



Osaamista
ja oivallusta
tulevaisuuden
tekemiseen

Elisa Mikkonen

Rotaviruksen VP6-antigeenin puhdistusmenetelmän kehitys

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalyttikko (AMK)

Laboratorioanalytiikka

Opinnäytetyö

9.9.2019

Tekijä Otsikko	Elisa Mikkonen Rotaviruksen VP6-antigeenin puhdistusmenetelmän kehitys
Sivumäärä Aika	39 sivua 9.9.2019
Tutkinto	Laboratorioanalyttikko (AMK)
Tutkinto-ohjelma	Laboratorioanalytiikka
Ohjaajat	Teknologiapäällikkö Suvi Eklin (Medix Biochemica) Lehtori Tiina Soininen (Metropolia)
Useiden tärkeiden <i>in vitro</i> -diagnostisten testien toimintaperiaate perustuu vasta-aineiden kykyyn tunnistaa kohdeantigeeni ja sitoutua siihen spesifisesti. Antigeenejä on mahdollista tuottaa korkealaatuisina rekombinanttiproteiineina, joita voidaan käyttää testi- ja kontrolliantigeeneina lääketieteellisissä tutkimuksissa, diagnostiikassa ja diagnostisten testien laadunvalvonnassa. Rotavirus A on yleisin vauvojen ja pienten lasten vakavien ripulitautien aiheuttaja. Rotavirusinfektion rutiinidiagnostiikka perustuu rotavirusantigeenin havaitsemiseen potilasnäytteissä. Rotaviruksen kapsidin immunogeeninen rakenneproteiini, virusproteiini 6 (VP6), on hyvin konservoitunut eri rotavirus A -kantojen välillä, joten se sopii hyvin diagnostiseksi antigeeniksi. Työn tavoitteena oli kehittää rekombinanttisen VP6-antigeenin puhdistusmenetelmää. VP6-antigeeni tuotettiin <i>Escherichia coli</i>ssa (<i>E. coli</i>) fuusioproteiinina, jossa pieni ubiquitiinin tyyppinen modifikaattori (Small Ubiquitin-Like Modifier, SUMO) oli liitetty VP6-proteiiniin. Tuotettu SUMO-VP6-fuusioproteiini puhdistettiin nikkeli(Ni)-affiniteettikromatografialla kahdessa eri vaiheessa. Ensimmäisessä vaiheessa SUMO-VP6-proteiini puhdistettiin lysaattista. Toisessa vaiheessa fuusioproteiinin SUMO-osa pilkottiin fuusioproteiinista entsymaattisesti, minkä jälkeen VP6-proteiini erotettiin irronneesta SUMO-osasta. Lopputuotteen immunoreaktiivisuus määritettiin fluoroimmunoanalyysillä (FIA) ja puhtaus natriumdodekyylisulfaattipolyakryyliamidigeelielektroforeesilla (SDS-PAGE). Tulosten perusteella VP6-antigeenin tuottaminen SUMO-VP6-fuusioproteiinina toimi hyvin, mutta VP6-antigeenin puhdistaminen ei ollut täysin suoraviivaista. VP6-antigeenin luontainen taipumus muodostaa trimeerejä sekä suurempia proteiinikomplekseja hankaloitti puhdistusmenetelmän optimointia. SUMO-VP6-fuusioproteiinin havaittiin eluoituvan gradientin eri vaiheissa, mikä todennäköisesti aiheutui muodostuneiden SUMO-VP6-proteiinikompleksien sisältämien polyhistidiinihäntien erilaisista vuorovaikutuksista Ni-affiniteettipylvään kanssa. Epälineaarisen eluoitumisen vuoksi lopputuotteen saannon maksimoiminen puhdautta heikentämättä oli haastavaa: lopputuotteessa havaittiin epäpuhtauksia ja lopputuotteen immunoreaktiivisuus oli kontrolliin verrattuna selvästi heikompi.	
Avainsanat	rekombinanttiantigeeni, <i>in vitro</i> -diagnostiikka, rotavirus, VP6

Author Title	Elisa Mikkonen Development of the method for purification of Rotavirus VP6 antigen
Number of Pages Date	39 pages 9 September 2019
Degree	Bachelor of Laboratory Services
Degree Programme	Laboratory Sciences
Instructors	Technology manager Suvi Eklin (Medix Biochemica) Senior lecturer Tiina Soininen (Metropolia)
The principle of several important <i>In Vitro</i> diagnostic tests is based on the ability of antibodies to recognize and specifically bind to the target antigen. Antigens can be produced as high-quality recombinant proteins used as both test and control antigens in medical research and diagnostics and as quality controls for diagnostic tests. Rotavirus A is the most common cause of severe diarrhea in infants and young children. Routine diagnostics of rotavirus infection is based on the detection of rotavirus antigen in patient samples. The immunogenic structural protein of the rotavirus capsid, viral protein 6 (VP6), is well conserved between different rotavirus A strains, therefore it is well suited as a diagnostic antigen. The purpose of this work was to develop a method for purifying the recombinant rotavirus VP6 antigen. The VP6 antigen was produced in <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>) as a fusion protein in which a small ubiquitin-like modifier (SUMO) was attached to the VP6 protein. The produced SUMO-VP6 fusion protein was purified by nickel (Ni) affinity chromatography in two different steps. First, the SUMO-VP6 protein was purified from lysate. Second, the SUMO tag of the fusion protein was digested enzymatically from the fusion protein, after which the VP6 protein was separated from the separated SUMO tag. Immunoreactivity of the final product was determined by fluoroimmunoassay (FIA) and purity by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Based on the results, the production of the VP6 antigen as a SUMO-VP6 fusion protein was successful, but purification of the VP6 antigen was not entirely straightforward. The inherent tendency of the VP6 antigen to form trimers and larger protein complexes complicated the optimization of the purification method. The SUMO-VP6 fusion protein was found to elute at different stages of the gradient, which was probably due to different interactions of the polyhistidine tags of the formed SUMO-VP6 protein complexes with the Ni affinity column. Due to non-linear elution maximizing the yield of the final product without compromising purity was challenging: impurities were detected in the final product and the immunoreactivity of the final product was significantly weaker than the control.	
Keywords	recombinant antigen, <i>In Vitro</i> diagnostics, rotavirus, VP6

Sisällys

Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Teoreettinen tausta	2
2.1	Antigeeni-vasta-ainekompleksi	2
2.2	Rekombinantiantigeenien hyödyntäminen <i>in vitro</i> -diagnostiikassa	3
2.2.1	Rekombinantiantigeeni	3
2.2.2	Diagnostiset antigeenit	4
2.2.3	Vieritestit	5
2.3	Rotavirus	7
2.3.1	Kliininen merkitys	7
2.3.2	Diagnostiikka	9
2.3.3	VP6-antigeeni	10
2.4	Rekombinantti-VP6-antigeenin tuottaminen <i>E. colissa</i>	11
3	Materiaalit ja menetelmät	12
3.1	SUMO-VP6-proteiinin tuottaminen <i>E. coli</i> -kasvatuksissa	12
3.1.1	Solukasvatukset	12
3.1.2	Indusointi ja solujen harvestointi	12
3.2	VP6-antigeenin puhdistaminen	13
3.2.1	Solujen lyysi	13
3.2.2	SUMO-VP6-fuusioproteiinin puhdistaminen solulysaatista	13
3.2.3	Entsyymireaktio	14
3.2.4	VP6-proteiinin erottaminen SUMO-osasta	14
3.3	Analyysimenetelmät	15
3.3.1	PhastGel	15
3.3.2	Immunoreaktiivisuus	16
4	Tulokset	18
4.1	SUMO-VP6-fuusioproteiinin erottaminen solulysaatista	18
4.2	VP6-proteiinin erottaminen SUMO-osasta	20
4.3	VP6-antigeenin puhdistusmenetelmän kehitys	24

4.4	VP6-antigeenin immunoreaktiivisuus	28
4.4.1	Immunoreaktiivisuusmääritykset	28
4.4.2	Kuuden pisteen immunoreaktiivisuustesti	30
5	Pohdinta ja johtopäätökset	32
	Lähteet	35

Lyhenteet

A ₂₈₀	Absorbanssi 280 nm:n aallonpituudella
DTT	Ditiotreitoli
Eu	Europium
EIA	(Enzyme Immuno Assay) Entsyymi-immunomenetelmä
ELISA	(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) Entsyymiavusteinen immuno-määritysmenetelmä
Fab	(Antigen binding fragment) Antigeenia sitova osa
FIA	Fluoroimmunoanalyysi
His ₆ -tag	Kuuden histidiinitähteen muodostama polyhistidiinihäntä
IA	Immunoanalyysi
Ig	Immunoglobuliini
IPTG	Isopropyli-β-D-1-tiogalaktopyranosidi
IVD	In Vitro -diagnostiikka
LFIA	(Lateral Flow Immunoassay) Lateraaliseen virtaukseen perustuva immunoanalyysi
OD	(Optical Density) Optinen tiheys
POC	(Point of Care) Vieritestaus
RT-PCR	(Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) Käänteistranskriptiopolymeraasi-ketjureaktio

RVA	Rotavirus A
SDS-PAGE	(Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) Natrium-dodekyylisulfaattipolyakryliamidigeelielektroforeesi
SUMO	(Small Ubiquitin-Like Modifier) Pieni ubikitiinin tyyppinen modifikaattori
ULP1	(Ubiquitin-Like specific Protease 1) Ubikitiinin tyyppinen spesifinen proteaasi-1
VP6	Virusproteiini 6
BME	β -merkaptetaanoli

1 Johdanto

Rekombinantiantigeenit ovat tärkeitä bioreagensseja *in vitro* -diagnostiikassa (IVD). Rekombinantiantigeenejä käytetään testi- ja kontrolliantigeeneinä useissa diagnostisissa testeissä ja kliinisissä tutkimuksissa. Molekyylibiologisten tekniikoiden kehittyminen viime vuosikymmenien aikana on mahdollistanut korkealaatuisten rekombinantiantigeenien kehittämisen. Laadukkaat rekombinantiantigeenit puolestaan mahdollistavat hyvin tarkkojen diagnostisten testien kehittämisen.

Rotavirukset ovat yleisimpiä ripulitautien aiheuttajia erityisesti pienillä lapsilla. Rotavirukset aiheuttavat vuosittain infektoita maailmanlaajuisesti ja työllistävät terveydenhuollon ammattilaisia ympäri maailmaa. Rotavirusinfektioon ei ole olemassa varsinaista hoitokeinoa, mutta nopea diagnostiikka on tärkeää oikean hoidon kannalta. Rotavirusinfektio voidaan osoittaa ulosteesta erilaisilla osoitusmenetelmillä, kuten entsyymi-immunometelmillä (Enzyme Immunoassay, EIA), jotka perustuvat rotavirusantigeenin havaitsemiseen potilasnäytteissä. Useimmat diagnostiset testit perustuvat VP6-antigeeniin, joka on rotaviruksen immunogeeninen rakenneproteiini. Sitä on mahdollista tuottaa korkealaatuisena rekombinanttiproteiinina klinisen tutkimuksen ja IVD:n käyttöön.

Opinnäytetyö suoritettiin Medix Biochemican tuotekehitystiimissä rekombinanttiryhmässä, jossa työn ohjaajana toimi ryhmänvetäjä Suvi Eklin. Medix Biochemica on Minerva säätiön perustama *in vitro* -diagnostiikkaan erikoistunut terveysteknologian yritys, joka perustettiin vuonna 1985. Yritys kehittää, valmistaa ja markkinoi bioreagenssejä kuten monoklonaalisia vasta-aineita ja antigeenejä IVD-teollisuudelle. Medix Biochemican tytäryhtiö Actim Oy vastaa diagnostisten pikatestien valmistamisesta terveydenhuoltoalan yrityksille ja julkiselle terveydenhuollolle. Työn tavoitteena oli kehittää rotaviruksen rekombinanttisen virusproteiini 6:n (VP6) puhdistusmenetelmää sekä karakterisoida *Escherichia coli* (*E. coli*) -bakteereissa tuotetun VP6-antigeenin puhtaus ja immunoreaktiivisuus.

2 Teoreettinen tausta

2.1 Antigeeni-vasta-ainekompleksi

Antigeeni on mikä tahansa molekyyli, jonka elimistön immuunipuolustus tunnistaa vieraaksi. Antigeeninä voivat toimia proteiinit, sokerit, lipidit, hiilihydraatit, fosfolipidit ja nukleiinihapot. Useimmiten antigeenit ovat polysakkarideja tai proteiineja, kuten toksiinimolekyylit tai bakteerien, virusten, sienten ja parasiittien pintarakenteet. Immunogeeniksi kutsutaan yleensä suurta proteiinimolekyyliä, joka kykenee sellaisenaan aikaansaamaan immuunivasteen. Antigeenit voivat olla myös pieniä molekyylejä, hapteneja, jotka eivät pienen kokonsa takia kykene itsenäisesti aktivoimaan immuunipuolustusta. Sen sijaan haptenein sitoutuminen suurempaan kantajamolekyyliin aktivoi immuunivastetta. [1, s. 21.] Immunogeenien pinnassa on usein monia antigeenisia rakenteita, epi-tooppeja, jotka toimivat vasta-aineiden sitoutumiskohtina. Suurempaan molekyyliin sitoutunut hapteeni toimii kompleksin antigeenisenä kohtana. [2, s. 102.]

Immuunivasteen aktivoituminen käynnistyy, kun vasta-aine sitoutuu antigeeniin, jolloin muodostuu antigeeni-vasta-ainekompleksi. Vasta-aineita kutsutaan myös immunoglobuliineiksi (Ig). Y-kirjaimen muotoisen Ig-molekyylin käsivarret muodostavat antigeeniä sitovan osan (antigen binding fragment, Fab). [2, s. 94.] Antigeenin sitoutumiskohta on stereokemiallisesti komplementaarinen siihen sitoutuvalle vasta-aineelle. Ig-molekyylin Fab-osassa sijaitsevat raskas- ja kevytketjujen hypervariaabelit alueet, jotka ovat tärkeitä antigeenin sitomiskohtia. Aminohapposekvenssien vaihtelu Fab-osan hypervariaabeilleilla alueilla vaikuttaa sitomiskohdan kolmiulotteiseen rakenteeseen ja siten eri antigeenien tunnistamiseen. [3.]

Antigeeni-vasta-ainekompleksin muodostumisessa syntyvät molekyylien väliset sidokset ovat luonteeltaan ei-kovalenttisiä. Useat sidokset antigeenin ja vasta-aineen välillä varmistavat, että vasta-aine sitoutuu tiukasti ja spesifisesti antigeeniin. Erityisesti sitoutumiskohdan elektrostaattisten ja hydrofobisten vuorovaikutusten vaihtelut variaabeleilla alueilla vaikuttavat eri vasta-aineiden affiniteettiin ja spesifisyyteen. [4.] Useiden tärkeiden IVD-testien toimintaperiaate perustuu vasta-aineiden kykyyn tunnistaa kohdeantigeeni ja sitoutua siihen spesifisesti.

2.2 Rekombinantiantigeenien hyödyntäminen *in vitro* -diagnoosissa

2.2.1 Rekombinantiantigeeni

Molekyylibiologian, genomiikan, proteomiikan ja bioinformatiikan avulla on mahdollista suunnitella uusia strategioita sensitiivisten ja spesifisten diagnostisten testien kehittämiseksi. Rekombinantiantigeeni on molekyylibiologian menetelmillä tuotettu proteiini, joita on mahdollista tuottaa suuria määriä prokaryootti- ja eukaryoottisoluissa. Yleisin menetelmä on siirtää antigeenin geenisekvenssin sisältävä vektori sopivaan isäntäsoluun, kuten *E. coli*n. [5.]

Antigeenin tuottamista varten valitaan sopiva tuottosysteemi. Tuotettavan proteiinin geenisekvenssin perusteella suunnitellaan DNA-konstruktin, joka liitetään sopivaan vektoriin. Suurin osa kaupallisista vektoreista on plasmideja, jotka sisältävät tehokkaan promootorialueen, joka ei tuota proteiinia normaaleissa kasvuolosuhteissa. Bakteriofagi T7:n promootori on yleisesti käytetty rekombinanttiproteiinien tuottamiseen *E. coli* -bakteereissa. [5.] Proteiinin tuotto on mahdollista indusoida tehokkaasti esimerkiksi lisäämällä kasvatusmediumiin geenin transkriptiota aktivoivaa biologista reagenssia. *E. coli* -tuottosysteemeissä geenien transkriptiota säätelee laktoosin metaboliaan liittyvä lac-operoni, joka aktivoituu laktoosin läsnä ollessa. Proteiinien ekpressio voidaan indusoida lisäämällä kasvatusmediumiin isopropyli-β-D-1-tiogalaktopyranosidia (IPTG), jonka molekyyli rakenne muistuttaa lac-operonia aktivoivan allolaktoosin rakennetta.

