

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.

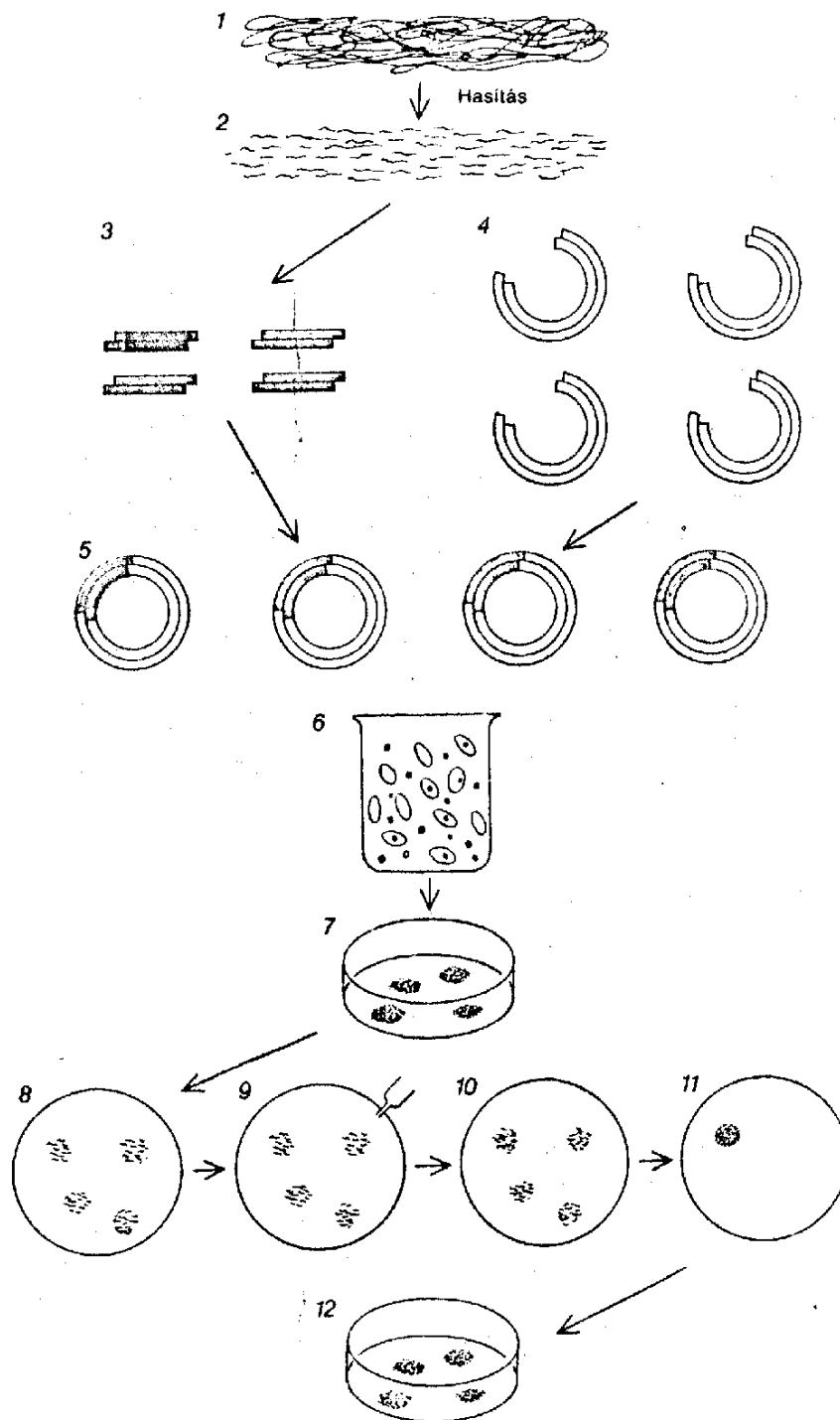
Angolul legelterjedtebben talán a „genetic engineering” kifejezést használják, amely „genetikai mérnöki tevékenységet” jelent. Ez utal a DNS-fragmentumok összeépítésének tervezett és tudatos voltára, ezért találó elnevezés. Sajnos magyarosítani lehetetlen, hiszen még az engineering szót sem sikerült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



