



Osaamista
ja oivallusta
tulevaisuuden
tekemiseen

Annette Asplund

Bakteriofagi ϕ R1-37:n häntäkarvaproteiinin muokkaus ja ekspressio

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalyttikko (AMK)

Laboratorioala

Opinnäytetyö

24.9.2018

Tekijä Otsikko Sivumäärä Aika	Annette Asplund Bakteriofagi ϕ R1-37:n häntäkarvaproteiinin muokkaus ja ekspressio 32 sivua + 2 liitettä 24.9.2018
Tutkinto-ohjelma	Laboratorioanalytiikka (AMK)
Ohjaajat	Dosentti Maria Pajunen Professori Mikael Skurnik Lehtori Tiina Soininen
<p>Tämä opinnäytetyö käsitteli bakteriofagi ϕR1-37:stä peräisin olevan fuusioproteiinin muokkausta. Projektin tarkoituksena oli selvittää bakteriofagin kykyä infektoida eri <i>Yersinia enterocolitica</i> -kantoja. Aikaisempien tutkimusten pohjalta tiedettiin, että faagi ϕR1-37 kykenee infektoimaan pintarakenteeltaan täysin erilaisia <i>Yersinia</i>-suvun bakteereja. Tämä oli herättänyt tarpeen selvittää, kuinka faagi infektoi eri isäntäsoluja. Yhtenä vaihtoehtona on, että faagilla on kaksi tai jopa useampia erilaisia häntäkarvaproteiineja. Erilaisten häntäkarvojen avulla se kykenisi tunnistamaan erityyppisiä bakteerien pintarakenteita. Toinen vaihtoehto on, että se kykenee tähän yhden häntäkarvan avulla. Tällöin asia vaatisi lisätutkimuksia infektointimetodin selvittämiseksi.</p> <p>Projekti toteutettiin käytännössä muokkaamalla fuusioproteiinia, joka sisälsi ϕR1-37-faagin häntäkarvaproteiinin. Aikaisemman tutkimuksen valossa tiedettiin, että proteiinia täytyisi muokata, jotta se saataisiin ilmentymään. Muokkaus päätettiin toteuttaa lisäämällä <i>YadA</i>-varsi häntäkarvageenin ja eGFP:n (vihreä fluoresenssi proteiini) väliin. Tämän toivottiin parantavan proteiinin kolmiulotteista rakennetta ja edesauttavan oikeaa laskostumista. eGFP:n avulla proteiinia vuorovaikutusta bakteerin kanssa voitiin tarkastella fluoresenssia mittaamalla.</p> <p>Työ toteutettiin muokkaamalla proteiinia koodaavaa geeniä. Valmistettu fuusioproteiinia tuottava plasmidi sekvensoitiin. Sekvenssin perusteella voitiin todeta, että proteiinia koodaava geeni oli saatu muokattua oikeanlaiseksi.</p> <p>Sitoutumiskokeet tehtiin kasvattamalla eri <i>Yersinia</i>-kantoja ja mittaamalla niistä fluoresenssi mikrotiitterilevynlukijalla sekä tutkimalla niitä fluoresenssimikroskoopilla. Tämän opinnäytetyön puitteissa vain YeO3-R1- sekä YeO3-c-OCR -kantoja ehdittiin tutkimaan. YeO3-R1-kanta toimi positiivisena kontrollina ja negatiivisena kontrollina oli YeO3-c-OCR-kanta. Mikrotiitterilevynlukijalta saadut tulokset olivat epäjohdonmukaisia eikä niiden perusteella voitu päätellä mitään. Fluoresenssimikroskoopilla otetut kuvat olivat puolestaan hyvin havainnollisia. Niiden perusteella voitiin helposti päätellä, että proteiini oli kiinnittynyt YeO3-R1-kantaan mutta ei YeO3-c-OCR-kantaan.</p>	
Avainsanat	eGFP, bakteriofagi, faagi, häntäkarva, fluoresenssi

Author Title	Annette Asplund Bacteriophage ϕ R1-37 Tailfiber Modification and Expression
Number of Pages Date	32 pages + 2 appendices 24 September 2018
Degree	Bachelor of Laboratory Services
Degree Programme	Laboratory Sciences
Instructors	Maria Pajunen, Adjunct Professor Mikael Skurnik, Professor Tiina Soininen, Senior Lecturer
<p>The aim of the project was to modify a fusion protein that originated from bacteriophage ϕR1-37. The purpose was to determine how the phage is able to infect its host cell. From previous studies it is known that the phage is able to infect several different kind of <i>Yersinia</i> strains, even though their surface structures differ greatly from each other. Therefore, further study was required to find out the exact method of infection. One possibility is that the phage has two or several different tail fibers. With these it could recognize and infect different kinds of bacterial surface structures. Another possibility is that it can do this with only one tail fiber. If that were to be the case, further study would be required to solve the infection method.</p> <p>The project was carried out by modifying a fusion protein that had the tail fiber gene from bacteriophage ϕR1-37. From previous research it was known that the protein as such did not express itself well and needed some modifying. The modifying was done by inserting a YadA stalk between the tail fiber protein and the EGFP (green fluorescent protein). By doing so, the yield and the trimeric structure were hopefully going to be better.</p> <p>After modification the protein encoding gene was sequenced. The sequence confirmed that the constructed recombinant gene was the correct one.</p> <p>To check if the protein was able to bind to bacteria, different <i>Yersinia</i>-strains were cultured and incubated with the fusion protein. The fluorescence was measured with a microwell plate reader and the samples were also observed with a fluorescence microscope. Within this project there was only time to examine YeO3-R1- and YeO3-c-OCR –strains. YeO3-R1-strain was the positive control and YeO3-c-OCR the negative control. Results from the first experiment were inconsistent and no conclusion whether the protein was able to bind to bacteria could be made. The pictures taken with the fluorescence microscope, however, were very informative. Based on the pictures it was easy to determine that the protein had bound to YeO3-R1-strain but not to YeO3-c-OCR-strain.</p>	
Keywords	eGFP, bacteriophage, phage, tail fiber, fluorescence

Sisällys

1	Johdanto	1
2	<i>Yersinia</i> -bakteerit	1
3	Bakteriofagit	3
4	Fuusioproteiinit	5
5	Työn suoritus	8
5.1	Elektrokompetenttien solujen valmistus ja elektroporaatio	9
5.2	Plasmidieristys	10
5.3	PCR	10
5.4	Digestio	12
5.5	Ligaatio, elektroporaatio ja maljaus	13
5.6	Tuotteen tarkistus	14
5.7	Proteiiniykspressio ja lyysaus	16
5.8	Proteiinipuhdistus	17
5.9	Proteiinin konsentrointi ja puskurinvaihto	18
5.10	Sitoutumiskokeet	18
6	Tulokset	21
6.1	Kloonaus	21
6.2	Ligaatio	23
6.3	Koedigestiot ja sekvensointi	23
6.4	Proteiinipuhdistus ja -tuotto	25
6.5	Fluoresenssimittaukset	27
7	Loppupäätelmät	29
	Lähteet	31
	Liitteet	
	Liite 1. Kasvatusalustat	
	Liite 2. pAA1-sekvenssi	

1 Johdanto

Projektin tavoitteena oli tutkia *Yersinia enterocolitica* spesifistä ϕ R1-37-faagia. Projekti oli osa isompaa Helsingin yliopiston faagitutkimusta, jota tehdään bakteriologian ja immunobiologian osastolla. Tämä tutkimus lisää yleistä tietämystä faagien toiminnasta, ja siitä voi olla hyötyä tulevaisuudessa esimerkiksi faagiterapiassa. Faagien häntäkarvaproteiineja käytetään myös bakteerien endotoksiinien poistamiseen liuoksista affiniteettikromatografian avulla sekä kliinisessä työssä vasta-aineiden tapaan diagnostiikassa. [1; 2.]

Bakteriofagi ϕ R1-37 kykenee infektoimaan vain tiettyjä *Yersinia*-suvun bakteereita kiinnittymällä niiden pintaan häntäkarvansa avulla ja tunnistamalla eri bakteerien pinnalta erilaisia lipopolysakkaridirakenteita. Vaikka faagi on *Y. enterocolitica* spesifinen, tuoreet tutkimukset ovat osoittaneet, että faagi kykenee infektoimaan myös muita *Yersinia*-lajeja, joiden pintarakenteet poikkeavat täysin toisistaan. [3, s. 1.]

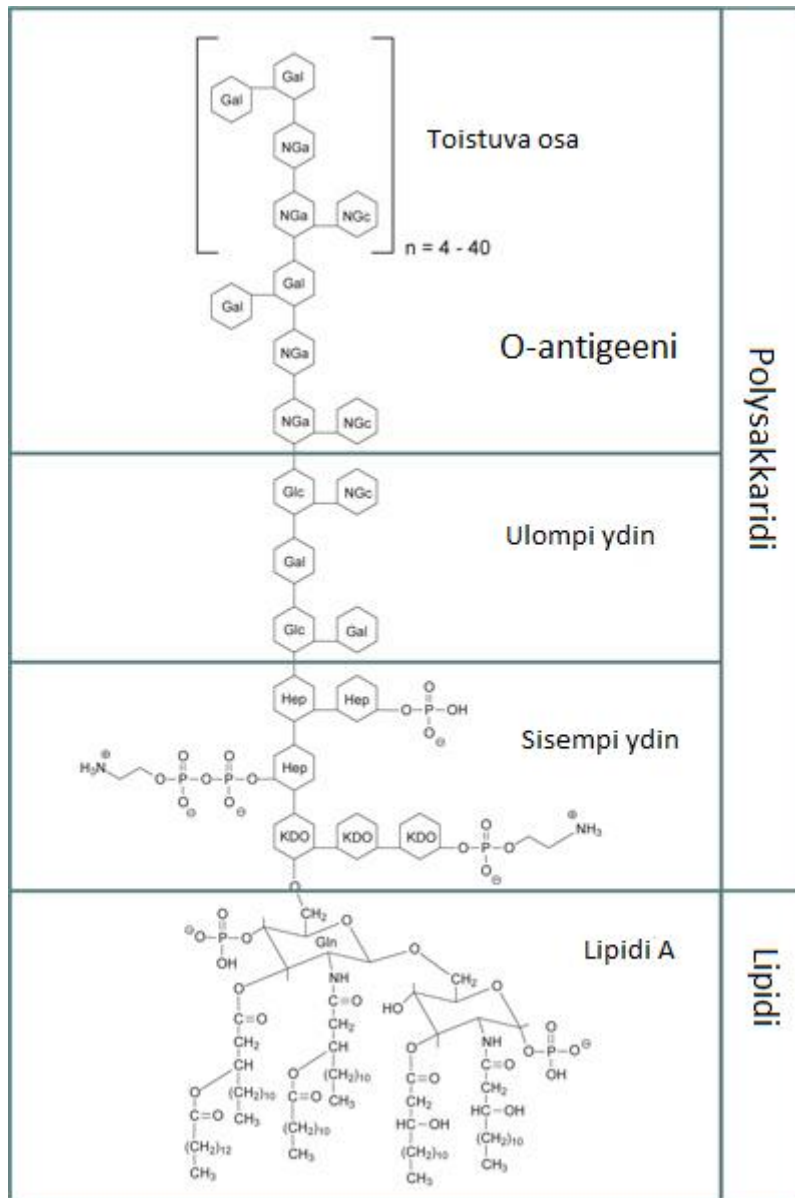
Tämän opinnäytetyön tavoitteena oli selvittää, käyttääkö faagi infektointiin yhtä vai useampaa häntäkarvaa. Aiemmassa tutkimuksessa häntäkarvaproteiinia (gp298) oli tuotettu täyspitkinä (sisältäen kaikki 704 aminohappoa) histidiinihännän sekä proteiinin trimerisoinnissa tarvittavan chaperonin (gp297) kanssa. Proteiinin tuotto oli hyvä, mutta proteiinin kiinnittymistä bakteerin pinnalle oli hankala seurata. [4, s. 34.]

2 *Yersinia*-bakteerit

Yersinia-suvun bakteerit ovat gramnegatiivisia ja niitä esiintyy yleisesti maaperässä ja vesistöissä. *Y. enterocolitica* kykenee lisääntymään sekä happamassa että emäksisessä ympäristössä. Se kasvaa parhaiten huoneenlämmössä, mutta viihtyy myös jääkaappilämpötiloissa. *Y. enterocolitica* ja *Y. pseudotuberculosis* aiheuttavat kolmanneksi eniten bakteeriperäisiä suolistotulehduksia Suomessa. *Yersinia* tarttuu useimmiten elintarvikkeiden välityksellä ja yleensä vain pieni osa altistuneista ihmisistä sairastuu. *Yersinia* ei tartu ihmisestä toiseen. [5; 6.]

Lipopolysakkaridit

Gramnegatiivisten bakteerien pinta muodostuu pääasiallisesti lipopolysakkarideista (LPS). Ne ovat myrkyllisiä ja niitä kutsutaan myös endotoksiineiksi. LPS:t ovat makromolekyylejä, jotka muodostuvat rasvaosasta (lipidi A), sisemmästä polysakkaridiosasta sekä O-antigeenistä. Lipidi A:n tehtävä on kiinnittää LPS bakteerin soluseinään. Kuvassa 1 on havainnollistettu LPS:n rakennetta. [3; 7, s. 2015; 8.]



Kuva 1. Lipopolysakkaridien rakenne [8].

