

Opinnäytetyö (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikka

Biotekniikka

2012

Ilaf Bilal

FNR-ISOENTSYYMIEN YLITUOTTO LITURUOHON KLOOROPLASTISSA



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Ilaf Bilal

FNR-ISOENTSYYMIEN YLITUOTTO LITURUOHON KLOOROPLASTISSA

Arabidopsis thaliana, lituruoho, toimii kasvikunnan malliorganismina muun muassa fotosynteesireaktioiden tutkimisessa. Fotosynteesireaktioissa vihreät kasvit tuottavat kloroplasteissaan vedestä ja hiilidioksidista auringon energian avulla happea ja sokeria. FNR (Ferredoksiini-NADP⁺-oksidoreduktaasi-entsyymi) osallistuu fotosynteesissä elektroninsiirtoreaktioihin pelkistämällä NADP⁺:n NADPH-molekyyliksi, jota käytetään ATP:n kanssa hiilensidontareaktioissa.

Lituruohon genomissa kaksi eri geeniä *At5g66190* (*FNR1*) ja *At1g20020* (*FNR2*) koodaavat kloroplastiin ohjautuvia FNR-isoentsyymejä. Molempia isoentsyymejä esiintyy villityypin kasveilla kloroplastissa sekä liukoisessa muodossa että kiinnittyneinä tylakoidikalvoon. *fnr1*-poistogeenisellä kasveilla *FNR1*-geeni on keskeytetty, jonka seurauksena FNR1-proteiinia ei tuoteta mutta *FNR2*-proteiinia esiintyy kloroplastin stroomassa. *fnr2*-poistogeeniset kasvit eivät tuota *FNR2*-proteiinia mutta *FNR1*-proteiinia esiintyy kloroplastin stroomassa ja tylakoidikalvoilla.

Opinnäytetyön tarkoituksena on valmistaa *FNR1* yliekspressiolinja *fnr2*-poistogeeniseen taustaan ja *FNR2* yliekspressiolinja *fnr1*-poistogeeniseen taustaan. Yliekspressiolinjoissa tuotetaan ylimäärin kyseistä FNR-isoentsyymiä. Yliekspressiolinjoja tutkimalla pyritään selvittämään johtuuko mutanttikasvien fenotyyppi FNR:n alhaisesta totaalmäärästä vai ainoastaan toisen isoentsyymin puuttumisesta. Samalla kerätään lisätietoa fotosynteesimekanismeista.

Yliekspressiolinjoja tuotetaan käyttämällä yhdistelmä-DNA-tekniikan menetelmiä. *E. coli* DH10B-linjan DKLAT5g66190- ja DKLAT1g20020-plasmideissa olevat *FNR*-geenit eristetään ja liitetään agrobakteerissa toimivaan pGWR8-plasmidiin. pGWR8-konstruktit transformoidaan agrobakteeriin, joka luonnostaan pystyy infektoimaan kasveja Ti-plasmidinsa avulla. Infektoituneet kasvit voidaan erottaa muista kasveista pGWR8-plasmidissa olevan antibioottiresistenssikasetin avulla kasvattamalla kasvin siemeniä selektiivisellä kasvatusalustalla. Vain mutatoituneet siemenet voivat kasvattaa alustalla juuria ja ne voidaan siten siirtää mullalle kasvamaan. Agrobakteerivälitteisen transformaation tuloksena saadaan kaksi mutanttikasvia, yksi tuottaa ylimäärin *FNR1*- isoentsyymiä ja toinen *FNR2*-isoentsyymiä. Homotsygoottisia kasveja tutkitaan myöhemmin muun muassa proteiinitasolla immunoblottauksella.

ASIASANAT:

Arabidopsis thaliana, lituruoho, kloroplasti, fotosynteesi, FNR, yhdistelmä-DNA-tekniikka, agrobakteeri

Ilaf Bilal

OVEREXPRESSION OF FNR ISOENZYME IN CHLOROPLAST OF *ARABIDOPSIS THALIANA*

Arabidopsis thaliana, thale cress, is a model organism for the research of photosynthetic reactions. In photosynthesis plants use water and carbon dioxide to produce oxygen and sugar by using sunlight as the energy source. FNR (ferredoxin-NADP⁺-oxidoreductase enzyme) is involved in electron transfer reactions by reducing NADP⁺ into an NADPH molecule which is then used together with ATP in carbon fixation reactions.

The chloroplast-targeted FNR isoforms are encoded by two genes, *AT5g66190* (*FNR1*) and *At1g20020* (*FNR2*). In wild type plants both isoforms are present in chloroplast stroma and thylakoid membrane. *fnr1* mutant line plants lack the production of FNR1 protein whereas FNR2-protein is present in the chloroplast stroma. Correspondingly, *fnr2* mutant line plants lack FNR2 protein production, but FNR1 protein is present in the stroma and at the thylakoid membrane.

The objective of this thesis was to produce an *FNR1* overexpression line in an *fnr2* knock out plant and an *FNR2* overexpression line in an *fnr1* knock out plant. In each overexpression line the target FNR isoform was overproduced. The aim of studying the overexpression lines was to determine whether the phenotype of the mutant plants was due to the lower amount of one specific FNR isoform or the total amount of FNR. Also more information on plants photosynthesis was gained.

The overexpression lines were produced by recombinant DNA techniques. The *FNR* genes in DKLAT5g66190 and DKLAT1g20020 plasmids in *E.coli* strain DH10B were isolated and ligated into pGWR8 (plasmid). Only pGWR8 plasmid is capable of reproducing in both *E. coli* and agrobacterium cells. pGWR8 constructs are transformed into agrobacterium, which has an ability to infect plants with its T-DNA located in the Ti-plasmid. Transformed plants express a kanamycin-resistant cassette which originates from the plasmid pGWR8, and therefore, the plants can grow in a kanamycin-containing medium. The properties of the homozygote *FNR1* and *FNR2* overexpressor plants will be characterized later by using various techniques, i.e. photosynthetic measurements, proteomics, transcriptomics, and measurements of enzyme activities.

KEYWORDS:

Arabidopsis thaliana, thale cress, chloroplast, photosynthesis, FNR, recombinant DNA, agrobacterium

SISÄLTÖ

KÄYTETYT LYHENTEET	6
1 JOHDANTO	7
2 LITURUOHO	8
3 FOTOSYNTeesi	9
3.1 Kloroplasti	9
3.2 Fotosynteesireaktiot	10
3.2.1 Lineaarinen elektroninsiirto ja hiilen sidonta	11
3.3 Ferredoksiini-NADP ⁺ -oksidoreduktaasi-entsyymi	12
3.4 Agrobakteerivälitteinen transformaatio	13
4 MENETELMÄT JA MATERIAALIT	14
4.1 Lituruohon kasvatus	14
4.2 Yhdistelmä-DNA-tekniikka	14
4.3 Käytetyt bakteerikannat ja bakteerien kasvatus	14
4.3.1 <i>E.coli</i>	15
4.3.2 <i>A. tumefaciens</i>	15
4.3.3 Varastosolut ja antibiootit	16
4.4 Kompetenttien solujen valmistaminen	16
4.4.1 Kemiallisesti valmistetut kompetentit solut	17
4.4.2 Elektrokompotentit solut	17
4.5 Plasmidin eristys kaupallisilla kiteillä	18
4.6 Agaroosigeelielektroforeesi	18
4.7 Plasmidin puhdistus agaroosigeeliltä	19
4.8 PCR-alukkeiden suunnittelu ja PCR-reaktiot	20
4.9 Restriktio	21
4.10 Defosforylaatio ja ligaatio	22
4.11 Transformaatio	23
4.11.1 Transformaatio lämpökäsittelyllä	24
4.11.2 Transformaatio elektroporaatiolla	24
4.12 Sekvensointi	25
4.13 Mutageneesi	25
4.14 Lituruohon transformaatio agrobakteerilla	26
5 TYÖN SUORITUS	28
5.1 Plasmidien valmistelu	30

5.2 Kloonaus	30
6 TULOKSET JA TARKASTELU	33
6.1 Plasmidien eristys ja tarkastelu sekä PCR-ajo	33
6.2 FNR-geenien kloonaus pGWR8-plasmidiin	35
6.2.1 Restriktiotulokset	35
6.2.2 Ligaatio ja transformaatio	37
6.3 Paikkaspesifinen mutageneesi ja kasvien agrotransformaatio	38
6.4 Jatkotoimenpiteet	40
LÄHTEET	42

KUVAT

Kuva 1. Yksinkertaistettu kloroplastin rakenne	100
Kuva 2. Yleiskuva fotosynteesistä kloroplastissa	11
Kuva 3. Lineaarinen elektroninsiirtoketju	12
Kuva 4. Agaroosigeelillä ajetut plasmidit DKLAT5g66190 ja DKLAT1g20020	33
Kuva 5. Agaroosigeeliltä puhdistetut PCR-tuotteet	34
Kuva 6. pGWR8-plasmidi agaroosigeelillä	35
Kuva 7. Restriktoidut ja geeliltä puhdistetut FNR-tuotteet ja pGWR8-plasmidit	36
Kuva 8. Transformaatissa saatujen kloonien puhdistetut plasmidit	38

KUVIOT

Kuvio 1. Työn suorituskaavio	28-29
------------------------------	-------

TAULUKOT

Taulukko 1. Käytetyt antibiootit	16
Taulukko 2. PCR-reaktioiden valmistus	21
Taulukko 3. PCR-ohjelma	21
Taulukko 4. Restriktio BamHI:llä	22
Taulukko 5. Ligaation pipetointitaulukko	23
Taulukko 6. DNA-pitoisuus DKLAT-plasmidien eristämisen jälkeen	33
Taulukko 7. Agaroosigeeliltä puhdistettujen PCR-tuotteiden pitoisuudet	34
Taulukko 8. Restriktoidut agaroosigeeliltä puhdistetut näytteet ja niiden DNA-pitoisuudet	36
Taulukko 9. Transformaation tuloksena saatujen kloonien DNA-pitoisuudet	37
Taulukko 10. Mutageneesi-kloonien DNA-pitoisuudet	40

KÄYTETYT LYHENTEET

bp	emäspari (eng. base pair)
Cyt b ₆ f	sytokromi b ₆ f
DMSO	dimetyylisulfoksidi
FD	ferredoksiini
FNR	ferredoksiini-NADP ⁺ -oksidoreduktaasi –entsyymi
LB	Luria-Bertani
MQ	ultrapuhdistettu vesi (Milli-Q)
NADPH	nikotiiniamidiadeniinidinukleotidifosfaatti
NASC	Nottingham Arabidopsis Stock Centre
OD	optinen tiheys (eng. optical density)
P ₆₈₀	valoreaktio II:n reaktiokeskus
P ₇₀₀	valoreaktio I:n reaktiokeskus
PC	plastosyaniini
PSI	fotosysteemi I
PSII	fotosysteemi II
PQ	plastokinoni
RPM	kierrosta minuutissa (eng. Revolutions Per Minute)
SOB	Super Optimal Broth
WT	villityyppi

1 JOHDANTO

Opinnäytetyöni on perustutkimusta, joka tähtää lituruohon ja fotosynteesireaktioiden ymmärtämiseen. Lituruohon (*Arabidopsis thaliana*) genomissa on kaksi geeniä, jotka koodaavat kloroplastiin ohjautuvia FNR-proteiineja (FNR= ferredoksiini-NADP⁺-oksidoreduktaasi-entsyymi), FNR1 ja FNR2. Molempia proteiineja on sekä liukoisessa muodossa kloroplastin stroomassa että kiinnittyneinä tylakoidikalvoihin (Lintala ym. 2009). Kloroplastissa FNR osallistuu fotosynteesin elektroninsiirtoreaktioihin. Lineaarisessa elektroninsiirtoketjussa elektroni siirtyy H₂O:lta kolmen suuren proteiinikompleksin ja elektroninsiirtokomponenttien kautta NADP⁺:lle pelkistäen sen NADPH:ksi.

Työn tarkoituksena on yhdistelmä-DNA-tekniikkaa hyödyntämällä tehdä lituruohon *FNR1* yliekspressiolinjoja *fnr2*-poistogeeniseen taustaan ja *FNR2* yliekspressiolinjoja *fnr1*-poistogeeniseen taustaan. *fnr1*-poistogeenisillä kasveilla *FNR1*-geeni on keskeytetty, jolloin kasvi ei tuota lainkaan FNR1-proteiinia mutta FNR2-proteiinia esiintyy kloroplastin stroomassa (Lintala ym, 2009). Vastaavasti *fnr2*-poistogeenisessä kasvissa ei ole FNR2-proteiinin tuottoa mutta FNR1-proteiinia esiintyy sekä kloroplastin stroomassa että tylakoidikalvoilla (Lintala ym, 2009). Molempien linjojen kohdalla poistogeenisyys näkyy myös fenotyypissä. Villityyppiin verrattuna *fnr1*- ja *fnr2*-kasvien osat ovat pienempiä ja vaaleampia, ja niiden fotosynteesitehokkuus on vähän villityypin kasveja alhaisempi.