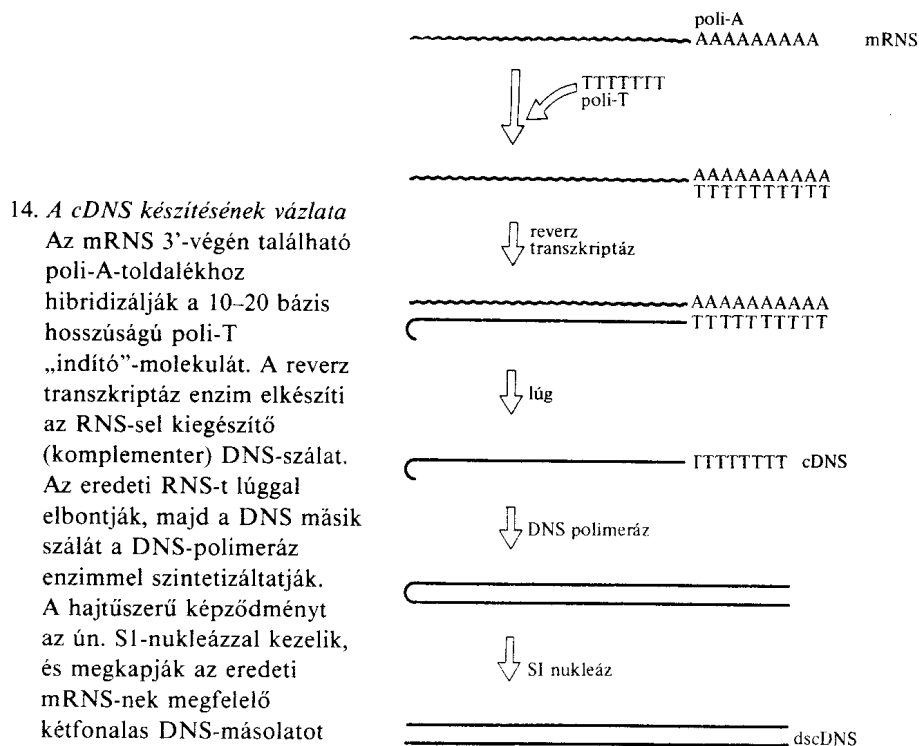
1. ábra: A GÉNKLÓNOZÁSNAK, a rekombináns DNS-technológia alpműveletének egyik változatát mutatja az ábra. Emlős genom-DNS-ét (1) restriktív enzimmel hasítják. A kapott töredékek (2, 3) valamelyike tartalmazhatja a keresett gént. Plazmid klónozó vektorok példányát hasítják ugyanezzel az enzimmel (4). A plazmidokat és a genomtöredékeket összekeverik, DNS-ligázzal összekapcsolják (5) és a rekombináns plazmidokat a baktériumokba juttatják (6). A baktériumokat a tenyésztőcsészébe behelyezik 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 kötött szondát eltávolítják (10). A szűrőpapírra fotoemulziót visznek, a radioaktív szonda az emulzió nyomot hagy (11), azonosítva a keresett klónt (12).

Speciális esetekben mód van tisztított gén előállítására is. Ilyen az afrikai karmosbéka 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 karmosbéka 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.