O-antigeeni muodostuu oligosakkaridiketjista ja on kullekin bakteerin serotyypille ominainen. Tätä voidaan käyttää hyväksi bakteerien tyyppityksessä. O-antigeenin toistuva osa muodostuu glykosyylijäämistä, joiden määrä vaihtelee yhden ja kahdeksan välillä. Eri bakteerikantojen välillä vaihtelua on tässä osassa hyvin paljon. SDS-PAGE-geelillä on mahdollista tarkastella näitä rakenteellisia eroavaisuuksia. [3; 7, s. 2015; 8; 9, s. 383.]

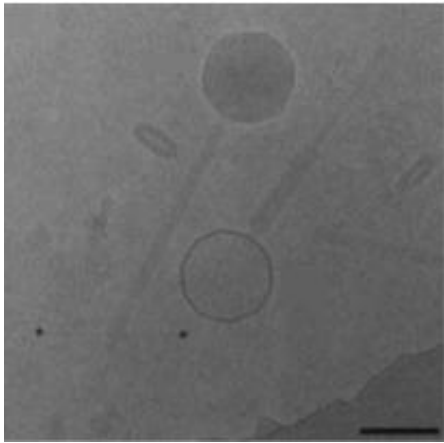
Ytimen rakenne puolestaan vaihtelee vain vähän. Ulompi ydin muodostuu yleisistä heksoosisokereista kuten glukoosista tai galaktoosista. Ulommassa osassa on yleensä rakenteellisesti enemmän vaihtelua kuin sisemmässä. Sisempi ydin rakentuu epätavallisemmista sokereista kuten heptoosista. [9, s. 838.]

3 Bakteriofagit

Bakteriofagit ovat viruksia, jotka kykenevät infektoimaan bakteereja. Niitä käytetään faagiterapiassa, faagien tyyppityksessä sekä muissa molekyylibiologisissa sovelluksissa. [6.] Faagien perimä voi olla yksi- tai kaksijuosteista DNA:ta lajista riippuen [10, s. 273].

Faagit ovat lajispesifisiä, ja suurin osa faageista kykenee häntäkarvansa avulla tarttumaan isäntäsoluun ja infektoimaan sen. Tarttuminen perustuu bakteerin pinnalla oleviin reseptoreihin, joita on luonnostaan bakteerin pinnalla. Reseptoreina voivat toimia proteiinit, hiilihydraatit, glykoproteiinit, lipidit, lipoproteiinit tai joidenkin näiden yhdistelmät. Faagi tarttuu häntäkarvallansa johonkin tiettyyn reseptoriin ja kykenee näin infektoimaan bakteerin. [10, s. 272.]

Häntäkarvat sijaitsevat faagin hännän uloimmassa päässä. Faagin häntä voi olla supistuva tai supistumaton. [11.] Kuvassa 2 on elektronimikroskooppikuva ϕ R1-37-faagista. Kuvassa on hyvin nähtävissä kyseisen faagin supistuva häntä. Kuvan vasemmalla puolella olevalla faagilla häntä on koko pituudessaan ja oikealla puolella supistuneena.

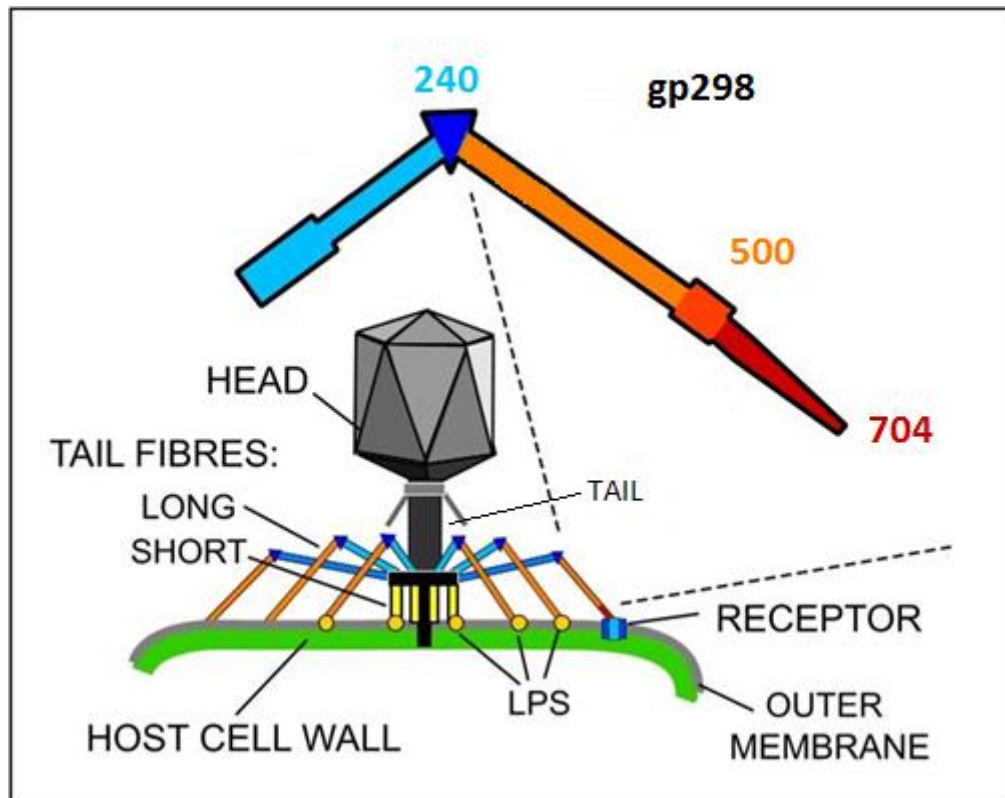


Kuva 2. Bakteriofagi ϕ R1-37 kuvattuna elektronimikroskoopilla [12, s. 12639].

Laboratoriossa bakteriofagien infektointikykyä eri bakteereilla voidaan tutkia titraamalla faageja yhdessä bakteerien kanssa pehmytagarmaljoilla. Maljalta voidaan määrittää faagien määrä laskemalla tyhjät kohdat eli plakit. Jos halutaan tarkempaa tietoa faagin infektointitavasta, voidaan tuottaa pelkkää häntäkarvan proteiinia. Infektio perustuu reseptorien interaktioon bakteerin pinnan LPS:n ja bakteriofagin häntäkarvaproteiinin välillä. Jos proteiini kykenee tarttumaan bakteeriin, myös aito faagi kykenee infektoimaan bakteerisolun. [10, s. 271, 272, 327.]

Faagi ϕ R1-37

Bakteriofagi ϕ R1-37 on *Yersinia enterocolitica* spesifinen faagi, jolla on lyyttinen sykli. Se on kooltaan varsin suuri ja kuuluu *Caudovirales*-lahkon *Myovirales*-heimoon. Faagin genomi on kooltaan 270 kb, ja se on kaksijuosteista DNA:ta. Häntäkarvan geeni on *g298*, ja se koodittaa kokonaisuudessaan 704 aminohappoa. Kuvassa 3 on esitetty ϕ R1-37-bakteriofagin kaavamainen rakenne. Kuvassa oleva häntäkarva on kuvattu sillä oletuksella, että koko häntäkarva koostuisi yhdestä proteiinista. On myös mahdollista, että häntäkarva koostuu useammasta proteiinista, koska yksittäisen häntäkarvan pituus on ainakin 86 nm. [13, s. 4096; 14.]



Kuva 3. Bakteriofagi T4:n rakenne, josta on muokattu kuva ϕ R1-37 [15]. Häntäkarvaproteiini gp298:n muodostuu kokonaisuudessaan 704 aminohaposta.

Infektointiin faagi käyttää *Y. enterocolitica* reseptorina LPS:n ulompaa ydinsokeria ja *Yersinia similiksellä* O-antigeenia. YeO3-c-OCR-kantaa faagi ei voi infektoida, koska siitä puuttuu ulompi ydinsokeri. [3, s. 1.]

4 Fuusioproteiinit

Fuusioproteiinit ovat laboratoriossa tuotettuja proteiineja, joita on muokattu niin, että ne sisältävät geenin osia kahdesta tai useammasta eri proteiinista. Geenin osia koodittavat DNA-fragmentit liitetään yhteen, jolloin tuloksena on vain yksi avoin lukukehys. Koodattavan DNA:n muokkaamisessa käytetään restriktioentsyymejä ja tätä varten on proteiinia koodittavan geenin sekvenssi tunnettava. [10, s. 458–459.]

Fuusioproteiineja voidaan käyttää helpottamaan proteiinipuhdistusta liittämällä siihen jokin tunniste esimerkiksi yleisesti käytetty histidiinihäntä. Tällöin fuusioproteiini voidaan puhdistaa metallipylvään avulla, johon proteiini kiinnittyy histidiinihäntänsä avulla. Itse

proteiini voidaan tämän jälkeen helposti eluoida imidatsolilla, joka on histidiinin sivuketju. Joissakin tapauksissa voidaan myös käyttää kemiallista käsittelyä proteiinitunnisteen irrottamiseen. [10, s. 458–459; 2, s. 208.]

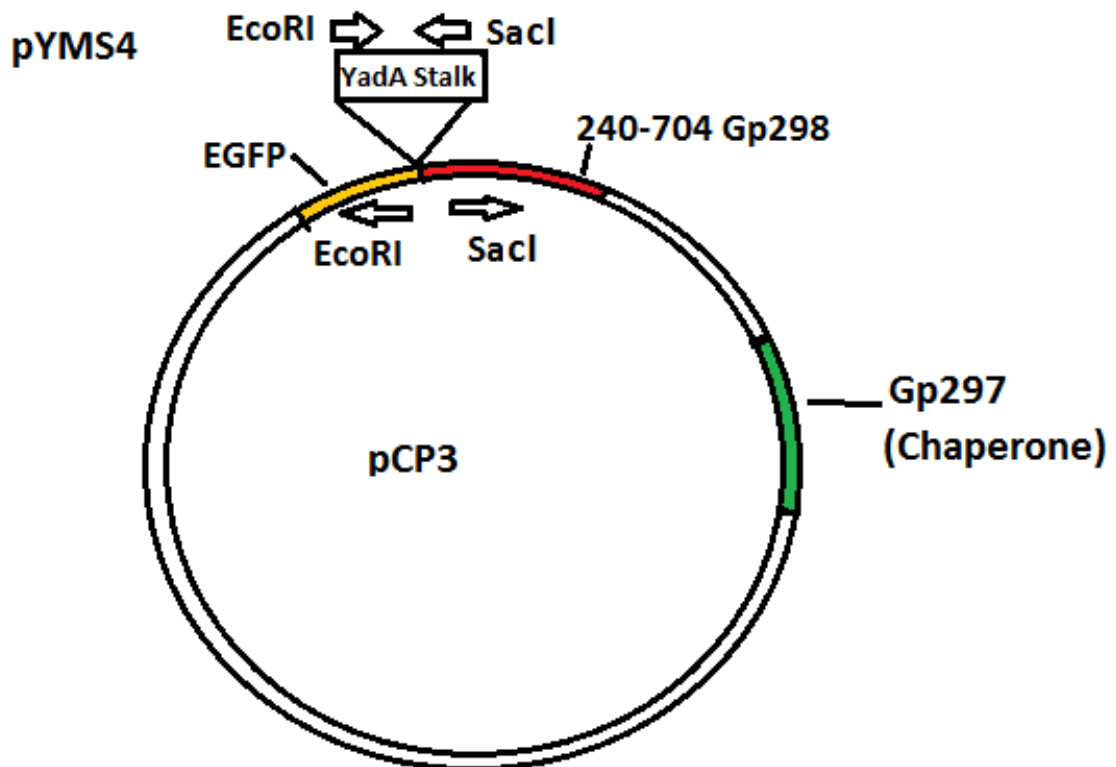
Fuusioproteiineja voidaan käyttää myös proteiinintuotossa. Jos proteiiniin liitetään bakteerin signaalisekvenssi, voi proteiini erittyä solukalvon läpi. Tällöin bakteerit voivat tuottaa myös eläinproteiineja tai proteiinia voidaan tuottaa eri lajin isäntäbakteerissa. Usein varsinkin pienten proteiinien tuotto saattaa olla sellaisenaan hyvin heikkoa. Tämä johtuu varsin usein vieraan proteiinin hajoamisesta. Liittämällä proteiini osaksi isäntäsolun proteiinia voidaan vieras proteiini stabiloida. Näin ollen saantoa voidaan parantaa huomattavasti, koska isäntäsolusta peräisin oleva osa fuusioproteiinia suojelee koko proteiinia hajottavilta proteaaseilta. [16, s 205.]

Käytännössä fuusioproteiineja tehdään muokkaamalla plasmideja, joita käytetään ekspressiovektoreina. Tämä tehdään pilkkomalla plasmidi ja siihen liitettävä geeni sopivilla restriktioentsyymeillä ja liittämällä ne ligaatiolla yhteen. Geenejä voidaan liittää yhteen myös useampia kuin kaksi, jos pilkkomiseen käytetään eri restriktioentsyymejä. On tärkeää varmistaa, että uusi geeni liitetään sellaiseen kohtaan vektoria, että proteiinisynteesi ei häiriinny lukukehyksen muuttumisen takia. [10, s 458 - 459; 2, s 206.]

