



Teemu Roininen

Tangentiaalisen ultrasuodatuksen ja differentiaalisen ultrasentrifugoinnin konsentroititehokkuuden vertailu $\Phi 6$ -bakteriofaagin avulla

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalytiikka (AMK)

Laboratorioanalytiikka

Opinnäytetyö

19.4.2024

Tiivistelmä

Tekijä:	Teemu Roininen
Otsikko:	Tangentiaalisen ultrasuodatuksen ja differentiaalisen ultrasentrifugoinnin konsentrintitehokkuuden vertailu Φ 6-bakteriofaagin avulla
Sivumäärä:	30 sivua + 3 liitettä
Aika:	19.4.2024
Tutkinto:	Laboratorioanalyttikko (AMK)
Tutkinto-ohjelma:	Laboratorioanalytiikka
Ohjaajat:	Vanhempi yliopistotutkija, dosentti, Katri Eskelin Vanhempi biotieteiden lehtori, Tiina Soininen

Tämän opinnäytetyön tavoitteena oli tutkia suurten makromolekyyliden konsentroitumiskäyttäytymistä tangentiaalisessa ultrasuodatuksessa ja differentiaalisessa ultrasentrifugoinnissa. Tämän lisäksi työssä haluttiin määrittää, kumpi menetelmä on kustannustehokkaampi näytteiden konsentroinnissa.

Makromolekyyliden mallina käytettiin puhdistettua Φ 6-bakteriofaagia. Φ 6 on lipidivai-pallinen dsRNA-bakteriofagi. Sen ulkohalkaisija on 85 nm ja MW $9,9 \cdot 10^4$ kDa. Konsentrintianalyysissä Φ 6-viruksesta tehtiin laimennoksia, joita käytettiin näytteinä 100 kDa RC Amicon® Ultra-4- ja 100 kDa PES Vivaspin® 6 -konsentraattoreissa. Konsentroitumista tutkittiin myös Thermo Scientific Sorvall wX+ Ultra -ultrasentrifugin uudella Fiberlite™ F50L-24 x 1,5 -roottorilla eri kierrosnopeuksien ja sentrifugointiaikojen yhdistelmillä. Menetelmien konsentrintitehokkuus määritettiin ensisijaisesti konsentraattien viruspitoisuuksien (PFU/ml) ja saantojen (PFU, %) avulla.

Konsentraattoreilla loppupitoisuus ja saanto laskivat lähtöpitoisuuden laskiessa. RC-membraani on noin 2 kertaa tehokkaampi konsentroinnissa kuin PES-membraani. Kun lähtöpitoisuus on noin 10^{10} – 10^{11} PFU/ml, näytteet voidaan konsentroida Amicon-konsentraattoreilla 15x-pitoisuuteen yli 80 %:n saannossa ja Vivaspin-konsentraattoreilla noin 9x-pitoisuuteen 50 %:n saannossa. Kun lähtöpitoisuus on noin 10^9 – 10^{10} PFU/ml, näytteet voidaan konsentroida Amicon-konsentraattoreilla noin 4x-pitoisuuksiin 15–30 %:n saannossa ja Vivaspin-konsentraattoreilla 2x-pitoisuuksiin 10 %:n saannossa. Lähtöpitoisuuden ollessa 10^8 – 10^9 PFU/ml saannot ovat molemmilla konsentraattoreilla <1 %. F50L-roottorin konsentrintitehokkuus on suurempi kuin konsentraattoreilla, ja se on yhtä suuri lähtöpitoisuuksien $8,1 \cdot 10^{10}$ ja $2,4 \cdot 10^9$ PFU/ml sekä testattujen olosuhteiden kesken: konsentraattien saannot ovat keskimäärin yli 80 % ja loppupitoisuudet noin 5,2x lähtöpitoisuuksiin nähden. F50L-roottorilla olosuhde 15 min, 35 000 rpm riittää Φ 6-näytteiden konsentroiintiin. Jos laboratoriossa voidaan käyttää ultrasentrifugilaitteistoja, F50L-roottori on konsentraattoreita kustannustehokkaampi näytteiden konsentroinnissa.

Avainsanat: liikkuvan vyöhykkeen ultrasentrifugointi, differentiaalinen ultrasentrifugointi, ultrasuodatus, plakkianalyysi, Φ 6-bakteriofaagi

Abstract

Author: Teemu Roininen
Title: Comparison of Concentration Efficiency between Tangential Ultrafiltration and Differential Ultracentrifugation by Utilization of $\Phi 6$ Bacteriophage
Number of Pages: 30 pages + 3 appendices
Date: 19 April 2024

Degree: Bachelor of Laboratory Services
Degree Programme: Laboratory Sciences

Instructors: Katri Eskelin, Senior Research Scientist, Docent
Tiina Soininen, Senior Lecturer

The goal of this Bachelor Thesis project was to study how large macromolecules behave when they are concentrated by methods based on tangential ultrafiltration and differential ultracentrifugation. Additionally, it was of interest to determine which of the two methods was more profitable for sample concentrations.

Purified bacteriophage $\Phi 6$ was used as a model of large macromolecules. $\Phi 6$ is a lipid enveloped dsRNA phage. Its outer diameter is 85 nm and MW $9.9 \cdot 10^4$ kDa. Various $\Phi 6$ dilutions were made and utilized as samples for 100 kDa RC Amicon[®] Ultra-4 and 100 kDa PES Vivaspin[®] 6 concentrators. Sample behavior during concentration was also evaluated with Thermo Scientific Sorvall wX+ Ultra and its novel Fiberlite[™] F50L-24 x 1.5 rotor in running conditions which differed from each other based on rotational speeds and run times. Concentration efficiency of both methods was determined primarily by viral end concentrations (PFU/ml) and yields (PFU, %).

In the case of the concentrators, end concentrations and yields diminished as the initial concentration decreased. Also, RC membrane is approximately 2 times more efficient than PES in sample concentration. When initial concentration is 10^{10} – 10^{11} PFU/ml, sample concentration can be increased to 15x with over 80 % yields and almost to 9x with 50 % yields with Amicon and Vivaspin, respectively. Starting from 10^9 – 10^{10} PFU/ml, sample concentration can be increased approximately to 4x with 15–30 % yields and to 2x with 10 % yields with Amicon and Vivaspin, respectively. If viral concentrations are initially 10^8 – 10^9 PFU/ml, both concentrators have yields less than 1 %. F50L rotor's concentration efficiency is greater than that of the concentrators and it is equal among starting concentrations $8.1 \cdot 10^{10}$ and $2.4 \cdot 10^9$ PFU/ml as well as the tested running conditions: Yields in the concentrated samples are over 80 % on average and the end concentrations are around 5.2x in relation to the starting concentrations. With F50L, 15 min and 35 000 rpm are sufficient to concentrate $\Phi 6$ samples. If the laboratory has access to ultracentrifuges, it is more profitable to use F50L rotor than concentrators for sample concentrations.

Keywords: rate zonal ultracentrifugation, differential ultracentrifugation, ultrafiltration, plaque assay, $\Phi 6$ bacteriophage

Sisällys

Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Kirjallisuuskatsaus	2
2.1	Ultrasentrifugointi	2
2.1.1	Sedimentaatioteoria	2
2.1.2	Liikkuvan vyöhykkeen ultrasentrifugointi	4
2.1.3	Differentiaalinen ultrasentrifugointi	6
2.2	Ultrasuodatus	7
2.3	Virustutkimuksen malliorganismit	8
2.3.1	Φ 6-bakteriofaagi	8
2.3.2	<i>Pseudomonas syringae</i>	10
3	Työn suoritus	10
3.1	Materiaalit ja menetelmät	11
3.2	Φ 6 ja <i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> HB10Y	11
3.3	Plakkianalyysi kaksikerrosmaljausmenetelmällä	11
3.4	Φ 6-stokin valmistus	12
3.5	Φ 6-bakteriofaagin tuotto ja puhdistus	13
3.6	Konsentraattorit ja roottorit	15
3.7	Konsentroidintianalyysien suoritus	15
4	Tulokset	16
4.1	Φ 6-bakteriofaagin puhdistus	16
4.2	Tulokset konsentroidintehokkuudesta	19
4.2.1	Amicon Ultra-4- ja Vivaspin 6 -konsentraattorit	19
4.2.2	F50L-roottori	22
5	Yhteenveto	24
	Lähteet	28

Liitteet

Liite 1: Kasvatusalustojen koostumukset

Liite 2: Ultrasentrifugointiaikojen laskenta

Liite 3: Konsentrintianalyysien tulostaulukot

Lyhenteet

EM:	Elektronimikroskopia.
FBS:	Fetal bovine serum. Naudan sikiön seerumi.
LB:	Luria-Bertani. Kasvatusmediumi.
MOI:	Multiplicity of infection. Infektion monikerta. Suhdeluku, joka kuvaa infektiivisten viruspartikkelien määrää isäntäsoluihin nähden.
MS:	Massaspektrometria.
MW:	Molecular weight. Molekyylipaino.
MWCO:	Molecular weight cut-off. Molekyylipainon leikkauskoko.
OD ₅₅₀ :	Optical density at 550 nm. Optinen tiheys aallonpituudella 550 nm.
O/N:	Over night. Yön yli.
PC:	Polymerase complex. Polymeraasikompleksi.
PEG ₆₀₀₀ :	Polyethylene glycol 6000. Polyetyleeniglykoli-6000.
PES:	Polyethersulphone. Polyeetterisulfoni.
PFU:	Plaque forming unit. Plakkeja muodostava yksikkö eli plakkiluku.
pv.:	Pathovar. Patogeeninen variantti.
RC:	Regenerated cellulose. Regeneroitu selluloosa.
RdRp:	RNA-dependent RNA-polymerase. RNA-riippuvainen RNA-polymeraasi.

rpm_{act}: Roottorin kierrosnopeus (rotaatiota per minuutti), joka on pienempi kuin roottorin suurin mahdollinen kierrosnopeus.

rpm_{max}: Roottorin suurin mahdollinen kierrosnopeus (rotaatiota per minuutti).

RO: Reverse osmosis. Käänteisosmoosi.

RT: Room temperature. Huoneenlämpötila (noin 23 °C).

SDS-PAGE: Sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. Natriumdodekyylisulfaatti-polyakryliamidigeelielektroforeesi.

1 Johdanto

Virusnäytteiden konsentroitua tarvitaan esimerkiksi puskurinvaihdossa ja viruspuhdistuksen aikana, kun näytteiden puskuri halutaan vaihtaa ja näytteiden seassa olevista gradienttimateriaaleista halutaan päästä eroon. Myös rakenneanalyysissä käytetyt EM- ja MS-tekniikat edellyttävät, että virusnäytteet on saatu konsentroitua korkeisiin pitoisuuksiin ja että näytteet ovat mahdollisimman homogeenisia sekä biologisesti aktiivisia. Modernissa virologiassa käytetyt konsentroidintimenetelmät ovat sakkaus, ultrasuodatus, ultrasentrifugointi ja kromatografiset tekniikat.

Eri konsentroidintimenetelmät kohdistavat virusnäytteeseen eri määrän biokemiallisia ja biofysikaalisia stressitekijöitä. Virusten proteiiniakuoren tai lipidivaipan pintaproteiinit toimivat spesifisti viruksen isäntäsolun tunnistamisessa, ja näihin komponentteihin kohdistuva stressi voi saada aikaan viruksen hajoamista tai virusproteiinien sakkautumista, mikä alentaa virusnäytteen biologista aktiivisuutta ja vaikeuttaa näytteiden jatkoanalysointia. Ideaalinen konsentroidintimenetelmä mahdollistaa näytteen nopean, toistettavan, yksinkertaisen sekä edullisen konsentroidinnin ilman merkittävää näytteen biologisen aktiivisuuden laskua. Näitä parametreja, kuten myös konsentroidintavan lähtötilavuuden suuruutta, menetelmän käyttöönotettavuutta ja analytikoilta vaadittavaa osaamista, käytetään konsentroidintimenetelmien välisessä vertailussa ja lopullisen menetelmän valinnassa.

Tämä opinnäytetyö tehtiin Helsingin yliopiston Bio- ja ympäristötieteellisen tiedekunnan Biocomplex-tutkimusyksikössä aikavälillä 13.11.2023–26.1.2024. Työn tarkoituksena oli tutkia suurten makromolekyylien konsentroidintumiskäyttäytymistä $\Phi 6$ -malliviruksen avulla. Työssä käytettiin kahta eri menetelmää, jotka perustuivat tangentialiseen ultrasuodatukseen ja differentiaaliseen ultrasentrifugointiin. Menetelmiä verrattiin ensisijaisesti loppupitoisuuksien (PFU/ml) ja saantojen (PFU, %) avulla, jotta voitiin määrittää, kumpi menetelmä on kustannustehokkaampi näytteiden konsentroidinnissa.

