

Dr. Bodai László

A rekombináns DNS technikában használt  
főbb módszerek és eszközök: vektorok,  
enzimek, hibridizáció, PCR, DNS szekvencia  
meghatározás

Segédlet a BSc záróvizsgára való felkészüléshez

Jelen tananyag a Szegedi Tudományegyetemen  
készült az Európai Unió támogatásával.

Projekt azonosító: EFOP-3.4.3-16-2016-00014



# A rekombináns DNS technika módszerei

## Segédlet a BSc záróvizsgára felkészüléshez

Készítette: Dr. Bodai László  
SZTE, 2020.

**Záróvizsga tétel címe:** A rekombináns DNS technikában használt főbb módszerek és eszközök: vektorok, enzimek, hibridizáció, PCR, DNS szekvencia meghatározás.

# A nukleinsavak mennyiségének és fragmentumok méretének vizsgálata

A nukleinsavak koncentrációja meghatározható spektrofotometriával, a fragmentumok méretének vizsgálatára alkalmazott leggyakoribb eljárás a gélelektroforézis.

**UV Spektrofotometria:** A nukleinsavak (RNS és DNS is) jellegzetes fényelnyelési maximumot mutatnak UV tartományban 260 nm-es hullámhossznál.

- 260 nm-en mért fényelnyelésük alapján koncentrációjuk meghatározható.  $OD_{260}=1$  esetén DNS oldat koncentrációja 50  $\mu\text{g/ml}$ , RNS oldat koncentrációja 40  $\mu\text{g/ml}$ .
- A 260 és 280 nm-en mért fényelnyelés értékek hányadosa alapján a nukleinsav oldat fehérje szennyezettsége becsülhető, tiszta DNS-nél a  $OD_{260}/OD_{280}$  hányados 1,8-2 közötti, szennyezettnél alacsonyabb.

**Gélelektroforézis:** Gélelektroforézis során töltéssel rendelkező molekulák elektromos erőtér hatására egy gél mátrixban vándorolnak. A nukleinsavak a foszfát csoportok miatt uniform negatív töltéssel bírnak, ezért a pozitív pólus felé vándorolnak.

- Nukleinsavak elválasztására használt leggyakoribb géltípusok az agaróz gél (nagyobb méretű fragmentumok elválasztásához) és a poliakrilamid gél (kisebb fragmentumok elválasztásához).
- A fragmentumok gélben való migrációjának sebessége függ a feszültségeséstől, a gél típusától és koncentrációjától, a nukleinsav fragmentumok hosszától és konformációjától is.
- Minél hosszabb egy fragmentum, annál lassabban vándorol a gélben. A vándorlás sebessége a fragmentum hosszának logaritmusával mutat lineáris összefüggést.
- A gélelektroforézis követően a DNS fragmentumokat UV fényben fluoreszkáló DNS kötő festékkel teszik láthatóvá. (pl. etidium bromid)
- A DNS fragmentum méretét ismert méretű DNS darabokat tartalmazó molekulasúly markerhez (DNS létre) hasonlítva határozhatjuk meg.
- A gélből a megfelelő méretű DNS fragmentumok kivághatóak, visszaizolálhatóak.

# A nukleinsavak analízisében és manipulálásában használt enzimek

**Polimerázok:** nukleinsavak szintézisét végző enzimek.

A nukleinsavakat templát (minta) szál alapján szintetizálják úgy, hogy vele komplementer szekvenciájú, antiparalel szálakat hoznak létre nukleotidok (ribonukleozid-trifoszfátok (NTP) – RNS, illetve dezoxiribonukleozid-trifoszfátok (dNTP) – DNS) felhasználásával.

- DNS polimerázok (pl. E. coli DNS polimeráz III): a természetben a replikációért felelős enzimek
  - DNS templát függő DNS polimerázok, lánc indító primer szükséges a szintézis kezdetéhez, a szálszintézishez dNTP nukleotidok.
  - Aktivitásai: 5'-3' irányú szintézis aktivitás, 5'-3' irányú és 3'-5' irányú (hibajavító) exonukleáz aktivitás.
  - Felhasználás példa: Polimeráz láncreakció, nick transzláció.
- RNS polimerázok (pl. T7 bakteriofág RNS polimeráz): a természetben a transzkripcióért felelős enzimek
  - DNS templát függő RNS polimerázok, az RNS szintézis indításához promóter DNS szakasz szükséges, a szálszintézishez NTP nukleotidok.
  - Aktivitása: 5'-3' irányú RNS szál szintézis.
  - Felhasználás példa: RNS hibridizációs próba előállítása
- Reverz transzkriptázok (pl. MLV retrovírus reverz transzkriptáz): a természetben retrovírusok RNS genomjáról DNS másolat előállításáért felelősek.
  - RNS templát függő DNS polimerázok, lánc indító primer szükséges a szintézis kezdetéhez, a szálszintézishez dNTP nukleotidok.
  - Aktivitása: 5'-3' irányú DNS szál szintézis
  - Felhasználás példa: cDNS szintézise

