



Fosfolambaanin tuottaminen ja puhdistus

Essi Tuomensalo-Porkka

OPINNÄYTETYÖ
Tammikuu 2024

Laboratoriotekniikka

TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu
Laboratoriotekniikan tutkinto-ohjelma

TUOMENSALO-PORKKA, ESSI:
Fosfolambaaniin tuottaminen ja puhdistus

Opinnäytetyö 46 sivua, joista liitteitä 9 sivua
Tammikuu 2024

Fosfolambaani on pienikokoinen proteiini, joka fosforylaation seurauksesta inhiboi sydänlihaksen supistumisesta vastaavan SERCA2a-proteiinin toimintaa rentouttamalla sydänlihasta. Fosfolambaaniin merkitys sydänlihaksen toimintamekanismissa on hyvin olennainen, ja tämän vuoksi proteiinin rakenteen ja toimintamekanismin parempi ymmärtäminen auttaa kehittämään sydänlihaksen toiminnalliseen häiriöön liittyviä hoitomuotoja.

Opinnäytetyön tavoitteena oli tuottaa ja puhdistaa fosfolambaania kahdessa eri muodossa. Tarkoituksena oli saada tuotettua riittävä määrä proteiinia aptameerien valmistamista varten. Opinnäytetyö suoritettiin Tampereen yliopistolla toimivan Protein Dynamics -ryhmän projektina.

Proteiinia tuotettiin His-TEV-PLB-His- ja MBP-PLB-muodoissa. Näistä muodoista jälkimmäinen oli fuusioproteiini, jossa kohdeproteiini on yhdistettynä maltoosia sitovaan proteiiniin. Fuusioproteiini katkaistiin entsyymaattisesti fosfolambaaniin keräämiseksi. Työn eri vaiheita sekä olosuhteiden vaikutusta proteiinin tuottavuuteen tarkasteltiin ja analysoitiin SDS-PAGElla ja Western blotilla.

Proteiinien tuottamisessa ja puhdistamisessa onnistuttiin tavoitteen mukaisesti. Fuusioproteiinista onnistuttiin katkaisemaan kohdeproteiini ja tulokset saatiin analysoitua. Olosuhteiden vaikutuksesta saatiin alustavia tuloksia ja prosessille pystyttiin muodostamaan toistettavat menetelmät.

Asiasanat: fosfolambaani, ekspressiovektori, fuusioproteiini, affiniteettikromatografia

ABSTRACT

Tampereen ammattikorkeakoulu
Tampere University of Applied Sciences
Degree Programme in Laboratory Engineering

TUOMENSALO-PORKKA, ESSI:
Production and Purification of Phospholamban

Bachelor's thesis 46 pages, appendices 9 pages
January 2024

This Bachelor's thesis focuses on the objective of production and purification of phospholamban. The purpose of this thesis was to develop methods for production and purification of phospholamban. This thesis was conducted as a project within the Protein Dynamics group at Tampere University.

For producing the protein in two different forms, His-TEV-PLB-His and MBP-PLB, expression vectors were made. The produced proteins were purified with affinity chromatography and the MBP-PLB protein was enzymatically cleaved with TEV to obtain the target protein PLB-His. The results were analysed using SDS-PAGE and Western blot. The effect of different production conditions and the efficiency of TEV was tested during the process.

The predefined objectives were successfully achieved. The findings suggest that the production of MBP-PLB was more effective, despite the lower yield of cleaved PLB-His compared to the His-TEV-PLB-His form. Preliminary insights into the effects of production conditions were obtained, and reproducible methods for the process were established. The efficiency of TEV and the outcomes of its cleavage were comprehensively examined, providing a foundation for future cleavage initiatives.

Key words: phospholamban, expression vector, fusion protein, affinity chromatography

SISÄLLYS

1	JOHDANTO	6
2	TEORIA	7
	2.1 Fosfolambaani.....	7
	2.2 Maltoosia sitova proteiini.....	7
	2.3 Proteiinin tuottaminen bakteerisoluiissa.....	8
	2.4 Affiniteetikromatografia	10
	2.5 Kokoekskluusiokromatografia	10
	2.6 SDS-PAGE	11
	2.7 Western Blot.....	12
3	MENETELMÄT	14
	3.1 Proteiinien tuottaminen	14
	3.2 Proteiinin puhdistaminen.....	15
	3.2.1 MBP-PLB:n puhdistus	15
	3.2.2 Tuotetun MBP-PLB:n dialysointi ja entsyymaattinen katkaisu	18
	3.2.3 Entsyymaattisesti katkaistujen proteiinien erottelu	20
	3.2.4 His-TEV-PLB-His puhdistus	21
4	TULOKSET.....	25
	4.1 Tuotetut proteiinit	25
	4.2 Puhdistaminen	26
	4.2.1 MBP-PLB.....	26
	4.2.2 His-TEV-PLB-His.....	28
	4.3 Entsyymaattinen katkaisu ja saavutettujen proteiinien erottelu	29
	4.4 Lopputuotteet.....	31
5	POHDINTA	33
	LÄHTEET.....	36
	LIITTEET	38
	Liite 1. Fosfolambaani.....	38
	Liite 2. MBP-PLB ekspressiovektori.....	39
	Liite 3. His-TEV-PLB-His ekspressiovektori	40
	Liite 4. Bio Rad NGC-laitteen menetelmä puhdistamista varten 1(2) 41	
	Liite 5. Proteiinin puhdistamisessa käytetty muokattu menetelmä 1(2) 43	
	Liite 6. Proteiinien tiedot ProtParam-ohjelmasta	45
	Liite 7. SDS-PAGEssa käytetty standardi, PageRuler Broad Range ..	46

LYHENTEET JA TERMIT

PLB	Fosfolambaani
SERCA	Sarcoendoplasmic Reticulum Calcium ATPase. Sarcoendoplasminen retikulumin kalsium ATPaasi.
MBP	Maltose Binding Protein. Maltoosia sitova proteiini
IPTG	Isopropyylitiogalaktosidi
IMAC	Immobilized metal-affinity chromatography. Imobilisoitu metalliaffiniteettikromatografia
AMP	Ampisilliini
GLU	Glukoosi
OD	Optical Density. Optinen tiheys.
FT	Flow Through. Pylvään läpimennyt fraktio
RT	Room temperature. Huoneenlämpö
MWCO	Molecular Weight Cut-Off. Molekyylipainon raja
TEV	Tobacco etch virus. Tupakan juomuvirus
SEC	Size Exclusion Chromatography. Kokoekskluusiokromatografia
PBS	Phosphate Buffered Saline. Fosfaattipuskuroitu suolaliuos

1 JOHDANTO

Sydänlihaksen toiminnan ymmärtäminen on merkittävässä roolissa kardiovaskulaarisen terveyden tutkimuksessa. Fosfolambaanin rooli tässä prosessissa on ollut tarkastelun kohteena jo useiden vuosikymmenien ajan. Viimeaikaiset tutkimukset ovat korostaneet fosfolambaanin fosforylaation vaikutusta proteiinin rakenteeseen, mikä johtaa SERCA2a-proteiinin inhibointiin. Proteiinin rakenteen ja toimintamekanismin parempi ymmärtäminen tarjoaa arvokasta tietoa sydänlihaksen toimintahäiriöiden ymmärtämiseksi samalla mahdollistaen tehokkaampien hoitomuotojen kehittämisen. (Ablorh & Thomas 2015)

Tämän opinnäytetyön päätavoitteena oli tuottaa ja puhdistaa fosfolambaania. Pyrkimyksenä oli saavuttaa toistettavat menetelmät proteiinin tuottamiseen ja puhdistamiseen. Proteiinin käyttäytyminen prosessin eri vaiheissa oli tuntematonta ja tämän vuoksi proteiinia haluttiin tuottaa kahdessa eri muodossa, His-TEV-PLB-His ja MBP-PLB. Proteiineja tuotettiin E.coli kannassa. Eri muodoilla haluttiin varmentaa prosessin onnistuminen sekä tarkastella eri muotojen hyviä ja huonoja puolia prosessin eri vaiheissa. Proteiinia puhdistettiin affiniteettikromatografialla ja tuloksia analysoitiin SDS-PAGElla ja Western blotilla.

Proteiinia tuotettiin Tampereen yliopistolla toimivan Protein Dynamics-ryhmän asiakasprojektina. Ryhmä tuottaa proteiinipalveluita sekä asiakastarpeeseen että ryhmässä työstettävien tutkimuksien tukemiseksi. Projektin tarkoituksena oli tuottaa fosfolambaania riittävästi, jotta asiakas voi hyödyntää proteiinia aptameerien valmistamiseen. Aptameerit ovat aminohappomolekyylejä, jotka toimivat vasta-aineiden tapaan. Aptameereja on tarkoitus valmistaa ja hyödyntää osana Itä-Suomen yliopistossa toteutettavaa tutkimusta.

2 TEORIA

2.1 Fosfolambaani

Fosfolambaani (PLB) on pienikokoinen 6 kD proteiini. Sen merkitystä osana sydänlihaksen supistumista on tutkittu paljon 1970-luvulta asti. Fosfolambaani toimii osana sydämen SERCA-pumppua, joka vastaa sydänlihaksen supistumisesta. SERCA-pumpussa lihaksen supistumisesta vastaa SERCA2a-proteiini, joka aktiivisesti kuljettaa kalsiumioneja pumppuun. Fosfolambaani puolestaan vastaa lihaksen rentoutumisesta inhiboiden SERCA2a-proteiinin toimintaa. (Koss & Kranias 1996)

Fosfolambaani sisältää useita fosfaatin kiinnittymiskohtia. Näistä muutaman kohdan tiedetään johtavan fosfolambaanin fosforylaatioon siten, että proteiini inhiboi SERCA2a-proteiinin toimintaa näin ollen estäen kalsiumionien aktiivisen kuljetuksen pumppuun. Fosforylaatio on reversiibeli reaktio. Fosfaatin vaikutus fosfolambaanin ominaisuuteen inhiboida SERCA2a-proteiinia päättyy fosfaatin irrottua fosfolambaanista. Tämän myötä SERCA2a-proteiini kykenee jatkamaan kalsiumionien aktiivista kuljetusta. (Ablorh & Thomas 2015)

Fosfolambaanin merkitys sydänlihaksen supistumismekanismeissa on suuri ja näin ollen fosfolambaanin rakenteen ja toiminnan parempi ymmärtäminen auttaa kehittämään parempia hoitomuotoja osaan sydänsairauksista. (Iwanaga, Hoshihijima, Gu, Iwatae, Dieterle, Ikeda, Date, Chrast, Matsuzaki, Peterson, Chien & Ross 2004)

2.2 Maltoosia sitova proteiini

Maltoosia sitova proteiini (MBP) on suuri 43 kD proteiini, jota voidaan hyödyntää esimerkiksi proteiinin tuottamisessa ja puhdistamisessa. Liitettynä toiseen proteiiniin fuusioproteiiniksi, MBP lisää proteiinin liukoisuutta ja mahdollistaa proteiinin puhdistamisen esimerkiksi amyloosiresiinillä. Kokonsa vuoksi MBP voi myös helpottaa pienen kohdeproteiinin analysoimista. (Malhotra, Burgess & Deutscher 2009)

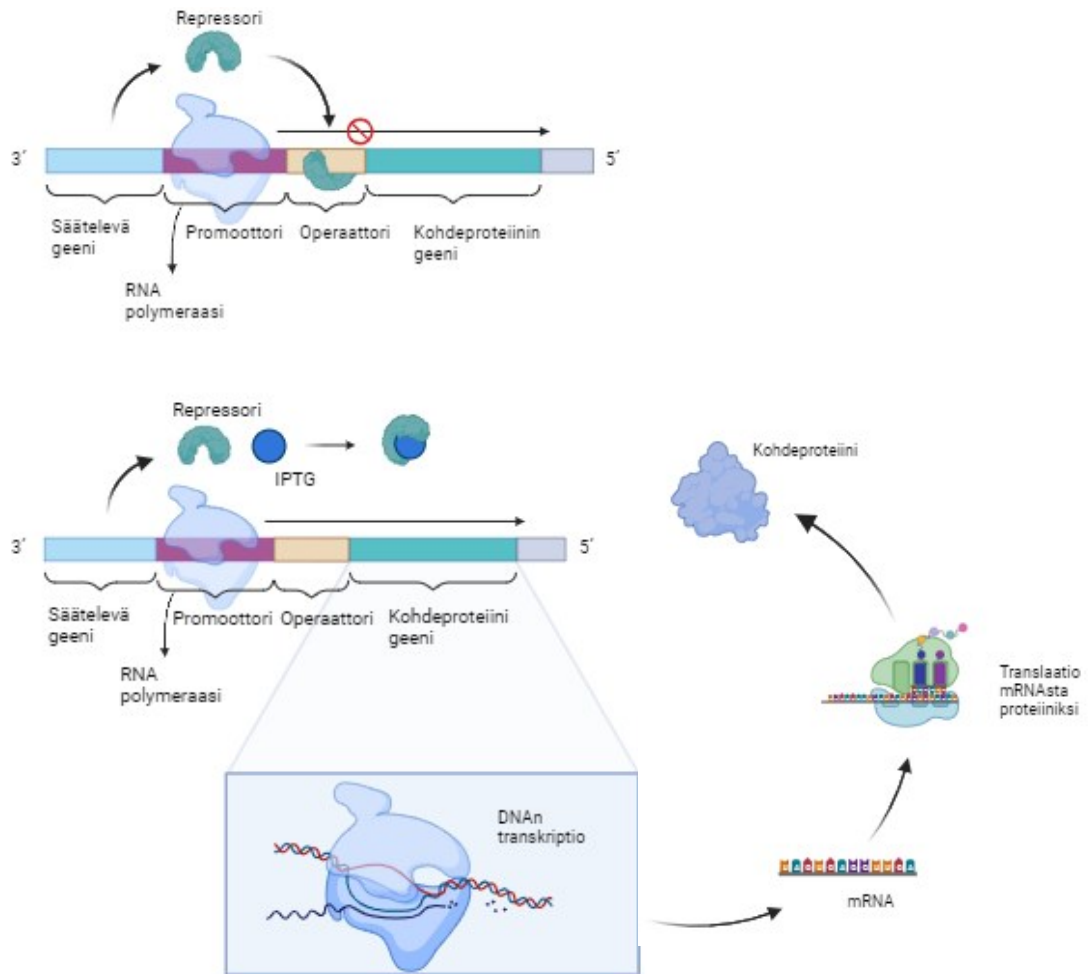
Fuusioproteiinia suunnitellessa tulee ottaa huomioon proteiinin käyttötarkoitus sekä mahdollinen fuusioproteiinin katkaisu. Kohdeproteiinin katkaiseminen MBP:stä voidaan toteuttaa esimerkiksi entsyymaattisesti TEV-proteaasilla. Proteaasi pystyy tunnistamaan tietyn aminohapposekvenssin ENLYFQG/S, joka toimii katkaisukohtana. Proteaasi hajottaa katkaisukohtassa olevien aminohappojen välisiä sidoksia, mikä johtaa proteiinin katkeamiseen. Sisällyttämällä katkaisukohta tuotettavaan fuusioproteiiniin, MBP ja kohdeproteiini voidaan katkaista toisistaan. (Nam, Hwang, Choi D., Shin & Choi M 2020)

