



M Ű E G Y E T E M 1 7 8 2

Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem
Vegyésszmérnöki és Biomérnöki Kar
Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék

Nagy Kinga

Biomérnök szakos hallgató, MSc. II. évfolyam

A genomi uracil előfordulásának és eloszlásának vizsgálata



Témavezető: Dr. Vértessy G. Beáta egyetemi tanár
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék
MTA SzBK Enzimológiai Intézet

Konzulens: Scheer Ildikó PhD. hallgató
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék

**TDK dolgozat
BUDAPEST, 2013**

XXXII. OTDK Biológia Szekció

Tartalomjegyzék

1	Bevezetés és irodalmi áttekintés	3
1.1	DNS károsodás és hibajavítás.....	3
1.2	Uracil a DNS-ben	4
1.2.1	Uracil a DNS-ben mint „hiba”	4
1.2.2	Uracil a DNS-ben normál élettani körülmények között.....	6
1.3	Az UDG enzimcsalád	7
1.4	A DNS-ben előforduló uracil detektálásának módjai.....	8
2	Célkitűzés.....	10
3	Anyagok és módszerek	11
3.1	Uracil tartalmú plazmid előállítása.....	11
3.2	Genomi DNS izolálás <i>Escherichia coli</i> sejtekből.....	12
3.3	Klónozás pET20b vektorba	12
3.4	UNG konstruktok transzformálása BL21 sejtekbe	15
3.5	A fehérjék próba expressziója	15
3.6	DNS koncentráció meghatározás Nanodrop UV-spektrofotométerrel	16
3.7	DNS minták vizsgálata agaróz gélelektroforézissel	16
3.8	Elektroforetikus mobilitás teszt (EMSA)	17
3.9	Agaróz-assay	17
3.10	Dot-blot.....	18
4	Eredmények és értékelésük.....	21
4.1	DNS minták vizsgálata agaróz gélelektroforézissel	21
4.2	A fehérjék próba expressziója	22
4.3	Elektroforetikus mobilitás teszt (EMSA)	23
4.4	Agaróz-assay	24

4.5	A dot-blot módszer optimalizálása	25
4.5.1	A minták membránra történő felvitelének módja	25
4.5.2	A felhasznált membrán nedvesítési kísérlete	28
4.5.3	A DNS membránhoz történő rögzítése	29
4.5.4	Aspecifikus kötődések vizsgálata.....	30
4.5.5	A dot-blot módszer kvantifikálása	30
5	Összefoglalás.....	32

1 Bevezetés és irodalmi áttekintés

1.1 DNS károsodás és hibajavítás

A DNS-ben történő változások, hibák (mutációk) folyamatos javítása minden élőlény számára nélkülözhetetlen. A mutációkat csoportosíthatjuk abból a szempontból, hogy az örökítőanyagban milyen mértékű változást okoznak.

A génmutáció (ezt gyakran pontmutációnak is nevezik) egy bázist érint, és különböző módon jelentkezhetsz: bázisbetoldás/addíció, báziskiesés/delécíó és báziscsere/szubsztitúció. A báziscsere lehet tranzíció (azonos típusú bázisok cseréje), valamint transzverzió (purin bázis pirimidin bázisra cserélődik, illetve fordítva). A génmutációkat négy csoportra oszthatjuk a szerint, hogy milyen hatással vannak a keletkező fehérjetermékekre. Silent, azaz „csendes” mutációról beszélünk, amikor a kodon változik, de ez nem eredményez más aminosavat. Neutral, vagyis „semleges hatású” mutációról, amennyiben a mutáció ugyan más aminosavat eredményez, de az hasonló tulajdonsággal bír, mint az eredeti, így a fehérje tulajdonságaira nincs lényegi hatással. Missense mutációról akkor beszélünk, ha a mutáció olyan aminosav változást eredményez, amely már kihat a fehérje szerkezetére, funkciójára. Ez jelentheti a funkció megváltozását, vagy akár annak teljes mértékű elvesztését is, bár a fehérje hossza az eredetivel megegyező marad. Nonsense mutáció esetén a kodon oly módon változik meg, hogy már nem aminosavat, hanem stop kodont fog kódolni, így a keletkező fehérje az eredetinel rövidebb lesz, ami szintén komoly hatással lehet mind a szerkezetre, mind pedig a funkcióra. A negyedik fajtája a génmutációknak a frameshift, azaz kereteltolódást okozó mutáció, ahol egy vagy több bázispár kiesése, vagy beékelődése hatására a leolvasási keret a kódoló szekvencián belül eltolódik, így a mutáció helye után a DNS teljesen más aminosav sorrendet határoz meg. A fehérje hossza és szekvenciája a mutáció helyétől C-terminális irányban változik.

A genomban bekövetkező nagyobb mértékű változások esetén pedig beszélhetünk kromoszóma mutációról, mely több gént érintő elváltozás, illetve genom mutációról, mely az örökítőanyag egészét érintheti. [1]

A DNS számos külső behatásnak lehet kitéve, melyek különböző mértékben képesek rontcsolni a szerkezetét. Ilyenek például az ionizáló sugárzások, melyek száltöréseket okozhatnak a kettős hélix egyik, vagy mindkét szálán, illetve az UV-sugárzás, amely timin dimerizációt okozhat. Bázisanalógok (pl.: bróm-dezoxiuridin) beépülése a DNS replikáció során az eredeti szekvencia megváltozását eredményezhetik. Különböző alkilezőszerek etil-, illetve metil-csoportot kapcsolhatnak a bázisokhoz, pl.:guaninhoz metil-csoport, melyből ezáltal O⁶-metilguanin keletkezik, amely citozin helyett már timinhez fog kapcsolódni. Nagy veszélyt jelentenek a normál metabolizmus melléktermékei, a reaktív oxigéngyökök is, melyek a bázisok oxidatív változását eredményezik.

Ezek és még számos károsító hatás ellen különféle javítómechanizmusok alakultak ki az élőlényekben. A hibajavítási mechanizmusokat annak alapján csoportosítják, hogy 1/ a mutációt okozó kémiai reakciót fordítja-e meg, ez a direkt hibajavítás, vagy 2/ a hibás bázis(oka)t vágja-e ki, s helyettesíti a megfelelő bázissal, ez az ún. excíziós (kivágásos) hibajavítás. A kivágásos hibajavításon alapuló hibajavító mechanizmusokat két részre oszthatjuk aszerint, hogy a károsodás a DNS egy-, vagy mindkét szálát érinti-e. Az egy szálát érintő hibáknál a javítás a másik szál segítségével történik. Ezek lehetnek például: az össze nem illő párok javítása (mismatch repair, MMR), báziskivágó hibajavítás (base excision repair, BER), valamint nukleotidkivágó hibajavítás (nucleotide excision repair, NER). A két szálát érintő károsodásoknál (pl. száltörés) vagy a nem homológ végek összekapcsolásával, vagy homológ rekombinációval történik a hibajavítás. [2] [3] [4] [5]

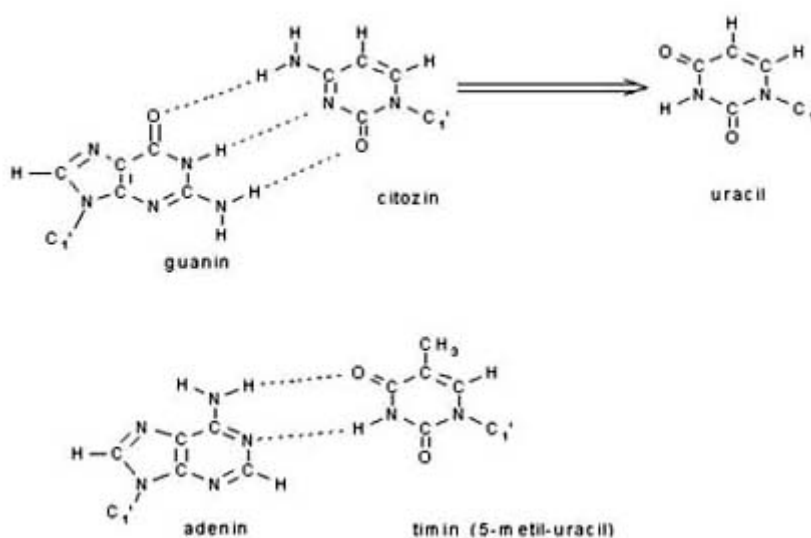
1.2 Uracil a DNS-ben

1.2.1 Uracil a DNS-ben mint „hiba”

Normál esetben a DNS nem tartalmaz uracilt, ellentétben az RNS-sel, amelybe timin helyett az uracil épül be. Ez a helyettesítés azért jöhet létre a kódolt információ megváltoztatása nélkül, mert az uracil és a timin szerkezetileg szinte teljesen megegyezik, csupán egy metil-csoport az eltérés, amely viszont a hidrogén kötésekben nem vesz részt, így a bázispárosodási mintázat uracil és timin esetén azonos. A DNS-polimerázok általában nem képesek különbséget tenni az azonos bázispár-képzési hajlammal bíró, egymástól csupán egyetlen metil csoportban különböző uracil és timin között, így az uracil hibásan timin helyett

beépülhet a DNS-be. Ez, bár a bázispárosodási mintázatot nem változtatja meg, nagy mennyiségben káros a sejt számára, ugyanis az evolúció során a különböző DNS-kötő fehérjék többnyire a „normális”, azaz timint tartalmazó DNS-hez idomultak. Így például egyes transzkripció faktorok DNS felé mutatott affinitása megváltozik, ha timin helyett uracilt tartalmaz a felismerőhely, emiatt nagy mennyiségű timint helyettesítő uracil jelentős torzulást okozhat a sejt expressziós mintázatában. Amennyiben a genom csaknem teljes mértékben uracilos, a sejt növekedése és osztódása gyakorlatilag ellehetetlenül. [6]

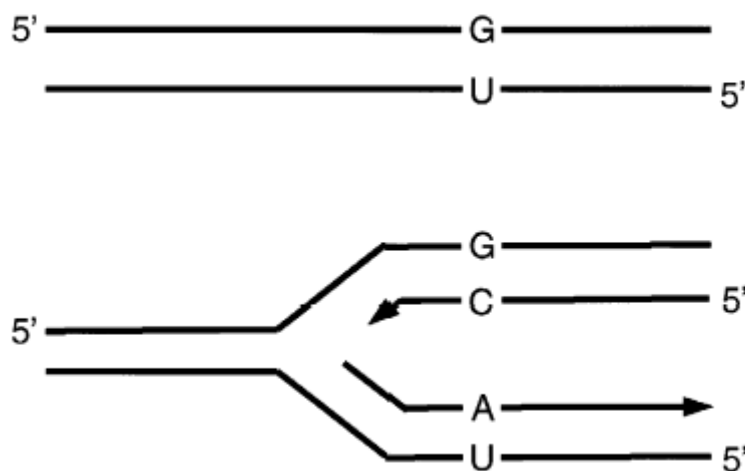
Uracil kerülhet ezen kívül a DNS-be a citozin oxidatív dezaminálása során is (1. ábra).



