



Saana-Mari Jänkälä

CDNA-KIRJASTON VALMISTUKSESSA KÄYTETTÄVIÄ GEENITEKNIIKAN MENETELMIÄ

CDNA-KIRJASTON VALMISTUKSESSA KÄYTETTÄVIÄ GEENITEKNIIKAN MENETELMIÄ

Saana-Mari Jänkälä

Opinnäytetyö

syksy 2011

Laboratorioalan koulutusohjelma

Oulun seudun ammattikorkeakoulu

Koulutusohjelma	Opinnäytetyö	Sivuja	+	Liitteitä
Laboratorioalan koulutusohjelma		60	+	3
Suuntautumisvaihtoehto	Aika			
Bioteknologia	syksy 2011			
Työn tilaaja	Työn tekijä			
Fysiologian laitos, Oulun yliopisto	Saana-Mari Jänkälä			
Työn nimi	cDNA-kirjaston valmistuksessa käytettäviä geenitekniikan menetelmiä			
Avainsanat	yhdistelmä-DNA-tekniikka, cDNA-kirjasto, geenien säätely, mRNA, cDNA, PCR, plasmidivektorit			

Geenitekniikan menetelmissä hyödynnetään tietoja nukleiinihappojen eli DNA:n ja RNA:n rakenteesta ja toiminnasta, proteiinisynteesistä sekä geenien säätelystä. DNA:han sisältyy solun perinnöllinen tieto, jonka ilmentämisessä eli proteiinisynteesissä RNA toimii. Kun tutkitaan eukaryoottien geenien toimintaa, valmistetaan usein cDNA-kirjastoja. Tällöin saadaan mukaan ne geenit, joita kyseisellä hetkellä solussa ilmennetään. cDNA-kirjasto on siis edustava kokonaisuus näytteen mRNA-populaatiosta eli transkriptomista tietyllä hetkellä.

Opinnäytetyön tarkoituksena on perehtyä kirjallisuuteen perustuen yhdistelmä-DNA -tekniikassa käytettäviin menetelmiin. Työssä käydään läpi geneettisen tiedon kulkua DNA:sta mRNA:n kautta aina proteiinisynteesiin saakka sekä hieman geenien toiminnan säätelyä. Työssä tulee selvitettyä myös erityisesti cDNA-kirjaston valmistukseen liittyviä geenitekniisiä menetelmiä lähtien RNA:n eristyksestä, PCR-monistusten sekä vektorin valmistamisen kautta *E. coli* -solujen transformointiin.

Työn kokeellinen osuus tehtiin Oulun yliopiston lääketieteellisen tiedekunnan fysiologian laitoksella vuonna 2008 ja työn valvojana toimi tutkija, filosofian tohtori Johanna Veijola. Opinnäytetyö ei kuitenkaan sisällä varsinaista kokeellista ja tuloksia sisältävää osiota, vaan on tehty kirjallisuuteen perustuen liittyen kokeellisessa osuudessa cDNA-kirjaston valmistuksessa koettuihin asioihin ja menetelmiin.

SISÄLTÖ

TIIVISTELMÄ SISÄLTÖ

1 JOHDANTO	6
2 NUKLEIINIHAPOT JA NIIDEN RAKENNE	8
2.1 DNA:n rakenne.....	9
2.2 RNA:n rakenne.....	11
3 PROTEIINISYNTeesi JA SEN SÄÄTELY	13
3.1 Transkriptio.....	13
3.2 Translaatio.....	15
3.3 Proteiinisynteesin säätely.....	18
3.3.1 <i>Escherichia coli</i> –bakteerin laktoosioperoni (<i>lac</i> -operoni)	19
4 RIBONUKLEIINIHAPON ERISTYS.....	22
4.1 RNA:n eristämässä huomioitavia seikkoja	22
4.2 Totaali-RNA:n eristys.....	23
4.3 Poly(A)-RNA:n eli mRNA:n eristys	24
4.4 mRNA:n eristys Dynabeads®-menetelmällä	25
5 CDNA-KIRJASTO	27
6 PCR ELI POLYMERAAASIKETJUREAKTIO.....	30
6.1 PCR-reaktion vaiheet	31
6.2 PCR-reaktion suunnittelu ja optimointi	32
6.2.1 Alukkeiden suunnittelu	33
6.2.2 Polymeraasientsyymien määrä.....	33
6.2.3 Deoksinukleotidit.....	34
6.2.4 Magnesiumpitoisuus	34
6.2.5 Denaturaatio-olosuhteet.....	34
6.2.6 Ekstensio	35
6.2.7 Muita PCR-reaktiossa huomioitavia seikkoja	35
6.3 Reverse transcription PCR (RT-PCR)	36
7 AGAROOSIGEELIELEKTROFOREESI (AGE)	38
8 PLASMIDIVEKTORIN VALMISTAMINEN	40
8.1 Plasmidivektorit	40
8.1.1 Ori-alue	41
8.1.2 MCS-alue.....	42
8.1.3 Selektiogeeni	42
8.1.4 α -komplementaatio	43
8.2 Digestio eli DNA:n pilkkominen restriktioentsyymien avulla	46
8.3 Ligaatio eli DNA-jaksojen liittäminen toisiinsa ligaasientsyymien avulla.....	48

9 TRANSFORMAATIO.....	51
9.1 CaCl ₂ -menetelmä	51
9.2 Elektroporaatio (elektrotransformaatio)	53
10 POHDINTA.....	55
LÄHTEET	56
LIITE 1. E.Z.N.A.™ Total RNA Midi Kit Manual 03/2007	
LIITE 2. Invitrogen™ Dynabeads® Oligo (dT) ₂₅	
LIITE 3. Finnzymes Phusion™ RT-PCR Kit 2008	

1 JOHDANTO

Nukleiinihapot eli DNA ja RNA ovat erikoistuneita informaation varastointiin ja siirtoon. DNA:han sisältyy solun perinnöllinen tieto, jonka ilmentämisessä eli proteiinisynteesissä RNA toimii. Proteiinisynteesiksi kutsutaan biologista prosessia, jossa solu valmistaa aminohapoista proteiineja mRNA:n ohjeen mukaisesti. Solu ei koskaan valmista proteiineja turhaan, vaan kullakin hetkellä valmistuvat proteiinit ovat juuri silloin tarpeellisia. Proteiinisynteesiä voidaankin säädellä, ja yleisesti puhutaan geeniekspression eli geenien ilmenemisen säätelystä. (Suominen – Pärssinen – Haajanen – Pelkonen 2010, 15, 44.)

Tutkittaessa eukaryoottien geenien toimintaa valmistetaan usein cDNA-kirjastoja. Tällöin saadaan mukaan ne geenit, joita kyseisellä hetkellä solussa ilmentään eli aktiiviset mRNA:ta tuottavat geenit. cDNA-kirjasto on siis edustava kokoelma näytteen mRNA-populaatiosta eli transkriptomista tietyllä hetkellä. (Suominen ym. 2010, 69.)

Polymeraasiketjureaktio eli PCR (engl. Polymerase chain reaction) on tunnetun DNA-jakson monistamista. Tällä keinolla saadaan monistettua esimerkiksi yksittäistä geeniä tai muuta DNA-pätkää jopa miljardikertaiset määrät hyvin pienestä lähtöainemäärästä, ja siksi PCR onkin yksi tärkeimmistä molekyylibiologian menetelmistä. Jotta voitaisiin valmistaa cDNA-kirjastoja hyvinkin pienistä mRNA-määristä, käytetään apuna polymeraasiketjureaktiota. Templaattina PCR:ssä on vaan aina DNA, joten haluttaessa monistaa RNA:ta on se ensin käännettävä DNA:ksi eli cDNA:ksi. (Suominen ym. 2010, 153, 170; PCR. 2011.)

Vektoreita käytetään geenitekniikassa kuljettamaan haluttu DNA-jakso toiseen eliöön, yleensä bakteeriin. Vektoreiden päätyyppejä ovat plasmidivektorit, faagivektorit sekä lambda- ja kosmidivektorit, joilla kaikilla on omat etunsa ja

käyttökohteensa. Plasmidivektorit olivat ensimmäisiä kloonausvektoreita ja ovat edelleen hyvin laajasti käytössä, koska ne ovat yksinkertaisimpia käyttää. Ne ovat myös erinomaisia vektoreita cDNA-kirjastojen valmistuksessa. (Suominen ym. 2010, 74; Prescott – Harley – Klein 2002, 333 - 334.)

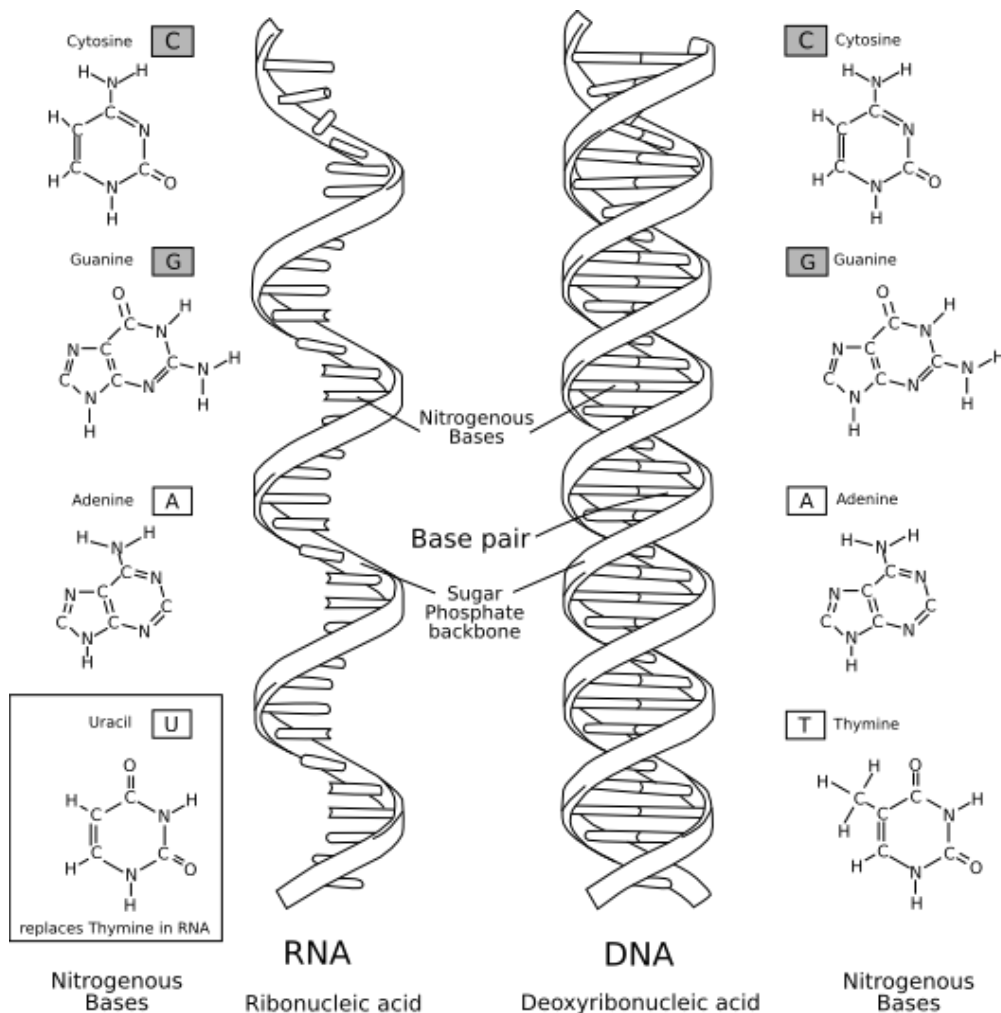
Geenitekniikassa transformaatiolla tarkoitetaan DNA:n siirtämistä bakteeri-, hiiva-, home- tai kasvisoluun, kun kuljettajana eli vektorina on plasmidi. Transformaatioissa on siis kyse geneettisen materiaalin siirtymisestä DNA-molekyylien välityksellä solusta tai eliöstä toiseen. (Suominen ym. 2010, 140.)

Opinnäytetyön tarkoituksena on perehtyä kirjallisuuteen perustuen yhdistelmä-DNA -tekniikassa käytettäviin menetelmiin. Työssä käydään läpi geneettisen tiedon kulkua DNA:sta mRNA:n kautta aina proteiinisynteesiin saakka sekä hieman geenien toiminnan säätelyä. Työssä tulee selvitettyä myös erityisesti cDNA-kirjaston valmistukseen liittyviä geenitekniisiä menetelmiä edeten RNA:n eristyksestä PCR-monistusten sekä vektorin valmistamisen kautta *E.coli* -solujen transformointiin.

Työn kokeellinen osuus tehtiin Oulun yliopiston lääketieteellisen tiedekunnan fysiologian laitoksella vuonna 2008 ja työn valvojana toimi tutkija, filosofian tohtori Johanna Veijola. Fysiologian laitoksella tutkittiin sydämen toimintaa solu- ja molekyyalitasolla. Opinnäytetyö liittyi laitoksella diagnostisten menetelmien kehittämiseen sydämen toiminnan mittaamiseksi. Tavoitteena oli löytää uusia vasta-aineita käytettäväksi diagnostisessa määrittämisessä ihmisen verinäytteistä. (Veijola 2011.) Opinnäytetyö ei kuitenkaan sisällä varsinaista kokeellista ja tuloksia sisältävää osiota, vaan on tehty kirjallisuuteen perustuen liittyen kokeellisessa osuudessa cDNA-kirjaston valmistuksessa koettuihin asioihin ja menetelmiin.

2 NUKLEIINIhapot JA NIIDEN RAKENNE

Nukleiinihapot ovat erikoistuneita informaation varastointiin ja siirtoon. Niitä ovat DNA eli deoksiribonukleiinihappo sekä RNA eli ribonukleiinihappo. DNA:han sisältyy solun perinnöllinen tieto, jonka ilmentämisessä eli proteiinisynteesissä RNA toimii. Ne rakentuvat nukleotideista, joiden perusrakenne on sama: fosfaattiryhmä, pentoosisokeri eli viisihiilinen monosakkaridi ja orgaaninen emäs. Nukleotidit liittyvät yhteen muodostaen kuvan 1 mukaisia pitkiä ketju-maisia nukleiinihappomolekyylejä. (Suominen ym. 2010, 15; Heino – Vuento 2002, 39; Ulmanen – Tenhunen – Yläne – Valste – Viitanen 1998, 11.)



KUVA 1. Nukleiinihappojen (DNA ja RNA) rakenne (Ribonucleiinezuur. 2011)

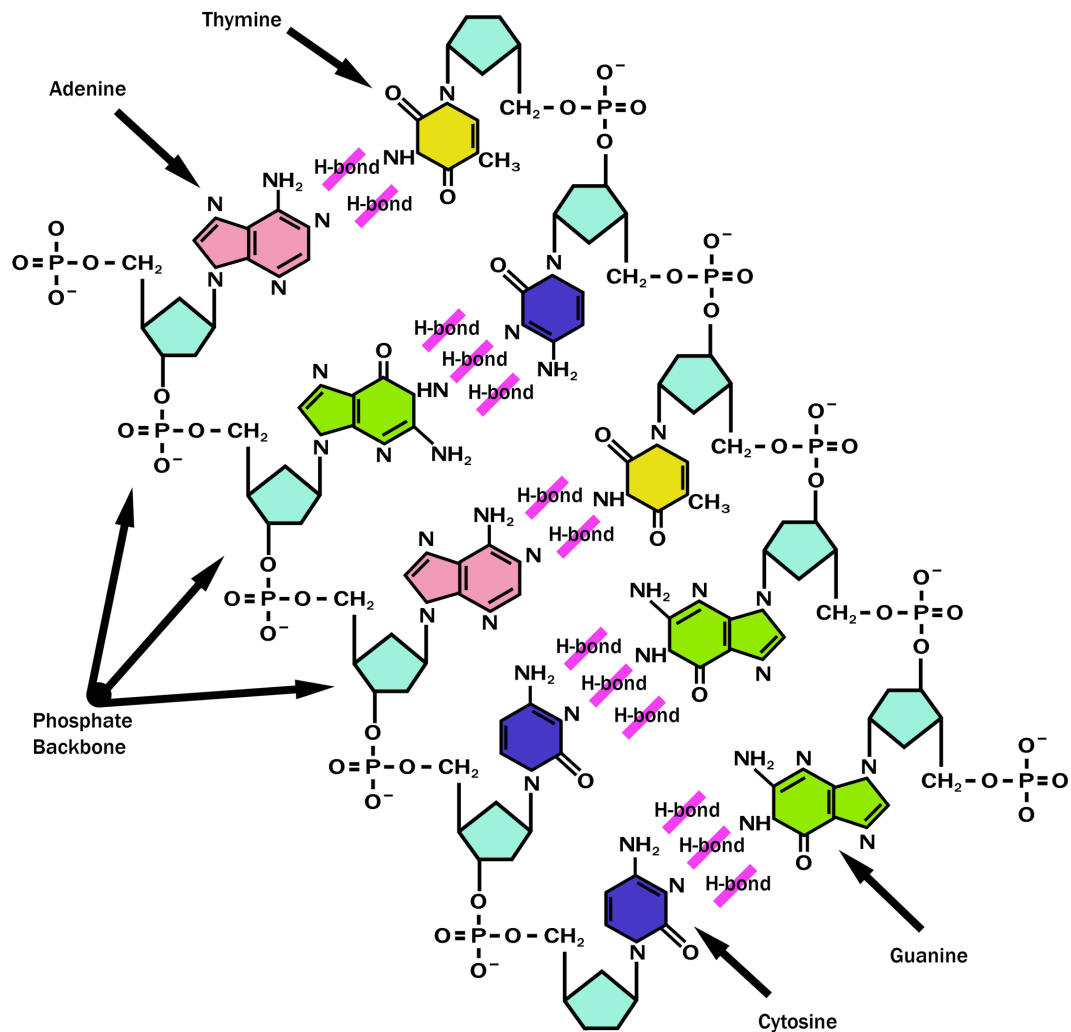
Nukleiinihappojen runko muodostuu vuorottelevista toisiinsa sitoutuneista sokeri- ja fosfaattimolekyyleistä. Peräkkäiset nukleotidit liittyvät toisiinsa sokeri- ja fosfaattiryhmien välisten 3'-5'-fosfodiesterisidosten välityksellä. Fosfaattiosa sitoutuu siis aina edellisen sokerin 3'-asemaan ja jälkimmäisen sokerin 5'-asemaan. Tästä aiheutuu nukleiinihappojuosteille tietty suunta eli polariteetti. Nukleiinihappojen alkupäässä on fosfaattiryhmä ja loppupäässä hydroksyyli-ryhmä. Nukleiinihappojen emäsjärjestys eli sekvenssi ilmoitetaan aina 5'→3'-suunnassa. Fosfaattiryhmät aiheuttavat myös nukleiinihappojen happamuuden sekä voimakkaan negatiivisen sähkövarauksen. (Suominen ym. 2010, 18; Carpi 2003; Ulmanen ym. 1998.)

Jokainen sokerimolekyyli sitoutuu nukleotidin kolmanteen rakenneosaan eli orgaaniseen emäkseen. Näitä nukleiinihappoissa esiintyviä emäksiä on ainoastaan neljä erilaista kussakin molekyylissä. Se, missä järjestyksessä emäkset ovat, määrää nukleiinihapon geneettisen informaation. (Carpi 2003.)

2.1 DNA:n rakenne

Useimmilla eliöillä viruksia lukuun ottamatta perintöaines on varastoituneena DNA:han. DNA:n nimi deoksiribonukleiinihappo juontuu sen sokeriosasta, deoksiriboosista. Verrattuna RNA:n sokeriosaan riboosiin deoksiriboosissa ei ole happiatomia 2'-asemassa. Riboosilla 2'-asemassa on hydroksyyli-ryhmä (OH), kun taas deoksiriboosilla ainoastaan vetyatomi. (Suominen ym. 2010, 15; Carpi 2003.)

DNA:n muodostavat neljä erilaista nukleotidia, joiden emäkset ovat adeniini (A), guaniini (G), sytosiini (C) ja tymiini (T). Kemiällisen rakenteensa ansiosta nukleotidien on mahdollista sitoutua pareittain vetysidoksin, kuten kuvassa 2 on esitetty. DNA:ssa nämä parit ovat A-T ja G-C. Kaksi oligo- tai polynukleotidi-juostetta, joissa on vastakkaiset nukleotidijärjestykset voivat siis sitoutua kaksijuosteiseksi ketjuksi. DNA-molekyylit ovatkin yleensä kaksijuosteisia. (Heino – Vuento 2007, 40.)



KUVA 2. DNA:n kemiallinen rakenne. Viisikulmiot deoksiriboosiyksiköitä, niiden välissä fosforihappoa. Värilliset renkaat typpiä. (DNA. 2011.)

DNA-molekyylin juosteet ovat sitoutuneena toisiinsa emäspariutumissäännön mukaisesti vetysidoksilla. Adeniini ja tymiini sitoutuvat toisiinsa kahdella vetysidoksella, kun taas guaniini ja sytosiini kolmella, minkä vuoksi guaniini-sytosiinisidos on vahvempi (kuva 2). Tämä vaikuttaa DNA-juosteiden välisen sitoutumisen lujuteen. Mitä enemmän DNA:ssa on G-C emäspareja, sitä voimakkaampi käsittely tarvitaan juosteiden erottamiseksi toisistaan eli DNA:n denaturoimiseksi. Denaturointi tapahtuu esimerkiksi kuumentamalla, kuten PCR-reaktiossa, tai emäskäsittelyllä, jolloin juosteiden väliset vetysidokset katkeavat. Poistamalla denaturoiva tekijä DNA:n kaksoiskierre saadaan palautettua eli renaturoitua. Yhdistelmä-DNA-tekniikassa hyödynnetään näitä tietoja nukleiinihappojen sidosvoimakkuuksista muun muassa PCR-tekniikassa

reaktio-olosuhteita suunniteltaessa. (Suominen ym. 2010, 20.)

2.2 RNA:n rakenne

Toisin kuin perintöaineksen varastomolekyylinä toimivalla DNA:lla RNA:lla on soluissa useita eri tehtäviä. Lähetti-RNA eli mRNA (engl. messenger RNA) vastaa geneettisen informaation siirrosta DNA:lta ribosomeille, siirtäjä-RNA eli tRNA (engl. transfer RNA) kuljettaa aminohappoja ribosomeille proteiinisynteesin aikana ja ribosomaalinen RNA eli rRNA (engl. ribosomal RNA) toimii ribosomien rakenneosana. Näiden tunnetuimpien RNA-tyyppien lisäksi on olemassa myös kahta muuta, siRNA (engl. small interfering RNA) sekä mikro-RNA (miRNA, engl. microRNA), jotka osallistuvat enimmäkseen geenien ekspresion säätelyyn. (Suominen ym. 2010, 29; Heino - Vuento 2007, 42.)

RNA eli ribonukleinihappo muodostuu myös toisiinsa sitoutuvista nukleotideista, kuten DNA. Nukleotiditkin ovat muuten samat, mutta DNA:n tyymiinin sijaan RNA:ssa on urasiili U. Sokeriosana RNA:ssa on riboosi, jonka hiileen numero 1 emäs sitoutuu. Hiilessä numero 2 on hydroksyyli-ryhmä -OH, mikä erottaa DNA:n ja RNA:n sokeriosat toisistaan. RNA:n hydroksyyli-ryhmästä on seurauksena myös se, että RNA-molekyylin kierre poikkeaa hieman DNA:n kierteestä, ja siksi RNA-molekyylillä ei ole yhtä pysyvää kuin DNA. DNA:n tapaan RNA:ssakin on 3'- ja 5'-päät, mutta RNA esiintyy yksijuosteisena ketjuna. (Tapana 2010, 29.)

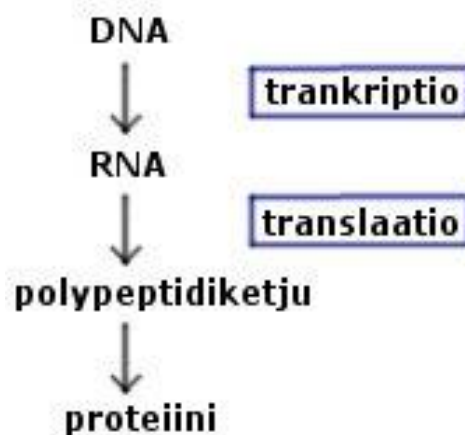
Lähetti-RNA eli mRNA (engl. Messenger RNA) syntyy solun tumassa transkriptiossa DNA:n emäsjärjestyksen määräämällä. mRNA sisältää geneettisen informaation, jonka avulla sytoplasman ribosomeissa valmistetaan proteiineja. Ennen kuin mRNA voi kulkeutua tumasta sytoplasmaan translaatiota varten siihen on tehtävä muutamia muutoksia. Lähetti-RNA:n 5'-päähen liitetään GTP eli guanosiinitrifosfaatti, yksi RNA:iden nukleotideista, johon on liittynään metyyli-ryhmä. Tätä kutsutaan CAP-rakenteeksi ja sen tarkoitus on stabiloida mRNA:ta ja suojata sitä RNA:ta hajottavilta ribonukleaasientsyymeiltä. mRNA:n 3'-päähen liitetään sen sijaan useita adenosiniribonukleotideja eli poly(A)-häntä. Sekin suojaa mRNA:ta sitä hajottavilta entsyymeiltä, mutta poly(A)-hännällä on myös

muita tärkeitä tehtäviä esimerkiksi transkription lopetuksessa, mRNA:n kuljetuksessa tumasta sytoplasmaan ja translaatiossa. Eukaryoottisolujen DNA sisältää eksoneita ja introneita, joten lopuksi vielä intronit poistetaan mRNA:sta silmukoinnilla ennen sen siirtymistä tumasta sytoplasmaan. Prokaryoottisoluissa ei ole tumaa eikä DNA:ssa introneita, joten niillä sytoplasmassa syntyvä mRNA voidaan käyttää sellaisenaan proteiinisynteesissä. (Suominen ym. 2010, 31; Lähetti-RNA. 2011.)

Vaikka lähetti-RNA:lla on erittäin oleellinen osa proteiinisynteesissä, koska sen emäsjärjestys määrää solun kaikkien proteiinien syntetisointia, ainoastaan 2-5 prosenttia solun kokonais-RNA:sta on mRNA:ta. Sen sijaan jopa 80 % RNA:sta on ribosomaalista RNA:ta ja noin 15 % siirtäjä-RNA:ta. (Tapana 2010, 31.)

3 PROTEIINISYNTESI JA SEN SÄÄTELY

Proteiinisynteesiksi kutsutaan monimutkaista ja runsaasti solujen energiaa kuluttavaa biologista prosessia, jossa solu valmistaa aminohapoista proteiineja mRNA:n ohjeiden mukaisesti. Varsinainen proteiinisynteesi eli translaatio tapahtuu sekä pro- että eukaryoottisolujen sytoplasmassa ribosomeilla. Ohjeet proteiinien valmistukseen sisältyvät tumassa sijaitsevan DNA:n geneettiseen koodiin, joten ennen varsinaista translaatiota tumassa tapahtuu transkriptio, jossa geneettisen koodin sisältävä DNA:n nukleotidijärjestys käännetään mRNA:ksi. Kuvassa 3 on esitetty proteiinisynteesin perusrakenne. (Suominen ym. 2010, 44; Proteiinisynteesi.)