Tämän työn avulla halutaan selvittää, johtuuko mutanttikasvien ilmiasu FNR:n alhaisesta totaalimäärästä vai spesifisesti toisen isoentsyymin puuttumisesta. Samalla saadaan lisätietoa fotosynteesin mekanismeista. Uusien ympäristöystävällisten ja tehokkaiden bioenergiaratkaisujen onnistumisen ja toteuttamisen edellytyksenä on ymmärtää perinpohjaisesti fotosynteesireaktioita.

2 LITURUOHO

Kasvikunnan banaanikärpäsenä pidettävä lituruoho eli *Arabidopsis thaliana* on yksivuotinen ristikukkaiskasveihin kuuluva ruoho, jota esiintyy luonnostaan laajalti lähes koko Euroopassa. Lituruohon pieni koko, lyhyt elinkierto ja siementen runsaus tekevät kasvista otollisen malliorganismien kasvien perustutkimukselle. Lituruoholla itsellään ei ole kaupallista arvoa mutta tiede- ja tutkimustyössä kasvi on merkittävässä osassa. (Tair 2008 [viitattu 27.12.2011].)

A.thaliana on ulkonäöltään melko vaatimaton. Kasvi voi kasvaa noin 30 cm pituiseksi ja tuottaa useita pieniä, valkoisia neliterälehtisiä kukkia. Suurin osa lehdistä kasvaa ruusukkeena kasvin tyvessä mutta myös varressa on koko matkalta kierteisesti pieniä soikeita lehtiä.

Lituruoho oli ensimmäinen kasvi, jonka genomi sekvensoitiin. Genomin emäsjärjestys julkistettiin joulukuussa 2000. Lituruohon perimäaine on melko yksinkertainen, kasvin 119 146 348 DNA-emäsparia muodostavat viisi kromosomia, joissa on ja noin 25 000 geeniä. Suurin osa kasvin genomissa olevasta DNA:sta koodaa jotain geeniä, koska genomissa on suhteellisen vähän tilke-DNA:ta, eli proteiinia koodaamatonta DNA-aluetta. (NCBI 2012 [viitattu 20.12.2011].).

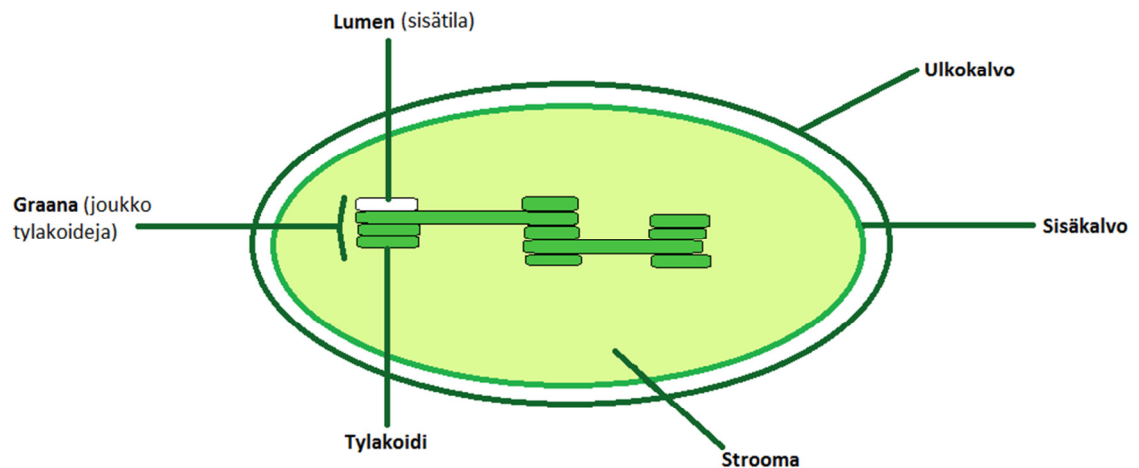
3 FOTOSYNTeesi

Fotosynteesi eli kasvien yhteyttäminen on yksinkertaisesti esitettyinä sokerin ja hapen tuottamista vedestä ja hiilidioksidista auringon energian avulla. Yhteyttäminen on yksi maailman tärkeimmistä reaktioista, joka mahdollistaa elämisen maapallolla. Kasvit autotrofisina pystyvät muuttamaan auringon valoenergian kemialliseksi energiaksi toisenvaraisten eliöiden käyttöön. Tuloksena saadaan sekä ravintoa että hengittämiseen happea.

3.1 Kloroplasti

Kasvisolujen kloroplastissa tapahtuva yhteyttämisreaktio on monimutkainen tapahtumakokonaisuus, joka vaatii toimiakseen useita satoja proteiineja. Kloroplasti eli viherhiukkanen on noin 2-4 µm leveä ja 5-10 µm pitkä pyöreä ja litteä kaksoiskalvon ympäröimä soluelin, joita on yhdessä kasvisolussa 20-40 kappaletta. Kloroplastin uloimmassa kalvossa esiintyy integraalisia proteiineja, joiden muodostamat huokoset läpäisevät pieniä molekyylejä. Sisäkalvo taas on lähes läpäisemätön; sisäkalvolla tapahtuva aineensiirto tapahtuu vain kuljettajaproteiinien avulla. Kaksoiskalvon sisällä on tylakoidikalvo, joka koostuu graanoista ja lumenista. Graanat ovat päällekkäin asettuneita litteitä kalvosäikeitä ja lumeni on tylakoidikalvoston sisätila. Yhteyttämisreaktioiden elektroninsiirtoreaktiot tapahtuvat pääasiassa juuri tylakoidikalvostoissa. Lisäksi kloroplastissa on stroomaksi kutsuttu tylakoidikalvostoa ympäröivä neste, joka sisältää useita tärkeitä hiilen sitomisessa tarvittavia entsyymejä. Kuvassa 1 on esitetty kloroplastin rakenne. (Ihalainen, 2003)

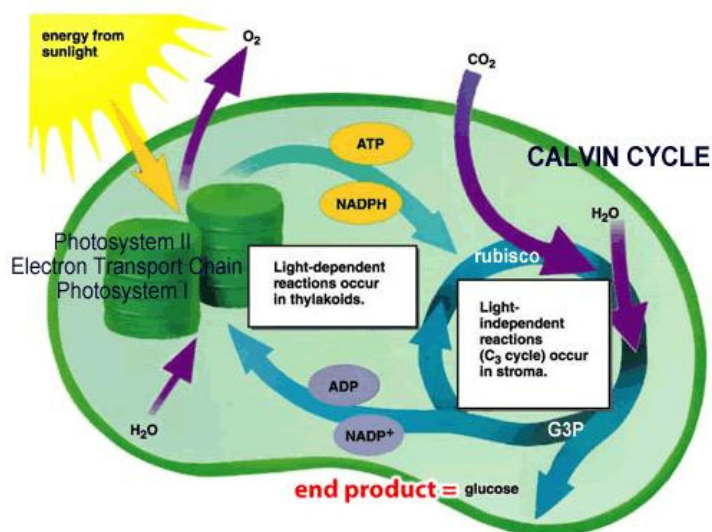
Kloroplastissa on myös oma genomi, joka koodaa noin sataa kloroplastiproteiinia. Muut noin 3000 proteiinia ovat tuman genomien koodaamia, ne syntetoidaan soluliman ribosomeilla ja kuljetetaan kloroplastiin edellä kuvattujen kuljettajaproteiinien avulla. (Taiz, Zeiger, 2006)



Kuva 1. Yksinkertaistettu kloroplastin rakenne

3.2 Fotosynteesireaktiot

Yhteyttäminen voidaan jakaa stroomassa tapahtuviin hiiltä sitoviin reaktioihin ja tylakoidikalvoilla tapahtuviin valoreaktioihin. Valoreaktion lineaarisessa elektroninsiirrossa tuotetaan veden ja valoenergian avulla ATP- ja NADPH-molekyylejä, joita käytetään hiilensidontareaktioissa sitomaan hiilidioksidin hiili orgaanisiin yhdisteisiin (Joliot, Johnson, 2011). Kuvassa 2 on esitetty yleismalli yhteyttämisestä kasvin kloroplastissa.



Kuva 2. Yleiskuva fotosynteesistä kloroplastissa (Muokattu kuva verkkosivusta www.tokresource.org -> biology syllabus -> photosynthesis, viitattu 12.4.2012)

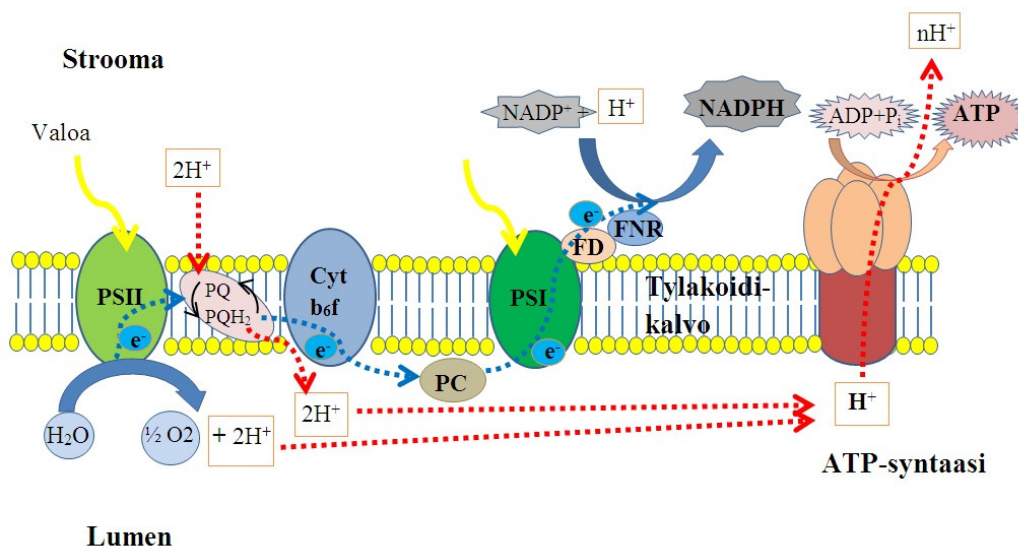
3.2.1 Lineaarinen elektroninsiirto ja hiilen sidonta

Lineaarisessa elektroninsiirrossa elektronit kuljetetaan vedeltä $NADP^+$:lle kolmen suuren proteiini-kompleksien avulla: fotosysteemi II (PSII), sytokromi b_6f -kompleksi (Cyt b_6f) ja fotosysteemi I (PSI) (Joliot ja Johnson, 2011). PSII hajottaa veden happimolekyyleiksi ja protoneiksi. Elektronit siirtyvät PSII:n ja Cyt b_6f -kompleksin kautta PSI:lle, jonka tehtävänä on kuljettaa kyseiset elektronit tylakoidikalvon läpi $NADP^+$:n pelkistäjäproteiineille, ferredoksiinille. Lineaarinen elektroninsiirto on esitetty kuvassa 3. (Ihalainen, 2003)

PSI ja PSII ovat suuria, useista proteiineista koostuvia komplekseja. Näihin proteiineihin on kiinnittynyt erilaisia pigmenttejä (klorofylli ja karotenoidit), jotka absorboivat valoa. PSI:n reaktiokeskus-klorofyllien (P_{700}) absorptiohuippu on 700 nm kohdalla ja PSII:n (P_{680}) absorptiohuippu on 680 nm kohdalla (Pohjola, 2010). Valoreaktioissa pigmenttien absorboima valoenergia siirtyy reaktiokeskuksille virittäen reaktiokeskuksen ja elektroni siirtyy ensisijaisille elektronin vastaanottajille. Sekä PSI:ssä että PSII:ssä on elektronivaje, jotka korvataan PSII:n tapauksessa vesimolekyylin hajotessa vapautuvilla elektroneilla ja PSI:n tapauksessa PSII:lta Cyt b_6f -kompleksin kautta saaduilla elektroneilla. Lineaarisessa elektroninsiirrossa siis elektronit kuljetetaan P_{680} :lta

P_{700} :lle elektroninsiirtäjien avulla. (Taiz, Zeiger, 2006). PSII:n tärkeimpiä tehtäviä on riistää vesimolekyyliltä elektronit ja katalysoida elektroninsiirtoa vedeltä plastokinonille (PQ). (Taiz, Zeiger 2006; Pohjola, 2010)

PSI puolestaan katalysoi elektroninsiirtoa Cyt b_6f -kompleksilta plastosyaniinin (PC) kautta ferredoksiinille (Fd) (Hald, 2008). Ferredoksiinilta elektronit siirretään ferredoksiini-NADP⁺-oksidoreduktaasin (FNR) kautta NADP⁺:lle, jolloin se pelkistyy NADPH:ksi. Elektroninsiirtoreaktioiden tapahtuessa lumeniin kertyy protonigradientti. Gradientin purkautuessa ATP-syntaasikompleksin kautta muodostuu ATP:tä. ATP:tä ja NADPH:ta käytetään hiilensidontareaktioissa sitomaan hiili orgaanisiin yhdisteisiin.