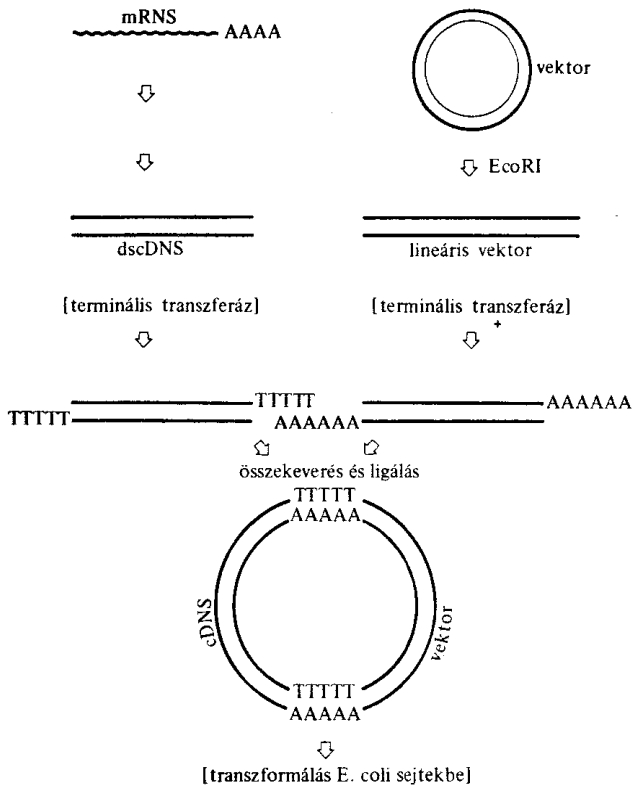
Kémiaailag szintetizált génekkel is végezhetünk klónozást. Elsősorban kis fehérjék génjeinél éri meg a fáradságot, olyanoknál, mint például a peptidhormonok. Ezeknek a szerkezete ismeretes, és az aminosavsorrendből le lehet vezetni egy megfelelő génszerkezetet is. Azért egy szerkezetet, mert a genetikai 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.

A cDNS készítését és a vele való klónozást a 2. és 3. ábrák mutatják.



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 klónozendó DNS-t az mRNA-ről 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

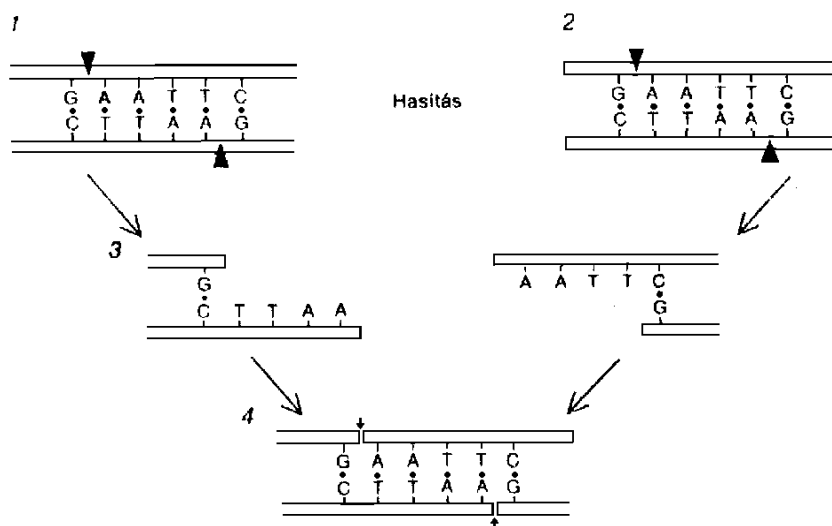
A reverz transzkriptáz, vagyis a „fordítva átíró enzim” működésének feltétele, hogy a DNS-lánc meg legyen kezdve. Az mRNA esetén ezt könnyű megvalósítani mert RNS 3'- végén elhelyezkedő poli-A-lánchoz a bázispárosodás révén „hozzátapasztunk” egy poli-T-darabot. Az ilyen módon létrejövő molekulát hibridnek 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 felhasználhatunk klónozásra is. Az mRNA-ről készített másolatot cDNS-nek („complementer „-kiegészítő) nevezzük. Szokták a kétfonális vázlatot ds-cDNS-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 restriktív endonukleáz enzimekkel, a lánc végek összekapcsolása pedig DNS ligáz enzimekkel történik.