2.3 Proteiinin tuottaminen bakteerisoluiissa

Proteiinin tuottamista bakteerisolulla on toteutettu hyvin laajasti osana useita tutkimuksia. Menetelmässä hyödynnetään Stanley Cohenin kehittelemää geneettistä muuntelua (Gill, Negi, Rana & Kumar 2023). Tarkoituksena on transformoida, eli siirtää proteiinin tuottamisesta vastaava yhdistelmä-DNA bakteeriin. Lopputuloksena saavutetaan proteiinia tuottavia soluja. (Kaur, Kumar & Kaur 2018)

Proteiinin tuottamista varten on vuosien varrella kehitelty useita E.coli -kantoja, joilla pystytään saavuttamaan tuottavuuteen vaikuttavia etuja. Oikean kannan valitseminen proteiinin tuottamiseen on olennaista tuloksen kannalta. Esimerkiksi usein hyödynnetty BL21 (DE3) -kanta mahdollistaa proteiinin tuottamisen hallitsemisen. Edellä mainitussa kannassa yhdistelmä-DNA liitetään osaksi T7-promoottoria. Promoottorin toimintaa rajoittaa säätelevä geeni, joka vastaa repressorin tuottamisesta. Bakteeri ei tällä menetelmällä tuota proteiinia ilman tuottamisen indusoimista esimerkiksi IPTG:llä. (Kaur, Kumar & Kaur 2018)

Kuviossa 1 on havainnoitu IPTG:n vaikutusta proteiinin tuottoon. Kuvaajan yläosassa repressori on kiinnittynyt operaattoriin, jolloin polymeraasin toiminta on estynyt, jonka vuoksi kohdeproteiinia ei tuoteta. Alemmassa alaosassa IPTG kiinnittyy repressoriin mahdollistaen polymeraasin toiminnan. Tämä johtaa DNA:n transkriptioon, jossa polymeraasi muodostaa DNA:n pohjalta mRNA:n. Kohdeproteiini valmistetaan translaatiossa, jossa ribosomi yhdistää mRNA:n määrittelemät aminohapot ketjuksi.



KUVIO 1. Havainnekuva, jossa ylhäällä olevassa mallissa säätelävä geeni tuottaa repressoria, joka kiinnittyy operaattoriin estäen RNA-polymeraasin toiminnan ja näin ollen kohdeproteiinin geenin luennan, jonka vuoksi kohdeproteiinia ei tuoteta. Alla olevassa mallissa repressoriin kiinnittyy IPTG mahdollistaen RNA-polymeraasin toiminnan. Transkriptiosta valmistunut mRNA muutetaan translaatiossa aminohappoketjuksi, joka laskostuu lopulliseen muotoonsa kohdeproteiiniksi. (Tehty BioRenderillä, Tuomensalo-Porkka, 2023)

Proteiinin tuottamisen kannalta olennainen RNA-polymeraasi on kiinnittyneenä promoottoriin. Promoottorin toimintaa rajoittaa operaattoriin kiinnittynyt repressori, joka estää polymeraasin toiminnan ja näin ollen proteiinin tuottamisen. Proteiinin tuottamista voidaan edellä mainitusti indusoida IPTG:llä, joka kiinnittyy repressoriin. Operaattoriin kiinnittymättä repressori ei estä RNA-polymeraasin toimintaa ja proteiinin tuottaminen mahdollistuu. (Simas, Pessoa & Long 2023)

2.4 Affiniteettikromatografia

Kromatografia on menetelmä, jonka avulla pyritään erottamaan nesteessä olevat komponentit toisistaan. Erottelu tapahtuu kahdella eri faasilla, joiden välinen vuorovaikutus eri komponenttien kanssa vaikuttaa erottelun tehokkuuteen. Kromatografiassa käytetään pysyvää stationääristä faasia, joka yleensä toteutetaan pylväällä, ja liikkuva faasi, joka sisältää nestemäisen näytteen. (Giddings & Keller 2023)

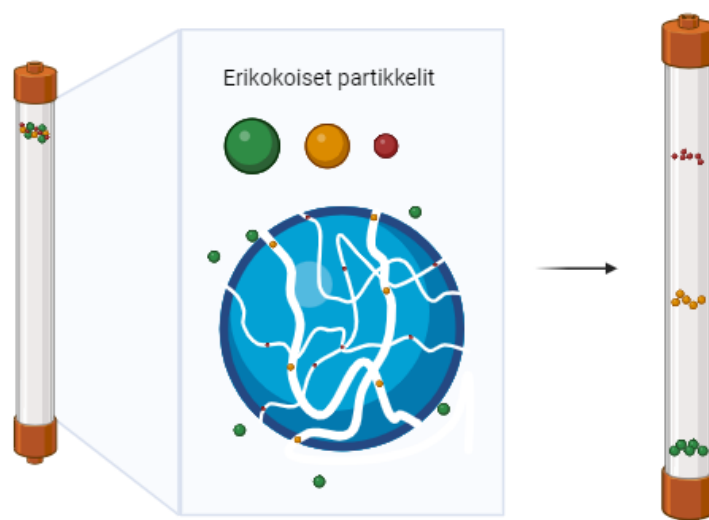
Affiniteettikromatografia on hyvin laajasti bioteknologiassa käytetty kromatografian menetelmä, jossa hyödynnetään biologisen materian reaktiivisuutta. Esimerkiksi histidiinillä merkattu proteiini (His-tag) voidaan puhdistaa hyödyntämällä histidiinin affiniteettia nikkeliin (IMAC). Menetelmässä nestemäinen näyte virtaa nikkelipylvään läpi, jolloin His-tagillinen proteiini sitoutuu pylvääseen, kun taas näytteen muut komponentit voidaan eluoida sopivalla puskurilla pois pylväästä. Kun kaikki muut tekijät ovat eluoitu pylväästä, proteiini voidaan lopulta eluoida. Proteiinia eluoidessa tulee käyttää sellaista puskuria, joka sisältää kiinnittyneen osan, esimerkkitapauksessa histidiiniä, vastaavan affiniteetin näin ollen korvaten kiinnittyneen osan pylväästä. Esimerkiksi imidatsolipuskurilla voidaan eluoida His-tagillinen proteiini pylväästä. (Bornhorst & Falke 2000)

2.5 Kokoekskluusiokromatografia

Kromatografiaa voidaan käyttää myös erikokoisten partikkelien erottamiseen toisistaan. Erottelu voidaan toteuttaa esimerkiksi käyttämällä kokoekskluusiokromatografiaa (SEC). Tässä menetelmässä hyödynnetään pylväässä olevan geelimatriksin huokoista rakennetta, joka erottelee partikkelit toisistaan molekyylikoon perusteella. (Irvine, n.d.)

Nestemäinen näyte ajetaan inertin geelimatriksin läpi. Näytteen pienet partikkelit kulkeutuvat geelimatriksin huokoisessa materiaalissa pidemmän matkan kuin isommat partikkelit. (Dolman & Thorpe, n.d.) Kuviossa 2 havainnollistetaan prosessia. Kuvassa vihreät partikkelit kulkevat sinisen geelimatriksin pinnalla, kun taas pienemmät partikkelit kulkevat matriksissa olevien huokosien läpi pidemmän

reitit. Menetelmällä voidaan olettaa, että näytteen suurimmat partikkelit eluoi-
vat ensimmäisenä ja pienimmät viimeisenä.

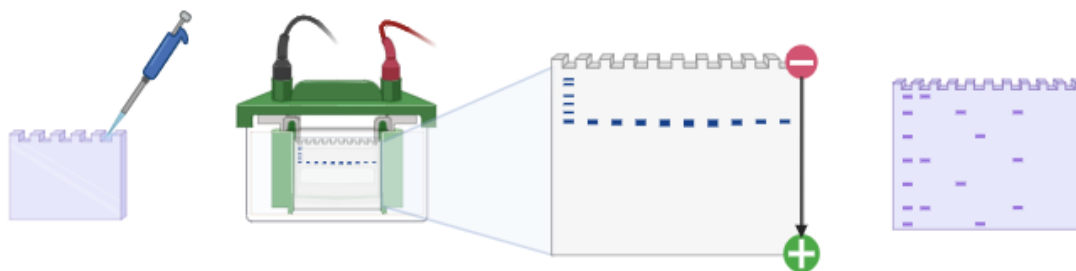


KUVIO 2. SEC pylvään toimintaperiaatetta havainnollistava kuva, jossa kolmen erikokoisen partikkelin liikehdintää geelimatricsissa ja pylväessä on kuvailtuna. (Tehty BioRenderillä, Tuomensalo-Porkka, 2023)

2.6 SDS-PAGE

Polyakryyliamidigeelielektroforeesi (PAGE) on proteiinien analysoimisessa yleisesti käytetty menetelmä, jossa proteiinit on mahdollista erotella toisistaan niiden ominaisuuksien perusteella. Nestemäiset näytteet pipetoidaan geelille, joka asetetaan sähkökenttään. Sähkökentän vaikutuksesta proteiinit kulkeutuvat kohti vastakkaista varausta (kuvio 3). (Westermeier 2016)

SDS-PAGE on yksi yleisimmistä proteiinien analysointitekniikoista. Tässä menetelmässä anioninen detergentti peittää alleen näytteiden sähkövarauksen, jonka vaikutuksesta proteiinit saadaan eroteltua toisistaan molekyylipainon mukaisesti. Sähkökenttä kuljettaa proteiineja kohti vastakkaista varausta, mutta varsinainen erottelu toteutuu geelin tiheyden perusteella. Näytteiden ajautumista voidaan vertailla tunnettuihin näytteisiin tai standardeihin, joiden perusteella pystytään arvioimaan näytteessä olevan proteiinin kokoa. (Westermeier, 2016)

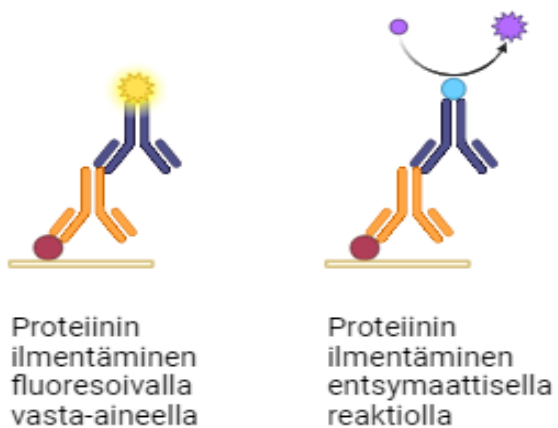


KUVIO 3. SDS-PAGE:n vaiheet vasemmalta oikealle: Näytteiden pipetointi geelille, geelin asettaminen ajokammioon ja proteiinien kulkeutuminen negatiivisesta varauksesta kohti positiivista varausta, erotellut proteiinit geelillä ajon päätteeksi. (Tehty BioRenderillä, Tuomensalo-Porkka, 2023)

2.7 Western Blot

Proteiinien analysoimiseen käytetään usein Western blottia, jossa kalvolle siirretyt näytteet detektoidaan immunovärjäyksen avulla. Analyysin suorittamiseksi proteiinit ajetaan ensin SDS-PAGElla geelille, josta ne voidaan siirtää elektroforeesilla nitroselluloosamembraanille. Elektroforeesin sähkökenttä saa proteiinit diffusoitumaan geelillä huokoiseen nitroselluloosaan, johon proteiinit kiinnittyvät. (Westermeier, 2016)

Kiinnitetyt proteiinit voidaan havaita vasta-ainevärjäyksellä. Vasta-aineiden valintaan vaikuttaa proteiinien ominaisuudet, esimerkiksi His-tagillisen proteiinin voi tunnistaa membraanilta anti-His primäärillä, jonka jälkeen membraanille voidaan lisätä sekundäärivasta-aine, joka kiinnittyy primäärivasta-aineeseen. Vasta-aineet voivat olla valmiiksi fluoresoivia, jolloin membraanilla olevat proteiinit voidaan värjäyksen jälkeen kuvantaa fluoresenssiin perustuvalla CCD-kameralla. Vasta-aineet voidaan myös havaita entsymaattisella reaktiolla, esimerkiksi piparjuuriperoksidaasilla (HRP), jolloin tuloksen kuvantamiseen voi riittää myös korkearesoluutioinen kamera (kuvio 4). (Westermeier, 2016)



KUVIO 4. Western blot-analyysin toteutustapojen havainnekuva, jossa analysoituva proteiini on merkattuna punaisella, primäärivasta-aine keltaisella ja sekundäärivasta-aine sinisellä. Vasemmalla fluoresoiva vasta-aine merkattu keltaisella pallolla. Oikealla entsyymin aikaansaama värireaktio merkattu violetilla. (Tehty BioRenderillä, Tuomensalo-Porkka, 2023)

3 MENETELMÄT

3.1 Proteiinien tuottaminen

Fosfolambaaniin tuottamista varten valmistettiin kaksi ekspressiovektoria (liitteet 2 ja 3). Vektorit valmistettiin Gateway-tekniikalla (Invitrogen 2023), jossa fosfolambaani (liite 1) liitettiin osaksi pDEST566 ja pDEST527 plasmideja. Lopputulokseksi saatiin MBP-PLB- ja His-TEV-PLB-His-proteiinia tuottavat ekspressiovektorit. MBP-PLB-proteiinissa kohdeproteiini PLB oli kiinnittyneenä maltoosia sitovaan proteiiniin (MBP). PLB tuli katkaista tässä muodossa tuotetusta proteiinista lopputuloksen saavuttamiseksi. His-TEV-PLB-His muodossa tuotetusta proteiinista ei tarvinnut katkaista muita osia, sillä niiden läsnäolo lopputuotteessa ei ollut käyttökohteen kannalta häiritsevää. Molemmissa muodoissa tuotetuissa proteiineissa oli His-tag, jota hyödynnetään proteiinin puhdistamisessa ja analysoimisessa.

