

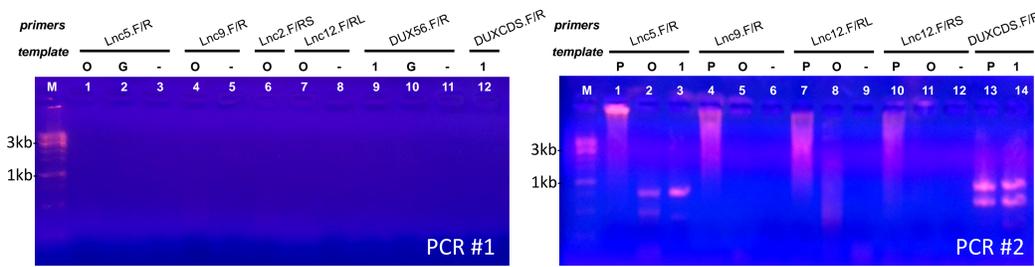
Клонирование кДНК из зигот и ооцитов

Елизавета Губанова, Мариона Латорре, Дарья Лепехина, Марк Масрамон, Илья Попадун
Джулия Кенет-Понс, Ольга Глазунова, Наталия Маркелова, Сергей Шумейко, Петр Свобода

Введение

Тема исследования в нашей лаборатории - гены, функционирующие на ранней стадии эмбрионального развития. Контроль экспрессии генов у млекопитающих от ооцита до эмбриона – является увлекательным, но мало изученным процессом. В прошлом году при помощи метода секвенирования нового поколения было выявлено много генов, которые могут участвовать в регуляции вышеуказанного процесса. Для функционального анализа в рамках проекта Школы из них были отобраны четыре гена активных в ооцитах и зиготах. При этом, три из них являются длинными некодирующими РНК (*Lnc5*, *Lnc9* и *Lnc12*), которые специфичны для ооцитов. Они были отобраны в ходе биоинформатического анализа материнского транскриптома. Четвертый отобранный ген – *Dux*. Он кодирует белок и может быть вовлечен в раннюю стадию активации генома зиготы. С целью изучения функций выбранных генов, необходимо было клонировать их кДНК, которая будет использоваться в дальнейших экспериментах. Соответственно, проект предусматривал получение рекомбинантных ДНК в бактериях с использованием методов генной инженерии. Во-первых, мы использовали полимеразную цепную реакцию (ПЦР) для амплификации выбранных генов. Полученные ПЦР-продукты были клонированы в плазмиду (pcDNA3.1 / CT-GFP-TOPO) с использованием GFP Fusion TOPO TA Expression Kit. Полученная плазмидная ДНК была проверена количественно и на наличие (и ориентацию) вставок с помощью рестрикционного анализа. В целом, мы успешно клонировали *Lnc5* кДНК, и несколько кДНК-фрагментов, которые нуждаются в дальнейшей характеристике. Поскольку плазида (pcDNA3.1 / CT-GFP-TOPO) содержит кодирующую последовательность зеленого флуоресцентного белка (GFP), мы могли бы трансформировать его в живую клетку для того, чтобы пронаблюдать экспрессию белок-кодирующего гена (*DUX*). Но к сожалению, время и условия не позволили нам это сделать. В дальнейшем результаты нашего исследования будут использованы для изучения функций выбранных генов в лаборатории Петра в Праге.

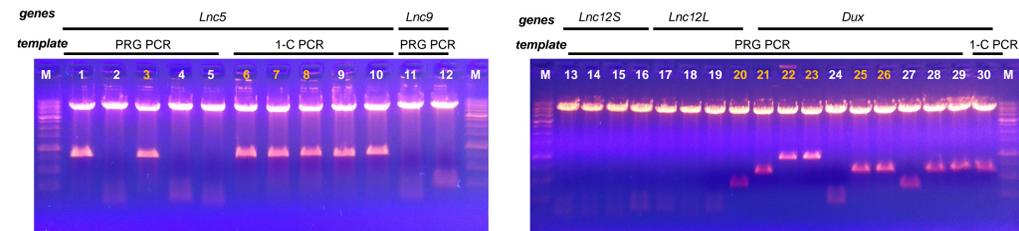
АМПЛИФИКАЦИЯ ВСТАВОК: *Lnc5*, *Lnc9*, *Lnc12* и *Dux*



