

Szegedi Orvostudományi Egyetem Biokémiai Intézet

Dékány Katalin

Csirke porc kapcsoló fehérje genomiális
klónjainak térképezése

doktori értekezés

S z e g e d

1985.



B 5128



E 2.498

Ezúton szeretném megköszönni Dr Guba Ferencnek, a SZOTE Biokémiai Intézet professzorának, hogy lehetővé tette számomra dolgozatom megírását, egy részének külső Intézetben történő elvégzését.

Külön megköszönöm Dr Kiss Ibolyának az SZBK Biokémiai Intézet tudományos munkatársának, hogy lehetőséget adott a saját laboratóriumában munkám elvégzésére, szakmai tudásával támogatott, segített.

Köszönöm Simon Ferencnének az SZBK Biokémiai Intézet asszisztensének, hogy sok mindenben segítségemre volt, munkájával elősegítette kísérleteim gyors, pontos elvégzését.

Köszönöm mindazoknak a Kollegáknak, Ismerősöknek, Barátoknak, akik szakmai tudásukkal vagy egyéb úton közreműködtek e dolgozat létrejöttében.

Tartalomjegyzék

	oldal
Bevezetés, ismertetés	1.
Célkitűzés	5.
Anyagok, módszerek	7.
Baktérium szuszpenzió előállítása	7.
Fágkoncentráció meghatározása	7.
Fágzaporítás	8.
Fág DNS izolálás	9.
Emésztés restriktációs enzimmel	10.
Elektroforézis	12.
Southern hibridizáció	13.
A DNS jelölése	15.
Eredmények	17.
A gLP39.13 klón térképezése	17.
A gLP39.23 klón térképezése	31.
A gLP12.1 klón térképezése	43.
Eredmények tárgyalása, összefoglalás	54.
Irodalomjegyzék	59.

Rövidítések: kb; kilobázis, bp; bázispár

B e v e z e t é s

A porcszövet a kötőszövetek egy igen jelentős és érdekes fajtája. Kevés sejtet és kiterjedt sejtközötti állományt tartalmaz, melybe a sejtek be vannak ágyazva. /1/ A sejtközötti állomány óriásmolekuláit a porcsejtek termelik és szekretálják, s a létrejött stabil hálózat biztosítja a porcszövet fizikai tulajdonságait.

A porcnak az egyedfejlődés kezdetén fontos szerepe van a test formájának kialakításában, majd a későbbiekben a test támasztásában segít. /2/ Az egyedfejlődés kezdetén a porcszövet képezi az embrió vázát /kivéve a koponya csontjait/. Helyét később a csontok foglalják el, a porc pedig ú.n. növekedési korongok formájában van jelen a csontok végeinél, majd az egész életen át mintegy védelmül és felületül szolgál, beborítva a csontok végeit és lehetővé téve azok könnyű elmozdulását, a terheléssel szembeni ellenállást, illetve a csontok érintkezési felületének "kipárnázását" /pl. gerincoszlop/.

A porcszövet sejtközötti állományának fehérjéi főként kollagénból, proteoglikánokból és egyéb, nem kollagénszerű fehérjékből /mint pol az 54 kD-os porc matrix fehérje /14// állnak, melyek bonyolult hálózatot alkotnak. E molekulák jelenléte, helyzete és szerkezete határozza meg a porcszövet fizikai jellemzőit, ugymint a keménység, rugalmasság, nyomásnak és

feszülésnek való ellenállás, stb. /1/ A viszonylag nagy mennyiségű víz jelenléte szintén jelentős a fizikai jellemzők kialakításában. /2/

A hosszú, pálcikaalakú kollagén molekulák /2-3/ felelősek a porcszövet keménységéért, nagy szakítószilárdságáért, a proteoglikánok pedig a porcszövet rugalmasságáért. /3-4/

A kollagén rostok nagy szakítószilárdsága kémiai szerkezetükre vezethető vissza. - Ezek először prokollagén formájában szintetizálódnak a porcsejtben. A prokollagén egy 1100 aminosavból álló fehérjelánc /2/, melyben minden harmadik aminosav glicin és egy-negyede az aminosavaknak prolin, illetve hidroxiprolin. Ez igen figyelemreméltó, összehasonlítva más fehérjékkel, melyek kevés prolint és főleg kevés hidroxiprolint tartalmaznak. Jelenlétük a kollagénben biztosítja annak kompakt, merev, csavarásnak, húzásnak ellenálló strukturáját. /3/ Három prokollagén szál jobbmenetes szuperhélixzé csavarodik. Az egyes prokollagén molekulák hosszirányban is összekapcsolódhatnak egymással és a szuperhélixek tovább rendeződhetnek hosszabb és vastagabb kötegekké, melyek végül egy kemény, merev hálózattá alkotják a porcszövetnek. /2/

A proteoglikánok 1,5 - 2,5 millió D-os óriásmolekulák, melyek egy hosszú, hialuronsav lánchoz kapcsolódva molekuláris aggregátumokat képeznek. /4/

A proteoglikánok 250 - 350 ezer D-os központi fehérjeláncból az ú.n. "core-fehérjéből állnak, melyekhez kovalens kötéssel különböző oligo- és poliszacharid oldalláncok kapcsolódnak, és üvegmosó kefére emlékeztető képződményt alakítanak ki. A fehérjelánc hialuronsavhoz közelebb eső végére oligoszacharidok kapcsolódnak, majd keratán-szulfát végül kondroitin-szulfát molekulák. A kondroitin-szulfát molekuláknak negatív töltésük van, így nagymennyiségű vízmolekulát tudnak a felszínükön rendezetten megkötni, melynek jelentős szerepe van a porc összenyomhatóságában, rugalmasságában. Mikor nyomás éri a szövetet, a vízmolekulák kipréselődnek a molekulák közül és így a molekulák felszíni töltései közel kerülnek egymáshoz, melyek taszító hatása ellenáll a további nyomásnak.

A nyomás megszűntekor a vízmolekulák újból elrendeződnek a poliszacharid molekulák körül. Mivel a porcszövet táplálása nem történhet a véren keresztül /nem tartalmaz ereket/, a szükséges tápanyag csak a nyomás változtatásával /melyet a test mozgása biztosít/ tud bekerülni a szövetbe. Így, ha a porcszövet hosszú ideig mentesül e mozgás alól, elvékonyul és törékennyé válik.

A hialuronsav és a proteoglikán "core"-fehérje kötődését elősegíti, stabilizálja egy másik fehérje a 42-48 kD-os ú.n. kapcsoló fehérje jelenléte, /11/ mely mind a fehérjéhez, mind a hialuronsav lánchoz kötődik. /5-10/ Az izolált kapcsoló fehérjék képesek

kötődni a hialuronsavhoz /9/, illetve a proteoglikán monomerhez. /10/ Ez az aggregátum úgy jön létre, hogy a kapcsoló fehérje először a proteoglikánhoz, majd azután a hialuronsavhoz kötődik. /12/ A csirke mellporcból kétféle kapcsoló fehérjét izoláltak, melyek a hozzájuk kapcsolódó poliszacharidokban különböznek egymástól. /11-12/ A fehérjeláncok szekvenciájáról korlátozott számú adat áll rendelkezésre, de találtak néhány szakaszt, mely a különböző fajokban nagyfoku homológiát mutat /13/ /pl. csirke- és marhaporc esetében/. /12/ A cDNS klónok szekvenciaadataiból levezetett aminosav szekvencia szerint a fehérjeláncban találunk két konzervatív repetitív szakaszt, mely szakasz valószínű a hialuronsav kötésében játszik szerepet, mivel nagyfoku homológiát mutat a "core"-fehérje hialuronsavhoz kapcsolódó részével. /12/

A porcfehérjék alaposabb megismerése érdekében a labor munkatársai a csirke kapcsolófehérje génjét klónozták. /15/ Először csirke mellporcból mRNS-t izoláltak, abból in vitro cDNS-t szintetizáltak, melyet pUC 8 ill. 9 vektor SalI -EcoR I helyére klónoztak. A klónok közül oligonukleotid próbával kolóniahibridizáció segítségével keresték ki a kapcsoló fehérjét kódoló cDNS klónokat. A genomiális gének izolálására csirke génbankot készítettek.

λ EMBL 3 szubsztitúciós vektor /16/ BamH I helyére Sau 3 A-val részlegesen emésztett csirke DNS-t építettek be. A rekombináns kólonokat P2 lizogén

törzsön növesztették fel Spi⁻ fenotípusuk alapján. Az így létrehozott génbankból . plack-hibridizációval keresték ki a kapcsoló fehérje génjét hordozó klónokat. A próba az előző lépésben előállított cDNS klónok ³²P jelölt inszertje volt.

A genomális klónok restrikciós térképének meghatározása fontos a gén méretének és szerkezetének megismeréséhez. A restrikciós térkép birtokában a klónok közötti átfedő szakaszok megállapíthatók. A különböző cDNS szakaszokkal hibridizáló restrikciós fragmentumok helyzete pedig az exonok elhelyezkedésére ad felvilágosítást.

Célkitűzés:

A kötőszövetek sejtközötti állományának fehérjéit eddig kevésbé ismerjük. E fehérjék tulajdonságainak, valamint szintézisük szabályozásának meghatározásában fontos a géneik szerkezetének vizsgálata.

A sejtközötti állomány fehérjéit kódoló gének közül eddig csak a kollagén és a fibronectin géneket izolálták és vizsgálták.

Munkánk célja egy másik, a sejtközötti állományban előforduló kapcsoló fehérje génjének jellemzése. Ennek érdekében az alábbi kísérleteket kívánom elvégezni a laborban izolált csirkeporc kapcsoló fehérje genomiális klónjainak fizikai térképezésére.

Nevezetesen 1/a λ gLP 39.13, λ gLP 39.23 és
 λ gLP 12.1 klónok nagyspecifitású restrikciós
enzimekkel történő analizise.

2/ A restrikciós térképek birtokában a
klónok közötti átfedő szakaszok megállapítása.

3/ cDNS fragmentumokat használva
hibridizációs próbaként következtetés az exonok
helyzetére és a gén méretére.

Anyagok, módszerek:

Baktérium szuszpenzió előállítása

Q 358 baktériumtörzset használtunk gazdaként a következők szerint:

Folyadéktápolaj	Alap-agar	Fedő-agar
10 g Tryptone	10 g Tryptone	10 g Tryptone
5 g NaCl	5 g NaCl	5 g NaCl
5 g Yeast Extract	12 g Difco-Agar	7 g Difco-Agar
0,2 % Maltóz		

1 literre

Q 358 baktériumot 100 ml folyadéktáptalajon 37 °C-on egy éjszakán át /stacioner fázisig/ növesztettem. A baktérium kultúrát 4000 g-vel lecentrifugáltam /K24/. A sejteket 50 ml 10 mM-os $MgCl_2$ oldatban szuszpendáltam. A továbbiakban a szuszpenziót 4 °C-on tároltam, így 1-2 hétig tudtam használni.

Fágkoncentráció meghatározása /17/:

A fág törzsoldatból higitási sorozatot készítettem: 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 -szer higitott fágoldatból 100-100 μ l-t 100 μ l baktérium szuszpenzióval 37 °C-on 30 percig inkubáltam, /Igy elősegítjük a fág megtapadását a baktérium felszínén/ majd 3 ml 48 °C-os fedőagar hozzáadása után 8 cm-es petricsészére kilemezelttem. 5-7 óra múlva a fágok lizáltak, és a kontroll petricsészével összehasonlítva /ahol csak



baktérium nőtt/ jól látható üres foltok keletkeztek. Kiválasztottam azt a higitást, ahol a petricsészéken jól számolható mennyiségű plack nőtt ki, leszámoltam a plackok mennyiségét és a higitással beszorozva megkaptam az eredeti törzsoldat 100 µl-ében lévő fágok mennyiségét.

Fágszaporítás: /17-18/

100 µl baktérium szuszpenziót $10^5 - 10^6$ pfu fággal kilemezeltem /lásd feljebb/. 5-7 órán át 37°C -on inkubáltam, majd teljes liziskor 5 ml λhigitó oldatot /10 mM Tris-Cl, pH=7,4, 5 mM MgSO_4 , 200 mM NaCl, 0,1 % zselatin/ rétegeztem a lizátumra és egy éjszakán át állni hagytam. Ez alatt az idő alatt a fágok átdiffundáltak az oldatba, amit pasteur pipettával leszívtam és 5 % klorofomot adtam hozzá. Az oldatot 4000 g-vel lecentrifugáltam és kloroform fölélt tároltam 4°C -on. Az így nyert fágoldat titere $1-3 \times 10^{11}$ pfu/ml volt.

Nagyobb mennyiségű fágizolálást folyadékkultúrából végeztem. 3 l-es Erlenmayer lombikban 1 l folyadéktáptalajra előzőleg egy éjszakán át kinövesztett starterről baktériumot oltottam le, 37°C -on rázatam. Az OD félóránkénti mérésével követtem a baktériumok szaporodását és OD=0,6-nél $/2-3 \times 10^8$ sejt/ml/ a baktériumkultúrát 1-es multiplicitással fertőztem a fággal. 6-8 óra múlva 37°C -on erős levegőztetésnél teljes lizis következett be, az így nyert lizátumból DNS-t izoláltam.

Fág DNS izolálás: /17/

A lizátumokhoz 5-5 ml kloroformot adtam és további 15 percig rázattam. E lépés célja a még nem lizált baktériumok sejtfalának roncsolása és így a benne lévő fágok szabaddá tétele. 5 mg DN-ázt és 15 mg RN-ázt mértem a lombikokba és szobahőn 1 órán át emésztettem. E lépés a szabad bakteriális DNS, ill. RNS eltávolítására szolgál. Ezután 40 g NaCl-t oldottam a lombikokban. A kicsapódott fehérjét, ill. sejt-törmelékeket lecentrifugáltam /JA 10, 4000 rpm, 20 perc/. A felülúszót C típusú G3-as üvegszűrőn szűrtem, a szűrlethez 100 g Polietilén-glikol 6000-t /PEG/ oldottam lombikonként és néhány órán át jégben kevertettem. E lépés során a fágok kicsapódnak /az oldat opálos lesz/ amit lecentrifugáltam. /JA 10, 7000 rpm, 15 perc/. A felülúszót eltávolítottam, a csapadékot 33 ml fág pufferben /10 mM Tris-Cl, pH=7,9 10 mM MgCl₂ 10 mM NaCl/ felszuszpendáltam és azonos térfogat kloroformmal jól összerázva a PEG-t eltávolítottam. Centrifugálás után a felső vizes fázist leszivtam és CsCl lépcsős grádiensre rétegeztem, melyet a következőképen készítettem:

SW 27 nitrocellulóz csőben 2-2 ml CsCl oldatot pipettáztam egymás alá növekvő koncentráció szerint:

Telített CsCl oldat: 65 g CsCl + 35 ml viz.

Telített CsCl /ml/	Fág puffer /ml/	Törésmutató	Sűrűség /g/cm ³ /
13,3	21,1	1,3625	1,3
17,76	14,24	1,3813	1,5
16,0	6,87	1,3994	1,7

SW 27 rotorban, Beckman ultracentrifugában 2 órát 20 000 rpm-el centrifugáltam. Az 1,7 és 1,5 g/cm³ sűrűségű fázis közötti kékes korong tartalmazta a fágot, melyet fecskendővel óvatosan leszívtam. 4 órára át DNS dializáló pufferrel /10 mM Tris-Cl, pH=7,5, 50 mM CaCl, 1 mM EDTA/ szemben dializáltam, a puffert óránként cserélve. Ezután 150 µg/ml protináz K-val emésztettem 37 °C-on 1 órára át, majd DNS dializáló pufferrel telített fenollal kifenoloztam, amit 2-3 napos újabb dialízis követett, hogy a legcsekélyebb fenolmaradéktól is megszabaduljak.

Emésztés restrikciós enzimmal:

A restrikciós enzimeket az MTA SZBK Biokémiai Intézet kutatói állították elő.

Az emésztési térfogat általában 20 µl volt.

1 µg DNS-t emésztettem a megfelelő pufferben /1. táblázat/. 100 µg/ml zselatin jelenlétében 2-3 U restrikciós endonukleázzal /1-2 µl/. A térfogatot desztilláltvízzel egészítettem ki 20 µl-re.