Ekspressiovektorit transformoitiin TOP10-soluihin. Solut kerättiin ja hajotettiin kasvatuksen jälkeen. Solujen sisältämät ekspressiovektorit puhdistettiin Thermo Scientificin Miniprep -protokollan mukaisesti (Thermo Fisher Scientific, n.d., Plasmid DNA Miniprep Kits). Valmistettujen vektorien oikeellisuus varmistettiin sekvensoimalla. Sekvensoinnissa selvitetään DNA:n nukleiinihappojärjestys, jota verrattiin jo tunnettuihin sekvensseihin.

Varmennetut vektorit transformoitiin BL21 Star (DE3) -soluihin. Onnistuneista transformoinneista kerättiin pesäkkeet siemenkasvatusta varten. Siemenkasvatus toteutettiin 10 ml tilavuudessa, jonka pohjana oli LB+AMP-mediumi, jossa ampisilliinia oli lisättyä 100 µg/ml pitoisuuteen. Siemenkasvatuksia inkuboitiin yön yli 37 °C, 220 rpm tasosekoituksessa.

Siemenkasvatuksessa tuotetut solut pelletoitettiin putken pohjalle sentrifugoimalla putkia huoneenlämmössä 4300 rpm nopeudella 15 minuutin ajan. Putkesta poistettiin supernatantti ja pelletti resuspensoitiin edellisessä vaiheessa kuvailtuun LB+AMP-mediumiin. Solususpensio lisättiin 900 ml LB+AMP-mediumia proteiinin tuottokasvatusta varten.

Tuottokasvatusta inkuboitiin 37 °C, 220 rpm tasosekoituksessa, kunnes optinen tiheys (OD) oli aallonpituudella 600 nm mitattuna välillä 0,6–0,8. Molempiin tuottokasvatuksiin, His-TEV-PLB-His ja MBP-PLB, lisättiin 1800 ml edellä kuvailtua LB+AMP-mediumia. Kasvatukset jaettiin kolmeen 900 ml erään. Jaon tarkoituksena oli saavuttaa kolme identtistä kasvatusalustaa, jotka asetettiin eri lämpötiloihin. Tavoitteena oli tarkastella lämpötilan vaikutusta proteiinin tuottavuuteen. Jaon jälkeen kasvatuksia inkuboitiin 37 °C, 220 rpm tasosekoituksessa, kunnes OD oli välillä 0,9–1,0. Proteiinin tuotto indusoitiin lisäämällä IPTG:tä. Kasvatuksia inkuboitiin taulukon 1 mukaisesti.

TAULUKKO 1. Tuottokasvatusten inkubointi eri lämpötiloissa indusoinnin jälkeen.

His-TEV-PLB-His	MBP-PLB	Inkuboitu aika
18 °C	18 °C	Yön yli
25 °C	25 °C	Yön yli
37 °C	37 °C	5 h

Inkuboinnin päätteeksi, tuottokasvatuksista saadut solut sentrifugoitiin 5000 g, 4 °C, 30 minuutin ajan. Sentrifugoinnissa erottunut supernatantti poistettiin ja solupelletti säilöttiin -20 °C:ssa proteiinin puhdistamiseen asti.

3.2 Proteiinin puhdistaminen

Puhdistamista varten pakastetut solupelletit sulatettiin ja resuspendoitiin sonikointipuskuriin. Puhdistamisessa hyödynnettiin molemmissa proteiineissa olevaa His-tagia. Proteiinien eri ominaisuudet vaikuttivat puhdistuksessa käytettyihin puskureihin ja lopulliseen menetelmään.

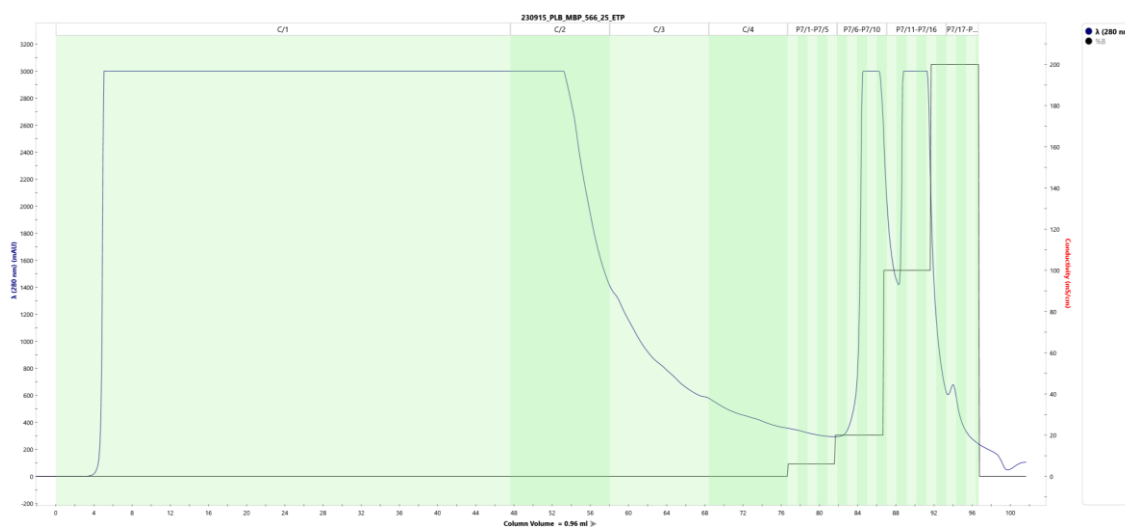
3.2.1 MBP-PLB:n puhdistus

Solut hajotettiin sonikoimalla 5 minuutin ajan 2 sekuntia päällä/ 5 sekuntia pois päältä -syklillä 60 % amplitudilla. Sonikointipuskurina käytettiin 50 mM NaPO₄-

puskuria, jossa oli 500 mM NaCl, pH 8. Jokainen pelletti resuspensoitiin 35 ml:aan puskuria, jonka jälkeen suspensioon lisättiin myös 1 kpl Pierce Protease Inhibitor Mini -tabletti lisäämään proteiinin stabiiliutta sonikoinnin aikana.

Sonikoinnista saatu lysaatti sentrifugoitiin 4 °C, 20 000 g, 20 minuutin ajan. Sentrifugoinnissa erottunut supernatantti kerättiin talteen affiniteettikromatografiaa varten. Eri lämpötiloissa toteutetut tuottokasvatukset säilytettiin vertailun vuoksi erillisinä näytteinä, jotka ovat seuraavissa vaiheissa nimettynä inkubointilämpötilan mukaan.

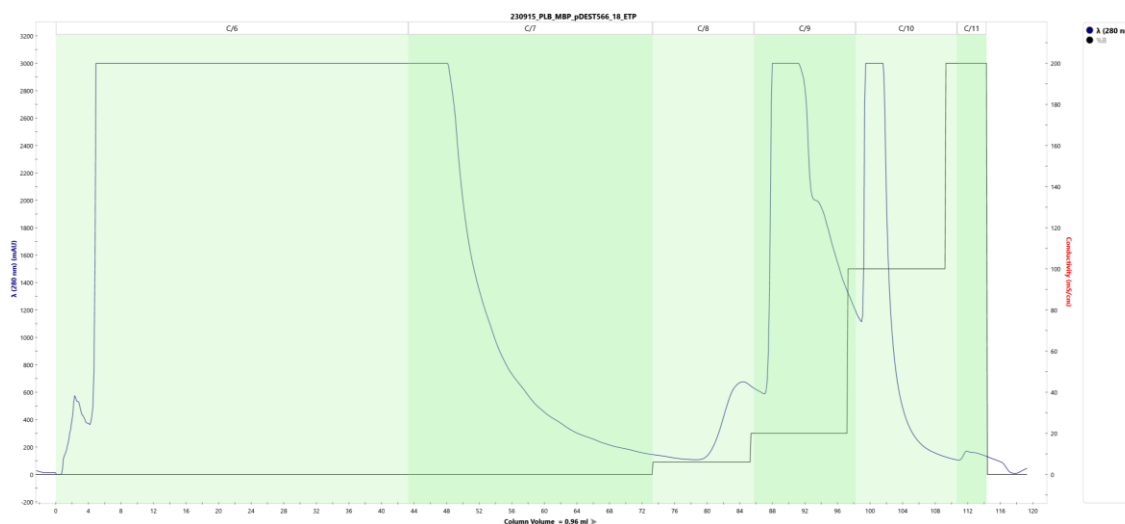
Proteiinin puhdistaminen affiniteettikromatografialla aloitettiin 25 °C tuotosta. Puhdistaminen toteutettiin Bio Radin NGC -laitteistolla HisTrap HP 1 ml -pylväällä. Proteiinia eluoiitiin puskureilla A, 50 mM Tris, 500 mM NaCl ja 10 mM imidatsoli, ja B, 50 mM Tris, 500 mM NaCl ja 500 mM imidatsoli. Eluointi toteutettiin liitteessä 4 näkyvän menetelmän mukaisesti.



KUVIO 4. 25 °C:ssa tuotetun MBP-PLB:n puhdistuksesta laitteelta saatu kromatogrammi.

Puhdistamisesta saadun kromatogrammin (kuvio 4) perusteella pystyttiin näkemään proteiinin eluotuminen kahdessa osassa fraktioihin 6–16. Eluotuminen havaittiin piikkinä $\lambda(280 \text{ nm})(\text{mAU})$ -käyrällä, joka kuvassa on esitettyinä violetilla. Kuvaajassa mustalla on havainnoituna puskurin B määrä puhdistuksen eri vaiheissa.

Puhdistuksesta kerättiin talteen fraktiot 8–10 ja 12–14. Menetelmää muokattiin siltä siten, että proteiini eluoituu mahdollisimman pienellä imidatsolipitoisuudella proteiinin jatkokäsittelyn helpottamiseksi. Lämpötiloissa 18 °C ja 37 °C tuotettujen proteiinien puhdistus toteutettiin muokatulla menetelmällä (liite 5).



KUVIO 5. Menetelmän muokkaamisen jälkeen toteutetun MBP-PLB:n puhdistuksesta saatu kromatogrammi.

Myös lämpötiloissa 18 °C ja 37 °C tuotettujen proteiinien puhdistuksista kerättiin ne eluotiofraktiot, joissa kromatogrammin (kuvio 5) perusteella oli proteiinia. Proteiinia sisältävien fraktioiden lisäksi kerättiin näytteet myös pylvään läpi viraneesta fraktiosta (FT) ja pesufraktioista (Wash). Näytteistä valmistettiin SDS-PAGE (kuva 11), jolla varmennettiin proteiinin eluoituminen.

Geelistä valmistettiin myös Western blot-analyysi siirtämällä geelillä olevat proteiinit Trans-Blot Turbolla Bio Radin Midi Format, 0.2 µm, nitroselluloosa membraanille. Analyysilla haluttiin varmentaa, että SDS-PAGElla havaitut proteiinit olivat His-tagilla varustettuja kohdeproteiineja. Membraani blokattiin Bio Radin EveryBlot Blocking -puskurilla epäspesifin kiinnittymisen vähentämiseksi. Blokkauksen jälkeen membraanille lisättiin primäärivasta-aineeksi Invitrogenin Mouse 6 x His-tag mAb (His-H8) -vasta-aine (Invitrogen, n.d.) suhteessa 1:10 000.

Membranaa inkuboitiin yön yli primäärivasta-aineessa, jonka jälkeen vasta-aine huuhdeltiin membraanilta. Huuhtelun jälkeen membraanille voitiin lisätä sekundäärivasta-aine. Sekundäärivasta-aineena käytettiin Li-Cor:in IRDye 800 CW Goat anti-Mouse vasta-ainetta (Li-Cor, n.d.) laimennettuna suhteessa 1:30 000 EveryBlot Blocking Solutioniin. Inkuboinnin jälkeen membraani huuhdeltiin ja kuvattiin Li-Corin Odyssey DLx -laitteella.

3.2.2 Tuotetun MBP-PLB:n dialysointi ja entsyymaattinen katkaisu

MBP-PLB:n puhdistuksesta kerätyt proteiinifraktiot dialysoitiin käyttäen Thermo Scientificin 10K MWCO, 12–30 ml -dialyysikasetteja sekä Spectra/Por molecularporous membrane-putkea, jonka MWCO oli 12–14 kD. Dialyysissa käytettiin 10 mM NaPO₄ -puskuria, jossa oli 300 mM NaCl, pH 7,4. Dialyysin alussa puskuriin lisättiin imidatsolia pitoisuuteen 75 mM. Puolet dialyysipuskurista vaihdettiin noin kahden tunnin välein puskuriin, joka ei sisältänyt imidatsolia. Tällä tavalla toteutettuna, dialyysi mahdollisti näytteen puskurissa olevan imidatsolin poistamisen ilman proteiinin saostumista.

Dialysoiduista MBP-PLB-näytteistä mitattiin proteiinikonsentraatio Nanodrop-laitteella aallonpituudella 280 nm. Proteiinikonsentraatioksi saatiin 2,6 mg/ml. Proteiinin entsyymaattisen katkaisun toteuttamiseksi laskettiin näytteen ja sTEV-entsyymin molaarinen suhde hyödyntäen proteiinikonsentraation tulosta. Entsyymaattisella katkaisulla haluttiin erottaa MBP ja PLB toisistaan. Lopputulokseksi odotettiin MBP-TEV- ja PLB-His-proteiinit. Katkaisukohta on korostettuna keltaisella liitteessä 6.