2 Kirjallisuuskatsaus

2.1 Ultrasentrifugointi

Ultrasentrifugoinnilla tarkoitetaan sentrifugointitekniikoita, joissa roottorien pyörimisnopeudet ovat suuruusluokkaa 35 000–120 000 rpm, mikä vastaa roottorista riippuen noin 350 000–700 000 RCF-arvoja [1; 2, s. 168]. Jotta roottorit voivat pyöriä näin suurilla nopeuksilla, ultrasentrifugin roottorikammiossa tulee olla vaakuumi, jotta ilmanvastuksesta aiheutuva kitka ei vastustaisi roottorin pyörimistä ja kuumentaisi roottoria. Ultrasentrifugointi mahdollistaa esimerkiksi ribosomien, ekstrasellulaaristen vesikkelien, makromolekyylien tai viruksien puhdistamisen.

Kirjallisuuskatsaus keskittyy preparatiiviseen ultrasentrifugointiin. Preparatiivista ultrasentrifugointia käytetään tyypillisesti silloin, kun tarkoituksena on eristää ja puhdistaa yksi tai useampi näytekomponentti alkuperäisestä näyteseoksesta. Tekniikka hyödyntää swing-out-tyyppisiä roottoreita ja kiinteän kulman roottoreita, jotka eroavat toisistaan muun muassa näytetilavuuksien ja käytettävien gvoimien osalta. [2, s. 168; 3.]

2.1.1 Sedimentaatioteoria

Sedimentaatioteoria ja sen periaatteet on kuvattu virusten näkökulmasta. Sentrifugoitavien viruspartikkelien käyttäytymistä ja erottumista voidaan kuvata Stoken lain avulla (kaava 1) [1; 4, s. 5].

$$v = \frac{d^2(p-L) \cdot g}{18 \eta} \quad (1)$$

d : pyöreän viruspartikkelin halkaisija

p : viruspartikkelin tiheys

L : mediumin eli viruspartikkelia ympäröivän liuoksen tiheys

g : kiihtyvyys Maan putoamiskiihtyvyyksinä

η : mediumin viskositeetti

v : viruspartikkelille ominainen sedimentaationopeus.

Kaava 1 esittää, kuinka viruspartikkelien koko vaikuttaa suoraan verrannollisesti sedimentaationopeuteen. Sedimentaationopeus on suoraan verrannollinen partikkelin ja mediumin tiheyden erotusta kuvaavan termin ($\rho-L$) kanssa. Jos viruspartikkelien tiheys on yhtä suuri kuin mediumin tiheys, sedimentaationopeus on nolla. Mediumin viskositeetin kasvattaminen pienentää sedimentaationopeutta, kun taas g-voimien suurentaminen nostaa sedimentaationopeutta. [1.]

Stoken laista voidaan johtaa analyttikohtainen sedimentaatiovakio (kaava 2). Viruspartikkelien muoto vaikuttaa sedimentaationopeuksiin ja sedimentaatiovakioihin. Kaavaa 2 sovelletaan pyöreille viruksille [5].

$$S = \frac{m}{6\pi\eta r} \quad (2)$$

m : viruspartikkelin massa

η : mediumin viskositeetti

r : viruspartikkelin säde.

Sedimentaatiovakio voidaan ilmoittaa Svedberg-yksikkönä ($1 \text{ S} = 10^{-13}$ sekuntia), joka kuvaa, kuinka nopeasti viruspartikkeli sedimentoituu suurten g-voimien vaikutuksesta [2, s. 169; 4, s. 5]. Kirjallisuudessa on kuvattu erilaisten analyttien sedimentaatiovakioita, jotka on määritetty standardisoiduissa olosuhteissa. Prokaryoottivirusten sedimentaatiovakiot ovat tyypillisesti 100–1000 S [2, s. 169].

Roottorikohtaista sedimentoitumistehokkuutta voidaan arvioida k-tekijän avulla (kaava 3). Mitä pienempi roottorin k-tekijä on, sitä nopeammin roottori kykenee sedimentoimaan viruspartikkeleita. [6.]

$$k = \frac{2,533 \cdot 10^5 \ln\left(\frac{r_{max}}{r_{min}}\right)}{(rpm/1000)^2} \quad (3)$$

r_{max} : roottorin maksimisäde (esimerkiksi cm)

r_{min} : roottorin minimisäde (esimerkiksi cm).

Roottorin k-tekijä maksiminopeudessa ilmoitetaan roottorissa numeerisena arvona. Se määräytyy kaavan 3 mukaisesti. Mikäli roottoria käytetään alhaisemalla kierrosnopeudella, k_{adj} -tekijä lasketaan kaavan 4 mukaisesti [5].

$$k_{adj} = k \cdot \left(\frac{rpm_{max}}{rpm_{act}} \right)^2 \quad (4)$$

k: k-tekijä

rpm_{max} : roottorin suurin mahdollinen kierrosnopeus

rpm_{act} : käytetty kierrosnopeus.

Roottorin k-tekijän ja tutkittavan viruksen sedimentaatiovakion välistä suhdetta vertaamalla voidaan määrittää, kuinka kauan virusta tulee sentrifugoida, jotta se saadaan sedimentoitua (kaava 5) [6]. Jos sedimentaatiovakioita ei tunneta, sedimentaatioaika määritetään kokeellisesti.

$$t = \frac{k}{S} \quad (5)$$

k: roottorin k-tekijä (joko k tai k_{adj})

S: viruksen sedimentaatiovakio.

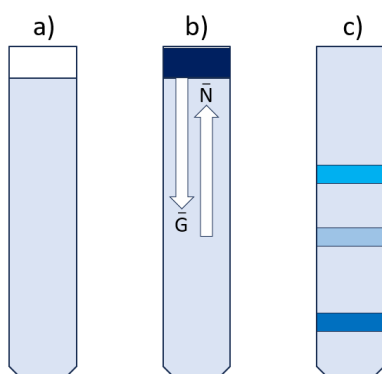
2.1.2 Liikkuvan vyöhykkeen ultrasentrifugointi

Liikkuvan vyöhykkeen ultrasentrifugointi on tekniikka, joka erottelee näytekomponentit niiden sedimentaatiovakioiden perusteella [1; 2, s. 170; 7; 4, s. 2].

Tässä tekniikassa ultrasentrifugiputket täytetään viskooseilla tiheysgradienttiliuoksilla siten, että gradientti kasvaa lineaarisesti, porrastetusti tai logaritmisesti sentrifugiputken pohjaan päin kuljettaessa [8; 9; 2, s. 168–170]. Ideaalitilanteessa gradienttiliuosten käyttö mahdollistaa sen, että näytteestä voidaan selektiivisesti erotella sellaiset komponentit, joilla on sama koko, mutta eri massa. Tekniikka pystyy erottelemaan esimerkiksi maturoituneet virukset sellaisista viruksista, jotka eivät ole vielä pakanneet genomiaan [2, s. 169].

Gradienttimateriaaleille on useita kriteerejä [9; 4, s. 6], mutta ideaalista gradienttimateriaalia ei ole olemassa [2, s. 169–170; 9; 4, s. 6]. Gradienttimateriaali ei saa vaikuttaa virusnäytteen biologiseen aktiivisuuteen tai reagoida sentrifugiputkien kanssa. Sen tulee olla edullinen, ja siitä tehtyjen liuosten happamuutta ja ionivahvuutta pitää pystyä säätämään. Usein sopivimpia gradienttimateriaaleja ovat epäorgaaniset suolat, jodoidut yhdisteet tai tietyt sokeriyhdisteet [8; 9]. Liikkuvan vyöhykkeen ultrasentrifugoinnissa käytetään usein sakkaroosigradientteja niiden inertin luonteen vuoksi. Gradientit valmistetaan itse tai kaupallisten gradienttisekoittajien avulla [8; 2, s. 169–170; 9].

Ultrasentrifugointia varten virusnäyte annostellaan valmiin gradientin päälle (kuva 1b). Koska gradienttiliuoksen tiheys on näyteliuoksen tiheyttä suurempi, gradientti estää näytteen diffundoitumista koko sentrifugiputken alueelle. [7; 9.] Ultrasentrifugoinnin aikana tiheysgradientti kohdistaa näytekomponentteihin nosteen, joka vaikuttaa kohtisuorasti suhteellista sentrifugivoimaa vastaan (kuva 1b). Noste kasvaa sentrifugiputken pohjaan päin kuljettaessa, kun gradientin viskositeetti ja tiheys kasvavat. Kun näytekomponentit liikkuvat gradientin läpi eri nopeuksilla Stokesin lain mukaisesti, ne erottuvat omiksi näytevyöhykkeiksi (kuva 1c). [2, s. 169–170; 1; 8; 9.] Ajo keskeytetään hetkellä, jolloin virus on erottunut näytteen muista komponenteista. Lopuksi haluttu virusnäytevyöhyke kerätään gradientista.



Kuva 1. Liikkuvan vyöhykkeen ultrasentrifugointi. Gradienttiputki täytetään lähes kokonaan gradienttiliuoksella (A), minkä jälkeen näyteliuos pipetoidaan gradientin päälle (B). Näytekomponentit erottuvat ajon aikana omiksi näytevyöhykkeiksi, ja virusta sisältävä vyöhyke voidaan havaita, jos virusten koko ja konsentraatio on riittävän suuri siroamaan valoa (C). [2, s. 168, 170; 7; 9.]

Käytännössä liikkuvan vyöhykkeen ultrasentrifugointi tehdään swing out -tyyppisillä roottoreilla, joissa sentrifugiputket ovat 90°:n horisontaalisessa kulmassa sentrifugoinnin aikana. Tämä mahdollistaa näytekomponenttien sedimentoitumisen koko sentrifugiputken pituudelta, mikä auttaa näytekomponenttien erottamista. [4, s. 7.] Tekniikassa on tärkeää, että ajoaika ja kierrosnopeudet optimoidaan. Mikäli ajoajat ja kierrosnopeudet ovat liian suuria, kaikki näytekomponentit sedimentoituvat sentrifugiputken pohjalle, jolloin virusnäytevyöhykkeen eristäminen ei ole enää mahdollista [9; 4, s. 3; 2, s. 170].

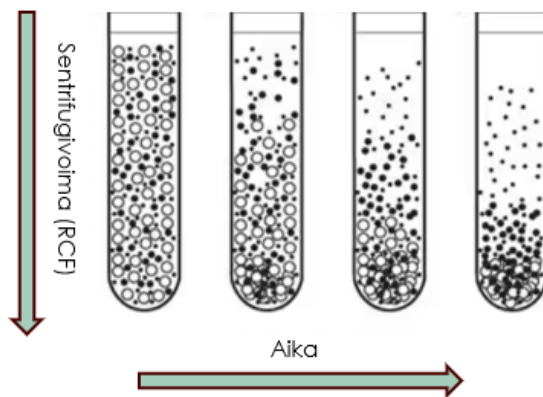
Liikkuvan vyöhykkeen ultrasentrifugoinnissa saannot vaihtelevat sen mukaan, kuinka hyvin analyytit, kuten virukset, sietävät hajoamista, gradienttimateriaaleja sekä osmoottista painetta ultrasentrifugoinnin aikana [2, s. 169]. Tekniikan rajoitteena on, että näyte laimenee, kun eri näytekomponentit erottuvat omiksi vyöhykkeikseen. Jatkoanalyysija varten virusnäytteet pitää konsentroida korkeisiin pitoisuuksiin, ja näytepuskuri pitää vaihtaa.

2.1.3 Differentiaalinen ultrasentrifugointi

Differentiaalinen ultrasentrifugointi eli pelletointi on yksinkertaisin ultrasentrifugointitekniikka, jota käytetään sekä virusten konsentroinnissa että fraktioinnissa pelletti- ja supernatanttifraktioksi. Differentiaalinen ultrasentrifugointi tehdään kiinteän kulman roottoreilla, joiden kulma on 15–45°. Mitä pienempi roottorin kulma on, sitä nopeampaa pelletointi on. [2, s. 168–169; 4, s. 2, 7; 9.] Tausalla on r_{\max} -arvon pieneneminen suhteessa r_{\min} -arvoon, eli sedimentoitumismatkan pieneneminen, mikä laskee k-tekijää ja pelletointiin kuluvaan aikaa (kaava 3 ja 5).

Differentiaalisessa ultrasentrifugoinnissa ei käytetä tiheysgradientteja, minkä vuoksi näytekomponentit esiintyvät suspensiona ennen sentrifugoinnin aloittamista. Osa pienikokoisista ja kevyistä analyyteista sijaitsevat sentrifugiputken pohjan alueella, minkä seurauksesta ne sedimentoituvat samaan aikaan kooltaan ja tiheydeltään suurien näytekomponenttien kanssa. Pellettiin päätyy suhteellisesti sitä enemmän pienempikokoisia analyytteja, mitä lähempänä niiden

sedimentaatiovakiot ovat suurikokoisten analyyttien sedimentaatiovakioiden kanssa (kuva 2). [2, s. 168–169; 9; 4, s. 2.]



Kuva 2. Differentiaalinen ultrasentrifugointi [9].

Pelletointi ei ole yhtä selektiivinen eri näytekomponenttien suhteen kuin liikkuvan vyöhykkeen ultrasentrifugointi. Tekniikka ei puhdistaa virusnäytteen komponentteja omiksi vyöhykkeikseen, vaan se rikastaa näytekomponentit pelletin pieneen tilavuuteen niiden sedimentaatiovakioiden laskevassa suuruusjärjestyksessä Stokesin lain mukaisesti (kuva 2). [2, s. 169; 4, s. 1–2; 9.] Mitä suurempia suhteelliset sentrifugivoimat, sentrifugointiajat ja virusten sedimentaatiovakiot ovat, sitä tehokkaammin virukset pelletoituvat [2, s. 169; 9].

