



Leena Keskitalo

**HYBRIDOOMASOLUN SISÄLTÄMÄN VASTA-AINEGEEININ
MONISTAMINEN JA KLOONAAMINEN
SEKVENSOINTIVEKTORIIN**

**HYBRIDOOMASOLUN SISÄLTÄMÄN VASTA-AINEGEENIN
MONISTAMINEN JA KLOONAAMINEN
SEKVENSOINTIVEKTORIIN**

Leena Keskitalo
Opinnäytetyö
Syksy 2011
Laboratorioalan koulutusohjelma
Oulun seudun ammattikorkeakoulu

TIIVISTELMÄ

Oulun seudun ammattikorkeakoulu
Laboratorioalan koulutusohjelma, Bioteknologian suuntautumisvaihtoehto

Tekijä(t): Leena Keskitalo

Opinnäytetyön nimi: Hybridoomasolun sisältämän vasta-ainegeenin monistaminen ja kloonaaaminen sekvensointivektoriin

Työn ohjaaja(t): Elsa Kumpulainen, Johanna Veijola

Työn valmistuslukukausi ja -vuosi: syksy 2011 Sivumäärä: 67 + 13 liitettä

Työn tavoitteena oli monistaa hybridoomasolun sisältämä vasta-aineen geeni ja siirtää se sekvensointivektoriin. Hybridooma on fuusiosolu, jossa on yhdistetty immunisoidun hiiren pernan vasta-ainetta tuottava solu sekä ATCC-solupankista ostettu syöpäsolukanta, joka on hiiren pernan lymfoomasyöpäsolulinja.

pShuttle-CMV-tuottovektori, johon monistettu ja muokattu vasta-ainegeeni voidaan siirtää, valmistettiin ensin. Seuraavaksi tuotettiin tarvittava määrä nisäkässolumateriaalia, josta eristettiin totaali-RNA. Eristettyä RNA:ta käytettiin materiaalina cDNA-synteesissä, jonka jälkeen tehtiin PCR I ja II -monistuskerrokset. Vasta-ainegeenin monistuksessa monistetaan aina erikseen sekä kevyt että raskas ketju. Molempiin käytetään siis omia alukkeita ja niille tehdään omat cDNA-synteesit ja PCR-reaktiot. Monistettu geeni siirrettiin kaupalliseen sekvensointivektoriin, varmistettiin siirron onnistuminen testidigestiolla ja pesäke-PCR:llä sekä vietiin vektoriin siirretty geeni sekvensoitavaksi.

pShuttle-CMV-tuottovektorin valmistus onnistui ja vasta-ainegeeni-insertin siirto sekvensointivektoriin todennettiin. Opinnäytetyö suoritettiin Oulun yliopiston, Biolääketieteen laitoksen fysiologian yksikössä. Työ liittyy laajempaan Biocenter Oulun EAKR-hankkeeseen ”Biopalvelut kilpailukykyisiksi tuotteiksi”, jossa kehitetään menetelmiä ja työskentely-ympäristöjä palvelemaan entistä paremmin terveys- ja hyvinvointialan sekä bioalan tutkimuslaitoksia ja yrittäjiä.

Asiasanat: vasta-aine, hybridooma, nisäkässoluviljely

SISÄLLYS

TIIVISTELMÄ	3
1. JOHDANTO	6
2. VASTA-AINEET	7
2.1 Vasta-aineet ja niiden rakenne	7
2.2 Polyklonaaliset vasta-aineet ja niiden tuottaminen	8
2.3 Monoklonaaliset vasta-aineet ja niiden tuottaminen	9
2.4 Vasta-aineiden käyttö	10
3.4.1 Immunologiset määrittämenetelmät	11
3.4.2 Immunokemialliset menetelmät	13
3.4.3 Vasta-aineiden terapeuttinen käyttö	13
3. NISÄKÄSSOLUVILJELY	14
3.1 Nisäkässoluviljelyn välineet	14
3.2 Aseptinen työskentely	16
3.3 Soluviljelyn liuokset	17
3.4 Solujen rutiinikasvatus	18
4. GEENITEKNISE T MENETELMÄT	20
4.1 Tuottoplasmidin valmistuksessa käytettävät menetelmät	20
5.1.1 Transformaatio	20
5.1.2 Kloonauk bakteeriviljelmässä	21
5.1.3 Plasmidi-DNA:n eristys	21
5.1.4 Digestio	21
5.1.5 Agarosigeelielektroforeesi (AGE)	22
5.1.6 Ligaatio	22
4.2 Vasta-ainegeenin monistuksessa käytettävät menetelmät	22
5.2.1 Kokonais-RNA:n eristys	23
5.2.2 cDNA-synteesi	23
5.2.3 Polymeerasiketjureaktio (PCR)	24
5.2.4 Sekvensointi	26
5. KOKEELLINEN OSUUS	28
5.1 pShuttle-CMV-tuottovektorin valmistus	28
6.1.1 Plasmidin Transformaatio <i>Escherichia coli</i> -soluihin	28

6.1.2 Kloonien kasvatus	28
6.1.3 Dna:n eristys kloonikasvustoista	29
6.1.4 Kloonien testidigestio	29
6.1.5 Herätekasvatus	30
6.1.6 Plasmidin eristys	30
6.1.7 Testidigestio.....	32
6.1.8 Preparatiivinen digestio.....	32
6.1.9 DNA:n eristys geelipaloista	34
6.1.10 Vektorin puhdistuksen todentaminen testiligaatiolla	35
6.1.11 Ligatoitujen vektorien transformaatio	36
6.1.12 Vektorin uudelleen valmistus	37
5.2 Solumateriaalin kasvatus ja käsittely.....	38
5.3 RNA:n eristys	39
5.4 cDNA-synteesi	40
5.5 PCR-monistukset.....	40
5.6 Geeni-insertin siirto sekvensointivektoriin	44
5.7 Geeni-insertin todentaminen.....	44
5.8 Sekvensointi	49
6. TULOKSET JA TULOSTEN TARKASTELU	50
6.1 Tuottovektorin valmistus	50
6.2 Solumateriaalin kasvatus ja käsittely.....	55
6.3 RNA:n eristys ja cDNA-synteesi.....	55
6.4 PCR-monistus	55
6.5 Geeni-insertin siirto ja todentaminen.....	57
6.6 Sekvensointi	61
7. POHDINTA	63
LÄHTEET	66
LIITTEET	68

1. JOHDANTO

Vasta-aineet ovat erittäin tärkeä osa organismien immuunipuolustuksesta, joka on kehittynyt suojelemaan organismeja patogeeneiltä. Rakenteeltaan Y-kirjaimen muotoiset vasta-aineet kiinnittyvät antigeeneihin spesifisesti reseptoriensa avulla. Spesifisyytensä asiosta vasta-aineita voidaan hyödyntää tutkimuksessa ja diagnostiikassa. (Kindt – Goldsby – Osborne 2007, 1, 76; Kumpulainen 2011.)

Tuotetut vasta-aineet voivat olla poly- tai monoklonaalisia. Polyklonaalinen vasta-aine on heterogeeninen kokoelma vasta-aineita, jotka ovat muodostuneet antigeenin eri epitooppien vaikutuksesta. Monoklonaalinen vasta-aine on koostumukseltaan homogeeninen. Se sisältää vain yhteen, samanlaiseen epitooppiin sitoutuvaa vasta-ainetta. Monoklonaalisia vasta-aineita voidaan tuottaa hiiren hybridoomasoluilla, jotka ovat fuusiosoluja. (Kindt ym. 2007 105–106; Aittomäki – Eerikäinen – Leisola – Ojamo – Suominen – von Weymarn 2002, 104.)

Hybridoomasoluja kasvatetaan soluviljelyllä. Nisäkässolujen kasvatus on teknisesti vaativampaa kuin bakteerien viljely. Käytössä täytyy olla nisäkässoluviljelyyn tarkoitettut laitteet, välineet ja liuokset. Erittäin tärkeää on myös noudattaa aseptisen työskentelyn ohjeita. (Höyhty 1999.)

Työn tavoitteena oli kasvattaa valittua hybridoomasolulinjaa, monistaa solujen sisältämät vasta-ainegeenit, siirtää ne ns. PCR-vektoriin sekvensointia varten sekä valmistaa nisäkässolun tuottovektori, johon monistetut vasta-ainegeenit voidaan myöhemmin siirtää.

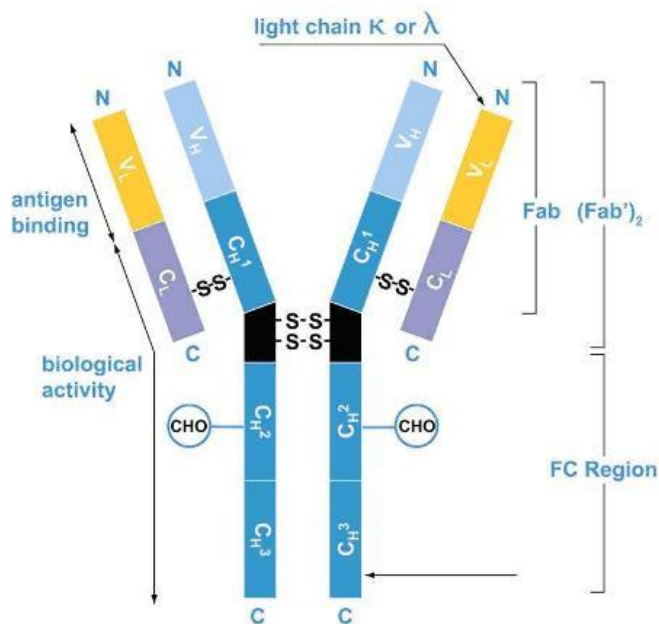
Opinnäytetyö suoritettiin Oulun yliopiston, Biolääketieteen laitoksen fysiologian yksikössä. Työ liittyy laajempaan Biocenter Oulun EAKR-hankkeeseen ”Biopalvelut kilpailukykyisiksi tuotteiksi”, jossa kehitetään menetelmiä ja työskentely-ympäristöjä palvelemaan entistä paremmin terveys- ja hyvinvointi- sekä bioalan tutkimuslaitoksia ja yrittäjiä.

2. VASTA-AINEET

Vasta-aineet ovat proteiineja, joita kutsutaan myös immunoglobuliineiksi (Ig). Niitä muodostuu selkärankaisten vereen ja eritteisiin, kun jokin antigeeni aktivoi B-solujen vasta-ainetuotannon. B-solu aktivoituu, kun antigeeni sitoutuu solun pinnalla olevien vasta-aineiden reseptoreihin. Lisäksi tarvitaan T-auttajasolujen stimulaatiota. Kun B-solu on aktivoitunut, se alkaa joko tuottaa suuria määriä vasta-aineita tai siitä erilaistuu muistisolu. Vasta-aineen ja antigeenin sitoutumiskohta on spesifinen ja sidos melko pysyvä, vaikka se ei ole kovalenttinen. (Kumpulainen 2011.)

2.1 Vasta-aineet ja niiden rakenne

Vasta-aineiden tyypillinen rakenne muodostuu neljästä peptidiketjusta, kuten esitetään kuvassa 1. Rakenne sisältää kaksi kevyttä (light) ketjua ja kaksi raskasta (heavy) ketjua, jotka muodostavat y-kirjaimen muotoisen rakenteen. Kumpikin kevyt ketju sitoutuu raskaisiin ketjuihin, ja raskaat ketjut sitoutuvat toisiinsa rikkisidoksilla. Rikkisidosten määrä ja paikka vaihtelevat riippuen vasta-aineryhmästä. Vasta-ainemolekyylin kärkiosissa ovat Fab-alueet, jotka sitovat spesifisesti antigeenin. Raskaiden ketjujen väliin jäävä sarana-alue eli kulma on taipuisa. Se voi vaihdella riippuen millaiseen ja moneenko antigeeniin vasta-aine sitoutuu. Vasta-aine voi siis sitoutua kahteen eri antigeeniin tai yhteen antigeeniin, jossa on erilliset, mutta identtiset epitoopit. Molekyylin häntäosassa raskaiden ketjujen alueella on Fc-alue, jossa on sitoutumiskohtia proteiineille ja erilaisille solupintareseptoreille. (Kindt ym. 2007, 85–86, 93.)



KUVA 1. Vasta-aineen rakenne (Abcam 1998-2011)

Nisäkkäillä on viittä erilaista vasta-ainetyyppiä: IgG, IgM, IgA, IgE ja IgD. Eri vasta-aineryhmät eroavat toisistaan rakenteeltaan; jokaisella ryhmällä on pysyvällä raskaan ketjun alueella uniikki aminohapposekvenssi, jonka perusteella ryhmien väliset biologisen aktiivisuuden erot määräytyvät. Pysyviksi alueiksi määritellään ketjujen muut kohdat kuin antigeenin sitoutumiskohdat. (Kindt ym. 2007, 95.)

Vasta-aineryhmien IgG, IgD ja IgA raskaat ketjut sisältävät neljä yksikköä ja sarana-alueen, kun taas vasta-aineryhmien IgM ja IgE raskaat ketjut sisältävät viisi yksikköä, mutta eivät ollenkaan sarana-alueita. Myös rikkisidosten määrä vaihtelee eri ryhmillä. Ryhmät IgA ja IgM muodostavat polymeerisiä muotoja niin sanotun J-sidoksen avulla, joka liittyy kaksi monomeeriä yhteen. IgM esiintyy aina pentameeri-muodossa eli yhteen on liittynyt viisi monomeeriä. (Kindt ym. 2007, 97.)

2.2 Polyklonaaliset vasta-aineet ja niiden tuottaminen

Yleensä antigeeneillä on useita epitoppeja eli sitoutumiskohtia, jolloin ne saavat aikaan monenlaisten B-solukloonien lisääntymisen. Jokainen antigeeni tuottaa B-solun, joka tunnistaa tietyn epitopin. Lopullinen vasta-aineiden seos on heterogeeninen, joka sisältää vasta-aineita, joilla kaikilla on erilainen

sitoutumiskohta. Tällaisia vasta-aineiden seoksia eli antiseerumeja kutsutaan polyklonaaliksi. (Kindt ym. 2007 105–106.)

Hiiri immunisoidaan rokottamalla ihon alle antigeenia. Vahvistusrokotusten jälkeen eläimestä otetaan kokoverinäyte, josta erotetaan sentrifugoimalla solut ja seerumi. Seerumi (antiseerumi) sisältää polyklonaalisen vasta-aineen seoksen. Vasta-aineet voidaan affiniteettipuhdistaa seerumista käyttämällä kolonnia ja väliainetta, johon on sidottu antigeeni. (Western-Blot.us.)

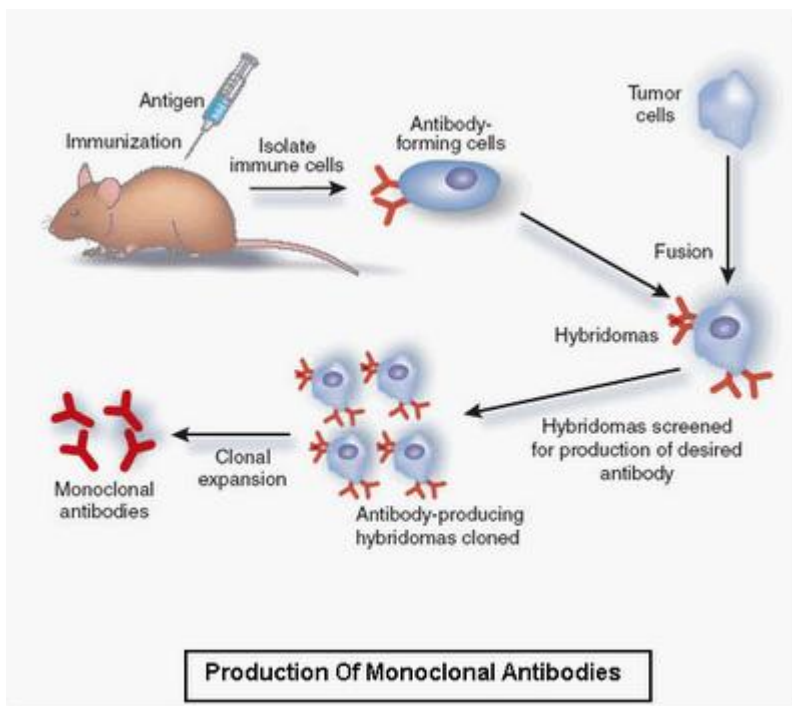
Polyklonaaliset vasta-aineet helpottavat antigeenien paikannusta, fagosytoosia ja hajotusta organismeissa *in vivo*. Vasta-aineiden heterogeenisuus kasvaa immuunipuolustuksen toimiessa *in vivo*, mutta laboratorio-oloissa, *in vitro* heterogeenisuus vähentää antiseerumin tehokkuutta ja käytettävyyttä. Tutkimuskäytössä monoklonaaliset vasta-aineet ovatkin parempia. Ne ovat peräisin yhdestä B-solukloonista, jolloin niiden sitoutumiskohdat ovat kaikki samanlaisia ja tietylle antigeenille spesifisiä. (Kindt ym. 2007, 105-106.)

2.3 Monoklonaaliset vasta-aineet ja niiden tuottaminen

Monoklonaalisia vasta-aineita tuotetaan hybridoomasolujen avulla. Hybridoomasolu on eräänlainen fuusioitu solu, johon on yhdistetty vasta-ainetta tuottava B-solu ja kuolematon myeloomasyöpäsolu. Tällaisissa solulinjoissa solujen ohjelmoitu kuolema on saatu ”pois päältä” eli apoptoosi on vältetty geeniteknisesti. (Aittomäki ym. 2002, 104.)

Hiiri immunisoidaan kiinnostuksen kohteena olevalla antigeenillä. Antigeenit stimuloivat immuunireaktion ja B-lymfosyyttisolut aktivoituvat tuottamaan vasta-ainetta. Hiiren perna otetaan talteen, koska juuri pernassa on runsaasti B-soluja. Jos yksittäinen B-solu eristetään, se tuottaa monoklonaalista vasta-ainetta, mutta sellaisenaan se kuolee lyhyen ajan kuluessa eikä siksi sovellu pitkäaikaiseen vasta-aineen tuottoon. Kun B-solu fuusoidaan myeloomasoluun, siitä tulee loputtomasti jakautuva, ehtymätön vasta-aineen tuottaja. (Walsh 1998, 343-345.)

Fuusio saadaan aikaan inkuboimalla yhdessä myelooma- ja B-soluja kemiallisesti polyetyleeniglykolissa tai propyleeniglykolissa. Fuusio voidaan saada aikaan myös sähkövirralla. Fuusioituneet hybridoomasolut valikoidaan fuusioitumattomista viljelemällä niitä valikoivassa hypoksantiiniaminopteriini-thymiidiini- eli HAT-kasvatusmediumissa. Yksittäiset hybridoomat erotellaan toisistaan laimentamalla, minkä jälkeen ne viljellään kuoppalevyille. Laimennosta ja jakoviljelyä toistamalla lopulta jokaisessa kuoppalevyn kuopassa on vain yhden solun kloonija. Kun sopivat kloonit on selvitetty, voidaan aloittaa hybridomien kasvatus laajemmassa skaalassa. Koulitut hybridoomat tuottavat vasta-ainetta mediumiin samalla kun ne kasvavat. Monoklonaalisten vasta-aineiden tuottamisen vaiheet on esitetty kuvassa 2. (Forbes 2010; Kumpulainen 2011; Walsh 1998, 343–345.)



KUVA 2. Monoklonaalisten vasta-aineiden tuottaminen (Jaiswal 2009)

2.4 Vasta-aineiden käyttö

Vasta-aineita hyödynnetään laajasti immunologisissa menetelmissä, joissa määritetään joko vasta-ainepitoisuuksia tai erilaisia analyyttejä, kuten

hormooneja, lääkkeitä tai tuumoriantigeenejä. Määritysmenetelmät perustuvat vasta-aineen ja antigeenin spesifiseen sitoutumiseen ”avain-lukko” -periaatteella. Immunologisilla määritysmenetelmillä pystytään mittaamaan todella pieniä pitoisuuksia esimerkiksi nmol/l. Millään muulla kemiallisella menetelmällä ei voida osoittaa niin pieniä pitoisuuksia. Lisäksi vasta-aineita käytetään hyväksi immunokemiallisissa puhdistusmenetelmissä sekä sairauden hoidossa eli terapiassa. (Kumpulainen 2011.)

3.4.1 Immunologiset määritysmenetelmät

RIA, IRMA, EIA, ELISA, FIA ja IFMA ovat immunologisia määritysmenetelmiä. RIA:ssa eli radioimmunologisessa menetelmässä ja IRMA:ssa eli radioimmunometrisessä menetelmässä käytetään radioaktiivisella merkkiaineella leimattua antigeeniä. RIA:ssa liuoksessa on vasta-ainetta ja leimattua antigeeniä. Antigeeni eli analyytti ja leimattu antigeeni kilpailevat vasta-aineen sitoutumiskohdista. Reaktion jälkeen vapaa ja sitoutunut radioaktiivisuus erotetaan erilaisilla menetelmillä ja lasketaan putkiin jäänyt radioaktiivisuus. RIA:ssa käytetään apuna standardeja. Radioaktiivisuus on kääntäen verrannollinen antigeenin pitoisuuteen. IRMA on suoran ELISA-menetelmän kaltainen, mutta käytettävät leimat poikkeavat toisistaan. (Kumpulainen 2011.)

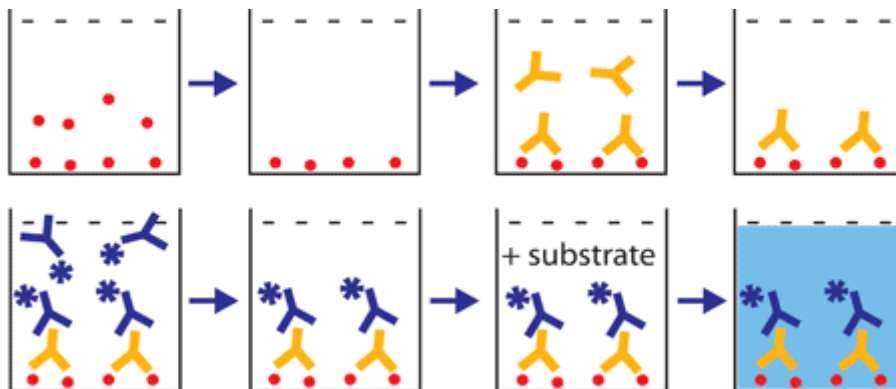
Kompetitiivisessä entsyymimenetelmässä eli EIA:ssa entsyymillä leimattu antigeeni kilpailee näytteen mitattavan analyytin kanssa vasta-aineen sitoutumiskohdista. Vasta-aine on kiinnitetty mikrotiitterilevyjen kaivojen pintaan. Kun ylimääräinen entsyymileima on poistettu, kaivoihin lisätään entsyymin substraatti, jolloin muodostuu värillinen yhdiste, joka mitataan spektrofotometrisesti. Absorbanssi on kääntäen verrannollinen antigeenin pitoisuuteen. (Kumpulainen 2011.)

