



Teemu Ukonaho

**IHMISEN FIBRONEKTIININ TYPE III TOISTOJAKSOJEN
KLOONAAMINEN REKOMBINANTIN FUUSIOPROTEIININ
TUOTTAMISEKSI**

**IHMISEN FIBRONEKTIININ TYPE III TOISTOJAKSOJEN
KLOONAAMINEN REKOMBINANTIN FUUSIOPROTEIININ
TUOTTAMISEKSI**

Teemu Ukonaho
Opinnäytetyö
Syksy 2013
Laboratorioalan koulutusohjelma
Oulun seudun ammattikorkeakoulu

TIIVISTELMÄ

Oulun seudun ammattikorkeakoulu
Laboratorioalan koulutusohjelma, bioteknologian sv.

Tekijä(t): Teemu Ukonaho

Opinnäytetyön nimi: Ihmisen fibronektiinin tyypIII toistojaksojen kloonaminen rekombinantin fuusioproteiinin tuottamiseksi

Työn ohjaaja(t): Johanna Veijola

Työn valmistumislukukausi ja -vuosi: Syys 2013 Sivumäärä: 46 + 6 liitettä

Opinnäytetyö liittyy Oulun yliopiston, biolääketieteen laitoksen, fysiologian yksikössä käynnissä olevaan tutkimusprojektiin, jossa selvitetään spesifisten vasta-aineiden kohdemolekyyleissä olevia sitoutumisrakenteita. Tieto auttaa suunnittelemaan vasta-aineiden käyttösovellutuksia. Opinnäytetyössä valmistetaan yhdistelmä-DNA-plasmideja, joiden avulla kohdemolekyylin alueelta voidaan tuottaa valikoituja toiminnallisia osia eli domeeneja yhdistelmä- eli fuusioproteiininä *Escherichia coli* -bakteerissa. Työn tavoitteena on valmistaa ja muokata solumateriaalista molekyyliytökäly, joka sisältää tarvittavan geneettisen tiedon halutunlaisen valkuaisaineen tuottamiseksi bakteerissa.

Geenitekniikan menetelmiä soveltamalla soluista eristetään valkuaisaineen ohjekoodit sisältävä RNA-pooli, joka käännetään cDNA-muotoon. Tästä monistetaan spesifisillä alukkeilla PCR-menetelmällä halutut geenijaksot, jotka muokataan entsyymaattisesti sopimaan yhteen kaupallisen proteiinintuottovektorin kanssa. Plasmidit siirretään kemiallisesti käsiteltyihin *E.coli* -bakteereihin. DNA-materiaalia tutkitaan entsyymikäsittelyllä, PCR-menetelmällä, agaroosigeelielektroforeesilla sekä sekvensointireaktiolla. Tuloksia verrataan teoreettisiin arvoihin, kuten molekyylien kokoon tai emäsjärjestykseen.

Työssä valmistettiin yhdistelmä-DNA plasmidit, joiden avulla voi tuottaa bakteerissa ihmisen fibronektiinin tyypin III toistojaksot 1 sekä 1–2 fuusioituna tioredoksiiniin. Yhdistelmä-DNA plasmidilla voidaan tuottaa kaksi seitsemästä tutkimuksen kohteena olevasta domeiinista. Jatkossa plasmideilla tuotetaan tuottokannassa T7 Express kyseisiä fuusioproteiineja, ja puhdistetaan ne IMAC-menetelmällä. Puhdistettuja fuusioproteiineja käytetään ELISA vasta-ainetestissä sekä suoraan sitoutumisen testaamiseen sekä kompetetiiviseen reaktioon cyto-ELISAssa, syrjäyttämään vasta-aineen sitoutuminen solun pintaan.

Asiasanat: RNA, cDNA , PCR monistus, kloonaus, fibronektiini

SISÄLLYS

TIIVISTELMÄ	3
SISÄLLYS	4
MERKKIEN SELITYKSET JA SANASTO	6
1 JOHDANTO	7
2 NISÄKÄSSOLUTYYPPEJÄ	8
2.1 Kantasolut	8
2.1.1 Alkion kantasolut	8
2.1.2 Napaveren hematopoeettiset kantasolut	9
2.1.3 Aikuisen kantasolut	9
2.1.4 Kantasoluterapia	9
2.2 Epiteelisolut	10
2.3 Sidekudossolut	10
2.4 Syöpäsolut	10
3 SOLUVÄLIAINE	12
3.1 Sidekudos muutokset	12
3.1.1 Immunodiagnostiikka	13
3.1.2 Vasta-aineterapia	13
3.2 Fibronektiini	14
3.2.1 Fibronektiinin rakenne	14
3.2.2 Fibronektiinin tehtävät	15
3.2.3 Fibronektiini diagnostiikassa	15
4 KOKEELLINEN OSUUS	17
4.1 RNA:n eristys	17
4.2 cDNA	17
4.3 PCR-monistus ja geenipalojen tuotto	17
4.3.1 Testi-PCR	18
4.3.2 Esi-PCR	19
4.3.3 Jatko-PCR	19
4.4 Vektorin pET32a valmistus	20
4.5 DNA liittämismenetelmät	21
4.5.1 Monistettujen geenipalojen liittäminen pET32 vektoriin	21
4.5.2 Monistettujen geenipalojen liittäminen Zero Blunt vektoriin	24
4.6 Kloonien seulonta ja tarkastaminen	25
4.6.1 Restriktioendonukleasikäsittely eli testidigestiot	26

4.6.2	Pesäke-PCR	27
4.6.3	Kloonien emäsjärjestyksen tarkistaminen	29
5	TULOKSET	30
5.1	Materiaalit	30
5.1.1	Nisäkässolujen keräys ja RNA:n eristys	30
5.1.2	Plasmidin pET32 eristys	31
5.1.3	Kompetentit solut	31
5.2	DNA:n muokkaus	31
5.3	Kimeerisen DNA-plasmidin valmistus	34
5.3.1	Transformaatio	34
5.3.2	Kloonien seulonta	35
5.3.3	Kloonien emäsjärjestyksen tarkistaminen	38
6	YHTEENVETO	40
	LÄHTEET	41
	LIITTEET	46

MERKKIEN SELITYKSET JA SANASTO

A	Adnosiini
bp	Base pair eli emäspari
C	Sytosiini
cDNA	Komplementaarinen (complementary) DNA on lähetti-RNA:sta käänteiskopioijaentsyymillä tehty DNA-kopio
DNA	Deoksiribonukleiinihappo
G	Guaniini
kb	Kilobase eli kiloemäs. kb = 1000 bp
RNA	Ribonukleiinihappo
st.	Steriili
T	Tymiini

1 JOHDANTO

Työn tarkoituksena on kloonata ihmisen fibronektiinin tyypIII toistojaksot rekombinanttiproteiinin tuottamiseksi. Tavoitteena on kloonata viisi erilaista toistojaksoa. Fragmentit liitetään eli ligatoidaan pET32-vektoriin, joka siirretään eli transformoidaan lopulta proteiinintuottoa varten *Escherichia coli* -solukantaan T7 Express.

Työ alkaa eristämällä totaali-RNA ihmisen erilaisista soluista. RNA:sta valmistetaan cDNA:ta, josta PCR-reaktiolla monistetaan halutut fragmentit. Vektorin valmistamista varten pET32-plasmidi eristetään bakteereista ja käsitellään DNA:n muokausentsyymeillä. Yhteensopivaksi muokatut DNA-molekyylit liitetään toisiinsa. Yhdistelmäplasmidi siirretään aluksi *E.coli* -solukantaan XL1-Blue, joka on DNAn tuottoon kehitetty K12-pohjainen laboratoriokanta. Sen avulla tuotetaan riittävästi plasmidia erilaisia DNA-analyysejä varten. Virheettömäksi todettu plasmidi siirretään lopuksi T7 Express-soluihin, joka on proteiinin tuottoon kehitetty *E.coli* B-strain pohjainen laboratoriokanta.

Ongelmakohtia työssä voi olla PCR-reaktioiden optimoinnissa ja yhdistelmäplasmidia sisältävän kloonin seulonnassa. PCR-reaktioiden olosuhteiden täytyy olla erikseen jokaiselle fragmentille sopivat, jotta tuotetta muodostuu riittävästi. Kloonien seulonnan haasteena on löytää fragmentin sisältävät kloonit sellaisten joukosta, jotka eivät fragmenttia sisällä.

2 NISÄKÄSSOLUTYYPPEJÄ

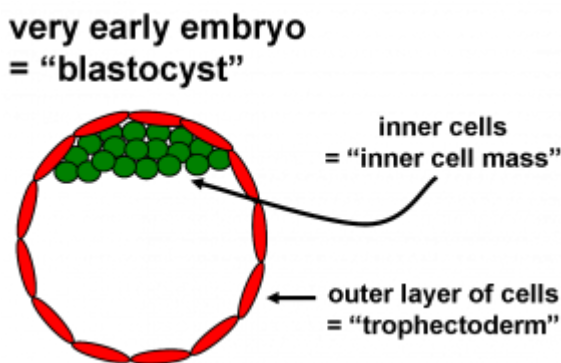
Ihmisessä on 200 erilaista solutyyppiä, jotka kaikki erilaistuvat alkion kaikkikykyisistä kantasoluista. Jokaisella solutyypillä on omat erityiset tehtävänsä. (1.)

2.1 Kantasolut

Kantasolut ovat erilaistumattomia soluja, joilla on kyky jakautua ja kyky erilaistua eri solutyypeiksi ja sitä kautta kudoksiksi. Erilaistumiskyky kuitenkin vaihtelee kantasolun alkuperän mukaan ja vain alkion kantasolut ovat kaikkikykyisiä. Kantasoluja on tähän mennessä löydetty varhaisvaiheen alkion lisäksi sikiön kudoksista, napaverestä ja useista aikuisen kudoksista. (2.)

2.1.1 Alkion kantasolut

Hedelmöityksen jälkeen kaikki alkion solut ovat kaikkikykyisiä muutaman päivän. Kaikkikykyinen eli totipotentsolu pystyy jakautumaan ja erilaistumaan joko kaiseksi solutyypiksi ja täten myös muodostamaan uuden yksilön. Noin sadan solun kokoista alkioita kutsutaan blastokystiksi eli alkiorakkulaksi. Kuten kuvasta 1 nähdään, se koostuu kahdesta osasta, joista sisemmät solut ovat pluripotenttejä kantasoluja. Pluripotentsolu pystyy erilaistumaan miksi tahansa soluksi. Se ei kuitenkaan pysty muodostamaan uutta yksilöä. (2; 3; 4.)



KUVA 1. Alkiorakkula (4)

2.1.2 Napaveren hematopoeettiset kantasolut

Napanuoran napaveri sisältää hematopoeettisia kantasoluja. Ne ovat samoja veren kantasoluja, joita löytyy luuytimeistä. Hematopoeettiset kantasolut voivat erilaistua kaiken tyyppisiksi veren kantasoluiksi ja näin niiden tehtävänä on ylläpitää veren tuotantoa. Hematopoeettiset kantasolut kuuluvat mesenkymaalisiin kantasoluihin, joiden alkuperä on alkion mesodermikerros. Tutkimukset ovat osoittaneet, että kasvutekijöiden ja mikroympäristön vaikutuksesta ne voivat erilaistua myös esimerkiksi rasvasoluiksi tai luusoluiksi, jotka ovat myös mesodermaalista alkuperää. (5; 6.)

2.1.3 Aikuisen kantasolut

Aikuisen kantasolut sijaitsevat erilaistuneiden solujen seassa kudoksissa ja elimissä. Aikuisen kantasolut ovat monikykyisiä eli ne pystyvät erilaistumaan osaksi tai kaikiksi sijaintinsa kudoksen tai elimen soluiksi. Eri kokeissa aikuisen kantasolut on kuitenkin saatu erilaistumaan myös eri kudoksen soluiksi, kuin sen missä ne sijaitsevat. Ei kuitenkaan tiedetä voiko sitä tapahtua kehossa luonnostaan. (7.)

Aikuisen kantasolujen tehtävänä on ylläpitää ja korjata kudosta, jossa ne sijaitsevat. Tarvittaessa ne jakautuvat, jolloin muodostuu kaksi solua, joista toinen jää kantasoluksi ja toinen erilaistuu tarvittavaksi soluksi. Esimerkiksi iho uudistuu jatkuvasti ihon kantasolujen avulla. (8.)

2.1.4 Kantasoluterapia

Kantasoluterapiassa sairauksia hoidetaan kantasoluilla. Hoito perustuu siihen, että kantasoluilla korjataan vahingoittunutta kudosta. Hoidossa alkion kantasoluja erilaistetaan tarkoitukseen sopiviksi soluiksi, minkä jälkeen ne siirretään kudokseen, jossa ne korvaavat vahingoittuneet solut. (9.)

