



Tillverkning av DNA-konstrukt med hjälp av enzymatiska metoder

Kandidatarbete inom civilingenjörsprogrammet Bioteknik

EMELIE ANDERSSON, JOHANNES BORGQVIST
JAUQULINE NORDQVIST, CHRISTOFFER SUNDSTRÖM
AMANDA VÄSTERNÄS & MARIA ÅSTRÖM

Handledare: Björn Åkerman, Niklas Bosaeus & Lu Sun

Examinator: Nikola Marković

Förord

Ett stort tack vill vi rikta till våra handledare, Björn Åkerman, *biträdande professor på avdelningen för Fysikalisk kemi vid Chalmers Tekniska högskola*, Niklas Bosaeus, *doktorand på avdelningen för Fysikalisk kemi vid Chalmers Tekniska Högskola* och Lu Sun, *doktorand på avdelningen för Fysikalisk kemi vid Chalmers Tekniska Högskola*, för deras stora engagemang och tålamod för vårt kandidatprojekt. Utan er hade det inte varit möjligt. We want to thank Verena Siwers, *PostDoc at the System Biology group at Chalmers University of Technology* for taking the time to help us running our PCR application. Further we want to thank Piotr Hanczyc, *PhD student at the division of Physical chemistry at Chalmers University of Technology*, for assistance with various tasks regarding our spectroscopy measurements.

Framsida: DNA-konstrukt fäst mellan två polystyrenkulor. DNA-handtag syns i svart, överlapps-sekvenser i blått samt kärna i ljus- och mörkrött.

Sammandrag

Mekaniska studier av enskilda DNA-molekyler i en optisk pincett har visat att vid ett kraftintervall nära 65 pN genomgår dubbelsträngat DNA en fas av reversibel bistabilitet, vilket innebär att dess konformation alternerar mellan B- och S-form. Kraftintervallet varierar dock mellan mätningar av olika "individer" av samma DNA-molekyl, vilket antas bero på att längden av de befintliga DNA-handtagen på cirka 40 baser är för kort. När dessa DNA-handtag används i den optiska pincetten förmodas de orsaka så kallade ändeffekter. Av den anledningen var projektets syfte att tillverka DNA-handtag för att dels minimera eventuella ändeffekter och dessutom studera den reversibla bistabiliteten. Ett cirkulärt enkelsträngat genom från bakteriofagen Φ X174 bestående av 5386 baser användes som utgångsmaterial till DNA-handtagen.

Problemställningen bestod inledningsvis i att erhålla linjära DNA-molekyler från det cirkulära Φ X174-genomet. Dessa skulle därefter hybridiseras och ligeras till den dubbelsträngade DNA-molekylen av intresse. Dessutom behövde de linjära DNA-molekylerna märkas in med affinitetstaggar för att kunna fästas till polystyrenkulor. Slutligen skulle det tillverkade konstruktet analyseras i den optiska pincetten.

Den slutgiltiga verifikationen av de framställda DNA-konstrukten visade att då kraften 60 pN applicerades på DNA-konstrukten gick kraften snabbt ner till 0 pN. Kraftminskningen tyder på att DNA-konstruktet inte längre var sammanlänkat mellan de båda polystyrenkulorna. Därmed kunde fenomenet reversibel bistabilitet inte studeras. Det kunde däremot bekräftas, då det gick att applicera en kraft på konstruktet, att de tillverkade DNA-handtagen var betydligt längre än de tidigare använda.

Anledningen till att den reversibla bistabiliteten aldrig kunde studeras antas bero på att kärnsekvensen inte hybridiserade. Att det ändå applicerats kraft på långa enkelsträngade DNA-molekyler i den optiska pincetten antas bero på att DNA-handtagen hybridiserade med varandra.

Design of DNA constructs using enzymatic methods

Abstract

Mechanical studies of single DNA molecules in an optical tweezer have shown that in an interval close to 65 pN, double stranded DNA undergoes a phase of reversible bistability, which means that its conformation alternates between B and S form. The force range varies between measurements of different "individuals" of the same DNA molecule, probably due to the fact that the length of the existing DNA handles of about 40 bases are too short. When force is applied on these DNA handles in the optical tweezer, so called end effects are believed to occur. The aim of this project was therefore to design long DNA handles in order to minimize possible end effects and simultaneously investigate the reversible bistability. The starting material used to create the DNA handles was the circular single stranded genome of the bacteriophage Φ X174, which consists of 5386 bases.

Initially, the assignment was to obtain linear DNA molecules from the circular Φ X174 genome. The linear DNA molecules were then hybridized and ligated to each end of the double-stranded DNA molecule of interest. Furthermore, the linear DNA molecules had to be tagged with affinity markers in order to become attached to polystyrene beads. Finally, the construct was to be analysed in the optical tweezer.

The final verification of the DNA constructs obtained, showed that when a force of 60 pN was used to stretch the DNA constructs, the force rapidly went down to 0 pN. The decrease in force suggests that the DNA construct was no longer interconnected between the two polystyrene beads. However, since it was possible to exert a force on the DNA construct the DNA handles could be proven to be longer than those previously used.

Due to the fact that the core sequences could not hybridize, the reversible bistability could not be studied. Nevertheless, force was applied on long single stranded DNA molecules in the optical tweezer and this result is perhaps explained by the hypothesis that the two DNA-handles have hybridized with each other .

Begreppslista

Anti-DIG	Anti-digoxigenin. Antikropp med affinitet till antigenet DIG.
APS	Ammoniumpersulfat, initiator i polymeriseringen av polyakrylamidgeler.
DIG	Digoxigenin. Antigen som binder med affinitet till antikroppen anti-DIG.
DNA	Deoxyribonukleinsyra. Organisk molekyl som innehåller den genetiska koden.
DNA-handtag	Oligonukleotidsekvens skapat utifrån virusgenomet Φ X174. DNA-handtaget är inmärkt med affinitetstaggar på dess 3'-ände. DNA-handtaget är också komplementär mot överlappssekvensen hos kärnan vid dess 5'-ände.
DNA-konstrukt	Två DNA-handtag tillsammans med kärnan och överlappssekvenser. Se Figur 1-1.
dNTP	Deoxyribonukleotid trifosfat. Nukleotiden (N) utgörs av adenin(A), tymin (T), cytosin (C), guanin (G) eller uracil (U).
Kärna	Benämning på de biomolekyler som studeras med hjälp av en optisk pincett som i detta projekt utgörs av dubbelsträngat DNA. Se vidare Figur 1-1.
NAD ⁺	Nikotinamidadenindinukleotid. Molekyl som fungerar som kofaktor till många enzym, till exempel DNA-ligas.
PCR	Polymeraskedjereaktion (Eng. <i>Polymerase Chain Reaction</i>). Metod för amplifiering av DNA.
PCR-komplement	Enkelsträngad oligonukleotid som innehåller en kärnsekvens komplementär till PCR-oligos kärnsekvens och överlappssekvens som är komplementär mot ett av DNA-handtagen tillverkade med PCR-metoden.
PCR-oligo	Enkelsträngad oligonukleotid som innehåller en kärnsekvens komplementär till PCR-komplementets kärnsekvens och överlappssekvens som är komplementär mot ett av DNA-handtagen tillverkade med PCR-metoden.
PCR1	Linjär DNA-sekvens komplementär till Φ X174-genomet framtagen med hjälp av PCR med Primer1.
PCR2	Linjär DNA-sekvens komplementär till Φ X174-genomet framtagen med hjälp av PCR med Primer2.
Permutation	Permutation definieras i detta projekt som två olika linjära sekvenser som kommer från samma cirkulärvirusgenom.
Φ X174	Ett bakteriellt virus (bakteriofag) med enkelsträngat cirkulärt genom.
Primer	Oligonukleotidsekvens (~20 baser) komplementär till enkelsträngat DNA för att ange start för elongering av ett polymeras.
Primer1	25 nukleotider lång primer som används i PCR-metoden. För sekvens se bilaga B.
Primer2	25 nukleotider lång primer som används i PCR-metoden. För sekvens se bilaga B.
PsiI-primer	25 nukleotider lång primer som, då den hybridiserat till Φ X174-genomet, genererar en palindromsekvens för restriktionsenzymet <i>Psi</i> I. För sekvens se bilaga B.
<i>Psi</i> I	Restriktionsenzym som känner igen palindromsekvensen TTATAA. Klipper jämna ändar mitt i palindromsekvensen.

RE	Restriktionsenzym. Enzym som bryter fosfodiesterbindningar i DNA-strängars ryggrad. Se vidare avsnitt 2.2.1
RE-komplement	Enkelsträngad oligonukleotid som innehåller en kärnsekvens komplementär till RE-oligos kärnsekvens och överlappssekvens som är komplementär mot ett av DNA-handtagen tillverkade med RE-metoden.
RE-oligo	Enkelsträngad oligonukleotid som innehåller en kärnsekvens komplementär till RE-komplementets kärnsekvens och överlappssekvens som är komplementär mot ett av DNA-handtagen tillverkade med RE-metoden.
RE1	Linjär DNA-sekvens av Φ X174-genomet framtagen med PsiI-Primer.
RE2	Linjär DNA-sekvens av Φ X174-genomet framtagen med StuI-Primer.
Reversibel bistabilitet	Fenomenet när dubbelsträngat DNA alternerar mellan B- och S-form, vilket förekommer då dubbelsträngat DNA sträcks med krafter runt 65 pN.
Stacking	Icke kovalenta interaktioner mellan aromatiska ringar såsom kvävebaserna i DNA.
StuI-primer	25 nukleotider lång primer som innefattar, då den hybridiserat till Φ X174-genomet, en palindromsekvens för restriktionsenzymet <i>StuI</i> . För sekvens se bilaga B.
<i>StuI</i>	Restriktionsenzym som känner igen palindromsekvensen AGGCCT. Klipper jämna ändar mitt i palindromsekvensen.
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i> . Organism med hög temperaturtålighet vars polymeras (<i>Taq</i> -polymeras) ofta används i PCR.
TBE	Buffer innehållande tris, borsyra och EDTA.
TEMED	Tetrametyletylendiammin. Katalysator i polymeriseringen av polyakrylamidgeler.
Templat	Enkelsträngad DNA-molekyl, vilken används som mall för DNA-polymeras vid kopiering av DNA.

Innehåll

1	Inledning	1
1.1	Syfte	3
1.2	Problemställning	3
1.3	Avgränsningar	3
2	Teori	3
2.1	DNA-molekylens uppbyggnad	4
2.2	Modifieringar av DNA	5
2.2.1	Restriktionsenzym	5
2.2.2	DNA-ligas	5
2.2.3	DNA-polymeras	6
2.2.3.1	Thermus aquaticus polymeras	6
2.2.3.2	Terminal deoxynukleotidyltransferas	7
2.2.4	Affinitetskomplex	7
2.2.4.1	Digoxigenin och anti-digoxigenin	7
2.2.4.2	Biotin och streptavidin	7
2.3	Grundläggande teori om metoder	7
2.3.1	Polymeraskedjereaktion	8
2.3.2	Gelelektrofores	8
2.3.2.1	Polyakrylamidgel	9
2.3.2.2	Agarosgell	9
2.3.2.3	Infärgning av DNA	9
2.3.3	Spektrometri	9
2.3.4	Optisk pincett	9
3	Material	10
4	Metod	10
4.1	Standardutföranden	10
4.1.1	Beredning av denaturerande och icke-denaturerande polyakrylamidgel	10
4.1.2	Beredning av agarosgel	11
4.1.3	Infärgning med Sybrgold och gelscanning	11
4.1.4	Rening av DNA-prov	11
4.2	Förberedande experiment	11
4.2.1	Förfärgning och koncentrationsbestämning av Sybrgold på agarosgel	11
4.2.2	Val av gel för att separera cirkulärt från linjärt Φ X174-genom	12
4.3	Metoder specifika för projektet	12
4.3.1	Design av oligonukleotider	13
4.3.2	Från cirkulärt till linjärt virusgenom	13
4.3.2.1	RE-metoden	13
4.3.2.2	PCR-metoden	13
4.3.3	Verifiering av linjära DNA-sekvenser	14
4.3.4	Inmärkning med biotin och DIG	14
4.3.5	Tillagd rening av DNA-prov	14
4.3.6	Titring för att verifiera inmärkning av affinitetstaggar	14
4.3.7	Hybridisering av DNA-konstrukt med RE-handtag	15
4.3.8	Ligering av DNA-konstrukt	15
4.3.9	Sträckning av DNA-konstrukt	15
4.3.10	Analys av sekundärstrukturer i DNA-handtagen	15
4.3.10.1	Undersökning av hybridisering	15

5 Resultat och diskussion	16
5.1 Metodutvecklande steg	16
5.2 Från cirkulärt till linjärt DNA	17
5.3 Verifiering av biotin- och DIG-inmärkning	20
5.4 Sträckning av DNA-konstrukt i optisk pincett	21
5.5 Analys av kärnan med överlappssekvenser	24
5.6 Analys av design av oligonukleotider	24
5.7 Slutsats	25
Referenser	27
Bilaga A Förbrukningsmaterial	30
Bilaga B Sekvenser	31
Bilaga C Geler och tillbehör	33
Bilaga D Förinfärgning med Sybrgold	34
Bilaga E Förberedande experiment: Bestämning av agaros eller polyakrylamidgel.	35
Bilaga F Rening av DNA	36
Bilaga G Öppning av cirkulärt genom med restriktionsenzym	37
Bilaga H Beredning av dNTP-mix	38
Bilaga I Öppning av cirkulärt genom med PCR	39
Bilaga J Verifikation för att linjära DNA-molekyler erhållits från virusgenom	40
Bilaga K Inmärkning	41
Bilaga L Titration av DNA-handtag med polystyrenkolor	42
Bilaga M Hybridisering av DNA-konstrukt	45
Bilaga N Smältkurvsanalys	46
Bilaga O Ligerings	47
Bilaga P Undersökning av sekundärstrukturer i DNA-handtag	47
Bilaga Q Beräkning av DNA-molekyler/polystyrenskula i kulgradient (Matlab)	47
Bilaga R Elektroforetisk kraftpåverkan	48
Bilaga S Teoretisk längd av DNA-konstrukt	48
Bilaga T Virusgenom	49

Figurer

1-1 DNA-konstrukt	1
1-2 Översträckning av kärnsekvens.	2
1-3 Vinkeleffekter	2
1-4 Jämförelse av långa och korta DNA-handtag	3
2-1 Detaljerna i en DNA-helixstruktur	4
2-2 Restriktionsenzymklyvning	5

2-3	NAD ⁺ -beroende ligation	6
2-4	Schematisk bild över hur DNA-polymeras verkar	6
2-5	Strukturer för DIG och biotin	7
2-6	Elongering av DNA.	8
4-1	Från cirkulära sekvenser till linjära sekvenser med RE-metoden och PCR-metoden	12
4-2	Icke-ligerat konstrukt	15
5-1	Koncentrationsgradient för Sybrgold	16
5-2	Linjärt och cirkulärt DNA på polyakrylamid- respektive agarosgel.	17
5-3	Verifiering av linjära DNA-molekyler.	18
5-4	Intensitetsprofiler	19
5-5	Polystyrenkulgradient	20
5-6	Intensitetsjämförelse	21
5-7	Kraftpåverkan på det framställda DNA-konstruktet.	22
5-8	Enkelsträngat DNA under kraftpåverkan	23
5-9	Icke-denaturerande polyakrylamidgel för att undersöka sekundärstrukturer hos DNA-handtagen.	23
5-10	Absorbansmätning under temperaturintervallet 15-90°C.	24
5-11	RE-komplement	25
B-1	PsiI-primer/Primer1.	31
B-2	StuI-primer/Primer2.	31
B-3	Kärnsekvens	31
B-4	Komplement till kärnsekvens	31
B-5	RE-oligo	31
B-6	RE-komplement	31
B-7	PCR-oligo	32
B-8	PCR-komplement	32
T-1	Cirkulära genomet hos Φ X174	49

1 Inledning

År 1953 föreslog J. Watson och F. Crick en modell för den molekylära strukturen av deoxyribonukleinsyra, DNA [1]. Den beskrivna modellen byggde på att två spiralformade DNA-strängar ringlade sig kring samma axel [2]. Strukturen accepterades av forskare världen över och benäms sedermera dubbelhelix. Trots god kunskap om DNA-molekylens struktur är det bara under de senaste 20 åren som de mekaniska egenskaperna för en enskild DNA-molekyl har kunnat analyseras på molekylär nivå [1, 3]. Genom dessa analyser har forskare fått en djupare förståelse för hur bland annat de enzym som interagerar med DNA verkar i cellerna. Forskare har också applicerat krafter på en enskilda kromatinfiber och redan vid 6 pN sett en reversibel konformationsförändring av strukturen [3]. Vid 20 pN har de observerat att nukleosomerna förflyttas, vilket möjliggör transkription av DNA. Det har även påvisats att DNA-interagerande enzym fungerar som molekylära motorer, vilka omvandlar energi till mekaniskt arbete i biologiska processer i cellen.

Att dubbelhelixen är flexibel och kan anta olika former är ytterligare information som erhållits via mekaniska studier. I akvatiska lösningsmedel är DNA-helixen högervriden [3] och sekundärstrukturen kallas B-form, vilken är den vanligaste strukturen för en DNA-molekyl under cellulära betingelser. Studier av dubbelsträngat DNA har dessutom visat att när strukturen sträcks genom mekanisk påverkan ökar DNA-helixens längd, inom ett visst kraftintervall, med 70 % i förhållande till B-formen [4]. Vid detta översträckta tillstånd antar DNA-helixen en annan struktur som kallas S-form.

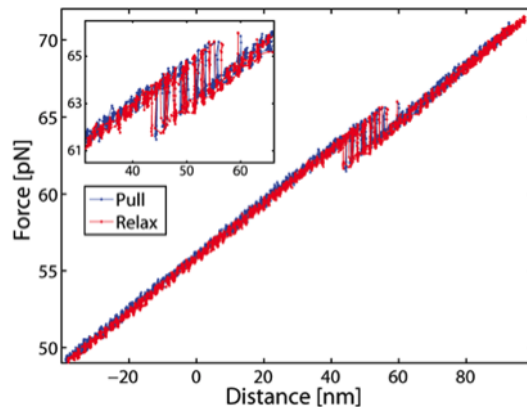
För att utföra mekaniska studier, såsom att dra i en biomolekyl, kan en optisk pincett användas [5]. Vid kraftmätningar i en optisk pincett krävs att biomolekylen ingår i ett DNA-konstrukt som är bundet till polystyrenkulor. I instrumentet styrs polystyrenkulornas position, vilket medför att molekylen sträcks och en kraft kan mätas. I ett DNA-konstrukt ingår en kärna, överlappssekvenser och DNA-handtag, vilket illustreras i Figur 1-1.



Figur 1-1: DNA-konstrukt. DNA-konstrukt med kärna (röd) och överlappssekvens (blå). DNA-handtagen består av en enkelsträngad DNA-sekvens (svart) och affinitetstaggarna biotin eller digoxigenin, DIG. Affinitetstaggarna binder till ytbelagda polystyrenkulor. Endast en liten del av polystyrenkulorna illustreras i utkanten av figuren. Figuren är inte skalenlig då DNA-handtagen i verkligheten är väsentligt mycket större än affinitetstaggarna.

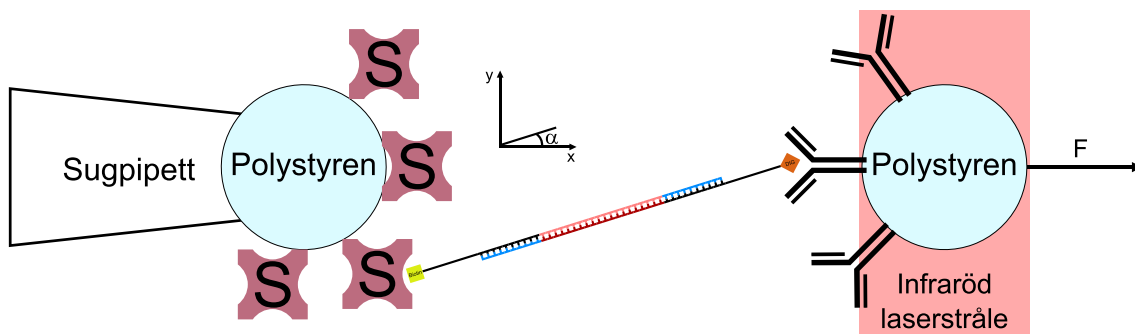
Den studerade biomolekylen benämns kärna och består i detta projekt av dubbelsträngat DNA. I DNA-konstruktet sammanlänkas kärnans två 5'-ändar med överlappssekvenser. Vidare hybridiserar DNA-handtagen till de två överlappssekvenserna och de sammanlänkas till kärnans 3'-ändar. De två DNA-handtagen är enkelsträngade DNA-sekvenser som vardera har en specifik affinitetstagg i dess 3'-ände. DNA-handtagens affinitetstagg binder till polystyrenkulor ytbelagda med protein som respektive tagg har hög affinitet till.

