



Tuija Solismaa

**IHMISEN RECQL4-PROTEIININ 450 ENSIMMÄISTÄ
AMINOHAPPOA KOODITTAVAN DNA-JAKSON KLOONAUS**

RAPORTIN NIMIÖSIVU

**IHMISEN RECQL4-PROTEIININ 450 ENSIMMÄISTÄ
AMINOHAPPOA KOODITTAVAN DNA-JAKSON KLOONAUS**

Tuija Solismaa
Opinnäytetyö
Kevät 2011
Bioanalytiikan koulutusohjelma
Oulunseudun
ammattikorkeakoulu

TIIVISTELMÄ

Oulun seudun ammattikorkeakoulu

Bioanalytiikan koulutusohjelma

Tekijä: Tuija Solismaa

Opinnäytetyön nimi: Ihmisen RecQL4-proteiinin 450 ensimmäistä aminohappoa koodittavan DNA-jakson kloonauk

Työn ohjaajat: Helmut Pospiech, Paula Reponen, Outi Mäkitalo

Työn valmistumislukukausi ja -vuosi: Kevät 2011

Sivumäärä: 35 + 19

Projekti sai alkunsa Oulun yliopiston biokemianlaitoksella työskentelevän yliassistentti Helmut Pospiechen tarpeesta saada kloonattua ihmisen RecQL4-proteiinia tutkimustyötään varten. Helmut Pospiech tekee tutkimusta, jonka tarkoituksena on selvittää RecQL4-proteiinin tehtävää solun jakautumisen yhteydessä tapahtuvassa DNA:n kahdentumisessa. Projektin tavoitteena on suunnitella ja toteuttaa RecQL4-proteiinin 450 ensimmäistä aminohappoa koodittavan DNA- jakson kloonauk.

Opinnäytetyö suoritettiin Oulun yliopiston biokemianlaitoksen laboratoriossa. Työn eri vaiheet syvensivät molekyylibiologian ja geenitekniikan työskentelymenetelmien hallitsemista. Projekti kokonaisuudessaan tarjosi mahdollisuuden suunnitella ja toteuttaa tunnetun DNA-jakson kloonauksen. . Projekti sisälsi paljon aiheeseen ja tekniikoihin tutustumista kirjallisuuden avulla. Käytännön työssä tutustuttiin DNA-laboration työskentelymenetelmiin.

Oppimisprosessina projekti oli erittäin vaativa. Oppimistavoitteet käytännön työstä ja kirjallisuuden avulla työvaiheisiin tutustumisesta saavutettiin. RecQL4-proteiinin kloonauk tämän tutkimuksen osalta jäi toteutumatta. Haluttua tuotetta ei saatu valmistettua. Tuloksia voidaan käyttää tulevaisuudessa hyväksi, kun mietitään mikä kloonauksessa meni vikaan ja kuinka kokonaisuus saadaan toimimaan.

Asiasanat:

RecQL4-proteiini, kloonauk, PCR, sekvensointi, korjaajaentsyymit

ABSTRACT

Oulu University of Applied Sciences

Biomedical laboratory scientist

Author: Tuija Solismaa

Title: Cloning of DNA sequence that encode RecQL4-protein 450 first amino acids

Supervisors: Helmut Pospiech, Paula Reponen, Outi Mäkitalo

Published: Spring 2011

Number of pages: 35+ 19

The project is part of Assistant Helmut Pospiech research. Research takes place in Department of Biochemistry at the University of Oulu. Helmut Pospiech need to have cloned human RecQL4 protein for his examination. Purpose of his examination is to find out RecQL4 protein function in connection with a cell division in DNA replication. This project aims to design and implement RecQL4 protein for the first 450 amino acid codes for a DNA-cloning period.

The thesis was conducted at the University of Oulu, Department of Biochemistry Laboratory. Different work phases deepened managing of molecular biology and genetic engineering working methods. Project as a whole provided an opportunity to design and implement a well-known DNA cloning period. The project included a lot of exploring information of topics and techniques from literature. In practical work explored working methods of DNA laboratory.

As a learning process the project was extremely demanding. The learning objectives of practical work and the literature exploring the phases was achieved. Cloning of RecQL4 protein was never achieved. Desired product could not be prepared. The results can be used in the future in favor, while figuring out what went wrong with the cloning and how the whole system becomes operational.

Subject:

RecQL4 protein, cloning, PCR, sequencing, restrictio enzymes

SISÄLLYS

1 JOHDANTO.....	6
2 GEENIN TOIMINTA.....	8
3 REPLIKAATIO.....	10
3.1 Korjaajaentsyymien toiminta replikaatiossa.....	12
3.2 RecQL4-proteiini.....	13
4 PROJEKTIN TAVOITTEET JA KUVAUS.....	15
4.1 Polymeraasiketjureaktio.....	17
4.2 Kloonaus bakteerisolujen avulla.....	18
4.3 DNA:n eristäminen ja puhdistus.....	22
5 TYÖN SUORITTAMINEN.....	24
6 TULOSTEN TARKASTELUA.....	28
7 POHDINTA.....	31
LÄHTEET.....	33
LIITTEET.....	36

1 JOHDANTO

Kaikki elävät solut rakentuvat niiden sisältämän perimän avulla. Ihmisillä tämä tieto on DNA- ketjun muodossa jokaisessa solussa. Soluja kuolee jatkuvasti ja uusia syntyy tilalle solujakautumisen avulla. Solun jakautuessa myös sen sisältämä perimä jakautuu. Lopputuloksena yhdestä solusta syntyy kaksi keskenään aivan identtistä solua. Useat eri proteiinit osallistuvat DNA:n kahdentumiseen solun jakautumisen yhteydessä. Yksi tällainen proteiiniryhmä on korjaaja- entsyymit. Nämä proteiinit suojelevat uutta DNA-juostetta mutaatioilta sekä korjaavat DNA:han syntyviä vaurioita. Korjaajaentsyymien perustehtävä on suojella eliötä mutaatioilta, jotka voivat johtaa solun toimintakyvyn heikkenemiseen tai jopa kuolemaan. (Niemi, M., Virtanen, I. & Vuorio, E. 1994. 22.)

Oulun yliopiston biokemianlaitoksella työskentelevä yliassistentti Helmut Pospiech tekee tutkimusta, jonka tarkoituksena on selvittää RecQL4-proteiinin tehtävää solun jakautumisen yhteydessä tapahtuvassa DNA:n kahdentumisessa. Tämä projekti sai alkunsa Pospiechen tarpeesta saada kloonattua RecQL4-proteiinia tuottavaa cDNA:ta. cDNA on ihmisen DNA:ta joka sisältää ainoastaan informaatiota sisältävät alueet. Geenin rakentamaa proteiinia tutkitaan tulevaisuudessa ja valmiiksi optimoitu kloonauksen sekä valmistettu ja varastoitu cDNA helpottaa tutkimuksen laboratorio-osuuden aloittamista. Tämä tarve tarjosi luonteeltaan ja laajuudeltaan sopivan kokonaisuuden opinnäytetyön aiheeksi ja lisäksi se sopi projektin suorittajan valitsemaan suuntautumisvaihtoehtoon, joka on molekyylibiologia ja geenitekniikka.

RecQL4-proteiini kuuluu RecQ-helikaasientsyymien ryhmään. Helikaasientsyymit avaavat DNA:n kaksoisjuosteen väliaikaisesti solun jakautuessa, jolloin DNA-juosteet voidaan polymeerasientsyymien avulla kopioida. Helikaasientsyymit osallistuvat DNA:han syntyvien mutaatioiden

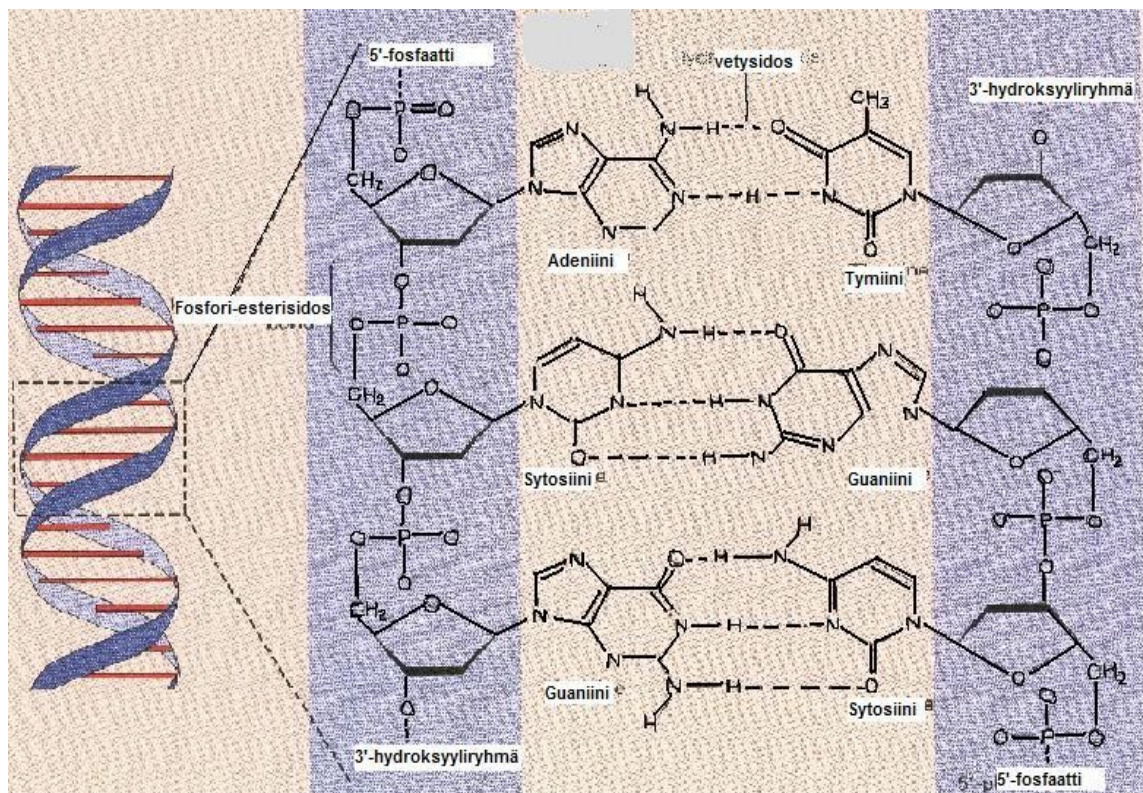
ehkäisyyn varmistamalla, että vain tietty osa juosteesta kopioidaan kerralla. RecQL4-proteiinin tarkkaa toimintaa solunjakautumisen yhteydessä ei vielä tunneta, mutta voidaan olettaa, että se muiden ryhmään kuuluvien entsyymien tavoin ehkäisee mutaatioiden syntymistä uuteen DNA-juosteeseen. (Mahesh, M. 2005. 887 – 898.)

Työssä toteuttettavan kloonauksen kaltainen kokonaisuus vaatii bioanalyttikolta selkeämpää kokonaiskäsitystä työn eri vaiheista, kuin esimerkiksi kliinisen kemian laboratoriossa analysointoreilla suoritettavien analyysien tekeminen. Kloonauksen eri vaiheet suoritetaan käsityönä. Lisäksi osa liuoksista valmistetaan itse. Tämän vuoksi kloonauksen vaatii bioanalyttikolta perusteellista tekniikkoihin perehtymistä ennen käytännön työn suorittamista. Tämän kaltainen projekti on tietyllä tavalla intiimimpää työskentelyä, kuin isojen näytemäärien ja analysointoreiden parissa työskentely.