# A nukleinsavak analízisében és manipulálásában használt enzimek

**Nukleázok:** nukleinsavak bontását végző enzimek.

A nukleotidokat összekapcsoló foszfoészter kötéseket bontják.

- a szubsztrát molekula szerint:
  - DNázok: DNS molekulák bontását végzik (pl. DNáz I)
  - RNázok: RNS molekulák bontását végzik (pl. RNáz A)
  - DNS-t és RNS-t is hasító nukleáz (pl. S1 nukleáz)
  
- a hasítás pozíciója szerint:
  - exonukleázok: a polinukleotid lánc végéről képesek nukleotidokat lehasítani. Hasíthatnak az 5', vagy a 3' vagy mindkét végről. Felhasználás példa: túlnyúló egyesszálú DNS vég leemésztése.
  - endonukleázok: a polinukleotid láncon belül bárhol képesek felbontani a foszfoészter kötéseket. Működhetnek szekvencia független módon (pl. DNáz I), vagy lehetnek szekvencia specifikusak (pl. restrikciós endonukleázok). Felhasználás példa: DNS fragmentumok létrehozása klónozáshoz.
  
- A DNS klónozás szempontjából kiemelt fontosságúak a restrikciós endonukleázok, amelyek szekvencia specifikus DNS endonukleázok. (p. EcoRI, NotI)
  - Felismerő/hasítóhelyük legtöbbször palindrom szekvencia, melyek szimmetrikusak, szekvenciájuk a DNS két szálán olvasva azonos.

palindrom példa:      5' -GCGGCCGC -3'      NotI enzim felismerőhelye  
                                 3' -CGCCGGCG-5'

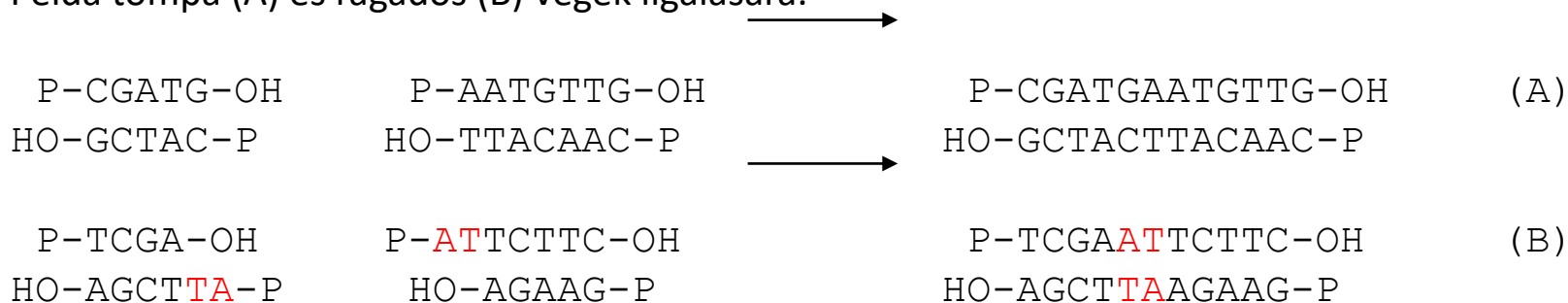
- A felismerő hely hossza ált.  $n = 4, 6, 8$  bp, egy hasítóhely előfordulási valószínűsége  $1/4^n$ .
- A hasítás eredményeképpen létrejövő fragmentumok végein 5'-foszfát és 3'-hidroxil csoport van, a vég típusa lehet tompa, vagy ragadós (ezen belül 5'-túlnyúló vég vagy 3' túlnyúló vég).

# A nukleinsavak analízisében és manipulálásában használt enzimek

**Polinukleotid ligázok:** polinukleotid láncok összekapcsolását végző enzimek, a láncokat foszfodiészter kötés kialakításával hozzák létre. (pl. T4 DNS ligáz) Felhasználás példa: DNS fragmentumok egyesítése.