När dubbelsträngat DNA dras ut med en viss kraft i en optisk pincett alternerar DNA-helixens sekundärstruktur mellan B- och S-form [4]. Fenomet kallas för reversibel bistabilitet och illustreras i Figur 1-2 i intervallet 61-65 pN. Reversibel bistabilitet förekommer alltid vid sträckningar av dubbelsträngat DNA, men intervallet varierar mellan kraftmätningar av likadana DNA-konstrukt. En anledning till att intervallet varierar kan eventuellt vara att så kallade ändeffekter uppstår vid sträckningen av DNA-konstrukten.



Figur 1-2: Översträckning av kärnsekvens. Översträckning av kärnsekvensen med hjälp av DNA-handtag med längden cirka 40 baser. Graf av kraft mot avstånd under en cykel av utsträckning, blå, och relaxation, röd. DNA-helixen uppvisar en reversibel bistabilitet mellan 61-65 pN. Den inskjutna bilden visar övergången i detalj. Figuren är hämtad från experiment utförda av Niklas Bosaeus, doktorand vid institutionen för Fysikalisk kemi på Chalmers Tekniska Högskola (ej publicerad).

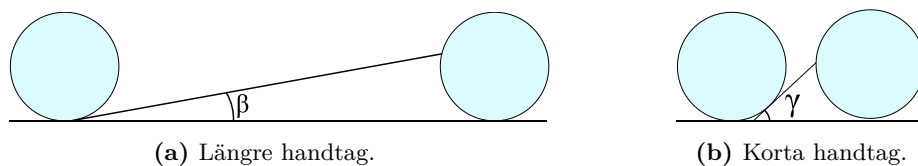
Flera typer av ändeffekter kan ligga bakom intervallskillnaderna mellan flertalet mätningar av likadana DNA-konstrukt, exempelvis att polystyrenkulorna repellerar varandra eller så kallade vinkel effekter. Repulsionen mellan polystyrenkulorna skulle vara en följd av det korta avståndet mellan kulorna i den optiska pincetten, vilket beror på att de är mycket större än DNA-konstruktet. Vinkel effekten kan till exempel uppkomma då kraften på DNA-konstruktet i den optiska pincetten appliceras med en vinkel. Detta sker till följd av att DNA-handtaget kan binda in till olika bindningsäten på den icke-roterbara ytbelagda polystyrenkulan, vilket illustreras i Figur 1-3 nedan.



Figur 1-3: Vinkel effekter. Vinkel effekter på ett DNA-konstrukt i en optisk pincett. Kraften appliceras i x-riktning. Vinkel effekten uppstår då bindningsvinkeln, α , överstiger noll, det vill säga då DNA-konstruktet inte förenar de två kulorna längs med x-axeln. Detta delar upp den applicerade kraften i komponenter. Notera att sugpipetten till vänster hålls stilla och att denna kula inte kan rotera medan laserstrålen, som kallas för den optiska fällan, flyttas. Figuren är inte skalnig då polystyrenkulorna är mycket större i förhållande till DNA-konstruktet i verkligheten. De strukturer på pipettkulan märkta med S symboliserar streptavidin. De Y-formade strukturerna på ytan av fällkulan motsvarar antikroppar (anti-DIG).

Vid sträckningar av DNA-konstrukt är storleken på polystyrenkulorna konstant mellan mätningarna, därför kommer bindningsvinkeln att påverkas av DNA-handtags längd. Vinkel effekten har större påverkan på ett DNA-konstrukt med korta DNA-handtag än ett med längre DNA-handtag. Hur bindningsvinkeln skiljer sig i de båda fallen illustreras i Figur 1-4.

Ett exempel på korta DNA-handtag är de som används i Figur 1-2. DNA-handtagen har syntetiserats bas för bas vilket leder till en begränsning av hur långa DNA-handtagen kan vara [6]. Idag är det möjligt att syntetisera DNA-sekvenser bas för bas i storleksordningen upp emot 150 baser med hög noggrannhet (minst 99,5 %) [7].



Figur 1-4: Jämförelse av långa och korta DNA-handtag. Två polystyrenkulor som förenas av ett DNA-konstrukt. Notera att vinkeln β är mindre än vinkeln γ . Effekten av vinkeln ökar då korta DNA-handtag används i jämförelse med långa DNA-handtag. Figuren är ej skalenlig då polystyrenkulorna är betydligt större än DNA-konstrukten i verkligheten.

1.1 Syfte

Under projektet ska ett DNA-konstrukt med längre handtag än de 40 baser långa som för nuvarande används på Chalmers Tekniska Högskola tillverkas. DNA-konstrukten ska kunna användas i en optisk pincett för att mäta kraftintervallet då den reversibla bistabiliteten uppstår. Ett DNA-konstrukt ska innehålla två stycken cirka 5000 baser långa funktionella DNA-handtag skapade utifrån ett och samma virusgenom samt en dubbelsträngad DNA-kärna med tillhörande överlappssekvenser. Syftet med att tillverka de längre DNA-handtagen är att de eventuellt kan minska ändeffekterna då DNA-molekyler sträcks. Kraftintervallet då DNA-helixen genomgår reversibel bistabilitet kan därmed bestämmas med högre precision.

1.2 Problemställning

Problemet består av att skapa två olika linjära enkelsträngade DNA-molekyler från ett och samma enkelsträngade cirkulära virusgenom, så kallade permutationer. Därefter ska 3'-ändarna hos de enkelsträngade DNA-molekylerna som framställts märkas in med varsin specifik affinitetstag. Till de två DNA-handtagen ska sedan kärnan ihopsatt med överlappssekvenserna hybridiseras och ligeras. Rening och verifiering av produkter kommer att behöva genomföras efter vissa delmoment och dessutom ska ett laborationsprotokoll utvecklas allt eftersom ovan ställda problem löses.

1.3 Avgränsningar

En av avgränsningarna i projektet är att DNA-handtagen kommer att framställas av genomet hos bakteriofagen Φ X174. Anledningen är att virusgenomet är enkelsträngat, relativt litet då det består av endast 5386 baser och dessutom är det sekvenserat [8]. Storleken på virusgenomet är dock avsevärt mycket större än de enkelsträngade DNA-sekvenser som kan skapas bas för bas på syntetisk väg.

För att framställa DNA-handtag som i allt annat förutom längden är jämförbara med de syntetiserade DNA-handtagen som används på Chalmers Tekniska Högskola kommer samma affinitetsskomplex att användas. De två affinitetsskomplex som uteslutande används i projektet är därför streptavidin och biotin samt digoxigenin och anti-digoxigenin.

Då fokus för projektet är att minimera ändeffekterna och producera DNA-konstrukt kommer arbetet begränsas genom att sträckningen i den optiska pincetten utförs av handledaren. Dock kommer resultatet som genereras ligga till grund för valideringen av DNA-konstrukten.

Dessutom kommer de två komplementära oligonukleotiderna i kärnan att beställas ligerade med respektive överlappssekvens. Dessa två enkelsträngade DNA-molekyler kommer att benämnas oligo och komplement. Oligonukleotiderna kommer att vara konstanta under projektets gång eftersom det är DNA-handtagets och inte kärnans längd som ska studeras.

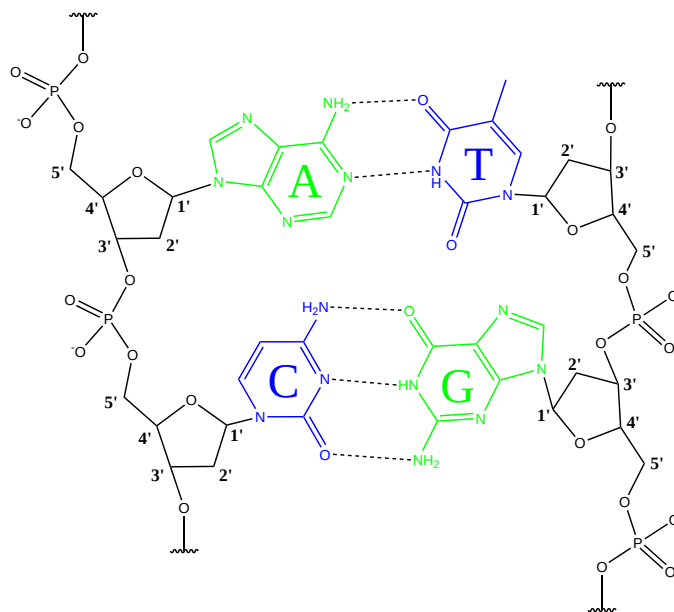
2 Teori

DNA-molekylens egenskaper, såsom att två komplementära DNA-strängar binder till varandra, kommer att utnyttjas vid tillverkningen av DNA-konstrukten. Även enzyms egenskaper att modifiera DNA-molekyler kommer att användas. Dessutom nyttjas olika tekniker i projektet för att

konstruera samt verifiera DNA-konstrukten. En av teknikerna som frekvent användes var gelelektrofores, där DNA-molekyler separeras efter storlek, för att verifiera laborativa moment. I följande avsnitt förklaras därför DNA-molekylens uppbyggnad följt av för projektet viktiga enzymatiska reaktioner samt teorin bakom de använda metoderna.

2.1 DNA-molekylens uppbyggnad

DNA består av repeterande nukleotider som utgörs av en deoxyribos, en fosfatgrupp och en av kvävebaserna adenin (A), cytosin (C), tymin (T) och guanin (G) [9]. Deoxyribosmolekylen och fosfatgruppen binds samman via fosfodiesterbindningar mellan fosfat- och hydroxylgruppen på två närliggande nukleotider, och tillsammans utgör de ryggraden för en DNA-sträng. Uppbyggnaden av DNA-molekylen illustreras i Figur 2-1.



Figur 2-1: Detaljerna i en DNA-helixstruktur. DNA-helixen består av en negativt laddad ryggrad (svart) hydrofoba kvävebaser (grönt respektive blått). Ryggraden består av en fosfatgrupp och en sockermolekyl som sammanlänkas via fosfodiesterbindningar. Det som sammanlänkar två olika ryggrader är de hydrofoba kvävebaserna adenin (A), tymin (T), cytosin (C) och guanin (G) som binder till varandra via vätebindningar. Guanin och adenin (grönt) är puriner som består av två heterocykler. Tymin och cytosin (blått) är pyrimidiner vilka består av en heterocykel. Guanin binder till cytosin via tre vätebindningar och adenin binder till tymin via två vätebindningar.

De fyra olika kvävebaserna delas in i två klasser, puriner och pyrimidiner [9]. Adenin och guanin är puriner som består av två heterocykler. Tymin och cytosin är pyrimidiner som består av en heterocykel. Två DNA-strängar sammanlänkas via vätebindningar mellan en purin och en pyrimidin enligt regeln adenin binder till tymin och guanin binder till cytosin, vilket kallas för komplementär basparning, se Figur 2-1. Guanin binder starkare till cytosin än vad adenin binder till tymin. Anledningen till detta är att guanin sammanlänkas med cytosin via tre vätebindningar medan adenin sammanlänkas till tymin via två vätebindningar.

Det sätt som nukleotiderna är sammanlänkade på resulterar i att DNA-strängen får en kemisk polaritet [9]. Ena änden, 3'-ändan, har en hydroxylgrupp på deoxyribosmolekylens 3'-kol och andra änden, 5'-ändan, har en fosfatgrupp på 5'-kolet hos deoxyribosmolekylen. Per definition anges alltid riktningen hos en DNA-sträng från 5'- till 3'-ändan, vilket är den riktning som DNA-sekvenser elongeras naturligt i cellen. Två enkelsträngade DNA-molekyler hybridiserar till varandra antiparallellt via vätebindningar mellan respektive DNA-molekyls baser. Dessa bindningar och andra typer av intermolekylär växelverkan ger upphov till den dubbelsträngade DNA-helixen.

De negativt laddade syreatomerna i fosfatgrupperna gör ryggraden hydrofil medan kvävebaserna är hydrofoba [9]. I vatten, ett polärt medium, sker så kallad stacking där den hydrofila

ryggraden vänds mot lösningen så att den hydrofoba regionen skyddas. Detta ger upphov till den karaktäristiska tredimensionella B-formen hos DNA-dubbelhelixen.

För enkelsträngade DNA-molekyler finns inte samma möjlighet att skydda de hydrofoba baserna [9]. Basparning kan istället förekomma inom DNA-molekylen, vilket resulterar i sekundärstrukturer. Ett exempel på en sekundärstruktur är en hårnål som uppstår när en del utav en enkelsträngad DNA-molekyl binder komplementärt till en annan del inom samma molekyl. Regionen mellan de komplementära DNA-sekvenserna bildar en cirkel och hela strukturen benämns hårnål.

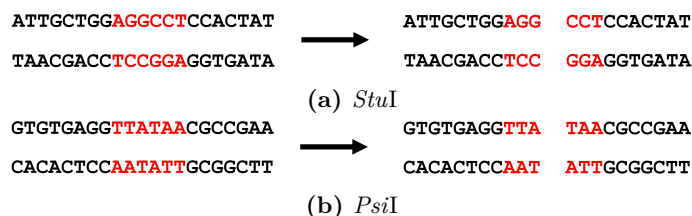
2.2 Modifieringar av DNA

För att skapa DNA-konstrukten användes flera enzym vars uppgift var att på olika sätt modifiera DNA. Viktiga enzym för projektet var restriktionsenzym, DNA-ligas samt DNA-polymeras. Med hjälp av enzymatiska metoder kan exempelvis affinitetstaggar inkorporeras till DNA-sekvenser. En beskrivning av nämnda enzym följer nedan.

2.2.1 Restriktionsenzym

Restriktionsenzym, RE, är proteiner som klyver dubbelsträngat DNA genom att hydrolysera fosfodiesterbindningarna [9]. I bakterier är RE hindrade av metylerade adenin och cytosin och ingår i en intracellulär försvarsmekanism då de degraderar främmande virus-DNA som vanligtvis inte är metylerat. Enzymerna är viktiga för analys av bland annat långa DNA-molekyler, genisolering och för att generera nya DNA-molekyler [10].

Restriktionsenzym binder in till en specifik DNA-sekvens, ofta en dubbelsträngad palindromsekvens [10], bestående av fyra till åtta nukleotider [9]. Vid klyvning av DNA kräver enzymerna magnesiumjoner och genererar fragment med 5'-fosfat- och 3'-hydroxylterminal. Dessa ändrar kan vara ojämna, sticky ends, eller jämna, blunt ends, beroende på klyvningsställe och enzym [11]. *StuI* och *PsiI* är de restriktionsenzym som användes i projektet och de klyver jämna ändrar vars palindromsekvenser illustreras i Figur 2-2.

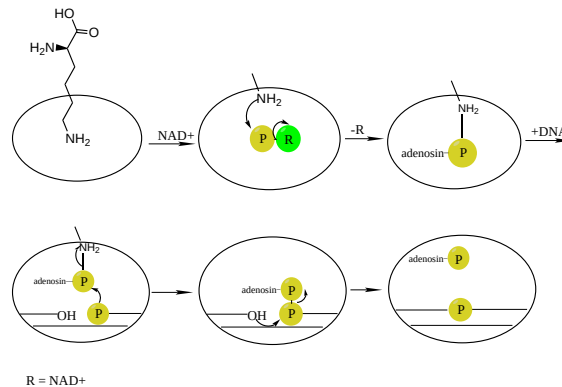


Figur 2-2: Restriktionsenzymklyvning. *StuI* och *PsiI* är restriktionsenzym som kommer att användas i projektet. Deras palindromsekvenser (rött) visas i (a) respektive (b). Klyvningen genererar jämna ändrar.

2.2.2 DNA-ligas

DNA-ligas är ett enzym som spelar en viktig roll i alla levande organismer och medverkar i processer såsom replikation, reparation och rekombination av DNA [12]. Enzymets funktion är att sammankoppla nukleotider genom att skapa fosfodiesterbindningar mellan 5'-ändens fosfatgrupp och 3'-ändens hydroxylgrupp hos två närliggande DNA-sekvenser [13]. DNA-ligas som används kommersiellt renas från bakterien *Escherichia coli*, som infekterats av en *T4-fag*, och kan användas för att ligera ihop två skilda DNA-kedjor [14].

De bakteriella ligasen tillhör en grupp av ligas som kräver kofaktorn nikotinamid adenin dinukleotid, NAD^+ , för att skapa fosfodiesterbindningarna [12]. Reaktionen sker i delsteg och kallas ligering. Enzymet reagerar med NAD^+ , vilket aktiverar enzymet som då binder AMP kovalent till aminosyran lysin som är placerad i enzymets aktiva säte [15]. DNA-molekylen blir därefter adenylerad genom att DNA-molekylens 5'-ände reagerar med AMP-molekylens nu aktiva fosfatgrupp. Enzymet katalyserar reaktionen så att DNA-molekylens hydroxylgrupp på 3'-änden attackerar den aktiverade fosfatgruppen vilket leder till att AMP frigörs och en fosfodiesterbindning mellan 3'-änden och 5'-änden bildas. I Figur 2-3 nedan visas den NAD^+ -drivna ligeringen.

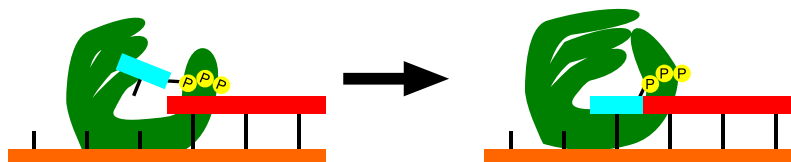


Figur 2-3: NAD⁺-beroende ligering. NAD⁺-beroende ligering där NAD⁺ krävs för att bilda den nya fosfodiesterbindningen. Först blir enzymet adenylerat genom att NAD⁺ klyvs, vilket bildar AMP och pyrofosfat avges. AMP aktiveras genom att binda kovalent till lysins kolvätekedja som sitter vid ligasets aktiva säte. Enzymet är nu aktiverat och AMP överförs till DNA-molekylens fosforylerade 5'-ände, varefter fosfodiesterbindningen bildas och AMP avges.

2.2.3 DNA-polymeras

DNA-polymeras är ett enzym som katalyserar bildningen av nukleotidkedjor [9]. Enzymet är essentiellt för att celledelning ska ske och utnyttjar deoxynukleotid trifosfat, dNTP, för att syntetisera nya DNA-strängar. För att DNA-polymeraset ska verka krävs ett templat, det vill säga en mall, i form av en enkelsträngad DNA-sekvens och ofta krävs en primer. En primer är en oligonukleotid, det vill säga en kort sekvens enkelsträngat DNA, som DNA-polymeraset binder in till och där elongeringen startar.

Strukturen på DNA-polymeras brukar liknas vid en högerhand, se Figur 2-4, där handflatan, fingrarna och tummen utgör det aktiva sätet som omsluter den växande nukleotidkedjan [9]. När en dNTP komplementärbinder till templatet hårdnar greppet och inkorporering sker. I detta steg frigörs även pyrofosfat och den frigjorda energin bidrar till att greppet blir lösare igen så att kedjan kan fortsätta byggas på. Inom biotekniken utnyttjas DNA-polymeras förmåga att amplifiera DNA och det finns flera sorters DNA-polymeras med olika egenskaper, nedan kommer två av dem att beskrivas utförligare.



Figur 2-4: Schematisk bild över hur DNA-polymeras verkar. DNA-polymeras illustreras i grönt i form av en högerhand, där fingrarna, handflatan och tummarna utgör det aktiva sätet som omfamnar templat- och primerkomplexet. När en passende dNTP komplementärbinder till templatet hårdnar greppet och inkorporering sker. Efter ligeringen frigörs pyrofosfat och den frigjorda energin används för att lätta på greppet igen för att processen ska kunna upprepas.