2 GEENIN TOIMINTA

Geeni on DNA-jakso, joka koodittaa perinnöllistä ominaisuutta. Geeni sisältää tiedon proteiinin tai RNA:n rakenteesta. Suurin osa kromosomeihin pakatusta DNA:sta on introneita eli aluetta, joka ei sisällä informaatiota. Näillä alueilla voi kuitenkin olla erilaisia suojele- ja säätelytehtäviä. Eksonit eli informaatiota sisältävät alueet sisältävät kaiken tiedon solun elämästä. Geenin tiedonsiirrossa yleensä valmistuu DNA:n koodin mukaan RNA:ta, josta taas tehdään proteiini, joka kulkeutuu sille tarkoitettuun paikkaan. Tieto proteiinien aminohappojärjestyksestä on DNA:ssa kolmen nukleotidin ryhminä. Jokainen emäskolmikko vastaa yhtä tiettyä aminohappoa. Proteiineissa voi olla vain 20 erilaista aminohappoa, joten yhtä aminohappoa voivat vastata useat eri emäskolmikot. Tiedonsiirto DNA:sta tapahtuu RNA-polymeraasin avulla. RNA-polymeraasientsyymi valmistaa RNA:ta DNA:n sisältämän ohjeen mukaan. (Campbell, M. 1999, 275 - 300.)

Deoksiribonukleiinihappo eli DNA sisältää perintötekijät. Perintötekijöiden avulla solu kykenee kehittymään, toimimaan ja siirtämään informaatiota jälkeläisilleen. DNA koostuu nukleotideista. Yhden nukleiinihappoketjun rungon muodostavat vuorottelevat sokeri- ja fosfaattiosat. DNA:ssa esiintyy neljää eri emästä. Näistä kaksi, sytosiini (C) ja tymiini (T), ovat pyrimidiiniemäksiä, jotka ovat muodostuneet yhdestä hiili-typpirenkaasta. Adeniini (A) ja guaniini (G) ovat puriiniemäksiä. Puriiniemäket ovat suuria emäksiä, jotka ovat muodostuneet kahdesta renkaasta. Nukleotidien emäket pystyvät kemiallisen rakenteensa vuoksi muodostamaan keskenään vetysidoksia. Mahdollisia muodostuvia pareja on ainoastaan kaksi. Parin muodostavat C - G sekä A - T (KUVIO 1). Nukleotidin emäkseen on liittynyt sokeriosa, joka sisältää viisi hiiliatomiä. Nämä hiiliatomit sijaitsevat renkaassa, jota yhdistää yksi happiatomi. Fosfaattiosa kiinnittyy emäksen sokeriosaan happisillan avulla (KUVIO 1). (Suominen & Ollikka 2004, 15 - 19; Heino & Vuento 2002, 39 - 40. Campbell, M. 1999, 275 - 300.)



KUVIO 1. DNA:n rakenne.

Kaksoiskierteisen DNA:n sisällä sijaitsee toisiinsa vetysidoksilla kiinnittyneet emäkset. Ketjun ulkopuoli muodostuu sokeri-fosfaatti-sokeri-ketjusta. (Lim, D 998, 47. Mukaellen.)

Ribonukleiinihapon eli RNA:n tehtävänä on siirtää DNA:n sisältämä tieto ja valmistaa sen avulla proteiineja eri käyttötarkoituksiin. RNA:ta on kolmea erilaista. Lähetti-RNA (mRNA) kopioi DNA:n sisältämän tiedon ja siirtää sen edelleen ulos tumasta. Kopioitu tieto kulkeutuu ribosomeille, jotka sisältävät proteiinia ja ribosomaalista RNA:ta (rRNA). Lähetti-RNA kiinnittyy ribosomin pintaan ribosomaalisen RNA:n avulla. Siirtäjä-RNA eli tRNA tunnistaa yhden emäskolmikon kerrallaan ja tuo paikalle jokaista lukemaansa emäskolmikka vastaavan aminohapon. RNA-juoste rakentuu samalla tavoin kuin DNA. Ainoat erot ovat sokeriosassa ja yhdessä emäksessä. RNA:ssa on tyymiinin tilalla urasiili (U). (Campbell, M. 1999, 275 - 300; Heino & Vuento 2002, 44; Suominen & Ollikka 2004, 17 – 20.)

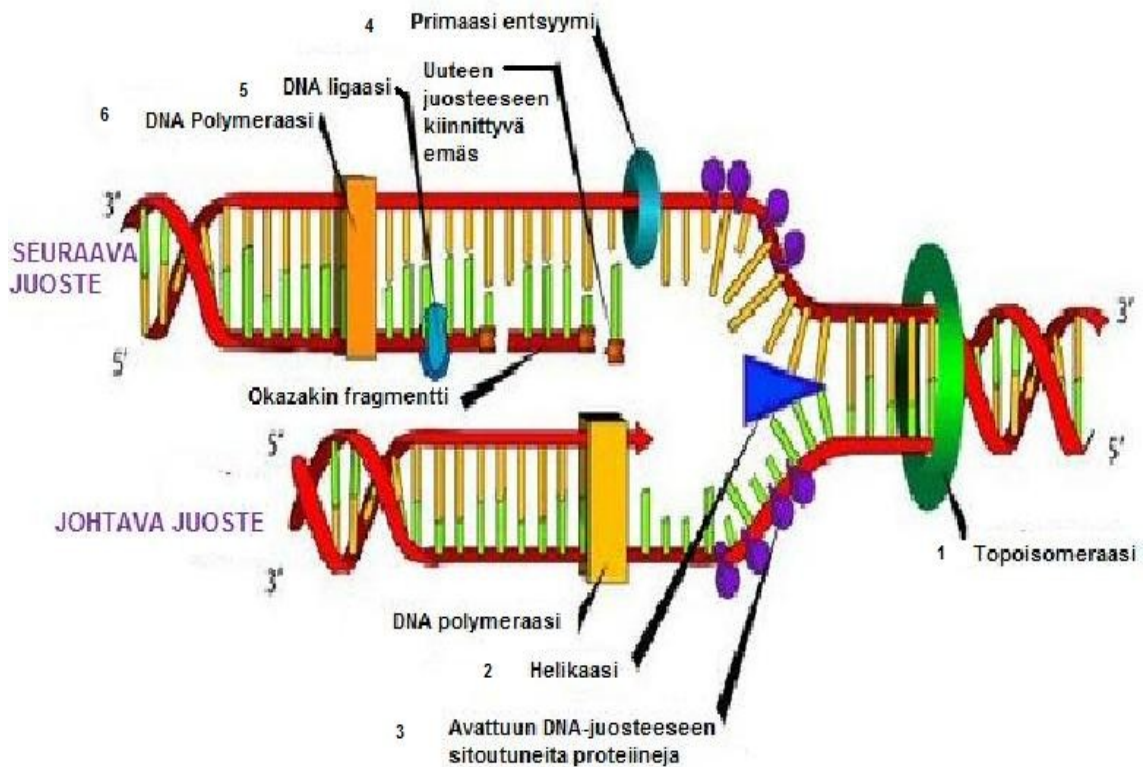
3 REPLIKAATIO

DNA:ssa on varastoituna kaikki tieto, jota eliön ominaisuuksien rakentamiseen ja ylläpitämiseen tarvitaan. Vanhat solut kuolevat ja tilalle syntyy uusia soluja. Nämä solut syntyvät solun jakautuessa. Solujen jakaantuminen on välttämätöntä elämän jatkumisen kannalta. Ilman solujen jakaantumista ei tapahdu kasvua eikä kehittymistä. Ennen kuin solu alkaa jakaantua, täytyy perintötekijöitä olla kaksi kappaletta, yksi molemmille uusille soluille. Tämän vuoksi solun DNA monistuu ennen kuin solu alkaa kopioitua. Tätä DNA:n monistumista kutsutaan replikaatioksi. Vanhasta solusta syntyneitä kahta uutta solua sanotaan tytärsoluiksi. Replikaatio on nopeasti tapahtuva prosessi, mikä onkin välttämätöntä, koska uusia soluja syntyy jatkuvasti. Ihmisen DNA:n sisältämä tieto kopioituu replikaatiossa muutamassa tunnissa. (Campbell, N. ym. 1999, 286 – 287; Campbell, M. 1999, 275 - 300.)

Keskeisenä tekijänä replikaatiossa toimii DNA-polymeraasientsyymi, jonka tehtävänä on kopioida solun DNA:n informaatio tytär-DNA:lle. Uusi DNA-juoste rakentuu aina DNA-juosteen 5'-päästä, joka sisältää vapaan fosfaattiosan, 3'-päästä kohti, jossa on vapaa OH-ryhmä 3'-hiilessä. Templaattina eli mallina toimii jakautuvan solun DNA-juoste. DNA-polymeraasi alkaa kiinnittää nukleotidejä yksi kerrallaan malli-DNA:n 3'-päästä alkaen (KUVIO 2). Malli-DNA:n ja syntyvän DNA-juosteen nukleotidien emästen täytyy olla toisilleen vastakkaiset eli komplementaariset, jotta emästen välille voi syntyä vetysidos. (Suominen & Ollikka 2004, 22 – 23; Campbell, M. 1999, 275 - 300.)

Replikaatiossa DNA-juoste kopioidaan osissa. Replikaation alkaessa topoisomeraasientsyymi suoristaa kierteisen DNA-juosteen, minkä jälkeen helikaasientsyymi avaa DNA-kaksoisjuosteen. DNA-juosteet eroavat paikallisesti tapahtuman aloituskohdassa. Replikaation aikana DNA-juosteeseen on sitoutunut proteiineja, joiden avulla DNA-juosteet ovat erillään toisistaan. Näin syntyy kopioitava alue. Kopioitavaa aluetta kutsutaan

replikaatiokuplaksi ja sen keskikohdasta molempiin suuntiin lähtevät replikaatiohaarukat (KUVIO 2). Replikaatiokuplia on yhdessä kromosomissa useita samanaikaisesti. Kahdentumisen aloituskohtana toimii replikaatiokuplan keskiosa. Alukkeena eli kopioinnin aloituskohdan merkinä toimii primaasientsyymin rakentama lyhyt RNA- tai DNA-jakso. Tämän jakson perään polymeerasientsyymin alkaa kiinnittää nukleotidejä yksitellen. Nukleotidit kiinnittyvät rakennettavan nauhan vapaaseen 3'-OH-ryhmään. Uuden nukleotidin kiinnittyessä syntyy fosfodiesterisidos kahden nukleotidin deoksiriboosien välille. Tällainen fosfodiesterisidos voi syntyä vain, jos nukleotidi pystyy muodostamaan vetysidoksen sen emäksen kanssa, joka toimii sille vastinemäksenä malli-DNA:ssa (KUVIO 1). Koska jokaiseen kohtaan syntyvää nauhaa voi kiinnittyä vain yksi tietty emäs, tämä takaa sen, että uuden nauhan emäsjärjestys on oikea. Uusi DNA-juoste kasvaa 5' - 3'-suunnassa uusia nukleotidejä lisättäessä. 3' - 5'-suunnassa monistettava nauha kopioidaan jatkuvana, kun taas toisen nauhan juoste syntyy osissa. Näitä osia kutsutaan Okazakin fragmenteiksi (KUVIO 2). Tapahtuma jatkuu, kunnes tullaan toisen päään replikaatiohaarukkaan replikaatiokuplan vastakkaisella puolella. Tällöin syntyneet DNA- juosteet kiertyvät kahdeksi uudeksi DNA-kaksoiskierteeksi. (Suominen & Ollikka 2004, 22 - 23; Alberts, B. ym. 1994, 358; Campbell, M. 1999, 275 - 300.)



