

Opinnäytetyö (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikka

Biotekniikka

2011

31 s

Anastasia Susi

# VIRUSPROTEIINIEN TUOTTO HYÖNTEISSOLUISSA BAKULOVIRUKSEN AVULLA



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU  
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

OPINNÄYTETYÖ (AMK) | TIIVISTELMÄ

TURUN AMMATTIKORKEAKOULU

Bio- ja elintarviketekniikka | Biotekniikka

2011 | 31 s.

Petri Susi

Anastasia Susi

# VIRUSPROTEIINIEN TUOTTO HYÖNTEISSOLUISSA BAKULOVIRUKSEN AVULLA

Työn tarkoituksena oli tuottaa bakuloviruksen avulla tiettyjä pikornavirusproteiineja hyönteissoluissa. Menetelmässä käytettiin Bac-to-Bac-kitin sisältämää FastBac™-vektoria, jota käyttäen pintaproteiineja koodaava DNA-jakso siirtyy DHc10Bac *E. coli* -soluissa olevaan bacmidiin. Bacmidi on muokattu bakuloviruksesta, ja kun se transfektoidaan hyönteissoluihin, bacmidiin kloonatut pikornavirusproteiinit alkavat ekspressoitua.

Työssä kloonattiin neljän eri pikornaviruksen VP1-proteiinia koodaavaa geeniä. Nämä olivat peräisin CAV9- ja CBV3-enteroviruksista ja HPEV1- ja HPEV3-parechoviruksista. CAV9-, CBV3- ja HPEV1-VP1-proteiineja koodaavat geenit monistettiin plasmideista. HPEV3-VP1-proteiinia koodittava geeni (virus-RNA) eristettiin suoraan potilasnäytteestä RT-PCR:n avulla. VP1-geenit (insertit) kloonattiin TA-vektoriin, tuotettiin *E. coli* -soluissa ja siirrettiin TA-vektorista restriktioentsyymi-leikkausta ja ligaatiota käyttämällä FastBac™-vektoriin. Yhdistelmävektori transfektoidettiin kompetentteihin DHcBac10 *E. coli* -soluihin, joissa insertti siirtyi bacmidiin.

Työssäni tuotettavia pikornavirusproteiineja on suunniteltu käytettäväksi serologisissa tutkimuksissa vasta-ainesitojina, immunogeeneinä vasta-aineiden tuotossa ja antigeneinä erilaisissa *in vitro* -kokeissa, joissa tutkitaan proteiinien sitoutumista solutekijöihin.

ASIASANAT:

(Bakulovirus, pikornavirus, hyönteissolu, virusproteiini)

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Biotechnology and Food Technology | Biotechnology

2011 | 31 p.

Petri Susi

Anastasia Susi

## PRODUCTION OF VIRAL PROTEINS IN INSECT CELLS

The purpose of this study was to produce picornaviral proteins by means of recombinant baculoviruses. The Bac-to-Bac® Baculovirus Expression System is a method for the generation of recombinant baculoviruses. The method is based on site-specific transposition of genes to be expressed into a baculovirus vector (bacmid). The bacmid is a modified shuttle vector, which allows picornaviral gene expression in insect cells.

Four picornaviral capsid VP1 proteins were used in the study. They derived from enteroviruses (CAV9 and CBV3) and parechoviruses (HPEV1 and HPEV3). Genes encoding VP1 proteins from CAV9, CBV3 and HPEV1 were encoded from plasmids. The gene (viral RNA) encoding the HPEV3-VP1 protein was isolated from patient samples by RT-PCR. The VP1 genes were cloned into TA vector to produce them in *E. coli* cells and inserts were transferred into FastBac™ vectors using restriction enzyme-mediated digestion and ligation. The inserts were transfected from the recombinant FastBac™ vector to the bacmid. Isolated recombinant bacmid was transfected into insect cells.

Picornaviral VP1-proteins will be useful in serological studies, as immunogens in antibody generation, and as binders in antigen binding studies.

KEYWORDS:

(Baculovirus, picornavirus, insect cell, viral protein)

# SISÄLLYLUETTELO

<b>1 JOHDANTO</b>	<b>1</b>
<b>1 YHDISTELMÄ-DNA-TEKNIikka</b>	<b>2</b>
1.1 Plasmidi- ja insertti-DNA	2
1.2 Restriktioentsyymit	3
1.3 DNA:n analysointi AGE:lla	4
1.4 Bakteerisolujen transformaatio ja selektio	5
<b>2 PIKORNAVIRUKSET</b>	<b>6</b>
<b>3 BAKULOVIRUSEKSPRESSIOSYSTEEMI (BEVS)</b>	<b>6</b>
3.1 Bakulovirukset	7
3.2 Bac-to-Bac®	7
3.3 Vektorit	8
3.3.1 pFastBac™ 1	9
3.3.2 pFastBac™ HT A	9
3.3.3 pFastBac™ Dual	10
3.3.4 Kompetentit DHc10Bac™ <i>E. coli</i> -solut	11
3.4 Hyönteissolut	12
3.5 TOPO TA Cloning® ja sen toimintaperiaate	12
3.5.1 TA-vektori	12
3.6 Proteiinien tuotto muilla menetelmillä	14
3.6.1 MERCK InsectDirect® System method	14
3.6.2 ParaTechs VE-BEVS	14
<b>4 MATERIAALIT JA MENETELMÄT</b>	<b>15</b>
4.1 Transformaatio	15
4.2 RNA:n eristys	16
4.3 PCR	16
4.4 AGE	16
4.5 Primerit	17
4.6 Vektoriplasmidin ja insertin tuottaminen	18
4.7 Rekombinantti-TA-vektori	20
4.8 pFastBac™-vektorin tuotto ja eristys	20
4.9 Kompetentit <i>E. coli</i> -solut	21
4.10 Bacmidin eristys DHc10Bac soluista ja analysointi	22

<b>5 TULOKSET</b>	<b>22</b>
5.1 VP1-proteiinien tuotto	22
5.2 VP1-PCR-tuotteiden kloonaus TA-vektoriin ja restriktioanalyysi	24
5.3 FastBac-vektori	25
5.4 Rekombinantin Bacmidi-DNA:n analysointi PCR:n avulla	27
<b>6 YHTEENVETO</b>	<b>28</b>
<b>7 LÄHTEET</b>	<b>31</b>

## LIITTEET

### KUVAT

Kuva 1. Plasmideista monistetut VP1 proteiinit: .....	23
CAV9 (900 bp), HPEV1 (700 bp) ja CBV3 (900 bp) .....	23
Kuva 2. Potilasnäytteestä monistettu HPEV3-viruksen .....	24
VP1-PCR-tuote (700 bp). Rivit 1-4. HPEV3, 5. 1kb-DNA- .....	24
kokostandardi. DNA-fragmenttien koot ja pitoisuudet:.....	24
5000 bp, 75 ng/0,5µg 1500 bp,80 ng/0,5 µg, 500 bp, 75.....	24
ng/0,5 µg .....	24
Kuva 3. Digestoitu TA-vektori (3956 bp) ja insertit .....	25
CAV9 (900 bp), HPEV1 (700 bp) ja CBV3 (900 bp) .....	25
Kuva 5. FastDigest BamHI:lla ja HindIII:llä käsitellyt rekombinantit FastBac .....	27
-vektorit. Rivi 1. HPEV1, 2. CAV9, 3. CBV3, 7. 1kb DNA-kokostandardi. ....	27
DNA-fragmenttien koot ja pitoisuudet:5000 bp, 75 ng/0,5µg, 1500 bp, .....	27
80 ng/0,5 µg, 500 bp, 75 ng/0,5 µg .....	27
Kuva 6. Bacmidin analysointi PCR:n avulla CAV9 primereillä. Rivit 1-3. Bacmidi CAV9,	
4-5. FastBac-vektori, 6. 1kb-DNA-kokostandardi. DNA-fragmenttien koot ja pitoisuudet:	
5000 bp, 75 ng/0,5µg, 1500 bp,80 ng/0,5 µg, 500 bp, 75 ng/0,5 µg .....	28

### KUVIOT

Kuvio 1. Insertin liittäminen vektoriin ligaatioreaktiossa	3
Kuvio 3. Rekombinantin bakuloviruksen lisääntyminen ja geeniekspressio Bac-to-Bac-	
systeemin avulla	8
Kuvio 4. pFastBac™ 1-vektori	9
Kuvio 5. pFastBac™ HT A-vektori	10
Kuvio 6. pFastBac™ Dual-vektori	11
Kuvio 8.pCR®TOPO® -vektori	13

Kuvio 7. pIEx-1 ja pBiEx-1-vektorit, MERK 14

## **TAULUKOT**

Taulukko 1. Työssä käytetyt primerit. 18

Taulukko 2. PCR-reaktion reagenssit ja pipetointitulavuudet VP1-geenin monistamiseksi 18

Taulukko 3. PCR-ajo-olosuhteet DNA:n monistamiseksi 19

Taulukko 4. HPEV3-VP1-geenin RT-reaktiossa käytetyt reagenssit ja pipetointitulavuudet 19

## KÄYTETYT LYHENTEET

AGE	agaroosielektroforeesi
bp	emäspari (eng. emäspari)
cDNA	complementary DNA
dNTP	deoksiribonukleotidi
DMSO	dimetyylisulfoksidi
DNA	deoksiribonukleiinihappo
EtBr	etidiumbromidi
FBS	vasikan seerumi
IPTG	isopropyyli-tio- $\beta$ -galaktopyranosidi
KO-H <sub>2</sub> O	käänteisosmoosivesi
PCR	polymeraasiketjureaktio
PIPES	piperatsiini-N,N'-bis(2-etaanisulfonihappo)
rmp	kierrosta minuutissa
RNA	ribonukleiinihappo
RT	huoneenlämpö
SDS-PAGE	natriumlauryylisulfaattipolyakryyliamidigeelielektroforeesi
TAE	Tris-etikkahappo-EDTA
TE	Tris-EDTA
X-Gal	5-bromo-4-kloro-3-indoli- $\beta$ -D-galaktopyranosidi

# 1 JOHDANTO

Entero- ja parechovirukset ovat pikornavirussukuja *Picornaviridae*-heimossa, ja ne jakautuvat moneen lajiin, jotka edelleen jakautuvat eri serotyyppeihin. Pikornavirusten kyky mutatoitua auttaa viruksia nopeaan sopeutumiseen uuteen kasvuympäristöön, ja sen seurauksena on syntynyt laaja serotyypikirjo. Tämä vaikeuttaa virusdiagnoosiin ja lääkkeiden kehittämistä, koska virusten sekvenssit ja siten myös pintaepitoopit eroavat toisistaan. Serotyypin määrittelevät viruksen kapsidissa olevat pintaepiteiinit ja erityisesti ns. VP1-geenin tuottama VP1-proteiini, kun taas genotyypin määrittämiseen pitää sekvensoida viruksen VP1-geeni.

Työn tarkoituksena on tuottaa pikornaviruksen pintaepiteiineja käyttäen hyväkseen yhdistelmä-DNA-tekniikkaa. Työssä tuotettuja virusproteiineja voidaan käyttää erilaisissa tutkimuksissa vasta-ainesitojina, immunogeeninä tai antigeeninä. Restriktioentsyymillä käsitellystä viruksen cDNA-kopiosta peräisin oleva VP1-geeni liitetään TOPO TA Cloning® kitin sisältämään vektoriin. Vektorin avulla saadaan tuotettua lisää inserttiä bakteerisoluihin, jonka jälkeen insertti siirretään FastBac™-vektoriin käyttäen hyväkseen restriktio- ja ligaasiensyymejä. Transformaatio suoritetaan kompetentteihin bakteerisoluihin, jossa FastBac™-vektorissa oleva insertti siirtyy aluespesifisen transposition avulla Bacmidiin. Eristetty ja puhdistettu bacmidi transfektoidaan hyönteissoluihin, jossa siitä muodostuu rekombinantti-bakulovirusia. Infektoidut hyönteissolut tuottavat lisää bacmidia ja samalla tuotettua pikornaviruksen pintaepiteiinia.

Työssä kloonattiin neljän erilaisen pikornaviruksen VP1-alueita koodaava DNA-jakso FastBac™-vektoreihin. Näistä viruksista kolmen eli CAV9-, CBV3- ja HPEV1-viruksen VP1-geeni kopioitiin PCR:n avulla suoraan virusgenomin sisältävästä geenivektorista ja kloonattiin TA-vektorin kautta Bac-to-Bac-kitin sisältämiin bakulovektoreihin. Neljäs insertti on ihmisen parechoviruksen pintaepiteiinia koodaava DNA-jakso (HPEV3-VP1), joka tuotettiin virusinfektoidusta solunäytteestä eristetystä RNA:sta muuttamalla virus-RNA RT-reaktiossa cDNA:ksi ja monistamalla se PCR:llä ja kloonamalla VP1-geeni TA-vektorin kautta FastBac-vektoriin. FastBac™-vektori sisältää Tn7 alueen, joka mahdollistaa VP1-geenin siirron bacmidin Tn7-alueeseen bacmidissa olevan helper-plasmidin erittämien entsyymien avulla. Rekombinantti bacmidi transfektoidaan hyönteissoluihin tuottaen niissä bakulovirusta ja samalla VP1-proteiineja.

