

MIKROBIEN cDNA:N SYNTEESIN AUTOMATISOINTI RIBOSOMAALISESTA RNA:STA

Marianna Vainionpää

**Opinnäytetyö
Huhtikuu 2011**

**Laboratorioala
Tekniikan ja liikenteen ala**





Tekijä(t) VAINIONPÄÄ, Marianna	Julkaisun laji Opinnäytetyö	Päivämäärä 05.04.2011
	Sivumäärä 66	Julkaisun kieli suomi
	Luottamuksellisuus () saakka	Verkkojulkaisulupa myönnetty (X)
Työn nimi MIKROBIEN cDNA:N SYNTEESIN AUTOMATISOINTI RIBOSOMAALISESTA RNA:STA		
Koulutusohjelma Laboratorioalan koulutusohjelma		
Työn ohjaaja(t) VÄRTÖ-NIEMI, Merja		
Toimeksiantaja(t) Jyväskylän yliopisto, bio- ja ympäristötieteiden laitos, TIIROLA, Marja		
TIIVISTELMÄ Opinnäytetyö tehtiin Jyväskylän yliopiston bio- ja ympäristötieteiden laitokselle. Työ oli osana laajempaa projektia, jonka tavoitteena on kehittää automatisoitu mikrobiologinen laadunvalvontatesti teollisuusprosesseihin. Projektin koordinoijana toimii akatemiaturkija Marja Tirola Jyväskylän yliopiston bio- ja ympäristötieteiden laitokselta. Opinnäytetyön tavoitteena oli saada automatisoitu RNA:n eristysmenetelmä Thermo Scientific KingFisher -magneettipartikkelirobotilla. Laitteella oli tarkoitus tehdä cDNA synteesi lysatoidulle <i>E. coli</i> lle. Tutkimuksessa <i>E. coli</i> -pelletit homogenisoitiin 70 %:ssa etanolissa FastPrepillä. Homogenisoinnin jälkeen <i>E. coli</i> -lysaatit puhdistettiin KingFisher-robotilla. Puhdistetuille tuotteille tehtiin käänteistranskriptio, jolloin yksijuosteisesta RNA:sta muodostui kaksijuosteista komplementaarista DNA:ta, cDNA:ta. Käänteistranskription jälkeen tuotteessa vielä jäljellä oleva alkuperäinen RNA poistettiin ribonukleasi I (RNase I) -käsittelyllä. Tutkimuksen perusteella paras kokonaisuus käänteiskopioitaessa RNA-fragmenttia oli seuraavanlainen: reaktiolämpötila oli 55 °C ja entsyyminä käytettiin RevertAidin Premium käänteistranskriptiinaasia. Lämpötilaohjelmassa lämpötila nostettiin ensin 65 °C:een, laskettiin sen jälkeen 10 °C:een ja vasta sitten lämpötila nostettiin reaktiolämpötilaan. Näin saatiin hajotettua RNA:n sekundäärirakenteet ja käänteistranskriptio onnistui paremmin. Käänteistranskription jälkeen RT-tuotteelle tehtiin RNase I -käsittely ja sopiva RNase I:n määrä käsittelyyn oli 0,3 µl. Pelkkä Thermo KingFisher -magneettipartikkelirobotilla tehtävä puhdistus jätti tuotteeseen liikaa epäpuhtauksia. Epäpuhtaudet estivät käänteistranskriptioreaktion, joten epäpuhtaudet oli poistettava ennen Thermo KingFisher -robotilla tehtävää puhdistusta. Tässä tutkimuksessa epäpuhtaudet poistettiin fenoliesikäsittelyllä. Fenoliesikäsittelyn jälkeen entsyymaattiset reaktiot onnistuivat hyvin.		
Avainsanat (asiasanat) Thermo KingFisher, <i>E. coli</i> , RNA-eristys, käänteistranskriptio		
Muita asioita		



Author(s) VAINIONPÄÄ, Marianna	Type of publication Bachelor's Thesis	Date 05042011
	Pages 66	Language finnish
	Confidential () Until	Permission for web publication (X)
Title Automation of microbial cDNA synthesis from ribosomal RNA		
Degree Programme Laboratory Sciences		
Tutor(s) VÄRTÖ-NIEMI, Merja		
Assigned by University of Jyväskylä, The Department of Biological and Environmental Science, TIROLA, Marja		
Abstract <p>This Bachelor's Thesis was made for the Department of Biological and Environmental Science of the University of Jyväskylä. This Thesis was a part of a larger project the aim of which was to develop an automated microbiological quality control test for the industrial processes. Academy researcher Marja Tirola from the Department of Biological and Environmental Science of the University of Jyväskylä acts as coordinator of this project.</p> <p>The aim of this Thesis was to create an automated RNA isolation protocol for Thermo's Scientific KingFisher magnetic particle processor. In the research <i>E. coli</i> pellets were homogenized in 70% EtOH by FastPrep and after that homogeneous <i>E. coli</i> was purified by KingFisher-robot. Purified products were transcribed and then single stranded RNA turned into double stranded complementary DNA, cDNA. After the transcription there was still original RNA left in the product which was removed from the product by ribonuclease I (RNase I) –treatment.</p> <p>Based on the research the best way to transcribe RNA is the following: the reaction temperature was set to 55 degrees centigrade and the enzyme used in the reaction was RevertAid Premium. The temperature was programmed so that it first rose to 65 degrees centigrade, then fell to 10 degrees centigrade and finally rose to the reaction temperature of 55 degrees centigrade. RNase I -treatment was made to the product after the transcription and a suitable amount of RNase I for the treatment was 0,3 µl.</p> <p>After the purification just by Thermo's KingFisher robot, too much impurity was left in the product. Transcription did not work because of the impurity in the product therefore the impurity had to be removed before the purification by the KingFisher-robot. In this research phenol was used to remove the impurity and after the phenol treatment enzymatic reactions succeeded.</p>		
Keywords Thermo's KingFisher, <i>E. coli</i> , isolation of RNA, reverse transcription		
Miscellaneous		

SISÄLTÖ

KÄYTETYT LYHENTEET JA SANASTO	3
1 MIKROBIOLOGISEN LAADUNVALVONNAN NOPEUTTAMINEN TEOLLISUUSPROSESSEISSA.....	6
1.1 Mikro-organismien määrittymenetelmien kehittämisen taustaa.....	6
1.2 Opinnäytetyön tavoitteet	7
1.3 Mahdolliset sovelluskohteet mikrobiologisessa laaduntarkkailussa	7
2 RNA:N ERI LAJIT	8
2.1 Ribosomaalinen RNA.....	9
2.2 RNA-eristys Griffithsin menetelmällä.....	11
3 KÄÄNTEISTRANSKRIPATIO	12
3.1 RT-reaktio	12
3.2 Käänteistranskriptaasit	14
3.3 Tutkimuksessa käytettyjen käänteistranskriptaasien ominaisuudet	16
3.4 RNase:t eli ribonukleaasit	19
4 <i>Escherichia coli</i>	20
5 GEELIELEKTROFOREESI.....	23
6 THERMON SCIENTIFIC KINGFISHER MAGNEETTIPARTIKKELIROBOTTI.....	25
6.1 Thermon Scientific KingFisher -magneettipartikkelirobotin toiminta.....	25
6.2 RNA-eristykset RNAClean- ja MagAttract- magneettipartikkeliseoksilla.....	30
6.3 Automatisoinnin vaatimat uudistukset Thermon KingFisher –robotille.....	31
7 TUTKIMUKSEN TOTEUTUS	32
7.1 <i>Escherichia coli</i> kasvatus	32
7.2 <i>Escherichia coli</i> -pellettien homogenisoinnin optimointi	33
7.3 RNA:n puhdistus Thermon KingFisherillä	33

	2
7.4 RNA-eristys Griffithsin menetelmällä	34
7.5 Käänteistranskription olosuhteiden optimointi ja RNase I -käsittely.....	35
8 TUTKIMUKSEN TULOKSET	36
8.1 <i>Escherichia coli</i> -pellettien homogenisoinnin optimointi ja RNA:n puhdistus KingFisherillä.....	36
8.2 Käänteistranskription olosuhteiden optimointi ja RNase I -käsittely.....	41
8.3 Ribonukleasi I:n määrän lisäyksen vaikutus	52
9 POHDINTA	55
9.1 Johtopäätökset työstä ja sen avulla saaduista tuloksista.....	55
9.2 Omien kykyjen kehittyminen opinnäytetyön aikana.....	57
LÄHTEET	58
LIITTEET.....	61
Liite 1. KingFisher-laitteen puhdistusohjelma ja puhdistuksessa käytettyjen reagenssien määrät	61
Liite 2. RNA-eristys Griffithsin menetelmällä.....	63
Liite 3. Master Mix -ohje käänteistranskriptioreaktiota ja ribonukleasi I -käsittelyä varten.....	64
Liite 4. RT-reaktion ja RNase I -käsittelyn lämpötilaohjelmat	65
Liite 5. Agaroosigeelielektroforeesi	66

KÄYTETYT LYHENTEET JA SANASTO

cDNA	Komplementaarinen DNA on lähetti-RNA:sta syntetisoitu yksiketjuinen DNA-molekyyli, josta puuttuvat intronit. cDNA valmistetaan RNA:sta käänteisellä transkriptiolla käyttäen apuna käänteiskopioijaentsyymiä.
Deleetio	¹⁾ Yhden tai useamman emäksen puuttuminen DNA-ketjusta ²⁾ Kromosomipoikkeama joka syntyy kromosomin katketessa ja irronneen osan hävitessä.
DNA	Deoksiribonukleiinihappo
EHEC	Enterohemorraginen <i>Escherichia coli</i> on <i>E. coli</i> –bakteeri, joka tuottaa verotoksiinia ja aiheuttaa ihmisellä tautia.
Elektroforeesi	Sähköisesti varautuneiden aineiden liikkumista sähkökentässä kohti vastakkaista sähkövarausta.
Endoribonukleaasi	Entsyymi, joka katkaisee fosforiesterisidoksen polynukleotidiketjun keskeltä.
Eksoribonukleaasi	Entsyymi, joka katkaisee fosforiesterisidoksen polynukleotidiketjun päästä.
Eukaryootti	Aitotumainen
Fakultatiivinen	Kykenee tarpeen mukaan elämään sekä hapellisissa että hapettomissa olosuhteissa.
Fluoresenssi	Aineen molekyylit absorboivat valokvantin ja lyhyen ajan jälkeen emittoivat matalaenergisemmän valokvantin, jolla on suurempi aallonpituus.
Genomi	Organismin koko perintöaines, joka on koodattu DNA:han.
HLA -geenit	HLA-geenit (Human Leukocyte Antigen) säätelevät ihmisen puolustusjärjestelmää.
Immuno-kromatografinen	Vasta-aineisiin perustuva kromatografinen testi
Inhibiittori	Aineita, jotka estävät entsyymin toiminnan joko kokonaan tai osittain.

Integraasientsyymi	Retroviruksen tuottama entsyymi, joka mahdollistaa viruksen geneettisen materiaalin siirtymisen infektoituneen solun DNA:han.
<i>in situ</i> -reaktiot	Reaktioseoksessa tehtävät reaktiot/ paikan päällä suoritettavat reaktiot.
<i>in vitro</i> -reaktiot	Elävän organismin tai solun ulkopuolella tehtävä reaktio.
Kvalitatiivinen	Laadullinen
Kvantitatiivinen	Määrällinen
Luminesenssi	Atomin tai molekyylin viritystila purkautuu, ja atomi palaa alemmalle energiatasolle vapauttaen ylimääräisen energian valona.
Lyysaus	Solujen hajotus
mRNA	Lähetti-RNA
PBS -alue	Alukkeen sitoutumiskohta on nukleotidi sekvenssin alue, johon RNA tai DNA aluke sitoutuu replikaation alussa.
Pistemutaatio	Mutaatio, jonka seurauksena yksi emäs vaihtuu toiseksi DNA-ketjussa.
Pol-geeni	Polymeraasigeeni, retroviruksen geeni, joka koodaa käänteiskopioija entsyymiä.
Prokaryootti	Esitumalliset, alkeistumaiset, ovat tumattomia soluja ja yksisoluisia eliöitä ja ne jaetaan bakteereihin ja arkkeliöihin.
Retrovirus	RNA-virus eli virus, jonka genomi koostuu DNA:n sijasta RNA:sta. Retroviruksilla on käänteistranskriptaasientsyymi, jonka avulla ne kääntävät RNA:n DNA:ksi. Esim. HI-virus on retrovirus.
RNA	Ribonukleiinihappo, jota käytetään solun sisällä tiedon siirtoon ja jossain tapauksissa geneettisenä materiaalina.
RNase I	Ribonukleaasi I, nukleaasi, joka katalysoi RNA:n hajomista pienemmiksi komponenteiksi.

RPA	Ribonuclease protection assay, laboratorio tekniikka biokemiassa ja genetiikassa, jolla määritetään yksittäisiä RNA molekyyliä heterogeenisistä soluista eristetyistä RNA näytteistä.
rRNA	Ribosomaalinen RNA
RT-entsyymi	Käänteistranskriptaasi, entsyymi, joka katalysoi käänteistranskriptiota.
RT-reaktio	Käänteistranskriptio, reaktio, jonka avulla yksijuosteisesta RNA:sta valmistetaan kaksijuosteista DNA:ta.
S	Svedberg luku, hiukkasten sedimentoitumisnopeutta keskipakovoimakentässä kuvaava termi, kuvaa hiukkasten suhteellista kokoa.
Sentrifugointi	Seoksen partikkeleiden erottamista toisistaan sentrifugilla. Sentrifugoinnissa koeputki kiihdytetään moottorin avulla sopivaan pyörimisnopeuteen tarvittavan keskipakovoiman saavuttamiseksi. Hiukkaset erottuvat toisistaan kokonsa ja tiheydensä perusteella omiksi faaseikseen.
tRNA	Siirtäjä-RNA

1 MIKROBIOLOGISEN LAADUNVALVONNAN NOPEUTTAMINEN TEOLLISUUSPROSESSEISSA

1.1 Mikro-organismien määrittymenetelmien kehittämisen taustaa

Nopeiden ja luotettavien mikrobimäärittymenetelmien tarve on teollisuudessa kasvanut. Monissa tuotantolaitoksissa – etenkin metsä- ja elintarviketeollisuudessa - on ollut jo pitkän aikaa tarve saada kvantitatiivinen testi mikrobimäärityksille. Testin tulee olla nopea, helppokäyttöinen ja laitoksessa toimipaikalla tehtävä. Elintarviketeollisuudessa nopeita mikrobimäärityksiä tarvitaan erityisesti liha- ja meijeriteollisuudessa prosessien ohjauksen ja omavalvonnan tukena. Jos elintarvikkeissa havaitaan koho-neita mikrobimääriä ja elintarvikkeet ovat jo kaupoissa myynnissä, siitä seuraa haittaa tuotantolaitokselle ja myös kuluttajille. Tämän vuoksi nopea ja toimipaikalla tuotanto-laitoksessa tehtävä määrittymenetelmä on välttämätön.

Mikro-organismien määrittymenetelmien ja etenkin mikro-organismien point-of-care -menetelmien kehittäminen on ollut Jyväskylän yliopiston kiinnostuksen kohteena useita vuosia, mutta lähinnä vain ideoiden tasolla. Edesmennyt biotekniikan professori Christian Oker-Blom suunnitteli mikro-organismien pitoisuuden mittaamista immuno-kromatografisesti DNA:han ja magnetismiin perustuen. Metsäteollisuuden edustajat olivat kiinnostuneita jatkamaan tutkimusta Oker-Blomin idean pohjalta. Syksyllä 2009 testattiin RNA-pohjaisia menetelmiä fluoresenssiin ja luminesenssiin perustuen, ja marraskuusta 2009 lähtien on käyty neuvotteluja eri yritysten kanssa. Vuoden 2010 alussa rekisteröitiin hyödyllisyysmalli (magneetin avulla liikuteltava mikrosiru). Rekisteröinnin jälkeen hankeideasta voidaan puhua vapaasti mahdollisten yhteistyö-kumppaneiden kanssa. Vaikka magneettisauvoja on käytetty näytemateriaalin esipuh-distamisessa magneettipartikkeleiden avulla, niitä ei ole aiemmin hyödynnetty entsy-maattisten reaktioiden toteuttamisessa tai näytteiden analysoinnissa. (Tirola 2010.)

1.2 Opinnäytetyön tavoitteet

Sain mahdollisuuden osallistua hankkeeseen, jonka tavoitteena oli kehittää automatisoitu RNA-eristysmenetelmä Thermo KingFisher -magneettipartikkeliautomaatilla. Hankkeen koordinoija, ympäristömikrobiologian dosentti ja akatemiatutkija Marja Tirola oli ohjaajani Jyväskylän yliopiston bio- ja ympäristötieteiden laitoksessa touko-kesäkuussa 2009 ja tammi-maaliskuussa 2010 suorittamani harjoittelun aikana. Tirola kertoi minulle hankkeesta ja pyysi minua kehittämään RNA-eristyksen, joka olisi mahdollista automatisoida Thermo Scientific KingFisher -robotilla.

Opinnäytetyöni on osa Jyväskylän yliopiston bio- ja ympäristötieteiden laitoksen hanketta, joka liittyy Thermo Scientific KingFisher -magneettipartikkeliautomaatilla. Hankkeen tavoitteena on kehittää automatisoitu mikrobinäytteiden puhdistus ja entsyymireaktiot, jotka tehdään Thermo Scientific KingFisher -robotilla. RNA-eristyksen jälkeen syntyvälle tuotteelle tehdään käänteistranskriptio, jolloin yksijuosteisesta RNA:sta muodostuu kaksijuosteista cDNA:ta. Muodostuneesta RT-tuotteesta poistetaan sitten jäljelle jäänyt alkuperäinen eli yksijuosteinen RNA RNase I -käsittelyllä. Tutkittavana mikrobina käytettiin *Escherichia colia*, koska sitä on helppo käsitellä ja nopea kasvattaa laboratorio-olosuhteissa.

Opinnäytetyön tavoitteena oli saada automatisoitu RNA:n eristysmenetelmä Thermo Scientific KingFisher -magneettipartikkelirobotilla. Laitteella oli tarkoitus tehdä cDNA synteesi lysatoidulle *E. colille*.

1.3 Mahdolliset sovelluskohteet mikrobiologisessa laaduntarkkailussa

Tätä automatisoitua mikrobimääritysmenetelmää voitaisiin käyttää erilaisissa tuotantolaitoksissa laaduntarkkailussa. Magnetismiin perustuvia sovellusaloja on paljon teollisuuden ja yhteiskunnan eri osa-alueilla. Magnetismiin perustuvalla sovelluksella voi tutkia esimerkiksi mikrobien ribosomaalista RNA:ta, pintaproteiineja tai veren vastaaineita. Kunkin yrityksen tuotteiden laaduntarkkailussa vaatimukset näytemäärien ja seurattavien mikrobien suhteen vaihtelevat, joten myös käytettävän laitteen tulee olla muunneltavissa jokaisen yrityksen vaatimusten ja tarpeiden mukaisesti. (Tirola 2010.)

Metsäteollisuuslaitokset voivat soveltaa magnetismiin perustuvaa menetelmää mm. bakteeriperäisen RNA:n kokonaismäärän ja ongelmamikrobien, kuten *Bacilluksen*, tutkimiseen. Elintarvike- teollisuuslaitokset pystyvät testaamaan elintarvikkeiden (liha, maitotuotteet, kala) *Listeria*-, *Salmonella*- tai *Campylobacter* -määriä. Myös tietyt erityispatogeenit, kuten EHEC eli *Enterohemorraginen Escherichia coli*, pystytään testaamaan. Terveyskeskukset voivat tutkia mm. streptokokkien määrää ja veren vasta-aineiden avulla testata allergiat ja veriryhmät. Kalanviljelylaitoksilla ja eläinlääkäriasemilla on tarve testata monien eri bakteerien (Flavobakteerit, *Yersinia ruckeri*, *Renibacter salmoninarum*, *Aeromonas salmonicida*) määriä. Sovelluskohteena voi olla myös spesifisen DNA:n määrittäminen, jota voidaan hyödyntää mm. virusten diagnostiikassa ja tulevaisuudessa perinnöllisten alttiuksien, kuten keliakian, HLA-geenien ym., määrittämisessä. (Tirola 2010.)

