

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ŠPELA OBERSTAR

DIPLOMSKA NALOGA  
UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ŠPELA OBERSTAR

**PRIPRAVA DNA-SOND ZA FLUORESCENČNO  
HIBRIDIZACIJO *IN SITU***

**CONSTRUCTION OF DNA PROBES FOR FLUORESCENT  
*IN SITU* HYBRIDIZATION**

Ljubljana, 2013

Diplomsko nalogo sem opravljala na Univerzitetnem kliničnem centru Ljubljana (Oddelek za hematologijo, Specializirani hematološki laboratorij) pod mentorstvom doc. dr. Helene Podgornik, spec. med. biokem., vodje Enote za citogenetiko, imunologijo in citologijo. Gojitev in izolacijo plazmidov, merjenje optične gostote, nekatera spektroskopska in druga merjenja smo izvedli v laboratorijih Centra odličnosti za biosenzoriko, instrumentacijo in procesno kontrolo Cobik pod mentorstvomizr.prof.dr. Aleša Podgornika ter na Centru za funkcijsko genomiko in bio-čipe.

### **Izjava**

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom doc. dr. Helene Podgornik, spec. med. biokem.

## Zahvale

Mentorici doc. dr. Heleni Podgornik se zahvaljujem za izkazano zaupanje ter izvrstno izpeljano mentorsko vlogo. Znala me je spodbuditi in usmerjati, hkrati pa mi omogočiti potrebno svobodo za napredek do samostojnosti in suverenosti.

Hvala Ani, Elzi, Hermini, Jasmini, Karmen, Katarini, Martini ter ostalim zaposlenim v specializiranem hematološkem laboratoriju UKC Ljubljana za vso pomoč, nasvete ter toploto, zaradi katere sem se med vami počutila kot doma!

*Posebno zahvalo namenjam staršema – njuna ljubezen in podpora sta veter pod mojimi krili.*

# KAZALO

<b>KAZALO .....</b>	<b>II</b>
<b>KAZALO SLIK.....</b>	<b>V</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC .....</b>	<b>VI</b>
<b>POVZETEK.....</b>	<b>VII</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>VIII</b>
<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Fluorescenčna <i>in situ</i> hibridizacija .....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Zgodovina in razvoj <i>in situ</i> hibridizacijskih tehnik.....	1
1.1.2 Fluorescenčna <i>in situ</i> hibridizacija.....	1
1.1.3 FISH-preiskava .....	2
1.1.3.1 Direktni in indirektni FISH .....	2
1.1.3.2 Priprava tarčne DNA .....	3
1.1.3.3 Sestava sonde in označevanje.....	4
1.1.3.5 Spiranje po hibridizaciji in analiza FISH-preparata.....	7
<b>1.2 Izdelava DNA-sonde .....</b>	<b>8</b>
1.2.1 Kloniranje dednega materiala .....	8
1.2.2 Izbor kлона .....	10
1.2.3 Pridobivanje DNA.....	10
1.2.3.1 Gojenje gostitelja .....	10
1.2.3.2 Čiščenje DNA .....	11
1.2.3.3 Odstranjevanje RNA z RNazo A in izobarjanjem s CaCl <sub>2</sub> .....	12
1.2.3.4 Etanolno izobarjanje .....	12
1.2.4 Fragmentacija plazmidne DNA .....	12
1.2.4.1 Fragmentiranje z restrikcijskimi encimi .....	13
1.2.4.2 Fragmentiranje z DNazo I.....	13
1.2.5 Označevanje fragmentov .....	14
1.2.5.1 Universal Linkage System.....	14
1.2.5.2 Označevanje nukleotidov s pomikanjem zareze (»nick« translacija).....	14
1.2.5.4 Ločljivost ter občutljivost postopka in vrednotenje uspešnosti označevanja.....	15
<b>2. DELOVNA HIPOTEZA.....</b>	<b>17</b>
<b>3. MATERIALI IN METODE.....</b>	<b>18</b>
<b>3.1 Materiali in aparature .....</b>	<b>18</b>
3.1.1 Kloni .....	18

3.1.2	Materiali za izolacijo ter čiščenje plazmidne DNA .....	19
3.1.3	Materiali za fragmentacijo DNA .....	19
3.1.4	Materiali za elektroforezo ter etanolno izobarjanje .....	20
3.1.5	Materiali za fluorescentno označitev DNA.....	20
3.1.6	Materiali za izvedbo FISH-metode .....	21
3.1.7	Priprava raztopin .....	22
3.1.8	Aparature .....	24
<b>3.2</b>	<b>Metode .....</b>	<b>25</b>
3.2.1	Pridobivanje in izolacija BAC DNA.....	25
3.2.2	Vrednotenje DNA.....	30
3.2.3	Fragmentacija plazmidne DNA .....	31
3.2.4	Označevanje fragmentirane DNA .....	32
3.2.5	Priprava tarčne DNA .....	34
3.2.6	Dodatna obravnava tarčne DNA .....	37
<b>4.</b>	<b>REZULTATI IN RAZPRAVA.....</b>	<b>38</b>
<b>4.1</b>	<b>PRIDOBIVANJE IN IZOLACIJA BAC DNA.....</b>	<b>38</b>
4.1.1	Izopropanolno izobarjanje DNA.....	38
4.1.2	Izolacija DNA s HPLC-metodo .....	39
4.1.3	Odstranjevanje RNA iz vzorcev, izoliranih s HPLC metodo, z RNazo A .....	44
4.1.4	Izolacija DNA in razgradnja RNA s komercialnim kitom.....	45
4.1.5	Primerjava izkoristkov metod izolacije .....	46
<b>4.2</b>	<b>Specifična Fragmentacija DNA z encimi .....</b>	<b>48</b>
4.2.1	Restrikcija z EcoRI .....	48
4.2.2	Restrikcija z EcoRI in HindIII .....	49
4.2.3	Restrikcija z EcorI in HindIII po predhodnem razvijanju DNA .....	50
<b>4.3</b>	<b>Nespecifična fragmentacija z DNazo I.....</b>	<b>51</b>
4.3.1	Optimizacija časa inkubacije reakcijske zmesi z DNazo I in koncentracije DNA v reakcijski zmesi za klon, izolirane s HPLC in ob izobarjanju RNA s CaCl <sub>2</sub> .....	51
4.3.2	Preverjanje poteka fragmentacije z DNazo I za klon, izolirane s HPLC in brez izobarjanja RNA s CaCl <sub>2</sub> .....	52
4.3.3	Primerjava nefragmentiranih in fragmentiranih klonov, izoliranih s HPLC in brez izobarjanja RNA s CaCl <sub>2</sub> .....	53
4.3.4	Optimizacija koncentracije DNA v reakcijski zmesi z DNazo I za klon, izolirane s HPLC in brez izobarjanja RNA s CaCl <sub>2</sub> .....	54
4.3.5	Primerjava klonov, izoliranih s HPLC (brez izobarjanja RNA s CaCl <sub>2</sub> ) in klonov, izoliranih s komercialnim kitom ter fragmentacijskih zmesi z DNazo I.....	55
<b>4.3</b>	<b>Uspešnost označevanja DNA glede na metodo izolacije .....</b>	<b>57</b>
4.3.1	Označevanje z ULS-metodo .....	57
4.3.1.1	ULS označevanje klonov, izoliranih s HPLC (odstranjevanje RNA s CaCl <sub>2</sub> ) .....	57
4.3.2	Označevanje s pomikanjem zareze («nick» translacija).....	60
4.3.2.1	«Nick» translacija klonov, izoliranih s HPLC po izobarjanju RNA s CaCl <sub>2</sub> .....	60
4.3.2.2	«Nick» translacija pri klonih, izoliranih s HPLC brez izobarjanja RNA s CaCl <sub>2</sub> .....	61

4.3.2.3 »Nick« translacija klonov, izoliranih s komercialnim kitom .....	61
<b>4.4 Optimizacija hibridizacije in denaturacije.....</b>	<b>62</b>
4.4.1 Primerjava hibridizacijskih pufrov .....	62
4.4.2 Primerjava časa hibridizacije .....	64
4.4.3 Ugotavljanje specifičnosti vezave sonde preko predhodnega proganja kromosomov .....	64
<b>6. SKLEP .....</b>	<b>66</b>
<b>7. LITERATURA.....</b>	<b>68</b>
<b>PRILOGA A.....</b>	<b>71</b>

# KAZALO SLIK

<i>Slika 1: Indirektni (a) in direktni (b) FISH (8).</i>	3
<i>Slika 2: Fiksacija celic (10).</i>	4
<i>Slika 3: Ugotavljanje translokacije t(2;X) z WCP-sondo.</i>	5
<i>Slika 4: Fluorokromi za označevanje FISH-sond (11).</i>	5
<i>Slika 5: Formamid</i>	6
<i>Slika 6: Shema vektorja, ki smo ga uporabljali (pBeloBAC11) (21).</i>	10
<i>Slika 7: Izvedba virtualne restrikcije</i>	13
<i>Slika 8: ULS Linkage System (34).</i>	14
<i>Slika 9: Označevanje s pomikanjem zareze.</i>	15
<i>Slika 10: Rezultati virtualne restrikcije za klon RP11-793J2.</i>	31
<i>Slika 11: Elektroforezni gel po izopropanolnem izobarjanju lizata</i>	39
<i>Slika 12: Klasična gelska elektroforeza</i>	41
<i>Slika 13: Kromatogram klona 3</i>	43
<i>Slika 14: Suha gelska elektroforeza klonov 1, 3, 4 in 5, ki so bili izolirani s HPLC in obravnavani z RNazo A.</i>	44
<i>Slika 15: Suha gelska elektroforeza plazmidne DNA klonov 1, 3, 4 in 5, ki so bili izolirani s komercialnim kitom</i>	45
<i>Slika 16: Razmerje A260/A280 pri izolatih DNA, pridobljenih s posameznimi metodami.</i>	47
<i>Slika 17: Primerjava izkoristka izolacije DNA in razmerja A260/A280 med posameznimi metodami.</i>	47
<i>Slika 18: Klasična agarozna elektroforeza po restrikciji klonov z EcoRI</i>	48
<i>Slika 19: Suha agarozna elektroforeza po sočasni restrikciji klonov z EcoRI in HindIII</i>	49
<i>Slika 20: Suha agarozna elektroforeza klona 1 po predhodnem razvijanju</i>	50
<i>Slika 21: Suha agarozna elektroforeza po obravnavi klona 3 z DNazo I</i>	51
<i>Slika 22: Suha agarozna elektroforeza s primerjavo nefragmentiranega in fragmentiranega klona</i>	52
<i>Slika 23: Suha agarozna elektroforeza klonov 1, 3, 4, 5 in njihovih fragmentiranih različic</i>	53
<i>Slika 24: Suha agarozna elektroforeza klona 3 po obravnavi z DNazo I</i>	54
<i>Slika 25: Suha agarozna elektroforeza ob časih A) 6 min, B) 8 min in C) 10,5 min</i>	55
<i>Slika 26: Pričakovan elektroforezni gel</i>	56
<i>Slika 27: Suha agarozna elektroforeza</i>	57
<i>Slika 28: Interfaza (klon 3), ULS označevanje, 10 x prebitek Cot.</i>	58
<i>Slika 29: Primerjava metafaz klona 3</i>	59
<i>Slika 30: Metafaza (klon 3), označevanje s pomikanjem zareze, brez Cot-1.</i>	60
<i>Slika 31: Metafaza in interfazna jedra (klon 3)</i>	61
<i>Slika 32: FISH na metafazi. Klon 3, označevanje s pomikanjem zareze. A) brez Cot DNA, B) 10 x prebitek Cot DNA.</i>	62
<i>Slika 33: Primerjava hibridizacijskih pufrov. A) CEP (klon 4, 18q22.3), B) LSI (klon 1, 19q13.32) in C) Formamidni pufer, pripravljen po protokolu Invitrogena (klon 3, 12p13.31).</i>	63
<i>Slika 34: Primerjava A) predhodno progane metafaze in B) metafaze po hibridizaciji sonde</i>	65



# KAZALO PREGLEDNIC

<i>Tabela I: Optimalna velikost fragmentov glede na način označevanja ter proizvajalca</i> .....	13
<i>Tabela II: Ekstinkcijski koeficienti in korekcijski faktorji za uporabljena barvila</i> .....	16
<i>Tabela III: Oznake uporabljenih BAC klonov</i> .....	18
<i>Tabela IV: Seznam uporabljenih materialov za izolacijo in čiščenje plazmidne DNA</i> .....	19
<i>Tabela V: Seznam uporabljenih materialov za specifično fragmentacijo DNA</i> .....	19
<i>Tabela VI: Seznam uporabljenih materialov za elektroforezo in etanolno izobarjanje</i> .....	20
<i>Tabela VII: Seznam uporabljenih materialov za fluorescentno označitev DNA</i> .....	20
<i>Tabela VIII: Seznam uporabljenih materialov za izvedbo FISH-metode</i> .....	21
<i>Tabela IX: Seznam uporabljenih aparatov</i> .....	24
<i>Tabela X: Sestava uporabljenih pufrov</i> .....	28
<i>Tabela XI: Primer restrikcijske zmesi (40)</i> .....	31
<i>Tabela XII: Sestava delovne raztopine DNaze I</i> .....	32
<i>Tabela XIII: Priprava reakcijske zmesi</i> .....	33
<i>Tabela XIV: Izmerjena koncentracija in razmerje A260/A280</i> .....	38
<i>Tabela XV: Rezultati meritev absorbanc in izračunana masa DNA, pridobljene z izolacijo s HPLC</i> .....	40
<i>Tabela XVI: Legenda elektroforeznega gela za DNA, pridobljeno s HPLC (serije 1–11)</i> .....	42
<i>Tabela XVII: Primerjava razmerja A260/280</i> .....	44
<i>Tabela XVIII: Pridobivanje DNA s PureLink® HiPure Plasmid Miniprep Kit</i> .....	45
<i>Tabela XIX: Izračun količine DNA, ki jo s posamezno metodo pridobimo iz 50 mL lizata</i> .....	46
<i>Tabela XX: Seznam nanosov v žepke elektroforeznega gela</i> .....	48
<i>Tabela XXI: Priprava reakcijske zmesi z DNazo za vzorec 3A in 3B</i> .....	51
<i>Tabela XXII: Legenda nanosov v žepke elektroforeznega gela</i> .....	52
<i>Tabela XXIII: Sestava reakcijskih zmesi z DNazo I za klon 1</i> .....	54
<i>Tabela XXIV: Legenda nanosov v žepke gela</i> .....	56
<i>Tabela XXV: ULS označevanje klona 3 (<math>c_{DNA} = 17 \mu\text{g/mL}</math>)</i> .....	58
<i>Tabela XXVI: Izmerjena absorbanca in izračun DoL</i> .....	60
<i>Tabela XXVII: Meritve absorbanc za sondo klona 3 (»nick« translacija)</i> .....	61
<i>Tabela XXVIII: Izmerjena absorbanca in izračun DoL (klon 3, 12p13.31)</i> .....	62
<i>Tabela XXIX: Izmerjena koncentracija in razmerje A260/A280 po izolaciji s HPLC</i> .....	71

## POVZETEK

S fluorescenčno *in situ* hibridizacijo (FISH) ugotavljamo in potrjujemo kromosomske preureditve. Za ugotavljanje pogostejših kromosomskih preureditev se uporabljajo komercialno dostopne sonde, če pa gre za preureditve, za katere komercialne sonde niso dostopne, jih lahko izdelamo sami. V diplomski nalogi smo skušali izdelati DNA-sonde za specifične točke preloma na kromosomih, za katere komercialno dostopne sonde niso na voljo. V začetni fazi smo izbrali primerne BAC-klone, jih ustrezno izolirali in očistili, nato fragmentirali ter fluorescentno označili DNA. Za izolacijo smo preizkusili tako visokotlačno tekočinsko kromatografijo (HPLC) kot izolacijo in čiščenje s komercialnim kitom, ki prav tako temelji na ionsko-izmenjevalni kromatografiji. Ker mora biti DNA pred fragmentiranjem čim bolj čista, smo jo skušali očistiti z alkoholnim izobarjanjem, RNA pa odstraniti tako encimsko z RNazo A kot z izobarjanjem RNA s  $\text{CaCl}_2$ . Pridobljeno DNA smo nadalje fragmentirali. Želeli smo primerjati specifično fragmentacijo z restrikcijskimi endonukleazami in nespecifično fragmentacijo z DNazo I. Ker je bila DNA pridobljena na različne načine, primerjava metod ni toliko zanesljiva, kot bi bila v primeru enotnega načina pridobivanja in čiščenja klona. Za označevanje DNA smo uporabili metodo označevanja s pomikanjem zareze (nick translacija) in označevanje preko platinastih vmesnikov (ULS). Izdelane sonde so se z veliko afiniteto vezale na jedra celic, vendar smo pri pregledu metafaznih kromosomov ugotovili, da se sonda na kromosome ne veže s pričakovano specifičnostjo. Problem nespecifične vezave smo skušali rešiti z optimizacijo časa hibridizacije, sestave hibridizacijskega pufru ter dodajanjem enoverižne DNA s ponavljajočimi zaporedji (Cot-1 DNA). Dodatek Cot-1 DNA je specifičnost izboljšal; število nespecifičnih signalov se je zmanjšalo. Ugotovili smo, da na stabilnost izolirane BAC DNA močno vplivajo grobi postopki (temperaturni šoki, centrifugiranje, vorteksiranje), pri katerih zaradi strižnih sil prihaja do razgradnje DNA. Zato je za izolacijo DNA HPLC manj primeren način od izolacije na kromatografski koloni komercialnega kita. Za bolj specifično vezavo sonde na tarčno DNA bi bilo potrebno pridobiti fragmente DNA optimalne velikosti (100–300 bp) ter doseči boljše odstranjevanje nečistoč, saj te motijo tako encimsko fragmentiranje kot kasnejše označevanje.

## ABSTRACT

Fluorescent *in situ* hybridization (FISH) is a reliable tool for the detection of chromosomal aberrations. Even though probes for detection of common chromosomal aberrations are commercially available nowadays, a FISH probe can also be constructed by various labelling techniques that are useful if one wishes to detect a less common aberration or one that is not yet described in literature. The goal of thesis was to construct probes that would detect certain chromosomal translocations with great reliability and specificity. Complementary DNA had to be isolated and cleaned from appropriate clones which was followed by DNA fragmentation and labelling. For isolation of BAC DNA from *E.coli* host high performance liquid chromatography (HPLC) as well as a commercial BAC DNA isolation kit were used which are both based on anion exchange chromatography. Removal of RNA and other contaminants was performed by alcohol precipitation, enzymatic RNA removal by RNase A and by RNA precipitation with CaCl<sub>2</sub>. Fragmentation of DNA was achieved by specific fragmentation by restriction endonucleases as well as by non-specific DNase I cleavage. Since DNA template for both fragmentation procedures did not derive from the same isolation method, fragmentation efficiency may not be comparable. For labelling we used nick translation as well as ULS labelling (universal linkage system). Constructed probes bind to cell nucleus but metaphase spreads showed that binding of probe to DNA was not specific. We tried to achieve higher specificity by optimising hybridization time, hybridization buffer components and with addition of single stranded DNA from human placenta (Cot-1 DNA) which showed improvement by reducing the amount of nonspecific signals. We noticed that stability of isolated BAC DNA greatly depends on the presence of rough procedures such as temperature changes, centrifuging and vortexing which could be due to high shear forces. As a result, HPLC was found to be less suitable for isolation of DNA than isolation on chromatographic column of the BAC DNA isolation kit. Since certain contaminants such as RNA can compete with DNA for enzymatic restriction and even labelling, additional research of gentle removal of contaminants would be recommended in order to obtain probes with higher specificity. One of common reasons for non-specific hybridization is the presence of repeats, therefore optimization of fragmentation towards acquiring smaller fragments (100 – 300 bp) could also lead to greater specificity of the probe (17).

## Seznam okrajšav

AEC – angl. *anion exchange chromatography*; anionska izmenjevalna kromatografija

BAC – angl. *bacterial artificial chromosome*; umetni bakterijski kromosom

BSA – angl. *bovine serum albumin*; goveji serumski albumin

cDNA – angl. *chromosomal DNA*; kromosomska DNA

DAPI – 4', 6'-diamidino-2-fenil-indol

DEAE – dietilaminoetil

DMSO – dimetisulfoksid

DNA – angl. *deoxyribonucleic acid*; deoksiribonukleinska kislina

dUTP – angl. *deoxyuridine triphosphate*; deoksiuridin-trifosfat

EtBr – etidijev bromid

FISH – fluorescenčna *in situ* hibridizacija

FITC – fluorescein izotiocianat

gDNA – genomska DNA

GTG – G-proganje s tripsinom in Giemso

HPLC – angl. *high performance liquid chromatography*; visokotlačna tekočinska kromatografija

ISH – *in situ* hibridizacija

KML – kronična mieloična levkemija

NP-40 – Nonidet P-40

PCR – angl. *polymerase chain reaction*; verižna reakcija s polimerazo

pDNA – plazmidna DNA

PEG – polietilenglikol

SDS – angl. *sodium dodecyl sulfate*; natrijev dodecil sulfat

SOP – standardni operativni postopek

SSC – angl. *saline-sodium citrate*; citratni pufer z NaCl

TE-pufer – Tris-EDTA-pufer

TRIS – tris(hidroksimetil)aminometan

UKC – univerzitetni klinični center

ULS – angl. *universal linkage system*; univerzalni povezovalni sistem

YAC – angl. *yeast artificial chromosome*; umetni kromosom kvasovke

# 1. UVOD

## 1.1 FLUORESCENČNA *IN SITU* HIBRIDIZACIJA

### 1.1.1 ZGODOVINA IN RAZVOJ *IN SITU* HIBRIDIZACIJSKIH TEHNIK

Pardue, Gall ter John so leta 1969 razvili *in situ* hibridizacijsko tehniko (ISH), s katero lahko preko izkoriščanja specifičnosti vezave komplementarnih enoverižnih DNA-molekul ugotovljamo spremembe v dednem zapisu. Čeprav se je v prvih letih metoda soočala z mnogimi pomanjkljivostmi, so bile te s časom in razvojem sodobne tehnologije odpravljene ali optimizirane, ISH pa je postala eno najbolj uporabljenih orodij v citogenetiki in molekularni biologiji današnjega časa.

Ena od pomanjkljivosti ISH v sedemdesetih letih prejšnjega stoletja je bila nedostopnost DNA-zaporedij, saj je bila njihova izdelava v času pred dobo molekularnega kloniranja praktično nemogoča, stroški pa visoki. Odkritje človeškega genoma leta 2003 je vodilo do enostavnejših in cenejših tehnik izdelave DNA-zaporedij. Ker je ISH spočetka temeljila na radioaktivno označenih sondah, je bilo delo podvrženo radioaktivnemu sevanju, čas uporabnosti sond kratek, ločljivost nizka ter stroški shranjevanja in obdelave vzorcev visoki. Napredna sodobna tehnologija zadnjih nekaj desetletij je omogočila uporabo varnejših ter zmogljivejših postopkov, ki temeljijo na imunocitokemičnih ali fluorescenčnih tehnikah (1), (2).

Dandanes je ISH primerna za splošno laboratorijsko uporabo, pri čemer se največ uporablja za določanje virusnih okužb, raziskave v celični biologiji, dokazovanje genomskih sprememb, ki so zaznavne na metafaznih ali interfaznih jedrih celic, ter za razkrivanje informacij o genskem izražanju (3).

### 1.1.2 FLUORESCENČNA *IN SITU* HIBRIDIZACIJA

Fluorescenco definiramo kot fizikalni pojav, pri katerem snov po absorpciji svetlobe ali drugega elektromagnetnega sevanja emitira svetlobo, ki ima daljšo valovno dolžino in nižjo energijo kot absorbirano sevanje (4). Fluorescenčna *in situ* hibridizacija (FISH) fluorescenco izkorišča kot mehanizem, preko katerega opazujemo rezultate hibridizacije med komplementarnima molekulama sonde in tarčne DNA. V prispevku

»Fluorescence In Situ Hybridization (FISH)« Clare O'Connor FISH primerja z iskanjem igle v seniku, pri čimer je igla DNA, ki bi jo radi zaznali, preostala kromosomska DNA pa seno (5). FISH si lahko predstavljamo kot magnet, s pomočjo katerega do igle pridemo veliko hitreje, kot če bi eno za drugo pregledovali vsako slamico.

Molekularna citogenetika, ki se ukvarja z vlogo kromosomov v človeškem organizmu, FISH uporablja za lokalizacijo genov in specifičnih genomskih regij na kromosomih. Tarčno DNA lahko iščemo na metafaznih kromosomih, interfaznih celičnih jedrih ali tkivih. Ker so fluorescenčne sonde stabilne, se lahko shranjujejo daljše časovno obdobje. Za izvedbo FISH-a imamo na voljo širok spekter komercialno pripravljenih sond, če pa želimo zaznati spremembo genomskega materiala, za katero sonda ni na voljo, lahko uporabimo komercialno pripravljene kite, s katerimi sondo izdelamo sami ali jo damo izdelati po naročilu (6).

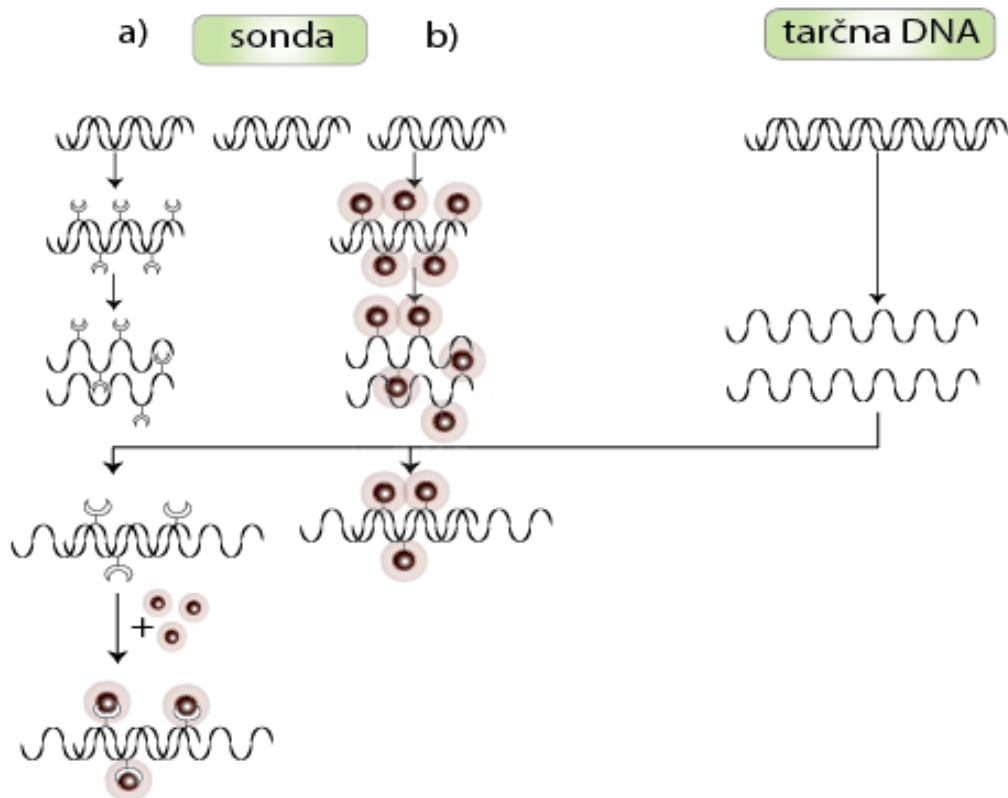
### 1.1.3 FISH-PREISKAVA

#### 1.1.3.1 Direktni in indirektni FISH

Princip FISH izhaja iz metode »Southern blot« in temelji na zmožnosti vezave med komplementarnima enoverižnima DNA-verigama. Tarčno DNA pridobivamo iz tkiv, kot so venska kri, aspirat kostnega mozga, parafinske rezine tkiva, sperma in oplojena jajčeca idr. Kromosomi so v interfaznih ter metafaznih celicah pritrjeni na predmetno stekelce. Sonda je običajno označena preko encimske ali kemijske vgradnje spremenjenih nukleotidov v vijačnico, glede na način označevanja pa ločimo direktni in indirektni FISH.

