehérje hosszúságának meghatározása poliakrilamid gélelektroforézissel és kemilumineszcenciás detektálással. Ezt az eljárást sikerrel alkalmazták például az ACP (Adenomatous Polyposis Cole) gén mutációjának meghatározására.

A mutáció azonosítása nukleotid szekvencia analízissel

Ha a fenti mutáció szűrési eljárásokkal mutációt tudunk kimutatni, akkor a kérdéses gén szakaszról PCR segítségével másolatokat készítünk. A PCR termék azonosságát (nagyságát), és tisztaságát ellenőrizzük, és ha szükséges megtisztítjuk a nem specifikus (nem a templátunkról képződött) termékektől, és ezután történik a nukleotid szekvencia meghatározás. A szekvenálást mindkét irányból (5'⇒3' és 3'⇒5') el kell végezni és két szekvenálási eredménynek meg kell egyeznie. A mutáns és a kontroll szekvenciáját összehasonlítva állapíthatjuk meg a mutáció jelenlétét. Sokszor a teljes gént szekvenálása helyett az exonok és határoló intronok egy részének, az 5' és 3' végnek a vizsgálata elegendő a mutáció kimutatására, és annak kizárására, hogy további mutációk nincsenek.

A leggyakoribb mutációk és megjelenésük/megtalálásuk a szekvenciában

A szekvencián a nukleotidok különböző színnel jelennek meg: T(Timín) piros, A(Adenin) zöld, G(Guanin) fekete és C(Citozin) kék. A készülék software azonosítás után a megfelelő színnel rajzolt csúcs fölé a nukleotid nagy kezdőbetűjét írja ki. Ha azonos pozícióban több nukleotid vagy azonos nagyságú zaj csúcs található akkor ezen a helyen nagy fekete N betű jelenik meg.

A szekvencia értékelésekor a legelső teendő, hogy azt először alaposan szemügyre vesszük. Ha sok N jelzés (a program a kérdéses helyen nem egy nukleotidot hanem több nukleotidot, zajt talál), akkor szekvenálási hibára gondolunk. Ha ezt ki tudjuk zárni, és a szekvencia egyik része (eleje vagy vége) jól olvasható, akkor nukleotid(ok) beépülésével vagy deléciójával állunk szemben.

Ha csak egy N látható, amit két nukleotid okoz, és a szekvenálási hiba kizárható, akkor heterozigotáság a felelős a jelenségért.

Ha a szekvencia egész terjedelmében jól olvasható és nem tartalmaz N-t, akkor nukleotidonként kell az egész szekvenciát a cél szekvenciával összehasonlítani. Ekkor az eredmény lehet vad típus vagy homozigóta mutáns.

Az előzetes tájékozódás után minden esetben nukleotidonként kell az egész szekvenciát a cél szekvenciával összehasonlítani.

Heterozigotáság kimutása

Mivel a szekvenciában a nukleotidok csúcsai nem azonos nagyságúak, ezért a heterozigotáság sem úgy mutatkozik, hogy két azonos nagyságú, de a többi nukleotidhoz képest fele nagyságú nukleotid jelenik meg egy pozícióban. Az előző fejezetben leírt csúcsmagasság változások magyarázzák ezt a jelenséget. Általában nem ismert a homozigóta mutáns szekvencia. A vad szekvenciából a mutáns helyen lévő nukleotid csúcs területe megbecsülhető (~50%). Ezután a heterozigóta helyen lévő másik nukleotid csúcs nagyságát is megbecsüljük. Ha ez egyezik a homozigóta szekvenciák alapján várt aránnyal, akkor biztosan lehetünk abban, hogy egy heterozigóta mutációt derítettünk fel. Az értékelést zavarja a nagy zaj/jel arány, a nukleotid csúcsok nagyságának változása és az esetleges vándorlási problémák miatt fellépő kompresszió.

Előfordulhat, hogy a homozigóta olyan előzetes nukleotidot tartalmaz, amely után a nukleotid nagyon kicsi csúcsot eredményez. Ha ez a heterozigóta helyen található, akkor az 50%-os nagyságú csúcs olyan kicsi lesz, amely már megkülönböztethetetlen a zajtól. Az ellenkező eset, az amikor a kérdéses helyen nagyon nagy csúcs jelenik meg. Ennek a nagy

Egy másik csőben a mutáns gén keresése történik a mutációnak megfelelő komplementer nukleotiddal.

MUTÁNS

nukleotid --GACAGGC A AGGAATA

↑↑↑↑↑↑↑

+ próba CTGTCCG

+ jelzett dT*TP + DNS polimeráz

CTGTCCG←T* és a fluoreszcencia mérhető, ami csak a mutáns allél esetében jelentkezik.

Fluoreszcencia detektálása alapján történik az értékelés az alábbi séma szerint:

Vad típus:

az első csőben (vad allél detektálás) ++

a második csőben (mutáns allél) --

Homozigóta mutáns:

az első csőben --

a második csőben ++

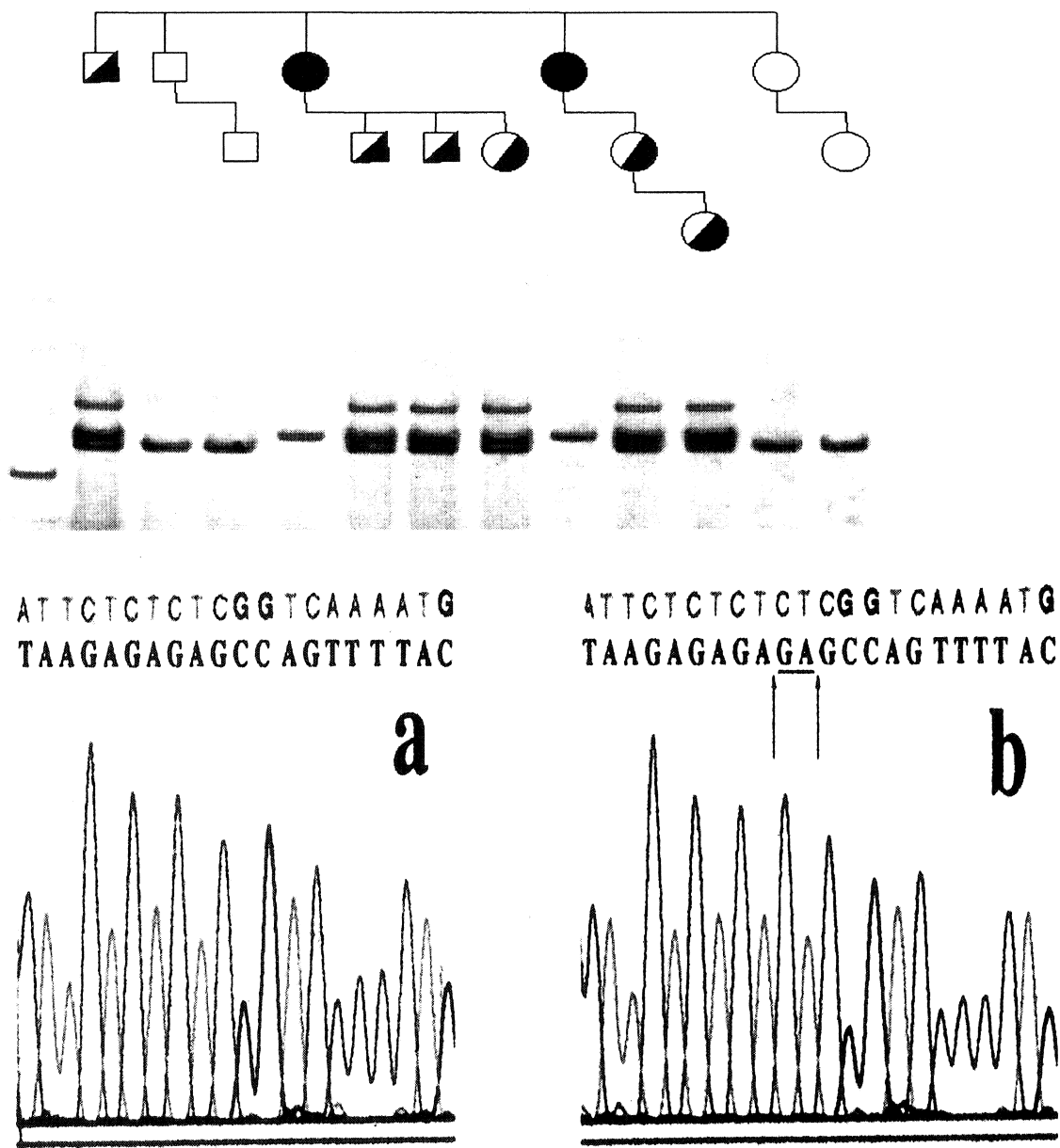
Heterozigóta mutáns:

az első csőben +

a második csőben +

Betegséért felelős mutáció vagy benignus polimorfizmus?

A kérdés eldöntéséhez vizsgálni kell a genotípus-fenotípus összefüggést. Ha a mutáció a betegségért/szindrómáért felelős mutáció, akkor minden érintett egyénnél kimutatható homozigóta vagy heterozigóta formában, és minden olyan családtagnál aki a szindrómában/betegségben nem szenved a mutáció nem mutatható ki. Az utóbbi megerősítésére célszerű megvizsgálni azt is, hogy a mutáció kontroll populációban sem legyen kimutatható. Ha a fenti feltételek együttesen nem állapíthatók meg, akkor benignus polimorfizmusról beszélünk. A folyamat plauzibilissé tételére egy olyan ábra/pedigri a legalkalmasabb, amelynél a felső sorban a klinikai tünetek által definiált pedigri, a középső sorban a mutáció szűrési eljárás eredménye, míg a legalsó sorban a nukleotid szekvenciák azon részei láthatók, amelyek a mutációt tartalmazzák min ahogyn azt a 2. ábra mutatja.



2. ábra. Betegségért felelős mutáció kimutatása

A legfelső sor a klinikai enzimológiai vizsgálat alapján definiált pedigré.

A középső rész a PCR-heteroduplex analízist mutatja. A vad típusnál (üres jelek) egy gyorsab sáv, a homozigóta mutánsnál (tele sötét jelek) egy lassúbb sáv, míg a heterozigótáknál (félíg sötét jelek) a két gyorsabb homoduplex (nem szétválva) és a két lassúbb heteroduplex sáv látható. Az enzimológiai és mozgékonyágbeli eltérések teljes összhangban vannak.

Az ábra alsó részén a nukleotid szekvencia analízis eredménye látható.

a: vad típus a TC(GA) ismétlődésből 4 látható

b: homozigóta mutáns, a CT(GA) ismétlődésből 5 látható.

A mutáció CT(GA) beékelődés révén alakult ki.

REKOMBINÁNS FEHÉRJÉK ELŐÁLLÍTÁSA

Farkas Ilona

A rekombináns DNS technikák kifejlődésével lehetővé vált peptidek és fehérjék termeltetése megfelelő gazdasejtben, a klónozott gének (vagy cDNS-ek) expressziója révén.

A génexpresszió célja

A rekombináns fehérje előállítása többféle célból történhet:

1. a gén azonosítása érdekében, annak bizonyítására, hogy a gén egy adott fehérje szintézisét irányíthatja;
2. a sejtekben rendkívül kis koncentrációban előforduló fehérjék homogén formában való előállítására, antitest termeltetése, a fehérje szerkezetének vizsgálata (röntgenkristallográfia, NMR), biológiai szerepének tanulmányozása céljából;
3. a génekben előidézett mutációk hatásának vizsgálatára;
4. gyógyászati, mezőgazdasági, ipari felhasználás céljából (pl. humán inzulin, vakcinák).

Expressziós rendszerek

Rekombináns fehérjék előállítása prokarióta és eukarióta sejtekben egyaránt történhet. Bár már számos törvényszerűséget ismerünk, az expresszió ma még nem tekinthető teljesen egzakt tudománynak, a gyakorlat dönti el, melyik rendszer a legalkalmasabb egy adott gén kifejezésére.

Legelterjedtebbek az *Escherichia coli* expressziós rendszerek viszonylagos egyszerűségük, olcsóságuk, kis időigényük következtében. A baktérium képes lehet az összes fehérje 50%-át elérő mennyiségű idegen fehérjét termelni. Az *E. coli* által készített eukarióta fehérjék posztranszlációs módosítása (acilezés, metilezés, foszforiláció, glikozilezés, specifikus proteolitikus hasítások, oligomerizáció) azonban elmarad, és a nagy koncentrációban keletkező idegen fehérjék oldhatatlan aggregátumokat képezhetnek, amelyeket denaturáló szerekkel szolubilizálva, majd óvatosan renaturálva lehet csak aktív formában tisztítani.

Az eukarióta expressziós rendszerekben megtörténhet a rekombináns fehérje sokféle posztranszlációs módosítása és szekréciója is. Rekombináns emlős fehérjék emlős sejtekben termeltetve várhatóan a natív fehérjével hasonló biológiai aktivitással rendelkeznek, az emlős expressziós rendszerek hátránya viszont költségességük, az expresszió viszonylag alacsony szintje, továbbá a rekombináns fehérjékhez hasonló (vagy velük azonos) endogén fehérjék zavaró hatása.

Fehérje termeltetés *Escherichia coli*-ban

Mivel az eukarióta gének átiratából a baktériumban nem hasadnak ki az intronok, eukarióta fehérjék termelése a gén helyett a mRNS-ről reverz transzkriptázzal készített komplementer DNS (cDNS) kifejezésével történik. Az expressziós vektor rendszerint plazmid, amely általában a következő elemeket tartalmazza:

- (1) replikációs origó,
- (2) szabályozható prokarióta transzkripciós promoter, mely indukció hatására nagymennyiségű mRNS szintézisét teszi lehetővé,
- (3) riboszóma-kötőhely és megfelelő helyzetű transzlációs startkodon,

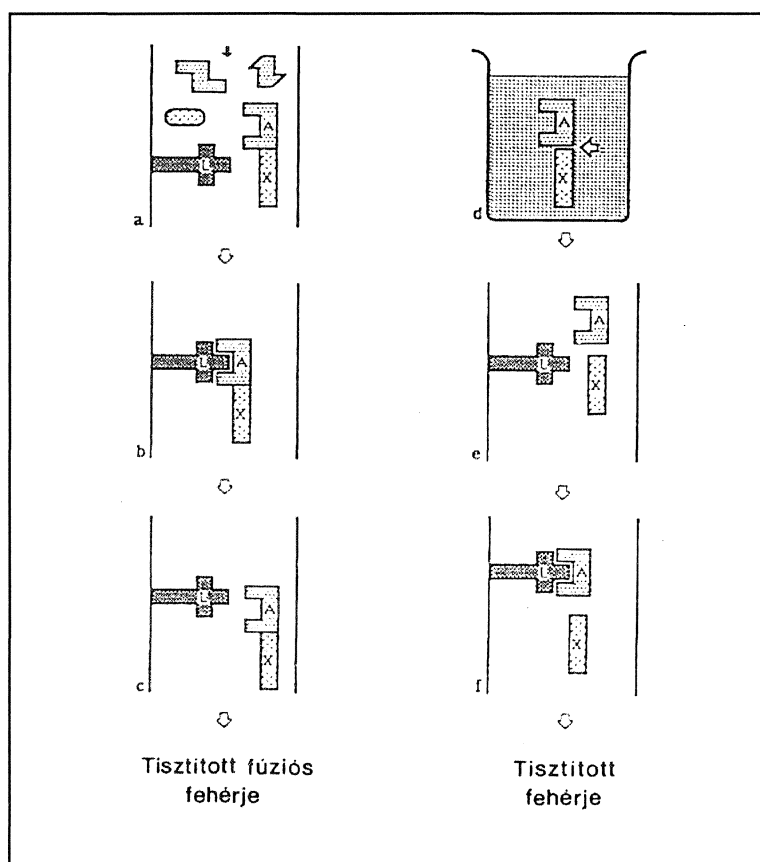
(4) polilinker, egyedi restriktióenzim-hasítási helyekkel, a cDNS beillesztése céljából,

(5) transzkripció terminátor és

(6) szelekciós marker (antibiotikumrezisztencia-gén).

A cDNS-t az olvasási keret megtartásával úgy illesztik a plazmidba, hogy második kodonja az iniciátor ATG után következzen. A cDNS rendszerint tartalmazza a transláció stopkodont is.

A rekombináns fehérje termelése történhet a natív fehérjéhez hasonló formában, valamint N-vagy C-terminális végén megfelelő peptidszakasszal meghosszabbított alakban is. A fúziós fehérje gyakran nagyobb koncentrációban termelődik és jobban ellenáll a baktériumsejtekben működő proteázoknak, mint a natív fehérje. Másik előnye, hogy a fúziós peptidszakasz – pl. az ellene termelt antitest felhasználásával - lehetővé teszi a fehérje detektálását, vagy egyszerű tisztítását affinitás-kromatográfia segítségével (1. ábra). A fúziós peptidszakasz eltávolítása kémiai módszerekkel vagy enzimekkel történhet. Az expressziós plazmidok egy része ezért tartalmaz fúziós peptidet kódoló nukleotidszekvenciákat, valamint a lehasítást katalizáló proteázok felismerési helyét kódoló szekvenciákat is.



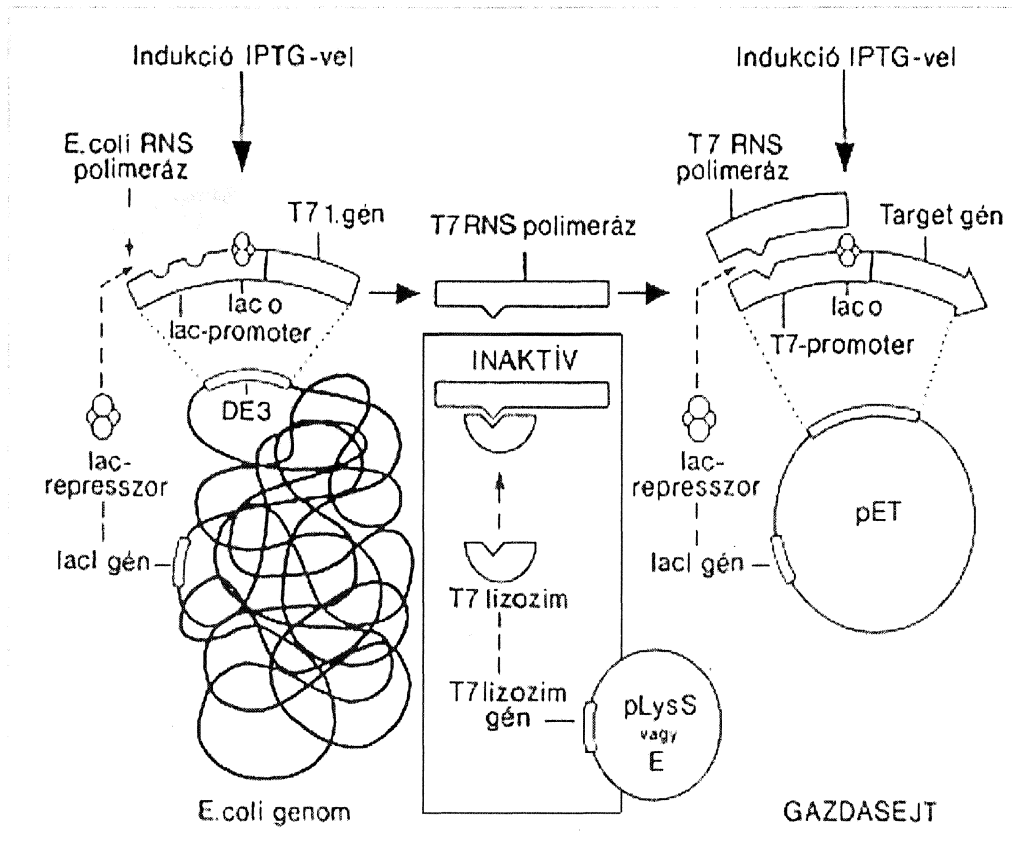
1. ábra. Fúziós fehérje affinitáskromatográfás tisztításának elve.

Az X génterméket AX fúziós fehérjeként termelő baktérium nyers kivonatát olyan oszlopra viszik fel, amely az A peptidet specifikusan kötő L ligandumot tartalmaz immobilizálva (a). Az oszlop megköti az AX fúziós fehérjét (b). Megfelelő eluálószerrel tisztított fúziós fehérjét kapnak (c). A fúziós fehérjéről lehasítják az A peptidszakaszt (d), majd az oldatot újra az oszlopra viszik (e). Az oszlopon átfolyó oldat tiszta X fehérjét tartalmaz (f).

A rekombináns fehérjét termelő baktériumtörzset úgy választják ki, hogy a generációs idő rövid legyen, az expresszió pedig lehetőleg nagy koncentrációjú és oldható fehérjét eredményezzen. A termelt fehérje baktériumban való hasításának elkerülése érdekében előnyös proteázhiányos *E. coli* törzseket használni.

A T7 RNS polimeráz/ promoter rendszer

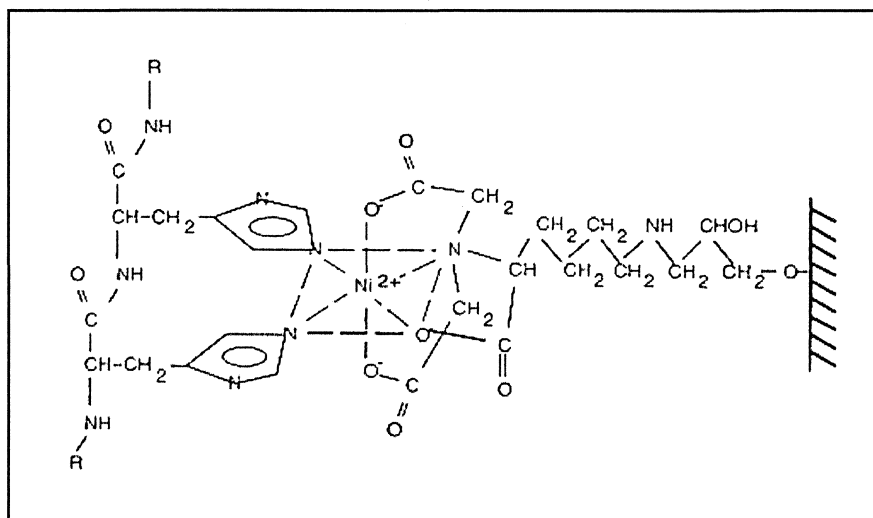
Rekombináns fehérjék *E. coli*-ban való termelésére a pET vektorok (pET: plasmid for Expression by T7 RNA polymerase) bizonyultak eddig a legalkalmasabbnak. A pET expressziós rendszerek (2. ábra) a T7 bakteriofág igen aktív RNS polimerázára épülnek, amely saját promoterére rendkívül szelektív.



