

Sanna Viitanen

Kukan kehitystä säätelevien geenien molekyylikloonauus

Opinnäytetyö

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Terveys- ja hoitoala

Bioanalytiikka

Opinnäytetyö

15.5.2014

| | |
|--|---|
| Tekijä(t) Otsikko | Sanna Viitanen Kukan kehitystä säätelevien geenien molekyylikloonauus |
| Sivumäärä Aika | 32 sivua + 1 liite 15.5.2014 |
| Tutkinto | Bioanalyttikko |
| Koulutusohjelma | Bioanalytiikan koulutusohjelma |
| Suuntautumisvaihtoehto | Bioanalytiikka |
| Ohjaajat | Vastuullinen tutkija Kristiina Himanen Lehtori Hannele Pihlaja Tutkija Mirko Pavicic |
| <p>Kukan kehitykseen ja toimintaan vaikuttaa ubikitiini proteasomi-järjestelmä, joka vaikuttaa kaikissa organismeissa hajottamalla säädellysti organismin proteiineja. Järjestelmän vaikutusta kukan kehitykseen on tutkittu vielä vähän, mutta on saatu näyttöä siitä, että se voi mahdollisesti vaikuttaa välttämättömiin kasvisignaaleihin. Tämän takia järjestelmän uskotaan voivan mullistaa koko kasvisignaalien tutkimuksen. Vaikuttamalla kukan kehitykseen uskotaan pystyvän luomaan uudenlaisia kukkia, jotka kestävät paremmin stressiä ja joiden kukinnat kestävät pidempään. Näin voidaan saada esimerkiksi enemmän siemeniä ja hedelmiä. Tämä olisi hyvä asia niin maatalouden kestäväälle kehitykselle, kuin yhteiskunnallekin.</p> <p>Työn tavoitteena oli kloonata kaksi geeniä, jotka toimivat ubikitiini proteasomi-järjestelmässä. Geenit kloonattiin vektoreilla ja <i>E.coli</i>-bakteereilla. Kloonatut geenit voitaisiin tämän jälkeen käyttää tutkimuksiin, joiden tarkoituksena on selvittää, miten geenit vaikuttavat kukan kehitykseen.</p> <p>Geenit kloonattiin Gateway Technology-menetelmällä, joka käyttää bakteriofagin ja bakteerin luontaista rekombinaatiota hyväkseen siirtääkseen geeni vektoriin. Siirrettäessä geeni menetelmän "donor"-vektoriin saadaan "entry clone". Luotu "entry clone" siirrettiin bakteeriin, joka pystyy monistamaan geenin nopeasti ja tehokkaasti. Kloonattu geeni siirrettiin tämän jälkeen kolmeen "destination"-vektoriin, joiden avulla pystytään tutkimaan geeniä erilaisissa tutkimuksissa. Myös nämä vektorit siirrettiin ja kloonattiin samalla menetelmällä. Ensimmäisen sekvensointituloksen perusteella saatiin kloonattua geenit onnistuneesti Gateway technology-menetelmän "entry clone". Toisella sekvensointi tuloksella todettiin, että kloonattujen geenien siirto "destination"-vektoreihin ja näiden kloonauus onnistui kahteen vektoriin. Yhteen vektoriin ei saatu siirrettyä geenejä ollenkaan, minkä takia yhdestä vektorista ei saada tehtyä tarvittavia tutkimuksia. Jos halutaan siirtää geenit vektoriin, pitää koko prosessi tehdä uudestaan. Kahdesta onnistuneesta vektorista voidaan tehdä luotettavasti tarvittavia tutkimuksia.</p> | |
| Avainsanat | ubikitiini proteasomi-järjestelmä, kloonaminen, geeni, vektori, bakteeri, rekombinaatio, Gateway Technology, sekvensointi |

| | |
|--|--|
| Author(s) Title | Sanna Viitanen Gene cloning of flower development genes |
| Number of Pages Date | 32 pages + 1 appendix 15 May 2014 |
| Degree | Bachelor of Health Care |
| Degree Programme | Biomedical Laboratory Science |
| Specialisation option | Biomedical Laboratory Science |
| Instructors | Principal investigator Kristiina Himanen Senior Lecturer Hannele Pihlaja Investigator Mirko Pavicic |
| <p>One of the factors in the development of a flower is the ubiquitin-proteasome system that functions in all organisms by regulating protein degradation. The system is still poorly studied but there are results indicating that the essential plant signaling processes are controlled by the ubiquitin-proteasome system. The system could therefore be groundbreaking in plant investigation. By having an impact on the flowers development it is believed that it can create flowers that can produce bigger flowers and bloom longer, thus we can get more seeds and fruits as yield. This would be a good cause not only for the society but also for the sustainable development of agriculture.</p> <p>The purpose of this thesis is to clone two genes that affect a flower development. The cloned genes are then ready to be used in scientific research to determine how the genes are affecting the development of the flower.</p> <p>The genes were cloned by using the Gateway Technology. The method uses the natural recombination of bacteriophage and bacteria when putting the gene into a "donor" vector. Putting a gene into the donor vector creates an entry clone. The cloning is made by transferring the entry vector into bacteria that multiply the gene fast and effectively. The cloned genes are then transferred into three different destination vectors. With the destination vector it is possible to make different kinds of research on the gene. These genes were also transferred and cloned with the Gateway Technology System.</p> <p>The first sequencing result showed that the genes were successfully transferred and cloned with the entry clone. The second sequencing result showed that the transferring and cloning with the destination vectors was a success with two of the destination vectors. With one destination vector we could not get any results, thus it is not possible to make any more research with it. If there is any necessary research to be done with the genes and the destination vector in the future, the whole process must be executed again. Reliable research can be done with the two successfully transferred and cloned destination vectors.</p> | |
| Keywords | ubiquitin proteasome system, clone, gene, vector, bacteria, recombination, Gateway Technology System, sequence |

Sisällys

| | | |
|-------|--|----|
| 1 | Johdanto | 1 |
| 2 | Ubikitiini proteasomi-järjestelmä | 2 |
| 2.1 | Tausta | 2 |
| 2.2 | Ubikitiinin biokemia | 2 |
| 3 | Vektori eli geenikuljetin | 4 |
| 3.1 | Plasmidivektori | 4 |
| 3.2 | Säätelyalueet ja promoottori | 5 |
| 3.3 | Faagivektori | 6 |
| 4 | Opinnäytetyön tarkoitus ja tutkimusongelmat | 6 |
| 5 | Työssä käytetyt menetelmät | 7 |
| 5.1 | RNA:n eristäminen ja puhdistaminen | 8 |
| 5.2 | cDNA-transkriptio ja PCR | 8 |
| 5.2.1 | DNA eristäminen PCR-reaktiosta | 14 |
| 5.3 | Transformaatio <i>E.coli</i> -bakteereille CaCl ₂ -menetelmällä | 14 |
| 5.3.1 | Työprosessi | 14 |
| 5.4 | Yhdistelmä-DNA:n eristäminen bakteerista ja DNA:n säilyttäminen | 15 |
| 5.5 | Kloonaaminen Gateway Technology-menetelmällä | 16 |
| 5.5.1 | BP-reaktio | 16 |
| 5.5.2 | LR-reaktio | 17 |
| 6 | Opinnäytetyöprosessi | 18 |
| 6.1 | Sekvensointi | 19 |
| 6.2 | Spektrofotometrinen analyysi | 20 |
| 7 | Tulokset | 20 |
| 7.1 | RNA:n eristys tulokset | 20 |
| 7.2 | Käänteistranskriptio- ja PCR-tulokset | 21 |
| 7.3 | BP- reaktion tulokset | 22 |
| 7.4 | LR-reaktion tulokset | 24 |
| 7.5 | Sekvensointitulokset | 27 |
| 8 | Johtopäätökset ja pohdinta | 28 |

| | | |
|-----|--------------------|----|
| 8.1 | Lopuksi | 29 |
| | Lähteet | 30 |
| | Liitteet | |
| | Liite 1. Työohjeet | |

1 Johdanto

Työ tehtiin Helsingin yliopiston maataloustieteidenlaitoksella toimivassa tutkimusryhmässä, jonka vastuullisena tutkijana toimii FT Kristiina Himanen. Opinnäytetyö on osa ryhmässä tehtävää tohtorintutkintoa. Tutkimusryhmä tutkii ubikitiini-signaalien vaikutusta kukan kehitykseen eli niin kutsuttuja FUPS-signaaleja (Flower specific Ubiquitin Proteasome System). Uusimmista tutkimuksista on selvinnyt, että ubikitiini proteasomisysteemi eli UPS voi mahdollisesti vaikuttaa välttämättömiin kasvisignaaleihin, kuten kehitys- ja stressivasteisiin. Tämä on aivan uudenlainen ja vähän tutkittu järjestelmä, joka voi mullistaa kasvisignaalien tutkimuksen. Tutkimustuloksista odotetaan keinoja, joilla voidaan vaikuttaa UPS-järjestelmän avulla mm. kasvin kehitykseen, kestävyYTEEN ja kukintaan. Vaikuttamalla näihin tekijöihin pystytään luomaan uusia ja parempia kasveja, jotka pystyvät esimerkiksi tuottamaan suurempia kukkia ja siten enemmän siemeniä. Tämä olisi hyvä asia niin kestäväälle kehitykselle kuin yhteiskunnallekin. (Himanen 2013a, Mäki-Kihniä 2013.)

Opinnäytetyön tarkoitus on kloonata kaksi geeniä ja siirtää kloonatut geenit kolmeen tutkimuskohtaiseen vektoriin. Kloonattavat geenit osallistuvat UPS-järjestelmään ja vaikuttavat näin sekä kukan toimintaan että kehitykseen. Työssä tutkittavat geenit koodaavat E3-entsyymiin, joka toimii pääosana UPS-järjestelmässä. Geenien kloonaukseen käytetään vektoreita, joihin siirretään kloonattava geeni. Tuotettu yhdistelmä-DNA monistetaan siirtämällä se *Escherichia coli*-bakteeriin. Lisääntyessään *E.coli*-bakteeri kopioi täsmälleen samanlaisen yhdistelmä-DNA:n ja geenin uuteen bakteerin. Näin saadaan kloonattua alkuperäinen geeni moninkertaisesti. Kloonattu geeni voidaan tämän jälkeen eristää bakteerista ja käyttää tulevia tutkimuksia varten.

Tutkimusryhmä käyttää tutkimuksissaan *Arabidopsis thaliana* eli lituruohoa. *Arabidopsis thaliana* on paljon käytetty mallikasvi kasvitutkimuksessa, sillä kasvin koko genomi tunnetaan ja se on hyvin helppohoitoinen ja nopeakasvuinen (Luontopoortti 2014). *Arabidopsis thaliana*lla on 1200 (kappaletta) erilaista E3-entsyymiä ja näistä opinnäytetyöhön valittiin kaksi geeniä (Jones – Ougham – Thomas – Waaland 2012: 178). Geenien viralliset nimet pidetään salassa tutkimusryhmän pyynnöstä ja opinnäytetyössä näistä käytetään koodinimiä. Geenien koodinimet ovat XRC ja FG1.

2 Ubikitiini proteasomi-järjestelmä

Tutkimusprojektin perusta on ubikitiini proteasomi-järjestelmä eli UPS. UPS löytyy kaikista aiotumaisista organismeista ja se on välttämätön järjestelmä normaalille solutoiminnalle. UPS-järjestelmän tehtävä organismissa on säädellä proteiinien hajotusta. (Jones ym. 2012: 177–179.) Proteiinit koostuvat aminohapoista ja toimivat mm. entsyymeinä ja säätely- ja rakenneproteiineina (Solunetti 2006c). Proteiinit säätelevät kaikkia organismin prosesseja ja ovat sen vuoksi elintärkeitä. Toimimattoman UPS-järjestelmän seurauksena voi olla viallisten proteiinien kertyminen organismiin tai tarpeellisten proteiinien poisto. Tästä voi seurata organismille erilaisia kehitysongelmia. (Holmberg-Still 2013.)

Ubikitiini proteasomi-järjestelmällä on iso rooli solutoiminnassa. Solu pystyy UPS-järjestelmän avulla valikoivasti alentamaan tiettyjen proteiinien toimintaa ohjaamalla niitä hajotukseen. Näin solu pystyy vaikuttamaan eri prosesseihin ja niiden muutoksiin, joissa vaikuttavat avainsäätelijät kuten mm. transkriptiotekijät ja erilaiset reseptorit. (Himanen 2013b: 1; Jones ym. 2012: 177–179.)

2.1 Tausta

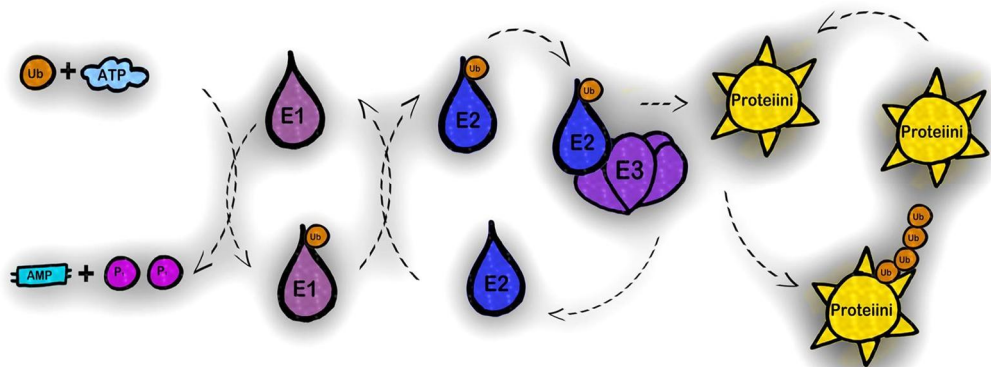
Ubikitiini proteasomi-järjestelmää on tutkittu vielä hyvin vähän ja parhaiten kuvatut UPS-tekijät ovat ilmaantuneet mutanttiseulonnoista ja genomien laajuisista seulonnoista. Ei ole olemassa mitään yleistä strategiaa, jolla näitä tekijöitä pystytään tunnistamaan, joten niitä on kuvattu vielä hyvin vähän. Ubikitiini proteasomi-järjestelmä on hyvin tärkeä tutkimusala ja sen tutkiminen ja ymmärtäminen antaa paljon vastauksia solun toiminnasta. Esimerkiksi pystytään paremmin ymmärtämään tiettyjä sairauksia tai organismin eri kehitysvaiheita, ja näin ollen myös vaikuttamaan niihin. (Himanen 2013b: 1; Holmberg-Still 2013.)

2.2 Ubikitiinin biokemia

Ubikitiini on pienimolekyylinen proteiini, joka kiinnittyy hajotettavaan proteiiniin. Kiinnittymällä proteiiniin ubikitiini merkitsee proteiinin proteasomille, jonka tehtävä on tämän jälkeen hajottaa proteiini aminohapoiksi ja tuottaa näin uusia rakenneaineita solulle. Ubikitiinin kiinnittymiseen tarvitaan kolmea eri entsyymiä, jotka ovat aktivoiva entsyymi

(E1), konjugoiva entsyymi (E2) ja ligoiva entsyymi (E3). Näiden entsyymien perusteella prosessi voidaan jakaa kolmeen osaan. (Jones ym. 2012: 177–179.)

Prosessi alkaa kun E1 aktivoi ubikitiinin ATP:n avulla. Tämä saa aikaan ubikitiinin kiinnittymisen E1:seen. Seuraavaksi ubikitiini siirtyy ja kiinnittyy E2:seen. E2 pystyy ubikitiinin kiinnittymisen jälkeen kiinnittymään E3:seen. E3 toimii ligaasina, joka yhdistää E2:sen ja ubikitiinin hajotettavaan proteiiniin. Ubikitiini pystyy tämän yhdistymisen jälkeen kiinnittymään kohdeproteiiniin. Tämä prosessi toistuu riittävän usein, kunnes ubikitiinit muodostavat polyubikitiiniketjun. Ketjun pituus on hyvin spesifinen ja määräytyy suurimmalta osin E3 ligaasivaiheessa. Arabidopsis-kasvissa on yli 1200 geeniä, jotka koodittavat E3-entsyymejä, kun taas E1 geenejä on vain 2 ja E2 geenejä 37. Proteasomi tunnistaa valmiin polyubikitiiniketjun proteiinista ja saa näin signaalin hajottaa proteiinin. (Himanen 2013b: 1; Jones ym. 2012: 177–179.)