1. ábra

A Watson-Crick bázispárosodás-nak megfelelően létrejött adenin-timin, illetve guanin-citozin párok, valamint a citozin oxidatív dezaminálódásával létrejövő uracil. Jól látszik, hogy az uracil a bázispárosodási hajlamát tekintve már a timinnel mutat hasonlóságot, nem pedig a citozinnal.

Ez fiziológiás körülmények között is kb. naponta 50-500 alkalommal játszódik le egy emlős genomban, még kettős szálú DNS esetén is, viszont a transzkripció során, amikor a DNS hosszabb ideig egyszálú formában van jelen, a dezaminálás 200-300-szor is gyorsabb lehet. Ennek veszélyessége abban rejlik, hogy a változást követő replikáció során az így a DNS-be kerülő uracilhoz (dezaminált citozinhoz) már nem guanin kötődik, hanem adenin, ezzel megváltoztatva az eredeti szekvenciát – stabil pontmutáció jön létre (2. ábra). Ez mindaddig nem okoz komoly gondot, amíg a mutáció nem egy kódoló régióban jön létre. A DNS-ben megjelenő uracil hibát a sejt báziskivágásos javítómechanizmussal (BER) javítja.



2. ábra

Az uracil DNS-be kerülésének veszélye.

A replikáció során (alsó kép) a DNS-be épült uracillal szembe az eredetileg ott lévő guanin helyett egy adenin épül be, ezzel pontmutációt hozva létre.

Az uracil felismeréséért az uracil-DNS-glikoziláz (UDG) enzimesalád tagjai felelősek. [5] [7] [8]. Az UDG enzimek általában mind a guaninnal szemben álló (dezaminált citozin eredetű), mind az adeninnel szemben álló (timinhelyettesítő) uracilt kivágják, kivéve a timin-DNS glikoziláz alcsalád enzimeit.

1.2.2 Uracil a DNS-ben normál élettani körülmények között

Több esetben is kimutatták, hogy egyes baktériumokat fertőző fágok DNS-e nagy mértékben tartalmaz uracilt timin helyett. Az egyik ilyen ismert fág például a *Bacillus subtilis* fertőző PBS fág, amely genomja teljes mértékben uracilt tartalmaz timin helyett. [9] Ezen állapot fenntartása érdekében részben a bakteriofág genomja, részben pedig a célszervezet (*B. subtilis*) genomja is kódolhat enzimeket illetve enzim inhibitorokat. Kiváló példát szolgáltat erre a bakteriofág által kódolt uracil-DNS glikoziláz inhibitor (UGI) fehérje, amely rendkívül hatékonyan képes gátolni egyes UDG enzimek működését. A baktérium genomban kódolt releváns fehérjék expresszióját a fágfertőzés indukálhatja. Jellemző módon ezen inhibíciók hatékonyságának csökkenése a fertőzőképesség csökkenésével jár együtt. [5]

Nemrég került azonosításra egy további DNS-beli uracilt tartalmazó bakteriofág is (Φ R137), amely több *Yersinia* fajt is képes megfertőzni. [10]

A HIV vírus esetében is fontos szerepet játszik a reverz transzkripció során a keletkező DNS-ben felhalmozódó uracil, amely meghaladhatja az 500 uracil / 10 kb HIV genom szintet is. Kimutatták, hogy a DNS-ben felhalmozódó uracil gátolja a vírus autointegrációját, de elősegíti a kromoszómális integrációt. [11]

A vírusokon kívül a humán B-limfociták esetében is fontos szerepet játszik a sejtek DNS-ében megjelenő uracil, ami nagy jelentőséggel bír a szomatikus hipermutációban, valamint az osztályváltó rekombinációban (izotípus váltás) - ezekkel együtt pedig a keletkező antitestek változatosságának kialakításában. Ezekben az esetekben az aktiválás-indukált deamináz (AID) enzim felelős azért, hogy a citozinok enzimatis deaminációjával uracilokat hoz létre a DNS-ben, melyeket hibajavító enzimek (elsősorban UNG) eliminálnak a DNS-ből. A javítás során ezek az uracilok akár hibásan is korrigálódhatnak (vagyis nem citozinnal helyettesítődnek), ezzel mutációt eredményezve az adott génben. [12]

1.3 Az UDG enzimcsalád

A DNS-ben megjelenő uracil eltávolításáért az uracil-DNS-glikozilázok (UDG) felelősek, melyek a báziskivágáson alapuló hibajavítás (BER) enzimjei. Ezek a fehérjék képesek szelektíven felismerni az uracilt, majd elhasítják a pirimidin gyűrű és a dezoxiribóz közti N-glikozidos kötést, bázismentes (AP) helyeket eredményezve.

Emlősökben ilyen aktivitással négy különböző enzimcsalád is rendelkezik, nevezetesen az UNG, TDG, SMUG és az MBD4. [13]

Az ung génről humán sejtekben az alternatív promóterhasználat révén két fehérje is képződhet, amelyek csak az N-terminális részükben különböznek egymástól. Az egyik a mitokondriális lokalizációjú UNG1, a másik pedig a magi lokalizációjú UNG2. Az UDG-k közül az UNG fehérjék rendelkeznek a legnagyobb katalitikus aktivitással, a DNS-ből való uracil eltávolítása szempontjából. Aktívak egyes és kettősszálú DNS-en, valamint képesek kivágni az uracilt az A:U és a G:U párokból is. Az UNG a többi UDG fehérjétől eltérően specifikusan gátolható az UGI (uracil-DNS glikoziláz inhibitor) fehérjével. [14]

A SMUG (Single - strand selective Monofunctional UDG; egyesszál szelektív monofunkciós UDG) feltehetőleg az 5-hidroximetil-uracil kivágásáért felelős legfőbb enzim. Az egyesszálú és a kettősszálú DNS-ből is képes kihasítani a citozin dezaminációjával keletkező uracilt (bár az egyesszálú DNS-t részesíti előnyben), míg a timin helyett beépült uracilt kisebb hatékonysággal távolítja el. [15]

A T/U hibáspár DNS-glikoziláz (TDG) csak kettős szálú DNS-en aktív, és kis hatékonysága mellett szigorúan specifikus a guaninnal szemben beépült hibás bázisokra, legyen az akár az 5-metilcitozin dezaminálódása során keletkezett timin, vagy a citozin oxidatív dezaminálódásakor keletkezett uracil (bár különböző fajokban más-más mértékben preferálják az adott bázisokat). [13]

Az MBD4 (hibáspár specifikus UDG (Metil Binding Domain)) szintén kettősszálú DNS-ből távolítja el a T:G hamis párok esetén a timint, valamint a citozin és az 5-metilcitozin dezaminációjával képződő uracilt CpG (azonos DNS szálon egymás mellett lévő citozin és guanin) ill. 5meCpG környezetből. [16] [13] [17] [18]

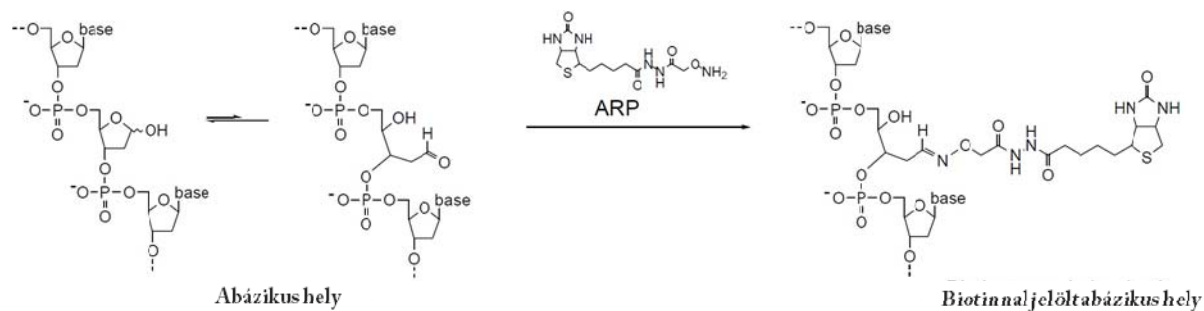
1.4 A DNS-ben előforduló uracil detektálásának módjai

A DNS uraciltartalmának meghatározása nagy kihívást jelentő feladat, mivel az irodalomban fellelhető módszerek nagy részével nehéz különbséget tenni a timin és az uracil között. [19]

Az analízisre használható fordított fázisú folyadékkromatográfiás módszer, tandem tömegspektrometriával ötvözve, amelyet a DNS valamilyen módszerrel történő hidrolízise előz meg 2'-deoxi-ribonukleozidokra. [10] [20]. Más módszerek során az UDG enzimet használják fel az uracil DNS-ből való specifikus eltávolítására, majd az uracil derivatizálását követően gázkromatográfiás módszerrel - melyet szintén tandem tömegspektrométerrel kötnek össze – határozzák meg annak mennyiségét. [21]

Az uraciltartalom meghatározása történhet UDG felhasználásával oly módon is, hogy nem közvetlenül a DNS-ből kivágódó uracilt határozzák meg, hanem a kivágódáskor keletkező abázikus helyeket [¹⁴C]metoxiamin, [22] vagy aldehid reaktív próba (ARP) segítségével (3. ábra). [23] Az aldehid reaktív próba során a DNS-ben UDG kezelés hatására

képződött abázikus helyeket biotinnal jelölik meg, melyeket avidin-biotin-assay segítségével lehet kimutatni. Az avidin-biotin-assay során peroxidázt, vagy alkalikus foszfatázt adnak a komplexhez, majd kolorimetriás módszerrel történik a detektálás. [24]



3. ábra

Az aldehid reaktív próba során a felhasznált reagens (N'-(aminooximetilkarbonil)hidrazino-D-biotin) a DNS-ben található abázikus helyhez kötődik.