2. ábra. A pET-rendszer szabályozási elemei

A kifejezni kívánt gént ill. cDNS-t a T7 promoter és a *lac*-operátor mögé illesztik be a T7 transzkripció/expressziós régióban. A plazmid tartalmazza a *lac*-represszort kódoló szekvenciát is (*lacI*) ellenkező orientációban. A T7 RNS polimerázt kódoló gén (T7 1) a *lacUV5*-promoter szabályozása alatt az *E. coli* gazdatörzs genomjába van beépítve (DE3). Indukció nélkül a *lac*-represszor egyaránt gátolja a T7 RNS polimeráz gén *E. coli* RNS polimeráz által történő átírását, valamint a plazmidba épített gén (cDNS) transzkripcióját (amelyet a T7 RNS polimeráz végez). IPTG (izopropil-1-tio- β -D-galaktózid) hatására megszűnik a *lac*-represszor hatása és megindul a polimeráz, majd az expresszálni kívánt gén transzkripciója és a fehérje szintézise.

A gyakorlatban egy kevés rekombináns fehérje indukció nélkül is termelődhet. Ha a géntermék a baktérium számára toxikus, a T7 RNS polimeráz alapaktivitását inhibitorával, a T7 lizozimmal csökkentik. A gazdasejtek ebben az esetben olyan másik expressziós plazmidot is tartalmaznak, amelybe a T7 lizozim gént építették be.



4. ábra. 6xHis fúziós fehérjék kötődése Ni²⁺-NTA-agaróz gyantán

Glutation-S-transzferáz-fúziós fehérje termeltetése

A pGEX vektorokba illesztett cDNS-ről a rekombináns fehérje az aminoterminálison a *Schistosoma japonicum* 26 kD méretű glutation-S-transzferáz (GST) enzimével összekapcsolódva termelődik a baktériumokban. A GST-fúziós szekvencia általában megnöveli a termelt fehérje oldhatóságát. A rekombináns fehérje a baktériumsejtek lízise után a kivonatból immobilizált glutationt tartalmazó gyantához kötve egyszerűen tisztítható. A nem specifikusan kötődő molekulákat a gyanta pufferrel való mosásával eltávolítják, majd a fúziós fehérjét redukált glutationnal eluálják.

Fluoreszcens fúziós fehérjék

Az *Aequorea victoria* medúzában található zöld fluoreszcens fehérje (green fluorescent protein: GFP) forradalmi jelentőségű riportermolekulának bizonyult. A GFP ultraibolya vagy kék fényvel megvilágítva gerjesztődik, majd zöld színű fényt emittál. A GFP specifikus mutációival fokozható a fluoreszcens fény intenzitása.

GFP-fúziós fehérje termeltetése révén az expresszált fehérje fajtól függetlenül közvetlenül, további fehérje, szubsztrát vagy kofaktor hozzáadása nélkül detektálható a különféle gazdasejtekben, így lehetőség van a génexpresszió tanulmányozására, a fehérje egyszerű detektálására, sejten belüli *in vivo* lokalizációjára.

Az expressziós kísérlet jellemző lépései

1. Az expressziós plazmidba az olvasási keretnek megfelelően be kell illeszteni a cDNS-t. A konstrukció ellenőrzésének szokásos módszerei: (a) plazmid DNS tisztítása és restriktációs térképezése; (b) az illesztési szakasz szekvenálása; (c) a baktériumkolóniák szűrése szilárd táptalajról nitrocellulóz membránra való átvitel és lízise után a rekombináns fehérje elleni antitesttel.

2. A rekombináns plazmidot tartalmazó baktériumot kis térfogatú (néhány ml-nyi) folyékony táptalajon tenyésztve indukálják az expressziót. A sejtek ülepítése, megfelelő pufferben történő lízise után általában SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel és Western blot technikával vizsgálják a homogenizátumot és annak centrifugálás után kapott felülúszóját, amely az oldható fehérjéket tartalmazza. A termelt fehérje jelenlétére biológiai aktivitása is utalhat, ezért enzimek esetében aktivitásméréseket is végeznek.

3. Expresszió nagyobb méretben. A rekombináns fehérjét termelő baktériumok exponenciális fázis közepén tartó, nagyobb térfogatú tenyésztésben indukálják az expressziót, majd további 2-5 órán át folytatják a tenyésztést. A baktériumsejtek kivonatában az előzőek szerint vizsgálják az expresszió szintjét. A tenyésztés hőmérsékletét, a táptalaj összetételét stb. változtatva megkeresik a rekombináns fehérje termeltetésének optimális körülményeit.

4. Az expresszált fehérje tisztítása.

Expresszió *Saccharomyces cerevisiae*-ben

Az élesztők kiváló gazdarendszerek rekombináns eukarióta fehérjék termeltetésére, mivel egyszerűen, olcsón és gyorsan tenyészthető egysejtű eukarióták, amelyek a termelt fehérjék szekréciójára és sokféle olyan poszttranszlációs módosítására is képesek, mint a magasabbrendű eukarióták. Az élesztősejtek 120 kDa-nál nagyobb molekulatömegű fehérjét is termelhetnek, amelyre a baktériumsejtek nem alkalmasak. Elsősorban a *Saccharomyces cerevisiae* expressziós rendszerek terjedtek el.

A *S. cerevisiae* a ill. α párosodási típusú haploid sejtek, vagy az ivaros szaporodás eredményeként kialakuló a/α diploid sejtek formájában tenyészthető. Fermentálható szénforrás és nitrogéntartalmú tápanyag hiányában a diploid sejtek meiózison mennek keresztül. A keletkező tetrádok négy-négy haploid spórát tartalmaznak, amelyek izolálhatók, szaporíthatók és genetikai vizsgálatokkal elemezhetők. Viszonylag egyszerű olyan törzseket létrehozni, amelyek alkalmasak idegen gén nagy mennyiségben történő kifejezésére.

Élesztő plazmidok

Az általánosan elterjedt élesztőplazmidok ingázóvektorok (shuttle vectors), azaz baktériumban és élesztőben egyaránt használhatók. *E. coli* vektorok származékai, bakteriális replikációs origót és antibiotikum-rezisztenciagént tartalmaznak (ld. Élesztősejtek transzformálása).

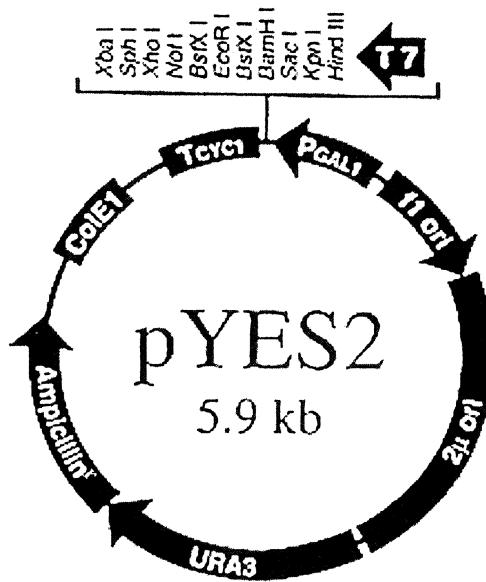
Az integrálódó élesztőplazmidokban (YIp) nem található élesztő replikációs origó. A plazmidokban levő élesztőszekvencia és az élesztőkromozómában levő homológ szekvencia rekombinációja révén épülnek be a genomba, ahol stabilan megmaradnak és a kromoszóma részeként replikálódnak. Az élesztőgenom rendszerint egyetlen kópiát tartalmaz belőlük.

Az élesztő centroméras plazmidokban (YCp) van replikációs origó, továbbá egy centroméra szekvencia, amely lehetővé teszi, hogy a plazmidok önállóan replikálódjanak és a mitózis során kis kópiaszámban stabilan fenntarthatók legyenek az élesztősejtekben.

Az élesztő episzómális plazmidok (YEp) a *S. cerevisiae* 2 μ m-es gyűrűnek nevezett plazmidjának szekvenciáját tartalmazzák, amelynek révén kromozómán kívül replikálódnak és sejtenként 50-100 kópiaszámban viszonylag stabilan megmaradnak az utódsejtekben. Ha egy klónozott gén nagymértékű kifejezése a cél, YEp vektorokat szoktak választani.

Mindegyik plazmid tartalmaz egy *S. cerevisiae* markergént (pld. *URA3*, *LEU2*, *LYS2*, *TRP1*, *HIS3*). A gyakran használt *URA3* gén az uracil bioszintéziséhez szükséges orotidin-5'-foszfát-dekarboxilázt kódolja (5. ábra). A gazdasejtben a markerként használt gén működésképtelen (*ura3-52*), ezért nem tud uracilt szintetizálni. A plazmid *URA3* génje komplementálja a sejt uracil auxotrófiáját.

Az expressziós plazmidok jelentős részében nem található külön iniciációs kodon. Az 5'-irányban nem kódoló régió egy részét is tartalmazó gént a plazmidba illesztve a transzláció a gén saját startkodonjával kezdődik. A kódoló szakasz 3'-végének közelében az expressziós vektor általában transzkripció terminátor szekvenciát tartalmaz (*T_{CYC1}* a *pYES2* vektorban, 5. ábra).



5. ábra. A pYES2 vektor felépítése és restrikciós térképe (Invitrogen). A plazmid a *S. cerevisiae* GAL1 gén 5'-aktivátor és promoter szekvenciáit, a CYC1 gén transzkripció terminációs szignálját, a 2 μ plazmid replikációs origóját és az URA3 markergént tartalmazza élesztőben történő expresszió céljából. Az ampicillinrezisztenciagén és a ColE1 origó a plazmid baktériumban nagy kópiaszámban való replikációjához szükséges.

Az *E. coli* vektorokhoz hasonlóan az élesztő plazmidok egy része fúziós fehérje termelését teszi lehetővé. A fúziós szakasz gyakran egy kisméretű antigén epitópja, amely a kereskedelmi forgalomban lévő antitesttel detektálható, a tisztítást megkönnyítő hexahisztidin, glutation-S-transzferáz, illetve a fehérje szekréciját biztosító szignál-szekvencia.

Konstitutív és szabályozható expresszió

Az élesztő expressziós vektorokba épített promoterek egy része az élesztőből származik (homológ), mások pedig vírusokból, növényekből vagy állatokból (heterológ promoterek). A homológ promoterek általában hatékonyabbak. Egy részük a szabályozott gén állandó, magas szintű expresszióját biztosítja. A gyakran alkalmazott konstitutív élesztő promoterek közé tartozik a foszfoglicerát kináz (*PGK*), a gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz (*GAP491*), alkohol dehidrogenáz 1 (*ADH1*) gén promotere, amelyek jól használhatók nem-élesztő gének transzkripciójának irányítására. Ha az idegen fehérje állandó termelése károsítja a gazdasejtet, célszerű indukálható expressziós rendszert választani.

Az élesztő expressziós vektorok indukálható promotereinek többsége a táptalaj összetételében bekövetkező változásokkal szabályozható, és így elérhető, hogy a kívánt méretű sejtpopuláció létrejötte után kezdődjön csak meg a heterológ gén expressziója. A galaktóz anyagcsere *GAL1*, *GAL7*, *GAL10* géneinek promotere galaktóz hatására, glikóz távollétében mintegy 1000-szeres mértékben indukálódik. A galaktokinázt kódoló *GAL1* gén promotere tartalmazza a pYES2 vektor (5. ábra).

A szabályozás központi eleme a *GAL4* gén által kódolt transzkripció aktivátor (Gal4p), antagonistája, a *GAL80* géntermék (GAL80p), továbbá a Gal3p fehérje. A Gal4p a szabályozása alatt álló gének promotereiben levő 5'-aktivátor szekvenciákhoz kötődik és transzkripció aktivátor doménjével elősegíti, hogy a TFIIB az általános transzkripció faktorok komplexébe épüljön, ily módon aktiválja a transzkripciót. Galaktóz hiányában a Gal4p kötődik ugyan a DNS-hez, de nem segíti elő az átírást, mert a Gal80p a Gal4p aktivátor

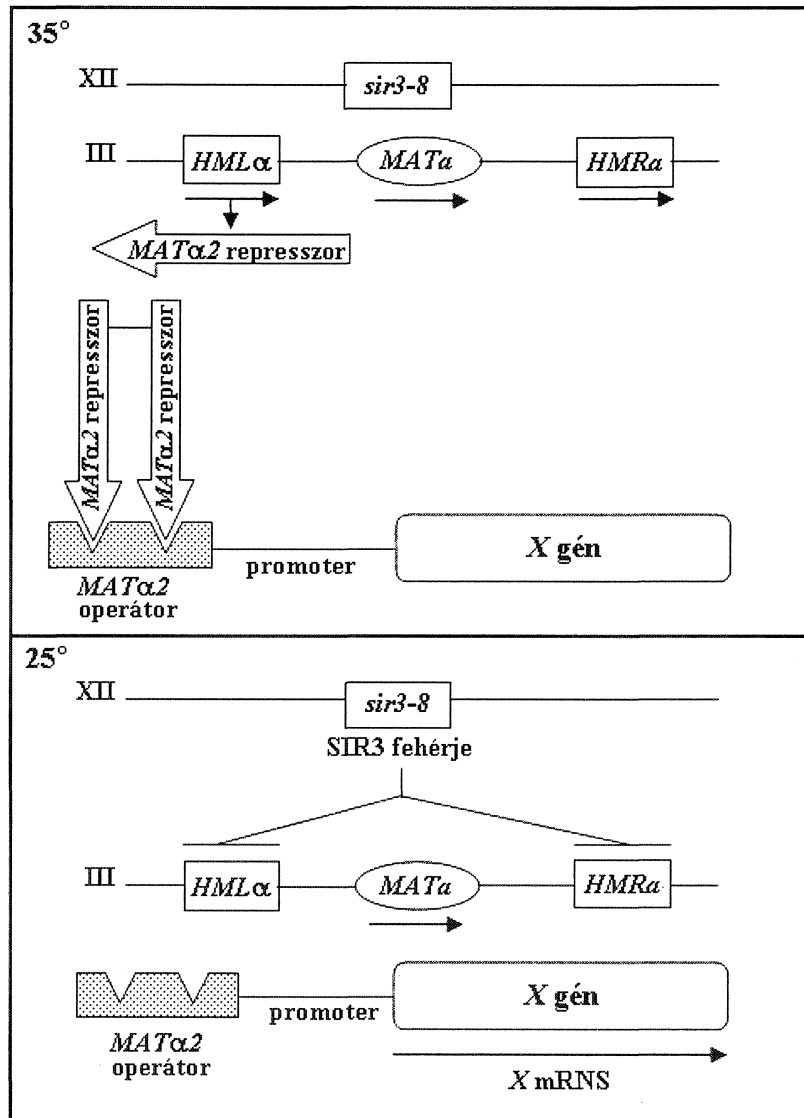
felületéhez kötődve azt elfedi. Galaktóz hatására aktiválódik a Gal3p, kölcsönhatásba lép a Gal80p-vel, amelynek révén valószínűleg megváltozik a Gal80p kötőhelye a Gal4p-n, és így a Gal4p transzkripciós aktivátorként működhet.

A glükóz represszálo hatása összetett: (1) gátolja a galaktóz transzportját a galaktóz transzporter, valamint a galaktóz permeázát kódoló gén expressziójának represszálásával, (2) az induktor funkciójú *GAL3* expresszióját represszálja, (3) elnyomja a *GAL4* expresszióját és gátolja a transzkripciós aktivátor fehérjét, végül (4) aktivátortól függetlenül is represszál, ami a gének promoterében levő 5'-represszálo szekvenciákhoz kötődő fehérjéknek tulajdonítható.

A Gal4p rendkívül kis koncentrációja miatt az expressziós plazmid GAL promotere mögé épített gén expressziója nem fokozható egyszerűen a plazmid kópiaszámának növelésével. A Gal4p-t fokozott mértékben, konstitutív módon termelő törzsek előállítására az indukálhatóság elvesztéséhez vezetne, mert nem érvényesülne a Gal80p hatása. Ezért szerkesztettek egy olyan *S. cerevisiae* törzset, amelynek kromoszómájában a vad típusú *GAL4* génen kívül a *GAL10* promoterhez fuzionált *GAL4* gént tartalmazó expressziós kazetta is megtalálható. Galaktóz nélkül a vad típusú *GAL4* génről expresszált Gal4p-t a Gal80p inaktív állapotban tartja. Galaktóz hatására és glükóz távollétében sokszorosára nő a Gal4p mennyisége a sejtben, és így nagyobb lehet a nagy kópiaszámú plazmid GAL promotereinek szabályozása alatt álló gén expressziója. Az expressziós kazetta nemcsak a kromoszómába beépítve lehet jelen az élesztősejtben, hanem egy centromérás plazmid részeként is alkalmazható.

Az élesztő metallotionein promotere (*CUP1 promoter*) rézionok hatására indukálódik. A *CUP1* promotert tartalmazó plazmidokkal nagymennyiségű rekombináns fehérje termelhető. Nagy kópiaszámú plazmidok segítségével több fehérje terméket lehet előállítani, de ilyenkor az indukció nélküli expresszió (háttér) is nagyobb mértékű. A rézionok optimális koncentrációját empirikusan határozzák meg úgy, hogy az a sejtekre toxikus küszöbértéket még ne érje el. A *PHO5* (savas foszfátot kódoló) gén promotere a szervetlen foszfát, az *ADH2* (alkohol dehidrogenáz 2) promotere pedig a glükóz koncentrációjának csökkenése "kapcsolja be". Az expresszió hőmérsékletváltoztatással történő szabályozása is megvalósítható. Ismeretes, hogy az α párosodási típusú sejtekben nem íródnak át az *a* típusú sejtekre specifikus gének. Az α sejtekben ugyanis termelődik egy represszor fehérje (*MAT α 2* fehérje), amely az *a* típusú gének promoterében levő operátor szekvenciához kötődik (amely egyben a gének 5'-aktivátor szekvenciája is). Ha a szabályozni kívánt gén promoterébe illesztik a *MAT α 2* operátor szekvenciáját, és speciális mutációkkal biztosítják azt, hogy a *MAT α 2* fehérje szintézise vagy aktivitása hőmérsékletfüggő legyen, akkor a gén átíródásának repressziója is hőmérsékletfüggővé tehető (6. ábra).

A represszor hőmérsékletfüggő szintézise elérhető pl. olyan *a* sejtekben, amelyekben a *SIR* gének egyikében hőmérsékletérzékenységet okozó mutáció van. A *SIR* gének által kódolt fehérjék szükségesek a *HMR α* és *HML α* lokuszok repressziójához, amelyek a párosodási típust meghatározó *MAT α* és *MAT α* nem expresszált kópiáit tartalmazzák. A *sir3-8* mutáció pl. a *SIR3* fehérjét inaktívvá teszi 35°C-on, így a *HMR α* és *HML α* lokuszok repressziója megszűnik, és más regulátor fehérjék mellett a *MAT α 2* represszor is szintetizálódik, amelynek következtében a *MAT α 2* operátort tartalmazó promoter 35°C-on represszálva van. 25°C-on a *SIR3* fehérje aktív, így represszorfehérje nem készül, és a *MAT α 2* operátort tartalmazó promoter szabályozása alatt levő gén átíródik (6. ábra). A hősokk-elemet (HSE) tartalmazó promoterekkel rendelkező gének transzkripciója fokozódik hőmérsékletemeléssel előidézett stress hatására, és más élő sejtekhez hasonlóan az élesztő sejtekben is hősokk-fehérjék szintetizálódnak. A HSE szabályozható transzkripciós promoterként idegen gén expressziójára is felhasználható.



6. ábra. Hibrid promoter hőmérsékletfüggő szabályozása (a *Methods in Enzymology* 185 (1990) ábrája nyomán). A *MATα2* operátort tartalmazó promoter szabályozása alatt álló *X* gén a *sir3-8* gazdasejtben 25°C-on átíródik, 35°C-on, funkcióképes SIR3 fehérje hiányában azonban nem.

Expresszió rovarsejtekben

Rekombináns fehérje rovarsejtekben a baculovírus expressziós rendszer segítségével termeltethető. A baculovírusra épülő rendszer rendelkezik az eukarióta expressziós rendszerek már ismertetett előnyös tulajdonságaival (nagy méretű fehérje előállítására alkalmas, a fehérje poszttranszlációs módosítása, szekréciója lehetséges). Nagyon kedvező, hogy a biológiailag aktív rekombináns fehérje magas koncentrációban termeltethető (az összes fehérje 20%-át elérő mennyiségben is), és a rovarsejtben oldva maradhat. A baculovírus ízeltlábúakat fertőz meg, gerincesekre veszélytelen, és promoterei emlős sejtekben nem aktívak. A rendszer hátrányos tulajdonsága, hogy a rekombináns vírus előállítása időigényes, és a rekombináns fehérje termelése költségesebb, mint a baktériumokban.

A baculovírus élelciklusa

A legelterjedtebb baculovírus expressziós rendszer az *Autographa californica* nucleopolyhedrovirusra (AcMNPV) épül, amelyet a továbbiakban baculovírusnak nevezünk. A vírus genomja cirkuláris kettősszálú DNS, amely a lipoprotein burokkal körülvett, pálcikaalakú nukleokapszidban egy kisméretű bázikus fehérjével komplexet alkotva található. A baculovírus a gazdasejtet lizálja és viszonylag hamar elpusztítja.

A rovarsejtbe lépő vírusok a sejtmagba kerülnek, és DNS-tartalmuk felszabadul. A fertőzés után kb. 6 órával megkezdődik a DNS replikációja, majd a virionok alkotórészeinek összerendeződése. Kétféle új vírusrészecske keletkezik: extracelluláris vírusrészecskék, amelyek a fertőzés utáni 12-36. órában a gazdasejt membránján kidudorodnak és kiszakadnak, valamint a 18-72. óra között (illetve a sejt líziséig) intracelluláris vírusrészecskék, amelyek a sejtmagban főként *polyhedrin fehérjéből* álló vastag virális fehérjeburkokba (occlusion bodies) ágyazódva halmozódnak fel. A polyhedrin fehérje védi a vírust az elhaló sejtek proteázaitól. A fehérjeburok egy új gazda tápcsatornájába jutva szolubilizálódik, és a vírus felszabadul.

A polyhedrin fehérje a megfertőzött sejtben rendkívül nagy koncentrációban termelődik (mennyisége az összes sejtfehérje 50 %-át is eléri), ugyanis a gén promotere nagyon erős. A természetben a polyhedrin a vírus túléléséhez feltétlenül szükséges, de sejt kultúrákban való fenntartásához nem nélkülözhetetlen.

