

Molekuláris biológiai módszerek
laborgyakorlatok középiskolásoknak

Az MTA Szakmódszertani pályázata (Sz-049/2014) támogatásával készült

Dr. Bodai László

Szegedi Tudományegyetem, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszék

2015

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK.....	1
I. ELMÉLETI BEVEZETŐ.....	2
A DNS szerkezete és funkciója.....	2
Az örökítőanyag változatossága.....	5
DNS kivonása és tisztítása.....	7
DNS elválasztása gélelektroforézissel.....	8
DNS felsokszorozása polimeráz láncreakcióval.....	10
RAPD módszer.....	13
DNS szekvenálás, szekvenáláson alapuló vizsgálatok.....	14
II. LABORGYAKORLATOK.....	17
DNS kivonása kiviből.....	17
DNS izolálása ecetmuslicából.....	19
Ivar meghatározása polimeráz láncreakcióval.....	21
DNS elválasztása gélelektroforézissel.....	24
4A: Kimutatás fluoreszcens festékkel.....	24
4B: Kimutatás metilénkéssel.....	27
Biztonsági információk.....	29

I. ELMÉLETI BEVEZETŐ

A DNS szerkezete és funkciója

A DNS, azaz Deoxiribonukleinsav a sejtés szerveződésű élőlények örökítőanyaga. (Vírusok között DNS illetve RNS örökítőanyaggal rendelkezők is előfordulnak, így például a herpeszt okozó *Herpes simplex* vírus DNS, míg az influenza vírus, vagy a járványos gyermekbénulást okozó polio vírus RNS genommal rendelkezik). Az eukarióta élőlények DNS állománya a sejtmagban kromoszómákba szervezeten található; míg a prokarióták DNS-e általában cirkuláris formában található meg a sejtben.

A DNS egy lineáris (nem elágazó) szerves polimer molekula. A polimer alapegységei a nukleotidok, ezek láncait polinukleotidoknak nevezik. Minden egyes nukleotid egy 5 szénatomos deoxiribóz cukor molekulából, valamint ehhez kapcsolódó nukleinsav bázisból és foszfát csoportból áll. A DNS-ben négyféle nukleinsav bázis található: adenin, guanin, citozin és timin. A nukleinsav bázisok a deoxiribóz 1' szénatomjához kapcsolódnak glikozidos kötással - ennek megfelelően négyféle nukleozidról beszélünk: deoxiadenozin, deoxiguanozin, deoxicitidin és timidin. A nukleotidok a nukleozidok és foszforsav észterei (az észterkötés a foszforsav és a ribóz 5' szénatomjához kapcsolódó hidroxil csoport reakciójával alakul ki). A polinukleotid láncban a nukleotidok 5' szénatomjához kapcsolódó foszfát csoport egy második észter kötést alakít ki a láncban előtte lévő nukleotid ribózának 3' szénatomjával. Az így létrejött polinukleotid láncban az ismétlődő deoxiribóz – foszfát – deoxiribóz – foszfát – deoxiribóz – foszfát láncot nevezzük cukor-foszfát gerincnek. A cukor-foszfát gerinc nem változatos, a DNS lánc változatosságát, specifikitását az egyes nukleotidokat alkotó különféle bázisok sorrendje adja.

A polinukleotidok láncok irányultsággal rendelkeznek, megkülönböztetjük 5' illetve 3' végüket: az 5' végen a láncvégi nukleotid 5' foszfát csoportja van szabadon, míg a 3' végen a láncvégi nukleotid 3' hidroxil csoportja van szabadon. Így például az alábbi két polinukleotid lánc nem azonos, mivel irányultságuk eltérő (p: foszfát csoport, OH: hidroxil csoport, a nagybetűk a megfelelő nukleinsav bázissal rendelkező nukleotidokat jelölik a láncban):

- 1: p-A-p-A-p-T-p-C-p-G-p-C-p-T-OH
- 2: OH-A-p-A-p-T-p-C-p-G-p-C-p-T-p

Az egyszerűsítés (és félreértések elkerülése) végett a polinukleotid láncokat a megfelelő nukleotidok betűkódjának 5' – 3' irányban való sorrendjének (szekvenciájának) megadásával írják

fel. Így az előbbi példa szekvenciák a következők lesznek:

1. AATCGCT
2. TCGCTAA

A DNS az élőlényekben kettősszálú formában található meg. A két szál antiparallel lefutású, azaz míg az egyik szál 5' – 3' lefutású, addig a másik szál 3' – 5' lefutású; és a két láncban egymással szemben mindig komplementer bázisok találhatóak: A-val szemben mindig T, G-vel szemben mindig C.

5' – AAGTCGGTGCAACTATATGCGTA –3'
3' – TTCAGCCACGTTGATATAACGCAT –5'

A komplementer bázispárosodásnak az az oka, hogy szerkezeti (méret ill. funkciós csoportok elhelyezkedése) okok miatt csak megfelelő bázisok tudnak egymással kapcsolódni - az adenin a timinnel tud kialakítani kettő hidrogén híd kötést, míg a guanin a citozinnal tud kialakítani három hidrogén híd kötést. Mivel a két szál komplementer egymással, így az egyik bázissorozat (szekvenciája) egyértelműen meghatározza a másik szál bázissorozatát is, ezért kettősszálú DNS felírásához is elegendő az egyik szál szekvenciáját felírni 5' – 3' irányban (csak észben kell tartani, hogy valójában kettősszálú DNS-ről van szó). Így a fenti kettősszálú DNS a következőképpen írható fel:

AAGTCGGTGCAACTATATGCGTA

A DNS háromdimenziós szerkezete egy jobbkezes dupla hélix, melyben a két szál egymás körül csavarodik, csavarulatonként 10 bázispár található. Ennek a szerkezetnek a leírásáért 1962-ben Francis Crick, James Watson és Maurice Wilkins kapott élettani-orvosi Nobel díjat.

A DNS jelentőségét a földi élet szempontjából nehéz túlbecsülni. Egyrészt biztosítja a biológiai információ átörökítését egyik generációról a másikra. Ehhez a DNS minden sejtosztódást megelőzően megkettőződik a DNS replikációnak nevezett mechanizmussal, melynek során a DNS két szála elválik egymástól, és enzimek közreműködésével kiegészül kétszálúvá a bázispárosodás szabályainak megfelelően. Így mitózis esetén a sejtosztódást követően mindkét utódsejt rendelkezni fog a teljes (diploid) genetikai állománnyal. Meiózis esetén a létrejövő 4 haploid ivarsejt a genetikai állomány felével fog rendelkezni, amely megtermékenyítés esetén a másik szülő ugyancsak haploid

ivarsejtje által hordozott DNS-sel egészül ki és hozza létre az utódra jellemző diploid genomot. Másrészt a DNS által hordozott genetikai információ meg is nyilvánul az élőlényekben, azaz a gének kifejeződnek más, általuk kódolt makromolekulák szintézisét irányítva. Ennek első lépéseként a DNS-ről RNS (ribonukleinsav) másolat képződik, majd ez az RNS molekula a riboszómákon fehérje molekulák szintézisét irányítja.

Az örökítőanyag változatossága

Az élőlények örökítőanyagául szolgáló DNS nagy változatosságot mutat. Magától értetődő, hogy a különböző fajok örökítőanyaga eltérő, de az egy azonos fajba tartozó élőlények DNS állománya sem teljesen azonos, hanem egyedi variációkat is hordoz – ezt úgy is mondják, hogy a DNS polimorf, azaz többalakú. A molekuláris ökológiai vizsgálatok szempontjából a DNS polimorfizmusok elsősorban azért fontosak, mert a különféle változatok molekuláris markerként használhatóak fel, amelyek segítségével például a populációk genetikai változásai követhetőkké válnak. A genetikai változatosságnak az érintett DNS állomány mérete és típusa alapján többféle változata van.

- Megváltozhat egyes kromoszómák (aneuploidia), vagy az egész kromoszóma készlet (euploidia) száma. Az ilyen változatok általában súlyos következményekkel járnak (gondoljunk pl. a Down-kórra, amelyet a 21.-es kromoszóma triszómiája idéz elő) és nem a klasszikus mendeli módon öröklődnek. Az euploidia azonban nem ritka jelenség, például a termesztett búza hexaploid, a boltokban kapható magtalan banán triploid.
- Az egyes kromoszómákon nagyobb DNS szakaszok hiányozhatnak (deléció) vagy beépülhetnek (inzerció), többször fordulhatnak elő (duplikáció), megfordulhatnak a kromoszómán (inverzió), vagy áthelyeződhetnek egy új genomi pozícióba (transzlokáció). Az ilyen változatok attól függően, hogy milyen genetikai állományt érintenek, járhatnak súlyos következményekkel, de lehetnek teljesen semleges hatásúak is.
- Kiváló molekuláris markerek az ún. mikroszatellita és miniszatellita ismétlődések, amelyek nagy példányszámban fordulnak elő a genomban. Mindkét tandem (egymás után elhelyezkedő) ismétlődő szekvenciákból áll, a mikroszatelliták esetében általában 2-5 bp-os szakasz, a miniszatelliták esetében 10-60 bp hosszúságú szakasz ismétlődik többször egymás után. Ezek az ismétlődések nagyon változékonyak, azaz könnyen mutálódnak úgy, hogy megváltozik az ismétlődések száma; és emiatt nagyon változatosak is, azaz nagy variációt mutatnak egy faj egyedei között. Emiatt hívják őket VNTR-nek (Variable Number Tandem Repeats), azaz változó számú tandem ismétlődéseknek. A VNTR lokuszok alkalmasak egyedek azonosítására, leszármazási vonalak feltérképezésére.
- Az SNP-k (Single Nucleotide Polymorphism) olyan genetikai változatok, amelyek egyetlen egyedi nukleotidban térnek el egymástól. Így például az alábbi két szekvenciában egy SNP található a 7. pozícióban.

