

OTKA F037331 Zárójelentés 2006.

***In situ* hibridizáció különböző módszereinek adaptálása és továbbfejlesztése búza genetikai alapanyagok elemzésére**

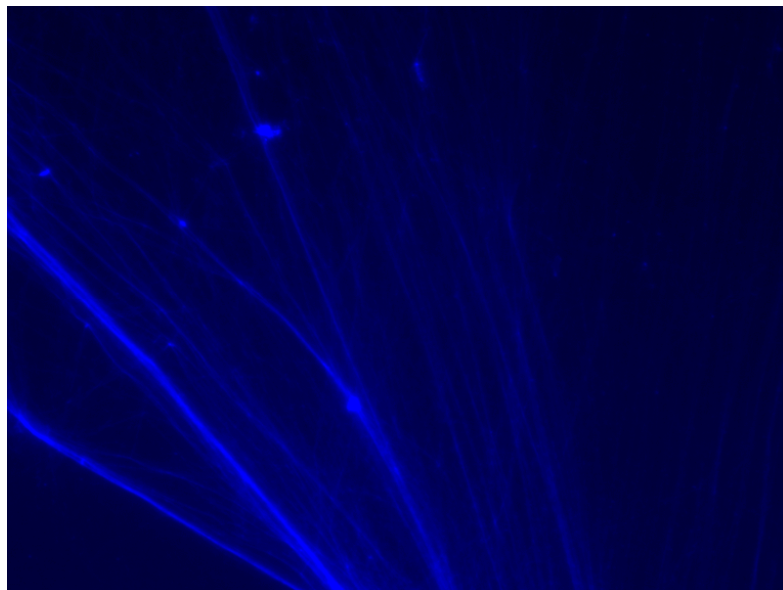
Kísérleteinkben célul tűztük ki a transzgének kimutatására alkalmas *in situ* hibridizációs módszerek adaptálását és továbbfejlesztését. Munkánk során különböző technikai módosításokat alkalmaztunk. Bevezettük a PRINS- primed *in situ* módszert, amelyben PCR készülékben történik az *in situ* hibridizáció teljes folyamata. A technika a PCR készülékre ráhelyezhető tárgylemez adapter limitált helykapacitása, valamint a DNS próbák egyidejű alkalmazásának akadályai miatt nem bizonyult hatékonynak. Az általunk felszaporított GAA trinukleotid szekvencia *in situ* hibridizációs próbaként történt jelölését követően alkalmassá vált az *Aegilops biuncialis* kromoszómák elemzésére. Tervünk volt a korábban a martonvásári molekuláris citogenetika csoportban előállított búza-*Ae. biuncialis* hibridekben és származékaikban genomikus *in situ* (GISH) hibridizációval a két faj kromoszómáinak megkülönböztetése. Kidolgoztuk a GISH optimális körülményeit és kísérleteink során sikerült elkülönítenünk a búza és az *Ae. biunciális* genomokat a módszer segítségével. Kiemelt célunk volt csoportunkban a fiber-FISH technika bevezetése. A módszert sikerrel elsajátítottuk és megkezdtuk alkalmazását és tesztelését transzgénikus búza és burgonya vonalakon.

1. Fiber-FISH technika alkalmazásakor linearizált DNS szálakon történik az *in situ* hibridizáció. A csupasz, kevésbé kondenzált DNS szálakon 1000 bp-nál rövidebb, jelölt DNS szekvenciák is kimutathatók. A módszer alkalmazása egy lehetséges megközelítés beépült alacsony kópiaszámú vagy egyedi idegen gének és vektor szekvenciák kópiaszámának és helyzetének meghatározására genetikailag transzformált növényekben. A fiber-FISH technika kiválóan alkalmas expressziós és egyéb kromoszóma specifikus markerek (pl. RFLP), valamint nagyobb kromoszóma fragmenteket tartalmazó klónok (pl. BAC, YAC) fizikai térképezésére.