Enzim	<u>Sal</u> I.	<u>EcoR</u> I.	<u>BamH</u> I.	<u>Xho</u> I.
Puffer	6 mM Tris-Cl pH=7,9 150 mM NaCl 6 mM MgCl ₂ 6 mM ME	100 mM Tris-Cl pH=7,5 50 mM NaCl 5 mM MgCl ₂	6 mM Tris-Cl pH=7,9 150 mM NaCl 6 mM MgCl ₂	6 mM Tris-Cl pH=7,9 150 mM NaCl 6 mM MgCl ₂ 6 mM ME

Enzim	<u>Bgl</u> II.	<u>Hind</u> III.	<u>Xba</u> I.	<u>Kpm</u> I.	<u>Sac</u> I.
Puffer	10 mM Tris-Cl pH=7,4 100 mM NaCl 10 mM MgCl ₂ 10 mM ME	50 mM Tris-Cl pH=8,0 50 mM NaCl 10 mM MgCl ₂ 6 mM ME	6 mM Tris-Cl pH=7,9 50 mM NaCl 6 mM MgCl ₂ 6 mM ME	6 mM Tris-Cl pH=7,5 6 mM NaCl 6 mM MgCl ₂ 1 mM DTT	6 mM Tris-Cl pH=7,4 6 mM MgCl ₂ 6 mM ME

1. Táblázat: a használt enzimek pufferei

A reakcióelegyet 1-3 órán át 37 °C-on inkubáltam. Kettős emésztéseknél - amennyiben a két enzim működési körülményei eltérnek egymástól, a második emésztés előtt 0,1 térfogat 3 M Na-acetát /pH=5,6/ jelenlétében 2,5 térfogat alkohollal kicsaptam a DNS-t és az újabb emésztést a második enzim optimális körülményei szerint végeztem.

Részleges emésztéseknél 5-szörös mennyiségeket mértem össze és 5, 10, 20, 30, 60 perc múlva kivett aliquotokat állítottam le.

Az emésztést 5 µl STOP-pufferrel /50 % glicerin, 200 mM EDTA, 0,04 % Brómfenolkék/ állítottam le.

Elektroforézis:

Agaróz gél:

A futtatást 0,9 %-os horizontális agaróz gélen végeztem TEA pufferben /50 mM Tris, 10 mM Na-acetát, pH=8,05, 10 mM NaCl, 10 mM EDTA/. A gélrevitel előtt a mintákat 10 percig 68 °C-os vízfürdőbe állítottam /hogy a fág DNS ragadós végei elváljanak egymástól/, majd jeges vízben lehütöttem. A mólsúlymarker emésztetlen λ fág DNS és BRL mólsúlysorozat volt. A futtatást 12-16 órán keresztül 30 V-on végeztem. A futtatás befejezésekor a gél 1 µg/ml etidiumbromidot tartalmazó oldatba tettem 10 percig, majd desztillált-vizes mosás után UV lámpa alatt narancssárga szűrővel 6,5x9 cm-es Fortepan negatív filmre fényképeztem.

Akrilamid gél:

4 ill. 6 %-os akrilamid gél-t használtam az 1 kb-nál kisebb fragmentum méretek meghatározására a következőképpen:

29 % akrilamid és

1 % Bis-akrilamid tartalmú oldatból	4 ill. 6 ml
10 x TBE oldatból	3 ml

/1 mM Tris, 20 mM EDTA,

kb. 55 g bórsav, míg a pH=8,3 nem lesz/

10 % ammóniumperszulfát	0,45 ml
desztillált víz	<u>20,55 ml</u>
	30,00 ml
TEMED	18 μ l

1,2 mm vastag 18 cm hosszú gél-t öntöttem, melyet vertikális helyzetben, a mintafelvétel után 1 x TBE pufferban futtattam 150 V-on 2,5 órán át. A DNS fragmentumok molekulasúlyát BRL molekulasúlysorozat és Bsp emésztett pBR 322 DNS felhasználásával, kalibrációs görbe segítségével határoztam meg.

Southern hibridizáció: /18/

Transfer nitrocellulóz filterre:

Az 5 kb-nál nagyobb fragmentumok ~~transfer~~ének megkönnyítése érdekében a gél megfelelő részét 0,25 M HCl oldatban áztatjuk 25 percig, majd vízzel leöblítjük.

Denaturáló oldat: Semlegesítő oldat: 20 x SSC:

1,5 M NaCl

3 M NaCl

175,3 g NaCl

0,5 M NaOH

0,5 M Tris-Cl

88,2 g Na-citrát

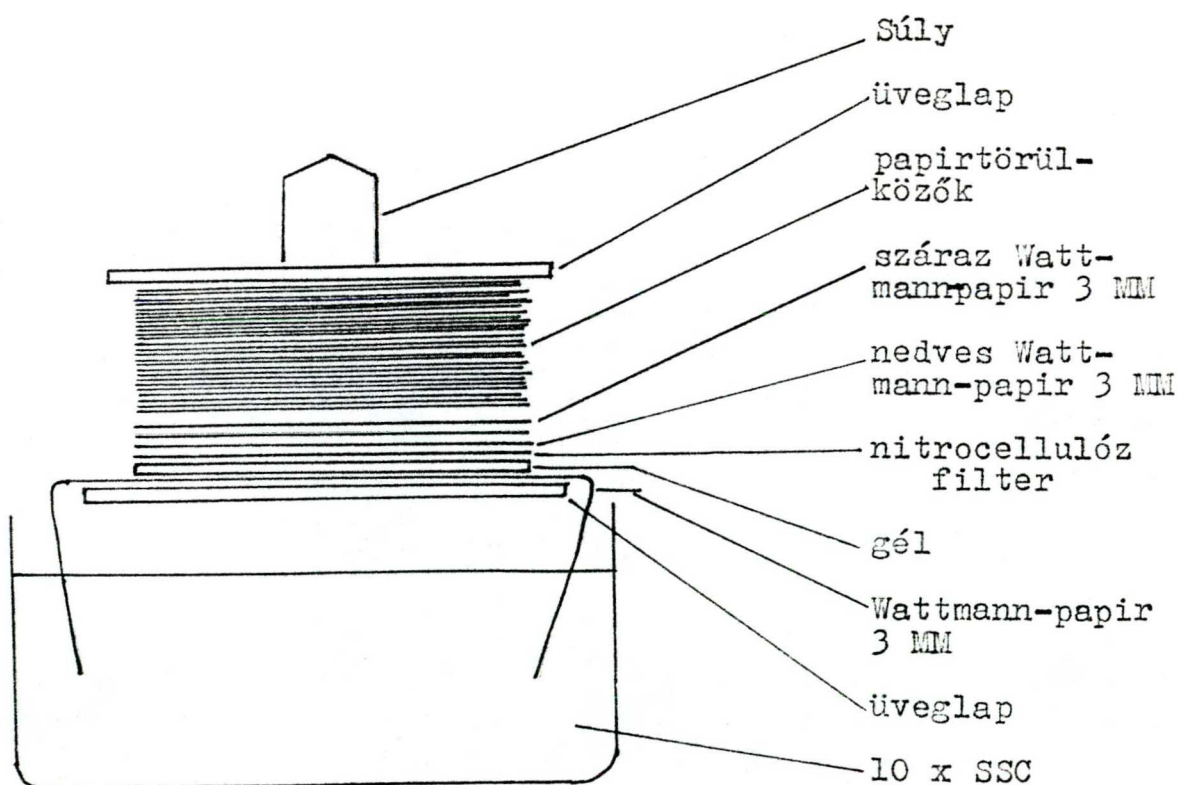
pH= 7,0

10 M NaOH - pH=7,0

Denaturálás: 2x20-30 percig denaturáló oldatban áztatjuk a gélét. Ilyenkor a gélben a kettős szálú DNS egyszálúvá denaturálózik.

Semlegesítés: 2x20-30 percig semlegesítő oldatban áztatjuk a gélét.

A nitrocellulóz filtert pontosan méret szerint kivágjuk, 2xSSC-ben pár percig előáztatjuk, majd a következő berendezést állítjuk össze az egyirányú DNS transzferhez.



A transzfer végén a filtert 15-20 percig 2xSSC-ben áztatjuk, utána infralámpa alatt 30 percig szárítjuk. A filtert szűrőpapír közé tesszük és 80 °C-on vákumban 2 órán keresztül rásütjük a DNS-t.

Hibridizálás: /17/

A filtereket 1 x Denhardt reagensbe mártjuk.

/100 x Denhardt reagens: 2 % Ficoll, 2 % PVP, 2 % BSA/

A filtereket 15 ml előhibridizáló oldattal /5 x SSC, 5 x Denhardt reagens, 100 µg/ml hering sperma DNS/ buborékmentesen nylon fóliába forrasztjuk és 2 órán keresztül 68 °C-on előhibridizáljuk. Utána hozzátesszük a próbát /2-3 x 10⁶ dpm aktivitásu ³²P jelölt DNS/ és további 16 órán keresztül 68 °C-on inkubáljuk. A hibridizálás befejezésekor a filtereket 4 SSC-ben 15 percig szobahőn, majd 3x15 percig 68 °C-on mossuk és utána infralámpa alatt szárítjuk. Az autoradiográfiát ólomkazettában fényvisszaverő lemez segítségével Forte Medifort 30x40 cm-es röntgen filmmel végeztük, 5-24 órát exponáltuk - 70 °C-on.

A DNS jelölése: /19/

A próba előállítása a laboratóriumban történt nick-transzlációval: a nick-transzlációs elegy 100-200 µg DNS-t 50 u Ci ³²P jelölt dATP-t 4 µl 5x nick-transzlációs puffert /10x puffer tartalmaz: 0,5 M Tris-Cl /pH=7,2/, 0,1 M MgSO₄, 1 mM DTT, 500 µg/ml BSA/ 1 µl 0,1 µg/ml DN-ázt. Az elegyet összekevertük, 10

percig 37 °C-on inkubáltuk. Ezután hozzáadtuk 2 U E. coli DNS-Polimeráz I-t /Boehringer/ és 15 °C-on 1 órán át inkubáltuk. A nick-transzlálódott DNS-t a be nem épült ^{32}P dATP-től a következő módon tudjuk kiválasztani:

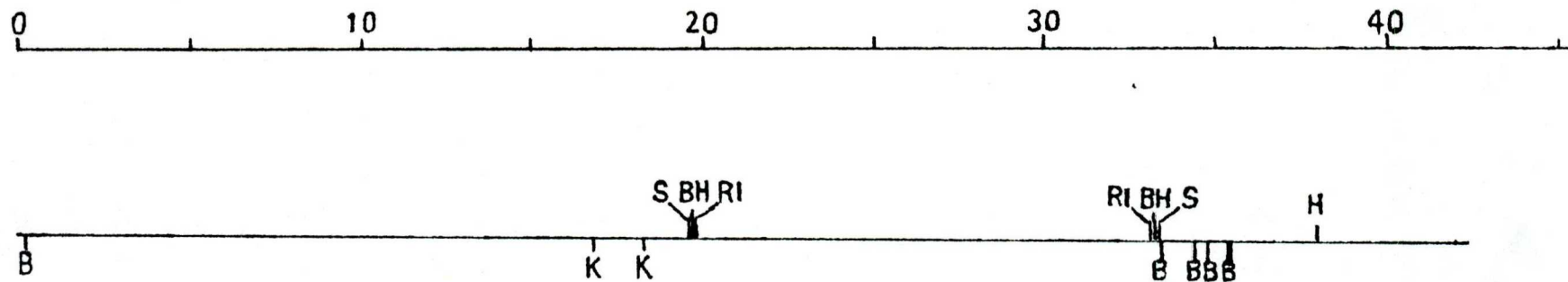
Fenolos extrahálás után kisméretű /0,5 x 10 cm-es/ Sephadex G 50 oszlopra vittük és 10 mM Tris-Cl /pH=7,5/ és 1 mM EDTA pufferrel eluáltuk. A jelölt DNS minta a kizárási térfogatban található. Az oldatot - 20 °C-on tároltuk későbbi használatra.

Eredmények

Az EMBL 3 vektor egy λ szubsztitúciós vektor, mely három részből áll: egy 19,4 kb bal karból, egy 9,2 kb jobbkarból és a közte levő 13,7 kb középső részből, melyet egy polilinker szakasz /Sal I., BamH I, EcoR I/ szegélyez. /1. ábra/ A rekombináns fágok inszertjei csak Sal I enzimmel vághatók ki, mivel Sau3 A végű idegen DNS-t ligáltunk a BamH I helyre. Először az egyes enzimekkel, illetve Sal I-gyel történő kettős emésztéssel néztem meg, hogy melyek a szélső fragmentumok és az inszertben található-e Sal I hasítóhely. Ezután a különböző enzimek egyes, illetve kettős emésztéseiből - először az adott klónban kevés hasítóhellyel rendelkező enzimekkel - felrajzoltam az egyik vagy mindkét enzimre a lehetséges térképet. A fragmentumok elhelyezésében némi segítséget nyújtottak a hibridizációs kísérletek is, melyekben próbaként jelölt cDNS klónokat használtunk. Ezek a génorientáció meghatározásához is segítséget nyújtottak, így a hibridizáló fragmentumok körülbelüli helyét meg lehetett mondani, illetve egymással összhangba hozni.

A λ gLP 39.13 klón térképezése

BamH I emésztési termékek: 22 kb^x 9,4 kb, 4,8 kb, 3,9 kb, 3,25 kb, 0,5 kb, BamH I + Sal I kettős emésztésben egy 1,8 kb fragmentum jelent meg és a 9,4 kb fragmentból a Sal I enzim levágta a 9,2 kb hosszú jobb kart. Ebből



1. ábra: EMBL3 vektor hasítási térképe
 B/Bgl II/; 472 bp, 34399 bp, 34692 bp, 35343 bp, 35403 bp,
 K/Kpn I/ ; 17272 bp, 18775 bp,
 S/Sal I/ ; 19383 bp, 33122 bp,
 BH/BamH I/; 19389 bp, 33116 bp,
 RI/EcoR I/; 19398 bp, 33107 bp,
 H/Hind III/; 37942 bp

tudjuk, hogy a jobb kar mellett egy kb 0,2 kb

BamH I fragment van, így az 1,8 kb fragmentum csak a bal kar mellett lehet. /2. ábra/

Xho I enzimmal történő emésztés nem mutatott változást. /3. ábra/

Bgl II.; 20,5 kb^x 7,6 kb, 7,0 kb^x, 3,9 kb, 2,2 kb, 1,2 kb^x, 0,6 kb^x, 470 bp^x, 310 bp^x. /Ezek közül az utolsó 4 vektor fragmentum, melyet ezentúl x-gal jelölök/.

Sal I-el történő kettős emésztésre megjelent egy 1,1 kb fragment: mivel egyéb változás nem látható, azért ez valószínű, hogy a bal kar mellett van /2. ábra/

EcoR I; 20 kb^x, 11,5 kb^x, 10,7 kb,

Sal I-el történő kettős emésztés után 10,7 kb, 9,2 kb^x, 2,8 kb, 1,2 kb fragmentumokat kaptunk. Mivel valószínűleg a 11,5 kb fragment hasadt el a jobb karra és a 2,8 kb fragmentumra, ez a fragmentum a jobb szélén van az inszertnek, így az 1,2 kb fragmentum található a bal kar mellett /2. ábra/.

Ezzel az EcoR I. térképét ismerjük /7. ábra/

Hind III.