Pri indirektnem FISH-u je sonda označena s haptenom, ki sam po sebi ne fluorescira (dinitrofenol, digoksinin, estradiol idr.). Nanjo se vežejo protitelesa, ki so označena s fluorokromom, molekulo s številnimi konjugiranimi dvojnimi vezmi, ki po svetlobnem vzbujanju emitira svetlobo. Najpogosteje gre za interakcijo med biotin-dUTP in avidinom, na katerega je vezan fluorokrom (Slika 1).

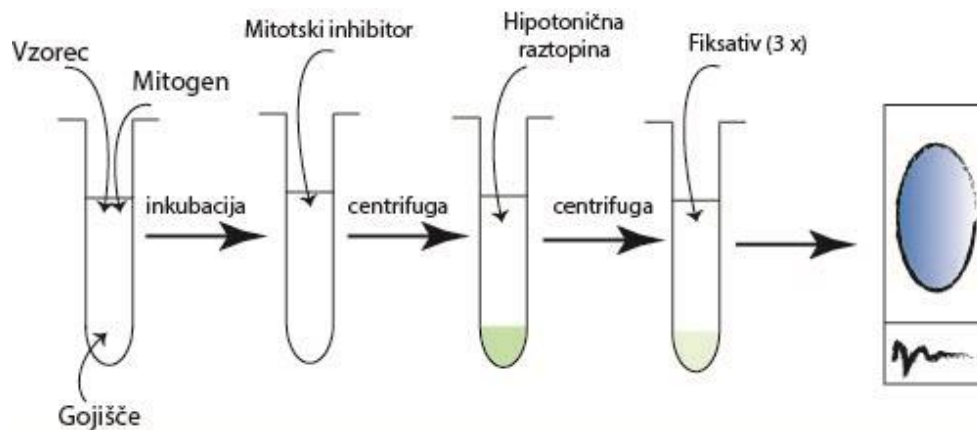
Pri direktnem FISH-označevanju pa so v sondo vključeni deoksiuridintrifosfati (dUTP-ji), ki so na fluorokrom vezani neposredno ter po vgradnji v sondo fluorescirajo. Prednost direktnega označevanja je v krajšem času izdelave, slabost pa v nižji intenziteti signalov, zato se pri označevanju zelo majhnih fragmentov običajno uporablja indirektno označevanje (Slika 1) (7).



Slika 1: Indirektni (a) in direktni (b) FISH (8).

### 1.1.3.2 Priprava tarčne DNA

Namen priprave tarčne DNA je izolacija in koncentriranje celic ter čim boljša ohranitev morfologije DNA. V prvi fazi celice, ki nas zanimajo (običajno levkociti), gojimo. Če se ne pomnožujejo same, pomoževanje lahko spodbujamo z mitogeni. Z mitotskim inhibitorjem (najpogosteje kolhicin), ki preko vezave na tubulin preprečuje tvorbo niti delitvenega vretena, zagotovimo zaustavitev rasti celic v metafazi. Nato jih izpostavimo hipotonični raztopini, ki zaradi nizke ionske jakosti spodbuja osmozo. Ta povzroči nabrekanje celice in prerazporeditev kromosomov, ki se oddaljijo en od drugega. S fiksativom (običajno raztopina metanola in očetne kisline v razmerju 3 : 1) celice fiksiramo v nabreklem stanju ter istočasno liziramo rdeče krvničke, ki niso bile predhodno odstranjene (Slika 2). Tako pripravljen vzorec nanese na stekelca ter jih staramo (pri zvišani temperaturi), s čimer izboljšamo kasnejše proganje kromosomov. Alternativa staranju z visoko temperaturo je staranje s pomočjo UV-svetlobe (9).



Slika 2: Fiksacija celic (10).

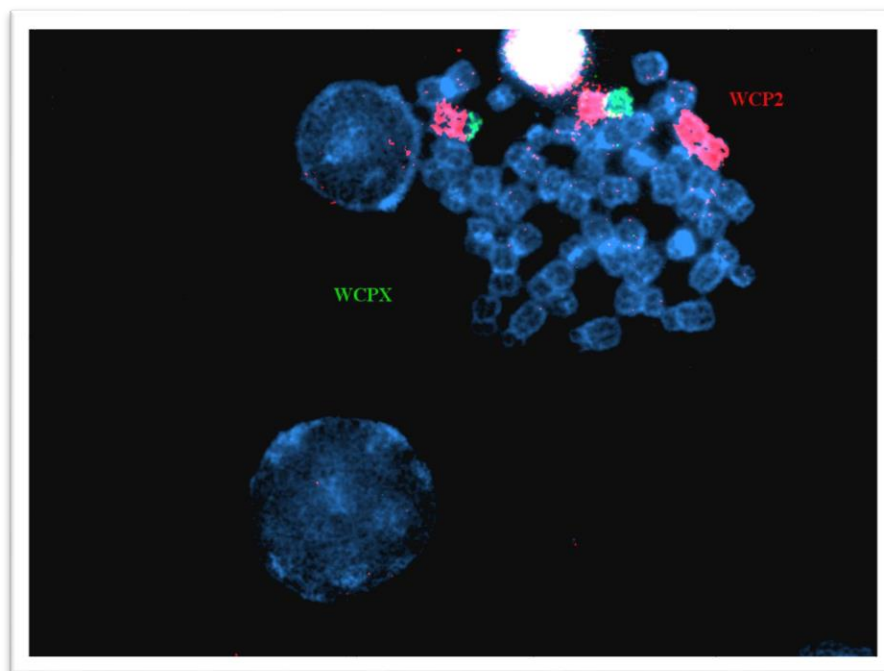
V naslednjem koraku preko razgradnje celične stene s proteolitičnimi encimi sonde omogočimo dostop do jedra celice, kjer se nahaja tarčna DNA. Nenukleinski gradniki celičnega jedra in citoplazme se med obilnim spiranjem s pufrom sperejo s stekelca. Z naknadno fiksacijo s fiksativi, ki temeljijo na aldehidu (npr. s formaldehidom), se izognemo izgubi tarčnega materiala med nadaljnjim postopkom (10).

#### 1.1.3.3 Sestava sonde in označevanje

DNA-sonde za FISH se v grobem delijo na tri različne tipe:

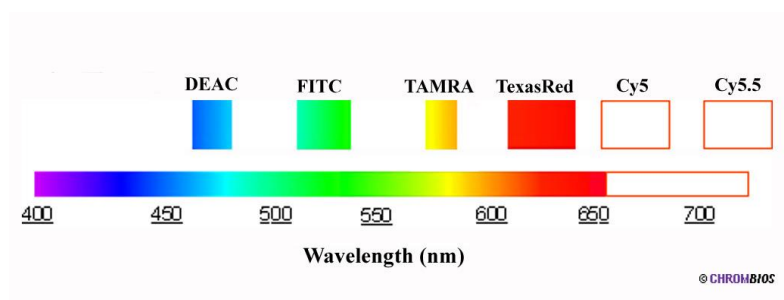
- ∅ Lokusno specifične sonde hibridizirajo na manjše področje kromosoma, zato so najbolj uporabne za lokalizacijo genov.
- ∅ Centromerne in telomerne sonde so sestavljene iz ponavljajočih se zaporedij, ki se nahajajo v centromerah ali telomerah kromosomov. Ker lahko vsak kromosom označimo s sondo drugačne barve, so te sonde še posebej primerne za ugotavljanje števila kromosomov ter diagnosticiranje monosomij in trisomij.
- ∅ WCP (whole chromosome probes) sonde so sestavljene iz več manjših sond, ki skupaj označijo celoten kromosom. Primerne so za ugotavljanje kompleksnejših kromosomskih preureditev (Slika 3) (10).





Slika 3: Ugotavljanje translokacije t(2;X) z WCP-sondo (Citogenetski laboratorij KO za hematologijo, UKC Ljubljana).

Med fluorokrome, ki se najpogosteje uporabljajo za označevanje DNA-sond, spadajo fluorescein izotiocianat (FITC), ki emitira zeleno fluorescenco, in barvila, ki emitirajo oranžno ali rdečo fluorescenco, kot so Cy3™ ali TexasRed™. Uporablja se tudi Cy5™, ki emitira v rdeče – bližnje infrardečem območju in ga lahko zaznamo le z občutljivo kamero. Pri enakih ali podobnih valovnih dolžinah kot zgoraj naštetih emitirajo tudi drugi komercialno dostopni fluorokromi, npr. Rhodamin 110, karboksitetrametilrodamin (TAMRA) in drugi (Slika 4). Intenziteto signalov tako indirektno kot direktno označenih sond lahko povečamo s »sendvič« tehniko, pri kateri po hibridizaciji sonde in tarčne DNA preparat izpostavimo fluorescentno označenim protitelesom, ki se vežejo na sondo, vendar je slabost takšne ojačitve ta, da je običajno povečana tudi intenziteta nespecifično vezanih sond iz ozadja (11).



Slika 4: Fluorokromi za označevanje FISH-sond (11).

#### 1.1.3.4 Denaturacija in hibridizacija sonde na tarčno DNA

Da med molekulama tarčne DNA in sondo poteče hibridizacija, je treba obe molekuli denaturirati. Denaturacija DNA je reverzibilen proces, pri katerem se zaradi prekinitve vodikovih vezi dvojna vijačnica razklene na dve komplementarni DNA-molekuli. Dosežemo jo lahko z visoko ali nizko pH vrednostjo, eksonukleazno odstranitvijo ene vijačnice ali preko segrevanja vzorca nad  $T_m$  (temperaturo taljenja) DNA-verige (12), (13).

$T_m$  je temperatura, pri kateri je polovica baznih parov v dvojni vijačnici razklenjena, odvisna pa je od dolžine DNA-molekule, njene zgradbe ter sestave topila. Preostre pogoje, ki lahko škodujejo morfologiji DNA, omilimo z dodatkom organskega topila (običajno formamida (Slika 5)). Ta zaradi tekmovanja za tvorbo vodikovih vezi z DNA pri določeni temperaturi destabilizira dvojno vijačnico DNA ter zniža njeno  $T_m$  (zvečanje koncentracije formamida za 8 % zniža  $T_m$  za približno 5 °C (17)). Ko je raztopina z DNA segreta nad  $T_m$ , se verigi razkleneta in DNA molekula denaturira (14).

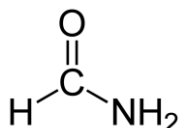
Sondo in tarčno DNA lahko denaturiramo hkrati ali ločeno. V molekularni citogenetiki se običajno uporablja ločena denaturacija, saj pri tej do sprememb v morfologiji DNA prihaja v manjši meri kot pri ko-denaturaciji, ki jo uporabljamo pri analizi tkiv. Prednost ko-denaturacije pred ločeno denaturacijo je v manjšem številu korakov pri pripravi in posledično krajšem času in stroških preiskave (10). Pri ko-denaturaciji formamid do DNA dovajamo preko formamidnega pufra, v katerem neposredno pred nanosom redčimo sondo, pri ločeni denaturaciji pa poleg redčenja sonde s hibridizacijskim pufrom tudi stekelca s tarčno DNA segrevamo v kadički z raztopino 70 % formamida v 2 x SSC (pH = 7).

Sestava hibridizacijskih pufrov se rahlo razlikuje glede na proizvajalca (15):

CEP hibridizacijski puffer (Vysis): 55 % formamid, 1 x SSC, 10 % dekstran sulfat

LSI/WCP hibridizacijski puffer (Vysis): 50 % formamid, 2 x SSC, 10 % dekstran sulfat

Hibridizacijski puffer, pripravljen po navodilu Invitrogena (41): 65 % formamid, 1 x SSC



Slika 5: Formamid z DNA tekmuje za tvorbo vodikovih vezi in tako stabilizira enoverižno molekulo (16).

Po uspešni denaturaciji poteče hibridizacija ali ponovna vzpostavitev nekovalentnih in zaporedno specifičnih vezi med molekulama sonde in tarčne DNA. Za čim učinkovitejšo hibridizacijo moramo molekulam omogočiti dovolj visoko koncentracijo sonde, čas ter primerno temperaturo inkubacije (37 °C). Pri določenih vrstah sond (kromosomi in kromosomski segmenti, YACs (yeast artificial chromosomes), BACs (bacterial artificial chromosomes) in PACs (p1 plasmid artificial chromosomes)), pri katerih lahko pričakujemo veliko kopij ponavljajočih se zaporedij, je za preprečitev navzkrižne hibridizacije pomembno izvesti CISS-hibridizacijo (chromosomal *in situ* supression). Pri tej je sonda predhodno hibridizirana s presežkom neoznačenih ponavljajočih se zaporedij DNA (DNA fragmenti iz človeške posteljice, obogateni s ponavljajočimi se zaporedji, Cot-1 DNA). Cot-1 DNA se veže na ponavljajoča se zaporedja, ki posledično ne morejo hibridizirati s ponavljajočo se kromosomsko DNA, enak učinek pa dosežemo tudi z dodatkom tRNA ali določenih detergentov, npr. SDS (17).

Učinkovitost hibridizacije je odvisna od ustreznosti vezave komplementarnih nukleotidov med seboj. Nanjo vplivajo (10):

- ⊗ Temperatura: pri previsokih temperaturah do hibridizacije ne pride, ker je za obe enoverižni molekuli energetsko bolj ugodno ločeno stanje, pri prenizki temperaturi pa se sonda veže nespecifično in se kasneje spere s stekla.
- ⊗ Koncentracija formamida: višja koncentracija formamida pomeni močnejšo destabilizacijo nekomplementarno vezanih hibridov ter posledično večjo specifičnost.
- ⊗ Koncentracija soli: nižja ionska jakost raztopine vodi do boljše specifičnosti vezave.
- ⊗ Dolžina sonde: daljša kot je molekula sonde, večja je specifičnost vezave med sondo in tarčno DNA.
- ⊗ Čas hibridizacije je odvisen od zaporedja DNA. Visoko ponavljajoča zaporedja za hibridizacijo potrebujejo 2–4 ure, tista z nizkim številom kopij pa 12 in več ur.
- ⊗ Čistost sonde: sonde z manj primesmi in nečistočami hibridizirajo bolj specifično.

Optimalni pogoji so ponavadi vzpostavljeni empirično, saj ima vsaka sonda drugačno nukleotidno zaporedje ter število označenih nukleotidov, ki znižujejo  $T_m$  (17).

#### 1.1.3.5 Spiranje po hibridizaciji in analiza FISH-preparata

Pred pregledom stekelc pod mikroskopom je treba nevezano sondo s stekelca odstraniti s spiranjem ter preparat zaščititi pred bledenjem fluorescenčnega signala. Da so signali boljše vidni, kromosome in jedra označimo s kontrastnim fluorescentnim barvilom

DAPI (4', 6'-diamidino-2-fenil-indol), ki ekscitira v UV-področju in kromosomi in jedra zažarijo v modri fluorescenci. Kot alternativo lahko uporabljamo propidijev jodid, ki DNA obarva rdeče.

Četudi je FISH široko uporabljana in uveljavljena metoda, morajo biti raziskovalci pozorni na nekaj nevarnosti, ki lahko vodijo do napak in nepravilnih rezultatov preiskave:

- ∅ Navzkrižna hibridizacija (kros-hibridizacija) je posledica medsebojne vezave ponavljajočih se zaporedij na netarčne kromosome, ki lahko povzroči nespecifičnost signalov. Delno jo lahko odpravimo z dodatkom neoznačene DNA ali frakcije Cot-1 DNA, ki s sondo tekmuje za vezavo na netarčno DNA.
- ∅ Učinkovitost hibridizacije: četudi je učinkovitost hibridizacije za večino sond zelo dobra, je redko blizu 100 %, za določene oblike sonde (cDNA in fragmenti, krajši od 600 bp) pa lahko zelo nizka.
- ∅ Ločljivost: navkljub odlični ločljivosti signalov se njihove lokacije lahko od celice do celice razlikujejo, še posebno pri metafaznih celicah zaradi različnih stopenj kondenzacije kromatina. Ključni orodji za reševanje tega problema sta analiza dovolj velikega števila celic in ocena porazdelitve signala med njimi.
- ∅ Človeška napaka: zadnja, a nikakor ne najmanj pomembna nevarnost, pa je prisotnost človeških napak pri predpripravi, pripravi ter analizi FISH-preparata. Interpretativne napake zmanjšamo tako, da FISH-preiskavo vedno opravljata dva izkušena analitika, laboratorijske napake pa bodo hitreje odpravljene, če sondo nanašamo na dva zaporedna preparata in ugotavljamo, ali se v obeh primerih veže na isto mesto (12).

## 1.2 IZDELAVA DNA-SONDE

### 1.2.1 KLONIRANJE DEDNEGA MATERIALA

V delu »Molecular Biology« Turner s sodelavci kloniranje dednega materiala opredeljuje kot postopek, pri katerem relativno kratek fragment genoma s tarčno DNA vložimo v vektor, ki zaradi svoje sposobnosti samostojnega pomnoževanja tvori rekombinantno DNA, postopek pomnoževanja pa se lahko nadaljuje tako v izvornem genomu kot v gostitelju (13). Ta novodobni postopek omogoča ustvarjanje velikega števila enakih molekul dednega materiala, ki ga potrebujemo za obravnavo ter izvedbo poskusov.

Najobičajnejša gostiteljska organizma sta bakterija *E. coli* in za večje fragmente

kvasovka *Saccharomyces cerevisiae*, pri čemer so prednosti *E.coli* njena dostopnost, hitro razmnoževanje pod nezahtevnimi pogoji ter z minimalno opremo in njena prefinjenost ter raznovrstnost.

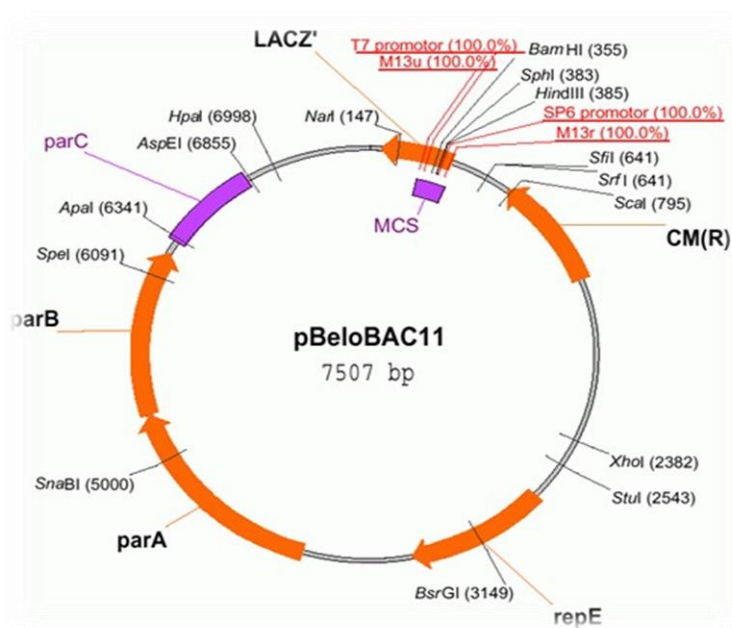
Vektor, v katerega vgrajujemo DNA-fragment, mora izkazovati sposobnost pomnoževanja, imeti eno ali več klonirnih mest, preko katerih lahko vanj vstavimo tujo DNA ter selektivnostni označevalec (gen za antibiotično rezistenco ali galaktozidazno aktivnost). V biotehnologiji dandanes uporabljamo več vrst vektorjev, izbira najprimernejšega pa je odvisna predvsem od narave DNA-materiala, ki ga želimo klonirati (18):

- ❖ Plazmid je vektor v obliki dvojnoverižne krožne DNA-molekule, ki se samostojno pomnožuje v bakteriji. Zaradi tesnega pakiranja aromatskih baz je hidrofobnost znotraj dvojnega heliksa povečana ter lahko povzroči nastopanje plazmida v različnih strukturnih oblikah. Najbolje prilagojena za aktivno vlogo v celični fiziologiji je superzvita oblika plazmidne DNA. Z njimi lahko kloniramo manjše fragmente velikosti od 0,1 do 10 kbp.
- ❖ Bakteriofag oz. fag je vektor v obliki virusa, ki okuži bakterijo ter se v njej samostojno razmnožuje. Sestavljen je iz proteinskega ovoja, ki ščiti dedni material, ter ima lahko enostavnejšo ali zapleteno strukturo. Preko fagov lahko kloniramo fragmente velikosti 8–20 kbp.
- ❖ Kozmid je plazmid, ki zaradi *cos* zaporedij  $\lambda$ -bakteriofaga poseduje lastnosti plazmidov in fagov. Preko *cos* mest oz. kohezivnih koncev se tuji geni lahko prenašajo med celicami preko transdukcije, s čimer preprečimo nestabilnost, ki jo plazmidi izkazujejo pri večjih vstavkih DNA. Velikosti fragmentov, ki jih kloniramo s kozmidi, so med 35 in 50 kbp.
- ❖ BAC (bacterial artificial chromosome) oz. umetni bakterijski kromosomi so plazmidni vektorji, v katere lahko vstavljamo večje fragmente DNA. Vstavki DNA so od 75 do 350 kbp, medtem ko klasičen plazmid nosi fragmente, krajše od 10 kbp.
- ❖ Za izredno velike fragmente DNA uporabljamo YAC (yeast artificial chromosome), s pomočjo katerih lahko kloniramo fragmente velikosti do 3000 kbp (18).

Pri insertih večjih velikostnih razredov se odločamo med vektorjema BAC in YAC. Čeprav YAC lahko gostijo zelo velike fragmente, kloni pogosto vsebujejo vključke nesosednjih segmentov genoma in med pomnoževanjem izgubijo dele DNA. BAC so manjši, a stabilnejši, in omogočajo lažjo transformacijo, hitrejšo rast gostitelja (*E.coli*) ter enostavnejše čiščenje z običajnimi plazmidnimi tehnikami (19).

## 1.2.2 IZBOR KLONA

DNA-material za izdelano sondo mora biti komplementaren tarčni DNA, ki jo želimo zaznati. Izbiramo ga v genomskih knjižnicah, pri čemer smo pozorni, da izbrano sosledje ustreza mestu na kromosomu, na katerem je prišlo do preloma. Velikost klona mora biti dovolj velika, da dosežemo dovolj jasen signal in specifičnost, vendar pa se z večanjem velikosti klona veča tudi verjetnost nespecifičnega označevanja v ozadju zaradi prisotnosti ponavljajočih se zaporedij (npr. *Alu*- in *Kpn*-zaporedij), ki se pojavljajo čez celoten genom (9). Pri izboru vektorja, v katerega bo klon dostavljen, se proizvajalec odloča glede na pričakovano velikost in naravo molekule, ki jo želimo klonirati (Slika 6).



Slika 6: Shema vektorja, ki smo ga uporabljali (pBeloBAC11) (21).

## 1.2.3 PRIDOBIVANJE DNA

### 1.2.3.1 Gojenje gostitelja

Liofilizat bakterijske kulture *E.coli* je treba rehidrirati ter po navodilih proizvajalca gojiti v mediju z antibiotikom, na katerega so bakterije z vstavljenim BAC-vektorjem neobčutljive. Ko rast iz eksponentne faze preide v stacionarno, se gojenje prekine ter iz bakterijske brozge izolira DNA.

DNA iz vektorja lahko izoliramo z alkalno ali encimsko lizo, izobarjanjem DNA s polietilen glikolom (PEG) ali drugimi metodami. Najhitrejša je uporaba komercialno dostopnih kitov, ki DNA izolirajo in očistijo v enem koraku, lahko pa postopke izolacije in

čiščenja izvajamo posamično.

Leta 1979 sta Brinboim in Doly razvila alkalno lizo. Pri tej metodi bakterijsko suspenzijo izpostavimo detergentu in močni bazi, zaradi česar pride do razbitja celične stene (22). Sledi sproščanje ter denaturacija genomske DNA, celičnih sten in proteinov. Detergent SDS-celice lizira ter denaturira proteine, bazični pogoji pa denaturirajo genomsko in plazmidno DNA ter proteine. Sledi nevtralizacija, pri kateri se genomska ter plazmidna DNA renaturirata. Genomska DNA se zaradi naključne renaturacije izobori, plazmidna pa ostane raztopljena v supernatantu (23).

### 1.2.3.2 Čiščenje DNA

Namen čiščenja DNA je odstranitev gostiteljske DNA, RNA ter endotoksinov, za kar se običajno poslužujemo kromatografskih tehnik ali ultracentrifugiranja. Med najbolj priljubljene metode tako v laboratorijski kot industrijski uporabi spada tekočinska kromatografija, saj je ustrezna za pridobivanje večjih količin DNA, prav tako pa ne uporablja reagentov, ki niso primerni za proizvodnjo biomolekul za humano uporabo (EtBr, CsCl ter živalsko pridobljeni encimi) (24).

Anionsko-izmenjevalna kromatografija (AEC) je ena izmed najpogosteje uporabljanih tehnik za koncentriranje, čiščenje ter kvantifikacijo DNA, pridobljene iz vektorjev. Med prednosti te kromatografske tehnike spadajo hitrost, odsotnost uporabe organskih topil, možnost razkuževanja sistema z natrijevim hidroksidom ter možnost uporabe različnih stacionarnih faz. Princip metode temelji na interakciji med negativno nabitimi fosfatnimi skupinami DNA in pozitivno nabitimi ligandi stacionarne faze. Na jakost vezave ter koncentracijo soli, potrebno za izpiranje, vplivajo dolžina, sestava ter oblika nukleinskih kislin. Z dovolj visoko koncentracijo soli v lizatu (nad 0,4 M NaCl) večini RNA ter ostalim nizkomolekularnim nečistočam preprečimo adsorpcijo na kromatografsko kolono (24). Potencialne težave pri čiščenju plazmidne DNA s tekočinsko kromatografijo predstavljata sočasno spiranje nečistoč ter nizka selektivnost, literatura pa zaradi visoke jakosti strižnih sil predvideva tudi možne težave pri obdelavi večjih DNA-molekul (nad 20 kbp) (27). V doktorski disertaciji z naslovom »Razvoj tehnologije čiščenja plazmidov in bakteriofagov namenjenih humani uporabi« Smrekar ugotavlja, da pri čiščenju biomolekul s tekočinsko kromatografijo največjo težavo predstavlja odstranitev nečistoč, ki so najbolj podobne tarčni molekuli – gDNA, oc pDNA, l pDNA ter delno RNA ter endotoksinov (24).

Ker konvencionalne stacionarne faze BAC DNA zaradi velike molekulske mase ne

morejo zadržati, je bila razvita nova generacija nosilnih kolon, ki je prešla omejitve z difuzijskimi koeficienti ter izboljšala vezavno kapaciteto za tarčne molekule. Monolitni kromatografski nosilci so porozni organski polimeri v obliki diska ali valja, ki se uporabljajo za izolacijo, čiščenje ter koncentriranje bioloških molekul. S svojimi dobro povezanimi porami tvorijo mrežo pretočnih kanalov, pri čemer masni prenos temelji na konvekciji in ne več na difuziji, posledica česar je večja mehanska ter kemijska stabilnost, odpornost na višje pretoke mobilne faze ter posledično krajši čas ločevanja, izboljššan izkoristek nosilca, večja pretočnost por, zelo velika specifična površina in enostavna in priročna uporaba (25), (26).

#### 1.2.3.3 Odstranjevanje RNA z RNazo A in izobarjanjem s $\text{CaCl}_2$

RNA, ki v vzorcu lahko moti potek reakcije in vrednotenje procesa na elektroforeznem gelu, lahko odstranjujemo na več načinov. Med encimske načine odstranjevanja RNA uvrščamo cepljenje z RNazo A. Ta pankreatična ribonukleaza RNA razcepi na majhne fragmente, ki so v nadaljnjih postopkih čiščenja odstranjeni iz vzorca (35). Pogost kemijski način odstranjevanja večjih količin RNA je tudi izobarjanje s solmi, kot sta  $\text{LiCl}$  in  $\text{CaCl}_2$  v končnih koncentracijah 2-3 M (27).