A baculovírusra épülő expresszió lépései

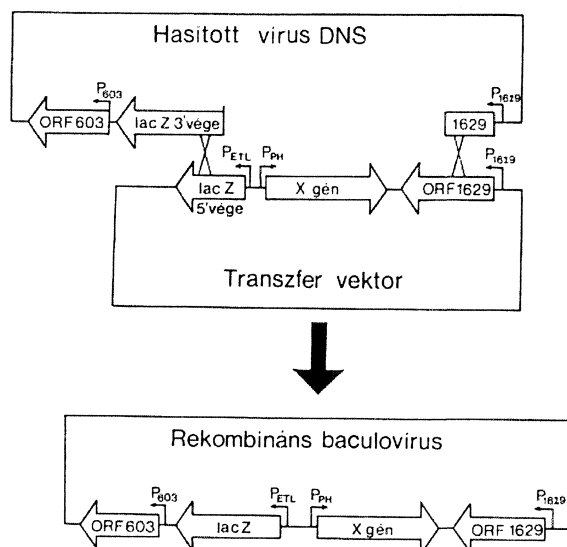
1. Rekombináns baculovírusokat hoznak létre, amelyek az expresszálni kívánt X gént (ill. cDNS-t) a polyhedrin promoter (p_{PH}) mögött tartalmazzák. Ennek során a gént először egy transzfer vektor (plazmid) polyhedrin génjébe építik be, a promoterhez képest 3'-helyzetben (7. ábra). A transzfer vektor tartalmazza egy esszenciális vírusgénnek azt a darabját, amely a speciálisan hasított vírus DNS-ből hiányzik (a linearizált vírus DNS kereskedelmi forgalomban hozzáférhető). A fentiek szerint átalakított transzfer vektort és a hasított vírus DNS-t együtt transzfectálják rovarsejtekbe. Homológ rekombináció révén a kívánt szerkezetű rekombináns vírus keletkezik, amelyben az esszenciális gén is kiegészül.

2. A transzfectációs közegből rekombináns vírusokat tisztítanak és szaporítanak. A polyhedrin gént tartalmazó vírusok és a rekombináns vírusok vizuálisan is megkülönböztethetők, mivel plakkjaik morfológiája eltérő. A szelekció másik lehetőségét azok a transzfer vektorok és lineáris vírus DNS-ek adják, amelyek rekombinációja révén a keletkező vírus β -galaktozidáz aktivitással fog rendelkezni (a β -galaktozidáz kódoló lacZ gén ebben az esetben un. riporter gén, vö. 7. ábra).

3. A rekombináns vírussal rovarsejteket (pld. *SF9*, *Spodoptera frugiperda*) fertőznek a rekombináns fehérje termelése céljából.

4. A termelt fehérjét analizálják és megkeresik az optimális körülményeket nagymennyiségű fehérje előállításához.

5. Az expresszált fehérjét tisztítják.



7. ábra. Rekombináns baculovírus készítése hasított vírus DNS segítségével (az Invitrogen katalógusa alapján). A transzfer vektor polyhedrin promotert és erősítő (enhancer) elemeket tartalmaz. A hasított vírus DNS és az X gént tartalmazó transzfer vektor kotranszjektálásakor keletkező rekombináns baculovírusban homológ rekombináció révén kiegészül az ORF1629, továbbá a szelekciót biztosító lac Z gén.

Expresszió emlős sejtekben

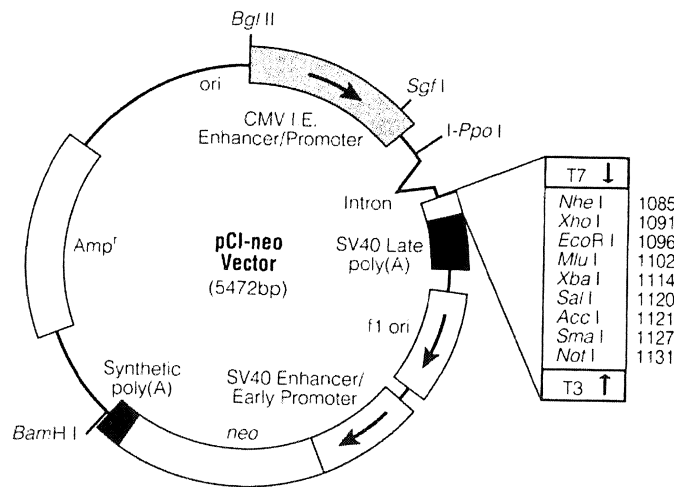
A natív fehérjével megegyező szerkezetű, biológiailag aktív fehérje termelése érdekében az emlős gént (cDNS-t) gyakran emlős fogadósejtekben fejezik ki. Az emlős expressziós rendszerek egyik típusában a cDNS-t a megfelelő plazmidba építve juttatják a sejtekbe. A transzfecció leggyakrabban kalcium-foszfát, DEAE-dextrán vagy liposzómák segítségével történik, amikor is a DNS endocitózissal jut be a sejtekbe, majd a sejtmagba. Elektroporáció során a sejtmembránban rövid ideig tartó, magasfeszültségű elektromos impulzusokkal létesített lyukakon keresztül juttatható a sejtbe az idegen DNS. Az idegen gén mikroinjektálással közvetlenül a sejtmagba is bevihető.

Az expressziós rendszerek másik típusában a kifejezni kívánt gént virális promotor mögött tartalmazó rekombináns vírusokkal fertőzik a sejteket (pl. retrovírus, adenovírus, vaccinia vírus rendszerek). Előnyük, hogy nagy DNS-eket is közel 100%-os hatékonysággal képesek a sejtekbe juttatni, hátrányuk pedig a gazdasejteket károsító hatásuk. Egyes vírusokkal a DNS a fogadósejtek kromoszómájába integrálható, és így hosszan, stabilan expresszáló sejt vonalak hozhatók létre (pl. retrovírus, adenovírus ve¹-torokkal). A nem integrálódó expressziós vektorok általában az idegen gén nagy kópiaszámában történő átmeneti expresszióját teszik lehetővé addig, amíg a sejtek el nem halnak.

Plazmid vektorok

Az emlős expressziós plazmidvektorok ingázóvektorok. A prokarióta szekvenciák (replikációs origó, antibiotikumrezisztencia-gén) révén a vektorkonstrukció baktériumban klónozzható és tisztítható. Emlős sejtekben történő expresszió céljából a plazmidok vírusokból (pl. simianvirus 40, SV40; humán cytomegalovírus, CMV) származó regulációs elemeket tartalmaznak (promoter és enhancer, poliadenilációs szignál/terminátor, és általában a vírus replikációs origója). Napjainkban már különféle fúziós szekvenciát hordozó emlős expressziós plazmidok is hozzáférhetők (8. ábra). Az eukarióta expressziós vektorok

túlnyomó részében domináns szelekciós markerként antibiotikumrezisztencia-gén található (pl. neomicin-rezisztenciát eredményező aminoglikozid foszfortranszferáz gén). A szelekciót a pirimidin- és purin-bioszintézis több enzimének (pl. timidin kináz, dihidrofolát reduktáz) génje is biztosíthatja, ha a gazdasejt az adott aktivitással nem rendelkezik (komplementációs markerek). A markergén és az expresszálni kívánt gén lehet azonos vagy két különböző plazmid része is, amelyekkel együtt transzfektálják a sejteket. Nagyobb mértékű expresszió elérése céljából előnyös kiválasztani azokat a sejteket, amelyek kromoszómájába nagy kópiaszámban épült be a bevitt DNS (génerősítés). Dihidrofolát reduktáz markergén esetében pl. az enzim inhibitorának, a metotrexátnak növekvő koncentrációit alkalmazva timidin, glicin és purinok nélkül csak azok a sejtek maradnak életben, amelyekben kellően nagy a dihidrofolát reduktáz aktivitása.



8. ábra. A pCI-neo vektor restriktációs térképe (Promega)

A plazmid fontosabb elemei: cytomegalovírus azonnali korai erősítő (enhancer) és promoter erős, konstitutív expresszió céljából; a β -globin intron 5'-hasítási helyét és egy IgG intron 3'-hasítási helyét tartalmazó kimérés intron; T7 és T3 promoter átírat *in vitro* készítése céljából; klónozó helyek; SV40 késői poliadenilációs szignál; f1 replikációs origó egyszálú DNS készítése céljából; SV40 erősítő és korai promoter; SV40 minimális replikációs origó; neomicin foszfortranszferáz kódoló régió; szintetikus poliadenilációs szignál; β -laktamáz (Amp^r) kódoló régió.

COS sejtek

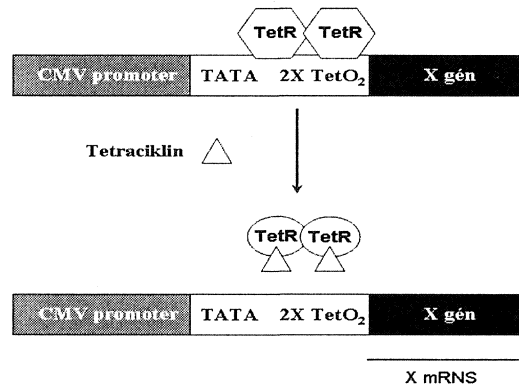
Az expressziós rendszert a kísérlet céljától függően választják meg. Egy cDNS klón gyors jellemzésére, adott mutáció hatásának vizsgálatára elterjedten használják a COS sejteket, amelyek általában átmeneti expressziót biztosítanak. A COS-sejtek olyan CV-1 majomsejtek, amelyek genomjába hibás replikációs origójú SV40 genomot építettek be. A sejtekben termelődik a vírus replikációjához szükséges SV40 nagy T antigén és egyéb faktorok, de vírusok nem keletkeznek. A kifejezni kívánt DNS-t normál SV40 replikációs origót tartalmazó plazmidba építve juttatják a sejtekbe. Az SV40 fehérjék kölcsönhatásba lépnek a normál replikációs origóval, és megkezdődik a rekombináns expressziós plazmid nagy kópiaszámban (10^5 /sejt) történő replikációja, majd a kívánt fehérje szintézise. A COS-sejtek a transzfektáció után egy héttel rendszerint elpusztulnak, vagy elvesztik a plazmidot. Rekombináns fehérje stabil termelésére alkalmasabbak más sejt vonalak, pl. a kínai hörcsög ováriumsejtjei (CHO: Chinese hamster ovary). Az emlős expressziós rendszerekről a Current Protocols in Molecular Biology adatai alapján az 1. táblázat ad áttekintést.

1. táblázat. Emlős expressziós rendszerek

Sejtvonal	A DNS-bevitel módja	Optimális expressziós szint ($\mu\text{g/ml}$)	Elsődleges alkalmazás
<i>Majomsejtek</i>			
CV-1	SV40 vírus-infekció	1-10	Vadtípusú és mutáns fehérjék expressziója
COS	Átmeneti DNS/DEAE-dextrán transzfekció	1	Expressziós klónozás emlős sejtekben; cDNS klónok gyors jellemzése; mutáns fehérjék expressziója
CV-1	Átmeneti DNS/DEAE-dextrán transzfekció	0,05	
<i>Rágcsáló fibroblasztok</i>			
C127	Stabil BPV* transzformáns	1-5	magasszintű, konstitutív expresszió
3T3	Retrovírus infekció	0,1-0,5	génbevitel állatokba; expresszió különböző sejtípusokban
<i>Egyéb sejtek</i>			
CHO (DHFR ⁺)	Stabil DHFR ⁺ transzformáns MTX ^r erősítése	0,01-0,05 10	magasszintű konstitutív expresszió
Főemlősök/ rágcsálók	Vaccinia vírus-infekció EBV vektor	1 nincs adat	vakcinák termelése expressziós klónozás

*BPV: bovine papilloma vírus, EBV: Epstein-Barr vírus, DHFR: dihidrofolát reduktáz, MTX: metotrexát

Szabályozható expresszió emlős sejtekben is megvalósítható. A tetraciklinel indukálható rendszer a CMV promoterre és a bakteriális tetraciklin rezisztencia operon szabályozó elemeire épül. A tetraciklin represszor gént tartalmazó expressziós plazmiddal transzfektált és a represszor fehérjét (TetR) állandóan termelő sejtekbe olyan másik expressziós plazmidot juttatnak be, amelybe a kifejezni kívánt gént a CMV promoter és két tetraciklin operátor szekvencia (TetO₂) mögé építették be (9. ábra). Tetraciklin nélkül a TetR homodimer a TetO₂ helyekhez kötődik, és megakadályozza a transzkripciót a CMV promoterről. Tetraciklin hozzáadásakor, annak kötődése következtében megváltozik a TetR konformációja, így szabaddá válnak a TetO₂ szekvenciák és megkezdődik a gén átírása.

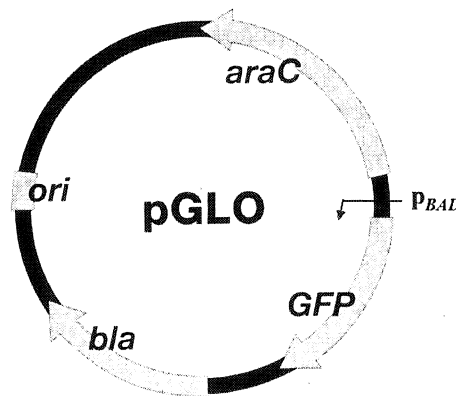


9. ábra. Tetraciklinnel indukálható emlős expressziós rendszer (Invitrogen).

A kísérlet kivitelezése

Medúza zöld fluoreszcens fehérje expressziója *Escherichia coliban*

Az *Aequorea victoria*ban található zöld fluoreszcens fehérje (Green Fluorescent Protein: GFP) hosszuhullámú ultraibolya fényvel megvilágítva zöld színnel fluoreszkál. A GFP gén pontmutációival a fluoreszcens fény intenzitása fokozható. Az így módosított GFP gént arabinózzal indukálható módon expresszálhatjuk baktériumokban a pGLO plazmid (Bio-Rad) segítségével.



10. ábra. A pGLO plazmid felépítése.

Az arabinóz operon a cAMP-CAP komplex és az araC génről készülő, L-arabinózt kötő fehérje szabályozása alatt áll. Ha nincs elég araC fehérje és cAMP-CAP, akkor az araC gén átíródik. Elegendő araC fehérje és alacsony cAMP-CAP koncentráció esetén az araC a B, A, D struktúrgének promoterének araO₁ operátorához kötődve gátolja az araC gén átíródását, az araI és araO₂ szabályzóhelyekhez kötődve pedig DNS hurkot hoz létre és meggátolja a struktúrgének transzkripcióját. Ha glükóz nincs jelen, arabinóz pedig igen, akkor a cAMP szint megemelkedik, és a cAMP-CAP komplex az araO₂ és araI operátor között kötődve elősegíti a DNS hurok felnyílását. Az araC-arabinóz komplex ekkor csak az araI helyhez kötődik, és indukálja a struktúrgének átíródását.

A pGLO plazmidban (10. ábra) az arabinóz operon araB, A és D struktúrgénjeinek közös promotere (P_{BAD}) mögé, a struktúrgének helyére építették be a GFP gént, és megtalálható benne az araC regulátor gén is. A szelekciót az ampicillinrezisztencia-gén (bla) biztosítja.

A gyakorlaton *HB101* sejteket transzformálunk pGLO plazmival.

A transzformáció lépései

Jelöljön meg két eppendorf-csövet a következőképpen: +DNS, ill. – DNS.

Mérjen be mindkét csőbe 250 μ l transzformációs oldatot (50mM $CaCl_2$, pH7,4), és helyezze őket jégbe.

Steril kaccsal vegyen fel egy *HB101* baktériumtelepet az LB starter lemezről és szuszpendálja jól el a +DNS jelű csőben, majd tegye vissza jégbe a csövet. Ismétlje meg az eljárást a –DNS jelű csővel, használjon új steril kacsot.

Mérjen megadott térfogatú és koncentrációjú pGLO DNS-oldatot a +DNS jelű csőbe, rázza óvatosan össze.

Tartsa jégben a két csövet 10 percig. Közben készítsen elő négy agarlemezt a szélesztéshez:
+DNS jelöléssel: LB/amp és LB/amp/ara
-DNS jelöléssel: LB és LB/amp.

Hősokk: 42°C, pontosan 50 sec. Utána azonnal tegye vissza a csöveket jégbe 2 percre.

Mérjen mindkét csőbe 250 μ l LB tápfolyadékot.

Tartsa a csöveket szobahőmérsékleten 10 percig.

A lezárt +DNS jelű cső tartalmát ujjheggyel ütögetve keverje össze, majd mérjen ki 100-100 μ l szuszpenziót a megfelelő lemezekre, szélesztéshez. Az eljárást ismétlje meg a –DNS jelű csővel (kónuszcseré!).

Szélesztés (sterilizált kaccsal).

Helyezze a lemezeket 37°C-os inkubátorba másnap reggelig.

Az eredmények értékelése

Adja meg az egyes lemezeken található telepek számát.

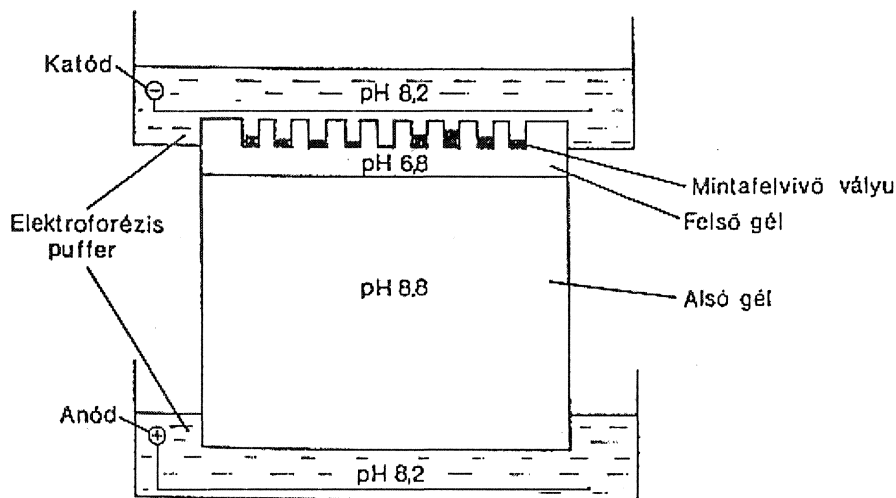
Vizsgálja meg a telepeket látható fényben és ultraibolya fényvel átvilágítva.

Adja meg a transzformáció hatékonyságát az LB/amp/ara lemezen észlelhető telepek számának alapján, transzformáns/ μ g DNS egységben.

gél felhasználható továbbá oligonukleotidok és kisebb méretű nukleinsavfrakciók szétválasztására is. A poliakrilamid gél alkalmazásának hátránya az, hogy a nem polimerizált akrilamid monomer neurotoxin, ezért a polimerizálás kellő körültekintést igényel.

Pufferrendszerek

Poliakrilamid gélelektroforézis során két típusú pufferrendszert alkalmazhatunk. Amennyiben a gél pórusait kitöltő puffer minden tulajdonsága (összetétel, koncentráció, ionerősség, pH) azonos a gél minden pontján, folytonos (kontinuos) pufferrendszerről beszélünk. Ennél sokkal hatásosabb elválasztást biztosítanak az olyan ún. *nem folytonos (diszkontinuos) pufferrendszerek*, amelyekben a gél több egymástól eltérő tulajdonságú rétegből áll. Ilyen például a *Laemmli-féle pufferrendszer*, (Laemmli, 1970, Nature 227, 680-685), amelynek alsó szeparáló része 8,8 pH-jú 375 mM koncentrációjú tris(hidroximetil)amino metán (Tris) oldatot tartalmaz, míg a felső mintafelvívő rész pH-ja 6,8 és Tris koncentrációja 62,5 mM. (A fehérje mintát a felső géllal azonos pH-jú és Tris koncentrációjú pufferben visszük fel.) Az elektroforézis puffer viszont 25 mM Tris és 200 mM glicin tartalmú (pH 8,2). A szeparáló rendszer tehát háromféle eltérő összetételű és pH-jú pufferből áll (lásd 1. ábra). Ha egy ilyen nem folytonos pufferrendszert tartalmazó gélt elektromos térbe helyezünk, létrejön az ún. *elektrokémiai hatás*, ami a mintában lévő fehérjéket rendkívül vékony startzónába tömöríti. A minta koncentrációja a gél tetején ellensúlyozza a későbbi diffúzió okozta elmosódást, ezért a Laemmli-féle pufferrendszerben végzett elektroforézis rendszerint éles, jól értékelhető fehérje sávokat szolgáltat.



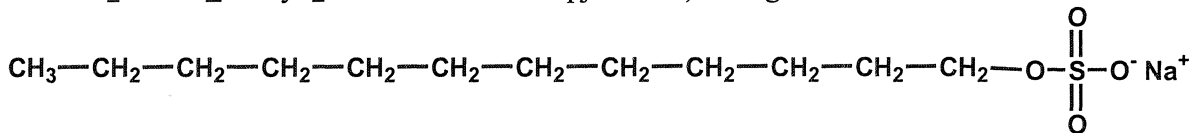
1. ábra. A Laemmli-féle gélelektroforézis vázlatja

Az elektrokémiai hatás a következőképpen jön létre. A Tris pK értéke 8,0; szerepe a közeg pH-jának biztosítása. A különböző pH-jú oldatokat a Tris/Tris×HCl arány módosításával hozzuk létre. A glicin izoelektromos pontja 6,8; azaz pH 6,8-on ikerionos formában található, míg pH 8,2 és 8,8 között az anionforma van túlsúlyban. Az ikerionos forma elektromos térben nem mozdul el, míg az anion az anód irányába halad; hasonló irányban mozog a kloridion is, de a glicinnél nagyobb sebességgel. A mozgékonyágkülönbség eredményeként a felső gélből gyorsabban távoznak a kloridionok, mint ahogy helyüket a glicin anionok elfoglalnák. Ezért a felső gél ionkoncentrációja a futtatás közben lecsökken, ellenállása nő, ami nagy feszültségesést hoz létre. A nagy feszültségkülönbség hatására a glicin-anionok mozgási sebessége megnő, a glicin-anionok felgyorsulnak és utoléri a kloridionokat. Így egy éles ionfront alakul ki, ami az anód felé vándorol. Ha az elválasztandó minta mozgékonyága a két anion mozgékonyága közé esik (mint pl. az SDS tartalmú fehérjéké), a minta a két ionzóna közé koncentrálik. A minta

koncentrációját a Kohlrausch-féle regulatív függvény szabja meg. Ennek megfelelően az elektroforézis úgy játszódik le, hogy a különböző ionfajtákra vonatkozó koncentráció/mozgékonyosság viszonyszám összege állandó marad. Azaz a glicin és kloridionban szegény szűk térben a mintaanion-koncentráció megnő. Az eredetileg híg minta így a felső gélben az elektrokémiai hatás miatt töményedik. A felső gél pórusnagyságát úgy célszerű megválasztani, hogy itt csak a koncentrálódás játszódjon le, a molekulaszűrő hatás ne érvényesüljön. A minta szeparálása a kisebb pórusméretű alsó gélben történik.