24 kb^x, 4,4 kb^x, 3,45 kb, 3,2 kb, 0,66 kb, 0,47 kb, 0,45 kb. Sal I-el történő kettős emésztéskor a 6 kb és a 24 kb fragmentum hasadt és keletkezett 5,4 kb, 4,8 kb^x, 1,1 kb. Azt tudjuk, hogy a Hind III enzim belehasít a jobb karba /16/ /1. ábra/, ahonnan egy

4,4 kb fragmentumot vág ki, a kar másik része a Sal I helyig 4,8 kb, így ezek a fragmentumok vektor eredetűek. Az 5,4 kb fragmentum csak a nagyobbik karból jöhetett, így az 1,1 kb fragmentum a jobb kar mellett található /2. ábra/

Hind III + EcoR I:

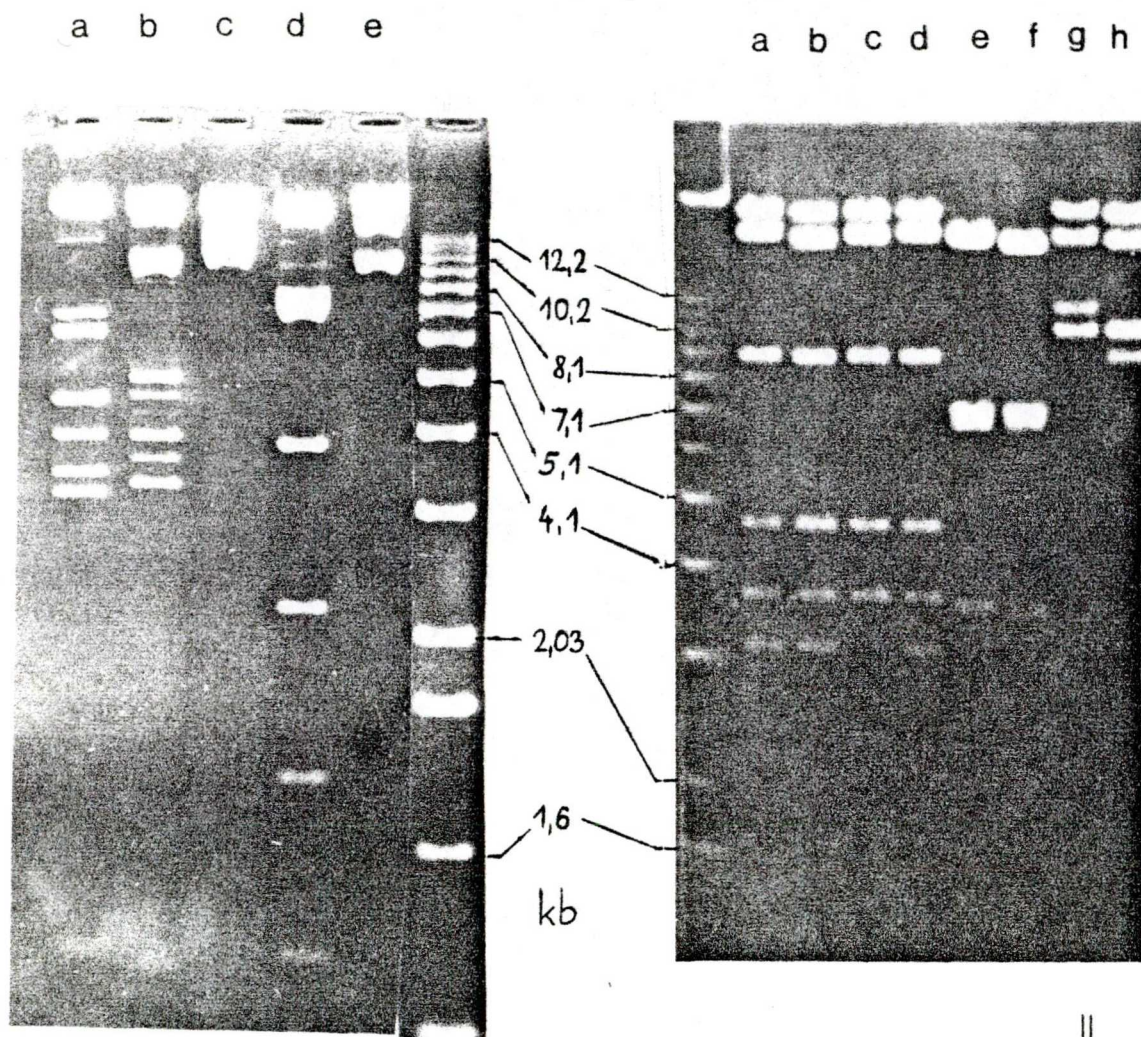
21 kb^x, 4,4 kb^x, 4,2 kb, 3,2 kb, 2,3 kb, 1,12 kb, 0,6 kb, 0,47 kb, 0,45 kb. A 4,2 kb fragmentum az 5,4 kb Hind III fragmentumból hasadt ki /mivel más, ilyen nagyméretű fragment a Hind III emésztésben nem található/ és a 3,45 kb-os Hind III fragmentum elhasadt egy 2,3 és egy 1,12 kb fragmentumra, tehát ennek a fragmentumnak a jobboldali EcoR I hely körül kell elhelyezkednie. /3. ábra/

EcoR I + BamH I.

A 3,25 kb BamH I fragmentum elhasadt egy 2,5 kb és egy 0,78 kb fragmentumra. A baloldali BamH I és EcoR I helyek helyzetét ismerjük, így ez csak a jobb oldalon lehet, ahol az EcoR I hely éppen 2,5 kb-ra van a szélső BamH I helytől. A többi fragmentum mérete változatlan maradt, így ezek középen helyezkednek el. /3. ábra/

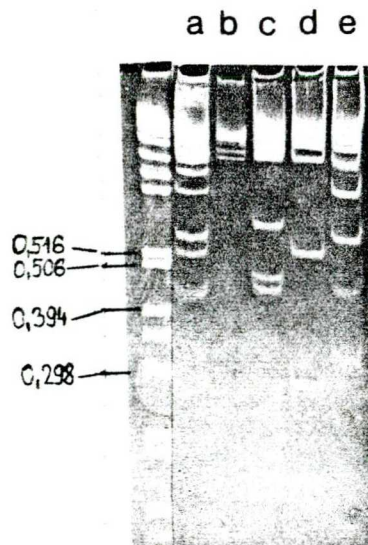
Hind III + BamH I

21 kb^x, 5 kb, 4,4 kb^x, 3,5 kb, 1,92 kb, 1,85 kb, 1,25 kb, 0,8 kb, 0,6 kb, 0,45 kb és 0,4 kb. A 3,25 kb-os BamH I fragmentum részleges átfedésben kell, hogy legyen 3,45 kb-os Hind III fragmentummal, ha a na-



2. ábra:

λ gLP39.13 klón emésztése
 I. a/ Hind III, b/ BamH I,
 c/ EcoR I, d/ Bgl II,
 e/ Sal I,
 II. a/ BamH I, b/ BamH I + Sal I
 c/ BamH I + EcoR I, d/ BamH I +
~~Xho~~ I, e/ Bgl II, f/ Bgl II +
Sal I, g/ EcoR I, h/ EcoR I +
Sal I,
 III/ akrilamid gél/
 a/ Bgl II + BamH I b/ BamH I +
Hind III, c/ Hind III
 d/ BamH I, e/ Bgl II



gyobbik 1,92 kb innen ered, akkor kell egy 0,45 kb kis fragmentumnak még közben lennie. A fragmentum másik része feldarabolódott, mivel nincs 1,4 kb-os kettős emésztési-termék, így a szélső BamH I fragmentum mellett kell legyenek a kis fragmentumok: 0,5 kb és 0,3 kb.

A 3,5 kb fragmentum csak az 5,4 kb Hind III, ill. a 4,8 kb vagy 3,9 kb BamH I fragmentumból jöhetett, ami közvetlenül a baloldali fragmentum mellett helyezkedik el. Mivel a lehasított rész az 1,25 kb fragmentummal épp 4,8 kb-ra egészíthető ki, így ez a fragmentum van a BamH I térképen a baloldaltól a második helyen, a fennmaradt részen pedig a 3,9 kb BamH I fragmentum áll. A 4,8 kb BamH I fragmentum 1,23 kb túlnyúló része a fennmaradó 1,85 kb fragmentumokkal - a hibahatáron belül - adhatja a 3,2 kb Hind III fragmentumot. /Mivel más nagyobb fragmentum nincs jelen./ Így a 3,2 kb és a 3,45 kb Hind III fragmentum között foglal helyet a két kicsi fragmentum /0,6 kb és 0,4 kb/ /3. ábra/.

Bgl II + EcoR I:

20,5 kb^x, 7,0 kb^x, 4,9 kb. 3,9 kb, 2,6 kb, 2,0 kb, 1,2 kb^x, 0,6 kb^x. Látható, hogy a 7,6 kb fragmentumból egy 4,8 kb és egy 2,6 kb fragmentum keletkezett, így biztos, hogy ez a fragmentum a jobb oldalon van.

A 3,9 kb Bgl II fragmentum változatlan, így ennek közepén kell lennie. 2,2 kb Bgl II fragmentumból a bal oldali EcoR I hasítóhely csak egy kb. 100 bázis-



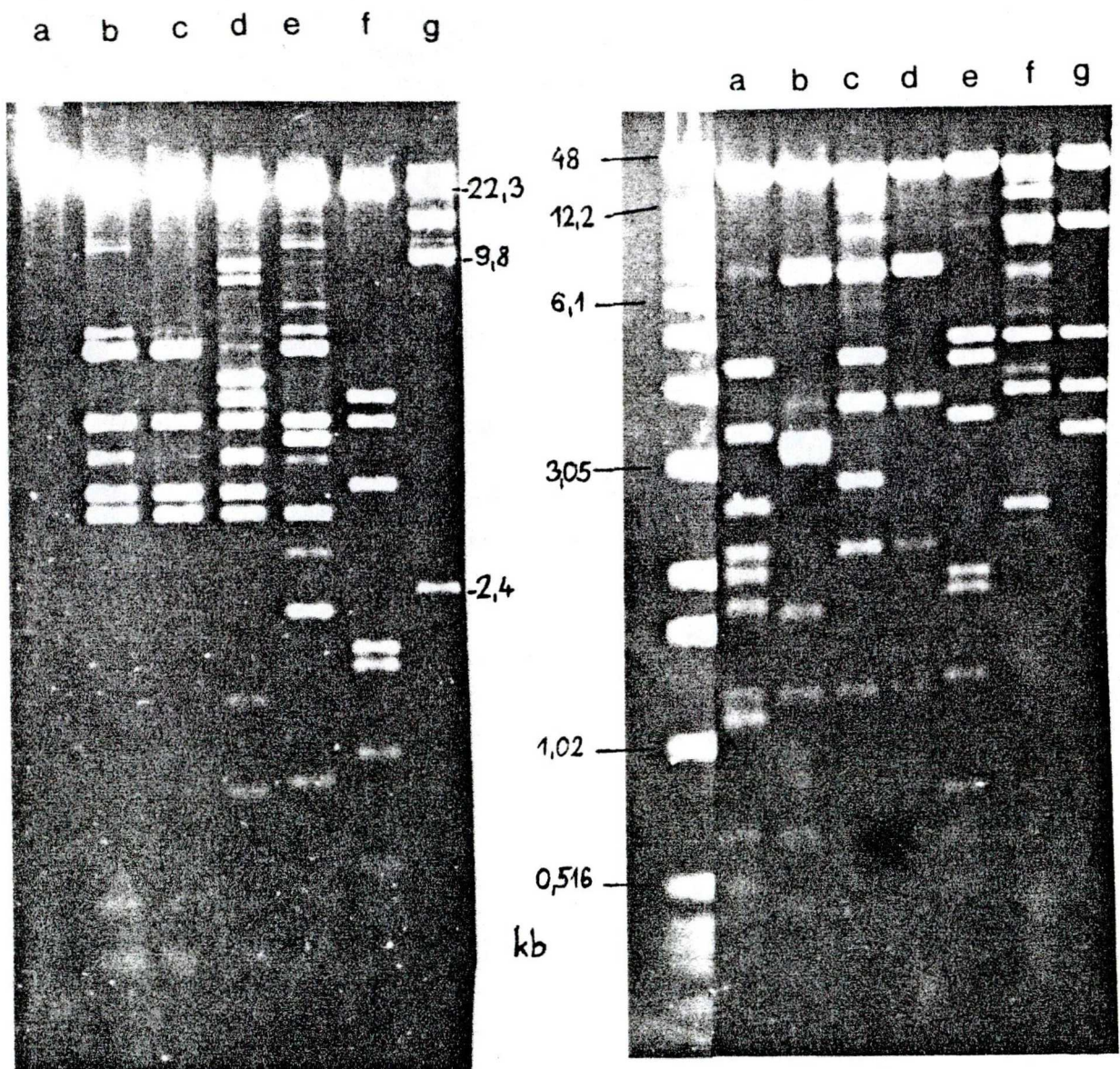
párnyi részt hasított le /amely a gélen már nem látható/, így a bal oldali Sal I helytől 1,1 kb-ra van az első Bgl II hasítóhely, majd 2,2 kb-ra a második. /3. ábra/

Bgl II + Hind III:

20,5 kb, 7,0 kb^x, 4,4 kb^x, 3,45 kb, 2,6 kb, 2,15 kb, 2,0 kb, 1,8 kb, 1,2 kb^x, 1,15 kb, 1,12 kb, 0,9 kb, 0,6 kb^x, 0,45 kb^x, 0,4 kb .

Ebben az emésztésben kapott eredmények teljes összhangban vannak az eddig leírt térképpel. Látható, hogy a 3,45 kb Hind III fragmentum megtalálható, valamint a kis fragmentumok és a 2,2 kb Bgl II fragmentum. A 3,9 kb Bgl II fragmentum elhasadt egy 2,0 kb és egy 1,8 kb darabra, az 1,15 kb és 1,8 kb fragmentum pedig a 3,2 kb Hind III fragmentumot alkotja. Az 1,12 kb fragmentum a jobb szélső 1,2 kb Hind III fragmentumból származik. /3. ábra/

A Bgl II + BamH I enzimekkel kapott emésztési eredmények is jó összhangban vannak az eddig megállapított térképpel. A kapott fragmentumok 21 kb^x, 7,0 kb^x, 3,25 kb, 3,1 kb, 3,1 kb, 1,75 kb, 1,2 kb^x, 0,7 kb, 0,6 kb^x, 0,5 kb^x. A 4,8 kb BamH I fragmentum egy 1,75 kb és egy 3,1 kb részre hasadt, a 3,25 kb BamH I fragmentum változatlan, a 3,9 kb BamH I fragmentum pedig egy 3,1 kb és egy 0,7 kb darabokra vágódott. /3. ábra/



3. ábra: λ gLP39.13 klón emésztése
 I.a/ λ fág DNS, b/ Hind III, c/ Hind III+Xho I,
 d/ Hind III+Sal I, e/ Hind III+EcoR I, f/ Hind III
 +BamH I, g/ λ xBgl II
 II.a/ Bgl II+ Hind III, b/ Bgl II+BamH I
 c/ Bgl II + EcoR I, d/ Bgl II, e/ BamH I
 + Hind III, f/ BamH I + EcoR I, g/ BamH I

Ezzel a klónnal készítettünk részleges emésztést is, amit nitrocellulóz filterre blottoltunk és a 4,4 kb Hind III vektor fragmentum volt a próba. A jelölődő fragmentumok méretbeli különbségeiből tudtunk következtetni a fragmentumok egymás utáni elhelyezkedésére. /4. ábra/ A kapott eredmények jó összhangban vannak az eddig leírtakkal.

Kpn I:

16 kb^x, 3,4 kb, 1,5 kb^x. Tudjuk, hogy a Kpn I bele-
vág a bal karba és onnan 1,5 kb fragmentumot hasít
ki. /1. ábra/ Máshol hasítóhely a karokban nincs,
/16/, így az 3,4 kb fragmentum nagyobbik része csak
az inszertből származhat úgy, hogy a Kpn I hasítóhely
2,0 kb-ra van a baloldali Sal I helytől. /5. ábra/

Kpn I + EcoR I:

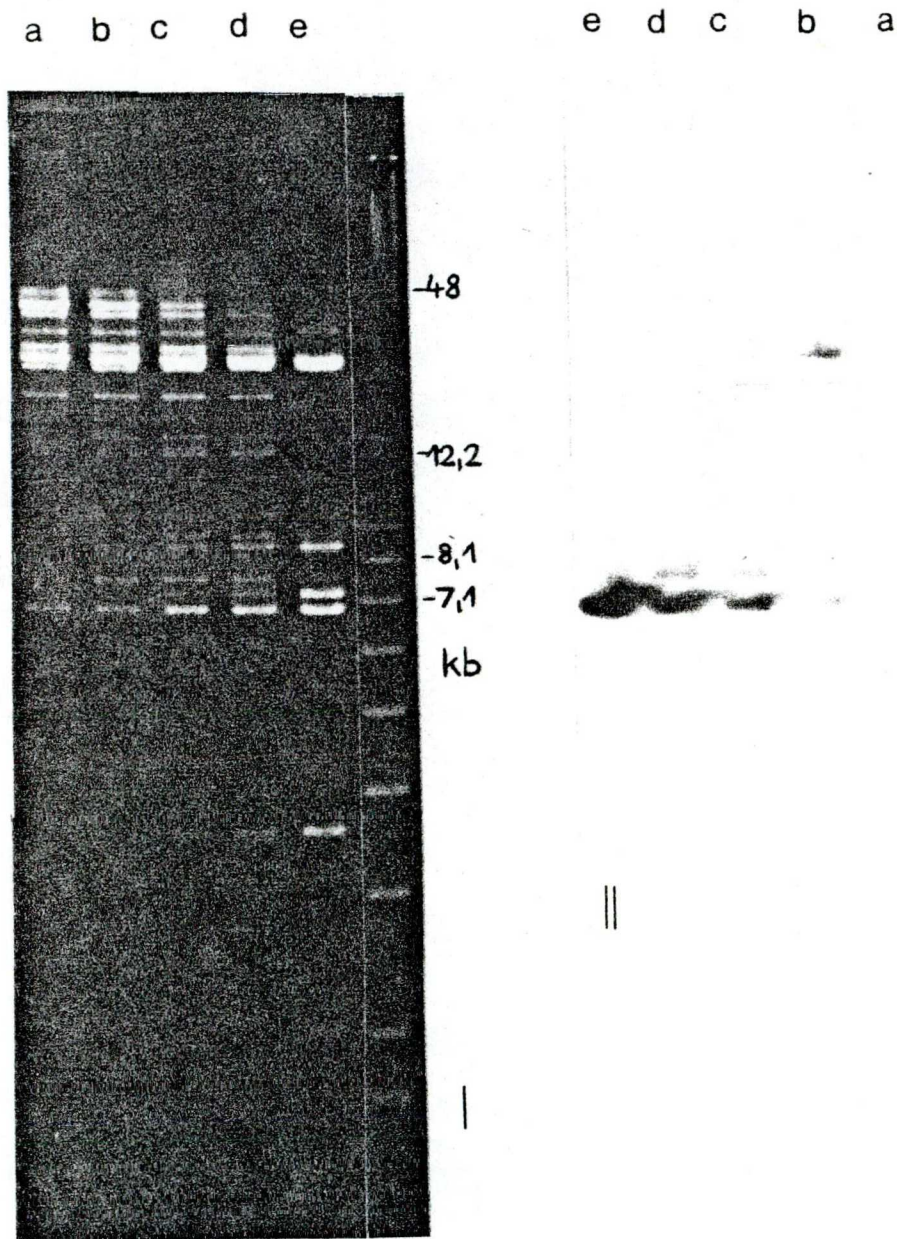
Megjelenik egy 2,6 kb és egy 0,9 kb új fragmentum,
mely a 3,4 kb Kpn I fragmentum hasítási terméke.
A 2,6 kb fragmentum egy része /1,4 kb/ a vektorból
származik. /5. ábra/

