

AMINOTRANSAMINAASI-ENTSYYMIN
PUHDISTUS JA KITEYTYS

Saara Sipola
2011
Oulun seudun ammattikorkeakoulu

AMINOTRANSAMINAASI-ENTSYYMIN
PUHDISTUS JA KITEYTYS

Saara Sipola
Opinnäytetyö
Kevät 2011
Laboratorioalan koulutusohjelma
Oulun seudun ammattikorkeakoulu

OULUN SEUDUN AMMATTIKORKEAKOULU

Koulutusohjelma

Laboratorioalan koulutusohjelma

Suuntautumisvaihtoehto

Bioteknologia

Työn tilaaja

Oulun yliopisto, Bioprosessitekniikan laboratorio

Työn nimi

Aminotransaminaasi-entsyymin puhdistus ja kiteytys

Avainsanat

transaminaasi, proteiinin puhdistus, kiteytys

TIIVISTELMÄ

Sivuja + Liitteitä

43 + 9

Opinnäytetyö

Opinnäytetyö

Aika

Kevät 2011

Työn tekijä

Saara Sipola

Opinnäytetyön tarkoituksena oli puhdistaa ja kiteyttää *Escherichia coli* BL21(DE3) -bakteeriin liitetyn *Arthobacter citreus* -bakteerin plasmidi-DNA:n tuottamaa aminotransaminaasi-entsyymiä (AcATA). Puhdistus tehtiin kolme kertaa ja menetelmä oli jokaisella kerralla samanlainen. Puhdistuksissa käytettiin EnBase® Flo -menetelmällä kasvatettuja soluja sekä ZYM505-mediumilla kasvatettuja soluja. Kiteytyskokeissa käytettiin molemmilla tavoilla kasvatettua ja puhdistettua AcATA-proteiinia. Lopuksi vertailtiin kaikkien puhdistusten tuloksia keskenään.

Puhdistus aloitettiin solujen hajotuksella ja ammoniumsulfaattisaostuksella, minkä jälkeen työssä siirryttiin anioninvaihtokromatografiaan. Ensimmäiseksi käytettiin HiTrap Capto DEAE -pylvästä, minkä jälkeen siirryttiin paremmin erottelemaan HiTrap Q HP -pylvääseen. Viimeisenä puhdistusvaiheena oli HiLoad Superdex 200 pg -geelisuodatuspylväs. AcATAN puhdistumista seurattiin proteiinipitoisuus- ja entsyymiaktiivisuusmittauksilla sekä SDS-PAGE:n avulla.

AcATAN kiteytymiskokeissa optimoitiin olosuhteita proteiinikiteiden muodostumiselle. Saatujen proteiinikiteiden laatua testattiin röntgendiffraktiolla (XRD). Työn aikana saatiin selville, että eri kasvatusmenetelmillä ei ollut proteiinin tuoton ja aktiivisuuden suhteen merkittävää eroa. Proteiinin molekyylipaino määritettiin, ja sen havaittiin olevan tetrameeri. XRD-kokeissa saatiin röntgendiffraktiokuva, joka oli hyvä alku AcATAN rakenteen selvittämiseksi. Myöhemmin Biokemian laitoksella ja Ranskassa testatuista kiteistä saatiin hyvää diffraktiotietoa, jonka avulla AcATAN rakennetta pystytään tulevaisuudessa selvittämään.

SISÄLTÖ

TIIVISTELMÄ.....	3
SISÄLTÖ.....	4
1 JOHDANTO.....	6
2 TRANSAMINAASIENTSYYMIT.....	8
2.1 Aminotransaminaasi-entsyymin (ATA) aktiivisuuden mittaaminen.....	8
2.2 Pyridoksaali-5'-fosfaatti (PLP).....	9
3 NATRIUMDODEKYLLISULFAATTIPOLYAKRYYLI-AMIDIGEELIELEKTROFOREESI (SDS-PAGE).....	11
4 PROTEIINIEN PUHDISTUS.....	13
5 PROTEIININ PUHDISTUSMENETELMIÄ.....	14
5.1 Ammoniumsulfaattisaostus.....	14
5.2 Dialyysi.....	14
5.3 Ioninvaihtokromatografia.....	15
5.4 Geelisuodatus.....	15
6 KROMATOGRAFIAPYLVÄÄT.....	16
6.1 HiTrap Canto DEAE 5 ml (GE Healthcare).....	16
6.2 HiTrap Q HP 1 ml (GE Healthcare).....	16
6.3 HiLoad 16/60, Superdex 200 prep grade (GE Healthcare).....	17
7 PROTEIININ RAKENTEEN TUTKIMUSMENETELMIÄ.....	18
7.1 ThermoFluor®.....	18
7.2 Static Light Scattering (SLS).....	18
8 PROTEIINIEN KITEYTYS.....	19
8.1 Yksinkertainen kiteytys.....	19
8.2 Höyrydiffuusio-menetelmä.....	19
8.3 Kiteytyksen ongelmia.....	20
9 RÖNTGENDIFFRAKTIO-ANALYYSI (XRD).....	21
9.1 Kidehila.....	21
9.2 Braggin laki.....	22
10 AMINOTRANSAMINAASI-ENTSYYMIN PUHDISTUS <i>E. COLI</i> BL21(DE3) -SOLUISTA.....	23
10.1 EnBase® Flo -menetelmällä kasvatetut solut.....	23
10.1.1 Entsyymiaktiivisuuden mittaaminen.....	24
10.1.2 AcATA:n puhdistus ammoniumsulfaattisaostuksella.....	24

10.1.3 AcATA:n puhdistus HiTrap Capto DEAE -pylväällä	25
10.1.4 AcATA:n puhdistus HiTrap Q HP -pylväällä	26
10.1.5 AcATA:n puhdistus HiLoad 16/60 Superdex 200 pg -pylväällä	27
10.1.6 AcATA:n kiteytys.....	27
10.2 ZYM505-mediumilla kasvatetut solut.....	28
10.2.1 AcATA:n puhdistus HiTrap Capto DEAE -pylväällä	28
10.2.2 AcATA:n puhdistus HiTrap Q HP -pylväällä	29
10.2.3 AcATA:n puhdistus HiLoad 16/60 Superdex 200 pg -pylväällä.....	29
10.2.4 AcATA:n kiteytys.....	29
10.3 ZYM505-mediumilla kasvatetut solut.....	29
10.3.1 AcATA:n puhdistus HiTrap Capto DEAE -pylväällä	30
10.3.2 AcATA:n puhdistus HiTrap Q HP -pylväällä	30
10.3.3 AcATA:n puhdistus HiLoad 16/60 Superdex 200 pg -pylväällä.....	30
11 TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU	32
11.1 AcATA:n puhdistumisen seuranta	32
11.2 AcATA:n rakenteen tutkiminen	35
11.3 AcATA:n kiteytys	35
12 YHTEENVETO.....	38
LÄHTEET.....	39
LIITTEET	43

1 JOHDANTO

Transaminaasit ovat ryhmä entsyymejä, jotka katalysoivat aminohappojen aminoryhmän siirtoa karbonyyliyhdisteille (1, hakusana transaminase). Esimerkiksi glutamaatin transaminaatioreaktiossa glutamaatin aminoryhmä siirtyy pyruvaatille, jolloin syntyy alaniinia ja α -ketohappoa (2, hakusanat glutamaatti ja ketoglutaraatti). Aminotransaminaasit (ATA) toimivat esimerkiksi katalyyttinä reaktiossa, jossa α -metyylibentsyyliamiini (MBA) reagoi pyruvaatin kanssa muodostaen asetofenonia ja alaniinia. (3, s.1.)

Aiemmin on tutkittu muun muassa *Vibrio fluvialis* JS17 -bakteerissa kasvatettua pyruvaatti-transaminaasi-entsyymiä, joka on osoittanut aktiivisuutta kiraalaisia amiineja kohtaan. Tämän entsyymin entsyymaattiset ominaisuudet on myös saatu selvitettyä. Entsyymin molekyyllipainoksi oli määritetty 100 kDa, ja sen huomattiin koostuvan kahdesta 50 kDa:n alayksiköstä. Tutkimuksessa pyruvaatin ja pyridoksaali-5'-fosfaatin (PLP) todettiin parantavan entsyymin stabiilisuutta (4, s. 463). Toisessa tutkimuksessa tarkasteltiin *Bacillus alcalophilus* -bakteerissa tuotettua fosfoseriini-aminotransferaasi-entsyymiä (PSAT), jonka kiderakenne saatiin määritettyä. Entsyymi on homodimeeri, jonka monomeerit koostuvat kahdesta alayksiköstä. PSAT katalysoi kahdensuuntaista reaktiota, jossa 3-fosfohydroksipyruvaatti muuttuu L-fosfoseriiniksi. PSAT-entsyymin todettiin tutkimuksessa olevan PLP-riippuvainen. (5, s. 97.)

Opinnäytetyön tarkoituksena oli puhdistaa ja kiteyttää aminotransaminaasi-entsyymiä (AcATA). *Arthobacter citreus* -bakteerin aminotransaminaasi-entsyymiä koodaava plasmidi-DNA on liitetty *Escherichia coli* BL21(DE3) -bakteeriin. Työn aikana proteiinia kasvatettiin EnBase® Flo-menetelmällä ja ZYM505-mediumilla. AcATAN puhdistusmenetelminä käytettiin anioninvaihtopylväitä sekä geelisuodatuspylvästä. AcATAN puhdistumista seurattiin työn aikana proteiinipitoisuus- ja entsyymiaktiivisuusmittausten sekä SDS-PAGE:n avulla. Proteiinin kiteytyskokeet tehtiin Oulun yliopiston Biokemian laitoksella. Työ suoritettiin Oulun yliopiston Bioprosessitekniikan laboratorii-

ossa Anu Mursulan ohjauksessa. Opinnäytetyö oli osa monivuotista kansainvälistä biokatalyysialan projektia, jossa Oulun yliopisto oli mukana.

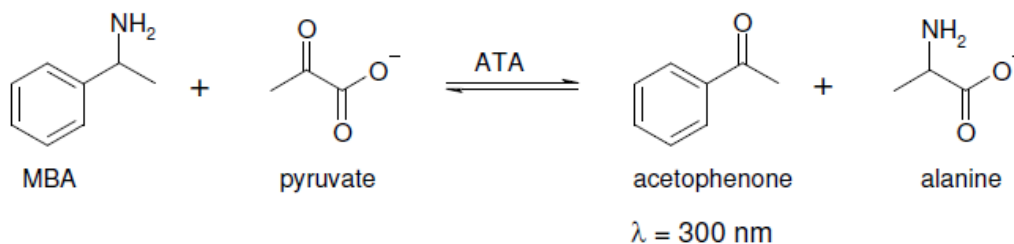
2 TRANSAMINAASIENSYYMIT

Transaminaasit ovat ryhmä entsyymejä, jotka katalysoivat aminohappojen aminoryhmän siirtoa karbonyyliyhdisteille (1, hakusana transaminase). Transaminaaseja on tutkittu paljon, sillä niitä voidaan hyödyntää aminohappojen ja kiraalisten amiinien tuottamisessa. Entsyymeillä on laaja substraattispesifisyys sekä korkea muuttumisnopeus ja stabiilisuus. Entsyymien teollinen tuotto on kuitenkin rajattua, sillä transaminaatioreaktiolla on pieni tasapainovakio. (4, s. 463.)

Transaminaatio on yksi tärkeimmistä mekanismeista proteiinien aineenvaihdunnassa, jossa syntyy välttämättömiä aminohappoja (1, hakusana transaminase). Esimerkiksi glutamaatin transaminaatioreaktiossa glutamaatin aminoryhmä siirtyy pyruvaatille, jolloin syntyy alaniinia ja α -ketohappoa (2, hakusana glutamaatti ja ketoglutaraatti). Maksasolujen sytoplasma sisältää alaniiniaminotransferaasi (ALAT) - ja aspartaattiaminotransferaasi-entsyymejä (ASAT), joiden pitoisuuksia käytetään lääketieteessä maksasolujen vaurioiden osoittamisessa (6, hakusana ALAT ja ASAT). ALAT ja ASAT katalysoivat glutamiinihapon aminoryhmän siirtymistä α -ketohapolle. Suurentuneet arvot viittaavat maksavaurioon.

2.1 Aminotransaminaasi-entsyymien (ATA) aktiivisuuden mittaaminen

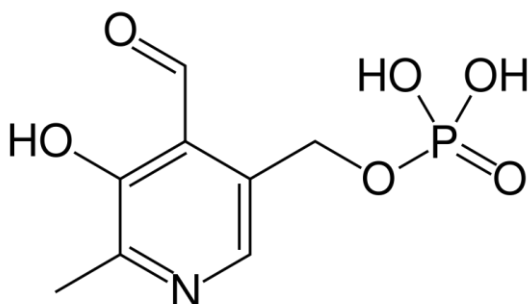
Aminotransaminaasi-entsyymit toimivat katalyytteinä reaktiossa, jossa α -metyyli-bentsyyliamiini (MBA) reagoi pyruvaatin kanssa muodostaen asetofenonia ja alaniinia. Pyruvaatti toimii reaktiossa aminoryhmän vastaanottajana (kuva 1). Asetofenonin muodostumista voidaan tarkkailla reaaliajassa seuraamalla näytteen absorbanssia aallonpituudella 300 nm, koska reaktiossa syntyvä alaniini on värillinen yhdiste (3, s. 1.)