#### 1.2.3.4 Etanolno izobarjanje

Z etanolnim izobarjanjem DNA izoliramo, jo speremo ter na novo raztopimo v mediju. Tako jo očistimo nečistoč ter primesi in po potrebi skoncentriramo. S soljo ( $\text{NaCl}$  ali  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) nevtraliziramo negativni naboj DNA, z etanolom, ki raztopino dehidrira, pa znižamo njeno dielektrično konstanto ter omogočimo tvorbo vezi med polianionom (DNA) ter kationom ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  itd.) in posledičen nastanek anionskega para, zaradi katerega se DNA izobori (28).

#### 1.2.4 FRAGMENTACIJA PLAZMIDNE DNA

Pred označitvijo je izolirano BAC DNA treba razcepiti na fragmente velikosti 100–700 bp. Optimalna velikost fragmentov se razlikuje glede na metodo označevanja (Tabela I). Fragmentiranje lahko dosežemo z restrikcijskimi encimi, nespecifičnim cepljenjem z DNazo I, sonifikacijo in drugimi metodami.



Tabela I: Optimalna velikost fragmentov glede na način označevanja ter proizvajalca

Proizvajalec	Metoda	Optimalna velikost fragmentov (bp)
Kreatech	ULS	100–300
Abbot	pomikanje zareze (nick translacija)	300–600
Invitrogen	pomikanje zareze (nick translacija)	300–700

#### 1.2.4.1 Fragmentiranje z restrikcijskimi encimi

Restrikcijske endonukleaze so encimi, ki prepoznavajo določena nukleotidna zaporedja in na teh mestih specifično režejo DNA-molekulo. Njihova velika prednost je specifičnost in ponovljivost. Povprečna velikost DNA-fragmentov, ki jih nacepi endonukleaza, je odvisna od sestave DNA-molekule ter je lahko zelo spremenljiva, zaradi česar lahko obravnava DNA s temi encimi predstavlja težavo, ko želimo cepiti zelo dolge DNA-molekule (29). S programom NEBcutter V2.0 (Slika 7) lahko na klonu, ki smo ga pridobili iz genomske banke, izvedemo virtualno restrikcijo (30). S programom si lahko ustvarimo pregled nad velikostjo fragmentov, ki jih bomo pridobili z uporabo določenega encima ali kombinacije encimov.



Slika 7: Izvedba virtualne restrikcije po fazah: naložitev DNA-zaporedja klona v program – virtualna restrikcija z izbranim encimom ali kombinacijo encimov – pregled fragmentov in – ogled virtualnega elektroforeznega gela.

#### 1.2.4.2 Fragmentiranje z DNaza I

DNaza I je endonukleaza, ki hidrolizira enojno, dvojno vijačnico DNA ter kromatin. Četudi se delovanje tega encima običajno obravnava kot nespecifično, je bilo ugotovljeno, da prednostno cepi fosfodiesterske vezi ob pirimidinskem nukleotidu. Njena

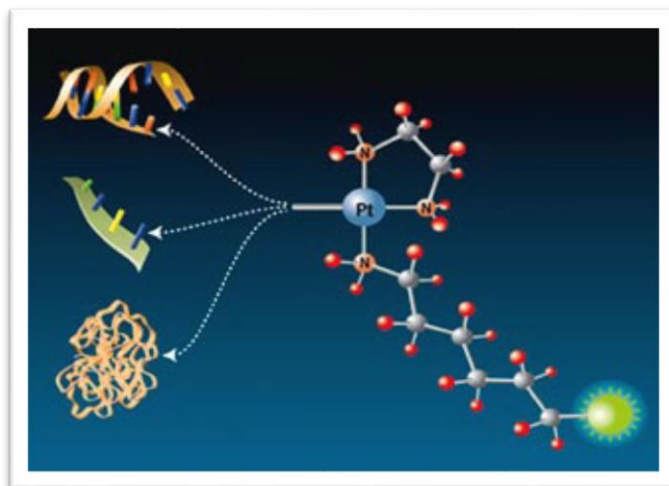
funkcija je odstranjevanje odpadnih molekul v celicah in fragmentiranje DNA med apoptozo, saj katalizira razgradnjo poškodovanih, postaranih in odvečnih nukleinskih kislin. Encim je optimalno aktiven pri pH vrednosti med 7 in 8,6 ter za delovanje nujno potrebuje dvovalentne katione, npr.  $\text{Ca}^{2+}$  ali  $\text{Mg}^{2+}$ . Prisotnost drugih soli, npr.  $\text{NaCl}$ , in molarnost reakcijske zmesi nad 30 mM pa delovanje encima močno inhibira. Četudi je afiniteta DNaze I do enoverižnih DNA molekul približno 500-krat manjša kot do dvoverižne DNA pa ne gre zanemariti dejstva, da DNaza I v reakcijskih zmesih običajno nastopa v presežku, zato v določeni meri deluje tudi na RNA (31).

### 1.2.5 OZNAČEVANJE FRAGMENTOV

Označevanje DNA-fragmentov se začne z vgraditvijo fluorescirajoče molekule v DNA-vijačnico, kar lahko dosežemo preko encimskih ali kemijskih pristopov. V nadaljevanju sta podrobneje opisani metodi označevanja s pomikanjem zareze (»nick« translacija) in ULS-metoda (universal linkage system).

#### 1.2.5.1 Universal Linkage System

Metoda temelji na kemijski reakciji med platino in biomolekulami (Slika 8). ULS-molekula je sestavljena iz kompleksa s platino, haptena ter izhajajoče skupine, ki se ob reakciji s tarčno DNA odstrani, med ULS-molekulo ter dušikom na gvaninu (na mestu 7) pa se vzpostavi koordinacijska vez (32), (33).

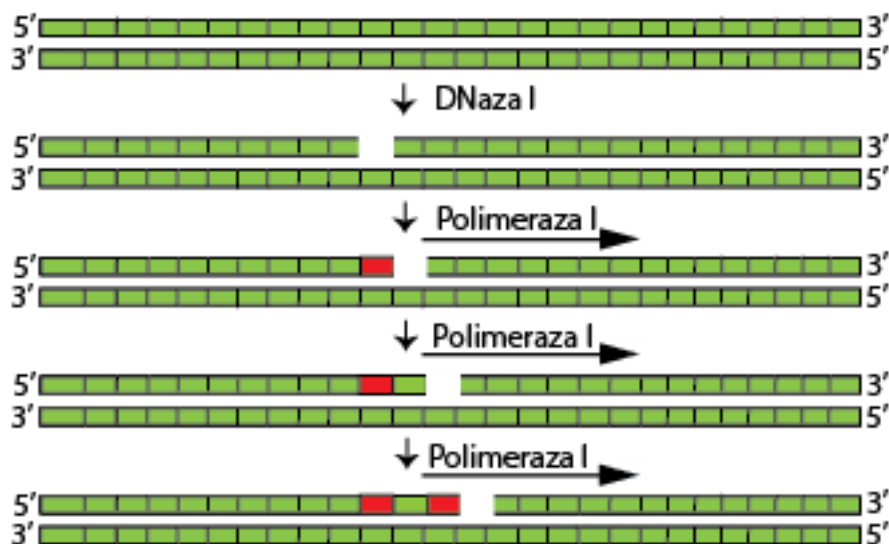


Slika 8: ULS Linkage System (34).

#### 1.2.5.2 Označevanje nukleotidov s pomikanjem zareze (»nick« translacija)

Za označevanje lahko uporabimo tudi encimski proces, ki v eni stopnji zajame tako fragmentiranje kot označevanje DNA. Fragmente DNA, ki jih ustvari DNaza I, prepozna

DNA-polimeraza I, ki v smeri 5' → 3' DNA-fragmentu dodaja nukleotide. Nekatere od timidinov zamenja z amino-modificiranimi dUTP (aminoalil dUTP), ki v nadaljnjih korakih reagirajo s fluorokromom ter tvorijo kovalentno vez (31) (Slika 9). Ena od prednosti te metode je širok časovni okvir, saj se po obravnavi z DNazo I DNA lahko shrani za kasnejše nadaljevanje označevanja (17), 35).



Slika 9: Označevanje s pomikanjem zareze.

#### 1.2.5.4 Ločljivost ter občutljivost postopka in vrednotenje uspešnosti označevanja

Pri izvajanju poskusov se je treba zavedati omejitev fluorescenčnega mikroskopa ter omogočiti doseg primerne ločljivosti in občutljivosti. Od občutljivosti je odvisno, ali bodo signali sonde vidni pod mikroskopom, od ločljivosti pa, ali jih bomo zmogli razlikovati med seboj. Svetlobni mikroskopi ne zmorejo razlikovati objektov, ki so med seboj ločeni za manj kot 200–250 nm, pomembna pa je tudi konformacija kromosomov, ki nam služijo kot tarčna DNA. Metafazni kromosomi so tisočkrat bolj kompaktni kot interfazni, ki pa so vsaj 10-krat bolj kompaktni kot dvojna vijačnica DNA. Prvi hibridizacijski poskusi naj bi se zato izvajali na metafaznih kromosomih, nato interfaznih, najvišjo možno ločljivost (1–500 kbp) pa dosežemo s hibridizacijo sonde na raztegnjenih kromatinskih vlaknih (fiber FISH) (3), 36).

Eden od pomembnih parametrov za vrednotenje izdelave sonde je koncentracija sonde. Ker je med procesom označevanja prišlo do vključitve barvil v DNA-molekulo, moramo pri izračunu koncentracije poleg absorbance pri 260 nm ( $A_{\max}$  za DNA) upoštevati tudi meritev absorbance pri maksimalni valovni dolžini barvila.

$$A_{\text{sonde}} = A_{260} - (A_{\text{barvila}} \times CF_{260})$$

V zgornji enačbi  $CF_{260}$  predstavlja korektivni faktor, ki ga določa vrsta barvila (Tabela II). Prilagojeno absorbanco nato upoštevamo pri izračunu koncentracije sonde (41).

$$c \left( \frac{mg}{mL} \right) = \frac{A_{\text{sonde}} \times MW_{\text{barvila}}}{\varepsilon_{\text{barvila}} \times b}$$

DoL (degree of labelling) ali stopnja označevanja je drugi od parametrov, s katerim lahko vrednotimo uspešnost označevanja sonde. Izraža odstotek označenih baz v molekuli sonde. DoL 2 torej pomeni, da sta na 100 nukleinskih baz v molekuli sonde 2 bazi amino-modificirani («nick» translacija) ali označeni z ULS-molekulo (ULS-označevanje). Izračunamo ga s pomočjo Beer-Lambertovega zakona, pri katerem moramo upoštevati tako absorbanco vzorca pri valovni dolžini DNA (260 nm) kot pri maksimalni valovni dolžini barvila. Priporočeni DoL se razlikujejo glede na uporabljeno barvilo, večinoma pa se gibljejo med 1 in 6. (Pre)nizki rezultati so lahko posledica neuspešne izolacije DNA, vdora vode v sondo, onesnaženosti s prostimi amini ter neustreznega raztapljanja in mešanja sonde.

Tabela II: Ekstinkcijski koeficienti in korekcijski faktorji za uporabljana barvila

Barvilo	$\lambda_{\text{max}}$ (nm)	$\varepsilon$ (cm <sup>-1</sup> M <sup>-1</sup> )	CF <sub>260</sub>
Alexa Fluor 488	492	62000	0,3
Alexa Fluor 555	555	150000	0,04
Alexa Fluor 594	588	80400	0,43
Alexa Fluor 647	650	239000	0

## 2. DELOVNA HIPOTEZA

V diplomskem delu se bomo posvetili izdelavi DNA-sond, ki bodo pri ugotavljanju kromosomskih preureditev zanesljive in specifične. Kloni za določanje kromosomskih preureditev so bili izbrani, ker so vsebovali DNA, ki se je prilegala kromosomskim področjem, kjer je standardna citogenetska preiskava pokazala točke preloma pri redkejših kromosomskih preureditvah.

Ker so kloni, ki so vstavljeni v vektor BAC, večji od plazmidov, s katerimi delo običajno poteka, lahko pričakujemo težave pri optimizaciji in izboru metode čiščenja ter izolaciji zelene DNA. Velikost BAC-vstavka namreč vpliva na njegovo stabilnost, do težav pa lahko pride tudi pri vrednotenju izolacije, saj se plazmidi zvijajo v različne oblike, zaradi katerih je njihova detekcija na elektroforeznem gelu manj zanesljiva (24). DNA bomo poskušali izolirati s HPLC-ločbo, alkoholnim izobarjanjem ter s komercialnim kitom ter te metode med seboj primerjali. Ker prisotnost RNA v vzorcu lahko moti potek fragmentacije DNA, jo bomo odstranjevali z RNazo A in z izobarjanjem s  $\text{CaCl}_2$  ter oba načina ovrednotili ter medsebojno primerjali. Po izolaciji DNA bomo za pridobitev krajših fragmentov uporabili specifično restrikcijo z restrikcijskimi endonukleazami (EcoRI, HindIII) ter nespecifično restrikcijo z DNazo I ter metodi fragmentacije med seboj primerjali in ju skušali optimizirati. Dobljeno fragmentirano DNA bomo fluorescentno označili z označevanjem s pomikanjem zareze in označevanjem s platinasto označenimi vmesniki (ULS labelling). Metodi bomo ovrednotili in denaturacijo ter hibridizacijo DNA skušali optimizirati z namenom čim večje specifičnosti postopka. Za oceno uspešnosti označevanja bomo določali koncentracijo DNA in stopnjo označenosti (degree of labelling, DOL). Problemu nespecifične vezave sonde se bomo skušali izogniti z optimizacijo dodatka enoverižne DNA, pridobljene iz človeške posteljice (Cot-1 DNA), z izbiro ustreznega hibridizacijskega pufra in njegove sestave ter z optimizacijo časa hibridizacije. Vmesne korake bomo skušali vrednotiti z izvedbo agarozne elektroforeze, merjenjem absorbance na spektrofotometru ter računanjem koncentracije vmesnih produktov.

### 3. MATERIALI IN METODE

V diplomskem delu smo za izdelavo ter preverjanje izdelave DNA-sonde uporabljali različne materiale, aparature in metode.

#### 3.1 MATERIALI IN APARATURE

##### 3.1.1 KLONI

Pri delu smo uporabili 5 različnih BAC klonov, ki smo jih pridobili iz dveh različnih bank, in sicer iz Roswell Park Cancer Institute (RP kloni) in California Institute of Technology (CTD klon). Pri iskanju klonov smo izhajali iz preureditev, ki jih s proganjem kromosomov oziroma s komercialno dostopnimi DNA sondami citogenetiki niso mogli razrešiti. Izbrali smo jih, da bi poskusili razrešiti kromosomske preureditve, ki so pri treh različnih bolnikih zajele kromosomska področja 19q13.32, 12p13.31 in 18q22.3. V bazi CAGP (Cancer Anatomy Genome Project (43)) smo ob teh mestih prelomov iskali BAC klone, ki so primerni za FISH preiskavo in pokrivajo področja potrjenih ali potencialnih onkogenov. Za boljšo preglednost in manjšo nevarnost zamenjav klonov smo jih označili z številkami od 1 do 5.

Tabela III: Oznake uporabljenih BAC klonov

Oznaka klona	Ime klona	Lokacija na kromosomu	Opombe
1	CTD-2159N22	19q13.32	
2	RP11-369N23	12p13.31	<i>E.coli</i> ni rastla
3	RP11-101F21	12p13.31	
4	RP11-504H5	18q22.3	
5	RP11-793J2	18q21.33	slab izkoristek in nizko razmerje

### 3.1.2 MATERIALI ZA IZOLACIJO TER ČIŠČENJE PLAZMIDNE DNA

Tabela IV: Seznam uporabljenih materialov za izolacijo in čiščenje plazmidne DNA

Material	Proizvajalec
GeneHogs® E.coli z pBeloBAC11	Invitrogen
LB gojišče s kloramfennikolom, 12,4 µg/mL	Sigma Aldrich
EDTA, 292,24 g/mol	Merck
TRIS, 121,14 g/mol	Merck
NaCl, 58,44 g/mol	Merck
CIM® DEAE kolona	Bia separations
NaOH, 40,00 g/mol	Merck
PureLink® HiPure Plasmid Miniprep Kit	Life technologies, Invitrogen

### 3.1.3 MATERIALI ZA FRAGMENTACIJO DNA

Tabela V: Seznam uporabljenih materialov za specifično fragmentacijo DNA

Material	Proizvajalec
Bovine serum albumin BSA, 10 mg/mL	Promega
HindIII, 10 u/µL	Promega
EcoRI, 12 u/µL	Promega
BamHI, 10 u/µL	Promega
EcoRV, 10 u/µL	Promega
Pufer E 10x	Promega
Pufer H 10x	Promega

### 3.1.4 MATERIALI ZA ELEKTROFOREZO TER ETANOLNO IZOBARJANJE

Tabela VI: Seznam uporabljenih materialov za elektroforezo in etanolno izobarjanje

Material	Proizvajalec
E-Gel <sup>REX</sup> 1 % agarosa	Invitrogen
GeneRuler <sup>TM</sup> DNA Ladder 1 kbp, 0,5 µg/µL	Thermo Scientific
GeneRuler <sup>TM</sup> DNA Ladder 100 bp, 0,5 µg/µL	Thermo Scientific
TrackIt <sup>TM</sup> 100 bp DNA Ladder, 0,1 µg/µL	Invitrogen
Agarosa, ~ 120000 g/mol	Lexchem
TRIS extra pure, 121,14 g/mol	Lexchem
Na <sub>2</sub> EDTA, 372,24 g/mol	Lexchem
Absolutni etanol, > 99,5 %	Lexchem
Dvakrat destilirana voda	UKC Ljubljana

### 3.1.5 MATERIALI ZA FLUORESCENTNO OZNAČITEV DNA

Tabela VII: Seznam uporabljenih materialov za fluorescentno označitev DNA

Material	Proizvajalec
FISH Tag <sup>TM</sup> DNA Multicolor Kit, Alexa Fluor <sup>®</sup> dye combination	Invitrogen
FISHTag <sup>TM</sup> Orange Kit #with Alexa Fluor 555 dye	Invitrogen
FISHBright <sup>TM</sup> Nucleic Acid Labeling Kit - 550 Red/Orange	Kreatech
Nick Translation Kit	Abbot
DNA, single stranded from human placenta 1 mg/mL	Sigma Aldrich
Wizard <sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-Up System	Promega



### 3.1.6 MATERIALI ZA IZVEDBO FISH-METODE

Tabela VIII: Seznam uporabljenih materialov za izvedbo FISH-metode

Material	Proizvajalec
Transportno gojišče RPMI 1640 z L-glutaminom in Na-heparinom	GIBCO™, Invitrogen
Raztopina Hank's	Sigma-Aldrich
Rastni medij Bone Marrow Karyotyping Medium z L-glutaminom in antibiotiki	Biological Industries
Rastni medij MarrowMax™ Bone Marrow Medium z L-glutaminom in Gentamicin sulfatom	GIBCO™, Invitrogen
Timidin, 99,0 %	Sigma-Aldrich
KaryoMax® Colcemid®, 10 µg/mL	GIBCO™, Invitrogen
KCl, 74,55 g/mol	Merck
Fetal bovine serum FBS	Sigma
Koncentrirana očetna kislina, 99,9 %	LexChem
Kemex A	Kemika
Tripsin	Sigma-Aldrich
Giensa reagent	Fluka Analytical
NaOH, 40,00 g/mol	Sigma Aldrich
HCl, ≥ 37 %	Sigma Aldrich
MgCl <sub>2</sub> , 95,211 g/mol	Lekarna UKC Ljubljana
Na <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> , 88,25 g/L	Kemika
Pepsin, 3.200–4.500 U/mg proteina	Sigma-Aldrich
Formaldehid, 36,5 %	Sigma-Aldrich
BSA, 6 %	Ortho-Clinical Diagnostics
Tween 20	Sigma-Aldrich
CEP-hibridizacijski pufer	Vysis, Abbot Molecular
LSI/WCP-hibridizacijski pufer	Vysis, Abbot Molecular
DAPI II Counterstain	Abbot Molecular

Gumijasti cement Fixogum	Marabuwerke GmbH & Co.
NP-40	BDH Chemicals
Formamid	Sigma
Na-citrat dihidrat	Lekarna UKC Ljubljana
pH indikator lističi 5–10	Merck
Amonijev acetat, brezvodni	Merck
Natrijev acetat, brezvodni	Kemika

### 3.1.7 PRIPRAVA RAZTOPIN

Protokole za pripravo raztopin smo črpali iz dela FISH Technology (10), The AGT Cytogenetics Laboratory Manual (44) ter Standardnih operativnih postopkov kliničnega oddelka za hematologijo na UKC Ljubljana.

- ∅ 0,005 % raztopina pepsina: v 100 mL bučki smo združili 99 mL dvakrat destilirane vode ter 1 mL 1 M HCl, kateri smo dodali 200 µL koncentrirane raztopine pepsina.
- ∅ 0,5 M EDTA: V 500 mL erlenmajerici smo združili 93,05 g Na<sub>2</sub>EDTA ter jo raztopili v 400 mL dvakrat destilirane vode. Z 1 M NaOH smo pH uravnali na 8,0 in raztopino prelili v bučko ter z dvakrat destilirano vodo dopolnili do oznake.
- ∅ 0,5 x TBE-pufer: V 1000 mL bučko smo nalili 50 mL 10 x pufru TBE in z dvakrat destilirano vodo dopolnili do oznake.
- ∅ 0,7 % raztopina agaroze: 0,79 g agaroze smo v mikrovalovki raztopili v 112,5 mL 1 x TAE-pufra.
- ∅ 1 M HCl: v 50 mL bučko smo vlili 4,24 mL koncentrirane HCl (36 %) ter z dvakrat destilirano vodo dopolnili do oznake.
- ∅ 1 M MgCl<sub>2</sub>: v 100 mL bučki smo v dvakrat destilirani vodi raztopili 20,331 g MgCl<sub>2</sub>.
- ∅ 1 M NaOH: 20 g NaOH smo raztopili v 500 mL dvakrat destilirane vode.
- ∅ 1 x PBS, pH = 7,4: V 1000 mL bučko smo združili 100 mL 10 x PBS in 900 mL dvakrat destilirane vode.
- ∅ 1 x TAE-pufer: V 1 L bučko smo vlili 20 mL 50 x TAE-pufra ter z dvakrat destilirano vodo dopolnili do oznake.
- ∅ 10 x PBS, pH = 7,4: V 1 L bučko smo združili 80 g NaCl, 2 g KCl, 2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ter 14,41 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O ter dvakrat destilirano vodo dolili do 900 mL. Izmerili

smo pH, ga po potrebi uravnali do 7,4 ter z dvakrat destilirano vodo dopolnili do oznake.

- ⊗ 10 x TBE-pufer: V 1000 mL bučki smo združili 108 g Tris-a, 55 g borove kisline, 40 mL 0,5 M EDTA (pH = 8,0) in z dvakrat destilirano vodo dopolnili do oznake.
- ⊗ 2 x SSC: Združili smo 100 mL 20 x SSC (pH = 6,3) ter 850 mL dvakrat destilirane vode, z 1 M NaOH uravnali pH na  $7,0 \pm 0,2$  ter z dvakrat destilirano vodo dopolnili do 1000 mL.
- ⊗ 20 x SSC: 175,3 g NaCl in 88,2 g natrijevega citrata dihidrata smo raztopili v 800 mL dvakrat destilirane vode, pH z 1 M HCl uravnali na 6,3 ter z dvakrat destilirano vodo dopolnili do 1000 mL.
- ⊗ 3 M natrijev acetat (pH = 5,2): 40,8 g natrijevega acetata smo raztopili v 70 mL dvakrat destilirane vode ter z očetno kislino pH uravnali na 5,2. Z dvakrat destilirano vodo smo dopolnili do 100 mL in prefiltrirali.
- ⊗ 50 x TAE-pufer: V 1 L bučki smo združili 242,2 g Tris-a, 57,1 mL očetne kisline (99,9 %), 100 mL 0,5 M EDTA ter dodali dvakrat destilirano vodo do 950 mL. Po potrebi smo pH uravnali na 8,5 ter z dvakrat destilirano vodo dopolnili do oznake.
- ⊗ 70 % formamid/2 x SSC (pH = 7): v kivetu smo združili 49 mL formamida, 14 mL H<sub>2</sub>O ter 7 mL 20 x SSC (pH = 5,3) ter s pH-lističem preverili, če je pH končne raztopine med 7 in 8.
- ⊗ Fiksativ: absolutni etanol in koncentrirano očetno kislino smo zmešali v razmerju 3 : 1.
- ⊗ Fosfatni pufer, pH = 6,8: združili smo 245 mL 0,06 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ter 225 mL 0,06 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ter uravnali pH.
- ⊗ Hank's: Komericalno raztopino Hank's smo 10-krat redčili, z NaHCO<sub>3</sub> pH uravnali na 7,2 ter raztopino sterilno prefiltrirali.
- ⊗ Hibridizacijski pufer: zmešali smo 6,5 µL formamida ter 1 µL 20 x SSC.
- ⊗ Hipotonična raztopina: zmešali smo 7 mL hipotoničnega KCl (0,075 M), 6 mL dvakrat destilirane vode ter 1 mL raztopine FBS : H<sub>2</sub>O = 1 : 6.
- ⊗ Koncentrirana raztopina pepsina: 250 mg pepsina z aktivnostjo 3.200–4.500 enot/mg proteina smo redčili z 10 mL dvakrat destilirane vode.
- ⊗ PBT: V 500 mL bučki smo združili 2 mL BSA (6 %) ter 0,5 mL Tween 20. Z 1 x PBS pufrom smo dopolnili do oznake ter raztopino pustili stati čez noč, da se je detergent

raztopil ter prefiltrirali.

- ⊕ Raztopina formaldehida (5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 % formaldehid): V 1000 mL bučki smo združili 5 mL MgCl<sub>2</sub>, 2,5 mL formaldehida (37 %) ter do oznake dopolnili s 2 x SSC.
- ⊕ Raztopina Giemse: Združili smo 72 mL fosfatnega pufru ter 3 mL reagenta Giemse.
- ⊕ Raztopina KCl (0,075 M): 5,59 g KCl smo raztopili v 1 L dvakrat destilirane vode ter sterilizirali.
- ⊕ Raztopina timidina: 1 g timidina smo raztopili v 167 mL raztopine Hank's ter jo sterilizirali.
- ⊕ Spiralna raztopina NP-40 (0,4 x SSC/0,3 % NP-40): V erlenmajerici smo združili 0,9 g detergenta NP-40, 60 mL 20 x SSC (pH = 6,3) ter 120 mL dvakrat destilirane vode. Raztopino smo pustili stati čez noč, da se je detergent raztopil, ter prefiltrirali.
- ⊕ Spiralna raztopina NP-40 (2 x SSC/0,1 % NP-40): V erlenmajerici smo združili 0,5 g NP-40 ter z 2 x SSC dopolnili do 500 mL. Raztopino smo pustili stati čez noč, da se detergent raztopi ter prefiltrirali.
- ⊕ Tripsin (0,2 %): 1 g tripsina smo raztopili v 500 mL 1 x PBS.

### 3.1.8 APARATURE

Tabela IX: Seznam uporabljenih aparatov

Aparatura	Proizvajalec
CO <sub>2</sub> inkubator Sanyo MCO-15AC	Sanyo Electric Co.
Denaturator/hibridizator ThermoBrite™	StatSpin, Abbot Molecular
Električna grelna plošča z magnetnim mešalom Rotamix 550MMH	Tehtnica
Električna grelna plošča za preparate	Termoproc TP
Foto-dokumentacijski system Bio-Rad-GelDoc 1000	BioRad
HPLC sistem AKTA purifier 100	GE Healthcare
iBase E-Gel elektroforezna celica	Invitrogen
Invertni mikroskop Opton	West Germany
Komora z laminarnim pretokom zraka LFVP-12	Iskra PIO
MiniSpin centrifuga	Eppendorf
Centrifuga Heraeus Labofuge 400	Thermo Scientific

OptiChrome aparatura za razprševanje celic	EuroClone
pH-meter SevenEasy	Mettler Toledo
Precizna tehtnica AX 304	Mettler Toledo
Program NebCutter V2.0	BioLabs New England
Računalniški program MolecularAnalyst	BioRad
Svetlobni mikroskop Olympus BX41	Olympus Optical Co.
UV/VIS-spektrofotometer K2500	Knauer
UV/VIS-spektrofotometer LambdaBio+	Perkin Elmer
UV/VIS-spektrofotometer ND-1000	NanoDrop, ThermoScientific
Vibramix 10 stresalnik	Tehtnica
Vodna kopel TW8	Julabo

## 3.2 METODE

### 3.2.1 PRIDOBIVANJE IN IZOLACIJA BAC DNA

Protokole za pridobivanje in izolacijo DNA smo črpali iz dela Molecular Cloning: A Laboratory Manual (7) ter navodil proizvajalcev (37).

