

Opinnäytetyö (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikka

Biotekniikka

2015

Elina Sahla

INFLUENSSA B -VIRUKSEN NUKLEOPROTEIININ PUHDISTUS



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Elina Sahla

INFLUENSSA B -VIRUKSEN NUKLEOPROTEIININ PUHDISTUS

Työn tavoitteena oli puhdistaa Influenssa B -viruksen nukleoproteiinia (InB-NP), joka on *Pichia pastoris* -hiivakannassa tuotettu rekombinanttiproteiini, johon on liitetty hydrofobiini-fuusioproteiini. Puhdistettavan fuusioproteiinin teoreettinen koko on 82,5 kDa, mutta aiempien tulosten perusteella proteiini aggregoituu partikkelimaiseen muotoon.

Työssä käytettiin ioninvaihtokromatografiaa (IEX), geelisuodatusta (GF) ja ultrasentrifugointia sekä erikseen että peräkkäin. Ennen varsinaisia puhdistusmenetelmiä näytteelle tehtiin esikäsitteilyä muun muassa bentsonaasi-käsittely ja ultrasuodatus. Varsinaisessa työssä verrattiin kahta erilaista lähtönäytettä, jotka erosivat toisistaan siten, että toinen näytteistä oli ultrasuodatettu Pellicon 300 kDa -suodatinkasetilla ja toinen näytteistä oli suodattamaton. Puhdistetun InB-NP:n analysointimenetelminä käytettiin TR-FIA-, SDS-PAGE- ja Western blot -menetelmiä. TR-FIA-tulosten perusteella ajoille tehtiin puhdistustaulukot.

Kromatografisia menetelmiä käyttäen kohdeproteiini puhdistui parhaiten, kun käytettiin ioninvaihtokromatografiaa ja geelisuodatusta peräkkäin. Tällöin saanto oli 8 %. Ultrasentrifugointi sisälsi kaksi peräkkäistä vuorokauden mittaista ajoa eri matriiseilla. Paras mittaustulos saavutettiin ensimmäisen vuorokauden mittaisen ajon jälkeen 30 %:lla sakkaroosimatriisilla, jolloin näytteen saanto oli 198 %. Kun vastaavan näytteen puhdistusta jatkettiin CsCl-gradientilla, saanto oli 15 %.

Tiivistettynä ultrasentrifugointi vaikutti parhaalta menetelmältä InB-NP:n puhdistamiseksi. Jatkotoimenpiteinä pitäisi mitata proteiinikonsentraatio, jotta spesifinen aktiivisuus olisi mitattavissa.

ASIASANAT:

proteiinipuhdistus, ioninvaihtokromatografia, geelisuodatus, ultrasentrifugointi

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Biotechnology and Food Technology | Biotechnology

2015 | 33

Instructors Petri Susi (PhD) and Jarmo Pusa (B. Eng.)

Elina Sahla

PURIFICATION OF INFLUENZA B VIRUS NUCLEOPROTEIN

The objective was to purify influenza B virus nucleoprotein (InB-NP). InB-NP is a recombinant protein produced by a *Pichia pastoris* yeast and connected to a hydrophobin fusion protein. The theoretical size of the fusion protein is 82.5 kDa but on the basis of past previous results, the protein aggregates into particulate form.

As methods Ion-exchange chromatography (IEX), gel filtration (GF) and ultracentrifugation were used, both individually and in succession. Before the actual purification methods, the samples were subjected to pretreatments such as benzonase treatment and ultrafiltration. Two kinds of output samples were compared, which differed from each other in that one of the samples was ultrafiltered with a Pellicon 300 kDa cassette and the other one was unfiltered. As analysis methods for the purified influenza B virus nucleoprotein TR-FIA, SDS-PAGE and Western blot were used. On the basis of the TR-FIA results, purification tables were compiled for the runs.

When using chromatographic methods for purifying the target protein, the best option was to use ion exchange chromatography and gel filtration successively, producing a yield of 8 %. Ultracentrifugation comprised two consecutive-day runs of different matrices. The best result was obtained after the first day with a 30 % sucrose matrix. Here, the yield was 198 %. When the sample purification was continued with a CsCl gradient, the yield was 15 %. When using chromatographic methods, the best protein purification was achieved with successive ion-exchange chromatography and gel filtration.

In conclusion, ultracentrifugation seemed the best method for InB-NP purification. The next step should be to measure the protein concentration to enable measurable specific activity.

KEYWORDS:

protein purification, ion-exchange chromatography, gel filtration, ultracentrifugation

SISÄLTÖ

KÄYTETYT LYHENTEET JA SANASTO	6
1 JOHDANTO	7
2 TEORIA	9
2.1 Influenssa B -viruksen nukleoproteiini	9
2.2 Kromatografiset menetelmät	9
2.2.1 Ioninvaihtokromatografia	9
2.2.2 Geelisuodatus	10
2.3 Ultracentrifugointi	11
3 MATERIAALIT JA MENETELMÄT	12
3.1 Puskureiden valmistus	12
3.2 Solujen hajotus, bentsonaasi-käsittely ja ultrasuodatus	12
3.3 Ioninvaihtokromatografia	13
3.4 Geelisuodatus	13
3.5 Ultracentrifugointi	14
3.6 Analyysimenetelmät	17
3.6.1 TR-FIA	17
3.6.2 SDS-PAGE	17
3.6.3 Western blot	18
4 TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU	19
4.1 InB-NP:n puhdistaminen kromatografisilla menetelmillä	19
4.2 Ultracentrifugointi	22
4.3 Näytteen aktiivisuuden säilyminen	28
5 LOPPUPÄÄTELMÄT	30
LÄHTEET	32

LIITTEET

Liite 1: TR-FIA mittaustulokset

KUVAT

Kuva 1: Puhdistusprosessin lohko-kaavio	8
Kuva 2: Ultrasentrifugoinnin vaiheet	16
Kuva 3: Pellicon-suodatetun näytteen kromatogrammi ioninvaihtokromatografia-ajosta	19
Kuva 4: Kromatogrammi geelisuodatukselta käyttäen kuvassa 3 esitettyjä A10- ja A11-fraktioita	20
Kuva 5: Geelisuodatuksen SDS-PAGE (vasemmalla) ja Western blot (oikealla).	21
Kuva 6: Ultrasentrifugointiputki toisen vuorokauden pituisen ultrasentrifugoinnin jälkeen.	23
Kuva 7: Ultrasentrifugointinäytteiden aktiivisuudet (CPS/ μ l). Näytteiden numeroinnit vastaavat ultrasentrifugointivaiheiden kuvan 2 numeroita. Kaaviossa on aina samasta vaiheesta otettu Pellicon-suodatettu ja suodattamaton näyte rinnakkain.	24

TAULUKOT

Taulukko 1: Kromatografisten menetelmien puhdistustaulukko	21
Taulukko 2: Ultrasentrifugoinnin Pellicon-suodatetun näytteen puhdistustaulukko näytteille 3 ja 5	26
Taulukko 3: Ultrasentrifugoinnin Pellicon-suodattamattoman näytteen puhdistustaulukko näytteille 9 ja 11	26
Taulukko 4: Ultrasentrifugoinnin Pellicon-suodatetun näytteen puhdistustaulukko näytteelle 6	27
Taulukko 5: Ultrasentrifugoinnin Pellicon-suodattamattoman näytteen puhdistustaulukko näytteelle 8	27
Taulukko 6: Pellicon-suodatetun näytteen aktiivisuuden muutos 43 päivän aikana	28

KÄYTETYT LYHENTEET JA SANASTO

CPS	TR-FIA:ssa käytetty mittausyksikkö tulosten ilmoittamiseen (eng. Counts per second)
GF	Geelisuodatus (eng. Gel filtration tai size exclusion chromatography)
IEX	Ioninvaihtokromatografia
InB-NP	Influenssa B -viruksen nukleoproteiini
PBS	Fosfaattipuskuroitu saliini
PBST	Fosfaattipuskuri + Tween-20
pI	Isoelektrinenpiste eli pH:n arvo, jossa proteiinin nettovaraus on nolla
rpm	Kierrosten määrä minuutissa (eng. Revolution per minute)
SDS-PAGE	Natriumdodekyylisulfaattipolyakryyliamidigeelielektroforeesi ¹
TR-FIA	Aikaerotteinen fluoroimmunomenetelmä, (eng. Time resolved fluorescence immunoassay)

1 JOHDANTO

Influenssavirukset ovat vaipallisia pallomaisia hiukkasia, joiden halkaisija vaihtelee välillä 80-120 nm. Influenssaviruksille on ominaista niiden membraanimainen vaippakerros, joka sisältää noin 500 glykoproteiinimolekyyliä, jotka ovat nimeltään hemagglutiniini (HA) ja neuraminidaasi (NA).²

Influenssavirukset kuuluvat ortomyksovirus-perheeseen ja niillä on yksijuosteinen segmentoitu RNA-genomi. Influenssavirukset jaotellaan A-, B-, ja C-tyyppeihin niiden ydinproteiinien perusteella. A-tyypin virukset jaotellaan lisäksi niiden pintaproteiinien perusteella HA- ja NA-tyyppeihin.³

