# 11. Klónozás, nukleinsav-könyvtárak

A molekuláris biológiában a klónozás kifejezés jelentése eltér attól, amit sejtbiológiában, ill. általánosságban értünk alatta. Itt már azt a folyamatot is klónozásnak nevezzük, amikor **idegen DNS**-t illesztünk valamilyen **vektorba.** Természetesen a vektort ezután élő sejtekbe juttatva szaporítjuk fel, **egyetlen** genetikailag megváltozott sejt szaporodásával keletkeznek annak **identikus változatai**, klónjai. Ha egy adott élő rendszerből származó nukleinsavak összességét illesztjük ugyanannak a vektornak sok-sok példányába, majd mindegyik konstrukciót más-más sejtbe juttatjuk, akkor egy könyvtárat hozunk létre, melynek köteteiben ott rejlik az adott élő rendszerre jellemző genetikai információ. Csakúgy, mint az igazi könyvtárban, bizonyos kulcsszavakkal (genetikai próbákkal) **rá tudunk keresni** az olvasni (vizsgálni) kívánt kötetre.

A könyvtárak reprezentálhatják a teljes organizmust, vagy annak egy speciális részét. Kétféle könyvtárat különböztetünk meg: **genomi** és **cDNS** könyvtárat. Könyvtárnak nevezhetjük magát a vektor nélküli DNS-szakaszok összességét („DNS-pool”) a DNS-szakaszokat vektorokba illesztve, vagy az idegen DNS-szakaszokat tartalmazó vektorokat hordozó organizmusokat.

## 11.1. Klónozás restrikciós enzimekkel

Két duplaszálú DNS-darabot a legegyszerűbben úgy tudunk egymáshoz illeszteni, ha mindkettőnek a végén ugyanolyan végeket generáló restrikciós endonukleázzal történt a hasítás. Ha a restrikciós endonukleáz ún. **ragadós végeket** generál, akkor a végeken lévő egyszálú szakaszok hidrogénhíd kötésekkel összetapadhatnak, a két (mindkét szálon egy-egy) hiányzó dezoxiribóz-foszfát kötést pedig **ligáz enzim** segítségével hozzuk létre. Így tudunk a legegyszerűbb módon például lineáris DNS-t klónozni cirkuláris plazmidba (11-1 ábra). A lényeg, hogy mindkét DNS-t ugyanazzal az (vagy ugyanolyan komplementer ragadós végeket generáló) enzimmel emésszük.

11-1. ábra

http://www.accessexcellence.org/RC/VL/GG/images/inserting.gif

2013.10.01.

Sajnos igen gyakran előfordul, hogy a felnyitott plazmid két vége inkább egymáshoz kapcsolódik és ligálódik vissza. Hogy ezt elkerüljük, gyakran alkalikus foszfatázzal (CIP) leszedjük a nyitott plazmid 5’ foszfátjait. A foszfátok hiánya miatt a plazmid önmagával nem ligálódik össze. Mivel az inzerten sértetlenek az 5’ foszfátok, az a vektor 1-1 szálához hozzáligálódik. Az így cirkularizált vektor transzformációs hatékonysága körülbelül 3 nagyságrenddel nagyobb, mint a ligálódni képtelen lineárisé, ezért csak az **inzertet is tartalmazó vektorok tudnak transzformálódni**. A baktériumsejtbe bejutott konstrukció két megmaradt bemetszését („nick”) a baktérium DNS-hibajavító mechanizmusa kijavítja, még a plazmid gazdasejtben történő replikálódása előtt.

 Megtörténhet az is, hogy az inzert végein és a vektor klónozó helyén nincs egymásnak megfelelő hasítóhely. Ilyenkor meg lehet próbálkozni tompa végű (blunt end) ligációval, aminek a hatásfoka sokkal rosszabb, mint a ragadós végű (sticky end) ligációnak. Ebben az esetben vagy már eleve tompa véget generáló restrikciós enzimekkel hasítunk, vagy ragadós végeket generáló emésztés után feltöltjük a hiányzó nukleotidokat, illetve leemésztjük a túlnyúló végeket. A vektor önmagával történő kapcsolódását elkerülendő, itt is érdemes azt **alkalikus foszfatázzal** kezelni a ligáció előtt (11-2. ábra).