#### ☉ Gojenje *E. coli*:

*E. coli* smo gojili na Centru odličnosti za biosenzoriko, instrumentacijo in procesno kontrolo Cobik. Liofilizat smo nagojili na LB-ploščo s kloramfenikolom (12,4 µg/mL). Ploščo smo čez noč inkubirali na 37 °C ter kolonijo inokulirali v 5–10 mL tekočega LB-gojišča s kloramfenikolom (12,5 µg/mL). Rast kulture smo spremljali z merjenjem optične gostote ter jo zaustavili v stacionarni fazi ( $OD_{600} = 1-2$ ). Za nadaljnje shranjevanje smo 0,8 mL kulture zmešali z 0,2 mL sterilnega glicerola, mešanico prenesli v kriovialo ter jo shranili pri –80 °C.

#### ☉ Izolacija BAC-plazmidne DNA

S sterilno paličico smo bakterijsko kolonijo, ki se je razrastla čez noč, nagojili v 2 mL tekočega gojišča LB s kloramfenikolom (12,5 µg/mL) ter ga čez noč inkubirali na stresalniku pri hitrosti stresanja 225–300 rpm in temperaturi 37 °C.

❖ Bakterijsko brozgo smo 10 minut centrifugirali pri 12000 rpm in sobni temperaturi ter

supernatant zavrgli. S pridobljeno biomaso smo izvedli alkalno lizo.

- ❖ Predhodno pridobljeno maso smo na ledu resuspendirali v raztopini 50 mM Tris-pufer, pH 8,0 in 10 mM EDTA, pH 8,0 pri čemer smo na vsak gram biomase dodali 10 mL raztopine. Z magnetnim mešalom smo celice popolnoma resuspendirali.
- ❖ Na ledu ter ob mešanju s stekleno palčko (da zmanjšamo morebitne poškodbe DNA) smo homogeni suspenziji dodali 10 mL/g biomase sveže pripravljene raztopine 0,2 N NaOH in 1 % SDS ter jo pustili stati natančno 5 minut.
- ❖ Ob mešanju s stekleno palčko smo dodali še 10 mL/g biomase 3 M raztopine kalijevega acetata, pH 5,5, ki je bil predhodno hlajen v zamrzovalniku.
- ❖ Po mešanju smo dodali raztopino CaCl<sub>2</sub> do koncentracije 0,5 M ter čašo 15 minut hladili v hladilniku.
- ❖ Vsebino smo 30 minut centrifugirali na 12000 rpm in supernatant prefiltrirali skozi 0,45 µm filter.

Zaradi možnosti, da se ob dodatku CaCl<sub>2</sub> obori ali razgradi BAC DNA, smo poskuse izvajali tako z dodajanjem CaCl<sub>2</sub> kot brez ter metodi ovrednotili z izvedbo agarozne elektroforeze ter merjenjem absorbanca pri 260 in 280 nm.

#### ☞ Čiščenje DNA z izopropanolnim izobarjanjem

Po dodatku kalijevega acetata smo izvedli izopropanolno izobarjanje. 500 µL vzorca smo prenesli v 2 mL epico ter mu dodali 350 µL absolutnega izopropanola, rahlo premešali ter 30 minut hladili na -20 °C. Ker je bil vzorec v 1 M kalijevem acetatu, soli ni bilo treba dodatno dodajati. Vzorec smo 50 minut centrifugirali pri 12000 rpm ter 4 °C in zavrgli supernatant, usedlino pa smo osušili na zraku ter resuspendirali v 80 µL TE-pufra.

#### ☞ Čiščenje DNA z visokotlačno tekočinsko kromatografijo

DNA smo izolirali z alkalno lizo, sledeč zgoraj opisanemu postopku. Vsak klon smo razdelili na dve paralelki, in sicer smo eni dodali CaCl<sub>2</sub> za izoboritev RNA, drugi pa ne. Po meritvi absorbanca pri 260 in 280 nm smo vsako paralelko kromatografsko ločili s HPLC. Najprej smo 500 µL vzorca preko zanke nanegli na DEAE (diethylaminoetil) CIM-monolitno anionsko izmenjevalno kromatografsko kolono ter mu preverili prevodnost. Ker je bila ta dovolj nizka, da je omogočena vezava plazmida na ionski izmenjevalec (okoli 29,5 mS/cm), smo lizat s peristaltično črpalko nalagali na kolono ter preko spreminjanja mobilne faze lovili frakcije, ki smo jih analizirali. Na HPLC-sistemu smo z drugo DEAE

CIM-monolitno kromatografsko kolono preverjali, ali je bil dosežen preboj DNA. Če je bila izmerjena prevodnost vzorca previsoka za učinkovito ločbo, smo lizat redčili in ga ponovno nanесли na kolono.

Lovili smo sledeče frakcije:

- ❖ Flow trough oz. nevezani material: frakcija nečistoč, ki se na kolono niso vezale.
- ❖ Wash: spiranje zaostalega nevezanega materiala. To frakcijo smo lovili samo v prvi seriji.
- ❖ Elucija 1 pri 60 %B: material, ki se eluira pri 60 % dotoku 1 M NaCl ter 40 % dotoku TE-pufra.
- ❖ Elucija 2 pri 70 %B: material, ki se eluira pri 70 % dotoku 1 M NaCl ter 30 % TE-pufra.
- ❖ Elucija 3 pri 80 %B: material, ki se eluira pri 80 % dotoku 1 M NaCl ter 20 % dotoku TE-pufra.
- ❖ Elucija 4 pri 90 %B: material, ki se eluira pri 90 % dotoku 1 M NaCl ter 10 % dotoku TE-pufra. To frakcijo smo zbirali samo v prvi seriji.

Sestava mobilnih faz je bila sledeča:

<u>Mobilna faza A</u> : 50 mM TRIS, 10 mM EDTA, pH 7,42
---

<u>Mobilna faza B</u> : 50 mM TRIS, 10 mM EDTA, 1 M NaCl, pH 7,35
---

Vsem zbranim frakcijam smo na spektrofotometru izmerili absorbanco ter izračunali koncentracijo DNA.

∅ Izolacija DNA s komercialno dostopnim kitom

Za izolacijo DNA smo uporabljali PureLink<sup>®</sup> HiPure Plasmid DNA Purification Miniprep Kit (K2100-02) podjetja Invitrogen (Life Technologies), ki temelji na predhodno opisanih metodah izolacije, saj *E.coli* lizira z alkalno lizo, DNA pa izolira z ionsko-izmenjevalno kromatografijo. Pri izvedbi izolacije BAC DNA smo sledili njihovemu protokolu (37):

- 1) Razgradnja gostitelja z alkalno lizo:
  - ❖ 10–15 mL predhodno nagojene bakterijske brozge smo 15 min centrifugirali pri 11600 rpm ter odstranili supernatant.
  - ❖ Usedlini smo dodali 2 mL resuspenzijskega R3 (Tabela X) pufra z RNazo A in raztopino zvorteksirali do homogenosti.
  - ❖ Po dodatku 2 mL L7 pufra za lizo smo vzorec nežno (z obračanjem epruvete) premešali

do homogenosti.

❖ Vzorec smo 5 minut inkubirali pri sobni T ter mu dodali 2 mL N3 (Tabela X) izobarjalnega pufru ter z obračanjem epruvete nežno premešali do homogenosti.

❖ Vzorec smo 10 minut centrifugirali pri 13400 rpm.

2) Vezava in spiranje izolirane DNA:

❖ Supernatant smo naložili na predhodno ekvibrilirano kolono ter pustili, da steče čeznjo.

❖ Na kolono smo dodali dvakrat po 2,5 mL spiralnega pufru (W8) ter dovolili, da steče čeznjo. Eluat smo zavrgli.

3) Izpiranje in izobarjanje DNA:

❖ Pod kolono smo namestili sterilno epico ter na kolono nanесли 0,9 mL E4 elucijskega pufru (Tabela X), ki je bil predhodno segret na 50 °C.

❖ Dodali smo 0,63 mL izopropanola ter dobro premešali.

❖ Epice smo v hladilni centrifugi 5 minut centrifugirali pri 13400 rpm in 4 °C.

❖ Supernatant smo previdno odstranili ter usedlino 10 minut sušili na zraku.

❖ DNA smo raztopili v 10 µL TE-pufra, ji izmerili koncentracijo in izračunali izkoristek.

Tabela X: Sestava uporabljenih pufov

R3 resuspenzijski pufer	50 Mm Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM EDTA, 20 mg/mL RNaze A
L7 pufer za lizo	0,2 M NaOH, 1 % m/V SDS
N3 izobarjalni pufer	3,1 M kalijevega acetata (pH 5,5)
EQ ekvibrilacijski pufer	0,1 M natrijev acetat (pH 5,0), 0,6 M NaCl, 0,15 % v/v Triton® X-100
W8 spiralni pufer	0,1 M natrijevega acetata (pH 5,0), 825 mM NaCl
E4 izpiralni pufer	100 mM Tris-HCl (pH 8,5), 1,25 M NaCl
TE-pufer	10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 0,1 mM EDTA

⊗ Alkoholno izobarjanje DNA

Etanolno izobarjanje smo izvajali tako, da smo vzorcu dodali 1/10 volumna 3 M natrijevega acetata (pH = 5,2) ter 2,5 volumna absolutnega ledeno mrzlega etanola. Nato smo vzorce čez noč pustili na -20 °C ali -80 °C ter jih vsaj 10 minut centrifugirali na 13400 rpm. Če smo izobarjali nefragmentirano plazmidno DNA, smo centrifugiranje izvajali pri 4 °C. Nato smo iz epice previdno odstranili supernatant ter usedlino dvakrat sprali z ledeno mrzlim 70 % etanolom ter ga 5–10 minut sušili na zraku.



Alternativna oblika alkoholnega izobarjanja je izopropanolno izobarjanje, pri katerem smo vzorcu namesto 2,5 volumna etanola dodali 0,7 volumna izopropanola. Pri izopropanolnem izobarjanju smo vzorce inkubirali na sobni temperaturi.

#### ☞ Klasična agarozna elektroforeza

- ❖ V erlenmajerici smo pripravili 0,7 % raztopino agaroze, dodali 12  $\mu\text{L}$  barvila SybrSafe ter še vroč gel vlili v kadičko z vstavljenimi glavnički.
- ❖ Ko se je gel strdil, smo previdno odstranili glavničke ter kadico sprostili iz nosilca.
- ❖ V elektroforezno celico smo nalili 1 x TAE- ali 0,5 x TBE-pufer, ki naj za vsaj 2–3 mm prekriva agarozni gel.
- ❖ V prvi žepki smo nanesti označevalce velikosti, v ostale pa vzorce, katerim smo primešali barvilo, s katerim bomo lahko opazovali potovanje fragmentov. Skupni volumen vzorca in barvila v žepku ne sme biti večji od 20  $\mu\text{L}$ .
- ❖ Elektroforezno celico smo povezali z virom napetosti ( $U = 80 \text{ V}$ ) ter pričeli z elektroforezno ločbo.
- ❖ Potek elektroforeze smo spremljali in jo ustavili, ko se nam je zdela ločba zadovoljiva.
- ❖ Gel smo prenesli v komoro foto-dokumentacijskega sistema Bio-Rad-Gel-Doc 1000 ter ga poslikali in računalniško obdelali s programom Molecular Analyst.

#### ☞ Suha agarozna elektroforeza s predhodno pripravljenimi geli E-Gel

- ❖ Bazo PowerBase smo priključili na električno omrežje ter v nosilec vstavili E-Gel (1 % agarozni gel).
- ❖ Po odstranitvi glavnička iz kasete E-Gela smo v žepke nanesti 20  $\mu\text{L}$  pripravljenega vzorca ter označevalce velikosti fragmentov.
- ❖ V nezasedene žepke smo nanesti po 20  $\mu\text{L}$  vode ter s pritiskom na gumb »Mode« operacijskega sistema iBase nastavili program ter zagnali elektroforezo. Potovanje fragmentov smo lahko spremljali s posebnim UV zaščitnim nastavkom.
- ❖ Po končani elektroforezni ločbi smo E-Gel slikali s foto-dokumentacijskim sistemom Bio-Rad-Gel-Doc 1000 ter sliko računalniško obdelali s programom Molecular Analyst.

### 3.2.2 VREDNOTENJE DNA

Čistost ter koncentracijo DNA med procesom smo preverjali z agarozno elektroforezo ter merjenjem absorbanco z UV/VIS-spektrofotometrom. Meritve absorbanco smo izvajali z UV/VIS-spektrofotometri, ki so na podlagi merjenja absorbanco pri valovnih dolžinah 260 nm in 280 nm s pomočjo Beer-Lambertovega zakona izračunali koncentracijo DNA ali pa smo jo ob upoštevanju faktorja redčenja, ekstinkcijskega koeficienta in dolžine poti svetlobe izračunali sami. Pred meritvijo smo topilo, v katerem je bila raztopljena DNA, izmerili ozadje ter ga odštevali od meritev vzorca. Čeprav so merjenja DNA v pufru z nizko molarnostjo (TE-pufer) bolj zanesljiva od meritev v vodi, kjer raztopljen CO<sub>2</sub> iz zraka lahko spreminja pH raztopine in moti absorbanco, smo zaradi narave vzorca in predpisov protokola DNA največkrat raztapljali v vodi. Pri teh meritvah moramo zato upoštevati možnost slabše zanesljivosti rezultatov.

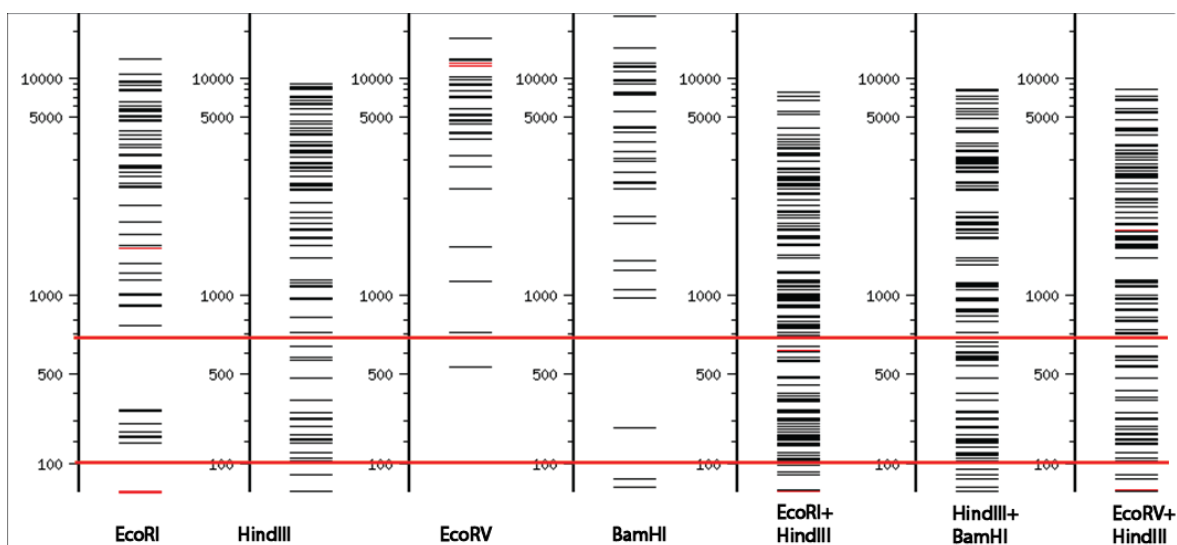
Ker heterociklični obroči nukleinskih kislin ultravijolično svetlobo absorbirajo pri valovni dolžini 260 nm, lahko iz teh vrednosti ter meritev absorbanco pri drugih valovnih dolžinah izračunamo koncentracijo ter čistost DNA. Na zanesljivost meritev vplivajo pH vrednost vzorca, sestava in ionska jakost topila ter sestava in čistost pridobljene DNA. Pozorni moramo biti tudi na to, da meritve izvajamo v linearnem območju spektrofotometra. Pred merjenjem smo DNA segreli na 37 °C ter jo z nežnim pipetiranjem premešali.

Razmerje med absorbanco pri 260 nm in 280 nm je eno od razmerij, ki nam podajajo oceno čistosti DNA v vzorcu. Razmerje je za čisto DNA 1,8. Odstopanja od te vrednosti lahko pripišemo onesnaženosti vzorca s proteini, RNA, solmi in drugimi organskimi spojinami. Na zanesljivost izmerjenega razmerja A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> vplivajo redčitev vzorca, vrsta prisotnih nečistoč, določenih organskih spojin, ki absorbirajo pri 280 nm (fenol), pH vrednost, sestava DNA idr. Razmerje med A<sub>260</sub> in A<sub>230</sub> je sekundarni parameter pri oceni čistosti DNA in je običajno višje od razmerja A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>. Nakazuje predvsem onesnaženost vzorca s kaotropnimi solmi ter organskimi spojinami. Zaželeni vrednosti razmerja so med 1,5 in 1,8 (38).

### 3.2.3 FRAGMENTACIJA PLAZMIDNE DNA

#### ☞ Specifična fragmentacija plazmidne DNA z restrikcijskimi endonukleazami EcoRI, EcoRV, HindIII in BamHI

Na spletu (39) lahko poiščemo GenBank število našega klon ali v program NebCutter vstavimo njegovo nukleotidno (FASTA) zaporedje, ki izvede virtualno restrikcijo vseh klonov (30). Ko vidimo lokacije in pogostost restrikcijskih mest, pregledamo še virtualni elektroforezni gel (»View gel«) in ocenimo, ali je razporeditev velikosti fragmentov primerna za označevanje.



Slika 10: Rezultati virtualne restrikcije za klon RP11-793J2. Želeni fragmenti se nahajajo med rdečima mejama (100 – 700 bp).

Restrikcijsko zmes prilagajamo koncentraciji DNA, ki jo imamo v vzorcu.

Tabela XI: Primer restrikcijske zmesi (40)

Reagent	V (μL)
Sterilna voda	43,25 - X
10 x pufer	5
Acetilirana BSA (10 μg/μL)	0,5
Vzorčna DNA (2,5 μg)	X
	<i>premešamo s pipeto</i>
Encim(i)	1,25
<b>Skupni volumen</b>	<b>50</b>

Restrikcijo lahko izvajamo tudi s kombiniranjem dveh restrikcijskih endonukleaz hkrati. DNA smo obenem obravnavali z EcoRI in HindIII. Ker sta oba encima zadovoljivo aktivna v pufru E (EcoRI 70–100 % in HindIII 100 %), smo restrikcijo izvedli istočasno. V

želji po povečanju koncentracije fragmentov primernih velikosti smo zmes inkubirali čez noč in nato uspešnost restrikcije ponovno preverili z elektroforezo.

Da bi ugotovili, kakšen vpliv imata čas restrikcije in superzvitost molekule na uspešnost restrikcije z endonukleazami, smo klon 1 pred restrikcijo za 10 minut postavili v vodno kopel, ki je bila segreti na 95 °C in tako spodbudili razvitje plazmidne molekule, nato pa ga takoj postavili na led in mu onemogočili ponovno zvijanje. Restrikcijo smo izvedli kot običajno in vsakih nekaj ur odvezemali vzorce, da bi ugotovili vpliv časa restrikcije na njeno uspešnost.

#### ⊗ Nespecifična fragmentacija z DNazo I

Nespecifično označevanje je potekalo v sklopu označevanja fragmentirane DNA s kitom Invitrogena (FISH Tag™ Orange Kit #with Alexa Fluor 555 dye in FISH Tag™ DNA Multicolor Kit, Alexa Fluor® dye combination) po protokolu iz kita (41).

### 3.2.4 OZNAČEVANJE FRAGMENTIRANE DNA

Za označevanje fragmentirane DNA smo uporabljali kita FISHTag™Orange Kit #with Alexa Fluor 555 dye in FISH Tag™ DNA Multicolor Kit, Alexa Fluor® dye combination. Pri izvedbi postopkov smo sledili priporočenemu protokolu (41):

#### 1) Sinteza amino-modificirane DNA

- ❖ Na ledu smo pripravili delovno raztopino DNaze I:

Tabela XII: Sestava delovne raztopine DNaze I

Reagent	Volumen (μL)
Nukleaze prosta voda	89
10 x »nick translation« pufer	10

Raztopino smo 10 minut hladili na ledu, dodali 1 μL DNaze I ter nežno premešali.

- ❖ Reakcijsko zmes smo pripravili po spodnjemu protokolu:

Tabela XIII: Priprava reakcijske zmesi

Reagent	Volumen
Nukleaze prosta voda	do končnega volumna 50 $\mu\text{L}$
10 x »nick translation« pufer	5 $\mu\text{L}$
0,1 M ditioneitol	5 $\mu\text{L}$
10 x DNA nukleotidni miks	5 $\mu\text{L}$
Fragmentirana DNA	1 $\mu\text{g}$
DNA polimeraza I	1,7 $\mu\text{L}$
Delovna raztopina DNaze I	4–6 $\mu\text{L}$
<b>Skupni volumen</b>	<b>50 <math>\mu\text{L}</math></b>

- ❖ Reakcijsko zmes smo previdno premešali s pipetiranjem ter jo 2 uri inkubirali na 15  $^{\circ}\text{C}$ .
- ❖ Dodali smo 50  $\mu\text{L}$  nukleaz proste vode ter DNazo I inaktivirali tako, da smo reakcijsko zmes vsaj 10 sekund močno premešavali.
  - 2) Čiščenje amino-modificirane DNA
- ❖ Reakcijski zmesi smo dodali 400  $\mu\text{L}$  vezavnega pufru ter dobro premešali.
- ❖ Celotni volumen (500  $\mu\text{L}$ ) zmesi smo nanesti v kolono, ki je bila vstavljena v zbiralno epico ter pri 13400 rpm centrifugirali 1 minuto. Material, ki se je nabral v zbiralni epici, smo zavrgli.
- ❖ Kolono smo sprali s spiralnim pufrom ter jo pri 13400 rpm dvakrat centrifugirali po 1 minuto ter zavrgli material, ki se je nabral v zbiralni epici.
- ❖ Kolono smo vložili v svežo epico, nanjo nanesti 55  $\mu\text{L}$  izpiralnega pufru ter jo na sobni temperaturi inkubirali 1 minuto.
- ❖ Kolono smo pri 13400 rpm centrifugirali 1 minuto ter material, ki se je nabral v zbiralni epici, shranili.
  - 3) Etanolno izobarjanje očiščene amino-modificirane DNA
- ❖ Izprani DNA smo dodali 10  $\mu\text{L}$  3 M natrijevega acetata (pH = 5,2), 1  $\mu\text{L}$  glikogena, 39  $\mu\text{L}$  nukleaz proste vode ter 250  $\mu\text{L}$  100 % etanola.
- ❖ Vzorec smo čez noč shranili na  $-20^{\circ}\text{C}$  ter ga nato 10 minut centrifugirali na 13400 rpm.
- ❖ Supernatant smo zavrgli ter usedlino dvakrat sprali s 70 % etanolom ter posušili na

sobni temperaturi.

- ❖ Usedlini smo dodali 5  $\mu\text{L}$  nukleaz proste vode, jo na 37 °C inkubirali 5 minut ter z UV/VIS-spektrofotometrom izmerili koncentracijo. Če je bila ta višja od 0,2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , smo jo prilagodili z nukleaz prosto vodo.

#### 4) Označevanje amino-modificirane DNA s fluorescentnim barvilom

- ❖ 1  $\mu\text{g}$  vzorca smo denaturirali tako, da smo ga 5 minut inkubirali na 96 °C. Za 3 minute smo ga prestavili na led ter ga 3 minute centrifugirali pri 13400 rpm.
- ❖ Vzorcju smo dodali 3  $\mu\text{L}$  raztopine natrijevega bikarbonata.
- ❖ Barvilo smo resuspendirali v 2  $\mu\text{L}$  DMSO ter ga dodali k vzorcju. Zmes smo dobro zvorteksirali ter jo v temi inkubirali 1 uro.
- ❖ Zmesi smo dodali 90  $\mu\text{L}$  nukleaz proste vode.

5) Čiščenje fluorescentno označene DNA: ponovili smo korake iz podpoglavij »Čiščenje amino-modificirane DNA« ter »Etanolno izobarjanje očiščene amino-modificirane DNA«.

- ❖ Usedlini smo dodali 10  $\mu\text{L}$  nukleaz proste vode, jo 5 minut inkubirali na 37 °C ter ji zmerili absorbanco.

### 3.2.5 PRIPRAVA TARČNE DNA

#### ⊗ Gojitev celic s tarčno DNA

Material s tarčno DNA bolnika lahko pridobivamo tako iz kostnega mozga kot iz venske krvi. V prvem primeru zdravnik v lokalni anesteziji s posebno iglo iz predela zadnjičnega črevničnega trna odvzame aspirat, ki ga shrani v epruveto s tekočim gojiščem RPMI 1640 in 0,5 mL natrijevega heparinata. Vensko kri odvezamemo iz vene na hrbtišču roke in jo zbiramo v epruveto z antikoagulantom natrijevim heparinatom. Pri pridobivanju in pripravi vzorcev smo sledili standardnim operativnim postopkom laboratorija za citogenetiko UKC Ljubljana.

Pri našem delu smo uporabljali predvsem vzorce krvi, ki smo jih gojili s stimulacijo z mitogenom PHA, ki k razmnoževanju v mediju spodbudi limfocite T. Venski krvi, odvzeti v epruveto z natrijevim heparinatom, smo s hematološkim analizatorjem izmerili koncentracijo levkocitov. Volumen vcepka smo izračunali po naslednji formuli:

$$V(\text{mL}) = \frac{9 \times 10^6 \left(\frac{\text{celic}}{\text{mL}}\right) \times 1000}{X \left(\frac{\text{celic}}{\text{L}}\right)}$$

Izračunanemu volumnu smo dodali toliko rastnega medija, da je skupni volumen vcepka znašal 2 mL. V sterilne centrifugirke (15 mL) smo odpipetirali kompletno gojišče (Chromosome medium A (PHA)), ga ogreli v vodni kopeli pri 37 °C ter vanj sterilno prenesli preračunani volumen venske krvi. Centrifugirko smo nedvoumno označili ter celice v inkubatorju v vlažni atmosferi gojili pri 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>. Po 48 h smo v gojišče dodali 400 µL timidina, po 70 h pa 100 µL kolcemida in vzorce inkubirali še 2 h.

#### ∅ Izolacija tarčne DNA

Po gojenju smo celice izolirali in trajno fiksirali za nadaljnjo analizo. Vzorec smo 10 minut centrifugirali pri 1600 rpm in odstranili supernatant. Po mešanju (vortex) smo začeli ob stalnem mešanju počasi in previdno (po kapljicah) dodajati hipotonično raztopino (0,075 M KCl), ki mora biti predhodno segreti na 37 °C. Epruvete smo 25 minut termostatirali na 37 °C, nato pa smo v epruveto z vzorcem dodali 3 kaplje fiksativa (raztopina metanola in oetne kisline v razmerju 3 : 1) in vzorec 8 minut centrifugirali na 1600 rpm. Po odstranitvi supernatanta in temeljitem mešanju smo po kapljicah dodali 8 mL fiksativa, čemur je sledila 15-minutna inkubacija vzorca na sobni temperaturi. Po centrifugiranju (8 minut, 1600 rpm) smo postopek ponavljali (odstranjevanje supernatanta, dodajanje fiksativa ob stalnem mešanju), dokler raztopina ni bila prozorna. Takrat smo v epruveti pustili 1 mL supernatanta in dobro premešali. Vzorec smo za vsaj dve uri postavili v zamrzovalnik (−20 °C) in nanegli na stekla.