Kuva 3. Lineaarinen elektroninsiirtoketju

Lineaarisessa elektroninsiirtoketjussa elektronit siirretään vedeltä kolmen proteiini-kompleksin (PSII, Cyt b_6f , PSI) ja proteiiniensiirtokomponenttien (PQ (plastokinoni), PC (plastosyaniini), FD (ferredoksiini), FNR) kautta NADP⁺:lle, jolloin se pelkistyy NADPH:ksi. Kloroplastin tylakoidien lumeniin siirtyneet protonit kulkeutuvat stroomaan ATP-syntaasin kautta ja samalla syntyy ATP-molekyylejä

3.3 Ferredoksiini-NADP⁺-oksidoreduktaasi-entsyymi

Ferredoksiini-NADP⁺-oksidoreduktaasi (FNR) on flavoentsyymi, joka osallistuu lineaarisen elektroninsiirtoketjun viimeiseen vaiheeseen luovuttamalla elektronit ferredoksiinilta NADP⁺:lle (Lintala ym. 2009). Lituruohon genomissa kloroplastiin ohjautuvia FNR-isoentsyymejä koodaa kaksi eri geeniä *At5g66190* (*FNR1*) ja

At1g20020 (FNR2), jotka ovat melko homologisia (81% identtisiä) (Lintala ym. 2007). Lituruohon villityypin kasvissa molempia isoentsyymejä esiintyy sekä liukoisessa muodossa kloroplastin stroomassa että kiinnittyneinä tylakoidikalvoon ja kloroplastin ympäröivään sisäkalvoon. Ilmeisesti FNR2 kiinnittyy tylakoidikalvoon FNR1:n avulla eli FNR1 ja FNR2 muodostavat heterodimeerin (Lintala ym. 2007).

FNR-isoentsyymien tarkkaa spesifistä tehtävää kloroplastissa ei vielä tunneta. Jos toisen FNR-isoentsyymiä koodaavan geenin toiminta keskeytetään, mutanttikasvin omavarainen kasvu on mahdollista. Silloin ei kuitenkaan saavuteta optimaalista kasvua. Tutkimustulosten perusteella toisen isoentsyymien puuttuminen johtaa fotosynteesireaktioiden tehokkuuden vähenemiseen (Lintala ym. 2009).

3.4 Agrobakteerivälitteinen transformaatio

Bakteereilla on kromosomaalisen DNA:n lisäksi itsenäisesti lisääntyviä plasmideja, jotka ovat rengasmaisia DNA-molekyylejä. *Agrobacterium tumefaciens* on maaperäbakteeri, joka luontaisesti pystyy siirtämään DNA:ta plasmidistaan (Ti-plasmidi) kasvisoluihin aiheuttaen kasveissa aitosyövän (Lohtander-Buckbee ym. 2004). *A. tumefaciens*in infektoidessa kasvia se siirtää palan Ti-plasmidin DNA:ta, T-DNA (transferred DNA), osaksi kasvin genomia. T-DNA sisältää geenejä, jotka koodaavat kasvihormonien ja eräiden entsyymien synteesiä. Infektoitu kasvi tuottaa ylimäärin hormoneja ja muuttuu kasvainsoluksi. T-DNA:n koodittamat entsyymit aiheuttavat opiinien, eräänlaisten aminohappojohdannaisten, synteesin, joita vain agrobakteeri voi käyttää aineenvaihduntaansa. T-DNA ei itsessään sisällä geeninsiirtoon vaadittavia geenejä joten tarvittaessa kaikki T-DNA:ssa sijaitsevat geenit voidaan korvata halutulla vieraalla DNA:lla ja siirtää se osaksi kasvin genomia. (Häikiö, Kangasjärvi, 1999)

4 MENETELMÄT JA MATERIAALIT

4.1 Yhdistelmä-DNA-tekniikka

Yhdistelmä-DNA-tekniikka ei ole varsinainen tieteenala vaan kokoelma menetelmiä, joiden avulla pystytään eristämään eliöiden geneettistä materiaalia, muunnella sitä halutulla tavalla ja lopuksi siirtää se toisiin organismeihin. Tekniikan yleisimpiä työvaiheita ovat restriktioentsyymien käyttö katkomaan DNA spesifisistä kohdista, DNA päiden mahdollinen CIP-käsittely ja ligaatio, solujen transformaatio ja transformanttien seulonta. (Suominen, Ollikka, 1997)

Yleisimpiä yhdistelmä-DNA-tekniikassa käytettäviä vektoreja ovat plasmidivektorit, jotka ovat rengasmaisia, isäntäsolussa itsenäisesti lisääntyviä DNA-molekyyliä. Plasmidit voivat aiheuttaa erilaisia ominaisuuksia isäntäsolulleen, joista yhdistelmä-DNA-tekniikan kannalta tärkein on antibioottiresistenssi. Antibioottiresistenssinen bakteeri pystyy kasvamaan kyseistä antibioottia sisältävässä kasvualustassa, koska bakteerilla on plasmidissa geeni, joka tuottaa antibioottia hajottavaa tai inaktivoivaa entsyymiä. (Suominen, Ollikka, 1997)

4.2 Lituruohon kasvatus

Lituruohon siemeniä kasvatettiin multa-vermikuliittiseoksessa (noin 1:1). Siemeniä pyrittiin istuttamaan harvakseltaan kasvatusalustaan. Tarpeen vaatiessa kasveja harvennettiin poistamalla pinsetillä yksittäisiä kasveja. Lituruohon siemeniä kasvatettiin kasvatushuoneissa, fytoatroneissa. Fytoatroneissa lämpötila oli +23 °C, vuorokausirytmä oli 8 h pimeää/16 h valoa ja valon intensiteetti oli 110 µmol fotoneja m⁻²s⁻¹. Villityypin siemenet olivat Columbia-ekotyyppiä, *fmr1*-poistogeeninen kasvi oli linjaa SALK_085403 ja *fmr2*-poistogeeninen kasvi linjaa SALK_017328. Kasveja kasteltiin kolme kertaa viikossa ja noin 5 viikossa kasvi oli kasvattanut kukkavarret ja kasvia voitiin käyttää agrobakteerilla infektoimiseen.

4.3 Käytetyt bakteerikannat ja bakteerien kasvatatus

4.3.1 *E.coli*

Työn aikan kasvatettiin useita eri *E. coli*-kantoja. NASC:ista (Nottingham Arabidopsis Stock Centre) tilatuissa DH10B-kannan soluissa oli DKLAT5g66190-plasmidissa *FNR1*-geeni (geenin pituus 1083 bp) ja DKLAT1g20020-plasmidissa *FNR2*-geeni (pituus 1110 bp). DH10B-soluja kasvatettiin selektiivisillä LB-maljoilla (Luria-Bertani), antibioottina käytettiin spektinomysiinia, jonka lopullisena konsentraationa oli 50 µg/ml. Maljoja kasvatettiin +37°C:ssa lämpökaapissa yön yli. Nestekasvatuksia varten pipetoitiin pieniin kasvatusputkiin 3 ml LB-kasvatusliuosta ja antibioottia. Nesteeseen poimittiin maljalta yksi *E. coli*-pesäke ja laitettiin pullot ravisteluun noin 220 rpm ja +37°C:seen yön yli. *E. coli*n DH5α-kannan soluja kasvatettiin samoin kuin DH10B-soluja. DH5α-soluista tehtiin kompetentteja.

pGWR8-vektoria (koko n. 5480 bp) sisältävää *E. coli*-kantaa kasvatettiin samalla tavalla mutta tämän kannan kanssa käytettiin kanamysiinia 50 µg/ml. pGWR8 käytettiin vektorina, johon *FNR*-geenit liitettiin. Toisin kuin DKLAT-plasmidit, pGWR8-plasmidit pystyvät lisääntymään sekä *E. coli*ssa että agrobakteerissa. pGWR8-plasmidissa on kukkakaalin mosaiikkiviruksen 35S-RNA geenin säätelyalue, jonka avulla siirrettävä geeni ilmenee voimakkaasti kasvin genomissa (Rozhon ym. 2010).

4.3.2 *A. tumefaciens*

Agrobakteerikantaa GV3101 käytettiin kasvin infektoimiseen. Tässä kannassa on helper-plasmidi, jonka koodaamia geenin tuotteita tarvitaan kasvin infektoimiseen. Plasmidissa on myös tetrasykliini-, rifampisiini- ja gentamysiini-resistenssikasetit. GV3101-soluja kasvatettiin selektiivisillä LB-maljoilla, antibiootteina gentamysiini 10 µg/ml, tetrasykliini 5 µg/ml ja rifampisiini 5 µg/ml. Pakkasessa olevista varastosoluista herätettiin soluja uudelle maljalle. Agrosoluja kasvatettiin +29°C:een lämpökaapissa kaksi vuorokautta koska agrobakteerit kasvavat hieman *E. coli*-soluja hitaammin.

Nestekasvatusta, esimerkiksi varastosolujen tekoa, varten poimittiin yksi pesäke 3 ml:aan LB-kasvatusliuosta, jossa oli kaikkia kolmea antibioottia. Soluja kasvatettiin yön yli noin +29 °C:ssa ravistelussa 150 rpm.

4.3.3 Varastosolut ja antibiootit

Jokaisesta kannasta valmistettiin varastosoluja. Soluja kasvatettiin nestekasvatuksessa: poimittiin yksi pesäke maljalta ja laitettiin 3 ml LB:tä, johon lisättiin antibioottia kannan mukaan valittuna. Soluja kasvatettiin yön yli ravistelussa ja seuraavana päivänä jaettiin solut kolmeen Eppendorf-putkeen. Kuhunkin putkeen lisättiin steriiliä 60%:sta glyserolia. Glyserolin loppukonsentraatio putkissa oli 15%. Sekoitettiin putkien sisältö hyvin ja jaettiin solut uusiin Eppendorf-putkiin, noin 400 µl/putki. Varastosolut jäädettiin nestetyypessä ja siirrettiin -80 °C pakastimeen.

Antibioottiliuokset valmistettiin itse. Työn ajan käytettiin viittä eri antibioottia: spektinomysiini, kanamysiini, gentamysiini, tetrasykliini ja rifampisiini. Alla olevassa taulukossa 1 on esitetty antibioottien kantaliuosten pitoisuudet ja loppukonsentraatiot malja- ja nestekasvatuksissa.

Taulukko 1. Käytetyt antibiootit

Antibiootti	stokki, mg/ml	lopullinen käyttökonsentraatio, µg/ml
Spektinomysiini	50	50
Kanamysiini	50	50
Gentamysiini	10	50
Tetrasykliini	5	5
Rifampisiini	5	20

4.4 Kompetenttien solujen valmistaminen

Erilaisia kompetentteja soluja on kaupallisesti saatavilla mutta itse tehtiin omat kompetentit *E. coli*-solut. DH5α-kannan soluista valmistettiin kompetentteja soluja sekä elektrotransformaatiota että kemiallista transformaatiota varten.

Agrobakteerin GV3101 soluista valmistettiin kompetentteja soluja elektrotransformaatiota varten.

4.4.1 Kemiallisesti valmistetut kompetentit solut

Kun *E. coli* soluille tehdään CaCl_2 -käsittely, niistä tulee kompetentteja eli kykeneviä ottamaan vierasta DNA:ta sisäänsä. CaCl_2 heikentää solukalvoa ja transformoituminen voi tapahtua hetkellisesti kun kylmille soluille annetaan lyhyt lämpöshokki $+42^\circ\text{C}$:ssa. (Suominen, Ollikka, 1997)

CaCl_2 -käsittelyä varten kasvatettiin DH5 α -soluja 100 ml:ssa LB:tä, $+37^\circ\text{C}$:ssa ja ravistelussa 225 rpm. Solutiheyttä mitattiin spektrofotometrillä liuoksen absorbanssia mittaamalla. Mittaus tehtiin aallonpituudella 600 nm ja nollanäytteenä oli puhdas LB-liuos. Soluja kasvatettiin kunnes spektrofotometrillä mitattu solujen OD_{600} (optinen tiheys) oli 0,369, jolloin lopetettiin kasvatus ja kerättiin solut sentrifugoimalla Falcon-putkissa 2700 g, $+4^\circ\text{C}$, 10 min. Supernatantti kaadettiin pois ja pelletti suspensoitiin 30 ml puskuria, jossa oli 80 mM MgCl_2 ja 20 mM CaCl_2 . Solujen suspensointi suoritettiin kylmähuoneessa noin $+4^\circ\text{C}$:ssa hitaasti pulloja pyörittelemällä. Saatu suspensio sentrifugoitiin samoilla parametreillä kuin aikaisemmin. Supernatantti kaadettiin pois ja pelletti suspensoitiin hellävaraisesti 2 ml:aan kylmää 0,1 M CaCl_2 . Suspensioon lisättiin 70 μl DMSO:ta hitaasti pyörittämällä. Valmiit kompetentit solut jaettiin Eppendorf-putkiin, 50 μl /putki. Putket siirrettiin -80°C säilöön.