11-2. ábra

http://eu.idtdna.com/pages/images/decoded/cc\_blunt-end-cloning\_fig-1.png?sfvrsn=0&c=HU

2013.10.2.

Ha ismert a beültetni kívánt DNS-szakasz szekvenciája, az is meghatározható, hogy **milyen irányban** üljön be a vektor adott részébe. Ilyenkor **két különböző**, egymással nem komplementer ragadós véget generáló restrikciós endonukleázzal emésztjük a vektort és az inzertet. Ez nemcsak az inzert irányát szabja majd meg, hanem a plazmidot is megakadályozza abban, hogy önmagával összeligálódjon. Ahhoz, hogy megfelelő restrikciós endonukleázokkal tudjunk emészteni, először a plazmid MCS-ét kell tanulmányoznunk, és az inzert szekvenciájának és a megfelelő puffer-rendszerek ismeretében kiválasztanunk a két megfelelő restrikciós enzimet. Az inzertet egy **PCR-reakcióval**, az 5’ végeken a megfelelő restrikcós endonukleázok hasítóhelyeit tartalmazó primerek segítségével szoktuk sokszorosítani, majd restrikciós hasítás után ligálni az ugyanezen enzimekkel felnyitott plazmidba (11-3. ábra).

11-3. ábra

http://www.addgene.org/static/cms/images/PCR-based-Subcloning-2\_1.gif

2013.10.02.

A fent leírt klónozási folyamatok több, egymást követő reakciók sorozatai. Az egyes reakciók között a DNS-darabokat (PCR-termék, vágott inzert, vágott plazmid, CIP-kezelt plazmid) mindig megfelelő módon **tisztítanunk kell** (kromatográfia, fragment izolálás, DNS-kicsapás), hogy a szennyeződéseket eltávolítsuk (mono- és oligonukleotidok, enzimek, pufferek) a soron következő reakció hatékonyságának érdekében.

## 11.2. Ligáz nélküli klónozások

A ligáz nélküli klónozási technikákban az a közös, hogy a konstrukciók előállításához szükséges reakciók közül elhagyható az általában igen időigényes ligálási lépés. A beültetni kívánt inzertben lévő restrikciós endonuekleáz helyekre sem kell tekintettel lennünk, mivel az inzertet nem emésztjük semmilyen restrikciós enzimmel.

**11.2.1. USER technológia**

A technológia lényege, hogy olyan **hosszú ragadós végeket** gyártunk a reakció során, amelyek összetapadva cirkuláris DNS-t eredményeznek, **nem kell ligázzal** megerősítenünk a kötődést. A transzformált plazmid két szálát azután a baktérium saját ligázai kapcsolják össze. A klónozáshoz speciális plazmidot kell terveznünk/vásárolnunk. A plazmidot egy restrikciós endonukleázzal elhasítjuk, majd egy másik, csak az egyik DNS-szálat hasító enzimmel kezeljük. Az eredeti, és a nick-et okozó hasítások között a komplementer szál el tud távolodni a nyílt plazmid két végéről, amelyek így két igen hosszú, de egymással **összetapadni nem képes ragadós véget** tartalmaznak. A túlnyúló végek utolsó, 3’ nukleotidja **mindig dTMP**. A beültetni kívánt szakaszt olyan primerek segítségével sokszorosítjuk fel, amelyek a specifikus részüktől 5’ irányban egy dezoxi-uridint, majd a plazmid túlnyúló végével megegyező szekvenciát tartalmaz. A PCR-reakció után a tisztított fragmentet **enzimkeverékkel** (USER) kezeljük, mely felismeri a DNS-be nem illő uracilt, és kivágja a szálból a dUMP-t. (Az enzimkeverékben kétféle, a DNS-hibajavítás során használatos enzim van: az **uracil DNS-glikoziláz** az uracil bázist vágja le a dezoxiribózról, az **endonukleáz VIII** pedig a láncban maradt dezoxiribóz 3’ és 5’ foszfodiészter kötéseit hidrolizálja, kihasítva a dezoxiribózt a láncból.) A PCR-fragment végeken megmaradt részek statisztikusan ledisszociálódhatnak, a plazmid ragadós végeivel komplementer szakaszok jönnek létre. Összekeverés után a vektor és az inzert így össze tud tapadni, lehet transzformálni a gazdasejtbe (11-4. ábra).

