

Adleman kísérlete - A Hamilton-út probléma megoldása

- Tegyük fel, hogy n városunk van, és 1-ből keresünk Hamilton-utat n -be
- **Az implementált algoritmus:**
 - 1. Generáljunk véletlenszerűen a gráf útjait
 - 2. Az 1-es pontban generált utak közül tartsuk meg azokat, melyek 1-gyel kezdődnek és n -nel végződnek
 - 3. A megmaradt utak közül tartsuk meg azokat, melyek pontosan n hosszúak
 - 4. A megmaradt utak közül tartsuk meg azokat, melyek érintik az
 - 2-es csúcsot; a maradékból azokat melyek érintik a
 - 3-as csúcsot, \dots , a maradékból azokat, melyek érintik az
 - $n - 1$ -ik csúcsot
 - 5. Ha marad utunk, akkor a kimenet „igen”, egyébként „nem”

Az algoritmus lépéseinek megvalósítása – 1. lépés

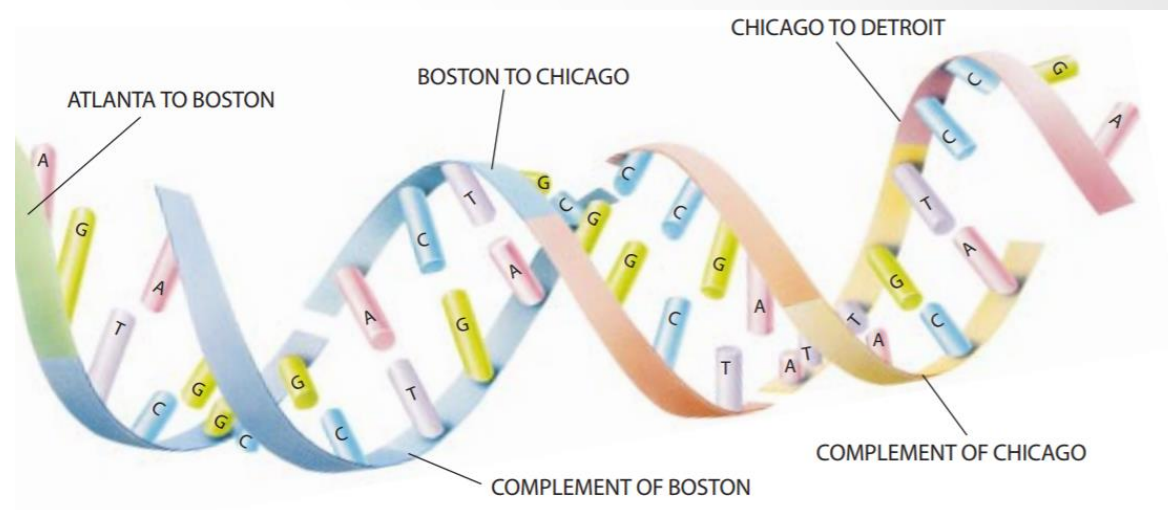
1. Generáljunk véletlenszerűen a gráf útjait

- Külön-külön kémcsőben készítünk (rendelünk) nagy számú másolatot mind a **csúcsokat** reprezentáló láncok komplementeréből, mind az **éleket** reprezentálókból

- Ezeket egy kémcsőbe téve, a **Watson-Crick komplementaritás** segítségével megkapjuk a gráfban lévő utakat reprezentáló láncokat