Valmiiden proteiinien toimintaa voi olla tarve seurata ja tällöin niihin voidaan muokausvaiheessa liittää GFP-proteiini. GFP eli Green Fluorescent Protein on eristetty meduusasta, ja se emittoi vihreää valoa altistuessaan UV-valolle. Koska se liittyy osaksi tuotettavaa proteiinia, sitä voidaan käyttää reportterina kohdeproteiinin ekspressoitumisen seuraamisessa. GFP on stabiili eikä häiritse normaalia solutoimintaa. Fluoresenssi on soluille myös myrkytöntä ja mahdollistaa näin solutoimintojen reaaliaikaisen seurannan fluoresenssimikroskopian avulla. [10, s. 327; 4, s 341.] Modifioitu eGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) on tehty muokkaamalla luonnollisen GFP:n kromoforeja. Sen lähettämä fluoresenssi on 35 kertaa voimakkaampaa kuin luonnollisen GFP ja lisää näin reportteriproteiinin sensitiivisyyttä. Sitä voidaan käyttää samoin kuin normaalia GFP-proteiinia. [17.]

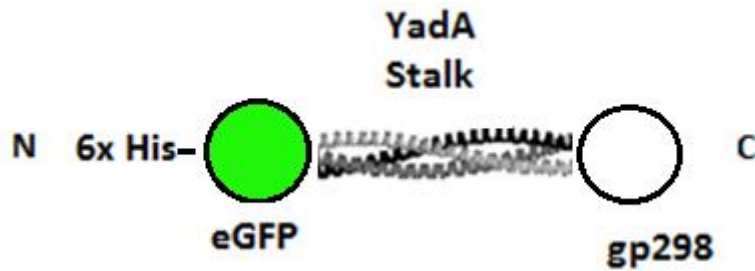
pCP-3-plasmidi

Käytännössä fuusioproteiineja voidaan tutkia esimerkiksi muokkaamalla pCP-3-plasmidia (kuva 4), johon on lisätty eGFP ja histidiinihäntä N-terminaaliseen päähän. Häntäkarvaproteiinia koodaava geeni on *g298*, joka koodaa 704:ää aminohappoa. pCP-3:ssa geenistä oli poistettu 240 ensimmäistä aminohappoa koodaava fragmentti, koska sen arveltiin helpottavan proteiiniekspressiota. Lisäksi ekspressiovektori sisälsi laskostumisessa avustavan chaperonia koodaavan geenin (*g297*). Tästä ekspressiovektorista oli aiemmin tehty jo yksi versio mutta proteiinia ei saatu tuottumaan. Lisäämällä vektoriin pätkä YadA-geenin varsiosasta eGFP:n ja häntäkarvaproteiinin väliin toivottiin tuoton paranevan. eGFP:n ansiosta lopullisen proteiinin sitoutumista bakteereihin on mahdollista seurata.



Kuva 4. Muokkaussuunnitelma, jossa pCP-3-plasmidi lähtökohtana.

Proteiinin huonon tuoton syyksi epäiltiin proteiinin trimeerisen rakenteen toimimattomuutta ja YadA-varren lisäämisen toivottiin korjaavan tämän. Kuvassa 5 on esitetty tarkemmin valmiin fuusioproteiinin rakennetta.



Kuva 5. Havainnollistava kuva valmiista fuusioproteiinista. eGFP ja His-tag sijaitsevat N-terminuksessa.

5 Työn suoritus

Projektissa käytettiin eri *Yersinia*- ja *E. coli*-kantoja. Käytetyt kannat on lueteltu taulukossa 1.

Taulukko 1. Eri työvaiheissa käytetyt bakteerikannat. Kantakokoelma on Helsingin yliopiston Bakteriologian ja immunologian osaston oma kokoelma.

Kantakokelman numero	Kannan nimi	Kanta	Serotyyppi
1430	YeO3-R1	<i>Y.enterocolitica</i>	O:3
2684	YeO3-C-OCR	<i>Y.enterocolitica</i>	O:3
6152	DH5alfa	<i>E.coli</i>	K12
2689	DH10B	<i>E.coli</i>	K12
6565	BL21 star	<i>E.coli</i>	B

Taulukossa 2 on lueteltu kaikki työssä käytetyt plasmidit sekä muokkaukseen käytetyt alukkeet.

Taulukko 2. Käytetyt plasmidit ja alukkeet. R on reverse ja F forward aluke. Alukkeen lihavoitu osa tarkoittaa restriktioentsyymiä ja DNA:han spesifisesti kiinnittyvä sekvenssi on merkitty isoilla kirjaimilla.

Plasmidi	Aluke	Kommentit
pCP-3	pCP-3F: g cg gagctc AATCTAGG TCTTGGAA CAGC	Restriktioentsyymi: <i>SacI</i>
	pCP-3R: g cg gaattc CTTG TACAGCTCGTCC ATGC	Restriktioentsyymi: <i>EcoRI</i>
pYMS4	Yada-1362F: g cg gaattc GGG ATCGCAAATAACTATA CTG	Restriktioentsyymi: <i>EcoRI</i>
	Yada-1751R: g cg gagctc AAG TTTATCTA ACCG TTGTC	Restriktioentsyymi: <i>SacI</i>
pAA1	-	-
pUC19	-	-

5.1 Elektrokompenttien solujen valmistus ja elektroporaatio

50 ml:aan S.O.B-mediaa (liite 1) laitettiin kasvamaan yksittäinen pesäke *Escherichia coli* DH5 α -kantaa ja kasvatettiin yön yli 200 rpm ravistuksessa +37°C:ssa. Seuraavana päivänä kasvatusta pipetoitiin 20 ml 500 ml:aan uutta S.O.B-mediaa, joka oli valmiiksi lämmitetty +37°C:seen. Soluja kasvatettiin 220 rpm ravistuksessa +37 °C:ssa kunnes absorbanssi aallonpituudella 600 nm oli 0,6–0,8. Solut siirrettiin jäälle ja kerättiin sentrifugoimalla (Thermo Scientific, SL 16R centrifuge) 10 minuuttia, +4 °C:ssa, 2300 g:n voimalla. Soluja pestiin suspensoimalla ne 500 ml:aan jääkylmää 10-prosenttista glyserolia ja sentrifugoimalla 15 minuuttia, +4 °C:ssa, 1900 g:n voimalla. Neste kaadettiin varovasti pois. Pesu toistettiin yhteensä kaksi kertaa. Jäljelle jäänyt sakka liuotettiin 1 ml:aan jääkylmää 10-prosenttista glyserolia ja jaettiin jäällä 100 μ l:n eriin 1,5 ml:n eppendorf-putkiin. Solut jäädytettiin nestetyppellä ja säilöttiin -75 °C:seen.

Elektroporaatiota varten tarvittava määrä edellä kuvatulla tavalla valmistettuja kompetentteja soluja sulatettiin jäällä. Työssä käytettiin kyvettejä 0,2 cm:n raolla. Kyvetit jäädytettiin jäällä, jonka jälkeen niihin pipetoitiin 40 μ l soluja sekä 10 ng plasmidia. Kyvetit siirrettiin Bioradin Genepulser II -elektroporaatiolaitteeseen ja solut elektroporoitiin (200 Ω , 25 μ F, 2,5 kV). Kyvetiin lisättiin 1 ml +37 °C:seen esilämmitettyä

S.O.C-mediaa (liite 1) ja siirrettiin 1,5 ml:n eppendorf-putkeen. Soluja inkuboitin +37 °C:ssa 45 minuuttia kevyessä ravistuksessa. Solut levitettiin LB-antibioottimaljoille, joissa oli streptomysiiniä 50 µg/ml. Näytteitä kasvatettiin yön yli +37 °C:ssa.

Elektrokompetenttien solujen puhtaus tarkistettiin viljelemällä maljalla 100 µl pelkkiä kompetentteja soluja. Tehokkuus tarkistettiin elektroporoimalla soluihin 1000 pg pUC19-plasmidia ja viljelemällä ne antibioottimaljalla. Tehokkuus laskettiin työhjeesta löytyvällä kaavalla 1 [18].

$$\frac{\text{PMY kontrollimaljalla}}{\text{pg pUC19, joka käytetty transformaatioissa}} \times \frac{1 \times 10^6}{\mu\text{g}} \times \text{laimennuskertoimet} \quad (1)$$

5.2 Plasmidieristys

Plasmidieristystä varten pCP-3-plasmidin sisältäviä BL21 ja DH10B *E.coli*-kannoista siirrostettiin kustakin pesäke 15 ml:aan streptomysiiniä 50 µg/ml sisältävään LB-mediaan. Niitä kasvatettiin ravistuksessa (150 rpm) yön yli +37 °C:ssa. Seuraavana päivänä koko bakteerikasvatus sentrifugoitiin pelletiksi +4 °C:ssa 4700 g:n voimalla. Tämän jälkeen jatkettiin kitin valmistajan ohjeen mukaan.

Plasmidieristykseen käytettiin Machery-Nagelin NucleoSpin Plasmid EasyPure -kittiä sekä Machery-Nagelin NucleoSpin plasmid -kittiä. Ohjeista poikettiin hieman, jotta bakteerit saataisiin paremmin hajotettua. Lyysausvaiheessa putkia ravistettiin kunnolla ja myös sentrifugointiaikoja pidennettiin. Pesuvaihe toistettiin runsaan bakteerimäärän takia. Myös pesuliuoksen poistamiseen ennen eluointia kiinnitettiin huomiota, koska pesuainejäämät vaikuttavat eluoitumiseen häiritsevästi.

Plasmidieristuksen tulos tarkistettiin Nanodrop ND1000 -spektrofotometrillä ja 1-prosenttisella agarosigeelillä (80 V, 1 h). Kokomarkkerina käytettiin ThermoScientificin GeneRuler 1kb DNA ladderia. Mitatun plasmidipitoisuuden perusteella päätettiin, paljonko näytettä ajetaan geelillä. Geelijossa käytettiin noin 200 ng:aa DNA:ta.

5.3 PCR

PCR tehtiin ensin pYMS4-plasmidille, jota oli valmiina pakastettuna. PCR:ään käytettiin templaattina 1 µl 10 ng/µl vahvuista plasmidia ja negatiiviseen kontrolliin 1 µl vettä. PCR-reaktio tehtiin valmistajan ohjeen mukaan [19]. Mastermix tehtiin 4,5-kertaisena, josta

pipetoitiin 49 µl PCR-putkeen yhteensä neljään reaktioon. Reaktioon käytettiin ThermoScientificin Phusion DNA-polymeraasia sekä YadA-1751R- ja YadA-1362F - alukkeita, joiden pitoisuus oli 10 µM. Taulukossa 3 on eritelty mastermixissä käytetyt reagenssit.

Taulukko 3. Mastermixissä käytetyt reagenssit.

Reagenssi	Määrä (µl)
Vesi	146,2
5 x HF puskuri	45
Forward aluke	11,25
Reverse aluke	11,25
10 µM DNTP	4,5
DNA polymeraasi 2 (U/µl)	2,25

PCR:n lämpötilaksi valittiin gradienttialue 58–68 °C. Näytepaikat valittiin taulukon 4 mukaisesti.

Taulukko 4. Gradienttialueeseen valitut lämpötilat näytteille ja negatiiviselle kontrollille.

Näytepaikat	Lämpötila (°C)	Näyte
A	68,0	
B	67,3	Näyte 1
C	66,0	
D	64,1	Näyte 2
E	61,8	
F	60,0	Näyte 3
G	58,7	
H	58,0	Neg. kontrolli

Käytetty PCR-ohjelma on esitetty taulukossa 5.

Taulukko 5. PCR-ajon parametrit. Vaiheita 2 - 4 toistettiin yhteensä 30 kertaa.

Vaihe	Lämpötila (°C)	Aika
1. Esidenaturaatio	98	30s
2. Denaturaatio	98	10 s
3. Annealing	Gradientti	30 s
4. Pidennys	72	15 s
5. Loppupidennys	72	10 min
6. Loppu	4	∞

Monistetut PCR-tuotteet puhdistettiin ja konsentroidiin tarkoitukseen sopivalla kitillä (Machery Nagel, Nucleospin Gel and PCR Clean up -kit).

pCP-3 plasmidin PCR-reaktio tehtiin samoilla ajoparametreillä kuin pYMS4:n (taulukko 5) paitsi pidennysvaiheen kesto muutettiin 2 minuuttiin isomman monistettavan geenipalan takia. Reaktiossa käytettiin pPCP-3:n monistamiseen sopivia alukkeita (taulukko 2). Lämpötilaa vaihdeltiin gradienttialojalla kuten pYMS4:n reaktiossa ja näytelämpötiloiksi valittiin 64,1 °C, 60,0 °C ja 58,0 °C. Negatiivinen kontrolli laitettiin 58,7 °C:n lämpötilaan. Reaktiossa käytettiin templaattina BL21 *E. coli* -kannasta eristettyä pCP-3-plasmidia 10 ng, ThermoScientificin Phusion DNA polymeraasia sekä 5 x GC-puskuria.

PCR-tuotteen oikeanlainen monistuminen tarkistettiin 1 prosenttisella agarosigeelillä (80V, 1h). Onnistuneen PCR:n jälkeen 64,1 °C:ssa ja 60,0 °C:ssa olleet tuotteet yhdistettiin yhteen eppendorf-putkeen ja lisättiin latausväriä (ThermoScientific 10x FastDigest green buffer). Kokonaistilavuudeksi tuli 100 µl. Näyte jaettiin kolmeen osaan ja ajettiin preparatiivisella geelillä (60 V, 2 h). Tämän jälkeen geeliltä leikattiin halutut palat talteen ja puhdistettiin ne samalla PCR-puhdistus-kitillä kuin pYMS4.