# 1 YHDISTELMÄ-DNA-TEKNIikka

Yhdistelmä-DNA-tekniikka antaa mahdollisuuden eristää kohdegeeni erilaisia käyttötarkoituksia varten. Tässä käytetään yleensä apuna plasmidimolekyyliä, johon liitetään inserttinä haluttu DNA-jakso. Plasmidivektorit insertteineen transformoidaan kompetentteihin soluihin tuottoa varten. Plasmidi eristetään solusta hajottamalla solukalvo ja puhdistamalla plasmidi muista molekyyleistä.

## 1.1 Plasmidi- ja insertti-DNA

Plasmidi on rengasmaisen DNA-molekyyli, joka replikoituu solun solulimassa. Se esiintyy melkein kaikissa bakteerisoluisissa, eivätkä sen geenit ole välttämättömiä isäntäsolulle. Yhdistelmä-DNA-tekniikassa plasmidivektorit ovat yleisimmin käytetyt geenien siirrossa organismista toiseen. Plasmidin erityispiirteinä on sen sisältämän ORI-alueen ansiosta replikoituminen isäntäsolussa kromosomaalisesta DNA:sta riippumatta, jolloin plasmidi muodostaa oman replikoninsa. Sen sisältämät geenit voivat vaikuttaa isäntäsoluun erittämällä tietyn geenin vaikutuksesta entsyymiä, jolloin isäntäsolun käyttäytyminen muuttuu. Työssä käytettiin vektoreita, joilla oli antibioottiresistenssigeeni, joka antoi mahdollisuuden isäntäsolulle tulla toimeen antibioottia sisältävällä kasvualustalla. Geenin vaikutuksesta solulimaan erittyvät antibiootteja hajottavia tai inaktivoivia entsyymejä. Tällä menetelmällä saatiin selektoitua työn kannalta tärkeät plasmideja sisältävät solut.

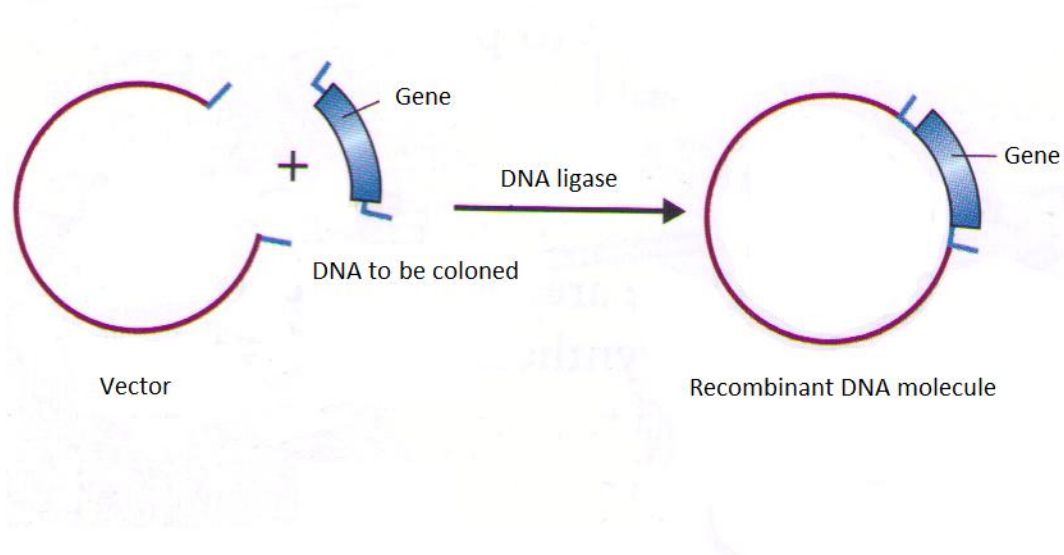
Insertit ovat yleensä vieraasta solusta peräisin lyhytjaksoisia DNA-molekyyliä, jotka kloonataan yhdistelmä-DNA-plasmidiin ja siirretään sen avulla uuteen isäntäsoluun. Inserttinä voi toimia ihan mikä tahansa DNA-juoste, kunhan se sopii yhteen käytettävän plasmidin kanssa.

Digestio eli DNA:n katkaiseminen restriktioendonukleaaseilla on menetelmä, jolla saadaan katkaistua DNA-juoste tarkalleen määrätystä kohdasta. Vektori ja insertti digestoidaan samoilla restriktioentsyymeillä, jotta niiden kohessiiviset päät sopisivat toisiinsa ligoidessaan ne myöhemmin yhteen tuottaen rekombinantti-plasmidivektori. Digestion tarkoituksena on saada aikaan insertin ja vektorin päiden leikkautumisen

symmetria-akselin 5'-puolelta, jotta DNA- päissä syntyisi toisilleen komplementaariset, yksinauhaiset, kohessiiviset 5'-päät. (Suominen & Ollikka, 1999)

Viimeinen vaihe rekombinantti-DNA:n teossa on vektorin ja insertin ligaatio eli DNA-juosteiden liittäminen yhteen ligaasientsyymien avulla. Se on yksi tärkeimmistä yhdistelmä-DNA-tekniikan menetelmistä. Ligaasientsyyminä käytetään yleensä *E. coli*:n T4-faagin tuottama T4-DNA-ligaasi. Ligaasi tarvitsee toimiakseen Mg<sup>+</sup> ioneja ATP:tä ja DNA-jaksojen yhteen liitettävät päät.

Ligaatio kannattaa tehdä alhaisessa lämpötilassa, koska tällöin molekyylien lämpöliike vähenee ja kohessivisten päiden on helpompi löytää toisiaan. Kun liitettävät päät ovat kohdallaan, ligaasientsyymi muodostaa puuttuvat sidokset ja sulkee kovalenttisesti ehjäksi rengasmaiseksi plasmidiksi. (Suominen & Ollikka)



Kuvio 1. Insertin liittäminen vektoriin ligaatioreaktiossa. (Gene cloning & DNA analysis)

## 1.2 Restriktioentsyymit

Restriktioentsyymejä käytetään pääasiassa DNA- jaksojen katkaisemiseen, mutta tarvittaessa entsyymien avulla voidaan myös tarkistaa kloonauksen onnistumisen. Restriktioentsyymien toiminta perustuu spesifisen nukleotidijärjestyksen tunnistamiseen ja DNA:n katkaisemiseen tarkalleen määrättyssä kohdassa joko tunnistuskohdassa tai

sen lähetyksillä. Työssä käytettiin kahta restriktioentsyymiä *Bam*HI:a ja *Hind*III:a, joiden leikkauskohdat on esitetty seuraavaksi.

*Bam*HI:n tunnustussekvenssi:

5'-G↓GATCC-3'

3'-CCTAG↑G-5'

*Hind*III:n tunnustussekvenssi:

5'-A↓AGCTT-3'

3'-TTCGA↑A-5'

Jotkut restriktioentsyymit voidaan reaktion jälkeen inaktivoida suuressa lämpötilassa kuumentamalla reaktioseos yli 65 °C:seen noin 5-20 minuuttia. Toiset taas tarvitsevat inaktivoituaakseen fenoli-kloroformiuuton. (Suominen & Ollikka,1999)

### 1.3 DNA:n analysointi AGE:lla

Nukleiinihapot ovat negatiivisesti varautuneet ja fosfaattiryhmiensä ansiosta happamia molekyyliä, joten joutuessaan sähkökenttään ne kulkeutuvat negatiivisesti varautuneena positiivista anodia kohti. Tähän perustuu DNA:n kulkeutuminen agarosielektroforeesissa eli AGE:ssä. Mitä suurempikokoisempi DNA on, sitä hitaammin se kulkee verkkorakenteisen geelin läpi. Pienikokoiset insertit etenevät paljon nopeammin kuin suurikokoiset vektorit. Tällä menetelmällä voidaan erotella leikatut insertit plasmidista, puhdistaa DNA:ta pienikokoisista proteiineista ja muista tarpeettomista molekyyleistä. AGE ajon jälkeen EtBr:llä värjättyä geeliä tarkastellaan UV-valossa, jossa näkyvät kirkkaina DNA-vyöhykkeet eli bändit. AGE:n avulla voidaan mitata myös DNA:n kokoa, käyttäen rinnalla ajossa kokomarkkeria. Kokomarkkeri valitaan ajettavan DNA:n perusteella siten, että ajettava DNA jää markkerin rajaaman alueen sisäpuolelle. Jos ei tiedetä DNA-juosteen emäsparien määrää ollenkaan, niin on valittava mahdollisimman laajaa molekyyliainoaaluetta kattava kokostandardi.

#### 1.4 Bakteerisolujen transformaatio ja selektio

Transformaatiolla tarkoitetaan DNA-molekyylien siirtymistä solun sisälle tai solusta toiseen. Isäntäsolun tulee olla kompetentti, jotta se voisi vastaanottaa geneettistä materiaalia sisäänsä. Kompetenttiin bakteerisolun transformoidaan ligaatiossa syntyneitä yhdistelmä-DNA-molekyylejä, joko lämpöshokkimenetelmällä tai elektroporaatiolla. Joillakin bakteereilla on luontaisesti kompetenssi, mutta sen voi aikaansaada laboratorio-olosuhteissakin. Käsittelemällä solut jääkylmällä  $\text{CaCl}_2$ -liuoksella ja sen jälkeen lyhyellä lämpöshokilla, solut tulevat hetkellisesti DNA:ta läpäiseviksi. Kaikki solut eivät kuitenkaan saa sisäänsä DNA:ta ja monet solut kuolevat tässä käsittelyssä. Elektroporaatio on menetelmä, jossa lyhytaikaisella korkeajännitteen sähköimpulssilla solun seinämiin saadaan väliaikaisia aukkoja, josta DNA transformoituu soluun. Elektroporaatiolla on erittäin korkea transformaatiotehokkuus. (Suominen & Ollikka, 1999)

Transformaatiossa saadaan vain pieni määrä DNA:ta siirrettyä soluun, joten on tärkeää, että käytössä on jokin selektiomenetelmä, jolla vain transformoituneet solut saadaan kasvamaan. Geeniteknologiassa käytetään yleensä antibioottiresistenssigeenin sisältäviä geenivektoreja. Resistenssigeeni antaa vektoria kantavalle isäntäsolulle tunnistettavan ominaisuuden, jolloin vain transformoituneet solut pystyvät lisääntymään antibioottikasvualustalla. Yleisin selektiomenetelmänä käytetty antibiootti on ampicilliini. Työssä käytettiin ampicilliinin lisäksi myös tetrasykliiniä, kanamysiiniä ja gentamysiiniä, sillä käytössä olevilla vektoreilla ja bakteereilla oli resistenssigeenit kyseisille antibiooteille.

Väriselektiota käytetään tarkistaakseen onko transformoituneessa vektorissa inserttiä. Väriselektio perustuu bakteerin kykyyn tunnistaa ja pilkkoa LacZ-geenin koodaaman  $\beta$ -galaktosidaasi-entsyymin avulla X-gal-molekyylä, jolloin syntyy tummansininen väri. Tietyillä bakteerikannoilla esiintyy lacZ-geenin osa, joka toimii yhdessä vektorin koodaaman osan kanssa pilkkoen X-gal-molekyylä vain siinä tilanteessa, jos plasmidiin ei ole onnistuneesti kloonattu inserttiä. Solu, johon on onnistuneesti transformoitu plasmidi, jossa on insertti, johtaa siis tilanteeseen, jossa toimivan  $\beta$ -galaktosidaasin synteesiä ei tapahdu ja siten solut jäävät valkoisiksi (T.A. Brown, 2010).

## 2 PIKORNAVIRUKSET

Pikornavirukset ovat pieniä vaipattomia RNA-virusia, jotka kuuluvat *Pikornaviridae*-heimoon. Rakenteeltaan ne ovat hyvin yksinkertaisia, proteiiniuoren ympäröimiä virusia. Pikornaviruksiin kuuluvat mm. enterovirukset ja parechovirukset, joiden pintaproteiineja oli tässä työssä tarkoituksena tuottaa. Pikornavirukset lisääntyvät solun sytoplasmassa. (Jyrki Heino, Matti Vuento, 2007)

Entero- ja parechovirukset ovat yleisimpiä ihmisiä infektioitavia virusia ja aiheuttavat maailmanlaajuisesti suuria epidemioita aiheuttaen akuutteja sekä kroonisia tauteja mm. aivokalvontulehdusta, sydänlihastulehdusta ja muita ihottumatauteja. Mutaatio ja rekombinaatio ovat entero- ja parechovirusten tärkeimmät mekanismit evoluutiossa, joten viruksen nopean kehityksen takia diagnostiikka- ja lääkekehitys on vaikeaa. Pikornaviruslajit jaetaan serotyyppeihin geneettisten ja antigeenisten ominaisuuksien perusteella. Työssä tuotettiin kahden entero- ja kahden parechoviruksen VP1-pintaproteiineja. Coxsackievirus A9 (CAV9) aiheuttaa herpangina-kuumetautia, jonka oireina on rakkuloita nielussa ja kitalaessa. Coxsackievirus B3 (CBV3) aiheuttaa sydänlihastulehdusta ja ns. Bornholmin tautia, jonka oireena on usein pitkään kestävä kuume, rintakipu ja huonovointisuus. Parechovirukset aiheuttavat hengitystieinfektioita ja HPEV3 on myös yleinen pienten lasten keskushermostoinfektioissa.

