



Tarja Huhta

FUUSIOPROTEIINI Fc-ENDOSTATIININ TUOTTAMINEN NISÄKÄSSOLUSSA

FUUSIOPROTEIINI F_c-ENDOSTATIININ TUOTTAMINEN NISÄKÄSSOLUSSA

Tarja Huhta
Opinnäytetyö
Kevät 2012
Laboratorioalan koulutusohjelma
Oulun seudun ammattikorkeakoulu

TIIVISTELMÄ

Oulun seudun ammattikorkeakoulu
Laboratorioalan koulutusohjelma, Bioteknologian suuntautumisvaihtoehto

Tekijä: Tarja Huhta

Opinnäytetyön nimi: Fuusioproteiini Fc-endostaatiinin tuottaminen nisäkässolussa

Työn ohjaaja: Elsa Kumpulainen

Työn valmistuslukukausi ja -vuosi: Kevät 2012

Sivumäärä: 48 + 12 liitesivua

Lääkkeinä käytettäviä arvokkaita valkuaisaineita on puhdistettu aiemmin luonnollisista lähteistä. Geenitekniikan avulla niitä voidaan nykyään tuottaa rekombinanttiproteiineina solutehtaissa eli tuottosoluissa, joihin on siirretty halutunlaisen valkuaisaineen valmistumista ohjaava geenirakenne. Rekombinanttiproteiini voi sisältää luonnollisen valkuaisaineen rakenteiden ohella lisärakenteita, erilaisia puhdistushäntiä tai myös jonkin toisen proteiinin rakenteosia. Nämä tehostavat lääkeproteiinin talteenottoa tai parantavat sen stabiilisuutta tai vaikutusajan kestoa elimistössä.

Opinnäytetyössä tavoitteena oli tuottaa verisuonten muodostumista vähentävää endostaatiinia rekombinanttimuodossa, jossa IgG-vasta-ainemolekyylin Fc-osaan oli saumattomasti liitetty endostaatiini. Fc-endostaatiini-fuusiovasta-ainetta tuotettiin kaupallisessa nisäkässolulinjassa, hamsterin soluissa (CHO, Chinese Hamster Ovary). Endostaatiinia voidaan käyttää muun muassa syövän hoidossa estämään kasvainta ruokkivan verisuoniston muodostumista.

Opinnäytetyö tehtiin Oulun Yliopistossa, Biolääketieteen laitoksen Fysiologian yksikössä. Työ oli osa laajempaa Euroopan aluekehitysrahaston rahoittamaa toimintaympäristön kehittämishanketta, Biopalvelut kilpailukykyisiksi tuotteiksi, jossa kehitettiin uudenlaisia molekyyliytökaluja sekä tuotantomenetelmiä erilaisten vasta-aineiden tuottoon.

Työssä siirrettiin onnistuneesti rekombinanttivasta-ainekonstruktin nisäkässoluihin, joiden tuottamaa vieraan geenin ohjeen mukaista valkuaisainetta pystyttiin havaitsemaan tuottomediumissa ELISA-määrittäyksillä, polyklonaalisten endostaatiini- tai anti-human-vasta-aineiden avulla.

Asiasanat:

fuusioproteiini, terapeuttinen valkuaisaine, rekombinantti, vasta-aine, nisäkässolu, solutehdas

SISÄLLYS

TIIVISTELMÄ

SISÄLLYS

1	JOHDANTO	6
2	VASTA-AINEET	7
2.1	Vasta-aineen rakenne	7
2.2	Vasta-aineluokat	9
2.3	Polyklonaaliset ja monoklonaliset vasta-aineet	11
2.3.1	Polyklonaaliset vasta-aineet	11
2.3.2	Monoklonaliset vasta-aineet	12
3	PROTEIININ TUOTTO NISÄKÄSSOLUISSA	14
3.1	Eläinsolujen rakenne	14
3.2	Transkriptio ja proteiinisynteesi	15
3.3	Proteiinin muokkaus ja erityys solusta	16
3.4	Nisäkäsolujen kasvuolosuhteet	17
3.5	Erilaisia nisäkäsoluja	18
4	ENDOSTATIINI.....	20
5	TYÖN KOKEELLINEN OSUUS	22
5.1	Tuottovektorin valmistus.....	22
5.1.1	Plasmidi DNA:n eristys	22
5.1.2	Vektorin muokkaus Smal- ja BamHI*HF-entsyymeillä	23
5.1.3	Vektorien testiligaatio.....	24
5.1.4	Fc-endostatiini-geenin ligaatio vektoreihin ja transformaatio kompetentteihin soluihin.....	25
5.2	pCDNA3.3-Fc-est-kloonipesäkkeiden testaus.....	26
5.3	Soluviljely	28
5.3.1	Solujen kasvatus ja hoito	28
5.3.2	Solujen jakaminen	29
5.4	Transfektiot liposomimenetelmällä CHO-nisäkäsoluihin.....	30
5.5	Mediumin ja solujen keräys sekä solujen hajotus.....	32
5.6	Fc-endostatiini vasta-aineen puhdistus kasvumediumista.....	33
5.6.1	Blue Sepharose -hartsikäsittely	33

5.6.2	Proteiini A -hartsikäsittely	34
5.7	ELISA-testi	35
5.7.1	Kaivojen pinnoittaminen ja blokkaukset	36
5.7.2	Näytteet ja vasta-aineinkuboinnit sekä mittaus	36
5.8	Tuotettujen vasta-aineiden karakterisointi	37
6	TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU	38
6.1	Vektorin valmistus	38
6.2	pCDNA3.3-Fc-est kloonit	40
6.3	Fc-endostatiinin puhdistus mediumista	41
6.4	SDS-PAGE	41
6.5	ELISA-testi	42
7	POHDINTA	44
	LÄHTEET	46
	LIITTEET	48

1 JOHDANTO

Vasta-aineet ovat stabiileja valkuaisaineita, joiden erityisominaisuus on tunnistaa yksityiskohtaisia rakenteita ja sitoutua niihin tiukasti. Vasta-aineita käytetään diagnostiikassa tunnistamaan tutkittavia analyyttejä, mutta myös sairauksien hoidossa, esimerkiksi syövän hoidossa täsmälääkkeen kuljettajana tai sitoutumaan johonkin elimistön valkuaisaineeseen estäen sen biologisen toiminnan. Vasta-aineen osa voidaan liittää toiseen valkuaisaineeseen, esimerkiksi lääkeaineeseen, jolloin se parantaa lääkeaineen ominaisuuksia.

Opinnäytetyössä tuotettiin fuusioproteiini Fc-endostatiinia nisäkässoluissa. Fc-endostatiini-geeni kloonattiin nisäkässolutuottovektoriin ja siirrettiin CHO-nisäkässoluihin (chinese hamster ovary cells), joita käytetään yleisesti proteiinien tuotossa. Tuotto tehdään nisäkässoluissa, koska ne osaavat tehdä vaadittavat proteiininmuokkausreaktiot, jolloin proteiini laskostuu oikeaan kolmiulotteiseen muotoonsa.

Lopuksi tuottomediumeista ja solu-uutteista mitattiin ELISA-menetelmällä (enzyme linked immunosorbent assay) Fc-endostatiini-fuusioproteiinin määrä, ja tuotteen puhdistusta kokeiltiin affiniteettikromatografialla käyttäen hyväksi fuusioproteiinin Fc-osaa ja sen sitoutumishalukkuutta. Tuotteen ominaisuuksia selvitettiin SDS-PAGE:lla.

Opinnäytetyö tehtiin Oulun yliopistossa, Biolääketieteen laitoksen Fysiologian yksikössä. Opinnäytetyön valvojana oli erikoistutkija Johanna Veijola ja ohjasi Elsa Kumpulainen.

2 VASTA-AINEET

Vasta-aineet eli immunoglobuliinit ovat selkärankaisten veressä ja eritteissä esiintyviä immuunijärjestelmään kuuluvia glykoproteiineja, joiden avulla elimistö tunnistaa vieraita organismeja tai niiden osia. (Vasta-aineet. 2006.)

Vasta-aineet kuuluvat hankittuun eli spesifiseen puolustusjärjestelmään, joka kehittyy sen mukaan, millaisten vieraiden antigeenien kanssa elimistö joutuu tekemisiin. Vasta-aineiden tuotannosta huolehtivat B-lymfosyytit, jotka antigeenikontaktin jälkeen alkavat jakautua T-lymfosyyttien avulla ja muuttuvat vasta-aineita tuottaviksi plasmasoluiksi. (Kumpulainen 2009.)

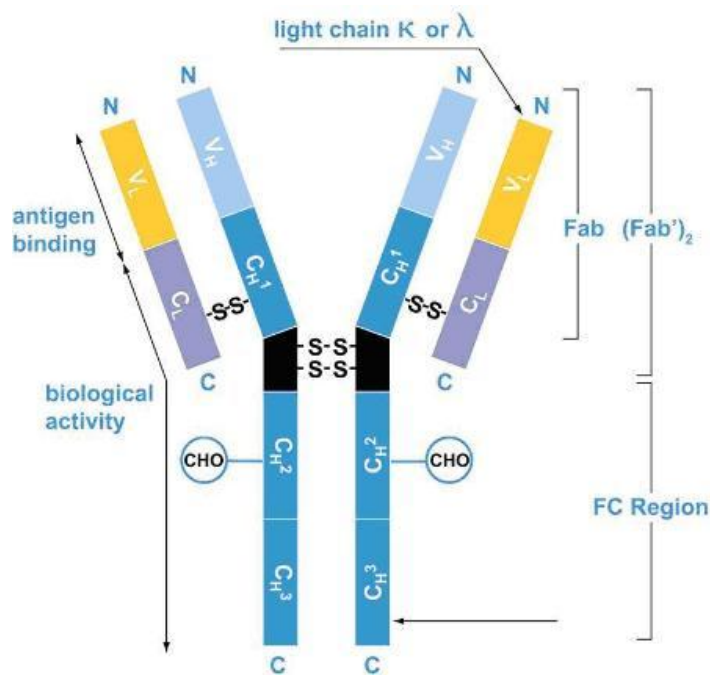
2.1 Vasta-aineen rakenne

Vasta-aine on Y-kirjaimen muotoinen molekyyli, joka rakentuu neljästä polypeptidiketjusta: kahdesta identtisestä raskasketjusta (molekyylipaino n. 50 kDa) ja kahdesta identtisestä kevytketjusta (molekyylipaino 25 kDa.) Ketjut ovat sitoutuneet toisiinsa disulfididisidoksilla. (Vasta-aineet. 2006.)

Fab-alueeksi kutsutaan vasta-aineen kevyen ja raskaan ketjun muodostamaa ”käsivartta”. Niiden päissä sijaitsee spesifinen sitoutumiskohta, jolla vasta-aine kiinnittyy antigeenin tiettyyn kohtaan, niin sanottuun epitooppiin. Ketjuissa on vaihtelevia ja samankaltaisia alueita. Erityisesti vaihtelevilla alueilla on suuri merkitys antigeeniä sitovan kohdan kolmiulotteiseen muotoon, joka määrää eri vasta-aineiden sitoutumisen erilaisiin antigeenimolekyyleihin. Vasta-aineen sarana-alue mahdollistaa kiinnittymisen kahteen erilliseen, mutta identtiseen epitooppiin. (Vasta-aineet. 2006.)

Fc-alueeksi kutsutaan molekyylin raskaiden ketjujen muodostamaa jalkaosaa, jossa on sitoutumiskohtia komplementin proteiineille sekä erilaisille

solupintareseptoreille. Fc-osalla on kaksi tärkeää tehtävää puolustusreaktioissa. Kun kohdesolun pinnalle on muodostunut antigeeni-vasta-ainekompleksi, se aktivoi komplementin. Immunoglobuliinit sitoutuvat Fc-osallaan efektorisolujen pinnalla oleviin Fc-reseptoreihin. IgG:tä sitovat Fc-reseptorit ovat tärkeä osa fagocytoosissa, vasta-aineesta riippuvaisissa sytotoksisuusreaktioissa. Fc-osia on viittä erilaista, joista jokaisella on erilaiset biologiset ominaisuudet. Niiden perusteella vasta-aineet voidaan jakaa viiteen eri ryhmään. (Vasta-aineet. 2006; Lilius 2011.) Kuvassa 1 on esitetty vasta-ainemolekyylin rakenne.



KUVA 1. Vasta-ainemolekyylin rakenne (Abcam – discover more 1998–2011)

2.2 Vasta-aineluokat

Vasta-aineet jaetaan viiteen eri immunoglobuliiniluokkaan Y-yksiköiden lukumäärän ja raskaan ketjun tyyppin mukaan. Luokat ovat IgA, IgD, IgE, IgG ja IgM. (Autio 2006, s. 13.)

IgG

IgG on rakenteeltaan monomeeri (kuva 1). Immunoglobuliineista 80 % kuuluu tähän vasta-aineluokkaan. IgG voidaan jakaa neljään alaluokkaan sarana-alueen koon ja disulfididostosten lukumäärän ja sijainnin perusteella. Alaluokat ovat IgG1, IgG2, IgG3 ja IgG4. (Lilius 2011.)