4.4.2 Elektrokompetentit solut

Elektrokompetenttien solujen valmistusta varten kasvatettiin 100 ml DH5 α - tai GV3101-soluja kuten CaCl_2 -käsittelyä varten tehtiin. Solujen OD_{600} ollessa noin 0,4 solut siirrettiin jälle 30 minuutiksi, jonka jälkeen jaettiin solut kahteen Falcon-pulloon ja pellettoitiin sentrifugoimalla 10 min $+4^\circ\text{C}$:ssa 4500 rpm. Supernatantti kaadettiin pois ja kukin pelletti suspensoitiin 5 ml:aan kylmää MQ-vettä. Suspensio sentrifugoitiin 5000 rpm $+4^\circ\text{C}$:ssa 10 min. Supernatantti kaadettiin pois ja pelletti suspensoitiin 3 ml:aan MQ-vettä, jonka jälkeen jälleen

solut kerättiin kuten viimeksi. Saatu pelletti suspensoitiin nyt 1 ml:aan 10% glyserolia. Solut siirrettiin Eppendorf-putkiin ja sentrifugoitiin 5000 rpm +4 °C:ssa 15 min. Supernatantti pipetoitiin varovasti pois ja molemmat pelletit suspensoitiin 1 ml:lla 10% glyserolia. Valmiit elektrokompetentit solut jaettiin uusiin putkiin ja jäädytettiin nestetyypessä. Solut varastoitiin -80 °C:ssa.

Elektrokompetentteja GV3101 soluja valmistettiin samalla tavalla kuin elektrokompetentteja *E. coli* DH5 α -soluja. Poikkeuksena oli agrobakteerien solukasvatuksen suurempi nestetilavuus ja solutiheys. Agrobakteereja kasvatettiin 300 ml ja solut kerättiin niiden OD₆₀₀ ollessa noin 1,45. Näihin kompetentteihin soluihin transformoidaan *FNR*-geenit pGWR8-plasmidilla.

4.5 Plasmidin eristys kaupallisilla kiteillä

Roche High Pure Plasmid Isolation Kit:llä puhdistettiin *E.colista* plasmidi DNA:ta suoraan kitin ohjeiden mukaisesti. Kitin puhdistusmenetelmä perustuu alkaaliseen lyysikseen. Saatua puhdasta plasmidia voitiin käyttää suoraan muun muassa PCR-reaktioihin, kloonaukseen ja seulontaan.

Plasmidin eristystä varten kasvatettiin *E.coli* soluja aluksi selektiivisellä LB-maljalla yön yli +37 °C lämpökaapissa. Maljalta valittiin yksi pesäke 3 ml:aan 50 mg/ml kanamysiini-antibioottia sisältävään LB-nesteliuokseen ja kasvatettiin yön yli, +37 °C. Seuraavana päivänä suoritettiin plasmidin eristys sentrifugoimalla solut pohjaan ja etenemällä Rochen kitin ohjeiden mukaisesti. Lopuksi plasmidieristyksen onnistuminen tarkistettiin ajamalla plasmidi-DNA agarosigeelillä ja mittaamalla pitoisuus Nanodrop-spektrofotometrillä.

4.6 Agarosigeelielektroforeesi

Agarosigeelielektroforeesi eli AGE on geenitekniikassa yleisesti käytetty menetelmä erityisesti nukleiinihappojen eripituisten jaksojen erottamiseen, tunnistamiseen ja puhdistamiseen. Menetelmän ideana on sähkökentän avulla tapahtuva nukleiinihappojen kokoon perustuva kulkeutuminen negatiivista varausta kohti agarosigeelillä. Näytteet ladataan geelin toiseen päähän ja sähkökentän syntymisen seurauksena DNA-molekyylit alkavat kulkeutua kohti

negatiivista varausta. Mitä pienempi molekyyli on sitä nopeammin se kulkeutuu agarosigeelin huokosten läpi. Suuremmat molekyylit kulkeutuvat hitaammin ja näin geelille muodostuu, molekyylin koon perusteella eri kohtiin vyöhykkeitä eli bändejä.

Koska DNA molekyyliä ei voida havaita silmin, agarosigeelin valmistamisen yhteydessä geeliin lisätään etidiumbromidia vyöhykkeiden visualisoimiseksi. Etidiumbromidi sitoutuu DNA:n emäsparien väliin ja UV-valolla valaistuna se fluoresoi oranssin värisenä. Yleisestä käytöstään huolimatta etidiumbromidi on myrkyllinen ja terveydelle haitallinen aine, jota tulee käsitellä asianmukaisella tavalla. Etidiumbromidi voidaan korvata harmittomammilla tuotteilla, jotka kuitenkin maksavat huomattavasti enemmän.

DNA eristysten onnistumisen varmistamiseksi käytettiin 0,8% agarosigeeliä. Geeli valmistettiin punnitsemalla 0,4 g agarosia ja sulattamalla tämä 50 ml:aan TAE-puskuriin (Tris-acetate-EDTA, 40 mM Tris-acetate ja 1 mM EDTA) mikroaaltouunissa. Hieman jäähtyneeseen nesteeseen lisättiin 25 µl etidiumbromidia (lopullinen etidiumbromidi-konsentraatio: 0,5 µg/ml) ja kaadettiin liuos geelinajotarjottimelle jähmettymään. Ennen geelin jähmettymistä geelin toiseen päähän asetettiin kampa, jolla saatiin kaivot geeliin. Kaivoihin pipetoitiin 6 µl näytettä. Silloin kun haluttiin leikata geelillä ajetut näytteet talteen DNA-puhdistusta varten, käytettiin hieman leveämpiä kampoja ja näytettä pipetoitiin kaivoihin 24 µl. Ajolaite täytettiin TAE-ajopuskurilla ja asetettiin laitteen kansi paikoilleen. Geeliä ajettiin aluksi 70 V:lla noin 10 minuuttia ja sitten 100 V:lla 30-40 minuuttia. Valmista geeliä tarkasteltiin tavallisesti lyhytaaltoisen UV-valon alla.

4.7 Plasmidin puhdistus agarosigeeliltä

Agarosigeeliltä DNA-plasmidi puhdistettiin Macherey-Nagelin NucleonSpin® Extract II kitin avulla. Puhdistusvaiheet tehtiin kitin ohjeiden mukaisesti. Ajetulta agarosigeeliltä leikattiin DNA:lle harmittoman pitkäaaltoisen UV-valon alla Eppendorf-putkeen haluttu DNA-vyöhyke, joka liuotettiin kitin mukana tulevaan eluutiopuskuriin, Elution Buffer AE (5 mM Tris/HCl, pH 8,5). Muutamien

Washing-puskurilla tehtyjen pesujen jälkeen kitin mukana tulleetseen pylvääseen kiinnittynyt DNA elutiin AE-puskurilla talteen uuteen Eppendorf-putkeen. Puhdistusten jälkeen tarkistettiin DNA-pitoisuus Nanodropilla.

4.8 PCR-alukkeiden suunnittelu ja PCR-reaktiot

FNR1- ja *FNR2*-geenien monistusta varten suunniteltiin ja tilattiin alukkeet Oligomer.fi -verkkosivulta. Opinnäytetyöni aloittamisen yhteydessä alukkeet suunniteltiin ottaen huomioon BamHI- ja NcoI-restriktioentsyymit eli lisättiin sopivat restriktioentsyymien tunnistamat nukleotidit varsinaisen alukkeen päihin. Lisäksi lisättiin 5'-päähän muutamia ylimääräisiä satunnaisia nukleotidejä. Alukkeille laskettiin sulamislämpötilat (T_m) erillisen internetistä saatavan ohjelman avulla. Alla on esitetty tilattujen alukkeiden sekvenssit. Nuolen kohdalta restriktioentsyymi katkaisee DNA:n ja varsinaisen geenin aloituskohta on alleviivattu.

FNR1:

for: 5' ATCCATG↓GATCCATGGCTGCTGCTATAAGTGCTGC 3' $T_m=63.6$

rev: 5' TTGTCAG↑GATCCGTAGACTTCAACATTCCACTGTTCACTCC3'

$T_m=61.4$

FNR2:

for: 5' ATCCATC↓CATGGATGGCGACTACCATGAATGCTG 3' $T_m=63$

rev: 5' TTGTCAC↑CATGGGTAGACTTCAACGTTCCATTGCTCTG 3' $T_m= 63,1$

Alukkeiden saavuttua niihin lisättiin steriiliä MQ-vettä mukana tulleiden ohjeiden mukaisesti. Alukkeiden loppupitoisuudeksi saatiin 100 μM . PCR-reaktiot valmistettiin taulukon 2 mukaisesti. Polymeraasientsyyminä käytettiin Finnzymes:in F-549S Phusion Hot Start II, 2 U/ μl DNA Polymerase:ia ja templaatteina käytettiin puhdistettuja DKLAT-plasmideja. Reaktiilavuutena oli 20 μl . Näytteet valmistettiin pipetoimalla reagenssit PCR-putkiin, sekoitettiin putkia koeputkiravistelijassa ja sentrifugoitiin näyte lyhyesti putken pohjaan. PCR-ajo-ohjelman tiedot on esitetty taulukossa 3.

Taulukko 2. PCR-reaktioiden valmistus

Reagenssi	Määrä
5xHF puskuri	4µl
dNTP 10mM	0,4µl
templaatti (DKLAT5g66190 [43 ng/µl] / DKLAT1g20020 [41 ng/µl])	0,5µl
aluke for (100 µM)	0,2µl
aluke rev (100 µM)	0,2µl
entsyymi (Phusion 0,4 U)	0,2µl
MQ-vettä	14,5µl

Taulukko 3. PCR-ohjelma

Vaihe	Syklejä	Lämpötila, °C	Aika, s/min
1	1	98	30 s
2	30	98	10 s
		72	30 s
3	1	72	10 min
4	∞	4	∞

4.9 Restriktio

Restriktioentsyymit ovat bakteereista eristettyjä entsyymejä. Nämä entsyymit pystyvät tunnistamaan DNA:ssa tietyn, tavallisesti kuuden, nukleotidin jakson ja pystyvät katkaisemaan DNA:ta tästä kohtaa. (Aittomäki ym. 2002)

PCR-tuotteet restriktioitiin restriktioentsyymeillä. FNR1-PCR-tuote restriktioitiin BamHI:llä (New England BioLabs, BamHI R0136S, 20 U/µl) ja FNR2-PCR-tuote NcoI:llä (BioLabs, NcoI HF R3193S, 20 U/µl). BamHI-restriktioentsyymi tunnistaa kuuden nukleotidin pituisen jakson ja katkaisee sen nuolen kohdalta:

5'...G↓GATCC...3'
3'...CCTAG↑G...5'

NcoI-restriktioentsyymi tunnistaa myös kuuden nukleotidin pituisen jakson ja katkaisee sen nuolen kohdalta:

5'...C↓CATGG...3'

3'...GGTAC↑C...5'

Vektorina toimiva pGWR8 restriktioitiin erikseen vastaavasti samoilla entsyymeillä. Reaktioihin tarvittiin pGWR8-plasmidia noin 2 µg ja FNR1- ja FNR2-PCR-tuotteista FNR-DNA:ta noin 300 ng. Esimerkki FNR1-PCR-tuotteen restriktioinnista on esitetty taulukossa 4. Restriktiutilavuutena oli 50 µl.

Taulukko 4. Restriktio BamHI:llä

Reagenssi	Pipetoitava määrä
DNA (FNR1-PCR-tuote)	10 µl
NB4 puskuri (10x)	5 µl
BSA (10mg/ml)	0,5 µl
MQ-vettä	33 µl
BamHI (40 U)	1 + 1 µl

Restriktio-olosuhteet ovat entsyymikohtaisia. Molemmat käyttämämme restriktioentsyymit vaativat +37°C lämpötilaa ja reaktion annettiin tapahtua kaksi tuntia. Tunnin päästä reaktion aloittamisesta lisättiin uudelleen 1µl restriktioentsyymiä. NcoI ei tarvinnut BamHI:n tapaan BSA:ta mutta sen sijaan NcoI-ensyymiä käytettäessä piti reaktio lopettaa lämpökäsittelyllä. Reaktion lopetus tehtiin siirtämällä kyseinen putki +80°C:een 20 minuutiksi. Molemmat entsyymit toimivat NB4 puskurin kanssa, joka tekee restriktio-olosuhteet optimaalisiksi entsyymin toiminnalle.