#### ∅ Nanos tarčne DNA

Nova objektna stekla smo čez noč namakali v Kemexu A ter jih naslednji dan 30 minut spirali z vročo vodo ter nato 5 minut z mrzlo vodo. Sprana stekla smo še trikrat spirali z destilirano vodo ter jih shranili v hladilnik. Vzorce smo pred nanašanjem dobro premešali na stresalniku in z dodajanjem ali odvzemanjem fiksativa dosegli optimalno gostoto celic. Na stekla smo nanegli 20 µL vzorca ter jih za 4 minute vložili v razprševalnik celic OptiChrome. Pod invertnim mikroskopom smo preverili ustreznost gostote nanosa ter prisotnost metafaznih celic. Z diamantnim rezilom smo na steklu označili področje velikosti 2 x 2 cm, na katerega bomo kasneje nanegli sondo. Stekla smo označili s svinčnikom, jih na grelni plošči starali 30 minut na 60 °C ter jih pustili, da se ohladijo.

V nadaljevanju smo posušena stekla namakali v sledečih raztopinah:

- |   |  |
|---|--|
| 1. 2xSSC/5 minut/37 °C                                | 7. 2xSSC/2 minuti/sobna temperatura          |
| 2. raztopina pepsina/5 minut/37 °C                    | 8. 2xSSC/2 minuti/sobna temperatura          |
| 3. 2xSSC/2 minuti/sobna temperatura                   | 9. 2xSSC/2 minuti/sobna temperatura          |
| 4. 2xSSC/2 minuti/sobna temperatura                   | 10. 70 % etanol/2 minuti/sobna temperatura   |
| 5. 2xSSC/2 minuti/sobna temperatura                   | 11. 90 % etanol/2 minuti/sobna temperatura   |
| 6. formaldehidna raztopina/10 minut/sobna temperatura | 12. 100 % etanol/2 minuti/sobna temperatura. |

Stekla smo posušili na zraku ter nadaljevali z denaturacijo tarčne DNA.

∅ Ločena denaturacija vzorca in sonde

13. Stekla smo za 3 minute pomočili v raztopino formamida (pH = 5,6), ki se je vsaj pol ure termostatirala na 73 °C ter jih na hitro sprali v ledeno mrzlem 2 x SSC.

14. 70 % etanol/2 minuti/ledeno mrzel

15. 90 % etanol/2 minuti/ledeno mrzel

16. 100 % etanol/2 minuti /ledeno mrzel

Stekla smo posušili na zraku in medtem denaturirali sondo:

17. 1 µL sonde smo zmešali z 2 µL vode ter 7 µL hibridizacijskega pufra CEP, LSI/WCP ali samostojno pripravljene pufra s formamidom, ki smo ga pripravili po navodilih proizvajalca kita. Vsebino smo na hitro centrifugirali, premešali in spet centrifugirali, da se je zbrala na dnu ter pokrovček epice zaščitili s parafilmom.

18. Tako pripravljeno sondo smo 10 minut denaturirali pri 72 °C ter jo takoj nanesli na predhodno pripravljena stekla.

19. 10 µL sonde smo nanesli na sredino označenega polja na steklu in nanjo položili krovno stekelce (22 x 22 mm), tako med enim in drugim steklom ni bilo mehurčkov. Robove krovne stekelca smo zalili z »gumijastim cementom« ter stekla vložili v denaturator/hibridizator ThermoBrite.

20. V programu ThermoBrite smo izbrali in zagnali ustrezen program, ki je stekelca čez noč termostatiral na 37 °C ter primerni vlažnosti.

∅ Spiranje stekel po hibridizaciji

21. S stekel smo odstranili krovna stekelca ter jih za 4 minute postavili v spiralno raztopino NP-40, ki smo jo predhodno segreli na 73 °C.

22. Dodatno smo jih 4 minute pri sobni temperaturi namakali v raztopini PBT ter na



označeno področje kanili 10  $\mu$ L DAPI Counterstain II, ki obenem omogoča kontrastno žarjenje celic kot tudi zaščito pred izgubo intenzitete signala (antifade). Stekla smo pokrili z velikim krovnim steklom in pazili na morebitne mehurčke.

24. S staničevino smo preparate dobro popivnali in osušili ter za 10 minut postavili v zamrzovalnik ( $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

25. Stekla smo pregledali pod fluorescenčnim mikroskopom.

### 3.2.6 DODATNA OBRAVNAVA TARČNE DNA

Da bi preverili specifičnost izdelane DNA-sonde, smo kromosome po predhodni tripsinizaciji obarvali z reagentom Giemso. Na ta način smo na kromosomih ustvarili zanje značilne proge, po katerih jih lahko prepoznavamo. GTG-barvanje smo izvedli na sledeč način:

1. Na stekla smo nanесли 20  $\mu$ L celic v fiksativu ter jih 30 minut starali na  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  in 30 minut na  $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

2. Vsako stekelce smo za 5 sekund pomočili v raztopino tripsina ter jo na hitro sprali v 1 x PBS.

3. Stekla smo 15 minut namakali v raztopini Giemse, jih sprali pod tekočo vodovodno vodo ter posušili na zraku.

Poskusno stekelce smo vedno najprej pregledali pod mikroskopom ter prilagodili čas izpostavitve celic tripsinu in Giemsi. Z mikroskopom smo poslikali nekaj mitoz na vsakem stekelcu ter si označili njihovo lokacijo ter na stekelcih izvedli FISH-preiskavo.

#### ☞ Razmastitev stekelc

4. Ultraclear/20 minut/sobna T

5. Ultraclear/20 minut/sobna T

Stekelca smo vsaj 15 minut sušili na zraku.

#### ☞ Razbarvanje

6. MeOH : CH<sub>3</sub>COOH = 3 : 1/nekaj sekund/sobna T

7. 2 x SSC/2 minuti/sobna T

Od te točke smo pripravo tarčne DNA nadaljevali po standardnem postopku FISH od fiksacije s formaldehidom dalje (točka 6.).

## 4. REZULTATI IN RAZPRAVA

FISH-preiskavo smo izvajali na celicah, izoliranih iz kontrolnih vzorcev venske krvi zdravih prostovoljcev. Rezultate bomo predstavili po fazah izdelave sonde:

- ∅ Pridobivanje in izolacija DNA, pri čemer bomo primerjali izolacijo in čiščenje DNA s HPLC z odstranjevanjem in brez odstranjevanja RNA s CaCl<sub>2</sub> ter RNazo A ter s komercialnim kitom (PureLink® HiPure Plasmid Miniprep Kit).
- ∅ Fragmentiranje DNA, pri čemer bomo primerjali specifično fragmentiranje z DNazo I ter nespecifično fragmentiranje z restrikcijskimi encimi EcoRI in HindIII.
- ∅ Uspešnost označevanja glede na metodo označevanja, pri čemer bomo primerjali označevanje s pomikanjem zareze in ULS označevanje glede na način izolacije in čiščenja DNA.
- ∅ Optimizacija hibridizacije in denaturacije, pri čemer bomo primerjali različne hibridizacijske pufre, vpliv časa hibridizacije ter dodatka Cot DNA na specifičnost označevanja in preverjanje specifičnosti vezave sonde s pomočjo predhodnega GTG barvanja kromosomov.

### 4.1 PRIDOBIVANJE IN IZOLACIJA BAC DNA

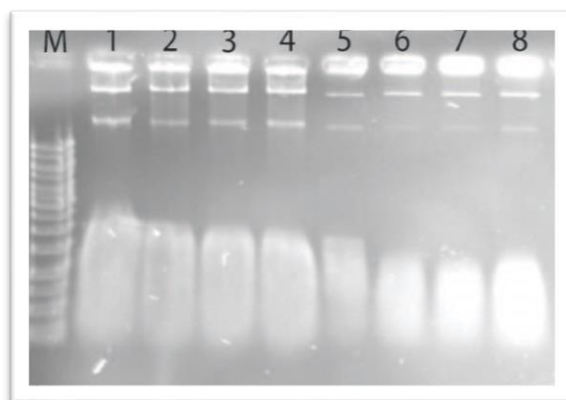
#### 4.1.1 IZOPROPANOLNO IZOBARJANJE DNA

Bakterijsko kulturo *E.coli* smo nagojili in lizirali z alkalno lizo (str. 25). Lizat smo izopropanolno precipitirali ter mu z UV/VIS-spektrofotometrom K2500 (Knauer) izmerili absorbanco ter izračunali koncentracijo.

Tabela XIV: Izmerjena koncentracija in razmerje A260/A280 ter izračunana masa DNA, ki jo po izopropanolnem izobarjanju pridobimo iz 500 µL lizata

Volumen precipitata (µL)	Vzorec	Začetni volumen lizata (µL)	A260/A280	c DNA (µg/mL)	m DNA (µg)
80	klon 1	500	2,148	2490,83	199,3
	klon 3	500	2,112	3217,99	257,4
	klon 4	500	1,568	3564,93	285,2
	klon 5	500	2,143	2614,29	209,1

Naredili smo tudi elektroforezno ločbo vzorcev ter njihovih desetkratnih redčitev.



Slika 11: Elektroforezni gel po izopropanolnem izobarjanju lizata (0,7 % agaroz, 1 x TBE pufer, 80 V, 60 min). Nanosi v žepke: 15  $\mu$ L vzorca + 2  $\mu$ L barvila. Oznake: M – 1 kbp označevalec, 1 – klon 1, 2 – klon 3, 3 – klon 4, 4 – klon 5, 5 – 10 x redčitev klon 1, 6 – 10 x redčitev klon 3, 7 – 10 x redčitev klon 4, 8 – 10 x redčitev klon 5.

Z izopropanolnim izobarjanjem smo izoborili tako DNA kot tudi razgradne produkte BAC DNA, RNA, polisaharide, nečistoče ter druge ostanke gostitelja, kar je razvidno tako iz elektroforeznega gela, visokega razmerja A260/A280 in visokih koncentracij, izračunanih na podlagi meritev absorbance. Gelska elektroforeza nakazuje prisotnost nečistoč velikosti do 6 kbp in dve lisi večje DNA-molekule, ki lahko predstavljata razgrajeno BAC DNA ali nastopanje dveh oblik BAC DNA. Do razgradnje DNA lahko pride zaradi prevelikih strižnih sil med centrifugiranjem (24).

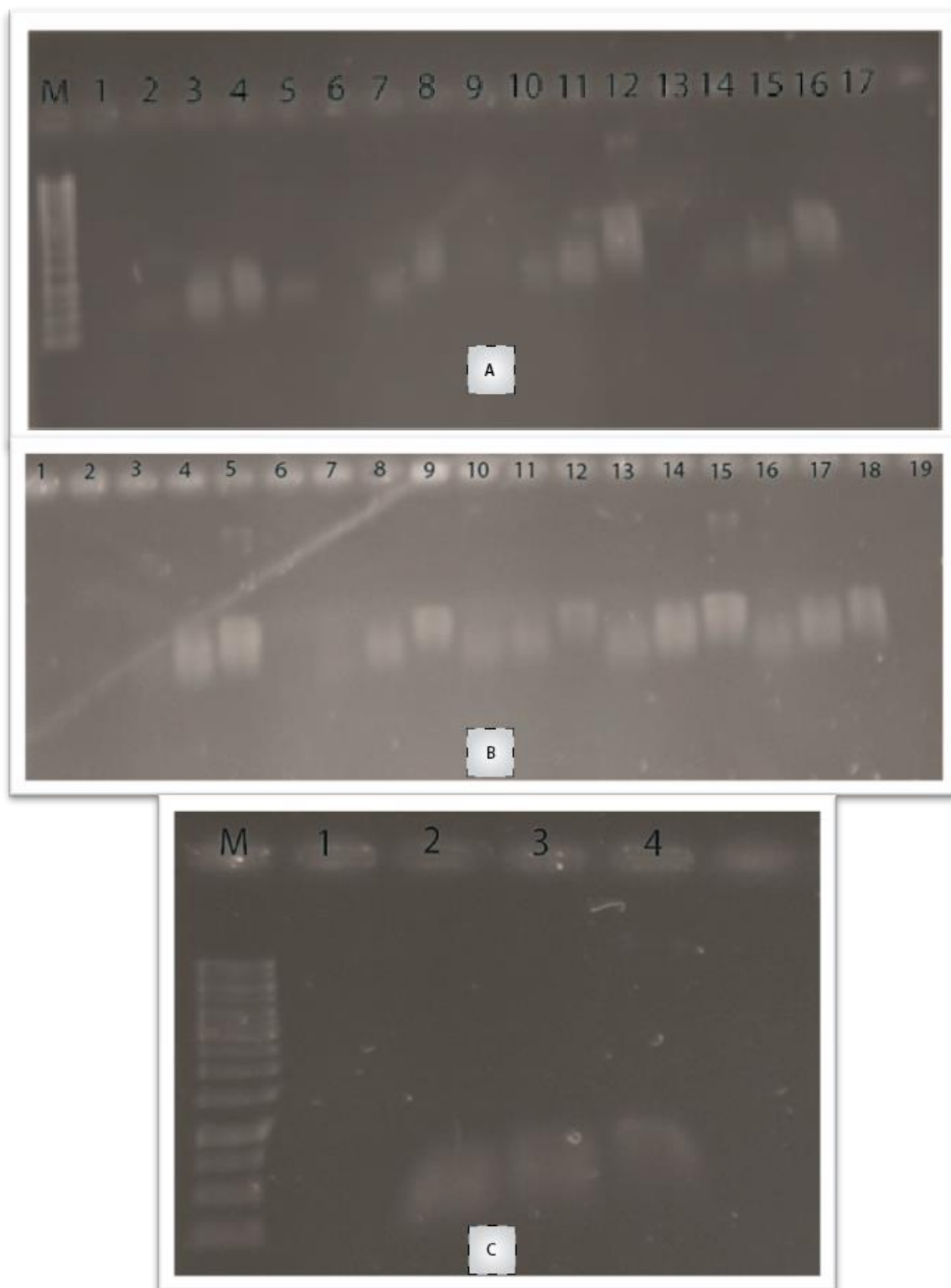
#### 4.1.2 IZOLACIJA DNA S HPLC-METODO

Bakterijsko kulturo *E.coli* smo nagojili in lizirali z alkalno lizo (str. 25). Iz lizata smo po opisanem postopku (str. 26) z visokotlačno tekočinsko kromatografijo izolirali DNA. Prevodnost smo uravnavali s spreminjanjem ionske jakosti mobilne faze. Ta se spreminja na podlagi sestave mešanice, ki jo uravnava dva dotoka: dotok A (TE pufer, pH 7,4) in dotok B (1 M NaCl). Pri frakcijah E1 in E2 lahko pričakujemo izpiranje RNA ter nečistoč, pri E3 pa se s kolone spere tarčna DNA. Z UV/VIS-spektrofotometrom K2500 smo vsaki frakciji izmerili tudi absorbanco (Priloga A.) in na podlagi meritev izračunali količino pridobljene DNA. Seriji 3 in 6 smo zaradi neskladnosti v delovanju HPLC-aparature in previsoke koncentracije lizata ponovili.

Tabela XV: Rezultati meritev absorbanc in izračunana masa DNA, pridobljene z izolacijo s HPLC

HPLC	Serijska	Izobarjanje s CaCl <sub>2</sub>	A260/A280	c DNA (µg/mL)	V frakcije (mL)	m DNA (µg)
<b>klon 1</b> V(lizata) = 50 mL	11E3 80 %	DA	2,079	8,846	2,5	<b>22,115</b>
	3E3 80 %	NE	2,145	88,581	6	531,486
	8E3 80 %	NE	2,263	8,846	2,5	22,115
					vsota 3E3 in 8E3	<b>553,601</b>
<b>klon 3</b> V(lizata) = 50 mL	2E3 80 %	DA	2,03	13,783	3,5	<b>48,2405</b>
	1E3 80 %	NE	2,141	72,269	4	<b>289,076</b>
<b>klon 4</b> V(lizata) = 50 mL	4E3 80 %	DA	2,195	25,509	3	<b>76,527</b>
	6E3 80 %	NE	2,158	72,716	7	509,012
	7E3 80 %	NE	2,138	27,153	2,5	67,8825
					vsota 6E3 in 7E3	<b>576,8945</b>
<b>klon 5</b> V(lizata) = 50 mL	10E3 80 %	DA	2,069	21,784	5,5	<b>119,812</b>
	9E3 80 %	NE	2,306	52,438	2	<b>104,876</b>

Izvedli smo tudi gelsko elektroforezo vseh serij. Podčrtano in okrepljeno besedilo v tabeli nakazuje žepke z vidno liso BAC DNA na gelu, razmazane lise manjših velikosti pa lahko pripišemo RNA in ostalim nečistočam.



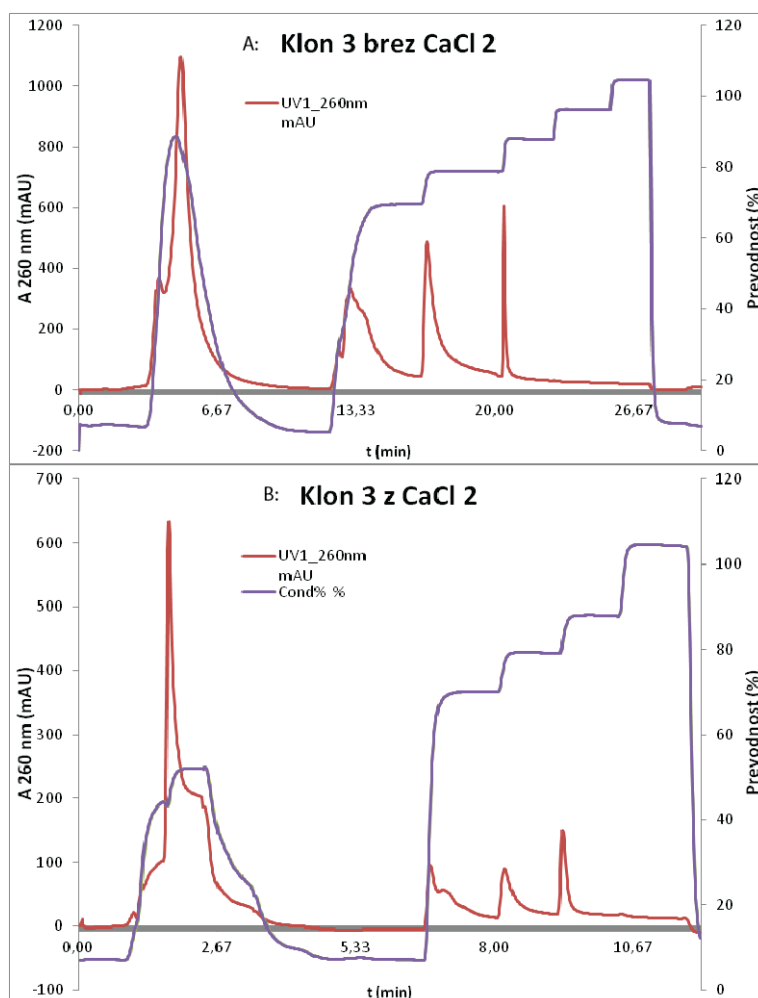
Slika 12: Klasična gelska elektroforeza serij A) 1-4, B) 6-10 in C) 11 (0,7 % agaroz, 1 x TBE pufer, 80 V, 60 min). Nanosi v žepke: 15  $\mu$ L vzorca + 2  $\mu$ L barvila. Oznake: Tabela

XVI.

Tabela XVI: Legenda elektroforeznega gela za DNA, pridobljeno s HPLC (serije 1–11)

Pozicija na gelu	Vzorec
M (A)	Označevalec 1kbp Ladder (Fermentas)
1 (A)	1F1 Klon 3 brez dodanega CaCl <sub>2</sub>
2 (A)	1E1 Klon 3 brez dodanega CaCl <sub>2</sub> 60 % B
3 (A)	1E2 Klon 3 brez dodanega CaCl <sub>2</sub> 70 % B
<b>4 (A)</b>	<b>1E3 Klon 3 brez dodanega CaCl<sub>2</sub> 80 % B</b>
5 (A)	2F1 Klon 3 z dodanim CaCl <sub>2</sub>
6 (A)	2E1 Klon 3 z dodanim CaCl <sub>2</sub> 60 % B
7 (A)	2E2 Klon 3 z dodanim CaCl <sub>2</sub> 70 % B
8 (A)	2E3 Klon 3 z dodanim CaCl <sub>2</sub> 80 % B
9 (A)	3F1 Klon 1 brez dodanega CaCl <sub>2</sub>
10 (A)	3E1 Klon 1 brez dodanega CaCl <sub>2</sub> 60 % B
11 (A)	3E2 Klon 1 brez dodanega CaCl <sub>2</sub> 70 % B
<b>12 (A)</b>	<b>3E3 Klon 1 brez dodanega CaCl<sub>2</sub> 80 % B</b>
13 (A)	4F1 Klon 4 z dodanim CaCl <sub>2</sub>
14 (A)	4E1 Klon 4 z dodanim CaCl <sub>2</sub> 60 % B
15 (A)	4E2 Klon 4 z dodanim CaCl <sub>2</sub> 70 % B
16 (A)	4E3 Klon 4 z dodanim CaCl <sub>2</sub> 80 % B
2 (B)	6FT Klon 4 brez dodanega CaCl <sub>2</sub>
3 (B)	6E1 Klon 4 brez dodanega CaCl <sub>2</sub> 60 % B
4 (B)	6E2 Klon 4 brez dodanega CaCl <sub>2</sub> 70 % B
<b>5 (B)</b>	<b>6E3 Klon 4 brez dodanega CaCl<sub>2</sub> 80 % B</b>
6 (B)	7FT Klon 4 brez dodanega CaCl <sub>2</sub> (nalaganje 6FT)
7 (B)	7E1 Klon 4 brez dodanega CaCl <sub>2</sub> 60 % B
8 (B)	7E2 Klon 4 brez dodanega CaCl <sub>2</sub> 70 % B
9 (B)	7E3 Klon 4 brez dodanega CaCl <sub>2</sub> 80 % B
10 (B)	8E1 Klon 1 brez dodanega CaCl <sub>2</sub> 60 % B
11 (B)	8E2 Klon 1 brez dodanega CaCl <sub>2</sub> 70 % B
12 (B)	8E3 Klon 1 brez dodanega CaCl <sub>2</sub> 80 % B
13 (B)	9E1 Klon 5 brez dodanega CaCl <sub>2</sub> 60 % B
14 (B)	9E2 Klon 5 brez dodanega CaCl <sub>2</sub> 70 % B
<b>15 (B)</b>	<b>9E3 Klon 5 brez dodanega CaCl<sub>2</sub> 80 % B</b>
16 (B)	10E1 Klon 5 dodan CaCl <sub>2</sub> 60 % B
17 (B)	10E2 Klon 5 dodan CaCl <sub>2</sub> 70 % B
18 (B)	10E3 Klon 5 dodan CaCl <sub>2</sub> 80 % B
19 (B)	10FT Klon 5 dodan CaCl <sub>2</sub>
M (C)	Označevalec 1kbp Ladder (Fermentas)
1 (C)	11FT Klon 1 z dodanim CaCl <sub>2</sub>
2 (C)	11E1 Klon 1 z dodanim CaCl <sub>2</sub> 60 % B
3 (C)	11E2 Klon 1 z dodanim CaCl <sub>2</sub> 70 % B
<b>4 (C)</b>	<b>11E3 Klon 1 z dodanim CaCl<sub>2</sub> 80 % B</b>

Razmerje A260/A280 ob dodajanju CaCl<sub>2</sub> je bilo v večini primerov nižje kot brez dodatka CaCl<sub>2</sub>, vendar še vedno nad 1,8 in nakazuje prisotnost RNA v vzorcu. Masa DNA (in drugih snovi, ki absorbirajo pri 260 nm), pridobljene s HPLC ob dodajanju CaCl<sub>2</sub>, je bila bistveno nižja od mase, ki jo dobimo, če CaCl<sub>2</sub> ne dodajamo. Na elektroforeznem gelu so lise, ki nakazujejo BAC DNA ob dodatku CaCl<sub>2</sub> veliko šibkejše od lis DNA, kateremu CaCl<sub>2</sub> nismo dodajali ali sploh niso bile prisotne. Če upoštevamo, da so koncentracije DNA v teh vzorcih veliko višje, lahko sklepamo, da je dodatek CaCl<sub>2</sub> povzročil razgradnjo ali izgubo BAC DNA, ali pa je bila izračunana koncentracija lažno visoka na račun nečistoč, ki absorbirajo pri 260 nm. Iz odzivov, vidnih na kromatogramih, lahko razberemo manjše odzive v primeru dodajanja CaCl<sub>2</sub>. Klon 5 izstopa po tem, da je masa pridobljene DNA tako po dodajanju CaCl<sub>2</sub> kot brez dodajanja podobna, lisa na elektroforeznem gelu pa je prisotna le v primeru izolacije brez odstranjevanja RNA.



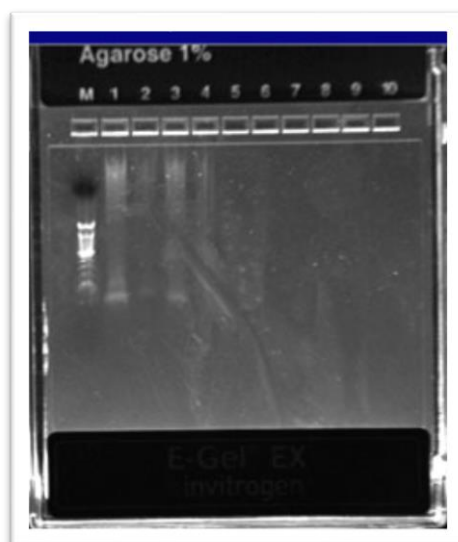
Slika 13: Kromatogram klona 3, izoliranega s HPLC, brez CaCl<sub>2</sub> (A) in kromatogram klona 3, izoliranega s HPLC, dodatek CaCl<sub>2</sub> (B).

#### 4.1.3 ODSTRANJEVANJE RNA IZ VZORCEV, IZOLIRANIH S HPLC METODO, Z RNazo A

Z visokotlačno tekočinsko kromatografijo (HPLC) smo izolirali klone (Tabela XV) in jim po protokolu iz PureLink® HiPure Plasmid Miniprep Kit-a z RNazo A iz kita odstranili RNA (str.12) (37). Pred obravnavo smo vzorcem izmerili razmerji A260/A280 in A260/A230 ter izračunali koncentracijo. Za primerjavo smo vzorcem po obravnavi z RNazo A zopet izmerili razmerje A260/A280 ter izračunali koncentracijo in maso vzorca, ki smo ga pridobili iz 20 µL vzorca.

Tabela XVII: Primerjava razmerja A260/280 in koncentracij s HPLC izolirane DNA pred in po obravnavi z RNazo A

Pred obravnavo z RNazo	A260/A280	A260/230	c (µg/mL)
Klon 1	1,904	1,589	2177
Klon 3	1,921	1,224	2071
Klon 4	1,823	1,469	2114
Klon 5	1,884	1,438	2243
Po obravnavi z RNazo	A260/A280	c (µg/mL)	m DNA (µg)
Klon 1	1,665	1324	26,48
Klon 3	1,534	847	16,94
Klon 4	1,586	911	18,22
Klon 5	1,667	772	15,44



Slika 14: Suha gelska elektroforeza klonov 1, 3, 4 in 5, ki so bili izolirani s HPLC in obravnavani z RNazo A. Pogoji elektroforeze: 1 % agarosa, 230 V, 6 min. Nanosi v žepke: 10 µL vzorca + 10 µL vode. M – 100 bp označevalec, 1 – klon 1, 2 – klon 3, 3 – klon 4, 4 – klon 5.



