



**TEKNIikka JA LIIKENNE**

**Laboratorioala**

**OPINNÄYTETYÖ**

**FUUSIOPROTEIININ KLOONAAMINEN, TUOTTO JA KARAKTERISOINTI**

**Työn tekijä: Jenni Mikkonen  
Työn ohjaaja: Heli Haakana  
Työn ohjaaja: Tiina Soininen**

**Työ hyväksytty: \_\_. \_\_. 2010**

**Tiina Soininen  
lehtori**



## **ALKULAUSE**

Tämä opinnäytetyö tehtiin Thermo Fisher Scientificin tutkimus- ja tuotekehitysosastolla Espoossa vuonna 2010. Haluan erityisesti kiittää työni ohjaajaa tutkija Heli Haakanaa hyvästä ohjauksesta, opetuksesta ja kärsivällisyydestä. Lisäksi kiitän kaikkia työtovereitani saamastani tuesta ja käytännön neuvoista.

Helsingissä 29.10.2010

Jenni Mikkonen

## TIIVISTELMÄ

<b>Työn tekijä:</b> Jenni Mikkonen	
<b>Työn nimi:</b> Fuusioproteiinin kloonaminen, tuotto ja karakterisointi	
<b>Päivämäärä:</b> 29.10.2010	<b>Sivumäärä:</b> 33 s.
<b>Koulutusohjelma:</b> Laboratorioala	
<b>Työn ohjaaja:</b> tutkija Heli Haakana	
<b>Työn ohjaaja:</b> lehtori Tiina Soininen	
<p>Geenit ohjaavat kaikkien - niin luontaisten kuin geenitekniikan avulla tuotettujen - proteiinien synteesiä. Nisäkäsgeenien ilmentäminen sellaisenaan bakteereissa on mahdotonta DNA:n proteiinia koodaamattomien intronien takia, joten käänteistranskriptaasien löytäminen viruksista vuonna 1970 oli hyvin merkittävää; ne mahdollistivat geenien eristämisen lähetti-RNA:n kautta.</p> <p>Tämän opinnäytetyön tavoitteena oli eri fuusioproteiinien kloonaminen, tuotto <i>E. colissa</i> ja karakterisointi. M-MuLV-käänteistranskriptaasiin liitettiin kuuden histidiinin häntä, His-tag, proteiinin puhdistusta varten ja lisäksi pieni proteiini joko C- tai N-terminaaliseen päähän eri pituisten linkkerien avulla. Tarkoituksena oli löytää sopivin fuusio, jonka myötä RT-entsyymien ominaisuudet, kuten termostabiilisuus, prosessiivisuus ja fideliteetti, paranisivat.</p> <p>Viiden eri konstruktin kloonaminen tehtiin perusmolekyybiologisten menetelmien avulla. Puhdistusvaiheessa affiniteettikromatografia yksinään ei riittänyt kontaminoivien endo- ja eksonukleaasien poistamiseen, vaan jouduttiin käyttämään kolmea eri kromatografiapylvästä. His-tag ei muuttanut M-MuLV RT:n ominaisuuksia verrattaessa sitä Finnzymes Oy:n kaupalliseen M-MuLV RT RNase H<sup>+</sup>:aan. Jos se olisi haitannut entsyymien toimintaa, histidiini-hännällisten fuusioiden tuottamista ei olisi kannattanut jatkaa.</p> <p>Tuotettaessa fuusioproteiineja niiden liukoisuus osoittautui huonommaksi kuin pelkällä M-MuLV RT:lla. Madaltamalla tuottumislämpötilaa, pidentämällä induktioaikaa sekä suurentamalla kasvatustilavuutta, saatiin isompia solumassoja ja enemmän entsyymiaktiivisuutta. Tähän perustuen entsyymien liukoisuusominaisuudet olivat fuusion myötä muuttuneet.</p> <p>qRT-PCR:n avulla testattiin puhdistettujen entsyymien kykyä toimia käännettäessä RNA:ta eri pituisuuksilla cDNA:ksi.</p> <p>Kaikkia neljää eri fuusiota ei ehditty karakterisoida tämän opinnäytetyön aikana, mutta tutkimuksia jatketaan edelleen. Thermo Fisher Scientificin tuotekehitykseen kuuluvien salassapitosyiden takia muun muassa fuusiopari, linkkerit sekä kloonamisessa käytettyjen alukkeiden sekvenssit on jätetty kertomatta.</p>	
<b>Avainsanat:</b> käänteistranskriptaasi, M-MuLV RT, fuusioproteiini	

## ABSTRACT

<b>Name:</b> Jenni Mikkonen	
<b>Title:</b> Cloning, expression and characterization of a fusion protein	
<b>Date:</b> 29. October 2010	<b>Number of pages:</b> 33
<b>Department:</b> Laboratory sciences	
<b>Instructor:</b> Heli Haakana, Senior Scientist	
<b>Supervisor:</b> Tiina Soininen, Senior Lecturer	
<p>Genes control the synthesis of all proteins, both natural and proteins produced through genetic engineering. Mammalian gene expression as such is impossible in bacteria because of introns which do not encode proteins. For this reason, finding reverse transcriptases from viruses was significant because they allowed the isolation of genes via messenger RNA.</p> <p>The target of this graduate study was to clone, express in <i>E. coli</i> and characterize fusion proteins. A 6-histidine tail, His-tag, was attached to the C-terminus of M-MuLV reverse transcriptase to facilitate protein purification. Another protein was fused to either N- or C-terminus of M-MuLV RT with different linkers. The purpose was to find an appropriate fusion which will improve the properties of the RT-enzyme such as thermostability, processivity and fidelity.</p> <p>The cloning of five different constructs succeeded with basic molecular biology methods. It was challenging to remove contaminating endo- and exonucleases in all constructs and, therefore, the proteins were purified using three different chromatography columns. M-MuLV RT with attached His-tag worked in the same way as commercial M-MuLV RT RNase H<sup>+</sup> produced by Finnzymes Oy. His-tag did not weaken the properties of the protein. Therefore, it was worthwhile to continue producing fusion proteins with the same affinity-tag.</p> <p>When the fusion proteins were produced their solubility was worse than that of M-MuLV RT. Larger cell masses and better enzymatic activities were obtained by decreasing the expression temperature, extending induction time and increasing the growth volume of the bacterial culture. On this basis, it was concluded that the fusion partner had changed the solubility properties of M-MuLV RT.</p> <p>Purified enzymes were tested by amplifying different amounts of RNA using qRT-PCR.</p> <p>There was not enough time to characterize all fusions during this graduate study and therefore, the studies will be continued. Thermo Fisher Scientific's product development includes confidentiality issues, and that is the reason why some things have been left undisclosed, e.g. the fusion partner, linkers and primer sequences used in cloning.</p>	
<b>Keywords:</b> reverse transcriptase, M-MuLV RT, fusion protein	

## SISÄLLYS

### ALKULAUSE

### TIIVISTELMÄ

### ABSTRACT

## SISÄLLYS

<b>1</b>	<b>JOHDANTO</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>TYÖN TEORIA</b>	<b>2</b>
<b>2.1</b>	<b>Käänteistranskriptaasit</b>	<b>2</b>
2.1.1	<i>M-MuLV RT</i>	3
2.1.2	<i>AMV RT</i>	4
2.1.3	<i>HIV RT</i>	4
<b>2.2</b>	<b>cDNA-synteesi</b>	<b>5</b>
2.2.1	<i>Alukevaihtoehdot</i>	5
2.2.2	<i>RT-PCR</i>	6
2.2.3	<i>cDNA-kirjastot</i>	7
<b>2.3</b>	<b>DNA-polymeraasin ominaisuuksien parantaminen fuusioteknologian avulla</b>	<b>8</b>
<b>3</b>	<b>MENETELMÄT JA MATERIAALIT</b>	<b>9</b>
<b>3.1</b>	<b>Kloonaus</b>	<b>9</b>
3.1.1	<i>Geenin tuottaminen PCR:n avulla</i>	9
3.1.2	<i>Plasmidi-DNA:n eristys</i>	9
3.1.3	<i>Geenin siirto tuottovektoriin</i>	10
3.1.4	<i>Pesäke-PCR</i>	10
3.1.5	<i>Sekvensointi</i>	11
3.1.6	<i>Fuusioparit</i>	11
<b>3.2</b>	<b>Proteiinien tuotto</b>	<b>11</b>
3.2.1	<i>Testikasvatukset</i>	11
3.2.2	<i>Suuremman mittakaavan kasvatukset</i>	13
<b>3.3</b>	<b>Proteiinin puhdistus</b>	<b>13</b>
3.3.1	<i>Esivalmistelut</i>	13
3.3.2	<i>Affiniteetikromatografia</i>	13
3.3.3	<i>Q-anioninvaihtokromatografia HiTrap</i>	15
3.3.4	<i>SP-kationinvaihtokromatografia</i>	15
<b>3.4</b>	<b>Proteiinin karakterisointi</b>	<b>15</b>
3.4.1	<i>Aktiivisuusmääritykset</i>	15
3.4.2	<i>Dystrophin-geenin monistus RT-PCR:n avulla</i>	16
3.4.3	<i>Funktionaalinen testi qRT-PCR:n avulla</i>	18

<b>4</b>	<b>TULOKSET JA NIIDEN TULKINTA</b>	<b>20</b>
4.1	Kloonaus	20
4.2	Proteiinin tuotto	21
4.3	Proteiinin puhdistus	22
4.3.1	<i>Affiniteettikromatografia</i>	22
4.3.2	<i>Q-anioninvaihtokromatografia HiTrap</i>	23
4.3.3	<i>SP-kationinvaihtokromatografia</i>	24
4.4	Proteiinin karakterisointi	25
4.4.1	<i>Aktiivisuusmääritykset</i>	25
4.4.2	<i>SDS-PAGE</i>	26
4.4.3	<i>Dystrophin-geenin monistus RT-PCR:n avulla</i>	27
4.4.4	<i>Funktionaalinen testi qRT-PCR:n avulla</i>	27
<b>5</b>	<b>YHTEENVETO</b>	<b>30</b>
	<b>VIITELUETTELO</b>	<b>32</b>

## 1 JOHDANTO

Proteiineihin pääsääntöisesti kuuluvat entsyymit mahdollistavat elämän olemassaolon - ilman niitä reaktiot olisivat liian hitaita pitämään yllä solun aineenvaihduntaa. Geenitekniikan menetelmissä yleisesti käytetyt entsyymit ovat luonnosta eristettyjä, esimerkiksi DNA- ja RNA-polymeraasit. DNA-polymeraasilla on tärkeä merkitys DNA:n kahdentumisessa, ja RNA-polymeraasin avulla tapahtuu RNA-synteesi eli transkriptio. Geneettinen informaatio nukleiinihapoilla voi kulkea kahdensuuntaisesti. Käänteistranskriptiossa viesti kulkee takaisin RNA:lta DNA:lle, ja tapahtumaan tarvitaan käänteistranskriptaasia. Vuonna 1970 löydetyn käänteistranskriptaasin merkitys on suuri analysoitaessa solussa esiintyviä RNA-molekyylejä; saadaan tietoa, mitä genejä luetaan, ja näin pystytään löytämään ja tuottamaan uusia proteiineja [1].

Koska normaalioloissa elävien mikrobien entsyymit denaturoituvat korkeissa lämpötiloissa, käytettäviä entsyymejä pitää parannella kestäämään korkeita lämpötiloja. Proteiineja muokkaamalla voidaan muuttaa muitakin niiden ominaisuuksia. Geneettisellä modifikaatiolla muokataan cDNA:ta ja tämän jälkeen tuotetaan uutta mutanttia proteiinista rekombinantiteknologian avulla. Muutoksia voidaan tehdä kohdentamalla mutaatio tiettyyn aminohappoon (pistemutaatio), korvaamalla aminohappoja toisilla aminohapoilla ja sekä poistamalla että lisäämällä proteiiniin rakenteita. [2.]

