

Plazmid transzformálás, steril munka

1. Ismertessen legalább kétféle sterilizálási eljárást!

Forralás: edények, oldatok csíramentesítésére, akár mikróban melegítéssel is működik, legalább 5 percig érdemes

UV: az ultraibolya fény DNS roncsoló hatású, a mikroorganizmusokra is ugyanúgy hat, mint az **emberekre**.

Nyílt láng: legrégebbi, legegyszerűbb sterilizáló módszer. **Fémeszközöket** (csipeszeket, fémszészétöket) szokás előbb **alkoholba** mártani, majd a **lángba tartani**, így miközben az **alkohol elég a felületen elpusztítja az összes csírákat**. Üvegek, kémcsövek száját szokás még néhányszor **áthúzni a láng felett**, hogy kiöntés közben ne szennyeződjön be az agar, vagy a sterilizált eszközeink ne vihessék be az üveg száján/a kupak alatt vagy mellett megtelepedő csírákat a minta belsejébe. Megfelelő **körültekintéssel műanyag eszközöket is** lehet lángolással csíramentesíteni, különösen azokat a hőálló tárolókat, amik kifejezetten steril munkához, sejtek tenyésztéséhez lettek kifejlesztve.

Plazmasterilizáció: legújabban alkalmazott sterilizációs eljárás. **Zárt terű berendezésben vákuumot** hoznak létre, majd **H₂O₂-t fecskendeznek be**. **Elektromos vagy mágneses tér hatására** a H₂O₂ „**plazmaállapotba**” kerül, amelyet az anyag negyedik halmazállapotának is szokás nevezni. A peroxid **pozitív és negatív töltésű szabad gyökei általános antimikrobiális** - virucid, baktericid, sporacid - hatásúak. A plazmasterilizáció **alacsony hőmérsékleten** (46 ± 4 °C) **száraz légtérben történik**. **Hőre és nedvességre érzékeny anyagok esetében is** alkalmazható. **O₂ és H₂O marad vissza, tehát nem toxikus**. Sterilizáció hossza **45–75 perc**. A sterilizálást követően a készülék tartalma száraz, azonnal felhasználható.

2. Hogyan hat az ultraibolya fény a mikroorganizmusokra? (Kifejtve, hogy pontosan mit csinál.)

DNS roncsoló hatású (mint emberben). A citozin esetében **fotohidratációt** (kettős kötésének felszakadását okozza), timin és uracil esetében **photodimerizációt** okoz.

3. Mi a hátránya az UV sterilizációnak (mire kell figyelni a használatakor)?

A sugárzásnak igen **kicsi az áthatoló képessége**, hatása a **távolsággal négyzetes arányban csökken**, és a **légterek csíramentesítésénél mindig maradhatnak olyan, a sugárzás számára nem elérhető területek**, ahol a **mikroorganizmusok életben maradhatnak**.

4. Mi történik autoklávozáskor?

Az autokláv **nagy nyomáson működő, álló vagy fekvő kivitelű, mechanikusan vagy gőzzel kavart, gőzzel fűtött, zárt tartály formájú** készülék. A **munkaterét légtelenítik**, majd **túlnyomásos vízgőzt** juttatnak a készülékbe, amely adott hőfokon és hatóidő alatt **elpusztítja** a mikroorganizmusokat.

5. Mit jelent a lamináris légáramlás, hol és miért használjuk?

A **lamináris légáramlás** azt jelenti, hogy **nincs benne turbulencia**, a **levegő egy irányba** vagy **vertikálisan vagy horizontálisan áramlik**. A **lamináris fülkékben** használjuk, ahol a **szűrt**

levegő folyamatos, lamináris áramlása biztosítja azt, hogy az eszközökre és mintákra semmilyen **mikroorganizmus ne telepedhessen** rá.

6. Sorolja fel a plazmid három fő komponensét!

- **klónozó hely** (idegen DNS helye)
- **szelekciós marker** (ez alapján **kiválaszthatók azok a baktérium sejtek/kolóniák**, melyek **tartalmazzák a plazmidot**, általában **antibiotikum rezisztencia gén**)
- **replikációs origó** (ez szükséges ahhoz, hogy a **plazmid replikálódni tudjon a gazdasejtben**)

7. Hogyan különböztük el azokat a baktérium telepeket, amikben van plazmid azoktól, amikben nincs?

Szelekciós markerek (általában antibiotikum rezisztencia gének) segítségével kiválaszthatók azok a baktérium sejtek/kolóniák, amelyek **felvették a plazmidot** (illetve antibiotikum rezisztencia alkalmazásakor csak **azok a baktériumok élnek túl**, amelyek felvették a plazmidot).