2.2.3.1 *Thermus aquaticus* polymeras

Thermus aquaticus (*Taq*) polymeras upptäcktes i en varm källa i nationalparken Yellowstone utav mikrobiologen Thomas D. Brock [16]. Det produceras naturligt av bakterien *Taq* och dess funktion är att amplifiera DNA inuti cellen under celledelningen. *Taq*-polymeras är termofil och amplifierar som effektivast vid en temperatur på 74°C och ett pH på 7,4 men kan behålla sin aktivitet i temperaturer på upp mot 95°C [17]. För att *Taq*-polymeras ska kunna katalysera amplifieringen av DNA optimalt behövs kofaktorer såsom magnesiumjoner som hjälper *Taq*-polymeras att binda in till templat- och primerkomplexet [18].

2.2.3.2 Terminal deoxynukleotidyltransferas

Terminal deoxynukleotidyltransferas, nedan benämnt terminaltransferas, upptäcktes som en sidoreaktion då DNA-polymeras renades ur sköldkörtlar från kalvar [19]. Enzymet uttrycks endast i odifferentierade lymfocyter och dess roll i cellen är att skapa mångfald i immunsystemet. I processen då variationer skapas i genen avlägsnas nukleotider av terminal exonukleas och därefter fyller terminaltransferaset dessa gap med nya nukleotider [13].

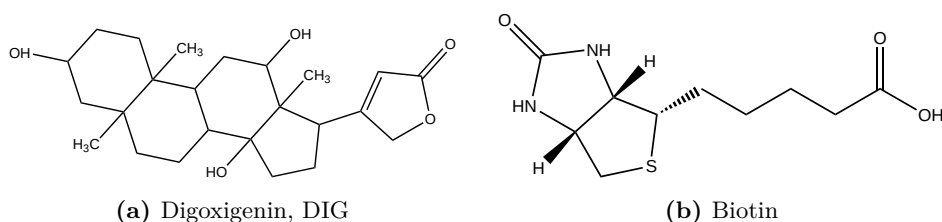
Enzymet inkorporerar deoxynukleotider till fria hydroxylgrupper på DNA-sekvensers 3'-ände, då sekvensen är tre baser eller längre [13]. För att enzymet ska vara funktionellt krävs en kofaktor i form av en tvåvärd katjon exempelvis kobolt eller magnesium [19]. Nukleotiderna som inkorporeras till en DNA-sekvens kan vara modifierade med affinitetstaggar som till exempel biotin eller digoxigenin.

2.2.4 Affinitetskomplex

Begreppet affinitet används för att beskriva bindningsstyrkan mellan receptor och ligand eller antikropp och antigen [13]. När de två enheterna är bundna till varandra kallas strukturen för affinitetskomplex. Affiniteten mellan digoxigenin och anti-digoxigenin samt biotin och streptavidin kommer att utnyttjas i DNA-konstruktet.

2.2.4.1 Digoxigenin och anti-digoxigenin

Digoxigenin, DIG, syntetiseras naturligt i växtarten *Digitalis* och används för inmärkning av exempelvis DNA [20]. Antikroppen till DIG kallas anti-DIG och binder med hög affinitet till DIG ($K_d \cong 10^{-9}\text{M}$) [21]. Den höga affiniteten mellan DIG och anti-DIG bygger främst på laktonringen och sidoringar vid kol nummer 12 [22] och strukturen för DIG illustreras i Figur 2-5a.



Figur 2-5: Strukturer för DIG och biotin. (a) Struktur för DIG, som binder med hög affinitet till anti-DIG via interaktioner med laktonringen och med sidoringar vid kol nummer 12 ($K_d \cong 10^{-9}\text{M}$). (b) Struktur för biotin, som binder starkt till streptavidin, vilket delvis kan förklaras med att tre vätebindningar skapas till karboxylsyret och en vätebindning till vardera NH-grupp ($K_d \cong 10^{-15}\text{M}$).

2.2.4.2 Biotin och streptavidin

Streptavidin består av fyra likadana enheter och kan binda specifikt till biotin vid fyra säten. Biotin, se Figur 2-5b, binder icke-kovalent till streptavidin med mycket hög affinitet ($K_d \cong 10^{-15}\text{M}$) [21], vilket beror av en rad faktorer [23]. Bindningen utgörs av fem samverkande vätebindningar, tre vätebindningar till karboxylsyret och en till vardera NH-grupp på biotin [24]. Den laddade aminosyran aspartat, som finns i streptavidin, polariserar ureamotivet i biotin vilket ger upphov till den samverkande vätebindningskraften. Styrkan i bindningen blir då större än summan av de enskilda vätebindningarna. Bindningen förstärks ytterligare av van der Waals-krafter från fyra tryptofan som finns nära bindningssätet. Dessutom ändras streptavidins konformation när biotin binder in vilket bidrar till att stabilisera bindningen [25].

2.3 Grundläggande teori om metoder

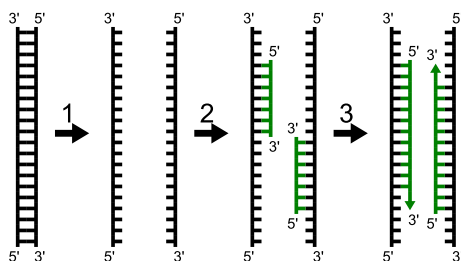
I projektet användes olika metoder såsom optisk pincett för att sträcka DNA-konstrukt och PCR för att amplifiera en DNA-sekvens. Avsnittet behandlar teorin bakom metoder och instrument som var viktiga för projektet.

2.3.1 Polymeraskedjereaktion

Polymeraskedjereaktion, PCR, är en ofta använd teknik inom molekylär biologi [26]. Metoden uppfanns år 1983 av Kary Mullis [18] och förenklade många processer där genkloning tidigare använts [27]. PCR möjliggjorde att en liten mängd DNA kunde amplifieras till större mängder DNA [28], vilket revolutionerade DNA-relaterad forskning där ursprungsmängden DNA tidigare varit ett problem.

Den sekvens, så kallad templat, som används som mall vid amplifieringen under PCR består av enkelsträngat eller dubbelsträngat DNA i storleken 100-45 000 baser [18]. Då templatet amplifieras behövs endast en liten mängd startmaterial. För att amplifieringen av DNA ska kunna initieras behövs primrar. Vanligtvis används två primrar vilka ska vara komplementära mot regioner på motsatt DNA-sträng och dessutom flankera den region som ska amplifieras, se Figur 2-6. Efter att primrarna hybridiserat med templatet kommer deras 3'-ändar att vara riktade mot varandra. Det är från 3'-änden på primern som DNA-polymeraset adderar nya baser, dNTP:s, till templatet [9]. DNA-polymeraset bör kunna behålla sin aktivitet vid temperaturer runt 95°C så att nytt DNA-polymeras ej behöver tillsättas efter varje PCR-cykel och därmed riskera att kontaminera PCR-provet. Ett ofta använt enzym är *Taq*-polymeras [17], se tidigare avsnitt 2.2.3.1.

PCR utförs i en termocykler, även kallat PCR-maskin, där ett inställningsbart program över tider och temperaturer avgör hur proverna inkuberas [27]. Programmet består av cykler innehållande tre steg; denaturering, hybridisering och syntes [6]. Under det första steget denaturerar provet vid 95°C och därefter sänks temperaturen till ungefär 55°C där två primrar hybridiserar till var sin komplementär sträng av templatet. Vid det tredje steget höjs temperaturen till det optimala för DNA-polymeraset, vilket är kring 74°C då elongering av produkter katalyseras. Dessa tre steg pågår vanligtvis i ungefär 30 cykler [27, 6], se Figur 2-6.



Figur 2-6: Elongering av DNA. 1) Denaturering. Provet värms upp till 95°C och DNA-strängarna denatureras. 2) Hybridisering. Temperaturen sänks till ungefär 55°C och två primrar hybridiserar till respektive DNA-sträng. 3) Syntes. Temperaturen höjs till 74°C, DNA-polymeraset binder in och baser adderas vid primrarnas 3'-ände.

Oftast används lika proportioner utav de två primrarna och det sker en exponentiell ökning av templatet [17]. Det är också möjligt att utföra PCR med endast en primer, vilket skulle resultera i linjär ökning av DNA-sekvenser [29], vilket var den metod som tillämpades i projektet.

2.3.2 Gelelektrofores

Principen bakom gelelektrofores bygger på den elektriska laddning som många molekyler har i vattenlösning [27]. I fallet då DNA studeras nyttjas det faktum att denna molekyl är negativt laddad och kommer vid placering i ett elektriskt fält således migrera mot den positiva elektroden. Skälet till att låta DNA migrera genom en gel är att separera DNA med avseende på dess storlek. Förhållandet mellan storlek och migrering gäller såväl enkelsträngade som dubbelsträngade DNA-molekyler [30]. En liten molekyl kommer att migrera längst i gelen då det är lättare för denna att förflytta sig jämfört med en större molekyl. Hur fort migrering sker kan varieras genom att ändra sammansättningen hos gelen och nedan beskrivs strukturen för polyakrylamid- respektive agarosgelen.

2.3.2.1 Polyakrylamidgel

Polyakrylamidnätverket utgörs av långa kedjor av akrylamid, som är huvudbeståndsdel i gelen, vilka sedan sammanlänkas av tvärbindningsmonomeren bisakrylamid¹ [31]. Övergången från akrylamidmonomerer till akrylamidpolymerer sker syntetiskt och styrs av de två initiatorerna ammoniumpersulfat, APS, och tetrametyletylendiammin, TEMED [32]. Porstorleken hos en polyakrylamidgel är omvänt proportionell mot koncentrationen av monomererna akrylamid och bisakrylamid [31]. Genom att ha en hög koncentration bisakrylamid kan polyakrylamidkedjorna sammanlänkas frekvent och därmed blir porstorleken liten. Om monomerkoncentrationen är låg blir porstorleken däremot stor. Om gelen har små porer kan små DNA-fragment separeras och om gelen har stora porer kan större DNA-fragment separeras. Cirkulära DNA-fragment med storlek över 1400 baspar migrerar inte på en polyakrylamidgel [33]. Enkelsträngade DNA-molekyler separeras ofta under denaturerande förhållanden, genom tillsats av urea, för att undvika effekter från eventuella sekundärstrukturer [34].

2.3.2.2 Agarosgel

Agaroshelixen är en alternerande 1,3-länkad β -D-galaktopyranos och 1,4-länkad 3,6-anhydro α -L-galaktopyranos [35, 36]. När flera helixar binder till varandra bildas långa kedjor kallade fibrer [37]. Fibrerna sammanlänkas sedan genom enstaka helixar och på detta sätt bildas gelnätverket. Agarosgeler har ofta stor porstorlek vilket tillåter separation av stora molekyler [35]. Dessutom kan enstaka fibrer i gelnätverket agera som fria kedjor på vilka stora cirkulära DNA-molekyler i storleksordningen 20-30 kilobaspar kan fångas [38].

2.3.2.3 Infärgning av DNA

DNA-molekyler som migrerat på en gel varken absorberar eller emitterar ljus inom det synliga spektrat och kan visualiseras först då de färgats in med ett preparat som binder till DNA [9]. Infärgning kan ske före, alternativt efter, att gelelektroforesen utförts och med flertalet olika preparat [39]. Ett exempel på infärningspreparat är Sybrgold, vilket binder till både enkel- och dubbelsträngat DNA [40]. Detektionen bygger på fluorescens, vilket innebär att det tillsatta preparatet emitterar ljus vid en särskild våglängd då det exciteras.

2.3.3 Spektrometri

Vid UV-spektrometri uppvisar både dubbel- och enkelsträngat DNA ett absorptionsmaximum vid en våglängd runt 260 nm [41]. Ur *Beer-Lamberts lag*² kan koncentrationen i en lösning bestämmas med hög tillförlitlighet.

Det är även känt att hybridiserat DNA uppvisar ett omkring 30 % lägre absorptionsmaximum än ifall motsvarande två basparade DNA-strängar skulle vara denaturerade [41]. Sekundärstrukturer eller basparning med komplementär DNA-sträng kan upptäckas genom mätningar av absorption under kontinuerlig ökning av temperatur. Eventuella sekundärstrukturer kan således bekräftas genom en ökning av absorbans vid våglängden 260 nm när temperaturen är tillräckligt hög.

2.3.4 Optisk pincett

För att studera mekaniska egenskaper hos dubbelsträngat DNA används en optisk pincett. Med hjälp av instrumentet kan krafter upp till 100 pN och rörelser hos små partiklar mätas med hög precision [4]. Det finns variationer på hur en optisk pincett är uppbyggd, nedan beskrivs den som används i detta projekt.

Vid mätningar på kärnan fästs DNA-konstruktet mellan två polystyrenkulor. De två polystyrenkulorna kallas för pipettkula respektive fällkula. Pipettkulan fixeras av en mikropipett, medan fällkulan fångas in av två motriktade infraröda laserstrålar med ett gemensamt fokus [3]. Infångningen sker då polystyren i fällkulan inte absorberar utan bryter det infraröda ljuset, vilket kallas refraktion [42]. Brytningen medför att en del av ljusets rörelsemängd överförs till kulan vilken då

¹Det kemiska namnet för bisakrylamid är N,N'-bis-metylen-bis-akrylamid.

² $c = A/\epsilon l$. c = molära koncentrationen i lösningen, ϵ = molära absorptiviteten av lösningen och l = längden av kyvetten.

påverkas av en kraft [43]. Intensiteten på den infraröda lasern påverkar kraften vilket medför gör det möjligt att kontrollera hur hårt kulan hålls fast.

3 Material

För projektet beställdes material från ett antal olika företag, vilka presenteras i bokstavsordning nedan, för katalognummer på de olika materialen se Bilaga A.

De syntetiserade oligonukleotiderna, *PsiI*Primer (5'-fosforylerad, Primer1), *StuI*Primer (5'-fosforylerad, Primer2), PCR-oligo, PCR-komplement, RE-oligo och RE-komplement, kommer från Atdbio. För exakt design av sekvenserna se Bilaga B. Från Bio-rad beställdes 40 % akrylamid/bis solution, TEMED och ammoniumpersulfat (APS). Av Fermentas beställdes Long PCR Enzyme Mix, O'RangeRuler 500 bp DNA Ladder ready-to-use 500-6000 bp, 6X Orange DNA Loading Dye, GeneRuler Ultra low Range DNA ladder, *Eco1471* (*StuI*), *AanI* (*PsiI*), Terminal Deoxynucleotidyl Transferase 500 u och T4 DNA Ligase. Infärgningsämnet SYBR Gold Nucleic Acid Gel Stain (10,000x Concentrate in DMSO) kommer från Invitrogen. D1 AGAROSE LOW EEO kommer från Laboratorios CONDA. Från New England Biolabs beställdes virusgenomet Φ X174 bestående av 85 % cirkulärt och 15 % linjärt enkelsträngat virusgenom. Av Roche beställdes Digoxigenin-11-dUTP och Biotin-16-dUTP. Streptavidininmärkta polystyrenkuler (0,5 %vikt per volym, diameter 2,1 μ m, 5ml), anti-DIG inmärkta polystyrenkuler (0,1 %vikt per volym, diameter 2,17 μ m, 2 ml) beställdes från Spherotech. Från Qiagen beställdes dNTP Set, PCR Grade 4x100 μ l och QIAquick PCR Purification Kit som användes till båda metoderna. Ficoll 400 beställdes från Sigma. Dessutom användes standardkemikalier som ej är presenterade ovan.

De instrument som användes under projektet var PCR-maskinen *Master Cycler Gradient*, *He-raeus instruments Biofuge 28RS*, *Nanodrop Spectrophotometer 5069*, *Varian Cary 5000 spectrophotometer*, *Scannern GE Typhoon 9400 VMI* med tillhörande programvara *ImageQuant TL*, *optisk pincett* (byggd av Niklas Bosaeus, doktorand på institutionen för Fysikalisk kemi vid Chalmers Tekniska Högskola) samt vertikala och horisontella elektroforesceller från Biorad.

4 Metod

Standardutförande för olika metoder som används i projektet kommer att presenteras nedan, följt av specifika metoder för tillverkning av DNA-konstrukten. DNA-handtagen kommer att tillverkas med hjälp av två olika metoder. Förberedande experiment gjordes för att utforma en del av de tillvägagångssätt som användes till det projektspecifika metodprotokollet.

4.1 Standardutföranden

Agaros- och polyakrylamidgeler bereddes under projektet enligt standardutföranden. Även hur DNA-molekylerna infärgades och detekterades samt hur DNA-prover renades presenteras nedan.

4.1.1 Beredning av denaturerande och icke-denaturerande polyakrylamidgel

Vid framställning av denaturerande polyakrylamidgeler mättes urea upp i ett 50 ml falconrör. Därefter tillsattes milliQ och 10xTBE-buffert. Provröret värmdes i en mikrovågsugn tills urean löstes upp. Provet placerades i dragskåp på is där 40 % akrylamid/bisakrylamid-lösning tillsattes. Därefter behandlades vätskan med kvävgas i 30 sekunder varefter TEMED och 10 % APS tillsattes. Provet hälldes i en vertikal gjutform bestående av två glasskivor ihopsatta med parafilm. En kam placerades i gelen varefter den fick stelna i två timmar. Gelen placerades vertikalt i ett tråg som fylldes med 1xTBE-buffert. Kammen togs bort och därefter utfördes pre-elektrofores i 20 minuter med samma voltstyrka som applicerades efter att proverna laddats på gelen. Brunnarna rengjordes via pipettering av 1xTBE-buffert innan provsatsning. Icke-denaturerande geler göts inte på samma sätt som denaturerande geler men innehöll samma kemikalier förutom urea, vilket innebar att upphettning inte behövdes. Gelen hälldes istället mellan en glasplatta behandlad med *binding-silane working solution* och botten av en horisontell gjutform. Gelen placerades horisontellt i ett

tråg som fylldes med 1xTBE-buffert varefter fältstyrkan kontrollerades. För exakta mängder av ingående komponenter, se Bilaga C.

4.1.2 Beredning av agarosgel

Vid beredning av agarosgel uppmättes 1xTBE-buffert och agarospulver vägdes upp i ett vågskepp. De båda kemikalierna överfördes till en E-kolv innehållandes magnetloppa varvid vikten noterades. Agarosblandningen kokades under omrörning tills dess att en homogen suspension erhöles. Därefter vägdes E-kolven och uppvärmt milliQ tillsattes för att justera vikten till den grund vikt lösningen hade innan värmning. Gelen tilläts svalna till cirka 70°C och överfördes till en gjutform där en kam placerades på gelen. Då gelen stelnat i en timma togs kammen bort och gelen placerades horisontellt i ett tråg som sedan fylldes med 1xTBE-buffert till maxgränsen. Fältstyrkan på gelen mättes med en voltmeter och justerades till 4 V/cm. För protokoll se Bilaga C.

4.1.3 Infärgning med Sybrgold och gelscanning

Vid förfärgning med Sybrgold gjordes en arbetslösning genom att späda stamlösningen 10 000x. En 2x spädnings av Sybrgold-arbetslösning adderades till proverna innan de laddades på gelen. Mängden Sybrgold som slutligen användes till DNA-proven togs fram genom ett experiment, se avsnitt 4.2.1. I de fall då gelen efterfärgades med Sybrgold lades den i ett tråg med 0,01 % Sybrgold-stamlösning i fem minuter. Scannern som användes i experimenten var GE Typhoon 9400 VMI som kan detektera fluorescens genom excitation vid fyra olika våglängder. Excitation vid 488 nm valdes då det är nära Sybrgolds absorptionsmaximum på 495 nm [44].

4.1.4 Rening av DNA-prov

Vid rening av DNA-prov för att eliminera kontaminanter användes QIAquick PCR Purification Kit som innehåller affinitetskolonn, reningsbuffert och elueringsbuffert. Proven innehållande DNA överfördes till 2 ml eppendorfrör och reningsbuffert innehållande en pH-indikator tillsattes. För att justera pH till 7,5 eller lägre³ användes 3 M natriumacetat med pH 5. Lösningen överfördes till nya 2 ml provrör innehållande filterkolonn och centrifugerades med centrifugen *Heraeus instruments Biofuge 28RS* i 17900 g under en minut varefter supernatanten innehållande kontaminanter kasserades. Centrifugeringssteget upprepades tre gånger. Därefter tillsattes ytterligare en reningsbuffert och proverna centrifugerades två minuter i 17900 g varvid supernatanten kasserades efter centrifugeringen. Filterkolonnerna innehållande DNA överfördes sedan till nya 1,5 ml eppendorfrör. Elueringsbuffert tillsattes och proverna centrifugerades i en minut i 17900 g varefter ytterligare elueringsbuffert tillsattes och steget upprepades. Filterkolonnerna kasserades då DNA-molekylerna nu överfördes till supernatanten. För exakta mängder i reningssteget se Bilaga F.