(<http://www.ktl.fi>, viitattu 20.5.2010)

(<http://www.tohtori.fi>, viitattu 20.5.2011)

## 3 BAKULOVIRUSEKSPRESSIOSYSTEEMI (BEVS)

Bakulovirusten genomiin perustuva bakulovirusekspressiosysteemi (BEVS) on suosittu tapa tuottaa proteiineja. Työssäni käytettiin Invitrogenin Bac-to-Bac®- BEVS-systeemiä. Se on tehokas aluespesifiseen transpositioon perustuva systeemi, jolla voidaan luoda proteiinia ekspressoiva rekombinantti bakulovirus. Infektoimalla soluja rekombinantti-bacmidilla, johon on liitetty kohdegeeni, saadaan hyönteissoluissa tuotettua suuria määriä proteiineja. Suurin osa proteiineista kerääntyy solun sisälle, joten proteiinin eristys tehdään hajottamalla isäntäsoluja. Kitin sisältämässä FastBac™-

vektorissa on polyhedriini promotterialue  $P_{PH}$ , joka mahdollistaa korkeatason ekspresion.

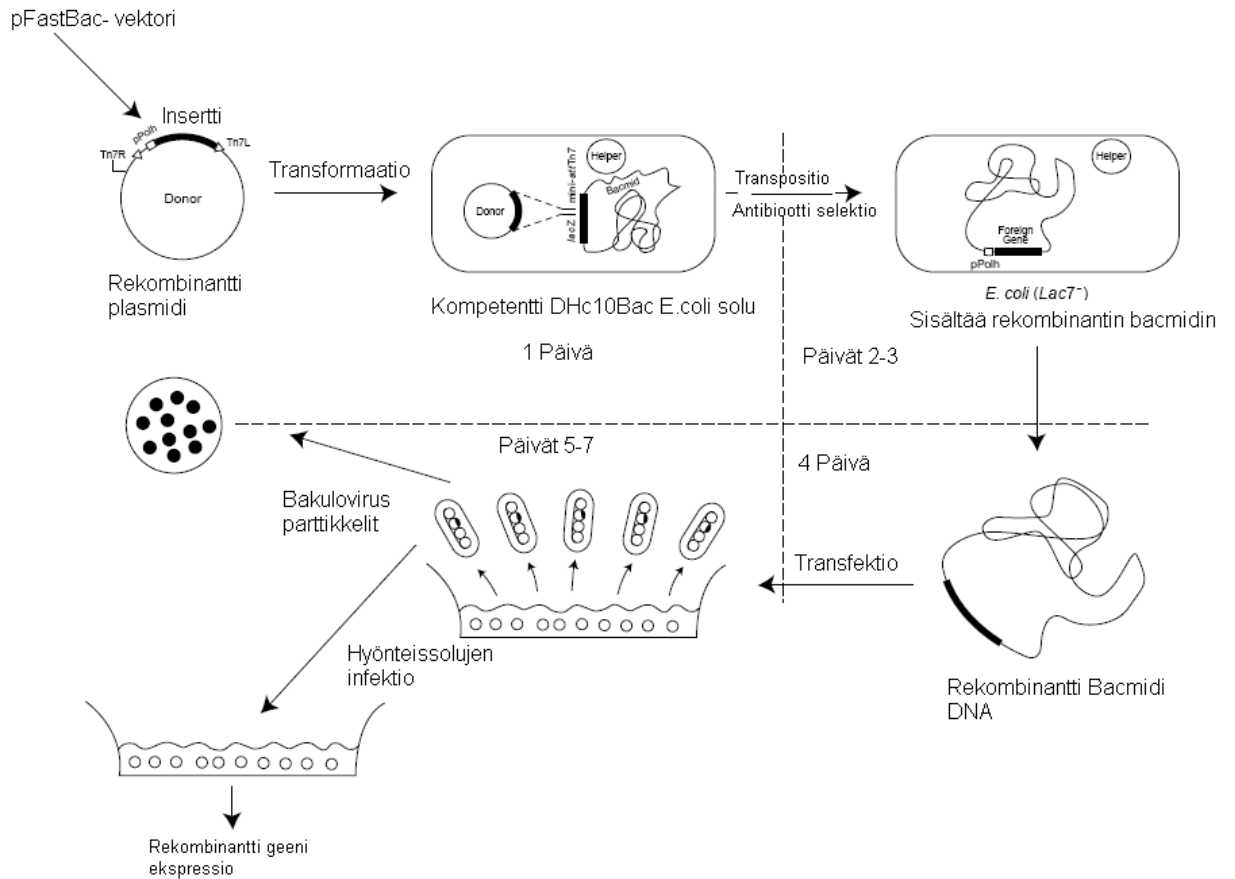
### 3.1 Bakulovirukset

Bakulovirukset ovat hyvin lajispesifisiä ja infektoivat pääasiassa niveljalkaisia. Niiden genomi koostuu kaksijuosteisesta, sirkulaarisesta, DNA:sta, joka sijaitsee sauvamaisessa kapsidissa. Kaksi eniten käytettyä bakulovirusviruskantaa vieraan geenin ekspressiossa ovat *Autographa californica* (AcMNPV) ja *Bombyx mori* (BmNPV).

Luonnossa bakuloviruksilla on kolme lisääntymisfaasia. Ensimmäisessä faasissa virus infektoi soluja kulkeutumalla solun sisään endosytoosin avulla ja alkaa valmistella solua DNA:n replikaatiota varten. Ensimmäinen vaihe kestää 0,5 -6 tuntia. Toisessa eli myöhäisessä vaiheessa, noin 6-12 tuntia infektiosta alkaa muodostua viruksen ekstrasellulaarinen muoto EV, joka sisältää plasmamembraanin ja glykoproteiinin, jota tarvitaan viruksen endosytoosissa eli tunkeutumisessa soluun. Viimeinen eli erittäin myöhäinen vaihe alkaa 24–96 h infektiosta. Erittäin myöhäisessä vaiheessa alkaa polyhedriinigeenien ekspresio, jolloin solu tuottaa viruksen OV-muotoa ja aiheuttaa isäntäsolun kuoleman. (BEVS, Invitrogen)

### 3.2 Bac-to-Bac®

Bakuloviruksen ekspresiosysteemi perustuu aluespesifiseen transpositioon, se on nopein tapa tuottaa rekombinanttia bakulovirusta (Kuvio 3.). pFastBac™-vektorissa oleva Tn7 alue ja helper-plasmidi mahdollistavat vieraan geenin siirtoa bacmidiin E.coli solussa. Vieras geeni kloonataan ensin pFastBac™-vektoriin, jonka jälkeen rekombinantti plasmidi transformoidaan kompetenttiin DHc10Bac™E.coli soluun, jossa on helper-plasmidi ja bacmidi mini-attTn7 alueineen. pFastBac™-vektorissa oleva mini-attTn7-elementti mahdollistaa ekspresoituvan geenin liittymistä bacmidissa olevaan mini-attTn7-elementtiin. Geeni siirtyy helper-plasmidin tuottamien transpositioproteiinien avulla bacmidiin ja liittyy mini-attTn7 elementtiin. (Introvigen, 2004)



Kuvio 3. Rekombinantin bakuloviruksen lisääntyminen ja geeniekspressio Bac-to-Bac-systemin avulla, Invitrogen 2004.

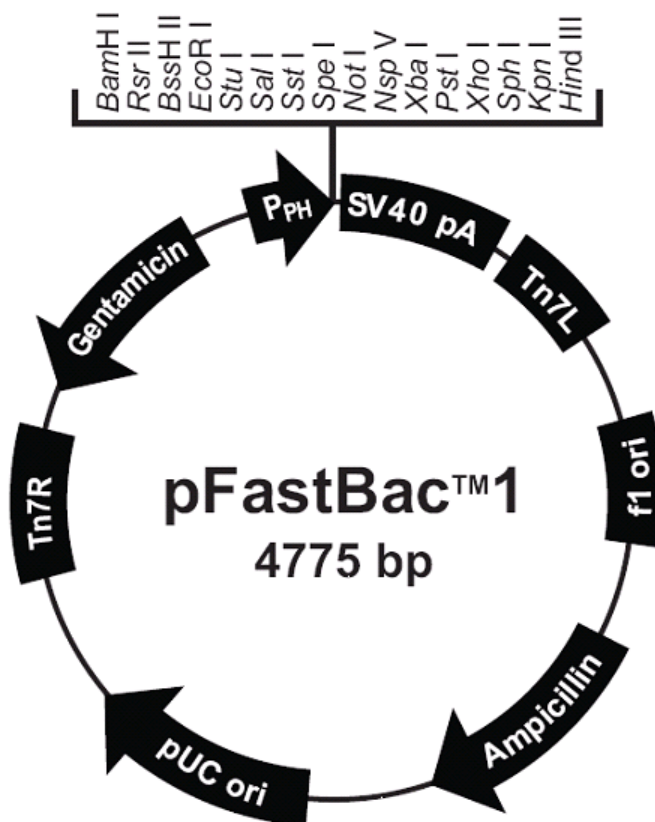
### 3.3 Vektorit

Bac-to-Bac- kitti sisältää kolme erilaista pFastBac-vektoria, joihin kloonataan tuotettava insertti. Työssä käytettiin vain yhtä näistä vektoreista pFastBac<sup>TM</sup>HT A:ta, johon suoritettiin kohdegeenikloonaus käyttäen avuksi restriktio- ja ligaasi-entsyymejä. Käytetty vektori on kooltaan 4856 emäsparia eli noin viisi kertaa suurempi tuotettua inserttiä. Se sisältää resistenssigeenit genytmysiinille ja ampicillinille, joka mahdollistaa antibioottiselektion. Vektorilla on myös N-terminaalinen Histidiini-häntä, jonka ansiosta proteiinin puhdistus voidaan suorittaa His-kolonnilla. pFastBac<sup>TM</sup>1 ja pFastBac<sup>TM</sup>HT A- vektorit sisältävät vain yhden promoottorialueen. pFastBac<sup>TM</sup>Dual-

vektorissa on kaksi promoottoriauuetta, jotka mahdollistavat kahden geenin samanaikaista ilmentymistä.

### 3.3.1 pFastBac™1

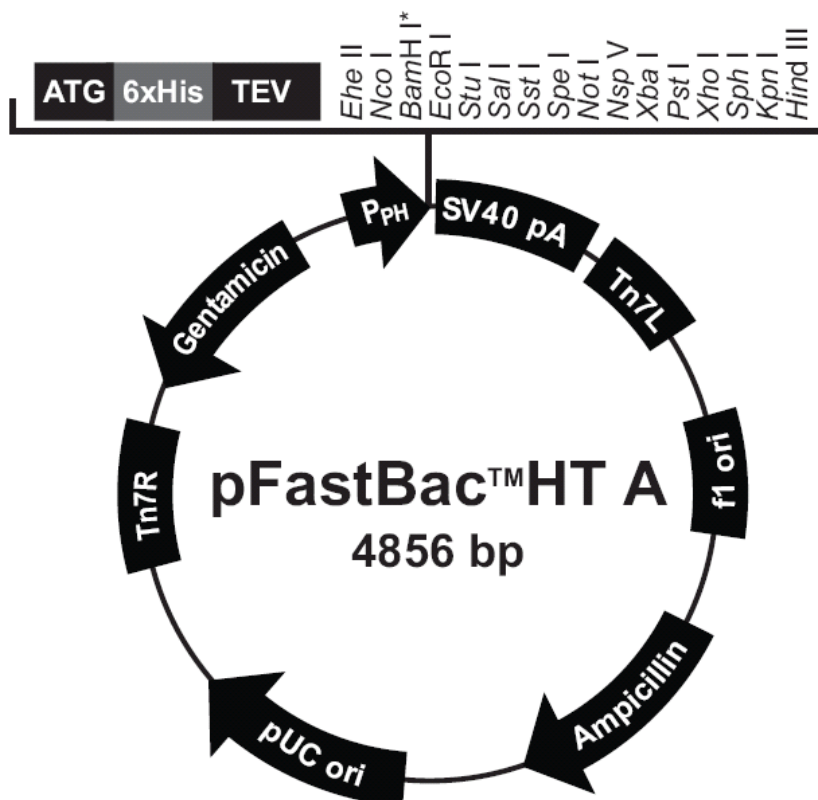
pFastBac™1- vektori on kooltaan 4775 emäsparia. Vektorilla on polyhedriini-promoottoriauue, kloonaualue ekspressoituvalle geenille ja resistenssigeenit sekä ampisilliinille että gentamysiinille. (Invitrogen, 2004)