ELISA-menetelmiä (enzyme linked immunosorbent assay) on kahdenlaisia: suora ja epäsuora. Suorassa menetelmässä mitataan antigeenin (analyytin) pitoisuutta, niin sanotulla sandwich-menetelmällä. Vasta-aine on kiinnitetty kaivojen pinnalle, johon mitattava analyytti tarttuu. Entsyymillä leimattu,

antigeenin eri epitoopin tunnistava toinen vasta-aine tarttuu antigeeniin ja niin muodostuu sandwich eli vasta-aine-antigeeni-vasta-aine-muodostelma. Kun kaivoon lisätään substraatti, kuoppiin muodostuu värillinen lopputuote, joka mitataan. Kuvassa 3 on esitetty suoran ELISA-menetelmän sandwich-periaate. Epäsuorassa menetelmässä mitataan vasta-ainepitoisuutta. Antigeeni on kiinnitetty kaivojen pinnalle, ja mitattava vasta-aine sitoutuu antigeeniin. Leimana käytetään entsyymillä leimattua vasta-aineen vasta-ainetta esimerkiksi anti-human-IgG:tä. Substraatin lisäyksen jälkeen muodostuu värillinen yhdiste, joka mitataan. Kuvassa 4 on esitetty epäsuoran ELISA-menetelmän periaate. Molemmissa ELISA-menetelmissä absorbanssi on suoraan verrannollinen vasta-aineen pitoisuuteen. (Kumpulainen 2011.)



KUVA 3. Suoran ELISA-menetelmän periaate (Chakravarthy 2011)



KUVA 4. Epäsuoran ELISA-menetelmän periaate (Antibody-antigen interactions)

FIA- ja IFMA-menetelmissä käytetään merkkiaineena fluoresoivaa maametallia europiumia. FIA:ssa (fluorescent immunoassay) kuoppiin on kiinnitetty vasta-aineen vasta-aine. Mitattavan analyytin vasta-aine toimii ikään kuin antigeeninä,

joka sitoutuu vasta-aineen vasta-aineeseen. Tämän jälkeen mitattavana oleva analyysi kilpailee europiumilla leimatun vastaavan antigeenin kanssa. Ylimääräinen leimattu-antigeeni pestään pois. Kun kaivoihin lisätään kehitin, europium vapautuu liuokseen ja muodostaa kehitteen komponenttien kanssa fluoresoivan kelaatin, jonka fluoresenssi mitataan. Mitattu fluoresenssi on kääntäen verrannollinen näytteessä olevan antigeenin pitoisuuteen. IFMA:n periaatteena on ei-kilpaileva ”sandwich”-malli. (Kumpulainen 2011.)

3.4.2 Immunokemialliset menetelmät

Yksi käytetyimmistä immunokemiallisista menetelmistä on immunoblottaus eli westernblot-analyysi. Immunoblottauksella voidaan selvittää, sisältääkö näyte tutkittavan antigeenin, mikä on antigeenin molekyylipaino, paljonko näytteessä on antigeeniä, miten antigeeni assosioituu muiden proteiinien kanssa tai kuinka spesifinen käytetty vasta-aine on. Ennen blottausta näytteen sisältämät proteiinit erotetaan toisistaan SDS-polyakryyliamidigeelielektroforeesilla. Geelistä proteiinit siirretään sähkövirran avulla proteiineja sitovalle nitroselluloosa- tai polyvinyylidifluoridi- eli PVDF-kalvolle, joka käsitellään spesifisellä vasta-aineella. Se tunnistaa kalvolta tietyn spesifisen antigeeninsä. Vasta-aine voi olla leimattu tai sen sitoutuminen osoitetaan primaari vasta-aineeseen sitoutuvalla, leimatulla toisella vasta-aineella. Westernblot-analyysin detektoraja on 10 fg proteiinia. (Kumpulainen 2011.)

3.4.3 Vasta-aineiden terapeuttinen käyttö

Hybridomasolujen tuottamia monoklonaalisia vasta-aineita voidaan käyttää myös diagnostiikkaan tai terapiaan mm. elimensiirroissa, syövän, reuman sekä sydän- ja verisuonitautien tilanteen seuraamisessa, mutta myös hoidossa. Ihmiskeho hylkii hiiren vasta-aineita, joten terapiaan käytetään ihmisen monoklonaalisia vasta-aineita, joita voidaan tuottaa transgeenisillä hiirillä, geenitekniikan avulla ja ihmissoluilla. (Forbes 2010.)

3. NISÄKÄSSOLUVILJELY

Soluviljely on mahdollistanut monien asioiden tutkimisen solutasolla, sillä eläimen fysiologiset toiminnot eivät vaikuta solun käyttäytymiseen. Soluviljelyn avulla on tutkittu muun muassa solun sisäistä aktiivisuutta (DNA:n transkriptiota, proteiinisynteesiä ja energiametaboliala), solun sisäistä liikennettä (RNA:n kulkeutumista tumasta sytoplasmaan, hormonireseptorien liikkeitä ja solukalvon liikennettä), ympäristön vuorovaikutuksia (ravinnonsaantia, tartuntoja sekä myrkkujen ja lääkkeiden vaikutuksia), solujen välisiä vuorovaikutuksia, genetiikkaa, solutuotteita sekä erityistä. Soluviljelyn onnistuminen vaatii kuitenkin paljon huomioon otettavia asioita. Välineet ja laitteet täytyy olla soluviljelyyn tarkoitettuja, työskentelyn aseptista ja solujen olosuhteet tarkoin säädeltäviä. (Höyhty 1999; Forbes 2010.)

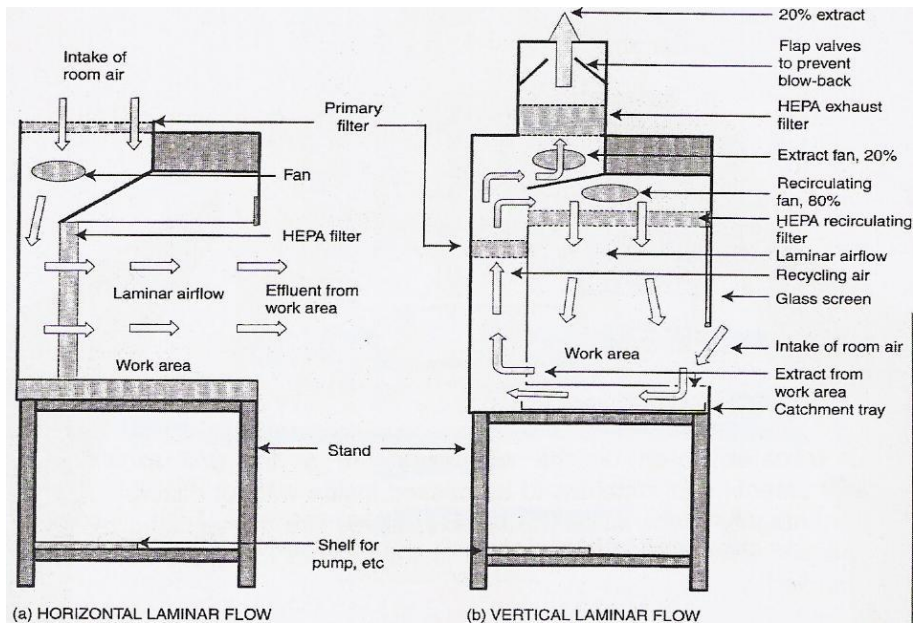
3.1 Nisäkässoluviljelyn välineet

Soluviljelylaboratorion pitäisi olla aina oma eristetty yksikkönsä, sillä silloin aseptinen työskentely sujuu luotettavimmin. Laminaarivirtauskaappi tavallisessa laboratoriossa myös mahdollistaa aseptisen työskentelyn, mutta nisäkässolut kasvavat huomattavasti hitaammin ja huonommin kuin kontaminantit, jolloin kontaminaation vaara kasvaa. Laboratoriotilan pitää olla helposti puhdistettavissa. Laitteiden asetteluun laboratoriossa pitääkin kiinnittää huomiota. Kontaminaatiolle herkimvät laitteet sijoitetaan kauimmaksi ovesta ja kulkutiloista. Laboratorio olisi myös hyvä varustaa omalla ilmanpuhdistussysteemillä, ja sen olisi hyvä olla positiivisen ilmanpaineen alaisena kontaminanttien vähentämiseksi. Soluviljelylaboratorion perusvarustukseen kuuluu ainakin käänteismikroskooppi, autoklaavi, jääkaappi-pakastin, nestetyppisäiliö, sentrifuugi, inkubaattori ja UV-valolla varustettu laminaarivirtauskaappi,. (Höyhty 1999.)

Inkubaattorina käytetään yleensä CO₂-virtauskaappia, jossa viljelyliuoksen pH puskuroidaan 5–10 %:n hiilidioksidipitoisuudella. Hyvä ilmankierto inkubaattorissa on tärkeää, jotta lämpötila ja kosteus- sekä hiilidioksidipitoisuus säilyvät

tasaisena. Lämpötila säädetään kasvatettavien solujen mukaan: humaani- ja eläinsoluille 37 °C ja lintujen soluille 38,5 °C. Lämpötila täytyy pitää stabiilina, sillä jopa $\pm 0,5$ °C lämpötilan vaihtelu saattaa hidastaa solujen kasvua. (Höyhty 1999.)

Laminaarivirtauskaappi on aseptisen työskentelyn perusedellytys ja soluviljelyn onnistumisen kannalta välttämätön. Laminaarivirtauskaapin HEPA-suodatin puhdistaa ilmassa olevat epäpuhtaudet ja mikrobit, jolloin työskentelytilaan puhallettava ilma on puhdasta. Virtauksen täytyy olla 0,4 m/s. Laminaarivirtauskaappeja on kahta eri mallia: horisontaali- ja vertikaalivirtauskaappeja. Horisontaalivirtauskaapissa ilma puhalletaan kaapin takaseinästä suoran työskentelijää kohti, kuten esitetään kuvassa 5. Tällöin työtila pysyy puhtaana, mutta työntekijä voi altistua, jos näyte on patogeeninen. Vertikaalivirtauskaapissa ilma puhalletaan kaapin katosta, ja ilma poistuu pohjan ja takaosan kautta. Kuvassa 5 on esitetty myös vertikaalivirtauskaapin rakennekuva. Työntekijän kannalta tämä malli on turvallisempi. Lisäksi on olemassa myös biovaarallisten näytteiden käsittelyyn tarkoitettu laminaarivirtauskaappimalli. Sitä käytetään, jos näytteen tiedetään olevan humaanipatogeeninen. Näytteet laitetaan kaappiin sisälle sivuilla olevista luukuista, lisäksi käsille on valmiiksi asennetut käsineet, jotta työntekijä ei altistu missään vaiheessa näytteille. Kaapeissa voidaan pitää työskentelyn jälkeen päällä ultraviolettilamppua, joka steriloi kaappia tuhoamalla mikrobeja. (Höyhty 1999; Forbes 2010.)



KUVA 5. Horisontaali- ja vertikaalilaminaarivirtauskaappien rakennekuvat (Forbes 2010)

3.2 Aseptinen työskentely

Aseptisellä työskentelyllä vältetään mikro-organismien aiheuttamia kontaminaatioita. Yleisimmät kontaminaatioiden lähteet ovat työntekijä, ilma, työskentelypinnat ja kasvuliukset. Ongelmia voidaan vähentää, kun huomioidaan muutama tärkeä seikka. Kaikkien välineiden, laitteiden ja liuosten tulee olla steriilejä. Viljelmät mikroskopoidaan joka käsittelyn yhteydessä. Jos antibiootteja käytetään, aika-ajoin kannattaa myös viljellä ilman antibiootteja, jotta piilevät kontaminaatiot havaitaan. Jokainen työntekijä valmistaa ja käyttää vain omia liuoksia. Paikat kannattaa myös pitää yleisesti siistinä, eikä laminaarikaapissa saa säilyttää mitään, kun siellä ei työskennellä. (Höyhty 1999.)

Laminaarikaappi laitetaan päälle puoli tuntia ennen työskentelyä. Työskentelypinnat ja laminaarikaappiin vietävät pullot ja välineet suihkutetaan 70 %:lla etanolilla ennen aloittamista. Myös kädet pestään ja suihkutetaan etanolilla ennen laminaarikaappiin viemistä. Jos käsiä käytetään välillä kaapin ulkopuolella, ne täytyy suihkuttaa uudelleen alkoholilla. Steriili liuospullo avataan vasta juuri ennen käyttöä. Korkki asetetaan takaseinälle avoin puoli alaspäin. Pullo suljetaan heti käytön jälkeen. Steriilejä pipettejä käytetään vain

kerran. Nekin otetaan kääreestä vasta kun tarvitaan. Pipetillä ei saa koskea pulloihin tai tavaroihin laminaarikaapissa eikä pipetoitaessa astian sisäpintoihin. Pipetoitaessa pulloa voi kallistaa hieman, jolloin mikro-organismit eivät leijaile suoraan pulloon. Puhumista on syytä välttää työskentelyn aikana, jotta työskentelijän suusta ei pääse kontaminantteja laminaarikaappiin. Muutenkin työskentely kannattaa hoitaa mahdollisimman ripeästi kontaminaatioiden minimoimiseksi. (Forbes 2010.)

3.3 Soluviljelyn liuokset

Peruskasvatusliuos valitaan viljeltävän solulinjan tarpeiden mukaan. Yleisimpiä kasvatusliuoksa ovat muun muassa Basal Media Eagle, BGJb Media, CMRL Media, Dulbecco's Modified Eagle Media, RPMI Medium 1630 ja Minimum Essential Media (MEM). Peruskasvatusliuokseen on lisättävä solulinjan vaatimat lisäravinteet ennen käyttöä. Valmis kasvatusliuos eli medium sisältää ainakin aminohappoja, vitamiineja, suoloja, glukoosia, hormooneja ja kasvutekijöitä, joista solut saavat välttämättömät aineet kasvaakseen ja elääkseen. (Höyhty 1999; Forbes 2010.)

Yksi tärkeimmistä lisättävistä ravinteista on seerumi, vaikka nykyään on kehitelty myös seerumin korvaavia seerumivapaita kasvatusliuoksia. Yleisimmin käytetään vasikan (CS), vasikan sikiön (FBS), hevosen tai ihmisen seerumeita. Seerumi voidaan tarvittaessa inaktivoida ennen käyttöä 30 minuuttia 56 °C:ssa. Seerumi sisältää kasvutekijöitä, jotka edistävät muun muassa kasvua ja lisäävät solujen kiinnittymistä. (Forbes 2010.)

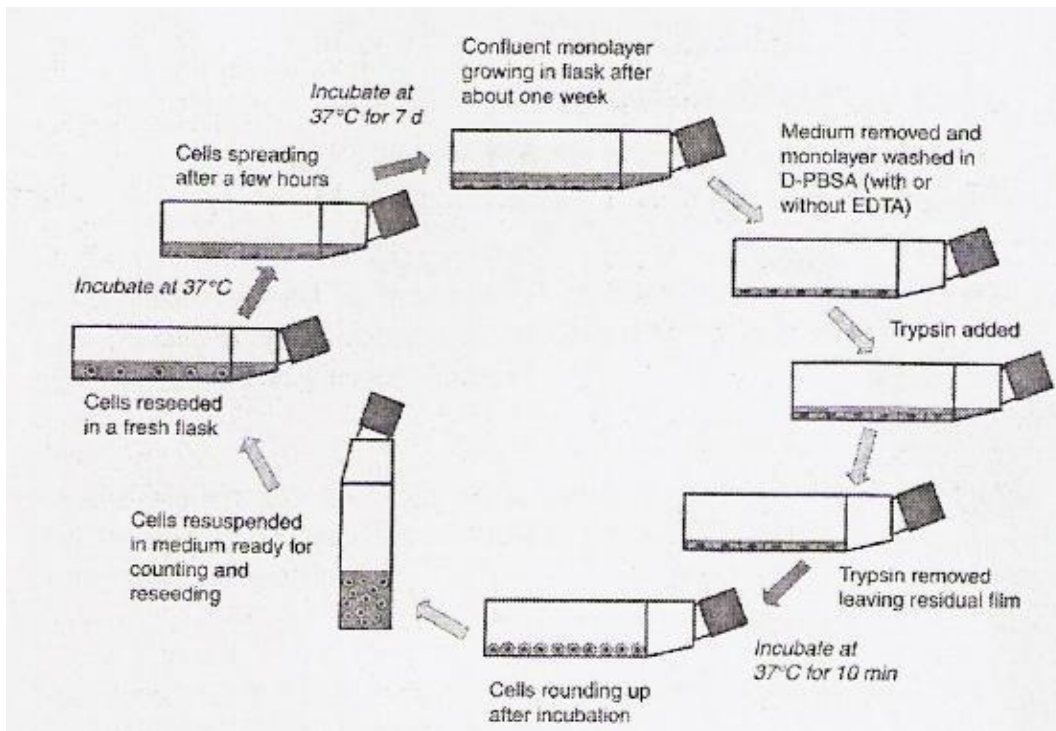
Kasvatusliuokseen lisätään myös solujen tarvitsemaa aminohappoa, glutamiinia, jota ne eivät kykene itse valmistamaan. Lisäksi voidaan lisätä tarvittaessa antibioottia kontaminaatioiden vähentämiseksi, glukoosia solujen energianlähteeksi sekä HEPES-puskuria vastustamaan happamuuden muutoksia. (Höyhty 1999.)

3.4 Solujen rutiinikasvatus

Kun solut kasvavat, ne kuluttavat kasvatusliuoksessa olevia ravintoaineita ja erittävät siihen metaboliatuotteita. Solujen hyvinvoinnin ja kasvun turvaamiseksi elatusliuos on vaihdettava tietyin väliajoin. Vaihtoväli riippuu solutyypistä. Mediumin vaihtotarvetta voidaan ennustaa esimerkiksi mediumin sisältämän väri-indikaattori avulla. Kun kasvatusliuoksen indikaattoriväri alkaa muuttua punaisesta keltaiseksi, tiedetään, että sen pH on laskenut, kun solut ovat tuottaneet runsaasti haitallisia metaboliatuotteita mediumiin. Mitä tiheämmässä solut ovat, sitä nopeammin ravinteet kuluvat. Jos solujen muoto eli morfologia muuttuu kasvatuksen aikana, se tarkoittaa ravinteiden loppumista tai jotakin muuta ongelmaa. Myös kasvatusliuoksen määrä vaikuttaa. Yleisesti liuostarve on 0,2–0,5 ml/cm² ja suspensiossa kasvavat solut tarvitsevat 5 cm:n liuoskorkeuden. (Höyhty 1999.)

Kun solut täyttävät kasvualustansa tai tiheys saavuttaa tietyn pisteen, niitä täytyy harventaa eli jakaa useampaan pulloon tai kasvatusastiaan. Harvennuslaimennos riippuu täysin solulinjasta ja kasvunopeudesta. Herkät ja hitaasti kasvavat solut harvennetaan yleensä 1:2, elinvoimaiset 1:8 ja nopeasti kasvavat 1:16. (Höyhty 1999.)

Yleensä harvennus tehdään kuvan 6 mukaisesti pohjassa kasvaville soluille siten, että kasvatusliuos poistetaan, solut pestään PBS:lla, lisätään trypsiini solujen irrottamiseksi ja annetaan sen vaikuttaa 30 s, jonka jälkeen se poistetaan. Soluja inkuboidaan muutama minuutti, jolloin ne pyöristyvät ja irtoavat alustastaan. Kasvatusliuosta lisätään alustalle ja pipetoidaan sitä ilmakuplia välttämällä varovasti edestakaisin homogeenisen suspension saamiseksi. Solut lasketaan, mikäli se on tarpeen ja laimennetaan haluttuun tiheyteen ja jaetaan uusille kasvualustoille. (Höyhty 1999; Forbes 2010.)



KUVA 6. Solujen jakaminen (Forbes 2010)

4. GEENITEKNISET MENETELMÄT

Melkein kaikki työssä käytettävät geenitekniikan menetelmät ovat yhdistelmä-DNA-tekniikan perusmenetelmiä. Menetelmillä voidaan eristää eri lähteistä peräisin olevaa geneettistä materiaalia, yhdistellä ja muuntaa sitä tarkkaan tunnetulla tavalla *in vitro* ja siirtää yhdistelmiä toisiin organismeihin.

4.1 Tuottoplasmidin valmistuksessa käytettävät menetelmät

Tuottoplasmidin valmistuksessa käytetään muun muassa transformaatiota, kloonausta, plasmidi-DNA:n eristystä, digestiota, agaroosigeelielektroforeesia ja ligaatiota. Ensin plasmidi siirretään transformaatiolla *Escherichia coli* -bakteereihin. Transformoiduista soluista kasvatetaan klooneja, joista eristetään DNA. Testidigestion eli restriktioentsyymikäsittelyn ja agaroosigeelielektroforeesin avulla tutkitaan sisältävätkö valitut kloonit halutunlaisen plasmidin. Positiivisista klooneista tehdään herätekasvatus ja soluista eristetään plasmidi-DNA, joka tarkistetaan vielä testidigestiolla. Seuraavaksi tehtävässä preparatiivisessa digestiossa plasmidi pilkotaan entsyymeillä ja leikataan steriilisti agaroosigeelielektroforeesigeeliltä. Plasmidi on siis tässä vaiheessa lineaarinen, ja siinä on entsyymien leikkauskohdat. DNA eristetään geelipalasta minikolonneilla, jolloin plasmidi on valmis kunnes sen puhtaus on varmistettu testiajolla, testiligaatiolla ja transformaatiolla.