Az analízis történhet kvantitatív módon is, real-time PCRa-alapú technológia segítségével. Ezt a mérést egy archea baktériumból, a *Pyrococcus furiosus*-ból izolált DNS polimerázzal (Pfu pol) végzik, amely (a legtöbb DNS-polimerázzal ellentétben) érzékenyen reagál a DNS-beli uracilra. A Pfu polimeráz a templatként használt DNS-beli uracil helyek érzékelésekor átlagosan négy bázisbár után megáll és nem folytatja a DNS-szál másolását. Amennyiben egy pont mutációt hoznak létre ebben a polimerázban a specifikus uracil kötő helyen, az enzim akadály nélkül áthalad az uracilt tartalmazó helyeken is, ezzel a PCR során több terméket eredményezve. Ha a PCR reakciót mindkét enzimmel (Pfu WT-pol, illetve Pfu V93Q-pol) elvégezzük és meghatározzuk a termékképződés hatékonyságát, akkor a kapott eredményekből számolható a vizsgálni kívánt DNS fragmens uraciltartalma. [19]

2 Célkitűzés

Az uracil a természetben az RNS egyik alkotóeleme, a DNS-ben való megjelenése általában hibának számít. Az élővilágban számos esetben találunk arra példát, hogy az uracil normál élettani körülmények között is megjelenik a DNS-ben. Erre talán a legjobb példa a B-sejtek esetében az AID hatása által a sejtek DNS-ében létrejövő uracil. Ennek megjelenése fontos szerepet játszik az szomatikus hipermutációban, valamint az osztályváltó rekombinációban.

Kutatómunkám célja egy olyan gyors, szemikvantitatív és szelektív módszer kidolgozása, és optimalizálása volt, amely alkalmas genomi DNS uraciltartalmának meghatározására. Erre egy speciális dot-blot technikát kívántam alkalmazni.

Szintén célom volt egy olyan kvalitatív módszer kidolgozása, amellyel sejtekben, szövetekben lehetne kimutatni a DNS-be hibásan beépült, vagy egyéb úton (például a citozin dezaminálódása során) képződött uracil pozícióját. Ezen célkitűzés jelentősége abban rejlik, hogy az eddigi módszerek (qPCR és MS alapú) elsősorban az uracil mennyiségi meghatározására alkalmasak, így az uracil-hibák genomban való eloszlási mintázata a jelenleg rendelkezésre álló módszerek segítségével csak nehezen vizsgálható.

3 Anyagok és módszerek

3.1 Uracil tartalmú plazmid előállítása

Célunk magas uraciltartalmú plazmid előállítása, amelyeket a későbbiekben a kísérleteknél fel fogunk használni. Magas uraciltartalmú plazmidot úgy kapunk, hogy *Escherichia coli* dut⁻, ung⁻ kompetens sejtekbe (CJ236) transzformálunk pEGFP-N1 plazmidot. A plazmid nem tartalmaz számottevő uracilt, viszont a sejtekből, amelyekbe bejuttatjuk, ki van ürítve a dUTP/dTTP arányt alacsonyan tartásában, és így a dUTP DNS-be történő beépülésének megakadályozásában szerepet játszó dUTPáz (dut) gén, valamint a legfontosabb uracil-DNS glikoziláz kódoló ung gén. Utóbbi kiütése azért fontos, hogy a kettős génkiütést elszenvedett sejtek ne tudják eliminálni tudják a DNS-be beépülő uracilt.

A plazmidot hősokk transzformációval juttattam a sejtekbe. Kétféle antibiotikumot használtam a sejtek szelekciójára: klóramfenikolt (a törzs antibiotikum szelekciós markere) és kanamicint (ennek az antibiotikumnak a rezisztencia génjét a pEGFP-N1 plazmid kódolja).

A transzformálás során 100 µl kompetens sejthez 1 µl tízszeresére hígított β-merkatoetanolt (β-szulfaniletanol), valamint 1 µl plazmid DNS-t adtam, majd 30 percet állni hagytam jégén. Ezt követően a hősokkhoz 1 percig 42°C-os vízfürdőbe tettem, majd ismét 2 percre jégre raktam a szuszpenziót. 100 µl steril Luria Bertani (LB) tápoldat hozzáadása után 1 órára 37°C-ra beállított rázó-termosztátba tettem a sejteket, majd ebből 100 µl-t a fent említett két antibiotikumot tartalmazó agar-lemezre szélesztettem. Egy éjszakán keresztül 37°C-on növesztettem fel a sejteket. A lemezen felnőtt sejtekből másnap 50 ml LB tápoldatba oltottam át, majd 37°C-on, egy éjszaka alatt felszaporítottam őket.

A transzformált baktérium sejtekből az uraciltartalmú plazmidot Promega midipreppel tisztítottam, majd agaróz gél segítségével vizsgáltam.

3.2 Genomi DNS izolálás *Escherichia coli* sejtekből

Genomi DNS-t izoláltam mind vad típusú *Escherichia coli* XL1-Blue sejtekből (tetraciklin rezisztenciával rendelkezik), mind pedig a duplamutáns CJ236 sejtekből (kloramfenikol rezisztenciával rendelkezik) a későbbi kísérletekhez. Az utóbbi DNS-e nagymértékben tartalmaz uracilt a 3.1 pontban leírt mutációk miatt.

Ehhez fagyasztott baktériumtörzsekből vettem mintát 50 ml LB tápoldatba „overnight kultúrához”, majd a felnövesztett sejtekből Epicenteres DNS pucoló kit-tel tisztítottam ki a genomi DNS-eket a kit-hez mellékelt protokollt követve.

3.3 Klónozás pET20b vektorba

Célunk - a későbbiekben tervezett *in vivo* kísérletekhez - olyan UNG konstruktok létrehozása, amelyek specifikusan kötődnek a DNS-ben található uracilhoz, viszont katalitikusan inaktívak, vagyis nem hasítják ki az uracil bázist a DNS-ből, csupán hozzákötődnek. Mindemellett az is fontos szempont volt, hogy ne tartalmazzák azokat az aminosavakat, amelyek az RPA2-vel (Replication protein A), illetve a PCNA-val (Proliferating cell nuclear antigen) való kölcsönhatások kialakításáért felelősek. [25] [26] Ezeknek a fehérjéknek a DNS replikáció során van fontos szerepük. [27] Ez azért fontos, hogy ténylegesen csakis az UNG-nak az uracillal való kölcsönhatását detektáljuk.

Az alábbi rekombináns fehérjét kódoló plazmidokat kívántuk létrehozni: Δ UNG-DsRed, Flag- Δ UNG-DsRed. A rekombináns fehérjék esetében a „DsRed” egy fúziós fluoreszcens fehérje, a „Flag” egy epitóp tag, míg a Δ UNG az N-terminálisán az első 84 aminosavat nem tartalmazó, így az RPA2-vel és PCNA-val kölcsön nem ható UNG konstrukt.

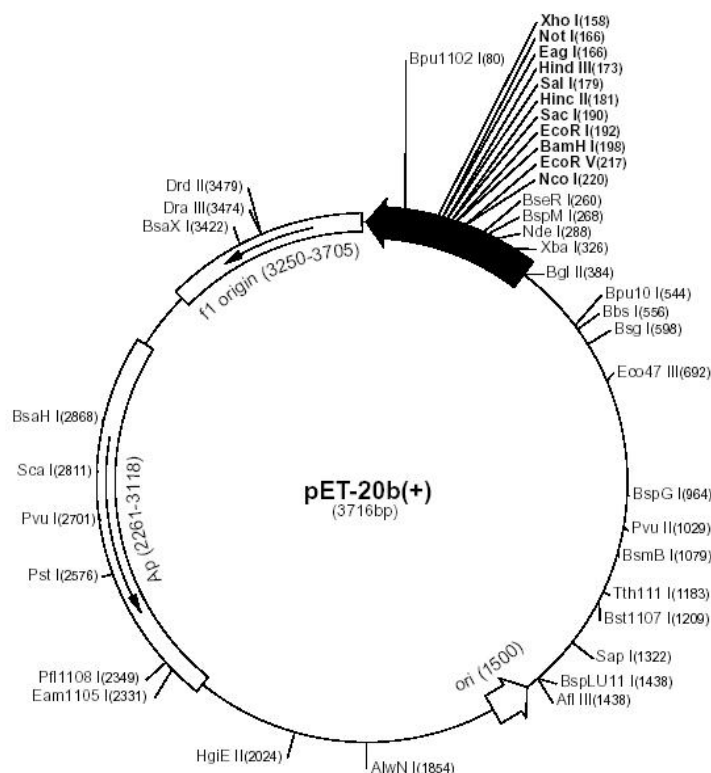
A klónozás első lépéseként polimeráz-láncreakcióban (PCR - polymerase chain reaction) sokszorozítottuk a Δ UNG-DsRed-et kódoló plazmidokat oly módon, hogy a reakciótermékek ne kódolják a duplamutáns UNG fehérje első 84 aminosavát. Ezt úgy értük el, hogy a „forward” primert a 85. aminosavnak megfelelő nukleotid szekvenciától terveztük. A PCR során a plazmidok 5'-végére NdeI, a 3'-végükre pedig XhoI restrikciós enzim hasítóhelyet hoztunk létre a felhasznált primerek által. A Flag- Δ UNG-DsRed konstruktok esetében a „Flag” is szintén a PCR reakció során került a plazmidok 5'-végére, közvetlenül a

restrikciós enzim hasítóhely mögé (szintén a felhasznált primeren volt kódolva, így került a plazmidra).

A PCR-hez 100 -100 µl össztérfogatú oldatokat készítettünk. Ezekbe 0,25 - 0,25 µM koncentrációban raktunk mind a „forward”, mind a „reverse” primerekből (Eurofins MWG Operon), és 0,2 mM koncentrációban tettünk dezoxiribonukleotid-trifoszfátot (dNTP - Fermantas). Ezenkívül 50 ng templát DNS-t, 1 µl Q5 Hot Start (High-Fidelity) DNS Polimerázt (Pfu polimeráz - New England Biolabs) és ötszöröseére hígított - az alkalmazott polimerázhoz a NEB által ajánlott - puffert (New England Biolabs) adtunk hozzájuk. A mintákat nukleáz-mentes desztillált vízzel (Ambion) egészítettük ki 100 µl-re.

A reakciókörülményeket a NEB honlapján található „Tm Calculator” által ajánlott módon állítottuk be. Ez alapján mindkét konstrukt esetében a DNS szálak szétválasztására 15 másodpercig 98°C-ot, a primerek hibridizációjához 30 másodpercig 65°C-t, a polimerizációhoz pedig 45 másodpercig 72°C-ot alkalmaztunk. A reakciót 30 cikluson át ismételtük, majd 4°C-on állítottuk le. A PCR termékeket GenElute™ PCR Clean-Up Kit-tel (Sigma-Aldrich) tisztítottam ki.

A PCR során kapott konstruktokat pET-20b expressziós vektorba (Novagen) klónoztuk (4. ábra). A felhasznált vektor az úgynevezett „multi cloning site” régiójában tartalmazza azt a két restrikciós enzim hasítóhelyet, amelyeket a PCR során mi a plazmidokra illesztettünk. Amennyiben ezzel a két restrikciós enzimmel (NdeI és XhoI) kezeljük a vektort, abból kiesik a két hasítóhely által határolt rész. Ezek az enzimek a hasítást követően ragadós végeket eredményeznek. A mintákat is ezzel a két enzimmel kezelve, és a (már kezelt) vektorral elegyítve a ragadós végeknél összeilleszkednek. Ligáz enzimet is adva a mintákhoz, az összekapcsolja a cukor-foszfát láncot, így a plazmid beépül a vektorba.