Tällä hetkellä ainoastaan luuydinsiirto on käytössä kantasoluihin perustuvana hoitomuotona. Muita hoitomuotoja on kuitenkin tutkimus- ja kokeiluvaiheessa. Kantasoluterapialla voidaan mahdollisesti hoitaa kaikkia tapauksia, joissa kudoksella on jotenkin vahingoittunut. Esimerkiksi sydänkohtauksessa vahingoittunutta sydänkudosta voitaisiin korjata kantasoluilla. (9.)

2.2 Epiteelisolut

Epiteelisolut muodostavat epiteelikudoksen, joka peittää elimistön kaikki sisä- ja ulkopinnat. Epiteelisolut ovat tiukasti pakkautuneet yhteen ja niiden välinen tila ja soluväliaine on hyvin vähäistä. Epiteelisolujen alla on yleensä tukea antava soluväliainekalvo, nimeltä tyvikalvo. Epiteelikudos voidaan jakaa yhden solukerroksen paksuiseen yksinkertaiseen epiteeliin ja usean solukerroksen kerrostuneeseen epiteeliin. Epiteelisolut jaotellaan myös niiden muodon mukaan. (10.)

Epiteelikudoksella on monia tehtäviä. Pintana se antaa fyysistä suojaa. Se myös osallistuu aineenvaihduntaan välittämällä diffuusiota, imeytymistä ja erityymistä. Epiteelikudokset liittyvät myös tuntoaistimuksen tuottamiseen. Epiteelisolut vähentävät kitkaa verisuonen ja veren välillä. (11.)

2.3 Sidekudossolut

Sidekudossolut muodostavat sidekudoksen, joka toimii rakenteellisena tukena ja yhdistäen muita kudoksia toisiinsa. Muita sidekudoksen tehtäviä ovat aineiden kuljetus, immuunipuolustus, kudonvaurioiden korjaus sekä toimiminen energiavarastona, lämmönmuodostajana ja verisolujen muodostajana. Sidekudos sisältää paljon soluväliainetta, joka määrittää sen ominaisuudet. (12; 13.)

Sidekudos voidaan lajitella löyhään ja tiiviiseen järjestäytyneeseen sidekudokseen, järjestäytyneeseen tiiviiseen sidekudokseen, rustokudokseen, rasvakudokseen, hematopoeettiseen kudokseen, vereen ja luukudokseen. (14.)

2.4 Syöpäsolut

Syöpäsolut eroavat monella tapaa normaaleista soluista. Syöpäsolujen poikkeavuus johtuu DNA-muutoksista eli mutaatioista. Normaalisti solujen DNA vaurioiden korjausjärjestelmä pyrkii korjaamaan muutokset. Mutaatio voi kuitenkin tapahtua korjausmekanismissa jolloin samaan soluun kertyy useita mutaatioita. Monet mutaatiot samassa solussa on syöpäsolun syntymisen edellytys. Nämä muutokset ovat usein suuria ja tapahtuvat vaiheittain. Muutoksia voivat aiheuttaa monet eri tekijät, esimerkiksi karsinogeeniset kemikaalit ja sähkömagneettinen säteily. (15, s. 279–288.)

Syöpäsolut eivät ole normaalilla tavalla riippuvaisia solun ulkopuolisista kontrolloivista tekijöistä, jotka säätelevät solun jakautumista, erilaistumista ja kuolemistä. Kontrollitta kasvavien syöpäsolujen jakautuminen on nopeaa ja voi tapahtua ilman soluväliainetta. Syöpäsolut pystyvät käynnistämään verisuonien synnyn eli angiogeneesin kasvavaan syöpäsoluryppääseen, jolloin solut saavat tarvitsemansa hapen ja ravinteet. Erilainen kiinnittymistapa soluväliaineeseen ja muihin soluihin aiheuttaa syöpäsolujen poikkeavan ulkomuodon. Syöpäsolut pystyvät välttämään apoptoosin eli ohjelmoidun solukuoleman. Muuttunut vuorovaikutus soluväliaineen kanssa mahdollistaa pahanlaatuisten syöpäsolujen liikkumisen ja tunkeutumisen tyvikalvojen ja endoteelikerrosten läpi, jolloin syöpäsolut voivat levitä ympäri kehoa. (15, s. 279–288.)

3 SOLUVÄLIAINE

Soluväliaine on nimensä mukaisesti solujen välissä oleva aine. Sen määrä kudoksissa vaihtelee kudoksen mukaan. Eniten sitä on sidekudoksessa, jossa soluväliainetta on enemmän kuin soluja. Soluväliainetta on myös tyvikalvo, joka toimii tukirakenteena epiteelisoluille. Tyvikalvo esiintyy epiteelisolujen ja sidekudoksen rajalla, ja lisäksi se ympäröi lihas- ja rasvasoluja sekä ääreishermoston tukisoluja. (16; 17; 18.)

Soluväliaine koostuu proteiineista ja hiilihydraateista, joita väliaineessa elävät solut tuottavat. Väliaineen sisältämät makromolekyylit voidaan jakaa säikeitä muodostaviin proteiineihin ja glykosaminoglykaaneihin. Polysakkarideihin kuuluvat glykosaminoglykaanit ovat yleensä kovalenttisesti sitoutuneena proteiineihin proteoglykaaneina. Säikeitä muodostavia proteiineja soluväliaineessa ovat kollageeni, fibronectiini, tenaskiini, elastiini ja laminiini. (16.)

Aiemmin soluväliaineen luultiin toimivan vain solujen tarttumispintana ja tukirakenteena. Se kuitenkin vaikuttaa merkittävästi myös kudosten kehitykseen ja fyysikaalisiin ominaisuuksiin. Soluväliaine vaikuttaa paikallisesti solujen kehitykseen, liikkumiseen (migraatio), lisääntymiseen (proliferaatio), muotoon ja toimintoihin. Samalla määräytyy kudosten fyysikaaliset ominaisuudet, kuten vetolujuus ja joustavuus. (16.)

3.1 Sidekudos muutokset

Sidekudokset muodostuvat alkion mesodermikerroksesta, joka on kolmesta alkiokerroksesta sisin. Sidekudokset ovat dynaamisia, eli ne muuttuvat erilaisissa tilanteissa. Esimerkiksi jänteiden ja lihasten sidekudokset sopeutuvat fyysiseen rasitukseen lisäämällä kollageenin synteesiä. (13; 19.)

Sidekudossairaukset johtuvat muutoksista sidekudoksessa. Muutoksia sidekudoksessa aiheuttavat mutaatiot geeneissä sekä autoimmuunisairaudet. Mutaatiot sidekudoksen rakentamiseen liittyvissä geeneissä voivat aiheuttaa muutoksia sidekudoksen rakentumisessa, rakenteessa ja toiminnassa. Sidekudoksen autoimmuunisairauksissa ihmisen oma immuunipuolustus hyökkää sidekudok-

sen soluja vastaan. Niiden syytä ei tiedetä. Sidekudoksien syöpiä ovat sarkoomat ja leukemia. (20; 21; 22.)

Sidekudossairauden diagnosoinnissa ja hoidossa voidaan käyttää vasta-aineita. Näiden tekniikoiden nimet ovat immunodiagnostiikka ja vasta-aineterapia. (23; 24; 25.)

3.1.1 Immunodiagnostiikka

Immunodiagnostiikalla tarkoitetaan diagnostiikkaa, joka perustuu spesifiseen vasta-aineen ja antigeenin väliseen tunnistusreaktioon. Immunodiagnostiset menetelmät perustuvat antigeeniä, kuten esimerkiksi taudinaiheuttaja bakteeria vastaan tuottuneiden vasta-aineiden havainnointiin ja kvantitointiin näytteestä, esimerkiksi seerumista. Erilaisia immunodiagnostisia testejä on kehitetty lukuisia. (23; 24.)

3.1.2 Vasta-aineterapia

Vasta-aineterapiassa käytetään nimensä mukaisesti vasta-aineita sairauden hoidossa. Suurin osa terapeuttisista vasta-aineista on monoklonaalisia vasta-aineita, jotka sitoutuvat spesifisesti tiettyyn kohtaan valkuaisaineessa, esimerkiksi solun pinnan reseptoreihin. Vasta-aineterapiaa sovelletaan autoimmuunisairauksien ja syöpien hoidossa. Hoidon periaate ja vasta-aineiden vaikutusmekanismi vaihtelee sairauden luonteen mukaan. (25.)

Syövän hoidossa vasta-aineet esimerkiksi kiinnittyvät syöpäsolujen pintaan aktiivoiden immuunipuolustuksen niitä vastaan. Vasta-aineet voivat myös kiinnittyä syöpäsolujen reseptoreihin häiriten niiden toimintaa. Vasta-aineisiin voidaan myös liittää radioaktiivisia partikkeleita, kemoterapialääkkeitä tai solumyrkkyjä, jotka vaikuttavat paikallisesti vasta-ainetta itseensä sitoviin syöpäsoluihin. Autoimmuunisairauksien hoidossa vasta-aineet hillitsevät ihmisen oman immuunipuolustuksen soluja, jotka ovat ylireagoinnillaan aiheuttaneet taudin oireet. (26; 27.)

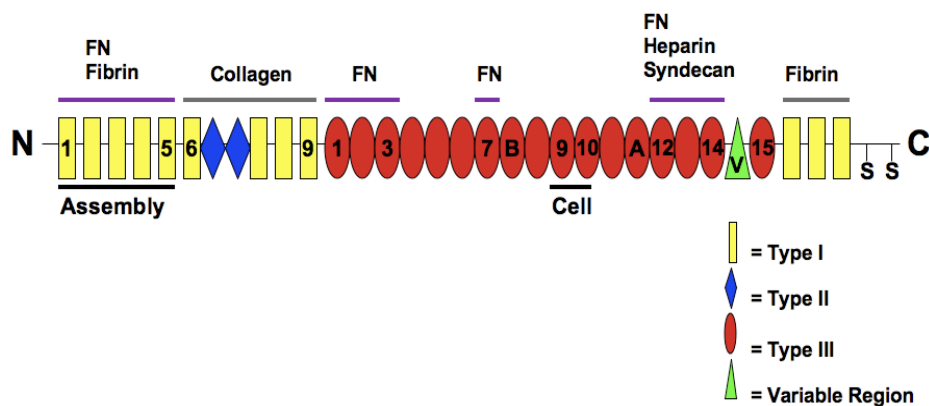
3.2 Fibronektiini

Fibronektiini on paljon tutkittu 1970-luvulla löydetty soluväliaineen glykoproteiini. Fibronektiinillä on monia vuorovaikutuksia muiden soluväliaineen makromolekyylien kanssa sekä solujen reseptoreiden kanssa. Fibronektiini on merkittävässä roolissa selkärankaisten kehityksessä. Se mahdollistaa esimerkiksi solujen liikkuvuuden. Sama solujen liikkuvuus tosin myös mahdollistaa syövän leviämisen. (15, s. 193; 28; 29.)

3.2.1 Fibronektiinin rakenne

Fibronektiini esiintyy dimeerimuotoisena. Se muodostuu kahdesta samankokoisesta alayksiköstä, jotka ovat kiinnittyneet toisiinsa disulfididisidoksilla. Alayksikkö sisältää kolme toistojaksoa, jotka ovat nimeltään type I, type II ja type III. Toistojaksot koostuvat moduuleista, joita tyypissä I on 12, tyypissä II 2 ja tyypissä III 15. Moduulit ovat itsestään laskostuvia osia, jotka muodostavat domeeneja eli biologisesti toiminnallisia yksiköitä. Fibronektiinissä on useita domeeneja, jotka ovat sidoskohtia toisiin molekyyliin. (15, s. 193–195; 29.)

Kuvassa 2 esitetään ihmisen fibronektiinin perusrakenne, johon on merkitty erilliset toiminnalliset osat eli domeiinit. Tunnetut disulfididisidokset on merkitty kahdella s-kirjaimella. Toistojaksot on merkitty eri väreillä ja moduulit eri kuvioilla. Sitoutuminen toisiin molekyyliin on merkitty kirjainlyhentein domeenien yläpuolelle.



KUVA 2. Fibronektiinin rakenne (30)

Fibronektiinia esiintyy monena eri muotona, vaikka sitä koodaa vain yksi geeni. Eri esiintymismuodot johtuvat lähetti-RNA:n vaihtoehtoisesta silmukoinnista, joka määrää yksittäisten moduulien ja samalla domeenien mukana olon valmiissa proteiineissa. Eri muodot eroavat toisistaan sen suhteen, miten ne kiinnittyvät eri solytyyppeihin. (15, s. 193–195.)

Fibronektiini Tyypin III ensimmäinen moduuli on nimeltään anastelliini. Se sisältää sidoskohdan toiseen fibronektiinimolekyylisiin. Anastelliinilla on kasvainten, etäpesäkkeiden ja angiogeneesin estämismominaisuuksia. Anastelliinia tutkimalla voidaan ehkä kehittää uusia syöpälääkkeitä. (31; 32; 33.)