A: AACGTGCATTGTG

B: AACGTGGATTGTG

Az SNP-k funkcionális hatása attól függ, milyen régióját érintik a genomnak. A gének kódoló régióját érintő SNP-knek lehet fenotipikus hatása; döntő részük azonban nem gének kódoló területére esik, és nem jár fenotipikus következménnyel

A molekuláris ökológiai vizsgálatok szempontjából a fentiek közül kisebb szakaszok beépülése vagy kiesése, a VNTR és az SNP markerek a leghasznosabbak, egyrészt mert igen változatok egy fajon, populáción belül is, másrészt könnyen vizsgálhatóak a jelenleg rendelkezésre álló molekuláris biológiai módszerekkel és megváltozásuk egyszerűen modellezhető.

DNS kivonása és tisztítása

A DNS molekuláris markerek vizsgálatához elengedhetetlen, hogy a DNS-t a vizsgálati mintából (pl. vér, szövetminta, baktérium szuszpenzió, stb) kivonjuk és tisztítsuk. A tisztítás mértéke eltérő lehet attól függően, hogy az alkalmazandó módszer a szennyezésekre mennyire érzékeny – pl. a gyakorlaton is alkalmazott, lentebb tárgyalt, polimeráz láncreakció (PCR) módszer eléggé robusztus, nem igényel túlságosan nagy tisztaságú DNS-t.

A DNS preparálása általában az alábbi lépések sorából áll: először feltárjuk a szövetet, majd eltávolítjuk a szennyező makromolekulákat (elsősorban RNS-t és fehérjéket), végül az oldatból kivonjuk a DNS-t.

A feltárás (azaz a szövet és a sejtek roncsolása, a sejtfaalak és membránok integritásának felbontása) sokféleképpen megvalósítható attól függően, milyen mintából indulunk ki. Gyakran alkalmaznak mechanikai módszereket, mint például turmixolást, homogenizálást dörzsmozsárban, vagy ultrahanggal történő feltárást (szonikálást). Használhatunk kémiai ágenseket is, például lúgos oldatot, vagy detergenset (pl. SDS – nátrium dodecil-szulfát) a sejtmembrán felbontására. Emellett alkalmazhatunk olyan enzim kezelést is, amely elbontja az vizsgált élőlény sejtjeinek sejtfaalát.

A feltárást követően általában igyekezünk minél teljesebben eltávolítani a kivonatunkból a nem DNS szennyeződések. Az oldhatatlan törmelék (pl. a sejtfaal maradványai, rovarok kitin váza) általában centrifugálással távolíthatjuk el. A szennyező makromolekulákat, így a fehérjéket és az RNS molekulákat általában vagy rájuk specifikus bontó enzimekkel (proteázok illetve RNázok) degradáljuk, vagy szerves oldószeres extrakcióval (kivonással) távolítjuk el.

Végül az így tisztított oldatból kivonjuk a DNS-t, amelyhez gyakran használnak alkoholos kicsapást. Ennél a módszernél azt használjuk ki, hogy míg a DNS vizes közegben jól oldódik, 70%-os etil-alkohol oldatban nem; ezért vizes oldatából egyértékű kationok és etil-alkohol oldatával kicsapható, majd a csapadék centrifugával összegyűjthető. Megvásárolható DNS izoláló kitekben (előre összeállított reagens csomag) gyakran használnak szilikagél membránokat is a DNS kivonására, amelyhez a DNS specifikusan kikötődik az oldatból.

DNS elválasztása gélelektroforézissel

A DNS vizsgálati módszerek gyakori részfeladata, hogy a DNS oldatunkban található molekulákat méret szerint elválasszuk, azaz meghatározzuk, hogy a mintákban milyen hosszúságú DNS fragmentumok vannak. Ehhez használható, akár egy bázispárnyi hossz különbség kimutatására is alkalmas a gélelektroforézis, amely során a molekulaféleségeket egy gél mátrixban elektromos erőtér segítségével választjuk el egymástól. A DNS a cukorfoszfát gerinc miatt a bázisösszetételtől független, egységes negatív töltést mutat, ezért elektromos erőtérben a pozitív pólus felé mozog. DNS elválasztásához általában agaróz gélt használnak, amely tengeri moszatokból kivont poliszacharid molekulákból kialakított térhálós szerkezet (konzisztenciájában hasonló a kocsonyához). Ebben a térhálós gélben annál gyorsabban tud mozogni egy molekula, minél kisebb a mérete. Így ha a DNS mintákat felvisszük a géltre és a gélt tartalmazó futtató kádat elektromos áramkörbe kötjük, akkor a DNS molekulák a pozitív pólus felé migrálnak („futnak”), méghozzá úgy, hogy a rövidebb DNS fragmentumok futnak elől, a nagyobbak hátul.

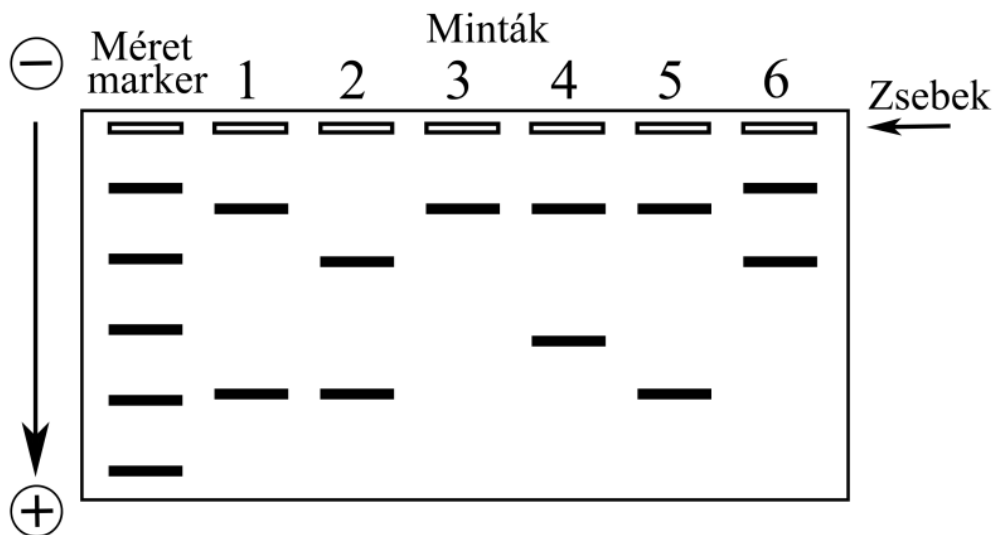
Az elektroforézishez használt gél általában egy kb 10x15 cm területű, 0,5 cm vastag (magasságú) téglatest, amelyet egy öntőformában öntünk ki melegítéssel oldatba vitt agarózból. Az agaróz oldat visszahűlés közben géllé szilárdul. A megszilárduló agarózba egy speciális (10-12 db 3-4 mm széles fogakat tartalmazó) fésűt eresztünk, amely az agaróz megszilárdulása után kihúzva ú.n. zsebeket hagy hátra – ide fogjuk betölteni a mintáinkat. A kész gélt behelyezzük egy futtatókádba, amely futtató puffert tartalmaz (ez fogja vezetni az áramot a kádban), majd bemérjük a mintákat a zsebekbe, végül csatlakoztatjuk a futtatókádat egy transzformátorhoz, amivel állandó feszültséget kapcsolunk rá. A minták futását szintén negatív töltésű, a DNS-sel együtt haladó festékek segítségével követhetjük. Miután a minták a kiindulási ponttól (a zsebeiktől) elegendő távolságra futottak, a gélt kivesszük a futtatókádból, a benne elválasztott DNS fragmentumokat DNS kötő festék segítségével jelenítjük meg.