2.2 Ultrasuodatus

Ultrasuodatus on yksinkertainen näytteenpuhdistusmenetelmä, joka hyödyntää puoliläpäiseviä membraaneja erottelemaan näytekomponentit koon perusteella [2, s. 167]. Ultrasuodatuksessa oleellinen suure on membraanin MWCO-arvo. MWCO-arvo on standardisoimaton yksikkö, joka kuvaa molekyyllipainoltaan (Da) sellaista analyyttiä, josta 90 % pidättyy membraanin pintaan; 100 kDa:n membraani kykenee pidättämään 90 % analyyteista, joiden koko on 100 kDa. Ultrasuodatuksessa käytettävien membraanien huokoskoot ovat suuruusluokkaa 0,01–0,100 μm , mikä vastaa MWCO-arvoja 1–500 kDa. [10.] Käytännössä membraani tulee valita siten, että sen MWCO on 3–6 kertaa pienempi kuin

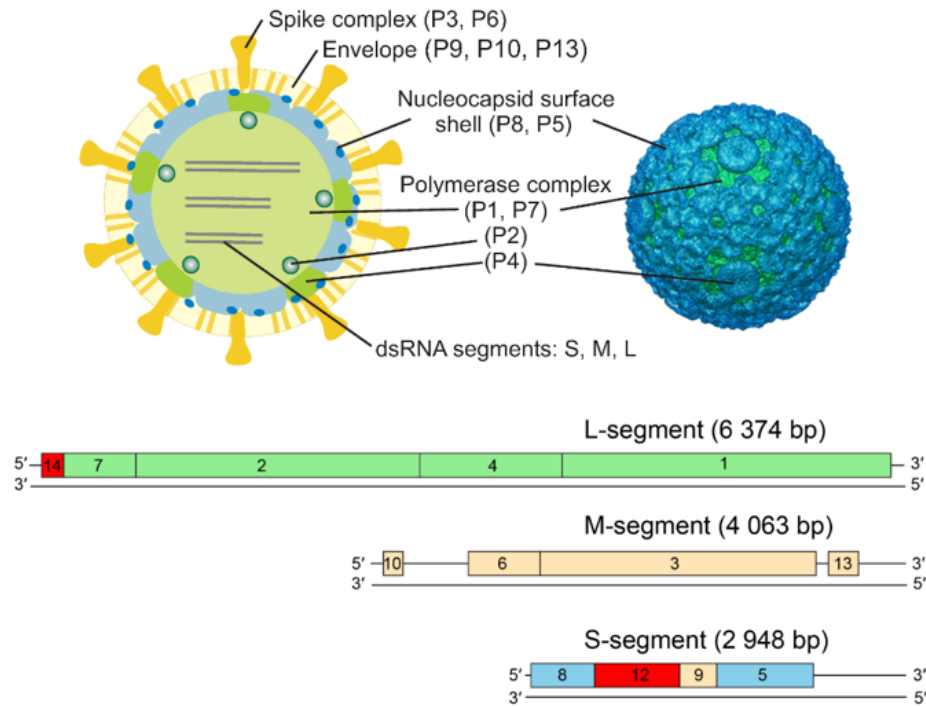
konsentroitavan analyytin koko [11]. Tekniikka soveltuu esimerkiksi proteiinien, muovipartikkelien, endotoksiinien ja virusten erottelamiseen alkuperäisestä näytteestä [10; 12].

Ultrasuodatuksessa näyte annostellaan membraanin päälle ja siihen kohdistetaan imun tai sentrifugoinnin avulla hydrostaattinen paine, joka pakottaa näytekomponentit kohti membraanin pintaa. Näytekomponentit, jotka ovat kooltaan suurempia kuin membraanin huokoskoko, pidättyvät membraanin pinnalle konsentraattifraktioksi eli retentaatiksi, kun taas näyteliuos ja membraanin huokoskoko pienemmät näytekomponentit kulkeutuvat membraanin läpi ohivirtausfraktioksi eli filtraatiksi. [2, s. 167; 12.]

2.3 Virustutkimuksen malliorganismit

2.3.1 Φ 6-bakteriofaagi

Φ 6 on *Cystoviridae*-perheeseen kuuluva lyyttinen, lipidivaipallinen dsRNA-bakteriofaagi (kuva 3), joka infektoi kasvipatogeenisia *Pseudomonas syringae* -bakteerikantoja [13, s. 799; 14, s. 462]. Virus eristettiin *P. syringae* pv. *paseolicola* HB10Y -bakteerikannasta, ja se on ensimmäinen koskaan eristetty dsRNA-bakteriofaagi. [13, s. 799; 15.] Φ 6 on yksi eniten tutkituista viruksista, ja sitä on käytetty dsRNA-virusten, esimerkiksi reovirusten, malliorganismina genomien pakkaamisen, replikaation, translaation ja kapsidin kokoamismekanismien tutkimisessa [15]. Φ 6 soveltuu sen biokemiallisen ja biofysikaalisen samankaltaisuuden vuoksi myös esimerkiksi influenssa-, SARS-CoV-2- ja ebolaviruksen surrogaatiksi. Tämä mahdollistaa BSL-2-, BSL-3- tai BSL-4-tasoisten virusten tutkimisen BSL-1- tai BSL-2-tason laboratorio-olosuhteissa. [16; 17.]



Kuva 3. $\Phi 6$ -bakteriofaagin rakenne ja genomi [18]. $\Phi 6$ rakentuu sisemmästä polymeerasikompleksista (PC), tätä ympäröivästä nukleokapsidikuoresta, nukleokapsidikuorta peittävästä lipidivaipasta ja piikkiproteiinikomplekseista. Sininen pallo esittää nukleokapsidia ilman lipidikalvoa ja tämän proteiineja.

$\Phi 6$ -bakteriofaagin ulkohalkaisija on noin 85 nm ja MW $9,9 \cdot 10^4$ kDa. $\Phi 6$ on stabiili pH-alueella 6,0–9,5, ja sen sedimentaatiopakio ($S_{20,w}$) on 405 S, mikä on prokaryoottiviruksille tyypillistä suuruusluokkaa. [2, s. 169; 18.] Viruksen dsRNA-genomi on segmentoitunut kolmeen osaan (kuva 3). Segmenttejä kuvataan kirjaimilla S (2948 bp), M (4063 bp) ja L (6374 bp), ja ne sijaitsevat ikosaedraalisesti symmetrisen proteiinikapsidin sisällä. $\Phi 6$ sisältää yhden kopion jokaista segmenttiä, jotka muodostavat noin 10 % viruksen painosta. Noin 70 % viruksen painosta on proteiineja ja 20 % lipidejä, jotka ovat peräisin isäntäbakteerin solukalvosta. [18.]

Virusen genomi koodaa 14 proteiinia, joista 12 ovat sen rakenneproteiineja (kuva 3). Proteiinit on nimetty niiden suuruusjärjestyksen mukaisesti termeillä P1–P14. P1 (85 kDa) on suuri kapsidiproteiini, joka muodostaa polymeerasikompleksin rungon. [18.] P2 (75 kDa) on RdRp, joka vastaa (-) ja (+)-juosteen synteesistä. P3 on piikkiproteiini (69 kDa), joka vastaa viruksen adsorptiosta

isäntäsolun pili-värekarvaan. P4 (35 kDa) vastaa genomien pakkaamisesta. P5 (24 kDa) on lyyttinen enstyyymi, joka hajottaa isäntäsolun solukalvorakenteen, kun $\Phi 6$ tunkeutuu isäntäsoluun ja kun $\Phi 6$ -virukset purkautuvat isäntäsolusta tämän lyysautuessa. P6 (17 kDa) ankkuroi P3-piikkiproteiinin lipidivaippaan. P7 (17 kDa) stabiloi prokapsidin ja osallistuu (+)-juosteen synteessin säätelyyn. P8 (16 kDa) on nukleokapsidin pintaproteiini. P9 (10 kDa) on lipidivaipan membraaniproteiini. P10-proteiinia (4 kDa) tarvitaan isäntäsolun lyysautumiseen. P12 (20 kDa) on ei-rakenneproteiini, joka todennäköisesti vaikuttaa lipidivaipan koamiseen. P13 (8 kDa) on ei-välttämätön rakenneproteiini. P14 (7 kDa) on ei-välttämätön, ei-rakenneproteiini. [18; 19, s. 9.]

2.3.2 *Pseudomonas syringae*

Tässä opinnäytetyössä käytetty *P. syringae* pv. *phaseolicola* HB10Y (ATCC 21781) on $\Phi 6$ -bakteriofaagin spesifi isäntä, ja se aiheuttaa kehälaikkua (engl. halo blight) tarhapavuissa (*Phaseolus vulgaris*) [13, s. 799; 20, s. 617]. *P. syringae* luokitellaan gamma-proteobakteereihin [20, s. 617]. Se on gram-negatiivinen sauvabakteeri, joka kykenee liikkumaan yhden tai useamman polaarisen flagellan avulla. *P. syringae* esiintyy luonnossa maailmanlaajuisesti. [21, s. 323–324.] Se on yksi eniten tutkituista kasvitauteja aiheuttavista bakteereista, ja sitä käytetään malliorganismina esimerkiksi kasvitautien mekanismien ja bakteerien patogeenisuuden tutkimisessa [22, s. 316]. *P. syringae* pv. *phaseolicola* HB10Y kuuluu ATCC:n luokituksen mukaan bioturvaluokkaan BSL-1 [23], mutta Suomessa se luokitellaan BSL-2-luokkaan.

3 Työn suoritus

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli tutkia suurten makromolekyylien konsentroitumiskäyttäytymistä tangentialiseen ultrasuodatukseen ja differentiaaliin ultrasentrifugointiin perustuvien menetelmien avulla käyttämällä mallina puhdistettua $\Phi 6$ -bakteriofaagia. Menetelmien konsentroititehokkuutta verrattiin ensisijaisesti konsentraattien viruspitoisuuksien (PFU/ml) ja saantojen (PFU, %) avulla, jotta voitiin määrittää, kumpi menetelmä on kustannustehokkaampi

virusnäytteiden konsentroidinnissa. Kustannustehokkuuden arvioinnissa huomioitiin myös laitekustannukset, näytteiden lähtötilavuus, analyysi-aika ja analytiikolta vaadittu koulutus.

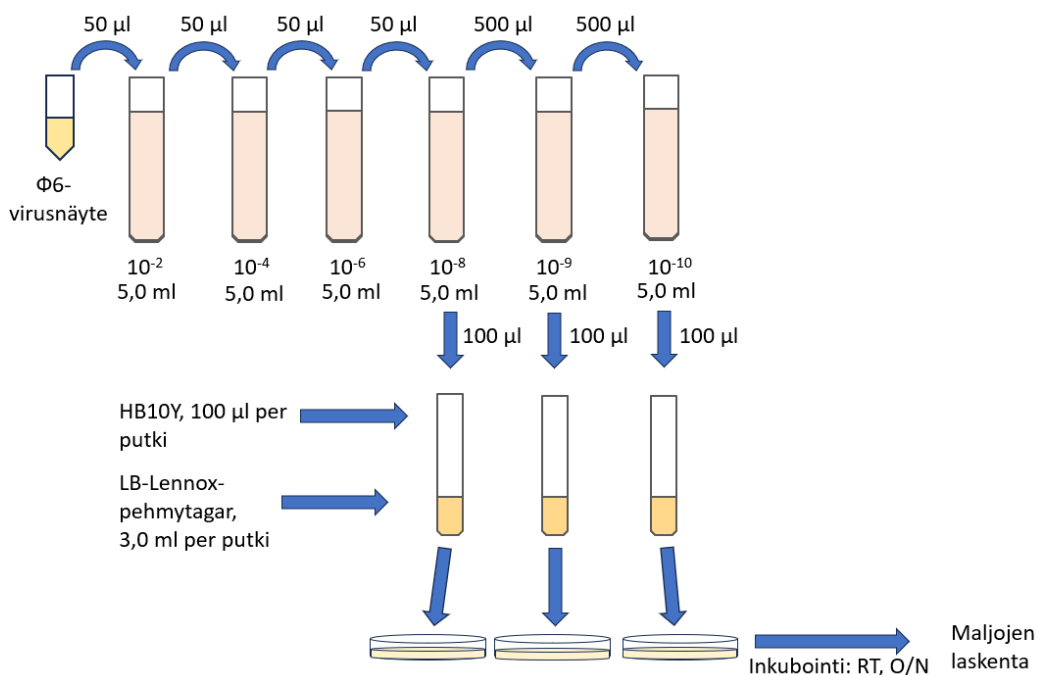
3.1 Materiaalit ja menetelmät

3.2 $\Phi 6$ ja *P. syringae* pv. *phaseolicola* HB10Y

Tässä opinnäytetyössä käytettiin $\Phi 6$ -bakteriofaagia ja *P. syringae* pv. *phaseolicola* HB10Y -bakteerikantaa, joita säilytettiin syväjäähäpakkastimessa $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa. Työtä varten HB10Y-bakteeria siirrostettiin LB-Lennox-maljalle, jossa sitä viljeltiin yön yli huoneenlämmössä, minkä jälkeen bakteeria säilytettiin kylmähuoneessa $4\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa. Kylmähuoneessa säilytettyä HB10Y-bakteeria kasvatettiin inkuboimalla sitä LB-liemessä (200 rpm, RT) joko O/N tai 4–5 h. Kylmähuoneessa säilytetty bakteerikanta uusittiin noin 3 viikon välein. Työn aikana $\Phi 6$ -virusta säilytettiin $4\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa.