Rekombinantiantigeenien puhdistusta varten niiden C- tai N-terminaaliseen päähän on usein liitetty puhdistusta helpottavia peptidisekvenssejä, kuten kuusi histidiinitähdettä sisältävä polyhistidiinihänkä (His₆-tag), jota hyödynnetään nikkeli(Ni)-affiniteettikromatografiassa. Histidiinin sivuketjun imidatsolirengas sitoo voimakkaasti kahdenarvoisia metalli-ioneja. Kun His₆-tagin sisältävä proteiini on kontaktissa kantajafaasin kanssa, johon on immobilisoitu Ni²⁺-ioneja, histidiinitähteet kelatoivat metalli-ionit, jolloin proteiini sitoutuu pylvääseen. [6.]

Yllä mainittuja työkaluja hyödyntämällä on mahdollista tuottaa antigeenejä korkealaatuisina rekombinanttiproteiineina. Niitä voidaan hyödyntää sekä testi- ja kontrolliantigeeneinä lääketieteellisissä tutkimuksissa ja diagnostiikassa että diagnostisten testien laadunvalvonnassa.

2.2.2 Diagnostiset antigeenit

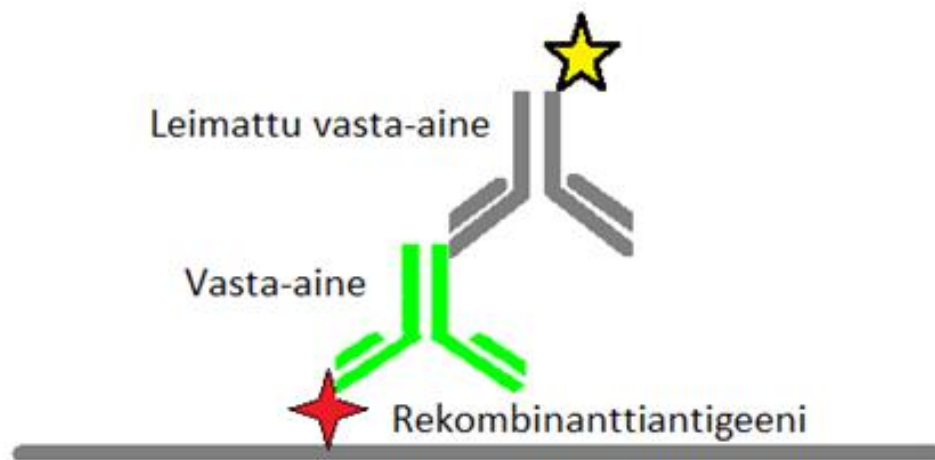
Diagnostisten testien tarkoituksena on löytää potilasnäytteistä tutkittava antigeeni tai antigeeniä vastaan syntyneitä vasta-aineita. Tutkittava antigeeni voi olla elimistön ulkopuolinen bakteeri-, virus-, sieni- tai parasiittiantigeeni, mutta se voi myös olla elimistön oma proteiini kuten hormoni, syöpä- tai tulehdusmarkkeri. Perinteiset diagnostiset menetelmät ovat immunoanalyysejä (IA), jotka perustuvat vasta-aineiden ja antigeenien välisiin reaktioihin. IA-menetelmiä käytetään kliinisessä diagnostiikassa yleensä seulontamenetelminä. Yleisimpiä käytettyjä IA-menetelmiä ovat immunosäostus, agglutinaatiotesti, komplemettifiksaatio, immunofluoresenssitesti ja entsyymiavusteinen immunomääritysmenetelmä (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA). Useimmat diagnostiset testit perustuvat ELISA-menetelmään. [7.]

Diagnostiikassa käytetyt rekombinantiantigeenit voidaan jakaa kontrolliantigeeneihin, jotka toimivat diagnostisten testien positiivisina kontrolleina ja serologisiin antigeeneihin, jotka ovat serologisten testien testikomponentteja. Serodiagnostiikan periaatteena on löytää potilaan verestä tiettyä antigeeniä vastaan syntyneitä vasta-aineita. Serodiagnostisten testien laatuun vaikuttavat niissä käyt antigeenit. Useiden virus-, bakteeri- ja parasiitti-infektioiden diagnostiikka on hankalaa ja työlästä. Esimerkiksi testeissä käytetyt viraaliset antigeenit ovat usein peräisin kokonaisista virioneista valmistetuista lysaateista. Ne saattavat sisältää viruksen isäntäsolun proteiineja, jotka heikentävät testin spesifisyyttä. [8.] Natiivien antigeenien ongelmana on niiden sisältämä ei-antigeeninen materiaali, jolloin antigeenien laatu saattaa vaihdella ja testin standardisoiminen on hankalaa [9].

Epäspesifisten ja standardoimattomien antigeenien takia testien laatu kärsii usein ristireaktioista muiden patogeenien kanssa, minkä seurauksena uusittavuus eri laboratorioiden välillä on hankalaa. Käyttämällä rekombinantiantigeeneja on mahdollista kehittää hyvin sensitiivisiä testausmenetelmiä. Lisäksi testien spesifisyyttä on mahdollista parantaa käyttämällä eri rekombinantiantigeenien yhdistelmiä. [10.]

Nykyään korkealaatuisten, puhtaiden ja homogeenisten kaupallisten rekombinantiantigeenien tuottaminen molekyylibiologisin menetelmin on mahdollistanut uusien nopeiden ja kustannustehokkaampien testien kehittämisen. Rekombinantiantigeenien suuret pi-

toisuudet, tasalaatuisuus ja epäspesifisten osien puuttuminen mahdollistavat hyvin spesifisten, sensitiivisten diagnostisten testien kehittämisen. [11; 12.] Kuvassa 1 on esitetty ELISA-menetelmään perustuvan serodiagnostisen testin toimintaperiaate.



Kuva 1: Kun halutaan määrittää potilasnäytteistä vasta-aineita tiettyä patogeeniä vastaan, rekombinantiantigeeni kiinnitetään kiinteään alustaan tai kantajaan. Näytteessä olevat vasta-aineet sioutuvat antigeeniin. Syntynyt vasta-aine-antigeenikompleksi detektoidaan sekundaarisella leimatulla vasta-aineella.

Diagnostiikassa laadunvarmistus on erittäin tärkeää. Laadunvalvonnan tarkoituksena on sisäisten kontrollien avulla varmistaa testien päivittäinen toimivuus. Sisäisten kontrollien avulla kliiniset laboratoriot sekä vieritestejä (Point Of Care, POC) tekevät terveydenhuollon toimipisteet varmistavat, että diagnostisten testien tulokset ovat tilastollisesti luotettavia ja uusittavia. [13.] Rekombinantiantigeeneja voidaan luotettavasti käyttää kontrolliantigeeneinä sekä laadunvalvonnassa että immunomenetelmien positiivisina kontrollina. Positiiviset kontrollit toimivat testien laadunvarmistimina. Kontrollien tarkoituksena on varmistaa, että testit ja niissä käytettävät reagenssit toimivat, ja siten ilmaista, että testin tulos on luotettava. Ilman positiivisia kontrolleja testien luotettavuus on heikompi. [14.]

2.2.3 Vieritestit

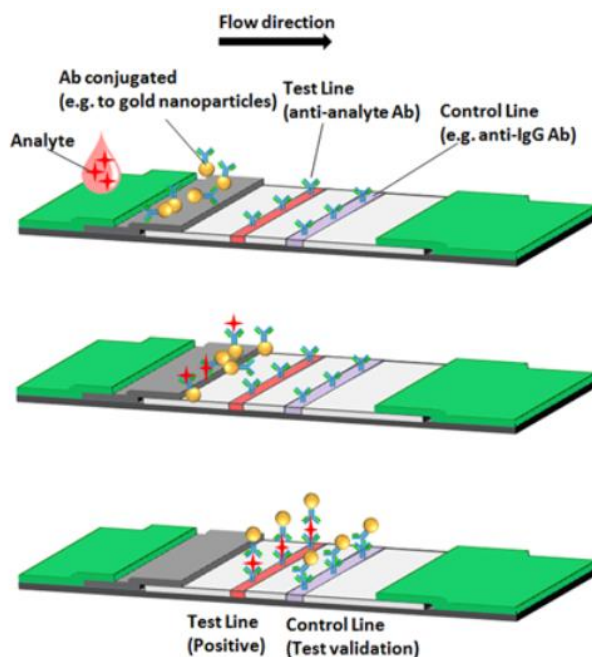
POC-testit tarjoavat nopean diagnostisen tavan saada informaatiota potilaiden hoidosta. POC-testien helppous, edullisuus ja nopeus ovat kasvattaneet niiden suosiota kliinisessä diagnostiikassa. POC-testi suoritetaan potilaan välittömässä läheisyydessä. Nopeat diagnostiset testit tunnistavat antigeenit tai niitä vastaan syntyneet vasta-aineet potilasnäytteissä. [15.] Bakteeri-infektion diagnostiikka perinteisin viljelymenetelmin voi

kestää 48 tunnista 72 tuntiin. Vakavissa bakteeri-infektioissa potilaan selviytymisen kannalta on tärkeää aloittaa oikea antibioottihoito mahdollisimman nopeasti. [16.]

Suurin osa POC-testeistä perustuu lateraaliseen virtaukseen perustuvaan immunoanalytiikkaan (Lateral Flow Immunoassay, LFIA). LFIA:n periaate on yksinkertainen. Nestemäinen näyte imeytyy kapillaarivoimien avulla polymeerisen testiliuskan eri vyöhykkeiden läpi. Samalla näytteen sisältämät analyytit reagoivat testin pintaan kiinnitettyjen vasta-aineiden tai kanssa.

Tyypillinen LFIA-testi koostuu päällekkäisistä membraaneista, jotka on kiinnitetty testiliuskan tukialustaan. Näyte applikoidaan imukykyiselle näytetyynylle. Näytetyyny sisältää puskureita ja suoloja, jotka edesauttavat analyytin vuorovaikutusta testin molekyyliden kanssa. Näyte etenee analyytillä spesifisiä konjugoituja vasta-aineita sisältävän vyöhykkeen läpi. Yleisimpiä konjugaatteja ovat kolloidiset kulta- ja lateksi-mikropartikkelit. Konjugoidut vasta-aineet sitoutuvat analyytin, ja syntynyt kompleksi kulkeutuu liuskan testialueelle. Testialue on yleensä nitroselluloosamembraani, johon on kiinnitetty analyytillä spesifisiä vasta-aineita. Konjugoituneet vasta-aine-analyytti-kompleksit sitoutuvat testialueelle immobilisoituihin vasta-aineisiin, jolloin testialueelle kerääntyvät konjugaatit muodostavat näkyvän viivan. [17.]

Testiliuska sisältää myös kontrollialueen, johon kiinnitetyt vasta-aineet sitovat testin konjugoituneita vasta-aineita ilman analyyttiä. LFIA-testien kontrolleina voidaan käyttää myös rekombinantiantigenejä, jotka on kiinnitetty liuskan kontrollialueelle. Vapaat konjugoidut vasta-aineet sitoutuvat immobilisoituihin antigeeneihin, jolloin muodostuu näkyvä viiva testin kontrollialueelle. Kontrolliviivan tarkoituksena on ilmaista, että virtaus on ollut riittävä ja testi onnistunut. [17.] Kuvassa 2 on esitetty LFIA:n toimintaperiaate. LFIA-menetelmään perustuvia POC-testejä voidaan hyödyntää myös serologiassa, kun halutaan määrittää potilaan verestä vasta-aineita kohdeantigeenille. Tällöin liuskan testialueelle on kiinnitetty rekombinantiantigenejä, joihin potilasnäytteessä olevat antigeeniä vastaan syntyneet vasta-aineet sitoutuvat. [18.]



Kuva 2: LFIA:n toimintaperiaate. Analyytti etenee kapillaarivoimien kuljettamana ja sitoutuu konjugoituihin vasta-aineisiin. Konjugoitu vasta-aine-analyytti-kompleksi etenee testialueelle ja sitoutuu testialueen immobilisoituihin vasta-aineisiin. Samaan aikaan kontrollialueen immobilisoidut vasta-aineet tai antigeenit sitovat vapaita konjugoituja vasta-aineita, jolloin syntyy näkyvä kontrolliviiva. [17.]

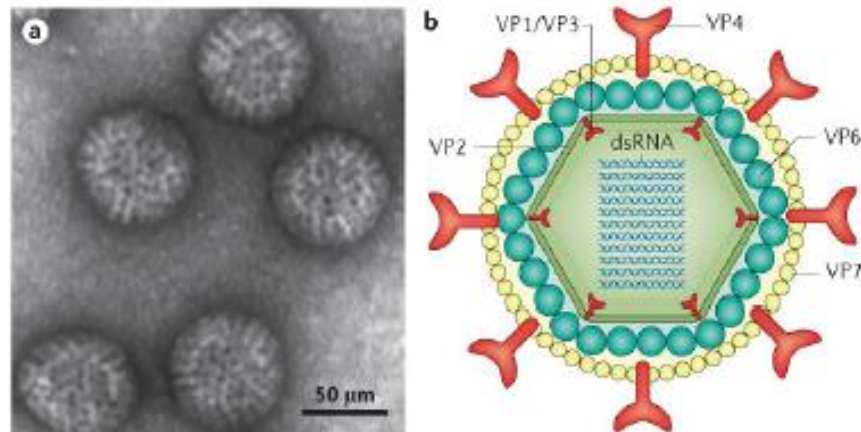
2.3 Rotavirus

2.3.1 Kliininen merkitys

Ripulitaudit ovat yksi suurin syy alle viisivuotiaiden lasten sairastumisen ja kuoleman aiheuttajista etenkin kehitysmaissa. Ripulitaudit aiheuttavat maailmanlaajuisesti yli 500 000 kuolemaa vuosittain. Rotavirus on yleisin vauvojen ja pienten lasten vakavien ripulitautien aiheuttaja. [19.] Suomessa A-ryhmän genotyypin I rotavirus aiheuttaa epidemioina pienten lasten ripulitautia loppuvuodesta kesäkuuhun saakka. Teollistuneissa maissa ripulitaudit ovat ongelma myös sairauden heikentämällä potilailla, jolloin sairaalainfektiot ja -epidemiat erityisesti lastensairaaloissa ovat ongelmallisia. [20.] Rotavirukset ovat hyvin yleisiä. Esimerkiksi vuonna 2003 alle viisivuotiailla lapsilla raportoitiin 114 miljoonaa rotavirusinfektiota, joista 2,3 miljoonaa tapausta vaati sairaalahoitoa. [21.]

Rotavirukset ovat rengasmaisia Reoviridae-heimoon kuuluvia kaksijuosteisia RNA-viruksia. Rotaviruksia on löydetty 10 lajia (A-J), joista Rotavirus A (RVA) on yleisin infektioiden

aiheuttaja. RVA:n genomi koostuu 11 dsRNA-segmentistä, jotka koodaavat kuutta rakenneproteiinia (VP1-4, VP6 ja VP7) ja kuutta ei-rakenneproteiinia (NSP1-NSP6). [19.] Rotavirusten lajityypitys perustuu VP6-rakenneproteiinin antigeenisiin ominaisuuksiin [20]. Rotavirukset jaetaan genotyyppeihin RNA-sekvenssien 4 ja 7 perusteella, jotka koodaavat viruksen proteiineja VP4 ja VP7 [19]. Rotaviruksen rakenne on esitetty kuvassa 3.



Kuva 3: Rotaviruksen rakenne: a: Elektronimikroskooppikuva rotaviruksesta. Rotavirukset muistuttavat pyöreitä rattaita (lat. *rota* = ratas). b: Rotaviruksilla on kolmikerroksinen proteiinkuori. Sisimmän kapsidin muodostaa viraalinen rakenneproteiini VP2 sekä entsyymit VP1 ja VP3. Kesimmäisen kuoren muodostaa VP6 ja uloimman VP7 ja VP4. [19.]

Rotavirusripulissa virusta erittyy suuria määriä ulosteiden mukana. Virus tarttuu pääasiassa uloste-suuteitse. Virus tarttuu herkästi, sillä tartuttamiseen riittää vain muutama virus. [19.] Rotavirus lisääntyy ohutsuolen villusten enterosyyteissä ja enteroendokriinisoluisissa. Lisääntyessään virus tuhoaa villusten epiteelisoluja, jolloin suolessa toimivien disakkaridaasientsyymien aktiivisuus vähenee. Hiilihydraattien malabsorbtio aiheuttaa veden kertymistä ohutsuoleen. [22.] Infektoituneet solut erittävät NSP4-enterotoksiinia, joka lisää sytoplasmisten Ca^{2+} -ionien määrää ja aktivoi Ca^{2+} -riippuvaiset kloridikanavat. Kloridi-ionien erittyminen suolen luumeniin aiheuttaa osmoottista ripulia [23.]. Rotavirusinfektion taudinkuvaan liittyy vetisen ripulin lisäksi kuume ja oksentelu. Tauti voi johtaa nopeasti dehydraatioon, joka vaatii aktiivista hoitoa. [21.]