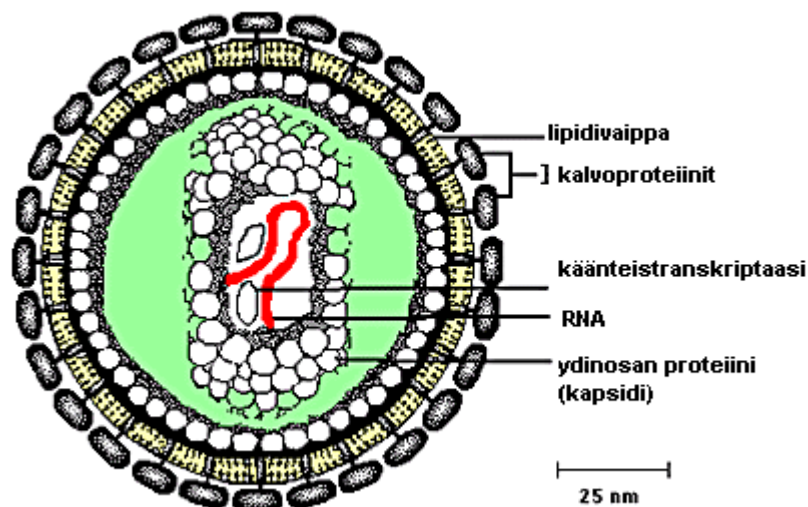
Liittämällä kaksi eri proteiinia tai niiden osaa yhteen geenitekniikan avulla, saadaan aikaiseksi fuusioproteiini. Jotkin arkkibakteerit tuottavat suuria määriä pieniä, kaksijuosteiseen DNA:han epäspesifisesti sitoutuvia proteiineja. Liittämällä tällainen proteiini polymeraasiin kovalenttisin sidoksin voidaan esimerkiksi parantaa polymeraasin fideliteettiä ja prosessiivisuutta. [3.] Fuusio voidaan tehdä kohdeproteiinin aminopäähän, N-terminukseen tai karboksipäähän, C-terminukseen. Linkkerillä tarkoitetaan aluetta, jolla proteiinit liitetään toisiinsa. Muuttamalla sen emäskoostumusta ja pituutta, voidaan myös vaikuttaa tuotettavan proteiinin ominaisuuksiin. Tässä opinnäytetyössä on sovellettu edellä kuvattua fuusioteknologiaa käänteiskopioijaentsyymiin.

## 2 TYÖN TEORIA

Teoriaosuudessa on keskitytty käänteistranskriptaaseihin, niiden ominaisuuksiin ja merkitykseen cDNA-synteesissä. Kohdassa 2.3 on kerrottu tutkimuksesta, jossa fuusioiden avulla pystyttiin muuttamaan DNA-polymeraasien ominaisuuksia. Tässä työssä fuusioita tehtiin RT-entsyymiin ja fuusioparit olivat erilaisia.

### 2.1 Käänteistranskriptaasit

Käänteistranskriptaasit (engl. *reverse transcriptases RTs*) ovat entsyymejä, jotka toimivat transkriptiolle käänteiseen suuntaan eli mahdollistavat cDNA-synteesin. Nämä entsyymit on eristetty RNA:ta sisältävistä retroviruksista (lat. *retro*, taaksepäin), joiden vaipan ja rakenneproteiinien suojassa on diploidi RNA-genomi ja tähän liittyneenä käänteistranskriptaasi. [4.] Kuvassa 1 on esitetty retroviruksen rakenne.



**Kuva 1.** Retroviruksen rakenne [lähteitä 5 ja 6, s. 298 mukailleen]

Viruksen infektoimassa solussa käänteistranskriptaasi kopioi genomien RNA-mallin mukaan kaksisäikeiseksi DNA:ksi, joka integroituu solun DNA:han integraasientsyymien avulla. Kyseistä DNA-muotoa kutsutaan provirukseksi. Provirus voi ryhtyä aktiivisesti lisääntymään tai pysyä inaktiivisena, jolloin isäntäsolun puolusjärjestelmät eivät havaitse sitä. Inaktiivisessa muodossakin se voi vaikuttaa isäntäsolun vieressä olevien geenien



ilmentymiseen ja näin esimerkiksi, mahdollisesti aiheuttaa syöpää. [6, s. 298 - 299.]

Provirus täydellisessä muodossaan koostuu retroviruksen kolmesta geenistä: *gag* (koodittaa rakenneproteiineja), *pol* (polymeraasi) ja *env* (vaippaproteiinit). Geenejä reunustavat kummallakin puolella retroviruksille ominaiset LTR-yksiköt (*long terminal repeat* -sekvenssit), joissa sijaitseva transkription promoottori avaa *gag-pol-env*-geenit toimimaan ja tuottamaan lähetti-RNA-molekyylejä. [4.] *pol*-geeni koodittaa monia entsyymattisia aktiivisuuksia. Sen tarkoituksena on muodostaa viruksen entsyymit, kuten käänteiskopioija, proteaasi ja integraasi. [7, s. 193.]

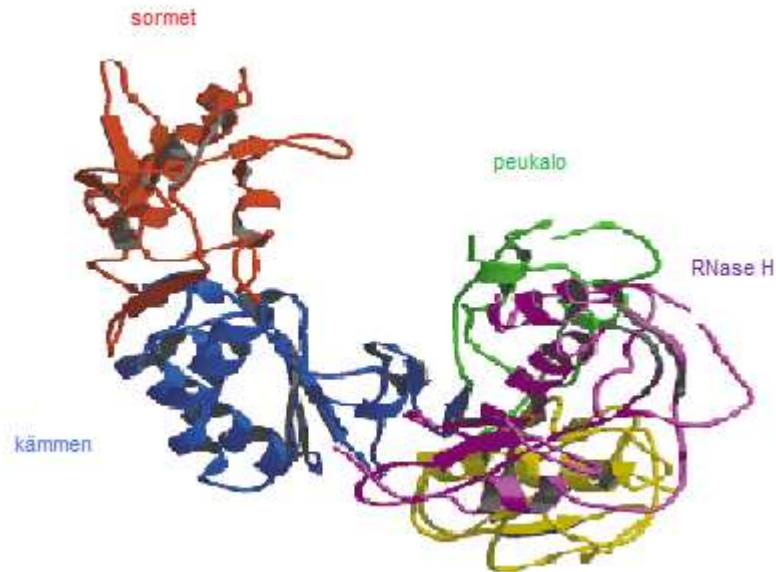
### 2.1.1 M-MuLV RT

Moloney Murine Leukemia -viruksesta eristetty M-MuLV-käänteistranskriptaasi on 78 kDa:n kokoinen monomeeri. Kaupallisesti saatava versio on tuotettu rekombinanttiproteiinina. Normaali käänteistranskriptiolämpötila tällä entsyymillä on +37 °C. M-MuLV RT omaa polymeraasiaktiivisuuden, joka pidentää alukkeiden 3'-päitä ja sen templaattina voi toimia sekä DNA että RNA. RNase H -aktiivisuuden avulla RNA voidaan hajottaa RNA-DNA-hybridistä, mikä näin auttaa PCR-alukkeita sitoutumaan cDNA:han. [8.]

M-MuLV:sta on olemassa kaksi versiota: M-MuLV RNase H<sup>+</sup> ja H<sup>-</sup>. Miinusmuodossa RNase H -aktiivisuus on tuhottu, esimerkiksi deleetion [9] tai pistemutaation [10] avulla. Pistemutaatioiden myötä huomattiin, että RNase H -aktiivisuudella on tärkeä merkitys retrovirusten elinkierrossa [10].

Agilent Technologiesin tekemässä tutkimuksessa vuonna 2008 pistemutaatioiden avulla yritettiin parantaa M-MuLV RT:n termostabiilisuutta. Viiden eri aminohapon muutoksen, E69K, E302R, W313F, L435G ja N454K, myötä entsyymi toimi jopa +55 °C asteessa viidestä minuutista puoleen tuntiin. Mutaatioiden seurauksena myös cDNA-saannot kasvoivat sekä RT-PCR:n tehokkuus parani verrattuna villityypin M-MuLV RT:iin. [11.]

Kuvassa 2 on nähtävissä M-MuLV RT:n kolmiulotteinen rakenne, jossa eri värein on ilmaistu sekundäärirakenteet, joista usein puhutaan kämmenenä, sormina ja peukalona. Keltainen osa kuvaa liitosaluetta, joka yhdistää domeenit toisiinsa. [8.]



**Kuva 2.** M-MuLV RT:n kolmiulotteinen rakenne [lähdettä 8 mukailleen]

### 2.1.2 AMV RT

AMV -käänteistranskriptaasi on eristetty Avian Myeloblastosis -viruksesta. Tällä heterodimeerilla on polymeeraasi- ja RNase H -aktiivisuudet ja se mahdollistaa käänteistranskription tekemisen jopa 70 °C:ssa. Korkea lämpötila avaa RNA:n sekundaarirakenteita ja lisää myös alukkeiden spesifistä kiinnittymistä. [12.]

Vaikka M-MuLV RT:n termostabiilisuutta yritetään parantaa rekombinantiteknologian avulla, se tuskin koskaan pystyy toimimaan yhtä korkeassa lämpötilassa kuin AMV RT. Syntetisoitaessa cDNA:ta saanto on kuitenkin ollut vähäisempi käytettäessä AMV RT:a kuin M-MuLV RT:a. [13.]

### 2.1.3 HIV RT

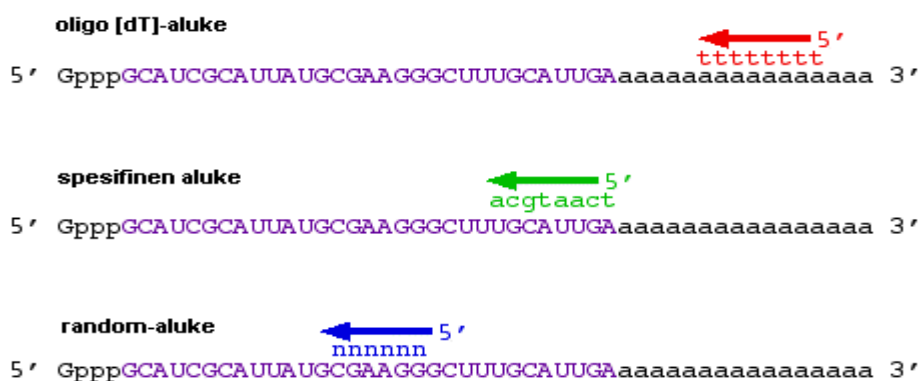
Immuunikatoa aiheuttavasta Human Immunodeficiency -viruksesta eristetty HIV-käänteisentsyymi on heterodimeeri, ja se on rakenteeltaan hyvin samanlainen kuin M-MuLV RT [8]. Tätä kyseistä entsyymiä on oletettavasti tutkittu eniten maailmassa etsittäessä lääkehoitoa AIDSia (engl. *Acquired Immune Deficiency Syndrome*) vastaan.

## 2.2 cDNA-synteesi

cDNA-synteesi perustuu käänteistranskriptaasin kykyyn kääntää mRNA:ta cDNA:ksi. Eristämällä mRNA eukaryoottisolun sytoplasmasta ja tekemällä siitä DNA-kopio käänteiskopioijaensyymien avulla, saadaan cDNA, *complementary DNA*, josta intronit on poistettu. [14, s. 92.] Synteesin aluksi voidaan tehdä RNA:n, nukleotidien ja alukkeiden alkudenaturaatio, jossa RNA:n hiuspinnimuodostumat avautuvat. Tämän jälkeen lämpötilaa lasketaan, jolloin alukkeet sitoutuvat RNA:han. Kun lämpötilaa jälleen nostetaan, alkudenaturaation jälkeen reaktioon lisätty käänteiskopioijaensyymi valmistaa cDNA-juosteen käyttäen dNTP:itä lähtöaineina ja mRNA:n nukleotidijärjestystä templaattina.

### 2.2.1 Alukevaihtoehdot

Alukkeiden valinta cDNA-synteesiin riippuu tutkimuskohteesta. Oligo[dT]-aluke sitoutuu mRNA:n poly-A-häntään, ja RT alkaa luoda uutta juostetta 5'-3'-suunnassa käyttäen 3'-5'-mRNA:ta templaattina. Jos geeni on erittäin pitkä, saattaa mRNA katketa, jolloin synteesi jää keskeneräiseksi ilman 5'-päätä. Jotta saadaan cDNA:ta koko matkalta, voidaan käyttää satunnaisia heksameereja. Nämä niin kutsutut random-alukkeet sitoutuvat satunnaisesti koko mRNA:han, jolloin syntyy joukko lyhyitä cDNA-pätkiä. Sekvenssispesifiset alukkeet sopivat silloin, kun cDNA halutaan tietyltä, tunnetulta alueelta mRNA:sta. [15.] Kuvassa 3 on havainnollistettu eri alukkeiden liittyminen templaattiin.



**Kuva 3.** Eri alukevaihtoehdot cDNA-synteesiin [lähde: 15 mukailen]

### 2.2.2 RT-PCR

RT-PCR:n (engl. *reverse transcription polymerase chain reaction*) tarkoituksena on monistaa cDNA:ta polymeerasiketjureaktion avulla. RT-PCR voidaan tehdä joko 1- tai 2-vaiheisena. 1-vaiheisen menetelmän etuna on sen helppous, kaikki tehdään yhdessä putkessa; vähemmän pipetoimisvaiheita, minkä myötä myös kontaminaatoriski on vähäisempi. Haasteena tässä on optimoida reaktio sopimaan sekä PCR:lle että käänteistranskriptiolle ja alukkeista ainoastaan spesifiset alukkeet ovat mahdolliset. RT-vaiheen kontrollointi on myös mahdotonta. [16.]