4.2 Förberedande experiment

Innan den projektspecifika metoden utformades, undersöktes lämplig koncentration på Sybrgold vid förfärgning av DNA-molekylerna. Även hur det enkelsträngade cirkulära genomet migrerar på agaros- och polyakrylamidgel studerades. Metoden för de förberedande experimenten beskrivs nedan.

4.2.1 Förfärgning och koncentrationsbestämning av Sybrgold på agarosgel

Sybrgold användes vid gelelektrofores eftersom färgämnet även binder till enkelsträngat DNA, till skillnad från exempelvis etidiumbromid som endast binder till dubbelsträngat DNA. Polyakrylamidgeler kan både för- och efterinfärgas med Sybrgold, men agarosgeler kan inte efterinfärgas med Sybrgold då färgämnet även binder in till själva gelen. För att undersöka huruvida DNA kan förfärgas och sedan detekteras i agarosgel utfördes en gelelektrofores. Under experimentet avgjordes även lämplig koncentration av färgämnet Sybrgold vid förfärgning av DNA. En 1 % agarosgel framställdes och i vardera brunnen laddades DNA-stegen O'RangeRuler 500 bp, 1xTBE och Sybrgoldlösning med olika koncentration. Stamlösningen av Sybrgold späddes först till en arbetslösning

³Detta påvisades av att lösningen blev gulaktig av den tillsatta pH-indikatorn.

varefter denna späddes 2x, 4x, 8x och 16x. För volymer laddade i respektive brunn, se Bilaga D. Elektrofores utfördes i två timmar med fältstyrkan 4 V/cm. Gelen scannades i GE Typhoon 9400 VMI vid våglängden 488 nm och det givna resultat presenteras under resultat i Figur 5-1.

4.2.2 Val av gel för att separera cirkulärt från linjärt Φ X174-genom

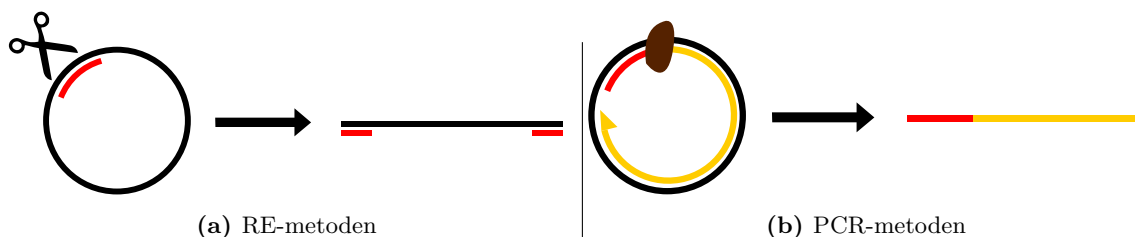
Intressant för projektet var att kunna skilja på cirkulärt och linjärt enkelsträngat DNA för att senare kunna bekräfta att de två metoderna som presenteras i avsnitt 4.3 producerat linjära DNA-molekyler. Det faktum att provet med Φ X174-genom innehåller 85 % cirkulärt DNA och 15 % linjärt DNA utnyttjades för att se hur enkelsträngat DNA migrerar på gel. Undersökningen gjordes på en 1 % agarosgel och en denaturerande 5 % polyakrylamidgel. Till polyakrylamidgelen bereddes ett prov innehållande DNA-stegen O'range ruler 500 bp och formamid samt ett prov med virusgenom ($1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$), 6X Orange DNA Loading Dye och formamid. Proven laddades på gelen och därefter utfördes gelelektrofores i två timmar vid 150 V. Polyakrylamidgelen efterinfärgades med Sybrgold och scannades. För agarosgelen innehöll ena provet DNA-stegen O'range ruler 500 bp, 1xTBE samt Sybrgold. Det andra provröret innehöll virusgenom ($1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$), 15 % ficollösning och 6X Orange DNA Loading Dye. Protokollet för volymer av respektive komponent visas i Bilaga E. Proverna till agarosgelen förfärgades med Sybrgold och elektrofores utfördes under två timmar vid 4 V/cm. Gelen scannades och presenteras i Figur 5-2.

4.3 Metoder specifika för projektet

Två metoder för att skapa DNA-konstrukt har tagits fram vilka skiljer sig från varandra angående hur det cirkulära Φ X174-genomet görs linjärt och hur mycket produkter som bildas. I båda metoderna binder primrarna till virusgenomen på två ställen, vilket genererar två olika permutationer av sekvensen som ska användas för de två olika DNA-handtagen, se Figur 4-1. Anledningen till att två permutationer för respektive metod gjordes var för att båda DNA-handtagen av ett DNA-konstrukt inte ska kunna binda in till samma polystyrenkula.

I den första metoden används restriktionsenzymer som klyver DNA och denna metod benämns RE-metoden. Den andra metoden benämns PCR-metoden och bygger på att med hjälp av PCR producera nya linjära DNA-fragment medan det cirkulära substratet förblir intakt.

En viktig skillnad mellan metoderna är hur mycket linjära produkter som bildas i det inledande steget. I RE-metoden är det maximala antalet produkter begränsade till hur mycket av Φ X174-genom som tillsätts tillsammans med respektive restriktionsenzym, eftersom inget nytt DNA tillverkas. I PCR-metoden beror antalet linjära DNA-molekyler bland annat på hur många PCR-cykler som genomförs och mängden dNTP som tillsätts. Av den anledningen måste den slutliga mängden DNA i PCR-metoden mätas med hjälp av absorbans.



Figur 4-1: Från cirkulära sekvenser till linjära sekvenser med RE-metoden och PCR-metoden. I figurerna illustreras virusgenomet (svart) samt inbindande primer (röd). Notera att ytterligare en primer, som inte visas i figuren, används för vardera metod för att skapa linjära permutationer av Φ X174-genomet. (a) Schematisk bild över öppningen med RE-metoden. Notera de kvarblivna primerresterna efter restriktionsenzymklyvningen. Saxen representerar att restriktionsenzymet klyver genomet vid den dubbelsträngade sekvensen. (b) Schematisk bild över skapandet av komplementär linjär DNA-sekvens med Φ X-genomet som mall. I figuren visas DNA-polymeraset i brunt.

4.3.1 Design av oligonukleotider

För RE-metoden designades två primrar så att vardera primer, då den hybridiserats till det enkelsträngade Φ X174-genomet, genererade en dubbelsträngad palindromsekvens för ett restriktionsenzym. Utifrån sekvenserna på primrarna kunde de överlappande sekvenserna, sammanlänkade till kärnan, bestämmas då dessa skulle hybridisera till 5'-ändan av de linjära DNA-molekylerna.

För tillverkning av linjära DNA-molekyler utifrån virusgenomet med PCR-metoden utformades två olika primrar. Primrarna valdes komplementära till olika sekvenser i virusgenomet för att generera två sekvenspermutationer. Då polymeraset i PCR-metoden elongerar från primerns 3'-ände kommer DNA-molekylerna som skapas att bli komplementära till substratet. Överlappssekvenserna valdes även i denna metod komplementär till 5'-ändan av det linjära fragmentet skapat i PCR-metoden.

Samma sekvenser på primrar valdes för de båda metoderna och med fosforylerade 5'-ändar då detta krävs för PCR-metoden. Sekvenserna kan ses i Bilaga B. För att erhålla primrar som band in starkt⁴ till dess komplement konstruerades de så att cirka 50 % av det totala innehållet och att två av de tre sista baserna på 5'- respektive 3'-ändarna bestod av cytosin och guanin.

4.3.2 Från cirkulärt till linjärt virusgenom

I RE-metoden klövs Φ X174-genomet genom att de två primrarna först hybridiserades med det cirkulära enkelsträngade virusgenomet i två separata provrör. Ett överskott av primer tillsattes för att erhålla maximalt utbyte. Efter hybridiseringen tillsattes restriktionsenzym för att på så sätt erhålla linjära genomsekvenser.

För PCR-metoden användes en PCR-maskin för att tillverka linjära enkelsträngade DNA-molekyler som blir komplementära till det cirkulära enkelsträngade virusgenomet. En linjär amplifikation av DNA förväntades då endast en primer användes per provrör under PCR-programmet. Det skulle därmed endast genereras linjära DNA-molekyler som var komplementära till virusgenomet, vilket användes som templat. Cyklerna i PCR-programmet anpassades efter polymerasetts elongeringshastighet längs med hela det cirkulära genom.

4.3.2.1 RE-metoden

För hybridisering av primrar till virusgenomet tillsattes Φ X174 ($1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) samt buffert innehållande NaCl, Tris-HCl och milliQ till två olika eppendorfrör. *PsiI*-primer ($100 \mu\text{M}$) tillsattes i ena röret och *StuI*-primer ($100 \mu\text{M}$) i det andra. För protokoll se Bilaga G. Proven placerades på värmeblock under 40 minuter i 51°C , vilket är 10°C lägre än primrarnas smälttemperatur, varefter de lades på is. Till eppendorfröret med *PsiI*-primer tillsattes restriktionsenzymet *PsiI* ($10 \text{ u}/\mu\text{l}$) samt tillhörande buffert. Detta prov kommer nedan att benämnas *RE1*. Till provröret som innehöll *StuI*-primer adderades enzymet *StuI* ($10 \text{ u}/\mu\text{l}$) och dess tillhörande buffert och provet benämns *RE2* nedan. Proverna inkuberades på ett 37°C värmeblock i 18 timmar. Enzymerna inaktiverades därefter genom att proven placerades på ett 80°C värmeblock i 20 minuter. Se Bilaga G för protokoll.

4.3.2.2 PCR-metoden

Till fyra tunna PCR-rör tillsattes *10x long PCR buffert*, nukleasfritt vatten och dNTP Mix (2 mM) vilken bereddes enligt Bilaga H. Därefter tillsattes Primer1 ($100 \mu\text{M}$) till två rör och Primer2 ($100 \mu\text{M}$) till två rör. Virusgenomet ($1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) tillsattes därefter i alla prover. Precis innan PCR-körningen tillsattes *long PCR enzyme mix* ($5 \text{ u}/\mu\text{l}$) för att *Taq*-polymerasetts aktivitet inte skulle försämrats. Under samtliga beskrivna steg hölls alla prover på is. För mängder, se Bilaga I. Proverna placerades i en PCR-maskin över natten enligt protokollet som återfinns i Bilaga I. Produkterna från de två prov som innehöll Primer1 överfördes till ett nytt eppendorfrör, vilket benämns *PCR1*. På samma sätt överfördes produkterna från de två prov som innehöll Primer2 till ett annat eppendorfrör, vilket benämns *PCR2*. Proverna renades och därefter bestämdes koncentrationen DNA via absorbans med Nanodrop spectrophotometer 5069. MilliQ användes som referensprov och $2 \mu\text{l}$ av *PCR1* respektive *PCR2* analyserades. Resultat från koncentrationsbestämning av *PCR1* och *PCR2* finns tillgängligt i Tabell J-2.

⁴Guanin binder till cytosin med tre vätebindningar medan adenin binder till tymin med två vätebindningar, vilket visas i Figur 2-1.

4.3.3 Verifiering av linjära DNA-sekvenser

Verifiering av att linjära enkelsträngade DNA-sekvenser tillverkats med RE- och PCR- metoden gjordes på en denaturerande 5 % polyakrylamidgel. Φ X174-genom (312 pmol DNA-bas), RE1 (256 pmol DNA-bas), RE2 (256 pmol DNA-bas), PCR1 (200 pmol DNA-bas) samt PCR2 (238 pmol DNA-bas) adderades till varsitt provrör. Till de fem provrören tillsattes också formamid och 6X Orange DNA Loading Dye. För volymer av respektive prov, se Bilaga J. Proverna laddades på gelen och elektrofores utfördes vid 150 V i två timmar. DNA-proverna efterinfärgades med Sybrgoldlösning och scannades. Resultat från verifieringen av linjära DNA-sekvenser redovisas i Figur 5-3. Intensitetsanalys på gelbilden genomfördes med programvaran *ImageQuantTL* för att erhålla ett kvantitativt mått på mängden DNA vid specifika positioner på gelen. Resultatet visas i Figur 5-4.

4.3.4 Inmärkning med biotin och DIG

Med terminaltransferas inmärktes de två olika linjära sekvenspermutationerna från virusgenomet med två olika affinitetstaggar, biotin och DIG för att skapa DNA-handtagen. Med biotin inmärktes DNA-molekyler från RE1 (4,95 pmol) samt DNA-molekyler från PCR1 (5 pmol). Samma mängd molekyler från respektive metod inmärktes med DIG på de två resterande proverna, RE2 och PCR2, innehållandes de linjära DNA-molekylerna. De fyra reaktionerna skedde i varsitt eppendorfrör tillsammans buffert, dNTP-mix, terminaltransferas, linjära DNA-molekyler, samt respektive affinitetstagg, BIOTIN-16-dUTP eller DIG-11-dUTP. Därefter placerades eppendorfrören i ett 37°C värmeblock i 30 minuter. För exakta mängder se Bilaga K. För innehåll i dNTP-mix se Bilaga H.

4.3.5 Tillagd rening av DNA-prov

Under experimentets gång framkom det att den buffert som användes tillsammans med terminaltransferas reagerade med den buffert som användes vid ligering av DNA-konstrukt. Under reaktionen skapades en brunaktig fällning, troligen ett koboltsalt. Av denna anledning renades de biotin-respektive DIG-inmärkta handtagen enligt avsnitt 4.1.4.

4.3.6 Titrerings för att verifiera inmärkning av affinitetstaggar

För att verifiera att DNA-handtagen blivit inmärkta med biotin respektive DIG utfördes en titrerings med streptavidin- respektive anti-DIG-inmärkta polystyrenkulor. Storleken på polystyrenkulorna hindrar kulorna från att migrera in på gelen. Med en ökad mängd polystyrenkulor i brunnarna kan större andel DNA-handtag genom att binda till polystyrenkulorna hindras från att migrera in på gelen.

Två 1 % agarosgeler tillverkades och lösningar förbereddes för att laddas på gelerna. Först tillsattes DNA och inmärkta polystyrenkulor till eppendorfrör som inkuberades i rumstemperatur i tio minuter innan övriga ämnen adderades. För RE-metoden förbereddes totalt 13 prover. Till ett av proven tillsattes RE1-molekyler (0,24 pmol) och till ett annat adderades RE2-molekyler (0,24 pmol), i dessa provrör tillsattes inga kulor. Till ytterligare fem eppendorfrör tillsattes RE1-handtag (0,1 pmol DNA-molekyler) och en 0,5 % vikt per volym-lösning av streptavidininmärkta polystyrenkulor med ökande volym för varje prov. I fem andra eppendorfrör tillsattes RE2-handtag (0,1 pmol DNA-molekyler) tillsammans med en 0,1 % vikt per volym-lösning av anti-DIG-inmärkta polystyrenkulor med ökande volym för varje prov. Till det sista eppendorfröret adderades DNA-stegen O'RangeRuler 500 bp. Till samtliga prover tillsattes Sybrgoldlösning, 6X Orange DNA Loading Dye och 15 % ficollösning. För volymer se Bilaga L. En gelelektrofores utfördes med fältstyrkan 4 V/cm i två timmar och därefter scannades gelen. Resultatet redovisas i Figur 5-5. Dessutom utfördes en intensitetsanalys av gelen för att kvantifiera andelen DNA som fanns kvar i brunnen. Mängden DNA i brunnen normerades mot den totala mängden DNA i banan och resultatet visas i Figur 5-6. En titrerings med polystyrenkulor utfördes även för prover från PCR-metoden. För protokoll se Bilaga L.

Utifrån resultatet från experiment beskrivna i avsnitt 4.3.3 och 4.3.6 som redovisas i resultatavsnitten 5.2 samt 5.3 bestämdes att resterande experiment endast skulle utföras med DNA-handtag

tillverkade med RE-metoden.

4.3.7 Hybridisering av DNA-konstrukt med RE-handtag

För att skapa DNA-konstrukten utifrån DNA-handtagen tillsattes i ett eppendorfrör RE1-handtag (0,678 pmol DNA-molekyler), RE2-handtag (0,678 pmol DNA-molekyler), RE-oligo (1 pmol DNA-molekyler), RE-komplement (1 pmol DNA-molekyler), 10xT4 DNA-ligasbuffert och milliQ. För volymer av respektive komponent, se Bilaga M. Provet blandades, centrifugerades varsamt, värmdes i fem minuter i 70°C och hybridiserades i rumstemperatur över natten. Uppvärmningen till 70°C var för att denaturera hybridiserade primerrester, se vidare Figur 4-1a, samt eventuella sekundärstrukturer. Detta för att DNA-handtagen skulle kunna hybridisera korrekt till respektive kärnssekvens.

4.3.8 Ligering av DNA-konstrukt

För att ligera ihop det hybridiserade DNA-konstruktet, se Figur 4-2, tillsattes *T4 DNA ligase* med tillhörande buffert till provröret. Därefter vortexades och centrifugerades provet under några sekunder. För volymer se Bilaga O. Provet ligerades i rumstemperatur i två timmar och ligaset inaktiverades genom värmning i 70°C i fem minuter. Slutligen adderades EDTA-lösning (0,2 µM) för att eventuella DNA-nedbrytande enzym skulle inaktiveras.



Figur 4-2: Icke-ligerat konstrukt. Ett konstrukt där alla fyra delar har hybridiserat. Notera de orangefärgade cirkelarna vilka markerar de områden där ligering ska ske.

4.3.9 Sträckning av DNA-konstrukt

Sträckning av DNA-konstrukt utfördes av handledare med hjälp av en optisk pincett. DNA-konstrukten undersöktes i en lösning bestående av NaCl (1 M), tris (10 mM), pH 7,4 samt EDTA (1 mM), resultatet presenteras i Figur 5-7.

4.3.10 Analys av sekundärstrukturer i DNA-handtagen

Verifiering av sekundärstrukturer i de linjära DNA-handtagen utfördes på en icke-denaturerande 5 % polyakrylamidgel. För volymerna av ingående komponenter i provsatsningen, se Bilaga C. DNA-stegen O'RangeRuler 500 bp, Sybrgold (2x) och formamid adderades till ett eppendorfrör. Därefter adderades intakt ΦX174-genom (312 pmol DNA-bas), RE1 (256 pmol DNA-bas), RE2 (256 pmol DNA-bas) till var sitt eppendorfrör. Till dessa tre tillsattes också formamid, Sybrgold (2x) och 6X Orange DNA Loading Dye. Proverna laddades på gelen varefter elektroforesen pågick under två timmar med fältstyrkan 8 V/cm. Därefter scannades gelen, för resultat se Figur 5-9.

4.3.10.1 Undersökning av hybridisering

Hybridiseringen av RE-oligo och RE-komplement, det vill säga DNA-konstrukt utan handtag, undersöktes via en smältkurvsanalys med spektrofotometern *Varian Cary 5000 spectrophotometer*. Detta gjordes med RE-oligo (100 µM), RE-komplement (100 µM) samt RE-oligo (100 µM) blandat med RE-komplement (100 µM) i en NaCl-lösning (100 mM). Proverna förflyttades till kvartskvetter för mätning av absorbansspektra och DNA-koncentration. Efter att absorbanmätningar gjorts, späddes proverna till 1,05 µM för att erhålla värden inom det tillförlitliga absorptions-spektrat⁵. RE-oligo (100 µM), RE-komplement (100 µM) samt RE-oligo (100 µM) blandat med RE-komplement (100 µM), adderades till var sin kyvett tillsammans med 100mM NaCl-lösning för att erhålla slutkoncentrationen på 1,05 µM. Se Bilaga N för volymer.

⁵Det vill säga en absorban under 1.