3.2.2 Fibronektiinin tehtävät

Fibronektiinin ominaisuus on sen kyky tarttua moniin eri molekyyliin, mukaan lukien toisiin fibronektiineihin, sekä solujen reseptoreihin. Näin se sitoo soluväliaineen makromolekyyliä toisiinsa sekä solut soluväliaineeseen. (15, s. 193–195.)

Fibronektiini pystyy muodostamaan pinnan, jota pitkin solut voivat liikkua. Solujen liikkuminen on tärkeää alkion ja sikiön kehityksen aikana, kudosaaurioiden korjausprosesseissa ja syövän leviämisen yhteydessä. Fibronektiinillä on tärkeä tehtävä haavan paranemisessa. Veressä liuenneena oleva plasma-fibronektiini muodostaa fibriinin kanssa fibriiniverkon, joka tukkii vuotokohdan pysäyttäen verenvuodon. Tämän jälkeen fibronektiini kiinnittää ja ohjaa korvaavat solut paikalleen vahingoittuneiden solujen tilalle. (15, s. 193–195; 24.)

3.2.3 Fibronektiini diagnostiikassa

Ennen aikaisen synnytyksen riskiä voidaan arvioida mittaamalla kohdunkaulan eritteestä fetaali fibronektiinin pitoisuutta. Fetaali fibronektiini on lähtöisin istukasta. Kohonnut fetaalin fibronektiinin pitoisuus nostaa ennen aikaisen synnytyksen todennäköisyyttä. (35.)

Seerumin fibronektiinipitoisuuden on todettu muuttuvan, jos raskaus on kohdun ulkopuolinen. Täten fibronektiini voisi toimia yhtenä biologisena indikaattorina vaikeasti todettavan kohdun ulkopuolisen raskauden diagnoosissa. (36.)

Immunohistokemiallisissa kudostäjäyksissä fibronektiinin värjäyksellä syöpä-näytteistä voidaan ennustaa syövän pahanlaatuisuutta. Tutkimuksissa on osoi-tettu, että syöpäkasvainta ympäröivien fibroblastien toiminta ja niiden tuottama soluväliaine on muuttunut. Sitä kautta voidaan etsiä sopivia biologisia indikaat-toreita syövän toteamiseksi. (37; 38.)

4 KOKEELLINEN OSUUS

Työssä käytettyjen laitteiden ja reagenssien tarkemmat tiedot on esitetty liitteessä 1.

4.1 RNA:n eristys

RNA:n eristyksessä käytettiin vain RNA käyttöön tarkoitettuja pipettejä ja DEPC-käsiteltyjä mikrosentrifuugiputkia RNA:n eli RNA:ta hajottavien entsyymien välttämiseksi.

RNA:n eristykset tehtiin Omega Bio-Tekin E.Z.N.A Total RNA Kit 1:llä liitteessä 2 olevan valmistajan ohjeen mukaan. Eristyksen jälkeen pitoisuudet mitattiin Nanodropilla ja laatu tarkastettiin 1 % agarosigeelillä, johon lisättiin Invitrogenin SybrSafe DNA gel stain -reagenssia RNA:n visualisoimiseksi sinivalon avulla. Kyseinen väri sitoutuu RNA:n rakenteeseen ja fluoresoi sinisen valon aallonpituudella.

RNA:ta eristettiin napaveren kantasoluista, MDA231-syöpäsoluista, HT29-syöpäsoluista, luuytimen kantasoluista, R058-ihmisen ihon fibroblastisolusta sekä #352-aikuisen luuytimen mesenkymaalisista kantasoluista.

4.2 cDNA

Eristetyille RNA:lle tehtiin cDNA first strand -synteesi Fermentuksen RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit #K1621, #K1622-kitillä liitteessä 3 olevan valmistajan ohjeen mukaan. Reaktion onnistuminen tarkistettiin 1 % agarosigeelillä, johon lisättiin Invitrogenin SybrSafe DNA gel stain -reagenssia. Väriaine sitoutuu DNA:n rakenteeseen ja fluoresoi sinisen valon aallonpituudella.

4.3 PCR-monistus ja geenipalojen tuotto

PCR-reaktiot tehtiin pipetoimalla kaikki PCR-reaktioon tarvittavat liuokset PCR-putkeen 50 µl:n PCR-perusreaktion mukaan (taulukko 1), jota muutettiin tarpeen vaatiessa lisäämällä tai vähentämällä DNA templaatin määrää ja muuttamalla samalla steriilin veden määrää pitäen reaktion tilavuutena 50 µl. Valmiit reaktiot ajettiin PCR laitteella, johon ohjelmoitiin tarvittavat ohjelmat.

TAULUKKO 1. Perus PCR-reaktion pipetointilavuudet

	μl
St.vesi	29,5
5xGC puskuri	10
2,5 mM dNTP	4
50uM FWD aluke	0,5
50uM REV aluke	0,5
Phusion	0,5
DNA	5

PCR-reaktioiden onnistuminen tarkistettiin 3 % agarosigeelillä, johon oli lisätty SybrSafe-reagenssi. Agarosigeelinäytteet valmistettiin pipetoimalla suhteella 4/1 PCR tuotetta ja Fermentaksen 6xMass loading dye solution -liuosta mikrocentrifuugiputkeen mikrolitra määrien vaihdella tarpeen mukaan. Markkereina käytettiin Fermentaksen GeneRuler 1kb DNA ladder #SM0311 (liite 4) -markkeria ja Fermentaksen MassRuler DNA ladder low range #SM0383 (liite 4) -markkeria. Geelit ajettiin asetuksilla 80 V, mA max, 70–90 min. Geelit kuvattiin sinivalopöydällä.

4.3.1 Testi-PCR

Sopivimman cDNA:n valitsemiseksi tehtiin testi-PCR-reaktiot oligopareilla hCOL1A1 forward ja reverse sekä hCOL1A2 forward ja reverse.

PCR testit ajettiin käyttäen seuraavaa PCR-ohjelmaa:

98 °C 30s / 1x

98 °C 10s – 60 °C 5s – 72 °C 5s / 40x lämpökäsittelyn toisto

72 °C 30s

4.3.2 Esi-PCR

Parhaimmaksi valitusta napaveren kantasolujen cDNA:sta tehtiin esi-PCR reaktiot perusreaktion mukaan oligopareilla Fn+ ja Fn-, F+PCR ja Fn-3, F+1 ja Fn-3 sekä F+PCR ja Fn-7. PCR-ohjelma oli sama kuin testimonistuksessa. Muut esi-PCR reaktiot tehtiin oligopareilla F+PCR ja Fn-7, F+1 ja Fn-7 sekä F+1 ja Fn-6 PCR-ohjelmalla:

98 °C 30s / 1x

98 °C 5s – 61 °C 10s – 72 °C 30s / 27x lämpökäsittelyn toisto

72 °C 2 min

Tuotteet tarkistettiin agaroosigeelillä.

4.3.3 Jatko-PCR

Esi-PCR-reaktioista jatkettiin PCR-reaktioilla sisennetyillä oligopareilla Fn+1 ja Fn-1, Fn+1 ja Fn-2 sekä Fn+1 ja Fn-3 perusreaktio-ohjeen mukaan (kts. Testi-PCR ohjelma). Templaattina käytettiin esi-PCR-reaktioita Fn+PCR ja Fn-3. Jatko-PCR-reaktiot tehtiin myös oligopareilla Fn+1 ja Fn-3 sekä Fn+1 ja Fn-6, jossa templaattina käytettiin esi-PCR-reaktiota F+PCR ja Fn-6 sekä seuraavaa lämpötilaohjelmaa:

98 °C 30s / 1x

98 °C 5s – 61 °C 10s – 72 °C 30s / 30x lämpökäsittelyn toisto

72 °C 2 min

Tuotteet tarkistettiin agaroosigeelillä.

Koemonistuksen jälkeen jatko-PCR reaktioita tehtiin massamonistuksena 6 reaktiota rinnakkain alukkeen Fn+1 parina alukkeilla Fn-1, Fn-2 ja Fn-3. Samat reaktiot yhdistettiin ja monistunut DNA puhdistettiin Macherey-Nagelin PCR clean-up NucleoSpin extract II -kitillä liitteessä 5 olevan valmistajan ohjeen mukaan. Lopuksi eluoiitiin DNA pylvästä 50 µl:lla st.vettä. DNA-pitoisuudet tarkistettiin Nanodropilla.

4.4 Vektorin pET32a valmistus

Vektorin pET32a valmistus aloitettiin eristämällä plasmidi-DNA pakastetuista soluista, jotka sisälsivät pET32a-plasmidin. Eristykseen käytettiin Macherey-Nagelin Plasmid DNA Purification NucleoBond Xtra Midi -kittiä liitteessä 6 olevan valmistajan ohjeen mukaan. Pitoisuus mitattiin Nanodropilla ennen saostusta ja sen jälkeen.

Vektorin valmistamista varten 20 µg plasmidia käsiteltiin BamHI-HF ja HindIII-HF restriktioendonukleasientsyymeillä. Entsyymeitä käytettiin 4U (yksikköä) mikrogrammaa DNA:ta kohti. Reaktion lopputilavuuden piti olla 15-kertainen entsyymien mikrolitra määrää kohti, jotta entsyymien liuoksen sisältämä glyseroli-pitoisuus (50 %-v/v) laimenee riittävästi. Mikrosentrifuugiputkeen pipetoitiin vektori, vesi, puskuri ja lopuksi entsyymit filterikärjillä alla olevan taulukon 2 mukaan.

TAULUKKO 2. Vektorin entsyymikäsitelyreaktion pipetointitulavuudet

	Tilavuus µl
Vektori (20µg)	19
Vesi	81
10xNEB4 puskuri	12
BamHI-HF	4
HindIII-HF	4

DNA pilkottiin +37 °C:ssa lämpökaapissa yön yli. Reaktio lopetettiin kuumentamalla +85 °C:ssa lämpöblokkissa 15 minuuttia. DNA eristettiin Macherey-Nagel PCR clean-up gel extraction NucleoSpin extract II -kitillä liitteessä 5 olevan valmistajan ohjeen mukaan. DNA eluoiitiin pylväästä 55 µl:aan st.vettä.

Näytteeseen lisättiin 15 µl XC-LB puskuria. Vektori ajettiin 0,8 % preparatiivisella agarosigeelillä eli geelin tekoon ja ajoon käytettiin steriilejä välineitä. Markkereina käytettiin Fermentaxen GeneRuler 1kb DNA ladder #SM0311 -markkeria. Vektoriliuosta ajettiin geelillä 40 µl asetuksilla 80 V, mA max, 110

min. Geeliltä leikattiin sinivalopöydällä steriilillä skalpellilla vektorin kokoa vastaava vyöhyke 6000 kb:n kohdalta ja jaettiin se kahteen punnittuun mikrosentrifuugiputkeen. DNA eristettiin geelipaloilta kahdella pylväällä DNA Macherey-Nagel PCR clean-up gel extraction NucleoSpin extract II -kitillä valmistajan ohjeen mukaan. DNA eluoiitiin yhteen putkeen yhteensä 55 µl:aan st.vettä. DNA pitoisuus mitattiin Nanodropilla.

Valmistetun vektorin laadun tarkistamiseksi sille tehtiin testiligaatio eli liittämisreaktio, joka transformoitiin eli siirrettiin kompetentteihin soluihin. Koska tuloksena oli runsaasti bakteeripesäkkeitä, vektori käsiteltiin vielä toistamiseen samoilla restriktioentsyymeillä sekä lisäksi käsittelemällä DNA:n päät fosfataasilla lisäämällä reaktioon 1 µl CIP (calf intestinal alkaline phosphatase)-entsyymiä. Fosfataasi käsittelyä inkuboitiin vielä 45 minuuttia +37 °C:ssa. Vektori-DNA eristettiin ja DNA pitoisuus mitattiin kuten aiemmin.

4.5 DNA:n liittämisreaktiot

DNA:n liittämisreaktioissa monistetut geenipalat liitettiin pET32-vektoriin sekä Zero Blunt -vektoriin.

4.5.1 Monistettujen geenipalasten liittäminen pET32 vektoriin

PCR tuotteiden Fn-1-, Fn-2- ja Fn-3 -päät muokattiin BamHI-HF ja HindIII-HF entsyymeillä. Entsyymeitä käytettiin 4U (yksikköä) mikrogrammaa DNA:ta kohti. Reaktion lopputilavuuden piti olla 15-kertainen entsyymiin mikrolitramäärää kohti, entsyymien liuoksen glyserolin laimentamiseksi. Mikrosentrifuugiputkiin pipetoitiin 50 µl:n kokonaisreaktioon vesi, puskuri ja lopuksi entsyymit filterikärjillä alla esitetyn taulukon 3 mukaan.

