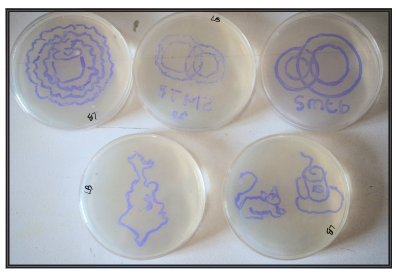
Getting ready to landscape infA, or, lessons learned in a wet lab

infA-ի լանդշավտի նախապատրաստում կամ կարևոր դասեր լաբարատորիայից

Приспособление к изучению ландшафтов (и работе в мокрой лаборатории)



Abstract

Fitness landscapes are essential for understanding mutations' interactions and their influence on organism survivability. We selected the bacterial transcription factor infA for our pilot study because it is essential but also short and easy to sequence. We aim to eventually replace the native infA gene with a genome-integrated library of mutants, and compete the different variants.

To this end, we first need to construct a plasmid containing native infA and introduce it to our cells, so as to not kill them while deleting the genomic copy. Secondly, we will replace the chromosomal infA with sacB, a negative selection gene that poisons cells in the presence of sucrose, and confirm integration by PCR. Finally, we will replace sacB with the mutant infA library and select infA-mutant cells on sucrose plates.

During our project, we focused on generating the mutant infA library and the native infA plasmid, as the first steps towards constructing the infA fitness landscape.

Նախաբան

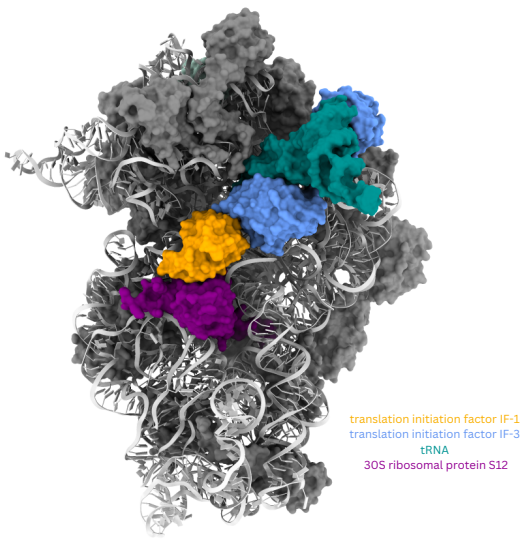
Հարմարվողականության լանդշավտները կարևոր են մուտացիաների փոխազդեցությունների և կենդանի օրգանիզմների գոյատևման վրա դրանց ազդեցությունը հասկանալու համար:Մենք ընտրեցինք բակտերիալ տրանսկրիպցիայի գործոնը ՝ infA մեր փորձնական ուսումնասիրության համար,քանի որ այն կարևոր է,բայց նաև այն կարճ է և հեշտ է սեկվենավորել:Մենք նպատակ ունենք ի վերջո փոխարինել սկզբնական infA գենը մուտացված դարանով և մրցակցության մեջ դնել տարբեր տարբերակները:Այդ նպատակով մենք նախ պետք է պատրաստենք սկզբնական infA պարունակող պլազմիդ և ներմուծենք այն մեր բջիջներին, որպեսզի չսպանենք դրանք գենոմային պատճենը ջնջելիս:Ապա, մենք կփոխարինենք քրոմոսոմային infA-ն sacB-ով՝ բացասական սելեկցիոն գենով, որը թունավորում է բջիջները սախարոզայի առկայության դեպքում և կհաստատենք ինտեգրումը ՊՇՌ-ով:Ի վերջո, մենք կփոխարինենք sacB-ին infA-ի մուտացված գրադարանով և կընտրենք infA-մուտանտ բջիջները սախարոզային թիթեղների վրա:Մեր նախագծի ընթացքում մենք կենտրոնացել ենք inf-A-ի մուտացված գրադարանի և սկզբնական infA-ի պլազմիդի ստեղծման վրա՝ որպես infA-ի հարմարվողականության լանդշաֆտի կառուցման առաջին քայլեր:

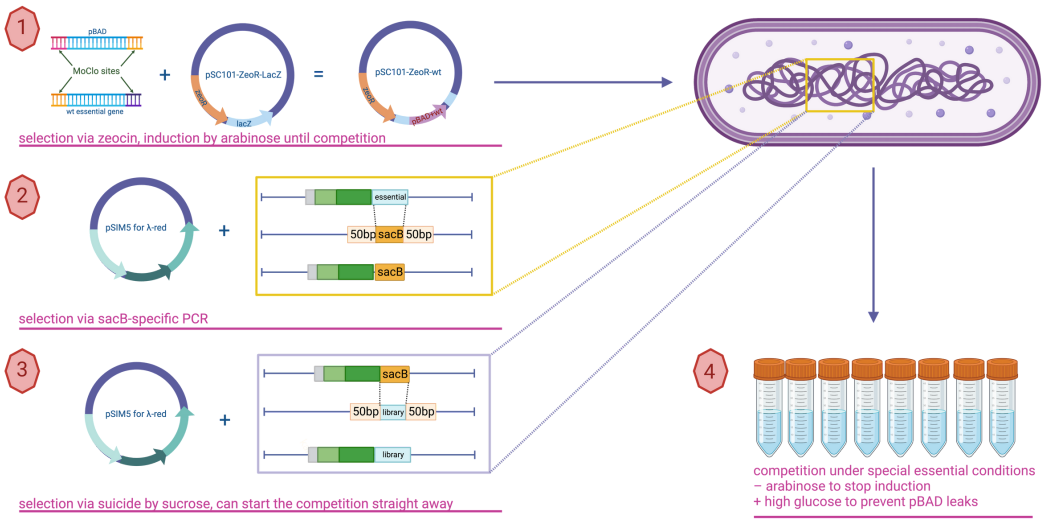
Резюме

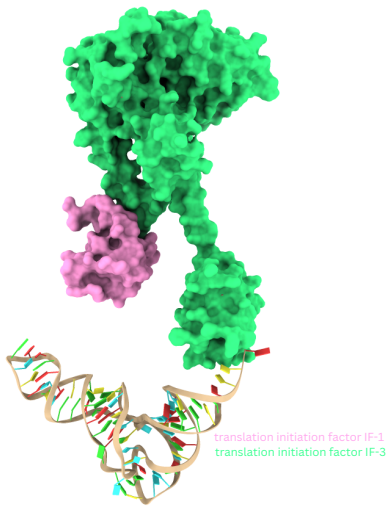
Изучение ландшафтов приспособленности важно для понимания того, как взаимодействуют друг с другом и влияют на выживание организма разные мутации. Для пилотного эксперимента мы выбрали бактериальный фактор транскрипции infA. Это жизненно важный ген, поэтому его можно напрямую связать со скоростью роста бактерий, и сравнительно небольшой, поэтому удобен для секвенирования мутантных библиотек на платформе Illumina. Наша конечная цель – заменить исходный ген на интегрированную в геном библиотеку мутантных вариантов и провести соревнование полученных штаммов.

Для этого нам необходимо сначала сконструировать плазмиду, содержащую копию исходной последовательности гена, и внести её в клетки, чтобы не уничтожить их при делеции геномного варианта. Затем мы заменим infA на хромосоме геном sacB, убивающим клетки в присутствии сахарозы в среде – интеграция будет подтверждена с помощью ПЦР. Наконец, мы заменим sacB на библиотеку мутантных вариантов infA и произведём отбор с помощью среды, содержащей сахарозу.

Во время нашего проекта мы сфокусировались на подготовке мутантной библиотеки infA и сборке плазмиды с резервной копией гена.