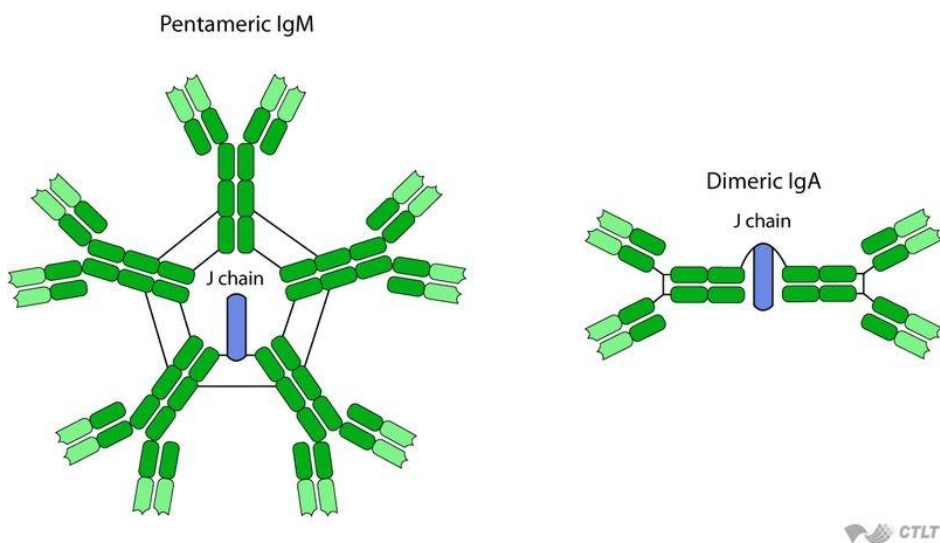
IgG aktivoi komplementin. Se pystyy neutralisoimaan toksiineja, ehkäisee virusinfektioita sekä estää bakteerien leviämisen, mikäli bakteerien flagelloille ja värekarvoille on muodostunut vasta-aineita. Pienen koon ansiosta IgG on ainoa vasta-aineluokka, joka läpäisee istukan, jolloin äiti voi siirtää immuniteettia sikiölle. (Lilius 2011.) Diagnostiikassa sekä terapiassa käytetyt vasta-aineet ovat useimmiten IgG luokasta.

IgM

Immunoglobuliineista 5–10 % kuuluu IgM-vasta-aineluokkaan. Rakenteeltaan IgM on pentameeri, eli se rakentuu viidestä Y-yksiköstä, jotka ovat järjestäytyneet Fc-osa keskustaan päin ja ovat kiinni toisissaan disulfididoksin (kuva 2). Rakenteen ansiosta sillä on kymmenen antigeeniä sitovaa kohtaa ulospäin. IgM on ensimmäinen vasta-aineluokka, joka muodostuu primäärivasteessa antigeeniä vastaan. Sen kohonnut määrä kertoo altistumisesta antigeenille tai infektiosta. (Lilius 2011.)

IgA

IgA muodostuu kahdesta Y-yksiköstä eli se on dimeeri. Sitä kuitenkin tavataan myös mono- ja trimeerinä. Seerumissa IgA:ta on 10–15 %, mutta se on vallitseva muoto ulkoisissa eritteissä, kuten sylki, hiki, rintamaito, sekä limakalvoilla keuhkoissa, virtsa- ja sukupuolitehjeissä. IgA:ta erittävät plasmaselulit ovat keskittyneet limakalvojen membraaneille. (Lilius 2011.)



KUVA 2. IgM ja IgA vasta-aineen rakenne (Abcam 1998–2011)

IgE

IgE on rakenteeltaan monomeeri, ja sitä on seerumissa selkeästi vähemmän kuin muita immunoglobuliineja, vain 0,004 %. Sitä on runsaasti epiteelipintojen alla (hengitystiehyet, iho, ruoansulatuskanava) liittyneenä heti syöttösoluihin. Sillä on tärkeä osa välittömissä yliherkkyysreaktioissa, jotka ilmenevät esimerkiksi heinänuhana ja nokkosrokkona. Allergiat kohottavat IgE pitoisuutta. (Kumpulainen 2009; Lilius 2011.)

IgD

IgD on monomeeri. Sitä on vähän seerumissa. Sen biologista tehtävää ei tunneta. (Lilius 2011.)

2.3 Polyklonaaliset ja monoklonaaliset vasta-aineet

Vasta-aine muodostuu ja kiinnittyy antigeenin pinnalla olevaa aluetta tai rakennetta vastaan. Tätä aluetta nimitetään epitoopiksi. Antigeenissä on yleensä useita mahdollisia epitooppeja, jolloin vasta-aineiden tuotannossa syntyy heterogeeninen seos vasta-aineita, joita kutsutaan polyklonaalisiksi vasta-aineiksi. Monoklonaalinen vasta-aine on homogeeninen; se on muodostunut vain yhtä antigeenin epitooppia vastaan. (Kumpulainen 2009.)

Polyklonaalisia vasta-aineita (Pab) on helppo valmistaa, mutta niitä saadaan tuotettua vain rajallinen määrä. Erot eri tuotantoerien välillä voivat vaihdella suuresti. Polyklonaalinen vasta-aine on yleensä spesifinen, mutta saattaa ristireagoida muiden alkuperäisen kaltaisten antigeenien kanssa. Monoklonaaliset vasta-aineet (Mab) ovat hankalia valmistaa ja vaativat erityisosaamista. Kun oikea kloni on löydetty, voidaan vasta-ainetta tuottaa rajattomasti soluviljelmissä. (Kumpulainen 2009.)

2.3.1 Polyklonaaliset vasta-aineet

Polyklonaalisia vasta-aineita tuotetaan yleisimmin kaneissa eläimen koon, suhteellisen pitkän iän ja helpon käsiteltävyyden takia. Yksi kani tuottaa elinikänsä aikana 100–200 ml antiseerumia. Muita vasta-aineen tuotannossa käytettyjä eläimiä ovat esimerkiksi lammas, rotta ja hiiri. (Autio 2006, s. 32–33.)

Vasta-aineiden valmistus kestää 3–5 kuukautta. Immunisointiin valitaan useita eläimiä, koska niillä on yksilöllinen vaste ja usein eläimistä vain 10–20 % tuottaa korkealaatuista vasta-ainetta. Kanin immunisoinnissa eläintä rokotetaan ihon alle 2–4 viikon välein. Eläimen seeruminäytteistä seurataan erilaisilla testeillä, onko vasta-ainetuotanto käynnistynyt. Immunisointia eli rokotevahvistuksia jatketaan loppuelämän, jotta vasta-ainetuotanto säilyisi. (Kumpulainen 2009.)

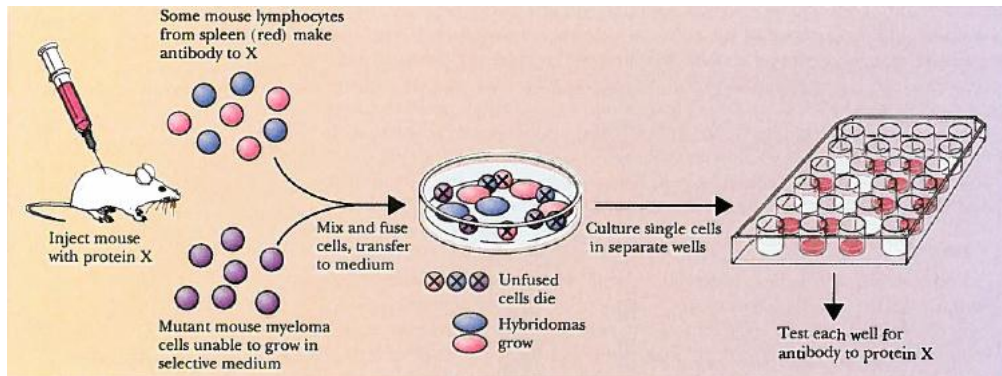
Polyklonaaliset vasta-aineet erotetaan verestä antigeenin avulla. Antiseerumi käsitellään ja puhdistetaan yleisillä proteiinin puhdistuskeinoilla, kuten esimerkiksi suolasaostus, geelisuodatus, elektroforeesi ja affiniteettipuhdistus. Puhdistuksessa nostetaan vasta-aineen pitoisuutta ja poistetaan häiritseviä proteiineja. (Autio 2006, s. 33.)

2.3.2 Monoklonaaliset vasta-aineet

Koe-eläimet rokotetaan eli immunisoidaan halutulla antigeenillä. Immunisointia toistetaan 2–4 viikon välein. Koe-eläinten seerumista tutkitaan, onko vasta-ainetuotanto käynnistynyt. Kun vasta-ainetuotanto on käynnistynyt ja vahvistunut riittävästi, hyvän immuunivasteen omaava eläin lopetetaan. Koe-eläimen perna eristetään. Pernan sisältämät B-lymfosyytit fuusoidaan yhteen myeloomasolujen kanssa. Myeloomasolut ovat syöpäsoluja, jotka jakaantuvat lähes rajattomasti. Muodostunutta solufuusiota kutsutaan hybridoomasoluksi. (Kumpulainen 2009; Autio 2006, s. 35–36.)

Hybridoomasoluja kasvatetaan laimennossarjana usealla maljalla olosuhteissa, joissa pernasolut ja fuusioitumattomat myeloomasolut kuolevat ja vain fuusioituneet solut kasvavat ja myös tuottavat eri vasta-aineita. Maljoilta tutkitaan, mikä laimennossarjan malja tuottaa parhaiten haluttua vasta-ainetta. Yhdestä solusta peräisin oleva kloonin pyritään puhdistamaan laimentamalla kasvustoa, kunnes saadaan yhdestä B-solusta lähtöisin oleva hybridoomalinja.

(Kumpulainen 2009.) Monoklonaalisten vasta-aineiden valmistuksen periaate on esitetty kuvassa 3.



KUVA 3. Monoklonaalisten vasta-aineiden valmistuksen periaate (Cambell, s. 718)

Monoklonaalisia vasta-aineita pidetään arvokkaina tutkimustyökaluina. Niitä voidaan käyttää proteiinin puhdistamiseen, tietyn proteiinin paikantamiseen soluissa tai solufraktioissa. Niitä käytetään laajasti diagnostisiin ja terapeuttisiin sovelluksiin. (Hybridisolut. 2006.)

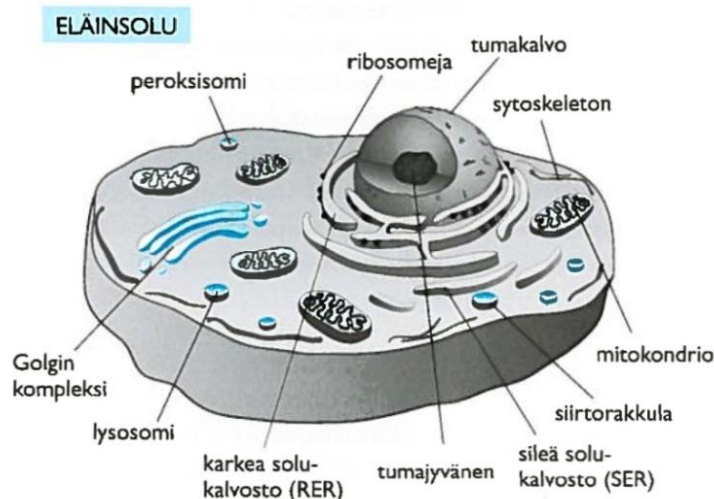
3 PROTEIININ TUOTTO NISÄKÄSSOLUISSA

Eläinsoluviljelmiä käytetään erityisesti diagnostisten ja farmaseuttisten proteiinien, kuten monoklonaalisten vasta-aineiden tuottoon. Viljelmät ovat hankalia ja kalliita kasvattaa, mutta niiden suurena etuna ovat solun proteiininmuokkausreaktiot, jolloin saadaan biologisesti aktiivisia proteiineja. (Aittomäki – Eerikäinen – Leisola – Ojanen - Suominen 2002, s. 43; Kumpulainen 2009.)

3.1 Eläinsolujen rakenne

Nisäkäsolut kuuluvat eukaryooteihin, joita ovat lisäksi hiivat, homeet ja kasvisolut. Eukaryoottisoluissa on tuma, jossa sijaitsee solun perintöaineksen sisältävät kromosomit. Jokainen kromosomi koostuu yhdestä suuresta lineaarisesta DNA-molekyylisestä ja siihen liittyneistä proteiineista. Muuta yhteistä eukaryoottisoluilla on energia-aineenvaihdunnassa tärkeät mitokondriot, joissa ravintoaineiden sisältämä energia muutetaan solulle käyttökelpoiseen muotoon. Lisäksi eukaryoottisoluilla on endoplasmakalvosto, Golgin kompleksi ja hydrolyyttisiä entsyymejä sisältävät lysosomit. (Aittomäki ym. 2002, s. 24; Haajanen – Suominen – Pärssinen 2010, s. 11.) Eläinsolun rakenne on esitetty kuvassa 4.

Hiivoilla, homeilla ja kasvisoluilla on soluseinä, joka vaihtelee solutyypin mukaan. Eläinsoluissa puolestaan ei ole soluseinää vaan solua ympäröi ohut solukalvo. Sen takia ne vaurioituvat helposti mekaanisten rasitusten vaikutuksesta, mikä on otettava huomioon eläinsoluja kasvatettaessa. (Aittomäki ym. 2002, s. 25.)



KUVA 4. Eläinsolun perusrakenne (Haajanen ym. 2010, s. 12)

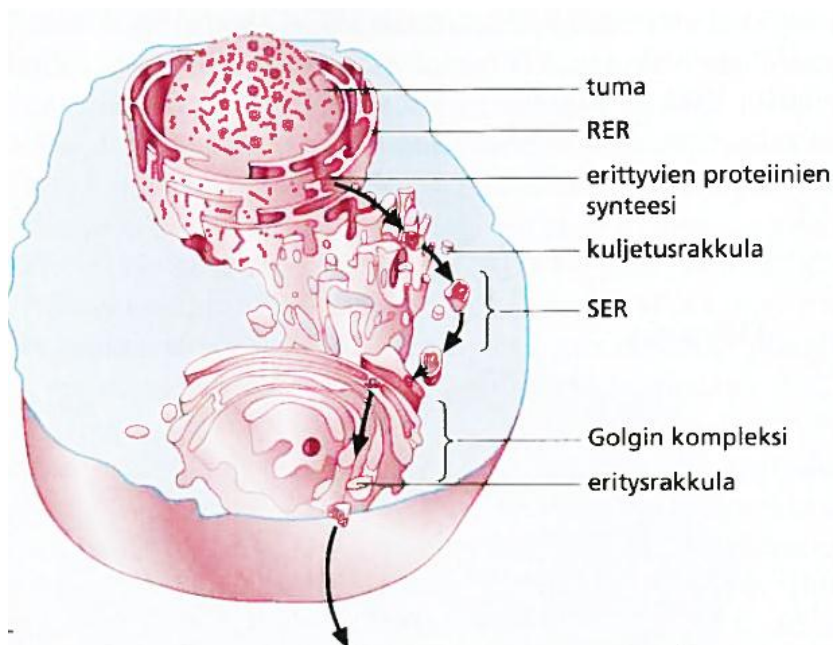
3.2 Transkriptio ja proteiinisynteesi

Eukaryoottisolulla perintöaines eli DNA sijaitsee tumassa. DNA:n avulla solu pystyy toimimaan, kehittymään ja siirtämään informaatiota jälkeläisilleen. Transkriptio eli RNA-synteesi on tapahtuma, jossa DNA:n sisältämä informaatio siirretään RNA:lle yksijuosteisen DNA:n toimiessa templaattina. (Haajanen ym. 2010. s. 13, 29.)

