# cDNA-kirjaston seulonta ei-radioaktiivisen plakkihybridsaation avulla

### Tiivistelmä

Työn tehtävänä on löytää ja eristää valmiista cDNA-kirjastosta klooni, joka kantaa koko cDNA sekvenssiä ihmisen lihaksen gykogeenisyntaasi-geenistä, käyttäen 3’ terminaalin segmenttiä geenistä templaattina spesifiseen koettimeen, joka leimataan digoksigeniinillä (DIG). Työ suoritetaan kahdella seulontakerralla, jotta positiivisten plakkien kokonaismäärä kasvaisi. Lopputuloksena pystyimme paikantamaan 46 positiivista kantajaa kasvatusmaljallamme, jolla oli 47 plakkia.

### Tausta

Työssä käytetty cDNA-kirjasto on tehty ihmisen lihaskudoksesta. Lihassolusta eristetyt mRNA-molekyylit on käännetty käänteistranskriptaasilla cDNAksi ja kloonattu faagivektoriin. Seulonnassa paikannetaan faagien muodostamia plakkeja. cDNA-kirjasto edustaa niitä geenejä, joita solussa sillä hetkellä ilmennetään ja ei sisällä promoottorialuetta geeneille.

Työssä valmistettu DIG-koetin valmistetaan käyttämällä DIG-leimattuja nukleotidejä tutkittavalle geenille spesifiseen koettimen valmistuksessa. Koetin valmistetaan lineaarisella PCR-reaktiolla ja leimataan lisäämällä normaalien dNTP:ien sekaan DIG-11-dUTP-konjugaattia ja dTTP:tä. Onnistuneet yksijuosteiset DIG-leimatut koettimet voidaan löytää korkean affiniteetin omaavilla DIG-vasta-aineilla (anti-DIG-AP). DIG-koetin on turvallinen, hyvin sensitiivinen ja erinomaisesti säilyvä.

Lineaarinen PCR käyttää vain yhtä aluketta. Toisin kun normaalissa PCR:ssä, templaatin määrä ei lisäänny joka kierroksella (eksponentiaalinen kasvu), vaan leimatun koettimen määrä lisääntyy lineaarisesti. Työssä käytimme etukäteen monistettua kaksijuosteista koetintemplaattia, josta teimme DIG-koettimen.

Isäntäbakteerien (E. coli LE392) kasvatus tehtiin L-liemessä, joka sisälsi 0,2% maltoosia (indusoi faagireseptorin ekspression bakteerissa) ja 10mM MgSO4 (stabiloi faagin absorption bakteeriin). Bakteerit infektoitiin valmiilla rekombinanttifaagistokilla ja maljattiin MgSO4-L-maljoille.

Maljoilta nostettiin kuva faageista positiivisesti varautuneille nitroselluloosamembraaneilla, jolle faagit replikoituvat. Maljojen käsittely alkaa emäskäsittelyllä, jossa faagipartikkelit hajoavat, mutta DNA ja proteiinit jäävät membraanille negatiivisen varauksensa vuoksi. Neutraloinnissa ja korkeassa suolapitoisuudessa suoritetussa pesussa DNA-säilyy yksijuonteisena ja membraanin pinnalla, mutta proteiinit ja muu epähaluttu materiaali peseytyvät pois. DNA kiinitetään kovalenttisesti membraaniin UV-crosslinkkerin avulla.

Esihybridisaatiossa membraanille jäänyt, edelleen varautunut, tyhjä tila tulee peittää ennen tunnistimen lisäystä käyttämällä valmista blokkausregeanssia (sisältää esim. epäspesifista DNA:ta). Blokkaus vähentää epäspesifistä sitoutumista. Hybridisaatiossa lisätään yksijuosteista koetinta, joka kiinnittyy membraanilla komplementaariseen sekvenssiin. Hybridisaatio tapahtuu korkeassa lämpötilassa ja matalassa suolapitoisuudessa, joka nostavat pariutumisen spesifisyyttä ja irroittavat epäspesifiset koettimet. Hybridisaation jälkeen membraania pestään korkeassa suolapitoisuudessa epäspesifisesti sitoutuneiden koettimien poistamiseksi.