2 RNA:N ERI LAJIT

Geneettinen informaatio on varastoituna neljästä eri emäksestä muodostuviin yhdistelmiin solutuman DNA-molekyyleissä. Informaation tulkintaan ja siirtämiseen tarvitaan RNA-molekyylejä. RNA on ribonukleiinihappo, jota käytetään solun sisällä tiedon siirtoon ja joissain tapauksissa myös geneettisenä materiaalina. Rakenteensa ja toimintansa perusteella RNA-molekyylit eroavat DNA:sta eli deoksiribonukleiinihaposta neljällä eri tavalla. RNA-molekyylit pystyvät siirtymään tumasta solulimaan eli sytoplasmaan, johon DNA ei pysty. Polynukleotidiketjussa RNA:lla on deoksiriboosin tilalla riboosi ja RNA:lla on emäksissä tyymiinin sijalla urasiili. Näiden erojen lisäksi RNA-molekyylit ovat paljon lyhyempiä kuin DNA-molekyylit ja useimmiten RNA:ssa on vain yksi juoste (eräiden virusten RNA-molekyyleissa on kaksi juostetta). Kukin RNA-molekyyli kopioi vain lyhyen osan yhden DNA-juosteen geneettisestä informaatiosta. (Heino & Vuento 2007, 290–293.)

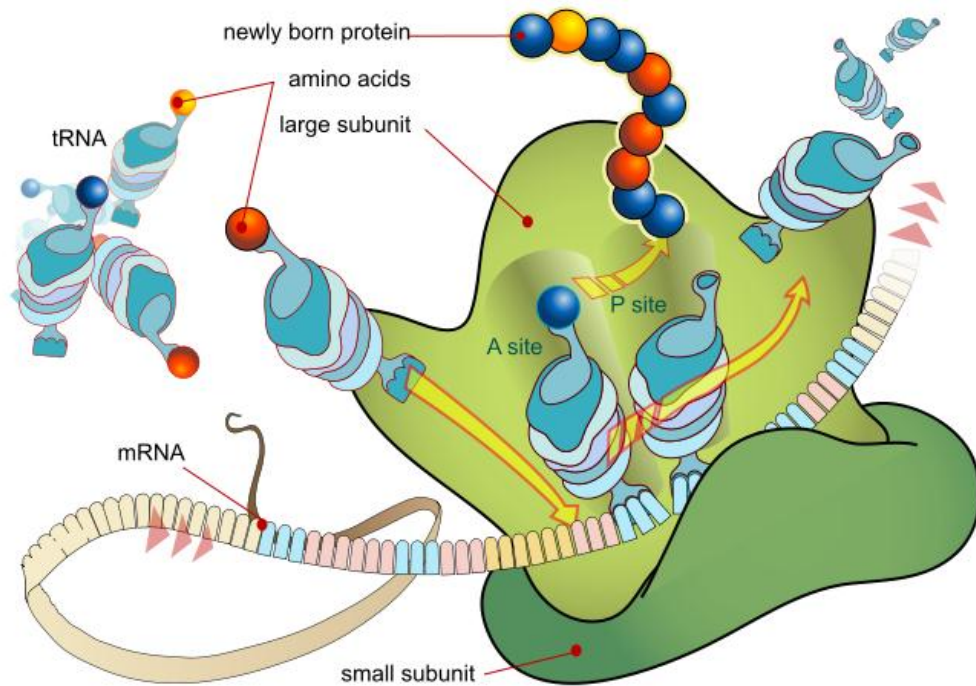
RNA on ainoa makromolekyyli, jolla tiedetään olevan rooli sekä tiedon kuljettamisessa ja varastoinnissa että katalyyssissa. Soluissa ajateltiin pitkään olevan vain neljää eri RNA-lajia, jotka ovat hnRNA (heteronukleaaninen RNA), mRNA (lähetti-RNA), rRNA (ribosomaalinen RNA) ja tRNA (siirtäjä-RNA). Nämä RNA:n lajit osallistuvat keskeisesti valkuaisaineiden valmistamiseen eli translaatioon, mikä on solujen yksi

päätehtävä. Solulimassa suurin määrä on ribosomaalista RNA:ta, muita RNA-tyyppejä on rRNA:n määrään verrattuna suhteellisen vähän. Edellä mainittujen RNA-lajien lisäksi soluissa on useita muita ns. ei-koodaavia RNA-tyyppejä (ncRNA), joiden tiedetään osallistuvan useisiin solun tehtäviin, kuten replikaatioon, transkription säätelyyn, lähetti-RNA:n stabilointiin, translaatioon, RNA:n muokkaukseen ja jopa valkuaisaineiden hajottamiseen ja kuljetukseen. (Lim 1998, 224-229.)

Heteronukleaaninen RNA on solujen tumassa valmistettu lähetti-RNA:n esimuoto, joka muokataan tumassa lähetti-RNA:ksi lähetti-RNA:n esimuodon valmistamisen eli transkription jälkeen. Lähetti-RNA:n emäsjärjestys määrää tuotettavan valkuaisaineen aminohappojärjestyksen. Lähetti-RNA:n tehtävänä on kuljettaa DNA:n sisältämää informaatiota tumasta solulimaan, jossa proteiinien synteesi tapahtuu. Proteiinisynteesissä tarvitaan siirtäjä-RNA, joka valikoi jokaisen synteesissä tarvittavan aminohapon ja kuljettaa sen kohtaan, jossa peptidisidos syntyy lähetti-RNA:n valvonnassa. Ei-koodaavia RNA-lajeja ovat mm. miRNA (microRNA), snRNA (small nuclear RNA), snoRNA (small nucleolar RNA) ja siRNA (short interfering RNA). Ei-koodaavat RNA:t säätelevät geeniekspressiota monella tasolla, esimerkiksi vaikuttamalla kromatiinin rakenteeseen, RNA:n muokkaukseen, RNA:n vakauteen transkription, silmuointiin ja translaatioon. (Nelson & Cox 2005, 995–1029.)

2.1 Ribosomaalinen RNA

Ribosomi on sille tyypillisestä proteiinista ja RNA:sta (ribosomaalinen RNA) koostuva pieni soluelin, jonka pinnalla proteiinisynteesi tapahtuu. Ribosomi liittyy valmistettavan valkuaisaineen aminohapot toisiinsa peptidisidoksilla. RNA on ribosomin tärkein osa. Ribosomi koostuu suuresta ja pienestä alayksiköstä, joiden entsyymaattisena osana toimii ribosomaalinen RNA. Ribosomi on suuri kompleksi, jossa ribosomaalisen RNA:n lisäksi on runsaasti valkuaisaineita. Proteiinisynteesissä ribosomin rakenteessa olevat valkuaisaineet lähinnä tukevoittavat katalyyttinä toimivan RNA:n rakennetta. Ribosomaalinen RNA on erittäin samankaltainen kaikilla eliöillä, ja sen emäsjärjestystä on laajalti käytetty yhtenä kriteerinä arvioitaessa sitä, miten lähellä toisiaan eri eliöt ovat sukupuussa. (Nelson & Cox 2005, 1007–1021.)



KUVIO 1. Ribosomaalinen RNA. (small subunit=pieni alayksikkö, large subunit=suuri alayksikkö, tRNA=siirtäjä-RNA, mRNA=lähetti-RNA) (Alberts, Bray, Hopkin, Johnson, Lewis, Raff, Roberts & Walter 2004.)

Ribosomin nukleiinihappo on ribosomaalinen RNA eli rRNA, jota ribosomista on 65 %. Ribosomaalinen RNA katalysoi ribosomissa tapahtuvia reaktioita. Ribosomin proteiinit, 35 % ribosomista, ovat ribosomaalista proteiinia, jotka vakauttavat ribosomin reaktioita. (Nelson & Cox 2005, 1007–1021.)

Toimiva ribosomi koostuu kahdesta osasta, suuresta ja pienestä alayksiköstä. Kummassakin alayksikössä on sekä ribosomaalista RNA:ta että ribosomaalista proteiinia. Kokonaisen ribosomin kiderakenteen analyysi on osoittanut, että suuren ja pienen alayksikön kontaktialue, johon siirtäjä-RNA molekyylit sitoutuvat, on etupäässä RNA:ta. Valkuaisaineet sijaitsevat ribosomin laitaosissa. Eri ribosomeissa olevista osasista ja kokonaisista ribosomeista käytetään nimiä niiden painon mukaan, esimerkiksi prokaryoottien kokonaiset ribosomit ovat 70S ribosomaalista RNA:ta ja eukaryoottien 80S ribosomaalista RNA:ta. Paino ilmoitetaan ultrasentrifugissa saaduilla Svedbergin yksiköillä (S). (Nelson & Cox 2005, 1007–1021.)

Eukaryoottien ribosomit ovat kooltaan 80S ja prokaryoottien 70S ja molemmat ovat rakenteeltaan melko samanlaisia. Eukaryoottisolun ribosomin suuri alayksikkö (60S) sisältää 5S, 5.8S ja 28S ribosomaaliset RNA-molekyylit. Pieni alayksikkö (40S) puolestaan sisältää 18S ribosomaalisen RNA-molekyylin. Kaikki ribosomaaliset RNA:t 5S rRNA:ta lukuun ottamatta valmistetaan 45S rRNA:n esimuodosta. 28S on kooltaan noin 4800 emäksen suuruinen ja 18S noin 1800 emäksen suuruinen. Prokaryoottisolun ribosomin (70S) suuri alayksikkö 50S sisältää kaksi ribosomaalista RNA-molekyyliä (5S ja 23S) ja useita (n.34) proteiineja, kun taas pieni alayksikkö (30S) sisältää yhden ribosomaalisen RNA-molekyylin (16S) ja noin 21 proteiinia. 23S rRNA on noin 3000 nukleotidia pitkä ja 16S noin 1500 nukleotidia pitkä. (Lim 1998, 224–228.)

2.2 RNA-eristys Griffithsin menetelmällä

Griffithsin nukleotidien (RNA ja DNA) eristysmenetelmä on nopea eristysmenetelmä ja se on tarkoitettu erityisesti ympäristönäytteille. Menetelmä mahdollistaa samanlaisen arvioinnin mikrobien 16S ribosomaalisen RNA:n monimuotoisuudesta PCR- tai RT-PCR monistuksen kautta vain yhdellä eristyksellä. Molekyylianalyysit 16S rRNA:sta ovat nyt keskeisimpiä tutkimuskeinoja, tutkittaessa ympäristön mikro-organismien monimuotoisuutta. Perinteiset menetelmät, jotka perustuvat mikrobien kasvatukseen, aliarvioivat mikrobien monimuotoisuutta melkoisesti, kun taas uudet molekyylianalyysimenetelmät (PCR, kloonaus ja sekvensointi) ovat antaneet paremman käsityksen prokaryoottien monimuotoisuuden laajuudesta. (Griffiths, Whiteley, O'Donnell & Bailey 2000.)

Nykyiset DNA- ja RNA -eristysmenetelmät eroavat suuresti toisistaan. On suoria *in situ* -lyysauksia ja sitten toisaalta on epäsuoria menetelmiä, joissa alkuperäinen solu eristetään ennen solun hajottamista eli lyyssausta. Molemmissa tapauksissa menetelmään kuuluu erilaisia yhdistelmiä seuraavista: solun hajotus erikokoisilla ”helmillä”, nukleiinihapon pesu erilaisilla pesuliuksilla, entsyymaattinen lyyssaus ja liuottimen uuttaminen, jotta saadaan aikaiseksi raaka nukleiinihappo preparaatti. (Griffiths ym. 2000.)

3 KÄÄNTEISTRANSKRIPTIO

3.1 RT-reaktio

DNA:n molekyyli-tason tutkimuksen alussa tunnettiin vain yksi tiedon siirtymissuunta ja se oli DNA → RNA → proteiini tai DNA → DNA solun valmistautuessa jakautumaan. Mutta eräistä viruksista löytyi toinen tie RNA → RNA → proteiini. Periaatteiltaan tämä vastaa DNA-järjestelmää. (Niemi, Virtanen & Vuorio 1995, 144.)

Käänteinen transkriptio eli käänteinen tiedon siirto RNA → DNA löytyi vasta vuonna 1970. Tuolloin tutkimuksissa myös selvisi eräiden kasvaimia aiheuttavien RNA-virusten sisältävän käänteiskopioija entsyymejä, jotka pystyvät tuottamaan DNA:ta käyttäen RNA:ta alukkeena. Käänteiskopioija entsyymiä sisältävän viruksen infektoidessa solun siirtyy soluun sekä käänteiskopioija entsyymiä että viruksen omaa RNA:ta. Käänteiskopioija entsyymi syntetisoi ensin viruksen RNA-genomille yksiketjuisen DNA:n käyttäen viruksen omaa RNA:ta templaattina ja tämän jälkeen entsyymi syntetisoi tälle yksiketjuiselle DNA:lle komplementaarisen DNA:n (cDNA). Entsyymi pystyy näin tekemään, koska se pystyy katalysoimaan myös DNA:n synteesiä käyttäen DNA:ta templaattina. Näin syntynyt kaksiketjuinen DNA liittyy isäntäsolun DNA:han ja kahdentuu isäntäsolun DNA:n mukana siirtyen tytärsoluihin piilevänä proviruksena. Otollisissa olosuhteissa virusgenomi, joka on DNA:ssa, voi aktivoitua ohjaamaan viruksen RNA:n, käänteiskopioijan ja vaippaproteiinien synteesiä. (Niemi, Virtanen & Vuorio 1995, 144–145.)



KUVIO 2. Käänteistranskription mekanismi. Koko prosessia katalysoi käänteistranskriptiini, jolla on sekä DNA polymeraasi että RNase H aktiivisuus. LTR= "long terminal repeat" (Subramani, Rajakannu, Sudhakar & Jayaprakash 2005.)

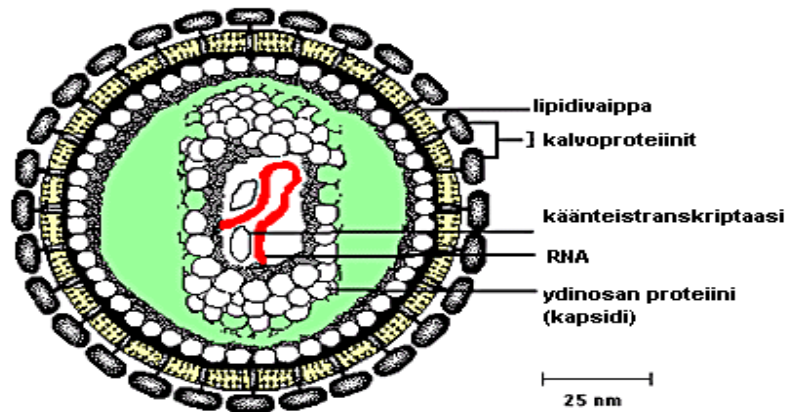
RNA retroviruksen päästyä isäntäsolun sisälle, sen genomisen RNA käännetään kaksijuosteiseksi DNA:ksi ja sitten se sulautuu isännän DNA:han. RNA:n kääntämistä DNA:ksi kutsutaan käänteistranskriptioksi. Käänteistranskriptio tapahtuu seuraavalla mekanismilla: (numerot vastaavat kuvion 2 numeroita) (Mechanism of Reverse Transcription 2010.)

Retrovirus spesifinen siirtäjä-RNA hybridisoituu komplementaarisen alueen, alukkeen sitoutumiskohdan (PBS), kanssa. (1) DNA segmentti pidentyy siirtäjä-RNA:sta ja pidentyminen pohjautuu retroviruksen genomisen RNA:n sekvenssiin. (2) RNase H poistaa viruksen R ja U5 sekvenssit. (3) DNA hybridisoituu 3`-pään R sekvenssin kanssa. (4) DNA juoste pidentyy 3`-päästä. (5) Suurin osa viruksen RNA:sta poistetaan RNase H:n avulla. (6) Toinen DNA juoste pidentyy viruksen RNA:sta. (7) RNase H poistaa sekä siirtäjä-RNA:n että jäljellä olevan viruksen RNA:n. (8) Toisen juosteen PBS-alue hybridisoituu ensimmäisen juosteen PBS-alueen kanssa. (9) Lopuksi tapahtuu molempien DNA juosteiden pidentyminen. (10) (Mechanism of Reverse Transcription 2010.)

3.2 Käänteistranskriptaasit

Käänteistranskriptaasit (engl. reverse transcriptases RTs), jotka tunnetaan myös nimellä RNA riippuvainen DNA polymeraasi, ovat entsyymejä, jotka toimivat transkriptiolla käänteiseen suuntaan eli mahdollistavat cDNA-synteesin. RT-entsyymit on eristetty RNA:ta sisältävistä retroviruksista (lat. *retro*, taaksepäin), joiden vaipan ja rakenneproteiinien suojassa on diploidi RNA-genomi ja tähän liittyneenä käänteistranskriptaasi. (Vaehri & Alitalo 1983.)

Viruksen infektoimassa solussa käänteistranskriptaasi kopioi genomisen 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 puolustusjärjestelmät eivät havaitse sitä. Inaktiivisessa muodossakin se voi vaikuttaa isäntäsolun vieressä olevien geenien ilmentymiseen ja näin esimerkiksi, mahdollisesti aiheuttaa syöpää. (Heino & Vuento 2007, 290–293.)



KUVIO 3. Retroviruksen rakenne (Heino & Vuento 2007.)

Käänteistranskriptaaseilla on kaksi aktiivisuutta, DNA polymeraasi aktiivisuus ja RNase H aktiivisuus. DNA polymeraasi aktiivisuus tarkoittaa sitä, että retroviruksen elämäntierrossa käänteistranskriptaasi kopioi vain RNA:ta, mutta laboratoriokäytössä se kääntää sekä yksijuosteisen RNA- että yksijuosteisen DNA -templaatin. Molemmilla tapauksissa synteesin aloittamiseen vaaditaan RNA- tai DNA -aluke. RNase H on ribonukleaasi, joka hajottaa RNA:ta RNA-DNA-hybrideista, jotka ovat muodostuneet RNA templaatin käänteistranskriptiossa. Tämä entsyymi toimii sekä endonukleasina että eksonukleasina hajottaessaan kohdettaan. (Nelson & Cox 2005, 1007–1021.)

RT-entsyymi löytyy kaikista retroviruksista, mutta kaupallisesti saatavilla olevat entsyymit ovat peräisin muutamasta retroviruksesta (Moloney Murine Leukemia Virus: yksi polypeptidi ja Avian Myeloblastosis Virus: kaksi peptidiketjua), joko puhdistamalla viruksesta tai ilmentämällä *E. coli*ssa. Molemmilla entsyymeillä on sekä DNA polymeraasi aktiivisuus ja RNase H aktiivisuus, mutta eroavat useissa tunnuspiirteisissä, kuten toiminnalle optimaalisessa lämpötilassa ja pH:ssa. Tärkeimpänä eroavuutena on se, että Murine Leukemia Virus (M-MuLV) entsyymillä on heikko RNase H aktiivisuus verrattuna Avian Myeloblastosis Virus (AMV) entsyymiin. Tämän vuoksi sitä käytetään, kun syntetisoidaan komplementaarista DNA:ta pitkistä RNA molekyyleistä. (Lim, D. 1998, 224–228.)

Käänteistranskriptaasia käytetään RNA:n kopioimiseen DNA:ksi. Tämä vaihe on oleellinen osa komplementaarisen DNA:n (cDNA) kloonauksessa. Komplementaariset DNA:t ovat valmiiden lähetti-RNA:n kopioita. Toinen tavallinen käänteistranskriptaasin käyttökohde on tuottaa DNA kopioita RNA:n varhaismuodosta monistamalla sitä DNA:ta polymeerasiketjureaktiolla (PCR). Käänteistranskriptio PCR (RT-PCR) on hyödyllinen työkalu esimerkiksi cDNA:n kloonaukseen, mikrobitautilien nopeaan diagnosointiin ja moniin muihin sovelluksiin. Useimmissa tapauksissa käänteistranskriptaasia käytetään RT-PCR:ssä, mutta mutatoituneita RT-entsyymimuotoja, joilla on korkea lämmönkestävyys, on kehitetty prosessien helpottamiseksi ja nopeuttamiseksi. (Lim, D. 1998, 224-228.)