5.4 Digestio

Digestioon käytettiin Biolabsin *EcoRI*- (20 U/ml) ja *SacI* (20 U/ml) -restriktioentsyymejä pilkkomaan yllä kuvatut PCR-tuotteet. *SacI* oli vanhentunut, joten sitä käytettiin enemmän. Taulukossa 6 on esitetty reaktioseos. Molemmista plasmideista digestoititiin koko käytettävissä oleva määrä. pYMS4-plasmidin (insertti) pitoisuus oli 192,7 ng/µl ja pCP-3:n (vektori) 5,5 ng/µl.

Taulukko 6. Digestio.

Näyte	28 µl
Vesi	14 µl
10x CutSmart -puskuri	5 µl
20 U/ml <i>Eco</i> RI	1 µl
20 U/ml <i>Sac</i> I	2 µl
Kokonaistilavuus	50 µl

Digestion ajan näytteet olivat +37 °C:ssa 3 h. Vektorille tehtiin alkaalinen fosfataasikäsittely (Thermo Scientific FastAP, 1U/µl) vapaiden 5'-pään fosfaattien poistamiseksi, jotta vektori ei ligoituisi itsensä kanssa. FastAP-entsyymiä lisättiin suoraan digestioreaktioon 1 µl ja annettiin vaikuttaa 20 minuutin ajan +37°C:ssa. Inserttiin jätettiin vapaat 5'-pään fosfaatit, jotta ligaatio vektorin kanssa olisi mahdollinen. Lopuksi restriktioentsyymit poistettiin PCR puhdistus -kitillä (Machery Nagel, Nucleospin Gel and PCR Clean up -kit).

5.5 Ligaatio, elektroporaatio ja maljaus

Ligaatioreaktioita tehtiin kaksi. Insertin ja vektorin määrän laskemiseen käytettiin NEBioCalculator-laskinta [20]. Ligaatioon käytettyjen reagenssien, insertin ja vektorin määrät on esitetty taulukossa 7.

Taulukko 7. Ligaatioreaktioon käytetyt reagenssit ja näytteet.

	Ligaatio 1		Ligaatio 2	
	Näyte	Neg.kontrolli	Näyte	Neg.kontrolli
pCP-3:sta saatu PCR-fragmentti	6,75 µl	6,75 µl	2,5 µl	2,5 µl
pYMS4:stä saatu PCR-fragmentti	1 µl	-	2 µl	-
Vesi	5,25 µl	6,25 µl	8,5 µl	10,5 µl
10x ligaatiopuskuri	1,5 µl	1,5 µl	1,5 µl	1,5 µl
T4 ligaasi (400 000 U/ml)	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl
Kok. tilavuus	15 µl	15 µl	15 µl	15 µl

Ensimmäiseen reaktioon olisi inserttiä laskurin mukaan pitänyt laittaa 8,5 ng, jotta saavutettaisiin 3-kertainen molaarinen ylimäärä vektoriin nähden. Käytännössä inserttiä

käytettiin 9,6 ng. Vektoria olisi ollut hyvä olla vähintään 50 ng mutta vähäisen käytettävissä olevan määrän takia laitettiin vektoria 37 ng. Reaktiossa käytettiin T4-ligaasia (Biolabs T4 DNA Ligase) sekä 10x puskuria. Toiseen reaktioon käytettiin vektoria 89,8 ng ja 20 ng inserttiä. Reaktioiden kokonaistilavuus oli 15 µl. Negatiivinen kontrolli valmistettiin samoin kuin näytteet mutta insertti korvattiin vedellä. Näytteitä inkuboitiin yön yli +16 °C:ssa, jonka jälkeen ligaasientsyymi inaktivoitiin +65 °C:ssa 20 min.

Ligaationäytteet elektroporoitiin aiemmin valmistettuihin elektrokompetentteihin DH5α-soluihin. Näytettä käytettiin 2 µl/ 40 µl soluja. Muuten elektroporaatio ja viljely tehtiin kohdassa 5.1 kuvatulla tavalla. Maljoille viljeltiin 10 µl, 100 µl sekä loput, jossa jäljelle jäänyt näyte sentrifugoitiin pelletiksi ja ylimääräinen neste pipetoitiin pois. Pelletti suspensoitiin nesteeseen ja levitettiin maljalle.

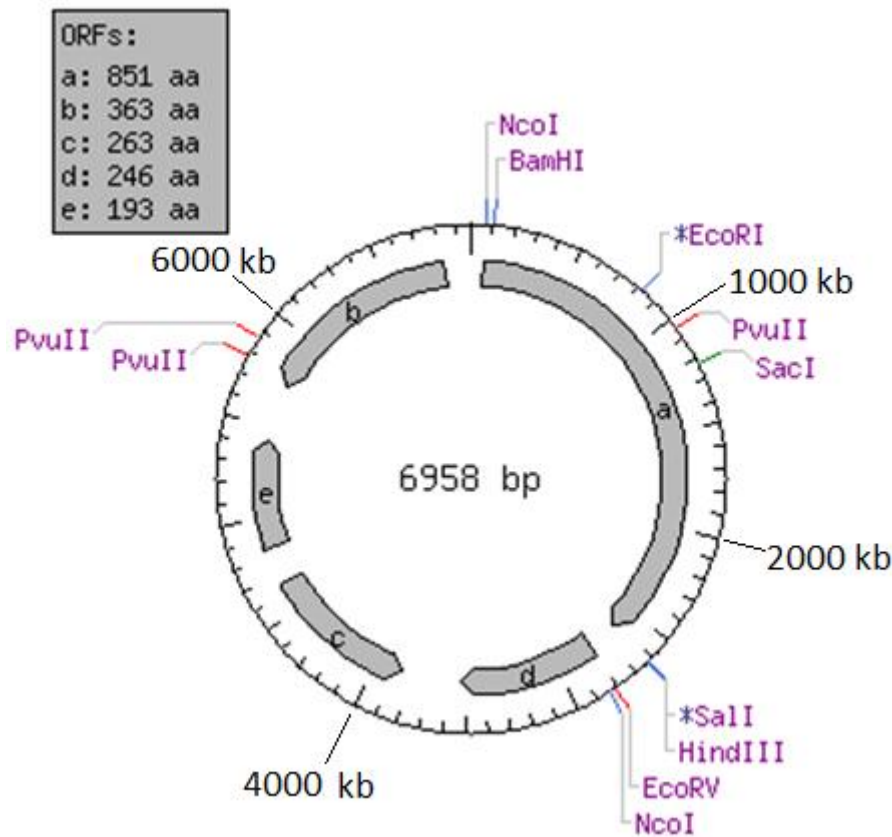
Molemmista ligaatioista jäljelle jäänyt osa saostettiin lisäämällä ligaatioseokseen vettä niin, että kokonaistilavuudeksi tuli 20 µl. Kumpaankin putkeen lisätiin 3 mol/l vahvuista natriumasetaattia, jonka pH oli 5,2. Putkiin pipetoitiin 2,5 vol etanolia ja näytteitä inkuboitiin -20 °C:ssa yön yli. Inkuboinnin olisi vaihtoehtoisesti voinut tehdä myös -70 °C:ssa 2 tunnin ajan. Näytteet sentrifugoitiin (30 min, +4 °C, 16000 g), supernatantti poistettiin ja putket siirrettiin jäälle. Putkiin lisätiin 200 µl 70-prosenttista kylmää etanolia. Näytteet sentrifugoitiin (10 min, 4 °C 16000 g), supernatantti poistettiin ja pelletin annettiin kuivua noin 10–15 minuuttia. Kuiva pelletti liuotettiin 4 µl:aan vettä ja koko määrä elektroporoitiin 40 µl:aan DH5α-soluja. Solut maljattiin kuten muutkin ligaationäytteet.

Elektroporaatiomaljoilta tehtiin puhdasviljelmät LB-maljoille, joissa oli streptomysiiniä 50 µg/ml ja kasvatettiin yön yli +37 °C:ssa. Puhdasviljelmiltä siirrostettiin yksi pesäke 5 ml:aan LB-mediaa, jossa oli streptomysiiniä 50 µg/ml. Niitä kasvatettiin yön yli ravistuksessa (150 rpm) +37 °C:ssa. Kasvatuksista eristettiin plasmidit kohdassa 5.2 kuvatulla tavalla.

5.6 Tuotteen tarkistus

Tuotteen oikeanlaisen rakenteen varmistamiseksi, edellisessä kohdassa eristetyt plasmidit ajettiin 1-prosenttisellä agarosigeelillä (80V, 1h). Lisäksi plasmidista tehtiin 10 µl:n koedigestioita, joissa oli 300 ng DNA:ta. Myös nämä ajettiin geelillä.

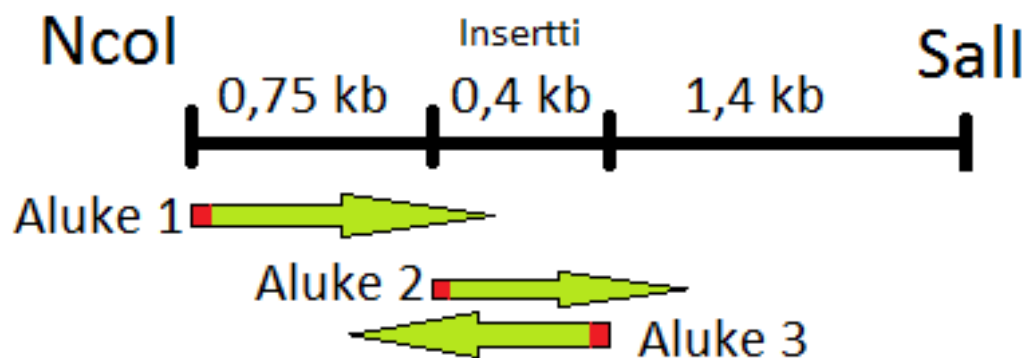
Sekvenssitietojen avulla muodostettiin tietokoneella malli fuusioproteiinia koodittavasta plasmidista (kuva 6). Kuvassa on esimerkkejä kyseisen plasmidin leikkaamiseen soveltuvista restriktioentsyymeistä, joita käytettiin digestioissa.



Kuva 6. Valmis plasmidi ja restriktioentsyymiesimerkkejä sen leikkaamiseen. ORF tarkoittaa avointa lukukehystä, joista a on tässä projektissa muokattu plasmidiosa, b on lac operoni, c streptomysiiniresistenttisuuden antava osa, d on chaperoni ja e CloDF13 eli replikaation aituskohta. [21.]

Kolmesta valitusta pesäkkeestä eristettiin plasmidi, joka leikattiin eri entsyymeillä ja tarkistettiin, että tuote oli oikea. Tuotteen tarkistukseen käytettiin yhdistelmiä *EcoRI* + *EcoRV*, *EcoRI* + *SacI*, *BamHI* + *Sall* sekä yksittäisiä restriktioentsyymejä *PvuII* ja *HindIII*. Digestioreaktioiden kesto oli kolmesta tunnista yön yli. Reaktiotuotteet ajettiin lopuksi 1-prosenttisellä agroosigeelillä (80V, 40 min).

Lopuksi valmis plasmidi lähetettiin sekvensoitavaksi FIMM:lle. Sekvensointiin käytettiin 300 ng kolmesta pesäkkeestä eristettyä plasmidia. Alukkeiksi valittiin *NcoI*:n leikkauskohdasta ja insertin alusta forward-alukkeet sekä insertin lopusta alkava reverse-alue. Näin saatiin katettua koko insertti liitoskohtineen. Kuvassa 7 on havainnollistettu valittuja alukkeita.



Kuva 7. Sekvensointiin valitut alukkeet on merkitty nuoliin punaisella. Nuolen vihreä osa kuvaa arvioitua sekvensoidun fragmentin pituutta.

5.7 Proteiiniekspressio ja lyysaus

Valmis proteiini tuotettiin *E. coli* BL21 star -bakteerikannan soluissa, koska tämä kanta sopii hyvin proteiiniekspressioon [22]. Työssä käytettiin toisen opiskelijan valmistamia kompetentteja soluja.

Kemiallisesti kompetentit *E. coli* solut sulatettiin jäällä. Transformaatiossa valmiiksi muokattua plasmidia sekoitettiin 100 ng 50 µl:aan soluja. Solujen annettiin olla jäällä 30 min, minkä jälkeen niille annettiin 30 s kestävä lämpöshokki (42 °C). Solut siirrettiin takaisin jäälle 5 minuutiksi. Putkiin lisättiin 950 µl huoneenlämpöistä S.O.C-liuosta. Solut siirrettiin +37 °C:seen 60 minuutiksi 160 rpm:n ravistukseen. Näytteistä tehtiin laimennokset 1:10 ja 1:100 ja maljattiin kumpaakin laimennosta sekä laimentamatonta näytettä 50 µl LB-maljalle, joka sisälsi streptomysiiniä 50 µg/ml. Maljoja inkuboitii 37 °C:ssa yön yli.

1:100-laimennetulta maljalta siirrostettiin puhdasviljelmät uusille maljoille. Samoista pesäkkeistä laitettiin 5 ml:aan 50 µg/ml streptomysiiniä sisältävään steriiliin 2x YT-liemeen (liite 1) kaksi pesäkettä kultakin maljalta proteiinituottoa varten. Näitä kasvatettiin yön yli 200 rpm:n ravistuksessa.