KUVIO 2. Replikaatio.

1. Topoisomeraasi suoristaa kierteisen juosteen. 2. Helikaasientsyymi avaa kaksoisjuosteen. 3. Avattuun juosteeseen sitoutuu proteiineja, jotka pitävät juosteen auki ja suojelevat DNA:ta replikaation aikana. 4. Primaasientsyymi rakentaa alukkeen josta kopiointi alkaa. 5. Ligaasientsyymi kiinnittää uuden emäksen DNA-juosteeseen. 6. Polymeraasientsyymi rakenstaa uuden DNA-kaksoisjuosteen (DNA MikroBiologyGuide. Mukaellen.)

3.1 Korjaaajentsyymien toiminta replikaatiossa

DNA-juosteeseen syntyy vaurioita jatkuvasti. Vauriot voivat olla solun ulkoisten tekijöiden, kuten säteilyn tai kemikaalien aikaansaannoksia. DNA vaurioituu kuitenkin myös solun sisäisten tekijöiden vaikutuksesta jopa satoja kertoja päivässä. Tyypillisimpiä vaurioita ovat emäsmuutokset sekä yhden juosteen katkeaminen. DNA:n vaurioiden korjaamisessa auttavat siihen erikoistuneet valkuaisaineet, joita kutsutaan korjaaajentsyymeiksi. Ihmisen solussa

arvioidaan olevan useita satoja korjaajaentsyymejä. Osa näistä entsyymeistä on erikoistunut DNA:n korjaamiseen, mutta monilla on myös muita tehtäviä solun sisällä. (Campbell, M. ym. 1999, 283 – 284; Mustonen, R., 2002, 32 – 34.)

Korjaajaentsyymit toimivat vauriosta riippuen eritavoin. Yleisesti ottaen ne tunnistavat vaurioituneita kohtia ja korjaavat siihen syntyneen virheen. DNA:n jakautuminen ei jatku ennen kuin virhe on saatu korjattua. Glykosylaasientsyymit tunnistavat vaurioituneen tai pilkkoutuneen emäksen ja poistavat sen DNA-ketjusta. DNA-juoste voi olla myös vääntynyt, koska siinä on liikaa emäksiä. Tällöin vaurion korjaa entsyymi, joka katkaisee ylinmääräisen juosteen osan pois. Ligaasi- ja polymeerasientsyymit osallistuvat DNA-ketjun rakentamiseen kiinnittämällä valmiita ketjuja toisiinsa ja rakentamalla uutta juostetta. Samalla ne osallistuvat vaurioiden korjaamiseen suorittamalla omaa tehtäväänsä. Ligaasi-entsyymi voi korjata DNA-juosteeseen syntyneen katkoksen kiinnittämällä katkenneet päät yhteen. Yksittäisen juosteen vauriot ovat suhteellisen helppoja korjata, koska silloin vastinjuoste toimii mallina vaurioituneelle juosteelle. Tällöin vaurion voi korjata polymeerasientsyymi kiinnittämällä vaurioituneeseen kohtaan oikean emäksen. Kaksoisjuosteen katkossa toimii useampi korjaajaentsyymi yhtäaikaan. Mallina käytetään ehjän kromosomin DNA-juostetta. Helikaasi-entsyymit avaavat DNA-kaksoisjuosteen yhdestä kohdasta kerrallaan. Ne estävät vaurioiden syntymistä säätelemällä juosteiden kopioimista. (Campbell, M. ym, 1999, 285 – 286; Mustonen, R., 2002, 32 – 34.)

3.2 RecQL4-proteiini

RecQL4-proteiini, eli RecQ proteiini- like 4, kuuluu RecQ-helikaasiproteiinien ryhmään. RecQ-helikaaseilla on tärkeä rooli DNA:n replikaation kontrolloimisessa. Ne auttavat ylläpitämään DNA:n ehjänä ja perimän muuttumattomana. RecQL4-proteiinin aminohappojärjestys on samankaltainen muiden RecQ-perheeseen kuuluvien proteiinien kanssa. RecQL4-proteiinin mutaation on havaittu olevan yhteydessä sairauksiin jotka johtuvan DNA:n

vaurioitumisesta. Sairauksille yhteistä on luuston kehittymisen häiriöt. Tästä syystä voidaan olettaa, että RecQL4-proteiini osallistuu DNA:n sisältämän tiedon suojelemiseen ehkäisemällä muutoksia perimässä. (Mahesh, N. ym. 2005, 887)

Solun kahdentuminen jakautuu eri vaiheisiin. G1-vaihe aloittaa solun jakautumisen. Sen aikana solun tilavuus, sekä RNA:n ja Proteiinien määrä kasvavat. G1-vaiheen jälkeen siirrytään S-vaiheeseen. S-vaiheessa tapahtuu DNA:n replikaatio. S-vaiheen jälkeen, kun DNA on jautunut, alkaa G2-vaihe joka kestää mitosisin alkuun asti. Mitosia kutsutaan M-vaiheeksi ja sen aikana solu jakaantuu. M-vaiheen jälkeen solusykli on ohi ja uusi solu on valmis. RecQL4-proteiinia on todettu olevan solussa eniten G1/S-vaiheen vaihteessa sekä S-vaiheessa. Tästä voidaan päätellä sen osallistuvan DNA:n replikaatioon. (Thangavel, S. ym. 2009. 1382 – 1396.)

Jotkut elimistössä tapahtuvat reaktiot tuottavat vetyperoksidia. H_2O_2 on soluille vaarallinen aine ja sen vuoksi sen hajoittaminen vedeksi ja hapeksi tapahtuu peroksisomeissa. H_2O_2 kuitenkin aiheuttaa jonkin verran vaurioita DNA:ssa. RecQL4-proteiinin on osoitettu osallistuvan näiden vaurioiden korjaamiseen aktivoimalla korjausta suorittavia BER-proteiineja. RecQL4-proteiini säätelee kolmen BER-proteiinin toimintaa. Nämä proteiinit ovat APE1, POL β ja FEN1. BER-proteiinien puuttellinen toiminta vaikuttaa osaltaan luusyöpien ja joidenkin muiden syöpien syntyyn. On mahdollista että RecQL4-proteiinia voidaan käyttää näiden syöpien hoidossa uudelleen aktivoimaan viallisesti toimivia BER-proteiineja. (Schurman, S. ym. 2009)

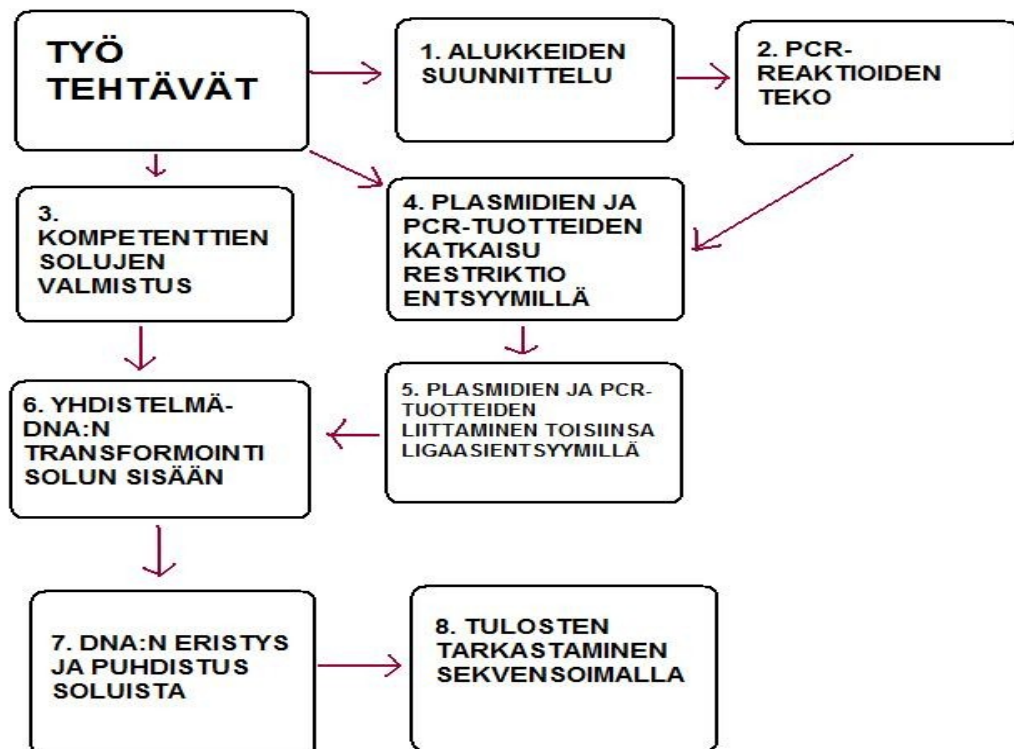
4 PROJEKTIN TAVOITTEET JA KUVAUS

Solun jakautumiseen osallistuu useita entsyymejä. Näiden entsyymien tehtävänä on aloittaa ja lopettaa DNA:n jakautuminen, sekä korjata mahdollisia virheitä, joita prosessin aikana syntyy. Helmut Pospichen, projektin asettajan, tavoitteena on selvittää ihmisen RecQL4-proteiinin tehtävää solun jakautumisen yhteydessä. Tutkittava proteiini koostuu noin 1200 aminohaposta. Proteiinia on aikaisemmin tutkittu 450 aminohaposta eteenpäin. Työn, johon tämä opinnäytetyö sisältyy, tutkimuskohteena ovat aminohapot 1 – 450. 450 ensimmäistä aminohappoa koodittava DNA-jakso kloonataan osissa. Kloonattavien osien koko valitaan sen mukaan, missä proteiinin mahdolliset toiminnalliset osat sijaitsevat.

RecQL4-proteiini on rakenteeltaan identtinen hiivan Sld2-proteiinin kanssa ensimmäisen 169 aminohapon suhteen. Sld2- proteiinia on tutkittu paljon ja sen tehtävä hiivan solunjakautumisen yhteydessä on suojata DNA:ta mutaatioilta. Pospiechen tarkoituksena on tutkia näiden proteiinien yhtäläisyyksiä. Koska Sld2-proteiinin toiminta tunnetaan hyvin, voidaan yhtäläisyyksistä päätellä RecQL4-proteiinin ominaisuuksia. Tässä projektissa on tavoitteena tuottaa RecQL4-proteiinia kloonamalla. RecQL4-proteiinia koodittava DNA kloonataan osissa.

Tässä työssä tutustutaan molekyylibiologian ja geenitekniikan menetelmiin. Projekti kokonaisuudessaan tarjoaa mahdollisuuden suunnitella ja toteuttaa tunnetun DNA-jakson kloonauksen. Projekti sisältää paljon aiheeseen ja tekniikoihin tutustumista kirjallisuuden avulla. Käytännön työssä päästään tutustumaan DNA-laboratorion työskentelymenetelmiin. Laboratoriossa oppii steriilin työskentelyn tärkeyden helposti hajoavien ja kontaminaatioille herkkien näytteiden kanssa työskennellessä. Työtehtävät on esitetty kuviossa 3.