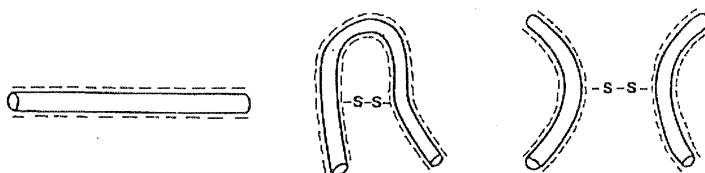
SDS gél elektroforézis

Mivel a gélben való mozgás sebessége a minta-ion (fehérje) töltésétől, méretétől és alakjától egyaránt függ, egymástól nagyon különböző fehérjék natív térszerkezet mellett gélelektroforézissel nem mindig választhatók el. Ha a fehérjéket méret szerint kívánjuk szétválasztani, denaturáló körülményeket kell biztosítani, pl. nátrium-dodecil-szulfát (angol nevének sodium dodecyl sulfate rövidítése alapján SDS) detergens hozzáadásával.



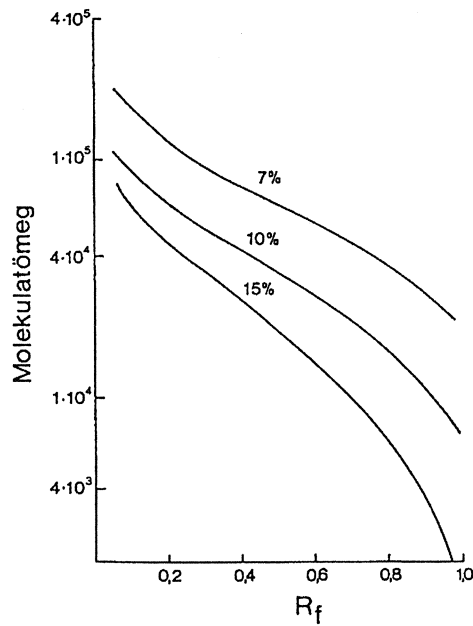
Nátrium-dodecil-szulfát (SDS)

Az amfipatikus SDS molekula hidrofób szénhidrogénláncával kötődik a fehérjék hidrofób oldalláncjaihoz úgy, hogy a negatív töltés a vizes fázis felé irányul. Néhány kivételes szerkezetű fehérjétől eltekintve az (pld eredendően rendezetlen szerkezetű fehérjék) SDS kötődése arányos a fehérje méretével, azaz a detergens nagyjából egyenletesen borítja be a polipeptid felületét. Mivel a kötött SDS-molekulák száma sokkal nagyobb, mint a fehérje ionos oldalláncainak száma, a keletkezett komplex töltését az SDS szulfát csoportjai határozzák meg (az erősen bázisos vagy savas fehérjéktől eltekintve a fehérje saját töltése elhanyagolható). Ebből és a fehérjék hasonló SDS-kötő képességéből adódik, hogy a fehérje-SDS komplexek töltéssűrűsége nagyjából azonos (SDS jelenlétében a fehérjék azonos sebességgel mozognak). A fehérjék alakkülönbségét is eltünteti a detergens. Mivel a negatív szulfát-csoportok egymást taszítják, a fehérje kibomlik, a polipeptidlánc kifeszül, és egy flexibilis rúd alakját veszi fel. A rúd tengelyét a polipeptidlánc alkotja, melyet SDS borít be úgy, hogy a külső felszín negatív töltésű (2. ábra).



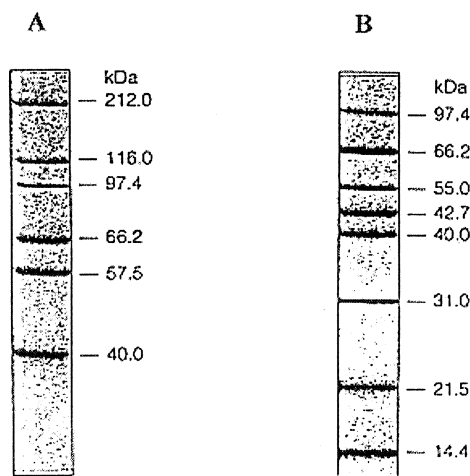
2. ábra. Fehérje-SDS komplexek alakja

Ettől az alaktól csak akkor van eltérés, ha a polipeptid-láncon belül, vagy a polipeptid-láncok között kovalens kötés, legtöbbször diszulfid-híd található (2. ábra). A diszulfid-hidak redukálószerekkel (pl. merkaptóetanol, ME; ditiotretitol, DTT; vagy ditioeritritol, DTE) való főzéssel felszakíthatók és így biztosítható az egységes flexibilis rúdszerkezet. Az egymáshoz nagyon hasonló alakú és fajlagos töltésű fehérje-SDS komplexek a gél molekulaszűrő hatása következtében szétválaszthatók. A fehérjék méretének (molekulatömegének) logaritmus és a fehérje-SDS komplex mozgékonyága között egyenes arányosság van (3. ábra) a gél molekulaszűrő tartományában. Az akrilamid koncentráció növelésével csökken a szétválasztható fehérjék mérete, ami a pórusméret csökkenésével magyarázható.



3. ábra. Fehérjék mozgása 7, 10 és 15%-os poliakrilamid gélben (számított értékek)
A fehérjék molekulatömegét logaritmus skálán tüntettük fel. Az R_f a fehérje által megtett út és a jelzőfesték által megtett út hányadosa

A fehérjék molekulatömegének meghatározásához ismert fehérjékből álló kalibrációs sorozatokat készítenek. A 4. ábra két ilyen sorozat gél elektroforetikus képet és a standard sávok molekulatömegét mutatja be.



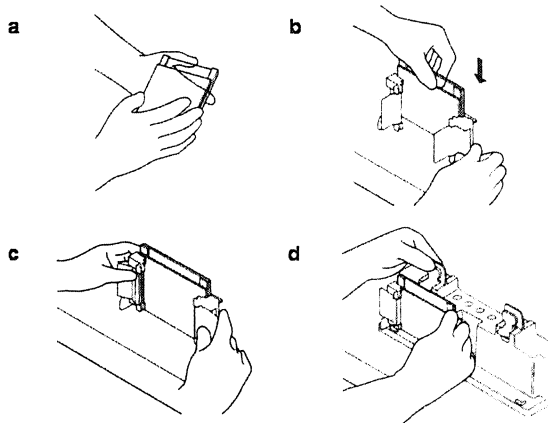
4. ábra. Nagy (A), és közepes (B) molekulatömegű fehérjék molekulatömegének meghatározásához használatos standard fehérje keverékek gél elektroforetikus képe 16 % (A), 12 % (B) poliakrilamid koncentrációjú gélben SDS jelenlétében végzett elektroforézis után. A fehérjék molekulatömegét kiloDalton (kDa) egységben adtuk meg.

A 4 ábrán láthatónál szélesebb molekulatömeg tartomány vizsgálható az úgy nevezett gradiens gélekkel, amelyekben az akrilamid koncentráció felülről lefelé haladva fokozatosan nő. Az ilyen géleket gradiens keverő berendezéssel lehet előállítani.

A kísérlet kivitelezése

Előkészületek

Az elválasztáshoz használt poliakrilamidot monomerekből közvetlenül a kísérlet előtt polimerizációval kell létrehozni. A polimerizáció két üveglap között játszódik le. Az üveglapok egyike a minta felvitel érdekében rövidebb, A másikra pedig ráragasztották a távtartó lapokat. Mindkét üveglap belső felületét alaposan tisztítsa le ultrás vízzel, desztillált vízzel és végül 70% etanollal. Szárítsa le az üveg felszínét papírtörülközővel. A gél öntő lapok összeállítását az 5. ábrán mutatattja.



5. ábra A gél öntő lapok előkészítése

- Helyezze a rövidebb üveglapot a távtartókkal ellátott üveglapra.
- Csúsztassa a két lapot a gél-öntő keretbe úgy, hogy a rövid üveglap előre nézzen. Vigyázzon arra, hogy mind a két üveglap szorosan illeszkedjék az alsó felszínhez.
- A biztosító karok megnyomásával rögzítse az üveglapokat az öntő keretbe.
- A rugós kar felemelése után helyezze az öntő állványba a gél-öntő keretet. A kart leeresztve szorítsa az üveglapokat az állvány alján található sűrke gumiszigeteléshez.

Gélöntés

Az alsó gél elkészítése. Az elektroforézis elvégzéséhez szükséges oldatokat tömény törzsoldat formájában 4°C-on tárolják, kivéve a 10%-os ammónium perszulfátot (AMPER), amit mindig frissen kell készíteni. Mérjen ki 0,1 g ammónium-perszulfátot és oldja fel 1 cm³ desztillált vízben. *Az akrilamid idegméreg, ezért a következő műveleteket gumikesztyűben végezze!* Az alsó gél összetételét az elválasztandó fehérjék mérete szabja meg. Az 1. táblázat felhasználásával állítsa össze a megfelelő akrilamid koncentrációjú alsó gél puffert egy 50 cm³-es Erlenmeyer lombikba.

1. Táblázat Különböző akrilamid koncentrációjú poliakrilamid gélek összetétele

Akrilamid tartalom Komponens (cm ³)	6%	7%	8%	9%	10%	11%	12%	15%
H ₂ O	5,3	5,0	4,6	4,3	4,0	3,6	3,3	2,3
30% Akrilamid 0,8% Bis-akrilamid	2,0	2,3	2,7	3,0	3,3	3,7	4,0	5,0
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8) 0,4% SDS	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
0,1 M EDTA	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
TEMED	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008
10% AMPER	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1

A polimerizáció az AMPER hozzáadásával megindul. Pipetázza az oldatot az előkészített üveglapok közé úgy, hogy a folyadék szintje kb. 2 cm-rel a kisebb üveglap felső széle alatt legyen. Rétegezen desztillált vizet a géloldat tetejére a levegő oxigénjével való érintkezés megakadályozására. A polimerizáció 15-30 perc alatt lejár. A polimerizáció előrehaladtát úgy ellenőrizheti, hogy a feleslegben maradt felső géloldatot egy kémcsőbe önti, és felületére desztillált vizet rétegez. Amikor a kémcső tartalma megszilárdult, az üveglapok között is végbement a polimerizáció. A polimerizáció felmelegedéssel és kismértékű térfogatcsökkenéssel jár.

A felső gél elkészítése. Miközben az alsó gél polimerizálódik, készítse el a 3% felső gél előállításához szükséges oldatot. Erlenmeyer lombikba mérje be a következőket:

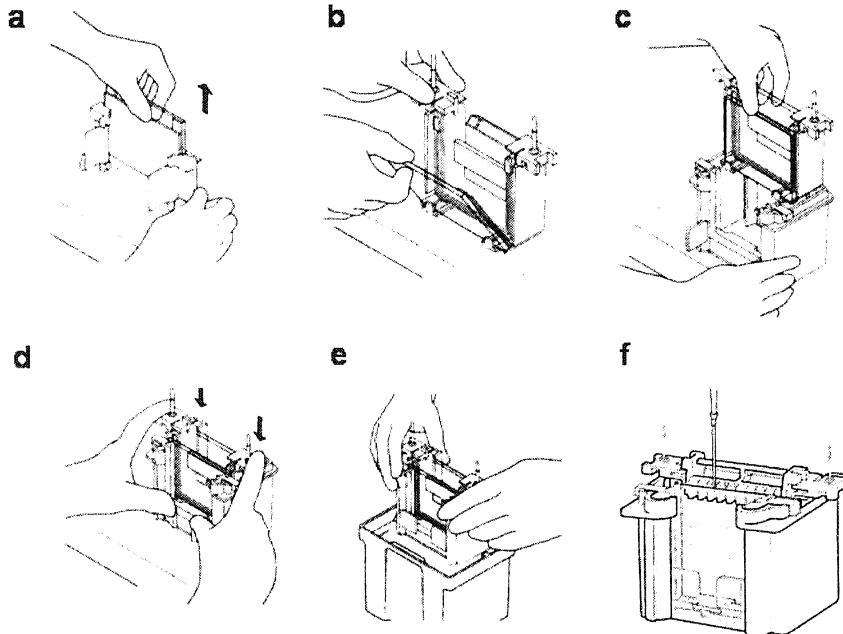
- 0,38 cm³ felső gél oldat (0,5 M Tris pH 6,8; 0,4% SDS),
- 0,5 cm³ 30% akrilamid (0,8% bisz akrilamidot tartalmaz),
- 2 cm³ deszt. víz.

Ha az alsó gél megszilárdult, öntse le felszínéről a folyadékot, desztillált vízzel öblítse le és csepegtesse le a maradék desztillált vizet a gélről, majd adjon a felső géloldathoz 10 µl TEMED-et és 100 µl 10%-os AMPER-t.

A polimerizáció gyorsan lejár, ezért gyorsan pipetázza az oldatot az üveglapok közé az alsó gél tetejére és helyezze bele a mintafelvívő fésűt ütközésig. A felső gél polimerizációja után óvatosan húzza ki a fésűt a gélből, a fésű fogai helyén alakulnak ki a mintafelvívő vályúk. (A polimerizált akrilamid már nem mérgező.)

Elektroforézis

Az elektroforézist Mini-PROTEAN 3 cellában végezzük. Az elektroforézis modul összeállítása a 6. ábra a-e része szerint történik.



6. ábra Az elektroforézis modul összeállítása (a-e) és a minta felvitele (f)

- a. Távolítsa el a gél-szendvicset (poliakrilamid gél két üveglap között) az öntőkeretből.
- b. Helyezze a gél-szendvicset az elektródokat tartalmazó blokkhoz úgy, hogy a rövid üveglap befelé nézzen.
- c. A gél-szendvicset és az elektród blokkot együtt csúsztassa a tartó állványba.
- d. Miközben a blokkot lefelé nyomja a két kar benyomásával rögzítse a kerethez.
- e. Az így összeállított futtató kamrát eressze a futtató kádba.

A minták felvitele

Öntsön 800 cm³ elektroforézis puffert (200 mM glicin/25 mM Tris-HCl pH 6,8, ami 0,1% SDS-t tartalmaz) a felső és alsó kamrákba. Ügyeljen arra, hogy a puffer ellepje a mintafelvívő vályúkat. Ellenőrizze, hogy nincs-e levegőbuborék az alsó kamrában a gél aljánál.

A mintákat úgy kell meghígítani, hogy a felvitt fehérjemennyiség sávonként kb. 1 µg legyen. A hígított mintákhoz 1:1 arányban mintapuffert kevernek, ami 10% glicerint, 5% merkaptotetanolt, 2% SDS-t; 0,0625 M Tris-t (pH 6,8) és kevés brómfenolkék jelzőfestéket tartalmaz. A keverékhez késhegynyi DTT-t adva 100°C-os vízfürdőben 5 percig kell inkubálni. Az előkészítés lényege az, hogy az SDS hatására a fehérjék denaturálódnak, a DTT hatására a diszulfid hidak redukálódnak, a glicerin megnöveli a minta sűrűségét, ami lehetővé teszi a puffer alá való rétegezést, végül a festék színe megkönnyíti a felvitel és az elválasztás követését.

Pipetázzon minden mintából 10-10 µl-t a vályúba a megadott sorrendben a *6. ábrán* bemutatott módon. Csatlakoztassa a pufferkádakon lévő aljzathoz az elektromos vezetékek banándugóját. (Piros dugót a piros aljzatba, fekete dugót a fekete aljzatba.)

A gél futtatása

A minták felvitele után zárja le a készülékeket a biztonsági fedővel. A fedőn lévő elektromos csatlakozók érintkezésbe kerülnek az elektródokkal. Az elektromos vezetékeket csatlakoztassa a stabilizátorhoz (piros vezetéket a +, fekete vezetéket a - pólushoz). Kapcsolja be a stabilizátort, és a futtatást kezdje el 120 V konstans feszültségen. Figyelje meg a buborékok képződését az elektródokon és a jelzőfesték áramlásának irányát. Amikor a jelzőfesték a vályúból maradéktalanul bejutott a felső gélbe (kb. 5-10 perc elteltével), növelje a feszültséget 150 V-ra és folytassa az elektroforézist, amíg a jelzőfesték a gél alját 1-2 cm-re megközelíti (kb. 40-50 perc).

Kapcsolja ki a stabilizátort, húzza ki a banándugókat és emelje le a védőfedőt a készülékről. Emelje ki a futtató kamrát a kádból és öntse le a puffert. Fektesse a kamrát az oldalára és távolítsa el róla a gél-szendvicset. Válassza el egymástól a két üveglemezt. Óvatosan emelje le a gélt egy üveglapra, és az első vályú azonosítására vágja le a gél bal alsó sarkát. A felső gélt vágja le az alsó gélről, csak az alsó gélt használja a további műveletekhez

A gél festése

Hagyományos (Coomassie Blue R) festés

A gélben lévő fehérjéket legtöbbször savas közegben fixálják és Coomassie Blue R250 festékkel teszik láthatóvá.

Az üveglapról csúsztassa a gélt egy festőfolyadékkal negyedéig töltött zárható tetejű műanyag dobozba. (A festőfolyadék 30% etanolt, 10% ecetsavat és 0,1% Coomassie Blue R250-et tartalmazó kékszínű oldat.) A festés enyhe rázogatás mellett szobahőmérsékleten 30-60 percig tart.

Öntse le a gélről a festőfolyadékot egy nagy főzőpohárba. (A folyadék többször is felhasználható festésre.) Mossa ki a gélből a festék feleslegét 300 cm³ 10%-os ecetsavval enyhe rázogatás közben szobahőmérsékleten a mosófolyadék többszöri cseréjével. A festék kimosását meggyorsítja, ha a mosófolyadékba szivacs darabot tesz, ami a Coomassie Blue R-et adszorbeálja. A mosást akkor lehet abbahagyni, ha a világoskék háttéren a sötétebb kék fehérje sávok jól láthatók (ez több órát vesz igénybe). Ezután a 10% ecetsavat cserélje ki desztillált vízre.

Ezüstfestés

A hagyományos festéssel kényelmesen kimutatható néhány μg fehérje/sáv, azonban 0,1 μg fehérje mennyiség alatt a gélen a sáv nem látható ezért nagyobb érzékenységű módszert kell találni a fehérje megjelenítésére. Néhány ng fehérje kimutatására is alkalmas a részleteiben ma sem tisztázott fotokémiai mechanizmuson alapuló ezüstfestés. Nagyobb időigénye és költsége miatt csak akkor érdemes alkalmazni, ha nagyon kevés fehérje mennyiség áll rendelkezésünkre.

Ezüstfestéshez frissen készített oldatokat használjunk. Az oldatok gyors eltávolítását vízsugár-szivattyúval oldhatjuk meg, de ekkor vigyázni kell, hogy a szivattyú nehogy beszívja vagy megsértse a poliakrilamid gélét.

A gélét 20 percig fixálja 400 cm^3 50 % metanol, 10 % ecetsav tartalmú oldattal enyhe rázogatózás közben. A fixáló oldat magas alkohol tartalma miatt a gél eközben zsugorodik. Ezután háromszor mossa a gélét 10-10 percig 200 cm^3 10 % etanol, 5 % ecetsav tartalmú oldattal. A mosás során a gél megduzzad és visszanyeri eredeti méretét.

200 cm^3 0,10 % $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, 0,02 % HNO_3 oldattal 7 percig oxidálja a gélben lévő fehérjéket, majd háromszor mossa 10-10 percig 200 cm^3 desztillált vízzel.

Napfényben vagy világos helyen 20 percig fesse meg a gélét 200 cm^3 0,2 % AgNO_3 oldattal, majd négyszer öblítse kb. félpercenként 100 cm^3 desztillált vízzel. A fotokémiai reakcióban egy latens kép alakul ki, ami szabad szemmel még nem látható. A kép előhívása háromszor 300 cm^3 lúgos formaldehid oldattal* történik. Az első két adaggal homályos helyiségben gyorsan öblítse át a gélét, majd a harmadik adag redukálószerrel világosban addig rázogassa a gélét amíg a kívánt intenzitású fekete sávok meg nem jelennek. Vigyázzon, mert túl hosszú előhívás esetén az egész gél megsötétedik! Az előhívott képet 100 cm^3 5 % ecetsav oldattal 30 percig fixálja. Ezután a megfestett gélét 200 cm^3 desztillált vízben mossa kb. félóráig.

A gél kiértékelése

Amennyiben lehetőségünk van rá a nedves gél képét látható fényben szkenneljük, és az így gyűjtött adatokat elektronikusan tároljuk, illetve dolgozzuk fel (lásd a DNS vizsgálata agaróz gélelektroforézis című fejezetet). Az eredmények dokumentálására a gél két celofánlap között gél-száritó berendezéssel megszáritható.

A kalibráló fehérjék molekulatömegének logaritmusá függvényében ábrázolja a mozgékonyaságukra jellemző R_f értéket a 3. ábrán bemutatott módon. Az ismeretlen fehérje mozgékonyasága alapján becsülje meg molekulatömegét a kalibrációs görbe segítségével. Az ismeretlen fehérje gélelektroforetikus képe alapján értékelje annak tisztaságát.

* Lúgos formaldehid oldat: 30 g Na_2CO_3 -ot oldunk kb. 800 cm^3 desztillált vízben, majd $0,5\text{ cm}^3$ 35 % alt. minőségű formalin hozzápipettázása után az oldatot 1 dm^3 -re töltjük fel.

ANTIPEPTID ANTITESTEK ELŐÁLLÍTÁSA ÉS ALKALMAZÁSA (FEHÉRJÉK AZONOSÍTÁSÁRA WESTERN BLOTTAL)

Erdődi Ferenc

Fehérjék blottolása

A molekuláris biológiai eljárások során alkalmazott nukleinsav blottolási technikák mellett az utóbbi időben széleskörűen elterjedt a fehérjék gélről membránra történő átvitele (blottolása) is (*Western blot*). A membránra átvitt (transzferált) fehérje sokoldalúan vizsgálható. Leggyakrabban a fehérjére specifikus antitesttel antigén-antitest reakciót hoznak létre és ezt detektálják. A fehérjék a membránra történő transzferálást követően részben visszanyerik natív konformációjukat, így alkalmasak fehérje-fehérje és fehérje-ligand kölcsönhatások kimutatására is (*FarWestern technikák*).

