

# GÉNSEBÉSZET- DNS-KLÓNOZÁS

A génsebészet olyan in vitro módszereket, technikát foglal magába, mely a génkészlet nagymértékű megváltoztatását, célzott keveredését teszi lehetővé. A genetikai információt az egyik élőlényből (állat, növény, mikroorganizmus) mesterségesen visszük át egy másik organizmusba.

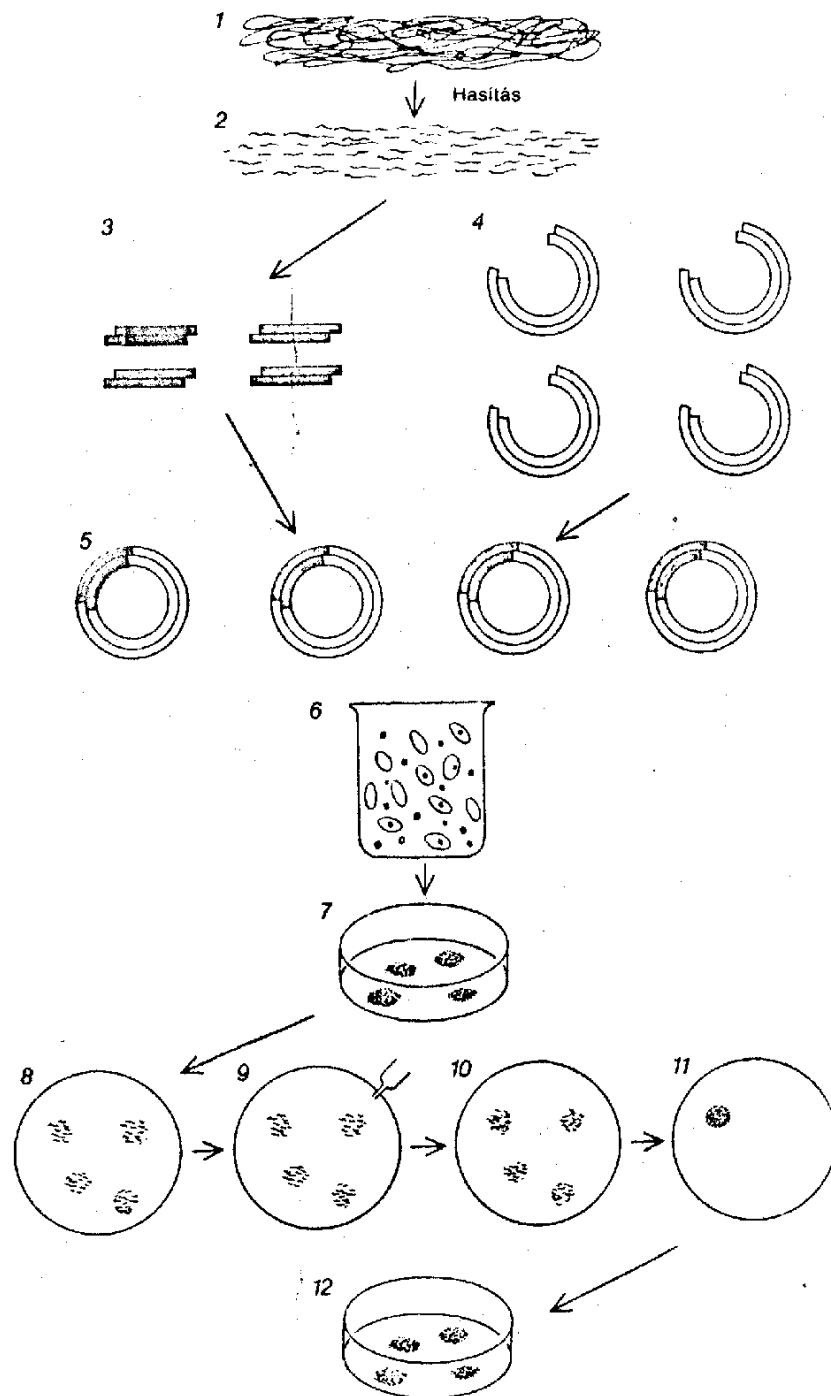
Angolul legelterjedtebben talán a „genetic engineering” kifejezést használják, amely „genetikai mérnöki tevékenységet” jelent. Ez utal a DNS-fragmentumok összeépítésének tervezett és tudatos voltára, ezért találó elnevezés. Sajnos magyarosítani lehetetlen, hiszen még az engineering szót sem sikerült (más tudományágakban) lefordítani. Az angol nyelvterületen használt genetikai manipuláció sem találó, és magyarul a manipulációnak rossz mellékcsengése is van.

