



Milyen öregkorra számíthatok?

Molekuláris genetikai technikák a megelőző orvoslás szolgálatában

Jelige: CUBO4
V. KutDiák Esszépályázat

Tartalomjegyzék

| | |
|---|-----------|
| Tartalomjegyzék | 1 |
| Bevezetés | 2 |
| PCR: a polimeráz láncreakció [3, 11] | 2 |
| A PCR története, lényege és alkalmazási területei [3, 6, 11] | 2 |
| A Taq-polimeráz [5, 11] | 3 |
| Primerek [11]..... | 3 |
| A PCR menete [11] | 3 |
| Vizsgálatom: csonttöréses rizikófaktor megléte [2, 3, 9, 10] | 4 |
| A vizsgálat elmélete dióhéjban [8] | 5 |
| RFLP: a PCR révén nyert DNS-szakaszok emésztése [8]..... | 5 |
| Gélelektroforézis [4]..... | 5 |
| Saját vizsgálat [1, 2, 8] | 6 |
| Ha balul sült el a kísérlet: egyes hibalehetőségek [3, 11]..... | 8 |
| Kitekintés [5] | 8 |
| Források: előadások, felhasznált irodalom | 9 |
| Köszönetnyilvánítás | 10 |
| Mellékletek: kiegészítő ábrák | 10 |

Bevezetés

2006 nyarán öt napot töltöttem Budapesten a BioGén Tábor résztvevőjeként. A középiskolások részére összeállított rendezvény során társaimmal a Semmelweis Egyetem I. sz. Belklinikájára, illetve az I. sz. Patológiai Intézetébe látogathattam el, ahol a molekuláris biológia, a genetika és az orvostudomány ezen szegletének modern diagnosztikai módszereivel és fő kutatási irányjaival ismerkedtem meg. A tábor nagyon érdekes és tanulságos volt – számomra örök élmény. A tanultak közül a legérdekesebb az ún. polimeráz láncreakció technikája és egy vele elvégzett vizsgálat volt. A kísérlettel, mint azt majd bemutatom, meg tudható, hogy esetleges időskori csonttritkulásos állapotban kell-e számolni fokozott csonttörési hajlammal. A vizsgálatval valamelyest pontosabb képet kaphattam szervezetemről. Ebből is látszik, a módszernek igen nagy jelentősége lehet a következő évek-évtizedek gyógyító munkájában.

PCR: a polimeráz láncreakció [3, 11]

Ha le akarjuk egyszerűsíteni a dolgokat, akkor akár azt is mondhatnánk: a polimeráz láncreakció (Polymerase Chain Reaction – PCR) az örökítőanyag-állomány természetben lejátszódó, sejtosztódáskor (mitózis és meiózis) bekövetkező megkettőződési folyamatának „mesterséges változata”. Ez a mondat azonban egy kicsit pontatlan; precízebben fogalmazva a PCR egy molekuláris biológiai technológia a DNS enzimatis felerősítésére (amplifikálására, azaz a másolatok megsokszorozására) élő szervezet, például kólibaktérium vagy élesztőgombák felhasználása nélkül. A technológia így lehetővé teszi a DNS egy kis darabjának másolását analízis céljából. A PCR általánosan használt módszer az élettudományi kutatásokban és egészségügyi laboratóriumokban.

Célunk tehát a PCR-rel a teljes DNS-szál egy rövid, határozott szakaszának felerősítése. Ez lehet egyetlen gén vagy csak egy génrészlet is akár. És itt található a differenciát a sejtosztódás és a PCR között: az előbbi során teljes DNS-molekulák másolódnak le, a PCR-folyamatban *csak kis DNS-szakaszok másolása* zajlik. A DNS kettős szálú, és a bázispárok száma határozza meg a méretét. A PCR-hez alkalmas szakaszok hossza általában 10 kb (kb = kilobázispár = 1000 bázispár). Bizonyos módszerek akár 40 kb méretű szakaszokat is képesek lemásolni, de még ez is elenyésző egy eukarióta sejt DNS-ének méretéhez képest. Egy emberi sejt például mintegy hárommilliárd bázispárt tartalmaz. Ebben rejlik emberi mivoltunk, minden egyéni tulajdonságunk – így például szemszínünk is!

Felfoghatjuk a „rövidséget” azonban előnyként is. Ha ugyanis a DNS-szakasznak csak egy kis részletét szeretnénk felerősíteni, akkor a PCR-rel nem kell az örökítőanyag más, számunkra szükségtelen részeire „pazarolni” az alapanyagokat.

A PCR története, lényege és alkalmazási területei [3, 6, 11]

A PCR-t az amerikai Kary Bank Mullis (1944) kémikus hozta létre 1983 decemberében, még amikor a Cetus Corporation nevű cég alkalmazásában állt (I. ábra). Abban az évben el is adta a technikát 10 000 dollárért a munkahelyének. A tudományos élet eleinte kétkedve fogadta elképzeléseit, de hamarosan felismerte a PCR jelentőségét: a világraszóló módszerért végül többen versengtek, és számos bírósági ügy is ismerté vált vele kapcsolatban (így a DuPont-per). 1992-ben a Hoffmann-La Roche vállalat a szabadalmat 300 millió dollárért (!) vásárolta meg a Cetustól, pontot téve a jogi huzavona végére. Az eredeti PCR-szabadalom azóta is az ő tulajdonuk.

Mullis feladata a Cetusnál eredetileg az volt, hogy a DNS egy megadott szakaszát sokszorosítsa. A sokak szerint „lusta, de rendkívül elmés” kutató ezért olyan eljárást fejlesztett ki, amely a DNS *kívánt szakaszát* mesterségesen megsokszorozza a DNS-polimeráz enzim segítségével, megismételt kétszerezési (duplikációs) ciklusok által. Eredményéért

Milyen öregkorra számíthatok?

Mullis 1993-ban megkapta a kémiai Nobel-díjat, alig hét évvel azután, hogy ötletét a gyakorlatba átültette.

Mára az örökletes betegségek és velejáráók kimutatása (mint látni fogjuk) mellett más fontos kísérletek is elvégezhetők a PCR-rel. Ilyen az ún. genetikai ujjlenyomat vizsgálata, amikor bűncselekmények gyanúsítottjainak vér-, ondó-, nyál- vagy hajmintáját összevetik a helyszínen találtakkal. Vírusos és baktériumos fertőző betegségek kimutatására is alkalmas a módszer, illetve ősi DNS-maradványok is vizsgálhatóvá tehetők PCR-rel (például az egyik orosz cárt azonosították így). A PCR-berendezés képe a II. ábrán látható.