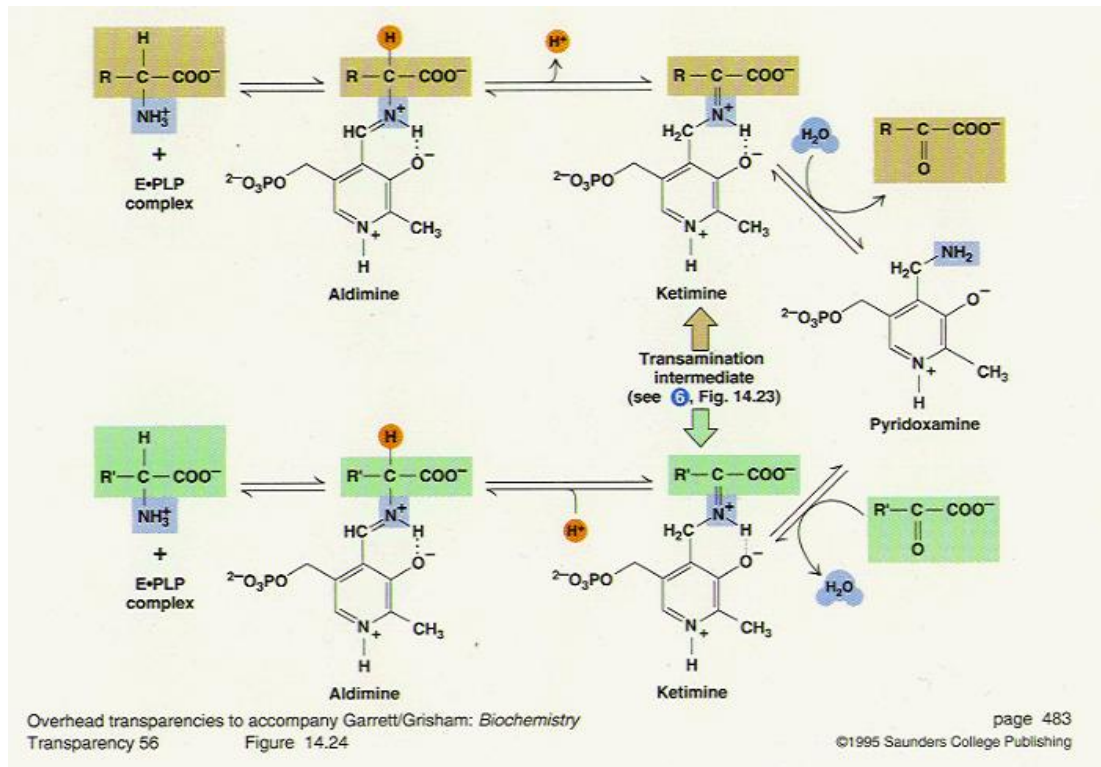
KUVA 1. Asetofenonin muodostus. (3, s. 1.)

2.2 Pyridoksaali-5'-fosfaatti (PLP)

PLP (kuva 2) on B₆-vitamiinin aktiivinen muoto, ja se koostuu pyridoksiinista, pyridoksaalista ja pyridoksamiinista. PLP toimii transaminaatioissa koentsyyminä, eli välittäjäaineena (kuva 3), aminohapon aminoryhmälle (7, hakusana Pyridoxal phosphate). Aiemmissä tutkimuksissa on saatu selville, että kaikki aminotransaminaasi-entsyymit ovat PLP-riippuvaisia. (4, s. 467.)



KUVA 2. PLP-molekyylä (7, hakusana Pyridoxal phosphate)



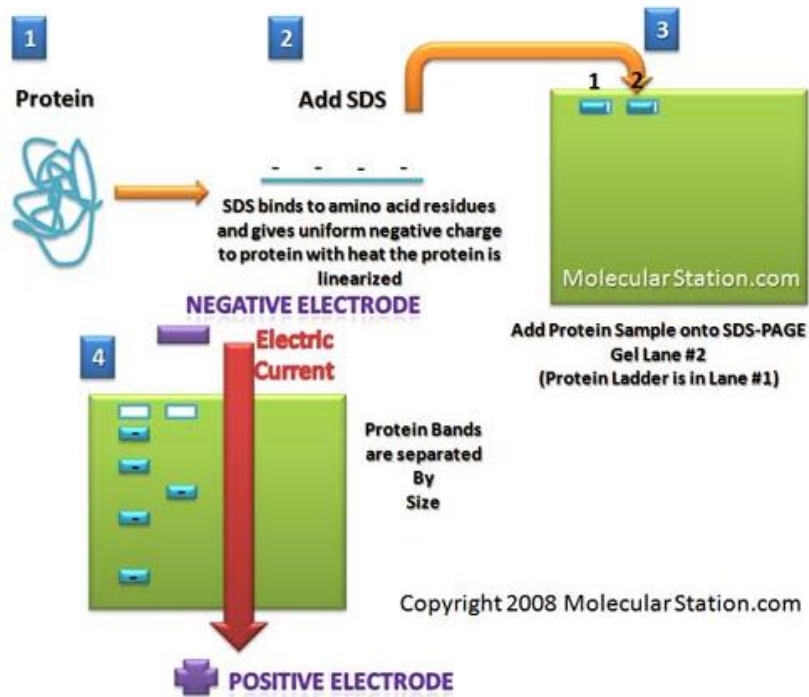
KUVA 3. PLP koentsyiminä transaminaatiossa (8, hakusana PLP in the Mechanism of Transamination)

3 NATRIUMDODEKYYLISULFAATTIPOLYAKRYYLI-AMIDIGEELIELEKTROFOREESI (SDS-PAGE)

SDS-PAGE on yleinen proteiinikemiassa käytetty analyysi- ja erottelumenetelmä. Sen avulla proteiinit erotellaan niiden koon perusteella ja selvitetään niiden likimääräinen molekyylipaino. SDS-PAGE:n avulla ei kuitenkaan voida erottaa toisistaan proteiineja joilla on yhtä paljon aminohappoja, sillä se ei erottele aminohapposekvenssejä toisistaan (9, hakusana SDS-PAGE). Tutkimustyössä voidaan käyttää joko itse tehtyjä tai valmiita kaupallisia geelejä molekyylipainomarkkerin kanssa (liite 1) esimerkiksi tutkittavan proteiinin koon selvittämisessä.

Näyte käsitellään ennen ajoa lisäämällä siihen näytepuskuria ja lämmittämällä näytteitä viiden minuutin ajan 95 °C:ssa. Näytepuskuri sisältää pelkistävää merkaptoetanolia sekä anionista detergenttiä eli natriumdodekyylisulfaattia (SDS). Merkaptoetanolin katkoo proteiinien rikkisillat aiheuttaen proteiinin konformaation hajoamisen alayksiköihin. SDS-molekyylit taas aiheuttavat suuren negatiivisen varauksen, joka peittää proteiinien alkuperäisen varauksen alle. Mitä suurempi proteiinin koko on, sitä suurempi on sen varaus. (10, hakusana SDS-PAGE.)

Polyakryyliamidigeelielektroforeesissa (PAGE) erikokoiset proteiinit liikkuvat geelin läpi eri nopeuksilla (kuva 4). Sähkövirta vetää proteiineja positiivista napaa kohti, pienten proteiinien liikkua nopeinten geelin läpi (11, hakusana SDS-PAGE). PAGE koostuu kahdesta erilaisesta geeliosasta: aluksi konsentrintigeeli konsentroi näytteen tiiviiksi vyöhykkeeksi, minkä jälkeen erotusgeeli erottelee proteiinien alayksiköt (12, s. 64). Ajon jälkeen vyöhykkeet saadaan näkyviin värjäämällä geelit väriaineella, joka sitoutuu proteiiniin. Coomassie blue on yleinen, myrkytön väriaine, jota käytetään SDS-PAGE-värjäyksissä. Molekyylipainot saadaan selville vertaamalla tuntemattoman proteiinin liikkuvuutta tunnettuun molekyylipainostandardiin (liite 1), joka ajetaan samalla geelillä näytteiden kanssa. (9, hakusana SDS-PAGE.)



KUVA 4. SDS-PAGE-ajon periaate (11, hakusana SDS-PAGE)

4 PROTEIINIEN PUHDISTUS

Proteiinien puhdistuksessa on kolme vaihetta. Nämä vaiheet ovat eristys, keskivaiheen puhdistus ja kiillotus (eng. polishing). Eristysvaiheessa kohdeproteiini eristetään, konsentroidaan ja stabiloidaan. Proteiini tulee tässä vaiheessa olla sellaisissa olosuhteissa että se säilyttää aktiivisuutensa. Tässä vaiheessa saadaan yleensä poistettua kriittiset epäpuhtaudet. Keskivaiheen puhdistuksen tarkoituksena on poistaa suurin osa epäpuhtauksista, kuten muut proteiinit ja nukleiinihapot. Kiillotuksessa jäljellä on vain pieniä määriä epäpuhtauksia. Kiillotuksen lopputulos on puhdas proteiini, joka voidaan seuraavaksi esimerkiksi kiteyttää. (13, s. 39–40.)

Yleisimmät keskivaiheen proteiinien puhdistusmenetelmät sisältävät joko yhden tai useita kromatografisia puhdistusmenetelmiä. Puhdistusmenetelmä valitaan proteiinin ominaisuuksien perusteella, kuten nähdään taulukosta 1. (13, s. 17.)

TAULUKKO 1. Proteiinien ominaisuuksia vastaavat puhdistusmenetelmät (13, s.17)

Proteiinin ominaisuus	Puhdistusmenetelmä
spesifinen ligandin tunnistus	affiniteettikromatografia
metalli-ionien sitoutuminen	liikkumaton metalli-ioni-affiniteettikromatografia
varaus	ioninvaihtokromatografia
koko	geelisuodatus
hydrofobisuus	käänteisfaasikromatografia ja hydrofobinen vuorovaikutus -kromatografia
isoelektrinen piste	kromatofokusointi

5 PROTEIININ PUHDISTUSMENETELMIÄ

Proteiinia puhdistetaan yleisesti ammoniumsulfaattisaostuksen, ioninvaihtokromatografian ja geelisuodatuksen avulla. Suolan poisto näytteestä tapahtuu usein dialyysin avulla.

5.1 Ammoniumsulfaattisaostus

Ammoniumsulfaattisaostusta käytetään alustavana näytteen konsentroidin- ja puhdistusmenetelmänä proteiinien puhdistuksessa. Kun suolan saturaatio liuoksessa kasvaa, proteiini alkaa saostua ulos liuoksesta. Eri proteiinit saostuvat erilaisissa suolasaturaatioissa. Valitsemalla ammoniumsulfaattisaturaatio huolellisesti, saadaan näytteestä saostettua halutut epäpuhtaudet ulos. Suolasaturaatio valitaan niin, että mahdollisimman iso osa epäpuhtautena olevista proteiineista saostuu ulos, saostaen samalla mahdollisimman vähän kohdeproteiinia (13, s. 70). Tässä työssä oli jo aiemmin määritetty, että sopiva ammoniumsulfaatin loppusaturaatio oli 50 %. Lisättävä ammoniumsulfaattimäärä laskettiin ammoniumsulfaattilaskurin avulla (14, hakusana ammonium sulfate calculator.)

5.2 Dialyysi

Dialyysia käytetään yleisesti proteiinien puhdistuksessa suolan poistossa tai puskurin vaihdossa. Näyte suljetaan puoliläpäisevän dialyysikalvon sisään astiaan, joka sisältää suuren määrän puskuria jonka ominaisuuksiin pyritään. Puoliläpäisevä kalvo päästää näytteessä olevat suolapartikkelit ulkopuolella olevaan puskuriin. Dialyysi on hidas prosessi, ja se suoritetaan yleensä yön aikana magneettisekoittajalla. (13, s. 38.)

5.3 Ioninvaihtokromatografia

Ioninvaihtokromatografia perustuu varauksellisten näytemolekyylien adsorptioon ja desorptioon vastakkaisesti varautuneiden kemiallisten ryhmien kanssa. Nämä ryhmät on kiinnitetty liukenemattomaan matriksiin eli geeliin. pH-arvoa jossa biomolekyyllillä ei ole nettovarausta, kutsutaan molekyylin isoelektriseksi (pI) pisteeksi. pI-pistettä alemmassa pH:ssa molekyylillä on positiivinen varaus ja ylemmässä pH:ssa negatiivinen varaus. Positiivisesti varautunut proteiini sitoutuu kationinvaihtajaan ja negatiivisesti varautunut anioninvaihtajaan (15, s. 5). Nykyisin on saatavana valmiiksi pakattuja pylväitä, joita voidaan käyttää esimerkiksi ÄKTA™ avant - nestekromatografialaitteistolla.

5.4 Geelisuodatus

Geelisuodatuksessa erikokoiset näytemolekyylit erotellaan toisistaan koon perusteella. Näyte ei sitoudu pylvääseen, jolloin se laimenee. Näytemäärän tulee olla pieni, ja paras erottelukyky saadaan näytemäärällä, joka on 0,5 - 2,0 % koko pylvään tilavuudesta. Geelisuodatusta käytetään yleensä yhden tai useamman alustavan puhdistusvaiheen jälkeen, jolloin näyte on konsentroitunut ja suuret epäpuhtaudet on poistettu. Geelisuodatuksella puhdistettu proteiini on kooltaan yhdenmukaista. (13, s. 23–24.)

6 KROMATOGRAFIAPYLVÄÄT

Proteiinin puhdistamisessa käytetään yleisesti anioninvaihtopylväitä sekä geelisuodatuspylväitä.

6.1 HiTrap Capto DEAE 5 ml (GE Healthcare)

HiTrap Capto DEAE sisältää BioProcess™-geeliä, jota voidaan käyttää proteiinien keskitason puhdistamiseen. Geelipylväs on valmiiksi pakattu, ja sen avulla voidaan tutkia selektiivisyyttä, sitomis- ja eluointiolosuhteita sekä tehdä pienimuotoisia proteiinipuhdistuksia. Pylvään optimaalisin käyttö on nestekromatografiassa, esimerkiksi ÄKTA™-laitteella. Pylvästä voidaan käyttää myös ruiskun tai peristalttisen pumpun avulla. (16, s. 1.)

Pylväs on valmistettu bioyhteensopivasta polypropyleenistä, joka ei reagoi biomolekyylien kanssa. HiTrap Capto DEAE -pylväs on korkean kapasiteetin heikko anioninvaihtaja. DEAE-ligandi on sidottu kemiallisesti muunneltuun, korkean virtausnopeuden omaavaan, agarooosi-matriksiin. Matriksi on peitetty lisäksi dekstraanilla, minkä vuoksi näyte virtaa nopeasti pylvään läpi. Tämän vuoksi DEAE-geelillä on korkea dynaaminen sitoutumiskapasiteetti 100 mg BSA/ml mediumia. (16, s. 4–5.)

6.2 HiTrap Q HP 1 ml (GE Healthcare)

HiTrap Q HP on esipakattu anioninvaihtopylväs, jota voidaan käyttää varauksellisten biomolekyylien erilaisten kemiallisten ryhmien erottelussa, konsentroinnissa ja puhdistuksessa. Pylvästä voidaan käyttää ruiskulla, peristalttisella pumpulla tai nestekromatografialaitteistolla. (15, s. 1.)

HiTrap Q HP -pylväs on valmistettu bioyhteensopivasta polypropyleenistä, joka ei reagoi biomolekyylien kanssa. Pylvään Q Sepharose High Performance -geeli toimii vahvana anioninvaihtajana, joka pysyy varauksellisena ja säilyttää korkean sitomiskapasiteettinsa 50 mg HSA/ml mediumia laajalla pH-alueella. (15, s. 3–4.)