A DNS gélben való futásának sebességét elsődlegesen az alábbi paraméterek befolyásolják:

- Az agaróz gél koncentrációja. Az agarózt általában 0,7% - 2% koncentráció tartományban használják. Minél koncentráltabb a gél, annál inkább akadályozza a DNS molekulák mozgását, így annál rövidebb fragmentumok pontos elválasztására alkalmas. Nagyobb méretű molekulák elválasztásához hígabb géleket használnak.
- A DNS fragmentumok mérete. Minél kisebb egy fragmentum, annál gyorsabban fut. Az agaróz gélek elválasztási tartománya (koncentrációtól függően) általában 100 bp – 20000 bp tartományba esik.

- Az alkalmazott feszültség. Minél nagyobb feszültséget használunk, annál gyorsabb a molekulák vándorlása, viszont a hőfejlődés is egyre jelentősebb lesz, ami negatívan befolyásolja a elektroforézis minőségét. Általában ~ 5 V/cm feszültségesést alkalmaznak (az elektródák közti feszültség / az elektródák közötti távolság), ami a legáltalánosabban használt közepes méretű futtatókádak esetében ~ 100 V-nak felel meg.

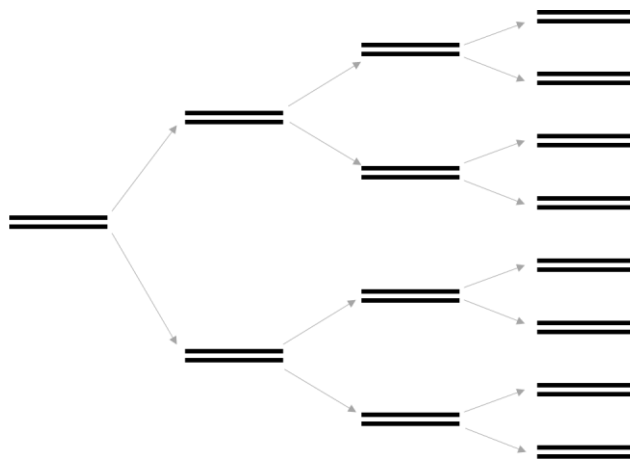
Az alábbi ábra egy gélelektroforézissel kapott mintázatot illusztrál. A molekulasúly markereket a mintában lévő DNS fragmentumok méretének meghatározására használjuk. A minták (1-6) lehetnek például egy populáció egyedei, amelyekből DNS-t izoláltunk.



DNS felsokszorozása polimeráz láncreakcióval

A polimeráz láncreakció, más néven PCR (Polymerase Chain Reaction) az egyik leggyakrabban használt technika a molekuláris biológiai laboratóriumokban. A módszert Kary Mullis amerikai biokémikus dolgozta ki 1983-ban. A módszer olyan jelentőségűnek bizonyult, hogy Mullist 1993-ban megosztva megkapta a kémiai Nobel díjat. Bár a polimeráz láncreakció alapvetően DNS felsokszorozására (amplifikálására) szolgál, alkalmazása igen széleskörű, így például felhasználható klónozáshoz, génkifejeződés vizsgálatához, mutációk előállításához és DNS variánsok kimutatásához is. A kis kiindulási DNS minta igénye (pl. vérből, madártollból elegendő nyerhető) mellett ez utóbbi felhasználási lehetőség miatt vált a molekuláris ökológiai kutatások eszköztárának részévé.

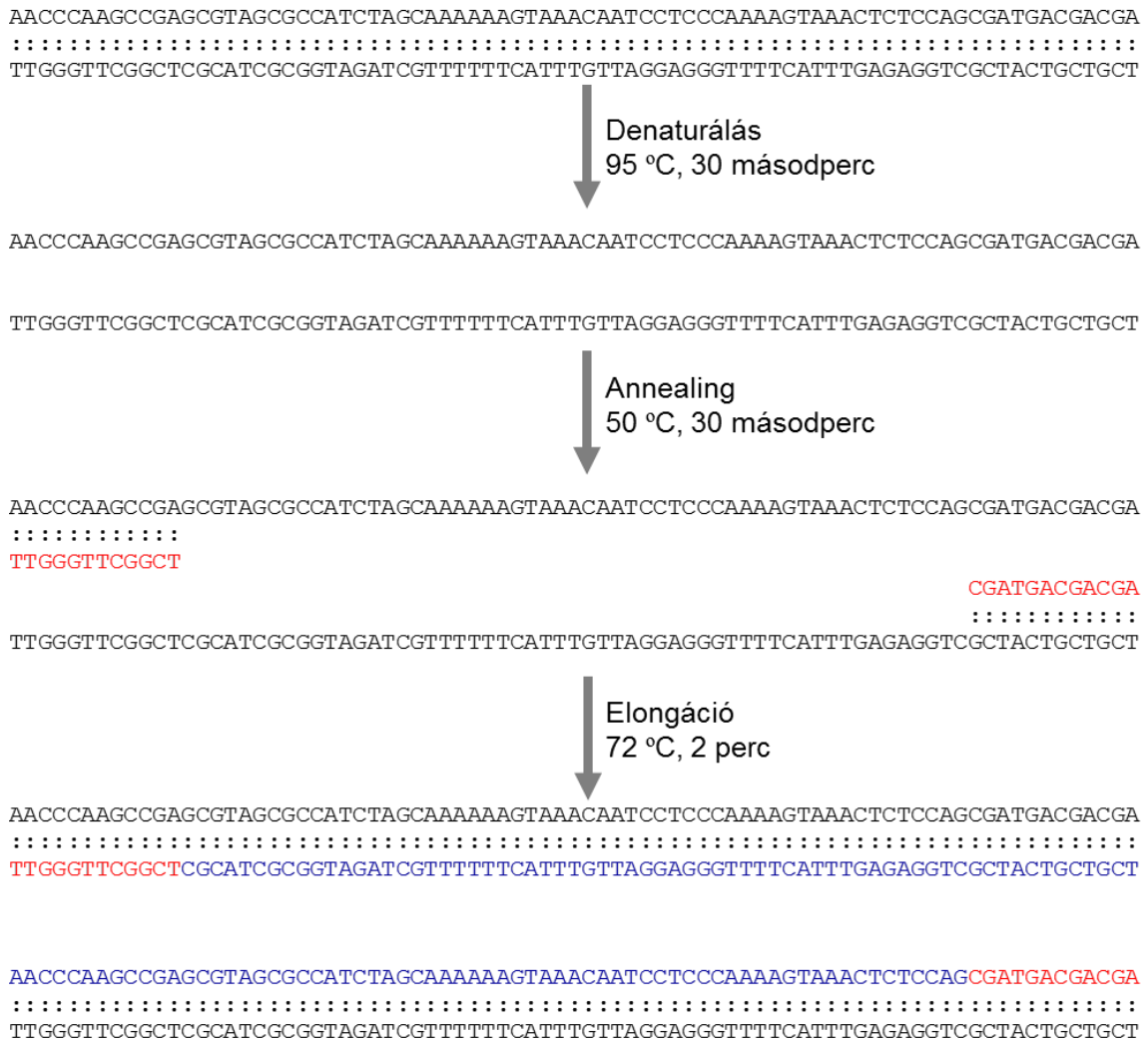
A polimeráz láncreakció a DNS *in vitro*, azaz kémcsőben, mesterséges körülmények között zajló való megsokszorozására szolgál. Ehhez azonban a módszer végrehajtása során leutánozzák a DNS sejtben történő megkettződésének (a replikációnak) a főbb lépéseit. A sejtben történő replikáció során enzimek részlegesen szétválasztják a DNS két szálát (denaturálják azt); ezt követően más enzimek a DNS szintézis beindításához szükséges egyesszálú lánccindító oligonukleotidokat (primereket) szintetizálnak az egyes szálú DNS szakaszok mellé; majd ezektől a primerektől kiindulva a DNS polimeráz enzim megkezdi a DNS szintézisét. A polimeráz láncreakció során hasonlóak a lépések, de ezek közül csak a DNS szintézisét végzi enzim, a megelőző lépéseket mesterségesen hajtjuk végre. Egy lépés sorozat – azaz PCR ciklus – (denaturáció, primer kötődés, szintézis) eredményeként a kémcsőben lévő DNS megduplázódik: minden fél szál kiegészül duplaszálúvá. A ciklus végére létrejött duplaszálú DNS molekulák kiindulási anyagát (mintáját, vagy templátját) adják egy újabb PCR ciklusnak, ezért hívják a módszert láncreakciónak. A DNS mennyisége a reakció során minden ciklusban duplázódik, így kettő hatványainak megfelelően exponenciális módon szaporodik fel.



A gyakorlatban általában 25 - 40 ciklust hajtanak végre egy PCR reakció során, ezzel elméletben

$2^{25} - 2^{40}$ (~ 33 millió – 1100 milliárd) másolatot hoznak létre az eredeti DNS szárlól. Ez (mint a számokból is látszik) igen nagymértékű felsokszorozása az eredeti DNS-nek, így például a lenti példában szereplő 60 bp hosszúságú DNS egyetlen kópiájából egy 40 ciklusos PCR reakcióval mintegy 70 ng DNS-t lehet előállítani, amely már jól látható agaróz gélben.