Restriktív endonukleázok

A restriktív endonukleázok (korlátozó vagy restriktív 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 génebesztettség kialakulásához éppen ez a specifikus hasítási lehetőség nyújtott alapot. Felfedezték a gazdaspecifitás jelentőségét, más néven a restriktív-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 megjelöli a saját DNS-üket. A jelölést úgy végzik, hogy egy meghatározott bázissorrendű résznél, az egyik bázisra metilcsoportot (CH₃) kapcsolnak. Van még egy enzim a sejtben, amely ugyanezt a DNS szakaszt ismeri fel. Ez az enzim a restriktív 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 restriktív enzim hasításától, a sejtbe behatoló idegen DNS viszont védtelen a nukleáz támadásával szemben, így az a behatolás után hamarosan lebomlik. Manapság kb. 400 restriktív endonukleáz 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 restriktív 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*-R-el hasítják el, a kapott daraboknak komplementer egyszálú nyúlvánnyal rendelkeznek (3). A darabok összekeverésekor e 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 (nyílak).

Plazmidok

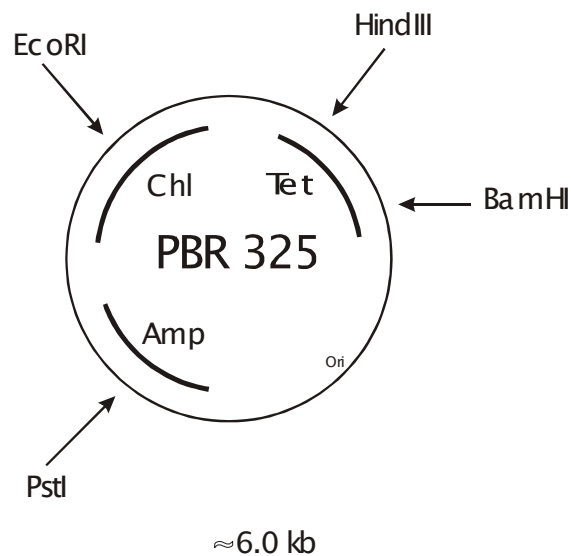
A vektor leggyakrabban plazmid vagy fág. A plazmid mind élesztőgombákban, mind baktériumokban megtalálható cirkuláris szerkezetű (nincs szabad vég), kis mólsúlyú DNS, melynek önreplikációs képessége van. Egy sejtben lehet egyetlen plazmid, de lehet több100 is. Kis mérete miatt viszonylag könnyű a sejtekből 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:

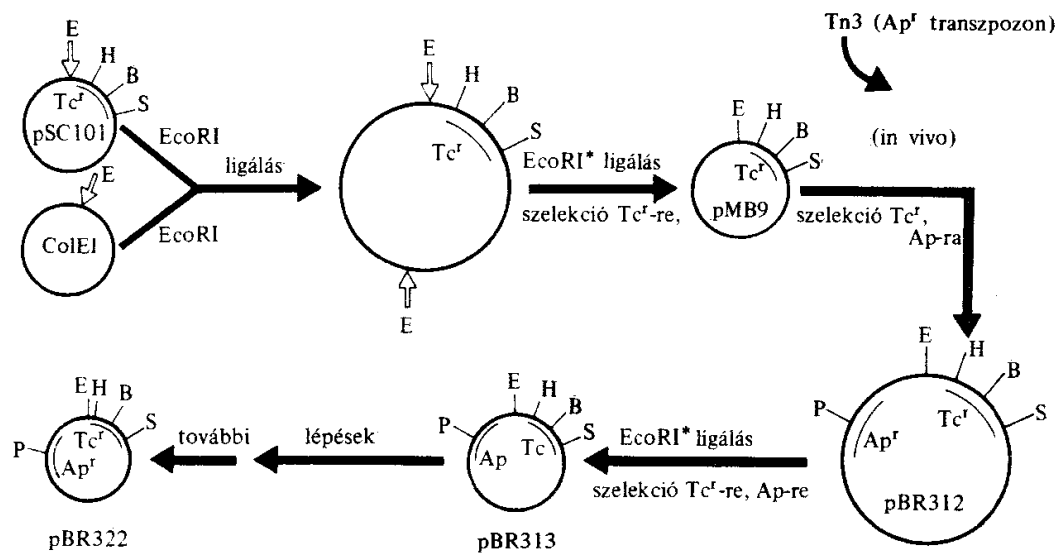


Chl – chloramphenicol (Clorocid)
Tet – tetracyclin (Tetrán)
Amp - ampicillin (Semicillin) szembeni rezisztenciáért felelős gének.