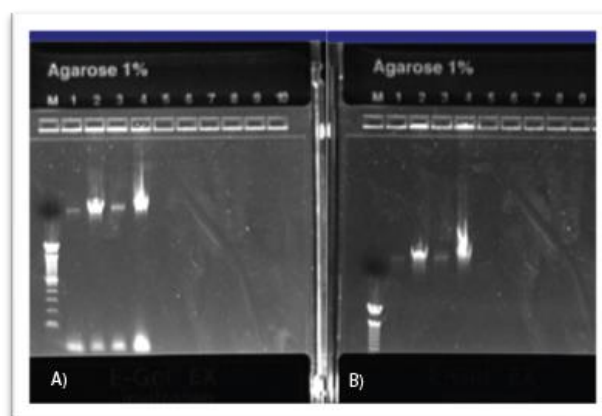
Lise so nejasne in razmazane, kar nakazuje na prisotnost fragmentov različnih velikosti. Po odstranitvi RNA z RNazo A se je razmerje A260/280 znižalo, kar pomeni, da je bila RNA v določeni meri odstranjena. Masa pridobljene DNA med procesom odstranjevanja je padla za 40 %–65 %, kar je lahko zaradi razgradnje DNA, lahko pa je RNA predhodno lažno višala izmerjeno koncentracijo DNA. Sodeč po elektroforeznem gelu se je DNA popolnoma razgradila na fragmente različnih velikosti. Do razgrajevanja DNA je lahko prišlo zaradi številnih korakov izolacije in čiščenja, v katerih je bilo veliko robustnih pristopov, kot so grobo mešanje, centrifugiranje, temperaturni šoki, itn.

#### 4.1.4. IZOLACIJA DNA IN RAZGRADNJA RNA S KOMERCIALNIM KITOM

Iz bakterijske brozge so bili kloni izolirani s PureLink® HiPure Plasmid Miniprep kitom. Izolirani DNA smo izmerili absorbanco pri 260 nm in 280 nm ter izvedli elektroforezno ločbo.

Tabela XVIII: Pridobivanje DNA s PureLink® HiPure Plasmid Miniprep Kit

PureLink® HiPure Plasmid Miniprep Kit	Vzorec	V brozge (mL)	A260/A280	c DNA (µg/mL)	m DNA (µg)
	Klon 1	10	1,736	606	6,06
	Klon 3	10	1,755	430	4,3
	Klon 4	10	1,772	512	5,12
	Klon 5	15	1,121	612	6,12



Slika 15: Suha gelska elektroforeza plazmidne DNA klonov 1, 3, 4 in 5, ki so bili izolirani s komercialnim kitom. Slikano ob A) 10 min in B) 17,5 min. Pogoji elektroforeze: 1 % agarosa, 230 V, 17,5 min. Nanosi v žepke: 2 µL vzorca + 18 µL vode. Oznake: M – 100 bp označevalec, 1 – klon 1, 2 – klon 3, 3 – klon 4, 4 – klon 5.

Večje zgornje lise kažejo na prisotnost BAC DNA, spodnje razmazane lise pa na prisotnost RNA in ostalih nečistoč, manjših od 100 bp. Izkoristek pridobljene DNA je skladen s smernicami proizvajalca kita (iz 100 mL bakterijske kulture pridobimo približno 40 µg DNA). Razmerje A260/280 je blizu 1,8. Klon 5 tudi tokrat izstopa tako po koncentraciji kot razmerju A260/230, zato lahko sklepamo, da gre za slabo kvaliteto klona, neuspešno gojenje ali neuspešno vstavitve vektorja v gostitelja. Na elektroforeznem gelu vidimo nekaj nečistoč, manjših od 100 bp. Pri klonih 3 in 5 opažamo liso na začetku gela in razmazanost ostalih lis, kar je lahko posledica prisotnosti soli v vzorcu ali neenakomernega nanašanja vzorcev v žepke in slabe kvalitete agaroze.

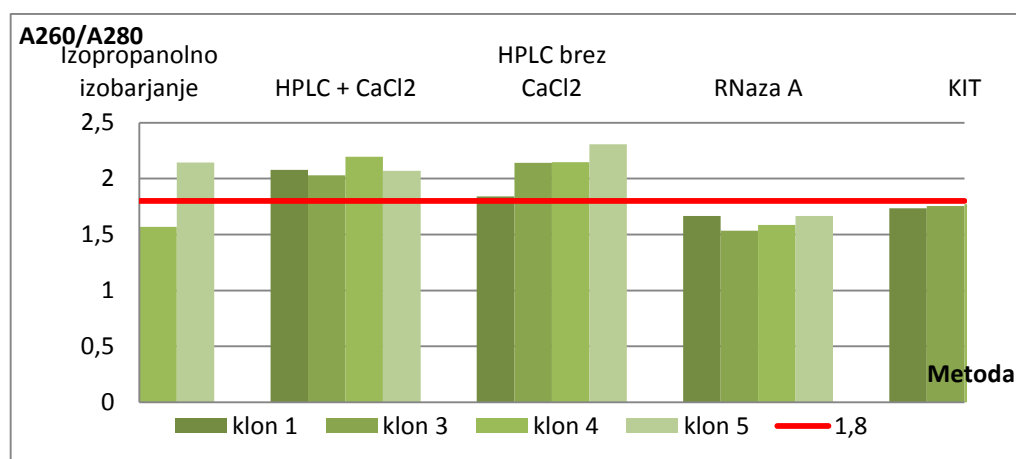
#### 4.1.5 PRIMERJAVA IZKORISTKOV METOD IZOLACIJE

Zanimalo nas je, koliko DNA dobimo iz 50 mL izhodiščne bakterijske brozge, zato smo koncentracije DNA, pridobljene z različnimi metodami izolacije, prilagodili na volumen 50 mL in izračunali maso pridobljene DNA.

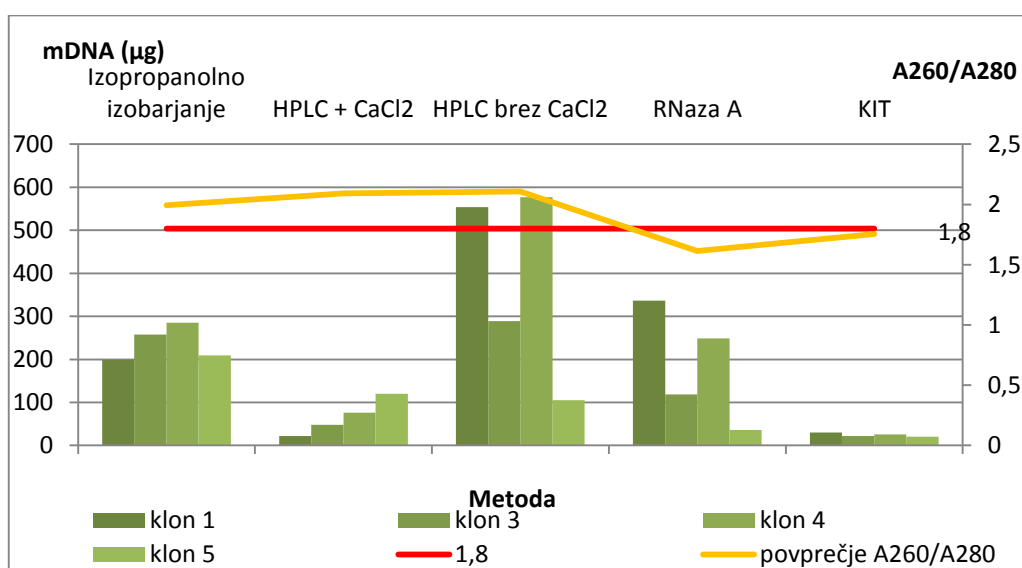
Tabela XIX: Izračun količine DNA, ki jo s posamezno metodo pridobimo iz 50 mL lizata

Metoda	Vzorec	m DNA (µg)	A260/A280
<b>Izopropanolno izobarjanje</b>	Klon 1	199,27	2,148
	Klon 3	257,44	2,112
	Klon 4	285,19	1,568
	Klon 5	209,14	2,143
<b>HPLC, izobarjanje RNA s CaCl<sub>2</sub></b>	Klon 1	22,115	2,079
	Klon 3	48,241	2,030
	Klon 4	76,527	2,195
	Klon 5	119,81	2,069
<b>HPLC brez izobarjanja RNA s CaCl<sub>2</sub></b>	Klon 1	553,60	1,840
	Klon 3	289,08	2,141
	Klon 4	576,89	2,148
	Klon 5	104,88	2,306
<b>HPLC brez izobarjanja RNA s CaCl<sub>2</sub> Odstranjevanje RNA z RNazo A</b>	Klon 1	336,60	1,665
	Klon 3	118,23	1,534
	Klon 4	248,64	1,586
	Klon 5	36,077	1,667
<b>PureLink® HiPure Plasmid Miniprep Kit</b>	Klon 1	30,3	1,736
	Klon 3	21,5	1,755
	Klon 4	25,6	1,772
	Klon 5	20,4	1,121

Pri izračunih koncentracije in mase DNA, ki jo pridobimo z določeno metodo, moramo upoštevati dejstvo, da je ta lahko lažno višja na račun snovi, ki absorbirajo pri podobnih valovnih dolžinah kot DNA. Jasnejšo oceno o izkoristku izolacije DNA dobimo, če poleg koncentracije pridobljene DNA upoštevamo tudi razmerje A260/280, ki označuje čistost pridobljenega vzorca. Na podlagi izračunov smo izdelali graf (Slika 16), ki ponazarja odvisnost razmerja A260/A280 od metode izolacije. Drugi graf (Slika 17) predstavlja tako izkoristek posameznih metod izolacije kot njihovo razmerje A260/A280 v odvisnosti od uporabljane metode. Ker je razmerje A260/A280 odvisno od kvalitete klona in se pri klonu 5 razlikuje od ostalih, smo ga pri metodi izolacije s kitom izvzeli iz izračuna povprečja.



Slika 16: Razmerje A260/A280 pri izolatih DNA, pridobljenih s posameznimi metodami.



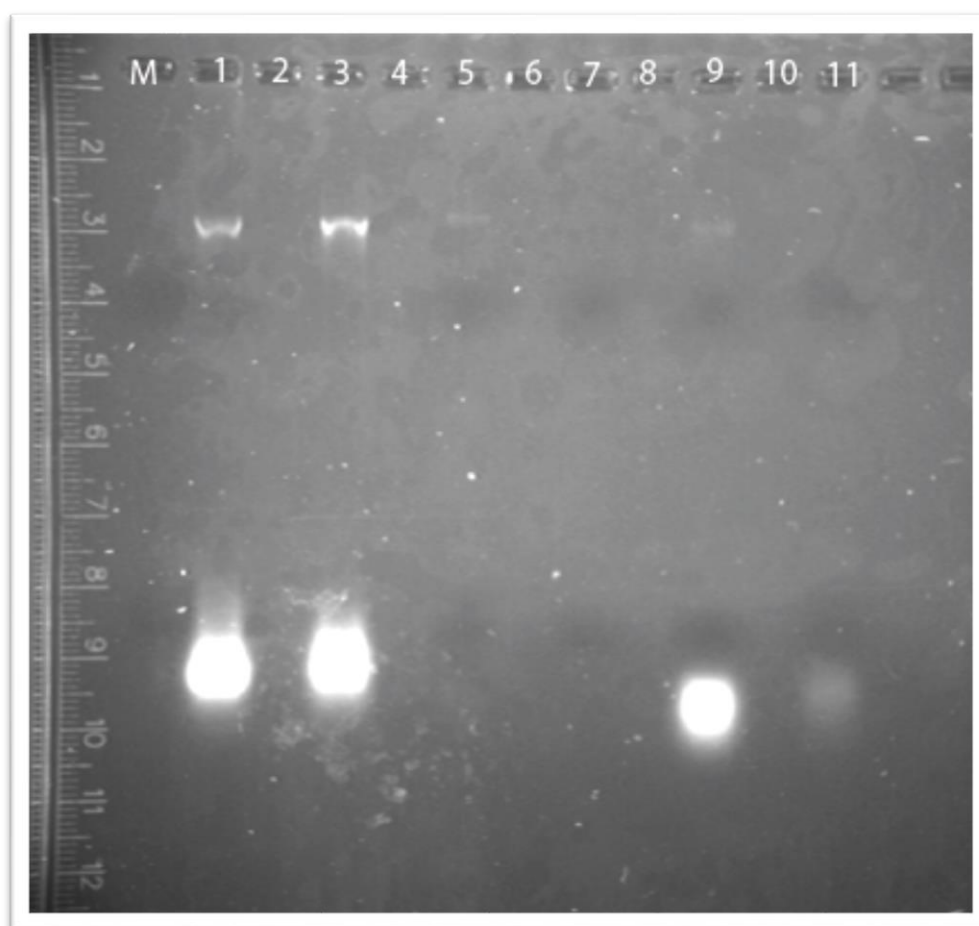
Slika 17: Primerjava izkoristka izolacije DNA in razmerja A260/A280 med posameznimi metodami.

Glede na razmerji A260/A280 in A260/A230 ter sodeč po elektroforeznih gelih dobimo najboljše očiščeno obliko BAC DNA s komercialnim kitom. Pri ostalih metodah je koncentracija, ki smo jo izračunali na podlagi izmerjenih absorbanc, višja, vendar sodeč po rezultatih elektroforeze in razmerja A260/A280 na račun preostalih nečistoč in RNA v vzorcu.

## 4.2 SPECIFIČNA FRAGMENTACIJA DNA Z ENCIMI

Kloni so bili izolirani s HPLC-metodo ob dodatku CaCl<sub>2</sub> (Tabela XV). Restriksijske zmesi smo pripravljali skladno s protokolom proizvajalca encimov (Tabela XI).

### 4.2.1 RESTRIKCIJA Z ECORI



Slika 18: Klasična agarozna elektroforeza po restrikciji klonov z EcoRI (0,7 % agarozna, 100 V, 120 min). Nalaganje v žepke: 15 µL vzorca + 2 µL barvila. Označe: Tabela XX.

Tabela XX: Seznam nanosov v žepke elektroforeznega gela

Žepček	Vzorec	Restrikcija
M	100 bp označevalec	
1	Klon 1	NE
2	Klon 1	DA
3	Klon 2	NE
4	Klon 2	DA
5	Klon 3	NE
6	Klon 3	DA
7	Klon 4	NE
8	Klon 4	DA
9	Klon 5	NE
11	Klon 5	DA

Zaradi dolgega poteka elektroforezne ločbe so fragmenti, krajši od 1 kbp, ušli iz elektroforeznega gela. Pri neobdelanih klonih na elektroforeznem gelu opazimo liso, ki nakazuje veliko BAC DNA molekulo ter nečistoče neznane velikosti. Po reakciji te lise niso več opazne, kar lahko pomeni, da je restrikcija uspela. Mali fragmenti so lahko ušli iz elektroforeznega gela ali pa je koncentracija fragmentov v restriksijski zmesi prenizka.

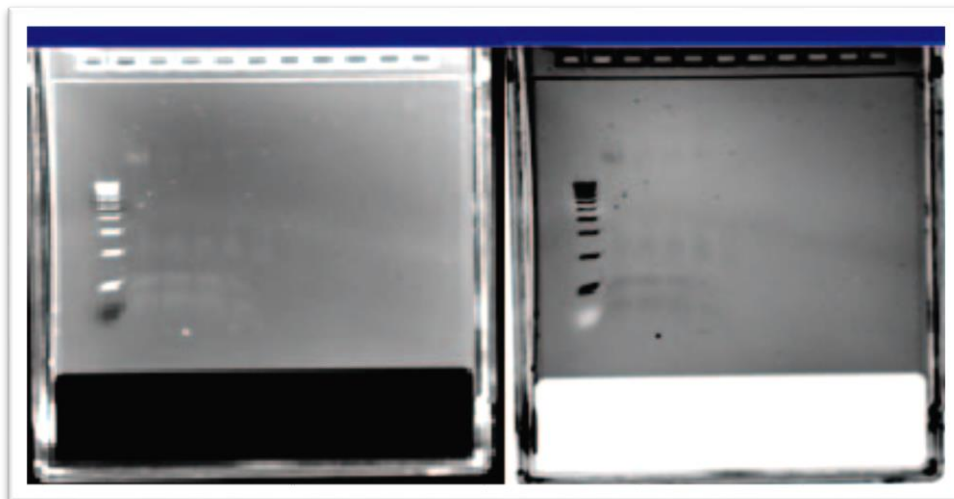
#### 4.2.2 RESTRIKCIJA Z ECORI IN HINDIII



Slika 19: Suha agarozna elektroforeza po sočasni restrikciji klonov z EcoRI in HindIII (2 % agarosa, 230 V, 6 min). Označe: M – 100 bp označevalec, 1 – klon 5, 2 – klon 4, 3 – klon 3, 4 – klon 2, 5 – klon 1.

Sodeč po elektroforeznem gelu do restrikcije ni prišlo ali pa je ta potekala v premajhnem obsegu, saj je večina DNA še vedno prevelika za uspešno nadaljevanje z označevanjem (300–700 bp). Večje lise so verjetno nerazrezana BAC DNA, nižje na gelu pa so fragmenti DNA, nečistoče in RNA. Ker je razlog za neuspešno restrikcijo lahko superzvitost BAC DNA, smo v naslednjem koraku pred restrikcijo s temperaturnim šokom izzvali razvitje molekule (uncoiling).

#### 4.2.3 RESTRIKCIJA Z ECORI IN HINDIII PO PREDHODNEM RAZVIJANJU DNA



Slika 20: Suha agarozna elektroforeza klona 1 po predhodnem razvijanju in invertna slika (2 % agarozna, 230 V, 15 min). Oznake: M – 100 bp označevalec, 1 – 1 h restrikcije, 2 – 4 h restrikcije, 3 – 5 h restrikcije, 4 – 6 h restrikcije, 5 – 16 h restrikcije.

Pred encimsko restrikcijo smo vzorce 10 minut segrevali na 95 °C, nato pa takoj postavili na led. Med inkubacijo smo ob časovnih intervalih 1 h, 4 h, 5 h, 6 h in 16 h odvzeli po 5 µL vzorca, ga shranili na –20°. Po zaključku inkubacije smo izvedli elektroforezno ločbo vseh vzorcev. Zaradi nizke koncentracije so lise slabo vidne, vendar se ob mestu nanosa v vseh vzorcih vidi nerazrezana DNA. Sklepamo lahko, da restrikcija ni bila uspešna ali ni potekla v dovolj velikem obsegu. Lise velikosti 0–350 bp so lahko fragmenti razrezane DNA, RNA, encimi ali druge nečistoče. Na podlagi tega poskusa prednosti razvijanja DNA s temperaturnim šokom pred restrikcijo ne moremo ovrednotiti, ker pa je lisa nerazrezane DNA v 1 h močnejša od ostalih, lahko predvidevamo, da je do restrikcije DNA prišlo med prvo in četrto uro inkubacije.

### 4.3 NESPECIFIČNA FRAGMENTACIJA Z DNazo I

Ker je uspešnost fragmentacije lahko odvisna od metode izolacije DNA, izmerjena koncentracija BAC DNA v našem vzorcu pa lahko lažno višja od realne, smo želeli sestavo reakcijske zmesi najprej optimizirati in izbrati metodo, ki zagotavlja najmanj razgrajeno izhodiščno DNA za obravnavo z DNazo I (31).

#### 4.3.1 OPTIMIZACIJA ČASA INKUBACIJE REAKCIJSKE ZMESI Z DNazo I IN KONCENTRACIJE DNA V REAKCIJSKI ZMESI ZA KLONE, IZOLIRANE S HPLC IN OB IZOBARJANJU RNA S $\text{CaCl}_2$

Tabela XXI: Priprava reakcijske zmesi z DNazo za vzorec 3A in 3B

Reagent	3A ( $\mu\text{L}$ )	3B ( $\mu\text{L}$ )
nukleaz prosta voda	22,3	24,3
10 x »nick translation« pufer	5	5
0,1 M DTT	5	5
10 x DNA nukleotidna mešanica	5	5
DNA (klon 3), $c = 1751 \mu\text{g/mL}$ , (izolacija s HPLC, dodajanje $\text{CaCl}_2$ )	5	3
DNA polimeraza I	1,7	1,7
DNaza I delavna raztopina	6	6



Slika 21: Suha agarozna elektroforeza po obravnavi klona 3 z DNazo I glede na čas inkubacije in koncentracijo DNA (1 % agarosa, 230 V, 7 min). Oznake: Tabela XXII.

Tabela XXII: Legenda nanosov v žepke elektroforeznega gela

Žepek	Vzorec	Čas obravnave z DNazo I (min)
M	DNA TrackIt 100 bp označevalec	
1	Klon 3A	1
2	Klon 3B	1
3	Klon 3A	30
4	Klon 3B	30
5	Klon 3A	60
6	Klon 3B	60
7	Klon 3A	90
8	Klon 3B	90
9	Klon 3A	120
10	Klon 3B	120

Kloni so bili izolirani s HPLC metodo ob dodatku  $\text{CaCl}_2$  (Tabela XV). Med vzorci, ki so se inkubirali različno dolgo časa, na elektroforeznem gelu ni videti bistvenih razlik. Ker so tudi lise vzorcev z različnimi koncentracijami DNA v reakcijski zmesi praktično enake, je potek fragmentacije in prisotnosti nerazgrajene BAC DNA v vzorcu vprašljiv, zato smo v nadaljevanju fragmentacijo preverili s kloni, izoliranimi z drugimi metodami.

#### 4.3.2 PREVERJANJE POTEKA FRAGMENTACIJE Z DNazo I ZA KLONE, IZOLIRANE S HPLC IN BREZ IZOBARJANJA RNA S $\text{CaCl}_2$

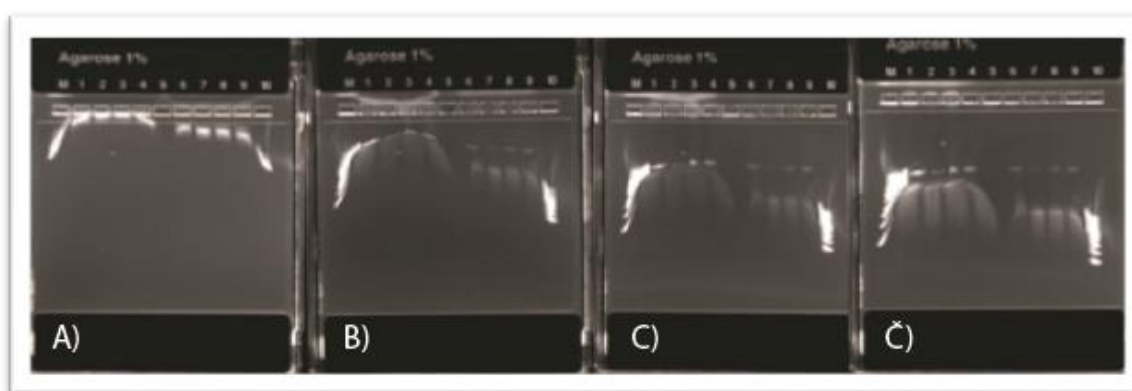


Slika 22: Suha agarozna elektroforeza s primerjavo nefragmentiranega in fragmentiranega klona (1 % agarosa, 230 V, 7 min). Označe: M – 1 kbpoznačevalec, 1 – klon 3 (5  $\mu\text{L}$  + 15  $\mu\text{L}$  vode), 2 – klon 3 (10  $\mu\text{L}$  + 10  $\mu\text{L}$  vode), 9 – reakcijska raztopina z DNazo I (5  $\mu\text{L}$  + 15  $\mu\text{L}$  vode), 10 – 100 bp označevalec.



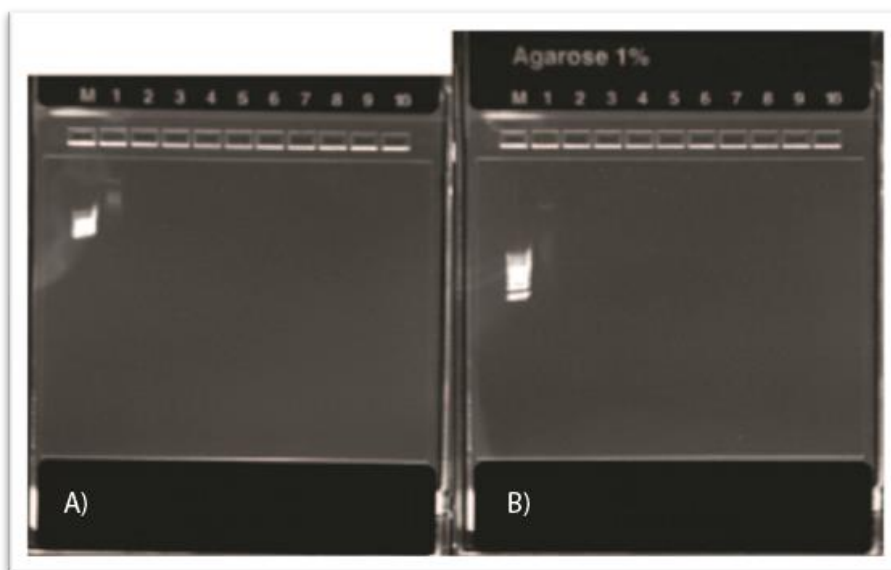
Kloni so bili izolirani s HPLC metodo brez izobarjanja RNA s  $\text{CaCl}_2$  (Tabela XV). Prvi trije žepki so namenjeni preverjanju prisotnosti BAC DNA v izhodiščnem vzorcu in nakazujejo, da je nerazgrajena BAC DNA prisotna. S prostim očesom je pod žepkom 9 viden razmaz lis velikosti 100–300 bp. Glede na to, da pod žepkom 9 ni vidne lise velikosti nerazgrajene BAC DNA (kot pod prvim in drugim žepkom), lahko sklepamo, da je fragmentacija v določeni meri potekla. Ker pa po obravnavi z DNazo I vzorca nismo etanolno izoborili, so manjši fragmenti lahko tudi DNaza I ali nečistoče (RNA).

#### 4.3.3 PRIMERJAVA NEFRAGMENTIRANIH IN FRAGMENTIRANIH KLONOV, IZOLIRANIH S HPLC IN BREZ IZOBARJANJA RNA S $\text{CaCl}_2$



Slika 23: Suha agarozna elektroforeza klonov 1, 3, 4, 5 in njihovih fragmentiranih različic ob časih A) 5 min, B) 10 min, C) 12,5 min in Č) 15 min (1 % agarozna, 230 V, 15 min). Nanosi v žepke: 10  $\mu\text{L}$  vzorca + 10  $\mu\text{L}$  vode. Oznake: M – 1 kbp označevalec, 1 – klon 1, 2 – klon 3, 3 – klon 4, 4 – klon 5, 6 – fragmentiran klon 1, 7 – fragmentiran klon 3, 8 – fragmentiran klon 4, 9 – fragmentiran klon 5, 10 – 100 bp označevalec.

Kloni so bili izolirani s HPLC brez dodajanja  $\text{CaCl}_2$  (Tabela XV). Ker je območje velikosti razmazanih lis v primeru obravnave z DNazo I manjše (100–700 bp) kot pri nefragmentiranih klonih (1–6 kbp), lahko sklepamo, da je DNaza I v določeni meri fragmentirala tudi nečistoče. Šibkejše lise BAC DNA po fragmentaciji nakazujejo na uspešnost fragmentiranja, vendar je samo iz elektroforeznega gela težko reči, v kolikšni meri, vsekakor pa ne v celoti. V želji, da bi se fragmentiralo več BAC DNA, smo klonu 3 dodali 1  $\mu\text{L}$  delavne raztopine DNaze I in vzorec dodatno inkubirali.



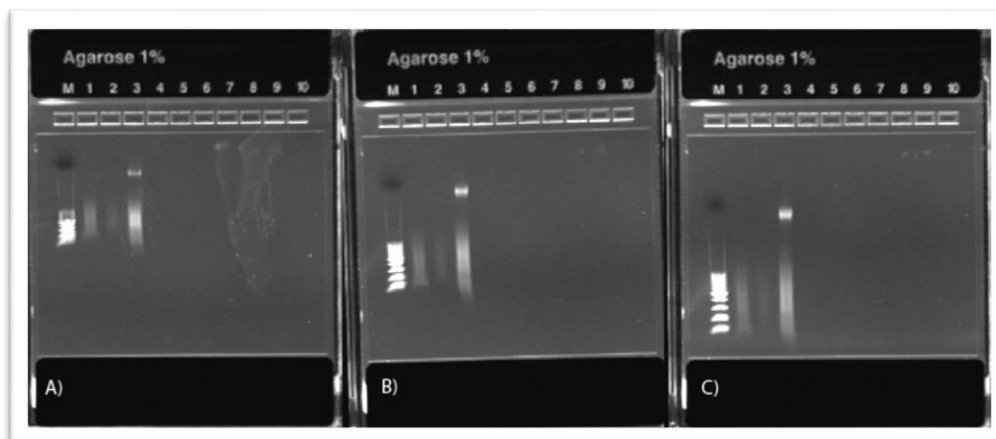
Slika 24: Suha agarozna elektroforeza klona 3 po obravnavi z DNazo I ob časih A) 3 in B) 5 minut (1 % agarosa, 230 V, 5 min). Oznake: M – 100 bp označevalec (1,5  $\mu$ L + 18,5  $\mu$ L vode), 1 – klon 1 z dodano DNazo I (5  $\mu$ L + 15  $\mu$ L vode).