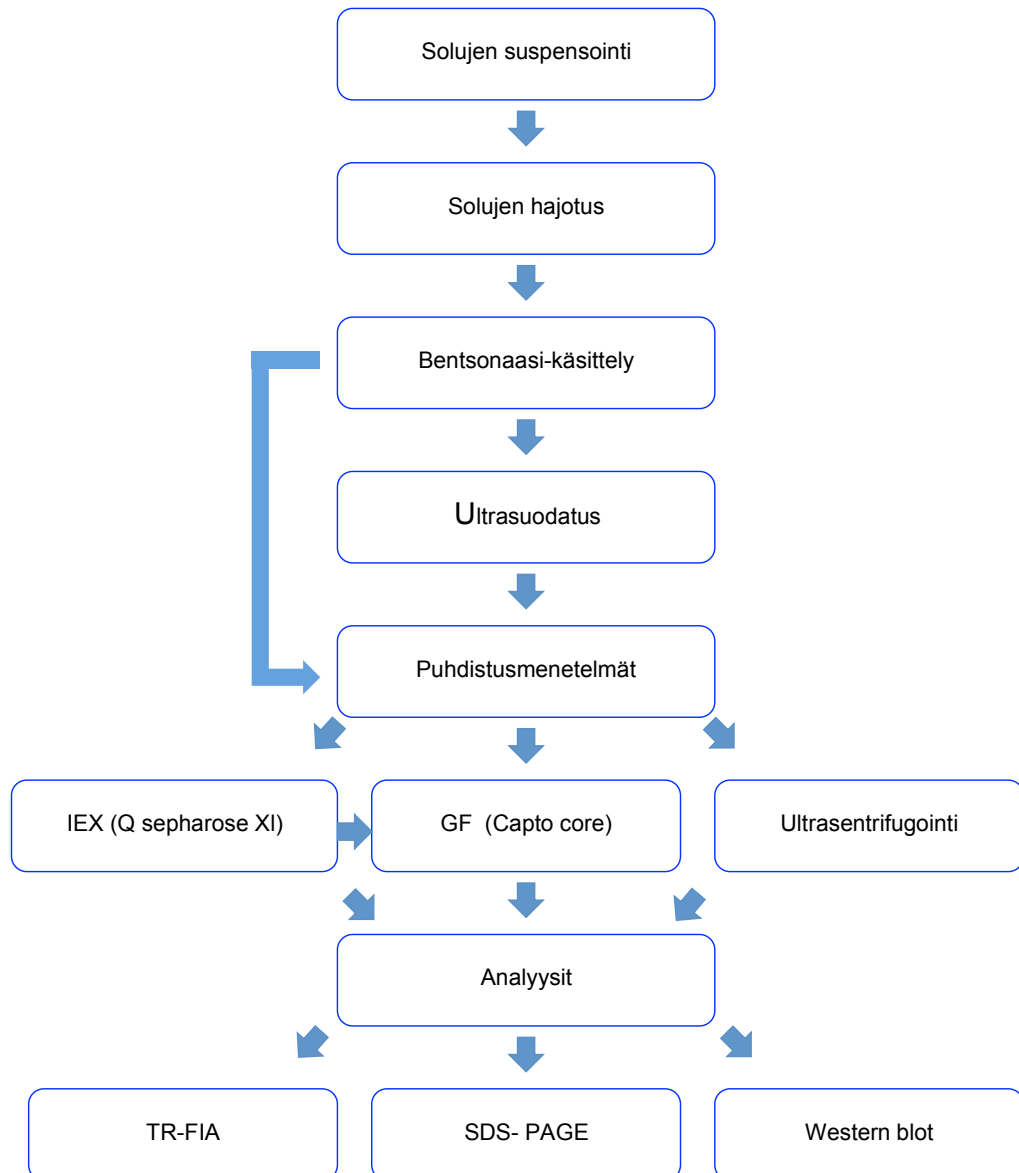
Diagnostiikan kannalta merkittävimmät ovat A- ja B-tyypin influenssavirukset, jotka aiheuttavat joka talvi esiintyvän kausi-influenssaepidemian. B-tyypin aiheuttamat influenssatartunnat ovat yleensä A-tyypin tartuntoja lievempiä.⁴

Influenssavirusia voidaan tunnistaa sekä PCR- että antigeenintunnistusmenetelmillä. Aikaerotteinen immunofluoresenssi (TR-FIA), TPX ja pikatestit perustuvat virusproteiinin tunnistamiseen vasta-aineilla.⁵ Yksi esimerkki suomalaisesta influenssapikatestistä on Medix Biochemican Actim -testi.

Tämän työn tavoitteena oli puhdistaa *Pichia pastoriksessa* tuotettua Influenssa B -viruksen nukleoproteiinia käytettäväksi diagnostisten testien kontrollinäytteenä. On olemassa tutkimuksia, joissa samankaltaisia proteiineja on tuotettu hiivasoluista (*Saccharomyces cerevisiae* ja *Pichia pastoris*) ja ne käyttäytyivät partikkelimaisesti, joten oli oletettavaa, että myös InB-NP tuottuu viruksenkaltaisena partikkelina (VLP).⁶

Työssä tutkittiin kromatografisten menetelmien (ioninvaihto ja geelisuodatus) soveltuvuutta InB-NP:n puhdistamiseen. Näitä menetelmiä kokeiltiin sekä yksitän että peräkkäin. Näiden menetelmien lisäksi työssä testattiin ultrasentrifugointia, jota on käytetty InA-NP:n eristämiseen infektiivisistä viruspartikkeleista.⁷ Kuvassa 1 on esitetty puhdistusprosessin lohkokaavio.

Työssä käytettiin kahta erilaista lähtönäytettä. Molemmat lähtönäytteet olivat peräisin samasta solumassasta, mutta erona näytteillä oli se, että toinen näyte Pellicon-suodatettiin 300 kDa -suodatinkasetilla. Molempia lähtönäytteitä valmistettiin heti työn alussa riittävästi koko työtä varten, joten lähtönäyte oli aina peräisin samasta erästä.



Kuva 1: Puhdistusprosessin lohkokaavio

2 TEORIA

2.1 Influenssa B -viruksen nukleoproteiini

Työssä puhdistettiin *Pichia Pastoris* -hiivakannassa tuotettua Influenssa B -viruksen nukleoproteiinia, joka ekspressoituu fuusioituna hydrofobiini-proteiiniin. Kyseistä InB-NP:tä käytettiin alunperin Hydrobody-projektissa kaksifaasiuuttokokeisiin. Internetistä löytyvän laskurin (ExPaSy, Bioinformatics Resource Portal) perusteella ja aminohapposekvenssin avulla tämän fuusioproteiinin teoreettinen pl on noin 8 ja molekyylipaino 82500 Da.⁸

Puhdistettu InB-NP karakterisoitiin TR-FIA:n, SDS-PAGE:n ja Western blot:n avulla. TR-FIA:n käyttö kohdeproteiinin havaitsemiseksi perustui aikaisempiin tutkimuksiin, jotka osoittivat TR-FIA:n olevan nopea ja herkkä menetelmä influenssaviruksen havaitsemiseksi.⁹

2.2 Kromatografiset menetelmät

2.2.1 Ioninvaihtokromatografia

Ioninvaihtokromatografia on menetelmä, jota käytetään proteiinien, peptidien, aminohappojen ja muiden varauksellisten biomolekyylien puhdistamiseen. Menetelmä perustuu varauksellisten molekyylien kykyyn sitoutua varaukselliseen matriisiin. Proteiinit muodostuvat aminohappoketjuista, joihin on liittynyt monia kemiallisia ryhmiä, jotka voivat olla positiivisesti varautuneita, negatiivisesti varautuneita tai sähköisesti neutraaleja. Ioninvaihtomatriisi sisältää sähköisesti varautuneita ryhmiä, jotka on liitetty matriisiin kovalenttisillä sidoksilla.¹⁰

Ioninvaihtokromatografiassa on neljä eri vaihetta: tasapainotus, näytteen syöttö ja pesu, eluutio ja regenerointi. Tasapainotusvaiheessa puskuria, jossa on matala ionipitoisuus, syötetään pylvään läpi, kunnes tasapainotila on saavutettu. Tasapainotilassa kaikkiin varauksellisiin ryhmiin liittyy vastaioni. Toisessa vai-

heessa näyte syötetään pylvääseen, jolloin näytteen proteiinit sitoutuvat matriisiin ja sitoutumattomat proteiinit pestään pois. Eluutiivaiheessa pylvääseen syötetään puskuria, jolla on korkeampi ionivahvuus, minkä johdosta proteiinit irtoavat matriisista. Regeneroinnissa kaikki loputkin matriisiin sitoutuneet proteiinit poistetaan, mikä takaa sen, että pylvästä voidaan käyttää uudestaan.¹¹

Ioninvaihtokromatografia voi olla joko kationinvaihtoa tai anioninvaihtoa. Kationinvaihdossa kohdeproteiinin pI on alhaisempi kuin puskuriliuoksen pH, jolloin puhdistettava proteiini on positiivisesti varautunut ja sitoutuu negatiivisesti varautuneeseen matriisiin. Anioninvaihdossa tämä tilanne on toisinpäin eli kohdeproteiinin pI on korkeampi kuin puskuriliuoksen pH, jolloin puhdistettava proteiini on negatiivisesti varautunut ja sitoutuu positiivisesti varautuneeseen matriisiin. Proteiinin eluointi tapahtuu yleensä suolagradienilla, mikä irrottaa kohdeproteiinin matriisista.¹²

Ioninvaihtopylväissä käytetään eniten joko agarosi- tai polymeerimatriiseja, sillä niillä on korkea sitomiskyky ja ne ovat kemiallisesti ja fysikaalisesti vakaita.¹³ Tässä työssä käytettiin 1 ml:n Q Sepharose XL-pylvästä (HiTrap™), joka toimii vahvana anioninvaihtajana.