A PCR reakció három lépésből áll, ezeket mutatjuk be az alábbi példán. Amplifikáljunk fel egy 60 bp-os DNS szakasz! A DNS két antiparallel szála egymással komplementer, a megfelelő bázispárokat (A:T, G:C) hidrogén hidak kötik össze.



A PCR első lépése a denaturáció. Ennek során az oldatban lévő DNS-t hőkezeléssel denaturálják, aminek során a DNS két szála elválik egymástól, mivel a bázispárok közti hidrogén hidak felszakadnak. A lépést általában 95 °C-on végzik, 30 másodpercig.

A PCR második lépése az ú.n. annealing. Ennek során a PCR reakció keverékbe általunk bemért, az ábrán pirossal kiemelt láncindító primerek (az amplifikált DNS-sel komplementer egyesszálú DNS oligonukleotidok) hozzákapcsolódnak a DNS két szálának komplementer részeihez. A primerek kapcsolódási helye határozza meg, hogy a DNS mely részét amplifikáljuk, mivel a primerekről indulva fog megindulni a DNS szálak szintézise. A lépés hőmérsékletét a

primerek hossza és bázisösszetétele befolyásolja; általában 50-60 °C-on végzik, 30 másodpercig.

A PCR harmadik lépése az ún. **elongáció**. Ennek során a DNS polimeráz enzim kapcsolódik a primerek megfelelő (3') végéhez, és onnan kiindulva megkezd a DNS szál szintézisét (az újonnan szintetizált szakasz kékkel van jelölve). A lépést általában 72 °C-on végzik, a lépés hossza a felsokszorozni kívánt DNS szakasz hosszától függ.

Figyeljük meg, hogy a reakció eredményeként létrejött két DNS molekula teljesen azonos a kiindulási DNS molekulával (a színezéstől eltekintve)! Más szóval a kiindulási DNS kópiáit hoztuk létre.

Mint a fentiekből sejthető, a PCR reakcióhoz szükség van néhány specializált reagensre és berendezésre. Egyrészt szükség van hőstabil – magas hőmérsékleten sem denaturálódó – DNS polimeráz enzimre. Erre a célra a leggyakrabban a forróvízű gejzírekben élő *Thermus aquaticus* baktériumból származó Taq polimerázt használják.

Emellett szükség van a primer molekulákra. Ezek az oligonukleotidok határozzák meg, hogy kérdésünknek megfelelően mely DNS szakasz lesz felsokszorozva a reakció során – így minden PCR reakcióhoz külön primer párost kell tervezni. A primerek tervezésének részleteire itt nem térünk ki, de a lényeg, hogy mindig párban használjuk őket – az egyik primernek a DNS egyik, a másiknak a DNS másik szálával kell komplementernek lennie – és úgy kell elhelyezkedniük, hogy mindegyik primerről a másik primer irányába induljon a DNS szintézise (a DNS szintézis irányultsággal rendelkező folyamat!). Továbbá a primer kötőhelyek nem lehetnek túlságosan messze egymástól (tipikusan 600-800 bázispár, de ennél lényegesen nagyobb is lehet).

Ezeken kívül a reakciókeverék tartalmazza puffer komponenst (a pH-t biztosítja); a polimeráz működéséhez szükséges Mg^{2+} ionokat; négyféle nukleotid trifoszfát keverékét (dNTP) amit a DNS polimeráz beépít az új DNS szálba; valamint a felsokszorozni kívánt DNS templátot.

Végül szükség van az PCR berendezésre, ami egy programozható inkubátor. Ebbe helyezik be a mintát, majd a gép a ciklus lépéseinek megfelelően változtatja a hőmérsékletet. Így egy átlagos PCR program a következő:

95 °C, 2 perc: kezdeti denaturáció	} PCR ciklus, 35x ismételve
95 °C, 30 másodperc: denaturáció	
55 °C, 30 másodperc: annealing	
72 °C, 2 perc: elongáció	
72 °C, 5 perc: végső elongáció	

RAPD módszer

A RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA – azaz véletlenszerűen felszaporított változatos, polimorfikus DNS) módszer egy polimeráz láncreakción alapuló technika, amely lehetővé teszi, hogy nem ismert genom szekvenciájú élőlények örökítőanyagának változatosságát vizsgálni lehessen. Az módszer előnye, hogy könnyen kivitelezhető, gyors, olcsó, kevés DNS-t igényel és felhasználható genetikailag kevésbé jellemzett organizmusok vizsgálatára is; hátránya, hogy nem feltétlenül reprodukálható és az eredmények értelmezése sem feltétlenül egyértelmű.

A polimeráz láncreakcióhoz, mint az a megelőző fejezetben kiderült, szükségesek olyan oligonukleotid primerek (egyesszálú DNS molekulák), amelyek az amplifikálni kívánt templát DNS-sel komplementer szekvenciájúak. Emiatt célzott PCR reakciók tervezéséhez szükséges az, hogy a vizsgálni kívánt DNS bázisrendjét ismerjük. Újjonnan izolált biológiai minták esetében azonban ez az információ nem mindig áll rendelkezésünkre. A RAPD módszer esetén úgy kerülük ki ezt a követelményt, hogy egy vagy két rövid (általában 10 nukleotidos), mesterségesen meghatározott vagy véletlenszerűen választott primert használnak a PCR reakcióhoz. A sikeres PCR amplifikációhoz persze továbbra is két primerre lesz szükség, amelyekről kiindulva egymás irányába megindul a DNS szintézis a két szálon; csak hogy ebben az esetben például ugyan az a primer lesz mind a kettő. Egy DNS szálnak egy véletlenszerűen kiválasztott 10 nukleotidos primer $1/4^{10}$ eséllyel, azaz nagyjából egymillió nukleotidként kötődhet be. Gombák esetében tízes, rovarok esetében százas nagyságrendben található a genomban egy 10 nukleotidos primerrel komplementer szekvencia. Nem fogunk persze ilyen sok PCR terméket kapni, hiszen a sikeres reakcióhoz nem csak egy, hanem kettő, a DNS két szálán egymáshoz meglehetősen közel (500 – 5000 bp) lévő pozícióban kell a primernek kötődnie. Amennyiben azonban ez teljesül, úgy kapnak PCR termékeket, amelyeket aztán agaróz gélelektroforézis segítségével választanak el és tesznek láthatóvá – ez a RAPD fragmentum mintázat jellemző lehet az adott populációra. A DNS szekvenciájának változatai, polimorfizmusai érinthetik a felhasznált primer kötőhelyeit is, elrontva azt, vagy éppen újat hozva létre, így előidézve egy eltérő RAPD fragmentum mintázatot. Kisebb szakaszok beépülése/kiesése is hozzájárul a polimorfizmushoz.

DNS szekvenálás, szekvenáláson alapuló vizsgálatok

A leszármazási kapcsolatok (populációk története, fajok filogenetikája) meghatározására alkalmas legmodernebb módszerek a DNS bázissorrendjének meghatározásán, más szóval a DNS szekvenáláson alapulnak. A DNS szekvenálásának módszereit az 1970-es évek során dolgozták ki, amiért 1980-ban Walter Gilbert amerikai és Frederick Sanger brit biokémikusokat kémiai Nobel díjjal tüntették ki. Módszereiket az eredeti formájukban már nem használják – a technológia fejlődésnek hála modern csúcskategóriás szekvenátor modellek akár több milliárdszor (!) hatékonyabbak – de azok logikája tovább él egyes modern eljárásokban is.

Jelenleg alapvetően kétféle szekvenálási módszert használnak: a kapilláris vagy Sanger szekvenálást, amely az eredeti Sanger szekvenálás fejlesztett változata; illetve az úgy nevezett új generációs szekvenálási eljárásokat (NGS – Next Generation Sequencing). A kétféle módszer között a fő különbség, hogy a kapilláris szekvenálás során egyes DNS molekulák bázissorrendjének meghatározása elkülönülten, egyesével zajlik; ezzel szemben az NGS módszerekben igen nagy számú (több százezer vagy több százmillió) DNS szakasz párhuzamos szekvenálása zajlik. Az utóbbi módszerek jóval hatékonyabbak, és elterjedésük óta több kutatási területen is forradalmi változásokat idéztek elő.

