Phage display

LEÍRÁS

A kit tartalmaz 100 µl, $2x10^{12}$ pfu/ml fágot (M13 fág), 2 db szekvenáló primert, egy E. coli ER2738 törzset, streptavidint, biotint

Ezzel a technikával fehérje-fehérje kölcsönhatást lehet vizsgálni, illetve olyan szekvenciát, motívumot, peptid részletet lehet keresni, melyhez egy adott fehérje kötődik.
A peptid részlet a bakteriofág coat-fehérjjével (*pIII minor coat protein)* fúziósan jelenik meg a fág felszínén míg a peptidet kódoló szekvencia a fág belsejében marad. A peptid a pIII N-terminálisán jelenik meg és egy rövid spacer (Gly- Gly- Gly-Ser) választja el a pIII coat fehérjétől.
A peptidet kódoló szekvenciákat ($2,8x10^9$ különböző) elektroporációval juttatták be a fágba, amplifikálták így a kit által adott fág-oldat minden 10 µl-ében az előforduló szekvenciák 70 példányban vannak jelen.
A fágok az ER coli törzset jó hatásfokkal fertőzik, bennük felszaporodnak, majd anélkül, hogy megölnék a colikat, kiszabadulnak belőlük.
A kísérlet során egy plate-be ki kell kötni a vizsgálni kívánt fehérjét, vagy peptidet. Ezt követően a fágokat hozzá kell adni a plate-hez. Az inkubáció során egyes fágok, a felszínükön lévő peptidszakasz révén, kötődni fognak a peptidünkhöz/fehérjénkhez). A nem kötődött fágokat lemossuk a plate-ről, a kötődötteket pedig eluáljuk. Az eluált fággal megfertőzzük a colikat, bennük felszaporítjuk a fágokat, majd onnan kitisztítjuk őket, és a folyamatot még kétszer megismételjük. A harmadik kör végén elviekben már csak olyan fágokkal dolgozunk, melyek felszínén csak azok a bizonyos peptidek fejeződnek ki, melyek nagy affinitással kötődnek a plate-hez kikötött fehérjéhez/peptidhez.
Ezekből a fágokból DNS-t izolálunk és a kit primerjeinek segítségével szekvenáljuk (tatjuk), végül megtudhatjuk, milyen szekvencia / szekvenciák kódolták azt a peptidet, mely annyira szerette a mi fehérjénket.

E. coli ER2738
F+ pilusa van, ezen keresztül könnyen megfertőzhető, valamint tartalmaz egy mini transzpozont, ami lehetővé teszi a tetraciklinnel szembeni rezisztenciát.
A fágokban van lacZα gén (a fágkönyvtár M13mp19 klónozó vektorból ered), emiatt LB/IPTG/XGal plate-n kék színű telepeket kapunk.
A fág titer meghatározásnál tehát a kék színű coli-telepek azt jelentik, hogy a coli megfertőződött a fággal.

OLDATOK

LB medium:

- 10 g Bacto-tripton
- 5 g yeast extract
- 5 g NaCl

1L pH: 7

Kimér, felold, pH, autokláv, tárolás: 4^{o}C

Ha LB-t készítünk, számoljunk úgy, hogy kell a LB/IPTG/XGal LB/Tet platekre és kell önmagában is!!

LB/IPTG/Xgal:

- 15 g / L agar LB mediumban

bepH-zott LB mediumban oldjuk fel az agart, majd így autoklávozzuk, az autoklávból akkor vegyük ki, mikor az már 100^{o}C alá hűlt, és egy órára tegyük 55^{o}C-os vízfürdőbe. Mielőtt platekbe öntenénk, 1 ml IPTG/XGal- t tegyünk hozzá, majd fülkében öntsük gyorsan platekbe. Szilárdulás után a plateket parafilmezzük körbe, csomagoljuk alufóliába és fejjel lefelé tároljuk sötét helyen, 4^{o}C-on

Agaróz top:

- 10 g bacto-tripton
- 5 g yeast extract
- 5 g NaCl
- 1 g $MgCl_2x6H_2O$
- 7 g agaróz

1L

Kimér, felold, autokláv, 100^{o}C alatt kivenni és 40ml-enként Falcon csövekbe szétosztani fülke alatt, megvárni míg megszilárdul, majd bekupakolni, a kupakot körbeparafilmezni, tárolás: 4^{o}C.
Egy kísérlet-sorozathoz elég 200-300 ml-t csinálni.