2-vaiheisessa RT-PCR:ssä on enemmän työvaiheita, täten kontaminaatoriski on suurempi ja työ kokonaisuudessaan vie enemmän aikaa. Hyvinä puolina on kuitenkin mahdollisuus optimoida oikeat olosuhteet reaktioille, saada tarkempia tuloksia sekä mahdollisuus käyttää erilaisia alukkeita. Samaa cDNA:ta voidaan käyttää useiden eri amplikonien tekemiseen. cDNA:ksi käännetty RNA säilyy paremmin. Käänteistranskription kontrollointi on myös mahdollista. [17.]

#### *qRT-PCR*

End-point -analyysissä cDNA:n monitus tehdään PCR-laitteessa ja tulokset havainnoidaan agarosigeelielektroforeesin avulla. Tähän verrattuna qRT-PCR (engl. *quantitative reverse transcription PCR*) on paljon herkempi ja nopeampi menetelmä. Kvantitatiivisessä RT-PCR:ssa cDNA:n monistumista voidaan seurata reaaliajassa tietokoneelta, joka on yhdistetty qPCR-laitteeseen. Periaate menetelmässä on melko sama kuin perinteisessä PCR:ssa. Protokolla koostuu alkudenaturaatiosta, denaturaatio-annealing-ekstensio-sykleistä, fluoresenssin luvusta, mahdollisesta sulamispisteanalyysistä, loppuekstensiosta ja jäädytyksestä.

qPCR-reaktioissa on aina mukana jokin DNA:han sitoutuva fluoresoiva koetin tai leima. Mittaamalla fluoresenssi joka syklissä ekstensiovaiheen jälkeen saadaan reaaliaikaista tietoa DNA:n monistumisesta. Ei-spesifisistä detektointikemoista yksi käytetyimmistä on SYBR<sup>®</sup> Green I. Se on fluoresoiva, kaksisäikeiseen DNA:han sitoutuva väri, joka sitoutuessaan vahvistaa fluoresenssia. SYBR<sup>®</sup> Green I sitoutuu kaikkeen dsDNA:han, jolloin myös epäspesifiset tuotteet aiheuttavat signaalin. Tulokset voidaan

kuitenkin erotella sulamispisteanalyysin avulla. Esimerkkinä spesifisistä kemioista voidaan mainita TaqMan<sup>®</sup>-koetin.

Tuloksia tarkastellessa tärkeitä parametrejä ovat kynnystaso (engl. *Threshold line*), kynnysyksi (engl. *Threshold cycle, Ct*), standardisuora, tehokkuus ja sulamispisteanalyysi. Kynnystaso asetetaan monistuskäyrän eksponentiaalisen kasvun vaiheeseen, jotta voidaan määrittää kynnysyksi. Ct-arvo on yksi tärkeimmistä parametreistä. Sen suuruus kertoo näytteen alkuperäisestä templaattikonsentraatiosta; mitä enemmän templaattia reaktion alussa, sitä pienempi Ct-arvo eli sitä aiemmin tuote monistuu. [18.]

### 2.2.3 cDNA-kirjastot

cDNA-kirjastojen tekemiseen tarvitaan kaksijuosteista cDNA:ta. Yksijuosteinen cDNA-nauha, joka on tehty mRNA:sta käänteistranskriptaasin avulla, toimii tässä vaiheessa templaattina. cDNA-nauhan kanssa pariutunut mRNA poistetaan osittain RNAasi H -entsyymillä, jolloin jäljelle jääneet RNA-juosteen osat toimivat toisen nauhan synteessissä alukkeina. cDNA:n toinen nauha syntetisoidaan DNA-polymeraasilla, joka syrjäyttää ja poistaa edellisessä vaiheessa jääneet RNA-juosteen osat ja korvaa ne DNA-juosteella.

Kaksijuosteinen, typpäpäinen cDNA ligoituu vektoriin sellaisenaan huonosti. Ligaation tehostamiseksi cDNA-päihin voidaan esimerkiksi ligoida synteettiset kaksijuosteiset DNA-palat, joissa on sopiva restriktioentsyymillä katkaisukohta. Kun vektori katkaistaan tätä entsyymiä käyttäen, voidaan cDNA ligoida vektoriin.

Transformaation ja maljauksen jälkeen saadaan kokoelma klooneja, jotka sisältävät cDNA-kopioina eristyshetken kaikki mRNA-molekyylit. Koska cDNA-kopioissa ei ole enää introneja, ne voidaan periaatteessa ekspressoida missä tahansa isäntäsoluissa. [14, s. 91 - 92.]

### 2.3 DNA-polymeraasin ominaisuuksien parantaminen fuusioteknologian avulla

San Franciscossa, MJ Bioworks Inc.:n tutkimus- ja tuotekehityksessä vuonna 2004 tutkittiin Sso7d-proteiinin vaikutusta *Taq*- ja *Pfu*-polymeraaseihin. Tavoitteena oli parantaa polymeraasien prosessiivisuutta eli kykyä liittää nukleotidejä mahdollisimman paljon kopioitavaan DNA-juosteeseen yhdellä sitoutumiskerralla. Fuusioproteiinien kloonauksen, tuoton ja puhdistusten jälkeen niistä määritettiin polymeraasiaktiivisuus, prosessiivisuus, kineettinen stabiilisuus, termostabiilisuus ja PCR-tehokkuus.

*Thermus aquaticus* -bakteerista eristetty *Taq*-polymeraasi on erittäin termostabiili, mutta omaa melko suuren virhefrekvenssin, koska sillä ei ole 3'-5'-oikolukuaktiivisuutta. Arkkeihin kuuluvasta *P. furiosus* -lajista eristetyllä *Pfu*-polymeraasilla on korkea fideliteetti eli kyky lisätä oikea nukleotidi syntetisoitavaan juosteeseen, mutta se polymerisoi DNA:ta hitaammin kuin *Taq*. [3.]

Sso7d on arkkeihin kuuluvan *Sulfolobus solfataricus* -lajin 7 kDa:n kokoinen globulaarinen proteiini. Sen kolmiulotteinen rakenne koostuu viidestä  $\beta$ -laskoksesta, jotka muodostavat epätäydellisen  $\beta$ -tynnyri-rakenteen. Edellä mainitun rakenteen päässä on lyhyt C-terminaalinen  $\alpha$ -heliksi. Proteiinin on osoitettu edistävän komplementaaristen DNA-juosteiden liittymistä toisiinsa, osallistuvan DNA:n pakkaamiseen ja hajottavan proteiinikasaumia solussa. [19.]

Tutkimuksessa todettiin Sso7d-proteiinin liittäminen DNA-polymeraasiin lisäävän merkittävästi polymeraasin prosessiivisuutta. Sso7d:hen tehdyt pistemutaatiot osoittautuivat tärkeiksi proteiinin kyvyssä kiinnittyä kaksijuosteiseen DNA:han. Fuusion myötä katalyyttinen aktiivisuus ja entsyymin stabiilisuus eivät vähentyneet. PCR-reaktioiden tehokkuus parani ja tämän myötä lyhyemmät ekstensioajat. Myös fuusiopolymeraasin suolansietokyky parani, mikä mahdollisti erilaisten puskuriliuosten käytön. [3.]

### 3 MENETELMÄT JA MATERIAALIT

Kaikissa aktiivisuusmääryksissä, SDS-PAGE-ajoissa ja funktionaalisissa testeissä oli mukana verrokkinä toiminut kaupallinen M-MuLV RT RNase H<sup>+</sup> (Finnzymes Oy).

#### 3.1 Kloonaus

##### 3.1.1 Geenin tuottaminen PCR:n avulla

Lähtötilanteessa haluttua proteiinia vastaava M-MuLV RT-geeni oli pLEX-vektorissa, josta se kopioitiin PCR:n avulla. Suunniteltujen alukkeiden avulla saatiin kloonattavaan geeniin sopivien restriktioentsyymien, *NdeI*:n ja *NotI*:n, katkaisukohtat. PCR-reaktio tehtiin Finnzymes Oy:n Phusion-entsyymillä valmistajan ohjeen mukaan templaattimäärän ollessa 1 ng. 2 kb:n PCR-tuote tarkistettiin agarosigeelielektroforeesilla, minkä jälkeen se puhdistettiin QIAGENin QIAquick PCR Purification -kitin ohjeen mukaisesti (cat. 28106).

##### 3.1.2 Plasmidi-DNA:n eristys

Proteiinin tuottamiseksi RT-geeni tuli siirtää pET21a-vektoriin samaan lukukehykseen vektorin C-terminaalisisessä päässä olleen His-tag-sekvenssin kanssa. Vektori oli transformoitu *Escherichia coli* XL1Blue -soluihin ja säilytetty glyserolissa -80 °C:ssa. Soluja siirrostettiin silmukallinen 5 ml:aan LB-kasvatusalustaa, joka sisälsi 0,1 mg/ml ampisilliinia, ja niitä kasvatettiin +37 °C:ssa ravistelijassa (200 rpm) yön yli. Seuraavana päivänä soluista eristettiin plasmidi-DNA Invitrogenin PureLink™ Quick Plasmid Miniprep -kitin ohjeen mukaisesti (cat. K2100-10). Plasmidin DNA-pitoisuus määritettiin spektrofotometrillä. Plasmidin eristys tarkistettiin digestiolla New England Biolabsin *PstI*- ja *XhoI*- restriktioentsyymeillä valmistajan ohjeiden mukaisesti.

### 3.1.3 Geenin siirto tuottovektoriin

Puhdistettu 2 kb:n PCR-tuote ja eristetty plasmidi pilkottiin *NdeI*- ja *NotI*-restriktioentsyymeillä. Lisäksi plasmidi käsiteltiin CIP-entsyymillä (engl. *Calf Intestinal Alkaline Phosphatase*) DNA:n 5'-päiden defosforyloimiseksi. Pilkotut tuotteet ajettiin 1 % agarosigeelillä, josta ne eristettiin QIAGENin MinElute Gel Extraction -kitin ohjeen mukaisesti (cat. 28604). Geeliltä eristys tarkistettiin vielä agarosigeelielektroforeesilla.

2 kb:n PCR-tuote siirrettiin pET21a-plasmidiin ligaatioreaktiolla käyttäen T4 DNA quick -ligaasia, joka on *Escherichia coli* T4-faagin tuottama entsyymi. Reaktiossa vektorin määrä oli 1,5-kertainen verrattuna insertin määrään. Näin saatu pET21a+RT+HisTag -plasmidi (= RT+His) transformoitiin Mandel & Higa -menetelmällä [14, s. 83] tehtyihin kompetentteihin XL1Blue-soluihin. Transformaatioon otettiin 10 µl ligaatioseosta ja 150 µl jäällä sulatettuja XL1Blue-soluja. Lisäksi tehtiin vektori- ja inserttikontrollit. Transformaatioseoksia pidettiin jäällä 30 minuuttia, minkä jälkeen niille annettiin lämpöshokki +42 °C:ssa 40 s. Putket siirrettiin nopeasti takaisin jäälle ja niihin lisättiin 840 µl LB-kasvatusalustaa sisältäen 0,1 mg/ml ampicilliinia. Näytteitä inkuboitiin +37 °C:ssa ravistelijassa (200 rpm) tunnin ajan, jotta vektorin antibioottiresistenssigeeni ehti ekspressoitua. Lopuksi solut maljattiin LB-amp-maljoille, joilla niitä kasvatettiin +37 °C:ssa yön yli.

### 3.1.4 Pesäke-PCR

Pesäke-PCR:n (engl. *Colony PCR*) avulla etsittiin transformanttipesäkkeet, joissa insertti oli oikein liittyneenä vektoriin. LB-amp-maljalta siirrostettiin puolet pesäkkeestä 20 µl:aan milliQ-vettä, josta otettiin 1 µl:n näyte PCR-reaktioon. Vektorin T7-promoottori ja T7-terminaattori alukkeiden avulla nähtiin, oliko vektoriin liittynyt yksi oikean kokoinen insertti. Reaktiossa, jossa toinen aluke oli vektorin ja toinen insertin, saatiin selville oliko insertti oikein päin. PCR-tuotteet ajettiin agarosigeelielektroforeesilla tulosten havainnollistamiseksi. Plasmidien kasvatus ja eristys tehtiin kuten kohdassa 3.1.2.



