

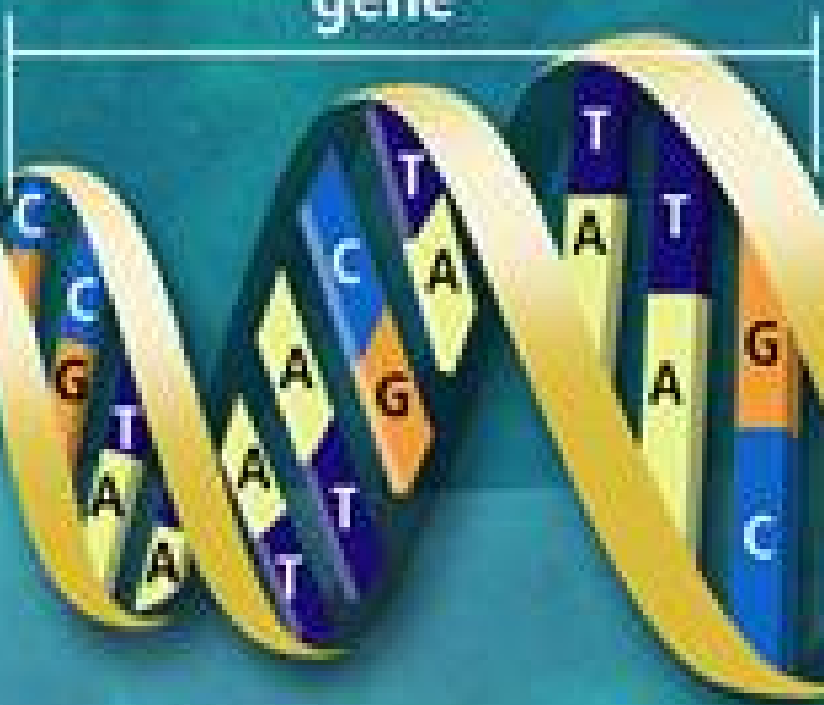
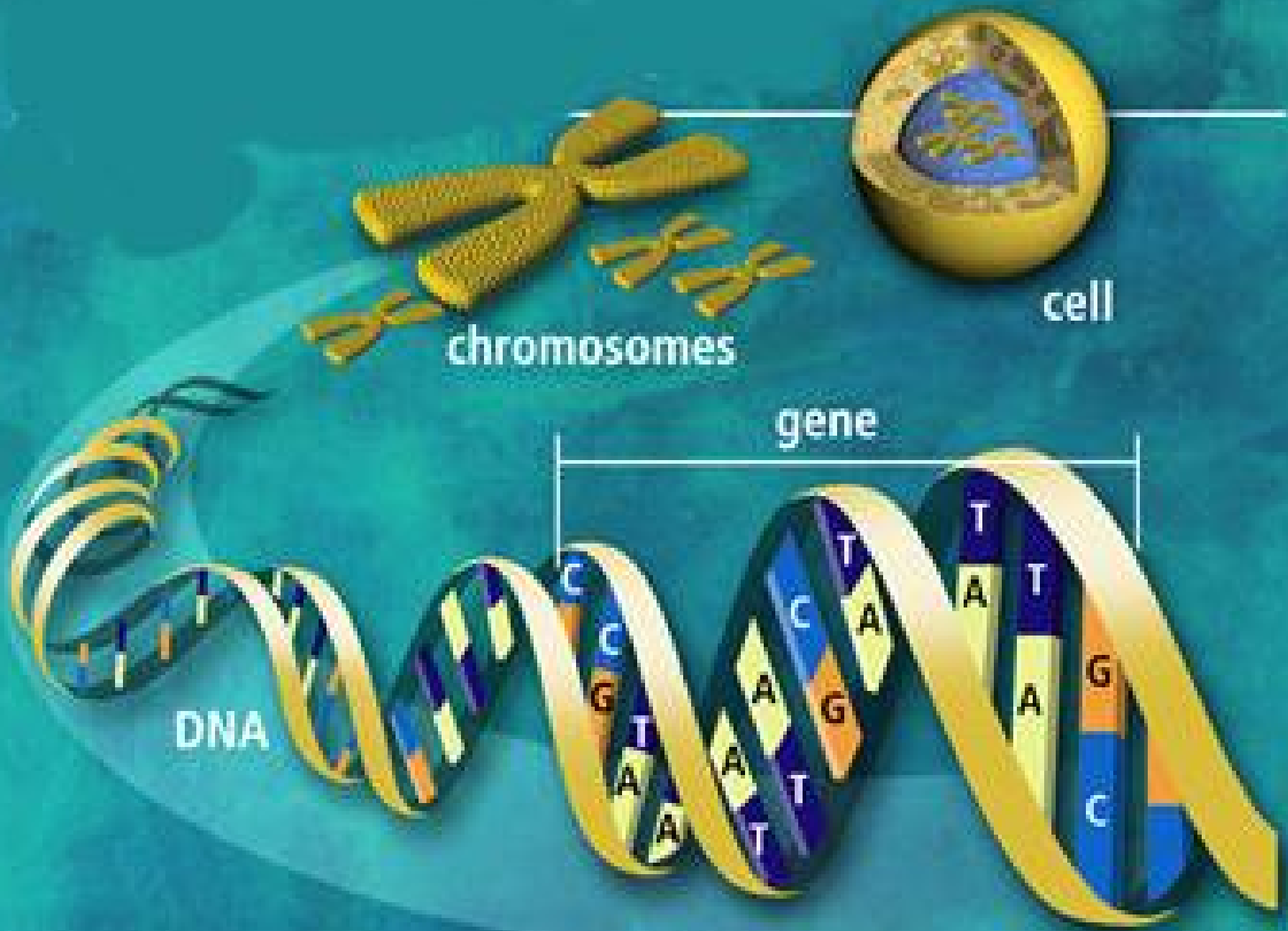
BIOTECHNOLÓGIA

Klasszikus biotechnológia: olyan gyártási eljárást jelent, melyben valamilyen élő szervezet vagy annak alkotórészei végzik a termék előállítását.

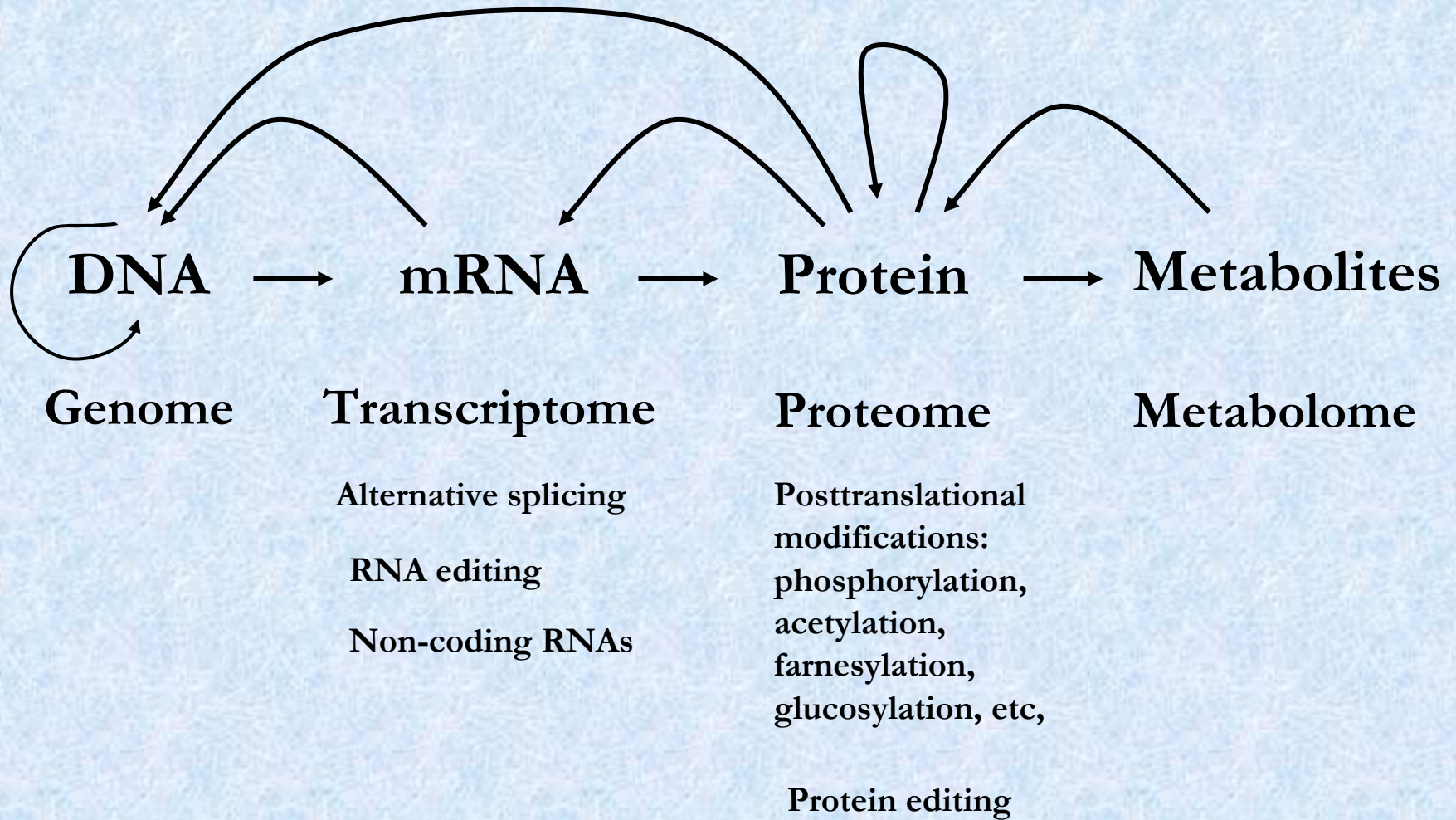
Az új **biotechnológiai** eljárásokban az ember által bizonyos célból genetikailag módosított élő szervezetek vesznek részt:

- mikroorganizmusok
- állatok
- növények

GMO → transzgénikus növények



A centrális dogma alkalmazhatósága a biotechnológiában



Rekombináns DNS technikák

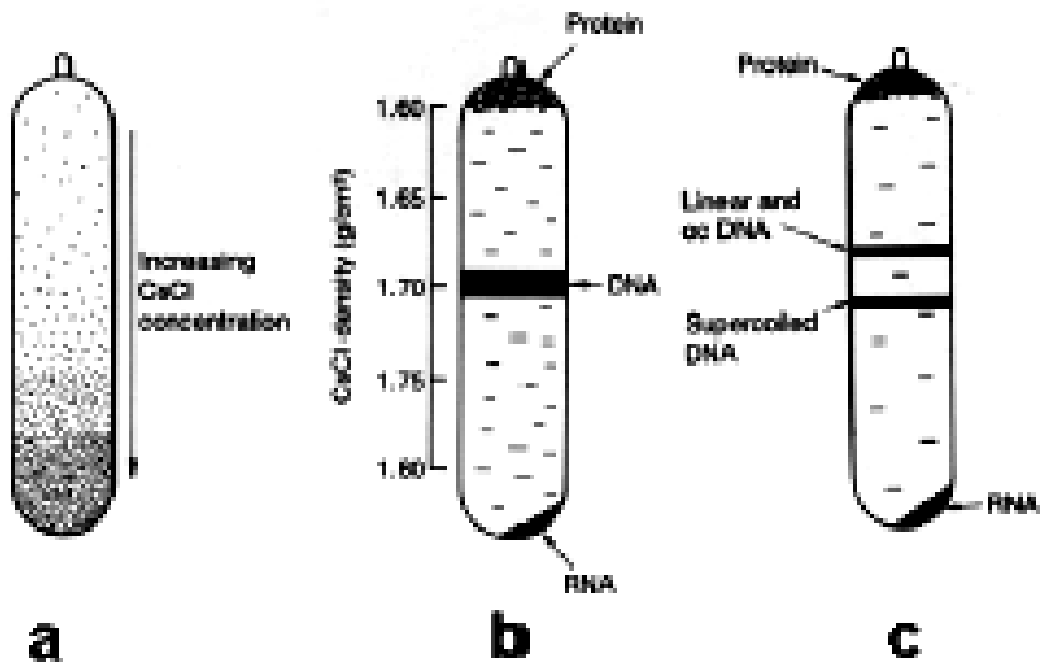
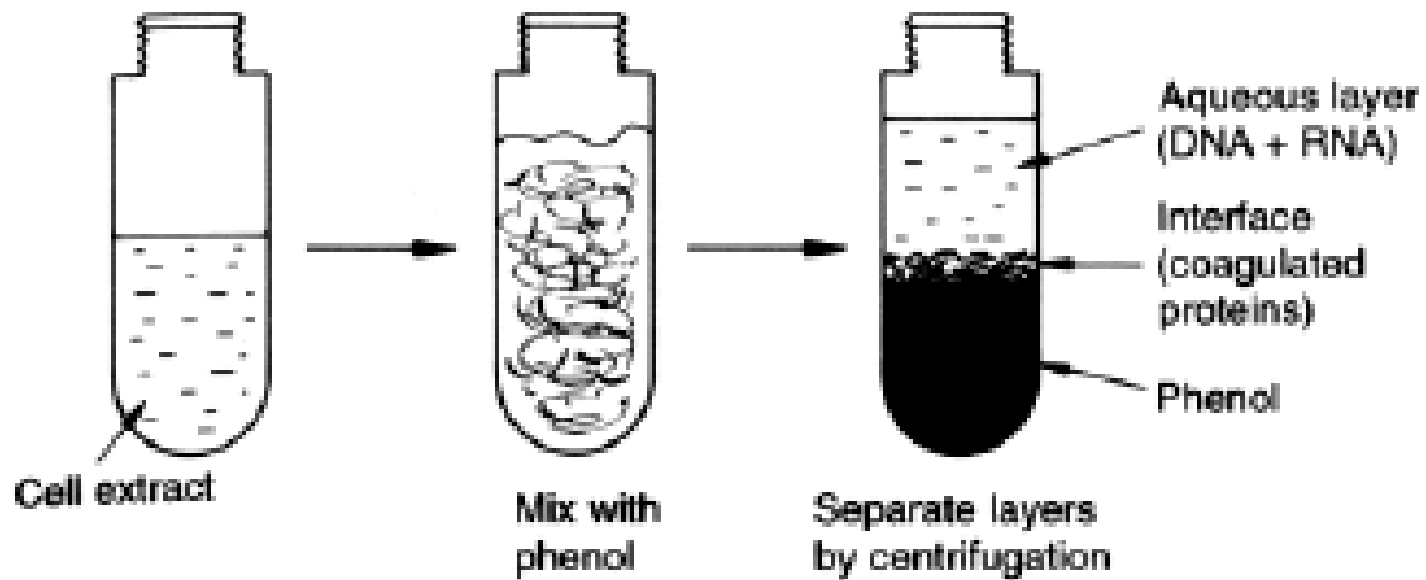
- DNS izolálás, gélelektroforézis
- Hibridizációs technikák
- Enzimek
- Polimeráz lánc reakció
- Vektorok, DNS bejuttatása a gazdasejtbe
- Könyvtárak készítése
- Szekvenálás, irányított mutagenézis
- Expressziós rendszerek

DNS izolálása

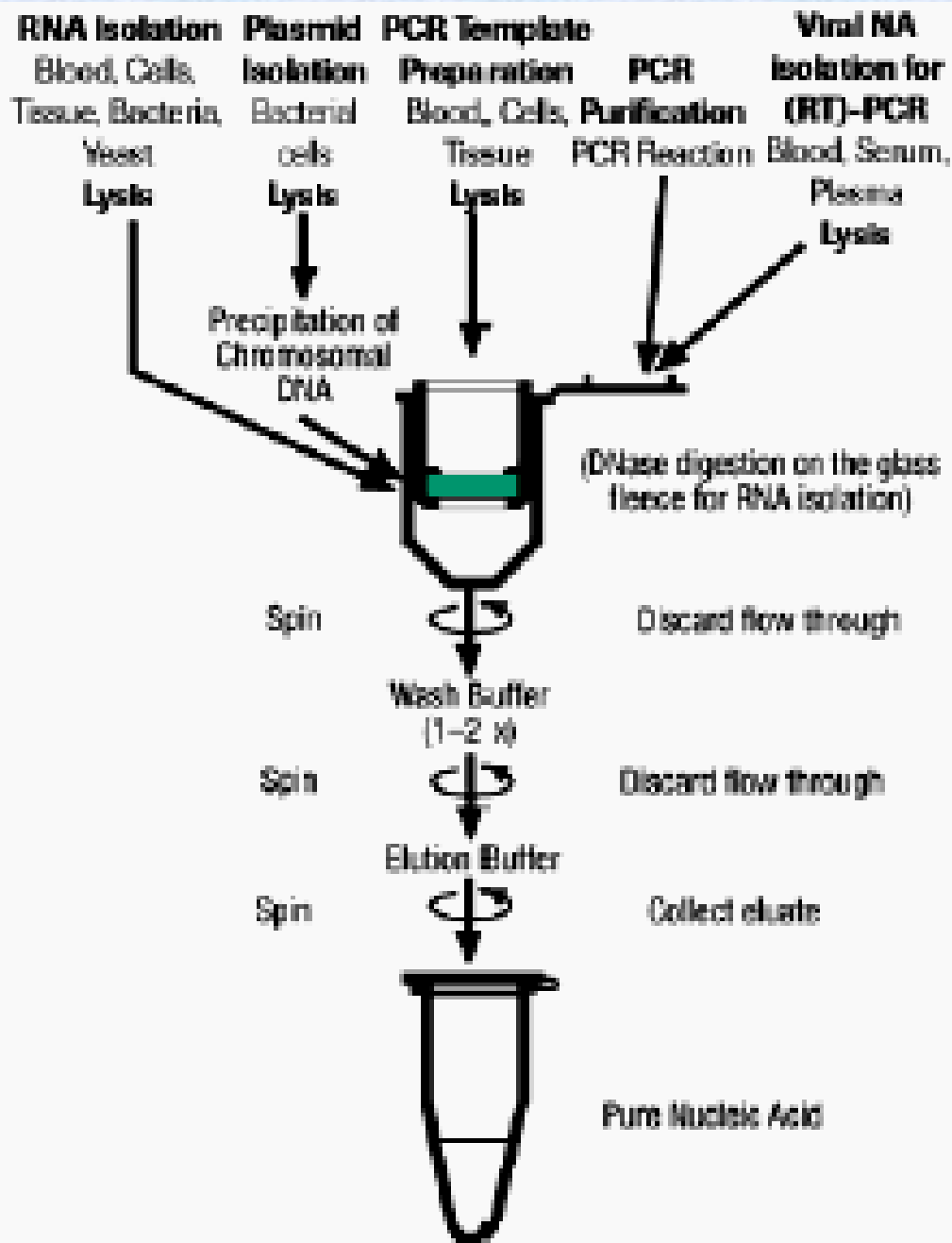
- A sejtek lizise (lúg, detergens)
- A nukleázok gátlása (EDTA!)
- A sejttermelékek eltávolítása
- A DNS kicsapása (EtOH, i-PrOH)

További tisztítás

- extrakció fenollal
- CsCl gradiens centrifugálás



Purification and analysis of nucleic acids III

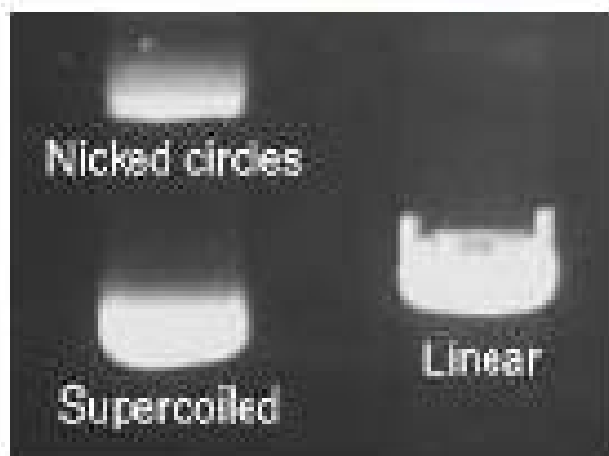
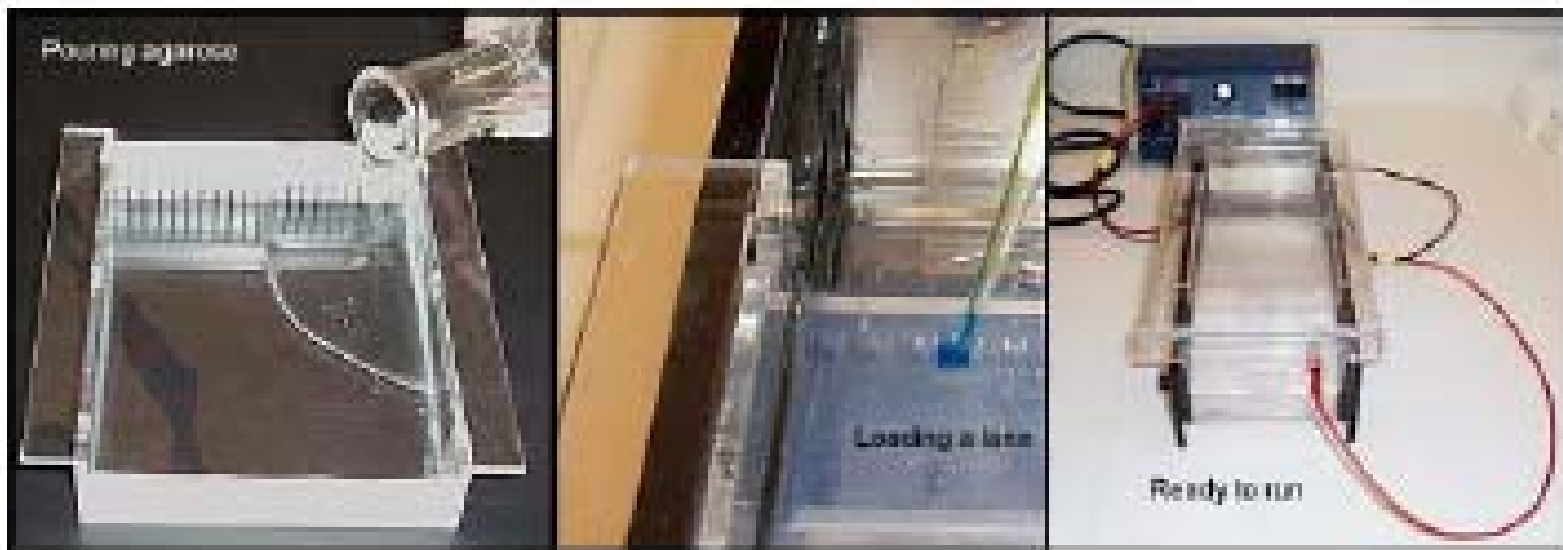


