ETH zürich

ETH Library

Partial purification of globin plus-strand sequences from rabbit DNA

Doctoral Thesis

Author(s):
Hofstetter, Hans

Publication date:
1976

Permanent link:
https://doi.org/https://doi.org/10.3929/ethz-a-000097973

Rights / license:
In Copyright - Non-Commercial Use Permitted

This page was generated automatically upon download from the ETH Zurich Research Collection.
For more information, please consult the Terms of use.

Diss. ETH

Diss. ETH 5834 ex B

PARTIAL PURIFICATION OF GLOBIN PLUS-STRAND SEQUENCES FROM RABBIT DNA

ETH-BIBLIOTHEK ZÜRICH

ABHANDLUNG

zur Erlangung
des Titels eines Doktors der Naturwissenschaften
der

EIDGENOESSISCHEN TECHNISCHEN
HOCHSCHULE ZUERICH

vorgelegt von

Hans Hofstetter
Dipl. Naturwissenschafter
ETHZ
geboren am 4. August 1947
von Zürich und Schänis (SG)

Angenommen auf Antrag von:

Prof. Dr. T. Koller, Referent

Prof. Dr. C. Weissmann, Korreferent

ABSTRACT

Procedures are described for the partial purification of globin plus-strand sequences from rabbit DNA on a preparative scale. DNA complementary to globin mRNA was elongated by the addition of dCMP residues and hybridized with EcoRI-cleaved and denatured rabbit DNA. The elongated cDNA (poly(dC)-cDNA), with globin plus-strand sequences annealed to it, was isolated by chromatography on poly(I)-Sephadex. Further purification was achieved by chromatography on hydroxyapatite and centrifugation through an alkaline sucrose gradient. As assayed by hybridization to [^{125}I] globin cDNA, the globin plus-strands were purified 500 to 2000 -fold with a recovery of 3 - 9 %.

ZUSAMMENFASSUNG

Das haploide Genom der Säugetiere umfasst etwa 2 - 3 x 10^9 Basenpaare, eine Zahl, die ausreichen würde um für 2 -3 x 10^6 Gene mit einer durchschnittlichen Länge von 1000 Basenpaaren zu kodieren. Die Untersuchung von Struktur und Funktion einzelner Gene auf molekularer Ebene ist weitgehend limitiert durch die Tatsache, dass alle bis heute untersuchten Gene, deren mRNA am 3' Ende eine Poly(A) Sequenz aufweisen, nur einmal, oder höchstens wenige Male im haploiden Genom vorkommen, und sie somit nur einen verschwindend kleinen Anteil (1:10^7) der im Zellkern vorhandenen DNA ausmachen. Seit 1970 wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen elegante Methoden entwickelt, die es ermöglichen, jedes beliebige, wenigstens teilweise doppelsträngige DNA Molekül mit einem bakteriellen Vektor (Plasmide und modifizierte Phagen) zu koppeln, in E. coli zu vermehren und anschliessend in grossen Mengen zu isolieren. Unser weitgestecktes Ziel ist es, die α und β Globingene des Kaninchens sowie deren Nachbarregionen, die vermutlich der Genregulation dienen, in ein Plasmid zu integrieren und sie so in grosser Menge für weitergehende Untersuchungen bereitzustellen. Ein erster Schritt in dieser Richtung ist die, in dieser Arbeit beschriebene Anreicherung von Globin (+) Strängen, d.h. derjenigen DNA Abschnitte die eine zur Globin mRNA identische Sequenz besitzen.

Ein erster Teil der Arbeit beschreibt die Entwicklung eines Hybridisierungstests, der eine quantitative Bestimmung der im Ausgangsmaterial und nach den verschiedenen Reinigungsstufen vorhandenen Globin (+) Stränge erlaubt. Der Test basiert auf der Hybridisierung von [^{125}I] Globin cDNA mit den DNA Proben, gefolgt von einem Abbau der einzelsträngigen DNA mit der Endonuklease S_1. Der prozentuale Anteil an doppelsträngiger [^{125}I] Globin cDNA ist ein Mass für den Gehalt an Globin (+) Strängen. Zur Standardisierung des Tests wurden bekannte Mengen Zell-DNA in analoger Weise behandelt. Aus den Standardkurven konnte zusätzlich abgeschätzt werden, dass im haploiden Genom des Kaninchens weniger als 5 Globingene enthalten sind.

Die Reinigung der Globin (+) Stränge erfolgt über drei Stufen, wobei das Prinzip der ersten Reinigungsstufe der Arbeit von Coffin et al. (J. Mol. Biol., 1974) entnommen wurde. Ausgehend von und Globin mRNA wurde zuerst mit Retrotranskriptase ein

komplementäre DNA Kopie (cDNA) synthetisiert, welche anschliessend, unter Verwendung von terminaler Deoxynukleotidyltransferase, am 3′ Ende um durchschnittlich 200 - 300 dCMP Nukleotide verlängert wurde. Das Produkt dieser in vitro Synthese bezeichnen wir als Poly(dC)-cDNA. Hochmolekulare, aus Kaninchenleber isolierte DNA wurde mit dem Restriktionsenzym EcoRI verdaut und nach Denaturierung in Gegenwart von Oligo(C) mit Poly(dC)-cDNA hybridisiert. Die Globin (+) Stränge, welche mit der Poly(dC)-cDNA hybridisierten, konnten mittels Filtration durch Poly(I)-Sephadex von der übrigen Kaninchen DNA abgetrennt werden, da die Poly(dC)-cDNA an das Poly(I)-Sephadex bindet. Die auf der Säule zurückgehaltenen Moleküle wurden mit Formamid eluiert. Ihr Gehalt an Globin (+) Strängen war 30 - 60 fach höher als im Ausgangsmaterial, wobei die Ausbeute rund 10 % betrug. Die von der Poly(I)-Sephadex eluierte DNA wurde zunächst selbsthybridisiert. Dabei bildeten die Poly(dC)-cDNA und die Globin (+) Stränge erneut einen Doppelstrang, welcher durch Chromatographie an Hydroxyapatite von einzelsträngiger DNA abgetrennt und um einen Faktor 3 weiter gereiningt werden konnte. Im dritten Reinigungsschritt wurden die DNA Moleküle in einem alkalischen Sucrosegradienten nach Grösse aufgetrennt und alle Moleküle mit mehr als 600 - 800 Nukleotiden eingesammelt. In zwei unabhängigen Experimenten fanden wir insgesamt eine 530 - und 1970 fache Anreicherung der Globin (+) Stränge, wobei die Ausbeute 3.4 bezw. 9 % betrug. Im Prinzip ist die beschriebene Methode auf alle Gene anwendbar, falls die entsprechende mRNA gereinigt werden kann.

Wir hoffen diese gereinigte DNA in naher Zukunft in ein Plasmid einbauen und dadurch vermehren zu können. Die verschiedenen Möglichkeiten diesen Schritt vorzunehmen werden in der Diskusion ausführlich besprochen.