Nykyään laboratoriossa analyyttorit suorittavat suuren osan analyyseista. Sairaalalaboratorioissa, missä suurin osa bioanalytikoista valmistuttuaan työskentelee, tehdään hyvin vähän näytteiden käsittelyä tai mitään työvaiheita käsin. Yleensä työ on analyyttoreilla näytteiden analysointia sekä tulosten tarkastelua, lähetystä ja analyyttoreiden huoltoa. Tämän projektin kaltainen työ tarjoaa erilaisen näkökulman laboratoriotyöhön. Molekyylibiologian ja geenitekniikan töissä suurin osa työvaiheista suoritetaan käsin. Lisäksi osa reagensseista valmistetaan itse. Kaikki pipetoinnit ja seosten valmistukset tehdään käsityönä. Tämän kaltainen laboratoriotyöskentely antaa tekijälle paljon selkeämmän kuvan työn eri vaiheista. Lisäksi liuosten valmistaminen pakottaa ajattelemaan reaktioiden eri osien tarkoitusta kokonaisuuden kannalta. Nämä taidot olisi hyvä säilyä jokaisella bioanalytikolla analyyttoreiden käytöstä huolimatta. On tärkeää miettiä reaktioita tulosten taustalla ja sitä kautta ymmärtää, mitä analyyttoreiden antamat tulokset oikeasti kertovat.



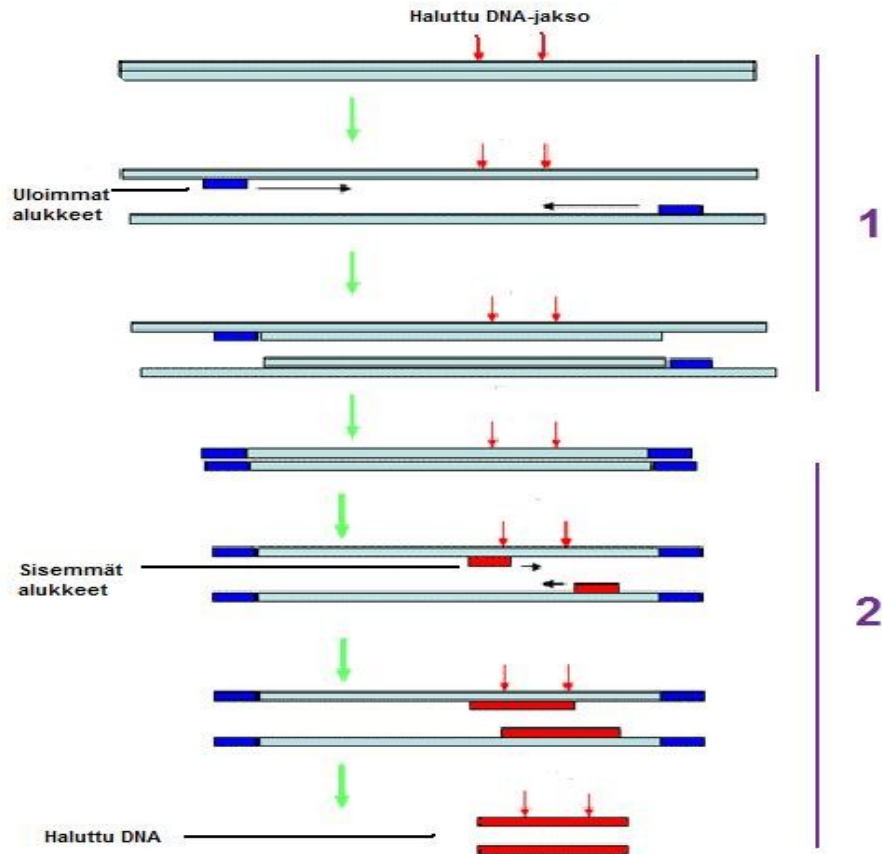
KUVIO 3. Projektin työtehtävät.

4.1 Polymeraasiketjureaktio

PCR:n eli polymeraasiketjureaktio, on samankaltainen prosessi kuin replikaatio luonnossa. Ennen PCR:n aloittamista tarvitaan alukkeet joiden avulla saadaan monistettua cDNA:sta juuri tiettyä DNA-jaksoa. Alukkeet on suunniteltava huolellisesti, jotta ne toimivat halutulla tavalla. Esimerkiksi emästen toistojaksot saattavat huonontaa alukkeen spesifisyyttä.

PCR:n avulla voidaan monistaa haluttua nukleiinihappojaksoa. Ainoa edellytys on se, että täytyy tuntea monistettavan jakson alku- ja loppupää. PCR:ää tehtäessä tärkeintä on hyvin lämpöä kestävä DNA-polymeraasi, joka ei inaktivoidu lähellä 100 astetta olevissa lämpötiloissa. Tähän tarkoitukseen sopivat hyvin kuumissa lähteissä elävien bakteerien DNA-polymeraasit. Toinen edellytys onnistuneelle reaktiolle on spesifisten alukkeiden käyttö. Yhtä DNA-jaksoa eristettäessä käytetään kahta aluketta, jotka tunnistavat halutun jakson molemmat päät. DNA-kaksoiskierre saadaan auki korkeassa lämpötilassa. Tällöin alukkeet pariutuvat juosteiden kanssa ja polymeraasientsyymi alkaa rakentaa uutta juostetta alukkeesta lähtien 3'-suuntaan (KUVIO 4). (Suominen & Ollikka 2004, 107.)

Käytettäessä kahta sisäkkäistä PCR-reaktiota puhutaan Nested-PCR:stä. Nested-PCR toimii käytännössä samalla tavoin kuin tavallinen PCR. Nested-PCR:ssä käytetään kuitenkin halutun DNA-jakson monistamiseen kahta eri alukeparia. Ensimmäisellä alukeparilla monistetaan DNA-jaksoa jota käytetään templaattina toisessa reaktiossa (KUVIO 4). Tässä tekniikassa on etuna se, että saadaan entistä tarkemmin rajattua tutkittava alue. Lisäksi varmistetaan, että saadaan juuri sitä tuotetta, mitä tarvitaan. Nested-PCR:ää käytetään silloin, kun oletetaan tai tiedetään, että tutkittavassa DNA:ssa on mahdollisesti useampia kohtia, joihin sopivat samat alukkeet. (Nested-PCR 2003, 1 - 2.)



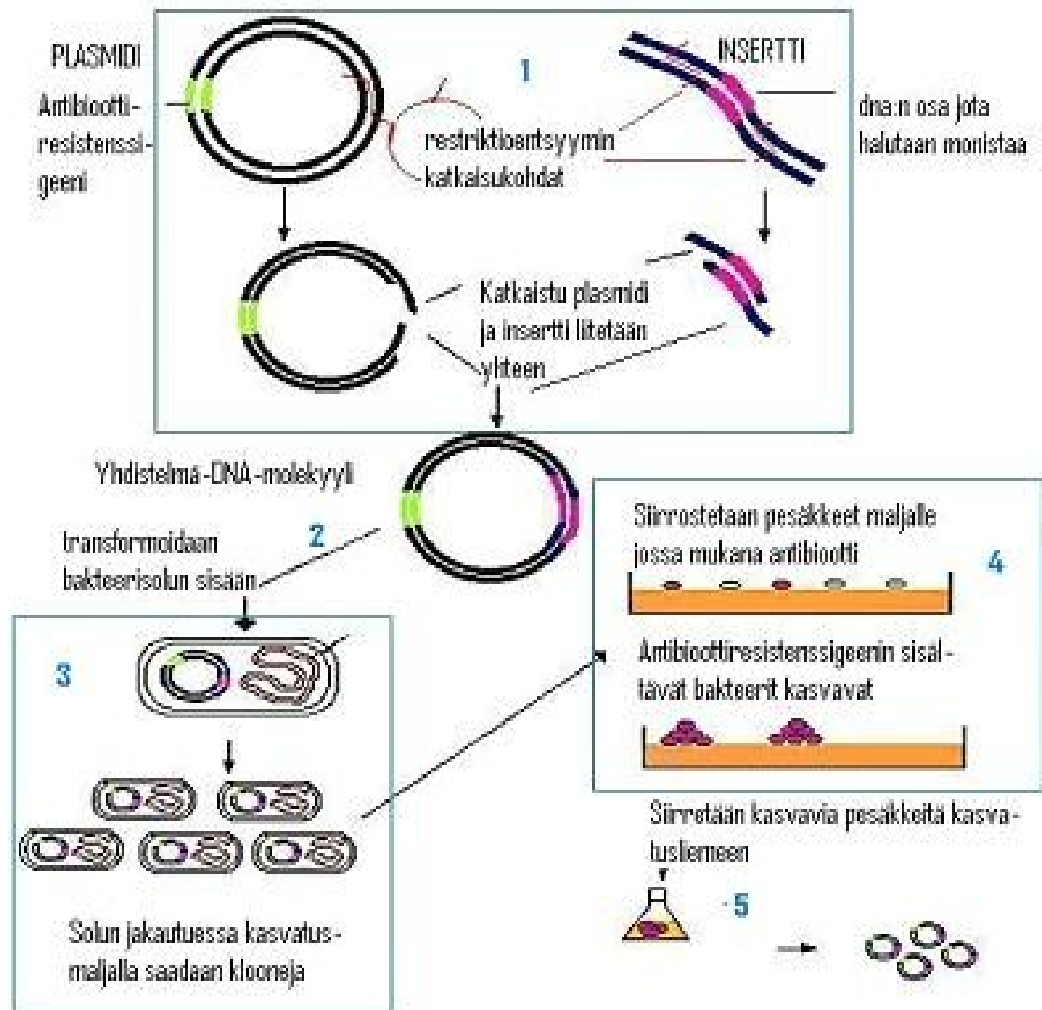
KUVIO 4. Nested-PCR.

Ensimmäisessä reaktiossa käytetään mallina cDNA:ta ja alukkeina uloimpia alukkeita. Toisessa reaktiossa käytetään mallina ensimmäisen reaktion tuotetta ja alukkeina sisempiä alukkeita. (PCRStation. Mukaellen.)

4.2 Kloonauksen avulla bakteerisolujen avulla

Kloonauksen avulla voidaan siirtää kohde-eliöstä eristetty geeni bakteerisoluuun. Bakteerisolun avulla voidaan monistaa haluttua geeniä (KUVIO 5). Bakteerisolujen avulla pystytään myös tuottamaan geenin koodittamaa proteiinia, jolloin saadaan parempi kuva geenin toiminnasta. Kloonauksessa käytetään bakteerisoluja joidenka toiminta tunnetaan hyvin. Kloonauksen avulla saadaan mahdollisuus tutkia geenin toimintaa hallitussa ja tunnetussa ympäristössä ilman alkuperäisen ympäristön aiheuttamia häiriöitä. (Suominen & Ollikka 2004, 63)

Ennen kloonauksen aloittamista on valmistettava kompetenttejä soluja. Kompetentit solut ovat soluja, joiden soluseinää on heikennetty niin, että ne ottavat herkemmin sisäänsä vierasta DNA:ta. Näitä soluja käytetään kloonaukseen sen jälkeen, kun on valmistettu yhdistelmä-DNA, eli plasmidi joka sisältää halutun DNA-jakson. Kompetentteja soluja saadaan käsittelemällä solut jääkylmällä kalsiumkloridilla (CaCl_2). Ohje kompetenttien solujen valmistamiseen löytyy liitteestä 4. (Niemi, M ym.1994, 117 – 120.)



KUVIO 5. Kloonaus bakteerisolujen avulla.

Kloonauksen työvaiheet: 1. digestiossa plasmidi ja insertti katkaistaan restriktioentsyymien avulla. 2. ligaatiossa plasmidi ja insertti liitetään yhteen ja saadaan yhdistelmä-DNA-molekyyl. 3. transformaatioissa yhdistelmä-DNA-molekyyl viedään bakteerisolun sisään. 4. Bakteereita kasvatetaan maljalla, joka sisältää antibiootin. Ainoastaan antibioottiresistenssigeenin sisältävän plasmidin sisäänsä ottaneet solut kasvavat. 5. Siirretään maljalla kasvanut pesäke kasvatusliemeen. Näin saadaan puhtasviljelmä, joka sisältää ainoastaan haluttua tuotetta sisältävää bakteeria. (Valattee 1997-2006. Mukaellen.)