6.3 HiLoad 16/60, Superdex 200 prep grade (GE Healthcare)

HiLoad 16/60 Superdex 200 prep grade on esipakattu geelisuodatuspylväs, jota käytetään proteiinien puhdistuksen viimeisessä vaiheessa. Superdex prep grade (pg) valmistetaan liittämällä dekstraania kovalenttisesti ristisidotuun agarosigeeliin. Dekstraanin tyyppi määrää Superdex-geelin erotusominaisuudet. Jyrkkä selektiivisyyskuvaaja kertoo peptidien ja proteiinien suuresta erottelukyvystä. Superdex 200 pg erottelee proteiinit joiden koko on 10–600 kDa. Superdex-geeli yhdistää korkean mekaanisen voiman korkeaan hydrofiilisyyteen, mikä mahdollistaa korkean virtausnopeuden käytön ja minimoi epäspesifiset vuorovaikutukset. (17, s. 1.)

7 PROTEIININ RAKENTEEN TUTKIMUSMENETELMIÄ

Puhdasta proteiinia voidaan tutkia esimerkiksi ThermoFluor®- ja Static Light Scattering -menetelmillä. Nämä menetelmät antavat lisää tietoa proteiinin rakenteesta.

7.1 ThermoFluor®

ThermoFluor®-menetelmällä voidaan erottaa toisistaan laskostuneet ja laskostumattomat proteiinit altistamalla ne fluoresenssia mittaavalle hydrofobiselle fluorokoettimelle. Koetin upotetaan proteiinia sisältävään vesiliuokseen, jolloin se tarttuu hanakammin aukeamassa olevan proteiinin sisällä olevaan hydrofobiseen osaan. Proteiinin rakenteen aukeaminen aiheutetaan lämpötilan nousulla. Koettimen sitoutuminen proteiinin hydrofobiseen osaan aiheuttaa jyrkän laskun fluoresenssissa, joten fluoresenssia tutkitaan lämpötilan funktiona. (18, s. 290.)

Lämpötilan nousulla aiheutettu proteiinin rakenteen avautuminen on peruuttamaton tapahtuma, jossa muutos laskostuneesta proteiinista laskostumattomaan tapahtuu hyvin nopeasti. ThermoFluor® -menetelmällä saadaankin näin selville proteiinin sulamispiste. Analyysi voidaan suorittaa reaaliaika-PCR-laitteistolla syväkuoppalevyillä, jolloin tuloksia saadaan nopeasti ja proteiinin kulutus on vain 1-15 µg kaivoa kohden (18, s. 290).

7.2 Static Light Scattering (SLS)

Static Light Scattering, eli staattinen valonsironna, on menetelmä, jolla mitataan valon kokonaissironnan intensiteettiä kulman funktiona. Tätä sironneen valon intensiteettiä mitataan useista eri kulmista. SLS:n tyypillinen sovellutus on proteiinien molekyylipainon (M_w) määrittäminen. Menetelmällä voidaan määrittää myös tutkittavan proteiinin hitaussäde (r_g) ja toinen viriaalikerroin (A_2). SLS-mittausta varten näytteeseen kohdistetaan laser, joka valaisee näyteliuoksen. Sironnan intensiteettiä mitataan yhdellä tai usealla detektorilla. Molekyylipainomäärittämisä varten SLS-laitteisto kalibroidaan tunnetulla vahvalla siroajalla, esimerkiksi tolueenilla (19, hakusana static light scattering).

8 PROTEIINIEN KITEYTYS

Proteiinien kiteytys tapahtuu hitaasti liuksesta kontrolloidussa ympäristössä, sellaisissa olosuhteissa että proteiini ei denaturoidu. Proteiinien kiteytymiseen vaikuttavat esimerkiksi suolat, orgaaniset liuottimet, pH, lämpötila ja vesiliukoiset polymeerit. Orgaaniset liuottimet reagoivat usein proteiinien hydrofobisten osien kanssa aiheuttaen proteiinin denaturoitumisen. Yksi useimmin käytetyistä vesiliukoisista polymeereistä on polyetyleeniglykoli (PEG), joka on voimakas saostaja joka ei denaturoi herkästi proteiinia. Polyetyleeniglykolia on saatavana useissa eri molekyylipainoissa. (20, s. 9–10.)

8.1 Yksinkertainen kiteytys

Proteiineja voidaan kiteyttää yksinkertaisesti saostamalla. Tämä tapahtuu lisäämällä proteiiniliuokseen denaturoivaa ainetta pitoisuuteen, joka on hie- man proteiinin saostumispisteen alapuolella. Näytteessä olevan veden annetaan haihtua, jolloin proteiinin ja denaturantin konsentraatio kasvaa, kunnes proteiini saostuu. Tämä menetelmä on epävarma, sillä ei voida tietää, saostuuko proteiini kiteinä vai sakkana. Luotettavampaa on käyttää optimointia etsittäessä muun muassa saostajan ja suolan pitoisuuksien sopivaa määrää. (20, s. 9–10.)

8.2 Höyrydiffuusio-menetelmä

Proteiineja kiteytetään yleisesti istuvan tipan (eng. sitting drop) höyrydiffuusio- menetelmällä kuoppalevyllä, useimmiten pipetointirobottia hyväksi käyttäen. Höyrydiffuusiossa kuoppalevyn isossa kuopassa on saostajaliuosta esimerkiksi 80 µl, ja viereisessä pienessä kuopassa proteiini-saostajaliuosta suhteessa 1:1, esimerkiksi 1,5 µl molempia. Pienen kuopan liuosta kutsutaan tipaksi. Saostajaliuoksen ominaisuudet pyritään optimoimaan kiteiden muodostumiseksi. Liuosten kuoppiin lisäämisen jälkeen levy teipataan kiinni, jolloin proteiini-saostajaliuoksen vesi diffusoituu saostajaliuokseen, kunnes molemmissa kuopissa on sama pitoisuus saostaja-aineita. Kun systeemi on tasapainossa, veden diffuusio lakkaa, ja saostaja-aineiden määrä tipassa py-

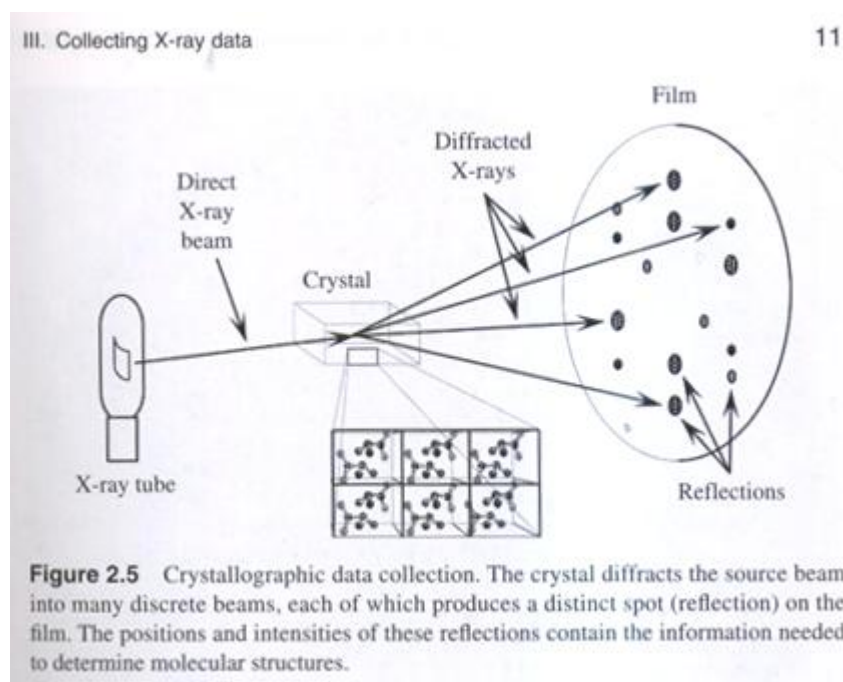
syy optimaalisena eikä nouse liian korkeaksi. Näin proteiinista saadaan muodostettua parhaita kiteitä. (20, s. 36–37.)

8.3 Kiteytyksen ongelmia

Usein proteiini kiteytyy lukuisina pieninä kiteinä. Jos kaikki kiteet kasvavat kerralla, ne kuluttavat liuoksen proteiinin loppuun, eivätkä kiteet kasva suuremmiksi. Tämä on ongelmallista, sillä pienet kiteet eivät diffraktoi hyvin röntgendiffraktometrilla. Kiteistä voidaan saada suurempia laskemalla saostajapiitoisuutta, jolloin on todennäköisempää saada yksittäisiä kiteitä. Pieniä kiteitä voidaan myös kasvattaa suuremmiksi seeding-menetelmällä, joka on muuten samanlainen kuin edellä, mutta pienen kuopan tippaan laitetaan aiemmin kasvatettu pieni kide. Liuoksessa oleva proteiini voi kiteytyä pienen kiteen päälle, jolloin saadaan suuria kiteitä nopeammin. (20, s. 37.)

9 RÖNTGENDIFFRAKTIO-ANALYYSI (XRD)

Röntgendiffraktion avulla voidaan yksityiskohtaisesti selvittää luonnollisten ja synteettisten materiaalien kemiallinen koostumus ja kiderakenne. Tekniikka on monipuolinen, ja se ei tuhoa näytettä (21, hakusana X-ray diffraction). Kide sijoitetaan mittauksessa röntgensäteen ja detektorin väliin. Kidettä pommitetaan röntgensäteillä, jolloin kiteestä heijastuvat säteet osuvat detektorille muodostaen diffraktiokuvan (kuva 5) tummista pisteistä (20, s. 10-11). Kiteet voidaan jäädyttää nestemäisellä typellä, jotta ne eivät hajoaisi röntgensäteen vaikutuksesta. Kide täytyy kuitenkin suojata cryoprotektantilla ennen jäädytystä, jottei jääkiteitä muodostuisi. Suoja-aineena voidaan käyttää esimerkiksi mineraaliöljyä (20, s.43.)



KUVA 5. Röntgendiffraktiokuvan muodostus (20, s. 11)

9.1 Kidehila

Kidehila on kolmiulotteinen malli atomien avaruusrakenteesta. Hilat muodostuvat useista samansuuntaisista tasoista, jotka eroavat toisistaan etäisyydellä d . Tämä etäisyys vaihtelee materiaalin ominaisuuksien mukaan. Tasot sijaitsevat kiteissä useissa eri suunnissa, ja niillä on jokaisella oma spesifinen

etäisyytensä d . Diffraktio muodostuu vain silloin, kun monokromaattista röntgensäteilyä suunnataan kidettä kohti aallonpituudella λ kulmassa θ , ja kiteen peräkkäisistä tasoista heijastuneiden säteiden matkaero on kokonainen lukumäärä n aallonpituuksia. (21, hakusana X-ray diffraction.)

9.2 Braggin laki

Braggin laki (kaava 1) olettaa, että saapuvien ja heijastuvien aaltojen kulmat ovat yhtä suuret. Jotta kaksi eri sädetä pysyisivät yhdensuuntaisina ja niiden tulokulma θ olisi sama, täytyy toisen säteistä kulkea pidempi matka (22, s. 22). Muuttamalla kulmaa θ saadaan diffraktoituneista röntgensäteistä koottua kuva, joka on jokaiselle materiaalille ominainen (21, hakusana X-ray diffraction). Diffraktiokuvassa säteilyn intensiteetti kuvataan kulman funktiona. (22, s. 22.)

$$n\lambda = 2d\sin\theta$$

KAAVA 1

n = kokonaisluku

λ = aallonpituus

d = hilatasojen välinen etäisyys

θ = kulma

10 AMINOTRANSAMINAASI-ENTSYYMIN PUHDISTUS

E. COLI/BL21(DE3) –SOLUISTA

Opinnäytetyön tarkoituksena oli puhdistaa aiemmin kasvatetuista pakastetuista soluista, sekä tuoreista *Escherichia coli* -soluista, *Arthobacter citreus* -bakteerin tuottamaa aminotransaminaasi-entsyymiä. Puhdistus suoritettiin kolme kertaa, käyttäen EnBase® Flo- ja ZYM505-menetelmillä tuotettua proteiinia. Oletuksena oli, että EnBase® Flo -menetelmällä tuotettu entsyymi olisi parempilaatuista entsyymiaktiivisuuden kannalta.

Proteiinin teoreettisen pI:n on aiemmin laskettu olevan 5,57. Proteiinia puhdistettiin anioninvaihtokromatografialla pH:ssa 7,5, koska pI-arvoa korkeammassa pH:ssa oli enemmän vaihtoehtoja puskurien suhteen. Kationivaihtajaa käytetään pI-arvoa alemmassa pH:ssa, mikä ei ollut mahdollista, koska pI-arvo on niin hapan. AcATAn puhdistumista seurattiin SDS-PAGE:n sekä entsyymiaktiivisuus- ja proteiiniipitoisuusmittausten avulla. Työn aikana puhdistunut AcATA kiteytettiin Oulun yliopiston Biokemian laitoksella.

10.1 EnBase® Flo -menetelmällä kasvatetut solut

Käytettävät solut oli kasvatettu aiemmin EnBase® Flo -menetelmällä, minkä jälkeen ne oli pakastettu. EnBase® Flo -menetelmällä soluja kasvatetaan panosyöttöprosessilla, jossa solujen kasvua kontrolloidaan lisäämällä kasvumediumiin entsyymaattisesti glukoosia (23, s. 3). Jäädetytty solunappi oli Falcon-putkessa, ja sen päälle lisättiin PLP-puskuria (liite 2) 10 ml jokaista solugrammaa kohden. Näyte homogenisoitiin sekoittamalla pipetin avulla. Tämän jälkeen putkeen lisättiin lysosyymi-entsyymiä pitoisuuteen 0,5 mg/ml:ssa. Seosta sekoitettiin, kunnes putkeen muodostui DNA-rihmastoa, mikä osoitti solujen hajonneen. Tämän jälkeen putkeen lisättiin DNase-entsyymiä, joka pilkkoo DNA:n osiin, pitoisuuteen 0,1 mg/ml:ssa.