4.10 Defosforylaatio ja ligaatio

Samalla restriktioentsyymillä katkaistut DNA-jaksot voidaan liittää toisiinsa DNA-ligaasientsyymien (Promega: l4180A T4 DNA ligase, 3 U/µl) avulla. Ligaatio suoritettiin yleisesti käytetyllä T4-DNA-ligaasilla, joka on *E.coli*n T4-faagin tuottama entsyymi. Jotta DNA-ligaasi voi liittää yhteen DNA-päät on niillä oltava toisessa päässä 3'-OH-ryhmä ja toisessa 5'-fosfaattiryhmä. Defosforyloinnilla tarkoitetaan DNA:n 5'-päiden fosfaattien poistamista alkaalisella fosfataasilla. Tämä tehtiin vasikan suolesta (CIP) eristetyllä alkaalisella fosfataasilla.

(Finnzymes: F201S CIP, 10 U/ μ l)). CIP-käsittelyn tarkoituksena on estää vektorin ligaatio itsensä kanssa. (Suominen, Ollikka, 1997)

Restriktion jälkeen pGWR8-plasmidit, joista oli tehty kaksi eri reaktiota (katkaisu BamHI:llä ja katkaisu NcoI:llä), käsiteltiin CIP:llä. Reaktioseokseen Eppendorf-putkissa lisättiin 1 μ l kaupallista CIP:ä ja inkuboitin putkia 20 min $+37^{\circ}\text{C}$:ssa. Defosforylointi lopetettiin siirtämällä putket 10 minuutiksi $+65^{\circ}\text{C}$:seen.

Ligaatiot tehtiin 10 μ l lopputilavuudessa ja käytettiin kolmea eri insertti-pitoisuutta. Taulukossa 5 on esitetty esimerkkinä pipetointikaavio FNR1-insertille. A-reaktio on nollareaktio, josta ei pitäisi tulla tulosta koska siihen ei lisätä inserttiä. B- ja C-reaktioissa on eri määrä inserttiä. Yhteensä saatiin kuusi erillistä reaktioputkea, joita inkuboitin $+16^{\circ}\text{C}$:ssa yön yli. Ligaation lopetus tehtiin seuraavana päivänä inkuboimalla putkia 10 minuuttia $+65^{\circ}\text{C}$:ssa, jonka jälkeen tuotteita voitiin käyttää transformaatioissa.

Taulukko 5. Ligaation pipetointitaulukko, inserttinä FNR1-PCR-tuote

	FNR1 A-reaktio	FNR1 B-reaktio	FNR1 C-reaktio
Vektori: pGWR8-BamHI (19,44 ng/ μ l)	2 μ l	2 μ l	2 μ
10 x T4-DNA-ligaasi-puskuri (Promega)	1 μ l	1 μ l	1 μ l
Insertti: FNR1-PCR-tuote (4,62 ng/ μ l)	-	3 μ l	5 μ l
T4-DNA-ligaasientsyymi (1,5 U)	0,5 μ l	0,5 μ l	0,5 μ l
MQ-vettä	6,5 μ l	3,5 μ l	1,5 μ l

4.11 Transformaatio

Ligaation jälkeen konstrukti siirretään kompetentteihin isäntäsoluihin. Transformaatio suoritettiin joko lämpökäsittelyllä tai elektroporaatiolla.

4.11.1 Transformaatio lämpökäsittelyllä

Kompetentteja (CaCl_2 -käsittelyllä) isäntäsoluja (DH5 α) sulatettiin hellävaraisesti kädessä, jonka jälkeen siirrettiin solut jäille 10 minuutiksi. 50 μl kompetentteja soluja pipetoitiin 15 ml Falcon-putkiin ja lisättiin 2 μl (noin 20 ng DNA:ta) kutakin ligaatiotuotetta eri putkiin. Putkia pyöräyteltiin varovasti ja inkuboitiin jäillä 30 minuuttia.

Inkuboinnin jälkeen suoritettiin lämpökäsittely siirtämällä putket 30 sekunniksi $+42^\circ\text{C}$ vesihauteeseen. Tämän jälkeen putket siirrettiin jäille noin 2 minuutiksi ja lisättiin 800 μl SOC-ravinneliuosta. SOC koostuu samoista reagensseista kuin SOB (Super Optimal Broth) mutta SOC sisältää lisäksi 20 mM glukoosia. Putkia lämmitettiin muutaman minuutin ajan noin $+37^\circ\text{C}$ vesihauteessa, jonka jälkeen siirrettiin putket inkubaattoriin ravisteluun 45 minuutiksi, $+37^\circ\text{C}$, 225 rpm. Kasvatuksen jälkeen transformoidut solut pipetoitiin selektiivisille SOB-maljoille ja soluja viljeltiin yön yli $+37^\circ\text{C}$:ssa.

4.11.2 Transformaatio elektroporaatiolla

Elektrokompetentteja soluja (DH5 α tai GV3101) sulatettiin jäillä. 50 μl :aan kompetentteja soluja lisättiin ligaatiotuotteita 1 μl . Solut pipetoitiin elektroporaatiokyvettiin ja kyvetti laitettiin elektroporaatilaitteeseen. Poraatio suoritettiin parametreillä: 25 kV, 25 mA, 200 Ω . Heti elektroporaation jälkeen kyvettiin lisättiin 450 μl SOC-kasvatusliuosta ja solut siirrettiin uusiin Eppendorf-putkiin. Soluja kasvatettiin ravistelussa 220 rpm noin kaksi tuntia $+29^\circ\text{C}$:ssa. Inkuboinnin jälkeen solut pipetoitiin selektiivisille LB-maljoille. Kompetentteja DH5 α -soluja kasvatettiin majalla, jossa kanamysiinia 50 $\mu\text{g/ml}$ ja maljoja inkuboitiin vuorokauden ajan $+37^\circ\text{C}$:ssa. Kompetentteja GV3101-soluja kasvatettiin maljoilla, joissa tetrasykliinia 5 $\mu\text{g/ml}$, rifampisiinia 20 $\mu\text{g/ml}$, kanamysiinia 50 $\mu\text{g/ml}$ ja gentamysiinia 50 $\mu\text{g/ml}$ ja maljoja inkuboitiin kaksi vuorokautta $+29^\circ\text{C}$:ssa.

4.12 Sekvensointi

DNA-sekvensoinnin tarkoituksena on varmistaa, että kahden DNA-jakson liittäminen toisiinsa on tapahtunut oikein eikä jaksojen välissä ole tapahtunut mutaatioita. Turun Biotekniikan Keskus (BTK) tarjoaa sekvensointipalveluja, jonne sekvensoitavat näytteet lähetettiin. Näytteet valmistettiin BTK:n verkkosivuilta saatavien ohjeiden mukaisesti ja ne toimitettiin BTK:lle. Sekvensointi tulokset saatiin viikon sisällä sekä FASTA-muodossa että kromatogrammeina. Sekvenssituloksista tarkistettiin geenin sekvenssi mahdollisten mutaatioiden varalta sekä se, miten päin geeni on kiinnittynyt vektoriin.

4.13 Mutageneesi

Sekvensointitulosten perusteella *FNR1*-geenissä oli tapahtunut pistemutaatio geenin keskellä, joka päätettiin korjata QuikChange XL Site-Directed Mutagenesis Kit:illä (Agilent Technologies). Oligomerilta tilattiin kitin ohjeen mukaisesti suunnitellut noin 35 nukleotidin pituiset alukkeet, joissa mutaatiokohta on alukkeen keskellä. Alukkeet ja templaatit laimennettiin ohjeiden mukaisesti ja reaktiot valmistettiin PCR-putkiin käyttäen puolta ohjeessa mainittua tilavuutta.

QuikChange XL menetelmällä mutaation sisältämä nukleotidisekvenssi korvataan halutulla ja korjatulla nukleotidisekvenssillä PCR:n avulla. Alukkeina käytetään korjauksen sisältävää erikseen tilattua aluketta, joka on muutoin komplementaarinen mutatoituneelle geenille. Mutageneesissä käytetään kitin mukana tullutta *PfuTurbo* DNA polymeraasia. PCR-ajo suoritetaan ohjeen mukaisesti ja PCR-tuote käsitellään *DpnI*-digestioentsyymillä. Digestioentsyymi pilkkoo vanhan metyloituneen templaattina olleen DNA:n, mutta syntyneet uudet päistään avonaiset (nick) dsDNA:t pysyvät ehjinä koska eivät sisällä entsyymin tunnistamaa metyyliä. Uudet mutatoidut plasmidit transformoidaan kompetentteihin soluihin, joiden sisällä plasmidin avonaiset päät liitetään yhteen ehjäksi plasmidiksi.

4.14 Lituruohon transformaatio agrobakteerilla

Agrobakteerien kanssa työskentellessä kerättiin kaikki bakteerin kanssa kosketuksissa ollut materiaali autoklaavattavaksi ja oltiin erityisen varovaisia päästämästä bakteeria muihin kasveihin kasvatushuoneessa. Lituruohon siemeniä (villityyppi-, *fnr1*- ja *fnr2*-kasvit) oltiin kylvetty aikaisemmin, ja kun kasvi alkoi kukkia voitiin se infektoida agrobakteerilla.

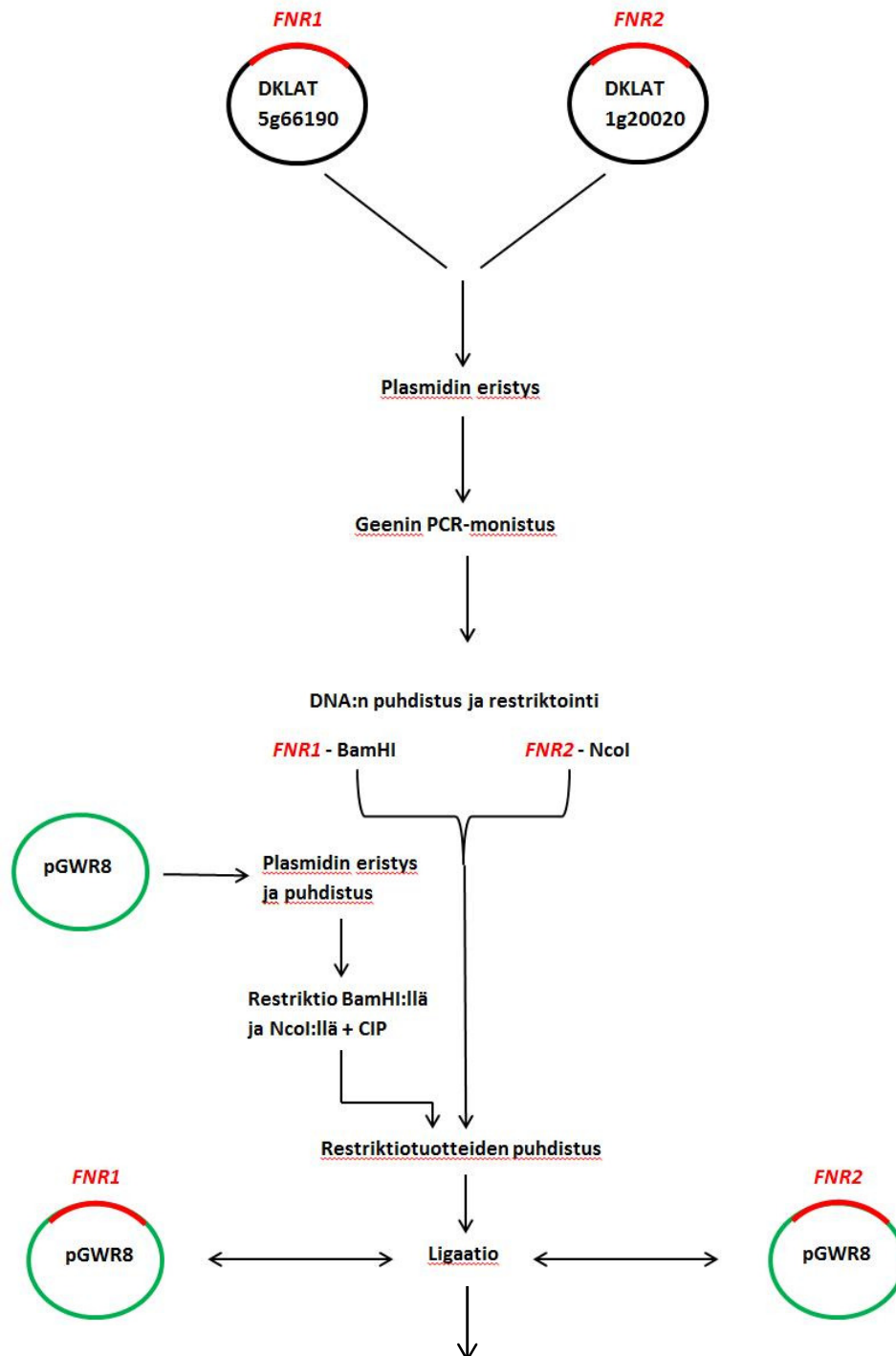
GV3101-soluja, joihin oli transformoitu FNR1-pGWR8-plasmidi ja FNR2-pGWR8-plasmidi, kasvatettiin selektiivisellä maljalla. Yhdestä pesäkkeestä poimittiin soluja 10 ml LB-kasvatusliokseen alkukasvatukseksi 50 ml Falcon-putkeen. Alukasvatusta kasvatettiin yön yli ravistelussa noin 200 rpm +29°C:ssa. Seuraavana päivänä siirrostettiin koko alkukasvatus 200 ml LB-nesteravinteeseen yön yli. Kolmantena päivänä mitattiin agrobakteerikasvatuksen OD₆₀₀ ja lasketaan sen perusteella paljonko tarvitaan soluja noin 500 ml dippausliuoksen valmistamiseen. Dippausliuoksen lopullinen OD oli 0,7. Dippausliuoksena on sakkaroosiliuos (5%), johon lisätään pintajännityksen vähentämiseksi Silvet L-77-detergenttiä (Lehle seeds, Vac-in-stuff) 20 µl 100 ml sakkaroosiliuosta kohti. Lituruohon transformaatiota varten valmistettiin kaksi erillistä dippausliuosta, yksi *fnr1*-kasvien ja toinen *fnr2*-kasvien infektoimista varten.