Proteiinisynteesi eli translaatio jaetaan kolmeen vaiheeseen: aloitus-, pitenemis- ja lopetusvaihe. Translaatio tapahtuu soluissa sytoplasmassa ja tärkeimmät komponentit ovat mRNA, tRNA ja ribosomit. Aloitus eli initaatiovaiheessa translaatio alkaa mRNA:n 5' päästä, jolloin aloitus tRNA sitoutuu ensimmäiseen AUG-aloituskodoniin. Pitenemis- eli elognaatiovaiheessa mRNA:n nukleotidisekvenssi määrää aminohapposekvenssin, ja ne liitetään toisiinsa mRNA:n kodonien sanelemassa järjestyksessä. Lopetus eli terminaatiovaiheessa translaatio päättyy, kun lukukehyksessä tulee vastaan terminaatiokodoni ja syntynyt polypeptidi vapautuu. (Haajanen ym. 2010, s. 44–47.)

3.3 Proteiinin muokkaus ja erityis solusta

Kaikki solussa valmistetut proteiinit eivät laskostu spontaanisti kolmiulotteiseen muotoon. Polypeptidiketjujen laskostumista auttavat kaperonit, proteiinit, jotka sitoutuvat polypeptideihin estäen niiden aggregoitumisen sekä monialayksikköproteiinien laskostumisen oikeaan rakenteeseen. (Kaperonit. 2006.) Proteiinin muokkaus ja erityis soluissa on esitetty kuvassa 5.



KUVA 5. Proteiinin muokkaus ja erityis nisäkässoluissa (Aittomäki ym. 2002, s. 26.)

Tärkein nisäkässolujen muokkausreaktioista on glykosylaatio eli sokeriosien lisääminen proteiiniin. Hiilihydraattien lisääminen alkaa jo endoplasmakalvostossa, jossa tapahtuu niin sanottu ydinglykosylaatio. Sokeriosien muokkaus jatkuu edelleen Golgin kompleksissa. Sokeriosat auttavat proteiinimolekyylien laskostumisessa. Ne lisäävät molekyylin

vesiliukoisuutta sekä stabiloivat ja suojaavat proteolyttisiltä entsyymeiltä. Jos proteiinissa on alkuperäisestä poikkeavia sokereita, ne saattavat aiheuttaa elimistöön päästyään immuunivasteen, jonka takia proteiini tuhoetaan. Tämän takia farmaseuttisiin tarkoituksiin tuotettavien proteiinien valmistuksessa pyritään mahdollisimman suureen samankaltaisuuteen alkuperäisen proteiinin kanssa. (Aittomäki ym. 2002, s. 26–27.)

3.4 Nisäkässolujen kasvuolosuhteet

Nisäkässoluja kasvatettaessa olosuhteet pyritään luomaan vastaamaan mahdollisimman hyvin fysiologisia oloja *in vivo*. Kasvumedium sisältää kaikki välttämättömät orgaaniset ja epäorgaaniset aineet. pH säädetään erilaisilla puskureilla. Lämpötila, kosteus sekä happi- ja hiilidioksidipitoisuus säädetään inkubaattoreissa. Soluille vaihdetaan uusi kasvumedium säännöllisesti, koska kasvaessaan solut kuluttavat ravintoaineita ja tuottavat elinympäristöönsä kasvulle haitallisia aineenvaihduntatuotteita. (Kumpulainen 2009.)

Solujen kasvatusliuoksen valinta perustuu usein kokemukseen tai siihen, mitä solulinjojen toimittaja on suositellut. Kasvatusliuoksia on lukuisia erilaisia eri käyttötarkoituksiin. Perusliuokseen lisätään eri määrä solutyypin vaatimia lisäravinteita. (Höyhty 2009.)

Tärkein kasvatusliuokseen lisättävä ainesosa on seerumi. Seerumi sisältää aminohappoja, kasvutekijöitä, vitamiineja, hivenaineita, lipidejä, proteiineja ja hormoneja. Se kelatoi raskasmetalleja, parantaa mediumin puskurikapasiteettia ja suojaa nisäkässoluja proteolyttisiltä vaikutuksilta. Seerumi on kallista ja saattaa sisältää viruksia ja mykoplasmaa, jotka kontaminoivat viljelmän. (Aittomäki ym. 2002, s. 176). Yleisimmin käytössä on vasikan sikiön seerumi, mutta myös ihmisen ja hevosen seerumia käytetään. Soluja voidaan kasvattaa myös ilman seerumia, jolloin esimerkiksi proteiinin puhdistus mediumista on

helpompaa. Mediumiin lisätään myös glutamiinia. Se on solujen tarvitsema aminohappo, jota solut eivät itse pysty valmistamaan. (Höyhtyä 1999; Gardemeister – Liimatainen 2009.)

Soluviljelyliuoksesta riippuen soluja voidaan kasvattaa joko tavallisissa inkubaattoreissa tai CO₂-inkubaattoreissa, jossa viljelyliuoksen pH puskuroidaan 5–10-prosenttisessa hiilidioksidikaasussa. Useimmille humaani- ja eläinsoluille kasvatuslämpötila on +37 °C. Lämpötilan stabiilisuus on tärkeää, koska jopa +/- 0,5 °C:n vaihtelu saattaa hidastaa solujen kasvua. (Höyhtyä 1999.)

Nisäkässoluviljelyssä aseptinen työskentely on erittäin tärkeää, koska viljeltävät solut kasvavat paljon hitaammin kuin kontaminaatiota aiheuttavat bakteerit, hiivat ja homeet. Aseptisessä työskentelyssä työntekijä on avainasemassa. Soluviljelytilojen tulisi olla oma yksikkönsä, jossa on erillinen ilmanvaihto. Kaikkien käytettävien laitteiden tulisi olla steriloituja ja helposti puhdistettavia. (Kumpulainen 2009.)

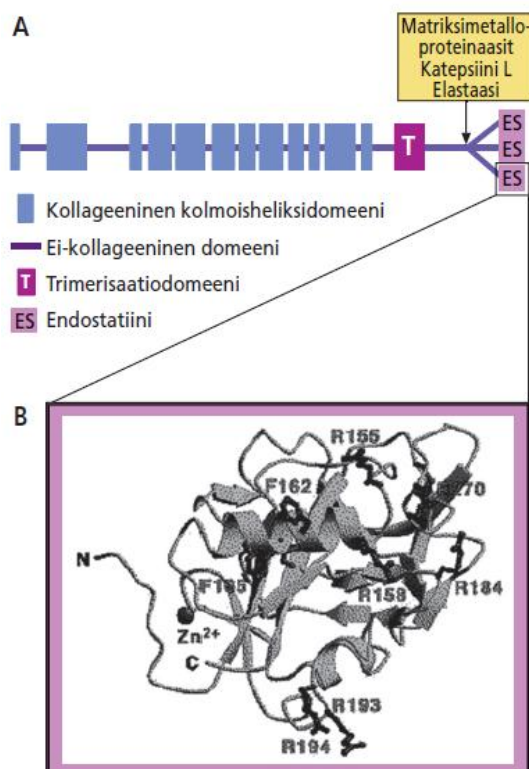
3.5 Erilaisia nisäkässoluja

Solujen elinikä riippuu niille ominaisista jakaantumiskerroista. Normaalisolujen kasvuston solut vanhenevat ja lopuksi kuolevat. Monissa bioprosesseissa edellytetään kuitenkin loputonta solujakaantumista. Fuusiolla syöpäsolulinjojen kanssa, virusinfektiolla tai mutageneesillä voidaan solut muuntaa kuolemattomiksi eli jakaantumaan loputtomasti. Tuotantoprosesseihin soveltuvia nisäkässolulinjoja on kehitelty muun muassa ihmisen, rotan, hamsterin ja hiiren soluista. Yksittäisistä elimistä peräisin olevia solulinjoja on saatavana muun muassa keuhkoista, munuaisista ihosta ja munasarjoista. (Aittomäki ym. 2002, s. 175.)

Yleisimpiä käytettyjä solulinjoja ovat hybridoomasolut, jotka ovat luuydinkasvainsolun ja valkosolun fuusio. Niiden avulla tuotetaan muun muassa sokeriosia sisältäviä glykoproteiineja ja monoklonaalisia vasta-aineita. Rekombinanttiproteiinin tuottamiseen käytetään CHO- (chinese hamster ovary cells) ja myeloomasoluja. (Aittomäki ym. 2002, s. 43 ja 175.)

4 ENDOSTATIINI

Endostatiini on osa tyypin XVIII tyvikalvokollageenia ja se irtoaa kollageenin karboksipäästä proteolyttisesti. Rakenteeltaan endostatiini on globulaarinen molekyyli, jonka molekyylipaino on 20 kDa. Siinä on argiineista muodostunut laaja emäksinen pinta, joka säätelee molekyylin biologista aktiivisuutta. (Keski-Oja – Wickström 2005.). Endostatiinin rakenne on esitetty kuvassa 6.



KUVA 6. Tyypin XVIII kollageenin ja endostatiinin rakenne (Keski-Oja ym. 2005)

Syöpäkasvaimet ovat riippuvaisia hapesta ja ravinteista, eivätkä ne kykene kasvamaan 2–3 millimetriä suuremmaksi ilman angiogeneesiä eli verisuonten uudismuodostusta. Endostatiinilla puolestaan on angiogeneesiä estävä ja sitä kautta myös kasvaimen kehittymistä estävä vaikutus. Endostatiinin pitoisuus

plasmassa terveillä ihmisillä on 10–50 ng/ml, mutta pitoisuus vaihtelee suuresti eri yksilöillä. Esimerkiksi Down-potilailla seerumin endostatiinipitoisuus on korkea. Heillä esiintyy vähemmän kasvaimia kuin ihmisillä keskimäärin. Se voidaan selittää sillä, että Downin syndroomassa on monistunut kromosomi 21, jossa sijaitsee COL18A1-geeni. (Keski-Oja ym. 2005.)

Syövän hoidossa endostatiinia voidaan antaa potilaille suuriakin määriä ilman haittavaikutuksia ja toksisuutta. Hoidon ongelmia ovat pitkäkestoinen – mahdollisesti elinikäinen hoito ja toistuvat ruiskeet. Myös bakteereissa tuotettujen proteiinivalmisteiden mahdollisten epäpuhtauksien riski sekä hoidon kalleus ovat endostatiinihoidon varjopuolia. Uusina hoitokeinoina kehitetään, esimerkiksi yhdistelmähoitoja, geeniterapiaa, lääkeaineiden muokkausta. (Keski-Oja ym. 2005.)

Fc-osan merkitys hiirikokeessa

Kliinisissä hiirikokeissa on todettu hiirille annetun endostatiinin puoliintumisajan olevan 1–2 tuntia. Lisäksi puolessa (50 %) annetusta humaanista rekombinantti-endostatiinista (50 %:ssa) puuttuu N-terminaalaisesta päästä neljä aminohappoa, minkä vuoksi sinkki ei sitoudu ja näin ollen molekyylillä ei ole kasvainten kasvua estävää aktiivisuutta (antitumor activity). Humaani endostatiini liitettiin IgG-vasta-aineen Fc-osaan ja fuusioproteiinia tuotettiin nisäkässoluissa. Hiirikokeissa Fc-endostatiinin puoliintumisaika piteni tunneista jopa viikkojen mittaiseksi. Koska vaikuttava aine säilyy elimistössä pidempään, sitä tarvitaan pienempiä määriä. Kokeessa riittävä antituumoriannos Fc-endostatiinilla oli noin 100 kertaa pienempi kuin pelkällä endostatiinilla. (Lee – TjinTham Sjin – Movahedi – Ahmed – Pravda – Lo – Gillies – Folkman – Javaherian 2008.)

5 TYÖN KOKEELLINEN OSUUS

Työn ensimmäisen vaiheen tarkoitus oli valmistaa tuottovektori, johon Fc-endostatiini-geeni liitettiin. Ligaatio transformoitiin kompetentteihin *Escherichia coli*-soluihin ja tutkittiin, missä kloonissa oli oikea plasmidikonstruktio. Kun oikea plasmidikonstruktio oli tarkistettu sekvensoimalla, plasmidi transfektoitiin kertaluonteisia testituottoja varten CHO-nisäkässoluihin (Chinese Hamster Ovary cells). Lopuksi tutkittiin, olivatko solut tuottaneet vasta-ainetta. Tuottunut vasta-aine puhdistettiin affiniteettikromatografialla ja karakterisoitiin natriumdodekyylisulfaatti-polyakryyliamidigeelielektroforeesilla (SDS-PAGE) ja ELISA-testeillä (Enzyme-linked immunosorbent assay).

5.1 Tuottovektorin valmistus

Työ aloitettiin valmistamalla erilaisia vaihtoehtoisia nisäkässoluntuottovektoreita. Käytettäviä vektoreita olivat Qiagenin pQETrisystem ja Sigman pBICEP-CMV-3. Molemmista vektoreista oli valmiit glyserolistokit, joissa plasmidit olivat NEB5 *E.coli*-kannassa.