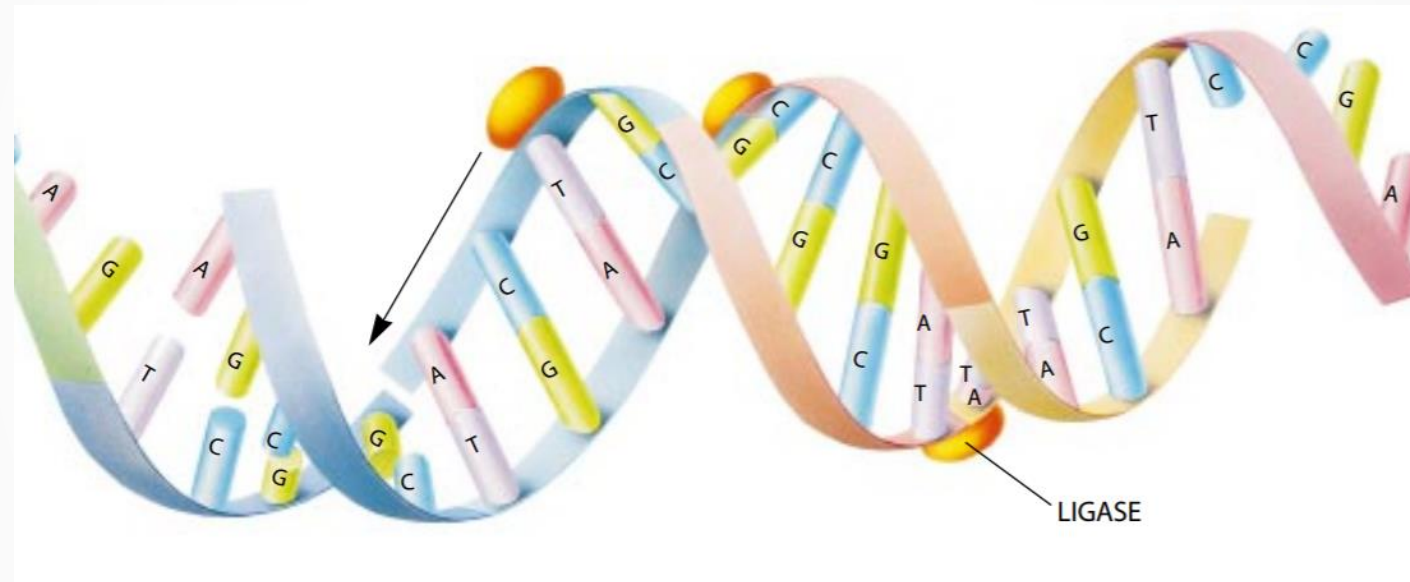
Adleman kísérletének illusztrálásához a cikkben használt gráfot és a cikk kapcsolódó képeit használjuk

Itt Atlantából Detroitba keresünk Hamilton utat, tehát az általános algoritmusban szereplő 1 és n csúcsok rendre Atlantát és Detroitot jelölik



Az algoritmus lépéseinek megvalósítása – 1. lépés

- A **ligáz enzim** segítségével „kijavítjuk” a szálakon lévő „hibákat”



Az algoritmus lépéseinek megvalósítása – 2. lépés

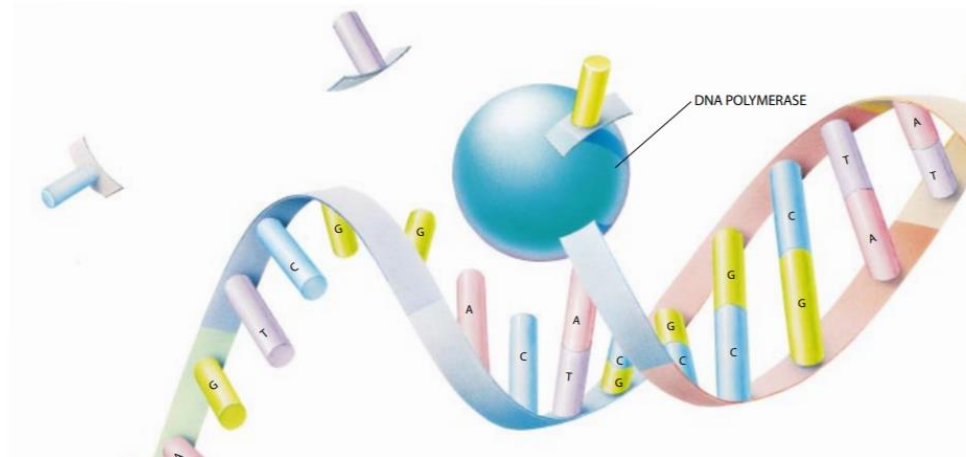
2. Az 1-es pontban generált utak közül tartsuk meg azokat, melyek 1-gyel kezdődnek és n -nel végződnek