4. ábra
A felhasznált pET20b vektor

A reakcióelegyekbe - mind a Δ UNG-DsRed, mind pedig a Flag- Δ UNG-DsRed esetében – 2 μ l NdeI enzimet (NEB), 1 μ l XhoI enzimet (NEB), 5 μ l puffert (a NEB által a restrikciós enzimekhez ajánlott), és 48 μ l plazmid DNS-t tettem. A vektor esetében a felhasznált enzimmennyiségek megegyeztek a plazmidok esetében használttal, ezen kívül pedig 10 μ l puffert, 7 μ l nukleáz-mentes desztillált vizet és 80 μ l DNS-t (vektor) adtam a mintához. A reakcióelegyeket 12 órán át 37 °C-on tartottam, hogy a kívánt reakció végbemenjen, majd 20 percig 65°C-on inaktíváltam az enzimeket.

Annak érdekében, hogy a vektorból az enzimátikus hasítás során kiesett rész ne tudjon visszazáródni, Antarctic foszfáttal (NEB) kezeltük a vektort, ami leszedi a DNS 5'-végén található foszfátcsoportot.

3.4 UNG konstruktok transzformálása BL21 sejtekbe

A 3.3. pontban leírt módon létrehozott plazmidokat (Δ UNG-DsRed, Flag- Δ UNG-DsRed) hősokk transzformációval jutattam *Escherichia coli* BL21 ung- kompetens sejtekbe. 2 x 75 μ l kompetens sejtől indultam ki, melyekhez 1 - 1 μ l nukleáz-mentes vízzel tízszeresére hígított β -merkaptoetanolt adtam. Ezt követően a sejteket öt-felé osztottam (30-30 μ l), majd 0,5 - 0,5 μ l plazmidot adtam hozzájuk. 30 perc jégen történő inkubálást követően 1 percig 42°C-on hagytam őket (ekkor veszik fel a sejtek a DNS-t), majd ismét jégen történő inkubálás következett, ezúttal 2 percen keresztül. 200 μ l steril LB tápoldatot mértem a sejtekhez, és 1 órán keresztül 37°C-on rázattam őket. A rázatást követően a szuszpenziót lecentrifugáltam - 1 percig 2400 rpm-en - Microspin FV2400 típusú asztali centrifuga segítségével. A felülúszóból 100 μ l-t eltávolítottam, a sejteket visszaoldottam a maradék felülúszóban, majd éjszakára 50 μ g/ml koncentrációban karbenicillint tartalmazó agar lemezre szélesztettem, és 37°C-on hagytam inkubálódni.

3.5 A fehérjék próba expressziója

Próba expressziót végeztem sejtekbe a 3.4. pontban leírt módon bejuttatott plazmidokról annak érdekében, hogy meggyőződjek a transzformáció sikerességéről.

Az agarlemezen felnőtt telepeket steril oltókaccsal 50 ml steril LB-be oltottam át, majd 37°C-on addig növesztettem őket, míg a szuszpenzió optikai denzitása (OD) nem ért el 0,6 - 0,8 közötti értéket. Ezt követően a sejteket 0,6 mM IPTG-vel (izopropil- β -D-tiogalaktozid) indukáltam, majd 18°C-on egy éjszakán át termeltem a fehérjét.

Másnap 200 - 200 μ l mintát vettem a szuszpenziókból. Ezeket 7000 rpm-en 5 percig centrifugáltam (Eppendorf – MiniSpin centrifugán). A felülúszót leöntve, a sejtsapadékokat 100 – 100 μ l FluorSaveTM Reagent-ben (Calbiochem) visszaoldottam, majd ezekből 15 – 15 μ l mintát vettem tárgylemezre, mikroszkópos vizsgálathoz. Mivel az általunk expresszáltatott fehérjék „DsRed” fúziós fehérjét tartalmaznak, ezért zöld fénnel megvilágítva piros fényt bocsátanak ki magukból. Tehát, amennyiben a mikroszkópos vizsgálat során a zöld fénnel megvilágított sejtek pirosan világítanak, sikeresnek tekinthető a klónozás és az expresszió is.

3.6 DNS koncentráció meghatározás Nanodrop UV-spektrofotométerrel

A DNS oldat koncentrációját az ultraibolya spektruma segítségével határoztam meg. Az UV spektrumot 220 nm-től 350 nm-ig vettem fel Nanodrop ND1000 spektrofotométerrel. A nukleinsavak jellemző elnyelési maximuma 260 nm-en van, a fehérjéké pedig 280nm-en. A Lambert-Beer-törvény ($A=\epsilon \cdot c \cdot l$) szerint a minta DNS koncentrációja egyenesen arányos a mért abszorbancia értékkel. A 260 nm-en mért egységnyi abszorbancia 50 μ g/ml DNS koncentrációnak felel meg. A minta fehérjeszennyezettségére nyújt információ a 260 nm-en, valamint a 280 nm-en mért abszorbanciák aránya. A tisztaság kritériuma, hogy a 260 nm-en mért DNS és a 280 nm-en mért fehérje abszorbancia értékek hányadosa 1,8 körüli érték legyen. Referenciaként azt a puffert használtam, amellyel az izolálás során a DNS-t eluáltam az oszlopról.

3.7 DNS minták vizsgálata agaróz gélelektroforézissel

Elektromos térbe helyezve, a töltéssel rendelkező molekulák - az össztöltésüknek megfelelően - az ellentétes töltéssel rendelkező elektród felé vándorolnak. A vándorlás sebessége függ a molekula töltésétől, tömegétől és alakjától, továbbá az elektromos térerőtől. A nukleinsavak töltése arányos a tömegükkel és a hosszúságukkal, tehát a módszer molekulatömeg szerinti elválasztásra is alkalmazható. A futás sebességét a nukleinsavak térszerkezete is befolyásolja, azonos tömegű cirkuláris és lineáris nukleinsav molekulák különböző sebességgel futnak (a cirkuláris DNS kompakt szerkezetű, és hidrodinamikai mérete jóval kisebb – elektroforetikus mobilitása pedig nagyobb –, mint a vele azonos méretű lineáris DNS-molekuláé). Nukleinsavak méret szerinti elválasztását agaróz gélben végezzük. A gél agaróz koncentrációját aszerint állítjuk be, hogy mekkorák az elválasztani kívánt nukleinsav molekulák. Minél kisebbek az elválasztandó fragmensek, annál töményebb gél alkalmazunk.

Az általam vizsgálni kívánt DNS-ek elválasztásához 0,7%-os gélt öntöttem. 0,21 g agarózt 30 ml TAE (40 mM Tris/acetát, 1 mM EDTA, pH = 8,5) pufferben felmelegítve oldottam fel (odafigyelve, hogy ne maradjanak feloldatlan agaróz-gömbök az oldatban), majd körülbelül 50°C-ra hűtve 3 μ l GelRed interkalálódó festéket adtam hozzá. Az oldatomat a gélöntő apparátusban hagytam megdermedni. 200 ng DNS-t tartalmazó egységnyi tréfogatú oldathoz

1/5 egységnyi térfogatú „6x Loading dye” mintakoktét (Fermentas) adtam (pl. 10 µl DNS mintához – melyet úgy hígítottam ki, hogy 200 ng DNS-t tartalmazzon - 2 µl mintakoktét („6X Loading dye”) adtam), így vittem fel a géltre. Az elektroforézist TAE pufferben végeztem, 100 V-ra beállított állandó feszültséggel. A gélben lévő DNS-t UV fénnel megvilágítva detektáltam.

3.8 Elektroforetikus mobilitás teszt (EMSA)

Az EMSA fehérjék DNS-kötő képességének vizsgálatára alkalmazott módszer. A fehérje-DNS komplex nagyobb, így lassabban vándorol az agaróz gélelektroforézis során, mint a fehérjét nem kötő DNS-kontroll, így a komplex a nagyobb molekulatömeg felé eltolódva jelenik meg a gélen.

A tesztet mind - a 3.1. pontban leírt módon előállított - uracilban gazdag, mind uracilt (számottevően) nem tartalmazó linearizált DNS-sel is elvégeztem. A vizsgálni kívánt duplamutáns UNG fehérjék közül az egyik 1xFLAG, a másik pedig 3xFLAG epitóp-taget tartalmaz. Külön-külön mindkettőből adtam a mintákhoz, hogy ellenőrizzem, hogy mindkét konstrukt specifikusan köti-e az uracilt.

A mintákhoz 10 ng/µl-es koncentrációban tettem a DNS-ekből, a fehérjékből pedig egy hígítási sort készítettem. A pontos koncentrációkat az eredmények és kiértékelésük részben tüntettem fel, a gélkép fölött. A kontroll minta csak DNS-t tartalmaz, fehérjét nem adtam hozzá.

A minták 10 µl-éhez 2-2 µl mintakoktét („6X Loading dye”) adtam, majd 1 %-os agaróz gélen megfuttattam, az előző pontban leírtak szerint.

3.9 Agaróz-assay

Agaróz-assay-t használtam annak eldöntésére, hogy a duplamutáns (akár az 1 x -, akár pedig a 3 x Flag epitóp - taget tartalmazó) UNG fehérjék valóban katalitikusan inaktívak-e. Amennyiben az UNG fehérje katalitikusan aktív, kivágja az uracilokat a DNS-ből, ezzel bázismentes helyeket (AP site) hozva létre a DNS-ben. A mintához AP endonukleázt

(APE/EndoIV) is adva, az elvágja az UNG által létrehozott bázismentes helyeknél a DNS cukor-foszfát vázát, ezzel egyes száltörést okozva. A fragmentálódott DNS az agaróz gélen kisebb moláris tömegnél jelenik meg, elmosódott sávokat eredményezve.