TAULUKKO 3. Geenipalojen entsyymikäsittelyreaktion pipetointitulavuudet

	Näyte ul	St. vesi ul	BamHI-HF ul	HindIII-HF ul	10xReaktio- puskuri ul
Fn+1 - Fn-1	50	15	2,6	2,6	7,8
Fn+1 - Fn-2	50	20	2,8	2,8	8,4
Fn+1 - Fn-3	50	12,5	2,5	2,5	7,5

DNA pilkottiin +37 °C:ssa lämpökaapissa yön yli. Reaktio lopetettiin kuumentamalla +85 °C lämpöblokkissa 15 minuuttia. DNA eristettiin Macherey-Nagel PCR clean-up gel extraction NucleoSpin extract II kitillä valmistajan ohjeen mukaan. DNA eluoiitiin pylvästä 50 µl:aan st.vettä.

Käsitellyt geenipalat liitettiin eli ligatoitiin vastaavasti yhteensopivaksi käsiteltyyn pET32-vektoriin. Ligaatioon käytettiin geenipaloja Fn-1, Fn-2 ja Fn-3, joiden reaktiot sekä lisäksi nollareaktio eli pelkästään pET32 vektoria ja st. vettä sisältävä reaktio tehtiin 500 µl:n pcr-putkissa alla esitetyn taulukon 4 mukaan. Ensin putkissa kuumennettiin vektori, vesi ja DNA fragmentti lämpöblokkissa 65 °C:ssa 5 minuuttia. Putki jäähdytettiin nopeasti nostamalla se jäälle, minkä jälkeen pikasentrifugoitiin näyte pohjalle ja nostettiin taas jäälle. Jäähdytyneeseen näyteteseokseen lisättiin 10xligaatiopuskuri, 20xspermiidiini ja lopuksi entsyymi T4-DNA ligaasi. Komponentit sekoitettiin kopauttamalla putkea pöytään ja pikasentrifugoitiin pohjalle. Nostettiin ligaatioreaktion putki PCR-laitteeseen yön yli ohjelmalla 20 °C 1 h, 16 °C 2 h ja lopuksi 14 °C 12 h.

TAULUKKO 4 Geenipalojen ja pET32-vektorin liittämisen pipetointilavuudet

	Tilavuus μ l
St. vesi	7
Vektori (50-100 ng)	1,5
Geenipala	2
10xligaatio puskuri	1
20xspermiini	0,3
T4DNA ligaasi	0,7
Yhteensä	12,5

Tämän lisäksi liittämisen reaktiolla yhdistettiin toisiinsa myös käsittelemätön PCR-monistettu geenipala sekä niin sanottu sekvensointivektori Zero Blunt, joka kuvataan erikseen kohdassa 4.5.2. Tästä välivaiheesta tuotettiin FN1-3 -geenipala liitettäväksi pET32-vektoriin.

Fibronektiinin geenipalan F1-3 kloonaminen tehtiin välivaihevektorin kautta, koska PCR-tuotteen pilkkominen suoraan ei toiminut. ZeroBlunt-Fn3 kloonista no 27 tuotettiin yhdistelmäplasmidi-DNA:ta 100 ml:n kasvustossa SB-MOPS-kan liemessä y/y 37 °C:ssa. Kasvuston solut sentrifugoitiin 3000 rpm, 20 min, 4 °C, sentrifuugiputkeen. Soluista eristettiin plasmidi-DNA Macherey-Nagelin Plasmid DNA Purification NucleoBond Xtra Midi -kitillä valmistajan ohjeen mukaan. DNA-pitoisuus mitattiin Nanodropilla. Zero Blunt-F1-3 -kloonin no 27 plasmidia digestoitiin yön yli BamHI-HF- ja HindIII-HF -entsyymeillä. Digestio lopetettiin lisäämällä putkeen 25 μ l XC-LB-puskuria. DNA-palan puhdistamiseksi reaktioseos ajettiin preparatiivisessa 1 % agarosigeelissä asetuksilla 80 V, mA max, 2,5 h. Geeliltä leikattiin pilkottu DNA-pala F1-3 steriilillä skalpelilla kahteen steriiliin mikrosentrifuugiputkeen. Geelipaloilta eristettiin DNA Macherey-Nagel PCR clean-up gel extraction NucleoSpin extract II -kitillä valmistajan ohjeen

mukaan. Pitoisuus mitattiin Nanodropilla. Ligaatio tehtiin pET32-vektoriin kuten aiemmin (kohta 4.5.1). Reaktio pipetoitiin taulukon 5 mukaan.

TAULUKKO 5 pET32 ja Fn1-3 geenipalan liittämisen reaktion pipetointitaulukko.

	Tilavuus µl
Vektori (50-100 ng)	1,5
Geenipala	13
10xligaatio puskuri	1,8
20xspermiini	0,5
T4DNA ligaasi	1,2

Liittämisen reaktiossa muodostuneet yhdistelmäplasmidit siirrettiin kompetentteihin eli vastaanottavaiseksi käsiteltyihin XL1-Blue -soluihin tai T7 Express -soluihin. Syväpakastetut mikrosentrifuugiputkiin varastoidut kompetentit solut sulatettiin jäällä, minkä jälkeen niihin lisättiin filttarikärjellä kutakin ligaatioreaktiota 9 µl omiin putkiin. Näyte sekoitettiin hellästi ja seisotettiin jäissä 20 minuuttia välillä sekoittaen. Soluille annettiin lämpöshokki nostamalla putket +42 °C lämpöblokkiin 1,5 – 2 min ajaksi, jonka jälkeen näyte nostettiin takaisin jäälle ja seisotettiin 2 minuuttia. Putkiin lisättiin 500 µl steriiliä +42 °C SOC-liuosta. Soluja kasvatettiin ravistelussa +37 °C:ssa 30–45 minuuttia. Kustakin XL1-Blue -kasvatuksesta tehtiin LB-carbenisilliini maljoille 50 µl:n ja 150 µl:n maljaukset sekä T7 Express näytteistä 100 µl ja 200 µl annosten maljaukset. Maljat kasvatettiin agarpuoli ylöspäin +37 °C:ssa yön yli. Maljoilta laskettiin pesäkkeet kasvatukset jälkeen.

4.5.2 Monistettujen geenipalojen liittäminen Zero Blunt vektoriin

Zero Blunt -ligaatio tehtiin varmistamaan, että geenipala saatiin vektoriin, jos pET32 vektoriin ligatointi ei onnistuisi.

Tehtiin 5 µl:n ligaatio Zero Blunt-vektorilla taulukon 6 mukaan. Ensin putkissa kuumennettiin vektori, vesi ja DNA fragmentti lämpöblokkissa 65 °C:ssa 5 mi-

nuuttia. Putki jäähdytettiin nopeasti nostamalla se jäälle, minkä jälkeen näyte pikasentrifugoitiin pohjalle ja nostettiin taas jäälle. Jäähtyneeseen näyteseokseen lisättiin 10xligaatiopuskuri ja lopuksi entsyymi T4-DNA -ligaasi. Komponentit sekoitettiin hellästi ja pikasentrifugoitiin pohjalle. Nostettiin ligaatioreaktio PCR-laitteeseen yön yli ohjelmalla 20 °C 1 h, 16 °C 2 h ja lopuksi 14 °C 12 h.

TAULUKKO 6 Geenipalojen ja Zero Blunt -vektorin liittämisreaktio

Määrät µl	Fn-1	Fn-2	Fn-3
ZeroBlunt 10 ng	0,5	0,5	0,5
PCR-tuote 100 ng	0,39	0,36	0,40
10xligaatiopuskuri	0,5	0,5	0,5
St.vesi	3,11	2,14	3,1
T4DNA ligaasi	0,5	0,5	0,5

Ligatoidut plasmidit transformointiin kompetentteihin XL1-Blue soluihin. Syväpakastetut mikrosentrifuugiputkiin varastoidut kompetentit solut sulatettiin jäällä, jonka jälkeen niihin lisättiin filttierikärjellä kutakin ligaatioreaktiota 9 µl omiin putkiin. Komponentit sekoitettiin hellästi ja seisotettiin jäissä 20 minuuttia välillä sekoittaen. Soluille annettiin lämpöshokki nostamalla putket +42 °C lämpöblokkiin 1,5 – 2 min ajaksi. Nostettiin takaisin jäälle ja seisotettiin 2 minuuttia. Putkiin lisättiin 500 µl steriiliä +42 °C SOC-liuosta. Kasvatettiin soluja ravistelussa +37 °C:ssa 30-45 minuuttia. Kustakin kasvatuksesta tehtiin LB-kanamysiini maljoille, joihin oli levitetty ensin 200 µl 0,1M IPTG-liuosta, 50 µl:n ja 150 µl:n maljaukset. Kasvatettiin maljat agarpuoli ylöspäin +37 °C:ssa yön yli. Laskettiin pesäke lukumäärät.

4.6 Kloonien seulonta ja tarkastaminen

Kloonien seulonta ja tarkastaminen suoritettiin testidigestioilla ja pesäke-PCR-menetelmällä ja kloonien DNA:n emäsjärjestys tarkistamisella.

4.6.1 Restriktioendonukleasikäsittelyt eli testidigestiot

Klooneista täytyi tarkistaa, että ne varmasti sisälsivät plasmidin sekä geenipalan. Tämä tehtiin pET32-yhdistelmäreaktiosta pesäke-PCR -menetelmällä sekä Zero Blunt -yhdistelmäreaktioista eristämällä klooniehdokkaiden DNA, joka analysoitiin restriktioentsyymikäsittelyllä. Zero Blunt ligaatiosta saaduista pesäkkeistä valittiin 10 pesäkettä kustakin geenipalasta. Niistä siirrettiin kasvustoa LB-kan (50 µg/ml kanamysiini) elatusmaljalle sekä kasvatusputkiin, joissa oli 5 ml SB-MOPS kasvatuslientä, jossa kanamysiini antibioottia loppupitoisuudessa 50 µg/ml. Pipetin kärjellä poimittiin maljalta pesäke ja pyyhkäistiin sillä puhdas maljalle numeroituun kohtaan pieni viiva ja siirrettiin pipetin kärki samoin numeroituun sentrifuugiputkeen. Puhdasmalja kasvatettiin lämpökaapissa +37 °C:ssa yön yli. Kasvustoja kasvatettiin ravistelussa +37 °C:ssa yön yli. Yön yli kasvustoista tehtiin glyserolistokit, eli otettiin 500 µl kasvustoa ja lisättiin siihen 500 µl 50 % glyserolia ja annettiin olla huoneenlämmössä 1-2 tuntia välillä vorteksoiden, minkä jälkeen tehtiin pikapakastus nestetyypellä ja laitettiin säilytykseen -70 °C:een. Lopusta kasvustosta eristettiin plasmidi-DNA Macherey-Nagelin PCR clean-up NucleoSpin extract II -kitillä valmistajan ohjeen mukaan (liite 5) ja mitattiin Nanodropilla pitoisuudet, jotta tiedettiin käytettävät plasmidi määrät digestioon. Jos pitoisuus oli alle 100 ng/µl, käytettiin suurempaa plasmidi määrää. Eristetyille plasmideille tehtiin pienimuotoinen restriktioentsyymikäsittely eli testidigestio taulukon 7 mukaan.

TAULUKKO 7. Zero Blunt-Fn klooniehdokkaiden testidigestioreaktio

	Tilavuus μ l
Plasmidi	5 (kl. 12,15 ja 29 8 μ l)
Vesi	12 (kl. 12,15 ja 29 9 μ l)
10xNEB4 puskuri	2
BamHI-HF	0,5
HindIII-HF	0,5

Kaikki liuokset pipetoitiin mikrosentrifuugiputkeen ja inkuboitiin 2,5 h +37 °C:ssa, minkä jälkeen reaktioihin lisättiin 6 μ l XC-LB puskuria. Näytteet ajettiin 1,5 % agarosigeelillä, johon lisätty Invitrogenin SybrSafe DNA gel stain. Geelille pipetoitiin 17 μ l näytteitä ja markkeria 5 μ l. Ajettiin asetuksilla mA max, 80 V n.1 h. Kuvattiin geeli sinivalopöydällä. Tämän ajon perusteella ajettiin ei-digestoidut näytteet 1, 2, 3, 13, 14, 16, 26, 27 ja 28 0,8 % agarosigeelillä samoilla asetuksilla, mutta geelille pipetoitiin vain 7 μ l näytettä (5 μ l näyte + 2 μ l XC-LB). Tämän ajon perusteella vietiin klooneista 2,14 ja 27 näytteet sekvensoitaviksi. Sekvensointireaktio on kuvattu kohdassa 4.6.3.

Kahdeksasta XL1-Blue-klooniehdokkaasta ja kuudestatoista T7 Express -klooniehdokkaasta tarkistettiin geenin esiintyminen pesäke PCR-menetelmällä (katso 4.6.2). PCR-näytteet ajettiin 1,5 % agarosigeelillä 80 V, mA max, 30 min ja visualisoitiin sinivalopöydällä.

4.6.2 Pesäke-PCR

Pesäke-PCR-reaktiota varten valmistettiin 80x reaktioseos 50 μ l:n perusreaktiosta, joka esitetään taulukossa 8, perusteella. Reaktioseospooli jaettiin 50 μ l:n eriin PCR 8-strippeihin.