2.2.2 Geelisuodatus

Geelisuodatus on menetelmä, joka perustuu molekyylien erottamiseen toisistaan koon perusteella. Menetelmässä suuret molekyylit kulkeutuvat pylvään läpi nopeammin kuin pienet molekyylit. Suuret molekyylit liikkuvat nesteen mukana pylvään läpi, kun taas pienemmät molekyylit kulkeutuvat matriisin huokosten sisään jääden kiinni huokosiin.¹⁴

Geelisuodatusmenetelmä sopii hyvin joko jälkipuhdistusmenetelmäksi näytteille, joille on jo tehty kromatografisia puhdistuksia tai näytteille, jotka sisältävät vain muutamia komponentteja.¹⁵

Matriisin valintaan vaikuttavat huokoskoko ja rakenteelliset ominaisuudet. Matriisin huokoskolla on kuitenkin suurin vaikutus resoluution ja erotuskykyyn.¹⁶

Tässä työssä käytettiin 1 ml:n Capto Core 700 -pylvästä (HiTrap™), jossa on huokoinen agarosimatriisi.

Capto Core 700 -pylväs on erityisesti suunniteltu virusten ja muiden makromolekyylien puhdistamiseen. Pylväs päästää lävitseen molekyylipainoltaan yli 700 kDa:n kokoiset partikkelit, jotka tulevat ulos jo heti flowthrough:n mukana. Kaikki alle 700 kDa kokoiset partikkelit kulkeutuvat huokosten sisään ja tulevat pylvästä ulos myöhemmin.¹⁷

2.3 Ultrasentrifugointi

Ultrasentrifugointi on menetelmä, joka perustuu partikkeleiden erottamiseen toisistaan ultrasentrifugin avulla hyvin suurilla kierrosnopeuksilla. Ultrasentrifugilla voidaan saavuttaa jopa 500000 x g-arvoja, jolla makromolekyylit saadaan sedimentoitumaan. Sentrifugointi erottelee partikkelit niiden koon, tiheyden ja muodon perusteella. Erottumiseen vaikuttavat erityisesti sentrifugaatiossa käytettävät matriisit, kuten sakkaroosi tai cesiumkloridi.¹⁸

3 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

3.1 Puskureiden valmistus

Ioninvaihtokromatografia-ajaja varten valmistettiin A- ja B-puskurit. A-puskuria käytettiin myös geelisuodatukseen. A-puskuriksi valmistettiin 20 mM PIPES (PIPES, Sigma- Aldrich) ja B-puskuriksi valmistettiin 20 mM PIPES, jossa oli mukana 1 M NaCl (Fisher Bioreagents). Molempien puskureiden pH:ksi säädettiin 6, koska aikaisemman opinnäytetyön perusteella tämä oli osoittautunut pH:ksi, jossa InB-NP voidaan puhdistaa käyttäen anioninvaihtokromatografiaa.¹⁹

3.2 Solujen hajotus, bentsonaasi-käsittely ja ultrasuodatus

Työssä käytettiin aiemmin tuotettua *Pichia pastoris* -solumassaa, joka sisälsi InB-NP-proteiinia. 50 g solumassaa lisättiin 50 ml:aan A-puskuria, johon oli lisätty 0,02 g magnesiumkloridia (Magnesium Chloride, J.T.Baker), koska bentsonaasi vaatii tätä aktivoituakseen. Solut hajotettiin solupressin avulla (French press, Thermo Electron Corporation) noin 20 000 psi:n paineessa. Soluprssiin mahtui kerrallaan enintään 35 ml suspensiota, joten suspensio hajotettiin neljässä erässä ja jokainen erä ajettiin läpi kolmeen kertaan.

Hajotetut solut jaettiin 50 ml:n Falcon-putkiin, jotka sentrifugoitiin (Centrifuge Stratos Heraeus, 10000 x g, 60 min, 4 °C). Putkista kerättiin talteen yhteensä 68 ml supernatanttia 50 ml solumassaa kohden. Supernatantille tehtiin bentsonaasi-käsittely lisäämällä joukkoon 68 µl bentsonaasia (Benzonase, Novagen). Bentsonaasi pilkkoo DNA:n pois, minkä ansiosta solumassasta tulee juoksevampaa eli viskoosisuus pienenee ja näin ollen helpommin pipetoitavaa. Supernatantti jaettiin kahteen erään, joista toinen säilöttiin sellaisenaan tulevia kokeita varten ja toiselle erälle tehtiin ultrasuodatus Pellicon-suodattimella.

34 ml supernatanttia ultrasuodatettiin Pellicon XL 300 kDa -kasetin avulla (Millipore Corporation). Supernatantti suodatettiin ensin 0,45 μm suodattimen läpi, jonka jälkeen se ajettiin kasetin läpi neljä kertaa. Ensimmäisen suodatuksen jälkeen retentaattia saatiin 8,5 ml ja se laimennettiin takaisin 34 ml:aan lisäämällä 24,5 ml A-puskuria. Tämä toistettiin kolme kertaa. Näyte jaettiin pieniin eriin ja säilytettiin $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa tulevia kokeita varten. Näitä näyte-eriä käytettiin koko kahden kuukauden työjakson ajan.

3.3 Ioninvaihtokromatografia

1 ml Pellicon-suodatettua tai suodattamatonta supernatanttia suodatettiin 0,45 μm suodattimen läpi ennen, kuin näyte syötettiin anioninvaihtomatriisiin, Q Sepharose XL -pylvääseen, jonka koko oli 1 ml ja joka oli liitetty Äkta FPLC -kromatografialaitteistoon.

Laitteeseen ohjelmoitiin ajo-ohjelma, jota käytettiin kaikkiin tässä työssä tehtyihin anioninvaihtoajoihin. Ajopuskureina käytettiin A-puskuria (20 mM PIPES) ja B-puskuria (20 mM PIPES + 1 M NaCl).

Ajoparametrit olivat seuraavanlaiset:

- Virtausnopeus 1 ml/min
- Tasapainotus 5 CV
- Kolonnin pesutilavuus 5 CV
- Eluutiofraktion koko 1 ml

3.4 Geelisuodatus

Alkuperäinen Pellicon-suodatettu näyte oli 5 ml tilavuudessa ja se käytettiin sellaisenaan geelisuodatuksessa. Mikäli näyte oli mennyt ensin ioninvaihtokromatografian läpi, niin näytekoko oli 1,5 ml. Kaikki näytteet suodatettiin 0,45 μm suodattimen läpi ennen geelisuodatusta.

Geelisuodatuslaitteistona toimi Äkta FPLC ja ajopylväänä käytettiin Capto Core 700 1 ml -pylvästä. Laitteeseen ohjelmoitiin ajo-ohjelma, joka pysyi lähes samanlaisena kaikissa geelisuodatusajoissa. Eroina ajoissa oli syötettävän näytteen tilavuus. Ajopuskurina käytettiin A-puskuria (20 mM PIPES).

Ajoparametrit olivat seuraavanlaiset:

- Virtausnopeus 1 ml/min
- Tasapainotus 5 CV
- Eluutiofraktion koko 1 ml

3.5 Ultrasentrifugointi

Ultrasentrifugointiin käytettiin Beckman Coulter Optima XE-90 -ultrasentrifuugia ja SW41 Ti -roottoria. Ajo suoritettiin 13,2 ml UltraClear 344059 -putkilla.

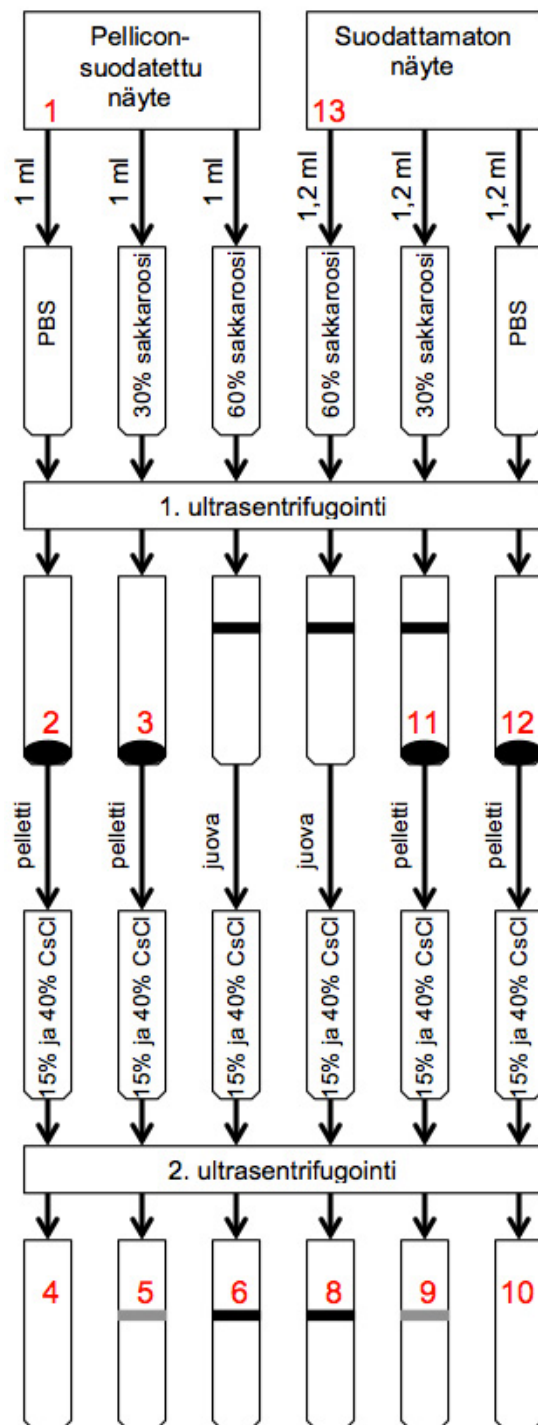
Ultrasentrifugointiajoja tehtiin kaksi erilaista ajokokonaisuutta. Ensimmäinen ajokokonaisuus käsitti sekä 3 h:n, että noin vuorokauden mittaisen sentrifugoinnin. 3 h:n ajoa varten valmistettiin neljä ajoputkea. Kaksi putkista täytettiin pelkällä PBS:llä ja kahteen muuhun putkeen laitettiin 3 ml 30 % sakkaroosia, jonka jälkeen loput putkesta täytettiin PBS:llä. Näytteiksi laitettiin suodattamatonta ja Pellicon-suodatettua näytettä. Näitä ajoputkia ajettiin 3 tunnin ajan (100000 x g, 4°C).