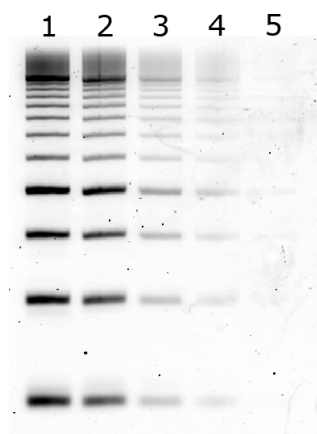
Kyvetterna placerades i ett tempererat block i spektrofotometern, varpå denna ställdes in för att mäta absorbans vid 260 nm. Temperaturen i blocket ställdes in till att öka från 15°C till 90°C med hastigheten 1°C per minut. Vid 90°C hölls temperaturen konstant i fem minuter för att sedan minska, med samma hastighet som ökningen, tillbaka till 15°C. Temperaturen hölls på 15°C i fem minuter varpå cykeln upprepades en gång till. Erhållna data konverterades och en graf över förloppet erhöles, för resultat se Figur 5-10.

5 Resultat och diskussion

Inledningsvis redovisas resultat från de experiment som utfördes under projektet. En diskussion följer där resultatens betydelse och relevans fastställs. Avslutningsvis presenteras en slutsats och även förslag på hur projektet hade kunnat fortskrida.

5.1 Metodutvecklande steg

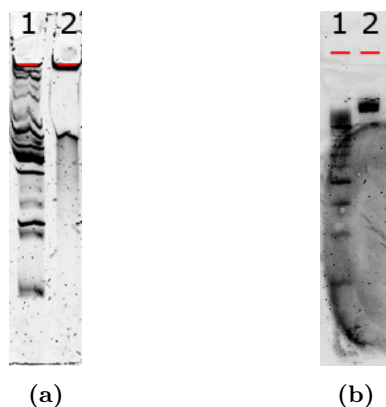
De två metodutvecklande stegen, infärgning med Sybrgold och gelbestämning beskrivs nedan. Resultatet från experimentet där DNA förfärgades med olika koncentrationer av Sybrgold och DNA-molekylerna migrerade i en agarosgel visas i Figur 5-1. Från gelen i figuren kan det bekräftas att DNA-molekyler kan förfärgas med Sybrgold och därefter visualiseras på en agarosgel. Alla banor på agarosgelen innehåller samma mängd av DNA-stegen O'range ruler 500 bp, men med en minskande mängd av tillsatt Sybrgold.



Figur 5-1: Koncentrationsgradient för Sybrgold. En koncentrationsgradient i en 1 % agarosgel där DNA-molekylerna förfärgades med Sybrgold. Samtliga banor innehåller samma mängd av DNA-stegen O'range ruler 500 bp (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). DNA-molekylerna i stegen förfärgades med olika mängd av Sybrgold. Stamlösningen Sybrgold späddes enligt rekommendation för bana 1. Denna lösning späddes sedan 2x för bana 2, 4x för bana 3, 8x för bana 4 och 16x för bana 5.

Distinkta DNA-band kan visualiseras på gelen vilket indikerar att DNA har migrerat på gelen, samt att färgämnet inte binder till gelen vid förfärgning. Koncentrationerna i bana 1 (1x) och 2 (2x) var tillfredställande eftersom tydliga band kunde observeras i båda banorna. Den infärgningskoncentration som användes i bana 2 tillämpades vid resterande experiment där DNA förfärgades, då den dels gav ett tydligt resultat och dessutom var koncentrationen av Sybrgold lägre än i bana 1. Koncentrationerna i bana 3 (4x), 4 (8x) och 5 (16x) ansågs för låga vid förfärgning av DNA i en 1 % agarosgel.

Resultatet som visar hur linjärt och cirkulärt ΦX174 -genom migrerar på en denaturerande 5 % polyakrylamidgel respektive 1 % agarosgel visas i Figur 5-2. Det kan tydligt observeras att en viss mängd av DNA-provet fastnat i brunnen på polyakrylamidgelen, se Figur 5-2a, vilket inte är fallet i agarosgelen, se Figur 5-2b, då alla DNA-molekyler migrerat från brunnen. Bana 1 på de båda gelerna innehåller DNA-stegen O'range ruler 500 bp och bana 2 på båda gelerna innehåller ΦX174 -genom.



Figur 5-2: Linjärt och cirkulärt DNA på polyakrylamid- respektive agarosgel. Gelelektrofores för att jämföra hur cirkulärt enkelsträngat Φ X174-genom migrerar i en polyakrylamid- respektive agarosgel. Bana 1 innehåller DNA-stegen O'range ruler 500 bp ($0,5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) och bana 2 det enkelsträngade virusgenomet ($9,4 \mu\text{M}$ DNA-bas). Brunnarna är markerade med rött i både (a) och (b). Notera hur en viss mängd DNA fastnar i brunnen i polyakrylamidgelen till skillnad från agarosgelen. **(a)** Denaturerande 5 % polyakrylamidgel som efterinfärgades med Sybrgold. **(b)** 1 % agarosgel där DNA-molekylerna förfärgades med Sybrgold.

Slutsatsen är att det DNA som fastnat i brunnen på polyakrylamidgelen, är de 85 % av Φ X174-genomet som består av cirkulära DNA-molekyler och det DNA som migrerat in på gelen utgörs av det resterande 15 % som är linjära DNA-molekyler. På agarosgelen syns bara ett band på gelen, vilket betyder att både de linjära och cirkulära DNA-molekylerna vandrat in på gelen.

Anledningen till att DNA-proverna migrerar olika på gelerna är troligtvis en följd av gelernas strukturella uppbyggnad. Att det cirkulära virusgenomet fastnar i brunnen på en polyakrylamidgel beror på de tvärbundna polymerkedjorna i gelen, vilka gör porstorleken relativt liten i förhållande till agarosgelen porstorlek, se stycke 2.3.2. I agarosgelen migrerar däremot det cirkulära virusgenomet, vilket kan förklaras med den större porstorleken. Baserat på resultatet i Figur 5-2 användes en polyakrylamidgel i de fall där linjära DNA-sekvenser behövde urskiljas från det cirkulära Φ X174-genomet.

5.2 Från cirkulärt till linjärt DNA

I både RE- och PCR-metoden erhöles linjära DNA-molekyler med cirkulärt virusgenom som startmaterial. Verifieringen av de linjära DNA-molekylerna presenteras på en denaturerande 5 % polyakrylamidgel i Figur 5-3. Bana 1 innehåller Φ X174-genom. Bana 2 och 3 visar de linjära DNA-fragmenten av Φ X174-genomet som klyvts med enzymerna *Pst*I, RE1, respektive *Stu*I, RE2. Bana 4 och 5 innehåller de linjära DNA-fragmenten tillverkade i PCR med Primer1, PCR1, respektive Primer2, PCR2.

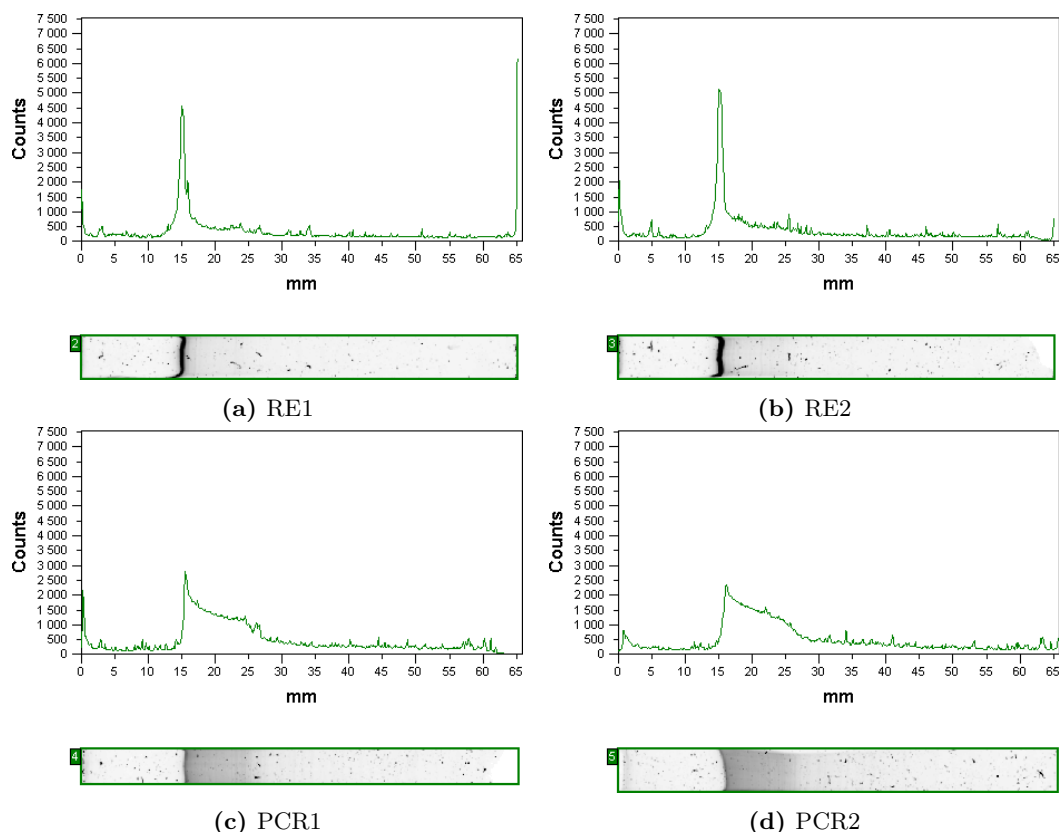


Figur 5-3: Verifiering av linjära DNA-molekyler. En denaturerande 5 % polyakrylamidgel som efterinfärgades med Sybrgold för att bekräfta att det utifrån cirkulärt Φ X174-genom skapats linjära DNA-molekyler. 1: Φ X174-genom där 85 % är cirkulärt och 15 % är linjärt (31,2 μ M DNA-bas). 2: RE1 (25,26 μ M DNA-bas). 3: RE2 (25,26 μ M DNA-bas). 4: PCR1 (22,8 μ M DNA-bas). 5: PCR2 (22,8 μ M DNA-bas). Notera att bana 1 har en högre koncentration av DNA-baser.

Då DNA-molekylerna i bana 2-5 har migrerat in på gelen indikerar det att DNA-molekylerna är linjära. En jämförelse kan göras med bana 2, där de cirkulära Φ X174-genomen fastnat i brunnen. Avsaknaden av DNA i brunnarna hos bana 2-5 tyder på att proven endast innehåller linjära DNA-sekvenser.

Figur 5-3 ger också en indikation av storleken på DNA-fragmenten. De 15 % linjära fragmenten av Φ X174-genomet i bana 1 har migrerat på gelen och kan därför användas som storleksmarkör för 5386 baser. DNA-sekvenserna i bana 2-5 har migrerat lika långt som det linjära bandet i bana 1. Resultatet tyder på att både RE- och PCR-metoden genererade linjära DNA-fragment av en uppskattad längd på 5386 baser.

Proverna framställda med PCR-metoden verkade innehålla en större variation av längder på de linjära DNA-fragmenten jämfört med de RE-baserade proverna i Figur 5-3. Denna observation bekräftades med intensitetsanalys av bana 2-5 i Figur 5-4. I figurerna plottas antalet DNA-molekyler mot sträckan som de har migrerat på gelen, där brunnen är vid 0 mm på den horisontella axeln. Figur 5-4a och 5-4b visar intensitetskurvorna för DNA-molekylerna framställda med RE-metoden. Figur 5-4c och 5-4d visar intensitetskurvorna för DNA-molekylerna framställda med PCR-metoden.



Figur 5-4: Intensitetsprofiler. Intensitetsprofiler baserade på bana 2-5 i Figur 5-3 för att kunna jämföra storleksfördelningen av DNA. Grafen visar antalet DNA-molekyler som en funktion av sträcka DNA-molekylerna migrerat i gelen. Banan som intensitetsprofilen är baserad på syns under respektive graf med jämförbar längdskala. Brunnen för de fyra banorna är vid 0 mm. Notera de skarpa topparna vid 15 mm för DNA-sekvenser skapade med RE-metoden jämfört med de mindre och bredare topparna för PCR-metoden.

I Figur 5-4 uppvisar RE-metoden skarpa och tydliga intensitetstoppar vid 15 mm för både 5-4a och 5-4b, vilket bekräftar att större delen av DNA-molekylerna i proverna är av samma längd. PCR-metoden däremot uppvisar en markant skillnad med en bred kortare topp vid 15 mm som sakta avtar, vilket betyder på att DNA-fragmenten är av mer varierande längd än fragmenten i RE-metoden. De varierande längderna på fragmenten i PCR-metoden kan komma att påverka analysen av ändeffekterna i den optiska pincetten, då det är av stor vikt för projektet att de linjära fragmenten är av fulllängd. De DNA-handtag som blir av fel längd kommer möjligtvis bidra till ett missvisande värde på denna ändeffekt.

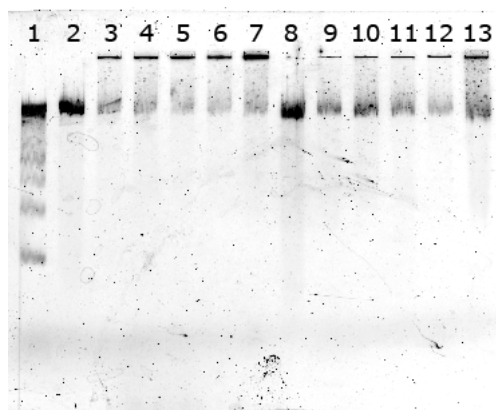
En tänkbar anledning till att fler korta DNA-fragment skapats med PCR-metoden jämfört med RE-metoden kan vara att *Taq*-polymeraset dissocierar från templatet innan syntesen var slutförd. En annan förklaring kan vara att de 15 % ursprungliga linjära DNA-molekylerna i Φ X174-provet också fungerat som templat. Det skulle betyda att sekvensen komplementär till primern kan finnas mitt i slumpmässigt linjäriserade Φ X174-genom, vilket genererar fragment av varierande längder.

För verifikationen av de linjära DNA-fragmenten, se Figur 5-3, behövdes DNA-provernas koncentration. Koncentrationen av produkter för RE-metoden beräknas genom att anta att maximalt utbyte erhöles, se avsnitt 4.3. Slutkoncentrationen av produkter för PCR-metoden bestämdes via absorptionsmätning och antalet genererade DNA-fragment redovisas i Bilaga J. Vid enhetsomvandlingen från vikt till antal DNA-molekyler antogs alla produkter vara av fulllängd. Resultatet från koncentrationsbestämningen visar en minst tiofaldig ökning av mängden DNA-molekyler av PCR-produkterna. Detta antyder att primern har bundit in till virusgenomet och att varje templat har gett upphov till ungefär tio produkter.

Antagandet att linjära molekyler erhöles för de båda metoderna bekräftas av intensitetsanalysen då provet lämnat brunnen även om mindre andel av PCR-metodens fragment var av fulllängd.

5.3 Verifiering av biotin- och DIG-inmärkning

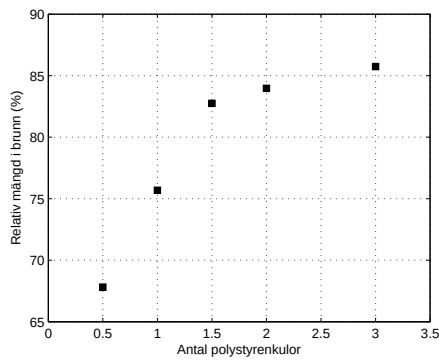
Resultatet från titreringen av restriktionsenzymbaserade DNA-handtag med polystyrenkulor för att verifiera att terminaltransferaset inkorporerat biotin och DIG redovisas i Figur 5-5. I experimentet var mängden DNA konstant i samtliga banor medan mängden polystyrenkulor varierades. De biotininmärkta DNA-molekylerna i bana 3-7 ansågs motsvara förväntningarna att DNA-handtagen ackumulerades med ökande mängd polystyrenkulor, vilket var ett resultat som inte var lika tydligt för de DIG-inmärkta DNA-molekylerna i bana 9-13. Observera att då kraftpåverkan under gelelektroforesen endast uppgick till 0,3 pN testades inte bindningarnas styrka, utan endast ifall DNA-handtagen blivit inmärkta, för beräkning av kraften se Bilaga R. I bana 1 visas DNA-stegen O'range ruler 500 bp, bana 2 och bana 8 innehåller RE1- respektive RE2-molekyler som ej är inmärkta med affinitetstaggar. Till dessa tre prover tillsattes inga polystyrenkulor. Bana 3-7 och bana 9-13 innehåller samma mängd DNA som bana 2 och 8. Skillnaden är att bana 3-7 och bana 9-13 innehåller RE1- respektive RE2-handtag samt ökande mängd polystyrenkulor.



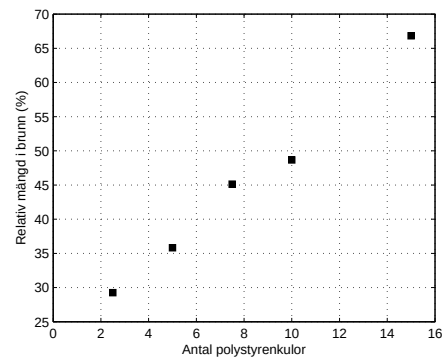
Figur 5-5: Polystyrenkulgradient. Titrering av DNA-handtag med polystyrenkulor för att undersöka om DNA-handtagen från RE-metoden blivit inmärkta. Bana 1 innehåller DNA-stegen O'range ruler 500 bp ($0,5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$). Banorna 3-7 innehåller samma mängd biotininmärkta DNA-handtag ($53,9 \mu\text{M}$ DNA-bas) och en ökande mängd streptavidininmärkta polystyrenkulor där bana 3 har minst mängd kulor och bana 7 störst mängd kulor. Banorna 9-13 har samma mängd DIG-inmärkta DNA-handtag ($53,9 \mu\text{M}$ DNA-bas) och en ökande mängd anti-DIG-inmärkta polystyrenkulor, där bana 9 har minst mängd kulor och bana 13 störst mängd kulor. Bana 2 och 8 innehåller RE1- respektive RE2-molekyler ($53,9 \mu\text{M}$ DNA-bas) samt inga kulor. Figuren visar en 1 % agarosgel där DNA-molekylerna förinfärgades med Sybrgold.

Motsvarande titrering utfördes för PCR-metodens DNA-handtag, även dessa inmärkta med biotin och DIG. Dock kunde inget resultat tydas från detta försök då DNA-handtagen, i banorna utan polystyrenkulor, ej kunde observeras på agarosgelen (data visas ej). Resultatet i kombination med att DNA-molekylerna verkade förekomma i varierande längder, se Figur 5-4, motiverade beslutet att utesluta PCR-metodens DNA-handtag från vidare studier.

En observation från agarosgelen i Figur 5-5 var att trots DNA-handtagens ackumulation i brunnarna med ökande mängd polystyrenkulor ansågs fortfarande DNA migrera ut i banorna. För att vidare analysera gelen utfördes en intensitetsjämförelse av brunnarna 3-7 samt 9-13 och resultatet av denna mätning visas i Figur 5-6. I grafen plottas de normerade värdena av DNA-molekylerna för respektive bana mot den tillsatta volymen polystyrenkulor. I Figur 5-6a visas sambandet mellan DNA-handtag inmärkt med biotin och mängd polystyrenkulor inmärkta med streptavidin. I Figur 5-6b visas motsvarande där DNA-handtagen är inmärkta med DIG och polystyrenkulorna med anti-DIG.



(a) Biotininmärkt DNA



(b) DIG-imärkt DNA

Figur 5-6: Intensitetsjämförelse. Intensitetsjämförelse av den DNA-mängd som är kvar i brunnarna i Figur 5-5. Relativ mängd DNA-molekyler i brunn normerat mot total mängd migrerat prov syns på y-axeln och tillsatt volym polystyrenkuler syns på x-axeln. Antalet kuler i bana 3-6 motsvarar antalet kuler i bana 9-13. Koncentrationen streptavidininmärkta polystyrenkuler var 5 gånger högre än koncentrationen anti-DIG-inmärkta polystyrenkuler, därav skillnaden i laddad volym. **(a)** Interaktionen mellan biotininmärkta DNA-handtag och streptavidininmärkta polystyrenkuler. Observera att mätdtatan avtar efter tillsats av cirka 1,5 μl polystyrenkuler. **(b)** Interaktionen mellan DIG-inmärkta DNA-handtag och anti-DIG-inmärkta polystyrenkuler. Notera att mätdatan inte avtar inom detta intervall.

