



Tn5-transposaasin tuotto, puhdistus ja aktiivisuuden määrittäminen

Eetu Karpiola

OPINNÄYTETYÖ
Toukokuu 2019

Laboratoriotekniikan koulutus

TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu
Laboratoriotekniikan koulutus

KARPIOLA, EETU:

Tn5-transposaasin tuotto, puhdistus ja aktiivisuuden määrittäminen

Opinnäytetyö 35 sivua, joista liitteitä 2 sivua

Toukokuu 2019

Opinnäytetyön tarkoituksena oli tuottaa Tn5-transposaasia tutkimuskäyttöön. Opinnäytetyö suoritettiin Tampereen yliopiston alaisuudessa toimivassa BioMediTechissä Protein Dynamics -tutkimusryhmässä. Toimeksianto työhön tuli tutkijalta, joka halusi proteiinia käyttöönsä. Tavoitteena oli tuottaa proteiinia kolmessa eri solulinjassa, puhdistaa se käyttäen erilaisia menetelmiä sekä varmistaa tuotteen aktiivisuus.

Proteiinia koodaavan geenin sisältävä vektori transformoitiin kolmeen eri *E. coli* -solulinjaan. Proteiinin tuotto indusoitiin IPTG:llä. Solut hajotettiin sonikoimalla, joka perustuu ultraäänen käyttöön. Hajotetuista bakteerisoluista saostettiin DNA pois käyttäen PEI-menetelmää. Tn5-transposaasia tuottavaan geeniin oli lisättyä kitiiniä sitova alue (CBD), jonka avulla proteiini pystyttiin puhdistamaan affiniteettikromatografiaa käyttämällä. Puhdistuksen eri vaiheissa otettiin SDS-PAGE-näytteitä, joiden avulla pystyttiin seuraamaan prosessin onnistumista. SDS-PAGE-geelien avulla saatiin selville, mitkä fraktiot sisältävät puhdistettua proteiinia. Fraktiot yhdistettiin ja dialysoitiin. Dialyysituotteista ajettiin uusi SDS-PAGE-geeli, proteiini konsentroitiin ja pakastettiin. Tn5-transposaasien aktiivisuuden määrittäminen tehtiin muodostamalla Tn5-kompleksi, joka aktiivisena pystyy pilkkomaan DNA:ta. Plasmidi-DNA:n pilkkoutumista voitiin analysoida agarosigeelielektroforeesin avulla.

Proteiinia saatiin tuotettua runsaasti toimeksiantajalle. Tuotetun proteiinin puhtaus oli SDS-PAGE-analyysien perusteella hyvä. Aktiivisuuden määrittäminen perusteella voidaan sanoa, että Tn5-transposaasi on aktiivista. Lisäksi toimeksiantajan omat kokeet Tn5-transposaasin kanssa varmistivat sen aktiivisuuden.

Opinnäytetyöprosessia ei optimoitu ajanpuutteen vuoksi. Tuottovaiheessa inkubaatioaikoja voitaisiin vaihdella, sekä lämpökaappien lämpötiloja muokata. Käytettyjen reagenssien konsentraatioita voitaisiin vaihdella saantojen parantamiseksi. Puhdistuksen aikana kitiiniä voitaisiin käyttää enemmän ja inkubaatioaika voitaisiin pidentää. Aktiivisuuden määrittämisessä lämpötilan vaikutusta Tn5-kompleksin ja pUC19-plasmidin välisessä reaktiossa voitaisiin tutkia tarkemmin. Jatkotutkimuksen kannalta olisi mielenkiintoista tutkia, kuinka kauan Tn5-kompleksilla kestää pilkkoa koko pUC19-plasmidi.

Asiasanat: Tn5-transposaasi, tuotto, puhdistus, aktiivisuuden määrittäminen

ABSTRACT

Tampere University of Applied Sciences
Degree Programme in Laboratory engineering

KARPIOLA, EETU:

Tn5 transposase expression, purification and activity determination

Bachelor's thesis 35 pages, appendices 2 pages

May 2019

The aim of the thesis was to produce Tn5 transposase for further research needs. The thesis was performed in Protein Dynamics research group at BioMediTech-institute working under the University of Tampere. The assignment came from a researcher who wanted to use the protein in their own research. The purpose of this thesis was to express the protein by using three different cell lines, to purify the protein by using various methods and to determine the activity of the product.

The vector plasmid containing the Tn5 expressing gene was transformed into three different *E. coli*-cell lines. The expression of the protein was induced with IPTG. The cells were lysed with sonication, which bases on the usage of ultrasound. From the lysed cells, DNA was precipitated by using PEI-method. Chitin binding domain (CBD) had been added into the Tn5 transposase coding gene, which makes the target protein bind to the matrix of the chitin column, therefore making the purification with affinity chromatography possible. During the different steps of the purification process SDS-PAGE samples were taken, which helped determining that everything went as planned. The samples indicated which fractions included the purified protein. After the SDS-PAGE analysis, the Tn5 transposase containing fractions were pooled and dialyzed. The dialyzed products were analyzed with SDS-PAGE, concentrated and frozen in the freezer. Determining the Tn5 activity was done by creating Tn5 complexes, which cleave the pUC19 plasmid. By changing the concentration of the complex, the activity could be measured by using agarose gel electrophoresis (AGE). The higher the Tn5 complex concentration was the higher the cleavage of the pUC19 plasmid would be while time is a constant.

Plenty of protein was produced for the researcher. The purity of the protein was good based on the SDS-PAGE-analysis. Based on the activity measurement results it can be said that the protein is active. Additionally, results from researcher's own research confirmed that the protein was active.

During the process, measurements were not optimized due to lack of time. During the expression, the incubation times and the temperatures could be modified in order to increase the yield. The concentrations of the reagents used could be different. During the purification, the amount of chitin and protein incubation time could be increased. During the determination of the activity, the effect of the temperature could be examined further. In terms of future research, it would be interesting to study how long it takes for the Tn5 complex to cleave the whole pUC19 plasmid.

Key words: Tn5 transposase, expression, purification, activity measurements

SISÄLLYS

1	JOHDANTO	6
2	TEORIA.....	7
	2.1 Transposonit ja transposaasit.....	7
	2.2 Proteiinin tuotto.....	8
	2.2.1 Transformaatio.....	9
	2.2.2 Induktio	10
	2.3 Proteiinin puhdistus	10
	2.3.1 Sonikaatio	10
	2.3.2 Polyetyleeni-imiini (PEI) -saostus.....	11
	2.3.3 Affiniteettikromatografia	11
	2.3.4 Natriumlauryylisulfaatti-polyakryyliamidigeelielektroforeesi (SDS-PAGE)	13
	2.3.5 Dialyysi	13
	2.4 Aktiivisuuden määrittäminen.....	14
	2.4.1 Restriktioentsyymidigestio	14
	2.4.2 Agarosigeelielektroforeesi (AGE).....	15
3	TYÖN SUORITUS.....	16
	3.1 Tuotto	16
	3.2 Puhdistus.....	17
	3.3 Tn5 aktiivisuuden määrittäminen.....	20
4	TULOKSET	24
	4.1 Proteiinin puhdistus ja SDS-PAGE	24
	4.2 Tn5-transposaasin aktiivisuuden määrittäminen.....	26
	4.3 Tampereen Yliopiston tutkimus valmistetulla Tn5-transposaasilla.....	29
5	POHDINTA.....	30
	LÄHTEET	32
	LIITTEET	34
	Liite 1. Puhdistuksessa käytetyt puskurit.....	34
	Liite 2. Restriktioentsyymidigestioreaktio.....	35

LYHENTEET JA TERMIT

CBD	Kitiiniä sitova alue (eng. chitin binding domain)
Da	Dalton
DNA	Deoksiribonukleiinihappo
DTT	Ditiotreitoli
IPTG	Isopropyyli- β -D-1-tiogalaktopyranosidi
PAGE	Polyakryyliamidigeelielektroforeesi
PEI	Polyetylenei-imiini
RNA	Ribonukleiinihappo
SDS	Natriumlauryylisulfaatti
TCEP	tris(2-kloorietyyli)fosfaatti

1 JOHDANTO

Opinnäytetyön tavoitteena on valmistaa Tn5-transposaasia toimeksiantajalle tutkimuskäyttöön. Opinnäytetyö tehtiin Tampereen yliopiston alaisuudessa toimivassa biolääketieteen tutkimuskeskuksessa Protein Dynamics -ryhmässä. Tarkoituksena on tuottaa Tn5-transposaasia kolmessa eri solulinjassa, puhdistaa proteiinituotteet ja määrittää niiden aktiivisuus. Toimeksiantajalle Tn5-transposaasia tuotettiin tutkimuskäyttöön.

Transposaasit ovat entsyymejä, jotka voivat genomien sisällä mahdollistaa transposonien avulla DNA-sekvenssien siirtämisen. Transposonien uskotaan olevan vastuussa muun muassa soluissa tapahtuvista mutaatioista. Opinnäytetyössä tuotetaan Tn5-transposaasia, joka puhdistetaan käyttäen erilaisia biokemiallisia menetelmiä. Tuoton ja puhdistuksen jälkeen määritetään vielä proteiinin aktiivisuus.

Johdannon jälkeen esitellään transposaasien teoriaa, sekä proteiinin tuoton, puhdistuksen ja aktiivisuuden määrittämisen teoriaa. Tämän jälkeen työn suorituksen vaiheet käydään läpi. Seuraavaksi esitellään tulokset analysoiden geelit sekä proteiinkonsentraatiomittaukset. Lopuksi työn suoritusta ja lopputulosta arvioidaan pohdinnassa.