Tetraciklin stock

ld datasheet

LB/Tet

- fc: 20 μg/ml

A tetraciklin antibiotikumot a már autoklávozott LB-be kell bemérni, mikor az már kellően lehűlt (55^{o}C, egy óra), Szilárdulás után a plateket parafilmezzük körbe, csomagoljuk alufóliába és fejjel lefelé tároljuk sötét helyen, 4^{o}C-on

Coating puffer:

- 0,1 M $NaHCO_3$ pH: 8,6

Kimér, felold, pH, autokláv

Blocking puffer:

- 5 mg/ml BSA in Coating buffer

Sterilre kell szűrni!!!

TBS:

- 50 mM Tris-HCl, pH: 7,5
- 150 mM NaCl

Autokláv, + 0,1% Tween20 = TBSTw (100 µl Tween20/100 ml TBS), tárolás: 4°C

PEG/NaCl:

- 20% (w/v) PEG-8000 *PEG8000: P4463-250 g Sigma*
- 2.5M NaCl-ban

Autoklávozni, tárolás: RT

Tris-HCl:

- pH: 9,1

autoklávozni, tárolás: 4°C

Glicin-HCl:

- 0,2M oldatot kell készíteni, pH: 2,2

IPTG/XGal:

- **1 g XGal** (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside) + **1,25 g IPTG** (isopropyl b-D-thiogalactoside) / **25 ml DMF** (dimetil formamid), tárolás: -20°C, sötétben

NaI: S8379

MINDENT STERILEZNI, LEHELŐSÉG SZERINT VÉGIG FÜLKE ALATT DOLGOZNI, A PLATEKET FÜLKÉN ÉS INKUBÁTORON KÍVÜL KÖRBE-PARAFILMEZNI !!!

ER törzs

- 10 ml LB hez adjunk 20 μg/ml f.c. Tetraciklint (Tet) (100mg/ml oldatból 2μl)
- karcoljuk meg az eredeti ER-t tartalmazó csövet, láng mellett, úgy hogy a cső a lehető legkevesebb ideig legyen kinn a -70°C-os hűtőből, nehogy felolvadjon
- 37°C, 200 rpm, 5-6 óra

Kb 5 óra múlva kezd el nőni (zavarosodik az LB) és ezt követően lehet széleszteni. Szélesszünk 8-10 platere, mert viszonylag sok telepre lesz később szükségünk.

- a szélesztést fülke alatt, láng mellett tegyük, a szélesztőkacsot is égessük le.
- az LB/Tet plateket O/N 37°C-os termosztátba tegyük, fejjel lefelé.

- másnap reggel a plateken telepeket kell látni. Azt a telepet tegyük el (parafilm, fejjel lefelé, 4°C) ahol sok önálló telepet látunk, csak olyan telepet lehet később levenni, ami nem érintkezik szomszédos teleppel.

OPCIÓ: az LB-ből esetleg szike, csipesz segítségével vehetünk ki telepeket, ezeket tegyük eppendorf csövekbe, majd a csöveket parafilmezzük és 4°C-on tároljuk, próbáltam ezeket később felnöveszteni és működött.