Mätdata för de biotininmärkta DNA-handtagen och streptavidininmärkta polystyrenkulorna tenderar till att konvergera mot 85 % av provet i brunnen efter tillsats av 1,5 μl polystyrenkuler. Detta tyder på att alla DNA-molekyler som kan fastna på polystyrenkulorna har gjort det, resterande 15 % av DNA-molekylerna har antagligen inte blivit inmärkta med biotin. En misstanke om att DNA-handtagen är steriskt hindrade av kulorna kan uppstå eftersom redan vid 0,5 μl tillsatta kuler återfinns drygt 65 % av DNA-handtagen i brunnen. Misstanken kan dock avfärdas vid en jämförelse av mätpunkterna, eftersom vid samma mängd DNA och med lika många kuler återfinns bara 30 % av DNA-handtagen på de anti-DIG inmärkta polystyrenkulorna i brunnen. För exakta mängder av DNA-molekyler per brunn se Bilaga L. Förhållandet mellan DNA-molekyler och polystyrenkuler som förekommer i brunnarna på gelen i Figur 5-5 redovisas i Tabell 5-1.

Mätdata för de DIG-inmärkta DNA-handtagen konvergerar inte men antyder att minst 67 % av DNA-handtagen har blivit inmärkta. Att ingen konvergens observeras kan bero på att de anti-DIG-inmärkta polystyrenkulorna har färre anti-DIG inkorporerade än vad de streptavidininmärkta polystyrenkulorna har streptavidin. En annan förklaring kan vara att DNA-handtagen har för få DIG inkorporerade för att vara jämförbara med de biotininmärkta DNA-handtagen. Detta styrks av att affiniteten är svagare för DIG och anti-DIG ($K_d \cong 10^{-9}\text{M}$) än biotin och streptavidin ($K_d \cong 10^{-15}\text{M}$), se vidare 2.2.4.

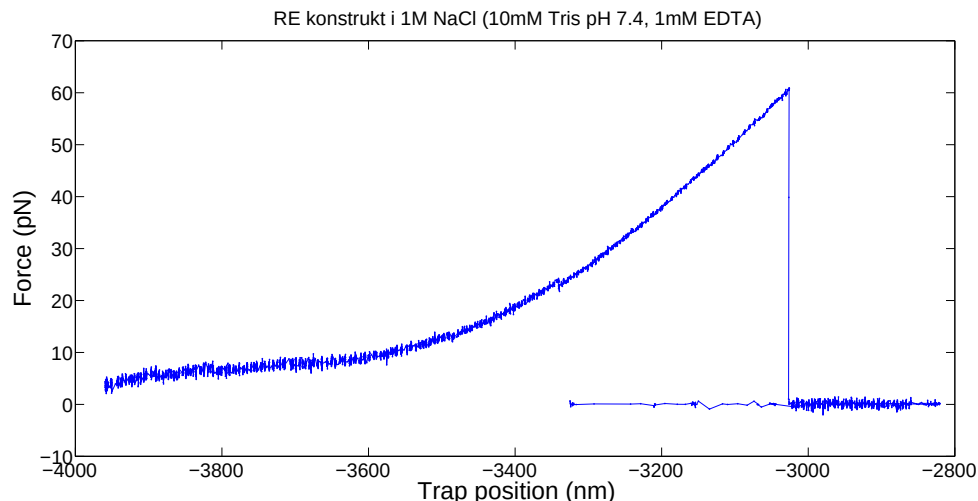
Tabell 5-1: DNA-molekyler per polystyrenkula. Antal DNA-molekyler per polystyrenkula baserat på de mängder som laddades på gelen i Figur 5-5. Bana 3-7 visar DNA-molekyler inmärkta med biotin per polystyrenkula märkt med streptavidin och bana 9-13 visar motsvarande där DNA-molekylerna är inmärkta med DIG och polystyrenkulorna med anti-DIG. Notera att antalet DNA-molekyler tillsatt är samma för båda typer av kuler.

Bana	3	4	5	6	7	9	10	11	12	13
Antal DNA-molekyl/ polystyrenkula (10^3)	123	61	41	31	20	123	61	41	31	20

5.4 Sträckning av DNA-konstrukt i optisk pincett

Resultatet från sträckningen av DNA-konstruktet i den optiska pincetten presenteras i Figur 5-7. Grafen tyder på att funktionella DNA-handtag har tillverkats eftersom det har varit möjligt att

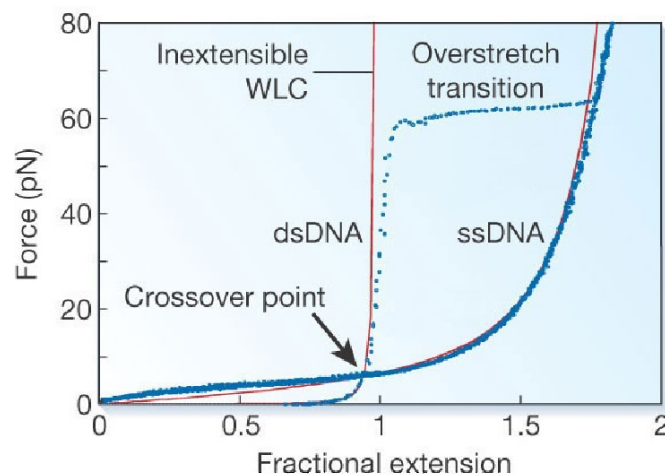
applicera kraft på DNA-konstruktet. Dessutom kan det bekräftas att DNA-konstruktet har längre DNA-handtag än de korta befintliga DNA-handtagen. Grafens trendbrott vid 60 pN i Figur 5-7 gör dock att den reversibla bistabiliteten i Figur 1-2 inte kunde studeras. I Figur 5-7 presenteras den kraft som applicerades på DNA-konstruktet som en funktion av det relativa avståndet mellan kulorna.



Figur 5-7: Kraftpåverkan på det framställda DNA-konstruktet. Den applicerade kraften syns på y-axeln och den optiska fällans absoluta position på x-axeln. Notera det tydliga trendbrottet vid omkring 60 pN, vilket motsvarar den kraft då DNA-molekylen inte längre är sammanlänkad mellan de två polystyrenkulorna.

Trendbrottet tyder på att DNA-konstruktet inte längre är sammanlänkat mellan de båda polystyrenkulorna. Dock har det varit möjligt att applicera kraft på DNA-konstruktet, vilket styrker det tidigare resultatet, se Figur 5-6, att affinitetstagarna har bundit in till de ytbelagda polystyrenkulorna. Därmed kan det bekräftas att det DNA-handtaget som är DIG-inmärkt är fäst till en anti-DIG-inmärkt polystyrenkula och att det biotinmärkta DNA-handtaget är fäst till en streptavidinmärkt polystyrenkula. Resultatet fastställer även att terminaltransferaset har inkorporerat tillräckligt många affinitetstaggar på respektive DNA-handtag för att sträckning i en optisk pincett ska vara möjlig.

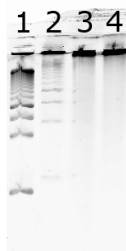
Kraftmätningen i Figur 5-7 bekräftar dessutom att DNA-konstruktet har längre DNA-handtag än de korta befintliga DNA-handtagen. Resultatet stärks av tidigare kraftmätningar som gjorts på enkelsträngat DNA och ett exempel illustreras i Figur 5-8 där det applicerats kraft på en lång enkelsträngad DNA-molekyl (blå kurva, ssDNA). Om trendbrottet inte hade inträffat för det tillverkade DNA-konstruktet så hade det kunnat undersökas om DNA-konstruktet undergår en reversibel bistabilitet, det vill säga där DNA-molekylen växlar mellan B- och S-form, vid 65 pN.



Figur 5-8: Enkelsträngat DNA under kraftpåverkan. Graf som visar hur långt enkelsträngat DNA (ssDNA) betar sig under kraftpåverkan i en optisk pincett. Figuren är lånad från artikeln *Ten years of tension: single-molecule DNA mechanics* av C. Bustamante m fl. [3].

Det är även av intresse att jämföra den experimentella längd av DNA-konstruktet som uppnåddes under dragning mot den teoretiskt maximala längd som DNA-konstruktet kan ha då kärnan befinner sig i B-form. Det borde inte vara någon större längdskillnad mellan det teoretiska och det experimentiella värdet, eftersom kraften på 60 pN då trendbrottet sker i Figur 5-7 är nära 65 pN där reversibel bistabilitet uppstår. Från Figur 5-7 kan man se att DNA-konstruktet har en längd av cirka 1 μm . Den teoretiskt maximala längden som beräknats är däremot 4,3 μm , för beräkningar se Bilaga S.

Skillnaden mellan DNA-konstruktets teoretiska och experimentiella längd kan bero på att det förekommer sekundärstrukturer inom DNA-handtagen. Den icke-denaturerande 5 % polyakrylamidgel som bekräftade sekundärstrukturer, visas i Figur 5-9. Bana 1 visar DNA-stegen O'Range ruler 500 bp, bana 2 visar startprovet med ΦX174 -genom där 85 % är cirkulärt och 15 % är linjärt, bana 3 visar RE1 och bana 4 visar RE2. Slutsatsen är att de restriktionsbaserade proverna har fastnat i brunnen till följd av sekundärstrukturer i DNA-handtagen.

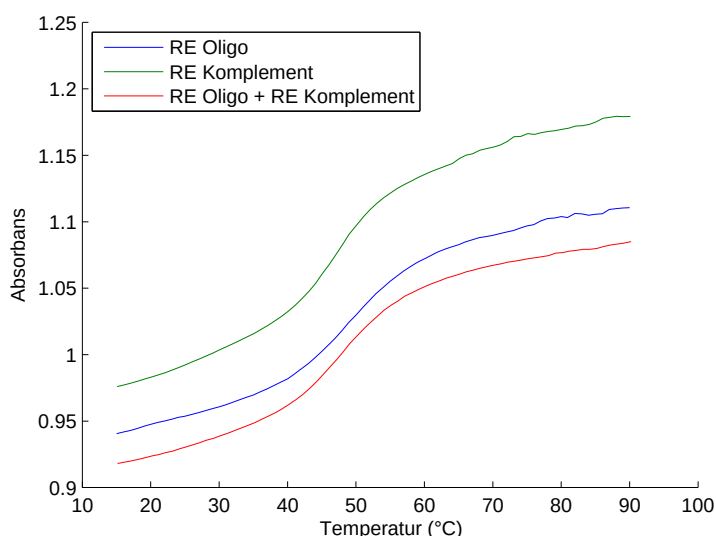


Figur 5-9: Undersökning av sekundärstrukturer inom DNA-handtagen. Bana 1-4 innehåller, i ordning; DNA-stegen O'Range ruler 500 bp (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), ΦX174 -genom där 85 % är cirkulärt och 15 % är linjärt (31,2 μM DNA-bas), RE1 (25,26 μM DNA-bas), RE2 (25,26 μM DNA-bas). Icke-denaturerande 5 % polyakrylamidgel där DNA-molekylerna förfärgades med Sybrgold.

Observera att de restriktionenzymbaserade proverna, RE1 eller RE2, inte migrerar på den icke-denaturerande polyakrylamidgelen, vilket tyder på sekundärstrukturer jämfört med DNA-stegen i bana 1. DNA-stegen användes för att säkerställa att linjära sekvenser utan sekundärstrukturer kunde migrera på gelen. De linjära DNA-molekylerna i virusgenomet i bana 2 migrerar inte heller ut på gelen vilket tyder på sekundärstrukturer redan i ursprungsgenomet. Den tidigare observationen att DNA-handtagen är kortare än den teoretiska längden tyder på sekundärstrukturerna som finns i ΦX174 -genomet.

5.5 Analys av kärnan med överlappssekvenser

Resultatet från de absorptionsmätningar som utfördes i temperaturintervallet 15-90°C för att verifiera hybridisering av kärnsekvenserna tyder på att hybridisering av kärnsekvensen inte har skett, se Figur 5-10. Nerkyllningen från 90°C till 15°C samt den upprepande cykeln visade samma resultat (visas ej i figur). I graferna presenteras den uppmätta absorbansen för proverna innehållandes DNA-sekvenserna RE-komplement, RE-oligo samt provet innehållandes båda enkelsträngarna som funktion av temperaturen.



Figur 5-10: Absorptionsmätning under temperaturintervallet 15-90°C. Absorbansen plottad mot temperaturen för prov innehållandes RE-oligo, RE-komplement samt RE-komplement tillsammans med RE-oligo. Notera att proven innehållandes RE-oligo, RE-komplement samt provet innehållandes både RE-oligo och RE-komplement har samma kurvatur.

Experimentet tyder på att hybridisering av kärnsekvensen inte har skett då de tre smältkurvor-
nas utseende inte skiljer sig nämnvärt åt. Provet innehållandes både RE-komplement och RE-oligo
uppför sig på samma sätt under temperaturintervallet som de båda enkelsträngarna var för sig.
Absorbansen för de tre proverna ökar med ungefär 10-20 % under temperaturökningen, vilket kan
förklaras med att det finns sekundärstrukturer i sekvenserna för RE-oligo och RE-komplement.
Det ska även poängteras att smältkurvsanalyserna inte utförts under samma betingelser, se avsnitt
4.3.7, som vid hybridiseringen av proverna vid framställningen av DNA-konstrukten. Lösningen
som användes i smältkurvsanalysen i Figur 5-10 innehöll färre komponenter men då proverna inte
hybridiserat under dessa förhållandena i smältkurvsanalysen så antas de inte heller hybridisera i
lösningen som DNA-konstrukten skulle framställas i.

5.6 Analys av design av oligonukleotider

Då smältkurvorna tydde på att ingen hybridisering skett undersöktes sekvenserna hos kärnan för
att kontrollera så att de från början var korrekt designade. Vad som då uppdagades var att kärnans
sekvenser var parallellt komplementära istället för antiparallellt komplementära. Kärnsekvensen i
RE-komplementet har designats felvänd men beställts syntetiserad med den korrekta överlapps-
sekvensen, se Figur 5-11. Upptäckten betydde i sin tur att kärnsekvenserna hos RE-oligo och
RE-komplement ej kunnat hybridisera och därmed har inte ett korrekt DNA-konstrukt kunnat
skapas. Slutsatsen påverkar dock inte de tidigare analyserna som utförts på DNA-handtagen.

5'-CTACGCGATTTTCATAGTGGAGGTAGTTGTCTCGGTGAAACC
GGGCGACCAGCGGCGATAGCTGTCCGAGTTACGACCTCCCA-3'

(a) RE-komplement

5'-CTACGCGATTTTCATAGTGGAGGACCCTCCAGCATTGAGCCTGTCGATAGCGGCGACCAGC
GGGCCAAAGTGGCTCTGTTGA-3'

(b) Korrekt RE-komplement

Figur 5-11: RE-komplement. (a) Bestäld felkonstruerad RE-komplementsekvens. I svart visas hur överlappssekvensen till DNA-handtaget ser ut, vilken är korrekt. I blått visas hur kärnsekvensen ser ut. Denna har dock visat sig vara felvänd vilket medför att den ej kan hybridisera antiparallellt med den komplementära kärnsekvensen i RE-oligo. (b) RE-komplementsekvensen som den borde sett ut för att kunna resultera i ett korrekt DNA-konstrukt. I svart visas hur överlappssekvensen till DNA-handtagen ser ut, vilken är korrekt. I Blått visas hur kärnsekvensen borde sett ut för att kunna hybridisera antiparallellt till kärnsekvensen i RE-oligo.

Vad som sedan tidigare bekräftades var att det existerar hybridiserat DNA mellan de två polystyrenkulorna då det har kunnat appliceras en kraft, se Figur 5-7. Det har också visats att det som sammanlänkats mellan de två polystyrenkulorna mestadels består av enkelsträngat DNA. Detta tillsammans med att kärnsekvensen ej kunnat sammanlänka DNA-handtagen leder till antagandet att DNA-handtagen hybridiserat med varandra.

Det som skulle göra det möjligt för de två DNA-handtagen att hybridisera till varandra är om de intramolekylära sekundärstrukturer som existerar bildar till exempel hårnålar. I så fall skulle hårnåls-sekvenserna från de två olika DNA-handtagen kunna hybridisera intermolekylärt, eftersom DNA-handtagen är permutationer av Φ X174-genomet. Antagandet styrks av Shlomai och Kornberg som 1980 föreslog att det åtminstone finns en förhållandevis stabil hårnål i Φ X174-genomet som involverar 44 baser, varav 16 hybridiserar [45]. Dock har det visats att det räcker med en komplementär sekvens på cirka 15 baser inom DNA-molekylen för att sekundärstrukturer ska kunna bildas under betingelserna NaCl (1 M) och 25°C [46]. Det var även dessa betingelser som rådde under verifieringen av de tillverkade DNA-konstrukten. Beroende på vart på DNA-handtagen hybridisering sker kan ett betydligt kortare DNA-komplex erhållas, som är i samma storleksordning som det i Figur 5-7.

Om de färdigställda DNA-konstrukten designats rätt och därefter fungerat som tänkt, hade ett flertal DNA-konstrukt testats på samma sätt som i Figur 5-7. Kraftintervallet där den reversibla bistabiliteten uppkommer hade använts för att beräkna ett medelvärde av kraften för varje test. Förhoppningen hade då varit att variansen mellan de olika medelvärdena skulle vara lägre i fallet med de längre DNA-handtagen än med de kortare DNA-handtagen och att kraften i y-led i Figur 1-3 varit försumbar.

5.7 Slutsats

I projektet har långa enkelsträngade DNA-handtag framställts, två metoder för att åstadkomma detta har kunnat jämföras och dessutom har det applicerats krafter på DNA-molekyler i den optiska pincetten.

Av de två metoderna som studerades anses RE-metoden vara mer effektiv när det gäller att framställa DNA-handtag av fullängd. Med hjälp av denna metod har långa enkelsträngade DNA-sekvenser tillverkats och de har blivit inmärkt med biotin respektive DIG. Första delen av syftet har således uppfyllts då de tillverkade DNA-handtagen även kunde användas i den optiska pincetten. Det tillverkade DNA-konstruktet kan dock inte klassas som funktionellt då den reversibla bistabiliteten vid 65 pN inte kunde studeras.

DNA-handtagen har troligtvis hybridiserat med varandra på grund av hårnålar eller liknande sekundärstrukturer som finns i Φ X174-genomet. Hybridiseringen har möjliggjort att man har kunnat sträcka DNA-handtagen i den optiska pincetten med en kraft på 60 pN men inte kunnat studera reversibel bistabilitet.

Om projektet hade fortskridit hade det fortfarande varit av intresse att studera den reversibla

bistabiliteten med hjälp av längre DNA-handtag. Genom att skapa en kärnsekvens som kan hybridisera och där ligering sedermera kan ske, så ges möjligheten att kunna studera den reversibla bistabiliteten. Dessutom är det av intresse att studera vilka sekundärstrukturer som existerar inom DNA-handtaget för att vidare förstå de oönskade interaktionerna mellan DNA-handtagen. Genom att hybridisera två DNA-handtag och sedan applicera krafter på dem i den optiska pincetten skulle interaktionerna kunna studeras. Utöver detta experiment hade de intramolekylära sekundärstrukturerna även varit av intresse att studera, vilket hade kunnat genomföras genom att dra i ett DNA-handtag åt gången i den optiska pincetten.