Koko kasvatus siirrettiin 50 ml:aan streptomysiiniä (50 µg/ml) sisältävään LB-liemeen. Kasvatusta jatkettiin, kunnes absorbanssi aallonpituudella 600 nm oli 0,6 - 0,8. Tästä

otettiin 1 ml:n näyte SDS-PAGE:a varten. Kasvatukseen lisättiin IPTG:tä (isopropyl-d-1-thiogalactopyranoside) niin, että loppupitoisuudeksi tuli 1 mmol/l. Kasvatusta jatkettiin yön yli +30 °C:ssa ja tästä otettiin myös 1 ml:n näyte. Tämän jälkeen solut siirrettiin +4 °C:seen yön yli, jotta proteiinit laskostuisivat paremmin. Kasvatuksesta otettiin vielä näyte ennen solujen keräämistä sentrifugoimalla (2300 g, 10 min), jonka jälkeen supernatantti poistettiin ja pelletti säilöttiin -20 °C:seen.

Kerätyt 1 ml:n näytteet valmistettiin suspensoimalla pelletti 200 µl:aan 1 x SDS-PAGE-puskuria (50 mM Tris-HCl, pH 6,8, 2 % SDS (w/v), 0,1 bromifenolinsininen (w/v), 10 % glyseroli (v/v), 100 mM DTT). Näytteitä keitettiin 5 min ja ajettiin Bioradin mini-Protean -laitteistolla SDS-PAGE-geelillä (10 % erotusgeeli, 5 % konsentroitigeeli).

Bakteeripelletti siirrettiin -20 °C:sta jäille ja suspensoitiin 10 ml:aan pesupuskuria (50 mM Na-P, 300 mM NaCl, 20 mM imidatsoli, pH 8), jossa oli lysotsyymiä (Sigma lysozyme) 0,5 mg/ml ja proteaasi-inhibiittoria (Thermo Scientific Mini Tablet -tabletti liuotettuna suoraan pesupuskuriin). Näytteiden annettiin olla jäillä 30 min.

Bakteerit hajotettiin sonikoimalla jäävesihauteessa (Branson sonifier 450, pulssisuhde 30 %, ulostulon säätö 2) 10 x 30 s pitäen välissä 30 sekunnin tauot. Soluriekaleet sentrifugoitiin (Beckman Coulter™, 10000 g, 30 min, +4°C) ja kirkas supernatantti otettiin talteen. SDS-PAGE:a varten otettiin 1 ml:n näyte sonikoinnin ja sentrifugoinnin jälkeen.

5.8 Proteiinipuhdistus

Proteiinit puhdistettiin agarosihelmillä (Qiagen Ni-NTA Agarose resin). 2 ml:aa valmiissa puskurissa olevia agarosihelmiä pestiin ensin sentrifugoimalla (1000 g, 10 s) resiiniä, poistamalla puskurin ja pesemällä helmiä 2 kertaa 10 ml:lla pesupuskuria (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM imidatsoli, pH 8). Edellisessä vaiheessa saadut kirkkaat supernatantit yhdistettiin ja laitettiin pestyjen helmien joukkoon. Näyteputkea pyörätettiin 1 tunti +4°C:ssa 15 ml:an Falcon-putkessa, jotta proteiinit sitoutuisivat nikkeliin histidiinihäntänsä avulla. Tämän jälkeen otettiin SDS-PAGE:a varten 1 ml:n näyte, jonka pitäisi sisältää histidiinihäntään sitoutumattomat proteiinit.

Helmi-supernatantti-seosta pestiin 3 kertaa 10 ml:lla pesupuskuria ja sentrifugoitiin välissä (1000 g, 10 s). Pesuliuokset otettiin talteen varmuuden vuoksi. Lopuksi proteiinit eluutiin 5 x 1 ml:lla eluutiopuskuria (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 250 mM imidatsoli).

Helmien joukkoon pipetoitiin loppu eluutiopuskuri ja niiden annettiin olla +4 °C:ssa yön yli. Puskuri poistettiin ja helmet pestiin 0,5 M NaOH:lla 30 min +4 °C:ssa. Helmet säilöttiin 30-prosenttiseen etanoliin ja uudelleenkäyttöä varten.

Kerätyistä näytteistä ja fraktoista otettiin 50 µl ja lisättiin siihen 50 µl 2 x näytepuskuria (100 mM Tris-HCl, pH 6,8, 4 % SDS (w/v), 0,2 bromifenolinsininen (w/v), 20 % glyseroli (v/v), 200 mM DTT). DTT lisättiin puskuuriin juuri ennen käyttöä. Näytteitä keitettiin 5 min ja ajettiin SDS-PAGE-geelillä (10 % erotusgeeli, 5 % konsentroitigeeli) Bioradin mini-Protean -laitteistolla.

5.9 Proteiinin konsentroidi ja puskurinvaihto

Proteiinien konsentroidiin käytettiin Vivaspin-kolonnia (Sartorius, Vivaspin TURBO 4, molecular cutoff 1 kDa). Kolonnia pestiin pesupuskurilla (50 mM Na-P, 300 mM NaCl, pH 8), joka ei sisältänyt imidatsolia ja sentrifugoitiin (10 min, 2500 g, +4 °C) kunnes kaikki puskuuri oli tullut läpi. Proteiininäyte pipetoitiin koloniin tarvittaessa useassa erässä ja sentrifugoitiin kuten edellä, kunnes näytettä oli jäljellä noin 500 µl. Proteiininäytettä pestiin kolme kertaa pesupuskurilla niin, että jäljelle jäi noin 500 µl. Tämä säilöttiin +4 °C:seen.

Konsentroidusta proteiininäytteestä määritettiin proteiinipitoisuus Piercen BCA™ Protein Assay -kitillä ohjeen mukaan. Proteiinista tehtiin kolme rinnakkaismäärittystä laimennettuna 1:10 sekä kaksi laimentamatonta näytettä. Näytteiden proteiinipitoisuus mitattiin Hidex Sense -mikroitiiterilevynlukijalla.

Läpitulleistä pesunesteistä otettiin 50 µl:n näytteet, lisättiin 2 x näytepuskuria ja analysoitiin SDS-PAGE-geelillä kuten kohdassa 5.7

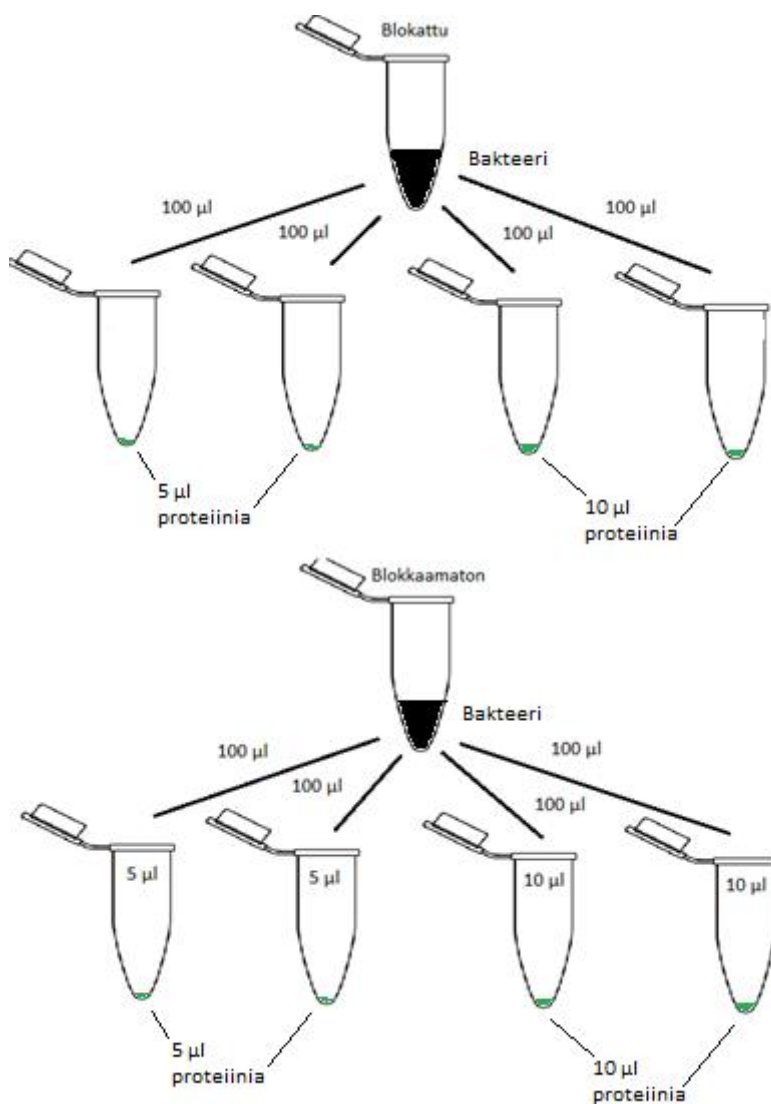
5.10 Sitoutumiskokeet

Proteiinin sitoutumista eri bakteerikantoihin tutkittiin kasvattamalla haluttua *Yersinia*-kantaa yön yli 5 ml:ssa LB-mediaa +22 °C:ssa. Tutkimus aloitettiin YeO3-R1 *Yersinia* -kannasta, koska proteiinin pitäisi sitoutua siihen. Lisäksi tutkittiin *Yersinia* YeO3-c-OCR -kantaa, jota käytettiin negatiivisena kontrollina. Epäspesifisen sitoutumisen eliminoimiseksi kokeesta oli myös versio, jossa bakteerin pinnan reseptorit oli estetty.

Tähän käytettiin rasvatonta maitojauhetta ja MaxiBlockia (MaxBlock™ blocking media, Active motif).

Haluttua *Yersinia*-kantaa kasvatettiin yön yli 5 ml:ssa LB-mediaa +22 °C:ssa. Bakteerikasvatuksista mitattiin absorbanssi 600 nm:ssä ja laimennettiin näytteet LB-medialla siten, että absorbanssi oli 0,5. Molempia näytteitä tehtiin 2 x 1 ml. Näytteet pestiin 2 x 1 ml PBS-puskuria (Phosphate Buffered Saline). Toinen näyteputki suspensoitiin 1 ml:aan PBS-puskuria ja toinen MaxiBlockiin, joka on laimennettu 1:1 PBS-puskurilla. Tässä voi käyttää myös 5-prosenttista PBS-puskuriin liuotettua maitojauhetta. Näytteitä inkuboitiin huoneenlämmössä 30 min kevyessä ravistuksessa.

Näytteitä pestiin 2 x 1 ml PBS-puskurilla ja suspensoitiin 1 ml:aan PBS-puskuria. Näytteet jaettiin 8 x 100 µl:n eriin, joista tehtiin kaksi rinnakkaista näytettä blokatusta ja blokkaamattomasta näytteestä, joihin lisättiin 5 µl (1280 ng) ja 10 µl (2560 ng) proteiinia (kuva 8). Kummastakin bakteerikannasta (YeO3-R1 ja YeO3-c-OCR) tehtiin samanlaiset näytteet. Negatiivisena kontrollina oli pelkkä bakteeri ja positiivisena kontrollina pelkkä proteiini. Näytteitä inkuboitiin kevyessä ravistuksessa 60 min. Näytteet pestiin vielä 3 x kertaa PBS-puskurilla sitoutumattomien proteiinien poistamiseksi. 50 µl näytettä mitattiin Hidex Sense -mikrotiitterilevynlukijalla. Eksitaatio tehtiin aallonpituudella 485±10 nm ja emissio mitattiin aallonpituudella 535±20 nm. Kustakin näyteputkesta tehtiin kaksi rinnakkaismääritystä. Taustan vähentämiseksi myös pelkkä PBS mitattiin levyltä.



Kuva 8. Näytteiden valmistus.

Bakteereja ja proteiineja tarkasteltiin myös fluoresenssimikroskoopilla. Näytteet valmisteltiin samoin kuin edellä. Kutakin näytettä pipetoitiin 2 µl mikroskooppilasille ja annettiin kuivua. Näytteet kiinnitettiin pipetoimalla näytteen päälle 4 µl jääkylmää asetonia. Lopuksi näytteiden päälle tiputettiin pisara peitinainetta (Thermo Scientific immu-mount) ja laitettiin peitinlasi päälle. Näytteitä säilytettiin valolta suojattuna +4 °C:ssa. Mikroskooppilevyjä tarkasteltiin fluoresenssimikroskoopilla (EVOS FL) 400-kertaisella suurennoksella.

6 Tulokset

6.1 Kloonaus

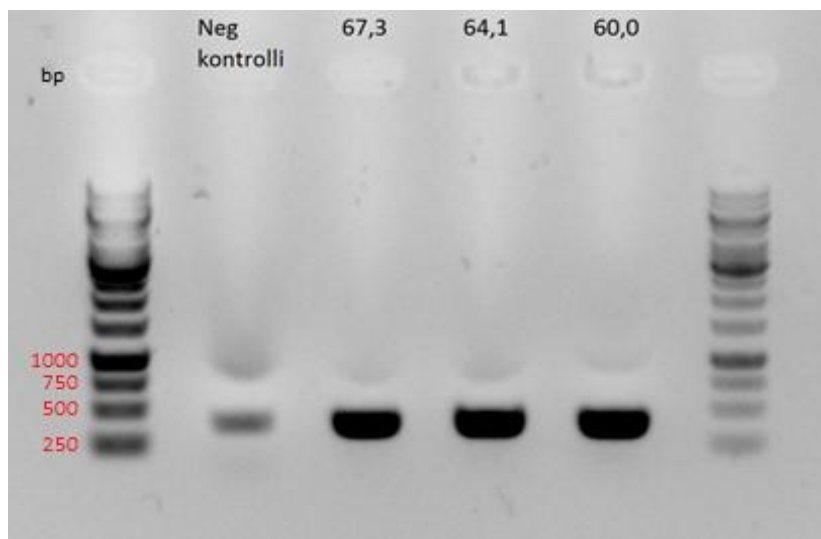
Elektrokompetenttien DH5 α -solujen puhtauden tarkistuksessa tulokseksi saatiin $1,76 \times 10^{10}$ pmy/ μ g DNA:ta.