### 3.1.5 Sekvensointi

Sekvensoimalla tarkistettiin, että PCR:ssa ei ollut tapahtunut virheitä. Sangerin sekvensointimenetelmään perustuvat reaktiot tehtiin kymmenellä eri fluoresoivalla alukkeella käyttäen Finnzymes Oy:ssä kehitettyä ei-kaupallista DNA-polymeraasia. Sekvensointigeeli valmistettiin Amrescon 6 % Gene-PAGE™-reagenssista, johon lisättiin 0,5 % ammoniumpersulfaattia ja 0,1 % N,N,N,N'-tetrametyleenidiamiinia. Ajo suoritettiin LI-COR-sekvensointilaitteella (1x TBE-puskuri, ajoaika 9 h, 1500 V, 50 °C, geelin pituus 41 cm ja paksuus 0,25 mm).

### 3.1.6 Fuusioparit

RT+His -plasmidi digestoititiin ja siihen liitettiin fuusioparit saaden neljä erilaista konstruktia. Kolmessa tapauksessa fuusio tehtiin N-terminaaliseen päähän ja yhdessä C-terminaaliseen päähän. Fuusioiden tekemiseen käytettiin kaikkia edellä mainittuja menetelmiä.

## 3.2 Proteiinien tuotto

### 3.2.1 Testikasvatukset

RT+His -plasmidia transformoitiin kompetentteihin *E. coli* BL21 (DE3) -soluihin kuten kohdassa 3.1.3. Transformanttipesäke siirrostettiin 50 ml:aan LB-amp-kasvatusalustaa ja inkuboititiin +37 °C:ssa ravistelijassa (200 rpm) yön yli. Yön yli kasvanutta kasvustoa harvennettiin 1/50 LB-amp-kasvatusalustaan tehden kaksi rinnakkaista 250 ml:n kasvatusta. Soluja inkuboititiin +37 °C:ssa ravistelijassa seuraten OD<sub>595</sub>-arvoa, kunnes se oli välillä 0,4 - 0,6.

#### *Induktio*

Solut indusoititiin tuottamaan proteiinia lisäämällä IPTG:a (engl. *isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside*) siten, että sen pitoisuudeksi kasvatusalustassa tuli 1 mM. Toinen kasvatuksesta laitettiin +37 °C:seen ja toinen +30 °C:seen ravisteluun (200 rpm) neljäksi tunniksi. Induktioin jälkeen solut sentrifugoititiin (2 655 g) 10 minuutin ajan +4 °C:ssa ja sakat säilöttiin -80 °C:seen. Ennen IPTG-lisäystä otetut 50 ml 0-näytteet sentrifugoititiin ja säilöttiin kuten edellä.

Kaikista neljästä fuusiokonstruktiosta tehtiin myös 250 ml:n kasvatukset. Niillä induktion annettiin tapahtua lisäksi +16 °C:ssa yön yli.

### *Sonikointi*

Jäillä sulatetut solumassat suspensoitiin 500 µl:aan sonikointipuskuria (0,25 M NaCl, 10 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH 8). Solut hajotettiin sonikoimalla Branson sonifier 450 -sonikaattorilla (4 x 10 s, 50 % duty cycle, output control 2, pieni kärki). Solususpensiot sentrifugoitiin 5 minuutin ajan +4 °C:ssa 20 800 g:n voimalla. Supernatantit otettiin talteen ja sakat suspensoitiin 500 µl:aan 1x TE-puskuria.

### *Käänteistranskriptaasiaktiivisuusmääritys*

Supernatanteista ennen ja jälkeen induktion määritettiin RT-aktiivisuus (U) perinteisellä suodatinpaperimenetelmällä (Meyer ja Keller, 1972; Chien ym., 1976; Kaledin ym., 1980; Sambrook ym., 1989), jossa yksi nukleotidi oli leimattu radioaktiivisella <sup>3</sup>H-isotoopilla. Yksi yksikkö (U) tarkoittaa entsyymimäärää, joka inkorporoi 1 nmol dTMP:a TCA:lla saostettavaksi tuotteeksi 10 minuutissa +37 °C:ssa 1 ml:n tilavuudessa. Templaattina reaktiossa toimi poly(rA):d(T)<sub>18</sub>, johon M-MuLV liitti nukleotidejä templaatin määräämässä järjestyksessä, jolloin tuotteeksi syntyivät pidentynyt RNA/DNA-säie ja pyrofosfaatti. Syntetisoituneen DNA:n määrä määritettiin TCA-saostuksella ja nestetuikelaskennalla. Nestetuikelaskimen CPM-arvot (engl. *Counts per minute, CPM*) kertovat näytteen antamasta pulssimäärästä eli radioaktiivisuudesta.

### *SDS-PAGE*

Ennen ja jälkeen induktion otetut näytteet supernatanteista ja sakkasuspensioista laimennettiin milliQ-vedellä ja niihin lisättiin 1/3 näytepuskuria (4x NuPAGE LDS Sample Buffer sisältäen 1/10 30x DTT). Näytteet kuumennettiin +95 °C:ssa 5 minuuttia, minkä jälkeen ne ajettiin SDS-polyakryyliamidigeelielektroforeesilla käyttäen valmista akryyliamidigeeliä (Invitrogen; NuPAGE 4-12 % Bis-Tris, 1x MOPS SDS Running Buffer) 200 V jännitteellä 40 minuutin ajan. Proteiinikostandardina oli Lonzan ProSieve QuadColor Protein Marker 4,6 - 300 kDa. Ajon jälkeen geeli värjättiin Invitrogenin SimplyBlue™ SafeStain-väriliuoksella valmistajan ohjeen mukaisesti. Lopuksi geeli kuvattiin AlphaDigiDoc-kameralla.

### 3.2.2 Suuremman mittakaavan kasvatukset

RT+His -tuottovektorin sisältänyt kasvusto yön yli kasvatuksen jälkeen harvennettiin 1/50 LB-amp -kasvatusalustaan. Kokonaistilavuudeksi tuli yksi litra. Soluja kasvatettiin +37 °C:ssa ravistelijassa (200 rpm) seuraten OD<sub>595</sub>-arvoa, kunnes se oli 0,4 - 0,6. IPTG:a lisättiin siten, että sen pitoisuudeksi kasvatusalustassa tuli 1 mM. Induktio tapahtui +30 °C:ssa ravistelijassa neljän tunnin ajan. Solut sentrifugoitiin JA-10-roottorilla 9000 rpm:n kierrosnopeudella, 30 minuuttia. Supernatantti kaadettiin pois, solumassat otettiin talteen, punnittiin ja laitettiin -80 °C:seen.

Fuusioproteiinit tuotettiin 4,5 litran tilavuudessa ja induktio tapahtui +16 °C:ssa yön yli.

## 3.3 Proteiinin puhdistus

### 3.3.1 Esivalmistelut

Solumassat sulatettiin jäällä ja suspensoitiin 10 mM imidazole-puskuriin ensimmäisenä puhdistusvaiheena toimineen Thermo Scientificin HisPur™ Ni-NTA Purification -kitin ohjeen mukaisesti (cat. 88229). Juuri ennen sonikointia soluihin lisättiin 1/1000-tilavuus 0,25 M PMSF-liuosta (engl. *phenylmethylsulfonyl fluoride*, PMSF, toimii proteaasi-inhibiittorina). Solut hajotettiin sonikoimalla kuten kohdassa 3.2.1. Sonikoinnin jälkeen solut sentrifugoitiin (+4 °C, 20 800 g, 5 min). Supernatanteista otettiin näytteet erilleen ja sakat siirrettiin -20 °C:seen.

### 3.3.2 Affiniteettikromatografia

Ensimmäinen puhdistusvaihe oli affiniteettikromatografia. Menetelmä perustuu nikkeli-ionien kiinnittymiseen kelatoija-ligandeihin ja on yleisesti käytetty histidiinihännän sisältävien proteiinien puhdistuksessa. Puhdistusvaiheet tehtiin kuten ohjeessa, paitsi että pesuissa käytettiin kolmea eri imidazole-pitoisuutta; 25, 35 ja 45 mM. Proteiinit eluoiitiin pylvästä 250 mM imidazolella. Kaikista fraktioista määritettiin RT-, endonukleaasi- ja eksonukleaasiaktiivisuudet sekä ajettiin SDS-PAGE.

### *Endonukleaasiaktiivisuusmääritys*

Endonukleasientsyymit pilkkovat DNA:ta/RNA:ta katkaisemalla nukleotidien välisen fosfodiesterisidoksen polynukleotidiketjun sisällä. Proteiinin puhdistumisen kannalta on tärkeää päästä eroon kontaminoivista endonukleaaseista, jos proteiinia on tarkoitus käyttää DNA:ta/RNA:ta sisältävissä reaktioissa.

RT-aktiivisuusmäärityksen perusteella lisättiin entsyymimäärät 100 ja 200 U 50 µl:aan endonukleaasiaktiivisuusmäärityksestä, joka sisälsi 1 µl ΦX174 RF I DNA:ta, 5 µl 10x RT-reaktiopuskuria ja 44 µl Milliporen milliQ-vettä. Näytteitä inkuboitii +37 °C:ssa kaksi tuntia, minkä jälkeen ne ajettiin agarosigeelielektroforeesilla. Geelistä määritettiin UV-valossa oliko ΦX174 RF I hajonnut eli muuttunut muotoon RF II. Hajoamattomassa muodossa geelillä näkyy kaksi vyöhykettä. Kun endonukleasit ovat pilkkoneet DNA:n/RNA:n, havaitaan kolme vyöhykettä: superkierteinen muoto, lineaarinen muoto keskellä ja avoin rengas muoto.

### *Eksonukleaasiaktiivisuusmääritys*

Eksonukleasit hajottavat DNA/RNA-molekyylin ketjuja joko 3'- tai 5'-päästä. Eksonukleaasiaktiivisuusmäärityksessä substraattina toimii <sup>3</sup>H-leimattu DNA. *E. coli* thy -kanta kasvatetaan alustassa, joka sisältää radioaktiivisesti leimattua tymiiniä. Näin kasvatuksen jälkeen eristetty DNA on kauttaaltaan leimattu tritiodulla tymiinillä.

50 µl:n eksonukleaasiaktiivisuusmäärityksessä käytettiin 2 µl leimattua kaksijuosteista DNA:ta sekä 2 µl yksijuosteista DNA:ta, jota saatiin inkuboimalla edellistä +100 °C:ssa viisi minuuttia. Mukana määrityksessä oli 5 µl 10x RT-reaktiopuskuria ja 41 µl milliQ-vettä. 50 µl:n reaktiot tehtiin 100 ja 200 U entsyymimäärillä. Reaktioaika oli neljä tuntia +37 °C:ssa. Inkuboinnin jälkeen lisättiin 100 µl herring sperm DNA:ta ja 150 µl 20 % TCA:ta. Näytteitä pidettiin jäissä viisi minuuttia, minkä jälkeen ne sentrifugoitiin (+4 °C, 20 800 g, 5 min). Putkista pipetoitiin varovasti sakkaan koskematta 150 µl näytteet 2,5 ml:aan nestetuiketta. Näytteiden radioaktiivisuus määritettiin nestetuikelaskimella.

### 3.3.3 Q-anioninvaihtokromatografia HiTrap

Q-pylvään tarkoituksena oli poistaa proteiinista eksonukleasit. Ni-NTA-pylväästä kerätyt eluutiofraktiot yhdistettiin ja näyte laimennettiin Q/S-sefaroosi-laimennospuskurilla (20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 0,2 % NP-40, 5 % glyseroli, pH 7,5) vastaamaan Q/S-sefaroosi A-puskurin (20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 0,2 % NP-40, 5 % glyseroli, 0,1 M NaCl, pH 7,5) johtokykyä. Näyte syötettiin A-puskurilla tasapainotettuun Amersham Biosciencesin Q-HiTrap-pylvääseen (HiTrap™ IEX Selection kit, 17-6002-33, 1 ml) virtausnopeudella 5 ml/min. Syötön jälkeen pylvästä pestiin A-puskurilla samalla keräten 10 ml:n fraktioita. Eksonukleasit eluoutuivat suoraan läpitulleen proteiinin jälkeen lineaarisella 0,1 M - 1 M NaCl-gradientilla (B-puskuri: 20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 0,2 % NP-40, 5 % glyseroli, 1 M NaCl, pH 7,5). Syötöstä ja kaikista fraktioista määritettiin RT- ja eksonukleasiaktiivisuudet.