Ultrasentrifugoinnin jälkeen valmistettiin CsCl -ajoputket. Ajoputkiin laitettiin 5 ml 15 % CsCl:ia, 5 ml 40 % CsCl:ia ja pinnalle näyte. Putki täytettiin täyteen PBS:llä. Yhteen ajoputkeen laitettiin näyte juovasta, joka oli putkesta, jossa Pellicon-suodatettu näyte oli ajettu 30 % sakkaroosissa 3 h. Toiseen putkeen laitettiin näyte juovasta, joka oli sakkaroosissa ajetusta suodattamattomasta näytteestä. Kolmanteen ajoputkeen laitettiin näytteet pelleleistä, joissa oli Pellicon-suodatettu ja suodattamaton näyte PBS:n kanssa. Neljänteen putkeen laitettiin näytteet pelleleistä, joissa oli Pellicon-suodatettu ja suodattamaton näyte sakkaroosin ja PBS:n kanssa. Viidenteen ajoputkeen laitettiin näyte Pellicon-suodatetusta näytteestä ja kuudenteen putkeen näyte suodattamattomasta al-

kuperäisestä näytteestä. Näiden kahden viimeisen ajoputken näytteet eivät siis olleet 3 h:n ultrasentrifugoinnissa kuten muihin ajoputkiin laitetut näytteet. Ajoputkia ultrasentrifugoitiin noin vuorokausi (100000 x g, 4 °C). Ultrasentrifugoinnin kaikista vaiheista otettiin näytteitä analyysjää varten.

Toisessa ajokokonaisuudessa tehtiin kaksi noin vuorokauden mittaista ultrasentrifugointia. Tämän ultrasentrifugoinnin vaiheet ovat esitettynä kuvassa 2. Ensimmäistä ajoa varten valmistettiin ajoputket, joihin laitettiin kahteen 10 ml PBS:ää, kahteen 10 ml 30 % sakkaroosia ja kahteen 10 ml 60 % sakkaroosia. Näytteinä käytettiin Pellicon-suodatettua ja suodattamatonta näytettä. Pellicon-suodatettua näytettä laitettiin putkiin 1 ml ja suodattamatonta laitettiin 1,2 ml. Näytteiden lisäämisen jälkeen kaikki putket täytettiin vielä pintaan asti PBS:ää käyttäen. Ajoputkia ultrasentrifugointiin noin vuorokauden (100000 x g, 4 °C).

Toista vuorokauden mittaista ultrasentrifugointia varten valmistettiin ajoputket, joihin laitettiin 5 ml 15 % CsCl:a ja 5 ml 40 % CsCl:a. Näihin putkiin laitettiin näytteitä 2 ml. Yhteen putkeen laitettiin näyte ensimmäisen ajon Pellicon-suodattamattomasta pelletistä ja yhteen putkeen näyte Pellicon-suodatetusta näytteestä. Seuraavaan putkeen laitettiin näyte 30 %:n sakkaroosin Pellicon-suodatetun näytteen pelletistä ja seuraavaan näyte Pellicon-suodattamattomasta. Seuraavaan putkeen laitettiin näyte 60 %:n sakkaroosin Pellicon-suodatetun näytteen juovasta ja yhteen putkeen näyte Pellicon-suodattamattomasta (kuva 2). Näytteiden lisäämisen jälkeen kaikki putket täytettiin vielä pintaan asti PBS:ää käyttäen. Ajoputkia ultrasentrifugoitiin noin vuorokauden ajan (100000 x g, 4 °C). Ultrasentrifugoinnin eri vaiheista otettiin näytteitä analyysjää varten.



Kuva 2: Ultrasentrifugoinnin vaiheet

Kuvassa merkitty punaisilla numeroilla SDS-PAGE- ja Western blot -analyysiin kerätyt näytteet.

3.6 Analyysimenetelmät

3.6.1 TR-FIA

Analysoitavat näytteet laimennettiin Delfia-mittauspuskuriin (Delfia Assay Buffer, Wallac Oy) ennen pipetoimista kuoppalevyille. Työssä käytettiin valmiiksi päälystettyjä kuoppalevyjä, jotka sisälsivät InB-NP-vasta-ainetta (anti-InB-NP, 0,25 µl/well). Kuoppalevyt pestiin ensin levypesurilla kahteen kertaan käyttäen 1 x Delfia Wash -pesuliuosta (Wallac Oy). Kuoppalevyn pesemisen jälkeen kuoppiin lisättiin 100 µl näytelaimennoksia. Laimennosten päälle lisättiin 50 µl leima-ainetta, joka sisälsi suhteessa 1/1000 Europium-leimattua vasta-ainetta ja Delfia-mittauspuskuria. Kuoppalevyä inkuboitiin 60 min ajan 37 °C:ssa, jonka jälkeen kuoppalevy pestiin levypesurilla kahdeksan kertaa. Pesujen jälkeen kuoppiin lisättiin 150 µl Enhancement-liuosta (Wallac Oy). Kuoppalevyä ravisteltiin vielä 1 min ajan ja signaali mitattiin mikrolevylukijalla (Hidex Sense Microplate Reader, Hidex).

3.6.2 SDS-PAGE

SDS-PAGE:ssa ajopuskurina toimi 1 x SDS-puskuri, (laimennettiin 10 x SDS-puskurista, jossa 10 g SDS (Sodium dodecyl sulfate, Sigma-Aldrich), 30,3 g Trizma base (Sigma-Aldrich), 144,1 g Glycine (Fischer Chemical) ja 1000 ml H₂O) ja geelit olivat valmiita 15-kuoppaisia BIO-RAD Mini Protean TGX precast 4-15 % -geelejä (BioRad). Geelien ajolaitteena käytettiin BIO-RAD-ajolaitetta (BioRad).

Näytteet valmistettiin laimentamalla ne 6 x Laemmli-puskuriin, johon oli lisätty 5 % BME (beta-merkaptotetanoli). Laimentamisen jälkeen näytteitä inkuboitiin 85 °C:essä 5 min ajan, jonka jälkeen ne sentrifugoitiin (16000 x g, 1 min). Näytteet pipetoitiin geeleille ja geelejä ajettiin 200 V jännitteellä noin 30 min ajan. Geelejä tehtiin aina kaksi rinnakkaista, joista toiselle tehtiin SDS-värjäys ja toista geeliä käytettiin Western blot -määrittelykseen. Molekyylipainostandardina toimi