- Az első lépés során kapott utak közül az 1-gyel kezdődőket és az n -nel végződőket a **polimeráz-láncreakció** segítségével **exponenciális** mértékben sokszorozítjuk
- A sokszorozításhoz olyan 1-nek és n -nek megfelelő **primérek**et használunk, melynek segítségével csak azok az utak **duplázódnak**, melyek 1-ből indulnak és n -be érkeznek
- Amikor végeztünk, a leves nagyságrendekkel több olyan utat tartalmaz, ami 1-ből indul és n -be érkezik, mint egyéb utat

Az algoritmus lépéseinek megvalósítása – 3. lépés

Adleman kísérletében a GGCT primér (Detroit neve első felének komplementere) és a GCAG primér (Atlanta nevének második fele) van felhasználva rendre a Detroit nevét tartalmazó szálak illetve az Atlanta nevének komplementerét tartalmazó szálak másolására (emlékeztető: PCR során egy szál és annak a Watson-Crick komplementere is másolásra kerül)

- Megjegyzés: a cikkből származó kép sajnos nem tartalmazza a lényegi részt, azaz a Detroit DNS nevét kódoló szekvenciát, amihez a GGCT primér kapcsolódik



3. A megmaradt utak közül tartjuk meg azokat, melyek pontosan n hosszúak

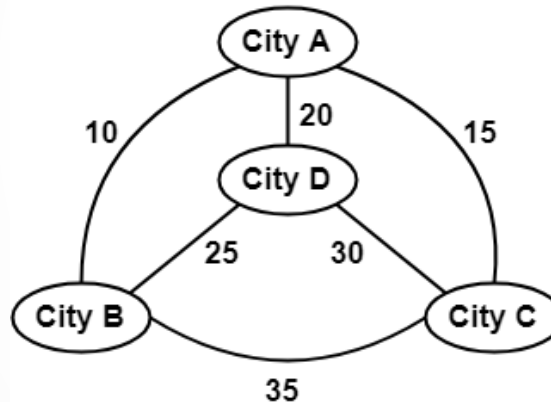
- Itt használjuk a gélelektroforézist
- A segítségével elérhető, hogy kiválogassuk azokat a molekulákat melyek n hosszú utat reprezentálnak

Az algoritmus lépéseinek megvalósítása – 4. és 5. lépés

- 4. A megmaradt utak közül tartsuk meg azokat, melyek minden csúcsot legfeljebb egyszer érintenek
 - Nagy számú, a 2. csúcs DNS nevét kódoló szekvenciát készítünk, és ezeket egy **mágneses gömbhöz rögzítve** a kémcsőbe tesszük (tehát ezek a szekvenciák a 2. csúcsot kódoló szekvencia komplementerei; ld. a kódolást a 7.ea 8. fólián)
 - Ehhez **hozzátapadnak** azok a láncok, melyek olyan utaknak felelnek meg, amik tartalmazzák a 2-es csúcsot
 - Ezeket a láncokat **szeparáljuk** (ezt hívják **pecázásnak** is)
 - Megismétljük a folyamatot a $3, 4, \dots, n - 1$ csúcsokra
- 5. Ha marad utunk, akkor a kimenet „igen”, egyébként „nem”

Az Utazóügynök probléma

- Adott egy G irányítatlan gráf az éleken pozitív egész súlyokkal (hurokélek nincsenek)
- Kérdés: Mi a legkisebb súlyú Hamilton-kör G -ben?
- Példa:



- Megoldás: $A \rightarrow B \rightarrow D \rightarrow C \rightarrow A$, költség: 80

Az Utazóügynök probléma

- Hogyan oldjuk meg ezt a problémát DNS-sel?
- Ismert, hogy a DNS szálak **olvadáspontja** függ attól, hogy mennyi **G-C pár** található benne
 - **Olvádpont**: az a hőmérséklet, melyen az azonos DNS láncok 50%-a már szétvált egyszálú DNS láncokra
- **Temperature gradient gél elektroforézis** (TGGE):
 - A hőmérséklet is **változik** ahogy a DNS láncok vándorolnak a gélben
 - Az olvadásponton lévő DNS láncok **lassabban** mozognak

Az Utazóügynök probléma

- A kis költségű utakat **kisebb olvadáspontú** DNS láncokkal kódoljuk
- Belerakjuk a bemenetet reprezentáló DNS-szálakat a levesbe, és ezzel legeneráljuk az összes lehetséges utat
- Kiválasztjuk azokat az utakat melyek kielégítik a szükséges feltételeit a TSP-nek:
 - ugyanazzal a várossal **kezdődnek és fejeződnek be** (polimeráz láncreakció - PCR)
 - Minden várost **pontosan egyszer** érintenek (gél elektroforézis, pecázás)
- **PCR módosítása:** minden ciklusban **csökkentjük a maximum hőmérsékletet**, így a kisebb olvadáspontú DNS-szálak többször fognak előfordulni a levesben
- Következtetésképp a **gazdaságosabb utak nagyobb koncentrációban** lesznek jelen a levesben
- TGGE módszerrel kiválasztjuk a leggazdaságosabb utat.

A DNS számítások hátrányai

A DNS számítások **nem hibamentesek**:

- A **DNS szintézis** (megtervezett DNS szekvenciák legyártása) során kb. 500 bázisonként előfordul egy hiba
- A **pecázás** során olyan DNS-láncokat is kiemelhetünk, melyek nem megfelelőek
 - Megoldás lehet, ha előtte PCR-ral sokszorozítjuk a kiemelni kívánt szekvenciákat
- A **ligáz enzim** összeköthet olyan láncokat, melyeket nem kellene
- **Hűtés**kor az egyszeres DNS szálak nem várt helyen is kapcsolódhatnak (akár saját magához is képes kapcsolódni egy lánc)
 - Megoldás lehet a bemenet **minél körütekintőbb elkódolása** DNS szekvenciákkal

A DNS számítások hátrányai

További hátrányok:

- **Időigényes** kiolvasni a számítás eredményét
 - Adleman kísérletében ehhez 7 nap kellett
- Ahogy a membránszámításnál, itt is az úgynevezett **time-space tradoff** jelenséget használjuk ki
 - Azaz a futási idő rövidül, de a felhasznált „memória” **exponenciálisan** növekszik
 - Egy 200 csúcsú gráf összes útjának a legyártásához már nagyon sok DNS lánc kell

