

7. gyakorlat: Plazmid izolálás, emésztés, gélelektroforézis

1. Miért van szükség restrikciós enzimek esetében hőinaktiválásra?

Azért, hogy elkerüljük a **star aktivitást**. Ez azt jelenti, hogy ha **túl sokáig hagyjuk a DNS-sel egy oldatban az enzimet**, akkor **nem csak a felismerőhelyeknél, hanem más, random helyeken** is elhasítja azt. Az **előírt inkubálási idő** leteltével, de legfeljebb 1 óra elteltével hőinaktiválást kell végeznünk. Ekkor **az enzim elveszti natív szerkezetét**, így onnantól nem tudja tovább ellátni funkcióját (azaz nem hasítja tovább a vele egy oldatban lévő nukleinsavakat – a **nukleinsavakban nem tesz kárt** a hőinaktiválás)

2. Röviden írja le a molekuláris klónozás (plazmid előállítás) lépéseit!

- a felszaporítani kívánt **génszakaszt tartalmazó DNS beszerzése** a kiválasztott organizmusból (pl. humán, patkány, egér)
- **PCR**: a kiszemelt nukleotid szekvenciát, target DNS-t nagyobb mennyiségben megfelelően **tervezett primerekkel, PCR reakcióval** nyerhetjük ki egy teljes gén, esetleg kromoszóma vagy genom szekvenciájából (attól függően, hogy mit tudunk „beszerezni”)
a tervezett PCR primereknek van egy hibridizáló része, felismerő régiója, ami a célszekvencia komplementere, illetve van egy nem hibridizáló része, ahol a restrikciós enzimek hasítási helye kódolódik
- **restrikciós enzimekkel emésztés**: ún. **ragadós vég**, néhány nukleotid hosszú egyszálú szakasz **marad** a felszaporított DNS **5' és 3' végén** is. Ezt a target (cél) DNS szakaszt nevezzük **inzertnek**.
- ha az **üres plazmidot** ugyanazokkal a **restrikciós enzimekkel emésztjük**, mint a target DNS szakaszt
- **ligálás**: a **plazmid és az inszert ragadós végei egymás komplementerei** lesznek. **Spontán hibridizálnak**, majd **ligáz enzim hozzáadásával a target kovalensen is beilleszthető a vektorba**
a DNS-ligáz enzim foszfodiészter kötés létrehozásával képes összekapcsolni két kovalensen nem kapcsolódott DNS molekulát

3. Mi a DNS ligáz enzim funkciója?

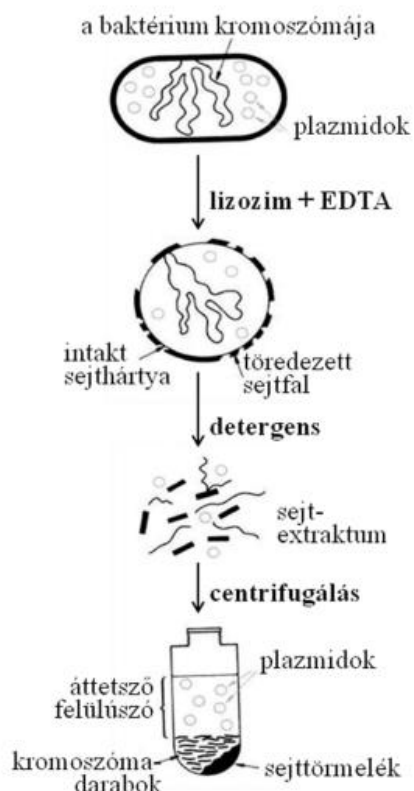
A DNS-ligáz enzim **foszfodiészter kötés létrehozásával** képes összekapcsolni két kovalensen nem kapcsolódott DNS molekulát.

4. Mi az a star (csillag) aktivitás?

Lásd: 1. kérdés → ha **túl sokáig hagyjuk a DNS-sel egy oldatban az enzimmel**, akkor **nem csak a felismerőhelyeknél, hanem más, random helyeken** is elhasítja azt.

5. Írja le a plazmid izolálás lépéseit vázlatosan!

- a baktérium kultúrát **centrifugáljuk**
- **lízispufferben** felvesszük a sejteket
- **feltárjuk a sejteket** (roncsoljuk a baktériumok membránját, hogy minden makromolekula kiszabaduljon a citoplazmából)
- több **mosó lépés**: a DNS károsítása nélkül **kicsapjuk**, így **eltávolítjuk a fehérjéket és egyéb sejtalkotókat**
- **felvisszük a plazmidot tartalmazó oldatot** a szilikon gyöngyökből álló **oszlopra**, ami kellően **magas sókoncentráción megköti a nukleinsavakat**
- további **mosó lépések**
- **megtisztított plazmid DNS kis térfogatú elúciós pufferrel vagy vízzel eltávolítható az oszlopról**, így tömény, tiszta, további felhasználásra kész plazmidot kapunk



(a képet a sejtbiológia I. jegyzetből vágtam ki)

6. A molekuláris klónozáshoz szolgáló kiindulási PCR során milyen primertervezési szempontot érdemes figyelembe venni, ami a klónozáshoz fontos lehet?

