# 8. Szekvenciameghatározás

A fehérjék és a nukleinsavak szekvenciáinak meghatározása a molekuláris biológia legfontosabb feladatai közé tartozik. Egyes peptidek szekvenciájának meghatározására már az 1950-es évek óta van lehetőség, elsősorban a láncvégi aminosavak lehasításának és analízisének segítségével. A legfontosabb, ma is használt módszer Pehr Edman nevéhez köthető. A huszadik század hetvenes éveinek végén nyílt először lehetőség arra, hogy a DNS bázissorrendjét meghatározzuk. Három, egymástól különböző technikán alapuló módszert fejlesztettek ki: a Sanger és Coulson nevével fémjelzett +/- szekvenálás módszerét, a Maxam- és Gilbert-féle kémiai hasítás elvén működő módszert és a Sanger-féle **láncterminációs módszert**. Egyszerűsége miatt csak ez utóbbi terjedt el, a klasszikus szekvenálási technikák közül csak ezt használják manapság.

## 8.1. DNS-szekvenálás

### 8.1.1. A Sanger-féle lánctermináción alapuló DNS-szekvenálás

A Sanger-féle szekvenálás során tulajdonképpen egy **polimerizációs reakció** zajlik. Az ismeretlen DNS-szekvencia komplementer szálának egy ismert szekvenciájú részéhez primert tervezünk, majd egy lehetőleg **nagy processzivitású polimeráz** segítségével elkezdjük átírni a másik szálat. A körülmények a szokásosak: puffer, Mg2+-ionok, dNTP-k szükségesek a reakcióhoz. A reakció 4 párhuzamos csőben zajlik, mindegyik csőbe más-más dideoxi-nukleotidot kell tenni, kis mennyiségben. A **2,3-dideoxi-nukleotidokban** a dezoxiribóz harmadik szénatomján sincs hidroxilcsoport, ezért nem képes hozzákapcsolódni a következő nukleotid 5’ foszfátja (8-1. ábra). A dideoxi-nukleotidok megjelenése a láncban tehát terminálja a további polimerizációt, az új lánc nem nő tovább. Mivel csak kevés dideoxi-nukleotid (ddATP, ddCTP, ddGTP vagy ddTTP) kerül egy adott csőbe, a termináció ritka, és véletlenszerű esemény. Keletkeznek olyan szálak, amelyekbe már korán beépül a dideoxi-nukleotid, ezért rövidek maradnak, és keletkeznek olyanok is, amelyekbe sokáig egy darab dideoxi-nukleotid sem épül be, ezért ezek hosszúak lesznek. Ha a négy párhuzamos mintát a reakciót követően gélen megfuttatjuk, a keletkezett szálak **nagyság szerint elválnak** egymástól. Mivel tudjuk, hogy melyik zsebbe melyik dideoxi-nukleotidot tartalmazó mintát tettük, a gél aljától (rövidebb szálak) indulva, visszafelé haladva leolvashatjuk a DNS szekvenciáját (8-2. ábra).

8-1. ábra

http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/D/ddTTP.gif

2013.08.06.

8-2. ábra

http://www.austincc.edu/mlt/mdfund/pictures/sequencing1.gif

2013.08.06.

Mivel az adott hosszúságú szekvenciák mennyisége külön-külön igen alacsony, a szokásos vizualizálási technikákkal (például EtBr) nem látszanának a gélben, ezért a keletkezett DNS-t valamivel meg kell jelölni. Ez vagy radioaktív, vagy fluoreszcens módon történik. Jelölhető az 5’ vég pl. **radioaktív foszfáttal**, vagy használhatunk előre megjelölt **radioaktív vagy fluoreszcens primereket**. Jelölhető radioaktívan az egyik dezoxi-nukleotid is az **α-foszfátján**; a keletkező polinukleotid-láncba beépülve azt is radioaktívvá teszi. (Ilyenkor elég az adott dezoxi-nukleotidnak csak egy kisebb részét jelölni, jó eséllyel a keletkezett láncok többsége így is tartalmaz majd radioaktív jelölést.) Lehet a láncterminációs **dideoxi-nukleotidokat** is **jelölni**, akár radioaktívan, akár fluoreszcensen.