3.3 Tutkimuksessa käytettyjen käänteistranskriptaasien ominaisuudet

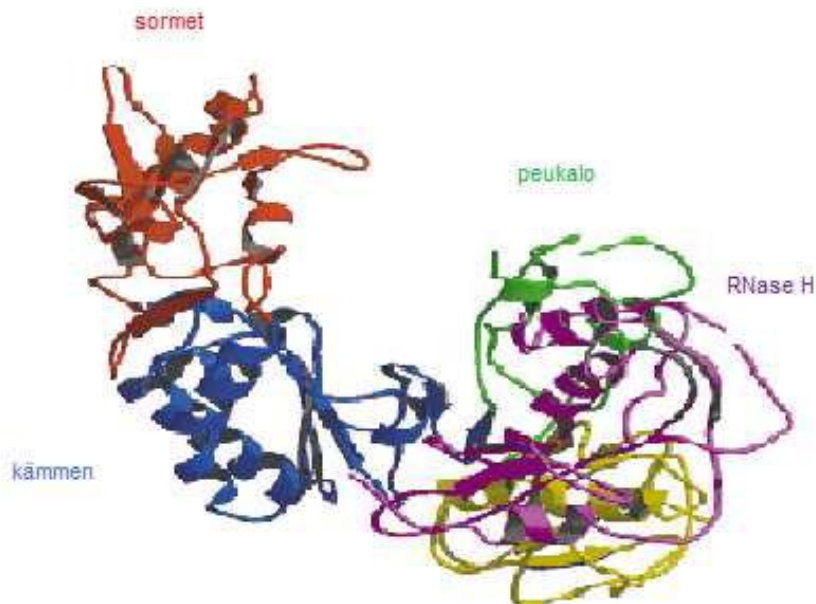
Tässä tutkimuksessa oli käytössä neljä eri RT-entsyymiä: RevertAid™ M-MuLV RT, RevertAid™ Premium RT, RevertAid™ H Minus M-MuLV RT ja AMV RT. Kaikkien RT-entsyymien valmistaja on Fermentas. RevertAid™ Premium RT:tä lukuunottamatta entsyymit ovat peräisin *E. coli:sta*. Premium RT on tuotettu *in vitro* evoluutiiossa M-MuLV käänteiskopioijaentsyymistä.

RevertAid M-MuLV RT

Moloney Murine Leukemia-viruksesta eristetty M-MuLV käänteistranskriptaasi on 78 kDa:n kokoinen monomeeri. Kaupallisesti saatava versio on tuotettu rekombinantti-proteiinina. Normaali käänteistranskriptiolämpötila tällä entsyymillä on +37 °C. M-MuLV RT omaa polymeerasiaktiivisuuden, 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. (Debanu & Georgiadis 2004.)

M-MuLV:ta on olemassa kaksi versiota: M-MuLV RNase H⁺ ja H⁻. Miinusmuodossa RNase H-aktiivisuus on tuhottu esimerkiksi deletion (Kotewicz, Sampson, D'Alessio & Gerard 1988, 266.) tai pistemutaation (Repaske, Hartley, Kavlick, O'Neill & Austin 1989.) avulla.

RevertAid M-MuLV käänteiskopioija entsyymi (RT) on RNA- ja DNA-riippuvainen DNA polymeraasi, joka on geneettisesti modifioitu M-MuLV RT. Se eroaa rakenteensa ja katalyyttisten ominaisuuksiensa perusteella M-MuLV RT:stä. Entsyymi on löydetty *E. coli* soluista, joissa on pol geenin kloonattuja fragmentteja, jotka koodaavat Moloney Murine Leukemia Virus transkriptaasia (RT). Entsyymien inhibiittoreita ovat metallikelaattorit, epäorgaaniset fosfaatit, pyrofosfaatit ja polyamiinit. Entsyymien inaktivaatio tapahtuu kuumentamalla sitä 70 °C:ssa 10 minuuttia. Huomioitavaa entsyymissä on se, että sen RNase H aktiivisuus on huomattavasti matalampi kuin AMV käänteiskopioija entsyymillä. (Molecular Biology Catalog & Product Application Guide. 2008.)



KUVIO 4. M-MuLV RT:n kolmiulotteinen rakenne (Debanu & Georgiadis 2004.)

Premium RT

RevertAid Premium RT on ensimmäinen käänteiskopioijaentsyymi, joka on tuotettu *in vitro* evoluutiossa M-MuLV käänteiskopioijaentsyymistä. M-MuLV entsyymiin verrattuna Premium entsyymillä on korkeampi lämpökestävyys ja se muodostaa cDNA:ta nopeammin. RNase H aktiivisuus on poistettu pistemutaatiolla M-MuLV RT:ssä olevaan RNase H:on. Näin varmistetaan korkeat täysimittaisten cDNA:n, jopa 20 kb:tä, saannot. Premium entsyymien inhibiittoreita ovat samat kuin M-MuLV RT:llä ja ent-

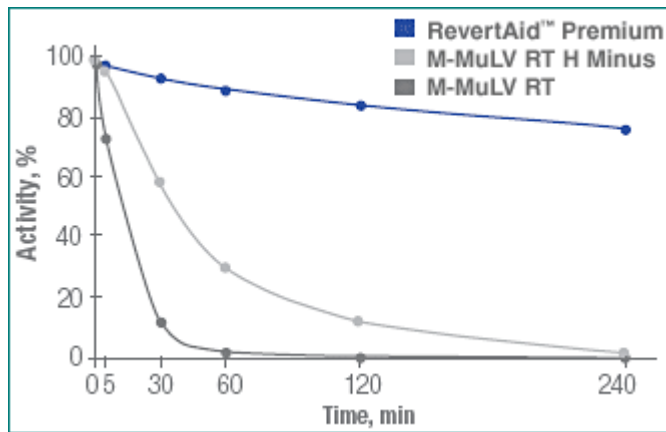
syymien inaktivaatio tapahtuu kuumentamalla 85 °C:ssa 5 minuuttia. (RevertAid™ Premium Reverse Transcriptase 2010.)

H Minus M-MuLV RT

RevertAid H Minus M-MuLV käänteiskopioijaentsyymi on geneettisesti muunneltu M-MuLV RT entsyymi. Entsyymillä on RNA- ja DNA-riippuvainen polymeeraasiaktiivisuus, mutta siltä puuttuu RNase H aktiivisuus RNase H domainissa tapahtuneen pistemutaation takia. RevertAid H Minus RT ei tuhoa RNA:ta RNA-DNA-hybridistä cDNA:n synteesin aikana, joten entsyymiä käytettäessä täysimittaisen cDNA:n saannot pitkistä templaateista ovat korkeat. Entsyymien aktiivisuus säilyy laajalla lämpötila-alueella, 42–55 °C, ja sillä saadaan aikaiseksi jopa 13 kb:n cDNA:ta. RevertAid H Minus entsyymi on peräisin *E. coli* soluista, jotka kantavat kloonattua fragmenttia mutatoituneesta pol-geenistä, joka koodaa M-MuLV käänteistranskriptaasia. Entsyymien inhibiittorit ovat samat kuin M-MuLV RT:llä ja entsyymien inaktivaatio tapahtuu kuumentamalla entsyymiä 70 °C:ssa 10 minuuttia. (Molecular Biology Catalog & Product Application Guide 2008.)

AMV RT

AMV-käänteistranskriptaasi on eristetty Avian Myeloblastosis-viruksesta. Tällä heterodimeerisellä RT-entsyymillä 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. AMV RT-entsyymi muodostuu ei-identtisistä α - ja β - alayksiköistä. AMV:llä on monia entsyymaattisia aktiivisuuksia, joihin kuuluvat polymeeraasi- ja RNase H-aktiivisuuden lisäksi DNA-RNA kierteisyyden purkamisaktiivisuus, sekvenssi spesifinen Mn^{2+} -riippuvainen endonukleasi aktiivisuus. Käytettäessä AMV entsyymiä cDNA synteesissä on saanto kuitenkin ollut vähäisempi kuin käytettäessä M-MuLV RT:a tai Premium RT:a. (Molecular Biology Catalog & Product Application Guide 2008.)



KUVIO 5. RevertAid Premium RT-entsyymin korkea lämpökestävyys 50 °C:ssa. (RevertAid™ Premium Reverse Transcriptase 2010.)

Kuviossa 5 käänteiskopioijaentsyymejä on inkuboitu yksinkertaisessa (1X) reaktiopuskurissa. Tiettyinä ajankohtina (5-240 min.) entsyymin aktiivisuus on mitattu olosuhteiden pysyessä vakiona.

3.4 RNase:t eli ribonukleaasit

RNase eli ribonukleaasi on nukleaasi, joka katalysoi RNA:n hajoamista pienemmiksi komponenteiksi. Ribonukleaasit voidaan jakaa endoribonukleaaseiksi ja eksoribonukleaaseiksi. Kaikista organismeista, joita on tutkittu, on löydetty eri luokkiin kuuluvia RNaseja. Tämä osoittaa sen, että RNA:n hajoaminen on tärkeä prosessi. RNase:t ovat myös merkittävässä roolissa sekä geneettistä materiaalia kuljettavien että eikoodaavien RNA-molekyylien valmistuksessa. (Nicholson 2001a, 3–28.)

Näiden lisäksi aktiivisen RNA:n hajoaminen on ensimmäinen puolustautumiskeino RNA-viruksia vastaan. Jotkut solut myös erittävät runsaita määriä ei-spesifisiä ribonukleaaseja kuten RNase A:ta ja RNase T1:tä. Juuri tämän takia RNase:t ovat syy siihen, miksi RNA huolimattomasti käsiteltynä tuhoutuu helposti. Solun sisäiset RNA:t on suojeltu RNase aktiivisuudelta useilla eri tavoilla kuten 5'-päässä olevan nukleotidin muutos, 3'-pään polyadenylaatio ja RNA-proteiini kompleksin muodostuminen ovat keinoja joilla estetään ribonukleaasien toiminta. Ribonukleaasi inhibiitorit suojelevat myös RNA:ta ribonukleaaseilta, koska ne sitovat tiettyjä ribonukleaaseja itseensä ja estävät näin niiden toiminnan. Ribonukleaasit katkaisevat RNA:n

fosforiesteri-sidoksen ja RNase:t ovat välttämättömiä sekä RNA:n hajoamisen kannalta että useiden RNA-muotojen muokkauksessa. Useimmat löydetty RNase:t ovat proteiinientsyymejä, mutta useissa ribonukleaaseissa katalyyttinen osa on RNA-molekyyli. (Nicholson 2001a, 3–28.)

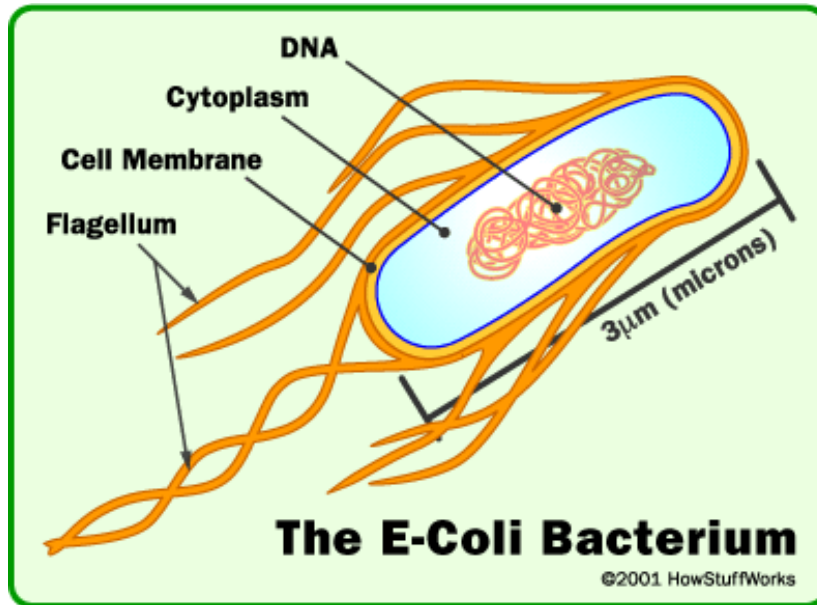
RNase I

Ribonukleaaseja on paljon erinimisiä riippuen niiden toiminnasta. RNase I, jota käytettiin tässä tutkimuksessa, on endoribonukleaasi. Se hajottaa yksijuosteisen RNA:n yksittäiseksi nukleosidiseksi 3'-monofosfaatiksi kiinnittymällä jokaiseen fosforiesterisidokseen ja hydrolysoimalla sidokset. RNase I on hyödyllinen RNA:n poistoon DNA synteesissä, väärin pariutuneiden emästen havainnointiin RNA-RNA ja RNA-DNA hybrideissä ja RNA:n analysointiin ja määrittämiseen ribonukleaasin suojaus-analyseissa (RPA). Entsyymi inaktivoidaan täydellisesti kuumentamalla sitä 70 °C:ssa 20 minuuttia 5 mM DTT:ssä eliminoiden tarpeen poistaa entsyymien varhaismuodot myöhempiä käsittelyjä varten. (RNase I in *E. coli*. 2010.)

4 ESCHERICHIA COLI

Kolibakteeri eli *Escherichia coli* (ks. kuvio 6) on yksi niistä bakteerilajeista, jotka elävät tasalämpöisten eläinten, kuten ihmisten, ruoansulatuskanavan alaosassa. Bakteeri on saanut nimensä sen löytäjän Theodor Escherichin mukaan. *E. coli* kuuluu enterobakteereihin. Muita enterobakteereihin kuuluvia bakteereja ovat *Salmonella*, *Shigella* ja *Yersinia*. (Lim 1998, 306–310.)

E. coli on noin kahden mikrometrin pituinen ja yhden mikrometrin levyinen. Sen soluseinä koostuu peptidoglykaaneista. Se on gram-negatiivinen bakteeri, koska sen kaksinkertaisen solukalvon ulompi kerros on peptidoglykaanikerroksen ulkopuolella. Gram-positiivisilla bakteereilla ei ole ulompaa toista solukalvoa, mutta niiden peptidoglykaanikerros on paksumpi. Muodoltaan *E. coli* on sauvamainen. *E. colilla* on noin 15000 ribosomia ja tuhat erilaista entsyymiä. *E. colin* genomien emäsparien lukumäärä on n. 5×10^6 (vrt. ihminen $2,9 \times 10^9$ emäsparia) ja genomien pituus oikaistuna on n. 1,36 millimetriä (vrt. ihminen 56 mm.). *E. colissa* on n. 2500 geeniä, joista tunnetaan n. 800. (Salkinoja-Salonen 2002, 619–623.)



KUVIO 6. *E. coli* (Marler 2009.)

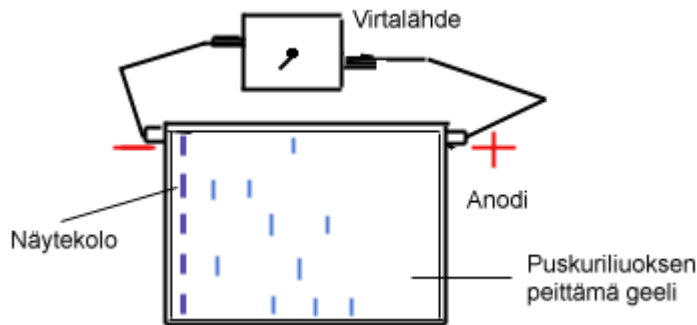
E. coli-bakteerit pystyvät koliformisille bakteereille määriteltyjen ominaisuuksien lisäksi tuottamaan laktoosista happoa ja kaasua 44,5 °C lämpötilassa ja tryptofaanista indolia 44,5 °C:ssa 21 tunnin kuluessa. *E. colin* tunnusmerkkinä voidaan käyttää myös β -glukuronidaasientsyymiä tuottavaa, koska kyseistä entsyymiä tuottavat *E. colin* lisäksi vain harvat enterobakteerit kuten *Salmonella* ja *Shigella*. *E. coli* on fakultatiivisesti anaerobinen, eli se kykenee tarpeen mukaan elämään sekä hapellisissa että hapettomissa olosuhteissa. (Salkinoja-Salonen 2002, 619–623.)

E. coli on vallitseva fakultatiivinen anaerobinen bakteeri, joka elää ruoansulatuskanavan loppupäässä. Normaalisti *E. coli* ei ole haitallinen ihmiselle. Itse asiassa se on hyödyllinen, koska se syntetisoi muutamia tärkeitä vitamiineja (esim. K-vitamiini) ja sen lisäksi bakteeri estää muutamien haitallisten bakteerien kasvun, koska *E. coli* kilpailee niiden kanssa ravinnosta ja hapestä. *E. coli* voi aiheuttaa myös ongelmia, jos bakteeri pääsee leviämään paksusuolesta muualle elimistöön. Bakteerin leviäminen johtuu yleisimmin kontaminoituneesta ruoasta tai vedestä tai huonosti kypsennetystä ruoasta. (Lim 1998, 306–310.)

E. coli jakautuu suotuisissa olosuhteissa kerran 20 minuutissa, mutta ympäristö on useimmiten rajoittavana tekijänä, joten jakautuminen on hitaampaa. *Escherichia colia* käytetään hyväksi vedenpuhdistuksessa ja jätteidenkäsittelyssä, koska bakteeri on havaittu hyväksi veden saastuneisuusasteen mittariksi. Pääasialliset syyt sen käyttöön ovat se, että ihmisulosteessa on paljon enemmän koliformisia bakteereja kuin patogeeneja sekä se, että *E. coli* on tavallisesti vaaraton. (Niemi, Virtanen & Vuorio 1995, 14–19.)

E. coli on myös paljon käytetty bakteeri geenitekniikassa, koska sitä voidaan helposti ja nopeasti kasvattaa ja käsitellä laboratorio-olosuhteissa ja siihen voidaan helposti siirtää genejä. Geeninsiirto tapahtuu esimerkiksi niin, että geenit monistetaan liittämällä ne bakteerin DNA:han, jolloin geeni monistuu *E. colin* jakautuessa. Bakteeria voidaan käyttää myös proteiinien tuottamiseen liittämällä *E. coliin* halutun proteiinin geeni, jolloin bakteeri alkaa tuottaa haluttua proteiinia. Näiden ominaisuuksien vuoksi se on maailman eniten tutkittu solu, jonka avulla monet solubiologian perusilmiöt, kuten geenien toiminta ja proteiinisynteesi on selvitetty. (Niemi, Virtanen & Vuorio 1995, 142–144.)

5 GEELIELEKTROFOREESI



KUVIO 7. Yksinkertainen elektroforeesilaitte päältä päin katsottuna (Salo 1997.)

Elektroforeesilla tarkoitetaan tekniikkaa, jossa käytetään hyväksi sähkökenttää erottelamaan sähköisesti varautuneet molekyylit, kuten proteiinit ja nukleiinihapot toisistaan. Elektroforeesissa positiivisesti (kationit) ja negatiivisesti (anionit) varautuneet molekyylit liikkuvat eri napoja (katodi ja anodi) kohden. Elektroforeesissa aineiden kantajana toimii puskuriliuoksen peittämä huokoinen aine, josta hyytelömäisen rakenteen vuoksi käytetään nimitystä geeli. Geelin rakennusaineena voi olla tärkkelys, agar tai polyakryyliamidi. Geeli valmistetaan sekoittamalla hyytelöainetta kuumaan veteen ja antamalla seoksen hitaasti jäähtyä muotoonsa elektroforeesiastiassa. Geeli voi olla joko kauttaaltaan tasajakoinen tai gradienttigeeli, jossa gradientti muodostuu esimerkiksi akryyliamidin pH:n suhteen. Elektroforeesi suoritetaan sähköä johtavassa puskuriliuoksessa. Molekyylien kulkunopeuteen geelin verkkomaisessa hienorakenteessa vaikuttaa paitsi molekyylin varaus, koko ja muoto, myös geelin pitoisuus, jännite, puskurin pH, ajoaika, ja ajolämpötila. Olosuhteita muuttamalla saadaan kullekin kohteelle luotua parhaat olosuhteet. Erottuneet vyöhykkeet paikannetaan ajon jälkeen erilaisilla värjäysmenetelmillä. (Glick & Pasternak 1998, 53.)

Nukleiinihappojen (DNA ja RNA) erottelu elektroforeettisesti perustuu niiden varauksen sijasta niiden kokoon, koska kaikki nukleotidit sisältävät negatiivisesti varautuneita ryhmiä (fosfaattiryhmät). DNA:n ja RNA:n elektroforeesi suoritetaan polyakryyliamidi- tai agarosigeeleissä. Geeli on rakenteeltaan verkkomainen. Pienet molekyylit ehtivät kulkeutua samassa ajassa kauemmas kuin suuremmat. Näytteen muodostamat vyöhykkeet saadaan näkyviin erilaisilla värjäysmenetelmillä. Vyöhykkeen voimakkuus vastaa siinä olevaa makromolekyylien määrää. Geelijaossa on mukana standardi, joka sisältää tunnetun kokoisia molekyylejä. Näytteen koko saadaan selville vertaamalla sen kulkemaa matkaa standardimolekyylien kulkemaan matkaan. DNA- ja RNA-fragmentit säilyvät ajossa ehjinä ja ne voidaan jopa uuttaa pois geeliltä ajon jälkeen. (Suominen & Ollikka 2004, 72, 104.)