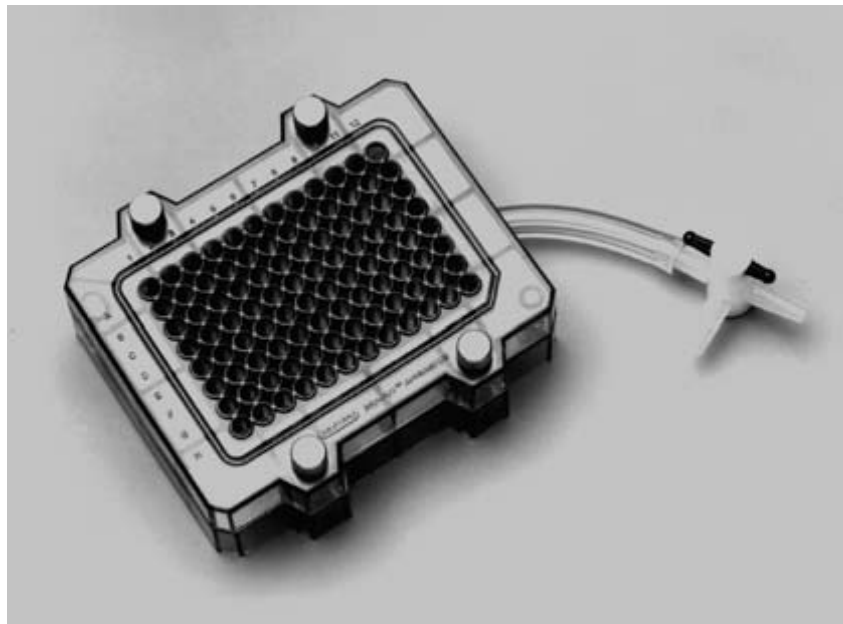
Mind az uracilos, mind pedig az uracilmentes plazmidból 10 - 10 µl 15 ng/µl koncentrációjú oldatokat készítettem nukleáz mentes vízzel tízszeresére hígított APE – pufferben (New England Biolabs - NEB). A mintákhoz 2 µg/ml koncentrációban adtam a duplamutáns UNG fehérjékből, majd 1 órán keresztül 37°C-on termosztáltam azokat. Ezt követően az oldatokhoz 1µl AP endonukleázt (NEB) adtam, majd ismét 1 órát termosztáltam 37°C-on. A reakció leállítására 4 µl inaktiváló mintakoktélt (1/2 rész 6 x LD, 1/4 rész 10 %-os SDS, 1/4 rész proteináz K (Sigma-Aldrich Proteinase K from Tritirachium album)) adtam a mintákhoz, amellyel először 55°C-on 15 percig, majd 95°C-on 10 percig inkubáltam azokat.

A pozitív kontroll esetében forgalomban kapható UNG-ot (NEB), valamint AP endonukleázt is adtam az uracilos plazmidhoz. A forgalomban kapható enzim katalitikusan aktív, így kivágja a DNS-ekből az uracilokat, majd az APE enzim a magas uraciltartalmú DNS-ek fragmentálódását okozza. A két negatív kontrollhoz nem adtam fehérjét, csak plazmid DNS-t (uracilosat, illetve uracilmenteset). Szintén kontrollként olyan mintákat is felvittem a gélre, amelyek esetén a kétfajta plazmidhoz vagy csak duplamutáns UNG-ot (UNG-1x Flag illetve UNG-3x Flag), vagy csak APE enzimet adtam, illetve olyan mintáim is voltak ahol mindkét enzimet, valamint UGI-t (Uracil-glikoziláz inhibitor, NEB) is adtam a DNS-hez.

3.10 Dot-blot

A DNS-beli uracil mennyiségének, illetve eloszlásának vizsgálatára egy speciális dot-blot technikát dolgoztunk ki. Ennek során azt használtuk ki, hogy mivel az uracil nem építőköve a DNS-nek, így annak eltávolítására különböző DNS hibajavító enzimek alakultak ki. Az egyik ilyen a már fent említett UNG, amely specifikusan kötődik az uracilhoz. Az enzim tulajdonságait oly módon változtattuk meg (D145N és H268N mutáns), hogy kösse a DNS-ben található uracilt, viszont ne legyen képes lehasítani. [28] Így, uracilos DNS-hez ezt a mutáns UNG fehérjét adva, megjelölhetjük az uracilokat. A vizsgálni kívánt DNS-t tartalmazó oldatokat egy nylon membránra (GE Healthcare Amersham Hybond™-N+)

cseppentettük – ezt a folyamatot csináltuk közvetlen pipettával történő felcseppentéssel, valamint egy erre a célra kifejlesztett dot-blot apparátussal (Bio-Rad Bio-Dot® Microfiltration Apparatus) is (5. ábra).

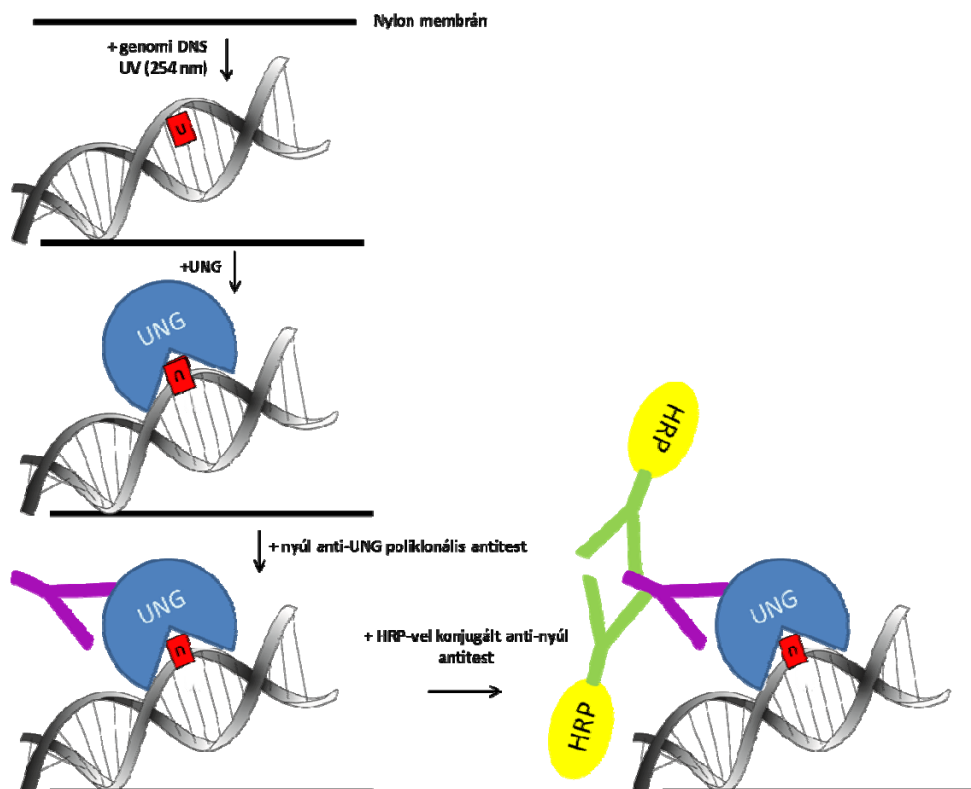


5. ábra
A dot-blot apparátus

A membrán szárítását követően a DNS-t UV-fény (254nm), vagy hő (80°C) segítségével kötöttük ki arra. Ezt követően a membránt egy éjszakán át rázattuk 4°C-on 100 µg/ml lazac DNS-t (Invitrogen), 5 vegyes % tejport, 10 mM β-merkaptóetanolt, valamint 1:1000 hígításban a duplamutáns UNG-ot tartalmazó ETBS-T pufferben (25 mM Tris-HCl, 2,7 mM KCl, 137 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,05 V/V % Tween-20, pH=7,4). A lazacsperma DNS, mint hordozó DNS hivatott a membránon maradt szabad helyek (ahová nem kötődött az előzőekben DNS) elfedésére, a tejport blokkolóként alkalmaztuk, hogy megakadályozzuk a nem-specifikus fehérje kölcsönhatásokat, a β-merkaptóetanolt pedig mint redukálószeradtuk az oldathoz.

Másnap a membránt először 3x10 másodpercig, majd 3x10 percig mostuk ETBS-T-vel, majd egy órán át kezeltük Proteintech-nyúlban termeltetett anti-UNG poliklonális ellenanyaggal (elsődleges ellenanyag), amelyet ezerszeres hígításban alkalmaztunk. Ezt szintén ETBS-T pufferbe tettük, amelyhez 5 vegyes %-ban tejport is kevertünk. Az egy óra elteltével ezt az oldatot is lemostuk a membránról a fent említett módon (ETBS-T pufferrel),

majd szintén egy órán át kezeltük GE-Healthcare HRP-vel (horseradish peroxidase / torna peroxidáz) konjugált anti-nyúl másodlagos ellenanyagot 1:5000 hígítási arányban, valamint 5 vegyes % tejport tartalmazó ETBS-T pufferrel. A másodlagos ellenanyaggal történő egyórás kezelést követően először 3x10 másodpercig, majd 3x10 percig mostuk, de ez esetben már ETBS pufferrel (25 mM Tris-HCl, 2,7 mM KCl, 137 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH=7,4).



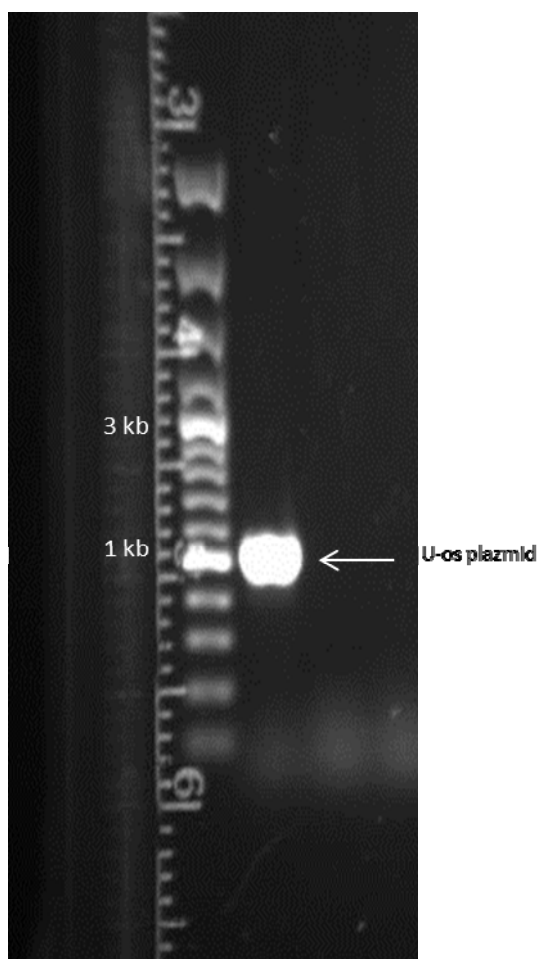
6. ábra
A dot-blot sematikus ábrája

A membrán előhívását kemilumineszcens szubsztráttal végeztem (Millipore, Western Chemiluminescent HRP Substrate) a gyártó által javasolt protokollt követve. A detektáláshoz GE Healthcare High performance chemiluminescence film-et használtunk, amelyen az előhíváskor fekete foltok jelentek meg azokon a helyeken, amelyek a nylon membrán azon része fölött voltak, amelyre uracil tartalmú DNS kötődött. Minél nagyobb az adott részhez kötődött DNS uraciltartalma, annál sötétebb foltot kapunk az adott részen előhíváskor.