Kloonauksen ensimmäinen vaihe on digestio. Digestiossa plasmidi-DNA ja monistettava DNA, jota kutsutaan insertiksi, katkaistaan kaupallisilla restriktioentsyymeillä. Katkaisussa käytetään entsyymeitä joiden avulla saadaan sekä plasmidi-DNA:han, että inserttiin päät, jotka sopivat yhteen liitosvaiheessa. Restriktioentsyymien luonnollinen tehtävä on hajottaa bakteeriin tunkeutuvaa virus-DNA:ta. Restriktioentsyymit katkaisevat DNA:n noin neljän emäksen mittaisen DNA-jakson kohdalta. Restriktioentsyymit tekevät DNA:han, joko kohessiiviset- tai tylpät päät. Kohessiivisissä päissä vastakkaiset DNA-juosteet eivät katkea samasta kohdasta vaan jäävät hieman eripituisiksi. Tylpät päät katkeavat samalta kohdalta ja ovat siksi tasaisia. Katkaisukohtat liitetään insertteihin PCR reaktiossa alukkeiden mukana. Kaupallisissa plasmideissa katkaisukohtat ovat valmiina. (Sambrook, J. & Russel, D.W. 2001, 1.19 – 1.24.)

Kloonauksen toisessa vaiheessa samalla restriktioentsyymillä katkaistut insertit ja plasmidit liitetään toisiinsa ligaasientsyymien avulla. Tätä vaihetta kutsutaan ligaatioksi. Ligaasientsyymi muodostaa DNA-palojen päiden välille kovalenttisen sidoksen kiinnittäen ne toisiinsa, kun plasmidia ja inserttiä inkuboidaan samassa liuoksessa. Restriktioentsyymien avulla saadut kohessiiviset päät liittyvät toisiinsa emäspariutumisen sääntöjen mukaisesti. Yhtenäiset nauhat saadaan kuitenkin vasta kun ligaasientsyymien avulla muodostetaan liitoskohtaan fosforiesterisidokset. Päiden kiinnittyttyä yhteen on yhdistelmä-DNA-molekyylit (rekombinantti-DNA-molekyylit) valmis (KUVIO 5). Ohje ligaation suorittamiseen löytyy liitteestä 6. (Sambrook, J. & Russel, D.W. 2001, 1.19 – 1.24.)

Ligaatiossa valmistettu yhdistelmä-DNA-molekyylit transformoidaan isäntäsolun sisään kloonauksen varten. Tätä vaihetta kutsutaan transformaatioksi. Isäntäsoluna kloonauksessa käytetään usein *E.coli*-bakteeria. *E.coli* ei luonnostaan päästä vierasta DNA:ta sisäänsä ja sen vuoksi bakteerisoluja heikennetään väliaikaisesti niin, että osa yhdistelmä-DNA-molekyyleistä läpäisee bakteerisolujen solukalvon. Jotkut bakteerisolut ottavat luonnostaan

sisäänsä vierasta DNA:ta. Tällöin hyödynnetään passiivista sisäänottoa. Bakteerisoluja, jotka ovat ottaneet yhdistelmä-DNA:n sisäänsä, kasvatetaan maljoilla ja näin saadaan jokaisen solunjakautumisen yhteydessä lisää haluttua tuotetta (KUVIO 5). Ohje transformaation suorittamiseen löytyy liitteestä 6. (Sambrook, J. & Russel, D.W. 2001, 1.19 – 1.24. Suominen & Ollikka 2004, 73 - 74)

4.3 DNA:n eristäminen ja puhdistus

Yleensä DNA:ta tutkittaessa on työn ensimmäinen vaihe DNA:n eristys ja puhdistus. Tämä on välttämätön työvaihe jos halutaan muokata, käsitellä tai analysoida DNA:ta. DNA:n saa eristettyä lähes mistä tahansa käytössä olevasta näytteestä, joka sisältää sitä edes vähän. Eristys ja puhdistus varmistavat sen, että käytössä on vain sitä tuotetta mitä halutaan käsitellä. Eristykseen ja puhdistukseen käytettävät tekniikat ovat hyvin samankaltaisia, koska molemmissa tarkoituksena on hajottaa ja poistaa tutkimusta häiritsevät proteiinit ja RNA.

DNA:n eristämiseen on olemassa nykyään paljon erilaisia kaupallisia reagenssisarjoja. Näissä reaktio perustuu usein siihen, että DNA sitoutuu silikakantajaan korkeassa ionivahvuudessa ja irtoaa siitä alhaisessa. Ensiksi näytteelle tehdään alkukäsittelyt RNA:n ja proteiinien hajottamiseksi. Tämän jälkeen DNA:ta sisältävään liuokseen pipetoidaan aineita joiden ansiosta saadaan liuokseen korkea ionivahvuus. Tällöin DNA sitoutuu silikakalvoon, kun taas liuos suodattuu kalvon läpi. Seuraavaksi kalvoa huuhdellaan erilaisilla pesuliuksilla, jotta saadaan mahdollisimman suuri osa proteiineista, RNA:sta ja muista solun osista poistettua. Tämä onnistuu, kun pesuliuos pakotetaan silikakalvon läpi sentrifugoimalla. Pesuliukset ovat yleensä etanolia sisältäviä puskureita joilla on korkea ionivahvuus. Näin varmistetaan se, että DNA ei irtoa silikakalvosta ennen kuin sen halutaan irtoavan. Lopuksi kalvolle pipetoidaan liuos, jossa on matala ionivahvuus. DNA irtoaa silikakalvosta liuoksen mukana. Tällä tekniikalla saadaan erittäin puhdasta DNA:ta. Ohjeet projektissa

käytettävistä DNA:n puhdistus- ja eristysmenetelmistä löytyy liitteistä 3.
(Suominen & Ollikka 2004, 64 - 65; DNeasy® Tissue Handbook 2002, 7.)

5 TYÖN SUORITTAMINEN

Ensimmäinen työvaihe oli alukkeiden suunnittelu. kloonattavan geenin sekvenssiä verrattiin geenipankissa samankaltaisiin sekvensseihin. Proteiineissa, joihin RecQ4-proteiiniä verrattiin, oli tunnettuja toiminnallisia osia. Näiden osien avulla voitiin päätellä missä tutkittavan proteiinin mahdolliset toiminnalliset osat sijaitsevat (KUVIO 6). Alukkeet eli kohdat joista geenin sekvenssi katkaistiin suunniteltiin niin, että mahdollinen toiminnallinen osa ei sijainnut katkaisukohtassa. Näiden tietojen lisäksi sekvenssiä tutkittiin ohjelmalla, joka rakentaa geenin todennäköisemmin muodostaman proteiinin. Molemmissa vertailuissa saatiin samankaltaisia tuloksia katkaisukohtien suunnitteluun. Helmut Pospiech suunnitteli alukkeet. Alukkeita tilattiin yhteensä kymmenen kappaletta (KUVIO 6). Kolme niistä oli ulommais PCR-reaktioita varten. Ulommais reaktioita oli yhteensä kaksi. Molemmissa reaktioissa käytettiin samaa aloitus aluketta. Näistä reaktioista toisesta tehtiin neljä sisempää reaktiota ja toisesta kaksi. Kaikissa sisemmissä reaktioissa käytettiin samaa aloitus aluketta.

PCR:n suorittaminen aloitettiin laimentamalla alukkeista sopivat käyttöliuokset. Tiedot reaktioliuoksista ja PCR-ohjelmista löytyy liitteistä 2. cDNA-kirjastot olivat kuivuneet. Kuivuneisiin cDNA-kirjastoihin lisättiin steriiliä vettä ennen kuin ne otettiin käyttöön. Reaktioissa käytetyt cDNA-kirjastot lytyvät liitteestä 2. PCR-reaktio oli kaksi vaiheinen. Ensimmäisen reaktion tuotteita käytettiin aloitus materiaalina toisessa reaktiossa. Agarosigeelianalyysillä ei näkynyt tuotetta ensimmäisten reaktioiden jälkeen. Negatiivisista tuloksista huolimatta kaikista näytteistä tehtiin sisemmät PCR-reaktiot. Sisemmistä PCR-reaktiosta saaduista tuotteista saatiin agarosigeelianalyysillä positiivinen tulos. Työhön otettiin mukaan vielä yksi tuore cDNA-kirjasto. Tälle DNA:lle tehtiin molemmat PCR-reaktiot ennen kuin jatkettiin seuraavaan vaiheeseen.

Kloonauksessa käytettiin *E.coli* HD5 α -kantaa. Syväjässä säilytettävät bakteerisolut sulatettiin. Bakteereita kasvatettiin + 37° C:sta. Vuorokauden jälkeen maljoilta siirrettiin pesäkkeitä SOB medium liuokseen. Bakteereita kasvatettiin + 18° C sekoittajassa kunnes optinen tiheys (OD) oli 0,5 aallonpituudella 600 nm. Ohje solujen käsittelyyn solukalvon heikentämiseksi on liitteessä 4. Kompetenttejä soluja testattiin transformoimalla solun sisään ampisilliiniresistenssigeenin sisältämä plasmidi. Maljoilla ei kasvanut haluttua määrää pesäkkeitä, mutta näitä soluja käytettiin kuitenkin jatkossa.

Kloonaus aloitettiin tekemällä digestio. Digestiossa plasmidi ja PCR-tuote katkaistiin BamH1 ja EcoR1 restriktioentsyymeillä. PCR-tuotteet puhdistettiin ennen digestion aloittamista (LIITE 3). Puhdistuksen jälkeen DNA:n määrän mittaamiseen tarkoitetulla spektrofotometrillä tarkistettiin, että DNA ei ole hävinnyt puhdistuksen aikana. Ohjeet Digestion tekemiseen on liitteessä 5. Digestion jälkeen plasmidi-DNA analysoitiin geelissä, josta se leikattiin irti ja puhdistettiin samalla kitillä, kuin PCR-tuotteet ennen digestiota (LIITE 3).

Digestion jälkeen suoritettiin ligaatio. Ligaatiossa plasmidi ja insertti kiinnitettiin toisiinsa ligaasientsyymien avulla. Ligaatiossa otettiin huomioon insertin ja

plasmidin koko reaktioon pipetoitavan näytteen määrässä. Ohje ligaation suorittamiseen on liitteessä 6.

Ligaation jälkeen suoritettiin transformaatio. Transformaatiossa oli huomioitava tuotteiden ja reagenssien lämpötilä. Transformaation ohje on liitteessä 6. Transformoiduista soluista siirrostettiin pesäkkeitä puhdasviljelmiksi sekä maljalle, että kasvatusliuokseen. Soluja kasvatettiin yön yli 37° C.

Kasvatuksen jälkeen DNA-eristettiin ja puhdistettiin liuoksista ja maljalta. Tulokset analysoitiin agarosigeelin avulla. Koko kloonaus toistettiin negatiivisten tulosten vuoksi. Toisessa kloonauksessa oli mukana myös tuoreesta cDNA-kirjastosta PCR:llä monistetut tuotteet.