5.1.1 Transformaatio

Transformaatiolla siirretään plasmidi-DNA:ta isäntäsolun sisään. Menetelmät perustuvat *E. coli*n kykyyn ottaa hetkellisesti sisäänsä DNA:ta, kun bakteerisolun on käsitelty CaCl_2 -menetelmällä eli tehty kompetenteiksi. CaCl_2 destabiloi solukalvoja ja kompleksoituu plasmidi-DNA:n kanssa. DNA-kompleksi siirtyy eli transformoituu solun sisälle, kun jääkylmille soluille annetaan lämpöshokki. Käsitely on kuitenkin sen verran rankka, että moni solu kuolee ja vain harva ottaa sisäänsä DNA:ta. Transformoituneita soluja saadaan yleensä kuitenkin tarpeeksi. (Suominen ym. 2010, 140.)

5.1.2 Kloonaus bakteeriviljelmässä

Geenitekniikassa kloonauksella tarkoitetaan jonkin geenin monistamista. Kun on ensin suoritettu transformaatio, siirrettyä geeniä voidaan lisätä kasvattamalla transformoituja bakteereita. Transformoituneen bakteerin kaikilla jälkeläisillä on siirretty geeni. Kasvatuksen jälkeen plasmidi voidaan eristää. Kloonauksen avulla saatua plasmidimateriaalia on siis enemmän kuin ennen kloonausta. (Ulmanen – Tenhunen – Yläne – Valste – Viitanen 2000, 61.)

5.1.3 Plasmidi-DNA:n eristys

Plasmidin eristystä varten on ensin oltava riittävä määrä bakteerisoluja. Solut kerätään tavallisesti sentrifugoimalla. Ne hajotetaan yleensä emäksisellä käsittelyllä, jossa lisätään yhtä aikaa natriumhydroksidia ja detergenttiä, yleensä Natriumdodekyylisulfaatti- eli SDS-liuosta. Solujen hajotessa DNA voi denaturoitua emäksen vaikutuksesta. Liuos neutraloidaan kaliumasetaatilla. Osa proteiineista ja kromosomaalinen DNA saostuu, mutta plasmidi-DNA renaturoituu. Plasmidi-DNA voidaan puhdistaa myös esim. fenoli-kloroformi-uutolla. Nykyään käytetään kuitenkin kaupallisia kittejä, jotka perustuvat pienten minipylväiden, niin sanottujen spin-kolonnien käyttöön. Ne sitovat DNA:n silikadioksidipohjaiselle kalvolle. Pesuliukset sentrifugoidaan silikakalvon läpi ja DNA eluoidaan pieneen määrään laimeaa puskuria sentrifugoimalla steriiliin vastaanottoputkeen. (Suominen ym. 2010, 104, 106.)

5.1.4 Digestio

Digestio tarkoittaa DNA:n katkaisemista restriktioentsyymien avulla. Restriktioentsyymien käyttö perustuu niiden kykyyn tunnistaa missä tahansa kaksinauhaisessa DNA:ssa spesifinen nukleotidijärjestys, josta ne katkaisevat DNA:n. Entsyymistä riippuen katkaisu tapahtuu tunnistuskohdan sisältä tai sen lähetyviltä. Entsyymit voivat tehdä katkaisun tylopästi tai kohessiivisesti, jolloin DNA:n katkaistuihin päihin jää muutaman nukleotidin mittainen yksijuosteinen osa. Digestoidut tuotteet voidaan erotella haluttaessa agarosigeelielektroforeesilla, jolloin saadaan selville DNA-palojen koot. (Suominen ym. 2010, 113.)

5.1.5 Agarosigeelielektroforeesi (AGE)

Agarosigeelielektroforeesilla voidaan erotella erikokoisia DNA- ja RNA-paloja toisistaan sähkökentän avulla. Nukleiinihapot sisältävät runsaasti negatiivisesti varautuneita fosforihappojäänteitä, joten ne liikkuvat sähkökentässä positiivista napaa kohden. Agarosi muodostaa hyytelömäiseen geeliin verkorakenteen, jonka lävitse DNA- tai RNA-palat joutuvat pujottelemaan. Mitä pidempi palanen on, sitä hitaammin se liikkuu geelin läpi, ja siten erikokoiset palaset erottuvat toisistaan. (Suominen ym. 2010 123; Ulmanen ym. 2000, 71.)

DNA ja RNA eivät sellaisenaan näy geelillä, vaan on käytettävä jotakin väriainetta, joka tunkeutuu nukleiinihappojen emästen väliin, kuten etidumbromidi tai SYBR-väri. Kun geeliä katsotaan ajon jälkeen ultraviolettivalolla, etidumbromidi fluoresoi oranssinpunaisena. Näytteisiin lisätään näytepuskuria, jotta näytteet olisivat raskaampia kuin ajopuskuri ja ne asettuisivat geelin näytekoloihin tasaisesti. Näytepuskurin väriaine auttaa myös seuraamaan ajon edistymistä. (Suominen ym. 2010, 124.)

5.1.6 Ligaatio

Kahden DNA-palan liittämistä toisiinsa kutsutaan ligaatioksi. Ligaation suorittaa DNA-ligaasientsyymi. Ligaasi tarvitsee toimiakseen DNA-päät, joista toisen 5'-päässä on fosfaattiryhmä ja toisen 3'-päässä OH-ryhmä. Lisäksi kovalenttisen sidoksen tekemiseen tarvitaan energiaa eli ATP-molekyylejä ja Mg^{2+} -ioneja sekä pelkistävät olot. Jos restriktioentsyymi on katkaissut DNA:n joko kohessiivisesti tai työpästi, päät voidaan littää takaisin toisiinsa ligaasilla tai väliin voidaan liittää samoilla entsyymeillä katkaistu geeni-insertti. (Suominen ym. 131.)

4.2 Vasta-ainegeenin monistuksessa käytettävät menetelmät

Kun solumateriaali on kasvatettu, niistä eristetään kokonais-RNA. RNA:sta tehdään cDNA:ta syntetisoidulla käänteistranskriptaasientsyymillä avulla. Sitten cDNA:ta monistetaan PCR-monistuskierroksilla. Monistettu vasta-ainegeeni konsentroidaan, muokataan tarkoitukseen sopivilla restriktioentsyymeillä ja

puhdistetaan preparatiivisella geelillä. Geeni-insertti liitetään ligaatiolla sekvensointivektoriin ja koko vektori transformoidaan *E. coliin*. Geeni-insertin olemassaolo plasmidikloonissa voidaan todentaa eristämällä transformaatiomaljojen klooneista DNA ja testidigestoimalla.

5.2.1 Kokonais-RNA:n eristys

RNA:n eristyksessä vaikeuksia aiheuttaa RNA:n nopea hajoaminen ja sen lyhyt elinikä soluissa. Lisäksi solujen omat RNAasit eli ribonukleaasientsyymit pilkkovat eristettävää RNA:ta. RNAaseja on kaikkialla ympäristössä, ja niitä on vaikea inaktivoida, koska ne ovat erittäin kestäviä. (Suominen ym. 2010, 108.)

Nisäkässoluviljelmistä voidaan eristää kokonais-RNA:ta samaan tapaan kuin kromosomaalista DNA:ta. Solut hajotetaan ensin detergenttikäsittelyllä. Solut sentrifugoidaan, jotta päästään eroon suurimmasta osasta DNA:ta. Proteiinit saadaan poistettua SDS- ja proteinaasi K-käsittelyillä sekä fenoli-kloroformiuutoilla. Nukleiinihapot saostetaan etanolilla ja näyte käsitellään vielä DNAasi I:llä, joka pilkkoo entsyymaattisesti DNA:ta. RNA:n hajoaminen on vähäistä kun käytetään RNAasi-inhibiittoria. (Suominen ym. 2010, 109.)

Solut voidaan hajottaa myös vetämällä näytettä ruiskun avulla useita kertoja ohuen neulan läpi tai käyttämällä erityistä homogenisaattoria. Solujen kunnollinen hajotus on tärkeää RNA:n saannon maksimoimiseksi. Eristys voidaan tehdä myös kaupallisilla kiteillä, joissa käytetään erityisiä eristyspylväitä eli spin-kolonneja, eikä fenoli-kloroformiuuttoja ja saostuksia tarvita. Tällaisilla kiteillä eristetyt RNA-näytteet ovat suoraan valmiita jatkokäsittelyyn, kuten tässä tapauksessa cDNA:n synteisiin. (Omega bio-tek 2009, 2.)

5.2.2 cDNA-synteesi

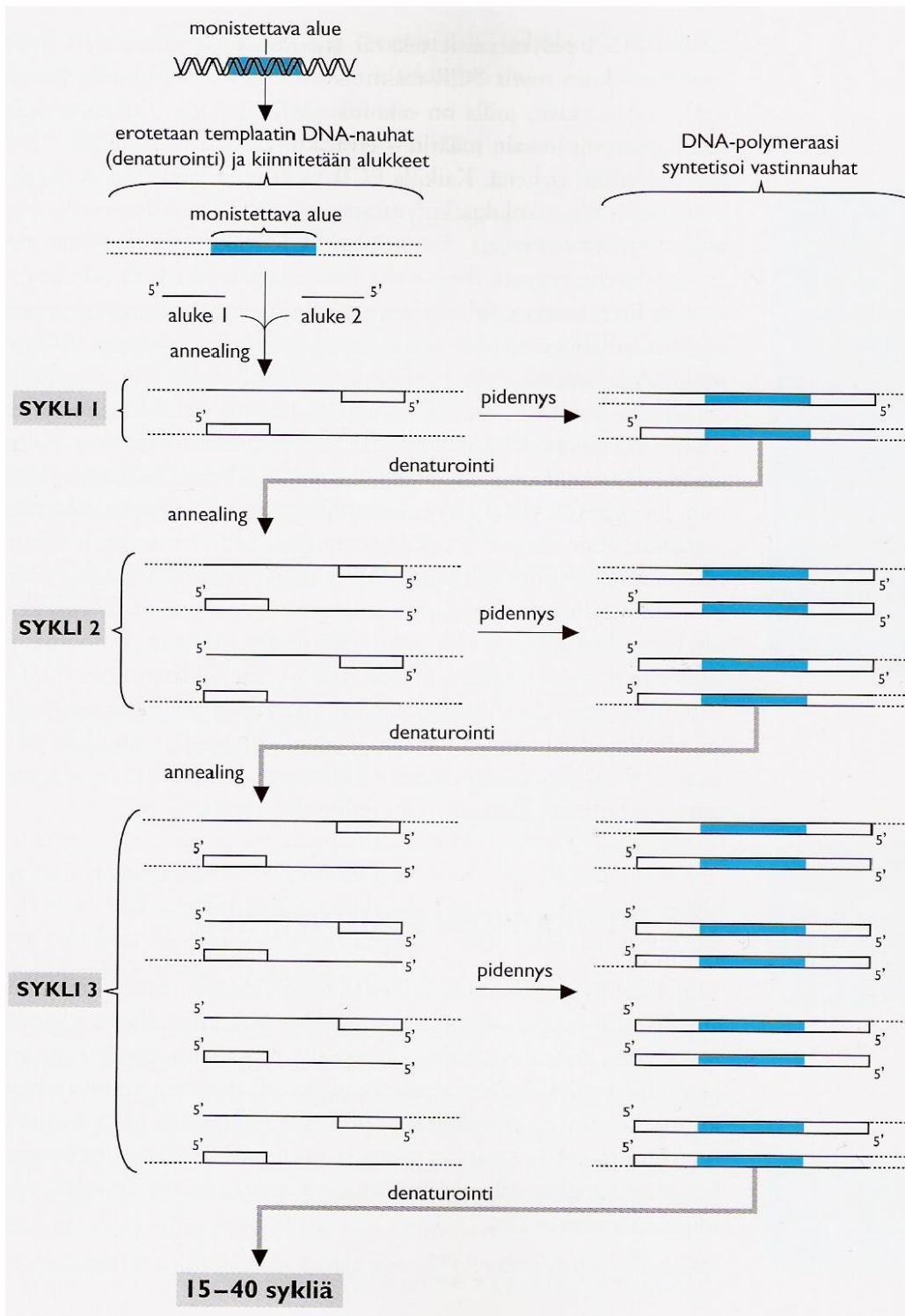
Normaalisti solujen proteiinisynteesin transkriptiossa DNA:n mallin mukaan valmistetaan RNA:ta ja translaatiossa RNA:sta valmistetaan nukleotidien koodin mukaan proteiineja. cDNA eli komplementaarinen-DNA valmistetaan päinvastoin kuin solussa yleensä tapahtuu. (Suominen ym. 2010, 40 ja 69.)

cDNA valmistetaan RNA:sta käänteistranskriptaasi entsyymillä, joka kuuluu DNA-polymeraasien ryhmään, ja toimii transkriptiolle käänteiseen suuntaan. RNA:ta käytetään templaattina eli mallijuosteena ja cDNA:n ensimmäinen juoste valmistetaan käyttäen vapaita nukleotidejä. Juosteet voidaan vielä erottaa toisistaan. Tällöin cDNA:n toinen juoste valmistetaan DNA-polymeraasilla, jolle ensimmäinen juoste toimii templaattina. Valmistettu cDNA on tässä vaiheessa typpöpäinen. Yleensä cDNA:ta pystytään valmistamaan vain vähän, mutta sitä voidaan monistaa PCR:llä. (Suominen ym. 2010, 151-152.)

5.2.3 Polymeraasiketjureaktio (PCR)

Polymeraasiketjureaktiolla eli PCR:llä monistetaan DNA-jaksoja alukkeiden ts. primeereiden eli oligoiden avulla. DNA-jakson nukleotidijärjestys on tunnettava, jotta voidaan suunnitella ja valmistaa toimivat alukkeet. Alukkeet ovat lyhyitä synteettisiä yksijuosteisia DNA-fragmenttejä. Ne suunnitellaan siten, että ne kiinnittyvät nukleotidien pariutumissääntöjen mukaisesti monistettavan DNA-juosteiden päihin, kun monistettavan DNA-jakson juosteet on saatu ensin kuumennuksella erilleen. Alukkeiden väliin jäävä DNA-jakso on alue, jota monistetaan. (Suominen ym. 2010, 153-154.)

Reaktiossa tarvitaan lämmön kestävää eli termostabiilia DNA-polymeraasia, alukkeita, templaattia eli kaksijuosteista malli-DNA:ta, jota halutaan monistaa ja vapaita nukleotidejä (dNTP), joilla uusi juoste rakennetaan mallijuosteen perusteella. Ensin reaktioseokselle tehdään kuumennuskäsittely eli denaturointi, jossa kaksijuosteinen malli-DNA saadaan avautumaan. Sitten lämpötilaa lasketaan sen verran, että alukkeet pääsevät sitoutumaan templaattiin. Kun taas lämpötilaa nostetaan, DNA-polymeraasi alkaa liittää reaktioseoksessa olevia vapaita nukleotidejä alukkeen 3'-päästä lähtien templaatin mallin mukaan. Nauha on valmis minuutin parin kuluttua, minkä jälkeen suoritetaan uusi denaturointi lämpötilan nostolla, jolloin kaikki uudet DNA-jaksojen juosteet irrotetaan toisistaan. Sykliä toistetaan 15–40 kertaa. Kuva 7 esittää PCR:n periaatteen. (Suominen ym. 2010, 154.)



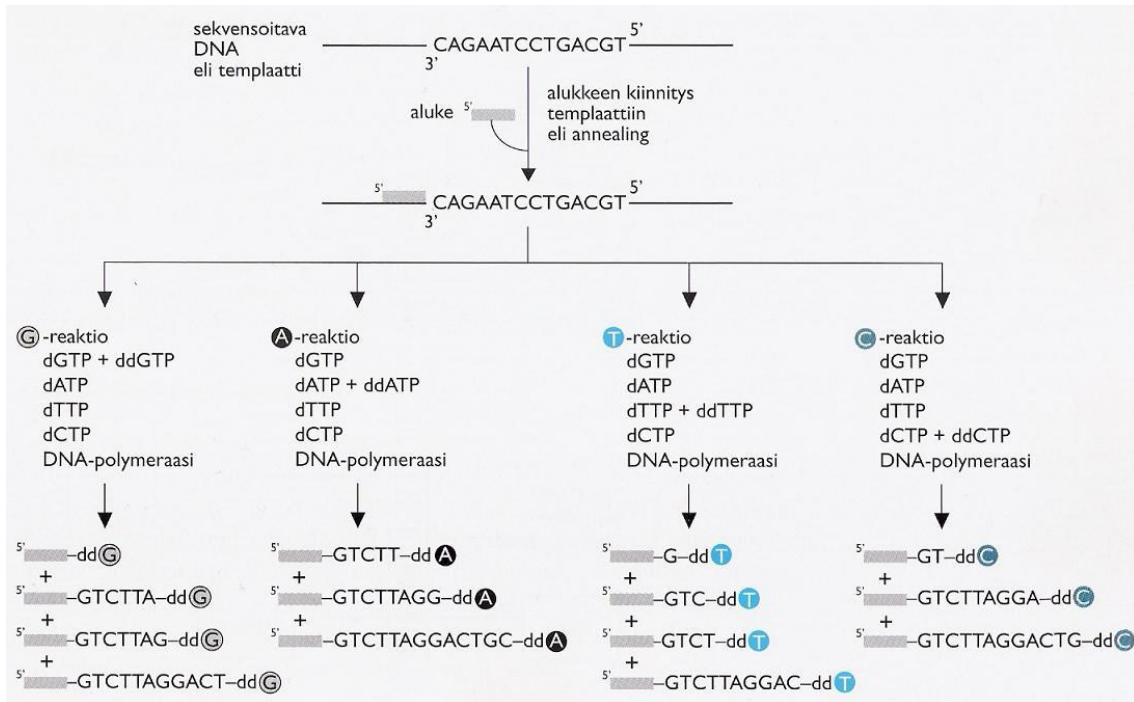
KUVA 7. PCR:n periaate (Suominen ym. 2010, 157)

Usein PCR-reaktioihin lisätään vielä magnesiumkloridia, koska magnesiumionien määrä vaikuttaa mm. alukkeiden kiinnittymiseen, DNA-juosteiden eroamislämpötilaan, tuotteen spesifisyyteen sekä entsyymin aktiivisuuteen ja tarkkuuteen. Monistettavan näytteen lisäksi voidaan tehdä

kontrollireaktioita ilman templaattia. Niiden avulla varmistetaan, monistuuko reaktiossa todellinen tuote ja onko jokin reagenssi kontaminoitunut. Monistetut PCR-tuotteet voidaan analysoida esimerkiksi agarosigeelielektroforeesilla. (Suominen ym. 2010, 156, 162 ja 166.)

5.2.4 Sekvensointi

Yksi tapa sekvensoida DNA:ta on Sangerin dideoksimenetelmä. Se perustuu DNA:n synteesiin sekvensoitavaa juostetta templaattina käyttäen. Sekvensoinnin onnistumiseksi tarvitaan nukleosiditriposfaattien lisäksi dideoksinukleotidejä. Dideoksimenetelmän periaate esitetään kuvassa 8. Aluke kiinnitetään sekvensoitavan DNA:n 3'-päähän, minkä jälkeen DNA-polymeraasi alkaa syntetisoida komplementaarista vastinjuostetta nukleosiditriposfaateista ja leimatuista dideoksinukleotideista, joilta puuttuu hydroksyyliiryhmä 3'-asemasta. Kun dideoksinukleotidi asetetaan synteesissä paikoilleen, DNA-polymeraasi ei pysty lisäämään sen jälkeen seuraavaa nukleotidiä hydroksyyliiryhmän puuttuessa eli synteesi päättyy. Reaktiota tehdään neljä, kullekin nukleotidille omansa. DNA-polymeraasi asettelee nukleotidejä sattumanvaraisesti, ja koska kussakin reaktioissa on mukana suuri määrä templaattia, aluketta, ja dNTP:itä, mutta vain pieni määrä dideoksinukleotideja, kyseiseen dideoksinukleotidiin päättyviä terminaatiotuotteita syntyy samassa suhteessa. Tuotepopulaatiossa on siis edustettuna kaikki kyseisen nukleotidin kohdat templaatisissa, ja ne voidaan erotella koon mukaan kapillaarielektroforeesilla. (Suominen ym. 2010, 177-180.)



KUVA 8. Dideoksimenetelmän periaate (Suominen ym. 2010, 179)

5. KOKEELLINEN OSUUS

5.1 pShuttle-CMV-tuottovektorin valmistus

Aluksi valmistettiin tuottovektori. Vektorina käytettiin pShuttle-CMV-plasmidia, joka on molekyyliytökälu, jota käytetään myöhemmin rekombinantin vastaainetta tuottavan adenoviruksen tekemiseen.

6.1.1 Plasmidin Transformaatio *Escherichia coli* -soluihin

Plasmidi siirrettiin transformaatiolla kompetentteihin *E. coli* DNA:n tuottokantoihin (TOP10, NEB5 ja XL1Blue). 15 µl plasmidia (1 ng/µl) pipetoitiin eppendorf-putkiin, joissa oli 200 µl kompetentteja soluja. Eppendorf-putkia napsuteltiin kevyesti ja seisotettiin 30 minuuttia jäissä. Putket nostettiin lämpöblokkiin 42 °C:een minuutiksi ja 30 sekunniksi, jonka jälkeen ne nostettiin takaisin jälle kahdeksi minuutiksi. Putkiin lisättiin 350 µl:a lämmitettyä SOC-kasvatuslientä (liite 3), ja putkia kasvatettiin ravistelussa 45 minuuttia 37 °C:ssa nopeudella 220 rpm. Kasvusto maljattiin kanamysiini-LB-agar-maljoille, joissa kanamysiinipitoisuus oli 50 µg/ml. Kasvustoa pipetoitiin maljoille 5 µl ja 20 µl. Lisäksi pipetoitiin steriiliä 1 x PBS 80 µl levityksen helpottamiseksi. Maljoja kasvatettiin lämpökaapissa 37 °C:ssa yön yli.

6.1.2 Kloonien kasvatus

Circle-grow-kasvatuslientä (liite 3), joka sisälsi 50 µg/ml kanamysiiniä, pipetoitiin 5 ml yhdeksään putkeen: kloonit 1–9. Kultakin maljalta poimittiin pipetin kärjellä kolme pesäkettä. Pesäke pyyhkäistiin LB-agar-kanamysiini-maljalle ja pipetin kärki pudotettiin putkeen. Kloonit 1–3 olivat TOP10-kantaa, kloonit 4–6 NEB5-kantaa ja kloonit 7–9 XL1Blue-kantaa.

