

Biokatalízis, biokonverziók, biotranszformációk

Rákhely, Gábor

Biokatalízis, biokonverziók, biotranszformációk

Rákhely, Gábor

Publication date 2012

Szerzői jog © 2012 Szegedi Tudományegyetem

TÁMOP-4.1.2.A/1-11/1 MSc Tananyagfejlesztés

Interdiszciplináris és komplex megközelítésű digitális tananyagfejlesztés a természettudományi képzési terület mesterszakjaihoz

Tartalom

Előszó	v
0. Bevezetés	1
1. Zöld kémia	2
2. Zöld kémia, biotranszformációk	3
3. Ellenőrző kérdések	4
I. A katalizátorok fogalma, jellemzése	5
4. Kémiai reakciók típusai	7
5. Katalízis	8
6. Ellenőrző kérdések:	10
II. Biokonverziók	11
7. A biokatalízis történelmi mérföldkövei	13
8. Biológiai katalizátorok, enzimek	15
9. Egészsejtes biokatalizátorok, biokonvertoerek	16
10. Ellenőrző kérdések:	17
III. A biokatalizátorok, biokonverterek előállítás	18
11. A biokatalizátorok, biokonverterek előállításának alapja a DNS	20
12. Gének izolálása, azonosítása	21
1. A DNS jellemzése, manipulálása	21
13. Ellenőrző kérdések:	22
IV. A DNS manipuláció klasszikus eszköztára	23
14. Restrikciós endonukleázok	25
15. Metilázok	28
16. Ellenőrző kérdések:	30
V. DNS módosító enzimek	31
17. Nukleinsav polimerázok	32
18. DNS függő DNS polimerázok	33
19. Templátfüggetlen DNS polimeráz	35
20. RNS függő DNS polimerázok	36
21. DNS függő RNS polimerázok	39
22. Nukleinsav kinázok	40
23. Foszfátázok	41
24. Ligázok	42
25. Ellenőrző kérdések:	43
VI. Vektorok	44
26. Plazmidok	45
27. Bakteriofágok, mint vektorok	49
28. Kozmidok	58
1. Élesztő vektorok	59
2. Növényi rekombináns DNS vektorok	61
3. Állati vírusvektorok	62
4. DNS bejuttatása sejtekbe	63
5. DNS direkt, vektor nélküli bevitel sejtekbe	63
6. DNS bevitel közvetítő segítségével	66
29. Ellenőrző kérdések:	68
VII. Klónozás	69
30. Az inszertek kiválasztására szolgáló módszerek	70
31. Könyvtárak	73
1. Genomi könyvtárak	74
2. cDNS könyvtárak	76
32. Ellenőrző kérdések:	78
VIII. Nukleinsavak kémiai szintézise, szintetikus oligonukleotidok, gének	79
33. Oligonukleotidok szintézise	80
1. Foszforamidit módszer	82
2. H-foszfónát kémia	82
3. Oligonukleotidok felhasználási területei	84
3.1. Primerek, linkerek, adapterek	84

3.2. Oligonukleotidok használata a génexpresszió szabályozásában	84
3.3. Génszintézis stratégiák	84
34. Ellenőrző kérdések:	87
IX. Genomika	88
35. Genom Projektek, Humán genom projekt	90
36. A genomika hagyományos módszerei	92
1. Shotgun genom szekvenálás	93
2. Primer séta	94
3. Kozmid könyvtárak	94
37. A genomika újgenerációs módszerei	95
1. 454 technológia	95
2. SOLID technológia	99
3. Illumina	104
38. Ellenőrző kérdések:	107
X. Funkcionális genomika: transzkriptomika	108
39. Gyakorlati példák az orvosbiológiából és egy egérmódellemel	113
40. Ellenőrző kérdések:	115
XI. Proteomika	116
41. Ellenőrző kérdések:	120
XII. Enzimatis biokatalizátorok előállítása, tervezése, biokémiai mérnökség	121
42. Nem-irányított in vitro mutagenézis módszerek	122
43. Irányított in vitro mutagenézis módszerek	123
44. Ellenőrző kérdések:	125
XIII. Egészsejtes biokatalizátorok, előállítása tervezése, metabolikus mérnökség.	126
45. Ellenőrző kérdések:	128
XIV. Enzimek előállítása fermentációval, kinyerése, kiserelése	129
46. Expressziós rendszerek	131
47. Fermentáció	133
48. Ellenőrző kérdések:	134
XV. Enzimek ipari alkalmazásai	135
49. Ellenőrző kérdések:	137
A. Irodalomjegyzék; ajánlott irodalom	138

Előszó

A jelen digitális tananyag a TÁMOP-4.1.2.A/1-11/1-2011-0025 számú, "Interdiszciplináris és komplex megközelítésű digitális tananyagfejlesztés a természettudományi képzési terület mesterszakjaihoz" című projekt részeként készült el.

A projekt általános célja a XXI. század igényeinek megfelelő természettudományos felsőoktatás alapjainak a megteremtése. A projekt konkrét célja a természettudományi mesterképzés kompetenciaalapú és módszertani megújítása, mely folyamatosan képes kezelni a társadalmi-gazdasági változásokat, a legújabb tudományos eredményeket, és az info-kommunikációs technológia (IKT) eszköztárát használja.



A jegyzet célja, hogy megismertesse a hallgatókat azokkal a környezetbarát biokonverziós eljárásokkal, mely az utóbbi 20 évben előtérbe került zöld kémia alapelveit maximálisan kielégítik. A vegyipar robbanásszerű fejlődése olyan környezeti, természeti ezen keresztül gazdasági és társadalmi károkat okozott, mely a Föld létének fenttarthatóságát veszélyeztetik. A vegyipari reakciók során nemcsak kémiai, hanem biológiai eredetű katalizátorokat is lehet alkalmazni, melyek természetüknél fogva környezetkompatibilisek, megújíthatóak, esetenként önreprodukálóak, nem tartalmaznak veszélyes komponenseket, specifikusak, sztereoszelektívek, hétköznapi körülmények között működnek. A biokatalitikus eljárások, melyek vagy enzimeket, vagy egészsejtes rendszereket alkalmaznak rendkívüli gyorsasággal fejlődnek és néhány éven belül a vegyipar jelentős szegmensében meghatározó mértékben lesznek jelen. A terület dinamikus fejlődését bizonyítja, hogy az új koncepció megjelenése óta több, mint 15000-re becsülik a természetes katalizátorokkal foglalkozó publikációk számát. Ezért a jegyzet elsődleges célja azon ismeretek bemutatása, mely az ipar különböző szegmenseiben alkalmazható biokonverziós eljárásokhoz szükségesek. A jegyzet elsősorban a biológiai részre koncentrálni, külön tananyag tárgya lehet azoknak a technológiai ismereteknek bemutatása, mely az ún. bioprocess engineering, a biológiai folyamatmérnökség témakörébe tartoznak: alapanyagok előkészítése, folyamatok monitorozása, vezérlése... stb. Az itt bemutatott ismeretek azt az utat mutatják be, amely a biotechnológiában a jövő egyik fő célja, a önreprodukáló biokatalizátorok, pontosabban biokonvertek előállítása és alkalmazása.

A html verzió használata során a külön könyvtárakban található animációk és tesztek javascriptek futtatását igénylik, ezért a javascript futtatást és a sütitet (cookie) engedélyezni kell a böngészőben. Az animációk és a tesztek a szövegből közvetlen hivatkozásokkal is elérhetőek. Az animációk flash formátumban is megtekinthetőek (az előzővel teljes mértékben azonos), értelemszerűen az ehhez szükséges lejátszót is telepíteni kell.

Flash player

1. animáció
2. animáció

A jegyzet végén hivatkozások ajánlott könyvek, kiegészítő olvasmányok találhatóak.

0. rész - Bevezetés

A XXI. Század gazdasága, társadalma új kihívások elé néz. Az előző évszázad technológiai, ipari forradalmának következtében a termelés és fogyasztás hihetetlen mértékben felgyorsult, ami során rendkívüli tempóban aknázzuk ki a Földünkben lévő ásványi készleteket, másrészt az ipari termelés hihetetlen környezetterhelést okoz. Ezt a világ az utóbbi években, évtizedekben kezdi felismerni és kialakult egy új közgazdasági fogalom: a fenntartható gazdaság fogalma, ami alatt nemcsak az agrár-ipari termelés fenntarthatóságát értjük, hanem az ember és környezet viszonyának harmonizálását, a környezetterhelés számottevő csökkentését, az elhasznált anyagok, hulladékok visszaforgatását értékként történő újrahasznosítását.

A vegyipari termelés is elképesztő ütemben fejlődött és a különféle vegyületek előállítása során évtizedeken keresztül figyelmen kívül hagyta azokat a szempontokat, amit a fenntartható természet, környezet, gazdaság és társadalom támaszt. A különféle ásványi készletek, energiahordozók kiaknázása olyan méreteket öltött, hogy záros határidőn belül ezek elfogynak, tehát új megoldások, források után kell nézni. Másrészt a vegyipari kibocsátások olyan szinten károsítják környezetünket, hogy ennek fenntarthatósága nem látszik biztosítottnak. Ennek orvoslására alakították ki a zöld kémia koncepciót, amely legfőbb célja a vegyipari termelés környezetbarát fenntarthatóságának biztosítása.

1. fejezet - Zöld kémia

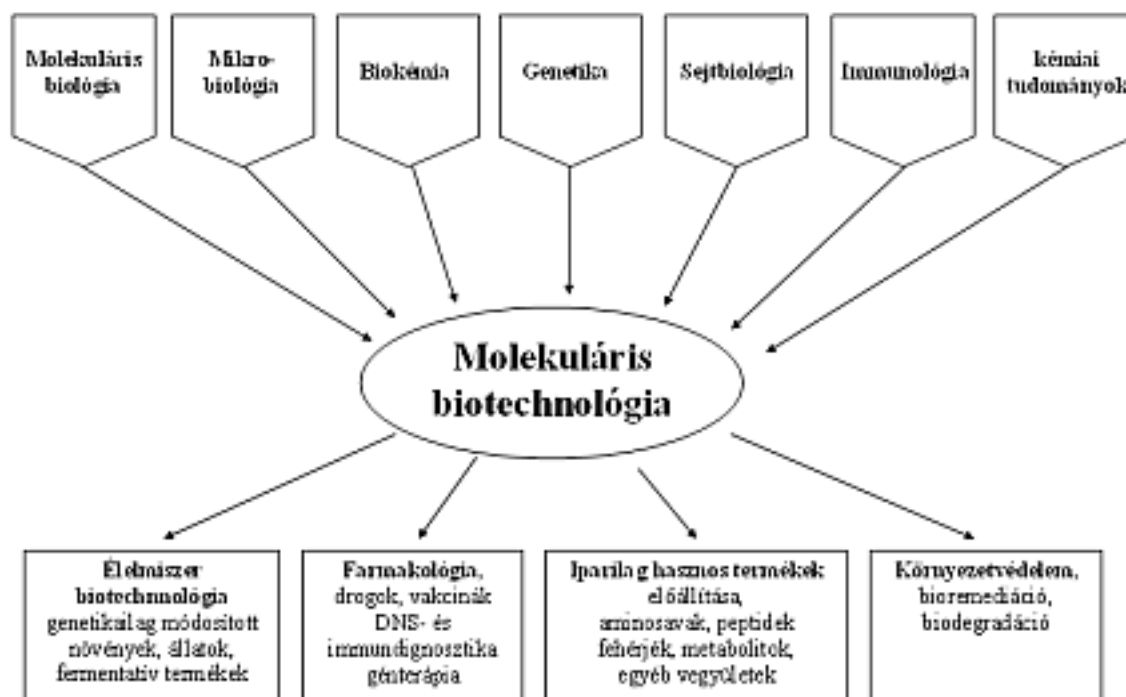
Az első ilyen zöld kémiai kutatási program „Alternatív szintetikus utak” címmel jelent meg 1991-ben az Amerikai Környezeti Minisztérium (Environmental Protection Agency, EPA) gondozásában. Ezt mindjárt a következő évben követte az Amerikai Tudományos Alap (National Science Foundation, NSF) „Környezetbarát szintézisek és eljárások” nevű programjának meghirdetése. A zöld kémia 1993-ban az Amerikai Környezeti Minisztérium hivatalos programjává vált (U.S. Green Chemistry Program) [4]. Az Európai Közösségben először 20 évvel ezelőtt, 1993-ban Velencében alakult meg 30 egyetem közreműködésével egy konzorcium, mely zöld kémia filozófiáját tűzte zászlajára [5]. A zöld kémia programját csakúgy, mint az 1848-as Magyar forradalom követeléseit, 12 alapelvben foglalták össze (Anastas és Warner, „Green chemistry: theory and practice” [3]):

1. Megelőzés. Jobb megelőzni a hulladék keletkezését, mint keletkezése után kezelni.
2. Atomhatékonyság. Szintézisek tervezésénél törekedni kell a kiindulási anyagok maximális felhasználására.
3. Minimális veszélyességű vegyipari szintézisek. Már a szintézisek tervezésénél törekedni kell arra, hogy olyan reakciókat válasszunk, melyekben az alkalmazott és a keletkező anyagok nem mérgező hatásúak és a természetes környezetre nem ártalmasak.
4. Biztonságosabb vegyületek. Kémiai termékek tervezésénél törekedni kell arra, hogy a termékekkel szembeni elvárások teljesítése mellett mérgező hatásuk minél kisebb mértékű legyen.
5. Környezetbarát oldószerek, segédanyagok. Segédanyagok (oldószerek, elválasztást elősegítő reagensek, stb.) használatát minimalizálni kell, ezek - szükség esetén - környezetkímélőek legyenek.
6. Energiahatékonyság. A vegyipari reakciók energiaszükségleteit illetve környezeti hatásait minimalizálni kell, törekedni kell a hétköznapi körülmények: szobahőmérséklet és atmoszférikus nyomás, alkalmazására.
7. Megújuló források. Megújuló nyersanyagokból válasszunk vegyipari alapanyagokat.
8. Közti- és melléktermékek csökkentése. A felesleges származékkészítést kerülni kell.
9. Katalízis. Reagensek helyett szelektív katalizátorok alkalmazását kell előtérbe helyezni.
10. Lebonthatóság. A kémiai termékeket úgy kell megtervezni, hogy használatuk végeztével természetes módon lebonthatóak legyenek és bomlásuk során a környezetre ártalmatlan termékek képződjenek.
11. Valós idejű monitorozás a szennyezések megakadályozására. Új, érzékeny analitikai módszereket kell használni a vegyipari folyamatok valós idejű monitorozására és vezérlésére, hogy a veszélyes anyagok keletkezését idejében észlelni lehessen.
12. Vegyi balesetek megakadályozása. A vegyipari folyamatokban olyan anyagokat kell használni, amelyek csökkentik a vegyipari balesetek (kémiai anyagok kibocsátása, robbanás, tűz) valószínűségét.

Kapcsolódó weboldalak: <http://www.epa.gov/greenchemistry>/http://ec.europa.eu/environment/index_en.htm

2. fejezet - Zöld kémia, biotranszformációk

A természetes, biológiai alapú katalizátorok a fenti kritériumok többségének megfelelnek, hisz általában vizes közegben, szobahőmérsékleten, atmoszférikus nyomáson működnek, megújuló és nagy mennyiségben előforduló elemekből épülnek fel és természetszerűleg környezetbarátok. Az életműködésekkel való kapcsolatuk miatt a specificitásuk, regio- és enantioszelektivitásuk nagy és reakcióhálózatokba szervezhetőek. A megújuló voltak kétségbevonhatatlan, és emellett az újratermelésük is könnyen megoldható.



3. fejezet - Ellenőrző kérdések

1. Zöld kémia koncepció célja
2. Az első Zöld kémiai program indítása
3. Hány pontja van a Zöld Kémia programnak?
4. Miben rejlik a biokatalizátorok legfőbb erénye?
5. Mit jelent az hogy exoterm reakció?

I. rész - A katalizátorok fogalma, jellemzése

Tartalom

4. Kémiai reakciók típusai	7
5. Katalízis	8
6. Ellenőrző kérdések:	10

4. fejezet - Kémiai reakciók típusai

A természetben számtalan reakció játszódik le spontán módon, mely során egy vagy több molekula más kémiai minőségű molekulává alakul át. A kiindulási és a keletkező anyagok száma szerint az alábbi reakciókat különböztetjük meg. Egyesülés – kettő vagy több anyagból egyféle anyag keletkezik, Bomlás – egy anyagból kettő vagy többféle anyag keletkezik, Molekulán belül történő átrendeződés – izomerizáció, intramolekuláris1 átalakulás, Cserebomlás – a hasonló jellegű vegyületrészek kicserélődnek A reakció lehet exoterm, hőfelszabadulással jár, a termékek szabadenergiája alacsonyabb, mint kiindulási anyagoké és endoterm, energiabefektetést igénylő, ahol a termékek szabadenergiája magasabb, mint a reaktánsoké. A reakciók járhatnak proton (sav-bázis reakciók) vagy elektronátmenetekkel (redox reakciók). Lehetnek azonos fázisban: homogén fázisú reakciók, különböző fázisban: heterogén fázisú reakciók. A kémiai reakciók lehetnek teljesen egyirányúak irreverzibilisek, amikor a kiindulási anyagok teljes mértékben átalakulnak terméké, reverzibilisek, vagy egyensúlyra vezetőek, amikor a kiindulási anyagokból termékek, a termékekből kiindulási anyagok egyaránt képződhetnek és a két folyamat eredőjeként a kiindulási anyagok és a termékek mennyisége egy stabil értékre beáll.

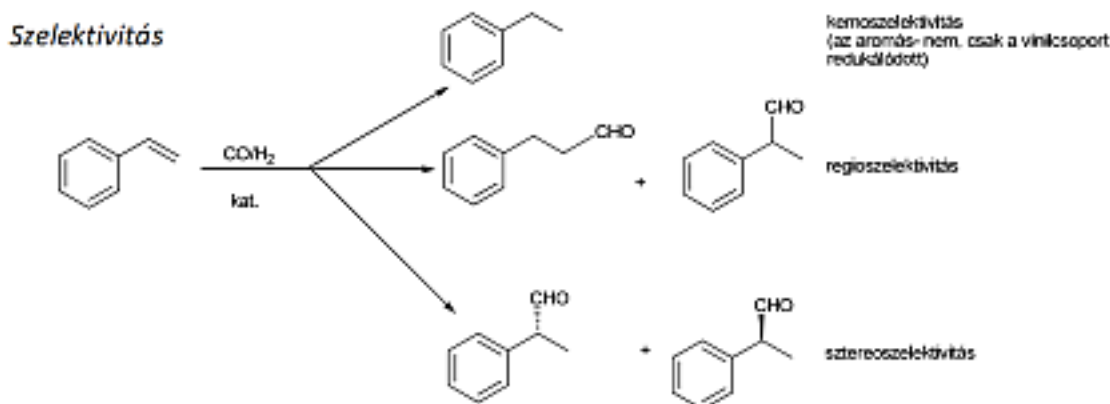
5. fejezet - Katalízis

A vegyiparban a reakciókhoz az esetek 80%-ában katalizátorokat alkalmaznak, a termelés volumene, értéke meghaladja a 400 billió eurót. A katalizátorok olyan anyagok, melyek felgyorsítják a reakciókat anélkül, hogy ők maguk a reakció következtében átalakulnának. Ez azt jelenti, hogy a reakció során ideiglenesen módosulhatnak, átmeneti termékeket képezhetnek a reaktánsokkal, de a reakció végére az eredeti formájukban minőségükben kapjuk vissza őket. Ez természetesen a reverzibilis elmélet szerint van így, a valóságban vannak olyan lassú folyamatok, melyek az anyagok a katalizátorok elhasználódásához vezetnek. A katalizátoros technológia közel kétszáz éves múltra tekint vissza, a katalizátor névadója Berzelius, aki 1836-ban az alábbi módon határozta meg a katalizátorok aktivitását: "A katalitikus erő ténylegesen azt jelenti, hogy az anyagok pusztán jelenlétük és nem saját affinitásuk következtében képesek az adott hőmérsékleten szunnyadó affinitásokat feléleszteni." A katalizátorok megnövelik egy reakció sebességét úgy, hogy általában valamilyen köztterméket képes az egyik reaktánsal, ezáltal csökken az aktiválási energia és nő a reakciósebesség. Mivel az aktiválási energia csökken, így a reakció hőmérséklete is csökkenthető, ami a Zöld Kémia 6. Alapelveivel szinkronban van.

Katalizátorokkal szembeni elvárások:

1. Aktivitás: Növelje a reakciósebességet. Ehhez kapcsolódik az katalitikus ciklusok száma (Turnover), megmutatja, hogy adott 1 mol katalizátor hány mol szubsztátumot alakít át, illetve az egységnyi időre eső katalitikus ciklusok száma (Turnover frekvencia)
2. Szelektivitás: Maximalizálja a kívánt és minimalizálja a nem-kívánt termékek képződését
3. Stabilitás: A katalizátorok változatlan volta csak elvi szinten létezik, a katalizátoroknak van véges élettartamuk. Ezt különféle katalizátor mérgek, termikus, mechanikus és vegyi hatások csökkentik.
4. Olcsó előállítás: a katalizátorok olcsó anyagokból, könnyen nagy mennyiségben előállíthatóak legyenek.

A szelektivitás fogalma többszintű: Kemoszelektivitás: egy vegyületben két (vagy több) hasonló átalakulásra képes funkciós csoport közül csak az egyik reakcióját segíti elő a katalizátor. Példa: ábra A Regioszelektivitás: Többféle lehetséges szerkezeti izomer képződése közül a katalizátor csak egynek a képződését segíti elő. Példa: ábra B Enantioszelektivitás: a sztereoizomerek közül csak az egyik szintézisét segíti elő a katalizátor Példa: ábra C Az enantioszelektivitást kinetikus és dinamikus rezolválással lehet elősegíteni. Kinetikus rezolválás: ha két enantiomer eltérő sebességgel reagál ugyanazzal a reagenssel, akkor a kisebb reakciókészségű visszamarad, és túlsúlyban lesz a reakcióelegyben. Ha a gyorsabban reagáló enantiomerrel kapott terméket visszaalakítjuk a kiindulási anyagokká, akkor ebben a gyorsabban reagáló sztereoizomer dúsul fel. Dinamikus rezolválás: A lassabban reagáló reaktánst gyors racemizációval folyamatosan a gyorsabban reagáló kiindulási anyaggá alakítják át.



A katalizátorok és a katalitikus folyamatok további osztályozása A katalizátor fázisa alapján lehet: gáz, folyadék, szilárd, A katalizátor és a reaktánsok fázisa alapján a katalízis lehet: Homogén fázisú: a katalizátor és a reaktánsok azonos fázisban vannak Heterogén fázisú: a katalizátor és a reaktánsok azonos fázisban vannak A katalitikus hatás lehet: sav-bázis katalízis, enzimkatalízis, fotokatalízis, elektrokatalízis stb.

A továbbiakban az enzimkatalízisről illetve tágabb értelemben a biológiai rendszerek által katalizált rendszerekről lesz szó.

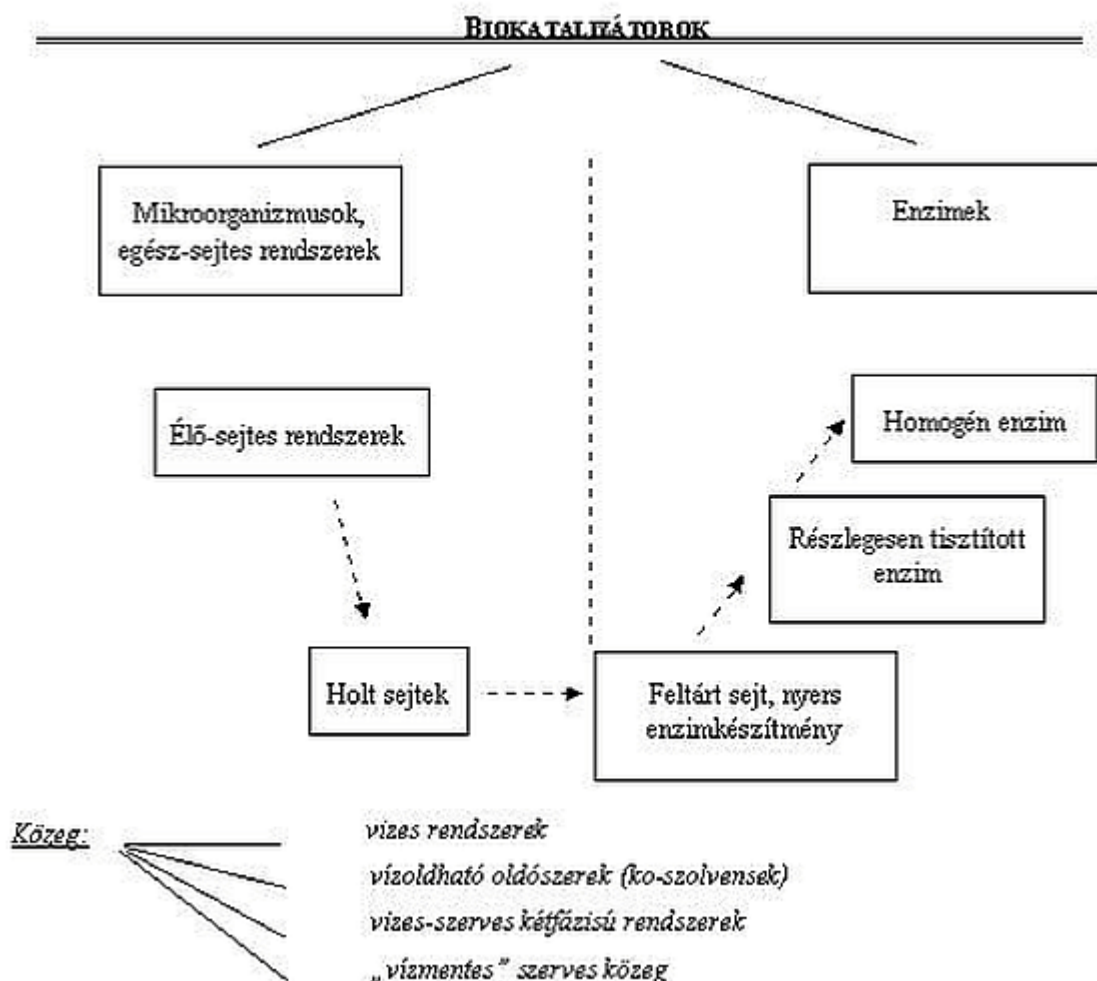
6. fejezet - Ellenőrző kérdések:

1. Mik a redox reakciók?
2. a reverzibilitás fogalma
3. a konszekutív reakciók fogalma
4. Kemoszelektivitás
5. Regioszelektivitás

II. rész - Biokonverziók

A fehér biotechnológia fogalma alatt minden biológiai eszközökkel előállított ipari - vegyipari termékekhez kapcsolható technológiát értünk. Olyan korszerű technológiákról van szó, mely a világ fenntartható fejlődését kiemelt szempontként kezeli és a teljes technológia a felhasznált alapanyagtól a termékig környezetbiztonság előírásainak megfelelnek. Igen szerteágazó területről van szó, ide tartoznak az alternatív üzemanyagok megújuló energiaforrásokból történő előállítása, a finomvegyipar számára termelt biokatalizátorok, vagy a környezetvédelmi biotechnológia. Emellett számos anyagot pl. műanyagokat vagy metabolikus termékeket, élelmiszeripari adalékanyagokat is sokszor a fehér biotechnológia módszereivel állítanak elő. A fehér biotechnológia vegyipari részesedése a világon rohamosan nő, néhány éve még alig néhány százalék volt, a mostani becslések abban egyetértenek, hogy 10-20 éven belül a világ ipari termelésének meghatározó szegmensét fogja képezni. A határ a fehér valamint a zöld és piros biotechnológia között nem éles, hisz számos olyan fehér biotechnológiai ipari termék lehet, amit akár a zöld akár a piros biotechnológia hasznosít. Gondoljunk például olyan fermentációs módszerekkel előállított anyagokra, amelyek terméshozam növekedést idéz elő (zöld biotechnológia) vagy vannak olyan anyagok, melyeknek egészségügyi hatásuk van, de előállításuk lényegében a fehér biotechnológiában használatos enzimtermelési módszerekkel történik. Alább arra is láthatunk példát, hogy egy termék (enzim) mind ipari mind egészségügyi célokra alkalmazható.

A fehér biotechnológiában biológiai eredetű katalizátorokat, biokatalizátorokat alkalmaznak, melyek lehetnek enzimek (fehérjék, melyek reakciókat katalizálnak), enzimkomplexek, egy reakciósor enzimeit (egymás után végbemenő reakciókat katalizáló fehérjék) illetve sejtek, szervezetek. Ez utóbbiak esetén a katalizátor fogalma tágabb értelmet nyer, hisz ezek már módosulnak a termék képzése során, de – mivel képesek önmagukat reprodukálni, szaporodni – a folyamat végén egy hasonló minőségű biokonverziós rendszer (sejt) visszanyerhető. Azért, hogy a katalizátorok nevezéktanával összhangban maradjunk, ezeket a továbbiakban biokonvertereknek nevezzük.



A biokatalizátorok fontos tulajdonsága, hogy sokszor a természetes enzimekkel is olyan specifikus reakciókat lehet velük megvalósítani, ami a hagyományos kémiai módszerekkel nagyon nehézkes. Másrészt – ha ez nem sikerülne - a tulajdonságaik korszerű módszerekkel változtathatóak, akár modulárisan fejleszthetőek.

7. fejezet - A biokatalízis történelmi mérföldkövei

Mielőtt arra gondolnánk, hogy a biológiai rendszerek fermentációs illetve biotranszformációs célokra történő hasznosítása csupán az utóbbi évtizedekben kifejlődött új eljárás, tekintsük át, hogy e módszerek milyen régi múltra tekintenek vissza (3. táblázat). A fermentációs módszerek alkalmazására történő első utalások szinte egyidősek az írásbeliség kialakulásával, az ipari körülmények közt megvalósított fermentációkról a XIX. század közepe óta beszélhetünk, és 1880-ra datálhatjuk az első, ipari fermentációs úton nyert optikailag aktív termék előállítását. A biotranszformációs módszerek szintén több ezer éves múltra tekintenek vissza. Érthető módon először a mikrobiológiai módszerek fejlődtek ki (ecetgyártás), ám a XX. század első évtizedeire már ipari szintű eljárásokat fejlesztettek ki mind egész sejttes rendszerekkel (LEfedrin), mind enzimekkel (Zemplén, 1914).

Fermentáció – I. e. 6000: Sumérok és babiloniak - A sörfőzés első történeti emlékei – XIX. sz. Középetől: „Modern” fermentáció, Alkoholkok, szerves savak – 1880, USA: Az első optikailag aktív ipari fermentációs termék: tejsav

Biotranszformáció – Korai előzmények Enzimatikusk [5] – 1836: (Schwann) A gyomornedv aktív komponense (pepszin) emésztí a húst in vitro – 1876: (Kühne) Az „enzim” fogalom [5] – 1894: (E. Fischer) [6, 7] α -MeO-Glc $\square$ maltáz $\square$ α -Glc β -MeO-Glc $\square$ emulzin $\square$ β -Glc – 1914: (Zemplén G.) Kb. 150 oldalas magyar nyelvű összefoglaló az enzimek kémiai alkalmazásáról [8] (pl.ricinusmag izolátum használata).

Mikrobiológiai – I. e. 2000: Ecetgyártás első emlékei $\text{EtOH} + 2 \text{O}_2 \square$ biokatalizátor $\square$ $\text{AcOH} + \text{H}_2\text{O}$ Az első „rögzített sejttes bioreaktor” $\Rightarrow$ (ágakon megkötött sejteken átfolyó alkohol-tartalmú oldat) [9] – 1858: (Pasteur) [10] Borkósav mikrobiológiai reszolválása – 1930: (Knoll AG) L-Efedrin gyártás [11, 12]

Mérföldkövek az enzimkatalízis alkalmazásában [1, 5] 1836: (Schwann) Hús in vitro emésztése pepszinnel [5] 1876: (Kühne) Az „enzim” név és fogalom [5] 1890: (Takamine Co.) Takadisztáz – az első iparilag alkalmazott enzimkészítmény [1] 1897: (Hill) Az enzimműködés reverzibilis (hidrolázok) [13] 1906: (Pottevin) Metil oleát szintézise gyakorlatilag szerves közegben ($\text{MeOH} + \text{ojalsav}$) [14] 1913: (Michaelis, Menten) Az enzimkatalízis kinetikai alapjai [15] 1926: (Summer) Ureáz: az első kristályos fehérje. Az enzim $\leftrightarrow$ fehérje kapcsolat felismerése [16] 1950-es évek (Watson, Crick és többen) A DNS, RNS szerkezete, a genetikai kód [17, 18] 1967: (Phillips) Lizozim – Röntgen krisztallográfia: az első fehérje harmadlagos szerkezet [19] 1969: (Gutte, Merrifield) A Ribonukleáz A enzim kémiai totálsintézise 11931 műveletben [20] 1969: (Tanabe Co) Az első iparilag alkalmazott rögzített enzim (Aminoaciláz $\square$ L-metionin) [21] 1983: (Ensley) Az első iparilag alkalmazott rekombináns mikroorganizmus (*Pseudomonas putida* gének $\rightarrow$ *Escherichia coli* $\rightarrow$ indigó előállítás) [22] 1986: (Klibanov) Az enzimek többsége működőképes „vízmentes” szerves közegben [23] 1992: (többen) HIV-1 proteáz (99 aminosav) enantiomer formájának szintézise D-aminosavakból (az enzimek sztereoselektivitásának forrása királításuk) [24, 25] HIV-1 proteáz $\Rightarrow$ L-aminosavból álló peptideket hasítja ent-HIV-1 proteáz $\Rightarrow$ D-aminosavakból álló peptideket hasítja

Az enzimekkel kapcsolatos első felismerések a XIX. század második felére nyúlnak vissza. A XIX. század végén már ipari alkalmazásokkal is alálkozhatunk és az enzimműködés reverzibilitását is a XIX. század utolsó éveiben ismerték fel.

Ezt követően a XX. század első harmadában sorra következtek az újabb felismerések és az ezzel párosuló alkalmazások és a biotranszformációk ipari eljárásokká fejlődtek. A biokatalízis alkalmazásának és fejlődésének okait elemelve (2. ábra) látható, hogy ezt a fejlődést a XX.század közepén egy megtorpanás követte és a biokatalízis „elfeledett” technológiává vált. Ennek oka az lehetett, hogy a gazdasági világválság és az ezt követő második világháború egy teremelési versenyt is eredményezett. A tömegtermelésre így kibontakozó igényt a nagy mennyiségben olcsón rendelkezésre álló fosszilis alapanyag és energiaforrásokra alapozták. A természet „kizsákmányolása” és elszennyezése ekkor még nem okozott sem politikai, sem gazdasági problémát. Ezt az iránynt alapjaiban rengette meg az olajválság. A fejlett ipari társadalmak ekkor döbbsentek rá a fosszilis források véges voltára, vagy talán inkább arra hogy ezektől való függőségüket csökkenteni kell. Ez, és a környezetvédelmi kérdések gazdasági kérdéssé válása újabb, máig tartó lendületet adott a biokatalízis ipari felhasználásának.Napjainkban az egyik legnagyobb kihívás amivel a szintetikus kémia szembenéz, a mind nagyobb számú összetett, biológiaiilag aktív anyag gazdaságos előállítása. Egyre nagyobb az igény a sztereioizomerek – kiemelendően a királis anyagok adott enantiomerjének – tiszta formában történő szintézisére

[26-28]. A biológiai rendszerek – köztük az enzimkatalizált folyamatok – molekuláris szintű megismerése a XX. század második felében robbanásszerű fejlődésnek indult.

Az ipari biokatalízis fejlődésének kulcselemei [1] 1. Ipari méretű fermentációs és sejtfeltárási módszerek kifejlődése 2. Ipari méretű sejt és enzimrögzítési technikák kifejlődése 3. Szerves oldószerben lejátszódó biotranszformációs folyamatok 4. Rekombináns DNS technológia – Túltermeltetés egyszerű gazdaszerkezetben (célfehérje termelése, akár az összfehérjemennyiség 50 %-ig) – Pontmutációk, „tetszőleges” genetikai manipulációk lehetősége – Nagymennyiségű tiszta fehérje □ 3D-szerkezet-meghatározás egyszerűsödése – Irányított evolúció, tervezett tulajdonságú biokatalizátorok

Ez a fejlődés köszönhető a molekuláris genetika (genetikai szekvenciák meghatározása, PCR, génexpresszió, „site-directed mutagenesis”, stb.), a biológiai rendszerek szerkezetkutatása (fehérjekristallográfia, biomolekulák oldatfázisú szerkezetmeghatározása NMR technikákkal, stb.) és a bioinformatika (gén és protein adatbázisok, modellezés, megjelenítés, ligandumillesztés, számítások fehérjékben belül, stb.) egyre fejlődő és bővülő módszereinek. A szélsőséges körülmények közt élő szervezetekből nyerhető „extremozimek” [29-31] kutatása, a kombinatórikus biokatalízis [32, 33], az ipari enzimek optimalizálására felhasznált célzott evolúció [34], vagy a szelektivitások elméleti számítási módszerekkel történő modellezése [35] a biokatalízis ígéretes fejlesztési területei. A biokatalitikus folyamatok ilyen szintű megismerése visszahat a szintetikus módszerekre, mivel a biokatalizátorok, biokatalitikus folyamatok fejlesztése mindinkább célzottá és tervezhetővé válik [36].

8. fejezet - Biológiai katalizátorok, enzimek

A biológiában a legegyszerűbb biokatalizátor az enzim, ami egy katalitikus sajátságokkal rendelkező fehérje. A szervezetekben számtalan sok enzim létezik, melyek a sejtekben lezajló biokémiai folyamatok valamelyikét katalizálják. Vannak olyanok, amelyek a tápanyag, pl. glükóz lebontásban játszanak szerepet, ezek a katabolikus enzimek, míg az anabolikus folyamatok különféle anyagokat pl. aminosavak szintetizálnak. A katabolikus és anabolikus folyamatokat együtt metabolizmusnak nevezzük. A sejtekben lezajló biokémiai folyamatok megismerésével az is világossá vált, hogy igen sok olyan enzim van, mely az ember számára hasznos, hasznos terméket tud előállítani, vagy segítségével valamilyen eszközt – például valamilyen anyagot kimutató, ún. bioszenzort - tudunk fejleszteni. Közismert a fehérjebontó enzimek, a proteázok, a zsírbontó enzimek lipázok fontos szerepe a mosószertiparban, a DNS manipulációját lehetővé tevő enzimek (hasító, szintetizáló, módosító enzimek).

Az ipari alkalmazásokhoz nagy mennyiségű enzimre van szükség, ami a természetes környezetéből már olcsón, gazdaságosan nem nyerhető ki, ezért mesterséges enzintermelő rendszereket (expressziós rendszereket) fejlesztettek ki. A fehérjék képződéséhez szükséges információt az adott fehérjéhez tartozó DNS szakasz a gén tartalmazza. Ez magában hordozza aminosavsorrendjét, szekvenciáját meghatározó fehérjét kódoló DNS szakaszt, illetve olyan régiókat, amelyek lehetővé teszik, hogy a génről mRNS, erről pedig fehérje képződjön (transzkripciós és transzlációs szignálok). DNS szinten mesterségesen létre lehet hozni olyan ún. expressziós kazettát, ahol a kódoló régiót illetve a szintézis szintjét meghatározó elemeket tetszőlegesen össze lehet építeni. Ezt a DNS szakaszt beépítik egy hordozó DNS molekulába (amit vektornak nevezünk), majd az expressziós DNS szakaszt tartalmazó vektort alkalmasan választott sejtbe juttatják. Az így kapott sejtvonalat fermentorendényekben szaporítják úgy, hogy a kívánt fehérjét nagy mennyiségben termelje. A kódoló szakasz szekvenciáját változtatva a fehérje biokémiai sajátságai változtathatóak, míg a termelt fehérje mennyiségét a kódoló szakaszt megelőző régiók alkalmas megválasztásával, megtervezésével lehet optimalizálni (genetikai/fehérje mérnöki tevékenység). Nagyon sok ilyen expressziós rendszer létezik, a legáltalánosabban használt bakteriális rendszerek pl. a *Escherichia coli*-ban vagy *Bacillus subtilis*-ben működnek, eukarióta szervezetek esetén pedig az élesztő gombák emelendők ki, pl. a *Pichia pastoris*. Természetesen vannak magasabb rendű emlős vagy növényi expressziós rendszerek is, de ezek elsősorban a piros és zöld biotechnológiában használatosak.

Ezekhez teljesen hasonló módszerekkel lehet a bonyolultabb enzimkomplexeket és egy egymást követő reakciósor elemeit katalizáló enzimkaszádót is termeltetni, nagy mennyiségben előállítani.

A biológiai katalizátorok igen alkalmasak szukcesszív, konsekutív reakciósorok integráns felépítésére, amelyekbe kompetitív reakciók is beépülhetnek. Egészében véve a biológiai reakciók összekapcsolásával biokatalitikus hálózatok építhetők fel, amelyre a legpregnánsabb példa az egész sejt metabolikus hálózatok, amelyek a sejtek életműködésének alapjait képezik.

9. fejezet - Egészsejtes biokatalizátorok, biokonvertorok

Amennyiben egész sejteket kívánunk alkalmazni valamilyen molekula előállításához, ehhez használhatunk természetes sejtizolátumokat, amelyek maguktól képesek az anyag előállítására. A folyamat során a sejt felvesz (táp)anyagokat felépíti saját építőköveit illetve megsztetizálja a kívánt terméket is. Azonban tudnunk kell, hogy a természet nem az ember vágyai szerint hozza létre teremtményeit, tehát ezek az élőlények egyáltalán nem optimálisak a kívánt anyag ipari előállításához. Ahhoz, hogy az ilyen törzsek optimálisan működjenek, korunk szelleme szerint meg kell ismerni összes biokémiai/metabolikus folyamatait és úgy módosítani, hogy a lehetőség szerint a legtöbb ipari terméket állítsa elő. Ezt el lehet érni egyrészt a fermentorban történő növesztési/termelési körülmények szigorú szabályozásával, másrészt a sejtek módosításával. Ha a a sejt metabolikus folyamatait genetikai szinten véglegesen módosítjuk, akkor metabolikus mérnöki munkát végzünk. Manapság igen korszerű nagy kapacitású készülékek vannak arra, hogy az élőlények teljes genetikai állományát és ezen keresztül metabolikus folyamatait egyre jobban megismerjük.

A 2008-2010 periódus egyik szenzációja, hogy az Egyesült Államokban a világon először sikerült elemeiből összerakni egy baktérium, a *Mycoplasma mycoides* teljes genomját, majd ezt genommentesített sejtbe juttatva létrejött az első olyan szintetikus sejt, mely teljes genetikai információja "in vitro" készült. Emellett a különféle élőlények metabolizmusának olyan szintű feltérképezése zajlott le, hogy számítógépen ma már modullyszerűen lehet metabolikus utakat, akár sejteket tervezni és összeilleszteni. Nincs messze az az idő, amikor valóban úgy készül el egy sejt vagy más biológiai objektum, hogy a génkészletét is az ember tervezi meg. Ez lesz igazán az önreprodukáló biokatalizátorok kora.

A fehér biotechnológiában rejlő hatalmas potenciál éppen ebben rejlik. A biokatalizátorok, biokonverterek mind természetes, környezetbarát anyagokból állnak (főbb építőelemei C, N, H, O, P, S), s ez Földünk fenntartható fejlődésének záloga. Másrészt a biokonverterek képesek önmaguk újraelőállítására (sejtek, szervezetek) míg a biokatalizátorok biokonverterek segítségével egyszerűen újra előállíthatóak: pl. enzimeket szaporodásra (önreprodukcióra) képes sejtek termelik. Ez a jelleg, melynek korunkban óriási jelentősége van, egyelőre kizárólag a biológiai katalizátorokat jellemzi.

Mind az enzim, enzimkomplexek, enzimkaskádok illetve mikrobiális élő biokatalizátorok esetén az ipari lépték eléréséhez nagy mennyiségű sejtet kell előállítani. Ezt általában fermentációval végzik, ami egy olyan edényben – fermentorban – megy végbe, ahol a sejtek növekedését, a termékképződést a körülmények szigorú kézbe tartásával tudjuk optimalizálni. A fermentor nem más, mint egy nagy tartály, amiben igen sok paramétert lehet szabályozni: pl. hőmérséklet, pH, oxigéntartalom/redox állapot, kevertetés, légter, tápanyagkoncentráció, megvilágítás stb. Az ipari célra használatos sejtek termelékenységére igen érzékenyen reagál a körülmények megválasztására és precíz kontrolljára, ezért erre a területre is külön szakemberek specializálódtak.

10. fejezet - Ellenőrző kérdések:

1. Enantioszelektivitás
2. Mi a kinetikus rezolválás ?
3. Mi a dinamikus rezolválás ?
4. Mit jelent, hogy heterogén fázisú reakció?
5. Mik a biokatalizátorok?

III. rész - A biokatalizátorok, biokonverterek előállítása

Tartalom

11. A biokatalizátorok, biokonverterek előállításának alapja a DNS	20
12. Gének izolálása, azonosítása	21
1. A DNS jellemzése, manipulálása	21
13. Ellenőrző kérdések:	22

11. fejezet - A biokatalizátorok, biokonverterek előállításának alapja a DNS

Az élet alapvető információhordozója a DNS. Ez a makromolekula tartalmazza azokat az információkat, melyek a sejt felépítéséhez illetve működéséhez szükségesek. A sejtben számos makromolekula fordul elő, DNS, RNS, fehérje, lipidek, poliszaharidok és egyéb biopolimerek. Ezek közül a fehérjék és az RNS-k emelhetők ki azon az alapon, hogy ezen biopolimereknek lehet katalitikus tulajdonsága. A sejt bioszintézisében illetve a biotechnológiai alkalmazásokban a fehérjéknek sokkal nagyobb szerepük van, ezért a további fejezetekben a fehérjékkel illetve ezek katalitikus tulajdonsággal rendelkező csoportjával az enzimekkel, azok bioszintetikus lehetőségeivel foglalkozunk.

Összességében elmondható, a teljes sejt illetve a sejtekben levő legfontosabb biokatalizátorokhoz szükséges minden információ megtalálható a DNS-ben, ezért a biokatalízis alapjául szolgáló rendszert a DNS-n keresztül állíthatjuk elő, illetve manipulálhatjuk.

Az enzimátikus biokatalizátorokat meghatározó egység a gén. Ez egy olyan DNS szakasz, melyben 3 nukleotid (kód) határoz meg egy aminosavat és ezek lineáris formában folyamatosan helyezkednek el a DNS szálán. Ahhoz, hogy egy enzimátikus biokatalizátort elő tudjunk állítani a fehérje génjét kell kifejeztetni, expresszálni. A fehérje termeltetés a centrális dogma szerint történik, azaz először a DNS-ről hírvívő, messenger, mRNA képződik a transzkripció folyamán, majd a mRNA-ről a transzláció során képződik fehérje.

Centrális dogma



DNS: információ hordozó

RNS: információ hordozó, katalizátor

Fehérje: enzim (katalizátor) + sok egyéb

Az enzimek termeltetéséhez az enzimek génjeit kézben kell tartani. A géneket egyrészt lehet a természetes környezetükből izolálni, másrészt meg is lehet őket szintetizálni. Ahhoz, hogy meg tudjunk szintetizálni egy gént, rendelkezünk kell a szekvenciájával, amelyet egyrészt a természetes gén szekvenciájából illetve annak újratervezéséből kaphatunk.

12. fejezet - Gének izolálása, azonosítása

Először a gének izolálásának klasszikus módszereit mutatjuk be, majd rátérünk a biológia forradalmasításához vezető nagyátersztőképességű ún high-throughput módszerekre. A géneket természetsszerűleg a sejtek DNS-éből lehet kinyerni. Ehhez szükség van a sejt DNS tulajdonságainak illetve manipulálhatóságának ismeretére.

1. A DNS jellemzése, manipulálása

DNS-ben található, de DNS megtalálható prokariótákban és eukariótákban egyaránt. Az információ döntő többsége a genomi általánosak az új extrakromoszómális elemek.

Eukariótákban található extrakromoszómális elemek: mitokondriális, illetve növények esetén kloroplaszt DNS-k, emellett főleg egyszerűbb egysejtűeknél előfordulnak plazmidok.

Prokariótákban elsősorban plazmidok fordulnak elő a genomtól függetlenül. A genomok illetve az extrakromoszómális elemek méretére a táblázat-ábra mutat jó néhány példát.

A DNS biokémiai tulajdonságait korábbi tanulmányaikból ismerik, erre itt nem térnénk ki részletesebben. Ehelyett a DNS manipulációban használatos klasszikus és újabb módszereket ismertetjük.

13. fejezet - Ellenőrző kérdések:

1. Mik a biokonverterek?
2. Az első fermentációs feljegyzések kora.
3. Mi az expressziós kazetta?
4. Ki a metabolikus mérnök?
5. Mik az önreprodukáló biokonverter?

IV. rész - A DNS manipuláció klasszikus eszköztára

Tartalom

14. Restriktív endonukleázok	25
15. Metilázok	28
16. Ellenőrző kérdések:	30

14. fejezet - Restrikciós endonukleázok

A géneket hordozó DNS általában sokkal nagyobb, mint maga a gén, a természetes eredetű DNS molekulák pedig akkorák, hogy egyben igen nehézkes őket kezelni. Ezért célszerű kisebb méretű darabokban dolgozni velük. Ráadásul jó, ha valamelyest tudjuk, hogy milyen szabályok szerint szedjük kisebb darabokra a DNS-t. A nagyméretű nukleinsavak például mechanikailag törékenyek, de nem igazán tudjuk, hogy hol törik el a DNS. Van olyan eset, amikor erre van szükség, de sokszor szisztematikus, áttekinthető darabolásra van szükség.

A nagy méretű DNS-k darabolására a természet ajánlotta az első biokémiai eszköztárat. A restrikciós endonukleázok olyan mikrobiális enzimek, amelyek a kétszálú DNS-t a látszon belül hasítják valamilyen meghatározott szabály szerint. A természet ezeket az enzimeket védekezőfegyvernek fejlesztette ki a baktériumokban: segítségükkel el lehet hasítani az idegen pl. fág DNS-t. A saját DNS elhasítását a sejtek metilációval akadályozzák meg, amelyet ún. metiláz enzimek katalizálnak (ld. alább).

A restrikciós modifikációs rendszereknek több fő és alcsoportja van, van, amelyben a metilációs és hasító domén egy polipeptiden van, esetleg ATP szükséges a működéséhez.

A molekuláris biotechnológiában általában a II. típusú restrikciós endonukleázokat használjuk. Ezen enzimek jellemzői, hogy a metiláció külön polipeptiden helyezkedik el. Emellett a felismerőhelyben, vagy annak közvetlen közelében hasítanak, definiált pozícióban. Működésükhöz nincs szükség ATP-re.

Az enzimek nevezéktana. A nevük első három betűje arra a mikroorganizmusra utal, melyből izolálták, pl. EcoRI, az *Escherichia coli*-ből, vagy KpnI *Klebsiella pneumonia*-ból származik. A név többi része egyéb azonosító.

A restrikciós endonukleázok száma több ezer, pontos értéket nem érdemes mondani, mert napról napra, hétről hétre jelennek meg új enzimek. A restrikciós modifikációs rendszerek szinte egyedülálló adatbázisa a REBASE adatbázis (<http://rebase.neb.com/rebase>), melyet igen sűrűn frissítenek és az enzimek illetve a gének tulajdonságait, szekvenciáit publikációs hivatkozásait tartalmazza.

Tipikusan 4-6 esetenként 8 nukleotid hosszúságú szakaszt ismernek fel, melyek sokszor ún. palindrom szekvenciák. Palindrom szekvenciának nevezzük azt, amikor egy DNS szakaszt a felső vagy az alsó szálán olvasva 5' – 3' irányban ugyanazt a szekvenciát kapjuk. Tipikus példa a 5' GGTACC 3' 3' CCATGG 5' BamHI enzim felismerőhelye.

Értelemszerűen minél rövidebb egy szekvencia felismerőhely annál gyakrabban hasítja az enzim, minél hosszabb, annál ritkábban.

A restrikciós enzimek felismerőhelyei nem mindig egyértelműek, példa erre a HincII enzim felismerő szekvenciája:

Az is előfordulhat, hogy a felismerési szekvencia nem folytonos, hanem véletlenszerű szekvenciaelem választja el a palindrom két felét. Pl.

Bár látszólag az enzimeknek csak a kanonikus szekvenciára van szükség a hasításhoz, abban az esetben, ha ez a felismerőhely a DNS végén helyezkedik el, a hasítás nem vagy csak nagyon korlátozottan mehet végbe. A katalógusokban és REBASE adatbázisban meg szokták adni, hogy a DNS terminálisától hány nukleotid távolságra legyen a hasítóhely, a megbízható DNS emésztéshez. Ez tipikusan 2-4 nukleotid.

A hasítás különböző végeket eredményezhet: tompa (blunt end) és ragadós (sticky end). Ez utóbbit még 5' és 3' túlnyúló végekre oszthatjuk. A hasítás során a DNS lánc foszfodiészter kötését adó foszfát mindig az 5' végén marad, azaz 5' foszforilált és 3' végén OH csoport található. Tompa végű hasítás, pl. SmaI Ragadós 5' túlnyúló véget adó hasítást ad, pl. EcoRI Ragadós 3' túlnyúló véget adó hasítást ad, pl. KpnI.

Enzim	Felismerőhely hossza	Felismerő-hasítóhely	Forrás organizmus
<i>AluI</i>	4	AG/CT	<i>Arthrobacter luteus</i>
<i>HphI</i>	5	GGTGAN ₈ /	<i>Haemophilus parahaemolyticus</i>
<i>EcoRI</i>	6	G/AATTC	<i>Escherichia coli</i>
<i>BamHI</i>	6	G/GATCC	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>

Ragadós végeket adó hasítások (sticky end)

5' túlnyúló

<i>SaI</i>	6	5' G TCGAC 3' 3' CAGCT G 3'	<i>Streptomyces albis</i>
------------	---	--------------------------------	---------------------------

3' túlnyúló

<i>KpnI</i>	6	5' GGTA C 3' 3' C CATGG 5'	<i>Klebsiella pneumonia</i>
-------------	---	-------------------------------	-----------------------------

Tompa végű hasítások (blunt end)

<i>HaeIII</i>	4	5' GG CC 3' 3' CC GG 5'	<i>Haemophilus aegyptus</i>
---------------	---	----------------------------	-----------------------------

Izoskizomereknek nevezzük azokat az enzimeket, melyek ugyanazt a szekvenciát ismerik fel és ugyanott hasítanak, de más biokémiai sajátágukban (metiláció érzékenység) vagy előállítási árukban különböznek. pl

Neoskizomereknek pedig azokat az enzimeket, melyek ugyanazt a szekvenciát felismerve másképpen hasítják a DNS-t. Pl

Neukadumerek, a más felismerőszekvenciával rendelkező, de kompatibilis-komplementer végeket adó enzimeket nevezzük. Pl.