Kuvio 4. pFastBac™1-vektori

### 3.3.2 pFastBac™HT A

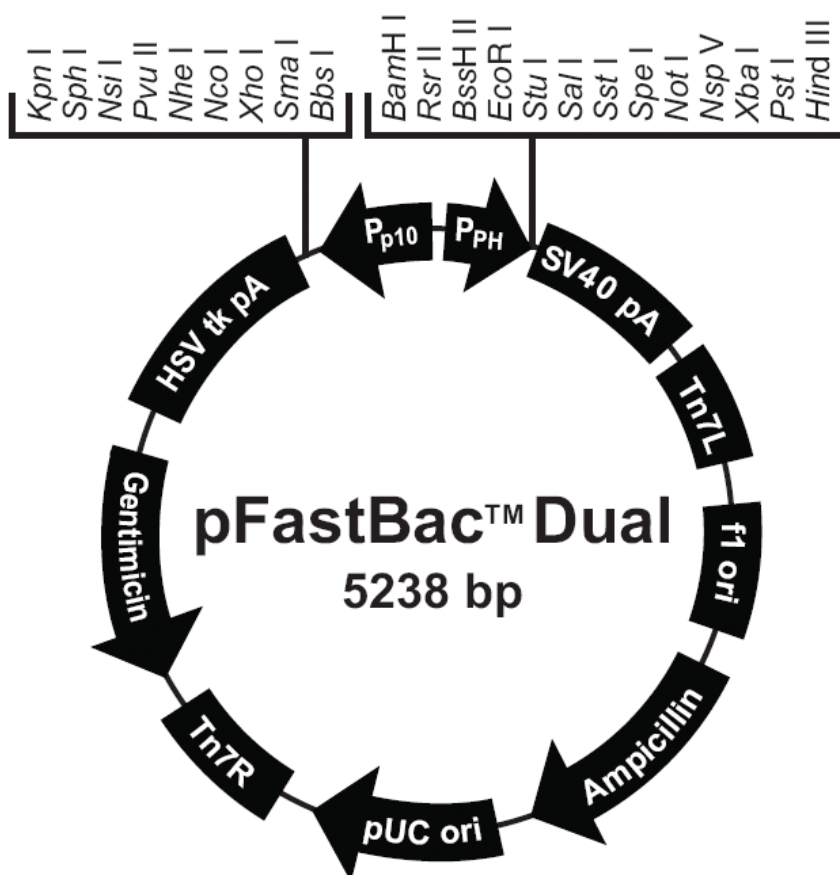
pFastBac™HT A – vektori sisältää edellä mainittujen ominaisuuksien lisäksi myös histidiini-hännän, joka mahdollistaa proteiinin puhdistuksen his-kolonnin avulla. Vektori on kooltaan 4856 emäsparia. (Introvigen,2004)



Kuvio 5. pFastBac™ HT A-vektori

### 3.3.3 pFastBac™ Dual

Tämän vektorin erityisominaisuutena on kaksi kloonauksen- ja promoottorialuetta, jotka mahdollistavat kahden geenin ekspressiota yhtä aikaa. Promoottorialue p10 (P<sub>p10</sub>) mahdollistaa myös polyhedriini-promoottorialueen (P<sub>PH</sub>) tavoin korkean rekombinanttiproteiinin tuottotason. Muuten vektorilla on samat ominaisuudet kuin pFastBac 1:lla ja FastBac HT A:lla. (Invitrogen, 2004)



Kuvio 6. pFastBac™ Dual-vektori

### 3.3.4 Kompetentit DHc10Bac™ *E. coli*-solut

DHc10Bac *E. coli* -solut sisältävät bacmidin, johon on tarkoitus siirtää proteiinia koodaava DNA-jakso rekombinantti-bakuloviruksen muodostamiseksi. Soluissa on bacmidin lisäksi vielä helper-plasmidi, joka auttaa transpositiossa erittämällä tarvittavia entsyymejä. Solut on ensin muutettava kemiallisesti kompetenteiksi ennen transformaatiota CaCl<sub>2</sub>-käsittelyllä. Kaupalliset solut kasvatetaan kanamysiini-tetrasykliini sisältävällä kasvualustalla selektion aikaansaamiseksi. Homogeeninen suspensio saadaan kasvattamalla maljalta poimittua yksittäistä pesäkettä LB-mediumissa käyttäen sama antibioottiselektiota. CaCl<sub>2</sub>-käsittelyn jälkeen solut ovat valmiita käytettäväksi transformaatioissa. Käsitellyt bakteerisolut säilytetään -70 °C:ssa kompetenssin säilyttämiseksi.

### 3.4 Hyönteissolut

BEVS-tekniikassa käytetyimmät hyönteissolulinjat ovat Sf9, Sf21, Tn-368 ja High-Five™-solut. Sf9-solulinja on eristetty alun perin harsosääsken toukasta (*Spodoptera frugiperda*) ja on eniten käytetty solulinja. Sf21-solulinja on myös peräisin harsosääsken toukasta. Uudempana solutyypinä on tullut perhosen toukasta (*Trichoplusia ni*) eristetyt solulinjat Tn-368 ja High-Five™. (BEVS, Invitrogen).

### 3.5 TOPO TA Cloning® ja sen toimintaperiaate

Työssä käytettiin apuvektorina TA-vektoria, jonka avulla saatiin tuotettua lisää inserttejä, jotka voidaan ligoida myöhemmin FastBac-vektoriin. TOPO-kloonauksen erikoispiirteenä on insertin ligoituminen vektoriin ilman ligaasientsyymejä. TA-vektorin sisältämän LacZ $\alpha$ -geenin avulla saadaan selektoitua vain transformoituneet *E. coli* -solut. TA-vektorin eristyksen ja puhdistuksen jälkeen insertti leikataan vektorista samoilla restriktioentsyymeillä kuin FastBac-vektori, jotta niiden kohessiiviset päät voisivat ligoitua yhteen ligaasi-entsyymien avulla.

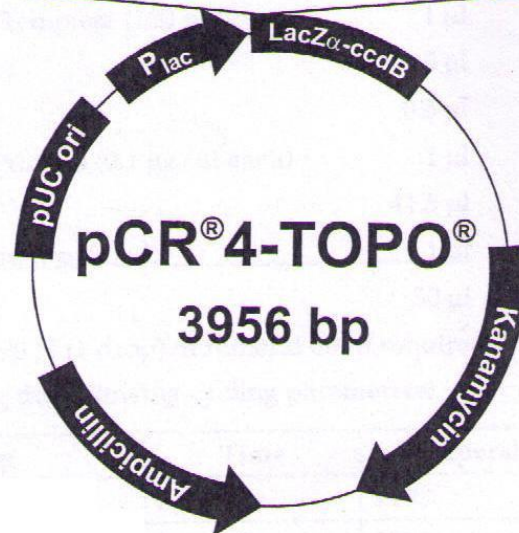
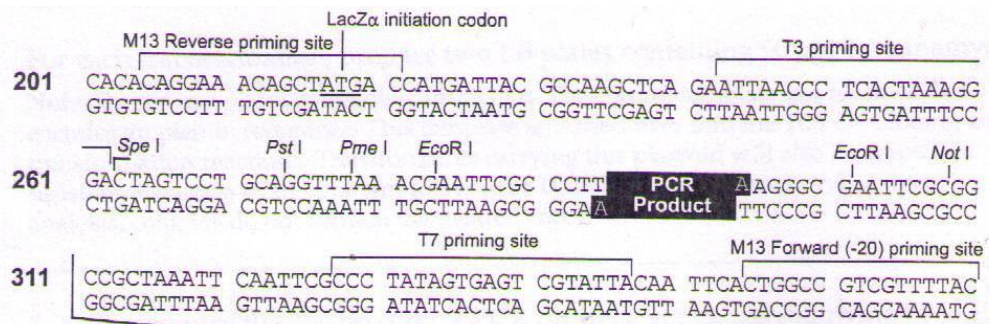
Invitrogenin valmistama TOPO TA Cloning® -kitti sisältää yhden pCR®4-TOPO® TA-vektorin, jonka 3' päässä on tymiini (T). Se mahdollistaa TA-kloonauksen PCR tuotteen kanssa, joka on käsitelty ensin DNA-polymeraasilla. Topoisomeraasi on sitoutunut kovalenttisesti vektoriin, jonka tarkoituksena on aktivoida vektori kloonauksen aikana. PCR-tuotteen 3' päähän, syntyy DNA-polymeraasin vaikutuksesta yksittäinen adeniini (A) -nukleotidi. Topoisomeraasi ligoi insertin adeniinin ja vektorin tymiinin kovalenttisesti yhteen yhtenäiseksi plasmidiksi. Tämän takia TOPO-kloonauksessa ei tarvitse käyttää restriktio- eikä ligaasientsyymejä.

#### 3.5.1 TA-vektori

TA-vektorin koko on 3956 emäsparia. Vektorissa on resistenssigeenit sekä ampicilliinille, että kanamysiinille. Se sisältää myös LacZ $\alpha$ -ccbB alueen, jonka tarkoituksena on selektoida vain insertin sisältäviä transformoituneita pesäkkeitä. (Kuvio 8.) Insertin ja vektorin ligaation onnistuminen estää LacZ $\alpha$ -geenin ilmentymisen transformoituneessa solussa. Jos solu sisältää pelkkää TA-vektoria ilman inserttiä, niin

LacZ $\alpha$ -geenin vaikutuksesta solu kuolee. Tästä syystä TA-vektorin kanssa ei tarvitse käyttää sini-valko-selektiota. TA-vektori toimii parhaiten kitin sisältämien One Shot<sup>®</sup> MACH1<sup>™</sup>T1<sup>R</sup>- One Shot<sup>®</sup> DH5 $\alpha$ <sup>™</sup>- T1<sup>R</sup>- ja One Shot<sup>®</sup> TOP10 *E. coli*-solujen kanssa.

TOPO TA –kloonauksessa insertti monistetaan ensin PCR:llä insertin omilla 3'- ja 5' primereillä ja Dynazyme<sup>™</sup> I DNA-polymeraasi-entsyymien avulla. Monistuksen jälkeen insertistä tulee TA-vektorin kanssa yhteensopiva, jolloin se voidaan ligoida sekoittamalla vektori ja insertti keskenään. Seokseen lisätään suola sisältävä liuos ja laimennetaan käänteisosmoosivedellä tarvittavan konsentraation saamiseksi.



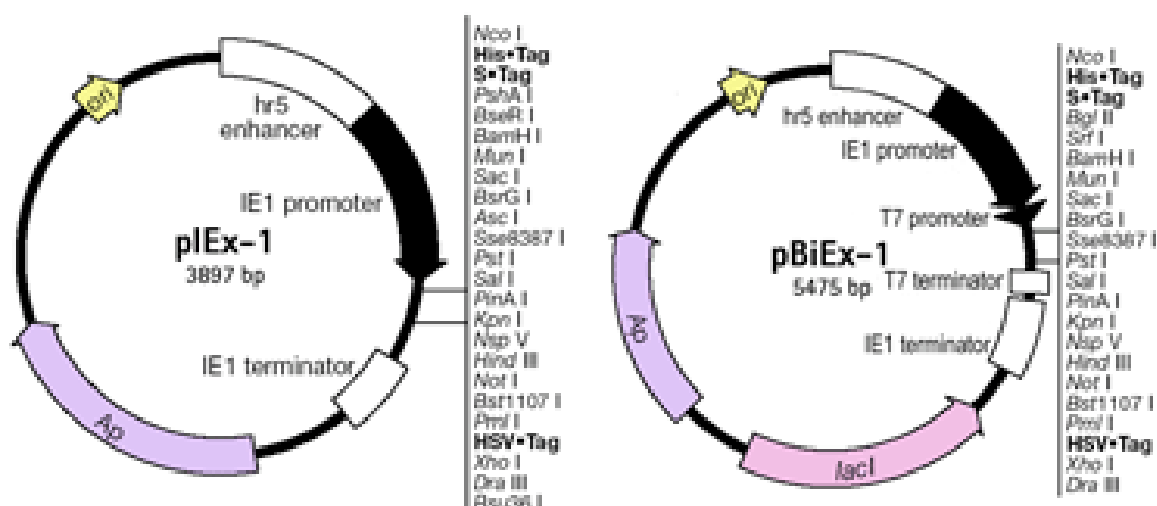
Kuvio 8.pCR<sup>®</sup>TOPO<sup>®</sup> -vektori

(TOPO TA Cloning<sup>®</sup>Kit, Invitrogen 2006)

### 3.6 Proteiinien tuotto muilla menetelmillä

#### 3.6.1 MERCK InsectDirect®System method

MERCK valmistaa InsectDirect®System method –kittiä, jonka toiminta perustuu virusvapaaseen heterogeeniseen proteiiniekspressioon hyönteissoluissa. Menetelmä on hyvin nopea ja mahdollistaa jo 48 tunnissa proteiinin ilmentymisen. Menetelmän avulla saadaan tuotettua parhaimmillaan 80µg proteiinia per 1 ml kasvatusliuosta. Kitti sisältää kahdenlaisia pIEx™ sarjan ekspressiovektoreita mahdollistaen liitetyn geenin nopean ekspression jommassa kummassa vektoreista. Vektoreilla on sama ie1-promoottorialue ja hr5-tehostaja. pBiEx-1-vektorin sisältämä T7lac-alue mahdollistaa täysin kontrolloidun geeniekspression myös *E. coli* -soluissa. (MERCK 2011, viitattu 18.5.2011)



Kuvio 7. pIEx-1 ja pBiEx-1-vektorit, MERK

#### 3.6.2 ParaTechs VE-BEVS

ParaTech:in valmistama VE-BEVS-kitti perustuu eukaryoottien proteiinien tuottoon hyönteissoluissa tehostetulla Vankyrin-proteiinilla. VE-BEVS- teknologia vähentää materiaalikuluja ja kustannuksia. VE-BEVS-tekniikassa käytetään muokattuja Sf9-

hyönteissoluja, jotka sisältävät Vankyrin-nimisen geenin. VE-solulinjat mahdollistavat tehokkaamman proteiiniekspression ja proteiinisaanto kasvaa jopa 15-kertaiseksi. Kitti mahdollistaa useiden geenien samanaikaisen ekspresion ja proteiinin koolla ei ole rajoituksia. (ParaTechs 2011, viitattu 18.5.2011)

## 4 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

### 4.1 Transformaatio

Transformaatio on menetelmä, jossa solun sisään siirretään vierasta DNA:ta käyttäen hyväksi sähkövirtaa tai lämpöshokkikäsitelyä. Tällöin soluseinämiin muodostuu väliaikaisia aukkoja, josta DNA transformoituu solun sisään. Solut on ensin kuitenkin muutettava sopivalla tavalla kompetenteiksi riippuen käytettävästä menetelmästä. Transfektiksi kutsutaan menetelmää, jolla DNA:ta siirretään eukaryoottisoluihin.