2.3.2 Diagnostiikka

Rotavirusinfektioon ei ole varsinaista hoitokeinoa. Rotavirusripuli paranee itsestään noin viikossa, ja hoitona on tehokas nesteytys. Nopea diagnoosi on kuitenkin tärkeää erityisesti heikomman elintason maissa, jotta potilas voidaan eristää tai kotiuttaa ja estää näin viruksen leviäminen. Nopea diagnoosi on myös tärkeää turhien antibioottikuurien välttämiseksi. [24.]

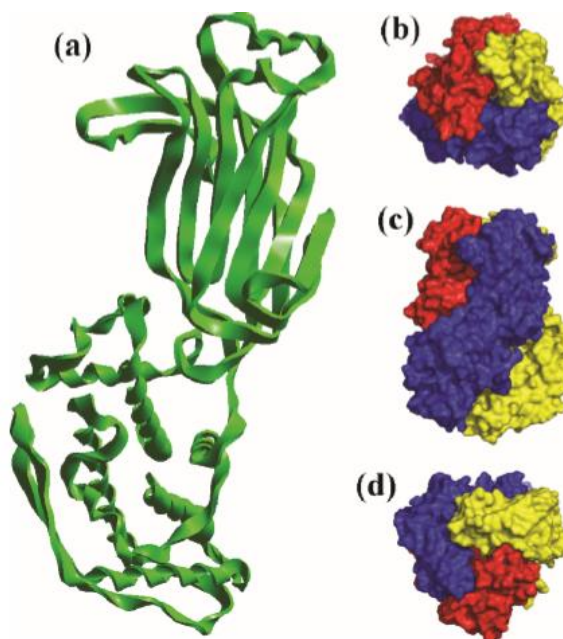
Rotavirusinfektion rutiinidiagnostiikka perustuu rotavirusantigeenin havaitsemiseen ulostenäytteissä EIA- tai lateksiagglutinaatio-menetelmillä. Rotaviruspartikkelit on mahdollista havaita ulostenäytteissä myös elektronimikroskoopilla. Elektronimikroskooppi on nopein menetelmä havaita rotavirukset näytteissä, mutta se on työläs ja vähemmän sensitiivinen kuin EIA-menetelmä. [24.] Käänteistranskriptiopolymeraasi-ketjureaktio (Reverse Transcription-Chain Polymerase Reaction, RT-PCR) on hyvin sensitiivinen ja spesifinen menetelmä rotaviruksen viraalisen RNA:n havaitsemiseksi potilasnäytteistä. RT-PCR-menetelmä ei kuitenkaan sovellu rutiinidiagnostiikkaan, ja sitä käytetäänkin lähinnä virusten genotyyppityksessä rokote- ja epidemiologisissa tutkimuksissa. [19.]

Maailman terveysjärjestö WHO suosittaa Rotaviruksen seulontamenetelmäksi sandwich-ELISA -menetelmää, jossa rotavirusspesifiset vasta-aineet on kiinnitetty 96-kuoppalevyille. Potilasnäytteiden sisältämät rotavirusantigeenit sitoutuvat vasta-aineisiin ja syntynyt kompleksi detektoidaan entsyymiin konjugoiduilla rotavirusvasta-aineilla. ELISA-menetelmä on hyvin sensitiivinen ja spesifinen ja helposti toteutettavissa rutiinidiagnostiikassa. Vaihtoehtoisena menetelmänä voidaan käyttää lateksiagglutinaatiotestiä, jossa lateksipartikkelit ovat päällystetty rotavirusvasta-aineilla. Rotavirusantigeenin havaitsemiseen kehitetyissä POC-testeissä hyödynnetään kumpaakin menetelmää. [25.] Suurin osa rotavirustesteistä perustuu rotaviruksen VP6-antigeenin havaitsemiseen potilasnäytteistä [26].

Kliinisissä tutkimuksissa, joissa mitataan immuunivastetta luonnollisessa rotavirusinfektiossa sekä rokotetutkimuksissa, käytetään rekombinantti-VP6-antigeeniin perustuvaa serodiagnostista immunomenetelmää. Menetelmässä mitataan rotaviruksen VP6-antigeenia vastaan syntyneitä IgA- ja IgG-vasta-aineita potilasnäytteistä. [27.] Rokotuksen jälkeen syntyneiden IgA-vasta-aineiden on havaittu kliinisissä tutkimuksissa korreloivan rotavirusrokotteen tehokkuuden kanssa [28].

2.3.3 VP6-antigeeni

VP6 on rotaviruksen keskimmäisen kapsidin rakenneproteiini. VP6 rakentuu 397 aminohaposta ja sen teoreettinen molekyylipaino on 45 kDa. VP6 on rotavirusproteiineista konservoitunein ja immunogeenisin sekä määrällisesti suurin rotavirusproteiini. [29.] VP6 on hyvin stabiili proteiini, joka muodostaa trimeereitä. pH ja ionivahvuus vaikuttavat VP6-trimeerien järjestäytymiseen erilaisiksi nanomuodostelmiksi, kuten pallomaisiksi ja putkimaisiksi rakenteiksi. [30, 31.] Kuvassa 4 on esitetty VP6:n sekä VP6-trimeerin rakenne.



Kuva 4: a) VP6-yksikön kolmiulotteinen rakenne b) VP6-trimeeri kuvattuna ylhäältä, c) edestä ja d) alhaalta [29]

VP6-trimeerit muodostavat hydrofobisia sidoksia sisimmän kapsidin VP2-proteiinien kanssa. VP6 ja VP2 muodostavat kaksikerroksisen rakenteen (Double Layered Particle, DLP). [32.] Viruksen tunkeutuessa isäntäsoluun uloin kapsidikerros (VP4 ja VP7) irtaantuu. Soluun päässyt DLP on transkriptionaalisesti aktiivinen. [33.] VP6-proteiinin ja viruksen transkriptiokoneiston elektrostaattiset vuorovaikutukset ovat välttämättömät mRNA-synteesin kannalta [32]. Koska VP6-proteiini on hyvin konservoitunut eri RVA-kantojen välillä, se sopii hyvin diagnostiseksi antigeeniksi.

2.4 Rekombinantti-VP6-antigeenin tuottaminen *E. colissa*

Rekombinanttiproteiinien tuottaminen *E. coli* -soluissa on vaivatonta ja kustannustehokasta. Haittapuolena on monimutkaisempien useista alayksiköistä koostuvien proteiinien väärinlaskostuminen ja kerääntyminen sytoplasmaan yliekspression seurauksena. [34.] Suurten multimeeristen proteiinien tuottaminen *E. colissa* vaatii lisäksi modulaattoreita, jotka ohjaavat proteiinin laskostumista. Nykyään onkin kehitetty uudenlainen ekspressiosysteemi, jossa pieni ubikitiinin tyyppinen modifikaattori (Small Ubiquitin-Like Modifier, SUMO) liitetään kohdeproteiiniin, mikä mahdollistaa rekombinanttiproteiinien tehokkaan ekspression *E. colissa*. [35.]

SUMO-proteiinin liittäminen eli SUMOlaatio on yleinen reversiibeli proteiinien postranslationalinen muokkaussysteemi eukaryoottisolussa. SUMOlaatiossa SUMO-proteiini liitetään kovalenttisesti kohdeproteiiniin. Myös virusinfektioissa isäntäsoluun tunkeutuneiden virusten proteiinit ovat isäntäsolun SUMOlaatiokoneiston kohteina. SUMOlaation on havaittu mm. säätelevän rotaviruksen replikaatiota ja viraalisten proteiinien tuottamista. [36.]

Prokaryoottisolussa ei ole vastaavaa SUMOlaatiosysteemiä, joten *E. colissa* vapaana tuotetun VP6-proteiinin on havaittu olevan liukenematonta ja häiritsevän proteiinin tuottoa [34]. Vapaan VP6-proteiinin on havaittu muodostavan synteesin jälkeen suurempia inkluusiokappaleita, jotka kertyvät sytoplasmaan [37]. VP6-proteiinin tuottaminen SUMO-fuusioproteiinina säilyttää proteiinin liukoisuuden ja parantaa siten fuusioproteiinin ekspressiota [29].

3 Materiaalit ja menetelmät

3.1 SUMO-VP6-proteiinin tuottaminen *E. coli* -kasvatuksissa

3.1.1 Solukasvatukset

VP6-proteiini tuotettiin *E. coli* -soluissa solunsisäisenä SUMO-fuusioproteiinina. SUMO-VP6-proteiinin *E. coli* -tuottokanta oli valmiiksi transformoitu ja jaettu glyserolistokkeihin. Tuottokasvatukset aloitettiin 125 ml:n kasvatuksilla 250 ml:n Erlenmeyerpulloissa. Glyserolistokista pipetoitiin 5 µl solususpensiota 125 ml:aan Luria-Bertani (LB) -kasvatusmediaa (50 g Bacto-tryptone, Bacto-yeast extract, 50 g NaCl, 5000 ml H₂O), johon lisättiin ampisilliinia (SIGMA) siten, että ampisilliinin loppukonsentraatio solukasvatuksissa oli 100 µg/ml. Soluja kasvatettiin ravistelussa yön yli (37 °C, 180 rpm).

Yön yli -kasvatukset nuorennettiin 1:100 jakamalla 10 ml kasvatusta 1 litraan tuoretta LB-mediumia 2 litran Erlenmayer-pulloihin. Kasvatukseen lisättiin ampisilliinia (SIGMA) siten, että ampisilliinin loppukonsentraatio solukasvatuksissa oli 100 µg/ml. Kasvatuksia kasvatettiin ravistelussa (37 °C, 180 rpm).

3.1.2 Indusointi ja solujen harvestointi

Fuusioproteiinin tuotto kasvatuksissa indusoitiin IPTG:lla (SIGMA). Kasvatusten optista tiheyttä (optical density, OD) seurattiin mittaamalla kasvatusten absorbanssia spektrofotometrillä 600 nm:ssa. Kasvatusten OD:n ollessa 0,6 proteiinin tuotto indusoitiin lisäämällä kasvatukseen IPTG (SIGMA) siten, että IPTG:n loppukonsentraatio kasvatuksissa oli 0,25 mM. Induktion jälkeen kasvatusta jatkettiin yön yli ravistelussa (25 °C, 180 rpm). Indusoinnin jälkeen solut kerättiin sentrifugoimalla (Sorvall Lynx 6000, Thermo Scientific) 15 minuuttia 10 000 g:n voimalla. Kasvatusmediumi kaadettiin pois ja solut kaavittiin las-talla 50 ml:n Falcon-putkiin. Solumassat säilytettiin -80 °C:ssa.

3.2 VP6-antigeenin puhdistaminen

3.2.1 Solujen lyysi

Koska SUMO-VP6-fuusioproteiini tuotettiin solunsisäisesti, puhdistusta varten solut hajotettiin sonikoimalla (Bandelin Sonopuls GM70). Pullokasvatuksista saatu solumassa liuotettiin lyysipuskuriin (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 20 mM imidatsoli, 5 mM fenyyliimetaanisulfonyylifluoridi (PMSF), pH 7,5). Lyysipuskuria lisättiin 5 ml/1 g solumassaa. Solususpensio säilytettiin jäässä. Solususpensiota sonikoitiin 10 sekunnin ajan 90 %:n syklillä ja 70 %:n teholla. Käsittely toistettiin 10 kertaa ja sonikointien välillä suspension annettiin jäähtyä jäällä 10 sekunnin ajan. Sonikoitu solususpensio sentrifugoitiin (Sorvall Lynx 6000, Thermo Scientific) 11 000 g:n voimalla (30 min., 4°C). Supernatantti kaadettiin uuteen 50 ml:n Falcon-putkeen. Lopuksi saatu lysaatti suodatettiin 0,2 µm-steriili-suodattimen läpi.

3.2.2 SUMO-VP6-fuusioproteiinin puhdistaminen solulysaatista

SUMO-VP6-fuusioproteiiniin oli liitetty myös His₆-tag. Tuotettu SUMO-VP6-fuusioproteiinin puhdistettiin lysaatista Ni-affiniteettikromatografialla. Käytetty pylväs oli 5 ml:n nikkelisefaarosipylväs HisTrap HP® (GE Healthcare, 17-5248-02). Puhdistus tehtiin huoneenlämmössä ÄKTA pure -kromatografialaitteistolla (GE Healthcare). Ennen puhdistusta pylväs tasapainotettiin ajamalla sen läpi viisi kolonnilavuutta MQ-vettä ja sen jälkeen viisi pylvästilavuutta tasapainotuspuskuria (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 20 mM imidatsoli, pH 7,5). Suodatettu lysaatti pumpattiin pylvääseen nopeudella 2 ml/min. Pylvääseen tarttumaton materiaali pestiin pois ajamalla pylvään läpi noin 10 kolonnilavuutta edellä mainittua tasapainotuspuskuria. Pesu lopetettiin, kun kromatogrammin absorbanssi 280 nm:ssa (A_{280}) ei enää laskenut. Pylvääseen tarttunut SUMO-VP6-fuusioproteiini eluoiitiin 12 kolonnilavuudella, eli noin 60 ml:lla, eluutiopuskuria (20 mM Tris-HCl, 500 mM imidatsoli, pH 7,5) ajonopeudella 4 ml/min ja eluutiopuskurin gradientilla 0 → 100 %. Eluutiovaiheen alusta lähtien kerättiin 0,5 ml:n fraktiot.

Kromatogrammin perusteella kerätyistä fraktioista otettiin näytteet immunoreaktiivisuustestiä ja natriumdodekyylisulfaattipolyakryyliamidigeelielektroforeesia (Sodium Dodecyl

Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE) varten. Kromatogrammin perusteella SUMO-VP6-fuusioproteiinia sisältävät fraktiot yhdistettiin pooliksi. Saadulle SUMO-VP6 -poolille tehtiin puskurinvaihto dialysoimalla yhdistetyt näytteet tasapainotuspuskuriin (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 20 mM imidatsoli, pH 7,5). Pooli siirrettiin 12–14 000 Da:n dialyysiletkuun (Medicell) ja annettiin dialysoitua vähintään 20-kertaisessa tilavuudessa puskuria. Dialysointi suoritettiin jääkaappilämpötilassa hitaassa sekoituksessa siten, että dialyysissa käytetty puskuri vaihdettiin kahdesti dialysoinnin aikana ja dialyysiaika oli vähintään 2 tuntia per puskuri. Dialyysin jälkeen SUMO-VP6-fuusioproteiinin pitoisuus poolissa määritettiin mittaamalla poolista otetun näytteen absorbanssi 280 nm:ssä. Näytteen proteiinipitoisuus laskettiin käyttämällä Beer-Lambertin lain kaavaa $A = \epsilon b c$, jossa A on absorbanssi, ϵ yhdisteen molaarinen absorptiokerroin, b valon kulkema matka (1 cm) ja c konsentraatio. Proteiinipitoisuus saatiin, kun näytteen absorbanssi jaettiin SUMO-VP6-proteiinin molaarisella absorptiokertoimella, joka on 0,76. Tällöin esimerkiksi 1 mg/ml SUMO-VP6-proteiinia antaa A_{280} -arvon 0,76. Dialysoidusta poolista otettiin näyte SDS-PAGE -analyysia varten.

3.2.3 Entsyymireaktio

SUMO-osan poistamiseksi SUMO-VP6-fuusioproteiinille tehtiin entsyymaattinen digestio. Pooliin lisättiin ubikitiinin tyyppistä spesifistä proteaasi 1:tä (Ubiquitin-Like Specific Protease 1, ULP1, Certest, MT-25ULP1), joka hydrolysoi SUMO-osan ja VP6-proteiinin välisen peptidisidoksen. ULP1-entsyymiä lisättiin 100 µg per 5 mg SUMO-VP6-proteiinia. Seokseen lisättiin ditiotreitolia (DTT, SIGMA) pitoisuuteen 5 mM. Seosta inkuboitiin 5 tuntia 30 C°:ssa, jonka jälkeen seos ajettiin heti pylvääseen. ULP1-proteaasi sisälsi His₆-tagin, joten reaktio pysähtyi puhdistuksen jälkeen ULP1-proteaasin jäädessä pylvääseen. Entsyymireaktion toimivuuden tarkistamiseksi inkuboinnin jälkeen otettiin näyte SDS-PAGE-analyysia varten.