11-4. ábra

http://openi.nlm.nih.gov/imgs/512/2/1635280/1635280\_gkl635f1.png

2013.09.29.

**11.2.2. Háromnukleotidos technológia**

A klónozás elmélete nagyon hasonló az előzőhöz, itt is a hosszú, ragadós végeket használjuk ki. A vektort restrikciós endonukleázzal hasítjuk, majd **T4 DNS-polimerázt** teszünk hozzá, de csak **egyféle nukleotidot** (mondjuk dTTP-t). A vektor úgy lett kialakítva, hogy a hasítóhelytől 5’ irányba mozogva elég sokáig **hiányzik az egyik fajta nukleotid** (a 11-5. ábrán ez a timidilát). A T4 DNS-polimeráznak egy gyenge **3’-5’ exonukleáz aktivitása** van: visszaemészti az egyik szálat egészen az első dTMP-ig (ha az előbb említett példánál maradunk). (Valójában azt is leemészti, de a polimeráz aktivitása sokkal nagyobb, dTTP jelenlétében azonnal visszahelyezi a láncba.).

 Ugyanez történik a beillesztendő DNS-szakasszal is. A felerősítéshez tervezett primerek 5’ végére a vektor egyszálú részével komplementer szakaszt tervezünk. A PCR-terméket tisztítása után T4 DNS-polimerázzal kezeljük. A T4 DNS-polimeráz ezekkel a primerekkel komplementer szálat fogja hasogatni, dATP jelenlétében az első adenilátig. A fragmentek tisztítása után a vektor és a PCR-termék homológ szakaszai hibridizálnak egymással, a konstrukció ligálás nélkül bejuttatható a gazdasejtbe (11-5. ábra).

A szakirodalomban tulajdonképpen ezt a módszert nevezik **ligálás-independens klónozásnak**, mi azonban egy hasonló fogalom (ligáz nélküli klónozás) alatt minden, ligáz enzim nélkül működő technikát összesítettünk. Megkülönböztetésképpen, a ragadós végek jellemző tulajdonsága miatt neveztük el háromnukleotidos technológiának.

11-5. ábra

http://www.sciencedirect.com

2013.09.29.

**11.2.3.TOPO-klónozás**

Ezt a technológiát használva nem ligázt, hanem **topoizomerázt** használunk a DNS-szakaszok összekapcsolásához. (A topizomerázok olyan enzimek, melyek elvágják a DNS kettős szálát, majd DNS-térszerkezeti változás után ugyanott összeillesztik őket.) A topoizomeráz gyárilag a nyitott vektor 3’ –OH-csoportjához van kapcsolva kovalensen, egy foszfátcsoporton keresztül. A vektor tartalmazhat mindkét végén **3’ túlnyúló timidilátot**, vagy valamelyik végén **5’ túlnyúló szekvenciát** (ragadós végek) a kapcsolódás hatékonyságának növelésére (és az önligálódás elkerülésére). Az inzertet a PCR-reakció során vagy olyan hőstabil polimerázzal (például Taq polimeráz) szaporítjuk fel, amelyek **túlnyúló adenilátot** készítenek (11-6. ábra), vagy olyan primert használunk a PCR-hez, amelynek 5’ vége **komplementer** a vektor túlnyúló végére (11-7. ábra). (Ez utóbbi esetben a vektor túlnyúló vége statisztikusan le tudja szorítani az inzert egyik szálát a másikról, hibridizál vele.) A topoizomeráz **létrehozza a kovalens kötést** a fragmentek között, a gazdasejt hibajavító mechanizmusai pedig elvégzik a tökéletes kapcsolódást (lelógó szálak leemésztése, „nick”-ek összeligálása).

11-6. ábra

http://2007.igem.org/wiki[/](http://2007.igem.org/wiki/images/6/64/BU_topo.jpg)images/6/64/BU\_topo.jpg

2013.09.29.