A kapilláris szekvenálás során egy speciális DNS szintézis reakció segítségével a meghatározni kívánt DNS molekuláról egy olyan DNS másolat populációt hoznak létre, amelynek tagjai eltérő hosszúak, és mindegyik annak megfelelő színű fluoreszkáló festéket hordoz, amilyen nukleotidra végződik. Ezt követően ezeket a különböző hosszúságú DNS molekulákat kapilláris gélelektroforézis segítségével bázispár pontossággal elválasztják egymástól; a kapilláris végén pedig egy detektor meghatározza, hogy éppen milyen fluorofór halad át előtte, azaz milyen nukleotidra végződnek az egyre nagyobb fragmentumok. Hogyan lesz ebből bázissorrend meghatározás? Nézzünk egy példát:

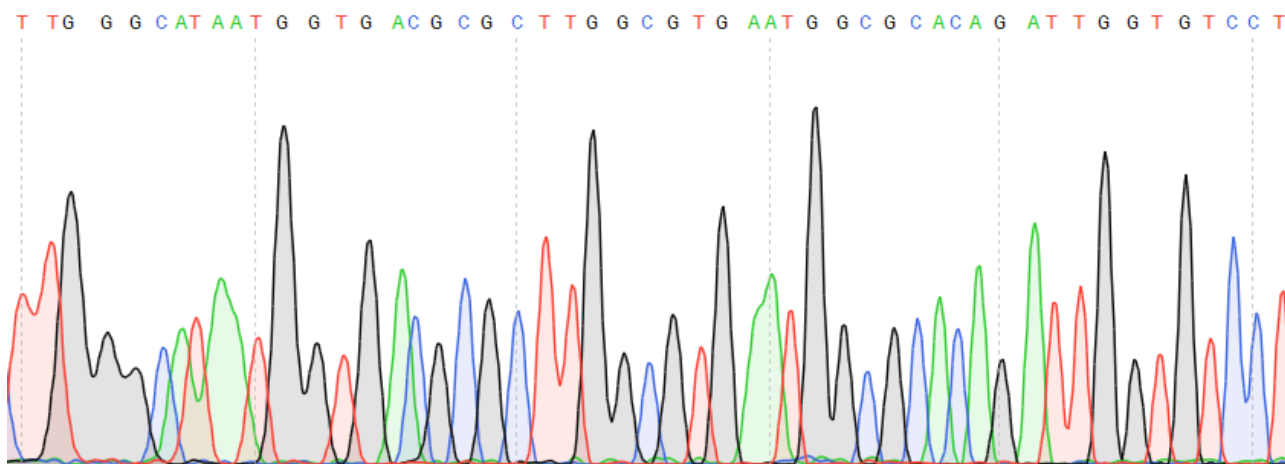
Legyen a 4 nukleotid a következő színekkel jelölve: **G (kék)**, **C (zöld)**, **A (piros)**, **T (sárga)**. Nézzük mit olvas le a detektor, ahogy 10 fluoreszcensen jelölt DNS sáv elhalad előtte, és ezek mögött milyen DNS fragmentumok állnak:

kék G
kék GG
zöld GGC
kék GGCG

piros GGCGA
 sárga GGCGAT
 kék GGCGATG
 sárga GGCGATGT
 piros GGCGATGTA
 kék GGCGATGTAG

Azaz a 10 bp hosszúságú DNS szakasz szekvenciája: GGCGATGTAG

Az alábbi ábrán a színes hullámcsúcsok a fluoreszcens jel intenzitását mutatják, ahogy a szekvenálás során a detektor leolvassa a különböző (1-1 nukleotiddal eltérő) hosszúságú DNS láncok utolsó nukleotidjának színkódját. A csúcsok felett látható az azonosított bázisok sorrendje, azaz a DNS szekvenciája.



Az NGS szekvenálási módszerek 2005-től kezdve jelentek meg, és nagyságrendekkel nagyobb hatékonyságukkal új kutatási lehetőségeket teremtettek. Bár technikai és kémiai megvalósításuk sokféle, végrehajtásuk hasonló logikai sémát követ. A DNS mintából először egy úgy nevezett szekvenáló könyvtárat hoznak létre: ennek során a DNS-t néhány száz bázispáros fragmentumokra tördelik, és meghatározott szekvenciájú polinukleotidokat (adaptereket) kapcsolnak hozzájuk. Ez után a szekvenáló könyvtárban lévő DNS darabokat az adapterek segítségével szilárd hordozó felülethez rögzítik. Az ezt követő reakciók felülethez kötötten, nem pedig oldatban fognak végbemenni, ez biztosítja, hogy nagy számú (akár több száz millió) mintát egyszerre tudjunk vizsgálni – hiszen mindegyik máshova van kötve a szilárd hordozó felületen. A felülethez rögzítés után a DNS szálakat helyben felsokszorozzák, és bázissorrendjüket meghatározzák. A szekvenálás eredménye igen nagy mennyiségű, akár több száz gigabázis mennyiségű adat. Természetesen ekkora adatmennyiséget nem lehet emberi erővel feldolgozni,

ezért a szekvencia adatok analízise mindig bioinformatikai eszközökkel történik.

Mire lehet felhasználni az NGS szekvenálást? Például:

- Teljes genom szekvenálás: A kisebb teljesítményű NGS szekvenáló berendezések is alkalmasak arra, hogy egyetlen szekvenálási munkamenetben több ismeretlen baktérium teljes genom szekvenciáját meghatározzák.
- Újraszekvenálás, variáns analízis: Újraszekvenálásról akkor beszélünk, ha az adott élőlény genomjának bázisrendje korábban már meg lett határozva. Miért szekvenáljuk akkor mégis újra? Hogy meghatározzuk a különböző egyedek örökítőanyagában tapasztalható egyedi eltéréseket, DNS polimorfizmusokat. NGS szekvenálás segítségével igen hatékonyan, bázis pontossággal határozhatóak meg az ismert referencia genomtól (a faj korábban meghatározott, referenciaként szolgáló genomja) való eltérések, variációk. Az NGS különösen alkalmas SNP-k meghatározására, a genom átrendeződések vizsgálatára viszont kevésbé használható.
- Metagenomikai analízis: Metagenomikai analízisről akkor beszélünk, ha a DNS szekvenálást közvetlenül környezeti mintából izolált DNS-en végezzük például a mintában lévő mikroba populáció jellemzése céljából. Laboratóriumi körülmények között csak a mikrobák kis száma szaporítható, a klasszikus tenyésztésen és biokémiai teszteken alapuló vizsgálatból a döntő többségük kiesik. A metagenomikai analízis egyik fő előnye, hogy nincs benne tenyésztés, ezért a mintában lévő mikrobák mindegyikének genomja azonos eséllyel jelenik meg az analízisben. Két fő megközelítést alkalmaznak jelenleg: A 16S metagenomikai analízis esetében a riboszómákban található 16S rRNS-t kódoló gén egy részletének szekvenciáját határozzák csak meg, és abból következtetnek arra, milyen mikrobák vannak a mintában, és milyen arányban. A metagenomikai teljes genom szekvenálás során ezzel szemben lehetőség nyílik új gének felfedezésére, új fajok genomjának leírására is – igaz jóval nagyobb költséggel. Ezzel a megközelítési móddal természetesen nem csak környezeti mikrobák elemzésére van lehetőség.
- Rokont terület a metatranszkriptomika. Míg a metagenomika azt kérdezi, hogy például milyen mikrobák vannak a mintában, a metatranszkriptomika azt, hogy mit csinálnak? Azaz milyen géneket fejeznek ki, milyen biokémiai folyamatok katalizálására képesek enzimeket termelhetnek?

II. LABORGYAKORLATOK

1. GYAKORLAT

DNS kivonása kiviből

Ezen a gyakorlaton azt fogjuk bemutatni, hogyan lehet egyszerű módszerekkel DNS-t kivonni húsos növényi mintákból. Amennyiben kivi nem áll rendelkezésre, banán vagy vöröshagyma is felhasználható. A gyakorlat során a növényi szöveteket mozsárban elroncsoljuk, majd detergenst és só-t tartalmazó oldatban homogenizáljuk. A mosogatószerben található detergens lebontja a membránokat és hozzáférhetővé teszi a DNS-t. A DNS-t a konyhasóból származó Na^+ ionok jelenlétében hideg alkohollal csapjuk ki.

Szükséges anyagok és eszközök:

- kivi, fél banán vagy vöröshagyma
- mosogatószer
- konyhasó
- behűtött abszolút etanol
- kés, mozsár és mozsártörő
- szűrőpapír (pl. papír kávéfilter)
- üveg főzőpohár
- gemkapocs

A gyakorlat végrehajtása:

1. Hámozzuk meg a gyümölcsöt. Csak az élő szövetre lesz szükségünk, a héjat eldobhatjuk.
2. Késsel aprítsuk fel a gyümölcsöt és helyezzük a mozsárba. Törjük össze minél alaposabban a mozsártörővel.
3. Készítsük el a feltáró oldatot: Mérjünk ki 80 ml csapvizet, és adjunk hozzá 2 g (vagy fél teáskanál) konyhasót és oldjuk be keveréssel. Adjunk hozzá 5 ml (vagy 2 teáskanál) mosogatószert, és óvatosan keverjük össze, míg homogén nem lesz.

4. Mérjük a feltáró oldatot a homogenizált kivihez, és folytassuk a homogenizálást.

5. Inkubáljuk a mintát 20 percet szobahőn majd a homogenizátumot szűrjük át a papírszűrőn a főzőpohárba.

6. Adjuk hozzá – óvatosan rétegezzük a feltárt homogenizátum tetejére kb 2 ujjnyi rétegvastagságban – a hideg abszolút etanol. Az etanolos közegben a DNS nem oldódik és kicsapódik áttetsző nyálkás anyagot képezve.