Kuvio 1. Kaavakuva ubikitiinin siirtymisestä hajotettavaan proteiiniin. Prosessi alkaa ubikitiinin kiinnittymisellä entsyymi 1:seen. Tähän tarvitaan energiaa eli ATP:tä, joka muuttuu kiinnittymisen jälkeen AMP:ksi ja kahdeksi fosforiksi (P). Entsyymi 1 siirtää ubikitiinin entsyymi 2:lle. Entsyymi 2 ja ubikitiini kiinnittyy entsyymi 3:seen, joka yhdistää ubikitiinin hajotettavaan proteiiniin. Koko prosessi toistetaan riittävän usein, kunnes hajotettavaan proteiiniin on muodostunut polyubikitiiniketju. (Kuva: Suvi Autto, 2014)

3 Vektori eli geenikuljetin

Geenitekniikassa on kehitelty vektoreita, joita käytetään geenikuljettimina. Vektori on hyvin stabiili ja helposti työstettävä, mikä tekee siitä hyvän tutkimusvälineen. Erilaisia vektorimalleja on kehitelty paljon ja niitä käytetään moniin eri tutkimuksiin. Vektorimalleja luodaan luonnon omista geeninsiirtotyökaluista. Vektorimalli pitää valita isäntäsolun perusteella niin, että se pystyy replikoitumaan ja monistumaan solussa. Tässä työssä esitetyt vektorimallit ovat plasmidivektori ja faagivektori. (Haajanen – Pelkonen – Pärssinen – Suominen 2010: 66–87; Salo 1997; Solunetti 2006e.)

Kun vektoriin siirretään tutkittava geeni, saadaan luotua yhdistelmä-DNA, joka pystyy lisääntymään ja/tai tuottamaan haluttuja proteiineja solussa. Luotu yhdistelmä-DNA voidaan tämän jälkeen siirtää bakteeriin transformaatiolla, jolloin saadaan kopioitua eli kloonattua lisää yhdistelmä-DNA:ta ja tutkittavaa geeniä. Kloonatut geenit (yhdistelmä-DNA) voidaan lisääntymisen jälkeen eristää bakteerista hajottamalla bakteeri. (Haajanen ym. 2010: 66–87.)

3.1 Plasmidivektori

Plasmidimolekyylit ovat pieniä rengasmaisia DNA-molekyylejä, joita esiintyy luontaisesti bakteereilla, hiivoilla, homeilla ja joillakin korkeammilla eliöillä. Ne eivät ole liittyneenä solun kromosomiin, vaan monistuvat ja toimivat itsenäisesti solun sisällä. Aina solun jakaantuessa kumpikin tytär solu saa plasmidin, jolloin plasmidin geneettinen sisältö siirtyy bakteerista toiseen. Tutkimusten ja kehityksen myötä on havaittu, että plasmidi voidaan siirtää bakteeriin, jolla ei ole aikaisemmin ollut plasmidia. Havaittiin myös, että plasmidi voidaan katkaista restriktioentsyymeillä tarkoin määrätystä kohdasta ja liittää uudelleen yhteen DNA-ligaasientsyymeillä. Plasmidin siirtämistä bakteeriin kutsutaan transformaatioksi, jota voi tapahtua joko luonnollisesti tai keinotekoisesti. (Brown T.A 2006: 14; Haajanen ym. 2010: 66–87.)

Plasmidit sisältävät usein myös yhden tai useamman geenin, jotka ovat hyvin tarpeellisia isäntäsolulle. Esimerkiksi bakteerisolun plasmidissa voi olla antibioottiresistenssi-geeni (selektiogeeni), jonka avulla bakteeri pystyy kasvamaan antibiootin läsnä ollessa. Laboratorioissa antibioottiresistenssiä on opittu käyttämään hyväksi mm. silloin, kun halutaan varmistaa että bakteeri, joka sisältää halutun plasmidin, kasvaa maljassa.

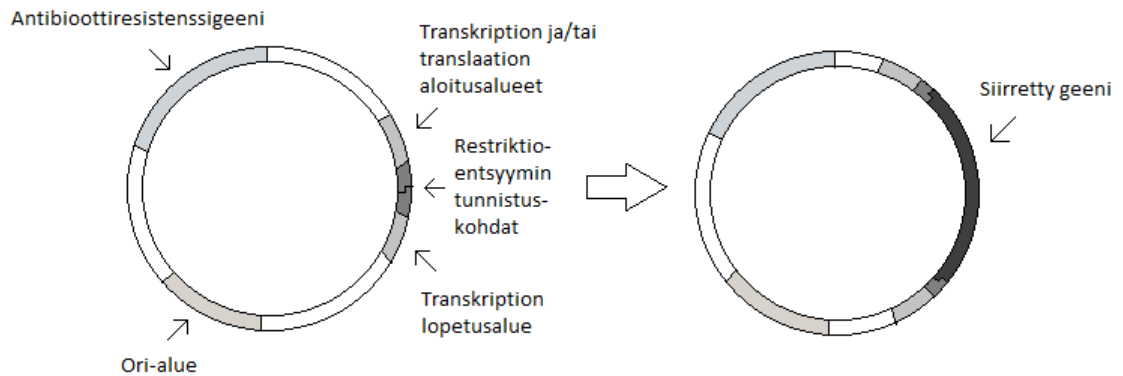
Maljoihin lisätään antibioottia, jolloin ainoastaan resistenssin omaava bakteeri pystyy lisääntymään maljalla. Näin voidaan valikoida eli selektoida mukaan ainoastaan sellaiset bakteerit, jotka sisältävät halutun plasmidin ja tarvittavan selektiogeenin. Antibioottiresistenssiä käytetään mm. varmistamaan onnistunut transformaatio. (Brown T.A 2006: 14; Haajanen ym. 2010: 66–87.)

Plasmidin luontaista esiintymistä ja lisääntymistä bakteerissa pystytään käyttämään hyväksi, kun halutaan kloonata lyhyitä DNA-jaksoja. Plasmidin tiedon pohjalta ja tutkimusten kautta on kehitelty plasmidivektori. Plasmidivektori kuten plasmidi on rengasmuotoinen DNA-yhdiste, joka voidaan katkaista ja liittää yhteen restriktioentsyymien ja DNA-ligaasientsyymien avulla. Näiden entsyymien avulla voidaan myös siirtää tutkittava geeni vektoriin. (Haajanen ym. 2010: 66–87.)

3.2 Säätelalueet ja promoottori

Vektorit sisältävät säätelalueita, jotka säätelevät vektorin toimintaa ja luovat vektorille erilaisia kykyjä. Säätelalueen yleisin tehtävä on toimia replikaation aloitusalueena, eli ori-alueena, sekä restriktioentsyymien katkaisukohtina. Nämä alueet ovat hyvin tärkeitä vektorin toiminnalle, ja ilman niitä vektori on käyttökelvoton. Käyttökelpoiselle vektorille tarvitaan myös muita säätelalueita tutkimuksesta riippuen. Esimerkiksi ekspressiovektori sisältää säätelalueen, jolla halutaan ilmentää vektoriin siirretty geeni in-vivo eli elävässä solussa. In-vitro-transkriptiovektoreiden säätelalueella voidaan taas valmistaa vektoriin siirretystä DNA-jaksosta RNA:ta koeputkessa. (Haajanen ym. 2010: 59–86.)

Promoottori on vektorirenkaassa sijaitseva säätelalue, joka sijaitsee ennen inserttiä eli tutkittua geeniä. Promoottori on alue, johon RNA-polymeraasi kiinnittyy, ja josta transkriptio alkaa. Alueella mahdollistetaan siirretyn geenin toiminnan isäntäsolussa. Promoottorilla on siis keskeinen osuus vektorin geenisäätelyssä. (Haajanen ym. 2010: 59–86.)



Kuvio 2. Pelkistetty plasmidivektori, jossa on muutamia tarvittavia säätelyalueita ja selektiogeeni. Säätelyalueet ovat ori-alue ja restriktioentsyymien tunnistuskohdat. Promootorialueena ovat transkription ja/tai translaation aloitusalueet sekä transkription lopetusalue. Selektiogeeninä toimii antibioottiresistenssigeeni. Restriktioentsyymien avulla saadaan vektorirengas katkaistua, ja liitettyä haluttu geeni DNA-ligaasientsyymeillä. Jälkimmäiseen vektorirenkaaseen on siirretty haluttua geeniä ja luotu yhdistelmä-DNA:ta. Yhdistelmä-DNA voidaan siirtää bakteerin kloonattavaksi.

3.3 Faagivektori

Opinnäytetyössä käytetty Gateway Technology-menetelmä on kehittänyt faagivektoreita, jotka hyödyntävät perinteisen restriktio-ligaatioentsyymien reaktiosarjan sijaan luontaista rekombinaatiota. Luontaista rekombinaatiota tapahtuu, kun bakteriofagi infektoi bakteerin. Bakteriofagin genomissa on säätelyalue, joka rekombinoi bakteerin genomissa olevan alueen kanssa. Rekombinaatiossa bakteriofagin ja bakteerin alueet vaihtavat paikkaa keskenään ja näin bakteriofagin genomia siirtyy bakteerin genomiin. Gateway Technology-menetelmä hyödyntää näitä samoja säätelyalueita siirtääkseen kloonattava geeni faagivektoriin ja luodakseen yhdistelmä-DNA:ta, joka siirretään bakteeriin monistettavaksi eli kloonattavaksi. Tästä on kerrottu lisää ”Kloonaaminen Gateway Technology-menetelmällä”-kappaleessa. (Haajanen ym. 2010: 91–92; Invitrogen Corporation 2010: 3–4.)

4 Opinnäytetyön tarkoitus ja tutkimusongelmat

Työn tarkoituksena on eristää *Arabidopsis thaliana* kasvista kaksi tutkittavaa geeniä (XRC ja FG1) ja siirtää ne Gateway technology-menetelmän reaktiolla vektoreihin. Vektoreiden avulla geenit kloonataan bakteerissa. Lopuksi kloonatut geenit siirretään kol-

meen tutkimuskohtaiseen vektoriin. Näiden vektoreiden avulla tutkimusryhmän on tarkoitus tehdä geeneille luotettavasti erilaisia tutkimuksia (proteiinien merkitseminen fluoresenssi merkillä, geenien ylituotto kasvilla sekä geenien indusoitava ylituotto kasvilla). Menetelmän reaktioiden ja geenin kloonauksen jälkeen lähetetään geenit sekvensoitavaksi, jotta saadaan varmistettua, että geenit ovat säilyneet virheettöminä koko prosessin ajan.

Tutkittava geeni siirretään vektoriin kloonattavaksi, sillä luotu yhdistelmä-DNA on hyvin stabiili yhdiste ja helposti kloonattavissa bakteerissa. Yhdistelmä-DNA on myös helppo säilyttää ja siirtää niin, että se säilyy hyvin ehjänä koko prosessin ajan. Näin pystytään siirtämään tutkittava geeni yhdistelmä-DNA:n mukana haluttuun paikkaan. Geeni siirretään kloonauksen jälkeen tutkimuskohtaisiin vektoreihin, sillä vektoreita voidaan muokata helposti tarvittaviin tutkimuksiin ja siirtää erilaisiin kohteisiin, joihin geeni saadaan vaikuttamaan.

Käytännön ongelmia voi ilmentyä koko prosessin ajan. RNA:n eristäminen kasvista voi epäonnistua esimerkiksi RNAasin takia, jolloin ei saada tutkittavia geenejä monistetua. Vektorin siirtäminen bakteeriin voi epäonnistua, jolloin ei saada kloonattua lisää geenejä. Samoin yhdistelmä-DNA:n eristäminen bakteerista voi epäonnistua, jolloin ei saada kloonattua geeniä. Geeni, joka kloonataan, voi muuttua prosessin aikana PCR-virheen takia, jolloin tarvittavia tutkimuksia ei voida tehdä. Tällöin geeni on kloonattava uudestaan. BP- ja LR-reaktio voivat epäonnistua, jolloin geeniä ei saada siirrettyä vektoriin. Myös sekvensointi voi antaa virheellisen tuloksen, jolloin reaktio pitää tarkistaa uudelleen ja todeta onko virhe geenissä vai reaktiossa.

Tutkimuskysymyksenä opinnäytetyössä kuuluu, että saadaanko geenit siirrettyä luotettavasti Gateway Technology-menetelmällä vektoreihin ja kloonattua tämän jälkeen bakteerissa niin, että geenit säilyvät virheettöminä koko prosessin ajan?

5 Työssä käytetyt menetelmät

Käytetyt menetelmät seuraavat Gateway Technology-menetelmää, jolla voidaan kloonata DNA-jaksoja vektoreihin ja monistaa *E.coli*-bakteerien avulla. Suurimmalta osin menetelmässä käytetään kaupallisia reagenssipakkauksia, joista työssä myöhemmin käytetään käsitettä "kitti". Valmistajien työohjeet löytyvät liitteenä.

5.1 RNA:n eristäminen ja puhdistaminen

RNA eli ribonukleiinihappo on hyvin nopeasti hajoavaa, minkä takia työ täytyy suorittaa nopeasti ja varovaisesti. Solut sisältävät myös ribonukleaasientsyymejä eli RNAaseja, jotka pilkkovat eristettävää RNA:ta. RNAasit ovat hyvin kestäviä ja vaikeasti inaktivoitavia entsyymejä, joita on kaikkialla ympäristössä, kuten esimerkiksi ihmisen iholla. Tämä lisää entisestään RNA-eristyksen vaikeutta kun halutaan eristää ehjiä ja täyspitkiä RNA-juosteita. (Haajanen ym. 2010: 108–109.)

Työn alussa Arabidopsis-kasvista saatu näyte homogenisoidaan ja hajotetaan nopeasti nestemäisessä työssä sekä hellävaraisella detergenttikäsittelyllä. Näin saadaan RNA esiin soluista ja RNA:n hajoaminen pysyy erittäin vähäisenä. Detergenttikäsittely sisältää guanidiinitiosyanaatin, joka hajottaa solut nopeasti ja samalla inaktivoi RNAasit. Käsittelyn aikana poistuu myös DNA, joka kiinnittyy reagensissa oleviin mineraalikantajapartikkeleiden pintaan. Nämä partikkelit poistuvat myöhemmin tapahtuvassa pesu- ja sentrifugointivaiheessa. (Haajanen ym. 2010: 109; Invisorb 2009: 9–11.)

Menetelmä perustuu sentrifugointi-pylväsmenetelmään, jossa käytetään hyväksi sili-kamatriksikalvoa. Silikamatriksi on negatiivisesti varautunut kalvo, joka pystyy sitomaan negatiivisesti varautuneen nukleiinihapon positiivisesti varautuneen ionin avulla. Silikamatriksikalvo on sidottu pieneen pylvääseen, joka asetetaan vastaanottoputkeen. Kun liuos sentrifugoidaan pylvään läpi eli kalvon läpi, saadaan tutkittava nukleiinihappo tarttumaan kalvoon ja ylimääräinen liuos putken pohjalle. Epäpuhtaudet saadaan pois pesuliuksilla ja etanolilla, jotka sentrifugoidaan pylvään läpi. Lopuksi nukleiinihappo irttaa silikakalvosta pienellä määrällä laimeaa puskuria, kun liuos sentrifugoidaan kalvon läpi puhtaaseen vastaanottoputkeen. (Haajanen ym. 2010: 106; Invisorb 2009: 2; Solunetti 2006b.)