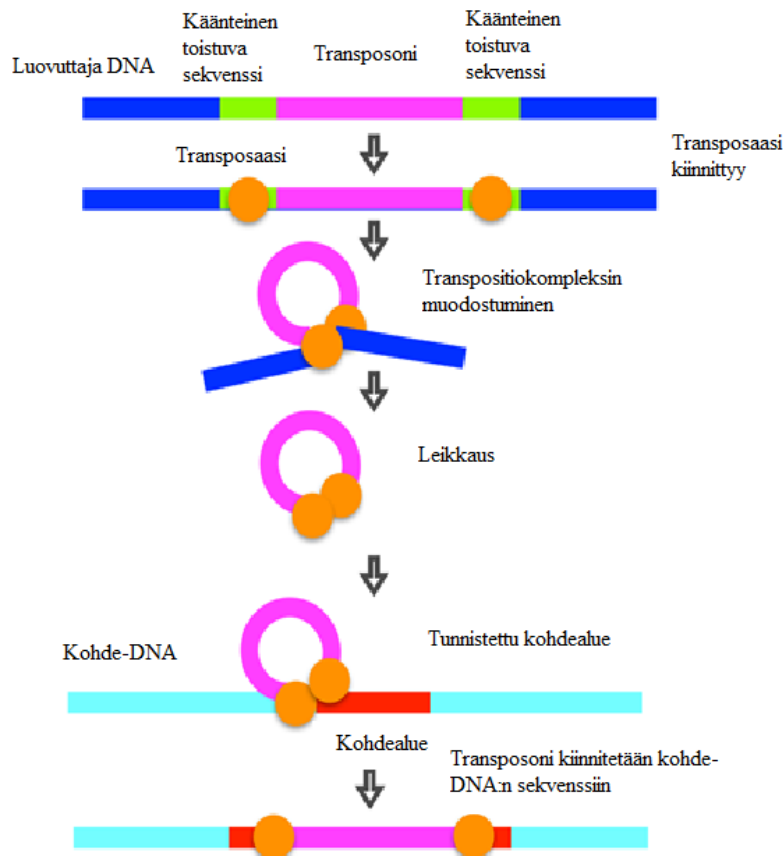
2 TEORIA

Tässä kappaleessa käsitellään transposaasien teoriaa lähdekirjallisuuden perustuen. Lisäksi käsitellään proteiinin tuottoon, puhdistukseen ja aktiivisuuden määrittämiseen käytettäviä menetelmiä.

2.1 Transposonit ja transposaasit

Genomin sisällä olevat transposonit ja niiden liikkuvuus ovat yksi suurimmista syistä geenien ilmentymisen vaihteluun. Transposonit pystyvät siirtämään itsensä eri paikkoihin genomin sisällä. Transposonit ovat sisäinen vastine vektoreille, jotka voivat liikkua genomista genomiin. Mutaatioiden uskotaan johtuvan suurilta osin transposonien siirroista. Transposonit voidaan jakaa kahteen eri luokkaan. Ensimmäiseen luokkaan kuuluu proteiineja koodaavia DNA-sekvenssejä, jotka voivat manipuloida DNA:ta suoraan genomin sisällä. Toiseen luokkaan kuuluu retroviruksiin ja retroposoneihin liittyviä transposoneita, joiden liikkuvuuden mahdollistaa kyky tehdä DNA-kopioita RNA-transkriptiosta. DNA-kopiot integroidaan uusiin alueisiin genomin sisällä. (Lewin 2004, 467-468)

Transposoni on elementti, joka siirretään ja transposaasi on entsyymi, joka katkaisee halutun DNA-sekvenssin ja siirtää sen halutulle paikalle kuvion 1 mukaisesti. Tn5-transposoni on jakso DNA:ta, joka sisältää useita geenejä, kuten eri resistenssigeenejä sekä geenin, jonka mukaan Tn5-transposaasi tuotetaan. (Goodsell 2006)



KUVIO 1. Transposaasin toimintaperiaate

Kuvio 1 esittelee transposaasin toimintaperiaatteen. Violettina oleva transposoni siirretään uuteen DNA-sekvenssiin käyttäen oranssin transposaasin apua. Transposaasi kiinnittyy transposonin molempiin päihin ja irrottaa sen entisestä DNA-sekvenssistä. Transposaasi tunnistaa uudesta DNA-sekvenssistä alueen, jonka se katkaisee. Lopulta transposoni liittyy katkaistun alueen väliin transposaasin avulla. (Hallet & Sherratt 1997)

2.2 Proteiinin tuotto

Tässä kappaleessa käsitellään proteiinin tuottamiseen liittyviä menetelmiä. Proteiinin tuottamiseen bakteerisoluissa vaaditaan monia erilaisia työvaiheita. *Escherichia coli* on vakiintunut bakteeri proteiinin tuotannossa. Bakteerin nopea kasvu ja kyky monistua ovat tehneet siitä hyödyllisen työkalun. Bakteeri monistuu nopeasti, mikä johtaa siihen, että tuottokasvatuksissa bakteerien määrä saadaan

suureksi lyhyessä ajassa. Suurella määrällä bakteereja saadaan tuotettua enemmän haluttua proteiinia. (Heino & Vuento 2010, 80-81; Rosano & Ceccarelli 2014)

Yhdistelmä-DNA-tekniikan avulla saadaan kloonattua samaan plasmidiin geenejä, joiden avulla proteiinin tuottaminen voidaan optimoida. Plasmidivektoriin voidaan lisätä esimerkiksi antibioottiresistenttiysgeenejä tai puhdistamiseen liittyviä geenejä. Periaatteessa geenien kloonaukseen kuuluu viisi eri vaihetta, jotka ovat geenin eristäminen, vektorin valitseminen, vieraan DNA:n liittäminen vektoriin, yhdistelmä-DNA:n transformaatio isäntäeliöön ja halutun kloonin valinta. (Sawhney & Singh 2005, 416-420)

2.2.1 Transformaatio

Yhdistelmä-DNA:n siirtämistä bakteeri-, hiiva-, home- tai kasvisoluihin kutsutaan transformaatioksi. Halutun proteiinin tuottamiseksi on bakteeriin siirrettävä yhdistelmä-DNA-vektori, joka sisältää halutut geenit. Bakteerien transformaatioissa lineaarinen DNA on heikko transformoimaan soluja. Tästä johtuen DNA saatetaan solun sisään yhdistelmä-DNA-molekyylissä eli vektoriplasmideissa. Vektoriplasmidi valmistetaan liittämällä DNA-molekyylit toisiinsa DNA-ligaasin avulla. (Suominen, Pärssinen, Haajanen & Pelkonen 2013, 140-141)

DNA-molekyylin siirtäminen *E. coli* -bakteeriin lämpöshokkimenetelmällä on yksi molekyylibiologian perustekniikoista. Lämpöshokki-menetelmän edellytyksenä on solujen kemiallinen kompetenttius. Lämpöshokin johdosta solun soluseinä muuttuu hetkellisesti dna-plasmidille läpäistäväksi. Menetelmän jälkeen solut elvytetään antamalla niille +37 °C lämpötilassa olevaa SOC-mediumia ja siirtämällä solut 30-60 minuutiksi sekoitusinkubaattoriin. Tästä alkaa antibioottiresistenttiysgeenien ilmentyminen. Tämän jälkeen solut voidaan viljellä sopivan antibiootin sisältäville maljoille ja kasvattaa yön yli inkubaattorissa. (Froger & Hall 2007)

2.2.2 Induktio

Escherichia coli -bakteerin geenisäätelystä vastaa lac-operoni, jonka geenituotteet pitävät yllä bakteerin laktoosimetaboliaa. *E. coli* -bakteerin lac-operoni koostuu kolmesta eri rakennegeenistä. LacZ koodaa β -galaktosidaasientsyymiä, joka pilkkoo laktoosin glukoosiksi ja galaktoosiksi. LacY koodaa laktoosipermeaasia, joka toimii laktoosin kuljetuksessa solun sisälle. LacA koodaa transasetylaasientsyymiä. Tämä entsyymi siirtää laktoosille asetyyliryhmän asetyylikoentsyymi-A:lta. Lac-promoottori ja -operaattori ovat rakennegeenien edessä. Ylävirtaan rakennegeneistä sijaitsee lacI-geeni, joka toimii repressorina eli säätelijänä. Tällä geenillä on oma promoottori ja sen geenin transkriptio tapahtuu itsenäisesti. LacI-geeni tuottaa jatkuvasti repressoriproteiinia, joka sitoutuu lac-operonin operaattorialueelle ja estää RNA-polymeraasin kiinnittymisen. Transkriptiota ei tapahdu, koska RNA-polymeraasi ei pysty toimimaan. Laboratorio-olosuhteissa voidaan käyttää indusorina IPTG:tä eli isopropyli- β -D-1-tiogalaktopyranosidia. IPTG sitoutuu repressoriproteiiniin estäen sen kiinnittymisen operaattorialueelle. Tällöin RNA-polymeraasi pystyy transkriptoimaan DNA:n ja näin ollen halutun proteiinin tuottaminen voi alkaa. (Suominen ym. 2013, 57-59)

2.3 Proteiinin puhdistus

Tässä kappaleessa käsitellään bakteerisoluissa tuotetun proteiinin puhdistusta. Proteiini täytyy puhdistaa, jotta sitä voidaan käyttää jatkossa erilaisiin tutkimuksiin. Esiteltäviä menetelmiä ovat sonikaatio, PEI-saostus, affiniteetikromatografia, SDS-PAGE ja dialyysi.

2.3.1 Sonikaatio

Liuksessa sonikaattorin pään värinä aiheuttaa suuria paine-eroja nesteen sisällä. Paine-eroista muodostuvien kuplien romahtaminen vapauttaa paljon energiaa. Käsiteltävällä alueella olevat solut hajoavat. Solut täytyy hajottaa, jotta niiden sisällä olevat proteiinit saadaan vapautettua liukseen puhdistusta varten. (Delta Labo N.d.)