3.2.4 VP6-proteiinin erottaminen SUMO-osasta

VP6-proteiini erotettiin Ni-affiniteetikromatografialla irronneesta SUMO-osasta ja pilkkoutumattomasta SUMO-VP6-fuusioproteiinista. Puhdistus tehtiin samalla pylvällä kuin aiemminkin. Erottaminen perustui siihen, että His₆-tagin sisältävät irronneet SUMO-osat

ja pilkkoutumaton SUMO-VP6-fuusioproteiini jäävät pylvääseen ja VP6-proteiini tulee pylvään läpi.

Entsyymikäsitelty seos pumpattiin pylvääseen nopeudella 2 ml/min. Fraktionkeräys aloitettiin heti ja pylvään läpi tulleesta VP6-proteiinin sisältämästä läpivirtauksesta kerättiin 5 ml:n fraktiot. Keräys lopetettiin, kun kromatogrammin A_{280} ei enää laskenut. Pylvääseen tarttumaton materiaali pestiin noin 10 kolonnilavuudella samalla tasapainotuspuskurilla kuin aiemmin. Pylvääseen tarttunut materiaali eluutiin samalla eluutiopuskurilla kuin aiemmin. Tällä kertaa eluutio tehtiin eluutiopuskurin 100-prosenttisella konsentraatiolla. Eluutiota jatkettiin, kunnes kromatogrammin A_{280} ei enää laskenut. Eluoitunut materiaali kerättiin talteen 2 ml:n fraktioina.

Kromatogrammin perusteella VP6-proteiinin sisältävät fraktiot yhdistettiin pooliksi ja sen proteiinipitoisuus määritettiin kuten edellä. Sekä pylvään läpi tulleista että eluoiduista fraktioista otettiin näytteet SDS-PAGE:a varten. Imidatsolin poistamiseksi lopputuote dialysoitiin säilytyspuskuriin (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM DTT, pH 7,5) kuten edellä, mutta tällä kertaa niin, että dialyysipuskuri vaihdettiin 3 kertaa. Dialysoidun lopputuotteen proteiinipitoisuus määritettiin kuten edellä. Tuote konsentroitiin pitoisuuteen 0,9-1,1 mg/ml Amicon® 8050 -ultrasuodatuslaitteella (Merck Millipore) käyttämällä 10 kDa:n suodatinta (Merck Millipore). Konsentroidu lopputuote suodatettiin 0,2 µm:n steriilisuodattimen läpi. Lopputuotteen koko ja puhtaus analysoitiin SDS-PAGE:lla.

3.3 Analyysimenetelmät

3.3.1 PhastGel

Puhdistuksen eri vaiheista sekä lopputuotteesta otettuja näytteitä pipetoitiin 10 µl Eppendorf-putkiin, joihin lisättiin 10 µl 2 x näytepuskuria (20 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 5% SDS, 0,02% bromofenolinsininen, 0,2 M DTT, pH 8,0). Näytteitä kuumennettiin 5 minuuttia 95 °C:ssa. Näytteet ajettiin PhastGel™ 10-15% -gradienttigelillä (GE Healthcare, 17-0540-01) ja SDS-puskuritripeillä (GE Healthcare, 17-0516-01). Kokostandardina oli LMW-standardi (GE Healthcare, 17-0446-01). Ajossa käytettiin automaattista elektrofooresilaitetta (Pharmacia PhastSystem, GE Healthcare). Geelin värjäys tehtiin Brilliant

Blue R -värillä laitteen automaattisella värjäysohjelmalla. Värjäysliuos valmistettiin sekoittamalla 1:1 värikantaliuosta (1 tabletti PhastGel™ Blue R (GE Healthcare, 170518-01), 80 ml H₂O, 120 ml metanoli) ja 20-prosenttista etikkahappoa. Värjäyksen jälkeen ohjelma suoritti värinpoiston värinpoistoliuksella (600 ml metanoli, 200 ml etikkahappo, 1200 ml H₂O) ja lopuksi geeliä inkuboitiiin säilytysliuoksessa (100 ml etikkahappo, 800 ml H₂O, 50 ml glyseroli). Geelit kuvattiin BioSpectrum® 810 UV -kuvantamislaitteella (Fisher Scientific) ja analytoitiin TotalLab Quant -ohjelmalla (Cleafer Scientific).

3.3.2 Immunoreaktiivisuus

Näytteiden ja fraktioiden immunoreaktiivisuus määritettiin Europium(Eu)-leimaan perustuvalla fluoroimmunoanalyysimenetelmällä (FIA). Fraktioille tehtiin laimennokset välillä 1:100–1:100 000. Puhdistetuille VP6-antigeeneille valittiin kuusi laimennospistettä. Maksimipitoisuuksiksi valittiin 3 ja 5 µg/ml ja loput viisi pistettä saatiin laimentamalla aina 1:3 edellisestä laimennoksesta.

Testiä varten 96-kuoppalevy (NUNC) koutattiin anti-rotavirus-VP6-vasta-aineella (MB, 11101). Vasta-aineen pitoisuus oli 3 µg/ml natrium-fosfaattipuskurissa (50 mM NaH₂PO₄ x 2H₂O, pH 6,5). Levy koutattiin pipetoimalla 100 µl/kuoppa ja inkuboimalla yli yön 4 °C:ssa. Kouttauksen jälkeen Kuopat blokattiin 1-prosenttisella naudan seerumin albumiiniilla (Millipore) natrium-fosfaattipuskurissa, jota pipetoitiin 300 µl/kuoppa. Levyä inkuboitiiin 1 tunti huoneenlämmössä. Blokkauksen jälkeen kuopat pestiin kolme kertaa auto-DELFI Wash -pesupuskurilla (Perkin Elmer, B117-100). Näytteistä ja kontrollista tehtiin laimennokset Eu-puskuriin (50 mM Tris-HCl, 0,9 % NaCl, 0,05 % NaN₃, 0,5 % naudan seerumin albumiini (BSA), 0,05 % naudan γ-globuliini, 0,05 % Tween 20, 20 mg/ml dietyleenitriamiinipentaetikkahappo (DTPA)) ja pipetoitiin 100 µl/kuoppa. Kontrollina oli VP6-antigeeni (Certest, MT-26VP6). Nollanäytteenä oli pelkkä Eu-puskuri. Näytteitä inkuboitiiin tunti ravistelussa, huoneen lämmössä, minkä jälkeen kuopat pestiin kolme kertaa pesupuskurilla (Perkin Elmer, B117-100).

Detektio tehtiin biotinyloidulla monoklonaalisella anti-rotavirus-VP6-vasta-aineella (Medix Biochemica, 11101), josta tehtiin 1:2000-laimennos Eu-puskuriin. Laimennosta pipetoitiin 100 µl/kuoppa ja inkuboitiiin 1 tunti huoneen lämmössä. Eu-leimatusta streptavidiinistä (PerkinElmer, 1244-360) tehtiin 1:1000-laimennos Eu-puskuriin, jota pipetoitiin 100

µl/kuoppa ja inkuboitin 30 minuuttia huoneen lämmössä. Levy pestiin viisi kertaa pesu-puskurilla (Perkin Elmer, B117-100). Kuoppiin lisättiin 200 µl enhancemet-liuosta (DEL-FIA/auto/DEL FIA Enhancement Solution, PerkinElmer B118-100) ja inkubointiin viisi minuuttia ravistelussa. Levy mitattiin EnVision Xcite -levynlukijalla (PerkinElmer). Levyn mitauksessa käytettiin aikaerotteista fluoresenssia. Käytetty eksitaatioaallonpituus oli 340 nm ja emissioaallonpituus 615 nm.

Puhdistettujen lopputuotteiden immunoreaktiivisuudet suhteessa kontrolliin määritettiin kuten yllä. Analysointia varten näytteet ja kontrolli pipetoitiin levylle taulukon 1 osoittamalla tavalla. Tulokset analysoitiin WorkOut 2.5 -ohjelmalla (DazDaq Solutions).

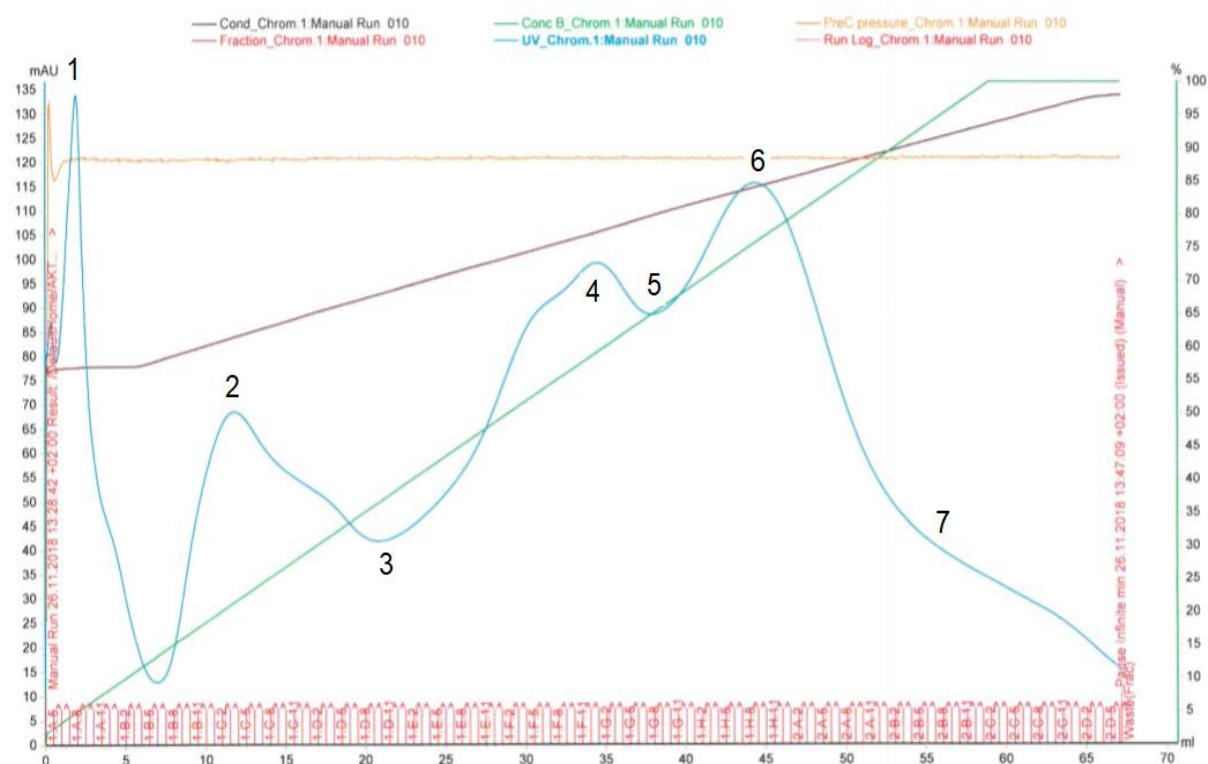
Taulukko 1: Näytteiden pipetointitaulukko immunoreaktiivisuusanalyysiä varten.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	EP	EP	EP	EP	EP	EP	REF MAX	REF MAX	REF MAX	REF MAX	REF MAX	REF MAX
B	Ref Laim 1	Ref Laim 1	Ref Laim 2	Ref Laim 2	Ref Laim 3	Ref Laim 3	Ref Laim 4	Ref Laim 4	Ref Laim 5	Ref Laim 5	Ref Laim 6	Ref Laim 6
C	Test Laim 1	Test Laim 1	Test Laim 2	Test Laim 2	Test Laim 3	Test Laim 3	Test Laim 4	Test Laim 4	Test Laim 5	Test Laim 5	Test Laim 6	Test Laim 6
D												

4 Tulokset

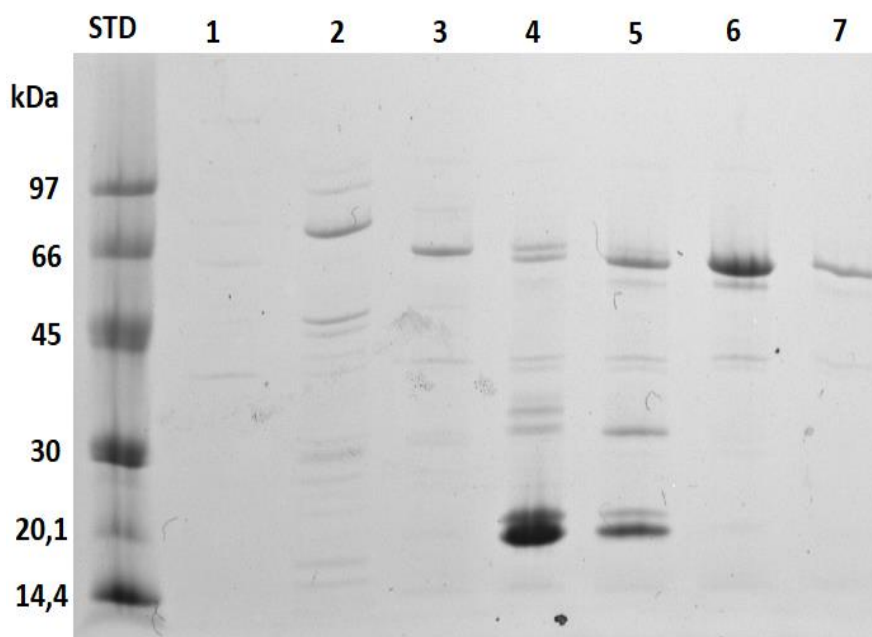
4.1 SUMO-VP6-fuusioproteiinin erottaminen solulysaatista

Solukasvatuksista saatiin noin 6 g solumassaa, joka suspensoitiin 30 ml:aan lyysipuskuria. SUMO-VP6-fuusioproteiini puhdistettiin lyaatista Ni-affiniteettipylväällä. Kuvassa 5 on SUMO-VP6-fuusioproteiinin eluutiokromatogrammi.



Kuva 5: SUMO-VP6-fuusioproteiinin eluutiokromatogrammi. Kromatogrammiin merkittyjen kohtien 1–7 fraktioista otettiin näytteet SDS-PAGE-analysia ja immunoreaktiivisuusmäärittämiä varten.

Yhden selkeän eluutiopiikin sijaan kromatogrammissa näkyi useampi piikki. Jotta nähtäisiin missä kohtaa SUMO-VP6 eluoituu, kromatogrammin perusteella valituista fraktioista (kuvassa 5 kohdat 1–7) otettiin noin 50 µl:n näytteet. Näytteille tehtiin immunoreaktiivisuusmäärittäykset ja SDS-PAGE-analyysi. Kuvassa 6 näkyy puhdistusfraktiot SDS-PAGE-geelillä.

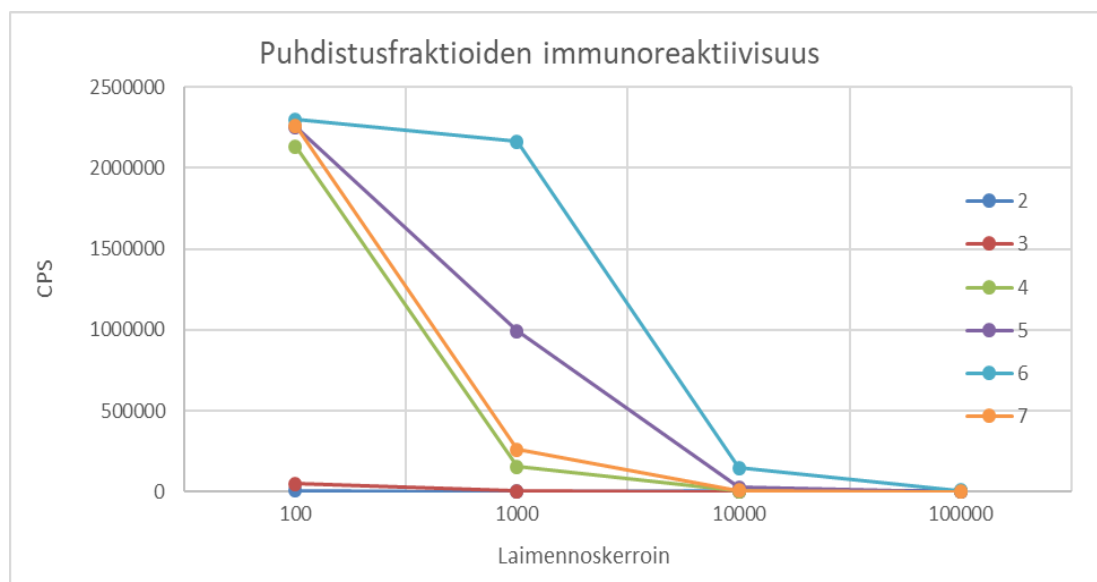


Kuva 6: Eluutiofraktioiden SDS-PAGE-analyysi PhastGel™ Blue R -värjättyllä PhastGel 10–15% -gradienttigelillä. Näytteet 1–7 on geelillä numerojärjestyksessä vasemmalta oikealle lukien, esim. näyte 1 on geelillä kohdassa 1.