Polyakryyliamidigeelejä käytetään erottelemaan nukleiinihappo-molekyylejä ja -fragmentteja 500 emäspariin asti, kun huokoisemmissa agarosigeeleissä voidaan erottaa jopa 10 000 emäsparin pituisia molekyylejä. Geelielektroforesilla eroteltujen nukleiinihappojen visualisointiin voidaan käyttää useita eri menetelmiä. Nukleiinihapot saadaan näkyviin Etidiumbromidi-värillä (EtBr), jota voidaan lisätä suoraan geeliin. Etidiumbromidi on hyvin karsinogeenista ja sen käsittelyssä on oltava huolellinen, jotta sitä ei joudu paljaalle iholle. Etidiumbromidi sitoutuu nukleiinihapon emäsparien väliin konsentroituen nukleiinihappoa sisältäviin vyöhykkeisiin ja valaistessa geeliä UV-valolla, etidiumbromidi fluoresoi voimakkaasti oranssinpunaisena. (Glick & Pasternak 1998, 53.)

6 THERMON SCIENTIFIC KINGFISHER -MAGNEETTIPARTIKKELIROBOTTI

6.1 Therman Scientific KingFisher -magneettipartikkelirobotin toiminta

Nukleiinihappojen nopea ja tehokas eristys monimutkaisista biologisista matriiseista on tärkeä toimenpide, jotta saadaan parhaat aloitusmateriaalit erilaisia kokeita varten. Therman Scientific KingFisher -magneettipartikkelirobotilla, magneettipartikkeleihin perustuvalla automaattisella puhdistuslaitteella, voidaan puhdistaa DNA-, RNA- ja proteiininäytteitä. Käytettäessä Therman Scientific KingFisher -magneettipartikkelirobottia (ks. kuvio 8) näytteiden puhdistuksessa aikaa kuluu vähemmän kuin perinteisillä puhdistusmenetelmillä puhdistuksen automaation vuoksi. Therman KingFisher -robotilla tehtävissä puhdistuksissa tarvitaan vain vähän näytteiden manuaalista käsittelyä, kuten pipetointia, sentrifuugausta tai sekoitusta. Puhdistusprosessin automaatio ja näytteiden manuaalisen käsittelyn vähyyden ansiosta puhdistus tulokset ovat toistettavia ja luotettavia. KingFisher-teknologia perustuu magneettisauvojen kykyyn siirtää magneettipartikkelit useiden puhdistusvaiheiden läpi. Nämä puhdistusvaiheet ovat sitomis-, sekoitus-, pesu- ja liuotusvaihe. Magneettipartikkelit valitaan puhdistukseen niin, että ne sitovat halutun nukleiinihapon (DNA/RNA). (Optimization of the DNA Purification Protocol for the Thermo Scientific KingFisher Flex and BindIt 3.1 Software 1999-2011.)



KUVIO 8. Thermo Scientific KingFisher -magneettipartikkeliprosessori (Thermo Fisher Scientific Inc 2006-2008.)

Thermo Scientific KingFisher -magneettipartikkelirobotilla voi käsitellä 24 näytettä samaan aikaan. Laitteisto koostuu KingFisher-robotista, jossa on 2×12 magneettisauvaa, ja näytteiden puhdistuksessa käytettävistä KingFisher-levyistä ja ”kammoista”, jotka laitetaan magneettisauvojen päälle puhdistuksen ajaksi. KingFisher-robotti liitetään tietokoneeseen, johon asennetaan laitteiston mukana tuleva BindIt 3.1-ohjelmisto. Tietokoneen ja BindIt 3.1-ohjelmiston avulla ohjelmoidaan haluttu puhdistusohjelma KingFisher-robottiin. Laite soveltuu nukleiinihappojen, proteiinien ja solujen puhdistukseen. Puhdistus perustuu magneettiseen erotustekniikkaan. Puhdistettavat näytteet voivat olla peräisin monesta eri lähteestä, kuten verestä, soluviljelmistä, kudosllysateista ja maaperästä. (Thermo Fisher Scientific Inc 2006-2008.)

Laitteessa käytetään KingFisher-levyjä, joissa on 12x8 kaivoa. Kaivojen tilavuus on 200 µl ja laitteella voi puhdistaa tilavuudeltaan 20 – 200 µl näytteitä. Tilavuuden yläraja on ehdoton, koska näytteen tilavuuden mennessä yli 200 µl, magneettisauvan liikkussa kaivossa puhdistusprosessin aikana, näyte tulee kaivosta ulos. Näytteen puhdistus ja kaikki puhdistuksen vaiheet tapahtuvat KingFisher-levyissä. KingFisher-laitteeseen voi ohjelmoida lähes minkä tahansa olemassa olevan magneettipartikkeleihin perustuvan puhdistusmenetelmän. (Thermo Fisher Scientific Inc 2006-2008.)

Ohjelmasta riippuen puhdistukset kestävät parikymmentä minuuttia. Laitteen toimintaperiaatteena on magneettipartikkeleiden siirtäminen puhdistettavien faasien läpi. Puhdistuksen aikana ei tapahdu puhdistettavien aineiden välistä kontaminaatiota, eivätkä reagenssit siirry levyn kaivosta toiseen. (Thermo Fisher Scientific Inc 2006-2008.)

Laitte toimii niin, että tietokoneeseen ohjelmoidaan ensin haluttu ohjelma ja sen jälkeen ohjelma siirretään tietokoneelta laitteeseen, minkä jälkeen haluttu ohjelma löytyy pelkästään käynnistämällä KingFisherin robotti ja selaamalla laitteessa olevia ohjelmia. KingFisher-laitteen pystyy automatisoimaan niin pitkälle, ettei sen toimintaa tarvitse tarkkailla koko ajan. Tarvitsee vain valita oikea ohjelma ja painaa käynnistysnappia.

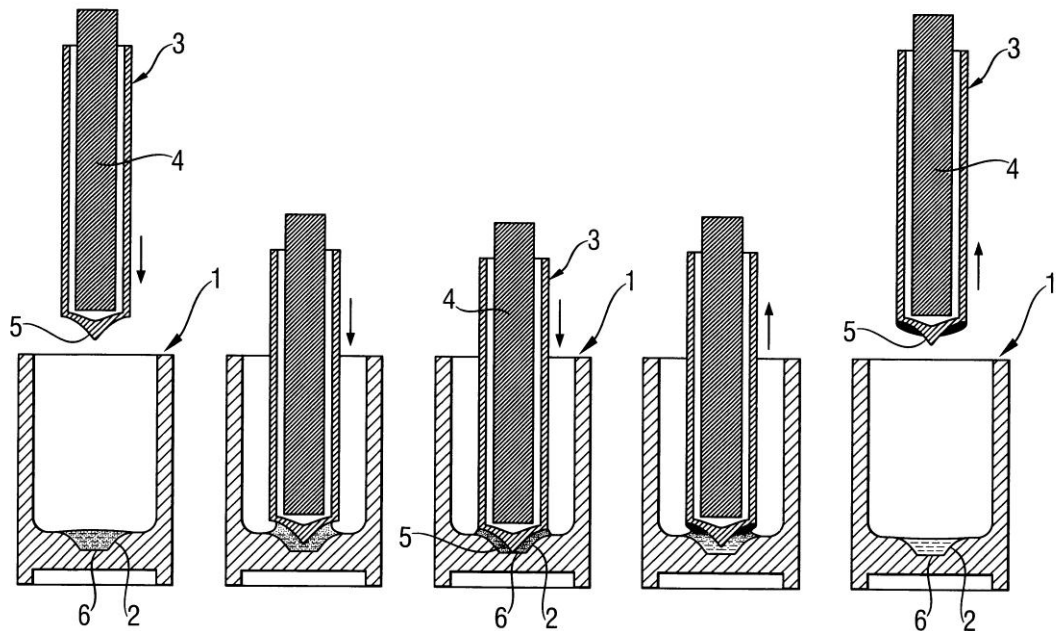
Nukleiinihappojen puhdistusmenetelmää ohjelmoitaessa tärkeitä on huomioida sekä puhdistuksen eri vaiheissa käytettävät sekoitusnopeudet että magneettipartikkeleiden keräykseen käytettävä aika. Sekoitusnopeuden ollessa liian hidas eivät magneettipartikkelit ja näyte sekoitu toisiinsa tarpeeksi hyvin. Tästä seuraa se, ettei koko näytemäärä kulkeudu magneettipartikkeleiden mukana liuotusvaiheeseen vaan siitä jää suurin osa puhdistuksen ensimmäiseen vaiheeseen. Magneettipartikkeleiden keräykseen käytettävä aika on tärkeä, koska ajan ollessa liian lyhyt eivät magneettipartikkelit ehdi tarttua kunnolla magneettisauvan pinnalle. Tämän seurauksena magneettipartikkelit ja niiden pinnalle tarttunut näyte eivät kulkeudu puhdistuksessa magneettisauvan mukana näytteen liuotusvaiheeseen. (Optimization of the DNA Purification Protocol for the Thermo Scientific KingFisher Flex and BindIt 3.1 Software 1999-2011.)

TAULUKKO 1. Suositeltavat sekoitusnopeudet nukleiinihappojen puhdistuksessa (Optimization of the DNA Purification Protocol for the Thermo Scientific KingFisher Flex and BindIt 3.1 Software 1999-2011. muunneltu)

Hidas sekoitusnopeus	Medium sekoitusnopeus	Nopea sekoitusnopeus
Hyvä perussekoitus helposti hajoaville näytteille	Hyvä perussekoitus	Tehokas sekoitus
Pitkiin inkubaatioihin	Pidempää pesuja varten	E erityisesti suuren määrän soluja sisältäviä näytteitä varten, esim. veri
”Puhtaat” näytemateriaalit, esim. seerumi	Helposti lyysattavat näytteet, esim. useimmat bakteerisolut	Hyvä nopeus nopeita pesuja varten

Taulukon 1 nopeudet vastaavat DNA:n puhdistuksessa käytettäviä nopeuksia, mutta ne eivät ole suoraan sovellettavissa esim. RNA:n tai proteiinien puhdistuksessa käytettäviin nopeuksiin. DNA:ta helpommin hajoavan RNA:n puhdistuksessa suositeltavia sekoitusnopeuksia ovat hidas ja medium. (Optimization of the DNA Purification Protocol for the Thermo Scientific KingFisher Flex and BindIt 3.1 Software 1999-2011.)

Kuviossa 9 on selitetty KingFisher-robotin magneettisauvojen toiminta. Laitetta käytettäessä magneettisauvan (4) päälle laitetaan kammaksi kutsuttu muovisuojus (3), jonka pää on terävä (5). Tutkittava näyte laitetaan KingFisher levyn kaivoon (1), jonka pohjalla on pieni kuoppa (2), jonne näyte ja magneettipartikkelit vajoavat (6). Magneettisauva liikkuu kaivossa ylösalaisin sekoittaen kaivon kuopassa olevaa näyte-magneettipartikkeliseosta. Sekoituksen päätyttyä ja magneettisauvan noustessa kaivosta ylös, näyte-magneettipartikkeliseos tarttuu magneettisauvan ansiosta kamman terävään päähän ja seos kulkeutuu sauvan mukana seuraavaan kaivoon. (Tuunanen 2003.)

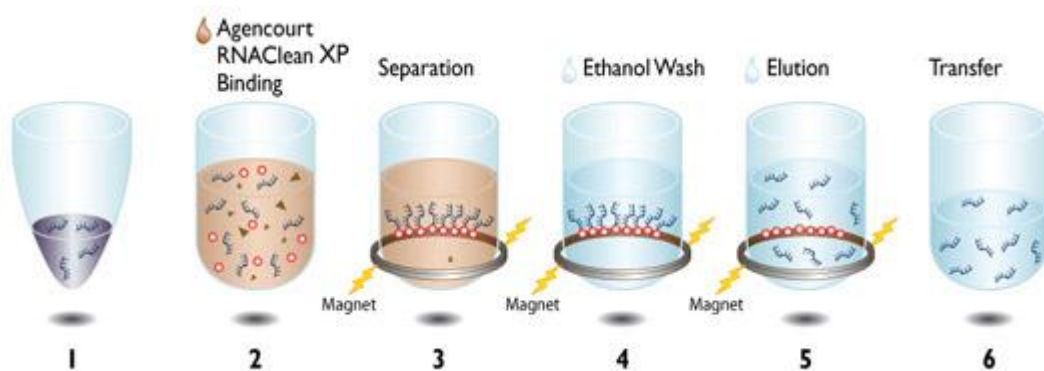


KUVIO 9. KingFisher-robotin magneettisauvan toiminta. (Tuunanen 2003.)

6.2 RNA-eristykset RNAClean- ja MagAttract-magneettipartikkeliseoksilla

RNA:n ja cDNA:n puhdistukset *in vitro* -reaktioista on perinteisesti tehty käyttämällä saostavaa tai kolonnipohjaista reagenssia. LiCl saostaa RNA:n, mutta se vaatii useita manuaalisia vaiheita kuten jäädytyksen, pesun ja useita sentrifugauksia. Kolonni-puhdistus ei vaadi jäädytystä, mutta vaatii useita sentrifugauksia, mikä tekee automaation vaativammaksi. (RNA & cDNA Purification using RNAClean 2004.)

Agencourtin RNAClean -magneettipartikkeliseoksella voidaan puhdistaa (ks. kuvio 10) sekä pieni- että suurikokoisia nukleinihappotuotteita. Se poistaa suolat, näytteen liittyvät alukkeet sekä dNTP:t. RNAClean-puhdistukset ovat helposti automatisoitavissa, koska puhdistuksissa ei tarvita sentrifugaus-, suodatus- tai saostusvaiheita. Agencourtin RNAClean -magneettipartikkeliseos puhdistaa sekä cDNA:ta että cRNA:ta ja puhdistustuote liukenee vesiliuokseen. (RNA & cDNA Purification using RNAClean 2004.)



KUVIO 10. Agencourt RNAClean –magneettipartikkeliseoksella tehtävä puhdistus. 1. Solulyysaus 2. Magneettipartikkeleiden sitominen. 3. Epäpuhtauksien poisto näytteestä (RNA:sta). 4. Näytteen (RNA:n) pesu etanolilla. 5. RNA:n liuotus vesiliuokseen. 6. Näytteen siirto jatkokäsittelyyn. (Agencourt RNAClean XP 2011.)

Agencourtin RNAClean -puhdistuksessa (SPRI, Solid Phase Reversible Immobilization) nukleiinihapot kiinnitetään magneettihelmien pinnalle, jolloin ne eivät pääse liikkumaan. Tämän ansiosta epäpuhtauksien poisto ja näytteen pesu on helppoa. Puhdistetut nukleiinihapot voidaan helposti liuottaa vesiliuokseen. Käytettäessä erilaisia pus-kureita voidaan selektiivisesti eristää tiettyjä nukleiinihappoja (RNA, cDNA). (RNA & cDNA Purification using RNAClean 2004.)

Qiagenin MagAttract –magneettipartikkeliseoksella voidaan puhdistaa RNA:ta ja DNA:ta. Näytteet voivat olla peräisin sekä eläin- että ihmiskudoksista sekä soluvil-jelmistä. Qiagenin MagAttract –magneettipartikkeliseoksella tehtävä puhdistus muis-tuttaa suurelta osin hyvin paljon Agencourtin RNAClean –magneettipartikkeliseosta, mutta Qiagenin MagAttract –magneettipartikkeliseosta suositellaan käytettäväksi BioRobot M48 –laitteistolla, jota ei tässä tutkimuksessa ollut mukana. Tämän lisäksi erona Agencourtin tuotteeseen oli se, että Qiagenin MagAttract –puhdistuskitin muka-na tuli puhdistuksessa käytettävä pesuliuos sekä näytteelle tarkoitettu eluointiliuos. (MagAttract RNA Tissue Mini M48 Kit 2003-2011.)

6.3 Automatisoinnin vaatimat uudistukset Thermo KingFisher –robotille

Tutkimuksen tavoitteena oli siis mikrobinäytteiden puhdistus, entsyymireaktiot ja mit-taus samalla laitteella ilman käsityötä. Näytteiden analysointiin tarvittavat prosessit ovat sekoitus, magneettipartikkelien tai mikrosirun nosto ja lasku, näytteen lämpötilan säätö tai lämmityssyklit ja näytteen luminesenssin mittaaminen nesteestä tai mikrosirun pinnalta. Mittausyksikkönä toimii radalla liikkuva kamera (luminometrinen detektio) ja mahdollisuutena on komponenttia vaihtamalla vaihtaa mittaustekniikkaa (fluoro-metrinen tai potentiometrinen biosensori -tekniikka). Näiden lisäksi tarvitaan läm-mityselementti, jonka lämpötilan säätelyalue riippuu siitä, mitä menetelmää käytetään. Esimerkiksi nukleiinihappomenetelmiä varten sopiva lämpötilan säätelyalue on 20 - 55 °C. Käytettäessä Peltier-elementtiä on myös PCR -syklitys mahdollinen ja sitä kautta saadaan monipuolisempia sovelluksia esimerkiksi virusten tutkimukseen. (Ti-rola 2010.)

Myös KingFisherin kittiosa vaatii muutoksia. Ajatuksena on, että tämän tutkimuksen tuloksena valmistuva kitti toimitetaan valmiiksi annosteltuina näytekaistoina, joiden kuopissa voi olla magneettipartikkeleita, reagensseja ja magneettisesti liikuteltava mikrosiru. Tämä laadunvalvontajärjestelmä voidaan automatisoida magneettipartikkelien avulla hyödyntäen suomalaista Thermo KingFisher -robotia täydentämällä laitteistoa uusilla ominaisuuksilla. Uusia ominaisuuksia KingFisher-laitteeseen olisivat uusi mittausyksikkö ja uudet lämmityselementit. (Tirola 2010.)

7 TUTKIMUKSEN TOTEUTUS

Opinnäytetyön tavoitteena oli siis saada automatisoitu RNA:n eristysmenetelmä Thermo Scientific KingFisher -magneettipartikkelirobotilla. Laitteella oli tarkoitus tehdä cDNA synteesi lysatoidulle *E.coli*lle.

Tutkimuksen päävaiheet olivat *Escherichia coli* kasvatus ja *E. coli* -pellettien valmistus fuugauksella. *E. coli* -pellettien homogenisointi ja *E. coli* -pellettien (RNA:n) puhdistus Thermo Scientific KingFisher -magneettipartikkelirobotilla. Lopuksi puhdistetusta RNA:sta valmistettiin cDNA:ta käänteistranskriptiolla ja jäljelle jäänyt alkuperäinen RNA poistettiin tuotteesta RNase I -käsittelyllä.

7.1 *Escherichia coli* kasvatus

Tutkimuksessa käytetty RNA oli peräisin maljalla kasvatetusta *E. coli*sta, josta siirrostettiin muutama bakteeripesäke LB-liemeen. Siirrostettuja pesäkkeitä kasvatettiin 37 °C:ssa vuorokausi kasvatuspulloissa, joka oli kasvatusajan sekoittajassa.

Kasvatuksen jälkeen neste siirrettiin eppendorf-putkiin, jonka jälkeen ne fuugattiin. Fuugauksen seurauksena putkien pohjalle muodostui *E. coli* -pellettejä. Fuugauksen jälkeen pellettien päällä olevan neste poistettiin ja näin valmistettuja pellettejä säilytettiin -18 °C:ssa.

7.2 *Escherichia coli* -pellettien homogenisoinnin optimointi

Lyysauksen eli homogenisoinnin tarkoituksena on saada tutkittava näyte mahdollisimman tasajakoiseksi. Näytteen tasajakoisuus varmistaa sen, että kaikki näytteestä otettavat otokset vastaavat toisiaan.

E. coli -pellettien valmistamisen jälkeen oli ensin selvitettävä, miten *E. coli* -pellettien lyysaus onnistuisi parhaiten. Optimoitavia olosuhteita olivat lyysausaika, lyysausmenetelmä (vortex/FastPrep) ja lyysaukseen käytettävä neste (TE-puskuri /70-prosenttinen etanoli). Lyysausajat olivat vortexilla 1 – 10 minuuttia ja FastPrepilla 15 sekuntista 2 minuuttiin.

7.3 RNA:n puhdistus Thermo KingFisherillä

Homogenisoinnin jälkeen RNA puhdistettiin RNA Cleanilla käyttäen Thermo King Fisher -laitetta. RNA:n puhdistuksessa piti optimoida se, missä suhteessa RNA Clean-magneettipartikkeliseosta piti laittaa suhteessa näytteeseen. Suhteen pystyi myös laskemaan, koska tiedossa oli, että puhdistus RNA Cleanilla onnistuu parhaiten etanolipitoisuuden ollessa 70 %.