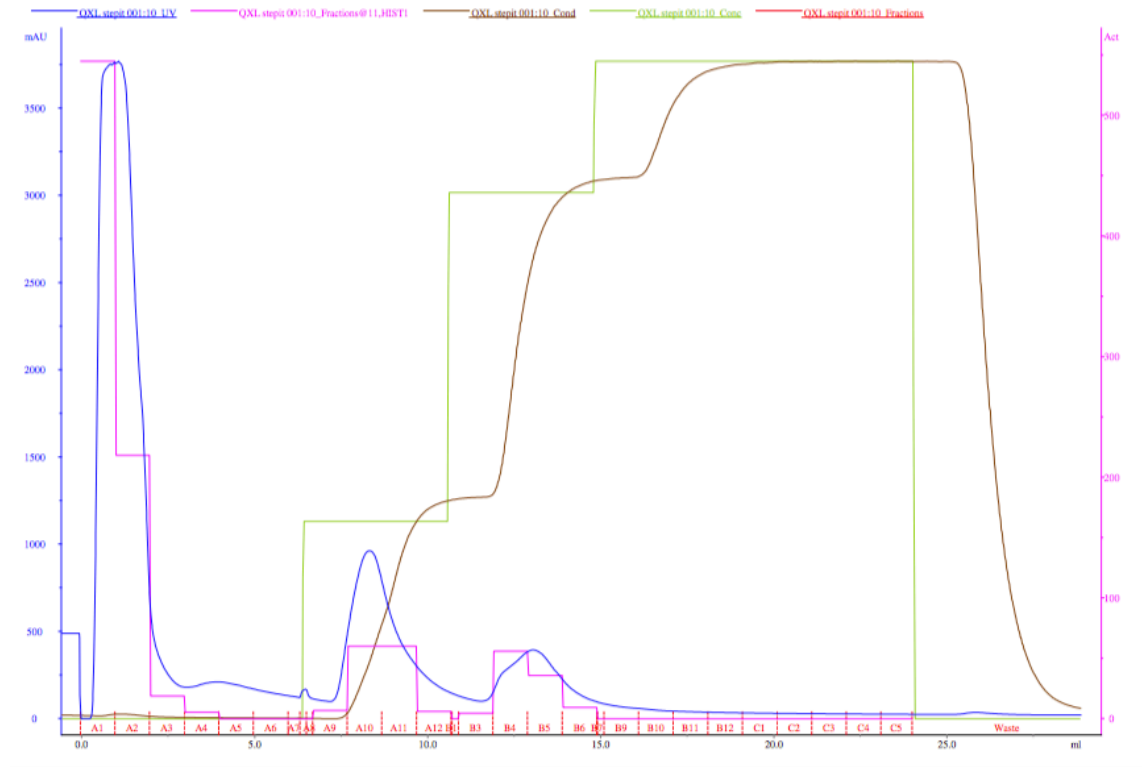
kaikissa ajoissa BlueStar Protein Marker (Nippon Genetics). SDS-värjäys tehtiin laittamalla geeli, joko Aqua Stain -väriliuokseen tai PageBlue Protein Staining -liuokseen noin 1 h ajaksi värjäytymään.

3.6.3 Western blot

SDS-geelin proteiinit siirrettiin Immun-Blot PVDF -kalvolle. Ajolaitteena käytettiin BIO-RAD Criterion Blotter -laitteistoa (Bio-Rad) ja siirto tapahtui 100 V:ssa 1 h:n ajan. Proteiinien siirtämisen jälkeen kalvolle tehtiin kaksi vasta-aineinkubointia. Ensimmäisenä vasta-aineena käytettiin anti-influenssa B -vasta-ainetta (HyTest Ltd MAb InB27) suhteessa 1/1000 ja toisena vasta-aineena käytettiin Goat anti-Mouse -vasta-ainetta (Bio-Rad) suhteessa 1/10000. Vasta-aineet laimennettiin 1 x PBS + 1 % maitojauhe -liuokseen. Molemmat vasta-ainekäsittelyt kestivät tunnin ja ensimmäisen ja toisen vasta-ainekäsittelyn välissä tehtiin kalvolle pesut (3 x 5 min, 1 x PBST). Vasta-aineinkubointien jälkeen kalvolle tehtiin pesut (1 x 5 min 1 x PBST ja 2 x 5 min 1 x AP-detektiopuskuri) ja valmistettiin AP-detektio-liuos, johon laitettiin 66 µl NBT:tä (Promega), 33 µl BICP:tä (Promega) ja 10 ml AP-detektiopuskuria. Kalvoa inkuboitiin AP-detektiossa noin 30 min, jonka jälkeen kalvo kuivattiin ja kuvattiin.

4 TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELO

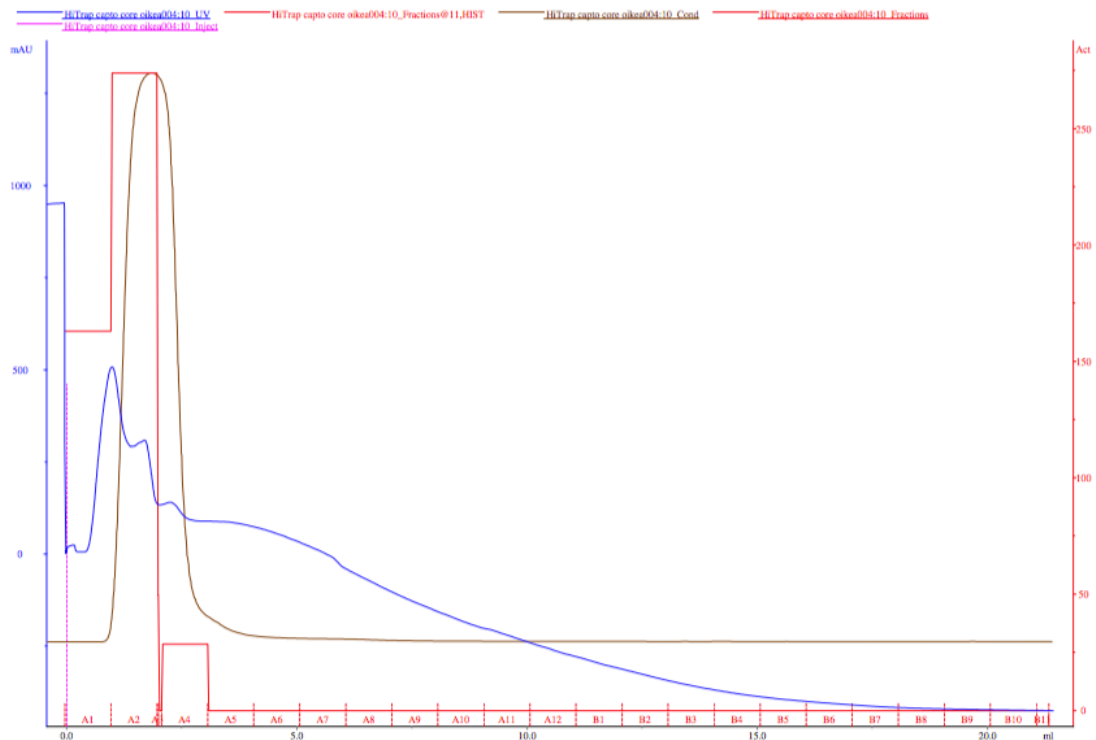
4.1 InB-NP:n puhdistaminen kromatografisilla menetelmillä



Kuva 3: Pellicon-suodatetun näytteen kromatogrammi ioninvaihtokromatografia-ajosta

Kuvassa 3 on kromatogrammi ajosta, jossa Pellicon- suodatettu näyte on ajettu Q Sepharose XL -pylväällä. Ajon UV-absorbanssi 280 nm:ssa on kuvattu sini-sellä (vasemmalla puolella oleva y-akseli) ja TR-FIA:sta saadut CPS-arvot violetilla (oikealla puolella oleva y-akseli).

Absorbanssikäyrä kertoo jokaisen fraktion proteiinimäärän. Mitä suurempi piikki fraktion kohdalla, sitä suurempi on fraktion proteiinimäärä. Fraktioista tehtyjen TR-FIA-määritysten perusteella (liite 1) isompi osa kohdeproteiinista tulee ulos keskimmaisessä piikissä eli fraktioissa A10 ja A11.

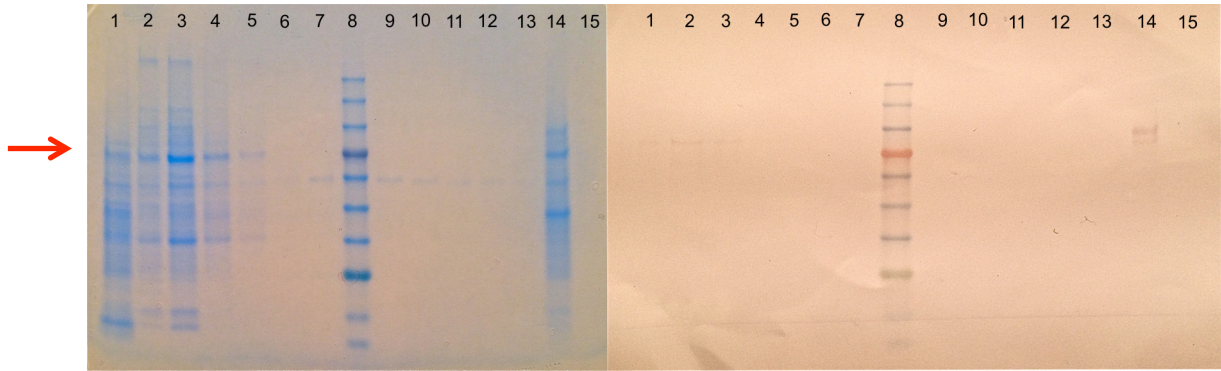


Kuva 4: Kromatogrammi geelisuoduksesta käyttäen kuvassa 3 esitettyjä A10- ja A11-fraktioita

Kuvan 3 kromatogrammin eluutiofraktiot A10 ja A11 yhdistettiin yhdeksi näytteeksi ja niille tehtiin geelisuodatus Cpto Core 700 -pylväällä, kuvassa 4 tämän ajon kromatogrammi. UV-absorbanssi 280 nm:ssa on esitetty sinisellä (vasemmalla puolella oleva y-akseli) ja TR-FIA:sta saadut CPS-arvot punaisella (oikealla puolella oleva y-akseli).

Kromatogrammista 4 havaitaan, että kaikki kohdeproteiinit tulevat ulos jo fraktioissa A1 ja A2. Tämä oli odotettua, koska teorian mukaan isot proteiinit tulevat ensimmäisenä ulos pylvästä. Myös TR-FIA:n (liite 1) perusteella havaitaan, että muissa fraktioissa ei ole mitattavaa InB-NP-proteiinia.

kuvan 4 kromatogrammin eluutiofraktioille (fraktiot, joiden kohdalla absorbanssikäyrällä piikit ja joiden CPS-arvot suurimmat) tehtiin SDS-PAGE ja Western blot -analyysi.