SUMO-VP6-fuusioproteiinin tarkka koko ei ollut tiedossa. Keskimäärin SUMO-osat ovat noin 12 kDa:n kokoisia pieniä proteiineja. VP6 on kooltaan 45 kDa, joten yhdessä His₆-tagin (1 kDa) kanssa SUMO-VP6-proteiinin koko olisi arviolta noin 58 kDa. Aikaisemmissa tutkimuksissa SUMO-VP6:n on havaittu ajautuvan noin 55 kDa:n kohdalle [29].

SDS-PAGE-analyysin perusteella ensimmäinen piikki (näyte 1) kromatogrammissa on luultavasti häiriöpiikki, joka aiheutui todennäköisesti syöttöletkun vaihtamisesta. Näytteessä 2 on paljon epäpuhtautta ja selkeä vyöhyke 75 kDa:n kohdalla, joka ei todennäköisesti ole SUMO-VP6. Näytteessä 3 näkyy selkeä vyöhyke 69 kDa:n kohdalla. Näytteissä 4–7 näkyy vyöhykkeet noin 65 kDa:n kohdalla, mikä on todennäköisesti SUMO-VP6. Lisäksi näytteessä 4 näkyy myös toinen vyöhyke noin 69 kDa:n kohdalla. Näytteissä 4 ja 5 näkyy paljon erikokoisia epäpuhtauksia sekä vahvat vyöhykkeet 19 kDa kohdalla, jotka ovat todennäköisesti vapaata SUMO-proteiinia, jota solut ovat tuottaneet ylimäärin.

SDS-PAGE:n perusteella näyte 1 ei sisältänyt juurikaan proteiinia, joten immunoreaktiivisuuseritykset tehtiin näytteille 2–7. Kuvassa 7 on näytteiden immunoreaktiivisuuksista laimennoksilla 1:100–1:100 000 piirretyt kuvaajat.

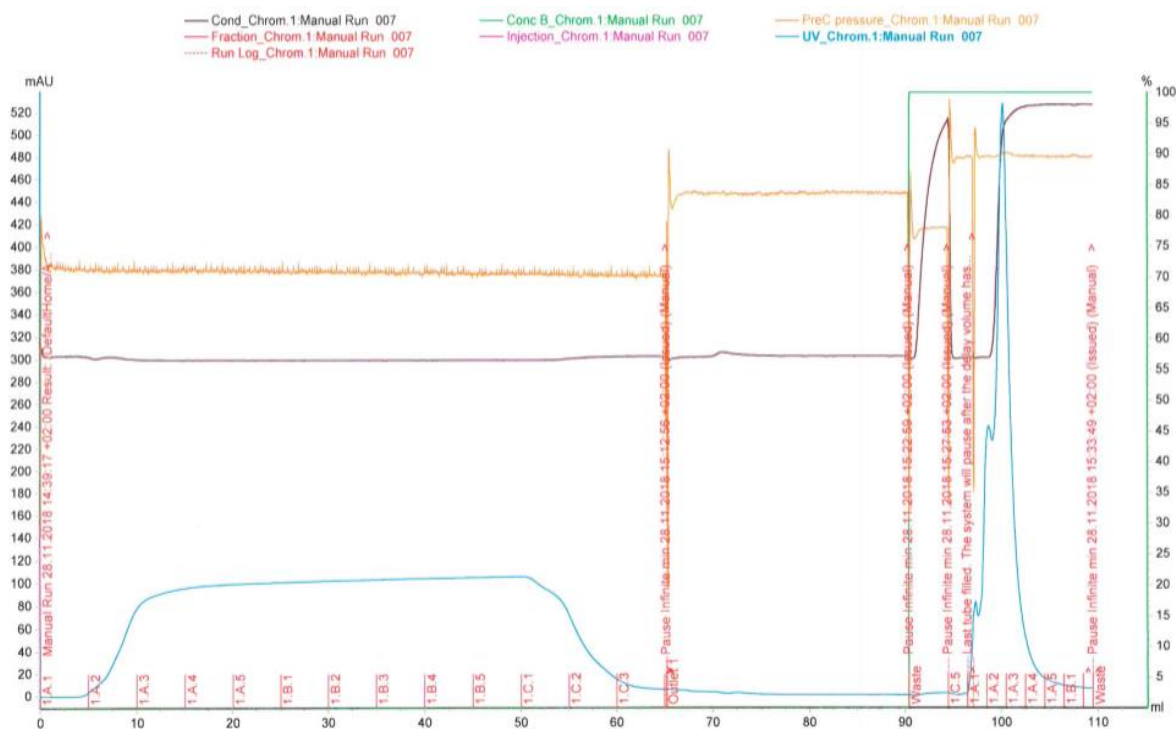


Kuva 7: Eluutiofraktioiden immunoreaktiivisuudet. Eluutiokromatogrammin kohdista 2–7 otetuista näytteistä tehtiin laimennokset välillä 1:100–1:100 000 ja niiden immunoreaktiivisuudet määritettiin FIA-menetelmällä.

SUMO-osan ei pitäisi oleellisesti vaikuttaa SUMO-VP6-fuusioproteiinin immunoreaktiivisuuteen. Kaikissa näytteissä oli havaittavissa immunoreaktiivisuutta, mutta näytteet 4–7 olivat selkeimmin immunoreaktiivisia. Näytteessä 6 oli selvästi eniten immunoreaktiivisuutta. SDS-PAGE:ssa näytteessä 6 oli vahva vyöhyke noin 65 kDa:n kohdalla. Tulosten perusteella noin 65 kDa:n kohdalla olevat vyöhykkeet ovat SUMO-VP6-proteiinia. Koska tässä vaiheessa ei ollut vielä täysin varmaa, mitkä fraktiot sisälsivät SUMO-VP6-fuusioproteiinin, fraktiot 1B10–2C2 (kuva 5) yhdistettiin proteiinin saannon maksimoimiseksi.

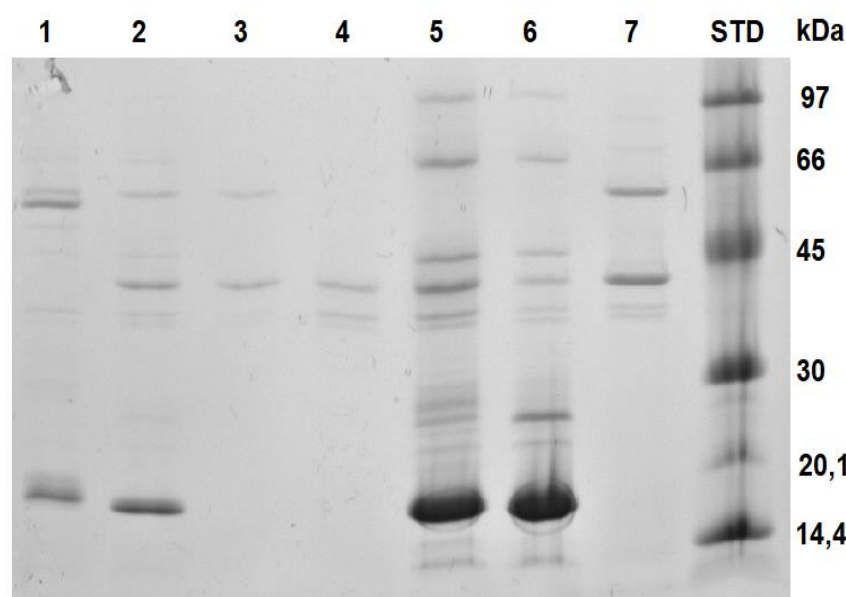
4.2 VP6-proteiinin erottaminen SUMO-osasta

ULP1-entsyymireaktion jälkeen VP6-proteiini erotettiin pilkkoutuneesta SUMO-osasta ja pilkkoutumattomasta SUMO-VP6-fuusioproteiinista ajamalla entsyymikäsitelty pooli uudestaan Ni-affiniteettipylvään läpi. Koska entsyymireaktiossa VP6-proteiinista on irronnut His₆-tagin sisältävä SUMO-osa, vapaa VP6-proteiini tulee suoraan pylvään läpi, kun taas irronneet SUMO-osat ja pilkkoutumattomat SUMO-VP6-fuusioproteiinit jäävät pylvääseen. Fraktioiden keräys aloitettiin heti näytteensyötöstä. Pylvään läpi tulleet fraktiot sisälsivät VP6-proteiinin. Kuvassa 8 on VP6-proteiinin puhdistuskromatogrammi.



Kuva 8: Entsyymikäsitellyn poolin puhdistuskromatogrammi. Fraktiot 1A2–1C3 sisälsivät läpi tulleen VP6-proteiinin ja fraktiot 1C5–1A5 pylvääseen tarttuneet SUMO-tagit ja pilkkoutumattomat SUMO-VP6-fuusioproteiinit.

Puhdistuskromatogrammin perusteella fraktiot 1A2–1C3 sisälsivät suoraan pylvään läpi tulleen vapaan VP6-proteiinin ja ne yhdistettiin. Fraktiot 1C5–1A5 ovat pylväästä eluoidut fraktiot, ja ne sisälsivät irronneet SUMO-osat ja pilkkoutumattomat SUMO-VP6-proteiinit. Puhdistuksen eri vaiheissa otetut näytteet analysoitiin SDS-PAGE:lla, joka on esitetty kuvassa 9.



Kuva 9: Puhdistusnäytteiden SDS-PAGE-analyysi PhastGel™ Blue R -värjättyllä PhastGel 10–15% -gradienttigelillä: 1: Ensimmäisen puhdistusvaiheen jälkeen yhdistetyt fraktiot, 2: Entsyymikäsittely pooli, 3: Entsyymireaktion jälkeen pylvään läpi tulleet fraktiot. 4: Eluutiofraktio 1A1, 5: Eluutiofraktio 1A2, 6: Eluutiofraktio 1A3, 7: Konsentroidu ja suodatettu lopputuote (VP6).

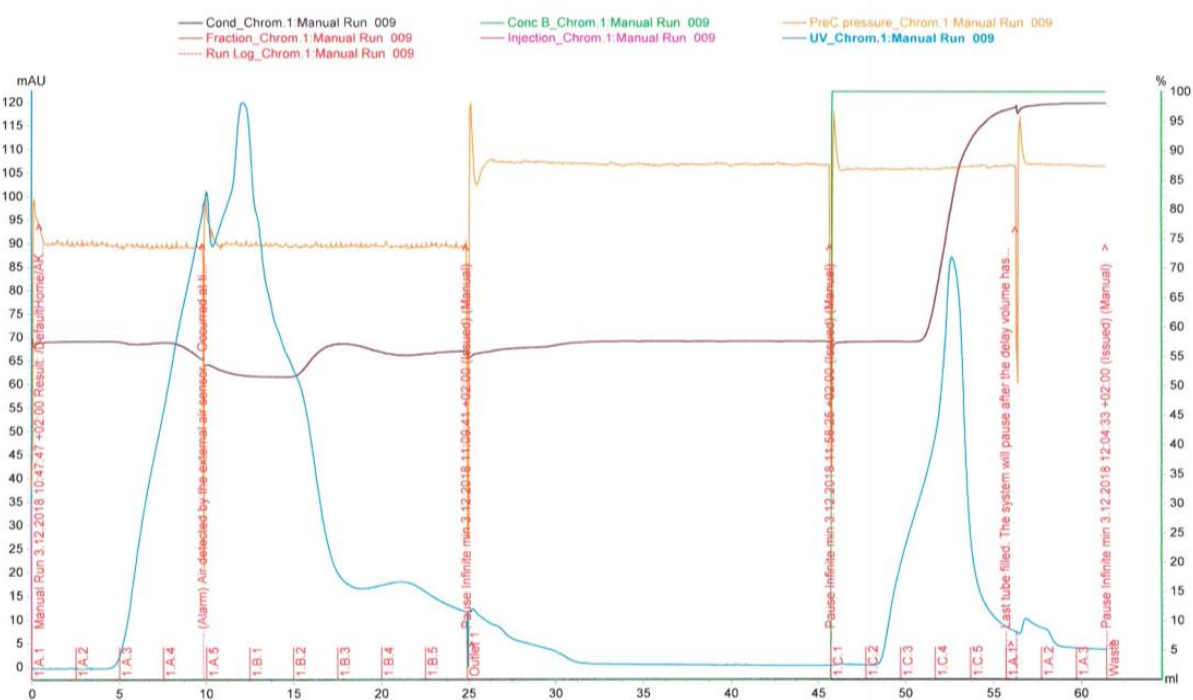
Geeliltä nähdään, että ensimmäisen puhdistusvaiheen jälkeen yhdistetyt fraktiot sisältävät SUMO-VP6-proteiinin: geelillä näkyy selvä vyöhyke noin 59 kDa:n kohdalla. Lisäksi havaitaan vyöhyke noin 17 kDa:n kohdalla, joka on todennäköisesti ylituotettua SUMO-proteiinia. Lisäksi geelillä näkyy heikompi vyöhyke noin 62 kDa:n kohdalla.

ULP1-entsyymikäsittelyn jälkeen SUMO-VP6-fuusioproteiini on pilkkoutunut vapaaksi VP6-proteiiniksi ja SUMO-osaksi. Geeliltä nähdään, että SUMO-VP6-proteiinin vyöhyke noin 59 kDa:n kohdalla on hävinnyt ja geelille on ilmestynyt noin 41 kDa:n vyöhyke, joka on luultavasti VP6-proteiini. Lisäksi geelillä näkyy noin 17 kDa:n vyöhyke, joka on todennäköisesti pilkkoutunut SUMO-osa. Geelillä näky edelleen hieman SUMO-VP6-fuusioproteiinia suurempi proteiini noin 62 kDa:n kohdalla, mikä on todennäköisesti epäpuhtautta. Entsyymireaktion jälkeen suoraan pylvään läpi tulleista fraktioista SUMO-osat ovat hävinneet, mutta VP6-proteiinin lisäksi geelillä näkyy edelleen sama epäpuhtaus noin 62 kDa:n kohdalla.

Eluutiofraktiot sisälsivät paljon epäpuhtauksia, jotka ovat todennäköisesti pylvääseen heikoilla vuorovaikutuksilla sitoutuneita proteiineja. Eluutiofraktioissa näkyy geelillä voimakkaat vyöhykkeet 17 kDa:n kohdalla, jotka ovat pilkkoutunutta SUMO-osaa.

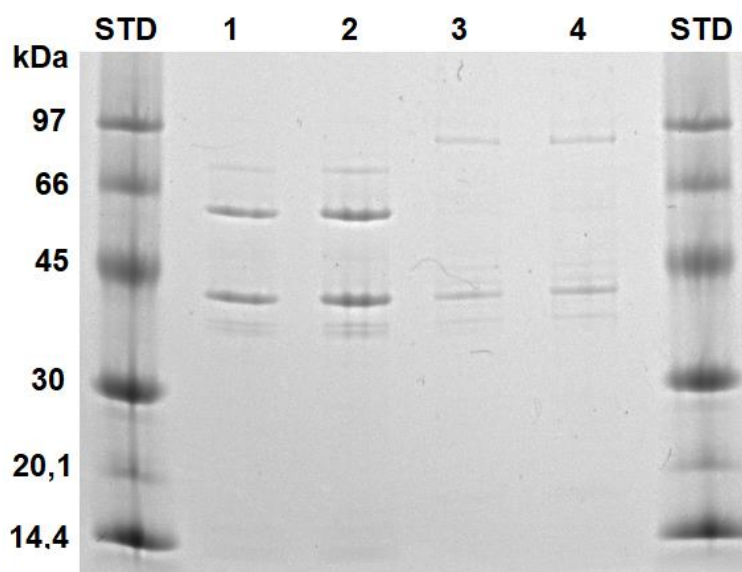
Tulosten perusteella entsyymireaktio vaikuttaisi toimineen. Siitä huolimatta lopputuotteessa havaitaan VP6-proteiinin vyöhykkeen (n. 42 kDa) lisäksi suurempi epäpuhtaus noin 62 kDa:n kohdalla, joka voi mahdollisesti olla pilkkoutumatonta SUMO-VP6-fuusioproteiinia. SUMO-VP6-proteiinin olisi pitänyt jäädä pylvääseen puhdistuksen toisessa vaiheessa, mutta on hyvin mahdollista, että pylvääseen on tarttunut niin paljon vapaata SUMO-osaa, että pieni osa pilkkoutumattomasta SUMO-VP6-proteiinista on päässyt pylvään läpi.

