

Integrációs esszé

beépült transzgén genomi helyének meghatározása (SB transzpozont tartalmazó klónok analízisére)

Splinkerette PCR

Genomi DNS emésztése:

1. 2ug gDNS-t 50ul-ben emészteni. (Vagy inkább 5ug-ot 100ul-ben.)
5ul 10xNEB4
1ul Bfal
1ul Ndel
Előtte kiegészíteni a DNS-t vízzel.
37 fok ON.
2. inaktiválás 80 fok 20perc
BSA pótlása (100x-ból kb. 0,5-1ul)
+ 30mM Tris
+ 50mM NaCl
+ 1ul Vspl vagy AseI
37 fok 3h
inaktiválás 65 fok 20perc.

Linker előkészítése – hibridizálás:

1. 75ul víz
+5ul 10xNEB2
+10ul Bfal linker sense T39 (100uM)
+10ul Bfal linker asense T51 (100uM)
2. 96 fok 2perc
3. Utána a blokkot egyszerűen kikapcsolni és ON hagyni magától lehűlni.

Emésztés kicsapása:

1. 1:1 térfogatarányban fenol-kloroform-izoamilalkohollal vortex
2. 5 perc fuga legalább 3000 rpm-en asztali fugán
3. felső vizes fázist átpipettázni másik csőbe
4. 1:1 arányban kloroformmal vortex
5. 5 perc fuga 3000rpm-en
6. felső vizes fázist átpipettázni másik csőbe
7. 1:1 arányban izopropanolt adunk hozzá, összeszuszpendáljuk
8. -70 fok ON.

9. Hűtött fugában (4 fok) maximumon 10 perc. Mivel a pellet nem biztos, hogy látszik, fontos a csövek orientációját megjegyezni a rotorban, hogy pipettával le lehessen szívni a folyadékot a pellet megsértése nélkül.
10. Leszívás.
11. + 80% Etanol
12. Hűtött fugában maximumon 10 perc ugyanolyan orientációban.
13. Leszívás.
14. Nyitott tetővel 37 fokon 2-3 perc szárítás
15. 25ul vízben felvesszük
16. DNS mérés 10x hígításból (6ul+54ul víz)

Linker ligálása:

1. 150ng kicsapott emésztett DNS-ből 10ul-es ligálás
2. +1ul 10xligáz puffer
3. +0,5ul T4 ligáz enzim
előtte kiegészíteni a DNS-t vízzel.
4. 22 fok ON.

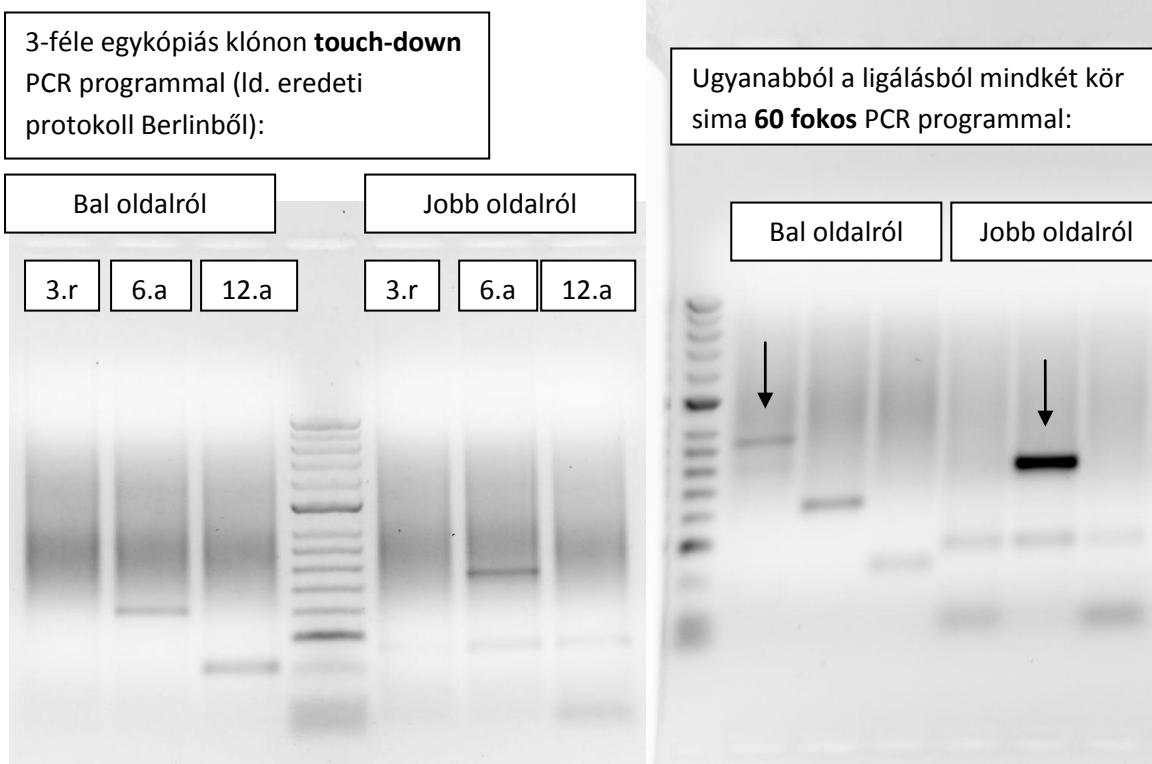
Nested PCR-ek:

Ezt a protokollt optimalizálni kellett, mivel az eredeti protokoll csak néha adott elég halvány terméket.

Eredetileg két hagyományos nested PCR volt 1ul-es bemérésekkel 20ul-ben (Promegás 2xMix):

Balról 1.kör – **T40/41** ebből 2.kör – **T72/42**. (T40 és 72 linkerre tapad, 41 és 42 IRDR-L-re.)

Jobbról 1.kör – **T40/43** ebből 2.kör – **T72/44**. (T43 és T44 IRDR-R-re tapad.)



Touch-down PCR program:

1. kör:

94 fok-5 perc
94 fok – 30mp
65 fok – 30mp 15x
72 fok – 3 perc
94 fok – 30mp
63 fok – 30mp 5x
72 fok – 2mp + 2mp/ciklus
94 fok – 30mp
60 fok – 30mp 5x
72 fok – 12mp + 2mp/ciklus
94 fok – 30mp
58 fok – 30mp 5x
72 fok – 22mp + 2mp/ciklus
94 fok – 30mp
55 fok – 30mp 5x
72 fok – 3 perc
75 fok – 5 perc

2. kör:

94 fok – 5 perc
94 fok – 30mp
63 fok – 30mp 10x
72 fok – 3 perc
94 fok – 30mp
55 fok – 30mp 20x
72 fok – 3 perc
72 fok – 5 perc

60 fokos PCR profil:

mindkét körre

94 fok 5 perc
94 fok 1 perc
60 fok 30 mp 40x
72 fok 3 perc
72 fok 10 perc

Megerősítésként a termékeket gélből kivágtam és kipucoltam, majd ismételve a PCR-t ha ugyanazt a terméket kaptam vissza, ez került szekvenálásra.

Habár hatékonyabbnak tűnik a sima PCR, érdemes először a szigorúbb PCR-t elvégezni és amit lehet ebből szekvenálni, mert a túl-PCR-ezés nem eredményez tisztán szekvenálható terméket.

A sima 60 fokos profilt csak abban az esetben érdemes felrakni, amelyekben a touch-down nem adott terméket.

Látható, hogy ezek a PCR-ek számos esetben csak elég halvány terméket adtak.

Más DNS-eken egyáltalán nem kaptam PCR terméket. Feltehetően azért, mert a linker minden emésztett DNS fragmentum végére odaligál, így a linkeres primerről történő extenzió „elviszi” a PCRT.