Spin column

96 well plate

Magnetic beads

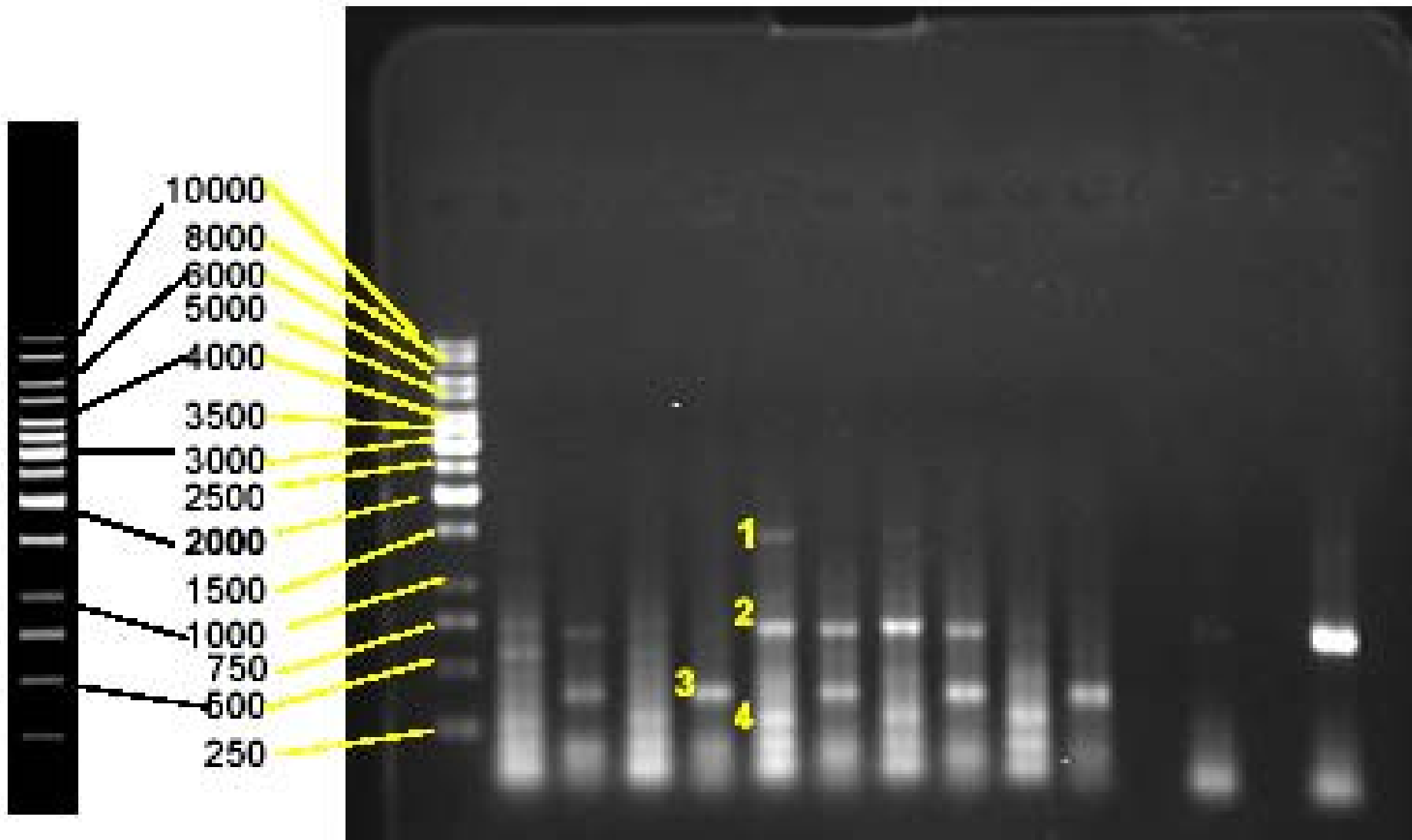
Agaróz gél elektroforézis



Fotó dokumentáció



Agaróz gél elektroforézis



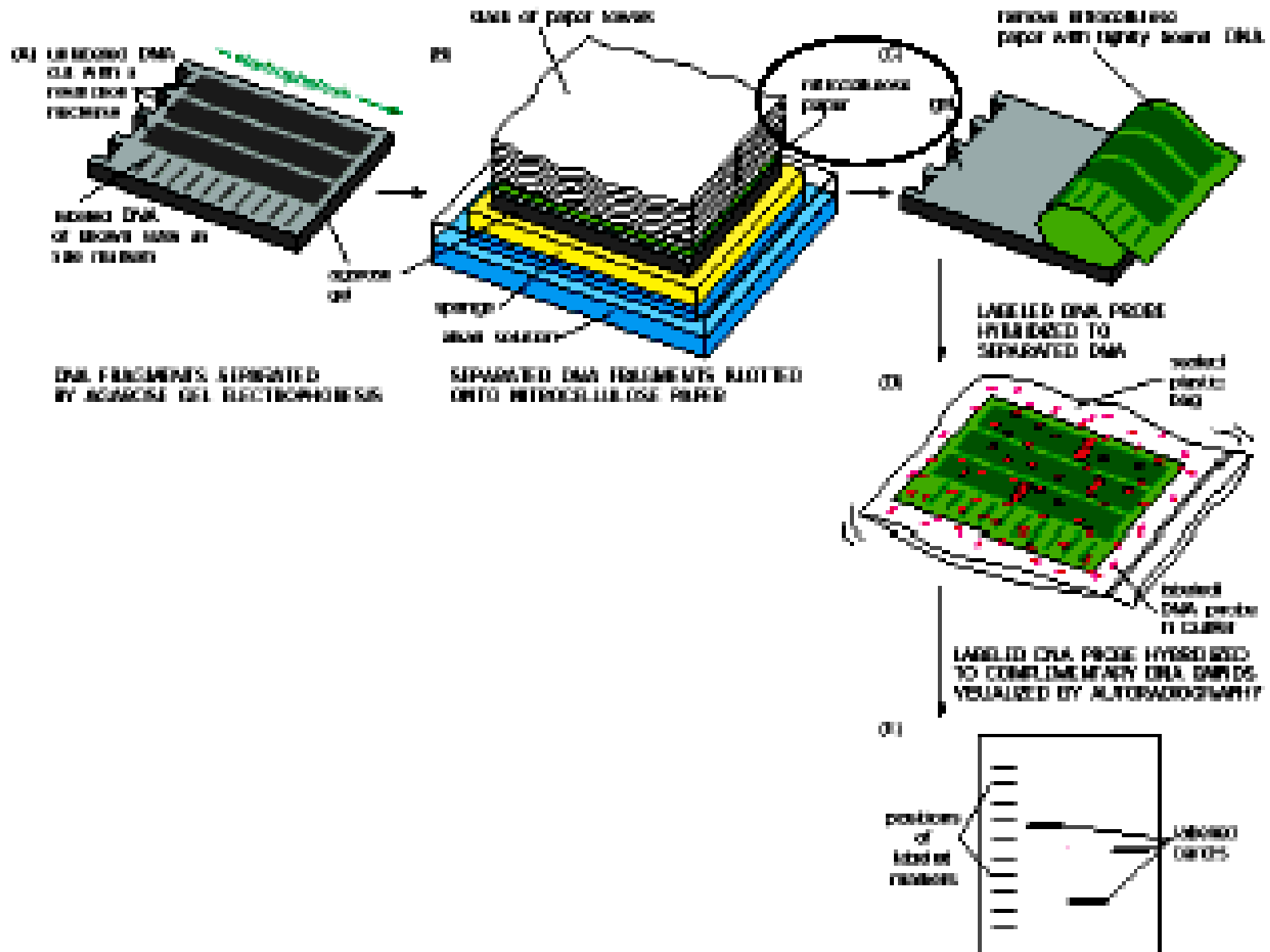
Hibridizációs technikák

- DNS, RNS immobilizálása nitrocellulóz vagy nylon membránon
- a hibridizálás szigorúsága („stringency”): hőmérséklet ↑,
ionerősség ↓
- próba anellálási hőmérséklete
- • SOUTHERN-BLOTTING („LENYOMATTECHNIKA”)
• DNS fragmentum, inszert azonosítás, RFLP
- • NORTHERN- BLOTTING
• mRNS méret meghatározás, szemi-kvantitálás
- • KOLÓNIA- ÉS PLAKK-HIBRIDIZÁCIÓ
• klónkeresés („szkrineelés”) génkönyvtárban

Nukleinsav próbák

- DNS, RNS, oligonukleotid próbák
radioaktív vagy nem-radioaktív jelölés
 ^{32}P ($t_{1/2}=14$ nap), ^{33}P ($t_{1/2}=25$ nap), ^{35}S ($t_{1/2}=87$ nap),
 γ -ATP, α -ATP, α -CTP
biotinált-dUTP + avidin (streptavidin) ($K_d=10^{-15}\text{M}$)
digoxigenin-dUTP
- detektálás: fluoreszcens. jelölt v. enzim-konjugált antitest
(alkalikus foszfatáz v. peroxidáz),
kolorimetria v. kemilumineszcencia
fluoreszcens jelölt nukleotidok