Dippausliuoksen valmistusta varten sentrifugoitiin tarvittava solumäärä 30 minuuttia 4000 rpm. Pelletti suspensoitiin valmistettuun sakkaroosiliuokseen ja lisättiin liuokseen tarvittava määrä Silvet L-77-liuosta. Lituruohon kukkavarret, joissa suurin osa kukkanupuista on vielä kiinni, kastettiin dippausliuokseen 10 sekunnin ajan. Dipatut kukkavarret suljettiin muovipussiin seuraavaan päivään asti. Kaksi villityyppi (WT)- ja *fnr1*-kasvia kastettiin *FNR2*-dippausliuokseen ja kaksi WT- ja *fnr2*-kasvia kastettiin *FNR1*-dippausliuokseen. *fnr1*-kasvi, jolta *FNR1*-geeni on keskeytetty, transformoidaan *FNR2*-geeniä sisältävällä pGWR8-FNR2-vektorilla, jolloin kasvi tuottaa ylimäärin *FNR2*-geeniä. Vastaavasti *fnr2*-kasvi transformoidaan *FNR1*-geeniä sisältävällä pGWR8-FNR1-vektorilla, jotta saadaan *FNR1* yliekspressiolinja. Samalla tuotetaan FNR1- ja FNR2-yliekspressiolinjat villityypin kasviin.

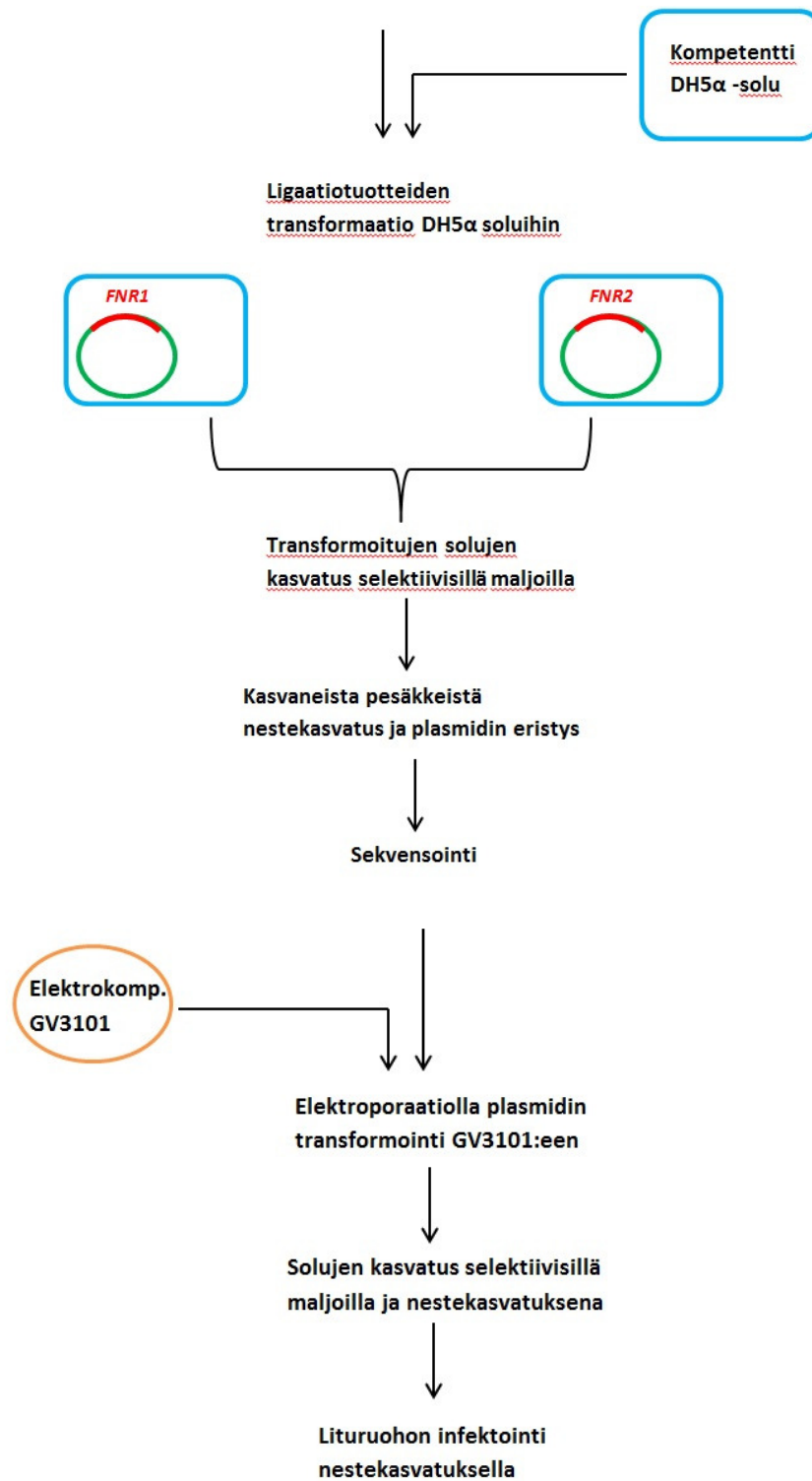
Infektoidut kasvit siirretään kahden päivän jälkeen infektoinnista kasvatushuoneeseen tuottamaan siemeniä. Siemenet kerätään ja steriloinnin jälkeen laitetaan selektiiviselle (kanamysiini) kasvatusalustalla. Vain ne siemenet, joilla on pGWR8-vektorin mukana tullut kanamysiiniresistenssi voivat kasvattaa juuria ja vihertyvät kasvatusalustalla. Noin viikon maljalla kasvatuksen jälkeen pienet taimet siirretään mullalle kasvamaan ja tuottamaan uusia siemeniä.

5 TYÖN SUORITUS

Alla olevassa kuviossa on esitetty suoritettut työvaiheet kaaviomaisesti.



Kuvio 1. Työn suorituskaavio.



Kuvio 1. Työn suorituskaavio (jatkuu).

5.1 Plasmidien valmistelu

Työ aloitettiin suunnittelemalla *FNR1* ja *FNR2*-geenien monistusta varten sopivat alukkeet, jotka tilattiin Oligomerilta (Oligomer Oy, Helsinki). Alukkeiden suunnittelemista varten geenien sekvenssit saatiin TAIR-sivustolta

DH10B-soluja, joissa oli plasmidit DKLAT5g66190 (*FNR1*) ja DKLAT1g20020 (*FNR2*), kasvatettiin erikseen ensin maljoilla. Maljalta poimittiin yksi pesäke 3 ml nestekasvatukseen erikseen varastosolujen valmistusta ja plasmidin eristystä varten. Nestekasvatuksen solut kerättiin ja solujen plasmidit eristettiin Roche'n High Pure Plasmid Isolation kitillä. Eristettyjen plasmidien pitoisuudet mitattiin Nanodropilla ja plasmidi-DNA ajettiin agarosigeelillä plasmidin kunnon ja eristymisen onnistumisen varmistamiseksi.

Seuraavaksi suoritettiin PCR-ajo, jossa templaatteina käytettiin eristettyjä plasmideja, DKLAT5g66190 ja DKLAT1g20020, ja alukkeina käytettiin Oligomerilta tilattuja alukkeita. PCR-tuotteet puhdistettiin agarosigeelijaon jälkeen NucleoSpin Extract II kitin avulla. Puhdistettujen PCR-tuotteiden DNA:n pitoisuudet mitattiin Nanodropilla ja DNA:n kunto tarkistettiin agarosigeelillä.

Vastaavat toimenpiteet suoritettiin samalla tavalla pGWR8-plasmidille: Solujen kasvatusta varastosoluiksi ja plasmidin eristystä varten, pGWR8-plasmidin eristys, plasmidipitoisuuden mittaaminen ja plasmidin kunnon tarkistus agarosigeelillä.

5.2 Kloonaus

Puhdistetut PCR-*FNR1*- ja PCR-*FNR2*-tuotteet restriktioitiin omilla alukkeiden sekvenssiin sopivilla restriktioentsyymeillä. PCR-*FNR1*-tuote restriktioitiin BamHI-restriktioentsyymillä ja PCR-*FNR2*-tuote restriktioitiin NcoI-restriktioentsyymillä. pGWR8-plasmidi restriktioitiin erikseen BamHI- ja NcoI-restriktioentsyymillä. Restriktoiduille pGWR8-vektoreille tehtiin CIP-käsittely, jotteivät avautuneet plasmidin päät kiinnittyisi takaisin yhteen.

Ligaatio tehtiin geeliltä puhdistetuilla PCR-tuotteilla. Restriktoitu ja puhdistettu PCR-FNR1-tuote liitettiin BamHI:llä restriktoituun ja CIP-käsiteltyyn pGWR8-vektoriin ja PCR-FNR2-tuote liitettiin NcoI:llä restriktoituun ja CIP-käsiteltyyn pGWR8-vektoriin T4-DNA-ligaasientsyymillä avulla.

Lämpökäsittelyllä transformoitiin ligaatiotuotteet kompetentteihin DH5 α -soluihin ja transformoituja soluja kasvatettiin selektiivisillä maljoilla yö yli +37 °C:een lämpökaapissa. Maljalla olevissa yksittäisissä pesäkkeissä kasvaa onnistuneesti transformoituneita klooneja. Yksittäisestä pesäkkeestä poimittiin soluja nestekasvatukseen. Nestekasvatuksista yhdestä erästä valmistettiin varastosoluja ja toisesta erästä eristettiin plasmidit Rochen kitillä. Plasmidikonsentraatio mitattiin Nanodropilla ja samalla valmistettiin näytteet sekvensointia varten. Sekvensointituloksista tarkistettiin onko geeni kiinnittynyt plasmidiin oikein päin ja onko geenin emäsjärjestyksessä tapahtunut mutaatioita.

Saatujen sekvensointitulosten perusteella ilmennyt mutaatiot korjattiin QuikChange XL mutageneesi-kitillä. Mutageneesiä varten suunniteltiin oikeanlaiset alukkeet ja tilattiin ne Oligomeriltä. PCR-ajo suoritettiin käyttämällä tilattuja alukkeita ja templaatteina käytettiin FNR1-pGWR8- ja FNR2-pGWR8-vektoria. Korjattu geeni transformoitiin kompetentteihin DH5 α -soluihin. Soluista valmistettiin varastosoluja talteen ja tarkistettiin plasmidien sekvenssit.

Sekvensointitulosten perusteella oikean geenin sisältämistä klooneista, *fnr1 c* ja *fnr2 a*, tehtiin varastosolut ja nestekasvatukset plasmidin eristystä varten. Plasmidit eristettiin Rochen kitin avulla ja Nanodropilla mitattiin plasmidipitoisuus. Elektroporaatiolla transformoitiin plasmidit klooneista *fnr1 c* ja *fnr2 a* kompetentteihin agrobakteeri GV3101-soluihin. Soluja kasvatettiin selektiivisillä maljoilla +28 °C:een lämpökaapissa kahden vuorokauden ajan. Kasvaneista yksittäisistä klooneista poimittiin soluja nestekasvatukseen erikseen varastosolujen tekoa varten ja lituruohon infektointia varten.

Lituruoho infektoitiin dippaamalla sopivan ikäisen kasvin kukkavarso agrobakteeri-dippausliuokseen. Sellaiset kasvit, joiden kukkavarren kukkanuput

eivät ole kaikki vielä kokonaa auennet, ovat sopivia infektointiin. Kaksi WT- ja *fnr2*-kasvia dipattiin *fnr1* c-dippausliuokseen ja kaksi WT- ja *fnr1*-kasvia dipattiin *fnr2* a-dippausliuokseen. Dipatut kasvit jätettiin yön yli kuivumaan dippausliuoksesta, jonka jälkeen kasvit siirrettiin kasvihuoneisiin siementämään.