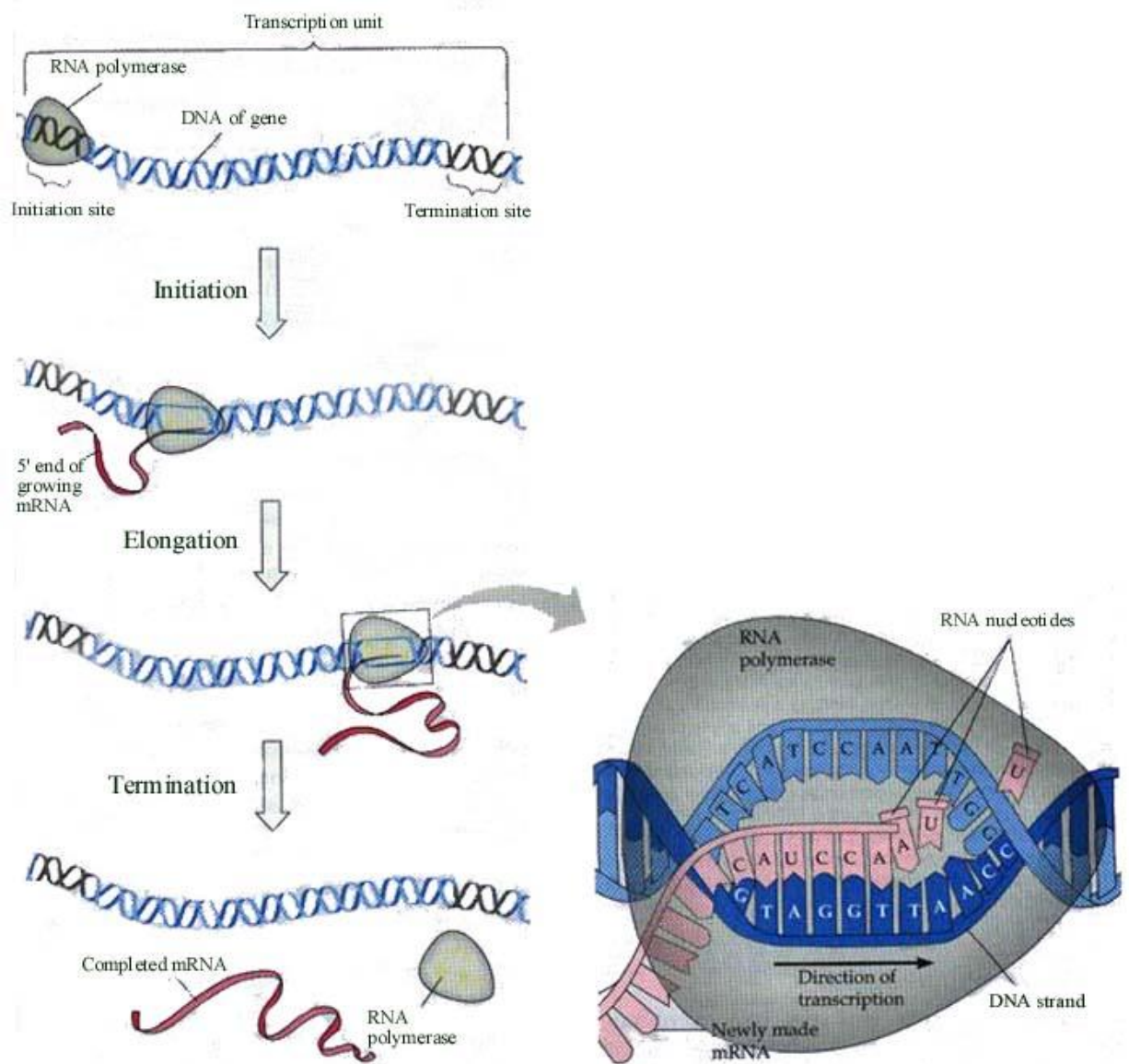


KUVA 3. Proteiinisynteesin perusrakenne (Proteiinisynteesi. 2006)

3.1 Transkriptio

Solun tumassa tapahtuvassa transkriptiossa valmistetaan DNA-juosteelle komplementaarinen RNA-juoste RNA-polymeraasientsyymin avulla. Tapahtumana transkriptio on hyvin samanlainen kuin DNA:n kahdentuminen eli replikaatio. (Suominen ym. 2010, 32.)

Ennen kuin varsinainen transkriptio alkaa, sitoutuu RNA-polymeraasi geenin säätelyalueella sijaitsevaan promoottoriin. RNA:n synteesi alkaa täsmälleen tietystä paikasta geeniä, promoottorialueella sijaitsevasta initiaatiokohdasta. RNA-polymeraasi kulkee pitkin templaattina toimivaa DNA-juostetta ja lisää muodostuvaan RNA-juosteeseen ribonukleotideja emäsparisäännön mukaisesti. Lopulta luettavassa DNA:ssa tulee vastaan lopetus- eli terminaatioalue ja tällöin RNA-polymeraasi ja syntynyt RNA irtoavat transkriptiokompleksista. Kuvassa 4 on havainnollistettuna transkription vaiheet. (Suominen ym. 2010, 32-33.)



KUVA 4. Transkription vaiheet RNA-polymeraasin kiinnittymisestä initiaation ja pidennysreaktion kautta terminaatiovaiheeseen (Transcription)

Lähettilä-RNA:ta muokataan vielä ennen translaatiota lisäämällä sen päihin nukleotidisekvenssit kuten polyA-häntä ja CAP-rakenne, joiden tarkoituksena on suojata RNA-molekyyliä RNA:ta hajottavilta mekanismeilta. Myös eukaryoottisoluja koskeva mRNA:n silmukointi eli intronien poisto tapahtuu tässä vaiheessa ennen solulimassa tapahtuvaa proteiinisynteesiä. (Suominen ym. 2010, 31.)

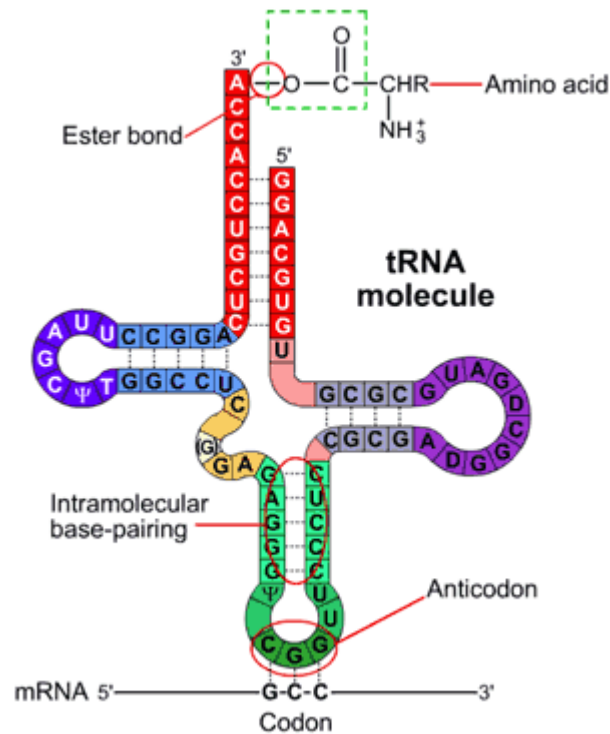
Proteiinisynteesissä mRNA:n katsotaan koostuvan peräkkäisistä kolmen emäksen pituisista ryhmistä, tripleteistä eli kodoneista. Kukin kodoni vastaa tiettyä aminohappoa, mutta koska aminohappoja on olemassa vain 20, useampi eri kodoni voi koodata samaa aminohappoa. (Transkriptio. 2006; Protein Synthesis.)

3.2 Translaatio

Varsinaisessa proteiinisynteesissä eli translaatiossa polypeptidiketju muodostuu lähetti-RNA:n ohjeiden mukaan aminohapoista solulimassa ribosomeilla. Translaatio koostuu viidestä vaiheesta, joita ovat aminohappojen aktivointi, translaation aloitus eli initiaatio, pitenemisvaihe eli elongaatio, translaation lopetus eli terminaatio sekä proteiinin laskostuminen ja muokkaus. (Suominen ym. 2010, 46; Translaatio. 2006.)

Ennen varsinaisen translaation alkua aminohapot kiinnitetään kukin oman entsyyminsä eli aminoasyyli-tRNA-syntetaasin avulla tRNA-molekyyliihin. Tässä aminohappojen aktivoinniksi kutsutussa tapahtumassa käytetään hyväksi ATP:n energiaa. Siirtäjä-RNA molekyylin toiseen päähän kiinnittyy siis tietty aminohappo, kun taas toisessa päässä on kutakin aminohappoa vastaava antikodoni. Oikeiden aminohappojen liittyminen polypeptidiketjuun mRNA:n koodin mukaisesti tapahtuukin kodoni-antikodonitunnistuksen perusteella kuvan 5 mukaisesti. Esimerkiksi tRNA^{Ala}-molekyyli voi kuljettaa ainoastaan alaniiniaminohappoa, koska sen antikodoni on komplementaarinen jollekin alaniinin kodonille eli mRNA:n emäsjärjestyksessä alaniinia koodaavalle kolmen emäksen pituiselle

ryhmälle. (Suominen ym. 2010, 44 - 45; Prescott – Harley – Klein 2002, 266 - 267.)



KUVA 5. tRNA-molekyylin rakenne ja toimintaperiaate translaatiossa. tRNA:n 3'-päässä on aminohappo, joka vastaa tRNA:n antikodonia. Antikodoni tunnistaa mRNA:sta itselleen komplementaarisen kodonin. (tRNA. 2002.)

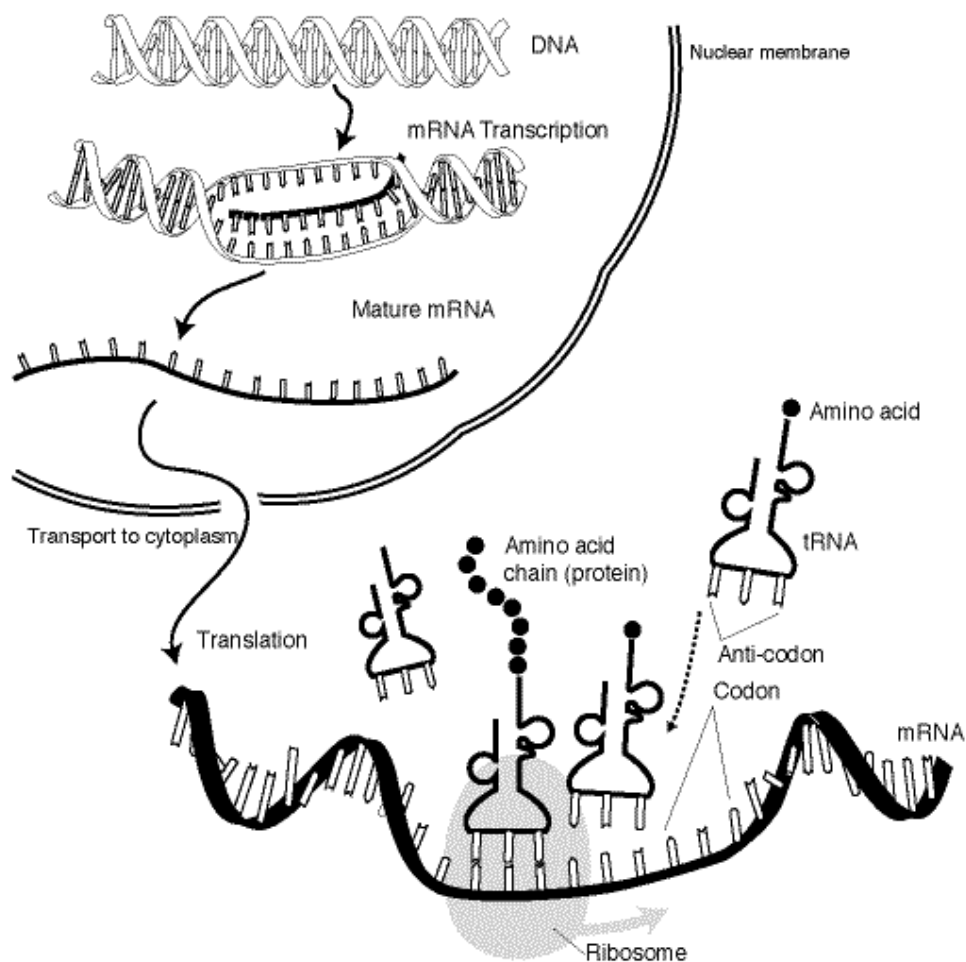
Ribosomit, joita kutsutaan solujen proteiininvalmistuskoneiksi, koostuvat pienestä ja suuresta alayksiköstä. Varsinaisen translaation aloitusreaktiot alkavatkin ribosomin pienen alayksikön sitoutuessa mRNA:ssa ribosomin sitoutumisalueelle, RBS-alueelle (engl. ribosome binding site), ja muodostaen initiaatio- eli aloituskompleksin. Tämän jälkeen aloitus-tRNA voi sitoutua mRNA:n aloituskodoniin (AUG). Proteiinisynteesi alkaa siis aina metioniini-aminohapolla, bakteereilla formyyli-metioniinilla. Aloitusreaktioiden lopussa myös ribosomin suurempi alayksikkö sitoutuu initiaatiokompleksiin. (Suominen ym. 2010, 46 - 47.)

Translaation pitenemisvaiheessa ribosomi liikuu pitkin mRNA:ta aina yhden

kodonin verran eteenpäin ja seuraava tRNA sitoutuu mRNA:ssa sitä vastaavan kodonin kohdalle tuoden polypeptidiketjuun aina uuden aminohapon. Vierekkäisten aminohappojen välille muodostuu peptidisidos. Syntyvä polypeptidiketju jää aina kiinni viimeisimpään tRNA-molekyylin edellisen tRNA:n irrotessa. (Suominen ym. 2010, 47.)

Proteiinisynteesi päättyy, kun ribosomi kohtaa mRNA:ssa ensimmäisen kolmesta mahdollisesta terminaatiokodonista, joita ovat UAA, UAG ja UGA. Polypeptidiketju vapautuu viimeisestä tRNA:sta. Myös ribosomi irtoaa ja hajoaa jälleen kahdeksi erilliseksi alayksiköksi. (Suominen ym. 2010, 47; Prescott ym. 2002, 270.)

Translaatiossa aminohappoja siis lisätään yksi kerrallaan kääntäen näin alunperin DNA:n nukleotidisekvenssi mRNA:n välittämänä proteiinikieleksi eli polypeptidisekvenssiksi (Protein Synthesis). Aminohapposekvenssi vastaa kunkin proteiinin primäärirakennetta, mutta välittömästi proteiinisynteesin jälkeen polypeptidi vielä laskostuu kyseiselle aminohappojärjestykselle ominaiseen kolmiulotteiseen muotoon biologisesti aktiiviseksi proteiiniksi. Kuvassa 6 on esitetty koko proteiinisynteesin vaiheet. (Suominen ym. 2010, 47.)



KUVA 6. Proteiinisynteesin kulku. DNA:n emäsjärjestys käännetään tumassa mRNA:n emäsjärjestykseksi, jonka mukaan sytoplasmassa siirtäjä-RNA:t tuovat aminohappomolekyylejä ja muodostuu polypeptidiketju. (Gene Expression).

3.3 Proteiinisynteesin säätely

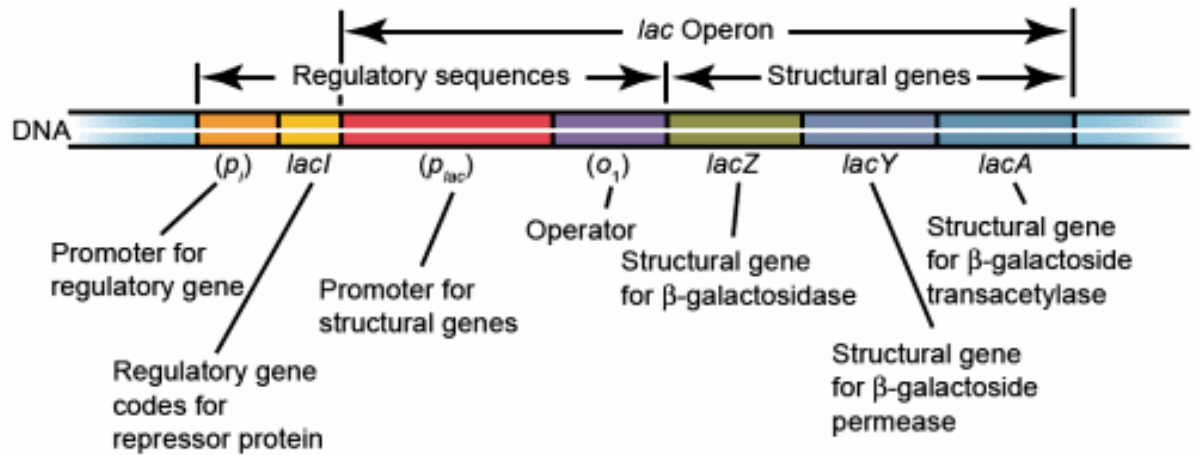
Solu ei koskaan valmista proteiineja turhaan, vaan kullakin hetkellä valmistuvat ja jo solussa olevat proteiinit ovat juuri sillä hetkellä tarpeellisia (Suominen ym. 2010, 44). Tämän vuoksi esimerkiksi työn kokeellisessa osuudessa tehtiin cDNA-kirjasto genomisen DNA-kirjaston sijaan. DNA-kirjastoon tulisi mukaan kaikki geenit, kun taas cDNA-kirjaston lähtöaineena oleva mRNA kuvaa juurikin sitä, mitkä geenit ovat sillä hetkellä aktiivisia tutkituissa soluissa. Yleisesti puhutaankin geeniekspression eli geenien ilmenemisen säätelystä.

Proteiinien valmistusta ja valmistusmäärää voidaankin säädellä ja myös tarpeetomat proteiinit hajotetaan nopeasti takaisin aminohapoiksi, joita voidaan käyttää uudelleen tarpeellisten proteiinien valmistukseen tai energianlähteenä. Solussa on myös proteiineja, joita tarvitaan koko ajan (ns. housekeeping proteiinit), mutta niidenkin määrä pidetään aina dynaamisessa tasapainossa eli niitä valmistetaan ja hajotetaan samanaikaisesti. (Suominen ym. 2010, 44-45.)

3.3.1 *Escherichia coli* -bakteerin laktoosioperoni (*lac*-operoni)

Geeniekspression molekyyli-tason säätelymekanismeja kuvataan yleisesti *E. coli* -bakteerin laktoosioperonin eli *lac*-operonin avulla, koska sen toiminta on tutkituin ja parhaiten tunnettu bakteerien geenisäätelystä. Operoniksi kutsutaan bakteereilla olevaa toisiaan lähellä olevien geenien rypästä. Näitä geenejä säätelee yksi tai useampi yhteinen säätelygeeni ja kyseiset rakennegeenit koodaavat yleensä esimerkiksi saman aineenvaihduntatien eri entsyymi-proteiineja. *lac*-operoni pitää yllä bakteerin laktoosiaineenvaihduntaa. Usein operonissa olevat geenit transkriptoidaan yhdessä eli useasta eri geenistä syntyy vain yksi mRNA. Yhdestä mRNA:sta huolimatta translaatio tapahtuu itsenäisesti eri lukukehyksissä ja kustakin geenistä valmistuu omat entsyymi-proteiininsa. Eukaryoottisolulla ei ole operoneja. (Suominen ym. 2010, 56.)

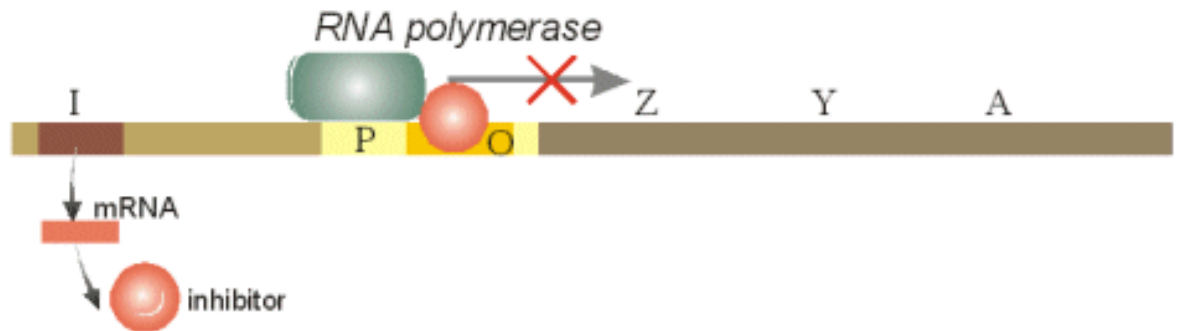
lac-operoni muodostuu kuvan 7 mukaisesti kolmesta rakennegeenistä, joita ovat *lacZ*, *lacY* ja *lacA*. Nämä kukin koodaavat tiettyjä laktoosiaineenvaihduntaan liittyviä entsyymiproteiineja. Rakennegeenien edessä sijaitsee geenien säätelyalue, *lac*-promoottori ja *lac*-operaattori eli *lac*-PO. Operonissa on myös rakennegeenien transkriptiota säätelevä *lacI*-repressorigeeni, jonka geenituote toimii repressorina eli säätelee laktoosioperonia. *lacI*-geenin transkriptiota ei säädellä, vaan se toimii jatkuvasti eli konstitutiivisesti. (Suominen ym. 2010, 57.)



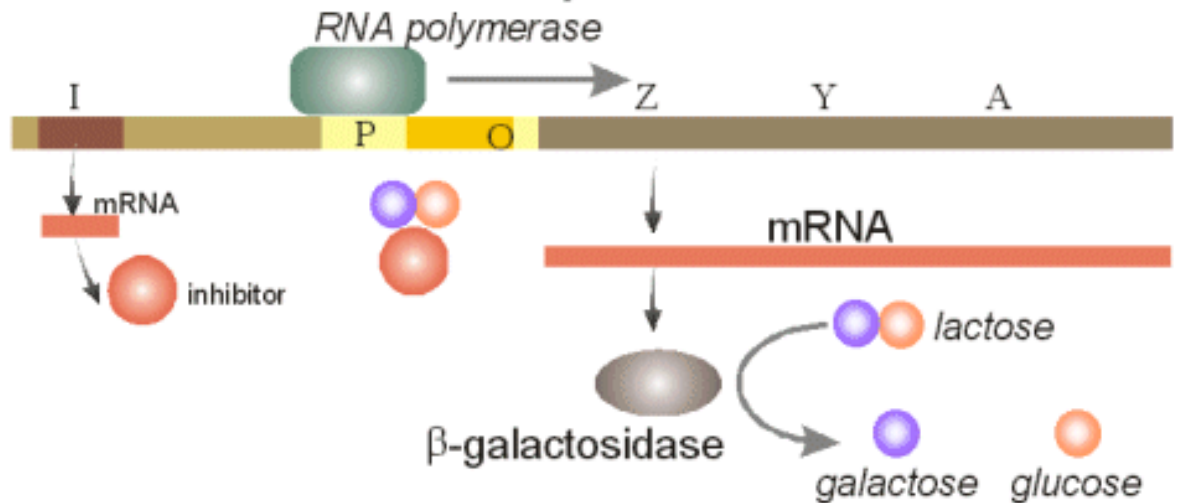
KUVA 7. *Escherichia coli* -bakteerin *lac*-operonin rakenne (Anderson – Purdom 2009)

Kuvan 8 mukaisesti *lac*-operonin toiminta voi olla joko repressoitua tai indusoitua. *lacI*-geenin toimiessa jatkuvasti myös sen repressorituotetta on läsnä koko ajan. Repressoriproteiini kiinnittyy *lac*-operonin operaattorialueelle, minkä vuoksi RNA-polymeraasientsyymien sitoutuminen promoottorialueelle estyy eikä transkriptiota tapahdu. Mikäli bakteerisolun kasvualusta on laktoosipitoista, laktoosi toimii *lac*-operonin induktorina. Indusori tarttuu repressoriproteiiniin, joka irtoaa operaattorialueelta ja muuttaa muotoaan siten, ettei se voi enää kiinnittyä operaattoriin. RNA-polymeraasi pystyy nyt sitoutumaan promoottoriin ja geenien transkriptio alkaa. Tätä kutsutaan *lac*-operonin indusoitumiseksi. Laboratorioissa induktorina käytetään myös laktoosin synteettistä johdannaista eli IPTG:tä (isopropyyli- β -D-tiogalaktopyranosidi). (Suominen ym. 2010, 58; Turpeenoja 1999, 150 - 151.)

No lactose : Lac operon turn off



Lactose in the media : Lac operon turn on



KUVA 8. *Escherichia coli* –bakteerin lac-operonin repressio ja induktio. Repressoriproteiini toimii inhibiittorina estäen transkription. Induktiossa laktoosimolekyylit tarttuu repressoriproteiiniin estäen sen sitoutumisen operonin operaattorialueelle. Transkriptio voi alkaa ja muodostuu mm. laktoosia pilkkovaa β -galaktosidaasientsyymiä. (lac operon. 2002.)

4 RIBONUKLEIINIHAPON ERISTYS

Nukleiinihappojen eristäminen ja puhdistaminen kuuluu molekyylibiologisten tutkimusten kuten cDNA-kirjastojen valmistamisen ensimmäisiin vaiheisiin ja voidaan toteuttaa monella tapaa riippuen näytteestä sekä myöhemmistä tutkimuksista. Vahingoittumattoman RNA:n eristäminen on usein kriittisimpiä vaiheita molekyylibiologisissa tutkimuksissa. (Nukleiinihappojen eristys ja puhdistus. 2006; The Basics: RNA isolation.)

4.1 RNA:n eristämässä huomioitavia seikkoja

Merkittävää RNA:n eristämisen prosessissa on myös kudoksen tai solunäytteen käsittely ennen varsinaista eristämistä sekä eristetyn RNA:n varastointi. RNA:n parissa työskennellessä on tärkeää huomioida, että RNA:ta pilkkovia ribonukleaasientsyymejä eli RNAasia on kaikkialla ympäristössä kuten ihmisen iholla. Siksi on tärkeää esimerkiksi käyttää työhanskoja estämään RNAasi-entsyymien pääsy käsistä näytteeseen. On myös huomioitava, että RNA-töissä käytetään eri välineitä ja esimerkiksi pipettejä kuin menetelmissä, joissa hyödynnetään RNAasi-entsyymiä, kuten plasmidin puhdistuksessa. Tiedetyt välineet sekä työssä käytettävät liuokset voidaan myös käsitellä DEPC:llä eli dietyylipyrokarbonaattilla, joka inaktivoi RNAasin. DEPC:tä ei kuitenkaan saa olla enää mukana valmiissa RNA-näytteessä. DEPC:n käytön ongelmana on sen myrkyllisyys, mutta nykyiset kaupalliset RNAasi-inhibiittorit ovat tehokkaita ja turvallisia käyttää. (Suominen ym. 2010, 108; The Basics: RNA isolation; Working with RNA.)