Taulukossa 8 on esitetty pCP-3-plasmidin eristyksestä saadut pitoisuudet.

Taulukko 8. pCP-3:n plasmidieristysten tulokset. pCP-2-plasmideja ei käytetty enää työn myöhemmissä vaiheissa.

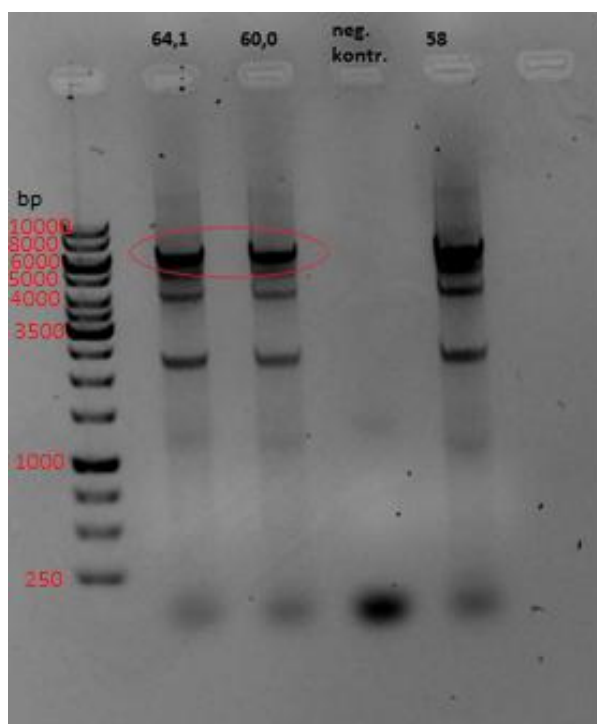
Näyte	c (ng/ μ l)	A260/A280	Geelille
1: BL21 star/ pCP-3	219,0	1,9	1 μ l
3: BL21 star/ pCP-2	244,4	1,9	1 μ l
5: DH10B/ pCP-3	116,2	1,9	2 μ l
7: DH10B/ pCP-3	97,0	2,0	2 μ l

Kuvassa 9 on esitetty pYMS4-plasmidin PCR-ajon tulokset. Haluttu geenipätkä oli hyvin monistunut ja näkyi geelillä 0,4 kb:n kohdalla kuten pitikin. Myös negatiivisessa kontrollissa näkyi heikompi bändi, vaikka ei olisi pitänyt mutta bändi oli paljon heikompi kuin varsinaisissa näytteissä. Negatiiviseen kontrolliin oli todennäköisesti päätynyt myös templaattia mukaan.



Kuva 9. YadA-fragmentin PCR-tuotteiden ajo agarosigeelillä. Näytteet on merkitty käytettyjen Ta-lämpöilojen mukaan. Monistetut fragmentit näkyvät alhaalla paksuna mustana vyöhykkeenä 400 bp:n kohdalla.

Kuvassa 10 on onnistunut pCP3-plasmidin PCR-ajo agarosigeelillä. Reaktiossa käytettiin GC-puskuria, Phusion polymeraasia ja pCP3-plasmidia templaattina. Kuvaan merkitty punainen vyöhyke eristettiin tämän jälkeen preparatiivisella agarosigeelillä.



Kuva 10. Onnistunut PCR-ajo. Näytteet on nimetty lämpötilojen mukaan. Punaisella on ympäröity haluttu bändi.

6.2 Ligaatio

Ligaatiota tehtiin kokonaisuudessaan kolme, joissa ligaatioseosta elektroporoitiin DH5 α -soluihin. Taulukossa 9 on koottuna ligaatiomaljausten tulokset. Ilman saostusta tehdyillä ligaatiomaljoilla kasvua näkyi laimentamattomilla maljoilla. Myös kontrollimaljalla oli samanlaisia pesäkkeitä. Ligaatioita, joissa käytettiin saostettua ligaatioseosta, tehtiin kaksi. Näistä toisesta ligaatiosta saatiin jatkoa varten neljä lupaavalta vaikuttavaa pesäkettä (isot pesäkkeet). Näistä tehdyistä puhdasviljelmistä vain kolme kasvoi. Kontrollimaljoilla ei näkynyt kasvua.

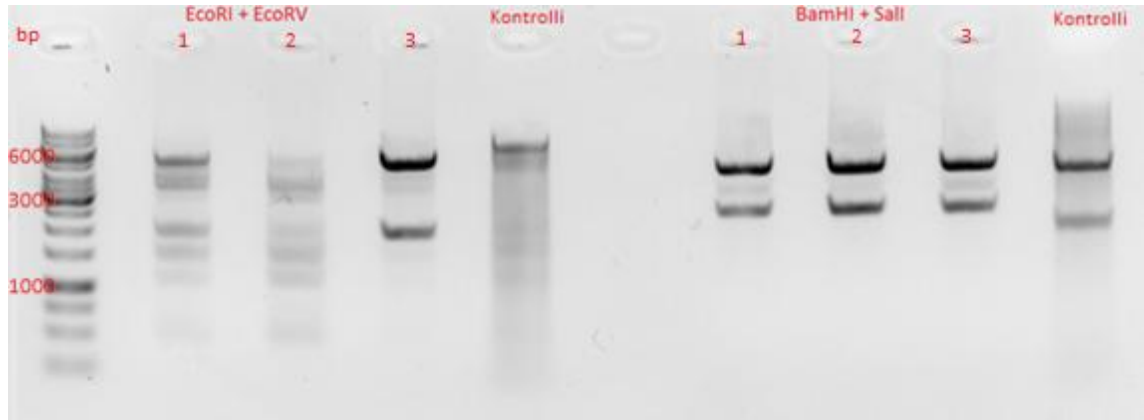
Taulukko 9. Ligaatiomaljojen pesäkemäärät.

Malja	Määrä	Pesäke lkm
Ligaatio ilman saostusta	10 μ l	0
	100 μ l	0
	Loput	Pieniä pesäkkeitä
Ligaatio ilman saostusta, kontrolli	10 μ l	0
	100 μ l	0
	Loput	Pieniä pesäkkeitä
Saostettu ligaatio 1	10 μ l	0
	100 μ l	1 pieni pesäke
	Loput	Muutama pieni pesäke
Saostettu ligaatio 1, kontrolli	10 μ l	0
	100 μ l	0
	Loput	0
Saostettu ligaatio 2	10 μ l	1 pieni pesäke
	100 μ l	0
	Loput	4 isoa ja muutama pieni
Saostettu ligaatio 2, kontrolli	10 μ l	0
	100 μ l	0
	Loput	0

6.3 Koedigestiot ja sekvensointi

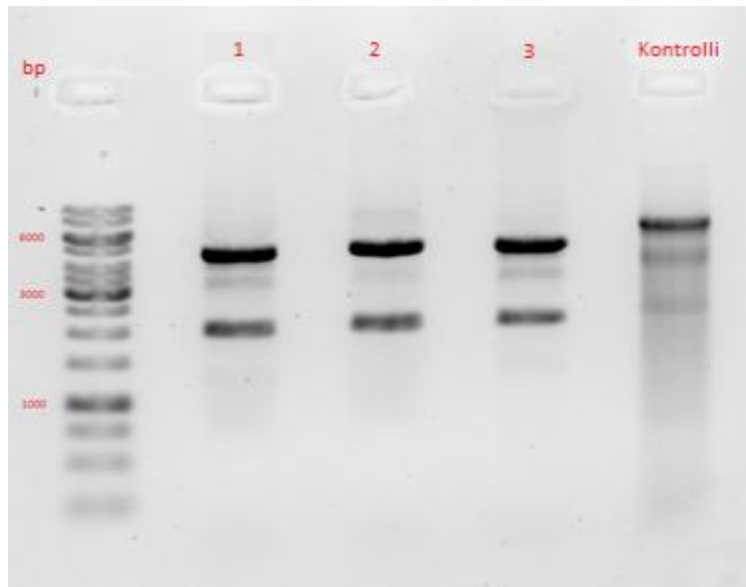
Tuotteen tarkistukseen käytettiin restriktioentsyymejä, koska oikeanlainen lopputuote pilkkoutuu eri tavalla kuin alkuperäinen, jota käytettiin kontrollina. Ensimmäiseen digestioreaktioon käytettiin *EcoRI*- ja *SacI*- sekä *HindIII* -entsyymejä. Plasmidit degradoituivat kuitenkin liikaa, joten digestioaikaa lyhennettiin yön yli kasvatuksesta neljään tuntiin. Myös käytettyjä entsyymejä vaihdettiin.

Kuvassa 11 on lyhyemmällä ajalla tehdyt digestiot. *EcoRI*- ja *EcoRV* -yhdistelmässä kontrolli ja näytteet 1 ja 2 ovat degradoituneet. *BamHI*- ja *SalI* -yhdistelmä puolestaan toimii hyvin. Kontrolli ja näytteet ovat selvästi digestoituneet eri tavoin. Näytteessä on nähtävissä 2500 kb:n ja ~4500 kb:n vyöhykkeet kuten pitikin. Kontrollissa on ~4500 kb:n vyöhyke sama kuin näytteessä mutta toinen on vain 2100 kb:n suuruinen, koska se ei sisällä *YadA*-vartta.



Kuva 11. Lisää koedigestioita.

Kuvassa 12 näkyy myös hyvin, kuinka näytteet ja kontrolli ovat tuottaneet erikokoisia bändejä. *PvuII* leikkaa plasmidin keskeltä insertiä ja lisäksi toisesta kohtaa plasmidia. Tällöin halutun insertin sisältävä kloni digestoituu kahteen osaan ja kontrolli vain yhteen osaan, mikä näkyy hyvin kuvasta.

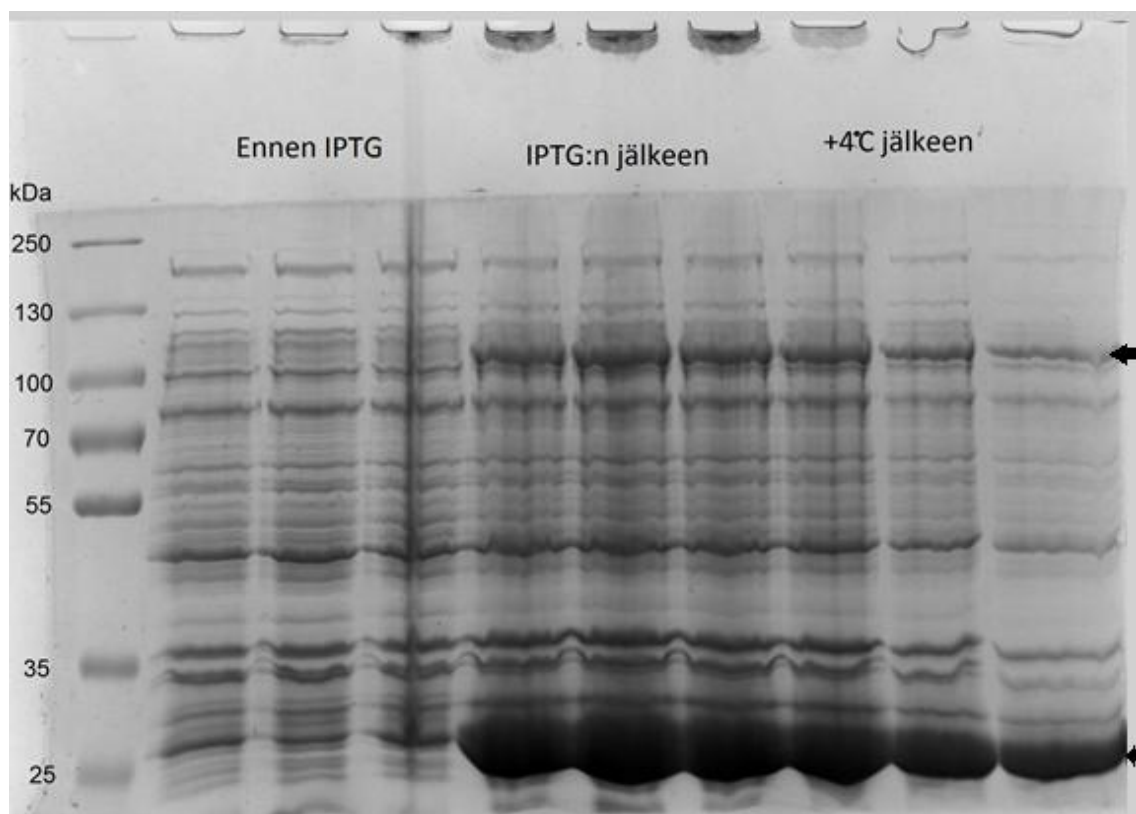


Kuva 12. Digestio *PvuII*:lla. Digestoidut plasmidit on merkitty numeroin.

Kaikki kolme sekvensoitavaksi lähetettyä plasmidia todettiin oikeanlaisiksi. Uudelle plasmidille annettiin nimi pAA1. Sen sekvenssi on liitteessä 2.