Kpn I + BamH I:

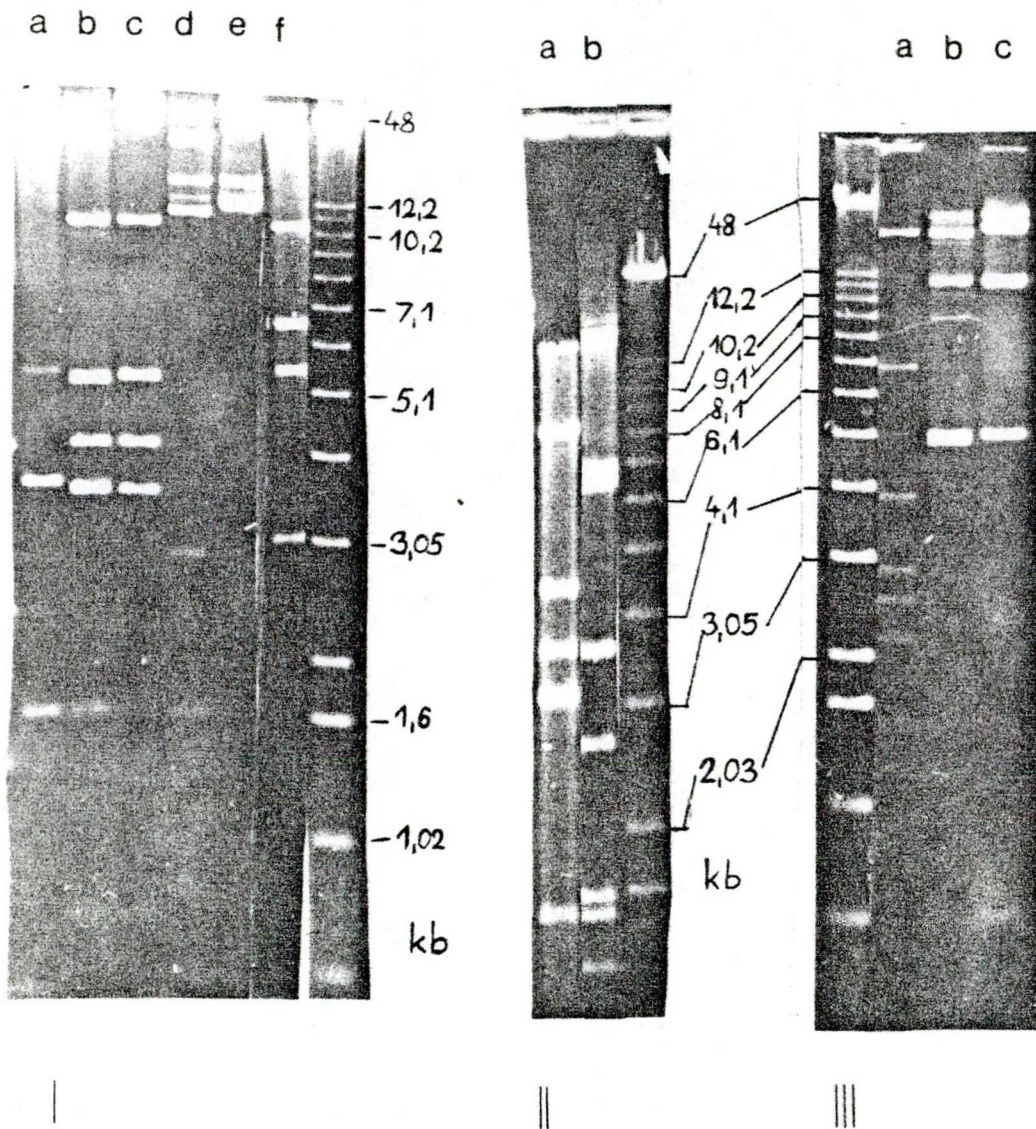
Megjelenik egy 3,3 kb új fragmentum, ez megerősíti
az eddigieket, miszerint a bal szélső BamH I
hasítóhely közelében van a Kpn I hasítóhely. /5. ábra/

Kpn I + Bgl II:

16 kb^x, 7,0 kb^x, 3,9 kb, 2,6 kb, 1,65 kb, 1,5 kb^x,
1,2 kb^x, 0,66 kb^x, 0,6 kb.



4. ábra: λ gLP39.13 klón részleges emésztése Bgl II enzimmal
I. a/ 5 perc, b/10 perc, c/ 20 perc, d/ 30 perc
e/ 60 perc
II. Ugyanezan emésztés autoradiogramja a 4,4 kb
Mind III vektrofragmenttel történő hibridizáció után.



5. ábra:

λ gLP39.13 klón emésztése
I. a/ Kpn I, b/ Kpn I + BamH I, c/ BamH I,
d/ Kpn I + EcoR I, e/ EcoR I, f/ Xba I + Sal I,
II. a/ Kpn I + Bam HI, b/ Kpn I + Bgl II,
III. a/ Xba I + Bgl II, b/ Xba I + EcoR I,
c/ Xba I

A 2,2 kb Bgl II fragmentum hasadt egy 1,65 kb és egy 0,6 kb fragmentumra a széli 1,1 kb-os Bgl II fragmentum, valamint az 1,4 kb vektordarab alkotja a 2,6 kb fragmentumot. /5. ábra/

Xba I:

25 kb^x, 12 kb^x, 4,8 kb, 0,5 kb.

Xba I + Sal I:

19 kb^x, 9,2 kb^x, 6,0 kb, 4,8 kb, 2,8 kb, 0,5 kb.

A 9,2 kb jobb kar mellett megkapjuk a 2,8 kb fragmentumot, amely a 12 kb Xba I fragmentumból származik, így ez a jobb szélén található. A 6,0 kb újonnan megjelent fragmentum a bal szélén foglal helyet. /5. ábra/

Xba I + EcoR I:

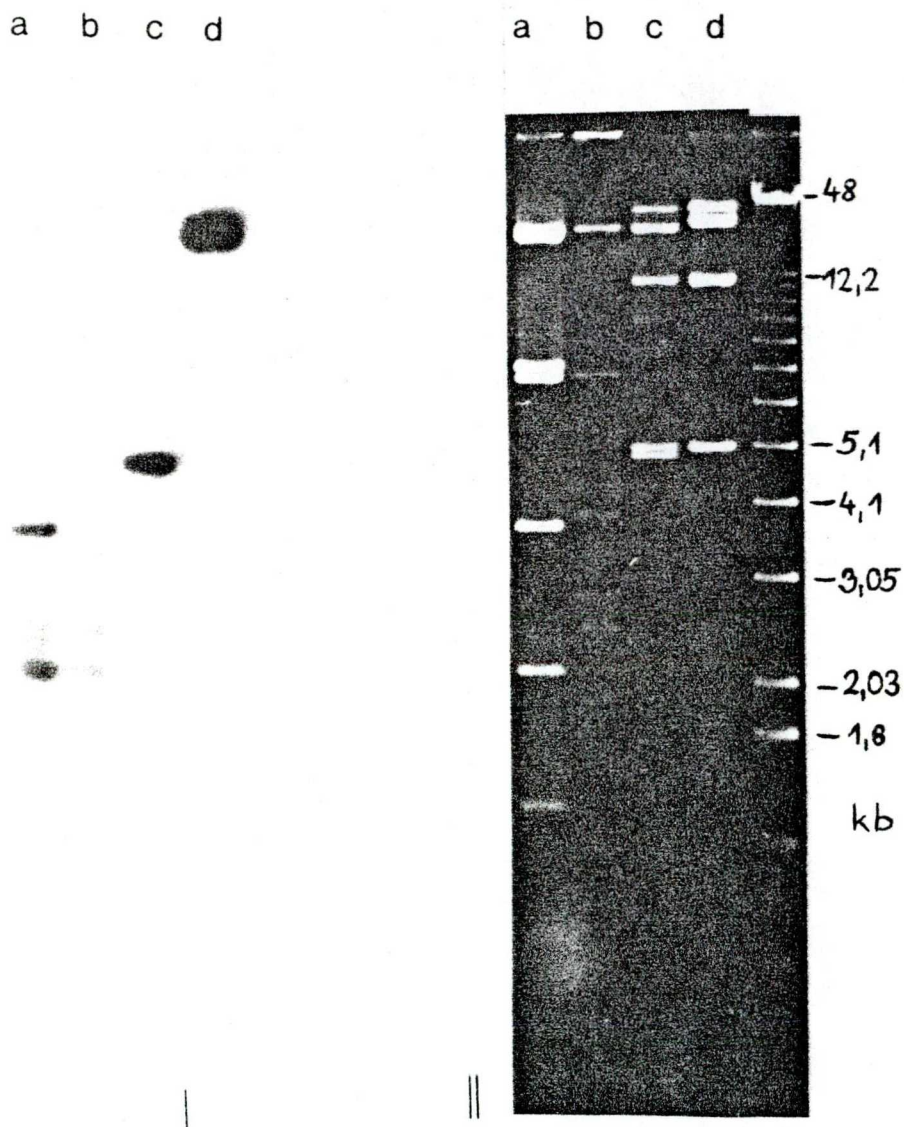
21 kb^x, 12 kb^x, 4,8 kb, 4,6 kb, 0,5 kb, 0,45 kb.

A 6 kb bal oldali Xba I- Sal I fragmentumból származik a kapott 4,8 kb-os fragmentum, az 1,2 kb bal széli EcoR I fragment levonásával.

Xba I + Bgl II

20,5 kb^x, 7,0 kb^x, 3,7 kb, 2,9 kb, 2,5 kb, 2,2 kb, 1,2 kb^x, 1,15 kb, 0,5 kb, 0,45 kb^x.

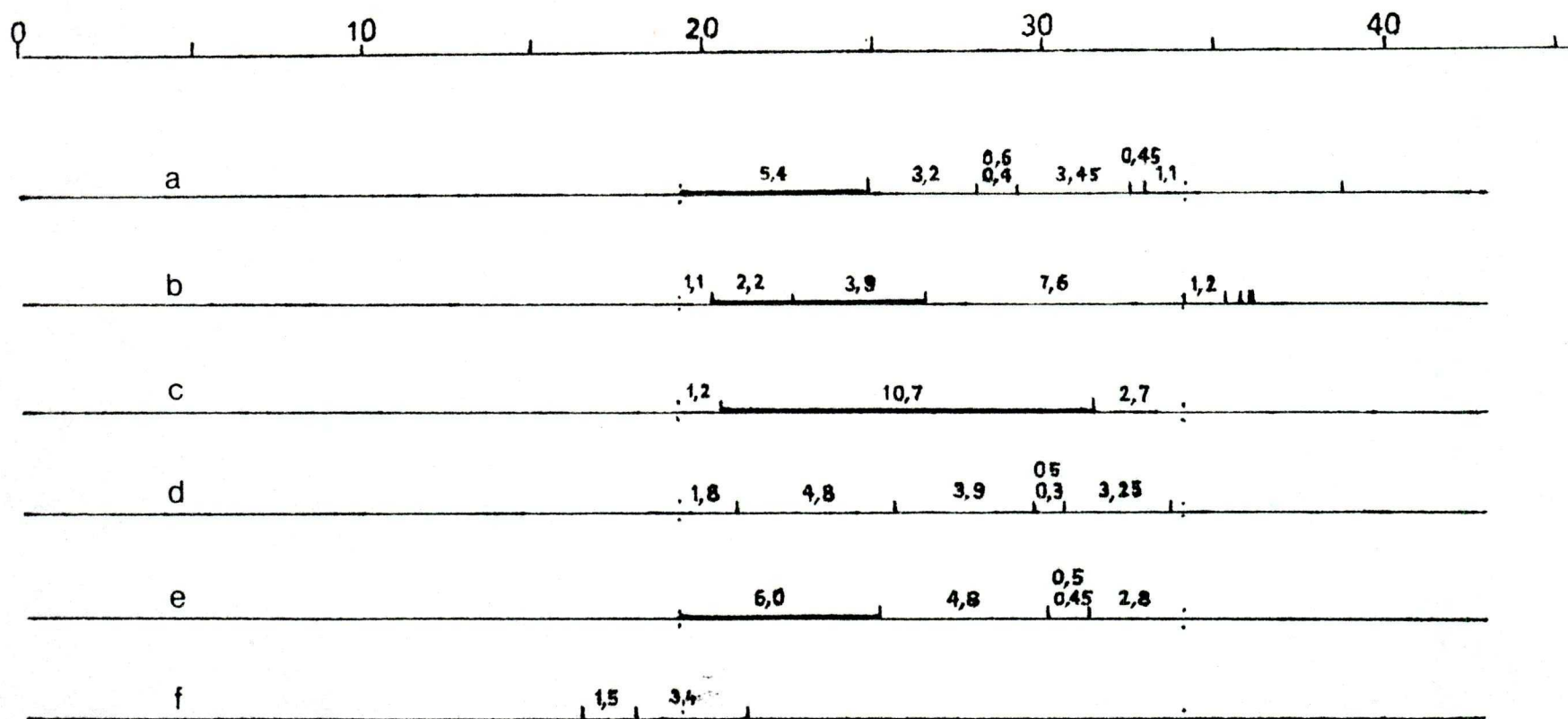
A 4,8 kb Xba I fragmentumból származik a 3,7 kb és 1,15 kb fragmentum. A 2,2 kb Bgl II fragmentum változatlan. /Átfedésben van a 6,0 kb-os Xba I fragmentummal/. A mellette lévő 3,9 kb Bgl II fragmentum azonban elhasad a 2,9 kb és 1,15 kb darabokra.



6. ábra: I. λ gLP39.13 klón autoradiogramja a pLPF4 cDNS klón ^{32}p jelölt inszertjével történő hibridizáció után. a/ Bgl II, b/ Xba I+Bgl II, c/ Xba I+EcoR I, d/ Xba I
II. Az emésztések képe elektroforézis után, sorrend ugyanaz.

Innen tehát tudjuk, hogy a 4,8 kb és a 6,0 kb fragmentum egymás mellett van, a kis fragmentum /0,5 kb és 0,45 kb/ a 4,8 kb és 2,8 kb fragmentumok között foglal helyet. /7. ábra/

A cDNS próbával a 4,8 kb Xba I-EcoR I fragmentum, a 2,2 kb és 3,9 kb Bgl II fragmentum, valamint a 2,5 kb Xba I - Bgl II fragmentum hibridizál. Az exonnak tehát a 2,5 kb Xba I - Bgl II és 2,2 kb Bgl II fragmentumokon kell elhelyezkedni. /6. ábra/



7. ábra: $\lambda_{gLP39.13}$ klón hasítási térképe.
a/ Hind III, b/ Bgl II, c/ EcoR I, d/ BamH I, e/ Xba I,
f/ Kpn I

AluLP 39,23 klón térképezése:

A térképezésnél a logikai menet hasonló volt az előző klónnál leírttal.

Hind III:

22,5 kb^x, 11 kb, 4,4 kb^x, 2,6 kb, 2,4 kb, 1,4 kb.

Hind III + Sal I:

19 kb^x, 6,2 kb, 4,8 kb^x, 4,4 kb^x, 3,1 kb, 2,6 kb, 2,4 kb, 1,4 kb.

A 11 kb-os Hind III fragmentum tartalmazza a 4,8 kb részletet a jobb karból, így ezt levonva, megkapjuk a 6,2 kb-os fragmentumot, mely tehát a jobb oldalon helyezkedik el. Az újonnan megjelent 3,1 kb fragmentum így csak a bal oldali kar mellett lehet. /8. ábra/

EcoR I:

Két nagy fragmentumot kaptunk.