Tähän vaiheeseen kuului myös KingFisher-laitteen ohjelmointi. Huomasin tärkeintä ohjelmoinnissa olevan sen, että magneettisauva kerää magneettipartikkeliseosta ensimmäisestä kaivosta tarpeeksi kauan. Nimittäin jos se vaihe jää liian lyhyeksi, suurin osa magneettipartikkeliseoksesta ja näytteestä jää ensimmäiseen kaivoon ja puhdistus epäonnistuu. RNA:n puhdistus tehtiin liitteessä 1 olevan puhdistusohjelman mukaisesti

Puhdistettaessa RNA:ta RNAClean-magneettipartikkeliseoksella, huomattiin se, että KingFisher-levyn kaivoihin laitettavan nesteen tilavuuden tuli olla vähintään 100 µl, koska muuten magneettisauva jostain syystä keräsi vain pienen osan kaivossa olevasta magneettipartikkeliseoksesta. Tämän seurauksena suurin osa magneettipartikkeliseoksesta ja näytteestä, joka oli sitoutunut magneettipartikkeleihin, jäi ensimmäiseen kaivoon. Näytteen olisi pitänyt kulkeutua magneettisauvojen mukana pesuliuosten kautta

viimeiseen kaivoon, jossa se olisi liuotettu TE-puskuriin. Tämä ongelma huomattiin monen puhdistuksen jälkeen, kun mikään niistä ei onnistunut. Sen jälkeen kokeiltiin puhdistusta suuremmalla nestetilavuudella ja puhdistus onnistui. Liitteessä 1 on eritelty puhdistuksessa käytettyjen reagenssien määrät sekä puhdistuksessa käytetty puhdistusohjelma.

Tässä tutkimuksessa näytteet puhdistettiin seuraavan ohjeen mukaisesti. Ensimmäiseen kaivoon pipetoitiin 30 µl näytettä (lyysattu *E. coli* pelletti) ja 70 µl Agilentin RNA-Clean -magneettipartikkeliseosta sekä 20 µl 70-prosenttista etanolia. Nämä määrät vaihtelivat aina tarpeen mukaisesti, mutta tutkimuksen edetessä huomattiin, että kunhan ensimmäisen kaivon nestetilavuus on vähintään 100 µl, puhdistus onnistuu. Seuraaviin kahteen kaivoon pipetoitiin pesuliuosta 100 µl 70-prosenttista etanolia. Pesuliuoksena pystyi käyttämään jotain muutakin, mutta on huomattu, että 70-prosenttinen etanoli on paras RNA:ta puhdistettaessa. Sitten neljänteen kaivoon pipetoitiin liuos, johon puhdistettu RNA liuotettiin. Tässä tutkimuksessa tämä liuos oli TE-puskuri (TE-puskuri sisältää 10 mM Tris:ä ja 0,1 mM EDTA:ta, pH 8). Lopuksi kun aineet oli pipetoitu levyn kaivoihin, levy laitettiin laitteeseen paikoilleen, etsittiin oikea puhdistusohjelma ja kone käynnistettiin.

7.4 RNA-eristys Griffithsin menetelmällä

Griffithsin RNA-eristysmenetelmä on nopea protokolla, jolla voidaan uutaa sekä DNA:ta että RNA:ta ympäristönäytteistä, esim. maa- ja vesinäytteistä. RNA eristettiin *E. coli* -pelletistä liitteen 3 ohjeen mukaisesti. Eristyksessä käytettävä fenoli estää RNAasi-entsyymiä hajottamasta näytteen RNA:ta. Eristyksessä RNA on vesiliuoksessa ja sitä käsiteltäessä fenolin ja kloroformin seoksella proteiinit denaturoituvat ja saostuvat fenoli-kloroformin ja vesiliuoksen rajapinnalle ja RNA jää vesiliuokseen. Lasihelmet hajottavat solut, kun putkia ravistellaan Fast Prep-laitteessa. (Griffiths ym. 2000.)

Sentrifugoinnissa orgaaninen faasi jää alimmaksi ja RNA:n sisältävä vesifaasi ylimmäksi. Näiden kahden faasin välissä ovat kloroformin ja fenolin saostamat proteiinit. Sentrifugointi tehdään 4 °C:ssa, jotta estetään RNA:n tuhoutuminen ja sen takia näyt-

teitä pidetään mahdollisimman paljon jäällä. Nukleiinihapot saostuvat vain suoloina, joten alkoholin lisäksi saostuksessa on oltava läsnä myös jotakin kationia. RNA saostuu, kun liuoksessa on NaCl:a ja alkoholia (glykoli). Glykoli ja suolat pestään pois etanolilla. (Griffiths ym. 2000.)

7.5 Käänteistranskription olosuhteiden optimointi ja RNase I -käsittely

RNA:n puhdistuksen jälkeen optimoitiin käänteistranskriptioreaktiolle parhaat olosuhteet. Optimointiin kuului reaktiolle parhaan lämpötilan, reaktioajan ja entsyymin etsiminen.

Lämpötiloina käytettiin 45, 50 ja 55 C° ja reaktioaikoina käytettiin 1-2 h. Tutkimuksessa oli testattavana neljä eri entsyymiä: RevertAid M-MuLV RT, RevertAid Premium RT, RevertAid H Minus M-MuLV RT ja AMV RT. Kaikki entsyymit olivat Fermentuksen valmistamia. RT-reaktioita varten tehtiin Master Mix-seos (ks. liite 3)

Käänteistranskriptio reaktion tapahduttua syntyneelle tuotteelle tehtiin RNase I -käsittely, jolla poistettiin cDNA:han jäljelle jäänyt yksijuosteinen RNA-häntä. Juuri tämän yksijuosteisen RNA-hännän takia geelikuvissa RT-reaktion jälkeen geelissä näkyy epäselvempi ja paksumpi tuote-vyöhyke. Periaatteessa tämä tarkoittaa sitä, että RT-reaktion jälkeen syntyvässä tuotteessa on jäljellä sekä 16S (kaksijuosteinen RNA, jossa vielä jäljellä yksijuosteista RNA-häntää) että 23S (yksijuosteinen RNA). RNase I -käsittelyn jälkeen jäljelle jää vain 16S ribosomaalinen RNA, jossa ei ole enää jäljellä yksijuosteista RNA:ta. RNase I ”syö” sekä yksijuosteisen RNA-hännän 16S:stä että yksijuosteisen 23S:n.

8 TUTKIMUKSEN TULOKSET

8.1 *Escherichia coli* -pellettien homogenisoinnin optimointi ja RNA:n puhdistus KingFisherillä

Oltiin jo harjoitteluni aikana testattu kummalla menetelmällä, TE-puskurilla vai 70 % etanolilla, lysatointi onnistuu parhaiten. Silloin tulokset viittasivat siihen suuntaan, että etanoli olisi parempi. Mutta jostain syystä tekemäni puhdistus osoittaisi kaikkien aiemmin saamieni tulosten vastaisesti, että TE-puskuri toimisi lysatoinnissa paremmin.

Alussa ohjelmoimani ohjelma Thermo KingFisher -magneettipartikkelirobotille oli väärä. Tämän huomaa siitä, ettei KingFisher-robotilla puhdistettujen tuotteiden vyöhykkeitä (ks. kuvio 11 näytteet **P-Z**) näy geelissä, mikä tarkoittaa sitä, ettei ajamassani näytteessä ollut yhtään RNA:ta. Tämä johtui siitä, että ohjelmassa olevan virheen takia näyte ei kulkenut magneettisauvojen mukana 1. kaivosta viimeiseen kaivoon vaan jäi 1.kaivoon ja silloin näytteen puhdistus epäonnistui. Virheeksi paljastui se, että puhdistuksessa käytetty magneettipartikkeleiden ja näytteen keräys ja sekoitus eivät olleet tarpeeksi tehokasta. Näin ollen magneettipartikkelit eivät ehtineet tarttua magneettisauvoihin tarpeeksi hyvin ja tästä seurasi magneettipartikkeleiden ja näytteen jääminen 1. kaivoon.

Näytteet **A-O** puhdistettiin manuaalisesti ja näytteestä **P** eteenpäin puhdistettiin KingFisher-robotilla (ks. kuvio 11). Kuten tuloksista näkyy, manuaalinen puhdistus onnistui hyvin, mutta KingFisher-robotilla tehty puhdistus ei onnistunut ollenkaan. Puhdistuksen epäonnistuminen laitettiin ohjelman syyksi, koska kuten seuraavista tuloksista (esim. kuvio 12 ja 13) huomaa, puhdistus onnistui hyvin puhdistusohjelmaan tehtyjen muutosten jälkeen. Näytteet **A-G** (kuvio 11) ovat manuaalisesti puhdistettuja *E. coli* -lysaatteja, jotka on homogenisoitu 70 %:lla etanolilla. Näytteet **H-O** (kuvio 11) ovat manuaalisesti puhdistettuja *E. coli* -lysaatteja, jotka on homogenisoitu TE-puskurilla.



KUVIO 11. Elektroforeesigeelikuva manuaalisesti (näytteet **A-O**) ja KingFisherillä puhdistetuista (näytteet **P-Z**) *E. coli* lysaateista.

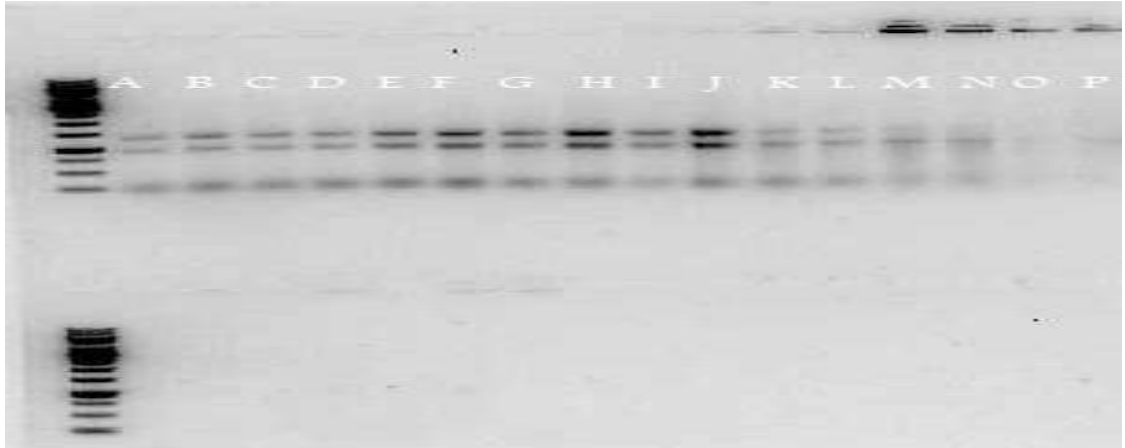
E. coli -lysaattien puhdistuksessa testattiin myös toisen valmistajan, Qiagenin MagAttract -magneettipartikkeleita. Verrattuna edelliseen (kuvio 11) KingFisher-robotilla tehty puhdistus onnistui, koska puhdistusohjelmaa oli muutettu niin, että magneettipartikkeli-näyte-seosta kerätään 1.kaivosta kauemmin. Tämän lisäksi seoksen sekoitus oli tehokkaampaa. Näiden muutosten vuoksi näyte kulki 1.kaivosta viimeiseen kaivoon, eikä 1.kaivoon jäänyt yhtään näytettä (RNA:ta). Sen näkee, koska geeliasossa olivat myös mukana käsin puhdistetut 1.kaivossa oleva neste ja kuten geeli kertoo, ei siihen ollut jäänyt yhtään RNA:ta (ks. kuvio 12 alarivi).

Näytteet **A-J** puhdistettiin Agilentin RNAClean -magneettipartikkeliseoksella ja näytteet **K-P** puhdistettiin Qiagenin MagAttract -magneettipartikkeliseoksella (kuvio 12). Tulosten (ks. kuvio 12) perusteella Agilentin magneettipartikkelit toimivat paremmin. Taulukosta 2 näkee miten paljon näytteiden puhdistuksessa on käytetty magneettipartikkeliseosta. Näytettä on jokaisessa käsittelyssä ollut 30 µl.

TAULUKKO 2. Kuvion 12 näytteiden puhdistuksessa käytetty magneettipartikkeleiden määrä. Agilentin RNA-Clean + 70 % EtOH/ Qiagenin MagAttract+ RPE-puskuri

Näyte	Agilentin RNA-Clean [µl]	70 % EtOH [µl]	Qiagenin MagAttract [µl]	RPE-puskuri [µl]
A	7	80	-	-
B	7	80	-	-
C	7	80	-	-
D	7	80	-	-
E	20	60	-	-
F	20	60	-	-
G	20	60	-	-
H	70	30	-	-
I	70	30	-	-
J	70	30	-	-
K	-	-	7	80
L	-	-	7	80
M	-	-	20	60
N	-	-	20	60
O	-	-	70	30
P	-	-	70	30

Tuotevyöhykkeistä ylempi kuvaa 23S-ribosomaalista RNA:ta ja alempi 16S-ribosomaalista RNA:ta. RT-reaktion ja RNase I -käsittelyn avulla pyrimme poistamaan 23S-ribosomaalisen RNA:n ja tuotteeseen jää vain 16S-ribosomaalinen RNA. 23S:n ja 16S:n tunnistaa kuviosta, koska geelياجossa käytetään aina kokostandardia geelin molemmissa reunoissa ja niissä vyöhykkeet muodostuvat aina tiettyyn kohtaan ja niiden avulla pystyy kertomaan minkä kokoinen tuote geelياجossa on ollut. Samoin on loppuissakin geelikuvissa: ylempi vyöhyke on 23S-ribosomaalinen RNA ja alempi on 16S-ribosomaalinen RNA.



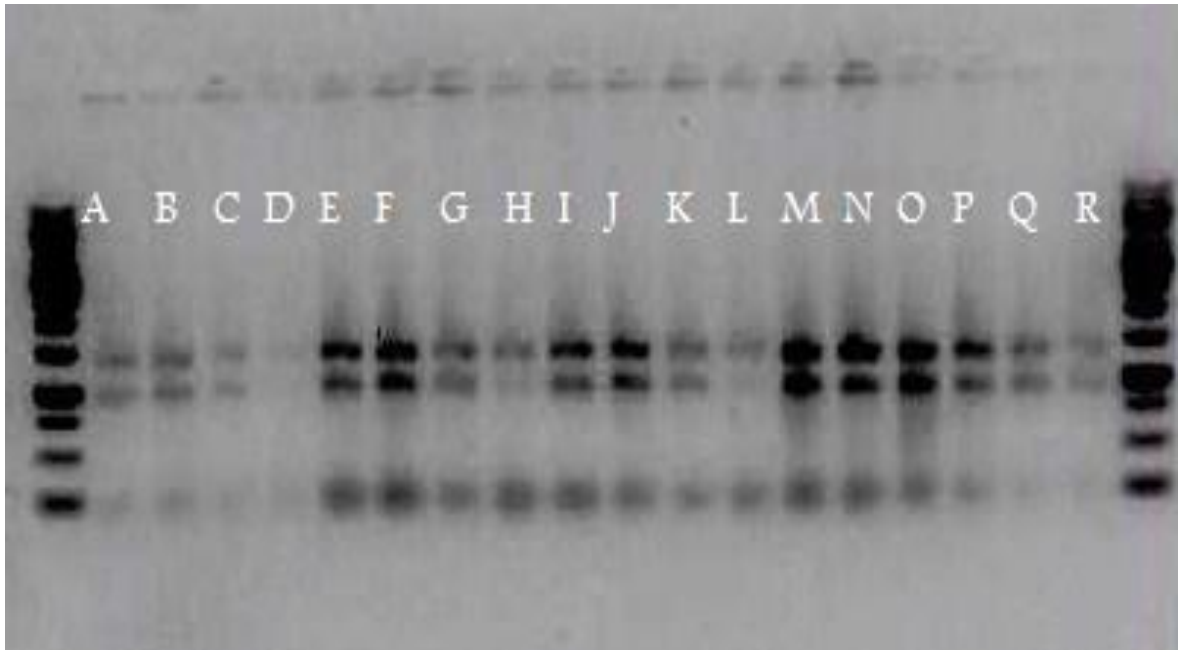
KUVIO 12. *E. coli* lyaattien puhdistus käyttäen Agilentin RNA-Clean magneettipartikkeleita ja Qiagenin MagAttract magneettipartikkeleita.

Puhdistuksen onnistuttua *E. coli* -lysaatit puhdistettiin käyttäen eri määriä Agencourin RNAClean -magneettipartikkeliseosta (ks. kuvio 13). Näin testattiin mikä on optimaalisin magneettipartikkelimäärä käytettäväksi puhdistuksessa. Testauksessa kaikki näytteet on lysatoitu käyttäen 70-prosenttista etanolia ja FastPrep-laitetta. Taulukosta 2 näkee näytteen lyysausajan, magneettipartikkeleiden määrän ja puhdistuksen tekotavan (KingFisher/manuaalinen).

Tulosten (ks. kuvio 13) perusteella *E. coli* -pellettien lyysaus onnistuu parhaiten käyttämällä FastPrep-laitetta ja lyysausajan ollessa 40 s. Lyysausajan ollessa 1 minuutti näyte alkoi hajota. Näytteen puhdistuksessa käytettävä optimaalisin magneettipartikkeliseoksen määrä on 60–70 μ l.

TAULUKKO 3. Kuviossa 13 käytetty näytteiden puhdistusmenetelmä, magneettipartikkelien määrä ja lyysausaika.

Näyte	KingFisher puhdistus	Manuaalinen puhdistus	Magneettipartikkelien määrä	lysatointiaika Fast Prep
A	X	-	40 µl	40 s
B	X	-	40 µl	40 s
C	X	-	40 µl	1 min
D	X	-	40 µl	1 min
E	X	-	60 µl	40 s
F	X	-	60 µl	40 s
G	X	-	60 µl	1 min
H	X	-	60 µl	1 min
I	X	-	70 µl	40 s
J	X	-	70 µl	40 s
K	X	-	70 µl	1 min
L	X	-	70 µl	1 min
M	-	X	60 µl	40 s
N	-	X	60 µl	1 min
O	-	X	70 µl	40 s
P	-	X	70 µl	40 s
Q	-	X	40 µl	1 min
R	-	X	40 µl	1 min



KUVIO 13. *E. coli* lyaattien puhdistus RNA-Cleanilla käyttäen eri määriä magneettibeadeja.

8.2 Käänteistranskription olosuhteiden optimointi ja RNase I -käsittely

Käänteistranskription optimoinnilla pyrittiin etsimään parhaat mahdolliset olosuhteet, joilla RT-reaktio tapahtuisi parhaiten. Optimoitavia olosuhteita olivat entsyymi, lämpötila ja reaktioaika.

Tutkimuksessa optimoitiin myös RNase I -käsittelyssä tarvittava ribonukleasi määrä, joten sitä varten tehtiin RNase I -käsittely eri ribonukleasi I määrillä. RNase I -käsittely tehtiin, jotta RT-reaktion onnistuminen pystytään varmistamaan. Nimittäin usein RT-tuotteen geelikuva on epäselvä, mutta RNase I -käsittelyn jälkeen kuvasta muodostuu selkeämpi ja sillä varmistuu RT-reaktion onnistuminen. Geelikuvan epäselvyys johtuu alkuperäisestä RNA:sta, jota on vielä RT-tuotteessa. Tämä alkuperäinen RNA peittää RT-tuotetta. RNase I -käsittelyllä poistetaan alkuperäinen RNA.

Kuviossa 14 on onnistuneiden RT-reaktiotuotteiden bandit. Tuotteessa **A** on käytetty alukkeena 907r:ää ja tuotteessa **B** TEG-biotiini-518r:ää. Tämän vuoksi ne pysähtyvät geelissä eri kohtiin. Kahta eri aluketta käytettiin, koska kokeiltiin soveltuvatko ne molemmat käytettäväksi tähän tutkimukseen ja tulosten perusteella (ks. kuvio 14) kumpikin aluke on käyttökelpoinen. Tämän jälkeen tuotteille (**A ja B**) tehtiin RNase I -käsittely (**C ja D**) ja kokeiltiin toimiiko S1 nukleaaasi -käsittely (**E ja F**) yhtä hyvin kuin RNase I -käsittely. Entsyyminä käytettiin tässä kokeilussa RevertAid Premium RT:a. Tässä käsittelyssä käytettiin lämpötilaohjelmaa, jossa näyte oli ensin kaksi minuuttia 65 °C:ssa, jonka jälkeen lämpötila laskettiin 10 °C:een 30 sekunniksi ja lopuksi lämpötila nostettiin 45 °C:een 1,5 tunniksi (ks. liite 4). RT-reaktioissa entsyymi lisättiin aina vasta alkukuumennuksen ja jäähdytyksen jälkeen eli tässä käsittelyssä entsyymi lisättiin vasta lämpötilan ollessa 45 °C:ssa. Tuotteissa **A ja B** käytettiin seuraavaa protokollaa: (ks. liite 3)

Yksinkertaista RT-reaktiota varten tehtävä Master Mix

- 5 µl DEPC H₂O
- 10 µl RNA (näyte)
- 5 µl dNTP 10 mM
- 5 µl aluketta (907r **A**/ TEG-biotiini-518r **B**)

Pipetoidaan samaan eppendorffputkeen ja sekoitetaan.