3.3 Plakkianalyysi kaksikerrosmaljausmenetelmällä

Viruspitoisuuden määrittäminen tehtiin plakkianalyysillä tutkimusyksikön työohjeen mukaisesti [24]. Plakkianalyysin työvaiheet on esitetty alempana (kuva 4).



Kuva 4. Esimerkki plakkianalyysin työvaiheista [24]. $\Phi 6$ -näyte laimennettiin 10-kertaisesti, minkä jälkeen laimennoksia pipetoitiin 100 μ l:n verran titrausputkiin, joihin lisättiin sama määrä nuorennettua isäntäbakteeria ja 3,0 ml vesihauhteessa temperoitua Luria-pehmytagaria. Titrausputkien sisältö kaadettiin LB-Lennox-maljoille, joita inkuboitiin huoneenlämmössä O/N. Plakit laskettiin seuraavana päivänä.

Maljauksissa käytettiin kahta rinnakkaista maljaa kutakin 10-kertaista laimennustasoa kohti ja viruspitoisuus (PFU/ml) määritettiin plakkien keskiarvon avulla. Viruspitoisuuden laskennassa ei huomioitu maljoja, joissa plakkiluvut olivat yli 300 tai alle 10. Negatiivikontrollina käytettiin maljausta, johon oli viruksen sijaan annosteltu 100 μ l LB-lientä. Liuosten ja kasvatusalustojen tiedot ovat liitteessä 1.

3.4 $\Phi 6$ -stokin valmistus

$\Phi 6$ -stokin valmistus tehtiin noudattamalla kirjallisuusartikkeliin perustuvaa menetelmää [14, s. 464]. Stokin valmistusta varten määritettiin, minkä laimennustason avulla saataisiin semikonfluentteja maljoja, joissa plakkiluvut ovat 500–1000. Stokki valmistettiin tekemällä 20 semikonfluenttia maljaa, joiden pehmytagar kaavittiin erlenmeyerpulloon, johon lisättiin 40 ml LB-lientä. Inkuboinnin

jälkeen (4 h, 200 rpm, RT) liuos sentrifugoitiin (Thermo Scientific, F12-roottori, 10 000 rpm, 30 min, 4 °C). Stokki (supernatantti) kerättiin ja se säilytettiin 4 °C:ssa Φ 6-viruksen tuottoa varten.

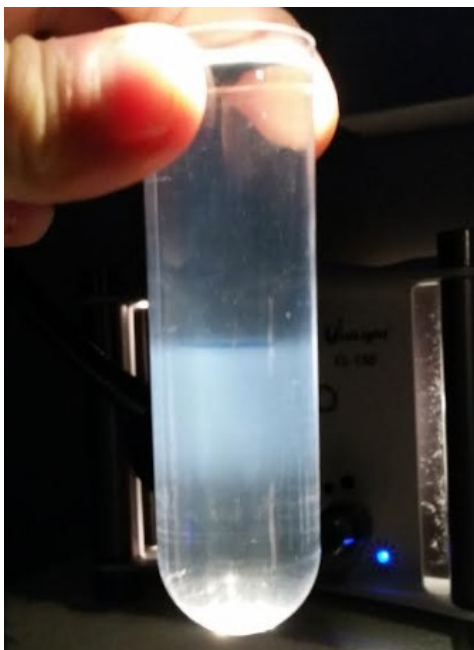
3.5 Φ 6-bakteriofaagin tuotto ja puhdistus

Virustuotto ja -puhdistus tehtiin noudattamalla tutkimusyksikön sisäistä työohjetta, joka perustuu kirjallisuusartikkeliin [14, s. 464–465]. Virustuottoa varten yön yli kasvatettua HB10Y-isäntäbakteeria nuorennettiin lisäämällä sitä LB-lieemeen, kunnes OD₅₅₀-arvo oli noin 0,4 (Clormic, JS Selecta). Isäntäbakteeria inkuboitiin 28 °C:ssa, kunnes OD₅₅₀ oli noin 0,6, minkä jälkeen kasvatukset infektoitiin Φ 6-stokilla siten, että infektion monikerta eli MOI-arvo oli 10. Kasvatuksia jatkettiin, kunnes solut olivat lyysautuneet ja OD₅₅₀-arvo oli stabiloitunut välille 0,2–0,3.

Tuoton jälkeen lysaatin aggregaatit ja bakteerisoluriekaleet poistettiin sentrifugoimalla kasvatukset (Thermo Scientific, F12-roottori, 8000 rpm, 20 min, 4 °C). Supernatantti PEG-saostettiin (10 % PEG₆₀₀₀, 0,5 M NaCl) magneettisekoituksessa 4 °C:ssa tunnin ajan. Virus kerättiin sentrifugoimalla (Thermo Scientific, F12-roottori, 8000 rpm, 20 min, 4 °C), minkä jälkeen pelletti huuhdottiin varovasti mQ-vedellä. Pelletin resuspensointi tehtiin ravistuksessa 4 °C:ssa yön yli kaliumfosfaattipuskurilla (20 mM kaliumfosfaatti, pH 7; 1 mM MgCl₂) siten, että puskuria oli noin sadasosa lysaatin lähtötilavuuteen nähden.

Resuspensoinnin jälkeen näytteessä jäljellä olevat suurikokoiset aggregaatit poistettiin sentrifugoimalla (Thermo Scientific, F20-roottori, 10 000 rpm, 10 min, 4 °C). Virus puhdistettiin gradientissa pipetoimalla supernatanttia 1,5 ml:n verran sakkaroosigradienttiputkiin, joissa gradientti oli 5–20 % (w/v) ja puskurina aiemmin kuvattu kaliumfosfaattipuskuri. Gradientti tehtiin gradienttisekoittajalla (Gradient Master 108, Biocomp, pyörimiskulma: 76,0°, pyörimisaika: 1 min 41 s). Näyteputket ultrasentrifugoitiin liikkuvan vyöhykkeen ultrasentrifugoinnilla (Thermo Scientific, AH629-roottori, 24 000 rpm, 50 min, 15 °C), jonka jälkeen

virusvyöhyke voitiin visuaalisesti havaita gradienttiputkesta, kun putkea valaistiin (VWR Visi-light CL-150) (kuva 5).



Kuva 5. $\Phi 6$ -näytevyöhyke 5–20 %:ssa sakkaroosigradienttiliuoksessa liikkuvan vyöhykkeen ultrasentrifugoinnin jälkeen.

Virusnäytteen yläpuolella oleva gradienttiliuos imettiin pois ja valoa siroava virusnäytevyöhyke kerättiin talteen (kuva 5). Kerätylle näytteelle tehtiin differentiaalinen ultrasentrifugointi (Thermo Scientific, T647,5-roottori, 32 000 rpm, 2 h 30 min, 10 °C). Pelletti huuhdottiin mQ-vedellä ja sen päälle lisättiin 300 μ l aiemmin kuvattua kaliumfosfaattipuskuria. Pelletti resuspensoitiin ravistellen jäällä yön yli 4 °C:ssa. Näin saatu 1x-virus jaettiin kahteen erään, joista toinen säilytettiin 4 °C:ssa ja toinen –80 °C:ssa.

Viruspuhdistuksen onnistumista arvioitiin plakkianalyysien, Bradfordin menetelmällä mitattujen proteiinipitoisuuksien sekä SDS-PAGE-analyysin avulla. SDS-PAGE-analyysissä ajoasetukset olivat 120 V, 60 mA ja 2 h 50 min. Ajo tehtiin 16 %:ssa geelissä. Geeli värjättiin Coomassie Brilliant Blue -liuoksella ja väri poistettiin 10 %:ssa (v/v) etikkahapossa. Geeli kuvattiin Bio-Rad-geelikuvauslaitteistolla.

3.6 Konsentraattorit ja roottorit

Konsentraattoriputkina käytettiin kahta tuotemerkkiä, joissa oli sama 100 kDa MWCO, mutta eri membraanimateriaali. Ensimmäinen tuotemerkki oli Amicon® Ultra-4 (membraanimateriaali: RC, maksimi näytetilavuus: 6,0 ml). Toisena tuotemerkkinä oli Vivaspin® 6 (membraanimateriaali: PES, maksimi näytetilavuus: 6,0 ml). Konsentraattoriputket sentrifugoitiin korkean kierrosnopeuden sentrifugilla (Eppendorf Centrifuge 5810 R). Differentiaalinen ultrasentrifugointi tehtiin Thermo Scientific Sorvall wX+ Ultra -ultrasentrifugiin soveltuvalla Fiberlite™ F50L-24 x 1,5 -roottorilla, jonka k-tekijä on 33, suurin mahdollinen kierrosnopeus 50 000 rpm ja vastaava RCF-arvo 280 000 g [25].

3.7 Konsentroidintianalyysien suoritus

1x $\Phi 6$ -näytteistä tehtiin laimennokset kaliumfosfaattipuskuriin (20 mM kaliumfosfaatti, pH 7; 1 mM $MgCl_2$). Niitä käytettiin keinotekoisina näytteinä konsentraattoriputkien ja F50L-roottorin konsentroidintitehokkuuden määrittämisessä. Koska työn aikana havaittiin, että työtä varten valmistetun virusnäytteen biologinen aktiivisuus oli huomattavasti laskenut, konsentroidintianalyseissa käytettiin myös toista vastaavasti puhdistettua 1x $\Phi 6$ -näytettä

Amicon- ja Vivaspin-konsentraattoriputkiin annosteltiin 4,0 ml virusnäytettä, jonka lähtöpitoisuus tehtiin välille 10^8 – 10^{11} PFU/ml. Tämä lähtöpitoisuus simuloi tilannetta, jossa virusnäyte on puhdistettu esimerkiksi kromatografisten tekniikoiden, suolan poiston tai sakkaroosigradientin avulla, minkä jälkeen näyte pitää konsentroida. Useimmiten lähtöpitoisuudet eivät ole niin matalia kuin 10^8 PFU/ml, mutta konsentroidumista tutkittiin myös tällä lähtöpitoisuudella. Konsentraattoriputket sentrifugoitiin (3700 g, 20 min, 10 °C) valmistajan ohjeiden mukaisesti [26, s. 5, 8–11]. Konsentroidujen näytteiden lopputilavuudet olivat noin 0,2 ml.

Ultrasentrifugointikonsentroidinneissa käytettiin F50L-roottoria, koska sitä ei ollut aiemmin testattu virusnäytteiden konsentroidinnissa. Ultrasentrifugointiolosuht-

teiden valinnassa hyödynnettiin kaavaa 4 ja kaavaa 5, joiden avulla laskettiin, kuinka kauan virusnäytettä tulee teoriassa sentrifugoida tietyllä kierrosnopeudella, jotta se saadaan pelletoitua (liite 2). Työssä haluttiin myös määrittää, muuttuuko saadun konsentraatin pitoisuus merkittävästi, jos näytettä ultrasentrifugoidaan teoreettista aikaa kauemmin. Analyysit tehtiin siten neljässä eri olosuhteessa: 1) 15 min, 35 000 rpm, 2); 15 min, 50 000 rpm, 3); 1 h, 35 000 rpm ja 4); 1 h, 50 000 rpm. Konsentroitava lähtöpitoisuus tehtiin välille 10^9 – 10^{11} PFU/ml samasta syystä kuin konsentraattoriputkien tapauksessa. Näytetilavuus oli jokaisessa analyysissä 1,0 ml ja käytössä olleiden putkien maksimitilavuus oli 1,5 ml. Näytteisiin lisättiin ennen ultrasentrifugointia 1 µl GlycoBlue™ Coprecipitant -reagenssia (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) viruspelletin visualisointia varten. Pelletit resuspensoitiin noin 0,2 ml:n tilavuuteen.

Konsentraattoriputkien konsentrintitehokkuus määritettiin laskemalla plakkiluvut konsentroidumattomasta alkunäytteestä, ohivirtausfraktiosta ja konsentraattifraktiosta. Konsentraattoreiden konsentrintitehokkuutta verrattiin toisiinsa konsentraattien $\Phi 6$ -pitoisuuksien (PFU/ml) ja saantojen (PFU, %) avulla. F50L-roottorin konsentrintitehokkuus määritettiin laskemalla plakkiluvut konsentroidumattomasta alkunäytteestä, supernatantista ja resuspensoidusta pelletistä.