Referenser

- [1] Julie Clayton och Carina Dennis. *50 Years of DNA*. Palgrave Macmillan, Gordonsville, USA, 2003.
- [2] James Watson och Francis Crick. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, 171:737–738, 1953.
- [3] Carlos Bustamante, Zev Bryant och Steven B. Smith. Ten years of tension: single-molecule dna mechanics. *Nature*, 421:423–427, 2003.
- [4] Carlos Bustamante, Steven B Smith, Jan Liphardt och Doug Smith. Single-molecule studies of dna mechanics. *Current Opinion in structural biology*, 421:279–285, 2000.
- [5] Anders Wallin. *Optical Tweezers for Single Molecule Biology*. Doktorsavhandling, Helsingfors universitet, 2011. ISBN:978-952-10-6880-5.
- [6] Bernard R. Glick, Jack J. Pasternak och Cheryl L. Patten. Molecular diagnostics. I: *Molecular Biotechnology*, s 350. ASM Press, Washington, D.C., fjärde utgåvan, 2010.
- [7] Emily M. LeProust, Bill J. Peck, Konstantin Spirin, Heather Brummel McCuen, Bridget Moore, Eugeni Namsaraev och Marvin H Caruthers. Synthesis of high-quality libraries of long (150mer) oligonucleotides by a novel depurination controlled process. *Nucleic Acids Research*, 38(8):2522–2540, mars 2010.
- [8] Hamilton O. Smith, Clyde A. III Hutchison, Cynthia Pfannkoch och J. Craig Venter. Generating a synthetic genome by whole genome assembly: ϕ X174 bacteriophage from synthetic oligonucleotides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(26):15440–15445, 2003.
- [9] Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts och Peter Walter. *Molecular biology of the cell*. Garland Science, New York, femte utgåvan, 2008.
- [10] M.B. Berg, L.J. Tymoczko och L. Stryer. *Biochemistry*. W. H. Freeman and Company, New York, NY, sjunde utgåvan, 2012.
- [11] S.S Szegedi och R.I Gumport. Restriction enzymes. I: T.E Creighton, redaktör, *The encyclopedia of Molecular Biology*, s 2138. John Wiley & Sons, inc., New York NY, 1999.
- [12] Ina V. Martin och Stuart A. MacNeill. Atp-dependet dna ligases. *Genome Biology*, 3(4):1–6, 2002.
- [13] J. Kendrew, redaktör. *The Encyclopedia of Molecular Biology*, ss 23,1063, 1066. Blackwell Science, Oxford, 1994. ISBN 0-632-02182-9.
- [14] T.A. Brown. *Gene Cloning and DNA analysis. An introduction*. Blackwell publishing Ltd, Oxford, UK, femte utgåvan, 2006.
- [15] Adam Wilkinson, Jonathan Day och Richard Bowater. Bacterial dna ligases. *Molecular Microbiology*, 40(6):1241–1248, april 2001.
- [16] Thomas D. Brock. The value of basic research: Discovery of 117termus aquaticus and other extreme thermophiles. *Genteics*, 146:1207–1210, 1997.
- [17] Elizabeth van Pelt-Verkuil, Alex van Belkum och John P. Hays. *Principles and technical aspects of PCR amplification*. [Dordrecht] : Springer, 2008.
- [18] Mike J. McPherson och Simon G. Moller. *PCR*. BIOS Scientific Publishers, Oxford, 2000.
- [19] Lucy M.S. Chang, F.J. Bollum och Robert C. Gallo. Molecular biology of terminal transferas. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 21:27–52, 1986.
- [20] Tom McCreery. Digoxigenin labeling. *Molecular Biotechnology*, 7(2):121–124, 1997.

- [21] György A. Marko-Varga och Peter L. Oroszlan. On-line continuous-flow multi-protein biochemical assays for the characterization of bio-active compounds using electrospray quadrupole time-of-flight mass spectrometry. I: György A. Marko-Varga och Peter L. Oroszlan, redaktörer, *Emerging Technologies in Protein and Genomic Material Analysis*, band 68 av *Journal of chromatography library*, kapitel 5, s 90. Elsevier, Amsterdam, första utgåvan, 2003.
- [22] Christoph Kessler. The digoxigenin:anti-digoxigenin (dig) technology a survey on the concept and realization of a novel bioanalytical indicator system. *Molecular and Cellular Probes*, 5:161–205, 1991.
- [23] P.C. Weber, DH Ohlendorf, JJ Wendoloski och FR Salemme. Structural origins of high-affinity biotin binding to streptavidin. *Science*, 243:85–88, 1989.
- [24] Jason DeChancie och K.N. Houk. The origins of femtomolar protein-ligand binding: Hydrogen bond cooperativity and desolvation energetics in the biotin-(strept)avidin binding site. *Journal of the American Chemical Society*, 129(17):5419–5429, 2007.
- [25] Takeshi Sano och Charles R. Cantor. Cooperative biotin binding by streptavidin. *The Journal of Biological Chemistry*, 265(6):3369–3373, februari 1990.
- [26] Allison K. Wilson. Polymerase chain reaction. I: Thomas E. Creighton, redaktör, *The encyclopedia of Molecular Biology*, ss 1903–1907. John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, 1999.
- [27] T.A. Brown. *Gene Cloning and DNA analysis. An introduction*. Blackwell Science Ltd, 2001.
- [28] Gerrit J. Viljoen, Louis H. Nel och John R. Crowther. *Molecular diagnostic PCR handbook*. [Dordrecht] : Springer, 2005.
- [29] Gavin R. Screaton, Charles R.M Bangham och John I. Bell. Direct sequencing of single primer pcr products: a rapid method to achieve short chromosomal walks. *Nucleic Acids Research*, 21(9):2263–2264, 1993.
- [30] Tom Maniatis, Andrea Jeffrey och Hans Van deSande. Chain length determination of small double- and single-stranded dna molecules by polyacrylamide gel electrophoresis. *Biochemistry*, 14(17):3787–3794, 1975.
- [31] Robert C. Allen, Calvin A. Saravis och H. Rainer Mauer. *Gel Electrophoresis and Isoelectric Focusing of Proteins*. Walter de Gruyter, Berlin, 1984.
- [32] BioRad Laboratories Inc. *Acrylamide Polymerization — A Practical Approach*, 2000. Tillgänglig på: http://www.bio-rad.com/LifeScience/pdf/Bulletin_1156.pdf [Hämtad: 2012-05-16].
- [33] Mark M. Garner och Andreas Chrambach. Resolution of circular, nicked circular and linear dna, 4.4 kb in length, by electrophoresis in polyacrylamide solutions. *Electrophoresis*, 13:176–178, 1992.
- [34] Sunay Patel, Ethan White och Sung-Kun Kim. Selection of ssdna aptamers against live escherichia coli cells. I: *67th Southwest Regional Meeting of the American Chemical Society*, Austin, TX, United States, 2011.
- [35] QIAGEN. *QIAEX II Handbook*, oktober 2008. Tillgänglig på: <http://www.qiagen.com/literature/render.aspx?id=130> [Hämtad: 2012-05-16].
- [36] Valéry Normand, Didier L. Lootens, Eleonora Amici, Kevin P. Plucknett och Pierre Aymard. New insight into agarose gel mechanical properties. *Biomacromolecules*, 1(4):730–738, november 2000.
- [37] Hideyuki Itagaki, Hiroyasu Fukiishi, Tomoe Imai och Mineo Watase. Molecular structure of agarose chains in thermoreversible hydrogels revealed by means of a fluorescent probe technique. *Polymer Physics*, 43:680–688, 2004.

- [38] Stephen D. Levene och Bruno H. Zimm. Separations of open-circular dna using pulsed-field electrophoresis. *Biochemistry*, 84:4054–4057, 1987.
- [39] Christopher K. Mathews, K. E. van Holde och Kevin G. Ahern. *Biochemistry*. Addison-Wesley Publishing Company, San Fransisco, CA, tredje utgåvan, 2000.
- [40] RS Tuma, MP Beaudet, X Jin, LJ Jones, CY Cheung, S Yue och VL Singer. Characterization of sybr gold nucleic acid gel stain: a dye optimized for use with 300-nm ultraviolet transilluminators. *Analytical biochemistry*, 268:278–288, 1999.
- [41] René Thomas. The denaturation of dna. *Gene*, 135:77–79, december 1993.
- [42] Harvey Lodish, Arnold Berk, Chris A. Kaiser, Monty Krieger, Matthew P. Scott, Anthony Bretscher, Hidde Ploegh och Paul Matudaria. Cell organization and movement 1: Microfilaments. I: K. Ahr, redaktör, *Molecular cell biology*, s 737. W.H. Freeman and Company, New York, NY, 6 utgåvan, 2008.
- [43] P. Nelson. Entropy, temperature, and free energy. I: C. Marshall, redaktör, *Biological physics. Energy, information, life*, s 226. W.H. Freeman and Company, New York, NY, 2008.
- [44] Invitrogen Molecular Probes, Eugene, OR. *SYBR Gold Nucleic Acid Gel Stain*, 2006.
- [45] Joseph Shlomai och Arthur Kornberg. An escherichia coli replication protein that recognizes a unique sequence within a hairpin region in ϕ x174 dna. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77(2):799–803, 1980.
- [46] Sebastian Tomac, Munna Sarkar, Tommi Ratilainen, Pernilla Wittung, Peter E. Nielsen, Bengt Nordén och Astrid Gräslund. Ionic effects on the stability and conformation of peptide nucleic acid complexes. *Journal of the American Chemical Society*, 118(24):5544–5552, juni 1996.

A Förbrukningsmaterial

Material som används under det laborativa arbetet redovisas i Tabell A-1.

Tabell A-1: Förbrukat material. Material samt fabrikat och katalognummer.

Material	Fabrikat	Katalognummer
ΦX174 ssDNA	New England Biolabs	N3023S
Long PCR Enzyme Mix	Fermentas	K0181
dNTP Set, PCR Grade 4x100 µl	Qiagen	201912
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen	28104
PsiI-Primer (5'-fosforylerad), (även kallad Primer1)	atdbio	B2583
StuI-Primer (5'-fosforylerad), (även kallad Primer2)	atdbio	B2584
PCR-oligo	atdbio	B2585
PCR-komplement	atdbio	B2586
RE-oligo	atdbio	B2587
RE-komplement	atdbio	B2588
O'RangeRuler 500 bp DNA Ladder, ready-to-use, 500-6000 bp	Fermentas	SM0643
6X Orange DNA Loading Dye	Fermentas	R0631
GeneRuler Ultra low Range DNA ladder	Fermentas	SM1213
SYBR Gold Nucleic Acid Gel Stain (10,000X Concentrate in DMSO)	Invitrogen	S-11494
Ficoll 400	Sigma	F2637-10G
D1 AGAROSE LOW EEO	Laboratorios CONDA	8008
<i>Eco</i> 1471 (<i>Stu</i> I)	Fermentas	ER0421
<i>Aan</i> I (<i>Psi</i> I)	Fermentas	ER2061
40% akrylamid/bis solution	Bio-rad	161-0146
TEMED	Bio-rad	161-0800
Amoniumpersulfat (APS)	Bio rad	161-0700
T4 DNA Ligase	Fermentas	EL0014
Terminal Deoxynucleotidyl Transferase 500u	Fermentas	EP0161
Digoxigenin-11-dUTP	Roche	11573152910
Biotin-16-dUTP	Roche	11093070910

B Sekvenser

Primersekvenser

I Figur B-1 visas sekvensen för den primer som kallas för PsiI-primer i RE-metoden och Primer1 i PCR-metoden. Primern är fosforylerad i 5'-ändan.

5'-ccgcttcggcgttataacctcacac-3'

Figur B-1: PsiI-primer/Primer1.

I Figur B-2 visas sekvensen för den primer som kallas för StuI-primer i RE-metoden och Primer2 i PCR-metoden. Primern är fosforylerad i 5'-ändan.

5'-cgatttcatagtggaggcctccagc-3'

Figur B-2: StuI-primer/Primer2.

Kärnsekvenser

I Figur B-3 samt B-4 visas kärnans komplementära sekvenser. Dessa sekvenser erhöles från handledare.

5'-ATCAACAGAGCCACTTTGGCCGCTGGTCG
CCGCTATCGACAGGCTCAATGCTGGAGGGT-3'

Figur B-3: Kärnsekvens

5'-ACCCTCCAGCATTGAGCCTGTCGATAGC
GGCGACCAGCGGGCCAAAGTGGCTCTGTTGAT-3'

Figur B-4: Komplement till kärnsekvens

Kärna med överlappssekvens för RE-metoden

I Figur B-5 och B-6 visas kärnsekvenserna från Figur B-3 och B-4 med respektive överlappssekvens. Här är överlappssekvenserna anpassade för att hybridisera till DNA-handtagen tillverkade med RE-metoden och syns i svart. De blåa sekvenserna utgör kärnan.

5'-TTTTTACGCTTCGGCGTTAATCAACAGAGCCACTTTGGC
CCGCTGGTCGCCGCTATCGACAGGCTCAATGCTGGAGGGT-3'

Figur B-5: RE-oligo

5'-CTACGCGATTTTCATAGTGGAGGTAGTTGTCTCGGTGAAACC
GGCGACCAGCGGGCATAGCTGTCCGAGTTACGACCTCCCA-3'

Figur B-6: RE-komplement

Kärna med överlappssekvens för PCR-metoden.

I Figur B-7 och B-8 visas kärnsekvenserna från Figur B-3 och B-4 med respektive överlappssekvens. Här är överlappssekvenserna anpassade för att hybridisera till DNA-handtagen tillverkade med PCR-metoden och syns i svart. De blåa sekvenserna utgör kärnan.

5'-GTGTGAGGTTATAACGCCGAAGCGGATCAACAGAGCCACTTTG
GCCCCGTGGTCGCCGCTATCGACAGGCTCAATGCTGGAGGGT-3'

Figur B-7: PCR-oligo

5'-GCTGGAGGCCTCCACTATGAAATCGTAGTTGTCTCGGTGAAAC
CGGGCGACCAGCGGCGATAGCTGTCCGAGTTACGACCTCCCA-3'

Figur B-8: PCR-komplement

De blåa sekvenserna utgör kärnan då de är hybridiserade till varandra. Överlappssekvenserna syns i svart.

C Geler och tillbehör

Följande ingredienser användes för denaturerande 5 % polyakrylamidgel, icke-denaturerande polyakrylamidgel med tillhörande binding-silane working solution samt 1 % agarosgel. Ingredienser skrivna i fetstilt tillsattes i dragskåp.

Denaturerande 5 % polyakrylamidgel

- 6,31 g urea
- 6,5 ml milliQ
- 1,5 ml 10xTBE
- **1,875 ml 40 % akrylamidlösning**
- **104 μ l 10 % APS**
- **5,3 μ l TEMED**

Icke-denaturerande 5 % Polyakrylamid gel

- 11,515 ml milliQ
- 1,5 ml 10xTBE
- **1,875 ml 40% akrylamidlösning**
- **104 μ l 10% APS**
- **5,3 μ l TEMED**

Binding-silane working solution

- 6 ml Etanol
- 1,350 ml milliQ
- **150 μ l Ättiksyra**
- **3,75 μ l Bind silan**

1 % agarosgel

- 1 g agaros
- 100 g 1xTBE
- milliQ för viktkorrigerig

D Förinfärgning med Sybrgold

I Tabell D-1 visas innehållet i de prover som laddades på en 1

Tabell D-1: Koncentrationsgradient med Sybrgold.

Provnummer	Innehåll
1	5 μ l O'RangeRuler 500 bp DNA Ladder (0,5 μ g/ μ l) 15 μ l 1xTBE 1 μ l Sybrgold (2x)
2	5 μ l O'RangeRuler 500 bp DNA Ladder (0,5 μ g/ μ l) 15 μ l 1xTBE 1 μ l Sybrgold (2x)
3	5 μ l O'RangeRuler 500 bp DNA Ladder (0,5 μ g/ μ l) 15 μ l 1xTBE 1 μ l Sybrgold (4x)
4	5 μ l O'RangeRuler 500 bp DNA Ladder (0,5 μ g/ μ l) 15 μ l 1xTBE 1 μ l Sybrgold (8x)
5	5 μ l O'RangeRuler 500 bp DNA Ladder (0,5 μ g/ μ l) 15 μ l 1xTBE 1 μ l Sybrgold (16x)

E Förberedande experiment: Bestämning av agaros eller polyakrylamidgel.

I Tabell E-1 visas de prov som laddades på den denaturerande 5 % polyakrylamidgelen.

Tabell E-1: Prov som laddades på denaturerande 5 % polyakrylamidgel.

Provnummer	Innehåll
1	4 μl O'range ruler 500bp DNA-stege 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 6 μl formamid
2	1 μl ΦX174 DNA 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 1 μl 6X Orange DNA Loading Dye 8 μl formamid

I Tabell E-2 visas de prov som laddades på den 1 % agarosgelen.

Tabell E-2: Prov som laddades på 1 % agarosgel.

Provnummer	Innehåll
1	5 μl O'range ruler 500bp DNA-stege 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 15 μl 1xTBE 1 μl Sybrgold (2x)
2	1 μl ΦX174 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 16 μl ficoll 1 μl Sybrgold (2x) 2 μl 6X Orange DNA Loading Dye

F Rening av DNA

Reningen utförs med *QIAquick PCR Purification Kit*. Tillsätt följande till vardera prov:

- 5 volymer Buffer PB innehållandes pH-indikator till 1 volym prov som ska renas.
- Om provet är orange eller violett, tillsätt 10 μ l 3M natriumacetat pH 5,0 åt gången tills dess att provet är gult, vilket då innebär ett pH på mindre eller lika med 7,5.
- 0,75 ml Buffer PE.
- 50 μ l Buffer EB + ev. 50 μ l Buffer EB.

G Öppning av cirkulärt genom med restriktionsenzym

Hybridisering RE-metoden

I Tabell G-1 visas innehållet i den buffertlösning som användes vid hybridisering.

Tabell G-1: Hybridiseringsbuffert.

Komponent	Mängd
NaCl	0,29229 g
Tris-HCl	2,5 ml
MilliQ	22,5 ml
Total volym	25 ml

I Tabell G-2 visas de två prover vilka bereddades för hybridisering av primer till virusgenomet.

Tabell G-2: Hybridisering av virusgenom till primer.

Prov	Innehåll
Hybridisering 1	7,5 μ l hybridiseringsbuffert 1 μ l Psil-primer (100 μ M) 8,5 μ l Φ X174 (1 μ g/ μ l)
Hybridisering 2	7,5 μ l hybridiseringsbuffert 1 μ l Stul-primer(100 μ M) 8,5 μ l Φ X174 (1 μ g/ μ l)

I Tabell G-3 visas de prover i vilken de cirkulära virusgenomen klyvdes till linjära DNA-molekyler.

Klyvning

Tabell G-3: Restriktionsenzymklyvning av genomet hos Φ X174.

Prov	Innehåll
RE1	2 μ l buffer Tango (från <i>AanI</i> (<i>Psil</i>)) 2 μ l <i>Psil</i> 17 μ l Hybridisering 1
RE2	2 μ l buffer B (från <i>Eco1471</i> (<i>StuI</i>)) 2 μ l <i>Stul</i> 17 μ l Hybridisering 2

H Beredning av dNTP-mix

I Tabell H-1 visas de ingående komponenterna i dNTP-mixen. Slutlig koncentration för respektive dNTP uppgår till 2 mM.

Tabell H-1: Ingående komponenter i dNTP-mixen.

Komponent	Mängd
dATP (100 mM)	0,1 μ l
dTTP (100 mM)	0,1 μ l
dGTP (100 mM)	0,1 μ l
DCTP (100 mM)	0,1 μ l
MilliQ (100 mM)	4,6 μ l
Total volym	5 μ l

I Öppning av cirkulärt genom med PCR

Komponenter för PCR

I Tabell I-1 visas de ingående komponenterna i två PCR-prov. I det ena provet användes Primer1 och produkten kallades sedan PCR1. I det andra provet användes Primer2 och produkten kallade sedan PCR2.

Tabell I-1: PCR-prover

Komponenter	Mängd
10X long PCR buffer med 15 mM MgCl ₂	5 µl
dNTP Mix (2 mM per bas)	5 µl
Primer (100 µM)	0,5 µl
Template DNA (1000 µg/ml)	1 µl
Long PCR enzyme mix (5 u/µl)	0,5 µl (2,5 u)
Nukleasfritt vatten	38 µl

PCR-program

I Tabell I-2 visas protokoll för PCR.

Tabell I-2: PCR-program

Steg	Temperatur	Tid	Antal cykler
Initial denaturering	94°C	180 s	1
Denaturering	95°C	20 s	10
Inbindning/Elongering	68°C	225 s	
Denaturering	94°C	20 s	99
Inbindning/Elongering	68°C	225 s + 2 s/cykel	
Slutgiltig elongering	68°C	600 s	1

J Verifikation för att linjära DNA-molekyler erhållits från virusgenom

I Tabell J-1 visas innehåll i de olika brunnarna på denaturerande 5 % polyakrylamidgel vid verifikation av att linjära DNA-molekyler erhållits. Proverna RE1, RE2, PCR1 och PCR2 är prov från Bilaga G samt Bilaga I.