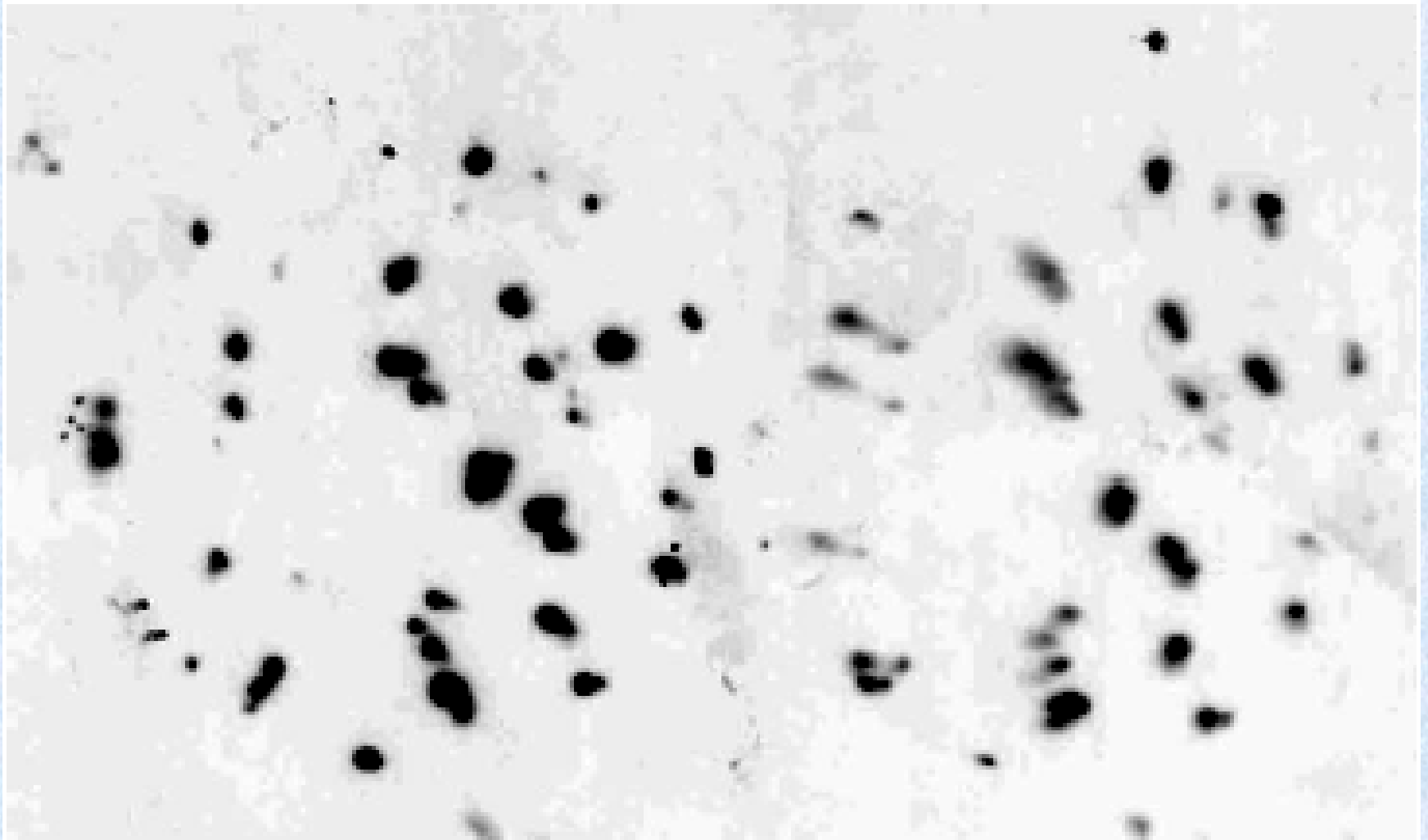
Blotting (lenyomattechnika)



Kolónia- és plakkhibridizáció

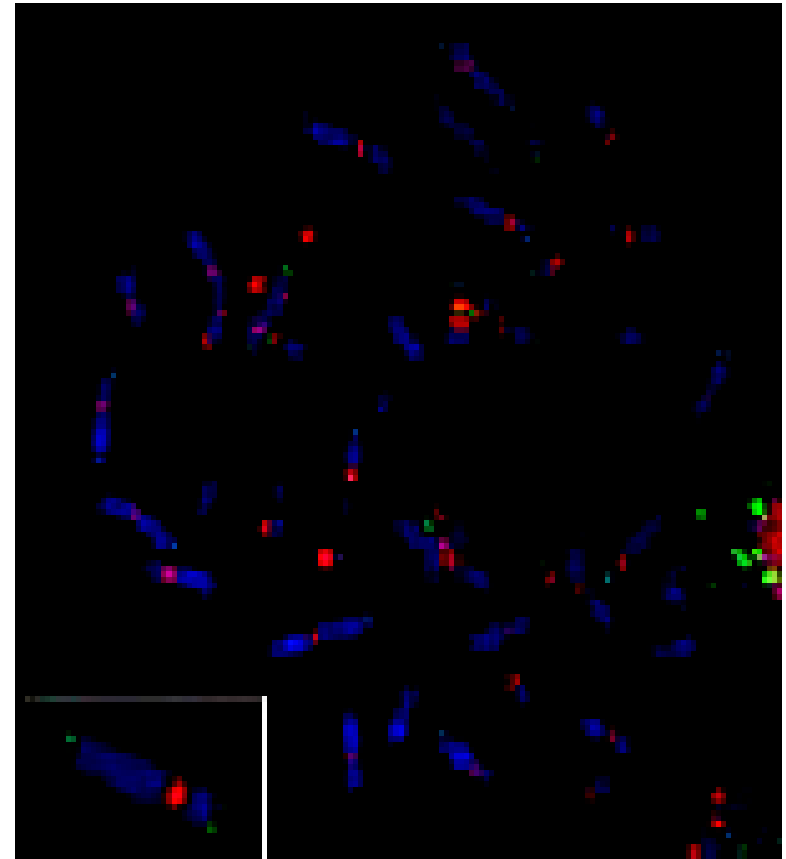
3' próba

5' próba



In situ hibridizáció

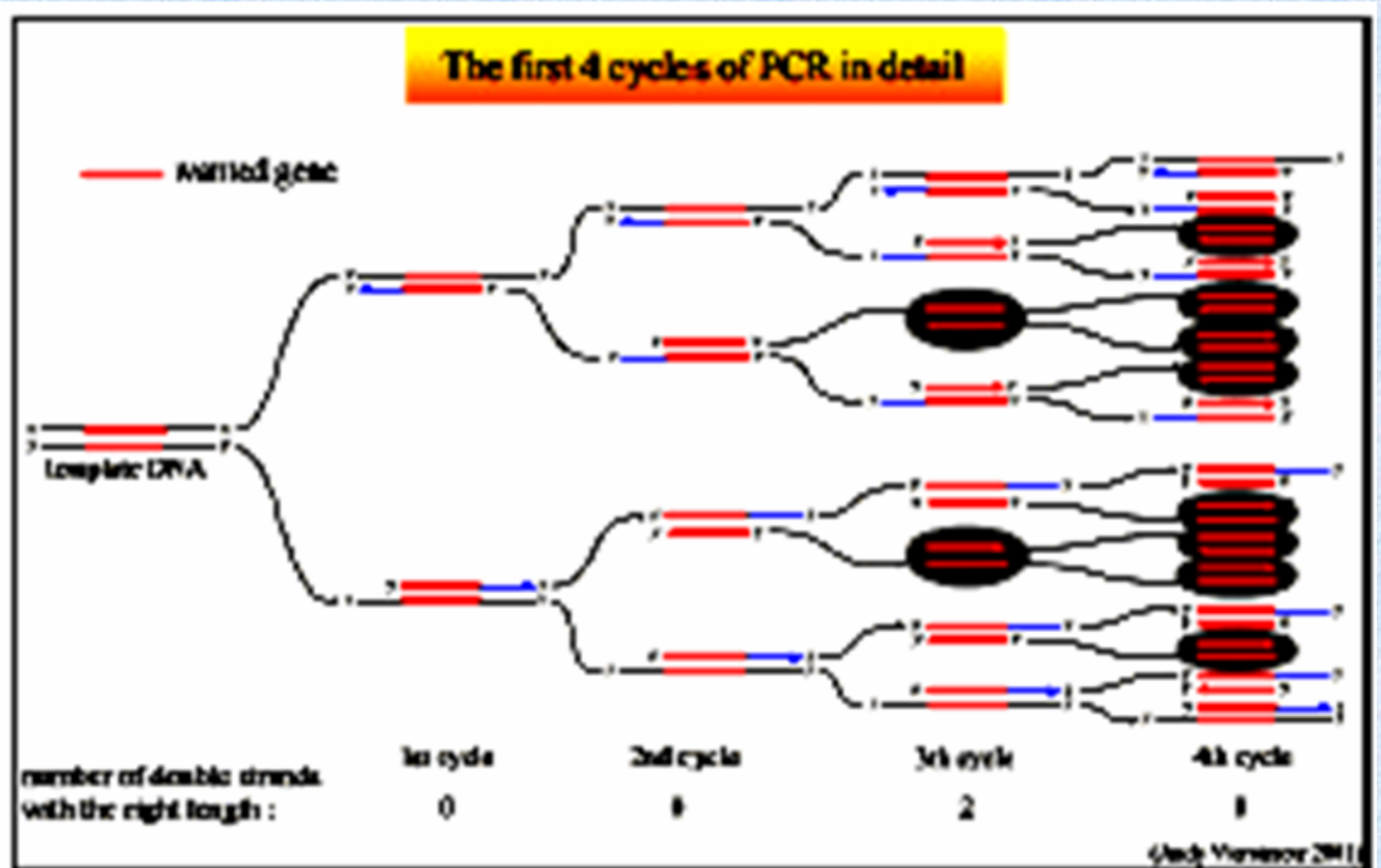
- fluoreszcein-jelölt telomer és Texas-Red jelölt centromer PNA-próba
- FISH (fluorescence *in situ* hibr.)