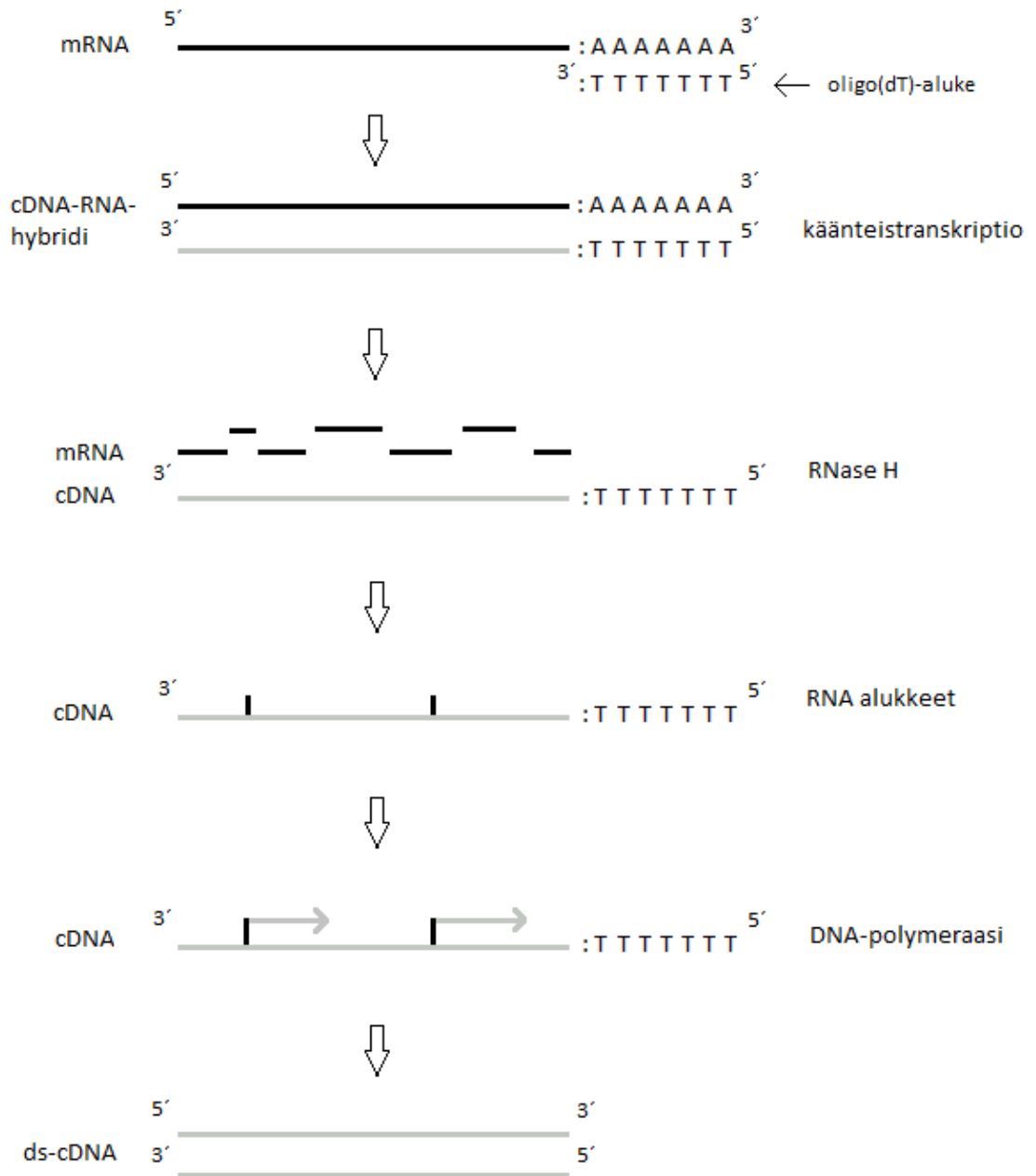
Kun eristetään RNA:ta, saadaan näytteeseen myös vähän DNA:ta. RNA käsitellään RNAasivapaalla DNAasientsyymillä eli deoksribonukleaasientsyymillä, joka pilkkoo yksi- ja kaksijuosteista DNA:ta. (Thermo Scientific 2012a: 1–2.)

5.2 cDNA-transkriptio ja PCR

Transkriptio tehdään käänteiskopioijaentsyymien avulla, joka tuottaa DNA:ta RNA-mallin mukaan. Käänteistranskriptiota ei normaalisti esiinny solussa, minkä takia käytetään

RNA-viruksen käänteiskopioijaentsyymiä. Entsyymi syntetisoi complementary DNA-juosteen (cDNA), eli komplementaarisen DNA-juosteen, käyttäen mallijuosteena eristettyä messenger RNA-juostetta, eli lähetti-RNA:ta. Eristetyt mRNA-juosteet sisältävät poly(A)-jakson 3'-päässä, johon käänteistranskriptioentsyymillä oligo(dT)-aluke kiinnittyy ja josta käänteistranskriptiosynteesi alkaa. cDNA-juoste saa siis poly(dT)-jakson 5'-päähän. Oligo(dT)-alukkeella saadaan erotettua mRNA muusta RNA:sta, sillä ainoastaan mRNA:lla on alukkeen kiinnittymiseen tarvittava poly(A)-jakso. (Brown T.A 2006: 166; Haajanen ym. 2010: 170.)

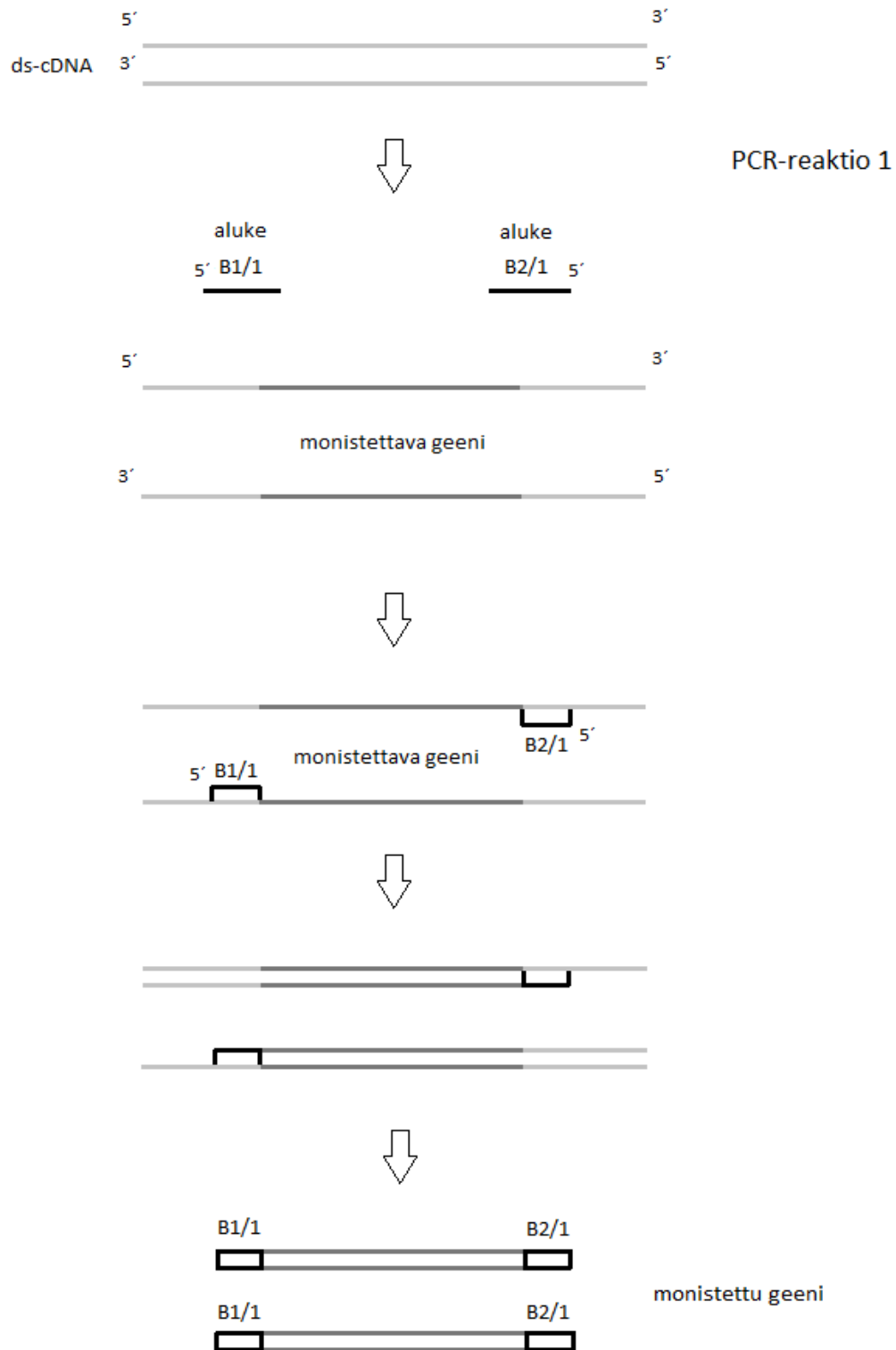
Käänteistranskription jälkeen mRNA:ta ei enää tarvita ja se pilkotaan RNase H:lla. Tämän jälkeen pilkottu mRNA toimii alukkeina DNA-polymeraasille, joka syntetisoi vastinjuosteen cDNA-juosteelle. Näin saadaan kaksijuosteista DNA:ta, joka edustaa alkuperäistä mRNA:ta. (Brown T.A 2006: 166; Haajanen ym. 2010: 170.)



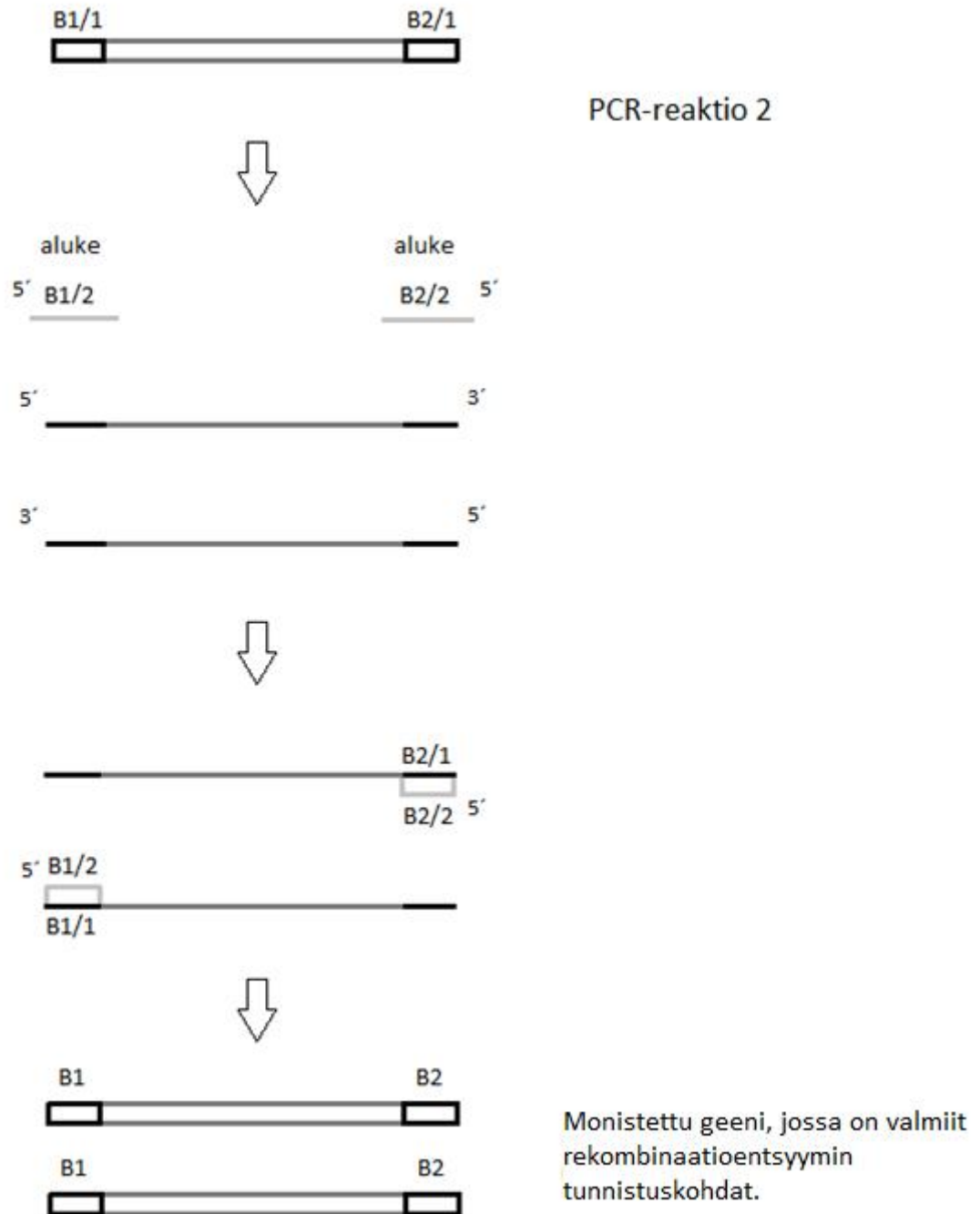
Kuvio 3. mRNA-juosteen 3'-pään poly(A)-häntään kiinnittyy oligo(dT)-aluke, joka toimii käänteistranskriptiosynteesin aloituskohtana. Käänteistranskriptiossa mRNA-juosteelle tehdään cDNA-vastinjuoste käänteiskopioijaentsyymeillä. Transkription jälkeen RNA pilkotaan RNAasi H:lla, jonka jälkeen pilkottu RNA toimii DNA-polymeraasin alukkeina. DNA-polymeraasi syntetisoi alukkeiden avulla cDNA:lle vastinjuosteen. Reaktion lopputuotoksena on kaksijuosteinen cDNA (ds-DNA), joka edustaa alkuperäistä mRNA:ta.

Tuotetusta kaksijuosteisesta cDNA:sta monistetaan tutkittavat geenit ja alukkeiden avulla liitetään geenin molempiin päihin rekombinaatioentsyymien tunnistuskohdat. Työssä käytettiin DNA-polymeraasia, joka tuottaa PCR-reaktiossa DNA-mallijuosteelle vastinjuosteen. (Finnzymes 2010.)

Reaktio tapahtuu kahdessa eri PCR-reaktiossa, jolloin monistus on tehokkaampaa ja kustannuksissa säästetään, sillä lyhyet alukkeet ovat halvempia ostaa. Alukkeet ovat jaettu kahtia niin, että ensimmäinen osa tunnistaa spesifisesti tutkittavan geenin 5'-pään ja kiinnittyy siihen. Alukkeen ensimmäisen osan kiinnitys ja geenin monistus tapahtuu ensimmäisellä PCR-reaktiolla. Seuraava osa alukkeesta tunnistaa ensimmäisen osan ja käyttää tätä mallijuosteena seuraavassa PCR-reaktiossa. Näin saadaan rekombinaatioentsyymien tunnistuskohdat *attB1* ja *attB2*, jotka myöhemmin rekombinoivat Gateway Technology-menetelmän vektoreiden tunnistuskohtien kanssa. (Haajanen ym. 2010: 154–173.)



Kuvio 4. Ensimmäisellä PCR-reaktiolla kiinnitetään ensimmäinen osa alukkeesta. Alukkeet ovat B1/1 ja B2/1. Alukkeet tunnistavat tutkittavan geenin 5'-pään ja kiinnittyvät siihen. Seuraavaksi DNA-polymeraasi käyttää geeniä mallijuosteena ja tekee tälle vastinjuosteen. Tämä toistuu, kunnes reaktion lopussa on monistettuna suuri määrä tutkittavaa geeniä.



Kuvio 5. Toisella PCR-reaktiolla saadaan luotua monistetun geenin molempiin päihin rekombinaatioentsyymien tunnistuskohdat. Toinen osa alukkeesta tunnistaa ensimmäisen osan ja käyttää tätä mallijuosteena. Alukkeet ovat B1/2 ja B2/2. PCR-reaktion lopussa on monistettuna tutkittavien geenien päihin rekombinaatioentsyymien tunnistuskohdat. Tunnistuskohdat ovat *attB1* ja *attB2*, jotka rekombinoivat Gateway Technology-menetelmän vektoreiden tunnistuskohtien kanssa.