Seuraavaksi näytettä inkuboitiin 30 °C:ssa 15 minuutin ajan välillä sekoittelun. Tämän jälkeen näyte siirrettiin jäälle 15 minuutiksi, jossa näytettä välillä sekoitettiin. Seuraavaksi solut hajotettiin sonikoimalla Hielscher GmbH

UP50H -sonikaattorilla minuutin ajan (amplitude 70 %, sykli 0,8), minkä jälkeen näyte oli jäissä minuutin ajan. Sonikointi ja jäähdytys toistettiin viisi kertaa. Tämän jälkeen näyte sentrifugoitiin nopeudella 15 000 rpm 45 minuutin ajan 4 °C:ssa. Puhdistettava proteiini jäi supernatanttiin, josta otettiin Eppendorf-putkeen 500 µl:n näyte proteiinipitoisuuden määrittystä, entsyymiaktiivisuusmittausta ja SDS-PAGEa varten.

10.1.1 Entsyymiaktiivisuuden mitta

Entsyymiaktiivisuusmittaukset tehtiin spektrofotometrillä. AcATAn entsyymiaktiivisuutta mitattiin aallonpituudella 300 nm kolmen minuutin ajan. Tulosaatiin spektrofotometriltä yksikössä $\Delta\text{Abs}/\text{min}$. UV-kyvetiin pipetoitiin nollaliuokseksi 900 µl substraattipuskuria ja 90 µl PLP-puskuria (liite 2). Aktiivisuusmittausta varten kyvetiin pipetoitiin lisäksi 10 µl näytettä. Entsyymiaktiivisuus laskettiin yksikköinä millilitraa kohti (U/ml) liitteenä 3 olevan kaavan avulla. Tässä työssä reaktion kokonaistilavuus oli 1 ml, kyvetin läpimitta 1 cm, näytteen määrä 10 µl ja laimennuskerroin yksi.

10.1.2 AcATA:n puhdistus ammoniumsulfaattisaostuksella

Epäpuhtautena olevat proteiinit saostettiin supernatantista ammoniumsulfaattisaostuksella. Ammoniumsulfaatin määrä laskettiin laskurin avulla (14, haku sana ammonium sulfate calculator). Supernatantin tilavuus oli 30 ml, saostus tehtiin 4 °C:n lämpötilassa ja haluttu ammoniumsulfaatin loppusaturaatio oli 50 %. Tämä pitoisuus oli aiemmin havaittu hyväksi. Ammoniumsulfaattia lisättiin siis laskurin mukaan 9,03 grammaa. Saostus tehtiin jäällä, ja ammoniumsulfaatti lisättiin supernatanttiin vähitellen, koko ajan magneetilla sekoittaen. Kun kaikki ammoniumsulfaatti oli lisätty, annettiin seoksen vielä sekoittua tunnin ajan. Näin varmistettiin että ammoniumsulfaatti sekoittuu kunnolla ja saostaa mahdollisimman paljon epäpuhtautena olevaa proteiinia. Tämän jälkeen näyte sentrifugoitiin nopeudella 15 000 rpm 30 minuutin ajan 4 °C:ssa. AcATA oli supernatantissa, jota oli 30 ml. Tästä otettiin taas 500 µl:n näyte mittauksia varten.

Näytteen sisältämä ammoniumsulfaattisuola täytyi poistaa dialysoimalla. Näyte laitettiin dialyysipussiin, joka laitettiin dekantterilasiin jossa oli magneetti ja 1 litra sitomispuskuria A (liite 2). Dekantterilasi asetettiin magneettisekoittajalle kylmäkaappiin yön ajaksi, jolloin suola poistui näytteestä puskuuriin. Seuraavana päivänä näyte otettiin pois dialyysista ja se ruiskusuodatettiin (suodatin 25 mm Syringe filter w/0,45 µm cellulose acetate membrane). Suodatuksen jälkeen näytettä oli jäljellä 42 ml. Dialyysin aikana näytteen tilavuus oli kasvanut.

10.1.3 AcATA:n puhdistus HiTrap Capto DEAE -pylväällä

Puskurit A ja B (liite 2) suodatettiin imusuodatuksella ja sonikoitiin Hielscher GmbH UP 400 S -sonikaattorilla (amplitude 95 %, cycle 0,8), jotta niistä saatiin poistettua epäpuhtaudet ja ilma. Näyte puhdistettiin ensimmäiseksi HiTrap Capto DEAE -pylväällä. Pylväs pestiin aluksi vedellä ja tasapainotettiin A- ja B-puskureilla. A-puskurista mitattiin johtokyky ja näytteestä proteiinipitoisuus sekä johtokyky (taulukko 2). Näytteen johtokyky oli korkeampi kuin A-puskurin, minkä vuoksi se ei tulisi sitoutumaan pylvääseen. Näytettä laimennettiin sen vuoksi A-puskurilla 70 ml:ksi ja se jaettiin kolmeen osaan, joista suoritettiin erilliset puhdistusajot. Näyte eluoiittiin pylvästä B-puskurilla, jonka pitoisuus nousi 0-100 %:iin 15 cv:n (pylvään tilavuuden) aikana.

TAULUKKO 2. Näytteestä ja A-puskurista mitatut johtokyvyt

Keskimääräiset johtokyvyt mS/cm		
	Näyte	A-puskuri
Ennen HiTrap Capto DEAE -ajoa	14,8	8,3
Ennen HiTrap Q HP -ajoa	28,4	8,5

Pylvään läpi tullut puhdistunut näyte kerättiin fraktionkerääjällä 96-kuopplevyille 1 ml:n fraktioina. Ensimmäisen ajon läpi tulleesta nesteestä sekä ensimmäisestä ja toisesta piikistä (liite 4) mitattiin entsyymiaktiivisuus, jotta nähtiin, onko proteiini tarttunut pylvääseen ja kumpi piikki on proteiinia ja kumpi PLP:tä. Vain ensimmäinen piikki oli entsyymaattisesti aktiivinen, joten ne fraktiot (taulukko 3) kerättiin kaikista ajoista talteen. Toinen piikki oli näin

ollen todennäköisesti PLP:tä ja epäpuhtausproteiineja. Yhdistettyjen fraktioiden tilavuudeksi tuli 50 ml, josta otettiin jälleen 500 µl:n näyte. Toisesta HiTrap Capto DEAE -ajosta tehtiin myös kaksi SDS-PAGE-ajoa (liite 5), joiden perusteella päätettiin seuraavaksi puhdistaa proteiinia paremmin erottelevalla pylväällä HiTrap Q HP.

TAULUKKO 3. Yleisimmät yhdistetyt fraktiot

Puhdistusvaihe	Keskimääräiset yhdistetyt fraktiot
HiTrap Capto DEAE	B4-C4
HiTrap Q HP	A9-A11 ja D9-D11
Superdex 200	B10-C4

10.1.4 AcATA:n puhdistus HiTrap Q HP -pylväällä

HiTrap Q HP -pylväs pestiin aluksi vedellä ja tasapainotettiin sen jälkeen A- ja B-puskureilla. Ajoa varten HiTrap Capto DEAE -pylvään läpi ajettu proteiininäyte piti konsentroida, ja siihen käytettiin kahta 20 ml:n Vivaspinkonsentraattoria. Aluksi konsentraattorit huuhdeltiin 10 ml:lla A-puskuria, eli konsentraattorit sentrifugoitiin 8 000 g minuutin ajan 4 °C:ssa, jolloin puskuriliuos huuhtoi konsentraattorin suodattimen. Suodatin päästää lävitseen 10 kDa:n molekyylit. Kohdeproteiinin yhden alayksikön koko on SDS-PAGEN perusteella n. 50 kDa, joten suodatin oli sopiva proteiinin konsentroidiin. Tämän jälkeen alettiin konsentroida näytettä. Molempiin konsentraattoreihin laitettiin 20 ml näytettä, ja ne sentrifugoitiin 8 000 g kahden minuutin ajan 4 °C:ssa. Suodattimen läpi tullut neste kaadettiin pois. Näyte jäi konsentraattorin yläosaan. Konsentroidia jatkettiin kunnes näytteen yhteistilavuus oli 18 ml. Tämän jälkeen näyte ruiskusuodatettiin, jolloin lopullinen näytemäärä oli 17,5 ml.

Näytteen johtokyky mitattiin, minkä perusteella näyte laimennettiin A-puskurilla 50 ml:ksi. Näyte eluoiitiin pylvästä B-puskurilla gradienttijaon käyttäen. Gradienttijaon ensimmäisessä osassa B-puskurin konsentraatio nostettiin 0-60 %:iin 20 cv:n aikana. Toisessa osassa B-puskurin konsentraatio nostettiin 60-100 %:iin 5 cv:n aikana. Pylvään läpi tullut puhdistunut näyte

kerättiin fraktionkerääjällä 96-kuopplevyille 1 ml:n fraktioina. ÄKTAn ohjel-
massa olleen virheen vuoksi vain 15 ml näytteestä sitoutui pylvääseen, loput
näytteestä virtasi pylvään läpi keräysastiaan. Tämän vuoksi läpi tullut näyte
ajettiin uudelleen pylvään läpi. Myös kyseisen ajon sitoutuneen proteiinin
puhdistuneet fraktiot päätettiin yhdistää (tilavuus 5 ml) ja ajaa uudelleen HiT-
rap Q HP -pylväällä. Yhdistetty fraktionäyte laimennettiin A-puskurilla 20
ml:ksi ja se jaettiin kahteen ajoon. ÄKTAlta saadun kromatogrammin (liite 6)
perusteella yhdistettiin proteiinia sisältävät fraktiot (tilavuus 9,5 ml), ja otettiin
500 µl:n näyte mittauksia varten.

10.1.5 AcATA:n puhdistus HiLoad 16/60 Superdex 200 pg - pylväällä

HiLoad 16/60 Superdex 200 pg -geelipylväs pestiin aluksi vedellä, minkä jäl-
keen se tasapainotettiin imusuodatetulla ja sonikoidulla Tris-puskurilla (liite
2). Pylvästä varten näyte konsentroidiin kahdella 6 ml:n Vivaspin-
konsentraattorilla, jotka huuhdeltiin aluksi 3 ml:lla Tris-puskuria (10 000 g mi-
nuutin ajan). Näytettä konsentroidiin niin kauan että lopputilavuus oli 2,5 ml.
Konsentroidu näyte jaettiin kahta geelisuodatusajoa varten erillisiin Eppen-
dorf-putkiin, jotka sentrifugoitiin 5 minuutin ajan 13 200 rpm:ssa. Tämän jäl-
keen näytteet ajettiin geelipylvään läpi kahdessa ajossa ja pylvään läpi tullut
puhdistunut näyte kerättiin fraktionkerääjällä 96-kuopplevyille 1 ml:n fraktioi-
na. ÄKTAlta saadun kromatogrammin (liite 7) perusteella molempien ajojen
proteiinia sisältävät fraktiot yhdistettiin (tilavuus 13,5). Tästä otettiin jälleen
500 µl:n näyte. Näytteen eluutiivilavuus oli 64,4 ml. Seuraavaksi näyte kon-
sentroidiin AcATA:n kiteytystä varten 5 mg/ml:ssa yhdellä 6 ml:n Vivaspin-
konsentraattorilla (10 000 g minuutin ajan). AcATA:n puhdistumista ja ent-
syymiaktiivisuutta seurattiin koko työn ajan ja tulokset kirjattiin taulukkoon 4,
joka löytyy kappaleesta 11.

10.1.6 AcATA:n kiteytys

Kiteytyskokeet tehtiin Oulun yliopiston Biokemian laitoksella. AcATA:n raken-
netta tutkittiin aluksi ThermoFluor®-laitteella joka osoitti, että proteiini on hyd-

rofobinen. Proteiinista ajettiin myös SLS-ajo (Static Light Scattering). Näyte ajettiin ennen SLS-ajoa geelisuodatuspylvään Superdex 200 10/300 GL läpi. SLS:n avulla saatiin määritettyä AcATAn molekyyliainoksi 264 kDa (liite 8). SLS:n avulla nähtiin myös missä kohdassa proteiini eluoituu ja minkä kokoisena.

Aluksi kiteytymistä testattiin valmiilla PEG Smear- ja Factorial II -screenailla. Proteiinin kiteytyksessä käytettiin apuna Tecan-pipetointirobottia. PEG Smearilla saatiin parempilaatuisia kiteitä ja niitä oli enemmän, joten seuraavaksi lähdettiin optimoimaan PEG Smear -screenia PEG 1500 -pitoisuuden ja pH:n suhteen. Saadut proteiinkiteet kuvattiin mikroskoopin ja kameran avulla (kuva 8, löytyy kappaleesta 11). Ensimmäisen optimoinnin jälkeen nähtiin, että kaksi hieman erilaista olosuhdetta olivat parhaat kiteytymistä varten. Nämä olosuhteet on kuvattu taulukossa 8, joka löytyy kappaleesta 11. Näitä olosuhteita ryhdyttiin optimoimaan vielä enemmän. Toisen optimoinnin jälkeen valittiin hyvä kide, jota testattiin röntgendiffraktometrillä. Kide ei kuitenkaan diffraktoitunut.

10.2 ZYM505-mediumilla kasvatetut solut

Toisessa puhdistuksessa käytettiin aiemmin ZYM505-mediumilla (liite 2) pnostyyppisellä pullokasvatuksella tuotettuja ja pakastettuja soluja. Solut käsiteltiin samalla tavalla kuin ensimmäisessä puhdistuksessa, poikkeuksena sonikointi, joka jäi tekemättä. Dialyysia varten näyte jaettiin kahteen dialyysipussiin, joista toinen oli yön aikana vuotanut. Suolaa sisältävä näyte valui puskuriin, joten suola ei poistunut jäljelle jääneestä näytteestä kunnolla. Näytettä oli kuitenkin jäljellä niin paljon (64 ml) että tämä ei vaikuttanut puhdistuksen etenemiseen.

10.2.1 AcATA:n puhdistus HiTrap Capto DEAE -pylväällä

Puhdistus suoritettiin samalla lailla kuin ensimmäisessä puhdistuksessa. Näytteestä ajettiin useita ajoja. Osa ajoista ei onnistunut, sillä proteiini ei tarttunut pylvääseen. Tämä johtui epäonnistuneesta dialyysistä, minkä vuoksi näytettä jouduttiin laimentamaan A-puskurin lisäksi vedellä, jotta se tarttuisi

pylvääseen. Epäonnistuneista ajoista ei kerätty fraktioita seuraavaan vaiheeseen. HiTrap Cpto DEAE -pylvään jälkeen näytettä oli 24 ml.