A fehérjék blottolásának és azt követő vizsgálatának előnyei az alábbiakban foglalhatók össze:

- (a) a membrán könnyebben kezelhető mint a gél (pl. kevésbé törékeny) és az alkalmazott teszt előtt tárolható,
- (b) a fehérjék a membránon (a membrán kisebb rétegvastagsága miatt) koncentrálnak, ami kimutatási lehetőségüket növeli,
- (c) a membránra átvitt fehérjék többféle módszerrel vizsgálhatók, mint pl. antigén-antitest reakciók, fehérje-fehérje és fehérje-ligand kölcsönhatások,
- (d) a fehérjék a membránon gyorsan és reverzibilisen is festhetők.

Ezzel szemben a blottolási eljárások hátránya, hogy a gél pontos másolata nem készíthető el, mivel a fehérjék a méretüktől (a kisebb molekulatömegű fehérjék nagyobb hatékonysággal) és jellegüktől (a bázikus, neutrális és savas fehérjék eltérő hatékonysággal) függő mértékben transzferálhatók.

Immunoblot

A továbbiakban a fehérjék immunológiai azonosítása során alkalmazott blottolási eljárásokat (*immunoblot*) ismertetjük részletesen. Az immunoblot eljárás fő lépései:

- (1) az antigént tartalmazó minta előállítása,
- (2) az antigént tartalmazó minta fehérjéinek elválasztása,
- (3) az elválasztott fehérjék átvitele (blottolása) a membránra,
- (4) a membrán szabad kötőhelyeinek telítése (blokkolás) indifferens fehérjével,
- (5) az antigén-antitest reakció létrehozása és
- (6) az antigén-antitest reakció detektálása.

Az antigént tartalmazó minta előállítása

Az antigént tartalmazó mintákat intakt szövetekből, sejtekből, szövet- és sejt kivonatokból, részlegesen vagy teljes mértékben tisztított fehérjepreparátumokból állíthatjuk elő. A minta előkészítés módja a fehérjék elválasztására alkalmazott eljárástól függ. Általában a mintákat olyan pufferekben oldják amelyek kompatibilisek az elválasztás során alkalmazott pufferrendszerrel. A minták preparálása során szulfhidril-védő reagensek (merkaptóetanol, ditiotreitól), valamint proteínáz inhibitorok alkalmazása ajánlott az oxidációs folyamatok (pl. diszulfidhidak képződésével kialakuló molekulaasszociátumok) ill. proteolízis (fehérje degradáció) elkerülésére.

A fehérjék elválasztása

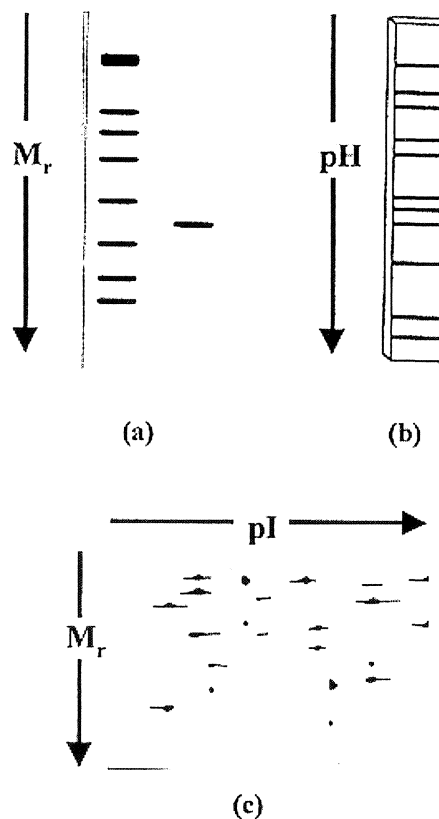
A fehérjék elválasztására leggyakrabban az alábbi elektroforetikus eljárásokat alkalmazzák:

(a) denaturáló detergens jelenlétében adott koncentrációjú poliakrilamidot vagy poliakrilamid koncentráció gradienst tartalmazó gélen (*SDS-PAGE*),

(b) izoelektromos fókuszálás (*IEP*) a fehérjék izoelektromos pont szerinti elválasztására gélben létrehozott pH grádiens segítségével.

(c) kétdimenziós gélelektroforézissel, ami az *IEP* és *SDS-PAGE* kombinálásával történik

A fenti módszerek lényegét foglalja össze az 1. ábra.

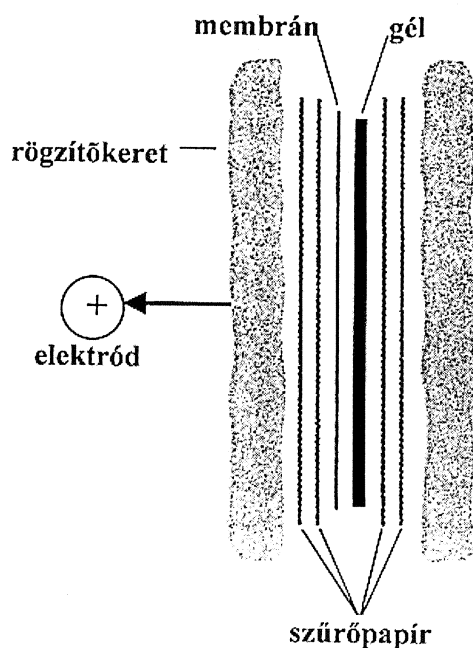


1. ábra. A fehérjék elválasztására használt módszerek. *SDS-PAGE* (a); *IEP* (b) és kétdimenziós gélelektroforézis (c).

A fenti eljárásokhoz képest viszonylag ritkán használják a (d) nem-denaturáló poliakrilamid géleket (*natív PAGE*), valamint (e) urea-poliakrilamid géleket a fehérjék elválasztására.

A fehérjék átvitele membránra (blottolás)

A fehérjéknek a gélről membránra történő átvitele vizes oldatban (blottoló pufferben) elektromos áram hatására (elektroblottal) történik. Az *elektroblott* egy speciálisan kialakított gél-membrán "szendvicsben" játszódik le (2. ábra). Az elektroblott során a gél-membrán szendvics a blottoló puffert tartalmazó kádba merül és elektródként platinaszálak szolgálnak ("nedves" blot). Az elektroblott kivitelezhető úgy is hogy a gél-membrán szendvicset blottoló pufferrel átitatott szűrőpapírok és szénlemez elektródok közé helyezik ("felszáraz" blot).



2. ábra A gél és a membrán elhelyezése a blottoló készülékben

Ez utóbbi eljárás előnye, hogy kevés blottoló puffert igényel és gyorsabb a “nedves” blottolási technikához hasonlítva. A blottoló puffer megválasztása függ az elválasztásra alkalmazott eljárás és a blottolandó fehérje sajátosságaitól (1. táblázat).

1. táblázat. Az immunoblot eljárások során leggyakrabban alkalmazott pufferek

Elválasztó gél	Blottoló puffer
SDS-PAGE (Laemmli szerint), kétdimenziós gél (O'Farrel szerint)	25 mM Tris 192 mM glicin 20 % (v/v) metanol pH = 8,3 pH = 8,3
SDS-PAGE (Laemmli szerint), kétdimenziós gél (O'Farrel szerint), natív PAGE neutrális vagy savas fehérjékkel	25 mM Tris 192 mM glicin pH = 8,3 vagy 25 mM foszfát, pH = 6,5
IEF gél, natív PAGE bázikus fehérjékkel	0,7 % ecetsav

A blottoláshoz legelterjedtebben különböző pórusméretű nitrocellulóz és polivinildifluorid (PVDF) alapú membránokat használnak. A nitrocellulóz membránok hatékony fehérje átvitelt biztosítanak, hátrányuk, hogy viszonylag törékenyek. A PVDF membrán ezzel szemben viszonylag nagy szilárdságú és használata ajánlott amikor a membránra átvitt fehérjét pl. szekvencia analízisnek kívánjuk alávetni (mivel a szekvenáláshoz használt vegyszereknek is ellen áll).

A membrán szabad kötőhelyeinek telítése indifferens fehérjékkel (blokkolás)

A blottolás után a transzferált fehérjék a membrán teljes felületének viszonylag kis részét foglalják el. A membrán szabad felülete még nagy fehérje kötő kapacitással bír, amelyet az antitesttel történő reakció előtt indifferens fehérjével blokkolni kell, egyébként a reakcióhoz használt antitest nagy része aspecifikusan a szabad membránfelületekhez kötődne. A membrán blokkolására olyan fehérjék alkalmasak amelyek viszonylag indifferensek (nem zavarják sem az antigén-antitest, sem a detektálási reakciókat), jól kötődnek a membránhoz és viszonylag olcsón, nagy mennyiségben izolálhatók. A fehérjékkel szembeni másik követelmény a kellő mértékű oldhatóság a Tris (TBS) vagy foszfát (PBS) alapú fiziológiás NaCl oldatban. A blokkoló oldat alacsony koncentrációban detergenst (0,05-0,1 % Tween-20) és a fehérjék gyors lebomlását akadályozó NaN_3 -ot (0,02 %) is tartalmazhat. Ez utóbbi két komponens azonban zavarhatja az antigén-antitest kölcsönhatás kimutatására alkalmazott reakciót, ezért a reakció kivitelezése előtt alapos mosással gondoskodni kell az eltávolításukról. A leggyakrabban alkalmazott blokkoló oldatokat a 2. táblázat mutatja be.

2. táblázat. A membrán blokkolására használt oldatok összetétele

Blokkoló oldat összetétele	Előny/hátrány
5 % szárított, zsírmentes tejpor TBS-ben vagy PBS-ben \pm 0,1 % Tween-20	tiszta háttér, olcsó/ elfedhet néhány antigént
0,1 % Tween-20 TBS-ben vagy PBS-ben + 0,02% NaN_3	olcsó, a membrán az antigén azonosítás után is festhető/nem specifikus kötődések előfordulhatnak előfordulhatnak származó háttérreakciók
3 % marhaszérumalbumin TBS-ben vagy PBS- ben+ 0,1 % Tween-20 és/vagy 0,02% NaN_3	jó jelerősség és háttér/ viszonylag drága

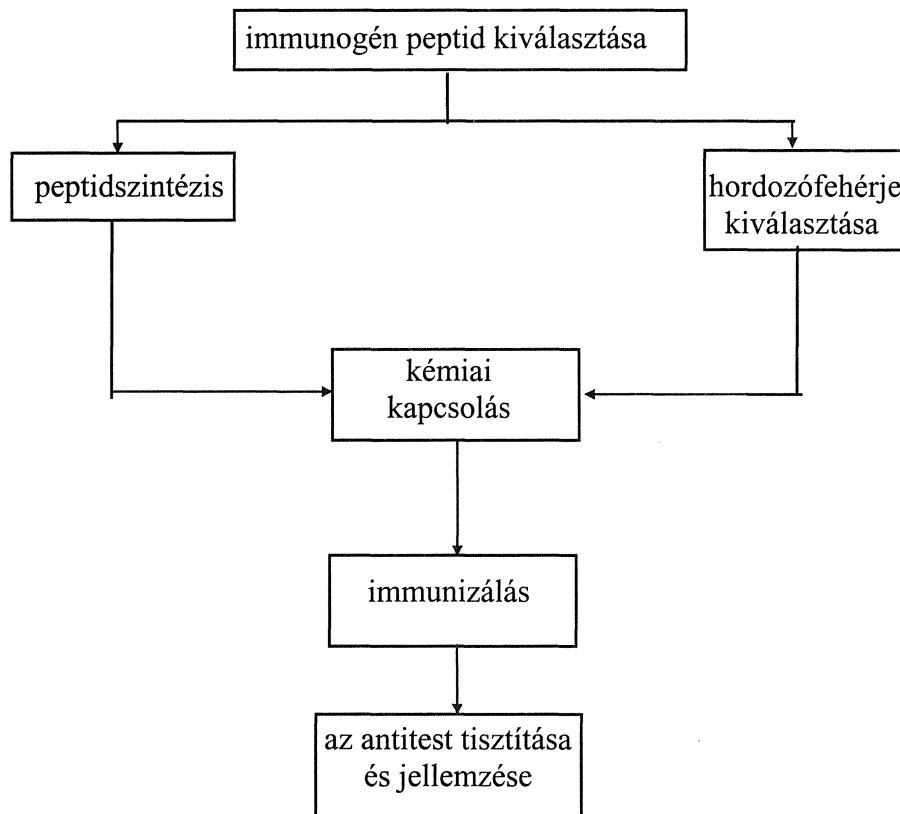
Az antitest típusának megválasztása, anti-peptid antitestek előállítás

A membránra transzferált fehérjék azonosítására monoklonális és poliklonális antitesteket egyaránt felhasználnak. A monoklonális antitestek alkalmazásának előnye a nagy specificitás és a gyakorlatilag korlátlan hozzáférhetőség. Hátrányuk viszont, hogy gyakran nem ismerik fel a teljesen vagy részben denaturált fehérjéket. Ezzel szemben a poliklonális antitestek általában részben denaturált fehérjéket is felismernek, hátrányuk viszont hogy aspecifikus kötődést is mutatnak, valamint az immunizálásra választott állattól függően, korlátozott mennyiségben állnak rendelkezésünkre.

Az utóbbi időben a molekuláris biológiai kutatásokban is jelentős alkalmazást nyertek a *poliklonális anti-peptid antitestek*. Az anti-peptid antitestek alkalmazása különösen előnyös amikor az általunk vizsgálni kívánt fehérjéről viszonylag keveset tudunk, de részszekvenciák ismerete alapján antitesteket állíthatunk elő. Az így előállított antitest elősegíti a fehérje további jellemzését, pl. Western blottal meghatározható a molekulatömeg és szövetspecificitás, immunfluoreszcenciával pedig a sejten belüli lokalizáció. Különösen előnyös az anti-peptid antitestek használata amikor a fehérjék egy specifikus régiójának (pl. katalitikus hely, szubsztrátkötő hely stb.) felismerésére tervezünk ellenanyagot, ill. ha azonos funkciójú és nagy szekvencia homológiát mutató fehérjék vagy izoenzimek

megkülönböztetésére az egyes fehérjékre specifikus peptidszakaszok felhasználásával állítjuk elő az antitesteket.

Az anti-peptid antitestek előállítása során általában az alábbi sémát követik:



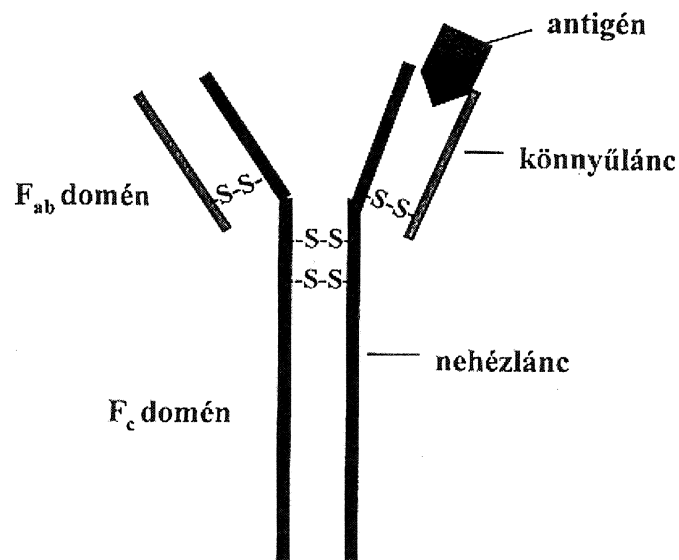
Az immunogén peptid kiválasztására általános szabály nincs. Általában a fehérje felszínén elhelyezkedő peptidszakaszok "elérhetőek" az antitestek számára, ezért a fehérje háromdimenziós szerkezetének ismeretében nagyobb biztonsággal választhatjuk ki az immunizálásra használt peptidszekvenciákat. Ennek hiányában azonban csak empirikus tapasztalatokra támaszkodhatunk, mint pl. hogy a hidrofíil aminosavak és a prolin általában a fehérje felületén exponált helyzetben vannak, valamint hasonló exponált helyzet jellemző az N- és C-terminális peptidszakaszokra is. A kiválasztott peptid hidrofób/hidrofíil jellegét gyakran az aminosavakhoz rendelt indexszámokból is számítják.

A sikeres immunizáláshoz a peptidet hordozóhoz kell kapcsolni. A fehérjék közül leggyakrabban a hemocianin vagy az albuminok (borjú, ló, tojás) szolgálnak hordozóként. A hemocianin előnye hogy jó immunogén, hátránya, hogy kapcsolás után rosszul oldódik. Az albuminok jól oldódnak, viszont kevesebb kapcsolásra alkalmas funkciós csoportjuk van. Előfordul az is, hogy a hordozót a peptid szintézise során alakítják ki, pl. egy elágazó polilizin váz formájában amelyek végcsoportjaihoz kapcsolják az immunizálásra felhasznált peptideket. A fehérjékkel történő kapcsoláshoz keresztkötéseket létesítő reagenseket (pl. glutáraldehid) használnak. Ezek hátránya, hogy maguk is immunogének, a peptidek bizonyos funkciós csoportjaival reagálva azokat lefedhetik (maszkírozhatják) és a peptidek között is keresztkötést hozhatnak létre. A kapcsolás gyakori módja az, hogy a peptidek N-terminális végéhez egy plusz ciszteint szintetizálnak és a fehérjékhez történő kapcsolás maleimid-benzoil-szukcináttal a ciszteinil maradékon keresztül megy végbe. A kapcsolás előtt a peptid más reaktív csoportjait (pl. amino, karboxil csoportok) olyan molekulákkal reagáltatják

amelyek megvédik ezeket a csoportokat attól, hogy a kapcsoló reagenssel vagy a hordozó fehérjével reakcióba lépjenek. A védőcsoportok beépítése reverzibilis, azok a kapcsolás után lehasíthatók, így a peptid funkció csoportjai ismét szabaddá válnak.

Az anti-peptid antitestek előállításának másik előnye, hogy maga a peptid, vagy a kapcsolt peptid felhasználható az immunizálás után az antitest termelés fokának ellenőrzésére, valamint a peptidet megfelelő kromatográfiás mátrixsal kapcsolva az alkalmas az antitest affinitás kromatográfiás tisztítására is. Az anti-peptid antitestek általában felhasználhatók a fehérjék Western blottal történő kimutatására. Az antitest specificitásának ellenőrzésére gyakran azt a módszert alkalmazzák, hogy az antitestet a peptiddel megkötik (telítik) és a specifikus reakciókat a peptid jelenlétében és távollétében kapott keresztreakciók közti különbségből állapítják meg. Az anti-peptid antitestek hátránya, hogy más immunológiai eljárásokra (pl. immunkicsapás) korlátozottan alkalmazhatók, mivel a natív fehérjékkel való kölcsönhatásuk függ az antigén peptidnek a fehérjében elfoglalt térbeli helyzetétől.

A 3. ábra az immunglobulinok vázlatos szerkezetét mutatja be. A molekula két könnyű (~25 kDa) és két nehéz (~55 kDa) láncnak nevezett polipeptidekből épül fel, amelyeket diszulfid hidak kapcsolnak össze. Az immunglobulin molekulák szerkezeti részeiben domének szerint is különbséget tesznek. Az Y alakú molekula könnyűláncokat is magába foglaló elágazó részét F_{ab} doménnek, a csak nehézlánc szerkezeti elemeket tartalmazó hosszanti régiót F_c doménnek nevezik. Az antigént kötő szerkezeti rész az F_{ab} doménon található.

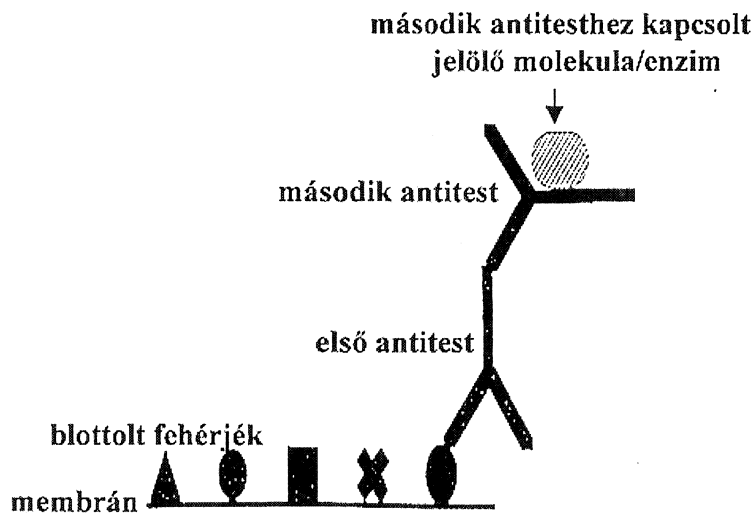


3. ábra. Az immunglobulinok vázlatos szerkezete

Az antigén-antitest kölcsönhatás kimutatása

Az antigén-antitest kölcsönhatás kimutatásához az antigénnel kapcsolódó antitestet olyan jelöléssel kell ellátni, amely lehetővé teszi a kölcsönhatás kimutatását. Ez történhet kémiai módszerekkel (pl. stabilan megmaradó színes termék létrehozásával a kölcsönhatás helyén) vagy fizikai-kémiai módszerek alkalmazásával (radioaktív jelölés, kemilumineszcencia létrehozása) amelynek során a jelek rögzítése a membrántól eltérő hordozón (pl. röntgenfilmek) válik lehetővé. Az antigénnel közvetlen kapcsolódó antitestek jelölésére kémiai molekulákat (pl. biotin), radioaktív atomokat (pl. ^{135}I , ^{35}S) vagy enzimeket (alkalikus foszfatáz, peroxidáz) lehet felhasználni. Az antigént felismerő antitest közvetlen jelölése azonban nem ajánlott, mivel a jelölés során az antitestben olyan kémiai reakciók is

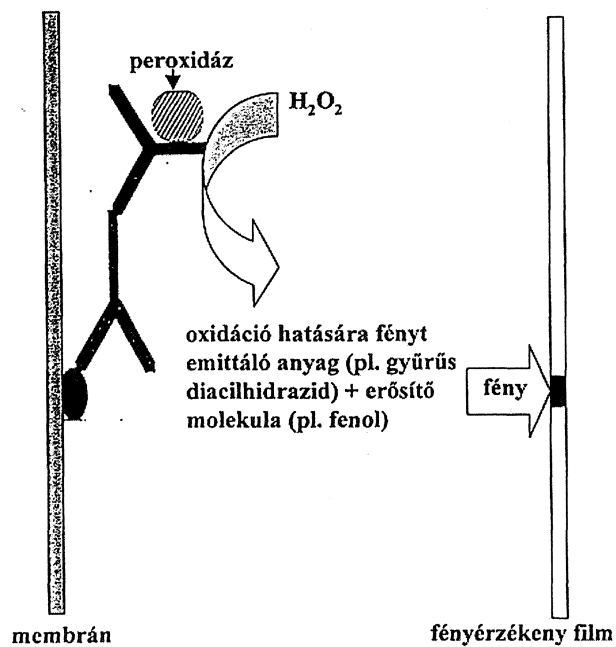
lejátszódhatnak (pl. az antigénkötő F_{ab} régióban), amelyek csökkentik vagy esetleg teljesen gátolják az antitestnek az antigén iránt mutatott affinitását. A ma alkalmazott eljárások többsége azon alapul (vö. 4. ábra) hogy az antigénnek a natív antitesttel létrejövő reakciója után az antitestet egy ahhoz nagy affinitással kötődő "második molekulával" reagáltatják, amelyek az előbbieken felsorolt módszerek valamelyikével jelöltek. Ez a "második molekula" lehet bakteriális eredetű protein A vagy protein G, amelyek nagy affinitással kötődnek a immunglobulinok (pl. nyúl, kecske, szarvasmarha IgG) F_c doménjéhez. Alkalmazásukat az korlátozza, hogy néhány állatból származó immunglobulin iránt (pl. csirke IgY) alacsony affinitást mutatnak. Általánosan felhasználható "második molekulaként" egy másik állatban termeltetett antitest azon állat immunglobulin készlete ellen, ahonnan az antigén felismerésére használt "első" antitest származik (4. ábra). A jelölést a második antitest F_c régiója hordozza.