TAULUKKO 8. Pesäke-PCR -perusreaktion pipetointitulavuudet

Perusreaktio	Tilavuus μ l
St.vesi	33,5
5xGC-puskuri	10
DMSO	1,6
2,5 dNTP	4
50 μ M pET5393+	0,5
50 μ M pET5868-	0,5
Phusion	0,5

Pesäke-PCR -reaktiota varten valittiin pET32-maljoilta Fn-1 -klooneista kaikki 16 pesäkettä, Fn-2 klooneista 30 pesäkettä ja Fn-3 klooneista kaikki 20 pesäkettä. LB-carb malja ja PCR-stripit numeroitiin. Pipetin kärjellä poimittiin maljalta pesäke ja pyyhkäistiin sillä puhdasmaljalle numeroituun kohtaan pieni viiva ja siirrettiin pipetin kärki samoin numeroituun PCR-putkeen. Kärjen annettiin liota reaktioseoksessa vähintään 5 minuuttia, minkä jälkeen seosta pipetoitiin ylös alas muutaman kerran. Kärki poistettiin ja putki suljettiin. Tehtiin myös negatiivinen kontrolli johon ei lisätty templaattia sekä positiivinen kontrolli, johon lisättiin 1 μ l 1/1000 pET32-B-H-CIP -plasmidi laimennosta, että nolla näyte, johon ei lisätty mitään. Puhdasmalja kasvatettiin yön yli +37 °C:ssa. PCR-stripit nostettiin kuumaan PCR-laitteeseen ja ajettiin seuraavalla ohjelmalla:

98 °C 30 s

98 °C 10 s - 63 °C 10 s - 58 °C 10 s - 72 °C / 6x

98 °C 10 s - 60 °C 10 s - 72 °C 25 s / 24x

72 °C 25 s

Jokaiseen putkeen lisättiin 20 μ l XC-LB -puskuria. Näytteitä ajettiin 17 μ l noin 1,5 % agarosigeelillä, johon oli lisätty SybrSafe-reagenssi. Markkerina

Fermentuksen GeneRuler 1kb DNA ladder #SM0311. Geeli kuvattiin sinivalopöydällä.

4.6.3 Kloonien emäsjärjestyksen tarkistaminen

DNA:n emäsjärjestyksen tutkimista varten klooniehdokkaista Zero Blunt-Fn-1 kloonin 2, Zero Blunt-Fn-2 kloonin 14 sekä Zero Blunt-Fn-3 kloonin 27 tuotettiin plasmidi-DNA:ta kasvattamalla niitä y/y 10 ml:n SB-MOPS-kan -liemessä. Pienestä määrästä kasvustoa valmistettiin varastokannat ja lopuista soluista eristettiin plasmidi-DNA ja pitoisuus mitattiin, kuten aiemmin on kuvattu.

Plasmidien sisältämä geeni tarkistettiin BamHI- ja HindIII-entsyymien testidigestiolla, kuten on aiemmin kuvattu. Kloonausalueen geenin emäsjärjestys selvitettiin sekvensointireaktiolla alukkeilla M+13 sekä M-13, jotka sitoutuvat Zero Blunt (ZB) plasmidiin kloonausalueen ulkopuolelle. Taulukossa 9 esitetään sekvensointireaktioiden pipetointitulavuudet. M+13 ja M-13 reaktioiden tilavuudet ovat samanlaiset, mutta käytettävä aluke vain vaihtuu. Reaktiot tehtiin 60 °C:n lämpötilassa sekvensointipalveluyksikössä, jossa myös reaktiotuotteet erotettiin kapillaarielektroforeesilla sekvensointilaitteessa.

TAULUKKO 9. M13+ -alukkeen sekvensointireaktion tilavuudet

Määrät µl	ZB Fn-1 kloonin 2	ZB Fn-2 kloonin 14	ZB Fn-3 kloonin 27
st.vesi	5,1	5	5,1
aluke M+13	0,5	0,5	0,5
plasmidi DNA	0,4	0,5	0,4

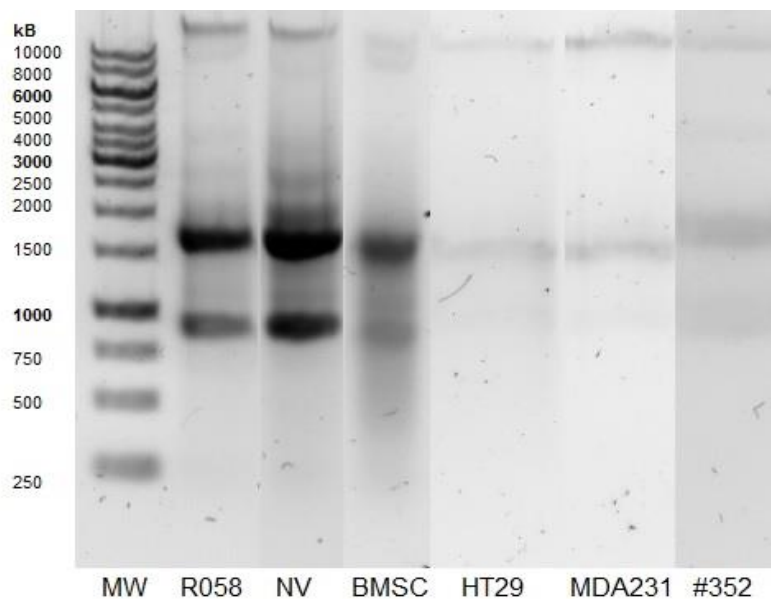
5 TULOKSET

5.1 Materiaalit

Työn tekemiseen tarvittiin ensiksi soluja, joista saatiin haluttu geenipala. Lisäksi tarvittiin plasmidi, josta valmistettiin vektori, johon geenipala voitiin liittää. Lopuksi tarvittiin kompetentteja soluja, joihin valmistettu plasmidi voitiin siirtää plasmidin tuottoa ja lopuksi proteiinin tuottoa varten.

5.1.1 Nisäkässolujen keräys ja RNA:n eristys

RNA:ta eristettiin monista eri soluista, sillä haluttiin paras mahdollinen RNA, josta valmistaa geenipaloja. RNA:n eristymisen onnistuminen tarkistettiin agarosigeeli ajolla ja kuten RNA:n eristysten tulosten koostekuvasta (kuva 3) nähdään, kaikista näytteistä saatiin RNA:ta, josta voitiin tehdä cDNA reaktio.



KUVA 3 RNA:n eristysten koostekuva

5.1.2 Plasmidin pET32 eristys

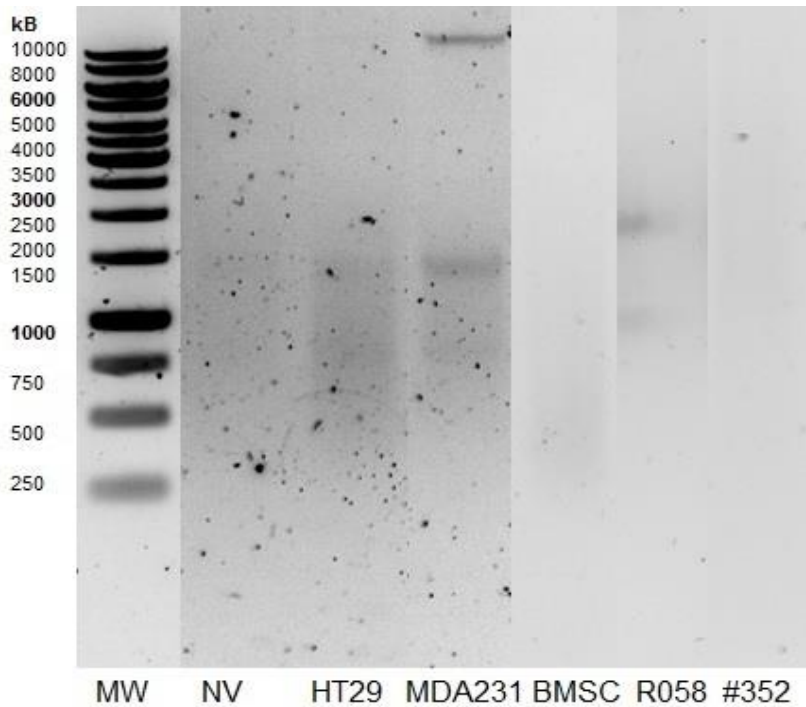
Plasmidin pET32 eristys tehtiin kahdesti, sillä ensimmäisellä eristyskerralla saatu plasmidisakka oli niin vähäistä, että pitoisuuden arveltiin jäävän matalaksi. Sen takia eristys tehtiin varalta toisen kerran eri solunäytteestä käyttäen pienempää kolonnia. Nanodropilla mitatuiksi pitoisuuksiksi mitattiin ensimmäiselle eristykselle 794 ng/μl ja toiselle 1073 ng/μl. Vektori valmistettiin toisella eristyskerralla saadusta plasmidista.

5.1.3 Kompetentit solut

Käytettyjen XL1-Blue- ja T7 Express -kompetenttien solujen toimivuus testattiin transformaatiolla, jossa soluihin siirrettiin pET32-plasmidi. Soluja kasvatettiin LB-kasvatusmaljoilla, joihin oli lisätty karbenisilliini antibioottia, jolloin maljalla saattoi kasvaa vain ne bakteerit, joilla oli karbenisilliini resistenssigeeni. Testimaljoilla oli bakteeripesäkkeitä, joten transformaatio oli onnistunut ja kompetenttisolut olivat toimivia, sillä pET32-plasmidi sisältää karbenisilliini resistenssigeenin ja täten se oli onnistuneesti siirretty soluihin.

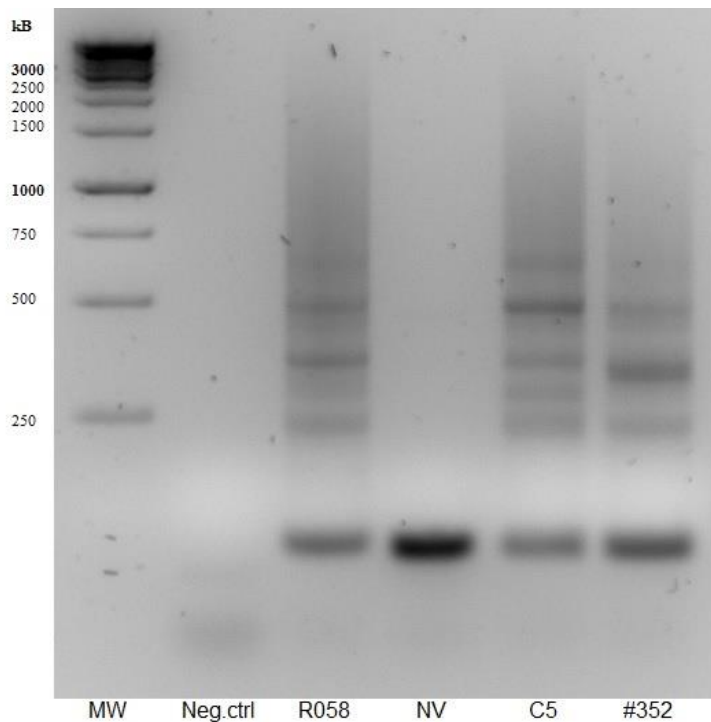
5.2 DNA:n muokkaus

Tehtyjen cDNA reaktioiden onnistuminen tarkistettiin agarosigeelillä ja geeleiltä nähtiin, että kaikista näytteistä saatiin cDNA:ta, kuten kuvasta 4 nähdään.



KUVA 4 cDNA koostekuva

PCR-reaktioihin tarvittiin parhaimman laatuista cDNA:ta, josta PRC-reaktiolla saadaan tuotettua haluttua DNA jaksoa. Valitseminen tapahtui testi-PCR-reaktiolla, jossa käytettiin oligoita, joilla saatiin sitä DNA jaksoa tuotettua, jossa haluttu fibronectiini geeni sijaitsee. Testeissä paras tulos saatiin napaveren kantasoluista tehdyllä cDNA:lla. Tämä näkyy agarosigeelillä (kuva 5) siten, että napaveren kantasoluilla saatiin vain yksi vahva vyöhyke, mikä kertoo siitä että tuotteessa on vain yhdenlaista DNA-jaksoa. Muilla näytteillä geelillä näkyy monia vyöhykkeitä ja niiden välissä laahusta, joka kertoo siitä että reaktiossa on tuottunut monia eri pituisia DNA-jaksoja. Napaveren kantasoluista tehty cDNA valittiin esi-PRC-reaktioiden templaatiksi



KUVA 5 testi-PCR

Esi-PCR-reaktioissa alukkeilla Fn+ ja Fn-, F+PCR ja Fn-3 sekä F+1 ja Fn-3 saatiin tuotettua oikeankokoiset fragmentit, joka nähdään agarosigeeliltä vertaessa DNA-vyöhykkeen sijaintia DNA- markkerin vyöhykkeiden sijaintiin. Alukkeilla Fn+PCR ja Fn-7 tehdyn PCR-reaktion tuotteessa ei sen sijaan ollut oikean kokoista 2007 kb:n kokoista vyöhykettä, vaan geelillä näkyy heikkoja erikokoisia vyöhykkeitä. Tämä kertoo, että reaktio ei ole onnistunut, ja siksi tehtiin uudet PCR reaktiot alukkeilla F+PCR ja Fn-7, F+1 ja Fn-7 sekä F+1 ja Fn-6 eri PCR-ohjelmalla, johon reaktion eri vaiheiden lämpötiloja muutettiin. Näistäkään reaktioista ei onnistuttu saamaan oikeita tuotteita, muuten kuin Fn-6 fragmentilla heikko vyöhyke. Mutta toistettaessa reaktio Fn-6 alukkeella ei saatu minkäänlaista tuotetta. Syynä näihin ongelmiin fraktioiden F-6 ja F-7, kanssa voi olla että PCR-reaktio ei ole ollut oikeanlainen ja sitä pitäisi muuttaa ja kokeilla esimerkiksi gradientti PCR-reaktiolla, jossa lämpötiloja muutetaan kierrosten välissä. Syynä voi olla myös, että cDNA näyte on voinut mennä huonoksi toistuvien sulatusten ja pakastusten vuoksi.