- A reakcióhoz energiahordozó kofaktor (ATP) szükséges.
- DNS ligázok akkor tudnak két DNS láncot összekapcsolni, ha (1) megvannak a 3'-végi hidroxil és az 5'-végi foszfát csoportok, (2) a végek tompák vagy egymással komplementer túlnyúló végek.

Példa tompa (A) és ragadós (B) végek ligálására.



**Polinukleotid kinázok:** polinukleotid láncok foszforilálását végző enzimek. (pl. T4 polinukleotid kináz)

- A reakció során ATP-ről származó foszfát csoporttal foszforilálják a DNS 5' végét úgy, hogy vagy az 5'-OH csoporthoz kapcsolják foszfoészter kötéssel, vagy az 5'-foszfát csoportot cserélik le rá.
- Felhasználás példa: hibridizációs próba 5' végjelölése radioaktív foszfort tartalmazó csoporttal.

**Alkalikus foszfatázok:** nukleotidok, polinukleotid láncok 5' végi foszfát csoportját eltávolító enzimek. (pl. CIAP – borjú bél alkalikus foszfatáz)

- 5'-OH csoport marad vissza, ami nem ligálható.
- Felhasználás példa: klónozó vektor önligálásának megakadályozása.

# A molekuláris klónozásban használt főbb vektor típusok

A rekombináns DNS technikában használt vektor biztosítja azt, hogy a klónozott DNS molekula fenntartható, szaporítható legyen a gazdasejtben.

A vektoroknak az alábbi fő funkciókat kell ellátniuk:

- hozzákapcsolható a klónozendó DNS fragmentum (multiklónozó hely)
- a sejtbe juttatva ott képes fennmaradni (replikációs origó)
- a vektort tartalmazó sejt szelektálható legyen (pl. antibiotikum rezisztencia gén biztosíthatja)

A főbb vektor típusok:

- **plazmid vektorok:** a leggyakrabban használt klónozó vektorok (pl. pUC19)
  - extrakromoszómális, cirkuláris, duplaszálú DNS elemek
  - magas kópiaszámban lehetnek a sejtben, általában max. ~10 kb fragmentum hordozására alkalmasak
- **bakteriofág vektorok:** pl. E. coli  $\lambda$  fág vektorok
  - a klónozendó DNS a  $\lambda$  fág genomjának fertőzéshez nélkülözhető helyére kerül
  - a baktérium sejteket a vektorral fertőzve lehet a klónozott DNS-t bejuttatni, tarfoltok jönnek létre
- **cosmid (kozmid) vektorok:** kombinált plazmid – bakteriofág vektorok
  - a sejtben plazmidként fenntartható, de fágként képes pakolódni és fertőzni is
- **mesterséges kromoszómák:** nagy, 100 ezer bp feletti DNS fenntartására is képesek
  - bakteriális mesterséges kromoszóma (BAC) – cirkuláris extrakromoszómális elem
  - élesztő mesterséges kromoszóma (YAC) – lineáris eukarióta kromoszóma

# A molekuláris klónozás

- Molekuláris klónozás alatt idegen eredetű DNS molekulákból rekombináns DNS előállítását és élő sejtekben történő fenntartását értjük.
- Rekombináns DNS alatt több eltérő forrásból származó DNS molekula kombinálásával előállított DNS molekulát értünk.
- A klónozás során a klónozni kívánt DNS szakaszt vektor molekulába inszertáljuk *in vitro*, majd az így előállított rekombináns DNS-sel gazda sejteket transzformálunk, azokban *in vivo* tartjuk fenn.
- Felhasználási célja sokféle lehet, például: DNS térképezése, szabályozó szakaszok izolálása, géntermék heterológ expressziója, genetikailag módosított élőlények létrehozása.

Tradicionalis klónozás menete (restrikciós enzimek, ligáz, plazmid vektor felhasználásával):

1. A klónozendó DNS szakaszt restrikciós enzim(ek)el kivágják, a plazmid vektort ugyan ezen (vagy velük kompatibilis DNS véget adó) enzim(ek)el felnyitják.
2. Az emésztett DNS-t és a vektort agaróz gélben megfuttatják, a megfelelő méretű fragmentumokat gélből visszaizolálják.
3. DNS ligázzal összekapcsolják a klónozendó DNS szakaszt (inszert) és a plazmid vektort.
4. A ligátumot kompetens *E. coli* sejtekbe transzformálják.
5. A transzformált sejteket szelektív médiumra szélesztik, azonosítják a sikeresen transzformált sejteket tartalmazó kolóniákat.