A PCR-hez szükséges DNS-polimeráz (azaz „DNS-másoló”) megtalálható az élő szervezetekben, és ahogy neve is mutatja, funkciója a DNS lemásolása a sejtek osztódásakor. A polimeráz enzim a DNS egyik szálához kötődve létrehozza a komplementer (lenyomat) szálát.

A Taq-polimeráz [5, 11]

A jelenlegi legfejlettebb PCR-módszerhez a 110 °C feletti átlaghőmérsékletű gejzírekben élő, hőkedvelő (extremofil) baktériumok DNS-polimerázát használják (III. ábra). Ezeknek az organizmusoknak a polimeráza magas hőmérsékleten is stabil, így a PCR-eljárás alatt nem bomlik le a hevítési lépésben. Ettől fogva nem kellett folyton új polimerázt hozzáadni a PCR-hez, mint ahogy azt Mullis eleinte tette. Így lehet az adott DNS-szál másolása mára teljesen automatizált.

Az egyik legelső és mindmáig széles körben alkalmazott hőstabil DNS-polimerázt – mely 1985-ben *Az év molekulája* volt – a *Thermophilus aquaticus* nevű organizmusból nyerték („hőkedvelő, vízben lakó” élőlény, rövidítve: Taq). Időnként sajnos hibázik a másoláskor, és ez mutációhoz vezet. Az *Archaea* organizmusból nyert Pwo vagy Pfu nevű polimerázok lassabbak szintetizálnak ugyan, de rendelkeznek a hibajavítás képességével (kisebb mutációs arány). Kedvelt eszköz a Taq és a Pfu enzimek kombinációja, mely egyszerre gyors és pontos.

Primerek [11]

A felerősítendő DNS-szakaszt a primerek kiválasztásával határozzák meg. A primerek olyan egyszálú, rövid, mesterséges DNS-szálak – 50 nukleotidnál kevesebb alkotja őket; általában 18-25 bp hosszúak –, amelyek komplementerek a felerősítendő DNS-szakasz elejével és végével. Olyan szakaszok tehát, melyeket a PCR-t végrehajtó ember tervezett meg (majd egy gyár előállította őket), és lehetőleg csak a kívánt szakaszon kapcsolódnak hozzá a fél-DNS-szakaszhoz. Ha nem jól tervezünk, elrontjuk a PCR-t, hiszen a primer a DNS-szakaszhoz más helyen kapcsolódhat, mivel több helyen is van egy ugyanolyan szekvencia. Ilyenkor nem elég hosszú, nem elég specifikus a DNS-szakaszt célzó primerünk. A primerek tehát hozzákapszolódnak a DNS-templáthoz ezeken a kezdő- és végpontokon, ahová majd egy másik összetevő, a DNS-polimeráz kötődik, és megkezdik egy új DNS-szál szintetizálását.

A primer hossza „alulról és fölülről” is korlátozott. Mint láttuk, a túl rövid primerek több helyre is kapcsolódhatnak egy hosszú DNS-templáton, amely nem specifikus másolatokat eredményezne. Másfelől a primer maximális hossza is limitált az olvadási hőmérséklet miatt. A túl magas olvadási hőmérsékletek (például 80 °C felett) gondot jelentenek, hiszen a DNS-polimeráz kevésbé aktív magas hőmérsékleten. A primer optimális hossza így körülbelül 20-40 nukleotid, 60 és 75 °C közötti olvadási hőmérséklettel.

Néha ún. degenerált primereket használnak. Ezek hasonló, de mégsem azonos primerek keverékei. Ha ugyanazt a gént különböző fajokban kell felerősíteni, rendkívül hasznosak lehetnek, ugyanis a gének maguk is valószínűleg hasonlóak, de nem azonosak (például emlősök közt).

A PCR menete [11]

A PCR-eljárás húsz-harminc ciklus egymásutánjából áll. Mindegyik ciklus három lépést tartalmaz.

Milyen öregkorra számíthatok?

Első ciklus: a három alaplépés

Az **első lépés** a hődenaturáció (angol szaknyelv szerint *denaturation*; 1-2. ábra). Ekkor a kettős szálú DNS-t egy vagy pár percig 94-96 °C-ra hevítik, hogy a kettős hélix szálai szétváljanak. A **második lépés** (3. ábra) során a DNS-szálak szeparálása után a hőmérsékletet csökkentik (saját kísérletünkhöz 50-65 °C-ra), így a primerek hozzá tudnak kapcsolódni az egyes DNS-szálakhoz, pontosabban azok komplementer szekvenciájú részéhez. A lépés elnevezése az „*annealing*” vagyis ragasztás. Ezek után következik a **harmadik lépés** (meghosszabbítás – *extension*, 4-6 ábra). A név meghosszabbítandó DNS-szál szintetizálására utal, ahol a „szülő” nukleinsavszál szolgál templátként a „gyermek” lánc létrehozásához. Az első ciklus ezzel véget ért. Az eredményül kapott két DNS-szál a következő ciklus templátja lesz, következésképpen minden ciklusban megkétszereződik a DNS mennyisége.

Második ciklus

A 7-10. ábrákon jól láthatóan ugyanaz a folyamat folytatódik, mint ami eddig zajlott, csak a DNS-szakaszok és az egyes PCR-összetevők (például a polimeráz) száma megkétszereződött.

Harmadik ciklus

Ebben a ciklusban érjük el a megfelelő hosszúságú DNS-szakaszt, mely narancssárga háttérszínnel van megjelölve. (11-15. ábrák)

A ciklusonként nyert DNS-szakaszok mennyisége 2^n , ahol n a PCR ciklusok száma. Egy általános PCR-folyamat 20-30 ciklusból áll. 30 ciklussal számolva, $2^{30} = 1,073,741,824$ DNS-másolatunk lesz, a cél-DNS-másolatok száma elvben pedig 1,073,741,764. Beláthatjuk tehát, hogy PCR rendkívül magas hatásfokú folyamat.

Vizsgálatom: csonttöréses rizikófaktor megléte [2, 3, 9, 10]

A kísérlet pontos neve: *Coll1A1 gén Sps1-es polimorfizmusának (többalakúságának) vizsgálata PCR-RFLP-vel*. Általán meg tudhatom, hogy egy időskori, remélem, nem bekövetkező csonttritkulásos állapotban kell-e majd számolnom genetikai eredetű fokozott csonttörési hajlammal.