2.3.2 Polyetyleeni-imiini (PEI) -saostus

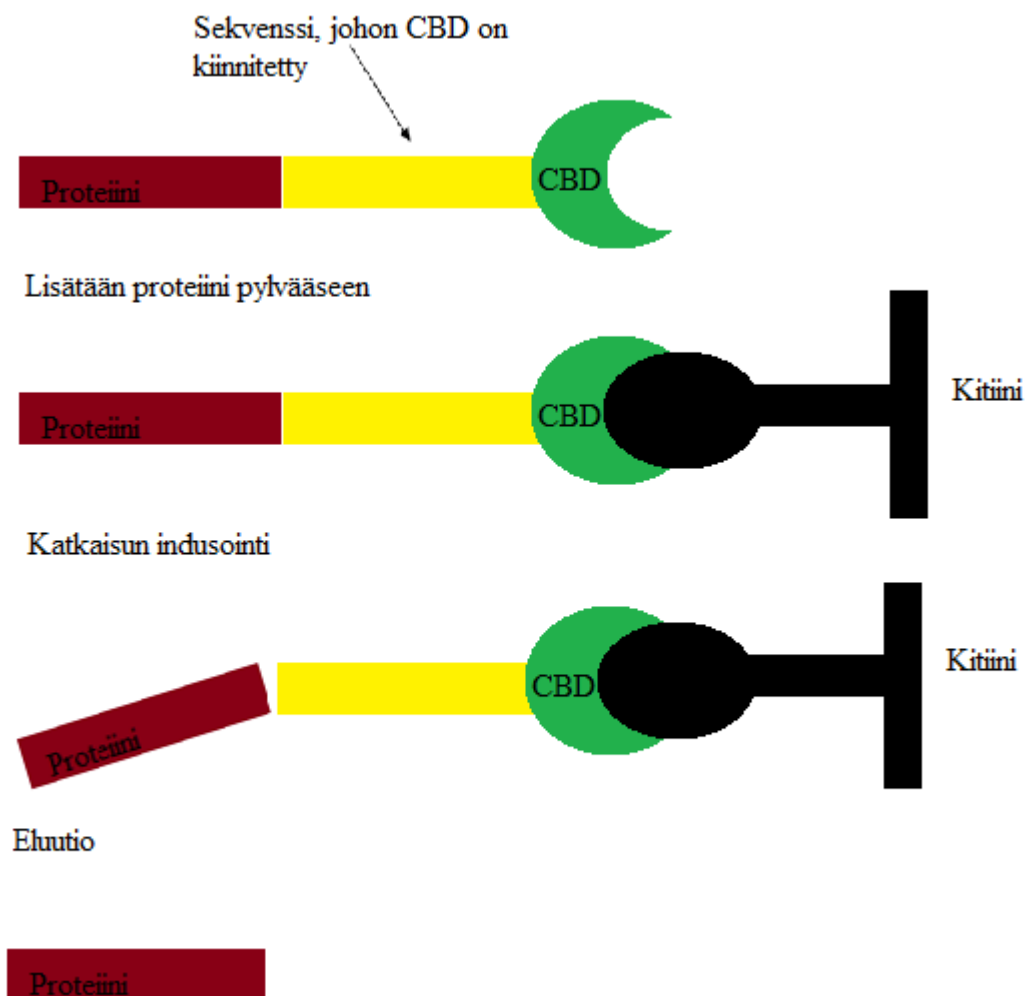
Polyetyleeni-imiini on etyleeni-imiinin polymerisoinnin tuote. Solujen hajotessa vapautuu liuokseen tuotetun proteiinin lisäksi DNA:ta ja RNA:ta. PEI-saostuksen avulla RNA ja DNA saadaan poistettua. Imino-ryhmän pK_a -arvo on 10-11 välillä, joten neutraalissa liuoksessa PEI on positiivisesti varautunut. PEI kiinnittyy negatiivisesti varautuneisiin makromolekyyleihin, kuten nukleiinihappoihin. Tällöin PEI-nukleiinihappo-kompleksit muodostavat verkkoja, jotka näkyvät liuoksessa sakkana. Saostettu aines voidaan erotella liuoksesta sentrifugoimalla. (Burgess 2009, 337-340)

2.3.3 Affiniteettikromatografia

Kromatografian avulla saadaan eroteltua haluttu proteiini kaikista solun proteiineista. Affiniteettikromatografia eroaa muista kromatografian menetelmistä siten, että tämä ei hyödynnä näytteiden fyysisiä ominaisuuksia, kuten liukoisuutta, adsorptiota, molekyyllipainoa tai ioniominaisuuksia. Tämä menetelmä käyttää hyväkseen biopolymeerien vuorovaikutusta toisten biomolekyylien kanssa. Usein proteiinit tuotetaan yhdistelmä-DNA:n avulla siten, että siinä on jokin osa, joka reagoi matriisin ligandien kanssa kiinnittyen niihin. Affiniteettikromatografia perustuu siis näytteen sitoutumiseen ligandiin eli sitoutettavaan aineeseen. Sitoutumattomat partikkelit näytteissä eivät kiinnity ligandiin, joka on spesifinen halutulle proteiinille. Nämä voidaan pestä pois samalla kun proteiini kiinnittyy ligandeihin. (Sawhney & Singh 2005, 207-210)

Kiinnittyneet proteiinit voidaan eluoida muuttamalla pH:ta tai ionikonsentraatiota. Ligandeja on monia erilaisia ja ne voivat olla spesifisiä yhdelle tai usealle tuotteelle. Kun valitaan ligandia, on otettava huomioon, että sen täytyy 1) sitouttaa haluttu proteiini ja 2) sen täytyy pystyä sitoutumaan kemiallisesti pohjamateriaaliin menettämättä aktiivisuuttaan. Hyvän matriisin, johon ligandi voi sitoutua kovalenttisesti täytyy pysyä muuttumattomana ligandin sitoutuessa. Sen täytyy säilyttää fysikaalinen ja kemiallinen tasapaino ligandin irrotessa. Lisäksi materiaa-

lissa pitäisi olla avoin huokosrakenne. Suosituimpia pohjamateriaaleja ovat agarroosi, polyakryyliamidigeeli, polystyreeni, selluloosa, silikageeli sekä huokoinen lasi. (Sawhney & Singh 2005, 207-210)



KUVIO 2. Kitiinipylvään toimintaperiaate

Proteiinin sekvenssiin on valmiiksi lisätty CBD-alue, joka sitoutuu kuvion 2 mukaisesti kitiinimatriisiin. Katkaisun indusoinnin aikana käytetään esimerkiksi diotretolia eli DTT:tä, joka on vahva pelkistäjä, jonka avulla proteiini saadaan erotettua muusta sekvenssistä. Tämän jälkeen erotettu proteiini saadaan kerättyä talteen fraktioina. (Chong, Mersha, Comb, Scott, Landry, Vence, Perler, Benner, Kucera, Hirvonen, Pelletier, Paulus, & Xu 1997)

2.3.4 Natriumlauryylisulfaatti-polyakryyliamidigeelielektroforeesi (SDS-PAGE)

Vuonna 1967 Shapiro, Viñuela ja Maizel esittivät SDS-elektroforeesin toimintaperiaatteen molekyylin kokoeroihin perustuen. SDS-PAGE:n avulla voidaan verrata tuotetun proteiinin kokoa markkereihin, joiden koko on tunnettu. Tämän avulla voidaan varmistua siitä, että tuotettu proteiini on oikea. Sekundäärisiä tai tertiäärisiä rakenteita ei ole, koska SDS estää vetysidosten muodostumista sekä molekyylin avautumista. Sulfidi-sidokset kysteiinitähteiden välillä voidaan katkaista käyttäen esimerkiksi 2-merkaptoetanolia, DTT:tä tai TCEP:iä. Polyakryyliamidigeelillä SDS:n vaikutuksen alaisena on suoraan verrannollinen suhde molekyylin kokoon sekä molekyylin siirtymän matkan välillä eli mitä pienempi proteiini on, sitä pidemmän matkan se etenee geelillä. Proteiinien molekyylin koko voidaan arvioida käyttämällä erilaisia markkereita. Markkerit ovat liuoksia, jotka sisältävät tunnettuja proteiineja, joiden koot tiedetään. Fluoresoiviin analyysiin löytyy fluoresoivia markkereita. (Westermeier 2016, 40-41)

SDS-PAGE-menetelmän käyttämiseen löytyy useita käytännöllisiä syitä. SDS liuottaa melkein kaikki proteiinit, jopa todella hydrofobiset sekä denaturoidut proteiinit. Menetelmän erotuskyky on nopea, koska SDS-proteiini-kompleksit ovat korkeasti varattuja. Kompleksit ovat kaikki negatiivisesti varattuja, joten ne kaikki siirtyvät kohti anodia. (Westermeier 2016, 42)

2.3.5 Dialyysi

Dialyysi on yksi bioteknologian perusmenetelmistä, jolla päästään eroon pienikokoisista molekyyleistä. Molekyylit voivat olla pelkistäviä, kuten DTT. Menetelmä perustuu puoliläpäisevän kalvon käyttöön. Kalvo koostuu pienistä huokosista, joiden läpi suolamolekyylit pääsevät, mutta proteiini ei. Dialyysipuskurissa on matala suolapitoisuus, joten kalvon sisällä oleva näyte korkeassa suolapitoisuudessa tasoittuu ajan kuluessa. Tasoittuminen jatkuu, kunnes saavutetaan tasapaino. (Berg, Tymoczko, & Stryer 2001, 80-82; Blaber 2019)

2.4 Aktiivisuuden määrittäminen

Transposaasit ovat solun genomin sisällä toimivia entsyymejä. Entsyymi katkaisee DNA-sekvenssistä paloja, joita se voi siirtää kohdesekvenssiin. Aktiivisuutta voidaan tutkia antamalla transposaasin katkoa DNA-sekvenssiä ja määrittää agarosegeelielektroforeesin avulla miten paljon DNA-sekvenssi lyhenee. Alukkeiden avulla voidaan luoda komplekseja, jotka ovat epäspesifisiä, eli ne voivat katkoa sekvenssiä eri kohdista. Restriktioentsyymidigestion avulla mahdollistetaan määrittäminen, koska transposaasit eivät pysty katkomaan syklistä sekvenssiä. (Picelli, Björklund, Reinius, Sagasser, Winberg, & Sandberg 2014)

2.4.1 Restriktioentsyymidigestio

Restriktioendonukleasit eli restriktioentsyymit kuuluvat kolmeen eri ryhmään. Ryhmät ovat I, II ja III. Näistä entsyymeistä II-ryhmän entsyymit katkaisevat DNA-juosteen spesifiseltä kohdalta. Nämä ovat tärkeitä analyysityökaluja molekyyli-biologiassa. Tunnistusjaksot ovat yleensä 4-6 aminohappoa pitkiä sekvenssejä. Yleisesti sekvenssin katkaiseminen johtaa 5'- ja 3'-suunnassa koheesiivisiin eli päihin, joihin jää ulkonemat aminohappojen välille. Restriktioentsyymit tunnistavat eri sekvenssejä. Restriktioentsyymien aktiivisuus kuvaillaan määränä, jota restriktioentsyymiä tarvitaan katkaisemaan 1 µg DNA:ta normaaliolosuhteiden vallitessa 1 tunnin aikana. Jokaiselle entsyymille on omat ideaalit olosuhteet, mutta yleisesti kaikki tarvitsevat MgCl₂, Tris-HCl-puskuria, NaCl sekä 37 °C lämpötilan inkubaattoriin. Kaupallisten restriktioentsyymipakkausten mukana tulee niille sopivat ohjeet sekä puskurit. Restriktioentsyymejä säilytetään yleensä -20 °C lämpötilassa 50% glyserolissa. (Sawhney & Singh 2005, 404-405; Johnson 2011, 136-137)