A módszer elsajátítása során első feladatunk az *in situ* hibridizációra alkalmas preparátumok elkészítése volt, melyhez különböző módszereket használtunk.

A DNS szál preparátumok készítésekor első lépésben az izolált DNS és sejtmag alapú eljárásokat alkalmaztunk, ami a nemzetközi irodalomban legelterjedtebb módszertani megközelítés. Az izolált DNS alapú technika esetében a preparátumkészítést DNS izolálás előzi meg valamely általánosan alkalmazott protokoll alapján, míg a sejtmag alapú

megközelítés esetében Fransz és munkatársai (1996) által kidolgozott módszert követtük, kisebb módosításokkal. A sejtmagizolálást követően a különböző sejt és szövet törmelékeket egy csökkenő pólus méretű filter sorozaton (200 - 20 μ m) átszűrve távolítottuk el, majd az oldat sejtmag koncentrációját DAPI-val történt festés után fluoreszcens mikroszkóp alatt ellenőriztük. A későbbiekben mindkét módszer esetében néhány μ L DNS ill. sejtmag szuszpenziót fixáltunk a tárgylemezeken, amit egy néhány perces SDS-t, EDTA-t és Tris-t tartalmazó lízis pufferben történő inkubáció követett a kromatin szerkezet fellazítása érdekében. Az inkubációt követően a tárgylemez 45°-os szögben történt megdöntésével és a puffer csepp elmozdulásával nyújtottuk ki a DNS szálakat. A DNS szálak fixálása érdekében a preparátumokat abszolút alkohol:jégetet 3:1 arányú elegyével kezeltük, amit egy 60°C-on, 30 percig történt inkubáció követett. A minták 4°C-on tárolhatók az *in situ* hibridizációig (1. ábra)

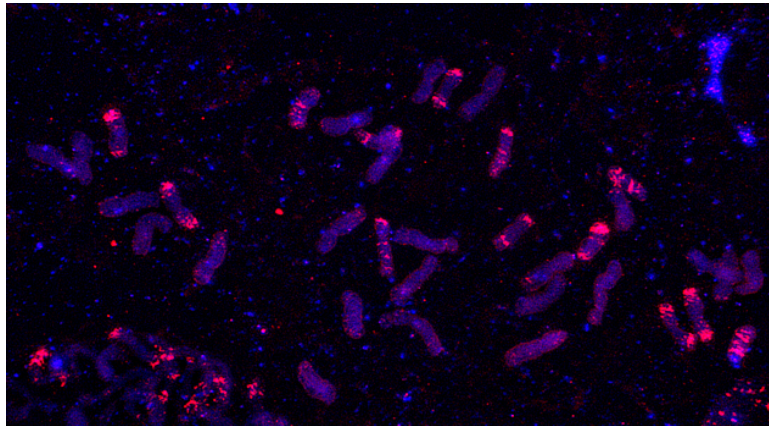


1. ábra. A Dx5 génkonstrukcióval transzformált búza genotípus sejtmagjaiból készített DNS fiber szálak DAPI-val festve.

A flow-sorted kromoszóma alapú DNS szál preparátumok előnye abban rejlik, hogy csak a genom adott kromoszómáit izoláljuk, ami egyszerűbbé teszi a célszekvenciák pontosabb lokalizációját a genomban. Munkánk során együttműködtünk a Dr. Jaroslav Dolezel által vezetett olomouc-i (Csehország) Citogenetikai és Flow-citometriai kutatócsoporttal. A preparátumok készítés során Proteinase K kezelés segítségével eltávolítottuk a