7. Hajtogassunk egy gemkapcsot kampó alakúra, gyűjtsük össze vele a DNS-t.

EXTRA: Ha a gemkapoccsal kiemelt DNS-t Eppendorf csőbe helyezünk, és szárítás után híg pufferben (10 mM Tris-HCl, pH8,0) visszaoldjuk, agaróz gélben megfuttatva vizsgálható (lásd 4. gyakorlat).

2. GYAKORLAT

DNS izolálása ecetmuslicából

A gyakorlaton Magyarországon is gyakori, és genetikai laboratóriumokban modellorganizmusként használt ecetmuslicából (*Drosophila melanogaster*) vonunk ki DNS-t. A gyakorlat során egy gyors, egyszerű feltárási módszert alkalmazunk, amellyel PCR reakcióhoz felhasználható minőségű DNS-t tartalmazó mintát állíthatunk elő. Egy ecetmuslica tömege 1 – 1,5 mg, az alábbi gyakorlati protokoll ennek figyelembevételével készült. Eltérő tömegű rovar feltárása esetén a homogenizáló oldat térfogatát annak megfelelően módosítani kell.

Szükséges anyagok és eszközök:

- ecetmuslica (könnyen gyűjthető borospincék ill. rothadó gyümölcs közelében, vagy beszerezhető laboratóriumokból)
- 1.5 ml-es centrifuga csövek (Eppendorf cső)
- 200 µl-es pipetta pipetta hegygel
- inkubátor (37 °C – 95 °C)
- 1M Tris-HCl, pH8,0
- 0,5M EDTA
- 5 M NaCl
- 10 mg/ml Proteináz K
- steril desztillált víz

A gyakorlat végrehajtása:

1. A csoport közösen készítse el a feltárási puffert! Minden feldolgozandó mintára számítsunk 55 µl puffert!

A feltárási puffer összetétele a következő:

- 10 mM Tris-HCl, pH8,0
- 1 mM EDTA
- 25 mM NaCl
- 200 µg/ml Proteináz K

Összemérés:

Törzsoldatok:	55 µl feltáró pufferhez:	X µl feltáró pufferhez:
1 M Tris-HCl	0,55 µl	
0.5 M EDTA	0,11 µl	
5 M NaCl	0,6 µl	
Proteináz K	0,55 µl	
H ₂ O	53,2 µl	

2. Altassuk el a muslicákat úgy, hogy a tároló edényüket helyezzük jégre. Amikor nem mozdulnak, csipesszel vagy ecsettel vegyünk ki egyetlen muslicát (ha lehetséges, határozzuk meg és jegyezzük fel a nemét: megkülönböztetésük sztereomikroszkóp nélkül is lehetséges az alapján, hogy a hím muslicák utolsó két potrohszelvénye fekete, míg a nőstényeké nem), és helyezzük a 1,5 ml-es centrifuga csőbe. Helyezzük a centrifugacsövet jégre.

3. Homogenizáljuk a muslicát a feltáró pufferrel. Ehhez szívjunk fel a pipettával 50 µl feltáró puffert, majd vegyünk ki a centrifuga csövet a jégről; és anélkül, hogy a puffert kinyomnánk a pipettából, a pipettahegygel dörzsöljük szét a muslicát. Miután a muslicát sikerült homogenizálnunk (ez 10 másodpercél általában nem vesz több időt igénybe), mérjük rá a pipettából a feltáró puffert. A homogenizálást szükség szerint folytathatjuk az elegy fel-le pipettázásával, de végig ügyeljünk, hogy a pipettahegy ne tömődjön el!

4. Miután az összes mintát homogenizáltuk, helyezzük őket 37 °C-os inkubátorba (vízfürdőbe) és tartjuk ott 30 percig. Ez alatt a feltáró pufferben lévő Proteináz K enzim lebontja a fehérjéket, ami hozzájárul a DNS feltárásához.

5. A 30 perces inkubációs idő letelte után helyezzük a csöveket 85 °C-ra 15 percre, vagy 95 °C-ra (forró vízfürdő) 3 percre. Ez a hőkezelés inaktiválja a Proteináz K enzimet, ami elengedhetetlen ahhoz, hogy a mintát további enzimreakciókban fel tudjuk használni. (Mivel a proteináz K azokat az enzimeket is lebontaná.)

6. Hűtsük vissza az mintát, amely közvetlenül felhasználható PCR reakcióban. Ha a mintát nem használjuk fel rögtön, tároljuk -20 °C-on.

3. GYAKORLAT

Ivar meghatározása polimeráz láncreakcióval

A gyakorlaton *Drosophila melanogaster* egyedek nemét fogjuk meghatározni polimeráz láncreakció segítségével. A muslicák nemét az emberhez hasonlóan nemi kromoszómák határozzák meg: a nőstények XX, a hímek XY kromoszómákkal rendelkeznek. Miután a muslicákból a DNS mintákat a 2. gyakorlaton részletezett módszerrel izoláltuk, azt felhasználhatjuk templátként PCR reakcióban. A nemek meghatározásához olyan PCR primer párokat használunk, amelyek az Y kromoszómán illetve az X kromoszómán található DNS szakaszt határoznak meg. Hímekben mindkét primer párral várunk terméket, nőstényekben arra számítunk, hogy csak az X specifikus primer párral kapunk PCR terméket, az Y specifikus primer párral nem. Az Y kromoszómára specifikus primer pár mintegy 800 bp-os DNS szakaszt amplifikál (ref: Genetics. 2010 Jan; 184(1): 295–307.) Az X kromoszómára specifikus primer pár 530 bp-os terméket amplifikál.

Szükséges anyagok és eszközök:

- ecetmuslica DNS minták (lehetőleg morfológiai bélyegek alapján ismert nemű egyedekből)
- 200 µl-es PCR csövek
- 20 µl-es pipetta pipetta hegygel
- PCR gép (amennyiben nem áll rendelkezésre, helyettesíthető 3 megfelelő hőmérsékletre beállított vízfürdővel, de ekkor a mintákat manuálisan kell mozgatni a vízfürdők között)
- Taq hőstabil DNS polimeráz
- 10x tömény Taq puffer
- 25 mM MgCl₂
- 10 mM dNTP (2,5 mM dATP, dTTP, dCTP és dGTP keveréke)
- YF (5 µM): Y specifikus forward primer: ATTTTGTGTCGATCAAGAATTTACCAA
- YR (5 µM): Y specifikus reverz primer: AGGGTGTGGGAGATGAAACCTC
- XF (5 µM): X specifikus forward primer: CGTTATTTTACTCGCAGACG
- XR (5 µM): X specifikus reverz primer: TGTGTAAGTGTGTGGTGAAA
- steril desztillált víz

A gyakorlat végreajtása:

1. Programozzuk be a PCR gépet! A következő hőmérsékleteket és időtartamokat állítsuk be:

- kezdeti denaturáció: 95 °C, 3 perc
 - denaturáció: 95 °C, 30 másodperc
 - annealing: 55 °C, 30 másodperc
 - elongáció: 72 °C, 1 perc
- } x35 PCR ciklus
- végső elongáció: 72°C, 5 perc
 - hűtve tartás: 4°C, ∞

2. Állítsuk össze a PCR reakció mixeket! Mindegyik DNS minta / primer pár kombinációhoz két PCR mixet állítunk össze: az egyikbe rakunk DNS templátot, a másikba nem. Ez utóbbi templát nélküli kontroll arra szolgál, hogy megállapíthassuk, ha a reakció valamilyen módon a bemért templától függetlenül is működik (pl. valamelyik reagens be van szennyeződve).

Mérjük össze a reakció mixeket kromozómánként 2 reakcióra az összetevőket a megadott sorrendben az oldathoz adva (amennyiben a 10x Taq puffer már tartalmazna MgCl₂-ot, akkor azt már ne mérjük be a mixbe, a steril deszt. víz mennyiségét viszont növeljük meg 27,5 µl-re):

Y kromoszóma specifikus mix (40 µl)	X kromoszóma specifikus mix (40 µl)
steril deszt. víz: 23,5 µl 10x Taq puffer: 4 µl 25 mM MgCl ₂ : 4 µl 10 mM dNTP: 4 µl YF primer: 2 µl YR primer: 2 µl Taq polimeráz: 0,5 µl	steril deszt. víz: 23,5 µl 10x Taq puffer: 4 µl 25 mM MgCl ₂ : 4 µl 10 mM dNTP: 4 µl XF primer: 2 µl XR primer: 2 µl Taq polimeráz: 0,5 µl

3. Keverjük meg a mixeket fel-le pipettázással, majd mindegyiket mérjük szét megfelelően megjelölt 2 – 2 PCR csőbe, úgy hogy mindegyik csőbe 20 µl PCR mix kerüljön.

