

## Kísérlettervezés a növényi molekuláris biológiában

### Előadók:

Tamás László Ph.D.

Berecz Bernadett Ph.D.

### A tantárgy tematikája:

1. Bevezetés, a gondolkísérlet részleteinek ismertetése, a növényi molekuláris biológia tárgykörében való elhelyezése. Az alkalmazott módszerek felsorolása, egymáshoz kapcsolódásuk ismertetése.
2. A heterológ rendszerben történő expresszióra kiválasztott, a szerkezet funkció kutatásban vizsgálni kívánt fehérje meghatározása, fehérje szinten való azonosítása. A fehérje gélelektroforézis kritikus pontjainak és a kísérlet tervezésben figyelembe veendő szempontok ismertetése. Fehérje szekvenálás módszereinek ismertetése a tervezés pontjainak megbeszélése.
3. A degenerált szekvenciájú oligonukleotid tervezése RT-PCR reakcióhoz. Az mRNS preparálás növényi mintából. A reverz transzkripció enzimeinek ismertetése, a kiválasztás szempontjainak megtárgyalása. Az RT-PCR reakció kivitelezése, kísérleti körülmények meghatározása, a hatékonyság növelés szempontjai.
4. A cDNS klóntár készítés rejtelvei, a klóntár ellenőrzése (szkrínelés) és a megfelelő klón, klónok kikeresése. A klón ellenőrzése restriktív emésztéssel, ill. szekvenálással. A fehérje expressziós rendszer kiválasztásának szempontjai. Előnyök és hátrányok.
- 5-6. A különböző bakteriális expressziós rendszerek részletes ismertetése előnyeivel és korlátaival. Alkalmazásuk feltételeinek kifejtése példákon keresztül.
7. PCR primerek tervezése az expressziós vektorba való klónozáshoz. A PCR reakció kísérletes alkalmazásának ismertetése, a módszer alkalmazása közben sokszor felmerülő problémák, gondok megoldásának részletes megtárgyalása.
8. A PCR amplifikált DNS klónozásának (emésztés, ligálás, transzformálás) részletes ismertetése, különös tekintettel a kapcsolódásokra és a hibás kísérleti eredmények kiküszöbölésére. A különböző bakteriális transzformálási módszerek ismertetése, összehasonlítása, előnyei és korlátai.
9. A DNS emésztés enzimeinek tulajdonságának ismertetése, a kettős emésztés problémájának megvitatása. A megfelelő ragadós végekkel rendelkező PCR amplifikált és klónozott DNS fragmentek ellenőrzése és szub-klónozása. A klónozó és expressziós gazdasejtek tulajdonságainak ismertetése, használatuk feltételei.
10. A kísérletesen vizsgálandó fehérje expressziójának körülményei, problémái, s a felmerülő nehézségek megoldásának lehetőségei. Indukció, idő, hőmérséklet, fehérje toxicitás.
11. A fehérje extrakciója a baktériumból. A fehérje és funkciójának vizsgálata tisztítás nélkül és tisztítás után. A „tag”-gel ellátott fehérjék expressziójának lehetőségei, előnyei, hátrányai. A „tag” eltávolításának lépései. A fehérje tisztítás módszerei, a megfelelő módszer kiválasztása.
12. A fehérje szerkezetének megváltoztatása PCR módszerrel. Hely specifikus mutagenézis, fúziós fehérjék. Módosított szerkezetű fehérjék funkciójának vizsgálata.