2.4.2 Agarosigeelielektroforeesi (AGE)

Agarosigeelielektroforeesin työskentelyalue on n. 0,1-50 kb. Agarosi on merilevästä eristettävä polysakkaridi. Nukleiinihappojen kulkeutuminen AGE-geelillä perustuu niiden negatiiviseen varaukseen. Negatiivisina nukleiinihapot vaeltavat kohti positiivista napaa. Geelin hyytelömäinen rakenne hidastaa nukleiinihappojen kulkeutumista. Mitä suurempi nukleiinihappo on, sitä hitaammin se kulkeutuu geelillä. DNA ja RNA eivät näy agarosigeelillä. Aiemmin nukleiinihapot on värjätty etidiumbromidilla, joka tunkeutui nukleiinihappojen emästen väliin. Tällöin tuloksia voitiin tutkia UV-valoa käyttämällä. Nykyään etidiumbromidia ei juurikaan käytetä, koska sen epäillään olevan karsinogeeninen. Esimerkiksi GelRed-väri värjää nukleiinihapot ja on turvallinen käyttää. (Suominen ym. 2013, 122-125)

Agarosi liuotetaan ajopuskuriin ja kiehautetaan. Agarosi valetaan tarjottimelle, jolloin lisätään siihen myös kampa, jonka avulla geelille syntyy kaivot. Kun agarosi jäähdytetään alle 45 °C lämpötilaan, se muodostaa hyytelömäisen geelin. AGE ajetaan ajopuskurissa, joka on yleensä Tris-asetatti-EDTA-puskuria. AGE:ssä käytettävä laite koostuu ajoaltaasta, altaan pohjalla olevista elektrodeista sekä turvakannesta. Näytepuskurissa käytetään Ficollia tai glyserolia. Nämä lisäävät näytteen tiheyttä, joka edesauttaa näytteen pysymistä kaivon pohjalla. (Suominen ym. 2013, 122-125)

3 TYÖN SUORITUS

Työtä varten tilattiin valmiina pTXB1-plasmidivektoria, joka sisältää Tn5-geenin. Tuottovaiheessa plasmidi saatettiin solujen sisään ja saatiin solut tuottamaan haluttua tn5-transposaasia. Puhdistuksen aikana eroteltiin proteiini epäpuhtauksista. Aktiivisuuden määrittäminen tapahtui AGE-analyysillä pohjautuen vahvasti kahden artikkeliin kyseisistä töistä. (Picelli ym. 2014; Chen, Shen, Draper, Buenrostro, Litzenburger, Cho, Satpathy, Carter, Ghosh, East-Seletsky, Doudna, Greenleaf, Liphardt, & Chang 2016)

3.1 Tuotto

Proteiinin tuotossa käytettiin kolmea eri *E. coli* -solulinjaa: AI, Star ja C43. Transformaatiossa Tn5-transposaasin sekvenssin sisältävä pTXB1-vektoriplasmidi saatettiin *E. coli* -solujen sisään lämpöshokkimenetelmällä. Transformaatiossa pipetoitiin soluille 1 ng plasmidia ja inkuboitiin 5 minuuttia jäällä. Seuraavaksi reaktiot siirrettiin 42 °C lämpötilassa olevaan vesihauteeseen, jossa niitä pidettiin 30 sekuntia. Tämän jälkeen solut siirrettiin välittömästi jäälle. Soluille lisättiin 300 µl SOC-mediumia, jotta ne selviäisivät lämpöshokista. Soluputket siirrettiin sekoitusinkubaattoriin (37 °C, 225 rpm), jossa niiden annettiin olla yhden tunnin ajan. Sillä aikaa siirrettiin LB-agar-maljat (Amp) inkubaattoriin (37 °C). Maljattiin transformaatiotuotetta maljoille 20 µl ja 200 µl per reaktio. Levitettiin viljelysauvalla solut tasaisesti maljan pinnalle. Lopuksi solut siirrettiin lämpökaappiin inkuboitumaan yön yli.

Seuraavana päivänä maljoilta tehtiin siemenkasvatukset. Valittiin maljoilta yksi pesäke, joka siirrettiin 15 ml kasvatusputkeen, jossa oli valmiina kasvatusmediumia (0,1 mg/ml ampicilliinia, 5 µM glukoosia ja 5 ml LB-mediumia). Tehtiin jokaisesta reaktiosta kolme rinnakkaista kasvatusta. Putket jätettiin yön yli sekoitusinkubaattoriin (37 °C, 225 rpm).

Aamulla kerättiin samentuneet siemenkasvatukset. Tarkoituksena tehdä 1 L kasvatukset, jotka voidaan indusoida proteiinin tuoton maksimoimiseksi IPTG:llä.

Tehtiin kasvatusmediumi (5 μ M glukoosia, 0,1 mg/ml ampicilliinia ja 1 l LB-mediumia). Kaadettiin siemenet kasvatusmediumiin ja siirretään sekoitusinkubaattoriin kasvamaan (37 °C, 225 rpm). Tarkkailtiin päivän aikana kasvatusten OD:ta (Optical Density) eli sameutta, joka voidaan mitata spektrofotometrillä 280 nm aallonpituudella. OD:n saavuttaessa 0.9 suoritettiin indusointi. Taulukossa 1 on esitetty tuottokasvatusten sameudet.

TAULUKKO 1. Solukasvatusten sameuksien mittaustulokset

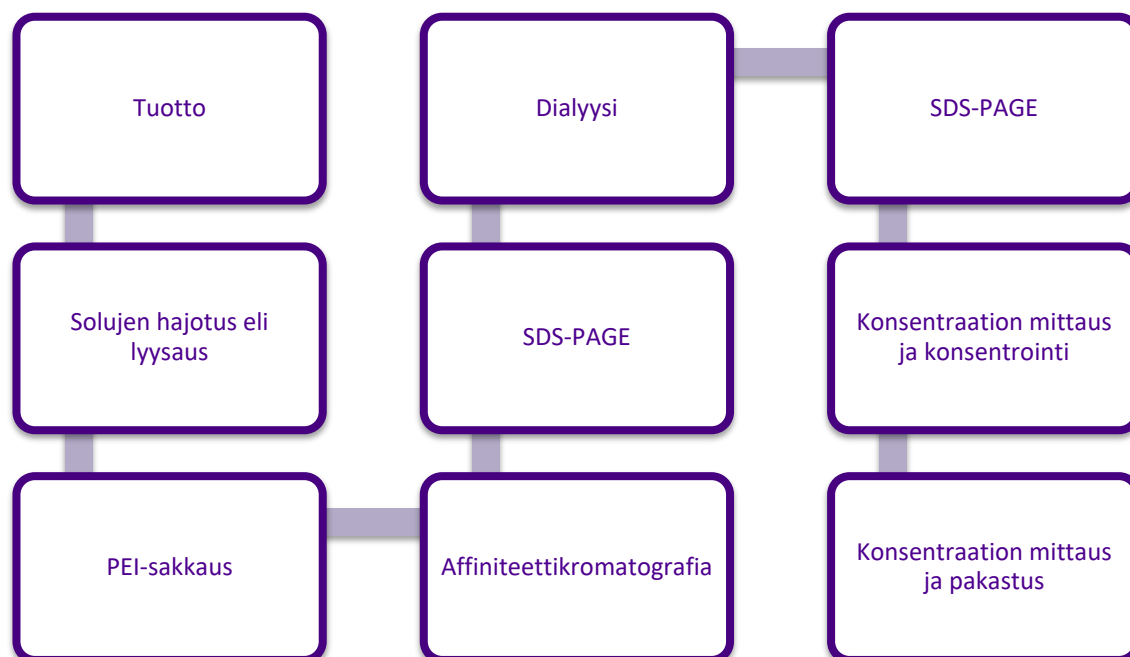
E. coli-solulinja	Aika	Optical Density (OD)
AI	14:00	0.88
Star	14:30	0.88
C43	13:30	0.92

Jäähdytettiin kasvatukset jäällä 10 °C lämpötilaan ja AI-kasvatukseen lisättiin arabinoosia, kunnes sen konsentraatio liuoksessa oli 0,1%. Arabinoosia lisättiin, koska T7 RNA polymeraasin toimimiseksi tarvitaan sokeria. T7 polymeraasi vastaa siis RNA:n muuttamisesta DNA:ksi. Lisättiin jokaiseen kasvatukseen 250 μ M IPTG:tä (Isopropyyli- β -D-tiogalaktopyranosidi). Solut jätettiin tuottamaan proteiinia yön ylitse sekoitusinkubaattoriin (+23 °C).

Solut kerättiin sentrifugoimalla (5000 x g, 10 minuuttia) Lynx 6000-sentrifugilla. Supernatantti kaadettiin pois ja pelletti siirrettiin pakastimeen (-20 °C) odottamaan puhdistusta.

3.2 Puhdistus

Proteiinin puhdistuksessa edettiin alla olevan kuvion 3 mukaisesti. Puhdistusprosessin aikana proteiini vapautettiin liuokseen, erotettiin epäpuhtauksista ja saatettiin se toimeksiantajalle sopivaan muotoon. Liitteessä 1 taulukossa 9 on esitelty puhdistuksessa käytetyt puskurit.



KUVIO 3. Puhdistusprosessin työvaiheet

Proteiinin puhdistus aloitettiin lyysaamalla eli hajottamalla solut. Solut resuspensoitiin 80 ml:aan HEGX-puskuria ja niihin lisättiin yksi complete proteaasi-inhbitoritabletti (Roche). Soluja sonikoitiin jäävesihauteessa metallikeitinlasissa. Valittiin seuraavat asetukset: 2s on/ 5s off viiden minuutin ajan 60% syklillä. Otettiin näyte lyysatuista soluista ja sentrifugoitiin, jotta saatiin supernatanattinäyte. Sentrifugointi tehtiin asetuksilla 15000 x g 10 minuutin ajan (+4 °C).

Kirkkaaseen supernatanttiin lisättiin neutralisoitua PEI-liuosta, kunnes lopulta PEI:n määrä supernatantissa oli 0,3%. Lisäys tapahtui tippa kerrallaan magneettisekoittajalla. Tästä otettiin SDS-PAGE-analyysiä varten näyte. Tuotetta sentrifugoitiin 10 minuuttia, jotta saatiin saostettu DNA pelletiksi pullon pohjalle.