Opinnäytetyöni osalta työn suoritus rajataan tähän kasvien infektointiin mutta varsinaisesti FNR-isoentsyymien ylituotto ei lopu tähän. Tulokset ja tarkastelu - osion viimeisessä kappaleessa on esitetty jatkotoimenpiteet, joita tullaan vielä suorittamaan. Kasvien siementen tuottaminen vie oman aikansa, jona aikana ei voida tehdä muuta kuin odottaa.

6 TULOKSET JA TARKASTELU

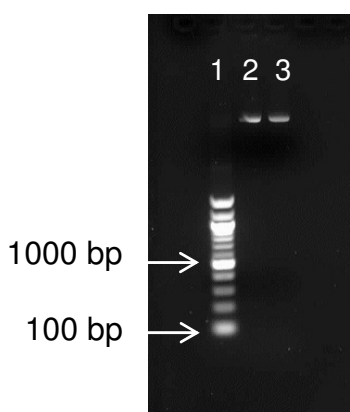
6.1 Plasmidien eristys ja tarkastelu sekä PCR-ajo

DH10B-soluista eristettiin DKLAT5g66190 (FNR1)- ja DKLAT1g20020 (FNR2)-plasmidit Roche High Pure Plasmid Isolation Kit:llä. Plasmidien pitoisuudet näytteessä mitattiin Nanodropilla ja ajettiin pieni näyte plasmidista agarosigeelillä. Tulokset on esitetty taulukossa 6 ja kuvassa 4.

Taulukko 6. DNA-pitoisuus DKLAT-plasmidien eristämisen jälkeen

Näyte	DNA-pitoisuus ng/μl
DKLAT5g66190 (FNR1)	43
DKLAT1g20020 (FNR2)	41

Eristyksen jälkeen plasmidit DKLAT5g66190 ja DKLAT1g20020 ajettiin agarosigeelillä. DNA-markkerina käytettiin vain 100 bp kokostandardia, koska sillä hetkellä käytössämme oli vain kyseistä standardia. Näytettä ladattiin 6 μl/kaivo ja DNA:ta pipetoitiin näytteeseen 1 μl, jolloin DNA-pitoisuutena oli noin 6 ng/μl. Koska plasmidit ovat vielä tässä vaiheessa ehjiä, niiden kokoa eigeeliltä pääättelemään. Geelikuvan perusteella voidaan sanoa eristyksen onnistuneen ja plasmidin olevan kunnossa.



Kuva 4. Agarosigeelillä ajetut plasmidit DKLAT5g66190 ja DKLAT1g20020, DNA-markkerina 100bp kokostandardi.

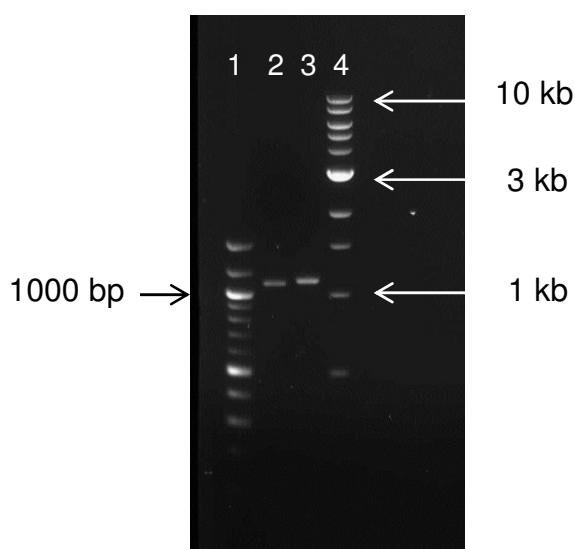
1 = 100 bp kokostandardi, 2 = DKLAT5g66190, 3 = DKLAT1g20020

Eristetyssä plasmidissa olevat geenit *FNR1* ja *FNR2* monistettiin PCR:ssä. PCR-tuotteet ajettiin agarosigeelillä. Negatiiviset kontrollinäytteet, joihin ei oltu lisätty templaattia, eivät antaneet tulosta geelillä, mikä viittaa kontaminaatiovapaaseen reaktioon. Geelistä leikattiin PCR-tuotteet DNA-puhdistusta varten pitkäaaltoisen UV-valon alla. Tässä vaiheessa geelistä ei voitu ottaa kuvaa, jotta DNA:t eivät vahingoittuisi. Leikatut vyöhykkeet puhdistettiin NucleoSpin® Extract II kitillä ja eluution jälkeen mitattiin DNA:n pitoisuus näytteissä Nanodropilla. Pitoisuudet on esitetty taulukossa 7.

DNA:n puhdistuksen jälkeen ajettiin uusi geeli puhdistetuilla näytteillä, kuva 5. Näytettä ladattiin geeliin 6 µl, josta 1 µl oli puhdistettua DNA:ta. Geelillä näkyvät DNA-vyöhykkeet ovat oikeassa kokojensa mukaisessa kohdassa. *FNR1*-PCR-tuote on kooltaan 1104 emäsparia ja *FNR2*-PCR-tuote on kooltaan 1131 emäsparia. PCR-monistus on siis onnistunut. DNA-kokostandardina käytettiin 100 bp ja 1 kb standardeja.

Taulukko 7. Agarosigeeliltä puhdistettujen PCR-tuotteiden pitoisuudet

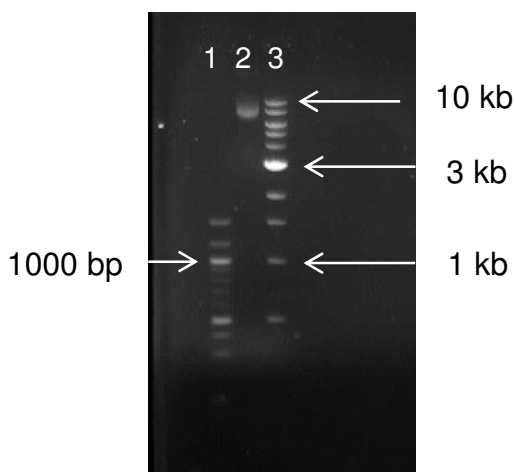
Näyte	DNA-pitoisuus ng/µl
<i>FNR1</i> -PCR-tuote	36
<i>FNR2</i> -PCR-tuote	45



Kuva 5. Agarosigeeliltä puhdistetut PCR-tuotteet.

1 = 100 bp kokostandardi, 2 = *FNR1*-PCR-tuote, 3 = *FNR2*-PCR-tuote, 4 = 1 kb kokostandardi

Koska oli tarkoitus siirtää PCR-tuotteet pGWR8-vektoriin, pGWR8-plasmidi eristettiin DH5 α -solusta Roche High Pure Plasmid Isolation Kit:llä. Eristetyn näytteen plasmidipitoisuus mitattiin Nanodropilla ja pitoisuudeksi saatiin 107,89 ng/ μ l. pGWR8-plasmidi ajettiin agarosigeelillä, kuva 6. Näytettä ladattiin geelille 6 μ l, josta 1 μ l oli pGWR8-DNA:ta.



Kuva 6. pGWR8-plasmidi agarosigeelillä, 100bp ja 1kb ladderit.

1 = 100 bp kokostandardi, 2 = pGWR8, 3 = 1 kb kokostandardi

6.2 FNR-geenien kloonaukseen pGWR8-plasmidiin

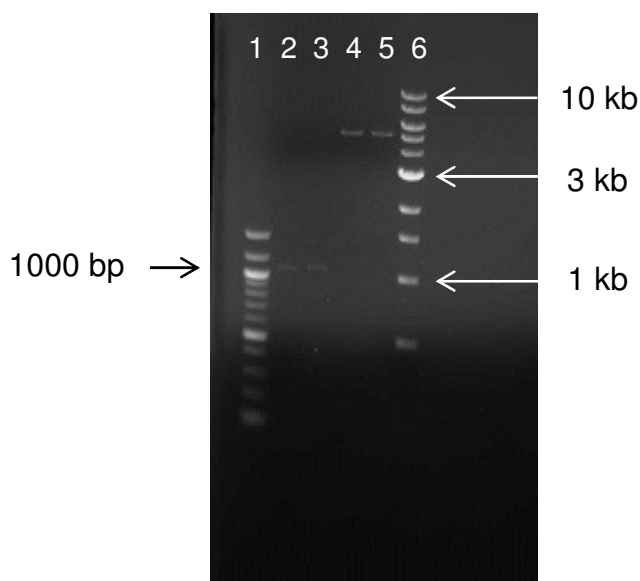
6.2.1 Restriktiotulokset

Puhdistettu FNR1-PCR-tuote restriktioitiin BamHI-restriktioentsyymillä ja FNR2-PCR-tuote NcoI-restriktioentsyymillä. pGWR8-plasmidi restriktioitiin vastaavasti BamHI:llä ja NcoI:llä. Lisäksi pGWR8:lle tehtiin CIP-käsittely. Restriktioinnin jälkeen ajettiin näytteet koko tilavuudeltaan (50 μ l) agarosigeelillä. Geelillä ajettiin kontrollinäytteenä pGWR8:lle restriktioimaton pGWR8-plasmidi, jonka pitäisi näkyä geelillä eri kohdassa kuin restriktoidut plasmidit. Ajetulta geeliltä leikattiin vyöhykkeet DNA:n puhdistusta varten pitkäaaltoisen UV-valon alla eikä otettu geelistä kuvaa, jotta DNA pysyisi ehjänä. Kontrollinäytteenä ollut

restriktoimaton pGWR8-plasmidi oli geelillä eri kohdassa ja voitiin todeta restriktion onnistuneen pGWR8-plasmidien (plasmidin koko noin 5480 bp) suhteen. PCR-tuotteiden restriktion onnistumista ei voitu tarkistaa agarosigeelillä koska kokoero restriktoitujen ja restriktioimattomien PCR-tuotteiden välillä on niin pieni, ettei se näy geelillä. Rochen kitillä puhdistetut restriktoidut tuotteet ajettiin vielä agarosigeelillä ja mitattiin näytteiden DNA-pitoisuudet Nanodropilla. Tulokset on esitetty kuvassa 7 ja taulukossa 8.

Taulukko 8. Restriktoidut agarosigeeliltä puhdistetut näytteet ja niiden DNA-pitoisuudet

Näyte	DNA-pitoisuus ng/μl
BamHI:llä restriktoitu FNR1-PCR-tuote	5
NcoI:llä restriktoitu FNR2-PCR-tuote	5
BamHI:llä restriktoitu ja CIPattu pGWR8	19
NcoI:llä restriktoitu ja CIPattu pGWR8	19



Kuva 7. Restriktoidut ja geeliltä puhdistetut FNR-tuotteet ja pGWR8-plasmidit

1 = 100 bp kokostandardi, 2 = restriktoitu FNR1-PCR-tuote, 3 = restriktoitu FNR2-PCR-tuote, 4 = pGWR8-BamHI, 5 = pGWR8-NcoI, 6 = 1 kb kokostandardi

6.2.2 Ligaatio ja transformaatio

Ennen FNR-geenien transformointia testattiin kompetenttien DH5 α -solujen kompetenttius pelkällä pGWR8-vektorilla ja viljelemällä soluja kanamysiiniä 50 $\mu\text{g/ml}$ sisältävällä LB-maljalla. pGWR8-vektori transformoitiin DH5 α -soluihin lämpökäsittelyllä ja kasvatettiin niitä selektiivisellä alustalla. Seuraavana päivänä todettiin transformaation onnistuneen sillä maljalla kasvoi useita pesäkkeitä. CIP-käsittelyn onnistuminen tarkistettiin transformoimalla restriktoitua ja CIP-käsiteltyä pGWR8-plasmidia DH5 α -soluihin ja viljeltiin soluja kanamysiiniä 50 $\mu\text{g/ml}$ sisältävällä LB-maljalla. Maljoilla ei kasvanut pesäkkeitä ja siksi voitiin todeta CIP-käsittelyn onnistuneen.