Kuva 5: Geelisuodatuksen SDS-PAGE (vasemmalla) ja Western blot (oikealla).

- | | | |
|-----------------------|----------------------------|----------------------------|
| 1) alkuperäinen näyte | 2) fraktio A1 | 3) fraktio A2 |
| 4) fraktio A4 | 5) fraktio A5 | 6) fraktio A6 |
| 7) fraktio A7 | 8) molekyylipainostandardi | 9) fraktio A8 |
| 10) fraktio A9 | 11) fraktio A10 | 12) fraktio A11 |
| 13) fraktio A12 | 14) negatiivinen kontrolli | 15) positiivinen kontrolli |

Molekyylipainostandardin bändien koot ylhäältä alaspäin ovat 180 kDa, 130 kDa, 100 kDa, 75 kDa (punainen bändi), 63 kDa, 48 kDa, 35 kDa, 28 kDa (vihreä bändi), 17 kDa ja 10 kDa.

Geelisuodatusnäytteillä tehdystä Western blot -kalvosta (kuva 5) havaitaan, että InB-NP tulee pylväästä ulos jo heti flowthrough:ssa (fraktiot A1 ja A2) vaikkakin hyvin heikkoina bändeinä. InB-NP:n koko osuu markkerista katsottuna 100 kDa:n ja 75 kDa:n välille mikä, sopii hyvin myös teoreettiseen proteiinin kokoon (82,5 kDa). Myös SDS-PAGE:n geelissä havaitaan bändit samoissa kohdissa Western blot -kalvon kanssa.

Taulukko 1: Kromatografisten menetelmien puhdistustaulukko

Vaihe	Tilavuus (μl)	CPS/μl	Saantoprosentti (%)
IEX lähtönäyte	1000	2861	100
IEX A10/A11 eluutiolle	2000	92	7
GF A1/A2 eluutiolle	2000	110	8

Kromatografisille menetelmille tehtiin puhdistustaulukko (taulukko 1). Puhdistustaulukosta havaitaan, että saanto laskee huomattavasti IEX-ajossa, jonka jäl-

keen saanto on 7 %. GF-ajon jälkeen saanto kasvaa vähän. Saannon kasvu on kuitenkin pieni, joten kyseessä voi olla mittausvirhe, sillä oletettavaa oli, että saanto laskee jokaisessa puhdistusvaiheessa, kun kohdeproteiinia puhdistetaan enemmän.

4.2 Ultrasentrifugointi

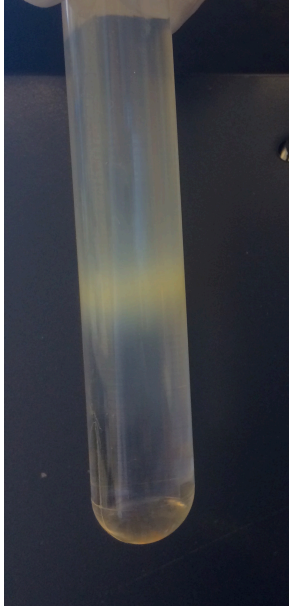
Ultrasentrifugointi-vaiheessa tehtiin työjakson puitteissa kaksi ajokokonaisuutta. Ajo-ohjelmat perustuivat artikkeliin, jossa onnistuttiin puhdistamaan viruksen kaltaista proteiinia kahdella peräkkäisellä ultrasentrifugoinnilla ajamalla näyte ensin 30 % sakkaroosimatriisin läpi ja seuraavaksi CsCl-matriisin läpi.⁶

Ensimmäinen ajokokonaisuus antoi tietoa toista ajokokonaisuutta varten, jossa päätettiin ajaa näytettä pelkän PBS:n, 30 % sakkaroosin ja 60 % sakkaroosin läpi noin vuorokauden ajan ja siihen perään noin vuorokauden mittainen ajo matriisin läpi, jossa oli sekä 15 %:sta, että 40 %:sta CsCl:a.

60 % sakkaroosi osoittautui liian tiheäksi matriisiksi ja kaikki näyte jäi sakkaroosin pinnalle. 30 %:sta sakkaroosia sisältävään Pellicon-suodatettuun putkeen muodostui pelkkä pelletti, mutta suodattamattoman näytteen putkeen muodostui sekä pelletti, että juova (kuva 2). Toiselle näytteelle tehty Pellicon-suodatus on poistanut näytteestä kaikki pienet partikkelit, mikä aiheuttaa todennäköisen eron näiden näytteiden välille. Tästä voidaan päätellä, että 30 %:nen sakkaroosimatriisi päästää siis lävitseen vain yli 300 kDa:n kokoiset partikkelit. Molempiin putkiin, joissa oli näytteiden kanssa PBS muodostui pelletit putkien pohjalle. PBS ja 30 %:n sakkaroosiputkien pelleteistä tehtiin näytteet toiseen vuorokauden pituiseen ajoon, myös 60 %:n sakkaroosin juovia käytettiin näytteinä, koska niiden oletettiin sisältävän InB-NP:tä. Kaikkiin putkiin laitettiin toista ajoa varten samanlainen matriisi, joka sisälsi sekä 15 %:sta, että 40 %:sta CsCl:a.

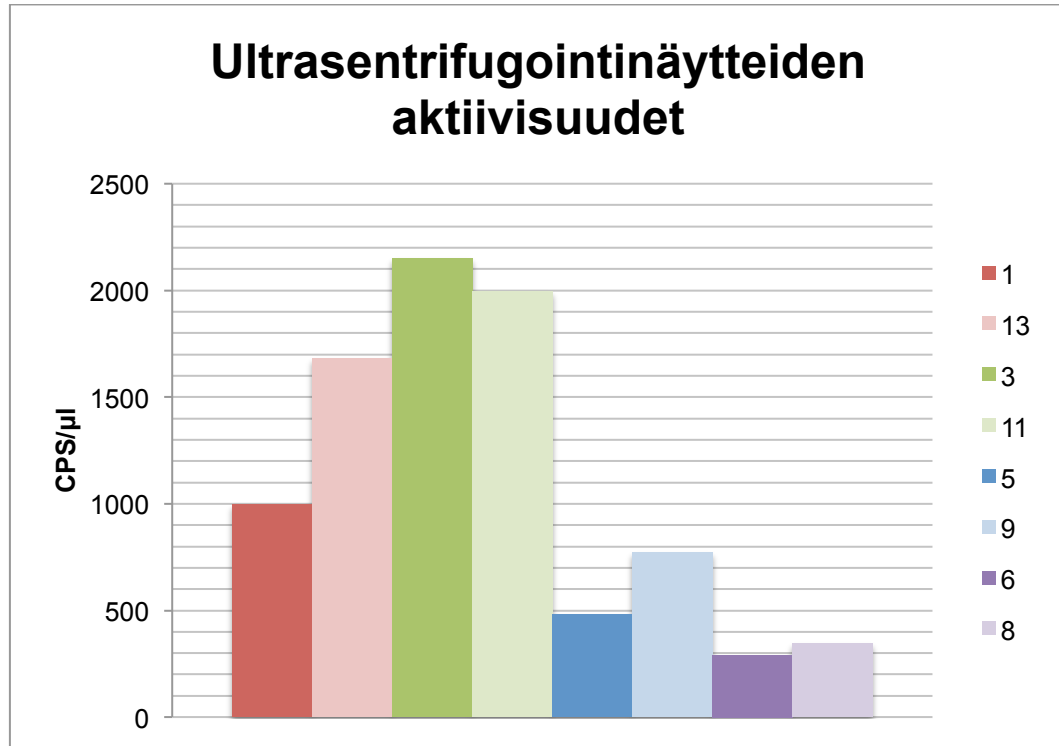
Toisen vuorokauden pituisen ajon jälkeen 60 %:n sakkaroosin juovista otetut näytteet muodostivat molemmat juovat putken puoleen väliin (kuva 7). Myös 30 % sakkaroosin pelleteistä otetut näytteet muodostivat juovat putkien puoleen

väliin. PBS-putkien pelleteistä otetut näytteet eivät muodostaneet ajopotkiin pellettiä, eikä juovaa, joten kohdeproteiini luultavasti tuhoutui.



Kuva 6: Ultrasentrifugointiputki toisen vuorokauden pituisen ultrasentrifugoinnin jälkeen.

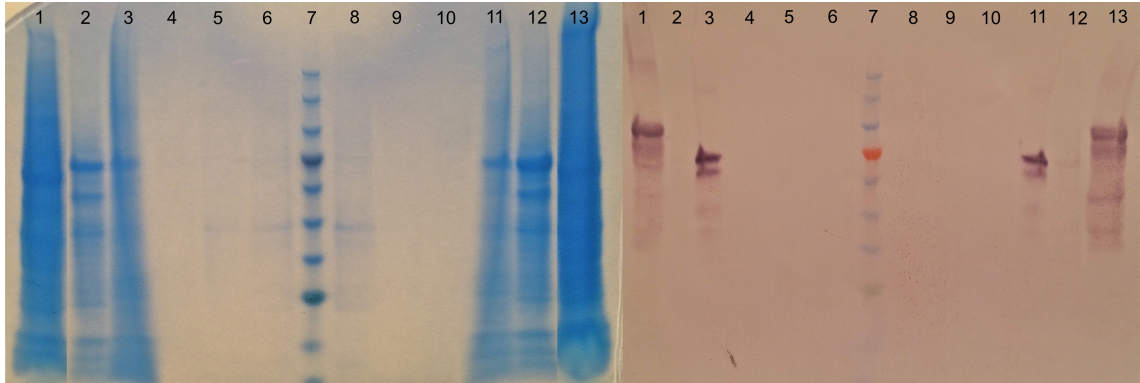
Kuvasta nähdään, mitä tarkoitetaan juovan muodostumisella. Valkoista kerrostumaa putken puolivälin alapuolella kutsutaan juovaksi.