Az örökletes betegségek és hajlamok kimutatása egy adott – például emberi – genomon hosszú és bonyolult folyamat. A PCR-rel mindez lerövidíthető, hiszen kérdéses génszakaszok könnyen felerősíthetőek megfelelő primerekkel, majd utána a mutáció egyértelműen kimutatható.

A vizsgált kór tehát a csonttritkulás (osteoporosis), a néma járványnak is nevezett betegség, amely Magyarországon minden tizedik embert érinti, világszerte pedig százmilliók problémáját okozza, noha szoros értelemben a csonttritkulás megelőzhető, ha nem is gyógyítható. A csonttritkulás egészen pontosan a *csontszövet anyagcsere-betegsége*. A csont élő támasztószövet, mely folyamatosan épül és bomlik annak érdekében, hogy szerkezete mindig az őt érő erőhatásoknak megfelelően épüljön fel (IV. ábra). Így az ásványi anyagok mellett számos, az átalakulásokat is biztosító élő sejtet is találunk itt. Tápanyagellátásuk sérülése, külső irányításuk, belső működésük hibája esetén bekövetkezhet, hogy felborul a csontépítő és csontlebontó folyamatok dinamikus egyensúlya. A lebontóak relatív túlsúlya esetén beszélünk csonttritkulásról, amely a szervezetet számos helyen érintheti, például a gerincoszlopnál (V. ábra). Számos ok kibillentheti a csontanyagcserét egyensúlyából: férfiaknál és nőknél egyaránt rizikótényezőnek számítanak a pajzsmirigybetegségek és a reuma, de akár az asztma is! Veszélyforrás lehet az is, hogy mit öröklünk szüleinktől, nagyszüleinktől – most szorítkozzunk erre.

Milyen öregkorra számíthatok?

A vizsgálat elmélete dióhéjban [8]

A vizsgálatot 2006. június 27-én, kedden, a Semmelweis Egyetem I. sz. Belklinikájának Klinikai Kutató és Izotópdiaosztikai Laboratóriumában végeztük. A vizsgálat mutatta meg számunkra, hogy a PCR az orvosi diagnosztikában is kiemelt szerepet játszik.

Örökítőanyag-állományunk (mely minden egyes testi sejtünkben megtalálható) egyik génje a kollagén-1 alfa-1 (továbbiakban: *Colla1*), amelynek az 1. intronjában lévő része az átírásban (transzkripcióban) szerepet játszó ún. Sp1-kötőhely. Egy bizonyos guanin-timin (G-T) pontmutáció játszódhat itt le, egészen pontosan az 1245. bázisnál. Genotípus szerint a G1245-ös allélt *S* (egészséges), a T1245-öt *s* (hajlamos) allélnak nevezzük. Más szavakkal: ha az 1245. bázis a génben guanin, akkor az illető személy egyik allélja *S*, ha a bázis timin, akkor *s*. Így, két szülőtől örököelve a tulajdonságokat lehet valaki *SS*-es, *Ss*-es és *ss*-es genotípusú.

Ha itt pontmutáció történik, akkor a kollagén-1-fehérje szintézise károsodik, a kollagént alkotó kollagén-1 és kollagén-2 fehérjék aránya megváltozik. A fontos fehérje beépülése a csontokba zavart szenved, és ennek lehet következménye idősebb korban fokozott csonttörési hajlam csontritkulásos állapotban. A pontmutáció tehát genetikai természetű csonttörési rizikófaktor: megállapíthatjuk, hogy *genetikailag, a Colla1 gén Sp1-es helyének többalakúsága szerint* magunkban hordozzuk-e ezt a hajlamot (egyszerűsítve: „milyen géneket örököltünk” – ahogy szokás mondani).

RFLP: a PCR révén nyert DNS-szakaszok emésztése [8]

A vizsgálat maga az ún. *restrikciós fragmenthosszúság-polimorfizmus* (angolul: Restriction Fragment Length Polymorphism – RFLP) eljárásának segítségével történhetett meg. A hosszú kifejezés röviden annyit takar, hogy egyes endonukleáz enzimek a kettős szálú DNS-szálat meghatározott szekvenciáknál hasítják el (azaz emésztik meg). Innen kapták a nevüket is: kötelezően, kizárólagosan (restrikció = kizárólagosság) egy meghatározott helyen metszik a DNS-molekulát. Az RFLP-vel, mint azt látni fogjuk, lényegében szabad szemmel megfigyelhetjük majd, hogy azon a kis helyen egy guanin-, vagy egy timinbázis foglal-e helyet.

Esetünkben a nukleáz enzim csak és kizárólag akkor hasítja el a DNS-t, ha a következő bázisszekvenciát találja: **CCAnnnnTGG**, ahol *n* bármilyen bázist jelölhet.

Az általunk vizsgált pontmutáció éppen az enzim előbb leírt felismerő helyét változtatja meg. A *Colla1* gén részlete: **CATGCCAGG GAATGGGGGC**. Az aláhúzott terület az ún. PflMI és a Van91I DNS-t hasító enzim felismerőhelye. Ha ott a G T-re változik, akkor a felismerőhely a mutáció által „tönkremegy”: **CATGCCAGG GAATGTGGGC**. Az enzim ebben az esetben nem tudja elhasítani az előzőleg PCR-rel felerősített DNS-szakaszt. Egyszerű logikával és egy újabb módszerrel, a gélelektroforézissel a mutáció felderíthető.

Gélelektroforézis [4]

Az gélelektroforézis a molekulák méretbeli, elektromos töltöttségbeli elválasztására (szeparálására) szolgáló, széles körben alkalmazott technika.

Ha a töltéssel rendelkező molekulák elektromos térbe kerülnek, akkor töltésüktől (annak előjelétől) függően a pozitív anód vagy a negatív katód felé mozdulnak el. (Az ellentétes előjelű töltések vonzzák, a megegyezőek taszítják egymást.)

A DNS elektroforézise által számos dolgot vizsgálhatunk, például igazolhatjuk az örökítőanyag meglétét, meghatározhatjuk a mennyiségét, egyes DNS-fragmentumokat választhatunk szét és így tovább. A sokféle felhasználási lehetőség közül mi a restrikciós emésztés (RFLP) termékeit vizsgáltuk.

A folyamat egy a külső környezettől (levegőtől) elhatárolt homogén anyagban, az ún. mátrixban (közegben) azaz gélben történik. A gél általában agaróz (VI. ábra; mi is azt használtuk)

Milyen öregkorra számíthatok?