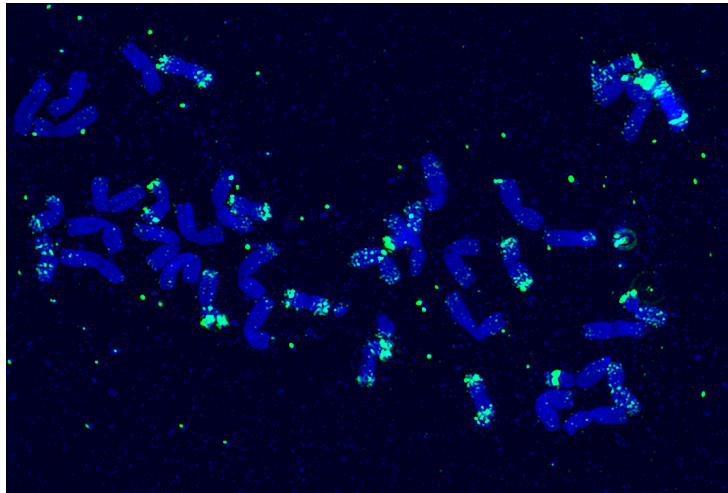
tárgylemezeken lokalizált metafázisos kromoszómák fehérje alkotórészeit, ami a kromatin szerkezet dekonzenzációját, fellazulását eredményezte. Az így kialakult kromatin szerkezet már lehetővé tette, hogy belőlük mechanikai nyújtás segítségével egyedi DNS szálakat különítsünk el.

Miután sikerrel elsajátítottuk a preparátumkészítés különböző módszereit, megkezdtük a pHMW1Dx5 transzgén konstrukció tesztelését egy, a kísérleteinkhez rendelkezésünkre bocsátott transzformált búzafajtával. A teljes konstrukció, amely ~11Kb hosszúságú, tartalmazza a mintegy 2.4Kb hosszúságú Dx5 gént. Előkísérleteket végeztünk osztódó gyökércsúcsból készített metafázisban lévő kromoszómákon és több kromoszómán jellegzetes mintázatot figyeltünk meg *in situ* hibridizáció után. Ez egyértelműen igazolta számunkra, hogy a gén repetitív szakaszokat tartalmaz (2. ábra).



2. ábra. Egy a Dx5 génnel transzformált búzafajta metafázisban lévő kromoszómái *in situ* hibridizáció után. Próbaként a teljes konstrukciót alkalmaztuk, amelyet biotinnal jelöltünk, a kromoszómákat DAPI-val kontrasztfestettük.

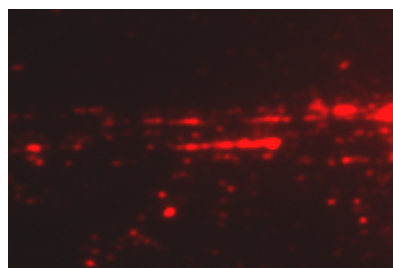
Ezt követően arra koncentráltunk, hogy olyan próbát állítsunk elő, amely a lehető legkevesebb repetitív DNS szakaszt hordozza. Próbát állítottunk elő az M13 primerpár felhasználásával és az inzertet használtuk jelölt próbaként. Az eredmény a teljes konstrukcióval történt hibridizációval meglehetősen hasonló mintázatot mutatott (3. ábra).



3. ábra.. Egy a Dx5 génnel transzformált búzafajta metafázisban lévő kromoszómái *in situ* hibridizáció követően, ahol az M13 primerpár felhasználásával előállított, fluorogreennel jelölt próba zöld hibridizációs jeleket mutat a DAPI-val kontrasztfestett kromoszómákon.

Ezek után különböző primerkombinációkat terveztünk: a Dx5 génkódoló régióra specifikus (A), az 5' határoló régió specifikus (B), valamint a kódoló régió 3' vég + 3' határoló régió specifikus (C) összeállításban. Az *in situ* hibridizáció során mindössze a C primerkombinációval előállított termékből készített próba adott értékelhető jeleket metafázisban lévő kromoszómákon.

A C primerkombinációval előállított próbával ezt követően fiber-FISH-t végeztünk. A felvételen megfigyelhető a kihúzott DNS szálon a biotinnal jelölt próba elhelyezkedése (4. ábra).