5.1.1 Plasmidi DNA:n eristys

Plasmidi eristettiin 200 ml:n kasvustosta, joka valmistettiin seuraavasti: Siirrettiin -80 °C:n syväpakastimen pQETrisystem/NEB5- ja pBICEP/NEB5-glyserolistokeista nokare pipetinkärjellä SB-MOPS-karbenisilliini-glukoosiliemeen (liite 2). Soluja kasvatettiin ravistelussa +37 °C:ssa, 230 rpm, yön yli. Seuraavana päivänä solut sentrifugoitiin pohjaan pulloissa 3500 rpm, 10 min.

Solupellesteistä eristettiin plasmidi-DNA Macherey-Nagel NucleoBond Xtra Maxi-kitillä (liite 5). Eluointivaiheessa mitattiin fraktioiden tilavuus ja määritettiin DNA-pitoisuus spektrofotometrisesti Nanodropilla. Tulosten perusteella laskettiin DNA-saalis ja lopullinen tilavuus eluointipuskuria, johon saostunut ja kuivattu DNA liuotettiin seuraavana päivänä, jotta loppupitoisuudeksi saataisiin noin 1 µg/µl.

5.1.2 Vektorin muokkaus Smal- ja BamHI*HF-entsyymeillä

Vektorit tarkistettiin testidigestiolla Smal- ja BamHI*HF-entsyymeillä. Eppendorf-putkiin pipetoitiin DNA:ta noin 1,5 µg ja lisättiin steriiliä vettä niin, että tilavuus oli 17,1 µl. Molempiin pipetoitiin lisäksi 10 x NEB4-puskuria 2 µl ja Smal-entsyymiä (10 U/µl) 0,5 µl. Seoksia inkuboitiin +25 °C:ssa noin tunti ja lisättiin BamHI*HF-entsyymiä (20 U/µl) 0,5 µl ja inkuboitiin vielä tunti +37 °C:ssa. Lisättiin 5 µl XC-lopetuspuskuria. Näytteet ajettiin agarosigeelillä.

Agarosia punnittiin 0,8 grammaa erlenmeyeriin ja lisättiin 100 ml TAE-puskuria. Seosta kuumennettiin mikroaaltouunissa, kunnes kaikki agarosia oli liuennut. Kun seos oli jäähtynyt, lisättiin 10 µl SybrSafe-geeliväriä ja kaadettiin lämmin liuos valukelkkaan, johon aseteltiin kampa paikoilleen. Geelin annettiin jähmettyä. Geeli nostettiin ajoastiaan, johon lisättiin TAE-ajopuskuria ja pipetoitiin näytteet kaivoihin. Näytteitä ajettiin 80 V noin 60 minuuttia. Geeliä tarkasteltiin ja kuvattiin sinivalopöydällä.

Preparatiivinen digestio

Preparatiiviseen digestioon käytettiin noin 20 µg DNA:a. Pipetoitiin pQETrisystem vektoria 30 µl ja pBICEP vektoria 20 µl. Lisättiin molempiin steriiliä vettä niin, että lopputilavuus oli 100 µl. Pipetoitiin lisäksi 10xNEB4-

puskuria 12 µl ja Smal-entsyymiä 8 µl. Seoksia inkuboitiiin lämpökaapissa + 25 °C:ssa yön yli. Seuraavana päivänä molempiin putkiin lisättiin 50 µl steriiliä vettä, 6 µl 10xNEB4-puskuria ja 4 µl BamHI*HF-entsyymiä. Seoksia inkuboitiiin + 37 °C:ssa kolme tuntia ja sen jälkeen reaktioihin lisättiin 45 µl XC-lopetuspuskuria.

DNA:n puhdistukseen käytettiin 0,8-prosenttista preparatiivista agarosigeeliä. Preparatiivinen geeli valmistettiin kuten testigeeli, mutta geelin valussa käytettiin steriiliä TAE-puskuria, kaikki laitteet ja välineet olivat puhtaita ja ajoastiaan vaihdettiin uusi puskuuri. Näytteitä ajettiin 3,5 h 60 V. Sen jälkeen geelit kuvattiin.

Geeliltä leikattiin vektoripalat steriilillä veitsellä eppendorf-putkiin ja punnittiin. Paloista puhdistettiin DNA Macherey-Nagel Nucleospin extract II-kitillä ohjeiden mukaan (liite 6). DNA eluoiitiin eluointipuskuurilla ja lopuksi mitattiin pitoisuus Nanodropilla.

5.1.3 Vektorien testiligaatio

Vektoreille tehtiin testiligaatio. Ligaatiota varten vektoreita pipetoitiin noin 90 ng. pBICEP-vektoria pipetoitiin 0,87 µl ja steriiliä vettä 6,53 µl. pQETrisystem-vektoria pipetoitiin 1,63 µl ja steriiliä vettä 5,77 µl. Putkia inkuboitiiin + 65 °C:ssa viisi minuuttia. Sen jälkeen putket nostettiin hetkeksi jäille ja sentrifugoitiin neste pohjaan. Putkiin pipetoitiin lisäksi 1 µl 10xT4 DNA ligaasipuskuuria, 1 µl 10 mM ATP-reagenssia ja 0,6 µl T4 DNA ligaasia (400 U/µl). Ligaatioreaktiot nostettiin yöksi PCR-laitteeseen. Valittiin ohjelma, joka inkuboi putkia 20 °C:ssa 60 minuuttia, sen jälkeen 16 °C:ssa 120 minuuttia ja lopuksi 14 °C:ssa 720 minuuttia.

Ligaatioseoksien transformaatio kompetentteihin soluihin

Koko testiligaatioseos 10 µl pipetoitiin XL1Blue kompetentteihin soluihin. Putkia sekoitettiin hellästi sormella naputellen ja niitä seisotettiin jäissä 30 minuuttia. Sen jälkeen annettiin lämpöshokki inkuboimalla 1,5 minuuttia +42 °C:ssa ja lopuksi vielä 2 minuuttia jäissä. Putkiin pipetoitiin 400 µl lämmintä SOC-lientä (liite 2) ja kasvatettiin lämpöravistelijassa +37 °C:ssa 45 minuuttia, 230 rpm. Transformaatioseoksia maljattiin LB-karbenisilliini-glukoosi-maljoille (liite 2) 50 µl ja 200 µl. Maljoja inkuboitiin yön yli lämpökaapissa +37 °C:ssa.

Preparatiivinen digestio toistettiin molemmille vektoreille Smal- ja BamHI-entsyymeillä. Reaktioissa otettiin huomioon DNA:n pienempi määrä, jolloin entsyymeitä käytettiin vähemmän. Lopuksi reaktioihin lisättiin 3 µl CIP-entsyymiä (calf intestinal alkaline phosphatase) ja inkuboitiin vielä tunti +37 °C:ssa. Alkaalisen fosfataasin tarkoitus on poistaa nukleiinihaposta 5'-pään fosfaattiryhmä, jonka takia vektorin ei pitäisi ligaatioreaktiossa sulkeutua kiinni ilman geeni-inserttiä. Reaktioihin lisättiin ¼ tilavuutta XC-lopetuspuskuria ja ajettiin 0,8 %:lla preparatiivisella agarosigeelillä, leikattiin oikeankokoiset palat steriilisti ja puhdistettiin DNA Nucleospin extract II-kitillä (liite 6) ohjeen mukaan.

5.1.4 Fc-endostatiini-geenin ligaatio vektoreihin ja transformaatio kompetentteihin soluihin

Fc-endostatiini-geeniä (Fc-est) oli monistettu PRC-menetelmällä ja puhdistettu agarosigeelillä ennen ligaatioita seuraaviin vektoreihin: pBICEP, pQETrisystem ja pCDNA3.3. Ligaatioseokset transformoitiin kompetentteihin NEB5 soluihin. Transformaatio tehtiin samalla periaatteella kuin testiligaatioiden transformaatio, mutta reaktioihin pipetoitiin lisäksi geeni-inserttiä. Osa seoksesta maljattiin LB-karbenisilliinimaljoille. Maljoja inkuboitiin +37 °C:ssa yön yli.

5.2 pCDNA3.3-Fc-est-kloonipesäkkeiden testaus

Työvaiheen tarkoituksena oli löytää transformoituneista soluista klooni, jossa oli oikea plasmidikonstruktio eli oikea vektori ja siinä geeni-insertti (liite 7). DNA tarkistettiin lopuksi vielä sekvensoimalla, jonka jälkeen plasmidi oli valmis transfektioihin.

pCDNA3.3-Fc-est-plasmidi-DNA:n eristys

pCDNA3.3-Fc-est-transformaatiomaljoilta poimittiin kymmenen kloonipesäkettä (K1-K10) pyyhkäisemällä pesäkettä pipetinkärjellä ja pudottamalla kärki putkeen, jossa on 5 ml SB-MOPS-karbenisilliinimediumia. Liemiä kasvatettiin ravistelussa yön yli +37 °C:ssa, 230 rpm.

Kasvustoista tehtiin glyserolistokit syväpakastimeen, että saataisiin oikeaa kloonit tuotettua myöhemminkin lisää. Kasvustoja pipetoitiin 500 µl eppendorf-putkiin ja lisättiin 500 µl 50-prosenttista steriiliä glyserolia. Putket annettiin olla huoneenlämmössä 2 tuntia välillä vorteksoiden. Solut pikapakastettiin nestetyössä ja siirrettiin -80 °C:seen syväpakastimeen.

Loput solut pelletoitettiin kasvustosta sentrifugoimalla 3500 rpm, 10 min, +4 °C:ssa. Solupelletistä eristettiin DNA Macherey-Nagel Nucleospin plasmid miniprep-kitillä (liite 4). Ohjeista poiketen DNA eluointi pylvästä käyttäen eluointipuskurin sijaan 50 µl lämmintä steriiliä vettä, koska näytteistä oikeat kloonit menevät sekvensointiin. Näytteiden DNA-pitoisuudet on esitetty taulukossa 1.

Testidigestio EcoRI*HF-entsyymillä

Jokaista eristettyä plasmidi-DNA:ta pipetoitiin 8 µl (noin 1,5 µg) omiin eppendorf-putkiin. Putkiin lisättiin 7 µl reaktioseosta, jossa on steriiliä vettä, 10xNEB4-puskuria ja EcoRI*HF-entsyymiä. Seosta inkuboitiin lämpökaapissa +37 °C:ssa noin tunti. Reaktio lopetettiin lisäämällä ¼ tilavuutta XC-lopetuspuskuria ja näytteet ajettiin 0,8-prosenttisella agarosigeelillä.

Sekvensointireaktiot

Kloonien emäsjärjestys varmistettiin sekvensoimalla kahdella eri oligolla: TIC PolyA reverse lämpötilassa 50 °C ja CMV Fwd primer lämpötilassa 60 °C. Taulukossa 1 on esitetty DNA-pitoisuudet ja pipetointitulavuudet oligoille. Reaktiot pipetoitiin PCR-putkiin ja ne vietiin analysoitavaksi Biocenterin sekvensointipalveluyksikköön.

TAULUKKO 1. DNA-pitoisuus, puhtaus ja pipetointitulavuudet sq-reaktioita varten.

klooni	pitoisuus (ng/µl)	puhtaus A260/A280	DNA (µl)	st. vesi (µl)	oligo (µl)	tot (µl)
K1	172,6	1,90	1,6	4,1	0,3	6
K2	191,2	1,91	1,4	4,3	0,3	6
K5	199,7	1,90	1,3	4,4	0,3	6
K7	194,8	1,90	1,3	4,4	0,3	6

5.3 Soluviljely

Soluviljelyyn oli varattu erillinen laboratoriotila, jossa käytettiin omaa suojatakkaa ja kenkäsuojuksia. Kädet pestiin huolellisesti ja työskentelypinnat ja tarvittavat välineet suihkutettiin ja pyyhittiin 70-prosenttisella etanolilla. Laminaarivirtauskaappia pidettiin päällä vähintään puoli tuntia ennen työskentelyn aloittamista. Laminaarivirtauskaapissa työskentely suunniteltiin siten, ettei käsiä viety avonaisten astioiden päälle eikä siellä säilytetty ylimääräistä tavaraa. Steriilit työskentelytavat olivat erittäin tärkeitä kontaminaatioiden välttämiseksi.

CHO-solut ovat hamsterin munasarjan soluja, joita käytetään yleisesti proteiinien tuotoissa. CHO-solut kasvavat alustaan kiinnittyneinä. Mediumina käytettiin DMEM-high glucose-mediumia, jonka resepti on liitteenä 2. Kontaminaation välttämiseksi ja säilyvyyden parantamiseksi mediumissa käytettävät liuokset oli jaettu steriilisti pienempiin 10–15 ml:n annoksiin, joista käytettiin yhtä käyttöputkea kerrallaan. Valmista DMEM-mediumia tehtiin kerralla 120 ml steriiliin pulloon.

5.3.1 Solujen kasvatus ja hoito

CHO-soluja saatiin tutkija Johanna Korvalta (Oulun yliopisto, Lääketieteellisen biokemian ja molekyylibiologian yksikkö). Soluampulli nostettiin nestetypestä +37 °C:seen vesihauteeseen muutaman minuutin ajaksi. Soluviljelylaboratoriossa putki suihkutettiin 70-prosenttisellä etanolilla. Solut siirrettiin laminaarivirtauskaapissa steriilillä pipetillä mediumin avulla 25 cm² kasvatuspulloon, jossa oli 8 ml DMEM high glucose-mediumia. Pullo nostettiin CO₂-inkubaattoriin, jossa lämpötila +37 °C.