11-7. ábra

http://bioinforx.com/lims1/bxseqtools/ultimate-molecular-cloning-guides/images/diagram\_directionalTOPO.gif

2013.09.29.

**11.2.4. Rekombinációs klónozás**

A rekombinációs klónozás során az egyik vektorban lévő inzertet helyezzük át a másik vektorba (**szubklónozás**). Jellemzően ez akkor szokott megtörténni, ha egy klónozó vektorból juttatunk át egy DNS-szakaszt egy expressziós vektorba, hogy ott kifejeződhessen. Ehhez szükség van arra, hogy mindkét vektorban egymással **kompatibilis szekvenciák** legyenek a klónozó kazetta két végén, hogy a kazetták egymással homológ rekombináció során kicserélődhessenek. Többnyire szükség van még valamilyen, a **rekombinációt segítő enzimre** (rekombináz, transzpozáz), amely a rekombináció incidenciáját jelentősen megnöveli akár *in vivo*, akár *in vitro* körülmények közt.

 A rekombináción alapuló klónozás egyik legismertebb, és talán leggyakrabban használt fajtája az ún. **Gateway-technológia**. A klónozás során két plazmiddal dolgozunk, egy klónozó (**donor vektor**) és egy expressziós (**„destination” vektor**) plazmiddal. Az ún. donor plazmidba az idegen DNS beültetését végezhetjük hagyományos módon, restrikciós endonukleázok és ligáz enzim segítségével, de a technológiát kifejlesztő cég TOPO-klónozásra, vagy **rekombinációs klónozásra** alkalmas vektorokat is ajánl és árusít. Utóbbi esetben a PCR-fragmentet olyan primerekkel szaporítjuk fel, melyek 5’ végükön tartalmazzák a **λ fágokban** található, azok integrációjáért felelős **attB1 és attB2** szekvenciákat. (A Gateway-technológia fejlesztése során a szekvenciákat több helyen módosították, hogy növeljék a rekombinációs reakció hatékonyságát és specifikusságát.) A donor vektorban is megtalálhatóak ezekkel kompatibilis szekvenciák (attP1 és attP2), ha a PCR-fragmentet és a vektort ún. „clonase” (klonáz) enzim jelenlétében összekeverjük, akkor *in vitro* rekombináció történhet, a PCR-fragment beülhet a vektorba. (A rekombináció következtében a vektorba integrálódott inzertet attL1 és attL2 szekvenciák fogják határolni). A vektor att szekvenciái által eredetileg közrefogott rész a rekombináció során kihasad, ami lehetőséget ad a pozitív (rekombináción átesett) klónok szelektálására (11-8. ábra).

A plazmidban található valamilyen antibiotikum (például ampicillin) rezisztencia gén, amely csak a megfelelően transzformált baktériumokat engedi kinőni az antibiotikumos lemezen. A vektorban továbbá az attP1 és attP2 szekvenciák között többnyire két gén található: a **ccdB** gén és a **kloramfenikol rezisztencia** (CmR) gén. A CcdB fehérje **gátolja** az E. coli egyik fajta **topoizomeréz enzimének** (giráz) a működését, ezért azok a klónok, melyekbe a nem rekombinálódott plazmid jut, elpusztulnak. (A ccdB gént tartalmazó, eredeti donor plazmidot speciális, CcdB-rezisztens E. coli törzsben sokszorosíthatjuk fel). A pozitív klónok telepeinek replikáját kloramfenikol antibiotikum-kezelésnek is alávethetjük. A kezelés során a rezisztenciagént már nem hordozó telepek nem fognak kinőni (az esetek többségében ez minden telepre igaz lesz). Az eredeti lemezen így is visszakereshetjük a pozitív klónokat (emlékezzünk: a pBR322 esetén is hasonlóan szelektáltunk a kétféle antibiotikummal).