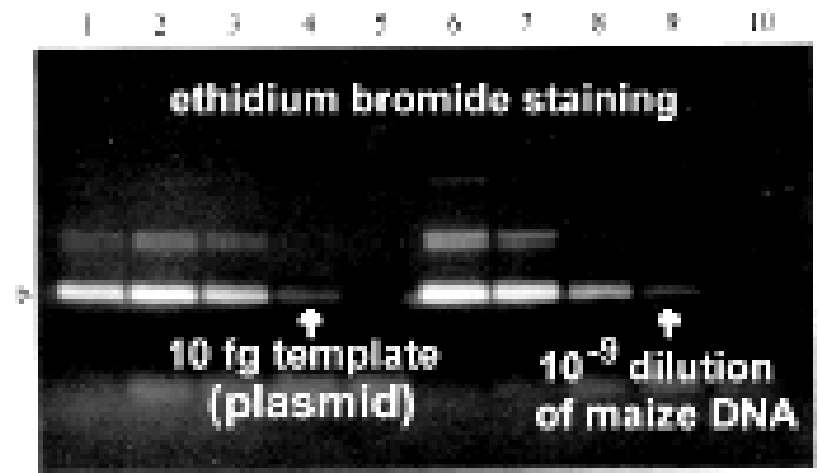
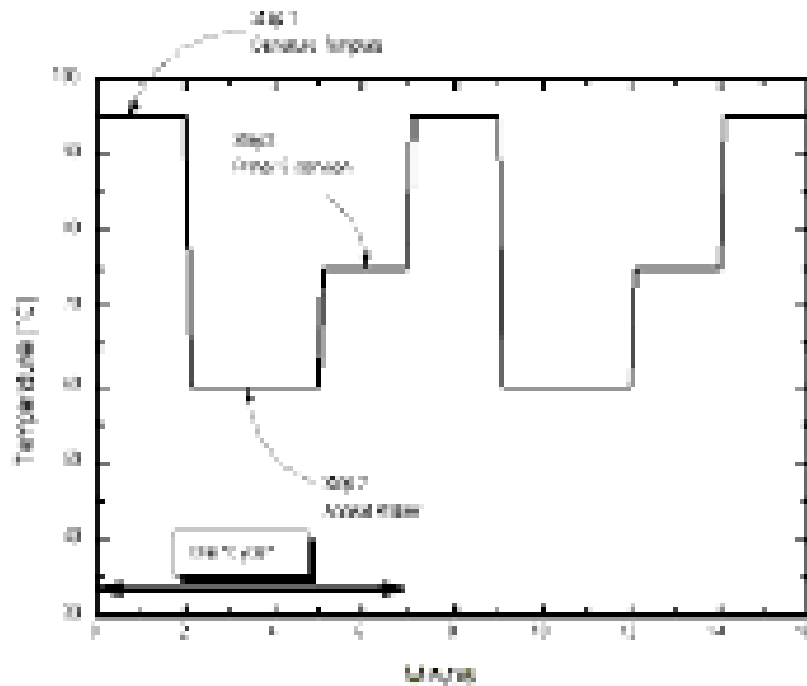
Polimeráz láncreakció (PCR)

- Kary B. Mullis, Cetus, 1985, **1993**
- <http://www.nobel.se/chemistry/laureates/1993/mullis-lecture.html>
- In 1989 Science named the molecule used in PCR, *Taq* Polymerase, its first "Molecule of the Year".
- In 1992 Cetus, who own the intellectual property rights for the technique (granted in 1989), underwent a corporate reorganisation and sold the patent for PCR and *Taq* polymerase to Hoffmann-La Roche for \$300 million (The USA patent for PCR is a national right and therefore requires that all American universities who wish to use PCR must obtain a licence. Universities and research environments in Europe are exempt from this patent and are allowed to use the technique without a licence).
- <http://www.pcrlinks.com/>

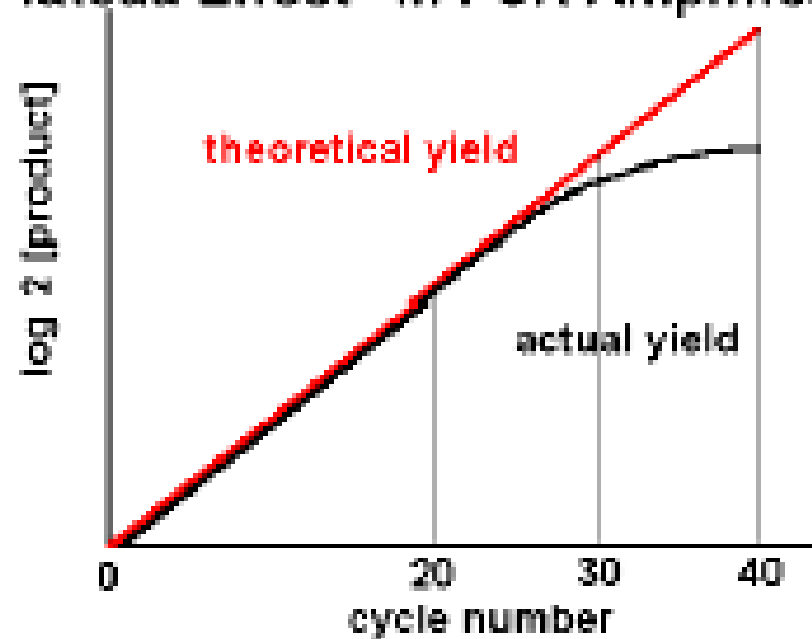
PCR



Template, primer, amplicon



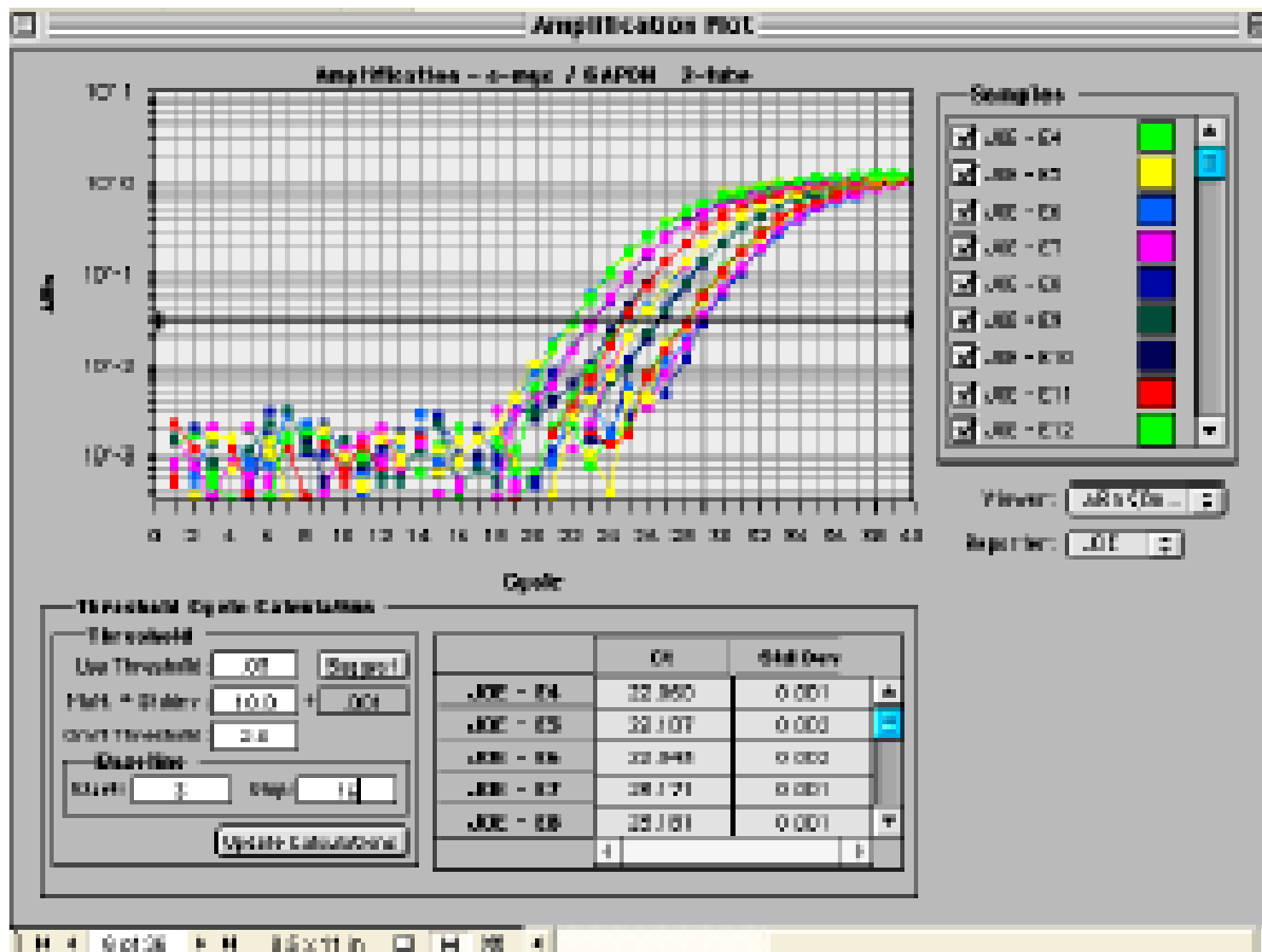
"Plateau Effect" in PCR Amplification



Valós idejű PCR – real time PCR

$$T_n = (1+Y)^n T_0$$

$$Y < 1$$



Enzimek

- Restrikciós endonukleázok
 - metilázok
- DNS ligáz
- Polinukleotid kináz –foszfatáz
- DNS polimerázok
 - Klenow (DNS pol I), T4, termostabil (Taq)
- reverz transzkriptáz
- nukleázok – RNáz, DNáz

Vektorok

- Klónozó:
 - plazmid
 - M13 fág
 - λ fág
 - kozmid
 - BAC
 - YAC
- Expressziós
 - prokarióta
 - eukarióta
 - élesztő (*Pichia*)
 - baculovírus
 - emlős sejt

Plazmid vektorok

- Kis méret
- Replikációs origó
- Szelekciós marker (antibiotikum rezisztencia gén)
- poliklónozó hely
- kék-fehér szelekció

Rezisztencia gének

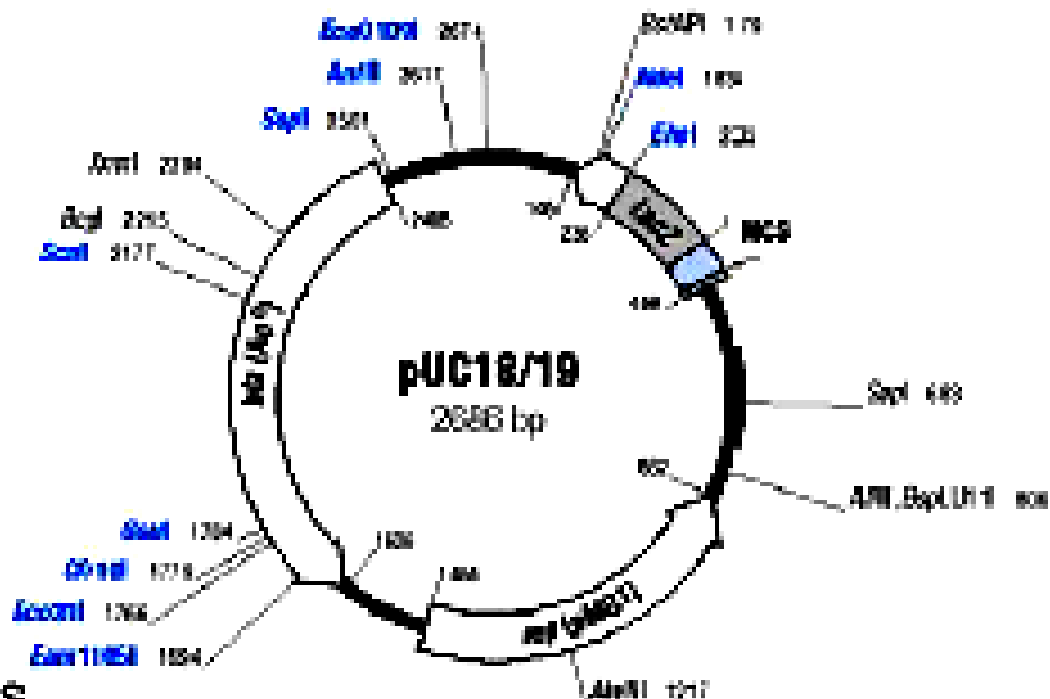
- **pl. R1 (108 kb):** Apr, Cmr, Snr, Smr, Kmr
- **ampicillin**
(karbenocillin) **sejtfa szintézis ↓** **β-laktamáz**
- **tetraciklin** **aa.-tRNS kötés ↓** **40 kD membrán protein**
- **kloramfenikol** **peptidil-transzferáz ↓** **kl-acetiltranszferáz**
- **streptomycin** **hibás transzláció** **st.-foszfo-transzferáz**
- **kanamicin (neomicin)** **hibás transzláció** **kan.-acetiltranszferáz**
- **Transzpozon, IS elem modul (pl. Tn3 R1-ben)**