A molekuláris klónozás

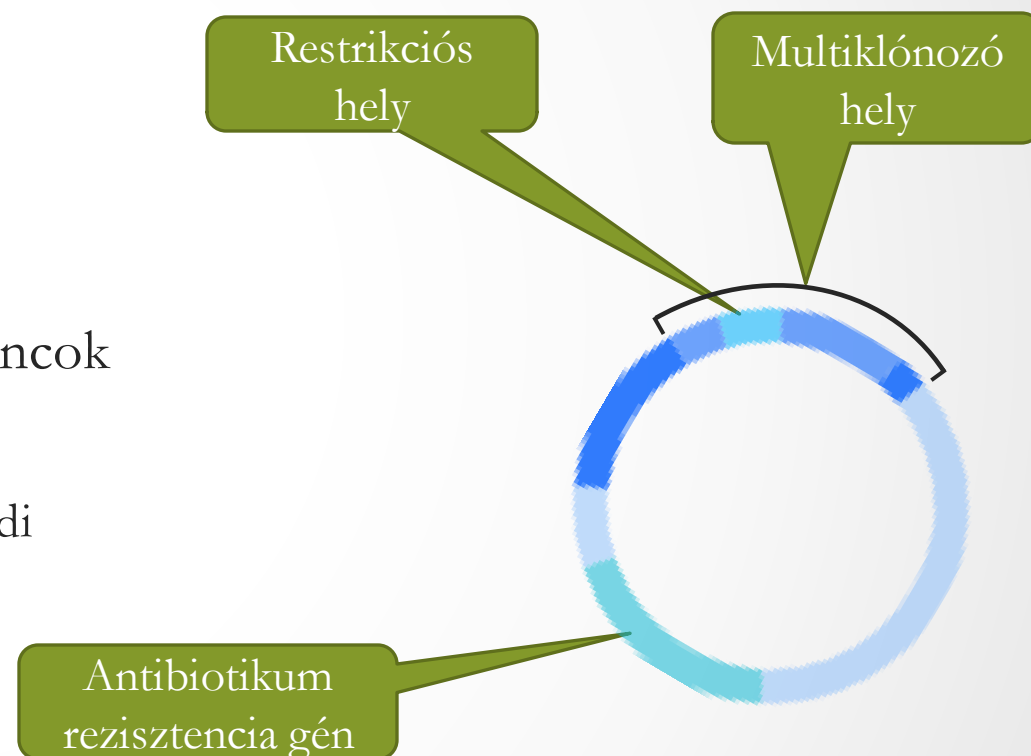
- Lehetőségek egy specifikus DNS szakasz **felszaporítására**:
 - Polimeráz láncreakció (*in vitro*)
 - **Molekuláris klónozás** (*in vivo*)
 - Gazda sejtet igényel (pl. baktérium)
 - A **cél DNS szakaszt** a gazdag sejt egy kör alakú DNS molekulájába (**plazmid**) építjük be
 - A plazmidot bakteriális transzformációval visszajuttatjuk a gazdasejtbe
 - A gazdasejt osztódásával a cél DNS szakasz is sokszorozódik
 - Ez a módszer használható fehérjék (pl. inzulin) létrehozására is

A molekuláris klónozás

Tegyük fel, hogy egy bizonyos **gént szeretnénk sokszorozítani** molekuláris klónozás segítségével

A következőkre lesz szükségünk

- a **cél gént** kódoló DNS lánc
- **E.coli** (kóli)baktériumok gazdatestnek
- **plazmidok** az E.coli-ból: speciális kör alakú DNS láncok
 - képesek **replikálódni** a gazdatestben
 - tartalmaznak egy **multiklónozó helyet**, melyekben egyedi **restrikciós helyek** vannak,
 - tartalmaznak valamilyen **antibiotikum rezisztencia gént**



A molekuláris klónozás

Szükség van még

- **restrikciós endonukleázra:** vágóenzim, ami felismeri a restrikciós helyet a plazmidban és a megfelelő helyen elvágja