Eristämisen ensimmäinen vaihe on solujen hajottaminen, johon kuuluu usein mekaaniset, kemialliset ja entsyymaattiset vaiheet. Erittäin tärkeää on myös solujen nukleiinihappoja hajottavien nukleaasien inaktivointi, koska esimerkiksi

RNA:n eristyksen suuri ongelma ovat RNA:ta nopeasti hajottavat ribonukleasit. Tämän vuoksi RNA:ta eristettäessä on käytössä RNAasi-inhibiittorit. Solujen hajottamisen jälkeen nukleinihapot eristetään suodattamalla tai saostamalla. Eristämisen jälkeen yleensä on tarpeen myös nukleinihappojen puhdistus, sillä näytteessä on usein epäpuhtautena erityisesti proteiineja. Myös puhdistamiseen on olemassa useita eri menetelmiä, joista valitaan tapauskohtaisesti sopivin. Näitä ovat muun muassa uuttamiseen ja saostamiseen, elektroforeesiin, sentrifugointiin, dialyysiin ja kromatografiaan perustuvat menetelmät. (Nukleinihappojen eristys ja puhdistus. 2006.)

4.2 Totaali-RNA:n eristys

Työn kokeellisessa osuudessa koko työn eli cDNA-kirjaston valmistamisen lähtömateriaalina oli hiiren perna, koska se sisältää erityisen suuret määrät vasta-aineita tuottavia valko-soluja (Veijola 2011). Pernaläytteestä eristettiin ensimmäiseksi totaali-RNA:ta. RNA:n eristys tapahtui liitteenä 1 olevan E.Z.N.A.™ Total RNA Midi Kit kaupallisen kitin mukaisesti. HiBind® -kolonni-tekniikkaa hyödyntävä menetelmä lyhentää huomattavasti RNA:n eristämiseen kuluva aikaa verrattuna esimerkiksi perinteisiin CsCl-ultrasentrifugointiin tai fenoli-kloroformi -uuttoon perustuviin eristämismenetelmiin. Puhdas eristetty RNA on siten valmis käytettäväksi muun muassa suoraan RT-PCR-sovellukseen tai polyA-RNA:n (mRNA) eristykseen. (E.Z.N.A.™ Total RNA Midi Kit. 2007.)

Menetelmä perustuu silikapohjaisen HiBind®-materiaalin reversiibeliin sitominaisuuteen. Solu- tai kudospnäyte hajotetaan ensin denaturoivissa olosuhteissa, jolloin myös RNAasiin pitäisi inaktivoitua. RNA sitoutuu HiBind®-kolonneihin, kun taas solujäänteet ja muut kontaminantit pestään pois. Lopuksi RNA voidaan eluoida talteen. (E.Z.N.A.™ Total RNA Midi Kit. 2007.)

Pernakudosta hajotettiin ensin mekaanisesti. Huolellinen hajotus, sekä alun mekaaninen että sitä seuraava lysipuskurissa tapahtuva hajotus, onkin tärkeää mahdollisimman tehokkaan RNA:n eristymisen aikaansaamiseksi. Kudospnäyte

siirrettiin putkeen, johon lisättiin myös RNAaseja denaturoivaa β -merkaptotanolonia sisältävää TRK-lyysipuskuria. Näytettä homogenisoitiin mikroterällä ja kudosriekaleet sentrifugoitiin putken pohjalle. Saatu lyaatti otettiin talteen puhtaaseen putkeen, lisättiin siihen 70 % etanoli-DEPC:iä ja sekoitettiin. Liuosta siirrettiin RNA-eristyspylvääseen ja sentrifugoitiin, jolloin RNA sitoutui silikapohjaiseen pylvääseen muiden aineiden tullessa pylvään läpi. Pylvästä pestiin kitissä olleilla pesupuskureilla kolme kertaa sentrifugoiden liuokset aina pylvään läpi. Lopuksi vielä kuivattiin pylväs sentrifugoimalla kerran putki tyhjänä. Sen jälkeen voitiin sitoutunut totaali-RNA eluoida pylvästä lämmitetyllä DEPC-vedellä.

4.3 Poly(A)-RNA:n eli mRNA:n eristys

Erityisesti valmistettaessa cDNA-kirjastoja on tarpeen eristää mRNA:t muiden RNA:iden joukosta. Eukaryoottien mRNA:n 3'-päässä on poly-(A)-häntä, joten mRNA:t erottuvat muusta RNA:sta esimerkiksi oligo-(dT)-pylvään avulla. (Suominen ym. 2010, 110.)

mRNA:n eristys perustuukin usein emäspariutumiseen poly-(A)-hännän ja synteettisen deoksitymidiniketjun eli oligo-(dT)-ketjun välillä. Kun RNA-liuos päästetään esimerkiksi pylvääseen, johon on selluloosaan tai johonkin muuhun kantajaan sidottu oligo-(dT)-ketjuja, mRNA:t sitoutuvat niihin poly-(A)-hännistään A- ja dT-vastinemästen välille muodostuvien vetysidosten ansiosta. (Suominen ym. 2010, 110; Isolating RNA: Pure and Simple)

Pylväskromatografisen menetelmän lisäksi oligo-(dT)-ketjuja on mahdollista liittää myös magneettipartikkeleihin. Tällöin niihin tarttuneet mRNA:t saadaan kerättyä talteen magneetin avulla ilman erotuspylväitä. Oligo-(dT)-ketjuilla päällystettyjä magneettipartikkeleita inkuboidaan solulysaatin tai eristetyn totaali-RNA-fraktion kanssa. Magneettipartikkeleilla on erittäin suuri tarttumispinta-ala, joten mRNA:n on mahdollista sitoutua hyvin nopeasti oligo-(dT)-ketjuihin. Kun seos siirretään magneettikenttään, saadaan magneettipartikkelit

niihin tarttuneine mRNA:ineen eristettyä ja muut RNA:t otettua pois. Kun taas magneettikenttä poistetaan, sitoutunut mRNA on mahdollista eluoida magneettipartikkeleista sopivalla eluentilla. (Isolating RNA: Pure and Simple.)

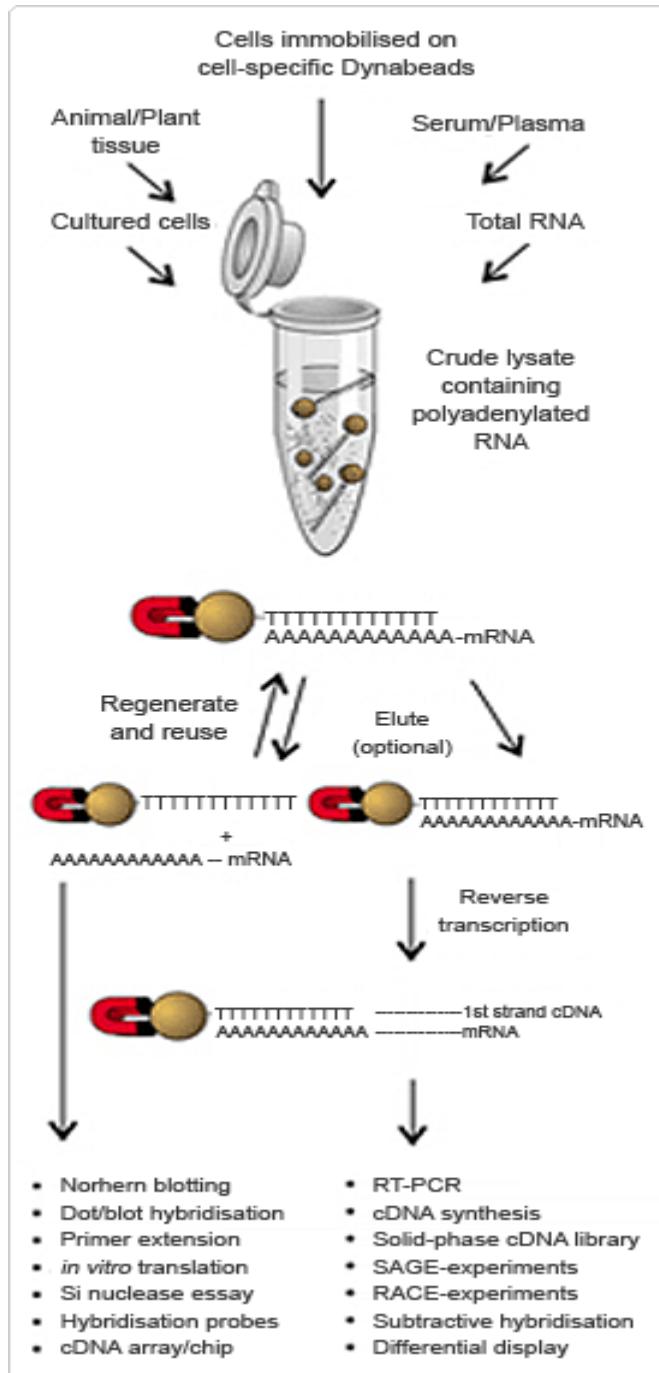
4.4 mRNA:n eristys Dynabeads®-menetelmällä

Työn kokeellisen osuuden mRNA:n eristys suoritettiin Invitrogenin Dynabeads Oligo (dT)₂₅-magneettipartikkeleilla liitteenä 2 olevan ohjeen mukaisesti. Kyseisellä menetelmällä saadaan eristettyä erittäin puhdasta ja ehjää mRNA:ta joko eukaryoottien totRNA:sta tai suoraan solu- ja kudoksenäytteistä. Täten eristetty mRNA olisi heti valmista käytettäväksi monissa molekyylibiologian sovellutuksissa kuten esimerkiksi RT-PCR:ssä sekä cDNA-kirjaston valmistamisessa. (Invitrogen™: Dynabeads® Oligo (dT)₂₅.)

Dynabeads® Oligo (dT)₂₅-magneettipartikkelit ovat yhdenmukaisia superparamagneettisia polymeeripartikkeleita, joiden pintaan oligo(dT)-sekvenssit ovat sitoutuneet kovalenttisesti. Partikkelit on suspensoitu PBS-liuokseen (phosphate-based saline) ja niitä ei saakaan päästää kuivumaan, vaan ne on koko ajan pidettävä nestesuspensiona sekä varastoitaessa että työvaiheiden aikana. Kuivuminen pienentää partikkeleiden tehokkuutta. Partikkeleita on mahdollista myös käyttää uudelleen regeneroimalla ne eristyskertojen välissä. Tämä on mahdollista tehdä kaikkiaan neljä kertaa ilman, että mRNA:n saanto kärsii. Jos mRNA:ta eristetään samasta näytteestä useampaan kertaan, magneettipartikkeleita ei tarvitse regeneroida välissä. (Invitrogen™: Dynabeads® Oligo (dT)₂₅.)

Menetelmä perustuu lähetti-RNA:n polyA-hännän sekä partikkeleiden pinnan oligo(dT)-sekvenssien väliseen emästen sitoutumiseen. Sen jälkeen näyteputki laitetaan magneettikenttään, jotta saadaan kerättyä magneettipartikkelit niihin sitoutuneine mRNA:ineen putken toiseen reunaan. Jäljelle jäänyt liuos sisältää muun muassa muut RNA:t ja voidaan poistaa. Menetelmä voidaan suorittaa jopa vartissa ilman, että tarvitsisi välttämättä ensin eristää kokonais-RNA:ta tai puhdistaa eristettyä mRNA:ta enää ennen seuraavia työvaiheita. Kuvassa 9 on

esitetty magneettipartikkeilla eristämisen periaate sekä mihin saatua tuotetta voi käyttää jatkossa. (Invitrogen™: Dynabeads® Oligo (dT)₂₅.)



KUVA 9. mRNA:n eristäminen magneettipartikkeilla sekä menetelmän jatkosovelluksia, mm. RT-PCR sekä cDNA-synteesi (Invitrogen™: Dynabeads® Oligo (dT)₂₅.)

5 CDNA-KIRJASTO

Etsittäessä ja tutkittaessa jonkin eliön tiettyä geeniä ensimmäistä kertaa ensimmäinen vaihe yleensä on valmistaa koe-eliön perimästä DNA-kirjasto. DNA-kirjasto on kattava kokoelma eliön kromosomaalisesta DNA:sta ja sitä kutsutaankin kromosomaaliseksi tai genomiseksi DNA-kirjastoksi. (Suominen ym. 2010, 69.)

Jos tutkitaankin eukaryoottien geenin toimintaa, on usein järkevämpää tehdä toisenlaisia kirjastoja, cDNA-kirjastoja. Eukaryoottisolujen geenit sisältävät proteiinia koodaamattomia DNA-jaksoja eli introneja, minkä vuoksi geenit ovat myös usein hyvin pitkiä. Tämä tekee kromosomaalisten geenien tutkimisesta ja kloonamisesta vaikeaa. Intronialueista on myös suurta haittaa haluttaessa ilmentää geeniä vieraassa isännässä, sillä ne eivät useinkaan osaa poistaa vieraan lajin introneita kunnolla. (Suominen ym. 2010, 69.)

Normaalisti intronit poistetaan tumassa silmukoinnilla irti esiaste-RNA:sta, jolloin varsinaiseen lähetti-RNA:han niitä ei enää tule. Tutkittavia geenejä siirretään usein myös bakteerisoluihin, jotka eivät pysty ollenkaan poistamaan introneita, koska niillä ei itsellä niitä ole. Koska eukaryoottisolun geeniä ei siis voida sellaisenaan ilmentää bakteerisoluissa, pitää niihin viedä mRNA:n DNA-kopio, ns. vastin-DNA eli cDNA (engl. complementary DNA). Siten yksinkertainen tapa välttää introneista aiheutuva haitta onkin valmistaa tutkittavan eliön, kudoksen tai solulinjan senhetkistä mRNA-populaatiota vastaava cDNA-kirjasto. Tällöin saadaan mukaan ne geenit, joita kyseisellä hetkellä solussa ilmennetään eli aktiiviset mRNA:ta tuottavat geenit. cDNA-kirjasto on siis edustava kokoelma näytteen mRNA-populaatiosta eli transkriptomista tietyllä hetkellä. (Suominen ym. 2010, 69; Makarow – Simonen – Ulmanen 1996.)

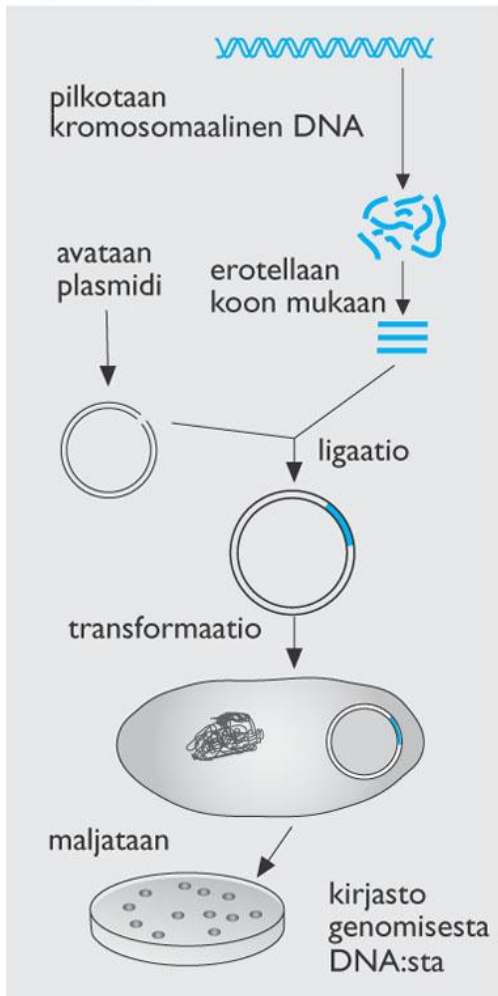
cDNA-kirjaston valmistaminen

cDNA-kirjaston valmistaminen alkaa eristämällä kudoksen näytteen soluista kaikki mRNA:t ja tekemällä niistä DNA-kopiot käänteiskopioijaentsyymin avulla. Kyseinen entsyymi toimii transkriptioon nähden käänteiseen suuntaan eli valmistaa mRNA:n nukleotidijärjestystä templaattina käyttäen cDNA-nauhan ensimmäisen juosteen dNTP-lähtöaineista. cDNA:n toinen juoste syntetisoidaan DNA-polymeraasin avulla. Syntynyt kaksijuosteinen cDNA on tässä vaiheessa käytännössä tylypääinen. (Suominen ym. 2010, 151.)

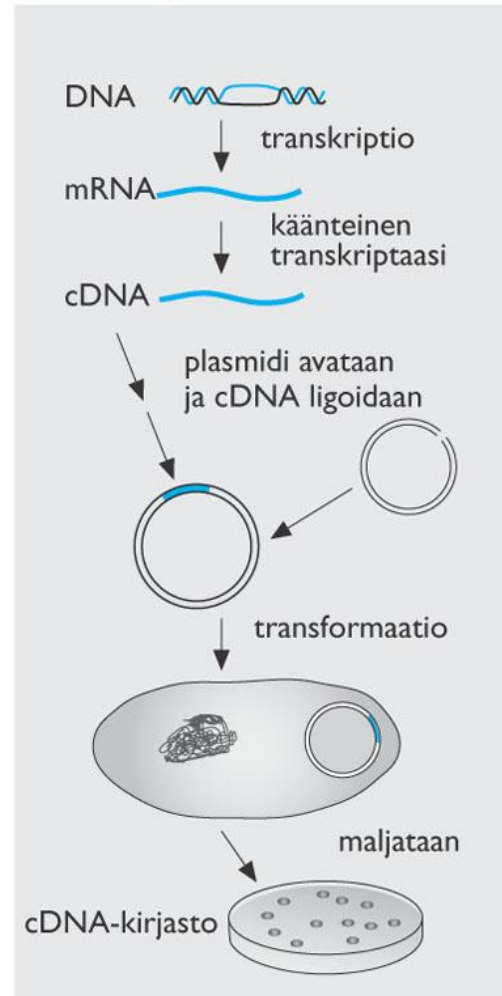
cDNA:ta saadaan usein valmistettua aika vähän, joten yleensä sitä monistetaan PCR:llä. Tällöin cDNA:iden päihin pystytään samalla alukkeiden avulla valmistamaan restriktioentsyymikohdat. Tätä menetelmää kutsutaan RT-PCR:ksi. (Suominen ym. 2010, 152.)

cDNA-synteesin ja monistamisen sekä sopivien restriktioentsyymikäsittelyjen jälkeen saatu DNA voidaankin liittää ligaasientsyymillä vektoriin, eli geenitekniikassa käytettävään DNA:n kuljettajaan. Vektorina toimii usein plasmidi tai virus. Sitten saatu ligaatioseos transformoidaan isäntäsoluihin. Transformoidut mikrobit eli transformantit säilötään ja näin varastossa on koe-elion cDNA-kirjasto tulevaa käyttöä varten. Kuvassa 10 vertaillaan yksinkertaistetussa muodossa genomisen DNA- sekä cDNA-kirjaston valmistamisen vaiheita. (Suominen ym. 2010, 152.)

kirjasto genomisesta DNA:sta



cDNA-kirjasto



KUVA 10. Genomisen DNA-kirjaston sekä cDNA-kirjaston valmistamisen vaiheet (Suominen ym. 2010, 149.)

6 PCR ELI POLYMERAASIKETJUREAKTIO

Polymeraasiketjureaktio eli PCR (engl. Polymerase chain reaction) on kahden nukleotidijärjestykseltään tunnetun DNA-jakson välissä sijaitsevan DNA-jakson monistamista. Tällä keinolla saadaan monistettua esimerkiksi yksittäistä geeniä tai muuta DNA-pätkää jopa miljardikertaiset määrät hyvin pienestä lähtöainemäärästä, ja siksi PCR onkin yksi tärkeimmistä molekyylibiologian menetelmistä. (Suominen ym. 2010, 153; PCR. 2011.)

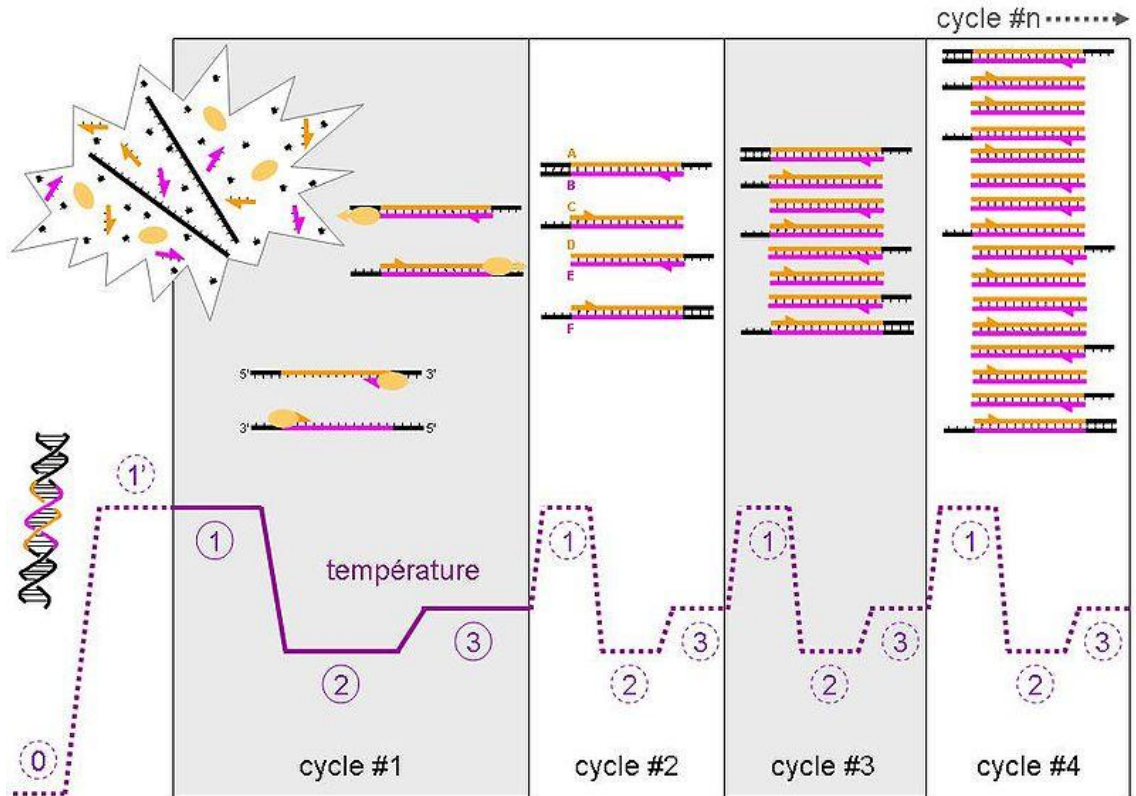
PCR perustuu termostabiilien eli hyvin korkeaa lämpötilaa kestävien DNA-polymeraasien käyttöön. Ne toimivat jopa lähellä 100 °C:ta olevissa lämpötiloissa. Kyseisiä polymeraaseja on löydetty muun muassa kuumissa lähteissä elävistä bakteereista ja yksi yleisimmin käytetyistä polymeraasientsyymeistä onkin *Taq*-polymeraasi, joka on eristetty *Thermus aquaticus* -bakteerista. Tämän polymeraasientsyymien heikkous on kuitenkin suurehko virheiden mahdollisuus, joten usein PCR-sovelluksissa on käytössä vähemmän virheitä tekevät DNA-polymeraasit. Näitä ovat muun muassa *Pfu*-, *Vent*-, *Tth*- ja *DynaZyme*-polymeraasit. (Suominen ym. 2010, 153.)

Termostabiilin polymeraasin ohella PCR-reaktion tarvitaan templaatti-DNA, monistettavan alueen rajaavat alukkeet sekä dNTP:t eli deoksinukleotidit. Templaattina eli monistusreaktion kohteena toimii yleensä kaksijuosteinen DNA, mutta lähtömateriaalina on mahdollista olla myös RNA. RNA:sta vaan on ensin valmistettava käänteistranskriptaasilla cDNA:ta ja tällöin kyseessä on RT-PCR-sovellus. Alukkeina (engl. primers) PCR-reaktiossa käytetään lyhyitä synteettisesti valmistettuja 15 - 50 nukleotidin pituisia DNA-pätkiä. Alukkeiden tarkoituksena on tunnistaa monistettavan DNA-alueen päät ja sitoutua niihin emäsparisäännön mukaisesti. Monistettavan alueen 3'- ja 5'-päihin on kumpaankin omat alukkeensa, joista lähtien polymeraasientsyymi monistaa niiden väliin jäävän halutun DNA-jakson. Deoksinukleotidimolekyylit toimivat PCR-reaktion rakennusaineina polymeraasientsyymien muodostaessa niistä uuden DNA-juosteen. dNTP-seos koostuu dATP-, dTTP-, dCTP- ja dGTP -molekyyleistä, joita

reaktioseoksessa on yleensä yhtä paljon. (Suominen ym. 2010, 153; PCR. 2011.)

6.1 PCR-reaktion vaiheet

PCR-reaktio koostuu useista toistuvista sykleistä, joissa vuorottelevat denaturointi, alukkeiden liittyminenvaihe (engl. annealing) ja pidentymisvaihe. Denaturointi tapahtuu erittäin korkeassa noin 95 °C:n lämpötilassa, jolloin kaksijuosteinen kohde-DNA eli templaatti aukeaa yksijuosteiseksi. Tämä mahdollistaa alukkeiden sitoutumisen templaattiin. Annealing-reaktiossa lämpötila lasketaan lyhyeksi ajaksi sen verran, että alukkeet voivat kiinnittyä. Alukkeiden kiinnittyminen tapahtuu kumpaankin templaatin juosteeseen. Annealing-reaktioksi riittää hyvin lyhyt aika, koska alukkeet ovat pieniä ja vikkeliä sitoutumaan templaattiin niiden komplementaarisiin kohtiin. Yleinen annealing-lämpötila on 55 - 70 °C:n paikkeilla. Alukkeiden kiinnittymisen jälkeen voidaan taas nostaa reaktion lämpötilaa noin 72 °C:een polymeerasientsyymien toiminnalle ihanteelliseksi. Näin tapahtuu templaatin pidentymisreaktio, ekstensio (engl. extension) eli DNA-polymeerasi liittyy reaktioseoksessa olevia nukleotideja alukkeiden 3' -päistä alkaen templaatin mallin mukaan emäsparisitoutumista noudattaen. Kuvassa 11 esitetään DNA:n monistuminen PCR:ssä sekä PCR-reaktion lämpötilaprofiili. (Suominen ym. 2010, 154.)



KUVA 11. DNA:n monistuminen ja PCR:n lämpötilaprofiili. 1': Alkudenaturaatio ja 1: Denaturaatiovaihe jossa DNA:n vastinjuosteet irtoavat toisistaan. (94–96 °C) 2: Alukkeiden kiinnittyminen (45–65 °C). 3: Pidentyminen (72 °C). Kuvan neljästä syklistä jokainen kaksinkertaistaa DNA:n määrän. (PCR. 2011.)

6.2 PCR-reaktion suunnittelu ja optimointi

Ennen kuin varsinaista PCR-reaktiota voidaan suorittaa käytännössä, on reaktio-olosuhteissa monia suunniteltavia ja mietittäviä seikkoja. Lähestulkoon kaikissa PCR-reaktion vaiheissa ja komponenteissa on eri mahdollisuuksia. PCR-reaktioiden optimointiin kuuluu alukkeiden suunnittelu, erilaisten reagenssipitoisuuksien kuten deoksinukleotidien ja entsyymien määrän testaaminen sekä reaktiolämpötilojen ja syklien määrän säätäminen tapauskohtaisesti. (Suominen ym. 2010, 162 - 164.)