Pl. ha **ampicillin rezisztencia gént** hordoz a plazmid, akkor **ampicillin tartalmú táptalajon növekszük** a baktériumokat a regenerálódási idő után.

8. Hogy hívják a folyamatot, melynek során nem rokon egyedek között génátadás történik?

Horizontális géntranszfer

9. Mit jelent az, hogy kompetens sejt? Hogyan lehet egy sejtet kompetenssé tenni?

Az a **sejt kompetens**, amelyik **képes a környezetéből DNS-t felvenni**. Kompetens sejteket legegyszerűbben úgy hozhatunk létre, hogy a sejteket **CaCl₂-ot tartalmazó oldatban inkubáljuk**, mely segíti a **plazmid DNS kötődését a baktériumfal lipopoliszacharidjához**; vagy **hőshockkal**, melytől a **sejtmembrán fluidabb** lesz. Legkönnyebben az **E. coli** tehető kompetenssé

10. Alkalmas-e a plazmid transzformálás arra, hogy emberi sejtekkel termeltessük a kívánt fehérjét? Fejtse ki, hogy miért igen/nem!

Prokarióták esetén **transzformálásnak** nevezzük azt az eljárást, amikor a **gazdasejt exogén genetikai anyagot vesz fel**. **Eukarióták, állati sejtek** esetén **bonyolultabb** módszerekre van szükség **idegen DNS bejuttatásához**, amit **transzfektálásnak** nevezünk.

11. Előzetes molekuláris biológiai tanulmányai alapján mit gondol, milyen hátrányai/nehézségei lehetnek annak, ha humán fehérjét termeltetünk baktériumsejtekben?

A **prokariótákban nincs sejtmag**, és egyéb **membrán határolt sejt szervecskék**, ezért az eukarióta gének lehet hogy **nem funkcionálnának** ugyanúgy a baktériumban mint az eukariótában működne, ami **megnehezítheti az izolálásukat**. Továbbá nehéz biztosítani, hogy a baktérium teljesen funkcionális fehérjét állít elő.

Baktériumokban nincsenek intronok, így ha olyan eukarióta gént akarunk baktériumban **expresszálni**, ami tartalmaz intront, és **ezek nem önmaguktól vágódnak ki**, akkor előbb **cDNS-t kell létrehozni**, és ezt **beültetni a baktériumba**. Sok eukarióta fehérje esik át **poszt-transzlációs módosításon**, amit a baktérium nem tud megcsinálni, mert **hiányoznak az** ehhez szükséges sejt szervecskéi (ER, Golgi).

12. Röviden ismertesse a lac operon működését, az IPTG szerepét a fehérje expresszióban!

A **lac-operon** a **laktóz hasznosítását szabályozza**. **Promóter-régióból, operátor-régióból és 3 struktúrgénből áll**. Ha **nincs laktóz** a rendszerben, a **gátlófehérje** (lac-represszor) bekapcsolódik az **operátor régióba**, emiatt az **RNS-polimeráz nem képes a DNS-hez kötődni** és **azon végighaladni és a struktúrgének nem képesek laktóz-bontó enzimet szintetizálni**.

Ha megjelenik a **laktóz a baktérium környezetében**, az **bekapcsolódik a represszorfehérjébe**, így **gátlás alá kerül**, ennek következtében **nem képes bekapcsolódni az operátor régióba**, ezáltal **megindulhat a laktóz-bontó enzim szintetizálása**.

Az **IPTG (izopropil-tiogalaktozid)** egy nem metabolizálódó laktóz analóg. A **bakteriális promótereket IPTG-vel indukáljuk**. Az indukció a lac-operon szabályozási elvén alapul. **IPTG jelenlétében a lac-represszor leválik a promóterről**, megtörténik a **génátírás**. A hozzáadott **IPTG mennyiségével még az átírás mértékét is szabályozni tudjuk**.

13. Mi történik molekuláris szinten, ha baktériumsejtekhez klóramfenikolt adunk? Mi a célunk ezzel?

A klóramfenikol nevű **antibiotikum baktériumokban az 50S riboszóma alegységhez kötődik**, a **peptidil transzlokációt blokkolja**, ezáltal **leállítja a fehérjeszintézist**, emellett pedig a baktérium saját **kromoszómájának replikációját is gátolja** – ezáltal a **kezelt baktériumban a plazmid replikációja fokozódik**.