Bár a természetben eredetileg védelmi rendszerként fejlődtek ki a restrikciós modifikációs rendszerek, de a mai tudásunk, tárházunk ennél szélesebb, és a restrikciós enzimeket három fő csoportba oszthatjuk aszerint, hogy mi a viszonyuk a metilált felismerőszekvenciával kapcsolatban. Lehetnek

1. Érzékenyek: csak a nem metilált DNS-t hasítják el, a metiláltat nem.
2. Érzéketlenek: mind a metilált, mind a nem metilált DNS-t képesek hasítani.
3. Metiláció függőek: csak a metilált DNS-t hasítják, a nem metiláltat nem.

Az izoskizomerek után kutatást éppen az vezérelte, hogy legyenek olyan enzimek, amelyek a három csoport valamelyikébe tartoznak. Természetesen amellet, hogy minél olcsóbb

A restrikciós endonukleázok hasítási körülményei (puffer, hőmérséklet) eltérhetnek, de vannak ún univerzális pufferek, melyek segítségével sokszor két vagy több enzimmel együtt lehet hasítani a DNS-t.

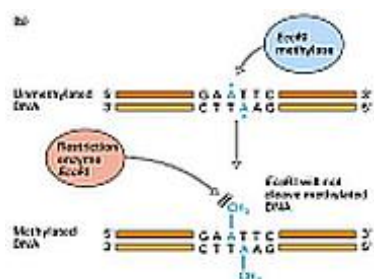
De! Bizonyos enzimek érzékenyek lehetnek arra, hogy nem optimális körülmények között vannak és ilyenkor ún csillag aktivitás (star activity) léphet fel. Ilyenkor az enzim nemcsak a kanonikus felismerési szekvenciáját, hanem hasonló szekvenciákat is felismer, így a hasítási mintázat szabálytalanná válik. Nagyon gyakran előforduló eset a megengedettnél nagyobb glicerinkoncentráció. Az enzimeket 50% glicerinolddal tartjuk - 20°C-on. Számos enzim esetén csillagaktivitás lép fel, ha az emésztési elegyben a glicerinkoncentráció magasabb, mint 5%. Ebből következően általános irányelv, hogy a restrikciós emésztőelegybe maximum a végtérfohat 1/10-ének megfelelő a enzimetoldatot szabad csak bemérni (50% /10 = 5%).

A restrikciós enzimek működéséhez megfelelő mennyiségű enzimre és időre van szükség. Ha egyikből vagy másikkól kevesebb van a kelleténél, az enzim nem fog minden hasítóhelynél hasítani ilyenkor a ún. részleges (parciális) emésztésről beszélünk. Számos olyan alkalmazás van, amikor a DNS részleges emésztésére van szükség, ezeknél az a jellemző, hogy vagy egyszerűen csak nagy, vagy átfedő fragmentumokra van szükség, vagy mindkettő (pl. genomiális könyvtárak, kromoszómális séta).

A fehérjetermeltetés, expressziós vektorok tekintetében kiemelt jelentőségűek azok a restrikciós endonukleázok, melyek tartalmazzák az ATG szekvenciát, amit a transzláció során a leggyakrabban használt startkodon. Ilyen enzimek pl. az NdeI, vagy az NcoI.

15. fejezet - Metilázok

A baktériumok, hogy ne “vágják meg” magukat a restrikciós endonukleázokkal, metilázokkal metilcsoportokat építenek be saját DNS-ükbe, mégpedig úgy, hogy a megfelelő restrikciós felismerőhely legyen metilálva. Az ismert, jellemzett és a kereskedelmi forgalomban kapható metilázok száma sokkal kisebb, mint a hasító enzimeké, hisz az alkalmazási palettájuk is sokkal szűkebb. Mindenesetre egy adott restrikciós enzimnek sokszor megvan a metiláz párja, pl. az EcoRI endonukleáznak az EcoRI metiláz.

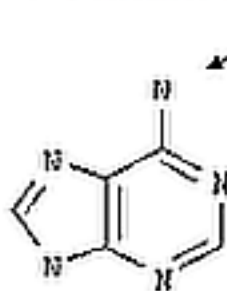


Azzal együtt, hogy az ismert metilázok száma sokkal kevesebb, mint a restrikciós endonukleázoké, elhanyagolható azon endonukleázok száma, mely felismerőhelyének metilálására ne lenne példa.

A fenti endonukleázokhoz kapcsolható metilázokon kívül E. coli-ban két jellegzetes metiláz található: a dam (deoxiadenozin) és a dcm (deoxicitozin) metiláz.

- dam metiláz (deoxiadenin metiláz)

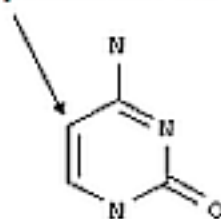
5' GATC 3' felismerő hely N⁶ pozícióban metilez



adenin

- dcm metiláz (deoxicitozin metiláz)

5' CCAGG 3' vagy 5' CCTGG 3', C⁵ pozícióban metilez



A legtöbb klónozó vagy expressziós gazdasejt tartalmazza ezeket a metilázokat, ezért abban az esetben, ha metilázérzékeny restrikciós endonukleázt akarunk alkalmazni, olyan törzset kell keresnünk, mely a zavaró metilázt már nem tartalmazza. Alternatívaként metiláz érzéketlen izoskizomert használhatunk.

Metilázok alkalmazási lehetőségei:

1. Egyre több, biotechnológiai jelentőségű törzs kerül az érdeklődés középpontjába. Ahhoz, hogy megismerjük a metabolikus folyamatait, vagy rekombináns technológiával módosítsuk őket genetikai rendszerre van szükség. Ennek egyik lépése idegen DNS bejuttatása és fenttartása a sejtben. Ahhoz, hogy a sejt ne bontsa le ezt a DNS-t célszerű metilálni.
2. Ha in vitro munkák során meg kívánjuk védeni a DNS-t a hasítástól.
3. Egy degenerált endonukleáz felismerőszekvencia specifikusságának növelésére (a degeneráció fokának csökkentésére)

16. fejezet - Ellenőrző kérdések:

1. Mi a fermentor?
2. Mi az enzimatis biokatalizátorokat meghatározó egység?
3. Mi a centrális dogma?
4. mik a restrikciós endonukleázok
5. a restrikciós endonukleázok melyik csoportja használatos a molekuláris biotechnológiában?

V. rész - DNS módosító enzimek

A gyakorlatban a restrikciós modifikációs enzimektől elkülönítve szoktuk tárgyalni azokat az enzimeket, melyek a DNS manipulálására szolgálnak, ezeket DNS módosító, vagy modifikációs enzimeknek hívjuk. Ilyenek a DNS, RNS polimerázok, kinázok, ligázok, foszfatázok, exo- és endonukleázok.

17. fejezet - Nukleinsav polimerázok

A nukleinsav polimerázokat aszerint csoportosítjuk, hogy milyen nukleinsavat szintetizál, illetve kell-e és ha igen, akkor milyen templát a szál szintéziséhez. Eszerint megkülönböztetünk

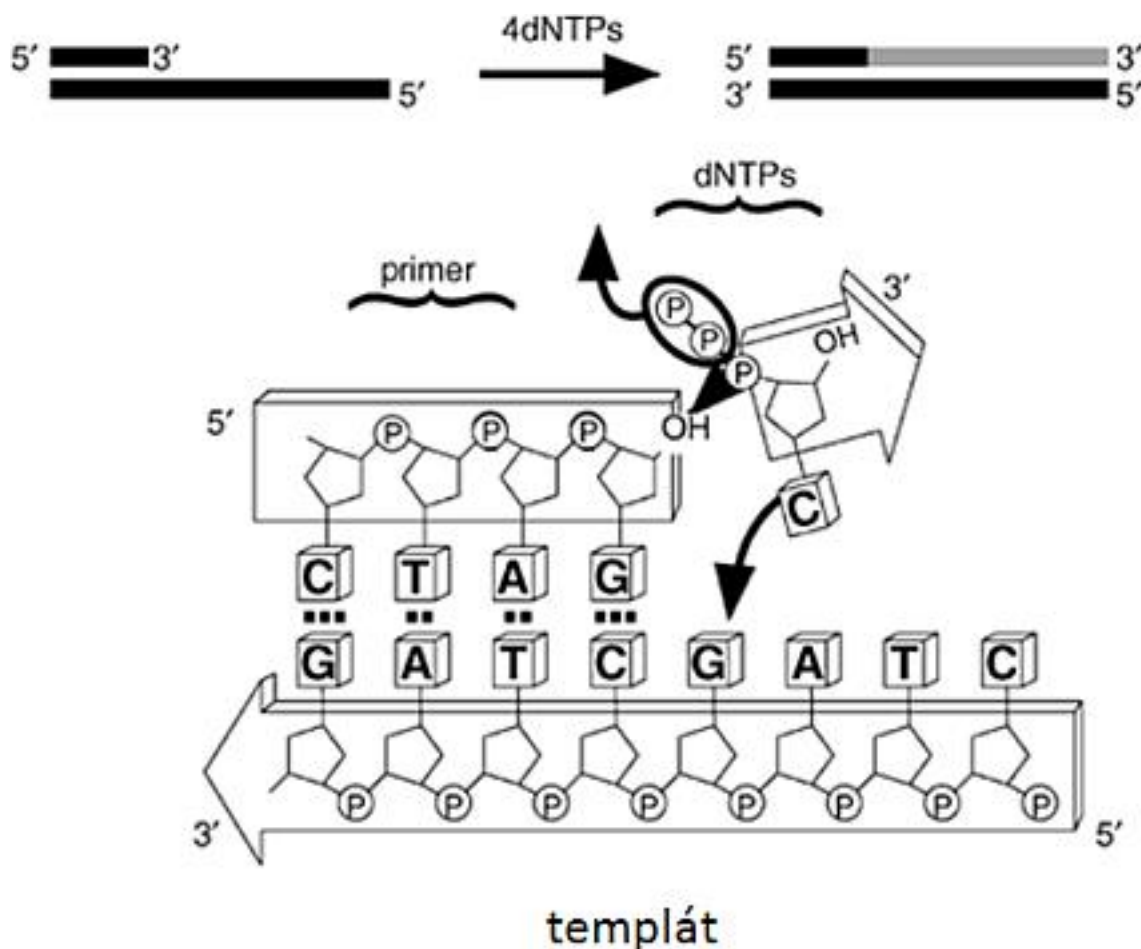
1. DNS függő DNS polimerázokat
2. RNS függő DNS polimerázokat
3. Templát független DNS polimerázokat
4. DNS függő RNS polimerázokat
5. RNS függő RNS polimerázokat (ennek jelentősége nem általános)

Minden polimeráznak jellemzője, hogy 5' – 3' irányban történik a szál szintézise és a 3' véghez kapcsolja a (deoxi)ribonukleotid trifoszfátból a monofoszfátot, miközben melléktermékként pirofoszfát molekula képződik.

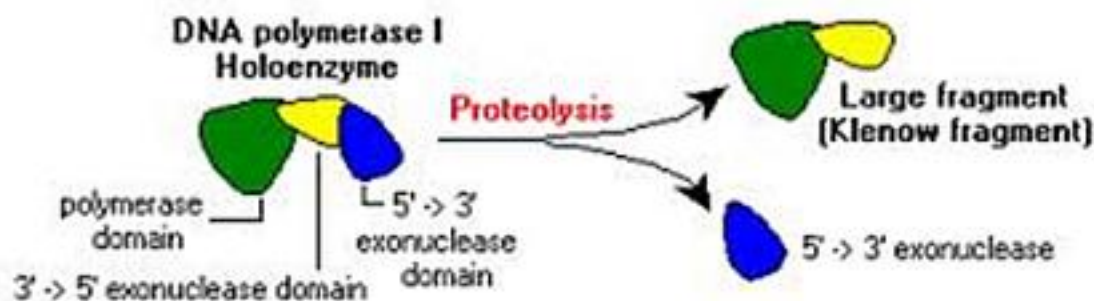
Minden DNS polimeráznak szüksége van egy ún indítoszekvenciára, amit primernek szoktunk nevezni. Ez egy rövid nukleinsav, mely a templátfüggő polimerázok esetén a tempáthoz tapadva pozicionálja a polimerizáció kezdőpontját. Míg a templátfüggetlen polimerázok esetén templátfüggetlen indítóelemként szolgálnak.

18. fejezet - DNS függő DNS polimerázok

A sejt replikációs folyamataiban játszanak szerepet. A laboratóriumokban azonban csak néhány fajtájuk használatos.



DNS polimeráz I 5' – 3' polimeráz, 5' – 3' exonukleáz, 3' – 5' exonukleáz aktivitással rendelkezik. Felhasználási területei: DNS jelölés nick translációval.



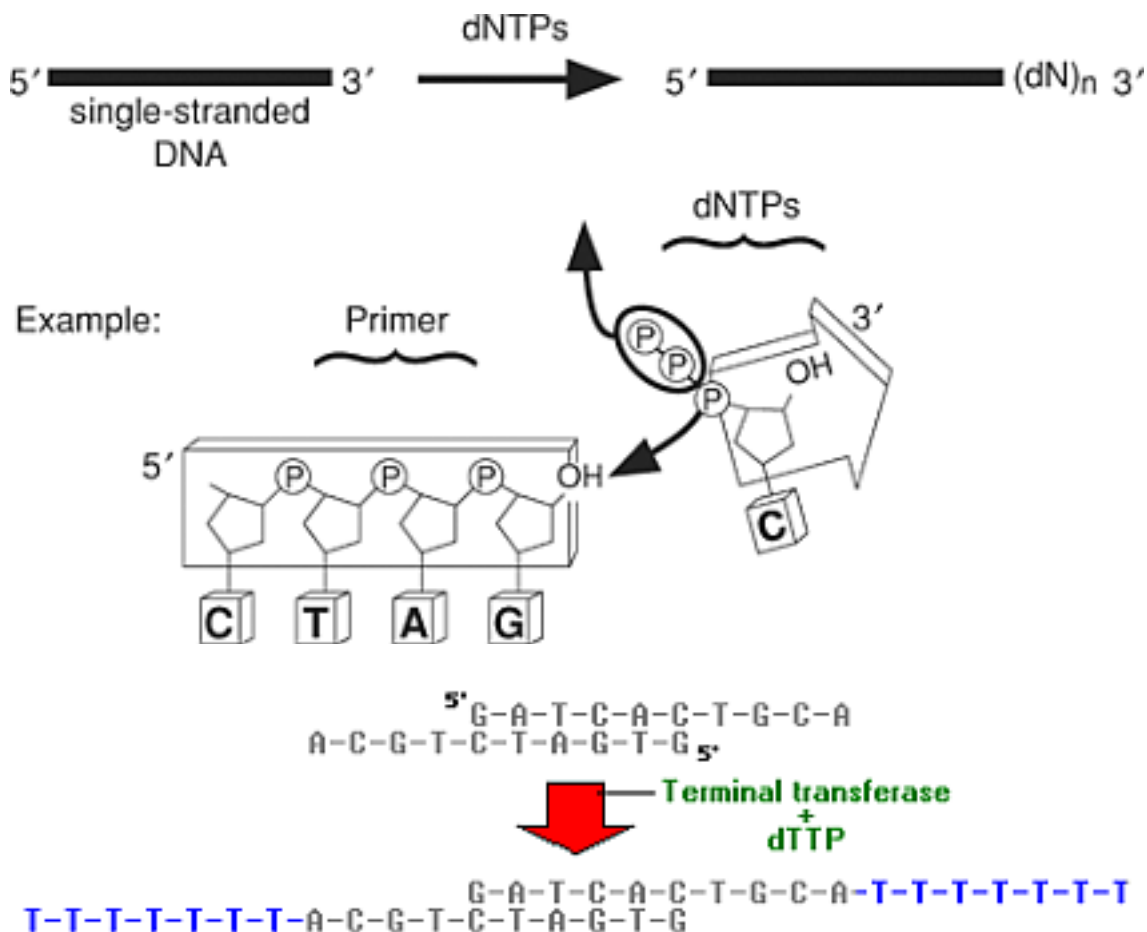
Klenow fragment A DNS polimeráz nagy alegysége, mely nem tartalmazza az 5' – 3' exonukleáz katalitikus részért felelős régiót. 5' – 3' polimeráz, 3' – 5' exonukleáz aktivitással rendelkezik. Felhasználási területei: DNS jelölés random priming, végjelölés, DNS átírás, ragadós végek tompítása stb. T4 DNS polimeráz Hasonló aktivitással rendelkezik, mint a Klenow, de erősebb az exonukleáz aktivitása.

Termostabil DNS polimerázok. Ezek közül legrégebben ismert a *Thermus aquaticus*-ból izolált Taq polimeráz. Ennek a hőmérsékleti optimuma 72°C, ezért nem egyszerűen termostabil, hanem termofil polimeráz. A termostabil enzimeknek általában rosszabb a templátátírási pontossága, mint a mezofil polimerázoké. Ráadásul Taq enzimnek sokszor hiányzik a 3' – 5' exonukleáz aktivitása, ezért mintegy 10.000 nukleotidonként hibázik. Az ilyen aktivitással rendelkező enzimek pontosság egy – két nagyságrenddel jobb, de még így is rosszabb, mint a mezofil enzimeké.

A termofil polimerázok legközismertebb és egyben legfontosabb alkalmazási területe a polimeráz láncreakció (PCR: polimeráz chain reaction).

19. fejezet - Templátfüggetlen DNS polimeráz

A templátfüggetlen DNS polimerázok csoportját lényegében a terminális transzferáz alkotja. Ez az enzim dNTP-k jelenlétében képes a DNS 3' végére nukleotidokat kapcsolni. Amennyiben mind a négyfajta nukleotid jelen van, a beépített szekvenciasorrend véletlenszerű. Amennyiben csak egyfajta dezoxinukleotidot adunk az elegyhez, pl. dCTP-t, akkor homopolimer szekvencia poli-dC képződik.

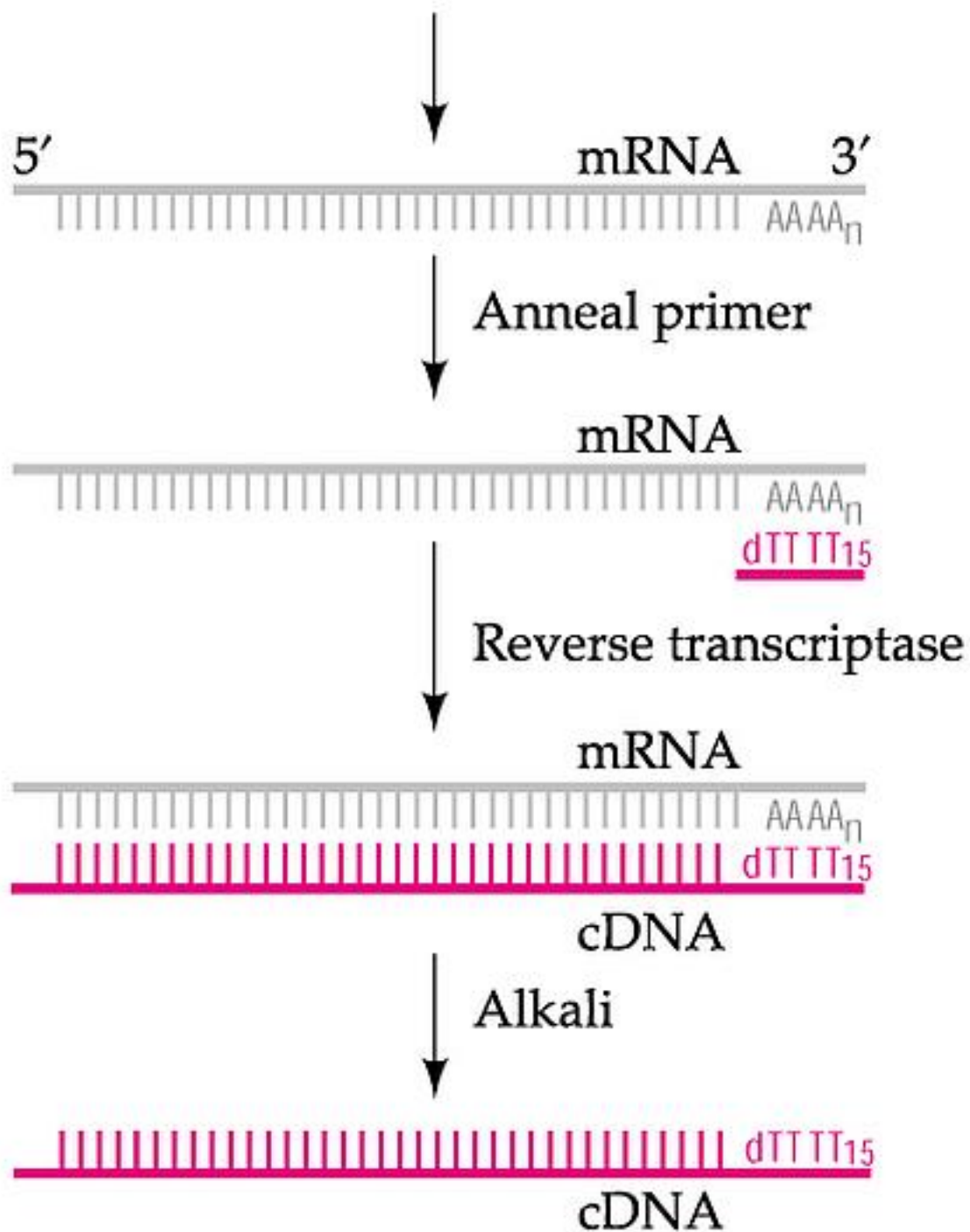


Felhasználási területek

1. cDNS könyvtár készítésénél, a második szál szintéziséhez szükséges primer számára templát generálása.
2. Amennyiben a dNTP jelölt, a DNS 3' végi jelölésére.
3. 5' RACE technikánál a transzkripció iniciációs pont meghatározásához.

20. fejezet - RNS függő DNS polimerázok

A retrovírusokból származtatható RNS függő DNS polimerázokat reverz transzkriptázoknak hívjuk, hisz a transzkripcióval ellentétben RNS templátról készül DNS másolat. Mint minden DNS polimeráznak, ennek az enzimnek is indítószekvencia (primer) kell az elinduláshoz és dNTP-k jelenlétében megsztetizálja az RNS komplementer szálát, melyet szokás cDNS-nek, copy DNS-nek is nevezni. Az enzimeknek a polimeráz aktivitásokon túlmenően van RNázH aktivitásuk. Az RNázH enzimeknek az RNS:DNS hibrid a szubsztrátja, melyről leemésztik az RNS-t. A dolog biokémiai racionáléját az adja, hogy a reverz transzkripciót követően már nincs szükség a templát DNS szálra, célszerű eltávolítani.



Többfajta revers transzkriptázt lehet kapni, ilyen pl. a AMV (Avian Myeloblastosis Virus) illetve Moloney Murine Leukemia Virus (M-MuLV, MMLV) Reverse Transzkriptáz. A M-MuLV RT-nek számottevően kisebb az RnázH aktivitása.

Felhasználásuk. cDNS szintézisre számtalan további célból, legjellemzőbben

1. cDNS könyvtárak készítésére,
2. génexpresszió analízisre (reverz transzkripció kapcsolt kvantitatív PCR)
3. gének szerveződésének vizsgálata (policisztronos génszerveződés)
4. RNS szekvenálás esetén,

5. transzkripció iniciációs pont meghatározás primer extenzióval vagy 5' RACE technikával.

21. fejezet - DNS függő RNS polimerázok

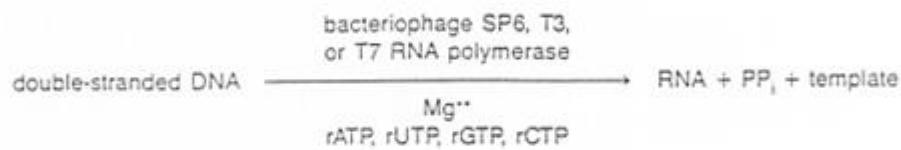
Ezek az enzimek a transzkripcióban vesznek részt és ennek megfelelően az iniciáláshoz nem indítószekvenciája (primerre), hanem promóterre van szükség. DNS templátról készítenek RNS szálát.

Bacteriophages SP6, T3, and T7 DNA-dependent RNA Polymerases

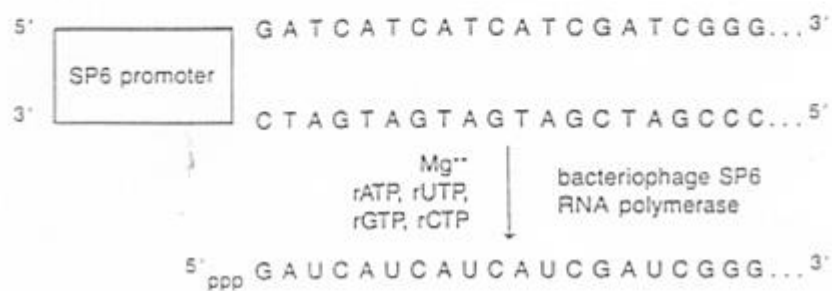
Activity: 5' → 3' RNA polymerase

Substrate: Double-stranded DNA molecules containing bacteriophage SP6, T3, or T7 promoters.

Reaction:



For example:



22. fejezet - Nukleinsav kinázok

A kinázok olyan enzimek, melyek foszfátcsoporthoz képesek kapcsolni a DNS vagy RNS 5' OH végére. Ehhez ATP (riboATP-t) használnak és a γ foszfátcsoporthoz mobilizálják (átészterezik) miközben ADP adenozin difoszfát képződik.

A legáltalánosabban használt kináz a T4 bakteriofág polinukleotid kináza, mely képes az 5' végi szabad OH-ra foszfátot kapcsolni (előre (forward) reakció). Azonban, ha az 5' vég eleve foszforilált, akkor egy kicserélődési reakcióban képes az ATP és a nukleinsav 5' foszfátjának kicserélésére (kicserélődési reakció).

Alkalmazási területek:

1. Két DNS lánc összekapcsolása ligázzal akkor lehetséges, ha az 5' vég foszforilált, a 3' vég OH. Abban az esetben, ha a DNS 5' vége OH, akkor ligálás előtt foszforilálni kell. Erre tipikus példa, ha foszforilálatlan oligonukleotidunk van és ezt szeretnénk ligálni, vagy pl. foszforilálatlan oligonukleotid primerekkel végzett polimeráz láncreakció esetén.
2. Amennyiben az ATP γ foszfátcsoporthoz radioaktív (β sugárzó ^{32}P vagy ^{33}P izotópot tartalmaz, akkor ennek segítségével az adott DNS az 5' végén jelölés. Ezt a jelölési formát szálvégi jelölésnek nevezzük.

23. fejezet - Foszfátázok

A foszfátázok a kinázokkal ellentétes reakciót katalizálnak, a nukleinsav 5' végéről lehasítják a foszfátcsoportot. Legismertebb képviselőjük a CIAP (calf intestinal alkaline phosphatase, borjúbél alkalikus foszfátáz), amely rendkívül stabilis enzimnek mutatkozott. Mivel relatíve nehezen inaktiválható, ezért a kutatások kevésbé stabilis enzimek irányába fordultak. Így kerültek a piacra a bakteriális alkalikus foszfátázok (BAP) illetve az aprórák (shrimp) alkalikus foszfátáza (SAP). Alkalmazási területek:

1. Amennyiben egy inszertet (DNS darabot) egy vektorba próbálunk ligálni, és a két DNS darab mind a négy vége kompatibilis, akkor lehetséges, hogy a vektor üresen önmagára tud ligálódni. Ennek megakadályozására szolgál az alkalikus foszfátáz, mely a vektor 5' végi foszfátjának eltávolításával annak önligálódását megakadályozza.
2. Speciális esetekben, pl. shot gun könyvtárak esetén nem a vektort, hanem az inszertet defoszforilálják, hogy a többszörös konkatamer, vagy kiméra inszertek létrejöttét megakadályozzák. Ilyen önmegsemmisítő, (suicide) klónozó vektorokat alkalmaznak.
3. Az alkalikus foszfátázok igen népszerű riporter fehérjék. Általában valamilyen hordozó molekulához, pl. ellenanyaghoz kapcsolva kolorimetriásan () vagy kemilumineszcens szubsztráttal detektálható. Természetesen közvetlenül a DNS-hez is kapcsolható, de ennek alkalmazási köre meglehetősen limitált. Az alkalikus foszfátázon alapuló kimutathatósági határ már eléri a legérzékenyebb izotópos jelölés detekciós küszöbértékét, így bevezetésük jelentős előrelépés volt a veszélyes izotópos technikák kiváltásához.

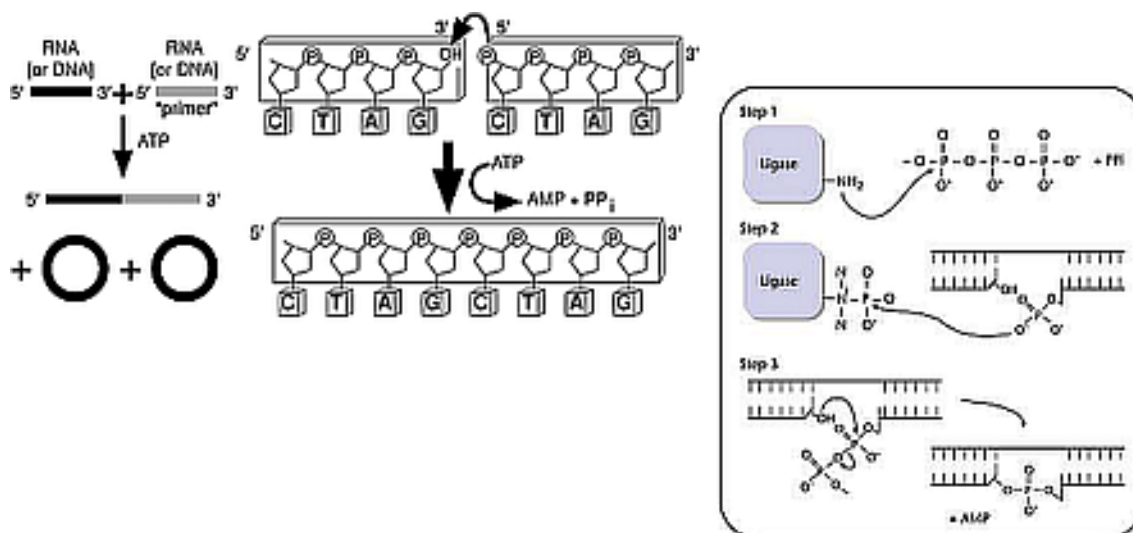
24. fejezet - Ligázok

A ligázok azok az enzimek, melyek képesek a nukleinsav 5' végi foszfát csoportját a 3' végi OH-hoz hozzákapcsolni, lényegében egy észterezési reakciót katalizálni. Természetesen, kétszálú DNS esetén, a feltételek teljesülése esetén mind a két szál képes összekapcsolni. Ennek feltétele, hogy a két szál kompatibilis, illeszhető legyen. Míg minden tompa vég kompatibilisnek tekinthető, a túlnyúló végek csak akkor, ha a túlnyúló (egyszálú) DNS szakaszok, egymással komplementerek. Trivialitás, hogy 5' túlnyúló vég nem lehet kompatibilis 3' túlnyúló véggel.

Amennyiben két DNS vég nem kompatibilis, akkor ezek kompatibilissá tehetők

1. Olyan DNS polimerázok használatával, melyeknek van 3' – 5' exonukleáz aktivitása. Ezek a polimerázok az 5' túlnyúló (3' recessive) végek esetén a másik szál 3' végétől indulva, dNTP jelenlétében feltöltik a szálát. A 3' túlnyúló végek esetén 3' – 5' exonukleáz aktivitásuk segítségével visszaemésztik a szálát így egy idő után 5' túlnyúló vég keletkezik, s ezt a polimeráz aktivitás dNTP jelenlétében feltölti, de csak addig, amíg a szál tart.
2. Speciális ún. egyszálú DNS-t emésztő nukleázok (S1 nukleáz, Mung bean nukleáz) mind a két túlnyúló végről leemésztik a DNS-t így tompa vég keletkezik.
3. Az adapterek olyan szintetikus kétszálú oligonukleotidok, melyeknek egyik vége a két összekapcsolandó vég közül az egyikkel, míg a másik vége a másikkal kompatibilis, így egy kis hídmolekulaként játszik szerepet az összeligálás során – feltéve, hogy a fenti foszforilációs feltételek teljesülnek.

A DNS ligázok közül kiemelt jelentőségű a T4 bakteriofág ligáza (T4 ligáz), mely képes mind kompatibilis ragadós végek, mind ragadós végek ligálására. A reakcióhoz ATP-re van szükség, aminek a koncentrációját az összeligálandó végek típusától függően kell beállítani.



25. fejezet - Ellenőrző kérdések:

1. mik az izoskizomerek?
2. Hol metilál a dam metiláz?
3. Mire van szükségük a DNS polimerázoknak a polimerizáció elindításához?
4. Mire van szükségük a RNS polimerázoknak a polimerizáció elindításához?
5. Milyen irányú a polimerizáció?

VI. rész - Vektorok

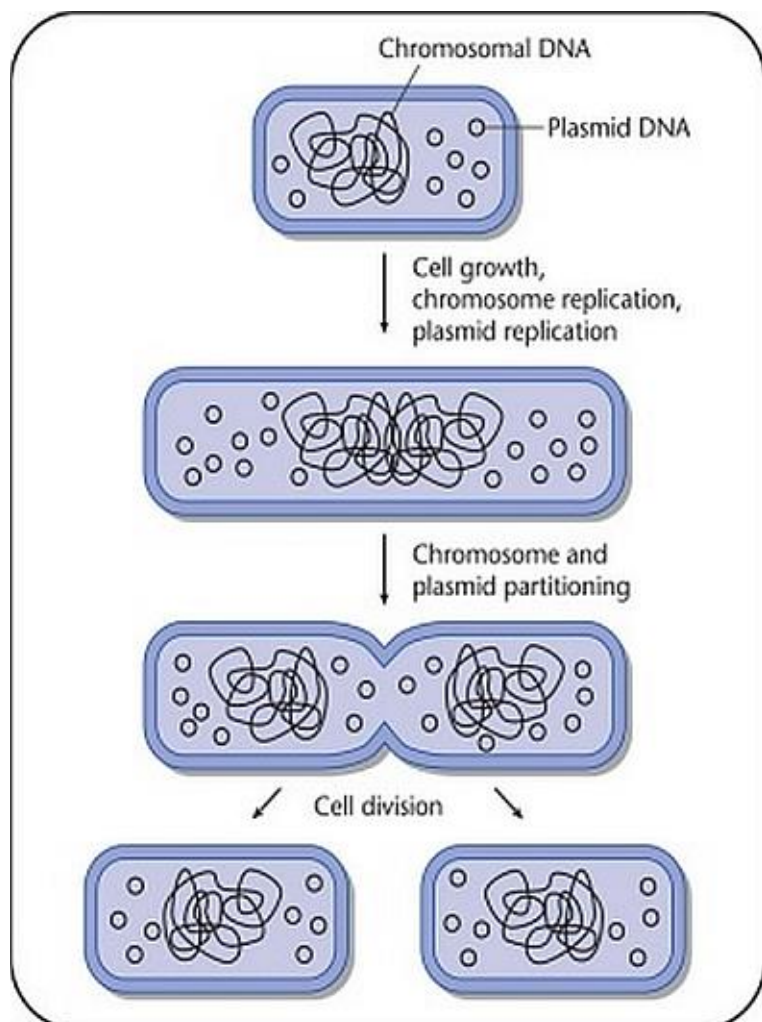
A vektorok felhasználási területe annyira sokféle, hogy definíciójuk meglehetősen absztrakttá vált. Eredetileg a vektorokat klónozásra, a DNS in vivo felszaporítására használták, de ma már a vektorokat alkalmazzuk genetikai manipulációk, vagy rekombináns fehérjék előállításának eszközeként. Ezért a vektorok fogalmát úgy határozzuk meg, hogy olyan hordozó, mely segítségével nukleinsavakat, tipikusan DNS-t lehet bevinni egy sejtbe. Ennek a célja lehet igen változatos és a vektor jellegét is eszerint kell megválasztani.

Igen sokfajta vektortípust lehet elkülöníteni, ezek közül itt hat típust fogunk tárgyalni:

	példa	inszert méret
plazmidok	pUC18,19	< 10 - 15 kb
fonalas fágok	mp18, 19	< 5 - 10 kb
fagemidek	pBluescriptKS, SK±	< 10 - 15 kb
λ. fágok	EMBL3,4	néhányszor 10 kb
kozmidok	pHC79	néhányszor 10 kb
BAC, YAC	pBAC108L, pYAC3	néhány 100 kb

26. fejezet - Plazmidok

A baktérium-plazmidok a természetben is igen elterjedtek. A baktériumok túlélését, alkalmazkodását biztosító mobilis genetikai egységek ezek, melyek egyik sejtől a másikba képesek átjutni, a kromoszómális DNS-től függetlenül osztódni és a rajta lévő géneken hordozott információt megnyilvánítani. Kettős szálú, gyűrű alakú DNS molekulák, melyek a nyitott gyűrűvel egyensúlyt tartó szuperhelikális formát is felvehetnek.



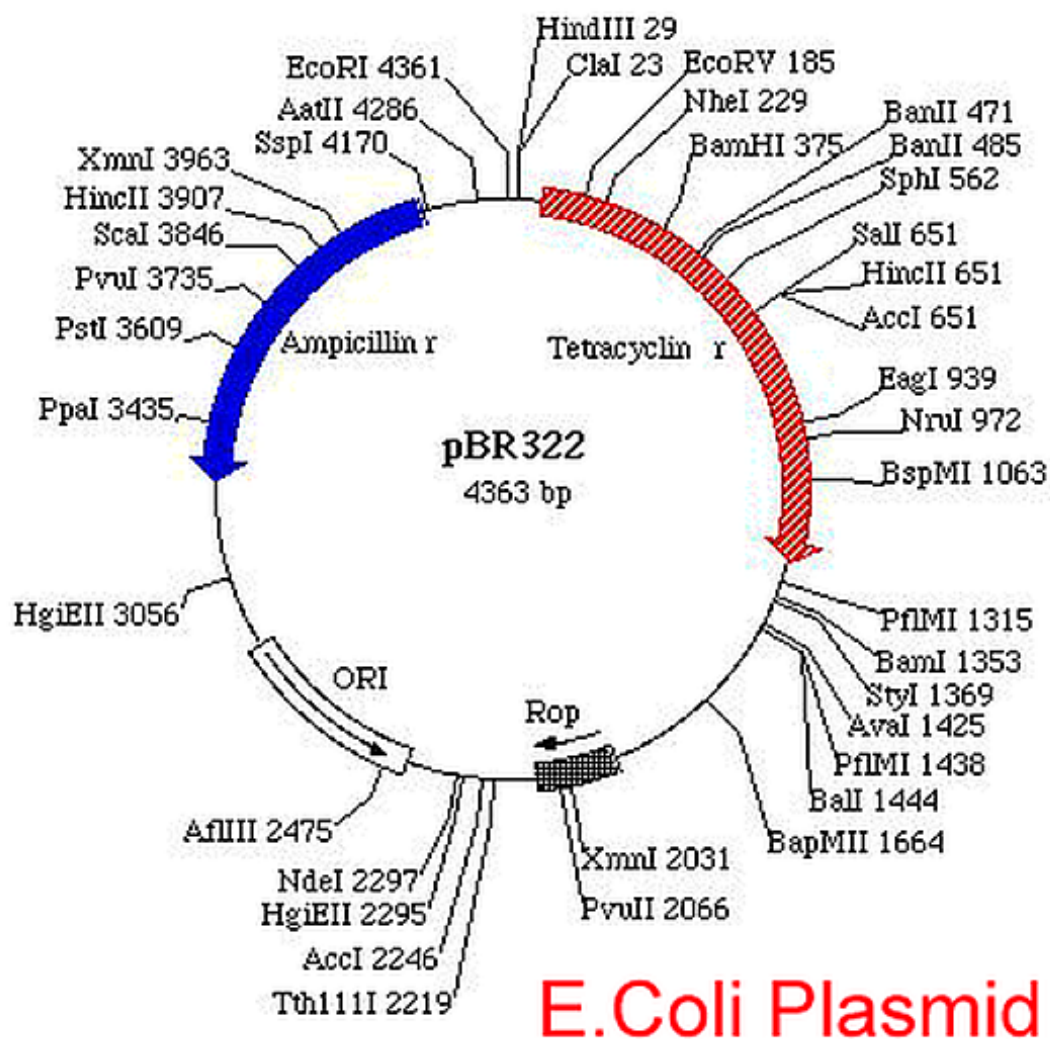
A baktériumok természetes plazmidjainak nagysága 3-20 kB, az *E. coli* kromoszómájához képest, annak mindössze ezredrésze. A géntechnikákban használt plazmid-vektorokat is a természetes plazmidokból kiindulva állították elő, módosították, hogy azok eleget tegyenek a klónozás követelményeinek, azaz, hogy kis méretűek legyenek, mechanikus behatások ellen védett térszerkezetűek, önreplikációra képesek (origó jelenléte), egyáltalán „szabhatóak és varrhatóak” legyenek, azaz tetszőleges módon és helyen felnyithatóak legyenek, idegen DNS-ek beleépíthetőek legyenek. A plazmid jelenlétét, követhetőségét biztosító marker gének legyenek rajta, valamint a plazmid tartalmú sejtek és a rekombináns plazmidot tartalmazó sejtek megkülönböztethetőségét és szelekcióját ugyancsak marker gének biztosítják. A plazmidokba nem építhető be akármilyen nagy DNS darab. Ha a DNS túl nagy a rekombináns plazmid instabil lesz, a beépített darab eltörhet vagy kihalhat.



A baktériumok plazmid-vektorjainak ideális mérete 4-6 kB (kilobázis). Az ilyen méretű gyűrű alakú DNS molekulákkal könnyen lehet dolgozni, nem sérülékenyek, könnyen kivonhatóak a sejtől és tisztíthatóak. A különböző in vitro manipulációk során sem sérülnek, törnek el.

PÉLDÁK PLAZMID REPLIKONOKRA

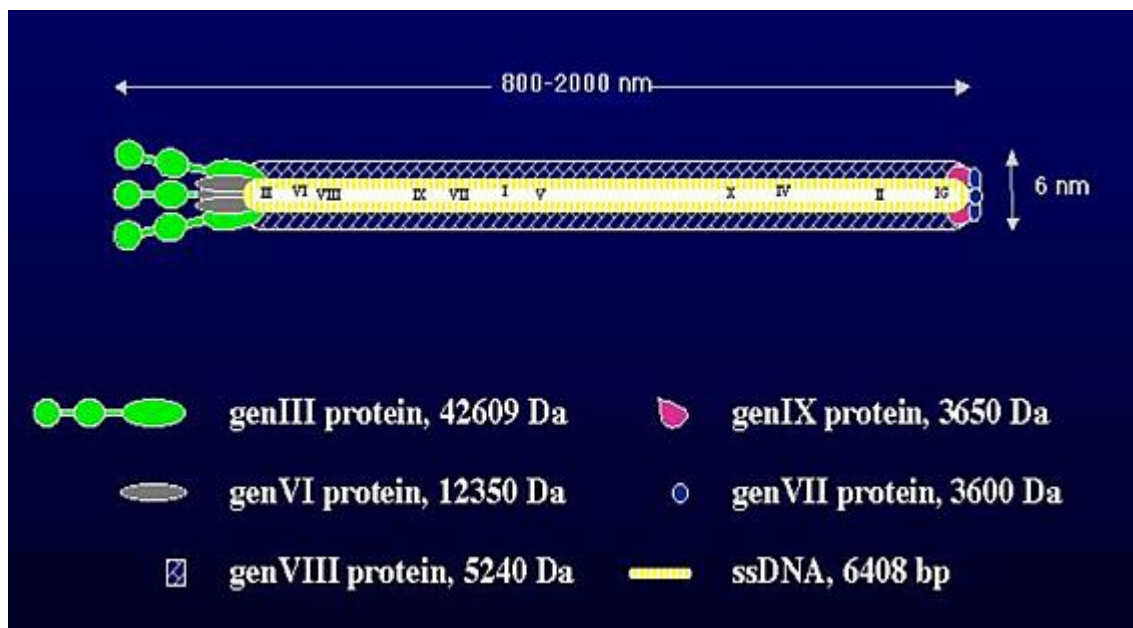
PLAZMID	INKOMPATIBILITÁSI CSOPORT	KÓPIASZÁM	GAZDASPECIFICITÁS
pBR322	ColE1	20	<i>E. coli</i> és még néhány
pUC19	ColE1	300	<i>E. coli</i> és még néhány
F plazmid	FI	1-2	<i>E. coli</i> és még néhány
pRK356 (R1, R6)	FII	2	<i>E. coli</i> és még néhány
pRK2501 (RK2)	P	1-4	Gram-negatív baktériumokban széles
RSF1010	Q	≈ 10	Gram-negatív baktériumokban széles
pRK353 (R6K)	X	13-40	Gram-negatív baktériumokban széles
P1	Y	1-2	Gram-negatív baktériumokban széles

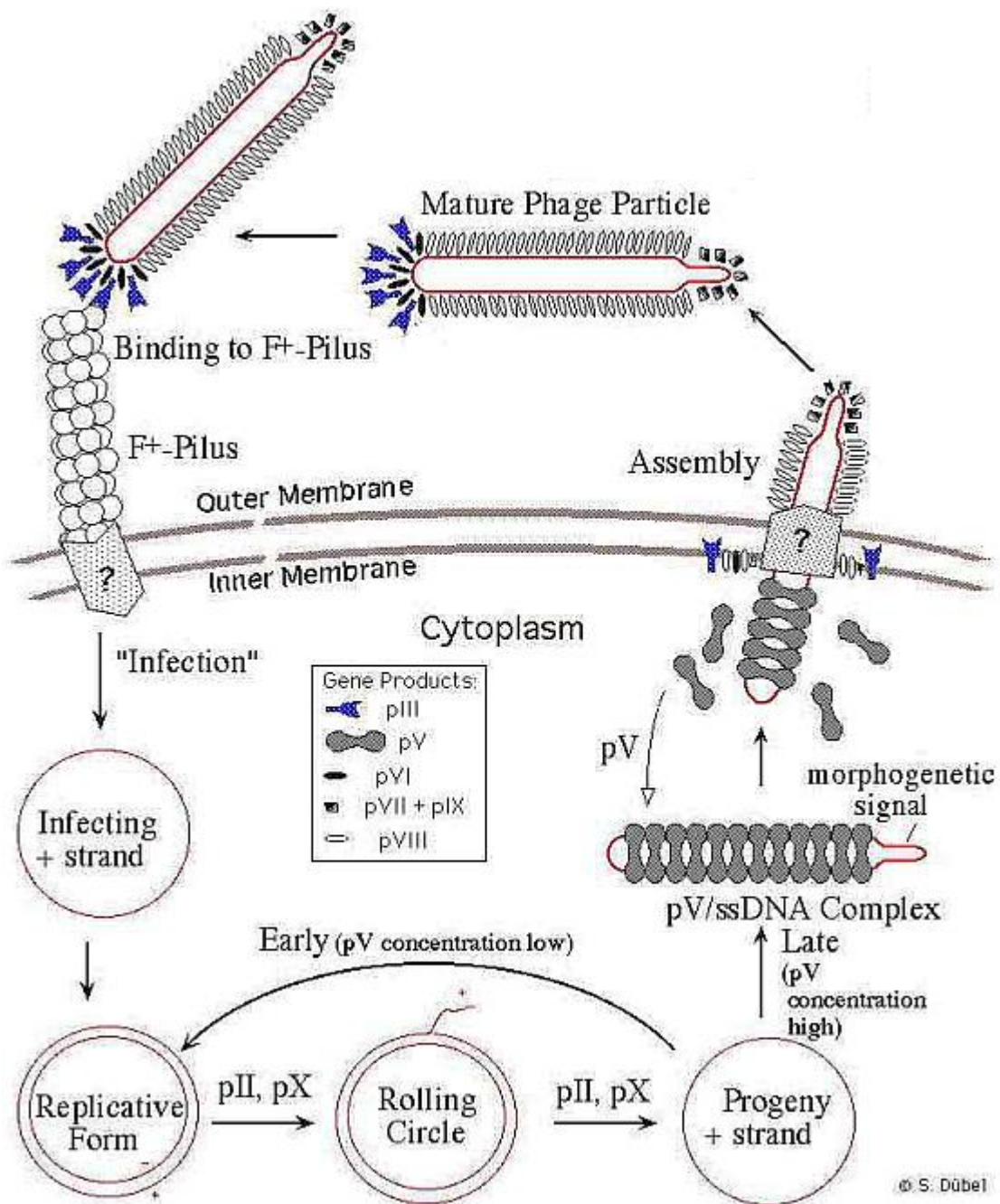


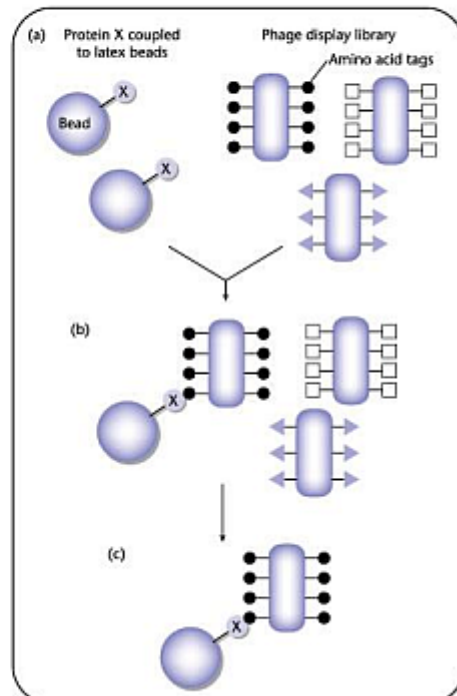
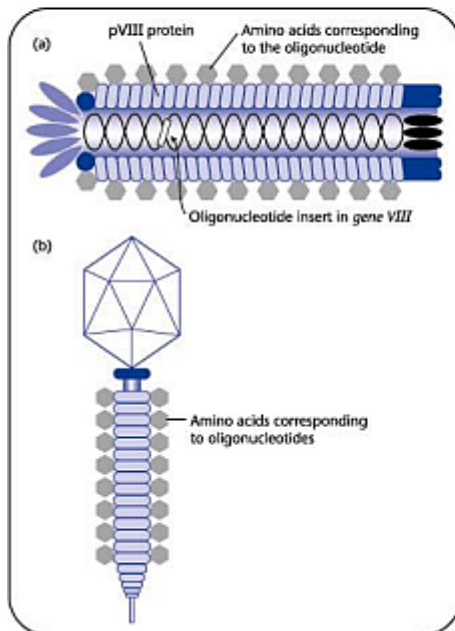
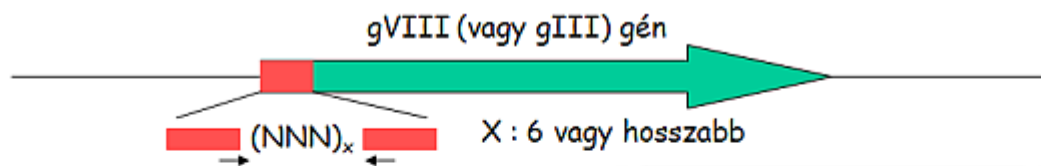
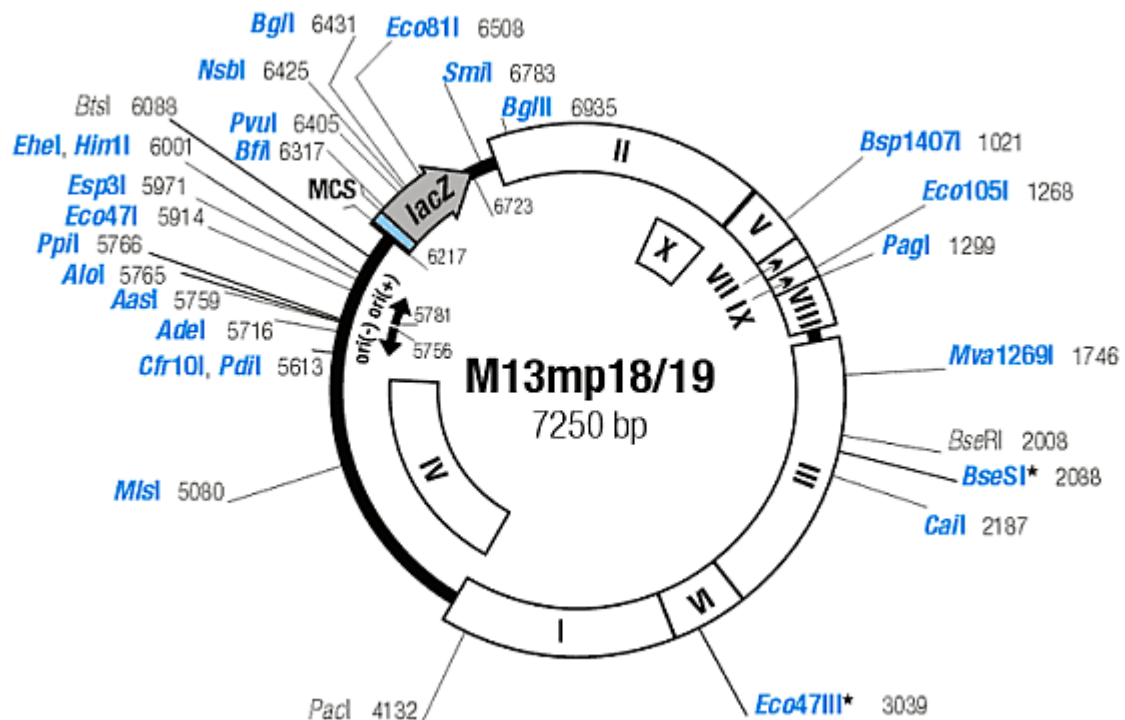
A replikációs origó jelenlétének köszönhetően baktérium-plazmidok a kromozómától függetlenül, saját hatáskörben képesek a gazdasejt enzimszisztémájának irányításával megkettőzni magukat. A plazmid replikációját baktériumok esetében ugyanaz az enzimszisztéma végzi, mint a kromozómáját. Az origó egy olyan szekvencia, ahova a plazmid átírásához szükséges DNS polimeráz enzim kapcsolódik. Ezek a DNS polimerázok specifikusak, egy adott plazmid csak abban a gazdasejtben, vagy közeli rokonságban képes replikálódni, amelyben felismerhető origót tartalmaz. Egyes plazmidok példányszáma a sejtben egy, vagy egynéhány, más plazmidok (un. relaxált) 10-200 példányban is jelen lehetnek egyetlen sejtben. Ez a szám amplifikációval akár több ezerre is növelhető. A plazmid átírása az origóból kiindulva a gyűrű alakú szálon mindkét irányban folyik. Azok a vektorok, amelyek több specifikus origót tartalmaznak, kettő vagy több különböző baktériumban, vagy baktériumban és élesztőgombában is képesek replikálódni. Ezeket ingázó (shuttle) vektoroknak nevezzük.