A vizsgálat egy vízszintesen elhelyezett berendezésben történik. Az ún. elektroforézis-kádba vagy gélkádba (VII. ábra) beöntjük a folyékony gélt, ami rövidesen megszilárdul. A lassan kidermedő gélbe merülnek a fésűszerű fogak, melyeket később kiemelve kis tasakokat nyerünk. Ezekbe a kis üregekbe kell pipettázni a DNS-tartalmú mintákat az eppendorf-csővekből (VIII. és IX. ábrák). Utána következhet a minták megfuttatása (szétválasztása), azaz a tényleges elektroforézis.

A DNS negatív töltésű molekulának tekinthető negatív cukorfoszfát-alapláncai miatt, így az örökítőanyag molekulái elektromos erőterben a pozitív anód felé vándorolnak. A zsebbe pipettázott DNS különböző méretű molekulákból áll. Ezek között vannak pontmutáció miatt egyben maradt, így hosszabb, illetve a RFLP során kisebb részekre hasított darabok. A lila színű folyadékban tehát különböző méretű DNS-ek különböztethetők meg. A molekulákat szabad szemmel nyilván nem láthatjuk, de a gélelektroforézis révén tudjuk, hol vannak. A részecskék eltérő sebességgel haladnak ugyanis: minél kisebb egy molekula, annál nagyobb távolságot képes megtenni kisebb közegellenállása és tehetetlensége folytán adott idő alatt a kádban (X. ábra). Mivel a molekulák hosszát nem láthatjuk, a vizsgálat végén a helyzetükből következtethetünk méretükre. A molekulaméret (molekulatömeg) és a migráció mértéke (megtett út) koordinátarendszerben ábrázolva körülbelül lineáris függvényt ad.

Az egymástól elválasztott DNS-ek méretének eldöntéséhez szükség van bizonyos kontrollokra, ún. súlymarkerekre. Ezekhez az ismert nagyságú DNS-fragmentumokat tartalmazó anyagokhoz tudjuk viszonyítani a vizsgált mintáinkat.

A vizualizálás, azaz a DNS láthatóvá tétele egy másik kardinális kérdés az elektroforézis alatt. Meg kell különböztetnünk a folyamat alatt és a folyamat után történő megfigyelést lehetővé tevő anyagokat. Az elektroforézis után DNS-hez kötődő fluoreszcens, nyomjelző festékeket alkalmazunk. (Fluoreszcencia: a molekulák elektromágneses sugárzás hatására gerjesztődnek, és a gerjesztési energiát fény formájában kisugározzák.) Ilyen az etídium-bromid (XI. ábra), illetve gyakran használt a SYBR Gold-eljárás is (XII. ábra). Az eredmény ún. UV-transzilluminátorral (a mintát ultraviolet fényvel átvilágító géppel) lesz látható.

Összegezve tehát megfuttattuk a DNS-mintát a gélen, majd UV-fénnyel „előhívtuk”, így elvileg készen vagyunk; látjuk a gélelektroforézis eredményét. A kép többszöri kiértékeléséhez és archiválásához viszont szükség van a megörökítésére is. Az eredmény lefényképezésére szolgál a CCD-kamerarendszer (más néven géldokumentációs rendszer vagy „géldokrendszer” – XIII. ábra): digitális fényképet készítünk vele, majd elmentjük azt.

Saját vizsgálat [1, 2, 7, 8]

A sejtekből a minták elkészítéséhez először is izolálni kellett az örökítőanyagot. Ez úgy történt, hogy a sejtek „bontása” (lízise) és az ún. Proteináz-K-s emésztése után speciális szűrőre pipettáztuk az anyagot. Többszöri mosással a szennyeződések eltávolítottuk, majd a DNS-t egy csőbe szűrtük. Az örökítőanyag tisztaságát az ún. spektrofotométerrel állapíthattuk meg, mellyel mérhetőek DNS fénytörési tulajdonságai is. Ha a leolvasott érték egy adott tartományon belül van, akkor abból arra következtethetünk, hogy mintánk megfelelően tiszta. Mindannyian négy darab mintával – négyféle DNS-sel – dolgoztunk tehát:

1. Vér – egy ismeretlen személy vérvétel során nyert, kémcsőben tárolt mintája. S mint emberi szövet, fokozott óvatossággal kell dolgozni vele, hiszen kórokozókat tartalmazhat.
2. Saját, a szájúreg el nem szarusodó nyálkahártyájából nyert DNS-minta. Az örökítőanyag kinyeréséhez felhasznált sejtek az ún. *swaben* helyezkednek el, mely egy fülpiszkáléhoz hasonló mintavevő pálcika. A mintát úgy készítettem el, hogy a pálcikát az ínyemhez dörzsöltem.
3. ismert *SS* genotípusú kontroll – összehasonlítási alapot nyújt a vizsgálatban
4. ismert *Ss* genotípusú kontroll – ugyanaz a szerepe, mint az *SS* kontrollnak.

A XIV. ábrán látható „fekete csík” a valójában kétszálú Col1a1. A két primer felől érkező polimeráz szintetizálási iránya piros nyilakkal jelölt. A teljes Col1a1-génből „nyerhetjük ki” a

Milyen öregkorra számíthatok?

300 bp hosszú szakaszt a primerekkel és a polimerázokkal a PCR révén. A piros X a mutáció helye, egyben az említett PflMI enzim hasítóhelye. Láttuk, hogy ha a pontmutáció itt bekövetkezik, akkor az enzim nem lesz képes a gént hasítani.

Kövessük a XV. ábrát! *S* genotípusú egyedeknél nincs mutáció, az 1245. bázis guanin (ahol az X van), a hasítás rendben lezajlik: a 300 bp hosszú PCR-termék két részre, egy 170 és egy 130 bp hosszúságú részre bomlik.

Akik *s* genotípusúak, azoknál az adott ponton mutáció következik be (XVI. ábra). Guanin helyett ott timint lelünk. Következésképpen az emésztés-hasítás ott *nem* tud lezajlani, így a PCR-termék megmarad egyben, 300 bp hosszúsággal.

Világos, hogy minél hosszabb egy fragment (a 130, 170 és 300 bp-os szakaszok mind fragmentek!), annál kisebb lesz megtett útja a gélelektroforézis során. Tehát, ha a fényképen egy kisebb migrációjú mintát látunk majd, akkor az a 300 bp-os lesz. A 170 bp-os rövidebb, tehát az tovább fog haladni. A legtávolabb jutott pedig a 130 bp-os lesz a három fragment közül, mert ő a legkisebb. Következzen hát maga a vizsgálat!