Maljoja kasvatettiin lämpökaapissa 37 °C:ssa yön yli ja putkia kasvatettiin ravistelussa 220 rpm 30 °C:ssa yön yli. Kaikista klooneista tehtiin varastokannat eli glyserolistokit: Eppendorf-putkiin pipetoitiin 500 µl 50-prosenttista glyserolia. 500 µl jokaista kloonista pipetoitiin omaan glyseroliputkeen. Putket vorteksoitiin

hyvin ja annettiin seistä noin 2 h huoneen lämmössä välillä vorteksoiden. Glycerolistokit pikapakastettiin nestetypellä ja varastoititiin -80 °C:seen.

6.1.3 Dna:n eristys kloonikasvustoista

Kloonikasvustoista eristettiin DNA:t kaupallisella miniprep-kitillä (liite 5). DNA-liuosten pitoisuudet mitattiin Nanodrop-spektrometrillä. Taulukossa 1 on esitetty DNA-kloonien pitoisuudet.

TAULUKKO 1. DNA-klooniliuosten pitoisuudet

Klooni	Pitoisuus µg/ml
1	0,0159
2	0,0782
3	0,0069
4	0,0277
5	0,0476
6	0,0199
7	0,0371
8	0,0320
9	0,0600

6.1.4 Kloonien testidigestio

Kaikkien kloonien DNA-liuoksista tehtiin testidigestiot, jotta tiedettäisiin, mihin klooneihin plasmidi on transformoitunut. Ensin pipetoitiin reaktioseokset 9+1 putkelle taulukon 2 mukaan.

TAULUKKO 2. Testidigestio-reaktioseos

Reagenssi	Tilavuus
Steriili vesi	50 µl
10 x NEB 2-puskuri	15 µl
Hind III-entsyymi	5 µl
	Yhteensä 70 µl

Jokaisen kloonin DNA:ta pipetoitiin 8 µl eppendorf-putkeen. Lisäksi jokaiseen putkeen pipetoitiin 7 µl reaktioseosta. Digestioreaktioseoksia inkuboitiin 1h lämpökaapissa 37 °C:ssa. Digestionäytteitä varten valettiin 0,8-prosenttinen agarosigeeli (liite 1). Digestioreaktioihin pipetoitiin 4 µl XC-puskuria. Putket vorteksoitiin ja neste kerättiin pohjalle pikafuugauksella. Agarosigeelille pipetoitiin 20 µl näytteitä ja 5 µl markkeria. Geeliä ajettiin TAE-puskurissa (liite 3) agarosigeelielektroforeesi-laitteistolla 80 V 40 minuutin ajan.

6.1.5 Herätekasvatus

Koska kuvan 7 mukaan plasmidi oli transformoitunut kaikkiin klooneihin, valittiin kloonit, joiden pitoisuudet olivat suurimmat eli joiden vyöhykkeet olivat tummimmat. Herätekasvatukseen siirrostettiin kloonien 2, 5 ja 8 glyserolistokkia 100 ml:aan CircleGrow-kasvatuslientä (liite 3), johon oli lisätty kanamysiiniä loppupitoisuuteen 50 µg/ml. Klooneja herätekasvatettiin yön yli ravistelussa nopeudella 220 rpm 30 °C:ssa. Näin lisättiin plasmidin sisältämää solumateriaalia.

Kasvuston solutiehyden arvioimiseksi kasvuston sameus mitattiin: kasvustoa laimennettiin CircleGrow-kasvatusliemellä (liite 3) 1:10 ja mitattiin sameudet spektrofotometrillä OD₆₀₀. Taulukossa 3 on esitetty kloonien 2, 5 ja 8 sameudet.

TAULUKKO 3. Kloonien 2, 5 ja 8 sameudet

klooni	OD ₆₀₀ 1:10	OD ₆₀₀
2	0,373	3,73
5	0,113	1,13
8	0,192	1,92

6.1.6 Plasmidin eristys

Plasmidi eristettiin kaupallisella NucleoBond Xtra Midi -kitillä (liite 6). Eristetyistä plasmidiliuoksista mitattiin DNA-pitoisuudet Nanodropilla.

TAULUKKO 4. Kloonien 2, 5 ja 8 DNA-pitoisuudet

Klooni	Pitoisuus (ng/μl)
2	27,7
5	13,8
8	18,7

Liuokset jaettiin viiteen 2 ml:n eppendorf-putkeen, 1 ml kuhunkin. Kuhunkin putkeen lisättiin 700 μl isopropanolia, ja liuoksia sentrifugoitiin 30 min nopeudella 13000 rpm kylmähuoneessa. Supernatantit kaadettiin pois putkista ja vielä viimeiset tipat imettiin pipetillä. Jokainen sakka suspensioitiin 750 μl 70-prosenttista etanolia. Liuokset sentrifugoitiin vielä 5 min nopeudella 13000 rpm huoneenlämmössä. Etanoli poistettiin varovaisesti pipetoimalla. Putkien päälle laitettiin löyhästi parafilm-kalvoa ja ne jätettiin puolitehoiseen laminaarikaappiin yön yli, jotta viimeisetkin etanolit haihtuvat.

Laskettiin mihin tilavuuteen puskuria klooni 2:n sakka täytyy liuottaa: $27,7 \text{ ng}/\mu\text{l} \times 5000 \mu\text{l} = 138500 \text{ ng}$ eli $138500 \text{ ng} = 138,5 \mu\text{g}$. $138,5 \mu\text{g} \times 0,9 = 124,65 \mu\text{g}$, jolloin $124,65 \mu\text{g} / 5 = 24,93 \mu\text{l}/\text{putki}$ eli se on noin $25 \mu\text{l}/\text{putki}$. Samalla tavalla laskettiin myös kloonien 5 ja 8 tilavuudet: klooni 5:n tilavuus oli $12,42 \mu\text{l} / \text{putki}$ eli noin $12,5 \mu\text{l}$. klooni 8:n tilavuus oli $16,74 \mu\text{l} / \text{putki}$ eli noin $16 \mu\text{l}$.

Sakat liuotettiin AE-eluointipuskuriin (5 mM TRIS/HCl, pH 8,5), vorteksoitiin ja annettiin liueta huoneenlämmössä n. 20 minuuttia välillä vorteksoiden. Liuosten pitoisuudet mitattiin Nanodropilla. Taulukossa 5 on esitetty kloonien 2, 5 ja 8 DNA-pitoisuudet.

TAULUKKO 5. Kloonien 2, 5 ja 8 DNA-pitoisuudet liuotuksen jälkeen

Klooni	Pitoisuus (ng/μl)
2	785,7
5	617,1
8	185,8

6.1.7 Testidigestio

Testidigestion kaksi reaktioseosta pipetoitiin viisinkertaisena taulukon 6 mukaan.

TAULUKKO 6. Sal1-HF ja Hind III -testidigestion reaktioseos

Reagenssi	Tilavuus
Steriili vesi	80 µl
10 x buffer n:o 2 (NEB)	10 µl
Sal1-HF-entsyymi (20 U/µl, NEB)	2,5 µl
Hind III-entsyymi (20 U/µl, NEB)	2,5 µl
	Yhteensä 95 µl

TAULUKKO 7. Sal1-HF ja Eco RV-HF -testidigestion reaktioseos

Reagenssi	Tilavuus
Steriili vesi	80 µl
10 x buffer n:o 4 (NEB)	10 µl
Sal1-HF (20 U/µl, NEB)	2,5 µl
Eco RV-HF (20 U/µl, NEB)	2,5 µl
	Yhteensä 95 µl

Kustakin kloonista tehtiin testidigestiot molemmilla reaktioseoksilla. Yhteensä putkia siis tuli 6 kpl. Eppendorf-putkiin pipetoitiin ensin 19 µl reaktioseoksia ja sitten 1 µl plasmidi-DNA:ta. Seoksia inkuboitiin tunti 37 °C:ssa, minkä jälkeen lisättiin 5 µl XC-puskuria. Valmistettiin 0,8-prosenttinen agarosigeeli testidigestioon samoin kuin aiemmin. Agarosigeelielektroforeesilaitteiston ajokammio täytettiin TAE-puskurilla (liite 3), geeli aseteltiin kammioon ja näytteitä pipetoitiin 20 µl ja markkeria 5 µl kaivoihin. Geeliä ajettiin 80 V 60 minuuttia.

6.1.8 Preparatiivinen digestio

Seuraavaksi plasmidille tehtiin preparatiivinen digestio, jossa se ensin pilkottiin entsyymeillä, kuten testidigestiossakin. Sitten lineaarinen leikattu plasmidi

puhdistettiin kaikista ei-toivotuista rengasmaisista ja superkierteisistä muodoista agarosigeelielektroforeesilla.

Ensin laskettiin reaktioseokseen pipetoitavien liuosten määrät. Kun DNA:ta piti olla 15 µg ja pitoisuus kloonilla 2 oli 0,7857 µg/µl, niin $X \times 0,7857 \text{ µg/µl} = 15 \text{ µg}$, joten $X = 19,1 \text{ µl}$. Entsyymejä piti olla 4 U/µg DNA kohti ja entsyymien pitoisuus oli 20 U/µl, joten $15 \text{ µg} \times 4 = 60 \text{ µg}$ ja $60 \text{ µg} / 20 = 3 \text{ µl}$. Reaktion kokonaistilavuus oli 30 kertaa käytettyjen entsyymien yhteistilavuus, joten $6 \text{ µl} \times 30 = 180 \text{ µl}$. Puskuri oli kymmenkertaista, joten sen täytyi laimentua 10 kertaa lopulliseen seokseen, joten $180 \text{ µl} / 10 = 18 \text{ µl}$. Jäljelle jäävä tilavuus lisättiin steriiliä vettä. Kloni 5:n tilavuudet laskettiin samaan tapaan, kun sen pitoisuus oli 0,6171 µg/µl.

TAULUKKO 8. Sal1-HF ja Hind III -preparatiivisen digestion reaktioseos (pSSH)

Reagenssi	Tilavuus
DNA	19,1 µl
Steriili vesi	136,9 µl
10 x buffer n:o 2	18 µl
Sal1-HF	3 µl
Hind III	3 µl
	Yhteensä 180 µl

TAULUKKO 9. Sal1-HF ja Eco RV-HF -preparatiivisen digestion reaktioseos (pSSE)

Reagenssi	Tilavuus
DNA	24,3 µl
Steriili vesi	131,7 µl
10 x Buffer n:o 4	18 µl
Sal1-HF	3 µl
Eco RV-HF	3 µl
	Yhteensä 180 µl

Reaktioseokset pipetoitiin taulukoiden 8 ja 9 mukaan, ja niitä inkuboitiin yön yli 37 °C:ssa. Kloonit 2:lle tehtiin Sal1-HF-HindIII-digestio ja kloonit 5:lle Sal1-HF-EcoRV-digestio. Seuraavana aamuna reaktioseoksiin lisättiin 3 µl CIP-liuosta ja inkuboitiin niitä vielä tunti, minkä jälkeen lisättiin 45 µl XC-puskuria. Preparatiivista agarosigeelielektroforeesia varten valmistettiin steriilisti kaksi 0,8-prosenttista agarosigeeliä kuten aiemmin. Kumpikin reaktioseos pipetoitiin kokonaan oman geelinsä kahteen kaivoon. Markkeria pipetoitiin 15 µl reunimmaiseen kaivoon. Yksi kaivo jätettiin siis tyhjäksi reaktioseoskaivon ja markkerin välillä, jotta markkeri ei kontaminoisi näytettä. Ajettiin geelejä 1 x TAE-puskurin kanssa 60 V, yhteensä 4 tuntia 30 minuuttia. Kuvat otettiin 3,5 tunnin ajan jälkeen, minkä jälkeen ajoa jatkettiin vielä tunti.

Geelipalat leikattiin steriilillä veitsellä valmiiksi punnittuihin eppendorf-putkiin. Vyöhykkeet häntivät, mutta kaikkia häntiä ei yritetty leikata mukaan. Putket ja palat punnittiin, jolloin geelipalojen painoiksi saatiin seuraavat: pSSH-digestion putki 1 oli 1,606 g – 1,013g = 0,593 g ja putki 2 0,454 g – 1,009 g = 0,454 g. pSSE-digestion oli 1 painoi 1,436 g – 1,008 g = 0,428 g ja putki 2 1,677 g – 1,001 g = 0,676 g.

6.1.9 DNA:n eristys geelipaloista

DNA eristettiin geelipaloista kaupallisella Nucleospin Extract II –kitillä (liite 7). Kun geelipalat oli saatu sulatettua, kukin liuos jaettiin kolmeen pylvääseen, koska yksi pylväs pystyy vastaanottamaan vain 400 mg geeliä. Kunkin vektorin DNA:t yhdistettiin yhteen eppendorf-putkeen, ja liuoksista mitattiin pitoisuudet Nanodropilla. Taulukossa 10 on esitetty mitatut DNA-pitoisuudet.

TAULUKKO 10. Geelipaloista eristettyjen DNA-liuosten pitoisuudet

Vektori	Pitoisuus (ng/µl)
pSSH	49,4
PSSE	37,4

Eri entsyymeillä leikatuille vektoreille tehtiin testiajo agarosigeelillä, että saatiin selville ovatko ne puhdistuneet kunnolla. Kumpaakin geeliltä eristettyä vektoria

pipetoitiin 3 µl omaan putkeen. Lisäksi putkiin pipetoitiin 3 µl XC-puskuria. Jäljelle jäävät vektoriliuokset pakastettiin -20 °C:seen odottamaan myöhempää ligaatiokäsittelyä.

Testilajoa varten valmistettiin 0,8-prosenttinen agarosigeeli kuten aiemmin. Geelistä leikattiin kolmen kaivon levyinen pala ja siihen pipetoitiin 6 µl kutakin preparatiivisessa digestiossa puhdistettua näytettä sekä lisäksi 5 µl markkeria. Geeliä ajettiin 80 V 1h.

6.1.10 Vektorin puhdistuksen todentaminen testiligaatiolla

Jotta saatiin selvitettyä ovatko vektorit kunnolla puhdistuneita, niille tehtiin vielä testiligaatio. Lineaarinen vektori liitettiin takaisin rengasmaiseksi, jotta se voitiin ligation jälkeen siirtää transformaatiolla bakteeriin. Reaktioseokset pipetoitiin pieniin eppendorf-putkiin. DNA:ta tarvittiin n. 50 ng. Sen perusteella laskettiin veden tilavuus, kun muut tilavuudet olivat vakioita.

TAULUKKO 11. Testiligaation reaktioseos (pSSH)

Reagenssi	Tilavuus
DNA	1 µl
Steriili vesi	13,7 µl
10 x ligaatiopuskuri (NEB)	1,8 µl
20 mg/ml spermidiini	0,5 µl
T4 DNA ligaasi (NEB)	1 µl
	Yhteensä 18 µl

TAULUKKO 12. Testiligaation reaktioseos (pSSE)

Reagenssi	Tilavuus
DNA	1,4 µl
Steriili vesi	13,3 µl
10 x ligaatiopuskuri (NEB)	1,8 µl
20 mg/ml spermidiini	0,5 µl
T4 DNA ligaasi (NEB)	1 µl
	Yhteensä 18 µl

Ensin putkiin pipetoitiin vain DNA ja vesi. Putkia kuumennettiin 65 °C:ssa 5 minuuttia, nostettiin jäihin ja pikafuugattiin. Sitten pipetoitiin loput reaktioseoksen liuokset taulukoiden 11 ja 12 mukaan. Seokset vorteksoitiin ja pikafuugattiin ja niitä inkuboitiin yön yli PCR-laitteessa taulukon 13 mukaisella ohjelmalla.

TAULUKKO 13. Testiligaation lämpötilaohjelma

Lämpötila	Aika
20 °C	60 min
16 °C	120 min
14 °C	720 min

6.1.11 Ligatoidujen vektorien transformaatio

Ligatoidut rengasmaiset vektorit siirrettiin transformaatiolla kompetentteihin soluihin. Transformoitujen solujen maljausta varten valmistettiin LB-agarmaljoja (liite 3) kanamysiiniantibiootilla (50 µl/ml). 9 µl ligaatioseosta pipetoitiin kompetenttien solujen eppendorf-putkiin. Solu-liuosta oli noin 200 µl/putki. Kompetentteina soluina käytettiin aiemmin fysiologian laitoksella valmistettuja XL1Blue (7.4.2011) ja NEB5 (12.5.2011) -kantoja. pSSH-vektori siirrettiin XL1Blue-kantaan ja pSSE-vektori NEB5-kantaan. Transformaatioseoksia pidettiin jäissä 20 minuuttia välillä hellästi sekoitellen. Putket nostettiin lämpöblokkiin 42 °C:seen 1 minuutin ja 30 sekunnin ajaksi, jonka jälkeen ne nostettiin taas jäihin 2 minuutiksi. Putkiin lisättiin 500 µl lämmitettyä SOC-kasvatuslientä (liite 3) ja niitä kasvatettiin 30 minuuttia ravistelijassa nopeudella 220 rpm 37 °C:ssa. Putket odottivat huoneen lämmössä kunnes ne saatiin maljattua. Kasvustoa maljattiin 100 µl, 10 µl ja 1 µl. 10 µl:n ja 1 µl:n levityksessä apuna käytettiin noin 100 µl SOC-kasvatuslientä. Maljoja kasvatettiin lämpökaapissa yön yli 37 °C:ssa. Niillä ei ollut yhtään pesäkkeitä, mutta maljojen epäilyttävän näköisen agarin takia transformaatioseokset maljattiin uudelleen.

Uusi transformaatio tehtiin samoin kuin aiemmin, mutta kompetentteina soluina käytettiin sellaisia kantoja, joista tiedettiin varmasti, että ne toimivat. Kannat

olivat RV308 (20.4.2010) ja NEB5 (21.1.2010). pSSH-vektori siirrettiin NEB5-kantaan ja pSSH-vektori RV308-kantaan. 20 minuutin jäissä pitoa venytettiin nyt 30 minuuttiin ja ravistelukasvatusta 45 minuuttiin transformaation onnistumisen maksimoimiseksi. Kasvustoa maljattiin samoin kuin aiemmin, mutta 1 µl:n maljaa ei tehty ollenkaan. Maljoja kasvatettiin taas yön yli 37 °C:ssa. Tällä kertaa kaikilla muilla maljoilla oli paljon pieniä pesäkkeitä, paitsi pSSH 100 µl:n maljalla. Vektorin teko päätettiin tehdä uudestaan preparatiivisesta digestiosta asti.

6.1.12 Vektorin uudelleen valmistus

Tarvittavat tilavuudet uuteen preparatiiviseen digestioon laskettiin samalla periaatteella kuin aiemmin, mutta DNA:ta päätettiin laittaa 20 µg 15 µg:n sijaan. Lisäksi leikkaukset DNA:han päätettiin tehdä vain SalI-HF- ja HindIII-entsyymeillä (pSSH). Reaktioseoksen lopputilavuutena käytettiin 240 µl. Preparatiivista geeliä ajettiin 60 V, 5 h 30 min. Geelipalojen painoiksi saatiin seuraavat: putkelle 1 1,2039 g – 0,9140 g = 0,2899 g ja putkelle 2 1,1240 g – 0,9100 g = 0,214 g. Eristetyn DNA:n pitoisuus geelipalasta eristyksen jälkeen oli 40,2 ng/µl. Muut osiot tehtiin samoin kuin aiemmin.

Transformaatioissa käytettiin kompetenttien solujen kantana vain RV308-kantaa (valmistettu 20.4.2010). Molempiin transformaation maljoihin oli kasvanut todella paljon pieniä pesäkkeitä. Transformaatio tehtiin vielä kerran uudestaan samasta ligaation reaktioseoksesta kuin edellisellä kerralla. Tällä kerralla käytettiin kuitenkin NEB5-kantaa. Epäiltiin, että RV308-kannan genomissa on mahdollisesti jo itsessään kanamysiiniresistenssigeeni eli se pystyy kasvamaan kanamysiinimaljalla joka tapauksessa. Lisäksi RV308-kantaa ei oikeastaan pitänyt käyttää, koska se on proteiinintuottokanta. NEB5-kanta on DNA:n tuottokanta.

Transformaatio suoritettiin samoin kuin aiemmin uusille LB-agar-kanamysiinimaljoille. Tällä kertaa pesäkkeitä ei tullut. Samalla tehtiin kontrollitransformaatiot RV308- ja NEB5-kannoille. Kompetenteille soluille

lisättiin 10 µl steriiliä vettä, muuten kontrollit tehtiin samoin kuin varsinainen transformaatio.

5.2 Solumateriaalin kasvatus ja käsittely

Valitut solukannat (9E10, 1B10 ja 3F7) olivat hybridoomasoluja, jotka vaativat kasvaakseen RPMI-1640-mediumia (liite 3). Kyseiset solut kasvavat myös suspensiona, eli ne ovat vain löyhästi kiinni pohjassa.

Aluksi solukannat otettiin nestetyypisäiliöstä ja sulatettiin nopeasti ravistaen 37 °C:n vesihauteessa. Solut siirrettiin kasvamaan pieniin 25 cm²:n kasvatuspulloihin, joissa oli 5 ml kasvatusmediumia, joka oli valmiiksi tasapainotettu 15 min CO₂-kaapissa. Soluja kasvatettiin 37 °C:ssa, 5,00 % CO₂ ilmanpaineessa.

Kasvuston kuntoa ja tiheyttä seurattiin joka päivä mikroskopoimalla faasi-kontrasti mikroskoopilla, lukuun ottamatta viikonloppuisin. Kasvustoa ylläpidettiin vaihtamalla tuore medium noin 2–3 päivän välein, riippuen kasvuston tiheydestä ja kasvunopeudesta. Myös kasvuston jakaminen riippui tiheydestä ja kasvunopeudesta. Tiheyttä arvioitiin silmämääräisesti. Jakamisessa soluja ei tarvinnut trypsinoida, sillä ne saatiin irrotettua pullojen pohjasta pelkällä läimäyttelyllä ja hellällä pipetin kärjellä raaputtelulla, koska niiden ominaisuutena on olla löyhästi kiinni kasvatuspullon pohjassa.