Tabell J-1: Följande prov laddades på en denaturerande 5 % polyakrylamidgel.

Provnummer	Innehåll
1	1 μ l Φ X174 (312 pmol DNA-bas) 1 μ l 6X Orange DNA Loading Dye 8 μ l formamid
2	0,2 μ l RE1 (256 pmol DNA-bas) 1 μ l 6X Orange DNA Loading Dye 8,8 μ l formamid
3	0,2 μ l RE2 (256 pmol DNA-bas) 1 μ l 6X Orange DNA Loading Dye 8,8 μ l formamid
4	0,28 μ l PCR1 (200 pmol DNA-bas) 1 μ l 6X Orange DNA Loading Dye 8,72 μ l formamid
5	0,38 μ l PCR2 (238 pmol DNA-bas) 1 μ l 6X Orange DNA Loading Dye 8,62 μ l formamid

Koncentrationsbestämning av PCR-produkt

För verifikationen av de linjära DNA-fragmenten behövdes DNA-provernans koncentration, dessa presenteras i Tabell J-2.

Tabell J-2: Koncentration innan och efter PCR. Koncentrationer av DNA som uppnåddes från de två PCR-proverna, där det cirkulära Φ X174-genomet användes som templat med vardera Primer1 och Primer2. Notera att cirka tio linjära produkter per substrat skapades under rådande betingelser. Startkoncentrationen av Φ X174-genom erhöles av tillverkaren (1000 μ g/ml).

Komponent	Mängd DNA (ng/ μ l)	Beräknad mängd DNA- molekyler (pmol/ μ l)	Beräknad mängd DNA-bas (pmol/ μ l)
Koncentration DNA innan PCR	20	0,01	62
PCR produkt Primer1	229,15	0,13	715
PCR produkt Primer2	201	0,12	627

K Inmärkning

I Tabell K-1 visas de ingående komponenterna som krävs för inmärkning med affinitetstaggar på de linjära DNA-molekylerna.

Tabell K-1: Inmärkning med affinitetstaggar på skapade linjära DNA-molekyler.

Prov	Innehåll
RE1-handtag	11,7 μ l (5x)Reaktionsbuffert för terminaltransferas 20,8 μ l RE1 (4,95 pmol DNA-molekyler) 0,5 μ l Biotin-16-dUTP (500 pmol molekyler) 4,5 μ l dNTP-mix (4500 pmol baser) 2 μ l terminaltransferas 10,5 μ l milliQ
RE2-handtag	11,7 μ l (5x)Reaktionsbuffert för terminaltransferas 20,8 μ l RE2 (4,95 pmol DNA-molekyler) 0,5 μ l Digoxigenin-11-dUTP (500 pmol molekyler) 4,5 μ l dNTP-mix (4500 pmol baser) 2 μ l terminaltransferas 10,5 μ l milliQ
PCR1-handtag	11,7 μ l (5x)reaktionsbuffert för terminaltransferas 38,46 μ l PCR1 (5 pmol DNA-molekyler) 0,5 μ l Biotin-16-dUTP (500 pmol molekyler) 4,5 μ l dNTP-mix (4500 pmol baser) 2 μ l terminaltransferas 1,34 μ l milliQ
PCR2-handtag	12 μ l (5x)Reaktionsbuffert för terminaltransferas 41,2 μ l PCR2 (5 pmol DNA-molekyler) 0,5 μ l Digoxigenin-11-dUTP (500 pmol molekyler) 4,5 μ l dNTP-mix (4500 pmol baser) 2 μ l terminaltransferas

L Titrering av DNA-handtag med polystyrenkolor

Titration av DNA-handtag skapade med RE-metoden

I Tabell L-1 visas innehåll i de olika brunnarna på den 1 % agarosgelen.

Tabell L-1: Prover som laddades på 1 % agaros.

Provnummer	Innehåll
1	5 μ l O'RangeRuler 500 bp DNA Ladder (0,5 μ g/ μ l) 1 μ l Sybrgold (2x) 12 μ l 15 % ficollösning
2	1 μ l RE1 (539 pmol DNA-bas) 1 μ l Sybrgold (2x) 16 μ l 15 % ficollösning 2 μ l 6X Orange DNA Loading Dye
3	1 μ l RE1-handtag (539 pmol DNA-bas) 0,5 μ l streptavidininmärkta polystyrenkolor (2,1 μ m 0,5% w/v) 1 μ l Sybrgold (2x) 15,5 μ l 15 % ficollösning 2 μ l 6X Orange DNA Loading Dye
4	1 μ l RE1-handtag (539 pmol DNA-bas) 1 μ l streptavidininmärkta polystyrenkolor (2,1 μ m 0,5% w/v) 1 μ l Sybrgold (2x) 15 μ l 15 % ficollösning 2 μ l 6X Orange DNA Loading Dye
5	1 μ l RE1-handtag (539 pmol DNA-bas) 1,5 μ l streptavidininmärkta polystyrenkolor (2,1 μ m 0,5% w/v) 1 μ l Sybrgold (2x) 14,5 μ l 15 % ficollösning 2 μ l 6X Orange DNA Loading Dye
6	1 μ l RE1-handtag (539 pmol DNA-bas) 2 μ l streptavidininmärkta polystyrenkolor (2,1 μ m 0,5% w/v) v 1 μ l Sybrgold (2x) 14 μ l 15 % ficollösning 2 μ l 6X Orange DNA Loading Dye
7	1 μ l RE1-handtag (539 pmol DNA-bas) 3 μ l streptavidininmärkta polystyrenkolor (2,1 μ m 0,5% w/v) 1 μ l Sybrgold (2x) 13 μ l 15 % ficollösning 2 μ l 6X Orange DNA Loading Dye
8	1 μ l RE2 (539 pmol DNA-bas) 1 μ l Sybrgold (2x) 16 μ l 15 % ficollösning 2 μ l 6X Orange DNA Loading Dye
9	1 μ l RE2-handtag (539 pmol DNA-bas) 2,5 μ l Anti-DIG inmärkta polystyrenkolor (2,17 μ m 0,1% w/v) 1 μ l Sybrgold (2x) 13,5 μ l 15 % ficollösning 2 μ l 6X Orange DNA Loading Dye
10	1 μ l RE2-handtag (539 pmol DNA-bas) 5 μ l Anti-DIG inmärkta polystyrenkolor (2,17 μ m 0,1% w/v) 1 μ l Sybrgold (2x) 11 μ l 15 % ficollösning 2 μ l 6X Orange DNA Loading Dye

11	1 μ l RE2-handtag (539 pmol DNA-bas) 7.5 μ l Anti-DIG inmärkt polystyrenkuler (2,17 μ m 0,1% w/v) 1 μ l Sybrgold (2x) 8.5 μ l 15 % ficoll-lösning 2 μ l 6X Orange DNA Loading Dye
12	1 μ l RE2-handtag 10 μ l Anti-DIG inmärkt polystyrenkuler (2,17 μ m 0,1% w/v) 1 μ l Sybrgold (2x) 6 μ l 15 % ficoll-lösning 2 μ l 6X Orange DNA Loading Dye
13	1 μ l RE2-handtag (539 pmol DNA-bas) 15 μ l Anti-DIG inmärkt polystyrenkuler (2,17 μ m 0,1% w/v) 1 μ l Sybrgold (2x) 1 μ l 15 % ficoll-lösning 2 μ l 6X Orange DNA Loading Dye

Tabell L-2 redovisar uträknade värden på den relativa mängden DNA-molekyler i respektive brunn efter ovan utförda gelelektrofores.

Tabell L-2: Uträknade värden på den relativa mängden DNA-molekyler i respektive brunn

Bana	3	4	5	6	7	9	10	11	12	13
Relativ mängd DNA-molekyler i brunn (%)	67,8	75,7	82,8	84,0	85,7	29,3	35,8	45,1	48,7	66,8

Titring av DNA-handtag skapade med PCR-metoden

I Tabell L-3 visas innehåll i de olika brunnarna på den 1 % agarosgelen.

Tabell L-3: Prover som laddades på 1 % agaros.

Provnummer	Innehåll
1	5 μ l O'RangeRuler 500 bp DNA Ladder (0,5 μ g/ μ l) 1 μ l Sybrgold (2x) 14 μ l 15 % ficollösning
2	0,6 μ l PCR1 (539 pmol DNA-bas) 1 μ l streptavidinkuler (2,1 μ m 0,5% w/v) 1 μ l Sybrgold (2x) 15,4 μ l 15 % ficollösning 2 μ l 6X Orange DNA Loading Dye
3	0,6 μ l PCR1-handtag (539 pmol DNA-bas) 0,5 μ l streptavidininmärkt polystyrenkuler (2,1 μ m 0,5% w/v) 1 μ l Sybrgold (2x) 15,9 μ l 15 % ficollösning 2 μ l 6X Orange DNA Loading Dye
4	0,6 μ l PCR1-handtag (539 pmol DNA-bas) 1 μ l streptavidininmärkt polystyrenkuler (2,1 μ m 0,5% w/v) 1 μ l Sybrgold (2x) 15,4 μ l 15 % ficollösning 2 μ l 6X Orange DNA Loading Dye
5	0,6 μ l PCR1-handtag (539 pmol DNA-bas) 1,5 μ l streptavidininmärkt polystyrenkuler (2,1 μ m 0,5% w/v) 1 μ l Sybrgold (2x) 14,9 μ l 15 % ficollösning 2 μ l 6X Orange DNA Loading Dye

6	0,6 μ l PCR1-handtag (539 pmol DNA-bas) 2 μ l streptavidininmärkta polystyrenkulator (2,1 μ m 0,5% w/v) 1 μ l Sybrgold (2x) 14,4 μ l 15 % ficollösning 2 μ l 6X Orange DNA Loading Dye
7	0,6 μ l PCR1-handtag 3 μ l streptavidininmärkta polystyrenkulator (2,1 μ m 0,5% w/v) 1 μ l Sybrgold (2x) 13,4 μ l 15 % ficollösning 2 μ l 6X Orange DNA Loading Dye
8	0,6 μ l PCR1-handtag (539 pmol DNA-bas) 4 μ l streptavidininmärkta polystyrenkulator (2,1 μ m 0,5% w/v) 1 μ l Sybrgold (2x) 12,4 μ l 15 % ficollösning 2 μ l 6X Orange DNA Loading Dye
9	0,6 μ l PCR2 (539 pmol DNA-bas) 1 μ l Anti-DIG inmärkta polystyrenkulator (2,17 μ m 0,1% w/v) 1 μ l Sybrgold (2x) 12,4 μ l 15 % ficollösning 2 μ l 6X Orange DNA Loading Dye
10	0,6 μ l PCR2-handtag (539 pmol DNA-bas) 0,5 μ l Anti-DIG inmärkta polystyrenkulator (2,17 μ m 0,1% w/v) 1 μ l Sybrgold (2x) 15,9 μ l 15 % ficollösning 2 μ l 6X Orange DNA Loading Dye
11	0,6 μ l PCR2-handtag (539 pmol DNA-bas) 1 μ l Anti-DIG inmärkta polystyrenkulator (2,17 μ m 0,1% w/v) 1 μ l Sybrgold (2x) 15,4 μ l 15 % ficollösning 2 μ l 6X Orange DNA Loading Dye
12	0,6 μ l PCR2-handtag (539 pmol DNA-bas) 1,5 μ l Anti-DIG inmärkta polystyrenkulator (2,17 μ m 0,1% w/v) 1 μ l Sybrgold (2x) 14,9 μ l 15 % ficollösning 2 μ l 6X Orange DNA Loading Dye
13	0,6 μ l PCR2-handtag (539 pmol DNA-bas) 2 μ l Anti-DIG inmärkta polystyrenkulator (2,17 μ m 0,1% w/v) 1 μ l Sybrgold (2x) 14,4 μ l 15 % ficollösning 2 μ l 6X Orange DNA Loading Dye
14	0,6 μ l PCR2-handtag (539 pmol DNA-bas) 3 μ l Anti-DIG inmärkta polystyrenkulator (2,17 μ m 0,1% w/v) 1 μ l Sybrgold (2x) 13,4 μ l 15 % ficollösning 2 μ l 6X Orange DNA Loading Dye
15	0,6 μ l PCR2-handtag (539 pmol DNA-bas) 4 μ l Anti-DIG inmärkta polystyrenkulator (2,17 μ m 0,1% w/v) 1 μ l Sybrgold (2x) 12,4 μ l 15 % ficollösning 2 μ l 6X Orange DNA Loading Dye

M Hybridisering av DNA-konstrukt

Volymer tillsatta för att erhålla ett prov med hybridiserade RE-konstrukt:

- 6,78 μl biotinmärkt RE 1 (0,678 pmol DNA-molekyler) 0,1 μM
- 6,78 μl DIG-inmärkt RE 2 (0,678 pmol DNA-molekyler) 0,1 μM
- 1 μl RE-oligo (1 mM)
- 1 μl RE-complement (1 mM)
- 2 μl 10xT4 DNA-ligasbuffert
- 1,04 μl MilliQ

N Smältkurvsanalys

Smältkurvsanalys utfördes med proverna som visas i Tabell N-1 nedan.

Tabell N-1: Provinnehåll i

Prov	Innehåll
RE oligo smältnikroskopi	10,5 μ l Re oligo 489,5 μ l NaCl (0,1 M)
RE komplement smältnikroskopi	10,5 μ l Re komplement 489,5 μ l NaCl (0,1 M)
RE komplement+RE oligo smältnikroskopi	5,25 μ l Re komplement 5,25 μ l Re oligo 489,5 μ l NaCl(0,1 M)
Referensprov	1000 μ l NaCl (0,1 M)

O Ligering

Volymer tillsatta provet hybrisirerat RE-konstrukt för ligering:

- 2 μl 50% PEG4000 solution
- 0,4 μl T4 DNA ligase
- 1 μl EDTA (0,2 μM)

EDTA tillsattes först efter ligering och inaktivering.

P Undersökning av sekundärstrukturer i DNA-handtag

I Tabell P-1 presenteras de prover som laddades på icke-denaturerande 5 % polyakrylamidgel av anledning av verifiera eventuella sekundärstrukturer hos DNA-handtagen.

Tabell P-1: Prover för att verifiera sekundärstrukturer hos DNA-handtag.

Provnummer	Innehåll
1	4 μl O'RangeRuler 500 bp DNA Ladder (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) 1 μl formamid 1 μl Sybrgold (2x)
2	1 μl ΦX174 (312 pmol DNA-bas) 0,5 μl 6X Orange DNA Loading Dye 4,4 μl formamid 1 μl Sybrgold (2x)
3	0,2 μl RE1 (256 pmol DNA-bas) 0,5 μl 6X Orange DNA Loading Dye 4,3 μl formamid 1 μl Sybrgold (2x)
4	0,2 μl RE2 (256 pmol DNA-bas) 0,5 μl 6X Orange DNA Loading Dye 4,3 μl formamid 1 μl Sybrgold (2x)

Q Beräkning av DNA-molekyler/polystyrenskula i kulgradient (Matlab)

Följande skript skrevs i Matlab för att beräkna antalet DNA-molekyler per polystyrenskula.

```
clc
%% ps kulorna
r=1.05e-6; % m
vkula=4*pi*r^3/3; % m^3
rps=1.05; % g/cm^3
wkula=rps*1e6*vkula; % gram
vsolbs=[0.5e-6 1e-6 1.5e-6 2e-6 3e-6] % volym kullsg. bs=biotin/streptavidin
vsoldad=[2.5e-6 5e-6 7.5e-6 10e-6 15e-6] % volym kullsg. dad=DIG/Anti-DIG
wsolbs=vsolbs*1e3 % gram antagit att lsg. är 1kg/liter
wsoldad=vsoldad*1e3
wbskulortot=wsolbs*0.005 % Xg*0.005 (w/v)
wdadkulortot=wsoldad*0.001
Npskulorbs=wbskulortot/wkula
Npskulordad=wdadkulortot/wkula
```



```

%% dna molekylerna
ndna=0.1e-12 % mol molekyler
NA=6.02214129*10^23 % avogados tal
Ndna=NA*ndna % antal molekyler
%% Dnamolekyler/PSkula
kvotbs=Ndna./Npskulorbs
kvotdad=Ndna./Npskulordad

```

R Elektroforetisk kraftpåverkan

För att beräkna den kraft som påverkar konstruktet under elektrofores användes följande samband:

$$F = e \cdot E \cdot n \quad (1)$$

där e motsvarar enhetsladdningen ($1.6 \cdot 10^{-19} \text{C}$), E den elektriska fältstyrkan (V/m) och n antalet laddningar. I fallet för enkelsträngat ΦX174 motsvarar n antalet fosfatgrupper i molekylen, det vill säga lika många som den totala längden hos genomet, 5386 baser. Fältstyrkan som användes var 400V/m. Kraften beräknades enligt ekvation (1) till 0,3 pN.

S Teoretisk längd av DNA-konstrukt

Följande Matlab-skript användes för att beräkna konstruktets totala längd. En längd motsvarande 4 Å används för avståndet mellan baser hos enkelsträngat DNA. Motsvarande siffra för dubbelsträngat DNA var 3,4 Å.

```

clc;
ssBaseLength = 4e-10;
dsBaseLength = 3.4e-10;

totGenome = 5386;
overlap1AT = 11;
overlap1GC = 9;
overlap1tot = overlap1AT+overlap1GC;

overlap2AT = 11;
overlap2GC = 11;
overlap2tot = overlap2AT+overlap2GC;

core = 60;

ssTot = 2*totGenome - overlap1tot - overlap2tot;
dsTot = overlap1tot + overlap2tot + core;
totLength = ssTot*ssBaseLength+dsTot*dsBaseLength;

disp(['Construct length: ', num2str(totLength), ' m']);

```

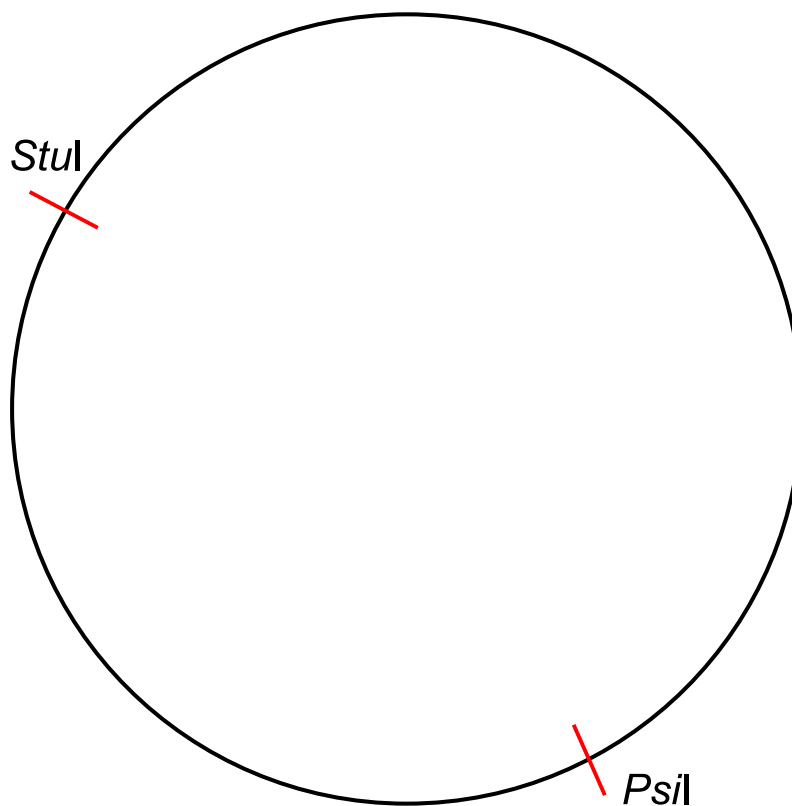
Ovanstående skript gav resultatet:

Construct length: 4.3267e-006 m

Det vill säga ungefär 4,3 μm .

T Virusgenom

Nedan illustreras det cirkulära virusgenomet samt vart de två restriktionsenzymerna *PsiI* och *StuI* klipper i förhållande till varandra.



Figur T-1: Cirkulära genomet hos Φ X174. De palindromsekvenser som känns igen av restriktionsenzymen *PsiI* och *StuI* är markerade i rött.