Tämän tarkistamiseksi lopputuote ajettiin toisen kerran pylvään läpi, jolloin SUMO-VP6-fuusioproteiinin pitäisi jäädä pylvääseen. Kuvassa 10 on esitetty ajon kromatogrammi.



Kuva 10: Lopputuotteen puhdistuskromatogrammi. Fraktiot 1A3–1B3 sisältävät pylvääseen tarttumatonta VP6-proteiinia. Eluutiovaiheen fraktiot 1C2–1A1 ovat pylväästä eluoituneita epäpuhtauksia.

Kromatogrammin perusteella pylväästä suoraan läpi tulleet VP6-proteiinin sisältävät fraktiot 1A3–1B3 yhdistettiin ja siitä otettiin näyte SDS-PAGE-analyysiä varten. Kromatogrammista nähdään, että lopputuote sisälsi jonkin verran epäpuhtauksia, sillä eluutiovaiheessa kromatogrammissa havaitaan selkeä piikki. Myös epäpuhtauksia sisältävät eluoidut fraktiot 1C2–1A1 yhdistettiin ja siitä otettiin näyte SDS-PAGE-analyysiä varten. SDS-PAGE-näytteet tehtiin sekä 2 x näytekupuriin että 5 x näytekupuriin, koska näytteen proteiinipitoisuus ei ollut selvillä. SDS-PAGE-geeli on esitetty kuvassa 11.

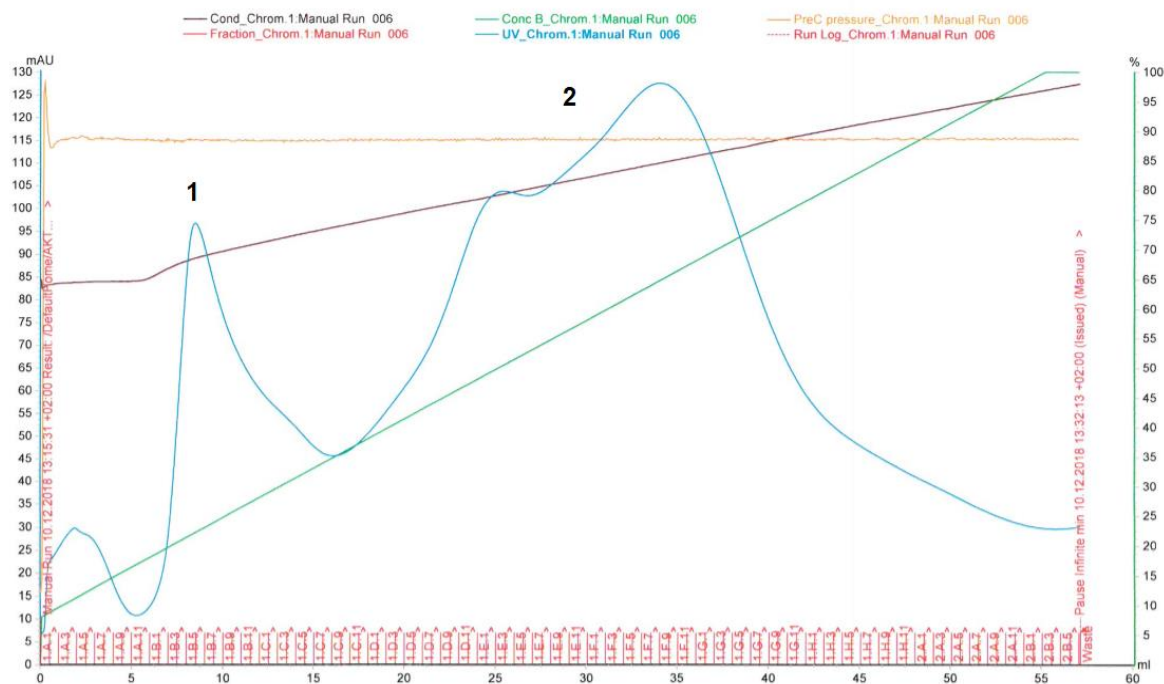


Kuva 11: Puhdistusnäytteen SDS-PAGE-analyysi PhastGel™ Blue R -värjättyllä PhastGel 10-15% -gradienttigelillä: 1: Pylvään läpi tulleet fraktiot 2 x näytempuskurissa, 2: Pylvään läpi tulleet fraktiot 5 x näytempuskurissa, 3: Eluutiofraktiot 2 x näytempuskurissa, 4: Eluutiofraktiot 5 x näytempuskurissa

Siitä huolimatta, että lopputuote ajettiin uudestaan Ni-affiniteettipylvään läpi, SDS-PAGE-geelillä näkyy edelleen VP6-proteiinin vyöhykkeen (42 kDa) lisäksi noin 62 kDa:n epäpuhtaus, joka tuskin on SUMO-VP6-fuusioproteiini. Eluutiofraktioiden perusteella nähdään että, jonkin verran epäpuhtauksia jäi pylvääseen, erityisesti 85 kDa:n epäpuhtaus näytti hävinneen.

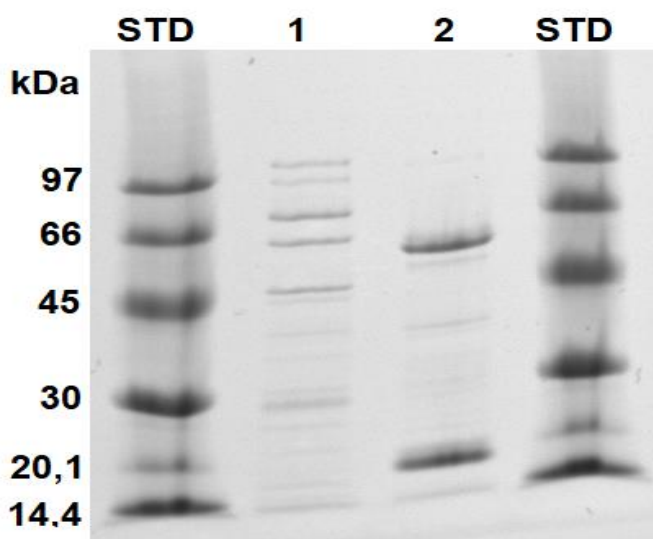
4.3 VP6-antigeenin puhdistusmenetelmän kehitys

Koska ensimmäisessä puhdistuksessa lopputuotteeseen jäi selvä epäpuhtaus, VP6-antigeenin puhdistusmenetelmää pyrittiin parantamaan, sillä bioreagensseinä käytettävien rekombinantiantigeenien on oltava ehdottoman puhtaita ja homologisia. SUMO-VP6-fuusioproteiinin puhdistaminen solulysaatista tehtiin kuten aiemminkin, jotta nähtäisiin vastaako SUMO-VP6-proteiinin eluutiokromatogrammi aikaisempaa. Kuvassa 12 on esitetty SUMO-VP6-fuusioproteiinin eluutiokromatogrammi



Kuva 12: SUMO-VP6-proteiinin eluutiokromatogrammi. Ensimmäisen piikin (1) sisältävät fraktiot 1B1–1C8 ja toisen leveämmän piikin (2) sisältävät fraktiot 1C9–2A9 yhdistettiin erikseen.

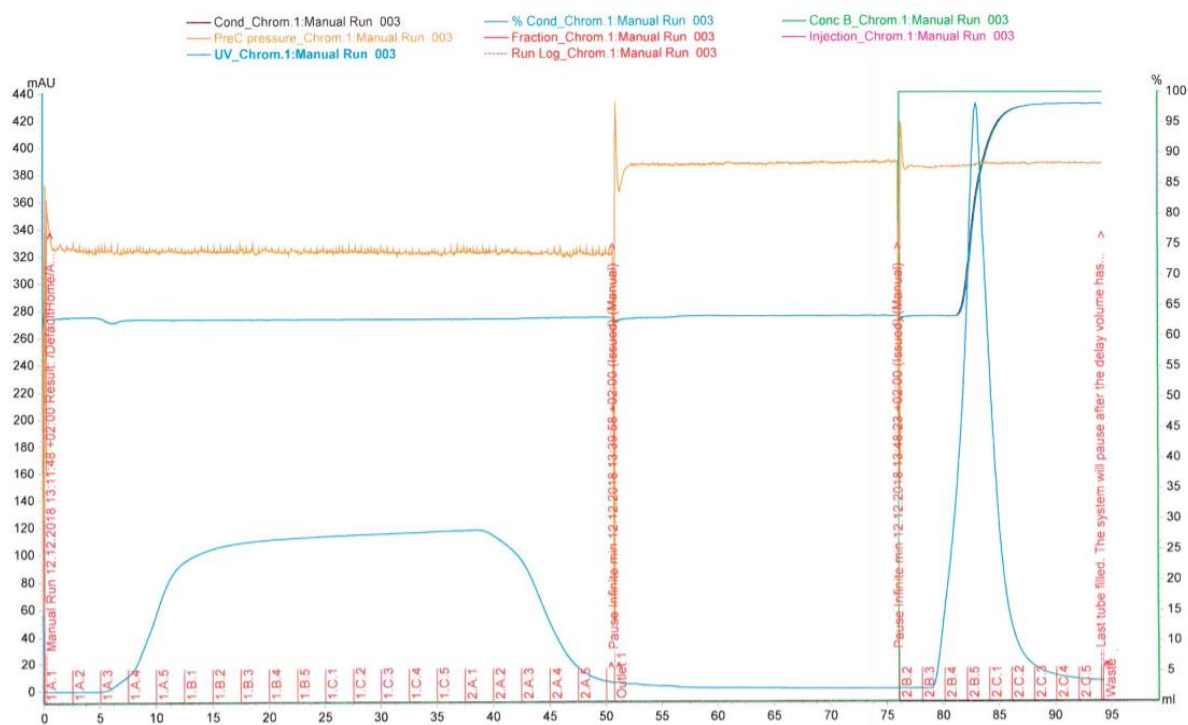
SUMO-VP6-fuusiproteiinin eluutiokromatogrammi vastasi muodoltaan ensimmäisen puhdistuksen kromatogrammia lukuun ottamatta häiriöpiikkiä, joka onnistuttiin poistamaan. Eluutiofraktiot yhdistettiin siten, että ensimmäisen piikin (kuva 12, kohta 1) sisältävät fraktiot 1B1–1C8 ja toisen leveämmän piikin (kuva 12, kohta 2) sisältävät fraktiot 1C9–2A9 yhdistettiin erikseen, koska ensimmäisessä puhdistuksessa havaittu epäpuhtaus saattoi aiheutua siitä, että ensimmäisen puhdistuksen kromatogrammin (kuva 5) toisen piikin sisältävät fraktiot sisälsivätkin SUMO-VP6-proteiinin lisäksi pylvääseen löyhästi sitoutunutta ja saman kokoista epäpuhtautta. Yhdistetyistä fraktioista otettiin näytteet, jotka analysoitiin SDS-PAGE-geelillä, joka on esitetty kuvassa 13.



Kuva 13: Puhdistusnäytteiden SDS-PAGE-analyysi PhastGel™ Blue R -värjättyllä PhastGel 10–15% -gradienttigelillä. 1: Ensimmäisen piikin sisältävät fraktiot 1B1–1C8. 2: Toisen piikin sisältävät fraktiot 1C9–2A9.

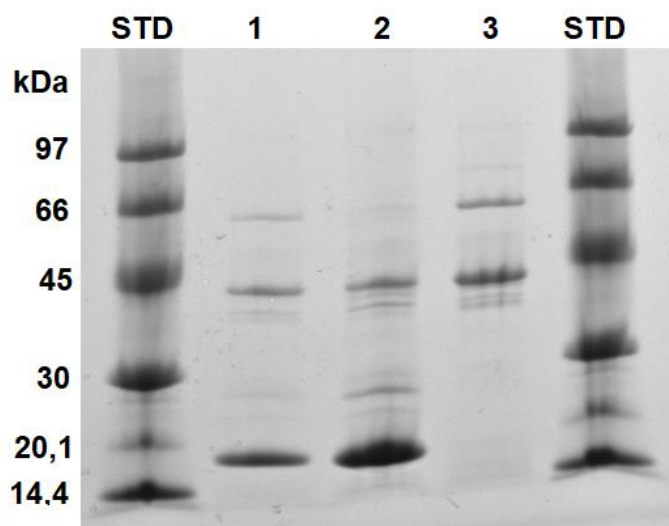
Geeliltä nähdään, että kromatogrammin ensimmäinen piikki sisältää paljon epäpuhtauksia, mukaan luettuna aikaisemmassa puhdistuksessa näkyneen 62 kDa:n epäpuhtauden. Toisen eluutiopiikin sisältävässä poolissa nähdään SUMO-VP6-fuusioproteiini noin 60 kDa:n kohdalla. Kuten myös ensimmäisessä puhdistuksessa, geelillä näkyy myös vyöhyke noin 19 kDa:n kohdalla, joka on todennäköisesti ylituotettua SUMO-proteiinia. SDS-PAGE:n perusteella ensimmäisen piikin sisältävä pooli hävitettiin ja puhdistusta jatkettiin SUMO-VP6-fuusioproteiinin sisältävällä poolilla.

Entsyymikäsittely suoritettiin SUMO-VP6-fuusioproteiinin sisältävälle poolille kuten ensimmäisessä puhdistuksessa. Entsyymireaktion jälkeen pooli ajettiin Ni-affiniteettipylvään läpi. Ajon kromatogrammi on esitetty kuvassa 14.



Kuva 14: Entsyymikäsitellyn poolin puhdistuskromatogrammi. Fraktiot 1A3–2A5 sisälsivät läpitulleen VP6-proteiinin ja fraktiot 2B3–2C3 pylvääseen tarttuneet SUMO-osat ja pilkkoutumattomat SUMO-VP6-fuusioproteiinit.

Kromatogrammin perusteella läpi tulleet VP6-proteiinin sisältävät fraktiot 1A3–2A5 yhdistettiin. Pylvääseen jäänyt materiaali eluoiitiin ja eluoituneen materiaalin sisältämät fraktiot 2B3–2C3 yhdistettiin. Näytteet entsyymikäsitelystä poolista, yhdistetyistä eluotiofraktioista sekä dialysoidusta ja konsentroidusta lopputuotteesta analysoidiin SDS-PAGE:lla, joka on esitetty kuvassa 15.



Kuva 15: Puhdistusnäytteiden SDS-PAGE-analyysi PhastGel™ Blue R -värjättyllä PhastGel 10–15% -gradienttigelillä. 1: Entsyymikäsitelty pooli, 2: Eluutiofraktiot 2B3–2C3, 3: Puhdistettu, dialysoitu ja konsentroitunut lopputuote

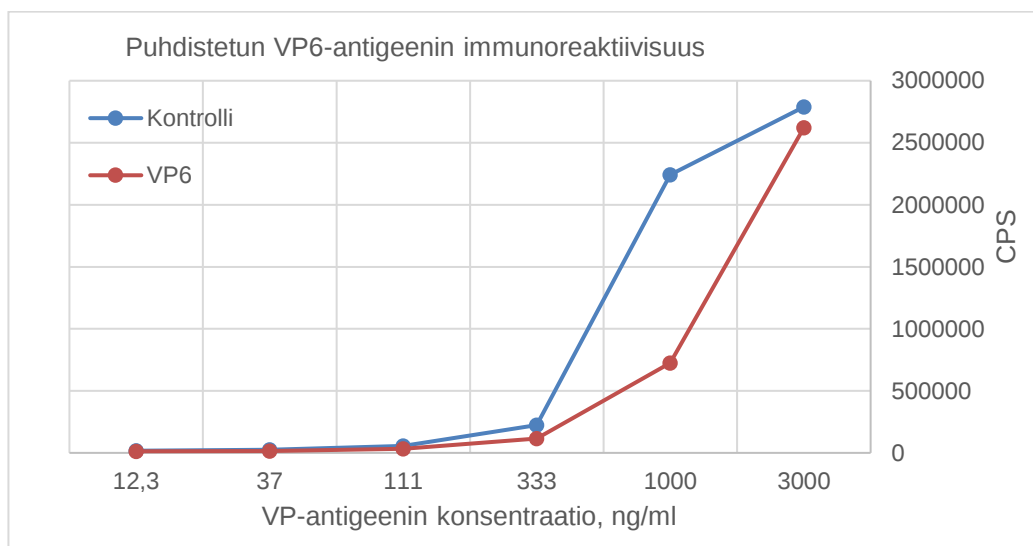
Kuvassa 15 olevalta geeliltä nähdään, että entsyymireaktio on toiminut. Aikaisemmassa SDS-PAGE:ssa (kuva 13) näkyvä SUMO-VP6-fuusioproteiinin vyöhyke 60 kDa:n kohdalla on hävinnyt ja geelillä näkyy VP6-proteiinin vyöhyke 42 kDa:n kohdalla ja irronneen SUMO-osan vyöhyke 19 kDa:n kohdalla. Eluutiofraktioissa näkyy paljon epäpuhtauksia sekä irronnutta SUMO-osaa. Lisäksi näkyy myös voimakas vyöhyke noin 42 kDa:n kohdalla, joka on joko VP6 tai saman kokoinen epäpuhtaus. Huolimatta ensimmäisen puhdistusvaiheen eluutiofraktioiden erilaisesta yhdistämisestä, geelillä nähdään edelleen sama epäpuhtaus noin 62 kDa:n kohdalla. SDS-PAGE:n perusteella epäpuhtauden määrä suhteessa VP6-proteiinin on kuitenkin vähentynyt, sillä epäpuhtautena näkyvä vyöhyke ei ole niin voimakas verrattuna VP6-proteiinin vyöhykkeeseen kuin ensimmäisessä puhdistuksessa.