4 Tulokset

4.1 $\Phi 6$ -bakteriofaagin puhdistus

Viruspuhdistuksessa $\Phi 6$ -virusta sisältävä lyaatti PEG-saostettiin, minkä jälkeen virus puhdistettiin 5–20 %:ssa sakkaroosigradientissa. Lopuksi virus puhdistettiin pelleteimalla, ja puhdistetusta viruksesta käytettiin nimeä 1x $\Phi 6$. Taulukot 1–2 esittävät viruspuhdistuksen eri vaiheiden aikana kerättyjä näytteitä. Näytteiden pitoisuudet määritettiin plakkianalyysin avulla ja proteiinipitoisuudet mitattiin Bradfordin menetelmällä. Tulokset on laskettu rinnakkaisten mittausten keskiarvona.

Taulukko 1. $\Phi 6$ -viruksen pitoisuus (PFU/ml) ja saanto viruspuhdistuksen eri vaiheissa.

Näyte	Tilavuus (ml)	Pitoisuus (PFU/ml)	Yhteensä (PFU)	Saanto (PFU, %)
Lysaatti	955	$2,7 \cdot 10^{11}$	$2,6 \cdot 10^{14}$	100
PEG ₆₀₀₀ -sakka	14	$9,0 \cdot 10^{12}$	$1,3 \cdot 10^{14}$	50
Sakkaroosi-gradientti	73	$1,1 \cdot 10^{12}$	$8,0 \cdot 10^{13}$	31
1x $\Phi 6$	0,3	$1,4 \cdot 10^{14}$	$4,2 \cdot 10^{13}$	16

1x-viruksen spesifinen infektiivisyys oli $7,0 \cdot 10^{12}$ PFU/mg (taulukko 2), mikä on lähes samaa suuruusluokkaa kuin sakkaroosigradienttinäytteen spesifinen infektiivisyys $1,1 \cdot 10^{13}$ PFU/mg. 1x-näytteen proteiinisaanto ja spesifinen infektiivisyys (taulukko 2) ovat samaa suuruusluokkaa kuin kirjallisuudessa julkaistut 2 % ja $9,6 \cdot 10^{12}$ PFU/mg [27, s. 253], joten viruspuhdistusta voidaan pitää onnistuneena. Muilta osin puhdistetun 1x-näytteen tulokset ovat pienempiä.

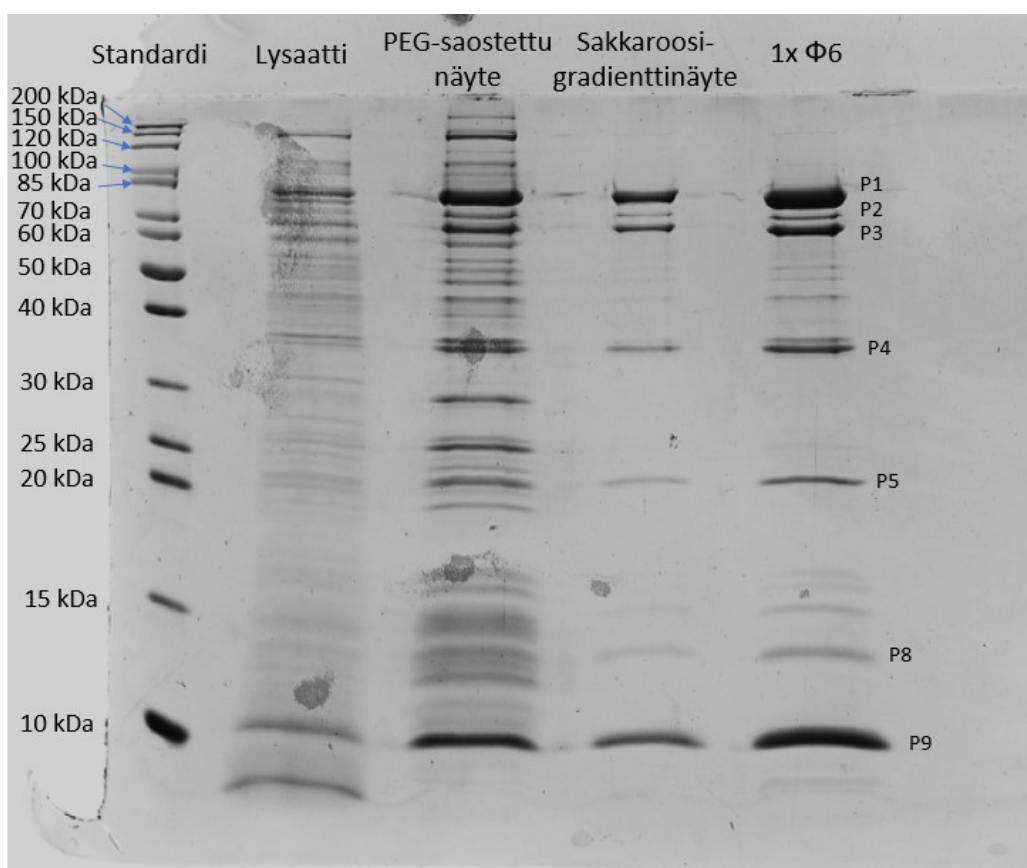
Taulukko 2. Proteiinipitoisuus ja spesifinen infektiivisyys viruspuhdistuksen eri vaiheissa.

Näyte	Tilavuus (ml)	Proteiinipitoisuus (mg/ml)	Yhteensä (mg)	Saanto (mg, %)	Spesifinen infektiivisyys (PFU/mg)
Lysaatti	955	0,2	191	100	$1,4 \cdot 10^{12}$
PEG ₆₀₀₀ -sakka	14	2,5	35	18	$3,7 \cdot 10^{12}$
Sakkaroosi-gradientti	73	0,1	7	4	$1,1 \cdot 10^{13}$
1x $\Phi 6$	0,3	19,6	6	3	$7,0 \cdot 10^{12}$

Taulukon 1 ja 2 perusteella voidaan havaita, että PFU-saannot ja proteiinisaannot eivät ole 1x $\Phi 6$ -näytteessä samaa suuruusluokkaa (vrt. 16 % ja 3 %). Viruspuhdistuksen aikana virukset pyritään erottamaan muista näytteessä olevista

proteiineista, jolloin 1x-viruksen PFU-saanto on oletettavasti korkeampi kuin proteiinien saanto.

Viruspuhdistuksen onnistumista eli 1x-näytteessä jäljellä olevien epäpuhtauksien määrää arvioitiin SDS-PAGE-analyysin avulla. Geelikuvasta voidaan nähdä, että suurin osa lyaatissa ja PEG-saostetussa näytteessä esiintyneistä proteiineista eivät ole enää läsnä 1x $\Phi 6$ -näytteessä. 1x-näytteessä on jäljellä muutamia isäntäbakteerista tai mahdollisesti viruspartikkelien hajoamisesta jäljelle jääneitä proteiineja välillä 50–65 kDa (kuva 6).



Kuva 6. Viruspuhdistuksen aikana kerätyt näytteet 16 %:ssa SDS-PAGE-geelissä, joka on värjätty Coomassie Brilliant Blue -väriliuoksella. Lysaattinäyte sisältää 4,1 μg proteiinia, PEG-saostettu näyte sisältää 9,4 μg proteiinia, 5–20 %:ssa sakkarooסיgradientissa käsitelty näyte sisältää 2,1 μg proteiinia ja 1x $\Phi 6$ sisältää 9,8 μg proteiinia. Standardina on PageRuler™ Unstained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific).

Viruspuhdistus onnistui, koska geelikuvasta voidaan nähdä kaikki viruksen pää-rakennekomponentit, jotka voidaan luotettavasti tunnistaa [27, s. 253]. Geelikuvasta voidaan tunnistaa $\Phi 6$ -viruksen proteiinit P1–P5 sekä P8 ja P9, joista P8 ja P9 näyttävät kulkeutuneen geelissä pidemmälle, kuin niiden molekyylipainojen (kuva 3) perusteella voisi olettaa. Kahden alimman standardivyöhykkeen epäta-saisuus on osittain tämän taustalla. Osa proteiineista on kooltaan niin pieniä, että ne ovat ajautuneet ulos geelistä, minkä vuoksi ne eivät ole nähtävissä.

4.2 Tulokset konsentroititehokkuudesta

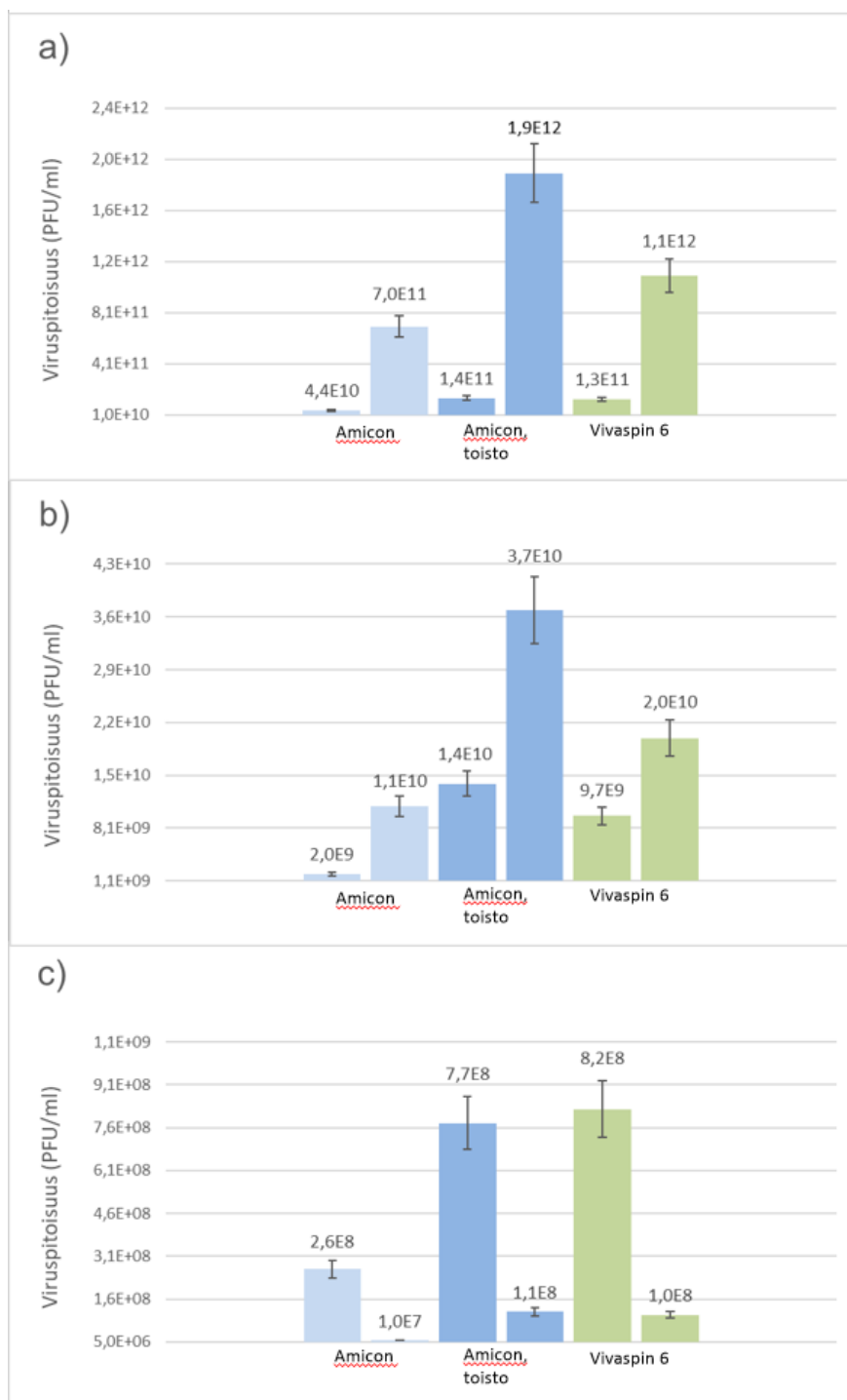
4.2.1 Amicon Ultra-4- ja Vivaspin 6 -konsentraattorit

Amicon Ultra-4- ja Vivaspin 6 -konsentraattoreiden konsentroititehokkuutta verrattiin toisiinsa konsentraattien $\Phi 6$ -pitoisuuksien ja saantojen avulla. Amicon Ultra-4-konsentraattoreissa käytettiin aluksi lähtöpitoisuuksia $4,4 \cdot 10^{10}$, $2,0 \cdot 10^9$ ja $2,6 \cdot 10^8$ PFU/ml. Vivaspin 6 -konsentraattoreilla lähtöpitoisuudet olivat $1,3 \cdot 10^{11}$, $9,7 \cdot 10^9$ ja $8,2 \cdot 10^8$ PFU/ml. Saantojen havaittiin olevan Amicon-konsentraattoreilla korkeampia kuin Vivaspin 6 -konsentraattoreilla, minkä vuoksi Vivaspin 6 hylättiin ja analyysija ei toistettu tällä konsentraattorilla. Amicon-konsentraattoreilla toistoanalyysit tehtiin lähtöpitoisuuksilla $1,4 \cdot 10^{11}$, $1,4 \cdot 10^{10}$ ja $7,7 \cdot 10^8$ PFU/ml. Kaikkien $\Phi 6$ -näytteiden alkutilavuudet olivat 4,0 ml ja lopputilavuudet noin 0,2 ml (liite 3). Lopputilavuudet säädettiin siten, että konsentraattien pitoisuudet olisivat 17–20-kertaisia lähtöpitoisuuksiin nähden. Konsentroitumista havainnollistettiin laskemalla saatu konsentroitikerroin, joka kuvaa konsentraatin viruspitoisuuden ja lähtöpitoisuuden välistä suhdetta (taulukko 3). Lähtöpitoisuudesta ja konsentraattorista riippumatta saatu konsentroitikerroin oli kaikissa näytteissä haluttua konsentroitikerrointa 17–20 pienempi, mikä saannon kanssa kuvastaa viruksen hävikkiä (taulukko 3).