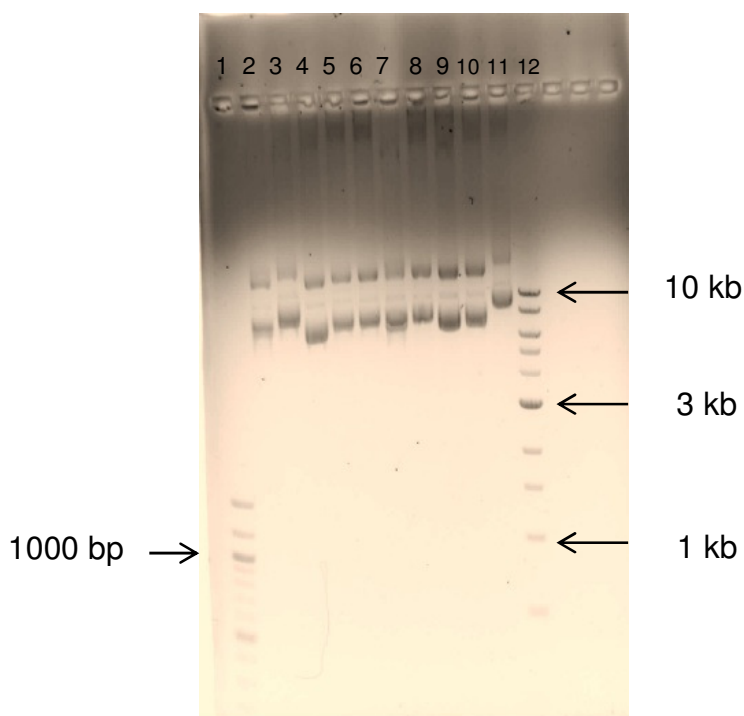
Ligaasientsyymillä liitettiin FNR-insertit restriktoituihin ja CIP-käsiteltyihin pGWR8-vektoreihin. Ligaatiotuotteet, pGWR8-FNR1 ja pGWR8-FNR2, transformoitiin lämpökäsittelyllä kompetentteihin DH5 α -soluihin ja viljeltiin soluja LB-maljoilla, joissa kanamysiinia 50 $\mu\text{g/ml}$. pGWR8-FNR1-maljoilla oli kasvanut vain kaksi erillistä pesäkettä ja pGWR8-FNR2-maljoilla 8 pesäkettä. Jokaisesta pesäkkeestä poimittiin soluja nestekasvatukseen varastosolujen tekoa ja plasmidin eristystä varten. Jokaisen kloonin plasmidit eristettiin ja DNA-pitoisuudet mitattiin Nanodropilla, tulokset on taulukossa 9.

Taulukko 9. Transformaation tuloksena saatujen kloonien DNA-pitoisuudet

Näyte/klooni	DNA-pitoisuus ng/ μl
FNR1 A	84
FNR1 B	125
FNR2 A	152
FNR2 B	112
FNR2 C	113
FNR2 D1	103
FNR2 D2	119
FNR2 E	143
FNR2 F	130
FNR2 G	81

Eristetyt plasmidit ajettiin agarosigeelillä ja tarkistettiin plasmidien kunto, kuva 8. Geelin perusteella plasmidit vaikuttivat olevan kunnossa ja ehjiä. DNA-

markkereina käytettiin 100 bp ja 1 kb kokostandardeja. Näytteet on ladattu geelille taulukon 9 mukaisessa järjestyksessä.



Kuva 8. Transformaatissa saatujen kloonien puhdistetut plasmidit.

1=100 bp kokostandardi, 2=FNR1 A, 3=FNR1 B, 4=FNR2 A, 5=FNR2 B, 6=FNR2 C, 7=FNR2 D1, 8=FNR2 D2, 9=FNR2 E, 10=FNR2 F, 11=FNR2 G, 12=1 kb kokostandardi

Puhdistetuista kloonien plasmideista valmistettiin näytteet sekvensoitavaksi ja sekvensointituloksista huomattiin muutamien kloonien insertin kiinnittyneen vektoriin väärin päin. Insetti oli oikein päin seuraavilla klooneilla: FNR2 A, D1, E ja F. Molemmat FNR1 kloonit olivat virheellisiä, minkä takia transformaatio täytyi tehdä uudestaan.

6.3 Paikkaspesifinen mutageneesi ja kasvien agrotransformaatio

Useiden transformaatioyritysten jälkeen saatiin yksi klooni, jossa *FNR1*-insertti oli kiinnittynyt vektoriin oikein päin. Sekvensointituloksista saatiin kuitenkin selville, että geenin keskellä oli tapahtunut spontaani pistemutaatio, yksi tymiini, (T) oli muuttunut adeniiniksi (A). Tässä vaiheessa huomattiin myös toinen, *FNR2*-inserttiä koskeva ongelma. *FNR2*-geenin restiktiota varten PCR-

alukkeeseen suunniteltu NcoI-restriktiokohta (CCATGG) sisältää translaation aloituskohdan ATG. *FNR2*-geenin restriktiossa käytetyn entsyymin (NcoI) katkaisukohta on saattanut aiheittaa sen, että *FNR2*-geenin translaatio alkaa väärästä kohdasta. NcoI tunnistaa sekvenssin 5'...C↓CATGG...3' (katkaisu nuolen kohdasta) ja katkaisukohdan jälkeen tulee ylimääräinen translaation aloituskodoni ATG. Varsinainen *FNR2*-geenin aloituskohda, aloituskodoni ATG, alkaa entsyymin katkaisukohdasta lukien kuuden nukleotidin jälkeen. On myös mahdollista, että geenin koodaus alkaa oikeasta kohtaa ja lukukehys pysyy oikeana. Varmuuden vuoksi tämä ongelma korjattiin mutageneesillä yhdessä *FNR1*-geenin mutaation kanssa. Suunniteltiin seuraavat alukkeet:

FNR1:

for: 5' CCGCACAAGCTCAGGCTTACTCTATCGCGAGTAG 3' T_m=75,5

rev: 5' CTACTCGCGATAGAGTAAAGCCTGAGCTTGTGCGG 3' T_m=75,5

FNR2:

for: 5' AACGATAGATATCACCATCGATGGCGACTACCATGAAT 3' T_m=74,4

rev: 5' ATTCATGGTAGTCGCCATCGATGGTGATATCTATCGTT 3' T_m = 74,4

FNR1-alukkeissa on punaisella korostettu pistemutaatiokohta, joka halutaan korjata. Alkuperäisessä geenissä punaisessa korostuskohdassa on T, pistemutaation jälkeen siihen on tullut A ja nyt mutageneesi-kitillä korjataan A takaisin T:ksi. *FNR2*-alukkeen kohdalla on tarkoituksena muuttaa sinisellä korostetun emäksen kohdalla oleva guaniini, G, sytosiiniksi, C. Muutoksen jälkeen ensimmäinen aloituskodoni tulee vastaan vasta *FNR2*-geenin alussa, juuri oikeassa kohtaa ja geeniä luetaan oikein.

Mutageneesi suoritettiin kitin ohjeen mukaisesti ja uudet korjatut plasmidit transformoitiin DH5α-soluihin. Saaduista klooneista eristettiin plasmidit ja näytteiden DNA-pitoisuudet mitattiin Nanodropilla, tulokset on esitetty taulukossa 10. Plasmidit sekvensoitiin ja sekvensointitulosten perusteella

osassa klooneissa insertti oli oikein päin ja kunnossa. Työ jatkettiin onnistuneilla klooneilla fnr1 c ja fnr2 a.

Taulukko 10. Mutageneesi-kloonien DNA-pitoisuudet

Näyte	pitoisuus ng/μl
fnr1 a	87
fnr1 b	105
fnr1 c	86
fnr2 a	77
fnr2 b	84
fnr2 c	80

Oikeanlaiset plasmidit klooneista fnr1 c ja fnr2 a transformoitiin kompetentteihin GV3101 agrobakteerisoluihin. Transformaatiomaljoja kasvatettiin +29°C:een lämpökaapissa. Kahden vuorokauden inkuboinnin jälkeen maljoilla oli runsaasti erillisiä pesäkkeitä. Maljoilta poimittiin yksi pesäke nestekasvatukseen kasvien transformaatiota varten. Kasvit infektoitiin dippaamalla kasvin kukkavarsi agrobakteeriliuokseen. Infektoidut kasvit siirrettiin kasvihuoneeseen kasvamaan ja tuottamaan siemeniä.

6.4 Jatkotoimenpiteet

Dipatut kasvit tuottavat siemeniä ja osassa siemenissä on transformoituneena kanamysiini-resistenssigeeni sekä *FNR1*- että *FNR2*-geeni kukkakaalin mosaiikkiviruksen 35S-promootterin alaisuudessa. Kaikki siemenet kerätään ja steriloidaan, jonka jälkeen niitä kasvatetaan kanamysiiniä sisältävillä MS ravinneagar-alustoilla. Vain ne siemenet, joissa on kanamysiini-resistenssigeeni voivat vihertää ja kasvattaa juuria tällä alustalla. Muista, suurimmasta osasta, siemenistä kasvaa pieniä ja vaaleita kasveja, jotka eivät ole transformantteja.

Noin viikon maljalla kasvattamisen jälkeen taimet siirretään multa-alustalle kasvamaan ja tuottamaan lisää siemeniä. Toisen erän siemeniä tullaan käsittelemään samoin; steriloidaan ja kasvatetaan kanamysiini-maljalla. Tässä vaiheessa kaikkien kasvien pitäisi periaatteessa kasvaa hyvin, koska kaikki siemenet ovat peräisin infektoituneesta kasvista. Tällöin meillä on FNR1 ja

FNR2 ylituottolinjoja, joita karakterisoidaan ja tutkitaan proteiinitasolla muun muassa immunomäärityksillä.

Opinnäytetyöni osalta tärkeimpiä tuloksia ja saavutuksia ovat olleet toimivien yhdistelmä-DNA-tekniikan avulla tuotettujen plasmidien tekeminen ja plasmidien siirtäminen kasviin. Myöhemmin kasvien fenotyyppiä voidaan tutkia ja verrata villityypin ja *fnr1*- ja *fnr2*-poistogeenisiin kasveihin sekä fenotyypeiltään että proteiinitasolla.

LÄHTEET

- Aittomäki, E., Eerikäinen, T., Leisola, M., Ojamo, H., Suominen, I., von Weymarn, N. 2002. Bioprosessiteknikka. WSOY, Porvoo
- Arakaki, A. K., Ceccarelli, E. A., Carillo, N. 1997. Plant-type ferredoxin-NADP⁺ reductases: a basal structural framework and a multiplicity of functions. *The FASEB Journal*, vol. 11, 133-140
- Hald, S., Pribil, M., Leister, D., Gallois, P., Johnson, GN. 2008. Competition between linear and cyclic electron flow in plants deficient in Photosystem I. *Biochimica et Biophysica Acta*, vol 1777, 1173-1183.
- Häikiö, E., Kangasjärvi, J. 1999. Biotekniikan riskit. Pohjois-Savon ympäristökeskus, Suomen ympäristökeskus, Kuopion Liikekirjapaino Oy, Kuopio
- Ihalainen, J. 2003. Kasvit valonsieppareina. *Dimensio* 3/2003, 4-9.
- Joliot, P., Johnson, N. G. 2011. Regulation of cyclic and linear electron flow in higher plants. *PNAS*, vol 108, no. 32, 13317-13322
- Lintala, M., Allahverdiyeva, Y., Kidron, H., Piippo, M., Battchikova, N., Suorsa, M., Rintamäki, E., Salminen, TA., Aro, EM., Mulo, P. 2007. Structural and functional characterization of ferredoxin-NADP⁺ -oxidoreductase using knock-out mutants of *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, vol 49: 1041-1052
- Lintala, M., Allahverdiyeva, Y., Kangasjärvi, S., Lehtimäki, N., Keränen, M., Rinamäki, E., Aro, EM., Mulo, P. 2009. Comparative analysis of leaf-type ferredoxin-NADP oxidoreductase isoforms in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, vol 57, 1103-1115
- Lohtander-Buckbee, K., Törmäkangas, K., Ruohonen-Lehto, M. 2004. Menetelmien valinta muuntogeenisten kasvien ympäristövaikutusten arviointiin ja seurantaan. Suomen ympäristökeskus, Edita Print Oy, Helsinki
- NCBI 2012, [viitattu 20.12.2011]. Saatavilla <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> > Genomes & Maps > Genome > Plants > *Arabidopsis thaliana* (thale cress)
- Pohjola, A. 2009. Vihreiden kasvien fotosynteesi. Kandidaatitutkielma. Kemian laitos. Helsingin yliopisto: Helsinki
- Pohjola, A 2010. Lukiolaisten vaihtoehtoiset käsitykset fotosynteesistä. Pro gradu –tutkielma. Kemian laitos. Helsingin yliopisto: Helsinki
- Rozhon, W., Mayerhofer, J., Petutschnig, E., Fujioka, S. and Jonak, C. 2010. ASK0, a group-III *Arabidopsis* GSK3, functions in the brassinosteroid signalling pathway. *The Plant Journal*, vol 62: 215–223.
- Suominen, I., Ollikka, P. 1997. Yhdistelmä-DNA-tekniikan perusteet. Opetushallitus, Hakapaino Oy, Helsinki.
- Tair – The *Arabidopsis* Information Resource 2008, [viitattu 27.12.2011]. Saatavilla www.arabidopsis.org > portals > education > about arabidopsis
- Taiz, L., Zeiger, E. 2006. *Plant Physiology*, 4th edition. Sinauer Associates. Sunderland, Massachusetts