Első lépés: PCR-erősítés: Eppendorf-csőben készítettük el a keveréket (összesen 18 µl), melynek tartalma: PCR Mastermix (mely tartalmaz enzimet, puffert stb.), primerek és desztillált víz. Négy PCR-csőbe bepipettáztunk egyező mennyiségeket a keverékből. A PCR-csöveket alkoholos filccel jelöltük meg: 1-vér, 2-hám, 3-SS, 4-Ss. A jelöléseknek megfelelően hozzáadtuk a különféle DNS-mintákat, vagyis az elsőbe a vér DNS-ét, a másodikba a szájüregit és így tovább. Ezután behelyeztük a PCR-készülékbe a mintákat, illetve elindítottuk a programot. Ekkor zajlanak le a már bemutatott, szabályozott hőmérsékletű ciklusok.

Második lépés: DNS-emésztés: ismét öt mintára elegendő keveréket készítettünk egy Eppendorf-csőben, vízből, B pufferből, restrikciós emésztőenzimből áll össze (15 µl mintánként). Ezt a teljes mennyiséget kellett a 4 feliratozott PCR-csőbe pipettázni. Az első lépés során elkészült PCR-reakciótermékekből hozzáadtunk a megfelelő sorszámú PCR-cső tartalmához. Az így elkészült keverékeket 37°C-os inkubátorba helyeztük emésztődni.

Harmadik lépés: a gélelektroforézis végrehajtása: a pontosan kimért agarózporhoz TAE puffert adtunk, majd kb. 3 percig melegítettük mikrohullámú sütőben: a gél ezzel elkészült.

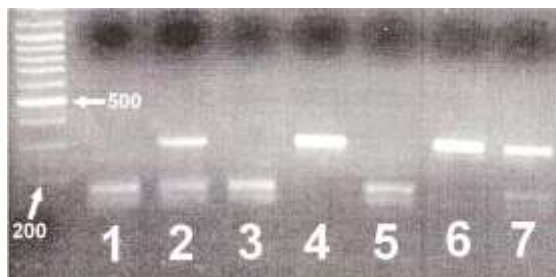
Következő lépésként adtuk hozzá a gélhez a DNS-festő EtBr-t. Ezután kiöntöttük géltartóba a folyadékot, ügyelve arra, hogy a tasakképző fésűk be legyenek helyezve. Várni kellett addig, amíg a gél meg nem szilárdult, majd óvatosan eltávolítottuk a fésűket és a gélt behelyeztük a kádba. Következő lépésként kék színű STOP-oldatot adtunk az emésztett mintákhoz, majd körültekintő fel-lepipettázással összekevertük őket. A minták ezzel elkészültek! A kísérletet a tasakokba való pipettázásnál könnyen el lehet rontani. Nagyon gondosan beadagoltuk a tasakokba a mintákat, majd elindítottuk a gélelektroforézist (feszültség: 100V, időtartam: 25-30 perc). A fél óra eltelte után kivettük a gélt a kádból, és lecsepegtettük. Következhetett a dokumentálás!

Negyedik lépés: a géldokumentáció: a lecsepegtetett gélt UV-transzilluminátor fölé, az átvilágító asztalra helyeztük, végezetül fényképet készítettünk eredményünkről.

A gyakorlatvezető elmondta, hogyan is mutat majd a gélelektroforézis a felvételen: az első sáv az ismert hosszúságú darabokat tartalmazó „létra”, ami az említett kontrollként szolgál. A PCR-termék mérete tehát egy, szintén a gélbe injektált, ismert hosszúságú DNS-szakaszokat tartalmazó DNS-létrával összehasonlítva határozható meg. E mellett helyezkedik el a négy minta. Összesen tehát öt sávot vizsgálunk.

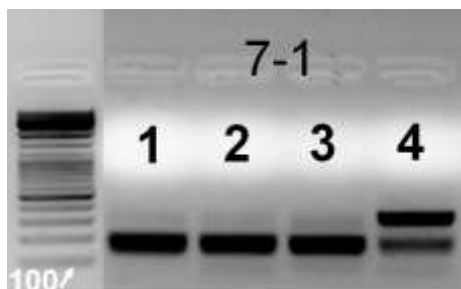
Ötödik lépés: kiértékelés, eredmények: a képen látható majd a négy minta elektroforézisének képe, amiből az egyes genotípusokra következtethetünk. Az elektroforézis

Milyen öregkorra számíthatok?



SS homozigóta normál genotípusú minta látható, ahol az anya és az apa is normális genotípusú (felírása: -/-). Mellette figyelhető meg (2-es sáv) a heterozigóta Ss, ahol valamelyik szülő mutációt hordoz (vagyis +/-). A 6-os az ss-minta sávja, mely egy homozigóta mutáns egyedből származik (itt mindkét szülő mutáns: +/+).

Most nézzük a saját mintát (alsó ábra; a 7-1-es jelölés a személyes kódomb). Itt az első sáv a kontroll, mely az ismert méretű szakaszokat tartalmazza. A legelső szinten a 100 bp hosszúságú fragmentek vannak. Fölöttük helyezkednek el a 200 bp-osak, 300 bp-osak és így tovább.



Az 1. sáv a vérmintáé, mely szerint a véradó személy genotípusa SS. Ezt úgy tudjuk felismerni, hogy megfigyeljük a minták futását. Emlékezzünk: minél nagyobb a migráció, annál kisebb a részecske hossza! Egy széles és vastag sötét mezőt látunk, mely valójában kétféle – 130 és 170 bp hosszú – fragmentet tartalmaz, melyek túlhaladtak a 300 bp-os süllyedtségi szinten.

Jobban szétváltak volna, ha tovább futtatjuk az elektroforézist. Mindez azt jelenti, hogy a donor a Coll1a1 gén szempontjából nem hajlamos időskorban fokozott mértékű csonttörésre csonttritkulásos állapotban.

A 2. sáv tartalmazza saját, a szájból vett sejtjeimnek a mintáját. Az ábra tanúsága szerint saját genotípusom is SS. Ezt igazolja az is, hogy a 1. és a 2. sáv rendkívül hasonlít egymásra. Örömteli következtetés: a Coll1a1 gén Sp1-es mutációjának szempontjából nincs bennem kódolva az a genetikai hiba, amely, ha ne adj' Isten csonttritkulásos lennék idősebb koromban, fokozott csonttörési hajlamot hordozna bennem. Továbbra is törekednem kell viszont az egészséges életvitelre, noha egy kicsit megkönnyebbültem...