4. Mind az Y, mind az X kromozómára specifikus mixet tartalmazó csövek közül az egyikhez mérjük 5 µl-t a DNS templátból, a másikhoz pedig 5 µl desztillált vizet.

Így mintánként 4 csőnek kell lennie:

- Y mix templáttal
- Y mix templát nélküli kontrollja
- X mix templáttal
- X mix templát nélküli kontrollja

5. Keverjük meg a csövek tartalmát, majd jól zárjuk le a csöveket és helyezzük őket a PCR gépbe.

6. Kapcsoljuk be a PCR gépet, és indítsuk el a beállított programot! Használjuk a „heated lid” (fűtés felülről is a párolgás csökkentésére) opciót, és állítsuk be a minta térfogatot 25 µl-re.

7. Miután a program lejárt (a hőmérséklet lement 4 °C-ra), kapcsoljuk ki a gépet, és a mintákat futtassuk meg agaróz gélelektroforézissel (4. gyakorlat), vagy későbbi felhasználáshoz fagyasszuk le -20 °C-on.

8. Az agaróz gélelektroforézist követően értékeljük a kapott eredményeket!

Mekkora DNS fragmentumokat kaptunk?

Mire utal, ha egy mintánál kapunk terméket a templát nélküli kontrollokban?

Mire utal, ha nem kapunk terméket a templát nélküli kontrollokban?

Mire utal, ha sem az X sem az Y specifikus reakcióban sem kapunk terméket?

Mire utal, ha csak az X specifikus reakcióban kapunk terméket?

Mire utal, ha az X és az Y specifikus reakcióban is kapunk terméket?

Mit gondolsz, milyen eredményt kaptunk volna, ha nem egyedi muslicákból izolált DNS-en, hanem legyek populációjából kivont DNS mintán végeztük volna a PCR reakciót?

4. GYAKORLAT

DNS elválasztása gélelektroforézissel

A gyakorlaton polimeráz láncreakcióval amplifikált DNS fragmentumokat választunk el agaróz gélelektroforézis segítségével. Az agaróz gélelektroforézis méret szerinti elválasztást tesz lehetővé, megfelelő molekulásúly marker (DNS létra – ismert hosszúságú DNS fragmentumok keveréke) mellett futtatva a mintákat a mintában lévő DNS fragmentumok mérete meghatározható. Amennyiben a molekulásúly markerben lévő fragmentumok anyagmennyisége is ismert (ez általában 20-80 ng nagyságrendbe esik), úgy azokhoz viszonyítva a mintában lévő DNS mennyisége is megbecsülhető a sávok intenzitása alapján.

A gélben elválasztott DNS kimutatásához használt DNS kötő festékek kimutatottan vagy feltételezett mutagén hatásúak, ezért azok használatakor gumikesztyű használata szükséges! Az alábbiakban a módszer kétféle változatát mutatjuk be a DNS kimutatáshoz használt festék szerint: a 4A. fejezetben részletezett fluoreszcens festékkel történő kimutatás érzékenyebb (kisebb mennyiség kimutatására alkalmas), gyorsabb, de többféle berendezést igényel és a felhasznált festékek veszélyesebbek; A 4B. Fejezetben részletezett metilénkék festékkel történő kimutatás egyszerűbb, olcsóbb, kevésbé veszélyes, de több időt vesz igénybe és kevésbé érzékeny.

4A: Kimutatás fluoreszcens festékkel

Szükséges anyagok és eszközök:

- DNS minták
- 1.5 ml centrifuga csövek (Eppendorf csövek)
- 6x tömény DNS felvivő puffer (összetétele: 10 mM Tris-HCl (pH 7.6); 60 mM EDTA; 60% glicerol; 0,03% brómfenolkék; 0,03% xylén-cianol)
- DNS molekulásúly marker
- 20 µl-es pipetta pipetta hegygel
- TAE puffer pH8,6 (40 mM Tris; 20 mM ecetsav; 1 mM EDTA)
- molekuláris biológiai tisztaságú agaróz
- DNS festék (pl. etídium bromid; SYBR Safe; GR Safe)
- steril desztillált víz

- gélöntő formák
- gél fésűk
- hőálló üveg edény (pl. Erlenmeyer lombik; cumisüveg – cumi nélkül)
- mikrohullámú sütő (gáz égővel helyettesíthető)
- gélfuttató kád
- elektroforézis transzformátor
- UV megvilágítás, vagy géldokumentációs rendszer
- gumikesztyű
- UV védő pajzs vagy szemüveg

A gyakorlat végrehajtása:

1. Először készítsük el a gél! Ehhez először szereljük össze a gél öntő formát. Helyezze bele a gél fésűt is.
2. Ezt követően mérjük össze egy hőálló üveg edényben a gél komponenseit. 50 ml 1%-os koncentrációjú agaróz gélhez mérjük ki és öntsünk az edénybe 0,5 g agarózt és 50 ml TAE puffert.
3. Mikrohullámú sütőben forraljuk fel a keveréket, és tartsuk forrón addig, amíg az agaróz teljesen be nem oldódik a pufferbe.
4. Hűtsük vissza az agaróz oldatot 50 °C – 60 °C hőmérsékletűre. Vegyünk fel gumikesztyűt és mérjük bele az oldatba a DNS festéket (A gélelektroforézishez használható DNS festékeket általában 1000x koncentrált formában használjuk – így 50 ml oldathoz 50 µl festékre lesz szükség). Az üveg mozgatásával keverjük össze az oldatot.
5. Öntsük ki a gél az összeszerelt gélöntő formába, még mielőtt megszilárdulna! (Ezt követően le lehet venni a kesztyűt.) A kiöntött oldat egyenletesen borítsa be a formát, ne legyen buborékos. A gél 20 – 30 perc alatt kihülés közben megszilárdul. A szilárd gél kissé opállossá válik.
6. Míg a gél szilárdul, készítsük el a megfuttatandó DNS mintákat! Mérjük a DNS mintáinkból 15 – 15 µl térfogatnyit új Eppendorf csövekbe, és adjunk hozzájuk 3 – 3 µl DNS felvivő puffert.
7. Mikor a gél megszilárdult, ismét vegyünk fel kesztyűt, húzzuk ki a gélből a fésűt, majd vegyük ki a gélöntő formából és helyezzük a TAE pufferrel feltöltött gélfuttató kádba, ügyelve arra, hogy a

fésű által kialakított zsebsor a negatív pólus irányába essen. A gélt 3 – 5 mm vastagságban borítsa be a puffer; a fésű fogai helyén kialakult zsebekben ne legyen buborék!

8. A gél első zsebébe mérjük be 5 µl DNS molekulaszúly markert, a többi zsebekbe pedig sorra 15 – 15 µl-t a mintákból. Végül helyezzük rá a futatókádra a fedelét, és kössük össze a transzformátorral. Kapcsoljuk be a transzformátort, és állítsuk be állandó feszültségre (4-5 V / cm, 100 V általában megfelelő). A DNS és a felvivőpufferben található színes festékek a zsebekből belefutnak a gélbe és ott megkezdik vándorlásukat a pozitív pólus felé.

9. A futtatás előrehaladtát a felvivőpufferben található festékek segítségével követhetjük: a gyorsabban haladó brómfenolkék futási sebessége 1%-os agaróz gélben a kb 300 bp-os DNS fragmentumokéhoz, a xylén-cianolé a kb 3500 bp-os DNS fragmentumokéhoz hasonló. Amint a brómfenolkék futási frontja eléri a gél $\frac{3}{4}$ -ét, kapcsoljuk ki a transzformátort.

10. Vegyünk fel gumikesztyűt. Vegyük ki a gélt a futatókádból, és helyezzük át az UV megvilágítást lehetővé tevő platformra vagy géldokumentációs rendszerbe. Amennyiben az UV forrás nem zárt, vegyünk fel UV védő pajzsot vagy szemüveget! Értékeljük a gélen látottakat, jegyezzük fel, melyik sávban milyen méretű DNS fragmentumok voltak megfigyelhetőek! Amennyiben lehetőség van rá, készítsünk fényképet a gélről!