Vírus titer meghatározás

- vegyük elő az LB/IPTG/XGal plateket, hogy szobahőmérsékletre melegedjenek.
- tegyük mikróba az agaróz-toppot (mellette legyen egy kis pohár víz) és olvasszuk fel az agarózt.
- tegyük 45°C-os vízfürdőbe, hogy lehűljön, és hogy vissza ne szilárduljon.
- fágokból (OUT és IN) hígitási sort kell csinálni, eppendorf csőben, LB-ben

a füzet szerint: 10^1-10^3 unamplified panning eluate
10^8-10^{11} amplified phage eluate

- 15 ml Falcon csövekbe 200-200 μl ER-t tegyünk (OD_{600}=0,5)
- ezekhez adjunk hozzá 10-10 μl fág hígitást és 1-5 percig hagyjuk állni.
- egymás után adjuk hozzá 3 ml agaróz top-ot, és minden egyes hozzáadás után vortexeljük 5" és öntsük az LB/IPTG/XGal platekre. Azonnal kezdjük el billegtetni a plate-eket, mivel az agaróz szinte egyből rádermed, és hogy ne egy csomóban legyen rajta, hanem nagyjából egyenletesen terüljön el.
- a plateket ezután fejjel lefelé tegyük 37°C-os termosztátba másnapig

másnapra szép, kék színű telepeket (tarfoltok) kell látni. Ha nem kék színűek a telepek akkor lehet gond a fertőzéssel, vagy esetleg az XGal-al. Tegyük még egy fél napra a termosztátba a plateket, aztán hűtőbe. Így talán még előjöhet a színük.

Számolás:

Összeszámolt, kék telepek x hígítás (10^1-10^{11}) = pfu (plaque forming unit) per 10 μl.

OPCIÓ:
A titert máshogy is meg lehet határozni:
Az amplifikált PEG-el kicsapott, tiszta fágokból vegyünk ki 5 μl-t

OD_{260}-on mérjük le, úgy hogy 495 µl dH_2O-t tegyünk egy szűkített küvettába, és abba tegyük az 5 µl-t

$$\mathbf{pfu = OD_{600} \times hígítás \times 2{,}214 \times 10^{11}}$$

Fág fertőzés és amplifikálás:

- 20 ml ER + 98 µl OUT 4,5 h 37oC, 200 rpm
- tegyük hűtött centricsőbe (ezeket előzőleg autoklávozni, de legalább alkoholozni)
- cf: 10,000 g 4ºC, 10' (pellet-ben lesznek a colik, a felülúszóban pedig a fágok)
- a felülúszót tegyük át egy új centricsőbe (láng mellett, fülkében)
- cf: 10,000 g 4ºC, 10' (pellet-ben lesznek a maradék colik, a felülúszóban pedig a fágok)
- a felülúszót tegyük steril mérőhengerbe, és mérjük le pontosan a fágok térfogatát
- tegyük egy újabb centricsőbe
- és adjunk hozzá 1/6 térfogat NaCl/PEG-et

pl: 20 ml = 5/6 x
120 ml = 5 x
24 ml = x
24-20 ml = 4 ml = 1/6 x

- a fágok koncentrálása: O/N jég közé dugva (hungarocel-doboz és hidegszoba)

Amplifikált fágok precipitálása és tisztítása:

Az éjszaka során a fágokat a PEG precipitálta, a csapadékot szabad szemmel is lehet látni (ha nem látjuk az sem baj)

- PEG precipitáció cf: 4ºC, 10,000 g, 15' pellet: itt lesznek a precipitált fágok
- a felülúszót óvatosan öntsük le
- a fágokat 1 ml TBS-ben szuszpendáljuk és tegyük eppendorf csőbe (újra feloldjuk őket, a csapadéknak a TBS-ben nagyon hamar fel kell oldódnia)
- cf: 4ºC, 5', 10,000 g (a fágok most már a felülúszóban lesznek, mert újra oldott állapotban vannak! A pelletben a fel nem oldott sejtek maradnak)
- a felülúszót tegyük másik eppendorf csőbe és 1/6 rész PEG/NaCl-al precipitáljuk újra
- 1h-t jégen áll (re-precipitáció)
- cf: 4ºC, 5', 10,000 g (pellet: itt lesznek a precipitált fágok)
- felülúszót eldobni, a precipitátum feloldása 200 µl TBS-ben
- cf: 1' max speed, 4ºC: fu ban lesznek az *amplifikált fág eluátumok*
- OD260-on lemérni, konc meghat

Coating:

96 lyukú platebe **150 µl 100 µg/ml target 0,1M $NaHCO_3$ pufferben hígítva.**
A targetből lehet csinálni egy töményebb stock oldatot (2-5 mg/ml) és azt tovább hígítani a coating pufferben
Párhuzamost felesleges készíteni.
A platet fülkéből kivéve körbe kell parafilmezni, és **4ºC, O/N**

1.NAP

- ER felnövesztés az eredeti csőből.
- 10 ml LB + 20 μg/ml fc. Tetraciklin, karcolás az eredeti csőből
- 37ºC, 200-220 rpm, 5-6 h, ameddig el kezd zavarosodni.
- szélesztés LB/Tet agarra, 37ºC, O/N

- coating

2.NAP

- egy ER telepet felvenni 30 ml LB-ben (250 ml-es Erlenmeyer lombikban)
- növesztés: 37ºC, 200 rpm, amíg $O.D._{600}$=0,5 (ez kb. 3 óra, ha túlnövi ezt az értéket lehet, hogy elveszíti az F^+ pilusát és nem lehet majd fertőzni. Ha netán nem végzünk addig míg eléri a 0,5 O.D.-t tegyük 4ºC-ra a colikat.

KÖZBEN:

- coating eltávolítása (kicsapás)

- 200 μl Blocking sol (900 μl coating + 100 μl BSA (50 mg/ml)) 1h, 4ºC

- kicsapás, mosás 6x (TBSTw (0,1%))

- fághígítás: 90 μl TBSTw + 10 μl fág (az eredeti csőből) = $2x10^{11}$ fág
  1h, rázatás a vortexen, (rock gently) RT

- nem kötődött fágok eltávolítása = **IN** (virus titert kell belőle meghatározni)

- mosás 10x (TBSTw (0,1%))

- elúció:100 μl 0,2 M Gly (pH:2,2), rázatás **10'** (szigorúan!!!), RT

- az eluált fágokat azonnal neutralizáni kell!!
  Epp csőbe: 15 μl 1 M TrisHCl pH: 9,1-t mérjünk először majd erre mérjük rá a lyuk teljes tartamát (100 μl Gly-ben eluált fág) = **OUT**

az OUT-ból kell majd a vírustiter (2μl) meghatározás és az amplifikákás (98 μl) is.

Hígítási sor a titer meghatározáshoz:
10^1: 20 μl LB - 2μl fág
10^2: 20 μl LB - 2μl előző
10^3: 20 μl LB - 2μl előző
10^4: 20 μl LB - 2μl előző

Mostanra már fel kellett nőnie az ER-kultúrának, osszuk kétfelé: 8 ml-t tegyünk egy steril csőbe (titer meghatározáshoz), maradék 20 ml-hez pedig adjuk az amplifikálni kívánt OUT-ot.

Először indítsuk el a fertőzést = amplifikálást utána pedig csináljuk a virus titer meghatározást.

3. NAP

- Az éjszaka alatt precipitált fágok tisztítása és re/precipitálása
- Koncentráció meghatározás és összevetés a virus titer meghatározással
- COATING a II. körhöz

4.NAP

- egy ER telepet felvenni 30 ml LB-ben (250 ml-es Erlenmeyer lombikban)
- növesztés: 37ºC, 200 rpm, amíg $O.D._{600}$=0,5 (ez kb. 3 óra, ha túlnövi ezt az értéket lehet, hogy elveszíti az F^+ pilusát és nem lehet majd fertőzni. Ha netán nem végzünk addig míg eléri a 0,5 O.D.-t tegyük 4ºC-ra a colikat.

KÖZBEN:

- coating eltávolítása (kicsapás)

- 200 µl Blocking sol (900 µl coating + 100 µl BSA (50 mg/ml)) 1h, 4ºC

- kicsapás, mosás 6x (TBSTw (0,1%))

- fághígítás: előző körben eluált, majd amplifikált, tisztított fágokból $2x10^{11}$ fág (ha van annyi, ha nincs, akkor mindet ami van, 100 µl-es térfogatban) **1h, rázatás a vortexen (rock gently), RT**

- nem kötődött fágok eltávolítása = **IN** (virus titert kell belőle meghatározni)

- mosás 10x (TBSTw (0,1%))

- elúció:specifikus!!!

solution of a known ligand for the target (0,1-1mM) in TBS OR
solution of the free target (100 µg/ml) in TBS 10-60' RT, rock gently

- az eluált fágokat tegyük eppendorf csőbe = **OUT**

az OUT-ból kell majd a vírustiter (2µl) meghatározás és az amplifikákás (98 µl) is.