Kemiallisessa transformaatiossa bakteerien solukalvo saadaan epästabiliin tilaan  $\text{CaCl}_2$ -käsittelyllä, jolloin lämpöshokissa solut pystyvät vastaanottamaan lämmön vaikutuksesta muodostamien aukkojen kautta DNA:ta sisäänsä. Lämpöshokki saadaan aikaan pitämällä solut ensin jäällä ja sitten siirtämällä 30-50 sekunniksi 42 °C:seen lämpöhauteeseen. Kaikki solut eivät kuitenkaan ota vierasta DNA:ta sisäänsä. Plasmidin sisältämän selektiomarkkerin avulla saadaan selektoitua transformoituneet solut.

Transformaatio sähkökentässä eli elektroporaatio on paljon tehokkaampi menetelmä kuin kemiallinen transformaatio. Tässä menetelmässä käytetään lämpöshokin sijaan korkeaa jännitettä, jolloin soluseinään muodostuu väliaikaisia aukkoja. Jännitteen on oltava kuitenkin hyvin lyhytaikainen, ettei synny soluvaurioita. Solut on myös suspentoitava suolattomaan liuokseen, joka sopii sähkövirralla tehtävän transformaatioon.

## 4.2 RNA:n eristys

RNA:n eristykseen käytettiin OMEGAN kehittämää E.Z.N.A.™ Viral RNA-kittiä, jonka toimintaperiaate perustuu uuteen piipohjaiseen HiBind® matriisiin. Kitti on suunniteltu RNA:n eristykseen soluvapaista nesteistä kuten veren plasmasta, seerumista, virtsasta ja viljelmien supernatantista. Näyte sekoitetaan voimakkaasti denaturoivan puskurin kanssa, jolloin RNAasi inaktivoituu kokonaan, tällöin ehjä RNA on suojattu vaurioilta. Näyte ladataan HiBind RNA-kolonneihin, jonka jälkeen se pestään muutaman kerran. Puhdistettu RNA eluoidaan RNAasi-vapaaseen veteen. (OMEGA bio-tek, 2007)

Tällä menetelmällä RNA:n eristys on helppoa ja nopeaa ja lopputuloksena saadaan puhdasta RNA:ta, josta on poistettu kokonaan kaikki epäpuhtaudet ja entsyymi-inhibiittorit. Puhdistettu RNA soveltuu käytettäväksi RT-PCR:ssä.

## 4.3 PCR

PCR eli polymeerasiketjureaktio on DNA:n monistusmenetelmä, jolla saa monistettua eksponentiaalisesti DNA:ta hyvin pienestä lähtö-DNA-määrästä. PCR koostuu erilaisista sykleistä, joissa lämpötilaa nostamalla ja alentamalla saadaan aikaan DNA:n monistuminen. PCR:n kolme eri vaihetta ovat: denaturaatio, annealing ja ekstensio. Denaturaatiovaiheessa vastinjuosteet irtoavat toisistaan lämpötilan noustessaan 95 °C:seen. Alkudenaturaatio tehdään varmistaakseen kaikkien pitkien DNA-jaksojen täydellinen denaturaatio. Annealing-vaiheessa lämpötila lasketaan 50 °C:seen, jolloin tapahtuu yksittäisten alukkeiden kiinnittyminen emäsparisäännön mukaisesti. Lämpötilan noustessaan 72 °C:seen, alkaa ekstensiovaihe, jolloin DNA-polymeraasi luo uuden vastinjuosteen ja tapahtuu pidennysreaktio. Nämä kolme vaihetta toistetaan peräkkäin noin 30-40 kertaa, jolloin DNA monistuu eksponentiaalisesti. Loppuekstensio varmistaa että kaikki kopiot on syntesoitu täydellisinä loppuun asti.

## 4.4 AGE

Agaroosigelelektroforeesin toiminta perustuu negatiivisesti varautuneiden DNA-jaksojen kulkeutumiseen geelillä sähkökentässä positiivista anodia kohti. Mitä pidempi DNA-jakso on kyseessä, sitä hitaampaa on sen siirtyminen geelillä. DNA merkataan

latauspuskurilla, jolloin UV-valossa etidiumbromidia sisältävällä geelillä näkyvät kirkkaat bändit. EtBr lisätään geelin tekovaiheessa, mikä mahdollistaa DNA:n tarkastelut AGE-ajon jälkeen. EtBr-käsittely on myös mahdollinen AGE-ajon jälkeen. Agarosigeelielektroforeesia käytetään PCR-tuotteen puhdistukseen ja DNA-jaksojen koon analysointiin. Geelistä voi arvioida myös DNA-pitoisuuden bändin kirkkauden mukaan, kun geeliä tarkastellaan UV-valossa. AGE-ajossa käytetään yleensä kokomarkkeria näytteiden rinnalla, jotta saisi analysoitua DNA:n kokoa.

Käyttettiin tässä työssä Fermentasin DNA Ladder Plus 1 kb kokomarkkerina. Kyseinen kokomarkkeri oli sopinut käyttämäni DNA:n kanssa eniten, sillä markkerin kolme eri bändiä näkyivät geelillä kirkkaammin kuin muut bändit 500 bp, 1500 bp ja 5000 bp kohdalla. Käytetyt insertit olivat kooltaan 700 bp ja 900 bp, joten ne ulottuivat kokomarkkerin kahden ensimmäiseen bändien välille. Vektorit olivat kooltaan noin 4000 bp ja 5000 bp, joten niidenkin analysointi onnistui kyseisen markkerin avulla.

#### 4.5 Primerit

Jokaiselle pintaproteiinille suunniteltiin yhteensopivat PCR- primerit vektorin suhteen. DNA-sekvenssista tehtiin restriktiokartta NEBCutter-ohjelmalla ([www.finnzymes.fi](http://www.finnzymes.fi)), jolla valittiin vektorin kanssa yhteensopivat restriktioentsyymien leikkauskohdat. Aloitus- ja lopetuskodonien täytyy vastata vektorin kodoneja. (<http://tools.neb.com>, viitattu 13.3.2011)

CAV9-HT-VP1-F	5'- GGGGATGTGGAAGAAGCCATTGA; <b>BamHI</b> [GGATCC]; extra <b>A</b> ORFin takia)
CAV9-HT-VP1-R	5'- ACCCTTAACACGCATGGTGCCTTC + <b>TAA</b> + <b>HindIII</b>
HPEV1-HT-VP1-F	5'- AATTCATGGGGTTCACAGATGGA; <b>BamHI</b>
HPEV1-HT-VP1-R	5'- AACCTTACAAATCAGAGTCCATAT + TAA
CBV3-HT-VP1-F	5'- GGCCCAGTGGGAAGACGCGATAA; <b>BamHI</b>
CBV3-HT-VP1-R	5'- CAATGACAAATACGGGCGCATTT + TAA

HPEV3-HT-VP1-F	5'- AATTCATGGGGTTCACAAATGGA
HPEV3-HT-VP1-R	5'- AGGGCTGCAGCACTTTATGATGAA

Taulukko1. Työssä käytetyt primerit.

#### 4.6 Vektoriplasmidin ja insertin tuottaminen

Vektoriplasmidina käytettiin TOPO-TA-vektoria, johon oli tarkoitus ligoida PCR:llä tuotettu insertti. TA-vektori on kaupallinen tuote, jonka avulla voi tuottaa insertti-DNA-ta transfoimomalla vektori bakteerisoluihin.

Insertit olivat plasmidimuodossa eli cDNA:ta: pCAV9, pHPEV1,pCBV3. Halutun insertin tuotto tapahtui käyttäen hyväkseen PCR:ää, jossa monistettiin primerien avulla tietty DNA-jakso plasmidista. Jokaiselle insertille oli valitut omat 5' ja 3'-pään primerit (Taulukko 1.) PCR-ohjelma suunniteltiin Dynazymelle soveltuvaksi (Taulukko 3.)

Reagenssi	Määrä
RT rektiosta cDNA:ta	5 µl
ddH2O	11,75 µl
10x Tag Puskuri	2,5 µl
10mM dNTP	0,5 µl
10µM 5'-aluke	2,5 µl
10µM 3'-aluke	2,5 µl
Dynatsyme	0,25 µl
Yhteensä	25 µl

Taulukko 2. PCR-reaktion reagenssit ja pipetointilavuudet VP1-geenin monistamiseksi

Lämpötila	Aika	Vaihe	Syklit
-----------	------	-------	--------

95°C	3 min	alkudenaturaatio	1X
95°C	30 sek	denaturaatio	40X
50°C	40 sek	annealing	
72°C	120 sek	ekstensio	
72°C	7 min	loppuekstensio	1X

Taulukko 3. PCR-ajo-olosuhteet DNA:n monistamiseksi

HPEV3-RNA eristettiin näytteestä OMEGA:n E.Z.N.A™ Viral RNA- kitin avulla. Koska HPEV3 oli RNA:ta, täytyi ensin tehdä RT-reaktio ennen varsinaista PCR:ää. RT suoritetaan sekoittamalla kaikki reagenssit keskenään ja inkuboimalla tunnin ajan +42°C:ssa, jolloin käänteistranskriptio tapahtuu. RT-reaktio inaktivoidaan +70 C:seessa 5 minuutin ajan. (Taulukko 4.)

Reagenssi	Määrä
5x ImProm II Puskuri	2 µl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	1 µl
10mM dNTP kutakin	0,5 µl
RNAaibiittorisi-in	0,5 µl
RT-entsyymi ImProm II	0,5 µl
Primeri 10µM HPEV3-HT-VP1-R	1 µl
RNA (HPEV3)	4,5 µl
Yhteensä	10 µl

Taulukko 4. HPEV3-VP1-geenin RT-reaktiossa käytetyt reagenssit ja pipetointi tilavuudet

#### 4.7 Rekombinantti-TA-vektori

Inserttiä ja TA-vektoria ei tarvitse pilkkoa erikseen restriktioentsyymeillä, sillä TOPO TA-kitin sisältämän vektorin päässä on Tyr-274-geeni, joka katalysoi vektorin 3' päässä olevan tymiinin ja insertin 3' päässä DNA-polymeraasin avulla liitetyn adeniinin sitoutumista kovalenttisesti keskenään. TA-vektorin ja insertin ligaatio tapahtuu automaattisesti sekoittamalla PCR-tuote, TA-vektori ja suolaliuos keskenään, jolloin topoisomeraasientsyymien avulla insertin ja vektorin kohessiiviset päät ligoituvat yhteen.

Rekombinantti plasmidi transformoitiin kompetentteihin XL1-tai MACH1 *E. coli* -soluihin Transformaation suoritin Invitrogenin TOPO TA Cloning® Kitin ohjeiden mukaisesti. TA-vektori, insertti, suolaliuos ja KO-H<sub>2</sub>O sekoitettiin keskenään ja siirrettiin kemiallisesti kompetentteihin *E. coli* -soluputkiin, jossa seos inkuboitiin 2-30 minuutin ajan. Lämpöshokki tehtiin jäähauteella jälkeen soluille 30 sekunnin ajan +42 °C:ssa. Solut siirrettiin ampicilliinia sisältävälle kasvualustalle ja inkuboitiin 37°C:seessa. *E. coli* -solut, johon on transformoitunut TA-vektori, kasvavat maljalla muodostaen valkoisia pesäkkeitä. *E. coli* -solut ilman plasmidia sen sijaan kuolevat, sillä niillä ei ole resistenssia ampicilliinille.