### 3.3.4 SP-kationinvaihtokromatografia

SP-kationinvaihtokromatografian tarkoituksena oli endonukleasien poistaminen. Edellisessä vaiheessa kerätyistä fraktioista yhdistettiin ne, joissa oli eniten RT-aktiivisuutta, mutta ei eksonukleasiaktiivisuutta. Näytteen johtokyky tarkistettiin A-puskurin tasolle, minkä jälkeen se syötettiin A-puskurilla tasapainotettuun SP Sepharose fast flow -pylvääseen (GE Healthcare, 7 ml). Pylvästä pestiin A-puskurilla ja näyte eluoiitiin suolagradientilla kuten edellisessä vaiheessakin samalla keräten 2 ml fraktioita virtausnopeudella 10 ml/min. Eluointiprofiilin perusteella valittiin fraktiot, joista määritettiin RT- ja endonukleasiaktiivisuudet. Tuloksista nähtiin mitkä fraktiot pystyttiin yhdistämään, konsentroimaan ja säilömään glyserolissa -20 °C:seen.

## 3.4 Proteiinin karakterisointi

### 3.4.1 Aktiivisuusmääritykset

Kaikille puhdistetuille entsyymeille tehtiin RT-aktiivisuusmääritykset (kuten kohdassa 3.2.1), joiden perusteella saatiin selville, kuinka paljon entsyymeissä oli aktiivisuutta (U) konsentroidin jälkeen. Tämän perusteella pystyttiin tekemään endo- ja eksonukleasiaktiivisuusmääritykset (kuvattu kohdassa 3.3.2) 100 ja 200 U entsyymimäärillä sekä ajamaan 200 U näytteet SDS-PAGE:lla.

### 3.4.2 Dystrophin-geenin monistus RT-PCR:n avulla

Tällä funktionaalisella testillä todettiin puhdistetun RT+His -entsyymin kyky tehdä DNA-juoste pitkästä RNA-molekyylistä. Vertaamalla testissä mukana olleeseen kontrollientsyymiin, kaupalliseen M-MuLV RNase H<sup>+</sup> RT:iin, nähtiin vaikuttiko M-MuLV RT:iin liitetty His-tag -sekvenssi entsyymin toimintaan. Templaattina oli ihmisen luurankolihasotaali-RNA, koska siinä tiedettiin olevan 6 kb:n dystrophin-mRNA.

#### *cDNA-synteesi*

20 µl:n cDNA-synteesireaktioissa käytetyt ihmisen luurankolihasotaali-RNA-määrät olivat 500 ja 50 ng. Ensin tehtiin RNA-laimennosten, alukkeena toimineen oligo d(T)<sub>15</sub>:n ja nukleotidien alkudenaturaatio taulukon 1 mukaisesti, +65 °C:ssa viiden minuutin ajan, minkä jälkeen näytteet siirrettiin heti jälle.

**Taulukko 1.** RNA-laimennosten, oligo d(T):n ja nukleotidien alkudenaturaatio

Reagenssi	Pipetoitu tilavuus	Pitoisuus reaktiossa
RNA-laimennos 250 / 25 ng/µl	2 µl	500 / 50 ng
100 ng/µl oligo d(T) <sub>15</sub> Finzymes Oy	1 µl	100 ng
10 mM dNTP-seos Finzymes Oy	1 µl	0,5 mM
H <sub>2</sub> O	6 µl	-

Taulukossa 2 esitetyt cDNA-synteesireaktiot tehtiin kahdella eri entsyymipitoisuudella. Alkudenaturaation jälkeen putkiin lisättiin RNase H -inhibiittoria, puhdistettua entsyymiä, RT-reaktiopuskuria ja milliQ-vettä niin, että kokonaistilavuudeksi reaktioille tuli 20 µl.

**Taulukko 2.** cDNA-synteesireaktiot

Reagenssi	Pitoisuus reaktiossa 1	Pitoisuus reaktiossa 2	Pitoisuus reaktiossa 3
10x RT-puskuri	1x	1x	1x
RNase H -inhibiittori 33,8 U/µl	20 U	20 U	20 U
M-MuLV 200 U/µl Finzymes Oy	150 U	-	-
RT+His 75 U/µl	-	75 U	150 U

Taulukossa 3 on esitetty PCR-ajo-ohjelma cDNA-synteesille, minkä jälkeen 20 µl:n reaktiot laimennettiin milliQ-vedellä 50 µl:ksi.

**Taulukko 3.** cDNA-synteesiohjelma PCR-laitteessa

	Lämpötila °C	Aika
1.	25	10 min
2.	40	30 min
3.	85	5 min
4.	4	∞

#### End-point RT-PCR

Kustakin cDNA-synteesireaktiosta monistettiin kahdella rinnakkaisella PCR:illa 6 kb:n dystrophin-amplikonit. 50 µl:n reaktioihin tuli 45 µl reaktioseosta ja 5 µl templaattina toiminutta cDNA:ta. Taulukossa 4 on nähtävissä pipetoidut reagenssit reaktioseokseen ja taulukossa 5 on PCR-ajo-ohjelma.

**Taulukko 4.** Reaktioseos 50 µl RT-PCR-reaktioon

Reagenssi	Pipetoitu tilavuus	Pitoisuus reaktiossa
5x HF-puskuri Finnzymes Oy	10 µl	1x
25 µM dys6upper-aluke (CTA AAA CGC CAA GTA CAA CAA CAT AAG GTG) MWG-Biotech AG	1 µl	0,5 µM
25 µM dys6lower-aluke (TGA TCA AGC AGA GAA AGC CAG TCG GTA AGT) MWG-Biotech AG	1 µl	0,5 µM
10 mM dNTP-seos Finnzymes Oy	1 µl	0,2 mM
Phusion Hot Start 2 U/µl Finnzymes Oy	0,5 µl	1 U
H <sub>2</sub> O	31,5 µl	-

**Taulukko 5.** PCR-ohjelma

	Lämpötila °C	Aika
1.	98	30 s
2.	98	10 s
3.	72	4 min
4.	takaisin kohtaan 2.	39 kertaa
5.	72	5 min
6.	10	∞

PCR-ajon jälkeen näytteisiin lisättiin 15 µl DNA Loading Dye -puskuria ja ne ajettiin 1 % agarosigeelielektroforeesilla. Tulokset havainnoitiin AlphaDigiDoc-kameralla.

### 3.4.3 Funktionaalinen testi qRT-PCR:n avulla

Tässä testissä tutkittiin puhdistettujen entsyymien kykyä toimia monistettaessa RNA:ta eri pitoisuuksilla. Reaktiot tehtiin RT+His-entsyymille sekä kahdelle fuusioproteiinille. RNA-laimennokset, 500, 250, 50, 5, 0,5, 0,05 ja 0,005 ng/µl, valmistettiin ihmisen HeLa-soluista eristetystä totaali-RNA:sta 10 ng/µl hiivan tRNA-liuokseen.

#### *cDNA-synteesi*

20 µl:n cDNA-synteesireaktioissa käytetyt HeLa RNA-määrät olivat 1 µg, 500 ng, 100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg ja 10 pg. Nollanäytteissä RNA korvattiin milliQ-vedellä. Kaikkien neljän entsyymien pitoisuus reaktiossa oli 150 U. Taulukossa 6 esitetty cDNA-synteesi-esiseos jaettiin putkiin, 18 µl/reaktio, joihin lisättiin 2 µl HeLa RNA-laimennosta.

**Taulukko 6.** 1x esiseos cDNA-synteesiin

Reagenssi	Pitoisuus reaktiossa
2x RT-puskuriseos Finnzymes Oy	1x
random hexameeriseos 300 ng/µl Finnzymes Oy	300 ng
RNase H -inhibiittori 33,8 U/µl	20 U
entsyymi	150 U

Taulukossa 7 on nähtävissä cDNA-synteesiohjelma PCR-laitteessa. Ajon jälkeen 20 µl:n reaktiot laimennettiin milliQ-vedellä 70 µl:ksi.

**Taulukko 7.** cDNA-synteesiohjelma PCR-laitteessa

	Lämpötila °C	Aika
1.	25	10 min
2.	37	30 min
3.	85	5 min
4.	4	∞



*qRT-PCR*

Kustakin cDNA-synteesireaktiosta monistettiin qPCR:illa, käyttäen SYBR® Green I kemialla, kolmena rinnakkaisena 141 bp:n kokoinen CALM1-amplikoni. 20 µl:n reaktioihin tuli 15 µl esiseosta (taulukko 8.) ja 5 µl templaattina toiminutta cDNA:ta.

**Taulukko 8.** 1x qPCR -esiseos

Reagenssi	Pipetoitu tilavuus	Pitoisuus reaktiossa
2x DyNAmo Hot Start mastermix Finnzymes Oy	10 µl	1x
25 µM CALM1 FW-aluke (GGC ATT CCG AGT CTT TGA CAA) MWG-Biotech AG	0,4 µl	0,5 µM
25 µM CALM1 REV-aluke (CCG TCT CCA TCA ATA TCT GCT) MWG-Biotech AG	0,4 µl	0,5 µM
H <sub>2</sub> O	4,2 µl	-

96-kuoppalevyille pipetoidut reaktiot sentrifugoitiin pikaisesti ja levy asetettiin MJ Researchin DNA Engine Opticon 2 System -qPCR-laitteeseen. Ohjelma tapahtui taulukon 9 mukaisesti.

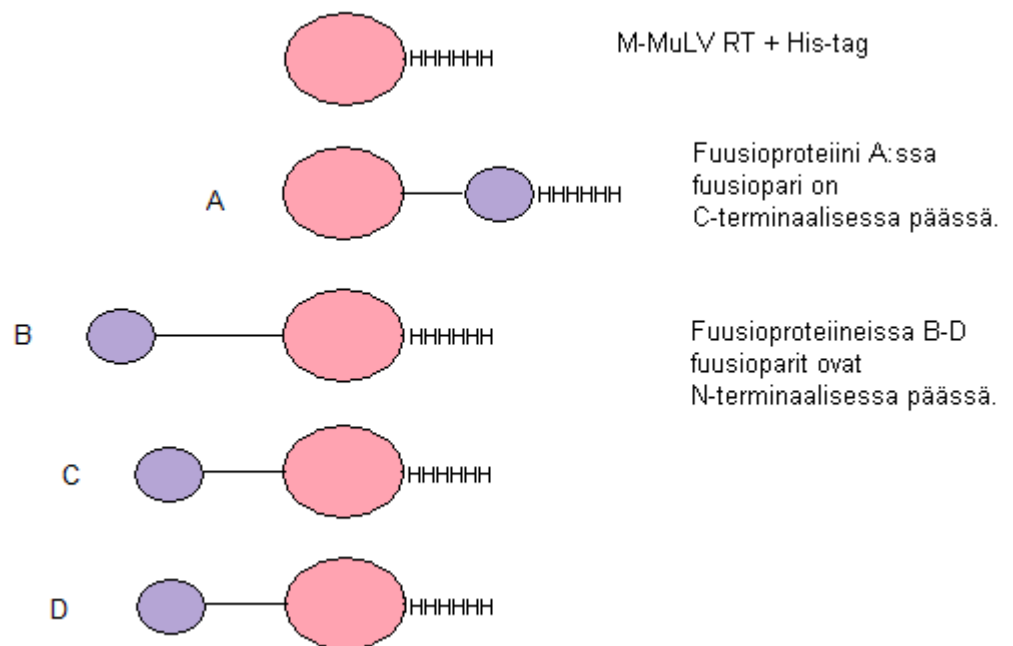
**Taulukko 9.** Ohjelma qPCR-ajossa

qPCR-ajo-ohjelma	
1.	95 °C 15 min
2.	95 °C 10 s
3.	54 °C 30 s
4.	72 °C 30 s
5.	fluoresenssin lukeminen
6.	80 °C 1 s
7.	fluoresenssin lukeminen
8.	takaisin kohtaan 2. 39 kertaa
9.	72 °C 10 min
10.	sulamiskäyräanalyysi 65 °C:sta 95 °C:een, fluoresenssin lukeminen 0,2 °C:n välein 2 s viiveellä
11.	30 °C 10 s

## 4 TULOKSET JA NIIDEN TULKINTA

### 4.1 Kloonauus

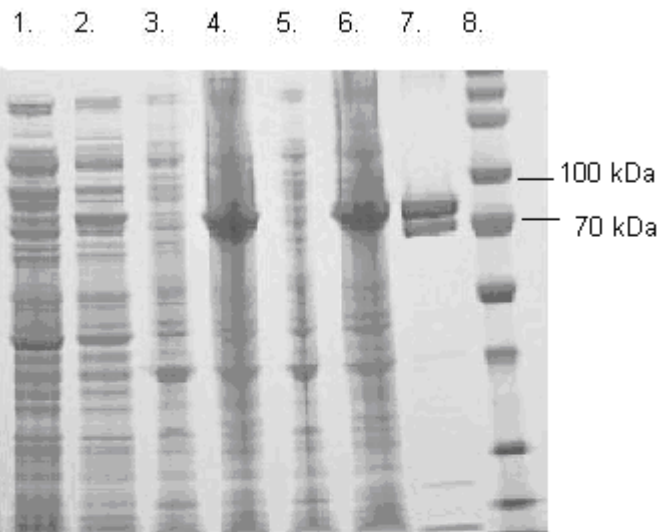
Kaikki viisi geeniä onnistuttiin tuottamaan PCR:n avulla. Pesäke-PCR:n perusteella löydettiin oikeat transformanttipesäkkeet, joista pystyttiin eristämään pET21a+RT+His -konstrukti sekä neljä eri fuusiota. Sekvensointitulosten perusteella kaikki kloonaukset olivat onnistuneet. Kuvassa 4 on havainnollistettu fuusioproteiinien rakentuminen.