Seuraavana päivänä soluja tarkasteltiin faasikontrastimikroskoopilla. Solut olivat kiinnittyneet pullon pohjaan ja näyttivät voivan hyvin. Vaihrettiin soluille uusi medium, koska solujen säilytyksessä käytetty DMSO (dimetyylisulfoksidi) on myrkyllistä soluille. Sitä käytetään estämään kiteiden muodostumisen jäätymisen aikana.

Soluille vaihdettiin 2–3 päivän välein uusi medium. Transfektioiden jälkeen medium vaihdettiin kerran, mutta sen jälkeen annettiin solujen tuottaa proteiinia kolme vuorokautta ennen mediumin keräystä.

5.3.2 Solujen jakaminen

Solut jaettiin laimentamalla 3–4 vuorokauden välein eri suhteissa, että transfektioita varten olisi käytettävissä sopivia solumaljoja heti, kun oikeat kloonit olivat varmistuneet ja DNA:ta oli puhdistettu riittävästi.

Steriilille 6-kuoppalevyn 3 cm:n maljoille pipetoitiin 2,5 ml mediumia ja 6 cm:n maljoille 5 ml mediumia. Mediumit tasapainotettiin CO₂-inkubaattorissa ennen solujen siirtoa niihin.

Soluja pestiin kaksi kertaa 5 ml:lla steriiliä PBS-puskuria. Lisättiin noin 1 ml trypsiini-EDTA-liuosta ja käännettiin pulloa. Tarvittaessa ylimääräinen trypsiini-EDTA pipetoitiin pois. Pulloa inkuboitiin viisi minuuttia CO₂-inkubaattorissa ja sen jälkeen katsottiin mikroskoopilla, olivatko solut irronneet ja tarvittaessa vähän koputeltiin pulloa loppujen solujen irrottamiseksi. Solut suspensoitiin 10 ml:aan uutta mediumia pipetoiden edestakaisin varoen ilmakuplia, jotka vahingoittavat soluja. Uuden mediumin seerumi inaktivoi trypsiini-EDTA:n.

6-kuoppalevyn maljoille pipetoitiin rinnakkain 0,2 ml, 0,3 ml ja 0,5 ml solususpensiota. Isoille 6 cm:n maljoille pipetoitiin 0,5 ml ja 1 ml

solususpensiota. Solumaljoja ja -pulloja kasvatettiin CO₂-inkubaattorissa +37 °C:ssa.

5.4 Transfektiot liposomimenetelmällä CHO-nisäkässoluihin

Transfektioita varten DNA:ta tarvitaan useita mikrogrammoja. Miniprep-eristyksessä saatiin riittävästi eri klooneja ensimmäiseen transfektioon. Toiseen transfektioon DNA:ta tuotettiin suurempi määrä NEB5- ja XL1Blue-soluissa ja eristettiin NucleoBond Extra Maxi-kitillä.

Liposomimenetelmä perustuu siihen, että negatiivisesti varautunut DNA-molekyylillä muodostaa kompleksin transfektioagenssin positiivisesti varautuneiden lipidien kanssa. DNA-lipidikompleksi sulautuu solukalvoon, jolloin DNA vapautuu solun sisälle.

Ensimmäinen transfektio

CHO-solut oli jaettu edellisenä päivänä 6 cm:n maljalle (28 cm²) ja levyille, jossa on kuusi 3 cm:n maljaa (7 cm²). Soluja mikroskopoihin faasikontrastimikroskoopilla ja sopivimmassa kasvuvaiheessa olevat maljat valittiin transfektioihin. Loput maljat jätettiin kontrollisoluiksi, eli tehtiin transfektio ilman DNA:ta. Jokaista DNA-kloonista transfektioitiin pienille maljoille erikseen, lisäksi tehtiin sekoitus kaikista klooneista isolle maljalle.

pCDNA3.3-Fc-est kloonien K1, K2, K5, ja K7 DNA-liuokset steriilisuodatettiin 0,2 µm eppendorf-suodattimella solujen kontaminaation välttämiseksi. DNA-liuos pipetoitiin pylvääseen ja sentrifugoitiin 10 000 rpm 5 minuuttia. Poistettiin pylväs. Steriili DNA jäi keräysputkeen.

Solumaljoilta poistettiin vanha medium, koska mediumin sisältämä seerumi häiritsee transfektiota. Solut pestiin kerran PBS-puskurilla ja kerran pienellä määrällä Optimem-mediumia. Pienille maljoille pipetoitiin 2 ml ja isoille maljoille 4 ml Optimem-transfektio-mediumia. Maljat nostettiin CO₂-inkubaattoriin tasapainottumaan.

DNA-klooneista tehtiin seos, jossa oli DNA:ta yhteensä 11 µg ja se laimennettiin Optimem-mediumilla lopputilavuuteen 750 µl. Negatiivisen kontrollin maljoille käytettiin vain optimem-mediumia. Lipofectamine-transfektio-reagenssia otettiin 135 µl ja lisättiin 3450 µl Optimem-mediumia, sekoitettiin ja inkuboitiin huoneenlämmössä 10 minuuttia. DNA-Optimem-seoksiin lisättiin yhtä suuri tilavuus lipofectamine-laimennosta ja inkuboitiin huoneenlämmössä 20 minuuttia kompleksin muodostumiseksi. Seos pipetoitiin CHO-maljoille tippoittain ja hyvin sekoittaen. Nostettiin maljat CO₂-inkubaattoriin.

Maljoille vaihdettiin muutaman tunnin jälkeen seerumiton medium ja seuraavana päivänä seerumillinen medium. Sen jälkeen annettiin solujen kasvaa ja tuottaa vasta-ainetta kolme vuorokautta ennen kuin kerättiin medium ja solut.

Toinen transfektio

Toista testitransfektioita varten soluja oli jaettu 10 cm:n ja 6 cm:n maljoille. Solut pestiin kerran steriilillä PBS-puskurilla ja lisättiin Optimem-mediumia, kuten ensimmäisessä transfektiossa.

Isolle maljalle tehtiin DNA-klooneista sekoitus, jossa jokaista kloonista K1, K2, K5 ja K7 oli 11 µg. Seokseen lisättiin Optimem-mediumia lopputilavuuteen 2,1 ml. 100 µl Lipofectamin-reagenssia laimennettiin 2,1 ml:ksi Optimem-mediumilla. Seokset yhdistettiin ja inkuboitiin huoneenlämmössä 20 minuuttia. Sen jälkeen

seos pipetoitiin solumaljoille. Maljoille vaihdettiin normaali seerumillinen medium viisi tuntia myöhemmin.

Pienempään 6 cm:n maljaan käytettiin 15 µg K2-kloonin DNA:ta, 30 µl lipofectaminea ja molemmat laimennettiin Optimem-mediumilla 750 µl:ksi. Yhdistettiin ja inkuboitiin huoneenlämmössä 20 minuuttia, jonka jälkeen seos pipetoitiin maljalle. Malja nostettiin CO₂-inkubaattoriin ja viisi tuntia myöhemmin soluille vaihdettiin normaali seerumillinen medium.

5.5 Mediumin ja solujen keräys sekä solujen hajotus

Vasta-aine Fc-endostatiini tuottui soluista mediumiin, mutta osa jäi ehkä solun sisälle. Ensimmäisen transfektion maljoilta kerättiin ja tutkittiin tuottosolut sekä medium. Toisen transfektion maljoilta tutkittiin vain medium.

Solumaljat siirrettiin soluviljelylaboratorion inkubaattorista jäihin. Maljoille pipetoitiin erilaisia proteaasi-inhibiittoreita, (AEBSF, aprotinin, antipain, benzamidine hydrokloridi, pefabloc, pepstatin, cla). Mediumit pipetoitiin huolellisesti maljoilta putkiin, jotka sentrifugoitiin solujen poistamiseksi. Eppendorf-putket sentrifugoitiin 10 000 rpm 5 minuuttia ja falconputket 3500 rpm 10 minuuttia. Mediumeihin lisättiin natriumatsidia (NaN₃) loppupitoisuuteen 0,02 % estämään bakteerien kasvua.

Maljoja ei pesty PBS-puskurilla ennen solujen keräystä, koska solut näyttivät huonoilta ja niiden pelättiin irtoavan pesujen yhteydessä. Tehtiin lyysipuskuria 6 ml lisäämällä PBS-0,6%BRIJ-puskuriin proteaasi-inhibiittorikantaliuoksia. Lyysipuskuria pipetoitiin 3 cm:n maljoille 500 µl ja 6 cm:n maljoille 800 µl. Solut raaputettiin kumilastan avulla maljan toiseen reunaan, josta ne siirrettiin pipetillä eppendorf-putkiin. Solut hajotettiin mekaanisesti ultra turraksilla, ensin kontrollisolut, sitten näytteet. Jokaisen näytteen välissä terä huuhdeltiin steriilissä vedessä. Hajotuksen jälkeen solulysaatti sentrifugoitiin 10 000 rpm, 25 minuuttia +4 °C:ssa. Supernatantti otettiin talteen ja siitä otettiin näytteet

SDS-PAGE-geelille (P1 ja N6) ja ELISA-testeihin. Loput pikapakastettiin nestetyypellä ja laitettiin syväpakastimeen -80 °C:een. Toisen testitransfektion solunaljoilta kerättiin vain medium.

5.6 Fc-endostatiini vasta-aineen puhdistus kasvumediumista

Testitransfektioiden mediuemeita yhdistettiin niin, että saatiin negatiivinen kontrollimedium ja positiivinen tuottomedium, jossa oletettiin olevan vasta-ainetta. Positiivinen medium (14,5 ml) koostui ensimmäisen transfektion poolimaljan mediumista ja toisen transfektion K2 ja MIX-mediumista. Negatiivista kontrollimediumia oli yhteensä 10,5 ml.

5.6.1 Blue Sepharose -hartsikäsitteily

Solujen kasvumediumissa käytettiin naudan seerumia, joka sisälsi myös naudan vasta-aineita sekä albumiinia. Ne voivat myös tarttua proteiini A-hartsiin, puhdistettavan vasta-aineen Fc-endostatiinin lisäksi. Ylimäärä albumiinia ja muita häiritseviä proteiineja poistettiin Blue Sepharose -hartsilla.

Laboratoriokokeissa aikanaan on havaittu, että seerumin albumiini sitoutuu siniseen väriin. Erilaisten väriaineiden käyttäminen proteiinin puhdistuksessa on yleinen menetelmä tietyn tyyppisille proteiineille. Se perustuu värin ja proteiinin hydrofobiseen vuorovaikutukseen.

Blue Sepharose -hartsin tasapainotus

Blue Sepharose -hartsia oli noin 40 ml ja se jaettiin kahteen 50 ml:n fuugiputkeen PBS-0,6%BRIJ-puskurin avulla. Hartsia sentrifugoitiin pohjaan 800xg 5 minuuttia ja poistettiin supernatantti. Toistettiin vielä kahdesti. Supernatanttiosa poistettiin ja lisättiin mediumit. Toiseen positiivinen medium ja toiseen negatiivinen medium. Putkiin lisättiin PBS-0,6%BRIJ-puskuria niin, että saatiin lopputilavuudeksi 45 ml. Inkuboitiin huoneenlämmössä sekoittaen noin 20 minuuttia.

Hartsia sentrifugoitiin pohjaan 800xg, 5 min. Liuososat siirrettiin toiseen putkeen ja sentrifugoitiin vielä kerran, kuten edellä, että saatiin loputkin hartsit poistettua liuososasta. Liuososasta otettiin 700 µl:n näytteet ja suodatettiin kerran 0,45 µm:n ruiskusuodattimen läpi ja konsentroidiin eppendorf-konsentroitelyyksiköllä noin 80 µl:ksi, (eli 9 kertaa väkevämpi). Otettiin konsentraateista 20 µl:n näytteet SDS-PAGE-geelille (P2 ja N7).

5.6.2 Proteiini A -hartsikäsittely

Proteiini A sitoutuu vasta-aineen Fc-osaan eli Proteiini A voi sitoa tuotetun Fc-endostatiini vasta-aineen lisäksi myös seerumin sisältämiä vasta-aineita. Vasta-aineet eluoidaan hartsista 0,1 M sitruunahapolla (pH=2,0) ja fraktio neutraloidaan heti 2 M Tris-puskurilla, jonka pH=8.8.

Hartsin esikäsittelyt ja näyteinkubointi

Proteiini A -hartsia otettiin molempia näytteitä varten 250 µl ja ne tasapainotettiin samaan tapaan PBS-BRIJ-puskurilla, kuin sinihartsia. Hartsia siirrettiin näytteen avulla 50 ml:n kierrekorkkiputkeen. Tilavuudet olivat POS=26

ml ja NEG=27,5 ml. Lisättiin PBS-BRIJ-puskuria niin, että lopputilavuus oli 45 ml. Inkuboitiin yön yli pyörivässä sekoittajassa +4 °C:ssa.

Vasta-aineen eluointi proteiini A -hartsista ja fraktioiden konsentroidi

Proteiini A -hartsia pestiin kerran PBS-BRIJ-puskurilla ja pakattiin BIO-RAD-pylvääseen. Pylvääseen lisättiin pesupuskuria, kunnes läpitulleen pesupuskurin absorbanssi A_{280} oli pienempi kuin 0,02. Mittaus tehtiin Nanodropilla käyttäen nollana PBS-BRIJ-puskuria. Näytteet eluointiin pylväistä 250 µl:n erillä 0,1 M sitruunahappoa (pH=2,0) eppendorf-putkiin, joihin oli valmiiksi pipetoitu 25 µl:aa 2 M TRIS-puskuria fraktioiden neutralointia varten. Molemmista näytteistä kerättiin kuusi fraktiota ja mitattiin pitoisuus Nanodropilla.