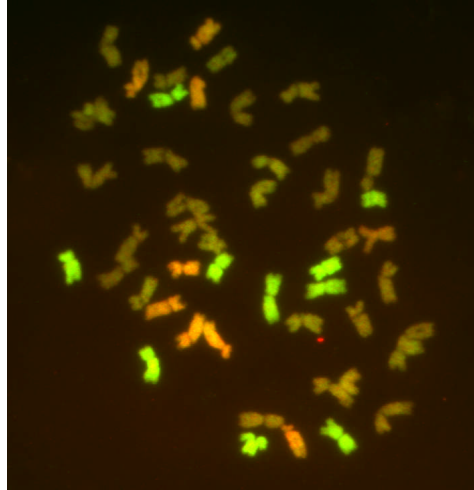
4. ábra. A C primerkombinációval előállított próbával történt fiber-FISH, ahol több biotinnal jelölt, próbaként alkalmazott DNS szakasz is megfigyelhető.

Sajnálatos módon belső kontroll DNS klón hiányában eddig nem sikerült meghatározni a beépült Dx5 gén pontos lokalizációját és kópiaszámát. A kontrol DNS próba általában egy

olyan egyedi, unikális szekvenciát tartalmazó DNS szakasz (pl. BAC klón), amely pontos fizikai helyét ismerjük a genomban az adott kromoszómán. A búza genomjában napjainkig kevés ilyen szekvencia ismert és kísérleteinkhez ezeket nem tudtuk felhasználni. Nagyon fontos eredmény azonban, hogy a célkitűzésünkben szerepelt fiber-FISH technikát adaptáltuk laboratóriumunkban. Többféle módszert dolgoztunk ki a preparátumkészítésre, majd a fiber-FISH technikát sikerrel alkalmaztuk transzgenikus búza és burgonya vonalakon.

2. Idegen fajból származó kromoszómák kimutatására a búza genomjában az egyik legalkalmasabb módszer a GISH. A célul kitűzött, búza-*Ae. biuncialis* hibridek utódaiban az *Aegilops* kromoszómák kimutatásához teljes genomikus DNS-t izoláltunk búza és *Ae. biuncialis* növényekből. Az *Ae. biuncialis* DNS-t ultrahangos ill. enzimatis úton történt fragmentálást követően Nick transzlációval jelöltük, a forralással ill. ultrahanggal hasított búza DNS-t blokkolóként alkalmaztuk. A blokkoló DNS szerepe abban áll, hogy csökkentse ill. megakadályozza a vizsgált fajok közötti kereszthibridizációt. A kísérletekben felhasznált próba és blokkoló DNS aránya függ a két faj genetikai távolságától, azaz a fajok közötti homológ DNS szekvenciák arányától.

Első kísérleteink a jelölt próba DNS/blokkoló DNS arány optimalizálására irányultak. Ennek során a blokkoló DNS arányát 1:30 és 1:130 között változtattuk. Egyes kísérletekben a nagyobb érzékenység érdekében az *Ae. biuncialis* (UUMM) DNS helyett annak diploid ősei, az *Ae. umbellulata* (UU) és az *Ae. comosa* (MM) teljes genomikus DNS-ét használtuk jelölt próbaként. A búza-*Ae. biuncialis* GISH feltételeinek optimalizálásához búza-*Agropyron elongatum* hibridek utódait vizsgáltuk GISH-el. Az *Ae. elongatum* filogenetikailag közelebb áll a hexaploid búzához, mint a rozs és az árpa genomok, de távolabb, mint az *Ae. biuncialis*. Az *Agropyron* kromoszómák kimutatása GISH-el segítségünkre szolgált a későbbiek során az *Ae. biuncialis* kromoszómák kimutatásának tökéletesítéséhez a búza genomjában (5 ábra).