Ap: ampicillin, Cmc: kloramfenikol, Sn: szulfonamid, Sm: streptomycin, Kmc: kanamicin
Tc: tetraciklin

- **pUC18/19**
(Vieira & Messing, 1982)
(2686 bp)
pMB1 (ColE1) replikon

- „MCS” (polilinker)
(57 bp, 10 hely) (18/19 fordított orientáció)

- **lacZ'**
(CAP kötőhely, P_{lac}, operátor, RBS, β-gal α-fragmentum: 60 aa, MCS: 6. és 7. kodon helyett)



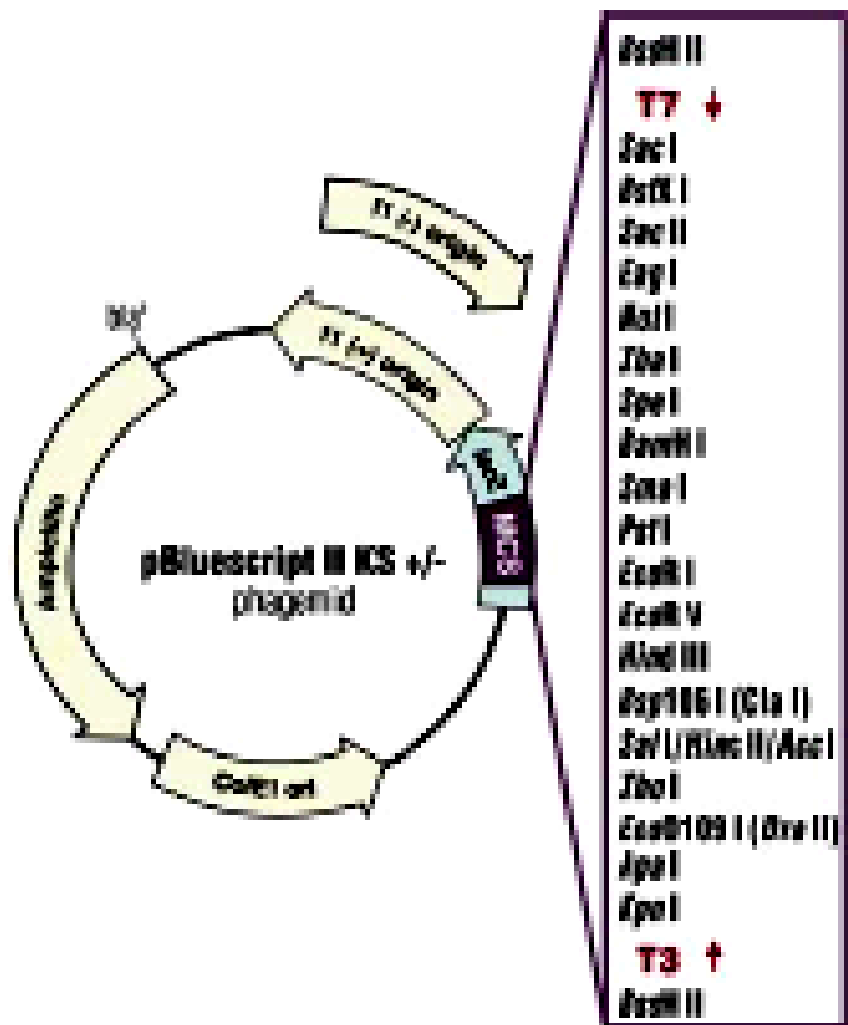
pUC18

Sac I *Sma I* *Xba I* *Pst I* *Hind III*
 atg acc atg att acc aat tgg agc tgg gta ccc ggg gat cca cta gag tgc acc tgc agg cat gca tgc ttc gca ctg gcc
 EcoRV *Kpn I* *BamHI* *Sal I* *Sph I*

pUC19

Hind III *Pst I* *Xba I* *Sma I* *Sac I*
 atg acc atg att acc cca agc ttc cat gcc tgc agg tgc acc cta gag gat ccc tgg gta ccc agc tgc aat tca ctg gcc
 Sph I *Sal I* *BamHI* *Kpn I* *EcoRV*

pBluescript (phagemid)



- 21 restriktációs hely (2 orientációban: KS/SK)
- Kék-fehér szelekcó
- Promóterek szekvenáláshoz
- T7 és T3 RNS polimeráz promóterek
- f1 ori 2 orientációban (+/-)
 - single stranded rescue
 - **helper fág szükséges**
- Restriktációs helyek alternáló 3' és 5' overhang
 - Nested deletions
- **lacI^q**

Génkönyvtárak: Genomiális könyvtár

Vektor: λ -fág, kozmid, BAC, YAC

Klónok száma:

$$N = \ln(1-P) / \ln[1-(I/G)]$$

P = valószínűség

G = genom méret

I = inszert (gén) méret

$$N = \ln(1-0,99) / \ln[1-(2 \times 10^4 / 3 \times 10^9)] = 690.000$$

cDNS könyvtárak

vektor: λ -fág (inszerciós), fágemid

méret: $N = \ln(1-P)/\ln[1-(1/n)]$ ha 0,01% RNS
 $\rightarrow n=10.000, N=46.050$

RNS, mRNS izolálás

(RNáz veszély! DEPC kezelés)

guanidin-izotiocianát; oligo-dT cellulóz

cDNS szintézis

primer: oligo-dT, oligo-dT-adapter,
random oligó,
specifikus oligó

reverz-transzkriptáz, RNáz H, DNS pol.áz I,

ligáz, T4 DNS pol.áz

linker v.adapter

RT-PCR

Szekvenálás

KÉMIAI MÓDSZER (Maxam & Gilbert, 1977)

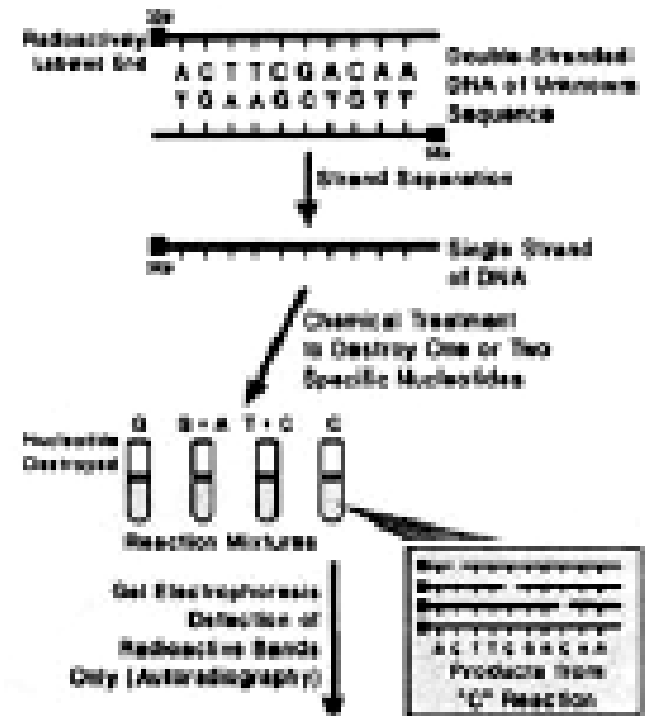
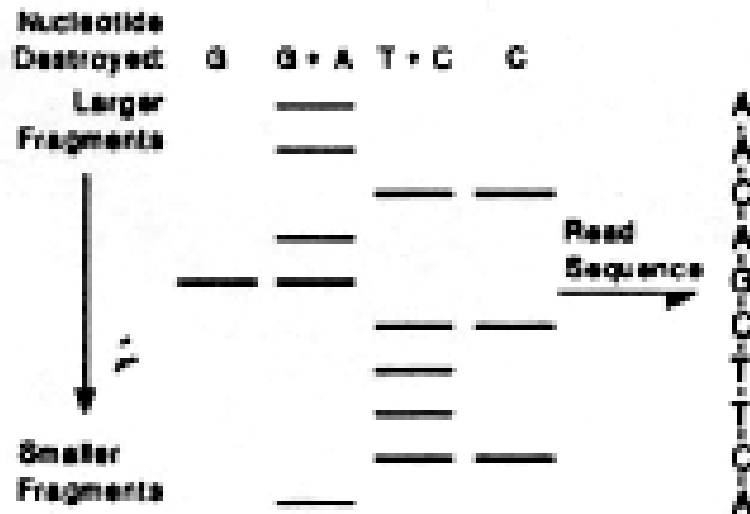
3' v. 5' végjelölt templát

bázis specifikus módosítás, **részleges hasítás**, PAGE

G dimetilszulfát (N⁷-metilálás)
 Pu savas piperidin
 Py hidrazin
 C hidrazin + NaCl

cukor-foszfát gerinc hasítása: (forró) piperidin

SV40 (5243 bp)



Szekvenálás

ENZIMATIKUS (lánctermínációs; dideoxi) MÓDSZER

(Sanger, 1977)

templát + primer + DNS polimeráz + dNTP/ddNTP

templát: egy- v. kétszálú DNS, PCR termék (tisztaság!)