A szakemberek is elterjedten használják a DNS-klónozás meghatározást. Ezt köznapi életben is lehet használni, hiszen a biológiai ismeretterjesztésben a klón fogalma eléggé elterjedőben van. (Szokták még a génsebészetet in vitro rekombinációnak nevezni, de mivel ez az elnevezés félrevezető, a szóhasználat is kezd kiveszni.) A hibrid DNS molekulákat azonban szokás rekombináns DNS-nek nevezni, ami újrarendezettet jelent.

## **A DNS-klónozás lépései a következők:**

1. A klónozendó gént tartalmazó DNS előállítása
2. A megfelelő vektor kiválasztása
3. A vektor hasítása
4. A célgén vektorhoz kötése
5. A célgén mikroorganizmusba juttatása
6. A célgént tartalmazó mikroorganizmusok kiválasztása

A klónozendó gén származhat állati, növényi vagy mikroorganizmus DNS-ből. Leggyakrabban az enzimesen felszabdalt teljes genom kerül klónozásra, amikor is a DNS fragmenteknek csak igen kis hányada azonos a kívánt DNS darabbal. Ennek a folyamatnak a vázlatát mutatja az 1. ábra.



**1. ábra: A GÉNKLÓNOZÁSNAK, a rekombináns DNS-technológia alpműveletének egyik változatát mutatja az ábra.** Emlős genom-DNS-ét (1) restriktív enzimmel hasítják. A kapott töredékek „, 3) valamelyike tartalmazhatja a keresett gént. Plazmid klónozó vektorok példányát hasítják ugyanezzel az enzimmel (4). A plazmidokat és a genomtöredékeket összekeverik, DNS-ligázzal összekapcsolják (5) és a rekombináns plazmidokat a baktériumba juttatják(6). A baktériumokat a tenyésztőcsészébe teszik, olyan hígításban, hogy minden létrejövő telep (7) tagjai biztosan egy sejtől származó klónt alkossanak. Néhány klón sejtjei tartalmazhatnak egy a keresett gént hordozó rekombináns plazmidot. Könnyen megkereshető az ilyen klón, ha a kérdéses gén mRNS-e ismert és szondaként alkalmazható. A telepekből mintát visznek szűrőpapírra; a sejteket felnyitják, hogy a DNS-ük hozzáférhető legyen (8). A radioaktív izotóppal jelzett RNS szondát a rendszerbe juttatják (9). Ez csak a keresett DNS-hez kötődik; a nem kötődött szondát eltávolítják (10). A szűrőpapírra fotoemulziót visznek, a radioaktív szonda az emulzióon nyomot hagy (11), azonosítva a keresett klónt(12).

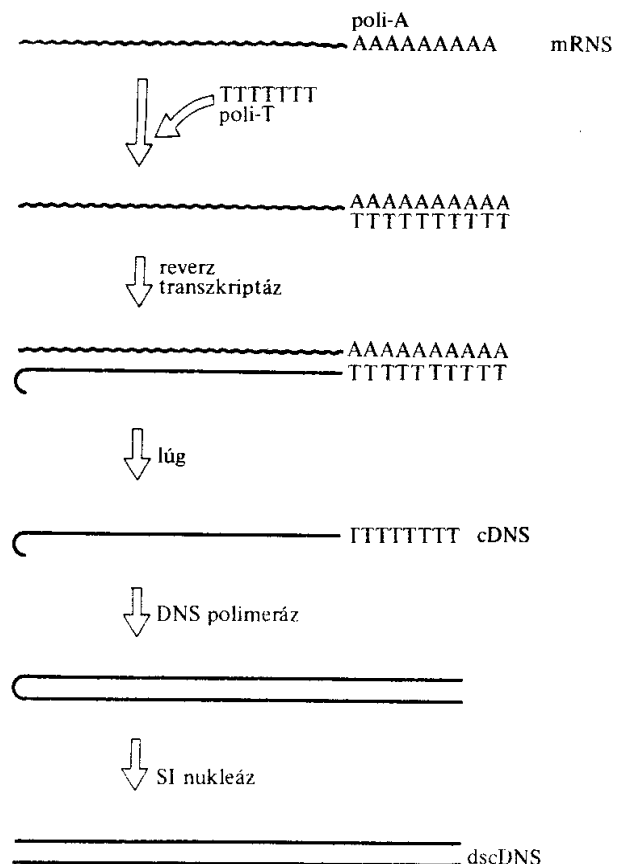
Speciális esetekben mód van tisztított gén előállítására is. Ilyen az afrikai karmos béka riboszomális RNS-génje. Ennek a génnek a tisztítását nagymértékben megkönnyítette, hogy a petesejtben több száz példányban fordul elő, méghozzá olyan formában, hogy közvetlenül egymás mellett, szomszédosan helyezkednek el. A tisztítás szempontjából igen kedvező továbbá, hogy az rDNS-gének sűrűsége eltér az átlagostól, amit kinyeréskor hasznosítani lehet. Mivel tehát a karmos béka rDNS-e nagy mennyiségben és tisztaságban hozzáférhető volt, a kutatók azt a célt tűzték maguk elé, hogy az rDNS-t, vagy annak egy darabját összeépítik a pSC101-plazmiddal és *E. coli* sejtjébe juttatják.