Template abbreviations: O – ovary cDNA, 1 – 1-cell cDNA, G – mouse genomic DNA, P – diluted PCR product from Prague (100x), PCR program: 36 cycles, denaturation: 94°C 30 sec, annealing 56°C 30 sec, extension 94°C 2 min. Resolved in 1% agarose gel, 100V, ~ 45 min. PCR#1 did not work because the final dNTP concentration was accidentally 10x higher (2µM) than recommended (200 nM).

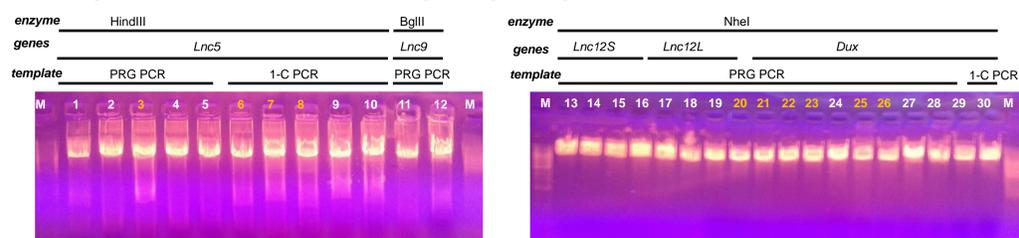
АНАЛИЗ ВСТАВОК В ПЛАЗМИДАХ pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO

Рестрикционный анализ с *Bst*XI – оценка размеров вставок



Рестрикционный анализ с *Bst*XI в течение 2 часов при 37°C, гель – 1% агарозы, 100 V, ~45 мин.

Рестрикционный анализ – проверка ориентации вставок



Restriction digest with indicated enzymes for 2 hours at 37°C, 1% agarose gel, 100 V, ~45 min.

ПЛАН ПРОЕКТА

Сборка модели транскрипта гена

Оценка размера ПЦР-продукта
Амплификация кДНК (ПЦР)

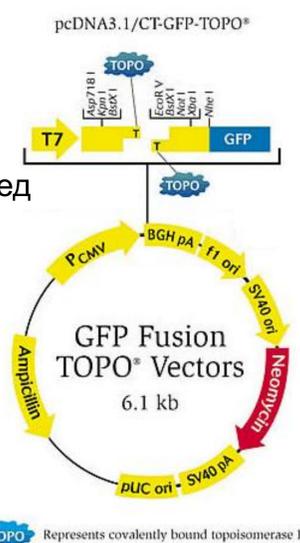
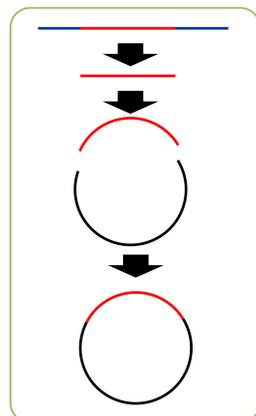
Анализ ПЦР-продуктов (электрофорез)

Отбор продуктов для клонирования
Вставка ПЦР-продуктов в векторы
Трансформация бактерий

Отбор колоний и инокуляция питательных сред

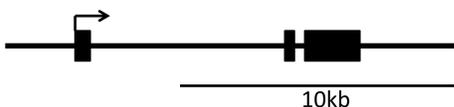
Выделение ДНК
Измерение концентрации препаратов ДНК
Рестрикционный анализ