**Kuva 4.** Viisi eri M-MuLV-konstruktia. Punainen pallo kuvaa RT-osaa ja lilat pallot fuusiopareja. Viivat, joilla lilat pallot ovat kiinni RT:ssa, kuvaavat linkkereitä, joiden pituus vaihtelee eri fuusioiden välillä. H-kirjaimet tarkoittavat kuuden histidiinin häntää, His-tag-sekvenssiä.

## 4.2 Proteiinin tuotto

Testikasvatukset tehtiin RT+His -konstruktille +37 ja +30 °C:ssa. Tämän perusteella todettiin, että proteiini tuottui hieman paremmin +30 °C:ssa kuin +37 °C:ssa. RT-aktiivisuutta oli induktion jälkeen otetuissa näytteissä eikä ennen induktiota. SDS-PAGE:n mukaan, kuvassa 5, on nähtävissä oikean kokoinen proteiini verrattaessa vyöhykkeitä kaupalliseen M-MuLV RT:iin noin 70 kDa:n kohdalla. Vahvemmat vyöhykkeet ovat sakkasuspensioissa, eli suurin osa proteiinista tuottui ei-liukoisessa muodossa. Kaupallisella M-MuLV RT:lla näkyy geelillä kaksi vyöhykettä. Tämä mahdollisesti johtuu proteiinin puhdistuksen yhteydessä tapahtuvasta proteolyytisestä pilkkoutumisesta.



1. 0-näyte supernatantista ennen induktiota
2. näyte supernatantista +30 °C 4 h induktion jälkeen
3. 0-näyte sakkasuspensiosta ennen induktiota
4. näyte sakkasuspensiosta +37 °C 4 h induktion jälkeen
5. 0-näyte sakkasuspensiosta ennen induktiota
6. näyte sakkasuspensiosta +30 °C 4 h induktion jälkeen
7. kaupallinen M-MuLV RT (Finnzymes Oy)
8. ProSieve QuadColor Protein Marker 4,6 - 300 kDa

**Kuva 5.** 4 - 12 % SDS-PAGE:lla ajetut RT+His:n testikasvatusnäytteet.

Kun fuusioproteiineja tuotettiin +37 ja +30 °C:ssa, neljän tunnin induktiossa, niiden RT-aktiivisuudet olivat erittäin vähäiset. Kokeilemalla kasvatuksia +16 °C:ssa yön yli induktiossa, aktiivisuudet paranivat. Tuottolämpötila vaikutti fuusioiden liukoisuuteen.

Taulukossa 10 on esitetty proteiinien ekspressio-olosuhteet. Matalammassa lämpötilassa solut jakaantuvat hitaammin, joten silloin tarvitaan pidempi induktioaika suurempien solumassojen saamiseksi. Suurentamalla fuusioproteiinien kasvatustilavuutta saatiin myös enemmän lähtömateriaalia puhdistusten aloittamiseksi.

**Taulukko 10.** Proteiinien tuottumisolosuhteet

Proteiini	Lämpötila	Aika	Kasvatustilavuus	Lähtömateriaalin aktiivisuus
RT+His	30 °C	4 h	1 l	++
fuusiot	16 °C	yön yli	4,5 l	+

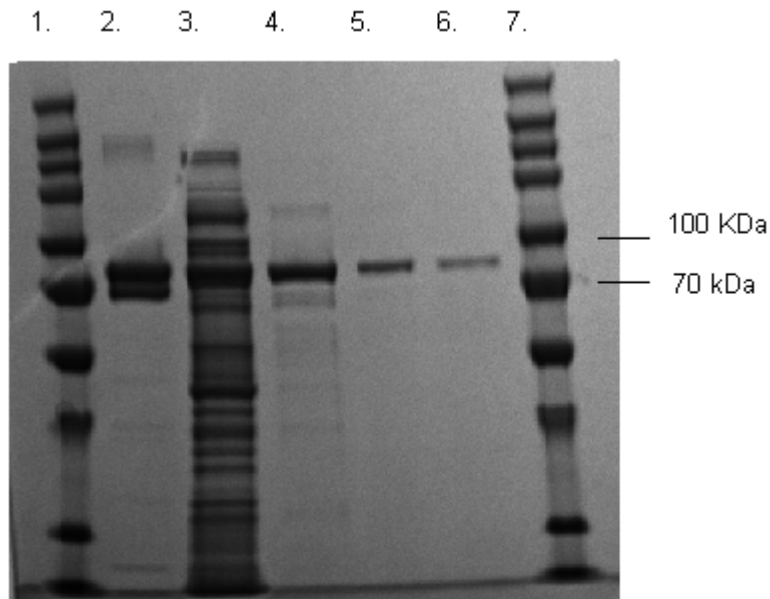
Fuusioproteiinit tarvitsivat erilaiset kasvatusolosuhteet verrattuna RT+His-versioon. Tämä kertoo siitä, että fuusio on vaikuttanut proteiinin ominaisuuksiin. Sillä ei ollut merkitystä, oliko fuusiopari N- vai C-terminaaliosassa päässä tai minkälainen linkkeri oli. Kaikki konstruktit tuottivat aktiivista entsyymiä. Suurentamalla kasvatustilavuutta lisää, kokeilemalla eri induktiolämpötiloja ja -aikoja sekä optimoimalla kasvatusalustan koostumusta, saataisiin mahdollisesti enemmän liukoista proteiinia.

### 4.3 Proteiinin puhdistus

Tässä osiossa on esimerkinomaisesti kerrottu RT+His -proteiinin puhdistuksesta, koska kaikkien fuusioproteiinien puhdistaminen noudatti samaa protokollaa.

#### 4.3.1 Affiniteetikromatografia

Kuvassa 6 on esitetty SDS-PAGE:lla ajetut RT+His:n fraktiot Ni-NTA-pylvään jälkeen. Vertaamalla kaivoissa 4 - 6 olevien eluutiofraktioiden vyöhykkeitä kaivossa 3 olevaan alkuperäiseen näytteeseen, nähdään kuinka paljon proteiini on puhdistunut affiniteetikromatografian avulla. Molekyylibiologisia sovelluksia haittaavat endo- ja eksonukleaasit eivät poistuneet aktiivisuusmääritysten perusteella Ni-NTA:n avulla, joten puhdistusta jatkettiin kyseisten nukleaasien poistamiseksi.



1. ProSieve QuadColor Protein Marker 4,6 - 300 kDa
2. kaupallinen M-MuLV RT (Finnzymes Oy)
3. alkuperäinen näyte
4. 1. fraktio (3 ml), 250 mM imidazole
5. 2. fraktio (3 ml), 250 mM imidazole
6. 3. fraktio (3 ml), 250 mM imidazole
7. ProSieve QuadColor Protein Marker 4,6 - 300 kDa

**Kuva 6.** SDS-PAGE:lla ajetut RT+His:n eluutiofraktiot Ni-NTA-pylvään jälkeen.

#### 4.3.2 Q-anioninvaihtokromatografia HiTrap

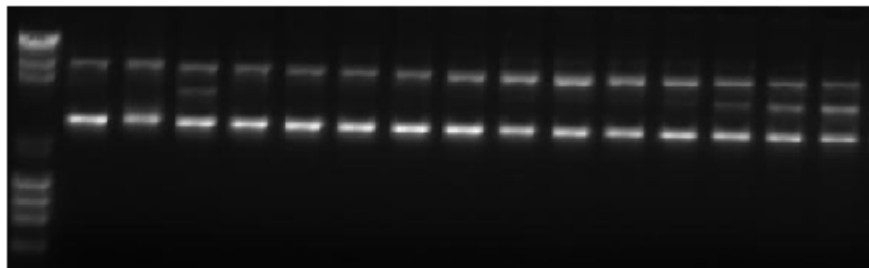
Ni-NTA -pylvään jälkeen yhdistetyt kolme eluutiofraktiota laimennettiin laimennospuskurilla vastaamaan A-puskurin johtokykyä ~12 mS/m. Näin saadun näytteen tilavuudeksi tuli ~30 ml. Q-pylvään tarkoituksena oli poistaa näytteestä eksonukleaasit. Puhdistettava proteiini tuli suoraan läpi eikä aiheuttanut selkeästi nähtävää piikkiä eluointiprofiilissa. Oletettavasti tämä johtui liian vähäisestä proteiinimäärästä, mikä olisi nostattanut absorbanssia verrattuna puskurissa olevien detergenttien absorboimiseen. Kymmenestä kerätystä fraktiosta yhdistettiin fraktiot 2 - 6, joiden yhteiseksi tilavuudeksi tuli ~50 ml. Aktiivisuusmäärityksen perusteella eksonukleaasit eluoutuivat fraktiosta 7 eteenpäin.

### 4.3.3 SP-kationinvaihtokromatografia

SP-sefaroosi-pylväs puhdisti proteiinit osittain endonukleaaseista (tuloksiin palataan kohdassa 4.4.1). Eluointiprofiilissa ei ollut selkeästi nähtävissä eroa, missä itse proteiini eluoi ja missä endonukleaasit, koska ne eluoutuivat melkein samassa kohdassa suolagradientissa. Aktiivisuusmäärittäisiin otettiin fraktiot, jotka osuivat oletetun eluointipiikin kohdalle.

Kuvassa 7 näkyy, että 13. kaivossa olevassa fraktiossa 17 on kolme vyöhykettä ja samoin siitä eteenpäin kaikissa muissakin fraktioissa. Tämä kertoo siitä, että fraktioissa olleet endonukleaasit olivat pilkkoneet  $\Phi$ X174 DNA:n RF I -muodon muotoon RF II.

1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8. 9. 10. 11. 12. 13. 14. 15. 16.



1. DNA-markkeri:  $\lambda$ -DNA – Hind III ja  $\Phi$ X174-DNA – Hae III sekoitus (Finnzymes Oy)
2. 0-näyte ilman entsyymiä
3. kaupallinen M-MuLV RT (Finnzymes Oy)
4. alkuperäinen näyte
5. pylvään pesun aikana läpi virrannut liuos
- 6.-16. fraktiot 10 - 20

**Kuva 7.** AGE:lla ajetut endonukleasimäärittämissäytteet SP-sefaroosi -pylvään jälkeen.

Taulukossa 11 on esitetty fraktioiden 10 - 20 RT-aktiivisuusmäärittelyn CPM-arvot sekä (-/+) -merkkien avulla havainnollistettu endonukleaasien määrää. Endonukleaasien takia hylättyjen fraktioiden myötä menetettiin paljon entsyymiaktiivisuutta.

**Taulukko 11.** Fraktioiden 10 - 20 CPM-arvot sekä endonukleaasit. (-)-merkki tarkoittaa, että endonukleaaseja ei ole, (+)-merkit kuvaavat niiden havaittua määrää endonukleaasimäärittelyssä.

| Fraktio | CPM   | Endonukleaasit |
|---------|-------|----------------|
| 10      | 6476  | -              |
| 11      | 7073  | -              |
| 12      | 12982 | -              |
| 13      | 16034 | -              |
| 14      | 17689 | -              |
| 15      | 18524 | -              |
| 16      | 13713 | -              |
| 17      | 17425 | +              |
| 18      | 18720 | ++             |
| 19      | 16036 | +++            |
| 20      | 13701 | +++            |

Aktiivisuusmäärittelysten perusteella fraktiot 11 - 16 yhdistettiin ja konsentroititiin 12 ml:n tilavuudesta 1 ml:ksi. Puhdistusten yhteydessä ei käynyt ilmi, oliko fuusioparin sijainnilla tai linkkereillä merkitystä entsyymien ominaisuuksille, koska kaikki käyttäytyivät samalla tavalla.