Puhdasviljelmistä eristetystä DNA:sta tehtiin sekvensointireaktiot (Liite 7). Sekvensointi suoritettiin ABI Prism® 3100 - analysaattorilla. Sekvensointireaktiossa käytetään PCR-reaktion kaltaista ohjelmaa. Reaktioliuoksessa on tavallisten ddNTP:n lisäksi fluorensioivalla väriaineella leimattuja emäksiä. Reaktiossa uusi juoste rakentuu alukkeesta alkaen. Juosteen kasvaminen päättyy kun juosteeseen kiinnittyy leimattu emäs. Uusien juosteiden määrä reaktion edetessä kasvaa niin suureksi, että voidaan olettaa juosteen rakentumisen loppuvan ainakin kerran jokaisen juosteen emäksen kohdalla. Analysaattorissa eri pituiset DNA-jaksot kulkeutuvat polymeerissä eri vauhtia. Laitteessa on laser, joka virittää leimat ylemmälle energiatasolle leimatun emäksen saapuessa laserin kohdalle. Kun tämä energia purkautuu, laite rekisteröi vapautuneen energian määrän. Näin se tunnistaa jokaisen leiman erikseen ja kirjaa saamansa tulokset, esimerkiksi tietokoneelle, sitä mukaa kun eri pituiset eli eri vauhtia geelissä ajautuneet DNA-jaksot kulkevat laserin ohi.

6 TULOSTEN TARKASTELUA

Alukkeiden suunnittelu oli haastavaa. DNA haluttiin monistaa tietynlaisissa osissa jolloin vaihtoehtoja alukkeiden sijoittelulle ei jäänyt paljon. Kun halutaan saada tiettyä DNA-jaksoa monistettua täytyy alukkeiden olla spesifisiä tälle kohdalle koko genomissa. Alukkeiden suunnittelussa yritetään välttää niihin jääviä toistojaksoja (esim. CGCGCG tai AAAAA), koska tällaisia kohtia genomissa on yleensä useita. Työssä käytetyissä alukkeissa toistojaksoja oli. Alukkeet valittiin, vaikka riski oli tiedossa, koska DNA haluttiin monistaa tietynlaisissa osissa. Voi olla, että jo ensimmäisessä PCR-reaktiossa on monistunut väärää tuotetta, jolloin sisemmästä reaktiosta ei voida saada oikeaa tuotetta.

PCR-tuotteita valmistettiin useaan kertaan. PCR-reaktioiden olosuhteita muutettiin ja lisäksi reagenssivalmistaja vaihdettiin, kun otettiin käyttöön tuore cDNA-kirjasto. PCR-tuotteita analysoitaessa huomattiin, että suurimmassa osassa reaktioista oli saatu väärän kokoisia tuotteita. Ainoastaan Human cerebellum cDNA:sta saadut ensimmäisen vaiheen reaktion tuotteet olivat oikean kokoisia. Toisen vaiheen reaktioista ei saatu tuotetta ollenkaan, tai se oli väärän kokoista. PCR oli kaikkein ongelmallisin osuus koko työtä. Väärän kokoisista tuotteista voidaan päätellä, ettei PCR-reaktioilla valmistetut insertit olleet oikeita. Kuivuneiden cDNA-kirjastojen iästä ei ollut tietoa. Jos cDNA-kirjasto on vanhentunut tai kuivunut on mahdollista, että DNA on vahingoittunut. DNA on voinut hajota tai siinä on mahdollisesti ollut kontaminaatioita, jolloin tuote ei ole ollut oikea. Koska kuitenkin myös tuoreesta kirjastosta tehdyt tuotteet näyttivät vääriltä, on mahdollista, että oletettu väärä tuote johtui alukkeista.

Kloonauksessa käytetyt heikennetyt *E.coli* solut eivät kasvaneet odotetusti. Maljoilla kuitenkin kasvoi soluja, mikä tarkoittaa sitä että osa soluista oli ottanut insertin sisäänsä. Vaikka kasvutulos jäi maljoilla huomattavasti haluttua

pienemmäksi, niin osa heikennetyistä soluista oli toimivia. Bakteerisolun sisältä puhdistetut plasmidit näyttivät geelissä analysoitaessa oikean kokoisilta. Digestio oli kohtalaisen yksinkertainen ja helppo työvaihe. Digestio onnistui toisella kerralla, koska ensimmäisellä kerralla PCR tuotteet unohdettiin puhdistaa ennen digestion suorittamista. Digestiossa on joitain työvaiheita, joissa tietty lämpötila on erittäin tärkeä. Lämpötiloja tarkkailtiin huolellisesti ja ne pysyivät halutuissa lukemissa koko työvaiheiden ajan.

Ligaatio on reaktiona hyvin yksinkertainen suorittaa. Ainoastaan lämpötilojen seuranta vaatii tarkkaavaisuutta. Lämpötilat saatiin pidettyä hyvin kohdallaan reaktion erivaiheissa. Reagenssit voivat tässä työvaiheessa aiheuttaa virheitä, mutta ei ole mitään syytä epäillä etteikö ne olisi olleen täysin toimivia ja oikein säilytettyjä. Yhdistelmä-DNA-molekyylin koko varmistettiin geelissä analysoimalla. Analyysin perusteella voitiin päätellä, että molekyylien koot olivat useimmissa tapauksissa liian pienet. Tämä viittaa siihen, ettei PCR-tuote ollut kiinnittynyt plasmidiin.

Transformaatiossa työskenneltiin useissa eri lämpötiloissa. Lämpötiloja tarkkailtiin koko ajan aivan kuten muissakin kloonauksen työvaiheissa. Vaikka niiden kanssa oltiin todella huolellisia on kuitenkin mahdollista että ne eivät ole säilyneet haluttuna koko aikaa.

DNA:n puhdistus on helppoa kaupallisia kittejä käytettäessä. Kun ohjeita seuraa huolellisesti, pitäisi puhdistuksen onnistua. DNA:ta ei voi nähdä paljaalla silmällä, joten puhdistuksen aikana on vain luotettava siihen, että DNA ei ole hävinnyt näyteastiasta. Puhdistuksen jälkeen on hyvä varmistaa agarosigeelin avulla tai DNA:n mittauslaitteella, että tuote on vielä tallella, ennen kuin jatkaa työtä eteenpäin. Kahden puhdistuksen jälkeen DNA oli hävinnyt puhdistuksen aikana, tai sitä ei ollut alunperinkään olemassa. Tässä vaiheessa työn edellinen osuus toistettiin ja puhdistus sekä tarkistus suoritettiin uudelleen ennen kuin jatkettiin eteenpäin.

Sekvensointireaktio on vähän samankaltainen kuin PCR reaktio. Sekvensointireaktiossa DNA kopioituu alukkeesta alkaen. Uuden juosteen synteesi päättyy, kun juosteeseen kiinnittyy leimattu nukleotidi. Sekvensointireaktio toistuu sykleissä PCR-reaktion tapaan. Jokaisella syklillä uusien juosteiden määrä tuplaantuu edelliseen kierrokseen nähden. Juosteiden määrä on reaktion lopussa niin suuri, että voidaan olettaa juosteen rakennuksen päättyneen kerran jokaisen juosteen emäksen kohdalla. Analysaattorissa sekvensointireaktiotuotteet kulkevat polymeeriä sisältävissä kapillaareissa kohti kapillaarin päässä olevaa positiivista napaa. Eri kokoiset juosteet kulkevat kapillaarissa koko järjestyksessä, koska polymeeri hidastaa isoja kappaleita enemmän, kuin pieniä. Kapillaarin päässä ennen positiivista napaa on lasersäde, joka aktivoi leimatut nukleotidit. Leiman väri kertoo mikä emäs on kyseessä ja tulokset siirtyvät järjestyksessä tietokoneelle.

Sekvenssit ajettiin kaikista saaduista tuotteista. Suurimmassa osassa ei näkynyt DNA:ta ollenkaan ja niissä missä näkyi jotain tuote oli väärä. Liitteessä 8 on kuva DNA:ta sisältävän näytteen sekvenssisä, jossa on väärää tuotetta sekä sekvenssistä missä tuotetta ei ollut lähes ollenkaan.

7 POHDINTA

Projekti kokonaisuutena oli erittäin mielenkiintoinen ja haastava. Vaikka lopputulos ei ollut toivotun kaltainen, oppimisprosessina työ oli erittäin antoisa. Erilaisia työskentelytekniikoita oli useita ja niiden suorittamisesta sekä periaatteista sai työn edetessä kattavan kokonaiskuvan. Oli mielenkiintoista kokea näin ison kokonaisuuden suorittaminen alusta loppuun asti. Työvaiheiden järjestys sekä niiden merkitys kokonaisuuden onnistumiselle korostui työssä vastaan tulleiden ongelmien kautta. Oppimisen kannalta oli tärkeää nähdä kuinka eri ongelmatilanteissa toimittiin ja miten päästiin siirtymään seuraavaan vaiheeseen.

Alukkeiden suunnittelu oli vaikeaa. Oli mielenkiintoista nähdä kuinka suunnittelu etenee ja mitkä asiat vaikuttavat lopullisten alukkeiden valintaan. Samalla sain tutustua geenipankeista löytyviin kattaviin aineistoihin sekä mahdollisuuksiin, miten niitä voi käyttää hyödyksi.

PCR-reaktioiden teko oli minulle ennestään tuttua aikaisempien opintojeni ja työni vuoksi. En ole kuitenkaan ennen käyttänyt templaattina cDNA:ta ja olikin mielenkiintoista päästä kokeilemaan PCR:n suorittamista erilaisesta näytteestä. Sain tässä projektissa myös itse asentaa ohjelmat PCR-laitteeseen ja testata reaktioiden joidenkin vaiheiden lämpötilojen ja reagenssin määrän vaikutusta saatuun tulokseen.

Kloonauksen eri työvaiheiden kokonaisuuden hahmottaminen tuotti minulle aluksi vaikeuksia. Asiaan syventyminen kirjallisuuden ja ohjaajan avulla kuitenkin avasi prosessin eri vaiheiden merkitystä. Heikennetyt solut valmistettiin työn alkuvaiheessa. Tämän vuoksi työssä digestioon päästäessä piti palauttaa mieleen, että yksi tärkeä työvaihe on jo suoritettu ja jäsentää se osaksi kokonaisuutta. Digestio, ligaatio ja transformaatio sulautuivat laboratoriossa työskennellessä yhdeksi kokonaisuudeksi. Olen ajatellut

kloonauksen pitkänä, monia työvaiheita sisältävänä ja aikaa vievänä prosessina. Vaikka kloonaus olikin tarkkaavaisuutta vaativa kokonaisuus, olin yllättynyt siitä kuinka nopeasti eri vaiheet oli suoritettu. Eri vaiheiden vaihtelevien lämpötilojen vuoksi alkuvalmistelut oli tehtävä aina huolella. Oppimisen kannalta valmistelujen tekeminen oli hyvä asia, koska samalla joutui pohtimaan, mitä seuraavassa vaiheessa tapahtuu ja minkä vuoksi vaaditaan juuri tietty lämpötila. Kloonauksessa vaikeinta on se, että paljaalla silmällä ei voi nähdä onko työvaihe onnistunut. Pitää vain luottaa reaktion eri osien toimivuuteen ja uskoa että vaihe on onnistunut. Lopputuloksen kuitenkin näkee vasta, kun koko työ on suoritettu ja tuotetta tarkastellaan esimerkiksi sekvensoimalla.

DNA:n eristys ja puhdistus suoritettiin valmiiden puhdistukseen käytettävien reagenssisarjojen avulla. Vaikka reagenssit ovat valmiina ja ohjeet on erittäin yksityiskohtaiset, voi yksikin virhe aiheuttaa koko materiaalin häviämisen. Eri työvaiheissa käytettiin hieman eri puhdistusmenetelmiä riippuen siitä millaisesta materiaalista DNA haluttiin saada puhdistettua. Se selkeytti kuvaa siitä kokonaisuudesta miten herkkä materiaali DNA on ja kuinka tärkeää on saada kaikki ylimääräinen pois ennen seuraavaan vaiheeseen siirtymistä.