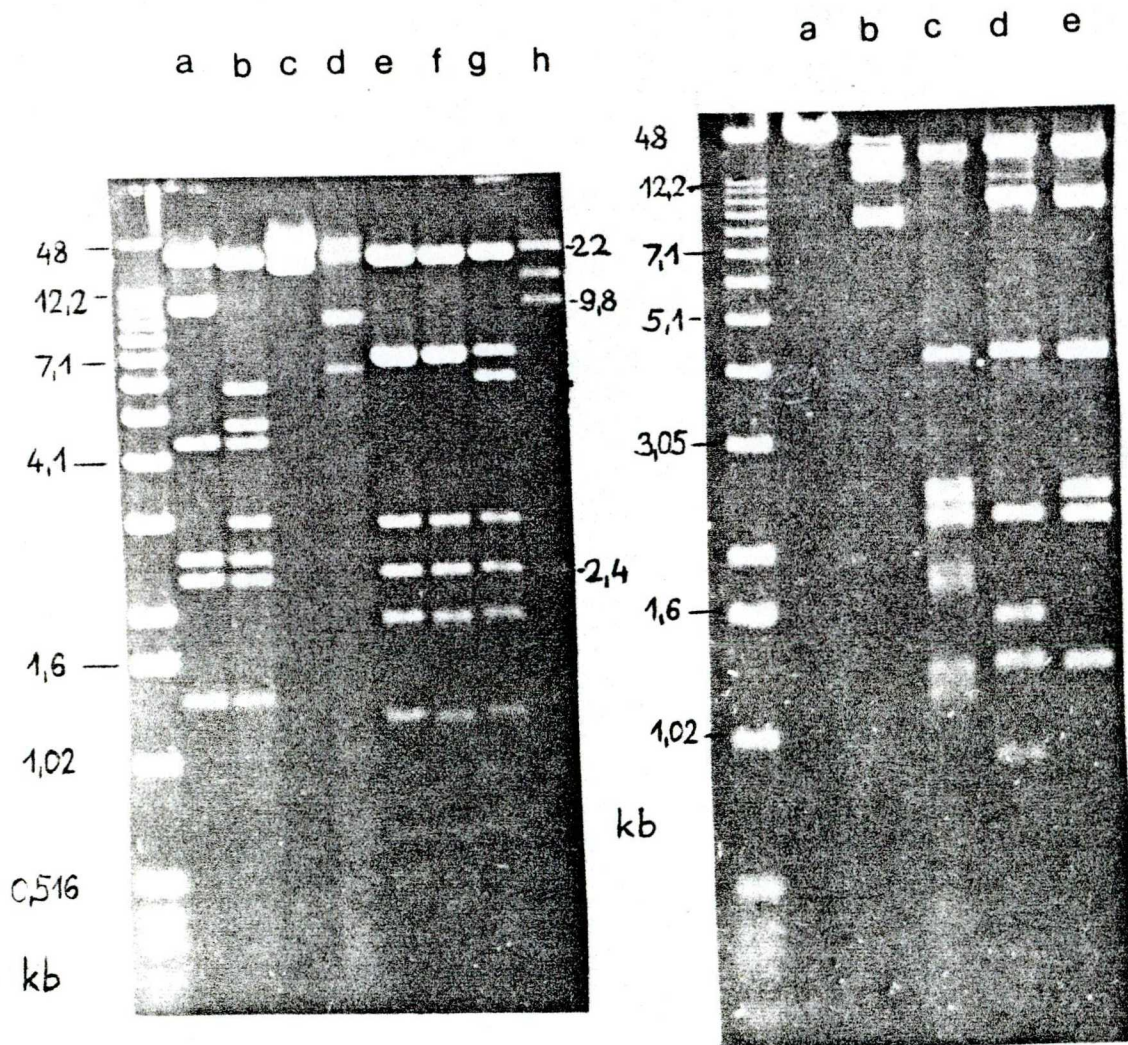
EcoR I + Sal I:

19 kb^x, 9,2 kb^x, 9,0 kb, 6,7 kb.

Ebből látjuk, hogy az inszertet egy helyen hasították az EcoR I, kb. közepén, egy 6,7 kb és egy 9 kb-os fragmentumra. /8. ábra/

Bgl II:

20 kb^x, 7,0 kb^x, 7,0 kb, 3,05 kb, 2,4 kb, 1,95 kb, 1,2 kb^x, 0,64 kb^x.



8. ábra:

λ gLP39.23 klón emésztése.
 I.a./ Hind III, b/ Hind III + Sal I, c/ EcoR I,
 d/ EcoR I + Sal I, e/ Bgl II, f/ Bgl II + Sal I,
 g/ Bgl II + EcoR I, h/ λ xBgl II.
 II.a/ Xho I, b/ Xho I + Sal I, c/ Hind III +
Bgl II, d/ Hind III + EcoR I, e/ Hind III

Bgl II + Sal I:

A kép azonos a Bgl II emésztéssel, de egy kicsi kb 500 bázispárnyi fragmentum jelent meg, amely valószínűleg a nagy kar mellett van /8. ábra/. BamH I enzimmel történő emésztéskor a vektor-inszert határ közelében térképeztük a BamH I helyet. /8. ábra/

Hind III + EcoR I:

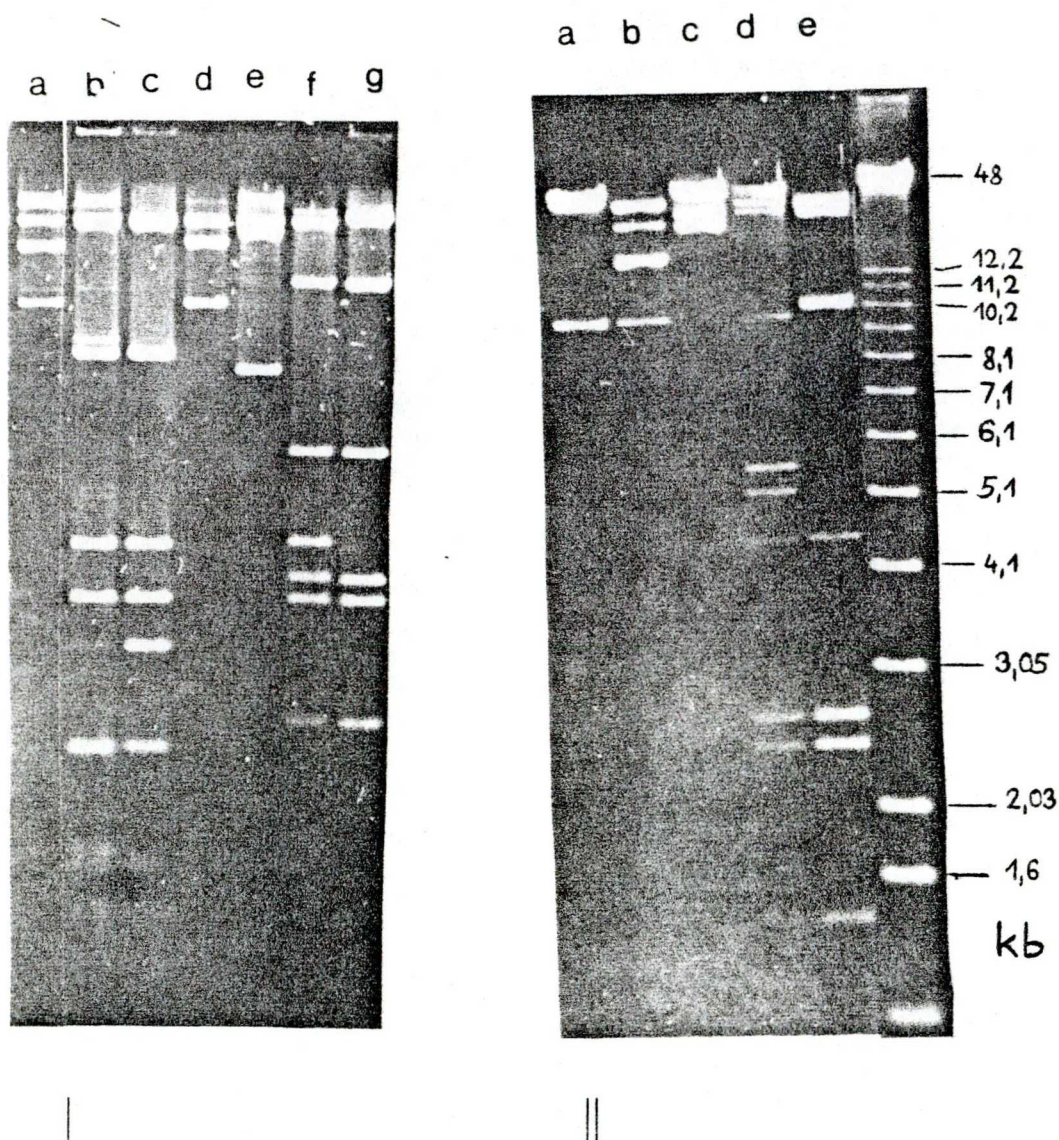
22,5 kb^x, 11 kb^x, 4,4 kb^x, 2,4 kb, 1,6 kb, 1,4 kb, 1,3 kb, 0,94 kb. Látható, hogy csak a 2,6 kb

Hind III fragmentum hasadt el egy 1,6 kb és egy 0,94 kb fragmentumra. Ha 6,7 kb EcoR I fragmentum van a jobb kar közelében, ez a hasítás nem lehetséges /akkor 0,5 és 2,1 kb-ra kellett volna hasadjon/, így biztos, hogy a 9 kb EcoR I fragmentum van a jobb oldalon, a bal kar közelében pedig a 6,7 kb fragmentum. Így, ha az EcoR I hasítóhely "köré" tesszük a 2,6 kb Hind III fragmentumot, csak úgy lehetséges a hasítás, ha az 1,4 kb Hind III fragmentum a 2,6 kb és a 6,2 kb szélső Hind III fragmentum között foglal helyet. A fennmaradó részre a 3,1 kb. bal oldali Hind III fragmentum mellé kerül a 2,4 kb-os darab /8. ábra/ Ezzel a Hind III és EcoR I térképe ismert /12. ábra/

Bgl II + EcoR I:

20 kb^x, 7,0 kb^x, 6,0 kb, 3,05 kb, 2,04 kb, 1,95 kb, 1,2 kb^x, 0,9 kb, 0,6 kb^x.

Látjuk, hogy egyedül a 7,0 kb Bgl II fragmentumból



9. ábra: λ gLP39.23 klón emésztése
 I. a/ Xba I+Sal I, b/ Xba I+Bgl II, c/ Bgl II
 d/ BamH I+Sal I, e/ BamH I+EcoR I, f/ BamH I +
Hind III, g/ Hind III
 II. a/ Xba I, b/ Xba I+BamH I, c/ BamH I,
 d/ Xba I+Hind III e/ Hind III

hasadt le 0,9 kb, a többi fragmentum változatlan maradt. /8. ábra/

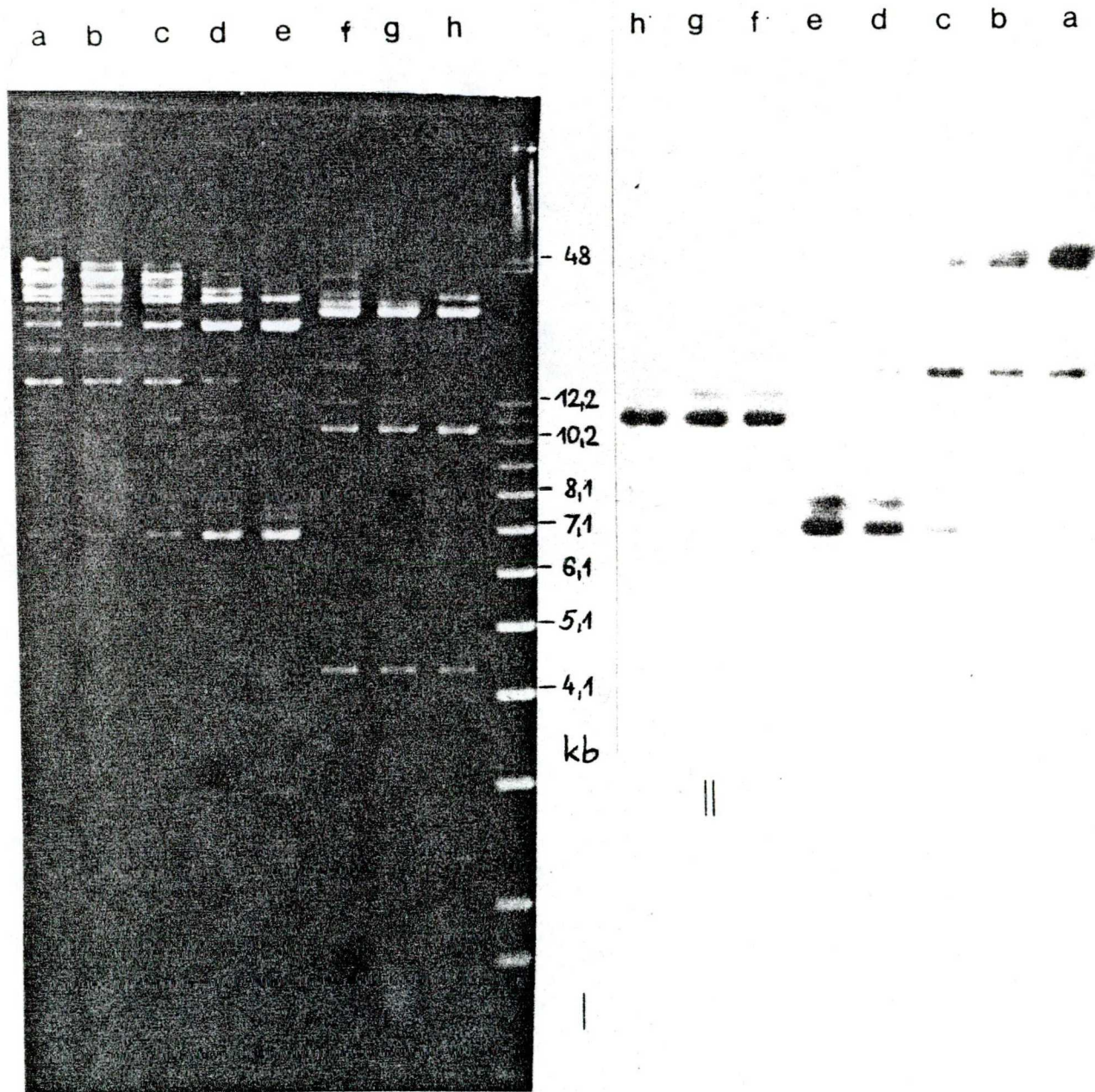
Bgl II + Hind III:

20 kb^x, 4,4 kb^x, 2,6 kb, 2,45 kb, 2,4 kb, 1,9 kb, 1,8 kb, 1,4 kb, 1,3 kb, 1,2 kb^x, 0,65 kb^x, 0,6 kb, 0,5 kb^x.

A 7,0 kb Bgl II fragmentum feldarabolódott, így ez valószínűleg a bal oldalon helyezkedik el /Ez összhangban van a Bgl II + EcoR I emésztésnél kapott eredménnyel is./ /8. ábra/

Ebben az esetben a 3,1 kb Hind III fragmentum : a bal széli 500 bázispár Bgl II fragmentum lehasításával megkapjuk a 2,6 kb fragmentumot. A 2,6 kb Hind III fragmentum hasítási terméke az 1,9 kb és 0,5 kb fragmentum a molsúly meghatározás hibahatárán belül. Az 1,8 kb és 2,4 kb, valamint a 0,5 kb Bgl II fragmentum a jobb oldalon, a 6,2 kb Hind III fragmentummal átfedésben van, így a 3,05 kb Bgl II fragmentum középtájon helyezkedik el. /12. ábra/

Az eddig kapott sorrendet megerősítették a laboratóriumban elvégzett hibridizációs kísérletek, amelyek kimutatták a cDNS próba segítségével az exon szakaszokat a klónon belül. Ezek a következők voltak: 9 kb EcoR I, 1,4 kb Hind III, 11 kb Hind III, /ez gyengébb aktivitású/ és 3,05 kb Bgl II fragmentum, tehát ezek a klónban átfedésben kell, hogy legyenek. /11. ábra/



19. ábra: λ gLP39.23 klón részleges emésztése Bgl II enzimmal
 I. a/ 5 perc b/ 10 perc, c/ 20 perc, d/ 30 perc,
 e/ 60 perc
 II. Ugyanezen klón autoradiogramja a 4,4 kb Hind III
 fragmentummal történő hibridizáció után.
 Sorrend ugyanaz.

Az inszert közepén elhelyezkedő további három Bgl II fragmentum sorrendjének eldöntésére részleges emésztéseket végeztünk: a 60 perces részleges emésztési képen látható a legjobban, hogy egy 2,4 kb fragmentum után 2,95 kb következik, tehát e fragmentum kell, hogy legyen a 0,5 kb kis fragmentum. Ugyanezt látjuk feljebb: 3,15 kb, illetve 3,55 kb, hogy a kis fragmentum a 3,05 kb fragmentum mellett is elhelyezkedik, tehát a 2,4 kb és 3,05 kb fragmentumok között. A sorrend tehát a jobb oldaltól nézve 1,95 kb, 2,4 kb, 0,5 kb 3,05 kb, 7,0 kb, 0,5 kb Bgl II fragmentumok /10. ábra/.