5.2.1 DNA eristäminen PCR-reaktiosta

DNA eli deoksiribonukleinihapon eristäminen PCR-reaktion lopputuotteesta tehdään samantapaisella sentrifugointi-pylväsmenetelmällä kuin RNA:n eristys. Poikkeuksena on molekyylien hajotus, johon käytetään kaotrooppia, joka on biomolekyyliä denaturoiva yhdiste, joka rikkoo molekyyliä ympäröivän vesivaipan. Tämä saa aikaan DNA:n kiinnittymisen silikamatriksikalvoon. Kaotrooppia käytetään myös usein RNA:n eristykseen soluhajotuksessa, sillä tämä ehkäisee hyvin RNA:n hajoamista. (Haajanen ym. 2010: 106–107.)

5.3 Transformaatio *E.coli*-bakteereille CaCl_2 -menetelmällä

Plasmidin saattamista bakteeri-, hiiva-, home- ja kasvisolujen sisään, joko luonnollisesti tai keinotekoisesti sanotaan transformaatioksi. Keinotekoisesti sen voi tehdä *E.coli*-bakteeriin käsittelemällä bakteerisolut ensin jääkylmällä CaCl_2 -liuoksella ja tämän jälkeen lyhyellä lämpökäsittelyllä eli lämpöshokilla. CaCl_2 -käsittely saattaa solut tilaan, jossa ne ovat kykeneviä ottamaan DNA:ta sisäänsä. Sanotaan, että solut ovat kompetentteja. (Haajanen ym. 2010: 141–142.)

E.coli-bakteerien solumembraanissa on reikiä, joiden kautta plasmidi pääsee bakteerin sisään lämpökäsittelyn aikana. Reaktio vaatii jääkylmän CaCl_2 -käsittelyn, sillä solumembraani ja plasmidi ovat molemmat negatiivisesti varautuneita kun taas on CaCl_2 positiivisesti varautunut. Käsittely saa aikaan neutraalin ympäristön CaCl_2 kiinnittyessä negatiivisesti varattuun soluun ja plasmidiin. Kylmyys taas tasapainottaa solumembraanin niin, että lyhyen lämpökäsittelyn aikana plasmidi pääsee solun sisään. Lyhyen lämpökäsittelyn aikana vallitsee hetkellisesti solun ulkopuolella ja sisällä epätasapaino, jonka aikana plasmidin on mahdollista sujahtaa solumembraanin reiästä sisään diffuusion voimalla. (Haajanen ym. 2010: 141–142; Cold Spring Harbor Laboratory 2003.)

5.3.1 Työprosessi

Kompetentteihin *E.coli*-bakteereihin, jotka ovat CaCl_2 -liuoksessa, lisätään pienessä tilavuudessa yhdistelmä-DNA:ta. Seoksen annetaan seistä jäähauteessa kolmekymmentä minuuttia, jolloin muodostuu neutraali varaus sekä tasapaino solujen ja DNA:n välille. Kylmäkäsittelyn jälkeen annetaan transformaatioseokselle minuutin kestävä

lämpöshokki, jolloin yhdistelmä-DNA:t sujahtavat solujen sisälle. Välittömästi lämpöshokin jälkeen seos siirretään takaisin jäähauteeseen pariiksi minuutiksi. Seokseen lisätään tämän jälkeen elatusainetta ja pidetään ravistelun alla noin tunnin ajan 37 °C:ssa, jotta yhdistelmä-DNA:n antibioottiresistenssigeeni ehtii ilmeentyä bakteerisolussa. Seos sentrifugoidaan ja solut viljellään selektiivisille maljoille, joilla vain transformoituneet bakteerisolut alkavat kasvaa. Maljat pidetään yön yli 37 °C:ssa ja onnistunut transformaatio näkyy seuraavana aamuna maljalle muodostuneina bakteeripesäkeinä. Bakteerit ovat hyvin herkkiä kaikille muutoksille, ja suurin osa kuolee käsittelyssä, joten työ täytyy suorittaa hyvin varovaisesti. (Haajanen ym. 2010: 141–142; Cold Spring Harbor Laboratory 2003; lähde.)

Bakteeripesäkkeistä otetaan seuraavaksi yksi pesäke, joka siirretään elatusaineeseen kasvamaan. Bakteerin annetaan lisääntyä yön yli 37 °C:ssa hiljaisessa sekoituksessa. Bakteerin lisääntyessä saadaan myös kopioitua eli kloonattua lisää yhdistelmä-DNA:ta moninkertaisesti. Seuraavana aamuna bakteereista voidaan eristää kloonattuja geenejä. (Haajanen ym. 2010: 141–142.)

5.4 Yhdistelmä-DNA:n eristäminen bakteerista ja DNA:n säilyttäminen

Yhdistelmä-DNA on rengasmuotoinen ja kestävä DNA-yhdiste, joka on erillään kromosomaalisesta DNA:sta. Tämän takia se on helposti eristettävissä bakteerisolusta. Jotta yhdistelmä-DNA saadaan eristettyä bakteerista, ovat bakteerit ensin kasvatettava ja kerättävä. Tämä tehdään kasvattamalla bakteerit elatusaineessa ja sentrifugoimalla seos. Bakteerisolut hajotetaan seuraavaksi alkaalisessa eli emäksisessä liuoksessa, joka sisältää emästä NaOH:a ja detergenttiä SDS:ä. Liuokseen lisätään myös RNAasia, joka pilkkoo soluissa olevan RNA:n. Näin saadaan emäksen vaikutuksesta DNA denaturoitua ja RNA pilkottua pois näytteestä. Seuraavaksi liuos neutraloidaan kaliumasetaatilla. Neutraloituminen saostaa proteiinit ja jättää suurikokoisen kromosomaalisen DNA:n denaturoituneeseen tilaan ja saostaa sen. Ainoastaan pienikokoinen yhdistelmä-DNA renaturoituu ja jää liuokseen. (Haajanen ym. 2010: 103–104; Sigma-Aldrich. 2010.)

Lopuksi yhdistelmä-DNA puhdistetaan liuoksesta sentrifugointi-pylväsmenetelmällä, jossa silikamatriksikalvo sitoo yhdistelmä-DNA:n ja päästää epäpuhtaudet kalvon läpi keräysputkeen pohjalle. Tilalle vaihdetaan puhdas putki, johon yhdistelmä-DNA irrote-

taan pois kalvolta, joko vedellä tai Tris-HCl:lla. (Haajanen ym. 2010: 103–104; Sigma-Aldrich. 2010.)

Osalle bakteerikasvustoa tehdään glyseroliseos ennen yhdistelmä-DNA:n eristystä bakteerisolusta. Näin saadaan säilöttyä geenejä myöhempiä tutkimuksia varten. Bakteerikasvustosta otetaan sopiva määrä bakteereita erilliseen säilöntäputkeen ja lisätään samassa suhteessa 100 %:sta glyserolia. Seos säilytetään -80 °C:ssa. (Addgene, Inc 2014.)

5.5 Kloonaminen Gateway Technology-menetelmällä

Bakteriofagit ovat bakteerin viruksia, jotka pystyvät infektoidessaan bakteerisolun vaihtamaan oman genominsa bakteerin genomiin. Bakteriofagin genomissa on kaksi *att*-kohtaa (*attachment*), jotka pystyvät tunnistamaan bakteerin genomissa olevat *att*-kohdat. Kun bakteriofagi tunnistaa nämä kohdat, se vaihtaa näiden paikat keskenään. Näin bakteeri alkaa tuottaa viruksen proteiineja ja jälkeläisiä, kunnes bakteerisoluhajoaa ja vapauttaa jälkeläiset. Koko tapahtumaa sanotaan transduktioksi ja genomien vaihtoa geneettiseksi rekombinaatioksi. Bakteriofagin ja bakteerin luontaista genomien vaihtoa käytetään hyväksi kloonatessa Gateway technology-menetelmällä. Menetelmä käyttää *E.coli*-bakteerin *attB1*- ja *attB2*-kohtia ja *E.coli*-bakteerin viruksen lambdafaagin *attP1*- ja *attP2*-kohtia hyväkseen heidän luomissaan vektoreissa. (Haajanen ym. 2010: 91–92; Invitrogen Corporation 2010: 3–4; Venäläinen; Solunetti 2006a; Solunetti 2006d.)

Gateway technology on kaksivaiheinen menetelmä, jonka vaiheet ovat BP-reaktio ja LR-reaktio. BP-reaktiossa tutkittava geeni siirretään menetelmään tuotettuun vektoriin ja tästä tuotettu yhdistelmä-DNA siirretään bakteeriin kloonattavaksi. LR-reaktiossa kloonattu geeni siirretään uuteen tutkimuskohtaiseen vektoriin, jonka avulla saadaan tehtyä geenille tarvittavia tutkimuksia. Myös tästä tuotettu yhdistelmä-DNA siirretään bakteeriin kloonattavaksi. (Invitrogen Corporation 2010: 3–4.)

5.5.1 BP-reaktio

Kloonattavat geenit sisältävät *attB1*- ja *attB2*-kohdat, joko PCR-reaktiossa lisättynä tai plasmidirenkaassa liitettynä, jotta menetelmässä käytettävä ”donor”-vektori (pDONR)

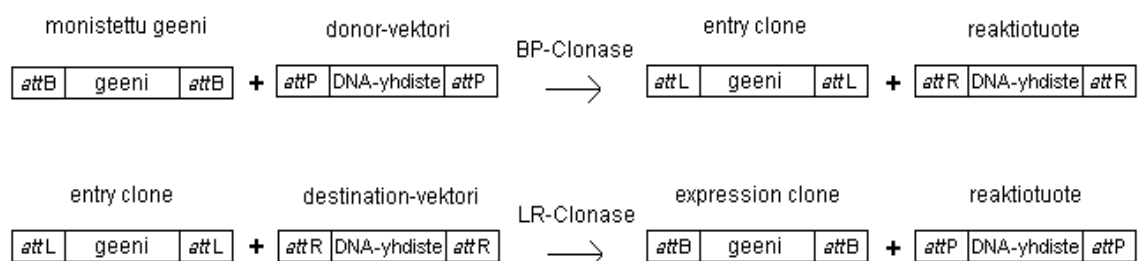
pystyy tunnistamaan ne. Rekombinaation avulla *attB*1- ja *attB*2-kohdat ja *attP*1- ja *attP*2-kohdat vaihtavat keskenään paikkaa, muodostaen *attL*1- ja *attL*2-kohdat. Muodostettua yhdistelmä-DNA:ta kutsutaan "entry clone":iksi. "Entry clone" transformoidaan *E.coli*-bakteeriin, joka lisääntyessä kopioi eli kloonaa geenin. Kloonattu geeni eristetään lopuksi bakteerista, josta se siirretään LR-reaktiossa tutkimuskohtaisiin vektoreihin. (Haajanen ym. 2010: 91–92; Invitrogen Corporation 2010: 3–4.)

Reaktion rekombinaatiota katalysoidaan "BP Clonase"-entsyymeillä, jotka tunnistavat *att*-kohdat, vaihtaa niiden paikat keskenään ja kovalentisti yhdistää DNA:n eli geenin vektoriin. Reaktio pysäytetään "Proteinase K"-reagenssillä, joka on proteiineja pilkkova entsyymi. (Invitrogen Corporation 2010: 3–4; Life Technologies Corporation 2011: 5.)

5.5.2 LR-reaktio

LR-reaktiossa kloonattu geeni siirretään "entry-clone":ista "destination"-vektoreihin, joiden avulla saadaan tehtyä geenille haluttuja tutkimuksia. Vektori sisältää *attR*1- ja *attR*2-kohdat, jotka tunnistavat "entry-clone":in *attL*1- ja *attL*2-kohdat. Rekombinaation avulla saadaan vaihdettua näiden paikat keskenään ja muodostettua tutkimukseen sopiva "expression clone". Lopuksi "expression clone" siirretään transformaatiolla *E.coli*-bakteeriin kloonattavaksi. (Invitrogen Corporation 2010: 3–4.)

Reaktio katalysoidaan "LR Clonase"-entsyymeillä, jotka tunnistavat *att*-kohdat, vaihtaa niiden paikat keskenään ja kovalentisti yhdistää DNA eli geenin vektoriin. Reaktio pysäytetään "Proteinase K"-reagenssillä. (Life Technologies Corporation 2011: 5.)



Kuvio 6. BP- ja LR-reaktion vaiheet: BP-reaktiossa siirretään tutkittava geeni kloonattavaksi "entry clone"-vektoriin. Reaktiossa "donor"-vektorin *attP*-kohdat tunnistavat monistetussa geenissä sijaitsevat *attB*-kohdat. *attB* ja *attP*-kohdat vaihtavat keskenään paikkaa niin, että myös tutkittava geeni ja ylimääräinen DNA-yhdiste vaihtavat paikkaa.

Reaktiossa muodostuu tällöin "entry clone", jonka *att*-kohtia sanotaan *attL*-kohdiksi. Ylimääräinen DNA-yhdiste siirtyy "donor"-vektorista ja muodostaa reaktiotuotteen, jonka kohtia sanotaan *attR*-kohdiksi. LR-reaktiossa siirretään kloonattu geeni "entry clone"-vektorista tutkimuskohtaiseen "destination"-vektoriin. Reaktiossa tapahtuu päinvastainen reaktio kuin BP-reaktiossa. "Entry clone":in *attL*-kohdat ja "destination"-vektorin *attR*-kohdat vaihtavat keskenään paikkaa, jolloin myös geeni ja ylimääräinen DNA-yhdiste vaihtavat paikkaa. Näin muodostuu "expression clone", jonka muodostavat *attB*-kohdat ja reaktiotuote, johon ylimääräinen DNA-yhdiste siirtyy ja johon muodostuu *attP*-kohdat. Menetelmässä tapahtuvaa reaktiota kutsutaan homologiseksi rekombinaatioksi, ja reaktioita katalysoidaan "BP"- ja "LR-Clonase"-entsyymeillä.

6 Opinnäytetyöprosessi

Työprosessi alkoi eristämällä *Arabidopsis*-kasvista RNA:ta. Näyte RNA:n eristykseen otettiin kasvin siitä kohdasta, joka ilmentää tutkittavaa geeniä. Kasvien täytyy olla kasvuvaiheessa, jolloin geenin ilmeneminen on vahvempaa. Eristetty RNA toimii geenituotteiden pohjana, josta saadaan käännteistranskription ja PCR:n avulla monistettua tutkittavat geenit. Geenipohjana käytetään mRNA:ta, sillä se ei sisällä introneita. Intronien puuttuminen lyhentää kloonattavan tuotteen pituutta ja helpottaa näin monistamista ja kloonamista. Intronit pitää myös poistaa silloin, kun halutaan ilmentää geeniä vieraassa isännässä, kuten bakteereissa ja hiivoissa, sillä ne eivät pysty muokkaamaan kasvin introneja (Haajanen ym. 2010: 69.) Eristetty RNA mitattiin spektrofotometrillä RNA:n puhtauden ja pitoisuuden varmistamiseksi. Työssä käytettiin "InviTrap® Spin Plant RNA Mini" Kittä, joka soveltuu kasvisolujen, kasvikudosten ja rihmasienten korkeanlaatuisten ja täyspitkien RNA-juosteiden eristykseen (Invsorb 2009: 2).

Geenien monistus ja erottaminen muusta DNA:sta tehtiin PCR:llä, minkä takia cDNA:n tuottaminen mRNA:sta ensin on välttämätöntä, sillä PCR:ssä monistamisen mallijuosteena toimii ainoastaan DNA. mRNA:ta ei myöskään voi siirtää rekombinaatioentsyymien avulla myöhemmin kloonattavaan vektoriin. Ennen mRNA:n monistamista ja kääntämistä cDNA:ksi, RNA:sta poistettiin kaikki ylimääräinen DNA. Tämä tehtiin, jotta PCR-vaiheessa ei monistettaisi ylimääräistä DNA:ta tutkimukseen. RNA puhdistettiin "DNase I, RNase-free" kitillä ja käännteistranskriptio tehtiin "iScript™ cDNA Synthesis" Kitillä. (Brown T.A 2006: 166; Haajanen ym. 2010: 170.)