Kolme väkevintä fraktiota yhdistettiin negatiivisista ja positiivisista ja konsentroidiin ne vielä 750 µl:sta noin 60 µl:ksi, eli noin 13-kertaisesti. Konsentraateista otettiin näytteet SDS-PAGE-geelille, P3 (positiivinen) ja N8 (negatiivinen). Lisäksi otettiin Proteiini A -hartseista näytteet P4 ja N9. Pipetoitiin hartsisuspensiota eppendorf-putkeen ja annettiin laskeutua pohjaan. Hartsia pestiin kerran PBS-puskurilla ja annettiin hartsin laskeutua. Poistettiin liuososa ja lisättiin näytepuskuri.

5.7 ELISA-testi

Fc-endostatiinin määrittämiseen näytteistä käytettiin sandwich-menetelmää. Kuoppalevyn pohjaan kiinnitettiin polyklonaalinen vasta-aine (anti-human endostatin), johon näytteen sisältämä Fc-endostatiini kiinnittyi endostatiini-osaan. Kaivot pestiin ja niihin lisättiin seuraavaksi leimattua kakkosvasta-ainetta (anti-human IgG-Fc-AFOS), joka kiinnittyy Fc-endostatiinin Fc-osaan. Lisäksi se on leimattu alkaalisella fosfataasilla (AFOS), entsyymillä, joka

substraatin lisäyksen jälkeen muodostaa keltaisen värin, jota voitiin mitata spektrofotometrisesti.

5.7.1 Kaivojen pinnoittaminen ja blokkkaus

Testejä varten pinnoitettiin kaivoja ohuman endostatin-vasta-aineella. Vasta-aineesta tehtiin laimennos 0,5 ng/μl 0,1 M natriumbikarbonaattipuskuriin. Liuosta pipetoitiin kaivoihin 100 μl ja suljettiin tarralla. Strippejä inkuboitiin yön yli ravistelijassa kylmähuoneessa. Seuraavana päivänä kaivoista poistettiin kouttausliuos ja kaivot pestiin kolme kertaa 250 μl PBST-pesupuskurilla (liite 2). Kaivoihin pipetoitiin 200 μl blokkaustrupuria, laitettiin tarrat kaivojen päälle ja inkuboitiin huoneenlämmössä ravistelijassa vähintään 20 minuuttia. Blokkaustrupurin tarkoitus on täyttää kaivon seinämien tyhjät paikat ja näin estää epäspesifinen kiinnittyminen kaivon seinämiin.

5.7.2 Näytteet ja vasta-aineinkuboinnit sekä mittaus

Medium- ja solulysaattisupernatantinäytteet sulatettiin ja sentrifugoitiin 13 000 rpm ja 5 minuuttia ennen pipetointia kaivoihin. Mediumnäytteitä pipetoitiin 100 μl ja solulysaattisupernatantteja 25 μl ja lisäksi blokkaustrupuria 75 μl. Näytteitä inkuboitiin ravistelijassa yksi tunti. Sen jälkeen kaivot pestiin viisi kertaa PBST-pesupuskurilla ja lisättiin kaivoihin 100 μl AFOS-leimattua anti-HUMAN IgG-vasta-ainetta, joka laimennettiin 1:5000 blokkaustrupuriin. Inkuboitiin 30 minuuttia ja pestiin viisi kertaa PBST-puskurilla. Lopuksi lisättiin kaivoihin 100 μl pNPP-substraattireagenssia.

pNPP-lisäyksen jälkeen mitattiin näytteiden absorbanssit Wallacilla aallonpituudessa 405 (1,0s) 30 minuuttia ja 2 tuntia lisäyksen jälkeen. Ennen mittausta kaivoista poistettiin mittausta häiritsevät ilmakuplat neulalla.

5.8 Tuotettujen vasta-aineiden karakterisointi

Työn aikana otettuihin SDS-PAGE geelinäytteisiin lisättiin yhtä suuri tilavuus 2xSDS-PAGE-näytepuskuria. Näytteitä keitettiin +95 °C:ssa kolme minuuttia. Keitettyjä näytteitä, joita oli säilytetty pakastimessa inkuboitiin +55 °C:ssa 20 minuuttia ennen geelijaajoa.

Ajossa käytettiin valmista Bioradin Criterion 10–20 % gradienttigeeliä ja ajopuskurina SDS-PAGE-ajopuskuria (liite 2). Ennen näytteiden pipetointia kaivoja huuhdeltiin ajopuskurilla pipetin avulla. Näytteitä pipetoitiin kaivoihin niin paljon kuin kaivoihin mahtui varoen kuitenkin näytteen leviämistä viereisiin kaivoihin. Geeliä ajettiin 65 minuuttia, 200 V, 400 mA, kunnes sininen väri oli geelin alareunassa.

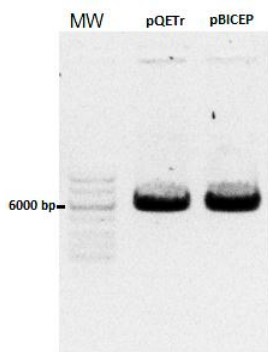
Ajon jälkeen geeliä inkuboitiin 10 minuuttia 10-prosenttisessä etikkahapossa proteiinien fiksausta varten. Siinä proteiini kiinnittyy akryyliamidiin, eikä enää sen jälkeen diffuntoidu tai uutu pois geeliltä. Seuraavaksi geeliä inkuboitiin Coomassie Brilliant Blue-värijäysliuoksessa 30 minuuttia ja värinpoistoon käytettiin 10 % etikkahappoa, jota vaihdettiin useaan kertaan. Geeliä myös säilytettiin etikkahapossa kuvaukseen asti.

6 TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELO

6.1 Vektorin valmistus

Työ aloitettiin tuottamalla DNA:ta puhdistukseen ja entsyymimuokkaukseen. Plasmidin eristyksessä maxi-kitillä saatujen vektoreiden DNA-pitoisuudet olivat liuotuksen jälkeen pBICEP 0,65 µg/µl ja pQETrisystem 1,08 µg/µl.

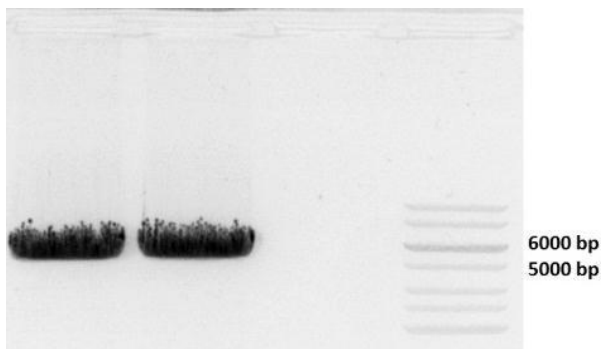
Vektoreille tehtiin testidigestio SmaI- ja BamHI*HF-restriktioentsyymeillä ja näytteet reaktiot ajettiin agarosigeelielektroforeesilla. Kuva geelistä on esitetty kuvassa 7. pBICEP-vektorin koko on noin 5300 bp ja pQetrisystem-vektorin koko noin 5700 bp. Kuvan perusteella molemmat ovat oikeita ja voitiin jatkaa preparatiiviseen digestioon.



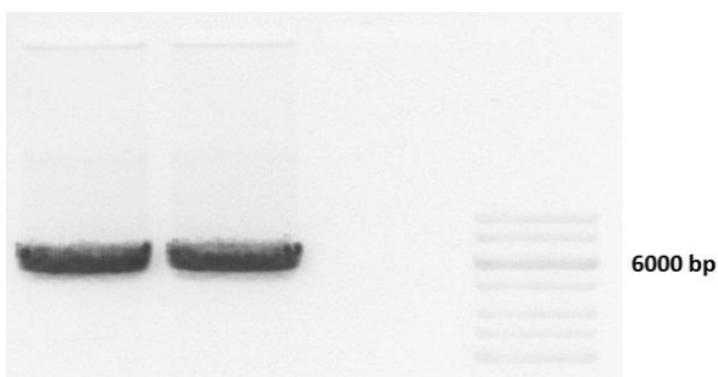
*KUVA 7. Testidigestio SmaI ja BamHI*HF-entsyymeillä*

Vektori-DNA:ta otettiin noin 20 µg preparatiiviseen digestioon SmaI- ja BamHI*HF-restriktioentsyymeillä. Näytteet puhdistettiin agarosigeelielektroforeesilla ja vektorit leikattiin geeliltä steriilisti, sekä eristettiin DNA. Puhdistuksen geelikuvat on esitetty kuvissa 8 ja 9.

Molekyylipainostandardina geelillä käytettiin Fermentaksen 1 kb DNA Ladder (liite 8). Työvaiheesta saatiin vektori DNA:ta seuraavasti: pBICEP 103 ng/μl ja saalis 8,2 μg. pQETrisystem-vektorin pitoisuus 55 ng/μl ja saalis 6 μg.



KUVA 8. pBICEP-vektorin preparatiivinen agasoorigeeliajo.



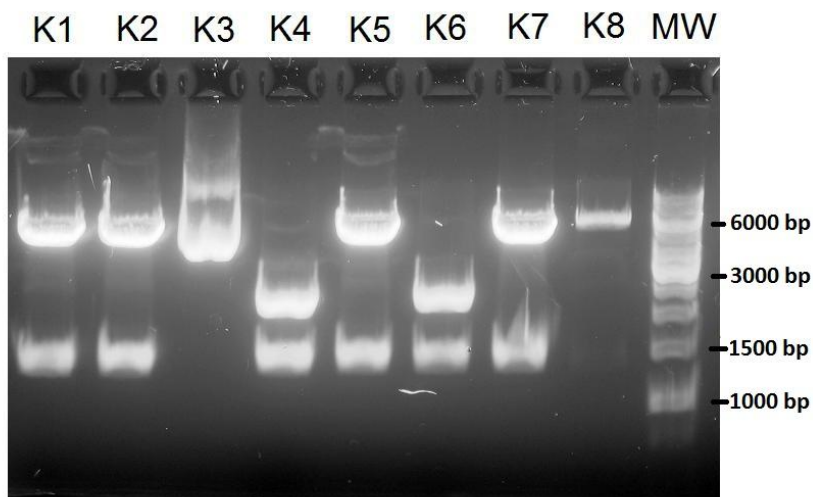
KUVA 9. pQETrisystem vektorin preparatiivinen agaroosigeeliajo

Restriktioentsyymeillä muokatuille vektoreille tehtiin testiligaatio ilman geeniä ja seos transformoitiin kompetentteihin soluihin. Transformaatiomaljoja tarkasteltiin seuraavana päivänä, ja molempien vektoreiden transformaatiomaljoilla oli pesäkkeitä. Tämä kertoi siitä, että vektorit eivät olleet puhdistuneet kunnolla ja mukana oli vielä rengasmuotoista DNA:ta. Entsyymikäsittelyt toistettiin ja lisättiin lopuksi reaktioihin CIP.

Vektoreihin liitettiin Fc-endostatiini-geeni. Lisäksi geeni liitettiin valmiiseen kaupalliseen nisäkässoluntuottovektoriin. Ligaatioreaktiot transformoitiin kompetentteihin soluihin ja maljattiin. pBICEP-Fc-est- ja pQETRISystem-Fc-est-maljoilla ei ollut juurikaan nähtävissä pesäkkeitä, eli ligaatio ei onnistunut ja ne hylättiin. pCDNA3.3-Fc-est-maljoilla oli pesäkkeitä, joista jatkettiin kloonien tarkistuksella.

6.2 pCDNA3.3-Fc-est kloonit

Kymmenestä kloonikasvustosta kahdeksan oli kasvanut, joten kloonit K9 ja K10 hylättiin. Lopuista eristettiin plasmidi-DNA ja tarkistettiin digestoimalla EcoRi*HF-entsyymillä. Testidigestion agarosigeelillä pitäisi oikeissa klooneissa näkyä kaksi vyöhykettä: vektori noin 5,4 kb ja geeni noin 1,4 kb. Kuvasta 10 nähdään, että kloonit K1, K2, K5 ja K7 näyttää olevan kokonsa puolesta oikeita. Kloonien emäsjärjestys tarkistettiin vielä sekvensoimalla ja kaikki neljä kloonia olivat oikeita ja identtisiä keskenään.



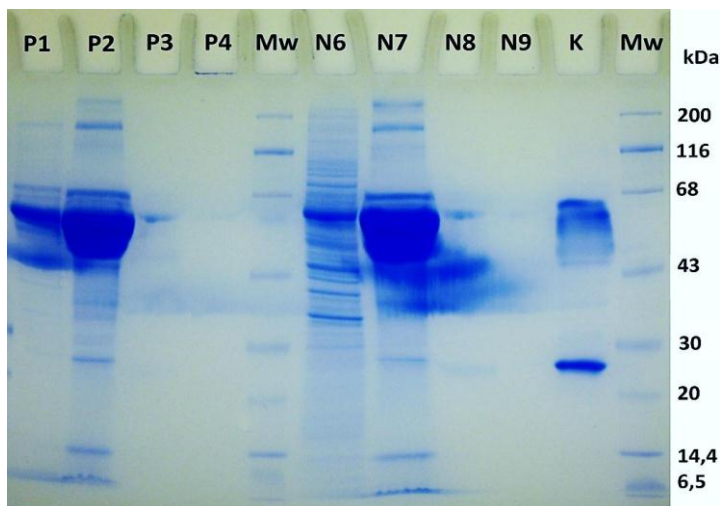
KUVA 10. pCDNA3.3-Fc-est-kloonien testidigestion näytteistä ajettu agarosigeeli

6.3 Fc-endostatiinin puhdistus mediumista

Fc-endostatiinia kokeiltiin puhdistaa mediumista proteiini A -hartsilla. Puhdistus tehtiin niin negatiivisesta kuin positiivisesta mediumista. Eluointifraktioissa oli todella vähän proteiinia eikä negatiivisella ja positiivisella ollut juurikaan eroa proteiinipitoisuudessa. Yhdistettiin kolme vahvinta fraktiota ja konsentroidiin, että saataisiin SDS-PAGE-geelillä näkymään jotain.