#### 4.4 Proteiinin karakterisointi

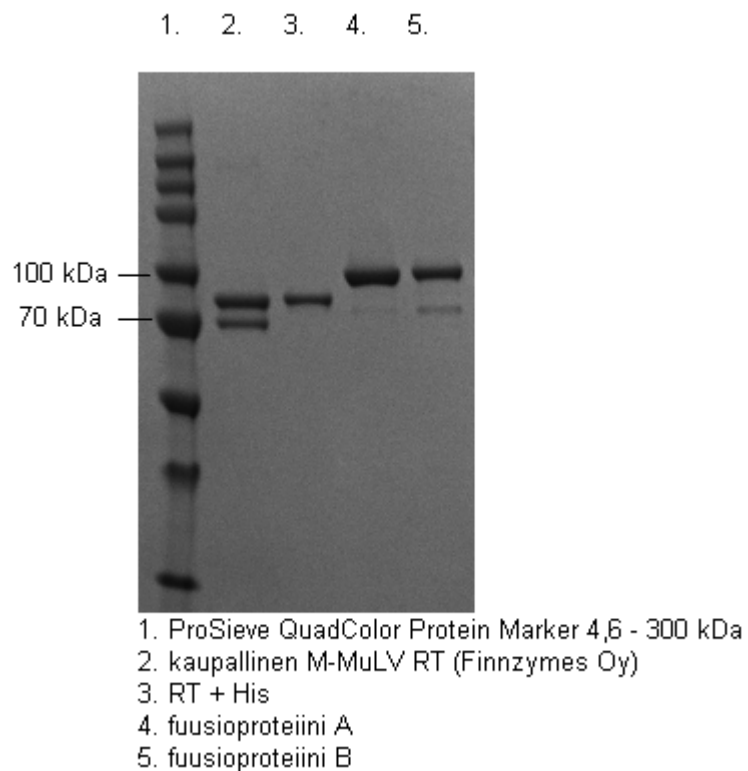
##### 4.4.1 Aktiivisuusmäärittelyt

Kaikkien kolmen puhdistetun entsyymien RT-aktiivisuudet määritettiin tekemällä eri entsyymilaimennoksia. Mukana määrittelyssä olleeseen kaupalliseen M-MuLV RT:iin vertaamalla pystyttiin toteamaan tulosten luotettavuus. RT+His:n aktiivisuudeksi tuli 75 U/μl, fuusioproteiini A:n 300 U/μl ja fuusioproteiini B:n 100 U/μl.

Vaikka puhdistusten aikana valittiin ne fraktiot, joissa ei ollut endo- eikä eksonukleaaseja, konsentroidin jälkeen tehdyissä aktiivisuusmäärittelyissä kävi ilmi, että kyseisiä nukleaaseja oli edelleen. Määrät olivat kuitenkin vähäisiä ja hyvin lähellä kaupallisen M-MuLV RT:n laadunvalvontakriteerejä, joten niistä huolimatta siirryttiin tekemään funktionaalisia testejä.

#### 4.4.2 SDS-PAGE

Ajamalla näytteet 4 - 12 % SDS-PAGE:lla 200 U entsyymimäärillä pystyttiin silmämääräisesti arvioimaan proteiinimääriä. Kuvasta 8 voi tarkastella ajautuneiden vyöhykkeiden leveyttä. Fuusioproteiini A:lla on voimakkaimmin värjäytynyt vyöhyke, mikä kertoo heikoimmasta spesifisestä aktiivisuudesta (U/mg). Kaupallisella M-MuLV RT:ssa on kaksi vyöhykettä, mutta His-tag -versiolla vain yksi. Ero johtuu affiniteettikromatografiasta, jota ei käytetä kaupallisen tuotteen puhdistuksessa. Affiniteettikromatografia puhdistaa vain täysipitkät proteiinit.



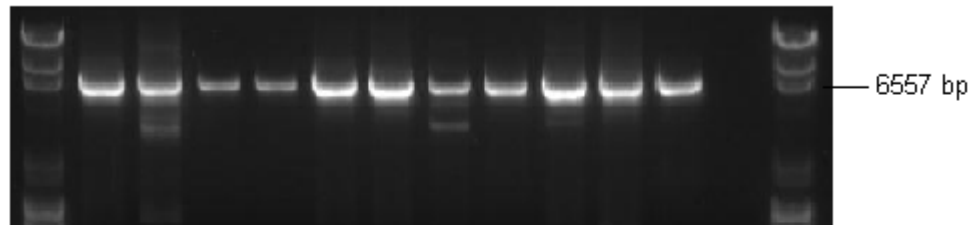
**Kuva 8.** SDS-PAGE-kuva puhdistetuista entsyymeistä



#### 4.4.3 *Dystrophin-geenin monistus RT-PCR:n avulla*

Dystrophin-geenin monistus onnistui kummallakin sekä entsyymi- että RNA-määrällä, mistä kertoo kuvassa 9 näkyvät vyöhykkeet 6 kb:n kohdalla. Ainoastaan toinen rinnakkaisista 150 U entsyymimäärällä monistetusta 50 ng RNA:sta ei onnistunut. His-tag ei vaikuttanut M-MuLV RT:n kykyyn monistaa 6 kb:n amplikoni. Mikäli se olisi vaikuttanut entsyymin ominaisuuksiin, tämä olisi tullut ilmi käännettäessä näin pitkää mRNA-molekyyliä. Nyt kun tiedettiin, että His-tag ei haitannut M-MuLV RT:a, pystyttiin jatkamaan histidiini-hännällisten fuusioproteiinien tuottamista.

1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8. 9. 10. 11. 12. 13.

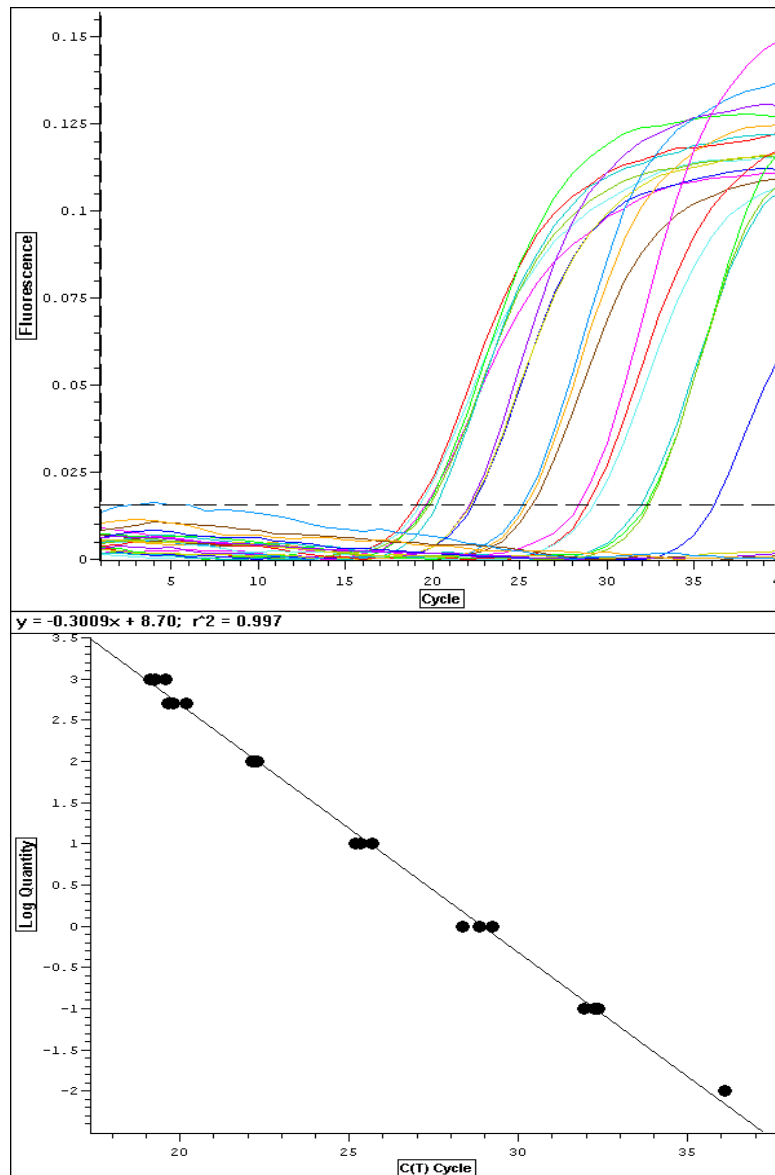


1. DNA-markkeri:  $\lambda$ -DNA – Hind III ja  $\Phi$ X174-DNA – Hae III sekoitus, (Finnzymes Oy)
- 2.-3. kaupallinen M-MuLV RT, 500 ng RNA:ta
- 4.-5. kaupallinen M-MuLV RT, 50 ng RNA:ta
- 6.-7. 75 U RT+His, 500 ng RNA:ta
- 8.-9. 75 U RT+His, 50 ng RNA:ta
- 10.-11. 150 U RT+His, 500 ng RNA:ta
- 12.-13. 150 U RT+His, 50 ng RNA:ta

**Kuva 9.** AGE:lla ajetut 6 kb:n dystrophin-amplikonit

#### 4.4.4 *Funktionaalinen testi qRT-PCR:n avulla*

qRT-PCR-ajossa käytettiin seitsemän HeLa RNA-laimennoksen sarjaa, jonka perusteella pystyttiin piirtämään standardisuora. Tärkeitä parametrejä suoran tarkastelussa olivat tehokkuutta kuvaava kulmakertoimen sekä lineaarisuutta kuvaava korrelaatiokertoimen neliö  $R^2$ . Kuvassa 10 on esitetty RT+His -entsyymin RNA-laimennosten monistuskäyrät sekä standardisuora, joka on vaadittavilta kriteereiltään hyvä. Kulmakertoimen tulisi olla mahdollisimman lähellä lukuarvoa -0,3 ja korrelaatiokertoimen lähellä yhtä. Kulmakertoimen -0,301 vastaa 100 %:n tehokkuutta.

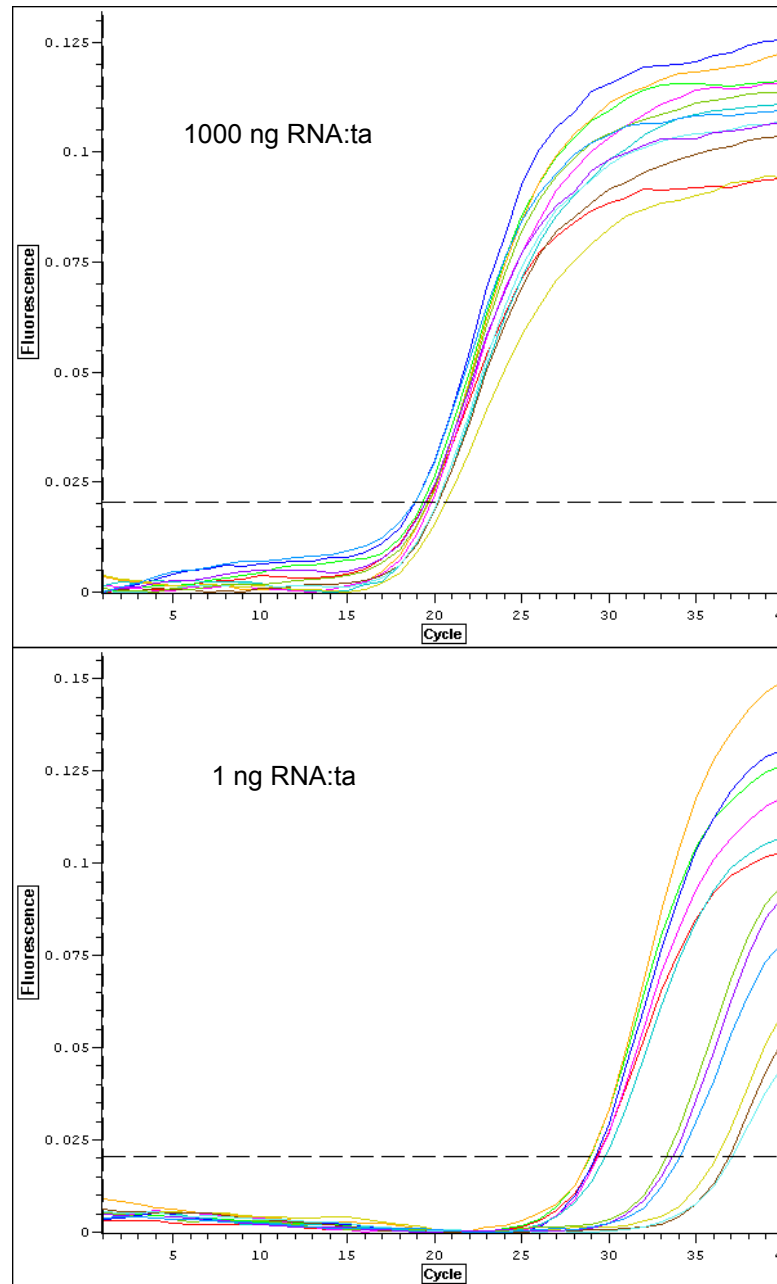


**Kuva 10.** Ylhäällä on nähtävissä RT+His-entsyymien standardilaimennosten monistuskäyrät ja alhaalla niiden perusteella piirretty standardisuora, jonka kulmakerroin on  $-0,3009$  ja  $R^2$  on  $0,997$ . Standardeina toimivat cDNA-synteesissä olleet HeLa RNA-määrät: 1000, 500, 100, 10, 1, 0,1 ja 0,01 ng.