Tuotetusta cDNA:sta tehtiin PCR-reaktiot, jotta saataisiin erotettua ja monistettua ainoastaan kiinnostuksen kohteena olevat geenit. Kiinnostavat geenit saatiin erotettua muusta DNA:sta geenituotteelle spesifeillä alukkeilla, jotka lisättiin PCR-reaktioon.

Alukkeet suunniteltiin niin, että ne kiinnittyvät ainoastaan tutkittaviin geeneihin. PCR-reaktion lopputuotteena oli tämän jälkeen suuri määrä tutkittavaa geeniä. Alukkeet sisälsivät myös Gateway technology-menetelmässä tarvittavat *attB1*- ja *attB2*-kohdat. Alukkeiden ja PCR-reaktion onnistuminen ja luotettavuus varmistettiin aina geelielektroforeesilla. Lopputuloksena geelissä pitäisi näkyä ainoastaan tutkittavien geenien DNA-juosteet. DNA eli tutkittavat geenit eristettiin tämän jälkeen PCR-reaktion lopputuotteesta ja mitattiin spektrofotometrillä. PCR-reaktiot tehtiin "High-Fidelity DNA Polymerase" kitillä ja DNA eristettiin PCR-reaktion lopputuotteesta "GeneJET PCR Purification" kitillä.

Monistetut geenit kloonattiin seuraavaksi Gateway technology-menetelmän BP-reaktiolla. Ennen menetelmän aloittamista mitattiin geenien konsentraatio spektrofotometrillä, sillä menetelmän reaktiot vaativat tietyn konsentraation. BP-reaktiossa tuotetut "entry clone"-vektorit transformoitiin *E.coli*-bakteeriin kloonattavaksi, ja eristettiin kloonauksen jälkeen bakteerista. Yhdistelmä-DNA:n eristys tarkistettiin spektrofotometrillä sekä geelielektroforeesilla ja kloonatut geenit sekvensoinnilla.

Kloonattu geeni siirrettiin tämän jälkeen LR-reaktion avulla kolmeen tutkimuskohtaiseen "destination"-vektoriin. Vektorit olivat pBA 002 HA, pER8 HA ja pK26w7. Vektorit transformoitiin *E.coli*-bakteeriin ja eristettiin bakteerista kloonauksen jälkeen. Myös tässä vaiheessa yhdistelmä-DNA:n eristys tarkistettiin spektrofotometrillä ja geelielektroforeesilla, ja kloonatut vektorit tarkistettiin sekvensoinnilla.

Geenin kloonauksen ja geenin siirto vektoriin tehtiin "Gateway®technology" kitillä. Plasmidin transformaatio *E.coli*-bakteeriin tehtiin tutkimusryhmän ohjeilla ja plasmidin eristys "GenElute™ Plasmid Miniprep" Kitillä.

6.1 Sekvensointi

Työssä sekvensoitavat näytteet lähetettiin maksua vastaan Haartmannin yksikköön sekvensoitavaksi. Geenit sekvensoitiin, jotta saatiin varmistettua, että tutkittavat geenit ovat säilyneet virheettöminä koko prosessin ajan. Työssä tarvittavat sekvensoinnit tehtiin BP-reaktion ja LR-reaktion jälkeen. Sekvensointi tehtiin Sangerin menetelmällä.

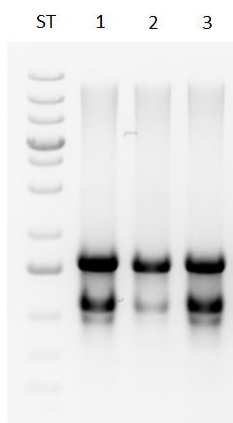
6.2 Spektrofotometrinen analyysi

Näytteiden pitoisuudet ja puhtauden mitattiin Nanodrop spektrofotometrillä. Analyysillä voidaan helposti mitata DNA:n ja RNA:n pitoisuus ja puhtaus, sillä molempien absorptiomaksimi on 260 nm, kun taas proteiinien absorptiomaksimi on 280 nm. Kun näitä kahta absorptiomaksimia vertaillaan keskenään, saadaan DNA:n ja RNA:n puhtaus. Puhtaan DNA:n suhde $A^{260\text{nm}}/A^{280\text{nm}}$ on 1,8 ja RNA:n 2,0. Tässä työssä oli tarkoituksena saada puhtaus väille 1,8-2,1. Jos suhde on pienempi kuin 1,8, on näytteessä todennäköisesti proteiinikontaminaatio. (Jauhiainen, Niko – Juntunen, Milka – Lahtinen, Eliisa 2009: 13–14.)

7 Tulokset

7.1 RNA:n eristys tulokset

RNA:ta eristettiin kolmesta versosta, joista tehtiin eristuksen jälkeen geelielektroforeesi ja spektrofotometrinen mittaus. Näin saatiin varmistettua RNA eristuksen onnistuminen ja RNA:n puhtaus. Tulokset osoittivat, että kaikista näytteistä saatiin puhdasta RNA:ta (kuvio 7). Kolmesta näytteestä otettiin yksi näyte tarvittavaan tutkimukseen. Näytteiden nimet tulivat kasvin tutkimusnimestä (columbia-0).



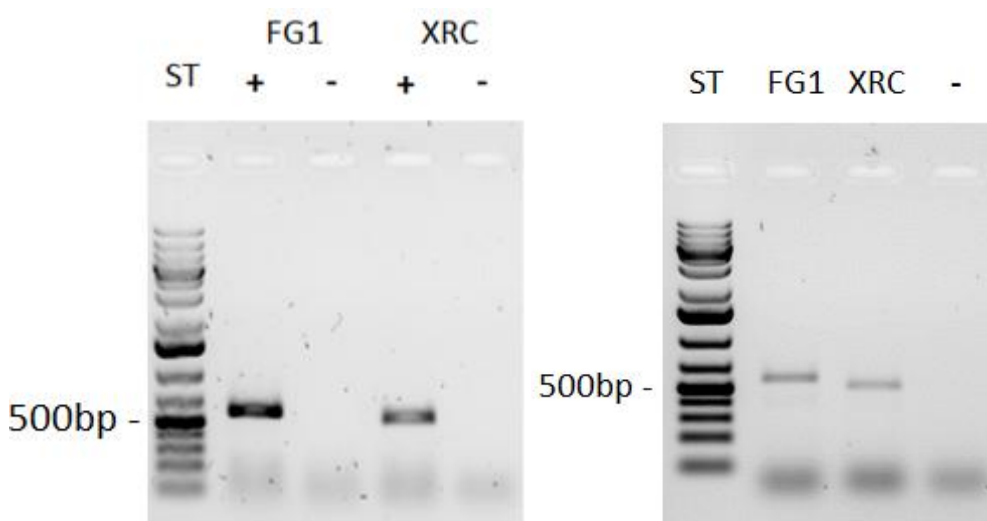
| Näyte | Pvm | Konsentraatio | Yksikkö | 260/280 | 260/230 | Näyte tyyppi |
|--------------|----------|---------------|---------|---------|---------|--------------|
| columbia-0#1 | 19/02/14 | 771,9 | ng/μl | 2,06 | 2,16 | RNA |
| columbia-0#2 | 19/02/14 | 498,6 | ng/μl | 2,1 | 1,99 | RNA |
| columbia-0#3 | 19/02/14 | 799,7 | ng/μl | 2,07 | 2,12 | RNA |

Kuvio 7. Geelielektroforeesin ja spektrofotometrinen tulokset. Geelielektroforeesissa näkyvät selvät juosteet, jokaisen näytteen kohdalla, mikä tarkoittaa sitä, että jokaisessa näytteessä on eristettyä RNA:ta. Spektrofotometrinen tuloksissa absorptiosuhde on 1,8–2,1 välillä, mistä voidaan päätellä, että näytteet ovat RNA:ta.

7.2 Käänteistranskriptio- ja PCR-tulokset

RNA:sta käänteistranskriptiolla tuotettu cDNA, käytettiin PCR-reaktioiden pohjana. Ensin monistettiin kloonattavat geenit ja seuraavaksi kiinnitettiin rekombinaatioentsyymien tunnistuskohdat. PCR-reaktioiden geelielektroforeesituloksista (kuvio 8) nähdään, että reaktiot ovat onnistuneet ja että reaktiotuotteet ovat oikean kokoiset. Geenien koko oli noin 500 emäsparin luokkaa ja kun vertaillaan geelielektroforeesin juosteita standardiin, voidaan päätellä, että PCR-reaktiossa monistettujen geenien koko on myös 500 emäsparia. Tämä tarkoittaa sitä, että reaktiossa on monistettu tutkimuksessa kloonattavia geenejä.

Lopullisesta PCR-reaktiotuotteesta mitattiin spektrofotometrillä DNA:n puhtaus, jotta saatiin varmuus, ettei reaktiossa ole ilmennyt epäpuhtauksia. Tulos näkyy kuviossa 9, jossa absorbanssi 260/280 on välillä 1,8-2,1. Tämä tarkoittaa sitä, ettei näytteessä ole epäpuhtauksia.



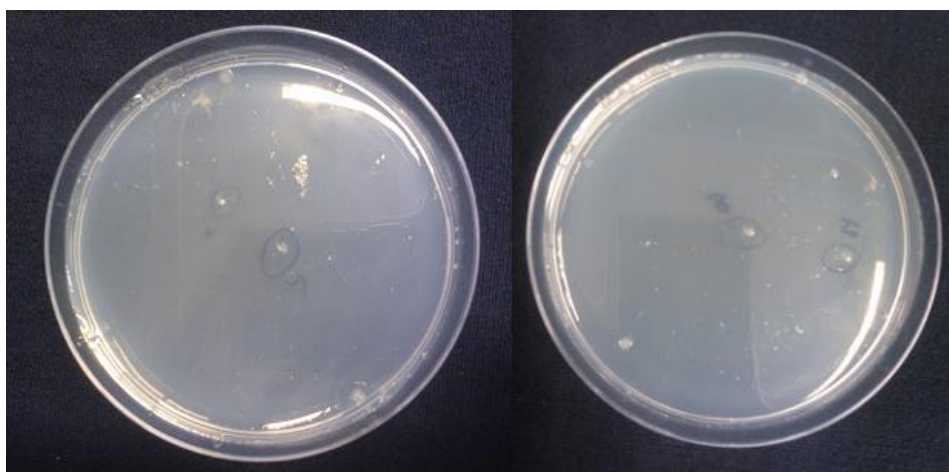
Kuvio 8. Molemmissa geelielektroforeeseissa näkyy selkeät juosteet, josta voitiin päätellä, että PCR-reaktiossa on monistettu tutkittavat geenit. Molempien geenien pituudet ovat luokkaa 500 emäsparia ja kun vertailtiin juovien pitoisuuksia standardiin, saatiin myös geelielektroforeesissa geeneille luokkaa 500 emäsparia. Mukaan oli otettu myös negatiiviset näytteet kontrolliksi, joista ei erota juostetta geelielektroforeesissa.

| Näyte | Pvm | Konsentraatio | Yksik- kö | 260/280 | 260/230 | Näyte tyyppi |
|-------|-----------|---------------|--------------|---------|---------|-----------------|
| FG1 | 29.1.2014 | 22,9 | ng/ μ | 1,92 | 0,26 | DNA |
| XRC | 29.1.2014 | 20,4 | ng/ μ | 1,92 | 0,65 | DNA |

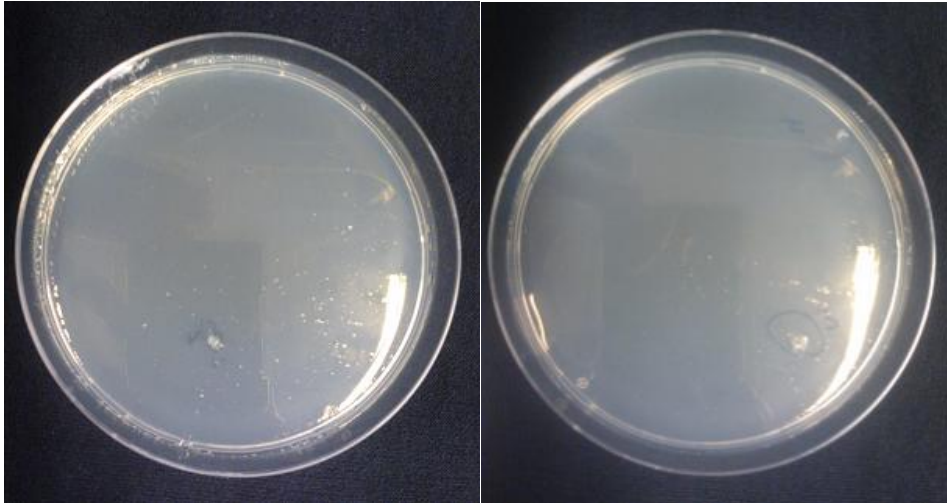
Kuvio 9. PCR-reaktioiden jälkeen mitattiin spektrofotometrillä näytteiden puhtauden. Tulos osoitti, että absorbanssi 260/280 nm oli välillä 1,8–2,1, mikä tarkoittaa sitä, että näytteessä on DNA:ta.

7.3 BP- reaktion tulokset

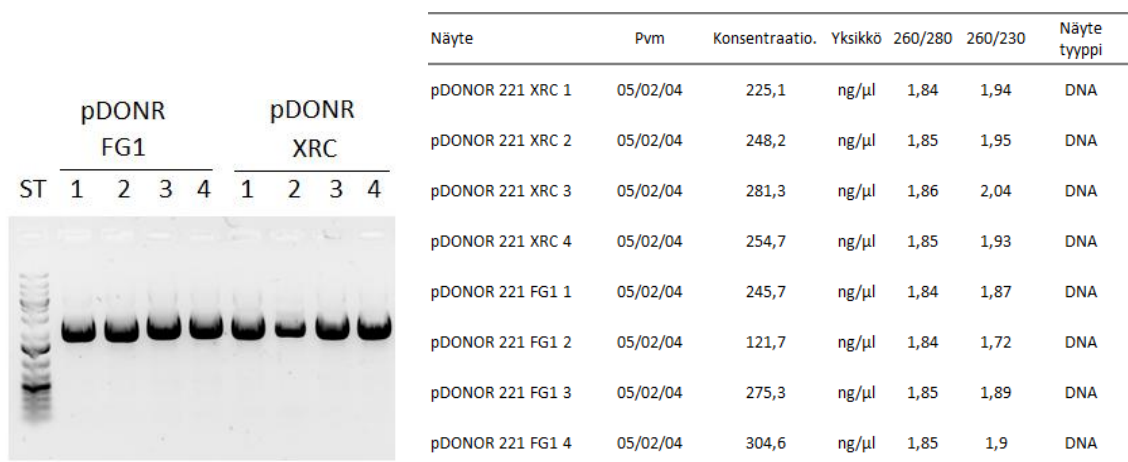
BP-reaktion jälkeen transformoidut bakteerit viljeltiin selektiiviselle maljalle kasvamaan. Onnistunut transformaatio näkyy maljoilla bakteeripesäkkeinä. Bakteeripesäkkeet näkyvät kuviossa 10 ja 11 valkoisina pisteinä. Molempien geenien transformaatiosta viljeltiin kaksi selektiivistä maljaa, jotta saatiin varmasti onnistunut transformaatio. Kuvista nähdään, että kasvua oli kaikissa maljoissa. Yhdestä maljasta otettiin kaksi bakteeripesäkettä, jolla varmistettiin ainakin yhdestä pesäkkeestä onnistunut yhdistelmä-DNA eristys. Onnistunut yhdistelmä-DNA eristys varmistettiin geelielektroforeesilla ja spektrofotometrimittauksella. Kuviossa 12 nähdään geelielektroforeesissa juosteet, jotka osoittavat, että näytteissä on yhdistelmä-DNA:ta. Spektrofotometrimittauksen tulos osoitti myös, että näytteet sisälsivät puhdasta DNA:ta.