Proteiinin puhdistukseen käytettiin kitiinipylväitä (NEB #S6651). Geeniin, jolla proteiinia tuotetaan, oli lisätty CBD-alue (eng. chitin binding domain) eli kitiiniä sitova alue. Kyseisen CBD-alueen avulla proteiini kiinnittyy kitiiniresiiniin. Eluutio tapahtuu aiemmin esitellyn kuvion 2 mukaisesti.

Jokaiselle solulinjalle valmisteltiin oma pylväs. Yhtä solulinjaa kohti käytettiin 4 ml kitiiniresiiniä. Resiini pestiin 5:llä pylvään tilavuudella vettä (20 ml). Sama toistettiin HEGX-puskurilla. Seuraavaksi ladattiin PEI-supernatantti pylvääseen ja ke-

rättiin läpi tullut tuote (FT). Lisättiin pylvääseen 10 ml HEGX-eluutiopuskuria reisiinille. Kerättiin 4,5 ml (pre-Elu) ja suljettiin pylväs korkilla. Pylväs suljettiin täysin ja siirrettiin jääkaappiin (+4 °C) 36-48 tunniksi. Inkuboimalla pitkään varmistettiin, että kaikki kitiiniresiiniin tarttunut Tn5 saadaan irtoamaan.

Inkubaation jälkeen kerättiin tuote 1 ml eluutiofraktioissa. Saatiin seitsemän fraktiota C43:sta ja Starista. A1:sta saatiin kuusi fraktiota. Fraktiot analysoitiin SDS-PAGE-analyysillä. Näytteet valmisteltiin lisäämällä niihin 10 µl 5x ajopuskuria. Näytteitä keitettiin 10 minuuttia. Ensimmäiseen SDS-PAGE-geeliin käytettiin Novexin valmisgeeliä (15%). Geeli laitettiin ajolaitteistoon, lisättiin 1x SDS-ajopuskuria ja näytteet pipetoitiin kaivoihin. Ajettiin 225 V jännitteellä, kunnes näyterintama saavutti geelin alareunan.

Toisessa SDS-PAGE-analyysissä käytettiin Bio-Radin 4-15% Criterion TGX Stain-Free-geelejä. Geeli purettiin pakkauksesta ja sen alareunasta poistettiin teippi. Geeli siirrettiin ajolaitteistoon ja siihen lisättiin 10x SDS-ajopuskuria, kunnes ajopuskurin konsentraatio näytteessä oli 1x. Näytteet pipetoitiin geeliin ja niitä ajettiin, kunnes näyterintama saavutti geelin alareunan.

Proteiinia sisältävät fraktiot yhdistettiin keskenään. Fraktiot siirrettiin dialyysikalvoihin pipetoimalla. Tuote jätettiin dialyysiin viikonlopun ajaksi 1x dialyysipuskuriin, joka valmistettiin 1 l mittalasiin 2x dialyysipuskurista. Dialyysilähtöaineista ja -lopputuotteista ajettiin itse tehty geeli. Dialyysin jälkeen mitattiin näytteiden proteiinikonsentraatiot NanoDropilla 280 nm aallonpituudella.

Päädyttiin konsentroimaan näytteet VivaSpin-kolonneja käyttäen. Konsentroiduissa käytettiin 30 kDa:n filteriä, joka päästää läpi kaikki alle 30 kDa:n molekyylit. Filteriin ladattiin 0,5 ml tuotetta ja sentrifugointiputkessa ollutta filteriä sentrifugoitiin 15000 G x 10 minuuttia, jonka jälkeen sama toistettiin, kunnes kaikki tuote oli saatu filteristä läpi. Konsentroitujen tuotteiden proteiinikonsentraatiot mitattiin uudelleen NanoDropilla. Näihin tuotteisiin lisättiin pakastuspuskuria, jaettiin 500 µl eriin ja säilytettiin pakastettuna.

3.3 Tn5 aktiivisuuden määrittäminen

Työn aktiivisuuden määrittäminen tehtiin qPCR-based characterization of DNA fragmentation efficiency of Tn5 transposomes (Picelli ym. 2014) ja ATAC-seq reveals the accessible genome by transposase-mediated imaging and sequencing (Chen ym. 2016) artikkeleihin perustuen. Artikkelien työohjeita sovellettiin ja niistä tehtiin sopivat tätä opinnäytetyötä varten.

Työhön käytetty pUC19-plasmidi transformoitiin *E. coli*-TOP10-soluihin, pesäkkeet kasvatettiin siemenviljelyssä. Plasmidi-DNA eristettiin bakteereista GeneJET Plasmidi miniprep-kitin valmistajan ohjeiden mukaan seuraavasti. Solut resuspensoitiin käyttämällä 250 µl resuspensiopuskuria. Siirrettiin solususpensio 1,5 ml Eppendorf-putkiin. Lisättiin putkiin 250 µl lyysauspuskuria ja käännettiin putkea 4-6 kertaa, kunnes liuos muuttui kirkaaksi. Tämän jälkeen lisättiin 350 µl neutralisointipuskuria ja sekoitettiin samalla tavalla. Putkia sentrifugoitiin 12000 G x 5 minuuttia pöytäsentrifugissa. Siirrettiin putkien sisällöt pelletit pois lukien uusiin GeneJET Spin-pylväisiin. Pylväitä sentrifugoitiin 12000 G x 1 minuuttia. Kaadettiin pois läpi mennyt liuos. Pestiin pylväs 500 µl pesuliuksella. Sentrifugoitiin 12000 G x 1 minuuttia. Toistettiin pesuvaihe. Sentrifugoitiin vielä kerran, jotta saatiin pylväs kuivaksi etanolista. Kaadettiin pois läpi mennyt liuos ja siirrettiin pylväät uusiin puhtaisiin 1,5 ml Eppendorf-putkiin. Lisättiin 50 µl eluutiopuskuria pylväaseen ja eluutiitiin tällä pUC19-plasmidi. Otettiin plasmidit talteen ja mitataan niiden konsentraatio NanoDropilla.

Tilattiin kaupallisena Tn5MErev-, Tn5ME-A- ja Tn5ME-B-alukkeet, joista tehtiin aluksi Tn5MErev+Tn5ME-A/Tn5ME-B-yhdistelmät. Tehtiin reaktiot, joihin tuli 50 µM A- tai B-aluketta sekä 50 µM rev-aluketta. Reaktiot siirrettiin PCR-laitteelle, jossa alukkeet denaturoitiin 95 °C lämpötilassa viiden minuutin ajan. Tämän jälkeen putkien annettiin jäähtyä laitteessa. Alukereaktiot (A+rev ja B+rev) yhdistettiin samaan putkeen. Seuraavaksi koottiin itse reaktio, jossa liitettiin alukkeet Tn5-transposaasiin. Käytettiin Tn5-transposaasia kolmesta eri solulinjasta, jotta voitaisiin nähdä mahdolliset eriävyydet. Taulukossa 2 on esitelty pipetointikaavio Tn5-kompleksi-reaktioille.

TAULUKKO 2. Tn5-kompleksien valmistusreaktiot

	AI	Star	C43
(A+B)+rev	25 µl	25 µl	25 µl
Tn5 (AI)	20 µl	-	-
Tn5 (Star)	-	22 µl	-
Tn5 (C43)	-	-	29 µl
100 % Glyseroli	40 µl	40 µl	40 µl
1x Dialyysipuskuri	12 µl	12 µl	6 µl
H ₂ O	3 µl	1 µl	-
Yht.	100 µl	100 µl	100 µl

Reaktioita inkuboitin huoneenlämmössä tunnin ajan. Tämän aikana alukkeet liittyivät Tn5-transposaasiin. Tunnin kuluttua reaktiot siirrettiin jääkaappiin. Seuraavaksi suoritettiin Tn5-transposaasin aktiivisuuden määrittäminen. Ensimmäinen reaktio tehtiin käyttämällä Tn5-transposaasikompleksia (AI) taulukon 3 mukaisesti.

TAULUKKO 3. Aktiivisuuden määrittämisen reaktiosarja 1

	1	2	3	4	5
Tn5-kompleksi (AI)	0 µl	0.6 µl	1.3 µl	2.5 µl	5.0 µl
pUC19-laimennos 1/10	1.3 µl	1.3 µl	1.3 µl	1.3 µl	1.3 µl
1x Dialyysipuskuri	23,7 µl	23,1 µl	22,5 µl	21,2 µl	18,7 µl
Yhteensä	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl

Reaktiot siirrettiin PCR-laitteelle, jossa niitä pidettiin 10 minuuttia 58 °C lämpötilassa. Tämän jälkeen reaktio lopetettiin lisäämällä SDS-liuosta siten, että sitä oli reaktiossa 0,08%. Inkuboitin 7 minuuttia 55 °C lämpötilassa. Näytteisiin lisättiin 5 µl 6X Loading Dye-puskuria, jolloin latauspuskuria oli lopputilavuudessa 1x. 1,1% AGE-geelille ladattiin 10 µl 1kb DNA Ladder (ThermoFisher) ja näytteitä ladattiin 30 µl. Geeliä ajettiin 2,5 h 120 V virralla. Geelillä ei kuvantamisen jälkeen näkynyt bändejä.

Päädyttiin tekemään restriktioentsyymidigestio liitteen 2 taulukon 10 mukaisesti EcoRI-entsyymillä, sillä syklinen plasmidi ei toiminut toivotulla tavalla. Kyseinen entsyymi katkaisee pUC19-plasmidin ja tekee siitä lineaarisen. Digestoitin 2 µg pUC19-DNA:ta EcoRI:llä 10 minuuttia 37 °C lämpötilassa liitteen 3 taulukon 12 mukaan. Restriktioentsyymin toiminta lopetettiin pitämällä reaktioita 80 °C lämpötilassa toiset 10 minuuttia. Reaktioiden onnistuminen varmistettiin agarosigeelielektroforeesin avulla. Geelille lisättiin reaktiotuotteiden lisäksi myös lineaarisoimatonta plasmidia kontrollinäytteeksi. Restriktioentsyymidigestion onnistumisen varmistuttua voitiin tehdä toinen yritys Tn5-kompleksin kanssa. Tehtiin reaktiot jokaisella kolmella Tn5-kompleksilla taulukon 4 mukaisesti.