4B: Kimutatás metilénkéssel

Szükséges anyagok és eszközök:

- DNS minták
- 1.5 ml centrifuga csövek (Eppendorf csövek)
- 6x tömény DNS felvivő puffer (összetétele: 10 mM Tris-HCl (pH 7.6); 60 mM EDTA; 60% glicerol; 0,03% brómfenolkék; 0,03% xylén-cianol)
- DNS molekulásúly marker
- 20 µl-es pipetta pipetta hegygel
- TAE puffer pH8,6 (40 mM Tris; 20 mM ecetsav; 1 mM EDTA)
- molekuláris biológiai tisztaságú agaróz
- metilénkék festő oldat (0,002% metilénkék feloldva 10X hígított TAE pufferben)
- steril desztillált víz
- gélöntő formák
- gél fésűk
- hőálló üveg edény (pl. Erlenmeyer lombik; cumisüveg – cumi nélkül)
- mikrohullámú sütő (gázégővel helyettesíthető)
- gélfuttató kád
- elektroforézis transzformátor
- festő edény (műanyag doboz) és folpack
- gumikesztyű

A gyakorlat végrehajtása:

1. Először készítsük el a gélt! Ehhez először szereljük össze a gél öntő formát. Helyezze bele a gél fésűt is.
2. Ezt követően mérjük össze egy hőálló üveg edényben a gél komponenseit. 50 ml 1%-os koncentrációjú agaróz gélhez mérjük ki és öntsünk az edénybe 0,5 g agarózt és 50 ml TAE puffert.
3. Mikrohullámú sütőben forraljuk fel a keveréket, és tartsuk forrón addig, amíg az agaróz teljesen be nem oldódik a pufferbe.
4. Hűtsük vissza az agaróz oldatot 50 °C – 60 °C hőmérsékletűre, majd öntsük ki a gélt az

összeszerelt gélöntő formába, meg mielőtt megszilárdulna! A kiöntött oldat egyenletesen borítsa be a formát, ne legyen buborékos. A gél 20 – 30 perc alatt kihülés közben megszilárdul. A szilárd gél kissé opálössá válik.

5. Míg a gél szilárdul, készítsük el a megfuttatandó DNS mintákat! Mérjük a DNS mintáinkból 20 – 20 µl térfogatnyit új Eppendorf csövekbe, és adjunk hozzájuk 4 – 4 µl DNS felvivő puffert.

6. Mikor a gél megszilárdult, vegyünk fel kesztyűt, húzzuk ki a gélből a fésűt, majd vegyük ki a gélöntő formából és helyezzük a TAE pufferrel feltöltött gélfuttató kádba, ügyelve arra, hogy a fésű által kialakított zsebsor a negatív pólus irányába essen. A gélt 3 – 5 mm vastagságban borítsa be a puffer; a fésű fogai helyén kialakult zsebekben ne legyen buborék!

7. A gél első zsebébe mérjük be 10 µl DNS molekulaszúly markert, a többi zsebekbe pedig sorra 20 – 20 µl-t a mintákból. Végül helyezzük rá a futatókádra a fedelét, és kössük össze a transzformátorral. Kapcsoljuk be a transzformátort, és állítsuk be állandó feszültségre (4-5 V / cm, 100 V általában megfelelő). A DNS és a felvivőpufferben található színes festékek a zsebekből belefutnak a gélbe és ott megkezdik vándorlásukat a pozitív pólus felé.

8. A futtatás előrehaladtát a felvivőpufferben található festékek segítségével követhetjük: a gyorsabban haladó brómfenolkék futási sebessége 1%-os agaróz gélben a kb 300 bp-os DNS fragmentumokéhoz, a xylén-cianolé a kb 3500 bp-os DNS fragmentumokéhoz hasonló. Amint a brómfenolkék futási frontja eléri a gél ¾-ét, kapcsoljuk ki a transzformátort.

9. Vegyünk fel gumikesztyűt. Vegyük ki a gélt a futatókádból és helyezzük egy műanyag dobozba a festéshez. Öntsünk rá annyi metilénkék festő oldatot, hogy elfedje. Fedjük le a dobozt a fedelével, vagy folpackkal.

10. Inkubáljuk a gélt a festőoldatban 1 – 4 órát szobahőn, vagy 24 órát 4 °C-on.

11. Vegyük ki a gélt a festőoldatból. Értékeljük a gélen látottakat, jegyezzük fel, melyik sávban milyen méretű DNS fragmentumok voltak megfigyelhetőek! Amennyiben lehetőség van rá, készítsünk fényképet a gélről!

Biztonsági információk

vegyyszer	H mondatok (Hazard statements)	P mondatok (Precautionary statement)
Brómfenolkék	H312: Bőrrel érintkezve ártalmas. H335: Légúti irritációt okozhat.	P102: Gyermekektől elzárva tartandó. P281: Az előírt egyéni védőfelszerelés használata kötelező.
EDTA	H373: Ismétlődő vagy hosszabb expozíció esetén belélegzéskor károsíthatja a légzőszerveket.	P314: Rosszullét esetén orvosi ellátást kell kérni.
Etanol	H225: Fokozottan tűzveszélyes folyadék és gőz.	P210: Hőtől/szikkától/nyílt lángtól/forró felületektől távol tartandó. Tilos a dohányzás. P233: Az edény szorosan lezárva tartandó. P240: A tárolóedényt és a fogadóedényt le kell földelni/át kell kötni. P403 + P235: Jól szellőző helyen tárolandó. Hűvös helyen tartandó.
Etidium-bromid	H302: Lenyelve ártalmas. H330: Belélegezve halálos. H341: Feltehetően genetikai károsodást okoz.	P281: Az előírt egyéni védőfelszerelés használata kötelező. P304 + P340: BELÉLEGZÉS ESETÉN: Az érintett személyt friss levegőre kell vinni és olyan nyugalmi testhelyzetbe kell helyezni, hogy könnyen tudjon lélegezni. P309 + P310: Expozíció vagy rosszullét esetén: Azonnal forduljon TOXIKOLÓGIAI KÖZPONTHOZ vagy orvoshoz.
Metilénkék	H302: Lenyelve ártalmas.	P264: A használatot követően az eszközöket alaposan meg kell mosni. P270: A termék használata közben tilos enni, inni vagy dohányozni. P301+P312 LENYELES ESETÉN: rosszullét esetén azonnal forduljon TOXIKOLÓGIAI KÖZPONTHOZ vagy orvoshoz. P330: A száját ki kell öblíteni. P501 A tartalom/edény elhelyezése hulladékként: 94/62/CE vagy 2008/98/CE utasítás szerint.
MgCl ₂	H335: Légúti irritációt okozhat. H319: Súlyos szemirritációt okoz.	P261: Kerülje a por/füst/gáz/köd/gőzök/permet belélegzését. P280: Védőkesztyű/védőruha/szemvédő/arcvédő használata kötelező. P305+P351+P338: SZEMBE KERÜLÉS esetén: Több percig tartó óvatos öblítés vízzel. Adott esetben a kontaktlencsék eltávolítása, ha könnyen megoldható. Az öblítés folytatása.
Proteináz K	H315: Bőrirritáló hatású. H317: Allergiás bőrreakciót válthat ki. H319: Súlyos szemirritációt okoz. H334: Belélegezve allergiás és asztmás tüneteket, és nehéz légzést okozhat. H335: Légúti irritációt okozhat.	P260: A por belélegzése tilos. P280: Védőkesztyű/szemvédő használata kötelező. P342+P311: Légzési problémák esetén: Forduljon TOXIKOLÓGIAI KÖZPONTHOZ/ orvoshoz.
Tris	H315: Bőrirritáló hatású. H319: Súlyos szemirritációt okoz. H335: Légúti irritációt okozhat.	P280: Védőkesztyű/védőruha/szemvédő/arcvédő használata kötelező. P264: A használatot követően a(z) -t alaposan meg kell mosni. P305+P351+P338: SZEMBE KERÜLÉS esetén: Több percig tartó óvatos öblítés vízzel. Adott esetben a kontaktlencsék eltávolítása, ha könnyen megoldható. Az öblítés folytatása. P337+P313 : Ha a szemirritáció nem múlik el: orvosi ellátást kell kérni.
SDS (nátrium-dodecilszulfát)	H228: Tűzveszélyes szilárd anyag. H302: Lenyelve ártalmas. H311: Bőrrel érintkezve mérgező. H315: Bőrirritáló hatású. H319: Súlyos szemirritációt okoz. H335: Légúti irritációt okozhat.	P210: Hőhatástól távol tartandó. P280: Védőkesztyű kötelező. P302 + P352: HA BŐRRE KERÜL: Lemosás bő szappanos vízzel. P304 + P340: BELÉLEGZÉS ESETÉN: Az érintett személyt friss levegőre kell vinni és olyan nyugalmi testhelyzetbe kell helyezni, hogy könnyen tudjon lélegezni. P305 + P351 + P338: SZEMBE KERÜLÉS esetén: Több percig tartó óvatos öblítés vízzel. Adott esetben a kontaktlencsék eltávolítása, ha könnyen megoldható. Az öblítés folytatása. P309 + P310: Expozíció vagy rosszullét esetén: Azonnal forduljon TOXIKOLÓGIAI KÖZPONTHOZ vagy orvoshoz.
Xilén cianol	H315: Bőrirritáló hatású. H319: Súlyos szemirritációt okoz. H335: Légúti irritációt okozhat.	P261: Kerülje a por/füst/gáz/köd/gőzök/permet belélegzését. P305 + P351 + P338: SZEMBE KERÜLÉS esetén: Több percig tartó óvatos öblítés vízzel. Adott esetben a kontaktlencsék eltávolítása, ha könnyen megoldható. Az öblítés folytatása.