Kémiaailag szintetizált génekkel is végezhetünk klónozást. Elsősorban kis fehérjék génjeinél éri meg a fáradságot, olyanoknál, mint például a peptidhormonok. Ezeknek a szerkezete ismeretes, és az aminosav sorrendből le lehet vezetni egy megfelelő génszerkezetet is. Azért egy szerkezetet, mert a genetikai kód tulajdonságai miatt sokféle megoldás van. Emlékezzünk arra, hogy 64 féle bázishármas csak 20-féle aminosavat kódol, tehát egy-egy aminosavnak többféle bázishármas feleltethető meg. A kémiaailag elkészített gént ezután egy olyan különleges vektorral (kifejező vektorral) kell klónozni, amelyben jelen vannak a transzkripciót és translációt vezérlő jelek, mint például a promóter. A sejtbe juttatott rekombináns tehát termeli a megfelelő fehérjét. Ilyen módon klónozták az emberi növekedési hormon génjét vagy az inzulin génjét is.

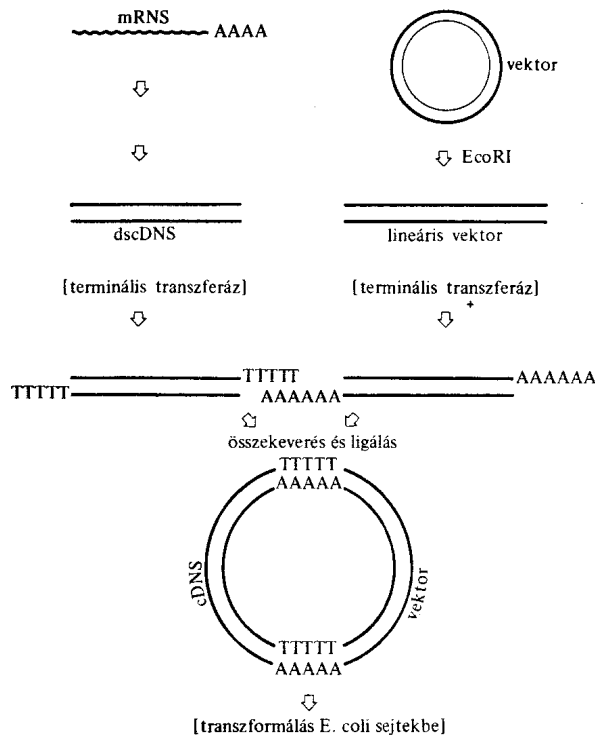
DNS szintetizálható enzimesen is a retro vírusoknál megismert és izolált reverz transzkriptáz enzim segítségével, mely RNS-ből készít DNS-t. Ezt a DNS-t cDNS-nek = komplementer DNS-nek nevezik.

#### 14. A cDNS készítésének vázlatja

Az mRNS 3'-végén található poli-A-toldalékhoz hibridizálják a 10–20 bázis hosszúságú poli-T „indító”-molekulát. A reverz transzkriptáz enzim elkészíti az RNS-sel kiegészítő (komplementer) DNS-szálat. Az eredeti RNS-t lúggal elbontják, majd a DNS másik szálát a DNS-polimeráz enzimmel szintetizáltatják. A hajtúszerű képződményt az ún. S1-nukleázzal kezelik, és megkapják az eredeti mRNS-nek megfelelő kétfonalas DNS-másolatot



2.ábra: cDNS készítése



15. A cDNS-klónozás vázlatja  
Az ábrán bemutatott folyamat nagyon hasonlít a 8. ábrán szemléltetett kísérlethez. Az egyetlen lényeges különbség abban rejlik, hogy a klónozendő DNS-t az mRNA-ról készítették. Az összekapcsolásnál itt is a poli-A- és poli-T-farkokat használták. Később látni fogjuk, hogy ezeket kémiai szintetizált kapcsoló molekulákkal lehet helyettesíteni, amelyeket a plazmidvektornak egy olyan pontjára építik be a cDNS-t, ahol a beépítés révén megszűnik egy antibiotikum-rezisztencia

### 3.ábra: cDNS klónozása

A reverz transzkriptáz, vagyis a „fordítva átíró enzim” működésének feltétele, hogy a DNS-lánc meg legyen kezdve. Az mRNA esetén ezt könnyű megvalósítani mert RNS 3'- végén elhelyezkedő poli-A-lánchoz a bázispárosodás révén „hozzátapasztunk” egy poli-T-darabot. Az ilyen módon létrejövő molekulát hibridnek mondjuk, mert az egyik része RNS, míg a másik DNS. A kettőszálú hibrid molekula azért tud létrejönni, mert az RNS és DNS közötti kémiai hasonlóság lehetővé teszi a bázispárosodást. Az mRNA-hez hibridizált poli-T-darabtól elindulva, a reverz transzkriptáz enzim az RNS teljes hosszában felépíti a komplementer (kiegészítő) DNS szálát, és így egy teljes hosszúságú hibrid molekula képződik.