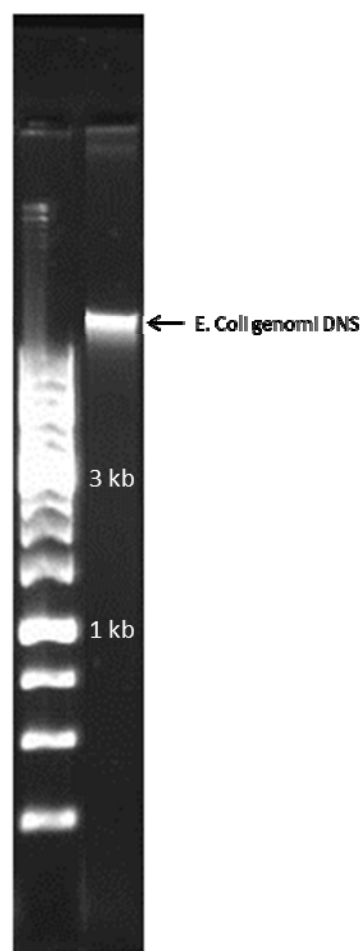
4 Eredmények és értékelésük

4.1 DNS minták vizsgálata agaróz gélelektroforézissel

A 3.1. és a 3.2. pontban leírt módszerrel kapott genomi és plazmid DNS-eket agaróz gélelektroforézissel vizsgáltam. A 7/a. ábrán látható a duplamutáns *Escherichia coli*-ből (CJ236) izolált uracilos pEGFP-N1 plazmid agaróz gélképe, a 7/b. ábrán pedig ebből a duplamutáns *E. coli* fajból izolált genomi DNS agaróz gélképe.



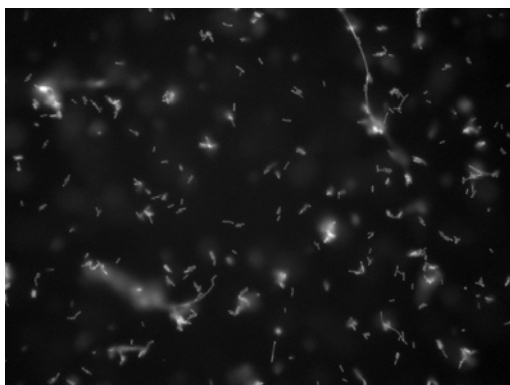
7/a. ábra
A duplamutáns *Escherichia coli*-ből (CJ236)
izolált uracilos pEGFP-N1 plazmid
agaróz gélképe



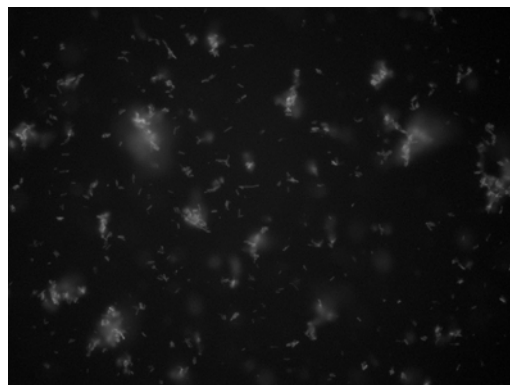
7/b. ábra
A duplamutáns *Escherichia coli*-ből (CJ236)
izolált genomi DNS (uracilos)
agaróz gélképe

4.2 A fehérjék próba expressziója

Próba expressziót végeztem a pET20b vektorba klónozott, majd BL21 ung- kompetens sejtekbe transzformált plazmidokról (amelyek a Δ UNG-DsRed, valamint a Flag- Δ UNG-DsRed fehérjéket kódolják). Ezzel vizsgáltam, a transzformáció sikerességét. Világító foltokként látszanak azok a baktérium sejtek, amelyek sikeresen felvették a plazmidokat és expresszálták a kívánt fehérjéket. Az alábbi képeken (8/a és 8/b ábrák) jól látszik, hogy a sejtek valóban világítanak, vagyis mindkét konstrukt esetében sikeresnek tekinthető a fehérjék expressziója.



8/a. ábra
A Flag- Δ UNG-DsRed-et expresszáló sejtek

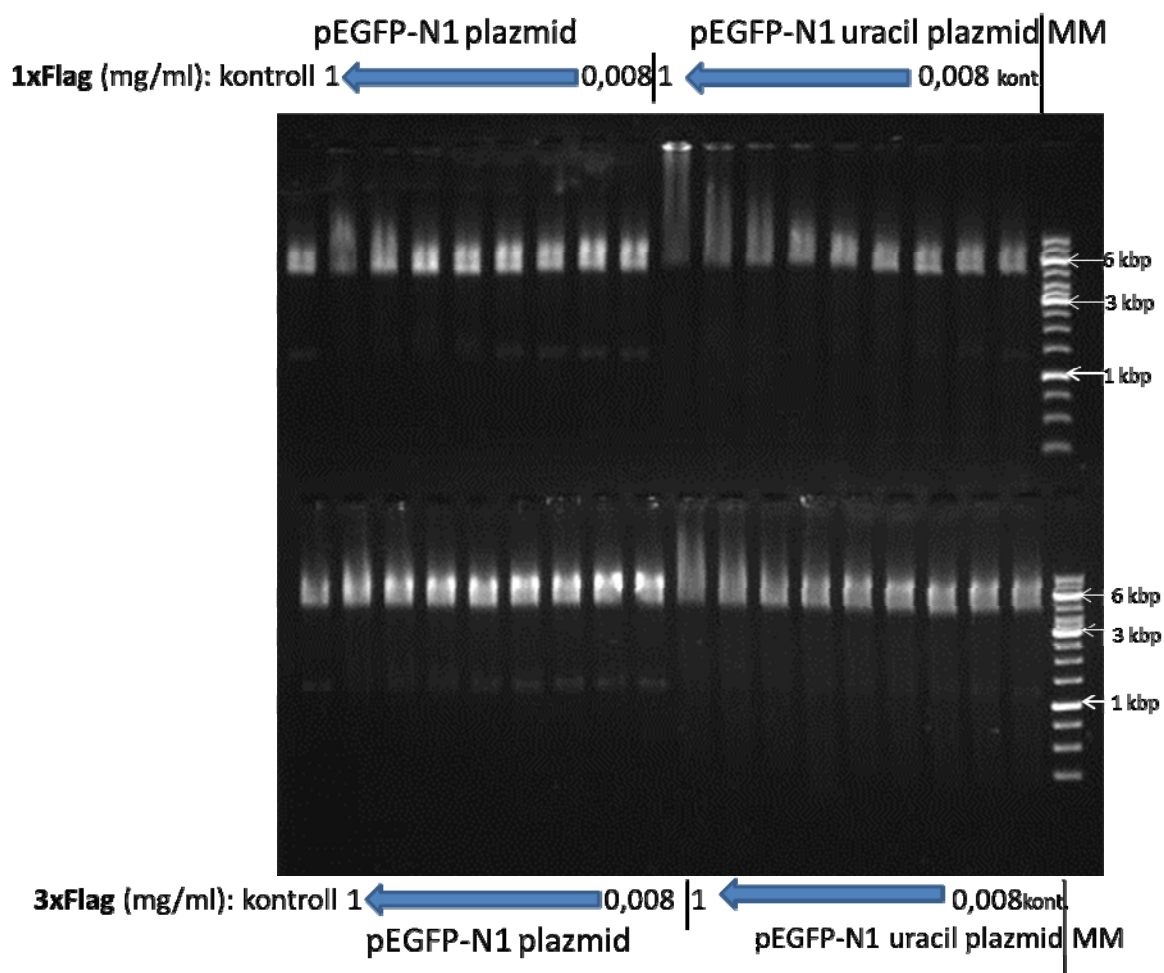


8/b. ábra
A Δ UNG-DsRed-et expresszáló sejtek

Amennyiben a „DSRed-et” tartalmazó fehérje nem termelődött a sejtekben, úgy a sejteket az adott fluoreszcencia mikroszkópos vizsgálati körülmények között nem lehet detektálni.

4.3 Elektroforetikus mobilitás teszt (EMSA)

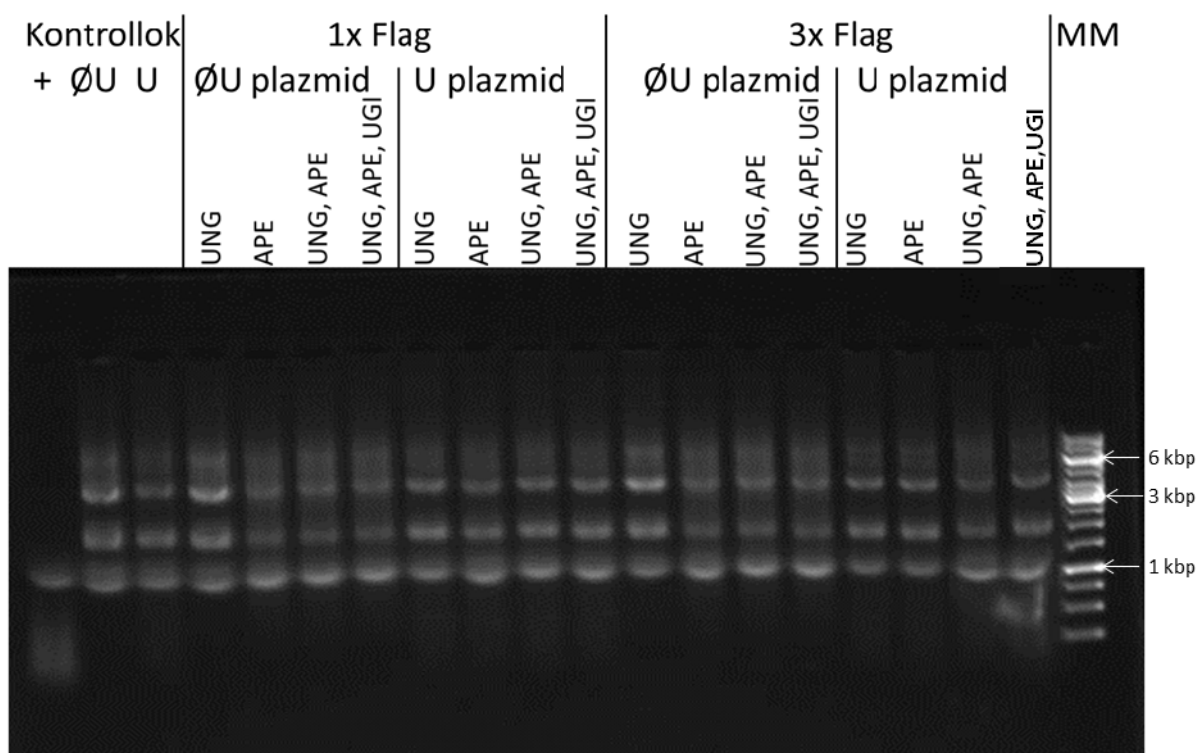
A DNS-hez kötődő fehérje csökkenti a DNS mobilitását az agaróz gélben, így magasabb pozícióban lesz detektálható. A kontroll minták nem tartalmaznak fehérjét, csak DNS-t (uracilos illetve nem uracilos linearizált pEGFP-N1 plazmid). A többi minta esetében a linearizált plazmid koncentrációk megegyeznek, a fehérjék koncentrációja pedig 0,008 mg/ml és 1 mg/ml között változik (felező hígításban), a 9. ábrán feltüntetett módon. Jól látható, hogy mind a két fehérje konstrukt (1xFlag, 3xFlag) kötődik az uracilos plazmid DNS-hez, és ezáltal annak látszólagos eltolódását okozza az agaróz gélben. Az eredmények azt is megmutatták, hogy fehérje konstruktjaink uracilt nem tartalmazó DNS-hez való kötődése jóval gyengébb.