Sekvensointi reaktiona varsinkin nykyisillä analysaattoreilla on erittäin mielenkiintoista. Sekvensointia varten tehtiin sekvensointireaktio, mutta sekvensointi suoritettiin muualla, koska analysaattoria käyttää vain tietyt henkilöt. Olen kuitenkin käyttänyt aikaisemmassa työpaikassani ABI Prism® 3100 analysaattoria, joten sen toiminta ja tulosteiden tulkinta oli minulle ennestään tuttua. Ikävä kyllä tulosteet vahvistivat sen mikä jo olikin tiedossa. Eli työ ei ollut onnistunut halutulla tavalla ja oikeaa tuotetta ei saatu valmistettua. Kokonaisuudessa projekti oli kuitenkin haastava ja opettava joten oppimisen kannalta haluttu tulos saavutettiin.

LÄHTEET

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Watson, J. 1994. Molecular Biology of The Cell. New York:Garland Publishing.

Andy Vierstraete 2009. users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html

Bernard, R., Glick, Jack, J. & Pasternak. 1998. Molecular Biotechnology: Principales and Applications of Recombinant DNA. Washington: ASM Press.

Bioguiden. 2010. Viitattu 08.04.2011. <http://www.bioguiden.com/technology/molecular/75794.html>

Bio Techniques. 1996. Vol 21, No. 2. The procedure for the Rapid Isolation of Plasmid DNA.

Campbell, M. 1999. Biochemistry. Florida: Harcourt Brace & Company.

Campbell, N., Reece, J. & Mitchell, L. 1999. Biology. Canada: World Student Series.

DNA MikroBiologyGuide. 06/2011. Viitattu 04/2011. <http://dna.microbiology-guide.com/s/10002/pics/danreplicationfork.png&imgrefurl>.

Heino, J. & Vuento, M. 2002. Solubiologia. Porvoo: WSOY.

Högskolan dalarna. 09.07.2009. Viitattu 08.04.2011. http://wiki.du.se/index.php?title=Subjects/Medical_Science/Kurser/Medicinsk_baskurs%2C_anatomi_och_fysiologi/Ordlista_A%26F/

Kuopion yliopisto. 25.06.2008. Viitattu 02.10.2010. www.uku.fi.

Lim, D 1998. Microbiology. United States of America. WSB/McGraw-Hill.

Mahesh, M., Sangrithi, J., Bernal, M., Phillipott, A., Lee, J., Dumphy, W. & Venkitaraman, A.. 2005. Initiation of DNA Replication Requires the RECQL4 Protein Mutated in Rothmund-Thomson Syndrome. Cell numero 121, sivut 887 – 898. Elsevier inc.

Mustonen, R. & Salo, A. 2002. Säteily ja solu. STUK taitto. Viitattu 15.09.2010.
http://www.stuk.fi/julkaisut_maaraykset/kirjasarja/fi_FI/kirjasarja4/_files/12222632510021056/default/kirja4_luku2.pdf

Nested-PCR 2003. The Biology Davidson Apartment. Viitattu 02.05.2009.
www.bio.davidson.edu/courses/genomics/method/nestedPCR.html.

Niemi, M., Virtanen, I. & Vuorio, E. 1994. Solu- ja Molekyylibiologia. Porvoo: WSOY:n graafiset laitokset.

NucleoSpin® Plasmid. 2002. Plasmid DNA Purification. Rev 3. MACHEREY-NAGEL.

PCR Station. 2007. www.pcrstation.com.

QIAquick® Spin Handbook. 2001. For QIAquick PCR Purification Kit, QIAquick Nukleotide Removal Kit, QIAquick Gel Extraction Kit. QIAGEN.

Sambrook, J. & Russel, D.W. 2001. Molecular cloning volume 1: A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Schurman, S., Hedayati, M., Wang, Z., Singh, D., Speina, E., Zhang, Y., Becker, K., Macris, M., Sung, P., Wilson, D., Croteau, D. & Bohr, V. 2009. Direct and indirect roles of RECQL4 in modulating base excision repair capacity. Vol 18, nro. 18. Human Molecular Genetics.

Suominen, I. & Ollikka, P. 2004. Yhdistelmä-DNA-tekniikan perusteet. Helsinki: Hakapaino.

Thangavel, S., Mendoza-Maldano, R., Tissino, E., Sidorova, J., Yin, J., Wang, W., Monnat, R., Falaschi, A. & Vindigni, A. 2010. Human RecQ4 Helicases Play Distinct Roles in DNA Replication Initiation. *Molecular and Cellular Biology*, sivut 1382 - 1396. American Society for Microbiology.

Valattea 1997-2006. Tutti i diritti riservati.
www.valattea.net/spaw/image/biologia/plasmide1.JPG.

Winter, P., Hickey, I. & Fletcher, H. 2006. *Instant Notes in Genetics*. UK; Taylor & Francis.

LIUOSTEN VALMISTUS OHJEET**SOB medium**

Valmistetaan 1 litra 2X liuosta

20 g tryptoni + 5 g hiivauute + 0,5 g natriumkloridi + 2,5 ml 1 M kaliumkloridi.
Liuotetaan 990 ml steriiliä vettä. Valmis liuos autoklavoidaan.

MgSO₄

Valmistetaan 100 ml 1M MgSO₄.

Liuotetaan 24,64 g kiinteää MgSO₄ (7kidevettä) 100 ml steriiliä vettä ja autoklavoidaan liuos.

TB/HEPES + DMSO

Valmistetaan 1 litra liuosta.

2,385 g Hepes + 3 ml 1 M kalsiumkloridi + 18,640 g kaliumkloridi. Liuotetaan noin 900 ml steriiliä vettä. Säädetään pH KOH:lla 6,7.

pH:n säätämisen jälkeen lisätään liuokseen 10,885 g Mangaanikloridia, jonka jälkeen säädetään liuoksen tilavuus 1 litraan steriilillä vedellä. Liuos suodatetaan ruiskusuodattimella 0,2 mikrometrin filterillä.

PCR REAKTIOLIUKOKSET JA OHJELMAT

PCR-reaktio-ohjelma

Reaktion vaihe	Lämpötila	Aika	Syklien määrä
Denaturaatio	94 °C	3 min	1
Denaturaatio	94 °C	30 s	30
Annealing	63 °C	30 s	30
Extension	72 °C	2 min pitkä reaktio 1 min lyhyt reaktio	30
Extension loppu		10 min	1

PCR-reaktioliuokset

Reagenssi	Pitoisuus liuoksessa
Puskuri	1X
DNTPs	0,2 mM
Primer 1	0,4 µM
Primer 2	0,4 µM
Näyte	1 µL /50 ml liuokseen
Polymeraasientsyymi	1,25 U
H2O	Sen verran että haluttu tilavuus saavutetaan

PCR-reaktioihin käytettiin seitsemää kuivunutta ja yhtä tuoretta cDNA-kirjastoa. Reaktiot suoritettiin yhteensä neljästä eri templaattista. Kahdessa ensimmäisessä reaktiossa kirjastoja yhdisteltiin DNA:n määrän maksimoimiseksi. Alla on esitetty mitä kussakin reaktiossa käytettiin templaattina.

1 reaktio: HUT 78 + CEM

2 reaktio: Human liver + HeLa + Placenta + Thymus

3 reaktio: Human spleen

4 reaktio: Human cerebellum (tuore cDNA-kirjasto)

DNA:N PUHDISTUS

PLASMIDI-DNA:N PUHDISTUS 1

(Suomennettu Benchmarksin ohjeesta)

- Siirretään yksi bakteeipesäke kasvatusmaljalta 1,5 ml TB-liuosta, 10 ml kasvatusputkeen. Kasvatetaan 37 °C 12-18 tuntia. Pidetään reagenssiastia ravistajassa koko ajan.
- Sentrifugoidaan solut 14000 x g 2 min.
- Poistetaan supernatantti putkesta ja liuotetaan sakka 100 µl GTE puskuria. Inkuboidaan huoneenlämmössä 5 min.
- Siirretään bakteerisakka + GTE-puskuri jäille. Lisätään 200 µl juuri valmistettua SDS-liuosta. Sekoitetaan kääntelemällä ja inkuboidaan jäillä 5 min.
- Neutralisoidaan seos lisäämällä 150 µl 3 M natriumasetaattia, pH 4,8. Sekoitetaan kääntelemällä. Inkuboidaan jäillä 5 min.
- Sentrifugoidaan seosta 14000 x g 10 min fuugissa joka on jäähdytetty 4 °C. Siirretään supernatantti putkesta puhtaaseen mikrosentrifuugiputkeen.
- Lisätään supernatantin joukkoon 145 µl 40 % PEG-6000 liuosta. Inkuboidaan jäillä 10 min.
- Sentrifugoidaan liuosta 14000 x g 10 min fuugissa joka on jäähdytetty 4 °C.
- Pipetoidaan supernatantti putkesta.
- Liuotetaan DNA-sakka 100 µl steriiliä vettä. Lisätään 100 µl 5,5 M LiCl-liuosta ja inkuboidaan jäillä 10 min.

- Sentrifugoidaan liuosta 14000 x g 10 min fuugissa joka on jäädytetty 4 °C. Siirretään supernatantti puhtaaseen mikrosentrifuugiputkeen.
- Lisätään 0,6 tilavuutta putkessa olevasta liuksesta isopropanolia. Inkuboidaan 10 min huoneen lämmössä.
- Sentrifugoidaan liuosta 14000 x g 10 min sentrifuugissa joka on jäädytetty 4 °C. Poistetaan putkesta supernatantti.
- Kaadetaan DNA-sakan päälle 500 µl kylmää 70 % etanolia. Kuivataan sakkaa tyhjiössä 5 min.
- Liuotetaan sakka 20 µl TE puskuria. Varmistetaan, että näytteessä on DNA:ta analysoimalla osa siitä agarosigeelissä.

PLASMIDI-DNA:N PUHDISTUS 2

(Suomennettu NukleoSpin® ohjeesta)

- Sentrifugoidaan 1-5 ml LB kasvatusliuosta eppendorffputkessa 11 000 x g 30s. Poistetaan putkesta liuos mahdollisimman tarkasti.
- Lisätään 250 µl puskuria A1. Liuotetaan sakka puskuriin vorteksoimalla seosta.
- Lisätään 250 µl puskuria A2. Sekoitetaan putkea varovasti kääntelemällä 6-8 kertaa. Inkuboidaan huoneen lämmössä enintään 5 min.
- Lisätään putkeen 300 µl puskuria A3. Sekoitetaan varovasti kääntelemällä kuten edellä.
- Sentrifugoidaan 11000 x g 10 min.
- Asetetaan suodatinosa 2 ml keräysputkeen. Pipetoidaan edellisessä vaiheessa saatu liuos suodattimen päälle ja sentrifugoidaan 11000 x g 1 min. Keräysputki liuoksineen laitetaan pois ja asetetaan suodatin uuteen keräysputkeen.
- Pipetoidaan suodattimelle 600 µl puskuria A4 (mihin on lisätty etanoli). Sentrifugoidaan 11000 x g 1 min. Kaadetaan liuos pois.
- Kuivataan suodatin asettamalla se keräysputken päälle ja sentrifugoimalla 11000 x g 2 min.
- Keräysputki poistetaan ja asetetaan suodatin eppendorffputken päälle. Lisätään suodattimelle 50 µl puskuria AE. Inkuboidaan huoneenlämmössä 1 min. Sentrifugoidaan 11000 x g 1 min. DNA irtoaa suodattimesta puskurin mukana. Suodatin voidaan hävittää ja DNA säilytetään eppendorffputkessa.