Kuva 7: Ultrasentrifugointinäytteiden aktiivisuudet (CPS/μl). Näytteiden numeroinnit vastaavat ultrasentrifugointivaiheiden kuvan 2 numeroita. Kaaviossa on aina samasta vaiheesta otettu Pellicon-suodatettu ja suodattamaton näyte rinnakkain.

Kuvassa 7 esitettynä ultrasentrifugoinnin eri vaiheista otettujen näytteiden CPS-arvoja, jotka on laskettu TR-FIA-määritysten perusteella (Liite 1). Kaaviosta on jätetty pois sekä näytteet 2 ja 12 että näytteet 4 ja 10, koska niissä ei juurikaan ollut aktiivisuutta jäljellä (pienet CPS-arvot). Kuvasta havaitaan, että näytteiden 3 ja 11 CPS-arvot kasvavat, kun taas kaikkien muiden näytteiden CPS-arvot pienenevät alkuperäisnäytteisiin verrattuna. CPS-arvot pellicon-suodatettujen ja suodattamattomien näytteiden välillä ovat kuitenkin yllättävän pieniä, vaikka lähtönäytteiden välillä CPS-arvojen ero on melko suuri.

Eri vaiheissa otetuista näytteistä tehtiin myös SDS-PAGE ja Western blot -analyysit.



Kuva 8: Ultrasentrifugoinnin SDS-PAGE (vasemmalla) ja Western blot (oikealla). Kuvan numeroita vastaavat näytteet ovat merkittynä punaisilla numeroilla kuvaan 2. Molekyylipainostandardin bändien koot ylhäältä alaspäin ovat 180 kDa, 130 kDa, 100 kDa, 75 kDa (punainen bändi), 63 kDa, 48 kDa, 35 kDa, 28 kDa (vihreä bändi), 17 kDa ja 10 kDa.

Kuvasta 8 havaitaan, että kohdeproteiinia on ensimmäisen vuorokauden pituisen ajon jälkeen sekä Pellicon-suodatetun näytteen, että suodattamattoman näytteen putkissa, joissa käytettiin matriisina 30 %:sta sakkaroosia (näyte 3 ja 11). Toisen vuorokauden pituisen ajon jälkeen, kohdeproteiinia ei näytä enää olevan juurikaan jäljellä (näyte 5 ja 9), vaikka puhdistustaulukkojen (taulukot 2 ja 3) mukaan kohdeproteiinia voisi olla vielä jäljellä. SDS-geeli (kuva 8) on värjäytynyt liian siniseksi, mutta siitä voidaan kuitenkin havaita yhdet kohdeproteiinin bändit, jotka ovat samoissa kohdissa myös Western-kalvolla.

Ultrasentrifugoinnista tehtiin myös puhdistustaulukkoja. Puhdistustaulukkoa ei tehty näytteille 2 ja 4 sekä näytteille 12 ja 10, koska näissä näytteissä ei ollut aktiivisuutta jäljellä puhdistusvaiheiden jälkeen.

Taulukko 2: Ultrasentrifugoinnin Pellicon-suodatetun näytteen puhdistustaulukko näytteille 3 ja 5

Vaihe	Tilavuus (μl)	CPU/μl	Saantoprosentti (%)
Lähtönäyte (näyte 1)	1000	997	100
1. vuorokauden pituinen ultrasentrifugointi, 30 % sakkaroosimatriisi (näyte 3)	2000	2148	431
2. vuorokauden pituinen ultrasentrifugointi, CsCl-matriisi (näyte 5)	400	480	19

Taulukko 3: Ultrasentrifugoinnin Pellicon-suodattamattoman näytteen puhdistustaulukko näytteille 9 ja 11

Vaihe	Tilavuus (μl)	CPS/μl	Saantoprosentti (%)
Lähtönäyte (näyte 13)	1200	1680	100
1. vuorokauden pituinen ultrasentrifugointi, 30 % sakkaroosimatriisi (näyte 11)	2000	1995	198
2. vuorokauden pituinen ultrasentrifugointi, CsCl-matrsiisi (näyte 9)	400	770	15

Taulukko 4: Ultrasentrifugoinnin Pellicon-suodatetun näytteen puhdistustaulukko näytteelle 6

Vaihe	Tilavuus (μl)	CPU/μl	Saantoprosentti (%)
Lähtönäyte (näyte 1)	1000	997	100
2. vuorokauden pituinen ultrasentrifugointi, CsCl-matriisi (näyte 6)	800	290	23

Taulukko 5: Ultrasentrifugoinnin Pellicon-suodattamattoman näytteen puhdistustaulukko näytteelle 8

Vaihe	Tilavuus (μl)	CPU/μl	Saantoprosentti (%)
Lähtönäyte (näyte 13)	1200	1680	100
1. vuorokauden pituinen ultrasentrifugointi, 60 % sakkaroosimatriisi (ei näytettä)			
2. vuorokauden pituinen ultrasentrifugointi, CsCl-matriisi (näyte 8)	800	345	14

Taulukkojen 2 ja 3 näytteitä on puhdistettu keskenään samalla tavalla, kuten myös taulukkojen 4 ja 5 näytteitä, mutta erona on se, että taulukossa 2 ja 4 käytettiin lähtönäytteenä Pellicon-suodatettua näytettä ja taulukossa 3 ja 5 suodattamatonta.

Taulukoista 2 ja 3 taulukoista havaitaan, että ensimmäisen vuorokauden pituisen ultrasentrifugoinnin jälkeen molempien näytteiden CPS-arvot ja saantoprosentit kasvavat huomattavasti alkuperäisiin näytteisiin verrattuna. Näytteiden käsittelyssä on tapahtunut jotain, mikä on aiheuttanut tämän signaalitason nousun. Näytteet ovat mahdollisesti voineet pilkkoutua pienempiin osiin tai niiden molekyyli rakenne on voinut muuttua, mikä mahdollistaa vasta-aineen paremman sitoutumisen proteiiniin. Saantoprosentin perusteella kohdeproteiinia on

kuitenkin selvästi vielä jäljellä ensimmäisen vuorokauden pituisen ultrasentrifugoinnin jälkeen, mikä käy ilmi myös kuvan 9 SDS-PAGE:ssa ja Westernkalvolla. Toisen vuorokauden pituisen ultrasentrifugoinnin jälkeen saantoprosentti on molemmissa tapauksissa hieman alle 20 %, mutta Pellicon-suodatetun näytteen saanto on kuitenkin parempi, kuin suodattamattoman näytteen.

Taulukoissa 4 ja 5 näytteitä ei otettu ensimmäisen vuorokauden pituisen ultrasentrifugoinnin jälkeen, koska ajateltiin ettei näytteissä ole tapahtunut puhdistusta liian tiheän sakkaroosimatriisin takia. Puhdistusprosessia voidaan siis tarkastella vain toisen vuorokauden pituisen ultrasentrifugoinnin perusteella. Toisen vuorokauden pituisen ultrasentrifugoinnin jälkeen havaitaan, että Pellicon-suodatetun näytteen saanto on parempi kuin suodattamattoman näytteen.

4.3 Näytteen aktiivisuuden säilyminen

Alkuperäisen Pellicon-suodatetun näytteen aktiivisuuden muutos on koottu taulukkoon 1.

Taulukko 6: Pellicon-suodatetun näytteen aktiivisuuden muutos 43 päivän aikana

Päivämäärä	Päiviä	CPS/ μ l	Saantoprosentti (%)
12.3.2015	0	4421	100
18.3.2015	6	4772	108
24.3.2015	12	2862	65
31.3.2015	19	2960	67
7.4.2015	26	1981	45
14.4.2015	33	2263	51
24.4.2015	43	1804	40

Taulukko 6 osoittaa, että Pellicon-suodatetun näytteen aktiivisuus vaihtelee hyvinkin paljon. Kuudessa päivässä näytteen saantoprosentti nousee ja yhdessä kuukaudessa saantoprosentti on enää 40 %. Näytteitä säilytettiin koko työn ajan $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ lämpötilassa olevassa pakkasessa. Pellicon-suodatettu näyte jaettiin heti alussa useampaan erään, joten näytettä ei jouduttu pakastamaan ja sulatta-

maan moneen kertaan. Tästä voidaan vain todeta, että näyte ei säily pitkiä aikoja pakkasessa ja vaikka kaikki näyte oli peräisin samasta erästä niin näyte on ollut epätasaista laadultaan. Jopa samana päivänä tehdyt mittaukset saattoivat erota toisistaan, mutta tähän voi vaikuttaa myös muun muassa valmiiksi päällystettyjen kuoppien epätasaisuus, reagenssien lämpötilaerot, laimennosten epätarkkuus, työskentelytapojen vaihtelevuus ja mittausvirheet.