Hasonló eredményt kaptunk mikor a gélt nitrocellulóz filterre blottoltuk és a ^{32}P jelölt 4,4 kb-os Hind III vektor fragmentummal meghibridizáltuk: 9,2 kb-nál nagyobb jelölt fragmentum a 11 kb volt, azaz 1,8 kb-ra a bal kartól, ez valószínűleg az 1,95 kb fragmentum jelenlétére utal. Ezután csak a 13,3 kb /illetve ennél nagyobb/ fragmentum jelölődött, tehát itt kell következni a 2,4 kb fragmentumnak /10. ábra/ Ezzel a Bgl II térképe ismert /12. ábra/

BamH I hasítóhely létezését Hind III, illetve EcoR I enzimekkel történő kettős emésztéssel mutattam ki. Hind III enzimmel történő kettős emésztéskor egy 3,0 kb fragment jelent meg, mely csak a 3,1 kb bal szélső Hind III fragmentumból származhat, tehát a Sal I hely közelében történt a hasítás /9. ábra/



EcoR I enzimmel történő hasításkor egy 6,3 kb fragmentum jelent meg, és mivel a 3,1 kb Hind III fragmentummal a 6,7 kb EcoR I fragmentum fed át, ezért ebből keletkezett a kapott darab.

A BamH I + Sal I kettős emésztésnél megkaptuk a 19,4kb és 9,2 kb vektor fragmentumokat és a 15 kb inszert fragmentumot. A cDNS próbával az utóbbi fragmentum hibridizált /11. ábra/

Xba I:

10 kb, és egy nagy fragmentum jelent meg.

Xba I + Sal I:

19 kb^x, 15 kb, 9,2 kb^x, 0,7 kb.

Ebből látjuk, hogy a jobb kar közelében van egy Xba I hasítóhely és a 10 kb Xba I fragmentum tartalmazza a jobb kart /9. ábra/

Xba I + Bgl II:

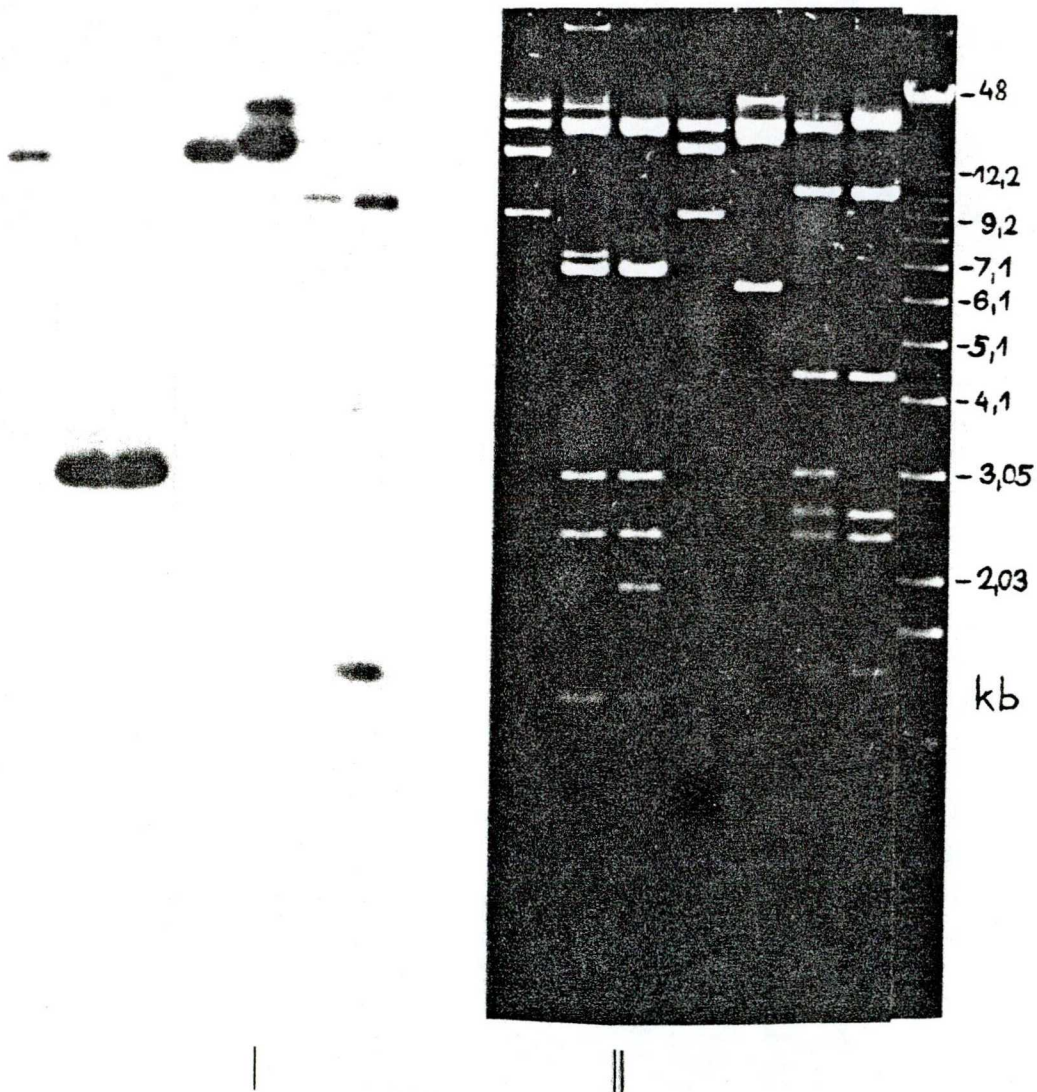
Az 1,95 kb Bgl II fragment eltűnik, keletkezik egy 1,0 kb és egy kb 0,7 kb fragment, tehát a Xba I hasítóhely 0,7 kb távolságra van a jobb kartól /9. ábra/

Xba I + Hind III:

A 11 kb Hind III fragmentum egy 5,7 és egy 5,2 kb fragmentre hasadt, ez alátámasztja az előző emésztésekből levont következtetéseket /9. ábra/.

a b c d e f g

a b c d e f g



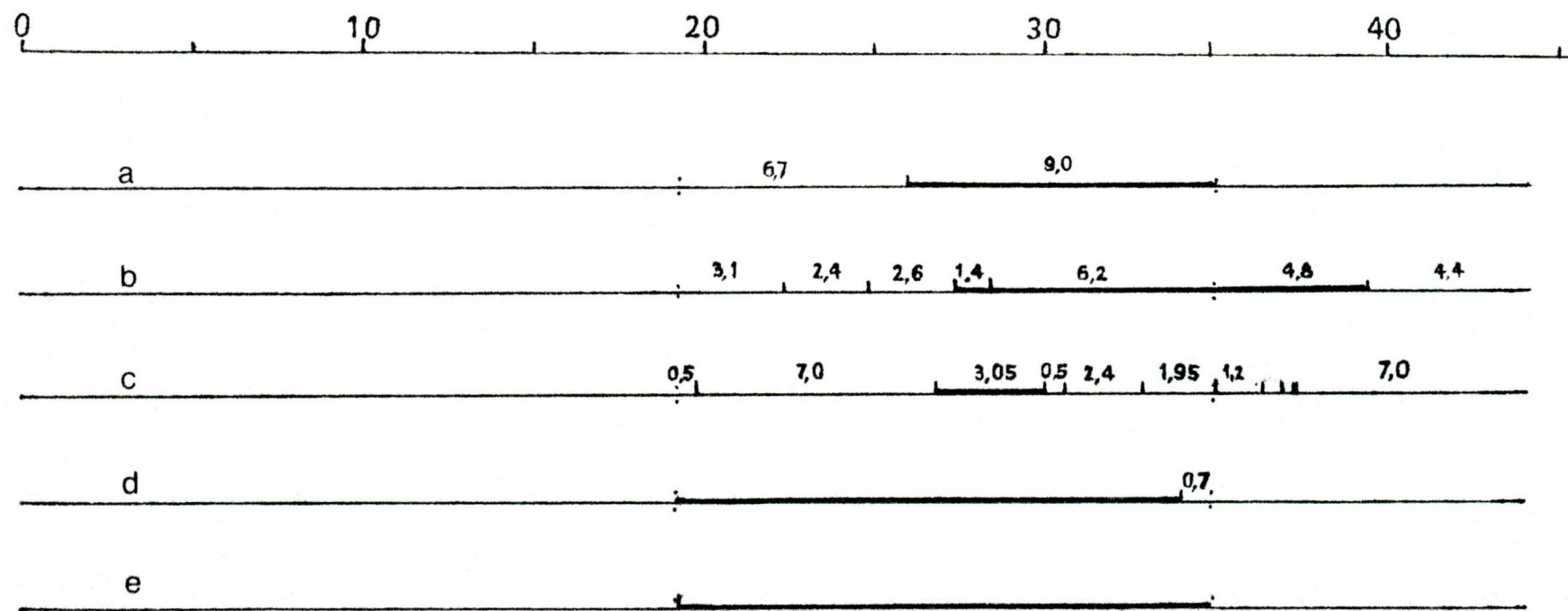
11. ábra: I. λ gLP39.23 klón autoradiogramja pLPP4 cDNS klón ^{32}P jelölt inszertjével történő hibridizálás után. a/Xba I+Sal I, b/Xba I+Bgl II, c/ Bgl II d/ BamH I+Sal I, e/ BamH I+EcoR I, f/Hind III+ BamH I, g/ Hind III
II. Az emésztések gélelektroforetikus képe hasonló sorrendben.

Xba I + BamH I:

20 kb^x, 14 kb, 10 kb.

A 14 kb fragmentum inszert. A 10 kb fragmentum vektor származék. /9. ábra/ /12. ábra/

A pLPP4 cDNS klónnal a 9,2 kb EcoR I a 11 kb és 1,4 kb hosszúságú Hind III, valamint a 3,05 kb Bgl II fragmentum hibridizált. Mivel a többi Bgl II fragmentum nem hibridzál a cDNS klónnal, így a cDNS klón által hordozott exonnak a 3,05 kb Bgl II fragmentumon kell elhelyezkednie. /11. ábra/



12. ábra: λ gLP39.23 klón hasítási térképe a/ EcoR I, b/ Hind III
c/ Bgl II, d/ Xba I, e/ BamH I

A λ gLP 12,1 klón térképezése:

Mivel ez a klón több kis fragmentumot tartalmazott, a 0,8 kb alatti fragmentumok méretét akrilamid gélről olvastuk le.

Hind III:

22 kb^x, 6,5 kb, 4,4 kb^x, 3,1 kb, 2,0 kb, 1,6 kb, 0,82 kb, 0,80 kb, 360 bp, 290 bp, 130 bp.

Hind III + Sal I:

A 6,5 kb fragmentum elhasadt a 4,8 kb vektor fragmentumra és egy 1,7 kb fragmentumra, így ez a jobb kar mellett van. Megjelent egy új 2,92 kb fragmentum, mely így a bal kar mellett foglal helyet/13-14. ábra/.

EcoR I:

20,5 kb^x, 9,8 kb^x, 6,3 kb, 4,0 kb, 2,35 kb.

EcoR I + Sal I:

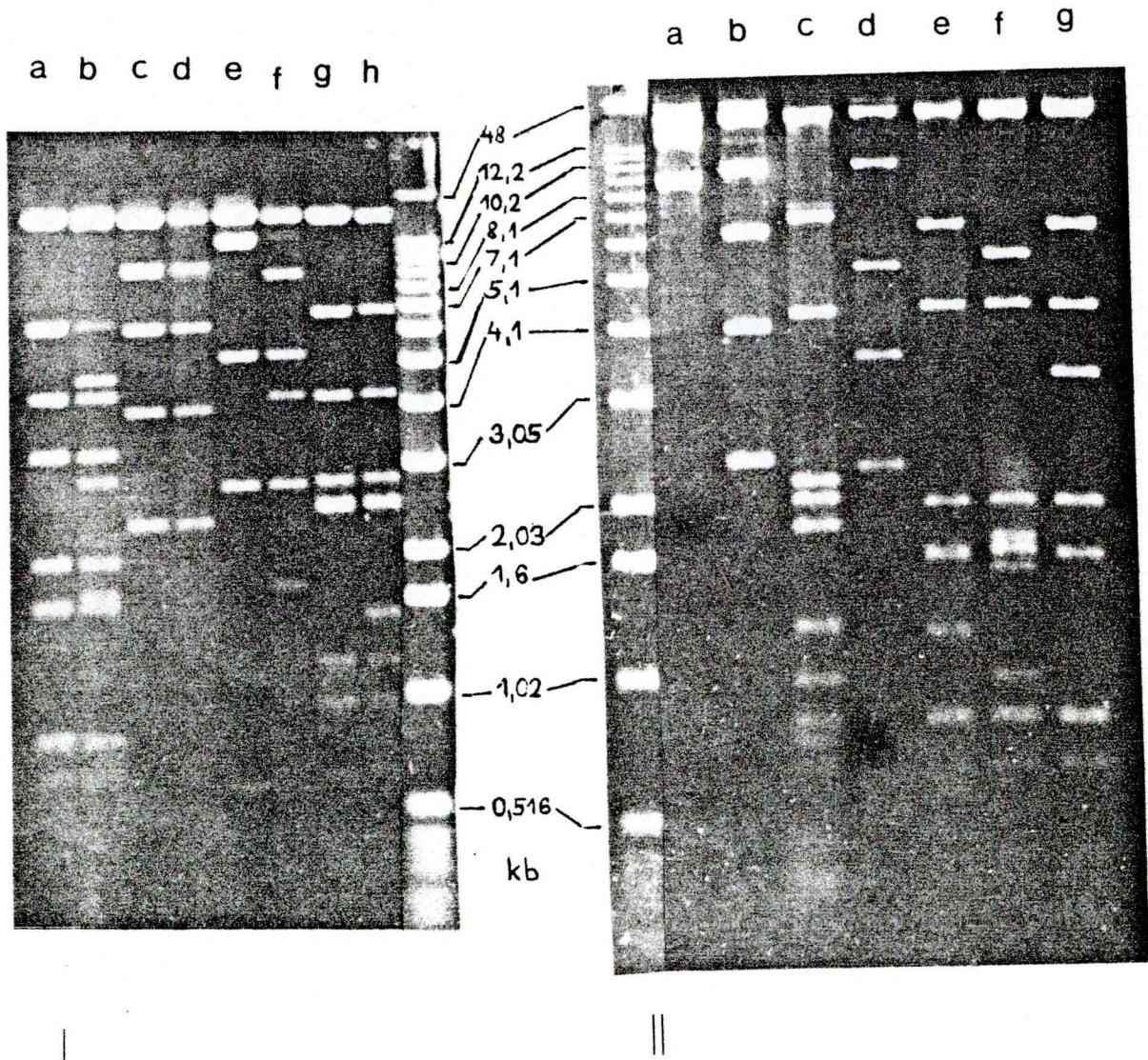
Megjelent egy 1,22 kb és egy 0,6 kb fragmentum. Az 1,22 kb fragmentum a bal kar mellett, a 0,6 kb fragmentum pedig a jobb kar mellett helyezkedik el, mivel az utóbbi a 9,8 kb fragmentumból hasadhatott le. /13. ábra/

BamH I:

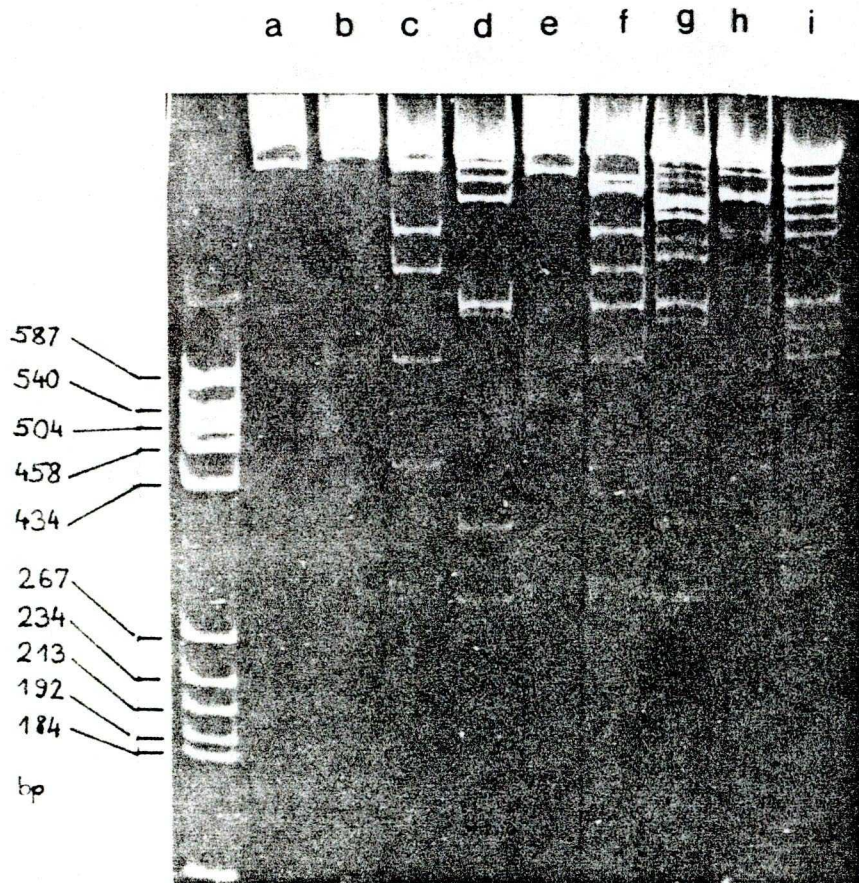
21 kb^x, 13,5 kb^x, 5,4 kb, 2,82 kb, 620 bp.