A restrikciós emésztéssel/ligálással, TOPO-klónozással, vagy rekombinációs klónozással kapott konstrukciót ún. „**entry clone**”-nak hívják. A konstrukciót felsokszorozzuk, szekvenálással ellenőrizzük, majd mikrocentrifuga-csőben hozzákeverjük az expressziós, ún. „destination” plazmidot és a „clonase” enzimet. Ez szintén tartalmaz egy anibiotikum-reszisztencia gént (mást, mint az „entry” klón plazmidja), valamint egy expressziós kazettát. Ebben a kazettában található valamilyen **promóter** szakasz, esetleg operátor régió, valamint a két, az „entry” vektorral homológ szakasz (attR1 és attR2), amelyeken keresztül a rekombináció történik. E két szakasz között található a már előbb is említett két markergén (ccdB és (CmR), amely sikeres rekombináció esetén kiesik és szelekcióval a megfelelő klónok elkülöníthetőek (11-8. ábra).

Az expressziós plazmidban a rekombináció következtében attB1 és attB2 szekvenciák fogják határolni a beültetett DNS-t (csakúgy, mint esetleg az eredeti PCR-termékben). A ccdB és a CmR gének az eredeti donor plazmidba, a keletkező attP szakaszok közé kerülnek, amely antibiotikum szelekciós nyomás hiányában eltűnik a baktériumpopulációból. Bár a legtöbb esetben a rekombináció a PCR-terméktől az „entry” konstrukción keresztül az expressziós klón felé halad, ez nem egyirányú utca, a reakciót meg is lehet fordítani. Ha például egy már meglévő expressziós konstrukció mellé szeretnénk létrehozni egy másikat, akkor az inzertet az eredetiből „visszarekombináltatjuk” egy donor plazmidba, ahonnan ismét be lehet illeszteni egy „destination” vektorba.

11-8. ábra

http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/gateway\_clonaseii\_man.pdf

2013.09.30.

## 11.3. Genomi könyvtárak

A genomi könyvtárakat úgy hozzuk létre, hogy egy adott élőlényből kinyert genomi DNS-t valamilyen módon **rövidebb szakaszokra daraboljuk**. A darabolás történhet **fizikai aprítással**, vagy **restrikciós endonukleázzal** történő emésztéssel. Az így kapott DNS-darabokat restrikciós endonukleázzal elhasított, vagy már eredetileg nyílt állapotban vásárolt **vektorokba ligáljuk**. Az így elkészített konstrukciókat azután valamilyen **organizmus** (baktérium, élesztő, bakteriofág) **sejtjeibe** (vagy kapszidjaiba) **juttatjuk**. Ezeket a sejteket (vagy bakteriofágokat) szélesztjük táptalajt (vagy baktériumpázsitot) tartalmazó agarlemezen, majd valamilyen technikával (például kolónia hibridizációval) keresünk rá az általunk kívánt DNS-t tartalmazó kolóniára.

 Vannak olyan kísérletek, amelyekhez felesleges a könyvtárat vektorokba illesztenünk. Ha például azt szeretnénk megtudni, hogy egy transzpozon, vagy egy adott virális eredetű DNS a genom mely részébe ült bele, akkor ezt ún. **reverz PCR-technikával** tudjuk kideríteni. A genomot restrikciós endonukleázzal emésztjük. A restrikciósan hasított DNS-fragmenteknek a két végét összeligáljuk, majd a vírus (vagy transzpozon) DNS-re tervezett, ún. kifelé mutató primerek segítségével végezzük el a PCR-t. A PCR-termék ilyenkor a két végén tartalmazza a vírusszekvenciákat, középen pedig a vírus-DNS-t két oldalról körülvevő genomi szakaszokat. A PCR-terméket ezután vektorba lehet ültetni, és meg lehet szekvenálni, így feltérképezhető az a genomi régió, amelybe a vírus (vagy transzpozon) beült (11-9. ábra).

11-9. ábra

http://www.nature.com/onc/journal/v24/n52/images/1209043f6.jpg

2013.09.30.

## 11.4. cDNS könyvtárak

A cDNS könyvtárakhoz mindig totál, vagy **mRNS-ből** kell kiindulnunk, amit az adott élőlényből (szövetből, sejtkultúrából) izolálunk. Ez a cDNS könyvtár reprezentálja majd az adott sejtek RNS-összetételét.