6.4 Proteiinipuhdistus ja -tuotto

Kerätyt proteiininäytteet ajettiin SDS-PAGE:lla (kuva 13). Geelillä näkyi proteiini 110 kDa:n kohdalla IPTG-lisäyksen jälkeen otetuissa näytteissä sekä +4 °C:ssa olleilla näytteillä. Geelin alaosassa näkyi samoissa näytteissä myös tumma bändi, joka on proteiinin laskostumisessa avustava chaperoni. Ennen IPTG-lisäystä otetuissa näytteissä kumpaakaan proteiinivyöhykettä ei ole havaittavissa.



Kuva 13. Proteiinit SDS-PAGE-geelillä. Ensimmäiset kolme näytettä on otettu ennen IPTG:tä, seuraavat kolme IPTG lisäyksen jälkeen ja viimeiset kolme proteiinin oltua +4°C:ssa. Ylemmän nuolen kohdalla on eGFP-YadA-gp298-fuusioproteiini ja alemman nuolen kohdalla on chaperoni (gp297).

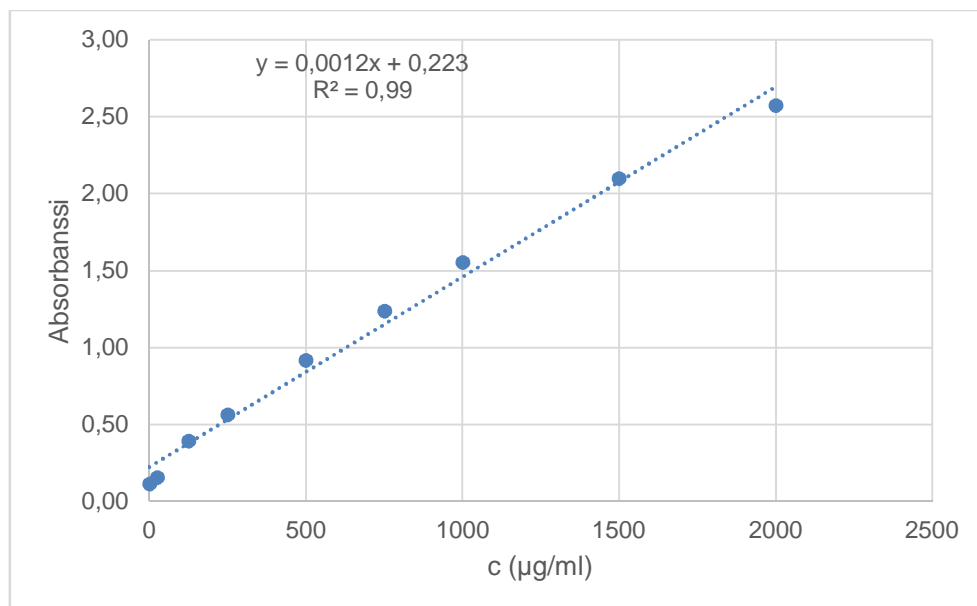
Proteiinipitoisuuden määrittämisen standardiliuosten ja näytteiden konsentraatiot ovat taulukossa 10. Laimennetusta näytteestä saatiin negatiivinen tulos, mikä jätettiin huomiomatta laskuissa. Negatiivinen tulos johtuu todennäköisesti kuvaajan epälineaarisuudesta. Kitin ohjeen mukaan kuvaajan tulisi olla hieman kaareva kuten standardisuorasta (kuva 14) on myös nähtävissä. Verrattaessa laimennetun näytteen mittaustulosta 0,17 standardiliuokseen on tulos hyvin lähellä 25 µg/ml:n standardin tulosta

(0,16). Laimentamaton näyte osuu kuvaajan keskivaiheille, jolloin suoran yhtälö sopii paremmin pitoisuuden laskemiseen.

Taulukko 10. Proteiinipitoisuuden määrittämisen mittaustulokset.

Standard	c (µg/ml)	Ka	Mittaus 1	Mittaus 2	Mittaus 3
I	0	0,11	0,11	0,11	0,11
H	25	0,16	0,15	0,16	0,16
G	125	0,39	0,40	0,40	0,38
F	250	0,56	0,57	0,57	0,56
E	500	0,92	0,93	0,93	0,90
D	750	1,24	1,24	1,22	1,25
C	1000	1,55	1,58	1,55	1,53
B	1500	2,10	2,19	2,03	2,08
A	2000	2,57	2,61	2,55	2,56
Laimentamaton näyte	255,83	0,53	0,547	0,519	
1:10 näyte	-438,88	0,17	0,182	0,175	0,154

Näytteen proteiinipitoisuus määritettiin kuvassa 14 olevan standardisuoran yhtälön avulla. Tulokseksi saatiin noin 256 ng/µl ja kokonaissaannoksi noin 128 µg.



Kuva 14. Proteiinipitoisuuden määrittäminen BSA:n avulla.

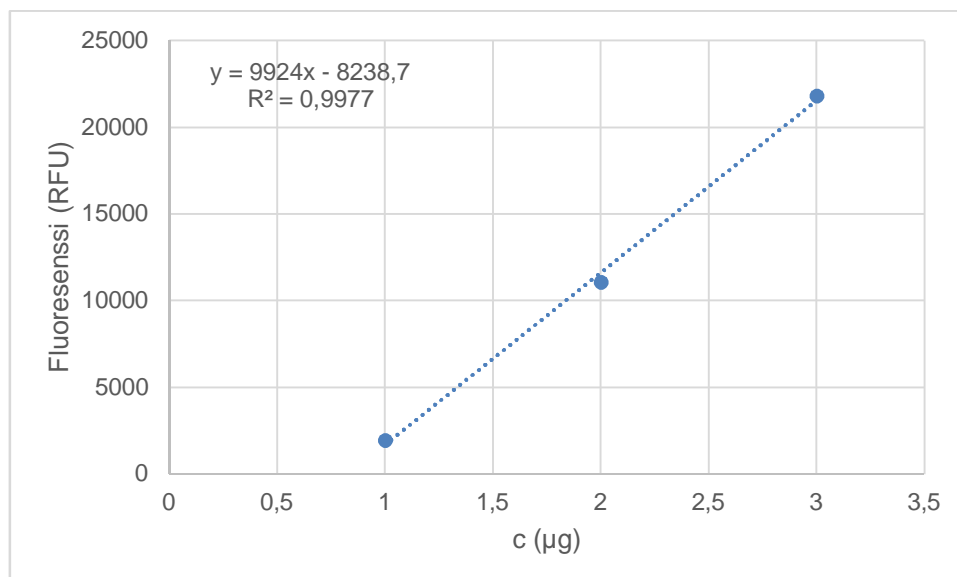
6.5 Fluoresenssimittaukset

Proteiinien tarttumista eri bakteerikantoihin seurattiin fluoresenssin avulla. Bakteeripesäkkeitä maljalla sekä puhdistamatonta proteiininäytettä katsottiin sinivalon avulla GelDoc-laitteella. Molemmat näkyivät vihreinä. Fluoresenssin määrä mitattiin Hidex Sense -laitteella. Taulukossa 11 on mitattu pelkän proteiinin antamat mittaustulokset. Näiden perusteella päätettiin laittaa 5 µl ja 10 µl (1290 ng ja 2580 ng) proteiinia yhdessä bakteerin kanssa. Näiden määrien arveltiin olevan tarpeeksi suuret tuottamaan mitattavan fluoresenssisignaalin myös näytteenkäsittelyn jälkeen.

Taulukko 11. Pelkän proteiinin antamat fluoresenssitulokset. Alarivissä on fluoresenssiarvoista vähennetty PBS-puskurin antama tausta.

Yksikkö	0 ng	258 ng	1290 ng	2580 ng
RFU	322	1959	11062	21807
RFU		1637	10740	21485

Kuvassa 15 on standardisuora proteiinin fluoresenssimittauksista. Suoran R-arvo oli hyvä ja proteiinin aiheuttama fluoresenssi kasvaa lineaarisesti.



Kuva 15. Proteiinin fluoresenssimittaukset.

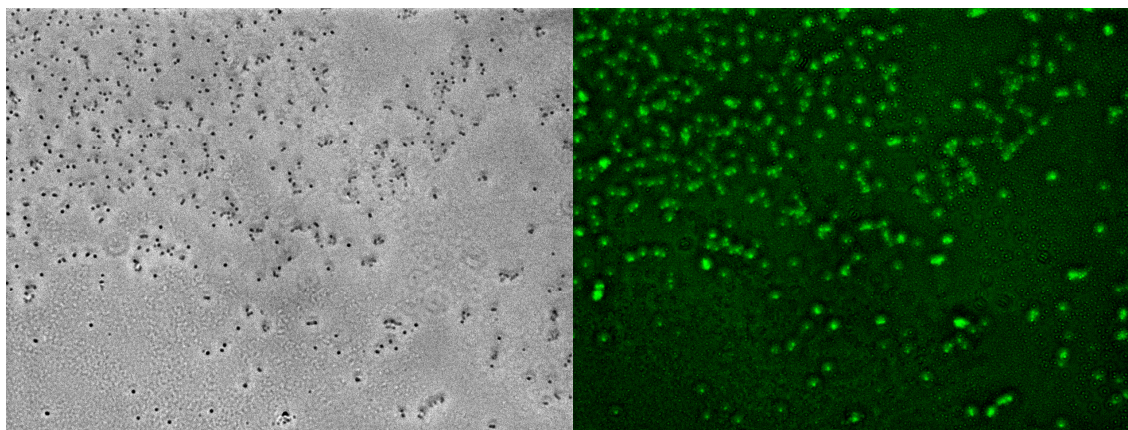
Näytteiden mittauksista saadut tulokset olivat hyvin epäjohdonmukaisia. Taulukossa 12 on esitetty yhden kokeen tulokset. Muiden kokeiden tulokset olivat samanlaisia. Numerot

näytteen nimessä viittaavat käytettyyn proteiinimäärään esimerkiksi 5 = 5 µl (1290 ng). Vierekkäin olevat, samalla värillä merkitty näytteet on pipetoitu samasta putkesta, vorteksoinnin jälkeen, joten tulosten pitäisi olla saman suuruiset. Näin ei kuitenkaan ole kaikkien rinnakkaisten kohdalla vaan tuloksissa on suurta hajontaa. Esimerkiksi PBS:ssä olleet R1 10a -näytteet eroavat toisistaan yli kymmenkertaisesti. Tuloksista ei näin ollen voitu päätellä mitään proteiinin sitoutumisen suhteen.

Taulukko 12. Sitoutumiskokeiden tulokset. Kokeessa käytetyt Yersinia-kannat ovat OCR eli YeO3-c-OCR ja R1 eli YeO3-R1. Block tarkoittaa blokattua näytettä.

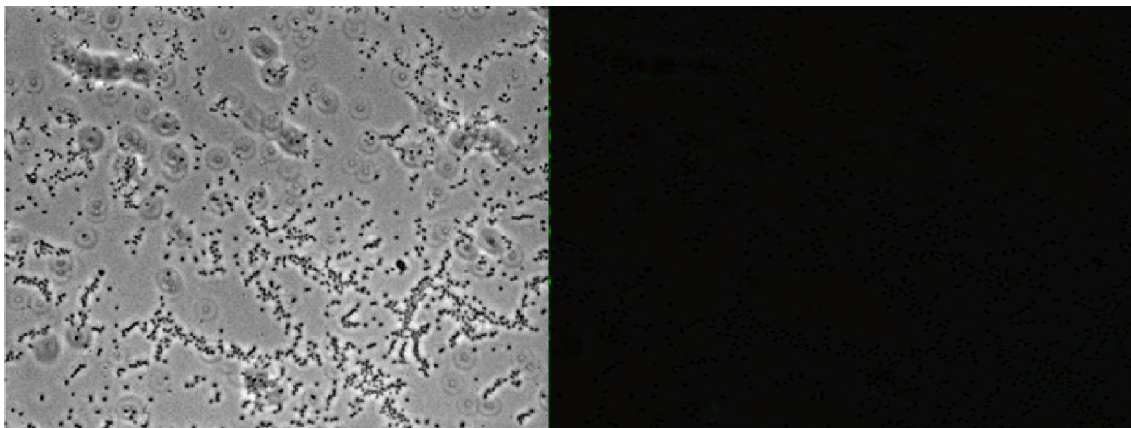
	5a1	5a2	5b1	5b2	10a1	10a2	10b1	10b2	neg1	neg2	PBS
OCR PBS	897	816	1494	1134	6455	5045	171083	31947	849	852	659
OCR Block	999	933	1010	1029	126364	31973	1078	1073	860	902	559
R1 PBS	83224	3581	10270	823	13043	1288	27883	1086	1034	810	-
R1 Block	33945	4290	988	871	62799	155926	19078	2466	838	884	-

Samoja näytteitä tarkasteltiin myös fluoresenssimikroskoopilla käyttäen 400-kertaista suurennosta. Kuvassa 16 on kuvattu sama näkymä ensin valomikroskoopilla ja tämän jälkeen vaihdettu fluoresenssioptiikkaan. Kuvia vertaamalla voidaan todeta, että proteiini on sitoutunut bakteereihin, koska bakteerit näkyvät vihreinä.