Lämpötilaohjelma käyntiin ja lämpötilan ollessa 45 °C:tta, lisätään seuraavanlainen Master Mix

- 10 µl puskuria
- 10 µl DEPC H₂O
- 1 µl Premium RT

Testauksissa oli aina enemmän kuin yksi RT-reaktio, joten piti vain kertoa reaktioiden lukumäärällä aineet ja tehdä Master Mix niiden mukaan. Usein tehtiin myös niin, että aineita pipetoitiin tarkoituksella ylimäärin, jotta ei tarvinnut aina tehdä uutta RT-reaktiota, vaan RT-tuotteet laitettiin pakkaseen ja jatkettiin toisena päivänä niistä eteenpäin.

Tuotteissa **C ja D** (ks. kuvio 14) on tehty RNase I -käsittely RT-tuotteille **A ja B** ja sitä varten on tehty seuraavanlainen Master Mix:

Yksinkertaista RNase I -käsittelyä varten tehtävä Master Mix

- 0,3 µl RNase I
- 5 µl DEPC H₂O

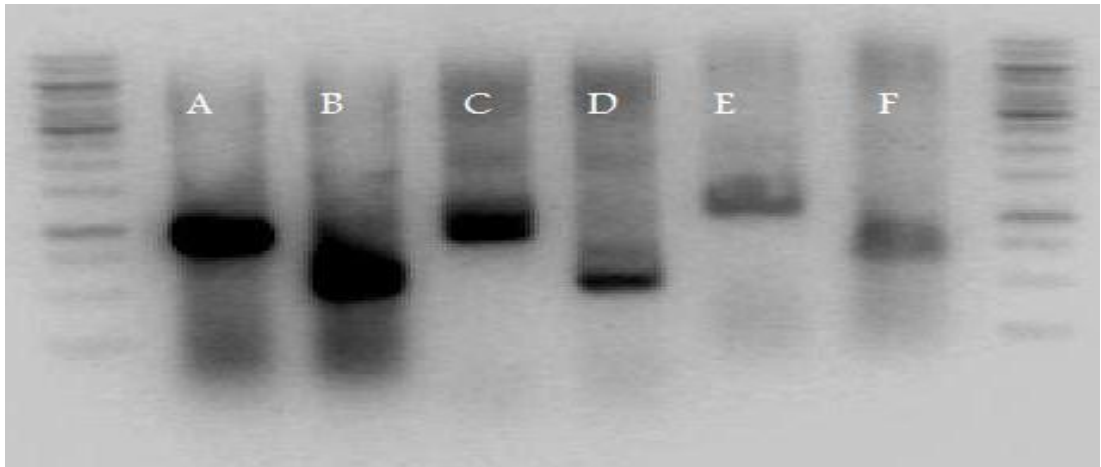
Edellä valmistettua RT-tuotetta otetaan 15 µl ja siihen lisätään RNase I -Master Mixiä 5 µl. RNase I -käsittelyä varten piti myös valmistaa Master Mix, koska 0,3 µl on niin pieni määrä, ettei sitä pysty tarkasti pipetoimaan. Tämän lisäksi RNase I on sellaista reagenssia, että sitä myös tarttuu todella helposti pipetin kärkeen, joten jos ei ole varovainen, voi sitä vahingossa pipetoida moninkertaisen määrän kuin mitä oli tarkoitus. RNase I -käsittelyssä on usein myös niin, että käsiteltäviä RT-tuotteita on useampia kuin vain yksi, joten silloin myös pipetoitavat määrät muuttuvat RT-tuotteiden määrän mukaan.

Tuotteissa **E ja F** (ks. kuvio 14) on tehty S1 nukleaasi -käsittely ja sitä varten on tehty seuraavanlainen Master Mix:

Yksinkertaista S1 nukleaasi -käsittelyä varten tehtävä Master Mix 5 µl S1 puskuri

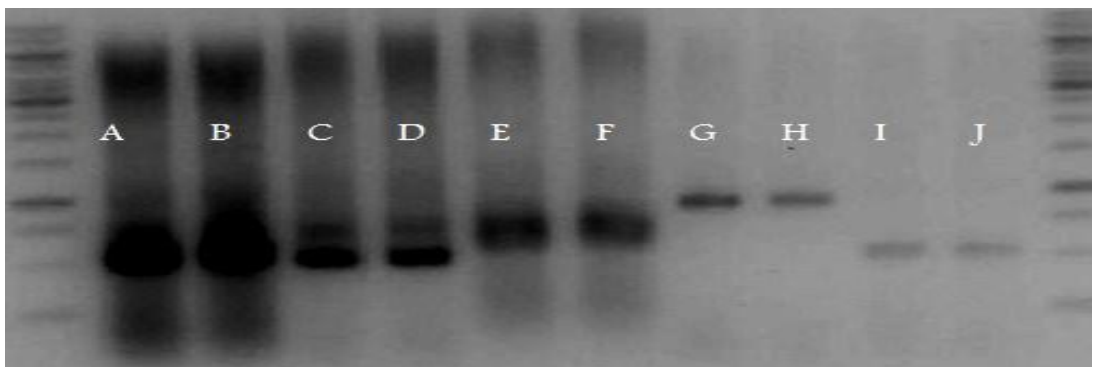
- 5 µl DEPC H₂O
- 0,15 µl S1 nukleaasia

RT-tuotetta otetaan käsittelyyn 15 µl ja siihen lisätään S1 nukleaasi -Master Mixiä 10 µl. RNase I - ja S1 nukleaasi -käsittelyssä lämpötilana on 37 °C ja siinä näytteitä pidetään 15 – 30 minuuttia. Näiden käsittelyjen jälkeen tapahtuu geelin lataus. Geelin lataus löytyy liitteestä 6 ja sieltä löytyy myös agarosigeelin valamisohje. Edellä olevan protokollan mukaan tein kaikki RT-reaktiot ja RNase I -käsittelyt.



KUVIO 14. RT-reaktio (**A, B**), RNase I -käsittely (**C, D**) S1 nukleasi -käsittely (**E, F**).

Kuviossa 15 näytteille **A ja B** on tehty käänteistranskriptio samalla protokollalla kuin kuviossa 14. Tämän jälkeen RT-tuotteille on tehty RNase I - (**C ja D**) ja S1 nukleasi -käsittely (**E ja F**). Näiden lisäksi kuvassa tuotteet **G-J** ovat kuvion 14 RT-tuotteet, jotka on puhdistettu KingFisher-robotilla (kaksi rinnakkaista). Tuotteista **G-J** näkee, että RNase I -käsittelyn voisi korvata myös KingFisher-laitteella tehtävällä puhdistuksella. Eli KingFisher-puhdistus poistaa myös RT-tuotteissa epäpuhtautena olevan alkuperäisen yksijuosteisen RNA:n ja jättää vain kaksijuosteisen cDNA:n.



KUVIO 15. RT-tuotteet (**A ja B**), RNase I -käsittely (**C ja D**), S1 nukleasikäsittely (**E ja F**) ja kuvion 14 KingFisher-robotilla puhdistetut RT-tuotteet (**G-J**)

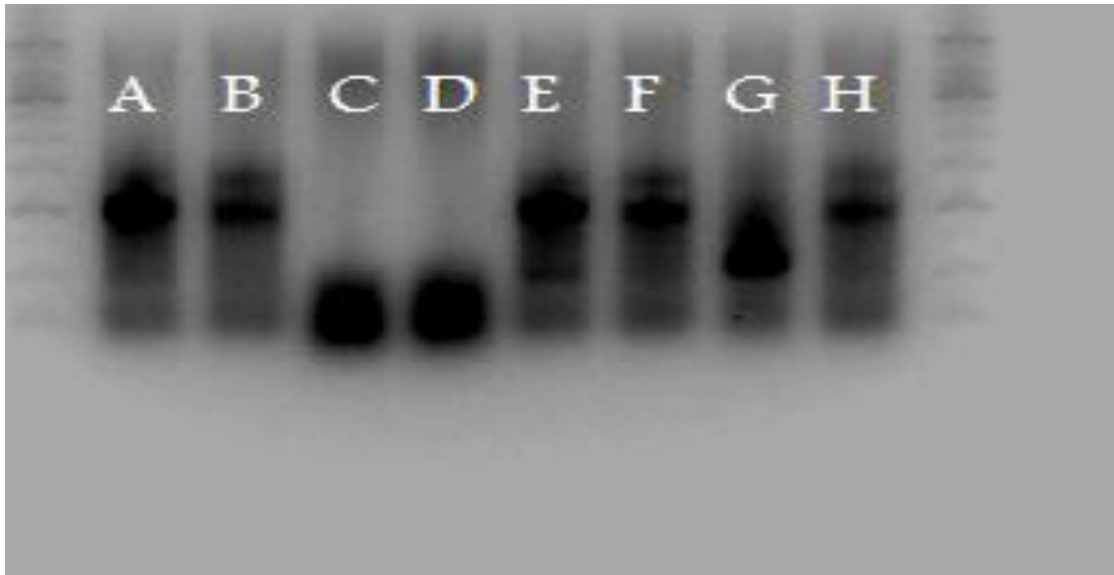
Entsyymitestaus

Entsyymitestauksessa (ks. kuvio 16) kokeiltiin, miten eri entsyymit toimivat käänteis-transkriptiossa. Testatut entsyymit olivat RevertAid Premium (tuotteet **A** ja **B**), AMV Reverse Transcriptase (tuotteet **C** ja **D**), RevertAid H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase (tuotteet **E** ja **F**) ja RevertAid M-MuLV Reverse Transcriptase (tuotteet **G** ja **H**). Kuten kuvioista 16 näkee ja kuten saattoi olettaa, niin AMV RT-entsyymi (tuotteet **C** ja **D**) ei muodosta haluttua tuotetta. Tämä johtuu AMV:n ominaisuudesta, jonka takia se saattaa syödä sekä yksijuosteisen RNA:n että halutun tuotteen eli kaksijuosteisen DNA:n pois joten tämän takia geelissä ei näy mitään tuotetta. Muut entsyymit toimivat kuten pitikin. Kuvioista 16 ei vielä näe kunnolla, mikä entsyymi toimii parhaiten, mutta kuvioista 17, jossa RT-tuotteille on tehty RNase I -käsittely, näkee paremmin.

Vaikka **A** ja **B** tuotteissa on käytetty samaa entsyymiä, niin ne eroavat toisistaan, koska **A**:ssa on käytetty aluketta kun taas **B**:ssä ei. Samoin on myös loppujen tuotteiden laita, **C**:ssä aluke ja **D**:ssä ei jne. Kokeessa käytetty Master Mix löytyy liitteestä 3 ja käytetty lämpötilaohjelma löytyy liitteestä 4. Taulukossa 3 on selitetty tarkemmin mitä entsyymiä on käytetty näytteen käsittelyssä ja onko aluke ollut mukana vai ei.

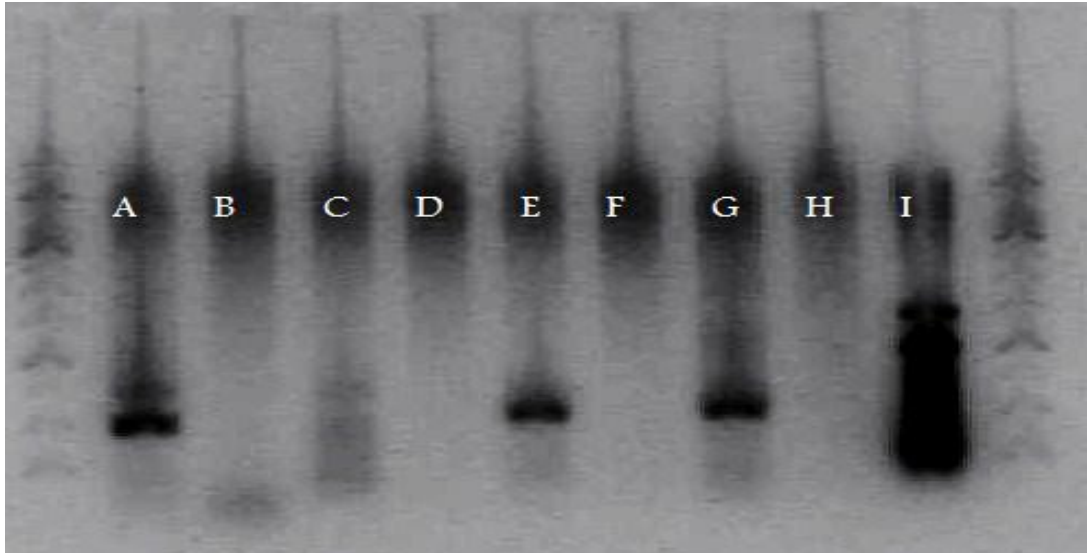
TAULUKKO 4. Entsyymitestauksessa käytetyt entsyymit.

Näyte	Entsyymi	Aluke
A	RevertAid Premium	TEG-biotiini-518r
B	RevertAid Premium	ei aluketta
C	AMV Reverse Transcriptase	TEG-biotiini-518r
D	AMV Reverse Transcriptase	ei aluketta
E	RevertAid H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase	TEG-biotiini-518r
F	RevertAid H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase	ei aluketta
G	RevertAid M-MuLV Reverse Transcriptase	TEG-biotiini-518r
H	RevertAid M-MuLV Reverse Transcriptase	ei aluketta



KUVIO 16. Entsyymitestaus RT-reaktio. Premium RT (**A ja B**), AMV (**C ja D**), H Minus M-MuLV RT (**E ja F**) ja M-MuLV RT (**G ja H**). Tuotteissa **C ja D** näkyvät tummat kohdat geelin alaosassa tarkoittavat sitä, että tuote on hajonnut.

RT-reaktion jälkeen tuotteille tehtiin RNase I -käsittely (ks. kuvio 17). RNase I:n avulla tuotteesta poistetaan alkuperäinen RNA. Kuten ribonukleasikäsittelyn jälkeen näkee, niin silloin kun aluketta ei ole käytetty niin RT-reaktiossa syntynyt tuote katoaa, koska alukkeen puuttuessa ei muodostu kaksijuosteista DNA:ta vaan kuviossa 16 näkyvä tuote on alkuperäinen eli yksijuosteinen RNA. Tämän alkuperäisen RNA:n RNase I ”syö” pois ja silloin ei geelissäkään näy tuotetta RNase I -käsittelyn jälkeen. RNase I -käsittelyn jälkeen RT-reaktion onnistumisen näkee, koska ilman ribonukleasikäsittelyä geelikuvaa peittää alkuperäinen yksijuosteinen RNA.

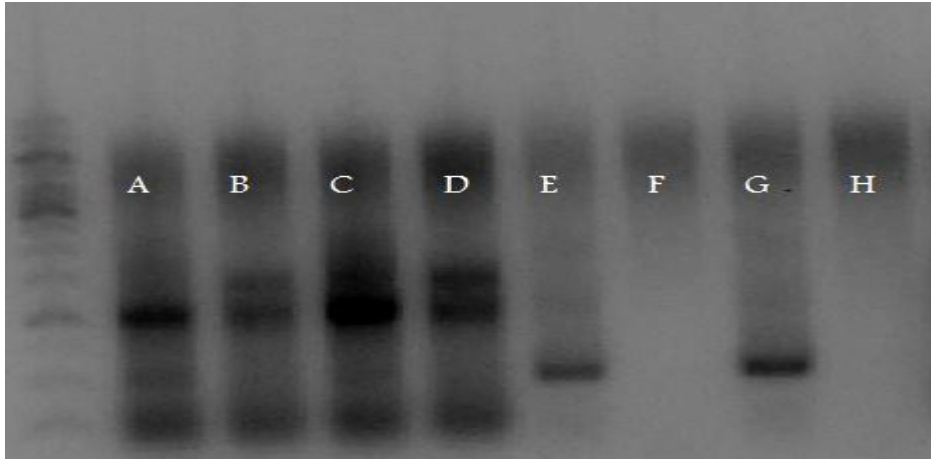


KUVIO 17. Entsyymitestaus RNase I -käsittely.

Lämpötilan testaus

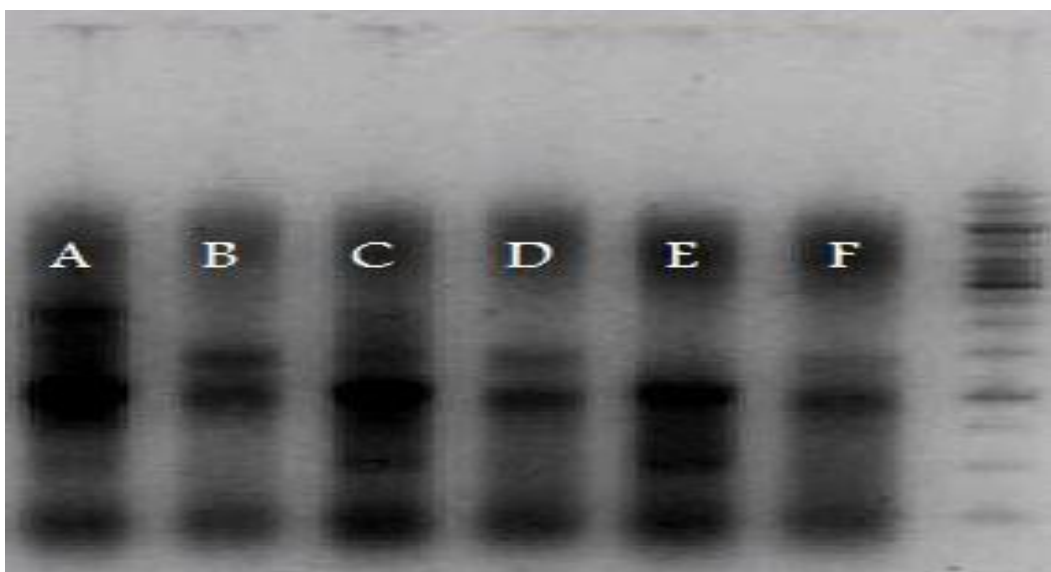
Optimaalisen lämpötilan etsimisessä kokeiltiin seuraavia lämpötiloja 45 °C, 50 °C ja 55 °C. Näiden lisäksi testattiin onnistuuko RT-reaktio paremmin, jos alussa on alkukuumennus ja kuumennuksen jälkeen jäähdytys. Alkukuumennus lämpötilana käytettiin 65 °C:ta. Entsyymi lisättiin vasta kuumennuksen ja jäähdytyksen jälkeen, koska entsyymi olisi inaktivoitunut lämpötilan vaihteluiden vuoksi. Jäähdytyslämpötilana käytettiin 10 °C:ta.

Kuviossa 18 RT-reaktio tapahtui ilman alkukuumennusta 45 °C:ssa (**A-B**) sekä alkukuumennuksen kanssa 65 °C 2 min (**C-D**), jonka jälkeen lämpötila laskettiin 45 °C:een ja jolloin entsyymi lisättiin. Kuvion 18 tuotteissa **A** ja **C** on käytetty aluketta, mutta tuotteissa **B** ja **D** ei ole. Tämän vuoksi RNase I -käsittelyn jälkeen tuotteissa **F** ja **H** ei näy tuote-vyöhykettä. Tuotteissa **E** ja **F** on tehty RNase I -käsittely RT-reaktiotuotteille **A** ja **B** ja tuotteissa **G** ja **H** RNase I -käsittely on tehty RT-tuotteille **C** ja **D**. Kuten kuvioista 18 näkee, alkukuumennuksella 65 °C:een (tuotteet **C-D**) RT-reaktio onnistuu paremmin.