Results

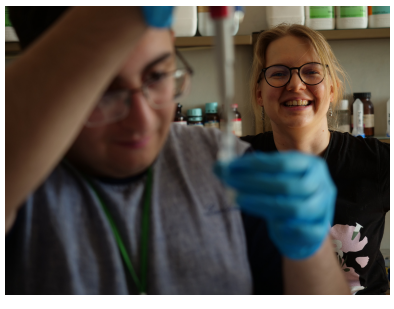
- We identified the optimal reaction conditions for mutagenic PCR
- We constructed the plasmid for a backup copy of infA under an inducible arabinose promoter
- We amplified the selection factor (sacB) suitable for a lambda-red mediated genome integration to knock out the genomic infA gene

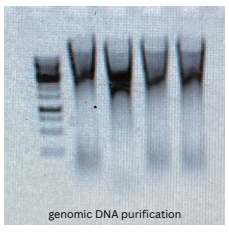
Արդյունքները

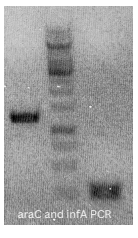
- Հայտնաբերվել են մուտագեն ՊՇՌ-ի օպտիմալ պայմանները
- Պատրաստվել է infA-ի կրկնօրինակը պահպանող պլազմիդը
- Կատարելագործվել է ընտրության գործոնը,որը հարմար է լամբդա-կարմիր միջնորդավորված գենոմի ինտեգրման համար՝ infA գենը դուրս մղելու համար:

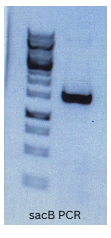
Результаты

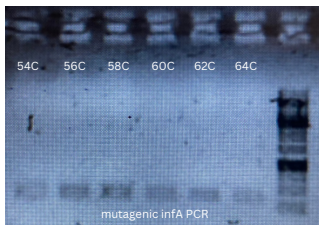
- Подобраны оптимальные условия для мутагенной ПЦР
- Создана плазмида, несущая резервную копию гена infA дикого типа и индуцибельный арабинозный промотор
- Получен продукт негативного селектора sacB, подходящий для последующей lambda-red опосредованной геномной интеграции и делеции infA из геномной ДНК











Methods

- DNA purification (genomic and PCR products)
- polymerase chain reaction (high fidelity and mutagenic)
- agarose gel electrophoresis
- molecular cloning
- competent cells preparation
- bacterial transformation

Մեթոդներ

- ԴՆԹ մաքրում(Գենոմային և ՊՇՌ արգասիքներ)
- պոլիմերազային շղթայական ռեակցիա(բարձրորակ և մուտագեն)
- ագարի գելի էլեկտրոֆորեզ
- մոլեկուլյար կլոնավորում
- կոմպիտենտ բջիջների պատրաստում
- բակտերիալ տրանսֆորմացիա

Методы

- выделение и очистка ДНК (геномной и ПЦР-продуктов)
- полимеразная цепная реакция (высокоточная и мутагенная)
- электрофорез в агарозном геле
- молекулярное клонирование
- приготовление компетентных клеток
- бактериальная трансформация

Lessons learned:

- Never ever add restriction enzymes to genomic DNA
- Read labels carefully
- Always check your plan and ask your colleagues to proof-read it
- Read the protocol whenever in doubt
- Request assistance when needed
- Do not touch other people's equipment without asking
- Ensure a normal room temperature

Կարևոր դասեր.

- Երբեք մի ավիալցրեք Ռեստրիկտազներ գենոմային ԴՆԹ-ին
- Ուշադիր կարդացեք պիտակները
- Միշտ ստուգեք ձեր պլանը և խնդրեք ձեր գործընկերներին կարդալ և հաստատել
- Ամեն դեպքում կարդացեք ընթացակարգը
- Անհրաժեշտության դեպքում դիմեք օգնության համար
- Ձեռք մի տվեք այլ մարդկանց գործիքները առանց հարցնելու
- Պահպանեք նորմալ սենյակային ջերմաստիճան

Важно помнить

- Рестриктазы не используют для добывания генов из генома
- Стоит внимательно читать этикетки и подписи
- Нужно проверять план эксперимента и просить окружающих проверить его ещё раз
- В любой непонятной ситуации перечитывать инструкцию
- Лучше попросить о помощи
- НЕ ТРОГАТЬ ЧУЖОЕ ОБОРУДОВАНИЕ БЕЗ СПРОСУ
- Комнатная температура не должна быть выше 25 градусов...