**11.4.1. Az első szál szintézise**

Az RNS izolálása és épségének (gélelektroforézissel történő) kimutatása után először egy komplementer DNS (cDNS) szálat kell szintetizálnunk. A reakcióhoz megfelelő pufferre, dNTP-kre, **reverz transzkriptáz** enzimre és primerekre van szükségünk. Ha csak egyfajta, ismert nukleotidszekvenciájú RNS-t akarunk átírni, akkor specifikus primerre, ha az összes mRNS-t át akarjuk átírni, akkor **oligo-dT primerre** (ez az mRNS-ek poli-A farkához tud hibridizálni), ha az összes RNS-t, akkor **random primerekre** (például random dekamerekre) van szükségünk (11-10 ábra). (A random primerek sokféle, véletlen nukleotidszekvenciájú primert jelentenek. Ezek többé-kevésbé aspecifikusan kötődhetnek az RNS jórészt komplementer szakaszaihoz, elősegítve ezzel a DNS-polimerizációt. A random primerek gyakran nem az RNS végéhez tapadnak, ezért ez utóbbi esetben nem feltétlenül fogjuk átírni a teljes hosszúságú RNS-t.)

11-10. ábra

http://www.bio.davidson.edu/genomics/method/cDNA/cDNA3.gif

2013.10.02.

Az RNS-t és a primereket összekeverjük, majd 85 °C-ra melegítjük körülbelül 5 percig. Kivesszük az inkubátorból, és jégre tesszük, hogy azonnal kihűljön. Ekkor tapadnak be a primerek. A csőhöz jégen hozzámérjük az előre összekevert többi reagenst, majd nagyon gyors keverés és centrifuga után 42-44 °C-on zajlik a polimerizációs reakció, körülbelül 1 óra hosszat. A reakciót 10 percig tartó 70 °C-os melegítéssel állítjuk le (tönkretesszük a hőérzékeny reverz transzkriptázt).

Adott mRNS-szintek real-time PCR-rel történő kimutatásához nem is kell tovább mennünk: Az **egyszálú DNS** ugyanúgy **alkalmas a PCR-reakcióra**, mint a kétszálú, csak eggyel több ciklusra van szüksége ugyanakkora fluoreszcencia generálásához. (Az **RNS nem alkalmas** templát a **PCR-reakcióhoz**). Ha azonban az átírt cDNS-eket vektorokba szeretnénk ültetni, akkor meg kell szintetizálnunk a cDNS második szálát is.

 Ha időt akarunk spórolni, lehetőségünk van arra, hogy a reverz transzkripcióval egy időben PCR-reakcióval erősítsük ki a kívánt cDNS szekvenciát a sok közül. Ezt a módszert nevezzük **RT-PCR**-nek. (Nem tévesztendő össze a real-time PCR-rel. Ha az RT-PCR reakciót real-time detektálással kapcsoljuk össze, akkor azt real-time RT-PCR-nek nevezzük.) Ehhez legalább **egy specifikus primerre** van szükségünk, a másik lehet az aspecifikus oligo dT. A két egymást követő reakció (reverz transkripció és PCR) működhet ugyanabban a reakció-pufferben, csak a két polimerizációs reakciót más-más polimeráz (reverz transzkriptáz vs. Taq polimeráz) fogja katalizálni.

**11.4.2. A második szál szintézise**

A cDNS második szálának szintézise több módon is történhet. A technikákban közös, hogy az RNS-szál eltávolítása után (vagy eltávolítása közben) valamilyen DNS-dependens DNS-polimerázzal szintetizáljuk meg a komplementer szálat. A legnagyobb problémát a priming okozza: A heterogén állománynak köszönhetően nincs olyan ismert szekvencia, amelyre primert tudnánk tervezni. Erre a következő technikákat dolgozták ki:

1. A DNS/RNS hibridről melegítéssel vagy lúgos kezeléssel leszedjük az RNS-szálat. Az egyszálú cDNS 3’ vége visszahajlik a szálra, ún. **hajtűt képez**, és primerként szolgálhat a második lánc szintéziséhez. (Az egyszálú nukleinsavak végei termodinamikai okokból hajlamosak visszahajlani, és a részlegesen komplementer szakaszok bázispárosodásával hajtű alakot felvenni. Az így kialakult szerkezetek nem stabilak; az egyszálú nukleinsav sok, hasonlóan instabil szerkezete folyamatosan alakulgat át egymásba.) A polimerizációhoz klenow fragmentet szoktunk használni, a reakció végén a hajtűkanyart S1 nukleázzal emésztjük (11-11. ábra).