A következő lépésben a DNS-t kétfonalúvá kell tenni. A hibrid molekulának az RNS részét lúggal el lehet bontani, s így csak a DNS szál marad meg. Ennek a kiegészítő szálát pedig DNS-polimeráz révén szintetizáljuk, így kialakul a kétfonális DNS, amit már fölhasználhatunk klónozásra is. Az mRNA-ról készített másolatot cDNS-nek („complementer „-kiegészítő) nevezzük. Szokták a kétfonális vázlatot dsc-DNS-nek is rövidíteni (itt a ds= double standard, azaz kettős szálú, kétfonális).

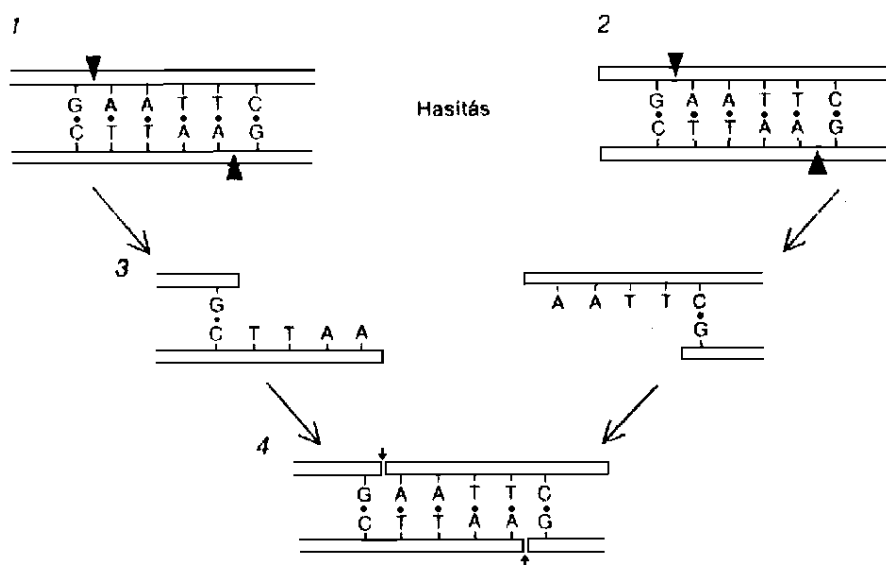
A cDNS szintézisének módszerét a globin-mRNA-re is alkalmazták, és az ismertetett - egyébként mind a mai napig használatos – eljárás révén klónozható DNS másolatot nyertek.

Erről a klónról feltételezték, hogy lényegében véve azonos a genomban található globin-génnel, legfeljebb az eleje és a vége hiányzik, ami a szintézis során esetleg megsérült. Később, amikor közvetlenül is klónozták a genomban található globin-gént, ez a feltételezés tévesnek bizonyult. A megfelelő módon előkészített DNS-t valamilyen hordozó (**vektor**) segítségével juttatjuk egy másik élőlény, általában mikroorganizmus szervezetébe, ahol a géndarabka sikeres esetben képes sokszorozódni és a genetikus információnak megfelelő terméket előállítani.

A DNS láncok specifikus hasítása restrikciós endonukleáz enzimekkel, a lánc végek összekapcsolása pedig DNS ligáz enzimekkel történik.

## Restrikciós endonukleázok

A restrikciós endonukleázok (korlátozó vagy restrikciós enzimek) olyan DNS bontók, amelyek a kétfonális DNS-en belül 4-6 bázisból álló, meghatározott szakaszokat „ismernek fel”, és ott a DNS mindkét szálát elhasítják. A felismerés és a hasítás szigorúan meghatározott, tehát ha a sokmilliárd molekulából álló DNS-oldatot egyfajta ilyen enzimmel kezeljük, akkor minden egyes DNS-molekula ugyanazonokon a helyeken hasad el. A génebesztet kialakulásához éppen ez a specifikus hasítási lehetőség nyújtott alapot. Felfedezték a gazdaspecifitás jelentőségét, más néven a restrikciós-modifikációs rendszert, melynek lényege, hogy a prokarióták szervezete meg tudja különböztetni a saját DNS-t más, idegen eredetű DNS-től. Ha a sejtbe idegen DNS jut, akkor azt a sejt lebontja, hatástalanítja egy enzim – a módosító (modifikáló) metiláz – révén megjelölik a saját DNS-üket. A jelölést úgy végzik, hogy egy meghatározott bázissorrendű résznél, az egyik bázisra metilcsoportot (CH<sub>3</sub>) kapcsolnak. Van még egy enzim a sejtben, amely ugyanezt a DNS szakaszt ismeri fel. Ez az enzim a restrikciós endonukleáz, amely elhasítja a DNS-t ezen a helyen, ha csak az nincs megjelölve egy metilcsoporttal. A specifikusan elhelyezett metilcsoportok révén a sejt meg tudja védeni a saját DNS-ét a restrikciós enzim hasításától, a sejtbe behatoló idegen DNS viszont védtelen a nukleáz támadásával szemben, így az a behatolás után hamarosan lebomlik. Manapság kb. 400 restrikciós endonukleázot ismerünk, ez kevesebb kb. 100 féle specifitást jelent. Kétfonális DNS-t bontanak, a hasítás a láncon belül jön létre, jellegzetes „tapadós” végeket eredményezve. (ld. 4. ábra)