Fragmenttien F-1, F-2 ja F-3 tuottamiseksi tehdyt jatko-PCR reaktiot tuottivat oikean kokoiset geenijaksot, mikä nähdään agarosigeeliltä. Kun PCR-reaktion

toimivuus oli testattu, tehtiin massamonistus riittävän DNA määrän saamiseksi. Puhdistettujen PCR-tuotteiden mitatut pitoisuudet ja 260/280 suhteet on esitetty taulukossa 10.

TAULUKKO 10. DNAn puhtaus spektrofotometrillä analysoituna

Fragmentti	Pitoisuus ng/μl	260/280
F-1	256	1,91
F-2	281	1,91
F-3	251	1,91

Kaikkien liuosten pitoisuudet olivat riittävät digestoituihin, johon tarvittiin vähintään 5 μg PCR-tuotetta.

Vektorin pitoisuudeksi mitattiin digestion ja agarosigeeliltä eristyksen jälkeen 47,6 ng/μl. Tästä tehtiin testiligaatio, jossa ei ollut mukana liitettävää DNA-jaksoa. Ligaatiosta tehdyn transformaation ja maljauksen jälkeen katsottiin että maljoilla kasvaa paljon pesäkkeitä. Tämä tarkoittaa että vektoriliuoksessa on mukana myös kokonaista plasmidia. Tämä johtuu siitä, että digestioreaktion jälkeen DNA-ketjut ovatkin liittyneet takaisin yhteen ja näin osa on pysynyt plasmidina. Tämän takia vektori digestoitui uudelleen, mutta tällä kertaa digestioreaktion jälkeen vektorit käsiteltiin CIP-entsyymillä, joka poistaa DNA-ketjujen päistä fosfaattiryhmät, jotka mahdollistavat ketjujen yhteen liittämisen. Eristyksen jälkeen mitattiin pitoisuudeksi 32,6 ng/μl.

5.3 Kimeerisen DNA-plasmidin valmistus

Transformaatioista laskettiin pesäkelukumäärät eli kloonien lukumäärät. Kloonista seulottiin halutut kloonit, jotka sisälsivät geenipalan. Geenipalan sisältävien kloonien emäsjärjestys tarkistettiin sekvensoinnilla.

5.3.1 Transformaatio

Laskettiin digestoiduista ja puhdistetuista DNA-jaksoista tehtyjen XL1-Blue-ligaatioiden pesäkelukumäärät:

Fn-1, 16 pesäkettä

Fn-2, paljon, joten pesäke PCR:ään otettiin 30 pesäkettä

Fn-3, 20 pesäkettä

Negatiivinen kontrolli, muutama pesäke

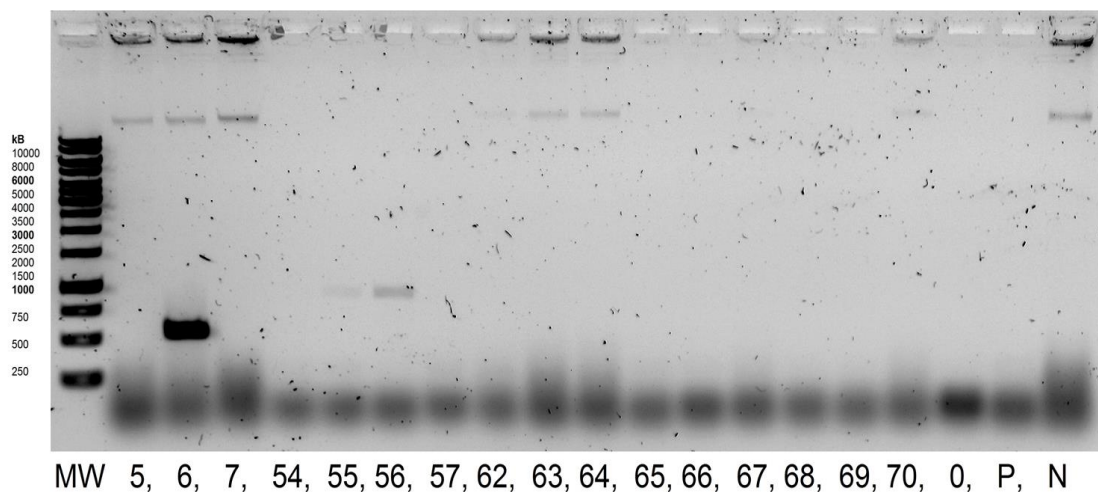
Tuloksista voi päätellä, että transformaatio on onnistunut ja soluihin on saatu siirrettyä plasmidi. Mutta koska negatiivisella kontrolli maljalla on pesäkkeitä, on mahdollista, että fragmenttimaljoilla kasvaa sellaisia klooneja joissa fragmenttia ei ole. Tämä siksi että negatiiviseen kontrolliin ei lisätty fragmenttia, mutta se pystyy silti kasvamaan koska plasmidi on katkaisukohdilta liittynyt takaisin yhtenäiseksi. Pesäke PCR:llä selvitettiin mitkä kloonit sisälsivät plasmidin.

Zero Blunt ligaation pesäkelukumäärät olivat:

- F-1: 50 µl: 5 pesäkettä
 150 µl: 18 pesäkettä ja 4 rypästä
- F-2: 50 µl: 9 pesäkettä ja 1 rypäs
 150 µl: 8 pesäkettä ja 2 rypästä
- F-3: 50 µl: 11 pesäkettä
 150 µl: 22 pesäkettä ja 3 rypästä

5.3.2 Kloonien seulonta

Pesäke-PCR:n näytteistä ajatulta agarosigeeliltä nähdään mihin klooneihin DNA-jakson siirto on onnistunut. Jos klooni ei sisällä fragmenttia, geelillä näkyy vain tyhjältä vektorista monistunut jakso, jonka koko on 270 bp. Fragmentin Fn-1 kanssa vektorista monistunut pala on 550 bp, fragmentin Fn-2 kanssa 880 bp ja fragmentin Fn-3 kanssa 1150 bp, eli jos geelillä näkyy tämän kokoisia vyöhykkeitä, siirto on onnistunut. Näin saatiin selville, että klooni 6 sisältää fragmentin Fn-1 ja kloonit 55 ja 56 fragmentin Fn-2. Fragmentin Fn-3 sisältävää kloonia ei löytynyt. Positiivisen tuloksen varmistamiseksi ajettiin geelillä nämä kloonit, niiden viereiset kloonit ja muutama muu klooni uudelleen. Kuvasta 6 nähdään, että tulokset varmistuivat.



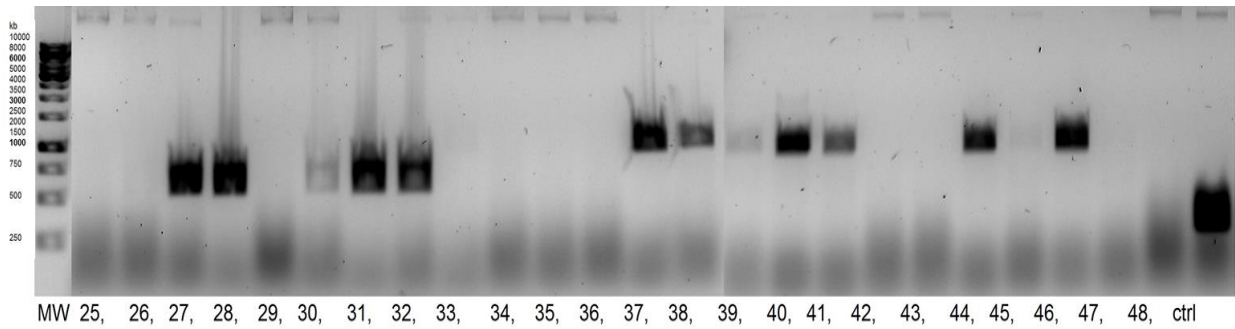
KUVA 6. Pesäke-PCR menetelmä XL1-Blue -kloonien seulonnassa

Klooneista 6,55 ja 56 kasvatetuista kasvustoista eristettyjen plasmidi-liuosten pitoisuudet mitattiin. Tulokset ovat taulukossa 11.

TAULUKKO 11 Kloonien 6, 55 ja 56 kasvustoista eristettyjen plasmidien pitoisuudet ja puhtaudet

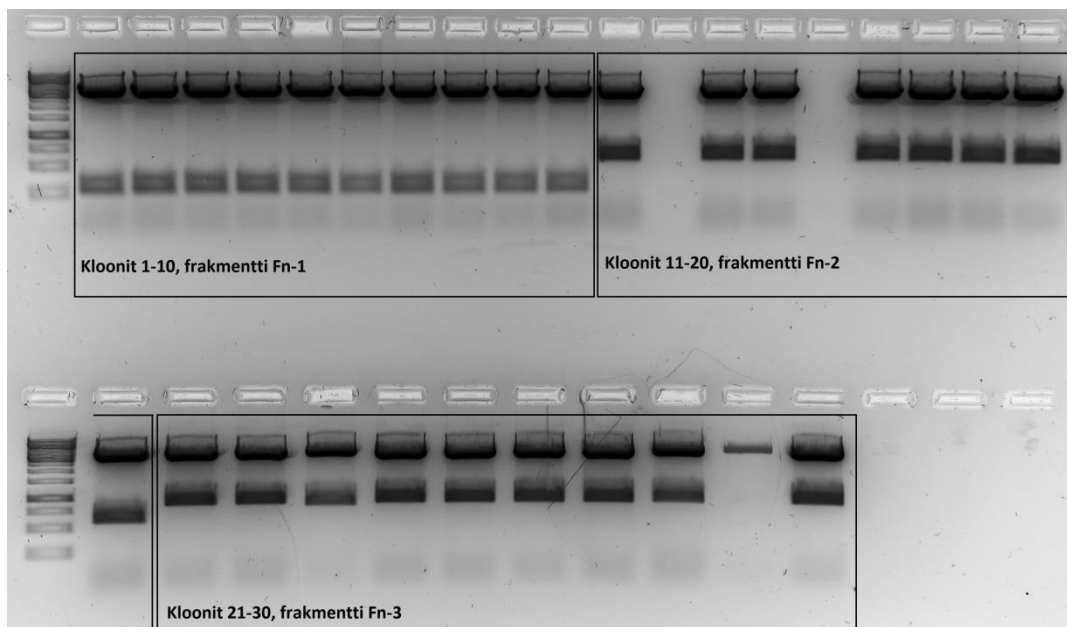
Näyte	Pitoisuus ng/μl	260/280
Fn-1 kl6 1.	118	1,90
Fn-1 kl6 2.	133	1,91
Fn-2 kl55 1.	171	1,92
Fn-2 kl55 2.	184	1,91
Fn-2 kl56 1.	237	1,92
Fn-2 kl56 2.	211	1,92

T7 Express maljauksista tehdyn pesäke-PCR:n tuotteista ajetusta agarosigeelistä otetussa kuvassa 7 nähdään, että kloonit 27, 28, 30, 31 ja 31 sisältävät fragmentin Fn-1 (550 bp) ja kloonit 33, 37, 38, 39, 40, 41, 44, 45 ja 46 fragmentin Fn-2 (880 bp). Viimeisenä on kontrolli, joka sisältää pelkän vektorin (270 bp).