Kun solut olivat kasvaneet 3 vuorokautta samassa mediumissa, voitiin kerätä medium talteen siinä olevien vasta-aineiden takia. Solut sentrifugoitiin nopeudella 3500 rpm 10 minuuttia ja suodatettiin Ø0,22 µm:n ruiskusuodattimella. Mediumiin lisättiin 20 -prosenttista NaN₃:a 1 µl yhtä medium millilitraa kohti.

Joistakin pulloista soluja varastoitiin nestetyyppeen myöhempää käyttöä varten. Varastoitavat solut pestiin 1xPBS:llä pelleteimalla solut nopeudella 1100 rpm (900xg) 5 minuuttia ja suspensoimalla mediumiin, joka sisälsi 5-prosenttista DMSO:ta. Solut pipetoitiin pieniin kryoampulleihin. Ampullit laitettiin

nisäkässolujen pakastusta varten kehiteltyyn isopropanoliastiaan, joka siirrettiin yön yli -70 °C:seen ja josta kryoputket siirrettiin seuraavana päivänä nestetyypisäiliöön.

5.3 RNA:n eristys

1B10-solukanta kasvoi nopeimmin, eli niistä eristettiin RNA:ta kaupallisella E.Z.N.A. Total RNA Kit I:llä (liite 8). Ensin solut siirrettiin kasvatuspullosta sentrifuugiputkiin ja pelletoitin nopeudella 3000 rpm 5 minuuttia. Supernatantti kaadettiin pois. Solut pestiin kylmällä 1 x steriilillä PBS:llä 3 kertaa. Sakka kopsuteltiin löyhemmäksi välillä ja sentrifugoitiin 3000 rpm nopeudella 5 min. Sakat yhdistettiin samaan putkeen PBS:llä ja lisättiin 4 µl β-merkaptotetanoli-TRK-lyysipuskuri-seosta. Putkea käännettiin, kunnes sakka oli liuennut. Solut homogenisoitiin Ultraturrax-homogenisointilaitteella 2 x 20 sekuntia nesteen pinnan alla. Terä oli aiemmin steriloitu autoklaavissa. Eristys tehtiin kitin ohjeen mukaan.

Eristetyistä RNA-liuoksista mitattiin Nanodropilla RNA-pitoisuudet, joista laskettiin RNA:n kokonaissaalis. Mittausta varten näytteitä laimennettiin 1:20 TE-DEPC-liuoksella. Taulukossa 14 on esitetty eluointien RNA-pitoisuudet.

TAULUKKO 14. Eluointien 1 ja 2 RNA-pitoisuudet

Näyte	Pitoisuus (ng/µl)
Eluointi 1	109,1
Eluointi 2	5,1

1. eluinnin pitoisuudeksi saatiin 109,1 ng/µl, josta laskettiin kokonaissaalis: $109,1 \text{ ng/ul} \times 20 \times (40 \text{ µl} \times 6) = 523680 \text{ ng} = 523,68 \text{ µg}$ eli 524 µg. 2. eluinnin pitoisuudeksi saatiin 5,1 ng/µl, josta saaliiksi laskettiin $5,1 \text{ ng/ul} \times 20 \times (40 \text{ µl} \times 6) = 24480 \text{ ng} = 25 \text{ µg}$. Toisen eluinnin pitoisuus oli niin pieni, että komplementaarista DNA:ta syntetöitiin vain ensimmäisestä eluinnista.

5.4 cDNA-synteesi

cDNA tehtiin vasta-aineen kevyille ja raskaille ketjuille erikseen kaupallisella Revert Aid -kitillä. Ensin alukkeet pariutettiin RNA:n kanssa: putkiin pipetoitiin 1 µl kokonais-RNA:ta, 1 µl 50 µM OL-1- tai OH-21-oligoa ja 10 µl steriiliä vettä. Seosputkia kuumennettiin 70 °C:ssa 5 minuuttia, nostettiin ne jäihin, pikafuugattiin nesteet pohjalle ja pidettiin jäällä. Seuraavaan vaiheeseen pipetoitiin seos, johon tuli yhtä putkea kohti 4 µl 5 x reaktiopuskuria, 1 µl Ribo Lock -inhibiittoria ja 2 µl 10 µM dNTP-seosta. Ensimmäiseen seokseen pipetoitiin 7 µl toista seosta ja annettiin DNA-säikeiden pariutua 37 °C:ssa 8 minuuttia, jonka jälkeen seokseen lisättiin 1 µl Revert Aid Reverse Transcriptase -entsyymiä ja inkuboitiin 42 °C:ssa 60 minuuttia. Lopuksi putket lämmitettiin vielä lämpöblokilla 85 °C:seen 10 minuutiksi ja nostettiin jälle.

5.5 PCR-monistukset

Jotta voitiin optimoida PCR I -reaktiota, cDNA-synteesisuotetteita otettiin heavy- ja light-ketjujen reaktioihin 1 µl ja 4 µl kumpaakin. Lisäksi pipetoitiin negatiivinen kontrollinäyte. Yhteen putkeen tuli taulukon 15 mukaiset reagenssit. Koska vasta-aineen geenien nukleotidijärjestystä ei tunneta, käytettiin useiden samankaltaisten alukkeiden seoksia. Ne sisältävät vaihtoehtoisia nukleotidijärjestyksiä.

TAULUKKO 15. PCR I -monistuskierröksen reaktioseos

Reagenssi	Tilavuus
50 mM MgCl ₂ (valmiissa seoksessa 2,25 mM)	0,75 µl
Steriili vesi	28-31 µl
5 x Phusion GC	10 µl
2,5 mM dNTP	4 µl
50 µM OL+19 tai OH-1 -oligoseos	1 µl
50 µM OH+41 tai OH-21 oligo	1 µl
DMSO (valmiissa seoksessa 3 %)	1,6 µl
Phusion polymeraasi	0,5 µl
Light tai heavy cDNA synteesituote	1-4 µl
	Yhteensä 50 µl

PCR-laite esilämmitettiin pipetoinnin aikana 98 °C:seen ennen varsinaista ohjelmaa. Negatiiviseen kontrolliin cDNA-synteesituotteen tilalle laitettiin steriiliä vettä. Putket nostettiin koneeseen ja aloitettiin ohjelma taulukon 16 mukaan.

TAULUKKO 16. PCR I -monistuskierröksen ohjelma

Lämpötila	Aika	Toistojen määrä
98 °C	30 s	1 x
98 °C	10 s	6 x
63 °C	10 s	
58 °C	10 s	
72 °C	20 s	
98 °C	10 s	27 x
63 °C	15 s	
72 °C	25 s	
72 °C	5 min	1 x
8 °C	→	-

PCR I -tuotteista ajettiin agarositestigeeli 1-prosenttisellä geelillä 80 V ja 40 minuuttia, että tiedettiin monistui ko tuotetta. 15 µl:aan tuotetta lisättiin 6 µl XC-

puskuria, ja seos pipetoitiin kaivoihin. Markkeria käytettiin 5 µl. Tuotteita saatiin monistumaan, joten voitiin jatkaa PCR II -monistuskierrökselle.

TAULUKKO 17. PCR II -monistuskierröksen reaktioseos

Reagenssi	Tilavuus
50 mM MgCl ₂	1,5 µl
Steriili vesi	59,9-63,4 µl
5 x Phusion reaction buffer GC	20 µl
2,5 mM dNTP	8 µl
50 mM OL+19 <u>tai</u> OL-1 -oligo	2 µl
50 mM OL+41 <u>tai</u> OL-19 -oligo	2 µl
DMSO	1,6 µl
Phusion polymeraasi	1,0 µl
PCR I Light tai Heavy -tuote	0,5-4 µl
	Yhteensä 100 µl

PCR II -monistuskierröksen reaktioseos pipetoitiin yhtä putkea kohti taulukon 17 mukaan. Näyteputkia oli 8 kappaletta; heavy- ja light –tuotteista molemmista (1 µl ja 4 µl) pipetoitiin 0,5 µl, 1 µl, 2 µl ja 4 µl. Lisäksi pipetoitiin negatiivinen kontrolli. Ohjelma tehtiin taulukon 18 mukaan. Tuotteista tehtiin testigeeli samoin kuin PCR I -monistuskierröksen tuotteille. Tuotteita saatiin monistumaan, joten voitiin jatkaa massamonistukseen.

TAULUKKO 18. PCR II -monistuskierröksen ohjelma

Lämpötila	Aika	Toistojen määrä
98 °C	30 s	1 x
98 °C	10 s	28 x
65 °C	10 s	
72 °C	10 s	
72 °C	5 min	1 x
8 °C	→	-

Massamonistus tehtiin samoin kuin PCR II, mutta putkia tehtiin 10 kappaletta kullekin light- ja heavy-ketjuille. PCR I-monistuskierröksen näytteistä käytettiin

vain niitä, joihin oli pipetoitu 0,5 µl cDNA-synteesituotetta lisäksi PCR I-monistuskerroksen tuotteista pipetoitiin massamonistukseen vain 1 µl, koska nämä tilavuudet olivat optimaaliset tuoton suhteen. Kummankin ketjun tuotteet yhdistettiin omiin putkiin ja ne konsentroidiin Nucleospin Extract II -kitillä (liite 7). Pylväitä käytettiin kaksi kumpaakin ketjua kohtia. DNA:t eluoiitiin 47 µl:lla/putki lämmintä eluutio puskuria. Saman ketjun tuotteet yhdistettiin yhteen putkeen ja DNA-pitoisuudet mitattiin Nanodropilla. Taulukossa 19 on esitetty konsentroitujen DNA-näytteiden pitoisuudet.

Taulukko 19. Konsentroitujen näytteiden DNA-pitoisuudet

Näyte	Pitoisuus (ng/µl)
Heavy	244,1
Light	300,5

PCR-massamonistustuotteet puhdistettiin preparatiivisella geelillä; näytteisiin lisättiin 30 µl XC-puskuria ja pipetoitiin näytteet 1-prosenttiselle puhtaalle agarosigeelille. Markkeria käytettiin 15 µl. Geeliä ajettiin 60 V noin 1 tunti ja 40 minuuttia. Geeliltä leikattiin steriilisti vyöhykkeet noin 700 bp:n kohdalta. Palat punnittiin tyhjen eppendorf-putkien avulla, kuten aiemmin vektorin valmistuksessa preparatiivisen puhdistuksen yhteydessä. Light-ketjun geelin painoksi saatiin $1,3066 \text{ g} - 0,9365 \text{ g} = 0,3701 \text{ g}$ ja heavy-ketjun geelin painoksi $1,1416 \text{ g} - 0,9312 \text{ g} = 0,2104 \text{ g}$.

DNA eristettiin geelipaloista Nucleospin Extract II kitillä (liite 7). DNA:t eluoiitiin 45 µl:lla/putki lämmintä steriiliä vettä. DNA-pitoisuudet mitattiin Nanodropilla. Taulukossa 20 on esitetty DNA-liuosten pitoisuudet.

TAULUKKO 20. Geelipaloista eristettyjen DNA-liuosten pitoisuudet

Näyte	Pitoisuus (ng/µl)
Heavy	43,7
Light	219,1

5.6 Geeni-insertin siirto sekvensointivektoriin

Geeni-insertit yhdistettiin ligaatiolla kaupalliseen pCR Blunt -sekvensointivektoriin. Reaktioseokseen pipetoitiin taulukon 21 mukaiset reagenssit. Kummallekin DNA-ketjulle tehtiin oma reaktioseos.

TAULUKKO 21. Ligaation reaktioseos

Reagenssi	Tilavuus
pCR Blunt vektoria	0,6 µl
geeliltä eristettyä heavy tai light DNA:ta	3 µl
10 x ligaatiopuskuria	0,6 µl
st. vettä	1,2 µl
T4 DNA ligaasia	0,6 µl
	Yhteensä 6 µl

Reaktioseoksia inkuboitiin 16 °C:ssa noin 4 tuntia 30 minuuttia. Vektorigeenipala-yhdistelmä siirrettiin transformaatiolla *E. coli* -solujen NEB5-kantaan, joka oli tehty laboratoriossa aiemmin 3/11. Kaikki 6 µl ligaatioseosta pipetoitiin kompetenteille soluille jäällä. Seoksia inkuboitiin jäällä 30 minuuttia, nostettiin lämpöblokkiin 42 °C:seen 1 minuutiksi 30 sekunniksi, nostettiin taas jäälle 2 minuutiksi, lisättiin 500 µl lämmintä SOC-kasvatuslientä (liite 3) ja kasvatettiin ravistelussa nopeudella 220 rpm 37 °C:ssa 45 minuuttia. Transformaatioseoksia maljattiin kanamysiinimaljoille 10 µl, 50 µl, 200 µl.

5.7 Geeni-insertin todentaminen

Loput transformaatioseoksista laitettiin kasvamaan 10 ml:aan SB-MOPS-kasvatusliemeen yön yli ravisteluun nopeudella 220 rpm 37 °C:seen. Tästä kasvoi sekaklooniseos. Sekakloonikasvustot sentrifugoitiin ja niille tehtiin DNA eristys miniprep-kitillä (liite 5). Molemmille DNA-ketjuille käytettiin 4 eristyspylvästä. Eluointiin käytettiin 50 µl putkea kohti lämmintä AE eluutiopuskuria. Pitoisuudet mitattiin Nanodropilla. Taulukossa 22 on esitetty eluotujen liuosten DNA-pitoisuudet.

TAULUKKO 22. Sekakloonikasvustoista eristettyjen DNA-liuosten pitoisuudet

Näyte	Pitoisuus (ng/μl)
Heavy	121,2
Light	150,9

Eristetyille DNA:lle tehtiin testidigestio EcoRI-HF-entsyymillä. Reaktioseokset pipetoitiin taulukon 23 mukaan yhtä putkea kohti kummallekin DNA-ketjulle.

TAULUKKO 23. Testidigestion reaktioseos

Reagenssi	Tilavuus
Eristetty DNA	5 μl
Steriili vesi	12,5 μl
10 x buffer n:o 4	2 μl
EcoRI-HF -entsyymi	0,5 μl
	Yhteensä 20 μl

Seoksia inkuboitiin 1 tunti ja joukkoon lisättiin 5 μl XC-puskuria. Näytteet pipetoitiin 1-prosenttiselle agarosigeelille ja ajettiin 60 V 30 minuuttia. Markkeria käytettiin 5 μl.

Positiivisia klooneja ei löydetty, joten työtä jatkettiin vielä poimimalla kunkin DNA-ketjun transformaatiomaljoilta 10 pesäkettä. 1–5 pesäkkeet olivat hieman 6–10 pesäkkeitä pienempiä ja kiinteämpiä. Jokaista pesäkettä pyyhkäistiin puhtaalle LB-agar-kanamysiinimaljalle ja kärki tiputettiin 15 ml:n kasvatusputkeen, jossa oli 5 ml SB-MOPS-kasvatuslientä (liite 3). Putkia kasvatettiin yön yli ravistelussa nopeudella 220 rpm 30 °C:ssa ja maljoja kasvatettiin lämpökaapissa yön yli 37 °C:ssa.

Putkikasvatuksille tehtiin DNA-eristys miniprep-kitillä (liite 5). Putkia sentrifugoitiin ensin nopeudella 3500 rpm 15 min 4 °C:ssa. Supernatantit kaadettiin pois ja jatkettiin kitin ohjeen mukaan. DNA eluoiitiin pylväistä AE eluutio -puskurilla 50 μl:lla putkea kohti. DNA-pitoisuudet mitattiin Nanodropilla. Taulukossa 24 on esitetty kloonien DNA-pitoisuudet.

TAULUKKO 24. Kloonien DNA-pitoisuudet miniprep-eristyksen jälkeen

Näyte	Pitoisuus (ng/μl)
Heavy kloni 1	280,6
H kl 2	247,8
H kl 3	275,2
H kl 4	60,7
H kl 5	272,3
H kl 6	267,2
H kl 7	444,1
H kl 8	259,1
H kl 9	252,2
H kl 10	283,3
Light kloni 1	260,5
L kl 2	289,2
L kl 3	181,6
L kl 4	235,8
L kl 5	151,2
L kl 6	277,5
L kl 7	267,4
L kl 8	240,2
L kl 9	274,9
L kl 10	295,1

Kaikille klooneille tehtiin testidigestio samoin kuten aiemmin sekaklooniseokselle. Geeliä ajettiin 60 V 45 minuuttia. Markkeria pipetoitiin 5 μl.

TAULUKKO 25. Pesäke-PCR:n reaktioseos

Reagenssi	Tilavuus
Steriili vesi	40,5 µl
10 x dynazyme buffer	5,0 µl
100 µM M+13 aluke	0,1 µl
100 µM M-13 aluke	0,1 µl
Dynazyme polymeraasi	0,3 µl
2,5 mM d NTP	4 µl
	Yhteensä 50 µl

Pesäke-PCR-reaktioseos pipetoitiin taulukon 25 mukaan. Jokaiseen putkeen pipetoitiin 50 µl reaktioseosta. Lisäksi pipetoitiin putket positiiviselle ja negatiiviselle kontrollinäytteelle. Positiivisena kontrollina käytettiin aiemmin laboratoriossa 8.7.2010 tehtyä 9E10-solukannan vasta-ainegeeniä pCR Blunt-vektorissa, NEB 5 *E. coli* -soluissa. Näytteen pitoisuus oli 0,35 µg/µl, joten sitä laimennettiin pipetoimalla 0,5 µl 175 µl:aan steriiliä vettä. PCR-putkeen näytettä pipetoitiin 0,5 µl. Negatiivisena kontrollina näytteen tilalle pipetoitiin 0,5 µl steriiliä vettä.

Jokaista pesäkettä pyyhkäistiin LB-agar-kanamysiinimaljalle ja kärki pudotettiin PCR-putkeen. Kärkien annettiin liettyä 5 minuuttia putkissa, minkä jälkeen liuosta pipetoitiin vielä pari kertaa edestakaisin ja poistettiin kärjet. Maljaa kasvatettiin lämpökaapissa 37 °C:ssa yön yli. Putket siirrettiin PCR-laitteeseen ja ajettiin taulukon 26 mukaisella ohjelmalla.

TAULUKKO 26. Pesäke-PCR:n ohjelma

Lämpötila	Aika	Toistojen määrä
96 °C	2 min	1 x
95 °C	30 s	1 x
54 °C	45 s	30 x
72 °C	1 min	1 x
72 °C	5 min	1 x
10 °C →	-	-

Kun putket oli laitettu ajoin, huomattiin, että alukkeet oli unohdettu pipetoida kokonaan. Ohjelma pysäytettiin, jokaiseen putkeen pipetoitiin alukkeiden seosta 0,2 µl ja ohjelma aloitettiin alusta. Ajoin jälkeen PCR-tuotteisiin lisättiin 12,5 µl XC-puskuria ja niitä pipetoitiin 25 µl 1-prosenttisen agarosigeelin kaivoihin. Geeliä ajettiin 80 V 30 minuuttia. Markkeria käytettiin 5 µl. Positiivisista testidigestion ja pesäke-PCR:n klooneista tehtiin yön yli kasvustot 5 ml:n SB-MOPS-kasvatusliemeen (liite 3). Kasvustoja kasvatettiin ravistaen nopeudella 220 rpm 37 °C:ssa. Seuraavana päivänä kasvustoista tehtiin glyserolistokit kuten aiemmin.

Lopuista kasvustoista eristettiin DNA miniprep-kitillä kuten aiemmin ohjeen mukaan (liite 5). Ennen eristystä kasvustot sentrifugoitiin nopeudella 3500 rpm 15 minuuttia 4 °C:ssa. Lopuksi DNA eluointiin 50 µl:lla lämmintä steriiliä vettä putkea kohti. Näytteiden DNA-pitoisuus mitattiin Nanodropilla. Taulukossa 27 on esitetty kloonien DNA-pitoisuudet eluoinin jälkeen.

TAULUKKO 27. Heavy- ja Light-kloonien DNA-pitoisuudet miniprep-eristyksen jälkeen

Näyte	Pitoisuus (ng/µl)
Heavy klooni 2	187,9
H kl 7	274,8
Light klooni 2	163,1
L kl 12	237,6
L kl 14	208,6
L kl 16	195,6
L kl 21	214,4
L kl 23	130,9
L kl 30	177,6
L kl 32	191,2
L kl 37	175,4
L kl 39	213,6

Positiivisille kloni-näytteille tehtiin testidigestio, jolla varmistettiin vielä, että ne ovat varmasti positiiviset. Se tehtiin samoin kuin testidigestio ennen pesäke-PCR:ä.

5.8 Sekvensointi

Testidigestion perusteella pystyttiin valitsemaan hyvät kloonit sekvensointiin. Koska positiivisia heavy-klooneja oli vain kaksi, kloonit 2 ja 7, ne molemmat otettiin sekvensointiin. Light-klooneista valittiin kloonit 12, 14 ja 21. Sekvensoinnilla selvitettiin geeni-inserttien nukleotidijärjestys ja ovatko PCR-monistuksen yhteydessä liitetyt entsyymipaikat todella vasta-ainegeenissä.

Sekvensoinnissa käytettiin samoja alukkeita kuin pesäke-PCR:ssä, mutta vain yhtä aluketta reaktiota kohti, joten putkia tuli kaksi yhdestä näytteestä. Sekvensoinnit tehtiin molemmista heavy-näytteistä ja kolmesta light-näytteestä; putkia tuli siis yhteensä 10 kpl. Putkiin pipetoitiin taulukon 28 mukaiset reagenssit. Putket vietiin sekvensoitavaksi sekvensointipalveluun; lämpötilaksi valittiin 60 °C.