**4. ábra: Megkönnyítik a klónozást a bizonyos restrikciós enzimek által létrehozott „tapadós végek”. Az ECO-RI enzim például a GAATTC nukleotidsornál átlósan hasít. Ha a genom DNS-t (1) és a hordozó DNS-t (2) ECO-RI-el hasítják el, a kapott darabok komplementer egyszálú nyúlvánnyal rendelkeznek (3). A darabok összekeverésekor a bázisok között hidrogénhidak (pontok) alakulnak ki, s megfordítható módon összekapcsolják a genom- és a hordozó DNS-t (4). A kapcsolódást nem megfordítható módon lezárja a DNS-ligáz enzim (nyilak).**

## Plazmidok

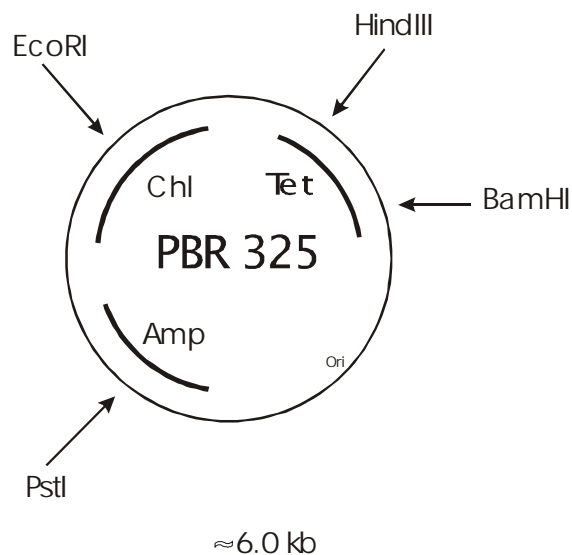
A vektor leggyakrabban plazmid vagy fág. A plazmid mind élesztőgombákban, mind baktériumokban megtalálható cirkuláris szerkezetű (nincs szabad vég), kis mólsúlyú DNS, melynek önreplikációs képessége van. Egy sejtben lehet egyetlen plazmid, de lehet több100 is. Kis mérete miatt viszonylag könnyű a sejtekből láncszakadás, összetöredezés nélkül kinyerni. Míg egy *Escherichia coli* kromoszóma DNS-ének mólsúlya kb. 2000 MD, addig egy plazmidjának mólsúlya mindössze 5-6 MD.

A plazmid akkor válik jól használható vektorrá, ha

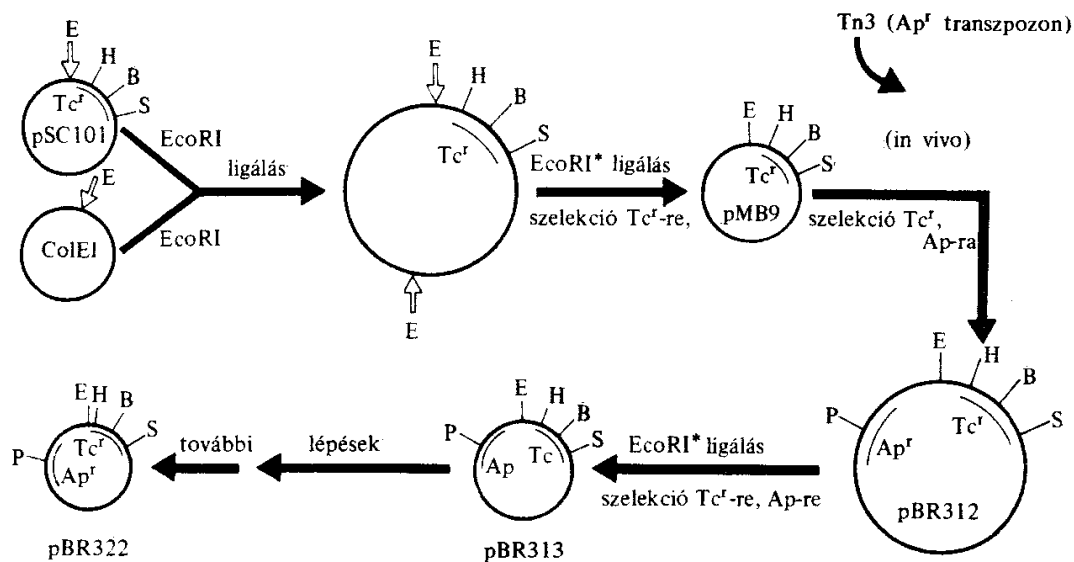
- mérete kicsi, max. 5 kb.,
- van replikációs origója,
- vannak szelekcióra alkalmas un. marker gének rajta,
- minél többféle restriktációs enzim hasítási hely a génekben, egy enzimhasítási helyből csak egy legyen.