Nem működő esetekben ki lehet próbálni másik két PCR sémát a sima 60 fokos profillal 1ul-es bemérésekkel 20ul-ben Promegás 2xMix-szel.

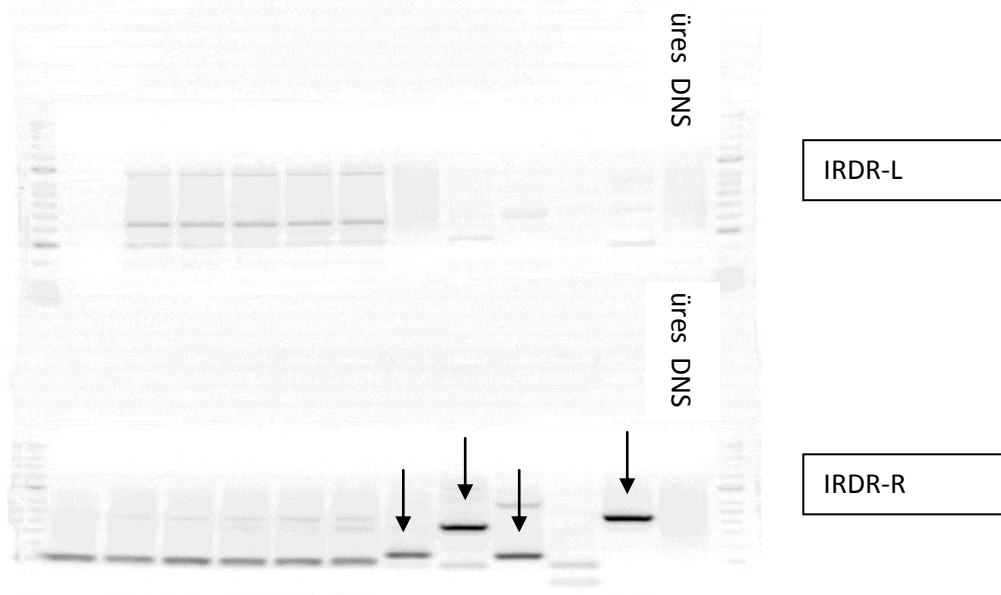
(Ezeknél először csak a transzpozonos primert alkalmazzuk, ami lineáris PCR-ben csak a specifikus szekvenciákat dúsítja fel.)

Az egyik:

Balról 1.kör – T41 ebből 2.kör – T42/T40vagyT72.

Jobbról 1.kör – T43 ebből 2.kör – T44/T40vagyT72.

A képen nyíllal jelzettek szép szekvenálást adtak, újabb PCR-es megerősítés után.