Hígítási sor a titer meghatározáshoz: 10^8-10^{11} amplified phage eluate füzet szerint
LB-ben kell csinálni (lehet egy hígítással alá menni)

Mostanra már fel kellett nőnie az ER-kultúrának, osszuk kétfelé: 8 ml-t tegyünk egy steril csőbe (titer meghatározáshoz), maradék 20 ml-hez pedig adjuk az amplifikálni kívánt OUT-ot.
Először indítsuk el a fertőzést = amplifikálást utána pedig csináljuk a virus titer meghatározást.

5.NAP

- az éjszaka alatt precipitált fágok tisztítása és re/precipitálása
- koncentráció meghatározás és összevetés a virus titer meghatározással (LB/IPTG/XGal plate-ken a kék pöttyök összeszámolása)
- COATING a III. körhöz

6.NAP

- egy ER telepet felvenni 30 ml LB-ben (250 ml-es Erlenmeyer lombikban)
- növesztés: 37ºC, 200 rpm, amíg $O.D._{600}$=0,5 (ez kb. 3 óra, ha túlnövi ezt az értéket lehet, hogy elveszíti az F^+ pilusát és nem lehet majd fertőzni. Ha netán nem végzünk addig míg eléri a 0,5 O.D.-t tegyük 4ºC-ra a colikat.

KÖZBEN:

- coating eltávolítása (kicsapás)

- 200 µl Blocking sol (900 µl coating + 100 µl BSA (50 mg/ml)) 1h, 4ºC

- kicsapás, mosás 6x (TBSTw (0,1%))

- fághígítás: előző körben eluált, majd amplifikált, tisztított fágokból $2x10^{11}$ fág (ha van annyi, ha nincs, akkor mindet ami van, 100 µl-es térfogatban) **1h, rázatás a vortexen (rock gently), RT**

- nem kötődött fágok eltávolítása = **IN** (virus titert kell belőle meghatározni, opció)

- mosás 10x (TBSTw (0,1%))

- elúció:specifikus!!!

solution of a known ligand for the target (0,1-1mM) in TBS OR
solution of the free target (100 µg/ml) in TBS 10-60' RT, rock gently (úgy ahogy az előző körben csináltuk)

- az eluált fágokat tegyük eppendorf csőbe = **OUT**

az OUT-ból kell majd a vírustiter (2µl) meghatározás amplifikákás NEM kell!!!

Hígítási sor a titer meghatározáshoz: 10^8-10^{11} amplified phage eluate füzet szerint
LB-ben kell csinálni (lehet egy-két hígítással alá menni)

Mostanra már fel kellett nőnie az ER-kultúrának, osszuk kétfelé: 8 ml-t tegyünk egy steril csőbe (titer meghatározáshoz), csináljuk a virus titer meghatározást.

- a plate-k most ne legyenek benn túl sokáig a termosztátban (MAX 18h), a visszamaradt eluátumot 4ºC-on tároljuk.
- indítsuk egy O/N ER kultúrát.(10 ml elég lesz)

7.NAP

characterization of binding clones (ezt nem értem, mire jó)

- az O/N kultúrát 1:100-hoz meghígítani LB-ben(20 ml LB - 200 µl ER),
- 1-1 ml-nként szétosztani kémcsövekbe
- 20’ 37ºC, 200 rpm
- ezekhez 1-1 kék telepből kell mintát tenni

Olyan platerről vegyük le a telepeket, ahol kevesebb mint 100 telep van (így biztos, hogy minden telep csak egy DNS szekvenciát hordoz)