### A plazmidok szerkezete

A pBR325 alapvető klónozó vektor, a pBR322 plazmid továbbfejlesztett változata. Három különböző antibiotikummal szembeni rezisztenciáért felelős gén van benne:



**5. ábra: pBR325 plazmid**



*A pBR 322-plazmidvektor előállításának vázlata*

A betűk restrikciós enzim felismerőhelyeit jelentik: itt elsősorban a könnyebb áttekinthetőség végett tüntettük fel ezeket; az E jelenti az *EcoRI*-enzimet (A konstrukció részleteit a szövegben ismertetjük)

**6. ábra: a pBR322 vektor előállításának vázlata**

Az egyik legáltalánosabban használt plazmidvektor a pBR322, ennek készítését ismertetjük nagy vonalaiban. Ez a vektor gyakorlatilag megfelel az összes olyan követelménynek, amelyeket a fejezet elején a „jó” vektorral szemben támasztottunk. A plazmid megkettőződés szempontjából a ColEI-re hasonlít: végső soron annak egy származéka. A ColEI típusu plazmidokra jellemző, hogy amplifikálhatók, vagyis cloramphenicol hozzáadásával megállítható a gazdasejt osztódása, a plazmid azonban tovább szaporodik. Végeredményben olyan, már nem élő sejteket kapunk, amelyekben a plazmid 1000 körüli példányban jön létre, és ez a sejt összes DNS-ének mintegy felét jelenti! Nyilvánvaló, hogy ez a plazmid kinyerés szempontjából igen kedvező.

**A gén beépítése plazmidba**

A plazmid vektorok használatának elve igen egyszerű. a plazmid DNS-t hasítjuk egy restrikciós endonukleázzal és in vitro hozzákapcsoljuk az idegen DNS-t. E kialakuló rekombináns plazmiddal ezután transzformálunk egy gazdasejtet. A fő probléma az inzerciót tartalmazó rekombinánsok és az egyszerűen (inzerció nélkül) körré visszazáródott plazmidok megkülönböztetése. A visszazáródás mértéke némileg csökkenthető a vektor és az idegen DNS koncentrációjának megfelelő megválasztásával a ligálási reakció során, többnyire azonban egyéb, az alábbiakban ismertetendő eljárást is alkalmazunk a recirkularizáció csökkentésére, illetve a rekombinánsok felismerésére és elkülönítésére.

### a., Inzerció inaktiválás

Ez a módszer alkalmazható két vagy több antibiotikumrezisztencia markert hordozó plazmidok esetén. A klónozendó DNS-t és a tisztított plazmidot egy olyan restriktív enzimmel emésztjük, amely például a tetraciklin-rezisztencia génjében hasít. Ligálás után a ligátummal transzformálunk ampicillin szenzitív *E. colit* ampicillin rezisztenssé. Az ampicillin jelenlétében kinövő transzformánsok között lesznek rekombinánsok és lesznek idegen DNS nélkül recirkularizálódott plazmidot tartalmazók is. A két transzformáció típus elkülönítésére a transzformánsokat **azonos helyekre oltjuk át** egy tetraciklin és egy ampicillin tartalmazó lemezre. A mindkét lemezen kinövő kolóniák rendelkeznek aktív tetraciklin-rezisztencia génnel, tehát valószínűleg nem tartalmaznak inzerciót. A csak ampicillinen növekvő kolóniák plazmidjaiban inaktív a tetraciklin-gén, ezek tehát valószínűleg inzerciót tartalmaznak.

### b., Irányított klónozás

A legtöbb plazmid vektor rendelkezik két vagy több egyedi restriktív hasító hellyel (pl. a pBR322-ben van egyedi HindIII és BamHI hasítóhely). Mindkét enzimmel történő emésztés után a nagyobbik fragmentum tisztítható gélelektroforézissel és ligálható egy olyan idegen DNS-sel, amelyik ugyanezzel a két enzimmel volt hasítva, így rendelkezik a megfelelő „ragadós” végekkel. A ligált rekombináns azután transzformálhatunk. Miután a HindIII és BamHI által generált „ragadós” végek egymással nem komplementerek, a nagy vektorfragment önmagában alig cirkularizál. Ezért az ampicillin rezisztens transzformánsok legnagyobb része olyan plazmidot fog tartalmazni, amely egy idegen DNS-darabbal köti össze a BamHI és a HindIII helyeket.