Klasszikusan a szekvenálást radioaktív jelöléssel végezték. Ez a technika manapság egyre inkább kiszorul a rutin szekvenálási technikák közül. A szekvenálás kezdetén a templát DNS-t **egyszálúsítani** kell. Ezt többnyire úgy oldják meg, hogy a DNS-t **felmelegítik** 95 °C-ra. 5-10 perc alatt a DNS teljesen denaturálódik (egyszálú DNS-t kapunk), majd jégre téve a mintát, **hirtelen lehűtik**. A gyorsan lehűtött DNS nem tudja olyan gyorsan megtalálni a komplementer szekvenciáját, ezért aspecifikusan, random módon fog kötődni a lehető legközelebbi, gyakran a saját láncán belüli, részben komplementer szakaszokhoz. Ilyenkor egy részben egyszálú hurkokat tartalmazó gubancot alkot, az egyszálú szakaszokhoz képesek más komplementer oligonukleotidok kötődni. Az ilyen gubancot hívjuk egyszálú DNS-nek (holott ez nem teljesen fedi a valóságot). Az egyszálú templát-DNS-hez hozzá kell mérni a primert, majd az egészet 65 °C-ra melegíteni 2 percig. A mintát ezután hagyjuk lassan kihűlni, a **primerek betapadnak** a komplementer helyekre. Az így előkészített DNS-hez hozzámérjük a reakciómixet: puffer, ionok, módosított **T7 polimeráz**, dNTP-k (részben jelölt), adott ddNTP. A reakció szobahőmérsékleten zajlik, adott ideig (általában 5 perc), majd reakciót formamidos pufferrel leállítjuk (a formamid tönkreteszi a fehérjéket, pl. a szekvenázt).

Ha genomi DNS-t szekvenálunk, érdemes a szekvenálandó szekvenciát **PCR-rel felszaporítani**. Ennek több előnye is van. Egyrészt felerősíthetjük a szekvenálás során kapott jelet, másrészt **alternatív nukleotidok** beépítésével gyengíteni tudjuk az egyszálúsított templát-DNS-en belül kialakuló, a szekvenálás hatékonyságát akadályozó másodlagos szerkezetek kialakulását (a GC-gazdag szakaszok hajlamosak összetapadni, hajtűt képezni). Ha a PCR-reakció folyamán dGTP helyett **7-deazaGTP**-t vagy **dITP**-t (dezoxi-inozin-trifoszfát) használunk, a szekvenálás során a templátszálon belül kialakuló másodlagos szerkezetek gyengébbek lesznek, könnyen átjut rajtuk a polimeráz (8-3. ábra). A reakció érzékenységét **hőstabil polimeráz** használatával is növelhetjük, ami **magasabb hőmérsékleten** történő polimerizációt, ezáltal a templát-DNS másodlagos szerkezetének fellazulását teszi lehetővé. Ráadásul ezt kombinálhatjuk egy speciális PCR-reakcióval. Ilyenkor a szokásos szekvenálási reakcióban használtnál jóval több primert és nukleotidot használunk, és a PCR-hez hasonlóan több fűtési-hűtési ciklusban írjuk át a templát-DNS-t (**lineáris PCR**). Az ismétlődő átírások megsokszorozzák a keletkezett termékek számát, így kevés templát-DNS-ről is sok termék keletkezhet, ami nagyobb jelintenzitáshoz vezethet.

8-3. ábra

http://www.vialattea.net/spaw/image/biologia/2007\_01/7-deaza-dGTP.jpg

2013.08.06.