TOPO-TA-vektorin eristys ja puhdistus suoritettiin Fermentasin GeneJET™-kitin avulla. Sen toimintaperiaate perustuu silikakalvoon, joka voi kerätä jopa 20 µg plasmidi-DNA:ta. Kolonni on kehitetty plasmidien eristämiseen rekombinanteista *E. coli* -soluista. Bakterisolupelletti resuspendoidaan ja lisätään lysis-liuosta rikkoakseen solukalvon. Sentrifugoimalla kiinteä aines alas, saadaan erotettua supernatantti, jossa on DNA:ta. Supernatantti sentrifugoidaan GeneJet™- membraanin läpi, jolloin DNA jää kalvolle. Plasmidi-DNA eluoidaan 10mM Tris-HCl (pH 8,0) eluutiopuskurilla tarvittavaan tilavuuteen. (Fermentas, 2008)

#### 4.8 pFastBac™-vektorin tuotto ja eristys

Kaupallinen pFastBac- vektori oli valmiiksi transformoitu *E. coli* -soluihin, joten käyttäen hyväkseen ampicilliiniselektiota kasvatettiin soluja LB-kasvatusalustalla. Vektori eristettiin *E. coli* -soluista Fermentasin GeneJET™- plasmidieristyskitin avulla. AGE:lla tarkistettiin pienellä määrällä DNA:ta onnistuiko vektorin tuotto, eristys ja puhdistus.

Vektorin ja insertin pitoisuuden mittausta tehdään, jotta lugaatiossa voitaisiin käyttää mahdollisimman optimaalista määrää vektoria ja insertiä. Konsentraation mitattiin käyttäen apuna Nanodrop-spektrofotometriä ( $\mu\text{g/ml}$ ). Konsentraation mittauksen jälkeen laskettiin jokaiselle insertille ja vektorille sopiva suhde jota käytettiin myöhemmin lugaatiossa. Vektorin konsentraatio oli paljon suurempi, kuin inserttien, joten käytettiin niitä 1/3 lugaatioreaktioseoksessa.

Sekä insertin, että vektorin päät täytyy pilkkoa restriktioentsyymeillä, jotta ne saisi ligoitua yhteen. Työssäni käytettiin uuden sukupolven restriktioentsyymejä, joiden vaikutusaika on saatu lyhennettyä yhdestä tunnista viiteen minuuttiin, mikä nopeuttaa huomattavasti työntekoa. Restriktioentsyymeiksi valittiin FastDigest™ HindIII ja FastDigest™ BamHI. Nämä restriktioentsyymit eivät löytyneet FastBac HT A-vektorin kartasta, joten suurella todennäköisyydellä vektori saadaan digestoitua oikeasta kohdasta. Digestioon käytetään yleensä 1-2 U restriktioentsyymiä, joka pystyy pilkkomaan tunnissa noin  $1\mu\text{g}$  DNA:ta. FastDigest™-entsyymit digestoivat saman määrän DNA:ta paljon lyhyemmässä ajassa, 5-10 minuutissa riippuen DNA:sta.

#### 4.9 Kompetentit *E. coli* -solut

Kaupalliset DHc10Bac *E. coli* solut, eivät olleet kompetentteja, joten  $\text{CaCl}_2$  -käsittelyn avulla muutettiin solut kykeneviksi transformoimaan sisäänsä vierasta DNA:ta. Käsittelemällä bakteerisoluja kaksiarvoisilla kationeilla  $\text{Ca}^{2+}$  ja inkuboimalla solut jäällä, soluista tulee kompetentteja. Matala kasvatuslämpötila ja kasvatusmedium vaikuttavat myös kompetenssiin. *E. coli* solut siirrostettiin ensin LB-mediumiin ja inkuboitin matalassa kasvatuslämpötilassa  $32\text{ }^\circ\text{C}$ :ssa. Kasvun edistymistä seurattiin spektrofotometrillä ottaen näytteet tunnein välein. Kun kasvatus saavutti logarinmistakasvuvaihetta, siirrettiin solut jäähtymään jäihin. Suspensoitiin solumassa jääkylmään  $\text{CaCl}_2$ - sisältävään TB-liuokseen ja inkuboin jäällä. Kompetentit solut voidaan käyttää heti tai pakastaa glyserolistokkiin. Transformaatiotehokkuuden varmistamiseksi transformoitiin FastBac™-vektori ilman inserttiä kemiallisesti kompetentteihin soluihin ja kasvatettiin solut selektiomaljoilla.

FastBac-vektoria sisältävät DHc10Bac *E. coli* -solut kasvatettiin LA-maljoilla jossa oli kanamysiini, tetrasykliini ja gentamysiini-antibiootit. DHc10Bac *E. coli* ovat resistenssejä kanamysiinille ja tetrasykliinille, joten näiden antibioottien läsnä ollessa

kasvatavat vain DHc10Bac *E. coli*. FastBac-vektorin resistenssigeeni gentamysiinille mahdollistaa selviytymisen vektoria sisältäville soluille. X-galin ja IPTG takaavat transformoituneiden pesäkkeiden selektion muodostaen valkoisia ja sinisiä pesäkkeitä. *E. coli* -kasvatuksen aikana solujen sisällä tapahtuu transposiitio, jolloin FastBac™-vektorista helper-plasmidin erittämien entsyymien vaikutuksesta insertti siirtyy DHc10Bac-solujen sisältämään bacmidiin. Solujen jakautuessa bacmidin DNA replikoituu solun mukana. Bacmidia tuotettiin sen verran lisää, jotta sitä olisi tarpeeksi hyönteissoluihin transfektiota varten.

#### 4.10 Bacmidin eristys DHc10Bac soluista ja analysointi

Bacmidin eristys soluista tehtiin omien liuosten avulla. Liuos 1 sisältää Tris-HCl:ä, EDTA:ta ja RNAasi A:ta. Solumassaa suspentoitiin liuos 1:een. Se sisältää NaOH ja 1% SDS. SDS:n vaikutuksesta soluseinät rikkoutuivat ja solun organellit ja tuman DNA pääsevät ulos solusta. 3M natriumasetaatilla saostetaan proteiineja ja *E. coli*:n DNA, jolloin bacmidi jää supernatanttiin. Supernatantti kerätään talteen, pestään isopropanolilla ja 70% etanolilla. Pelletin kuivauksen jälkeen eluoidaan bacmidi lievästi emäksiseen 1x-TE-puskuriin.

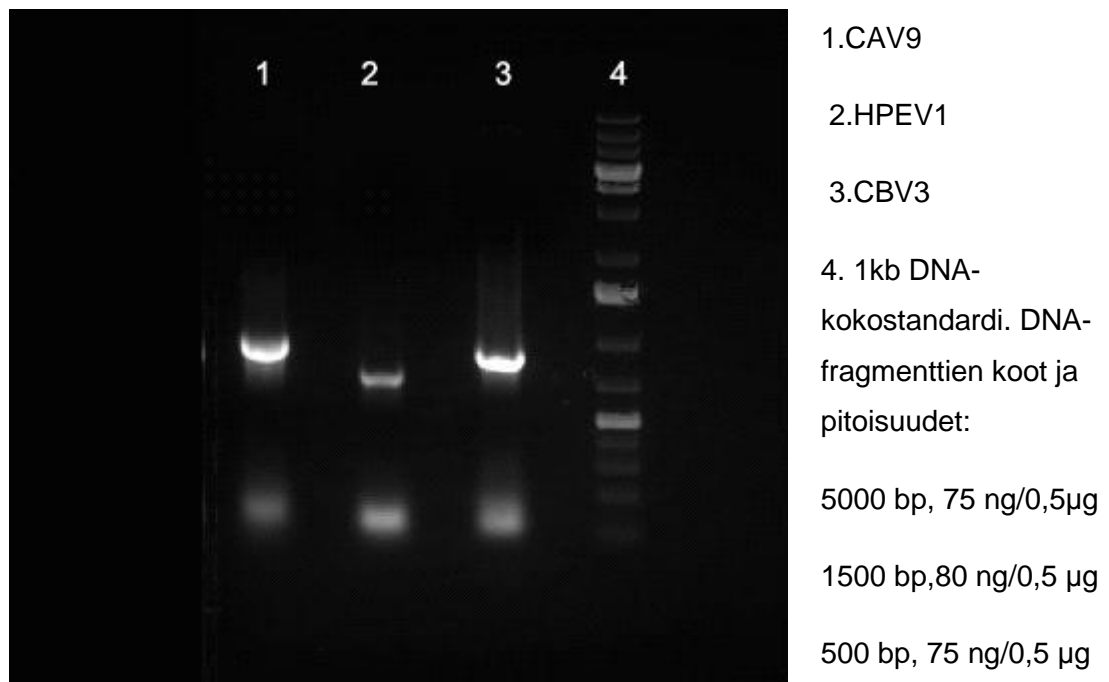
Bacmidi eristettiin DHc10Bac *E. coli* -soluista ja sen oikeellisuus tarkistettiin CAV9-VP1-primereilla PCR:llä. Positiivisena kontrollina käytin FastBac-vektoria, johon oli ligoitu CAV9-insertti. PCR-ohjelmalla käytettiin sama ohjelma ja reagensseja, kuin insertin monistuksessa plasmidista (Taulukko 2 ja 3).

## 5 TULOKSET

### 5.1 VP1-proteiinien tuotto

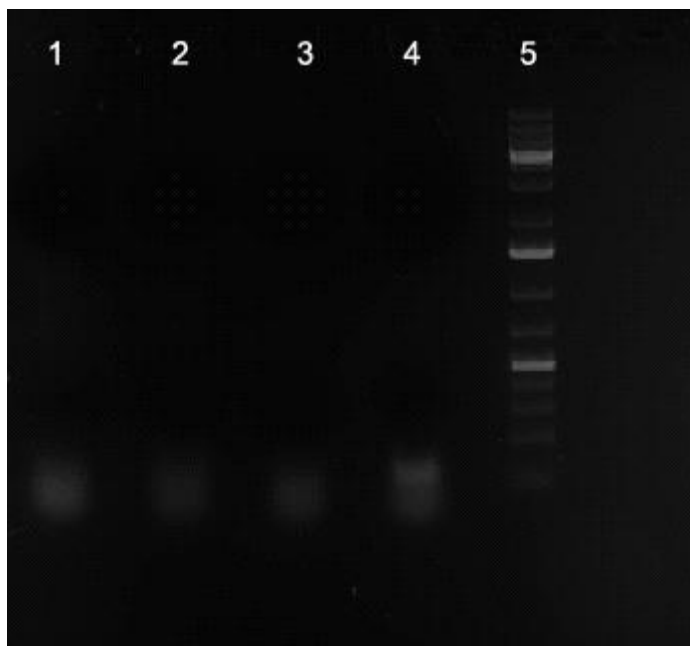
Työssä oli tarkoitus tuottaa neljä pikornaviruksen VP1-proteiineja hyönteissoluissa. Tätä varten VP1-geenit kloonattiin PCR:n avulla siirtovektoreihin. PCR:llä tuotettujen DNA-jaksojen tarkastaminen suoritettiin AGE:lla, jossa näkyivät oikeankokoiset bändit. CAV9- ja CBV3-VP1-geenit ovat 900 bp pituisia ja HPEV1- ja HPEV3-VP1 noin 700 bp.

Kuvassa 1. näkyy, että CAV9-, CBV3- ja HPEV1-VP1 PCR-tuotteet ovat oikeankokoiset (Kuva 1.). HPEV3:n bändiä ei näy ollenkaan (Kuva 2.). Tähän syynä voi olla epäonnistunut RT-PCR tai PCR. Väärin valitut primerit tai yksittäisen geenin aluemutaatio, joka voi saada aikaan väärän kohdan monistumisen DNA-jaksosta. Muuttamalla PCR-ohjelma mahdollisimman sopivaksi HPEV3:lle ja vaihtamalla reagenssit, tarvittavaa DNA-jaksoa ei kuitenkaan saatu monistettua. On mahdollista, että geenisekvenssi, jota käytettiin primerien suunnitteluun ei ollut sama kuin työssä käytetyn HPEV3-viruskannan ja sen takia primerit eivät sitoutuneet RNA:han. Yritysten jälkeen päätettiin, että HPEV3 jätetään tähän vaiheeseen ja työtä jatketaan CAV9:llä, CBV3:llä ja HPEV1:llä eteenpäin.