G|AATTC
CTTAAG|

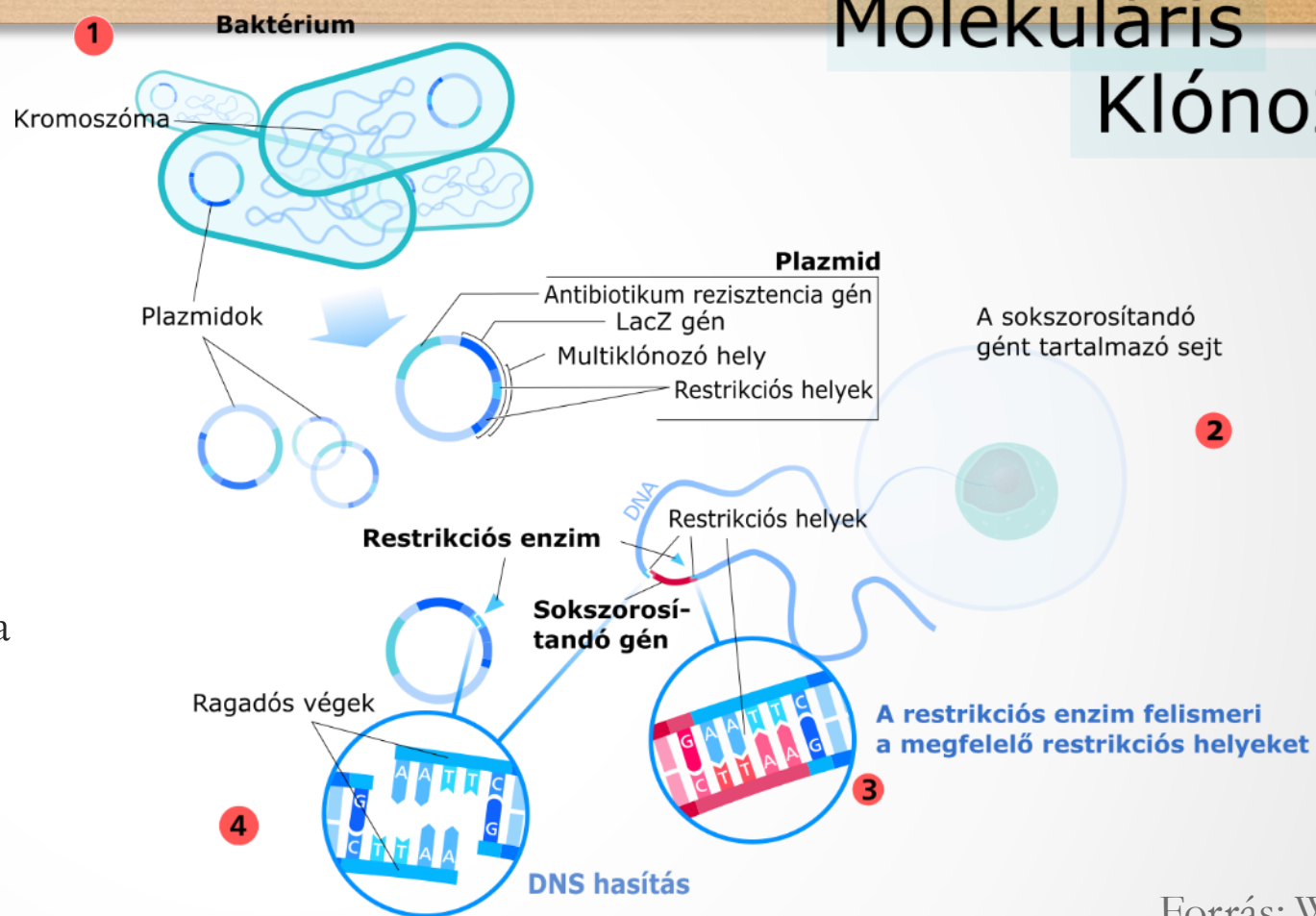
Ragadós
végek

- A fenti restrikciós helyet az **EcoRI** nevű enzim ismeri fel és vágja el
- **ligáz enzimre**

A molekuláris klónozás

A molekuláris klónozás lépései:

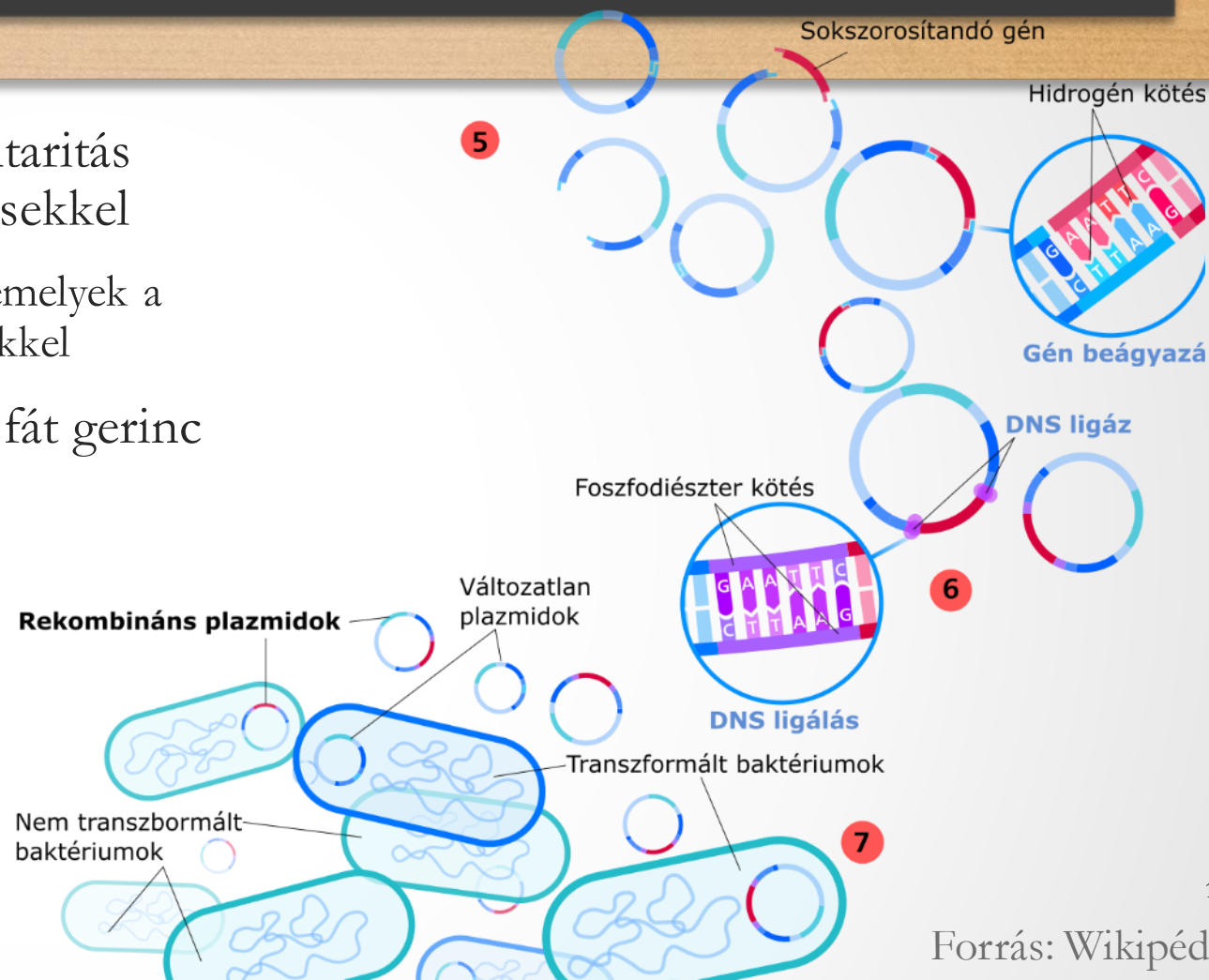
1. A baktériumsejtekből kinyerjük a plazmidokat
 - Ezek fogják hordozni a sokszorosítandó gént
 - Rendelkezik a LacZ génnel, ami a baktérium kék színéért felelős
2. A sokszorosítandó gént tartalmazó DNS-t is kinyerjük a megfelelő sejtől
3. Az EcoRI restrikciós enzim felismeri a megfelelő bázispár szekvenciákat
4. Az EcoRI a megfelelő restrikciós helyeken elvágja mind a plazmidokat, mind a sokszorosítandó géneket



