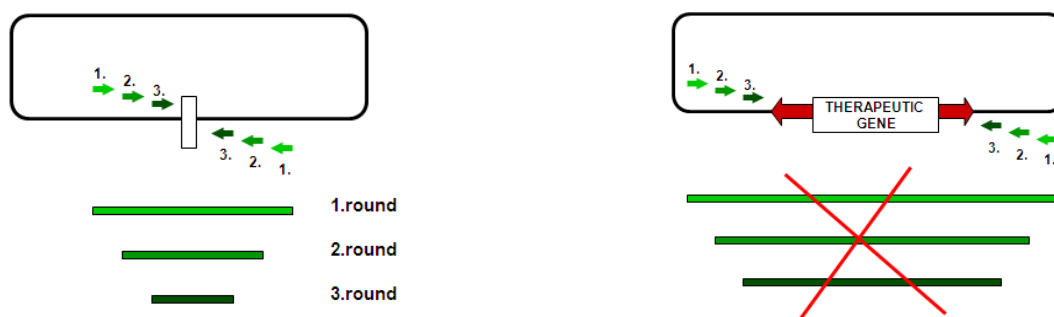


Exciziós esszé rövidebb-egyszerűbb

Cél: A transzpozon szekvencia donor plazmidból történő kivágódásának igazolása. Ez olyan primerekkel történik egymásba ékelt PCR-ek segítségével (nested PCR), amelyek a donor plazmid gerincén tapadnak és az eredetileg köztük lévő transzpozon szekvencia hiányát mutatják ki a PCR termék kis mérete alapján. A PCR reakcióban a kisméretű termék keletkezése mindig hatékonyabb, ezért először a kivágódásnak megfelelő kisebb termék válik láthatóvá. Megjelenése a harmadik PCR termék futtatásánál a kivágódást igazolja. (Rövid extenziós idő mellett a nagyobb termék keletkezése nem detektálható.)

Az exciziós esszéhez legalább egy negatív kontrol transzfekeció szükséges, ahol nem adunk a transzfekecióhoz helper plazmidot, amelyről a transzpozáz expresszálódik. Pozitiv kontrol donor plazmiddal történő transzfekeció sem árt. Az esszével persze tesztelhetünk új transzpozáz enzimet is megfelelő kontrok mellett.



1. Transzfekeciót követő másodikon 48h-nál feltripszinezük a sejteket.
2. Legalább kétszeres térfogatú médiummal leállítjuk a tripszint, majd pipettával sejtekre szuszpendáljuk.
3. A sejtek egy részét 1,5-2ml-es eppendorf csőbe pipettázuk. (A mennyiség attól függ, mi egyebet akarunk még az adott transzfekecióval.) Transzfekeciót követő 48h-nál már meglehetősen konfluensek, ebben az esetben 6 lyukú plét egy lyukának 1/5-e már elegendő. Kb. 10^5 – 10^6 sejt. A minimum kiindulási mennyiséget még befolyásolhatja a transzfekeciós és exciziós hatékonyság, előbbi általában minimum 10% szokott lenni. Utóbbi függ a transzpozon konstrukciótól és az alkalmazott transzpozázttól, valamint a kettő arányától, ami általában 10:1.
4. Lefugáljuk 5 percig 3000rpm-en.
5. Felülúszót leöntjük, maradékot leszívjuk pipettával. Ebben az állapotában fagyasztható.
6. A plazmid izolálása kittel történik. (Qiagen Spin miniprep Kit.) A protokoll elejét azonban sejtenyészetre kellett módosítani.
7. 300ul P1 pufferben felsuszpendáljuk a sejteket.
8. 300ul 1,2%-os SDS-t adunk hozzá, majd 5ul Proteinase K-t (10mg/ml).
9. inkubálás 55 fokon 30 percig.
10. 400ul N3 puffert adunk hozzá.
11. Fuga 10 percig 13000rpm-en.
12. Felülúszót oszlopra pipettázuk.
13. Innentől a kit protokollja szerint járunk el:

1 perc fuga maxon (13000rpm).
Ami átment kiöntjük.
500ul PB-vel mossuk az oszlopot.
1 perc fuga maxon.
Ami átment kiöntjük.
750ul PE-vel mossuk az oszlopot.
1 perc fuga maxon.
Ami átment kiöntjük.
1 perc újabb fugálás maxon, az oszlop szárítása miatt.
Tiszta eppendorfbba tesszük az oszlopot.
30ul vizet pipettázunk az oszlop közepére.
1 percet várunk szobahőn.
1 perc fuga maxon.

A DNS-t megmérjük fotométerrel 20-szoros hígításból: 95ul víz + 5ul DNS. Közvetlen mérés előtt vakoljunk vízzel, háromszori egymás utáni leolvasást átlagoljunk. 30-50ng/ul koncentráció várható.

Első PCR 20ul-ben:

1ul puc1 primer (10uM)

1ul puc6 primer (10uM)

10-15ng DNS beméréssel. 10-szeresre hígított DNS-ből 3-5ul.

Program:

95 fok 5 perc

95 fok 30 sec

65 fok 30 sec

72 fok 1 perc

72 fok 5 perc

} 35x

Második PCR 50ul-ben:

2,5ul puc2 primer

2,5ul puc5 primer

100x híg első PCR termékéből 3ul.

Program ua.

Harmadik PCR 50ul-ben:

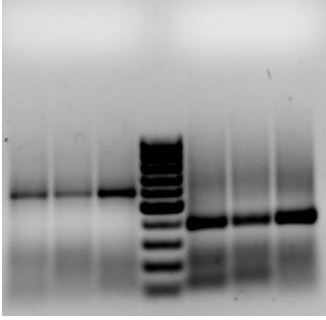
2,5ul puc3 primer

2,5ul puc4 primer

100x híg második PCR termékéből 3ul.

Program ua.

Második és harmadik PCR termék futtatása 5-10ul. De elegendő csak a harmadik termék is, ami 400bp körüli.



100bp SB+ SB- SB+ SB-

