

Molekuláris biológiai technikák

Wunderlich Lívius

A „Molekuláris biológiai technikák” jegyzet igyekszik átfogó képet adni a „jövő tudományának”, a molekuláris biológiának a módszertanáról. A technikák elméleti hátterének ismertetése mellett a könyv gyakran részletezi a gyakorlati kivitelezéshez szükséges tudnivalókat is. A jegyzet horizontálisan és vertikálisan is építkezik: a látszólag egymástól teljesen különálló, alapvető módszerek ismertetése után, azok szintézisével több, egymásra épülő komplex technikát mutat be. Néhány példa a komplexebb technikákra: DNS-szekvenálás, klónozás, *in vitro* mutagenézis, gén-expresszió vizsgálata, génkiütés és transzgenikus élőlények előállítása, fehérje-termeltetés, fehérje-interakciók vizsgálata. A technikák bemutatása nem öncélú; elsősorban a komplexebb módszerek leírása esetén hangsúlyosak a kutatási vagy ipari felhasználásukra való utalások.

Kulcsszavak: vektorok, klónozás, génkönyvtár, PCR, hibridizáció, restrikciós endonukleázok, szekvenálás, génkiütés, transzgenikus élőlények, *in vitro* mutagenézis, génexpresszió, géncsendesítés, fehérjeexpresszió, immunoblot, fehérje interakciók

Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem

Semmelweis Egyetem



Typotex Kiadó

2014

COPYRIGHT: © 2014-2019, Wunderlich Lívius, Budapesti Műszaki és
Gazdaságtudományi Egyetem, Semmelweis Egyetem

Creative Commons NonCommercial-NoDerivs 3.0 (CC BY-NC-ND 3.0)

A szerző nevének feltüntetése mellett nem kereskedelmi céllal szabadon másolható,
terjeszthető, megjelentethető és előadható, de nem módosítható.

Szakmai lektor: Zimányiné Ratkai Tünde, Stefán Gábor

ISBN 978 963 279 174 6

Készült a [Typotex Kiadó](#) gondozásában

Felelős vezető: Votisky Zsuzsa

Készült a TÁMOP-4.1.2/A/1-11/1-2011-0079 számú, „Konzorcium a biotechnológia és
bioinformatika aktív tanulásáért” című projekt keretében.

Nemzeti Fejlesztési Ügynökség
www.ujszachenyiterv.gov.hu
06 40 638 638



A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai
Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg.

Tartalomjegyzék

Előszó	8
1. Történeti áttekintés	9
1.1. A molekuláris biológia története	9
2. A molekuláris biológia objektumai, összefüggései, kísérleti tervezés	26
2.1. A molekuláris biológia objektumai	26
2.1.1. Szénhidrátok	26
2.1.2. Lipidek.....	28
2.1.3. Fehérjék	29
2.1.4. Nukleotidok, nukleinsavak	30
2.2. A molekuláris biológia összefüggései.....	31
2.2.1. Sejtek.....	32
2.2.2. Makromolekulák keletkezése	33
2.2.3. Határtudományok.....	35
2.3. Kísérleti tervezés.....	35
3. Elválasztási technikák	38
3.1. Szűrés, koncentráció	38
3.2. Centrifugálás	41
3.3. Kromatográfia	45
3.3.1. Kizárásos kromatográfia	46
3.3.2. Adszorpciós kromatográfia	46
3.3.3. Megoszlási kromatográfia.....	47
3.3.4. Ioncserés kromatográfia.....	48
3.3.5. Affinitás kromatográfia	49
3.4. Gélelektroforézis	49
3.4.1. Agaróz gélelektroforézis.....	49
3.4.2. Pulzáló erőterű gélelektroforézis.....	53
3.4.3. Poliakrilamid gélelektroforézis (PAGE)	54
3.4.4. Kétdimenziós (2D) gélelektroforézis.....	57
3.5. Kapilláris elektroforézis	58
4. Sejttenyésztés fenntartása, manipulálása	61
4.1. Baktériumok	61
4.1.1. Baktériumok tenyésztése.....	62
4.1.2. Baktériumok transzformálása.....	63
4.2. Élesztőgombák.....	64

4.2.1. Élesztőgomba tenyésztése.....	65
4.2.2. Élesztő transzformálása.....	66
4.3. Sejtkultúra állatokból	66
4.3.1. Állati sejtek tenyésztése.....	67
4.3.2. Állati sejtek transzfektálása	69
4.4. Növényi sejtkultúra	70
4.4.1. Transzgének növényi sejtekbe juttatása.....	71
4.5. Vírusok	71
5. DNS-, RNS-, fehérjeizolálási technikák	72
5.1. Nukleinsavak izolálása.....	73
5.1.1. Genomi DNS-izolálás.....	75
5.1.2. Plazmid izolálás.....	76
5.1.3. DNS-fragment izolálása.....	77
5.1.4. RNS-izolálás.....	78
5.2. Fehérjék izolálása	80
6. Nukleinsav-módosító enzimek	81
6.1. Polimerázok	81
6.1.1. DNS-polimeráz	81
6.1.2. RNS-polimeráz.....	84
6.2. Nukleázok.....	85
6.2.1. Dezoxiribonukleázok	85
6.2.2. Ribonukleázok.....	89
6.3. Ligázok	89
6.4. Másodlagos DNS-módosító enzimek	90
6.4.1. Alkalikus foszfatázok	90
6.4.2. Polinukleotid-kináz	91
6.4.3. Metilázok	91
6.5. Térszerkezet-módosító enzimek	91
6.5.1. Helikázok.....	92
6.5.2. Topoizomerázok.....	92
7. Polimeráz láncreakció	93
7.1. A PCR elve	93
7.2. Exponenciális szaporodás	97
7.3. A reakcióelegy összetétele.....	98
7.4. Primerek tervezése	98
7.5. A PCR alkalmazási területei, feltételei	99
7.6. Hőstabil polimerázok	99
7.7. A PCR-reakció specifitása	100
7.8. Extra szakaszok beépítése.....	101
7.9. Pontmutációk vizsgálata hagyományos PCR-rel.....	102
7.10. Degenerált PCR, multiplex PCR.....	103
7.11. Kvantitatív mérések PCR-rel.....	104