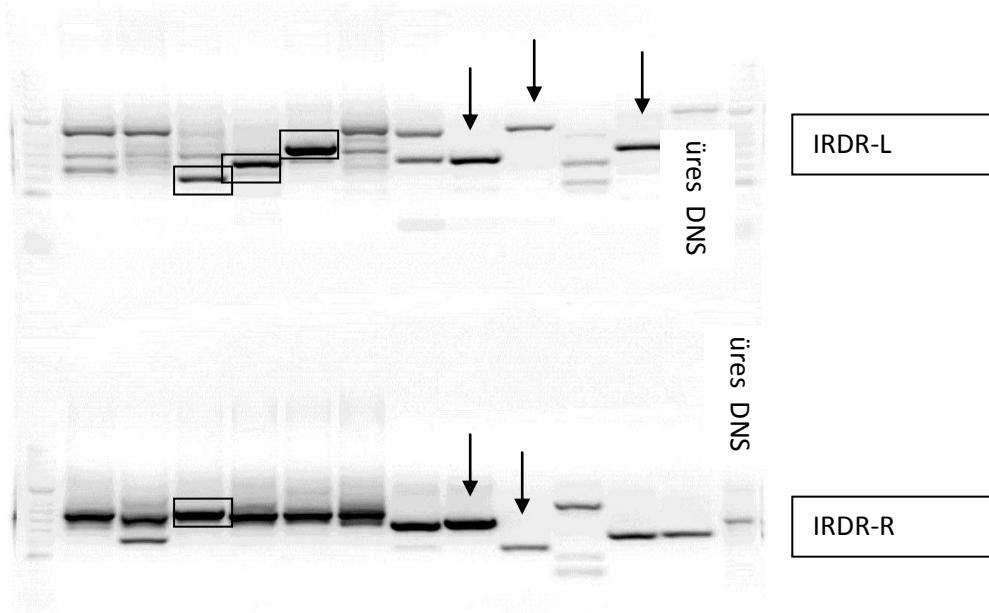


A másik:

Balról 1.kör – T41 ebből 2.kör – T42 ebből a 3.kör – T42/T40vagyT72.

Jobbról 1.kör – T43 ebből 2.kör – T44 ebből a 3.kör – T44/T40vagyT72.

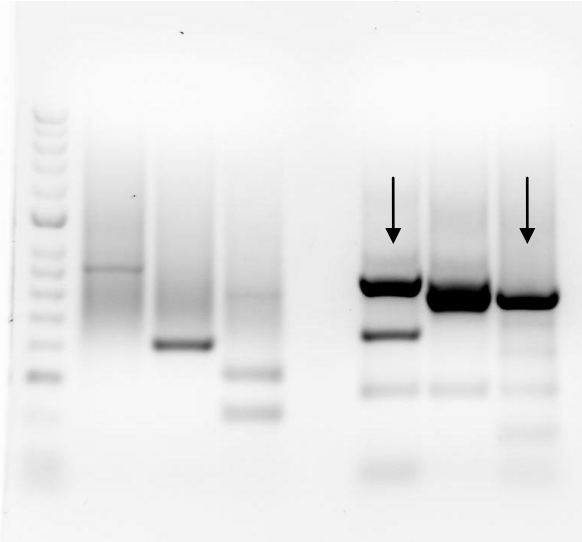
A nyíllal jelzettek szép szekvenálást adtak valamelyik irányból, a keretezettekél több szekvenancia látható a szekvenáláson, ezért utóbbiakat beklónoztam pGEM-be és onnan szekvenáltunk.



Ezzel a sámmal több esetben kaptam terméket, bár kevésbé voltak direkt módon szekvenálhatóak. A négy beklónozott inzertből csak kettő tartalmazott transzpozonos szekvenciát. A beklónozottaknál egy esetben két darab bal oldali transzpozon vég ligálódhatott egymásra a pGEM-es szekvenálás alapján mellettük különböző rövid genomi környezettel. Ez magyarázhatja a két primertapadási

pontról történő szekvenálást, de inkább úgy tűnik, hogy több hasonló méretű esetleg aspecifikus termék is lehet a kivágott termékekben, hiszen az üres genomi DNS-sel végzett protokoll is adott halvány terméket és a pGEM klónoknak csak fele tartalmazott transzpozonos szekvenciát.

Megerősítésként az először mutatott egy kópiás klónok ligálásaiból is kipróbáltam az előbbi protokollt (amikből az eredeti két körös nested PCR is működött ld. legelöl):



Látható, hogy ugyanazokat a termékeket kaptam, mint az eredeti protokoll szerint. Ráadásul több klón esetén kaptam terméket, mint az eredetivel. Vagyis az optimalizált PCR feltehetően megbízható, viszont a túl-PCR-ezés vagy a többféle szekvencia miatt szükség lehet a termék beklónozására.

Inverz PCR

A protokoll lényege az lenne, hogy olyan enzimmel kell emésztetni, ami az integrálódott fragmentet nem vágja el, hanem a genomban a két oldalán valahol vág. Az ilyen emésztést nagyobb hígításban ligálva az inzertet és a környező DNS-t tartalmazó fragment cirkularizálódik. Erről az inzert két oldalán „kifelé” extendáló primerekkel lehet PCR-ezni a körré zárult kétoldali környezetet.