4. ábra. Antigen-antitest kölcsönhatás kimutatása második antitesttel

Az antigen-antitest kölcsönhatás detektálásának módszere a második antitest jelölésének módjától függ. Ha a második antitesthez radioaktív atomot kapcsoltak, akkor a detektálás autoradiográfiával történhet. E módszer előnye, hogy érzékeny kimutatást tesz lehetővé és bizonyos esetekben a kötődő antitest (vagy protein A) radioaktivitásának meghatározása (szcintillációs mérőberendezéssel és a tisztított fehérjével készített megfelelő kalibrációs sor segítségével) akár az azonosított fehérje mennyiségi meghatározására is alkalmas pl. szövetkivonatokból. A radioaktív jelölés hátránya, hogy alkalmazásakor a sugárveszély és a lehetséges szennyezések miatt különös gonddal kell eljárni.

Az enzimekhez kapcsolt második antitestek többféle detektálási reakciót tesznek lehetővé. A hagyományos detektálási eljárások során az enzim közvetítésével az antigen-antitest kölcsönhatás helyén színreakciót hozunk létre, ami általában a színképzésre alkalmazott anyag kicsapódásával jár. Az eljárás előnye, hogy gyors és veszélytelen, hátránya, hogy érzékenysége jóval alacsonyabb a radioaktív, vagy a kemilumineszcenciás detektálási módszernél. A kemilumineszcenciás (szokás *ECL* módszernek is nevezni az angol *Enhanced ChemiLuminescence* elnevezés alapján) detektálás során a peroxidáz által katalizált reakcióban szerves molekulák oxidációjával olyan termék keletkezik ami fényt emittál és a kibocsátott fény fotóeljárással (pl. röntgenfilmen) detektálható (5. ábra).



5. ábra. Antigén-antitest kölcsönhatás detektálása kemilumineszcenciás módszerrel

A kemilumineszcenciás detektálás napjainkban széles körben elterjedt, mivel a színreakción alapuló módszernél érzékenyebb, míg a radioaktív módszerrel szemben gyakorlatilag veszélytelen.

FEHÉRJE EXPRESSZIÓ VÁLTOZÁSÁNAK KIMUTATÁSA WESTERN BLOT TECHNIKÁVAL

Szondy Zsuzsa

Elméleti háttér

A T sejtek differenciálódása a tímuszban történik, és különösen nagy intenzitással zajlik az egerek születését követő első 4 hétben. Ilyenkor a tímusz gyors növekedése is kimutatható, ami a csontvelőből a tímuszba kerülő pre T-sejtek nagyfokú osztódásának az eredménye. A T sejtek funkciójához alapvetően szükséges a megfelelő T sejt receptor, amely speciálisan képes az antigén felismerésére, ami peptid formájában az antigén prezentáló sejteken az MHC molekulákhoz kötötten helyezkedik el. A T sejt receptor véletlenszerűen keletkezik (a potenciálisan sokféle antigén felismerésére) és számunkra funkcionálisan jó és nem használható T sejt receptorral rendelkező sejtek is keletkeznek. A funkcionálisan jó T sejtek az antigén prezentáló sejtekkel történő interakció során differenciálódnak indulnak és lezárják a sejthalál programot. A többi sejt azonban érzékeny a sejthalál programot indító jelekre és hatásukra folyamatosan elhal a tímuszban belül. E jelek közül a glükokortikoid hormon a leghatásosabb, amely a vérben alacsony koncentrációban mindig jelen van. Kísérletünkben a glükokortikoid hormont nagy koncentrációban adjuk, amely az érzékeny sejtekben azonnal elindítja a sejthalál programot. Ennek a programnak része a transzglutamináz enzim expressziójának fokozódása. Az enzim keresztkötést hoz létre a fehérjék glutamin és lizin oldallánca között. A keletkező fehérjeburok megakadályozza a sejttartalom kiáramlását, a felszíni szerkezet megváltozása pedig hozzájárul ahhoz, hogy a makrofágok az elhaló sejtet felvegyék. A gyakorlaton az enzimfehérje mennyiségét Western blot technikával detektáljuk.

A kísérlet kivitelezése

Tímuszminták előkészítése

Kísérleti állatok

3 hetes NMRI egerek, amelyeket 0,5 mg dexametazonnal oltottunk i.p. 24 órával az egerek leölése előtt.

A kísérlethez szükséges anyagok

Dietiléter

Homogenizáló puffer (0,1 M Tris-HCl, 0,25 M szacharóz, 0,5 mM EDTA pH 8,3)
Használat előtt 1 ml homogenizáló pufferhoz 10 µl fenil-metil-szulfonil fluoridot (12 mg/ml izopropanolban) adunk a proteázok meggátlására.

Hígító oldat fehérje meghatározáshoz (25 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,5 mM EDTA, 0,02 % Na-azid pH 7,6)

Bradford fehérje reagens (BioRad)

2 x denaturáló oldat (0,125 M Tris HCl, 4% SDS 20% glicerin, 10% merkaptotanol, 0,02% brómfenolkék, pH 6,8)

Feladat

Altassa el az egeret éterrel (2 hallgató egerenként). Távolítsa el a teljes tímuszt. Mérje le a tímusz súlyát. A tímusz súlyának csökkenése jelzi a sejthalál folyamat előrehaladtát.

Homogenizálja a tímuszt 2 ml homogenizáló pufferban jégen.

Pipettázza át a homogenizátumot egy jégen tartott kémcsőbe. Határozza meg fehérje koncentrációját a következő táblázat szerint:

Kémcső	Vak	Standard	Minta
BSA (1mg/ml)	ml	0,005	-
Homogenizátum	ml	-	0,005
Hígító oldat	ml	0,800	0,795
Bradford reagens	ml	0,200	0,200

Mérje le az oldatok abszorpcióját 5 perc múlva 595 nm-en. (Ha a homogenizátum oldata túl kék, hígítsa meg a homogenizátumot 5 x-ére a homogenizáló pufferral.) A BSA standard koncentráció ismeretében számítsa ki a homogenizátum (minta) fehérje koncentrációját. Hígítsa meg a homogenizátumot a homogenizáló pufferral úgy, hogy a homogenizátum végleges fehérje koncentrációja 2 mg/ml legyen. (Ez azért kell, hogy azonos fehérje mennyiségre vonatkoztatva hasonlítsuk össze a transzglutamináz expressziót. Másrészt, magasabb koncentráció esetén a denaturálás során a fehérje és a DNS kocsonyásan kicsapódik.)

Vegyen ki 0,5 ml hígított homogenizátumot egy Eppendorf centrifuga csőbe. Tegyen hozzá 0,5 ml 2 x denaturáló (Laemmli) oldatot, majd helyezze az egészet 10 percre forró vízfürdőbe.

10 %-os poliakrilamid gél készítése

A gél a gyakorlat elején öntse meg. Addig, amíg a minták elkészülnek, a gél megdermed. (A szükséges anyagok leírása a Fehérjék poliakrilamid gél elektroforézise fejezetben található.)

Készítse el a szeparáló gél:

Gél puffer	7,5 ml
Akrlamid törzsoldat	10,0 ml
Desztillált víz	12,2 ml
20% SDS	0,15 ml
10 % ammonium perszulfát oldat	0,15 ml
TEMED	0,01 ml

A gél polimerizálódása után (kb.90 perc) készítse el a felső gél:

Felső gél puffer	2,5 ml
Akrlamid törzsoldat	1,5 ml
Desztillált víz	6,15 ml
10% ammonium perszulfát oldat	0,1 ml
20% SDS oldat	0,1 ml
TEMED	0,005 ml

Helyezze be a fésűt és várjon kb. 15 percig.

Távolítsa el a fésűt és helyezze be a gél az elektroforézis készülékbe. Töltse fel a tartályt a futtató pufferral. Hamilton pipettával vigyen fel 100 µl mintát, valamint 1 µl molekula tömeg standard keveréket egy külön vályúba. Mossa jól ki a pipettát a minta felvitele után.

Futtatás: 30 mA áramerősséggel amíg a felső gélben van a minta, utána 60 mA.

A fehérjék blottolása

A kísérlethez szükséges anyag

Blottoló puffer (25 mM Tris HCl, 0,192 M glicin, 20% metanol, pH 8,3)

Feladat

Helyezze át a gélt a blottoló készülékbe, PVDF membránnal együtt 3 réteg Whatman papír közé. A blottolást egy éjszakán át végezze.

A PVDF membrán blokkolása, antitest jelölés

A kísérlethez szükséges anyagok

TTBS oldat (20 mM Tris, 0.005% Tween fizioiógias NaCl oldatban, pH 7,5)

TTBS/BSA oldat (1 % BSA TTBS-ben)

Első antitest: egérben termelt monoklonális anti-transz glutamináz antitest

Második antitest: kecskében termelt peroxidáz jelölt anti-egér IgG antitest (Sigma)

Feladat

Vegye ki a PVDF-t a blottoló készülékből, helyezze egy műanyag tálba és blokkolja a szabad fehérjekötő csoportokat TTBS/BSA-val szobahőn 1 óráig állandó rázatás mellett.

1 óra múlva helyezze az 1:50 arányban hígított egér anti-transz glutamináz antitestet a TTBS/BSA-hoz. Helyezze a rázó készüléket hideg szobába és 1 napig rázassa a membránt az első antitesttel.

Mossa le az első, antitestet feleslegét 2 rész TTBS, 1 rész TTBS/BSA oldattal (3 x 20 perc) szobahőmérsékleten állandó mozgás mellett.

Helyezzen rá TTBS/BSA oldatot és a második antitestet 1:200 hígításban. Inkubálja egy órán keresztül szobahőn állandó rázás mellett.

Mossa le a feleslegben maradt második antitestet a korábban leirt módon.

A kötődött antitest láthatóvá tétele

A kísérlethez szükséges anyag

Előhívó oldat (Frissen készítsük úgy, hogy az Amersham cég ECL kitjének két komponensét 1:1 arányban összekeverjük).

Feladat

Tartsa a PVDF membránt 10 percig az előhívó oldatban. Utána öntse le az előhívó folyadékot, és vegye ki a PVDF-et. Takarja le fóliával és hozza össze egy kazettában rtg. filmmel 10 percre. Hívja elő a filmet. A kötődött antitestben lévő peroxidáz a luminolt oxidálja, és a keletkező fluoreszcencia a filmen sötétedést hoz létre. A sötétedés mértéke arányos az ott található transz glutamináz mennyiségével.

Kiértékelés

A molekula tömeg standardok segítségével határozza meg a transz glutamináz molekulatömegét! Hogyan változik a transz glutamináz expresszió a tímusz involúciója során?

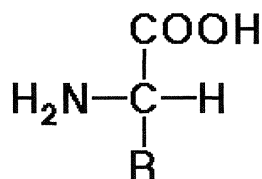
OLIGO-PEPTIDSZINTÉZIS

Andirkó István

Elméleti háttér

Az aminosavak kémiai szempontból amino- és karboxil-csoportot tartalmazó vegyületek. E vegyületsoprotot a végtelen változatosság jellemzi, számtalan aminosav írható fel elméletben ill. ezek természetesen elő is állíthatóak. Érdeklődésünk azonban csak a biológiai jelentőségű aminosavak iránt nagy, és valójában a szakirodalom csak a természetben megtalálható fehérjék bontásával (hidrolízisével) nyert α -aminosavakat nevezi *aminosavnak*. Ezen *aminosavakban* az aminocsoport a karboxilcsoporthoz viszonyítva az α helyzetű szénhez kapcsolódik.

A természetes aminosavak L sztereokémiájúak és *alfa*-NH₂-t tartalmaznak:



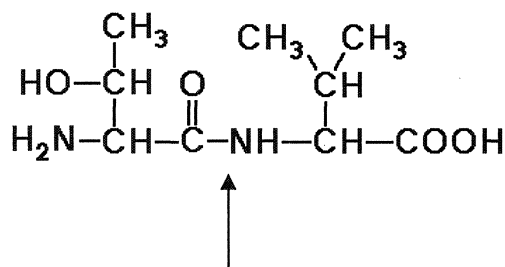
szerkezetük az R csoportban különbözik

~20 természetes aminosavat ismerünk

~10 (esszenciális) aminosavat a táplálékkal veszünk magunkhoz(a többit képesek vagyunk szintetizálni)

Peptidek - amidkötéssel összekapcsolt aminosavak

az elnevezés az N-terminális (szabad amin) felől a C-terminális (szabad karboxil) felé történik, az aminosavak -in végződését az utolsó kivételével -ilre cseréljük pl. a treonil-valin dipeptid a Thr-Val (treonil-valin):



A molekulában a -CO-NH- (amid) kötést nevezük peptidkötésnek (nyíl), a kötés nevéből ered a fehérjék szinonimájaként használt polipeptid elnevezés is.

a peptideket 3-betűs (néha 1-betűs) kóddal jelölik

a peptidek variációja óriási, a 20 aminosavat használva

20

400

8.000

160.000

5.200.000

etc. építhető fel.

aminosav

dipeptid

tripeptid

tetrapeptid

pentapeptid

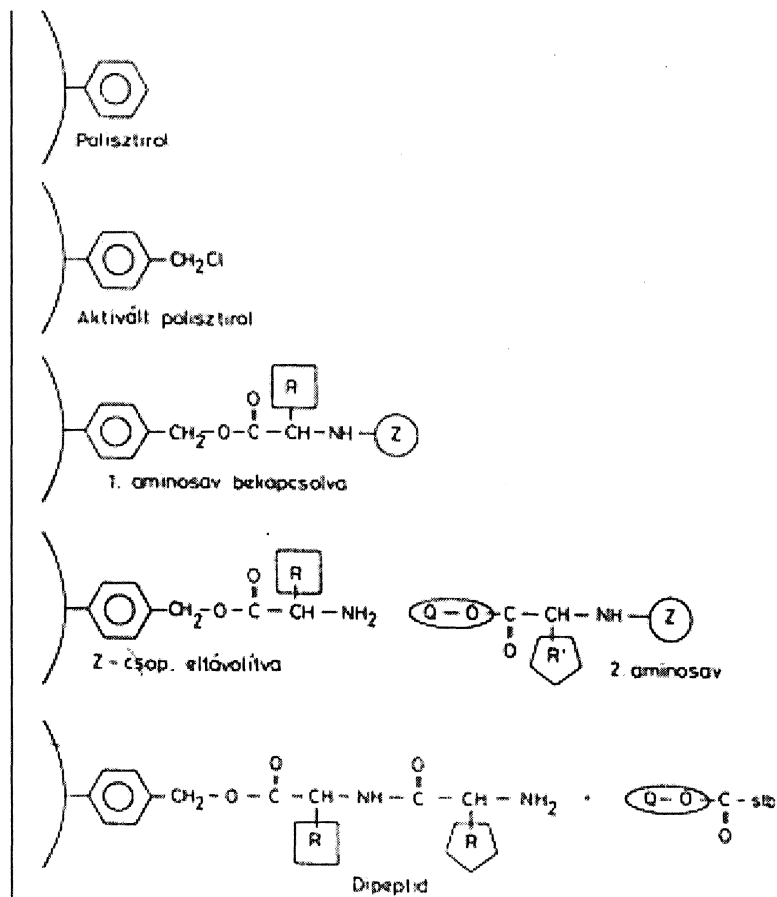
Egy tipikus fehérje 100-nál több aminosavból áll, így a variációk száma hatalmas

Peptid szintézis

Az egyszerű kémcsőben történő előállítás során ha egy Thr-Val-Gly tripeptidet akarunk szintetizálni, induláskor a Thr és Val aminosavakat reagáltatjuk. Két terméket kapunk: egyik a kívánt Thr-Val, a másik a Val-Thr mint melléktermék. A dipeptidkeveréket kromatográfiás módszerrel szétválasztva, a tiszta treonil-valinhoz adjuk a glicint. Ekkor ismét kétféle termék keletkezik, Gly-Thr-Val, ez az amit nem kívántuk előállítani, és végül keletkezik a céltermék a Thr-Val-Gly. Ismét kromatográfiás elválasztás szükséges a tiszta céltermék kinyerésére. Látható, hogy a módszer örökös hadakozás a melléktermékektől való megszabadulásért, és persze a költségeket nagyban emeli a nem kívánt termékek képződése során elveszített aminosav mennyiség is.

Az eljárás egyszerűbbé tétele és a mellékreakciók kiküszöbölése Merrifield zseniális ötletén alapul. Az 1963-ban kidolgozott szilárd hordozón végzett szintézisért 1984-ben Nobel-díjat kapott. A Merrifield-féle peptidszintézis leegyszerűsített lényege, hogy az első aminosavat hozzákapcsolják egy finomszemcsés szilárd hordozóhoz, majd újabb aminosavat kapcsolnak az előzőhöz, és az aminosavak egyenkénti kapcsolását a kívánt lánchossz eléréséig folytatják. Ezután a kész peptidet lehasítják a hordozóról (1. ábra).

Ez az eljárás azért is fontos számunkra, mert a lépésről lépésre épülő peptidet nagyon könnyű megtisztítani a melléktermékektől: a reagensektől (ezekre a kapcsolatteremtéshez van szükség) és a fölösleges aminosavaktól (amiket általában nagy fölöslegben alkalmaznak a reakció teljessé tételéhez, a kapcsolások hatásfoka 99% feletti). Addig mossuk a reakcióterméket, amíg a szűrőn nem marad más csak a műgyanta (ez a szilárd hordozó) és a hozzákapcsolt peptidmolekula. Így a folyamat végén a gyantáról tiszta peptid hasítható le.



1. ábra A Merrifield féle peptidszintézis elvi vázlatja:

Az 1. ábrából látható, hogy az előbb tömören és egyszerűen felvázolt szintézis a valóságban azért egy kicsit bonyolultabb, hiszen

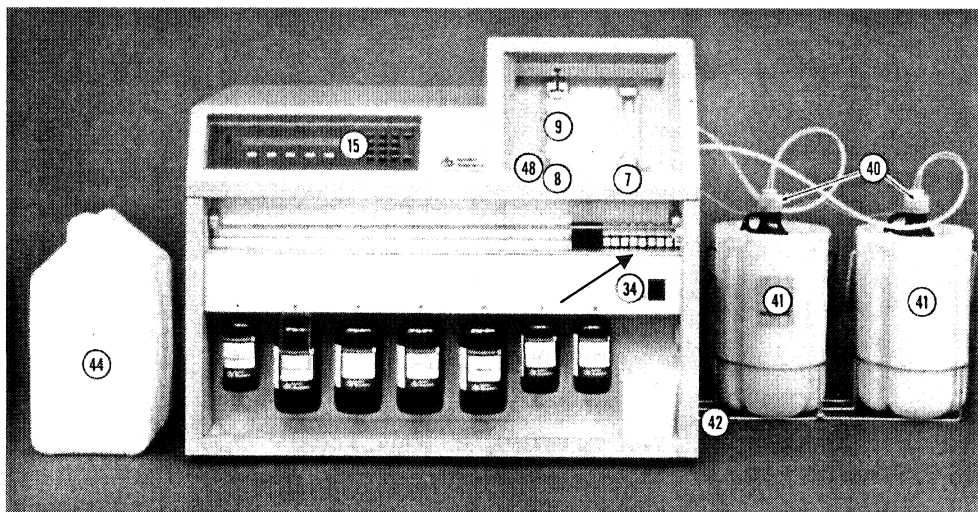
- meg kell akadályozni a gyanta-peptid komplex aminosavainak oldal-csoportjain való kapcsolódást
- a láncnövekedési reakció nem csak az aminosavi aminocsoporton hanem az oldallánc -NH₂, -OH és -SH csoportjain is lejátszódhatna
- , és el kell érni, hogy az aktuálisan kapcsolni kívánt aminosav csak „egy példányban” kapcsolódjék a kívánt láncrészlethez, ill. a reakció-elegyben önmagával se kapcsolódjon ez az aminosav.

Ezt megfelelő védő csoportokkal lehet elérni (az ábrán R, R' és Z). Ezeket a védő csoportokat aztán a láncnövelő lépések befejezésekor a peptidnek a gyantáról való lehasítása során eltávolítjuk.

Automata peptid szintetizátor

Az eljárás alkalmas az automatizálásra is. Míg az 1960-as években az ELTE Szerves Kémiai Tanszéke a Richter Gedeon Gyógyszergyár szakembereivel karöltve egy huszonegynéhány tagú peptidet több mint egy évig szintetizált, addig napjainkban az Applied Biosystems automatájával mindez alig több mint egy nap.

Az automata készülék előlnézeti képe a 2. ábrán szerepel. A szintézis megkezdése előtt a készüléket kalibrálni kell, hogy az oldószerekből és segédanyagokból megfelelő mennyiségeket adagoljon. A nyíllal jelzett helyen kis cartridge-okban lehet előkészíteni a kapcsolási sorrendnek megfelelő védett aminosavakat. A segédanyagokat és a védőcsoport lehasítását végző piperidint a készülék alsó részén a gyári kiserelésű üvegek közvetlen felcsatlakoztatásával lehet előkészíteni, az oldószerek: az N-metil-pirrolidon és a diklórmetán (41 számú edények) nagyobb kiserelésben a készülék mellett csatlakoztathatók.