KUVA 7. Pesäke-PCR T7-Express -kloonien seulonnassa

Zero Blunt ligaatiossa liitettiin käsittelemättömät fibronektiinin geenialueiden PCR- tuotteet sekvensointivektoriin Zero Blunt. Klooniehdokkaat seulottiin testidigestion avulla. Valituista kymmenestä kloonista fragmenttia kohti tehdyn testidigestion tuotteista ajeltulta agarosigeeliltä nähdään kuvasta 8, että kaikki kloonit sisälsivät fragmentin. Klooneissa 1-10 näkyy noin 280 bp:n kokoinen fragmentin Fn-1 vyöhyke, klooneissa 11–20 noin 610 bp:n fragmentin Fn-2 vyöhyke ja klooneissa 21–30 noin 880 bp:n fragmentin Fn-3 kokoinen vyöhyke. Kloonien 12 ja 15 vyöhykkeet näkyvät hyvin heikosti, koska niiden plasmidipitoisuus oli hyvin pieni.



KUVA 8. Zero Blunt klooniehdokkaiden analysointi.

Tämä oli odotettua, sillä Zero Blunt-vektori on suunniteltu siten, että jos sen juosteet liitetään yhteen ilman ligatoitavaa geenipalaa, ligaatiokohdassa säilyy toksiinia tuottava geeni, joka tappaa solun. Näin eliminoidaan ei-toivotut kloonit.

Valittiin kolme kloonia fragmenttia kohti, eli kloonit 1, 2, 3, 13, 14, 15, 26, 27 ja 28. Ajettiin näistä ei-digestoidut näytteet tuloksen varmistamiseksi ja myös tältä geeliltä nähtiin, että kloonit sisälsivät fragmentin.

Koska fragmentin Fn-3 sisältävää kloonia ei suoraan pET32-vektoriin tehdyn liigaation klooneista löytynyt, yritettiin ligaatiota uudelleen lähtemällä liikkeelle Zero Blunt-kloonista, joka sisälsi Fn-3-fragmentin. Zero Blunt kloonista 27 tehdystä kasvustosta eristetyn plasmidin pitoisuudeksi mitattiin 3279 ng/μl. Preparaatiiviseen digestioon otettiin 20 μg plasmidia, jota laskettiin tarvittava entsyymimäärä (4 U x 20 = 80 U) digestioon. Agarosigeeliltä Fn-3 fragmentti eristettiin kahdessa erässä, joiden pitoisuuksiksi mitattiin 41 ng/μl ja 34 ng/μl. Fn-3 pala liitettiin aiemmin valmistettuun pEt32-BamHI-HindIII vektoriin, ja transformoitiin kompetentteihin XL-1 blue soluihin. Maljauksien pesäkelukumäärät olivat:

XL1-Blue: 50 μl: noin 150 pesäkettä

100 μl: noin 200 pesäkettä

200 μl: noin 280 pesäkettä

T7 Express: 100 μl: noin 500 pesäkettä

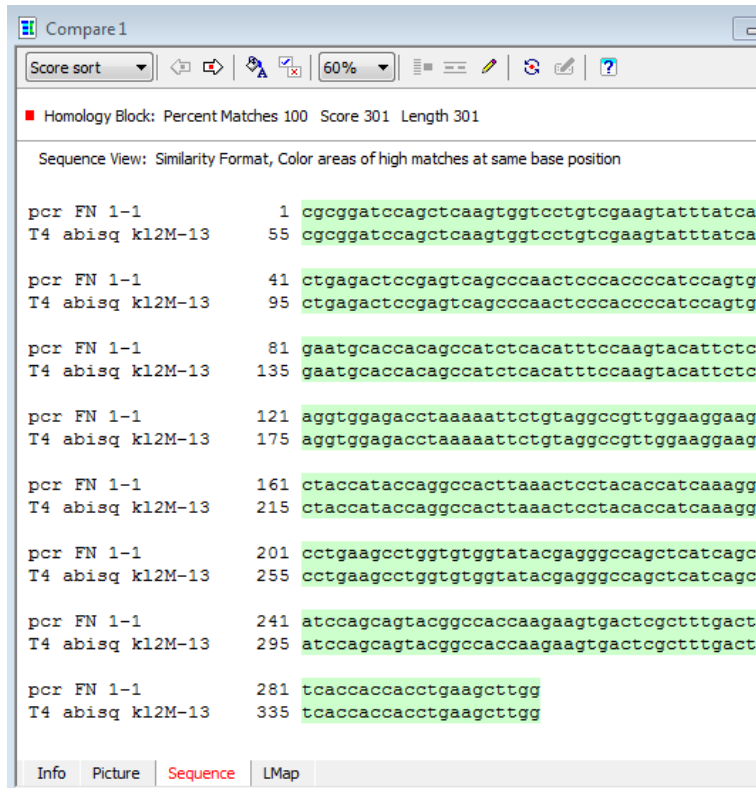
200 μl: noin 800 pesäkettä

Näiltä maljoilta valituille klooneille tehdyllä pesäke-PCR-reaktiolla ei löytynyt fragmentin sisältävää kloonia.

5.3.3 Kloonien emäsjärjestyksen tarkistaminen

Sekvensointitulosten käsittelyyn Zero Blunt -klooneista 2,14 ja 27 käytettiin Chromas- ja CloneManager-ohjelmia. Chromas-ohjelmalla etsittiin entsyymien BamHI ja HindIII alueiden sekvenssit, joilla tarkistettiin kloonauspaikat. CloneManager-ohjelmalla verrattiin sekvensointitulosten ja fibronktiini geenijaksojen nukleotidi- eli emäsjärjестystä yhden emäksen tarkkuudella. Ohjelma löysi kloonin 2 sekvensointi tuloksesta jakson, jolla on 100 %:n yhteneväisyys

geenijakson F1-1 kanssa, sekä kloonien 14 ja 27 sekvenssistä jaksot, joiden yhteneväisyys geenijakson F1-2 kanssa on 100 %. Esimerkkinä on kuva 9 F1-1 geenijakson tarkistuksesta.



KUVA 9. Emäsjärjestyksen vertailu ZB-F1-1 kloonin 2 sekvensointireaktiossa saadun sekvenssin ja teoreettisen PCR Fn1-1 sekvenssin kanssa.

Sekvenssien yhteneväisyys johtuu käytetystä oikolukevasta Phusion polymeeraasientsyymistä, joka tarkistaa ja korjaa virheet vastinjuosteen valmistuksessa DNA:ta monistettaessa PCR-reaktiolla. Proteiinin tuottoon tarkoitetun geenin pitää olla virheetön, sillä mutaatiot voivat vaikuttaa halutun proteiinin tuottoon merkittävästi.

6 YHTEENVETO

Työn tarkoituksena oli kloonata ihmisen fibronektiinin tyypIII toistojaksoja rekombinantin Fn-TRX -fuusioproteiinin tuottamiseksi. Tavoitteena oli kloonata viisi erilaista toistojaksoa. Kaksi toistojaksoa saatiin onnistuneesti kloonattua valmiiksi rekombinantin fuusioproteiinin tuottoon. Kolmen muun toistojakson teossa oli ongelmia ja niiden teko jätettiin myöhemmin tehtäväksi.

Kahden fragmentin Fn-1 ja Fn-2 kloonaminen siis onnistui niin kuin piti ja niiden osalta työ tuli suoritettua loppuun. Fn-3 fragmentti saatiin siirrettyä plasmidiin asti, mutta lopullinen siirto proteiinin tuotto vektoriin ja solukantaan jäi tekemättä. Haastavaa tässä oli se, että fragmentin sisältävää kloonaa ei löytynyt maljoilta, joilla kuitenkin oli satoja klooneja. Tämä olisi ollut korjattavissa jatkamalla kloonien seulontaa niin kauan että haluttu klooni olisi löytynyt. Fragmenttien Fn-6 ja Fn-7 kloonauksen jäi PRC-vaiheeseen, jossa ongelmana oli PRC-reaktion toimimattomuus. Syynä näihin ongelmiin fragmenttien Fn-6 ja Fn-7 kanssa oli se, että PCR-reaktion olosuhteet eivät olleet sopivat. Olosuhteita pitäisi muuttaa ja kokeilla esimerkiksi gradientti PCR-reaktiota, jossa voidaan kokeilla samalla kertaa useita erilaisia alukkeiden liittämislämpötiloja. Syynä voi olla myös, että cDNA näyte on voinut mennä huonoksi toistuvien sulatusten ja pakastusten vuoksi.

Kaiken kaikkiaan työ onnistui hyvin ja puutteet olisivat olleet korjattavissa, jos olisi ollut käytettävissä runsaasti aikaa. Opinnäytetyöhön käytettävä aika on kuitenkin rajallinen ja uusia kokeiluja ei ehditty tehdä.

LÄHTEET

1. The Cells in your body 2013. AAAS. Saatavissa: <http://sciencenetlinks.com/student-teacher-sheets/cells-your-body/>. Hakupäivä 18.11.2013.
2. Mitä kantasolut ovat?. BioteknologiaInfo. Saatavissa: <http://www.bioteknologia.info/etusivu/terveys/Kantasolut/>. Hakupäivä 12.11.2013.
3. Sanasto T 2006. Solunetti. Saatavissa: <http://www.solunetti.fi/fi/sanasto/t/>. Hakupäivä 12.11.2013.
4. Blair, Kate 2011. Embryonic stem cells: where do they come from and what can they do? EuroStemCell. Saatavissa: <http://www.eurostemcell.org/factsheet/embryonic-stem-cells-where-do-they-come-and-what-can-they-do>. Hakupäivä 12.11.2013.
5. Gupta, Rajeev 2012. Cord blood stem cells: current uses and future challenges. EuroStemCell. Saatavissa: <http://www.eurostemcell.org/factsheet/cord-blood-stem-cells-current-uses-and-future-challenges>. Hakupäivä 12.11.2013.
6. The Adult Stem Cell 2001. National Institutes of Health. Saatavissa: <http://stemcells.nih.gov/info/scireport/pages/chapter4.aspx>. Hakupäivä 17.11.2013.
7. IV. What are adult stem cells? 2012. National Institutes of Health. Saatavissa: <http://stemcells.nih.gov/info/basics/pages/basics4.aspx>. Hakupäivä 12.11.2013.
8. Stem Cell FAQs. Bedford Stemcell Research Foundation. Saatavissa: <http://www.bedfordresearch.org/stemcell/stemcell.php?item=what-is-a-stem-cell#1>. Hakupäivä 12.11.2013.

9. Turning stem cells into therapies 2008. California's stem cell agency. Saatavissa: <http://www.cirm.ca.gov/our-progress/stem-cells-therapies>. Hakupäivä: 12.11.2013
10. Epithelial Tissues. Saatavissa: http://www.botany.uwc.ac.za/sci_ed/grade10/mammal/epithelial.htm. Hakupäivä 12.11.2013.
11. Yleistä epiteeleistä 2006. Solunetti. Saatavissa: <http://www.solunetti.fi/fi/histologia/epiteelit/>. Hakupäivä 12.11.2013.
12. Foster, Niki 2013. What is Connective Tissue?. Saatavissa: <http://www.wisegeek.org/what-is-connective-tissue.htm>. Hakupäivä 13.11.2013.
13. Connective Tissue Study Guide 2013. Saatavissa: <http://www.siumed.edu/~dking2/intro/ct.htm#ordinspecial>. Hakupäivä 17.11.2013.
14. Classification of Connective Tissue. University of Leeds. Saatavissa: http://www.histology.leeds.ac.uk/tissue_types/connective/connective_tissue_types.php. Hakupäivä 13.11.2013.
15. Heino, Jyrki – Vuento, Matti 2002. Solubiologia. Porvoo: WSOY
16. Alberts, Bruce – Johnson, Alexander – Lewis, Julian – Raff, Martin – Roberts, Keith – Walter, Peter 2002. The Extracellular Matrix of Animals. Saatavissa: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26810/>. Hakupäivä 6.11.2013.
17. Paulsson, M. 1992. Basement Membrane Proteins: Structure, Assembly, and Cellular Interactions. Saatavissa: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1309319>. Hakupäivä 6.11.2013.
18. Soluväliaine 2006. Solunetti. Saatavissa: <http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/valiaine/>. Hakupäivä 6.11.2013.
19. Heinemer, Katja M. 2007. Adaptation of tendon and muscle connective tissue to mechanical loading. Ph.D. thesis. Kööpenhamina: Institute of Sports

Medicine Bispebjerg Hospital. Saatavissa:

[http://www.ismc.dk/pages/_4670993C320E8236C12573830056EA69/\\$file/PhD%20thesis%20-%20K.M%20Heinemeier.pdf](http://www.ismc.dk/pages/_4670993C320E8236C12573830056EA69/$file/PhD%20thesis%20-%20K.M%20Heinemeier.pdf). Hakupäivä 17.11.2013.

20. Connective Tissue Disease 2013. WebMD. Saatavissa:

<http://www.webmd.com/a-to-z-guides/connective-tissue-disease>. Hakupäivä: 12.11.2013.

21. Questions and Answers about Heritable Disorders of Connective Tissue

2013. National Institutes of Health. Saatavissa:

http://www.niams.nih.gov/Health_Info/Connective_Tissue. Hakupäivä 12.11.2013.

22. Cooper, Geoffrey M. 2000. The Development and Causes of Cancer.

Saatavissa: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9963/>. Hakupäivä 12.11.2013.