Molekuláris Klónozás

A molekuláris klónozás

5. A ragadós végek a Watson-Crick komplementaritás alapján összeragadnak gyenge Hidrogén kötésekkel
 - nem minden plazmid fog tartalmazni cél gént, némelyek a vágás helyén újra összekapcsolódnak a saját végükkel
6. A ligáz enzim összekapcsolja a szálakat a foszfát gerinc mentén
7. A plazmidokat hozzáadjuk azokhoz a baktériumokhoz melyekből kinyertük őket
 - A bakteriális transzformáció során – pl. melegítés hatására, a plazmidok beépülnek a baktériumokba (nem feltétlenül mindegyikbe)



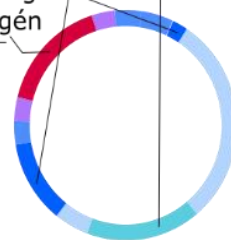
A molekuláris klónozás

8. A célgén megszakítja a LacZ gént a rekombináns plazmidokban

- Azok a baktériumok, melyek eredeti plazmidot építettek be kékek lesznek
- azoknak a baktériumoknak, melyek rekombináns plazmidot építettek vagy melyek nem építettek be semmit nem változik a színük

Rekombináns plazmid

Antibiotikum rezisztencia gén
Szétszakított LacZ gén
Sokszorozítandó gén

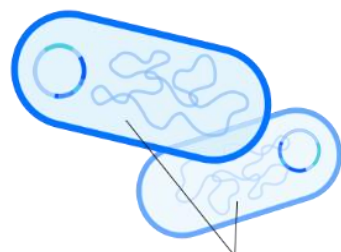


9. Antibiotikumot adunk a baktériumokhoz

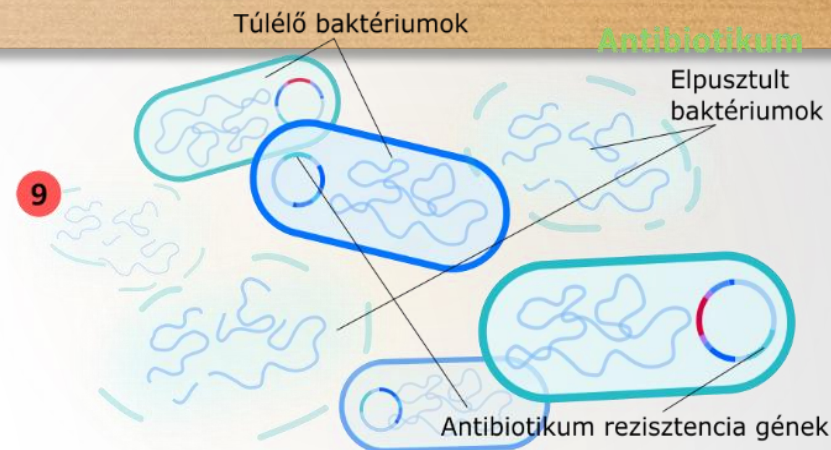
- Azok, melyek nem tartalmazzak plazmidot elpusztulnak

10. A maradék baktériumokból kiválogatjuk a nem kékeket; ezek tartalmazzák a cél gént

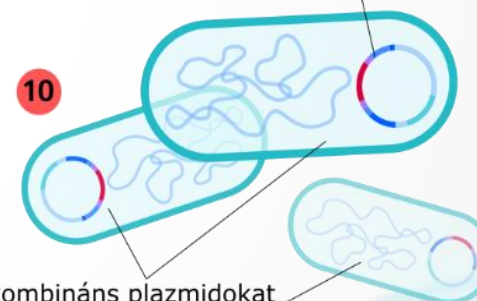
11. Ezeket a baktériumokat tenyésztjük, és ezzel szaporítjuk a cél gént



Változatlan plazmidokat tartalmazó baktériumok (kék színűek maradnak)



A sokszorozítandó gént tartalmazó plazmid



Rekombináns plazmidokat tartalmazó baktériumok