Membraanit seulotaan DIG-koettimella. Positiiviset kloonit tunnistetaan spesifisellä vasta-aineella (anti-DIG-AP), joka sitoutuu koettimen DIG-leimaan. Vasta-aineeseen on liitetty alkaalinen fosfataasi-entsyymi, joka pilkkoo membraanille lisätyn CSPD-substraatin, jonka tuloksena syntyy valokvantteja, jotka voidaan tallentaa röntgenfilmille. Vasta-aine sitoutuu vain niihin kohtiin missä on DIG-leimattua koetinta. Tuloksena on positiivisten (etsityn cDNA:n kantajat) plakkien näkyminen filmillä mustina pisteinä.

Filmillä on myös etsittävän cDNA:n suhteen negatiivisia plakkeja. Filmiltä positiiviseksi todetut plakit eristetään ja suoritetaan uusi seulontasarja, tarkoituksena saada puhdas faagikloonisarja.

### Aineisto ja menetelmät

#### Isäntäbakteerin kasvatus (primaariseulonta)

20ml L-liemeen lisätään 200ul maltoosia ja 200ul MgSO­­4, jotta pitoisuudeksi saadaan 0,2% maltoosi ja 10mM MgSO­4. Liemi inokuloidaan 400 ul:la valmiista E. coli LE392 kasvatusta. Kurssivihon mukaisesti kasvatetaan ja mitataan kunnes OD580 arvo on 0.959. Samanaikaisesti valmistetaan kurssivihon mukaisesti 10-1­ – 10-4 -diluutiosarja valmiista faagistokista 1ml eppendorf putkiin, siirtämällä 0.1ml edeltävää laimennosta 0.9ml SM-puskuria. Laimennoksista -2 , -3 ja -4 siirretään 0.1ml edelleen kolmeen uuteen eppariin, tuloksena laimennokset 10-3, 10-4 ja 10-5. Lopputyö suoritetaan kurssivihon mukaisesti, valmistetut laimennosmaljat jätetään 37C-kaappiin:n kasvamaan yön yli.

Ensimmäisenä päivänä kasvatetut ja infektoidut maljat olivat kontaminoituneet tuntemattomalla kasvustolla ja plakkeja ei näkynyt juuri lainkaan. Uusi kasvatus tehtiin valmiilla kasvatetulla liemellä, käyttäen kurssikirjan ohjeita pienillä muunnoksilla. Tälläkertaa bakteeria kasvatettiin kunnes OD580 oli lähes 1.2 ja kolmosvaiheen resuspensoiti tehtiin 1:1 SM-bufferiin (700ul). Laimennussarja tehtiin niin, että maljalle pipetoitavat faagilaimennokset olivat 10-4, 10-5, 10-6, 10-7.

#### DIG-koettimen valmistus, Lineaarinen PCR

Tehtiin ohjeen mukaan. PCR-reaktion tulokset tarkistettiin agaroosigeelielektroforeesissa (Tulokset, Kuva 1). Geeliä varten PCR-näytteestä otettiin 5ul ja lisättiin 1ul 6xLoading dye.

#### Plakkiliftit

Jopa meidän 10-7 –maljamme oli niin syöty, että yksittäisiä plakkeja ei voinut erottaa ja tiitteriä ei voitu laskea. Käytimme työhön ryhmän 4 toista 10-7 maljaa. Työ tehtiin ohjeiden mukaan. Valmistimme: 500ml *2x SSC-liuosta*: 50ml 20x SSC-stock, 450ml MQ-vettä.

#### Hybridisaatio muovipusseissa

Työ tehtiin ohjeiden mukaan yhdessä ryhmän 4 kanssa, paitsi kohdassa neljä jossa lisäsimme 10ul DIG-koetinta. Valmistimme seuraavat liuokset: 250ml *0,3x SSC*: 3,8 ml 20x SSC + 246,2 ml MQ-vettä. 500ml *2X SSC + 0.1% SDS*: 5ml 10% SDS + 20ml 20xSSC-stock + 475ml MQ-vettä.