Lise so zaradi volumsko manjših nanosov vzorca šibkejše, vidno pa je, da je nerazgrajeni BAC še vedno prisoten, razmaz fragmentov pa se giblje pri velikostih nad 800 kbp. Dodatek DNaze I ni zmanjšal velikosti fragmentov na velikost, ki je primerna za označevanje (pod 700 bp), zato smo se v nadaljnjih poizkusih zopet osredotočili na ugotavljanje optimalne sestave reakcijske zmesi z DNazo I, s katero bi dosegli fragmentiranje vse BAC DNA.

#### 4.3.4 OPTIMIZACIJA KONCENTRACIJE DNA V REAKCIJSKI ZMESI Z DNazo I ZA KLONE, IZOLIRANE S HPLC IN BREZ IZOBARJANJA RNA S $\text{CaCl}_2$

Tabela XXIII: Sestava reakcijskih zmesi z DNazo I za klon 1

Reagent	1A ( $\mu$ L)	1B ( $\mu$ L)
nukleaz prosta voda	25,3	26,8
10 x »nick translation« pufer	5	5
0,1 M DTT	5	5
10 x DNA nukleotidna mešanica	5	5
DNA (klon 1), c = 2339 $\mu$ g/mL, (izolacija s HPLC, brez dodajanja $\text{CaCl}_2$ )	2	0,5
DNA polimeraza I	1,7	1,7
DNaza I delavna raztopina	6	6



Slika 25: Suha agarozna elektroforeza ob časih A) 6 min, B) 8 min in C) 10,5 min (1 % agarosa, 230 V, 10,5 min). Oznake: M – 100 bp označevalec (1,5  $\mu$ L + 18,5  $\mu$ L vode), 1 – 1A (20  $\mu$ L), 2 – 1B (20  $\mu$ L), 3 – klon 1 nefragmentiran (2  $\mu$ L + 18  $\mu$ L vode)

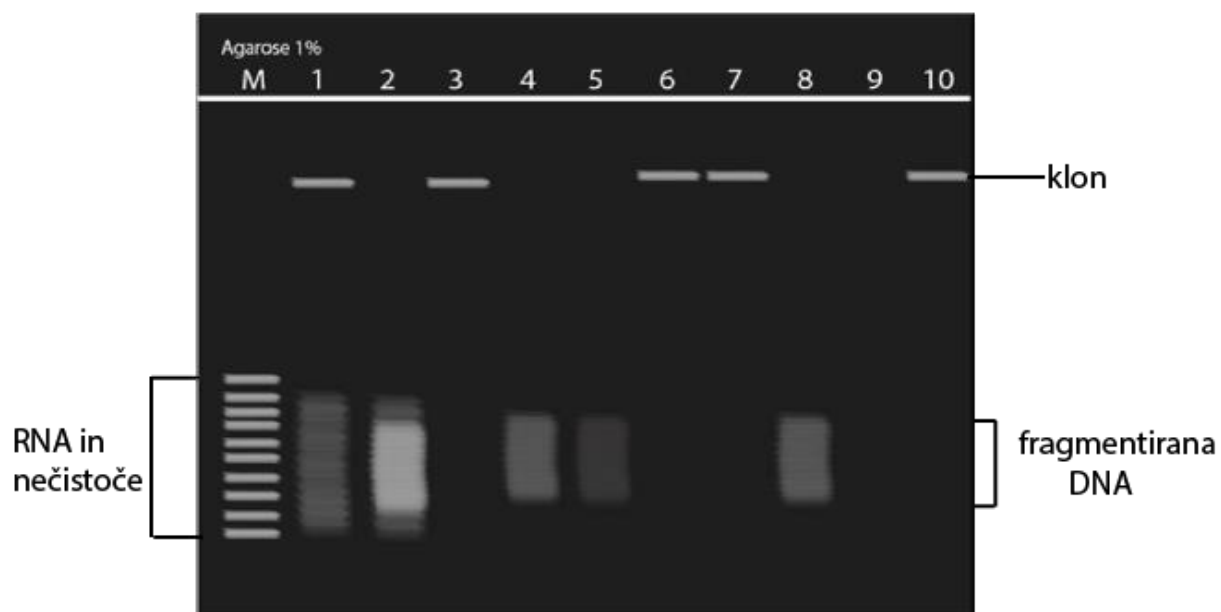
Kloni so bili izolirani s HPLC in brez odstranjevanja RNA s  $\text{CaCl}_2$  (Tabela XV). Ker lise nefragmentirane BAC DNA v primeru fragmentirane DNA niso vidne, lahko sklepamo, da je bila fragmentacija z DNazo I uspešna. Še vedno so v vzorcu tudi nečistoče in RNA (velikosti 100–1000 bp), zato je razmaz lis verjetno posledica tako fragmentirane DNA kot nečistoč. Pri vzorcu 1A (Tabela XXIII) je lisa močnejša, vendar smo med etanolnim izobarjanjem vzorca 1B izgubili delček usedline, zato glede na jakost lis ne moremo sklepati na primernejšo sestavo reakcijske zmesi.

#### 4.3.5 PRIMERJAVA KLONOV, IZOLIRANIH S HPLC (BREZ IZOBARJANJA RNA S $\text{CaCl}_2$ ) IN KLONOV, IZOLIRANIH S KOMERCIALNIM KITOM TER FRAGMENTACIJSKIH ZMESI Z DNazo I

Preko elektroforezne ločbe smo želeli primerjati

- ∅ klone, izolirane s HPLC brez odstranjevanja RNA  $\text{CaCl}_2$  (Tabela XV),
- ∅ klone, izolirane s HPLC, odstranjevanje RNA z RNazo A (Tabela XVII),
- ∅ klone, izolirane s komercialnim kitom (Tabela XVIII) in
- ∅ njihove fragmente po obravnavi z DNazo I (različne sestave reakcijskih zmesi).

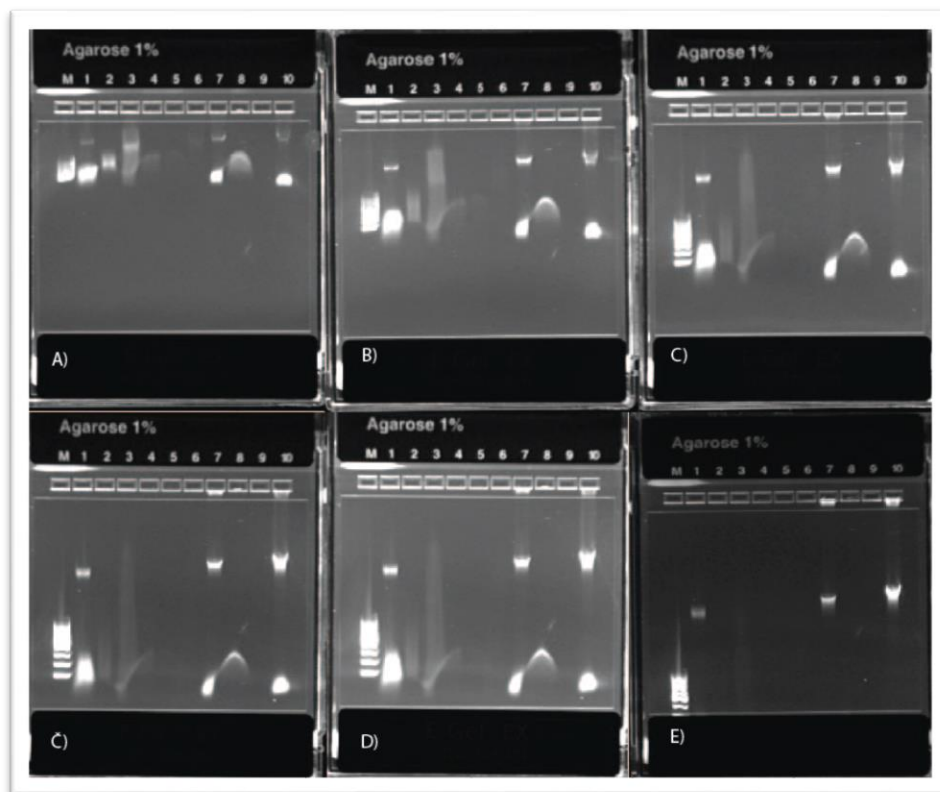
Pred izvedbo elektroforeze smo izdelali sliko pričakovanega elektroforeznega gela. Ker izolacija s kitom zajema odstranitev RNA z RNazo A, lis RNA pri teh vzorcih ne pričakujemo. Ostale lise smo ustvarili glede na pretekle izkušnje in pričakovanja:



Slika 26: Pričakovan elektroforezni gel.

Tabela XXIV: Legenda nanosov v žepke gela

Žepak	Vzorec	Priprava	V delovne raztopine DNaze I ( $\mu\text{L}$ ) v reakcijski zmesi	V ( $\mu\text{L}$ ) + V <sub>vode</sub> ( $\mu\text{L}$ )
M	100 bp označevalec	/	/	1,5 + 18,5
1	Klon 1	HPLC	/	3 + 17
2	Klon 1	HPLC	6	10 + 10
3	Klon 1	HPLC + Rnaza A	/	3 + 17
4	Klon 1	HPLC + Rnaza A	6	6 + 14
5	Klon 1	HPLC + Rnaza A	8	4 + 16
6	Klon 5	HPLC + Rnaza A	/	3 + 17
7	Klon 1	Kit	/	3 + 17
8	Klon 1	Kit	6	6 + 14
9	Voda	/	/	20
10	Klon 5	Kit		3 + 17



Slika 27: Suha agarozna elektroforeza ob časih A) 3,5 min, B) 5,5 min, C) 7,5 min, Č) 10,5 min, D) 10,5 min (daljši čas izpostavitve) in E) 14,5 min (1 % agarosa, 230 V, 14,5 min).

Ob primerjavi pričakovanega in realnega elektroforeznega gela smo ugotovili, da se vsa RNA (ali druge nečistoče) tudi ob izolaciji s kitom popolnoma ne odstrani. Tudi pri tem poskusu se je DNA, ki je bila izolirana s HPLC, po obravnavi z RNazo A razgradila. Fragmenti DNA, izolirani s kitom in fragmentirani z DNazo I, se po velikosti gibljejo okoli 300 bp. Pri obeh nefragmentiranih vzorcih, pridobljenih s kitom, imamo v žepku liso, ki ne potuje. Pripisemo jo lahko zaostanku soli v vzorcu. Fragmente primernih velikosti torej dobimo z izolacijo DNA s HPLC (brez odstranjevanja RNA) in s komercialnim kitom, vendar je slednja metoda primernejša, saj zagotavlja čistejši produkt (Slika 17).

### 4.3 USPEŠNOST OZNAČEVANJA DNA GLEDE NA METODO IZOLACIJE

Za izdelavo sonde smo uporabili ULS-označevanje in označevanje s pomikanjem zareze.

#### 4.3.1 OZNAČEVANJE Z ULS-METODO

##### 4.3.1.1 ULS označevanje klonov, izoliranih s HPLC (odstranjevanje RNA s $\text{CaCl}_2$ )

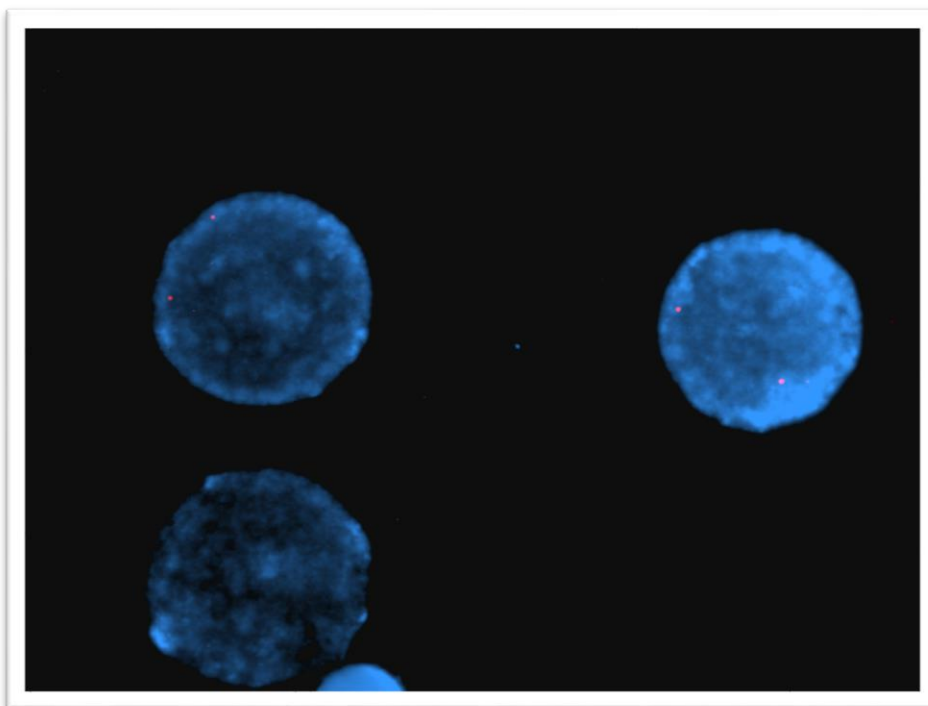
Po protokolu kita za ULS-označevanje (32) smo izdelali sondo (Kreatech), ji izmerili absorbanco ter s pomočjo DoL-kalkulatorja (42) izračunali DoL (uporabili smo

barvilo Cy3, z absorpcijskim maksimumom pri 550 nm in ekstinkcijskim koeficientom  $\epsilon$  150000  $\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ ). Kloni so bili izolirani s HPLC ter dodatkom  $\text{CaCl}_2$  (Tabela XV).

Tabela XXV: ULS označevanje klona 3 ( $c_{\text{DNA}} = 17 \mu\text{g/mL}$ )

A260	A550	dolžina poti (cm)	korekcijski faktor	cDNA (ng/ $\mu\text{l}$ )	c(barvila) (pmol/ $\mu\text{l}$ )	DoL (%)
0,022	0,009	0,5	0,08	2	0,1	1,9

Koncentracija DNA je nižja od priporočene (vsaj 4  $\mu\text{g/mL}$ ), DoL pa je ustrezen (1–3,6) (42). Zaradi majhnega volumna izdelane sonde smo koncentracijo in DoL izmerili samo klonu 3. Z izdelano sondo smo izvedli FISH preiskavo. Uporabili smo hibridizacijski pufer, izdelan po navodilu Invitrogena (41) in po predpripravi vzorcev izvedli hibridizacijo sonde na limfocite venske krvi. Slika 28 prikazuje interfazna jedra levkocitov po hibridizaciji s sondo.

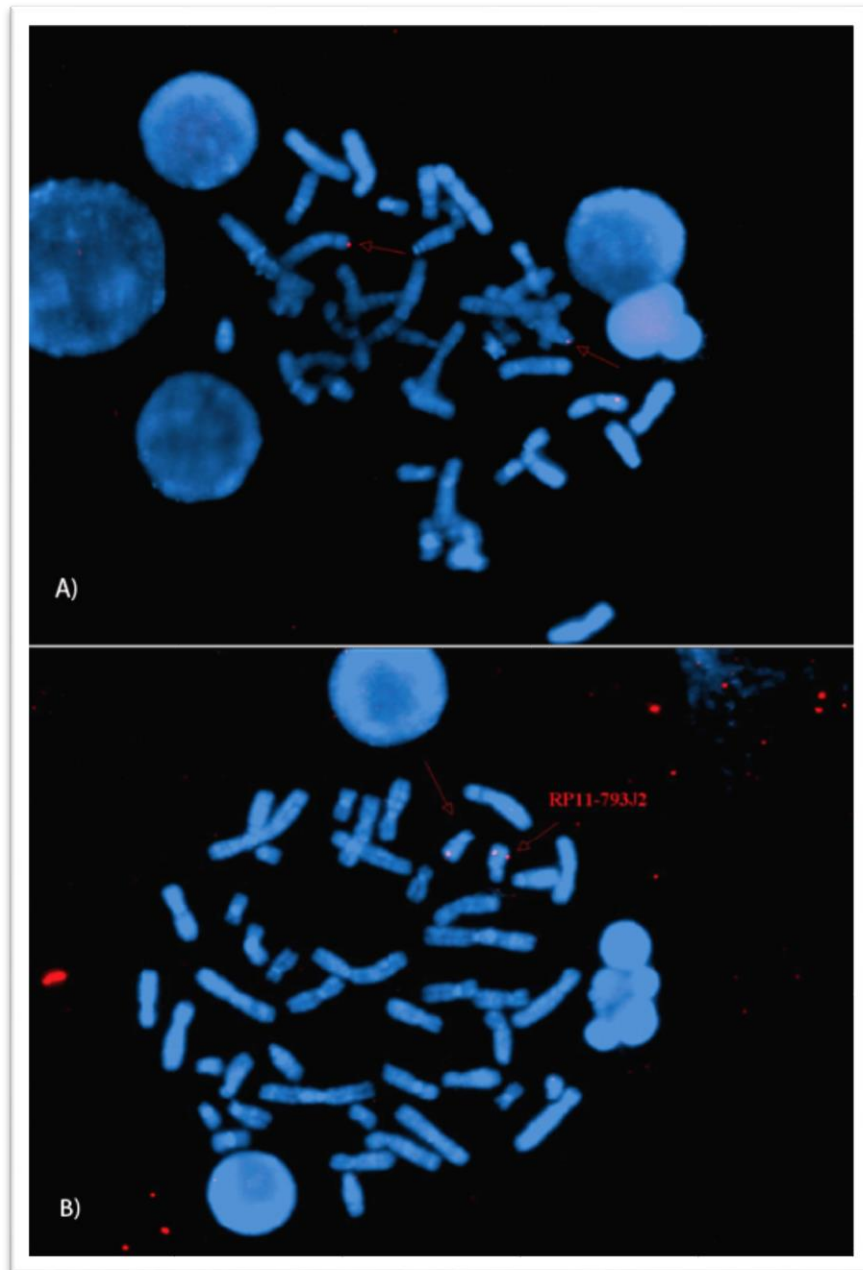


Slika 28: Interfaza (klon 3), ULS označevanje, 10 x prebitek Cot.

Oranžni signali sonde so vidni na interfaznih jedrih, nekaj pa jih je tudi v ozadju. V nekaterih interfaznih celicah zaznamo pričakovana dva signala. Opazili pa smo tudi celice z enim ali nobenim, tako da učinkovitost vezave sonde ni bila dovolj šnja.

Vezavo smo preverjali tudi na nanosih metafaz, da bi lahko ocenili specifičnost. Metafaza A (Slika 29) kaže signale sonde, ki naj bi bila specifična za področje 12p13.31

(klon 3). Čeprav kromosomov ne moremo prepoznavati pa bi glede na velikost signali lahko pripadali terminalnim delom kratkega kraka kromosoma 12. Tudi vezava sonde klona 5 bi lahko ustrezala dolgemu kraku kromosoma 18.



Slika 29: Primerjava metafaz klona 3 (12p13.31, ULS-označevanje), A) 10 x prebitek Cot DNA in B) klona 5 (18q21.33) brez Cot DNA.

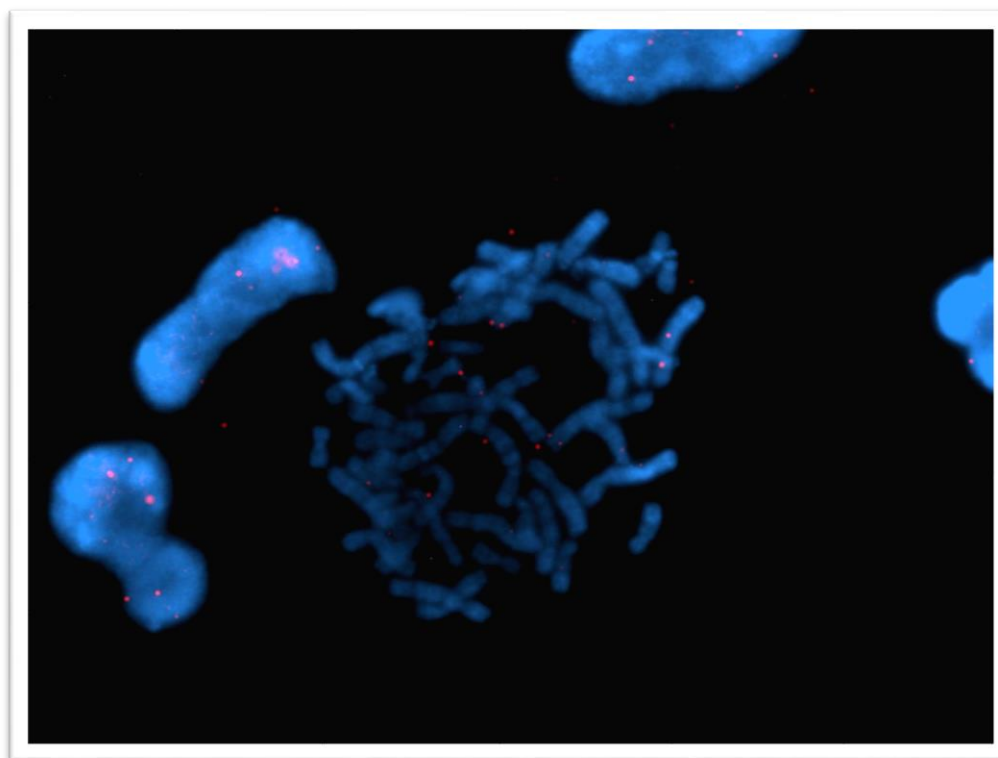
### 4.3.2 OZNAČEVANJE S POMIKANJEM ZAREZE (»NICK« TRANSLACIJA)

#### 4.3.2.1 »Nick« translacija klonov, izoliranih s HPLC po izobarjanju RNA s CaCl<sub>2</sub>

Klon 3 je bil izoliran s HPLC (po izobarjanju RNA s CaCl<sub>2</sub>) (Tabela XV). Po protokolu kita za označevanje s pomikanjem zarez (Invitrogen) smo izdelali sondo, ji izmerili absorbanco ter s pomočjo DoL-kalkulatorja izračunali DoL (uporabili smo barvilo Cy3, z absorpcijskim maksimumom pri 555 nm in ekstinkcijskim koeficientom  $\epsilon$  150000 cm<sup>-1</sup>M<sup>-1</sup>).

Tabela XXVI: Izmerjena absorbanca in izračun DoL

A260	A550	dolžina poti (cm)	korekcijski faktor	cDNA (ng/ $\mu$ l)	c(barvila) (pmol/ $\mu$ l)	DoL (%)
0,033	0,012	0,5	0,08	3	0,2	1,7



Slika 30: Metafaza (klon 3), označevanje s pomikanjem zarez, brez Cot-1.

Čeprav je koncentracija DNA nižja od priporočene (vsaj 4  $\mu$ g/mL), je DoL ustrezen (1-3,6). Oranžni signali sonde so posejani tako po celicah kot ozadju. V nekaterih interfaznih celicah zaznamo dva signala, v drugih enega ali nobenega. Vezava sonde je bila povsem nespecifična.

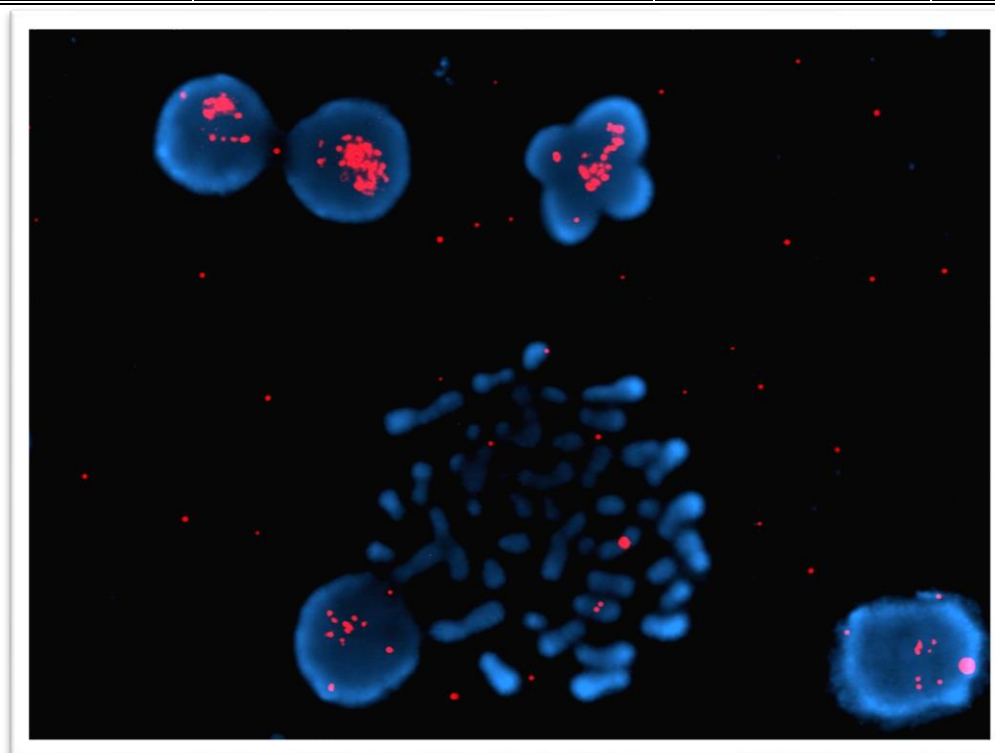


#### 4.3.2.2 »Nick« translacija pri klonih, izoliranih s HPLC brez izobarjanja RNA s CaCl<sub>2</sub>

Po protokolu kita za označevanje s pomikanjem zareze (Invitrogen) smo iz izhodiščnega vzorca klona 3 (Tabela XV) izdelali sondo ter ji s pomočjo UV/VIS-spektrofotometra Nanodrop ND-1000 izmerili absorbanco. Ker absorbance pri 260 nm zaradi tehničnih težav nismo mogli izmeriti, DoL in koncentracije sonde nismo izračunali.

Tabela XXVII: Meritve absorbanc za sondo klona 3 (»nick« translacija)

Vzorec	Lokacija	A260	A550
Klon 3	12p13.31	0,152	-0,066



Slika 31: Metafaza in interfazna jedra (klon 3), označevanje s pomikanjem zareze, brez Cot DNA.

Klon je bil izoliran s HPLC brez odstranitve RNA s CaCl<sub>2</sub>. Oranžni signali sonde so zelo gosto posejani po interfaznih jedrih, pa tudi v ozadju, kar kaže na izrazito nespecifično vezavo sonde.