Taulukko 3. Amicon Ultra-4- ja Vivaspin 6 -konsentraattoriputkien konsentroidintulosten tulokset.

Membraanimateriaali, tuotemerkki	Lähtöpitoisuus (PFU/ml)	Konsentraatin pitoisuus (PFU/ml)	Saatu konsentroidintekkeroin	Saanto (PFU, %)
100 kDa RC, Amicon Ultra-4	$4,4 \cdot 10^{10}$	$7,0 \cdot 10^{11}$	15,9	89
	$1,4 \cdot 10^{11}$	$1,9 \cdot 10^{12}$	13,6	86
	$2,0 \cdot 10^9$	$1,1 \cdot 10^{10}$	5,5	30
	$1,4 \cdot 10^{10}$	$3,7 \cdot 10^{10}$	2,6	15
	$2,6 \cdot 10^8$	$<1,0 \cdot 10^7$	$<0,1$	<1
	$7,7 \cdot 10^8$	$<1,1 \cdot 10^8$	$<0,2$	<1
100 kDa PES, Vivaspin 6	$1,3 \cdot 10^{11}$	$1,1 \cdot 10^{12}$	8,5	50
	$9,7 \cdot 10^9$	$2,0 \cdot 10^{10}$	2,1	10
	$8,2 \cdot 10^8$	$<1,0 \cdot 10^8$	$<0,2$	<1

$\Phi 6$ -näytteiden lähtöpitoisuuden tulee olla 10^{10} – 10^{11} PFU/ml, jotta näyte saadaan konsentroitua 4,0 ml:n lähtötilavuudesta noin 15-kertaiseen pitoisuuteen yli 80 %:n saannossa (Amicon) tai noin 9-kertaiseen pitoisuuteen 50 %:n saannossa (Vivaspin 6). Lähtöpitoisuuden ollessa 10^9 – 10^{10} PFU/ml pitoisuus kasvaa konsentroidinnissa keskimäärin 4-kertaiseksi Amicon Ultra-4-konsentraattoreilla ja noin 2-kertaiseksi Vivaspin 6 -konsentraattoreilla, ja saannot ovat 10–30 % konsentraattorista riippuen (taulukko 3). Kun lähtöpitoisuus on noin 10^9 – 10^{11} PFU/ml, Amicon-konsentraattoreilla saannot ovat lähes kaksinkertaisia Vivaspin-konsentraattoreihin verrattuna. Kun lähtöpitoisuus on 10^8 – 10^9 PFU/ml, lähes kaikki virus menetetään ja saannot ovat alle 1–2 %. Tulosten perusteella voidaan havaita, että konsentroidintehokkuus on Amicon Ultra-4- ja Vivaspin 6 -konsentraattoriputkissa riippuvainen virusnäytteen lähtöpitoisuudesta (taulukko 3, kuva 7).



Kuva 7. Amicon Ultra-4- ja Vivaspin 6 -konsentraattoriputkien konsentrinti-analyysien tulokset. Lähtöpitoisuus (vas.) ja sitä vastaava konsentraatti (oik.) on esitetty samalla värillä. Kuvassa a on lähtöpitoisuudesta 10^{10} – 10^{11} PFU/ml saadut tulokset. Kuvassa b on noin lähtöpitoisuuksista 10^9 – 10^{10} PFU/ml saadut tulokset. Kuva c esittää lähtöpitoisuudesta 10^8 – 10^9 PFU/ml saatuja tuloksia.

Viruksen stabiilisuuden vaihtelu aiheutti analyysihin haasteita, minkä vuoksi lähtöpitoisuudet eivät olleet yhtä suuria (taulukko 3, kuva 7). Tämän lisäksi kaikki tulokset eivät ole loogisia: Amicon-konsentraattorilla lähtöpitoisuudesta $2,0 \cdot 10^9$ PFU/ml saadun konsentraatin $\Phi 6$ -saanto on 30 %, mutta lähtöpitoisuudesta $1,4 \cdot 10^{10}$ PFU/ml saadussa konsentraatissa $\Phi 6$ -saanto on 15 % (taulukko 3). Tämä ei vastaa havaintoa virussaannon kasvamisesta lähtöpitoisuuden kasvaessa. Plakkianalyysin tarkkuus ja isäntäbakteerin pitoisuus plakkianalyysin aikana voivat aiheuttaa vaihtelua tuloksiin, joten tämä ero saannoissa ei merkittävästi vaikuta taulukon 3 tuloksista tehtyihin havaintoihin.

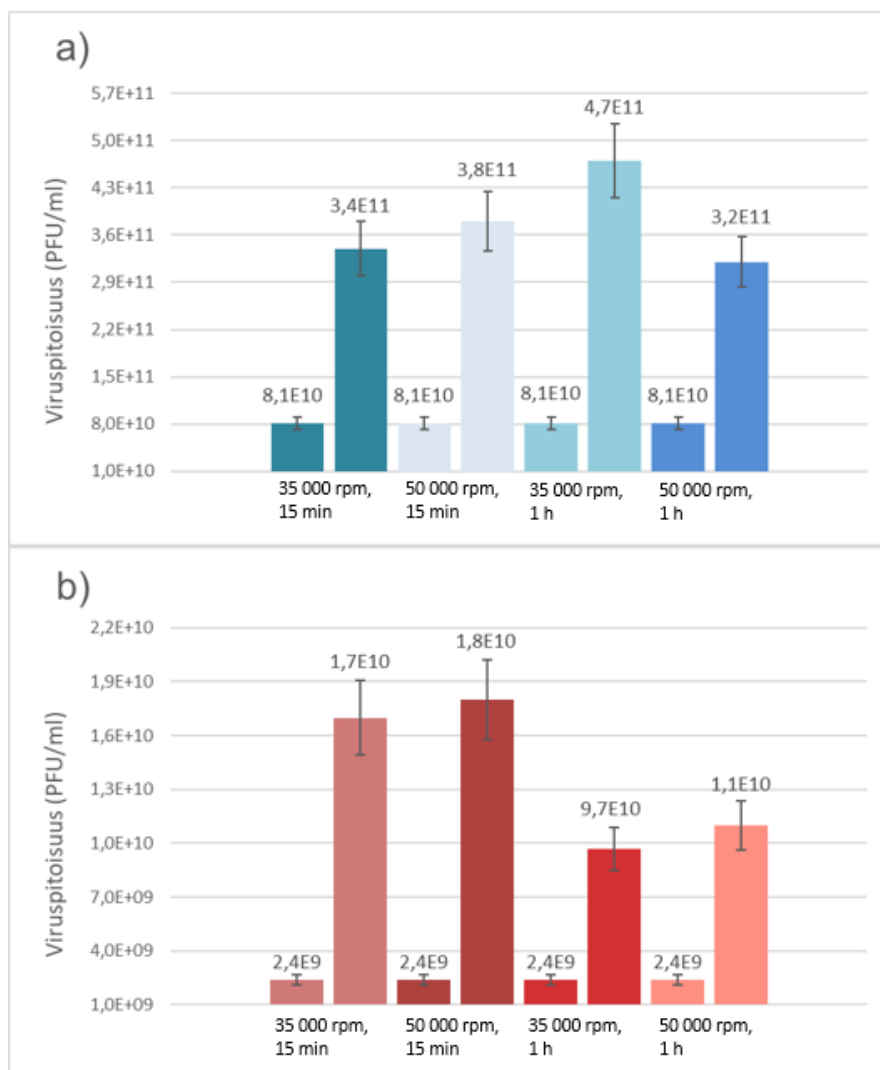
4.2.2 F50L-roottori

F50L-roottorin konsentroiditehokkuutta tutkittiin konsentraattien $\Phi 6$ -viruspitoisuuksien ja saantojen avulla. Konsentroidintianalyysit tehtiin neljässä ajo-olosuhteessa eri kierrosnopeuksien ja ultrasentrifugointiaikojen yhdistelmillä käyttämällä lähtöpitoisuuksia $8,1 \cdot 10^{10}$ PFU/ml ja $2,4 \cdot 10^9$ PFU/ml. Lähtötilavuudet olivat 1,0 ml ja lopputilavuudet noin 0,2 ml (liite 3). Konsentroidumista havainnollistettiin saadun konsentroidintikertoimen avulla aiemmin kuvatun periaatteen mukaisesti (kts. 4.2.1). Näytteet haluttiin konsentroida hieman yli 5-kertaiseen pitoisuuksiin. Saadut konsentroidintikertoimet ovat keskimäärin 5,2 mikä on halutussa suuruusluokassa. Loppupitoisuudet ovat suuriltaan samaa suuruusluokkaa olosuhteista riippumatta, ja $\Phi 6$ -saannot ovat keskimäärin yli 80 % (taulukko 4).

Taulukko 4. F50L-roottorin konsentrintitehokkuus eri olosuhteissa.

Olosuhde	Lähtöpitoisuus (PFU/ml)	Konsentraatin pitoisuus (PFU/ml)	Saatu konsentrintikerroin	Saanto (PFU, %)
15 min, 35 000 rpm	$8,1 \cdot 10^{10}$	$3,4 \cdot 10^{11}$	4,2	76
15 min, 50 000 rpm	$8,1 \cdot 10^{10}$	$3,8 \cdot 10^{11}$	4,7	89
1 h, 35 000 rpm	$8,1 \cdot 10^{10}$	$4,7 \cdot 10^{11}$	5,8	110
1 h, 50 000 rpm	$8,1 \cdot 10^{10}$	$3,2 \cdot 10^{11}$	4,0	72
15 min, 35 000 rpm	$2,4 \cdot 10^9$	$1,7 \cdot 10^{10}$	7,1	129
15 min, 50 000 rpm	$2,4 \cdot 10^9$	$1,8 \cdot 10^{10}$	7,5	133
1 h, 35 000 rpm	$2,4 \cdot 10^9$	$9,7 \cdot 10^9$	4,0	79
1 h, 50 000 rpm	$2,4 \cdot 10^9$	$1,1 \cdot 10^{10}$	4,6	83

Taulukon 4 tuloksissa on huomioitava, että plakkianalyysin avulla laskettujen viiruspitoisuuksien havaittiin työn aikana vaihtelevan jopa +/-20 % samaakin näyttöä määritettäessä. Tästä syystä saanto 110 % sekä ilmeisesti myös saannot 129 % ja 133 % voidaan nähdä vielä järkevinä tuloksina ja käytännössä 100 %:n saantoina. Saatuja tuloksia on havainnollistettu kuvassa 8.



Kuva 8. F50L-roottorin konsentroitianalyysien tulokset. Lähtöpitoisuus (vas.) ja sitä vastaava konsentraatti (oik.) on esitetty samalla värillä. Kuvassa a on lähtöpitoisuutta $8,1 \cdot 10^{10}$ PFU/ml vastaavat tulokset. Kuvassa b on lähtöpitoisuutta $2,9 \cdot 10^9$ PFU/ml vastaavat tulokset.

5 Yhteenveto

Tässä opinnäytetyössä verrattiin kahden konsentroitimen soveltuvuutta lipidivaipallisen malliviruksen konsentroidmiseen. Menetelminä olivat ultra-suodatukseen perustuvat Amicon Ultra-4- ja Vivaspin 6 -konsentraattorit sekä ultrasentrifugin F50L-roottorilla tehty pelletointi. Konsentraattoreissa oli yhtä suuri MWCO, mutta ne erosivat membraanimateriaalin perusteella.

Konsentraattoreita verrattiin aluksi toisiinsa. Molempien konsentraattorituotemerkkien membraanimateriaali (100 kDa PES ja 100 kDa RC) pidättää käytännössä kaiken $\Phi 6$ -virusnäytteestä, sillä ohivirtausfraktioissa ei havaita merkittävää määrää virusta (liite 3). Sen sijaan konsentroititehokkuus on riippuvainen virusnäytteen lähtöpitoisuudesta (PFU/ml). Lähtöpitoisuuden pitää olla vähintään 10^{10} – 10^{11} PFU/ml, jotta konsentraattien $\Phi 6$ -pitoisuudet ja saannot ovat hyviä. Tarkkaa syytä alhaisen lähtöpitoisuuden ja saannon välillä ei tiedetä, mutta taustalla on todennäköisesti viruksen sitoutuminen membraanimateriaaleihin, minkä havaitaan olevan suhteellisesti suurempaa pienillä pitoisuuksilla ja PES-membraanilla (taulukko 3).