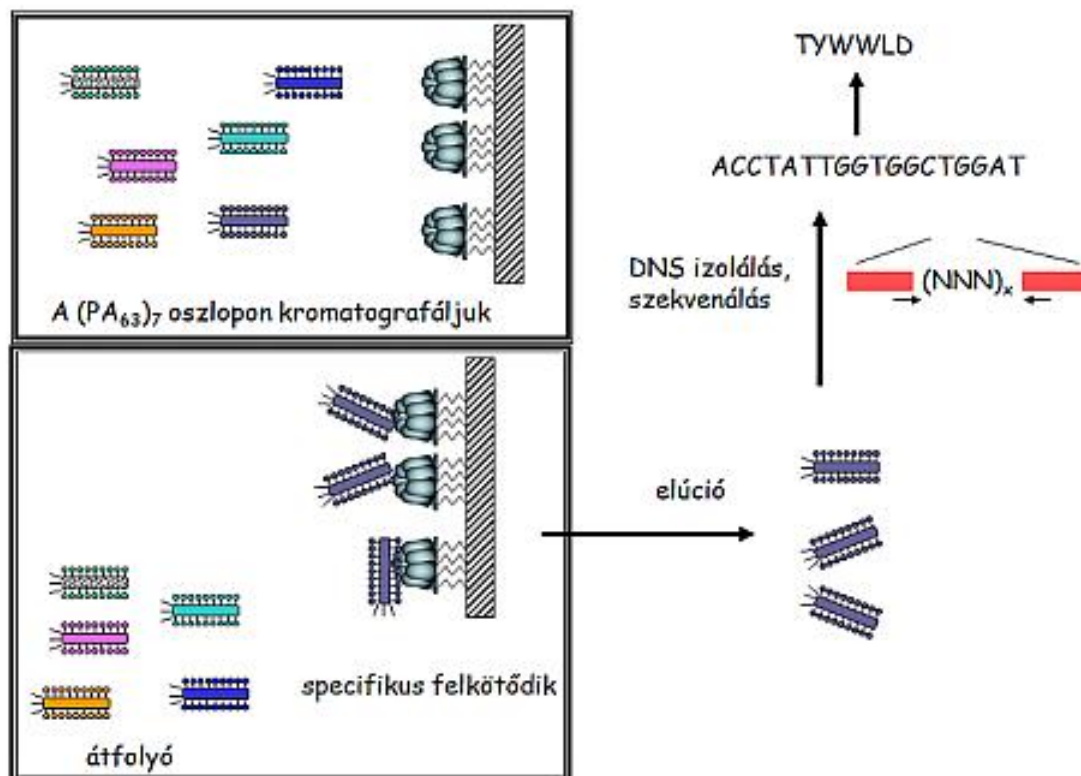
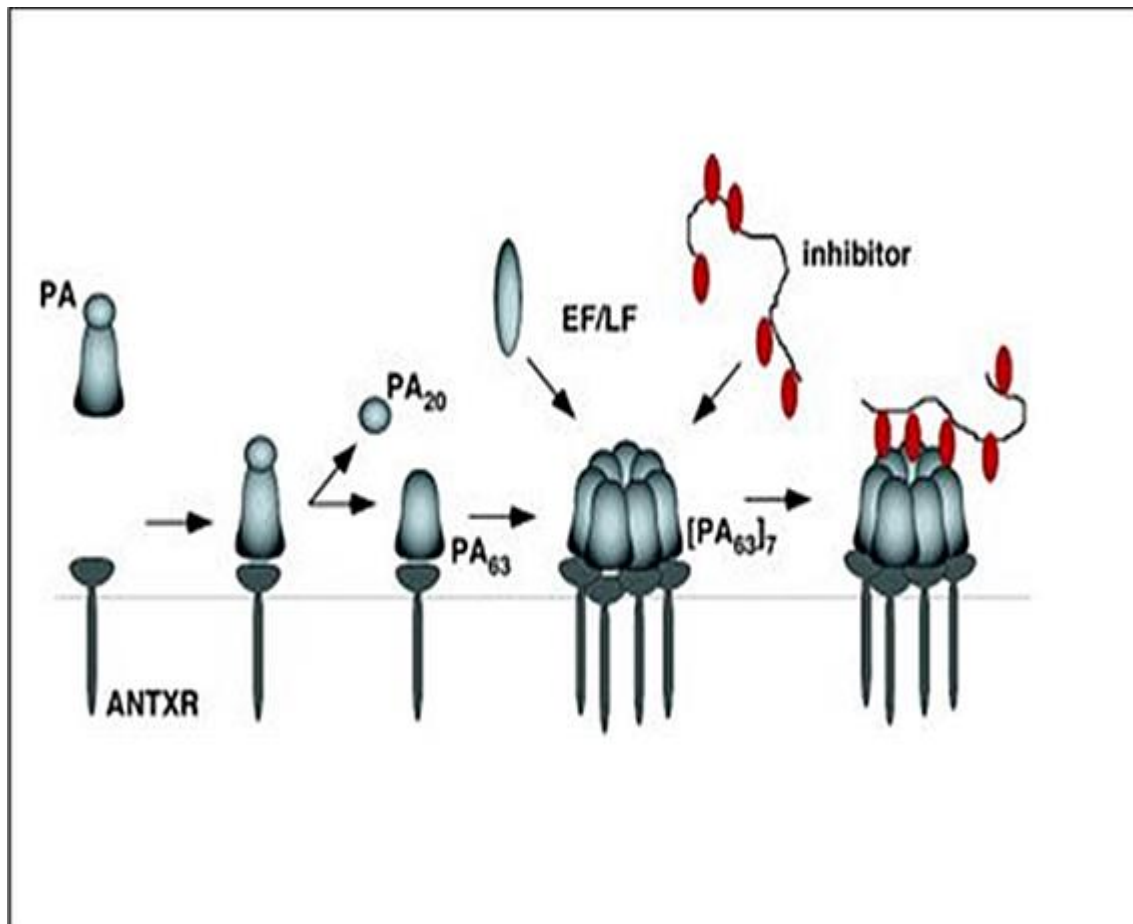
27. fejezet - Bakteriofágok, mint vektorok

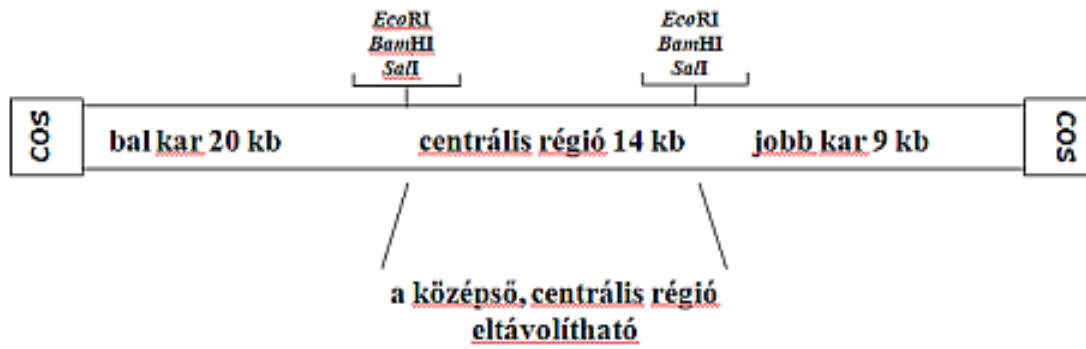
A bakteriofágok vektorként alkalmazása a transzdukció, vagyis a bakteriofágok közvetítette génátvitel in vitro felhasználásán alapul. A géntechnikus a fág számára nem létfontosságú DNS szakaszokat cél-DNS-re cseréli ki. A lambda fág esetében például a genom közel 30 %-a felesleges, azaz kicserélhető idegen DNS-re. A klónozendó DNS összekapcsolása a fág DNS-sel hasonló módon folyik, mint a plazmidok esetében. A célgénnel összeillesztett fág DNS-t in vitro csomagolás után lehet bejuttatni a baktériumsejtbe, egyszerű fágfertőzés útján. Az egyik első fág, amelyet vektorként alkalmaztak a *Escherichia coli* lambda-fágja. Ez egy úgynevezett mérsékelt fág, ami azt jelenti, hogy a két alternatív életmenet közül (ld. fágok) a lizogénia dominál, vagyis az, hogy a baktérium kromoszómájába beépülve a baktérium DNS-től megkülönböztethetetlenül profág formájában van jelen mindaddig, amíg egy mutáció nem indukálja, amikor kihat a baktérium kromoszómájából és áttér a lítikus szaporodási ciklusra. A lambda-fág 48 513 bázispárból áll és 61 génje van. Sanger teljesen megszekvenálta. A lambda-fágba beépíthető legnagyobb DNS 15 kB. Ahhoz, hogy a csomagoló enzim-rendszer becsomagolja a lambda DNS-t a fágfejbe, ahhoz a DNS mérete legalább 45-50 kB kell legyen (a genom 75 %-a), de legfeljebb a teljes genom 106 %-a lehet. Egy teljes emlősgenomot tartalmazó klóntár, melyben nagy valószínűséggel minden gén megtalálható, csak több millió fágplakkban (fágklónban) tartható fenn. A T7 fág DNS-e kb. 40 000 bázispárból áll, 50 gént tartalmaz. A genom 92 %-a ki is fejeződik. Mind klónozásra, mind kozmid készítésére felhasználták. A T4 fág szintén az *E. coli* fágja, főleg onnan ismert, hogy a klónozáshoz szükséges ligáz enzimet T4 faggal fertőzött *E. coli*ből nyerik ki. Az M13 fág is jól használható klónozó vektor. Egyfonalas fág, amely a replikáció során kétfonalas formává alakul. Az egyfonalas utódsejtbe az eredeti egyfonalas alakban jelenlévő + szál kerül. A kétfonalas replikatív formát használják klónozó vektorként. A fág igen kicsi, 7 200 bázispárból áll, restrikciós endonukleázos hasítási helyeket tartalmaz, ahova könnyen be lehet építeni idegen DNS-t. Legfontosabb felhasználása az M 13 fág, hogy egyfonalas templátot szolgáltat a Sanger-féle DNS-szekvenáláshoz.

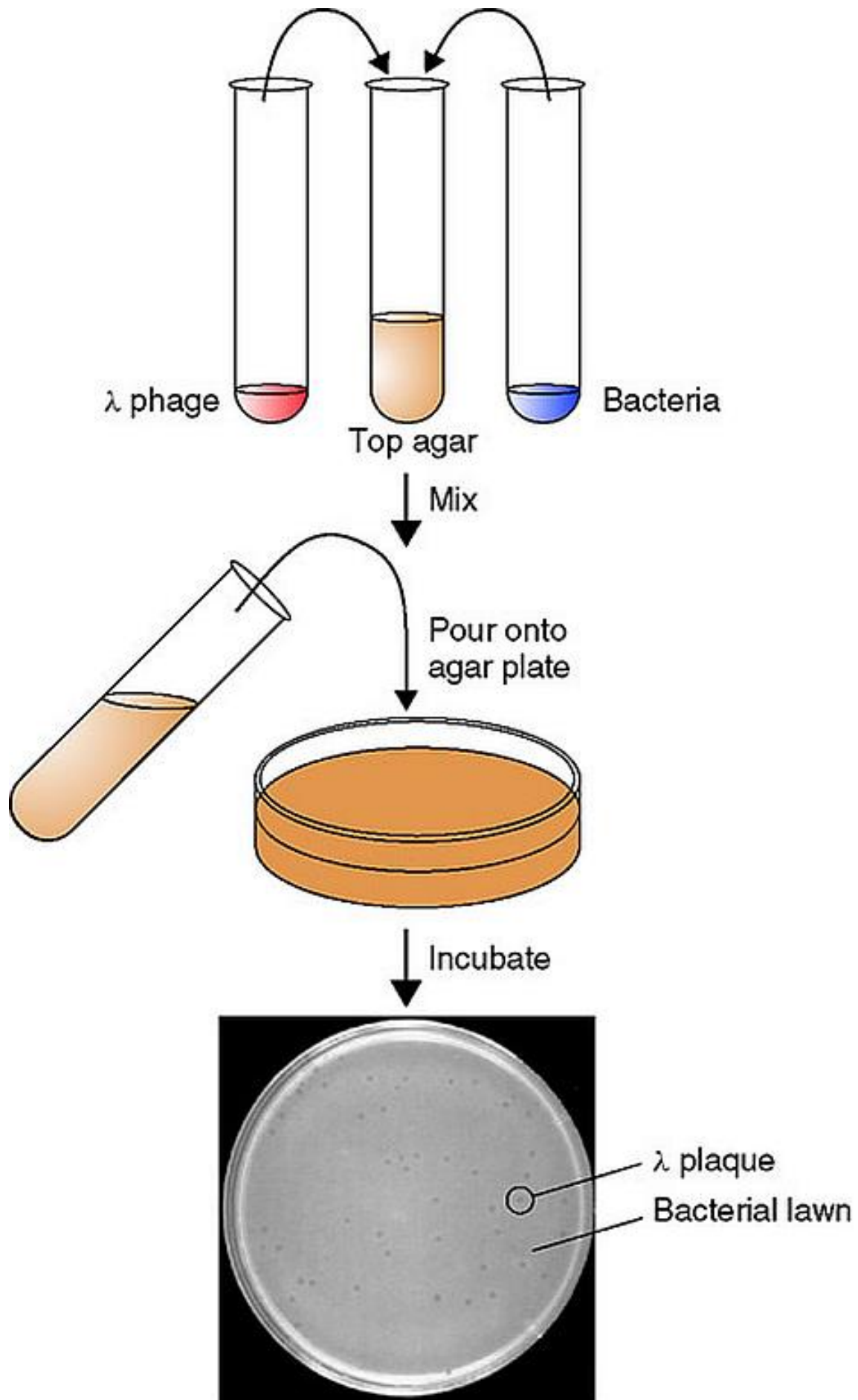


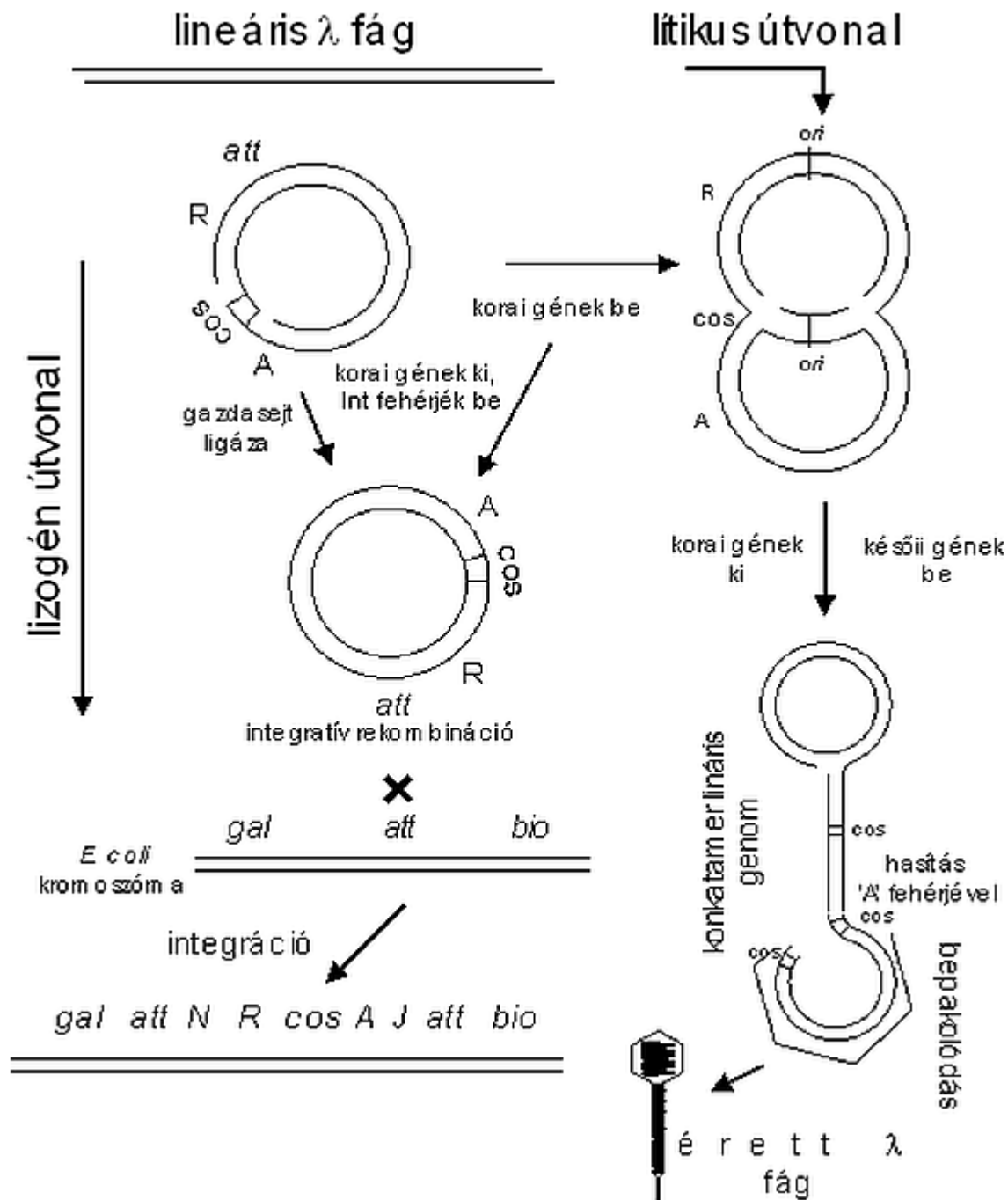




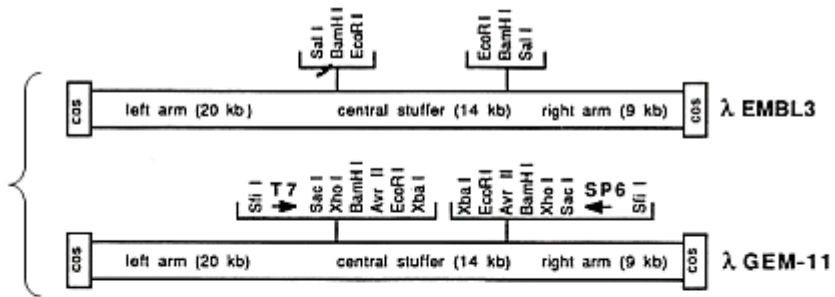




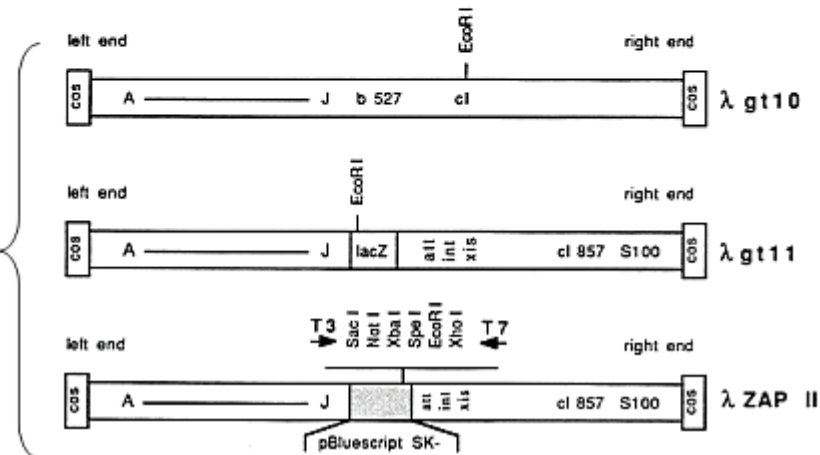


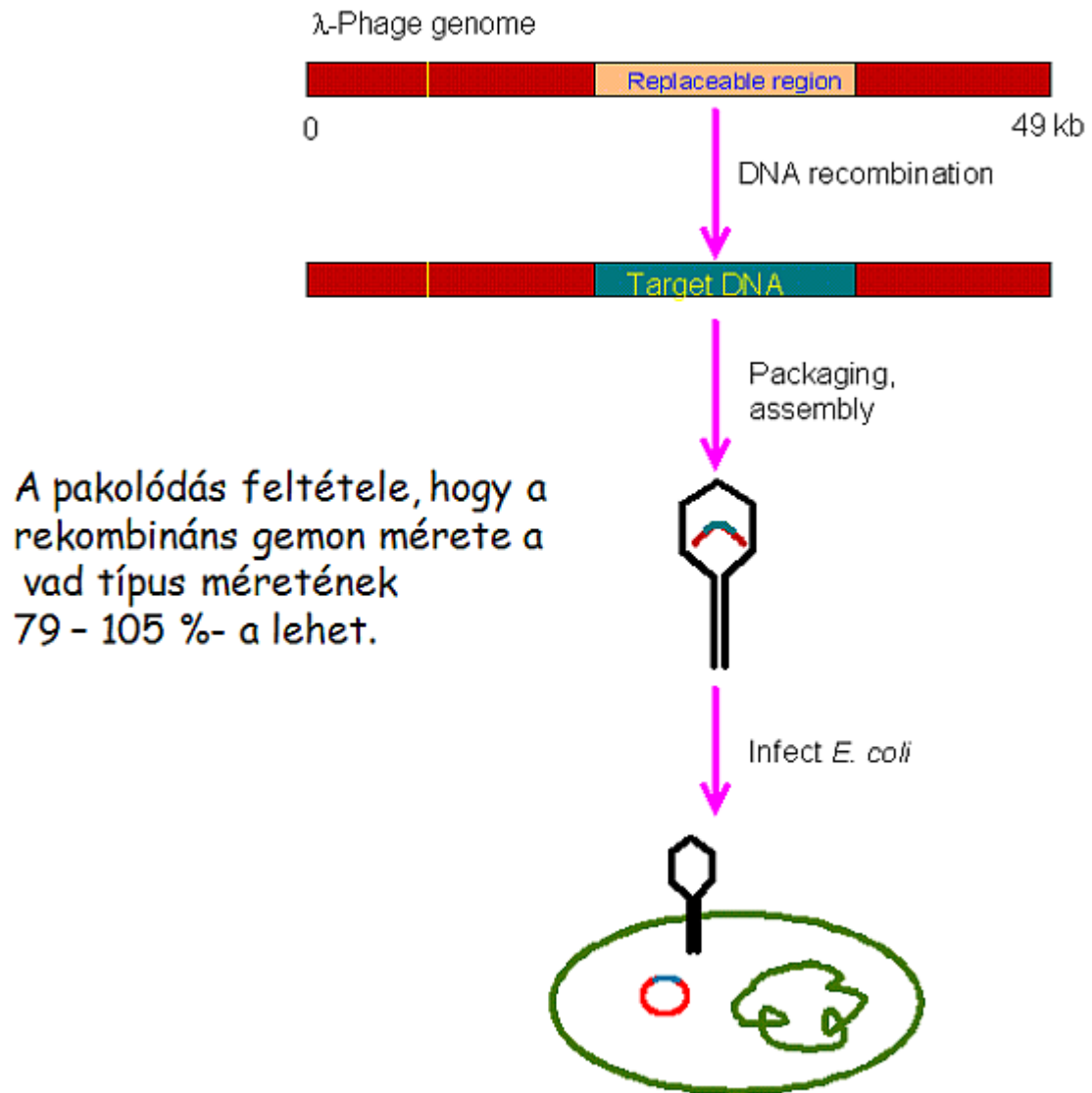


Helyettesítő/
replacement
vektorok



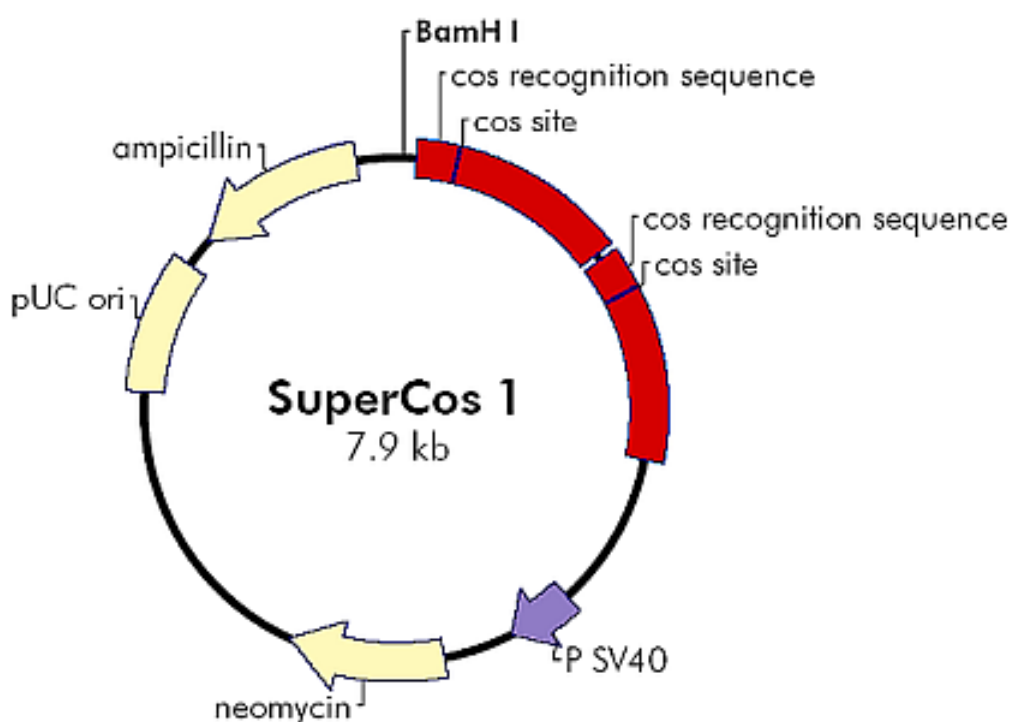
Inszerációs
vektorok



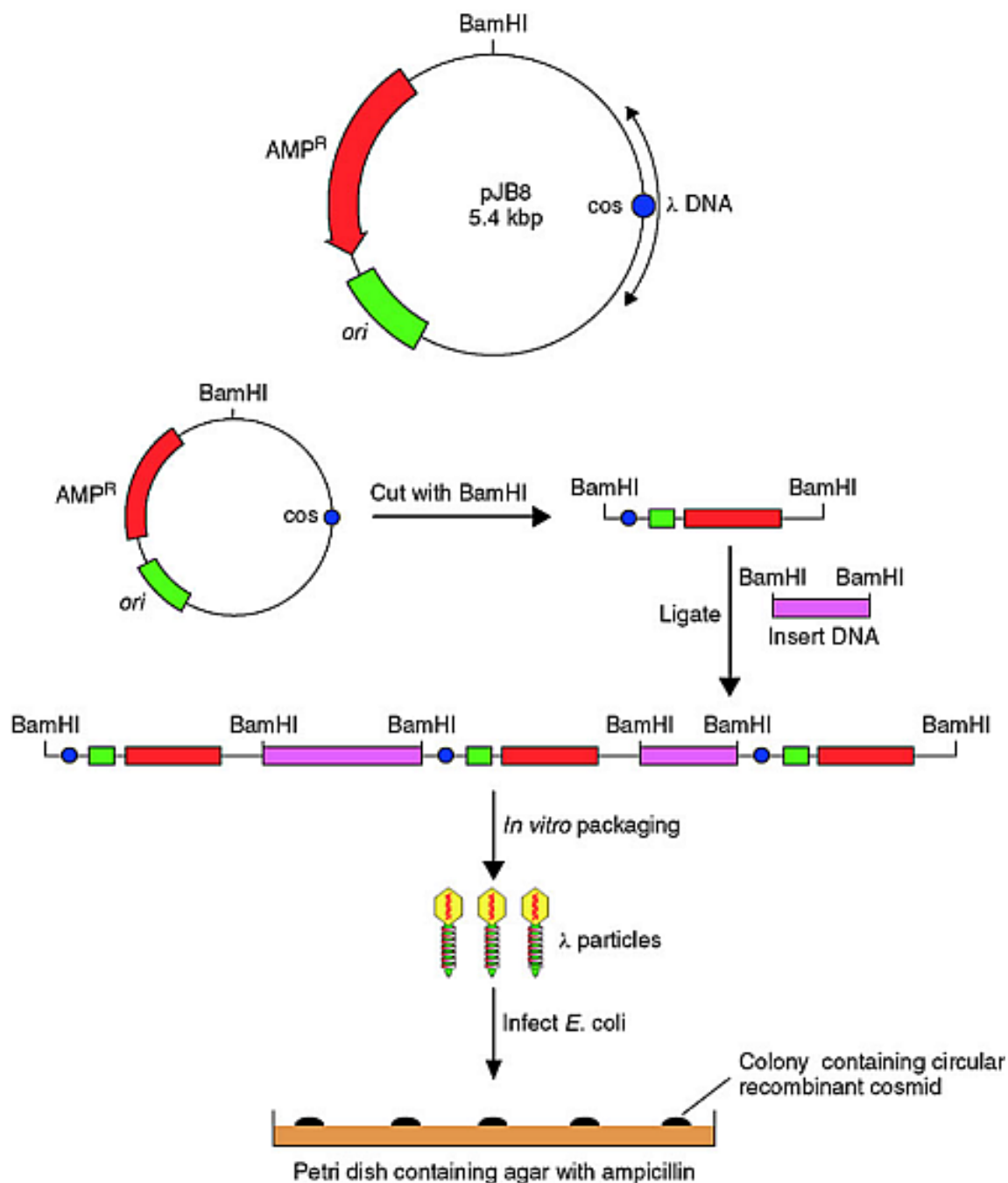


28. fejezet - Kozmidok

A kozmidok létrejöttét az az igény siettette, hogy egyre nagyobb DNS darabokat lehessen klónozni, hogy a klóntárak, – melyek a gyakorlati munka elengedhetetlen eszközeivé váltak a klónozás során— egy-egy genomot minél kevesebb klónban tartalmazzanak, illetve, hogy minél kevesebb klónt kelljen átvizsgálni, amikor egy gén kikeresése folyik. Láttuk, hogy a lambda-fág segítségével maximum 15 kB nagyságú DNS darabok klónozása oldható meg. Azt is láttuk, hogy a lambda fág DNS egy részéről bebizonyosodott, hogy nem is szükséges a fág anélkül is fertőzőképes és szaporodóképes. Egy bátor feltételezés később bizonyítást nyert: fágok álcázott plazmiddal is lehet baktériumot fertőzni. A fágok álcázás a csomagolóenzim számára szükséges. A csomagolóenzim a természetes csomagolás során a teljesen ép fágok konkaténátként egymáshoz kötött genomjain is csak egyetlen részt ismer fel, az ún. cos helyet, mely a lineáris fág-DNS két végén lévő komplementer egyszálú szakaszok, a konkaténáton viszont kétszálú cos szekvenciák. A feltételezés az volt, hogy ha ezt a kétszálú cos szekvenciát ráépítik egy plazmidra, majd ebbe a kozmidnak nevezett képződménybe 35-45 kB nagyságú eukarióta genomdarabokat építenek be, akkor ezt a gyűrű alakú DNS molekulát a csomagolóenzim a cos helynél felismerve, azt be fogja csomagolni.



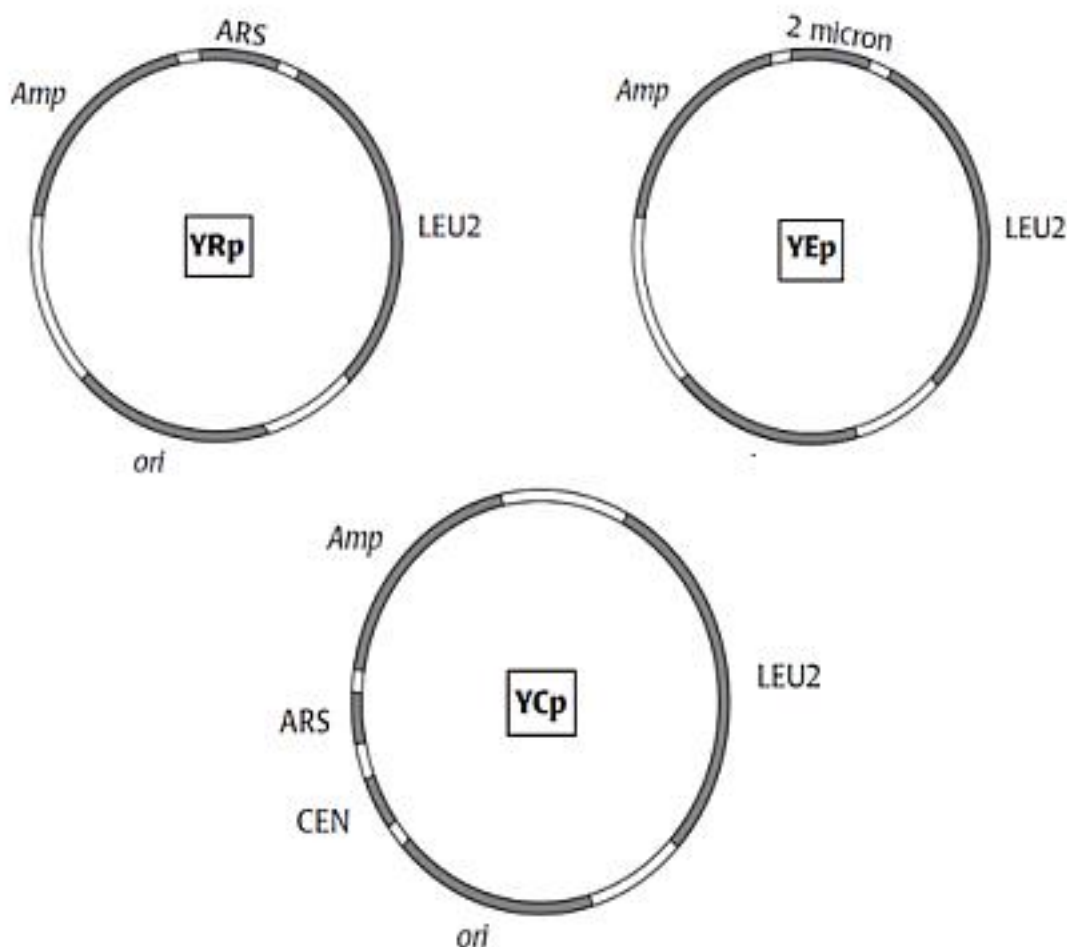
A rekombináns kozmid in vitro pakolása után lehet elvégezni a fágokkal való fertőzést. A baktériumba a fág fehérjeburok farki részének közreműködésével bekerült DNS a baktériumsejt plazmájában mint plazmid fog működni. Mint aktív fág természetesen nem működőképes, hiszen a cos génen kívül egyetlen fág eredetű gén sincs rajta. Ez biztonsági szempontból is előnyös. Az in vitro pakoláshoz ma már biotechnológiai termékeket és segédanyagokat előállító cégek készletet (kit) kínálnak, mely a fágburok feji és farki részleteit tartalmazó készítményből, pakolóenzimből, a pakoláshoz szükséges ATP oldatából és megfelelő pufferoldatokból áll.



A kozmidok segítségével készített génbankok, vagy klontárak (ld. még klontárak) például a humán genom esetében minimum 200 000 klónra van szükség, míg a lambda-fág felhasználásával 500 000 klónra. Ez a szám 10 000-re csökkenthető YAC vektorok alkalmazásával.

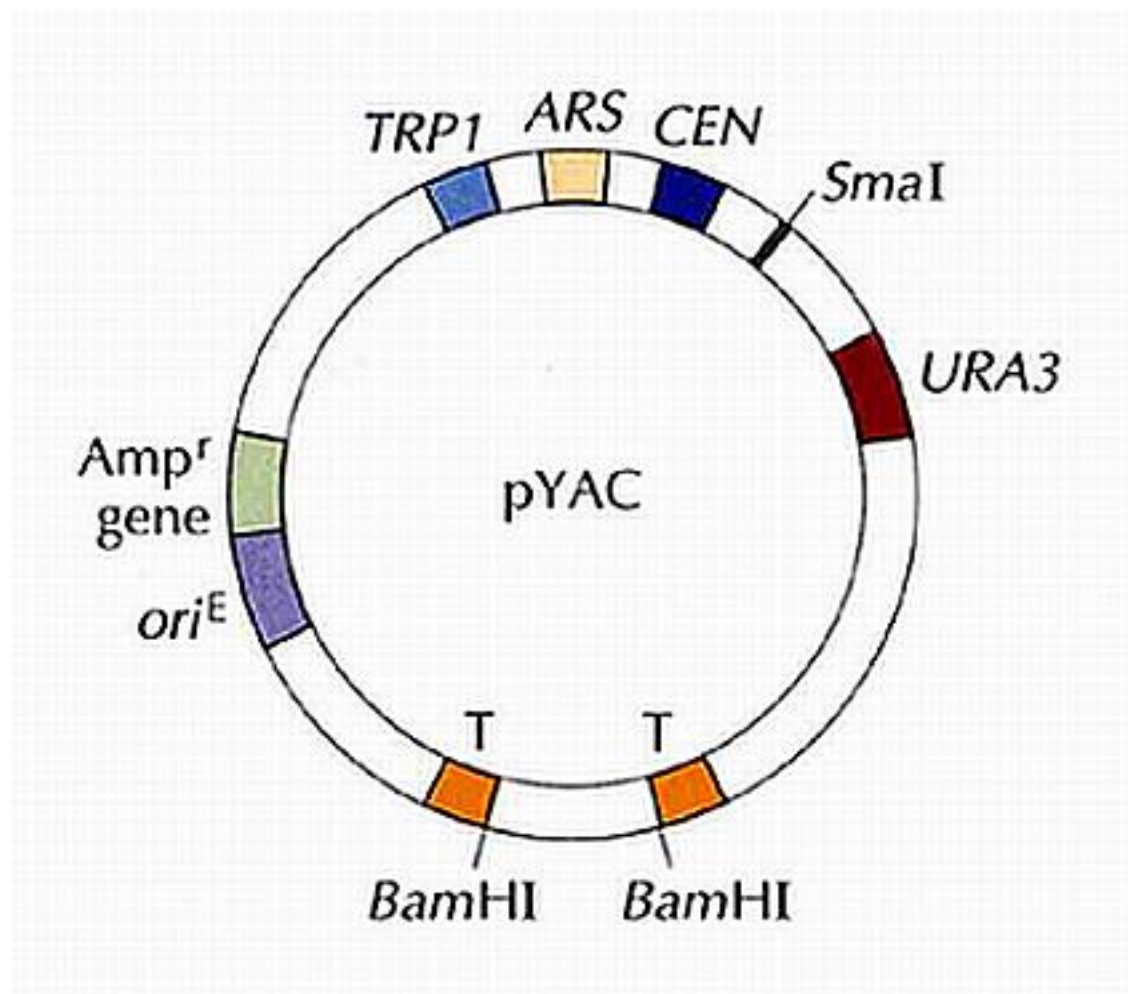
1. Élesztő vektorok

Az élesztők közül genetikai szempontból a *Saccharomyces cerevisiae* a legismertebb. Genomja viszonylag kicsi, csak négyszerese a *E. coli* genomjának. Az élesztőben a baktériumokhoz hasonlóan előfordulnak plazmidok. Legismertebb természetes élesztőplazmid a 2-mikronos gyűrű, mely egy autonóm módon replikálódó DNS. Van replikációs origója, és ún. REP génjei, melyek viszonylag kis extrakromoszómális kópiaszámot biztosítanak úgy, hogy csak akkor választják szét a plazmidreplikációt a normális sejtosztódástól, amikor a plazmid kópiaszáma lecsökkent a sejtben. Ekkor beindul a plazmid független replikációja, amely mindaddig tart, amíg a kópiaszám el nem éri a sejtenkénti 30-50 darabot. A 2-mikronos gyűrűt YE_p-nek is nevezik, azaz élesztő episzómális plazmidnak (yeast episomal plasmid). Egy sor élesztő-klónozó vektort fejlesztettek ki belőle.



ARS (autonomously replicating sequences) szekvenciák felelősek a független replikációért. Ilyen ARS szekvenciákat kimutattak már plazmidokon, pl. a 2-mikronos gyűrűn is, de magán a kromoszómán is. Az ARS szekvencia nagy kópiaszámot eredményez, de gyakran instabilis, mert hiányzik az a mechanizmus, mely biztosítaná a sejtosztódás során a nagy kópiaszámot és az utódsejtekbe jutást. Az ARS szekvenciákat tartalmazó plazmidokat YRp-nek azaz replikálódó élesztő-plazmidoknak (yeast replicating plasmids) is nevezik. Egy ARS szekvenciát tartalmazó E.coli plazmid például nagyon jó hatásfokkal transzformálódik, nagy lesz a kópiaszáma, de, főleg, ha nincs szelekciós nyomás a sejtosztódáskor elvész, nem kerül át az utódsejtekbe, 10 generáció elteltével szinte teljesen eltűnik. Vannak a kromoszómába integrálódó élesztő-plazmidok is, melyek a kromoszómába integrálódva stabilan bekötődnek az élesztőgenomba, osztódáskor megkettőződnek és átadódnak az utódsejtbe. Ezeket YIp-nek (yeast integrating plasmid) nevezik. A kromoszómák kettéosztódását és igazságosan egyik félnek az utódsejtekbe jutását az élesztőkromoszóma centromeréből származó CEN szakaszok biztosítják. A CEN szekvenciák felelősek a kromoszómák mitotikus orsóhoz kapcsolódásáért. Ha ilyen CEN szakaszt építünk az ARS szekvenciákat is tartalmazó függetlenül replikálódó plazmidokra, akkor biztosíthatjuk a nagy kópiaszámú plazmid stabil fennmaradását a generációk során át. Az ilyen mesterséges élesztőkromoszómákat YAC vektoroknak (yeast artificial chromosomes) nevezik. A YAC vektorok a centroméren kívül az élesztőkromoszóma végeiről, a telomérekről is tartalmaz darabokat. Ezeknek az a szerepük, hogy megakadályozzák a kromoszóma letörését, vagy más DNS-hez kapcsolódását. Tehát a YAC minden olyan szakaszt tartalmaz, amely a kromoszóma replikációjához és az utódsejtbe kerüléshez szükséges. Ezeket a szakaszokat bármilyen egyszerű DNS darabra rá lehet építeni. A YAC vektorok segítségével igen nagy genomdarabok, néhány millió bázispárból állók klónozása is megoldható. A HUGO project (Human Genome Project), mely a teljes emberi genom feltérképezését és szekvenálását tűzte ki célul ilyen vektorokat alkalmaz a klóntárak készítéséhez. Ezzel a technikával a teljes humán genom „elfér” 10 000 élesztőklónban. Így mind a tárolás, min a kikeresés lényegesen egyszerűbb feladatot és olyan nagy gének is vizsgálhatóak, mint például a kétmillió bázisból álló izomsorvadásért felelős gén (muscular dystrophy). A YAC vektort és többi élesztővektort nem csak klónozásra, hanem expresszióra is alkalmazzák. Mivel az élesztők maguk is eukarióták, így képesek kihalászni az intronokat. Az élesztősejtek glikozileznek is, de nem azonos módon az emlős

sejtekkel. Ez egyes esetekben még előny is lehet, ha másképp akarjuk glikozilezni a fehérjét, mint ahogy az emlős sejtekben glikozileződik (pl. stabilitásnövelés, például a TPA klónozásánál).



További előnyük az élesztőben történő expresszióknak, hogy az élesztők a baktériumokhoz hasonlóan gyorsan szaporodnak, de nem termelnek annyi toxint, mint a baktériumok, amit aztán a rekombináns DNS termékből a tisztítás során el kell távolítani. Az élesztő vektorok nagy része ingázó vektor (ld. baktérium-plazmidok), így az expresszálatást megelőző manipulációkat a jól ismert és könnyen használható *E. coli* gazdarendszerben lehet végezni. Kifejlesztettek élesztő kozmidot is, melyek az *E. coli*-val ingázó vektoroknak olyan továbbfejlesztése, mely a baktériumba való bejuttatás hatásfokának javítására in vitro csomagolást lehetővé tévő szakaszt, vagyis cos régiót is ültetnek a mesterséges DNS kreációra.

2. Növényi rekombináns DNS vektorok

A növényi szövettenyésztés, a növényi biotechnológiák birtokában a növényi rekombináns DNS technikák számtalan lehetőséget nyitottak meg számunkra. A tény, hogy izolált növényi sejtekkel tudunk dolgozni, és hogy protoplasztokból regenerálható a teljes növény, lehetővé teszi, hogy a növényi protoplasztokkal az élesztőgombákhoz és a baktériumokhoz hasonló módon végezzük a klónozást és a sejtfúzió ellenpontjaként egyetlen kiválasztott gén bejuttatását oldjuk meg. A növényeknél alkalmazható génvektorok olyan talajbaktériumok, melyek parazitaként genetikailag befolyásolják a növényt, miután megfertőzték. Ezt a természetes génátviteli módszert alakították a génszészek a baktériumok transzformációjához és a fágok transzdukcijához hasonlóan céljaik szolgálatába. Az *Agrobacterium tumefaciens* egy plazmid segítségével váltja ki a daganatot, vagyis a fertőzött növényi sejtek szabályozatlan és független növekedését. A baktérium beépíti a Ti plazmidját a növényi sejt kromoszómájába. A Ti plazmidon olyan, aminosav termeléséhez szükséges kód van, amelyet csak a fertőző baktérium tud felhasználni szén- és nitrogénforrásként. Ezek az aminosavak az opin az oktopin vagy a nopalín lehetnek. A Ti plazmid $1,2 \times 10^8$ molekulatömegű, gyűrű alakú DNS molekula. A baktériumban önállóan replikálódó genetikai egység. A plazmid DNS-nek van egy transzformáló (T) DNS-e, nagysága 20 000 bázispár, ez jut be a gazdasejtbe a fertőzést követően, majd

kovalensen beépül a növényi kromoszómába. Az aminosavak kódján kívül növényi hormonanalógok szintéziséhez szükséges információkat is hordoz, melyek segítségével a gyökér- és szárnövekedést leállítja, ezzel is előnyt kényszerítve ki a tumorsejtek növekedéséhez. A T DNS-ről azt is megállapították, hogy mendeli öröklődésmenetet mutat, tehát, ha egyszer már beépült a kromoszómába, ott úgy viselkedik, mint a növény saját génjei. A Ti plazmid előnyösen használható vektor, mert: az *Agrobacterium tumefaciens*nek igen széles gazdaköre van. Szinte minden kétszikű növényt képes transzformálni. Ha a kívánt gént sikerül beépítenünk a Ti plazmid megfelelő helyére, a T régióba, akkor a többit már a baktériumra bízhatjuk. A Ti plazmid túlságosan nagy mérete miatt (180 kB) a génszűrészek a T régiót kivágják a plazmidból és csak azzal dolgoznak tovább. Beépítik egy *E. coli* plazmidba, majd elszaporítják. A célgént a T DNS-be beépítik, majd ezt a hibrid molekulát még mindig *E. coli*-ban replikáltatják. Amikor rekombináns T DNS már nagyobb mennyiség áll rendelkezésre, akkor a hibrid molekulát bejuttatják az *Agrobacterium tumefaciens*-be, ahol az a natív Ti plazmidba homológ rekombinációval kerül be. Ha ezzel fertőzik a növényt, a célgén a T DNS-sel együtt beépül a rákos növény kromoszómájába.

A gén a baktérium előlése után is működőképes lesz. A baktériumnak az a génje, mely a növény regenerálódását gátolja inaktívváható, így a T DNS bejuttatás után a protoplasztból teljes növényké fejlődhet. A transzformált sejtek szelekciója is nagyon egyszerűen oldható meg: hormonmentes táptalajon csak a transzformánsok tudnak növekedni. Egyszerűsítették a transzformációt, miután rájöttek hogy a T DNS-en kívül csak a baktérium Ti plazmidjának vir szakaszára van szükség a transzformációhoz és a fertőzőképességhez. A végső megoldás az lett, hogy az egyik *Agrobacterium tumefaciens* plazmidon a T DNS, a másikon a vir régió lett külön-külön bevitt a sejtbe. Így nem kellett a nagy Ti plazmiddal dolgozni és főleg nem kellett a rekombináns T DNS-nek a Ti plazmidba homológ rekombinációval való beépülésére alapozni, ami nem túl jó hatásfokú folyamat. A Ti plazmid transzformációja közvetlenül növényi protoplasztokba is lehetséges, de ennek a folyamatnak lényegesen rosszabb a hatásfoka, mint a baktérium vektor közvetítésével történőnek. Növényekbe vektor nélkül is lehetséges DNS-t bejuttatni (ld. bejuttatás).

3. Állati vírusvektorok

A vektor nélkül történő DNS bevitelt transzformációnak neveztük, de állati sejtek esetében — a transzformáció kifejezés már foglalt voltára való tekintettel — gyakran a vektor közreműködése nélküli folyamatot is transzfekciónak nevezik. Hasonlóan transzfekciónak nevezik a vírus vektorok által közvetített DNS bejuttatást, mely mind az átvitel, mind az expresszió hatásfokát nagyban megnöveli. Az állati vírusok közül a következőket tárgyaljuk részletesen: DNS tumorvírusok: SV40, polioma vírus, adenovírusok, vaccinia vírusok, retrovírusok, embrionális karcinóma sejtek.

Az SV40 vírusvektorok Az SV40 a legkorábban megismert és legáltalánosabban használt emlős vírus-vektor. Méret igen kicsi, a gömb alakú kapszulában egy 5243 bázispárból álló gyűrű alakú DNS van. A DNS-en restriktációs endonukleázos hasítási helyek vannak, általában mindegyikből csak egy, ezért a vírus natív formája is alkalmas klónozó vektor. A kis méret előny, amikor in vitro manipulációkat végzünk, de hátrány olyan szempontból, hogy a genomon nincsenek felesleges részek, melyeket helyettesíteni lehetne a klónozendó DNS-sel. A genom funkcionálisan korai és késői régiókra oszlik a bakteriofágokhoz hasonlóan (ld. ott is). A korai régiók az egész lítikus ciklus során kifejeződnek, a késői gének viszont csak a DNS replikációt követően, a vírus szerkezeti fehérjéinek szintézise idején működnek. A DNS replikáció kezdőpontja korai és késői szakasz között helyezkedik el. Érdekes megemlíteni azt a felfedezést, amit éppen a DNS tumorvírusok korai régióival kapcsolatban fedeztek fel, ez pedig a DNS-ről megszüntetett RNS „összeillesztés” (splicing), ami megmagyarázza azt, hogy egy viszonylag kis DNS szakasz, hogyan lehet felelős egymagában a tumorfehérjék (szerepük a rákos állapot kialakítása és fenntartása) szintéziséért és a vírus replikációért. A splicing során az RNS transzkriptum két vagy több eltérő módon is összeilleszthetődik. Az SV40 vektor fejlesztése során kezdetben a vírus kis méretéből adódó hátrányokat igyekeztek kiküszöbölni. Ennek egyik megoldása az volt, hogy a vírus késői génjeit a klónozendó DNS-re cserélték. A késői szakasz hiánya a vírusok termelésének hiányához vezet. A vírustermelést egy segédvektor alkalmazásával oldották meg, amely tartalmazza vírustermeléshez szükséges késői géneket. Ezek együttesen alkalmazva teljessé teszik a folyamatot. Kezdetben a lítikus SV40 vírus használták, melynek hátránya, hogy elpusztítja a fertőzött sejteket. Később kifejlesztették a nem lítikus SV40 vírust, mely a sejtben plazmidként replikálódik. Ehhez olyan gazda sejt vonal szükséges, mely állandóan termeli a T-antigént. Ha ilyen, pl. majomsejt vonalban dolgozunk, akkor a vektornak csak az SV40 replikációs origóját kell tartalmaznia. Ezzel a plazmidként replikálódó kisméretű vektorral (200 bázispár) bármilyen bevitt gén replikációját meg lehet oldani az említett sejt vonalban.

Az Adenovírusok Az adenovírusok emberekben és állatokban enyhe lefolyású megbetegedések sorát okozhatják. Génklónozásra két módon lehet őket felhasználni. Az egyik a hagyományos klónozó, illetve

expressziós vektorként való felhasználás. Ilyenkor a kóozandó fehérje génjét beépítik a vírusgenomba, majd fertőznek az in vitro becsomagolt vírussal. Az adenovírusok más vírusokhoz hasonlóan génjeiket „be tudják kapcsolni” úgy, hogy nagysebességgel replikálódjanak illetve, hogy a kódolt fehérjetermék nagy mennyiségben termelődjen. A vírusgenom egy részének helyettesítése a célgénnel az azon kódolt fehérje termeléséhez vezet. A másik alkalmazás élő vírusvakcina előállítás. Ilyenkor az adenovírus genomjába egy veszélyes, patogén vírus antigénjét kódoló DNS szakaszt építik be, vagyis annak a fehérjének a kódját, mely immunválaszt vált ki az állatból. A rekombináns adenovírussal fertőzött élőlényben termelődni fog az idegen fehérje, az antigén (mely önmagában természetesen nem veszélyes) és ki fogja váltani az immunválaszt és a hosszútávú immunitást. Tehát az enyhe adenovírussal kiváltott immunitással együtt megszerezhető egy veszélyes vírussal szembeni ellenálló képesség is.

Vaccinia vírusok A vaccinia vírusok a bárányhimlő rokonai, de ártalmatlan, biztonságos vírusok, melyeket egy sor biotechnológiában alkalmaznak. Több sejttípust is képes fertőzni, és viszonylag nagy idegen géneket lehet beleépíteni. Többféle sejt fertőzésével lehet megtalálni a legmegfelelőbb expressziós rendszert, akár emlős sejtvonalakat humán fehérjék kifejezéséhez. A vaccinia vírusokat ún. „élő vakcinák” előállítására is használják. Ez azt jelenti, hogy emberre vagy állatra veszélyes vírusok antigénjének genetikai kódját beépítik a vaccinia vírus genomjába, majd fertőznek vele. Ilyenkor az kórokozó antigénje immunválaszt és antitesttermelést vált ki a beoltott emberben, s így módon az védettséget szerez (aktív immunizálás ártalmatlan oltóanyaggal).