TAULUKKO 4. Aktiivisuuden määrittämisen reaktiosarja 2

Tn5-kompleksi (C43, Al, Star)	0	0.62 µl	1.25 µl	2.5 µl	5.0 µl
pUC19	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
1x Dialyysi- puskuri	23 µl	22,4 µl	21,8 µl	20,5 µl	18,0 µl
Yhteensä	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl

Reaktioita pidettiin PCR-instrumentissa 10 minuuttia 58 °C lämpötilassa. Reaktiot pysäytettiin lisäämällä SDS-liuosta samalla tavalla kuin reaktiosarjassa 1. Putkien annettiin olla vielä 7 minuuttia koneessa 55 °C lämpötilassa, jonka jälkeen ne nostettiin sivuun. Valmistettiin 1,1 % agarosigeeli. Pipetoitiin 10 µl GeneRuler™ 1kb DNA-markkeria ja näytteitä 25 µl. Geeliä ajettiin 106 minuuttia ja kuvattiin ChemiDoc™ XRS+ instrumentilla. Tuloksissa näkyi, että Tn5-kompleksi hajottaa pUC19-plasmidia ja että kokomarkkeri oli epäonnistunut. Tämän vuoksi päädyttiin tekemään uudet reaktiot, joiden avulla tutkittiin, saadaanko kokomarkkeri näkymään paremmin. Uudessa reaktiossa käytettiin vain Star-solulinjasta peräisin olevaa Tn5-kompleksia, sillä tämä oli kaikkein lupaavin plasmidin pilkkosarjassa 2. Tehtiin reaktiosarjaan taulukon 5 mukaisesti myös kaksi negatiivista kontrollinäytettä, joiden avulla voitiin määrittää lämpötilaohjelman vaikutusta paljaaseen plasmidiin. Näin ollen toinen negatiivinen kontrollinäyte kävi läpi aktiivisuuden määrittämisen reaktion.

TAULUKKO 5. Aktiivisuuden määrittämisen reaktiosarja 3

Tn5-kompleksi (Star)	0	0 µl	0,62 µl	1,25 µl	2,5 µl	5,0 µl	10,0 µl
pUC19	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
1x Dialyysipuskuri	23 µl	23 µl	22,4 µl	21,8 µl	20,5 µl	18,0 µl	15,0 µl
Yhteensä	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl

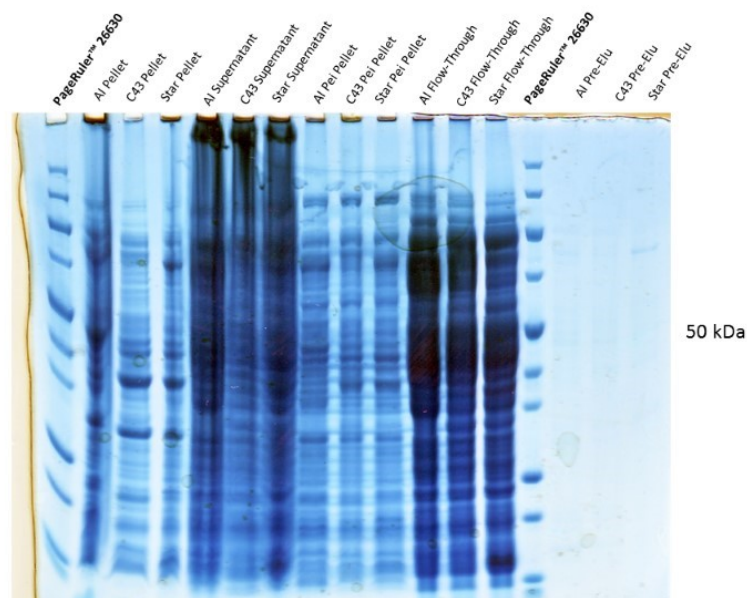
Reaktioiden kanssa meneteltiin samalla tavalla kuin aikaisempienkin kanssa. Valmistettiin 1,1% agarosigeeli ja ladattiin geelille markkeria 4 µl, 6 µl, 8 µl ja 12 µl. Näytteitä ladattiin koko niiden tilavuus eli 25 µl. Geeliä ajettiin 120 V virralla 2,5 tunnin ajan. Ajon jälkeen geeli kuvattiin ChemiDoctm XRS+ instrumentilla.

4 TULOKSET

Opinnäytetyöprosessin aikana oli erilaisia virstanpylväitä, joiden avulla voitiin varmistaa, että projekti sujuu halutulla tavalla. Tuloksien tarkastelu on jaettu kahteen eri osaan. Ensimmäisessä osassa tarkastellaan proteiinin puhdistukseen liittyviä tuloksia, kuten SDS-PAGE-geejejä ja proteiinkonsentraatioita. Toisessa osassa keskitytään tarkastelemaan aktiivisuuden määrittämiseen liittyviä tuloksia.

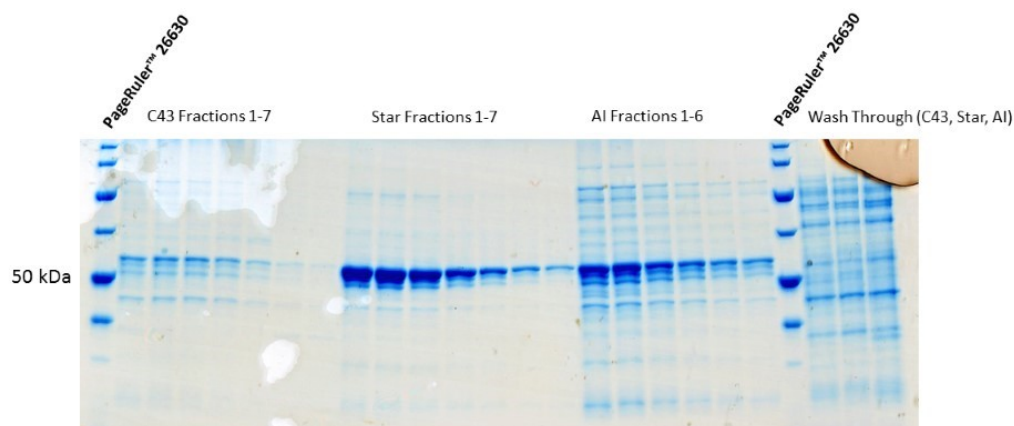
4.1 Proteiinin puhdistus ja SDS-PAGE

Ensimmäisenä ajettiin geeli puhdistuksen ja tuoton eri vaiheista otetuista näytteistä. SDS-PAGE-geeliltä kuvassa 1 nähdään, että tummat bändit 50 kDa:n kohdalla esimerkiksi supernatanttinäytteiden (Supernatant) alueella kertovat siitä, että tuotettua Tn5-transposaasia on tuotunut runsaasti. Pre-elut eli 4,5 ml:n fraktiot, jotka kerättiin ennen kuin proteiinituote jätettiin inkuboitumaan kitiinipylväeseen. Tämän aikana tuotetta ei ollut tullut ulos, mikä kertoo, että käytetty matriisi sitoi kohdeproteiinia tehokkaasti.



KUVA 1. Novexin valmisgeeli, jossa näkyvissä näytteet ennen kitiinipuhdistusta. Vasemmalta oikealla pelletti-, supernatantti-, PEI-pelletti-, Flow-Through- ja Pre-Elu-näytteet.

Toiseen SDS-PAGE-geeliin ajettiin eluutiofraktiot sekä eluution jälkeisen pesun fraktiot. Kuten kuvasta 2 nähdään, Tn5-transposaasi saatiin talteen hyvin eluutiofraktioiden aikana. Pesufraktioiden aikana pylväs huuhdeltiin 300 mM NaOH-liuoksella, jotta nähtiin, oliko pylväaseen jäänyt kohdeproteiinia. Pesufraktiot olivat puhtaita, sillä geelillä ei ollut juurikaan muun kokoisia proteiineja. Näin ollen voidaan sanoa, että 6-7 eluutiofraktiota solulinjaa kohti riittää saamaan halutun määrän proteiinia talteen.



KUVA 2. SDS-PAGE-geeli fraktioista sisältäen pesut

Dialyysin jälkeen mitattiin proteiinikonsentraatiot, jotta nähtiin, täytyykö tuotteita konsentroida. Kuten taulukosta 6 nähdään, tuotteiden konsentraatiot olivat huomattavasti alle halutun $\sim 3,0$ mg/ml. Siirryttiin konsentroimaan proteiinit VivaSpin-kolonneilla.

TAULUKKO 6. Proteiinikonsentraatiot dialyysin jälkeen

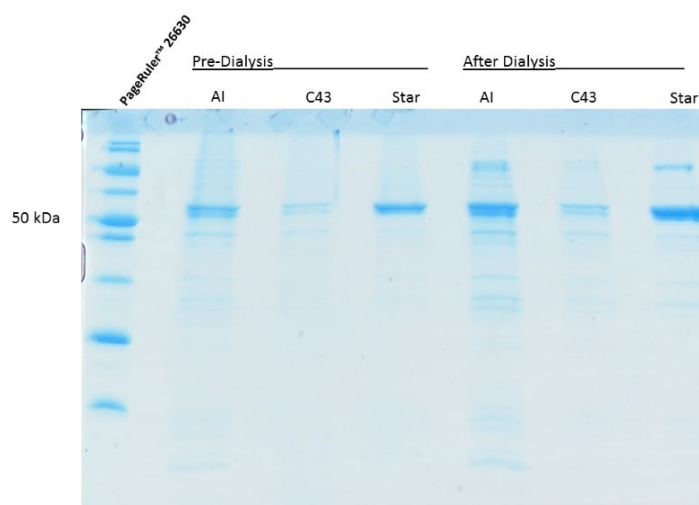
	c (mg/ml)	A280	A268/A260
AI	1,763	2,86	0,40
Star	1,464	2,38	0,39
C43	1,249	2,03	0,39

Proteiinikonsentraatiot VivaSpin-konsentroidinnin jälkeen nähdään taulukossa 7. Tulosten perusteella voidaan sanoa, että konsentroidinta onnistui hyvin ja tavoiteltuun proteiinikonsentraatioon $\sim 3,0$ mg/ml päästiin. Näin ollen tuotteet voitiin laittaa pakastuspuskuriin ja jakaa alieriin.