A PstI, az EcoRI, a HindIII. és a BamHI restriktációs endonukleázok, 6 nukleotidos felismerési hellyel. Ezek a rajzon jelöltek szerint 1 ill. 2 helyen hasítanak bele a rezisztenciáért felelős DNS részletekbe.

A pBR325 jelű plazmid elődje a pBR322, melynek előállítását az 5. ábrán látható.

5. ábra: pBR325 plazmid



A pBR 322-plazmidvektor előállításának vázlata

A betűk restriktions 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 plazmidvektor 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 típusú 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 restriktions 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 restriktions 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 transzformás típus elkülönítésére a transzformánsokat **azonos helyekre oltjuk át** egy tetraciklint és egy ampicillint 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 restriktions 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 rekombinánsal 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

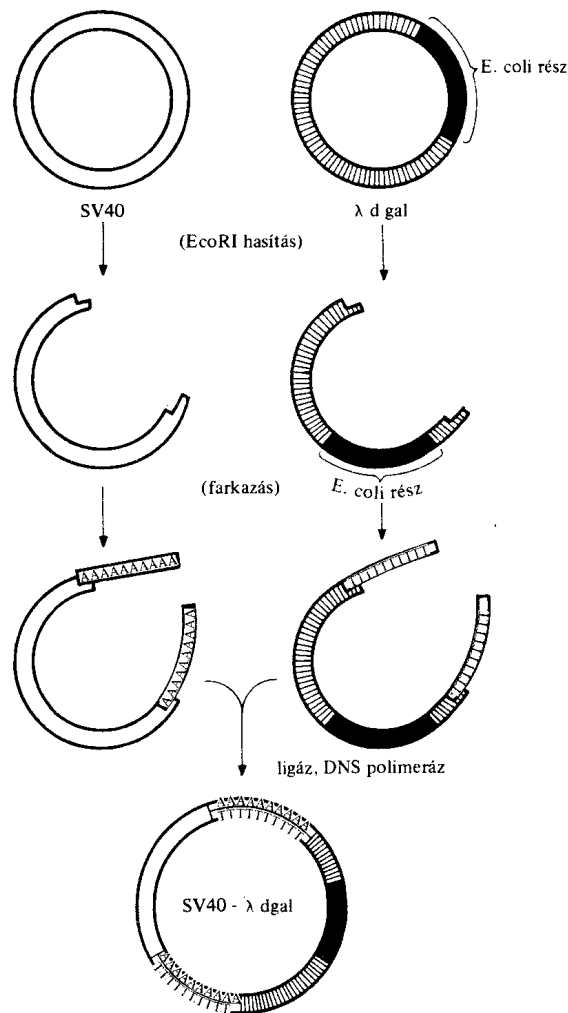
A DNS-ligáz enzim csak akkor tudja katalizálni két szomszédos nukleotid között a foszfodiészter kötés kialakulását, ha egyikük 5'-foszfát, másikuk 3'-hidroxil végződéssel rendelkezik. Ez egy linearizált plazmid vektor DNS-ről bakteriális alkalikus foszfatáz enzim kezelésével eltávolítjuk az 5'-foszfátot, akkor ezzel minimálisra csökkenthetjük a recirkularizáció esélyét. Így a DNS egyik szála sem képes foszfo-diészter kötet 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.