14. Írja le a transzformálás + szélesztés lépéseit röviden!

1. Jégen **fokozatosan kiolvasztjuk a -80°C-on tárolt, előzetesen elkészített kompetens sejteket**.
2. **5-10 ng plazmidot pipetázunk a kompetens sejtekhez**.
3. Óvatosan **keverjük a plazmidot és a sejteket** (NE vortexeljük, mert a sejtek ilyenkor még sérülékenyek).
4. Tegyük **42 °C-os vízfürdőbe vagy termosztátba a csöveket 90 másodpercre**.
5. Tegyük őket vissza **2 percre a jégre**.

6. Ezután steril fülke alatt tegyük a sejtekhez **300 µL steril, antibiotikum mentes „LB” médiumot**, majd tegyük **20-30 percre 37 °C-os vízfürdőbe** őket. Az *E. coli* baktériumok osztódási ciklusa LB médiumban 37°C-on kb. ennyi idő kell nekik, hogy egyet osztódjanak.

7. Steril fülke alatt **100 µL-nyi folyadékot pipetázzunk a plate-re** a transzformált csőből. **Kenjük szét** a folyadékot a teljes plate-en a lángolással sterilizált üveg szélesztőpálcikával.

8. Tároljuk a lemezeket **37°C-os termosztátban**, mert az az *E. coli* baktériumoknak a legmegfelelőbb hőmérséklet a növekedéshez. Érdemes egy-két órán keresztül **táptalajjal lefelé tárolni** a lemezeket, hogy a **gravitációt kihasználva beszívja a táptalaj a szélesztett baciszuspenziót**, majd egy-két óra elteltével fordítsuk a petricsészéket fejjel lefelé, hogy ne gyűljenek össze a telepek egy csomóba. **37 °C-on inkubáljuk a lemezeket egy éjszakán át.**

15. Mi az a hősokk? Mire jó? Hogy történik pontosan a protokollban?

Hősokk hatására a **sejtmembrán fluidabb** lesz, így a **DNS be tud jutni a citoplazmába**. A **hősokk 90 másodperces 42°C-ra melegítéssel** történik (termosztátban vagy vízfürdőben), ezután a **sejteknek rögtön vissza kell kerülniük a jégre**.

16. Mivel tehetőek kompetenssé a baktérium sejtek, mi zajlik ilyenkor?

Kompetens sejteket legegyszerűbben úgy hozhatunk létre, hogy a sejteket **CaCl₂-ot tartalmazó oldatban inkubáljuk**. Ez elősegíti a **plazmid DNS és a baktérium sejtfalában levő lipopoliszacharidok közti kötés** kialakulását, mert a **pozitív töltésű Ca²⁺-ok vonzzák a negatív töltésű DNS-t**.

17. Milyen hosszú az *E. coli* baktériumok osztódási ciklusa 37°C-on, LB médiumban?

20-30 perc

18. Mekkora összterfogatú kémcsőben indítana el egy 3 ml-s *E. coli* kultúrát? És egy 250 ml-s kultúrát?

A **sejtek növekedéséhez az O₂ jelenléte is fontos** – így **steril, zárt körülmények között** tudunk a növekedéshez elegendő mennyiségű oxigént biztosítani (**minden esetben az oldatnál 4-5x nagyobb térfogatú edénnyel** érdemes dolgozni a **megfelelő oxigénellátáshoz**).

3 ml-es kultúra: legalább **15 ml-es** kémcső

250 ml-es kultúra: legalább **1250 ml-es** kémcső

19. Ha reggel 9-kor 2,5 ml 2 MFU denzitású baktérium kultúrát kihígítunk 250 ml LB médiumba, akkor 37°C-on növesztve kb. mikorra számíthatunk rá, hogy 4 MFU-ra növekszik?

2,5 ml-ből lesz 250 ml, ez **100-szoros hígítás**.

128 = 2⁷-szeres baktériummennyiség esetén, tehát ha a **sejtek 7-szer osztódnak**, akkor a **hígított kultúrában megkapjuk az eredeti 2 MFU denzitást**. Nekünk **4 MFU denzitás** kell, ehhez a sejteknek **14-szer kell osztódnuk**. Az osztódási idő nagyjából **30 perc**, tehát **14 osztódás kb. 7 óra alatt** zajlik le. Ha reggel **9-kor indítottuk**, akkor kb. **délután 4 órára lesz 4 MFU denzitású**.