TAULUKKO 7. Proteiinikonsentraatiot konsentroinnin jälkeen

	c (mg/ml)	V (ml)	A280	A280/A260
AI	3,257	1,9	5,29	0,39
Star	2,910	2,5	6,72	0,38
C43	2,238	2,6	3,63	0,38

Alla olevassa kuvassa 3 voidaan nähdä dialyysin jälkeinen SDS-PAGE-geeli. Dialyysin avulla puskurin suolapitoisuus saatiin pienemmäksi.



KUVA 3. SDS-PAGE-geeli dialyysin jälkeen

Kuvasta 3 huomataan, että bändit ovat hiukan tummempia dialyysin jälkeen. Tämä tarkoittaa, että dialyysin aikana oli tapahtunut myös konsentroitumista.

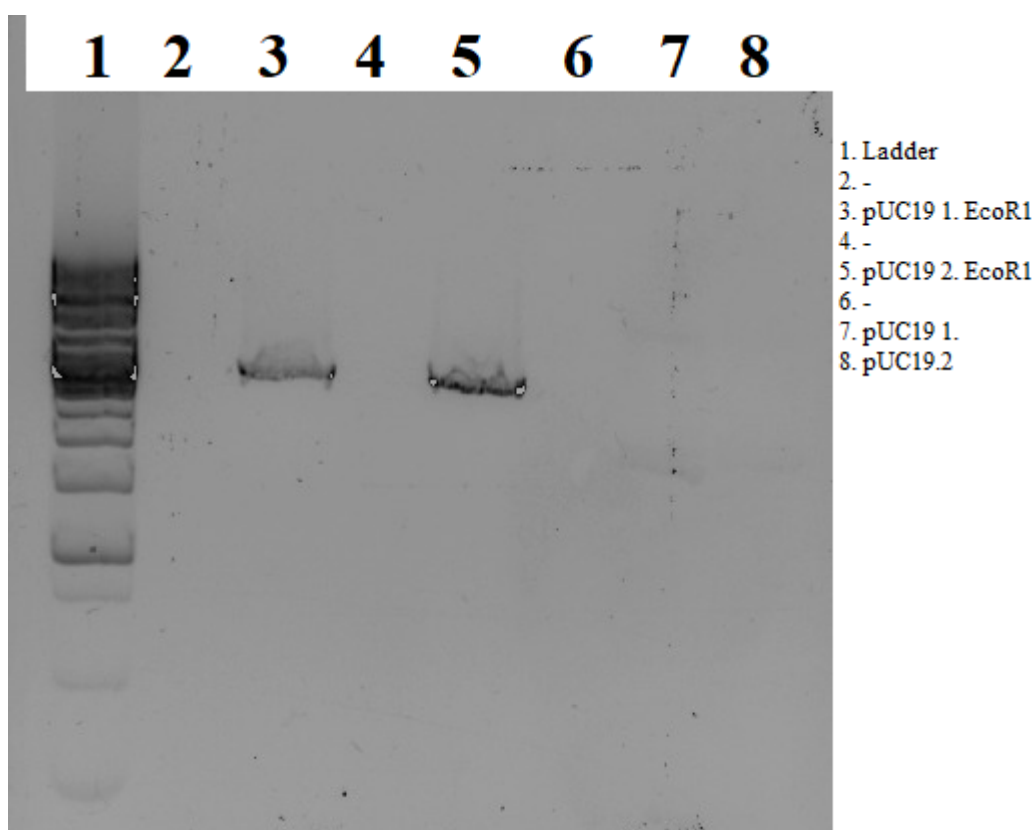
4.2 Tn5-transposaasin aktiivisuuden määrittäminen

Seuraavaksi tarkastellaan aktiivisuuden määrittämiseen liittyviä tuloksia, kuten plasmidikonsentraatioita sekä AGE-geelikuvia. Lisäksi tuotettiin MiniPrep-menetelmällä lisää pUC19-plasmidia ja mitattiin niiden konsentraatiot NanoDropilla. Konsentraatiomittausten tulokset on esitelty taulukossa 8.

TAULUKKO 8. pUC19-plasmidien konsentraatiot MiniPrepin jälkeen

	c (ng/μl)
pUC19-plasmidi 1	196,0
pUC19-plasmidi 2	178,0
pUC19-plasmidi 3	172,0

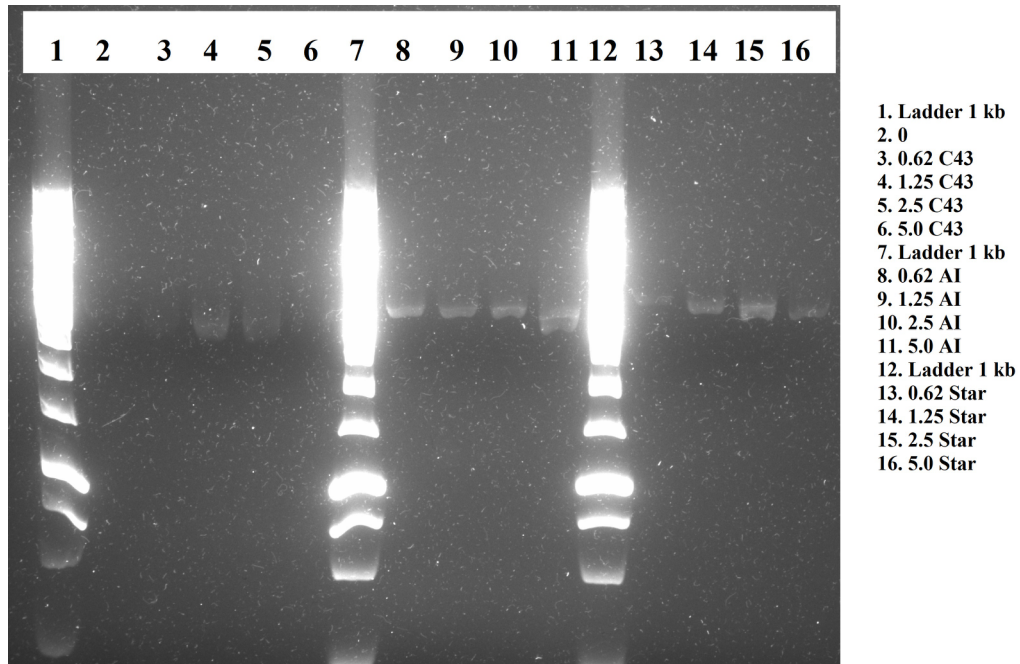
Restriktioentsyymidigestion avulla tehtiin pUC19-plasmidi lineaarisiksi. Kuvassa 4 kaivoissa #3 ja #5 on digestion läpikäyneet plasmidit lineaarisina. Tarkasti kuvaa katsottaessa kaivoista #7 ja #8 voidaan huomata kaksi päällekkäistä bändiä, mikä tarkoittaa, että plasmidi on superkierteellä, jolloin se kulkeutuu pidemmälle geelissä. Näitä kaivoja vertaamalla voidaan todeta, että #3 ja #5 ovat linearisoituneet. Linearisoituneen plasmidin kanssa jatkettiin seuraavaan aktiivisuusmittaukseen.



KUVA 4. Restriktioentsyymidigestion tulokset

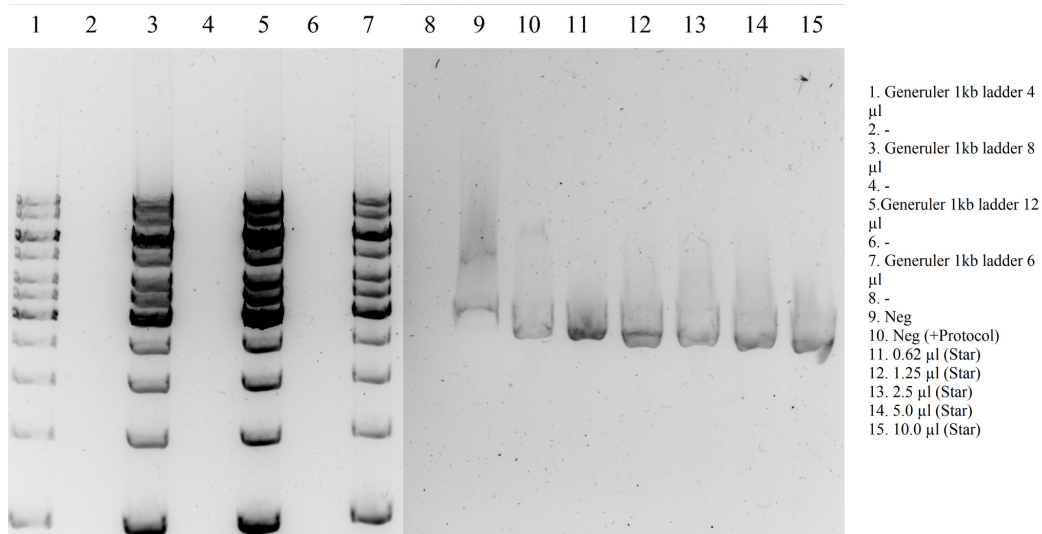
Toisen sarjan markkerit kuvassa 5 ovat todella epäselvät, jolloin tuloksia on vaikea lukea. Kuvasta kuitenkin nähdään, että jokaisen Tn5-transposaasin kanssa plasmidi on hajonnut suoraan verrannollisesti Tn5-kompleksin konsentraatioon

nähden. Eli voidaan sanoa, että kun Tn5-konsentraatio kasvaa, niin sen kyky pilkkoa plasmidia kasvaa samassa suhteessa.



KUVA 5. Toisen aktiivisuusmittauksen tulokset, joissa käytettiin kasvavia määriä Tn5-komplekseja

Kolmannessa sarjassa kuvassa 6 muutettiin markkerien määrää. Sarjassa keskityttiin saamaan tulokset selkeästi näkyviin markkerien avulla. Käytettiin vain yhtä solulinjaa ja kasvatettiin tn5-kompleksi konsentraatiota korkeammaksi kuin edellisessä sarjassa. Geeliltä näkyy plasmidin liikkuvan sitä pidemmälle, mitä enemmän Tn5-kompleksia reaktiossa on.