6.2.1 Alukkeiden suunnittelu

Yksi tärkeimmistä vaiheista ennen varsinaista PCR-reaktiota on alukkeiden suunnittelu. Alukkeiden pituus, nukleotidikoostumus sekä pitoisuus määräävät PCR-reaktion annealing-lämpötilan. Sulamislämpötila eli T_m kertoo alukkeiden sitoutumisen voimakkuudesta. Kyseisessä lämpötilassa puolet alukkeista on kiinnittyneinä templaattiin ja puolet irrallaan reaktioseoksessa. Karkeasti alukkeiden sulamislämpötila arvioidaan Wallacen säännöllä: $T_m [^{\circ}\text{C}] = 2 \times (A + T) + 4 \times (G + C)$, jossa kirjaimet kuvaavat kyseisen nukleotidin lukumäärää alukkeessa. A ja T vastaavat 2 $^{\circ}\text{C}$:ta sekä G ja C 4 $^{\circ}\text{C}$:ta. Alukepari olisi aina pyrittävä suunnittelemaan niin, etteivät niiden T_m :t poikkeaisi toisistaan paria astetta enempää, jotta niiden sitoutuminen käytettävässä annealing-lämpötilassa (T_a) olisi mahdollisimman samanlaista. Arvioitua sulamislämpötilaa ei kuitenkaan yleensä suoraan käytetä annealing-lämpötilana, vaan usein $T_a = T_m - 5 \text{ }^{\circ}\text{C}$, ja tämäkin arvo on yleensä ainoastaan sopiva lähtökohta optimoinnille. Käytännössä alukkeiden suunnittelussa käytetään kuitenkin aina tietokoneen suunnittelu-ohjelmia, jotka laskevat T_m :n ja T_a :n sekä lisäksi alukkeiden taipumukset muodostaa itsensä kanssa ei-toivottua sitoutumista. (Suominen ym. 2010, 158 - 160.)

Myös alukkeiden määrä vaikuttaa PCR-reaktion tehokkuuteen. Usein alukkeiden optimaalinen pitoisuus reaktioseoksessa on 0,1 – 0,5 μM . Alukkeiden määrän ollessa liian suuri todennäköisyys niiden sitoutumiselle väärään kohtaan templaattissa kasvaa ja näin ollen epäspesifisten tuotteiden määrä kasvaa. Myös alukedimeerejä voi syntyä enemmän. Epäspesifiset tuotteet kilpailevat halutun tuotteen kanssa reaktion entsyymeistä, alukkeista ja deoksinukleotideistä ja siten pienentävät toivotun tuotteen saantoa. (Suominen ym. 2010, 162.)

6.2.2 Polymeraasientsyymin määrä

Monistettaessa pitkiä DNA-jaksoja käytetään DNA-polymeraasia, jolla on

mahdollisimman hyvä prosessointitehokkuus. Eri entsyymeillä on erilaisia prosessointitehokkuuksia, joten myös entsyymin määrä riippuu käytettävästä entsyymistä. Myös erilaisille templaateille ja alukkeille on käytettävä erilaisia polymeerasientsyymejä. Liian suuri entsyymimäärä PCR-reaktiossa voi synnyttää liikaa epäspesifisiä tuotteita, kun taas liian pieni määrä vähentää halutun tuotteen saantoa. (Suominen ym. 2010, 162.)

6.2.3 Deoksinukleotidit

PCR-reaktioseoksessa on jokaista neljää deoksinukleotidia yhtä paljon. Usein sopiva määrä on 20 - 200 μM . Mikäli dNTP-seoksen määrä on pieni, alukkeiden kiinnittyminen väärin kohtiin vähenee ja PCR:n spesifisyys kasvaa. PCR-reaktion optimoinnissa pyritään löytämään pienin mahdollinen dNTP-pitoisuus. (Suominen ym. 2010, 162.)

6.2.4 Magnesiumpitoisuus

Magnesiumpitoisuuden pitäisi PCR-reaktiossa olla 0,5 – 2,5 mM yli deoksinukleotidien kokonaispitoisuuden. Magnesiumionien määrällä on vaikutusta muun muassa alukkeiden kiinnittymiseen, DNA-nauhojen denaturaatiolämpötilaan, PCR-tuotteen spesifisyyteen sekä entsyymin aktiivisuuteen ja tarkkuuteen, sillä DNA-polymeraasi tarvitsee vapaita magnesiumioneja voidakseen sitoutua templaattiin, alukkeisiin ja nukleotideihin. (Suominen ym. 2010, 162.)

6.2.5 Denaturaatio-olosuhteet

PCR-reaktion ensimmäinen vaihe eli DNA:n denaturaatio on hyvin olennainen reaktion onnistumiselle. Epätäydellinen denaturoituminen onkin yksi yleisim-

mistä syistä PCR-reaktion epäonnistumiselle. Denaturaatio-olosuhteet ovat usein 30 s 95 °C:ssa. Mikäli templaatti-DNA sisältää paljon GC-sidoksia, eli juosteiden välinen sitoutuminen on voimakasta, on denaturaatiolämpötila mahdollista nostaa 97 °C:seen. Denaturaatioaikaakin voidaan pidentää, mutta tällöin DNA-polymeraasien aktiivisuus vähenee nopeammin. On olemassa kuitenkin *Taq* entsyymiä termostabiilimpiakin entsyymejä, kuten *Vent*-polymeraasi ja *DynaZyme*-entsyymi, joita käytettäessä denaturaatioaikaa pystytään pidentämään minuuttiin. (Suominen ym. 2010, 163.)

6.2.6 Ekstensio

DNA:n varsinaiseen synteisiin eli alukkeiden pidentymiseen, ekstensioon, vaikuttavat templaatti-DNA:n pituus ja määrä, sekä käytettävä entsyymi ja reaktion lämpötila. Käytettäessä *Taq*-polymeraasia ekstensiolämpötila on usein 72 °C, missä lämpötilassa entsyymi kykenee kiinnittämään 35-100 nukleotidiä sekunnissa syntetisoitavaan DNA-nauhaan. Vaihtelua tähän aiheuttavat reaktioseoksen puskuri, pH ja suolapitoisuus sekä kyseisen templaatin luonne. (Suominen ym. 2010, 163.)

6.2.7 Muita PCR-reaktiossa huomioitavia seikkoja

PCR-reaktion syklien määrä riippuu ainoastaan templaatti-DNA:n määrästä, mikäli muissa reaktio-olosuhteissa ei ole huomioitavaa. Jos syklejä on liian vähän, ei toivottua tuotetta ehdi syntyä tarpeeksi, kun taas liian useat syklit lisäävät epäspesifisten tuotteiden muodostumista. (Suominen ym. 2010, 164.)

PCR on erittäin herkkä menetelmä kontaminaatiolle. Esimerkiksi cDNA-kirjastojen valmistuksessa PCR-reaktioon on usein käytettävissä vain vähän templaattia, jolloin kontaminaation riski kasvaa. Kontaminaatiota voivat aiheuttaa pienet määrät DNA:ta jostain muualta kuin monistettavasta näytteestä

esimerkiksi mikropipettien välityksellä, mutta tämän lisäksi voi olla myös reagenssi-kontaminaatiota. Erityisen hankalissa tapauksissa olisi hyvä, jos PCR-reaktioiden valmistukseen olisi oma puhdas tilansa, mutta kaikessa PCR-työskentelyssä olisi hyvä edes käyttää laminaarivirtauskaappia reaktioseosten valmistukseen sekä erityisesti PCR-töihin tarkoitettuja suodattimellisia pipetin-kärkiä. PCR-ajon jälkeen putkia ei myös saa avata samassa paikassa, jossa reaktioseokset valmistellaan, sillä aina putkia avatessa muodostuu hieman aerosolia. (Suominen ym. 2010, 165 - 166.)

Myös kontrollinäytteet ovat erittäin tärkeitä PCR-työskentelyssä. Varsinaisten monistusreaktioiden lisäksi kannattaa aina tehdä ainakin kontrollit ”templaatti ilman alukkeita” sekä ”alukkeet ilman templaattia”. Nämä auttavat selvittämään, toimiiko reaktio, kuten pitäisi, vai onko esimerkiksi jokin reagenssi kontaminoitunut. (Suominen ym. 2010, 156.)

6.3 Reverse transcription PCR (RT-PCR)

Jotta voitaisiin valmistaa cDNA-kirjastoja hyvinkin pienistä mRNA-määristä, käytetään apuna PCR:aa eli polymeerasiketjureaktiota. Templaattina PCR:ssä on vaan aina DNA, joten haluttaessa monistaa RNA:ta on se ensin käännettävä DNA:ksi eli cDNA:ksi. (Suominen ym. 2010, 170.)

Ensin eristetään soluista poly(A)-RNA:t, jonka jälkeen syntetisoidaan cDNA:n ensimmäinen juoste mRNA:ta templaattina käyttäen käänteiskopioijaentsyymien avulla. Siten muodostunutta cDNA-nauhaa voidaan käyttää templaattina ja monistaa PCR-reaktiossa. Samalla saadaan kaksijuosteista cDNA:ta. Tässä sovelluksessa kyseessä ovat siis RT-PCR -reaktiot (engl. Reverse transcription PCR), eli mallina toimii RNA, joka ennen PCR-reaktioita käännetään cDNA-muotoon. (Suominen ym. 2010, 170.)

Työn kokeellisessa osuudessa cDNA-synteesi sekä ensimmäiset PCR-reaktiot tehtiin liitteenä 3 olevan Finnzymes Phusion™ RT-PCR Kitin ohjeen mukaisesti. Kyseisellä kitillä saadaan cDNA-synteesi ja PCR suoritettua kahdessa vaihees-

sa. Ensimmäisessä vaiheessa eristettyä mRNA:ta käytetään templaattina ja M-MuLV käänteistranskriptaasin avulla valmistetaan cDNA:ta. Toisessa vaiheessa cDNA:ta monistetaan PCR-reaktiossa käyttämällä Phusion Hot Start DNA Polymerase -entsyymiä. Kyseinen DNA-polymeraasi on erittäin tarkka, jopa 52-kertainen tarkkuus verrattuna *Taq*-polymeraasiin, ja siten parantaa PCR-reaktion spesifisyyttä. (Finnzymes Phusion™ Rt-PCR Kit. 2008.)

cDNA:n valmistus ja monistus tällä tapaa on mahdollista tehdä kaikki vaiheet yhdessä koeputkessa ilman välivaiheita. Tämä tapahtuu yksinkertaisesti pipetoimalla kaikki tarvittavat komponentit samaan koeputkeen. Ensimmäistä cDNA-juostetta valmistaessa kohotetaan reaktion lämpötilaa sen verran, että käänteistranskriptaasi toimii tehokkaasti. Tämän jälkeen lämpötilan annetaan nousta lähelle 100 °C:ta, joka saa aikaan DNA-RNA-hybridien denaturoitumisen. Sitten voidaan aloittaa normaalit PCR-reaktiot. (Suominen ym. 2010, 172.)

7 AGAROOSIGEELIELEKTROFOREESI (AGE)

Nukleiinihappojen sisältämän fosfaattiryhmän vuoksi DNA- ja RNA-molekyylit ovat negatiivisesti varautuneita ja kulkevat sähkökentässä positiivista napaa kohti. Tämän ominaisuuden ansiosta nukleiinihapot on mahdollista erotella koon mukaan elektroforeesin avulla. (Turpeenoja 1999, 178 - 179.)

Elektroforeesiajon aikana nukleiinihappomolekyylit liikkuvat sähkökentässä kiinteässä väliaineessa kohti positiivista napaa. Agarosigeelielektroforeesissa kiinteänä väliaineena on merilevän agarista polymerisoitu agarosigeeli, jonka verkkomainen rakenne hidastaa molekyylien liikkumista. Pienimmät nukleiinihappomolekyylit kulkevat nopeimmin ja ovat elektroforeesiajon jälkeen ehtineet geelissä pisimmälle. (Turpeenoja 1999, 178 - 179; Suominen ym. 2010, 123.) DNA:n kohdalla pelkän koon lisäksi kulkeutumiseen vaikuttaa oleellisesti myös DNA:n muoto. Normaalisti plasmidit ovat superkierteisessä muodossa, joka on niin tiivis rakenne, että se pääsee kulkemaan geelillä DNA-muodoista nopeimmin. Plasmidin muuttuessa avoimeksi renkaaksi sen nopeus geelillä hidastuu huomattavasti ja jää superkierteistä muotoa ylemmäksi. Jos plasmidi on esimerkiksi restriktioentsyymikäsittelyn jälkeen lineaarinen, sen nopeus on edellä mainittujen välissä. (Suominen ym. 2010, 127.)

Nukleiinihappoja ei kuitenkaan sellaisenaan havaita agarosigeeliltä, vaan ne saadaan värjättyä käsittelemällä geeliä etidiumbromidilla (EtBr). Erikokoiset DNA/RNA-jaksojen vyöhykkeet erottuvat sitten värillisinä, kun geeliä ajon jälkeen säteilytetään ultraviolettivalolla. Jotta erottuneiden DNA/RNA-jaksojen kokoja voitaisiin arvioida, täytyy elektroforeesiajoon näytteen lisäksi ottaa myös kokostandardi. Yleensä kokostandardina on restriktioentsyymeillä tunnetun kokoisiksi fragmenteiksi pilkottua DNA:ta. (Suominen ym. 2010, 123 - 125.)

Työn kokeellisessa osuudessa agarosigeelielektroforeesilla suoritettiin testi-geeliatjat muun muassa ensimmäisten PCR-reaktioiden jälkeen, jotta saatiin selville, oliko saatu haluttua tunnetun kokoista tuotetta ja oliko mukana paljon epäpuhtauksia. Mikäli testigeeliltä löydettiin oikeaa tuotetta, tehtiin sitä vielä suuremmat PCR-reaktiot ja sen jälkeen haluttu DNA-tuote leikattiin preparatiiviselta geeliltä ja eristettiin ja puhdistettiin spin-kolonnimenetelmällä.

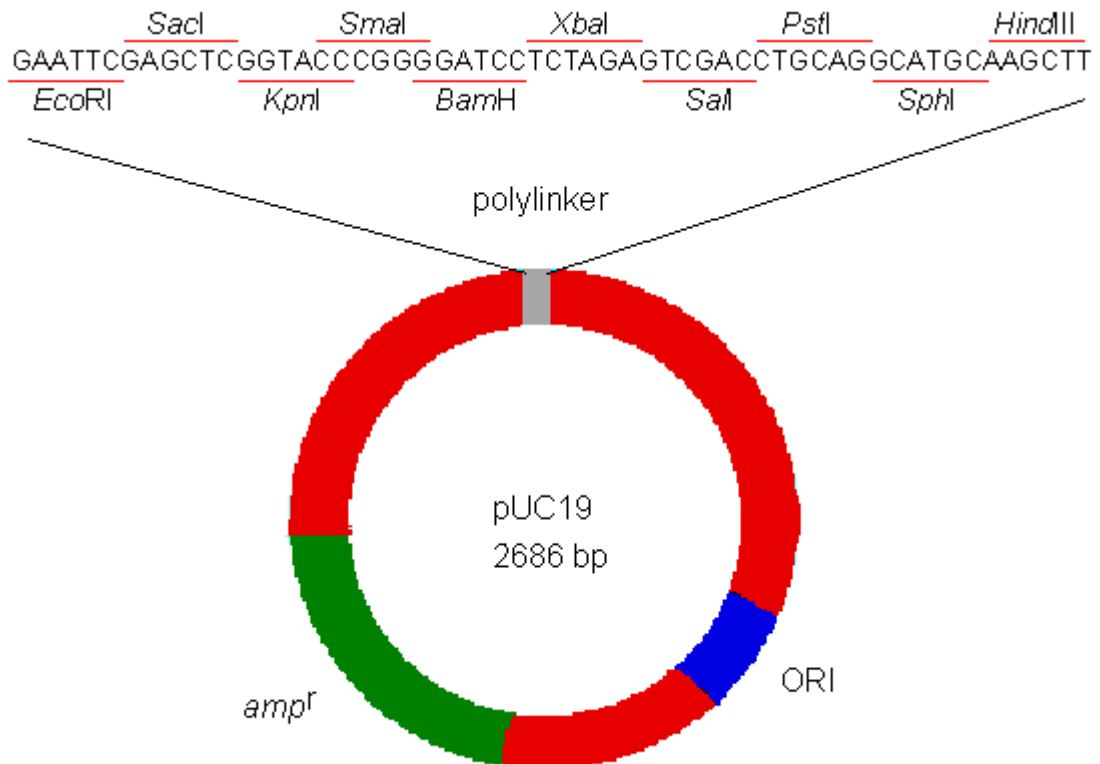
Myös digestioreaktioiden jälkeen otettiin näytteet testigeelille. Sen avulla voitiin tarkastella reaktion onnistumista, koska geeliltä nähtiin oliko digestoitunut oikean kokoiset DNA-palaset. Jos digestio oli onnistunut eli erottui vektori ja insertti, DNA saostettiin ensin reaktioseoksesta ja liuotettiin TE-puskuriin pienemmän tilavuuteen. Sen jälkeen näyte ajettiin kokonaisuudessaan preparatiivisella geelillä ja eristettiin DNA geeliltä kuten PCR:n kohdalla.

8 PLASMIDIVEKTORIN VALMISTAMINEN

Vektoreita käytetään geenitekniikassa kuljettamaan haluttu DNA-jakso toiseen eliöön, yleensä bakteeriin. Vektoreiden päätyyppejä ovat plasmidivektorit, faagivektorit sekä lambda- ja kosmidivektorit, joilla kaikilla on omat etunsa ja käyttökohteensa. Plasmidivektorit olivat ensimmäisiä kloonausvektoreita ja ovat edelleen hyvin laajasti käytössä, koska ne ovat yksinkertaisimpia käyttää. Ne ovat myös erinomaisia vektoreita cDNA-kirjastojen valmistuksessa. (Suominen ym. 2010, 74; Prescott ym. 2002, 333 - 334.)

8.1 Plasmidivektorit

Ensimmäiset plasmidit löydettiin *E. coli*lta 1940-luvulla. Ne ovat pieniä (< 10 kb) rengasmaisia DNA-pätkiä ja sisältävät muutamia geenejä. Plasmidit replikoituvat isäntäsoluissa itsenäisesti. Plasmidien eristäminen ja puhdistaminen on helppoa ja ne voidaan myös transformaatioissa siirtää uudelleen bakteerisoluuun. Bakteerisolut pystyvät ottamaan sisäänsä vain tietyn määrän paljasta DNA:ta. Tämän vuoksi geenitekniikan plasmideista poistetaan yleensä kaikki ylimääräinen DNA, jolloin saatu tila voidaan täyttää siirrettävällä DNA:lla. Yhdistelmä-DNA- eli rekombinantti-DNA-tekniikoissa on käytössä muunnellut plasmidit, joihin on lisäilty tai poistettu alkuperäisistä plasmideista osia. Plasmidivektoreita on kehitetty hyvin tarkasti tiettyjä tehtäviä varten, ja niitä voidaankin valita työn tarkoituksen mukaan. Tiettyjä piirteitä kuitenkin löytyy kaikista geenitekniikassa käytetyistä plasmidivektoreista, kuten replikaation aloitusalue (ori-alue, engl. origin of replication), restriktioentsyymien tunnistuskohta eli monikloonaukskohta (MCS-alue, engl. Multiple Cloning Site) sekä selektiogeeni. Nämä löytyvät myös kuvan 12 esimerkivektorista. (Salo 1997a; Prescott ym. 2002, 334; Suominen ym. 2010, 76; Cloning Vectors.)



KUVA 12. Kuvassa tyypillinen plasmidivektori, joka sisältää katkaisukohtat useille restriktioentsyymeille. Kyseinen plasmidi sisältää ampicilliiniresistenssi-geenin. Plasmidissa on myös ori-alue. (Cloning Vectors.)

8.1.1 Ori-alue

DNA-molekyyleissä on aina tietty kohta, josta replikaatio alkaa, ja sama koskee myös plasmideja. Ori-alueet ovat lajikohtaisia eli plasmidit pystyvät replikoitumaan vain yhdessä tietyssä tai muutamissa isäntäsoluissa. Plasmidi voi sisältää myös erilliset ori-alueet kahdelle eri lajille, jolloin yhdessä isäntäsolussa toimii toinen ja toisessa lajissa toinen ori-alue. Tällöin kyseessä on sukula-vektori. (Suominen ym. 2010, 75.)

Ori-alue vaikuttaa myös plasmidin kopiolukuun eli siihen kuinka monta identtistä plasmidimolekyyliä isäntäsolussa on. On olemassa siis pienen kopioluvun plasmideja, joita soluissa on vain 1 - 2 kappaletta, sekä suuren kopioluvun plasmidi-

deja, joita voi olla 300 - 700 kpl solua kohti. Kopioluvuilla on oleellinen merkitys muun muassa siihen, miten tutkittava geeni saadaan ilmentymään tehokkaasti. Jos geeni siirretään suuren kopioluvun plasmidiin, geenejä on isäntäsolussa normaalin yhden sijasta useita satoja, ja jokainen toimii transkriptiossa ja tuottaa huomattavasti enemmän mRNA:ta ja sitä myöten proteiinia. Jos taas tutkittava geeni tai sen tuottama proteiini on isäntäsolulle haitallista, on mahdollista käyttää pienen kopioluvun plasmidivektoreita, mikä vähentää haittavaikutusta. Yhdistelmä-DNA-tekniikan käytännön työskentelyssä on siis aina tapauskohtaisesti valittava plasmidivektori, joka kykenee replikoitumaan kyseisessä isäntäsolussa ja lisäksi kopioluvun olisi oltava tarkoituksenmukainen. (Suominen ym. 2010, 75.)

8.1.2 MCS-alue

Plasmidivektorissa on oltava tunnistuskohta jollekin restriktioentsyymille, jotta plasmidirengas voidaan avata vieraan DNA:n liittämistä varten. Usein nämä restriktioentsyymien katkaisukohtat ovat uniikkeja eli esiintyvät plasmidissa vain yhdessä kohdassa, koska muuten plasmidi hajoaisi katkaisussa useaan osaan. (Suominen ym. 2010, 77.)

Vektori ja liitettävä DNA pitää kumpikin pystyä katkaisemaan samalla entsyymillä. Käytännössä plasmidivektorissa olisi siis hyvä olla useita sopivia uniikkeja restriktioentsyymien katkaisukohtia, jotta mahdollisimman monien eri restriktioentsyymeillä katkaistujen DNA-jaksojen eli inserttien liittäminen vektoriin onnistuisi. Yleensä plasmidivektoreissa onkin ainakin yksi MCS-alue eli monikloonisuusalue, joka sisältää katkaisukohtat usealle restriktioentsyymille. (Suominen ym. 2010, 77; Cloning Vectors.)

8.1.3 Selektiogeeni

Plasmidivektorissa on oltava jokin selektiogeeni, jotta transformaation jälkeen voitaisiin tunnistaa halutun plasmidin sisältävät solut transformoitumattomista

soluista. Useimmin selektiogeeninä on antibioottiresistenssigeeni, joka aiheuttaa isäntäsolulle antibioottiresistenssin, eli geeni tuottaa jotakin antibioottia hajottavaa tai inaktivoivaa entsyymiä. Bakteerien, joilla on antibioottiresistenssi, on siis mahdollista kasvaa kyseistä antibioottia sisältävässä kasvualustassa. Usein yhdistelmä-DNA-vektoreissa käytetään ampicilliiniresistenssiä (Amp^r), kanamysiiniresistenssiä (Km^r) ja kloramfenikoliresistenssiä (Cm^r). (Suominen ym. 2010, 74.)

Esimerkiksi *E. colissa* plasmidien transformaatiotehokkuus on melko pieni ja suurin osa kasvualustalla lisääntyvistä soluista ei sisällä haluttua plasmidivektoria. Siksi kasvualustassa käytetään antibioottia, joka tappaa transformoitumattomat *E. colit*, ja ainoastaan vektorin sisältävät antibioottiresistentit bakteerit voivat lisääntyä kasvualustalla. Ampicilliiniresistenssigeeni muodostaa β -laktamaasi-entsyymiä, joka inaktivoi ampicilliinantibiootin. (Cloning Vectors.)

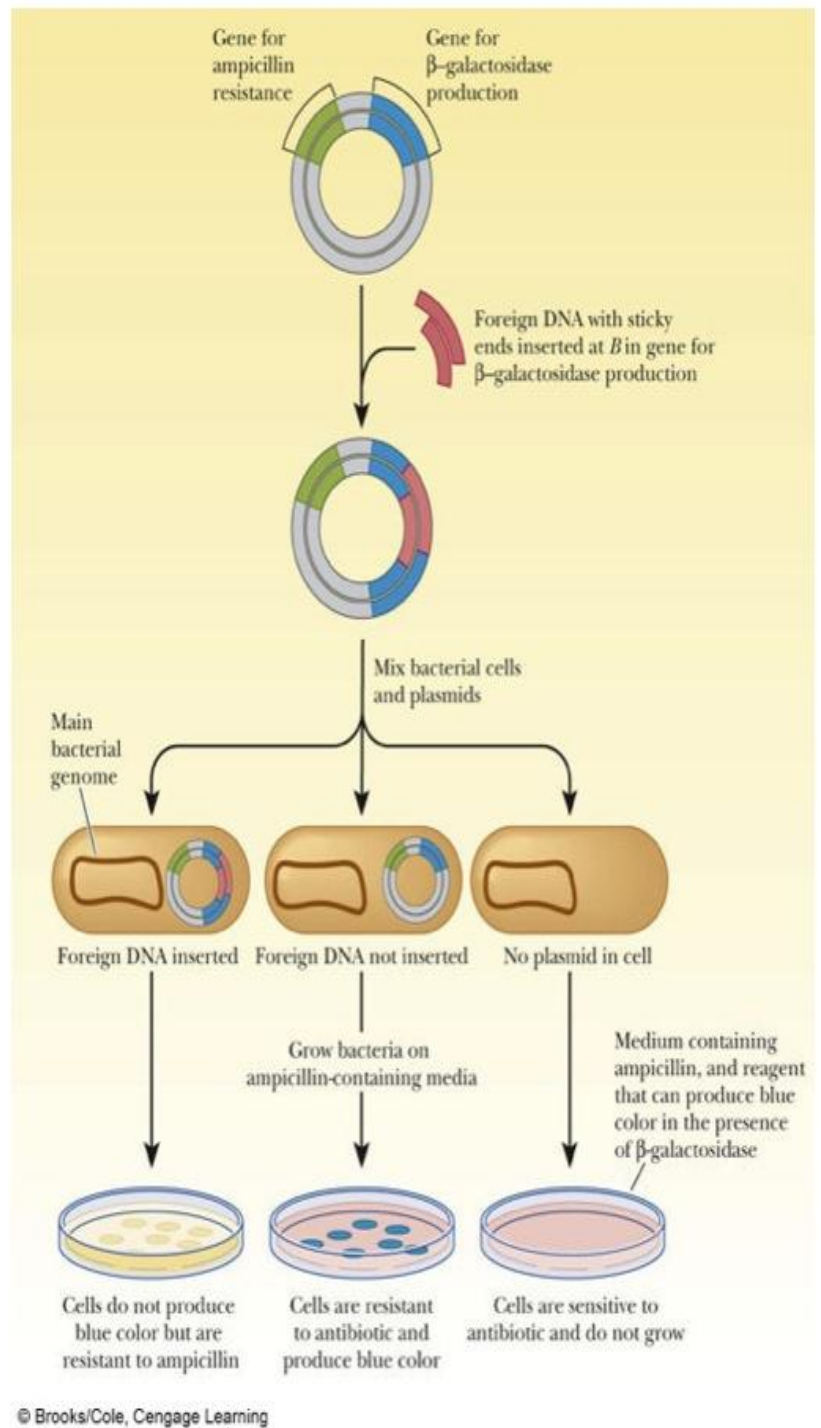
8.1.4 α -komplementaatio

Antibioottiresistenssigeenin ollessa plasmidivektorissa luonnostaan ja auttaessa erottamaan kasvualustalla transformoituneet bakteerisolut plasmidivektoria sisältämättömistä soluista, on monilla yleisvektoreilla lisäksi ominaisuus, jonka avulla voidaan erottaa yhdistelmä-DNA-plasmidin sekä pelkän vektoriplasmidin sisältävät transformantit toisistaan. Menetelmää kutsutaan α -komplementaatioksi tai sini-valkoseulonnaksi (engl. blue/white screening) ja se perustuu *E. colissa* β -galaktosidaasientsyymien aiheuttamaan värireaktioon elatusmaljalla. (Suominen ym. 2010, 79; Cloning Vector. 2011.)