4.4 VP6-antigeenin immunoreaktiivisuus

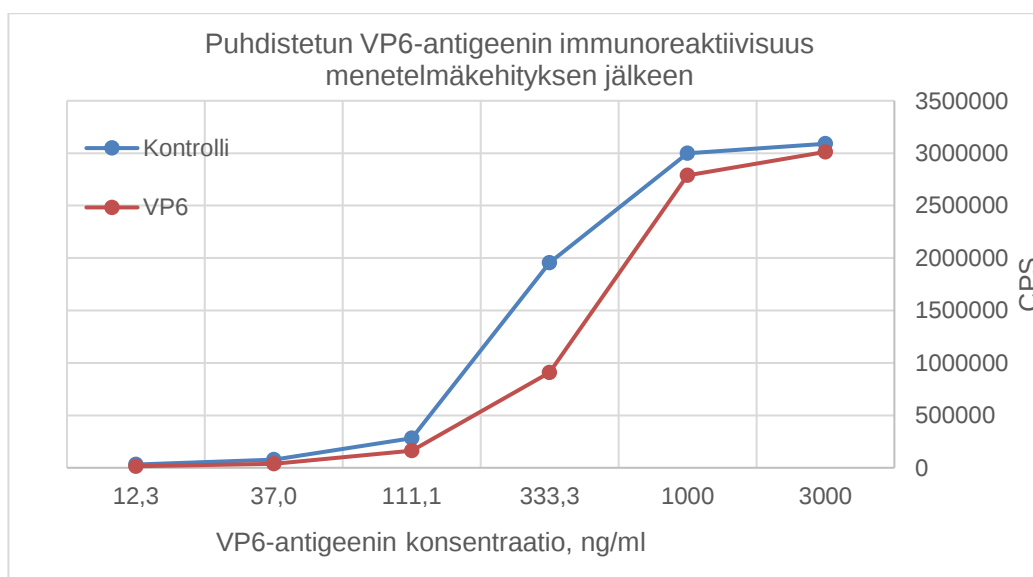
4.4.1 Immunoreaktiivisuusmääritykset

Kuuden pisteen immunoreaktiivisuustestiä varten puhdistetuille VP6-antigeeneille tehtiin immunoreaktiivisuusmäärityksiä eri laimennoksissa. Tarkoituksena oli löytää maksimipitoisuus, jossa immunoreaktiivisuus saavuttaa maksimiarvon ja kuusi laimennospistettä

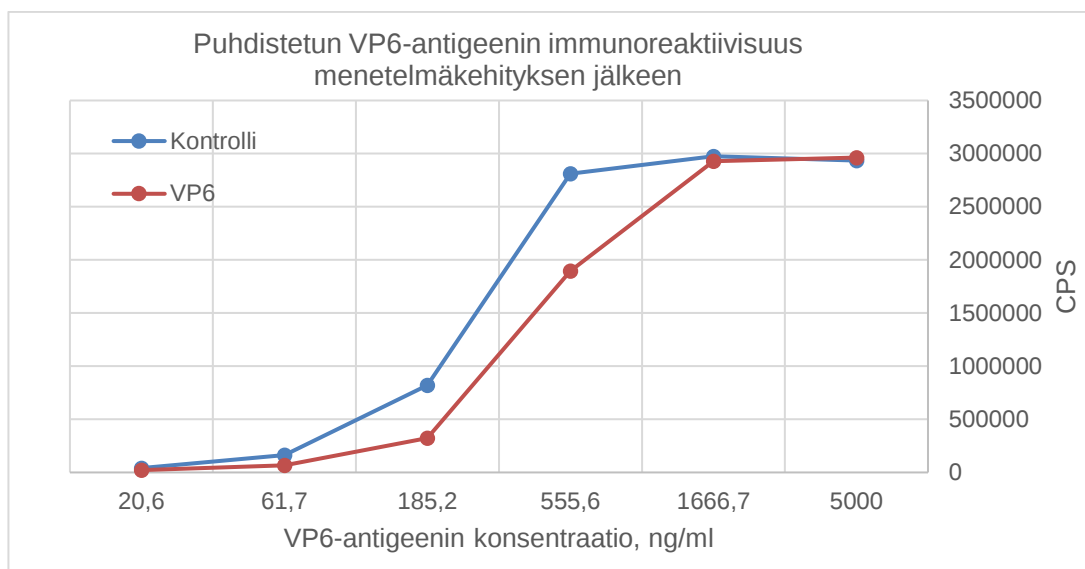
siten, että saadaan sigmoidaalinen käyrä, jonka lineaariselta osalta voidaan verrata antigeenin pitoisuuksia testattavien näytteiden välillä. Kuvassa 16 on esitetty puhdistetun VP6-antigeenin immunoreaktiivisuus eri laimennospisteissä. Kuvissa 17 ja 18 on esitetty menetelmän kehittämisen jälkeen puhdistetun VP6-antigeenin immunoreaktiivisuus eri laimennospisteissä.



Kuva 16: Puhdistetun VP6-antigeenin immunoreaktiivisuus. Maksimipitoisuutena oli 3 µg/ml.



Kuva 17: Puhdistetun VP6-antigeenin immunoreaktiivisuus menetelmäkehityksen jälkeen. Maksimipitoisuutena oli 3 µg/ml.

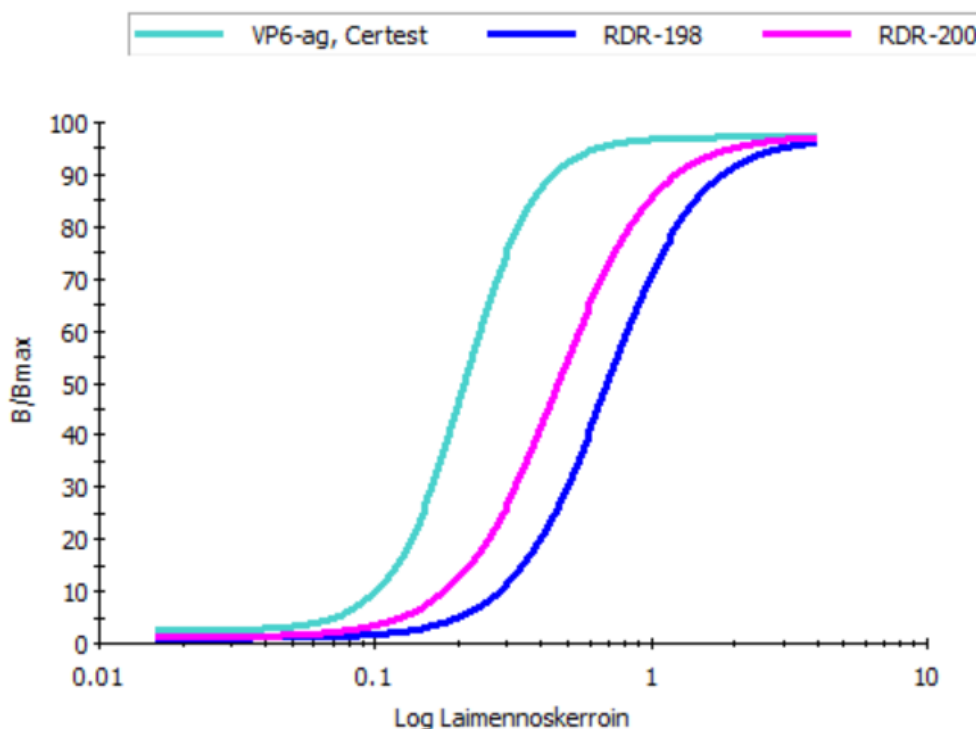


Kuva 18: Puhdistetun VP6-antigeenin immunoreaktiivisuus menetelmäkehityksen jälkeen. Maksimipitoisuutena oli 5 µg/ml

Immunoreaktiivisuustestien perusteella valittiin VP6-antigeenin maksimipitoisuudeksi 5 µg/ml ja 6 laimennospistettä laimentamalla 1:3 alkaen pitoisuudesta 4 µg/ml.

4.4.2 Kuuden pisteen immunoreaktiivisuustesti

Kuuden pisteen immunoreaktiivisuustestillä määritettiin puhdistetuille VP6-antigeeneille IC50-arvot suhteessa kontrolliin. Kontrollina oli kaupallinen rekombinantti-VP6 (Cer-Test). IC50-arvo kuvaa antigeenin pitoisuutta, kun antigeenin sitoutuminen vasta-aineseen saavuttaa puolet maksimista. Kuvassa 19 on WorkOut 2.5 -analyysiohjelmalla saadut sitomiskuvaajat, joista ohjelma laski IC50-arvot. Mitä pienempi IC50 arvo, sitä pienempi pitoisuus tarvitaan saavuttamaan maksimaalinen sitoutuminen ja sitä parempi on antigeenin immunoreaktiivisuus.



Kuva 19: WorkOut 2.5 -ohjelmalla saadut sitomiskuvaajat kontrollille ja VP6-antigeenin puhdistuserille. Kontrolli: VP6-ag, Certest, RDR-198: VP6-antigeeni, RDR-200: VP6-antigeeni menetelmäkehityksen jälkeen.

Sitomiskuvaajien perusteella ensimmäisessä puhdistuksessa saadun VP6-antigeenin immunoreaktiivisuus oli 30 % kontrollista. Menetelmäkehityksen jälkeen immunoreaktiivisuus oli 46 % kontrollista. Immunoreaktiivisuus oli selvästi parantunut menetelmäkehityksen ansiosta. SDS-PAGE:ssä näkynyt epäpuhtaus lopputuotteessa todennäköisesti heikentää immunoreaktiivisuutta. SDS-PAGE:n perusteella toisessa puhdistuserässä oli vähemmän epäpuhtautta suhteessa VP6-proteiinin, mikä näkyy parempana immunoreaktiivisuutena.

5 Pohdinta ja johtopäätökset

Opinnäytetyön tarkoituksena oli kehittää VP6-antigeenin puhdistusmenetelmää. Tässä työssä SUMO-VP6-fuusioproteiinin tuottaminen *E. coli*ssa toimi hyvin, mutta sen puhdistaminen ei ollut aivan yksiselitteistä. SUMO-VP6-proteiinin eluutiokromatogrammissa havaittiin useampi piikki ja tulosten perusteella SUMO-VP6-fuusioproteiini eluoituu useammassa kohdassa. Tämä saattaa aiheutua VP6-proteiinin taipumuksesta muodostaa trimeerejä ja suurempia komplekseja. [30; 31.] Osa SUMO-fuusioproteiinista saattaa muodostaa erilaisia komplekseja, mikä voi vaikuttaa fuusioproteiinin ja siihen liitetyn His₆-tagin vuorovaikutukseen Ni-affiniteettipylvään kanssa, jolloin osa fuusioproteiinista on heikommin sitoutunutta ja eluoituu eri vaiheessa. Tätä tukee havainto, että gradientin alussa eluoituneissa fraktioissa oli immunoreaktiivisuutta. Vaikka SUMOlaatio edistää VP6-proteiinin liukoisuutta, aikaisemmassa tutkimuksessa on havaittu, että noin 20 % tuotetusta fuusioproteiinista on kuitenkin liukenematonta. [29.]

SUMO-VP6-fuusioproteiinin eluoituminen gradientin eri vaiheissa tekee fraktioiden yhdistämisestä haastavaa. Molemmissa lopputuotteissa näkynyt epäpuhtaus aiheutui todennäköisesti liian laajalla skaalalla tehdystä fraktioiden yhdistämisestä. Tulosten perusteella eluutiopuskurin noin 50 %:n ja sitä suuremmalla gradientilla eluoituvat fraktiot ovat puhtaimpia. Gradientin alussa eluoituneet fraktiot todennäköisesti sisälsivät SUMO-VP6-fuusioproteiinin lisäksi pylvääseen löyhästi sitoutunutta ja saman kokoista epäpuhtautta, jota on vaikea erottaa SDS-PAGE-geeliltä SUMO-VP6-fuusioproteiinista. Koska epäpuhtaus on kooltaan samaa luokkaa kuin SUMO-VP6-fuusioproteiini, se havaitaan SDS-PAGE:ssa vasta entsyymireaktion jälkeen, kun SUMO-VP6-fuusioproteiinin vyöhyke häviää. SUMO-VP6-fuusioproteiinin vyöhykkeen yläpuolella (kuva 13) vaikuttaisikin olevan toinen heikosti havaittavissa oleva vyöhyke, joka on selvästi havaittavissa vasta entsyymireaktion jälkeen (kuva 15). SDS-PAGE-analyysin lisäksi fraktiot olisi mahdollista analysoida immunoblottauksella käyttämällä anti-His₆- tai anti-VP6-vasta-ainetta, jolloin voitaisiin tarkemmin osoittaa, mitkä fraktiot todella sisältävät SUMO-VP6-fuusioproteiinin.

Epäpuhtaus haittasi proteiinipitoisuuden määrittystä, joka tehtiin mittaamalla näytteiden absorbanssi aallonpituudella 280 nm. Epäpuhtautena oleva proteiini lisää näytteen absorbanssia, jolloin saadaan tulokseksi liian suuria pitoisuuksia. Tämän vuoksi SUMO-osan irrottamiseksi SUMO-VP6-fuusioproteiinista lisätyn ULP1-entsyymin pitoisuus oli todennäköisesti liian suuri. ULP1-entsyymi on kuitenkin hyvin spesifinen proteaasi, sillä

se tunnistaa SUMO-osan tertiäärirakenteen aminohapposekvenssin sijaan, joten sen ylimäärä ei todennäköisesti aiheuta epäspesifistä pilkkoutumista. [38.] Entsyymireaktio vaikuttikin toimivan hyvin, sillä SDS-PAGE:n perusteella irronnut SUMO-osa jäi tehokkaasti pylvääseen puhdistuksen toisessa vaiheessa.

Puhdistetun VP6-antigeenin proteiinipitoisuuden määrittästä vaikeutti epäpuhtauden lisäksi lisätty DTT, joka toimii puskurissa pelkistimenä, jolloin se itse hapettuu. Hapettuneena DTT absorboi aallonpituudella 280 nm. [39.] Tämän takia spektrofotometrin nollauksessa käytetyn nollanäytteen pitäisi sisältää vastaava määrä hapettunutta DTT:ia. Nollanäyte ei sisällä proteiinia, jolloin lisätyn DTT:n hapettumisaste on eri kuin näytteessä. Esimerkiksi entsyymireaktion jälkeisessä proteiinimäärityksessä proteiinipitoisuus vaikutti lisääntyneen, mikä aiheutui näytteeseen lisätyn DTT:n hapettumisesta.

Lopputuotteen proteiinimäärityksessä DTT:n vaikutus huomioitiin siten, että nollanäytteenä käytettiin viimeisessä dialyysissä käytettyä säilytyspuskuriä. Dialyysissä käytetyn puskurin sisältämän DTT:n hapettumisaste oli sama kuin lopputuotteessa, koska näytteen proteiinien kanssa vuorovaikutuksessa ollut ja siten hapettunut DTT pääsee liikkumaan dialyysikalvon läpi, jolloin nollanäytteenä käytetyn puskurin sisältämän hapettuneen DTT:n määrä on kutakuinkin sama kuin näytteessä. Vaihtoehtoisena pelkistimenä olisi mahdollista käyttää β -merkaptetaanolia (BME). BME:a ja DTT:a käytetään samaan tarkoitukseen, mutta ne eroavat kemiallisilta ominaisuuksiltaan. BME on helposti haihtuva ja myrkyllinen yhdiste. Lisäksi BME:lla on voimakas ja epämiellyttävä tuoksu. BME:n käyttäminen pelkistimenä edellyttäisi, että tuotetta käsitellään vetokaapissa. Koska BME haihtuu liuoksista helposti, sen pitoisuus muuttuu ajan kanssa, mikä saattaa vaikuttaa sen pelkistyskykyyn. Näiden ominaisuuksien takia BME ei sovellu käytettäväksi kaupallisissa bioreagensseissa.