A 3. sáv (SS genotípus) mintáján az erősebb színű mezők mélyebben találhatóak, és kettőt is megfigyelhetünk. Nem következett be mutáció, így az amplifikált génszakasz az enzim által 130 és 170 bp hosszú szakaszokra bomlott. Ezek is mélyebbre süllyedtek, hiszen a gélnak kisebb közegellenállása van velük szemben. Az első három sáv eredménye tehát megegyezik, hiszen mindegyik SS genotípusú.

A 4. sáv (Ss genotípus) elektroforézise mutációra utal. Ezt a felső, sötétebb színű mező igazolja. A tudomány mai állása szerint az Ss valószínűleg hajlamosságot okoz, de még nem igazolható tökéletesen. Mindazonáltal az Ss genotípusúaknak fokozottan számolniuk kell a töréssel csonttritkulásos állapotban.

Ha balul sül el a kísérlet: egyes hibalehetőségek [3, 11]

Látjuk hát, hogy vizsgálatunk sikeres volt. Számolni kellett viszont a hibalehetőségekkel is, melyek bőven akadnak. A műszerek bekapcsolásának hiányától kezdve a rossz primertervezésen át az idegen DNS-mintával való fertőződésig, rengeteg gond adódhat.

Kitekintés [5]

A vizsgálat ugyan egy kicsi részletet árult el szervezetemről, mégis tökéletesen érzékelteti: ilyen és ehhez hasonló génvizsgáló módszerek nagy távlatokat nyithatnak a jövőbeli gyógyászatban. A genetikai szemléletű megelőző orvoslás szerepe megnövekedhet, illetve az

Milyen öregkorra számíthatok?

emberek betegségre való hajlamuk ismeretében talán tudatosabban is élhetnék életüket. Több génhiba és mutáció mint rizikófaktor (komolyabb betegségek olykor több gén zavarakor jelentkeznek) megléte bebizonyíthatja majd veszélyes betegségek néhány éven belül valószínűsíthető bekövetkezését (a skizofrénia például feltehetően jelentős mértékben – 80%-ban – genetikai eredetű kórkép). Géntérképezés révén megjósolható lesz továbbá az adott gyógyszerre történő egyéni reakció! Rövidesen beköszönhet tehát a genom-alapú terápia és a személyre szabott gyógyítás korszaka. Ahogy Falus András professzor is sugallta előadásában: genotípusnak megfelelő gyógymód, megfelelő gyógyszerrel, megfelelő időben – ez lesz a közeljövő gyakorlata.

Források: előadások, felhasznált irodalom

A dolgozat elkészítéséhez szükséges ismereteket többek között a következő – a táborban elhangzott – előadások során szereztem meg:

- Dr. Koppány Viktória: Munkavédelem – hogyan dolgozzunk egy molekuláris genetikai laboratóriumban? [1]
- Dr. Kósa János: Az örökítő anyag, klónozás, hibridizálás [2]
- Zalka Anna: PCR – Polymerase Chain Reaction [3]
- Somlai Zsolt: Detektálási módszerek a molekuláris biológiában: gélelektroforézis; géldokumentációs rendszer [4]
- Prof. Falus András: Genomika, a biológia új írásbelisége [5]

A dolgozat elkészítéséhez a következő irodalmakat használtam fel:

- BioGén Tábor: Előadások – kivonatok [6]
- BioGén Tábor: Gyakorlatok – kivonatok [7]
- BioGén Tábor: Gyakorlati protokollok [8]
- Oláh Zsuzsa: Biológia 12. Nemzeti Tankönyvkiadó, Budapest, 2004 [9]
- Gál Béla: Biológia – Az életközösségek biológiája; Az evolúció és az öröklődés. Mozaik Kiadó, Szeged, 2006 [10]

Pályázatom írásakor számos hasznos weboldalt meglátogattam:

- <http://hu.wikipedia.org/wiki/PCR> [11]
- <http://www.komabiotech.co.kr/product/equipment/pcr.htm> [12]
- http://www.intas.de/images/gallery/geldokumentation/big/geldokumentation_sybr-gold.jpg [13]
- <http://www.microphotonics.com/images/bis393.jpg> [14]
- <http://aviva.urz2.com/images/drawing/skeleton.jpg> [címlapkép]
- <http://www.nobelprize.com> [15]
- http://www.clip.ubc.ca/seminars_conferences/MMP_GRC_2003/Bacterial%20Mats/MMP-GRC-03-delta-mat.jpg [16]
- <http://www.hazipatika.com/topics/osteoporosis> - [17]
- <http://www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/e26/agarose.htm> [18]
- <http://wine1.sb.fsu.edu/bch4053/Lecture20/etbr.jpg> [19]
- <http://www.dnalc.org/shockwave/pcranwhole.html> [20]
- <http://www.morrisonlabs.com/images/osteoporosis/osteobonelabel.gif> [21]
- <http://www.nof.org/osteoporosis/images/nof-two.gif> [22]
- <http://people.umass.edu/mbilab/electrophoresis.JPG> [23]
- http://oceanexplorer.noaa.gov/explorations/03bio/background/molecular/media/gel_plate_600.jpg [24]

Milyen öregkorra számíthatok?

A weblapok 2007. március 9-i frissítésűek.

A BioGén Táborról bővebben: <http://www.biogentabor.hu>

Köszönetnyilvánítás

A dolgozat elkészítésében sokat segített Babocsai Olga, Professzor Lakatos Péter, Takács László és Steve Pechous PhD. Segítségüket ezúton is köszönöm!

Mellékletek: kiegészítő ábrák

A dolgozatban eddig bemutatott alapvető képek mellett további fontos, kiegészítő ábrák láthatóak a következő oldalakon.



I. ábra [15]:

Kary Bank Mullis, a PCR megalkotója.

Felfedezésének nagyszerűségét érzékelteti a Nobel-díjátadáson elhangzott beszéde: „Heuréka! Heuréka! [...] Sikerült megoldanom a DNS-vegyészet lebosszantóbb problémáját! Két oligonukleotiddal, DNS-polimerázzal és a négy bázissal annyi DNS-szekvenciát gyárthatok, amennyit csak akarok! [...] Nem akartam elhinni. Ha ez igaz, akkor örökre megváltoztatja a DNS-kémiát... Ez így túl egyszerű.”

II. ábra [12]

A PCR-berendezés.