Sini-valkoseulontaa hyödyntävät vektorit sisältävät β -galaktosidaasin aminoterminaalista α -fragmenttia (entsyymien alkuosaa) koodaavan geeninosan eli *lacZ α* -geenin (tai *lacZ'*). β -galaktosidaasin α -fragmentti ei kuitenkaan yksistään toimi entsyymaattisesti, vaan vaaditaan myös entsyymien loppuosa eli ω -fragmentti (omega-fragmentti). Kyseisten vektorien isäntäsoluina toimivissa *E. coli*-kannoissa on ns. F' -tekijä, joka sisältää β -galaktosidaasin ω -fragmenttia koodaavan *lacZ*-geenin loppuosan. Transformoitaessa *E. colit* vektorilla näiden

entsyymien osien on mahdollista yhdistyä ja toimia β -galaktosidaasin tavoin.
(Suominen ym. 2010, 80.)

Normaalisti β -galaktosidaasientsyymi hajottaa laktoosia glukoosiksi ja galaktosiksi, mutta lisäksi se pystyy hajottamaan myös X-gal -nimistä ainetta. X-gal (5-bromi-4-kloori-3-indolyyli-D-galaktopyranosidi) on synteettinen laktoosintapainen yhdiste, jonka hajoamistuote on sininen. Kun X-gal -väriainetta sisältävällä maljalla kasvatetaan vektorilla transformoituja soluja, värjäytyvät solut ja koko pesäkkeet sinisiksi. Sen sijaan, jos vektorin *lacZ*-geeniosan alkupuolella sijaitsevalle MCS-alueelle liitetään haluttu DNA-jakso eli insertti, *lacZ*'-geenin toiminta loppuu. Tällöin ei enää muodostu β -galaktosidaasin α -fragmenttia ja koska ω -fragmenttikään ei toimi yksinään entsyymaattisesti, yhdistelmä-DNA-plasmidin sisältävät *E. coli* -solut eivät värjäydy kasvatusmaljalla sinisiksi, vaan jäävät valkeiksi pesäkkeiksi. Kuvassa 13 esitetään millä tavalla erotetaan kasvatusmaljalta bakteerit, jotka ovat transformoituneet insertin sisältävällä vektorilla tai pelkällä vektorilla, sekä lisäksi transformoitumattomat solut.
(Suominen ym. 2010, 80 - 81.)

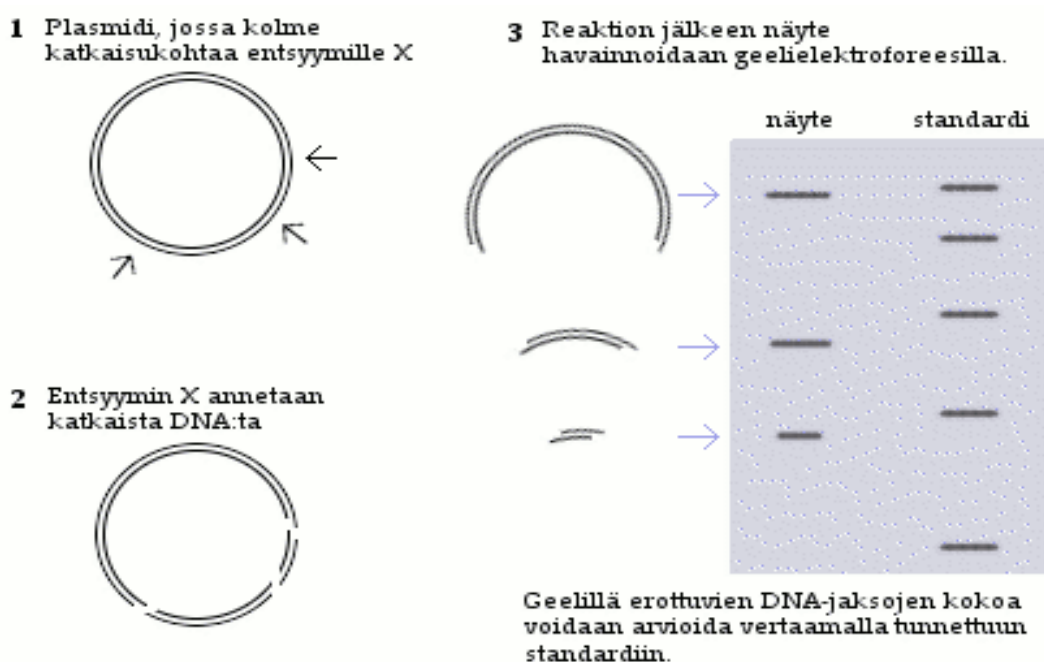


KUVA 13. Vasemman puoleisessa tapauksessa on bakteeri transformoitu sekä insertin että vektorin sisältävällä plasmidilla, kun taas keskellä vektoriin ei ole ligoitunut saatu inserttiä, joten pesäkkeet ovat siniset. Oikealla solut eivät ole transformoituneet ollenkaan eikä pesäkkeitä ole lainkaan amp-kasvualustalla. (<http://oregonstate.edu/instruction/bb350/textmaterials/13/Slide19.jpg>)

α -komplementaatio on yleisimmin käytetty seulontamenetelmä *E. colilla* työskenneltäessä, koska sen avulla voidaan yksinkertaisesti nähdä heti transformanttien kasvatusmaljalta, minkä pesäkkeiden solut sisältävät yhdistelmä-DNA-plasmidin eli insertin sisältävän vektorin ja missä soluissa on ainoastaan vektori. Tämä on erittäin tarpeellista ja aikaa säästävää, koska lugaatiossa syntyy myös paljon vektoritaustaa eli vektoria ilman inserttiä, kun vektori on lugaatiossa liittynyt pelkästään omat avoimet päänsä yhteen. (Suominen ym. 2010, 79 - 80.)

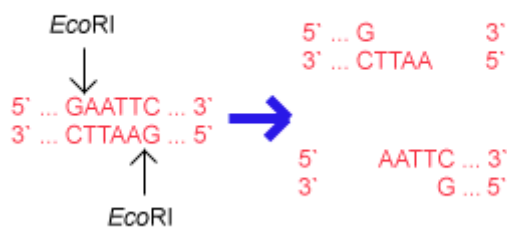
8.2 Digestio eli DNA:n pilkkominen restriktioentsyymien avulla

Restriktioentsyymit ovat bakteereista eristettyjä nukleiinihappoja pilkkovia entsyymejä eli nukleaaseja, jotka pystyvät katkaisemaan kaksijuosteisen DNA:n tietyn emäsjärjestyksen kohdalta. Restriktioentsyymien ansiosta DNA:sta saadaan eriteltyä halutun kokoisia, muutaman sadan tai tuhannen nukleotidin pituisia pätkiä. Restriktiopalaset voidaan erottaa elektroforeesin avulla, jolloin palat asettuvat kokonsa perusteella geelillä eri kohtiin kuvan 14 mukaisesti. Kukin DNA-pala pystytään irrottamaan geelistä ja jatkamaan sen tutkimusta. (Turpeenoja 1999, 151.)

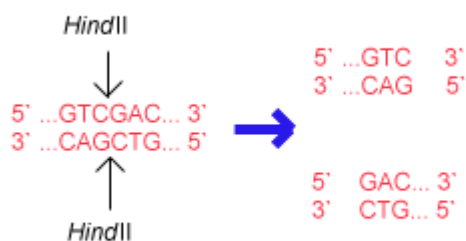


KUVA 14. Digestioreaktion tutkiminen geelielektroforeesilla (Digestio (restriktioentsyymien käyttö) 2006.)

Kullakin restriktioentsyymillä on omat tunnustuskohtansa DNA-sekvenssissä ja ne ovat yleensä 4 - 8 nukleotidiparia pitkiä. Tunnustuskohta sisältää entsyymille ominaisen katkaisukohtan kuvan 15 esimerkin mukaan. Suurin osa restriktioentsyymeistä aiheuttaa DNA:han kohessiiviset päät eli vastinjuosteita ei katkaista täysin samasta kohdasta, jolloin kumpaankin päähän jää lyhyt yksijuosteinen pää. Kohessiiviset päät ovat valmiita pariutumaan uudestaan sellaisen DNA-juosteen kanssa, jolla on oikea vastinemäsjärjestys. Sen sijaan osa restriktioentsyymeistä katkaisee molemmat DNA-juosteet saman emäsparin kohdalta muodostaen DNA:han tylpät päät kuten kuvassa 16. Tällöin DNA:n päihin voidaan joutua liittämään toiseen juosteeseen poly-A -häntä ja toiseen poly-T -häntä mahdollistamaan onnistuneempi ligaatio. (Salo 1997b; Digestio (restriktioentsyymien käyttö) 2006.)



KUVA 15. EcoRI-restriktioentsyymien tunnustuskohta ja nuolella osoitettu katkaisukohta, sekä sen muodostamat kohessiiviset päät (Salo 1997b.)



KUVA 16. HindII-restriktioentsyymien tunnustuskohta ja nuolella osoitettu katkaisukohta, sekä sen muodostamat tylpät päät (Salo 1997b.)

Restriktioentsyymien käytön merkittävä sovellus on esimerkiksi kloonauksessa eli vieras geenipala saadaan siirrettyä kloonausvektoriin, kuten plasmidiin. Ne ovat siis olennainen osa yhdistelmä-DNA:n valmistamisessa. Kun rakennetaan yhdistelmä-DNA-molekyylejä esimerkiksi eri lajeista peräisin olevista DNA:ista, yhdistettävät DNA:t katkaistaan samoilla restriktioentsyymeillä, jotta saadaan samanlaiset yksijuosteiset päät. (Salo 1997b.)

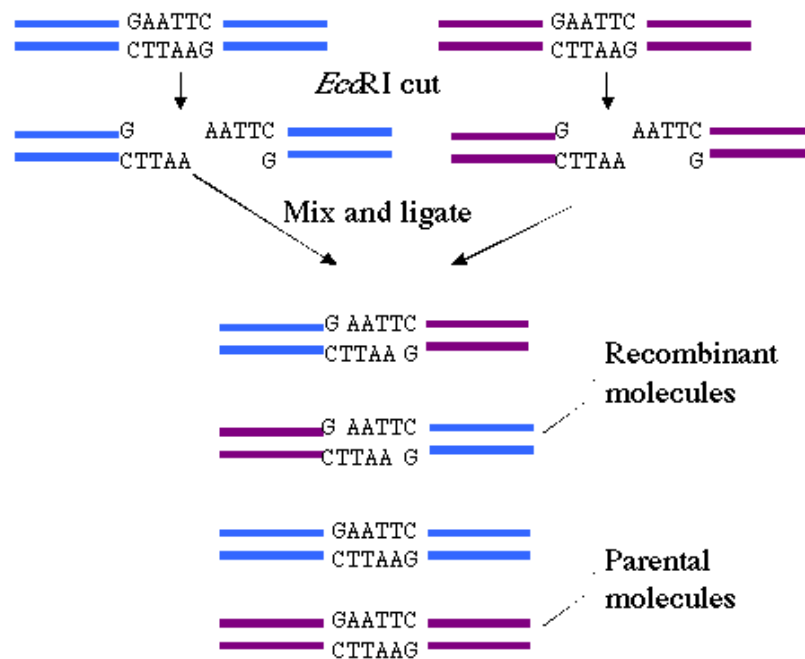
Käytännössä restriktioentsyymien annetaan vaikuttaa näytteessä tietty aika tietyssä lämpötilassa. Kullakin entsyymillä on omat optimiolosuhteensa. Digestioreaktion jälkeen DNA:n katkaisun onnistumista tutkitaan usein agarosigeeli-elektroforeesin avulla. Erikokoiset DNA-palat löytyvät geeliltä eri kohdista ja koot voidaan selvittää vertaamalla paikkoja tunnetun kokoisia DNA-palasia sisältävään standardinäytteeseen kuten kuvassa 14. (Digestio (restriktioentsyymien käyttö) 2006.)

8.3 Ligaatio eli DNA-jaksojen liittäminen toisiinsa ligaasientsyymien avulla

DNA-ligaasit ovat entsyymejä, jotka liittävät kovalenttisesti yhteen kaksi lineaarista DNA-jaksoa. Yhdistelmä-DNA-tekniikassa käytetyin ligaasi on *E. coli*n T4-faagin tuottama entsyymi eli T4-DNA-ligaasi. Ligaation yleisimpiä sovelluksia on liittää tietty DNA-jakso eli insertti vektoriin, kuten restriktioentsyymien avulla irrotettu geeni plasmidivektoriin. Kuvassa 17 on esitetty eri mahdollisuudet digestoitujen DNA-jaksojen ligatoitumiselle. (Suominen ym. 2010, 131; Ligaatio. 2006.)

Edellytys ligaasientsyymien toiminnalle on DNA-päät, joissa toisen nauhan 5'-päässä on vapaa fosfaattiryhmä ja toisen 3'-päässä vapaa OH-ryhmä. Näiden välille DNA-ligaasi muodostaa kovalenttisen fosfodiesterisidoksen ja syntyy yhtenäistä kaksijuosteista DNA:ta. Yhteen liitettävien DNA-päiden lisäksi T4-DNA-ligaasi tarvitsee myös ATP:tä energianlähteeksi, Mg^{2+} -ioneja sekä pelkistävät olosuhteet. (Suominen ym. 2010, 131.)

Restriction endonucleases generate ends that facilitate mixing and matching



KUVA 17. EcoRI-restriktioentsyymillä katkaistut DNA-jaksot laitetaan lugaatioreaktioon. On mahdollista syntyä kahdella tavalla yhdistelmä-DNA- eli rekombinanttimolekyylit tai alkuperäiset DNA-jaksot voivat liittyä takaisin yhteen. (Isolating and analyzing genes.)

Digestio eli DNA:n katkaisu restriktioentsyymeillä aiheuttaa DNA:han joko kohessiiviset tai tylpät päät. Kohessiivisissä päissä on muutaman nukleotidin mittaiset yksijuosteiset hännät, jotka liittyvät lugaatiossa helposti yhteen DNA-jaksojen kanssa, joiden häntien sekvenssit ovat komplementaariset. Yhteen liitettävät vektori ja insertti on siis katkaistava samalla restriktioentsyymillä, sillä eri entsyymien tuottamia erilaisia kohessiivisiä päitä ei voi liittää yhteen lugaatiolla. Sen sijaan DNA-jaksojen tylpät päät voi liittää yhteen lugaasientsyymillä, vaikka ne olisi saatu aikaan eri entsyymeillä. Kohessiivisten päiden lugaatio on kuitenkin huomattavasti tylppiä päiden lugaatiota tehokkaampaa, koska insertti

pystyy liittymään kohessiivisesta päästään vektoriin ensin vastinemästen välisillä vetysidoksilla, jonka jälkeen ligaasientsyymi muodostaa puuttuvat fosfodiesterisidokset. Tylppien päiden ligaatiossa ei ole vastinemästen vetysidoksia, mutta ligaasi voi silti muodostaa puuttuvat fosfodiesterisidokset. (Suominen ym. 2010, 132 - 133; Ligaatio. 2006.)

9 TRANSFORMAATIO

Geenitekniikassa transformaatiolla tarkoitetaan DNA:n siirtämistä bakteeri-, hiiva-, home- tai kasvisoluun, kun kuljettajana eli vektorina on plasmidi. Jos vektorina on virus, tapahtumaa kutsutaan transfektioksi. Kohdesolun ollessa eläinsolu puhutaan aina transfektiosta, kuljetettiinpa DNA soluun millä tavalla tahansa. Joka tapauksessa transformaatioissa on kyse geneettisen materiaalin siirtymisestä DNA-molekyylien välityksellä solusta tai eliöstä toiseen. Bakteerisolut eivät juuri transformoidu lineaarisella DNA:lla, joten yhdistelmä-DNA-molekyylit täytyy ennen transformaatiota liittää toisiinsa ehjäksi plasmidirenkaaksi DNA-ligaasientsyymin avulla. (Suominen ym. 2010, 140.)

On olemassa kaksi pääasiallista menetelmää bakteerisolujen transformoimiseen, kemiallinen menetelmä ja elektroporaatio. Kemiallinen transformaatio hyödyntää CaCl_2 -käsittelyä ja lämpöshokkia, kun taas elektroporaatioissa transformaatio tapahtuu sähkökentässä korkean jännitteen avulla. Molemmat menetelmät ovat ihan toimivia, mutta elektroporaatiolla saadaan suurempia transformatiotehokkuuksia. Kumpikin näistä transformaatiomenetelmistä oli käytössä myös työn kokeellisessa osuudessa. (Transformation and Phage. 2000.)

9.1 CaCl_2 -menetelmä

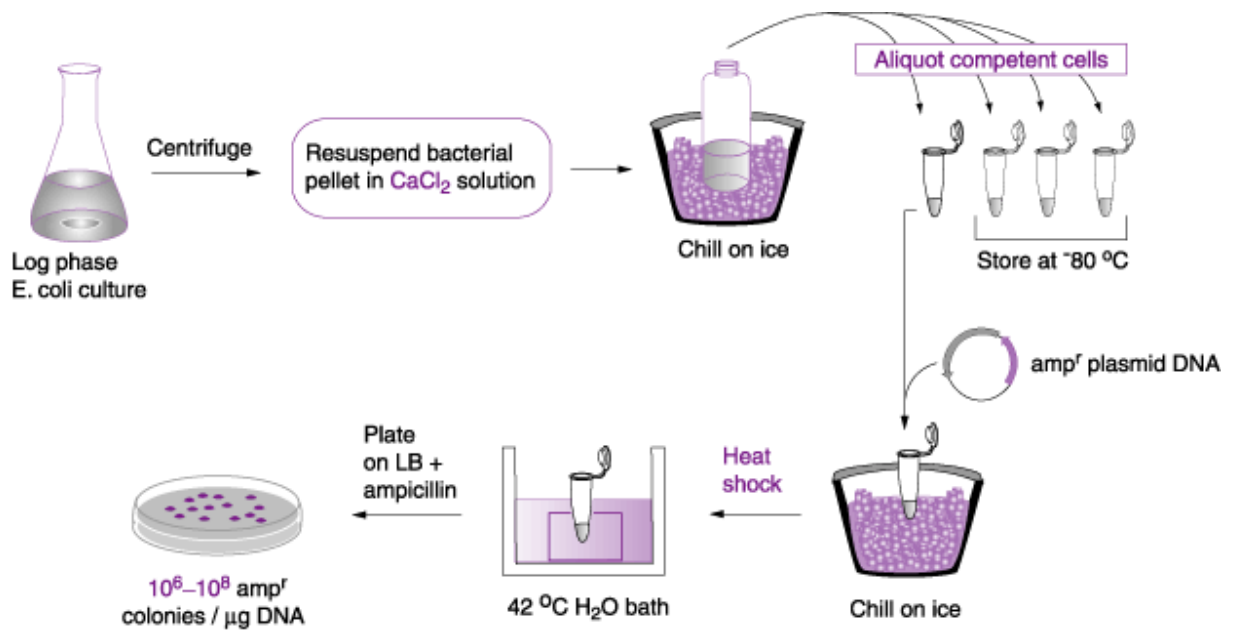
Jotkut bakteerisolut voivat olla luonnostaankin kompetenteja eli pystyvät ottamaan DNA:ta sisäänsä, toisin sanoen transformoitumaan, mutta yleensä solut kuitenkin täytyy tehdä kompetenteiksi esimerkiksi kalsiumkloridikäsittelyllä. CaCl_2 -menetelmä onkin vanhin tapa transformoida *E. coli*-soluja. CaCl_2 -käsittely tehdään transformoitavien solujen kasvun ollessa varhaisessa eksponentiaalivaiheessa eli kasvuston $A_{600\text{nm}} = n. 0,3-0,6$. (Suominen ym. 2010, 141 - 142.)

Bakteerien solukalvo päästää negatiivisesti varautuneet kloridi-ionit läpi, mutta

ei kalsiumioneja. Vesimolekyylit seuraavat varauksellisia kloridi-ioneja ja tämä veden tulo aiheuttaa solujen turpoamisen, mikä mahdollistaa DNA-molekyylien pääsyn bakteerisoluun. Solujen transformoituminen DNA:lla vaatii kuitenkin myös lämpökäsittelyn. (Bacterial Transformation and Transfection.)

Solujen käsittely kalsiumkloridilla tapahtuu hellävaraisesti jää-vesihauteella alle +4 °C:ssa. Kun bakteerisolut on erotettu kasvatusliemestä sentrifugoimalla, ne suspensoidaan jääkylmään CaCl₂-liuokseen, mikä aiheuttaa kompetenssin muodostumisen. Lopulta solut ja supernatantti erotetaan ja solut suspensoidaan pieneen määrään jääkylmää kalsiumkloridia. Syntyneitä kompetentteja soluja voidaan käyttää transformaatioon heti tai varastoida ne syväjäädetytinä myöhempää käyttöä varten. (Suominen ym. 2010, 142.)

Varsinainen transformaatio tapahtuu lisäämällä kompetenttien solujen joukkoon siirrettävä DNA, yleensä siis DNA-ligaatioseos, pienessä tilavuudessa. Transformaatioseosta pidetään jäähauteella parikymmentä minuuttia, jonka jälkeen sille aiheutetaan lämpöshokki, mikä saa DNA:n siirtymään soluihin. Sitten putket laitetaan takaisin jäihin ja lisätään kasvatusmediumia, joka voi olla esim. LB tai SOC. Soluja pidetään 37 °C:ssa hiljaa sekoittaen noin tunnin ajan, millä saadaan aikaan vektorin antibioottiresistenssigeenin ekspressoituminen. Lopulta transformoidut solut maljataan selektiivisille maljoille, joilla ainoastaan transformoituneet solut kasvavat ja muodostavat pesäkkeitä. Kuva 18 havainnollistaa sekä kompetenttien solujen valmistuksen että transformaation kulun CaCl₂-menetelmässä. (Suominen ym. 2010, 142.)



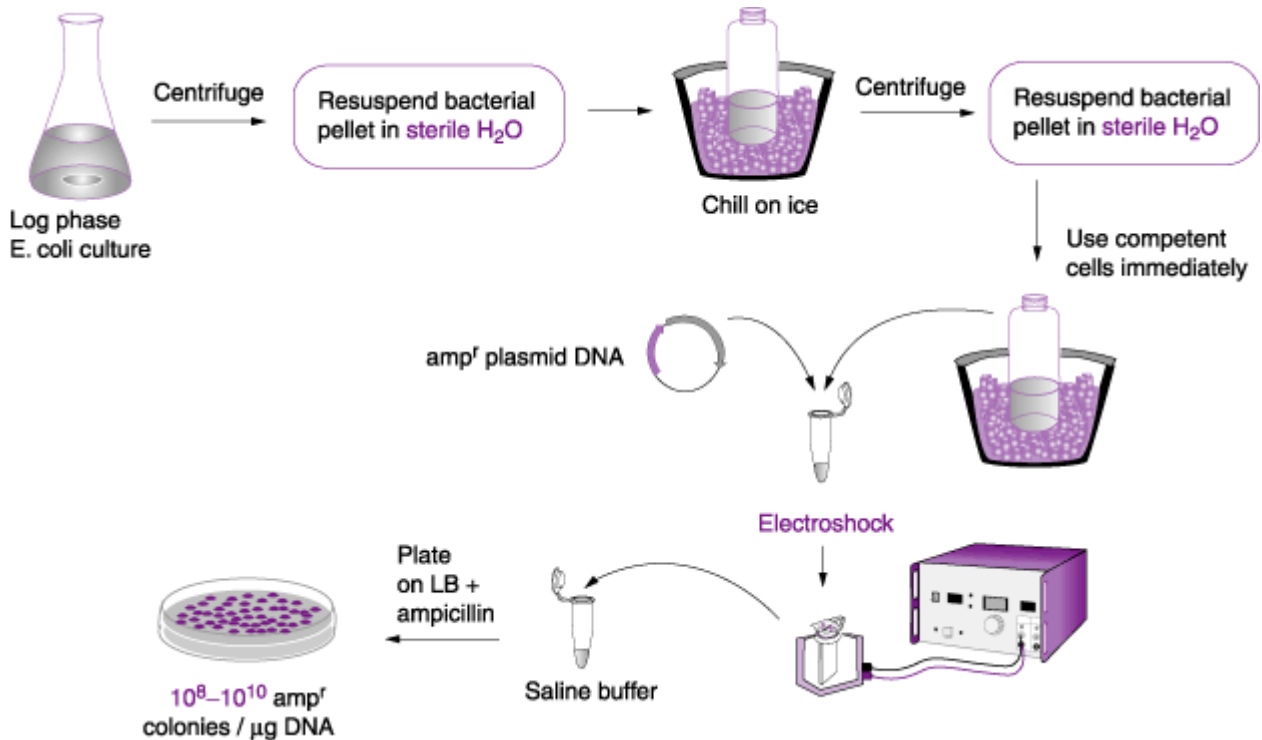
KUVA 18. Kompetenttien solujen valmistus CaCl_2 -menetelmällä sekä transformaation kulku (Transformation and Phage. 2000.)

9.2 Elektroporaatio (elektrotransformaatio)

Elektroporaatioksi kutsutaan transformaatiomenetelmää, jolla DNA saadaan siirtymään solujen sisään aiheuttamalla niille lyhyen voimakkaan sähköpulssein. Elektroporaatio on alunperin kehitetty transfektoimaan eläinsoluja, mutta sitä on mahdollista käyttää myös kaikkien muiden solujen kuten bakteerien transformointiin. Tätä menetelmää käytetään erityisesti tarvittaessa mahdollisimman tehokasta transformaatiota, koska sillä on huomattavasti suurempi transformatiotehokkuus kuin esimerkiksi CaCl_2 -menetelmässä. (Suominen ym. 2010, 143.)

Elektroporaatio tehdään eksponentiaalisen kasvun keskivälillä oleville soluille. Transformoitavat solut siirretään erityisiin transformaatiokvyetteihin, joiden reunoilla on elektrodit. Elektroporaatiossa kylmässä (0-4 °C) pidetyille soluille annetaan lyhytaikainen, mutta voimakas ja korkeajännitteinen sähköpulsssi. Tämä saa aikaan hetkellisiä aukkoja soluseinään, joiden kautta DNA pääsee siirtymään solujen sisään. Kuvassa 19 esitetään elektroporaation avulla tapahtuvan transformaation kulku. Tässä tapauksessa huomattavaa on myös, ettei

soluja tehdä kompetenteiksi CaCl_2 -käsittelyllä. Sillä tavoin valmistettuja kompetentteja soluja ei nimenomaan voi käyttää elektroporaatiossa, koska suolaionit transformaatioseoksessa aiheuttaisivat liian suuren sähkövirran soluille ja vahingoittaisivat niitä. (Suominen ym. 2010, 143.)