PCR TUOTTEIDEN PUHDISTUS

(Suomennettu QIAquick Purification Kit Protocol ohjeesta)

- Lisätään 5 tilavuutta PB-puskuria yhtä tilavuutta PCR-tuotetta kohti. Sekoitetaan eppendorfputkessa.
- Asetetaan suodatin keräysputken päälle ja pipetoidaan edellisessä vaiheessa saatu liuos suodattimelle. Sentrifugoidaan 10000 x g 30-60 s. Kaadetaan keräysputkesta liuos pois ja asetetaan suodatin uudelleen sen päälle.
- Pipetoidaan 750 µl PE-puskuria suodattimelle ja sentrifugoidaan 30-60 s. Kaadetaan liuos pois keräysputkesta ja asetetaan suodatin uudelleen sen päälle.
- Sentrifugoidaan uudelleen 1 min täydellä nopeudella.
- Asetetaan suodatin 1,5 ml puhtaaseen eppendorfputkeen. Lisätään 50 µl EB-puskuria suodattimelle. Sentrifugoidaan täydellä nopeudella 1 min. Lisätään fuugauksen jälkeen vielä 30 µl EB-puskuria suodattimelle ja sentrifugoidaan uudelleen. DNA on irronnut suodattimessa ja on puskurissa eppendorfputkessa.

DNA:N PUHDISTUS GEELISTÄ

(Suomennettu QIAquick Gel Extraction Kit Protocol ohjeesta)

- Leikataan DNA geelistä puhtaalla veitsellä.
- Punnitaan saatu geelin pala ja lisätään 3 tilavuutta QG-puskuria yhtä tilavuutta geeliä kohti (100 mg = 100 ml).
- Inkuboidaan 50 ° C 10 min, tai kunnes geeli on liuennut puskuriin. Liukenemista voidaan nopeuttaa vorteksoimalla seosta välillä. Liuotuksen jälkeen varmistetaan, että seos on keltaista.
- Lisätään seokseen 1 tilavuus isopropanolia. Pipetoidaan liuos suodattimelle, joka on asetettu 2 ml keräysputken päälle. Sentrifugoidaan 10000 x g 1 min. Jos kaikki liuos ei mahdu kerralla suodattimelle, tyhjennetään keräysputki välillä ja pipetoidaan lisää liuosta suodattimelle. Fuugaus toistetaan kunnes kaikki liuos on saatu suodatettua samalla suodattimella.
- Tyhjennetään keräysputki ja pipetoidaan suodattimelle 500 µl QG-puskuria. Sentrifugoidaan 10000 x g 1 min.
- Tyhjennetään keräysputki ja pipetoidaan suodattimelle 750 µl PE-puskuria. Inkuboidaan 2-5 min. Sentrifugoidaan 10000 x g 1 min.
- Tyhjennetään keräysputki ja fuugataan 1 min, jotta saadaan suodatin kuivattua.
- Asetetaan suodatin 1,5 ml puhtaaseen eppendorffputkeen ja pipetoidaan suodattimelle 50 µl EB-puskuria. Sentrifugoidaan 1 min täydellä nopeudella.
- DNA on siirtynyt puskurin mukana eppendorffputkeen ja suodatin voidaan heittää pois.

KOMPETENTTIEN SOLUJEN VALMISTUS

- Litran erlenmeyeriin mitataan 250 ml SOB medium liuosta. Kaadetaan SOB medium liuoksen sekaan 2,5 ml MgSO₄- liuosta.
- Bunsenliekissä desinfioidulla siirtosilmukalla siirrostetaan bakteereja kasvatusmaljalta kolmen ison pesäkkeen ryhmä SOB liuokseen.
- Laitetaan foliolla peitetty erlenmeyer sekoittajaan joka on + 18 °C. Kasvatetaan kunnes OD on 0,6.
- Seuraavissa työvaiheissa on ehdottoman tärkeää muistaa kylmässä työskentely!
- Valmistetaan liuos, joka sisältää 20 ml TB/Hepesiä ja 1,5 ml DMSO-liuosta. Tämän lisäksi viedään kaikki tarvittavat välineet kylmään, jotta ne ovat jäähtyneet työn alkaessa.
- + 18° C kasvamassa ollut SOB medium liuos jaetaan kahteen putkeen, kun haluttu OD on saavutettu.
- Sentrifugoidaan putket esijäähdytetyssä fuugissa (+4 C) 10 min 3700 rpm. Liuos kuljetetaan välimatkat jääastiassa.
- Sentrifugoinnin jälkeen poistetaan liuos putkista mahdollisimman tarkasti, niin että jäljelle jää vain sakka.
- Lisätää putkiin yhteensä 85 ml TB/Hebes liuosta. Liuotetaan sakka ja yhdistetään saadut seokset yhteen putkeen. Putkea pidetään 10 min jäitä sisältävässä astiassa, minkä jälkeen sentrifugoidaan esijäähdytetyssä fuugissa (+4 C) 10 min 3700 rpm. Putket kuljetetaan välimatkat jääastiassa..
- Sentrifugoinnin jälkeen poistetaan neste pullosta ja lisätään aikaisemmin valmistettu TB/Hebes + DMSO-liuos. Pidetään jäissä 10 min.

- Jaetaan liuos eppendorf putkiin 500 µl kuhunkin ja jäädytetään putket nestetyypellä.

DIGESTIO**Digestio plasmidi-DNA:lle**

Reaktion kokonaistilavuus on 20 µl.

Reagenssi	Reaktioon määrä	tarvittava	Reaktiossa määrä	käytetty
DNA	1000 ng plasmidi-DNA:ta		Tarvittava lasketaan laitteen tulosten perusteella	määrä nanodrop antamien
Puskuri	2 x Tango		4 µl	10 x Tango
Vektori 1	10 U EcoR1		1 µl	
Vektori 2	10 U BamH1		1 µl	
Vesi	H ₂ O		Steriiliä vettä haluttu saavutetaan	niin että tilavuus

- Inkuboidaan reaktioliuosta 37 ° C 2-3 tuntia.
- Lisätään 1 µl CIAP:tä (Calf intestinal alkaline phosphatase). Inkuboidaan +37 ° C 30 min.
- Pidetään seosta +80 ° C 20 min.
- Analysoidaan agarosigeelissä ja puhdistetaan DNA agarosigeelistä leikatuista palasista.

Digestio PCR-reaktiotuotteille

PCR-tuotteiden digestiossa käytetään koko PCR-reaktiosta saatu tuote sekä restriktioentsyymeitä ja puskuria samassa suhteessa kuin plasmidi-DNA digestiossa.

Reagenssi	Reaktiossa käytetty reagenssin määrä
DNA	50 µl
10 x Tango	12,5 µl
EcoR1	1 µl
BamH1	1 µl

- Inkuboidaan reaktioliuosta 37 ° C 2-3 tuntia.
- Annetaa seoksen olla +80 ° vesihauteessa C 20 min.
- Analysoidaan agarosigeelissä ja puhdistetaan DNA geelistä.

LIGAATIO JA TRANSFORMAATIO

Ligaatio

Ligaatiossa reagenssit pipetoidaan seuraavassa järjestyksessä: plasmidi, insertti, vesi, puskuri ja viimeisenä ligaasientsyymi. Reaktiot tehdään eppendorffputkissa. Kun kaikki reagenssit on pipetoitu putkiin, niitä pidetään 2 tuntia vesihauteessa jonka lämpötila on 22 ° C. Käytetään suljettavaa styroksi astiaa, jotta lämpötila pysyy vakiona. Vesihauteesta reaktioliuokset siirretään 10 minuutiksi 60 ° C. Tämän jälkeen reaktio on valmis.

Transformaatio

Transformaatiossa reaktioputket pitää olla jäähdytetty ennen aloitusta.

- Pipetoidaan 5 µl ligaatioreaktiotuotetta esijäähdytettyyn, jäällä olevaan eppendorffputkeen. Lisätään 100 µl kompetentteja soluja ja inkuboidaan 30 min jäissä.
- Eppendorffputket siirretään +42 ° C vesihauteeseen. Annetaan olla tässä lämpötilassa tasan 2 min.
- Otetaan eppendorffputket hauteesta ja lisätään niihin 1 ml LB mediumia. Inkuboidaan +37 ° C 30-60 min.
- Viljellään 100 µl reaktioseosta LB-maljalle. Sentrifugoidaan loppu liuos. Sentrifugoinnin jälkeen pipetoidaan seoksen kokonaistilavuudesta 900 µl pois. Eppendorffputkeen jäljelle jäänyt seos kasvatusaljalle.
- Kasvatetaan maljoja yön yli +37 ° C.

SEKVENSOINTIREAKTIOT

Sekvensointireaktiot tehdään tässä projektissa transformoiduista soluista. Soluista puhdistetaan DNA-puhdistusreaktioiden liitteen 5 mukaan. Tämä DNA toimii templaattina sekvensointireaktiossa. Alukkeina reaktiossa käytetään niitä alukkeita joilla PCR reaktiot on alunperin tehty.

Reagenssi	Tarvittava määrä reaktiossa jonka kokonaistilavuus on 10 µl
Malli-DNA	100 – 300 ng
Aluke 1	2 pmol/µl
Aluke 2	2 pmol/µl
Premix (sisältää entsyymin, puskurin, dNTP:t ja leiman)	2 µl
H ₂ O	Niin paljon että saavutetaan haluttu kokonaistilavuus

Sekvensointireaktoituotteiden käsittely ennen analysointia:

- Lisää 30 µl steriiliä vettä ja 60 µl 100% etanolia jokaiseen PCR reaktiotuotteeseen.
- Peitä PCR-tuotteet, vettä ja etanolin sisältävät PCR levyt huolellisesti ja sekoita kääntämällä ylösalaisin muutaman kerran.
- Jätä huoneenlämpöön seisomaan vähintään 15 min.
- Sentrifugoi PCR levyä 2000 x g, 45 minutes.
- Posta supernatantti levyn kuopista kääntämällä levy ylösalaisin lavuaarin päällä.
- Aseta PCR-levy, joka sisältää sekvensointireaktiotuotteet sakkana, sentrifuugiin väärinpäin käsipyyhkeen päälle ja fuugaa 700 x g. Kun fuugia saavuttaa halutun nopeuden, pysäytä fuugi välittömästi.

ABI Prism® 3100 - analyssaattorilla saadut sekvenssit

Kolme erimerkki kuvaa sekvensseistä, joita ABI Prism® 3100 - analyssaattorilla saatiin kloonauksen lopputuotteista. Sekvenssiä luetaan ABI PRISM merkin alta lähtöisin vasemmalta oikealle rivi kerrallaan.

Kuvassa 1 on oikea aluke noin 120 emäksen kohdalla. Siitä eteenpäin sekvenssi on väärää. Tuotteesta erottuu pääsekvenssi kohtalaisen selvästi, vaikka taustahälyksi kutsuttua epäpuhtautta on aika paljon.

Kuvassa 2 on siisti sekvenssi jonka kuvaaja näyttää juuri siltä mitä haetaan. Tuote on kuitenkin väärää tässäkin tapauksessa.

Kuvassa 3 on erittäin epäpuhdas sekvenssi ja tuotetta ei ole juuri lainkaan. Tällaisia oli suurin osa sekvensseistä.