Katkaisua testattiin ensin pienellä määrällä. Tarkoituksena oli saavuttaa tietoa siitä, millaisella molaarisella suhteella katkaisu on tehokas. Tämän lisäksi tarkasteltiin myös reaktion nopeutta keräämällä näytteitä taulukon 3 mukaisesti eri aikapisteistä. Testaukseen valmistetut näytteet ovat kirjattuna taulukkoon 2.

TAULUKKO 2. Entsymaattisen katkaisemisen ensimmäisessä versiossa käytetyt laimennokset MBP-PLB:stä ja sTEV:stä.

Näyte	Molaarinen suhde (sTEV:MBP-PLB)	MBP-PLB 2,6 mg/ml	sTEV 2,5 mg/ml	sTEV 1:10 laimennos 0,25 mg/ml	PBS	Lopputilavuus
A	1:10	80 µl	5 µl	-	15 µl	100 µl
B	1:30	80 µl	-	17 µl	3 µl	100 µl
C	1:150	80 µl	-	3 µl	17 µl	100 µl

Näytteet A–C valmistettiin 100 µl tilavuuteen. Näytteet jaettiin valmiiksi viiteen 20 µl erään eri aikapisteiden tarkastelua varten. Katkaisu pysäytettiin aikapisteessä lisäämällä näytteeseen SDS-PAGE näytepuskuria, jonka jälkeen näytteitä keitettiin 100 °C:ssa 5 minuutin ajan. Alla olevaan taulukkoon on kirjattuna aikapisteet sekä niitä vastaavat näytetunnisteet 1–5.

TAULUKKO 3. Katkaisun aikapisteet näytteille A – C.

Näytetunniste	Aikapiste (lämpötila)
1	1 h (RT)
2	2 h (RT)
3	4 h (RT)
4	Yön yli (RT)
5	Yön yli (+4 °C)

Testauksesta saavutettujen tuloksien pohjalta katkaisua jatkettiin 1:10 molaarisella suhteella. Lopullisessa katkaisussa käytettiin 15 ml tuotettua MBP-PLB:tä, jonka konsentraatio oli 2,6 mg/ml, ja 1,5 ml MBP-superTEV:ä, jonka pitoisuus oli 4 mg/ml. Reaktio asetettiin +4 °C kahdeksi päiväksi, jonka jälkeen katkaisun tuloksena saadut proteiinit eroteltiin toisistaan kokoeksklusiokromatografialla (SEC).

3.2.3 Entsymaattisesti katkaistujen proteiinien erottelu

Erottelussa käytettiin HiLoad 16/600 Superdex 75 pg -pylvästä, joka oli liitettynä osaksi aikaisemmin käytettyä Bio Radin NGC -laitteistoa. Lopputuloksena oletetaan suurimpien proteiinien eluoituvan pylvästä ensimmäisenä, jonka jälkeen proteiinit jatkavat eluoitumista suurimmasta pienimpään. Eluoinnissa käytettiin 10 mM NaPO₄ -puskuria, jossa oli 300 mM NaCl. Fraktiot kerättiin 1,5 ml tilavuuteen 96-kuoppalevyille.

Kohdeproteiinin eluoituminen varmennettiin SDS-PAGE- ja Western blot-analyysillä. Katkaistun PLB-His-proteiinin pienikokoisuuden vuoksi valmistettiin kaksi identtistä geeliä. Tarkoituksena oli kiinnittää proteiinit glutaraldehydiliuoksella proteiinien diffuusion välttämiseksi. Kiinnitetyt proteiinit voitiin värjätä Page-Bluella lopullisen tuloksen saavuttamiseksi.

Glutaraldehydin käyttäminen estää Western blot-analyysin suorittamisen. Tämän vuoksi toisesta geelistä valmistettiin aikaisemmin kuvatulla tavalla Western blot, siirtämällä geelillä olleet näytteet Bio Radin Midi Format, 0.2 µm, nitroselluloosa membraanille. Membraanin vasta-ainevärjäyksessä käytettiin aikaisemmin mainittuja Mouse 6 x-His-tag mAb (His-H8) - ja Li-Cor:in IRDye 800 CW Goat anti-Mouse-vasta-ainetta. Analyysissä primäärivasta-aine oli laimennettuna 1:15 000 ja sekundäärivasta-aine 1:30 000. Primäärivasta-aine laimennettiin EveryBlot Blocking-liuokseen ja sekundäärivasta-aine TBST-liuokseen.

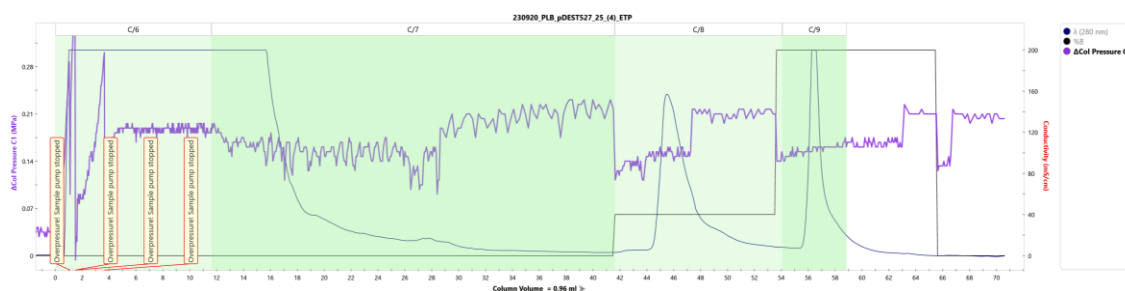
Analyyseista saatujen tuloksien perusteella SEC-ajoista kerättiin ne fraktiot, jotka sisälsivät fosfolambaania. Kerätyt fraktiot yhdistettiin kahteen eri osaan, joista ensimmäiseen (1) kerättiin fraktiot 44–48 ja toiseen (2) fraktiot 40–43 sekä 49–52. Yhdistettyjen fraktioiden proteiinipitoisuus mitattiin Nanodrop-laitteella, aallonpituudella 205 nm. Tulokset ovat kirjattuna taulukkoon 4.

TAULUKKO 4. PLB-His fraktioiden pitoisuus aallonpituudella 205 mitattuna, fraktioiden tilavuus sekä fraktion PLB-His massa kerätyissä fraktioissa.

Näyte	c (mg/ml)	V (ml)	PLB-His (mg)
1	0,0456	30	1,37
2	0,0185	47,5	0,88

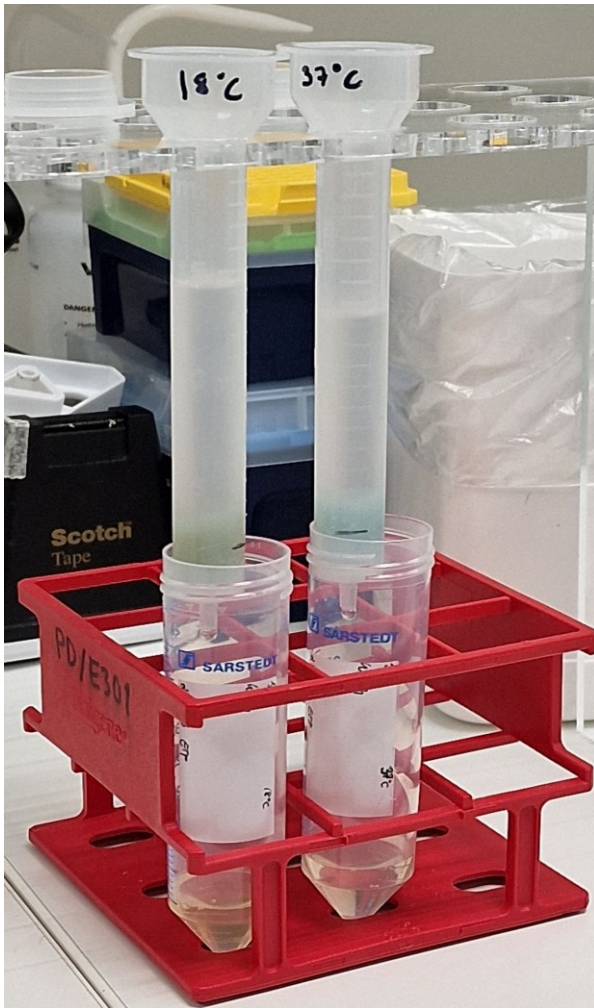
3.2.4 His-TEV-PLB-His puhdistus

Pakastettujen solupellettien käsittely toteutettiin opinnäytetyön kohdassa 3.2.1 kuvatulla tavalla. Sonikoinnissa käytettiin 6 M Guanidiini-HCl-puskuria, jossa oli 100 mM NaPO₄, pH 8. Pakastetut pelletit resuspensoitiin puskuriin ja sentrifugoiitiin sonikoinnin jälkeen 4 °C, 20 000 g, 20 minuutin ajan. Solurippeistä erottunut supernatantti kerättiin affiniteettipuhdistusta varten.



KUVIO 6. His-TEV-PLB-His-proteiinin puhdistaminen NGC-laitteistolla. Kuvassa pylvään paineraja on kuvattuna violetilla.

Puhdistaminen toteutettiin MBP-PLB:n puhdistamisessa käytetyllä laitteella sekä laitteelle puhdistamista varten luodulla menetelmällä (liite 5). His-TEV-PLB-His näytteiden puhdistaminen laitteella ei onnistunut pylväälle valmistajan määrittämien painerajojen ylittymisen vuoksi (kuvio 6). Puhdistaminen onnistuttiin suorittamaan 25 °C tuotetun proteiinin osalta laitteistolla, jonka jälkeen loput puhdistuksista toteutettiin avopylvävällä (kuva 1). Avopylväisiin pakattiin HisPur Ni-NTA-resiiniä.



KUVA 1. 18 °C ja 37 °C tuotettujen proteiinien puhdistaminen avopylväällä.

His-TEV-PLB-His-proteiinin puhdistamisen aikana talteen kerätyistä eluutiofraktoista valmistettiin näytteet SDS-PAGEa varten. MBP-PLB:n näytteistä poiketen, His-TEV-PLB-His proteiini on eluoitu 6 M Guanidiini-HCl-puskuriin, joka aiheuttaa näytteiden epätasaisen ajautumisen SDS-PAGE-geelille. Analyysin onnistumiseksi, näytteitä valmistettiin eri menetelmillä ja tuloksia vertailtiin keskenään. Alla on kuvailtuna parhaiten onnistunut menetelmä 6 M Guanidiini-HCl-näytteiden SDS-PAGE-analyysin toteuttamiseksi.

Kuvan 7 näytteet 1–10 valmistettiin laimentamalla näytettä suhteessa 1:5 PBS:llä, jonka jälkeen laimennettuihin näytteisiin lisättiin 2 X SDS-PAGE-näytepuskuria suhteessa 1:1. Näytepuskurin lisääminen sai näytteen saostumaan välittömästi. Saostuma sentrifugoitiin putken pohjalle (kuva 2) ja supernatantista laddattiin näyte geelille.



KUVA 2. Näytepuskurin lisäämisestä saostuneet näytteet sentrifugoinnin jälkeen.

Kuva 7 näytteet 12–15 valmistettiin saostamalla näytteessä oleva proteiini lisäämällä näytteeseen 95 % etanolilla (EtOH) suhteessa 1:10. Saostunut proteiini sentrifugoitii putken pohjalle ja erottunut supernatantti poistettiin putkesta. Saostunut proteiini resuspensoitiin PBS:ään siten, että näytteen lopullinen pitoisuus vastaa mahdollisimman tarkasti muiden geelille ladattavien näytteiden proteiinkonsentraatioita. Liuenneeseen proteiiniseokseen lisättiin 5 x SDS-PAGE-näytepuskuria ja näytteitä keitettiin 5 minuutin ajan ennen näytteen lataamista geelille.

Geelille ajettut proteiinit kiinnitettiin Silver Stain-kiinnitteellä, jossa oli kuusi osaa MilliQ-vettä, kolme osaa EtOH ja yksi osa etikkahappoa. Kiinnittämisen jälkeen geeli värjättiin PageBlue-värillä. Geelistä otetun kuvan perusteella eri eluutiofraktiot yhdistettiin niiden fraktioiden osalta, joissa proteiinia oli havaittavissa. Yhdistetyt fraktiot dialysoitiin Thermo Scientificin 3K MWCO-dialyysikaseteilla. Dialyysi aloitettiin 100 mM Tris, 1 % Glyseroli, pH 8-puskurilla, johon oli lisättyä 1 M Ureaa. Puskuri vaihdettiin muutaman tunnin sekoituksen jälkeen puskuriin, johon ureaa ei ollut lisättyä.



KUVA 3. PLB-His-proteiinin dialysointi 3K MWCO-kasetilla.

Dialysoinnin aikana näytteeseen muodostui kuvassa 3 havaittavaa sakkaa. Näyte kerättiin kasetista ja sakka poistettiin sentrifugoimalla näytettä huoneenlämmössä 20 000 g, 15 minuutin ajan. Dialysoinnista kerätyistä näytteistä mitattiin proteiinikonsentraatio Nanodrop-laitteella, aallonpituudella 205 nm. Lopullinen tulos sekä proteiinin saanto on taulukoituna opinnäytetyön osiossa 4.4.

4 TULOKSET

4.1 Tuotetut proteiinit

Ennen puhdistamista, tuotettua proteiinia tarkasteltiin SDS-PAGElla. Analyysissa käytettiin Bio Radin Criterion TGX, Any kD, Stain-Free Precast -geeliä. Kuvan 10 geelille pipetoitiin näytteet ennen proteiinin tuottamisen induointia (Pre IPTG) sekä induoinnin jälkeen eri lämpötiloissa tuotetuista proteiineista. Eri lämpötiloissa tuotetuista proteiininäytteistä valmistettiin 1:10 laimennos SDS-PAGEa varten. Tuloksia vertailtiin PageRuler-standardiin (liite 6).



