

HELSINGIN YLIOPISTO – HELSINGFORS UNIVERSITET

Tiedekunta/Osasto – Fakultet/Sektion Matemaattis-luonnontieteellinen tiedekunta		Laitos – Institution Biotieteiden laitos	
Tekijä – Författare Heikki Vilén			
Työn nimi – Arbetets titel DNA-konstruktioiden valmistus hiiren kohdennettuun geeninsiirtoon Mu-faagin <i>in vitro</i> –transposiotekniikalla			
Oppiaine – Läroämne Perinnöllisyystiede			
Työn laji – Arbetets art Pro gradu –tutkielma		Aika – Datum Syyskuu 2000	Sivumäärä – Sidoantal 55
Tiivistelmä – Referat			
<p>Kohdennettu geeninsiirto eli geenikohdennus on menetelmä, joka mahdollistaa organismin genotyypin täsmällisen muuttamisen. Menetelmä perustuu homologiseen rekombinaatioon soluun siirretyn DNA:n ja kromosomaalisen DNA:n välillä. Soluun siirrettävässä kohdennusvektorissa on vektorirungon lisäksi halutulle genomille homologinen alue sekä homologisen rekombinaation toteamisessa käytettävät selektiomarkkerit. Käytettävä markkerikasetti siirretään yleensä keskelle geenin koodausaluetta, jolloin se inaktivoi tutkittavan geenin. Perinteisesti tämä tapahtuu etsimällä kohdealueelta sopivat restriktiokohtat, joiden avulla kasetti siirretään. Menetelmä on hidaskäyttöinen ja sen onnistuminen riippuu sopivien restriktiokohtien olemassaolosta.</p> <p>Tämän työn tarkoituksena oli kehittää nopeampi, kohdesekvenssistä riippumaton menetelmä inaktivoitujen geenikonstruktioiden tuottamiseksi hiiren geenikohdennusta varten. Menetelmä perustuu Mu-faagin <i>in vitro</i> –transposiotekniikkaan. Siinä selektiomarkkerikasetin sisältävä keinotekoinen mini-Mu –transposoni siirtyy satunnaisesti paikkaan kohdegeenialueella. Haluttu konstrukti saadaan seulomalla reaktiotuotteista molekyylillä, jossa transposoni on integroituun paikkaan geenin koodausalueella inaktivoitujen tämän.</p> <p>Keinotekoinen mini-Mu –transposoni valmistettiin siten, että Mu-pää –DNA-alueet sopivassa orientaatioissa sisältävästä plasmidista korvattiin näiden välissä oleva markkerigeeni toisen plasmidin neomysiinimarkkerilla DNA:n leikkaus- ja liitosreaktioiden avulla. Valmistetusta plasmidista irroitettiin transposonipäiden rajaama alue. Syntynyt transposonifragmentti puhdistettiin korkean erotuskyvyn nestekromatografialla (HPLC). Kohde-DNA:na käytettiin hiiren <i>Kcc2</i>-geenin eksonit 2-6 sisältävää fragmenttia, joka puhdistettiin myös HPLC:lla.</p> <p><i>In vitro</i> –transposiioireaktiot sisältävät yhden proteiinikomponentin (MuA-transposaasi), valmiiksi leikatun transposoni-DNA:n ja linearisoidun kohde-DNA:n yksinkertaisessa puskurissa. Reaktiotuotteet analysoitiin agarosigeelielektroforeesilla. Reaktion olosuhteita optimoitiin, jotta saataisiin mahdollisimman paljon haluttua reaktiotuotetta, jossa kohde-DNA:han olisi integroitu yksi transposoni. Optimoinnissa tutkittiin sopivinta reaktioaikaa sekä muodostuvien donorikompleksien määrän, dimetyylisulfoksidin (DMSO) ja glyserolin vaikutusta reaktioon. Lopuksi tutkittiin kohde-DNA:n määrän vaikutusta reaktioon. Haluttua reaktiotuotetta muodostui parhaiten, kun reaktiot tehtiin 4 h inkubaatiolla, 1x standardireaktiolla, ilman DMSO:a, 15% (w/v) glyserolissa ja käyttäen 500 ng kohde-DNA:ta / standardireaktio. Näissä olosuhteissa tehtiin preparatiivinen transposiioireaktio, josta halutut reaktiotuotteet erotettiin koon perusteella geelielektroforeesilla, puhdistettiin ja kloonattiin plasmidiin. Jokaisessa plasmidissa transposoni oli integroituun eri paikkaan kohdegeenialueella.</p> <p>Plasmidit siirrettiin <i>Escherichia coli</i> –soluihin elektroporaatiolla ja plasmidin saaneet solut seulottiin antibioottiselektiolla. Soluista eristettiin plasmidi-DNA seulontaa varten. Polymeerasiketjureaktioon (PCR) pohjautuvassa seulonnassa käytettiin kolmiulotteista matriisimenetelmää, jossa plasmidi-DNA:t yhdistettiin kolmella eri tavalla 7 pooliin (pooleja yhteensä 21). Jokainen näyte oli edustettuna kolmessa poolissa, joiden yhdistelmä oli juuri tälle näytteelle tyypillinen. Yhdistetyistä poolinäytteistä tehtiin PCR, joissa toinen aluke kiinnittyi transposonin ja toinen kohdegeenin alueelle. Integraatiokohta määritettiin PCR-tuotteiden elektroforeesianalysillä määrittelyn koon perusteella. Näin löydettiin konstrukti, jossa transposoni oli integroituun haluttuun kohtaan, kohdegeenin eksoni 4:n alueelle. Tämän konstruktiin integraatiokohta tarkastettiin sekvensoimalla transposonin rajakohdat.</p> <p>Kokeiltu menetelmä osoittautui toimivaksi, tehokkaaksi ja nopeaksi tavaksi valmistaa inaktivoituja geenikonstrukteja kohdennettuun geeninsiirtoon. Koska <i>in vitro</i> –systeemit eivät ole riippuvaisia käytetystä kohteesta, kuvattua menetelmää voitaisiin ehkä soveltaa myös muiden organismien tutkimisessä.</p>			
Avainsanat – Nyckelord Kohdennettu geeninsiirto – Mu-faagi – <i>in vitro</i> –transposiio			
Säilytyspaikka – Förvaringställe Perinnöllisyystieteen osaston kirjasto			
Muita tietoja Työn ohjaaja dos. Harri Savilahti			