5 LOPPUPÄÄTELMÄT

Kromatografisista menetelmistä paras lopputulos saavutettiin käyttämällä ioninvaihtokromatografiaa (Q Sepharose XL -pylväs) ja geelisuodatusta (Capto Core 700 -pylväs) peräkkäin. Geelisuodatus yksinään ei ollut riittävä puhdistamaan InB-NP:tä vaan paras tulos saatiin yhdistämällä ajot.

Sekä ioninvaihtokromatografiaa, että geelisuodatusta käytettiin yksinään ja peräkkäin useamman kerran sekä Pellicon-suodatetulle näytteelle, että suodattamattomalle näytteelle. Pellicon-suodatettu näyte antoi parempia tuloksia, kuin suodattamaton näyte. Pellicon 300 kDa -kasetti poisti näytteestä alle 300 kDa kokoiset molekyylit. Kohdeproteiinin teoreettinen molekyylipaino on noin 82,5 kDa, mutta Pellicon-suodatuksen aikana kohdeproteiinia oli liittynyt toisiinsa useita (tetrameeri), mikä teki molekyylipainosta suuremman kuin 300 kDa, joten haluttu kohdeproteiini saatiin talteen. Vasta SDS-näytteille tehty inkubointi 85 °C:ssa ja beta-merkaptotetanoli hajottivat kohdeproteiinin monomeereiksi.

Geelisuodatus (Capto Core 700 -pylväs) antoi tulokseksi sen mikä oli jo etukäteen tiedossa eli geelisuodatus sopii paremmin jälkipuhdistusmenetelmäksi käytettäväksi esimerkiksi ioninvaihtokromatografian jälkeen. Ioninvaihtokromatografia (Q XL- pylväs) antaa yksinään jo hyviä tuloksia, mutta parhaimmat puhtaus-tulokset saavutetaan käyttämällä ioninvaihtokromatografiaa ja geelisuodatusta peräkkäin.

Vertailemalla kromatografisia menetelmiä ja ultrasentrifugointia toisiinsa, niin ultrasentrifugoinnilla saavutettiin kromatografisia menetelmiä paremmat saannot.

Ultrasentrifugoinnissa onnistuttiin hyvin saamaan kohdeproteiini näkyviin ensimmäisen vuorokauden mittaisen ajon jälkeen, kun käytettiin 30 %:sta sakkaroosimatriisia. 60 %:nen sakkaroosimatriisi osoittautui liian tiheäksi, sillä se ei päästänyt molekyyliä lävitseen. CsCl-matriisien käytöllä ei saavutettu haluttua tulosta sillä näytteiden CPS-arvot jäivät liian mataliksi.

Jatkossa pitäisi suorittaa lisää ajoja 30 % sakkaroosimatriisin kanssa ja tutkia toistuuko CPS-arvojen ja saantojen huomattava kasvaminen. Mikäli näin tapahtuu, niin pitäisi lähteä selvittämään tarkemmin syytä, että miksi näin tapahtuu. Puhdistusta voisi myös kokeilla esimerkiksi 40 %:n ja 50 %:n sakkaroosimatriisin kanssa ja tutkia miten matriisin tiheys vaikuttaa puhdistukseen. Jatkossa pitäisi myös mitata proteiinikonsentraatio, jotta spesifinen aktiivisuus olisi mitattavissa.

Työn tekemiseen ja tuloksiin vaikutti huomattavasti se, että alkuperäisten näytteen CPS-arvot vaihtelivat paljon eri kertoina. Näytteen pakastaminen ja sulattaminen ei voi vaikuttaa säilymättömyyteen, sillä näyte oli heti alussa jaettu useampaan erään, joten uudelleen pakastettuja näytteitä ei tarvinnut käyttää tämän työn aikana. Näyte mahdollisesti vain hajosi ajan kuluessa. Näytteen säilyttämiseen tulisikin jatkossa kiinnittää erityisesti huomiota tai tarvittaessa hajottaa solut jokaisella puhdistuskerralla erikseen.

LÄHTEET

¹ Solunetti, http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/proteiinien_sds-page/2/, viitattu 27.4.2015

² Rapid Reference to Influenza Resource Center, <http://www.rapidreferenceinfluenza.com/chapter/B978-0-7234-3433-7.50009-8/aim/influenza-virus-structure>, viitattu 27.4.2015

³ World Health Organization, <http://www.who.int/biologicals/vaccines/influenza/en/>, viitattu 27.4.15

⁴ Terveyden ja hyvinvoinnin laitos, <https://www.thl.fi/fi/web/infektiotaudit/taudit-ja-mikrobit/virustaudit/influenssa>, viitattu 11.5.2015

⁵ Centers for Disease Control and Prevention, <http://www.cdc.gov/flu/professionals/diagnosis/rapidlab.htm>, viitattu 11.5.2015

⁶ Slibinskas, R.; Samuel, D.; Gedvilaite, A.; Staniulis, J.& Sasnauskas, K. Synthesis of the measles virus nucleoprotein in yeast *Pichia Pastoris* and *Saccharomyces cerevisiae*, *Journal of Biotechnology* 107 (2004),115-124

⁷ Nikkari S.; Halonen P.; Kharitonov I.; Kivivirta M.; Khristova M.; Waris M. And Kendal A. One-incubation time-resolved fluoroimmunoassay based on monoclonal antibodies in detection of influenza A and B viruses directly in clinical specimens, *Journal of Virological Methods* 23 (1989), s, 29-39

⁸ ExPaSy, http://web.expasy.org/cgi-bin/compute_pi/pi_tool, viitattu 27.4.2015

⁹ Walls H.; Johansson K.; Harmon M.; Halonen P. And Kendal A. Time-Resolved Fluoroimmunoassay with Monoclonal Antibodies for Rapid Diagnosis of Influenza Infections. *Journal of Clinical Microbiology*. Dec 1986, 907-912

¹⁰ Wheelwright, S. 1991. Protein purification. Design and Scale up of Downstreaming Processing. s, 155

¹¹ GE Healthcare Life Sciences, https://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1314774443672/litdocGE_IonExchange_20130407221710.swf

¹² Tosoh Bioscience LLC, <http://www.separations.us.tosohbioscience.com/ServiceSupport/TechSupport/ResourceCenter/PrinciplesofChromatography/IonExchange>, viitattu 25.4.2015

- ¹³ GE Healthcare Life Sciences,
http://www.gelifesciences.com/file_source/GELS/Service%20and%20Support/Documents%20and%20Downloads/Handbooks/pdfs/Ion%20Exchange%20Chromatography.pdf, viitattu 25.4.2015. s, 21
- ¹⁴ Wheelwright, S. 1991. Protein purification. Design and Scale up of Downstreaming Processing. s, 194-195
- ¹⁵ Amersham Biosciences, http://kirschner.med.harvard.edu/files/protocols/GE_gelfiltration.pdf. s, 12, ciitattu 15.5.2015
- ¹⁶ Wheelwright, S. 1991. Protein purification. Design and Scale up of Downstreaming Processing. s, 197-198
- ¹⁷ GE Healthcare Life Sciences,
https://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1334667780708/litdoc29000334_20140211233953.pdf, viitattu 15.5.2015
- ¹⁸ Solunetti, <http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/sentrifugointi/>, viitattu 28.4.2015
- ¹⁹ Theseus, T. Kallio, opinnäytetyö,
http://www.theseus.fi/xmlui/bitstream/handle/10024/87020/Kallio_Tero.pdf?sequence=1, viitattu 15.5.2015

TR-FIA-mittaustulokset

Näytteen nimi	CPS-tausta	laimennos huomioitu	CPS/ μ l
Alkuperäinen Pellicon-suodatettu näyte 1/50	5722	286075	2861
IEX A1,A2 1/10	1534	15335	153
IEX A9 1/10	248	2480	25
IEX A 10 1/10	853	8525	85
IEX A11 1/10	996	9960	100
IEX A12 1/10	311	3110	31
IEX B3 1/10	91	910	9
IEX B4 1/10	438	4380	44
IEX B5 1/10	216	2155	22
IEX B6 1/10	175	1745	17

Näytteen nimi	CPS-tausta	laimennos huomioitu	CPS/ μ l
GF alkuperäinen näyte eli IEX:n fraktiot A10,A11 1/50	245	12225	122
GF A1 1/10	629	6285	63
GF A2 1/10	1566	15660	157
GF A4 1/10	-4		
GF A5 1/10	-126		
GF A6 1/10	-89		

Näytteen nimi	CPS-tausta	laimennos huomioitu	CPS/ μ l
Ultra-suodatus 1 1/50	1994	99675	997
Ultra-suodatus 2 1/10	18	175	2
Ultra-suodatus 3 1/10	21484	214835	2148
Ultra-suodatus 4 1/10	262	2620	26
Ultra-suodatus 5 1/10	4798	47980	480
Ultra-suodatus 6 1/10	2901	29010	290
Ultra-suodatus 8 1/10	3453	34530	345
Ultra-suodatus 9 1/10	7704	77040	770
Ultra-suodatus 10 1/10	1739	17385	174
Ultra-suodatus 11 1/10	19947	199465	1995
Ultra-suodatus 12 1/10	-1		
Ultra-suodatus 13 1/50	3360	168000	1680

Ultra-suodatusnäytteiden numerot vastaavat kuvan 2 numeroita.