KUVA 19. Transformaatio elektroporaation avulla (Transformation and Phage. 2000.)

Transformaatio sähkökentässä korkean jännitteen avulla on tehokkuutensa ansiosta hyvä menetelmä muun muassa kun valmistetaan cDNA-kirjastoja tai jos lähtömateriaalia on hyvin vähän. 1 μg :lla DNA:ta voidaan saada jopa yli 10^{10} transformanttia. Kuten CaCl_2 -menetelmässä myös elektroporaatiossa lineaarisen DNA:n transformaatiotehokkuus on vain noin 0,1 % rengasmaisen DNA:n tehokkuudesta. (Suominen ym. 2010, 143; Bacterial Transformation and Transfection.)

10 POHDINTA

Opinnäytetyön kirjallisen osuuden tekeminen oli loppujen lopuksi kiinnostava prosessi. Geenitekniikan kieli ja käsitteet jo pelkästään ovat asiaa syvemmin tuntemattomalle ja kokemattomalle hyvin vaikeasti ymmärrettäviä, ja ihan selvästi huomasi, että vasta kirjallista osuutta tehdessä ymmärsi useitakin työn kokeellisen osuuden asioita selvästi paremmin. Aineistoakin opinnäytetyöhön löytyi suhteellisen hyvin. Useista työn aiheista olisi tietenkin saanut kirjoitettua paljon syvemminkin, mutta raja oli vain vedettävä johonkin.

Työn kokeellinen osuus oli myös mielenkiintoinen kokemus. Työskentely oli hyvinkin itsenäistä, mutta toki työn ohjaajalta Johanna Veijolalta sai aina tarvittaessa apua ja neuvoja. Geenitekniikan työt ovat sikälikin melko haasteellisia, ettei työvaiheiden reaktioissa tapahdu paljonkaan mitään silmin nähtävää, vaan käytännössä pienen pieni läpinäkyvä DNA-sakka on koko työssä näkyvintä sekä tietysti pesäkkeet maljoilla bakteerisolujen transformaation jälkeen. Kuitenkin sekä opinnäytetyön kokeellisen että kirjallisen osuuden perusteella jäi sellainen mielikuva, että voisi kuvitella tekevänsä aiheeseen liittyviä töitä jatkossakin, tosin ehkä hieman rutiininomaisempina eikä niinkään tutkimusmielessä.

LÄHTEET

Anderson, Kevin L. PhD – Purdom, Georgia PhD 2009. Analysis of Barry Hall's Research of the E. coli ebg Operon. Saatavissa:

<http://www.answersingenesis.org/articles/aid/v4/n1/analysis-of-barry-halls-research>. Hakupäivä 24.10.2011.

Bacterial Transformation and Transfection. Saatavissa:

http://www.genome.ou.edu/protocol_book/protocol_adxF.html. Hakupäivä 12.9.2011.

Carpí, Anthony 2003. Nucleic Acids DNA and RNA. Saatavissa:

http://www.visionlearning.com/library/module_viewer.php?mid=63. Hakupäivä 5.6.2011.

Cloning Vectors. Saatavissa: [http://www.web-](http://www.web-books.com/MoBio/Free/Ch9A4.htm)

[books.com/MoBio/Free/Ch9A4.htm](http://www.web-books.com/MoBio/Free/Ch9A4.htm). Hakupäivä 24.9.2011.

Cloning Vector. 2011. Saatavissa: http://en.wikipedia.org/wiki/Cloning_vector.

Hakupäivä 3.10.2011.

Digestio (restriktioentsyymien käyttö). Solunetti 2006. Saatavissa:

<http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/digestio/2/>. Hakupäivä 7.10.2011.

DNA. 2011. Saatavissa: <http://fi.wikipedia.org/wiki/DNA>. Hakupäivä 3.9.2011.

E.Z.N.A.™ Total RNA Midi Kit. 2007. Saatavissa:

<http://www.omegabiotek.com/files/resource/Handbook/83815000.pdf>.

Hakupäivä 25.10.2011.

Finnzymes Phusion™ RT-PCR Kit. 2008. Saatavissa:

http://www.finnzymes.fi/pdf/phusion_rtpcrkit_datasheet_f546sl_1_1_low.pdf.

Hakupäivä 25.10.2011.

Gene Expression. Saatavissa:

http://www.contexto.info/DNA_Basics/Protein_synthesis.htm. Hakupäivä

25.10.2011.

Heino, Jyrki – Vuento, Matti 2002. Solubiologia. WSOY.

Heino, Jyrki – Vuento, Matti 2007. Biokemian ja solubiologian perusteet. WSOY.

Invitrogen™: Dynabeads® Oligo (dT)₂₅. Saatavissa:

<http://products.invitrogen.com/ivgn/product/61002>. Hakupäivä 25.10.2011.

Isolating and analyzing genes. Saatavissa:

http://www.bx.psu.edu/~ross/workmg/Isolat_analyz_genes_Chpt3.htm.

Hakupäivä 12.10.2011.

Isolating RNA: Pure and Simple. Saatavissa:

<http://mcbl.iisc.ernet.in/Welcome%20to%20MCBL/Faculty/Parag/microarray%20workshop%20details/RNA%20isolation%20Kits.html>. Hakupäivä 4.5.2011.

lac operon. 2002. Saatavissa:

http://biochemistry.yonsei.ac.kr/biochem_molecular/gene_cloning_18.php.

Hakupäivä 24.10.2011.

Ligaatio. Solunetti 2006. Saatavissa:

<http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/ligaatio/2/>. Hakupäivä 12.10.2011.

Lähetti-RNA. 2011. Saatavissa: <http://fi.wikipedia.org/wiki/MRNA>. Hakupäivä 28.1.2011.

Makarow, Marja – Simonen, Marjo – Ulmanen, Ismo 1996. Geenistä koeputken kautta proteiiniksi. Duodecim. Saatavissa:

http://www.duodecimlehti.fi/web/guest/etusivu?p_p_id=dlehtihaku_view_article_WAR_dlehtihaku&p_p_action=1&p_p_state=maximized&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-1&p_p_col_count=1&dlehtihaku_view_article_WAR_dlehtihaku__spage=%2Fportlet_action%2Fdlehtihakuartikkeli%2Fviewarticle%2Faction&dlehtihaku_view_article_WAR_dlehtihaku_tunnus=duo60080&dlehtihaku_view_article_WAR_dlehtihaku_p_auth. Hakupäivä 21.3.2011.

Nukleiinihappojen eristys ja puhdistus. Solunetti 2006. Saatavissa:

http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/nukleiinihappojen_eristys_ja_puhdistus/. Hakupäivä 20.12.2010.

PCR. 2011. Saatavissa: <http://fi.wikipedia.org/wiki/PCR>. Hakupäivä 15.8.2011.

Prescott, Lansing M. – Harley, John P. – Klein, Donald A. 2002. Microbiology. 5. painos. International Edition.

Proteiinisynteesi. Saatavissa: <http://wiki.helsinki.fi/display/solu/Proteiinisynteesi>. Hakupäivä 13.6.2011.

Proteiinisynteesi. Solunetti 2006. Saatavissa:

<http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/proteiinisynteesi/2/>. Hakupäivä 13.6.2011.

Protein Synthesis. Saatavissa:

http://www.accessexcellence.org/RC/VL/GG/protein_synthesis.php. Hakupäivä 22.6.2011.

Ribonucleïnezuur. 2011. Saatavissa:

<http://nl.wikipedia.org/wiki/Ribonucle%C3%AFnezuur>. Hakupäivä 4.9.2011.

Salo, Helena 1997a. Kantajavektorit. Saatavissa:

<http://materiaalit.internetix.fi/fi/opintojaksot/5luonnontieteet/biologia/geenitekniikka/kantajavektorit>. Hakupäivä 21.9.2011.

Salo, Helena 1997b. Katkaisuentyymit. Saatavissa:

<http://materiaalit.internetix.fi/fi/opintojaksot/5luonnontieteet/biologia/geenitekniikka/katkaisuentyymit>. Hakupäivä 7.10.2011.

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

Tapana, Pentti 2010. Elävä solu. Gaudeamus.

The Basics: RNA isolation. Saatavissa:

<http://www.ambion.com/techlib/basics/rnaisol/index.html>. Hakupäivä 30.1.2011.

Transcription. Saatavissa: <http://biology12-lum.wikispaces.com/Transcription--Danis+Wang>. Hakupäivä 25.10.2011.

Transformation and Phage. 2000. Saatavissa:
<http://www.biochem.arizona.edu/classes/bioc471/pages/Lecture4.html>.
Hakupäivä 13.9.2011.

Transkriptio. Solunetti 2006. Saatavissa:
http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/transkriptio_1/2/. Hakupäivä 14.6.2011.

Translaatio. Solunetti 2006. Saatavissa:
<http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/translaatio/2/>. Hakupäivä 20.6.2011.

tRNA. 2002. Saatavissa:
http://www.wiley.com/college/boyer/0470003790/structure/tRNA/trna_intro.htm.
Hakupäivä 28.10.2011.

Turpeenoja, Leena 1999. Biokemiaa: virtsa-aineesta lääkemaitoon. 3. painos.
Opetushallitus.

Ulmanen, Ismo – Tenhunen, Jukka – Yläne, Jari – Valste, Juha – Viitanen,
Pertti. 1998. Biologia: Geeni. WSOY.

Veijola, Johanna 2011. VS: Opinnäytetyöstä. Sähköpostiviesti. Vastaanottaja:
Saana-Mari Jänkälä. 22.10.2011.

Working with RNA. Saatavissa: http://www.ambion.com/techlib/tb/tb_159.html.
Hakupäivä 30.1.2011.

<http://oregonstate.edu/instruction/bb350/textmaterials/13/Slide19.jpg>.
Hakupäivä 3.10.2011.

Contents

Introduction..... 2

Storage and Stability..... 2

Binding Capacity..... 2

Kit Contents..... 3

Before Starting..... 3

Homogenization of Samples..... 5

E.Z.N.A.[™] Total RNA Midi Isolation Protocol

- Total RNA Isolation from Animal Cells..... 6
- Total RNA Isolation from Animal Tissue..... 9
- Total RNA Isolation from Heart, Muscle, and Skin Tissue..... 12
- Total RNA Isolation from Bacteria..... 14
- Optional: DNase I Digestion Protocol..... 15

Storage, Quantification and Quality of RNA..... 17

Troubleshooting..... 18

Products available for purchase separately..... 19

Δ NOTES..... 20

Introduction

The E.Z.N.A.[™] RNA family of products is an innovative system that radically simplifies the extraction and purification of RNA from a variety of sources. The key to this system is that it uses the reversible binding properties of the HiBind® Matrix (a new silica-based material) in combination with the speed of midi-column spin technology, thereby permitting single or multiple simultaneous processing of samples. There is no need for phenol/chloroform extractions, and time-consuming steps such as CsCl gradient ultracentrifugation, and precipitation with isopropanol or LiCl, are eliminated. RNA purified using the E.Z.N.A.[™] RNA Purification System is ready for applications such as RT-PCR, Northern blotting, poly A⁺ RNA (mRNA) purification, nuclease protection, and *in vitro* translation.

The E.Z.N.A.[™] Total RNA Midi Kit can purify up to 600 µg of Total RNA from cultured eukaryotic cells, tissue or bacteria. Normally, 5 x 10⁶ - 1 x 10⁸ eukaryotic cells, 5 x 10⁶ - 1 x 10¹⁰ bacterial cells, or 25-200 mg of tissue, can be processed in a single experiment. Lysis of Cells or Tissue occurs under denaturing conditions by practically inactivating RNases. After the homogenization process, samples are applied to the HiBind® RNA Midi column to which the Total RNA Binds. Cellular debris, and other contaminants are effectively washed away after a few quick wash steps. High quality RNA is finally eluted in Sterile DEPC-treated Water.

While this kit may be used for the isolation of RNA from whole blood, we recommend that you use the E.Z.N.A.[™] Blood RNA Midi Kit (Product # R6615) as it is specifically designed for effective hemolysis, and hemoglobin removal, thereby giving higher RNA yields.

Storage and Stability

All E.Z.N.A.[™] Total RNA Midi Kit components are guaranteed for at least 12 months from the date of purchase when stored at Room Temperature. During Shipment crystals may have formed in the TRK Lysis Buffer. Dissolve by warming Buffer to 37 °C.

Binding Capacity

Each HiBind® RNA Midi column can bind approximately 1mg of RNA. Using greater than 200 mg of tissue or 10⁸ cells is not recommended.

Kit Contents

Product Number	R6664-00	R6664-01	R6664-02
Purification Times	2 preps	10 preps	25 preps
HiBind® RNA Midi Columns	2	10	25
15 ml Collection Tubes	2	10	25
TRK Lysis Buffer	10 ml	40 ml	120 ml
RNA Wash Buffer I	10 ml	40 ml	110 ml
RNA Wash Buffer II	5 ml	20 ml	40 ml
DEPC Water	2 ml	5 ml	20 ml
Instruction Booklet	1	1	1

Before Starting

It is strongly advised that you familiarize yourself with the entire booklet before starting. E.Z.N.A.™ Kits are designed to be simple, fast, and reliable provided that all steps are followed diligently.

Materials and Reagents to be supplied by user

- Absolute(–96–100%) Ethanol
- Sterile RNase-free pipet tips and 15 ml centrifuge tubes
- 14.3M β-mercaptoethanol (β-ME, 2-mercaptoethanol)
- Microcentrifuge capable of at least 14,000 x g
- 70% ethanol in Sterile DEPC-treated Water.
- Disposable latex gloves

For All Protocols:

- Add 20µl of 2-mercaptoethanol (β-mercaptoethanol) per 1 ml of TRK Lysis Buffer. This mixture can be stored for 1 week at room temperature.
NOTE: 2-mercaptoethanol is the key in denaturing RNases and must be added before use.
- Please Remember to always wear latex gloves whenever working with RNA. This will minimize RNase Contamination. Use only clean RNase-free disposable plastic pipette tips when using the supplied reagents.
- During the procedure work CAREFULLY but QUICKLY.
- Under cool ambient conditions, crystals may form in TRK Lysis Buffer. This is normal; warm at 37°C to dissolve.
- **ALL CENTRIFUGATION STEPS MUST BE CARRIED OUT AT ROOM TEMPERATURE 22 °C - 25 °C.**

Specific to Protocol:

Sample Disruption and homogenization equipment. One or more of the following are required, depending on the method chosen.

- Liquid Nitrogen
- Needle and Syringe
- Mortar and pestle
- Glass Beads
- Rotor-stator Homogenizer

For Total RNA Isolation from Heart, Muscle, and Skin Tissue:

- RNase Free Proteinase K Solution, > 600mAU/ml
- Water Bath preheated to 55°C

For Total RNA Isolation from Bacteria

- RNase-free Lysozyme
- TE Buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.6, 1mM EDTA)

DNase I Digestion Protocol

- RNase-free DNase Set (product no. E1091)

Key Notes:

- Dilute RNA Wash Buffer II Concentrate with absolute ethanol as follows:

- R6664-00 Add 20 ml of absolute ethanol(96-100%) to bottle
- R6664-01 Add 80 ml of absolute ethanol (96-100%) to bottle
- R6664-02 Add 160 ml of absolute ethanol (96-100%) to bottle

Disruption and Homogenization of Samples

Efficient sample disruption and homogenization is essential for successful Total RNA isolation. Complete cell wall and plasma membrane disruption is very important for the release of all of the RNA contained in the sample. The purpose of homogenization is to reduce the viscosity of the cell lysates produced by cell disruption. Homogenization shears genomic DNA and other high molecular weight cell components thereby creating a homogenous lysate. Incomplete homogenization will reduce RNA binding to the HiBind® RNA Midi Column, and occasionally may clog the column thus resulting in lower or no yields.

Sample Disruption using a Mortar and Pestle followed by your choice of Homogenization method.

Wear gloves, and take great care when working with liquid nitrogen.

- Excise the tissue and promptly freeze in a small volume of liquid nitrogen.
- Grind the tissue with a ceramic mortar and pestle under approximately 10 ml of liquid nitrogen. Pour the suspension into a pre-cooled 15ml polypropylene tube. *The tube must be pre-cooled in liquid nitrogen or the suspension will boil vigorously possibly causing tissue loss.*
- Allow the liquid nitrogen to completely evaporate, and add TRK lysis buffer. Continue the procedure as outlined. *This is the preferred method of disrupting tissue samples.*

Using a Rotor-Stator Homogenizer for Sample Disruption and Homogenization
Can effectively simultaneously disrupt and homogenize most samples. The process usually takes less than a minute depending on your sample. Many Rotor-stator homogenizers operate with differently sized probes or generators that allow sample processing in 50ml tubes.

Using Bead Milling for Sample Disruption and Homogenization

By using bead milling, cells and tissue can be disrupted and homogenized by rapid agitation in the presence of glass beads, and a lysis buffer. The optimal amount of glass beads to use for RNA isolation are 0.5mm for yeast/unicellular cells, and 4-8mm for animal tissue samples.

Homogenization of lysate with the Syringe and Needle Method

High molecular weight DNA is responsible for the viscosity of cell lysates, and can be shredded by passing the sample 10-20 times through a narrow needle (19-21 gauge).

Isolation of Total RNA from Animal Cells

- Determine the proper amount of starting material:** It is critical to use the correct number of starting cells in order to obtain optimal yield and purity with the HiBind® RNA Midi column. The maximum number of cells that can be processed on a HiBind® RNA Midi column is dependent on the specific RNA contents and type of cell line. The maximum binding capacity of the HiBind® RNA Midi column is 1mg. The maximum number of cells that TRK Lysis Buffer can use in the Total RNA Protocol is 1×10^8 . Use the following table as a guideline to select the correct starting material.

Average Yield of Total Cellular RNA

Source	Number of cells	RNA Yield (µg)
IC21	4×10^7	850
Hela	7×10^7	1000
293HEK	6×10^7	850
HIN3T3	7×10^7	1000

- Harvest Cells** by choosing one of the following methods (do not use more than 1×10^8 cells)
 - For cells grown in suspension, **determine the number of cells. Pellet the appropriate number of cells by centrifuging at 500 x g for 5 minutes. Aspirate the supernatant** and continue with step 3 of this protocol.
 - For cells grown in a monolayer: These cells can either be lysed directly in the cell-culture dish or trypsinized and collected as a cell pellet prior to lysis. Cells grown in cell-culture flasks should always be trypsinized.
- For direct cell lysis: **Determine the cell number, and aspirate the cell-culture medium completely.** Immediately proceed to step 3.

NOTE: Not removing cell-culture medium completely will inhibit lysis and dilute the lysate. This will affect the conditions for binding of RNA to the HiBind® RNA Midi column, and may reduce RNA yield.

To trypsinize and collect cells:

Determine the cell number. Aspirate the medium and wash cells with PBS. Aspirate the PBS, and add 0.1-25% of trypsin in PBS. Add medium (containing serum to inactivate the trypsin), after the cells detach from the dish or flask. **Transfer the cells to an RNase-free glass or polypropylene centrifuge tube (not supplied), and centrifuge at 500 x g for 5 minutes. Aspirate the supernatant completely.** Proceed to step 3.

NOTE: Not removing cell-culture medium completely will inhibit lysis and dilute the lysate. This will affect the conditions for binding of RNA to the HiBind® RNA Midi column, and may reduce RNA yield.

3. **Disrupt cells** (do not use more than 1×10^8 cells) with **TRK Lysis Buffer**. **NOTE:** Remember to add 20µl of β-ME per 1ml of TRK Lysis Buffer before use.

For pelleted cells, loosen the cell pellet thoroughly by flicking the tube, and adding the appropriate amount of TRK Lysis Buffer based on the table below.

For direct lysis of cells grown in a monolayer, add the appropriate amount of TRK Lysis Buffer directly to the dish based on the table below as well.

Number of Cells	Amount of TRK Lysis Buffer (ml)
$5 \times 10^6 - 5 \times 10^7$	2
$5 \times 10^7 - 1 \times 10^8$	4

4. **Homogenize cells with a rotor-stator homogenizer or until the sample is uniformly homogenized.** Alternatively, sample can be homogenized by using the syringe and needle method as described on page 5.

NOTE: Incomplete homogenization of the sample will cause lower yields and clogging of the column. It is recommended to homogenize the sample with rotor-stator homogenizers since it normally produces better yields.

5. **Add an equal volume (2ml or 4ml) of 70% Ethanol to the lysate and mix thoroughly by vortexing. DO NOT CENTRIFUGE.** If any sample has lost its volume during homogenization, adjust the volume of ethanol accordingly.

NOTE: During RNA purification from certain cell lines, a precipitate may form after the addition of ethanol. This does not affect the procedure.

6. **Apply the sample** (including any precipitate that may have formed) to a HiBind® RNA Midi column placed into a 15ml collection tube (supplied). **Centrifuge at 4,000-5,000 x g for 5 minutes at room temperature. Discard the flow-through and proceed to the next step.**

NOTE: The maximum capacity of the HiBind® RNA Midi column is 4 ml. Larger volumes can be loaded on to the column successively in the same HiBind® RNA Midi column. Discard the flow-through after each centrifugation.

➔ **OPTIONAL:** This is the starting point if performing the optional on-column DNase I digestion. Follow the protocol as outlined on page 15, after completing step 6 of this protocol.

7. **Wash the HiBind® RNA Midi column with RNA Wash Buffer I by pipetting 3.5ml directly onto the spin column. Centrifuge at 10,000 x g for 1 minute, and discard the 15ml collection tube.**

8. **Place the HiBind® RNA Midi column into a clean 15 ml centrifuge tube. Add 3 ml of RNA Wash Buffer II diluted with absolute ethanol. Centrifuge at 4,000-5,000 x g for 5 minutes at room temperature. Discard the flow-through, and reuse the collection tube in the next step.**

9. **Wash the column as before, and use 3.5 ml of RNA Wash Buffer II diluted with absolute ethanol. Centrifuge at 4,000-5,000 x g for 5 minutes, and discard the flow-through.**

10. **With the empty 15 ml collection tube, centrifuge the HiBind® RNA Midi column for 10 minutes at 5,000 x g to completely dry the HiBind® matrix.**

11. **Elution of RNA:** Transfer the column into a clean 15 or 20 ml centrifuge tube (not supplied), and elute the RNA with 250-500µl of DEPC-treated water (supplied). **Make sure that you add the water directly onto the column matrix. Centrifuge for 5 minutes at 5,000 x g.** A second elution may be necessary if the expected yield of RNA is > 50µg. Alternatively, RNA may be eluted with a greater volume of water. While additional elutions increase Total RNA yield, the concentration will be lower since more than 80% of RNA has been recovered in the first elution. Pre-heating the water to 70°C before adding it to the column, and incubating the column for 5 minutes at room temperature before centrifugation may increase yields.

Isolation of Total RNA from Animal Tissue

1. Determine the proper amount of starting material. It is critical to use the correct number of starting cells in order to obtain optimal yield and purity with the HiBind® RNA Midi column. The maximum amount of tissue that can be processed on a HiBind® RNA Midi column is dependent on the specific RNA contents and type of tissue. The maximum binding capacity of the HiBind® RNA Midi column is 1mg. The maximum amount of tissue that TRK Lysis Buffer can use in the Total RNA Protocol is 250 mg. Use the following table as a guideline to select the correct starting material. If you have no information regarding your starting material, use 100 mg as a starting amount. Given the yield and quality of RNA obtained from 100 mg, adjust the starting amount in the next purification.

Average Yield of Total Cellular RNA

Source	Amount of Tissue	RNA Yield (µg)
Mouse		
Brain	100	100
Kidney	150	450
Liver	150	650
Heart	200	100
Spleen	150	500
Lung	100	120
Pancreas	100	400
Thymus	100	200

2. Disrupt tissue (do not use more than 250mg of tissue) with TRK Lysis Buffer. NOTE: Remember to add 20µl of β-ME per 1ml of TRK Lysis Buffer before use. Add the appropriate amount of TRK Lysis Buffer based on the table below.

Amount of Tissue (mg)	Amount of TRK Lysis Buffer (µl)
20-120	2
120-250	4

3. Homogenize the cells with a rotor-stator homogenizer or until the sample is uniformly homogenized. Alternatively, the sample can be homogenized by using the syringe and needle method as described on page 5.

NOTE: Incomplete homogenization of the sample will cause lower yields and clogging of the column. It is recommended to homogenize the sample with rotor-stator homogenizers since it normally produces better yields.
 4. Centrifuge at 4,000-5,000 x g for 10 minutes. Carefully transfer the cleared supernatant by pipetting to a clean 15 ml centrifuge tube (not supplied). Use only this supernatant (lysate) in subsequent steps.

NOTE: In some preparations, a fatty upper layer will form after centrifugation. Transferring any pellet of fatty layer may reduce RNA yields, or clog the column.
 5. Add an equal volume (2ml or 4ml) of 70% Ethanol to the lysate and mix thoroughly by vortexing. Do not centrifuge. If any sample has lost its volume during homogenization, adjust the volume of ethanol accordingly.

NOTE: A precipitate may form after the addition of ethanol in certain preparations. This does not affect the procedure.
 6. Apply the sample (including any precipitate that may have formed) to a HiBind® RNA Midi column placed into a 15ml collection tube (supplied). Centrifuge at 4,000-5,000 x g for 5 minutes at room temperature. Discard the flow-through and proceed to the next step.

NOTE: The maximum capacity of the HiBind® RNA Midi column is 800µl. Larger volumes can be loaded on to the column successively in the same HiBind® RNA Midi column. Discard the flow-through after each centrifugation.
- **OPTIONAL:** This is the starting point if performing the optional on-column DNase I digestion. Follow the protocol as outlined on page 15, after completing step 6 of this protocol.
7. Wash the HiBind® RNA Midi column with RNA Wash Buffer I by pipetting 3 ml directly onto the spin column. Centrifuge as above, and discard the 15ml collection tube.