Kuvio 10. Kaksi selektiivistä maljaa, jossa näkyy FG1-geenin onnistunut transformaatio. Maljalla näkyy bakteeripesäkkeet valkoisina pisteinä. Molemmista maljoista on otettu kaksi pesäkettä.

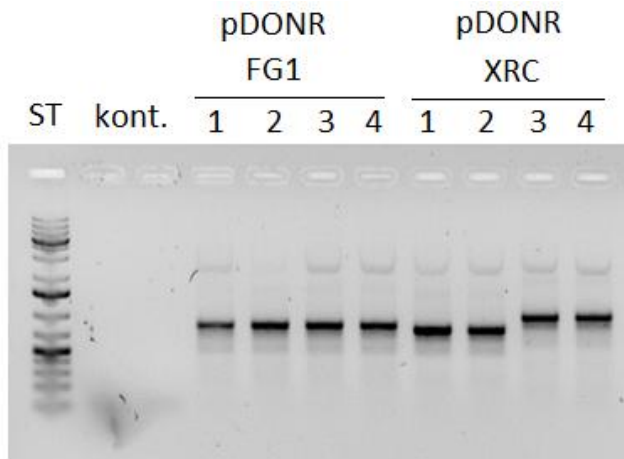


Kuvio 11. Kaksi selektiivistä maljaa, jossa näkyy XRC-geenin onnistunut transformaatio. Maljalla näkyy bakteeripesäkkeet valkoisina pisteinä. Molemmista maljoista on otettu kaksi pesäkettä.



Kuvio 12. Bakteerista eristetyistä yhdistelmä-DNA:sta tehtiin geielektroforeesi ja spektrofotometrinen mittaus. Geielektroforeesissa näkyvät juosteet osoittavat, että näytteestä on eristetty plasmidia. Spektrofotometrin tulos oli välille 1,8-2,1, jolloin voidaan todeta näytteen sisältävän puhdasta DNA:ta.

Lopuksi tehtiin PCR-reaktio eristetyistä plasmidinäytteistä, jotta geenit saatiin lähetettyä sekvensoitavaksi. PCR-reaktion geielektroforeesitulos näkyy kuviossa 13.

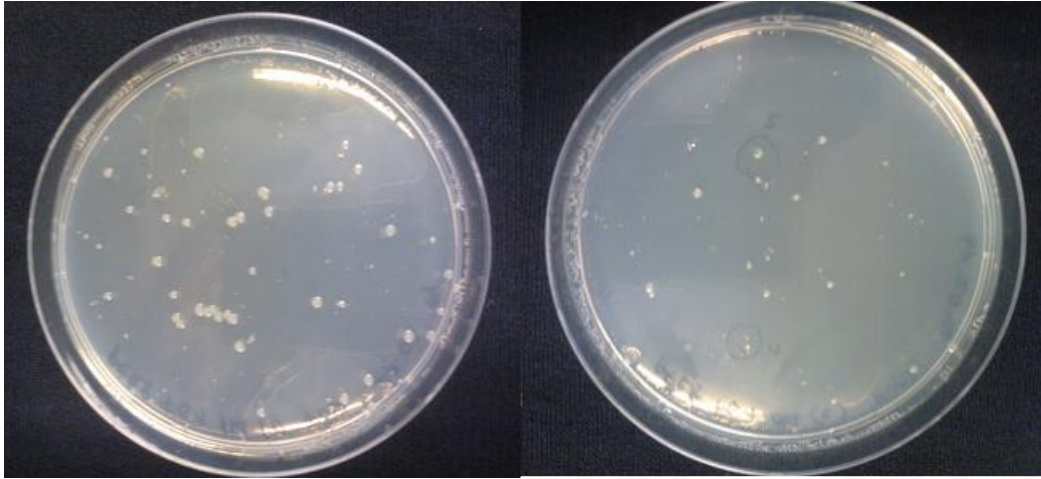


Kuvio 13. Eristetyistä näytteistä tehtiin PCR-reaktio, jonka geielektroforeesi näyttää geenien juosteet. PCR-reaktion lopputuotteesta lähetettiin näyte sekvensoitavaksi.

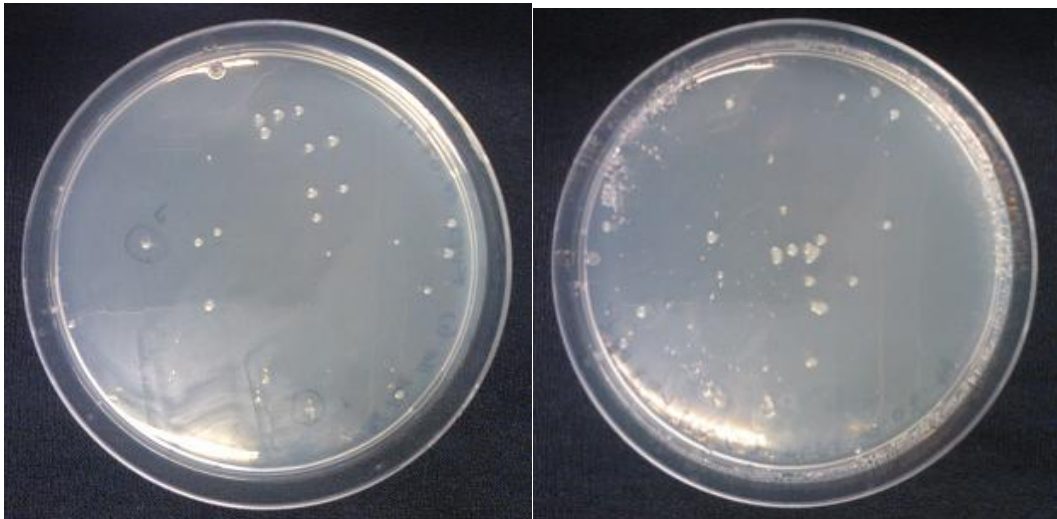
7.4 LR-reaktion tulokset

FG1 ja XRC geenit siirrettiin LR-reaktiossa kolmeen vektoriin pER8 HA, pBA 002 HA ja pK26w7, joista pER8 HA- ja pBA 002 HA-vektoriin saatiin onnistuneesti siirrettyä geenit. pK26w7-vektorin transformaatioissa ei saatu ollenkaan bakteeripesäkkeitä, mikä tarkoittaa epäonnistunutta transformaatiota. Epäonnistuneen transformaation takia ei saatu kloonattua tai eristettyä yhdistelmä-DNA:ta, jotka olisivat sisältäneet pK26w7-vektoria.

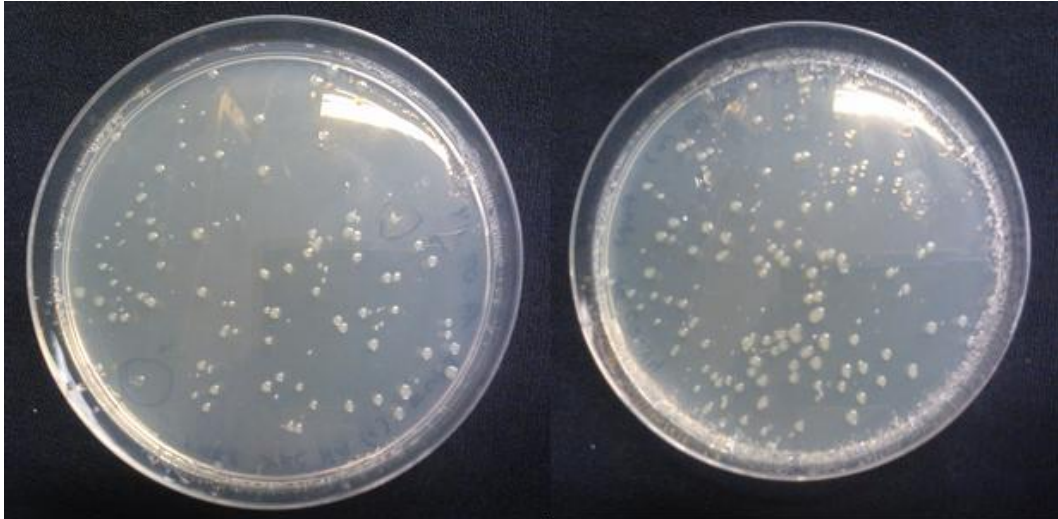
Prosessi oli sama kuin BP-reaktiossa. Onnistunut transformaatio näkyy kaikissa maljoissa bakteeripesäkkeinä, mikä tarkoittaa sitä, että geeni saatiin siirrettyä bakteeriin kloonattavaksi (Kuvat 14-17). Yhdestä tuotetusta vektorista viljeltiin kaksi maljaa, jotta saatiin varmasti onnistunut transformaatio.



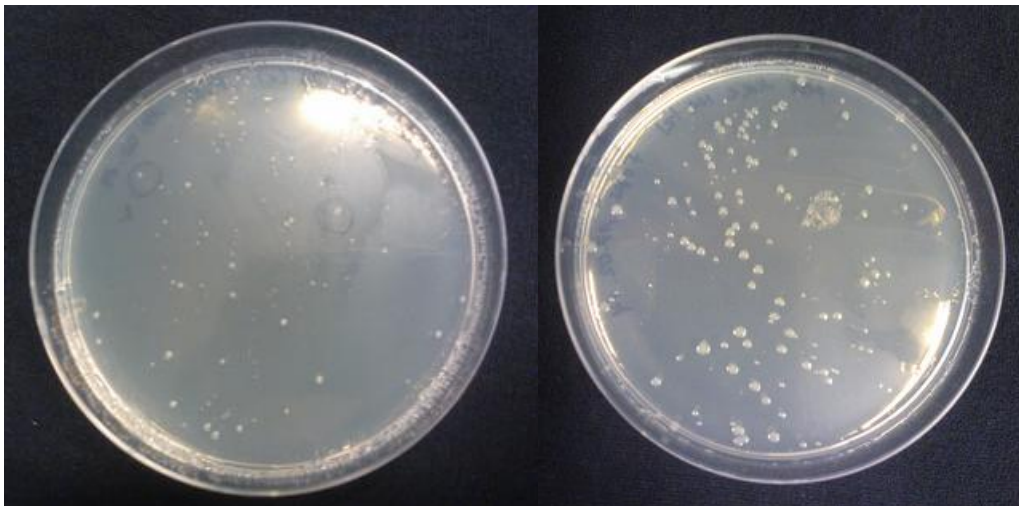
Kuvio 14. Kuvat pER8 HA-vektorin ja geenin FG1:n onnistuneesta transformaatiosta.



Kuvio 15. Kuvat pBA 002 HA-vektorin ja geenin FG1:n onnistuneesta transformaatiosta.

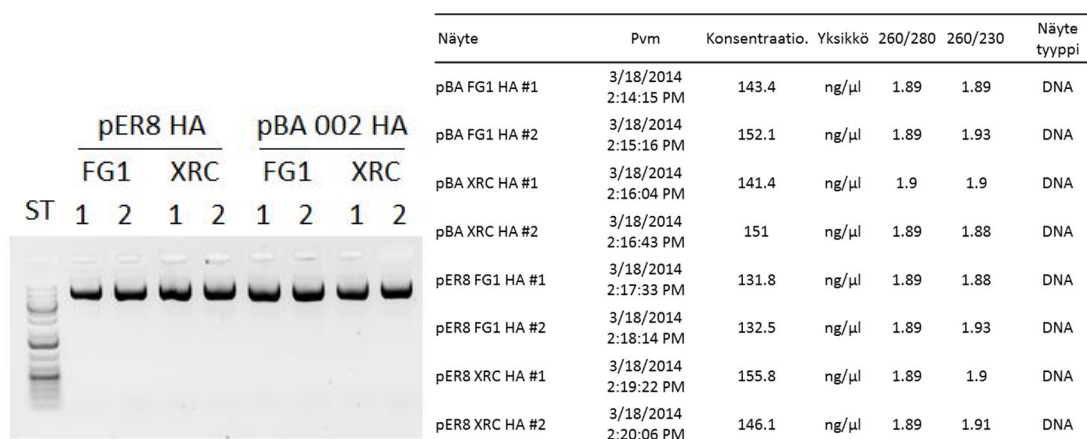


Kuvio 16. Kuvat pER8 HA-vektorin ja geenin XRC:n onnistuneesta transformaatiosta.



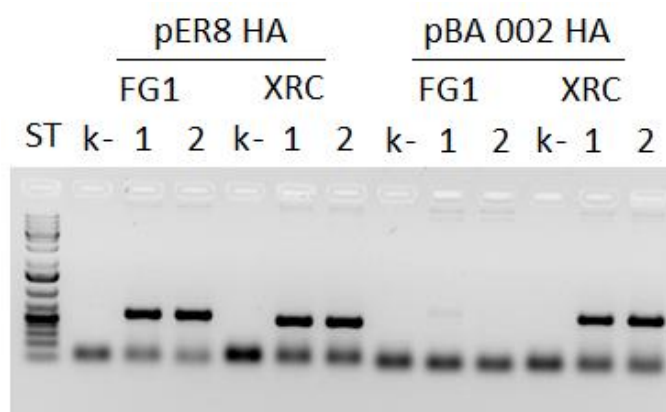
Kuvio 17. Kuvat pBA 002 HA-vektorin ja geenin XRC:n onnistuneesta transformaatiosta.

Jokaisesta maljasta otettiin kaksi bakteeripesäkettä plasmidin eristykseen. Eristetyistä näytteistä tehtiin kaikille geelielektroforeesi ja spektrofotometrinen mittaus, joka osoitti, että näytteet sisältävät yhdistelmä-DNA:ta (kuvio 18).



Kuvio 18. Geelielektroforeesin ja spektrofotometrimittauksen tulokset eristetyistä näytteistä osoittavat, että näytteet sisälsivät yhdistelmä-DNA:ta. Geelielektroforeesissa näkyvät selvät juosteet ja spektrofotometrimittauksen tulokset, jotka ovat välillä 1,8-2,1 ovat merkki siitä, että näyte sisälsi puhdasta DNA:ta.

Lopuksi tehtiin näytteille PCR-reaktio, jotta geenit saatiin tarkistettua sekvensoinnilla. PCR-reaktion geelielektroforeesitulos näkyy kuviossa 19.



Kuvio 19. Geelielektroforeesi PCR-reaktiosta, jossa on monistettu geenit vektoreista. PCR-reaktion lopputuotteesta lähetettiin näyte sekvensoitavaksi.

7.5 Sekvensointitulokset

BP- ja LR-reaktiossa eristetyt vektorit lähetettiin sekvensoitavaksi Haartmannin yksikköön. Sekvensointitulos osoitti, että geenit FG1 ja XRC ovat pysyneet virheettöminä koko prosessin ajan. Tämä tarkoittaa sitä, että BP-reaktiossa saatiin kloonattua geenit ilman virheitä ja LR-reaktiossa geenit siirrettiin onnistuneesti kahteen tutkimuskohtaiseen vektoriin.

8 Johtopäätökset ja pohdinta

Saadun sekvensointituloksen perusteella voidaan luotettavasti todeta, että geenit FG1 ja XRC kloonattiin ja siirrettiin onnistuneesti Gateway Technology-menetelmän reaktiolla pBA 002 HA- ja pER8 HA-vektoreihin. Vektoreita voidaan tämän perusteella myös jatkossa käyttää luotettavasti tarvittaviin tutkimuksiin eli siirtää kasveihin yliekspressiota ja indusoitua ilmenemistä varten.