jelölés: primer (5', [γ - ^{32}P]ATP)

polimerizáció ([α - ^{35}S]dATP)

enzim: Klenow, Sequenase, rev. transzkriptáz, Taq pol-áz

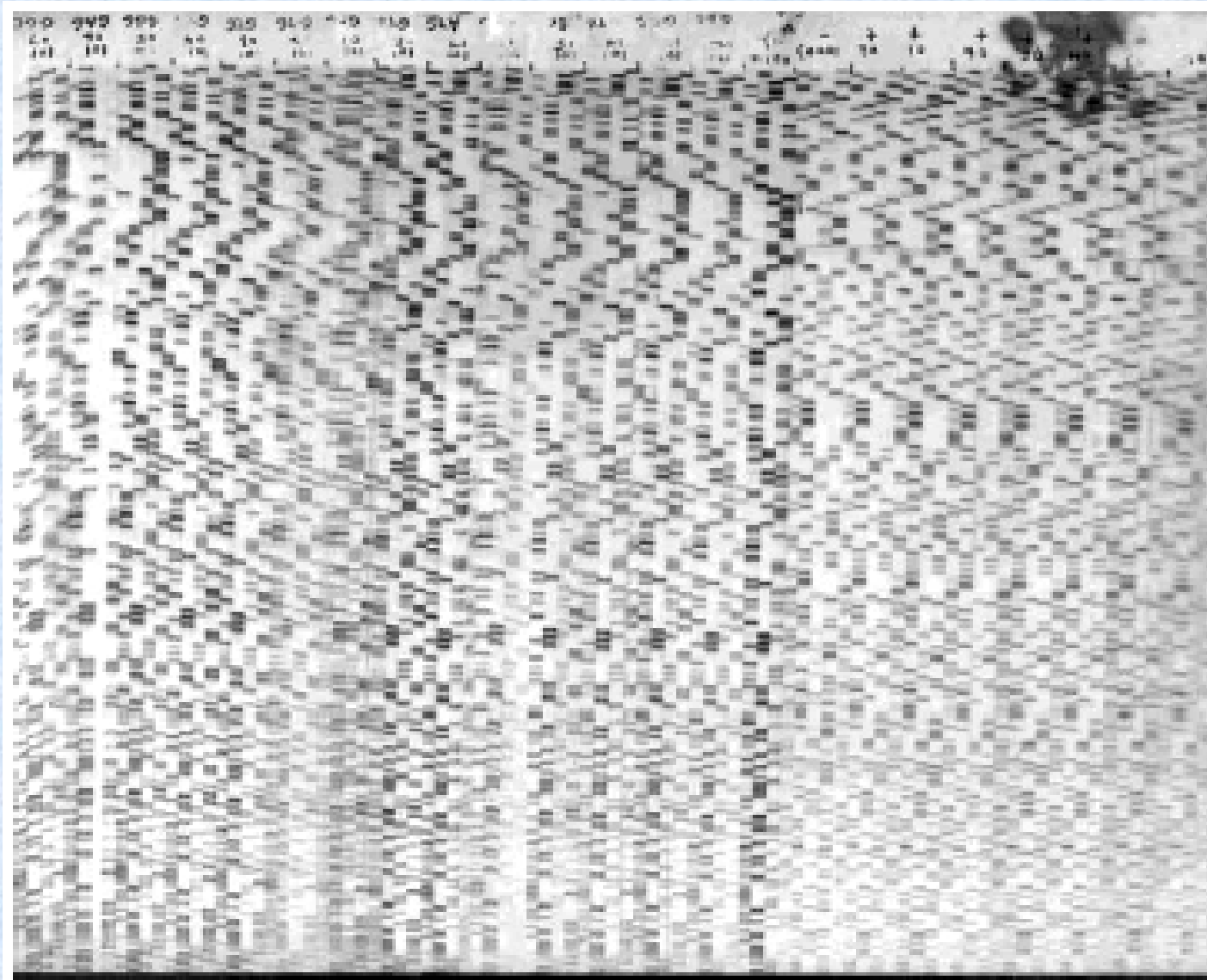
reakció: négy párhuzamos reakció (négy ddNTP)

denaturáló poliakrilamid gélelektroforézis

(urea, formamid, 70°C)

szekvenáló létra (300-1000 bázis)

Szekvenáló gél



AUTOMATA FLUORESCZENS SZEKVENÁLÁS

enzimatiskus módszer

jelölés: primer v. dNTP v. ddNTP (1 v. 4 különböző) **rodamin, BigDye**

„slab” gél v. kapilláris elfő (>500 bázis)

ABI Prism 310, 373, 377 (PE Biosystems)

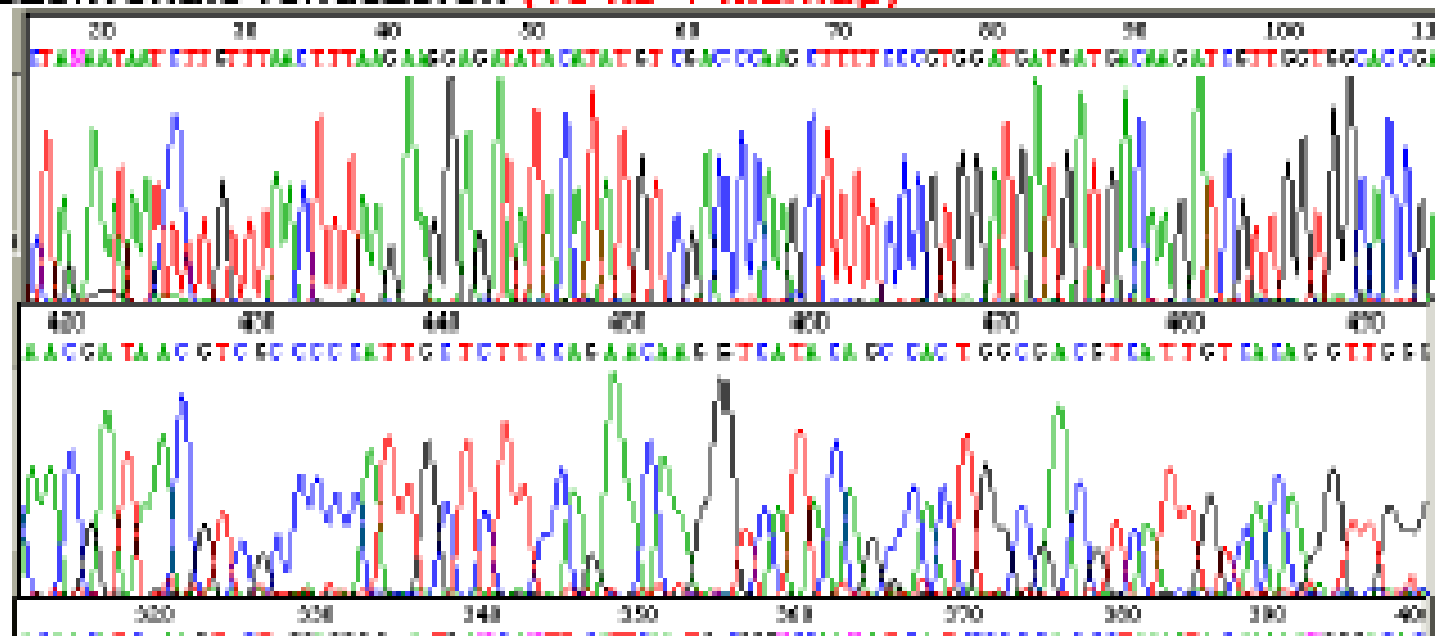
ciklusos szekvenálás (templát amplifikálás)

1 primer, AmpliTaq[®] polimeráz

szintetikus polimer gél

„online” detektálás (**lézer**)

integrált szekvenáló rendszerek (**10 kb-1 Mb/nap**)



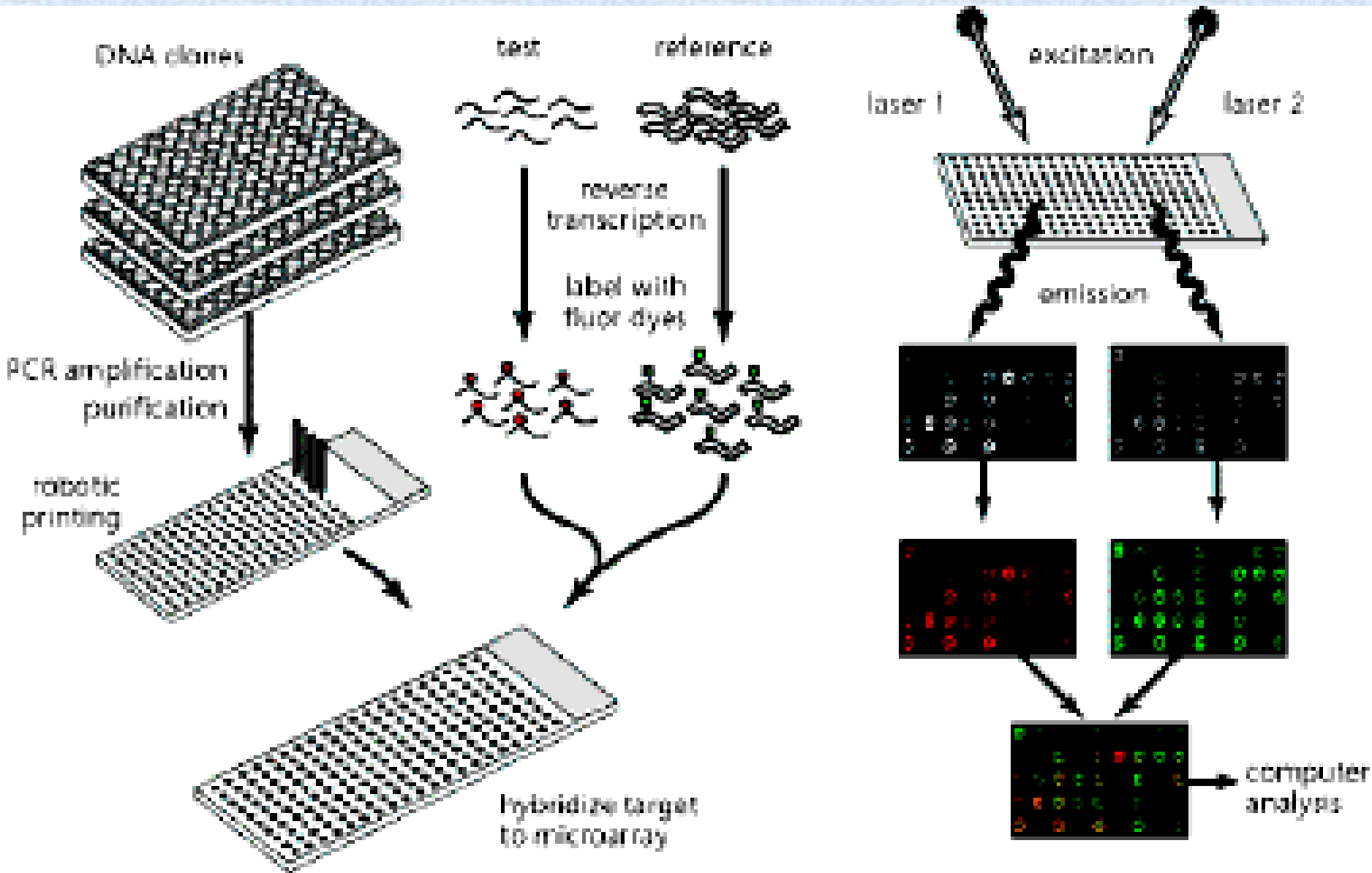
Expressziós rendszerek

- Prokarióta: olcsó, gyors, - **posztranszlációs módosítások!**
 - citoplazmatikus overexpresszió – zárványtestek
 - szekréció
 - promóter, riboszóma kötőhely, -**cDNS**- terminációs szignál
- Eukarióta
 - élesztő (*S. cerevisiae*) – auxotróf mutáns gazda törzs – bizonyos módosításokat pontosan végez, másokat nem!
 - bakulovírus – kapszid protein helyébe beépített idegen fehérje,
 - emlős sejt tenyészet – plazmidok – vírus promoterek – költséges, lassú
- *In vitro*
 - fehérjeszintetizáló rendszer izolált riboszóma, stb frakcióval + szintetikus mRNS