Puhdistuksen viimeisessä vaiheessa VP6 konsentroitiin pitoisuuteen 1 mg/ml, minkä jälkeen lopputuote suodatettiin 0,2 μ m:n steriilisuodattimella. Kummassakin puhdistuksessa VP6-antigeenin pitoisuus laski suodatuksen jälkeen noin 30 %. Korkean VP6-antigeenin pitoisuuden on havaittu olevan tärkeää multimeeristen rakenteiden muodostumiselle. VP6:n on havaittu muodostavan suuremmissa pitoisuuksissa multimeerisiä rakenteita sekä *in vivo* että *in vitro* [40] ja lisäksi kykenevän muodostamaan myös epä säännöllisiä partikkeleita [41]. Vaikka säilytyspuskuriin lisätyn DTT:n tarkoituksena on

estää rikkisiltojen muodostuminen VP6-monomeerien välillä ja siten suurempien kompleksien muodostuminen, pitoisuuden väheneminen suodatuksessa saattaa hyvinkin aiheutua siitä, että konsentroinnin aikana on päässyt muodostumaan suurempia VP6-komplekseja.

Yllä mainittujen seikkojen vuoksi VP6-antigeenin puhdistaminen on haastavaa. SUMO-VP6-proteiinin puhdistusta Ni-affiniteettikromatografialla voi kokeilla parantaa mm. lisäämällä NaCl:n pitoisuutta, mikä vähentäisi elektrostaattisia vuorovaikutuksia ja siten epäpuhtauksien epäspesifistä sitoutumista pylvääseen. NaCl-pitoisuuden lisääminen saattaisi vähentää myös heikommin sitoutuvien VP6-kompleksien jäämistä pylvääseen, jolloin saanto heikkenee. Myös hitaammalla eluutionopeudella on mahdollista saada epäpuhtaudet erottumaan selkeämmin, jolloin maksimoidaan saanto heikentämättä puhdautta. Lisäksi lopputuotteen konsentroidussa voisi olla perusteltua jäädä alhaisempaan pitoisuuteen, jolloin minimoitaisiin suurempien VP6-kompleksien muodostuminen ja lopputuotteen hävikki suodatuksessa.

VP6-antigeenin puhdistusta ja tuottoa voi olla mahdollista parantaa käyttämällä vaihtoehtoisia tuotto-organismeja. Vaikka *E. coli* on heterologisten proteiinien tuottamisessa yleisimmin käytetty isäntä, näiden proteiinien on havaittu muodostavan suurempia inkluusiokappaleita, jotka vaikeuttavat proteiinien puhdistamista. Sen sijaan metylotrooppisten hiivojen, kuten *Pichia pastoriksen* ja *Hansenula polymorphan*, suuren skaalan fermentoinnin on havaittu olevan tehokas tapa tuottaa rotaviruksen VP6-proteiinia suurina pitoisuuksina. [34.]

Lähteet

- 1 Cruse, Julius M. & Lewis, Robert E. 1995. Illustrated Dictionary of Immunology. 1st ed. New York: CRC Press.
- 2 Janeway, Charles A.; Travers, Paul; Walport, Mark & Shlomchik, Mark. 2001. Immunobiology. 5th ed. New York: Garland Publishing.
- 3 Chothia, Cyrus; Lesk, Arthur M.; Tramontano, Anna; Levitt, Michael; Smith-Gill, Sandra J.; Air, Gillian; Sheriff, Steven; Padlan, Eduardo A.; Davies, David; Tulip, William R.; Colman, Peter M.; Spinelli, Silvia; Alzari, Pedro M. & Poljak, Roberto J. 1989. Conformations of Immunoglobulin hypervariable region. Nature. Vol. 342, s. 877–883.
- 4 Sinha, Neeti; Mohan, Srinivasan; Lipschultz, Claudia A. & Smith-Gill, Sandra J. 2002. Differences in Electrostatic Properties at antibody-antigen Binding sites: Implications for Specificity and Cross-Reactivity. Biophysical Journal. Vol. 83 s. 2946–2968.
- 5 Laín, Ana; Elguezabal, Natalia; Amutio, Elena; Fernández de Larrinoa, Iñigo; Moragues, María Dolores & Pontón, José. 2008. Use of recombinant antigens for the Diagnosis of Invasive Candidiasis. Verkkosivusto. Clinical and Developmental Immunology. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2276615/>> 11.3.2008. Luettu 10.1.2019
- 6 Bornhorst, Joshua & Falke, Joseph. 2000. Purification of Proteins Using Polyhistidine Affinity Tag. Methods in Enzymology. Vol. 326, s. 245–25.
- 7 Yolken, R. H. 1980. Enzyme-linked Immunosorbent assay (ELISA): a practical tool for rapid diagnosis of viruses and other infectious agents. The Yale Journal of Biology and medicine. Vol. 53, s. 85–92.
- 8 Ng, Valerie L. 1991. Serological Diagnosis of Recombinant Peptides/Proteins. Clinical Chemistry. Vol. 37, s. 1667–1668.
- 9 Liessenfeld, Oliver; Press, Cynthia; Montoya, Jose G.; Gill, Raj; Isaac-Renton, Judith L.; Hedman, Klaus & Remington, Jack S. 1997. False-Positive results in immunoglobulin M (IgM) Toxoplasma antibody tests and importance of confirmatory testing: the Platelia Toxo IgM test. Journal of Clinical Microbiology. Vol. 35, s. 174–178.
- 10 Umezawa, Eufrosina S.; Bastos, Sueli F.; Camarargo, Mario E.; Yamauchi, Luci M.; Santos, Márcia R.; Gonzalez, Antonio; Zingales, Bianca; Levin, Mariano J.; Sousa, Octavio; Rangel-Aldao, Rafael & Franco Da Silveira, José. 1999. Evaluation of Recombinant Antigens for Serodiagnosis of Chagá's Disease in South and Central America. Journal of Clinical Microbiology. Vol. 37, s. 1554–1560.

- 11 Hoelzle, Katharine; Grimm, Julia; Ritzmann, Mathias; Heinritzi, Karl; Torgerson, Paul; Hamburger, Anja; Wittenbrink, Max M. & Hoelzle, Ludwig E. 2007. Use of Recombinant Antigens to Detect Antibodies against *Mycoplasma suis*, with Correlation of Serological Results to Hematological Findings. *Clinical and Vaccine Immunology*. Vol. 14, s. 1616–1622.
- 12 Fukushi, Shuetsu; Tani, Hideki; Yoshikawa, Tomoki; Saijo, Masayuki & Morikawa, Shigeru 2012. Serological Assays Based on Recombinant Viral Proteins for the Diagnosis of Arenavirus Hemorrhagic Fevers. *Viruses*. Vol. 4, s. 2097–2114.
- 13 Rehnuma, B.; Ibrahim, M. & Nasir, T. 2015. Quality Assurance and Quality Control in Clinical Laboratories. *Pulse*. Vol. 8, s. 62-65.
- 14 Bell, David; Bwanika, John Baptist; Cunningham, Jane; Gatton, Michelle; González, Iveth J.; Hopkins, Heidi; Kibira, Simon Peter S.; Kyabayinze, Daniel J.; Mayxay, Mayfong; Ndawula, Bbaale; Newton, Paul N.; Phommasone, Koukeo; Streat, Elizabeth & Umlauf, René 2017. Prototype Positive Control Wells for Malaria Rapid Diagnostic Tests: Prospective Evaluation of Implementation Among Health Workers in Lao People's Democratic Republic and Uganda. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. Vol. 96, s. 319–329.
- 15 Kozel, Thomas R. & Burnham-Marusic, Amanda R. 2017. Point-of-Care Testing for Infectious Diseases: Past, Present and Future. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 55, s. 2313–2320.
- 16 Stürenburg, Enno & Junker, Ralf. 2009. Point-of-Care testing in Microbiology: The Advantages and Disadvantages of Immunochromatographic Test Strips. *Dtsch Arztebl Int*. Vol. 106, s. 48–54.
- 17 Koczula, Katarzyna M. & Gallotta, Andrea. 2016. Lateral Flow assays. *Essays in Biochemistry*. Vol. 60, s. 111–120.
- 18 Leo, Megan; Haque, Rashidul; Kabir, Mamun; Roy, Shantanu; Lahlou, Rita Marie; Mondal, Dinesh; Tannich, Egbert & Petri Jr., William A. 2006. Evaluation of *Entamoeba histolytica* Antigen and Antibody Point-of-Care Tests for the Rapid Diagnosis of Amebiasis. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 44, s. 4569–4571.
- 19 Crawford, Sue E.; Ramani, Sasirekha; Tate, Jacqueline E.; Parashar, Umesh D.; Svensson, Lennart; Hagbom, Marie; Franco, Marie; Greenberg, Harry B.; O’Ryan, Miguel; Kang, Gagandeep; Desselberger, Ulrich & Estes, Mary K. 2018. Rotavirus Infection. *Verkkoaineisto. National Reviews Disease Primers*. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5858916/>> 9.11.2017. Luettu 12.1.2019

- 20 Matthijssens, Jelle; Otto, Peter; Ciarlet, Max; Desselberger, Ulrich; Ranst, Marc & Reimar, Johne. 2012. VP6-sequence-based cutoff values as a criterion for rotavirus species demarcation. *Archives of Virology*. Vol. 157 s. 1177–1182.
- 21 Tiilikainen, Anja S.; Vaara, Martti & Vaheri, Antti. 1996. *Lääketieteellinen mikrobiologia*. 5. painos. Helsinki: Duodecim.
- 22 Parashar, Umesh D.; Hummelman, Erik G.; Bresee, Joseph S.; Miller, Mark A.; & Glass, Roger I. 2003. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerging Infectious Diseases*. Vol. 9, s. 565–752.
- 23 Hyser, Joseph M.; Collinson-Pautz, Matthew R.; Utama, Budi; & Estes, Mary K. 2010. Rotavirus Disrupts Calcium Homeostasis by NSP4 Viriporin Activity. *mBio*.1(5): e00265-10.
- 24 Raboni, Sonia M.; Nogueira, Meri B.; Hakim, Valeria M.; Torrecilha, Vivian T.G.; Lerner, Henrique & Tsuchiya, Luine R.V. 2002. Comparison of Latex Agglutination with Enzyme Immunoassay for Detection of Rotavirus in Fecal Specimens. *American Journal of Clinical Pathology*. Vol.117, s. 392–394.
- 25 Manual of rotavirus detection and characterization methods. Verkkoaineisto. World Health Organization. 2009. <<https://apps.who.int/iris/handle/10665/70122>> Luettu 9.1.2019
- 26 Kumar, Naveen; Malik, Yashpal Singh; Kumar, Satish; Sharma, Kuldeep; Sircar, Subhankar; Saurabh, Sharad; Gulati, Baldev R.; Singh, Neeraj; Singh, Arvind Kumar; Joshi, Vinay G.; Banyai, Krisztian & Dhama, Kuldeep. 2016. Peptide-Recombinant VP6 Protein Based Enzyme Immunoassay for the Detection of Group A Rotaviruses in Multiple Host Species. *PLOS ONE*. 11(7): e0159027.
- 27 Kavanagh, Owen; Zeng, Xi-Lei; Ramani, Sasirekha; Mukhopadhy, Indranila; Crawford, Sue E.; Kang, Gagandeep & Estes, Mary K. 2013. A time-resolved immunoassay to measure serum antibodies to the rotavirus VP6 capsid protein. *Journal of Virological Methods*. Vol. 189, s. 228–23
- 28 Brigitte Cheuvart. 2014. Association of serum anti-rotavirus immunoglobulin A antibody seropositivity and protection against severe rotavirus gastroenteritis: Analysis of clinical trials of human rotavirus vaccine. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. Vol. 10, s. 505–511
- 29 Bugli, Francesca; Caprettini, Valeria; Cacaci, Margherita; Martini, Cecilia; Sterbini, Francesco Paroni; Torelli, Riccardo; Della Longa, Stefano; Papi, Massimiliano; Palmieri, Valentina; Giardina, Bruno; Posteraro, Brunella; Sanguinetti, Maurizio & Arcovito, Alessandro. 2014. Synthesis and characterization of different immunogenic viral nanoconstructs from rotavirus VP6 inner capsid protein. *International Journal of Nanomedicine*. Vol. 9, s. 2727–2739

- 30 Lepault, Jean; Petitpas, Isabelle; Erk, Inge; Navaza, Jorge; Bigot, Dominique; Dona, Michel; Vachette, Patrice; Cohen, Jean & Rey, Félix A. 2001. Structural polymorphism of the major capsid protein of rotavirus. *The EMBO journal*. Vol. 20, s. 1498–1507
- 31 Rodríguez-Galván, Andrés; Heredia, Alejandro; Plascencia-Villa, Germán; Tonatiuh, Octavio; Reivich, Ramirez; Palomares, Laura A. & Basiuk, Vladimir A. 2008. Scanning Tunneling Microscopy of Rotavirus VP6 Protein Self-Assembled into Nanotubes and Nanosphere. *Journal of Scanning Probe Microscopy*. Vol. 3, s. 25–31
- 32 Charpilienne, Annie; Lepault, Jean; Rey, Felix & Cohen, Jean. 2002. Identification of Rotavirus VP6 Residues Located at the Interface with VP2 That Are Essential for Capsid Assembly and Transcriptase Activity. *Journal of Virology*. Vol. 76, s. 7822–7831
- 33 Jayaram, Hariharan; Estes, M. K. & Prasad, B. V. 2004. Emerging themes in rotavirus cell entry, genome organization, transcription and replication. *Virus research*. Vol. 101, s. 67–81.
- 34 Bredell, Helba; Smith, Jacques J.; Prins, Willem A.; Görgens, Johann F. & van Zyl, Willem H. 2016. Expression of rotavirus VP6 protein: a comparison amongst *Escherichia coli*, *Pichia pastoris* and *Hansenula polymorph*. *FEMS Yeast Research*. Vol. 16, s. 1-12.
- 35 Malakhov, Michael P.; Mattern, Michael R.; Malakhova, Oxana A.; Drinker, Mark; Weeks, Stephen D. & Butt, Tauseef R. 2004. SUMO fusions and SUMO-specific protease for efficient expression and purification of proteins. *Journal of Structural and Functional Genomics*. Vol. 5, s. 75–86.
- 36 Campagna, Michela; Marcos-Villar, Laur; Arnoldi, Francesca; de la Cruz-Herrera, Carlos F.; Gallego, Pedro; González-Santamaría, José; González, Dolores; Lopitz-Otsoa, Fernando; Rodriguez, Manuel S.; Burrone, Oscar R. & Rivas, Carmen. 2013. Rotavirus Viroplasm Proteins Interact with the Cellular SUMOylation System: Implications for Viroplasm-Like Structure Formation. *Journal of Virology*. Vol. 87, s. 807-817.
- 37 Aijaz, Salma & Chilakalapudi, Durga Rao. 1996. Comparative sequence analysis and expression in *E. coli* of the subgroup I-specific antigen VP6 from a G2 serotype human rotavirus IS2. *Current Science*. Vol. 71, s. 6–464.
- 38 Yan, Yilin; Orcutt, Steven J. & Strickler, James E. 2009. The use of SUMO as a fusion system for protein expression and purification. *Chemistry Today*. Vol. 27, s. 42–47.

- 39 Seo, Angie; Jackson, Janelle L.; Schuster, Jolene V. & Vardar-Ulu, Didem. 2013. Using UV-absorbance of intrinsic dithiothreitol (DTT) during RP-HPLC as a measure of experimental redox potential in vitro. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. Vol. 405, s. 6379–6384.
- 40 Pattenden, Leonard K.; Middelberg, Anton P.J.; Niebert, Marcus & Lipin, Daniel I. 2005. Towards the preparative and large-scale precision manufacture of virus-like particles. *Trends in Biotechnology*. Vol. 23 s. 523–529
- 41 Mathieu, Magali; Petitpas, Isabelle; Navaza, Jorge; Lepault, Jean; Kohli, Evelyn; Pothier, Pierre; Prasad, B.V.Venkataram; Cohen, Jean & Rey, Félix A. 2001. Atomic structure of the major capsid protein of rotavirus: implications for the architecture of the virion. *The EMBO Journal*. Vol. 20, s. 1485–1497