6.4 SDS-PAGE

Proteiinipuhdistuksen geelinäytteistä ajettiin SDS-PAGE gradienttigeeli. Geeliä ajettiin yli tunnin ajan, kunnes näytteiden sininen väri oli geelin alareunassa. Kontrollinäytteenä geelillä käytettiin 9E10-hybridomamediumista proteiini A-hartsilla puhdistettua vasta-ainetta. Molekyylipainostandardina käytettiin Applichemin Protein marker II, jonka kokotaulukko on liitteessä 8.

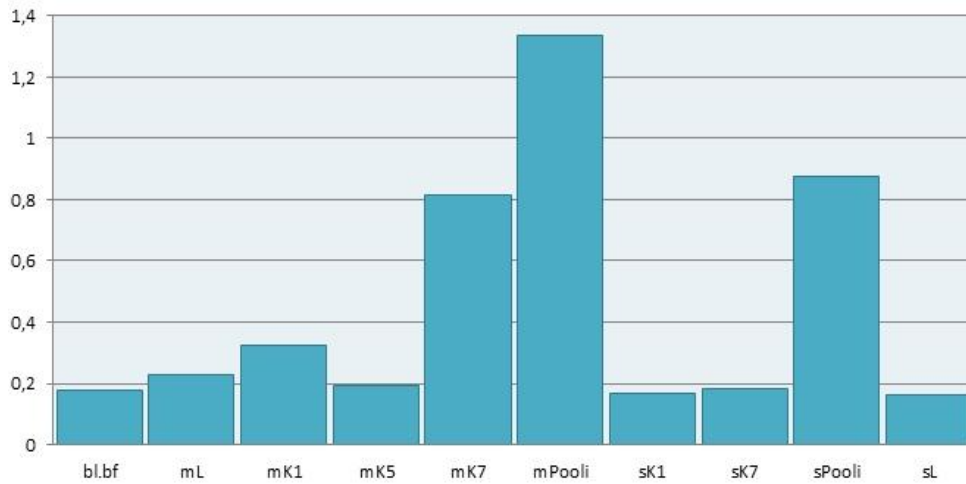


KUVA 11. Näytteistä ajettu SDS-PAGE-gradienttigeeli. P1 ja N6: Solulysaattisupernatantti. P2 ja N7: Sinihartsikäsitelty medium (konsentroidu). P3 ja N8: Proteiini A –fraktiot (konsentroidu). P4 ja N9: Proteiini A –hartsinäyte. K: 9E10-kontrollivasta-aine.

Proteiini A sitoo kaikkia IgG-tyyppejä, eri lajeilla eri voimakkuudella. Negatiivisesta mediumista on sitoutunut proteiini A -hartsiiin proteiini, joka jakaantuu noin 50 kDa:n ja 25 kDa:n kokoisiksi vyöhykkeiksi (N8). Kyseessä on todennäköisesti mediumin seerumin sisältämää naudan IgG, joka näkyy geelillä kahtena vyöhykkeenä, raskaat ja kevyet ketjut. Tuottomediumista on sitoutunut hartsiiin noin 50 kDa:n kokoinen proteiini, joka on todennäköisesti Fc-endostatiinia, koska geelillä ei silmin ole havaittavissa 25 kDa:n IgG:n kevytketjuista johtuvaa vyöhykettä (P3). Fc-endostatiinin molekyylipaino on noin 48 kDa. Tuottomediumissa on ainakin suhteessa enemmän 50 kDa:n kokoista proteiinia, mutta arvio perustuu silmämääräiseen arviointiin. Kyseisen proteiinivyöhykkeen varmistus olisi voitu tehdä vasta-aineen avulla, esimerkiksi Western Blot-menetelmällä.

6.5 ELISA-testi

Näytteistä laskettiin 30 minuutin kohdalla mitattujen absorbanssiarvojen keskiarvot. Tulokset esitetään kuvassa 12. Negatiivisena kontrollina käytettiin blokkauksuskuria (bl.bf) ja solumediumia joiden solut käsitelty pelkällä transfektioreagenssilla ilman DNA:ta (mL). Mediumnäytteet on merkitty "m" ja solu-uutteet "s".



KUVA 12. ELISA-testin absorbanssiarvot eri näytteistä.

Kuvasta 12 nähdään, että kloonin K7 ja pooli-maljan (DNA sekoitus kaikista neljästä eri kloonista) mediumeissa mittaustulos on selkeästi positiivinen, eli mediumiin on tuottunut Fc-endostatiinia. Myös pooli-maljan solujen solu-uute antoi positiivisen signaalin. Muilla klooneilla K7-kloonin lukuun ottamatta signaali jäi negatiivisen tasolle.

7 POHDINTA

Opinnäytetyön tavoitteena oli tuottaa Fc-endostatiinia CHO-nisäkässoluissa. Työ aloitettiin DNA-työskentelyllä valmistelemalla vektorit pBICEP ja pQETrisystem. Vektorit käsiteltiin restriktioentsyymeillä ja tulos tarkistettiin testiligaatiolla ja transformaatiolla kompetentteihin soluihin. Tuloksena oli reilusti pesäkkeitä transformaatiomaljoilla, eli vaihe ei ollut onnistunut ja digestio jouduttiin toistamaan. Huolellisempi puhdistus pidemmällä agarosigeelillä olisi voinut säästää toisen työvaiheen.

Fc-endostatiini-geeni liitettiin omien vektoreiden lisäksi myös kaupalliseen nisäkässolutuottovektoriin, pCDNA3.3 ja transformoitiin kompetentteihin soluihin ja maljattiin. Kaupallinen vektori olikin ainoa, jonka transformaatiomaljoilla oli pesäkkeitä. Ligaatiota ei toistettu, eikä alettu selvittää syytä epäonnistumiseen, vaan jatkettiin pCDNA3.3-Fc-est-transformanttien kanssa.

Soluviljely oli mielenkiintoista ja sujui hyvin. Uudet steriilit työskentelytavat vaativat jonkin verran totuttelua. Aluksi työvaihe tuntui vievän todella paljon aikaa valmisteluineen, kun suunnitteli mitä teki ja mitä välineitä tarvitsi. Haastavinta soluviljelyssä oli solujen mikroskopointi. Kun soluviljelyä ei ollut juurikaan tehnyt, oli todella hankala tunnistaa, miten solut voivat tai olivatko pullojen tai maljojen solut hyvässä kasvuvaiheessa transfektioihin tai solujen jakamiseen.

Tuottomediumista puhdistettiin Fc-endostatiini käyttäen proteiini A -hartsia, joka sitoutuu vasta-aineen Fc-osaan. Ennen proteiini A -hartsia poistettiin ylimäärä seerumin sisältämiä häiritseviä aineita sinihartsilla ja sen jälkeen mediumia inkuboitiin proteiini A -hartsissa. Hartsista eluoiduissa fraktioissa oli todella vähän proteiinia ja fraktioita konsentroidiin, mutta niissä ei näkynyt geelillä juurikaan mitään silmin havaittavaa vyöhykettä.

Proteiinin puhdistusvaiheessa mietittiin, että olisiko testituotto tai ainakin osa testituotoista kannattanut tehdä ilman seerumia, jolloin yksi puhdistusvaihe olisi jäänyt pois ja seerumin muut häiritsevät tekijät eivät olisi häirinneet myöhemmissä työvaiheissa. Tosin seerumi on tärkeä komponentti mediumissa, jolloin solut olisivat voineet huonommin ilman sitä. Teollisuudessa nisäkässolukasvatuksissa yleensä käytetään seerumitonta synteettisiä kasvuliukoja, jolloin BSA:n ja IgG:n häiritsevä vaikutus poistuu ja tuotteiden puhdistus mediumista on helpompaa.

ELISA-testien mukaan fuusioproteiinia oli tuottunut mediumiin. Testeihin olisi voinut käyttää enemmänkin aikaa. Myös affiniteettipuhdistuksen fraktioita olisi voinut testata ELISA-menetelmällä.

Työssä ajettiin vain yksi SDS-PAGE-geeli, koska näyttemateriaalia oli vähän useampaan ajoon. Geeliltä näkyy hyvin heikosti fraktioiden vyöhykkeet ja seerumin albumiinista suuret vyöhykkeet. Olisi ehkä voinut ajaa geeli ilman niitä tai jättää tyhjät kaivot väliin. Olisi ollut myös hyvä tehdä Western Blot -analyysi, jossa SDS-PAGE-geelin proteiinit siirretään kalvolle ja osoitetaan vasta-aineen avulla. Tähän ei kuitenkaan opinnäytetyöhön suunniteltu aika riittänyt.

LÄHTEET

Abcam 1998-2011. Antibody structure and isotypes. Saatavissa:

<http://www.abcam.com/index.html?pageconfig=resource&rid=11258&pid=11287>

Hakupäivä 13.10.2011.

Aittomäki, Esa – Eerikäinen, Tero – Leisola, Matti – Ojamo, Heikki – Suominen, Ilari – Weymarn, Niklas von 2002. Bioprosessiteknikka. Helsinki: WSOY.

Autio, Anne 2006. Immunologian ja immunologisten määrittymenetelmien perusteita. Oulu: Oulun seudun ammattikorkeakoulu, tekniikan yksikkö. Opinnäytetyö.

Campbell, Mary K. 1999. Biochemistry. United States of America: Harcourt Brace & Company.

Gardemeister, Marika – Liimatainen, Kirsi 2009. Soluviljelyn perusteet. Finnzymes oy.

Haajanen, Kari – Pelkonen, Jani – Pärssinen, Raimo – Suominen, Ilari 2010. Geenitekniikka. Saarijärven Offset Oy, Saarijärvi.

Hybridisolut 2006. Solunetti. Saatavissa:

<http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/hybridisolulinjat/2/>. Hakupäivä 17.10.2011.

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

Kaperonit 2006. Solunetti. Saatavissa:

<http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/kaperonit/1/>. Hakupäivä 17.10.2011.

Keski-Oja, Jorma – Wickström, Sara A. 2005. Verisuonten tyvikalvojen pilkkoutumistuotteet: Syövän kasvun estäjiä? Duodecim 121. s.1829–37.

Kumpulainen, Elsa 2009. T460503 Immunologia 3 op. Opintojakson luentomateriaali 2009. Oulu: Oulun seudun ammattikorkeakoulu, tekniikan yksikkö.

Kumpulainen, Elsa 2009. T460107 Bioprosessit 7 op. Opintojakson luentomateriaali 2009. Oulu: Oulun seudun ammattikorkeakoulu, tekniikan yksikkö.

Lee, Tong-Young – Tjin Tham Sjin, Robert M. – Movahedi, Shahla – Ahmed, Bissan – Pravda, Elke A. – Lo, Kin-Ming – Gillies, Stephen D. – Folkman, Judah – Javaherian, Kashi. 2008. Linking Antibody FC domain to endostatin significantly improves endostatin half-life and efficacy. Clinical Cancer Research 14. s. 1487–1493. Saatavissa:
<http://clincancerres.aacrjournals.org/content/14/5/1487.full.pdf+html>. Hakupäivä 9.5.2012.

Lilius, Esa-Matti 2011. Immunologian perusteet. Saatavissa:
<http://users.utu.fi/satjas/IMMUNOLOGIALuku3>. Hakupäivä 20.9.2011.

Pousa, Birgitta 2009. T460206 Geenitekniikan menetelmät 6 op. Opintojakson luentomateriaali 2009. Oulu: Oulun seudun ammattikorkeakoulu, tekniikan yksikkö.

Vasta-aineet 2006. Solunetti. Saatavissa:
<http://www.solunetti.fi/fi/histologia/vasta-aineet/>. Hakupäivä 5.9.2011.

LIITTEET

Liite 1. Työssä käytetyt reagenssit

Liite 2. Liuosten ohjeet

Liite 3. Työssä käytetyt laitteet

Liite 4. Macherey-Nagel, Nucleospin plasmid –kitin ohje

Liite 5. Macherey-Nagel, Midi / Maxi -ohje

Liite 6. Macherey-Nagel, Gel extract II –kitin ohje

Liite 7. Plasmidikonstruktio

Liite 8. Molekyylipainomarkkerit: DNA ja proteiinigeeli

Opinnäytetyössä käytettiin seuraavia reagensseja:

- agar, bacteriological agar type A, Biokar Diagnostics
- agarose, agarose multi-purpose, Bioline
- anti-HUMAN IgG -AFOS
- bacto-tryptoni, Biokar Diagnostics
- BamHI*HF –entsyymi, 20 U/μl, New England Biolabs
- benzamidine HCl,
- BRIJ 35, 30 %, Sigma
- BSA, albumin bovine, 96 %, Sigma-Aldrich
- CIP, Calf Intestinal Alkaline Phosphatase, Finnzymes
- coomassie brilliant blue
- DMEM-glutamax, Gibco
- EcoRI*HF-entsyymi, 20 U/μl, New England Biolabs
- etanoli, Etax Aa, Altia Oyj
- Fetal calf serum, EU FCS-500, PromoCell
- gelatiini, Oy FF-Chemicals Ab
- glukoosi, Baker analyzed, J.T. Baker
- glukoosi, 20 %, Sigma
- glyseroli, min. 99 %, Sigma
- glysiini, 99 %, Sigma-Aldrich
- hiivauute, Biokar Diagnostics
- karbenisilliini, carbenicillin disodiumsalt, Sigma-Aldrich
- MOPS, 99,5 %, Sigma
- natriumatsidi, NaN₃
- natriumbikarbonaatti, NaHCO₃, 7,5 %, Sigma
- natriumbikarbonaatti, NaHCO₃, baker analyzed, J.T.Baker
- natriumdodekyylisulfaatti, SDS, 99 %, Merck
- natriumkloridi, NaCl, p.a. Merck
- NEAA, no-essential amino acids, 10 mM, Gibco
- Opti-MEM, Gibco
- PBS, Dulbecco's phosphate buffered saline, 1x ja 10X, Sigma
- pensilliini (10 kU/ml)-streptomysiini (10 mg/ml), Sigma
- proteiini A, Sigma
- sitruunahappo
- Smal - entsyymi, 10 U/μl, New England Biolabs
- SYBR SafeDNA gel stain 10000 x, Invitrogen
- TRIS, (hydroksimetyyli)aminometaani, p.a, Merck
- trypsiini EDTA, 0,05 %, Sigma
- Tween 20, Merck
- T4 DNA ligaasientsyymi, 400 U/μl, New England Biolabs
- T4 DNA ligaasipuskuri 10X, New England Biolabs
- 2-merkoptoetanol, LLC, MP Biomedicals
- 2-pronanoli, p.a, Merck

SB-MOPS

30 g tryptoni
20 g hiivauute
10 g MOPS

Liuetetaan noin 700 ml:aan deionisoitua vettä. Säädetään 2 M NaOH:lla pH=7,0. Täytetään litraksi ja autoklavoidaan. Lisätään tarvittavaan määrään karbenisilliinikantaliuosta ja 40 % glukoosia.