A PCR reakcióhoz használt primereket úgy kell megtervezni, hogy segítségükkel **hozzá tudjunk adni a target szekvenciához** olyan **nukleotidokat**, amiket a **későbbi**

lépések során hasznosíthatunk. (pl restrikciós enzim felismerő helyeket, illetve stop kodonokat a 3' végre).

Pl. a target szekvenciához **hozzátoldunk primer által 5' irányba egy EcoRI hasítóhelyet, 3' irányban pedig egy NotI hasítóhelyet.**

Az így tervezett PCR primereknek van egy **hibridizáló része**, felismerő régiója, ami a célszekvencia komplementere, illetve van egy **nem hibridizáló része**, ahol a restrikciós enzimek hasítási helye kódolódik.

7.Milyen komponensekből áll a gélelektroforézishez használt gél, amit nukleinsavak futtatásához a laborban szokás önteni használat előtt? Melyik komponensnek mi a szerepe?

Poliszacharid molekulákból kialakított **térhálós szerkezetű agaróz gél** – Egy agaróz oldatot készítünk, ami **visszahűlés közben gellé szilárdul.**

Oldat komponensei:

- **TAE puffer:**
 - **Tris-acetát:** **savas** összetevő (nagyjából állandó 8,3 pH-n)
 - **EDTA:** **fémion kelátor**, a DNázok működését gátolja, amiknek **Mg²⁺ ion** kellene a működéséhez
- **agaróz**

8.Milyen komponensekből áll a gélelektroforézishez használt futtató puffer, amit nukleinsavak futtatásához használunk? Melyik komponensnek mi a szerepe?

TAE puffert használunk, amely **megfelelő ionos közeget biztosít a futáshoz.**

Két összetevő keverékéből áll:

- **Tris-acetát:** savas összetevő
- **EDTA:** fémion kelátor, a DNázok működését gátolja, amiknek **Mg²⁺ ion** kellene a működéséhez

9.Gélelektroforézis során milyen irányba futnak a DNS molekulák? (piros/fekete, pozitív/negatív, mindegyik legyen része a válasznak) Miért?

Mivel a **DNS negatív töltésű**, ezért ha a gél tartalmazó futtató kádat elektromos áramkörbe kötjük a DNS minták a **pozitív (piros) elektróda felé fognak futni**, úgy, hogy a rövidebb DNS fragmentumok futnak elől, a nagyobbak hátul. A gél úgy kell a **kádba helyezni**, hogy a **zsebek a fekete elektródához közelebb** legyenek, nehogy a minta ellenkező irányba futtatva kifusson a gélből.

10. Mikor mondhatjuk egy nukleinsav molekulára (szekvenciára), hogy rekombináns? (nem elég egy szó válasz gyanánt)

Rekombináns DNS szakasz: minden, ami akár csak részben is mesterségesen kialakított nukleinsav szekvencia, vagyis **egy az egyben nem lenne megtalálható semelyik organizmus saját genomjában.**

11. Mit jelent az in vitro és az in vivo kifejezés?

in vitro: ("kémcsőben") a kísérleti folyamat **nem az élő szervezetben**, hanem **azon kívül, ellenőrzött körülmények között** zajlik le

in vivo: ("élőlényben") a kísérleti folyamat az **élő szervezetben** zajlik le

12. Milyen típusú vektorokat használnak a molekuláris biológiában? Írjon legalább két típust.

vektor: az a **DNS molekula**, aminek a **segítségével az idegen génszakaszt bevigyük a sejtbe**

példák: plazmidok, virális vektorok (kozmidok), lambda fág alapú vektorok, illetve mesterséges kromoszómák

13. Egy plazmid emésztése utáni gélelektroforézis gélképén sok, a betöltésizsebtől a vártnál távolabb elhelyezkedő csíkot látunk. Mi lehet ennek a magyarázata?

A rövidebb DNS darabok „gyorsabban futnak”, így azok vannak **távolabb**. Valószínűleg túl sokáig volt inkubálva az emésztés, mivel olyankor az **enzim** hajlamos **nem csak a felismerő helyeknél elvágni a DNS-t**, hanem **random helyeken** is (star aktivitás).