Klónkönyvtárak:

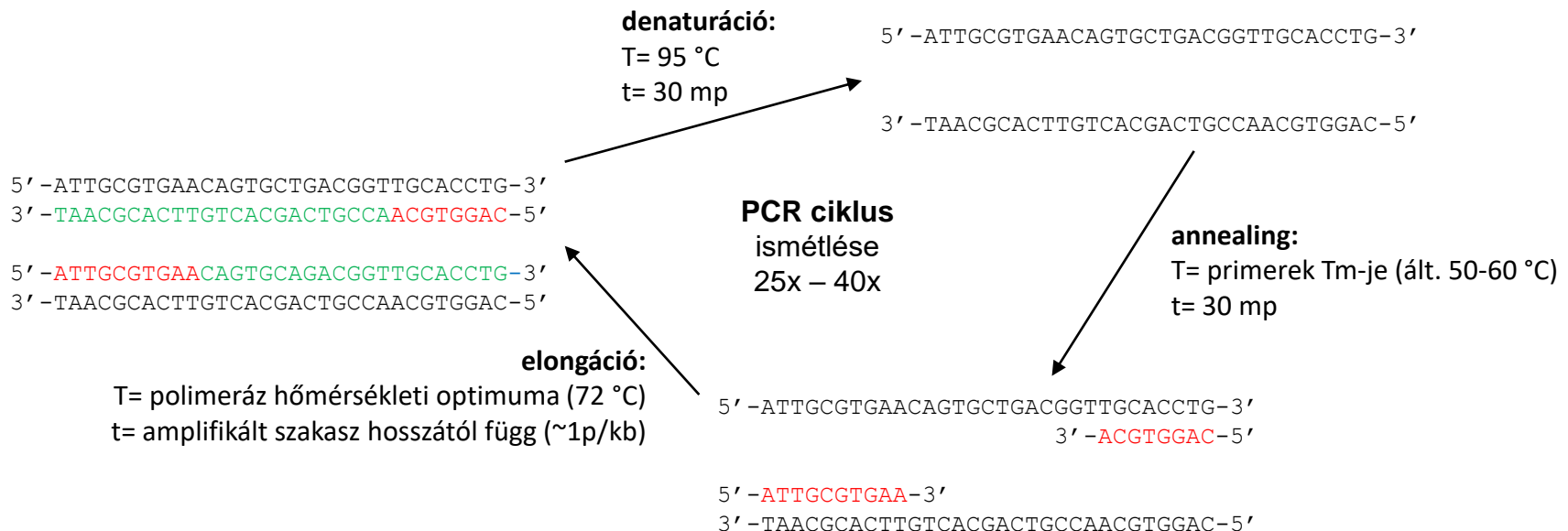
- genomi DNS könyvtár: klónok összessége, melyek együtt a teljes genom szekvenciát reprezentálják. Restrikciós enzimmel létrehozott fragmentumok klónozásával állítják elő.
- cDNS könyvtár: klónok összessége, melyek együtt a teljes transzkriptómot reprezentálják. Reverz transzkriptáz enzimmel mRNS-ből átírt cDNS klónozásával állítják elő. A gének szövetspecifikus kifejeződése miatt összetétele szövet specifikus.



# Polimeráz lánreakció (PCR)

A PCR egy DNS *in vitro* felszaporítására alkalmas módszer. Kidolgozásáért Kary Mullis 1993-ban kapott megosztott Nobel díjat. Széles körűen felhasználható módszer: pl. klónozás, variancia analízis.

- A reakció ciklusokban zajlik melyek során a DNS mennyisége ciklusonként duplázódik.
- A PCR ciklust egymás után többször ( $n=25-40$ ) ismétlik, így exponenciális ( $2^n$ ) amplifikációt érnek el.
- Minden PCR ciklus 3 lépésből áll, ezek a: denaturáció, annealing, elongáció.
- Egy PCR ciklus során a DNS szálait először hőhatással szétválasztjuk (denaturáció), majd az amplifikálni kívánt DNS szakasz végeihez **oligonukleotid primerek** kapcsolódnak (annealing), végül a primerektől indulva hőstabil DNS polimeráz **megszintetizálja a DNS szálakat** (elongáció).
- Ezt követően egy új PCR ciklus kezdődik, ahol az újonnan szintetizált DNS szálak is templátként szolgálnak. A DNS mennyisége így ciklusonként duplázódik – végeredményben exponenciális amplifikációt érünk el.