#### Posthybridisatiopesu

Tehtiin ohjeiden mukaan yhdessä ryhmän 4 kanssa.

#### Kemiluminesenssidetektio

Työ tehtiin ohjeiden mukaan yhdessä ryhmän 4 kanssa. Valmistimme liuokset: *”Detection buffer, 0.1M NaCl 0,1M Tris-HCl pH 9.5*”: 10ml 1M NaCl + 10ml 1M Tris-HCl + 80ml MQ-vettä. *”Blocking solution, 1:10 blocking regeant, maleiinihappopuskuri”:* 10ml blocking regeant + 90ml valmis maleiinihappopuskuri.

#### Positiivisten kloonien poiminta

Teimme ohjeen mukaan sekundaarista seulontaa varten oman faagistokin. Lisäksi poimimme kaksi PCR-näytettä 50ul MQ-veteen PCR-seulontaa varten. Ensimmäiseen (Näyte 1) otettiin muutama kummallakin filmillä positiivisena näkyvä plakki, toiseen (Näyte 2) kolme positiivisena näkyvää plakkia maljan reunalta(Tulokset, Kuva 2). Ensimmäiseen näytteeseen tuli mukaan jonkin verran agaria, toiseen ei lainkaan.

#### PCR-seulonta

Työ tehtiin ohjeiden mukaan. Näytteeseen johon tuli mukaan myös Agaria lisättiin 50ul MQ-vettä. Käytetössä oli dNTP oli 5mM, laimensimme sen 1mM, jolloin 2x PCR reaktiomixiin pipetoitiin sitä 2ul 10ul sijasta ja positiiviseen kontrolliin 1ul 5ul sijasta. Puuttumaan jäänyt tilavuus täytettiin MQ-vedellä. PCR-jätettiin pyörimään yön yli. Seuraavana päivänä PCR-reaktion tarkistamiseksi ajettiin 10ul kumpaakin näytettä ja 2 ul 6x-loading dye agaroosigeelielektroforeesissa (Tulokset, Kuva 3).

#### Sekundaariseulonta

Isäntäbakteerin kasvatus tehdään kuten ohjekirjassa, tälläkertaa 10ml L-lientä, jossa 100ul maltoosia ja 100ul MgSO4. Inokuloidaan liemi ja seurataan OD580, kunnes arvo 1,170. Otetaan näytteestä 1,5ml kahteen eppendorf-putkeen, jotka sentrifugoidaan kurssivihon ohjeiden mukaan. Resuspensoidaan näytteet 750ul:n SM-bufferia. Faagidilluutiosarja tehdään 10-1 – 10-6, niin että laimennetaan 50ul edeltävää faagilaimennosta 450ul:n SM-bufferia. Koska liuoksessa on kloroformia aiemmasta työstä, faageja vortexoidaan tavallista enemmän ennen joka laimennosta. Jatketaan laimennossarja lasiputkiin niin, että maljattavat laimennukset ovat 10-2 – 10-7.

Maljat onnistuivat erinomaisesti ja pystyimme laskemaan tiitterin:

47 pfu + 407 pfux 10 =4,127x109 pfu/ml

10-6 ml+ 10-7ml

Jatkoimme eteenpäin 10-7 –maljalla, jolla oli 47 selvää plakkia hyvin erillään toisistaan niin, että ne olisi helppo poimia. 10-6 maljalla oli 407 plakkia, osin päällekkäin, eli liikaa. Teimme työn 3 yhdessä ryhmän 4 kanssa ohjeiden mukaan, käytimme liuoksia jotka valmistimme edeltävällä viikolla.

#### Hybridisaatio putkissa ja posthybridisaatiopesu

Teimme työn ohjeiden mukaan ryhmän 4 kanssa.

#### Kemiluminesenssidetektio

Tällä kertaa teimme CSPD-substraattia 1:100 suhteessa 2ml, jotta voisimme pipetoida 500ul laimennosta jokaiseen neljästä pussistamme (ohjeessa 300ul), koska viimekerralla puolikas kummastakin kalvostamme jäivät haaleiksi/signaalittomiksi (Tulokset, Kuva 2). Yksi näytteistämme vuosi, mutta pussi korjattiin ennen filmin valotusta.