Kuva 1. Plasmideista monistetut VP1 proteiinit:

CAV9 (900 bp), HPEV1 (700 bp) ja CBV3 (900 bp)



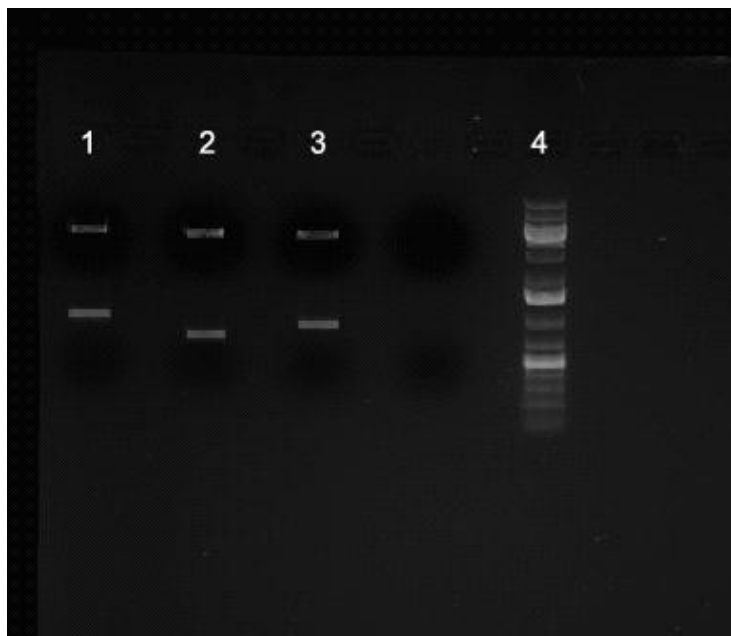
Kuva 2. Potilasnäytteestä monistettu HPEV3-viruksen VP1-PCR-tuote (700 bp). Rivit 1-4. HPEV3, 5. 1kb-DNA-kokostandardi. DNA-fragmenttien koot ja pitoisuudet: 5000 bp, 75 ng/0,5µg 1500 bp, 80 ng/0,5 µg, 500 bp, 75 ng/0,5 µg

## 5.2 VP1-PCR-tuotteiden kloonaus TA-vektoriin ja restriktioanalyysi

CAV9-, HPEV1- ja CBV3-PCR-tuotteet ligoitiin TA-vektoriin ja yhdistelmä-plasmidi transformoitiin MACH1 *E. coli* -soluihin. Selektiomaljoilla kasvoi yksittäisiä valkoisia pesäkkeitä, joita otettiin jatkokasvatusta varten. Maljoilla esiintyi myös taustakasvua, minkä tähden tehtiin rinnakkaistransformaatio plasmidilla, jossa ei ollut transformoitua tuotetta. Näillä maljoilla ei kasvanut pesäkkeitä. Näin pystyttiin vertaamaan testimaljaa ja transformoituneita soluja sisältävää maljaa keskenään. MACH1 *E. coli* -soluissa tuotettu TA-vektori, johon on ligoitu insertti, eristettiin ja puhdistettiin soluista Fermentasin GeneJET™-kitin avulla.

TA-vektorin tarkistamiseksi, se pilkottiin FastDigest™HindII:lla ja FastDigest™BamHI:lla niille yhteensopivassa FastDigest™-puskurissa. Näitä entsyymejä on tarkoitus käyttää jatkokloonauksessa FastBac-vektoriin. CAV9-, CBV3-

ja HPEV1-insertit eristettiin geeliltä ja puhdistus suoritettiin Macherey-Nagelin NucleoSpin®Extract- puhdistuskitin avulla. Kitti on erittäin helppokäyttöinen ja soveltuu pienen DNA-määrän puhdistukseen. Puhdistetusta tuotteesta restriktioentsyymejä käyttäen digestoitiin insertit. (Kuva 3.) Restriktioentsyymeinä käytettiin FastDigest BamHI:a ja FastDigest HindIII:a. Kuvassa näkyy, että vektorit ovat hyvin leikkautuneet ja pienempikokoiset insertit siirtyneet geelillä kauemmas TA-vektorista. Puhdistuksen jälkeen pieni määrä DNA:ta ajettiin AGE:lla puhdistuksen onnistumisen tarkistamiseksi.



1.CAV9 ja TA-vektori

2.HPEV1 ja TA-vektori

3.CBV3 ja TA-vektori

4. 1kb DNA-  
kokostandardi. DNA-  
fragmenttien koot ja  
pitoisuudet:

5000 bp, 75 ng/0,5µg

1500 bp, 80 ng/0,5 µg

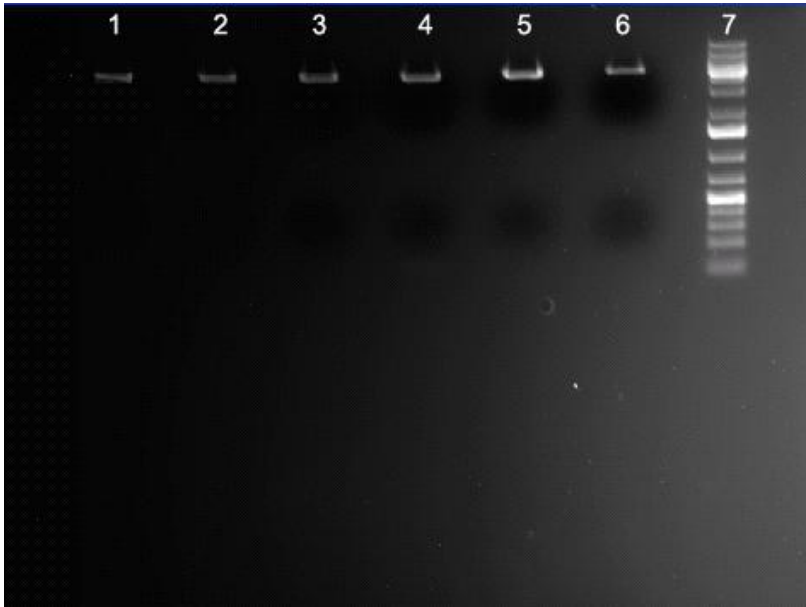
500 bp, 75 ng/0,5 µg

Kuva 3. Digestoitu TA-vektori (3956 bp) ja insertit  
CAV9 (900 bp), HPEV1 (700 bp) ja CBV3 (900 bp)

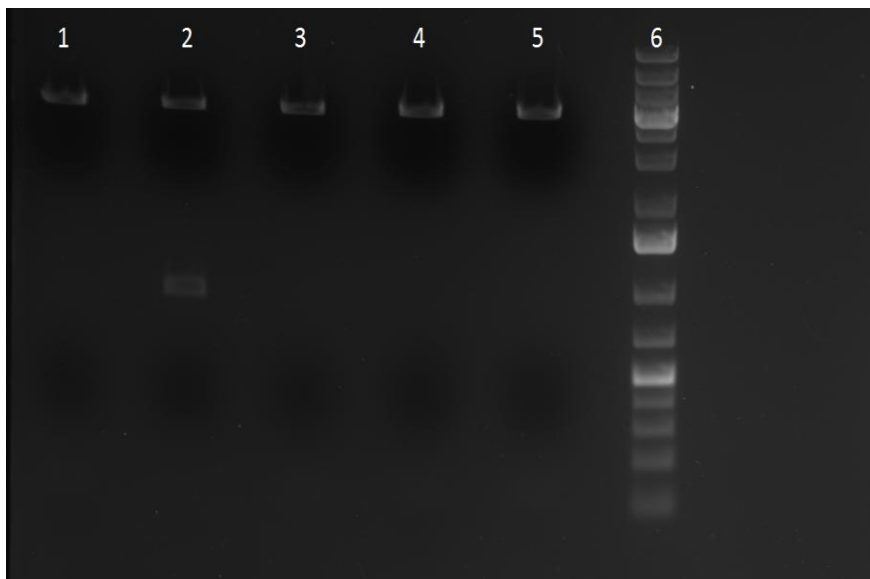
### 5.3 FastBac-vektori

FastBac-vektoria tuotettiin kasvattamalla vektoria sisältäviä *E. coli* -soluja selektiomaljoilla. Vektorin puhdistaminen soluista suoritettiin Fermentasin GeneJET™-kitin avulla. Kuvassa 4. näkyvät tuotetut FastBac-vektorit (Kuva 4). FastBac-vektori leikattiin geeliltä ja puhdistettiin NucleoSpin®-kitin avulla. Puhdistuksen jälkeen FastBac-vektori ja insertit ligoitiin yhteen. Yhdistelmävektorin transformoitiin *E. coli* -

soluihin tuottoa varten. AGE-analysissä havaittiin, että vain CAV9-insertti leikkautui FastBac-vektorista (Kuva 5.). Kahta muuta inserttiä (CBV3 ja HPEV1) yritettiin ligoida uudelleen ja transformoida soluihin, mutta plasmidipuhdistuksen jälkeen insertit eivät leikkautuneet vektorista. Työtä päätettiin jatkaa CAV9:llä eteenpäin ja kaksi muuta inserttiä jätettiin käytettäväksi myöhemmin.



Kuva 4. *E. coli* -soluissa tuotettu FastBac™ -vektori 4856 bp (rivit 1-6) FastBac-vektori, 7. 1kb-DNA-kokostandardi. DNA-fragmenttien koot ja pitoisuudet: 5000 bp, 75 ng/0,5µg, 1500 bp,80 ng/0,5 µg, 500 bp, 75 ng/0,5 µg



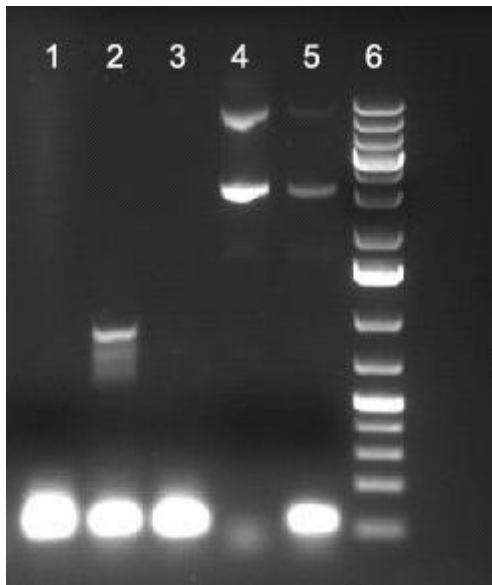
Kuva 5. FastDigest BamHI:lla ja HindIII:llä käsitellyt rekombinantit FastBac-vektorit. Rivi 1. HPEV1, 2. CAV9, 3. CBV3, 4. 1kb DNA-kokostandardi. DNA-fragmenttien koot ja pitoisuudet: 5000 bp, 75 ng/0,5µg, 1500 bp, 80 ng/0,5 µg, 500 bp, 75 ng/0,5 µg

#### 5.4 Rekombinantin Bacmidi-DNA:n analysointi PCR:n avulla

Sekä pFastBac™HT-vektori että CAV9-insertti digestoitiin restriktioentsyymejä käyttäen. pFastBac™HT-vektorin kaavassa näkyy, mitkä restriktioentsyymit sopivat katkaisemaan vektorin oikeassa kohdassa (kuvio 5). Valitsin niistä kaksi entsyymiä FastDigest™ *Bam*HI:n ja FastDigest™ *Hind*III:n. Jos on valitsemassa kahta eri entsyymiä, täytyy valita myös niille yhteensopiva puskuri, jossa molempien aktiivisuus säilyy korkeana. FastDigest™ restriktioentsyymit eivät toimi tavallisen digestiopuskurin kanssa, vaan tarvitsevat toimiakseen niille tarkoitetun FastDigest™ puskurin. 10X FastDigest™ puskuri on 95% yhteensopiva molempien restriktioentsyymien kanssa.

FastBac-vektori, johon oli kloonattu CAV9-insertti, transformoitiin kompetentteihin DHcBac10 *E. coli* -soluihin. Transformoituneet solut kasvatettiin ampicilliini-, tetrasykliini- ja kanamysiini-selektiomaljoilla. Käytettiin myös sini-valkoselektiota, lisäämällä maljoille x-galia ja IPTG:tä. DHcBac-soluissa aluespesifisen transposition

avulla insertti oli siirtynyt soluissa olevaan bacmidiin. Maljoilta otettiin neljä valkoista pesäkettä homogeenistä kasvatusta varten. Soluista eristettiin bacmidin ja analysoitiin sen PCR:n avulla käyttämällä CAV9 primereitä (Taulukko 1.). Tarkoituksena oli monistaa CAV9 DNA-jakso pienestä määrästä bacmidia AGE-analyysia varten. Agarosielektroforeesilla tarkistettiin monistetun bändin koko, joka vastasi CAV9 insertin kokoa (900bp) (Kuva 6.).



Kuva 6. Bacmidin analysointi PCR:n avulla CAV9 primereillä. Rivit 1-3. Bacmidi CAV9, 4-5. FastBac-vektori, 6. 1kb-DNA-kokostandardi. DNA-fragmenttien koot ja pitoisuudet: 5000 bp, 75 ng/0,5µg, 1500 bp, 80 ng/0,5 µg, 500 bp, 75 ng/0,5 µg

## 6 YHTEENVETO

Bakulovirussysteemin hyvinä puolina proteiinituotossa ovat virusgenomin ja partikkelien turvallinen käyttö, viruksen lajispesifinen infektoituvuus sekä kyvyttömyys jakautua nisäkässoluissa. Tämä tekee työskentelystä hyvin turvallisen. Bakuloviruksella on erittäin suuri DNA-kapasiteetti, mikä mahdollistaa myös isompikokoisten geenien kloonauksen ja proteiinien tuottamisen. Bac-to-bac®- kitti on

kehitelty erittäin helppokäyttöiseksi ja helposti ymmärrettäväksi. Se sisältää moneen käyttöön tarkoitettuja vektoreita ja erilaisia selektiomahdollisuuksia. Huonoina puolina on mm. veren komplementin inaktivoiva vaikutus, mikä estää seerumia sisältävien mediumien käyttöä. Markkinoilla on nykyään valikoima seerumivapaita mediujeja, joita on mahdollista käyttää solukasvatuksissa.

Hyönteissolut ovat aitotumallisia ja se on etuna bakulovirusekspressiossa, sillä eukaryoottisolut kykenevät sellaisiin proteiinimodifikaatioihin, joihin paljon käytetyt prokaryoottisolut eivät pysty. Proteiinituotossa bakteerisoluihin monet tärkeät elementit jäävät pois. Tällaisia ovat mm. fosforylaatio, asylaatio ja signaalipeptidien poistaminen.