9. ábra
Az UNG konstruktok DNS-kötését vizsgáló elektroforetikus mobilitás teszt gélképe

4.4 Agaróz-assay

Agaróz-assay-vel ellenőriztem, hogy az UNG konstruktok valóban katalitikusan inaktívak-e. A gélképen (10. ábra) minden minta esetében (a pozitív kontroll kivételével, „+ kontroll” elnevezésű sáv a 10. ábrán) 3-3 csíkot láthatunk. Ezekből a ~4500, illetve a ~2000 bp-nál megjelenő csíkok a cirkuláris plazmidra jellemző csíkok. Az 1000 bp-nak megfelelő helyen található, szabad szemmel is látható piros folt pontos eredetét nem sikerült kiderítenünk, de az egyértelmű, hogy ennek jelnek nincs szignifikáns zavaró hatása a mérésre.



10. ábra
Az UNG konstruktok vizsgálatára elvégzett agaróz-assay gélképe

A pozitív kontrollként felvitt mintában az AP endonukleáz mellett vad típusú, katalitikusan aktív UNG-ot (New England Biolabs uracil-DNS glikoziláz) adtam a DNS oldathoz, hogy ellenőrizsem a módszer jóságát. A gélképen jól látszik, hogy csak a pozitív kontroll („+”) esetében történt meg a DNS hasítása, mivel ez esetben eltűnt a plazmidra jellemző két csík, és kisebb molekulatömegnél pedig elmosódott foltot láthatunk.

Negatív kontrollként csak DNS-t (uracilos („U”) és nem uracilos („ØU”) plazmid) vittem fel a géltre, fehérjét nem adtam hozzá. A gélképen emellett az is látható, hogy mind az 1xFlag, mind pedig a 3xFlag epitóp tag-et tartalmazó UNG konstruktok valóban katalitikusan inaktívak (nem történt meg a DNS hasítása a duplamutáns UNG-ot és AP endonukleázt is tartalmazó minták esetében sem).

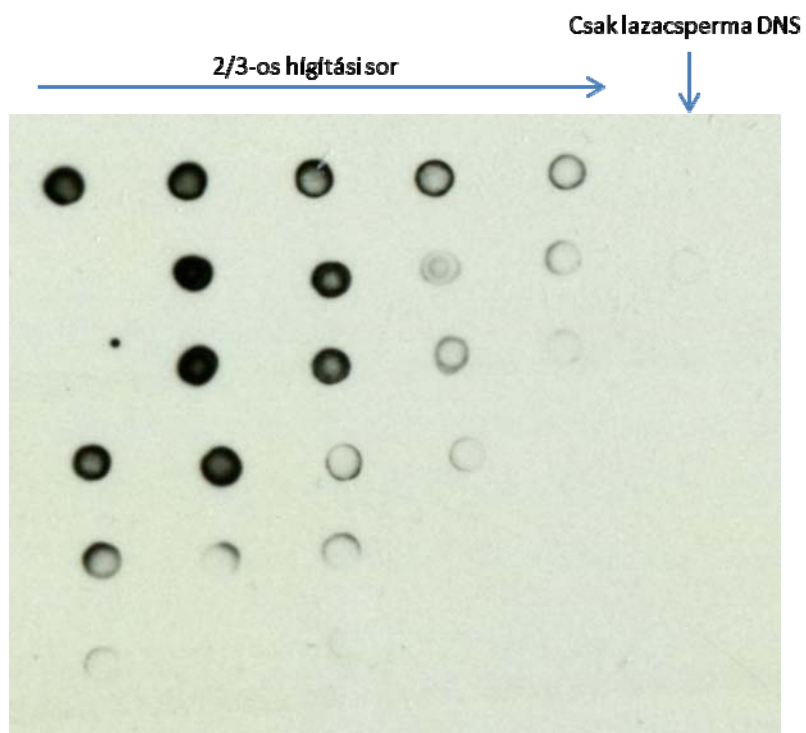
4.5 A dot-blot módszer optimalizálása

A 3.10. pontban leírt dot-blot technika optimalizálására számos kísérletet végeztem, amelyek során több körülményt is megvizsgáltam. Az ugyanolyan körülmények között elvégzett párhuzamos kísérletek közül csak egyet - egyet fogok bemutatni.

4.5.1 A minták membránra történő felvitelének módja

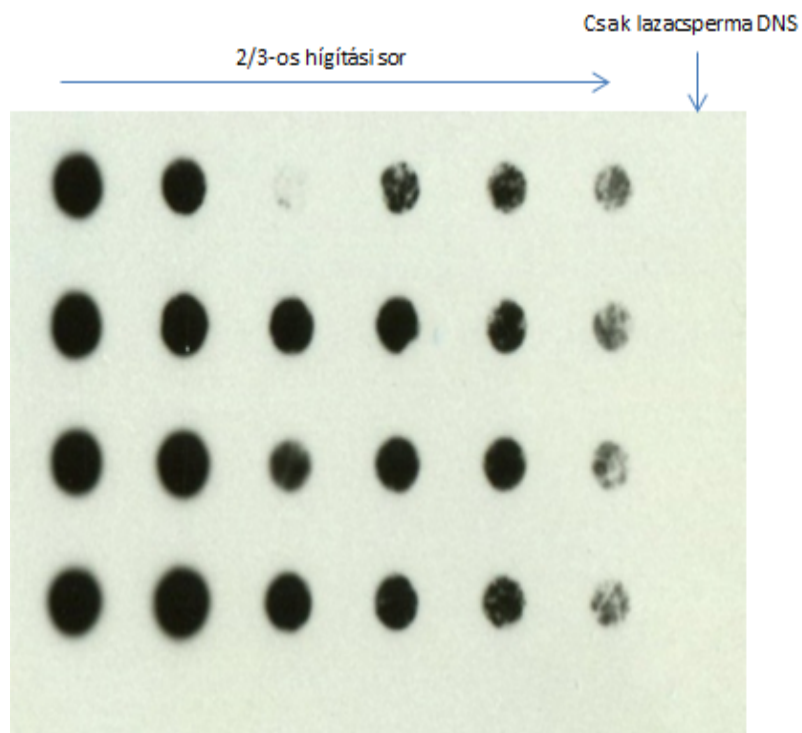
A DNS minták membránra történő felvitele történhet manuális cseppentéssel (11. ábra), ami annyit jelent, hogy adott mennyiségű mintát pipetta segítségével szabad kézzel visszük fel a membránra, illetve történhet a dot-blot apparátus segítségével (12. ábra).

A manuális cseppentés esetében 2/3-os hígítási sort készítettem Eppendorf csövekben, ahol az első pont 0,125 µg uracilos DNS-t (*Escherichia coli* dut-, ung- sejtekből izolált genomi DNS) tartalmazott. Ezekből 3-3 µl-t vittem fel a membránra. A hígítást lazacsperma DNS-sel végeztem, hogy minden folt azonos mennyiségű DNS-t tartalmazzon (ebből ne adódjon esetleges intenzitáskülönbség). Az utolsó sorba csak lazacsperma DNS-t tartalmazó oldatot cseppentettem, annak vizsgálatára, az ad-e esetleg valamilyen háttérjelet. Mivel ez esetben nem tapasztaltam elszíneződést a röntgenfilmen, arra a következtetésre jutottam, hogy a kapott jelet ténylegesen a DNS uraciltartalma szolgáltatja. Ugyanazokat a mintákat hat párhuzamosban, vittem fel a membránra egymás alá, hogy lássam mekkora a szórás.



11. ábra
Manuális cseppentéssel történő dot-blot

Az apparátus használatakor, a mintaelőkészítés során ugyanazt az eljárást alkalmaztam mint a manuális felcseppentés esetében, ezúttal azonban négy párhuzamos sort vittem fel a membránra.

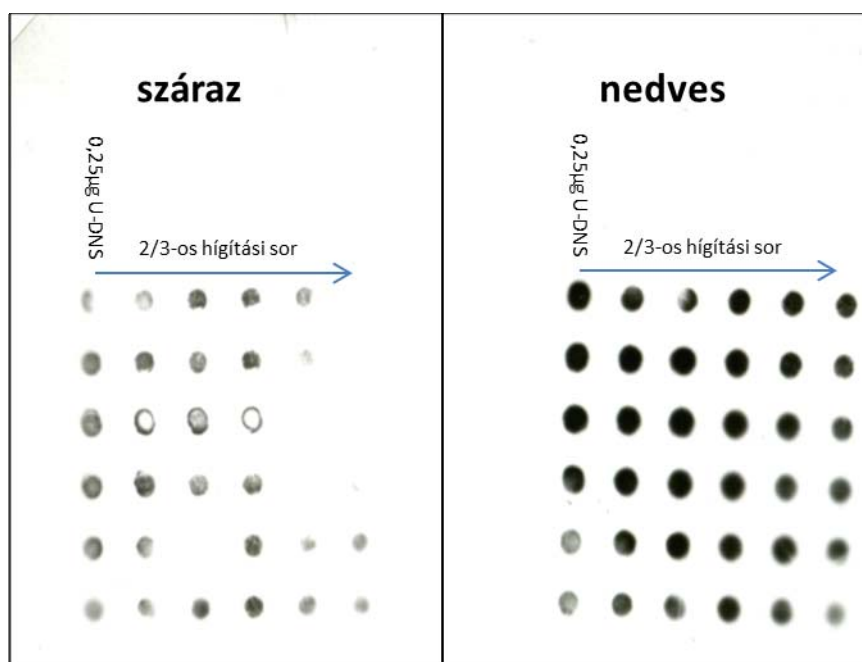


12. ábra
Dot-blot az apparátus használatával

Az eredményekből az látszik, hogy egyenletesebb a DNS eloszlás, amennyiben azt az apparátus segítségével visszük fel a membránra. Emellett a párhuzamos minták esetében is jobb eredményt kaptunk az apparátus használatakor (kisebb a folterősségek közötti szórás). Ezek alapján arra a következtetésre jutottam, hogy megbízhatóbb és reprodukálhatóbb eredményt kapok, amennyiben a dot-blot apparátus segítségével viszem fel a mintákat a membránra.