Myös kirjallisuudessa on esitetty, että makromolekyylien sitoutuminen membraanimateriaaliin on suurempaa PES-membraanilla kuin RC-membraanilla [28, s. 2333–2334; 29, s. 30–31]. Kirjallisuudessa on kuvattu, että ultrasuodatinmembraani voidaan käsitellä esimerkiksi 5-prosenttisen nautauutteen tai 1-prosenttisen FBS:n avulla virusten adsorbtiota estämiseksi, mutta tätä ei ole testattu vaipallisilla viruksilla [30, s. 1036–1037]. Todennäköisesti PES-membraanin suuremman adsorbtiotaustalla on, että sen hydrofobisuus on suurempi kuin RC-membraanilla, minkä seurauksena sillä on suurempi kyky sitoa analyyttejä, jotka sisältävät hydrofobisia komponentteja [28, s. 2333; 29, s. 30–31]. $\Phi 6$ -viruksen lipidivaippa on hydrofobinen, mikä selittää sen sitoutumisen membraanimateriaaliin. Saadut tulokset sekä kirjallisuus puoltavat analytiikkaa käyttämään Amicon-konsentraattoreita Vivaspin 6 -konsentraattoreiden sijaan. Tuloksia sovellettaessa on huomioitava, että saannot voivat konsentraattorien membraanimateriaalien lisäksi vaihdella myös konsentroitavien virusten kesken [31]. Esimerkiksi c2- ja $\Phi 2972$ -faagien saannot voivat olla matalampia kuin $\Phi 6$ -faagin saannot, jos konsentroinnissa käytetään Amicon 30 kDa:n RC-membraania [31].

Konsentraattoreita verrattiin uudella F50L-roottorilla tehtyyn pelletointiin, jossa käytettiin lähtöpitoisuuksia $2,4 \cdot 10^9$ tai $8,1 \cdot 10^{10}$ PFU/ml. Ultrasentrifugoimalla saatujen konsentraattien pitoisuudet ja saannot ovat käytännössä samaa suuruusluokkaa toistensa kanssa riippumatta siitä, sentrifugoidaanko näytettä

15 min nopeudella 35 000 rpm vai tunnin ajan nopeudella 50 000 rpm (taulukko 4, kuva 8). Saannot ja loppupitoisuudet eivät ole riippuvaisia lähtöpitoisuuksista. Tulosten perusteella $\Phi 6$ -näytteen konsentroidiin riittää ajoajaksi 15 min ja kierrosnopeudeksi 35 000 rpm. Näin ollen F50L-roottorin vaatima sentrifugointiaika vaikuttaa suurin piirtein vastaavan kaavojen 4 ja 5 avulla laskettuja teoreettisia pelletointiaikoja. Kierrosnopeudella 50 000 rpm $\Phi 6$ -virus saadaan pelletoitua noin 5 min aikana, ja kierrosnopeudella 35 000 rpm pelletointiajaksi riittää noin 10 min (liite 2).

Lopuksi F50L-roottoria verrattiin Amicon-konsentraattoriin: lähtöpitoisuuden ollessa vähintään 10^{10} PFU/ml, molemmissa menetelmissä konsentraattien saannot ovat yli 80 %. Mikäli käsitellään alhaisempia lähtöpitoisuuksia, Amicon-konsentraattorilla suurin osa viruksesta menetetään, ja vain F50L-roottorilla saadun konsentraatin saanto on yhä yli 80 % (taulukko 3). Korkeammat saannot puoltavat ultrasentrifugilaitteiston ja F50L-roottorin käyttöä näytteiden konsentroidinnissa.

Konsentroidi on kalliimpaa F50L-roottorilla kuin Amicon-konsentraattoreilla: konsentraattoreille sopiva sentrifugi maksaa noin 10 000 € (2019, sis. ALV), kun taas työssä käytetty ultrasentrifugi maksaa noin 50 000 € (2019, sis. ALV) ja F50L-roottori 17 200 € (2022, sis. ALV). Amicon-konsentraattorien kappalehinta on noin 10 €, ja F50L-roottorissa käytettävien 1,5 ml -ultrasentrifugiputkien kappalehinta on noin 2 €. Sekä konsentraattoreita että ultrasentrifugiputkia on mahdollista käyttää useamman kerran, mikä alentaa kustannuksia. Amicon-konsentraattorit soveltuvat suurille lähtötilavuuksille (enintään 6,0 ml), kun taas F50L-roottori soveltuu paremmin pienille lähtötilavuuksille (enintään 1,5 ml). Ero lähtötilavuuksissa ei aiheuta merkittävää eroa näytteiden käsittelyyn ja konsentroidiin kuluva ajassa. Menetelmien vertailussa on myös huomioitava, että ultrasentrifugilaitteistojen käyttö, toisin kuin konsentraattoriputkien käyttö, vaatii laboratorion henkilökunnalta erityisosaamista.

Menetelmien vertailun johtopäätöksenä on, että mikäli laboratoriossa on mahdollista käyttää F50L-roottorillisia ultrasentrifugilaitteistoja, näytteiden

konsentroidi on kannattavinta tehdä F50L-roottorilla. Tällöin lähtöpitoisuus voi olla niinkin matala kuin 10^9 PFU/ml.

Lähteet

- 1 Centrifugation Basics. Verkkoaineisto. Merck. <<https://www.sigmaaldrich.com/FI/en/technical-documents/technical-article/protein-biology/protein-pulldown/centrifugation-basics>>. Luettu 21.3.2024.
- 2 Eskelin, Katri & Oksanen, Hanna. 2021. Isolating, Culturing, and Purifying Viruses with a Focus on Bacterial and Archaeal Viruses. Teoksessa Bamford, D. H. & Zuckerman, M. (eds.). Encyclopedia of Virology, 4th Edition. Vol. 1, s. 162–174. Oxford: Academic Press.
- 3 Smith, Caitlin. 2013. Analytical and Preparative Ultracentrifuges. Verkkoaineisto. Labcompare. <<https://www.labcompare.com/10-Featured-Articles/135690-Analytical-and-Preparative-Ultracentrifuges/>>. Luettu 19.3.2024.
- 4 Voelkl, Alfred. 2010. Ultracentrifugation. Teoksessa Encyclopedia of Life Sciences (ed.). Luettavissa verkkoaineistona. ResearchGate. <https://www.researchgate.net/publication/228030693_Ultracentrifugation>. Luettu 16.3.2024.
- 5 Cvjetkovic, Aleksander; Lötvall, Jan & Lässer, Cecilia. 2014. The influence of rotor type and centrifugation time on the yield and purity of extracellular vesicles. Teoksessa Journal of Extracellular Vesicles. Vol. 3. Luettavissa verkkoaineistona. National Center for Biotechnology Information. National Library of Medicine. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3967015/>>. Luettu 19.3.2024.
- 6 Using k-factor to Compare Rotor Efficiency. Ladattava verkkoaineisto. Beckman Coulter Life Sciences. <https://media.beckman.com/-/media/pdf-assets/application-notes/centrifugation-application-note-using-k-factor-to-compare-rotor-efficiency-application-note.pdf?sc_lang=en&has_h=01CC2121AEFF5E85B5F64ED6DA614AE8>. Luettu 20.3.2024.
- 7 An Introduction to Ultracentrifugation. Verkkoaineisto. Beckman Coulter Life Sciences. <<https://www.beckman.com/resources/technologies/centrifugation/ultracentrifugation#:~:text=Ultracentrifugation%20rotates%20samples%20at%20high,megaDalton%20protein%20complexes%20and%20organelles>>. Luettu 20.3.2024.
- 8 Density Gradient Centrifugation. Verkkoaineisto. Beckman Coulter Life Sciences. <<https://www.beckman.com/resources/technologies/centrifugation/density-gradient-centrifugation>>. Luettu 21.3.2024.
- 9 Frei, Mark. Centrifugal Separations. Verkkoaineisto. Merck. <<https://www.sigmaaldrich.com/FI/en/technical-documents/technical-article/protein-biology/protein-pulldown/centrifugation-separations>>. Luettu 21.3.2023.

- 10 Molecular weight cutoff (MWCO). Verkkoaineisto. Lenntech. <<https://www.lenntech.com/services/mwco.htm>>. Luettu 19.3.2024.
- 11 General rule about choosing a MWCO. Verkkoaineisto. Membrane Solutions. <https://www.membrane-solutions.com/News_1333.htm>. Luettu 19.3.2024.
- 12 Ultrafiltration. Verkkoaineisto. Crystal Quest® Water Filters. <[https://crystalquest.com/pages/what-is-ultrafiltration#:~:text=Ultrafiltration%20\(UF\)%20is%20a%20variety,solutes%20pass%20through%20the%20membrane](https://crystalquest.com/pages/what-is-ultrafiltration#:~:text=Ultrafiltration%20(UF)%20is%20a%20variety,solutes%20pass%20through%20the%20membrane)>. Luettu 12.3.2024.
- 13 Vidaver, Anne K.; Koski, R. K. & Van Etten, J. L. 1973. Bacteriophage ϕ 6: a Lipid-Containing Virus of *Pseudomonas phaseolicola*. Journal of Virology. Vol. 11, Issue 5, s. 799–805.
- 14 Bamford, Dennis H.; Ojala, Päivi M.; Frilander, Mikko; Walin, Laura; Bamford, Jaana K. H.. Isolation, Purification, and Function of Assembly Intermediates and Subviral Particles of Bacteriophages PRD1 and ϕ 6. Methods in Molecular Genetics. Vol. 6, s. 455–474.
- 15 Gottlieb, Paul & Alimova, Aleksandra. 2023. Discovery and Classification of the ϕ 6 Bacteriophage: An Historical Review. Teoksessa Kuhn, Andreas & Jiang, Wen (eds.). Viruses. Volume 15, Issue 6. Luettavissa verkkoaineistona. National Center for Biotechnology Information. National Library of Medicine. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10304341/>>. Luettu 20.3.2024.
- 16 Whitworth, Carrie; Mu, Yi; Houston, Hollis; Martinez-Smith, Marla; Noble-Wang, Judith; Coulliette-Salmond, Angela & Rose, Laura. 2020. Persistence of Bacteriophage Phi6 on Porous and Nonporous Surfaces and the Potential for Its Use as an Ebola Virus or Coronavirus Surrogate. Teoksessa Schaffner, D. W. (ed.). Applied and Environmental Microbiology. Vol. 86, Issue 17. Luettavissa verkkoaineistona. National Center for Biotechnology Information. National Library of Medicine. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7440805/>>. Luettu 20.3.2024.
- 17 Serrano-Aroca, Ángel. 2022. Antiviral Characterization of Advanced Materials: Use of Bacteriophage Phi6 as Surrogate of Enveloped Viruses Such as SARS-CoV-2. Teoksessa Francolini, Iolanda & Popa, Marcel. (eds.). International Journal of Molecular Sciences. Vol. 23, Issue 10. Luettavissa verkkoaineistona. National Center for Biotechnology Information. National Library of Medicine. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9141689/>>. Luettu 19.3.2024.
- 18 Poranen, Minna M.; Mäntynen, Sari & ICTV Report Consortium. 2017. ICTV Virus Taxonomy Profile: Cystoviridae. Journal of General Virology. Vol. 98, Issue 10, s. 2423–2424.

- 19 Carpino, James. 2014. Structure and Function in Bacteriophage Phi6. Väitöskirja. New York: City University of New York Graduate Center.
- 20 Arnold, Dawn L.; Lovell, Helen C.; Jackson, Robert W. & Mansfield, John W.. 2011. *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*: from 'has bean' to supermodel. Molecular Plant Pathology. Vol. 12, Issue 7, s. 617–627.
- 21 Chakravarty, Shubham & Anderson, Gregory G.. Chapter 21: The Genus *Pseudomonas*. Teoksessa Goldman, Emanuel & Green, Lorrence H. (eds.). Practical Handbook of Microbiology. 3rd ed. CRC Press.
- 22 Xin, Xiu-Fang; Kvitko, Brian & He, Sheng Y.. 2018. *Pseudomonas syringae*: What it takes to be a pathogen. Nature Reviews Microbiology. Vol. 16, Issue 5, s. 316–328.
- 23 21781. HB10Y. Verkkoaineisto. ATCC. <<https://www.atcc.org/products/21781>>. Luettu 18.3.2024.
- 24 Titration of virus sample (plaque assay). 2023. Tutkimusyksikön sisäinen työohje. Helsingin yliopisto.
- 25 Fiberlite™ F50L-24 x 1.5 Fixed-Angle Rotor. Verkkoaineisto. Thermo Fisher Scientific. <<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/096-247028>>. Luettu 15.3.2024.
- 26 Vivaspin® 500, 2, 6 and 20. GE Healthcare. Instructions 28-9331-02 AB. Ohjekirja.
- 27 Lampi, Mirka; Oksanen, Hanna M.; Meier, Florian; Moldenhauer, Evelin; Poranen, Minna M.; Bamford, Dennis H. & Eskelin, Katri. 2018. Asymmetrical flow field-flow fractionation in purification of an enveloped bacteriophage $\phi 6$. Journal of Chromatography B 1095, s. 251–257.
- 28 Marioli, Maria & Kok, Wim Th.. 2019. Recovery, overloading, and protein interactions in asymmetrical flow field-flow fractionation. Analytical and Bioanalytical Chemistry. Vol. 411, s. 2327–2338.
- 29 Kassalainen, G.E., Williams, S.K.R.. (2012). Assessing Protein-Ultrafiltration Membrane Interactions Using Flow Field-Flow Fractionation. Teoksessa Williams, S. & Caldwell, K. (eds.). Field-Flow Fractionation in Biopolymer Analysis, s. 23–36. Springer, Vienna.
- 30 Winona, L.; Ommani, A. W.; Olszewski, J.; Nuzzo, J. B. & Ohsima, K.. 2001. Efficient and predictable recovery of viruses from water by small scale ultrafiltration systems. Canadian Journal of Microbiology. Vol. 47, s. 1033–1041.
- 31 Larsen, F.; Offersen, S.M.; Li, V.R.; Deng, L.; Nielsen, D.S.; Rasmussen, T.S.. 2023. Choice of Ultrafilter Affects Recovery Rate of Bacteriophages. Viruses 2023. Verkkoaineisto. MDPI. <<https://www.mdpi.com/1999-4915/15/10/2051>>. Luettu 15.4.2024.