2. A DNS/RNS hibridhez **RN-áz H és E. coli DNS-polimeráz I** keverékét adjuk. Az RN-áz H emésztés eredményeként az RNS-szál több helyen bevágódik (nickek keletkeznek), ami a DNS-polimeráz I-nek megfelelő primer a polimerizáció megkezdéséhez. 5’-3’ exonukleáz aktivitásának köszönhetően a DNS-polimeráz I leemészti az előtte lévő RNS-fragmenteket, és DNS-sel **cseréli le** őket. A reakció végén ligáz enzim kapcsolja össze a cDNS második szálának a darabjait (11-12. ábra).

3. A hibrid szál RNS-felének eltávolítása után terminális transzferáz és például dCTP segítségével **oligo-dC farkat** rakunk az első szálra, ezután **oligo-dG primer** segítségével szintetizáljuk meg a második szálat (11-13. ábra).

4. Az előző módszer finomítása, hogy poli-A farokhoz hibridizáló oligo-dT és az oligo-dC farokhoz hibridizáló oligo-dG primerek 5’ végére még egy-egy, **restrikciós endonukleáz** hasítóhelyet tartalmazó szekvenciát is tervezünk. Ha ezek az extra szekvenciák elég specifikusak, még specifikus PCR-rel is fel tudjuk erősíteni a fragmenteket. A (jellemzően két különböző) restrikciós endonukleázzal történt hasítás után a cDNS az előző három módszertől eltérően **közvetlenül ültethető a vektorba** (11-14. ábra).

11-11. ábra

http://dwb4.unl.edu/Chem/CHEM869N/CHEM869NLinks/www.dur.ac.uk/~dbl0www/Staff/Croy/cDNAfigs.htm

2013.10.02.

11-12. ábra

http://dwb4.unl.edu/Chem/CHEM869N/CHEM869NLinks/www.dur.ac.uk/~dbl0www/Staff/Croy/cDNAfigs.htm

2013.10.02.

11-13. ábra

11-14. ábra

Az első három módszernél elő kell készíteni a cDNS-eket a beültetésre. Először **tompa végeket** készítünk nekik, (erre **T4 polimeráz** és dNTP mix adása a leghatékonyabb, lásd 6. fejezet). Ezután specifikus metilázok és SAM segítségével **metiláljuk a fragmentet**, hogy a restrikciós endonukleázok ne ismerjék fel őket. Metilálás után polinukleotid kinázzal és ATP-vel kiegészítjük az esetleg hiányzó 5’ foszfátokat. Ezután restrikciós endonukleáz hasítóhelyeket tartalmazó **adaptorokat ligálunk** a szakaszok két végéhez. A kész fragmenteket azután restrikciós endonukleázzal hasítjuk, amik csak az adaptorokon belül tudnak vágni. Az így keletkezett ragadós végekkel tudjuk a cDNS-eket a megfelelő ragadós végeket tartalmazó, nyitott **vektorba beleültetni**. Természetesen minden reakciólépés után inaktiválnunk kell az enzimeket és tisztítanunk a DNS-t (például oszlopkromatográfiával), hogy a szennyeződés ne zavarja a soron következő reakciót.

 A negyedik módszer sokkal kényelmesebbnek tűnik, de itt számolnunk kell azzal, hogy a restrikciós endonukleázok esetleg hasítják a cDNS-szekvenciáink egy részét. Ezek a cDNS-ek teljes hosszúságukban ilyenkor nem lesznek a könyvtár részei, esetleg csak darabjaikban.