7.12. Kvantitatív mérések real-time PCR-rel	104
7.13. Pontmutáció kimutatása real-time PCR-rel	108
8. Szekvenciameghatározás	111
8.1. DNS-szekvenálás	111
8.1.1. A Sanger-féle lánctermináción alapuló DNS-szekvenálás	111
8.1.2. Új generációs szekvenálás.....	117
8.2. Fehérjeszekvenálás	118
8.2.1. Szekvenálás Edman-degradációval	118
8.2.2. Szekvenálás tömegspektrométerrel	119
9. Hibridizációs technikák.....	121
9.1. Southern-blot.....	121
9.2. Northern blot.....	123
9.3. Dot blot és slot blot.....	124
9.4. Nuclease-protection assay.....	125
9.5. DNS-chip (DNA-microarray)	126
9.6. Kolónia hibridizáció	129
9.7. Fluoreszcens <i>in situ</i> hibridizáció (FISH)	130
10. Vektorok.....	131
10.1. Plazmidok.....	131
10.1.1. pBR322	132
10.1.2. Antibiotikumok, rezisztencia	133
10.2. Bakteriofágok.....	133
10.2.1. λ -fág.....	133
10.2.2. M13 fág	134
10.3. Kék-fehér szelekció.....	135
10.3.1. pUC18/19	137
10.4. Vektorok <i>in vitro</i> transzkripcióhoz.....	138
10.5. Fágemid vektorok	139
10.5.1. pBluescript.....	140
10.6. Kozmidok.....	141
10.7. Mesterséges kromoszómák.....	142
10.7.1. YAC	142
10.7.2. BAC	143
10.7.3. HAC.....	144
10.8. Virális vektorok.....	145
11. Klónozás, nukleinsav-könyvtárak.....	147
11.1. Klónozás restriktív enzimekkel.....	147
11.2. Ligáz nélküli klónozások	150
11.2.1. USER technológia.....	150
11.2.2. Háromnukleotidos technológia.....	151
11.2.3. TOPO-klónozás	152

11.2.4. Rekombinációs klónozás	154
11.3. Genomi könyvtárak	156
11.4. cDNS könyvtárak	157
11.4.1. Az első szál szintézise	157
11.4.2. A második szál szintézise	158
11.4.3. RACE	162
12. Expressziós rendszerek	168
12.1. Expressziós vektorok.....	169
12.2. Expresszió baktériumsejtekben	174
12.3. Fehérjetermelés élesztőben	176
12.4. Fehérjeexpresszió bakulovírus segítségével	179
12.5. Expresszió emlőssejt-tenyészetekben	181
12.6. Expresszió állatokban.....	183
12.7. Sejtmentes fehérjeexpresszió	184
13. Mutagenézis, géncsendesítés	189
13.1. Mutagenézis.....	189
13.1.1. Irányított pontmutációk generálása.....	189
13.1.2. Random mutációk készítése PCR-rel	195
13.1.3. Deléciók készítése	196
13.1.4. Génkiütött állatok.....	200
13.2. Géncsendesítés	202
13.2.1. A géncsendesítés elmélete	203
13.2.2. Géncsendesítési módszerek.....	204
14. Fehérjék kimutatása	208
14.1. Antitestek termeltetése.....	208
14.1.1. Poliklonális antitestek készítése.....	208
14.1.2. Monoklonális antitestek készítése	210
14.1.3. Másodlagos antitestek	211
14.2. Aptamerek.....	212
14.3. Western blot.....	213
14.4. ELISA	215
15. Fehérje interakciók	217
15.1. <i>In vitro</i> kapcsolatok kimutatása.....	217
15.1.1. Kapcsolatok kimutatása fúziós fehérjével.....	217
15.1.2. Immunprecipitáció.....	218
15.1.3. Ko-immunprecipitáció.....	219
15.1.4. Gél-shift.....	220
15.1.5. Fág-display technika.....	221
15.1.6. Kromatin-immunprecipitáció.....	222
15.2. <i>In vivo</i> kapcsolatok kimutatása.....	224
15.2.1. Élesztő két-hibrid rendszerek	224

15.2.2. Élesztő egy-hibrid rendszerek.....	227
15.2.3. Élesztő három-hibrid rendszer	229
Felhasznált irodalom	231