Retrovírus vektorok A retrovírusok RNS-t tartalmazó tumorvírusok. A géntechnikákban nemcsak, mint vektort alkalmazták, hanem segítségükkel ismerték meg és termeltetik a reverz transzkriptáz enzimeket, melyek a in vitro DNS rekombináns technika egyik fontos segédanyaga. A retrovírusok genomja két egymással teljesen megegyező RNS lánc dimerje. Az RNS mérete 8-10 kB, de egyes defektív vírusoknál a méret mindössze 3,2 kB. A vírus RNS genomjára jellemző, hogy az emlősgenom m-RNS-éhez hasonlóan az 5' végén egy sapka (cap) a 3' végén pedig poli-A farok található. A különböző RNS vírusok felépítése nagyon hasonló: az RNS-genom egy középső magban (core) található egy kevés reverz transzkriptáz enzimhez és szerkezeti fehérjéhez (GAG) kapcsolódva. Ezt a magot membránburok veszi körül. A membrán felépítése hasonló a gazdasejt sejtmembránjához és tartalmazza a vírus által kódolt glikoproteint (env). Az erősen onkogén vírusok még egy negyedik fehérje kódját is tartalmazzák, a gazdasejt ráksejté alakulásáért felelős fehérjét. A gyengén onkogén, krónikus vírusok nem alakítják a sejteket ráksejté, csak lassan indukálnak daganatot. A fertőzés minden esetben egy DNS-provírus intermedieren keresztül történik. A kétszálú DNS intermedier szintézisét az RNS alapján a reverz transzkriptáz enzim végzi. A kétszálú DNS a megfertőzött sejt magjába vándorol és ott rekombinálódik, a sejt genomjával, azaz beépül a gazdasejt kromoszómájába. A retrovírusok vektorként való alkalmazása kézenfekvő. Szinte minden állatfajnál alkalmazhatóak célgénnel sejtbe, majd sejtmagba juttatására, a gazdasejt genomjába illesztésre és a kifejeződés biztosítására. Ily módon nagyon sok állati sejtet, illetve sejtenyészetet lehetne ipari célokra, egyes fehérjék termeltetésére hasznosítani.

4. DNS bejuttatása sejtekbe

Mind a természetes, mind a manipulált DNS különböző sejttípusokba juttatására egy sor kifejezést alkalmazunk. Ezek a kifejezések több szakterületről származnak és ennek megfelelően más és más értelemben használják. Még mielőtt a kifejezések bábéli zűrzavarát ismertetnénk, különböztessük meg a DNS bevitelének két alapvetően különböző módozatát, vagyis a meztelen DNS önmagában való, segédorganizmus nélkül történő, pusztán fizikai-kémiai-biológiai módszerek útján történő bejuttatását attól az esettől, amikor a folyamat szelektivitását és hatékonyságát növelendő a DNS sejten belülre juttatásához más biológiai rendszereket, pl. vírusokat, vagy baktériumokat használunk fel. A transzformáció a mikrobiológus, a bakteriológus számára azt a folyamatot jelenti, amikor a DNS kívülről, a baktériumot körülvevő közegből átkerül a baktérium sejtfalán és membránján és bekerül a sejt citoplazmájába. Ez egy természetes folyamat, mely mind lineáris DNS-fragmentumokkal, mind pedig plazmidokkal megtörténhet. A természetben az adaptáció, a célszerű rekombináció egyik, a baktériumok ivaros folyamatától eltérő génátadási folyamatról van szó. (ld. baktériumok rekombinációja). Ezt a természetes folyamatot optimálja a géntechnikus, a sejt, a közeg és a felveendő DNS, valaint e három kölcsönhatásait figyelembe véve. A transzformáció kifejezés a növényi, de főleg az állati sejtenyésztéssel foglalkozó számára a sejtek átalakulását jelenti, ezért ők a DNS illetve a gének bármilyen úton történő, tehát a direkt bevitelét transzfekeciónak nevezik, akkor is, ha ez a bevitel nincs vírus-, vagy parazita fertőzéshez kötve, amire a kifejezés eredetileg utal. A transzdukciónak elnevezés elsősorban a baktériumok között, fág közvetítésével történő géncserét jelenti. Az Agrobacterium tumefaciens Ti plazmidjával végzett génmanipulációkkal kapcsolatban is alkalmazott kifejezés, de összességében egyre kevesebbet használják.

5. DNS direkt, vektor nélküli bevitel sejtbe

A DNS direkt bejutása a sejtbe azt jelenti, hogy a meztelen DNS biológiai közreműködés nélkül, pusztán fizikai-kémiai-biokémiai alapon jut be a sejtbe valamilyen valószínűséggel. A géntechnikus ezt a valószínűséget igyekszik megnövelni az erre a célra kidolgozott és alkalmazott géntechnikákkal, receptekkel. A transzformációval történő DNS bejuttatás célja mind klónozás, mind expresszió lehet.

Baktériumok transzformációja plazmid DNS-sel Baktériumok DNS-sel való transzformációja a természetből is jól ismert folyamat. Holt sejtekből kiszabadult lineáris kromoszómateredékeken lévő gének is képesek a közegből (vér, szennyvíziszap, gyümölcslevek, stb.) baktériumok belsejébe kerülni, ott rekombinálódni a kromoszómával és kifejeződni. A kompetens baktériumok tehát spontán is felvehetik a DNS-t megfelelő körülmények között. A géntechnikus viszont képes ennek a ritka folyamatnak a valószínűségét megnövelni a folyamat részleteinek optimalizálása útján. A kompetens baktérium olyan fiziológiai állapotban van, hogy a külső térből való DNS felvétele maximális. Ilyen fiziológiai állapotba úgy kerülhet, hogy a szaporítás megfelelő szakaszába hozzuk és olyan pufferoldatban szuszpendáljuk, ami a DNS sejtbe lépését elősegíti. A DNS alakja, mérete, koncentrációja a közegben szintén jelentős faktor. A klónozás során mindig plazmid DNS-sel transzformálunk, arra kapcsoltuk a klónozendő DNS-t. A plazmid a sejtben önreplikációra képest, ez a klónozás sikerét jelenti. A bejutás sikerét a plazmid azzal növeli, hogy kisméretű, kompakt molekuláról van szó, mely viszonylag védett a roncsolódással, töredezéssel szemben. A membránon való átjutást zárt gyűrű vagy szuperhélikális formája is segíti a lineáris DNS-sel összehasonlítva. Meg kell itt jegyeznünk, hogy a r DNS technikákban alkalmazott a természetes plazmidok nagy részével ellentétben olyan mutánsok, melyekből kiirtották a sejtbe sejtbe átkerülésért, a mozgékonyaságért felelős géneket. Ennek biztonsági okai vannak: annak megelőzésére szolgálnak, hogy a bélbe bekerülve ne tudjanak egy másik bélbaktériumba átkerülni és elterjedni a bélmikroflórában. A DNS sejtbe kerülését nagyban befolyásolja a közeg összetétele. Mandel és Higa (1970) megfigyelték, hogy kalcium (Ca) jelenlétében sokszorosára növekszik az *E. coli* DNS felvétele. Az elérhető határfok kezdetben 105-107 transzformáns/ug plazmid volt, további optimalizálással ezt az értéket 107-108-ra lehetett felvinni. A határfok értékelésénél vegyük figyelembe, hogy a sejteknek csak egy kis része valóban kompetens, még optimális szaporodási szakaszt tekintve is, és hogy a közegben oldott plazmid DNS-ek közül mindössze minden 10 000-dik kerül be sejtbe. A kalcium hidakat képez a sejt felületének makromolekulái és a DNS között. A sejt felületére kötött DNS molekulák bejutásának nagyobb a valószínűsége, mint a közegben oldott és statisztikus eloszlást mutató molekuláké. A membránon való átjutást a membrán adekvát módon történő fellazítása, fluiditásának megnövelése segíti. A membránt felépítő lipidek szénhidrogénláncait a hőmérséklet emelésével lehet fluiddá, folyóssá és emiatt átengedőbbé tenni. A hő sokk néhány percig tartó hőfokemelés jelent, az optimális 30 °C-ról 42-43°C-ra. Ekkor a sejt felületére tapadt plazmidok hőmozgásuk és a megfolyt membrán miatt nagyobb valószínűséggel lépik át a membránt és kerülnek a sejt belsejébe. A plazmid transzformációval történő baktériumba juttatását a laborgyakorlatok leírását tartalmazó mappában találhatjuk. <ftp://intranet.ch.bme.hu/oktatas/konyvek/mezgaz/dnsklon/laborgyak/trafo> Sejtfúzióval összekötött DNS bevitel, azaz transzformáció akkor valósul meg, ha baktériumokat DNS jelenlétében fuzionáltatják. A baktériumokat fúzió előtt protoplasztokká alakítják, azaz sejtfalbontó enzimmel, pl. lizozimmal leemésztik a sejtfalat. A sejtfúzió elősegítéséhez polietilén-glikol (PEG) adagolnak a közeghez, melyben a sejtek protoplasztjai szuszpendálva vannak. Ha sejtek fúziója, vagyis membránjaik összeolvadása a transzformálandó DNS oldatában történik, akkor akkor a fúziós termékek magukba zárnak valamennyit a közegből és a benne oldott DNS-ből.

Az élesztő szferoplasztjai, vagyis a cellulóz sejtfaltól megszabadított sejtjei is képesek felvenni a hozzáadott DNS-t. CaCl_2 és polietilén-glikol (PEG) javítják a folyamat hatékonyságát, a polietilén-glikol átjárhatóvá teszi a sejtmembránt, ezzel elősegíti a DNS bejutását. Az élesztősejtbe mind élesztőplazmid, mind *E. coli* plazmidok bevitelre alkalmasak transzformációval. *E. coli*-ban működő plazmidok transzformálhatóak élesztőgombába és ott önreplikációra is képesek, ha ráültetik az élesztőben felismerhető origót. Ilyen ingázó plazmidok, melyek mind az *E. coli*, mind az élesztő replikációs origóját tartalmazzák, alkalmasak arra, hogy a klónozás *E. coli*-ban, ebben a nagyon jól ismert gazdasejtben történő előkészítése és ellenőrzése mellett az expressziót élesztőben oldják meg. Az élesztőplazmidok (ld. plazmidok) egyik fajtája autonóm replikálódó (ARS) formában, egy másik pedig kromoszómába épülve megmaradhat. Replikációs kezdőponttal rendelkező élesztőplazmidok transzformációs gyakorisága elérheti akár az 1 %-ot is.

Növényi sejtek transzformálása A növényi szövettenyésztés, a növényi biotechnológiák lehetővé teszik, hogy egyetlen izolált növényi sejtet úgy dolgozzunk, olyan génmanipulációkat vigyünk véghez, mint bármelyik mikroorganizmuson, és ha már a manipuláció megtörtént, akkor az izolált sejtből regeneráljuk a teljes növényt. Izolált növényi sejtek protoplasztjaiba tetszés szerint DNS-t tudunk bejuttatni, biztosítani a bevitt gének expresszióját. A növények génmanipulálásának célja lehet a hagyományos nemesítési célokkal egyező, például betegségekkel szembeni rezisztencia kialakítása egy olyan gén bevitelével, mely megakadályozza a patogén hatását, vagy rezisztencia bizonyos növényvédőszerrel, például gyomirtószerrel szemben, hogy a vetemény gyomoktól való megszabadítására szelektíven lehessen alkalmazni azt a bizonyos szert, hiszen az csak

a gyomokat fogja károsítani. A betegségek, a növényi kártevő rovarok elleni védekezés egyik megoldása, hogy rezisztens fajokból, vagy vad ősből kinyerni a betegség elleni rezisztenciáért felelős gént és azt beültetni az érzékeny kultúrfajtába. Ez főleg bakteriális és gomba kártevőkkel szemben adhat megoldást. A másik lehetőség, hogy teljesen új gén segítségével érjük el az ellenállókéesség kialakulását. Ilyen gén lehet a *Bacillus thuringiensis* toxinjának a génje. A toxin a rovarok bebábozódását akadályozza meg. A bakteriális gént sikeresen beültették dohányba és paradicsomba, majd burgonyába is. A *Bacillus thuringiensis* toxint termelő dohány már kereskedelmi forgalomban is van az USA-ban. Ennek engedélyeztetése, lévén, hogy nem eszik meg, hanem elégetik, tehát nem az élelmiszer minőségi kritériumoknak kell eleget tennie, tehát viszonylag enyhébb biztonsági és egészségkritériumoknak. A toxin génjének beültetésétől eltérő stratégia egy olyan enzim génjének a beültetése, mely megtámadja a kártevőt. A kitináz enzim génjéről van szó, mely képes lebontani a kitinvázis rovarokbélburkár a növény emésztése során. Vannak olyan fehérjék, főleg enzim-inhibitorok, amelyek a kártevő bélcsatornájában hatnak, amikor az már emészteti a növényt. Ezek a fehérjék a rovar valamelyik életfontosságú enzimjét gátolják, például tripszin-inhibitorok. Csak a géntechnikák segítségével elérhető új tulajdonságok kialakítása is lehet a cél. Kutatók ezrei dolgoznak például a légköri nitrogén megkötéséért felelős, azt lehetővé tevő gén növényekbe ültetésével, melynek segítségével a növények majd a „levegőből” is megélnék, hiszen annak nitrogéntartalmát fogják testükbe építeni, nem pedig az energiaigényes nitrogén-műtrágyákat. A DNS növényi sejtbe történő bejuttatásának legfőbb akadály a sejtfa. A vastag, merev sejtfa nem teszi lehetővé, hogy a növény a baktériumokhoz hasonlóan DNS-t vegyen fel a környezetéből. A növényi sejtek génszabványos átalakításához tehát az izolált növényi sejtől először protoplasztot kell készíteni olyan ozmotikus viszonyok között tartva ezt, hogy a sejt hártájára a belső ozmózisnyomással azonos nyomás nehezedjen, továbbá meg kell akadályozni a sejtfa spontán visszaépülését, vagyis a sejtfa bontó enzimek koncentrációját állandó értéken tartani. Ha ezy sikerül megcsinálni, akkor következhet a DNS bejuttatása a protoplasztba. Ennek leggyakoribb módszerei az egyszerű transformáció, azaz a DNS direkt bejuttatása, a mikroinjektálás, az elektroporáció és a gánpuska (bioliztika). Biológiai közvetítéssel az *Agrobacterium tumefaciens* felhasználásával történhet növényekbe génbevitel. Növényi protoplasztok transzformálása idegen DNS-sel lehetséges a sejtfa eltávolítása után. Egyes esetekben egyszerűen a DNS hozzákeverésével is megtörténik, természetesen megfelelő körülmények között. Növények mikroinjektálása leggyakrabban vagy DNS tartalmú liposzómákkal történik, ilyenkor a sejt citoplazmája a cél, vagy közvetlenül a sejtmagba. Utóbbi nehezekebb, de jól kontrollálható a beinjektált DNS mennyisége. A bioliztika, vagyis a gánpuska alkalmazása nem olyan hatékony eszköz a növényeknél, mint az állatok esetében. A növényi sejtbe jó hatásfokkal és könnyűszerrel bejut a DNS, de a kromoszómába épülés hatásfoka általában gyenge, így transzgénikus növények előállítására nem alkalmas.

Emlőssejtek transzformálása, transzgénikus állatok Az emlőssejtek transzformálásának jelentősége igen nagy, gondoljunk csak a génterápiára. Egyes örökletes genetikai betegségek oka, egy hiányzó, vagy hibás gén. Az ilyen betegséget a sejtekbe bevitt ép génekkel lehet gyógyítani, a hiányzó vagy kiesett funkciót pótolni. Ilyenkor egy soksejtű lény egyes szöveteibe, vagy összes sejtjébe be kell juttatni az ép gént és biztosítani kell annak expresszióját. Az olyan állatot, amely sejtjeiben egy másik organizmusból származó gént tartalmaz, transzgénikus állatnak nevezzük. Ez a kifejezés nem általánosodott az összes élőlényre, csak kimondottan transzformált állatok illetve állati sejtek esetében használják. Állatok esetében viszont akkor is használják, ha a gén bevitelére vírusok vagy tumorsejtek segítségével történik. Az első emlőssejt transzformációs kísérletek sejtenyészeten folytak a Herpes simplex vírus (HSV) timidinkináz enzimjének génjével. Timidinkináz deficiens mutáns emlőssejtenyészetet hoztak össze a herpeszvírus timidinkináz génjével, acélból, hogy a hibás emlőssejteket kijavítsák. Az emlőssejtek a DNS-t képesek felvenni, ha az kalcium-foszfát csapadék formájában kerül a sejtrel kapcsolatba. A kalciumfoszfát csapadék formát valószínűleg fagocitózissal kebelezi be a sejt, és az így bekerült DNS egy része integrálódik a kromoszómába. A felvett vírus eredetű timidinkináz gén véletlenszerűen épült be az emlőssejt kromoszómájába. Ha ehhez a timidinkináz génhez bármilyen más gént kapcsolnak, a kapcsolt gén is könnyűszerrel bejutott a kompetens sejtekbe és rekombináldott a kromoszómával. Az is világossá vált, hogy a timidinkináz génnek nem is elsősorban vektor, hanem inkább marker szerepe van, azaz jelzi az idegen gén beépülését. Az idegen gén akkor is beépül transzformációval a kromoszómába, ha nincs előzetesen hozzákapcsolva a timidinkináz génhez. Érdekes, hogy ilyen esetben is egymás mellett épülnek be a transzformált sejt kromoszómájába, ez azt jelenti, hogy a DNS-ek a sejten belül ligálódnak. Ezt a folyamatot kotranszformációnak nevezik. Transzgénikus állatok előállítása nem olyan egyszerű, mint a növényeké, ahol a teljes növény regenerálható egyetlen izolált sejtől a növényi sejt úgynevezett totipotenciája miatt. Ahhoz, hogy az egész állat transzgénikus legyen, a csírá, a petesejtet, vagy a spermiumot, vagy a megtermékenyített zigótát kell megváltoztatni, vagyis transzformálni a szükséges gént tartalmazó DNS-sel. A kifejlett állat egyes sejtjeinek transzformálása általában nem megoldás egy hiányzó gén pótlására. A fent említett kalciumfoszfátos DNS csapadék sejtbe juttatásán kívül más fizikai-kémiai eljárások is alkalmazhatóak DNS állati ivarsejtbe, vagy zigótába juttatására, illetve a bejuttatás hatékonyságának növelésére. Ilyen módszerek a mikroinjektálás, az ivarsejtek transzformációja (transzfekciónak is nevezik), az elektroporáció, kromoszómák injektálása,

embrionális sejtek összekeverése kiméra kifejlesztése céljából. Láthatjuk ebből a felsorolásból, hogy a transzgenikus állatok előállításánál az egyetlen gén bevitelétől egy teljes genom beviteléig teljes a stratégiai skála.

Mikroinjektálás Idegen DNS emlőssejtbe juttatására meglepő módon igen hatékonynak bizonyult a mikroinjektálás, vagyis az, hogy egy igen vékonyra kihúzott üveg mikropipettával egyenesen a sejtmagba injektáljuk a DNS-t. Ezt mikroszkópra szerelt mikromanipulátorral lehet kivitelezni. Aki ügyes kézzel tudja csinálni a mikroinjektálást, az óránként 500-1000 sejtbe is képes injektálni. Az injektált sejtek felébe stabilan beépül a bevitt gén. Nagy előnye, hogy bármely gén bevihető bármilyen sejtbe. Hátránya a kivitelezés nehézsége. Ha a mikroinjektálás a megtermékenyített petesejtre irányul, akkor a teljes állat transzgenikussá tehető. Már az 1970-es évek elején bebizonyították, hogy korai embriókba injektált gének a nevelőanyában kifejlődött egerek 40 %-ában megtalálhatóak voltak. Az eredetileg beinjektált gének a megszületett egér legkülönbözőbb szöveteiben fordultak elő, stabilan beépültek és öröklődtek. A mikroinjektálás első tapasztalatai után a technikát úgy módosították, hogy az injektálást petesejt megtermékenyítése utánra időzítették, amikor a már egyesült ivarsejtek magjai még nem olvadtak össze. A klónozott gént rendszerint a spermiumból származó sejtmagba injektálják, mert az bonyolult átalakulások után egyesül a petesejt magjával és ezek az átalakulások segítik az idegen gén beépülését. A manipulált petesejtet ezután vagy a petevezetékbe transzplantálják, vagy a blasztula stádium elérése után a méhbe ültetik be. Kutatási célból bármilyen gén petesejtbe injektálása megoldható, történelmi jelentőségű volt az emberi interferon és az inzulin génjének, a nyúl béte-globingénjének, a Herpes simplex vírus timidinkináz génjének vagy az egér leukémia vírus cDNSének mikroinjektálása. Ezekből a kezdeti kísérletekből meg lehetett állapítani, hogy 5 000 - 50 000 bázispár nagyságig lehet DNS-t bejuttatni, hogy a bejuttatott gének integrációja nem kromoszómaspecifikus és, hogy a bevitel határfoka igen jó, még a kezdeti kísérletek átlaga is eléri a 10 %-ot, ami 1-2 %-os beépüléstől egészen 40 %-os beépülésig változó hatások átlagát jelenti. Manapság már rutinszerűen alkalmazzák a mikroinjektálást marha, birka, kecske és disznó esetében. A mikroinjektálás két fő céllal szokott történni. Az egyik a háziállatok nemesítése, a másik hogy ezeket a génmanipulált állatokat expressziós rendszerként alkalmazzák.

Biolisztika, génpuska A kifejezés a ballisztika elferdítése. A ballisztika hajított testek és lövedékek mozgásának leírásával foglalkozó tudomány. A biolisztika névre keresztelt eljárás lényege, hogy a sejtbe juttatandó DNS-t összekeverik apró, mikron átmérőjű fém-részecskékkal, például tungstennel. Ezután ezt a DNS-fém keveréket nagy sebességgel belövik a sejtekbe, mint a lövedéket. Ez a lövedék a sörétre emlékeztet legjobban. Bejuttatása részecske pisztollyal történik. Ezek az apró sörétszemcsék átluggatják a sejt határoló felületét és a sejt plazmájába juttatják a DNS-t. Előnye, hogy bármilyen sejt típusra alkalmazható, baktériumok, gombák, növényi és állati sejtek egyaránt kezelhetők ilyen módon. Még sejt részecskéket, sejtszervecskéket, például a mitokondriumot vagy a sejtmagot is meg lehet célozni a speciális génpuskával. Ennek az eljárásnak vannak egyéb változatai is, például, amikor nem mechanikus fegyverrel lövik be a részecskéket, hanem elektromosan kiváltott gyújtószikra segítségével hirtelen elpárologtatott vízcseppből felszabaduló gőz energiájával. Ebben az esetben az elektromos energia nagyságával lehet szabályozni a mini-robbanás erejét és beállítani az optimális bejuttatási hatásfokot. Belövással izolált sejteken kívül szövetekbe, sőt élő szövetekbe is be lehet juttatni DNS-t. Növények esetében nem nagyon hatékony eljárás, mert annak ellenére, hogy bejut a DNS a sejtbe, a kromoszómába rossz hatásfokkal épül be. Kísérletekben sikerült egér bőrébe és fülébe DNS-t juttatni megfelelően átalakított génpuskával. A DNS jó néhány napig aktív maradt a sejtekben, mígnem később lebomlott. Ezek a kísérletek azt sugallják, hogy a génpuska alkalmas megoldás lehet az emberi szomatikus génterápia során a DNS élő szervezetbe juttatására. Ma még vannak hátrányai ezeknek a génpuskáknak, például azok a szöveteket roncsoló mellékhatások, melyet nem maga a bevitt részecske okoz, hanem a génpuska működése közben fellépő légáramok vagy gőzbuborékok. A Cornell Egyetemen kidolgozott módszer alapján a Du Pont kereskedelmi forgalomban is elérhető eljárást és eszközt dolgozott ki.

Elektroporáció A transzformációt, vagyis a meztelen DNS-nek a közvetlen sejtbe juttatását az elektromos erőter alkalmazása elősegíti. A sejtfüzió hatékonyságának növelésére is alkalmazzák. A körülményeket optimálni kell, nehogy a sejtek megsérüljenek, felrobbanjanak az elektromos erőterbe kerülve. A transzformálandó sejteket a DNS-t tartalmazó oldatba teszik, majd az egészet elektromos erőterbe helyezik, például váltóáramot adnak rá. Az elektromos erőter módosítja a sejt lipidmembránjának állapotát, megnövelve sejthártya átjárhatóságát, részecskéknak, molekuláknak a külső térből való felvételét (pinocitózis). Főleg növényi sejtekbe való DNS bejuttatásnál sikeres és elterjedt az elektroporáció, történelmileg is a növényi sejtfüziónál (szomatikus hibridek, poliploidok előállítása) történő alkalmazásából fejlődött tovább. Egyéb sejt típusoknál, például mikroba- és állati sejteknél más módszerek kapnak prioritást (ld. transzformáció, transzfekció).

6. DNS bevitel közvetítő segítségével

DNS sejtbe juttatása liposzóma közvetítéssel Liposzómákat kiterjedten alkalmaznak hidrofób gyógyszerek, kozmetikumok, egyéb ágensek. sejtmembránon át történő sejtbe juttatáshoz. Liposzómákba zárt DNS-t könnyen felveszi a máj és a spleen és viszonylag könnyen és gyorsan kifejeződnek.

Kalciumfoszfátos komplex Kalciumfoszfáttal komplexált DNS-t jó hatásfokkal veszi fel a máj és az izomszövet. A génnek egy része képes kifejeződni bejuttatás után. Ennek a ténynek nagy figyelmet szentelnek, mert ettől várják az izomsorvadás elleni génterápia megvalósulását.

Transzdukción Transzdukción tulajdonképpen a vírus közreműködésével történő génbejuttatás baktériumba. A természetes folyamat baktériumból baktériumba történő génátvitel (természetes genetikai rekombináció) jelent. A folyamatot tetszés szerinti célgén bejuttatására is fel lehet használni: manipulált genomú fággal történő fertőzés által.

Transfekción Általában vírus közvetítésével történő génbevitel növényi vagy állati sejtbe, de gének közvetlen (közvetítő nélküli) bejutására is alkalmazzák ezt a kifejezést (vö. transzformáció). Az emlős és a növényi géntechnikákban nagyon általános értelemben használják: mindenféle génbevitelre és rekombinációra.

Parazita baktérium közvetítésével Agrobacterium tumefaciens közvetítésével, ld. a növényi vektoroknál.

29. fejezet - Ellenőrző kérdések:

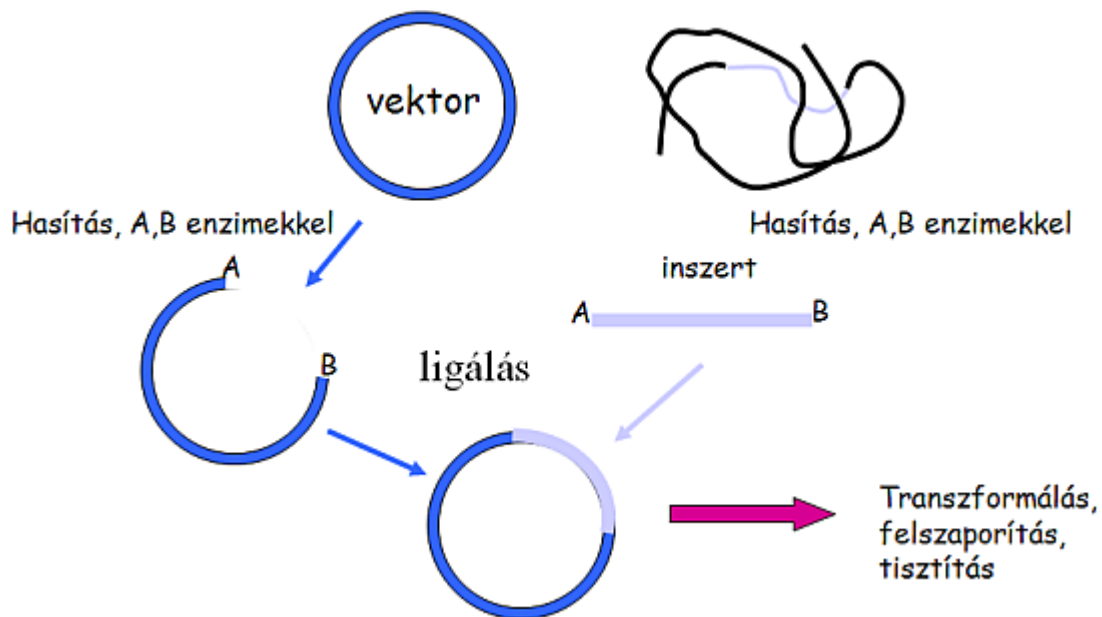
1. mik az izoskizomerek?
2. Hol metilál a dam metiláz?
3. Mire van szükségük a DNS polimerázoknak a polimerizáció elindításához?
4. Mire van szükségük a RNS polimerázoknak a polimerizáció elindításához?
5. Milyen irányú a polimerizáció?

VII. rész - Klónozás

A klónozás fogalma: a klónozás valamilyen DNS darab, sejt vagy egyed azonos változatainak több példányban való előállítását jelenti. A klón biológiai természete szerint csoportosítva: (1) a molekuláris klónozás (más szóval DNS klónozás) egy DNS fragmens megsokszorozását jelenti plazmidba építve, majd egy élőlényben (rendszerint baktériumban, de eukarióta szervezetekben is) felszaporítva; (2) a sejt klónozás azonos DNS-t tartalmazó sejtek előállítása és szaporítása, (3) az egyed klónozás pedig azonos genommal rendelkező egyedek előállítása egy sejtől, szövetből, vagy szervből különféle technikákkal. A klónozás célja alapján beszélhetünk (A) reprodukciós klónozásról, ahol genetikailag azonos egyedek előállítása a cél, ill. (B) terápiás /kutatási klónozásról, ahol az előállított sejtek gyógyítással kapcsolatos (terápiás klónozás) vagy alapkutatási (kutatási klónozás) célokat szolgálnak, nem pedig egy egyed előállítását. A „klónozás” fogalom határait feszegetjük, amikor azt kérdezzük, hogy vajon klónozás-e az, amikor egy hámsejt, osztódással, több hámsejtet eredményez. Sőt, maga a zigótával kezdődő embriogenezis is klónozás a fogalom szigorú értelmében, hiszen azonos genotípusú sejteket eredményez.

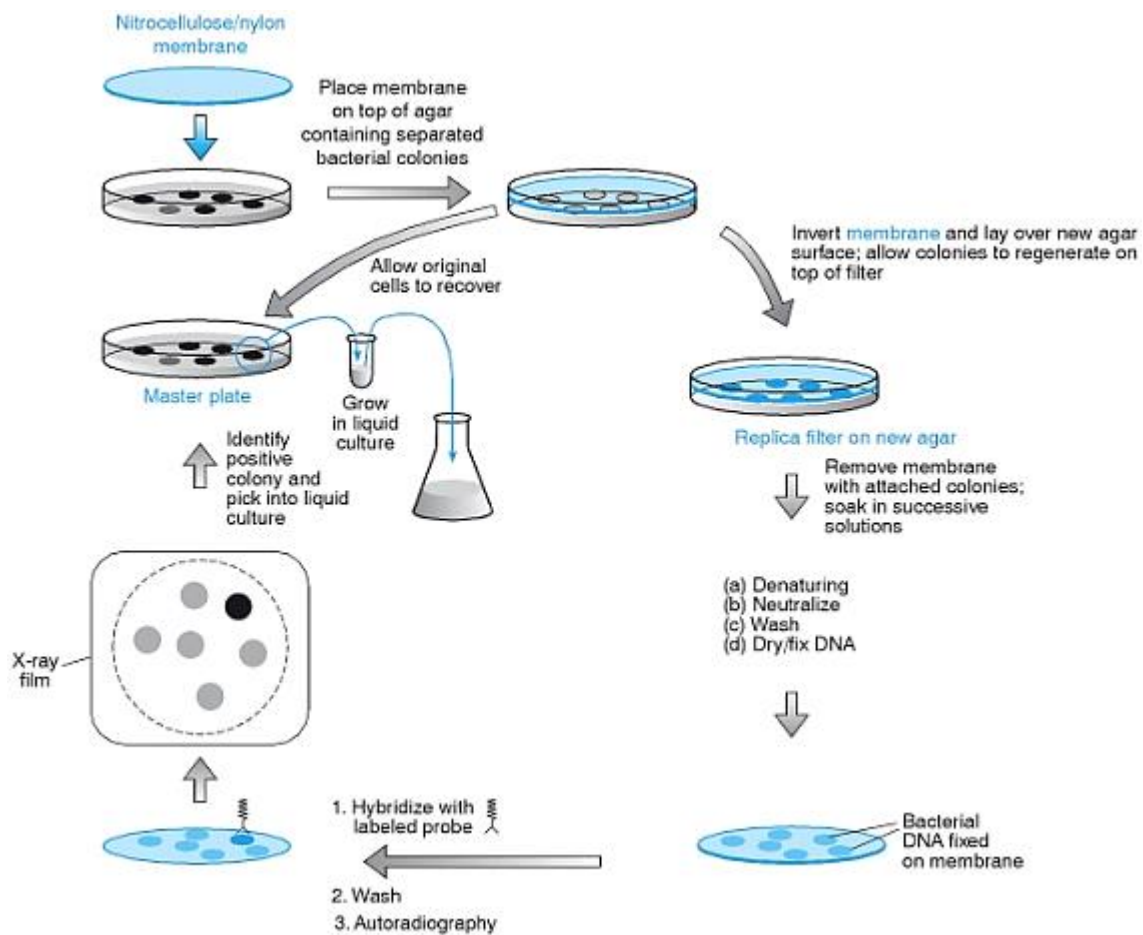
A következőkben a molekuláris klónozásról ejtünk pár szót.

A molekuláris klónozás célja, hogy egy adott DNS-t minél nagyobb mennyiségben kinyerjük. Ezt a klasszikus technológiákkal az alábbi stratégia szerint értük el. Vegyünk egy vektort, ami egy sejtben képes replikálódni és a sejtenkénti kópiaszáma legyen magas (3-500 kópia/sejt). Ha ebbe a vektorba beépítjük a szaporítandó DNS-t, akkor már néhány 100x-oros mennyiséget kaptunk. Ehhez még hozzáadódik a baktériumok szaporodása, mely akár 10¹⁰-10¹¹ sejt/ml koncentrációt is elérhet, így a DNS szaporítás mértéke 10¹²-10¹³ nagyságrendű is lehet.

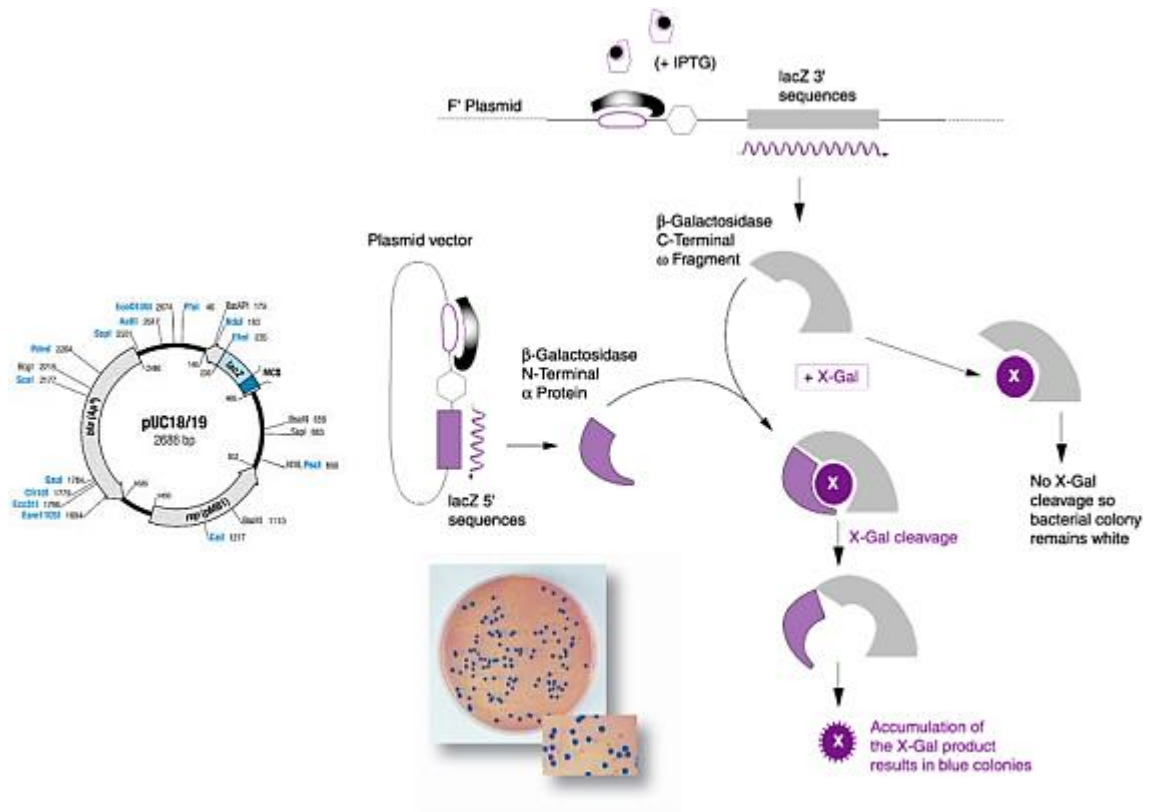


30. fejezet - Az inszertek kiválasztására szolgáló módszerek

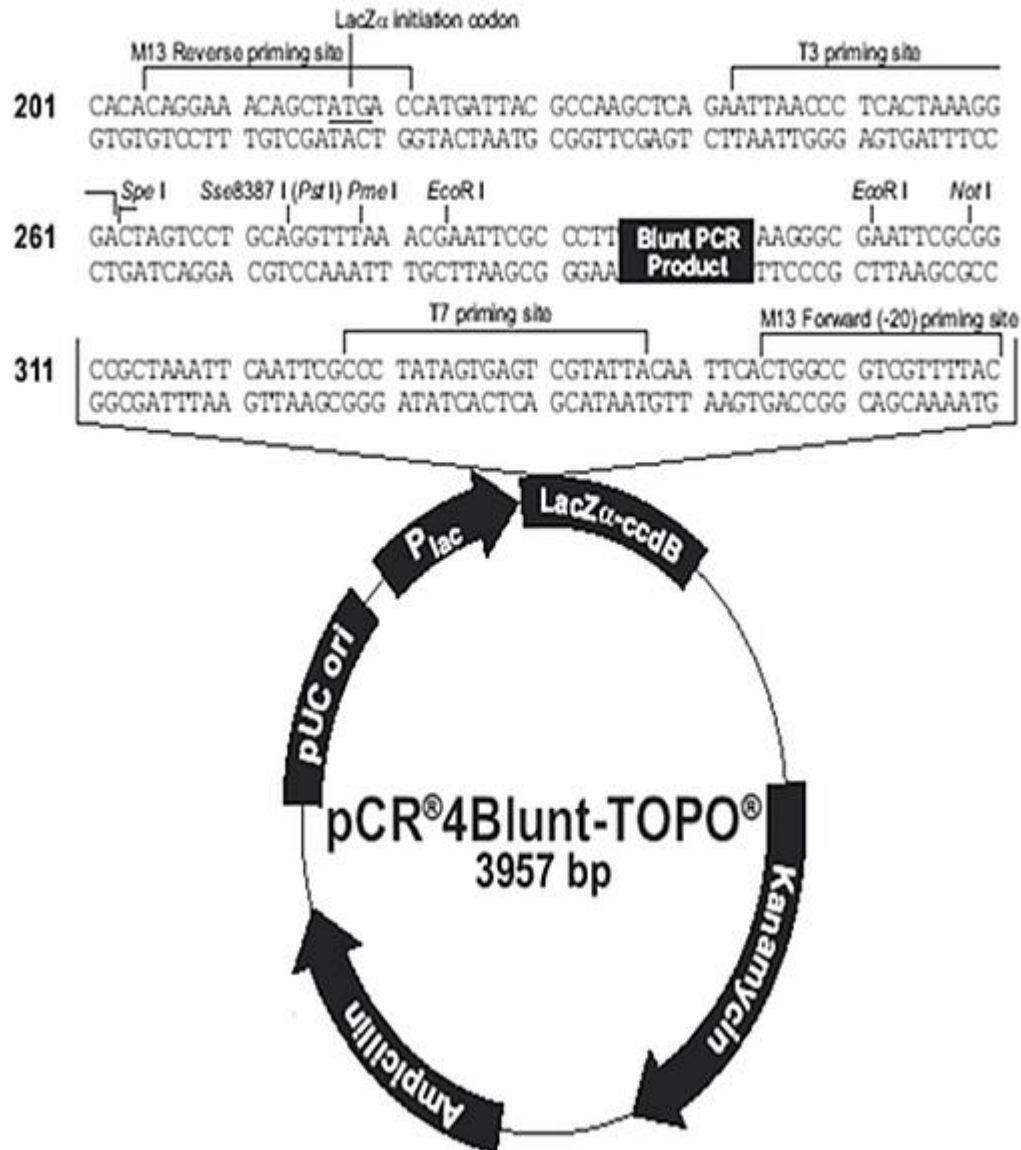
Kolónia hibridizáció



Kék-fehér színszelekció

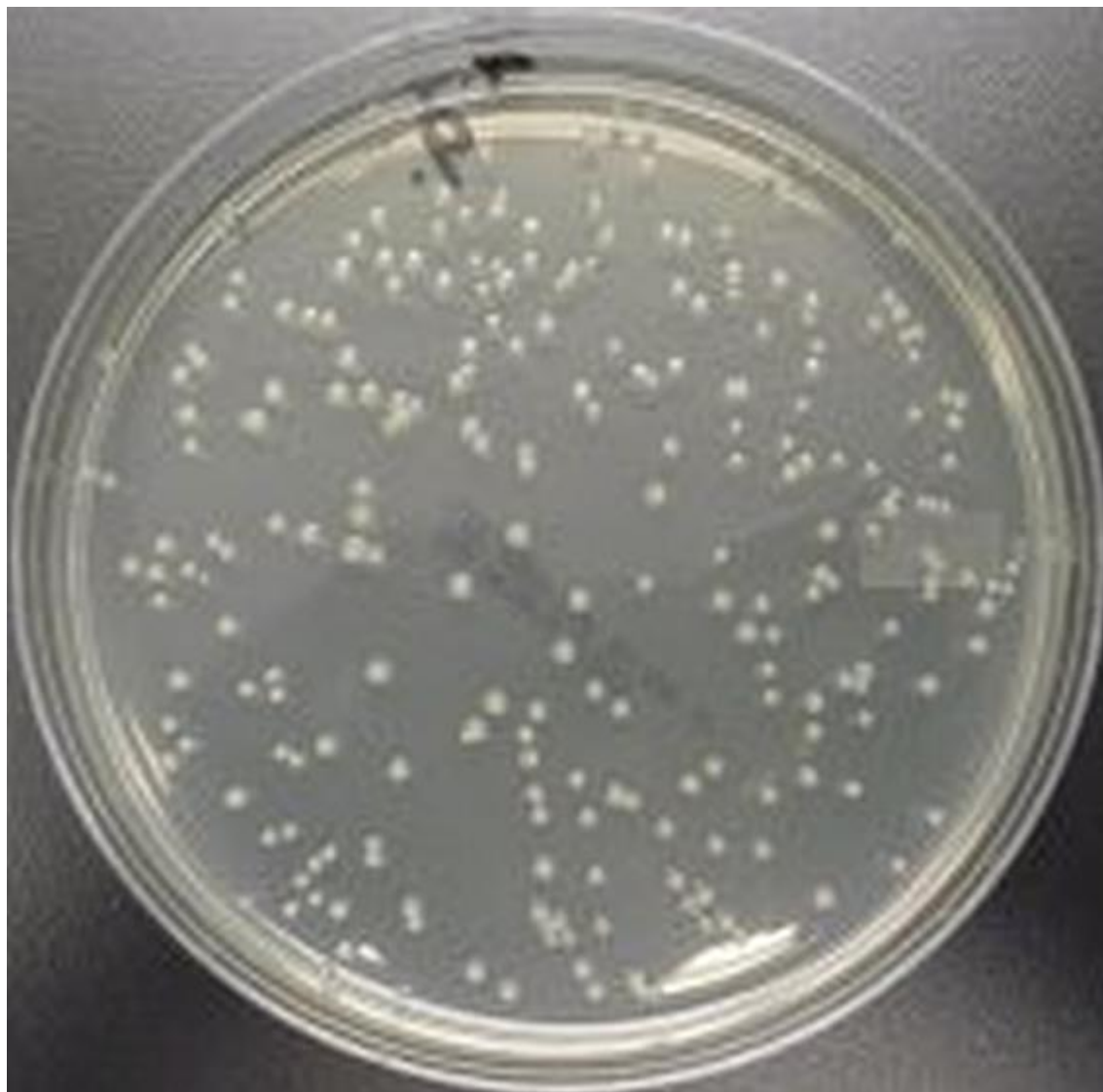


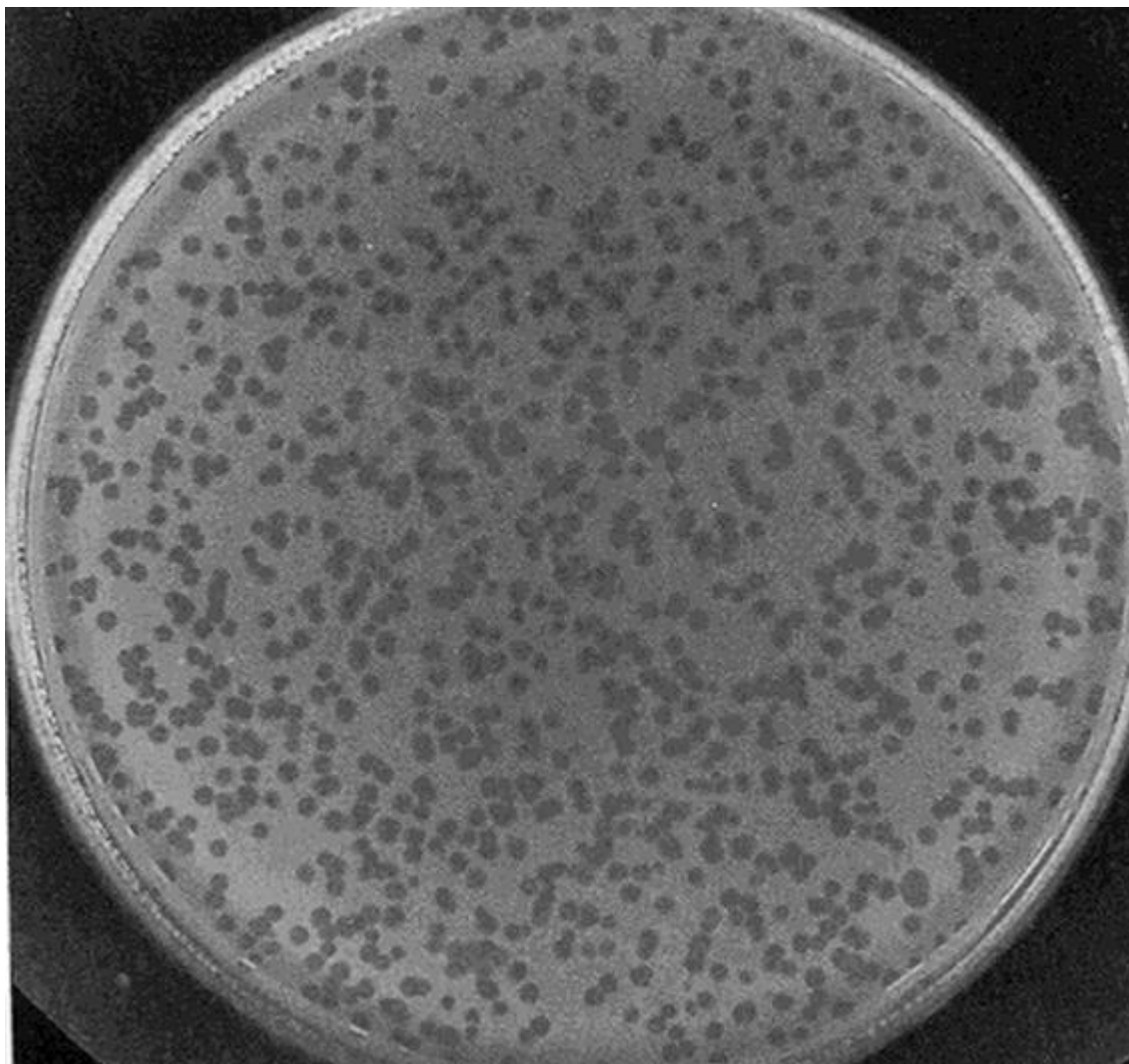
Pozitív szelekciós vektorok



31. fejezet - Könyvtárak

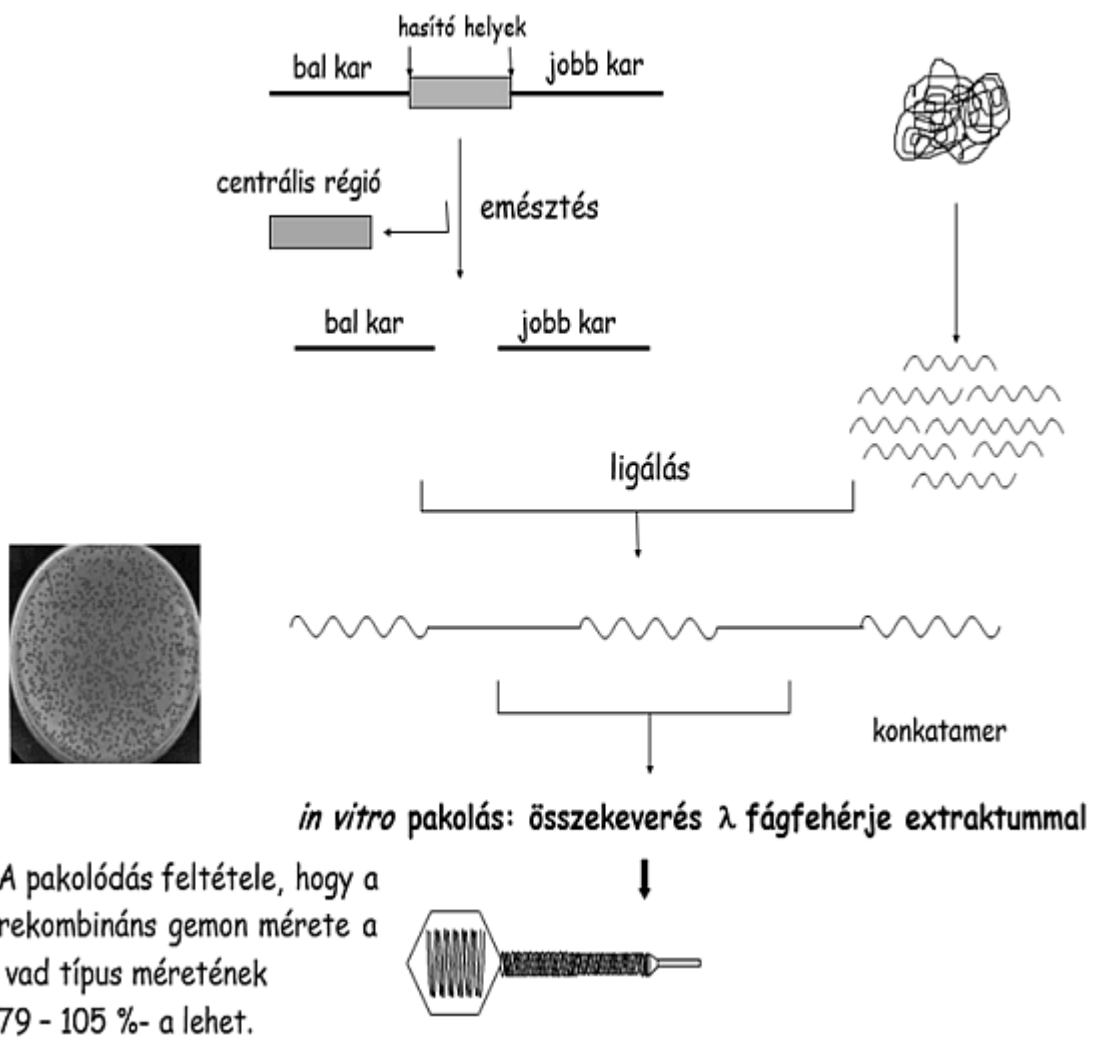
A könyvtárak gyakorlatilag klóngyűjtemények, melyekben minden klón ugyanazt a vektort hordozza, viszont a vektor a genom vagy a mRNS-ekről készült DNS-t tartalmazza. A könyvtárakat ennek megfelelően kolóniák vagy plakkok gyűjteményének kell tekinteni, ahol lemezeléssel az egyedi klónok szétválaszthatóak és ezek a klónok diverzek, azaz különböző inszertet hordoznak, hordozhatnak.