Työssä käytettiin Invitrogenin kitin sisältämää TA-vektoria apuvektorina. Sen avulla PCR-tuote saatiin ligoitua FastBac-vektoriin ja transformoitua kitin sisältämiin *E. coli* -soluihin. Transformaatiossa käytettiin alussa MACH1™T1<sup>R</sup> -soluja, mutta ne eivät toimineet hyvin, joten kokeiltiin transformoida kitin tarjoamiin muihin *E. coli* -solukantoihin: DH5 $\alpha$ -E- T1<sup>R</sup> ja TOP10. Transformaatiot suoritettiin onnistuneesti ja soluista saatiin eristettyä ja puhdistettua TA-vektoreita insertteineen. TOPO TA-kloonauksen on toiminut välivaiheena, jotta vältettäisiin PCR-tuotteen suoraa kloonausta FastBac-vektoreihin. TA-kloonauksen myötä tuli tarkastettua inserttien koot ja konsentraatio moneen kertaan. Insertin digestio TA-vektorista onnistui hyvin ja digestion tarkastus oli helppoa AGE:n avulla, jossa suoraan näki oliko insertti leikkautunut.

Digestoimalla puhdistettu PCR-tuote voi ligoitua suoraan FastBac-vektoriin ja transformoida vektori DHcBac *E. coli* -soluihin. Kuitenkin TA-vektorin käyttö mahdollistaa PCR-tuotteen ligoimiseen vektoriin ilman restriktio- ja ligaasi entsyymejä, mikä tekee välivaiheesta helppokäyttöisen. TA-vektorin hyvänä puolena on myös se, että tuotettu insertti tarkistetaan digestoimalla se TA-vektorista restriktioentsyymeillä ja ajamalla AGE:llä. Digestion onnistuessa geelillä nähdään TA-vektorin kokoinen bändi ja leikattu insertin bändi. Digestoimalla PCR-tuotetta ja ligoimalla se FastBac -vektoriin, digestion onnistuminen saadaan selville vasta yhdistelmä-vektorin tuoton jälkeen. Epäonnistunut digestio voi johtaa ylimääräisten vaiheiden suorittamiseen.

Työn tarkoituksena oli tuottaa bacmidi, johon transposition avulla siirtyy pikornaviruksen pintaproteiini. Proteiinia oli tarkoitus tuottaa infektoimalla hyönteissolut transfektoimalla bacmidi isäntäsoluun. CAV9:stä, CBV3:sta ja HPEV1:stä saatiin heti ensimmäisen PCR:n jälkeen eristettyä oikeankokoiset DNA-jaksot, jotka kloonattiin TA-

vektoriin. Sen sijaan HPEV3:n kohdalla AGE-ajon jälkeen geelillä ei näkynyt bändiä. HPEV3 eristettiin potilasnäytteen RNA:sta, mikä voi olla yksi syistä negatiiviselle tulokselle. RNA:n eristys on erittäin tarkka työ, ja on voinut tapahtua jokin virhe eristyksen aikana. RT-PCR:n tai PCR:n epäonnistuminen, väärin valitut primerit, reagenssit tai jokin yksittäisen nukleotidin mutaatio voivat olla syinä negatiiviselle tulokselle. Vanhoja reagensseja vaihdettiin uusin, mutta se ei auttanut aikaansaaman positiivista tulosta. Monistusta tehtiin myös eri PCR-ohjelmilla pidentämällä annealing-aikaa ja lisäämällä syklien määrää, mutta ei sekään tuonut tulosta. On mahdollista, että virus-RNA:n laatu ei soveltunut RT-PCR-reaktioon tai sitten primerit eivät sitoutuneet virus-RNA:han siitä huolimatta, että sekä viruskanta että primerien suunnitteluun käytetty sekvenssi oli yhteensopivat. Parechoviruksen pintaproteiinia koodaavaa inserttiä (HPEV3-VP1) ei siis lukuisten monistamisyritysten jälkeen saatu tuotettua ja työ jätettiin tehtäväksi myöhemmin.

TA-vektoriin kloonatut VP1-geenit (CAV9, HPEV1 ja CBV3) siirrettiin FastBac-vektoriin ja yhdistelmävektorit transformoitiin *E. coli* -soluihin tuottoa varten. Homogeenisen kasvatuksen, plasmidipuhdistuksen ja restriktioentsyymidigestion jälkeen ligaation onnistuminen analysoitiin AGE:lla. AGE-ajon jälkeen otetussa kuvassa näkyy, että vain CAV9 insertti oli leikkautunut FastBac™ vektorista (Kuva 5.) Kuvan perusteella voi päätellä joko, että HPEV1-VP1- ja CBV3-VP1-geenit eivät leikkautuneet vektorista, vaikka ligaatio olisi onnistunut tai eivät ole lainkaan ligoituneet FastBac vektoriin. Tässä tapauksessa todennäköisesti ligaatio vaiheessa insertit eivät sitoutuneet vektoriin, sillä koetta toistettiin moneen kertaan tuloksetta. HPEV1 ja CBV3-inserttien ligoiminen FastBac-vektoreihin ei siis onnistunut huolimatta siitä, vaikka tehtiin uudelleen muutamilla muutoksilla ligaatioita ja transformaatiota. Työtä jatkettiin CAV9-insertillä, joka saatiin onnistuneesti siirrettyä bacmidiin.

Työssä saatiin tuotettua rekombinantti bakulovirusvektori, joka sisältää CAV9-VP1-geenin. Ajanpuutteen vuoksi hyönteissoluja ei päästy infektoimaan. Tuotettu rekombinantti bacmidi eristettiin *E. coli* -soluista ja puhdistettiin epäpuhtauksilta. Bacmidia sisältävää stokkia säilytetään -70 C:seesa, missä se odottaa käyttöä VP1-proteiinituotannossa.

## 7 LÄHTEET

Bac-to-Bac® Baculovirus Expression System, Version D, 6 April 2004, Introvigen™.

Guide to Baculovirus Expression Vector Systems (BEVS) and Insect Cell Culture Techniques, Introvigen™.

TOPO TA Cloning® Kit for Sequencing, Version O, 10 April 2006,25-0276,Introvigen™.

Fermentas, GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit, 05.2008

NucleoSpin® Extract II, PCR clean-up Gel extraction, April 2008/Rev. 07, MACHEREY-NAGEL

E.Z.N.A™ Viral RNA Kit, OMEGA bio-tek, March 2007

Biokemian ja solubiologian perusteet. Jyrki Heino, Matti Vuento. WSOY Oppimateriaalit Oy 1. P. 2007

Suominen, I & Ollikka, P.1999. Yhdistelmä DNA-tekniikan perusteet. Hakapaino Oy. Helsinki

T.A.Brown,P.2010. Gene cloning & DNA analysis, sixth edition. Wiley-Blackwell, UK

<http://tools.neb.com>>NEBcutter, viitattu 13.3.2011

[www.merck-chemicals.se](http://www.merck-chemicals.se)> Merk4Biociences> search> baculovirus> Comparison of traditional bakulovirus method and InsectDirec, viitattu 18.5.2011

[www.paratechs.com](http://www.paratechs.com)>Technologies >VE-BEVS, viitattu 18.5.2011

[www.tohtori.fi](http://www.tohtori.fi) >lääkärikija>coxsackievirus, viitattu 20.5.2011

[www.ktl.fi](http://www.ktl.fi) >tietoa terveydestä>terveys ja sairaudet>infektioaudit>enterovirus, viitattu 20.5.2011

<http://www.duodecimlehti.fi>, pikornavirukset ,viitattu 23.5.2011

## Liite 1. Sanasto

Agaroosigeelielektroforeesi	Menetelmä, jossa nukleiinihapot erotellaan koon perusteella toisistaan agarosigeelissä sähkövirran avulla.
Aluke(primer)	DNA-tai RNA-jakso, joka toimii aloitusjaksona nukleiinihapposynteesissä.
$\beta$ -galaktosidaasi	Ensyymi, jonka aktivoitumista solussa voidaan käyttää seulontamenetelmänä. Hajottaa laktoosia ja sen analogeja.
cDNA	RNA:sta käänteisesti kopioitu DNA
Deoksiribonukleotidi (dNTP)	DNA:n rakennusaine
Digestio	DNA:n ensymaattinen katkaisu
Insertti	Vektoriin liitetty vieras DNA-jakso
IPTG	synteettinen laktoosin kaltainen aine, joka mahdollistaa <i>lacZ</i> -geenin aktiivisuuden ja siten $\alpha$ -komplementaation.
Kompetentti bakteerisol	Bakteerisol, joka kykenee ottamaan DNA:ta ympäristöstään sisäänsä.
Ligaatio	DNA- juosteiden liittämistä toisiinsa lagaasientsyymien avulla.
Plasmidit	Itsenäisesti replikoituva, rengasmainen DNA-molekyyli.

Restriktioentsyymi	Entsyymi, joka katalysoi kaksinauhaisen DNA:n katkeamista tarkasti määräytyistä kohdista.
Subkloonaus	Plasmidi-DNA-han liitetään vieras DNA-jakso.
Transfektio	Menetelmä, jolla DNA siirretään korkeamman eukaryootin soluun
Transformaatio	Menetelmä, jolla DNA siirretään mikrobisoluihin
Vektori	DNA-molekyyli, johon voidaan liittää vierasta DNA:ta ja siirtää isäntäsoluun.
Yhdistelmä-DNA-tekniikka	Kokoelma menetelmiä, joilla voidaan muodostaa yhdistelmiä DNA-jaksoista ja siirtää niitä toisiin organismeihin.
X-Gal	Toimii soluissa laktoosin tavoin. Hajoaa solussa $\beta$ -galaktosidaasin vaikutuksesta siniseksi väriaineeksi.

Liite 2.

Liuokset ja reagenssit

LB-medium (1 l):

10 g peptonia

5 g hiivauutetta

10 g NaCl

1000 ml KO-H<sub>2</sub>O

Aineet sekoitetaan keskenään ja säädetään pH 7 NaOH-liuoksella. Liuos steriloidaan autoklaavissa 121 °C 20 minuuttia. Säilytetään RT.

LA –agar (0,5l)

7,5 g agaria

5 g peptonia

2,5g hiivauutetta

5g NaCl

500 ml KO-H<sub>2</sub>O

Aineet sekoitetaan keskenään ja säädetään pH 7 NaOH-liuoksella. Liuos steriloidaan autoklaavissa 121 °C 20 minuuttia. Säilytetään RT.

SOB-medium (1 l):

20 g peptonia

5 g hiivauutetta

0,5 g NaCl

10 ml 250mM KCl

1000 ml KO-H<sub>2</sub>O

Aineet sekoitetaan keskenään ja säädetään pH 7 NaOH-liuoksella. Liuos steriloidaan autoklaavissa 121 °C 20 minuuttia. Lisätään steriiliä 2M MgCl<sub>2</sub>. Säilytetään RT.

TB-liuos (1 l):

2,2 g CaCl<sub>2</sub> (15 mM)  
18,64 g KCl (250 mM)  
3,36 g PIPES (10 mM)  
10,88 g MnCl<sub>2</sub> (55 mM)  
1000 ml KO-H<sub>2</sub>O

Liuotetaan CaCl<sub>2</sub>, KCl ja PIPES käänteisosmoosiveteen ja säädetään pH 6,7 1M NaOH-liuoksella, kunnes PIPES on kokonaan liuennut. Lisätään MnCl<sub>2</sub> pH:n ollessaan 6,7 . Liuos steriilisuodatetaan 0,2 µm suodattimella ja säilytetään RT.

DNA eristys- liuos I:

15 mM Tris-HCl, pH 8,0  
10 mM EDTA  
100 µg/ml RNAasi A

Sekoitetaan kaikki aineet keskenään ja steriilisuodatetaan 0,2µm suodattimella. Säilytys + 4 °C:ssa.

DNA eristys liuos II:

0,2 M NaOH  
1%:nen SDS

Sekoitetaan kaikki aineet keskenään ja steriilisuodatetaan 0,2µm suodattimella. Säilytys + 4 °C:ssa.

TAE-puskuri (1l):

242 g Tris  
100 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0  
57 ml jäätikkahappoa  
843 ml KO-H<sub>2</sub>O

Liuotetaan Tris 800 ml:aan käänteisosmoosivettä, lisätään 0,5 M EDTA ja jäätikkahappo. pH säädetään 7,8 1 M HCl:llä ja täytetään 1 L:aan käänteisosmoosivedellä.

AGE-geeli:

1 g agarosia

100 ml TAE-liuosta

5  $\mu$ l EtBr

Liutetaan agarosia TAE-liuokseen kuumentamalla mikroaaltouunissa. Jäähdytetään liuos noin 60°C:ksi ja lisätään EtBr. Valetaan geeli ja annetaan jähmettyä.

TE-puskuri, pH8 0,5 l:

0,6 g Tris-HCl (10mM)

1 ml 0,5 Na<sub>2</sub>EDTA (1mM)

KO-H<sub>2</sub>O 500 ml

Sekoitetaan kaikki aineet keskenään ja säädetään pH 8,0 0,1 M HCl-liuoksella. Steriloidaan autoklaavissa 121 °C 20 min.