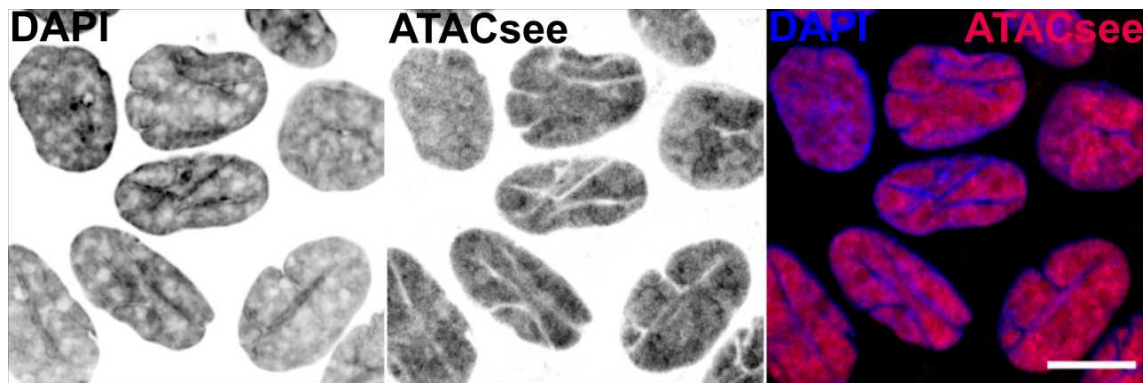


KUVA 6. Kolmannen aktiivisuuden määrittämissarjan tulos

Kuvan 6 avulla voidaan todeta, että konsentraatiota kasvattamalla plasmidi pilkkoutuu enemmän. Kaivoissa #9 ja #10 on negatiivisia kontrolleja, joiden avulla nähdään, että selkeästi lämpötilakäsittely vaikuttaa plasmidiin itsestään ilman kompleksia. Kun tarkastellaan tulosta lähemmin, nähdään kuitenkin, että plasmidin pituuksilla on selkeä trendi, joka noudattaa konsentraation kasvamista.

4.3 Tampereen yliopiston tutkimus valmistetulla Tn5-transposaasilla

Toimeksiantaja käytti Tn5-transposaasia omassa solututkimuksessaan. Tutkimuksessa tutkittiin Tn5-transposaasin kykyä tehdä solun genomissa oleva kromatiini käytettäväksi. Tutkimustuloksissa kuvassa 7 nähdään DAPI-värjätyt solut. DAPI on fluoresoiva väriaine, joka sitoutuu adeniini-tyymiini-rikkaisiin alueisiin. Tämä vahvistaa, että tuotettu Tn5-transposaasi on aktiivista.



KUVA 7. Toimeksiantajan tutkimustulokset Tn5-transposaasilla

5 POHDINTA

Tuotettu valmis Tn5-transposaasi toimi toimeksiantajan tutkimuksissa hyvin. Näin ollen opinnäytetyön tavoitteeseen päästiin. Tn5-transposaasi tuotettiin kolmessa eri solulinjassa ongelmitta. Tuottovaiheessa työssä ei tullut vastoinkäymisiä ja puhdistus sujui suunnitelmien mukaisesti. Ensimmäiset ongelmat tulivat vastaan aktiivisuuden määrittämisen aikana. Tn5-kompleksien luominen ja pUC19-plasmidi tuottivat haasteita. Kompleksin valmistamista varten tehtiin paljon pipetointeja pienillä reagenssimäärillä, jolloin pipetointivirheet aiheuttivat ongelmia. Plasmidit linearisoitiin restriktioentsyymidigestion avulla.

Aktiivisuuden määrittämisreaktioita optimoitiin, jotta päästiin selkeästi näkemään, että Tn5-kompleksi pilkkoi plasmidia. Muokattiin pUC19-plasmidin määrää sekä Tn5-kompleksin konsentraatioita. Aktiivisuuden määrittämisen aikana tehtiin monia AGE-ajoja, joissa suurimpana ongelmana esiin nousi markkereiden saaminen näkyviksi. Markkerien konsentraatioita muutettiin ja kuten kuvasta 6 nähtiin, 6 µl markkeria takaa parhaimman tuloksen. AGE-ajot olivat 2,5 tuntia pitkiä, joten niitä voitiin ajaa vain kerran tai kaksi päivässä. Aikaa oli rajallisesti, jonka vuoksi onnistuminen pipetoinneissa oli tärkeää.

Koko opinnäytetyöprosessia olisi mahdollista optimoida, vaikka tuotettua proteiinia tulikin runsaasti. Optimointi olisi hyödyllistä, sillä reagenssit ovat kalliita ja olisi kustannustehokasta saada prosessista ulos mahdollisimman paljon haluttua tuotetta. Proteiinisaantoja voitaisiin tutkia esimerkiksi muuttamalla lämpötiloja, joissa proteiinia tuotetaan. Indusoivan reagenssin IPTG:n konsentraatiota muuttamalla, voisi solun saada tuottamaan proteiinia vielä enemmän. IPTG:n konsentraation kanssa on silti oltava tarkkana, sillä liian suuri määrä IPTG:tä kiihdyttää solujen kuolemaa, joka laskee proteiinisaantoa.

Kolmannessa aktiivisuusmäärittämisen sarjassa negatiivisilla kontroleilla oli eroja keskenään. Aiemmin esitellyssä kuvassa 6 nähdään selkeästi, millaista vaikutusta lämpötilaohjelmalla on pelkkään lineaariseen pUC19-plasmidiin ilman Tn5-kompleksia. Lämpötilaohjelma kestää vain hieman alle 15 minuuttia, joten plasmidit voisi jättää lämpötiloihin pidemmiksi ajoiksi, jotta nähtäisiin kuinka

paljon lämpötila vaikuttaa. Olisi mielenkiintoista nähdä, että jos Tn5-kompleksille antaa rajattomasti aikaa, hajottaako se koko plasmidin. Pidemmällä ohjelmalla pystyttäisiin määrittämään Tn5-kompleksin hajottamiskyvylle numeeriset arvot. Jatkotutkimuksen kannalta olisikin mielenkiintoista tutkia, kuinka kauan Tn5-kompleksilla kestää pilkkoa koko pUC19-plasmidi.

LÄHTEET

Berg, J., Tymoczko, J. & Stryer L. 2001. Biochemistry. 5. painos. New York: W. H. Freeman.

Blaber, M. 2019 Protein Purification. Luettu 25.4.2019 [https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Biochemistry/Supplemental_Modules_\(Biochemistry\)/4._Biotechnology_2/4.1%3A_Protein_Purification](https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Biochemistry/Supplemental_Modules_(Biochemistry)/4._Biotechnology_2/4.1%3A_Protein_Purification)

Burgess, R.B. 2009 Protein Guide to Protein Purification. 2. painos. Wisconsin: McArdle Laboratory for Cancer Research, University of Wisconsin–Madison, Madison.

Chen, X., Shen, Y., Draper, W., Buenrostro, J., Litzenburger, U., Cho, S., Satpathy, A., Carter, A., Ghosh, R., East-Seletsky, A., Doudna, J., Greenleaf, W., Liphardt, J. & Chang, W. 2016. ATAC-se reveals the accessible genome by transposase-mediated imaging and sequencing. *Nature Methods*, 13(12), pp. 1013-1020.

Chong, S., Mersha, F.B., Comb, D.G., Scott, M.E., Landry, D., Vence, L.M., Perler, F.B., Benner, J., Kucera, R.B., Hirvonen, C.A., Pelletier, J.J., Paulus, H. & Xu, M.-Q. 1997. Single-column purification of free recombinant proteins using a self-cleavable affinity tag derived from a protein splicing element. *Gene*, 192(2), pp. 271-281.

Delta Labo N.d.. How Does a Sonicator Work? Luettu 20.4.2019 <http://www.deltalabo.fr/fr/catalogue/QA40.pdf>

Froger, A. & Hall, J.E. 2007. Transformation of plasmid DNA into *E. coli* using the heat shock method. *Journal of visualized experiments: JoVE*, 6, p. 253.

Hallet, B. & Sherratt, D.J. 1997. Transposition and site-specific recombination: Adapting DNA cut-and-paste mechanisms to a variety of genetic rearrangements. *FEMS Microbiology Reviews*, 21(2), pp. 157-178.

Heino, J. & Vuento, M. 2010. Biokemian ja solubiologian perusteet. 2. uudistettu painos. Helsinki: WSOYpro.

Goodsell, D. 2006. Molecule of the Month: Transposase. Luettu 16.4.2019 <https://pdb101.rcsb.org/motm/84>

Johnson, A.T. 2011. Biology for Engineers. India: Replika Press Pvt. Ltd.

Lewin, B. 2004. Genes VIII. 8. painos. New Jersey: Pearson Prentice Hall.

Picelli, S., Björklund, Å., Reinius, B., Sagasser, S., Winberg, G. & Sandberg, R. 2014. Tn5 transposase and tagmentation procedures for massively scaled sequencing projects. Genome research, 24(12), p. 2033.

Rosano, G. & Ceccarelli, E. 2014. Recombinant protein expression in Escherichia coli: Advances and challenges. Frontiers In Microbiology, 5.

Sawhney, S. & Singh, R. 2005. Introductory Practical Biochemistry. Harrow: Alpha Science International.

Suominen, I., Pärssinen, R., Haajanen, K. & Pelkonen, J. 2013. Geenitekniikka. 2. korjattu painos, Turku: Turun ammattikorkeakoulu.

Westermeier, R. 2016. Electrophoresis in Practice – A guide to Methods and Applications of DNA and Protein Separations. 5. painos. Singapore: Markono Print Media Pte. Ltd.

LIITTEET

Liite 1. Puhdistuksessa käytetyt puskurit

TAULUKKO 9. Puhdistuksessa käytetyt puskurit

HEGX-puskuri pH 7.2	20 mM Hepes-KOH 0.8 M NaCl 1 mM EDTA 10% Glyseroli 0.2% Triton X-100
HEGX-eluutiopuskuri pH 7.2	20 mM Hepes-KOH 0.8 M NaCl 1 mM EDTA 10% Glyseroli 0.2% Triton X-100 100 mM DTT
2x Tn5 dialyysipuskuri pH 7.2	200 mM Hepes-KOH 0.4 M NaCl 0.4 mM EDTA 2 mM TCEP 0.4% Triton X-100 40% Glyseroli
Pakastuspuskuri	55 % glyseroli ja pakas- tetaan -20 C
10% neutralisoitu PEI	50% Stock SIGMA #P3143 tehdään 1.5 M HCl, jotta pH 7

Liite 2. Restriktioentsyymidigestioreaktio

TAULUKKO 10.

	1. pUC19	2. pUC19
DNA	10,2 µl	11,2 µl
10x FastDigest buffer	2 µl	2 µl
EcoR1	2 µl	2 µl
Vesi	5,8 µl	4,8 µl
Yhteensä	20 µl	20 µl