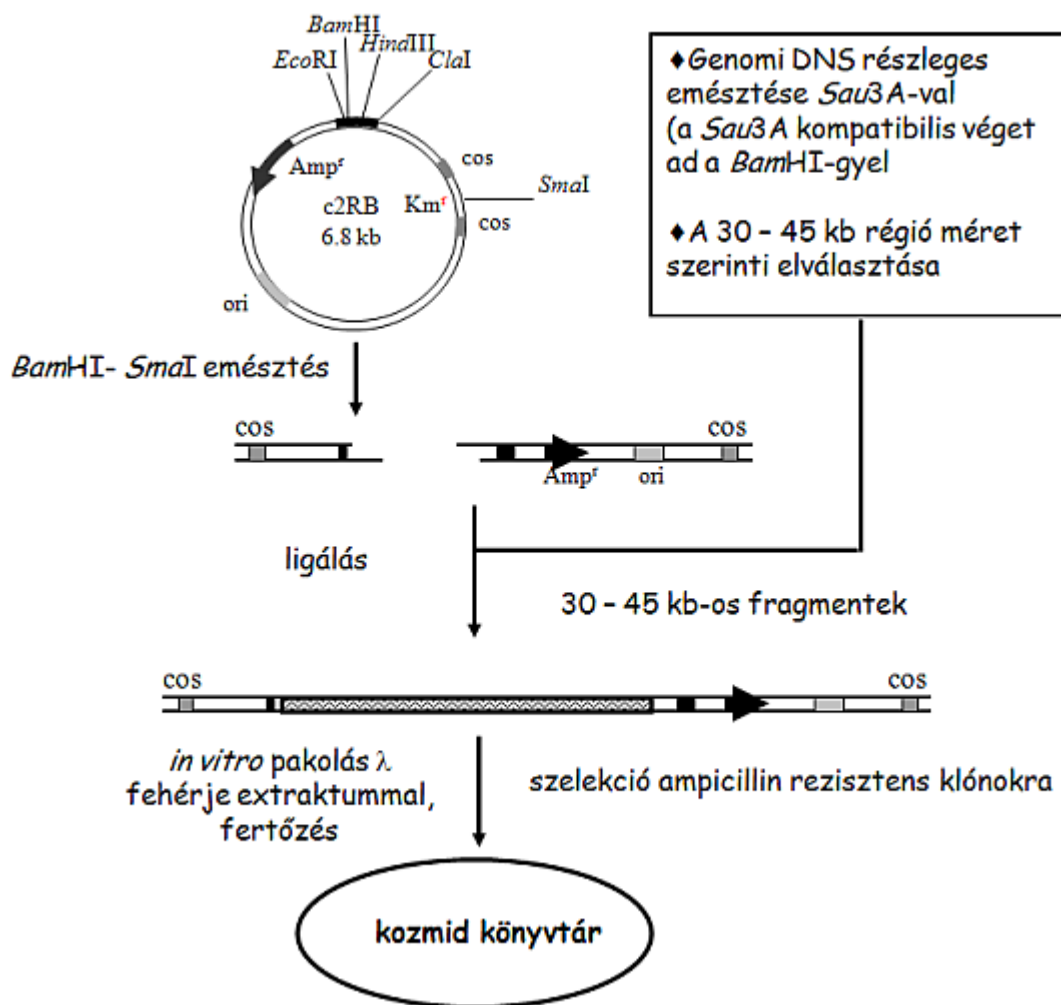




Amennyiben az inszertek a sejtek genomjából származnak genomi könyvtárról beszélünk. Ha a klónokban az inszert a mRNS-ről készült cDNS, akkor cDNS könyvtárakról van szó.

1. Genomi könyvtárak



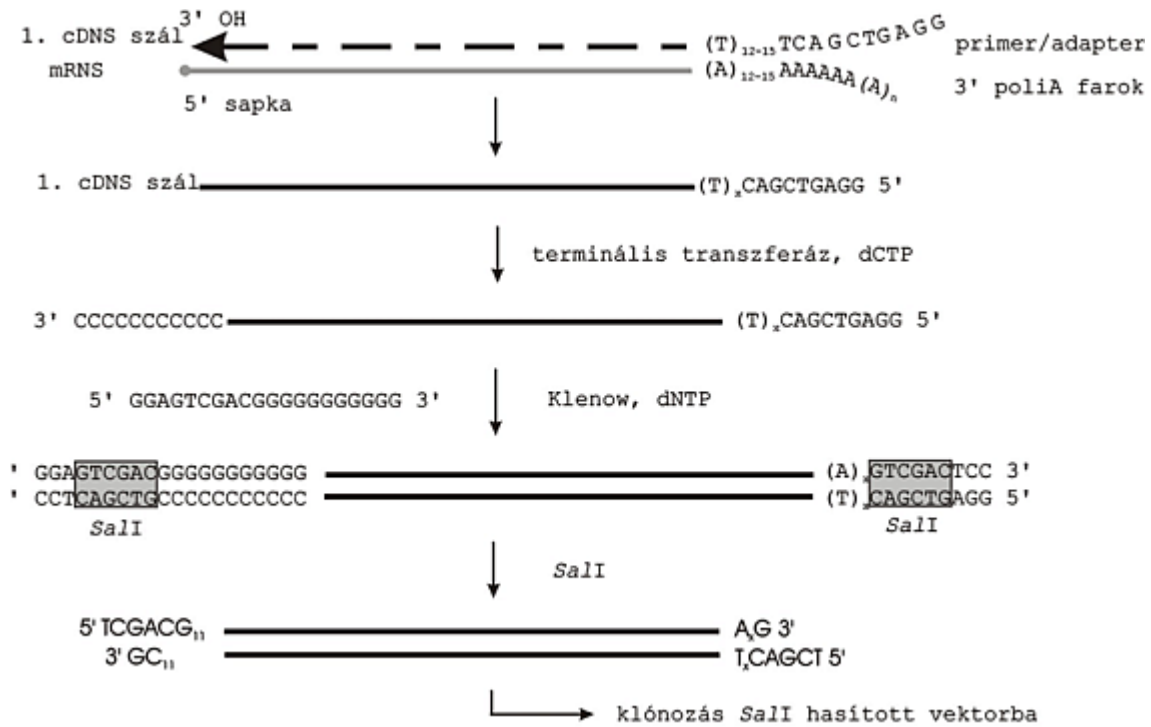


2. cDNS könyvtárak

cDNS könyvtárak készítésének célja alapvetően más, mint a genomiális könyvtárak esetében. A cDNS könyvtárak a könyvtárkészítés során használt sejttypusban kifejeződő fehérjék érett mRNS szekvenciáiról készült komplementer szálakat tartalmazzák. Ilyen könyvtárakat leginkább adott fehérjék kódoló szekvenciájának előállítására hoznak létre. A cDNS könyvtárból klónozott eukarióta gén intronokat nem tartalmaz. Ennek köszönhetően lehetséges a fehérje bakteriális expressziós rendszerben történő előállítása. A cDNS könyvtárak nem alkalmasak az egyes gének kifejeződésének, az expresszió szabályozásának vizsgálatára, mert a génekhez tartozó szabályozó elemek nincsenek jelen. A cDNS könyvtár elkészítése előtt körültekintően, előzetes ismeretek alapján kell megválasztani azt a sejttypust, amelyben a vizsgálni kívánt fehérjék nagy mennyiségben jelen vannak. A sejttypus megfelelő kiválasztása növeli annak az esélyét, hogy a keresett gének jelen lesznek a könyvtárban.

A cDNS könyvtárak létrehozásának első fontos lépése a megfelelő sejttypus vagy szövet, illetve az alkalmazott vektor kiválasztása. A cDNS könyvtárak létrehozása során gyakran használt vektorok közé tartoznak az inszerciós és szubsztitúciós λ -fág vektorok, valamint a plazmidok és kozmidok. A cDNS könyvtárak átlagos inszert mérete nem indokolja a mesterséges kromoszóma vektorok használatát. A kiválasztott sejtekből izolálják az RNS-t, majd az érett mRNS-ek 3' poli-A farkához hibridizáló oligo-dT primer és reverz transzkriptáz enzim felhasználásával elkészítik az mRNS-ekkel komplementer DNS (cDNS) szálakat. A cDNS molekulák vektorba klónozásához szükség van a létrejövő RNS/DNS hibrid molekulák kétszálú DNS megfelelőinek előállítására. Erre is több módszer áll rendelkezésre. Az egyik leggyakrabban alkalmazott eljárás során a reverz transzkripció termékéhez RNáz H és DNS-polimeráz enzimet adnak. Az RNáz H nick-eket (bevágásokat) hoz létre az RNS szálon. A DNS-polimeráz a nick-eknél megjelenő szabad 3'-OH csoportoktól indulva emésztja az RNS szálát és létrehozza a DNS másik szálát. A létrejövő kétszálú DNS-t a vektorba ligálást megelőzően még további kezelésnek kell alávetni. A molekulák végein az egyik szál esetleges túlnyúlását egyszálú-specifikus DNS-exonukleáz enzimmel emésztik, vagy DNS-polimeráz enzimmel feltöltik. A DNS

vektorba ligálásához a terméket restrikciós endonukleázzal kell hasítani. Ehhez el kell látni a DNS molekulák végeit a megfelelő enzim hasítóhelyével, valamint biztosítani kell, hogy az enzim csak a végeken hasítson. Ennek érdekében először metil - transferáz enzimmal kezelik a DNS - t, ami az alkalmazandó restrikciós endonukleáz hasítóhelyeit metilálja, ezáltal megóvjva azokat a későbbi hasítástól. Ezt követően a DNS molekulák végeire to mpa vég ligálással linkereket illesztenek, amelyek tartalmazzák a restrikciós endonukleáz metilálatlan hasítóhelyet . A választott vektort és a cDNS - t restrikciós enzimmal kezelik, majd az inszerteket a vektorba ligálják. A vektor önmagával való záródásának megakadályozására alkalmazható a vektor foszfataz enzimmal való kezelése. A cDNS könyvtárkészítés sémáját a 8 . 7 . ábra n mutatjuk be



32. fejezet - Ellenőrző kérdések:

1. Milyen aktivitása van a Klenow polimeráznak?
2. Mi a neve az RNS függő DNS polimeráznak?
3. Mik a nukleinsav kinázok alkalmazási lehetőségei?
4. Mi a foszfatázok alkalmazási lehetőségei?
5. Milyen végeket kapcsol össze a T4 DNS ligáz?

VIII. rész - Nukleinsavak kémiai szintézise, szintetikus oligonukleotidok, gének

A gének szintézise napjainkban hihetetlen lendületet vett. Legfőbb hajtóereje a heterológ fehérjeexpresszió iránt megnövekedett kutatási és ipari érdeklődés. A gének szintézisét szinte mindig meg kell előznie a gének izolálásának, hisz általában már egy ismert génjt kívánunk újraszintetizálni. Miért van erre szükség? A heterológ fehérjeexpresszió azt jelenti, hogy annak a génnek a származási helye, mely termékét elő kívánjuk állítani, különbözik a termelő organizmustól. Másrészt nagyjából 3x annyi aminosavat kódoló kodon van, mint ahány természetes aminosav, így egy aminosavat átlagosan 3 kodon kódol (valójában a kodonok száma 1-6 között változik). Ezeket a kodonokat az élőlények különböző mértékben preferálják. Molekuláris szinten ez azt jelenti, hogy a különböző kodonokhoz különböző mennyiségű tRNS tartozik. Azon kodonok esetén, ahol a tRNS koncentráció megfelelő, ott a riboszóma normálisan halad, míg azon kodonok esetén, amelyekhez tartozó tRNS-k mennyisége nem elegendő, a transláció megakad, végső soron terminálódik. A géneknek és élőlényeknek van ún. kodon felhasználási táblázatuk, melyben megadja, hogy egy adott organizmus milyen gyakorisággal használja az adott kodont. Ebben az élőlények meglehetősen diverzek, azaz a kodon preferenciájuk jelentősen különbözhet. Ha a heterológ fehérjetermelés során a gén és a termelő organizmus kodon felhasználási mintázata jelentősen eltér az egyik leggyakrabban alkalmazott megoldás az, hogy újraszintetizálják a gént. Alapesetben a gén szekvenciája jelentősen változik, viszont a fehérjeterméké nem. A tervezés során két alapvető szempontot vesznek figyelembe. Egyrészt a termelő organizmus kodon felhasználási táblázatát, másrészt a génről származtatott mRNS struktúráját. Utóbbi esetén törekedni kell arra, hogy a mRNS-n belül ne alakuljanak ki ún. terminátor struktúrák.

A gének alsó mérethatárát 300 bázisban szokás meghatározni. Természetesen vannak ennél kisebb gének is, de nem ezek a dominánsak. Kémiai szintézissel ilyen hosszúságú DNS-t nem lehet megszintetizálni, ezért a géneket kisebb egységekből, oligonukleotidokból szintetizálják meg.

33. fejezet - Oligonukleotidok szintézise

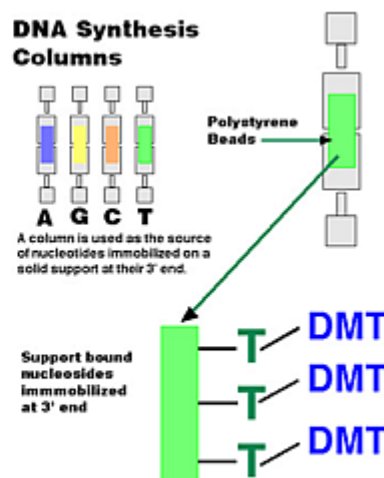
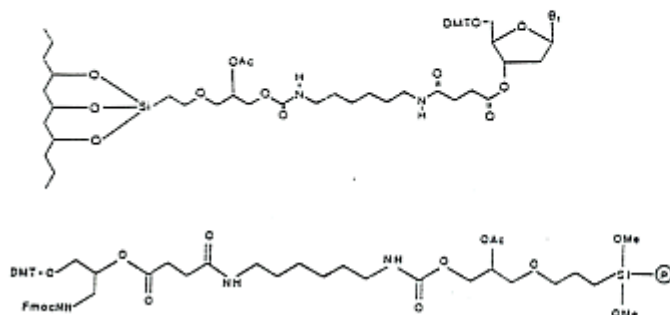
A kezdeti próbálkozások mind oldatfázisban zajlottak le, s ez azzal járt, hogy gyakorlatilag minden lépés után ki kellett tisztítani a terméket, ami egyrészt nagyon fáradtságos volt, másrészt anyagvesztéssel járt.

Nem sokkal azután, hogy Merrifield kifejlesztette a szilárd fázisú peptidszintézist, a nukleinsavak területén is megjelent a szilárd hordozó használata. Általában polisztirol kopolimer és kontrollált pórusú üveggyöngyöt (CPG) alkalmaznak.

A szilárd fázisú szintézis kiindulási anyaga a hordozóhoz - egy láncon keresztül - kapcsolt nukleozid, és ez lépésről lépésre kapcsolódik a hordozóhoz. A kötésnek olyannak kell lenni, hogy a szintetikus termék a reakció végén egy lépésben visszanyerhető legyen. Egy ilyen hordozó sematikus képét mutatja az ábra.

Szilárd fázisú szintézis:
hordozó: controlled pore glass (CPG), vagy polisztirol

Mind DNS mind RNS szintetizálható
mind a két módszerrel



A szilárd hordozón való szintézis előnyeit nem lehet kellőképpen hangsúlyozni. Azon kívül, hogy a reagensek és a termékek rendkívül gyors szétválasztásával rengeteg tisztítási lépés válik szükségtelenné, a különböző kémiai kifejlesztése mellett ez tette lehetővé a szintézis automatizálását (ld. később).

Az automata oligonukleotid szintézis alatt a nukleotidokon általában három helyen szerepel védőcsoport, amelyek közül kettő a kapcsolás során változatlan marad (a foszforon, és a bázisokon), egy pedig ideiglenes védőcsoportként működik (dimetoxitritil a cukorgyuru 5'-OH csoportján).

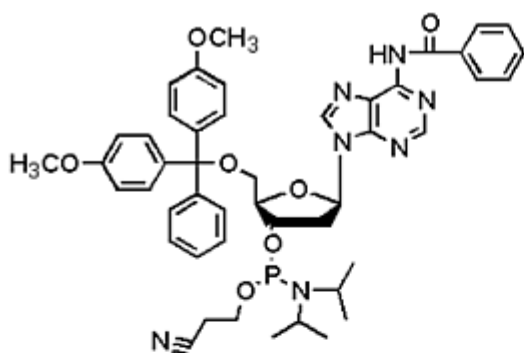
A foszforatomon lévő védőcsoportokkal az előzőekben részletesen foglalkoztunk (a H-foszfonát kémia esetén ilyen nincs is), s csak annyit tennénk még hozzá, hogy a követelmény ezek iránt az, hogy a kapcsolás során a reakciót elősegítsék, de ne vegyenek részt benne, a szintézis egyéb lépéseinél pedig inert módon viselkedjenek. Az amidit kémia esetén a β -cianoetil csoport ilyen, s lévén észter, a reakciók savas-semleges körülményei között stabil, viszont a szintézis végén lúgos kezeléssel egy lépésben eltávolítható a foszfátgerincről.

A nukleozid bázisok védőcsoportjai

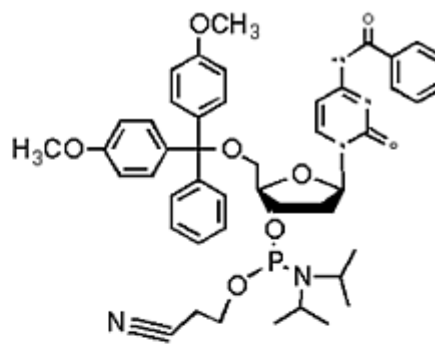
A kapcsolás során a nukleozid bázisokon található funkciós csoportok (amino, hidroxil) általában védőcsoport nélkül elreagálnának, nem kívánatos melléktermékek képződnének, ezért a reakciókba csak olyan nukleotid vihető be, amely megfelelő védőcsoportot hordoz, amit a szintézis befejeztével könnyen, és szelektíven el lehet távolítani. Mivel napjainkra, az alkalmazott kémiai eljárások igen nagy hányadánál ugyanazokat az anyagokat használják, ezért nem foglalkozunk részletesen a történeti háttérrel (részletes áttekintést ld. [4, 121, 122]). Ezek a következők: a., timin: ez a legegyszerűbb, mert a ma általánosan alkalmazott körülmények között nem kell védeni. b., citozin: a 4-es szénatomon lévő aminocsoportnak van nemkívánatos reakciókészsége, ezt általában benzoilcsoporttal blokkolják. c., adenin: a 6-os szénatomon lévő aminocsoportot szükséges védeni, de a védőcsoport megválasztásánál figyelembe kell venni, hogy a puringyuruk savas kezelés hatására (a dimetoxi-

tritol csoport eltávolítása során) hajlamosak leválni a cukorról (depurinálás), s ezt a folyamatot az aminocsoport elreagáltatása általában erősíti. Alkalmasan megválasztott savas kezeléssel, és megfelelő védőcsoporttal ezt vissza lehet szorítani. Ez az adenin esetén is a benzoil csoport. d., guanin: a 2-es pozícióban lévő amino és a 6-os szénatomon lévő oxigén egyaránt reaktív, de az aminocsoport izobutiril csoporttal történő acilálása mindkét csoport reaktivitását visszaszorítja. A depurinifikáció jelenségével itt is számolni kellett.

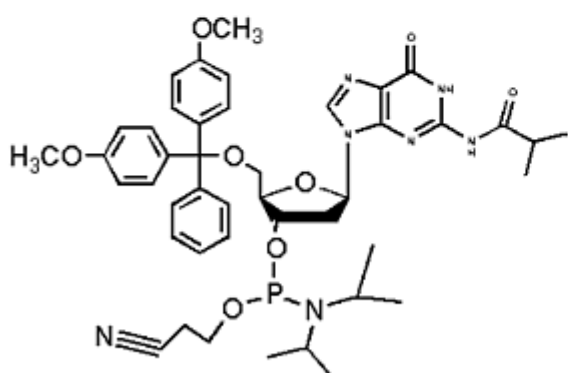
A fenti felsorolásból kiderül, hogy a jelenleg általánosan használt védőcsoportok az acilcsoportok, amelyek savasan stabilak, viszont alkalikus kezeléssel elhasadnak. Mivel a foszfáton lévő β -cianoetil is eltávolítható lúggal, valamint az első nukleozid is észterkötéssel kapcsolódik a hordozóhoz, ezért a szintézis végén egyetlen cc. NH_4OH -os kezeléssel mind a három feladat megoldható, s az oligonukleotid biológiailag aktív formájában lesz jelen, már csak meg kell tisztítani.



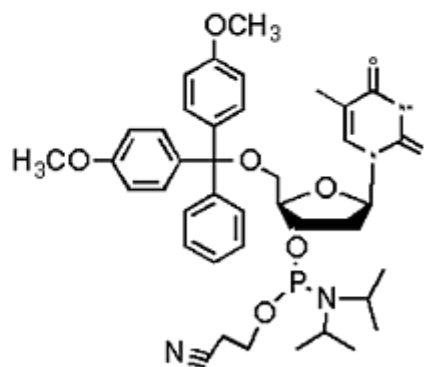
**N-6-benzoyl-deoxyadenosine
phosphoramidite**



**N-4-benzoyl-deoxycytidine
phosphoramidite**



**N-2-isobutryl deoxyguanosine
phosphoramidite**



**deoxythymidine
phosphoramidite**

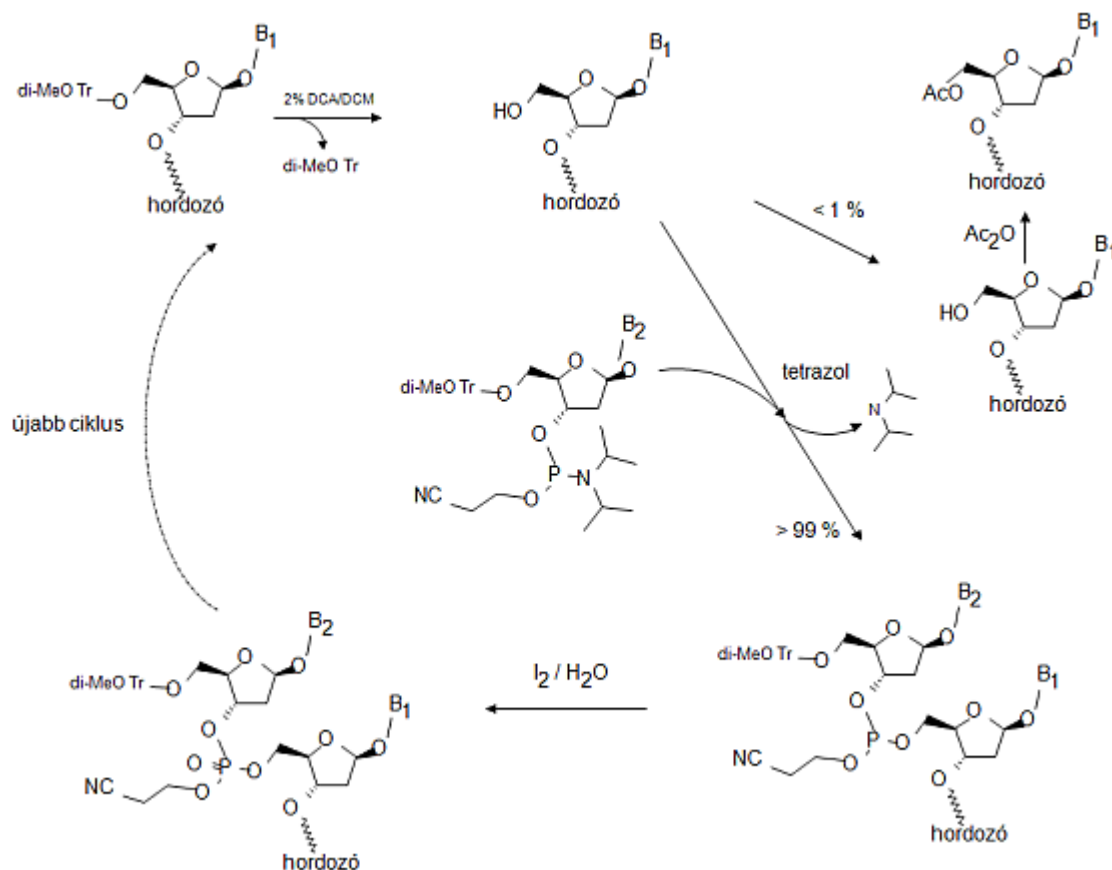
Primer 5'-OH csoport védelme

Az oligonukleotid szintézis hõskorában még mindkét irányú szintézis elõfordult (ld. fent), de a szilárd hordozó megjelenése óta a szintéziseket gyakorlatilag mindig 3'-5' irányban hajtják végre. Ennek az oka a szerves kémiából ismert: az 5'-OH (primer hidroxil) csoportok igen jó szelektivitással reagálnak a nagy térkitöltésű trifenilmetil (tritol, Tr) csoporttal, s így ez a hidroxil védetté válik. Ezt nem lehetne ilyen könnyen megtenni a szekunder 3'-OH-val. Bár korunkban a szintetikus oligonukleotid kémiában gyakorlatilag mindenhol a Tr egy továbbfejlesztett változatát, a dimetoxitritil (DMTr) csoportot használják az 5'-OH védelésére, korábban történtek más irányú próbálkozások, amelyeknek ma már különösebb gyakorlati jelentõsége nincs. (Összefoglalásuk: [4, 121, 122]).

A dimetoxitritil lúgosan stabil, enyhe savas kezelésre (pl. 2-4% diklórecetsav/diklórmétán) lehasad, ami lehetővé teszi a többi funkciós csoporttól való független kezelését, ez pedig a szintézis ciklusba szervezésénél óriási jelentõségű. Másik nagy elõnye, hogy savas oldata narancssárga színű, spektrofotometriásan mérhető 498nm-en, s ezáltal az egyes kapcsolások hatásfoka ebből az értékből számítható.

1. Foszforamidit módszer

1981-ben Beaucage és Caruthers egy olyan új nukleozid foszfit szintézisét közölte le, amely ma is a legelterjedtebb DNS szintetizálási eljárás alapját képezi. Sinha és mtsai javasolták azt az amidit típust, amivel ma a legtöbb DNS szintetizátor dolgozik. Ez a β -cianoetil-N,N-diizopropil-foszforamidit (ábra). Mindamellett történtek még próbálkozások N,N-dialkil-morfolino származékkal (ezt helyenként ma is használják), és egyéb NR1R2 csoportokkal, ahol R1 és R2 különböző alkil és allil csoportokat jelent.

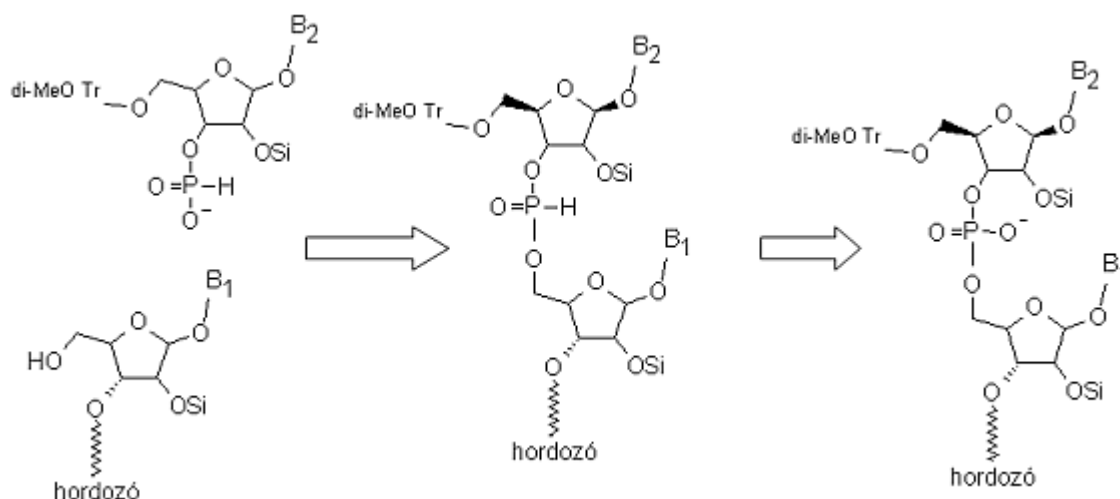


A foszforamidit kémián alapuló szintézis menete. i. a DMT (dimetoxitritil) csoport eltávolítása, ii. a nukleotidok kapcsolása, iii. a foszfor oxidációja, iv. az el nem reagált csoportok acetilezése, "CAP"-pelés. R: pl. β -cianoetil csoport. A reakció hatékonyságának növelésére 1H-tetrazolt használnak.

2. H-foszfónát kémia

Az amidit kémiát széles körben alkalmazzák ugyan, de a további kutatások új módszer megjelenését eredményezték. Ez az ún. H-foszfónát kémia, amelyet párhuzamosan, egymástól függetlenül fedezett fel két kutatócsoport: Garegg és mtsai, valamint Froehler és Matteucci. Érdekes megjegyezni, hogy az első H-foszfónátot, egy diribonukleotid vegyületet, Hall, Todd és Webb szintetizálta 1957-ben, s a módszer gyakorlati életbe való átültetéséhez csaknem 30 évet kellett várni. A reakció sémája a x. ábrán látható egy oligoribonukleotid példáján. A H-foszfónát kémia esetén egész más jellegű aktivátorokat használnak, a pivaloilklorid (trimetil-acetilklorid) aktivátorként való használatával 107 bázis hosszúságú oligonukleotidot tudtak szintetizálni. A H-foszfónát kémiának a méltán népszerű amidit módszerrel szemben elviekben az előnye az, hogy gyorsabb, a reagensek könnyen, egy lépésben elkészíthetők (a megfelelően védett nukleozidot van Boom reagenssel, szalicilklorofoszfittal, elreagáltatva közvetlenül a H-foszfónát származékot kapjuk), nem szükséges a lépések között a foszforatomokat oxidálni, keppelni (ld. később), és olcsóbb is.

Általában a DNS szintetizátorokat manapság úgy gyártják, hogy képesek legyenek mind a két fajta (az amidit és a H-foszfónát) kémia alapján dolgozni.



5. ábra. A H-foszfónát módszer egy kapcsolási lépése oligoribonukleotidok esetén. DMT: dimetoxitritil, Si: t-butil-dimetil-szilil csoport. PV-Cl: pivaloil-klorid.

A korábban említett blokkmódszernél, ahol több nukleotidból álló alegységeket kapcsoltak össze, a szintézis stratégiától függően mindkét irányban haladt. Ezzel szemben, ha az első nukleozid rögzítve van, a szintézis egyirányúvá válik. Ez tette lehetővé, és szükségessé az ún. keppelés bevezetését. "Cap"-elés A "cap"-elés funkciója az, hogy a kapcsolási reakció során el nem reagált (mivel a reakciók nem 100%-osak) aktív csoportokat kvantitatívan blokkolják a következő kapcsolás előtt. Ez általában ecetsavanhidriddel való katalitikus acilezést jelent.

A DNS szintézis automatizálása

A szintetikus DNS kapcsolási technika fejlődése, a szilárd hordozó megjelenése, a szintézis lépéseinek ciklusba szervezhetősége, valamint a megfelelő védőcsoportok elkülönült kezelhetősége lehetővé tette a DNS szintézis automatizálását. Az első gépeket foszfótkémiaira tervezték [3], de azóta már gyakorlatilag csak amidit illetve H-foszfónát kémián alapuló szintetizátorok vannak a piacon.



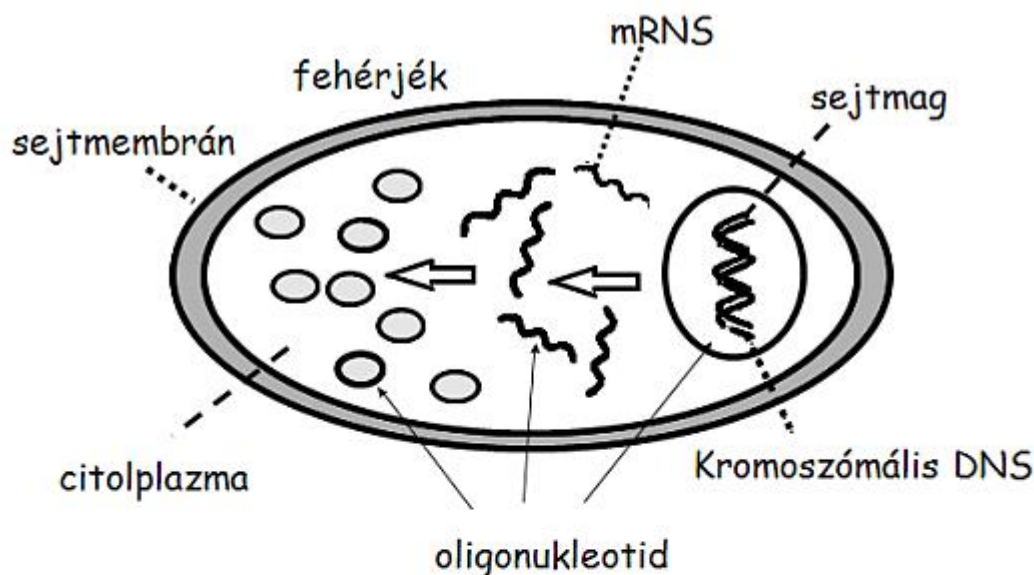
Oligoribonukleotidok szintézise

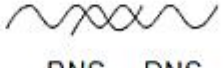
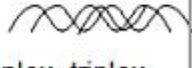
Röviden megemlékezünk arról is, hogy lehetséges szintetikusán előállítani oligoribonukleotidokat is, de ebben az esetben a 2' OH csoportot is meg kell védeni, s a reagáló nukleotidra a szokásos szintézis körülmények között inert védőcsoportot kell felkötni (pl. benzoil, tetrahidropiranoil stb.) (Összefoglaló áttekintést ad pl. [122]). Egy ilyen példát a H-foszfónát módszer ismertetésekor mutattunk (5. ábra). Mindazonáltal ennek a tárgyalásába nem megyünk bele, mert nem tartozik a tárgyhoz, és nem is szintetizáltunk riboszármazékot. Azt azért el lehet mondani, hogy a poliribonukleotid szintézisnek sokkal kisebb az irodalma, s általában komplikáltabb a kémiája, ezért nem olyan elterjedt, mint a deoxi változaté.

3. Oligonukleotidok felhasználási területei

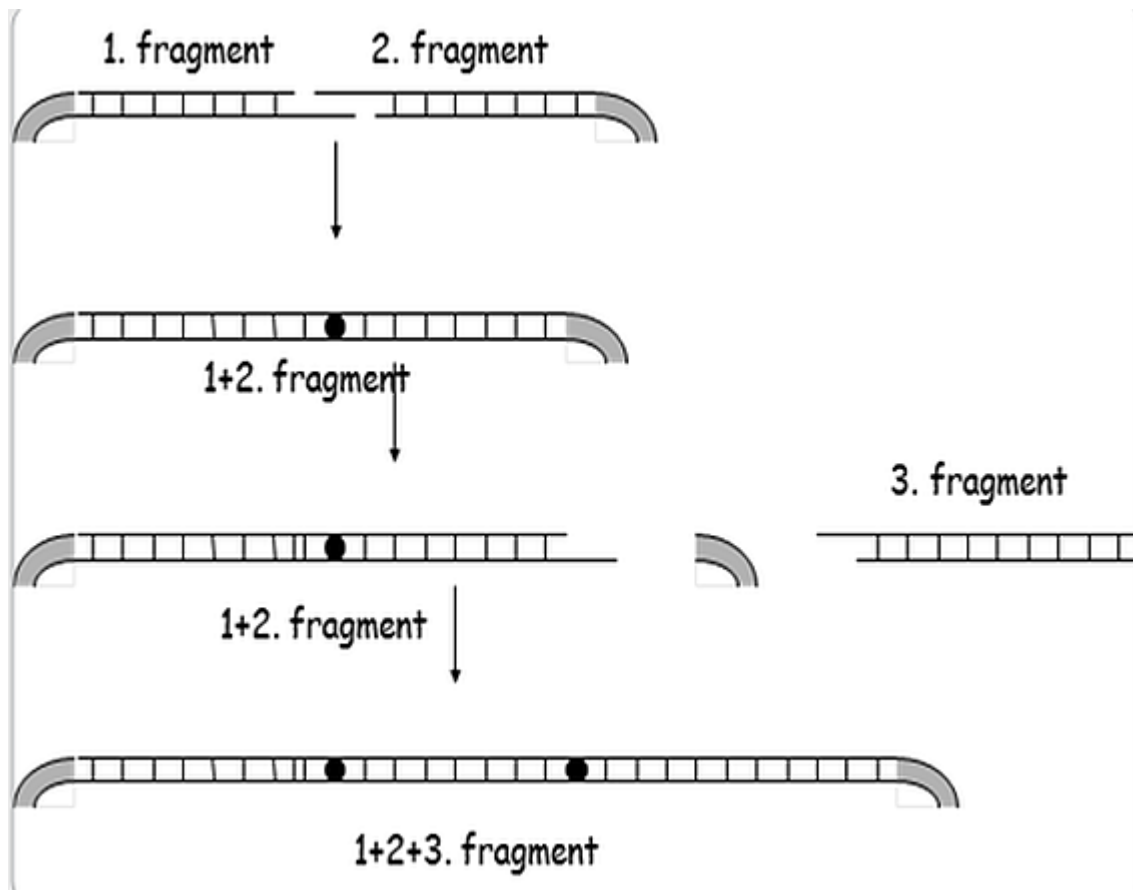
3.1. Primerek, linkerek, adapterek

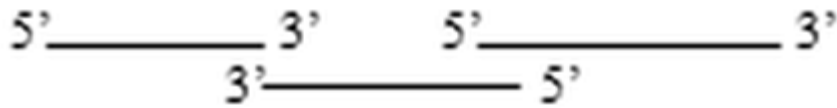
3.2. Oligonukleotidok használata a génexpresszió szabályozásában



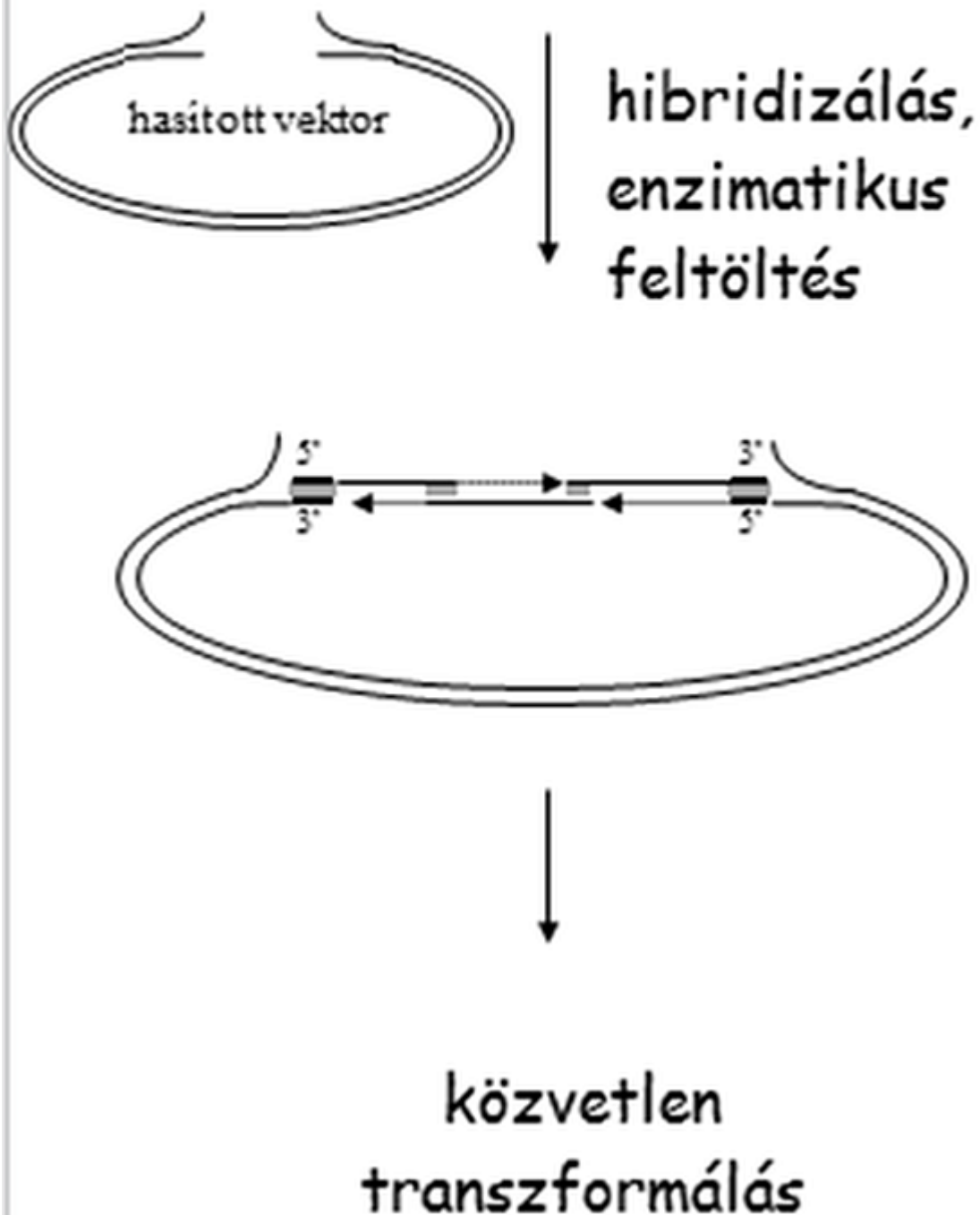
Cél molekula:	fehérje	mRNS	DNS
oligonukleotid iránya	kettősszalú	a leolvasással ellentétes	a leolvasással megegyező
		 RNS DNS	 duplex triplex
kölcsönhatás	fehérje-DNS	RNS-DNS hibrid/ RNáz H	Hoogsteen féle triplex
Gátlás	transzkripció szabályozás	transzláció	transzkripció

3.3. Génszintézis stratégiák





átfedő szintetikus
oligonukleotidok



34. fejezet - Ellenőrző kérdések:

1. Mi a vektor fogalma?
2. Mik a plazmidok?
3. Milyen tartományban mozog a plazmidok sejtenkénti kópiaszáma?
4. Plazmidok esetén, mik az inkompatibilitási csoportok, ennek mi a jelentősége?
5. Mik az ingázó, shuttle plazmidok?

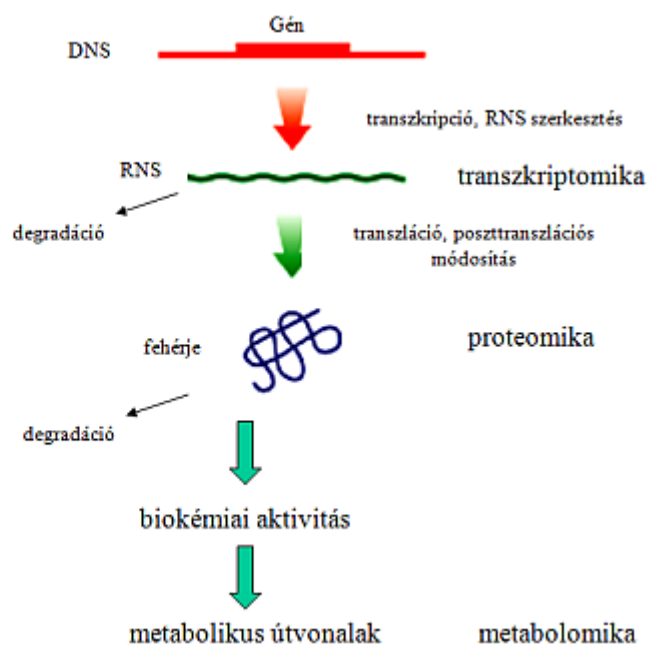
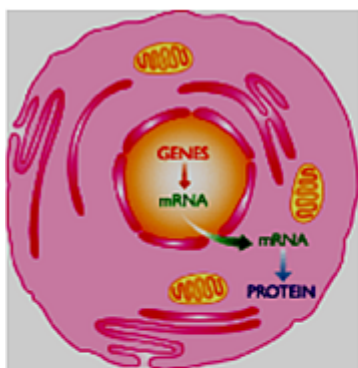
IX. rész - Genomika

Napjaink kísérletes biológiája, az élő rendszerek molekuláris működésének megismerése és alkalmazása óriási változáson megy át. Ennek legfontosabb mozgatóereje a genomikai megközelítés bevezetése. A genomika genom léptékű biológiát jelent, vagyis azt, hogy a vizsgálatok kiterjedhetnek akár az adott élőlény (például az ember) összes génjének DNS-szintű, illetve expressziós (mRNS és/vagy fehérje) analizisére. A teljes genom DNS-szintű megközelítését szerkezetű, az expressziós vizsgálatokat pedig funkcionális genomikának nevezzük.

A genomika abban segít bennünket, hogy a gének funkcióit megértsük, ami a modern molekuláris sejtbiológiában és a biológia szinte minden ágazatában korszakváltást hoz, gyakorlati szempontból pedig a biomedicinában és a mezőgazdaságban idéz elő rendkívüli változásokat. Hangsúlyozni kell, hogy mai nézeteink, a gyakorlati felhasználás hatóköre és a kivitelezés logisztikája feltehetően gyorsan módosulni fognak.

A genomika alkalmazását három, tudománytörténeti értelemben egyenként is jelentős terület egyazon időben született eredményei tették lehetővé. Az első lökést a genomprogramok adták. Mint tudott, 2001 első hónapjaiban már a baktériumok, az élesztő, a szőlőmuslica, a fonálféreg és a növények mellett az emberi genom, legújabbán pedig az egér lényegében teljes genomiális géntérképe elkészült, a világháló adatbázisaiból lehívható és elemezhető. Bár a gének annotációja (azonosítása) még sok időt vesz igénybe, ez a lexikális tudásanyag új genetikai információs minőség. Rendelkezünk ma már összehasonlító, illetve funkcionális szempontból csoportosított adatbázisokkal is. A legtöbb genomiális adat minden megkötöttség nélkül hozzáférhető, a szabadság alá eső gének „elzártsága” is (legalábbis emberben) időleges. A második terület, amely lendületet adott a genomika alkalmazásának, a „microarray” („csip”) módszer, aminek speciális jellegzetességei nagyságrendekkel emelik az egyidejűleg vizsgálható gének számát, s ami szerkezetű (nukleotidsorrend) és funkcionális (génkifejeződés-mRNS) információk tömegét képes nyújtani. A harmadik tudományterület a bioinformatika. Ez az új biostatistikai/biomatematikai megközelítés korrelációs és halmazelméleti eljárásokkal elemzi a genomiális/expressziós adatbankok és a géncsipechnika által szolgáltatott adathalmazt, és biológiai következtetésekre alkalmas elemzést nyújt.

Bár a genomika tudománya már több évtizedes múltat tekint vissza, tulajdonképpen csak az elmúlt két évtizedben vált még az élő természettudományokkal foglalkozók között is igazán ismertté. Annak ellenére azonban, hogy jelenleg is a leggyorsabban fejlődő tudományágak közé tartozik, a hétköznapi emberek túlnyomó többsége, sőt például arébben végzett orvosok, gyógyszerészek számára is gyakorlatilag ismeretlen fogalmat takar. Először is: Mi az a genom? A genom: Egy diploid sejt teljes haploid DNS tartalma, plusz a mitokondriális DNS. Mivel a férfiak és a nők genomja különbözik abban, hogy a férfiaknak kétféle nemi kromoszómájuk van (X és Y), a genom meghatározásánál ezt is figyelembe kell venni. A következő fontos kérdés, hogy mivel foglalkozik a genomika? Igazából erre többféle definíciót is lehet adni, ezek közül talán a legegyszerűbb: A genom működésének, szerkezetének, kölcsönhatásainak vizsgálata és az ezekhez tartozó módszerek. A DNS vizsgálatán túl azonban ide tartoznak az RNS-ek vizsgálata (transzkriptomika), a fehérjék vizsgálata (proteomika), bioinformatika, rendszerbiológia is. Egyes meghatározásokban a genomikát a molekuláris rendszerbiológia szinonimájának is definiálják, amelyben a genom szintű szerveződések alapján ismerjük meg a világot. Valójában a genomika inkább a rendszerbiológia részének tekinthető. A genomika vizsgálatának tárgya alapján különböző alcsoportokra osztható. Lehet például: strukturális genomika; komparatív genomika; funkcionális genomika; humán genomika; farmakogenomika; orvosi genomika, stb. Ebben a könyvben főleg az utolsó hárommal foglalkozom. Van még egy fontos kérdés, ami sokak számára problémát jelent. Mi a különbség a genetika és a genomika között? Igazából nem húzható éles határvonal a két tudományág közé, mindenesetre általánosságban elmondható, hogy ha egy gént, vagy genetikai variációt vizsgálunk, akkor genetikáról szoktunk beszélni, ha több gént, vagy az egész genomot mint rendszert vizsgáljuk akkor genomikáról beszélünk. Ebből következik, hogy a genomika, mivel a rendszerbiológia témakörbe tartozik, általában jóval összetettebb módszereket igényel. Azonban, még a tudományos szóhasználatban is, a két szó használata erős átfedést mutat.



35. fejezet - Genom Projektek, Humán genom projekt

A genomika tudomány ugrásszerű fejlődését a Humán Genom Projektnek (HGP) köszönhetjük. A következőkben a teljesség igénye nélkül röviden ismertetem a HGP történetét, célkitűzéseit és néhány eredményét (1). Érdekes módon a HGP az amerikai Energiaügyi Minisztérium (Department of Energy, DOE) kezdeményezésére indult el. Ennek a minisztériumnak az elődjai voltak ugyanis az atombomba kifejlesztésének irányítói. Miután Japánban az amerikaiak ledobták a két atombombát, az amerikai kongresszus azzal bízta meg a DOE elődjét, hogy tanulmányozza a genomot, hiszen a nukleáris sugárzás hosszú távú károsító hatásának az oka a genom sérülése. Mivel a genomot úgy lehet legjobban tanulmányozni, ha megismerjük annak felépítését, 1986-ban a DOE az NIH-el (National Institute of Health) összefogva elhatározta a HGP elindítását. A szervezőmunka 4 évig tartott, és 1990. október 1-én hivatalosan is elindult a HGP.

A projektre 15 évet és 3 milliárd dollárt szántak. A projekt fő céljai a következők voltak: Azonosítani a kb. 100.000 gént a humán genomban; Meghatározni a humán genomot felépítő 3 milliárd bázist; Nyilvános adatbázisokban tárolni az információkat, és szoftvereket fejleszteni az elemzéshez; Bevonni a magánszektor; Etikai, törvényi és társadalmi problémákat tisztázni; Modell szervezetek megszekvenálása (pl. egér, csimpánz, háziállatok; növények, mikroorganizmusok, patogének stb.). Ez utóbbival választ kaphatunk olyan kérdésekre mint pl: Miért ember az ember (csimpánz vs. ember)? Melyek az élethez nélkülözhetetlen gének (konzervált gének, amelyek minden élőlényben megtalálhatók)? Patogének, háziállatok, növények megszekvenálása. A HGP nem ment teljesen zökkenőmentesen. 1998-ban, a projekt tervezett idejének a felénél, még csak az emberi genom 5%-a volt ismert, és reménytelennek látszott a projekt sikeres teljesítése. Craig Venter a projekt egyik vezető alakja egy új módszer bevezetését javasolta. Ez az ún. „shotgun sequencing” lényege az volt, hogy a genomot rövid darabokra felszabdalták, ezeket a darabokat megszekvenálták, majd az átfedő szekvenciák segítségével összeillesztették őket. A módszer bizonyítottan működött kisebb (bakteriális) genomoknál, azonban a HGP vezetői úgy gondolták, hogy a nagyságrendekkel nagyobb emberi genomnál ez a módszer nem fog működni. Venter ezért kilépett a HGP-ből és saját céget (Celera) alapított, és magántőke bevonásával be akarta bizonyítani, hogy jól működik a módszere. Ez a kiválás katalizátorként hatott az eseményekre. A gyorsuláshoz persze az is hozzájárult, hogy a 8 év alatt rengeteg olyan fejlesztés történt, amelyek hatása ekkora érett meg. A szekvenálást a Sanger által kifejlesztett didedoxi módszerrel végezték, amelynek egyik hátránya az volt, hogy a DNS-t felépítő négy nukleotid sorrendjét 4 külön zajló reakció segítségével állapították meg, melyek termékeit egymás mellett 4 külön csíkban kellett elektroforézis segítségével futtatni. Ezzel kapcsolatban kifejlesztették, hogyha 4 féle fluorescens festékkel jelölik meg a 4 terméket, azok egyszerre, egyetlen kapilláris elfo segítségével is futtathatók. Ráadásul, pl. az Applied Biosystem olyan szekvenáló automatát is kifejlesztett, amely egyszerre 96 kapillárisal tudott dolgozni és mindössze napi 15 perc beavatkozást igényelt. De kifejlesztették például a bakteriális mesterséges kromoszóma vektort, amelyekbe a korábbiaknál lényegesen nagyobb (100-200 kilobázis) genom darabot lehetett klónozni. Az egyéb jelentős fejlesztések mellett kiemelkedik a számítástechnika fejlődése. A human genomot felépítő több mint 3 milliárd „betű” tárolása, kezelése, annotálása a 90-es évek elején még méregdrága szuperkomputereket igényelt, manapság már bármelyik személyi számítógép is könnyedén megbirkózik a feladattal. Ezzel kapcsolatban rengeteg új bioinformatikai módszer került kifejlesztésre és számos nyilvános, felhasználóbarát, on-line adatbázist alakítottak ki. Mindezek hatására 1999-től 15 hónap alatt 10%-ról 94%-ra nőtt a megismert humán szekvencia aránya. A szekvenálásokat nagy, gyárszerű épületekben végezték. A szekvenálás sebességére jellemző, hogy 1999-ben a HGP havonta 7 millió mintát dolgozott fel, és másodpercenként 1000 nukleotidot szekvenált meg. A Celera teljesítménye még lenyűgözőbb. A mindössze 65 fős személyzetből álló szervezet 1999 szeptember 8-a és 2000 június 17-e között 14.9 milliárd bázist szekvenált meg, ami a teljes humán genom közel 5-szörös lefedését tette lehetővé. A Celera és a HGP végül egymással megegyezve, egyszerre, 2001 februárjában, ugyanazon a héten közzétették eredményeiket a világ két vezető tudományos lapjában a Nature-ben és a Science-ben (2,3). A közzétett eredmények még csak a humán genom ún. „draft” szekvenciáját tartalmazták, azaz számos lyuk (gap) volt még benne, illetve sok szekvenálási hibát tartalmazott. Ebben egy szekvencia 4-5-szörös lefedéssel volt megszekvenálva. A HGP hivatalosan 2003 áprilisában zárult, amikor elkészült a lyuk nélküli, magas minőségű, 8-9-szeres lefedettségű humán genom szekvenciája (4). A DNS szekvenálás fejlődése a didedoxi szevenálással határozta meg. A HGP összköltsége 3 milliárd \$ volt, Craig Venter genomjának megszekvenálása összesen 70 millió \$-ba került. 2001-ben egy humán genom megszekvenálása minimum egy évbe tellett. Nyilvánvaló ekkora költség és ennyi idő nem alkalmas arra, hogy a genom szekvenálás a mindennapi rutinná váljon, de még arra sem, hogy sok ember genomját megismerjük, összehasonlítsuk. Az is

lassan világossá vált, hogy ennek a módszernek a továbbfejlesztésével nem lehet jelentősen csökkenteni a költségeket, illetve az időt. Azonban a szakértők számára nyilvánvaló volt, hogy ha olcsóvá és gyorsá lehetne tenni a szekvenálást, az óriási előrelépést jelentene például a gyógyszerkutatásban, vagy a személyre szabott gyógyászatban, de a felhasználási lehetőségek száma szintén végtelen. Hogy a fejlesztéseket elősegítsék, létrehozták az Archon X díjat a genomikáért (1. ábra) (5). Ezt a díjat, 10 millió \$-ral együtt az a cég kapja, amelyik képes 100 emberi genomot, maximum 10 nap alatt, maximum 1 hibával 100 ezer bázisonként, és nem többért, mint 10 ezer \$/genom költségért megszekvenálni. Ez a felhívás 2006-ban sokak számára még kicsit utópisztikus vágyalomnak tűnt, azonban hamarosan kiderült, hogy a célt valószínűleg hamarabb fogják elérni, mint ahogy azt sejtették. Abban mindenki egyetértett, hogy nem is a kitűzött 10 millió \$ az igazi tét, hiszen, ha egy cég jelentős piaci előnyhöz jut ezen a piacon, az ennél nagyságrendekkel nagyobb hasznot fog elérni. Mindenesetre számos cég, illetve szervezet egymással párhuzamosan olyan radikálisan új fejlesztéseket, újításokat fogott, hogy rövidesen többen is a cél közelébe kerültek. A didedoxi szekvenálás helyett olyan módszereket fejlesztettek ki, mint pl. a szekvenálás ligálással (Solid technológia, Applied Biosystem), a piroszekvenálás (454 technológia, Roche), vagy a szekvenálás reverzibilis terminátorral (Solexa technológia, Illumina). A módszerek annyira sikeresek voltak, hogy a szekvenálást 2007-ben megválasztották az év módszerének (6). Az új módszerek közül először 2007-ben a 454 technológiával James Watson genomját szekvenálták meg 2 hónap alatt 1 millió \$-ért, ami még ugyan messze volt a kitűzött céltól, de máris óriási előrelépést jelentett a korábbiakhoz képest. Sőt az összes cég folyamatos fejlesztésben van, és egyre lejjebb szorítják mind az időt, mind a költségeket. Például az Applied Biosystem 2008-ban 60 ezer \$-ért szekvenált meg egy genomot. 2011-ben az Illumina HiSeq 2000 rendszerével 30x-os lefedettséggel két emberi genom megszekvenálása 8 nap alatt történik, 6 ezer \$ dollár/genom költséggel. A Complete Genomics nevű cég egy cikkében 40x-es lefedettséggel már 1.500 \$-ról írt. De a verseny tovább folyik, új technikákkal, vagy a régiek tökéletesítésével szinte havonta jelennek meg újabb hírek a szekvenálás árának csökkenéséről és sebességének növekedéséről (2. ábra). A szekvenálás fejlődését kihasználva olyan projektek indultak, mint pl. az 1000 genom projekt, amely különböző etnikumú populációkhoz tartozó, összesen 2500 ember megszekvenálását tervezi. A projekt 2008-ban indult és első eredményeit már 2010 októberében közzétették (7,8). De ilyen projektek például a Genome 10k projekt, amely 10 ezer gerinces faj megszekvenálását tervezi (<http://genome10k.soe.ucsc.edu/>), vagy a 2011. márciusában indult i5k projekt, amely 5000 rovar megszekvenálását tűzte ki célul <http://www.arthropodgenomes.org/wiki/i5K>).