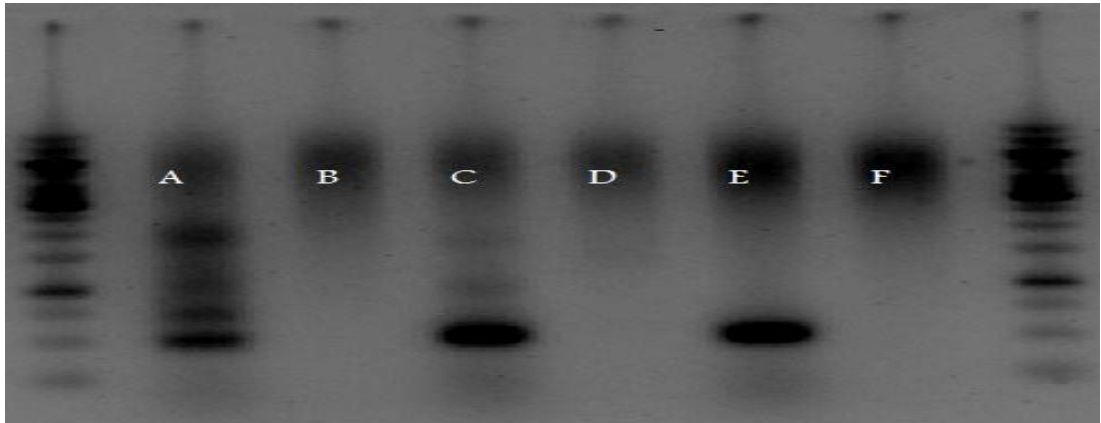
KUVIO 18. Lämpötilan testaus 45 °C (**A-B**) ja 65 °C 2 min → 45 °C (**C-D**) (RT-reaktio) ja **E-H** RNase I -käsittely.

Kuvion 19 kaikissa RT-reaktioissa on ollut sekä alkukuumennus ja välijäähdytys, mutta reaktion loppulämpötila on muuttunut. Kuvion 19 tuotteet **A** ja **B** olivat 65 °C:ssa 2 minuuttia, jonka jälkeen lämpötila laskettiin 10 °C:een 30 sekunniksi ja lopuksi lämpötila nostettiin 45 °C:een, jossa näytteet olivat 2 tuntia. Entsyymi lisättiin vasta lämpötilan ollessa 45 °C:ssa. Tuotteiden **C** ja **D** loppulämpötila oli 50 °C:ta, mutta muuten lämpötilat pysyivät samoina (65 °C 2 min ja 10 °C 30 s). Tuotteiden **E** ja **F** loppulämpötila oli 55 °C:ta. Tuotteissa **A**, **C** ja **E** on käytetty aluketta, mutta tuotteissa **B**, **D** ja **F** ei ole.



KUVIO 19. Lämpötilan testaus. **A-B** 65 °C 2 min → 10 °C 30 s → 45 °C 2 h, **C-D** 65 °C 2 min → 10 °C 30 s → 50 °C 2 h ja **E-F** 65 °C 2 min → 10 °C 30 s → 55 °C 2 h RT-reaktiot.

Kuviossa 20 on tehty RNase I -käsittely kuvion 19 RT-tuotteille. Kuvion 20 tuloksista näkee 45 °C:een (tuote **A**) olevan liian matala lämpötila, koska tuote ei ole vielä tarpeeksi puhdasta. Tämän epäpuhtauden huomaa siitä, että tuote-vyöhykkeen lisäksi kuviossa näkyy myös alkuperäisen RNA:n vyöhyke (kuviossa tumman vyöhykkeen lisäksi taustalla näkyvät harmaat vyöhykkeet). Samasta syystä 50 °C:ta (tuote **C**) on vielä hieman liian matala, mutta tuotteessa **C** ei ole enää niin paljon epäpuhtauksia kuin tuotteessa **A**. Paras tulos saavutetaan lämpötilan ollessa 55 °C:ta (tuote **E**).



KUVIO 20. Lämpötilan testaus. RNase I -käsittely kuvion 19 RT-tuotteille.

Aiemmissa RT-reaktioissa on käytetty näytteenä (RNA:na) Griffithsin eristysmenetelmällä eristettyä RNA:ta, mutta tämän tutkimuksen tarkoituksena oli tutkia onnistuuko RT-reaktio myös KingFisher-magneettipartikkelirobotilla puhdistetulle RNA:lle.

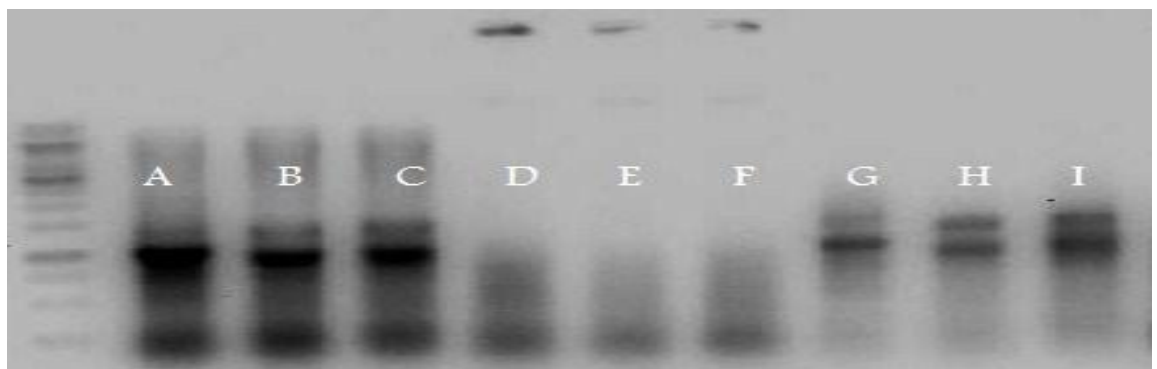
Kuviossa 21 testattiin onnistuuko KingFisher-robotilla puhdistetulle *E. coli* -lysaatille tehty RT-reaktio ja RNase I -käsittely, jos sille tehdään ennen puhdistusta fenoliesikäsittely. Kuvion 21 tuotteet **A-C** ovat Griffithsin eristyksellä saadulle RNA:lle tehdyn RT-reaktion tuotteet. Tuotteet **D-F** ovat KingFisher-robotilla puhdistetuille *E. coli* -lysaateille tehdyn RT-reaktion tuotteet, kun taas tuotteille **G-I** on tehty ennen KingFisher-puhdistusta fenoliesikäsittely. Kuten kuvion 21 tuotteista **G-I** näkee, RT-reaktio onnistuu myös KingFisher-puhdistetuille *E. coli* -lysaateille, jos niille tehdään esikäsittely, mutta ilman esikäsittelyä (tuotteet **D-F**) RNA:ssa olevat epäpuhtaudet tuhoavat RNA:n ja RT-reaktio epäonnistuu. Alla olevasta luettelosta näkee miten tuotteiden käsittelyt ovat eronneet toisistaan RT-reaktiossa.

- RT-reaktiossa on käytetty sekä aluketta että entsyymiä = tuotteet **A, D ja G**
- RT-reaktiossa on käytetty aluketta mutta ei entsyymiä = tuotteet **B, E ja H**
- RT-reaktiossa on käytetty entsyymiä mutta ei aluketta = tuotteet **C, F ja I**

RNA:n määrä mitattiin ennen RT-reaktiota Qubitilla (taulukko 4). Kuten Qubit-mittauksista näkee, ei RNA:n määrässä ole suurta eroa, oli RNA saatu Griffithsin RNA-eristyksellä tai KingFisher-puhdistuksella. Tästä voi vetää sellaisen johtopäätöksen, että KingFisher-puhdistuksella ei saada tarpeeksi puhdasta RNA:ta, mutta jos ennen puhdistusta näytteelle tehdään fenoliesikäsittely, se poistaa epäpuhtauksia. Qubit mittaa vain nukleiinihapon määrää, mutta se ei tunnista RNA:ssa olevia epäpuhtauksia.

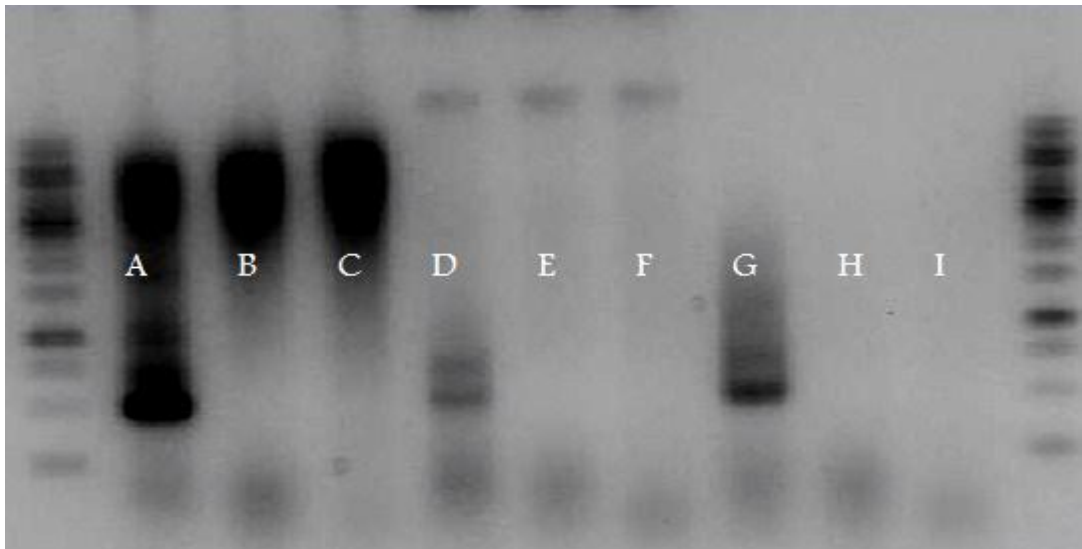
TAULUKKO 5. Qubit-mittaus RT-reaktiossa käytetyille näytteille.

Näyte	pitoisuus ₁ [ng/ml]	pitoisuus ₂ [ng/ml]	konsentraatio ₁ [µg/ml]	konsentraatio ₂ [µg/ml]
Griffithsin RNA (A-C)	910	920	60	60,7
KingFisher, ei esikä-sittelyä (D-F)	860	855	57	56,7
KingFisher, fenoliesi-käsittely (G-H)	960	985	64	65,7



KUVIO 21. RT-reaktio normaali RNA (A-C), *E. coli* -lysaatti, ei esikä-sittelyä (D-F) ja *E. coli* -lysaatti, fenoliesikäsittely (G-I).

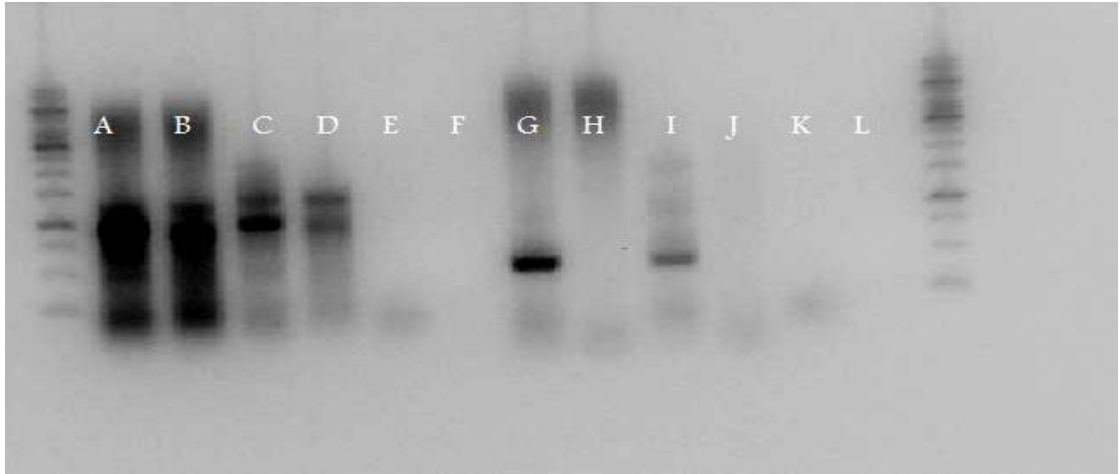
Kuviossa 22 on kuvion 21 RT-tuotteille tehty RNase I -käsittely. Kuvion 22 tuloksista näkee, että fenoliesikäsitellylle KingFisher-robotilla puhdistetulle RNA:lle tehty RT-reaktio ja RNase I -käsittely onnistuvat, mutta ilman esikäsitelyä ne eivät onnistu. Kuviossa 22 huomaa paremmin kuin kuviossa 21 sen, missä RT-käsittelyssä on ollut aluke ja entsyymi ja missä ei. Nimittäin ilman entsyymiä ja aluketta ei myöskään muodostu tuotetta. Eli kuvion 22 tuotteissa **A, D ja G** on käytetty sekä entsyymiä että aluketta, muista joko entsyymi tai aluke puuttuu.



KUVIO 22. Kuvion 21 RT-tuotteille tehty RNase I -käsittely

Kuviossa 23 on toistettu edellinen käsittely uusille näytteille. Kuvion 23 tuotteissa **A** ja **B** näytteenä on käytetty Griffithsin nukleiinihappoeristyksellä valmistettua RNA:ta. Tuotteissa **C** ja **D** näytteenä on käytetty fenoliesikäsiteltyä *E. coli* -lysaattia, joka on esikäsitellyn jälkeen puhdistettu KingFisher-magneettipartikkelirobotilla, kun taas tuotteissa **E** ja **F** näytteenä käytetty *E. coli* -lysaatti on vain puhdistettu KingFisher-magneettipartikkelirobotilla ilman fenoliesikäsitelyä. Geelin alun tuotteet ovat RT-reaktion tuotteita ja loput ovat näille tehdyn RNase I -käsittelyn tuotteita.

- RT-reaktiossa on käytetty aluketta = tuotteet **A, C** ja **E**
- RT-reaktiossa ei ole käytetty aluketta = tuotteet **B, D** ja **F**



KUVIO 23. RT-reaktio **A-F**, normaali RNA (**A ja B**), fenoliesikäsitelty *E. coli* -lysaatti (**C ja D**) ja KingFisher-robotilla puhdistettu *E. coli* -lysaatti (**E ja F**) ja RNase I -käsittely **G-L**

8.3 Ribonukleaasi I:n määrän lisäyksen vaikutus

RNase I:n määrän lisäyksen vaikutus RT-tuotteeseen tuotti mielenkiintoisia tuloksia. Nimittäin kun sen määrää lisättiin, alkoi RNase I tuhota tuotetta, vaikka niin ei kuuluisi tapahtua. Tutkimuksessa käytetyt RNase I määrät olivat hyvin pieniä. Yhden tuotteen käsittelyyn käytettiin vain 0,3 µl RNase I:tä. RNase I:n määrän pienuuden vuoksi tehtiin aina laimennos, koska noin pieniä määriä ei pysty pipetoimaan ilman suuria virhemarginaaleja.

RNase I:n määrää lisätessä normaalista (0,3 µl) määrästä, alkaa se vaikuttaa tuotteen (RNA:n) määrään. Tämä nähdään seuraavista tuloksista (ks. kuvio 24). Tuotteessa **A** on käytetty normaali määrä ribonukleaasi I:tä ja tuotteissa **D** ja **E** RNase I:n määrää on lisätty. Tuotteessa **D** RNase I:tä on kaksinkertainen määrä verrattuna tuotteeseen **A** ja tuotteessa **E** kolminkertainen määrä. Eli jo pieni lisäys RNase I:n määrässä alkaa vaikuttaa tuotteen määrään. Taulukossa 6 on esitetty näytteen käsittelyssä olleen entsyymin, alukkeen ja RNase I:n määrä.

TAULUKKO 6. Kuvion 24 näytteiden RT-reaktiossa käytetty entsyymiin ja alukkeen määrä sekä RNase I -käsittelyssä käytetty ribonukleasin määrä.

näyte	entsyymiin määrä [μ l] Premium RT	alukkeen määrä [μ l]	RNase I:n määrä [μ l]
A	1	5	0,3
B	0 ei entsyymiä	5	0,3
C	1	0 ei aluketta	0,3
D	1	5	0,6 RNase I:tä $2 \times 0,3 \mu$ l
E	1	5	0,9 RNase I:tä $3 \times 0,3 \mu$ l

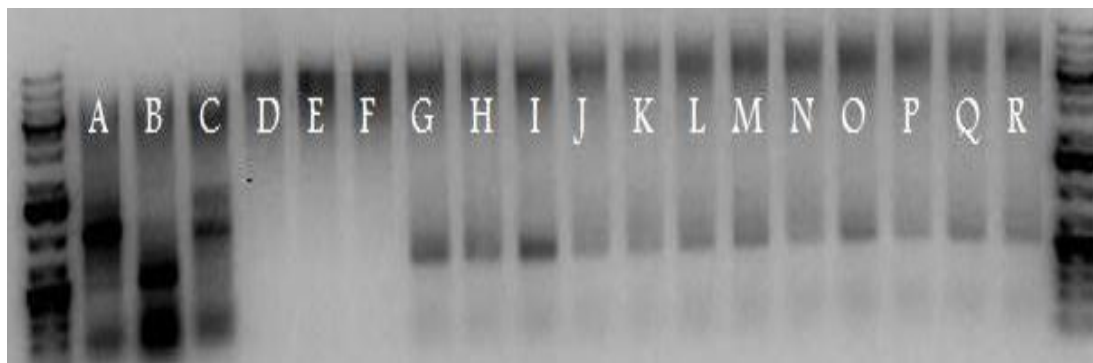


KUVIO 24. RNase I:n määrän lisäyksen vaikutus tuotteen määrään.

Kuviossa 25 kokeiltiin samaa kuin edellisessäkin, mutta tällä kertaa otettiin kolme rinnakkaista jokaiselle RNase I:n määrälle. Rinnakkaiset näytteet kertovat paremmin, että saatu tulos on todellakin oikea, eikä vain jokin sattuma. Sen lisäksi rinnakkainen näyte kertoo myös jos näytteen käsittelyssä jokin epäonnistuu. Seuraavan kuvion näytteiden **D-F** käsittelyssä jokin epäonnistui, koska niissä RNase I:n määrä on normaali eli 0,3 µl, joten niihin olisi pitänyt tulla tuotetta. Virhe, joka näytteiden käsittelyssä sattui, oli se, että ilmeisesti aluketta ei laitettu ollenkaan. Kuten tuloksista (ks. kuvio 25) RNase I:n määrää lisätessä, alkaa se ”syömään” RNA:ta. Taulukko 7 selventää, miten paljon RNase I:tä on käytetty kunkin näytteen käsittelyssä.

TAULUKKO 7. Kuvion 25 RNase I -käsittelyissä käytetty RNase I:n määrä.

Näyte	RNase I:n määrä [µl]
A (RT-reaktiotuote, ei RNase I-käsittelyä, ei 37 °C:ssa)	0
B (RT-reaktiotuote, ei RNase I-käsittelyä, 37 °C:ssa 30 min.)	0
C (RT-reaktiotuote, ei RNase I-käsittelyä, ei aluketta, ei 37 °C:ssa)	0
D-F (RNase I-käsittely normaali, aluke unohtunut)	0,3
G-I (RNase I-käsittely)	0,6
J-L (RNase I-käsittely)	0,7
M-O (RNase I-käsittely)	0,9
P-R (RNase I-käsittely)	1,2



KUVIO 25. RNase I:n määrän lisäyksen vaikutus.

9 POHDINTA

Opinnäytetyössä pyrittiin saamaan automatisoitu RNA-eristys menetelmä Thermo KingFisher-laitteelle. Laitteella oli tarkoitus tehdä cDNA synteesi lysatoidulle *E. coli*lle.

9.1 Johtopäätökset työstä ja sen avulla saaduista tuloksista

Tutkimusta tehdessä huomattiin, että pelkästään Thermo Scientific KingFisher -magneettipartikkelirobotilla puhdistetulle *E. coli* -lysaatille tehty RT-reaktio ei onnistunut. Tutkiessa syytä tähän kävi ilmi, että puhdistettuun *E. coli* -lysaattiin jäi paljon epäpuhtauksia. Nämä epäpuhtaudet aiheuttivat sen, että käänteistranskriptiossa RNA tuhoutui. RNA eristystä kokeiltiin Griffithsin nukleinihappoeristysmenetelmällä ja saadulle tuotteelle tehtiin RT-reaktio. Tällä eristysmenetelmällä saadulle RNA:lle tehty RT-reaktio onnistui ja näin huomattiin, että syy reaktion epäonnistumiseen ei ollutkaan käytetyissä reagensseissa vaan vika oli tutkimuksessa käytetyn RNA:n laadussa. Griffithsin RNA-eristysmenetelmällä saatu RNA on varmasti puhdasta, koska kyseistä eristysmenetelmää on käytetty paljon ja se on hyväksi havaittu. Kun taas KingFisher-robotilla eristetyn RNA:n puhtaudesta ei ole samanlaisia tutkimustuloksia, koska sitä ei ole aikaisemmin käytetty RNA:n eristykseen vaan DNA:n ja RNA:n puhdistukseen.