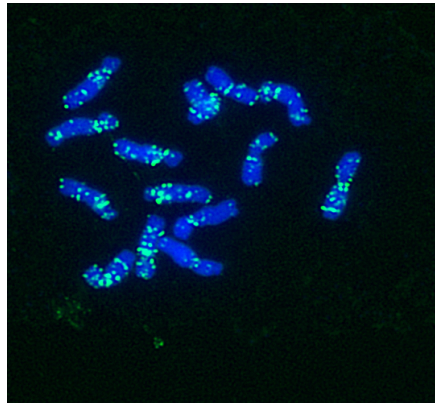


5. ábra. A *Triticum aestivum*-*Aegilops biuncialis* hibrid utódaiból létrehozott amfiploid sejtrészlete. Próbaként *Ae. biuncialis* DNS-t alkalmaztunk, a metafázisban lévő kromoszómák közül az *Ae. biuncialis* kromoszómák fluorogreennel jelöltek, a búza kromoszómáit promidium jodiddal kontrasztfestettük.

A próbaként használt *Agropyron* DNS-t és a búza genomjából származó, blokkolóként alkalmazott DNS-t ultrahangos szonikálással fragmentáltuk. A hexaploid búzablokkoló DNS-t 1:100 valamint 1:150 arányban bizonyult a legmegfelelőbbnek. A hibridizáció előtt ún. pre-annealinget hajtottunk végre. Ennek során a homológ DNS szakaszokon a próba és a blokkoló DNS szekvenciái összekapcsolódtak, így a tényleges hibridizáció folyamán csökkent az interspecifikus hibridizáció a két faj kromoszómái között. Kísérleteink eredményeként a BE1 *T. aestivum* × *A. elongatum* részleges amphiploid 56 kromoszómája közül 14 intenzív festődést mutatott, ami arra utalt, hogy ezek a kromoszómák az *A. elongatum*-ból származtak. Ezt követően újabb GISH kísérleteket végeztünk a búza-*Ae. biuncialis* hibridek utódaiban és sikerült elkülönítenünk a búza és az *Ae. biuncialis* genomok kromoszóma készletét.

Az *Ae. biuncialis* kromoszómák kimutatása lehetséges egyes repetitív DNS szekvenciák specifikus hibridizációs kromoszóma mintázata alapján is. Szakirodalmi adatok alapján ismert, hogy a GAA trinukleotid szekvenciák előfordulása gyakori a *Triticeae* tribushoz tartozó fajok genomjában, ezért kiválóan alkalmasak az egyes fajok kromoszómáinak azonosítására. A pályázat keretében - mint alternatív kromoszómaazonosítási út - elvégeztük a GAA trinukleotidokban gazdag szekvenciák, mint fluoreszcens *in situ* hibridizációs próbák előállítását és tesztelését. A FISH próbát két, egymást követő PCR reakció segítségével állítottuk elő. Első lépésben az *Ae. biuncialis* egyik diploid ősének, az *Ae. umbellulata*-nak genomikus DNS-ét használtuk templátként és a megfelelő primerek segítségével GAA gazdag

DNS szekvenciákat szaporítottunk fel. A második PCR reakció során fluorescein 12-dUTP jelenlétében, a GAA szekvenciák tovább szaporítása mellett a reakciótermék fluorokrómmal való jelölése is megtörtént. Az így előállított FISH DNS próba alkalmas lehet a búza-*Ae. biuncialis* hibridek utódaiban az *Ae. biuncialis* U genomhoz tartozó kromoszómáinak megkülönböztetésére és azonosítására (6 ábra).



6. ábra. *Aegilops umbellulata* (UU) metafázisban lévő kromoszómáin a GAA trinukleotid próbát fluorogreennel jelöltük, a kromoszómák DAPI-val kontrasztfestettek.

Fransz, P., Alonso-Blanco, C., Liharska, T.B., Peeters, A.J.M., Zabel, P., de Jong, H. (1996). High-resolution physical mapping in *Arabidopsis thaliana* and tomato by fluorescence *in situ* hybridization to extended DNA fibers. *Plant J.* 9: 421-430.