- 4,5 h 37ºC, 200 rpm
- eppendorf csövekbe mérjük vissza,
- cf: 30”, 4ºC, max speed
- a felülúszókat tegyük újabb epp.csőbe
- cf: 30”, 4ºC, max speed
- a felülúszókat tegyük újabb epp.csőbe = amplified phage stock (4ºC-on több hétig eltartható, ha tovább akarjuk tárolni: 1:1 arányban mérjünk hozzá glicerolt és -20ºC)

rapid purification of sequencing templates

- az O/N kultúrát 1:100-hoz meghígítani LB-ben(20 ml LB - 200 µl ER),
- 1-1 ml-nként szétosztani kémcsövekbe
- 20’ 37ºC, 200 rpm
- ezekhez 1-1 kék telepből kell mintát tenni

Olyan platerről vegyük le a telepeket, ahol kevesebb mint 100 telep van (így biztos, hogy minden telep csak egy DNS szekvenciát hordoz)

- 4,5 h 37ºC, 200 rpm
- eppendorf csövekbe mérjük vissza,
- cf: 30”, 4ºC, max speed
- a felülúszót új csőbe tenni: 500 µl a szekvenáláshoz, maradék **ELISA-hoz**
- 500 µl-hez 200 µl PEG/NaCl, párszor megforgatni, 10’ RT
- cf: 10’, 10,000 g, felülúszót jól leszívni
- a pellettet szuszpendáljuk 100 µl iodide pufferben, majd
- adjunk hozzá 250 µl etOH-t
- 10’ RT (rövid inkubálás alatt feltehetően csak az egyszálú DNS-ek fognak precipitálódni, a fág fehérjék nem)
- cf: 10’, 10,000 g, felülúszót jól leszívni
- a pellet-et 70%-os etOH-val mosszuk
- majd szárítsuk be a vákuum-fugával (speed vac)
- a pellett-et (ha eddig nem láttuk most már lehet látni!!!) 30 µl TE pufferben vegyük fel, 4ºC-on tárolható, koncentrációját határozzuk meg, amúgy szekvenálásra kész!!!

ELISA

1-2.NAP

- 20 ml LB+ER (vagy O/N kultúra 1:100 és 20'ig 37ºC, 200 rpm)
- ehhez 5 μl fág felülúszó
- 37ºC, 200 rpm, 4,5 h
- cf: 10' 10,000 g, 4ºC
- felülúszót új centricsőbe és újra lefugálni.
- a felülúszót 80%-át mérőhengerbe tenni, térfogatát pontosan elmérni és 1/6 PEG/NaCl al kiegészíteni, majd centricsőbe tenni
- O/N jég közé dugva áll a hidegszobában

3. NAP

- cf: 15', 4ºC, 10,000 g
- pellett szuszpendálása: 1 ml TBS-ben (közben eppendorf csőbe tenni)
- cf: 5', 4ºC, 10,000 g (pellett: maradék sejt, felűlúszó: feloldott fágok)
- a felülúszót új csőbe tenni és 1/6 térfogat PEG/NaCl-al kiegészíteni
- 4ºC, 1h
- cf: 10', 4ºC, 10,000 g (pellettben vannak a precipitált fágok)
- pellett szuszpendálása 50 μl TBS-ben (fág szám meghat, és tárolás 4ºC)

- coating ELSIAhoz: 150 μl, 100 μg/ml target in coating puffer

4.NAP

- blokkolás: 5 mg/ml BSA in coating puffer:1-2h, 4ºC 200-200 μl
- mosás: 6x TBSTw
- fágokat rátenni. 200 μl/well, TBSTw-ben hígítva, különböző hígításokban: 10^{12}-fággal indulva, 4x-es hígítási léptékkel haladva eészen $2x10^5$-ig, 1-2 h, RT, rázatás
- mosás: 6x TBSTw
- antitest: anti-M13 antibody (HRP-vel konjugálva!!!) (Pharmacia cat.no: 27-9411-01) 1:5000 in blocking buffer, 200 μl/well 1-2 h, RT, rázatás
- mosás: 6x TBSTw
- detektálás: ABTS