36. fejezet - A genomika hagyományos módszerei

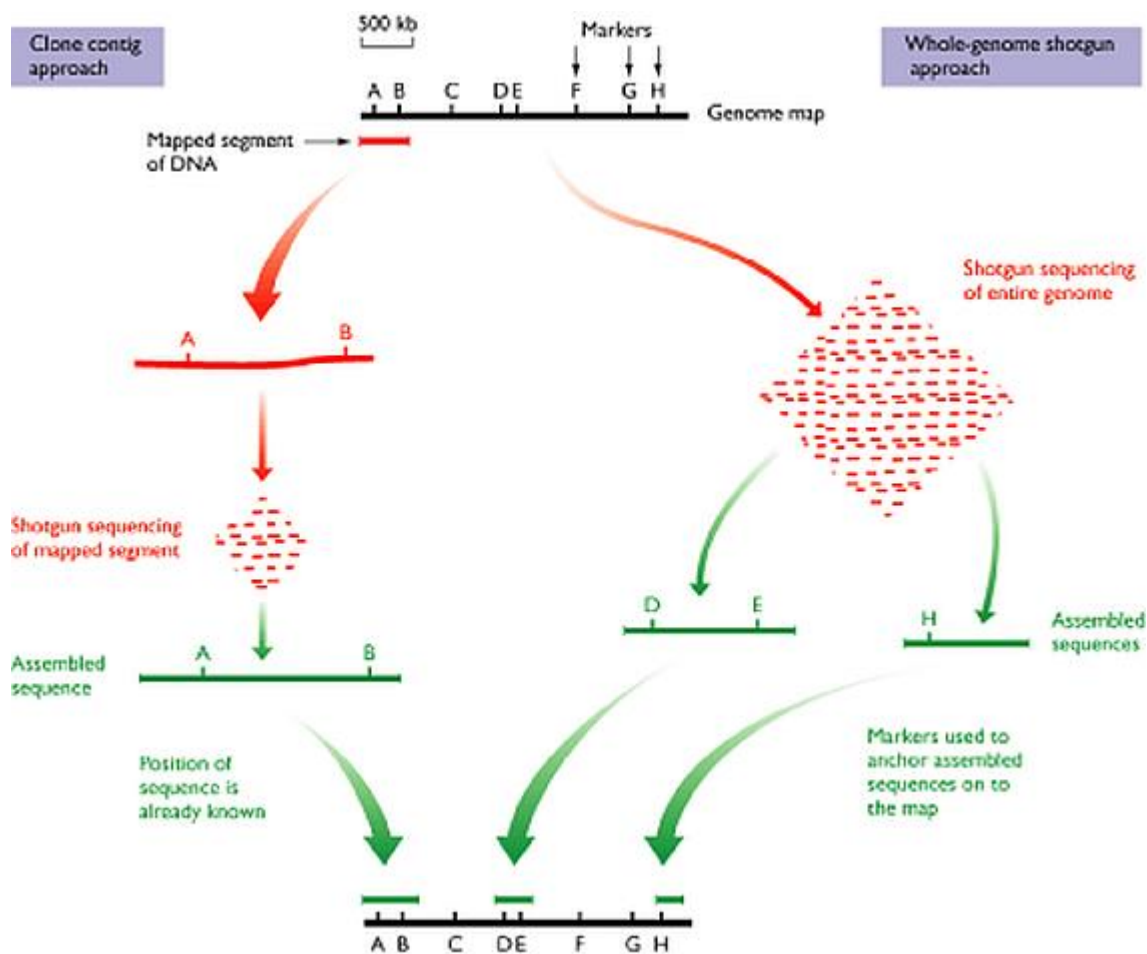
Előkészületek a genom-szekvenáláshoz:

A genom összerakásához fontos információkkal szolgált a genom genetikai és fizikai térképe. A genetikai térképezésnél korlátot jelent, hogy hiányosak az ismereteink a különböző génekről és markerekről illetve ezek biológiai funkciójáról. A fizikai térképezésnek lényegében nincsenek ilyen korlátai, mert a vizsgált szekvenciaelemek sorrendjét határozza meg függetlenül attól, hogy annak van-e biológiai funkciója, fenotipikus vonatkozása.

Fizikai térképezés

Ennél a szekvenálási stratégiánál az első lépésként fizikai térképet készítenek az élőlény genetikai állományáról. A fizikai térképezésnek három fő stratégiáját szokták alkalmazni:

1. leggyakrabban restrikciós endonukleázokkal való emésztéssel ezen restrikciós helyek egymáshoz való térbeli elhelyezkedését állapítjuk meg,
2. fluoreszcens in situ hibridizáció, ismert DNS darabokat fluoreszcensen megjelölünk és mikroszkóp alatt megvizsgáljuk, hogy ez a kromoszóma mely részéhez hibridizál. Ez egy viszonylag egy alacsony felbontású módszer.
3. A leghatékonyabbnak tekintett technika az ún STS-k térképezése (sequence tag site). Ezek 100-500 bp-os fragmentumok, és ezeknek az STS-eknek az egymáshoz való elhelyezkedését vizsgáljuk vagy hibridizációval, vagy PCR reakcióval. Annak a valószínűsége, hogy két STS ugyanarra a fragmentre térképeződjön fordítva arányos a távolságukkal. Ez egy gyors, nagy hatékonyságú és nagy felbontású módszer.
4. Genom-szekvenálási stratégiák:



5. Hierarchikus shotgun szekvenálás (klónról klónra történő shotgun szekvenálás, direkt módszer)

Ebben egy olyan genomi könyvtárat készítenek, amelynél a vektorok 20-300 kilobázisnyi inszerteket tartalmaznak (ábra). A nagy inszertek beépítésénél a legnagyobb problémát az okozhatja, ha valamelyik géntermék toxikus az *E. coli* sejtekre. Nyilván minél nagyobb az inszert, annál nagyobb a valószínűsége toxikus terméket kódoló gén előfordulásának. Különösen gyakori ez az eset, ha Gram-pozitív baktérium DNS-ét klónozzák Gram-negatív gazdába.

A könyvtár készítéséhez leggyakrabban BAC (bacterial artificial chromosome), lambda, cosmid vagy fosmid vektorokat használnak.

Miután ez elkészült, az egyes klónokban olyan pontokat keresnek, amely alapján később a szekvenciák összeállítása könnyebb lesz. Ilyen „jelzőhelyek” lehetnek bizonyos restrikciós enzimek hasítóhelyei, vagy más, ismert szekvenciaelemek. A könyvtár klónjaiból kiválogatják azokat, amelyek nem tartalmaznak nagy átfedő régiókat, ugyanis ezek szekvenálása fölösleges pluszköltséget jelentene. Az összehasonlítást általában DNS fingerprint módszerrel végzik.

A kiválasztott klónokban található inszertet ezután –általában valamilyen fizikai módszerrel– néhány kilobázisnyi darabokra törik, darabjait pedig plazmid vektorba szubklónozzák, és ezeket kétoldról szekvenálják.

1. Shotgun genom szekvenálás

A teljes genom shotgun módszerrel való szekvenálása:

Ennél a módszernél a genomiális DNS-t mindjárt az első lépésben kis méretű darabokra tördelik össze, majd a darabokat plazmid vektorba klónozzák (ábra). Az így kapott nagy számú klónt mindkét irányból megszekvenálják, majd a darabokat kontigokba és szuperkontigokba illesztik. Először 1995-ben bizonyították a

szkeptikus tudósoknak, hogy ezzel a módszerrel meg lehet állapítani egy élőlény teljes bázissorendjét, ekkor készült el ugyanis a *Haemophilus influenzae* nevű baktérium teljes genomszekvenciája.

A módszernél a legfontosabb követelmény, hogy a megszekvenált DNS hossza olyan nagy legyen, hogy többszörösen (5-10 $\times$) lefedje a teljes genomot, mert az összeillesztés csak ebben az esetben lehetséges, sőt még ekkor sem lesz teljes. A szuperkontigok között réseket PCR segítségével kiamplicifikálják és ezek alapján ezek még nagyobb egységekbe szervezhetőek.

Leginkább baktériumoknál alkalmazzák, ezek DNS-e ugyanis kevés ismétlődő szekvenciát tartalmaz, de eukariótáknál is használják, így készült el például a *Drosophila melanogaster* genom szekvenciája is (Adams és mts., 2000).

A humán genom szekvenciájának első változata az International Human Genome Sequencing Consortium (IHGSC) és a Celera biotechnológiai társaság munkájának eredményeként került nyilvánosságra, 2001-ben.

A munka során különböző megközelítéseket alkalmaztak, de mindkét esetben a random, ún. shotgun klónozás módszerét használták. E módszernél a szekvenálni kívánt genomot kisebb méretű, átfedő fragmentekre tördelik fel, majd ezeket klónozzák. A klónok által hordozott DNS szakaszok mindkét végén körülbelül 500 bázispár (bp) hosszúságban meghatározzák a szekvenciát. A genom minden egyes részletét hatszor-tízszer "olvassák el", hogy a meghatározás pontosságát növeljék. A DNS szekvencia meghatározásnál a bázissorrendet számítógép regisztrálja és illeszti be az addig kész szekvenciába.

Az IHGSC által használt módszer szerint a humán DNS-t 200,000 bp hosszúságú fragmentekre hasították és a 24 kromoszómát lefedő fizikai térképet készítették. Az így rendezett DNS fragmenteket azután egyenként shotgun módszerrel klónozták és szekvenálták.

Ezzel szemben a Celera kutatói az egész genomot random fragmentekre vágták, háromféle méretben (2,000, 10,000 és 200,000 bp) és a fragmentek végeinek szekvenciáját határozták meg. Ezek után csak számítógép segítségével állították össze a teljes szekvenciát, mert fizikaitérkép nem segítette a munkát.

A Celera 1998-ban jelentette be, hogy három éven belül meg kívánja határozni a teljes humán genom szekvenciáját, amit akkor meglehetősen szkepticizmussal fogadtak. Végül is mindkét kutatócsoport erőfeszítéseit siker koronázta és a munka meghatározó részét előbb fejezték be, mint bárki remélte volna.

2. Primer séta

Az Európai Bioinformatikai Intézet által kifejlesztett módszer szerint első lépésben 40 - 200 kb-os genomiális fragmentumokból könyvtárat készítünk, és ezek klónjait a végüktől a közepük felé haladva, minden fordulóban új specifikus primereket használva szisztematikusan megszekvenáljuk. Ennek végeztével a könyvtár klónjait kontigokba rendezzük, és a köztük levő rések kitöltését, a bizonytalan régiók korrekcióját a fentiek analógiájára elvégezzük.

3. Kozmid könyvtárak

Az üres, eredeti állapotú kozmid vektor *E. coli* sejtekben plazmidként szaporítható, és a plazmidokkal azonos módszerekkel izolálható. A könyvtárkészítési folyamat során a vektort restrikciós endonukleázokkal felnyitják, majd a keletkező 5' - végekről a foszfát - csoportot eltávolítják. A vektort ezután egy másik enzimmel is megemésztik. A reakció során vektor karok jönnek létre, amelyek végeiken cos szekvenciákat tartalmaznak. A vektor molekulákat méret szerint elválasztják a nem megfelelően hasadt DNS molekuláktól. Ezután az emésztett vektort összekeverik a klónozásra előkészített, azaz a megfelelő enzimmel kezelt és defoszforilált genomiális DNS - sel, és ligálják a komplementer DNS végeket. . A ligálás során a λ - fág vektorokhoz hasonlóan konkatamer DNS molekulák jönnek létre. Ezekhez a hosszú DNS molekulákhoz preformált λ - fág fej és farok egységeket és a becsomagoláshoz szükséges fág fehérjéket tartalmazó sejt kivonatot adnak. Ekkor a hosszú DNS molekulák a cos helyeknél elhasadnak és egyesével fág burokba pakolódnak. A megfelelő méretű inszertet tartalmazó vektorok becsomagolódása fertőzőképes fág részecskét eredményez. A rekombináns kozmid vektorokat tartalmazó fágokat, azaz a kozmid könyvtárat izolálják, majd azokkal baktérium sejteket fertőznek. A sejtben a vektor köralakú molekulává záródik, és plazmidként replikálódik. Sajnos a kozmid vektorok esetében is fennáll annak a veszélye, hogy a nagy inszertek egy része elveszik, amikor a könyvtár tagjai sejtekben vannak fenntartva. A rendszernek megvan viszont az az előnye, hogy ez a veszély a fág burokba csomagolt könyvtár esetében nem áll fenn.

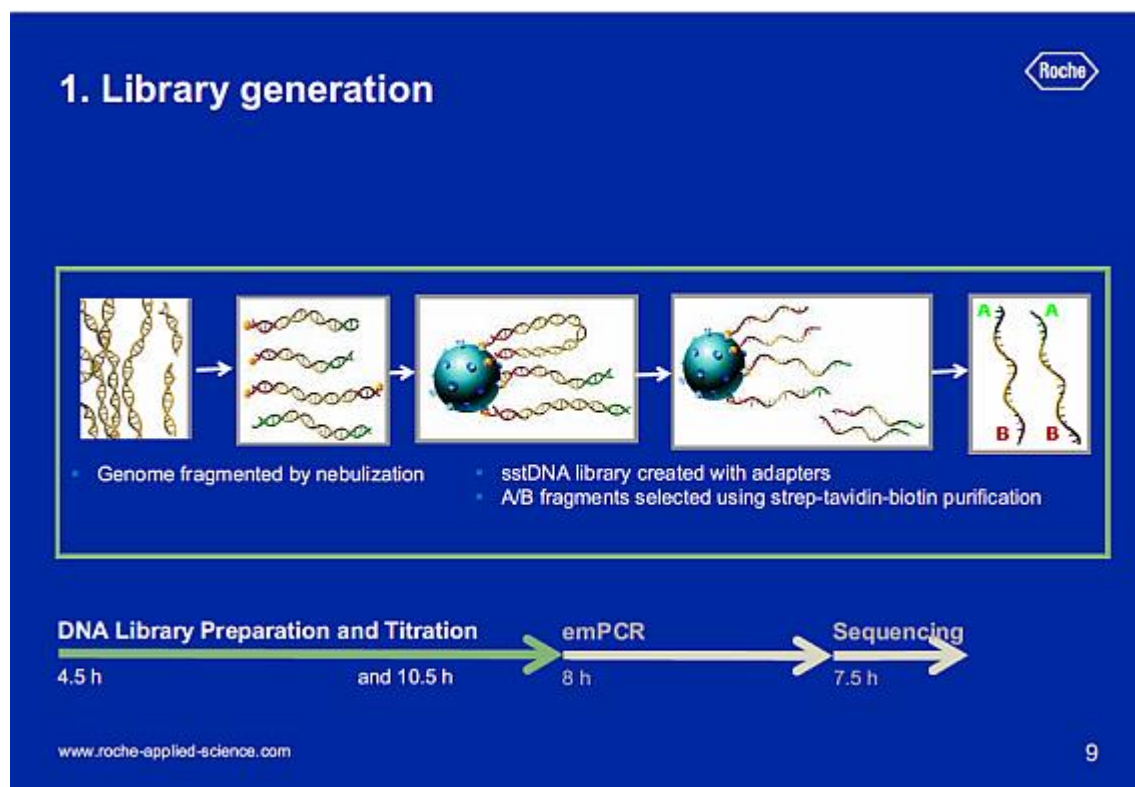
37. fejezet - A genomika újgenerációs módszerei

Az új generációs szekvenálások közé tartoznak azok a módszerek, amelyek párhuzamosan sok mintát képesek szekvenálni, azaz nagy áteresztőképességű (HTP high-throughput) módszerekről van szó (angolul más néven deep sequencing-nek, „mély” szekvenálásnak és massively parallel sequencing -nek is hívják az új módszereket). Az új-generációs módszerek mind a láncszintézis, mind a detektálás terén lényegileg térnek el a hagyományos Sanger-féle szekvenálástól. Használatukhoz fejlett robottechnika és igen nagy számítógép-kapacitás szükséges. Hátrányuk, hogy valamivel több hibát ejtenek és egy reakció során viszonylag rövid (néhány 100 bázis) DNS-darabot szekvenálnak, igaz, hogy párhuzamosan akár 1 milliót is. Az új - generációs módszerek bevezetésével robbanásszerűen megnövekedett a DNS - alapú vizsgálatok hatékonysága és csökkent a fajlagos költsége. Egy új - generációs szekvenátorral pár hét vagy akár pár óra alatt szekvenálni lehet akár az emberi genomot is. Elsősorban a funkcionális és a környezeti genomika (metagenomika), valamint a transzkriptomok vizsgálata területén alkalmazzák őket. Fontos megjegyezni, hogy ezek a módszerek nem csak DNS szekvenálására, hanem mRNS (RNAseq), kis RNS - ek (small RNA - Seq), és az ún. ChIPseq szekvenálásra (ennél a módszernél az ún. kromatin immunoprecipitációval előállított génexpresszió szabályozásban résztvevő DNS régiókat szekvenálják újgenerációs módszerekkel) is alkalmasak, melyből közvetlenül következtethetünk egy sejttől, vagy a vizsgálandó anyag expressziós állapotára, és DNS szabályozó régióira.

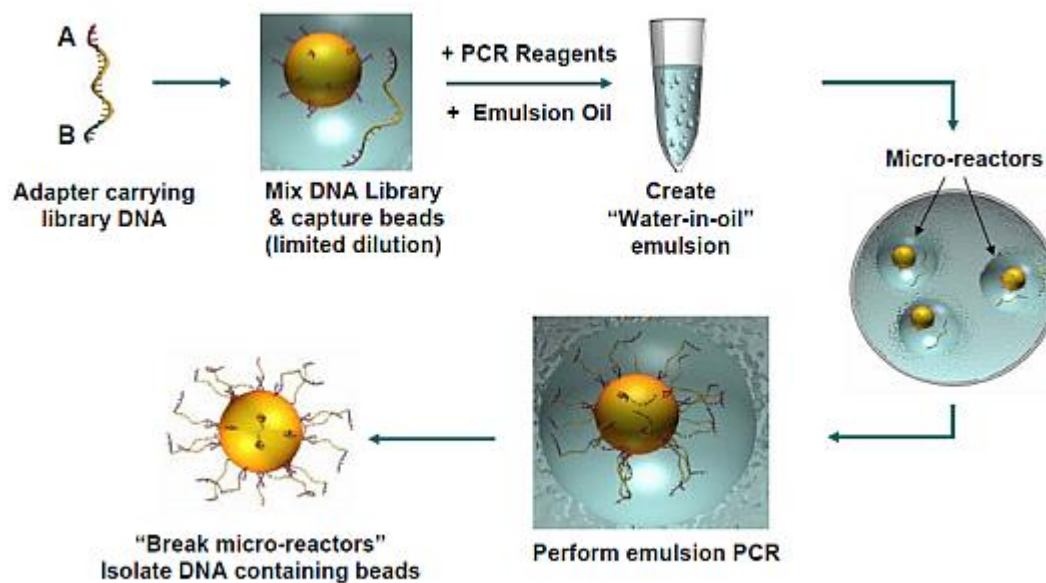
1. 454 technológia

A módszerben a szekvenálási eljárás lényegesen eltér a Sanger szekvenálási technikától és egy ún. pirosekválást alkalmaz. Ennek során a beépült bázist nem a DNS-ben levő jel alapján, hanem a nukleotidok beépülése során felszabaduló pirofoszfát átalakításán keresztül detektálják. A pirosekválást 1996-ban dolgozták ki, és néhány éve már teljesen automatizálttá vált. A módszer alapelve teljes mértékben eltér a Sanger-féle szekvenálástól. A pirosekválás a „szekvenálás szintézissel” elvén alapul, vagyis egy egyszerű DNS templárról enzimatikusan komplementer szálakat szintetizálnak. Valós időben a DNS - polimeráz aktivitását detektálják egy kemilumineszcens enzim segítségével. Amikor egy nukleotid beépül a DNS szálba, pirofoszfát (PPi) keletkezik, és ennek a mennyiségét mérjük egy kapcsolt reakcióval, ami végső soron a luciferáz enzim felvillanásával jel ez. Egyszerre csak egyféle nukleotidot adnak a rendszerhez, így biztos, hogy csak egy nukleotid fog beépülni növekvő szálba. Ha több nukleotid épül be, akkor arra a fényintenzitás növekedéséből lehet következtetni. Kemilumineszcencia csak a megfelelő, komplementer nukleotid esetében következik be, hiszen csak akkor szabadulhat fel a pirofoszfát. A nem komplementer, felhasználatlan nukleotid, még a következő bázis beépülése előtt degradálódik. Alapvetően azt kell detektálni, hogy éppen milyen nukleotid - trifoszfátot adtak a rendszerhez, és az beépült - e az egyszerű DNS - láncba vagy sem. Az eljárás egy ún. emulziós PCR segítségével párhuzamosítható, aminek a segítségével már nincs szükség arra, hogy a szekvenálandó DNS darabokat klónozzák. A pirosekválásnak két típusa van, a szilárdfázisú és a folyadék fázisú eljárás. Az első esetben a templátokat szilárdfázisú polisztrén gyöngyökre rögzítik, míg a második esetben enzimatikusan, apiráz és exonukleáz kezeléssel készítik elő. Rögzített DNS templát esetében a vizsgálandó DNS szálakat először feldarabolják, PCR - rel felszaporítják miközben a primerrel biotinálják. Majd a szálakat aprócska méretű, streptavidint tartalmazó műgyanta (polisztrén) gyöngyökhöz kötik. Egy gyöngyhez mindig csak 1 - 1 DNS darabot kapcsolnak. Ezt követően a gyöngyöket egy olaj/víz emulzióhoz adják. A vízcseppek melyek a PCR - hez szükséges anyagokat tartalmazzák mérete pontosan akkora, hogy mindegyikbe 1 db gyöngy férjen el. A gyöngyöket egy olyan szálóptikából készítet lemezre viszik fel, ami néhány cm 2 ugyan, de kb. másfél millió nanomélyedést tartalmaz. Egy ilyen mélyedés kb. 15 pikoliteres térfogatú, és csak egy gyöngy fér bele. Ezekbe centrifugálással juttatják be a DNS - t, majd hozzáadják a reakcióhoz a többi szükséges összetevőt. A vízcseppekben egymástól elválasztva, külön - külön zajlanak le a reakciók. Minden gyöngyön 100 - 500 bázis hosszúságú DNS szakasz szaporítható fel. A másfél millió miniatűr csőben egyszerre zajlanak le a reakciók, és ez által nagyon gyorsan, nagyszámú nukleotidot lehet szekvenálni. Az egyszerű DNS templátot először egy primerrel hibridizáltatják, majd DNS - polimeráz, ATP - szulfuriláz, luciferáz, apiráz, adenzin - 5' - foszfoszulfát (APS, mint szubsztrát) és luciferin (szintén szubsztrát) jelenlétében inkubálják. A reakció első lépése, hogy valamilyen dNTP - t adnak a rendszerhez. Ha az komplementer a templáttal, akkor beépül a szálba, leválik róla a pirofoszfát, melyet a szulfuriláz megköt és az APS -ből ATP - t állít elő. Az ATP -ből luciferin jelenlétében, a luciferáz oxiluciferint hoz létre, amely egy fényvillanással járó folyamat (kemilumineszcencia). Fontos megjegyezni, hogy az ATP - nek egy módosított változatát, (ATP_γS) alkalmazzák, melyet a DNS - polimeráz igen, de az ATP - szulfuriláz nem tud hasznosítani. Ennek köszönhetően a keletkező ATP biztosan a pirofoszfátból származik, és nem a mesterségesen hozzáadott ATP - t

használja fel a szulfuriláz. Minden egyes felvillanást a szál-optika egy kamerához vezet, ami detektálja és rögzíti a képet. Ismétlődő bázisok esetében (pl. : TTTT), öt darab dATP fog beépülni a szintéziskor, és öt luciferint fog felhasználni a luciferáz. A kamera képes arra, hogy ezt pontosan érzékelje, hiszen a keletkezett fény mennyisége arányos a beépülő bázisok számával, tehát ötször erős lesz. A be nem épült dNTP - ket és felesleges ATP - t, rögzített DNS - templát esetében lemosás, szabad templát esetében pedig apiráz enzimmel lebontják, még a következő nukleotid hozzáadása előtt, és kezdődhet újra a ciklus. Egy reakció kb. 10 mp alatt megy végbe, így egy lapocskán kb. 20 millió nukleotidot lehet meghatározni. A módszerhez elengedhetetlen volt a megfelelő informatikai szoftver(ek) kifejlesztése, ami pontosan értelmezni tudja a kapott jeleket, melyeket nukleotid sorrendre fordít, majd a rövi d szekvenciák átfedései által, összerakja a teljes DNS molekula pontos szekvenciáját. A piroszekvenálás sémáját az 5 . 6 . ábra n szemléltetjük. Amellett, hogy a piroszekvenálás egy rendkívül költséges módszer, további hátránya, hogy mivel nagyon kis térfogatban zajlanak a reakciók, teljesen egyedi DNS templátokkal, e gy reakcióban 300 - 500 nukleotidnál hosszabb templát DNS - t nem lehet alkalmazni, ami jóval rövidebb a Sanger - féle láncterminációs módszernél szintetizált új szálhoz képest (800 - 1200 nt). Azonban a legújabb technikákkal 5 - 10 óra leforgása alatt meghatározható akár 400 Mbp hosszúságú szekvencia is egyetlen készülékkel (egy ilyen futtatás kb. 5 - 7 ezer dollárba kerül). Baktériumok esetében 4 - 5 óra, eukarióták esetében pár hét alatt meg lehet szekvenálni egy teljes genomot.



Emulsion Based Clonal Amplification

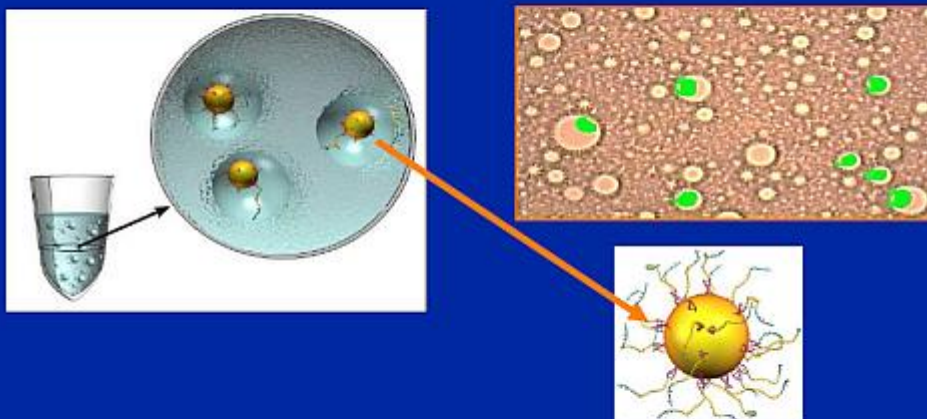


- Generation of millions of clonally amplified sequencing templates on each bead
- No cloning and colony picking

2. Clonal amplification during emPCR



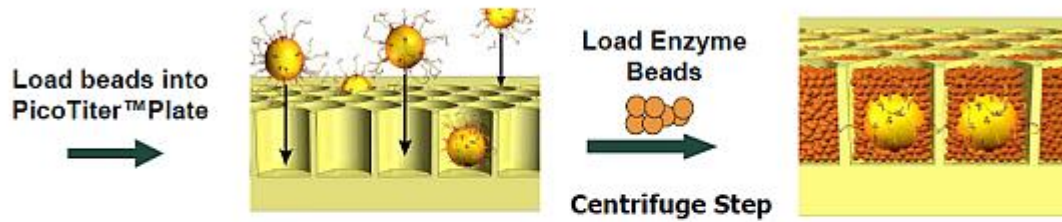
Emulsion-based clonal amplification



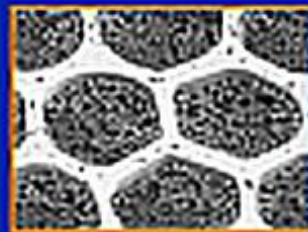
www.roche-applied-science.com

10

Depositing DNA Beads into the PicoTiter™ Plate

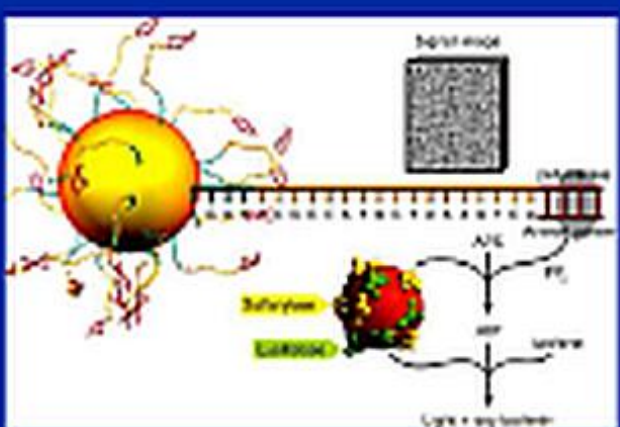


4. Sequencing Step



www.moxie-applied-science.com

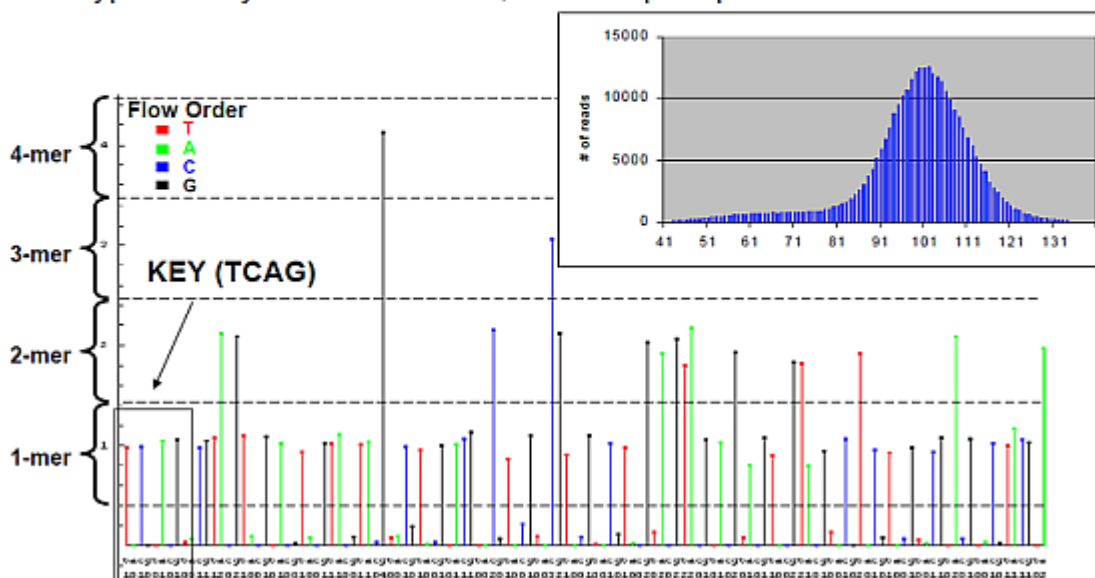
Sequencing Workflow Sequencing by Synthesis



- Bases (TAGC) are flowed sequentially and always in the same order (100 times for a large GS FLX run) across the PicoTiterPlate device during a sequencing run.
- A nucleotide complementary to the template strand generates a light signal.
- The light signal is recorded by the CCD camera.
- The signal strength is proportional to the number of nucleotides incorporated.

454 Sequencing: BaseCalling

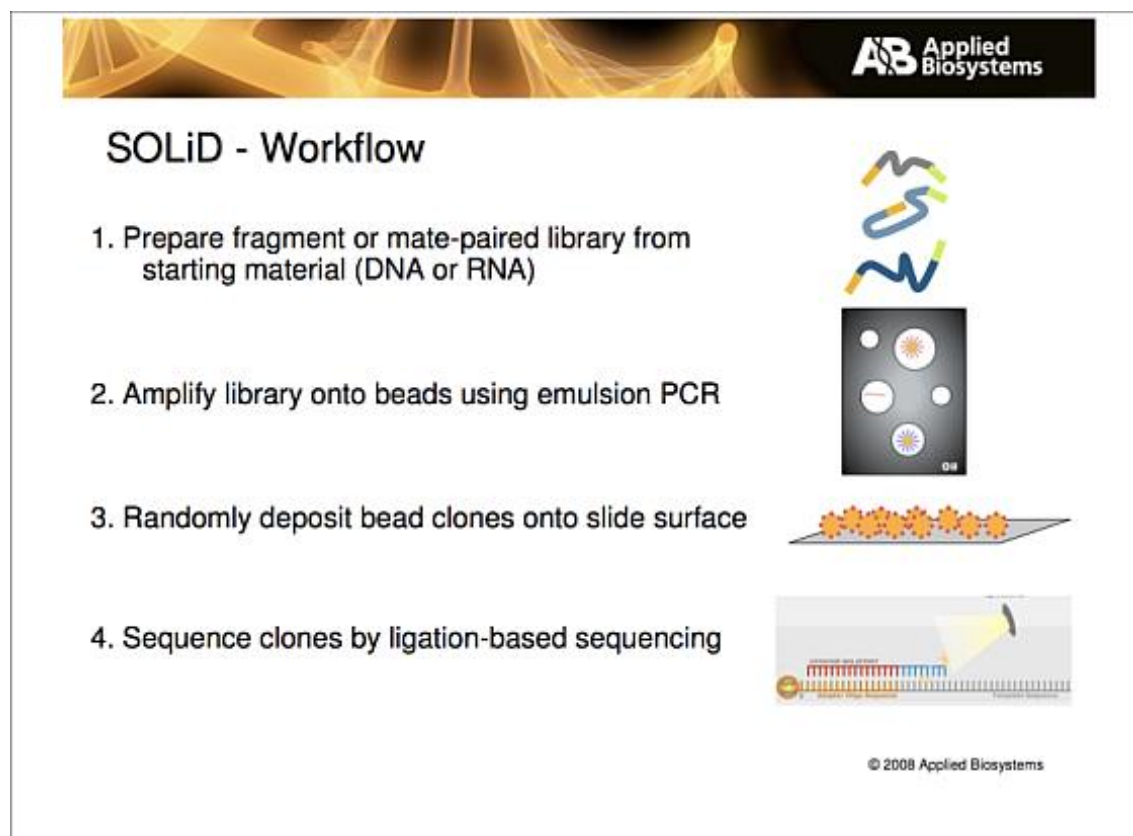
- Count the photons generated as pixel images for each "flow"
- Basecall using signal thresholds
- Typical run yields at least 200,000 100bp sequence



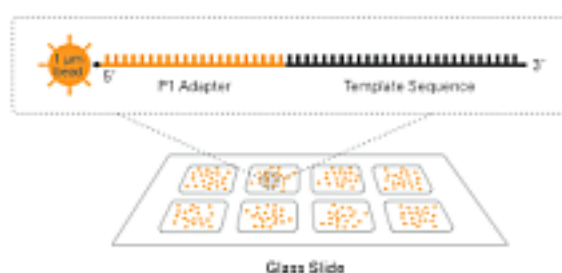
2. SOLID technológia

A szekvenálás oligonukleotid ligálással és detektálással (SOLiD: Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection) technika 2006 - ban született meg. Előnye, hogy nagyságrendekkel alacsonyabb költségekkel dolgozik, mint a korábbi módszerek, viszont hátránya, hogy rövid leolvasott szekvenciákat eredményez (ezért például genom projektekhez nem igazán alkalmas). Az eljárás ebben az esetben is azzal kezdődik, hogy

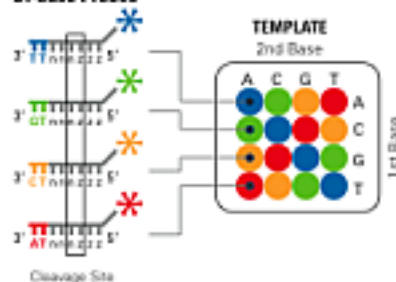
feldarabolják a genomot (35 - 50 bázis hosszú fragmentumok ra), és egy fragmentum könyvtár at hoznak létre. Először a fragmentumok két végére különböző adaptereket (pl. A1 és A2) ligálnak. Második lépésként a szálat mágneses gyöngyökhöz kapcsolják úgy, hogy az 1µm - es gyöngyökhöz kapcsolt P1 és P2 primerek hibridizálnak a komplementer A1 és A2 templát végekkel. Minden gyöngyhez csak egyféle DNS d arab kapcsolódik. Ezt követően emulziós PCR - rel felszaporítják a szálat a gyöngyök felszínén, denaturálják a templátot és a gyöngyöket kovalensen szekvenáló lemezre kötik. A szekvencia meghatározás itt ligálással történik olyan oligonukleotidok segítségével, melyek oktamerek, vagyis 8 nukleotidból állnak, és négyféle fluorofórral jelölik őket (ábra).



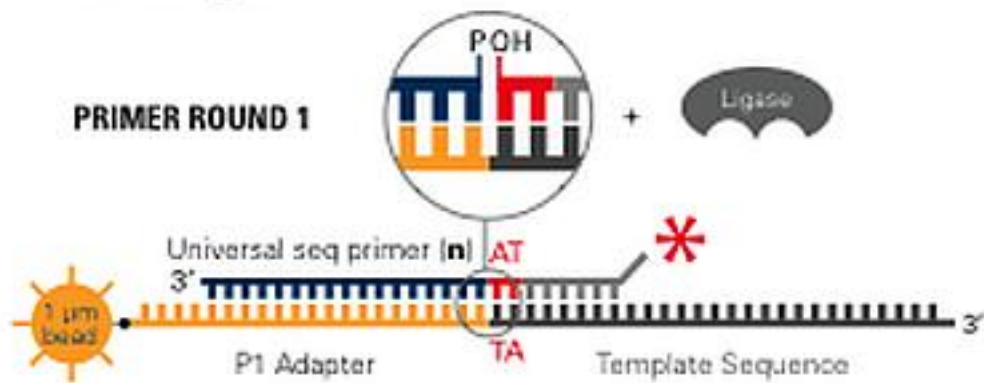
SOLiD™ Substrate



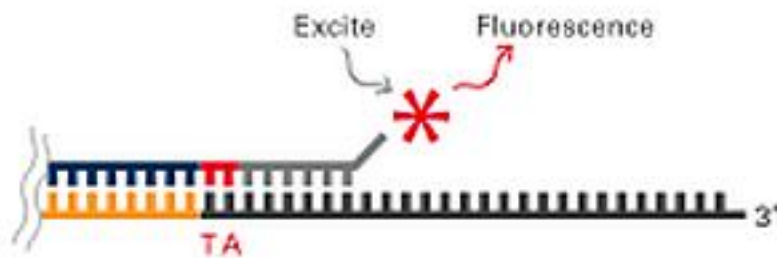
Di-base Probes



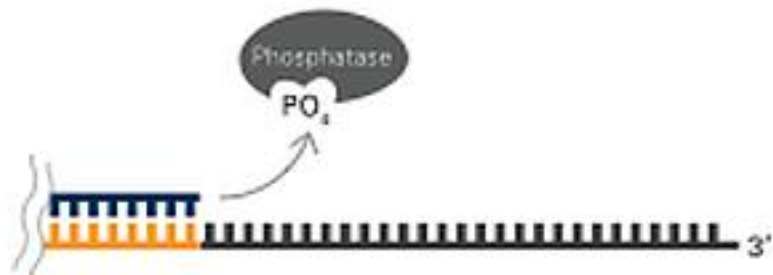
1. Prime and Ligate



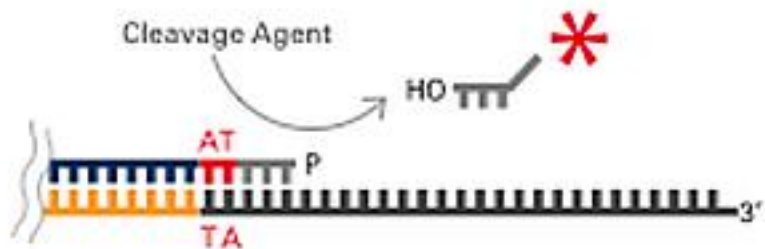
2. Image



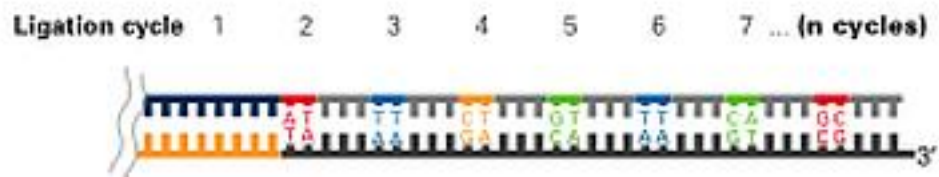
3. Cap Unextended Strands



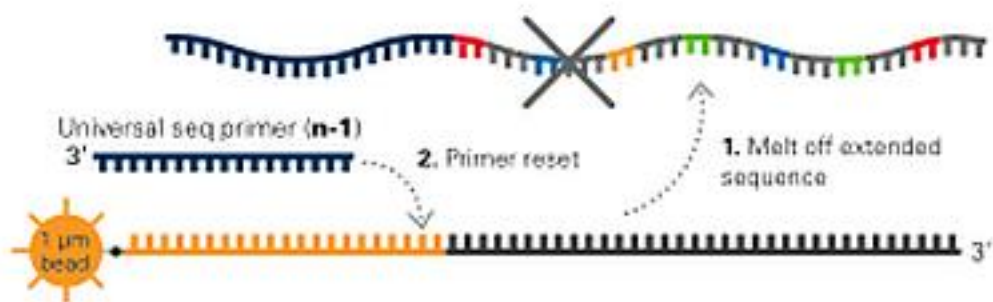
4. Cleave off Fluor



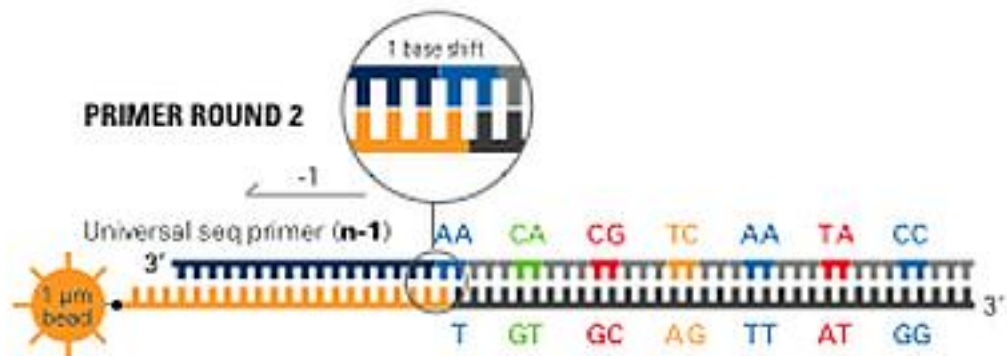
5. Repeat steps 1-4 to Extend Sequence

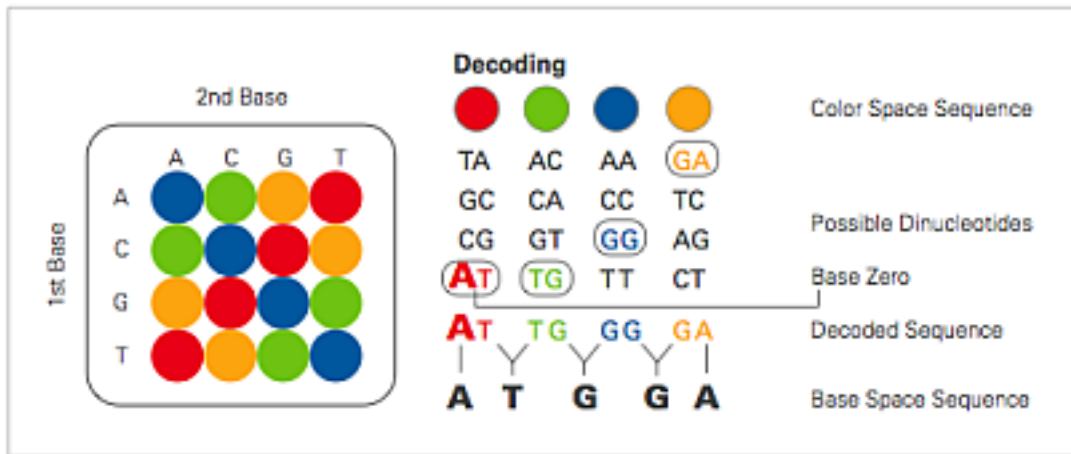
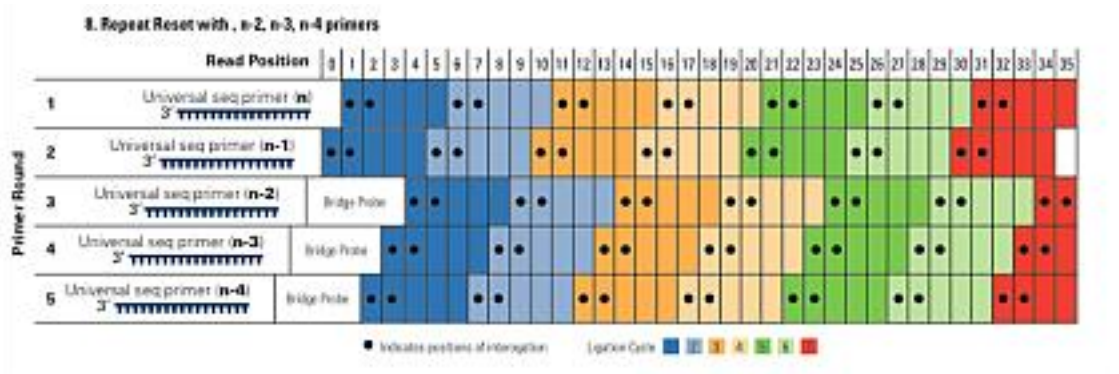


6. Primer Reset



7. Repeat steps 1-5 with new primer





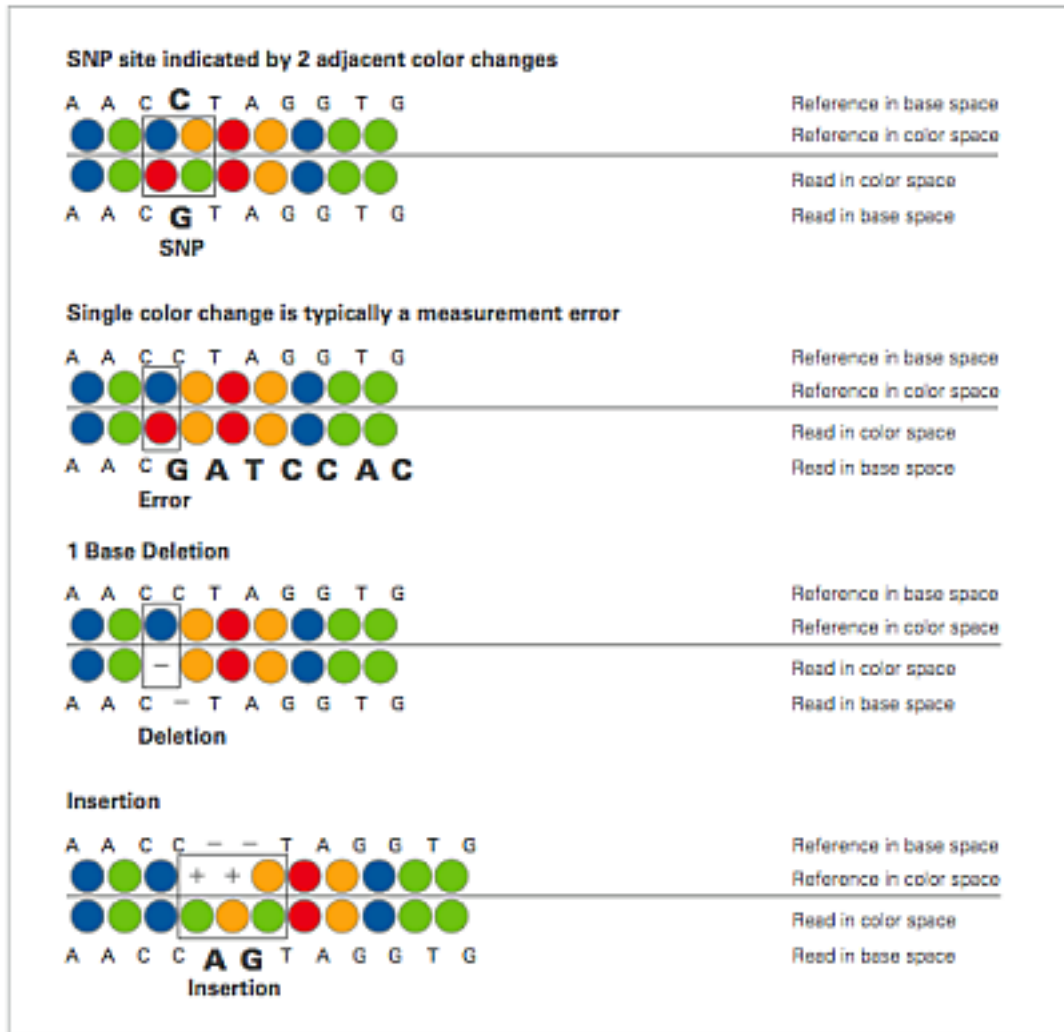
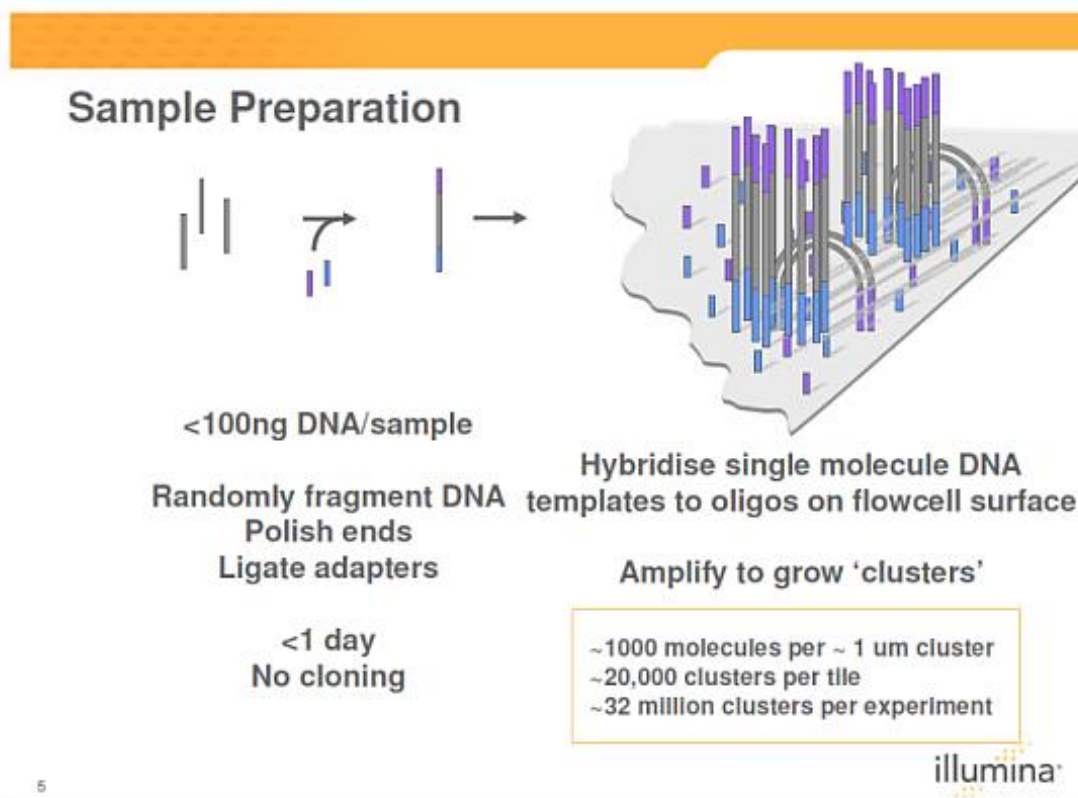


Figure 5. Examples of polymorphisms in color space.