10.2.2 AcATA:n puhdistus HiTrap Q HP -pylväällä

Puhdistus suoritettiin samalla lailla kuin ensimmäisessä puhdistuksessa. Näytettä ei tässä tapauksessa konsentroidu, koska näytettä oli vähemmän kuin ensimmäisessä puhdistuksessa. Näyte laimennettiin A-puskurilla suhteessa 1:1 ja jaettiin kahteen ajoon. Näytettä oli pylvään jälkeen jäljellä 8 ml.

10.2.3 AcATA:n puhdistus HiLoad 16/60 Superdex 200 pg -pylväällä

Geelisuodatus suoritettiin samoin kuin ensimmäisessä puhdistuksessa. Pylvään jälkeen näytettä oli jäljellä 13,5 ml. AcATAn kiteytystä varten näyte konsentroidiin 6 mg/ml:ssa. Ensimmäisen ja toisen puhdistuksen lopullisista näytteistä ajettiin SDS-PAGE -geeli (kuva 6, löytyy kappaleesta 11), jotta nähtäisiin, oliko eri menetelmillä kasvatettujen solujen puhtaudessa eroa. Proteiinin puhdistuminen ja entsyymiaktiivisuusmittausten tulokset nähdään taulukosta numero 5, joka löytyy kappaleesta 11.

10.2.4 AcATA:n kiteytys

Proteiinia kiteytettiin samoissa olosuhteissa jotka aiemmin optimoitiin. Näytteeseen lisättiin myös enemmän PLP:tä, loppukonsentraatioon 200 μ M. Kiteitä yritettiin myös saada suuremmiksi seeding-menetelmällä, mikä ei valitettavasti onnistunut. Diffraktointia varten cryoprotektanttina käytettiin tällä kertaa mineraaliöljyä, joka ei reagoinut näytteen kanssa. Diffraktometriltä saatiin diffraktiokuva (liite 9), joka osoitti, että kide oli proteiinia, mutta se oli kuitenkin liian pieni diffraktoitua kunnolla.

10.3 ZYM505-mediumilla kasvatetut solut

Kolmas puhdistus aloitettiin kasvattamalla soluja PLP:tä sisältävällä ZYM505-mediumilla. Solujen esikasvatus tehtiin valmiille LB-maljalle, joka sisälsi kanamysiiniä. Maljan annettiin kasvaa 37 °C:ssa yön yli. Seuraavana

päivänä valmistettiin 1 litra ZYM505-mediumia. Tästä otettiin 100 ml tuotto-
kasvatukseen litran erlenmeyer-kolviin, johon lisättiin PLP:tä pitoisuuteen
100 μ M ja kanamysiiniä pitoisuuteen 30 μ g/ml. Kasvatuslientä pipetoitiin mal-
jalle 3 ml, ja solut irrotettiin levityskolmion avulla. Irrotettu solumassa kerättiin
Falcon-putkeen ja tästä otettiin soluja tuottokasvatukseen siten, että aloitus
OD₆₀₀ oli välillä 0,1-0,2. Mitattu OD₆₀₀ oli 0,175.

Solumassaa otettiin 1,5 ml tuottokasvatukseen aiemmin valmisteltuun erlen-
meyer-kolviin, joka laitettiin 30 °C:seen ravistelukasvatukseen. Soluja tuli
kasvattaa kunnes OD₆₀₀ olisi välillä 0,6-0,9. Kun OD₆₀₀ oli 0,610, kasvu indu-
soitiin IPTG:llä pitoisuuteen 0,1 mM ja ravistelukasvatusta jatkettiin yön yli.
Lopullinen OD₆₀₀ tulisi olla yli 10. Seuraavana päivänä mitattu OD₆₀₀ oli 9,98,
mikä oli sopiva tulos. Kasvatusliemi jaettiin kahteen 50 ml:n Falcon-putkeen
joita sentrifugoitiin 10 000 rpm 10 minuutin ajan. Supernatantit kaadettiin pois
ja solujen hajotus suoritettiin kuten ensimmäisessä puhdistuksessa. Dialyysi
ja suodatus suoritettiin myös kuten ensimmäisessä puhdistuksessa, minkä
jälkeen näytetilavuus oli 30 ml.

10.3.1 AcATA:n puhdistus HiTrap Capto DEAE -pylväällä

Puhdistus suoritettiin samalla tavalla kuin ensimmäisessä puhdistuksessa.
Näytteestä ajettiin kaksi ajoa. Pylvään jälkeen näytetilavuus oli 11 ml.

10.3.2 AcATA:n puhdistus HiTrap Q HP -pylväällä

Puhdistus suoritettiin samalla tavalla kuin ensimmäisessä puhdistuksessa.
Pylväällä ajettiin kaksi ajoa ja pylvään jälkeen näytettä oli 4 ml. Geelisuoda-
tusta varten näyte konsentroidiin 6 ml:n Vivaspin-konsentraattorilla 2 ml:ksi.

10.3.3 AcATA:n puhdistus HiLoad 16/60 Superdex 200 pg - pylväällä

Geelisuodatus suoritettiin samalla lailla kuin ensimmäisessä puhdistuksessa.
Geelisuodatuksen jälkeen näytettä oli jäljellä 13,8 ml, joka konsentroidiin pi-
toisuuteen 6 mg/ml. Näytteen puhdistumisesta ajettiin SDS-PAGE -geeli (ku-

va 7, löytyy kappaleesta 11). Proteiinin puhdistuminen ja entsyymiaktiivisuudet nähdään taulukosta 6, joka löytyy kappaleesta 11.

Viimeisen puhdistuksen jälkeen proteiinia ei ehditty enää kiteyttää. Kiteytyksiä jatkettiin kuitenkin myöhemmin Oulun yliopiston henkilökunnan voimin ja saatuja kiteitä testattiin Oulussa ja Ranskassa. Kiteet diffraktoivat Oulussa 3,2 Å resoluutioon (kuva 9, löytyy kappaleesta 11) ja Ranskassa 2,5 Å resoluutioon. Saatua 2,5 Å resoluution diffraktiodataa voidaan käyttää AcATAn rakenteen ratkaisemisessa.

11 TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU

EnBase® Flo -menetelmällä kasvatetuista ja pakastetuista *E. coli* BL21(DE3) -soluista HiTrap Capto DEAE -pylvään jälkeen tehty SDS-PAGE -ajo (liite 5) osoitti, että proteiini oli puhdistunut jonkin verran verrattuna puhdistamattomaan ja ammoniumsulfaattisaostuksen jälkeiseen proteiiniin. Geeliltä nähtiin myös, että AcATAn yhden alayksikön koko on noin 50 kDa, mikä vastasi laskennallista arvoa. Geelillä ajettiin myös pylvään läpi tullut näyte, jotta saatiin varmistettua että AcATA oli sitoutunut pylvääseen. Läpi tullut näyte ei sisältänyt proteiinia, mikä varmisti proteiinin sitoutumisen. Geeli osoitti sen, että näyte sisälsi vielä muita proteiineja epäpuhtauksina, joten AcATAn puhdistusta päätettiin jatkaa paremmin erottelevalla anioninvaihtopylväällä HiTrap Q HP. Tämän vaiheen jälkeen proteiini oli puhdistunut enemmän, joten voitiin jatkaa geelisuodatukseen HiLoad 16/60 Superdex 200 pg.

11.1 AcATA:n puhdistumisen seuranta

Kohdeproteiinin puhdistumista seurattiin koko työn ajan ja tulokset kirjattiin taulukoihin 4, 5 ja 6.

TAULUKKO 4. Proteiinin puhdistumistaulukko EnBase® Flo -soluista

EnBase® Flo -solut (pakastettu 17.6.2010)						
puhdistusvaihe	proteiinipitoisuus (mg/ml)	tilavuus (ml)	entsyymiaktiivisuus (U/ml)	kokonaisentsyymiaktiivisuus (U)	kokonaisproteiinimäärä (mg)	spesifinen aktiivisuus (U/mg)
lysaatti	19,81	30	22,81	684,29	594,40	1,15
(NH ₄) ₂ SO ₄ -saostus	3,50	30	20,27	608,04	105,00	5,79
HiTrap Capto DEAE	1,36	50	7,48	374,01	67,75	5,52
HiTrap Q HP	1,07	9,5	6,22	59,09	10,12	5,84
HiLoad 16/60 Superdex 200 pg	2,97	2	15,12	30,24	5,95	5,08

TAULUKKO 5. Proteiinin puhdistumistaulukko ZYM505-soluista

ZYM505-solut (pakastettu 29.9.2010)						
puhdistusvaihe	proteiinipitoisuus (mg/ml)	tilavuus (ml)	entsyymiaktiivisuus (U/ml)	kokonaisentsyymiaktiivisuus (U)	kokonaisproteiinimäärä (mg)	spesifinen aktiivisuus (U/mg)
lysaatti	10,77	90	11,79	1061,10	969,30	1,09
(NH ₄) ₂ SO ₄ -saostus	7,41	92	14,11	1298,12	681,72	1,90
HiTrap Capto DEAE	0,43	24	5,36	128,58	10,20	12,61
HiTrap Q HP	1,00	8	7,41	59,29	8,03	7,39
HiLoad 16/60 Superdex 200 pg	0,46	13,5	4,02	54,24	6,21	8,73

TAULUKKO 6. Proteiinin puhdistustaulukko ZYM505-soluista

ZYM505-solut (kasvatettu 14.2.2011)						
puhdistusvaihe	proteiinipitoisuus (mg/ml)	tilavuus (ml)	entsyymiaktiivisuus (U/ml)	kokonaisentsyymiaktiivisuus (U)	kokonaisproteiinimäärä (mg)	spesifinen aktiivisuus (U/mg)
lysaatti	14,92	20,0	23,57	471,43	298,40	1,58
(NH ₄) ₂ SO ₄ -saostus	8,90	22,0	21,79	479,29	195,80	2,45
HiTrap Capto DEAE	1,99	11,0	14,64	161,07	21,84	7,38
HiTrap Q HP	2,67	4,0	16,79	67,14	10,66	6,30
HiLoad 16/60 Superdex 200 pg	0,53	13,8	4,73	65,30	7,25	9,01

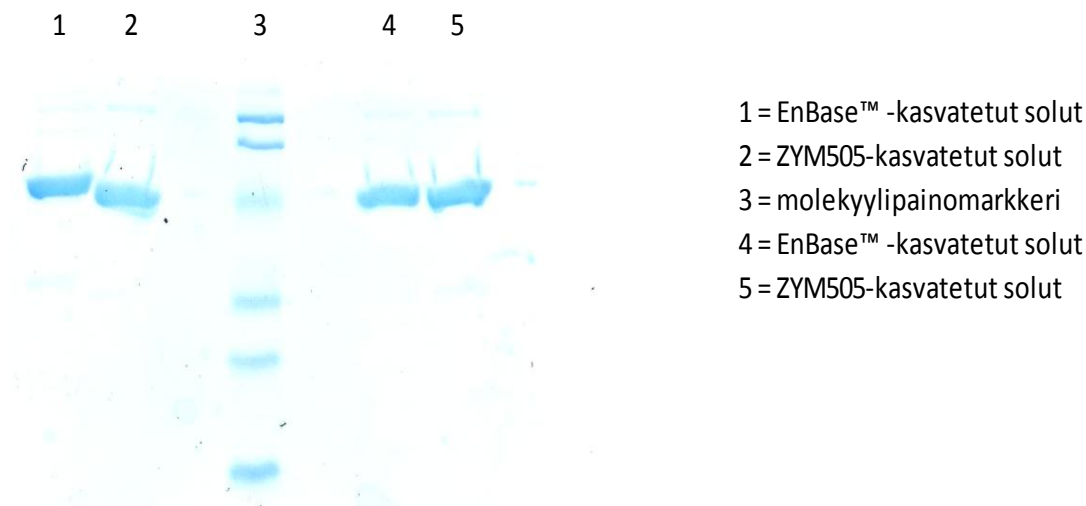
Taulukoista nähdään, että AcATA säilytti aktiivisuutensa koko puhdistuksen ajan ja että proteiinin spesifinen aktiivisuus lisääntyi puhdistuksen edetessä. Tämä osoittaa, että epäpuhtaudet saatiin puhdistettua todella hyvin. Spesifisissä aktiivisuuksissa nähdään välillä epäjohtonmukaisia tuloksia, jotka ovat todennäköisesti mittausvirheitä. Taulukosta 7 nähdään myös, että puhdistu-

neen proteiinin erilaisilla kasvatusmenetelmillä ei ollut keskenään merkittävää eroa. Myöskään PLP:n lisääminen kasvatusvaiheessa ei vaikuttanut proteiinin tuottoon tai puhtauteen.

TAULUKKO 7. Erilaisten kasvatusmenetelmien vertailu

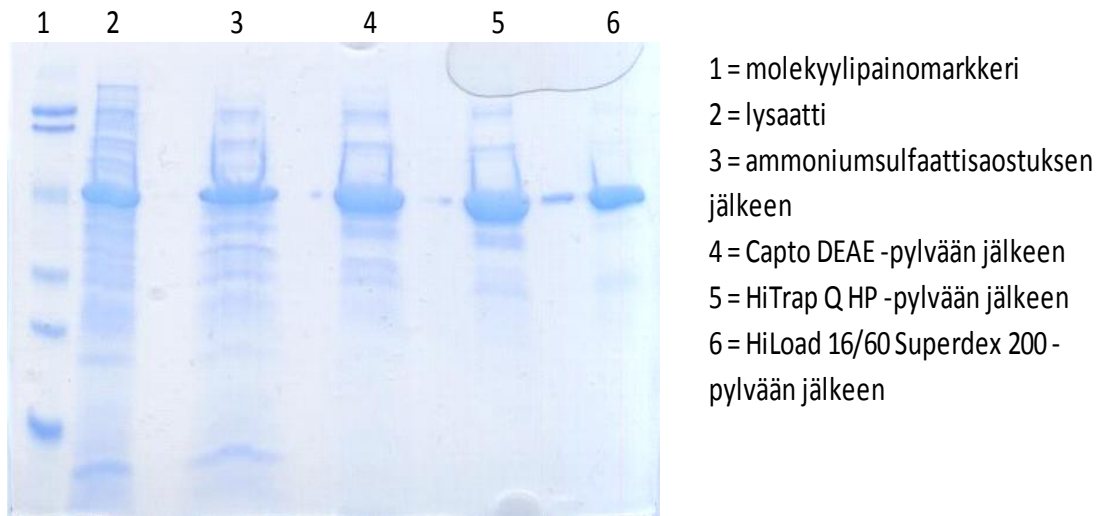
kasvatusmenetelmä	kokonaisentsyymiaktiivisuus (U)	kokonaisproteiinimäärä (mg)	spesifinen aktiivisuus (U/mg)
EnBase® Flo (pakastetut)	30,24	5,95	5,08
ZYM505 (pakastetut)	54,24	6,21	8,73
ZYM505	65,30	7,25	9,01

Ensimmäisestä ja toisesta puhdistuksesta saadut lopulliset näytteet ajettiin SDS-PAGE-geelillä (kuva 6), josta nähtiin, että AcATA oli puhdistunut molemmilla tavoilla yhtä hyvin. Proteiinivyöhykkeet olivat molemmilla tavoilla puhdistetuissa näytteissä yhtä suuret, ja niiden alapuolella ei ollut suuria epäpuhtauksia osoittavia vyöhykkeitä.