4.5.2 A felhasznált membrán nedvesítési kísérlete

A másik eldöntendő kérdés az volt, hogy száraz, vagy nedvesített membránra történjen-e a DNS oldatok felvitele. Mindkét esetben egy 2/3-os hígítási sort alkalmaztam, 0,25 µg uracilos DNS-ből kiindulva. Mindkét membránra ugyanazon mintákból vittem fel a megfelelő cseppeket. A hígítást most is lazacsperma DNS-sel végeztem.

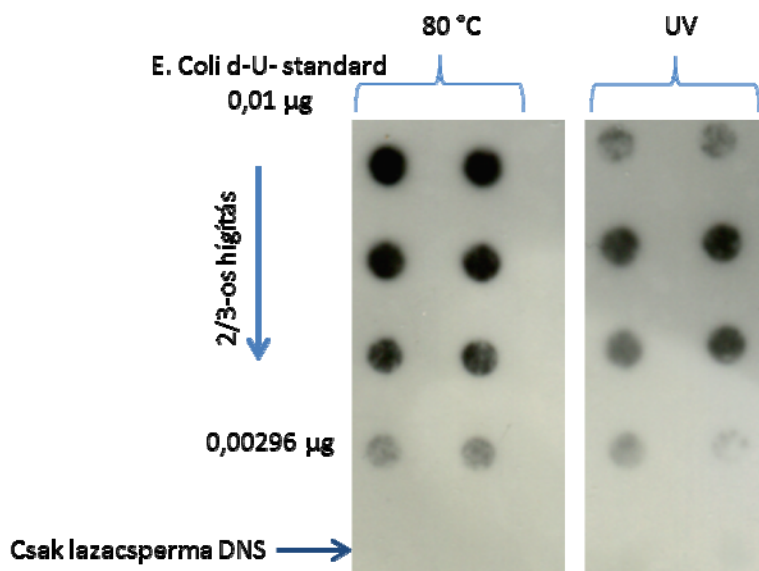


13. ábra
Dot-blot száraz illetve TE pufferrel nedvesített membránon

Ebben az esetben az látható, hogy amennyiben nedvesített membránra történik a mintafelvitel, az adott foltok esetében egyenletesebb DNS eloszlást tapasztalunk. A fent említett eredmények alapján azt találtam optimálisnak, amennyiben a DNS membránra történő felvitele nedves membránra történik, a dot-blot apparátus segítségével.

4.5.3 A DNS membránhoz történő rögzítése

A DNS membránra történő kikötéséhez a fent említett példák esetében UV fényt (254 nm) használtam. [29] Az UV fény hatására azonban pirimidin dimerek jöhetnek létre. Ez esetünkben azért különösen rossz, mert az uracil bázisok között is létrejöhet ez a kölcsönhatás, és ez torzíthatja a kapott eredményeket. Ennek elkerülése érdekében megpróbálkoztunk a DNS-ek hővel történő rögzítésével is (14. ábra). Ugyan azokból a mintákból vittünk fel mindkét membránra, kéz-két párhuzamosban. Az anyagmennyiségek a 14. ábrán vannak feltüntetve, a hígítást most is lazacsperma DNS-el végeztem.



14. ábra
Dot-blot hővel illetve UV fényel történt DNS immobilizálással

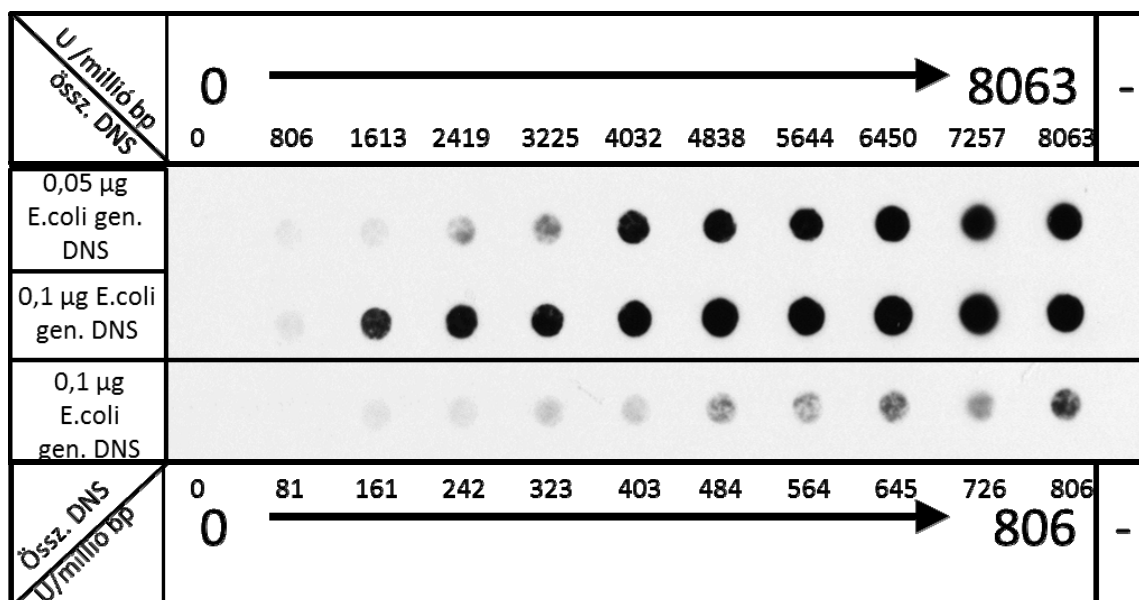
A kapott eredményből az látszik, hogy homogénebb lesz a DNS-eloszlás, erősebbek a foltok, valamint kisebb a szórás a párhuzamosok esetében, amennyiben hő segítségével kötjük rá a DNS mintákat a membránra.

4.5.4 Aspecifikus kötődések vizsgálata

Fontosnak tartottam annak vizsgálatát, hogy a módszer során nem történik-e aspecifikus kötődés a membránhoz, ami fals jelet eredményezhetne. Ennek vizsgálatára a dot-blottot elvégeztem úgy is, hogy nem tettem duplamutáns UNG enzimet a membránra, hanem a DNS kikötését követően egyből az elsődleges ellenanyagot tartalmazó oldatot vittem fel arra. Semmilyen aspecifikus kötődésre utaló jelet nem tapasztaltam.

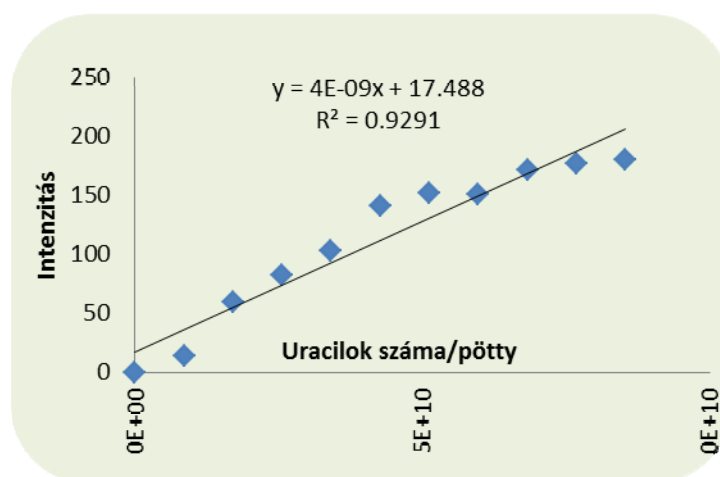
4.5.5 A dot-blot módszer kvantifikálása

A dot-blot alapú módszer nem csak annak kimutatására lehet alkalmas, hogy a vizsgált minta tartalmaz-e uracilt, hanem akár az uraciltartalom kvantifikálására is. Ennek vizsgálatára egy növekvő uraciltartalmú kalibráló sort készítettünk (15. ábra). A hígítást jelen esetben is az elhanyagolható uraciltartalmú lazacsperma DNS-sel végeztem. A kalibrációs egyenes elkészítéséhez az előhívott pöttyök denzitását (intenzitását) szoftveresen határoztuk meg, majd ezt a jelerősséget ábráztuk a hozzájuk tartozó uracilmennyiség függvényében.



15. ábra
Előhívott dot-blot kalibráló sorozat

A felhasznált duplamutáns *Escherichia coli* CJ236 törzs genomi uraciltartalma 8063 uracil /millió bázis. [19] A 16. ábrán látható a - 0,05 µg *Escherichia coli* genomi DNS-t tartalmazó - pontokra illesztett kalibrációs egyenes. A kapott $R^2 = 0,9291$ érték arra utal, hogy a pontok jól illeszkednek az egyenesre. A membránra felvitt, ismeretlen minták uraciltartalma a kalibráló egyenes egyenletéből számítható.



16. ábra
A 0,05 µg DNS-t tartalmazó kalibráló sorból készített kalibrációs egyenes

5 Összefoglalás

A DNS hibajavításra „szakosodott” UDG enzimesalád egyik tagja az UNG fehérje. Ez a fehérje specifikusan felismeri a DNS-be kerülő uracilt, majd enzimatis hasítás révén kivágja azt a DNS-ből. Ezt a fehérjét oly módon elmutálva, hogy az uracilkötő képessége megmaradjon, viszont a katalitikus aktivitás eltűnjön, felhasználhatjuk a DNS-ben megjelenő uracil specifikus megjelölésére.

Egy dot-blot alapú módszert dolgoztunk ki a genomi uracil előfordulásának, valamint eloszlásának vizsgálatára, mely során a fent említett mutáns UNG enzimet használtuk fel az uracilok megjelölésére. A módszer előnyei közé tartozik, hogy specifikus az uracilra, a teljes genomi DNS uracil-tartalmáról és annak eloszlásáról egyaránt kvantitatív információt szolgáltat, valamint, hogy nem csupán *in vitro*, hanem *in situ* ill. *in vivo* kísérletekben is alkalmazható lehet.

Munkám során elvégeztem a, optimalizálását, valamint egy új UNG konstrukt kidolgozásában is részt vettem. Ezt az új konstruktot a későbbiekben *in vivo* kísérleteknél szeretnénk felhasználni. Továbbá ELISA alapú kísérleteket is kívánunk végezni a fent említett dot-blot módszer érzékenyítésére.