#### 4.3.2.3 »Nick« translacija klonov, izoliranih s komercialnim kitom

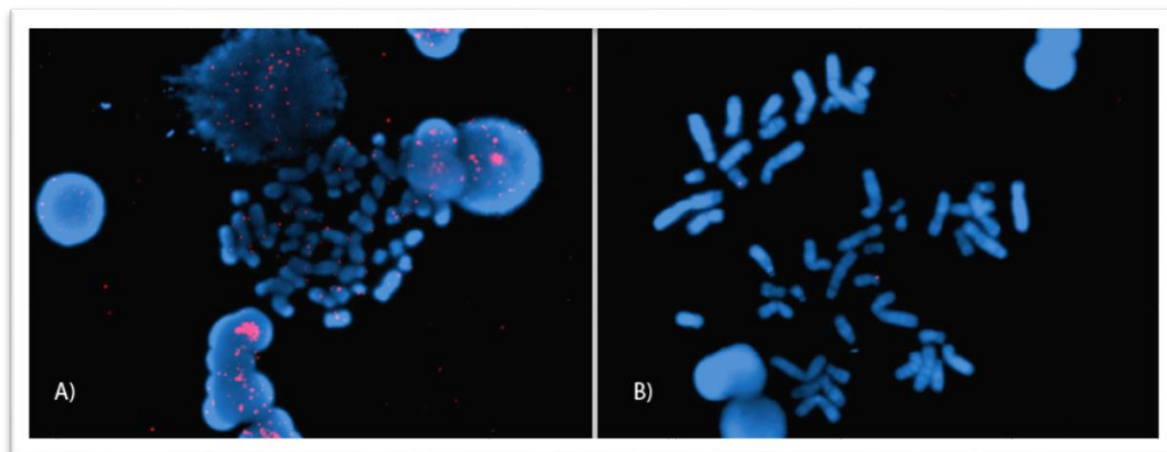
S PureLink® HiPure Plasmid Miniprep kitom smo izolirali klone (Tabela XVIII) ter sledeč protokolu kita za označevanje s pomikanjem zareze (Invitrogen) (37) izdelali sondo, ji izmerili absorbanco ter s pomočjo DoL-kalkulatorja izračunali DoL (uporabili

smo barvilo Cy3, z absorpcijskim maksimumom pri 555 nm in ekstinkcijskim koeficientom  $\epsilon$  150000  $\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ ).

Tabela XXVIII: Izmerjena absorbanca in izračun DoL (klon 3, 12p13.31)

A260	A555	dolžina poti (cm)	nucleic acid	korekcijski faktor	cDNA (ng/ $\mu$ l)	c (barvila) (pmol/ $\mu$ l)	DoL (%)
0,068	0,015	0,5	50	0,08	7	0,2	1,0

Koncentracija sonde je ustrezna (vsaj 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), DoL pa je na spodnji meji (1–3,6).



Slika 32: FISH na metafazi. Klon 3, označevanje s pomikanjem zareze. A) brez Cot DNA, B) 10 x prebitek Cot DNA.

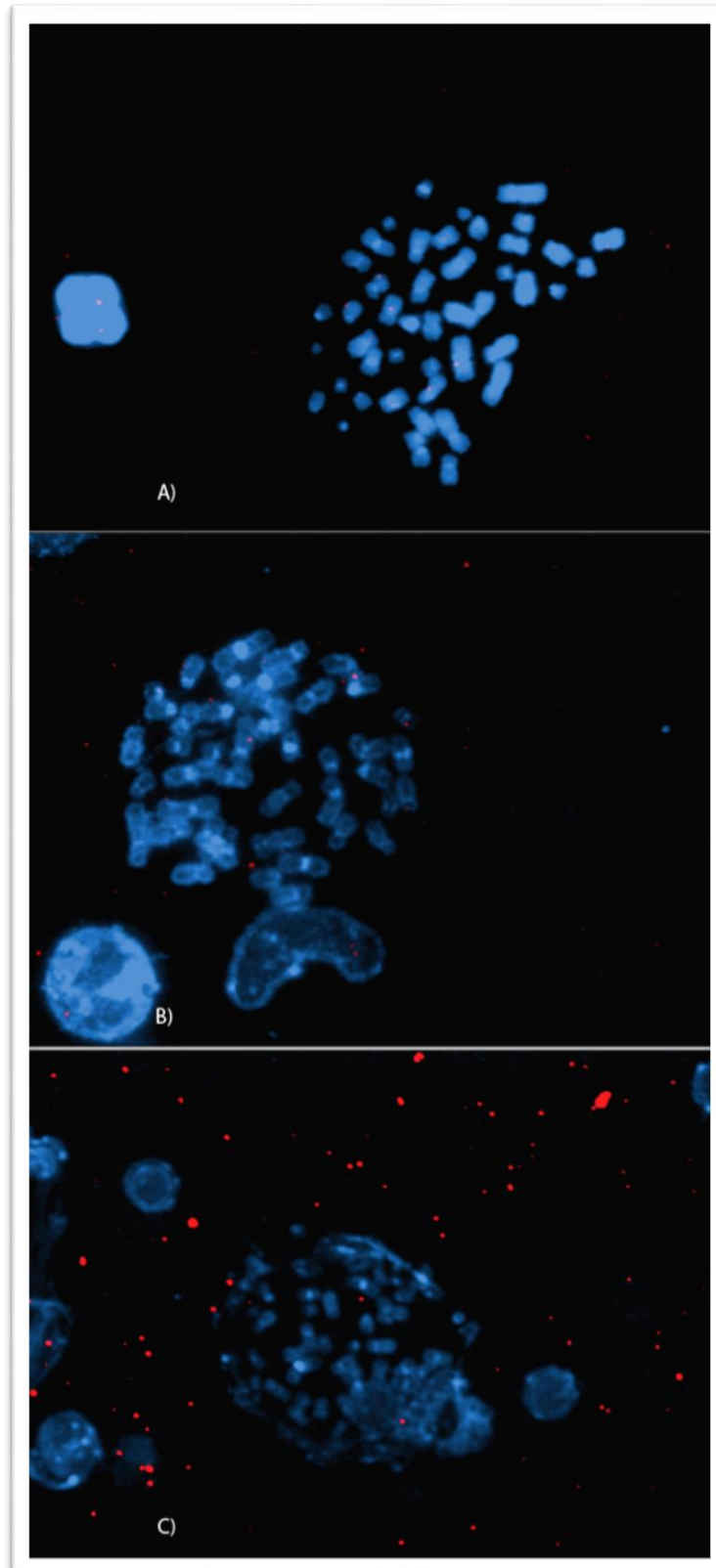
Oranžni signali sonde so v primeru brez dodajanja Cot DNA posejani tako po celicah kot v ozadju, ob dodatku Cot DNA pa je njihovo število bistveno manjše. Na številnih jedrih celic smo videli pričakovana dva signala, vendar analiza metafaz ni potrdila specifičnosti vezave na kratki krak kromosoma 12.

#### 4.4 OPTIMIZACIJA HIBRIDIZACIJE IN DENATURACIJE

Da bi povečali specifičnost, s katero se sonda veže na tarčno DNA, smo želeli optimizirati pogoje denaturacije in hibridizacije.

##### 4.4.1 PRIMERJAVA HIBRIDIZACIJSKIH PUFROV

Pred nanosom smo sondo zmešali s tremi različnimi hibridizacijskimi pufri (CEP, LSI in ročno pripravljene pufer iz formamida in 20 x SSC). S pomočjo mikroskopa smo preverjali morebitne razlike v specifičnosti vezave. Pri sondi s hibridizacijskim pufrom, ki smo ga pripravili sami, so bili signali veliki, slabo sprani in izraziti tudi v ozadju. Nismo pa dosegli izboljšave specifičnosti (Slika 33).



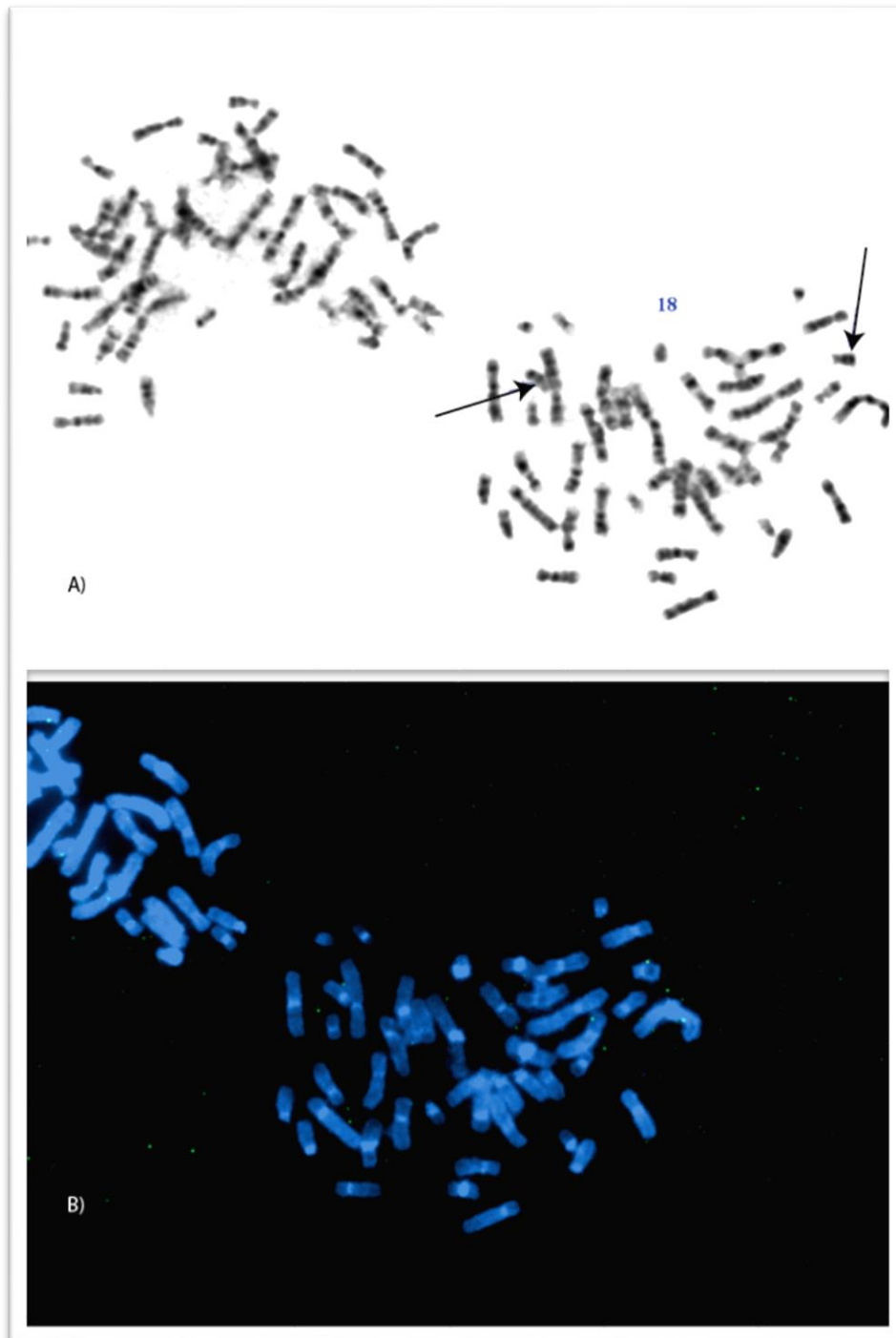
Slika 33: Primerjava hibridizacijskih pufrov. A) CEP (klon 4, 18q22.3), B) LSI (klon 1, 19q13.32) in C) Formamidni pufer, pripravljen po protokolu Invitrogena (klon 3, 12p13.31).

#### 4.4.2 PRIMERJAVA ČASA HIBRIDIZACIJE

Primerjali smo specifičnost signalov po 5- in 10-minutni hibridizaciji. Pri nobeni od sond nismo opazili bistvenih razlik v specifičnosti vezave sonde glede na čas hibridizacije.

#### 4.4.3 UGOTAVLJANJE SPECIFIČNOSTI VEZAVE SONDE PREKO PREDHODNEGA PROGANJA KROMOSOMOV

Pred izvedbo FISH preiskave s sondami smo kromosome GTG-progali (str. 37). Po hibridizaciji sonde smo predhodno poslikane metafaze poiskali in na kromosomih, na katere bi se morala vezati sonda, iskali signale. Kloni za sondo so bili izolirani s HPLC, RNA ni bila odstranjena (Tabela XV). Čeprav smo na zelenih kromosomih opazili signal (Slika 34), so bili signali tudi na drugih kromosomih, včasih pa so bili na zelenih kromosomih odsotni, zato specifične vezave sonde s predhodnim proganjem nismo mogli potrditi.



Slika 34: Primerjava A) predhodno progane metafaze in B) metafaze po hibridizaciji sonde (klon 5, 18q21.33). Kromosoma 18 sta na sliki A) označena s puščicami.

## 6. SKLEP

Ugotovili smo, da je od vseh preizkušenih metod izolacije najbolj čisto DNA zagotovila izolacija in čiščenje s PureLink® HiPure Plasmid Miniprep kitom. Sklepamo, da dodatni koraki čiščenja, ki smo jih morali izvesti pri drugih postopkih, zaradi visokih strižnih sil vodijo do večje razgradnje BAC DNA. Na njeno stabilnost vplivajo večkratno zamrzovanje in odtajanje, centrifugiranje in mešanje (vorteksiranje). Za ohranitev DNA in njene morfologije naj bo takšnih korakov čim manj. Prednost kita pred HPLC ločbo je verjetno tudi ta, da potovanje molekul čez kolono poteka spontano in ne pod tlakom, zaradi česar prihaja do manjših mehanskih poškodb DNA. Kljub relativno majhnemu izkoristku je uporaba komercialnega izolacijskega kita zaradi kvalitete plazmidne DNA najustreznejša (Tabela XV).

Za fragmentiranje BAC DNA smo uporabili tako specifično kot nespecifično restrikcijo. Ker je bila DNA, ki smo jo izolirali v prvi seriji poizkusov, vprašljive kvalitete, je metodi težko objektivno primerjati, saj so bili slabi rezultati fragmentacije z restrikcijskimi endonukleazami lahko posledica velike prisotnosti nečistoč v vzorcu. Težavna je tudi elektroforezna ločba fragmentirane DNA, saj je ta v restrikcijskih zmesih nastopala v zelo majhnih količinah. Za uspešno elektroforezno ločbo je bilo treba DNA pred nanosom na gel alkoholno izoboriti, kar vodi do dodatnih izgub materiala zaradi razgradnje in izgub med izobarjanjem. Obravnava z DNazo I je vendarle bolj smiselna, saj jo je lažje vpeljati v rutinsko delo, ker je postopek enostavnejši. Obenem zagotavlja manjše fragmente, saj se tudi po sočasni restrikciji z dvema restrikcijskima endonukleazama veliko fragmentov nahaja nad priporočeno mejo 600 bp (Slika 10).

Za označevanje DNA smo uporabili tako označevanje s pomikanjem zareze kot označevanje preko platinastih vmesnikov. Ker je na končni rezultat močno vplivalo ogromno dejavnikov iz predhodnih izolacijskih stopenj ter stopnja čistosti upoprabljenega DNA, je metodi težko primerjati v smislu večje zanesljivosti in specifičnosti. Nobena metoda ni prinesla zelenih rezultatov. Zlasti na interfaznih jedrih celic smo dobili signale, vendar le-ti niso bili specifični. Optimalne velikosti fragmentov DNA za označevanje z ULS so manjše kot za označevanje s pomikanjem zareze, kar daje ULS metodi določeno prednost pred »nick« translacijo, saj manjši fragmenti vodijo do večje specifičnosti vezave. Če smo sondi pred pričetkom hibridizacije dodali 10-kratni presežek enoverižne DNA iz

človeške posteljice (Cot-1 DNA), ki vsebuje veliko število ponavljajočih se zaporedij, je bilo nespecifičnih signalov v ozadju tako kot na DNA veliko manj.

Med optimizacijo FISH-preiskave smo ugotovili, da čas hibridizacije na rezultate ne vpliva bistveno, sestava hibridizacijskega pufru pa lahko vpliva na prisotnost nespecifičnih signalov. Hibridizacijski pufer, ki smo ga izdelali sami, za razliko od ostalih dveh ni vseboval dekstran sulfata, ki poveča viskoznost, kar lokalno poviša koncentracijo sonde in poveča specifičnost vezave na tarčno DNA (17).

Namen izolacije in čiščenja BAC DNA je zagotoviti čim bolj čist DNA-produkt. Ker pa dodatni koraki čiščenja zmanjšajo stabilnost BAC DNA, je treba z natančno optimizacijo postopka izolacije sprejeti kompromis med tehnikami čiščenja in ohranjanjem stabilne DNA-molekule.

Ker se manjši fragmenti sonde vežejo bolj specifično kot večji, saj je pri njih verjetnost vezave s ponavljajočimi zaporedji manjša, bi bilo pri fragmentaciji smiselno DNA razcepiti na fragmente, manjše od 300 bp, in ugotoviti, če se specifičnost poveča. Ker med posameznimi serijami encimov prihaja do precejšnjih razlik, ki lahko vodijo do sprememb v porazdelitvi velikosti fragmentov, je tudi izvedba več poizkusov z različnimi serijami encimov lahko ključna za nova spoznanja o optimalnih pogojih za njihovo delovanje.

Sodeč po literaturnih navedbah lahko že majhne spremembe temperature denaturacije ali koncentracije formamida v raztopini pufru znatno vplivajo na rezultate hibridizacije sonde, zato je ključ do bolj specifične vezave lahko tudi optimizacija pogojev denaturacije in hibridizacije (17).

## 7. LITERATURA

- 1) Griffiths AJF, Wessler SR, Lewontin RC, Carrol SB: Introduction to Genetic Analysis, 9th edition, W. H. Freeman and Company, New York 2008: 555–590
- 2) Swansbury J: Cancer cytogenetics: Methods and protocols, Humana Press Inc., New Jersey 2003: 173–193
- 3) Bridger JM, Volpi EV: Fluorescence in situ Hybridization (FISH), Humana Press, New York, 2010: 3–21
- 4) [http://dwb.unl.edu/Teacher/NSF/C08/C08Links/pp99.cryst.bbk.ac.uk/projects/gmo\\_cz/fluor.htm](http://dwb.unl.edu/Teacher/NSF/C08/C08Links/pp99.cryst.bbk.ac.uk/projects/gmo_cz/fluor.htm), 17.02.2013
- 5) <http://www.nature.com/scitable/topicpage/fluorescence-in-situ-hybridization-fish-327>, 17.02.2013
- 6) Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P: Essential cell biology, 2nd edition, Garland Science, New York 2004: 170–364, 727–740
- 7) Sambrook J, Russel DW: Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd edition, CSH Laboratory Press, New York 2001: 32–80
- 8) <http://www.nature.com/scitable/content/principles-of-fluorescence-in-situ-hybridization-35120>, 12.02.2013
- 9) Gersen SL, Keagle MB: The Principles of Clinical Cytogenetics, 2nd Edition, Humana Press, New Jersey 2005: 63–79, 455–487
- 10) Rautenstrauss B, Liehr T: FISH Technology, Springer – Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 2002: 8–18, 74–89
- 11) <http://www.chrombios.com/cms/website.php?id=/en/index/aboutfish/labeling.htm>, 13.04.2012
- 12) Boultonwood J: Methods in Molecular Biology, Vol.68: Gene Isolation and Mapping Protocols, Humana Press, New Jersey 1997: 53–77
- 13) Turner P, McLennan A, Bates A, White M: Molecular Biology, 3rd edition, Taylor & Francis Group, New York 2005: 105–145
- 14) Wegner RD: Diagnostics Cytogenetics, Springer, New York 1999: 305–333
- 15) <http://www.abbottmolecular.com/contactus/fishtechsupport/faq/reagents.html#sthash.PWucBvAj.dpuf>, 24.04.2013
- 16) <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Formamide-2D.png>, 15.03.2013



- 17) <http://people.physics.illinois.edu/Selvin/PRS/498IBR/chapter1.pdf>, 15.04.2013
- 18) <http://www.ndsu.edu/pubweb/~mcclean/plsc431/cloning/clone3.htm>, 12.03.2012
- 19) Strachan T, Read AP: Human Molecular Genetics, 3rd edition, Garland Publishing, New York 2004: 155–175, 315–317, 487–497
- 20) Yao-Shan F: Molecular Cytogenetics, Protocols and Applications, Vol 204, Humana Press, New Jearsey 2002: 21–40, 51–63, 343–351
- 21) <http://www.lifesciences.sourcebioscience.com/clone-products/genomic-dna-clones/fugu-bac-library/pbelobac11-vector-diagram-and-sequence.aspx>, 12.03.2012
- 22) Firman K: DNA Cloning/Sequencing Workshop a short course, Ellis Horwood Limited, Chicherster 1991: 7–37, 50–56
- 23) <http://bioinfoweb.com/TSNDB-plasmid-isolation-by-alkaline-lysis-method.htm>, 15.03.2012
- 24) Smrekar F: Razvoj tehnologije čiščenja plazmidov in bakteriofagov namenjenih humani uporabi, UL, Biotehniška fakulteta, Ljubljana 2011: 6–19, 51–58
- 25) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15081927>, 15.03.2012
- 26) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18675479>, 12.03.2012
- 27) Barut M, Podgornik A, Urbas L, Gabor B, Brne P, Vidič J, Plevčak S, Štrancar A: Methacrylate-based short monolithic columns: Enabling tools for rapid and efficient analyses of biomolecules and nanoparticles. Journal of Separation Science, Vol. 31 (11), 2008: 1867–1880
- 28) [http://www.nhm.ac.uk/resources-rx/files/ethanol-precipitation-of-dna-with-salts---theory\\_aug12-118483.pdf](http://www.nhm.ac.uk/resources-rx/files/ethanol-precipitation-of-dna-with-salts---theory_aug12-118483.pdf), 20.03.2012
- 29) Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P: Essential cell biology, 2nd edition, Garland Science, New York 2004: 170–364, 727–740
- 30) <http://tools.neb.com/NEBcutter2/>, 15.03.2012
- 31) <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/Ambion-Tech-Support/nuclease-enzymes/general-articles/dnase-i-demystified.html>, 28.03.2013
- 32) <http://www.kreatech.com/products/fishbrighttm-labeling-kits.html>, 13.03.2012
- 33) [http://www.kreatech.com/fileadmin/user\\_upload/Documenten/PDF/12\\_man\\_FLK-001\\_FLK-002\\_FLK-003\\_FLK-004\\_FLK-005-FLK-006\\_FLK-007\\_D2.0.pdf](http://www.kreatech.com/fileadmin/user_upload/Documenten/PDF/12_man_FLK-001_FLK-002_FLK-003_FLK-004_FLK-005-FLK-006_FLK-007_D2.0.pdf), 13.03.2012

- 34) <http://www.kreatech.com/science-technology/ulstm-universal-linkage-system.html>, 15.03.2012
- 35) Schellekens H, van Bragt PH, Olijve W, van der Weele CN: Medische biotechnologie, Elsevier gezondheidszorg, Maarssen 2001: 44–55
- 36) Hayhoe FGJ, Quaglino D: Haematological Cytochemistry, 3rd edition, Churchill Livingstone, London, 1994: 1–23
- 37) [http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/purelink\\_hipure\\_plasmid\\_dna\\_purification\\_man.pdf](http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/purelink_hipure_plasmid_dna_purification_man.pdf), 29.05.2013
- 38) [http://www.ogt.co.uk/resources/literature/483\\_understanding\\_and\\_measuring\\_variations\\_in\\_dna\\_sample\\_quality](http://www.ogt.co.uk/resources/literature/483_understanding_and_measuring_variations_in_dna_sample_quality), 15.04.2012
- 39) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=nucleotide>, 12.03.2012
- 40) <http://worldwide.promega.com/~media/Files/Resources/Protocols/Technical%20Manuals/101/Restriction%20Enzymes%20Protocol.pdf>, 13.03.2012
- 41) <http://probes.invitrogen.com/media/pis/mp32947.pdf>, 28.03.2013
- 42) <http://www.kreatech.com/products/universal-linkage-systemtm-labeling-kits/microrna/critical-steps.html>, 15.03.2012
- 43) <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/BACs>, 12.03.2012
- 44) Barch MJ, Knutsen T, Spurbeck JL: The AGT Cytogenetics Laboratory Manual, 3rd Edition, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1997: 19 – 76, 481 – 500, 557 – 600

## PRILOGA A.

Tabela XXIX: Izmerjena koncentracija in razmerje A260/A280 po izolaciji s HPLC

Seriya	A(260)	A(280)	260/280	c(ng/ $\mu$ L)	Klon	Oznaka klona	Dodatek CaCl <sub>2</sub> ?	Opomba
1F1 KLON3	-0,008	-0,003	2,962	-7,899	RP11-101F21	3	NE	
1E1 KLON3 60 %B	0,043	0,017	2,575	42,606	RP11-101F21	3	NE	
1E2 KLON3 70 %B	0,051	0,023	2,18	50,901	RP11-101F21	3	NE	
1E3 KLON3 80 %	0,072	0,034	2,141	72,269	RP11-101F21	3	NE	
2F1 KLON3	0,025	0,013	1,818	24,51	RP11-101F21	3	DA	
2E1 KLON3 60 %	0,013	0,004	3,297	12,575	RP11-101F21	3	DA	
2E2 KLON3 70 %	0,009	0,005	2	9,376	RP11-101F21	3	DA	
2E3 KLON3 80 %	0,014	0,007	2,03	13,783	RP11-101F21	3	DA	
3F1 KLON1	0,089	0,044	2,031	88,736	CTD-215PN22	1	NE	
3E1 KLON1 60 %	0,053	0,019	2,84	53,154	CTD-215PN22	1	NE	
3E2	0,038	0,017	2,235	37,997	CTD-215PN22	1	NE	

KLON1 70 %								
3E3 KLON1 80 %	0,089	0,041	2,145	88,581	CTD-215PN22	1	NE	
4F1 KLON4	0,008	0,007	1,129	8,068	RP11-504H5	4	DA	
4E1 KLON4 60 %	0,007	0,003	2,219	7,318	RP11-504H5	4	DA	
4E2 KLON4 70 %	0,02	0,01	2	19,976	RP11-504H5	4	DA	
4E3 KLON4 80 %	0,026	0,012	2,195	25,509	RP11-504H5	4	DA	
6F1 KLON4	0,066	0,033	1,994	66,084	RP11-504H5	4	NE	
6E1 KLON4 60 %	0,035	0,014	2,482	34,951	RP11-504H5	4	NE	
6E2 KLON4 70 %	0,055	0,025	2,224	55,307	RP11-504H5	4	NE	
6E3 KLON4 80 %	0,073	0,034	2,158	72,716	RP11-504H5	4	NE	
7F1 KLON4	0,006	0,004	1,5	6,463	RP11-504H5	4	NE	PON RUN6*
7E1 KLON4 60 %	0,045	0,016	2,837	44,881	RP11-504H5	4	NE	PON RUN6*
7E2 KLON4 70 %	0,02	0,009	2,198	20,483	RP11-504H5	4	NE	PON RUN6*

7E3 KLN04 80 %	0,027	0,013	2,138	27,153	RP11-504H5	4	NE	PON RUN6*
8F1 KLN01					CTD-215PN22	1	NE	PON RUN3*
8E1 KLN01 60 %	0,041	0,014	2,898	40,919	CTD-215PN22	1	NE	PON RUN3*
8E2 KLN01 70 %	0,015	0,007	2,167	14,574	CTD-215PN22	1	NE	PON RUN3*
8E3 KLN01 80 %	0,009	0,004	2,263	8,846	CTD-215PN22	1	NE	PON RUN3*
9F1					RP11-793J2	5	NE	
9E1 KLN05 60 %	0,072	0,025	2,835	72,266	RP11-793J2	5	NE	
9E2 KLN05 70 %	0,05	0,023	2,168	49,726	RP11-793J2	5	NE	
9E3 KLN05 80 %	0,052	0,023	2,306	52,438	RP11-793J2	5	NE	
10F1 KLN05	0,006	0,005	1,244	5,745	RP11-793J2	5	DA	
10E1 KLN05 60 %	0,028	0,013	2,07	27,611	RP11-793J2	5	DA	
10E2 KLN05 70 %	0,026	0,013	2,064	26,424	RP11-793J2	5	DA	
10E3 KLN05 80 %	0,022	0,011	2,069	21,784	RP11-793J2	5	DA	

11F1 KLON1	0,004	0,004	1,2	4,289	CTD-215PN22	1	DA	
11E1 KLON1 60 %	0,027	0,014	1,97	27,005	CTD-215PN22	1	DA	
11E2 KLON1 70 %	0,013	0,006	2,291	12,841	CTD-215PN22	1	DA	
11E3 KLON1 80 %	0,008	0,004	2,079	8,126	CTD-215PN22	1	DA	

\*PON RUN pomeni, da smo zaradi možnosti, da se je DNA sprala v napačno frakcijo, ločbo ponovili.