Kasvatusalustojen koostumukset

Plakkianalyyseissä käytetyn LB-Lennox-agarin ja pehmytagarin koostumukset on esitetty alempana taulukoissa 1 ja 2. HB10Y-isäntäbakteerin kasvatuksessa käytetyn LB-liemen koostumus on kuvattu taulukossa 3.

Taulukko 1. LB-Lennox-agarin koostumus.

Ainesosa	Määrä	Valmistaja	Tuotekoodi
Tryptoni	10 g	Neogen	NCM0120B
Bacto yeast extract	5 g	Gibco (Becton Dickinson)	212750
NaCl	5 g	Fisher	S/3161/70
Oriola agar	14 g	Oriola	-
RO-vesi	1 l	-	-

Taulukko 2. LB-Lennox-pehmytagarin koostumus.

Ainesosa	Määrä	Valmistaja	Tuotekoodi
Tryptoni	10 g	Neogen	NCM0120B
Bacto yeast extract	5 g	Gibco (Becton Dickinson)	212750
NaCl	5 g	Fisher	S/3161/70
Bacto agar	4 g	Gibco (Becton Dickinson)	214040
RO-vesi	1 l	-	-

Taulukko 3. LB-liemen koostumus.

Ainesosa	Määrä	Valmistaja	Tuotekoodi
Tryptoni	10 g	Neogen	NCM0120B
Bacto yeast extract	5 g	Gibco (Becton Dickinson)	212750
NaCl	5 g	Fisher	S/3161/70
RO-vesi	1 l	-	-

Ultrasentrifugointiaikojen laskenta

F50L-roottorilla tehdyissä konsentroiduissa käytettiin neljää eri olosuhdetta, joiden valinnassa hyödynnettiin kaavaa 4 ja kaavaa 5.

Mikäli F50L-roottorin kierrosnopeus on 50 000 rpm, $\Phi 6$ saadaan teoriassa konsentroitua ajassa

$$t = \frac{k}{s} = \frac{33}{405} = 0,0815 \text{ h} \approx 5 \text{ min.}$$

Mikäli F50L-roottorin kierrosnopeus on 35 000 rpm, k_{adj} on

$$k_{adj} = k \cdot \left(\frac{rpm_{max}}{rpm_{act}} \right)^2 = 33 \left(\frac{50\,000}{35\,000} \right)^2 = 67,35 \approx 67.$$

Tällöin on $\Phi 6$ saadaan teoriassa konsentroitua ajassa

$$t = \frac{k}{s} = \frac{67}{405} = 0,1654 \text{ h} \approx 10 \text{ min.}$$

Ultrasentrifugointiajat valittiin siten, että ne olivat pidempiä kuin teoreettiset ajat.

Testattavia ajo-olosuhteita oli neljä: 1) 15 min, 35 000 rpm, 2); 15 min, 50 000 rpm, 3); 1 h, 35 000 rpm ja 4); 1 h, 50 000 rpm.

Konsentrintianalyysien tulostaulukot

Konsentrintitehokkuutta määrittävien analyysien tulokset on esitetty taulukoissa 1–5. F50L-roottorin konsentrintitehokkuutta kuvaavat tulokset on esitetty taulukoissa 4 ja 5.

Taulukko 1. Vivaspin 6 -konsentraattoriputkilla tehtyjen konsentrintianalyysien saannot kolmella eri lähtöpitoisuustasolla.

Näyte	Näyte-tilavuus (µl)	Pitoisuus (PFU/ml)	Yhteensä (PFU)	Saanto (PFU, %)
Lähtöpitoisuus	4000	$1,3 \cdot 10^{11}$	$5,2 \cdot 10^{11}$	100
Konsentraatti	235	$1,1 \cdot 10^{12}$	$2,6 \cdot 10^{11}$	50
Ohivirtaus	3870	$<1,0 \cdot 10^7$	$<3,9 \cdot 10^7$	<1
Lähtöpitoisuus	4000	$9,7 \cdot 10^9$	$3,9 \cdot 10^{10}$	100
Konsentraatti	200	$2,0 \cdot 10^{10}$	$4,0 \cdot 10^9$	10
Ohivirtaus	3900	$<1,0 \cdot 10^6$	$<3,9 \cdot 10^6$	<1
Lähtöpitoisuus	4000	$8,2 \cdot 10^8$	$3,3 \cdot 10^9$	100
Konsentraatti	200	$<1,0 \cdot 10^8$	$<2,0 \cdot 10^7$	<1
Ohivirtaus	3900	$<1,0 \cdot 10^5$	$<3,9 \cdot 10^5$	<1

Taulukko 2. Amicon Ultra-4-konsentraattoriputkilla tehtyjen konsentroidintianalyysien saannot ensimmäisellä analyysikerralla. Konsentroidintianalyysit tehtiin kolmella eri lähtöpitoisuustasolla.

Näyte	Näyte-tilavuus (µl)	Pitoisuus (PFU/ml)	Yhteensä (PFU)	Saanto (PFU, %)
Lähtöpitoisuus	4000	$4,4 \cdot 10^{10}$	$1,8 \cdot 10^{11}$	100
Konsentraatti	225	$7,0 \cdot 10^{11}$	$1,6 \cdot 10^{11}$	89
Ohivirtaus	3900	$<1,0 \cdot 10^7$	$<3,9 \cdot 10^7$	<1
Lähtöpitoisuus	4000	$2,0 \cdot 10^9$	$8,0 \cdot 10^9$	100
Konsentraatti	220	$1,1 \cdot 10^{10}$	$2,4 \cdot 10^9$	30
Lähtöpitoisuus	4000	$2,6 \cdot 10^8$	$1,0 \cdot 10^9$	100
Konsentraatti	215	$<1,0 \cdot 10^7$	$<2,2 \cdot 10^6$	<1

Vivaspin 6 - ja Amicon Ultra-4-konsentraattoreissa ohivirtausfraktio ei sisällä merkittävää määrää virusta (taulukko 1 ja 2). Koska ohivirtausfraktiossa esiintyvä virusmäärä oli kertaalleen määritetty ja todettu mitättömän pieneksi (taulukko 2), ohivirtausfraktioita ei tutkittu uudelleen, kun analyysit toistettiin Amicon-konsentraattoreilla (taulukko 3).

Taulukko 3. Amicon Ultra-4-konsentraattoriputkilla tehtyjen konsentroidintianalyysien saannot toisella analyysikerralla. Konsentroidintianalyysit tehtiin kolmella eri lähtöpitoisuustasolla.

Näyte	Näyte-tilavuus (µl)	Pitoisuus (PFU/ml)	Yhteensä (PFU)	Saanto (PFU, %)
Lähtöpitoisuus	4000	$1,4 \cdot 10^{11}$	$5,6 \cdot 10^{11}$	100
Konsentraatti	230	$1,9 \cdot 10^{12}$	$4,8 \cdot 10^{11}$	86
Lähtöpitoisuus	4000	$1,4 \cdot 10^{10}$	$5,6 \cdot 10^{10}$	100
Konsentraatti	230	$3,7 \cdot 10^{10}$	$8,5 \cdot 10^9$	15
Lähtöpitoisuus	4000	$7,7 \cdot 10^8$	$3,1 \cdot 10^9$	100
Konsentraatti	205	$<1,1 \cdot 10^8$	$<2,3 \cdot 10^7$	<1

Taulukko 4. F50L-roottorilla tehtyjen konsentrointianalyysien tulokset näytteille, joiden lähtöpitoisuus oli $8,1 \cdot 10^{10}$ PFU/ml.

Näyte	Aika ja nopeus	Glyko-Blue (μ l)	Näyte-tilavuus (μ l)	Pitoisuus (PFU/ml)	Yhteensä (PFU)	Saanto (PFU, %)
Lähtöpitoisuus	15 min, 35 000 rpm	1	1000	$8,1 \cdot 10^{10}$	$8,1 \cdot 10^{10}$	100
Konsentraatti	-	-	180	$3,4 \cdot 10^{11}$	$6,1 \cdot 10^{10}$	76
Supernatantti	-	-	975	$<2,7 \cdot 10^8$	$<2,6 \cdot 10^8$	<1
Lähtöpitoisuus	15 min, 50 000 rpm	1	1000	$8,1 \cdot 10^{10}$	$8,1 \cdot 10^{10}$	100
Konsentraatti	-	-	190	$3,8 \cdot 10^{11}$	$7,2 \cdot 10^{10}$	89
Supernatantti	-	-	960	$<2,4 \cdot 10^8$	$<2,3 \cdot 10^8$	<1
Lähtöpitoisuus	1 h, 35 000 rpm	1	1000	$8,1 \cdot 10^{10}$	$8,1 \cdot 10^{10}$	100
Konsentraatti	-	-	190	$4,7 \cdot 10^{11}$	$8,9 \cdot 10^{10}$	110
Supernatantti	-	-	940	$<1,0 \cdot 10^8$	$<9,4 \cdot 10^7$	<1
Lähtöpitoisuus	1 h, 50 000 rpm	1	1000	$8,1 \cdot 10^{10}$	$8,1 \cdot 10^{10}$	100
Konsentraatti	-	-	180	$3,2 \cdot 10^{11}$	$5,8 \cdot 10^{10}$	72
Supernatantti	-	-	970	$<1,0 \cdot 10^8$	$<9,7 \cdot 10^7$	<1

Taulukko 5. F50L-roottorilla tehtyjen konsentrointianalyysien tulokset näytteille, joiden lähtöpitoisuus oli $2,4 \cdot 10^9$ PFU/ml.

Näyte	Aika ja nopeus	Glyko-Blue (μ l)	Näyte-tilavuus (μ l)	Pitoisuus (PFU/ml)	Yhteensä (PFU)	Saanto (PFU, %)
Lähtöpitoisuus	15 min, 35 000 rpm	1	1000	$2,4 \cdot 10^9$	$2,4 \cdot 10^9$	100
Konsentraatti	-	-	185	$1,7 \cdot 10^{10}$	$3,1 \cdot 10^9$	129
Supernatantti	-	-	975	$<1,0 \cdot 10^7$	$<9,8 \cdot 10^6$	<1
Lähtöpitoisuus	15 min, 50 000 rpm	1	1000	$2,4 \cdot 10^9$	$2,4 \cdot 10^9$	100
Konsentraatti	-	-	175	$1,8 \cdot 10^{10}$	$3,2 \cdot 10^9$	133
Supernatantti	-	-	955	$<1,9 \cdot 10^7$	$<1,8 \cdot 10^7$	<1
Lähtöpitoisuus	1 h, 35 000 rpm	1	1000	$2,4 \cdot 10^9$	$2,4 \cdot 10^9$	100
Konsentraatti	-	-	195	$9,7 \cdot 10^9$	$1,9 \cdot 10^9$	79
Supernatantti	-	-	990	$<1,5 \cdot 10^7$	$<1,5 \cdot 10^7$	<1
Lähtöpitoisuus	1 h, 50 000 rpm	1	1000	$2,4 \cdot 10^9$	$2,4 \cdot 10^9$	100
Konsentraatti	-	-	185	$1,1 \cdot 10^{10}$	$2,0 \cdot 10^9$	83
Supernatantti	-	-	980	$<1,0 \cdot 10^7$	$<9,8 \cdot 10^6$	<1

Saannot 110 % (taulukko 4) sekä 129 % ja 133 % (taulukko 5) ovat plakkianalyysin virhemarginaalin sisällä, joten ne voidaan käsitellä 100 %:n saantoina. Kun lähtöpitoisuus on $8,1 \cdot 10^{10}$ PFU/ml, Φ 6-viruksen saanto on konsentraateissa välillä 72–100 %, keskimäärin 84 %. Kun lähtöpitoisuus on $2,4 \cdot 10^9$ PFU/ml, saanto on konsentraateissa 79–100 %, keskimäärin 91 %. Saannot ovat lähes samaa suuruusluokkaa, yli 80 %, olosuhteista ja lähtöpitoisuuksista riippumatta.