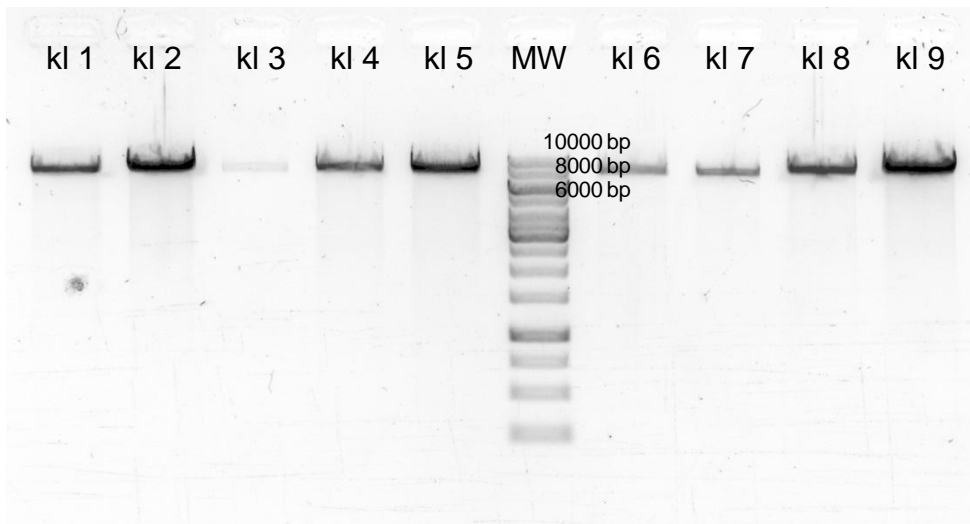
TAULUKKO 28. Sekvensoinnin reaktioseos

Reagenssi	Tilavuus
positiivisen kloonin eristetty DNA	1,0 µl
10 µM M13+ tai M13- aluke	0,5 µl
Steriili vesi	5,5 µl
	yhteensä 7µl

6. TULOKSET JA TULOSTEN TARKASTELO

6.1 Tuottovektorin valmistus

Aluksi plasmidi siirrettiin transformaatiolla *E. coli* -soluihin. Transformaatiomaljoilla kasvoi riittävän paljon pesäkkeitä, jotta niistä saatiin poimittua klooneja. Kokonaismäärää ei laskettu. Kuvassa 9 on esitetty testidigestion tulokset. Koska kuvan 9 mukaan plasmidi oli transformoitunut kaikkiin klooneihin, valittiin jatkoon kloonit, joiden pitoisuudet olivat suunnilleen suurimmat eli niiden vyöhykkeet olivat tummimmat.

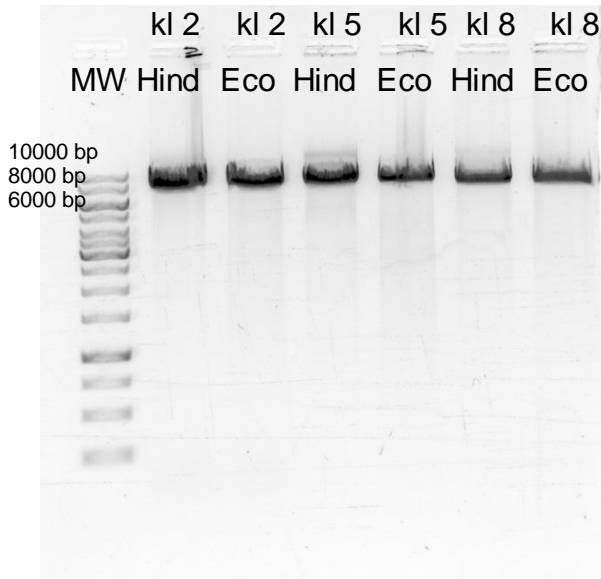


KUVA 9. Testidigestion agarosigeeli. Digestio tehtiin HindIII-entsyymillä pShuttle-plasmidille. MW tarkoittaa molecular weight eli molekyyliainoa.

Plasmidikasvatus tehtiin kloonien 2, 5 ja 8 glyserolistoikeista. Kasvatuksessa saatiin lisää solumateriaalia, joka sisälsi plasmidin. DNA-eristyksessä klooni 8:n pitoisuuden huomattiin olevan melko pieni, joten eristyksen yhteydessä DNA:ta oli luultavasti kadonnut. Klooni 8:lle tehtiin kuitenkin vielä testidigestio, mutta preparatiiviseen digestioon sen tekemistä ei enää jatkettu.

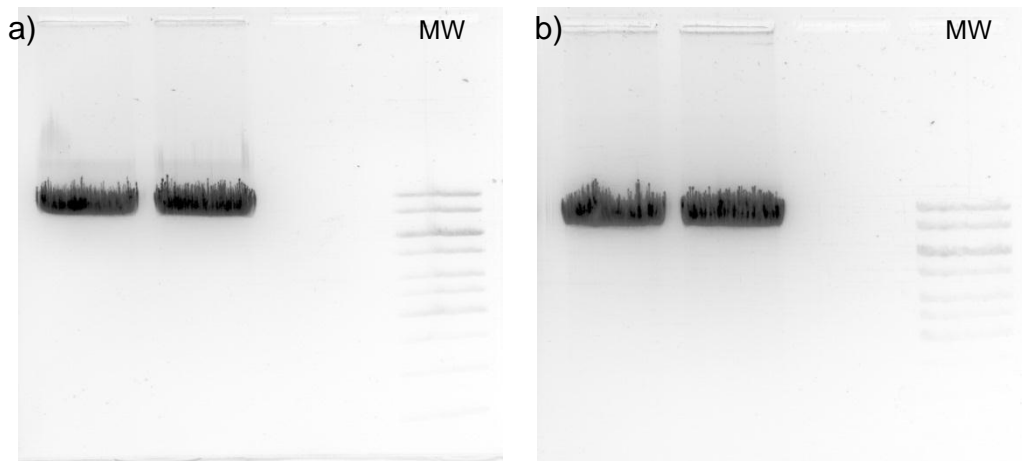
Seuraavaksi DNA-näytteelle tehtiin testidigestio. Se tehtiin kahdella eri entsyymikombinaatiolla: Sal1-HF ja HindIII sekä Sal1-HF ja EcoRV-HF. Kuvassa 10 on esitetty testidigestion tulokset. Plasmidin teoreettinen koko on

7500 bp. Jokainen pilkottu plasmidi liikkui alueella 10000–7500 bp. Jos geeliä olisi ajettu hieman pidemmälle, vyöhykkeet olisivat todennäköisesti ehtineet erottua paremmin toisistaan ja molekyylikoko olisi saatu arvioitua tarkemmin.



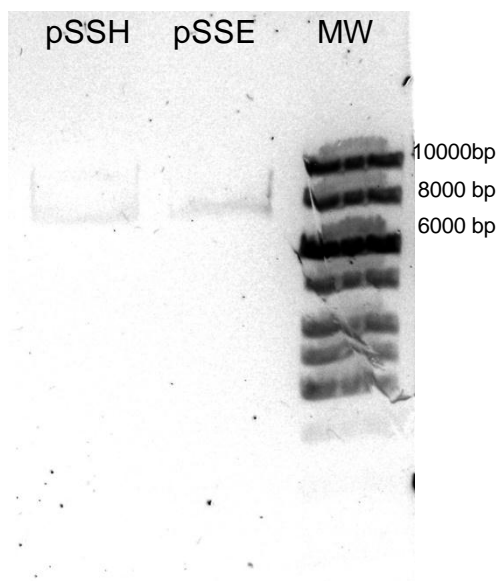
KUVA 10. Eristettyjen plasmidien testidigestion agarosigeeli. Digestio tehtiin HindIII-Sal1 tai EcoRV-Sal1 -entsyymeillä. Jokainen kloonisi sisälsi oikean plasmidin.

Preparatiivinen digestio tehtiin samoilla entsyymeillä kuin testidigestio. Kuvassa 11 on esitetty preparatiivisen digestion agarosigeelit 3,5 tunnin ajon jälkeen. Puhdistumista näyttää tapahtuneen varsinkin kuvassa 9 a), sillä varsinaisen vektorivyöhykkeen yläpuolella näkyy haaleammat vyöhykkeet.



KUVA 11. Preparatiivisen digestion agarosigeelit: a) pSSH ja b) pSSE. a-geeli tehtiin HindIII- ja Sal1-entsyymeillä ja b-geeli EcoRV- ja Sal1-entsyymeillä.

Seuraavaksi geeliltä eristettiin DNA:t ja ajettiin testigeeli, että nähtiin miten puhdistus oli onnistunut. Kuvassa 12 on esitetty testiajon tulokset. Vektoreiden vyöhykkeet ovat todella himmeät ja PSSH:n vyöhykkeen päällä näkyy himmeästi jotain epäpuhtautta. Vektoreihin oli siis saattanut jäädä preparatiivisen digestion jälkeen muitakin plasmidin muotoja kuin vain lineaarista muotoa, siksi tehtiin vielä testiligaatio puhdistuksen tarkemmaksi tutkimiseksi. Kun vektori oli saatu ligaatiolla takaisin rengasmaiseen muotoon, se voitiin transformoida kompetentteihin *E. coli* XI1Blue- ja NEB5-kantoihin.



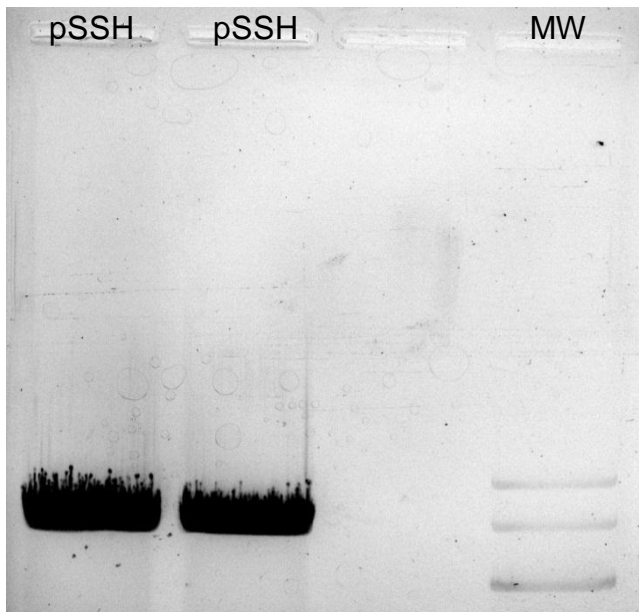
KUVA 12. Testiajon agarosigeeli

Transformaatiomaljoilla ei ollut yhtään pesäkkeitä. Mikäli maljoilla kasvaisi pesäkkeitä, vektoriliuos sisältäisi lineaarisen vektorin ohella ei-haluttua rengasmaista muotoa, koska plasmidissa on kanamysiiniresistenssiys ja resistenssiys toimii vain jos plasmidi on rengasmaisen muotoon. Myöhemmässä vaiheessa, kun insertti liitetään vektoriliuokseen, kontaminaationa oleva rengasmaisen muoto rikastuisi liikaa ja estäisi lineaarisen muodon monistumisen. Bakteeri, jolla on suurempi insertin sisältävä plasmidi, kasvaa hitaammin kuin pelkän pienemmän plasmidivektorin sisältävä bakteeri. Kuitenkin mietittiin olisiko preparatiivinen digestio voinut onnistua niin hyvin, ettei yhtään pesäkettä tullut. Koska maljojen agar näytti myös hieman oudolta,

transformaatio päätettiin tehdä uudestaan NEB5- ja RV308-kannoilla sekä uusilla maljoilla asian varmistamiseksi.

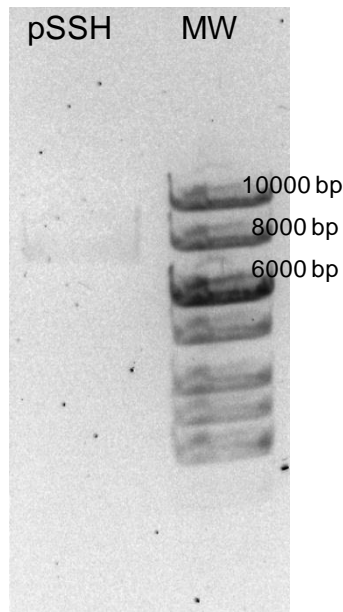
Kun transformaatio oli tehty uudestaan, kaikilla muilla maljoilla oli paljon pieniä pesäkkeitä, paitsi NEB5-pSSH 100 µl:n maljalla. Vektorin teko päätettiin tehdä uudestaan preparatiivisesta digestiosta asti. Tässä kuitenkin epäiltiin olisiko RV308-kantaa maljattu vahingossa myös toiselle NEB5-kannan maljalle

Kuvassa 13 on esitetty uuden preparatiivisen digestion tulokset. Tällä kertaa vyöhykkeitä ajettiin kunnolla geelin alareunaan asti. Muuten geeli näytti melko samalta kuin aiemmissa preparatiivisissa digestioissa.



KUVA 13. pSSH preparatiivisen digestion agarosigeeli. Digestiossa käytettiin HindIII- ja SalI-entsyymejä.

Kun DNA oli taas eristetty geeliltä, ajettiin testigeeli. Kuvassa 14 on esitetty testiajon tulos. Vyöhyke on noin 7500 bp kohdalla, niin kuin pitikin, mutta se on todella haalea.



KUVA 14. Testiajon agaroosigeeli

DNA:n puhdistumista testattiin taas testiligaatiolla ja transformaatiolla, mutta nyt se tehtiin RV308-kantaan. Maljoilla kasvoi todella paljon pieniä pesäkkeitä. Transformaatio tehtiin vielä kerran uudestaan samasta ligaation reaktioseoksesta kuin edellisellä kerralla. Tällä kerralla käytettiin kuitenkin NEB5-kantaa, sillä epäiltiin, että RV308-kannan genomissa on mahdollisesti jo itsessään kanamysiiniresistenssigeeni eli se pystyy kasvamaan kanamysiinimaljalla myös ilman plasmidia. RV308-kanta on proteiinintuotto kanta, jota ei tavallisesti käytetä kloonausvaiheessa, kuten NEB5-kantaa, joka on DNA:n tuottokanta. NEB5-maljoilla ei kasvanut pesäkkeitä. Jonkin väärinymmärryksen johdosta, RV308-kantaa käytettiin tässä yhteydessä, vaikka se ei ollut tarkoitus.

Samalla tehtiin myös kontrollimaljaukset pelkillä NEB5- ja RV308-kannoilla LB-kanamysiinimaljoilla. RV308-kontrollimaljalla kasvoi paljon samanlaisia pieniä pesäkkeitä kuin edellisessä transformaatiossa. NEB5-maljoilla ei kasvanut pesäkkeitä ollenkaan. Tästä pääteltiin, että RV308-kanta ei sopinut kanamysiiniresistenssigeeninsä vuoksi tähän transformaatioon. NEB5-kanta varmisti vektorin puhtauden ja vektori on valmis vasta-ainegeeni-insertin siirtoon.

6.2 Solumateriaalin kasvatus ja käsittely

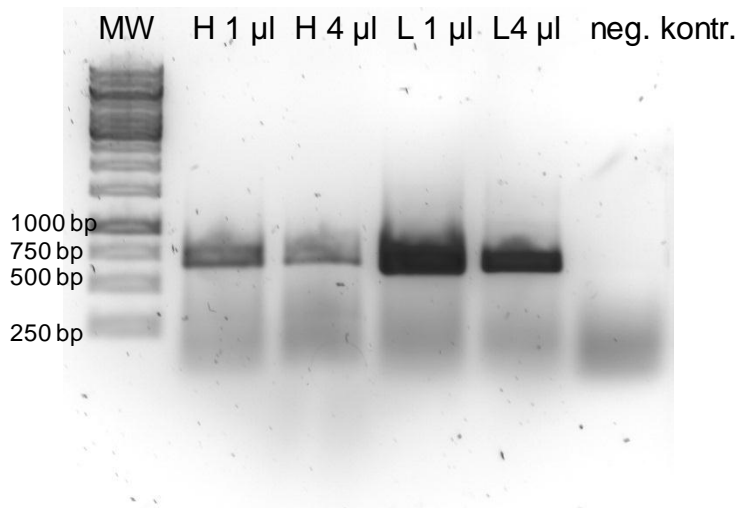
9E10-solukanta ei alkanut kasvaa toivotulla tavalla ja solut olivat todella huonovointisen ja ryppyisen näköisiä. Niitä yritettiin ottaa kahteen otteeseen kasvamaan, mutta ne näyttivät silti yhtä huonoilta. Todennäköisesti niiden aiemmassa varastoinnissa oli käynyt jotakin, mistä ne eivät olleet pitäneet, tai ne olivat kontaminoituneet jossakin varastoinnin vaiheessa. Lopulta 9E10-solut hävitettiin, jotta ne eivät ainakaan kontaminoisi toisia soluja. Muutkin solut kasvoivat välillä niin tiheäksi, että pulloissa oli pitkän aikaa hajonneita ja huonokuntoisia soluja. Yleensä jako oli 1:2–1:5. Soluja saatiin kasvatettua kuitenkin riittävästi varastointiin ja RNA:n eristykseen. Vasta kun soluja huomattiin jakaa reilummin, ne kasvoivat paljon paremmin.

6.3 RNA:n eristys ja cDNA-synteesi

Nanodrop-tulosten (taulukko 14) perusteella RNA:ta saatiin eristettyä. Toisen eluoinnin pitoisuus oli niin olemattoman pieni, että ainoastaan ensimmäisen eluoinnin RNA:sta jatkettiin cDNA-synteisiin. cDNA-synteestistä jatkettiin suoraan PCR-monistuskierroksiin.

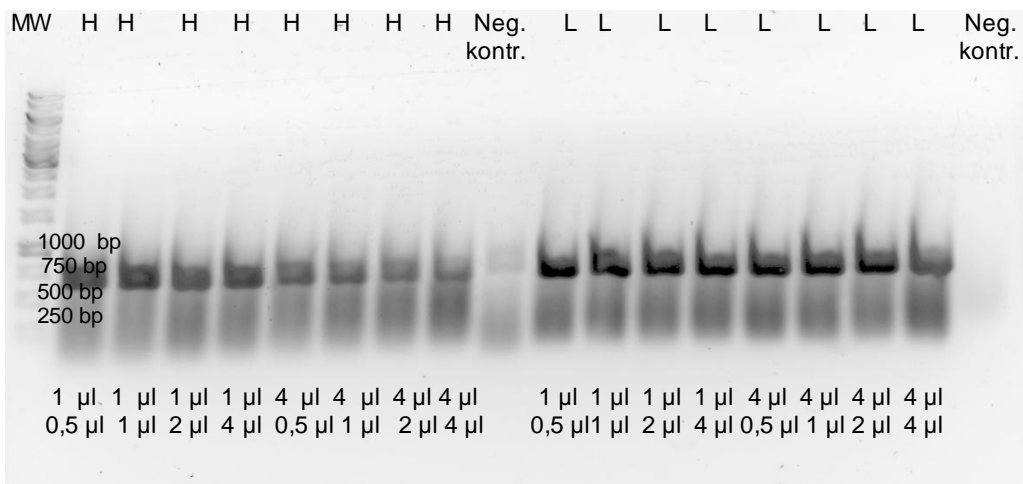
6.4 PCR-monistus

Vasta-aineen geenejä monistettiin kahdessa vaiheessa. Ensin cDNA:ta mallina käyttäen DNA:ta monistettiin PCR I -reaktiossa seos-oligoiden kanssa. PCR II -reaktioon malliksi otettiin PCR I -tuotetta. Kuvassa 15 on esitetty PCR I -monistuksen tulokset. Geelillä olevat vyöhykkeet ilmaisevat, että DNA:ta (noin 700 bp) oli saatu monistumaan ja voitiin jatkaa PCR II-monistuskierrokselle. Light-ketjujen vyöhykkeet ovat paljon paksummat ja tummemmat kuin heavy-ketjujen vyöhykkeet, joten light-ketjun DNA:t ovat monistuneet paremmin. Selkeiden vyöhykkeiden alapuoliset sumeat vyöhykkeet ovat peräisin oligoista.



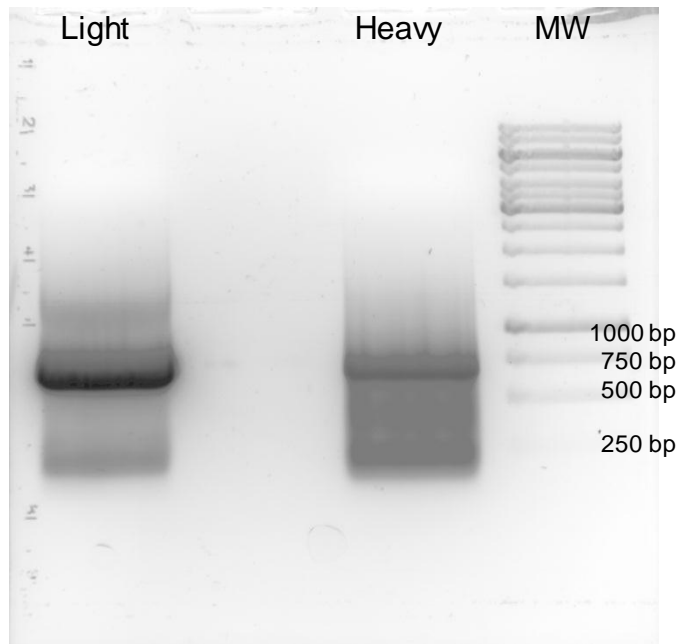
KUVA 15. PCR I -monistuskierroksen agarosigeeli

Kuvassa 16 on esitetty PCR II -monistuskierroksen tulokset. Jokaisen näytteen kohdalla on vyöhyke, joten se kertoo, että tuotetta monistui, joten voitiin edetä massamonistukseen.



KUVA 16. PCR II-monistuskierroksen agarosigeeli. Alareunassa olevat tilavuudet tarkoittavat kuinka paljon cDNA-reaktiota käytettiin PCR I-monistuskierrokselle ja kuinka paljon PCR I-reaktiota käytettiin II-monistuskierrokselle.

Kuvassa 17 on esitetty PCR-massamonistuksen tuotteiden puhdistuksen tulokset. Vasta-ainegeenin vyöhykkeet ovat noin 700 bp:n kohdalla eli ne ovat tummimat vyöhykkeet.