# Hibridizációs módszerek

Nukleinsav hibridizáció alatt azt a folyamatot értjük, amikor egyszálú polinukleotid láncok között hidrogén híd kötések alakulnak ki, azok kettős szálú hibrid molekulát képeznek.

- A hibridizáció feltétele a két szál közötti (nem feltétlenül teljes) báziskomplementaritás.
- DNS – DNS, DNS – RNS, RNS – RNS hibridek is létrejöhetnek.
- A hibridizációs módszerek alkalmasak egyedi nukleinsav molekulák komplex mintában való kimutatására, mennyiségi meghatározására, tisztítására is.
- A kimutatni kívánt *target* molekulát ú.n. *hibridizációs próbával* mutatjuk ki, ami valamilyen módon (radioaktívan, fluoreszcensen, biotin) jelölt, a targettel komplementer egyszálú polinukleotidlánc.

- **Southern blot:** a kimutatni kívánt target molekula DNS  
DNS fragmentumokat gélelektroforézissel méret szerint elválasztják, majd a gélből a DNS-t az elektroforézis során kialakult futási mintázatot megtartva hibridizációs membránra viszik át (blottolják), denaturálják (egyszálúvá teszik), majd hozzáadják a hibridizációs próbát. A nem kötődött próbák lemosása után a hibridizáló (membránhoz kötődött) próbák által adott jelet detektálják.
- **Northern blot:** a kimutatni kívánt target molekula RNS  
Munkafolyamata hasonló a Southern blottéhoz, de a target molekula RNS, denaturáló gélben végzik, hogy az RNS másodlagos szerkezetét felbontsák.
- **Microarray (DNS chip):** nagy számú target molekula szimultán vizsgálatára alkalmas módszer.  
Egy hordozó felületen (microarray) több ezer különböző próbát rögzítenek meghatározott elrendezésben, majd a target molekulákat ezekhez hibridizálják. A mintában jelenlévő nukleinsavakat úgy azonosítják, hogy megnézik, melyik rögzített próbáknál kaptak hibridizációs jelet.

# DNS szekvencia meghatározás

DNS szekvenálás alatt a DNS bázissorrendjének meghatározását értjük. Az első szekvenálási módszerek a Maxam-Gilbert féle (kémiai degradáción alapuló) és a Sanger féle (DNS szintézisen alapuló) módszerek voltak (osztott Nobel díj 1980).

- **Sanger szekvenálás:** Az eljárás két fő lépésből áll, először (1) DNS szintézissel egyszálú DNS fragmentum populációt hoznak létre, majd (2) a fragmentumokat poliakrilamid gélelektroforézissel (PAGE) elválasztják és az egyes fragmentumok mérete alapján meghatározzák a szekvenciát.
  - Az (1) lépésben négyféle reakcióelegyet állítanak össze: mindegyik van meghatározandó templát DNS, DNS polimeráz, radioaktívan jelölt primer, és dNTP keverék; valamint mind a 4 reakcióban kis mennyiségben egyetlen féle lánctermináló didezoxi-NTP (ddATP, ddCTP, ddGTP vagy ddTTP). Amikor a polimeráz lánctermináló nukleotidot épít be, a szintézis megszakad. Így a négyféle reakcióelegyben különböző hosszúságú DNS szakaszok keletkeznek, amelyek mindig egy olyan nukleotidnál végződnek, amilyen a reakcióba adott lánctermináló ddNTP volt.
  - Ezt követően a négy reakció termékeit poliakrilamid gélen egymás mellett megfuttatják, a gélről autoradiográfiás képet készítenek. A fragmentumok futási sebessége hosszuktól függ, ezért 4-féle reakcióból származó gélcsíkokat az általuk megtett távolság szerint sorba állítva leolvashatjuk a DNS bázissorrendjét.
- **Kapilláris szekvenálás:** a Sanger szekvenálás jelenleg használt változata, ebben a lánctermináló nukleotidokat 4-féle különböző színű fluorofórral jelölik, majd kapilláris gélelektroforézist követően egy detektor a megjelenő színek alapján olvassa le a bázissorrendet.
- **Újgenerációs szekvenálás (NGS):** ezeknél a szekvenálási eljárásoknál egyszerre több millió különböző DNS bázissorrendjét határozzák meg egyszerre. A DNS molekulákat egymástól térben elválasztva szilárd felülethez kötik, ahol a szekvenálás megtörténik. pl. az *Illumina* NGS szekvenálás DNS szintézisen alapul, a sorban beépülő nukleotidokat hozzájuk kapcsolt fluoreszcens festékek segítségével azonosítják.