### Tulokset

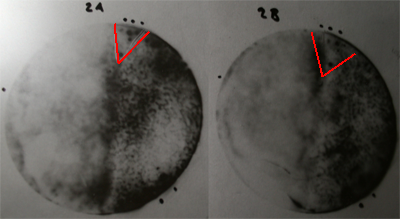
#### DIG-koettimen valmistus, lineaarinen PCR



Kuva . Kuva agaroosigeelistä näytteillä, jotka tehtiin lineaarisen PCR:n tuloksista. Urilla 1, 6, 9 molekyyli- painomarkkeri (GeneRuler 1kb DNA ladder mix). Näyteet 2 ja 3 ovat kontrolleja, jotka eivät sisällä DIG. Näytteet 4,5,8 sisältävät DIG-leimatun koettimen. Meidän näytteemme uralla 4. PCR on onnistunut, näytteessä ei ole kovin paljon vapaita nukleotidejä. DIG-koettimen valmistaminen on onnistunut ja sitä on paljon.

DIG-koettimen valmistus onnistui ja pystyimme käyttämään omaa koetintamme joka vaiheessa.

#### Primaariseulonnan tulokset



Kuva . Röntgenfilmi näyttää epätasaisen signaalin, vain puolet membraanista näyttää ”valoittuneen” On mahdollista, että CSPD-substraatti ei ollut tasaisesti levinnyt koko membraanille. Toisessa pussistamme on joitakin ilmakuplia, jotka ovat voineet haitata valoittumista. Kolmen pisteen merkin alle piirretyn kolmion alueelta otettiin kaikki näytteet seuraaviin töihin.

Vaikka kalvo olikin valoittunut huonosti, otimme plakit sekundaariseulontaa varten kolmion näyttämältä kohdalta, jossa oli selkeästi näkyviä mustia plakkeja molemmilla kalvoilla.

#### Sekundaariseulonnan tulokset



Kuva , Röntgenfilmi sekundaariseulonnan jälkeen. Erinomaisesti onnistuneet filmit, 46 selkeää mustaa täplää jotka ovat samat kummallakin filmillä.

Koska maljalla jolta membraanikuvat otettin oli 47 plakkia, positiivisten plakkien määrä 46/47= 98% .

#### PCR-seulonnan tulokset



Kuva . Kuva agaroosigeelistä näytteillä, jotka tehtiin PCR:llä käyttämällä primääriseulonnassa röntgen-kalvoilla positiivisina näkyvillä faageilla. Molekyylipainomarkkeri (Generuler 1kb DNA ladder mix) urilla 1 ja 14. Näytteemme urilla 8 (pos. kontrolli), 9 (Näyte, jossa putkessa oli mukana agar), 10 (agariton).

Kaikissa näytteissä nähtävissä n. 500kb:n kokoinen DNA-fragmentti, eli ne ovat positiivisia. Toisessa näytteessämme ollut agar ei ole häirinnyt PCRää. Positiivinen kontrolli ei ole onnistunut meillä, eikä ryhmällä 1 (ura 7) ja 2 (13), voi olla että se oli liian digestoitunut tai vanhentunut. Kummassakin näytteestämme löytyy positiivisia PCR fragmentteja.

### Tulosten tarkastelu

DIG-koettimen valmistus onnistui ja sen avulla etsimme positiivisia plakkeja kahtena seulontakertana, jotta positiivisten kloonien kokonaismäärä olisi suurempi ennen jatkovaihetta. Sekundaariseulonnan tuloksena 10-7 –maljallamme oli 98% positiivisia plakkeja. Olimme siis onnistuneet poimimaan primaariseulonnan röntgenkuvien perusteella positiivisia plakkeja ja maljanneet ne onnistuneesti. Kokonaisuudessaan työ onnistui erinomaisesti.

### Lähteet

Tekemiseen käytetty yleisiä lähteitä kuten wikipedia, solunetti, kurssin luentokalvot, geenitekniikan luentojen luentokalvot ja kurssin työvihko.