**11.4.3. RACE**

Ha a cDNS könyvtárból sikerült azonosítanunk azt a klónt, amelyet kerestünk, akkor az inzert DNS-t meg kell szekvenálnunk a vektorra specifikus primerek segítségével. A cDNS-készítés **technikájának hiányosságai** (leginkább a polimerázok nem túl magas processzivitása) miatt azonban előfordulhat, hogy a vektorban talált cDNS szakasz 3’, de még gyakrabban az 5’ vége **hiányzik** a teljes mRNS szekvenciájához képest. Hogy kiderítsük, mi az igazság, újra elővesszük az izolált RNS-mintát, és ún. RACE (rapid amplification of cDNA ends) technológiát használunk. Először is a szekvencia-analízis eredményét felhasználva **génspecifikus primereket** készíttetünk, melyek hibridizálni képesek az általunk megszekvenált cDNS-szekvencia **középső részével** (vagy a cDNS templátjául szolgáló RNS középső részével).

 Ha az **5’ vég** szekvenciáját szeretnénk az RNS-nek felderíteni, akkor az első szál szintéziséhez nem oligo dT, hanem az RNS közepére specifikus primert használjuk. Mivel ez közelebb van az 5’ véghez, nagyobb az esély arra, hogy a reverz transzkriptáz **végigszintetizálja** az első szálat. Ezután **homopolimer farkazás** következik terminális transzferáz és mondjuk dATP segítségével. Oligo dT primerrel készítjük el a másik szálat. Ha a specifikus és az oligo dT primerek 5’ végeihez restrikciós endonukleáz hasítóhelyet kódoló részeket tervezünk, akkor PCR-rel felszaporítható a szakasz, majd restrikciós endonukleázzal történő emésztést követően a vektorba ültethető (10-15. ábra).

 Ha a 3’ vég szekvenciát keressük, akkor az oligo dT primerrel átírt cDNS első szálát használjuk templátként, és a másik specifikus primer segítségével átírjuk a cDNS 3’ végét. A PCR-t követően a primerek 5’ végén lévő extra, restrikciós emésztőhelyeket tartalmazó szakaszokat ugyanúgy használhatjuk, mint az 5’ RACE esetében (10-16. ábra).

11-15. ábra

11-16. ábra

Van a RACE-nak olyan specifikus változata, mely biztosítja, hogy csakis a **teljesen ép RNS-eket** vizsgálhassuk. Az 5’ **RLM-RACE** esetében a reverz transzkripció előtt az RNS-eket egy **alkalikus foszfatázos** emésztésnek vetjük alá. Ez leszedi a sérült 5’ végű mRNS-ekről az 5’ foszfátcsoportot, míg az ép, 7-metil-guanidin sapkát horgozó mRNS-eket nem bántja. Ezután a foszfatázt (CIP) eltüntetjük a rendszerből. Második lépésben egy dohány savas pirofoszfatázt (TAP) adunk az RNS-hez, mely leszedi a 7-metil-guanilát sapkát, és szabad foszfátot hagy az 5’ végen. Az eredetileg ép RNS-ek 5’ végéhez így képesek vagyunk egy specifikus, **egyszálú adaptert** kapcsolni a foszfáton keresztül, míg a foszfátot nem tartalmazó, eredetileg sérült RNS-ek nem kapják meg ezt az adaptert. Ezután történik meg a reverz transzkripció, majd az adapterhez és a középső szakaszokhoz tervezett specifikus primerek segítségével a PCR-reakció (11-17. ábra).

 3’ RLM-RACE esetében az első szál átírásához szükséges primer 5’ TTTTTVN, ahol V lehet háromféle nukleotid, kivéve dTMP, az N pedig lehet mind a 4-féle nukleotid. Így összesen 12-féle primerrel végezzük az első szál szintézisét. (A primer szekvenciája biztosítja, hogy kizárólag az éretlen transzkriptum és a poli-A farok csatlakozási pontjától kezdődjön csak el a cDNS első szálának az átírása.) Természetesen a primerek 5’ végéhez speciális adapter szekvencia van tervezve. A második szál átírását itt is 5’ adaptert tartalmazó, a cDNS-re specifikus primerrel végezzük (11-18. ábra).

Az adapterekre specifikus primerekkel végzett PCR-reakciók és azt követő restrikciós hasítások következtében, a cDNS 3’ illetve 5’ fragmentje vektorba ültethető. A felszaporított vektorban lévő szakaszt aztán szekvencia-analízissel ellenőrizhetjük.

11-17. ábra

11-18. ábra