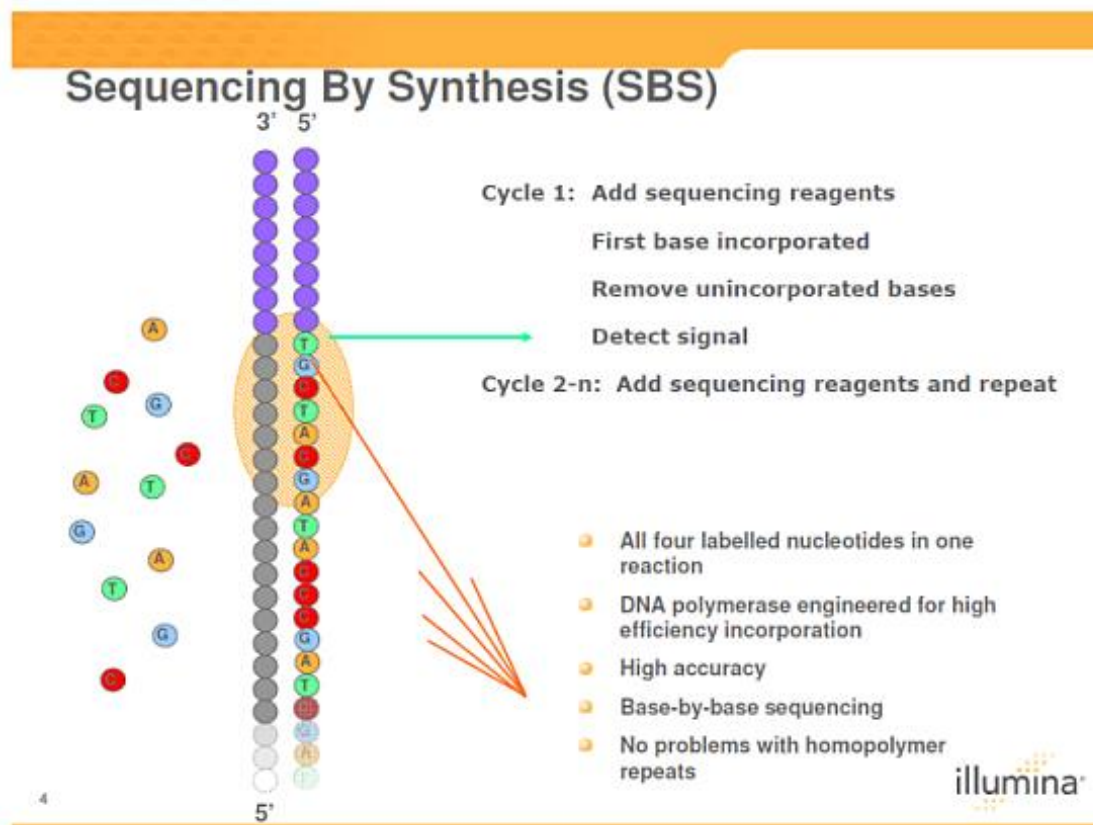
3. Illumina

Ezt a módszert a Solexa cég fejlesztette ki, amelyet az Illumina cég később felvásárolt. Jellegzetessége, hogy ez volt az első rövid leolvasásokat végző technika. A szekvenálni kívánt DNS-t (akár teljes genomot) apró, 100 bp-os darabokra fragmentálják. A dupla szálú DNS két végét kijavítják (ragadó s végek eltüntetése), és egy adeninnel töldik meg az 3' végeket. Ehhez egy timin túlnyúló véggel rendelkező adapter DNS-t ligálnak. A ligált DNS-darabokat ezt követően szelektálják, és egyszálúsítják NaOH-dal. Majd a mintát egy szekvenáló lemezre viszik fel, ahova az adapterrel komplementer oligonukleotidokat (primerek) horgonyoznak ki. Ezekhez hibridizáltatják a DNS fragmentumokat. E után az ún. híd-amplifikációs (bridge amplification) módszerrel (ld. 5.7. ábra) klasztereket képeznek az egyes szálak között és felszaporítják a megfigyelni kívánt DNS-szakaszt. 5.7. ábra: A Bridge-amplifikációs módszer. A felszínen történő amplifikáció állandó hőmérsékleten (60°C) zajlik megfelelő puffer és denaturáló formamid (ekvivalens a denaturációs lépéssel) jelenlétében. Minden reagens egy ciklus erejéig van jelen, aztán lemosódik. A PCR reakció végén kapott dupla szálú DNS templát szálát (amit eredetileg hibridizáltak a horgonyra) formamiddal leválasztják és lemosják. Az egyszálú DNS elhajlik, és a szabad végével egy másik lehorgonyzott primerrel hibridizál. Ezzel is végbemegy a PCR, és a végső denaturáció. Ezt követően az átírt szálak egymással vagy másik primerrel hibridizálhatnak és duplikálódhatnak. 35 ciklussal később nagy számmal lesznek jelen a DNS-darabok, melyeket végül denaturálnak és készen állnak a szekvenálásra. [alternatív szöveg: A Bridge-amplifikációs módszer] Maga a szekvenálás itt is szintézissel történik. A templáthoz egy primert ligálnak, majd a reakcióhoz egyszerre adják hozzá a 4 nukleotidot (reverzibilis terminátorok, ld. 5.8. ábra), melyeket különböző fluoreszcens jelöléssel látnak el. A beépült nukleotid fluoreszcens jelét CCD kamerával detektálják. A nukleotid beépülése után kémiai úton levágják róla a fluorofórt és a 3' blokkolót, majd lemosják a be nem épült nukleotidokkal

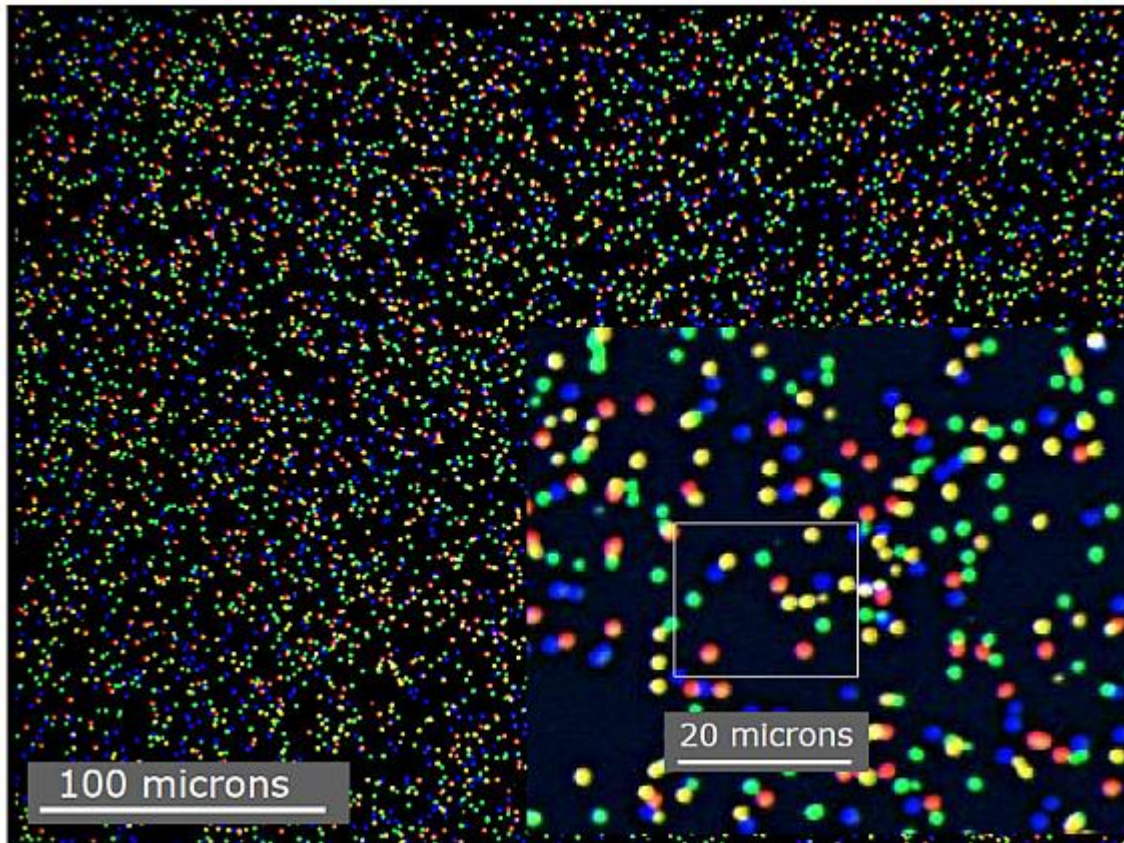
együtt. Ezzel a módszerrel a humán genomot 7 - 10 nap alatt lehet szekvenálni, ráadásul a költségek is alacsonyabbak.



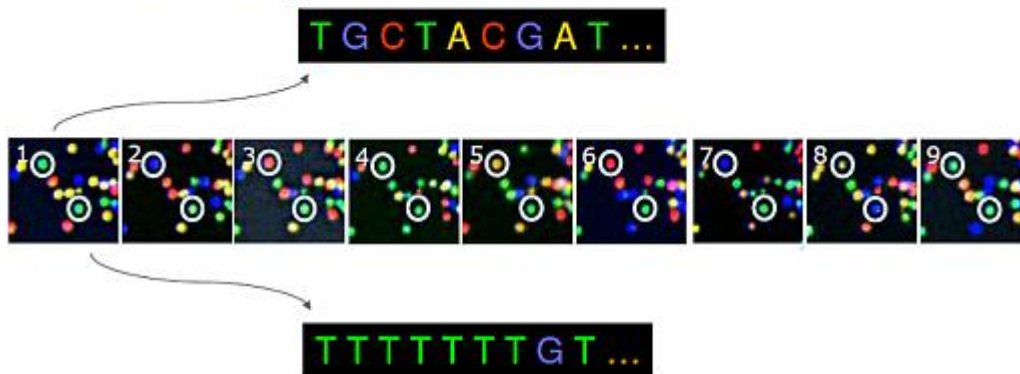
5



4



Base Calling From Raw Data



The identity of each base of a cluster is read off from sequential images

38. fejezet - Ellenőrző kérdések:

1. Milyen a genomja a fonalas fágoknak a sejten belül és az érett fágban.
2. Mi történik a gazdasejttel fonalas faggal történő szaporítás után?
3. Mire jó a fág display, epitóp könyvtár technika_
4. Az érett lambda fág genetika anyagának jellemzői.
5. Milyen életciklusai vannak a lambda fágoknak?

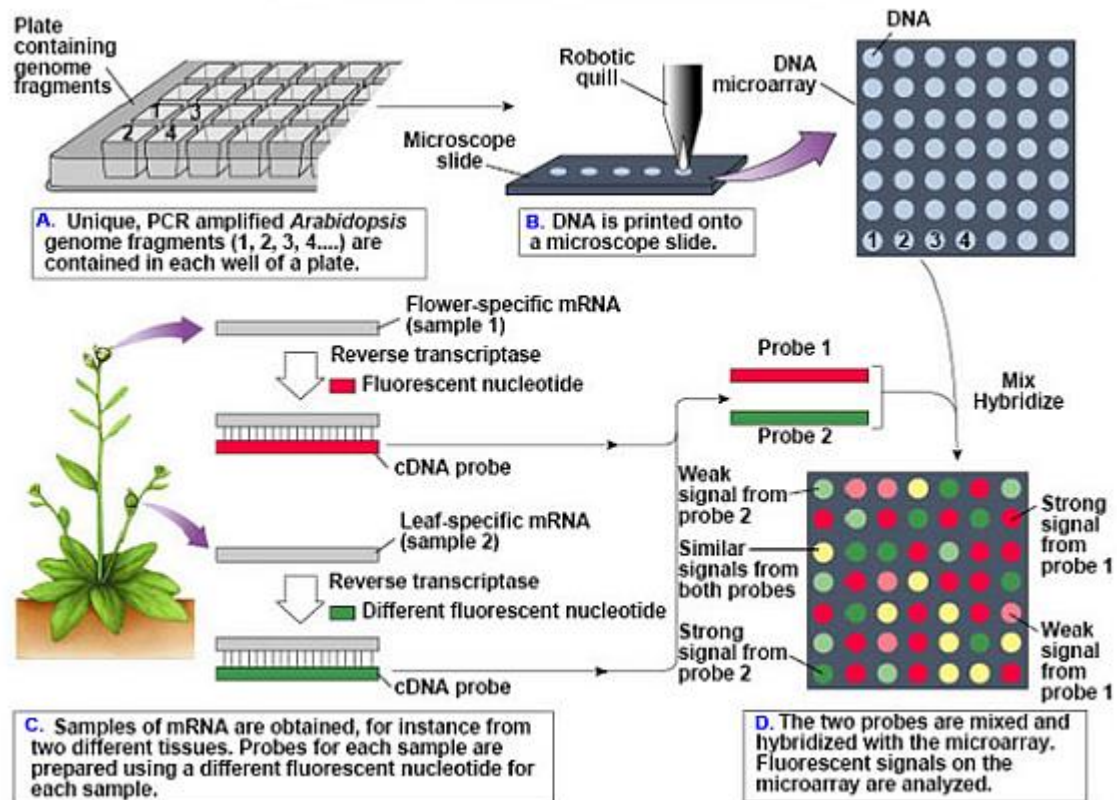
X. rész - Funkcionális genomika: transzkriptomika

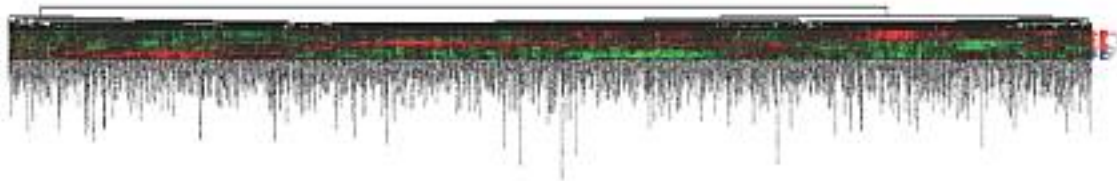
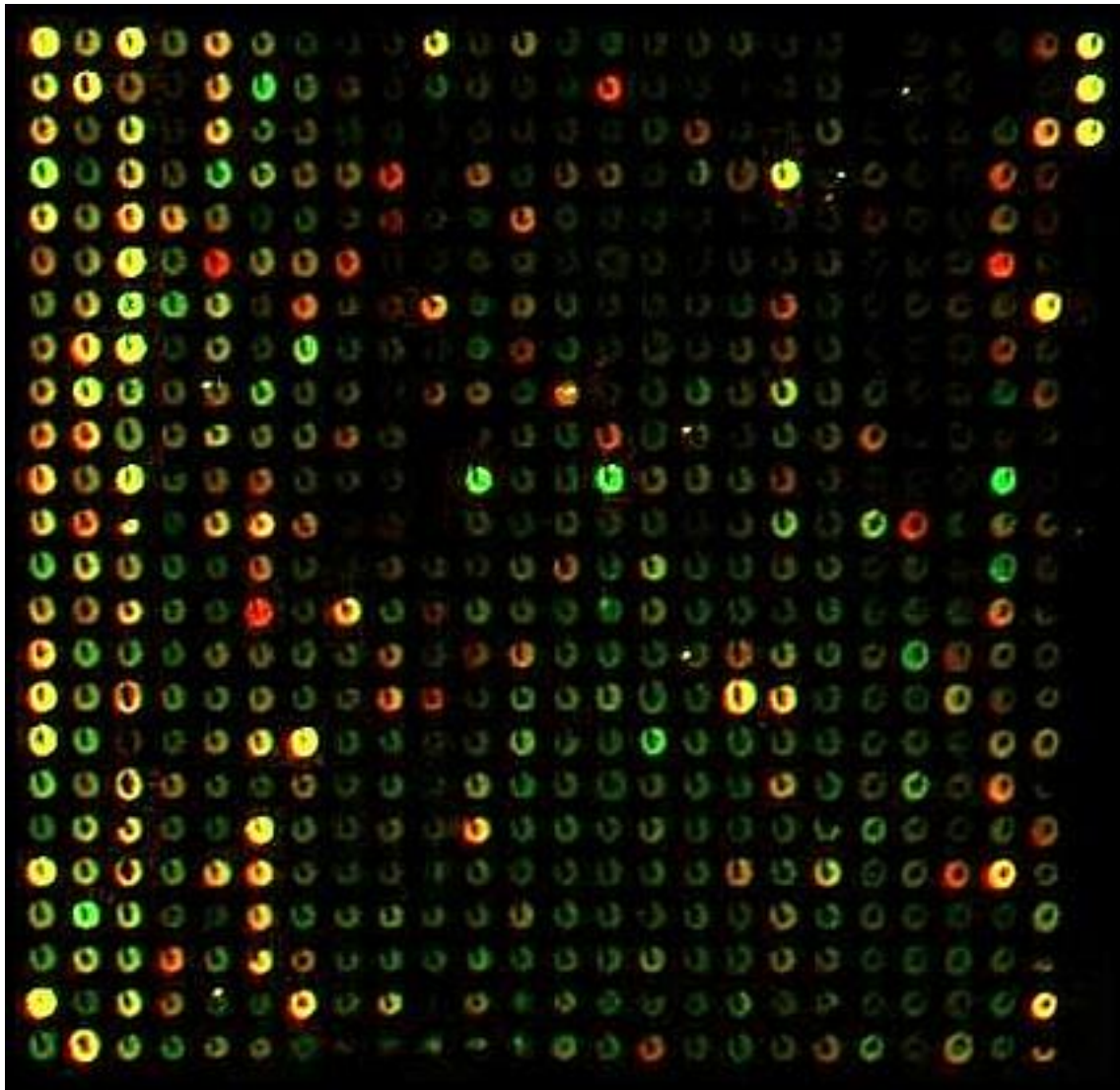
A microarray technológia során első lépésként olyan biológiai csipeket (cm² –es nagyságrendű) állítanak elő (ezek megvásárolhatók, vagy megfelelő laboratóriumi háttérrel a felhasználó maga állítja elő), amelyekre rendezetten, sorokban és oszlopokban több ezer, esetleg tízezer jól azonosítható ponton nukleinsavdarabokat (oligonukleotidokat) vagy cDNS (mRNS DNS-re visszaírt formáját) láncokat visznek fel. Felvitelükhöz (mások mellett) az úgynevezett „fotolitográfia” szolgál, amely során nukleotidokként („szintenként”) fényérzékeny védőcsoportokkal ellátott, előre meghatározott nukleotidokból építik fel a 8-20 elemből álló láncot. Az eljárás során megfelelő pontokon átluggatott „maszkok” segítségével alakítják ki a kétdimenziós mintázatot. Ha cDNS-ek felvitele történik, mikrocseppeket alkalmaznak, így kerülnek az ismert szerkezetű cDNS-molekulák a helyükre. A felvitelre használandó felületek továbbfejlesztése jelenleg és a közeljövőben minden bizonnyal tovább emeli az így kialakított elrendezés („array”) sűrűségét, tehát az egyidejűleg analizálható gének számát.

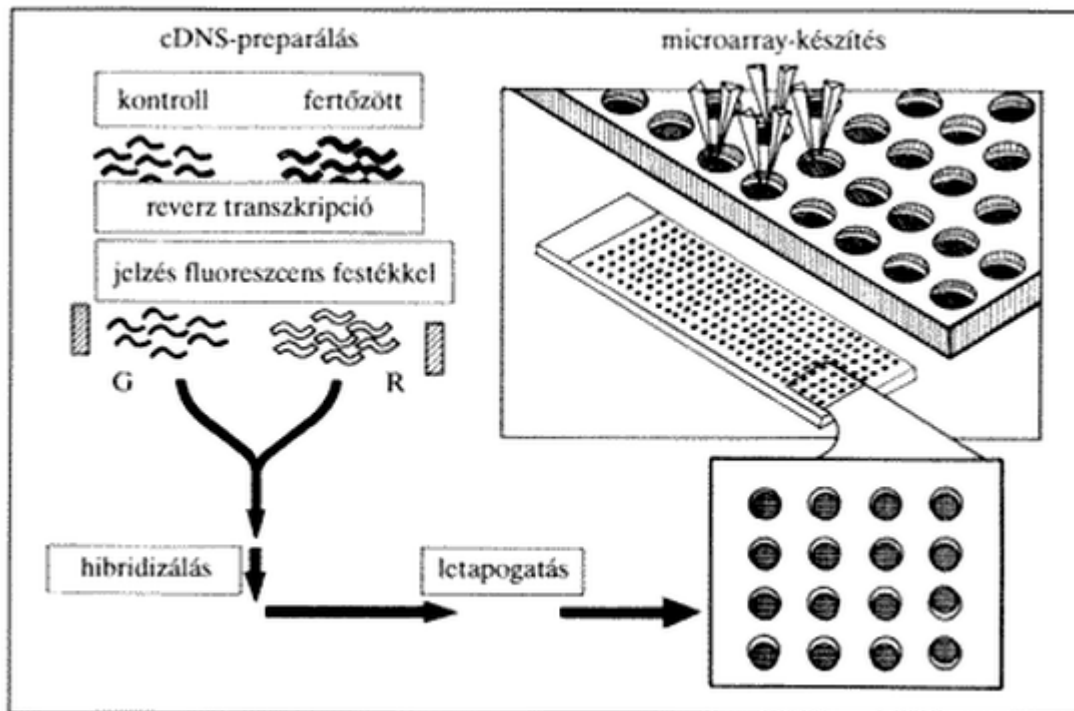
E topográfiai információkat és az egyes pontokra felvitt nukleinsavdarab pontos szekvenciáját számítógépen rögzítik. Az így előkészített array-t inkubálják („hibridizálják”) az ismeretlen minta valamilyen színes (például zöld vagy piros) festékkel jelzett nukleinsavdarabjaival. Előfordul, hogy az ismeretlen minta nukleinsavdarabjait a jelzés előtt polimeráz láncreakcióval bővíteni kell. Megfelelő ionerejű és hőmérsékletű oldattal átmosva őket, csak a részlegesen vagy teljesen azonos nukleotid-komplementaritást mutató darabok maradnak a csip felszínén. Általában a rögzített oligonukleotid közepén található bázisok eltéréseinek kimutatása a legegyszerűbb, itt mosható le legérzékenyebben a „mismatch”, vagyis a nem tökéletesen illeszkedő nukleinsavminta. DNS-csipeknél, ahol egy-egy pontmutációra kérdez rá a vizsgáló, ennek megfelelően tervezik az oligonukleotidokat.

A leolvasás a csip felszínének pásztázó értékelését jelenti, az érzékelő az egyes pontok színét, intenzitását rögzíti. Ezt követi a bioinformatikai elemzés, tehát a pontthalmaz színelemzése, az adatok szétválogatása és az értékelő csoportosítása.

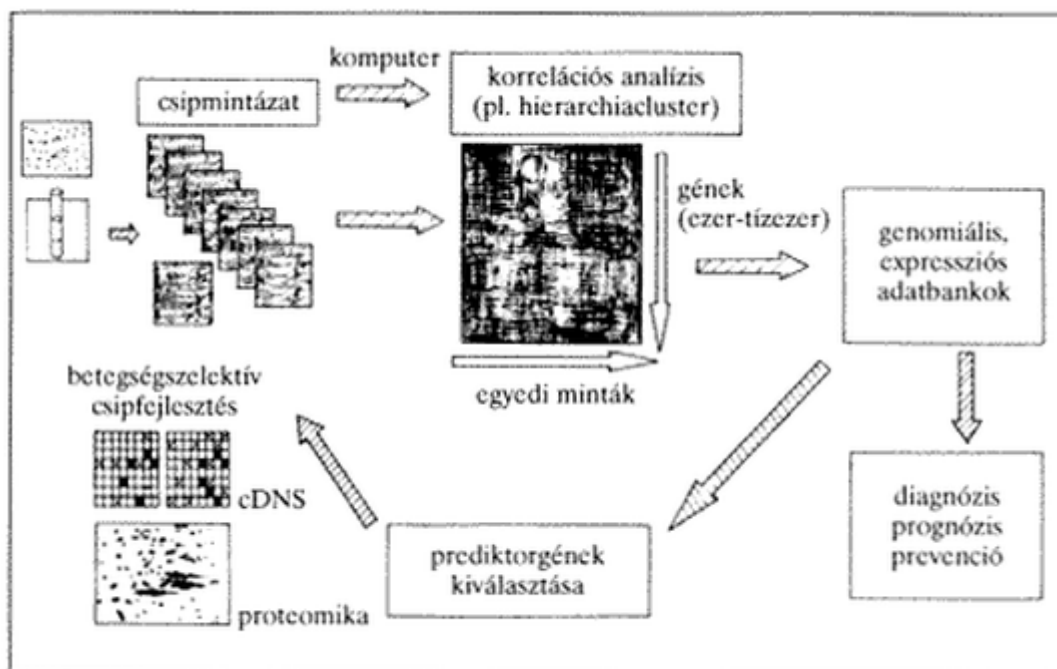
A DNS-csipeken mutációk (például nukleotidcsere) jelenlétét vagy hiányát keressük. Ez a módszer veleszületett génhibák, illetve az úgynevezett „single nucleotide polymorphism” (SNP) vizsgálatára használható. Utóbbiak pontmutációk, amelyek mint független genetikai allélok kezelhetők, kombinált vizsgálatuk individuális genetikai jellegzetességek követését teszi lehetővé. Több száz vagy ezer SNP egyidejű leolvasása kitűnően alkalmazható betegségek azonosítására, de akár gyógyszer-mellékhatások kimutatására is (lásd később). Génexpressziós microarray esetén a kérdés az, hogy két összehasonlítható mintában (például egy sejt vagy szövet két aktivációs állapota, egy biológiai hatóanyag hatása a kontrollhoz képest, egy egészséges és egy betegből származó szövetminta összehasonlítása stb.) milyen gének fejeződnek ki, és ezek mennyiségileg hogyan viszonyulnak egymáshoz. Ezt génexpressziós profilnak nevezik. A profilok összehasonlításával felismerhetők és azonosíthatók az adott hatásra jellemző gének. Technikailag ez úgy történik, hogy a kétféle mintából származó mRNS-mintát, illetve azok cDNS-re átirított formáját kétféle festék (például zöld és piros) egyikével jelölik, majd keverve a két populációt, hibridizálják azt a mikrocshipel (1. ábra). Amennyiben az egyik (például zöld festékkel jelzett) mintában az adott csipponponon reprezentált gén erősebben fejeződik ki, a leolvasás itt „zöldebb” pontot fog detektálni, fordított esetben viszont „pirosabb” lesz. A legtöbb esetben a két szín megfelelő kombinációja jelzi a két mintában egy adott gén kifejeződési arányát. Lehetséges az is, hogy a rögzített expressziós mintázatot ezután adatbankokban már megtalálható, korábban ugyanezen microarray-el nyert kétdimenziós mintázatokhoz hasonlítják, és kiemelik a hasonló eloszlású profilokat. Nyilvánvalóan, a különböző hatásokhoz különböző génkifejeződési mintázatok tartoznak. Például a sejtek különböző receptorain keresztül kiváltott jelátviteli útjainak génexpressziós mintázatát elemezve, azonosítani lehet ismert szignálok molekuláris következményeit mRNS-szinten. Nagyon lényeges az ebben az összeállításban részletesen nem tárgyalt proteomikai megközelítés is. Ekkor nem cDNS, hanem protein/peptid mintázatok összehasonlítására kerül sor, például kétdimenziós elektroforetogrammal. Immunológiai példával élve: a B-limfocitákon elvégezhető az immunglobulin-receptorok, citokinreceptorokon ható jelek, vagy például hisztamininhibitorok hatásának molekuláris követése. Kitűnően azonosíthatóak a genetikai beavatkozások (például antiszensz hatások, domináns negatív mutáció, génkiütés) hatásai is.







Az egyes csipekről bekerülő adathalmaz bioinformatikai elemzése nyomán a számítógép clusterekbe rendezi a kapott információkat (2. ábra). Erre egy példa a hierarchiacluster korrelációs analízis. Itt egy olyan mátrix ábrázolás az elemzés eredménye, ahol az egyes oszlopok az egyedi mintákat, az egyes sorok az egyes géneket jelentik. A számítógépes összerendezés lényege az, hogy a hasonló, majd egyre kevésbé hasonló géneket kifejező mintákat csoportokba rendezve tünteti fel. Az egész csip munkalogisztikája tehát úgy fest, hogy az egyes mintákból származó egyedi microarray adatok bioinformatikai összegzése után a számítógépes adatbankok meglévő mintázatkönyvtárai segítségével következtetéseket vonunk le. A következtetések természete biomedicinális területen legalább kétféle.



1. Diagnosztika (betegségmegállapítás), prognosztika (betegségkockázat becslése), esetleg megelőzés. 2. Olyan géncsoportok kiemelése, amelyek előre jeleznek valamilyen – például betegségi – állapotot, szövődményt, mellékhatást, tehát van predikciós potenciáljuk. Ez utóbbi lehetővé teszi a csip egy második „generációjának” („diagnózis” csip) előállítását is, amin már csak kizárólag a „betegségspecifikus” gének szerepelnek. Ez esetenként már „csak” néhány tucat génnel létrehozandó, nyilvánvalóan olcsóbb „makrocsipet” igényel. Ma már lehetséges szövettani blokkokból is rendezett microarray-t készíteni, esetenként akár több száz szövettani blokkból kiemelt hengerek együttes metszése nyomán létrehozott készítményen. Ezen akár nukleinsav-expressziós (például in situ génamplifikáció), akár proteomikai analízis is végezhető. Rendelkezésre állnak olyan fixáló reagensek is, amelyek speciálisan protektívak a minta RNS-tartalmát illetően.

39. fejezet - Gyakorlati példák az orvosbiológiából és egy egérmódel

A továbbiakban néhány, a biomedicina területéről vett példán, és egy kísérleti egérmódelen keresztül mutatom be a génexpressziós vizsgálatokat.

A daganatok. A Bethesda, az MD, az Egyesült Államok sejtbankjaiból 60 különféle emberi daganatos sejtvonall génkifejeződési mintázatát 1161 gén párhuzamos vizsgálata alapján állapították meg. Ennek során olyan bioinformatikai analízist végeztek, amely kimutatta a különféle szövettani eredetű ráksejtvonalak génexpressziós profiljaiban látható hasonlóságokat és eltéréseket. Ez az adatbank ettől kezdve összehasonlításként szolgálhat egyedi tumorok jellemzésére.

Egy másfajta bioinformatikai megközelítés a rendelkezésre álló génkifejeződési adatok alapján olyan halmazokat képez, amelyekbe olyan gének kerülnek, amik a legnagyobb eltérést mutatják a betegség kimenetelében. Így sikerült például melanómában szenvedő (festékes bőrrák) betegek májáttételét jósoló vagy azt nem valószínűsítő géneket kiemelni. Ezek a gének együttes expressziójuk esetén óriási valószínűséggel mutatják a melanóma beteg várható májáttétét. Ennek korai felismerése nyilvánvalóan gyökeresen más terápiás stratégiát sugall a kezelőorvos számára. Ma már olyan csipek is léteznek, amelyek egy-egy sejt expresszáladó génjeit foglalják magukban, ilyen például a limfocsip, amely az emberi limfociták kifejeződő génkészletét tartalmazza. Ennek felhasználásával sikerült például az úgynevezett „diffúz, nagy sejt B-sejtlimfoma” betegséget alcsoportokra bontani, amit eddig a hagyományosabb szövettani, immunológiai, sőt molekuláris módszerekkel nem értek el. Az expressziós microarray eljárással a betegeket két csoportra osztották: a germinális centrum B, illetve aktivált B jellegű betegekre. Az eredmény jelentősége az, hogy az előbbieket betegségkilátásai (például a túlélési idő) sokszorosan jobbakként az utóbbiakénál. Ez megint a kezelési stratégiákban jelent segítséget a klinikus orvosnak.

A fertőzések. A terjedő és súlyos vírusfertőzések (például a hepatitisz, a HIV) az egyre nagyobb és kiterjedtebb rezisztenciával jellemezhető bakteriális és gombafertőzések miatt az egészségügyi (gyógyító és megelőző) ellátás világszerte növekvő kihívás előtt áll. Központi jelentősége van a vakcinációnak abban, hogy az egyes fertőzések epidemiológiai következményeit megértjük.

A fertőzésigenomika a mikroorganizmusok és a gazdaszervezet kölcsönhatásának egyedi és fajspecifikus elemeit vizsgálja. Sikerült például a Bordetella alcsoportok eltérő patogenitása és génexpressziós mintázatai között összefüggést találni.

A szerkezeti és funkcionális genomika ígéretei igen jelentősek a fertőzésbiológiában. A nem túl távoli jövőben lehetségesnek látszik olyan DNS/cDNS mikrocip előállítás, amely potenciálisan minden ma ismert vírus, baktérium és mikroszkopikus gomba összes specifikus génjét tartalmazza. Lehetségesnek látszik tehát a mikrobiológiai diagnosztika felgyorsulása, és az is, hogy a megfelelő rezisztenciagének kimutatásával például az antibiotikum-érzékenység az eddigieknél sokkal gyorsabban derüljön ki. Hatalmas lehetőség a vakcinakészítés genomikai megközelítése, a mikroorganizmusból a megfelelő immunológiai „céltabletták” (epitópok) hatékony és gyors kiemelése, sőt a beteg egyéni genetikai jellegzetességeihez igazított egyéni vakcinatervezés is.

Az allergia. Korunk egyik terjedő népbetegsége az allergia, az azonnali túlérzékenység és az ehhez kapcsolódó krónikus gyulladásos betegségek (például asztma) arányának emelkedése. A környezetbiológiai okok feltárása mellett, úgy látszik, a szerkezeti és funkcionális genomika is nagy szerepet játszik a biomedicinális kutatásban és gyakorlatban. A Semmelweis Egyetem Bőrgyógyászati Klinikájával közösen sikerült például új, eddig nem ismert, vagy funkciójukban nem azonosított géneket találni az atopias dermatitis nevű betegségben. Az érintett gének annotációja (a funkció azonosítása) folyamatban van, remélhetőleg akadnak köztük olyanok is, amelyek új gyógyszerképpontokként jelölhetők ki.

Fontosnak látszik egyes kemokin- (sejtek mozgását szabályozó citokinek) gének genomikai elemzése, hiszen például az eozinofil sejteknek légzőrendszerbe vándorlása az asztmára való „hajlam” egyik fontos tényezőjének tekinthető. A legfontosabb bioaktív mediátorok egyike a hisztamin. Ennek egyik receptorán genomikai módszerekkel sikerült olyan, a jelátviteli funkciót érintő eltérést találni, amely szerepet játszik mind az allergiában, mind egyéb (tumoros, gasztroenterológiai) folyamatokban.

Sportgenomika. Genomiális szinten sok génről derül ki, hogy allélváltozataik nem különböznek bizonyos fizikai tulajdonságok szempontjából. Ezek genomikai elemzése edzésterv módosítását teheti lehetővé. Expressziós csipek felhasználásával az izomszövet öregedésének jellegzetességeit is sikerült jellemezni.

Gyógyszerkutatás. A farmakogenomika a genomikai analíziseknek az egyik sikerágazata. A már említett SNP-csipek révén mellékhatás jóslása is végezhető. A vizsgálat úgy történik, hogy egy adott betegségben (például Alzheimer-kór) kiválasztanak egy adott gyógyszerre mellékhatást mutató és nem mutató csoportot, majd az SNP-csipek eredményeinek bioinformatikai elemzésével keresnek olyan SNP-mintázatot, amely az egyik, vagy a másik csoportra jellemző. Ezután, a következő betegen már csak az SNP-profilt kell meghatározni. Ebből már nagy eséllyel megjósolható, hogyan hat a betegre az adott gyógyszer. Ez a technika az egyénre szabott gyógyszeradagolás mellett hosszabb távon még a gyógyszergyártás költségeit is csökkenteni fogja, hiszen sok hatóanyagot nem kell kidobni, csak a megfelelő célcsoportot kell hozzá megkeresni.

A farmakogenomika másik sikeres iránya a gyógyszer-metabolizációt feltáró (például Cyp450) fehérjék vizsgálata.

Az egérmodell. A génmodifikált egerek fenotípusának vizsgálatakor nagy segítséget nyújthat a genomikai elemzés. Mi hisztamintermelésre képtelen egerek (hisztidin-dekarboxiláz „knock-out”) embrióit vizsgáltuk három különböző expressziós csippel. Munkánk során a normális („vad”) és az ugyanolyan törzsből származó, de hisztaminmentes egerek embrionális szövetből nyert mRNS cDNS formáit használtuk. Mintegy 10 000 egérgént vizsgálva, a gének 5-8 százalékában találtunk változást a gének expressziós mintázatában. A hisztaminhiány miatt megváltozott kifejeződésű gének azonosítása folyamatban van.

40. fejezet - Ellenőrző kérdések:

1. Mik a helyettesítő lambda vektorok?
2. Milyen elemeket tartalmaznak a kozmidok?
3. A YAC vektorok elemei.
4. Mi a transzformáció?
5. Mi a transzformációs hatékonyság?

XI. rész - Proteomika

A sejt fehérjetartalmának kvalitatív és kvantitatív jellemzése.

A proteomika kifejezést először 1995-ben használták egy sejt, szövet vagy szerv összes fehérjéjének kvalitatív és kvantitatív meghatározására (Anderson és Anderson, 1996). A proteomagenomáltal kifejezett teljes fehérjeállomány (PROTEins expressed by the genOM). A megfelelőfelbontású elválasztástechnika kialakulásának mérföldköve 1975 volt, amikor O'Farrell elsőként alkalmazta a kétdimenziós gélelektroforézist *Escherichia coli* radioaktívanjelzett fehérjéinek tanulmányozásához. A technika nagy felbontóképessége néhány ezer fehérje elválasztását is lehetővé teszi egyetlen egy gélben. Ebben az időben a fehérjék azonosítása azonban a gélen elválasztott kis mennyiség és a megfelelőérzékenységtüchtechnika hiányában, nehezen volt megoldható. A proteomika történetében a következőkiemelkedőesemény az Edman szekvenálás érzékenységének növelése volt az elektroforetikusan átblottolt fehérjék azonosítására, mikroszekvenciális technikával (Aebersold és mtsai., 1988). Napjainkban a leggyakrabban használt fehérjeazonosítási technikák az elektropray ionizációs (ESI) és a mátrixhoztkötött lézer ionizációs(MALDI) tömegspektrometria. Kifejlesztésük John Fenn és Koichi Tanaka nevéhez fűződik. Munkájukat 2002-ben kémiai Nobel-díjjal jutalmazták.

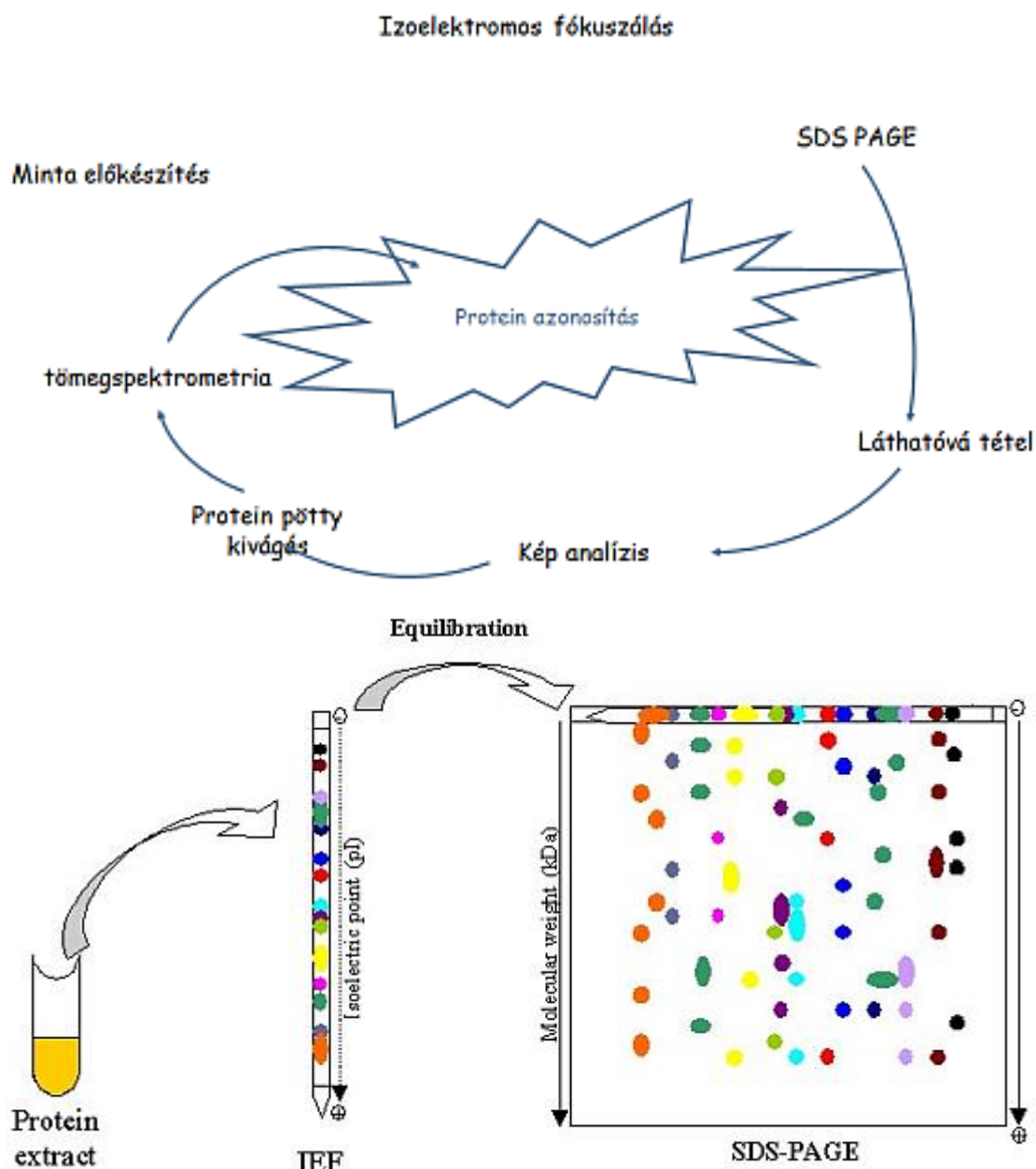
A kezdeti meghatározás után mamár több csoportját különböztetjük meg a proteomikai módszereknek: expressziós proteomika, funkcionális proteomika, fehérje-fehérje kölcsönhatás, strukturális (szerkezeti) proteomika, fehérje poszt-transzlációs módosítások vizsgálata. Expressziós proteomika: egy adott minta különbözőkörülmények között expresszáldott fehérjéinek mennyiségi összehasonlítása. Az eljárás során lehetőség nyílik up vagydown regulált fehérjék meghatározására, pl. alacsony hőmérséklet hatásának vizsgálata lenmag fehérjékexpressziójára (Tafforeau és mtsai., 2002), szárazság-stressz hatása rizs levelének fehérje-összetételére. Funkcionális proteomika: a fehérjék szerepének meghatározása különbözőéletfolyamatokban és változó környezeti körülmények között. Strukturális proteomika: célja egy fehérje-komplex vagy egy adott sejtszerv összesfehérjéjénekazonosítása és szerkezetének meghatározása, pl. rizs mitokondriális fehérjéinek, *Arabidopsis thaliana*kloroplaszt proteomjának (Schubert és mtsai., 2002) vizsgálata. Az eredmények alapján információt kapunk az adott sejt felépítéséről és a meghatározott fehérje szerepéről. A fehérjék poszt-transzlációs módosításainatanulmányozása a proteomika egyik fontosterülete. Afehérjék foszforilációjának kiemelkedőszerepe van a jelátvitelben,a polipeptidek glikolizációjának (Kaji és mtsai., 2003) pedig a fehérjékközötti kölcsönhatásokban, illetve az enzimatis aktivításban. A fehérje-fehérje kölcsönhatások vizsgálatánakfontos szerepe van például az anyagcserefolyamatok megismerésében. A metabolizmusban részt vevőenzimek specifikitásukat nemegyszer fehérje-komplexek formájában érik el, más enzimekkel vagy alegységekkel összekapcsolódva. Ezen fehérje-komplexek összetételének, szerkezetének tanulmányozása az anyagcsere utak mélyebb megértését eredményezhetik.

A fehérjék szeparálása és azonosítása alapján a proteomikai vizsgálatok általánosan 3 csoportba sorolhatók: (a) a kétdimenziós gélelektroforézissal szeparált fehérjék azonosítása enzimes hidrolízis után tömegspektrometriával 17(b) a fehérjékből enzimes bontással előállított peptidkeverék elválasztása folyadék kromatográfiával (LC) vagy kapilláris elektroforézissal (CE), amit tömegspektrometriás azonosítás követ (c) mikroarray technikák Az 1. ábra a proteomvizsgálatok általános kivitelezéseit mutatja.

A proteomika számos bonyolult módszert kombinál a fehérjék azonosítására és mennyiségi meghatározására. Az elektroforézis nagy felbontóképessége, széleskörű alkalmazhatósága és a kíméletes reakciókörülmények miatt az egyik leggyakrabban használt technika a fehérjék elválasztására és azonosítására. A proteom összetételét láthatóvá tévő legfőbb módszer a kétdimenziós gélelektroforézis, amellyel tipikusan 1000-2000 fehérje különböztethető meg. A fehérjék elválasztása első dimenzióban izoelektromos pont alapján, majd a második dimenzióban molekulatömeg alapján történik. A 70-es években O'Farrell (1975) és Klose (1975) egyidőben, egymástól függetlenül alkalmazta elsőként a kétdimenziós technikát komplex fehérjeminták (testfolyadék, sejtek, szövetek, vagy organizmusok) szeparálására. Mind az izoelektromos fókuszálás, mind a molekulatömeg szerinti elválasztás denaturáló körülmények között történik. Az izoelektromos fókuszálás nagy karbamid koncentrációjú, nem-ionos detergenst tartalmazó oldat jelenlétében egy vékony, függőleges gélrúdban megy végbe, amit vertikális SDS-PAGE követ a második dimenzióban. Az ebben a formában nehezen kivitelezhető kétdimenziós elválasztástechnikai problémáit Bjellqvist és mtsai. (1982) úgy oldották meg, hogy az elválasztást mindkétdimenzióban vízszintes rendszerben végezték. A 2-DE további problémái - a rossz ismételhetőség, anem megfelelőfelbontás, illetve a szélsőségesen savas (pH kisebb 3-nál) vagy bázikus (pH nagyobb 10-nél) fehérjék szeparálásának nehézségei - azonban az elsődimenzióban végzett izoelektromos fókuszáláshoz kapcsolódtak. Mindezek feloldására fejlesztették ki az immobilizált pH gradienst (IPG)

tartalmazó stripeket (gélcsíkot), ami poliakrilamid gélhez kovalensen kötött akrilamido (Immobiline TM) pufferekből épül fel.

Az IEF leggyakoribb kivitelezési módja a pH gradienst tartalmazó lágy gélbentörténőelválasztás, amikor a gél vékony fóliához polimerizálják és rászárítják. A száraz formában lévő géleket (strip) első lépésben rehidratálni kell, ami történhet mintával, illetve minta nélkül is. A fehérjék molekulatömeg szerinti elválasztását a polipeptidek ekvilibrálása előzi meg. Ennek az elsődleges célja a fehérjék SDS-sel történő beburkolása és egységes pH-kialakítása a strip teljes hosszában. Ezt a cisztein oldalláncok újbóli redukálása és alkilálása követi. A redukálás DTT-vel történik, amelynek célja a visszaalakult kénhidak megszüntetése. A második lépésben a redukált cisztein oldalláncokat jódecetsavval alkilálják. A jódecetsav alkalmazásának másik célja, a feleslegben lévő DTT megkötése a rendszerben. Az ekvilibrálóoldat alapvető komponense a glicerol, amelynek alkalmazásával az elektroosmózis kiküszöbölhető.

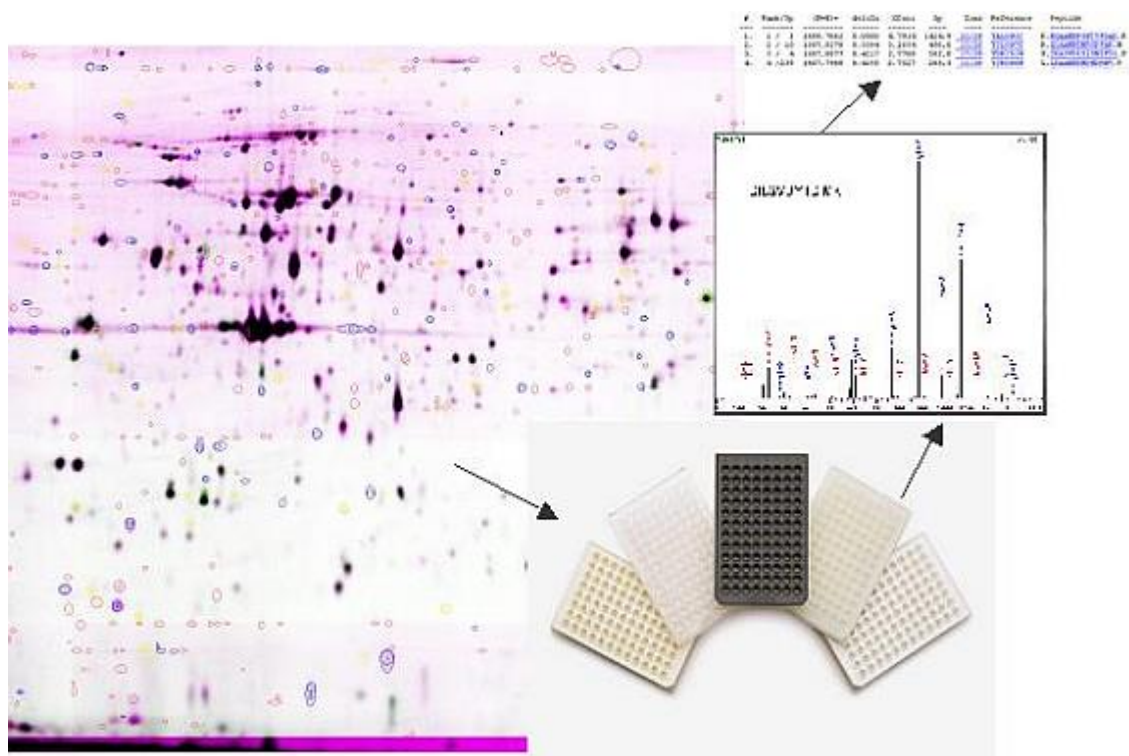


Az elektroforetikus elválasztás után a szétválasztott és rögzített fehérje-komponensek detektálására alkalmazott általános módszerek a fehérjék festésén alapulnak. A poliakrilamid gélben elválasztott fehérjék detektálására a hagyományos festési eljárások mellett egyre érzékenyebb, speciális igényeknek megfelelő detektálási módszerek is rendelkezésre állnak. A proteomikai vizsgálatokban a hagyományos festési eljárások közül legelterjedtebb a Coomassie Blue és az ezüst festék alkalmazása. A Coomassie festésnek több száz módosított

eljárása ismert (Neuhoff és mtsai., 1985). Gyakori használatának az oka, hogy egyszerű, olcsó, ugyanakkor tömegspektrométerrel kompatibilis festék. Az R-250 formáját ún. Regresszív festési módszerrel alkalmazzák (Mamone és mtsai., 2005). Az eljárás első lépésében magát a poliakrilamid gél telítik a festékkel, majd többszöri mosási lépéssel halványítják sötét háttérre. A festék ugyanis erősebben kötődik a fehérjékhez, mint a gél mátrixhoz (Patton, 2002). A G-250 esetében ún. progresszív festési eljárást végeznek (Neuhoff és mtsai., 1988). Az általában tömény savat (TCA, foszforsav), ammónium-szulfátot és metanol/etanolt tartalmazó kolloid festékkoldatban kolloid, illetve a diszperz formában jelen lévő festékrészecskék egyensúlyban vannak. A festés során a diszperz részecskék áthatolnak a mátrixon és a fehérjékhez kötődnek, a kolloid részecskék viszont nem képesek a gélbe jutni, ennek eredményeként a háttér nem festődik. Az ezüsfestést 1979 óta alkalmazzák, a legérzékenyebb festési eljárások egyike. Hátránya viszont, hogy nem „végpontos” festés, tehát nem alkalmas mennyiségi analízisre. A poliakrilamidgél elsőként ezüsttel telítik, majd eltávolítják a gél mátrixhoz kötött fémionokat és redukálják a fehérjéhez kötött ezüstöt. A proteomikai vizsgálatokban leginkább a Shevchenko és mtsai. (1996) által kidolgozott MS kompatibilis ezüsfestési eljárás terjedt el (Wang és mtsai., 2005). A fluoreszcens festékek közül a legelterjedtebb a SyproRuby (Lehesranta, 2006). Nagy érzékenységgel (kb. 1 ng/fehérjefolt), mennyiségi analízisre alkalmas MS kompatibilis festék.

A tömegspektrometriának számos alkalmazási lehetősége ismert a fehérjekémiában, úgymint: peptidek és fehérjék tömeg-meghatározása, izolált fehérjék (HPLC, PAGE) primer szerkezetének felderítése, poszt-transzlációs módosítások (acilezés, formilezés, amidálás, foszforilezés, szulfatálás, glikozilezés) detektálása, azonosítása és lokalizálása, fehérjebontási termékek, metabolitok azonosítása, fehérje-ligandumkötődések vizsgálata, enzimek aktív helyeinek felderítése, diszulfid hidak helyeinek feltérképezése valamint a proteomika. A proteomikai vizsgálatokban az elválasztott fehérjék azonosítására, szekvenciájuk meghatározására napjainkban a nagyérzékenységu elektropray (ESI) és mátrixhoz kötött lézer ionizáció-repülési idő (MALDI-TOF) tömegspektrométereket alkalmazzák, a „peptide mass mapping” és a tandem tömegspektrometriás (MS/MS) szekvenálási módszerekkel (2. ábra). A „peptide mass mapping” lényege, hogy a meghatározni kívánt fehérjét specifikus enzimmel (általában tripsinnel) vagy kémiai reagenssel fragmentálják, redukálják, alkilálják majd közvetlenül (nano-ESI, v. MALDI) vagy HPLC-vel történt elválasztás után (LC-MS) tömegspektrométerrel meghatározzák az egyes peptidek tömegét. Ezek a peptidtömegek szolgálnak bemeneti adatként a számítógépes adatbázis keresőprogramban, amely teoretikusan hidrolizál minden, az adatbázisban lévő fehérjét az alkalmazott fragmentálási reakciónak megfelelően. A kísérletesen kapott tömegadatokat a számítógép összeveti az adatbázisban található összes fehérjéből származó peptidtömegekkel, a fehérje azonosítása céljából. Már 3-4 peptidtömeg elég lehet a fehérje meghatározására, azonban több adat csak növeli a találat megbízhatóságát. Már többé-kevésbé egyértelmű az azonosítás, ha legalább öt peptidtömeg esetében lefedést tapasztalunk az azonosítani kívánt fehérje, illetve az adatbázisban megtalálható polipeptid peptidtömegei között és a szekvencia lefedettség minimum 15%. Ha eredményül több találatot kapunk, azaz nem lehet egyértelműen meghatározni, hogy melyik fehérjéről van szó, a tandem tömegspektrometriás eljárások segíthetnek pontosítani az eredményt. Ilyen eljárás a részleges aminosav-sorrend meghatározáson alapuló „sequence tag” módszer, amely megnöveli az adatbázisbontó keresés specificitását. A tömegspektrometriás „peptide mass mapping” gyorsasága és nagy érzékenysége miatt ma már nagyon elterjedt módszer fehérjék 2D gélből történő azonosítására.