2. ábra Applied Biosystems Model 431A Peptid szintetizáló Automata

A megfelelő szilárd hordozót (speciális műgyanta szemcsék) az ábrán 9-essel jelzett reakciótartályba mérjük, kihordódásukat alul és felül filterek akadályozzák. Ezután programot írunk a szintézis végrehajtásához.

Az előkészületek után a szintézis elindításakor egy speciális fecskendő hatol be az első cartridge-ba, oldószerkeletet juttat be és feloldja a védett aminosavat, majd a folyadékelegy a 7-essel jelzett aktivátor tartályba kerül, ahol a kapcsolást segítő segédanyagokat is hozzáadagolja az automata, és a tartály üvegszűrő alapján keresztül tiszta nitrogéngázzal keveri. Majd az üvegszűrőn átszűrve a reakciótartályba jut az N-terminálison védett aminosav és karboxilcsoportjával hozzákapcsolódik a gyanta aktív helyeihez. A reakció lejátszódása után a gyantáról a folyadékfázist leszívja a készülék a 44-essel jelölt hulladéktároló edénybe, a gyantát oldószerrel mossa, majd az N-terminálist védő csoportot lehasítja piperidinnel. (Az esetleges aminosav oldalcsoportokat védő csoportok nem hasadnak le.) Alapos mosás után a gyanta-aminosav komplex készen áll az újabb kapcsolásra, hiszen N-terminálisa immár szabad, és a hozzá adagolt N-terminálison védett aminosav kizárólag a kívánt láncnövelési reakcióban tud részt venni. A második lépés végén már gyanta-dipeptid komplexünk van és így folytatjuk az építkezést a kívánt oligopeptid eléréséig.

A láncnövelő lépések befejezése után a reakciótartályt szétszedve a tiszta gyanta-oligopeptid komplex kinyerhető. Ezt trifluorecetsavas hasítóeleggyel kezeljük, amely nemcsak lehasítja a gyantáról a peptidet, de az oldalcsoportokat maszkírozó védőcsoportokat is eltávolítja a peptidről.

A készülék segítségével 0,1-0,5 mmol peptid előállítására van lehetőség a kapcsolások maximális számát általában 100 körül határozzák meg, ilyen tagszámnál már (szerkezettől függően) a peptid olyan gomolyagot alkothat, amihez a következő aminosavak már nehezen férnek hozzá.

Végezetül egy tájékoztató adat: az oligopeptid előállításának költsége a fenti automatával kapcsolásonként 20-30 \$.

FEHÉRJÉK AMINOSAV ÖSSZETÉTELÉNEK MEGHATÁROZÁSA, FEHÉRJÉK SZEKVENÁLÁSA

Tózsér József

Fehérjék aminosav összetételének vizsgálata

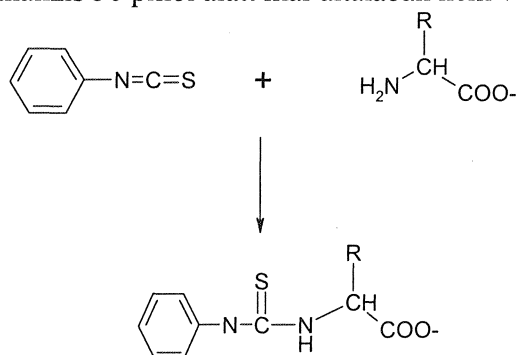
A fehérjék aminosav összetételének meghatározása része a fehérjék jellemzésének. Egy fehérje aminosav összetétele utalhat a fehérje funkciójára, valamint fontos információ a fehérje tápértékének jellemzésére. Jelentős lehet annak eldöntésében, hogy pontosan mekkora a vizsgálandó fehérje koncentrációja, illetve nagyszámú peptid fragmens közül segíthet a szekvenálásra alkalmasak kiválasztásában. Azonban kis mennyiségű minta esetén célszerűbb azt inkább fehérjeszekvenálásra felhasználni.

A fehérjék aminosav összetételének meghatározásához előbb hidrolizálni kell az adott fehérjét, az aminosavakat detektálható formává kell alakítani, (pl. ninhidrin reagenssel, o-ftálaldehiddel vagy fluoreszkaminnal), és az aminosavakat egymástól el kell választani. Ez utóbbi lépésre legelterjedtebb az ioncserés kromatográfia vagy reverz-fázisú HPLC használata. Az aminosavak derivatizálása megelőzheti ill. követheti a szeparálási lépést.

A számtalan alkalmazott módszer közül egy korszerű és érzékeny módszert ismertetünk vázlatosan. A Pico-Tag (Waters) módszer három lépésből áll:

1. fehérje és peptidminták hidrolízise,
2. derivatizáció,
3. analízis reverz-fázisú HPLC-n.

A derivatizációs lépésben fenilizotiocianáttal (PITC) feniltiokarbamoil (PTC) - aminosavak keletkeznek (1.ábra). Mivel a PITC a primer és szekunder aminosavakkal is egyformán reagál, ezért a Pro és Pro(OH) a többi aminosavakhoz hasonló mértékű választ ad. A lizin viszont (a két aminocsoportja miatt) nagyobb erősségű jelet ad. A módszer érzékenysége 1 pmól, de pontos aminosav analízis 50 pmól alatt már általában nem végezhető.



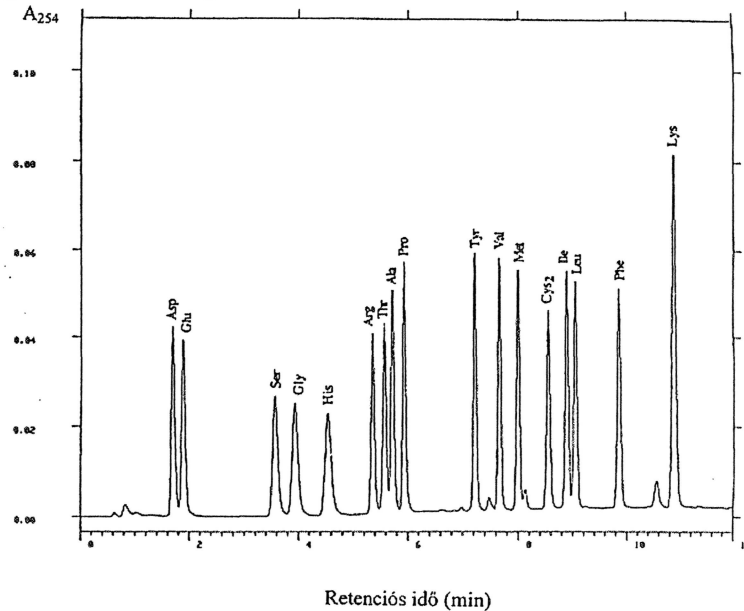
1. ábra. PTC aminosavak képződése

Az analízis lépései

1. A fehérje és peptidminták hidrolízise 6 M HCl-al történik (1% fenol jelenlétében, mely a triptofán degradációját akadályozza meg). A szennyezések elkerülése lényeges. Tris és egyéb primer és szekunder amin tartalmú anyagok jelenléte nem megengedett. Lehetőleg só, detergens és lipidmentes mintára van szükség az analízishez. A hidrolízis vákumban, 110 °C-on 24, 48 vagy 72 óráig, illetve 165 °C-on 1 óráig történik. Ez utóbbi esetben a szerin, treonin és tirozin meghatározott mennyisége kisebb az elméleti értéknél. Ezzel a módszerrel Cys meghatározása nem lehetséges. A hidrolízis után újra liofilizálni kell a mintát etanol, trietilamin és víz elegyéből. Ez a lépés a pH megváltoztatásához szükséges.

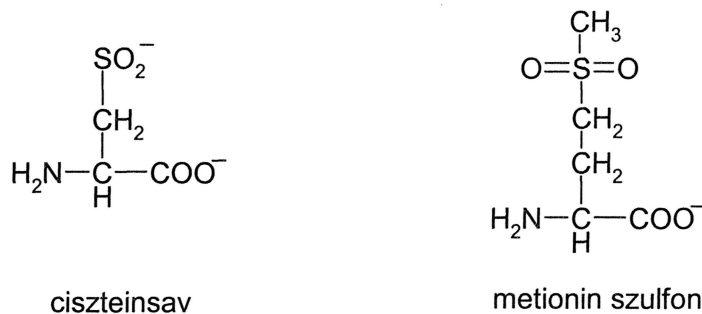
2. A derivatizáció során a PITC-t hozzáadják a reakció csövekhez majd 20 percig inkubálják szobahőmérsékleten. A mintát a főlegben lévő reagens eltávolítása céljából ismét liofilizálni kell.

3. Az analízis reverz-fázisú HPLC-n történik. A mintát 5 % acetonitrilt tartalmazó 5 mM foszfát pufferrel (pH 7.4) hígítják. Az aminosav származékokat Nova-Pak vagy Pico-Tag C₁₈-as oszlopon választják el. A detektálás 254 nm-en történik. Az oszlopfűtés 40 °C, az A puffer: 139 mM Na-acetát, pH 6.5, 3.6 mM trietilamin, 6% acetonitril és a B puffer: 60 % acetonitril összetételű. Egy tipikus elució képet mutat a 2. ábra.



2. ábra. Standard aminosav hidrolizátum elválasztása C₁₈-as oszlopon (A Cys₂ a fehérjében levő diszulfid hidakból keletkező cisztin elució pozícióját jelzi)

A triptofán és cisztein instabil normál hidrolízis körülmények mellett. Amennyiben a Trp kimutatása lényeges, célszerű metánszulfonsavas hidrolízist alkalmazni. A Cys kimutatására többféle módszer is alkalmazható. Vagy alkilálni kell (pl. 4-vinilpiridinnel), vagy savstabilis szulfonsavvá, ciszteinsavvá kell oxidálni, például perhangyasavval. Ez utóbbi esetben a metionin metionin szulfoná alakul.



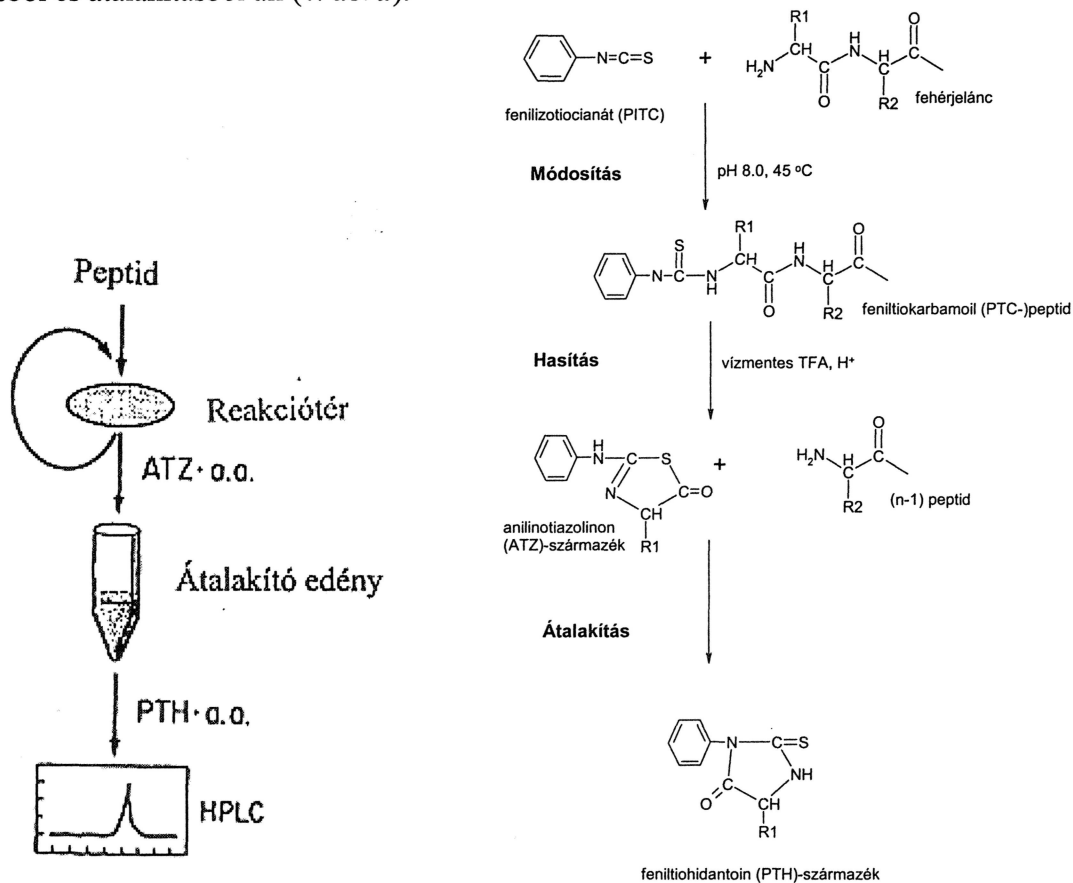
3. ábra. A ciszteinsav és metionin szulfon képlete

Fehérjeszekvenálás

A protein mikroszekvenálás leggyakoribb célja részleges fehérjeszekvenancia szolgáltatása (1) PCR primerek és oligonukleotid próbáktervezéséhez, (2) anti-peptid antitest preparálásához illetve (3) egy izolált fehérje azonosítására. Klónozáshoz egy fehérje N-terminális szekvenciájának meghatározása rendkívül hasznos lehet: A kódoló régió N-terminális

alapján tervezett primer és a mRNA poliA farka elleni primer felhasználásával teljes hosszúságú klón izolálható PCR segítségével.

A fehérjeszekvenálás lényege a vizsgált fehérje N-terminális aminosavjának reagáltatása Edman reagenssel, fenilizotiocianáttal (PITC). A reakció (egy ciklus) 3 lépésből, módosításból, hasításból és átalakításból áll (4. ábra).



4. ábra. A szekvenálás kémiai lépései

5. ábra. Egy szekvenálási ciklus

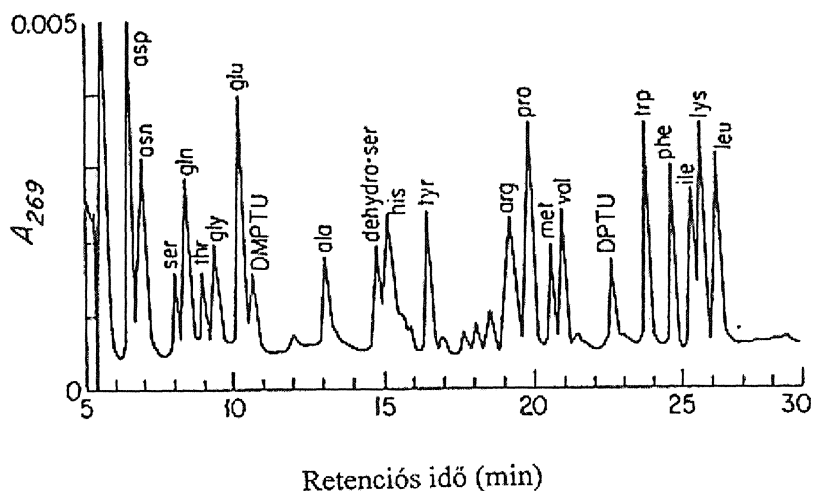
Egy ciklus során a fehérje N-terminális aminosavja hasad le, és ezt HPLC-vel azonosítják. Az automata fehérjeszekvenátor működésének lényege a következő (5. ábra). A mintát egy kémiaileg módosított üvegszál-lemezre vagy pórusos polivinilidén fluorid (PVDF) membránra viszik fel. A peptid (vagy fehérje) ehhez kötve marad a módosítási és hasítási lépés során. A készülékek típusát megkülönböztetjük aszerint, hogy a minta kovalensen van-e kötve a hordozóhoz, ill. gáz vagy folyadék fázisban történik-e a módosítási és hasítási lépés.

A módosítási lépésben a PITC kémiaileg módosítja a protein N-terminálisát, és feniltokarbamoil-peptid (PTC-peptid) képződik. A fehérje N-terminálisának korábbi módosulása (acetilálás, formilálás, zsírsav acilálás vagy ciklizáció) ezt a lépést nem teszi lehetővé.

A hasítási lépésben vízmentes trifluorecetsav (TFA) hatására a PTC-N-terminális aminosav lehasad a polipeptid láncról. Az így keletkezett (n-1) hosszúságú peptid később újabb ciklusban vehet részt. A hasítás során keletkező anilinothiazolinon-aminosav származékot extrahálni kell a hordozóról, és egy átalakító edénybe kell juttatni. Az átalakító edényben az aminosav származék vizes közegben, savas pH-n PTC-aminosav származékon keresztül stabil feniltiohidantoin (PTH) származékká alakul.

PTH aminosavak azonosítása

A legáltalánosabban elterjedt módszer a PTH-aminosavak azonosítására a reverz-fázisú HPLC kromatográfia, mely során a PTH-aminosavakat UV abszorpciójuk alapján azonosítják. Az oszlopról eluálódó húsz fehérjealkotó aminosav-PTH-származék könnyen azonosítható a retenciós idő alapján. (6. ábra).



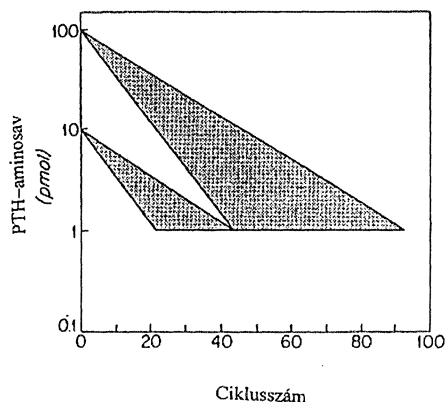
6. ábra. PTH aminosavak elúciós profilja. DMPTU és DPTU a szekvenálási reakció melléktermékei, és referenciacsúcsokként használhatóak.

Az Edman lebontás melléktermékei a PITC, DTT valamint bázisok (trimetilamin, trietilamin vagy diizopropiletilamin) reakciójából keletkeznek. Módosított aminosavak szintén detektálhatóak, pl. foszforilált szerin esetén PTH-dehidroalanin mutatható ki. Glikozilált aminosavak csak közvetve mutathatók ki, általában vak ciklust eredményeznek, mert a PTH-aminosav származék extrakciója csak nagyon rossz hatásfokú.

Fehérjeszekvenáló készülékek jellemzése

1. Az érzékenység manapság átl. 1 pmol, vagy jobb.
2. A kiindulási kitermelés általában 50-80% (ha az N terminális nem blokkolt).
3. Az ismétlési kitermelés általában 80-96%, függ a szekenciától és a peptid hosszától.

Ez a három paraméter együttesen meghatározza, hogy egy fehérje adott mennyiségéből hány aminosavrészt lehet meghatározni. Pl. 10 pmol peptidből 95%-os ismétlési kitermeléssel és 1 pmol érzékenység esetén 40 aminosavrészt lehet meghatározni. A 7. ábra 10 és 100 pmol kiindulási anyagmennyiség mellett mutatja be az ismételt kitermelés és az elérhető maximális ciklusszám közötti összefüggést.



7. ábra. A ciklusszám függése a vizsgált anyagmennyiségtől és a kitermeléstől

A peptid szekvenálás kémiai problémái

1. A PITC lebomlása vagy mellékreakciója csökkenti a kitermelést. Primer vagy szekunder aminok reagálnak a PITC-vel illetve oxidálószeres is elbontják.

2. Nagy mennyiségű puffer-só (pK <8.0) elviheti a pH-t, rossz hatásfokú kapcsolást okozva. Általánosságban a sók nem oldódnak azokban a szerves oldószerekben, melyek a szekvenálási lépéseknél használatosak, és a hordozón maradnak a szekvenálás során.

3. TFA neutralizációja puffer komponensekkel rontja a hasítás hatásfokát.

4. A fehérje N-terminálisának blokkolódása megakadályozza az Edman reakciót. Cianát és aldehidek a leggyakoribb szennyezők, melyek blokkolhatják a fehérjét. (Ammónium cianát jelentős mennyiségben keletkezik koncentrált alkalikus urea oldatban, melyet gyakran használnak fehérjetisztítás során).

5. A PTH-aminosavak reverz-fázisú HPLC analízisét számos UV-elnyelő anyag (A_{269} nm) nehezíti. Nyomnyi mennyiségű primer aminok a PITC-vel reagálva olyan anyagokat hoznak létre, melyek elfedhetik a PTH-aminosav csúcsoakat.

6. A szekvenáláshoz használt minta nem tartalmazhat puffereket és primer aminokat (pl. Tris, glicin), glicerolt vagy szacharózt (nagyon viszkózussá teszik a mintát), nemionos detergenst (Triton X-100, Brij, Tween), melyek gyakran tartalmaznak aldehideket, oxidánsokat, és nagyobb mennyiségű (> 0,1 %) SDS-t, mely jelenlétében a minta könnyen "leemosódik" a hordozóról.

Minta előkészítés szekvenáláshoz. Fehérjetisztítási módszerek.

A leggyakrabban használt módszer SDS-PAGE és elektroblottolás PVDF membránra vagy reverz-fázisú HPLC alkalmazása. Becslések szerint egy eukarióta sejt intracelluláris fehérjei 75%-ának poszttranszlációs módosítással blokkolt az N-terminális. Továbbá számos tisztítási lépés is vezethet a tisztítandó fehérje N-terminálisának blokkolásához. Ilyen esetben vagy a blokkoló csoportot el kell távolítani, vagy fragmentálni kell a fehérjét A teljes fehérje szekvencia meghatározásához legalább két független hasítási eljárást kell végezni annak érdekében, hogy két egymással átfedésbe hozható szekvencia sorozatot nyerjünk. A teljes szekvenciát az átfedések segítségével lehet megállapítani. A leggyakrabban használt hasítási eljárásokat az 1. táblázat foglalja össze.