KUVA 4. Eri lämpötiloissa tuotetuista proteiineista kerätyt näytteet ennen induointia IPTG:llä sekä induoinnin jälkeen. Kuvaan on ympyröity violetilla His-TEV-PLB-His muotoinen proteiini ja sinisellä MBP-PLB-proteiini.

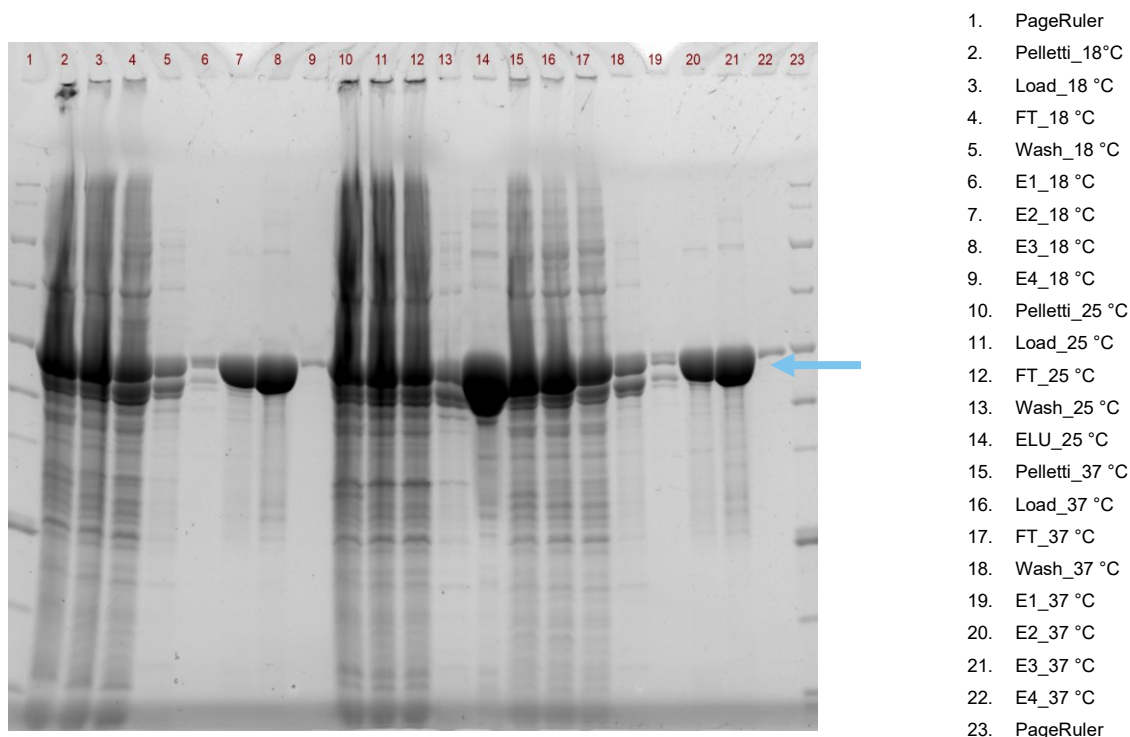
Kuvasta 4 nähdään, että proteiinia oli saatu tuotettua kummassakin muodossa. His-TEV-PLB-His muodossa, joka kuvassa on ympyröitynä violetilla, proteiinin tuottaminen oli geelin perusteella tehokkainta matalammilla lämpötiloilla, erityisesti 25 °C:ssa. Proteiinia ei ole juurikaan havaittavissa 37 °C:ssa tuotettujen näytteiden kohdalla.

MBP-PLB muodossa, joka kuvassa on ympyröitynä sinisellä, proteiinia saatiin tuotettua tehokkaasti kaikissa lämpötiloissa. Geelikuvan perusteella havaittiin, että 25 °C tuotetun proteiinin kohdalla vyöhyke on tummempi verrattessa muissa lämpötiloissa tuotettuihin proteiineihin. Tuloksen perusteella myös MBP-PLB muodossa proteiinin tuottaminen näyttää geelikuvassa tehokkaammalta matalammissa lämpötiloissa.

4.2 Puhdistaminen

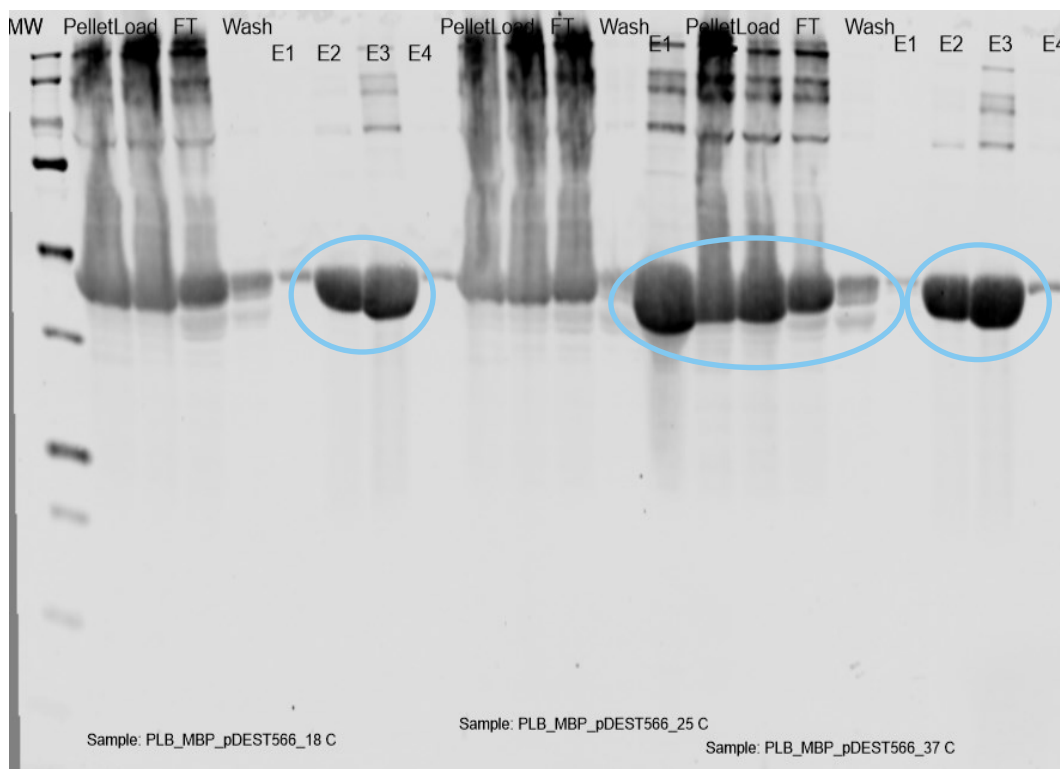
4.2.1 MBP-PLB

Puhdistuksista kerätyistä eluutiofraktioista kerättiin edellisen kohdan tavoin 20 µl näytteet SDS-PAGEa varten. Eluutiofraktioiden lisäksi geelille lisättiin näytteet sonikoidusta lysaatista (Pellet), näytteen pylvääseen ajettaessa läpi tullut fraktio (Load) sekä FT ja pesufraktio (Wash). Näytteiden lisäksi geelille pipetoitiin myös PageRuler-kokostandardi tulosten tarkastelua varten.



KUVA 5. SDS-Page MBP-PLB-proteiinin puhdistuksesta saaduista eluutiofraktioista. Kuvassa kohdeproteiinia vastaavat vyöhykkeet ovat osoitettuna sinisellä nuolella.

Geelikuvasta (kuva 5) havaitaan proteiini hieman standardin 50 kD vyöhykettä alempana sijaitsevista vyöhykkeistä. Proteiinista suurin osa eluoiutui geelin perusteella fraktioihin E2 ja E3. Tämä voitiin havaita vahvoina vyöhykkeinä muihin näytteisiin verrattuna. Geeliltä havaittiin myös, että osa proteiinista eluoiutui jo FT-fraktioon. Ensimmäisenä puhdistetun MBP-PLB:n FT-fraktio puhdistettiin uudelleen. Fraktiosta onnistuttiin keräämään myös toisen puhdistuksen yhteydessä MBP-PLB-proteiinia.

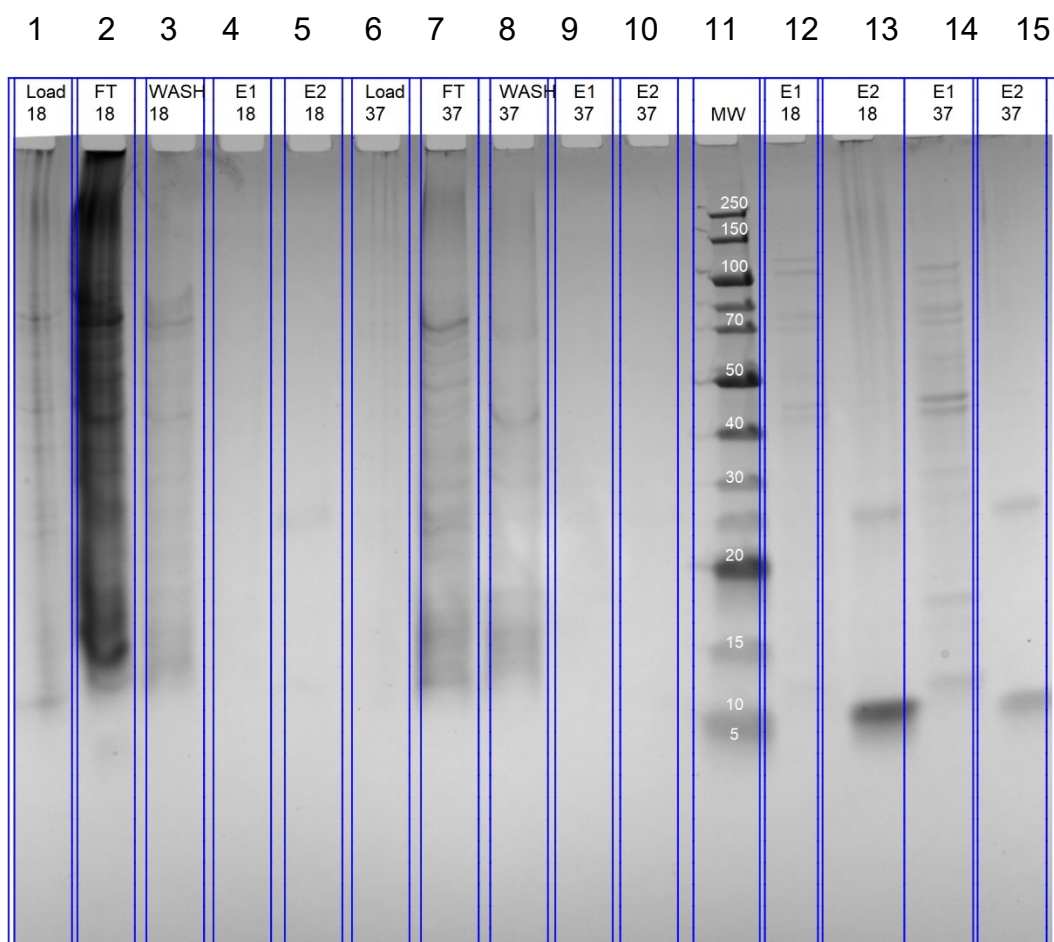


KUVA 6. MBP-PLB puhdistuksesta valmistettu Western blot-analyysi, jossa kohdeproteiini on ympyröitynä sinisellä.

Geelistä valmistetun Western blot-analyysin avulla saatiin vahvistettua, että SDS-PAGE-geelissä havaitut proteiinit olivat His-tagillisia. Tämä näkyy kuvassa 6 tummina vyöhykkeinä, jotka ovat kuvaan ympyröitynä sinisellä. Analyysien perusteella vahvistettiin, että tuotettu proteiini vastasi kooltaan ja His-tagin puolesta tuotettavan proteiinin ominaisuuksia. Näiden pohjalta voitiin tehdä oletus, että tuotettu proteiini oli MBP-PLB:tä.

4.2.2 His-TEV-PLB-His

Laitteistolla suoritetusta puhdistuksesta kerättiin eluutiofraktiot E1 ja E2. Tämän lisäksi kerättiin näytteet avopöylvällä suoritetuista puhdistuksista. Näytteistä valmistetun SDS-PAGE-analyysin perusteella (kuva 7) nähtiin, että proteiinia oli saatu puhdistettua näytteistä.



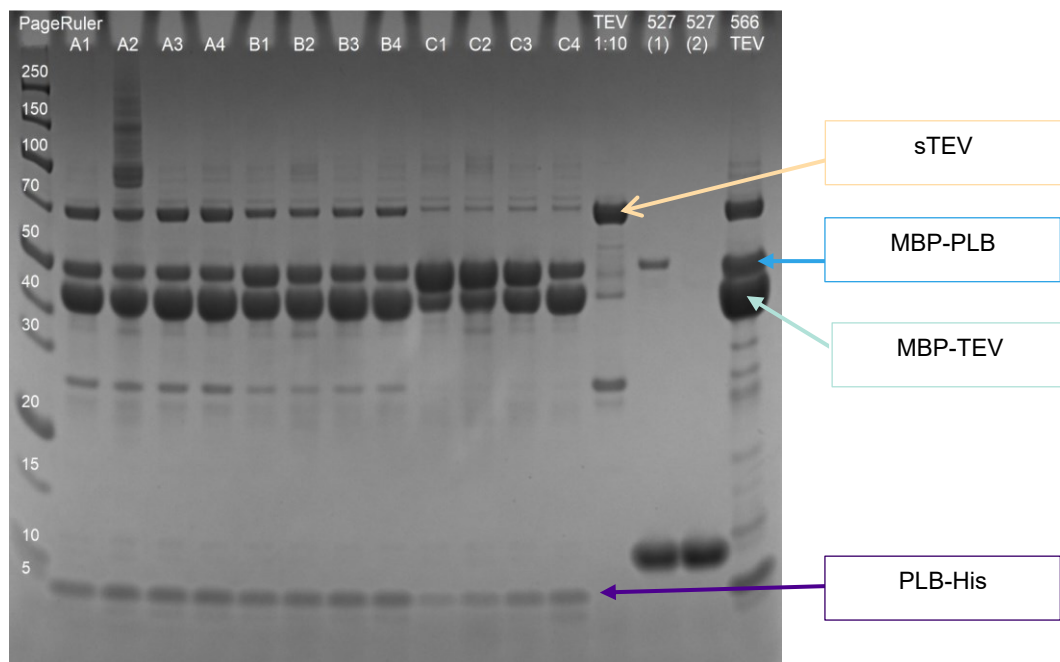
KUVA 7. PLB-His proteiinin eluutiofraktioista valmistettujen näytteiden SDS-Page-analyysi. Kaivojen linjat ovat korostettuna sinisellä.