DNS Chip technológia

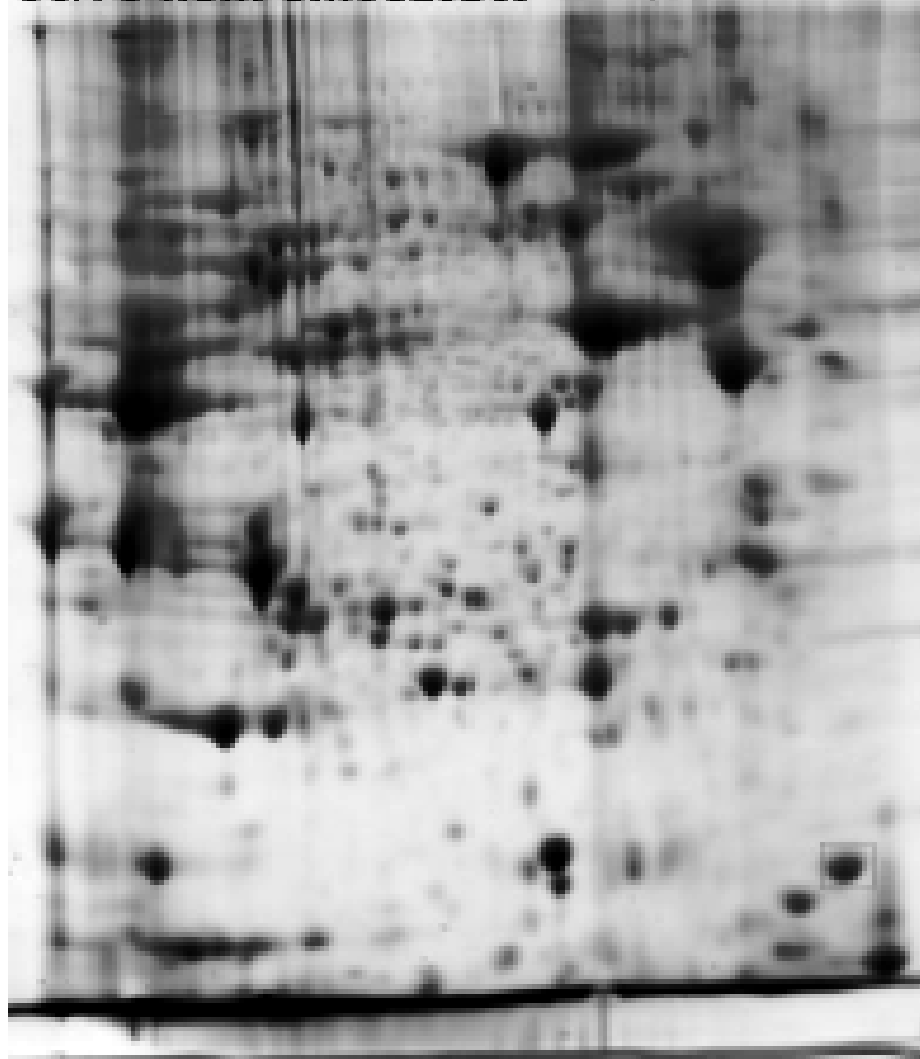
próba: szilárd felszínre szintetizált (fotolitográfia) oligonukleotid (10-25 bázis; 10^4 - 10^6 /cm²) - „chip”
nagy-denzitásban felvitt cDNS/genomiális DNS (max. 1-2 kb)
„microarray”

- target (minta): fluoreszcens-jelölt rövid (50-200 bp) cDNS/genomiális DNS
- GenChip® (Affymetrix)
- szekvenálás (SBH: sequencing by hybridization)
- polimorfizmus (SNP) és mutáció vizsgálat, genetikai betegségek
(pl. p53, CFTR, BRCA1, HIV)
- expresszió analízis (kvantitatív funkcionális genomika)
pl. prokarióták v. élesztő összes (6000) gén, egér >24000 gén

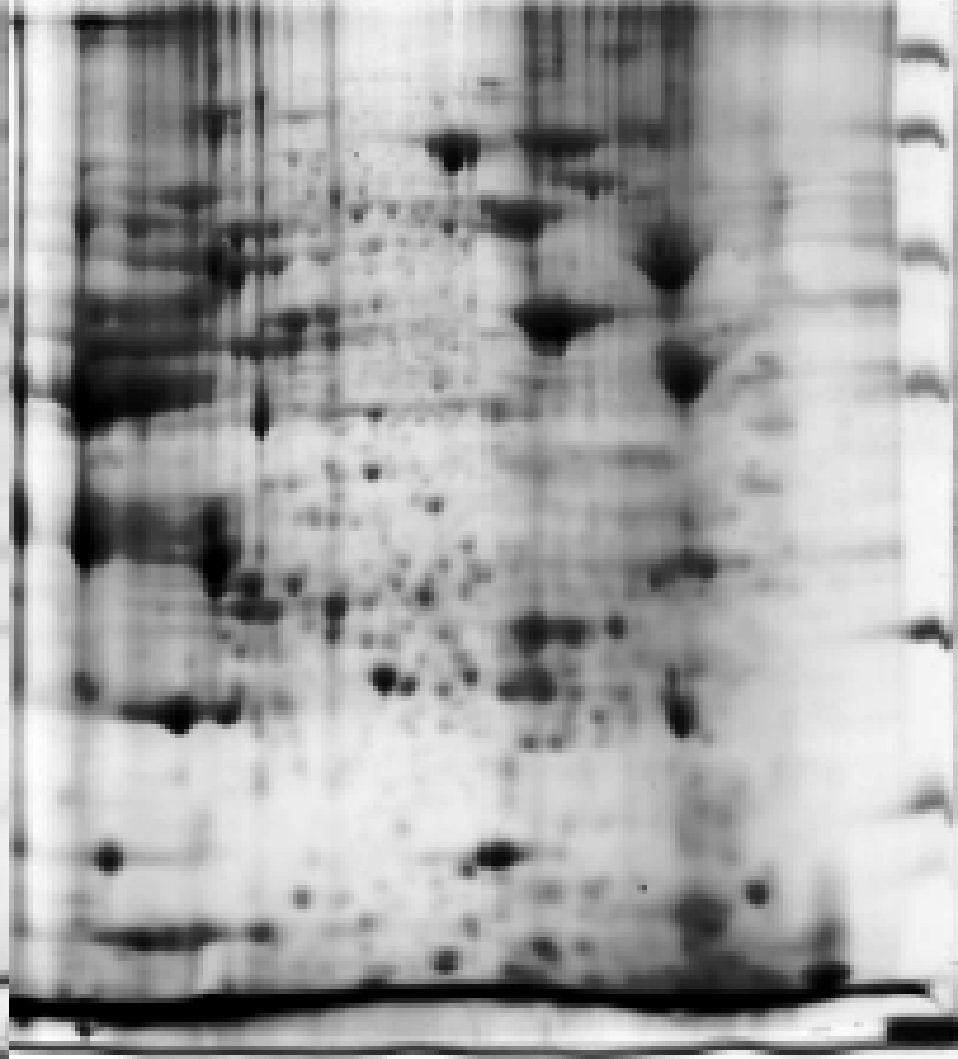


Proteomika: 2D elfo, tömegspektrometria

66/70 nem emésztett

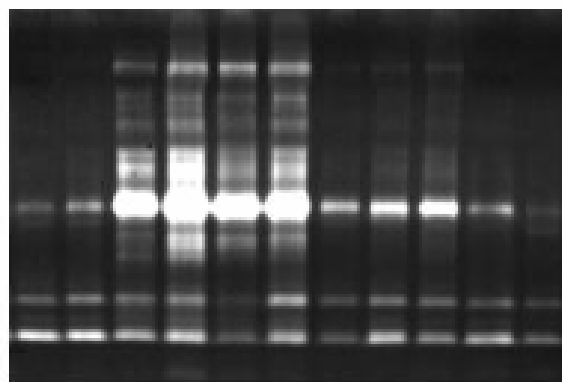


6/70 emésztett



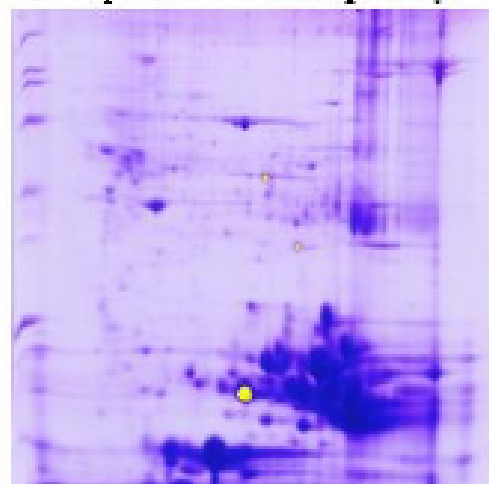
Proteomic studies on the regeneration of nerve cells

Zymogram after treatment

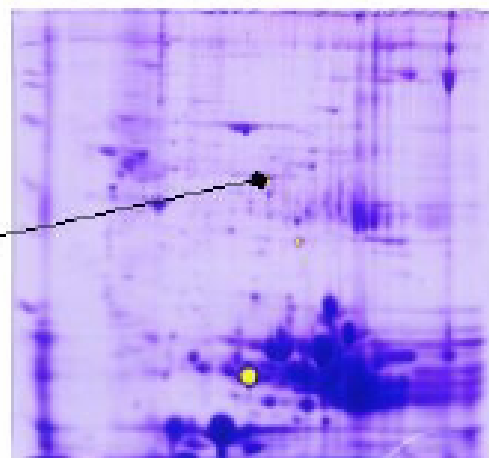


0h 3h 6h 12h 18h 24h 2d 3d 4d 5d 6d

2D elpho. of dark adapted eye



2D elpho. of light exposed eye



MALDI MS of tryptic digest