Отправка ДНК в Прагу

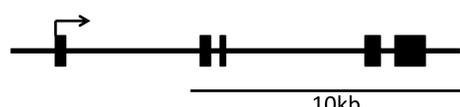


ЦЕЛЕВЫЕ ГЕНЫ

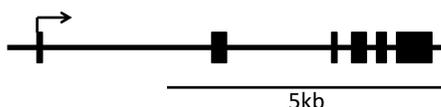
Lnc5 chr5:150,687,800-150,724,284



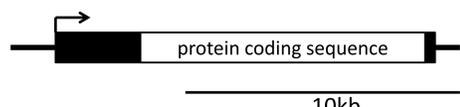
Lnc12 chrX:7,617,568-7,658,006



Lnc9 chr19:57,567,753-57,591,144



Dux chrX:7,617,568-7,658,006



ИТОГ ПО ВСЕМ ПОЛУЧЕННЫМ КЛОНАМ

clone	conc. (ng/µL)	A260/280	PCR primers	Insert (bp)		Conclusion
				Expected	Observed	
1	316,7	1,91	<i>Lnc5</i> .F/R	737	~750	<i>Lnc5</i> antisense
2	266,1	1,93	<i>Lnc5</i> .F/R	737	<250	Unknown
3	272,6	1,9	<i>Lnc5</i> .F/R	737	~750	<i>Lnc5</i> sense
4	235,2	1,9	<i>Lnc5</i> .F/R	737	<250	Unknown
5	292,4	1,82	<i>Lnc5</i> .F/R	737	<250	Unknown
6	333,6	1,88	<i>Lnc5</i> .F/R	737	~750	<i>Lnc5</i> antisense
7	177,1	1,89	<i>Lnc5</i> .F/R	737	~750	<i>Lnc5</i> sense
8	184,0	1,89	<i>Lnc5</i> .F/R	737	~750	<i>Lnc5</i> antisense
9	215,9	1,90	<i>Lnc5</i> .F/R	737	~750	<i>Lnc5</i> sense
10	266,6	1,90	<i>Lnc5</i> .F/R	737	~750	<i>Lnc5</i> sense
11	202,9	1,87	<i>Lnc9</i> .F/R	1845	<250	Unknown
12	229,7	1,86	<i>Lnc9</i> .F/R	1845	<250	Unknown
13	277,6	1,89	<i>Lnc12</i> .F/RS	583	<250	Unknown
14	388,5	1,74	<i>Lnc12</i> .F/RS	583	<250	Unknown
15	241,2	1,77	<i>Lnc12</i> .F/RS	583	<250	Unknown
16	354,3	1,88	<i>Lnc12</i> .F/RL	1686	<250	Unknown
17	315,6	1,81	<i>Lnc12</i> .F/RL	1686	<250	Unknown
18	206,2	1,81	<i>Lnc12</i> .F/RL	1686	<250	Unknown
19	321,8	1,89	<i>Lnc12</i> .F/RL	1686	<250	Unknown
20	311,3	1,83	<i>Lnc12</i> .F/RL	1686	~500	Unknown
21	262,7	1,91	<i>DuxCDS</i> .F/R	2041/2091	~700	Unknown
22	304,9	1,90	<i>DuxCDS</i> .F/R	2041/2091	~1000	Unknown
23	388,1	1,81	<i>DuxCDS</i> .F/R	2041/2091	~1000	Unknown
24	383,6	1,86	<i>DuxCDS</i> .F/R	2041/2091	<250	Unknown
25	370,5	1,84	<i>DuxCDS</i> .F/R	2041/2091	~600	Unknown
26	212,0	1,90	<i>DuxCDS</i> .F/R	2041/2091	~600	Unknown
27	334,6	1,87	<i>DuxCDS</i> .F/R	2041/2091	~400	Unknown
28	223,6	1,85	<i>DuxCDS</i> .F/R	2041/2091	~600	Unknown
29	196,2	1,93	<i>DuxCDS</i> .F/R	2041/2091	~600	Unknown
30	192,5	1,92	<i>DuxCDS</i> .F/R	2041/2091	~600	Unknown

ВЫВОДЫ

- *Lnc5* кДНК был успешно клонирован в обоих направлениях.
- *Lnc9*, *Lnc12*, *Dux* кДНК не были клонированы из-за неоптимальных условий для проведения полимеразной цепной реакции.
- Необходимо всегда быть внимательным при проведении эксперимента.
- Важно контролировать все возможные параметры эксперимента.