FG1 ja XRC geenien siirto ja kloonaminen eivät onnistuneet pK26w7-vektoriin, sillä LR-reaktiossa ei saatu minkäänlaista bakteerikasvustoa maljalle. Tämä tarkoittaa sitä, että LR-reaktiossa luotua yhdistelmä-DNA:ta ei saatu transformoitua bakteeriin niin, että bakteerit olisivat alkaneet lisääntyä kasvatusmaljalla, ja kopioimaan geenejä. Tämän takia ei ollut yhdistelmä-DNA:ta, eli geeniä, jota olisi voitu eristää bakteerista. Tämä voi johtua monesta syystä. Bakteeri on voinut esimerkiksi kuolla transformaatiokäsittelyn aikana, tai antibioottigeeni ei ole välttämättä ehtinyt ilmentyä bakteerisolussa, minkä takia bakteeri on voinut kuolla antibioottia sisältävällä kasvatusmaljalla, tai virhe on voinut tapahtua Gateway Technology-menetelmän aikana. Jos FG1 ja XRC geeneille halutaan tehdä jatkossa tutkimuksia pK26w7-vektorilla, täytyy koko prosessi tehdä uudestaan.

Yritin kahteen kertaan saada geenejä siirrettyä pK26w7 vektoriin LR-reaktiolla, mutta kummallakaan kerralla en saanut bakteeripesäkkeitä kasvatusmaljalle. Ensimmäisellä kerralla bakteerit viljeltiin väärälle antibioottia sisältävälle maljalle, jolloin kasvua oli liikaa. Tämän takia ei voida sanoa varmasti, mikä bakteeripesäke sisältää halutun geenin. Toisella kerralla virheen uskon sattuneen LR-reaktiossa, jossa entsyymien loppuminen johti reaktion heikkoon katalysointiin, sillä kitistä loppui "LR-Clonase"-entsyymi kesken.

Tein myös BP-reaktio kahteen kertaan, sillä ensimmäisellä kerralla laimennos oli liian suuri, jolloin geenejä ei ollut tarpeeksi näytteessä. Tämän takia ei saatu mitään tulosta transformaatiosta, koska geenejä ei saatu tarpeeksi siirrettyä vektoriin tai bakteeriin. Seuraavalla reaktiolla laimennos oli sopiva ja geenit saatiin onnistuneesti siirrettyä vektoriin ja bakteeriin ja näin jatkettua prosessi loppuun asti.

8.1 Lopuksi

Koin opinnäytetyön erittäin opettavaiseksi ja mielestäni työtä oli mukavaa ja mielenkiintoista tehdä. Aihe sinänsä ei ollut kovinkaan tuttu, joten aluksi työn hahmottaminen oli vaikeaa. Ohjaajani olivat kuitenkin erittäin päteviä ja opettivat kärsivällisesti kaiken mitä en ymmärtänyt, ohjaajille iso kiitos tästä. Sain myös käsiini erittäin hyvän kirjan (Geenitekniikka, Turun ammattikorkeakoulu), joka sisälsi suurimman osan työprosessissa käytetyistä menetelmistä. Sen avulla sain myös suomeksi tietoa aiheesta, mikä helpotti suuresti työn kirjoittamista ja ymmärtämistä. Muuten kaikki työohjeet olivat englanniksi ja myös työskentely oli englanniksi. Tästä ei kuitenkaan ollut mitään haittaa, vaan päinvastoin sain hyvin harjoittaa englanninkielen taitojani.

Ainoa tekijä mikä jäi harmittamaan, oli se, etten saanut kloonattuja geenejä siirrettyä pK26w7 vektoriin. Ajan loppuessa piti todeta, että prosessia ei tämän osalta saatu loppuun asti. Tämän takia opinnäytetyön tarkoitus ei kokonaan täytynyt. Olen silti erittäin tyytyväinen, että sain siirrettyä ja kloonattua geenit kahteen vektoriin, joita Mirko Pavicic voi käyttää väitöskirjassaan.

Eettisyyden kannalta koin tärkeäksi tehdä työn tarkasti ja luotettavasti alusta loppuun asti ja ajatuksena oli, että saan kaiken tehtyä niin hyvin, että tutkimusryhmälle on oikeasti käyttöä työlle. Työskentelin ja noudatin ohjeita mahdollisimman tarkasti ja yritin työskennellä niin, että tulokset ovat luotettavat. Kirjasin päivittäin ylös mahdollisimman tarkasti kaikki mitä olen päivän aikana tehnyt, jotta tutkimusryhmällä on mahdollista löytää tiedot tarvittaessa. Tutkimusryhmän pyynnöstä työssä käytettyjen geenien oikeat nimet vaihdettiin ja keksittiin tilalle koodinimet, jotta tutkimusryhmän tutkimusaiheita tai tuloksia ei tule esiin tässä työssä. En myöskään julkaise mitään, mikä liittyy läheisesti heidän tutkimusaiheeseen. Prosessin aikana ehdittiin myös pitää muutama palaveri, jossa käytiin muiden tutkimusryhmän jäsenten kanssa läpi saavutettuja tuloksia. Tämä helpotti paljon hahmottamaan oman työn ja koko ryhmän työn kokonaisuutta ja tutkimusaihetta.

Opinnäytetyön lopputulokseen olen tyytyväinen ja mielestäni työstä tuli toimiva kokonaisuus. Toivon, että työstä on hyötyä sille, joka haluaa pohjan lyhyiden DNA-jaksojen kloonamiseen, jossa käytetään hyödykseen vektoreita ja *E.coli*-bakteeria.

Lähteet

- Addgene, Inc. 2014. Creating Bacterial Glycerol Stocks for Long-term Storage of Plasmids. Verkkodokumentti.
<http://www.addgene.org/plasmid_protocols/create_glycerol_stock/>. Luettu 11.5.2014.
- Brown T.A. 2006. Gene cloning & DNA analysis. An introduction. Oxford: Blackwell Publishing
- Bio-Rad Laboratories. 2000. iScript™ cDNA Synthesis Kit. pdf-tiedosto.
<<http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/4106228C.pdf>>. Luettu 20.4.2014.
- Cold Spring Harbor Laboratory. 2003. Transferring and storing. Verkkodokumentti.
<<http://www.dnai.org/b/index.html>>. Luettu 6.4.2014.
- Finnzymes. 2010. High-fidelity DNA polymerase. Espoo: Finnzymes oy. pdf-tiedosto.
<<http://sevierlab.vet.cornell.edu/resources/Phusion.pdf>>. Luettu 29.3.2014.
- Haajanen, Kari – Pelkonen, Jani – Pärssinen, Raimo – Suominen, Ilari 2010. Geenitekniikka. Saarijärvi: Turun ammattikorkeakoulu.
- Himanen, Kristiina 2013a. PowerPoint. FUPS summary Metropolia.
- Himanen, Kristiina 2013b. Word-tiedosto. The role of ubiquitin proteasome system in flower development.
- Holmberg-Still, Carina 2013. Tutkijat löysivät solun puhtaanapitojärjestelmää säätelevän mekanismin - tuloksilla voi olla merkitystä muun muassa Alzheimerin taudin ja syöpien hoidossa. Suomen Akatemia. Verkkodokumentti.
<<http://www.aka.fi/fi/A/Suomen-Akatemia/Mediapalvelut/Ajankohtaiset-utiset/Tutkijat-loysivat-solun-puhtaanapitojarjestelmaa-saatelevan-mekanismi/>>. Luettu 27.11.2013.
- Invitrogen Corporation. 2010. Gateway® Technology. pdf-tiedosto.
<[file:///C:/Users/Santsa/Downloads/gatewayManual%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/Santsa/Downloads/gatewayManual%20(1).pdf)>. Luettu 20.4.2014.
- Jauhiainen, Niko – Juntunen, Milka – Lahtinen, Eliisa. 2009. Työohjeen laatiminen DNA-tutkimusmenetelmille Mosambikin bioanalytiikan koulutusohjelman molekyylibiologian ja geenitekniologian harjoituskokonaisuuteen. Kuopio. Opinnäytetyö.
<https://publications.theseus.fi/bitstream/handle/10024/5821/Lahtinen_Eliisa.pdf?sequence=1>. Luettu 7.5.2014.
- Life Technologies Corporation. 2011. E. coli Expression System with Gateway® Technology. pdf-tiedosto.
<[file:///C:/Users/Santsa/Downloads/ecoli_gateway_man%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/Santsa/Downloads/ecoli_gateway_man%20(1).pdf)>. Luettu 20.4.2014.
- Invisorb. 2009. Instruction for the InviTrap® Spin Plant RNA Mini Kit. Invitex. pdf-tiedosto. <<http://www.biomarket.cc/UpFiles/product/InviTrapSpinPlantRNAMiniKit.pdf>>. Luettu 15.3.2014.

Jones, Russel – Ougham, Helen – Thomas, Howard – Waaland, Susan 2012. The molecular life of plants. Wiley-Blackwell.

Luontoportti. 2014. Lituho. Verkkodokumentti.
<<http://www.luontoportti.com/suomi/fi/kukkakasvit/lituho>>. Luettu 14.3.2014.

Mäki-Kihniä, Nina 2013. Kukan kehitystä ohjaavat ubikitiinisignaalit. Tietysti.fi. Verkkodokumentti.
<<http://www.aka.fi/fi/T/Nuoret/Uusin-silmin/Esittelyssa-kuukauden-tutkija/Kukan-kehitysta-ohjaavat-ubikitiinisignaalit/>>. Luettu 29.11.2013.

Salo, Helena. 1997. Kantajavektorit. ©Internetix. Verkkodokumentti.
<<http://materiaalit.internetix.fi/fi/opintojaksot/5luonnontieteet/biologia/geenitekniikka/kan-kantajavekto>>. Luettu 22.5.2014.

Sigma-Aldrich. 2010. GenElute™ Plasmid Miniprep Kit. St. Louis. pdf-tiedosto.
<<https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Bulletin/pln70bul.pdf>>. Luettu 20.4.2014.

Solunetti. 2006a. Genetiikka. Verkkodokumentti.
<<http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/genetiikka/>>. Luettu 22.4.2014.

Solunetti. 2006b. Nukleiinihappojen geielektroforeesi. Verkkodokumentti.
<http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/nukleiinihappojen_geielektroforeesi/2/>. Luettu 6.4.2014.

Solunetti. 2006c. Proteiinien tehtäviä. Verkkodokumentti.
<http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/valkuaisaineiden_tehtavia/2/>. Luettu 7.1.2014.

Solunetti. 2006d. Transduktio. Verkkodokumentti.
<<http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/transduktio/2/>>. Luettu 22.4.2014.

Solunetti. 2006e. Virusvektorit. Verkkodokumentti.
<<http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/virusvektorit/2/>>. Luettu 6.4.2014.

Thermo Scientific. 2012a. DNase I, RNase-free. Thermo Fisher Scientific Inc. pdf-tiedosto. <<http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/4106228C.pdf>>. Luettu 29.3.2014.

Thermo Scientific. 2013b. GeneJET PCR Purification Kit. Thermo Fisher Scientific Inc. pdf-tiedosto. <<http://www.thermoscientificbio.com/uploadedFiles/Resources/k070-product-information.pdf>>. Luettu 5.4.2014.

Venäläinen, Rosa. Lysogeniassa faagi kiinnittyy bakteerin genomiin - lysissä syntyy faagijälkeläisiä. Otavan Opisto. Verkkodokumentti.
<http://opinnot.internetix.fi/fi/muikku2materiaalit/lukio/bi/bi5/3_seka_alkeistumallisten_bakteeie_etta_aitotumaisten_elioiden_geenit_ovat_dna-jaks-ja/3.1_mikrobit_ovat_bakteereja__viruksia_ja_muita_mikroskooppisen_pienia_elielio/3>.

1.5.3_lyysi_ja_lysojenia?C:D=hNCH.gWwR&m:selres=hNCH.gWwR>. Luettu
27.4.2014.

Työohjeet

InviTrap® Spin Plant RNA Mini Kit, Invisorb 2009

Scheme

Please work quickly and perform all extraction steps at room temperature (RT)!

| | |
|--|--|
| | <p>Please read the protocols carefully prior to the start of the preparation procedure!</p> <p>homogenization of the sample under liquid nitrogen (Prevent thawing of the starting material!)</p> <p>Note: Homogenize the carrier in the Lysis Solution DCT or RP by shaking and mix it with DTT or β-Mercaptoethanol.</p> <p>add 900 μl Lysis Solution DCT or Lysis Solution RP to maximal 100 mg tissue powder mix thoroughly by vortexing, incubate for 15 – 30 min under continuously shaking or vortexing centrifuge for 1 min at maximum speed</p> <p>place a Prefilter in a 2.0 ml Receiver Tube transfer the supernatant carefully into the Prefilter centrifuge for 1 min at 9.300 x g (10.000 rpm) discard the Prefilter</p> <p>add 500 μl of 96 – 100% ethanol to the filtrate, mix thoroughly by pipetting up and down</p> <p>transfer the lysate onto the RNA binding RTA Spin Filter and centrifuge for 1 min at 9.300 x g (10.000 rpm) discard the flow-through and place the RTA Spin Filter back into the RTA Receiver Tube</p> <p>transfer the residual sample into the same RTA Spin Filter and centrifuge again for 1 min at 9.300 x g (10.000 rpm) discard the flow-through and place the RTA Spin Filter back into the RTA Receiver Tube</p> <p>pipet 500 μl Wash Buffer R1 onto the RTA Spin Filter and centrifuge for 30 sec at 9.300 x g (10.000 rpm) discard the flow-through and reuse the RTA Receiver Tube</p> <p>pipet 700 μl Wash Buffer R2 onto the RTA Spin Filter and centrifuge for 30 sec at 9.300 x g (10.000 rpm) discard the flow-through and reuse the Receiver Tube (repeat this washing step once)</p> <p>to eliminate any traces of ethanol, centrifuge for 3 min at \geq 13.400 x g (12.000 rpm) discard the RTA Receiver Tube</p> <p>transfer the RTA Spin Filter into a RNase free Elution Tube pipet 30-60 μl of Elution Buffer R onto the membrane of the RTA Spin Filter, incubate for 2 min and centrifuge for 1 min at 9.300 x g (10.000 rpm) discard the RTA Spin Filter place the eluted total RNA immediately on ice</p> |
|--|--|

DNase I, RNase free, Thermo Fisher Scientific 2010

Removal of genomic DNA from RNA preparations

1. Add to an RNase-free tube:

| | |
|--|----------|
| RNA | 1 µg |
| 10X reaction buffer with MgCl ₂ | 1 µl |
| DNase I, RNase-free | 1 u |
| DEPC-treated Water (#R0601) | to 10 µl |

2. Incubate at 37°C for 30 min.

3. Add 1 µl 50 mM EDTA and incubate at 65°C for 10 min. RNA hydrolyzes during heating with divalent cations in the absence of a chelating agent (5). Alternatively, use phenol/chloroform extraction.

4. Use the prepared RNA as a template for reverse transcriptase.

Note

- Do not use more than 1 u of DNase I, RNase-free per 1 µg of RNA.
 - If using DNase I, HC, enzyme can be diluted in 1X DNase reaction buffer just prior to use, or in storage buffer (not supplied *see composition on reverse page*) for longer storage.
 - Volumes of the reaction mixture and 50 mM EDTA solution can be scaled up for larger amounts of RNA. The recommended final concentration of RNA is 0.1 µg/µl.
 - Thermo Scientific Ribolock RNase Inhibitor (#E00381), typically at 1 u/µl, can also be included in the reaction mixture to prevent RNA degradation.
- Removal of template DNA after *in vitro* transcription**
1. Add 2 u of DNase I, RNase-free per 1 µg of template DNA directly to a transcription reaction mixture. In some cases, the amount of enzyme should be determined empirically.
 2. Incubate at 37°C for 15 minutes.
 3. Inactivate DNase I by phenol/chloroform extraction.

DNA labeling by nick-translation

1. Mix the following components:

| | |
|---|---------------------------|
| 10X reaction buffer for DNA Polymerase I | 2.5 µl |
| Mixture of 3 dNTPs, 1 mM ⁺ each (without the labeled dNTP) | 1.25 µl |
| [α - ³² P]-dNTP, ~110 TBq/mmol (3000 Ci/mmol) | 1.85-3.7 MBq (50-100 µCi) |
| DNase I, RNase-free freshly diluted to 0.002 u/µl ⁺⁺ | 1 µl |
| DNA Polymerase I (#EP0041) | 0.5-1.5 µl (5-15 u) |
| Template DNA | 0.25 µg |
| Water, nuclease-free (#R0581) | to 25 µl |

2. Immediately incubate at 15°C for 15-60 min.

3. Terminate the reaction by adding 1 µl of 0.5 M EDTA, pH 8.0 (#R1021).

4. Take an aliquot (1 µl) to determine the efficiency of label incorporation. A specific activity of at least 10⁶ cpm/µg DNA is expected.