Geelistä havaittiin myös, että näytteen saostaminen etanolilla antaa parhaimman tuloksen 6 M Guanidiini-HCl-puskuria sisältävien näytteiden analysoimiseen. Muiden näytteiden osalta, guanidiinin vaikutus peittää proteiinin näkyvyyden. Näytteiden laimentaminen vaikutti näytteiden havainnoimiseen heikentävästi.

4.3 Entsymaattinen katkaisu ja saavutettujen proteiinien erottelu

Entsymaattisen katkaisun tulokseksi odotettiin kolmea eri proteiinia: katkaisemattomaa MBP-PLB, jonka molekyylipaino on 48.61 kD, MBP-TEV, joka on kooltaan 43.87 kD sekä PLB-His, joka on 4.75 kD. Fosfolambaanin pienikokoisuuden vuoksi entsyymattisen katkaisun testauksen analysoimisessa käytettiin Bolt 4–12 % Bis-Tris Plus -geeliä. Geeli mahdollistaa aikaisemmin käytettyjä TGX Stain Free-geeleihin verrattuna paremman pienien proteiinien erottelun.

Katkaisusta saavutettujen näytteiden lisäksi geelille lisättiin näytteet myös 1:10 laimennetusta sTEV-entsyymistä (TEV 1:10) sekä kaksi päivää +4 °C säilytetystä reaktiosta (566 TEV). Geelille lisättiin myös His-TEV-PLB-His-proteiinin puhdistuksesta kerätyt näytteet (527(1) ja 527(2)).

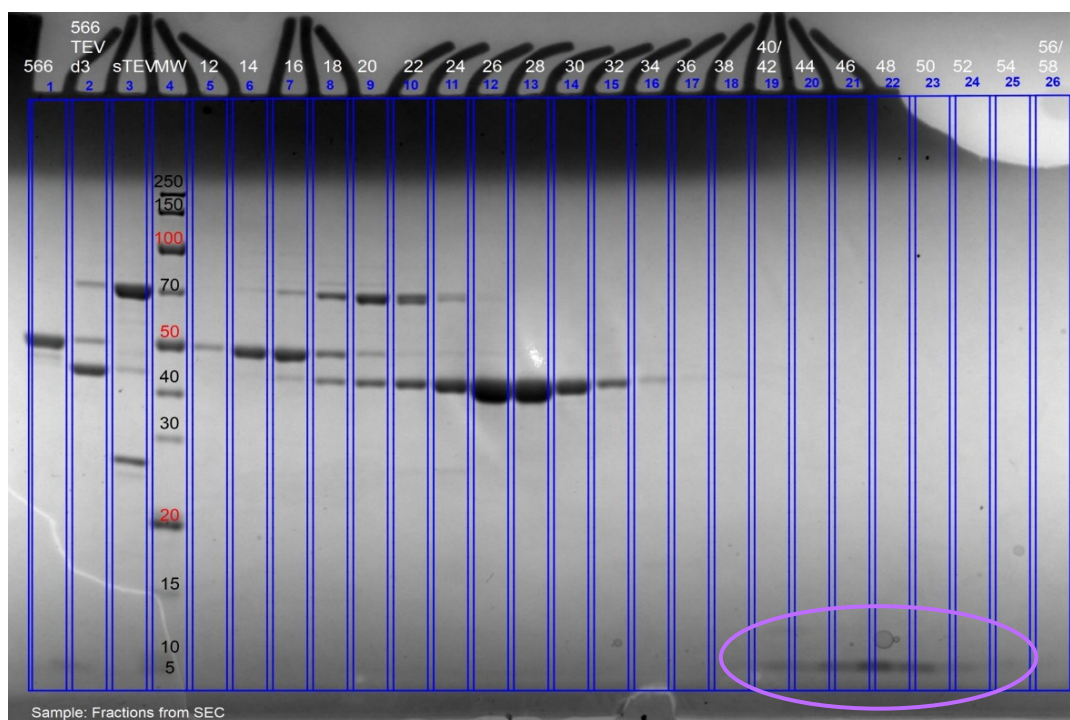


KUVA 8. Entsyymattisen katkaisun testaamisesta eri aikapisteissä kerättyjen näytteiden SDS-Page-analyysi.

Entsyymattisen katkaisun testauksessa havaittiin, että katkaisu toteutuu jokaisella testatulla MBP-PLB:n ja MBP-superTEV-entsyymien molaarisella suhteella. Tulos voidaan nähdä kuvassa 14 siitä, että jokaisen näytteen kohdalla on saavu-

tettu lopputulokseksi geelin alareunassa havaittava PLB-His-proteiini. Näitä vyöhykkeitä tarkasteltaessa havaittiin, että katkaisu on tehokkainta näytteiden A ja B kohdalla, sillä vyöhykkeet ilmenivät tummempina verrattuna näytteen C vyöhykkeisiin. Näytteiden A ja B kohdalla ei havaittu merkittäviä eroja aikapisteiden välillä.

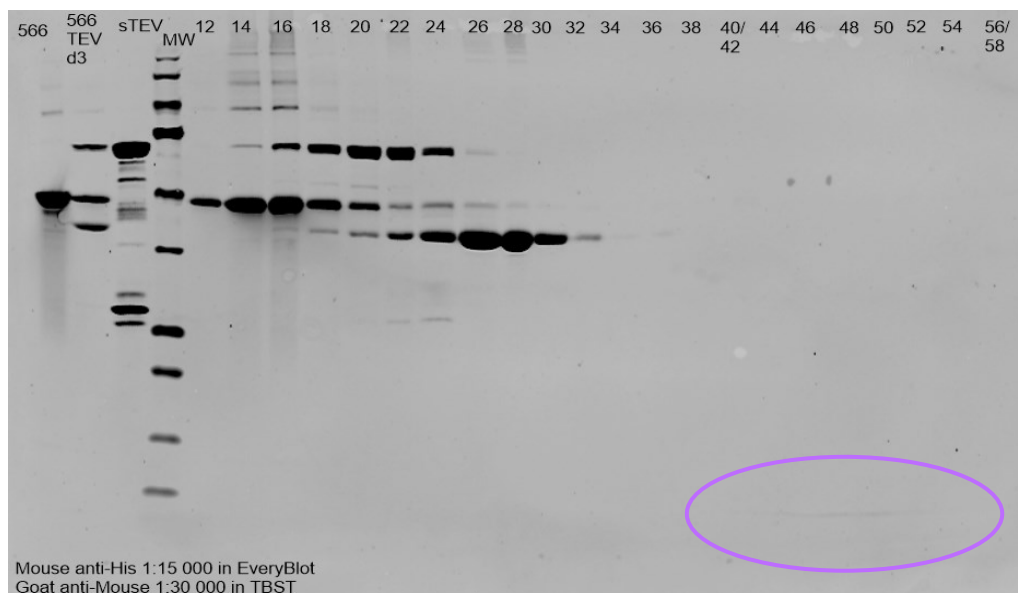
Proteiinien erottelusta saadun kromatogrammin perusteella voitiin olettaa, että PLB-His eluutui SEC-ajossa kuvan 9 ympyröidyssä kohdassa. Eluotuminen havaittiin kromatogrammin $\lambda(280\text{ nm})(\text{mAU})$ -käyrän pienenä nousuna. Ajosta kerättyjen näytteiden SDS-PAGE-analyysistä havaittiin, että pylvästä ensimmäisenä eluutui odotetusti täysipitkä MBP-PLB, jonka jälkeen fraktiosta 16 eteenpäin eluutuu sekä sTEV että katkaistu MBP-TEV. Eluutiofraktioissa 38–52 nähdään pienikokoisen proteiinin läsnäolo, joka vastaa kooltaan PLB-His proteiinia.



KUVA 9. SDS-PAGE geeli fiksauksen ja PageBlue värjäyksen jälkeen. Fosfolambaani on kuvassa ympyröitynä violetilla ja geelin kaivojen linjat ovat korostettu sinisellä.

SDS-PAGE-analyysissä havaittu tulos voitiin varmistaa Western blotilla. Membranilla odotettiin näkyvän proteiini tummina vyöhykkeinä. PLB-His oli kuvassa

10 havaittavissa, mutta tulos jäi hyvin haaleaksi. Havaitsemisen helpottamiseksi, PLB-His on ympyröitynä violetilla membraanista otetussa kuvassa (kuva 10).



KUVA 10. Western Blot-analyysi SEC eluutiofraktioista. Fosfolambaani ympyröitynä violetilla.

4.4 Lopputuotteet

Fosfolambaanin tuotto onnistuttiin toteuttamaan kummassakin muodossa, MBP-PLB ja His-TEV-PLB-His. Tuotoista saadut lopputulokset ovat dokumentoituna taulukkoon 5. Taulukkoon on merkattuna proteiinin kaikki ne muodot, jotka on opinnäytetyön aikana tuotettu ja säilötty. Tämä sisältää MBP-PLB:n katkaisemattoman muodon, jossa puhdistuksesta kerätyt eluutiofraktiot ovat yhdistettynä sekä tästä muodosta katkaistun PLB-His-proteiinin. Proteiinin toinen tuotettu muoto on merkattuna taulukossa His-TEV-PLB-His-proteiinina, josta on erikseen merkattuna eri lämpötiloissa tuotettujen proteiinien puhdistuksen ja dialysoinnin jälkeiset tulokset.

TAULUKKO 5. Tuotetut proteiinit ja niiden pitoisuudet sekä lopputilavuus.

Proteiini	Pitoisuus	Tilavuus	Saanto
MBP-PLB	2,6 mg/ml	45 ml	117 mg
PLB-His	0,038 mg/ml	77 ml	2,9 mg
His-TEV-PLB-His, 25 °C E1	0,91 mg/ml	30 ml	27,3 mg
His-TEV-PLB-His, 25 °C E2	0,97 mg/ml	15 ml	14,5 mg
His-TEV-PLB-His, 18 °C ja 37 °C	0,433 mg/ml	20 ml	8,6 mg

5 POHDINTA

Proteiinin tuotto onnistuttiin toteuttamaan kummassakin muodossa, MBP-PLB ja His-TEV-PLB-His. Myös proteiinin puhdistaminen ja prosessin eri vaiheiden vertailu keskenään pystyttiin toteuttamaan. Tuotetut proteiinit lähetettiin asiakkaalle ja proteiini on otettu käyttöön.

Proteiinin tuottamisessa vertailtiin lämpötilojen vaikutusta tuottoon. Lopputuloksena havaittiin, että proteiinia saatiin tuotettua MBP-PLB-muodossa hyvin kaikissa lämpötiloissa ja His-TEV-PLB-His muodossa parhaiten matalammissa lämpötiloissa (kuva 4). Koska His-TEV-PLB-His-proteiinin eri lämpötiloissa toteutetut proteiinit puhdistettiin eri menetelmillä, lämpötilojen välisiä eroja lopulliseen tulokseen ei voida vertailla. Taulukosta 5 voidaan kuitenkin havaita, että His-TEV-PLB-His-proteiinin paras saanto oli 25 °C tuotosta.

Proteiinin puhdistaminen affiniteettikromatografialla onnistui ilman ongelmia MBP-PLB:n kohdalla. Puhdistamiseen käytettyä menetelmää saatiin kehitettyä paremmin tarvetta vastaavaksi. Lopullisessa menetelmässä proteiinin voidaan odottaa eluoituvan pienemmillä imidatsolipitoisuuksilla. Proteiinia havaittiin jäävän FT-fraktioon (kuvat 5 ja 6), joten näistä fraktiosta voidaan suorittaa uusi puhdistus, jolloin proteiinin lopullinen saanto on korkeampi.

His-TEV-PLB-His proteiinin puhdistaminen tuotti vaikeuksia NGC-laitteella suoritettaessa. Käytössä ollut pylväs vaikutti tukkeutuneen hyvin pian puhdistamisen aloittamisen jälkeen, jonka vuoksi puhdistamista ei pystytty suorittamaan loppuun laitteistolla. Ongelman ratkaisemiseksi kokeiltiin näytteen suodattamista, uudelleen sentrifugoimista suuremmalla nopeudella sekä näytteen ajamista pylväälle käänteisessä suunnassa. Pylvästä huuhdottiin välissä valmistajan ohjeiden mukaisella puhdistusliuoksella ja pylväs vaihdettiin lopulta uuteen pylväaseen, mutta yrityksistä huolimatta näytettä ei saatu ajettua pylväälle painerajojen ylittymisen vuoksi.

Puhdistaminen onnistuttiin toteuttamaan loppuun avopylväillä. Tämän vuoksi His-TEV-PLB-His-proteiinin 18 °C ja 37 °C ei ole saatavilla kromatogrammia, josta

pystyisi näkemään tarkemmin fraktiot, joihin proteiini eluoituu. Proteiinin eluoitus voidaan kuitenkin havaita esimerkiksi SDS-PAGElla. Analyysissa tulee kuitenkin huomioida 6 M Guanidiini-HCl puskuri, johon proteiini on eluoitunut. Proteiini pystytään havaitsemaan geeliltä, mutta ajon lopputulos on sotkuinen (kuva 7), mikä voi aiheuttaa ongelmia tulevissa ajoissa.

Guanidiini-HCl:n vaikutuksia lähdettiin ratkaisemaan laimentamalla näytettä PBS:llä. Vaikutus lopputulokseen oli hyvin pieni, joten testasimme myös proteiinin saostamista etanolilla ja proteiinin uudelleen liuottamista PBS:ään. Tällä menetelmällä valmistetuista näytteistä saatiin parhaimmat geelitulokset (kuva 13). Pienien proteiinien kanssa voidaan myös jatkossa hyödyntää Bolt Bis-Tris Plus 4–12 %-geelejä, joilla saavutetaan parempi pienien proteiinien erottelu.