A 90-es években számos kutató beszámol a MALDI ionizációs technika és a „peptide mass mapping” eljárás kombinálásáról, amelynek használata a korábbiaknál érzékenyebb és kiváló alkalmazási lehetőségekkel rendelkező fehérje azonosítási módszerhez vezetett (Geveart és Vandekerckhove, 2000). A vizsgált fehérje egyértelmű meghatározásához akár femtomol mennyiségű fehérje is elegendő. MALDI ionizáció során a fehérje oldott vagy szuszpendált formában van egy kristályos mátrixban, ami szerves, UV-abszorbeáló vegyület. Ilyen pl.: a 2,5-dihidroxibenzoésav, vagy az α -ciano-4-hidroxifahéjsav. A mátrixabszorbeálja az UV sugárzást és ionizálódik, „supercompressed” gázzá alakul, miközben disszociál és átadja a töltését a fehérjének. A mátrix őrési sebességgel kitágul, magával ragadja a minta molekuláit, és töltést ad át nekik. A MALDI technikával ionizált molekulákat leggyakrabban repülési idő (TOF, time-of-flight) analízissel határozzák meg. A fehérjéket elektromos térben konstans feszültséggel gyorsítják, a detektorba érkezésüket így a tömegük határozza meg. Az ESI technikával összehasonlítva a MALDI-val végzett ionizációt nem zavarják a kis mennyiségben jelen lévő szennyezőkomponensek, ezáltal nem igényel bonyolult mintaelőkészítést. A „peptide mass mapping” elemzés alapja, hogy a vizsgált fehérjéből előállított peptidtömegeket egy „virtuális” ujlenyomathoz hasonlítja, amely az adatbázisban megtalálható fehérje teoretikus hasításából ered. Ennek következtében egy adott fehérje azonosítását nagymértékben befolyásolja annak megléte az adatbázisban. Amennyiben a proteomikai vizsgálat olyan fajra terjed ki, melynek genomja vagy proteomja még egyáltalán nem vagy csak részben ismert, a meghatározás bonyolult. Ebben az esetben homológia alapján végezhető el az azonosítás. Joubert és mtsai. (2001) feldolgozóiparban használt sörélesztők fehérjeit tömegspektrometriás vizsgálat után az adatbázisban megtalálható *Saccharomyces cerevisiae* fehérjei alapján homológia szerint eredményesen azonosították.



41. fejezet - Ellenőrző kérdések:

1. Mi a mikroinjektálás?
2. Mi a génpuska, biolisztika?
3. Mi a molekuláris klónozás?
4. Mik a pozitív szelekciós vektorok?
5. Mik a könyvtárak?

XII. rész - Enzimatikus biokatalizátorok előállítása, tervezése, biokémiai mérnökség

Az 1980-as években kialakuló és napjainkig töretlenül fejlődő géntechnológiai módszerekkel a rekombináns fehérjéket kódoló DNS-ben – így a humán fehérjéket kódoló DNS-ben is – mára egyszerűen, olcsón és gyorsan hozhatók létre mutációk, akár irányítottan is. A DNS-en történő változtatás lehet delécio, amikor tetszőleges számú nukleotid eltávolítása történik; inszercio, amikor tetszőleges számú nukleotid beillesztése történik; vagy szubsztitúció, ami egy nukleotid másik nukleotidra való kicserélését jelenti.

Az irányított mutagenézis módszerekkel rekombináns fehérjékben – akár humán fehérjékben is – gyorsan és hatékonyan tudunk véletlenszerű vagy akár célzott változásokat létrehozni. Az egyes aminosavak más kémiai karakterrel rendelkező aminosavakra cserélésével vagy akár nagyobb fehérjerészek mutációjával a fehérjék tulajdonságait megváltoztathatjuk. A megváltozott tulajdonságból következtetni tudunk az adott aminosavnak vagy a fehérjerésznek a fehérje enzimaktivitásában, szerkezetében vagy funkciójában betöltött szerepére. Az in vitro mutagenézis másik felhasználási területe a racionális fehérjemérnökség, vagy az irányított fehérje evolúció, melyek során irányított vagy nem-irányított mutációs módszerek segítségével fehérje variáns sereget hozhatunk létre (ld. 16. fejezet). Ebből a variáns seregből általunk meghatározott szelekciós körülmények között végeredményben megváltoztatott, valamilyen szempontból számunkra előnyösebb, vagy akár újfajta tulajdonsággal rendelkező fehérjék, enzimek, fehérje inhibitorok szelektálhatók (pl.: proteáz inhibitorok; stabilabb és gyorsabb enzimek). A rekombináns fehérjék in vitro mutációs módszerekkel történő vizsgálata nagymértékben hozzájárult a modern biológia mai sikerességéhez. A DNS in vitro mutagenézisére mára számos módszert kifejlesztettek. Ebben a fejezetben a teljeség igénye nélkül ismertetésre kerülnek a leggyakrabban használt, a legismertebb és a leghatékonyabb nem-irányított és irányított mutagenézis módszerek. A mutagenézis módszerek kihagyhatatlan lépése és szerves része a mutáns DNS szekvencia ellenőrzése, aminek a legbiztosabb módszere a DNS szekvenálása.

42. fejezet - Nem-irányított in vitro mutagenesis módszerek

Az egyik leggyakrabban használt nem-irányított mutagenesis módszer az úgynevezett hibát ejtő (error prone) PCR. Alapja, hogy a vizsgálandó fehérjét kódoló DNS szakasz PCR általi sokszorosítása során a DNS-polimeráz számára nem optimális körülményeket használnak. Nem megfelelő körülmények között a DNS-polimeráz mutációs frekvenciája megnő. A felszaporított DNS-ben a mutációk véletlenszerűen keletkeznek, számuk a ciklusszámmal nő. Error prone PCR során általában a *Thermus aquaticus* baktériumból izolált, alacsony hűségű („low fidelity”) Taq DNS- polimerázt használnak. A Taq-polimeráznak hiányzik a 3'→5' exonukleáz aktivitása, ezért ha a polimeráz a lánchosszabítás során nem a DNS bázispárosodás szabályainak megfelelő bázist épít be, akkor nincs lehetősége a hiba javítására. A Taq-polimeráz optimális reakciókörülmények közötti működése során átlagosan egy szubsztitúciós mutáció történik 104 bázispáronként. A Mn²⁺, a Mg²⁺, a DNS-polimeráz és a dNTP koncentrációjának megnövelésével stabilizálni lehet a nem komplementer bázispárosodást, csökkenthető a bázispárosodás specificitása, így továbbá növelhető a rosszul anellálódott primer oligonukleotidról történő lánchosszabítás valószínűsége. Összességében a Taq-polimeráz mutációs gyakorisága elérheti ciklusszámonként a 0,066%-ot (30 ciklus során).

Az error prone PCR során deléciók és inszerciók is előfordulhatnak, jellemzően azonban szubsztitúciók történnek. A legtöbb polimeráz esetében nagyobb valószínűséggel történik A→G vagy T→C tranzíció (purin→purin, piridin→piridin), mint transzverzió (purin→piridin, purin→piridin). A négy dezoxiribonukleozid-trifoszfát arányának eltolásával és módosított Taq-polimeráz enzim (Mutazyme) használatával ez a mutációs aránytalanság (mutational bias) javítható. Az error prone PCR használatával létrehozott DNS inszert ezután megfelelő restrikciós enzimmel való emésztés után a kívánt plazmidba ligálható. A módszer hátránya, hogy a létrehozható variáns sereg méretét korlátozza a szubklónozási lépés során alkalmazott ligálás hatékonysága.

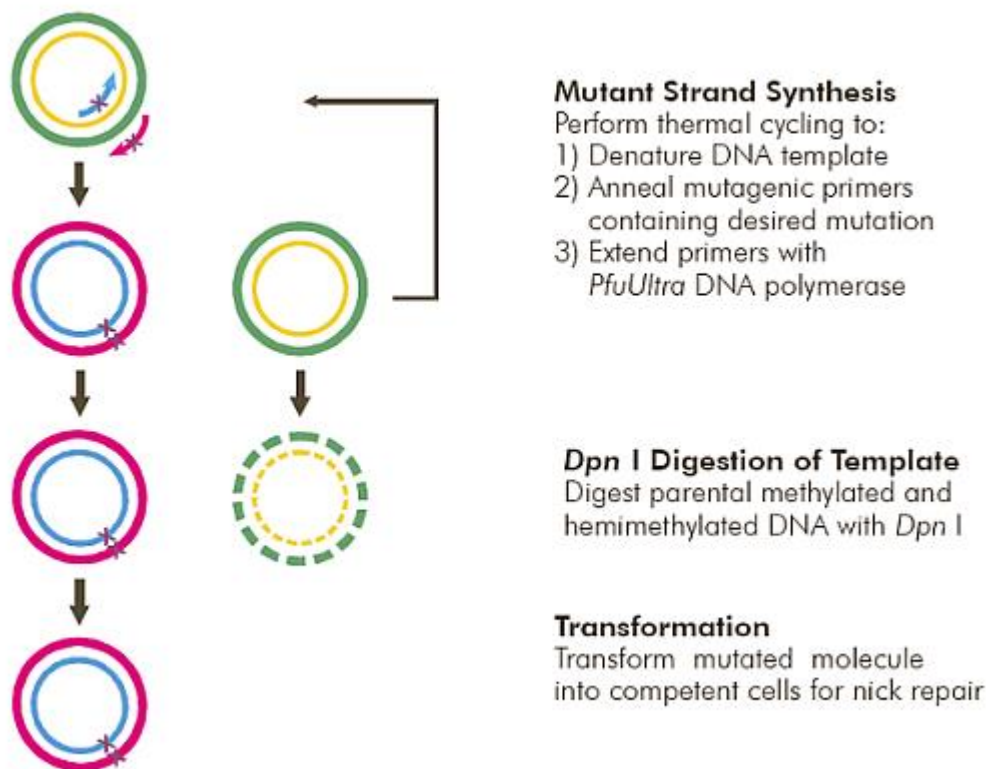
43. fejezet - Irányított in vitro mutagenézis módszerek

A Stratagene cég által kifejlesztett „QuickChange” mutagenézis az irányított mutagenézis módszerek közül, mint neve is mutatja, talán a leghatékonyabb és leggyorsabb módszer. Deléció, inszerció és szubsztitúció is létrehozható vele. Előnye, hogy nem igényel speciális vektorrendszert, mint a Kunkel mutagenézisnél alkalmazott M13 fágmid, valamint összehasonlítva a PCR-alapú „megaprimer”, vagy az „overlapping” mutagenézis módszerekkel, nincs szükség további klónozó lépésekre (restrikciós emésztés, ligálás) sem.

A módszer során a mutálandó DNS fragmentumot bármilyen kétszálú plazmid tartalmazhatja. A kivitelezésnek előfeltétele, hogy a használni kívánt plazmid vektor guanin bázisai metiláltak legyenek. E feltétel teljesítése bármely géntechnológiában általánosan használt (dam⁺) E. coli törzs esetében teljesül, mint például az XL1-Blue vagy a DH5-alpha törzsek esetében. A plazmidot vagy lúgos oldattal (NaOH kezeléssel), vagy hőkezeléssel denaturálják. A mutagenézishez olyan oligonukleotid primer párt használnak, melyek ugyanazon DNS-szakasz két szálához hibridizálnak és tartalmazzák a kívánt mutációt. A primerek tehát egymás komplementerei. A reakció végül vad típusú és mutációt tartalmazó plazmidokat és ezek heteroduplexeit eredményezi.

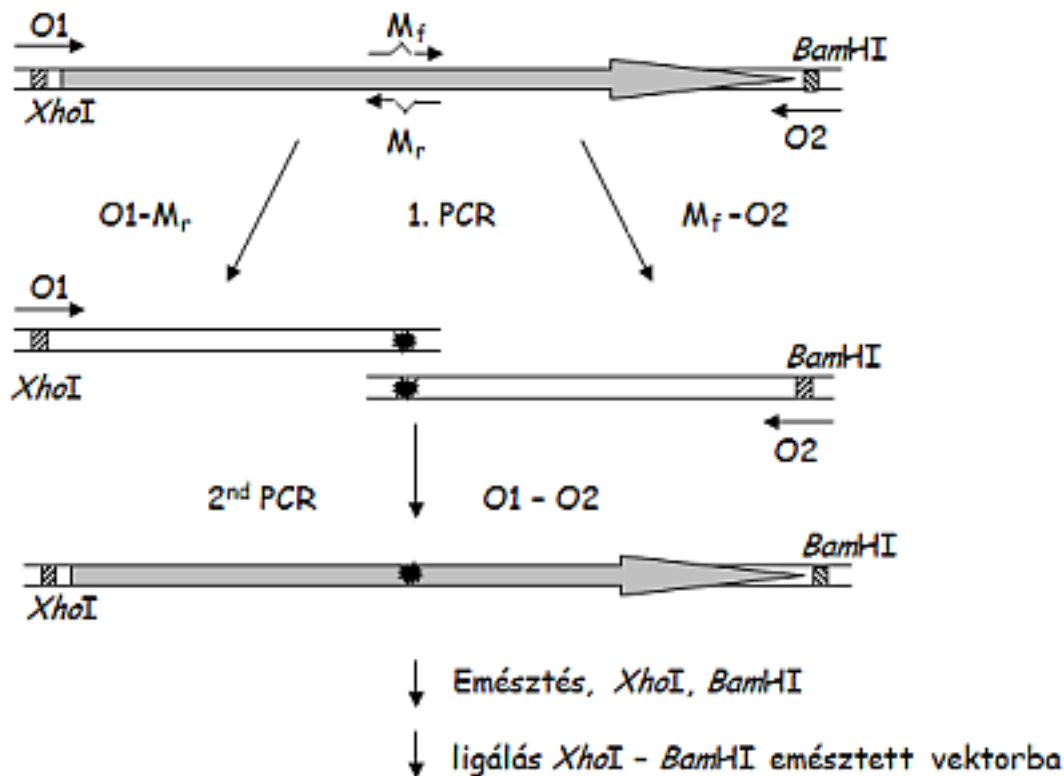
A következő lépésben a reakcióterméket DpnI restrikciós endonukleázzal kezelik, ami képes magas sókoncentráció mellett (150-200 mM NaCl) specifikusan a metilált DNS lebontására, így a vad típusú templát plazmidok eliminálására (célszekvenciája: 5'-Gm6ATC-3'). A kezelés után a mutációt tartalmazó plazmidok intaktak maradnak.

A „QuickChange” mutagenézis előnye a Kunkel módszerrel szemben, hogy nem igényel speciális sejtvonalakat és vektorrendszereket. A PCR alapú módszerekkel szembeni előnye pedig, hogy nincs szükség további klónozási lépésekre, mint restrikciós emésztés és ligálás. Hátránya, hogy az egész plazmid átírásra kerül ezért nagyon jó minőségű, nagy hűségű DNS-polimerázt igényel. Nagyméretű plazmidok esetén (> 8 kbp) ezért speciális reakciókörülményeket és enzimeket kell használni.



A megaprimer módszer során három primer oligonukleotid és a vad típusú DNS templát felhasználásával két PCR történik. A három oligonukleotidból kettő, a határoló vagy „flanking” oligonukleotidok jelölik ki a felszaporítandó DNS szekvenciát és tartalmazzák a későbbi klónozáshoz szükséges restrikciós enzim felismerőhelyeket. A harmadik oligonukleotid tartalmazza magát a mutációt, ami lehet inszerció, delécio, szubsztitúció vagy ezek bármilyen keveréke. A mutáció a target génen belül bárhol létrehozható. Az első PCR során a mutációt hordozó oligonukleotid és az egyik határoló primer segítségével, valamint a vad típusú templát DNS felhasználásával előállítjuk a mutációt tartalmazó „megaprimer”. Az elkészült megaprimer mérete elérheti a több száz, vagy akár ezer bázispár hosszúságot is. A megaprimer agaróz gélelektroforézissel elválasztjuk az esetleges aspecifikus termékektől és a PCR során fel nem használt primerektől, majd a gélből izoláljuk, tisztítjuk. A tisztított megaprimer, mint egy „általános” oligonukleotid primert használjuk fel a másik határoló primerrel a második PCR során a már mutációt tartalmazó DNS szekvenciánk sokszorosítására. A második PCR során beállított anellálási hőmérsékletnél figyelemmel kell lenni a megaprimer extrém méretére és a másodlagos szerkezet kialakítására való hajlamára. Érdemes a primer párját úgy tervezni, hogy annak olvadási hőmérséklete 55-60°C környékén legyen. A második PCR során elkészülő mutáns DNS szekvenciának a mennyiségét a reakcióelegybe bemért megaprimer mennyisége fogja meghatározni, ezért ajánlott nagy mennyiségű megaprimer előállítása és a második PCR reakcióba a lehető legnagyobb mennyiségben való hozzáadása. A 2. PCR hozamát a templát nagy mennyiségben való használatával is növelni lehet. Az elkészült mutáns DNS termék agaróz gélelektroforézissel választható el az esetleg megmaradó megaprimerrel és a templát DNS-t tartalmazó plazmidtól. A tisztított mutáns DNS inszertet a határoló oligonukleotidok által kialakított restrikciós enzim felismerőhelyeken emésztik és a megfelelően előkészített, restrikciós enzimekkel emésztett plazmidba ligálják. A ligátumot kompetens sejtekbe transzformálják, a mutáns DNS inszertet tartalmazó plazmidot szaporítják, majd a szekvenciáját szekvenálással ellenőrzik (a mutációt hordozó inszert plazmidba klónozásának folyamatáról további).

A PCR alapú irányított mutagenézis módszerek közül az „overlapping” PCR mutagenézis használatával a vizsgálandó fehérje DNS-én belül bárhol létrehozható mutáció. Ez a módszer a megaprimer PCR mutagenézis alternatívájaként használható. Hosszabb időigénye, az egymást követő három PCR és a négy primer miatt – szemben a „megaprimer” PCR során használt 3 primerrel – kevésbé terjedt el (ld. 11.7. ábra). Az első két PCR során két átfedő fragmentum jön létre, melyek tartalmazzák a mutációt és a klónozáshoz szükséges restrikciós enzim felismerőhelyeket. A következő PCR során ezen tisztított termékek anellálásából és lánchosszabbításából kialakuló, mutációt tartalmazó termék szolgál templátként a restrikciós enzim felismerőhelyét tartalmazó, a primer oligonukleotidok számára. A mutációt tartalmazó inszert megfelelő plazmidba klónozása a korábbiakban leírtak alapján történik (ld. 6.4.1 fejezet).



44. fejezet - Ellenőrző kérdések:

1. Mi genomika?
2. Milyen hagyományos genomszekvenálási stratégiákat ismer?
3. Mi a kontig?
4. Mi a szkaffold?
5. A genomszekvenátorok melyik hagyományos genomszekvenálási módszer továbbgondolásán, kiterjesztésén alapszanak?

XIII. rész - Egészsejtes biokatalizátorok, előállítása tervezése, metabolikus mérnökség.

A legtöbb ma használatos célzott génmódosító eljárás a homológ rekombináción alapul. Ez azonban nem hasonlít az in vitro klónozáshoz. Sosem szabad elfelejteni, hogy itt egy spontán folyamatról van szó, amelynek határfoka még ideális esetben is meglehetősen alacsony. A leghatékonyabb ma használatos technikák is csak kb. 1% valószínűséggel eredményeznek "jó" célegyedet, benne a célmolekulával. Ahhoz, hogy ezt ki tudjuk használni, nem elég a megfelelő DNS-darabot egyszerűen csak bejuttatni a célsejtbe. A valóságban a különböző pozitív és negatív szelekciós stratégiák ravasz kombinációjára van szükség. A gyakorlatban nagyon sokféle technikával lehet gén-targeting konstrukciókat előállítani. Itt csak néhány főbb módszert fogunk bemutatni, a teljesség igénye nélkül.

A legelterjedtebb a Red rekombinációs rendszer. Ennek működéséhez a λ -fág három különböző génjére van szükség (Exo, Bet és Gam). Az Exo gén egy exonukleáz kódol, ami a bejuttatott kétszálú DNS-seket 5' $\rightarrow$ 3' irányban visszanyesi, ragadós végeket hozva létre. A Bet fehérje a szabad, egyszálú DNS-végekhez kötődik, és megvédi őket a degradációtól. Végül, a Gam gén terméke blokkolja a baktérium saját RecBCD javító enzimét, amely egyébként szétszedné a bejuttatott lineáris DNS-t. A rekombináció létrejöttéhez a sejteknek aktívan növekednie kell, a beépülés ugyanis a DNS-szintézis közben, közvetlenül a replikációs villában történik. Mivel a virális gének aktiválódása akadályozza a baktérium normális életciklusát, ezért hőmérséklet-szenzitív rendszert használunk. Az E. coli tenyésztet 32°C-on tenyésztve a (defektív) profág formájában beépült λ -fág gének teljesen ki lesznek kapcsolva, de egy rövid hő sokk révén (42°C) aktiválhatóak. Ezután a baktériumokat azonnal transzformálni kell. A Red rendszert fel lehet használni in vivo mutagenézisre is: ha egyszálú DNS-t juttatunk a baktériumba (például elektroporációval), akkor az be fog épülni a születő szál helyére. A módszer akkor a leghatékonyabb, ha az oligonukleotidunkat úgy tervezzük meg, hogy a szintézis során elmaradó szállal legyen homológ. A Red rekombinációs rendszer akár plazmiddal is bevihető a célsejtbe (a pSIM plazmid család révén), ezért alkalmas arra, hogy bakteriális mesterséges kromoszómákból (BAC klónokból, illetve az azokat hordozó baktériumokból) genomális darabokat klónozzunk át egy általunk meghatározott vektorba. Így akár egér vagy emberi kromoszómák sok ezer nukleotidos darabjai is könnyen átvihetők a kívánt plazmidba. A Red rendszer bevétele után csupán egy feladatunk van: A megfelelő, a tervezett végekkel homológ kicsi szakaszokat kell beépítenünk a vektorunkba. De a célplazmidot a bejuttatás előtt linearizálni is kell, úgy, hogy a klónozni kívánt rész végeivel homológ rövid darabkák a vektor két szabad végére kerüljenek. Ezért a legkényelmesebb megoldás, ha a teljes vektor PCR termékét transzformáljuk, amit megfelelő (a célgénnel homológ) túlnyúló végekkel láttunk el, a PCR primerek ügyes megválasztásával. A rekombináció ezek után spontán ki fogja szedni a kívánt darabot a BAC klónból, és beépíti a vektorba, bezárva a plazmidot. Ugyanígy, a kívülről bevitt, PCR-rel létrehozott inszertek is egy lépcsőben (mindenféle restriktív emésztés nélkül) "bepattinthatóak" a kívánt vektorba, ha a tervezett beépülési hellyel megfelelő homológia van mindkét végén. Ezen előnyök miatt a Red rendszer a targeting vektorok építésénél ma az egyik leggyakrabban használt technika.

A targeting vektorok építésénél gyakori probléma, hogy vektor-alapvázat kell cserélni a klónozás során. Ha itt is el szeretnénk kerülni a restriktív emésztéseket, erre a leggyorsabb és leghatékonyabb technika az ún. "Gateway" klónozás. Ezt az Invitrogen cég által kifejlesztett módszert, mint hasításmentes klónozást röviden már említettük a 4.2.6. fejezetben. Itt is a λ -bakteriofág életciklusát használjuk ki: mikor lizogén fázisba lép, a fág integrációját a gazdakromoszómába egy specifikus enzim (integráz, Int) irányítja, amely a fág cirkuláris DNS-sét egy adott helyen (AttP) felnyitja és egyesíti a bakteriális genom egy specifikus helyével (AttB). Az AttP és AttB helyek összekapcsolódásával hibrid szekvenciák keletkeznek: AttL ("bal vég") és AttR ("jobb vég"). A reakció maga egyirányú, de megfordítható: méghozzá a fág excíziós enzime (Xis) által. Ez az enzim a profág két végén található AttL és AttR szekvenciákat ismeri fel, szétvágja a DNS-t és keresztben újraegyesíti. Ezzel kivágja a fág-genomot és cirkularizálja azt, helyreállítva az eredeti AttB és AttP helyeket (ld. 14.3. ábra).

A reakció mechanizmusa hasonló a restriktív klónozásra: a hasításkor itt is "ragadós" végek keletkeznek, amelyek a bázis-komplementaritás segítségével fognak újra egyesülni. Az AttB helyek általában rövidek, a beépülés során az AttP hely hosszú, nem szimmetrikus 5'- és 3'-végei megoszlanak az AttL és AttR között. Fontos észrevennünk, hogy egyik felismerő hely sem teljesen azonos a másikkal, mivel nem palindrom szekvenciákról, és csak részben komplementer párokról van szó. Viszont az enzimek érzékenyek a felismerő

helyek homológia viszonyaira: ha az összetartozó pár egyikében például az AttP-ben) a homológ szakaszt kicseréljük, akkor a reakció csak akkor fog működni, ha ugyanezt a cserét az AttB-ben is végrehajtjuk. Az egész technológia ezen az észrevételen alapszik: a megfelelő, kompatibilis párokat számozással szokták jelölni. Ha tehát a plazmidunk tartalmaz két darab, megfelelően orientált AttL helyet (AttL1 és AttL2), amelyek egy "picikét" különböznek egymástól (a komplementer szakaszuk más), de pontosan megfelelnek egy másik vektor AttR helyeinek (AttR1 és AttR2), akkor az összetartozó helyek páronkénti egyesítésével a köztes darabok átkerülnek az egyik vektorból a másikba. A reakció in vitro kivitelezhető: ehhez csak a megfelelő LR enzimkeverékre van csak szükség (a valóságban nemcsak a Xis enzim kell, hanem az E. coli saját IHS □ Integration Host Factor □ fehérjéjére, sőt az Int integrázra is). A végtermék vektorokban az inszert két végén AttP1, és AttP2, illetve AttB1 és AttB2 helyek keletkeznek. Természetesen, ha a másik fajta, BP enzim keveréket használunk a végterméken (ami csak az IHF és az Int fehérjéket tartalmazza, Xis nélkül), akkor a reakció iránya megfordul, és visszakapjuk az eredeti konstrukcióinkat. (ld. 14.3. ábra) Nem szabad elfelejteni, hogy az AttL, AttR, AttB és AttP végek mind-mind érzékenyek az irányításra: ha az egyik véget véletlenül fordítva építjük be, akkor a két vektor fog egyesülni egymással, ahelyett hogy az inszertet vinnénk át □ ezért nagyon figyeljünk oda a tervezésnél! A Gateway klónozás különösen akkor előnyös, ha az inszertünket később nagyszámú, különféle vektorba szeretnénk átvinni. Ilyenkor az inszertet előbb egy alapvektorba (entry vector) építjük be, amely tartalmazza a megfelelő AttL1 és AttL2 végeket. A bevitel történhet magával a BP reakcióval is (ligálás-független klónozás, ld. 4.2.5. fejezet): ilyenkor a PCR-termék túlnyúló végei tartalmazzák az AttB1 és AttB2 helyeket, a plazmid pedig az AttP1 és AttP2 célszekvenciákat. Az inszertet utána nagyszámú különböző, AttR1 és AttR2-tartalmú célvektorba lehet átvinni - például a fehérjetermelés optimalizálása céljából. Az AttP, AttL, AttR helyeket tartalmazó "gyári" vektorokat úgy alkották meg, hogy a két rekombinációs hely között egy speciális negatív szelekciós marker legyen: a ccdB gén (F-plazmid eredetű DNS-giráz inhibitor) □ ha a helyén marad □ akadályozni fogja az átlagos E. coli sejtek növekedését, így a csak a kicserélődött inszertet tartalmazó klónokat fogjuk visszakapni. A különféle AttR és AttL párok összetettebb szubklónozást is lehetővé tesznek: trükkös felhasználásukkal akár kis inszertek sorozatából is építhetünk egy nagy inszertet. A Gateway klónozás a targeting vektorok esetében a negatív rezisztencia-gének beépítésénél különösen hasznos: ezeket a végső célvektor tartalmazza, és ide lehet az összes különböző célzó (targeting) konstrukció magját berakni, mindenféle restriktációs emésztés nélkül, LR klónozással.

45. fejezet - Ellenőrző kérdések:

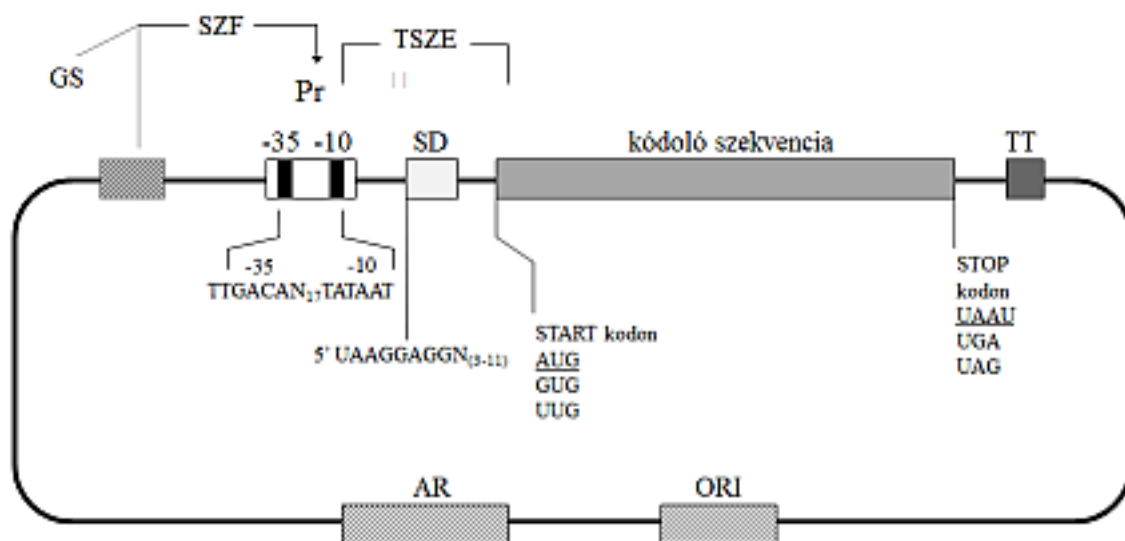
1. Milyen méretű szekvencia olvasatokat lehet kapni a 454(Roche), a Solexa (Illumina) és a Solid technológiákkal?
2. Mi a transzkriptomika?
3. Mi a chip?
4. A 2D elektroforézis során milyen elv szerint történik az 1 dimenzió és a 2. Dimenzió szerinti elválasztás?
5. Mi a PMF (peptid mass fingerprinting)?

XIV. rész - Enzimek előállítása fermentációval, kinyerése, kiszerezése

Tartalom

46. Expressziós rendszerek	131
47. Fermentáció	133
48. Ellenőrző kérdések:	134

46. fejezet - Expressziós rendszerek



Pr: promóter

TT: transzkripció terminációs szignál,

SZF: szabályozó fehérje,

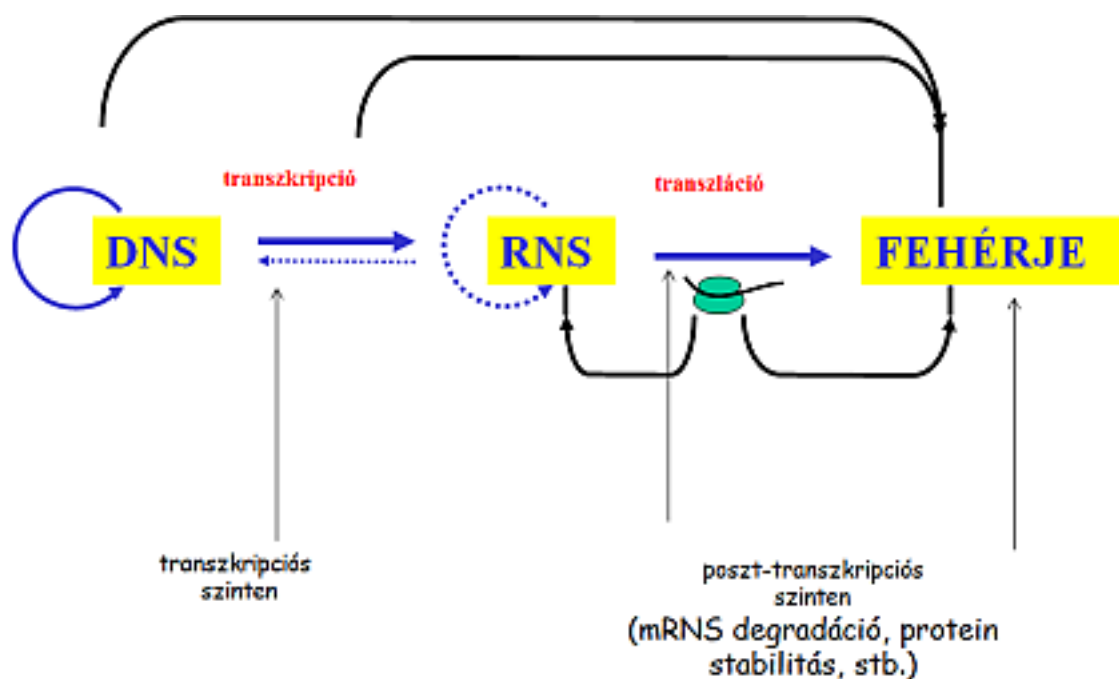
TSZE: transzlációt szabályozó elemek,

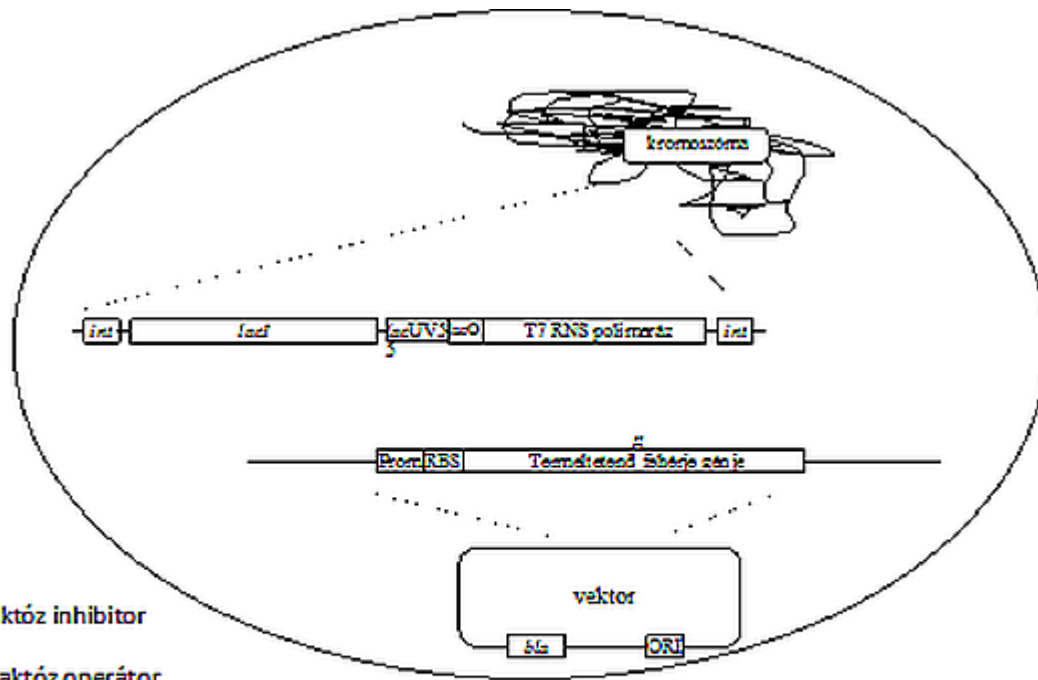
SD: Shine-Dalgarno szekvencia,

AR: antibiotikum rezisztencia,

ORI: replikációs origó

GS: gazdasejt





lacI: laktóz inhibitor

lacO: laktóz operátor

Pro: promóter $\phi 10$ v. T7lac

RB: riboszómakötő hely

47. fejezet - Fermentáció

Ha egy mikrobasejtet – az egyszerűség kedvéért tekintsünk egy baktériumsejtet – olyan környezetbe helyezünk, amelyben minden számára szükséges tápanyag elegendően nagy koncentrációban van jelen, valamint az egyéb körülmények (pH, hőmérséklet, ozmotikus viszonyok) is megfelelőek számára, akkor a sejt elkezd növekedni és egy idő után osztódik is, azaz egy anyasejtből két azonos leánysejt keletkezik. Tekintsük meg az 4.1. animációt, amely egy kaccsal történő átoltással kezdődik Petri-csészén kifejlődött baktériumtelepről egy rázólabdikban lévő tápoldatra, amit 30 percenként (példánkban egy gyorsan szaporodó *Escherichia coli* sejtet tételezünk fel) követ egy osztódás. Az első generáció tehát kettő, a második, 60 perc elteltével $2^2=4$, a harmadik generáció megszületése 90 perccel az átoltás után $2^3=8$, a negyedik $2^4=16$, és így tovább az n -edik generációig, amely összesen 2^n darab leánysejtet eredményez.

A biomérnöki gyakorlatban sokkal inkább a sejttömeg növekedése érdekel bennünket, mint a sejtek szám szerinti gyarapodása, ezért a a Jaques Monod nevét viselő növekedési modell alapegyenleteit, alkalmazzuk.

A növekedési görbe négy szakaszra osztható. Az első szakaszt lappangási fázisnak vagy lag szakasznak hívjuk. Ebben a mikrobasejtek még nem növekednek, legalábbis számottevő, mérhető növekedés sem szám szerint, sem tömeg szerint nincsen. Ebben a periódusban a sejtek adaptálódnak az új környezethez. E szakasz értelmezése nem teljesen egységes. (Mivel értelmezése és főként leírása meghaladja lehetőségeinket, ezért tekintsük lag szakasznak azt, ahol növekedés nem észlelhető.) E szakaszban $\mu=0$. A lag periódust a gyorsuló növekedés szakasza követi, amely alatt az adaptáció folytatódik, de itt már észlelhető növekedés, méghozzá egyre gyorsuló ütemben. Nem minden sejt jut el azonban egyidejűleg oda, hogy maximális sebességgel szaporodjék, fokozatosan kapcsolódnak be a növekedésbe, így e szakaszban μ 0 és $\mu_{\max}$ között van. A következő, exponenciális fázisban (a gyakran használt, logaritmikus fázis kifejezés helytelen!) a teljes sejttömeg maximális intenzitással növekszik, $\mu=\mu_{\max}$. A negyedik szakaszt hanyatló fázisnak nevezzük, itt ismét μ 0 és $\mu_{\max}$ között van és tart a nullához.

Mikroorganizmusok tápanyagigénye, az alkalmazott tápoldattípusok és összetevőik A fermentációs iparokban alkalmazott mikroorganizmusok termelőképessége alapvetően két tényezőtől függ: meghatározó szerepű a mikrobát jellemző genom, de ugyancsak döntő az a környezet, amelyben a mikroorganizmusokat tenyésztjük. Úgy is fogalmazhatunk, hogy a mikroba igen nagy számú „lehetősége” közül (amely a genom által meghatározott), az adott környezetnek megfelelő véges számú „tulajdonság” fog manifestálódni. Adott mikrobatorzs esetén tehát már a környezet az elsődleges meghatározó. A környezet fogalmába értjük a táptalajok minőségi és mennyiségi összetételét (beleértve az oldott oxigén szintjét is aerob fermentációk esetén) és az ún. környezeti paramétereket: pH, hőmérséklet, redoxpotenciál-viszonyok stb. Csak a mikroba tevékenysége szempontjából kedvező környezet biztosíthat kedvező termelési szinteket. A „kedvező” környezet meghatározása igen sok tényezős, bonyolult optimalizációs feladat, amelynek egyes elemeivel a következőkben foglalkozunk. Egy fermentációs folyamat megtervezésének, optimalizálásának, megvalósításának egyik legfontosabb lépése a megfelelő növekedést és/vagy termékképződést biztosító táptalaj összeállítása. A tápoldattáptalaj funkciója a mikroba táplálkozási és környezeti igényeinek egyidejű kielégítése, de ezen túlmenően gazdasági szempontokat is figyelembe kell venni a tápoldat tervezése, optimalizálása során.

Táplálkozási igényük szerinti valamennyi csoportban találhatunk olyan mikrobákat, amelyek gazdasági szempontból fontosak, de a fermentációs iparok jelenleg leginkább a heterotróf csoportba tartozó mikroorganizmusokat alkalmazzák, amelyek tehát mind energia-, mind szénforrásuk tekintetében szerves anyagra szorulnak. Ez a megállapítás azonban nem kizáró, hiszen ismerünk olyan ipari eljárást, amely például eukarióta, fényhasznosító fotolitotróf organizmust alkalmaz (alga), de vannak olyan biobányászati eljárások is, amelyek során ércet kemolitotróf baktériumokkal lúgoznak ki (bacterial leaching).

48. fejezet - Ellenőrző kérdések:

1. Mi az alapja az error prone polimeráz láncreakciónak?
2. Hogyan lehet megemelni a Taq polimeráz hibázási arányát?
3. Mi a közös elvi háttere a Kunkel féle és a Quick change mutagenezésnek?
4. Milyen tulajdonságai vannak a T7 RNS polimeráznak?
5. Mik a transzkripció expressziós vektorok?

XV. rész - Enzimek ipari alkalmazásai

A biokémiai enzimes hidrolízist a hidrolázok katalizálják. Ezek az EC 3. csoport enzimei, amelyek egyikével-másikkal már az eddigiekben is találkoztunk. A hidrolázok nagyszámú enzimescsoportja (észterázok, glikozidázok, proteázok, lipázok, acilázok stb.) mindegyikének közös jellemzője, hogy a szubsztrátból vízfelvétellel képződnek a termékek: $X \square Y + H_2O \rightarrow HX + YOH$

A $18O$ -val jelzett vízzel végzett hidrolízisreakció fontos szerepet játszik a hidrolízis mechanizmusának vizsgálatában. A fenti reakcióban a víz OH -ja a szubsztrát Y -komponenséhez kapcsolódott. Elméletileg az OH az X -komponenshez is kötődhet. A két lehetőséget reakció-mechanizmus szempontjából meg kell különböztetnünk. A továbbiakban ipari szempontból jelentős hidrolízises átalakításokat tekintünk át részletesebben a teljesség igénye nélkül, kiemelve a legfontosabbakat, illetve a valamilyen szempont szerint jelentőseket.

A keményítő enzimes hidrolízise.

A keményítő, a felépítésében részt vevő glükózmonomerek tekintetében homopolimer, a glükozid-kötések különbözősége révén azonban két eltérő szerkezetű polimert jelent. Az egyik az amilóz, amely α -1,4-glükozid-kötésekkel összekapcsolt láncpolimer, amelyben az egy molekulát alkotó glükózegységek száma – a polimerizációs fok – 100–2000 között változik. A másik keményítő-komponens az amilopektin, amely mintegy 95% α -1,4-kötés mellett mintegy 5% elágazó, α -1,6-kötést is tartalmaz. Az egy elágazásra jutó glükózegységek száma átlagosan tehát 20, polimerizációs foka pedig több 10 000 is lehet. A keményítők két frakciójának elsődleges felépítését a ábra szemlélteti. A különböző növényekben képződő keményítőszemcsék – amelyeket ipari módszerekkel kinyernek – különböző arányban tartalmazzák az amilózt és az amilopektint. Az amilóz helikális szerkezetét és az amilopektin fűrtös (klaszteres) elágazásokat tartalmazó szerkezetét tanulmányozhatjuk a ábrán, míg a növényi keményítőszemcse felépítését (felépülését a növekedés során) szemlélteti a ábra.

ábra: Az amilóz hélice és az amilopektin klasztere

A keményítő enzimes hidrolízise játszódik le a növényi magvak csírázásánál, a magasabbrendű élőlényekben az emésztésnél, egyes mikroorganizmusok tápanyagfelvételénél stb. A kötéshasítás minden esetben a $C1-O$ atomok között történik. A hidrolízisnél a felvett vízmolekula OH -csoportja tehát a $C1$ glikozidos szénatomhoz, míg H része az O atomhoz kapcsolódik. Az OH -csoport kapcsolódása sztereospecifikus, egyik esetben a $C1$ atomon α -, más esetben β -konfigurációjú kapcsolódás jön létre. Ebből a szempontból csoportosítva a keményítőt bontó ún. amilolitikus enzimeket, vannak α -amilázok, amelyek α -konfigurációjú lineáris és elágazó dextrineket képeznek a keményítő α -1,4-es kötéseinek hasítása révén.

Az α -amiláz (EC 3.2.1.1.: alpha-amylase) extracelluláris és általában induktív enzim, amely a keményítőt statisztikusan támadja meg (tehát endoenzim), és így a reakció eredménye kettő, három és nagyobb polimerizációs fokú dextrinek. Az α -amilázokat sok gomba- és baktériumfaj képes termelni. Ezek egymástól keményítőfolyósító és/vagy -elcukrosító hatásban, továbbá pH- és hőmérséklet- optimumban, valamint stabilitásban különböznek. A legtöbb α -amiláz stabilizátorként kalciumot igényel működése során. A kereskedelmi forgalomba kerülő α -amiláz-készítmények gyártásánál *Bacillus subtilis*, *Aspergillus oryzae* törzseket és újabbban termotabil *Thermomonospora* törzseket használnak.

A glükó-amilázok – vagy γ -amilázok – (EC 3.2.1.3. – glukan 1,4-alpha-glucosidase) β -konfigurációjú glükózegységeket hasítanak le, és így a teljes keményítőmolekulát glükózzá képesek hidrolizálni (exoenzimek). A maltózt csak nagyon lassan bontják, és nem támadják, illetve csak igen lassan az elágazó láncok 1,6-kötéseit, ezért a glükó-amilázoknak kitett keményítő hasítási termékei a következők: glükóz, maltóz és határdextrinek keverékei. Az enzim előállítására különböző *Aspergillus* és *Rhizopus* törzseket használnak.

A keményítőt bontó enzimek negyedik csoportja, a pullulánázok, ill. izoamilázok az amilopektin elágazó oldalláncait, α -1,6-kötéseit is képesek hasítani.

A keményítő hidrolizátumok előállításának menete vázlatosan a következő (lásd ábra): A vízóldhatatlan keményítőtől szuszpenziót készítenek, amelyet $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ra melegítenek fel. Ekkor az α -amiláz egy részét is hozzáadják, azaz már a csírizesedés közben elkezd kifejteni hatását az enzim. Ez művelet igen rövid ideig tart (5 perc), ezután a zagyot visszahűtik $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ra, és hozzáadják az enzim másik részét is. Az elfolyósítást Ca^{2+}

ionok jelenlétében végzik mintegy 2 óra hosszat. Ez a művelet az elfolyósítás, a csirizedés közben nagy viszkozitásúvá vált keményítőoldat ugyanis az enzim hatására elveszti nagy viszkozitását, elfolyósodik. Az elfolyósított keményítőoldatot rendszerint szűrés után pH=4,5-en és 60 °C-on cukrosítják el glükó-amiláz enzimmal. Ezen elcukrosítási művelet során, mely technológiától függően 48–72 óra hosszat is eltarthat, esetenként pullulanáz (izoamiláz) enzimet is adnak az oldathoz. Az enzimek specifikációja és az átalakítás körülményei meghatározzák a végtermék összetételét.

Az elcukrosítás pontos körülményeinek és az annak során felhasznált enzimeknek, enzim-keverékeknek a függvényében különböző bontásfokú glükózszörpök, illetve a glükóz mellett maltózt vagy főleg maltózt (ekkor maltózsörpről beszélünk) tartalmazó, különböző édességű szörpök állíthatók elő az édesipar, cukrászati ipar igényeinek megfelelően. Az említettekén kívül a keményítő hidrolízisének még egy sor iparágban, például a sör- és szesziparban, valamint a textiliparban az irtelenítésnél, illetve a papíriparban van jelentősége.

A ábrán látható szerkezetű diszacharid tejcukor a tehéntejben mintegy 4,7%-ban található, és ugyancsak lényeges összetevője a sajtgyártáskor keletkező savónak. Emésztése során a β -galaktozidáz vagy laktáz enzim (Exo-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-galactanase, lactase EC 3.2.1.23.) bontja le glükózra és galaktózra, és így hasznosul. Míg a csecsemők toleránsak, azaz rendelkeznek laktóz-lebontó képességgel, addig a felnőtt lakosság körében nagy népegészségügyi problémát okoz az ún. laktózintolerancia. A kínaiak 90, a fekete amerikaiak 73%-a nem rendelkezik laktázzal, azaz intoleráns, miközben a fehér amerikaiak 99%-a és a svédek 84%-a toleráns a laktózzal szemben. A bontatlan laktózt a vastagbél anaerob flórája gázfejlődés közben erjeszti, ráadásul a laktóz gátolja a vízfelszívódást is a vastagbélben, ezért az intolerancia esetén fogyasztott tej és tejcukortartalmú egyéb termék úgynevezett explozív diarreát, azaz hasmenéssel együttjáró puffadást okoz. E népbetegség kezelésére egyrészt laktáztartalmú enzimek készítményeket alkalmaznak, másrészt laktózmentes tejet és tejkészítményeket gyártanak a tej laktáz enzimmal történő kezelésével. A laktáz enzimmal kezelt tej lényegesen édesebb, mint a natív, hiszen a laktóz édessége a szaharózéénak csupán 20%-a, míg a hidrolíziskor keletkező glükózé 70% és a galaktózé 58%. Ez a tény a laktóz hidrolízis további felhasználását is indokolja: fagylaltekészítmények és különböző natúr és ízesített sűrített tejkészítmények előállításakor is alkalmazzák. Utóbbiaknál kedvező, hogy így a készítmény cukortartalma nehezebben is kristályosodik ki. Magát az enzimet többféle mikroorganizmus fermentációjával állítják elő, ekkor más-más optimális tulajdonságú enzimek készítményeket nyernek. A tejipari élesztő *Kluyveromyces fragilis* (*K. marxianus* var. *marxianus*) által termelt enzim pH-ja 6,5–7,0 optimumú, míg az *Aspergillus oryzae* pH 4,5–6,0, az *A. niger* pedig pH 3,0–4,0 közötti optimummal rendelkező enzimet állít elő. Ezek a β -galaktozidáz készítmények rögzített formában kaphatók a kereskedelemben. E készítmények nemcsak a pH-optimum értékeiben, hanem fémion-igényük (mint kofaktor), illetve fémek által okozott inhibíciójuk tekintetében is különböznek egymástól, abban azonban egyformák, hogy mindegyikre gátlólag hat a termék galaktóz.

49. fejezet - Ellenőrző kérdések:

1. Mik a transzlációs vektorok?
2. Mik a hidrolázok?
3. Milyen enzimekkel bontjuk a keményítőt.
4. Miért van szükség a pullulanázra.
5. Milyen enzimmel lehet megoldani a tejcukorérzékenységet.

A. függelék - Irodalomjegyzék; ajánlott irodalom

1. Aehle (ed.) (2004). Enzymes in industry: production and applications. Wiley Verlag GmbH &
2. Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A., Struhl K (eds.). 1987. Current Protocols In Molecular Biology, Greene Publ. Associat. & Wiley
3. Balbás, P., Lorence, A. (2004) Recombinant Gene Expression Reviews and Protocols. Humana Press Inc.
4. Brown, T.A. (2002) Genomes 2. BIOS Scientific Publishers, Oxfordshire, UK.
5. Clark, D.P., Pazdernik N.J. (eds) (2009). Biotechnology: Applying the Genetic Revolution. Elsevier Academic Press.
6. Glazer, A.N., Nikaido, H. (2007). Microbial biotechnology: Fundamentals of applied microbiology, 2nd edition, Cambridge University Press,
7. Glick, B. R., Pasternak, J. J., C. L. Patten, C. L. (2010). Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA. ASM Press.
8. Lesk, A., (2004) Introduction to Protein Science - Architecture, Function, and Genomics Oxford University Press, London, UK.
9. Lesk, A., (2004) Introduction to Protein Architecture The structural biology of proteins Oxford University Press, Press, London, UK
10. Liebler, D. C. (2002) Introduction to Proteomics Tools for the New Biology, Humana Press, Totowa, New Jersey, USA
11. Mosier, N.S., Ladisch M.R. (eds) (2009) Modern biotechnology: Connecting innovations in microbiology and biochemistry to engineering fundamentals. A John Wiley & Sons, Inc., Publication.
12. Sambrook, J., T. Maniatis, and E.F. Fritsch. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
13. Singh, U. S., Kapoor, K. (ed.) (2010) Microbial biotechnology. Oxford Book Company.
14. Vaillancourt P.E. (ed.) E. coli Gene expression Protocols. in Methods in Molecular Biology series, Humana Press, Totowa, New Jersey, USA
15. Walker J.M. (ed.) (2002) The protein protocols. Handbook. Humana Press, Totowa, New Jersey, USA.
16. Walker, J.M., Raply, R. (2009) Molecular Biology and Biotechnology, 5th Edition. The Royal Society of Chemistry.
17. Westhead, D.R., J.H. Parish and R.M. Twyman (eds.) (2002) Instant Notes Bioinformatics BIOS Scientific Publishers, Oxfordshire, UK.
18. Wink M., (ed) (2010) An Introduction to Molecular Biotechnology: Fundamentals, Methods and Applications, 2nd edition.
19. Whittall, J., Sutton, P. (eds) (2010). Practical methods for biocatalysis and biotransformations. A John Wiley & Sons, Inc., Publication.
20. Wu, W., Zhang, H.H., Welsh, M.J., Kaufman P.B. (eds.) (2011) Gene Biotechnology. CRC Press Taylor & Francis Group.