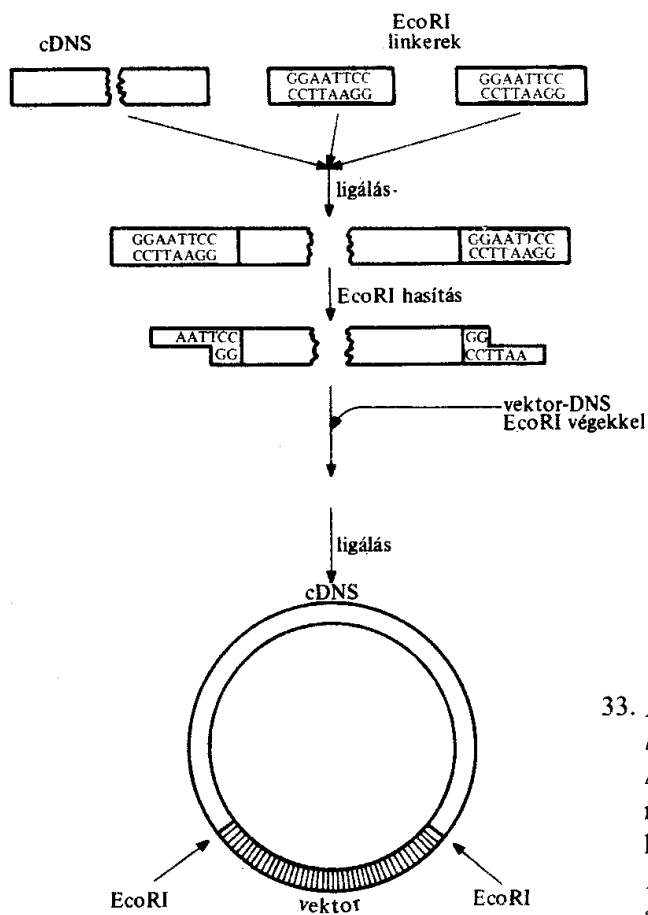
9. Az SV40-lambda-dgal-molekula konstrukciója
Mindkét gyűrűs molekulát „kiegyenesítették” az EcoRI-enzimmel, majd a terminális transzferáz enzimmel az SV40-molekulára poli-A-, a lambda-dgal-DNS-re poli-T-farkat szintetizáltak, s a két molekula összekeverése után további enzimekkel összekapcsolták a különböző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

E. coli transzformálás plazmid DNS-sel

A plazmid vektor gazdasejtbe juttatása direkt módon, transzformációval történik.

1. A transzformációhoz használt törzsek fenntartása

A transzformációhoz DH1, HB 101 nevű *E. coli* törzseket használunk. A törzsek fenntartása ferde agaron történik. A felhasznált táptalajok összetétele a következő:

LB tápagar

10 g	pepton /tripton	
5 g	élesztőkivonat	
10 g	NaCl	
17 g	agar	
1000 cm ³	desztvíz	pH 7.5

2. Oldatok

50 mM-os CaCl₂-oldat

Sterilezés autoklávban

Trafó puffer (1 l-re)

1.214 g	Trisz	
11.1 g	CaCl ₂	
0.95 g	MgCl ₂	pH 7

Sterilezés autoklávban.

TE oldat plazmid hígításhoz

1.21 g	Trisz	
0.37 g	EDTA-Na	
100 cm ³	deszt. víz	pH 8

Sterilezés autokláv.

Antibiotikum oldatok

Oxy-tetraciklin 1.25-1.5 mg OTC/ ml d.víz

Ampicillin 3.5-4 mg Amp/ ml d.víz

Sterilezés membránszűréssel.

3. Transzformáció menete

1. 37 °C-on egy éjszakán át szaporítjuk az *E. coli* törzseket (DH1, HB101) LB tápoldatban.
2. A tenyészet 1 cm³-vel beoltunk 20 cm³ LB tápoldatot (DH1 és HB101 törzsek esetén), és 37 °C-on 2 órán át inkubáljuk a sejteket. A sejteknek logaritmusos szaporodási fázisban kell lenniük: ez a feltétel 0.3-0.5 ODE-nél (550nm) valósul meg.
3. A tenyészetet 10 percig centrifugáljuk 4 °C-on, 8000 rpm-mel.
4. 2 cm³ 0 °C-os 50 mM-os CaCl₂-oldatban felfuszpendáljuk a sejteket és 15 percig 0 °C-on inkubáljuk. A CaCl₂ elősegíti a plazmid sejtfálhoz kötődését.
5. A plazmid DNS-t a trafó puffert és az 1-4 pontban leírtaknak megfelelően előállított *E. coli* sejtszuszpenziót összemérjük a következő sorrendben és arányban:

1. 5-10 µl plazmid oldat (az oldat koncentrációja 0.01 µg plazmid/ µl TE oldat)

2. A plazmid oldatot 100 µl-re egészítjük ki trafó pufferrel.

3. 200 µl sejtszuszpenzió

összesen: 300 µl oldat

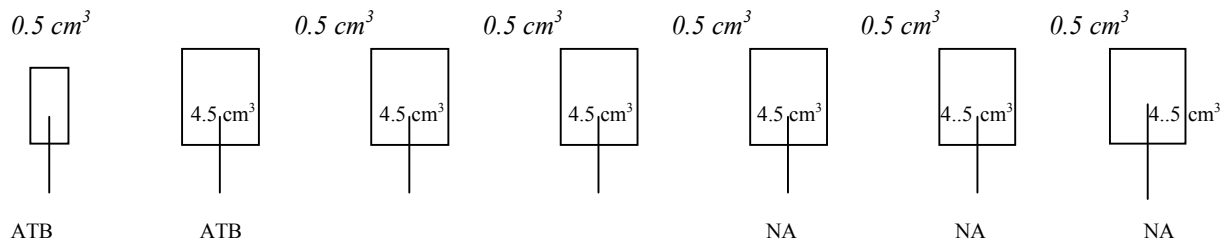
A törzseket és a hozzájuk tartozó plazmidokat, valamint a plazmidon található antibiotikum rezisztencia géneket az 1. táblázat tartalmazza.

1. táblázat

<i>Törzs</i>	<i>Plazmid</i>	<i>Rezisztencia gén</i>
DH1	pBR 329	Tet, Amp, Chl
HB101	pVG 5	Tet, Amp, Chl

Az 1. mellékletben található a használt plazmidok térképei.

6. Az 5. pontban előállított sejtszuszpenziót 30 percig $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on inkubáljuk, majd 2-3 percre $40\text{-}42\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tartjuk. A hősök a membrán fluiditását növelve lehetővé teszi a plazmid bejutását a sejtbe.
7. A sejtekre 1 cm^3 NB tápoldatot töltünk, lassú rázatás mellett $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on 60-90 percig inkubáljuk.
8. NA tápagarból lemezeket öntünk. Minden transzformáláshoz 5 lemezre van szükség amiből 2 db tartalmaz antibiotikumot 3 db pedig nem. Az antibiotikus lemezek öntésekor ügyelni kell az agar hőfokára ugyanis $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ -nál magasabb hőmérsékleten az oxy-tetraciklin elbomlik. Az antibiotikus lemez készítése a következő módon történik 10 cm^3 felolvasztott $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ra hűtött NA illetve LB agarhoz $100\text{ }\mu\text{l}$ antibiotikumot adunk (az antibiotikum oldat koncentrációja $c_{\text{OTC}}: 1.25\text{-}1.5\text{ mg/ml}$, $c_{\text{Amp}}: 3.5\text{-}4\text{ mg/ml}$). A szükséges antibiotikum a transzformációhoz használt plazmidnak megfelelő (lásd. 1. táblázat illetve 1. melléklet).
9. A transzformált sejtszuszpenzióból hígítási sort készítünk az ábrán látható módon, majd az ábrának megfelelően történik a 8. pontban előállított lemezekre a szélesztés.



ATB –antibiotikum

NA – nutrient agar

10. A transzformáció értékelése 24-48 óra múlva történik a telepek megszámlálásával.

Agaróz gél elektroforézis

A DNS fragmentek elválasztására, identifikálására és a fragmentek tisztítására legáltalánosabban használt módszer az agaróz gél elektroforézis. A technika egyszerű, gyors és a gélben lévő DNS közvetlenül láthatóvá tehető: a DNS csíkok a gélben festhetők kis koncentrációjú interkaláló festékekkel, az ethidium-bromiddal; már 1 ng DNS látható a gélen UV fényben.