Proteiinikonsentraatioita mitattaessa MBP-PLB voitiin mitata Nanodropilla aallonpituuksilla 280 nm ja 260 nm. Tämä mahdollisti sekä pitoisuuden selvittämisen että proteiinin puhtauden arvioimisen. Koska PLB-His-proteiinissa ei ole tähän menetelmään tarvittuja tryptofaania ja tyrosiinia, proteiinikonsentraatio mitattiin aallonpituudella 205 nm. Mittauksesta saadun tuloksen varmuus jäi epäselväksi, sillä puskurin vaikutus mittaukseen havaittiin olevan merkittävä.

MBP-PLB-proteiinin katkaiseminen TEV-proteasilla pystyttiin myös toteuttamaan. Toteutusta lähdettiin testaamaan erilaisilla MBP-PLB:n ja sTEV:n molaarisuhteilla (taulukko 2). Testattavista versioista kerättiin näytteet eri aikapisteissä reaktion tarkastelemiseksi. Näytteistä valmistetusta SDS-PAGE-analyysistä (kuva 8) nähdään, että reaktio on mahdollista toteuttaa kaikilla testatuilla molaarisuhteilla, mutta vaihtoehdoista tehokkaimmat olivat 1:10 ja 1:30. Näiden näytteiden kohdalla eri aikapisteiden välisissä näytteissä ei ole havaittavissa suuria eroja. 1:150 molaarisella suhteella nähdään, että reaktio vaatii pidemmän ajan paremman lopputuloksen saavuttamiseksi.

Taulukosta 5 nähdään, että proteiinia onnistuttiin tuottamaan parhaiten MBP-PLB-muodossa. Tästä muodosta sTEV:llä katkaistu PLB-His-proteiinin saanto jäi pienemmäksi kuin His-TEV-PLB-His proteiinin saanto. Tämä on hyvä huomioida jatkossa toteutettavissa proteiinin tuotoissa ja puhdistuksissa. Mikäli proteiinin tuottoa toteutetaan PLB-His-muodossa, proteiinin tuotto 25 ° C:ssa voi parantaa

proteiinin saantoa verrattuna korkeampiin lämpötiloihin. Proteiinin puhdistamiseen käytetty menetelmä vaatii vielä kehittelemistä, mutta opinnäytetyönä kerättyjen tietojen pohjalta, avopylväällä toteutettu puhdistus voi tälle muodolle olla toimiva ratkaisu.

PLB-His-proteiinin puhdistamisessa käytetty 6M guanidiini-HCl-puskuri on hyvä valmistaa liuottamalla guanidiini-HCl esilämmitettyyn veteen. Prosessin aikana huomattiin, että guanidiini-HCl:n liuottaminen veteen kesti hyvin pitkään. Liuoksen lämmittäminen paransi guanidiini-HCl:n liukoisuutta, mutta liuoksesta ei saatu tällä tavalla täysin kirkasta. Guanidiini-HCl liukeni erittäin hyvin valmiiksi lämmitettyyn veteen, jolloin liuos muuttui sekoittaessa kirkkaaksi. Puskurin vaikutus SDS-PAGE-analyysiin on hyvä myös ottaa huomioon. Proteiinin saostamisella ja uudelleen PBS:ään liuottamisella havaittiin olevan paras vaikutus guanidiinin aiheuttamien häiriöiden vähentämiseksi SDS-Page-analyysissä.

LÄHTEET

Ablorh, N.-A. D., & Thomas, D. D. 2015. Phospholamban phosphorylation, mutation, and structural dynamics: a biophysical approach to understanding and treating cardiomyopathy. *Biophysical Reviews*, 7(1), 63–76.

<https://doi.org/10.1007/s12551-014-0157-z>

Dolman, C., Thorpe, R., n.d. Analysis and Purification of IgG Using Size-Exclusion High Performance Liquid Chromatography (SE-HPLC). Teoksessa Walker, J. M. 2009. *The protein protocols handbook* (3. ed.). pp. 1765–1766. Humana Press/ Springer Science+Business Media.

Giddings, J. Calvin and Keller, Roy A. "chromatography". 12 Oct. 2023 *Encyclopedia Britannica*. <https://www.britannica.com/science/chromatography>. Accessed 9 November 2023

Gill, K., Negi, S., Rana, N., & Kumar, P. 2023. RDT and genetic engineering: Basic of RDT method, PCR, and application. In *Basic Biotechniques for Bioprocess and Bioentrepreneurship*. pp. 207–216. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816109-8.00013-1>

Invitrogen. n.d. 6x-His Tag Monoclonal Antibody (HIS.H8). Viitattu 29.10.2023. <https://www.thermofisher.com/antibody/product/6x-His-Tag-Antibody-clone-HIS-H8-Monoclonal/MA1-21315>

Invitrogen. 2023. Gateway Technology. pp. 41–42. Viitattu 25.10.2023. <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/gatewayman.pdf>

Irvine, G. B., n.d. Molecular Weight Estimation for Native Proteins Using High-Performance Size-Exclusion Chromatography. Teoksessa Walker, J. M. 2009. *The protein protocols handbook* (3. ed.). 1029–1031. Humana Press/ Springer Science+Business Media.

Iwanaga, Y., Hoshijima, M., Gu, Y., Iwatate, M., Dieterle, T., Ikeda, Y., Date, M., Chrast, J., Matsuzaki, M., Peterson, K. L., Chien, K. R., & Ross, J. 2004. Chronic phospholamban inhibition prevents progressive cardiac dysfunction and pathological remodeling after infarction in rats. *The Journal of Clinical Investigation*, 113(5), 727–736. <https://doi.org/10.1172/JCI18716>

Kaur, J., Kumar, A., & Kaur, J. 2018. Strategies for optimization of heterologous protein expression in *E. coli*: Roadblocks and reinforcements. *International Journal of Biological Macromolecules*, 106, 803–822. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.080>

Koss, K. L., & Kranias, E. G. 1996. Phospholamban: A Prominent Regulator of Myocardial Contractility. *Circulation Research*, 79(6), 1059–1063. <https://doi.org/10.1161/01.RES.79.6.1059>

Li-Cor. n.d. IRDye 800CW Goat anti-Mouse IgG Secondary Antibody. Viitattu 29.10.2023. <https://www.licor.com/bio/reagents/irdye-800cw-goat-anti-mouse-igg-secondary-antibody>

Löfblom, J., Feldwisch, J., Tolmachev, V., Carlsson, J., Ståhl, S., Frejd, F.Y. 2010. Affibody molecules: Engineered proteins for therapeutic, diagnostic and biotechnological applications. *FEBS Letters*. Vol. 584 Issue 12, pp. 2670–2680.

Malhotra, A. Burgess, R. R., & Deutscher, M. P. 2009. *Methods in Enzymology: Guide to Protein Purification*, 2nd Edition. In *Guide to Protein Purification*. Elsevier Science & Technology.

Masterson, L. R., Bortone, N., Yu, T., Ha, K. N., Gaffarogullari, E. C., Nguyen, O., & Veglia, G. 2009. Expression and purification of isotopically labeled peptide inhibitors and substrates of cAMP-dependant protein kinase A for NMR analysis. *Protein Expression and Purification*, 64(2), 231–236.

Nam, H., Hwang, B. J., Choi, D., Shin, S., & Choi, M. 2020. Tobacco etch virus (TEV) protease with multiple mutations to improve solubility and reduce self-cleavage exhibits enhanced enzymatic activity. *FEBS Open Bio*, 10(4), 619–626. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12828>

Sakai, H., Ikeda, Y., Honda, T., Tanaka, Y., Shiraishi, K., Inui, M. 2014. A cell-penetrating phospholamban-specific RNA aptamer enhances Ca²⁺ transients and contractile function in cardiomyocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 76 (2014) 177 – 185.

Simas, R. G., Pessoa Junior, A., & Long, P. F. 2023. Mechanistic aspects of IPTG (isopropylthio- β -galactoside) transport across the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* —a rate limiting step in the induction of recombinant protein expression. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 50(1). <https://doi.org/10.1093/jimb/kuad034>

SnapGene. N.d. Gateway Cloning Technique. Viitattu 17.10.2023. <https://www.snapgene.com/guides/gateway-cloning>

Thermo Fisher Scientific. n.d. Gateway Cloning Protocols. Viitattu 17.10.2023. <https://www.thermofisher.com/fi/en/home/life-science/cloning/gateway-cloning/protocols.html>

Thermo Fisher Scientific. n.d. Gateway Cloning. Viitattu 05.09.2023. <https://www.thermofisher.com/fi/en/home/life-science/cloning/gateway-cloning.html>

Thermo Fisher Scientific. n.d. Plasmid DNA Miniprep Kits. Viitattu 05.09.2023. <https://www.thermofisher.com/fi/en/home/life-science/dna-rna-purification-analysis/plasmid-isolation/plasmid-dna-mini-prep.html>

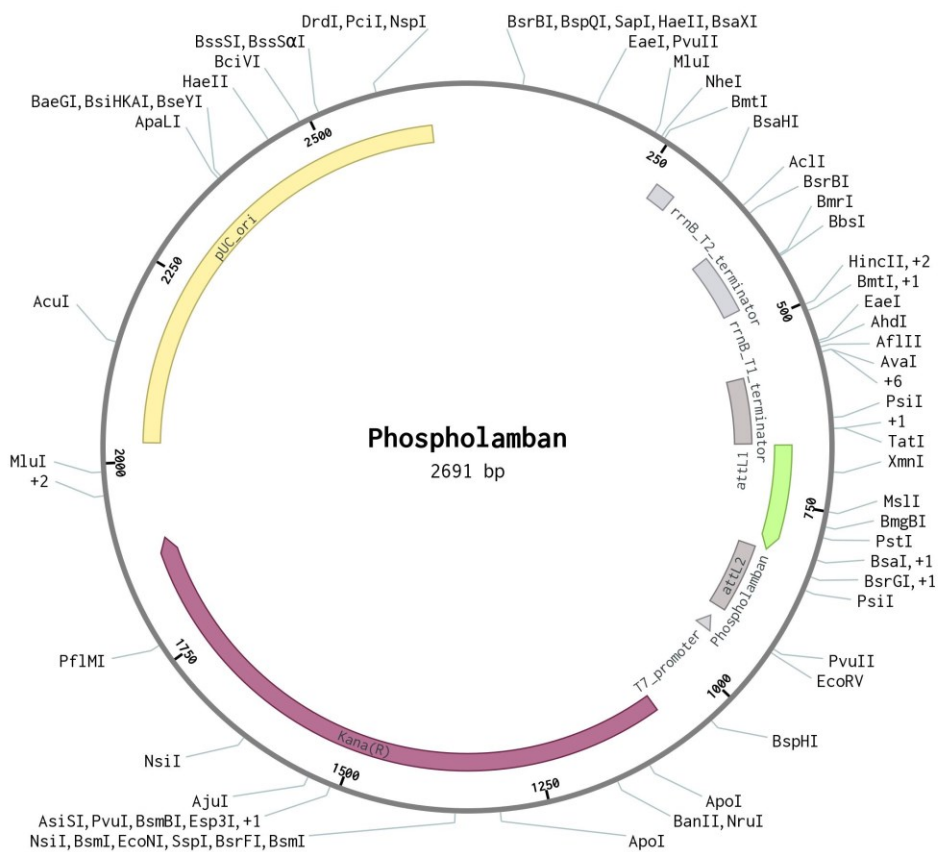
Westermeier, R. 2016. *Electrophoresis in practice: a guide to methods and applications of DNA and protein separations (Fifth edition.)*. pp. 165–179. Wiley VCH.

LIITTEET

Liite 1. Fosfolambaani

10/17/2023 1:07:50 PM

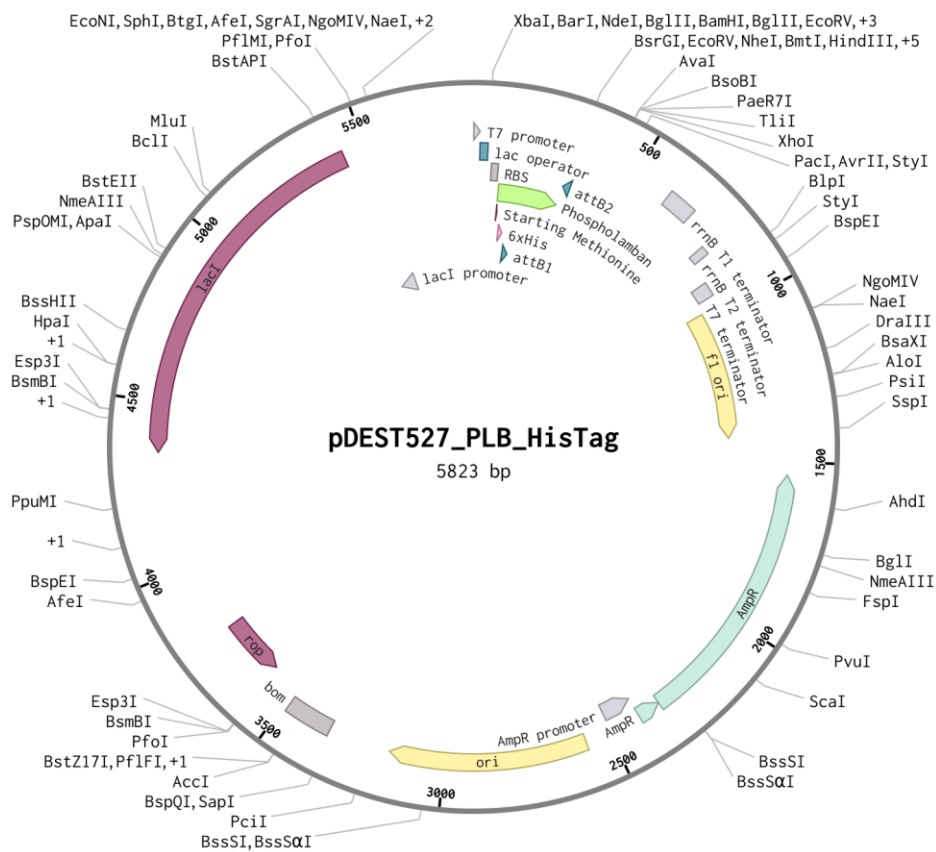
Phospholamban (2691 bp)



Liite 3. His-TEV-PLB-His ekspressiovektori

11/29/2023 1:05:59 PM

pDEST527_PLB_HisTag (5823 bp)



Liite 4. Bio Rad NGC-laitteen menetelmä puhdistamista varten

1(2)

ChromLab Method Report - Affinity IMAC_PLB_MBP_pDEST566



Created: 9/15/2023 12:56 PM Fluidic Scheme: no buffer blending
 Last Modified: 9/15/2023 12:56 PM Pump Head: F10
 Project: Essi Control Flow Rate: Yes
 Technique: Affinity pH Monitoring: No

Method Notes: METHOD DESCRIPTION: This method is used to purify molecules on the basis of molecular affinity. The protein of interest is adsorbed to the column ligand. Unbound sample is removed with a column wash and the protein is eluted using a one step gradient of a buffer to displace it. Finally, the column is re-equilibrated with the start buffer.