BamH I + Sal I:

A jobb kar mellett megjelenik egy 4,4 kb fragmentum, mely valószínű a 13,5 kb fragmentumból keletkezett. A másik újonnan megjelenő 1,75 kb fragmentum a bal



13. ábra: λ gLP12.1 klón emésztése
I. a/ Hind III, b/ Hind III + Sal I, c/ EcoR I,
d/ EcoR I + Sal I, e/ BamH I, f/ BamH I + Sal I
g/ Bgl II, h/ Bgl II + Sal I
II. a/ Xho I + Sal I, b/ EcoR I, c/ EcoR I + Bgl II,
d/ EcoR I + BamH I, e/ Hind III + BamH I,
f/ Hind III + EcoR I, g/ Hind III



14. ábra: λ gLP12.1. klón emésztése /4 %-os akrilamid gélen futtatva/ a/ EcoR I, b/ BamH I, c/ Bgl II d/ Hind III, e/ EcoR I + BamH I, f/ EcoR I + Bgl II, g/ EcoR I + Hind III, h/ BamH I + Bgl II, i/ Bgl II + Hind III

kar mellett foglal helyet /13-14. ábra/

Bgl II:

21 kb^x, 7,0 kb^x, 4,4 kb, 2,85 kb, 2,6 kb, 2,5 kb,
1,2 kb^x, 0,95 kb, 0,6 kb, 440 bp^x, 310 bp^x.

Bgl II + Sal I:

Megjelent egy 1,53 kb fragmentum, mely a bal kar mellett van /13-14. ábra/.

BamH I + EcoR I:

20,5 kb^x, 9,8 kb^x, 5,4 kb, 3,8 kb, 2,2 kb, 620 bp,
560 bp, 500 bp.

Mivel az 5,4 kb BamH I fragmentum megtalálható a kettős emésztési termékek között, így az átfedésben kell, hogy legyen a 6,3 kb EcoR I fragmentummal. A kapott 3,8 kb fragment a 4,0 kb EcoR I fragmentból jöhetett csak és ez átfedésben kell, hogy legyen a 4,4 kb BamH I fragmenttel, így tehát ez a jobb oldali 0,6 kb EcoR I fragment mellett van. A 2,2 kb fragmentum a 2,35 kb EcoR I fragmentumból keletkezett és ez átfedésben kell, hogy legyen a 2,82 kb BamH I fragmentummal. A további 2-2 fragmentum sorrendjének megállapításához a 4,4 kb Bgl II fragmentum elhelyezése nyújt segítséget /13-14. ábra/.

Sac I:

22 kb^x, 11 kb, 10,2 kb^x.

Sac I + Sal I:

19,5 kb^x, 11 kb, 9,2 kb^x, 2,55 kb, 0,88 kb.

Látható, hogy a Sac I két helyen vág bele az inszertbe

egy 11 kb hosszú inszert fragmentumot adva. A jobb oldali hasítóhely 0,9 kb-ra van a jobb kartól, a bal oldali 2,55 kb-ra /15. ábra/ 18. ábra/

Sac I + Bgl II:

A 4,4 kb Bgl II fragmentumot elhasítja egy 3,3 kb és egy 1,1 kb darabokra. A 2,6 kb Bgl II fragment pedig elhasadt egy 1,62 kb és egy 0,98 kb fragmentumra.

Ebből tehát látjuk, hogy 2,6 kb Bgl II fragmentum a jobb kar mellett, a 4,4 kb Bgl II fragmentum pedig a bal kar mellett van /15. ábra/.

Sac I + BamH I

21,5 kb^x, 10,2 kb^x, 5,1 kb, 3,3 kb, 2,8 kb, 0,62 kb.

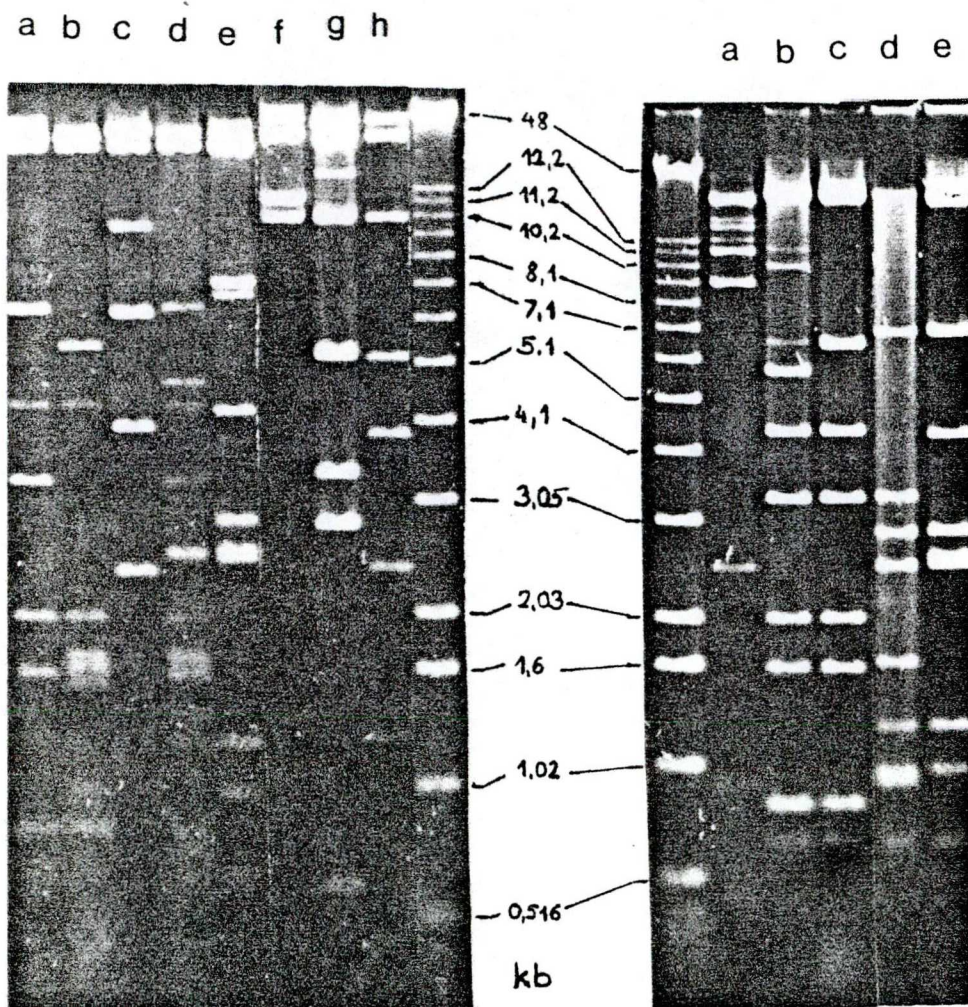
A jobb oldali 4,4 kb BamH I -Sal I fragmentumból hasad ki a 3,3 kb fragmentum. Az 5,4 kb BamH I fragmentum úgy tud csak elhasadni, ha a bal kar és e fragmentum között van a 0,6 kb kis fragmentum. Így tudjuk, hogy a 4,4 kb Bgl II fragmentum átfedésben van az 5,4 kb BamH I fragmentummal. /15. ábra/.

Ezzel a BamH I és EcoR I térképét ismerjük /18. ábra/.

Bgl II + EcoR I:

21 kb^x, 7,0 kb^x, 4,4 kb, 2,15 kb, 2,0 kb, 1,8 kb, 1,2 kb^x, 0,95 kb, 800 bp, 640 bp^x, 450 bp^x, 410 bp, 310 bp, 300 bp^x.

Látjuk, hogy a 4,4 kb Bgl II fragmentum megtalálható.



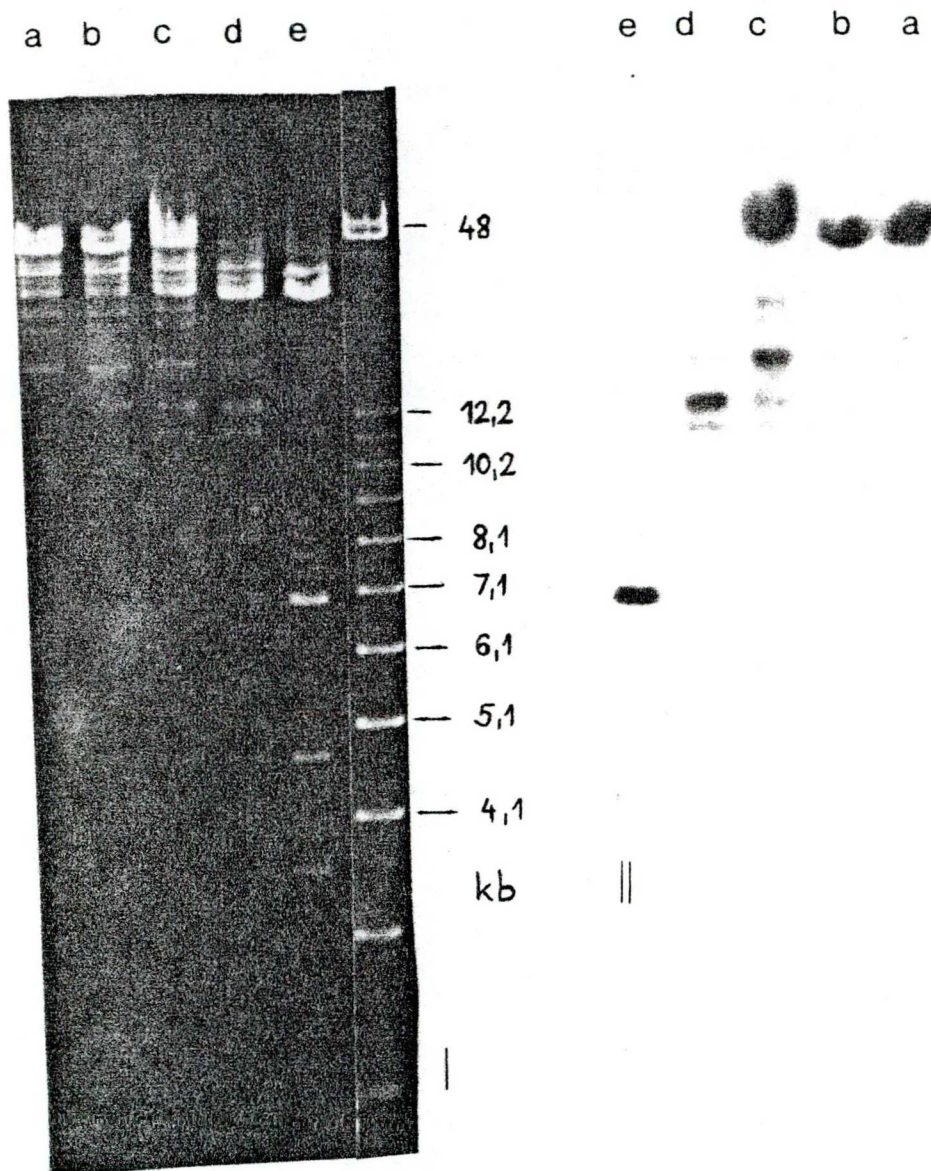
15. ábra: λ GPL12.1 klón emésztése
 I. a/ Hind III, b/ Hind III + EcoR I,
 c/ EcoR I, d/ Hind III + Bgl II,
 e/ Bgl II, f/ Sac I, g/ Sac I + BamH I,
 h/ Sac I + EcoR I
 II. a/ Sac I + Sal I, b/ Sac I + Hind III
 c/ Hind III, d/ Sac I + Bgl II
 e/ Bgl II

A 2,6 kb Bgl II fragmentból a 0,6 kb jobb széli EcoR I hasítóhely a 2,0 kb részt vágta le, a 2,85 kb Bgl II fragmentum egy 1,8 kb és egy 0,8 kb részre hasadt, a 2,5 kb Bgl II fragmentum pedig egy 2,15 kb és egy 410 bp részre darabolódott. Mivel a 4,4 kb Bgl II fragmentumtól éppen 1,8 kb-ra van egy EcoR I hasítóhely./18. ábra/ Így valószínű a 2,85 kb Bgl II fragmentum a 4,4 kb fragmentum mellett van. A 2,5 kb Bgl II fragmentum hasítása pedig úgy lehetséges, ha e fragmentum és a 2,85 kb Bgl II fragmentum között van a kis 410 bp-nyi Bgl II fragmentum /18. ábra/.

Hind III + EcoR I:

21 kb^x, 5,4 kb^x, 4,4 kb^x, 20 kb, 1,7 kb, 1,62 kb, 1,6 kb, 1,55 kb, 1,02 kb, 0,82 kb, 0,8 kb, 370 bp, 290 bp, 130 bp. A kis fragmentumok gyakorlatilag változatlanok, az 1,6 kb és 2,0 kb fragmentum is változatlan. Az 1,02 kb fragmentum a jobb kar mellett 6,4 kb Hind III fragmentumból hasadt le. A 3,1 kb Hind III fragmentum elhasadt az 1,62 és 1,55 kb fragmentumokra. A bal kari nagy fragmentumból származik az 1,7 kb rész.

A fragmentumok sorrendjének meghatározásában nagy segítséget nyújtott a Hind III részleges emésztési kép, amelyet aztán nitrocellulóz filterre blottolva a 4,4 kb Hind III vektor fragmentum próbával hibridizáltunk. A 11 kb körüli résznél / a jobb szélső Hind III hasítóhely mellett/ kis fragmentum különbségeket láttunk:



16. ábra: λ gLP12.1 klón részleges emésztése
Hind III enzimmal
I. a/ 5 perc, b/ 10 perc, c/ 20 perc,
d/ 30 perc, e/ 60 perc
II. Ugyanezen emésztés autoradiogramja
a 4,4 kb Hind III vektor fragmentummal
történő hibridizáció után

0,8 kb, illetve 0,4 kb, ezután majd 3 kb ugrás következik 15,6 kb-ra. Ez azt jelenti, hogy jobbról balra haladva az 1,7 kb fragmentum után egy 0,8 kb, 0,4 kb, majd a 3,1 kb fragmentum következik. Az 1,6 kb és 2,0 kb Hind III fragmentumok tehát a bal oldalon a 6,2 kb EcoR I fragmentummal átfedésben kell, hogy legyenek /16. ábra/

Hind III + Bgl II:

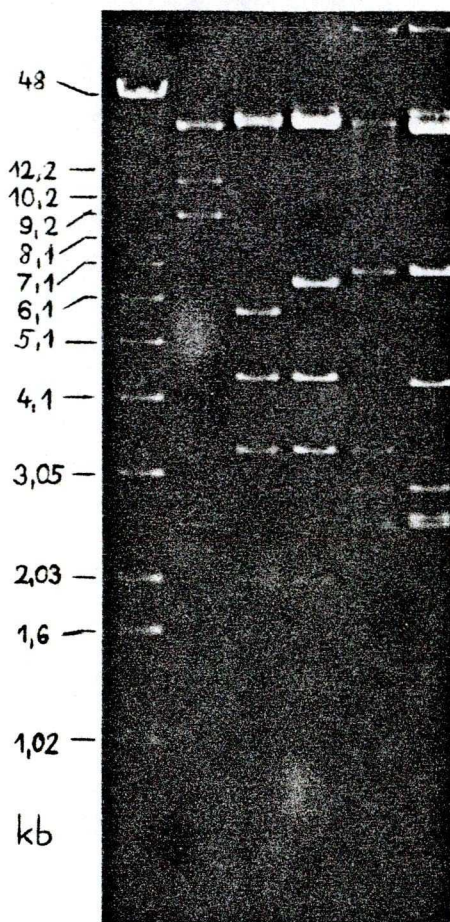
4,4 kb^x, 2,56 kb, 1,72 kb, 1,7 kb, 1,6 kb, 1,35 kb, 1,2 kb^x, 1,1 kb, 0,8 bp, 700 bp, 600 bp^x, 430 bp^x, 350 bp, 290 bp^x, 130 bp.