Sulamiskäyräanalyysistä nähtiin, että reaktiossa oli monistunut vain yhtä tuotetta. Sulamiskäyrän derivaatassa oli vain yksi piikki. Nollanäytteissä, joissa ei ollut RNA:ta ollenkaan, ei ollut tapahtunut monistumista.

Kuvassa 11 on esimerkkinä kaikkien entsyymien monistuskäyrät 1000 ja 1 ng RNA-määrillä. Neljällä suurimmalla RNA-pitoisuudella (1000 - 10 ng) monistuminen onnistui kaikkien entsyymien kohdalla. Yhdestä nanogrammasta eteenpäin toiminta selkeästi heikkeni. RT+His toimi tässäkin testissä samalla tavalla kuin kontrollina ollut kaupallinen M-MuLV

RT. Molemmat pystyivät monistamaan RNA:ta myös kaikista pienimmillä pitoisuuksilla.



**Kuva 11.** Kaikkien entsyymien monistuskäyrät 1000 ja 1 ng HeLa RNA-määrillä. Katkoviiva kuvaa kynnystasoa.

Kuvassa 11 alemmista monistuskäyristä näkee, kuinka Ct-arvot myöhästyvät toisistaan. Ct-arvo tulee kohdasta, jossa monistuskäyrä leikkaa kynnystason. RT+His:n ja kontrollin käyrät leikkaavat kynnystason aikaisemmin, joten niillä on pienemmät Ct-arvot. Myöhemmin nousevat käyrät kuuluvat fuusioproteiineille. Suuremmat Ct-arvot kertovat, että fuusiot eivät pystyneet kääntämään mRNA:ta cDNA:ksi yhtä tehokkaasti HeLa RNA-määrien

ollessa vähäiset. Tähän voivat vaikuttaa endo- ja eksonukleaasit, joita ei puhdistusten yhteydessä saatu täysin pois. Työtä jatketaan tarkempien tulosten saamiseksi.

## 5 YHTEENVETO

Tämän työn tavoitteena oli kloonata, tuottaa ja karakterisoida RT-fuusioproteiini. Tarkoituksena oli tutkia, kuinka M-MuLV-käänteistranskriptaasin ominaisuudet muuttuvat, kun siihen liitetään toinen proteiini eri pituisilla ja eri aminohappokoostumuksen omaavilla linkkereillä. Ominaisuuksia, joihin haluttiin vaikuttaa, olivat muun muassa termostabiilisuus, prosessiivisuus ja fideliteetti.

M-MuLV RT -geeni siirrettiin ligaatioreaktiolla pET21a-vektoriin samaan lukukehykseen His-tag-sekvenssin kanssa. RT+His-plasmidi transformoitiin kompetentteihin XL1Blue-soluihin, jotka lopuksi maljattiin LB-amp-maljoille. Maljoilta etsittiin pesäke-PCR:n avulla pesäkkeet, joissa insertti oli oikein liittyneenä vektoriin. Sekvensoimalla tarkistettiin, että PCR:ssa ei ollut tapahtunut virheitä. Oikeaksi todettuun RT+His-plasmidiin liitettiin pieni proteiini neljällä eri linkkerillä edellä kuvatun menetelmän avulla. Tuloksena oli neljä erilaista fuusiokonstruktia; yhdessä fuusiopari oli C-terminaalisisä päässä ja kolmessa muussa N-terminaalisisä päässä.

RT+His ja fuusiot transformoitiin kompetentteihin BL21 (DE3) -soluihin, jotka indusoitiin tuottamaan proteiinia IPTG:n avulla LB-amp-kasvatusalustassa. Testikasvatusten perusteella proteiinit tuottuivat enemmän ei-liukoisessa muodossa. Tuottuakseen fuusioproteiinit tarvitsivat matalamman induktiolämpötilan ja sen myötä pidemmän induktioajan kuin pelkkä M-MuLV RT. Erilaisten tuottumisolosuhteiden perusteella fuusiopari oli muuttanut entsyymien liukoisuusominaisuuksia. RT-aktiivisuutta oli kaikilla konstruktilla, joten siihen ei vaikuttanut, oliko fuusiopari N- vai C-terminaalisisä päässä ja millainen linkkeri oli kyseessä.

Endo- ja eksonukleaasien poistamiseksi proteiineista jouduttiin käyttämään kolmea eri puhdistusvaihetta. Puhdistetut fraktiot yhdistettiin ja konsentroidiin mahdollisimman suuren entsyymiaktiivisuuden saamiseksi. Konsentroidin jälkeen tehdyissä määrityksissä tuli ilmi, että kontaminoivia nukleaaseja oli

edelleen kaikissa näytteissä. Niistä huolimatta proteiinien karakterisointia jatkettiin.

Tässä työssä affiniteettikromatografia suoritettiin käytetyn Ni-NTA-pylvään valmistajan ohjeiden mukaisesti. Puhdistusolosuhteita optimoimalla affiniteettikromatografia yksinään voisi riittää. Esimerkiksi imidazolepitoisuuksia voisi vaihdella, pesujen määrää muuttaa tai kolonnin tilavuutta suurentaa. Jos puhdistaminen aloitettaisiin suuremmasta solumassasta, proteiinit tuottuisivat enemmän liukoisessa muodossa, ja puhdistusvaiheiden jälkeen olisi enemmän aktiivista proteiinia. Kun tuotetta olisi enemmän, puhtaiden fraktioiden kerääminen olisi helpompaa.

Puhdistettujen entsyymien toimintaa testattiin end-point RT-PCR:n ja qRT-PCR:n avulla. M-MuLV RT:n, johon oli liitetty pelkästään His-tag, ominaisuudet eivät olleet muuttuneet verrattuna kaupalliseen versioon. RT+His pystyi kääntämään 6 kb:n dystrophin-mRNA:n sekä HeLa RNA:ta kaikista pienimmillään pitoisuuksilla endo- ja eksonukleaaaseista huolimatta. Sen sijaan fuusioproteiinit käyttäytyivät eri lailla käännettäessä pieniä RNA-määriä. Saadut tulokset vaativat jatkotutkimuksia.

Tämän opinnäytetyön aikana ei ehditty tehdä kaikkia karakterisointiin liittyviä kokeita, esimerkiksi entsyymien termostabiilisuuDET jäivät tutkimatta, mutta työtä tullaan jatkamaan. Yhteenvetona voidaan sanoa, että fuusioilla on merkitystä M-MuLV RT:n ominaisuuksille ja His-tagin liittäminen ei haitannut sen toimintaa. Kokeilemalla eri entsyymimääriä cDNA-synteesissä ja vaihtamalla muitakin reaktio-olosuhteita, suolapitoisuutta, pH:ta tai reaktiolämpötilaa, saadaan enemmän tietoa fuusioiden merkityksistä. Esimerkiksi oikean puskuriliuoksen löytäminen voi vaikuttaa merkittävästi fuusioiden toimintaan.

## VIITELUETTELO

- [1] Suomen Akatemia, *Tutkimuksen vaikuttavuus biotieteiden ja ympäristön tutkimuksen aloilla* [verkkodokumentti]. 2006 [viitattu 26.9.2010]. Saatavissa: [http://www.aka.fi/Tiedostot/Tiedostot/Julkaisut/7\\_06%20BY\\_n%20vaikuttavuusraportti.pdf](http://www.aka.fi/Tiedostot/Tiedostot/Julkaisut/7_06%20BY_n%20vaikuttavuusraportti.pdf).
- [2] Nurminen, Kirsi Pauliina. *Uuden bakteeriperäisen avidiinin sukulaisproteiinin tuottaminen, puhdistus sekä sen ominaisuuksien määrittäminen*. Pro gradu -tutkielma. Jyväskylän yliopisto, 2007.
- [3] Wang, Yan - Prosen, Dennis - Mei, Li - Sullivan, John - Finney, Michael - Vander Horn, Peter. *A novel strategy to engineer DNA polymerases for enhanced processivity and improved performance in vitro*. *Nucleic Acids Research*, 2004, Vol. 32, No. 3, 1197 - 1207.
- [4] Vaheri, Antti - Alitalo, Kari. *Retrovirukset ja ihmisen syöpägeenit* [verkkodokumentti]. 1983 [viitattu 25.8.2010]. Saatavissa: [http://www.terveysportti.fi/d-htm/articles/1983\\_7\\_452-457.pdf](http://www.terveysportti.fi/d-htm/articles/1983_7_452-457.pdf).
- [5] National Health Museum, *Diagram of a Retrovirus* [verkkodokumentti]. [viitattu 28.8.2010]. Saatavissa: <http://www.accessexcellence.org/RC/VL/GG/images/diagram.gif>.
- [6] Heino, Jyrki - Vuento, Matti. *Biokemian ja solubiologian perusteet*. Helsinki, WSOY, 2007, 1. painos.
- [7] Skalka, Anna - Goff, Stephen. *Reverse Transcriptase*. COLD SPRING HARBOR LABORATORY PRESS, 1993.
- [8] Das, Debanu - Georgiadis, Millie. *The Crystal Structure of the Monomeric Reverse Transcriptase from Moloney Murine Leukemia Virus*. Department of Biochemistry and Molecular Biology Indiana University School of Medicine. Elsevier Science Ltd., 2004, *Structure*, Vol. 12, 819 - 829.
- [9] Kotewicz - Sampson - D'Alessio - Gerard. *Isolation of cloned Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase lacking ribonuclease H activity*. *Nucleic Acids Research*, v. 16 (1); Jan 11, 1988.
- [10] Repaske, Roy - Hartley, Janet - Kavlick, Mark - O'Neill, Raymond - Austin, Joan. *Inhibition of RNase H Activity and Viral Replication by Single Mutations in the 3' Region of Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase*. *Journal of Virology*, 1989, p. 1460 - 1464, Vol. 63, No. 3.
- [11] Arezi, Bahram - Hogrefe, Holly. *Novel mutations in Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase increase thermostability through tighter binding to template-primer*. Agilent Technologies, Stratagene Products Division, 2008. *Nucleic Acids Research*, 2009, Vol. 37, No. 2, 473 - 481.
- [12] Finnzymes, *AMV Reverse Transcriptase* [verkkodokumentti]. 2010 [viitattu 1.6.2010]. Saatavissa: [http://www.finnzymes.com/rt-pcr/amv\\_reverse\\_transcriptase.html](http://www.finnzymes.com/rt-pcr/amv_reverse_transcriptase.html)

- [13] Ståhlberg, Anders - Kubista, Mikael - Pfaffl, Michael. *Comparison of Reverse Transcriptases in Gene Expression Analysis* [verkkodokumentti]. 2004 [viitattu 13.10.2010]. Saatavissa: <http://www.clinchem.org/cgi/content/full/50/9/1678>.
- [14] Suominen, Ilari - Ollikka, Pauli. *Yhdistelmä-DNA-tekniikan perusteet*. Hakapaino Oy, Helsinki, Opetushallitus, 2006.
- [15] Department of Biology, Davidson College, *cDNA Production* [verkkodokumentti]. 2002 [viitattu 14.8.2010]. Saatavissa: <http://www.bio.davidson.edu/courses/genomics/method/cDNAproduction.html>
- [16] Finnzymes. *RT-PCR in one step* [verkkodokumentti]. 2010 [viitattu 28.10.2010]. Saatavissa: [http://www.finnzymes.com/rt-pcr/rt-pcr\\_introduction.html](http://www.finnzymes.com/rt-pcr/rt-pcr_introduction.html)
- [17] Finnzymes. *Phusion® RT-PCR Kit* [verkkodokumentti]. 2010 [viitattu 28.10.2010]. Saatavissa: [http://www.finnzymes.com/rt-pcr/Phusion\\_rt-pcr\\_kit.html](http://www.finnzymes.com/rt-pcr/Phusion_rt-pcr_kit.html)
- [18] Finnzymes, Tools for Molecular Biology. *Principles of qPCR*. Edita, 2009.
- [19] Sorri, Virpi. *DNA-polymeraasia inhiboivien proteiinien vertailu*. Pro gradu -tutkielma. Jyväskylän yliopisto, 2009.