COLUMN/SAMPLE: This method is designed for use with 5-ml IMAC columns, but it can be scaled to work with columns of different sizes.

MINIMUM REQUIRED DEVICES: Gradient Pumps A and B, Mixer module, Sample Inject Valve module, Single-Wavelength UV-Conductivity detector, BioFrac Fraction Collector

METHOD PARAMETERS
 Flow Rate 7.5 ml/min
 Sample Size: 2.0 ml
 Fraction Size 1.0 ml
 Fraction Collector Rack: F1 (12-13 mm x 100 mm tubes)

(jatkuu)

Fraction Collection:

Phase	Rack Type / Outlet Valve	Max Fraction Size (ml)
2	30 mm / 50 ml	50.00
3	30 mm / 50 ml	10.00
4	96-well microplate	1.00

Buffer Selection

Inlet A: Buffer A 1
 Inlet B: Buffer B 1

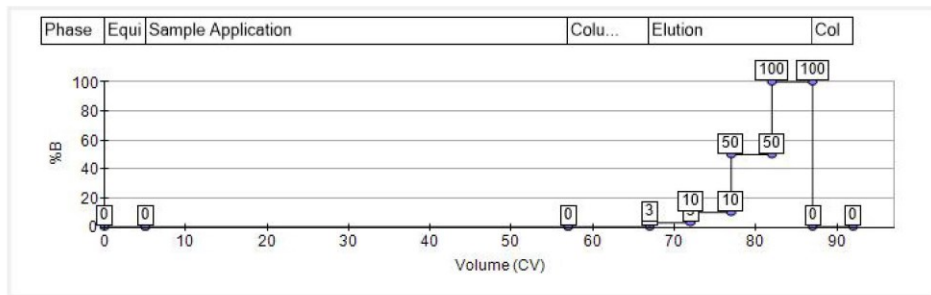
Columns

Position	Name	Volume	Max Pre Column Pressure	Max Delta Column Pressure	Default Flow Rate	Max Flow Rate
C1 Port 1	HisTrap HP, 1 ml	0.96 ml	0.50 MPa	0.30 MPa	1 ml/min	4 ml/min

UV Detector

Wavelengths: 280 nm

Gradient Graph



Liite 4. Bio Rad NGC-laitteen menetelmä puhdistamista varten

2(2)

ChromLab Method Report - Affinity IMAC_PLB_MBP_pDEST566



Method Steps

Step #	Total Vol (CV)	Step Description	Vol (CV)	Flow Rate (ml/min)	%B	Phase	Step Parameters
1	0	Gradient Segments	5	0	0	Equilibration	Forward Flow
1.1	5	Isocratic Flow	5	1	0	Equilibration	Buffer A 1, Buffer B 1
2	5	Hold Until (Disabled)	0	0	0	Equilibration	
3	5	Zero Baseline	0	0	0	Equilibration	
4	5	Fraction Collection (Frac. Size: 50.00 ml)	0	0	0	Sample Application	Scheme: Collect All (NGC FC)
5	5	Load Inject Sample	51.97	0		Sample Application	
5.1	5	Change Valve (Sample Inject Valve)	0	0		Sample Application	Sample Pump Direct Inject
5.2	56.97	Inject Sample	51.97	1		Sample Application	Interrupt if air
5.3	56.97	Change Valve (Sample Inject Valve)	0	0		Sample Application	Manual Load Loop / System Pump to Column
6	56.97	Fraction Collection (Frac. Size: 10.00 ml)	0	0	0	Column Wash	Scheme: Collect All (NGC FC)
7	56.97	Gradient Segments	10	0	0	Column Wash	Forward Flow
7.1	66.97	Isocratic Flow	10	1	0	Column Wash	Buffer A 1, Buffer B 1
8	66.97	Hold Until (Disabled)	0	0	0	Column Wash	
9	66.97	Fraction Collection (Frac. Size: 1.00 ml)	0	0	0	Elution	Scheme: Collect All (NGC FC)
10	66.97	Gradient Segments	20	0	0	Elution	Forward Flow
10.1	71.97	Isocratic Flow	5	1	3	Elution	Buffer A 1, Buffer B 1
10.2	76.97	Isocratic Flow	5	1	10	Elution	Buffer A 1, Buffer B 1
10.3	81.97	Isocratic Flow	5	1	50	Elution	Buffer A 1, Buffer B 1
10.4	86.97	Isocratic Flow	5	1	100	Elution	Buffer A 1, Buffer B 1
11	86.97	Fraction Collection (Waste)	0	0	0	Column Wash	
12	86.97	Gradient Segments	5	0	0	Column Wash	Forward Flow
12.1	91.97	Isocratic Flow	5	1	0	Column Wash	Buffer A 1, Buffer B 1
13	91.97	Hold Until (Disabled)	0	0	0	Column Wash	

Liite 5. Proteiinin puhdistamisessa käytetty muokattu menetelmä

1(2)

ChromLab Method Report - Affinity IMAC_PLB_MBP_pDEST566,v2.



Created: 9/15/2023 3:26 PM Fluidic Scheme: no buffer blending
 Last Modified: 9/15/2023 3:30 PM Pump Head: F10
 Project: Essi Control Flow Rate: Yes
 Technique: Affinity pH Monitoring: No

Method Notes: METHOD DESCRIPTION: This method is used to purify molecules on the basis of molecular affinity. The protein of interest is adsorbed to the column ligand. Unbound sample is removed with a column wash and the protein is eluted using a one step gradient of a buffer to displace it. Finally, the column is re-equilibrated with the start buffer.

COLUMN/SAMPLE: This method is designed for use with 5-ml IMAC columns, but it can be scaled to work with columns of different sizes.

MINIMUM REQUIRED DEVICES: Gradient Pumps A and B, Mixer module, Sample Inject Valve module, Single-Wavelength UV-Conductivity detector, BioFrac Fraction Collector

METHOD PARAMETERS
 Flow Rate 7.5 ml/min
 Sample Size: 2.0 ml
 Fraction Size 1.0 ml
 Fraction Collector Rack: F1 (12-13 mm x 100 mm tubes)

Fraction Collection:

Phase	Rack Type / Outlet Valve	Max Fraction Size (ml)
2	30 mm / 50 ml	50.00
3	30 mm / 50 ml	50.00
4	30 mm / 50 ml	12.00

Buffer Selection

Inlet A: Buffer A 1

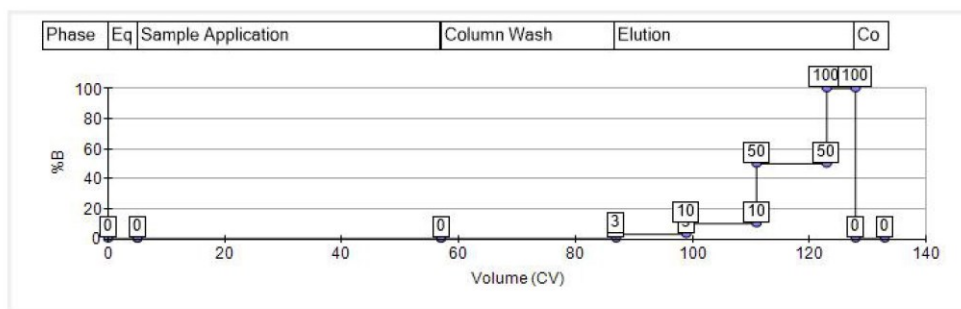
Inlet B: Buffer B 1

Columns

Position	Name	Volume	Max Pre Column Pressure	Max Delta Column Pressure	Default Flow Rate	Max Flow Rate
C1 Port 1	HisTrap HP, 1 ml	0.96 ml	0.50 MPa	0.30 MPa	1 ml/min	4 ml/min

UV Detector

Wavelengths: 280 nm

Gradient Graph

Liite 5. Proteiinin puhdistamisessa käytetty muokattu menetelmä

2(2)

ChromLab Method Report - Affinity IMAC_PLB_MBP_pDEST566,v2.



Method Steps

Step #	Total Vol (CV)	Step Description	Vol (CV)	Flow Rate (ml/min)	%B	Phase	Step Parameters
1	0	Gradient Segments	5	0	0	Equilibration	Forward Flow
1.1	5	Isocratic Flow	5	1	0	Equilibration	Buffer A 1, Buffer B 1
2	5	Hold Until (Disabled)	0	0	0	Equilibration	
3	5	Zero Baseline	0	0	0	Equilibration	
4	5	Fraction Collection (Frac. Size: 50.00 ml)	0	0	0	Sample Application	Scheme: Collect All (NGC FC)
5	5	Load Inject Sample	51.97	0		Sample Application	
5.1	5	Change Valve (Sample Inject Valve)	0	0		Sample Application	Sample Pump Direct Inject
5.2	56.97	Inject Sample	51.97	1		Sample Application	Interrupt if air
5.3	56.97	Change Valve (Sample Inject Valve)	0	0		Sample Application	Manual Load Loop / System Pump to Column
6	56.97	Fraction Collection (Frac. Size: 50.00 ml)	0	0	0	Column Wash	Scheme: Collect All (NGC FC)
7	56.97	Gradient Segments	30	0	0	Column Wash	Forward Flow
7.1	86.97	Isocratic Flow	30	1	0	Column Wash	Buffer A 1, Buffer B 1
8	86.97	Hold Until (Disabled)	0	0	0	Column Wash	
9	86.97	Fraction Collection (Frac. Size: 12.00 ml)	0	0	0	Elution	Scheme: Collect All (NGC FC)
10	86.97	Gradient Segments	41	0	0	Elution	Forward Flow
10.1	98.97	Isocratic Flow	12	1	3	Elution	Buffer A 1, Buffer B 1
10.2	110.97	Isocratic Flow	12	1	10	Elution	Buffer A 1, Buffer B 1
10.3	122.97	Isocratic Flow	12	1	50	Elution	Buffer A 1, Buffer B 1
10.4	127.97	Isocratic Flow	5	1	100	Elution	Buffer A 1, Buffer B 1
11	127.97	Fraction Collection (Waste)	0	0	0	Column Wash	
12	127.97	Gradient Segments	5	0	0	Column Wash	Forward Flow
12.1	132.97	Isocratic Flow	5	1	0	Column Wash	Buffer A 1, Buffer B 1
13	132.97	Hold Until (Disabled)	0	0	0	Column Wash	

Liite 6. Proteiinien tiedot Protparam-ohjelmasta

PLB pDEST566 vektorista

MRSHHHHHHGKIEEGKLIWINGDKGYNGLAEVGKKFEKDTGIKVTVVEHPDKLEEKFPQVAATGDGPDII
 FWAHDRFGGYAQSGLLAEITPKAFQDKLYPFTWDAVRYNGKLIAYPIAVEALSLIYNKDLLPNPPKTWEEI
 PALDKELKAKGKSALMFNLQEPYFTWPLIAADGGYAFKYENKGYDIKDVGVNDAGAKAGLTFLVDLIK
 HMNADTDYSIAEAAFNKGETAMTINGPWAWSNIDTSKVNYGVTVLPTFKGQPSKPFVGVLSAGINAASP
 NKELAKEFLENYLLTDEGLEAVNKDKPLGAVALKSYEEELAKDPRIAATMENAQKGEIMPNIPQMSAFWY
 AVRTAVINAASGRQTVDEALKDAQTNSGSDITSLYKKAGFENLYFQG/SMEKVQYLTRSAIRRASTIEM
 PQARQKLQNLFHHHHHH*

Number of amino acids: 437 / 39
 Molecular weight: 48613.10 / 4746.41
 Theoretical pI: 6.33 / 10.93

Extinction coefficients:

Extinction coefficients are in units of $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$, at 280 nm measured in water.

Ext. coefficient 70820 / 1490 (Huom >10% virhe mahdollinen)
 Abs 0.1% (=1 g/l) 1.457 / 0.314

Katkaistu PLB

SMEKVQYLTRSAIRRASTIEMPPQARQKLQNLFHHHHHH*

Number of amino acids: 39
 Molecular weight: 4746.41
 Theoretical pI: 10.93

Extinction coefficient at 205 nm: $162980 M^{-1} \text{ cm}^{-1}$

Extinction coefficient at 214 nm: $83074 M^{-1} \text{ cm}^{-1}$

Abs (0.1%) at 205 nm: 34.34

Abs (0.1%) at 214 nm: 17.50

PLB pDEST527 vektorista

MRSGSHHHHHRSDITSLYKKAGFENLYFQG/SMEKVQYLTRSAIRRASTIEMPPQARQKLQNLFHHHH
 HH*

Number of amino acids: 70
 Molecular weight: 8407.45
 Theoretical pI: 10.36

Extinction coefficient at 205 nm: $315050 M^{-1} \text{ cm}^{-1}$

Extinction coefficient at 214 nm: $165674 M^{-1} \text{ cm}^{-1}$

Abs (0.1%) at 205 nm: 37.47

Abs (0.1%) at 214 nm: 19.71

<https://web.expasy.org/protparam/>

Liite 7. SDS-PAGEssa käytetty standardi, PageRuler Broad Range