23. Immunodiagnostic 1997. Mondofacto. Saatavissa:

<http://www.mondofacto.com/facts/dictionary?immunodiagnostic>. Hakupäivä 11.11.2013.

24. Immunoassays for Disease. Boundless. Saatavissa:

<https://www.boundless.com/microbiology/immunology-applications/diagnostic-immunology/immunoassays-for-disease/>. Hakupäivä 11.11.2013.

25. Liden, Daniel 2013. What Are Therapeutic Antibodies?. Saatavissa:

<http://www.wisegeek.com/what-are-therapeutic-antibodies.htm>. Hakupäivä 11.11.2013.

26. Immunotherapy 2012. American Cancer Society. Saatavissa:

<http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/003013-pdf.pdf>. Hakupäivä 11.11.2013.

27. Wofsy, David 1985. Strategies for Treating Autoimmune Disease With Monoclonal Antibodies. Saatavissa:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1306490/>. Hakupäivä 11.11.2013.

28. Andersen, Peter – Cheng, Paul – Hassel, David – Juergensen, Lonny – Kaynak, Bogac L. – Kwon, Chulan – Limphong, Patraranee – Srivastava, Deepak 2013. Fibronectin mediates mesendodermal cell fate decisions. The Company of Biologists Ltd.
29. Pankov, Roumen – Yamada, Kenneth M. 2002. Fibronectin at a glance. Journal of Cell Science. Saatavissa:
<http://jcs.biologists.org/content/115/20/3861.full.pdf+html>. Hakupäivä 7.11.2013.
30. The Modular Structure of Fibronectin and its Binding Domains 2008. Wikipedia. Saatavissa:
http://en.wikipedia.org/wiki/File:The_Modular_Structure_of_Fibronectin_and_its_Binding_Domains.png. Hakupäivä 7.11.2013.
31. Ambesi, Anthony – Klein, R. Matthew – McKeown-Longo, Paula J. – Van De Water, Livingston – Zheng, Mingzhe 2003. Stimulation of extracellular matrix remodeling by the first type III repeat fibronectin. Albany Medical College, Albany.
32. Briknarová, Klára – Ely, Kathryn R. - Hoyt, David W. - Ruoslahti, Erkki – Åkerman, Maria E. 2003. Anastellin, an FN3 Fragment with Fibronectin Polymerization Activity, Resembles Amyloid Fibril Precursors. University of California, San Diego.
33. Ruoslahti, Erkki – Yi, Ming 2000. A fibronectin fragment inhibits tumor growth, angiogenesis, and metastasis. University of California, San Diego.
34. Midwood, Kim S. – To, Wing S 2011. Plasma and cellular fibronectin: distinct and independent functions during tissue repair. Saatavissa:
<http://www.fibrogenesis.com/content/4/1/21>. Hakupäivä: 17.11.2013.
35. Abbott, Danielle S. – Radford, Samara K. – Seed, Paul T. – Shennan, Andrew H. – Tribe, Rachel M. 2013. Evaluation of a quantitative fetal fibronectin test for spontaneous preterm birth in symptomatic women. American Journal of Obstetrics and Gynecology.

36. Bourne, Tom H. – Brown, Jeremy K. – Critchley, Hilary O. D. – Horne, Andrew W – Inglis, Neil F. – Ironmonger, Emily L. – Lauer, Katarina B. 2013. Shotgun Proteomics Identifies Serum Fibronectin as a Candidate Diagnostic Biomarker for Inclusion in Future Multiplex Tests for Ectopic Pregnancy. The University of Edinburgh, Edinburgh.

37. Agnantis, N. J. – Arvanis, D. L. – Briasoulis, E – Charchanti, A. – Ioachim, E – Karavasilis, V. – Pavlidis, N. – Tzanou, H. 2002. Immunohistochemical expression of extracellular matrix components tenascin, fibronectin, collagen type IV and lamin in breast cancer: their prognostic value and role in tumour invasion and progression. European Journal of Cancer, nro 38. S. 2362–2370.

38. Bonilla, Felix – Casal, Ignacio – Garcia de Herreros, Antonio - Garcia, Vanesa – Herrera, Alberto – Herrera, Mercedes – Islam, Abul – Martin, Paloma – Salas, Clara – Silva, Javier – Peña, Cristina 2013. Functional Heterogeneity of Cancer-Associated Fibroblasts from Human Colon Tumors Shows Specific Prognostic Gene Expression Signature. Clinical Cancer Research, nro 19. S. 5914-5925.

LIITTEET

Liite 1 Laitteet ja reagenssit

Liite 2 Omega Bio-Tek E.Z.N.A Total RNA Kit 1 ohje

Liite 3 Fermentas RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit #K1621, #K1622 ohje

Liite 4 Molekyylipainomarkkerit

Liite 5 Macherey-Nagel PCR clean-up NucleoSpin extract II ohje

Liite 6 Macherey-Nagel Plasmid DNA Purification NucleoBond Xtra Midi ohje

Työssä käytetyt laitteet:

- Agaroosiajolaite, Bio-Rad
- Lämpöblokki, VWR Analog Heatblock
- Lämpökaappi, Termaks
- Lämpöravistelijä, IKA KS 4000 I control
- Mikrosentrifugi, VWR Galaxy 16DH
- PCR-laite, Biometra Personal Thermocycler
- PCR-laite, Perkin Elmer DNA thermal cycler
- Sentrifugi, Thermo Scientific SL 40 R
- Sinivalopöytä, Safe Imager
- Spektrofotometri, Thermo Scientific Nanodrop 2000
- Vaaka, Sartorius BP 310 P
- Virtalähde, Bio-Rad Power Pac 300

Työssä käytetyt reagenssit:

- 6x Mass Loading Dye, Fermentas
- Agarose, multi-purpose, Bionline
- BamHI-HF, 20000 U/ml, Biolabs
- CIP, Calf intestine alkaline phosphatase, 10 U/ml, Fermentas
- HindIII-HF, 20000 U/ml, Biolabs
- Oligot, Sigma
- Phusion DNA polymerase, Biolabs
- Phusion GC-buffer, Biolabs
- SybrSafe, Invitrogen
- T4 DNA ligase, Biolabs
- T4 DNA ligation buffer, Biolabs
- ZeroBlunt, Invitrogen

Centrifugation Protocols



Add TRK Buffer and Lyse



Homogenize



Add Ethanol

Apply Sample to Column



Wash 3x



Dry



Elute

I. First strand cDNA synthesis

Mix and briefly centrifuge all components after thawing, keep on ice.

1. Add the following reagents into a sterile, nuclease-free tube on ice in the indicated order:

Template RNA	poly(A) mRNA or specific RNA	1 µg 0.5-1 µg
Primer	oligo (dT) ₁₈ primer or random hexamer primer or gene-specific primer	1 µl 1 µl 100 pmol
Water, nuclease-free		to 12 µl
Total volume		12 µl

2. *Optional.* If the RNA template is GC-rich or contains secondary structures, mix gently, centrifuge briefly and incubate at 65°C for 5 min. Chill on ice, spin down and place the vial back on ice.

3. Add the following components in the indicated order:

5X Reaction Buffer	4 µl	
RiboLock RNase Inhibitor (20 u/µl)	1 µl	
10 mM dNTP Mix	2 µl	
RevertAid M-MuLV Reverse Transcriptase (200 u/µl)	1 µl	
Total volume		20 µl

4. Mix gently and centrifuge.

For oligo(dT)₁₈ or gene-specific primed cDNA synthesis, incubate for 60 min at 42°C.

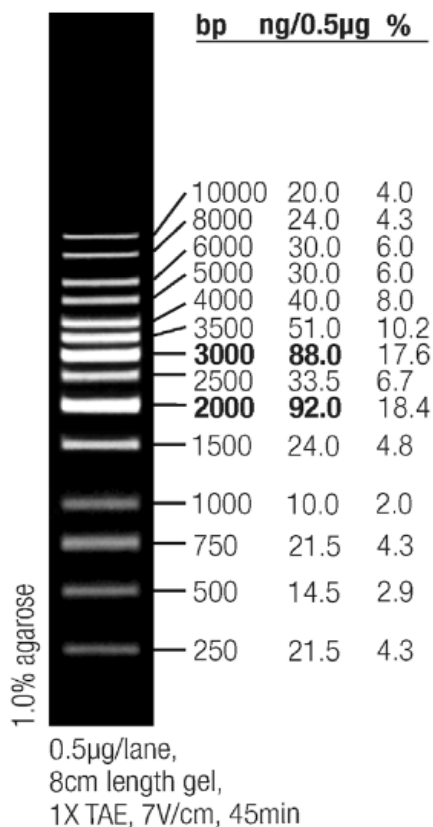
For random hexamer primed synthesis, incubate for 5 min at 25°C followed by 60 min at 42°C.

Note. For GC-rich RNA templates the reaction temperature can be increased up to 45°C.

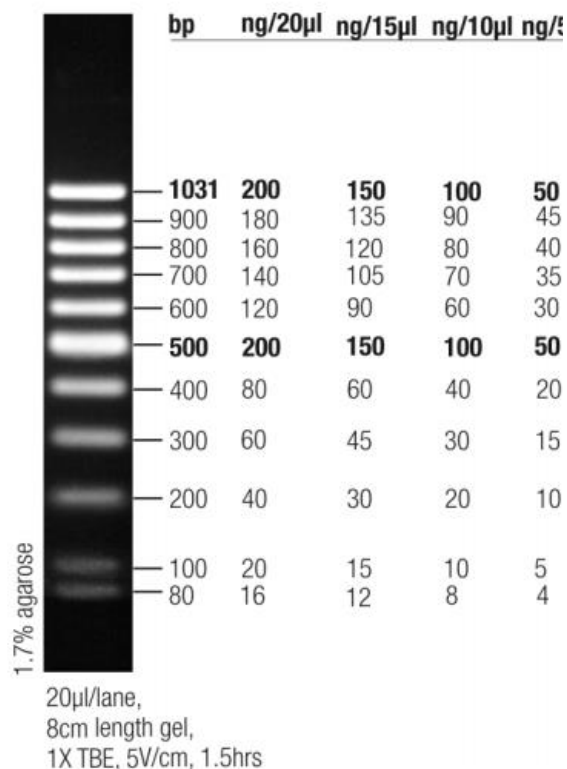
5. Terminate the reaction by heating at 70°C for 5 min.

The reverse transcription can be used immediately in second strand cDNA synthesis reactions or stored at -20°C for less than a week. For longer storage, -70°C is recommended.

GeneRuler™ 1kb DNA Ladder
















MassRuler™ DNA Ladder, Low Range, ready-to-use



PCR clean-up, gel extraction

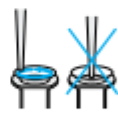
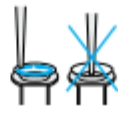
Protocol-at-a-glance (Rev.02)

	PCR clean-up	Gel extraction	DNA clean-up (with SDS)	Single stranded DNA clean-up
<p>1 <u>PCR clean-up, DNA clean-up, or single stranded DNA clean-up:</u> Adjust binding condition</p> <p><u>Gel extraction:</u> Excise DNA fragment / solubilize gel slice</p>	 200 µL NT1/ 100 µL PCR	  200 µL NT1/ 100 mg gel 50°C 5–10 min	 500 µL NTB/ 100 µL sample	 200 µL NTC/ 100 µL sample
2 Bind DNA			11,000 x g 30 s	
3 Wash silica membrane			700 µL NT3 11,000 x g 30 s Recommended: 2 nd wash 700 µL NT3 11,000 x g 30 s	
4 Dry silica membrane			11,000 x g 1 min	
5 Elute DNA			15–30 µL NE RT 1 min 11,000 x g 1 min	

Plasmid DNA purification (NucleoBond® Xtra Midi/Maxi) Protocol-at-a-glance (Rev. 11)

Midi

Maxi

1-3	Cultivate and harvest bacterial cells	4,500-6,000 x g 4 °C, 15 min			
4-5	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	
6	Equilibration of the column and filter	12 mL Buffer EQU			25 mL Buffer EQU
7	Neutralization	8 mL / 16 mL Buffer NEU Mix by gently inverting 10-15 times		12 mL / 24 mL Buffer NEU Mix by gently inverting 10-15 times	
8	Clarification and loading of the lysate	Invert the tube 3 times Load lysate on NucleoBond® Xtra Column Filter			
9	1 st Washing	5 mL Buffer EQU !			15 mL Buffer EQU !
10	Discard NucleoBond® Xtra Column Filter	Discard NucleoBond® Xtra Column Filter		Discard NucleoBond® Xtra Column Filter	
11	2 nd Washing	8 mL Buffer WASH !		25 mL Buffer WASH !	
12	Elution	5 mL Buffer ELU		15 mL Buffer ELU	
13	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
14	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
15	Reconstitute DNA	Appropriate volume of TE buffer	200-800 µL Buffer TRIS	Appropriate volume of TE buffer	400-1000 µL Buffer TRIS