Samaan johtopäätökseen päädyttiin myös mitatessa RNA:n määrää Qubitilla. Sen antamien tulosten perusteella ei RNA:n määrässä ollut suuria eroja verratessa Griffithsin menetelmällä eristettyä RNA:ta ja RNAClean-magneettipartikkeliseoksella ja KingFisher-robotilla eristettyä RNA:ta. Qubit mittaa vain RNA:n määrää eikä se ota huomioon RNA:ssa olevia epäpuhtauksia.

RNA-fragmentin käänteiskopioinnissa tärkeintä on se, että alkuperäinen RNA on tarpeeksi puhdasta. RNA on nimittäin muutenkin helposti hajoavaa, joten epäpuhtauksien läsnäolo vain edesauttaa RNA:n häviämistä. Epäpuhtauksien takia fenoliesikäsitteily ennen varsinaista KingFisher-puhdistusta ja käänteiskopiointia on välttämätöntä,

koska pelkkä *E. coli* -pellettien lysointi ja KingFisher-puhdistus jättää RNA:han epäpuhtauksia, jotka häiritsevät RT-reaktion onnistumista.

Tutkimuksen perusteella paras kokonaisuus käänteiskopioitaessa RNA-fragmenttia on seuraavanlainen: Lämpötila ohjelmoidaan nousemaan ensin 65 °C:een, jolloin RNA:n sekundäärirakenteet hajoavat ja aluke kiinnittyy. Tämän jälkeen lämpötila lasketaan 10 °C:een, jotta RNA-nauhat asettuvat rinnakkain. Lopuksi lämpötila nostetaan 55 °C:een ja entsyymi lisätään vasta tässä lämpötilassa. Parhaiten käänteiskopiointi onnistuu käytettäessä entsyyminä RevertAidin Premium käänteistranskriptaasia. Käänteiskopiointia seuraavassa ribonukleaasi I -käsittelyssä sopiva RNase I -määrä on 0,3 µl, koska määrän noustessa liian suureksi ribonukleaasi alkaa ”syömään” RNA:ta. Tämä havaittiin tutkimuksessa vahingossa, koska yhdessä testauksessa RNase I -käsittelyssä oli RNase I:tä kaksinkertainen määrä normaaliin (0,3 µl) verrattuna. Tämän seurauksena tuotevyöhyke oli paljon hailakampi kuin käytettäessä RNase I:tä 0,3 µl. Tuotevyöhykkeen hailakkuus käytettäessä RNase I:tä enemmän normaaliin määrään verrattuna tarkoittaa sitä, että tuotetta on muodostunut vähemmän kuin käytettäessä ribonukleaasi I:tä 0,3 µl.

RNase I -käsittely RT-reaktion jälkeen on tärkeää, jotta voitiin todentaa käänteiskopioinnin todella tapahtuneen. RNase I -käsittelyn avulla puhdistettiin alkuperäinen yksijuosteinen RNA pois. Ilman ribonukleasikäsittelyä geelikuvaa peittää alkuperäinen RNA eikä RT-reaktion onnistumista voi varmistaa.

Työssä varmistui se, että AMV transkriptaasi ei sovellu tämän kaltaiseen käänteiskopiointiin. AMV käänteiskopioijaentsyymi ”syö” sekä yksijuosteisen RNA:n että halutun tuotteen, kaksijuosteisen cDNA:n.

Opinnäytetyöni tarkoituksena alun perin oli RNA-eristyksen automatisointi Thermo Scientific KingFisher -laitteella, RNA-tuotteen RT-reaktio ja vielä RT-tuotteen jatkokäsittely. Kokonaisuus olisi muodostunut liian laajaksi, joten RT-tuotteen jatkokäsittely ei kuulu opinnäytetyöhöni. Lopulta opinnäytetyöhöni kuului selvittää, pystyykö RNA-eristyksen, RT-reaktion ja RNase I -käsittelyn automatisoimaan Thermo Scientific KingFisher -robotilla niin, että mikrobinäytteiden puhdistus ja entsyymireaktiot pystytään tekemään samalla laitteella ilman käsityötä.

Nämä tutkimuskohteet valittiin, koska tärkeintä tutkimuksen tässä vaiheessa oli selvittää pystyykö Thermo KingFisher -laitteella ylipäätään automatisoimaan entsyymaattisia reaktioita. Tutkimuksen tulosten perusteella voidaan sanoa, että automatisointi onnistuu, mutta tutkittavalle mikrobille täytyy tehdä esikäsittely joko fenolilla, jota tässä tutkimuksessa käytettiin, tai sitten jollain muulla RNA:sta epäpuhtauksia poistavalla reagenssilla.

Fenolin käyttäminen aiheuttaa työturvallisuus ongelmia, koska fenolin myrkyllisyyden takia on sitä käsiteltäessä työskenneltävä vetokaapissa. Tutkimusta jatkettaessa on otettava huomioon työturvallisuus ja pyrittävä kehittämään työturvallisuuden kannalta parempi keino saada poistettua RNA:n epäpuhtaudet fenolin sijasta. Tutkimuksen seuraavaan vaiheeseen kuuluu myös RT-tuotteen jatkokäsittely. Jatkokäsittelyyn kuuluu mm. tuotteen leimaaminen streptavidini-peroksidi -kompleksilla ja mittaaminen luminometrisesti (ELISA).

9.2 Omien kykyjen kehittyminen opinnäytetyön aikana

Opinnäytetyötä tehdessäni pääsin kehittämään monia eri taitoja, joita työelämään päästessäni tulen tarvitsemaan. Tutkimusta tehdessäni tein yhteistyötä projektin koordinoijan, Marja Tirolan, ja hänen tutkimusryhmänsä jäsenten kanssa. Näin ollen tutkimuksen aikana pääsin kehittämään myös työelämässä tarvittavia yhteistyötaitoja.

Tutkimuksen aikana sain myös konkreettisen esimerkin siitä, miten tärkeää on huolellinen työskentely nukleiinihappoja käsiteltäessä. Varsinkin RNA, jota tutkimuksessa käsiteltiin, tuhoutuu todella helposti huolimattomasti käsiteltäessä. Tutkimusta tehdessäni kehittyivät mikrobiologisessa työskentelyssä sekä nukleiinihappojen kanssa työskennellessä vaadittavat perustaidot ja vähitellen ne muuttuivat rutiinomaisiksi.

Kirjalliset taitoni kehittyivät opinnäytetyön kirjoittamisen aikana, koska siinä oli osattava koota teoreettinen tieto, joka oli saatu lähdemateriaalista, ja käytännön osuus kokonaisuudeksi, joka olisi toimiva ja yhtenäinen. Näiden lisäksi piti vielä osata tulkita tulokset ja esittää ne ymmärrettävästi, mikä on aina haastavaa.

LÄHTEET

Agencourt RNAClean XP. 2011. Tuoteseloste. Beckman Coulter Inc. Käyttöohje. Viitattu 7.11.2010.

http://www.beckmangenomics.com/products/rna_purification_and_cleanup/agencourt_rnaclean_xp.html.

Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. 2004. Essential Cell Biology. 2 ed. USA. Garland Science.

Debanu, D. & Georgiadis, M. M. 2004. 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. Structure. Vol. 12, p.819 – 829.

Glick, B. & Pasternak, J. 1998. Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA. 2 ed. Washington, D.C: ASM Press.

Gott, J. M. 2007. Methods in Enzymology: RNA Modification. USA: Elsevier Inc.

Griffiths, R.I., Whiteley, A.S., O'Donnell, A.G. & Bailey, M.J. 2000. Artikkel. Rapid Method for Coextraction of DNA and RNA from Natural Environments for Analysis of Ribosomal DNA- and rRNA-Based Microbial Community Composition. PubMed. Applied and Environmental Microbiology.

Heino, J. & Vuento, M. 2007. Biokemian ja solubiologian perusteet. Helsinki: WSOY.

Kotewicz, M. L., Sampson, C. M., D'Alessio, J. M. & Gerard, G. F. 1988. Isolation of cloned Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase lacking ribonuclease H activity. Nucleic Acids Research. Molecular Biology Research and Development. Bethesda Research Laboratories. Life Technologies. U.S. Inc. Gaithersburg.

Lim, D. 1998. Microbiology. 2 ed. USA: WCB McGraw-Hill.

MagAttract RNA Tissue Mini M48 Kit. 2003-2011. Tuoteseloste. Qiagen. Sample & Assay Technologies. Viitattu 27.2.2011.

<http://www.qiagen.com/products/rnastabilizationpurification/magattractsystem/magattractrnatissuemini48.aspx#Tabs=t1>.

Marler, W. 2009. Non-O157:H7 Shiga Toxin *E. coli* - Human Disease, Vectors and Outbreaks. Food Poison Journal. Viitattu 1.1.2011.

<http://www.foodpoisonjournal.com/2009/09/articles/foodborne-illness-outbreaks/nono157h7-shiga-toxin-e-coli-human-disease-vectors-and-outbreaks/>.

Mechanism of Reverse Transcription. 2010. LC Sciences. Molecular Biology Web Book. Web Book Publishing. Viitattu 9.1.2011. <http://www.web-books.com/MoBio/Free/Ch4J1.htm>.

Molecular Biology Catalog & Product Application Guide. 2008. Fermentas Life Sciences. Fermentas Inc. USA.

Nelson, D. L. & Cox, M. M. 2005. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 4 ed. New York: W. H. Freeman and Company.

Nicholson, A. W. 2001a. *Methods in Enzymology: Ribonucleases Part A*. USA: Academic Press.

Nicholson, A. W. 2001b. *Methods in Enzymology: Ribonucleases Part B*. USA: Academic Press.

Niemi, M., Virtanen, I. & Vuorio, E. 1995. *Solu- ja molekyylibiologia*. 6 p. Porvoo: WSOY.

Optimization of the DNA Purification Protocol for the Thermo Scientific KingFisher Flex and BindIt 3.1 Software. 1999-2011. Valmistajan laiteseloste. Biocompare. *SP & A Application laboratory. Thermo Fisher Scientific. Vantaa, Finland. Viitattu 7.1.2011.* <http://www.biocompare.com/Articles/ApplicationNote/1769/Optimization-of-The-DNA-Purification-Protocol-for-The-Thermo-Scientific-KingFisher-Flex-and-BindIt-31-Software.html>.

Repaske, R., Hartley, J. W., Kavlick, M. F., O'Neill, R. R. & Austin, J. B. 1989. 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*. American Society for Microbiology. Vol. 63. No. 3. ed. 1460 – 1464.

RevertAid™ Premium Reverse Transcriptase. 2010. Käyttöohje. Fermentas Life Sciences. Certificate of analysis. Viitattu 7.11.2010. http://www.fermentas.com/templates/files/tiny_mce/coa_pdf/coa_ep0731.pdf

RNA & cDNA Purification using RNAClean. 2004. Tuoteseloste. Agencourt Bioscience Corporation. Viitattu 7.11.2010. http://agencourt.com/documents/products/rnaclean/Agencourt_RNAClean_AppNote.pdf.

RNase I in *E. coli*. 2010. Käyttöohje. Epicentre Biotechnologies. *Enzymes for Molecular Biology*. Viitattu 9.1.2011. <http://www.epibio.com/item.asp?ID=347>.

Salkinoja-Salonen, M. 2002. *Mikrobiologian perusteita*. Jyväskylä: Gummerus.

Salo, H. 1997. Geelielektroforeesi. Internetix. Internetix-materiaali Opit-ympäristöön. verkkodokumentti. Viitattu 16.1.2011. <http://materiaalit.internetix.fi/fi/opintojaksot/5luonnontieteet/biologia/geenitekniikka/geelielektroforeesi>.

Subramani, P., Rajakannu, P., Sudhakar, P. & Jayaprakash, N. 2005. Targeting the HIV-1 Reverse Transcriptase, Integrase, P27, By Expression of RNAi Oligonucleotides from Engineered Human Artificial Chromosome. *Journal of Young Investigators*. Volume 13. Viitattu 9.1.2011. <http://www.jyi.org/research/re.php?id=637>.

Suominen, I. & Ollikka, P. 2004. *Yhdistelmä-DNA-tekniikan perusteet*. 2 p. Helsinki: Opetushallitus.

Teräväinen, K. 2007. *Iodobacter* sp. –bakteerin esiintyminen vesihometartunnoille alttiiden kalojen iholla. Opinnäytetyö. Jyväskylän ammattikorkeakoulu. Tekniikka ja liikenne. Laboratorioalan koulutusohjelma.

Thermo Fisher Scientific Inc. 2006-2008. Valmistajan laiteseloste. Part of Thermo Fisher Scientific. Viitattu 7.11.2010.
www.fishersci.com.my/product_details.asp?nid=818.

Tirola, M. 2010. Mikrobiologisen laadunvalvonnan automatisointi teollisuusprosesseissa (MILA). Jyväskylän yliopisto.

Tuunanen, J. 2003. Vessel and rod. United States Patent 6596162. FreePatentsOnline. Thermo Labsystems Oy Helsinki Finland. Viitattu 7.11.2010.
<http://www.freepatentsonline.com/6596162.html>.

Vaheri, A. & Alitalo, K. 1983. Retrovirukset ja ihmisen syöpägenit. verkkodokumentti. Viitattu 2.1.2011. http://www.terveysportti.fi/d-hm/articles/1983_7_452-457.pdf.

LIITTEET

Liite 1. KingFisher-laitteen puhdistusohjelma ja puhdistuksessa käytettyjen reagenssien määrät

1. Sekoitus1 (1. kaivo)

Alussa magneettipartikkelien vapautus

Sekoitusaika 20s, sekoitusnopeus medium

Lopussa ei magneettipartikkelien keräystä

2. Paused (1.kaivo)

Alussa ei magneettipartikkelien keräystä tai vapautusta

Sekoitusaika 1min 40s, sekoitusnopeus paused, magneettisauva kaivon yläpuolella pysäytyksen aikana

Lopussa magneettikeräysten määrä 3 kpl, keräysaika 1s

3. Sekoitus2 (1.kaivo)

Alussa magneettipartikkelien keräys

Sekoitusaika 1min, sekoitusnopeus slow

Lopussa magneettikeräysten määrä 3 kpl, keräysaika 1s

4. Sekoitus3 (2.kaivo)

Alussa ei magneettipartikkelien keräystä tai vapautusta

Sekoitusaika 30s, sekoitusnopeus paused, magneettisauvan kärki nesteessä pysäytyksen aikana

Lopussa magneettikeräysten määrä 3 kpl, keräysaika 1s

5. Sekoitus4 (3.kaivo)

Alussa ei magneettipartikkelien keräystä tai vapautusta

Sekoitusaika 30s, sekoitusnopeus paused, magneettisauvan kärki nesteessä pysäytyksen aikana

Lopussa magneettikeräysten määrä 3 kpl, keräysaika 1s

6. Kuivaus

Kuivausaika 4min

Magneettisauva kuivauksen aikana kaivon yläpuolella

7. Magneettipartikkelien vapautus1 (4.kaivo)

Vapautusaika 30s, nopeus medium

8. Magneettipartikkelien keräys (4.kaivo)

Keräysten määrä 5 kpl, keräysaika 5s

9. Magneettipartikkelien vapautus2 (3.kaivo)

Vapautusaika 30s, nopeus fast

1.kaivo: näyte + magneettipartikkelit + 70 % EtOH

2. kaivo: 70 % EtOH (pesu)

3. kaivo: 70 % EtOH (pesu)

4.kaivo: TE-puskuri (RNA:n liuotus)

Puhdistuksessa käytettävien reagenssien määrät

1. 30 μ l näyte + 7 μ l magneettipartikkeleita + 80 μ l 70 % EtOH ($V_{tot}=117 \mu$ l)

2. 30 μ l näyte + 20 μ l magneettipartikkeleita + 60 μ l 70 % EtOH ($V_{tot}=110 \mu$ l)

3. 30 μ l näyte + 70 μ l magneettipartikkeleita + 30 μ l 70 % EtOH ($V_{tot}=130 \mu$ l)

Liite 2. RNA-eristys Griffithsin menetelmällä

1. Lisää kierrekorkilliseen eppendorf-putkeen, jossa näyte on 400 µl fenoli-kloroformi-IAA (25:24:1), 400 µl CTAB ja 0,6 g lasikuulia. (IAA=isoamyylialkoholi)
2. Näyte hajotetaan FastPrepillä teho 5.5 ja aika 30 sekuntia.
3. Näyte 15 minuutiksi jäälle.
4. Nukleiinihappojen sisältämä vesifaasi erotetaan sentrifugoimalla 5 min. 13000×g 4°C:ssa.
5. Ylempi faasi uusiin eppendorf-putkiin, joiden pohjalla 400 µl kloroformi-isoamyylialkoholia (24:1). Aineiden sekoitus vortexoimalla. Näin poistetaan fenoli.
6. Faasien erotus sentrifugoimalla 5 min. 13000×g 4°C:ssa.
7. Ylempi faasi uusiin eppendorf-putkiin ja nukleiinihappojen erotus vesifaasista tapahtuu saostamalla ne 2×vol 30 % PEG-NaCl → sekoitus kääntelemällä putkia. Inkubointi 2h huoneenlämpötilassa.
8. Sentrifugaus 10 min. 13000×g 4°C:ssa.
9. Nesteen poisto. (putken pohjalle muodostunut RNA pelletti)
10. Pelletin pesu 500 µl jääkylmällä 70 % EtOH:lla → fuugaus 15 min 13000×g 4°C:ssa.

Liite 3. Master Mix -ohje käänteistranskriptioreaktiota ja ribonukleasi I -käsittelyä varten

1×RT-reaktio Master Mix

5 µl DEPC H₂O

10 µl näyte

5 µl dNTP 10mM

5µl primer (aluke)

Lämpötilaohjelma käyntiin ja lämpötilan saavuttaessa reaktiolämpötilan (45 °C/ 50 °C/55 °C), lisätään seuraava Master Mix

10µl Buffer (puskuri)

10µl DEPC H₂O

1µl RT-entsyymi

Käänteistranskriptio reaktion jälkeen näytteelle tehtiin RNase I -käsittely/ S1-nukleasikäsittely

1×reaktio Master Mix (**RNase I -käsittely**)

0,3 µl RNase I

5 µl DEPC H₂O

15 µl näyte + 5 µl Master Mix (RNase I -käsittely)

1×reaktio Master Mix (**S1-nukleasikäsittely**)

0,45 µl S1-nukleasi

10 µl S1 Buffer

10 µl DEPC H₂O

15 µl näyte + 10 µl Master Mix (S1-nukleasikäsittely)

Liite 4. RT-reaktion ja RNase I -käsittelyn lämpötilaohjelmat

RT-reaktio

1. 45 °C ei alkukuumennusta
2. 65 °C 2min →45 °C alkukuumennus
3. 65 °C 2min →10°C 30s → 45 °C alkukuumennus ja välijäähdytys
4. 65 °C 2min →10°C 30s → 50 °C alkukuumennus ja välijäähdytys
5. 65 °C 2min →10°C 30s → 55 °C alkukuumennus ja välijäähdytys

RNase I -käsittely tapahtuu 37 °C:ssa vähintään 15 min.

Liite 5. Agaroosigeelielektroforeesi

0,8-1,0 % agaroosigeelin valaminen

1. Ajokelkan päiden teippaus ja näytekampon asetukset paikoilleen
2. 50 ml:aan 1×TAE-puskuria sekoitetaan 0,8-1,0 g agaroosia
3. Agaroosi liuotetaan TAE-puskuriin lämmittämällä sitä mikroaaltouunissa.
4. Lisätään 50 ml:aa 1×TAE-puskuria ja annetaan jäähtyä noin 60 °C:een, mutta ei kuitenkaan liikaa, koska muuten neste jähmettyy.
5. Sekoitetaan geeliin 2 µl Syber Safe-väriainetta.
6. Kaadetaan geeli ajokelkkaan ja annetaan jähmettyä.

Näytteiden ajaminen geelissä

1. Poistetaan näytekammat sekä teipit ajokelkasta ja asetetaan kelkka ajolaitteeseen.
2. Lisätään 1×TAE-puskuria siten että geeli peittyy.
3. Pipetoidaan parafilmin päälle tippoja 6× LB:tä (Loading buffer).
4. 10 µl näytettä sekoitetaan LB:iin pipetoimalla muutaman kerran edestakaisin parafilmin päällä.
5. Näytteet pipetoidaan geelin näytekoloihin.
6. Geeliin pipetoidaan kokostandardiksi 1kb:n DNA ladderia. (valmistus 100 µl 1kb DNA Ladder + 350 µl TE-puskuria + 50 µl 10×LB:tä).
7. Elektroforeesi ajetaan 100 V:n jännitteellä noin tunnin ajan tai niin kauan kun näytteet ovat kulkeneet tarpeeksi pitkälle.

Geeli kuvataan UV-valossa ja kuvaa tarkastellaan Quantity One-ohjelman (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) avulla.