Az 1,6 kb Hind III fragment változatlanul marad, ha feltételezzük, hogy ez a bal széli fragmentum mellett van - így eddig egyik kettős emésztésben vizsgált enzim sem emészt - és mellette van a 2,0 kb Hind III fragmentum úgy, hogy közte van egy 300 bp kis fragmentum. A 2,0 kb Hind III fragmentum Bgl II hatására elhasad az 1,35 kb és 0,8 kb darabokra. A maradék kis fragmentek így a fennmaradó középső részen helyezkednek el, melyek sorrendjét csak szubklónozás segítségével lehetne megállapítani, így a térképen összesítve tüntettem fel. /13, 14, 18. ábra/

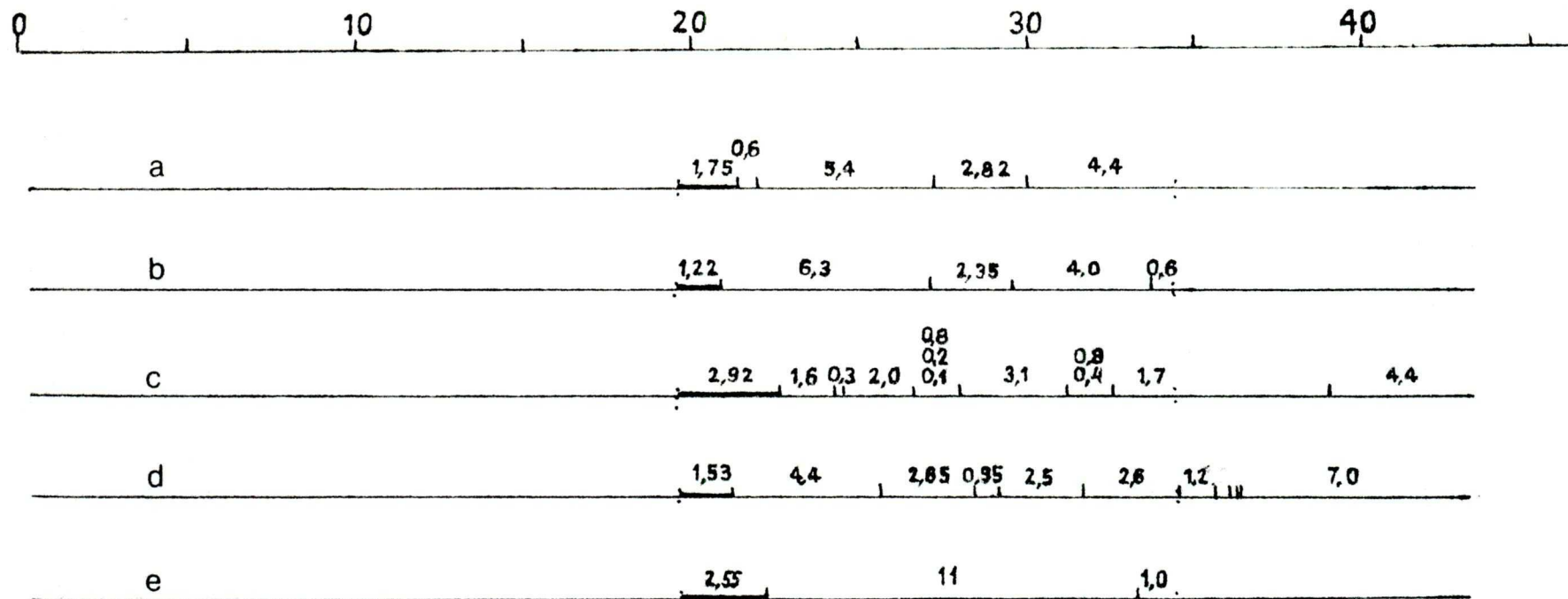
A pLPP4 cDNS klón inszertjével történő hibridizációkor a nagy fragmentumok /20 kb fölötti/ valamint a 2,6 kb Sac I - Sal I fragmentum jelent meg az autoradiogramon /17. ábra/. Ez azt jelenti, hogy az exon egészen a bal kar mellett van /18. ábra/.

a b c d e

a b c d e



17. ábra: I. λ GPL12.1 klón autoradiogramja
pLPP4 cDNA klón ^{32}P jelölt inszertjével
történő hibridizálás után
a/ Sac I + Bal I, b/ Sac I + Hind III
c/ Hind III, d/ Sac I + Bal II,
e/ Bal II
II. Az emésztések gélelektroforetikus
képe hasonló sorrendben.



18. ábra: λ gLP12.1 klón hasítási térképe
a/ BamHI I, b/ EcoRI I, c/ HindIII
d/ BclII, e/ SacI

Eredmények tárgyalása

A porcszövetben sokféle különböző markomolekula található, melyek egymással kölcsönhatásban vannak és így meghatározzák a porcszövet jellemző fizikai-kémiai sajátosságait. Eddig ezt a szövetet kevésbé tanulmányozták, napjainkban azonban előtérbe került.

Munkámban a kapcsoló fehérje génjeit vizsgáltam, melynek genomiális klónjait a laborban állították elő. E klónok közül hármat a λ gLP 39,13, λ gLP 39,23 és λ gLP 12,1, nagy specifitású restrikciós endonukleázokkal emésztettem, mint az EcoR I, BamH I, Hind III, Bgl II, Xba I, Kpn I és Sac I és ezekre az enzimekre meghatároztam a klónok fizikai térképét. Egy-egy emésztési eredmény meghatározására legalább 3 párhuzamos kísérletet végeztem, és az eredmények átlagértékével számoltam. A fragmentumméret meghatározásának hibahatára kb 10 %. Lehetséges, hogy 200 bp-nál kisebb fragmentumok még előfordulnak a térképen, melyet nem detektáltunk. Megállapítottam, hogy a vizsgált enzimek hasítóhelyeinek száma igen nagy variabilitást mutat. A laborban elvégezték más, a kapcsoló fehérje génjét tartalmazó klónok fizikai térképezését, így ezekkel össze tudtam hasonlítani saját eredményeimet. A cDNS próbákkal történő hibridizációs kísérletből megállapítottuk, hogy a klónok inszertjeinek nagyobb része - mintegy 60-80 %-a - intron eredetű. Ez a megállapítás egybevág az elektronmikroszkópos eredményekkel.

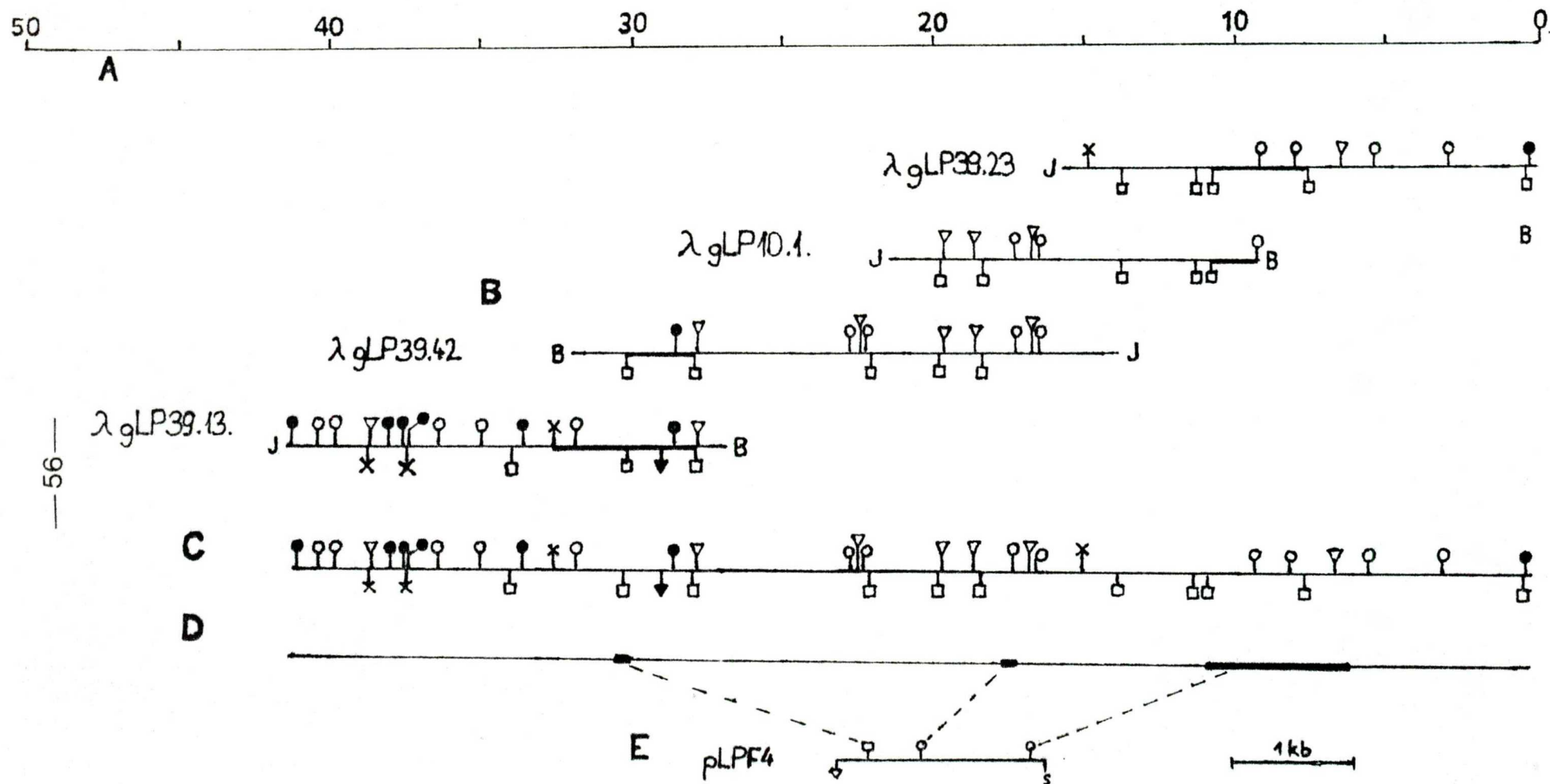
Mivel az általam vizsgált három klón restrikciós térképén nem találtam megegyező szakaszokat, megállapítottam, hogy ezek nem átfedő klónok. Más klónokkal viszont találtam átfedéseket, melyeket összerakva mintegy 42 kb-os génszakasznak ismertük meg a fizikai térképet /19. ábra/. Ez a szakasz három exont és négy intront tartalmaz, az exonok mérete 2-4,5 kb. A klónok átfedő részei a 19. ábrán láthatók.

A λ gLP 39,23 klón inszertje a jobb kar közelében 6,4 kb-on átfed a λ gLP 10.1 klón bal oldalával. A közös fragmentumok a következők: 1,4 kb Hind III - Bgl II /exont tartalmaz/, 0,5 kb Bgl II, 2,4 Bgl II. Ezen a szakaszon belül egyik klónban sincs EcoR I, illetve BamH I hasítóhely.

A λ gLP 10,1 klón 7,8 kb hosszú jobb oldala átfed a λ gLP 39,42 klón jobb oldalával: 1,9 kb és 1,9 kb EcoR I, 2,1 kb, 1,3 kb és 4,6 kb Bgl II, 0,86 kb Hind III a közös fragmentek.

A λ gLP 39,42 klón bal oldala 5,2 kb hosszan átfed a λ gLP 39,13 klón bal oldalával: 2,2 kb Bgl II, 0,6 kb és 1,7 kb BamH I - Bgl II és 0,8 kb BamH I - EcoR I fragmentek közösek. Hind III hely egyik klónban sem található ezen a szakaszon.

A jelölt pLPF4 cDNS klón inszertjével a következő fragmentumok hibridizáltak: λ gLP 39,13 klónból az 5,4 kb Hind III, a 2,2 kb és 3,9 kb Bgl II, 10,7 kb EcoR I, 6,0 kb Xba I - Sal I fragmentum, λ gLP 39,23 klónból 1,4 kb és 11 kb Hind III fragmentum 9,0 kb



19. ábra: Csirke porc kapcsoló fehérje hasítási térképe. A/ kilobázis skála, B/ genomiális klónok átfedése, hasítási térképük, C/ összesített hasítási térkép, D/ exonok helyzete az elektronmikroszkópos vizsgálatok alapján, E/ pLPP4 klón inszertjének térképe. $\square$ Bgl II, $\bullet$ BamH I, ∇ EcoR I, $\circ$ Hind III, $\times$ Xba I, $\blacktriangledown$ Kpn I,

EcoR I - Sal I fragmentum és a 3,05 kb Bgl II fragmentum, λ gLP 12,1 klónból az 1,75 kb BamH I - Sal I az 1,22 kb EcoR I - Sal I, 2,92 kb Hind III - Sal I, az 1,53 kb Bgl II - Sal I fragmentumok.

A λ gLP 39,13 klónban a legkisebb hibridizáló fragmentum a 4,8 kb EcoR I - Xba I fragmentum /7. ábra/.

Ez a DNS szakasz hordoz egy Bgl II hasítóhelyet, melyet megfeleltethetünk a pLPF4 cDNS klón inszertjében található Bgl II hasítóhellyel, mivel az elektronmikroszkópos vizsgálatok is arra utalnak, hogy az exon a genomiális DNS szakaszon a Bgl II hasítóhely körül helyezkedik el /19. ábra/.

A λ gLP 39,23 klónban a legkisebb hibridizáló fragmentum a 3,05 kb Bgl II fragmentum. Ez a DNS szakasz tartalmaz egy Hind III hasítóhelyet /12. ábra/, mely megfeleltethető a cDNS-en található jobb oldali Hind III hasítóhelynek, mivel az elektronmikroszkópos vizsgálatok szerint az exon a genomiális DNS-nek ennek a szakaszára esik /19. ábra/. Ez az exon 4,8 kb hosszú, de a használt cDNS klón csak a bal oldali, kb. 1 kb-os szakaszát hordozza.

A λ gLP 12,1 klónnal nem találtunk átfedő klónokat, a korábbi elektronmikroszkópos eredményekből azonban tudjuk, hogy ez a szakasz a gén 5' végénél helyezkedik el.

Összefoglalásképpen megállapíthatjuk, hogy a λ gLP39.13 , λ gLP39.23 és a λ gLP 12,1 klónok fizikai térképét ismerjük, mintegy 5-6 nagy specifikációs restrikciós endonukleázra. Ezek a klónok nem átfedő klónok, viszont más a laborban megtérképezett klónokkal átfedésbe hozhatók illetve sorbarakhatók, s az exonok az inszerteknek igen kis százalékát teszik ki.

Irodalomjegyzék

1. Stockwell, R. A.: /1979/ Biology of cartilage cells, Cambridge University Press, Cambridge
2. Caplan, A. I.: /1984/ Sci. Am. 251: 82-91
3. Bornstein, P. and Traub, W.: /1979/ The chemistry and biology of collagen pp 411-632 Academic Press, New York
4. Heinegard, D. and Paulsson, M.: /1984 / Structure and metabolism of proteoglicans, Elsevier North Holland, New York pp 277-328
5. Hardingham, T. E. and Muir, H.: /1972/ Biochem. Biophys. Acta 279: 401-405
6. Hascall, V. C. and Heinegard, D.: /1974/ J. Biol. Chem. 249: 4232-4241
7. Rosenberg, K., Hellmann, W. and Kleinschmidt, A. K.: /1975/ J. Biol. Chem. 250: 1877-1883
8. Thag, L.-H., Rosenberg, L., Reiner, A. and Poole, A. R.: /1979/ J. Biol. Chem. 254: 10523-10531
9. Oegema, T. R., Jr. Brown, M. and Dziwviatkozvsky, D. P./1977/ J. Biol. Chem. 252: 6470-6477
10. Caterson, B. and Baker, J.: /1978/ Biochem. Biophys. Res. Comm.
11. McKeown-Longo, P.J., Sparks, K. J. and Goetinck, P. F.: /1982/ Coll. Rel. Res. 2: 231-244



12. Deák, F., Kiss, I., Sparks, K. J., Argraves, W. S.,
Hampikian, G. and Goetinck, P. F.: /1985/
/közlés alatt/
13. Neame, P. J., Perin, J. P., Bonnet, F., Christner,
E., Jolles, P. and Baker, J. R.: /1985/
J. Biol. Chem. 260: 12402-12404
14. Paulsson, M. and Heinegard, D.: /1981/ Biochem. J.
197: 367-375
15. Deák, F., Argraves, W. S., Kiss, I., Sparks, K. J.
and Goetinck, P. F.: /1985/ Biochem. J.
229: 189-196
16. Frischauf, A.-M., Lehrach, H., Foustka, A. and
Murray, N.: /1983/ J. Mol. Biol. 170:
827-842
17. Maniatis, T., Fritsch, E. F., Sambrook, J.: /1982/
Molecular Cloning: A Laboratory Manual
/Cold Spring Harbor Lab./
18. Southern, E. M.: /1975/ J. Mol. Biol. 98: 503-517
19. Maniatis, T., Jeffrey, A. and Kleid, T. G.: /1975/
Proc. Nat. Acad. Sci. US 72: 1184-1188