### c., A lineáris plazmid vektor DNS foszfatáz kezelése

A DNS-ligáz enzim csak akkor tudja katalizálni két szomszédos nukleotid között a foszfodiészter kötés kialakulását, ha egyikük 5'-foszfát, másikuk 3'-hidroxil végződéssel rendelkezik. Ez egy linearizált plazmid vektor DNS-ről bakteriális alkalikus foszfatáz enzim segítségével eltávolítjuk az 5'-foszfátot, akkor ezzel minimálisra csökkenthetjük a recirkularizáció esélyét. Így a DNS egyik szála sem képes foszfo-diészter kötés kialakítani. Ha azonban 5'-foszforilált védekkel rendelkező idegen fragment van a ligáló elegyben, ez ligálható a vektorral olyan nyílt cirkuláris molekulává, amely két „nick”-et tartalmaz. Mivel a cirkuláris molekula sokkal jobban transzformál (még akkor is, ha „nick”-et tartalmaz), mint a lineáris, a transzformánsok többsége rekombináns lesz. A sejtben a saját enzimek létrehozzák a kémiai kötést.

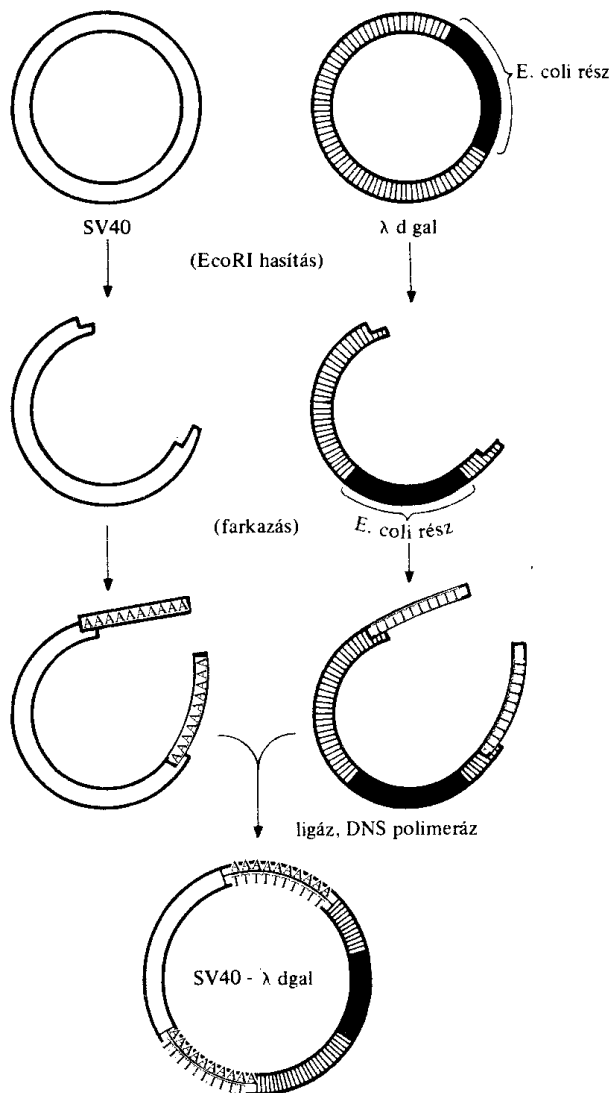
### *Problémák a nagy DNS molekulák plazmidban való klónozásánál*

A rekombinánsok és a recirkularizált vektorok arányát befolyásolja a klónozendó idegen DNS mérete is. Általában minél nagyobb az idegen DNS, annál alacsonyabb a transzformáció hatékonysága. Így nagy (nagyobb mint 10 kb) DNS fragmenteknél különösen fontos a recirkularizált vektor molekulák arányát leszorítani minden lehetséges módon. A háttér még így is magas szokott lenni és a rekombinánsok azonosítására hibridizációt kell használni.



## d., Farkazás

A terminális transzferáznak nevezett enzim a DNS 3'-végeire nukleotidokat tud kapcsolni, olyanokat, amelyeket a kísérlet során a reakcióelegyhez adnak. Ha csak egyféle nukleotidot használnak, akkor az enzim a 3'-végekre olyan túlnyomó toldalékot, „farkat” szintetizál, amely azonos bázisokból áll. Az eljárást homopolimer addíciónak lehetne nevezni, bár az angol nyelvű szakirodalomban inkább „tailing”-nek, farkazásnak hívják. Jobb szó híján mi is „farkazásnak” fogjuk nevezni ezt a módszert, amelynek révén bármely DNS molekula vagy fragmentum végeire egy azonos nukleotidból álló „farkat” lehet készíteni. Mivel az adenin és timin kiegészítő (komplementer) bázisok, a kétféle (tehát poli-A- és poli-T-farok) toldalék közt létre jöhet a bázis párosodás, azaz gyenge hidrogénkötéssel összekapcsolódhatnak. Megfelelő körülmények közt létre jön ez a kapcsolat, amelyet további enzimek felhasználásával már stabilizálni is lehet, vagyis kovalens kapcsolat építhető ki a két DNS – molekula közt.