2. **Disrupt tissue** (do not use more than 250 mg of tissue) **with 2 ml of TRK Lysis Buffer.**
NOTE: Remember to add 20µl of β-ME per 1ml of TRK Lysis Buffer before use.
3. **Homogenize cells with a rotor-stator homogenizer or until the sample is uniformly homogenized.** Alternatively, the sample can be homogenized by using the syringe and needle method as described on page 5.
NOTE: Incomplete homogenization of the sample will cause lower yields and clogging of the column. It is recommended to homogenize the sample with rotor-stator homogenizers since it normally produces better yields.
4. **Add 4ml of double distilled water to the homogenized lysate, and follow by adding 250µl of Proteinase K solution. Mix thoroughly by pipetting. Incubate at 55°C for 25 minutes.**
5. **Centrifuge at 4,000-5,000 x g for 10 minutes. Carefully transfer the cleared supernatant by pipetting to a clean 15 ml centrifuge tube (not supplied). Use only this supernatant (lysate) in subsequent steps.**
NOTE: In some preparations, a fatty upper layer will form after centrifugation. Transferring any pellet of fatty layer may reduce RNA yields, or clog the column.
6. **Add a .5 volume of absolute ethanol to the lysate and mix thoroughly by vortexing. DO NOT CENTRIFUGE.** If any sample has lost its volume during homogenization, adjust the volume of ethanol accordingly.
NOTE: A precipitate may form after the addition of ethanol in certain preparations. This does not affect the procedure.
7. **Apply the sample** (including any precipitate that may have formed) **to a HiBind® RNA Midi column placed into a 15ml collection tube (supplied). Centrifuge at 4,000-5,000 x g for 5 minutes at room temperature. Discard the flow-through and proceed to the next step.**
NOTE: The maximum capacity of the HiBind® RNA Midi column is 4 ml. Larger volumes can be loaded on to the column successively in the same HiBind® RNA Midi column. Discard the flow-through after each centrifugation.
OPTIONAL: This is the starting point if performing the optional on-column DNase I digestion. Follow protocol as outlined on page 15, after completing step 7 of this protocol.
8. **Wash the HiBind® RNA Midi column with RNA Wash Buffer I by pipetting 3 ml directly onto the spin column. Centrifuge at 4,000-5,000 x g for 5 minutes, and discard the 15ml collection tube.**

8. **Place the HiBind® RNA Midi column into a clean 15 ml centrifuge tube. Add 3ml of RNA Wash Buffer II diluted with absolute ethanol. Centrifuge at 4,000-5,000 x g for 5 minutes at room temperature. Discard the flow-through, and reuse the collection tube in the next step.**
9. **Wash the column as before except this time use 3.5ml of RNA Wash Buffer II diluted with absolute ethanol. Centrifuge at 4,000-5,000 x g for 5 minutes, and discard the flow-through.**
10. **With the empty 15 ml collection tube, centrifuge the HiBind® RNA Midi column for 10 minutes at 5,000 x g to completely dry the HiBind® matrix.**
11. **Elution of RNA:** Transfer the column into a clean 15 ml or 20 ml centrifuge tube (not supplied), and elute the RNA with 250-500µl of DEPC-treated water (supplied). Make sure that you add the water directly onto the column matrix. **Centrifuge for 5 minutes at 5,000 x g.** A second elution may be necessary if the expected yield of RNA is > 500µg.

Alternatively, RNA may be eluted with a greater volume of water. While additional elutions increase Total RNA yield, the concentration will be lower since more than 80% of RNA has been recovered in the first elution. Pre-heating the water to 70°C before adding it to the column, and incubating the column for 5 minutes at room temperature before centrifugation may increase yields.

Isolation of Total RNA from Heart, Muscle, and Skin Tissue.

Due to the rich contents of contractile proteins, connective tissue, and collagen, it is normally difficult to isolate RNA from heart, muscle, and skin tissue using the standard E.Z.N.A.™ Total RNA Midi Protocol. The following protocol is a modified version that has added Proteinase K digestion, which enables removal of the proteins described above.

1. **Determine the proper amount of starting material:** It is critical to use the correct number of starting cells in order to obtain optimal yield and purity with the HiBind® RNA Midi column. The maximum amount of tissue that can be processed on a HiBind® RNA Midi column is dependent on the specific RNA contents and type of tissue. The maximum binding capacity of the HiBind® RNA Midi column is 1mg. The maximum amount of tissue that TRK Lysis Buffer can use in the Total RNA Protocol is 250mg. If you have no information regarding your starting material, use 150 mg as a starting amount. Given the yield and quality of RNA obtained from 150 mg, adjust the starting amount in the next purification.

9. Place the HiBind® RNA Midi column into a clean 15 ml centrifuge tube. Add 3ml of RNA Wash Buffer II diluted with absolute ethanol. Centrifuge at 4,000-5,000 x g for 5 minutes at room temperature. Discard the flow-through, and reuse the collection tube in the next step.
 10. Wash the column with an additional 3 ml of RNA Wash Buffer II diluted with absolute ethanol. Centrifuge at 4,000-5,000 x g for 5 minutes, and discard the flow-through.
 11. With the empty 15 ml collection tube, centrifuge the HiBind® RNA Midi column for 10 minutes at 5,000 x g to completely dry the HiBind® matrix.
 12. Elution of RNA: Transfer the column into a clean 15 ml centrifuge tube (not supplied), and elute the RNA with 250-500µl of DEPC-treated water (supplied). Make sure that you add the water directly onto the column matrix. Centrifuge for 5 minutes at 5,000 x g. A second elution may be necessary if the expected yield of RNA is > 400 µg.
Alternatively, RNA may be eluted with a greater volume of water. While additional elutions increase Total RNA yield, the concentration will be lower since more than 80% of RNA has been recovered in the first elution. Pre-heating the water to 70°C before adding it to the column, and incubating the column for 5 min at room temperature before centrifugation may increase yields.
- room temperature). Discard the flow-through and proceed to step 6.
- **OPTIONAL:** This is the starting point if performing the optional on-column DNase I digestion. Follow protocol as outlined on page 15, after completing step 5 of this protocol.
6. Wash the column with 3ml of RNA Wash Buffer I. Centrifuge for 5 minutes at maximum speed and discard both the flow-through and collection tube.
 7. Place the spin column into a clean 15ml collection tube (supplied), and add 3 ml of RNA Wash Buffer II diluted with absolute ethanol. Centrifuge and discard the flow-through as above. Reuse the collection tube in the next step.
 8. Repeat wash step 7 with a second 3 ml Wash Buffer II. Centrifuge at 4,000-5000 x g for 5 minutes and discard the flow-through. Then empty the collection tube and centrifuge the spin cartridge for 10 minutes at 4000-5000 x g to completely dry the HiBind® matrix.
 9. Elution of RNA: Transfer the column into a clean 15 ml centrifuge tube (not supplied), and elute the RNA with 250-500µl of DEPC-treated water (supplied). Make sure that you add the water directly onto the column matrix. Centrifuge for 5 minutes at 5,000 x g. A second elution may be necessary if the expected yield of RNA is > 500 µg.

Isolating Total RNA from Bacteria

The E.Z.N.A.™ Total RNA Kit can be modified for the isolation of RNA from bacterial cultures. Only cells growing at log phase should be used. Measured at 600 nm an OD of 0.5-1.0 corresponds to ~10⁸ cells per ml. This method is suitable for no more than 10¹⁰ cells.

1. Centrifuge 5 x 10⁹ cells at 4,000 x g for 5 minutes. Discard the supernatant and add 500µl of TE buffer containing lysozyme (1 mg/ml for gram negative and 4 mg/ml for gram-positive bacteria). Resuspend the cells completely and incubate at room temperature for 7-10 minutes.
2. Add 2 ml of TRK Lysis Buffer and mix by pipetting several times. Remember to add 20µl of β-mercaptoethanol per 1 ml of TRK Lysis Buffer.
3. Centrifuge at 4000-5000 x g for 10 minutes. Transfer the cleared supernatant to a new 15ml tube.
4. Add 1.4 ml of absolute ethanol to the lysate and mix by vortexing. A precipitate may form at this point. This will not interfere with RNA purification.
5. Apply sample (~4ml) to a HiBind® RNA Midi column mounted in a clean 15ml collection tube (supplied). Centrifuge at 5,000 x g for 5 minutes (at

Optional: DNase I Digestion Protocol

Omega Bio-tek, Inc.'s RNase-Free DNase Set (product no. E1091), provides efficient on-column digestion of DNA during RNA Isolation.

Important to Note:

For most downstream applications it is not necessary to do DNase digestion due to HiBind® RNA resin and spin column technology removing nearly all DNA without the need for DNase Treatment. However, certain sensitive RNA applications might require further removal of DNA. In such case, we recommend that you please follow the outlined steps below using product E1091.

- NOTE:**
- After completing steps 1-6 of the standard protocol (making sure that all of your samples have completely passed through the HiBind® RNA Midi column), proceed with the following steps.
 1. Wash the HiBind® RNA Midi column by pipetting 1.5 ml directly into the spin column. Centrifuge at 4,000-5,000 x g for 5 minutes and discard the 15ml collection tube.

invitrogen | **DYNAL**
 invitrogen bead separations

Cat. no. **610.02**
610.05
610.50
 Rev. no. **006**

Dynabeads® Oligo (dT)₂₅

For research use only.

INDEX

1. PRODUCT DESCRIPTION

- 1.1. Intended Use
- 1.2. Principle

2. PROTOCOLS

- 2.1. Dynabeads washing procedure
- 2.2. Preparation of lysate from animal tissues, plants and cells
- 2.3. Isolation of mRNA from crude lysate
- 2.4. Purification of mRNA from total RNA
- 2.5. Regeneration and reuse of beads

3. TECHNICAL ADVICE

- 3.1. Preparation of mRNA for Downstream Applications
- 3.2. General Recommendations
- 3.3. Avoiding Contamination
- 3.4. References

4. GENERAL INFORMATION

- 4.1. Description of Materials
- 4.2. Additional Material Needed
- 4.3. Recommended Buffers/Solutions
- 4.4. Storage and Stability
- 4.5. Related Dynabeads Products
- 4.6. Warnings and Limitations
- 4.7. Trademarks and Patents
- 4.8. Intellectual Property Disclaimer
- 4.9. Limited Use Label License
- 4.10. Warranty

1. PRODUCT DESCRIPTION

1.1. Intended Use

Dynabeads® Oligo (dT)₂₅ are designed for the rapid isolation of highly purified, intact mRNA from eukaryotic total RNA or directly from crude extracts of cells, animal and plant tissues.

The isolated mRNA can be used directly in most downstream applications in molecular biology: RT-PCR, solid-phase cDNA library construction, S1 nuclease analysis, ribonuclease protection assay, primer extension, dot and slot hybridisation, in vitro translation experiments, RACE, subtractive hybridisation, northern analysis, gene cloning and gene expression analysis.

1.2. Principle

The use of Dynabeads Oligo (dT)₂₅ relies on base pairing between the poly A tail of messenger RNA and the oligo dT sequences bound to the surface of the beads (Figure 1). After annealing, the vial is placed on a magnet (DYNAL MPC™) to concentrate the beads with their bound mRNA at the side of the tube. The supernatant containing unwanted contaminants is discarded. The protocol can be performed in 15 minutes, without the need to prepare total RNA or perform any other purification steps.

The oligo dT bound to the bead surface can be used to both capture the mRNA and act as a primer for reverse transcriptase during first strand cDNA synthesis.

As the oligo dT is covalently bound to the Dynabeads surface it is possible to regenerate the Dynabeads Oligo (dT)₂₅ for reuse.

2. PROTOCOLS

Additional protocols to those presented here, as well as technical information and literature are available upon request.

2.1. Dynabeads Washing Procedure

This procedure takes approximately 10 minutes and can be carried out at a convenient interval during the mRNA purification.

1. Resuspend the Dynabeads Oligo (dT)₂₅ thoroughly in the vial to obtain a uniform brown suspension

and transfer 200 µl (1 mg) of beads to a tube.

2. Place the tube on a magnet (DYNAL MPC™) for 1-2 min. The Dynabeads Oligo (dT)₂₅ will migrate to the side of the tube nearest the magnet.
3. Remove the supernatant with a pipette while the tube remains on the magnet.
4. Remove the tube from the magnet and add 100 µl Binding Buffer to resuspend the beads. Again place the tube on the magnet for 1-2 min.
5. Remove the supernatant while the tube remains on the magnet.
6. Resuspend the beads in 100 µl Binding Buffer.

2.2. Preparation of lysate from animal tissues, plants and cells

The protocol is recommended for a sample size of 20-50 mg animal tissue, 100 mg plant tissue or 1-4 x 10⁶ cells, but can be scaled up or down to suit specific sample size requirements.

2.2.A. Preparation of lysate from solid animal and plant tissues

1. Aliquot the amount of animal or plant tissue while it is frozen. Use the specified amount of tissue, as an excess of tissue will reduce the mRNA yield and purity.
2. Grind frozen tissue in liquid nitrogen. Ensure tissue remains frozen at all times to avoid RNA degradation.
3. Transfer the frozen powder to a homogenizer containing 1 ml Lysis/Binding Buffer and homogenize for 1-2 min until the tissue has completely lysed. A rapid lysis in Lysis/Binding Buffer will prevent degradation of mRNA. If the raw extract is noticeably viscous a shear step might be helpful (see section 2.2.B step 3).
4. Spin the lysate for 30-60 seconds in a microcentrifuge to remove debris. The lysate is now ready for mRNA isolation (see section 2.3), or can be frozen and stored at -80°C for later use.

2.2.B. Preparation of lysate from cultured cells and cell suspensions

1. Wash the cell suspension in phosphate-buffered saline (PBS) and centrifuge to obtain a cell pellet. The cell pellet can be used immediately, or frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for later use. A stored cell pellet should be used directly from frozen.
2. Add 1.0 ml Lysis/Binding Buffer to the cell pellet (1-4 x 10⁶ cells). Pipette up and down a couple of times to ensure complete lysis. The release of DNA during lysis results in a viscous solution which confirms complete lysis.
3. Reduce the viscosity by a DNA-shear step. The lysate is passed three times through a 21 gauge needle using a 1-2 ml syringe. Repeated shearing may cause the lysate to foam. Foaming should however not affect the mRNA yield. The foam can be reduced by a 30 second centrifugation.
4. The lysate is now ready for mRNA isolation (see section 2.3) or can be frozen and stored at -80°C for later use.

2.3. Isolation of mRNA from crude lysate

1. Remove the solution from the washed Dynabeads Oligo (dT)₂₅ (from section 2.1) and add the lysate (from section 2.2.A or 2.2.B).
2. Mix beads and lysate. Anneal by rotating on a mixer for 3-5 min at room temperature, increase the annealing time if the solution is viscous. During this step the mRNA anneals to the oligo dT sequence.
3. Place the vial on the magnet for 2 min and remove the supernatant.

4. Wash the beads twice using the magnet to separate the beads from the supernatant, first with Washing Buffer A (0.5 - 1 ml) and then with Washing Buffer B (0.5 - 1 ml). Washing is performed at room temperature. The Dynabeads Oligo (dT)₂₅ must be mixed thoroughly in the Washing Buffer to remove contaminants which may have bound non-specifically. Make sure to remove the supernatant completely between washing steps.

5.A. If the isolated mRNA is to be used in enzymatic downstream applications whilst still bound to the beads (e.g. solid-phase cDNA synthesis), wash one extra time with Washing Buffer B (500 µl) followed by one wash with the enzymatic buffer to be used in the downstream application.

5.B. If the mRNA is to be eluted from the beads, first remove the final Washing Buffer B and add 10 - 20 µl 10 mM Tris-HCl. Incubate at 75 - 80°C for 2 min, then place the tube on the magnet and quickly transfer the supernatant containing the mRNA to a new RNase-free tube. The final yield may vary somewhat between tissues/cells depending on mRNA abundance.

2.4. Purification of mRNA from total RNA

In the below example, mRNA is purified from 75 µg of total RNA starting material.

1. Adjust the volume of the 75 µg total RNA sample to 100 µl with distilled DEPC-treated water or with 10 mM Tris-HCl pH 7.5.
2. Add 100 µl of Binding Buffer. If total RNA is more dilute than 75 µg/100 µl, then simply add an equal volume of Binding Buffer to the beads.
3. Heat to 65°C for 2 min to disrupt secondary structures. Immediately place on ice.
4. Add the 200 µl of total RNA to the 100 µl washed beads (from section 2.1). For every 75 µg total RNA use 1 mg beads which have been washed and resuspended in 100 µl of Binding Buffer.
5. Mix thoroughly and anneal by rotating continuously on a mixer for 5 min at room temperature.
6. Place the tube on the magnet for 1-2 min and carefully remove all the supernatant.

7. Remove the tube from the magnet and add 200 µl Washing Buffer B. Mix by pipetting carefully a couple of times. Again use the magnet to pull the beads to the side of the tube. Carefully remove all the supernatant.

8. Repeat the washing step as described in step 7.

9.A. If the mRNA does not need to be eluted off the beads, wash one more time using the same buffer that will be used in the downstream application, e.g. reverse transcription first strand synthesis buffer (without the enzyme). Then resuspend the beads in an appropriate volume of the downstream buffer.

9.B. If mRNA elution is required, add the desired amount (10 - 20 µl) of cold 10 mM Tris-HCl. Heat to 75-80°C for 2 min and place the tube immediately on the magnet. Quickly transfer the eluted mRNA to a new RNase-free tube.

2.5. Regeneration and reuse of Dynabeads Oligo (dT)₂₅

The oligo (dT) sequences are covalently attached to the surface of the Dynabeads. This enables single-step hybridization, and also allows regeneration of the beads for multiple use. The beads may be reused a total of four times without loss of yield. When mRNA is isolated from the same sample, the beads can be reused without regeneration.

Regeneration of Dynabeads Oligo (dT)₂₅

To avoid carry-over of mRNA between different samples the beads should be washed three times in 200 µl Reconditioning Solution by standard magnetic separation. Incubate at 65°C for 2 minutes at the first wash. Then wash using 200 µl Storage Buffer Oligo (dT)₂₅ and continue carrying out washes until the pH is below 8.0. Resuspend the beads in the desired volume of Storage Buffer Oligo (dT)₂₅. The beads are now regenerated and ready for mRNA isolation. Store the beads at 2-8°C. Do not mix regenerated beads with the original stock suspension.

Reuse on the same sample

By reusing the Dynabeads Oligo (dT)₂₅ on the same sample (without regenerating the beads) larger amounts of mRNA can be isolated. After elution of mRNA, wash the beads (original volume 200 µl) once in Lysis/Binding Buffer (300 µl). Then add the beads back to your sample for further mRNA isolation. Isolation can be repeated several times until all the mRNA is captured from the sample.

3. TECHNICAL ADVICE

3.1. Preparation of mRNA for downstream applications

For northern analysis, the mRNA can be eluted directly into a loading buffer containing formaldehyde and loaded directly onto the gel.

If the mRNA is to be used in downstream enzymatic applications (cDNA synthesis, in vitro translations experiments, RT-PCR etc.), detergents should be omitted in the final washing steps and the elution step.

Enzymatic downstream applications are not inhibited by the presence of the beads. It is possible to construct solid-phase cDNA libraries specific for a particular cell type or tissue directly on the bead-surface. The covalently linked oligo dT sequence is used both to capture the mRNA and as a primer for the reverse transcriptase to synthesise the first strand cDNA. This results in a covalently linked first-strand cDNA library.

3.2. General recommendations

- Before use, resuspend the Dynabeads Oligo (dT)₂₅ well to obtain a homogeneous dispersion of beads in solution.
- Keep the beads in liquid suspension during storage and all handling steps. Beads that are left unsuspended for a long period will dry out, leading to a possible reduction in isolation efficiency.
- The complete removal of all the buffer during washing is extremely important when working with small volumes.
- When working with cells isolated by immunomagnetic separation (IMS) using cell-specific Dynabeads, ensure that all IMS-Dynabeads are removed from the lysate before adding Dynabeads Oligo (dT)₂₅.
- We recommend the Dynabeads-mRNA complex to

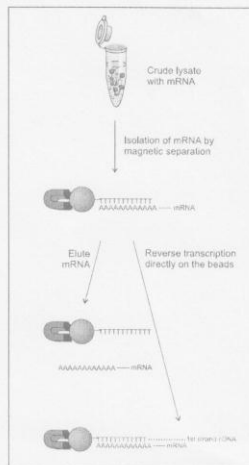


Figure 1: mRNA is isolated from crude starting material using Dynabeads Oligo (dT)₂₅. After purification the mRNA can be eluted off the bead in a small volume of appropriate buffer or used directly whilst still attached to the bead in downstream applications such as PCR, reverse transcription etc.

be used immediately for RT-PCR. If storage is necessary, elute the mRNA from the beads and freeze.

- RNases are very stable, active enzymes and generally require no cofactors to function. RNase inhibitors may be added to the protocol at any step, although this is normally not necessary. If storage of the eluted mRNA is required, addition of an RNase inhibitor at the elution step is recommended.

Please contact Invitrogen DYNAL for further technical information (see contact details).

3.3. Avoiding contamination

To obtain good preparations of eukaryotic mRNA, it is necessary to minimise the activity of RNases by creating a ribonuclease-free environment. The following precautions should be taken to avoid contamination:

Contamination by personnel

Your hands are a major source of contaminating RNases. Disposable gloves should be worn at all times during the procedure. Gloves remain RNase free only if they do not come into contact with "dirty" glassware and surfaces. Change gloves frequently when working with RNA.

Solutions

Any water and salt solutions used in RNA preparation should be RNase free, i.e. by treatment with diethylpyrocarbonate (DEPC). Wherever possible, the solutions should be treated with 0.1% DEPC for at least 1 hour at 37°C and then heated to 100°C for 15 minutes or autoclaved for 15 minutes to remove any traces of DEPC.

Tris Buffers cannot be DEPC-treated, as Tris inactivates DEPC. Solutions should be DEPC-treated and autoclaved before adding Tris. After addition of Tris, the solution should be autoclaved again. DEPC is a suspected carcinogen and should be handled with great care.

Plasticware

Sterile, disposable plasticware is essentially free of RNases and can be used for the preparation and storage of RNA without pre-treatment. General laboratory plasticware should be rinsed with chloroform.

3.4. References

- Fellmann E et al. Simplified Protocol of solid-phase cDNA libraries for multiple PCR amplification. *BioTechniques* 1996;21:766-770. (Ref. No. 1879)
- Jakobsen KS et al. Direct mRNA isolation using Magnetic Oligo(dT) Beads: A protocol for all types of cell cultures, animal and plant tissues. In *Advances in Biotechnology Separation*, Ed. Uhlen, M., Hornes, E., and Olovik, O., Eaton Publishing, 1994, pp. 61-71. (Ref. No. 1251)
- Karner EE et al. In situ isolation of mRNA from individual plant cells: Creation of cell-specific cDNA libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995;92:3814-3818. (Ref. No. 1520)
- Lambert KN, Williamson VM. NA library construction from small amounts of RNA using paramagnetic beads and PCR. *Nucleic Acids Res.* 1993;21:775-776. (Ref. No. 911)
- Raineri I et al. Improved efficiency for single-strand PCR by creating a reusable pool of first strand cDNA coupled to a solid phase. *Nucleic Acids Res.* 1991;19:4010. (Ref. No. 540)
- Rodriguez JR, Chader GJ. A novel method for the isolation of tissue-specific genes. *Nucleic Acids Res.* 1992;20:3528. (Ref. No. 715)
- Stinear T et al. Detection of a Single Viable Cryptosporidium parvum Oocyst in Environmental Water Concentrates by Reverse Transcription-PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 1996;62(9):3385-3390 (Ref. No. 1883)
- Aasheim HC et al. Subtractive hybridization for the isolation of differentially expressed genes using magnetic beads. *Methods in Molecular Biology* 1996;89:115-128. (Ref. No. 1882)
- Jose R et al. Magnetic quantitative reverse transcription PCR: A high-throughput method for mRNA extraction and quantitative reverse transcription PCR. The Australian National University, Canberra, Australia *BioTechniques* 43:206-211 (August 2007)

4. GENERAL INFORMATION

Invitrogen DYNAL AS complies with the Quality System Standards ISO 9001:2000 and ISO 13485:2003.

4.1. Description of Material

Dynabeads Oligo (dT)₂₅ are uniform superparamagnetic, monodisperse polymer particles with oligo dT sequences covalently coupled to the bead surface. The beads are supplied as a suspension of approximately 5 mg/ml in phosphate-buffered saline (PBS) pH 7.4 containing 0.02% Na₂S₂O₅ as a preservative.

The product is available in three formats: 2 x 1 ml (Cat. no. 610.02), 5 x 1 ml (Cat. no. 610.05) and 5 x 10 ml (Cat. no. 610.50)

Product Characteristics

Typical bead characteristics for any given lot of this product:

Diameter: 2.8 µm ± 0.2 µm (C.V. max 5%)

Surface area: 3-7 m²/g

Density: approx. 1.6 g/cm³

Magnetic mass susceptibility: 120 ± 25 x 10⁻⁶ m³/kg

Certificate of Analysis (CoA) is available upon request.

Binding Capacity

Up to 2 µg poly A⁺ RNA can be isolated per 200 µl (1 mg) of beads, depending on the tissue or cell type and the expression level of the mRNA. A typical mammalian cell contains about 10-20 µg of RNA of which 1-5% is mRNA. The total capacity per ml of beads is approx. 10 µg mRNA. If the same beads are reused for a total of 5 mRNA isolations (four regeneration cycles) the total capacity of 1 ml beads is up to 50 µg of mRNA.

4.2. Recommended Buffers/Solutions

All common buffers for mRNA purification and isolation can be used with Dynabeads Oligo (dT)₂₅. To take full advantage of the unique properties of the beads, the buffers described below are recommended. All buffers should be brought to room temperature prior to use, apart from the 10 mM Tris-HCl which should be kept on ice or at 2-8°C.

Binding Buffer:

20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1.0 M LiCl, 2 mM EDTA

Lysis/Binding Buffer:

100 mM Tris-HCl, pH 7.5, 500 mM LiCl, 10 mM EDTA, 1% LIDS, 5 mM dithiothreitol (DTT). If any precipitation is observed, warm to room temperature and shake until all the components are fully resuspended.

Washing Buffer A:

10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.15 M LiCl, 1 mM EDTA, 0.1% LIDS

Washing Buffer B:

10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.15 M LiCl, 1 mM EDTA

10 mM Tris-HCl, pH 7.5

Reconditioning Solution:

0.1 M NaOH

Storage Buffer Oligo (dT)₂₅:

250 mM Tris-HCl, pH 7.5, 20 mM EDTA, 0.1% Tween-20, 0.02% Na₂S₂O₅

4.3. Additional Material Needed

- Magnetic device (Dynal MPC™, Magnetic Particle Concentrator) for manual protocol. Dynal MPC™-S is recommended for 20 µl – 2 ml samples (Cat. No. 120.200)
- Mixing/rotation device allowing both tilting and rotation
- Sterile and RNase-free test tubes and pipette tips
- Buffers/solutions (see section 4.2)
- Water bath or heating block

For tissue samples:

- Liquid nitrogen
- Manual tissue grinder
- Syringe and needle

All reagents used should be analytical grade and RNase-free.

4.4. Storage and Stability

When stored unopened at 2-8°C, this product is stable until the expiration date stated on the label. Do not freeze the product. Resuspend well before use.

Store opened vials in an upright position and avoid bacterial contamination. Do not store the Dynabeads in distilled water. Keep Dynabeads in liquid suspension during storage and all handling steps, as drying will result in reduced performance. If the beads dry out, resuspend them in the buffer in which they are supplied and leave to mix continuously overnight at 4°C. This treatment will completely restore their function.

Dynabeads Oligo (dT)₂₅ are stable over a pH range of 4-13.

4.5. Related Dynabeads Products

Dynabeads Oligo (dT)₂₅ are also available as the key component in ready-to-use kits:

Cat. no. Product Description

- 610.11/12 Dynabeads® mRNA DIRECT™ Kit
- for mRNA isolation directly from crude extracts of animal tissues, cells and plants.
- 610.21 Dynabeads® mRNA DIRECT™ Micro Kit
- for mRNA isolation from micro-sized samples (up to 2.5 x 10⁴ mononuclear cells, 1 x 10⁴ cultured cells or 5 mg tissue). This kit offers a fast and simple way to combine poly A⁺ RNA isolation and RT-PCR.
- 610.06 Dynabeads® mRNA Purification Kit
- for isolation of mRNA starting from total RNA.

4.6. Warnings and Limitations

This product is for research use only. Not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use unless otherwise stated.

This product contains 0.02% sodium azide (NaN₃) as a preservative. Sodium azide may react with lead and copper plumbing to form highly explosive metal azides. When disposing through plumbing drains, flush with large volumes of water to prevent azide buildup. Preservatives such as sodium azide are toxic if ingested. Avoid pipetting by mouth.