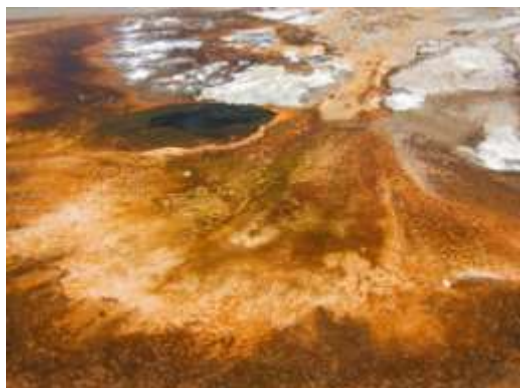
A képen a Mastercycler 5333 nevű gép látható.



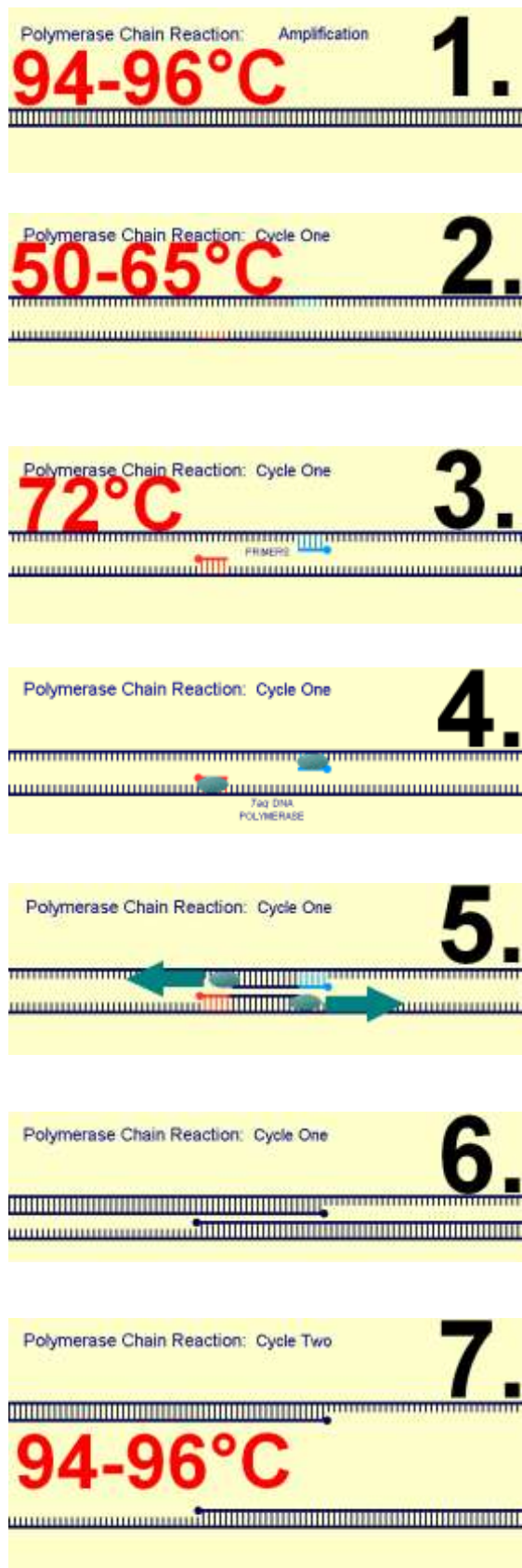
III. ábra [16]:

A hőkedvelő baktériumok élőhelye.

A képen az USA-beli Yellowstone Nemzeti Park egyik magas átlagos hőmérsékletű tócsája látható – itt élnek a hőkedvelő baktériumok, melyekből a Taq készül.



Milyen öregkorra számíthatok?

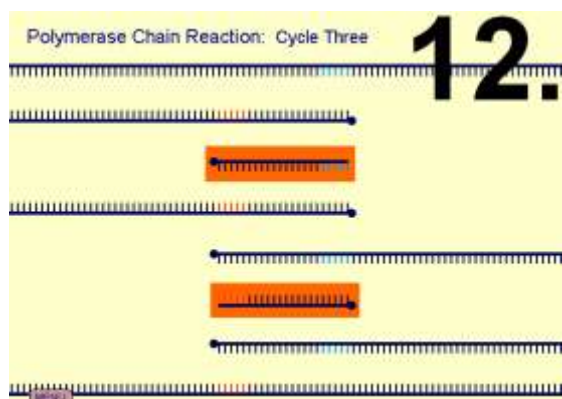
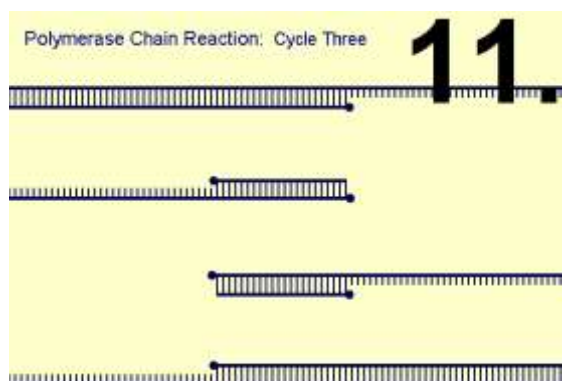
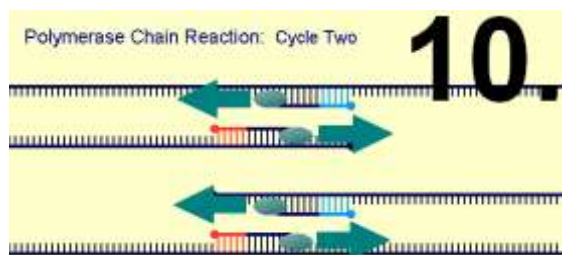
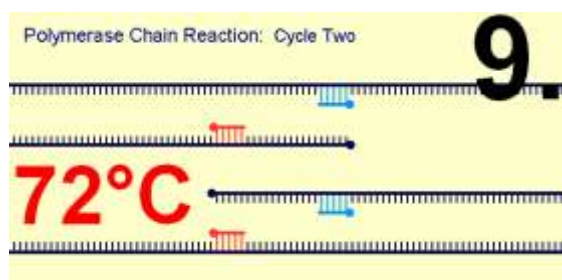
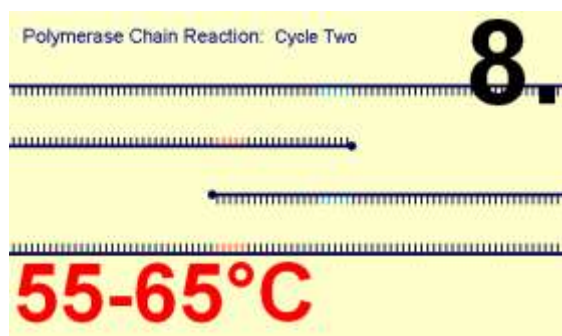