Klasszikusan a minták futtatása szekvenáló gélen zajlik, mely némileg különbözik az eddig ismertetett poliakrilamid géltől. A 4–10% poliakrilamid/biszakrilamid keveréket, TBE puffert 7M ureát tartalmazó gélt keverés után szűrni kell (hogy a legapróbb szennyeződéseket is eltávolítsuk), majd vákuummal lassú keverés mellett ki kell szívatni belőle az oldott gázok nagy részét (hogy az öntés során ne képezzenek buborékokat). A belső felületükön szilánnal (CH3-SiCl2-CH3) előkezelt üveglapok igen közel, mindössze 0,2–0,5 mm-re helyezkednek el egymástól, közéjük öntjük a katalizátorokkal (APS, TEMED) kiegészített gélt. A levegőbuborékok elkerülése végett öntés során érdemes a felszerelt üveglapokat kissé ferdén megdönteni. A gélt nem töltjük csurig. Öntés után a gél tetején az üveglapok közé szorítjuk fésű sima részét, hogy megfelelő vastagságú gél szilárduljon meg a tetején is. A gél megszilárdulása után az ún. cápafog fésűt megfordítjuk, a fogakat picit beleszúrva illesztjük a gél felszínére. A leendő mintáknak így piciny trapéz alakú zsebek keletkeznek. A gélt minták nélkül körülbelül 45 percig 2000-3000 voltos feszültségen elő kell futtatni, hogy megfelelő hőmérsékletű (45-50 °C) legyen, majd a zsebek gondos kimosása és a minták (5 μl/zseb) betöltése után kezdhetjük az elektroforézist. A gél egyik felét üresen szokták hagyni; körülbelül 15 perc futtatás után töltik bele ugyanazokat a mintákat, mint az elején. A másodszorra felvitt mintákat addig futtatják, amíg a brómfenolkék ki nem fut a gélből. Ezen a módon deríthetik ki ugyanazon DNS-darabnak a primerhez távoli és a primerekhez közeli szekvenciáját, összesen 200-300 nukleotid hosszúságban. Futtatás és az egyik üveglap óvatos eltávolítása után a gélt 10% metanolt és 10% ecetsavat tartalmazó oldatban fixáljuk, majd vastag szűrőpapírra visszük át. Műanyag fóliával lefedjük, és vákuum alatt kiszárítjuk. A kiszárított gélre röntgenfilmet helyezünk, és 14–24 óra hosszat röntgenkazettában exponáljuk -80 °C-on, majd előhívjuk (8-4. ábra).

8-4. ábra

Manapság az esetek többségében már külön arra specializálódott laborok végzik a szekvenálást, mégpedig **automatizált** módon. A jelölés minden esetben **fluoreszcens** módon történik, vagy a **primereket, vagy a dideoxi-nukleotidot** jelölik fluoreszcens festékkel. Utóbbi esetben megvalósítható az, hogy a négy különböző dideoxi-nukleotidhoz négy különböző, ugyanazzal a fénnyel gerjeszthető, de különböző hullámhosszúságú fényt emittáló festéket kapcsolunk. Ilyenkor a szekvenálási reakció négy helyett **egyetlen reakciócsőben** is végrehajtható (8-5. ábra). A reakcióhoz azonban olyan, **genetikailag módosított szekvenáz** enzimet kell használni, mely a fluorszcensen jelölt, az eredetitől erősen eltérő szerkezetű dideoxi-nukleotidot is szubsztrátként ismeri fel. Az **automata szekvenátorok** gyakran 96- vagy 384-lyukú plate-tel dolgoznak, ennyi mintát képesek szekvenálni egyszerre. A mintákat újabban már nem szekvenáló gélen, hanem **kapilláris gélelektroforézis** segítségével választják el, és fluoreszcens detektorral analizálják. A nagyság szerint elválasztott szakaszokat a detektor az emittált fény hullámhossza szerint azonosítja (8-6. ábra).

8-5. ábra

http://seqcore.brcf.med.umich.edu/doc/educ/dnapr/seqgels.jpg

2013.09.18.

8-6. ábra

http://genetics.thetech.org/sites/default/files/Seq4.gif

http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/1/18/DNA\_sequence.svg/332px-DNA\_sequence.svg.png

2013.09.18.

### 8.1.2. Új generációs szekvenálás

A legutóbbi időkben új, ún. „új generációs” DNS-szekvenálási technikák fejlődtek ki. Különböző biotechnológiai cégek különböző módszereket fejlesztettek ki a DNS gyors szekvenálására. Mindegyik technológia **nagyságrendekkel** növeli meg a **szekvenálás sebességét,** a fent ismertetett Sanger-féle módszerhez képest. Ez igen jelentős időbeli megtakarítást jelenthet: míg a Human Genom Project során közel két évtized és számos laboratórium kooperációja volt szükséges a teljes emberi genom feltérképezéséhez, a legújabb technológiák segítségével ma már elegendő **néhány nap** és egyetlen készülék ahhoz, hogy egy élőlény teljes genetikai állományát megszekvenálhassuk. Mivel még nem kristályosodott ki, hogy a sokféle módszer közül melyik lesz a „jövő technológiája”, ezeket részleteikben nem ismertetnénk. Annyit azonban érdemes megjegyeznünk, hogy szinte mindegyik technika során valamilyen **PCR-reakció** erősíti ki a szekvenálni kívánt DNS-szakaszokat, és a kapott információk alapján egy **nagy teljesítményű számítógép** illeszti össze teljes genommá a szekvenciatöredékeket.