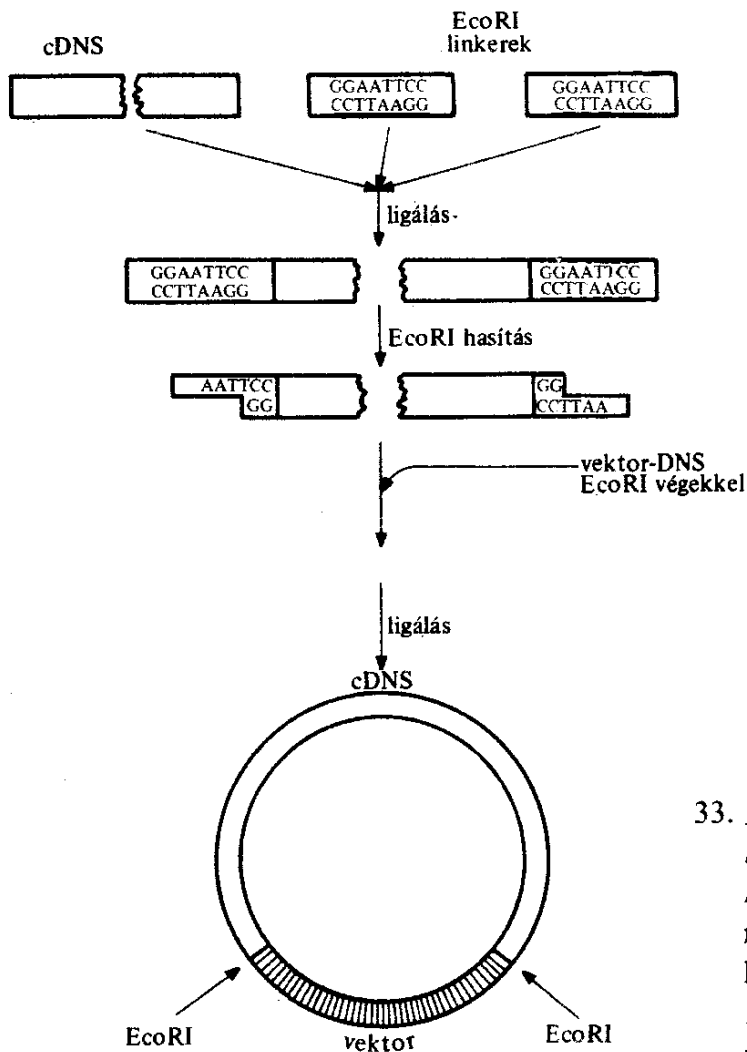
9. Az SV40-lambda-dgal-molekula konstrukciója  
Mindkét gyűrűs molekulát „kiegyenesítették” az EcoRI-enzimmal, majd a terminális transzferáz enzimmel az SV40-molekulára poli-A-, a lambda-dgal-DNS-re poli-T-farkat szintetizáltak, s a két molekula összekeverése után további enzimekkel összekapcsolták a különböző eredetű DNS-eket.

7.ábra: A farkazás vázlata

### e., Linkerek alkalmazása

A ligáz enzim nemcsak ragadós, hanem tompa végeket is össze tud kapcsolni, ha a szokásosnál sokkal nagyobb koncentrációban alkalmazzuk. Ezt tompa véghez való ligálásnak (kapcsolásnak) nevezzük. A cDNS vagy a kémiai szintetizált DNS végeire olyan oligonukleotidokat kapcsolunk, melyek tartalmazzák egy ragadós véget képző restrikciós enzim felismerőhelyét. Ezután a molekulát az illető restrikciós enzimmel kezeljük, mire a molekulán ragadós végek jönnek létre. Ezután már könnyű a vektorba való beépítés. A kapcsoló molekulák használata tehát egyesíti a „farkazás” és a ragadós véges kapcsolás előnyeit. további előny, hogy e molekulák használata esetén kevesebb restrikciós helyre kell vektort készíteni, hiszen a legtöbb feladatot meg lehet oldani a már meglévő vektorokkal és kapcsolókkal.

A 8. ábra mutatja vázlatosan a kapcsoló=linker molekula használatát.



### 33. *EcoRI* kapcsoló molekula használata

A példán egy cDNS-klónozást mutatunk be; cDNS-t kémiai szintetizált *EcoRI*-kapcsolókkal építenek a vektorhoz

8. ábra: *EcoRI* linker használata