LB-maljat

2 g tryptoni
1 g hiivauute
1 g NaCl
3,6 g agar-agar

Liuetetaan 200 ml:aan vettä ja autoklavoidaan. Kun seos on jäähtynyt noin 50 °C:een lisätään antibiootti ja glukoosi ja valetaan maljat.

40 % Glukoosi

40 g glukoosia liuetetaan veteen ja täytetään 100 ml:ksi. Autoklavoidaan ja annostellaan. Säilytetään jääkaapissa.

SOB

20 g tryptoni
5 g hiivauute
0.585 g NaCl
0.185 g KCL

Liuetetaan deionisoituun veteen ja täytetään litraksi. Autoklavoidaan. Lisätään 1 ml steriiliä 1M MgCl₂ ja 1 ml 1M MgSO₄ per 100 ml liuosta. Säilytetään jääkaapissa.

SOC

Lisätään SOB liemeen steriiliä 40 % glukoosia loppupitoisuuteen 2 %. Säilytetään jääkaapissa tai pakastetaan 10 ml:n annoksina -20 °C.

DMEM-high glucose

100 ml DMEM glutamax
12 ml FCS
1,2 ml pensilliini-streptomysiini
6 ml 7,5 % Natriumbikarbonaattia
1,2 ml NEAA (non-essential amino acids)
2 ml 20 % glukoosia

(L-glutamiiniä, eikä natriumpuryvaattia tarvinnut lisätä, koska sitä oli valmiiksi DMEM-glutamaxissa. Siinä oli glukoosia vain 1 g/l, joten lisättiin sitä loppupitoisuuteen 4,5 g/l)

karbenisilliinikantaliuos 50 mg/ml

1 g karbenisilliinia liuotetaan 20 ml:aan steriiliä vettä. Annostellaan 1 ml:n annoksiin -20 °C. Kantaliuos on 1000-kertainen, eli 100 ml:aan mediumia lisätään 100 µl kantaliuosta.

XC-lopetuspuskuri

832 mg EDTA-Na₄*H₂O

4,6 ml 87 % glyserolia

riipaus Xylene Cyanol-siniväriä. Täytetään tilavuus 10 ml:ksi steriilillä vedellä ja annostellaan eppendorf-putkiin. Säilytetään +4 °C.

50xTAE-kantaliuos: 2 M TRIS – 5,65 % etikkahappo – 100 mM EDTA

242,2 g TRIS

57,1 ml jäätikkää

100 ml 0,5 M EDTA pH=8,0

Täytetään tilavuus litraksi vedellä ja autoklavoidaan.

1XTAE laimennetaan 50xTAE-kantaliuoksesta deionisoituun veteen.

1xPBS-0,6 % BRIJ35

Lisätään 10 ml 30 % BRIJ35 500 ml:aan 1xPBS-puskuria, sekoitetaan.

2 M sitruunahappo, pH=2,0

42,03 g sitruunahappoa liuotetaan 80 ml:aan deionisoitua vettä. Säädetään pH väkevällä NaOH:lla. Täytetään 100 ml:ksi.

0,1 M sitruunahappo, pH=2,0

5 ml 2 M sitruunahappoa laimennetaan 100 ml:ksi deionisoidulla vedellä.

2 M Tris, pH=8,8

24,3 grammaa TRIS

liuotetaan 80 ml:aan vettä ja säädetään pH suolahapolla. Täytetään 100 ml:ksi ja autoklavoidaan.

0,1 M natriumbikarbonaattipuskuri, pH=9,6

4,24 g Na₂CO₃

5,04 g NaHCO₃

Blokkauspuskuri: 1 % BSA - 0,2 % gelatiini - 0,05 % Tween20 - 1xPBS.

2 g gelatiini

100 ml 10xPBS

Täytetään tilavuus litraksi vedellä. Autoklavoidaan. Lisätään 10 g BSA (Bovine serum albumin). Steriilisuodatetaan 0,22 µm filterillä. Lisätään tween20.

PBST-pesupuskuri: 1xPBS- 0,05 % Tween

500 ml 10xPBS laimennetaan litraksi. Lisätään 2,5 ml Tween20.

PNPP-substraattiliuos:

Tris-puskuritabletti liuotetaan 20 ml:aan steriiliä vettä. Liuotetaan sitten pNPP-tabletti Tris-puskuriin. Steriilisuodatetaan 0,22 µm filterin läpi. Säilytys valolta suojattuna.

2xSDS-PAGE –näytepuskuri:

2,5 ml 0,5 M Tris pH=6,8

2 ml 20 % SDS

4 ml 50 % glyseroli

0,5 ml deionisoitu vesi

riipaus bronphenol blue.

Annostellaan 450 µl annoksiin. Säilytetään -20 °C. Lisätään ennen käyttöä 50 µl beta merkaptotetanolia putkeen.

10xPAGE-ajopuskuri: 1.92 M glysiini - 0,25 M TRIS:

144 g glysiini

30,3 g TRIS

Liuotetaan litraksi deionisoidulla vedellä. Autoklavoidaan.

1xPAGE-ajopuskuri:

200 ml 10xPAGE-ajopuskuria

1790 ml deionisoitua vettä

10 ml 20 % SDS

20 % SDS:

20 g SDS

Täytetään 100 ml:ksi deionisoidulla vedellä.

CBB-värijäysliuos:

200 ml etanolia

40 ml etikkahappoa

0,25 g CBB

Täytetään 500 ml:ksi deionisoidulla vedellä. Sekoitus magneettisekoittajalla yön yli ja suodatetaan seuraavana päivänä.






































10 % Etikkahappo:
100 ml etikkahappoa
Täytä litraksi vedellä.

Opinnäytetyössä käytetyt laitteet:

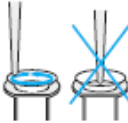
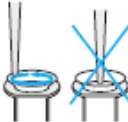
- Agarose ajolaite, Biorad
- Elisa-lukulaite, Perkin Elmer Precisely, Victor Wallac 1420 multilabel counter
- Faasikontrastimikroskooppi Leiga
- Inkubaattori Forma Scientific, CO2-icubator
- Lämpöblokki VWR
- Lämpökaappi Termaks
- Lämpöravistelijä, IKA RS 4000
- Mikrosentrifugi, Galaxy 16 DH, VWR
- PCR-laite, Perkin Elmer DNA thermal cycler
- PH-mittari Consort P600
- Ravistelijä Heidolph Titramax 1000
- SDS-ajolaite, Biorad
- Sentrifugi Sorvall Super Speed RC 2-B
- Sentrifugi SL 40 R Thermo Scientific
- Sinivalopöytä Safe Imager
- Spektrofotometri, Nanodrop 2000 Thermo Scientific
- Vaaka Ohaus CD 2000
- Vaaka Sartorius BP 310 P, Prolab Orion Oy
- Virtalähde, Biorad Power Pac 300

Plasmid DNA Purification

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

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











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

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

PCR clean-up, Gel extraction

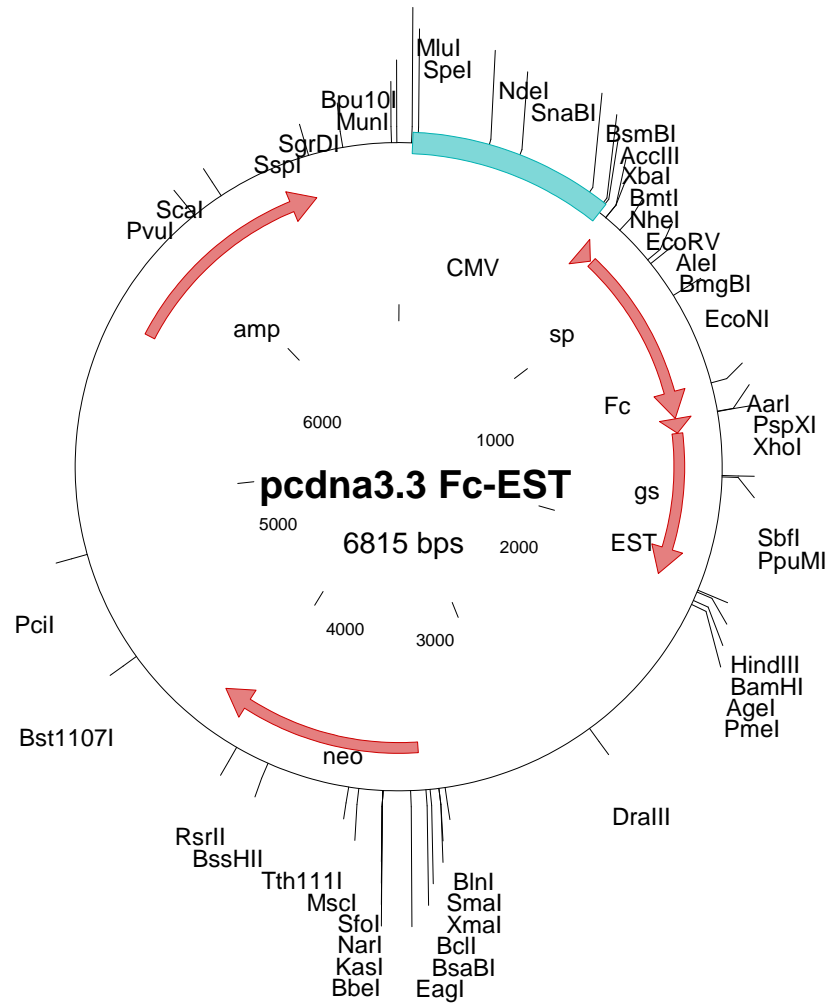
Protocol-at-a-glance (Rev. 11)

NucleoSpin® Extract II

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

VEKTORIN RAKENNEKUVA SELITYKSINEEN

Tuottovektorina työssä käytettiin pCDNA3.3-Fc-est, jonka plasmidikonstrukti on esitetty kuvassa 13.



KUVA 13. Kuvassa näkässölu tuottovektori, jolla Fc-endostatiini tuotettiin (Veijola 2010)

CMV= on sytomegaloviruksen geenistä kopioitu geeninsäätelyalue, joka toimii tehokkaasti nisäkässöluissa. Promoottoria ei indusoida vaan se toimii jatkuvasti (constitutive expression).

AMP= beta lactamase -geeni, joka antaa vastustuskyvyn ampisilliini- ja karbenisilliini-antibiooteille. Tarvitaan selektiomenetelmänä, kun plasmidia tuotetaan *E.coli*-kasvatuksissa.

neo= neomysiini, antaa vastustuskyvyn nisäkässoluissa käytettävää neomysiini-antibioottia vastaan. Tarvitaan, kun halutaan valikoida solulinja, jonka genomiin plasmidi on mennyt sisälle. Bakteerikasvatuksissa neomysiinigeeni antaa vastustuskyvyn kanamysiini-antibiootille.

sp= signaalipeptidi, joka ohjaa valmistuvan polypeptidin solulimasta endoplasmaikalvostoon ja proteiininmuokkausreitille ja ulos solusta eritettäväksi.

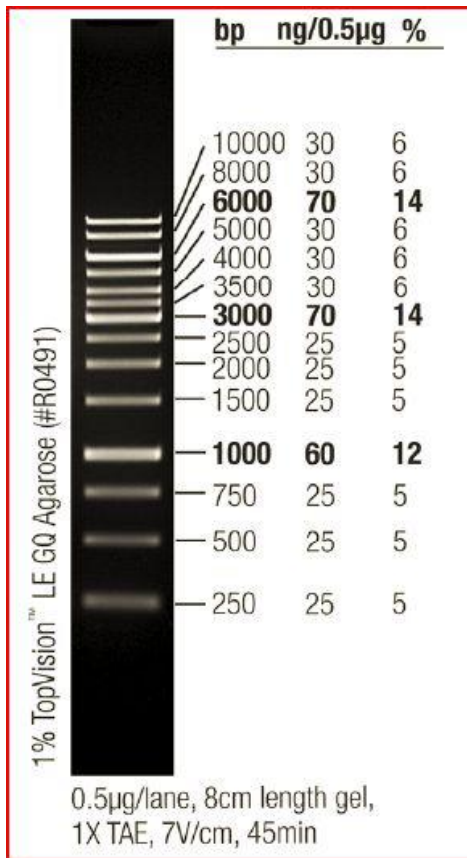
Fc= on ihmisen IgG (immunoglobuliini G) molekyylin niin sanottu Fc-osa, joka sisältää rakenteet:

sarana (H= hinge) sekä alueet CH2 ja CH3. Fc-osaan liitetään sokeri Ch2 ja Ch3 alueiden välissä.

gs= (glysiini-glysiini-glysiini-seriini)₃ peräkkäin peptidisilta kahden eri proteiinosan välillä. Antaa tilaa molemmille osille laskostua. Tähän kohtaan voisi laittaa tarvittaessa jonkin affinitetti-tagin, esimerkiksi His 6.

EST= ihmisen endostatiini-jakso

Fermentas 1 kb DNA Ladder SMO313



Applichem Protein Marker II