Mivel a transzpozon tartalom elég változatos, minden esetben külön kellene ilyen enzimet keresni. Én nem vettem erre a fáradságot. Arra lehet valami esély, hogy ha töményen ligálom a transzpozonban is vágó tisztított emésztést, esetleg a transzpozonos végek is egymásra ligálnak – nagyobb kópiánál ez az esély jelentősebb.

Kétféle emésztéssel próbálkoztam.

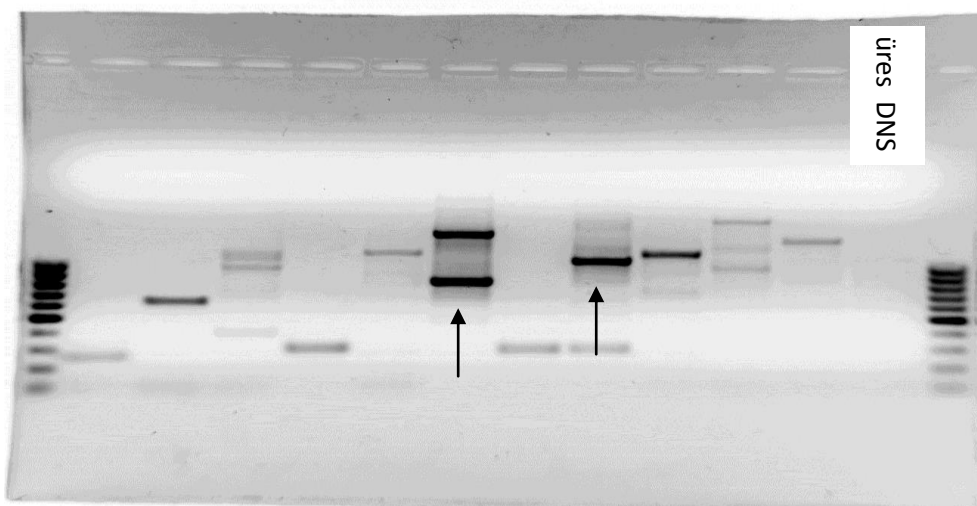
A **splinkeretthez végzett Bfal emésztett és kicsapott DNS-ből** linker nélkül raktam össze ugyanazt a ligálást. 2ul-es bemérésekkel 20ul-ben Promegás 2xMix-szel.

Ebből kiindulva többféle transzpozonos primerrel próbálkoztam.

A következő esetben kaptam terméket:

1.kör – T41, 2.kör – T42.

A **PCR profil** ugyanaz volt, mint a 60 fokos PCR-nél, de **55 fokon**.



A három legerősebb csíkot beklónoztam pGEM-be, a nyíllal jelölt 2 inzert tartalmazott valódi transzpozonos integrációt, bár az üres DNS (utolsó) nem adott aspecifikus terméket.

A genomi DNS-t **BamHI-el emésztettem és ebből is végeztem inverz PCR-t.**

Genomi DNS emésztése:

1. 5ug gDNS-t 100ul-ben emésztani.
10ul 10xBuffer G (Fermentas)
2ul BamHI
3ul BclI
Előtte kiegészíteni a DNS-t vízzel.
37 fok ON.
2. inaktiválás 80 fok 20perc
BSA pótlása (100x-ból kb. 0,5-1ul)
+ 1ul BclI
55 fok 1h
inaktiválás 80 fok 20perc.

Emésztés kicsapása ligálás ugyanaz, mint a Bfal-nél.

Itt is többféle transzpozonos primerrel próbálkoztam.