1-15. ábrák [20]:

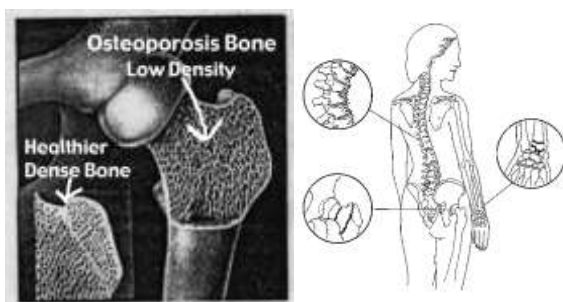
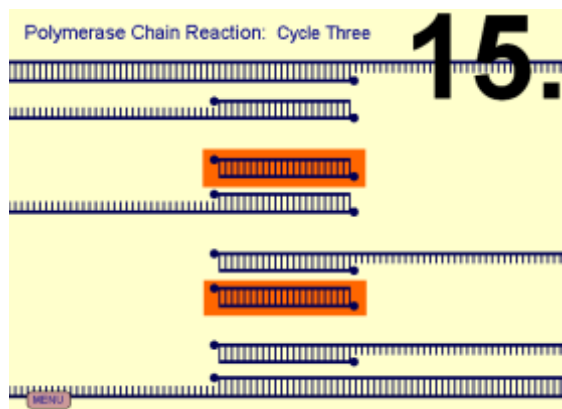
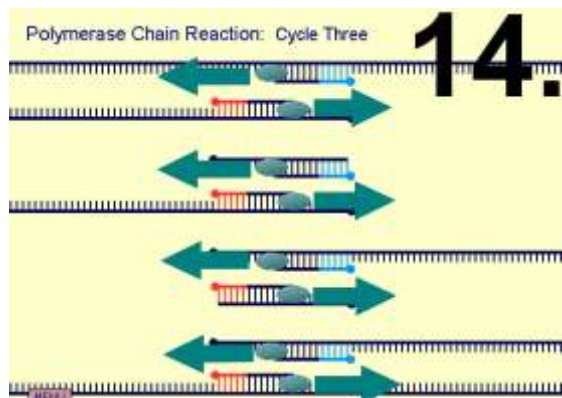
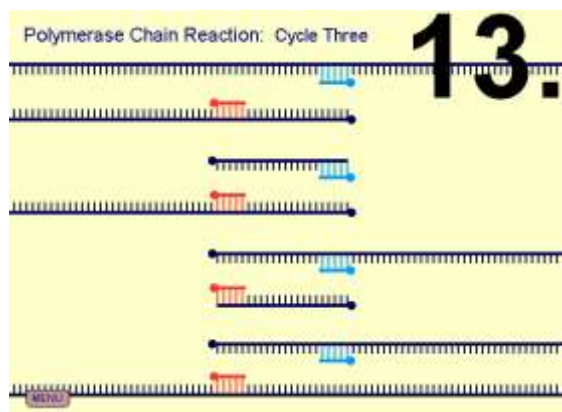
A PCR.

Az ábrák a PCR folyamat egyes fázisait szemléltetik. A képeken látható feketén szedett sorszám az ábrásorszám is egyben.

Milyen öregkorra számíthatok?



Milyen öregkorra számíthatok?

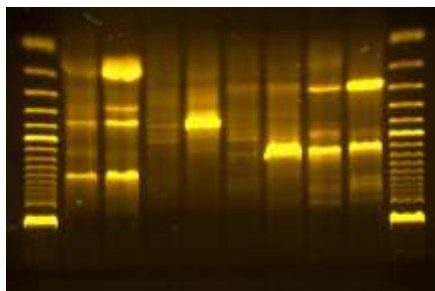
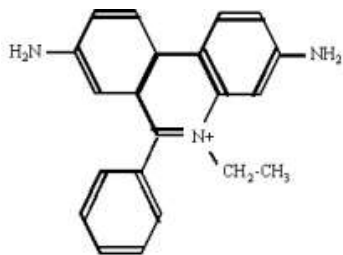
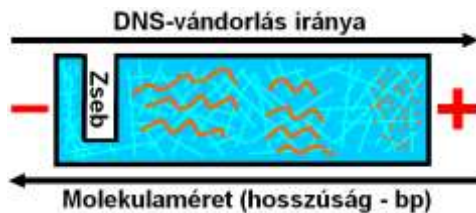


IV. [21] és V. [22] ábrák:

A csontritkulás megnyilvánulásai.

A bal oldali képen csontritkulásban szenvedő beteg és egészséges ember csöves csontjának hosszmetSZete látható, míg jobboldalt a csontritkulás jellemző támadási helyei figyelhetők meg, így a gerincoszlop, a csigolyák.

Milyen öregkorra számíthatok?



VI. ábra [18]:

Agaróz molekula képe.

A molekulaszervezet igazolja az anyag természetét: „molekuláris lyukacsai” teszik lehetővé a minta részecskéinek elkülönítését.

VII. ábra [23]:

Gélkád.

E berendezésben végzik a gélelektroforézist. Jól megfigyelhetők a lila színű fűsűk és az elektromos vezetékek is.

VIII. ábra [24] és IX. ábra:

Pipettázás és az Eppendorf-cső rajza.

Bal oldalon a helyes pipettázást szemléltetem, a jobb oldali kép pedig az oly sokat használt, Eppendorf-csővet mutatja benne a vizsgálandó anyaggal.

X. ábra:

A gélelektroforézis vázlata.

Elektroforézis során az különböző méretű szakaszok eltérő tehetelenségük és méretük (közegellenállásuk) miatt más-más utakat futnak be a gélben, és így szinteket hoznak létre.

XI. ábra [19]:

Az EtBr-molekula képe.

Az elektroforézis során használt festék, láthatóvá teszi futtatás eredményét.

XII. ábra [13]:

SYBR Gold

A SYBR Gold, azaz aranszínű festékekkel készített gélelektroforézis mellett alkalmazzák az élénkzöld festési technikát is.

Milyen öregkorra számíthatok?



XIII. ábra [14]:

A géldokumentációs rendszer.

Az UV-transzilluminátor mellett megfigyelhető a szokványos számítógépes kezelőfelület is.

XIV. ábra:

A Col1a1 gén.



XV. ábra:

Mutáció híján emésztés történik.



XVI. ábra

Mutáció: egységes szakasz marad.