1. táblázat. Fehérjék fragmentálására leggyakrabban használt ágensek

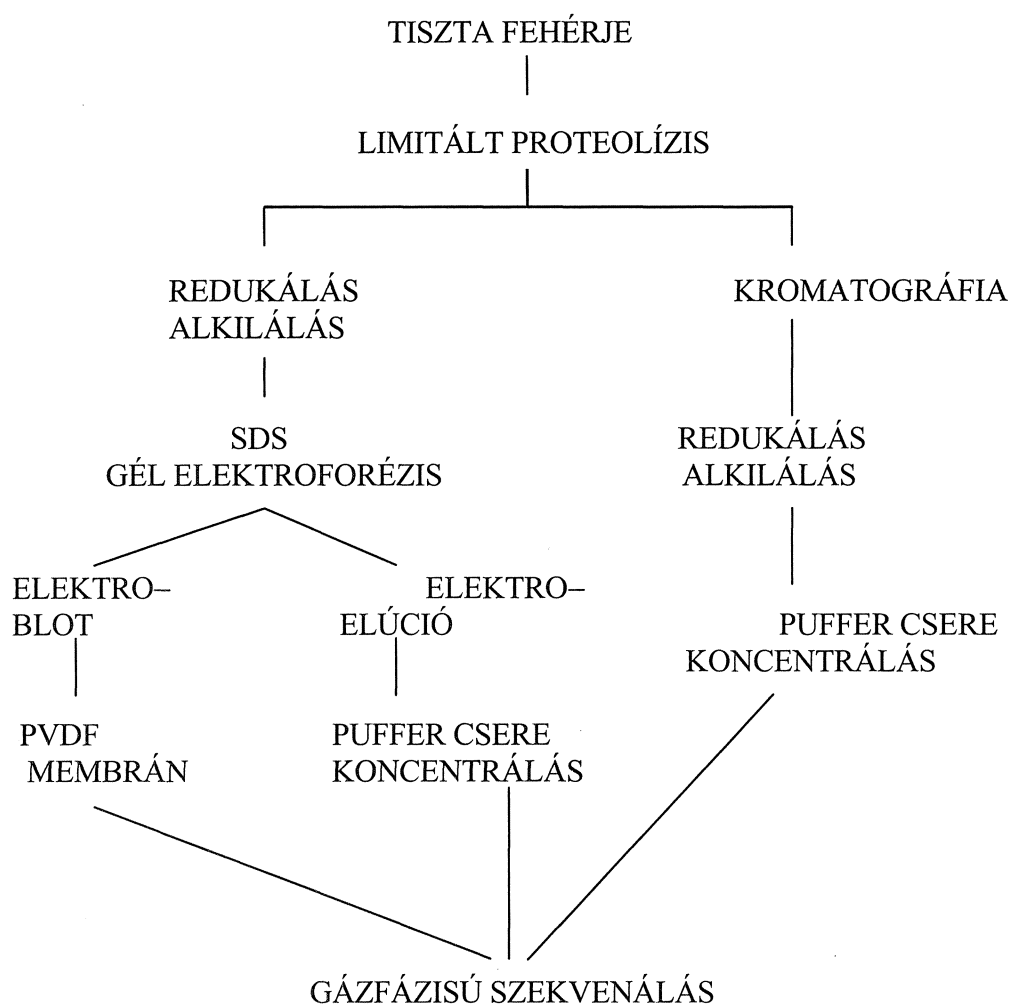
Ágens	Specifititás	Forrás
Lys-C endoproteináz	Lys-X	<i>Lysobacter enzymogenes</i>
Endoproteináz Asp-N	X-Asp	<i>Pseudomonas fragi</i>
V8 proteáz	Glu-X, Asp-X	<i>Staphylococcus aureus</i>
Tripszin	Lys-X, Arg-X	Szarvasmarha pankreász
Kimotripszin	Trp-X, Tyr-X, Phe-X, Leu-X	Szarvasmarha pankreász
Cianogén bromid	Met-X	Kémiai szintézis
Jódbenzoészav	Trp-X	Kémiai szintézis

Mivel gyakran SDS-PAGE az utolsó fehérjetisztítási lépés, célszerű olyan protokolt választani, melyre az így nyert minták felhasználhatóak (8. ábra).

A fehérje elektroeluálható a gélből.

A fehérje hasítható a gélmátrixban.

A fehérje blottolható, és hasítható a membránon.



8. ábra. Egy tipikus, fehérjehasítást is tartalmazó szekvenálási protokoll

A tripszines hasítás előnye, hogy 2 M ureában is megy, hátránya, hogy általában túl sok fragmens keletkezik. A nagyobb fragmenseket (pl. CNBr-os hasítás) azonban általában nehezebb izolálni homogén formában, és általában rosszul oldódnak.

Kiértékelés

Ha egy protein szekvenciáját meghatároztuk, az első lépés az adatbankokban lévő szekvenciákkal való összehasonlítás, hogy azonosítsuk: a mintánk egy még ismeretlen fehérje, egy ismert fehérje, vagy egy ismert fehérjéhez hasonló-e. Ha egy hasonló fehérjének a háromdimenziós szerkezete ismert, az kiindulásul szolgálhat a vizsgált fehérje szerkezetének jóslásához. Ha teljesen ismeretlen fehérjét szekvenáltunk, akkor másodlagos szerkezet predikciójára alkalmas módszereket használva (pl. Chou-Fasman) becsülhetjük meg a fehérje jellegét. Szintén célszerű a pattern-felismerő programok használata, melyek pl. potenciális foszforilációs, glikozilációs, stb. helyeket vagy lehetséges aktív centrumot jelölnek meg a fehérje szekvenciában.

Tömegspektrometria felhasználása fehérjék azonosítására

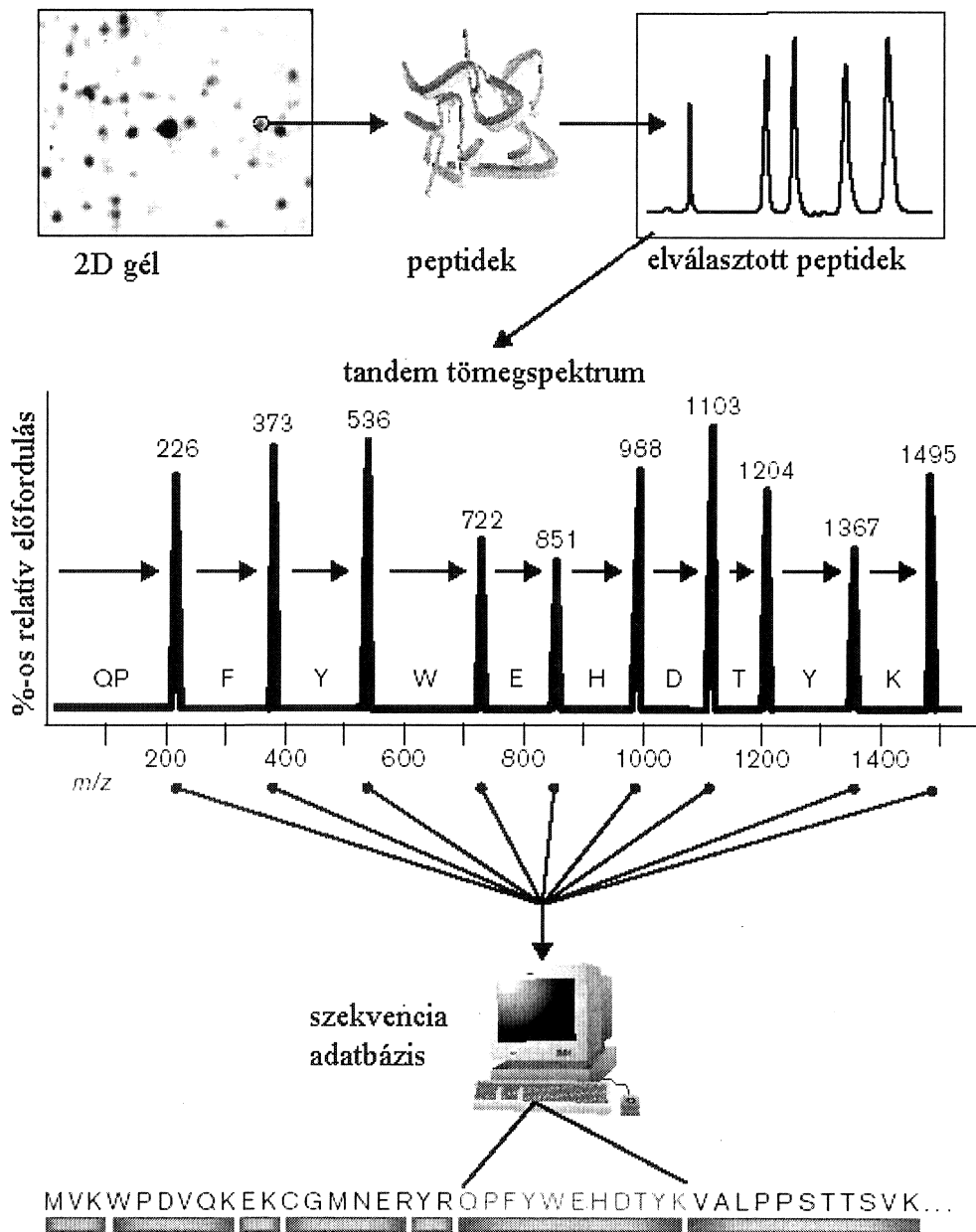
Az utóbbi időben a tömegspektrográfia (MS) jelentős szerepet kezd betölteni fehérjék elsődleges szerkezetének meghatározásában illetve fehérjék azonosításában. Különösen hasznos lehet N-terminálisan blokkolt fehérjék esetén, melyek Edman lebontással közvetlenül nem szekvenálhatók.

A legelterjedtebb tömegspektrometriás alkalmazásnál a fehérjemolekulák ionizációja lézer besugárzással történik. Az ilyen MALDI (matrix-assisted laser desorption ionisation) TOF (time of flight) készülékekben a molekulaionok repülési idejét mérik. Ez a módszer különösen alkalmas kisebb és teljesen meghatározott genommal rendelkező fajok proteom analízisére.

Amennyiben a fehérjék azonosításához a fehérjék molekulatömegének pontos meghatározása önmagában nem elegendő, tandem tömegspektrométereket (MS–MS) alkalmaznak. Ezen készülékekben az ionizáció tipikusan elektron nyalábbal történik (ESI: electron spray ionization), mely peptid fragmenseket generál.

Napjainkban a proteomikai kutatások nagykapacitású fehérjemeghatározási módszereket igényelnek, melyek során kétdimenziós elektroforézissel szétválasztott fehérjék azonosítása szükséges. Erre a feladatra az Edman lebontás kis kapacitása miatt nem alkalmas, ezért a tömegspektrometriás módszerek alkalmazása egyre inkább előtérbe kerül (9. ábra)

A fehérjék szétválasztása 2D elektroforézissel történik. A megfestett fehérjefoltokat kivágják, és tripszinnel (vagy más proteázzal) emésztik. Az így kapott fragmenseket online HPLC-vel szétválasztják. Ezen fragmenseket ionizálják, majd fragmentálják, így szekvenciainformációt nyernek (tandem tömegspektum). A kiválasztott ionizált peptid tömegspektrumát összehasonlítják az adatbázisok alapján megjósolt tömegspektrummal. A fehérje biztonságos beazonosításához több peptid esetén is elvégzik ezt az analízist



9. ábra. Tipikus proteom analízis 2D elektroforézis-tömegspektrometria kombinációjával.

Az aminosavak fontosabb fizikai és kémiai tulajdonságai

Az aminosavak jellemzői közül itt csupán az analitika szempontjából fontos tulajdonságokkal foglalkozunk.

Fizikai tulajdonságok

Oldhatóság. Az aminosavak oldhatósága eltérő. Vízen jól oldódik a prolin, hidroxiprolin, glicin és alanin, a többi kevésbé. Legrosszabb a cisztin és a tirozin oldékonysága. Savas vagy alkalikus vizes oldatokban az oldékonyság általában megnő a sóképződés következtében. Az oldékonysági viszonyok akkor is megváltoznak, ha más aminosavak is jelen vannak. Poláros karakterük miatt szerves oldószerekben általában rossz az aminosavak oldékonysága.

Optikai aktivitás. A glicin kivételével valamennyi aminosav tartalmaz legalább egy asszimetriás szénatomot. Oldataik optikailag aktívak, azaz képesek elforgatni a poláros fény síkját. A természetes aminosavak L-konfigurációt mutatnak.

Elektrokémiai tulajdonság. Valamennyi természetes aminosavra jellemző, hogy a molekulán belül lejátszódó protonvándorlás következtében már szilárd állapotban is ún. ikerion formában vannak. Vizes oldatban az oldat pH értékétől függően változik az elektrokémiai állapot, az aminosav molekuláknak savas közegben pozitív, lúgos közegben negatív töltésük van. Az a pH érték, amelyen a kérdéses aminosavnak nincs töltése (ikerion forma), az izoelektromos pont. Az aminosavaknak ezt a tulajdonságát használjuk ki az ioncserélő gyantán történő kromatográfiás elválasztásuk során.

Kémiai tulajdonságok

Az aminosavak kémiai jellegét elsősorban a bázikus karakterű NH_2 – csoport, illetve a savas jellegű COOH csoport szabja meg.

Monoamino- monokarbonsavak azok az aminosavak, amelyekben a savas és bázikus csoportok száma azonos (glicin, alanin, szerin, cisztein, cisztein, fenilalanin, tirozin, triptofán, treonin, metionin, valin, leucin, izoleucin, prolin, hidroxiprolin).

A diamino -monokarbonsavak (két aminocsoport) bázikus jellegűek (hisztidin, lizin, arginin).

A monoamino – dikarbonsavak (két karboxilcsoport) savas kémhatásúak (aszparaginsav, glutaminsav). Az aminosavak kémiai viselkedését a jellegzetes funkciók mellett az α -szénatomhoz kapcsolódó R oldallánc jellege is befolyásolja.

A karboxilcsoport legfontosabb reakciója a dekarboxileződés. A hő vagy reagensek hatására lejátszódó reakció során a karboxilcsoportról CO_2 hasad le, és amin keletkezik. A szervezetben enzimek hatására játszódik le a dekarboxileződési folyamat, amelynek során számos biogén amin keletkezik.

Az α -aminocsoport legfontosabb reakciója a ninhidrin-reakció. A keletkező vegyület intenzív kékes-ibolyás színű, intenzitása 570nm-en mérhető. A prolin kivétel, a keletkező származék színe sárga, 440nm-en mérhető. A reakció kvantitatív jellege miatt a ninhidrin-reakció felhasználható az aminosavak mennyiségi meghatározására.

Az aminosavak meghatározása

Az élelmiszer-fehérjék tápértékének megállapításakor igen fontos az aminosav-összetétel és az egyes aminosavak arányának megállapítása. A különböző meghatározási eljárásokhoz a fehérjékben kötött aminosavakat fel kell szabadítani (hidrolízis), ill. a szabad állapotban levő aminosavak mellől a zavaró komponenseket el kell távolítani.

Az elválasztás első eredményes módszere a papírkromatográfia volt, vékonyréteg kromatográfiával hasonló szétválasztás érhető el. Napjainkban a modern kromatográfias módszerekkel történő meghatározás a legelterjedtebb. A HPLC alkalmazásával történő meghatározások során elválasztás előtt fenil-tio-hydantoin (PTH), dabsyl, 2-4-dinitrofenil, vagy orto-ftálaldehid (OPA) származékokat képeznek. A következőkben az automata aminosav-analizátorral történő meghatározást ismertetjük, ahol a ninhidrides származékképzés az ioncserés elválasztást követően történik.

A vizsgálat leírása

A megdarált, homogenizált mintából – a fehérjetartalomtól függően – 20-50 mg-ot bemérünk légmentesen zárható üvegcsövekbe. Hozzáadunk 4 cm^3 6 N HCl-t, nitrogén gázt rétegzünk rá, majd teflon alátét és a kupak segítségével lezárjuk. A mintát tartalmazó csöveket 24 órára 106°C -os szárítószekrénybe helyezzük. A 24 óra elteltével, a mintát tartalmazó edényt kivesszük a szekrényből, megvárjuk, míg kihül, a tartalmát átmoszuk egy gömblombikba és nitogénáramban kíméletesen szárazra bepároljuk. A maradékot 2 cm^3 pH = 2,2 citrát pufferben feloldjuk, a mintát $0,45\ \mu\text{m}$ -es szűrőn leszűrjük, és szükség szerint a citrát pufferrel hígítjuk. (Megjegyzés: A cisztein/cisztin, illetve a metionintartalom pontos meghatározása céljából a később részletezett módszer szerint járunk el. A sósavas hidrolízis során a triptofán teljes mennyisége elbomlik. Ennek meghatározását is később mutatjuk be.)

A hidrolizált aminosavak mennyiségét leggyakrabban oszlopkromatográfias módszerrel, elsősorban ioncserés kromatográfiával határozhatjuk meg. Az állófázis polimer szerkezetű szerves vagy szervetlen anyag, amely kationcserélő aktív csoportokat tartalmaz (pl. Biotronik LC 3000 analizátor esetében Dionex DC-6A ioncserélő gyanta). A hidrolizátumot erősen savas pufferben feloldva visszük az automata aminosav analizátor oszlopára, hogy ott az aminosavak azonnal megkötődjenek. Az elúcióhoz pH 3-10 közötti pufferek használatosak, leggyakrabban lépcsős gradiens elúcióban. Az analízis során fokozatosan növekvő pH mellett az aminosavak folyamatosan leoldódnak az oszlopról. Az eluálás sorrendjét az izoelektromos pont határozza meg. Az elválasztás érzékenységét a hőmérséklet szabályozásával és az eluáló pufferek pH-jának megfelelő beállításával befolyásolhatjuk.

Az aminosavak mennyiségét, az elválasztást követően, ninhidrines színreakcióval határozzuk meg. Az effluens és a ninhidrin-reagens keveréke az átfolyási sebesség által meghatározott ideig magas hőmérsékletű reaktor kolonában tartózkodik ($100\text{-}135^\circ\text{C}$), a kialakult szín fotometrálnak átfoló küvettás detektorban történik.

A rekorder vagy a kiértékeléshez használt számítógépes program által regisztrált kromatogramon minden komponensnek egy Gauss-típusú eloszlási görbe felel meg. Ismert összetételű standard aminosav oldattal elvégzett kalibrációt követően a komponensek mennyiségét a görbék alatti terület alapján számoljuk. A minőségi azonosítást az injektálás időpontjától eltelt retenciós idő alapján végezzük.

A kéntartalmú aminosavak (cisztin, metionin) meghatározása

A kéntartalmú aminosavak savas közegben bomlanak, emiatt a sósavas hidrolízis előtt a fehérjeláncban a metionint és a cisztint/ciszteint oxidáljuk, majd a hidrolízist követően metionin-szulfon, illetve ciszteinsav formában határozzuk meg.

A vizsgálat leírása

1 térfogatrész 30%-os hidrogén-peroxidból és 9 térfogatrész 85 %-os hangyasavból perhangyasavat készítünk. 1 órán át szobahőmérsékleten, majd 30 percig hűtőszekrényben állni hagyjuk.

A keverékből 10 ml-t adunk a szintén 30 percig előhűtött, 40 mg mintához, és 16 órán át (egy éjszaka) hűtőszekrényben tartjuk. Ezután 3 ml 48 %-os HBr-ot adunk hozzá, és további 30 percre visszatesszük a hűtőszekrénybe, majd 37°C-on bepároljuk. A hidrolízist, a kromatográfiás elválasztást és a számítást a korábban leírtakszerint végezzük.

A triptofán meghatározása

A triptofán mennyiségének mérése kénsavas feltárást követő *p*-dimetil-amino-benzaldehiddel képzett színes diazovegyület spektrofotometriás mérésén alapszik (Votisky E., 1984).

A vizsgálat leírása

Bemérünk 50-50 mg mintát csiszolt dugós kémcsőbe. Hozzáadunk 20 ml 19 N H₂SO₄-et, illetve a 20 ml 19 N H₂SO₄-ban oldott 0,3 %-os *p*-dimetil-amino-benzaldehid oldatot. A kémcsöveket egy 16 órára (éjszakára) sötétben állni hagyjuk. Ezt követően 0,1 ml 0,045 %-os NaNO₂-oldatot teszünk a színreagenst tartalmazó kémcsőbe, és rövid állást után üvegszűrőn leszűrjük az oldatokat. A minták abszorbanciáját 590 nm-en mérjük. A vak minta értékét levonjuk a színes oldat extinkciójából. A további számításhoz L-triptofánból standard sort készítünk, és a standard görbéről leolvasott értékek, valamint a bemérés figyelembevételével számítjuk ki a triptofán mennyiségét.

A fehérjék biológiai értéke

A fehérjék biológiai értékét az őket felépítő esszenciális aminosavak mennyisége és aránya határozza meg, amelyet különböző indexekkel fejezünk ki. A *kémiai indexek* alkalmazása lehetővé teszi, ill. megkönnyíti a fehérjekeverékek optimális összetételének kialakítását, vagy szintetikus aminosavakkal történő kiegészítését. A kémiai indexek definiálásakor rögzíteni kell, hogy mely aminosavakat tekintjük esszenciálisnak, milyen legyen a leíró függvény, mit tekintünk referencia összetételnek. A különböző minták aminosav-összetételének jellemzésére az idők folyamán több kémiai indexet alkalmaztak, amelyek közül a FAO/WHO (1965) ajánlott *esszenciális aminosav indexet* ismertetjük.

Az esszenciális aminosav indexet az alábbi képlet segítségével számítjuk ki:

$$FAO/WHO_Index = 100 \cdot \frac{\left(\frac{a_i}{\sum_{i=1}^n a_i} \right)}{\left(\frac{a_{i,ref}}{\sum_{i=1}^n a_{i,ref}} \right)}$$

ahol a_i : az *i*-edik esszenciális aminosav mennyisége a mintában (g/100 g fehérje);
 n : 8, az esszenciális aminosavak száma, amelyek sorrendben: izoleucin, leucin, lizin, fenilalanin+tirozin (összes aromás), metionin+cisztin (összes kéntartalmú), treonin, triptofán és valin.

$a_{i,refa}$ a FAO/WHO 1965 Index referencia értékei: *izoleucin (4,2)*, *leucin (4,8)*, *lizin (4,2)*, *fenilalanin (2,8)*, *tirozin (2,8)*, *metionin (2,2)*, *cisztin (2,0)*, *treonin (2,8)*, *triptofán (1,4)*, és a *valin (4,2) g/100 g fehérje*.

Fentiek alapján az index az egyes esszenciális aminosavakra egyenként kiszámított arányszámok közül a legalacsonyabb érték, melyhez tartozó aminosav az ún. limitáló esszenciális aminosav a mintában.

Irodalom

Elődi Pál: Biokémia. Akadémia Kiadó, Budapest, 1981

Gasztonyi Kálmán (szerk): Az élelmiszerkémia alapjai. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest, 1979

Radomir Láztity – Máté Hidvégi: Amino acid composition and biological value of cereal proteins. Akadémia kiadó, Budapest, 1985.