KUVA 6. 1. JA 2. PUHDISTUKSEN LOPULLISET NÄYTTEET

SDS-PAGE-geelillä ajettiin myös jokaisen erillisen puhdistusvaiheen jälkeen kerätyt näytteet (kuva 7). Kuvasta nähdään, kuinka epäpuhtaudet näytteessä vähenevät, ja AcATAn määrä kasvaa.



KUVA 7. Puhdistuneen proteiinin SDS-PAGE-ajo.

11.2 AcATA:n rakenteen tutkiminen

Tutkimme proteiinia aluksi ThermoFluor® -laitteella jolla saatiin selville, että proteiini on hydrofobinen. Proteiinia tutkittiin myös Static Light Scattering -laitteella (liite 8) jolloin saatiin selville, että proteiinin molekyylipaino on 264 kDa. Aiemmin selvitetyn alayksikön koon (50 kDa) mukaan voidaan päätellä että proteiini on tetrameeri.

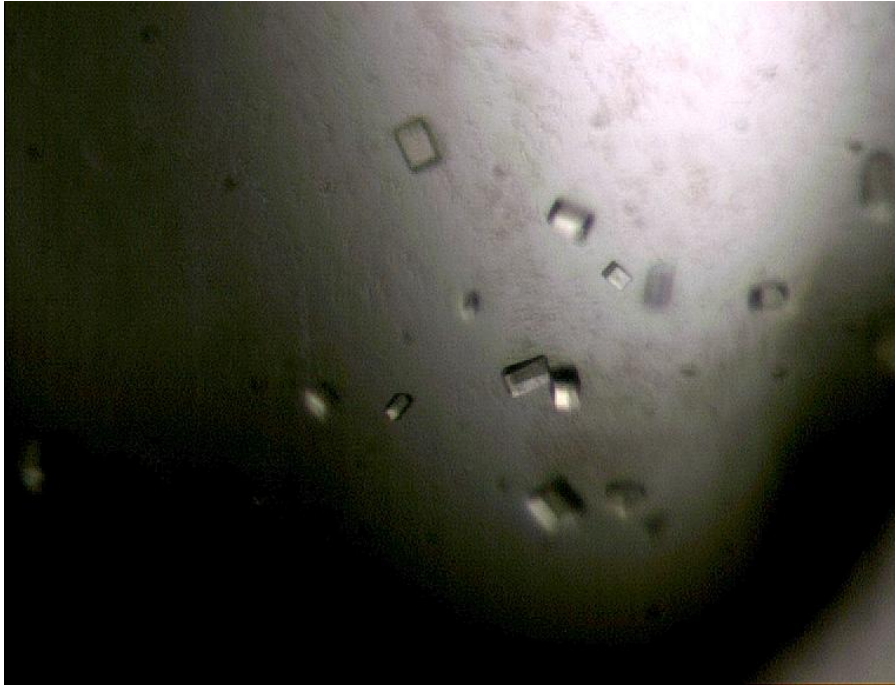
11.3 AcATA:n kiteytys

Proteiini saatiin myös kiteytymään, mikä osoitti sen, että se saatiin puhdistettua erinomaisesti. Parhaat olosuhteet kiteytymiselle ensimmäisen optoimoinnin jälkeen löytyvät taulukosta 8.

TAULUKKO 8. Parhaat olosuhteet AcATA:n kiteytymiselle

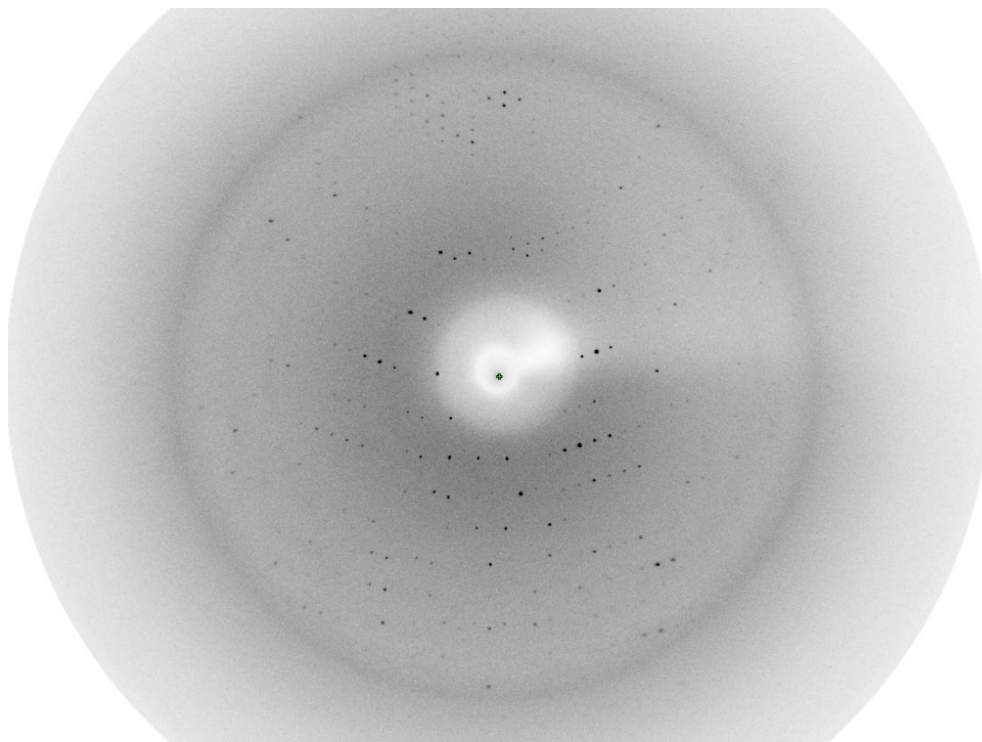
Olosuhde 1	Olosuhde 2
100 mM MOPS	100 mM MOPS
500 mM LiCl ₂	500 mM LiCl ₂
25,73 % PEG	26,64 % PEG
pH 7,5	pH 7,5

Saadut kiteet (kuva 8) olivat kuitenkin hyvin pieniä. Kuvasta kuitenkin nähdään kiteiden säännönmukainen muoto.



KUVA 8. Kuvatut proteiinkiteet.

Kiteitä testattiin röntgendiffraktometrillä (XRD), jolla ei kuitenkaan saatu merkittäviä tuloksia, sillä testatut proteiinkiteet olivat liian pieniä diffraktoituakseen kunnolla. Ensimmäinen testattu kide ei diffraktoitunut, mikä todennäköisesti johtui siitä, että se reagoi cryoprotektanttina käytetyn glyserolin kanssa niin, että proteiinkide sulii. Toisesta testatusta kiteestä saadusta diffraktiokuvasta (liite 9) kuitenkin voitiin varmasti sanoa että testattu kide oli proteiinia. Kuvasta löytyy tummia pisteitä, mikä todistaa että kuvattu kide on rakenteeltaan säännönmukainen. Tämä oli hyvä lähtökohta proteiinin rakennetutkimukseen. Myöhemmin Oulussa testattu kide diffraktoi melko hyvin (kuva 9), ja tulosten perusteella AcATAn rakenne voidaan jossain määrin selvittää.



KUVA 9. AcATAn diffraktiokuva.

12 YHTEENVETO

Opinnäytetyön tarkoituksena oli puhdistaa ja kiteyttää aminotransaminaasi-entsyymiä. Proteiinin puhdistus sujui erittäin hyvin, ilman mitään suurempia ongelmia. Ainoat ongelmat työn aikana johtuivat ÄKTA™ avant -laitteiston ohjelmistosta, ja ne eivät koskeneet itse menetelmiä joita käytettiin. Käytetyt puhdistusmenetelmät olivat tarkoitukseen hyvin sopivia. Puhdistuksen aikana tarkkailtiin myös sitä, onko erilaisilla kasvatusmenetelmillä eroa proteiinin tuotossa tai entsyymin aktiivisuudessa. Kasvatusmenetelmät olivat panossyötöprosessi EnBase® Flo ja panostyyppinen pullokasvatus ZYM505-mediumilla. Alkuperäinen oletus oli, että EnBase® Flo -menetelmällä kasvatetun proteiinin entsyymiaktiivisuus olisi parempi. Merkittävää eroa eri kasvatusmenetelmien välillä ei kuitenkaan havaittu, vaan entsyymin spesifinen aktiivisuus kasvoi tasaisesti molempia menetelmiä käyttämällä. Kolmannella puhdistuskerralla kokeiltiin myös PLP:n lisäystä itse kasvatusmediumiin, mutta sillä ei nähtävästi ollut suurta merkitystä proteiinin laadun kannalta.

AcATAn kiteytyminen oli mukava yllätys. Kiteytymisen ei uskottu onnistuvan hyvin, koska käytettyjä puhdistusmenetelmiä ei ollut optimoitu. Lopullinen näyte sisälsi myös vielä pieniä määriä epäpuhtauksia. Saadut kiteet olivatkin hyvin pieniä, mutta kuitenkin säännöllisenmukaisia ja hyvälaatuisia. Proteiinia tutkittiin myös röntgendiffraktometrilla, mutta sillä ei saatu merkittäviä tuloksia kiteiden pienen koon vuoksi. Jotta röntgendiffraktometrilla saataisiin selvitettyä AcATAn kiderakenne, täytyy kiteistä saada suurempia. Saadut tulokset olivat kuitenkin hyvä alku proteiinin tutkimiselle. Myöhemmin Biokemian laitoksella ja Ranskassa testatusta kiteestä saatiin melko hyvää diffraktiotietoa, jonka perusteella proteiinin rakennetta voidaan selvittää jossain määrin. AcATAn kromatografisen puhdistusprotokolla saatiin optimoitua hyvin, mutta kiteytystä täytyy optimoida vielä lisää.

LÄHTEET

1. Encyclopædia Britannica, Inc. 2011. Transaminase. Saatavissa: <http://www.britannica.com/EBchecked/topic/602366/transaminase>. Hakupäivä: 21.4.2011.
2. Solunetti. 2006. Aminohappojen synteesi. Saatavissa: http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/aminohappojen_synteesi/2/. Hakupäivä 21.4.2011
3. Transaminase Assay. 12.08.2009.Työohje.
4. Shin, J.-S. - Yun, H. - Jang, J.-W. - Park, I. - Kim, B.-G. 2003. Purification, characterization, and molecular cloning of a novel amine:pyruvate transaminase from *Vibrio fluvialis* JS17. Seoul National University, Institute for Molecular Biology and Genetics. Springer-Verlag.
5. Dubnovitsky, Anatoly P. - Kapetaniou, Evangelia G. - Papageorgiou, Anastassios C. 2004. Enzyme adaptation to alkaline pH: Atomic resolution (1.08 Å) structure of phosphoserine aminotransferase from *Bacillus alcalophilus*. University of Turku, Turku Centre for Biotechnology. The Protein Science.
6. Kustannus Oy Duodecim. 2011. ALAT ja ASAT. Saatavissa: http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=snk03071. Hakupäivä: 21.4.2011.
7. The Biochemistry Questions Site. 2008. About transamination, Vitamin B6 and Pyridoxal Phosphate. Saatavissa: <http://biochemistryquestions.wordpress.com/2008/06/02/about->

transamination-vitamin-b6-and-pyridoxal-phosphate/. Hakupäivä
21.4.2011.

8. Anthony S. Serianni. 2005. Reaction Mechanism: PLP-Catalyzed Transamination. Saatavissa: <http://www.nd.edu/~aseriann/transam.html>. Hakupäivä 21.4.2011.
9. Department of Biology, Davidson College. 2001. SDS-PAGE (PolyAcrylamide Gel Electrophoresis). Saatavissa: <http://www.bio.davidson.edu/courses/genomics/method/SDSPAGE/SDSPAGE.html>. Hakupäivä 21.4.2011.
10. Solunetti. 2006. Proteiinien SDS-PAGE. Saatavissa: http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/proteiinien_sds-page/2/. Hakupäivä 21.4.2011
11. Molecular Station. 2005-2008. SDS-PAGE Gel Electroforesis. Saatavissa: <http://www.molecularstation.com/sds-page-gel-electrophoresis/>. Hakupäivä 21.4.2011.
12. Oulun yliopiston biokemian laitos. 2003. Biokemian harjoitustyöt I. Saatavissa: <http://www.biochem oulu.fi/studies/laboratorioharj/BK1erillisohjeet.pdf>. Hakupäivä 21.4.2011.
13. GE Healthcare. 2010. Strategies for Protein Purification. Käsikirja. General Electric Company.
14. EnCor Biotechnology Inc. 2011. Ammonium Sulfate Calculator. Saatavissa: <http://www.encorbio.com/protocols/AM-SO4.htm>. Hakupäivä 21.4.2011.