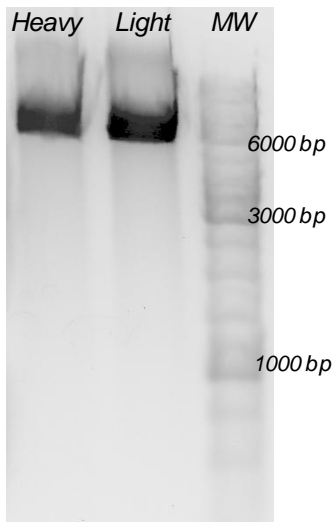


KUVA 17. PCR-massamonistuksen tuotteiden puhdistamisen agarosigeeli

6.5 Geeni-insertin siirto ja todentaminen

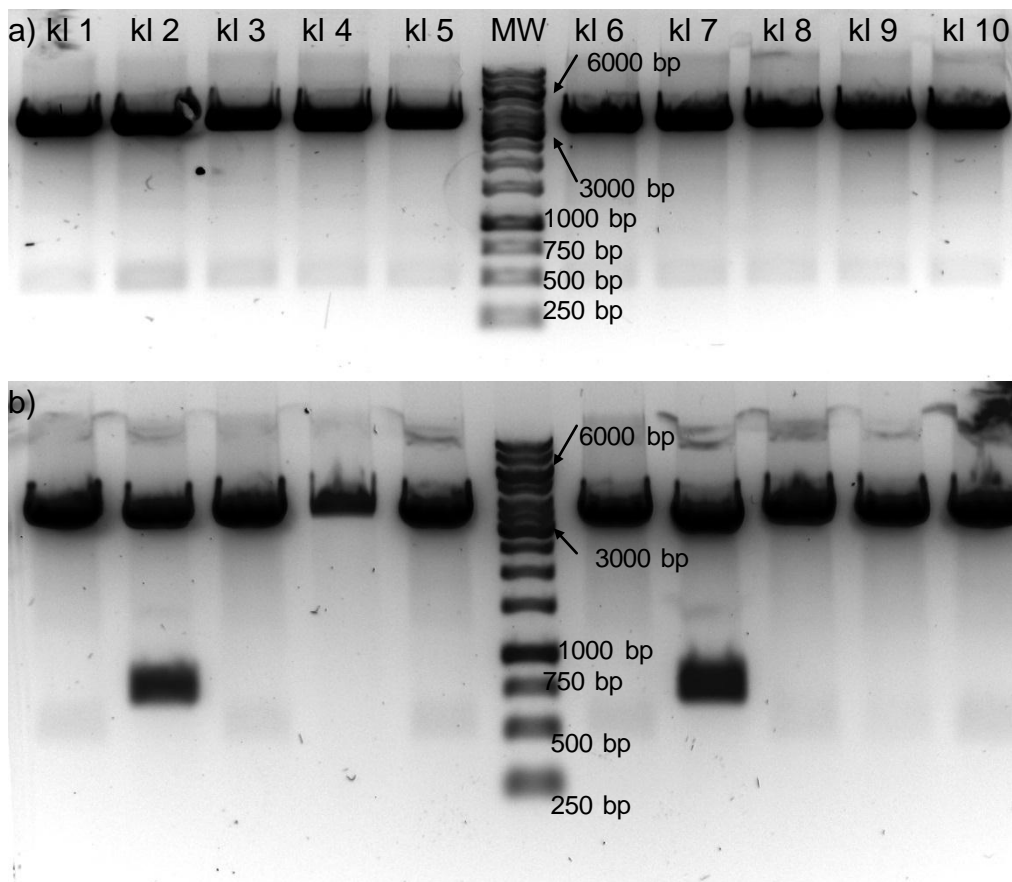
Massamonistetut geeni-insertit yhdistettiin ensin ligaatiolla sekvensointivektoriin ja sen jälkeen ligatoidut vektorit transformoitiin *E. coli* -soluihin NEB5kantaan. Transformaatioseosta sekä maljattiin että kasvatettiin sekaklooniseoksena putkissa. Sekaklooniseoksesta eristettiin DNA ja tehtiin testidigestio

Transformoidun sekaklooniseoksen viljely, DNA:n eristys ja digestio ei tuottanut toivottua tulosta eli positiivista kloonit ei löydetty sen avulla. Kuvassa 18 pitäisi näkyä pilkottu geeni-insertti noin 700 bp ja isompi vektoriosa noin 3000 bp. Kuvassa näkyy vain vektoriosa eli kyseiset kloonit eivät sisällä geeni-inserttiä.



KUVA 18. Testidigestion agarosigeeli. Digestioon käytettiin *EcoRI*-entsyymiä.

Transformaatiomaljoilta poimittiin kloonien pesäkkeitä, niistä eristettiin DNA, digestoitii tuotteet ja ajettiin geeli. Kuvassa 19 on esitetty testidigestion tulokset.

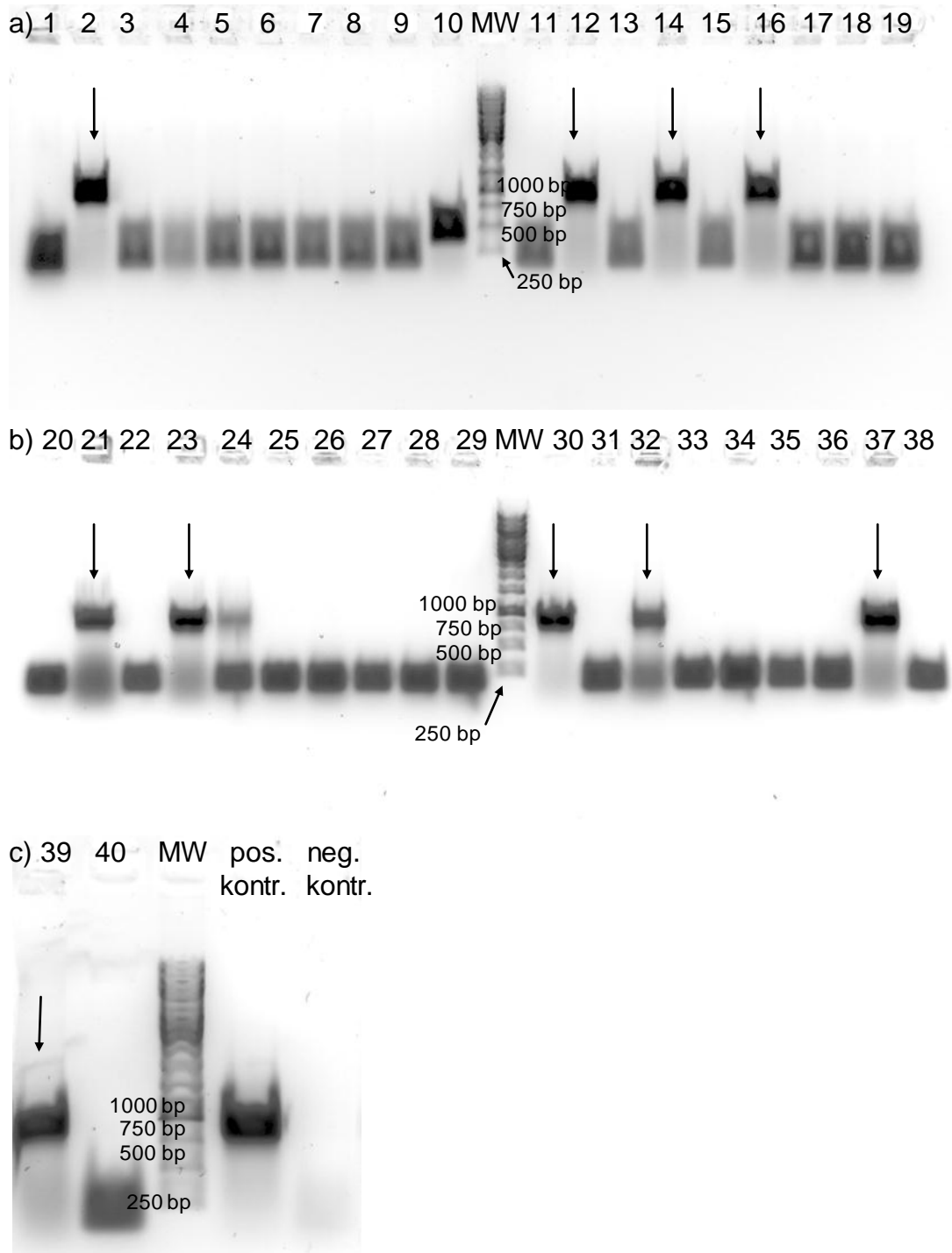


KUVA 19. a) Light-kloonien testidigestion agarosigeeli b) Heavy-kloonien agarosigeeli. Digestioihin käytettiin *EcoRI*-entsyymiä.

Sekvensointivektorien vyöhykkeet näkyvät isokokoisina ja tummina kuvissa 19 a) ja b) noin 4000 bp:n kohdalla. Heavy-kloonien 2 ja 5 kohdilla näkyy tumma vyöhyke noin 750 bp:n kohdalla. Geeni-insertin koon pitäisi olla suunnilleen sen kokoinen, mutta koska kuvissa näkyy myös pienempiä himmeämpiä vyöhykkeitä noin 500 bp:n kohdalla, tulokset hämmensivät hiukan. Light-ketjun kloonissa kuvassa a) ei näy ollenkaan vyöhykkeitä 750 bp:n kohdalla. Light-ketjun transformaatiomaljalta tehtiin siis vielä pesäke-PCR 40 pesäkkeelle tulosten selvennykseksi.

Pesäke-PCR:ssä monistetaan tiettyä aluetta vektorista, jolloin tulosten perusteella voidaan arvioida, sisältääkö monistettu alue vain vektoria vai myös alueen sisälle liitetyn geeni-insertin. Kuvassa 20 on esitetty pesäke-PCR:n tulokset. Kuvasta huomataan, että positiivisia klooniehdokkaita (insertin koko noin 700–1000 bp) on kymmenen: kloonit 2, 12, 14, 16, 21, 23,30, 32, 37 ja 39. Ne on merkitty kuvaan nuolella. Pienemmät vyöhykkeet (noin 200–500 bp) ovat pelkän vektorin sisältämiä alueita tai primerdimeereitä eli kun alukkeet tai PCR tuotteet ovat pariutuneet ja monistuneet keskenään.

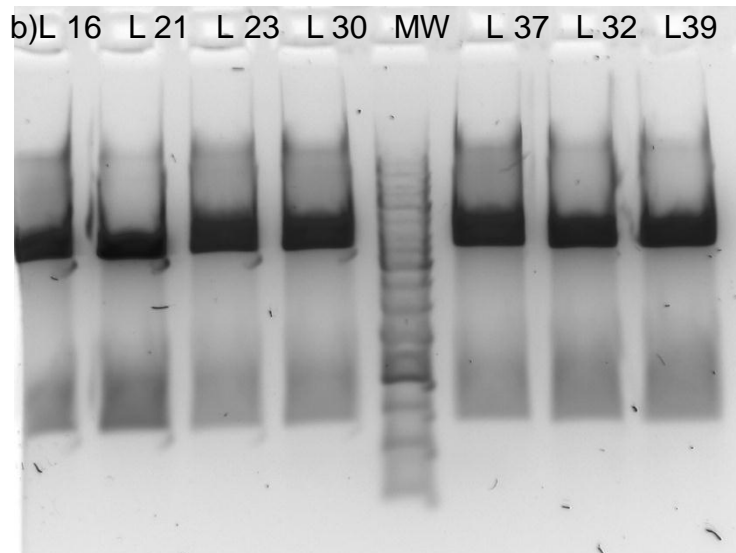
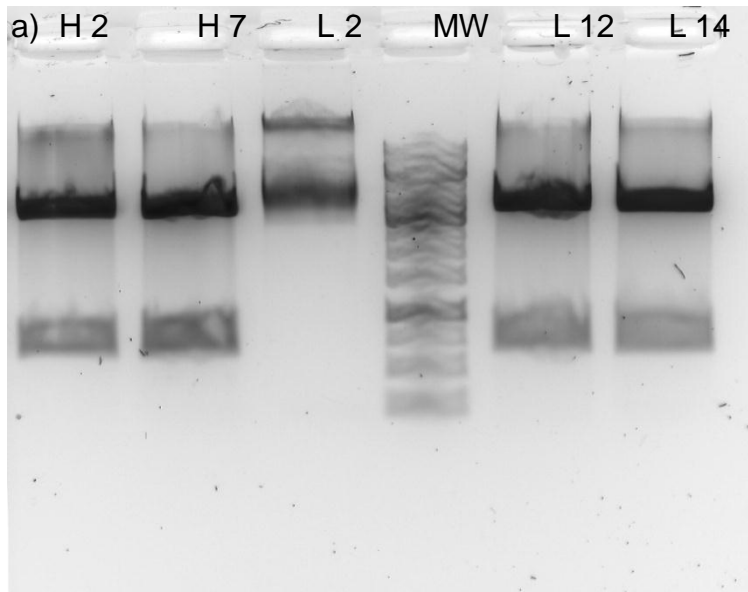
Positiivinen ja negatiivinen kontrolli toimivat niin kuin pitikin eli positiivisesta kontrollista monistui noin 700–1000bp välillä liikkuva tuote, ja negatiivisesta kontrollista näkyy vain alukkeet ja niiden muodostamat primeridimeerit.



KUVA 20. a), b) ja c) Light-ketjun kloonien pesäke-PCR:n agarosigeelit. Positiiviset klooniehdokkaat on merkitty nuolella.

Pesäke-PCR:n jälkeisellä testidigestiolla varmennettiin vielä positiivisista kloonista, että vasta-aine geeni-insertti oli siirtynyt vektoriin. Kuvassa 21 on esitetty testidigestion tulokset. Kuvassa näkyy, että light-klooni 2:lla on vain yksi vyöhyke, joten se ei olekaan positiivinen. Kaikki muut digestoidut kloonit ovat

positiivisia, sillä niissä ilmenee kaksi vyöhykettä: isompi yli 3000 bp vektori ja noin 700 bp geeni-insertti.

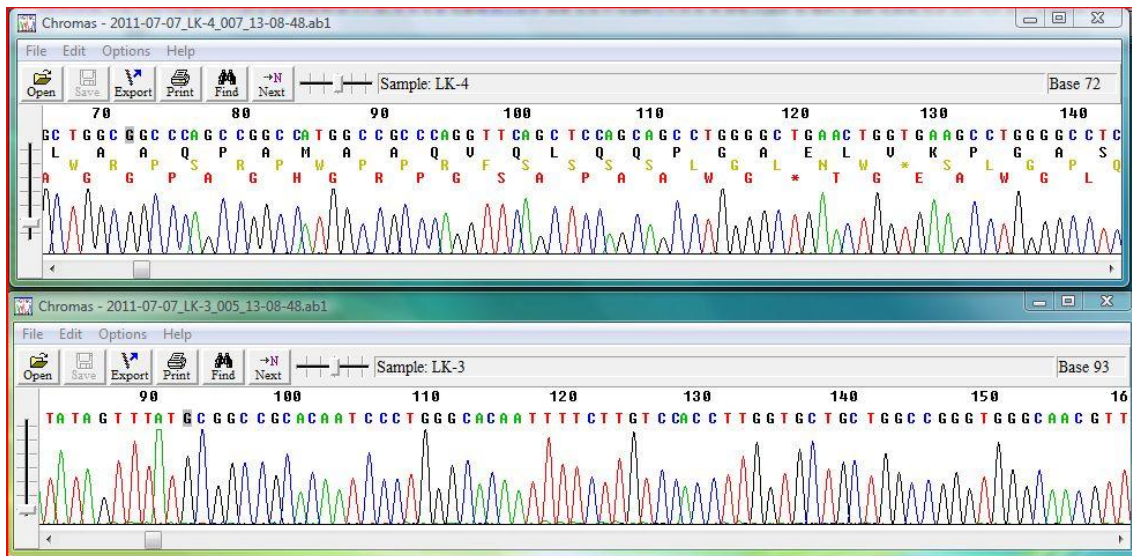


KUVA 21. a) Heavy-ketjun testidigestion agarosigeeli ja b) Light-ketjun testidigestion agarosigeeli. Digestioihin käytettiin Eco-RI-entsyymiä.

6.6 Sekvensointi

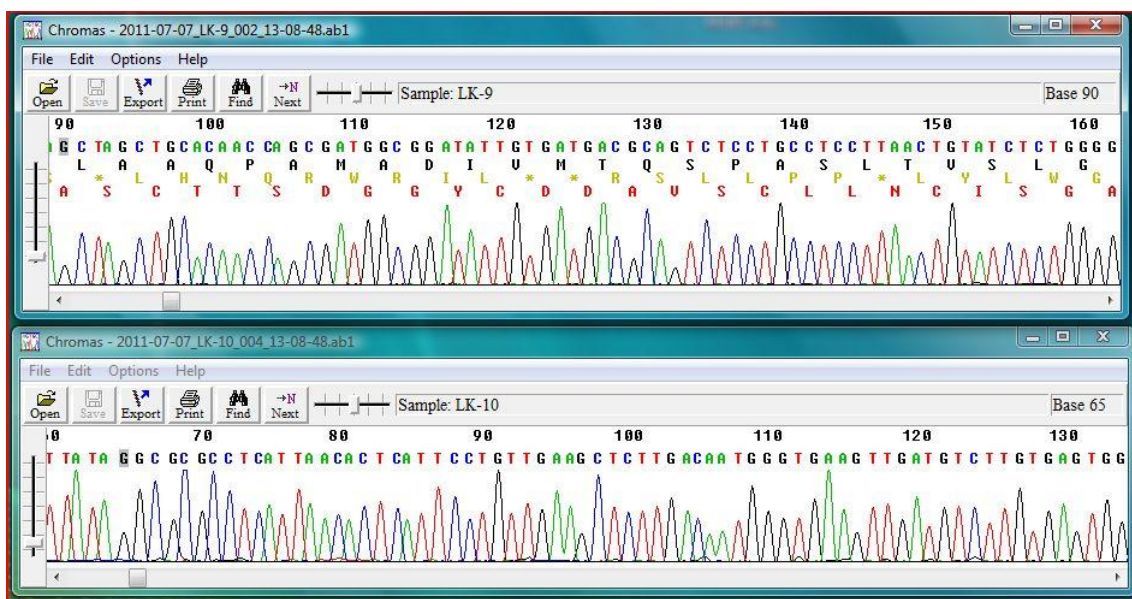
Heavy-kloonien 2 ja 7 sekvenssit olivat lähes samat eroten yhdellä aminohapolla. Heavy-geeniin on liitetty PCR-monistuksessa alukkeiden avulla 5'-päähän Sfi-entsyymipaikka (GGCCNNNNGGCC) ja 3'-päähän NotI-entsyymipaikka (GCGGCCGC) jatkokloonauksia varten. Kuvassa 22 on esitetty kloonin 7 vasta-ainegeenin alkupää ylempänä ja loppupää alempana. Koko

sekvenssi olisi ollut liian pitkä tässä esitettäväksi. Kuvasta ilmenee, että vasta-ainegeeni sisältää halutut entsyymipaikat. Jatkoon valittiin kloonit 2 ja 7.



KUVA 22. Heavy-klooni 7:n sekvenssi. Ylempänä geenin alkuosa ja alempana loppuosa, joissa monistuksella lisätyt restriktiopaikat sijaitsevat.

Light-kloonien 14 ja 21 sekvenssit olivat samanlaiset. Light-ketjun geenin 5'-pään on liitetty NheI-entsyymipaikka (GCTAGC) ja 3'-pään AscI-entsyymipaikka (GGCGGCC). Nämä klooniin 21 lisätyt entsyymipaikat on esitetty kuvassa 23. Klooni 12 hylättiin kokonaan, koska sen sekvenssissä oli ylimääräinen osa mukana. Jatkoon valittiin Light- klooni 21.



Kuva 23. Light-klooni 21:n sekvenssi. Ylempänä geenin alkuosa ja alempana loppuosa, joissa monistuksella lisätyt restriktiopaikat sijaitsevat.

7. POHDINTA

PShuttle-CMV-tuottovektorin valmistuksessa oli ongelmia, koska valmiin vektorin tutkimiseen valittiin vahingossa väärä *E. coli* -kanta. Uudelleenvalmistuksen ja uusien transformaatioiden myötä oikeat vektorit valmistuivat kahdella eri entsyymikombinaatiolla.

Nisäkässoluviljely onnistui suhteellisen hyvin, mutta kunnolla se alkoi toimia vasta lopuksi, kun soluja uskallettiin jakaa reilummin eli noin 1:20. Viljelyn alussa solut pääsivät välillä liian tiheäksi, jolloin ne alkoivat kuolla ja pulloihin kertyi paljon kuolleiden solujen jäänteitä ja riekaleita. Loppujen lopuksi materiaalia saatiin tarpeeksi yhdestä solukannasta ja työssä päästiin hyvin eteenpäin.

RNA:n eristys ja cDNA-synteesi sujuivat hyvin. Molemmat vaiheet olivat yksinkertaisia suorittaa kaupallisilla kiteillä. Myös PCR-monistuskierrokset sujuivat hyvin. Heavy-ketju monistui aavistuksen heikommin. Sen vyöhykkeet olivat hieman light-ketjun vyöhykkeitä haaleammat. Tämä johtuu ehkä entsyymipaikkojen sekvenssistä. Heavy-ketjun entsyymipaikat ovat enemmän GC-rikasta. Koska G-C-sidokset ovat tiukemmin kiinni toisissaan verrattuna A-T-sidoksiin johtuen kolmesta vetysidoksesta, G-C-sidosten puoliintumislämpötilat ovat korkeammat ja DNA-juosteen avautuminen hitaampaa. Lisäksi heavy-reaktioiden oligot olivat keskenään eripituiset eli toinen oli lyhyt ja toinen pitkä. Light-reaktioissa oligot olivat samankaltaisempia.

PCR-reaktioihin lisättävän cDNA-reaktion tilavuutta piti testata, joten se aiheutti enemmän työtä, kuin jos suoraan olisi tiedetty millä tilavuudella monistus onnistuu parhaiten. Massamonistus voitiin sitten tehdä rutiinilla, kun tilavuudet olivat tiedossa.

Geeni-insertin siirron todentaminen ei ensin onnistunut sekaklooniseoksesta. Se oli alun perin yritys säästää aikaa, jos kloni olisikin löytynyt helposti. Työtä jouduttiin jatkamaan kuitenkin transformaatiomaljojen kloonipesäkkeistä. Positiiviset kloonit olivat harvassa, joten vasta pesäke-PCR:ssä löytyi light-

ketjun positiivisia klooneja. Loppujen lopuksi molempien ketjujen positiiviset kloonit löytyivät eli molempien geeni-inserttien siirto onnistui

Sekvensointi onnistui erinomaisesti. Sekvenssit täsmäsivät kloonien kesken ja vastasivat tyypillistä vasta-ainegeenin sekvenssiä. Jatkoon saatiin hyvät kloonit, joissa halutut entsyymipaikat näkyivät selvästi.