## 8.2. Fehérjeszekvenálás

### 8.2.1. Szekvenálás Edman-degradációval

A fehérjék szekvenálására használt klasszikus módszer az ún. **Edman-degradáción** alapul, amelyet Pehr Edman az 1950-es években dolgozott ki. A módszer lényege, hogy a fehérjék **amino-terminális** részéhez gyengén bázikus körülmények között specifikusan **kapcsolható fenil-izotiocianát**. Savas környezetben, melegítés hatására a kötések elektronszerkezete átalakul, és az előbb felkapcsolódott csoport az **első aminosavval együtt lehasad** a fehérjéről. A kapott vegyület szerves oldószerekkel extrahálható, majd savas kezelés után valamilyen **kromatográfiás módszerrel azonosítható** (8-7. ábra). A megmaradó fehérjéhez újra kapcsolható a fenil-izotiocianát, és a ciklus kezdődik elölről. Mivel a reakció hatásfoka nem 100%-os (néha nem kapcsolódik csoport, vagy nem hasad le az aminosav), minden ciklus után egyre több az a fehérjemolekula, amelyiknek az első aminosava el fog térni attól, ami a többség szekvenciájában következne. Ezért a gyakorlatban mindössze **30 aminosav hosszúságig** szokták elvégezni a fehérje szekvenálását. Hogy a fehérje többi részének szekvenciáját is kiderítsék, valamilyen szekvenciaspecifikus **kémiai módszerrel**, vagy **endopeptidáz enzimek** (például tripszin) segítségével szokták a fehérjéket **oligopeptidekre** emészteni, majd elválasztás után a peptideket külön szekvenálni. Részleges hasítás, vagy különböző specifitású endopeptidázok használatakor a kapott szekvenciák részben átfedhetnek, így kikövetkeztethető a fehérje teljes szekvenciája. Ha már ismert aminosav-szekvenciájú **fehérje azonosítására** akarjuk használni a reakciót, akkor elég csak az első **5-6 aminosavat** megszekvenálni, többnyire az már egyértelműen definiálja a kapott fehérjét.

 Az Edman-degradáción kívül más, a peptidek N- vagy C-terminálisa felőli szekvenálást lehetővé tévő degradációs módszerek is ismeretesek. Elvük nagyon hasonló a fent leírtakhoz, de ezeket részletesen nem ismertetjük.

8-7. ábra

http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/e/e4/EdmanDegradation.png

2013.09.18.

### 8.2.2. Szekvenálás tömegspektrométerrel

A tömegspektrométerrel (mass spectrometer, **MS**) történő fehérjeszekvenálás viszonylag új technika. Egyre elterjedtebb, idővel teljesen kiszoríthatja az Edman-degradáción alapuló fehérjeszekvenálást. Az Edman-degradációs módszerhez hasonlóan a hosszú fehérjéket itt is rövidebb **peptidekre** kell **hasítani**. Ez megoldható például valamilyen specifikus endopeptidáz segítségével. A hasítás következtében keletkezett peptideket valamilyen kromatográfiás eljárással, többnyire **HPLC-vel** választják el egymástól. Az elválasztott peptideket magas feszültség segítségével, **aerosol** formájában **ionizálják**, miközben a peptidek részlegesen **fragmentálódnak**. Az ionizált fragmenteket a tömegspektrométer a **tömeg/töltés hányadosuk** alapján el tudja különíteni. (A tömegspektrométer működésének részleteit itt most nem ismertetjük.) Az eljárás finomítható egy újabb fragmentációval és azt követő elválasztással (**MS/MS**). Az így kapott spektrumo(ka)t számítógép analizálja. Ha már korábbról ismert a spektrum mintázata, akkor következtetni lehet a peptid szekvenciájára. Ha nem ismert a mintázat, akkor a mérést meg kell ismételni úgy, hogy a fehérjét valamely **másik enzimmel** emésztjük a kromatográfia előtt. Az egymást átfedő peptidekről kapott spektrumokat a számítógép már össze tudja hasonlítani, és következtetni tud a fehérje aminosavsorrendjére (8-8. ábra).

8-8. ábra

http://en.wikipedia.org/wiki/Protein\_mass\_spectrometry

2013.09.18.