A DNS elektroforetikus vándorlási sebessége az agaróz gélben 4 fő paramétertől függ:

A DNS molekula mérete:

A lineáris kettős szálú DNS (amely feltehetően egyik végével előrefele vándorol a gél mátrixban) sebessége fordítottan arányos a molekulasúly tizes alapú logaritmusával.

Az agaróz koncentrációja:

A DNS elektroforetikus mobilitásának (μ) a logaritmus és a gélkonzentráció (τ) között egyenes arányosság van, amely a következő egyenlettel írható le:

$$\log \mu = \log \mu_0 - K_r \tau$$

ahol μ_0 a szabad elektroforetikus mobilitás, K_r pedig a retenció együttható, amely függ a gél tulajdonságaitól és a vándorló molekula méretétől, valamint alakjától.

A DNS koformációja:

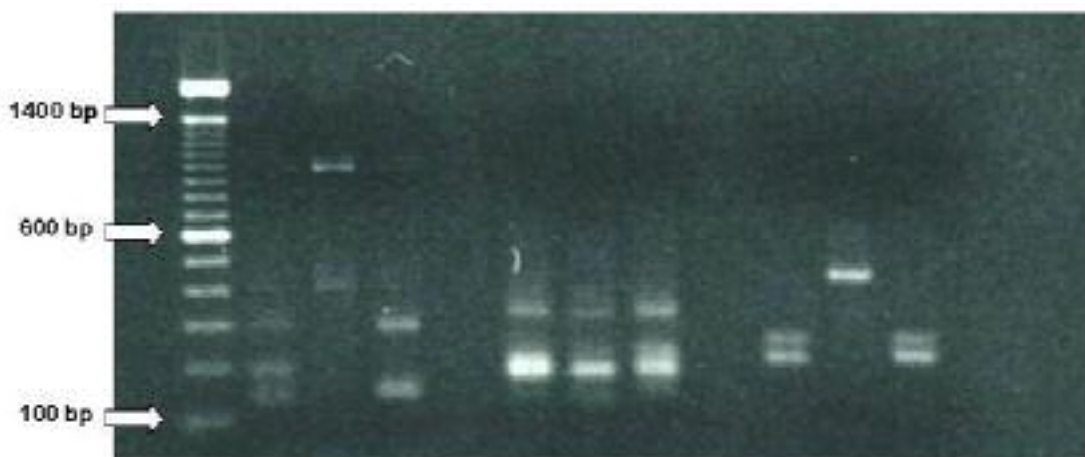
Az azonos molekulasúlyú zárt cirkuláris (I. forma), nicked cirkuláris (II. forma) és a lineáris (III. forma) DNS különböző sebességgel vándorol az agaróz gélben. A három forma relatív mobilitása elsősorban az agaróz koncentrációjától függ, de hat rá az áramerősség, a puffer ionerőssége és az I. formán levő szuperhelikus menetek sűrűsége. Bizonyos körülmények között az I. forma gyorsabban vándorol, mint a II. forma, máskor a sorrend fordított. Ebben az esetben egyre nagyobb mennyiségű ethidium-bromid kötődik a DNS-hez, az I. forma negatívan csavarodott szuperspiráljai kitekerednek és a molekula vándorlási sebessége csökken. Egy bizonyos kritikus szabad festék koncentrációnál ahol a molekula teljesen kiegyenesedik, a DNS I. formájának vándorlási sebessége eléri a minimumot.

Az alkalmazott áram:

Alacsony feszültségen a lineáris DNS vándorlása arányos a feszültséggel.

A DNS bázisösszetétele és a hőmérséklet:

A DNS viselkedése az agaróz gélben nem függ lényegesen sem a DNS bázisösszetételétől, sem a hőmérséklettől.



9. ábra: Az agaróz gélelfo felülről lefelé futott, a bal szélén a létra látható.