Note

- The labeled DNA can be purified from the unincorporated labelled dNTPs using Thermo Scientific GeneJET PCR Purification Kit (#K0701).
- * To prepare a mixture of 3 non-labeled dNTPs (1 mM of each), mix 1 µl aliquots of stock solutions of each dNTP (100 mM, from #R0181) with 97 µl of Water, nuclease-free (#R0581). Store at -20°C.
- ** DNase I, RNase-free can be diluted with 1X reaction buffer for DNA Polymerase I: 50 mM Tris-HCl (pH 7.5 at 25°C), 10 mM MgCl₂ and 1 mM DTT.

iScript™ cDNA Synthesis Kit, Bio-Rad Laboratories 2000**Reaction Setup**Please Note

The 5x iScript reaction mix may generate some precipitation upon thawing; this does not affect the quality of the mixture. If you do experience precipitation, please mix thoroughly to resuspend and use as directed below.

| Components | Volume per Reaction |
|---|---------------------|
| 5x iScript reaction mix | 4 μ l |
| iScript reverse transcriptase | 1 μ l |
| Nuclease-free water | x μ l |
| RNA template (100 fg to 1 μ g total RNA)* | x μ l |
| <hr/> | |
| Total volume | 20 μ l |

Reaction Protocol

Incubate complete reaction mix:

5 minutes at 25°C

30 minutes at 42°C

5 minutes at 85°C

Hold at 4°C (optional)

Reagents and Materials Not Supplied

Reagents for PCR or real-time PCR

Such as:

iTaq™ DNA polymerase, 170-8870

iQ™ supermix, 170-8860, or

iQ™ SYBR® Green supermix, 170-8880

Pipet tips, aerosol barrier tips

Such as:

Xcluda™ style B, 211-2006

Nuclease-free tubes

0.2 ml thin-wall tubes TWI-0201

0.2 ml thin-wall tubes HSP-9601 (Low-Profile)

HSS-9601 (Full Height)

RNA purification kit

Such as:

Aurum™ total RNA mini kit, 732-6820 or

Aurum total RNA kit, 2 x 96 well, 732-6800

High-Fidelity DNA Polymerase, Finnzymes 2010

3. Guidelines for Using Phusion™ DNA Polymerase

Phusion DNA Polymerase (2U/μl) is provided with 5x Phusion HF Buffer and 5x Phusion GC Buffer. Both buffers contain 1.5 mM MgCl₂ at final reaction concentrations. Separate tubes of DMSO and 50 mM MgCl₂ solutions are provided for further optimization.

3.1 Basic reaction conditions for PCR amplifications

Carefully mix and centrifuge all tubes before opening to improve recovery. PCR reactions should be set up on ice. Prepare a master mix for the appropriate number of samples to be amplified. Phusion DNA Polymerase should be pipetted carefully and gently as the high glycerol content (50 %) in the storage buffer may otherwise lead to pipetting errors. It is critical that the Phusion DNA Polymerase is the last component added to the PCR mixture, since the enzyme exhibits 3'→5' exonuclease activity that can degrade primers in the absence of dNTPs.

Table 1. Pipetting instructions (in order).

| Component | Volume / 50 μl reaction | Volume / 20 μl reaction | Final conc. |
|------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------|
| H ₂ O | add to 50 μl | add to 20 μl | |
| 5x Phusion HF Buffer* | 10 μl | 4 μl | 1x |
| 10 mM dNTPs | 1 μl | 0.4 μl | 200 μM each |
| primer A** | x μl | x μl | 0.5 μM |
| primer B** | x μl | x μl | 0.5 μM |
| template DNA | x μl | x μl | |
| (DMSO***, optional) | (1.5 μl) | (0.6 μl) | (3 %) |
| Phusion DNA Polymerase | 0.5 μl | 0.2 μl | 0.02U/μl |

Table 2. Cycling instructions.

| Cycle step | 2-step protocol | | 3-step protocol | | Cycles |
|----------------------|-----------------|------------------|-----------------|------------------|--------|
| | Temp. | Time | Temp. | Time | |
| Initial denaturation | 98°C | 30 s | 98°C | 30 s | 1 |
| Denaturation | 98°C | 5-10 s | 98°C | 5-10 s | 25-35 |
| Annealing (see 6.3) | - | - | X°C | 10-30 s | |
| Extension (see 6.4) | 72°C | 15-30 s /1 kb | 72°C | 15-30 s /1 kb | |
| Final extension | 72°C 4°C | 5-10 min hold | 72°C 4°C | 5-10 min hold | 1 |

GeneJET PCR Purification Kit, Thermo Fisher Scientific 2013

PURIFICATION PROTOCOL

Note

- Read IMPORTANT NOTES on p. 3 before starting.
- All purification steps should be carried out at **room temperature**.
- All centrifugations should be carried out in a table-top microcentrifuge at **>12000 × g** (10 000-14 000 rpm, depending on the rotor type).

| Step | Procedure |
|-------------------------|--|
| 1 | Add a 1:1 volume of Binding Buffer to completed PCR mixture (e.g. for every 100 µL of reaction mixture, add 100 µL of Binding Buffer). Mix thoroughly. Check the color of the solution. A yellow color indicates an optimal pH for DNA binding. If the color of the solution is orange or violet, add 10 µL of 3 M sodium acetate, pH 5.2 solution and mix. The color of the mix will become yellow. |
| 2 for DNA ≤500 bp | <i>Optional:</i> if the DNA fragment is ≤500 bp, add a 1:2 volume of 100% isopropanol (e.g., 100 µL of isopropanol should be added to 100 µL of PCR mixture combined with 100 µL of Binding Buffer). Mix thoroughly. Note. If PCR mixture contains primer-dimers, purification without isopropanol is recommended. However, the yield of the target DNA fragment will be lower. |
| 3 | Transfer up to 800 µL of the solution from step 1 (or optional step 2) to the GeneJET purification column. Centrifuge for 30-60 s. Discard the flow-through. Notes. 1. If the total volume exceeds 800 µL, the solution can be added to the column in stages. After the addition of 800 µL of solution, centrifuge the column for 30-60 s and discard flow-through. Repeat until the entire solution has been added to the column membrane. 2. Close the bag with GeneJET Purification Columns tightly after each use! |
| 4 | Add 700 µL of Wash Buffer (diluted with the ethanol as described on p. 3) to the GeneJET purification column. Centrifuge for 30-60 s. Discard the flow-through and place the purification column back into the collection tube. |
| 5 | Centrifuge the empty GeneJET purification column for an additional 1 min to completely remove any residual wash buffer. Note. This step is essential as the presence of residual ethanol in the DNA sample may inhibit subsequent reactions. |
| 6 | Transfer the GeneJET purification column to a clean 1.5 mL microcentrifuge tube (not included). Add 50 µL of Elution Buffer to the center of the GeneJET purification column membrane and centrifuge for 1 min. Note <ul style="list-style-type: none"> • For low DNA amounts the elution volumes can be reduced to increase DNA concentration. An elution volume between 20-50 µL does not significantly reduce the DNA yield. However, elution volumes less than 10 µL are not recommended. • If DNA fragment is >10 kb, prewarm Elution Buffer to 65°C before applying to column. • If the elution volume is 10 µL and DNA amount is ≥5 µg, incubate column for 1 min at room temperature before centrifugation. |
| 7 | Discard the GeneJET purification column and store the purified DNA at -20°C. |

GenElute™ Plasmid Miniprep Kit, Sigma-Aldrich 2010

Procedure

Note: All centrifugation speeds are given in units of *g*. Please refer to Table 1 for information on converting *g*-force to rpm. If centrifuges/rotors for the required *g*-forces are not available, use the maximum *g*-force possible and increase the spin time proportionally. Spin until all liquid passes through the column.

All steps are carried out at room temperature.

Harvest cells

Pellet 1–5 ml of an overnight recombinant *E. coli* culture by centrifugation. The optimal volume of culture to use depends upon the plasmid and culture density. For best yields, follow the instructions in the note below. Transfer the appropriate volume of the recombinant *E. coli* culture to a microcentrifuge tube and pellet cells at $\geq 12,000 \times g$ for 1 minute. Discard the supernatant.

Note: For best results with recombinant *E. coli* grown in LB (Luria Broth), use 1–3 ml of culture for high copy plasmids or 1–5 ml of culture for low copy plasmids. With recombinant *E. coli* grown in rich media such as TB (Terrific Broth) or 2X YT, use only 1 ml of culture. Higher volumes can cause a reduction in yield.

1. Resuspend cells



Important Reminder:

Verify that appropriate volume RNase A Solution was added to the Resuspension Solution.

Completely resuspend the bacterial pellet with 200 μ l of the Resuspension Solution. Vortex or pipette up and down to thoroughly resuspend the cells until homogeneous. Incomplete resuspension will result in poor recovery.

Another rapid way to resuspend the cell pellets is to scrape the bottoms of the microcentrifuge tubes back and forth 5 times across the surface of a polypropylene microcentrifuge tube storage rack with 5 \times 16 holes.³

2. Lyse cells

Lyse the resuspended cells by adding 200 μ l of the Lysis Solution. Immediately mix the contents by gentle inversion (6–8 times) until the mixture becomes clear and viscous. **Do not vortex.** Harsh mixing will shear genomic DNA, resulting in chromosomal DNA contamination in the final recovered plasmid DNA. **Do not allow the lysis reaction to exceed 5 minutes.** Prolonged alkaline lysis may permanently denature supercoiled plasmid DNA that may render it unsuitable for most downstream applications.

- 3. Neutralize**

Precipitate the cell debris by adding 350 μl of the Neutralization/Binding Solution. Gently invert the tube 4–6 times. Pellet the cell debris by centrifuging at $\geq 12,000 \times g$ or maximum speed for 10 minutes. Cell debris, proteins, lipids, SDS, and chromosomal DNA should fall out of solution as a cloudy, viscous precipitate. If the supernatant contains a large amount of floating particulates after centrifugation, recentrifuge the supernatant before proceeding to step 6.
 - 4. Prepare Column**


Insert a GenElute Miniprep Binding Column into a provided microcentrifuge tube, if not already assembled. Add 500 μl of the Column Preparation Solution to each miniprep column and centrifuge at $12,000 \times g$ for 30 seconds to 1 minute. Discard the flow-through liquid.

Note: The Column Preparation Solution maximizes binding of DNA to the membrane resulting in more consistent yields.
 - 5. Load cleared lysate**

Transfer the cleared lysate from step 3 to the column prepared in step 4 and centrifuge at $\geq 12,000 \times g$ for 30 seconds to 1 minute. Discard the flow-through liquid.
 - 6. Optional wash (use only with EndA⁺ strains)**

Add 500 μl of the Optional Wash Solution to the column. Centrifuge at $\geq 12,000 \times g$ for 30 seconds to 1 minute. Discard the flow-through liquid.

Note: When working with bacterial strains containing the wild-type EndA⁺ gene, such as HB101, JM101, and the NM and PR series, the Optional Wash step is necessary to avoid nuclease contamination of the final plasmid DNA product.
 - 7. Wash column**

Add 750 μl of the diluted Wash Solution to the column. Centrifuge at $\geq 12,000 \times g$ for 30 seconds to 1 minute. The column wash step removes residual salt and other contaminants introduced during the column load. Discard the flow-through liquid and centrifuge again at maximum speed for 1 to 2 minutes without any additional Wash Solution to remove excess ethanol.
-  **Important Reminder:**
Verify that ethanol has been added to the bottle of Wash Solution 2.
- 8. Elute DNA**

Transfer the column to a fresh collection tube. Add 100 μl of Elution Solution or molecular biology reagent water to the column. For DNA sequencing and other enzymatic applications, use water or 5 mM Tris-HCl, pH 8.0, as an eluant. Centrifuge at $\geq 12,000 \times g$ for 1 minute. The DNA is now present in the eluate and is ready for immediate use or storage at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Note: If a more concentrated plasmid DNA preparation is required, the elution volume may be reduced to a minimum of 50 μl . However, this may result in a reduction in the total plasmid DNA yield.

Gateway Technology, BP-reaction, Life Technologies Corporation 2011

1. Add the following components to 1.5 ml microcentrifuge tubes at room temperature and mix.

Note: To include a negative control, set up a second sample reaction and omit the BP Clonase™ enzyme mix (see Step 4).

| Components | Sample | Positive Control |
|---|---------------|------------------|
| <i>attB</i> -PCR product or linearized <i>attB</i> expression clone (40-100 fmol) | 1-10 μ l | – |
| pDONR™ vector (150 ng/ μ l) | 2 μ l | 2 μ l |
| pEXP7-tet positive control (50 ng/ μ l) | – | 2 μ l |
| 5X BP Clonase™ Reaction Buffer | 4 μ l | 4 μ l |
| TE Buffer, pH 8.0 | to 16 μ l | 8 μ l |

2. Remove the BP Clonase™ enzyme mix from -80°C and thaw on ice (~ 2 minutes).
3. Vortex the BP Clonase™ enzyme mix briefly twice (2 seconds each time).
4. To each sample above, add 4 μ l of BP Clonase™ enzyme mix. Mix well by vortexing briefly twice (2 seconds each time).

Reminder: Return BP Clonase™ enzyme mix to -80°C immediately after use.

5. Incubate reactions at 25°C for 1 hour.

Note: For most applications, a 1 hour incubation will yield a sufficient number of entry clones. Depending on your needs, the length of the recombination reaction can be extended up to 18 hours. An overnight incubation typically yields 5-10 times more colonies than a 1 hour incubation. For large PCR products (≥5 kb), longer incubations (*i.e.* overnight incubation) will increase the yield of colonies and are recommended.
6. Add 2 μ l of the Proteinase K solution to each reaction. Incubate for 10 minutes at 37°C.
7. Proceed to **Transforming Competent Cells**, next page.

Note: You may store the BP reaction at -20°C for up to 1 week before transformation, if desired.

Gateway Technology, LR-reaction, Life Technologies Corporation 2011

1. Add the following components to 1.5 ml microcentrifuge tubes at room temperature and mix.

Note: To include a negative control, set up a second sample reaction and omit the LR Clonase™ enzyme mix (see Step 4).

| Component | Sample | Negative Control | Positive Control |
|--------------------------------------|----------|------------------|------------------|
| Entry clone (100-300 ng/reaction) | 1-10 µl | -- | -- |
| Destination vector (300 ng/reaction) | 2 µl | 2 µl | 2 µl |
| pENTR™-gus (50 ng/µl) | -- | -- | 2 µl |
| 5X LR Clonase™ Reaction Buffer | 4 µl | 4 µl | 4 µl |
| TE Buffer, pH 8.0 | to 16 µl | 10 µl | 8 µl |

2. Remove the LR Clonase™ enzyme mix from -80°C and thaw on ice (~ 2 minutes).
 3. Vortex the LR Clonase™ enzyme mix briefly twice (2 seconds each time).
 4. To each sample above, add 4 µl of LR Clonase™ enzyme mix. Mix well by vortexing briefly twice (2 seconds each time).
- Reminder:** Return LR Clonase™ enzyme mix to -80°C immediately after use.
5. Incubate reactions at 25°C for 1 hour.
- Note:** For most applications, 1 hour will yield a sufficient number of colonies for analysis. Depending on your needs, the length of the recombination reaction can be extended up to 18 hours. For large plasmids (≥ 10 kb), longer incubation times (*i.e.* overnight incubation) will yield more colonies and are recommended.
6. Add 2 µl of the Proteinase K solution to each reaction. Incubate for 10 minutes at 37°C.
 7. Proceed to transform a suitable *E. coli* host and select for expression clones. If you are transforming Library Efficiency® DH5α™ competent *E. coli*, follow the protocol on page 24.

Note: You may store the LR reaction at -20°C for up to 1 week before transformation, if desired.