The suspension of Dynabeads Oligo (dT)₂₅ is produced and quality controlled to be ribonuclease-free and thoroughly tested for optimal performance. Precautions should be taken to prevent RNase contamination of opened vials. Standard methods must be taken to prevent contamination by RNases during the preparation of mRNA. Follow appropriate laboratory guidelines.

Material Safety Data Sheet (MSDS) is available at www.invitrogen.com.

Certificate of Analysis (CoA) is available upon request

4.7. Trademarks and Patents

Dyna®[®], Dynabeads®, Dynal MPC™ and mRNA DIRECT™ are either registered trademarks or trademarks of Invitrogen DYNAL AS, Oslo, Norway. Any registration or trademark symbols used herein denote the registration status of trademarks in the United States. Trademarks may or may not be registered in other countries.

Eppendorf® is a registered trademark of Eppendorf - Netheler-Hinz GmbH, Germany.

Pellet Pestle™ is a registered trademark of Kontes Biotechnology, Vineland, NJ, USA.

4.8. Intellectual Property Disclaimer

Invitrogen DYNAL will not be responsible for violations or patent infringements that may occur with the use of our products.

4.9. Limited Use Label License

The purchase of this product conveys to the buyer the non-transferable right to use the purchased amount of the product and components of the product in research conducted by the buyer (whether the buyer is an academic or for-profit entity). The buyer cannot sell or otherwise transfer (a) this product (b) its components or (c) materials made using this product or its components to a third party or otherwise use this product or its components or ma-

terials made using this product or its components for Commercial Purposes. The buyer may transfer information or materials made through the use of this product to a scientific collaborator, provided that such transfer is not for any Commercial Purpose, and that such collaborator agrees in writing (a) not to transfer such materials to any third party, and (b) to use such transferred materials and/or information solely for research and not for Commercial Purposes. Commercial Purposes means any activity by a party for consideration and may include, but is not limited to: (1) use of the product or its components in manufacturing; (2) use of the product or its components to provide a service, information, or data; (3) use of the product or its components for therapeutic, diagnostic or prophylactic purposes; or (4) resale of the product or its components, whether or not such product or its components are resold for use in research. Invitrogen Corporation will not assert a claim against the buyer of infringement of patents owned or controlled by Invitrogen Corporation which cover this product based upon the manufacture, use or sale of a therapeutic, clinical diagnostic, vaccine or prophylactic product developed in research by the buyer in which this product or its components was employed, provided that neither this product nor any of its components was used in the manufacture of such product. If the purchaser is not willing to accept the limitations of this limited use statement, Invitrogen is willing to accept return of the product with a full refund. For information on purchasing a license to this product for purposes other than research, contact

Licensing Department,
Invitrogen Corporation,
1600 Faraday Avenue, Carlsbad,
California 92008.
Phone (760) 603-7200.
Fax (760) 602-6500.
Email: outlicensing@invitrogen.com

4.10 Warranty

The products are warranted to the original purchaser only to conform to the quantity and contents stated on the vial and outer labels for the duration of the stated shelf life. Invitrogen DYNAL's obligation and the purchaser's exclusive remedy under this warranty is limited either to replacement, at Invitrogen DYNAL's expense, of any products which shall be defective in manufacture, and which shall be returned to Invitrogen DYNAL, transportation prepaid, or at Invitrogen DYNAL's option, refund of the purchase price.


Claims for merchandise damaged in transit must be submitted to the carrier.

This warranty shall not apply to any products which shall have been altered outside Invitrogen DYNAL, nor shall it apply to any products which have been subjected to misuse or mishandling. ALL OTHER WARRANTIES, EXPRESSED, IMPLIED OR STATUTORY, ARE HEREBY SPECIFICALLY EXCLUDED, INCLUDING BUT NOT LIMITED TO WARRANTIES OF MERCHANTABILITY OR FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE. Invitrogen DYNAL's maximum liability is limited in all events to the price of the products sold by Invitrogen DYNAL. IN NO EVENT SHALL INVITROGEN DYNAL BE LIABLE FOR ANY SPECIAL, INCIDENTAL OR CONSEQUENTIAL DAMAGES. Some states do not allow limits on warranties, or on remedies for breach in certain transactions. In such states, the limits set forth above may not apply.

Invitrogen DYNAL is a part of the Invitrogen Group.

Contact details for your local Invitrogen sales office/technical support can be found at <http://www.invitrogen.com/contact>

© Copyright 2008 Invitrogen DYNAL AS, Oslo, Norway. All rights reserved.
SPEC-05647


FINNZYMES
Phusion™
 RT-PCR Kit
Product codes:

F-546S, 20 reactions (cDNA synthesis in 20 µl, PCR in 50 µl)
 F-546L, 100 reactions (cDNA synthesis in 20 µl, PCR in 50 µl)

Stable for one year from the packaging date. Store at -20°C.

1. Introduction

Finnzymes' Phusion™ RT-PCR Kit is a complete kit designed for performing cDNA synthesis and PCR in two steps using RNA as a starting template. The kit includes all necessary reagents for both cDNA synthesis and DNA amplification.

In the cDNA synthesis step, RNA is transcribed by Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (M-MuLV RT) to its complementary DNA (cDNA). Examples of RNA that may be used as a starting material are total RNA, mRNA, viral RNA, as well as *in vitro* transcribed RNA. The reverse transcriptase utilized in this kit has intrinsic RNase H activity. This simplifies the cDNA synthesis protocol as it renders a separate RNase treatment step unnecessary. For the subsequent amplification of the cDNA template, Phusion Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase is provided. It is a proofreading DNA polymerase providing extreme processivity, accuracy and specificity in the amplification step.

2. Kit components

	Conc.	F-546S	F-546L
RT enzyme mix (M-MuLV RNase H ⁺ RT + RNase inhibitor)		1 x 40 µl	1 x 200 µl
10x RT Buffer (includes 50 mM MgCl ₂ *)		1 x 1.5 ml	1 x 1.5 ml
Oligo(dT) ₁₈ primers	100 ng/µl	1 x 20 µl	1 x 100 µl
Random primers (hexamers)	50 ng/µl	1 x 20 µl	1 x 100 µl
dNTP Mix	10 mM	1 x 40 µl	2 x 100 µl
Phusion™ Hot Start DNA Polymerase	2U/µl	1 x 10 µl	1 x 50 µl
5x Phusion™ HF Buffer		1 x 1.5 ml	1 x 1.5 ml
Control RNA with carrier	10 ng MS2 RNA/µl	1 x 20 µl	1 x 20 µl
Control primer mix	25 µM each	1 x 20 µl	1 x 20 µl

* Provides 5 mM MgCl₂ in 1x reaction concentration.

3. General considerations

3.1 cDNA synthesis

3.1.1 RNA template

The integrity and purity of the isolated RNA is crucial for a successful RT-PCR. Therefore, special attention should be paid when isolating the RNA template to ensure that it is free of any contaminating RNase and DNA. To avoid RNase contaminants, RNA isolation should be performed under RNase-free conditions. This can be done by wearing gloves and using sterile tubes and pipet tips. Examples of potential sources for RNase contamination could be glassware, plasticware, or reagent solutions.

Water used for the reactions should be RNase-free; however, DEPC treated water is not recommended because traces of DEPC can inhibit the PCR step. Contaminating DNA in the RNA preparation may be removed by RNase-free DNase I treatment. This should be done especially if primers for the PCR step cannot be designed in exon-exon boundaries or in separate exons. The purity of RNA can be determined by measuring the ratio of A₂₆₀/A₂₈₀. The optimal ratio is 1.8 - 2.0.

3.1.2 M-MuLV RNase H⁺ Reverse Transcriptase

M-MuLV RNase H⁺ (plus) Reverse Transcriptase (M-MuLV RT) used for cDNA synthesis in this kit is an RNA-directed DNA polymerase. This enzyme can synthesize a complementary DNA strand initiating from a primer using either a single-stranded RNA or a single-stranded DNA as a template.

The RNase H activity in the enzyme degrades RNA in the RNA-cDNA hybrid. This simplifies the RT-PCR protocol because, due to the RNase H activity, it is unnecessary to perform a separate RNase treatment step after cDNA synthesis.

3.1.3 RNase inhibitor

M-MuLV RT enzyme mix contains an RNase inhibitor. Its function is to inhibit contaminating RNases that may be present in the RNA preparation. It does not affect the intrinsic RNase H activity of the M-MuLV RT.

3.1.4 RT primers

Oligo(dT) primers, random primers, or gene-specific primers can be used for the RT step. Oligo(dT) primers and random primers are useful if several different amplicons need to be analyzed from a small amount of starting material. Gene-specific primers transcribe only specific sequences; in some cases their use may decrease background signal.

Use of oligo(dT) primers is recommended over random primers and gene-specific primers when using this kit. Oligo(dT) primers transcribe poly(A)⁺ RNAs. These include eukaryotic mRNAs and retroviruses with poly(A)⁺ tails. For amplicons that are located at the 5' end of the transcript, and for transcripts that don't contain a poly(A)⁺ tail, it is recommended that random primers be used. Random primers are used to transcribe all RNA, producing cDNA, thereby covering the whole transcript. To obtain optimal results, especially with long amplicons, the ratio of RNA and random primers may require optimization. Gene-specific primers are used to transcribe only the particular RNA of interest.

3.2 PCR

3.2.1 DNA polymerase

The DNA polymerase included in the Phusion RT-PCR Kit is Phusion Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase. It is a proofreading DNA polymerase, which contains a unique processivity-enhancing domain. This domain makes the enzyme extremely processive, accurate and rapid. The error rate for Phusion Hot Start DNA Polymerase (4.4 x 10⁻⁷ as determined with a modified *lacI*-based method¹) is approximately 52-fold lower than that of *Thermus aquaticus* DNA polymerase.

Phusion Hot Start DNA Polymerase utilizes a reversibly binding Affibody® protein.^{2,3} This protein inhibits DNA polymerase activity at ambient temperatures, thus inhibiting the amplification of non-specific products. In addition, the Affibody protein blocks the 3'→5' exonuclease activity of the polymerase preventing degradation of primers and template DNA during reaction setup. At polymerization temperatures, the Affibody protein dissociates from the polymerase, rendering the enzyme fully active.

Phusion Hot Start DNA Polymerase possesses the following activities: 5'→3' DNA polymerase activity and 3'→5' exonuclease activity. When cloning fragments amplified with Phusion Hot Start DNA Polymerase, blunt end cloning is recommended. If TA cloning is required, it can be performed by adding A overhangs to the blunt PCR product with DyNAzyme™ II DNA Polymerase (F-501), for example. However, before adding the overhangs it is very important to remove all Phusion Hot Start DNA Polymerase by purifying the PCR product carefully. Any remaining Phusion Hot Start DNA Polymerase will degrade the A overhangs, creating

blunt ends again. A detailed protocol for TA cloning of PCR fragments amplified with any of the Phusion DNA Polymerases can be found on Finnzymes' website (www.finnzymes.com).

3.2.2 cDNA template

The cDNA synthesis reaction mixture may be used directly as a source for template in the PCR reaction. Prior purification of the cDNA is not required. The volume of the cDNA reaction mixture used should not exceed 10 % of the final PCR reaction volume. Elevated volumes of template may reduce the efficiency of the DNA amplification. Usually, 1-5 μ l or less of the cDNA synthesis reaction mixture is sufficient in a 50 μ l PCR reaction.

3.2.3 PCR primers

Careful primer design is important in order to minimize non-specific primer annealing and formation of primer-dimers. PCR primers should be designed to anneal to sequences in two exons on opposite sides of the intron. This design enables differentiation by size between amplified cDNA and contaminating genomic DNA. Very long introns prevent amplification of the genomic target. Alternatively, primers can be designed to anneal to the exon-exon boundary of the mRNA. With such primers, amplification of genomic DNA will be highly inefficient.

With Phusion Hot Start DNA Polymerase, use primers with melting temperature (T_m) 60°C or higher. The T_m values should be calculated with the nearest-neighbor method,⁴ because results from primer T_m calculations can vary significantly depending on the method used. Instructions for T_m calculation and a link to a calculator using the nearest-neighbor method can be found on Finnzymes' web site (www.finnzymes.com).

4. Protocol for cDNA synthesis

4.1 Guidelines for reverse transcription

- Use gloves and RNase free plasticware to prevent RNase contamination.
- Prepare premixes to avoid pipetting very small volumes.
- Pipet all components on ice.
- Reaction volume in cDNA synthesis is 20 μ l.
- Use up to 1 μ g of RNA template. The minimum amount depends on both the template and the primers used.
- Recommended primer amounts in a 20 μ l reaction:
 - 100 ng oligo(dT) primers (can be increased up to 1 μ g) or
 - 50 ng random primers (may require optimization) or
 - 5 pmol (2-10 pmol) gene-specific primers.

Note: When determining the amount of RNA template, the expression level of the target RNA molecule should be considered, as it affects the subsequent PCR step. The volume of the cDNA reaction mixture used as a source for template in PCR should not exceed 10 % of the final PCR reaction volume. A high RNA concentration in the PCR may also inhibit the reaction.

4.2 Protocol

It is recommended that control reactions be performed in parallel with all experiments. Control RNA and primers are provided with the kit. The setup for controls is given in chapter 6.

1. Thaw template RNA, 10x RT buffer, dNTPs and primers. Mix the individual solutions to assure homogeneity and centrifuge briefly before pipetting.

2. Combine the following components in reaction tubes

Template RNA	x μ l (Up to 1 μ g)
10 mM dNTP mix	1 μ l
Oligo(dT) primer*	1 μ l
RNase-free H ₂ O	Add to 10 μ l

* Alternatively, random primers (1 μ l of the 50 ng/ μ l stock, provided with the kit), or gene-specific primers (volume depends on the concentration of the primer stock) can be used. See 4.1.

3. Incubate at 65°C for 5 minutes to predenature the RNA.

4. Place the reaction tubes on ice and add to each tube

10x RT buffer	2 μ l
RT enzyme mix	2 μ l
RNase-free H ₂ O	6 μ l

5. Program a thermal cycler as outlined in **Table 1**.

6. Place tubes in the cycler and start the program.

Table 1. Cycler protocol for cDNA synthesis.

Step	Temperature	Time
Primer extension	25°C	10 min
cDNA synthesis	40°C	30 min
Reaction termination	85°C	5 min
Cooling of the sample	4°C	Hold

4.3 Notes about cDNA synthesis conditions

4.3.1 Predenaturation

A separate RNA denaturation step is recommended. The denaturation step "5 minutes at 65°C" should be performed before adding the RT buffer and reverse transcriptase to the reaction.

4.3.2 Primer extension

The incubation for 10 minutes at 25°C extends oligo(dT) and random primers before the actual cDNA synthesis. Without the incubation at 25°C, the primers may dissociate from the template when the temperature is increased. When using gene-specific primers, this extension step is not necessary.

4.3.3 cDNA synthesis

Incubation at 40°C will work for most templates, but the incubation temperature can be optimized between 37-48°C, if necessary. Increasing the temperature can be helpful if the template has strong secondary structures. A higher temperature can also improve specificity if gene-specific primers are used. Incubation above 48°C is not recommended.

In most cases, incubation for 30 minutes is sufficient. If the target is located near the 5' end of a long transcript and oligo(dT) priming is used, or if the target is rare, cDNA synthesis time can be extended up to 60 min.

4.3.4 Reaction termination

The termination step at 85°C inactivates the M-MuLV RT. This prevents the reverse transcriptase from inhibiting the subsequent PCR reaction. **Note:** A separate RNase H treatment is not required. The cDNA can be directly used as a template in the subsequent PCR or stored at -20°C, if not used immediately.

5. Amplification of the cDNA template

5.1 Guidelines for PCR

- Carefully mix and centrifuge all tubes before opening to improve recovery.
- PCR setup can be done at room temperature.
- Prepare a master mix for the appropriate number of samples to be amplified.
- The DNA polymerase should be pipetted carefully and gently, otherwise the high glycerol content (50 %) in the storage buffer may lead to pipetting errors.

5.2 Protocol

Table 2. Pipetting instructions (add items in this order).

Component	Volume / 50 µl reaction	Final conc.
H ₂ O	add to 50 µl	
5x Phusion™ HF Buffer	10 µl	1x
10 mM dNTPs	1 µl	200 µM each
primer A	x µl	0.5 µM
primer B	x µl	0.5 µM
cDNA synthesis reaction mixture	x µl	Max 5 µl (see 3.2.2)
Phusion™ Hot Start DNA Polymerase	0.5 µl	0.02 U/µl

5.3 Cycling conditions

Table 3. Cycling instructions.

Cycle step	Temp.	Time	Cycles
Initial denaturation	98°C	30 s	1
Denaturation	98°C	10 s	25-40
Annealing (see 5.4.3)	X°C	5-10 s	
Extension	72°C	40 s / 1 kb	
Final extension	72°C 4°C	5 min hold	1

5.4 Notes about cycling conditions

5.4.1 Initial denaturation

Initial denaturation should be done at 98°C, although even higher temperatures can be used. 30 seconds at 98°C is recommended for most templates. This step can be extended up to 3 minutes, if necessary.

5.4.2 Denaturation

Keep the denaturation step as short as possible. 10 seconds at 98°C is adequate for most templates.

5.4.3 Primer annealing

With Phusion Hot Start DNA Polymerase, use primers with T_m 60°C or higher. Basic rules for primer annealing are: For primers >20 nt, anneal for 5 seconds at a T_m +3°C of the lower T_m primer. For primers ≤20 nt, use an annealing temperature equal to the T_m of the lower T_m primer. If necessary, use a temperature gradient to find the optimal annealing temperature for each template-primer pair combination. The annealing gradient should extend up to the extension temperature (two-step PCR). Two-step cycling without an annealing step is recommended for high T_m primer pairs.

5.4.4 Extension

Extension should be performed at 72°C. For cDNA templates, 40 seconds per 1 kb is recommended. However, many cDNA amplicons can be successfully amplified using even shorter extension times (15-30 seconds per 1 kb).

5.4.5 Number of cycles

The number of cycles required is dependent on the abundance of the original target RNA. Usually 25 cycles in PCR is adequate. If the target RNA is rare or if only a small amount of starting material is available, it may be helpful to increase the number of cycles to 35-40.

6. Control reactions

To monitor RT-PCR reactions and to facilitate optimization and possible troubleshooting, it is recommended to perform positive and negative control reactions in parallel with all experiments.

Before starting, see chapters 4.1 and 5.1 for guidelines for reaction setups. Control RNA and control primer mix are provided with the kit. Control RNA is MS2 viral RNA including a carrier RNA. A 1011 bp sequence in the viral RNA is amplified with the control primer mix.

6.1 Positive control reaction

6.1.1 cDNA synthesis

Table 4. Pipetting instructions (add items in this order).

Component	Volume / 20 µl reaction
H ₂ O	13 µl
Control RNA	1 µl
Random primers (50 ng/µl)	1 µl
10 mM dNTPs	1 µl
10x RT Buffer	2 µl
RT enzyme mix	2 µl

Table 5. Cycler protocol for cDNA synthesis step.

Step	Temperature	Time
Primer extension	25°C	10 min
cDNA synthesis	40°C	30 min
Reaction termination	85°C	5 min
Cooling of the sample	4°C	Hold

Note: With the positive control reaction, RNA predenaturation step is not necessary due to low complexity of the control RNA.

6.1.2 Amplification of the control cDNA template

Table 6. Pipetting instructions (add items in this order).

Component	Volume / 50 µl reaction
H ₂ O	32.5 µl
5x Phusion™ HF Buffer	10 µl
10 mM dNTPs	1 µl
Control primer mix	1 µl
cDNA from 6.1.1	5 µl
Phusion™ Hot Start DNA Polymerase	0.5 µl

Table 7. Cycling instructions (two-step protocol).

Cycle step	Temp.	Time	Cycles
Initial denaturation	98°C	30 s	1
Denaturation	98°C	10 s	25
Extension	72°C	40 s	
Final extension	72°C 4°C	5 min hold	1

6.2 Negative control reaction (minus RT control)

Set up an identical reaction with your application, except do not add the RT enzyme mix. This negative control is performed to detect potential DNA contamination. No PCR product should be visible in a negative control reaction.

7. Troubleshooting

No amplification product or low product yield	
Possible causes	Comments and suggestions
Error in cyclor set-up	<ul style="list-style-type: none"> Check that instrument settings correspond with the experiment.
Missing components (e.g. primers or template) or a pipetting error	<ul style="list-style-type: none"> Check the assembly of the reaction. Check the concentrations and storage conditions of the reagents.
RNA is degraded or of poor quality	<ul style="list-style-type: none"> Verify the integrity of RNA by gel electrophoresis. Replace the RNA if necessary. Isolate the RNA in the presence of RNase inhibitors and ensure that reagents, tips and tubes are RNase-free.
Inhibitors are present in RNA preparation	<ul style="list-style-type: none"> Reduce the volume of the RNA template in cDNA synthesis reaction. Remove inhibitors in the RNA preparation by ethanol precipitation. Note: Inhibitors of cDNA synthesis reaction include SDS, EDTA, guanidium salts, formamide, sodium phosphate, and spermidine. Decrease the amount of cDNA added to PCR reaction.
Incorrect temperature in cDNA synthesis reaction	<ul style="list-style-type: none"> The recommended temperature in cDNA synthesis step is 40°C. It can be optimized between 37–48°C.
RNase contamination	<ul style="list-style-type: none"> Maintain aseptic conditions, include RNase inhibitors in RNA isolation.
Not enough starting template	<ul style="list-style-type: none"> Increase the amount of template RNA (up to 1 µg).
RNA target is rare or long	<ul style="list-style-type: none"> Increase the length of cDNA synthesis step to 60 minutes. Increase the number of cycles in the PCR.
Incomplete synthesis of target cDNA because of the secondary structures in the RNA template	<ul style="list-style-type: none"> Make sure that the RNA predenaturation step was included in the protocol. Optimize the temperature of cDNA synthesis step to between 37–48°C. Try another priming method. If random primers were used, optimize the RNA/primer ratio.
PCR reaction conditions not optimal	<ul style="list-style-type: none"> Optimize annealing temperature and/or extension time varying both individually. Increase the number of amplification cycles. Set extension time for 40 seconds per 1 kb of target length. Redesign PCR primers. (See 3.2.3).
Target sequence not present in RNA preparation	<ul style="list-style-type: none"> Redesign experiment or try isolating target RNA from another source.
Low specificity	
Possible causes	Comments and suggestions
Incomplete synthesis of target cDNA because of the secondary structures in the RNA template	<ul style="list-style-type: none"> Make sure that the RNA predenaturation step was included in the protocol. Optimize the temperature of cDNA synthesis step to between 37–48°C. Try another priming method. If random primers were used, optimize the RNA/primer ratio.
PCR reaction conditions not optimal	<ul style="list-style-type: none"> Increase the annealing temperature or perform a temperature gradient PCR. Titrate the template amount (max 10 % of the final PCR reaction volume). Optimize extension time. Increase magnesium chloride concentration.
Primer design not optimal	<ul style="list-style-type: none"> Make sure primers are not self-complementary or complementary to each other. Verify that the primers are designed to be complementary to the appropriate strands. Try longer primers.
RNA or DNA contamination	<ul style="list-style-type: none"> Use aerosol resistant tips to reduce cross-contamination during pipetting. Use separate work areas and pipettes for pre- and post-amplification. Always wear gloves and change them often. Make aliquots of all reagents used and use one aliquot for one experiment only.

Unexpected bands after electrophoresis	
Possible causes	Comments and suggestions
RNA preparation is contaminated with genomic DNA	<ul style="list-style-type: none"> Verify the presence of contaminating DNA by performing minus RT control. Treat the RNA preparation with RNase-free DNase I. Redesign the primers to anneal to sequences in the exon-exon boundary or separate exons in the target gene.
Multiple target sequences exist in the RNA preparation.	<ul style="list-style-type: none"> Design new primers. Very sensitive PCR amplification may also detect rare, alternatively spliced variants.

8. References

- Frey & Suppmann (1995) *Biochemica* 2, 34-35.
- Nord *et al.* (1997) *Nature Biotechnol.* 15, 772-777.
- Wikman *et al.* (2004) *Protein Eng., Des. Sel.* 17, 455-462.
- Breslauer *et al.* (1986) *PNAS* 83, 3746-3750.

Shipping and storage

The Phusion RT-PCR Kit is shipped on gel ice. Upon arrival, store all kit components at -20°C. All the kit components can be refrozen and stored at -20°C without affecting the performance of the kit. The kit is stable for one year from the date of packaging when stored and handled properly.

Warranty

Finzymes Oy warrants that this product will meet the specifications stated on the technical data section of this data sheet, and Finzymes Oy agrees to replace the product free of charge if the product does not conform to the specifications. Notice for replacement must be given within 60 days. In consideration of the above promises by Finzymes Oy, the buyer agrees to and accepts the following conditions:

- That this warranty is in lieu of all other warranties, express or implied.
- That ALL WARRANTIES OF MERCHANT ABILITY OR OF FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE ARE HEREBY EXCLUDED AND WAIVED.
- That the buyer's sole remedy shall be to obtain replacement of the product free of charge from Finzymes Oy; and
- That this remedy is in lieu of all other remedies or claims for damages, consequential or otherwise, which the buyer may have against Finzymes Oy.

Exclusive terms of sale. Finzymes Oy does not agree to and is not bound by any other terms or conditions, unless those terms and conditions have been expressly agreed to in writing by a duly authorized officer of Finzymes Oy. Prices are subject to change without notice.

Recommended guidelines for safe use of the products. Finzymes Oy recommends that the buyer and other persons using this product follow the N.I.H. guidelines published in the Federal Register, Volume 41, No. 131, July 7, 1976, and any amendments thereto. Finzymes Oy disclaims any and all responsibility for any injury or damage which may be caused by the failure of the buyer or any other person to follow said guidelines.

Research use only. Since these products are intended for research purposes by qualified persons, the Environmental Protection Agency does not require us to supply Premanufacturing Notice.

Notice to user. The information presented here is accurate and reliable to the best of our knowledge and belief, but is not guaranteed to be so. Nothing herein is to be construed as recommending any practice or any product in violation of any patent or in violation of any law or regulation. It is the user's responsibility to determine for himself or herself the suitability of any material and/or procedure for a specific purpose and to adopt such safety precautions as may be necessary.

Phusion™ DNA Polymerases Notice to Purchaser: Limited license. The purchase price of this product includes a limited, non-transferable license under U.S. and foreign patents (5,500,363 and 5,352,778) owned by New England Biolabs, Inc. to use this product. No other license under these patents is conveyed expressly or by implication to the purchaser by the purchase of this product. The purchase price of this product includes a limited, non-transferable license under U.S. and foreign patents owned by BIO-RAD Laboratories, Inc., to use this product. No other license under these patents is conveyed expressly or by implication to the purchaser by the purchase of this product.

Phusion is a trademark of Finzymes Oy. Affibody is a registered trademark of Affibody AB, Sweden. This product is sold under license from Affibody AB, Sweden. The quality system of Finzymes Oy is certified according to standard SFS-EN ISO9001:2000.

Version 1.1, April 2008

 **FINNZYMES**
 TOOLS FOR MOLECULAR BIOLOGY
 FINNZYMES OY
 Keilaranta 16 A, 02150 Espoo, Finland
 Tel. +358 9 584 121
 Fax +358 9 5841 2200
 fz@finnzymes.fi, www.finnzymes.com