15. General Electric Company. 2006. Instructions 71-7149-00 AN, HiTrap ion exchange columns. Saatavissa:
[http://www.gelifesciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/6A5A42CEBA9741AEC1257628001CB901/\\$file/71714900AN.pdf](http://www.gelifesciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/6A5A42CEBA9741AEC1257628001CB901/$file/71714900AN.pdf). Hakupäivä 21.4.2011.
16. General Electric Company. 2004-2009. Instructions 11-0026-18 AF, Ion Exchange Columns, HiTrap Capto DEAE. Saatavissa:
[http://www.gelifesciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/C4360F835C1D2832C1257628001D1965/\\$file/11-0026-18_AF_web150.pdf](http://www.gelifesciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/C4360F835C1D2832C1257628001D1965/$file/11-0026-18_AF_web150.pdf). Hakupäivä 21.4.2011.
17. General Electric Company. 2001-2010. Instructions 71-5020-20 AK, HiLoad 16/60 and 26/60 Superdex prep grade. Saatavissa:
[http://www.gelifesciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/C26985E2E96B32CDC1257628001CE02C/\\$file/71502020AK.pdf](http://www.gelifesciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/C26985E2E96B32CDC1257628001CE02C/$file/71502020AK.pdf). Hakupäivä 21.4.2011.
18. Ericsson, Ulrika B. - Hallberg, B. Martin - DeTitta, George T. - Dekker, Niek - Nordlund, Pär 2006. Thermofluor-based high-throughput stability optimization of proteins for structural studies. Stockholm University, Department of Biochemistry and Biophysics. Elsevier Inc.
19. LS-Instruments. 2009. Static Light Scattering. Saatavissa:
http://www.lsinstruments.ch/services/technology/static_light_scattering_sl/s/. Hakupäivä 21.4.2011.
20. Rhodes, Gale 2000. Crystallography Made Crystal Clear: A Guide for Users of Macromolecular Models. 2. painos. San Diego: Academic Press.
21. PANalytical B.V. 2011. X-ray Diffraction. Saatavissa:
<http://www.panalytical.com/index.cfm?pid=135>. Hakupäivä 21.4.2011.

22. Samuli Rauhala. 2005. Röntgensäteilyn opetuksesta lukiossa sekä sen käytöstä tutkimuksessa ja lääketieteessä. Oulu: Oulun yliopisto, Fysikaalisten tieteiden laitos. Pro Gradu -tutkielma.
23. EnBase® Flo Shake Flask Set. 2010. Käyttöohje. BioSilta Oy.
24. Bio-Rad Laboratories. 2000. SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Low Range. Saatavissa: http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_9532.pdf. Hakupäivä: 21.4.2011.

LIITTEET

LIITE 1. SDS-PAGE molekyylipainomarkkeri

LIITE 2. Työssä käytetyt liuokset

LIITE 3. Entsyymiaktiivisuuden laskeminen

LIITE 4. Tyypillinen HiTrap Capto DEAE -kromatogrammi







LIITE 5. SDS-PAGE-geelit HiTrap Capto DEAE -ajosta

LIITE 6. Tyypillinen HiTrap Q HP -kromatogrammi

LIITE 7. Tyypillinen HiLoad 16/60 Superdex 200 pg -kromatogrammi

LIITE 8. SLS-ajon tulokset

LIITE 9. Proteiinin diffraktiokuva

Proteiini	MW	
Phosphorylase b	97,4	
Bovine serum albumin	66,2	
Ovalbumin	45,0	
Carbonic anhydrase	31,0	
Soybean trypsin inhibitor	21,5	
Lysozyme	14,4	

SDS-PAGE-molekyylipainomarkkeri Bio-Rad Prestained SDS-PAGE standards Low Range (24, s. 4)

PLP-puskuri

- 50 mM kaliumfosfaatti
- 0,1 mM pyridoksaali-5'-fosfaatti (PLP)
- pH 7,4

Puskuri A (sitomispuskuri)

- 50 mM kaliumfosfaatti
- 20 μ M PLP
- pH 7,4

Puskuri B (eluintipuskuri)

- 50 mM kaliumfosfaatti
- 20 μ M PLP
- 1 M KCl
- pH 7,4

Tris-puskuri

- 50 mM Tris(hydroksimetyyli)aminometaani (Tris)
- 20 μ M PLP
- 150 mM NaCl
- pH 8,0

ZYM505-medium (ZY, 1 x M, 1 x 505 ja 2 mM MgSO₄)

- ZY
 - 5 g/l hiivauute
 - 10 g/l tryptoni
- 1 x M
 - 25 mM Na₂HPO₄
 - 25 mM KH₂PO₄
 - 50 mM NH₄Cl
 - 5 mM Na₂SO₄
- 1 x 505
 - 5 g/l glyseroli
 - 500 mg/l glukoosi

Substraattipuskuri

- PLP-puskuri
- 11 mM natriumpyruvaatti
- 11 mM α-metyylibentsyyliamiini (MBA)
- pH 7,4

Entsyymiaktiivisuuden laskeminen (2, s. 3)

$$U/ml = \frac{\Delta Abs/min \times V_t \times D}{\epsilon \times d \times V_s} \times 1000$$

KAAVA 2

$$\epsilon_{(asetofenoni)} = 0,280 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

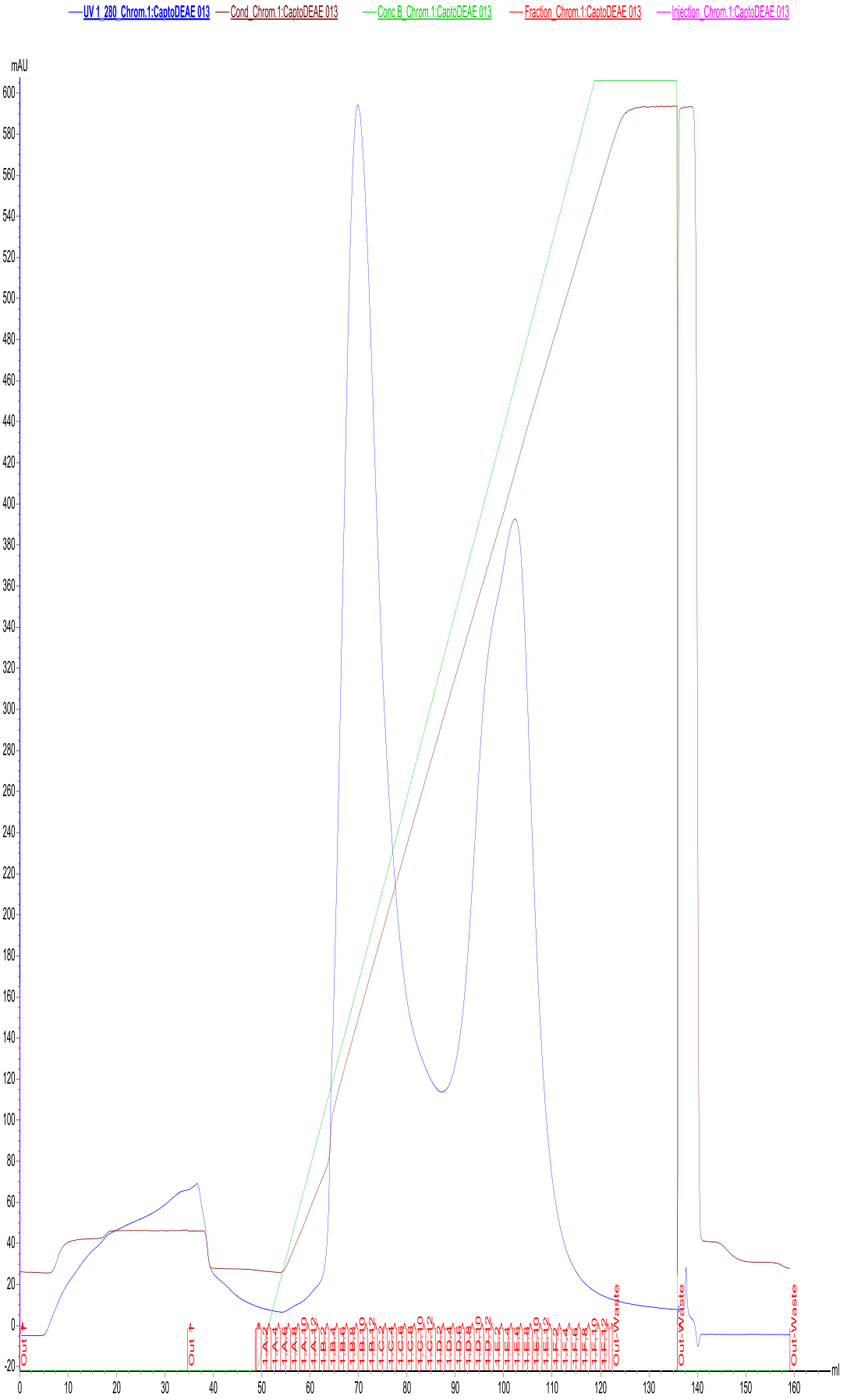
$\Delta Abs/min$ = spektrofotometrin antama lukema

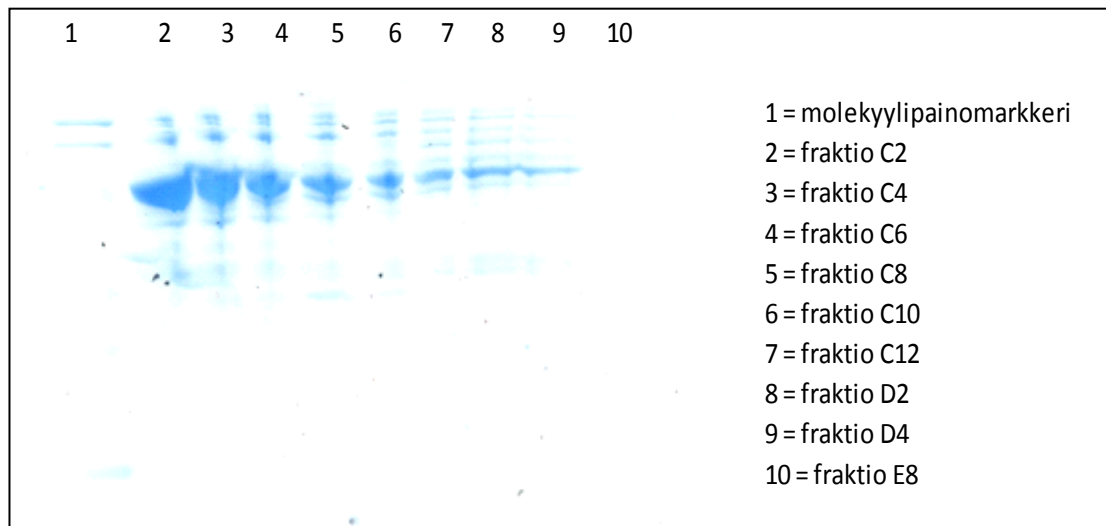
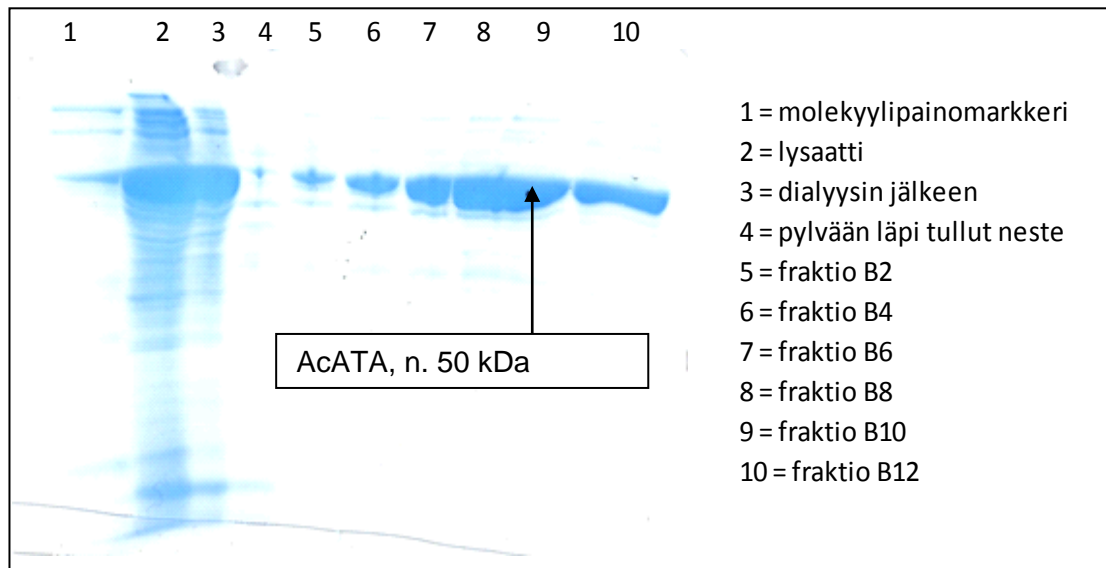
V_t = reaktion kokonaistilavuus (ml)

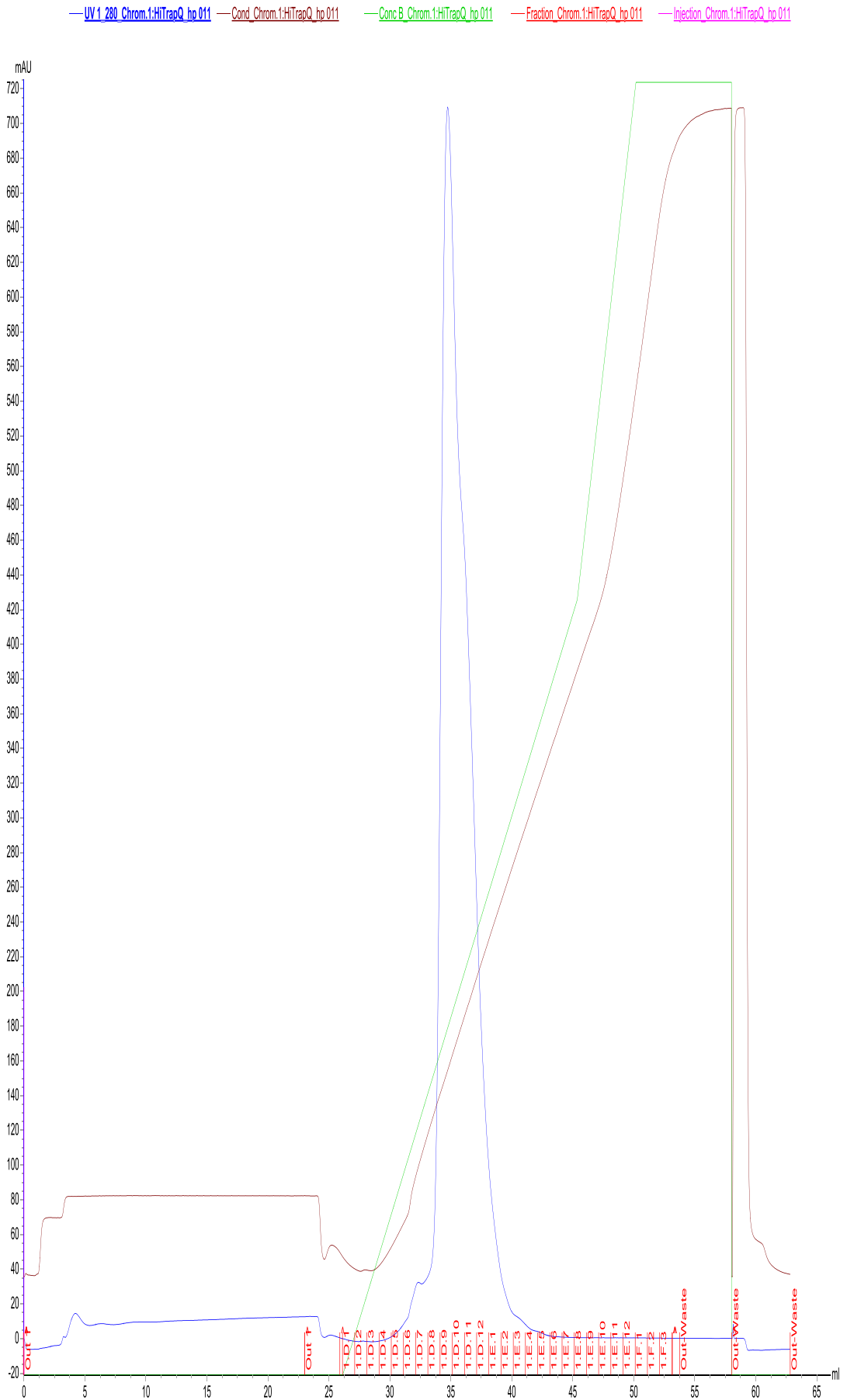
d = kyvetin läpimitta (cm)