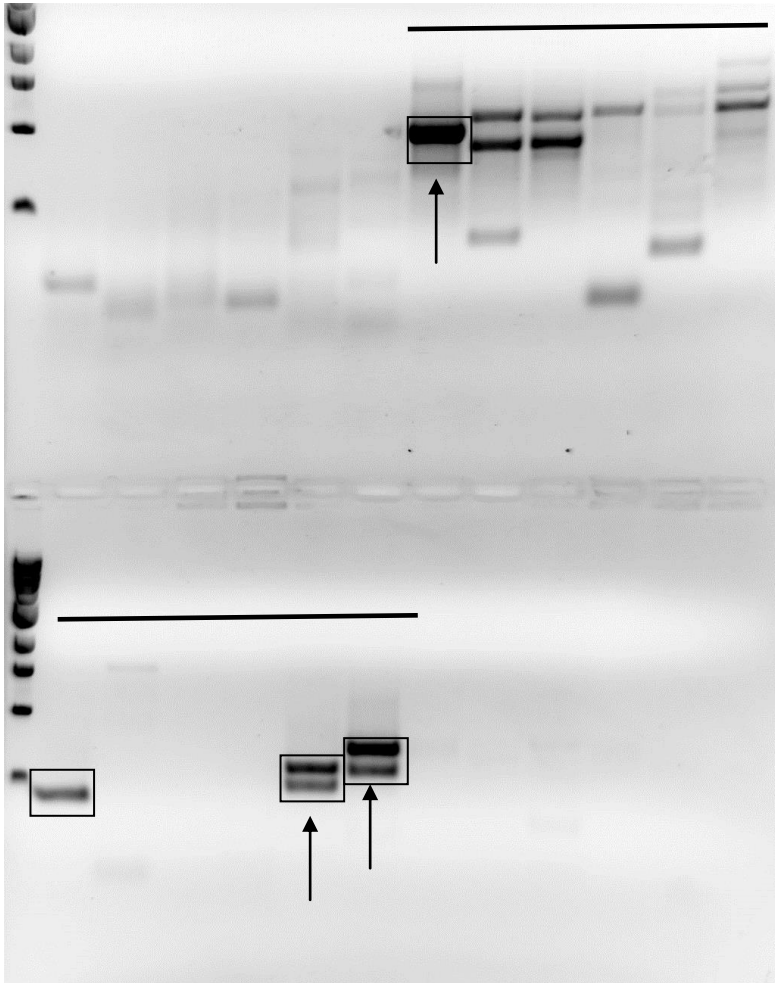
Hasonló séma vezetett valami eredményre, mint a Bfal emésztésnél.

2ul-es bemérésekkel 20ul-ben Promegás 2xMix-szel.

Itt a T24 primer hol az IRDR-L, hol pedig az IRDR-R belső oldalánál van, transzpozontól függ. A T25 primer a másik oldali párja.

1.kör – T24, 2.kör – T41, 3.kör – T42.

A foton a csíkkal jelzett sávok mutatják ezt a PCR-t.



A keretezetteket beklónoztam pGEM-be, a nyíllal jelöltekénél szekvenáltam transzpozonos inzertet. A kétféle méretű termékeknél mindkettőre izoláltam pGEM klónokat, amik eltérő integrációs helyeket tartalmaztak a szekvenálás alapján.

A transzpozonos pGEM klónokat beraktuk a plazmidtörzsbe, a konkrét integrációs helyeket kétféle táblázat tartalmazza word dokumentumban:

Egykópiás HEK klónok integrációs helyei

iPS klónok integrációs helyei.

Összefoglaláskép elmondhatjuk, hogy az összes protokollt kipróbáltuk, 8+6 klónból kettő iPS-nél és egy HEK klónnál nem tudtunk integrációs helyet megállapítani.

Nem mindegyik protokoll működött bármelyik mintán, és azt sem tudtam feltétlen megismételni. Szerencsés esetben jól szekvenálható terméket kapunk a PCR-ben, más esetben viszont klónozni kell. Tegyük hozzá, hogy nem próbáltam minden terméket megszekvenálni illetve beklónozni és a klónozás sem sikerült minden esetben. Utólag úgy gondolom, hogy a halványabb PCR termékekkel is érdemes próbálkozni.

A jegyzőkönyvünk alapján legközelebb már csak ezeket a protokollokat érdemes végigvinni.