Kokonaisuudessaan opinnäytetyö onnistui hyvin. Vain pieniä ongelmia ilmaantui työn kuluessa. Välillä yksittäisiä työvaiheita tehtäessä tuntui, että työn kokonaisuutta on vaikea hahmottaa. Viimeistään kirjoitusvaiheessa kokonaisuus alkoi kuitenkin hahmottua, ja yksittäisten työvaiheiden hämäräksi jääneet teoriaosiot alkoivat kirkastua. Työ edesauttaa osaltaan koko ”Biopalvelut kilpailukykyisiksi tuotteiksi” -projektia viemällä askeleen eteenpäin yhden molekyyliytökalan kehittämistä.

Jatkossa geeni-insertit (light ja heavy) voidaan monistaa kloonausta varten ja lisätä niihin kloonauspaikat (Sal1 ja Hind III) valmistettua pShuttle-CMV-vektoria varten. Geeni-insertteihin lisätään jatkossa PCR-monistuksen avulla myös puhdistus-tag kuten HIS6 tai HIS9. Muokatut insertit eli vasta-ainegeenien jaksot liitetään pShuttle-CMV-vektoriin. Seuraavaksi siitä valmistetaan rekombinantti adenovirus vasta-aineentuottoa varten viemällä vektori-vasta-aine-konstruktin adeno-apuplasmidin bakteerisoluun, jossa tapahtuu rekombinaatio eli muodostuu rekombinantti adenovirus-vasta-ainesiirtäjäplasmidi. Tämä vietään adenovirus-pakkaus-nisäkässoluun, jossa rekombinantti-adenovirus-vasta-ainegeeni pakataan adenoviruksen proteiinikapseliin. Lopuksi vielä tuotetaan vasta-ainetta CHO-nisäkässolussa rekombinantin adenoviruksen avulla. Adenovirus on valittu geeniinsiirtovektoriksi, koska sen avulla saadaan lähes kaikki kasvuston nisäkässolut tuottamaan haluttua rekombinanttigeeniä, tässä vasta-ainetta. Vasta-ainetta voidaan sitten käyttää diagnostisen vasta-ainekitin osana. Tässä monistetut geenit tuottavat vasta-ainetta, jolla voi tutkia sydämen tuottamaa merkkiainetta NTproBNP:tä. Jos merkkiaineen pitoisuus veressä on kohonnut, sydänkohtauksen riski on suurempi.

Työllä saatiin selvitettyä tarkka vasta-ainegeenin rakenne eli molekyyliohje, jonka avulla vasta-ainetta voidaan valmistaa soluviljelmässä geeniteknisin keinoin.

LÄHTEET

Abcam 1998–2011. Antibody structure and isotypes. Saatavissa: <http://www.abcam.com/index.html?pageconfig=resource&rid=11258&pid=1128>.

Hakupäivä: 26.8.2011.

Aittomäki, Esa – Eerikäinen, Tero – Leisola, Matti – Ojamo, Heikki – Suominen, Ilari – von Weymarn, Niklas 2002. Bioprosessitekniikka. Porvoo: WS Bookwell OY.

Antibody-antigen interactions. Saatavissa: <http://nfs.unipv.it/nfs/minf/dispense/immunology/agabint.html>. Hakupäivä: 4.10.2011.

Chakravarthy, Ankur 2011. Exploreable of Science and Skepticism. Blogi. Saatavissa: <http://exploreable.wordpress.com/2011/05/25/elisa-enzyme-linked-immunosorbent-assay/>. Hakupäivä: 4.10.2011.

Forbes, Christina 2010. Mammalian Cell and Tissue Culture, 5 op. Opintojakson oppimateriaali syksyllä 2010. Letterkenny, Irlanti: Letterkenny Institute of Technology.

Höyhty, Matti 1999. Soluviljelyn peruskurssi. Opintojakson oppimateriaali. Oulu: Oulun yliopisto.

Jaiswal, Pratibha 2009. Biology today and tomorrow. Blogi. Saatavissa: <http://biological-discoveries.blogspot.com/2009/04/monoclonal-antibodies.html>. Hakupäivä: 26.8.2011.

Kindt, Thomas J. – Goldsby, Richard A. – Osborne, Barbara A. 2007. Kuby Immunology. 6. painos. Ny York, United States of America: W. H. Freeman and Company.

Kumpulainen, Elsa 2011. Immunologia, 3 op. Opintojakson oppimateriaali keväällä 2011. Oulu: Oulun seudun ammattikorkeakoulu.

Omega bio-tek 2009. E.Z.N.A Total RNA Kit I Handbook. Saatavissa: http://www.omegabiotek.com/product_detail.php?ID=117. Hakupäivä: 6.7.2011.

Suominen, Ilari – Pärssinen, Raimo – Haajanen, Kari – Pelkonen, Jani 2010. Geenitekniikka. Turku: Turun ammattikorkeakoulu.

Ulmanen, Ismo – Tenhunen, Jukka – Yläne, Jari – Valste, Juha – Viitanen, Pertti 2000. Geeni. Porvoo: WS Bookwell Oy.

Walsh, Gary 1998. Biopharmaceuticals: Biochemistry and Biotechnology. West Sussex, England: John Wiley & Sons Ltd.

Western-Blot.us. Polyclonal Antibody. Saatavissa: <http://www.western-blot.us/index.php?page=polyclonal-anticody>. Hakupäivä: 26.8.2011.

LIITTEET

- LIITE 1 Agaroosigeelin valmistus
- LIITE 2 Agaroosigeelin molekyylipainomarkkeri
- LIITE 3 Liuosten valmistus
- LIITE 4 Työssä käytetyt välineet ja reagenssit
- LIITE 5 Nucleospin Plasmid Miniprep -kitin ohje
- LIITE 6 Nucleobond Xtra Midi -kitin ohje
- LIITE 7 Nucleospin Extract II -kitin ohje
- LIITE 8 E.Z.N.A. Total RNA Kit I -kitin ohje

Agaroosigeeli valmistetaan seuraavan ohjeen mukaan:

- Punnitaan massaprosenttisuuden mukaan agaroosi-jauhetta.

0,8-prosenttiseen geeliin punnitaan 0,8 g agaroosia 100 ml:a kohti.

- Liuotetaan punnittu agaroosi TAE-puskuriin mikroaaltouunissa. Uuni täytyy välillä pysäyttää ja liuosta sekoitella, koska agaroosi kuohuu helposti yli. Liuoksen annetaan jäähtyä niin, että astian kyljellä voi koskea ranteen sisäpuolen ihoon, sitä polttamatta. Liuoksen ei saa antaa jäähtyä kuitenkaan liikaa, ettei geeli ehdi hyytyä astiaan.

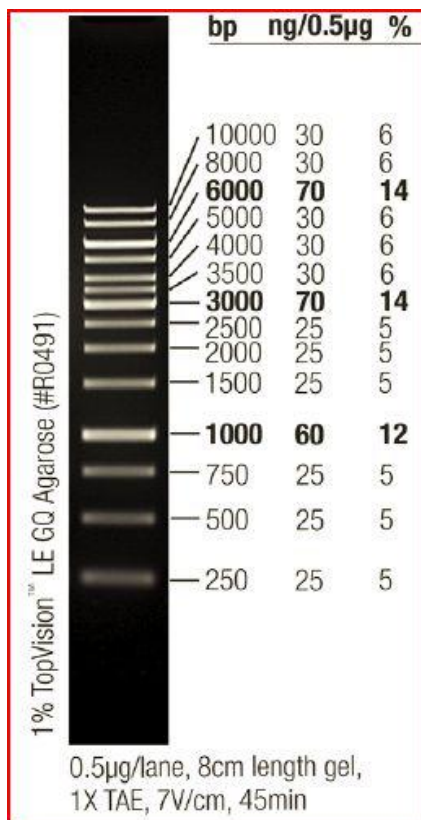
0,8-prosenttisen geelin 0,8 g agaroosia liuotetaan 100 ml:an TAE-puskuria.

- Pestään kelkka ja kampa. Kelkan avonaiset päät teipataan maalarin teipillä.
- Tasapainotetaan kelkan alla oleva valutaso vesivaa'an avulla, jotta geelin pinnasta tulee tasainen.
- Lisätään jäähtyneeseen liuokseen Sybr Safe -kantaliuosta 1/10000 eli 1 µl/10 ml:

100 ml:n geeliin lisätään 10 µl Sybr Safe -liuosta.

- Geeli kaadetaan kelkkaan ja kampa asetellaan paikoilleen vähän napsutellen, jotta ilmakuplat kaikkooavat. Geelin annetaan hyytyä noin 30 minuuttia.
- Kelkka asetellaan ajokammioon ja 1 x TAE-puskuria kaadetaan niin, että kaivot peittyvät.
- Jos geeli halutaan tehdä preparatiiviseen ajoon, geelin teossa täytyy käyttää steriiliä TAE-puskuria, autoklaavattuja astioita sekä kelkka ja kampa täytyy pestä niin, että ne huuhdotaan ensin deionisoidulla vedellä ja sitten 70-prosenttisellä etanolilla.

GeneRuler 1 kb DNA Ladder, ready to use, konsentraatio 0,5 µg/µl, Fermentas #SM0311, erä 00033708.



CircleGrow® -liemi

Punnitaan valmista kaupallista CircleGrow-jauhetta 40 g/l, liuotetaan deionisoituun veteen, täytetään 1 litraksi ja autoklavoidaan.

SOB-liemi

20 g Tryptoni

5 g Hiivauute

0,585 g NaCl

0,185 g KCl

Liuotetaan deionisoituun veteen, täytetään 1 litraksi ja autoklavoidaan.

Jäähtyneeseen liuokseen lisätään 1 ml steriiliä 1M MgCl₂ ja 1M MgSO₄ /100 ml liuos. Säilytetään jääkaapissa.

SOC-liemi

SOB liemeen lisätään steriiliä 40-prosenttista glukoosia loppupitoisuuteen 2 % glukoosia.

Säilytetään jääkaapissa tai pakastetaan 10 ml:n annoksina -20C.

Tarvittavan glukoosi-kantaliuoksen määrän voi laskea kaavalla:

Elatusliemimäärä / 19 = x ml glukoosi-kantaliluosta lisättävä SOB-liemeen.

Esim.

9.5 ml SOB + 0.5 ml 40% glukoosi

50 x TAE-puskuri

2 M Tris

10 % Etikkahappo

100 mM EDTA

Autoklavoidaan. Laimennetaan 50 x kantaliuoksesta 1 kertaiseksi deionisoidulla vedellä.

XC-puskuri

832 mg EDTA-Na₄*H₂O

4,6 ml 87 % glyserolia (lisätään punnitsemalla 4,6 g)

Ripaus siniväriä Xylene Cyanol

Tilavuus täytetään 10 ml:ksi steriilillä vedellä. XC-väri liikkuu geelillä kuten noin 3000–4000 bp kokoinen DNA.

LB-agarmaljat

2 g Tryptoni

1 g NaCl

1 g hiivauute

3,6 g Bactoagar

Liuetetaan 200 ml:an deionisoitua vettä ja autoklavoidaan. Annetaan jäähtyä niin, että voidaan koskea ranteen sisäpuolen ihoa, sitä polttamatta. Lisätään tarvittava määrä antibioottia. Kaadetaan tyhjiin maljoihin ja annetaan hyytyä.

RPMI-1640-medium

102 ml 1 x RPMI-medium

12,0 ml FBS

1,2 ml 1 M HEPES

1,2 ml 200 mM L-Glutamiini

1,2 ml PS-seos (100 U/ml penisilliini-100 µg/ml streptomysiini)

1,5 ml 20-prosenttinen glukoosi

Yht. 120 ml

Työssä käytettiin seuraavia välineitä ja laitteita:

- Analysivaaka Sartorius, Handy H51, max 31 g,
- Agaroosigeelielektroforeesilaitteisto Biorad, Powerpac 300 ja Biorad, wide mini-sub cell GT, Biorad, kelkka ja kampa,
- Laminaarivirtauskaappi Kojair, Biowizard,
- Laminaarivirtauskaappi Kojair, K series,
- Mäntäpipetti Biohit, Proline, 0,5-10 µl, AM36253,
- Mäntäpipetti Biohit, Proline, 5-50 µl, AM36692,
- Mäntäpipetti Biohit, Proline, 50-200 µl, AM55495,
- Mäntäpipetti Biohit, Proline, 200-1000 µl, AQ35330,
- Mäntäpipetti Thermo Labsystems, Finnpiipette, 0,2-2 µl, S66599,
- Mäntäpipetti RNA töissä Biohit, m200, 20-200 µl, 7513558,
- Mäntäpipetti RNA töissä Biohit, m1000, 100-1000 µl, 7512783,
- PCR-laite Biometra, Tgradient,
- PCR-laite Perkin Elmer, DNA Thermal Cycler,
- pH-mittari Consort P600, pH/mV/°C-mittari,
- Sentrifuugi Thermo Scientific, Heraeus Labofuge 400 Centrifuge,
- Sentrifuugi Thermo Scientific, SL 40R Centrifuge,
- Sentrifuugi VWR, Galaxy 16DH,
- Solujen homogenisointilaitte IKA, T10 basic Ultra-Turrax, jossa kärkenä oli S10N-5G dispersing tool 3304000,
- Solukasvatuskaappi Forma Scientific, Automatic CO₂ Incubator,
- Soluviljelypullot Greiner bio-one, Cellstar, 627160 (malja, 35 x 10 mm, steriloitu), 690175 (25 cm², filtterikorkki, steriloitu) ja 658175 (75 cm², filtterikorkki, steriloitu),
- Spektrofotometri Thermo Scientific, Nanodrop 2000 Spectrophotometer,
- Spektrofotometri Amersham Biosciences, GeneQuant pro,
- Yläkuppivaaka Sartorius, BP310P, max. 310 g

Työssä käytettiin seuraavia reagensseja:

- Agaroosi, Multi-Purpose, Bioline BIO-41025, erä: AG5-107H,
- Bactoagar, Bacteriological agar type A, Biokar diagnostics A1010HA, erä: 7D860,
- CIP Calf Intestinal Alkaline Phosphatase, Finnzymes F-201S, erä:115,
- D(+)-Glukoosi, Baker analyzed, J.T. Baker 0115, erä: 0224510006,
- DMSO, CN Biomedicals Inc 1960, erä: R15180,
- DMSO, 100 %, Finnzymes F-515, erä: 60,
- dNTP Mix, 2,5 mM, Bioline, erä: DM1-205I,
- EcoRI-HF-entsyymi, 20 U/ml New England Biolabs Inc. R3101S, erä: 0020909
- EcoRV-HF-entsyymi, 20 U/ml New England Biolabs Inc. R3195S, erä: 0051008,
- Etanoli, Etax Aa 99,5 paino/%, Altia,
- Fetal Calf Serum, EU FCS-500, PromoCell C-37360, erä: A10106-0828,
- Gentamisiini liuos, Sigma G1272, erä: 120M0826,
- Glyseroli,
- Hiivauute, Biokar diagnostics A1202HA, erä: 9D361,
- Hind III-entsyymi, New England BioLabs Inc. R0104L, erä: 66,
- HEPES,
- Kanamysin monosulfate, Duchefa K0126, erä: 002432.01,
- KCl, pro analyysi, Merck 1.04933.0500, erä: A9002391,
- L-Glutamiini,
- $MgCl_2$, 50 mM, Finnzymes F-510MG, erä: 85,
- $MgCl_2 \cdot 6 H_2O$, pro analyysi, Merck 1.05833.0250, erä: TA567033951,
- $MgSO_4 \cdot H_2O$, pro analyysi, Merck 1.05886.0500, erä: A974086925,
- NaCl, pro analyysi, Merck 1.06267.0500, erä: A0036467927,
- PBS (Dulbecco's phosphate buffered saline), 10x, Sigma D1408, erä: 079K2334,
- pCR Blunt vektori, 25 ng/ μ l, Invitrogen 46-0757, erä: 376555,
- Phusion DNA polymeraasi, Finnzymes F-530L, erä: 87,
- Phusion reaktio puskuri GC, 5x

- Penisilliini,
- RPMI-1640 –medium, Sigma R0883, erä: RNBB8229,
- Sal1-HF-entsyymi, New England Biolabs Inc. R3138S, erä: 0021007,
- Spermidiini, Sigma,
- SYBR SafeDNA gel stain, Invitrogen S33102, erä: 680435,
- Tryptoni, Biokar diagnostics A1401HA, erä: 10C363A,
- T4 DNA Ligase, New England Biolabs Inc. #M0202S, erä: 0991002,
- Xylene Cyanol, Sigma X-2751, erä: 47F-0558,
- 2-merkapttoetanol, MP Biomedicals LLC 1.800.854.0530, erä: R21748,
- 2-propanoli, pro analys, Merck 1.09634.2500, erä: K39316134845
- 10 x buffer n:o 2 (NEB), New England BioLabs Inc. #B7002S, erä: 0907A,
- 10 x buffer n:o 4 (NEB), New England Biolabs Inc. #B7004S, erä: 0021005,
- 10 x ligaatiopuskuri (NEB), New England Biolabs Inc. #B0202S, erä:0031003.

Työssä käytettiin seuraavia kaupallisia kittejä:





















- Nucleospin Plasmid Miniprep, Macherey-Nagel 740588.250, erä: 906/006,
- Nucleobond Xtra Midi, Machery-Nagel 74041050, erä: 910/016,
- Nucleospin Extract II, Macherey-Nagel 740609.250, erä: 808/007,
- E.Z.N.A. Total RNA Kit I, Omega bio-tek R-6834-02, erä: R68340208261001CN42010-B5962,
- RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit, Fermentas #K1622, erä: 00065236.

Työssä käytettiin seuraavia nisäkässolukantoja:

- 9E10 eli Hybridooma MYC 1-9E10.2 = CRL1729 ATCC, stoorattu 16.12.2007,
- 1B10 eli Hybridooma B29-1B10G.3, stoorattu 26.11.2010, NtproBNP₁₀₋₂₉MA6-KL,
- 3F7 eli Hybridooma B29.3F7H9, stoorattu 18.6.2010, NtproBNP₁₋₂₂.

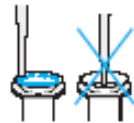
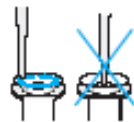
Plasmid DNA Purification

Protocol-at-a-glance (Rev.07)

	NucleoSpin® Plasmid	NucleoSpin® Plasmid (NoLid)		NucleoSpin® Plasmid QuickPure
1 Cultivate and harvest bacterial cells			11,000 x g 30 s	
2 Cell lysis			250 µL Buffer A1 250 µL Buffer A2 RT, 5 min 300 µL Buffer A3	
3 Clarification of the lysate			11,000 x g 5 – 10 min	
4 Bind DNA			Load supernatant 11,000 x g 1 min	
5 Wash silica membrane			<i>(Optional: 500 µL Buffer AW)</i> 600 µL Buffer A4 11,000 x g 1 min	
6 Dry silica membrane			11,000 x g 2 min	Drying is performed during centrifugation of the single washing step
7 Elute DNA			50 µL Buffer AE RT, 1 min 11,000 x g 1 min	




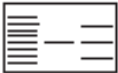








Plasmid DNA Purification (NucleoBond® Xtra Midi/Maxi) Protocol-at-a-glance (Rev. 09)

	Midi	Maxi		
1 Cultivate and harvest bacterial cells	4,500–6,000 x g 4 °C, 15 min			
2 Cell lysis <i>(Important: Check Buffer LYS for precipitated SDS)</i>	High-copy / low-copy 8 mL / 16 mL Buffer RES 8 mL / 16 mL Buffer LYS RT, 5 min	High-copy / low-copy 12 mL / 24 mL Buffer RES 12 mL / 24 mL Buffer LYS RT, 5 min		
3 Equilibration of the column and filter	12 mL Buffer EQU		25 mL Buffer EQU	
4 Neutralization	8 mL / 16 mL Buffer NEU	12 mL / 24 mL Buffer NEU		
5 Clarification and loading of the lysate	Invert the tube 3 times Load lysate on NucleoBond® Xtra Column Filter			
6 1 st Washing	5 mL Buffer EQU !		15 mL Buffer EQU !	
7 Discard NucleoBond® Xtra Column Filter	Discard NucleoBond® Xtra Column Filter		Discard NucleoBond® Xtra Column Filter	
8 2 nd Washing	8 mL Buffer WASH !	25 mL Buffer WASH !		
9 Elution	5 mL Buffer ELU	15 mL Buffer ELU		
10 Precipitation	NucleoBond® Xtra Midi 3.5 mL Isopropanol 5–15,000 x g 4 °C, 30 min	NucleoBond® Xtra Midi Plus 3.5 mL Isopropanol RT, 2 min Load NucleoBond® Finalizer	NucleoBond® Xtra Maxi 10.5 mL Isopropanol 15,000 x g 4 °C, 30 min	NucleoBond® Xtra Maxi Plus 10.5 mL Isopropanol RT, 2 min Load NucleoBond® Finalizer Large
11 Wash and dry DNA pellet	2 mL 70% ethanol 5–15,000 x g RT, 5 min 5–10 min	2 mL 70% ethanol / ≥ 3 x air until dry	5 mL 70% ethanol 5–15,000 x g RT, 5 min 10–15 min	5 mL 70% ethanol / ≥ 6 x air until dry
12 Reconstitute DNA	Appropriate volume of TE buffer	200–800 µL Buffer TRIS	Appropriate volume of TE buffer	400–1000 µL Buffer TRIS

PCR clean-up, Gel extraction

Protocol-at-a-glance (Rev. 11)

NucleoSpin® Extract II

	PCR clean-up	Gel extraction
<p>1 PCR clean-up: Adjust binding condition</p> <p>Gel extraction: Excise DNA fragment / Solubilize gel slice</p>	 <p>200 µL NT / 100 µL PCR</p>	  <p>200 µL NT / 100 mg gel</p> <p>50 °C 5–10 min</p>
<p>2 Bind DNA</p>	  <p>11,000 x <i>g</i> 1 min</p>	
<p>3 Wash silica membrane</p>	  <p>700 µL NT3</p> <p>11,000 x <i>g</i> 1 min</p>	
<p>4 Dry silica membrane</p>	 <p>11,000 x <i>g</i> 2 min</p>	
<p>5 Elute DNA</p>	  <p>15–50 µL NE</p> <p>RT 1 min</p> <p>11,000 x <i>g</i> 1 min</p>	

Centrifugation Protocols