V_s = näytteen määrä (μ l)

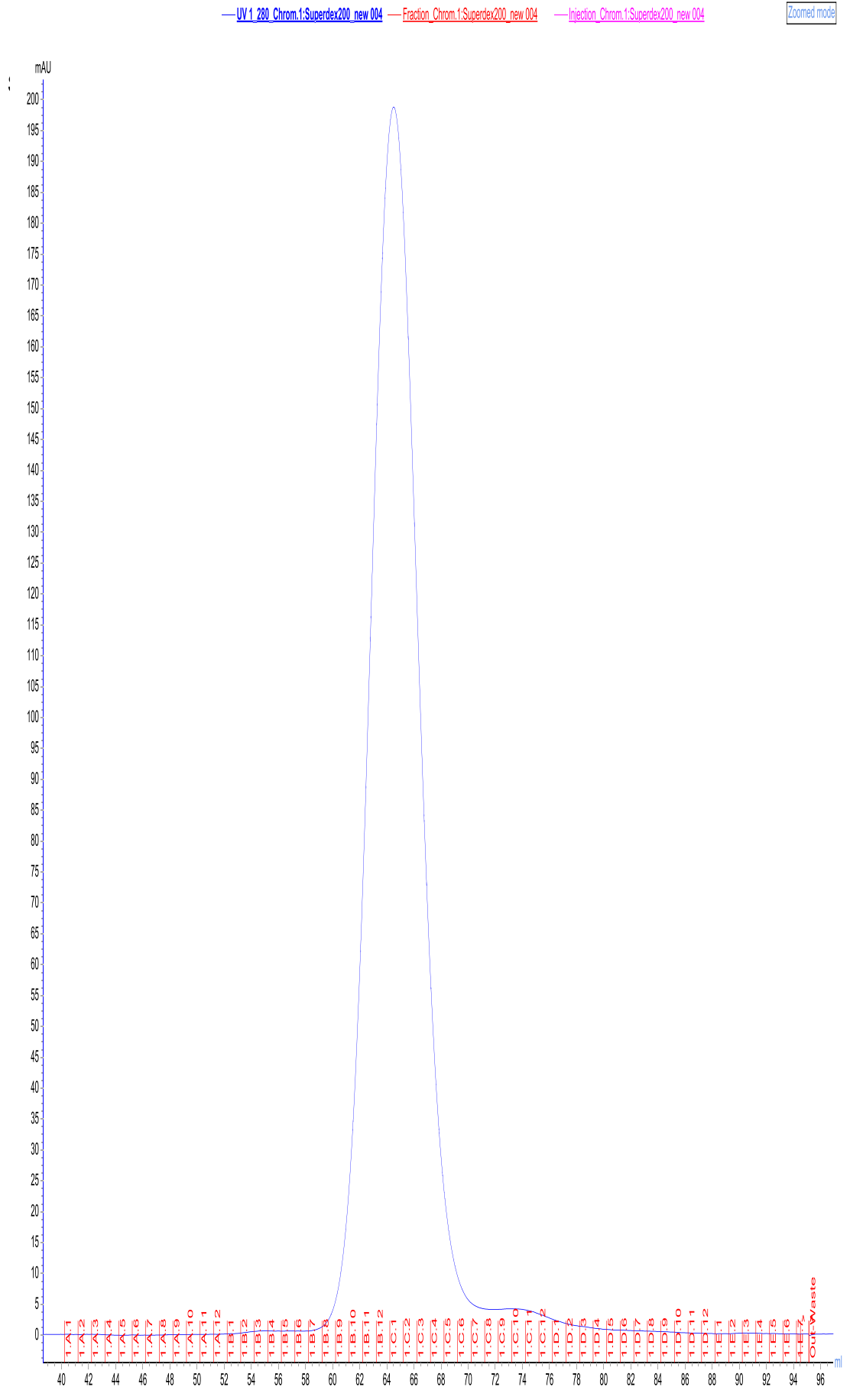
D = laimennuskerroin





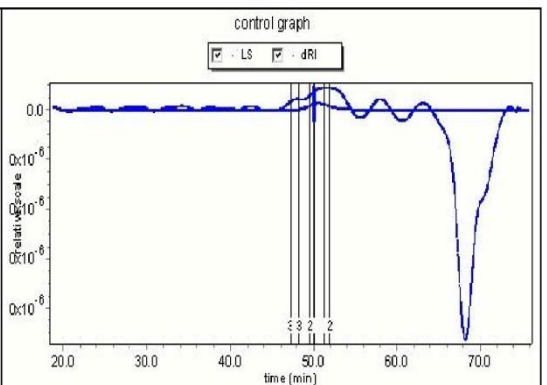
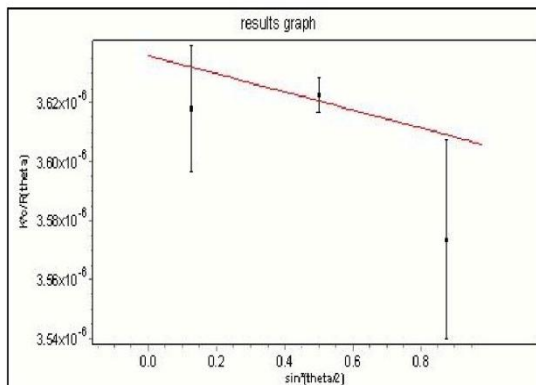
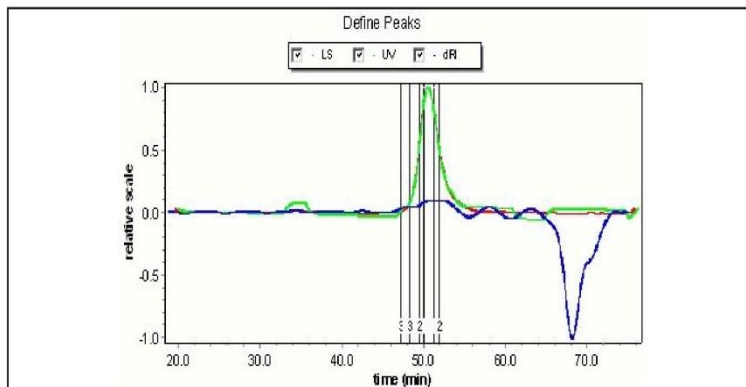
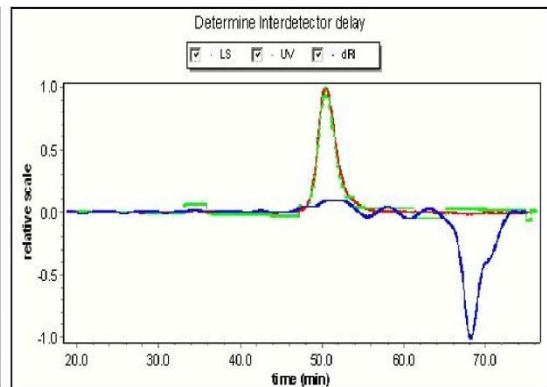
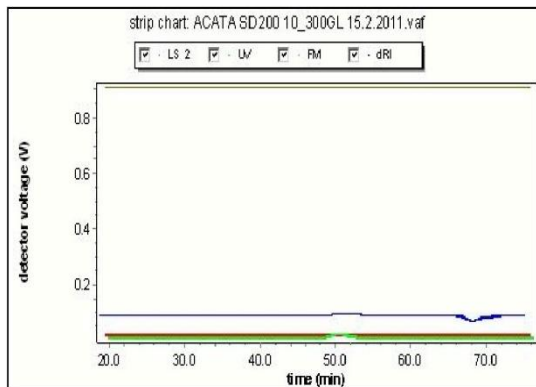
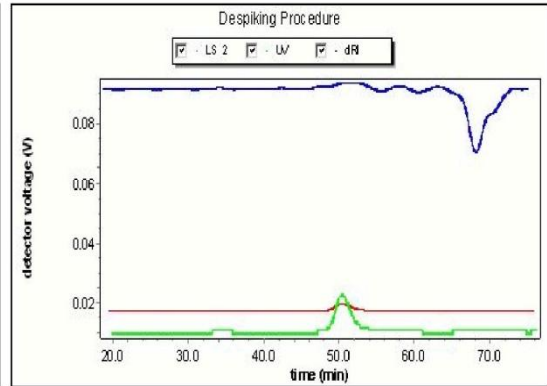
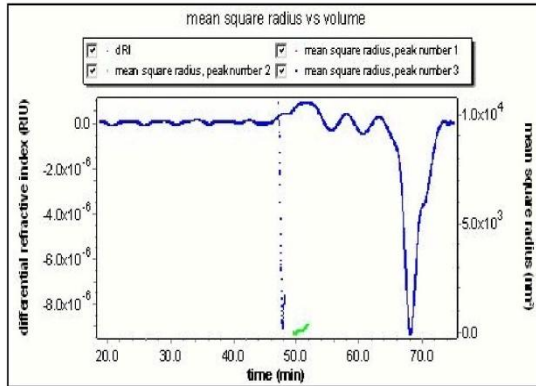


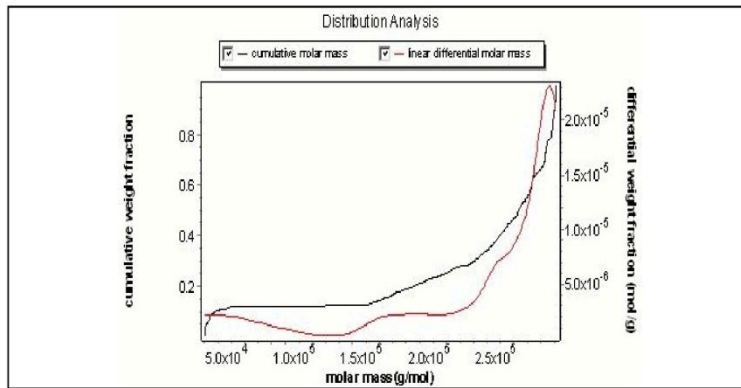
TYYPILLINEN HILOAD 16/60 SUPERDEX PG -KROMATOGRAMMI LIITE 7



ASTRA 5.3.4 Summary Report for ACATA SD200 10_300GL 15.2.2011.vaf

Experiment name: \\biokstorage\ratass\My Document\s\SLS\Anu M ACATA SD200 10_300GL 15.2.2011.vaf
 Sample: AcAt a sd 200 10_300 GL (450 mM HEPES 7.5 200 mM NaCl)
 Processing Operator: Rat as, Ville
 Collection Operator: Rat as, Ville
 Collection Astra Version: 5.3.4.15





CONFIGURATION

Light scattering instrument: miniDAWN TREOS
 Cell type: K5
 Laser wavelength: 658.0 nm
 Calibration constant: 5.0738e-5 1/(V cm)
 RI Instrument: Generic RI instrument
 UV Instrument: Generic UV instrument
 Solvent: water
 Refractive index: 1.331
 Flow rate: 0.400 mL/min

PROCESSING

Processing time: Tuesday February 15, 2011 02:01 PM FLE Standard Time
 Collection time: Tuesday February 15, 2011 12:58 PM FLE Standard Time
 Detectors used: 1 2 3
 Concentration detector: RI
 Mass results fitting: none (fit degree: n/a)
 Radius results fitting: none (fit degree: n/a)

	Peak 1	Peak 2	Peak 3
Peak limits (min)	49.956 - 51.197	49.498 - 51.915	47.187 - 48.192
dn/dc (mL/g)	0.185	0.185	0.185
A ₂ (mol mL/g ²)	0.000	0.000	0.000
UV ext. (mL/g cm)	6.700e+2	6.700e+2	6.700e+2
Model	Zimm	Zimm	Zimm
Fit degree	1	1	1
Injected mass (g)	8.0000e-5	8.0000e-5	8.0000e-5
Calc. mass (g)	2.2597e-6	4.2497e-6	8.6668e-7
Mass Recovery	2.8246 %	5.3121 %	1.0834 %
Mass Fraction	44.1652 %	83.0606 %	16.9394 %

RESULTS

	Peak 1	Peak 2	Peak 3
Polydispersity			
Mw/Mn	1.005 (0.9%)	1.040 (2%)	1.039 (54%)
Mz/Mn	1.009 (2%)	1.074 (2%)	1.089 (89%)
Molar mass moments (g/mol)			
Mn	2.626e+5 (0.7%)	2.277e+5 (1%)	2.364e+4 (39%)
Mp	2.242e+5 (1%)	1.445e+5 (2%)	2.827e+4 (32%)
Mv	n/a	n/a	n/a
Mw	2.638e+5 (0.6%)	2.369e+5 (1.0%)	2.456e+4 (37%)
Mz	2.650e+5 (1%)	2.446e+5 (2%)	2.575e+4 (81%)
rms radius moments (nm)			
Rn	5.2 (116%)	10.3 (51%)	58.4 (57%)
Rw	5.0 (120%)	9.0 (61%)	57.9 (57%)
Rz	5.0 (124%)	7.9 (76%)	56.9 (57%)

264 kD