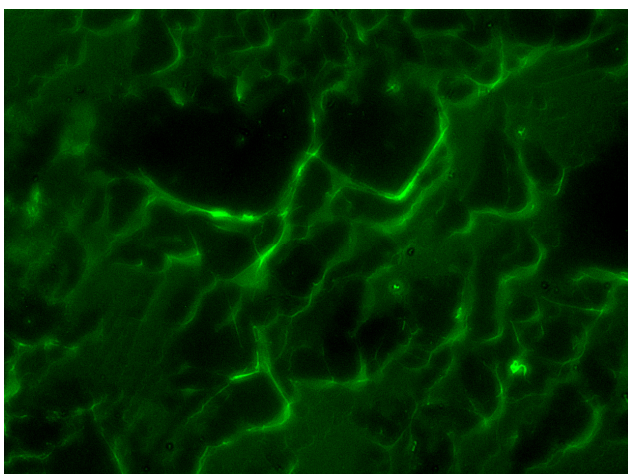
Kuva 16. YeO3-R1 bakteerikannan sitoutumiskokeita tarkasteltuna mikroskoopilla. Vasemmalla bakteerit on kuvattu valomikroskoopilla ja oikealla on sama näkymä fluoresenssioptiikalla.

Kuvassa 17 on bakteerikanta, johon proteiinin ei pitäisi sitoutua. Kuvat on otettu kuten edellä. Näitä kuvia tarkastelemalla nähdään bakteerit vasemmanpuoleisessa kuvassa, kun taas oikeanpuoleinen kuva on täysin musta. Proteiini ei siis ole sitoutunut bakteereihin, koska fluoresenssia ei ole havaittavissa.



Kuva 17. Kontrollina käytetty YeO3-c-OCR:n sitoutumiskokeet kuvattuna mikroskoopilla. Vasemmalla bakteerit on kuvattu valomikroskoopilla ja oikealla on sama näkymä fluoresenssimikroskoopilla.

Kuvassa 18 on kuvattu pelkkä proteiini. Kuvan väri ei ole tasainen, mikä viittaa aggregaattien muodostumiseen. Aggregaatit saattavat johtua proteiinin trimerisoitumisesta.



Kuva 18. Pelkkä proteiini kuvattuna fluoresenssioptiikalla. Kuvauksessa on käytetty 400 kertaista suurennosta ja proteiinia on näytteessä noin 510 ng.

7 Loppupäätelmät

Projektissa saavutettiin asetetut tavoitteet eli fuusioproteiini saatiin muokattua halutunlaiseksi sekä tehtyä sillä sitoutumiskokeita. Proteiini tuntuisi kuitenkin muodostavan aggregaatteja, jotka häiritsevät mittauksia mikrotiiterilevynlukijaa käytettäessä muodostamalla epätasaisen määrän proteiinia eri kohtiin. Näin ollen myös samasta putkesta otetun kahden rinnakkaisnäytteen pitoisuudet erosivat toisistaan.

Toisaalta pelkkää proteiinia mittaamalla saatiin hyvin johdonmukaisia tuloksia. Proteiinin infektiokykyä eri bakteerikantoihin ei myöskään ehditty nyt tutkimaan, koska kokeita ei vielä saatu onnistumaan ϕ R1-37-faagille spesifisellä *Yersinia*-kannalla.

Fluoresenssimikroskooppi tuntuisi toimivan hyvin infektoinnin testaukseen. Tämä on kuitenkin jonkin verran työläämpi menetelmä kuin mikrotiitterilevyllä mitattava fluoresenssi. Olisi hyvä, jos pelkkää fluoresenssia pystyisi mittaamaan tarkastelematta yksittäisiä bakteereja.

Tutkimusta voisi jatkaa koko aminohappoketjun sisältävän täyspitkän proteiinin tuottamisella, jolloin infektointia voisi uudelleen kokeilla. Täyspitkän proteiinin kanssa saattaisi tosin olla hankalampi työskennellä eikä se välttämättä tuottuisi yhtä helposti. Toisaalta proteiinin etuna olisi luultavasti proteiinien parempi laskostuminen ja sitä kautta parempi toiminta. Tällainen proteiini ei ehkä aggregoituisi, jolloin proteiinin infektiokykyä voisi testata uudestaan.

Lähteet

- 1 Pajunen Maria, dosentti. Helsingin yliopisto, bakteriologian ja immunologian osasto, Helsinki. Keskustelu 6.9.2018.
- 2 EndoTrap® Frequently Asked Questions (FAQ). Verkkoaineisto. Hyglos. <<http://www.hyglos.de/en/products-services/products/endotoxin-removal/faq.html>>. Luettu 10.9.2018.
- 3 Beczala Agnieszka, Ovchinnikova Olga G, Datta Neeta, Mattinen Laura, Knapska Katarzyna, Radziejewska-Lebrecht Joanna, Holst Otto ja Skurnik Mikael. 2013. Structure and genetic basis of Yersinia similis serotype O:9 O-specific polysaccharide. Verkkoaineisto. <<http://ini.sagepub.com/content/early/2013/12/17/1753425913514783>>. Luettu 2.5.2018.
- 4 Qasim Muhammad Suleman. 2018. Evaluation of receptor binding protein of phage ϕ R1-37. Lopputyö. Helsingin yliopisto, biologian ja ympäristötieteiden tiedekunta.
- 5 Yersinia-bakteerit. 2016. Verkkoaineisto. Evira. <<https://www.evira.fi/elintarvikkeet/tietoa-elintarvikkeista/elintarvikevaarat/ruokamyrkytykset/ruokamyrkytyksia-aiheuttavia-bakteereja/yersiniabakteerit>>. Luettu 6.9.2018
- 6 Lumio Jukka. Yersinia-infektiot (yersinioosi ja rutto). 2017. Verkkoaineisto. <http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk00616>. Luettu 10.9.2018.
- 7 Järveläinen Harri A ja Miettinen Minja. Bakteerirakenteiden aiheuttama akuutti tulehdusvaste. Verkkoaineisto. Duodecim 2001;117:2015–22. <<https://www.duodecimlehti.fi/api/pdf/duo92541>>. Luettu 10.9.2018.
- 8 Lipopolysaccharides. Verkkoaineisto. Sigma Aldrich. <<https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/glycobiology/lipopolysaccharides.html>>. Luettu 5.9.2018.
- 9 Erridge C, Bennett-Guerrero E, Poxton I R. Structure and function of lipopolysaccharides. 2002. Verkkoaineisto. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12270731>>. Luettu 11.9.2018.
- 10 Madigan Michael, Martinko John, Stahl David, Clark David. 2012. Brock Biology of Microorganisms. 13th edition. USA.
- 11 Skurnik Mikael, Kiljunen Saija. 2016. Bakteriofagihoidon mahdollisuudet. Verkkoaineisto. <<https://www.duodecimlehti.fi/lehti/2016/8/duo13080>>. Luettu 21.6.2018.

- 12 Skurnik Mikael, Hyytiäinen Heidi J, Happonen Lotta J, Kiljunen Saija, Datta Neeta, Mattinen Laura, Williamson Kirsty, Kristo Paula, Szeliga Magdalena, Kalin-Mänttari Laura, Ahola-livarinen Elina, Kalkkinen Nisse, Butcher Sarah J. 2012. Characterization of the genome, proteome, and structure of yersiniophage ϕ R1-37. *Journal of Virology* 8/2012 s. 12625 - 12642.
- 13 Kiljunen Saija, Hakala Kristo, Pinta Elise, Huttunen Suvi, Pluta Patrycja, Gador Aneta, Lönnberg Harri, Skurnik Mikael. 2005. Yersiniophage wR1-37 is a tailed bacteriophage having a 270 kb DNA genome with thymidine replaced by deoxyuridine. Verkkosivusto. Microbiology society, journals online. <<http://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/micro/151/12/4093.pdf?expires=1524646944&id=id&accname=guest&checksum=7A97558B8D61CC78AFB606764B57C64A>>. Luettu 25.4.2018.
- 14 Skurnik Mikael, bakteriologian professori. Helsingin yliopisto, bakteriologian ja immunologian osasto, Helsinki. Keskustelu 26.4.2018
- 15 Long and thin, the receptor-binding needle of bacteriophage T4. 2012. Verkkosivusto. Protein Databank in Europe, EMBL-EBI. <<http://www.ebi.ac.uk/pdbe/quirps?story=T4tail>>. Luettu 19.4.2018.
- 16 Glick Bernard R, Pasternak Jack J, Patten Cheryl L. 2010. *Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA*. 4th edition. USA.
- 17 Zhang G, Gurtu V, Kain S R. 1996. An enhanced green fluorescent protein allows sensitive detection of gene transfer in mammalian cells. Verkkosivusto. <www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8885998> Luettu 15.6.2018.
- 18 ElectroMAX DH10B Cells. 2003. Verkkosivusto. ThermoFisher Scientific. <<https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/18290015.pdf>>. Luettu 20.4.2018.
- 19 Thermo Scientific Phusion High-Fidelity DNA Polymerase. 2016. Verkkosivusto. Thermo Scientific. <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0012393_Phusion_HighFidelity_DNAPolymerase_UG.pdf>. Luettu 16.4.2017.
- 20 NEBioCalculator. 2018. Verkkosivusto. New England Biolabs. <<http://nebiocalculator.neb.com/#!/ligation>>. Luettu 19.4.2018.
- 21 NEBcutter V2.0. 2018. Verkkosivusto. New England Biolabs. <<http://www.labtools.us/nebcutter-v2-0/>>. Luettu 4.5.2018.
- 22 UniProt. Proteomes - Escherichia coli (strain B / BL21-DE3). Verkkosivusto. <<http://www.uniprot.org/proteomes/UP000001509>>. 27.2.2018. Luettu 25.4.2018.

Kasvatusalustat

S.O.B –media:

- 20 g tryptonia
- 5 g hiivauutetta
- 0,584 g NaCl
- 0,186 g KCl

Sekoita kaikki aineet noin 800 ml:aan milliQ-vettä ja säädä pH 7,0:aan 1 M NaOH:n avulla. Tasaa tilavuus 1000 ml:aan. Autoklavoi ja säilytä +4 °C:ssa.

S.O.C –media

- Sekoita 9,8 ml:aan S.O.B –mediaa 100 µl 2M Mg²⁺ -liuosta ja 100 µl 2M glukoosiliuosta. Valmista liuos juuri ennen käyttöä ja vain tarvittava määrä kerrallaan.

2 x YT media, pH 6,5 – 7,5

- 16 g tryptonia
- 10 g hiivauutetta
- 5 g NaCl

Sekoita kaikki aineet 800 ml:aan milliQ vettä ja säädä pH. Tasaa tilavuus 1000 ml:aan. Autoklavoi ja säilytä +4 °C:ssa.

pAA1-sekvenssi

His₆GFP_yadA_Gp298vs240-704 and Gp297 (6958 bp)

GGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCCCTGTAGAAAATAATTTTGTTTAACTTTAATAAGGAGATATACC
 ATGGGCAGCAGCCATCACCATCATCACCACAGCCAggatccgGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCG
 GGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGG
 CGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGCAAGCTGCCCGTGCCC
 TGGCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGTCTCAGCCGTACCCCGACCACATGAAGC
 AGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGA
 CGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAG
 GGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACCTACAACAGCCACAACG
 TCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGA
 CGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGCACGGCCCCGTGCTGCTGCC
 GACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCC
 TGCTGGAGTTCGTGACCGCCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGGAATTCgggatccgc
 aaataactatactgatagtaaaagtgctgaaacattggaaaatgcgcgtaaaagaggcttttggctcagctc
 aaagatgttttgaatatggcaaaagcacactcaaatagtgttgctagaacaactttagaaaactgctgaag
 aacatgcaaatagtgttgccagaacaactttagaaaactgctgaagaacatgcaataaaaaatcagctga
 ggcgttagcaagcgctaagtgtgatgcagacagcaagcttctcacacactaaaaactgcaaatagctat
 accgatgtgactgtaagtaattcgactaagaaagcaatccggtgaatcgaatcaatacacagatcataaat
 tccgtcaacttgacaaccggttagataaaacttGAGCTCAATCTAGGTCTTTGGAACAGCATCTGTATTAA
 TAAAGGTACTGCTAAAGGTAATGTAATTGTTGTAGGTGATGGTGGTTTAGGTATAAATGATAATAAAGTT
 GCTGCGCTTAAATCAGTAATACCCGCTTTCTACCAATTAACCTGATGACTCTCCGGATAAACCTGAAGTAG
 AATAAGATTATGGGGTCTATCTTTCCCTATATCTAAAACCTTTACAGGGTATTTAGTFTTATCTTCTGA
 TTGGCGTATTATCTTTAGGTATTGATGGCGCTGACGGAGTTGAGTTATCCAAGGTATATCTGGCAAATAAC
 TTACCTACTCTTAATGAATTAAGCATTAGGTACTGAAAATAAATTTATCTGATTTAAAGTAAAGCCA
 AAGCTAGAACTAATCTAGGTTTAGGTGATTCAGTACCAAAAATGTTGGTACGGAAACAGGTACAGTTGC
 TGCAGGTGACGATAGCCGATTACTGGTGTCTCAGAAAAGATAAAAACTTAAAAGATCTTACAGATAAAA
 TCAATAGCTCGTACTAATCTTGAATTAGGTAGTGTCTCAGAAAACCTGCTCAAACCTAACATTACCGATA
 CCACTTCAGGCAGTTTGATGCAAGTTGGAGCGTTTGGTTTGGGTGGCTCAGGAGTACCTTTTTCTGGTGA
 GGGTAAAGACTTAATTGCTTTTTTAAAAAATGCTCCTTCCGGTATGTATAGATTTGGTGATTCTTCATCA
 TATACAAATGGAATACCTTCTGGACAATATTCTGATATTCTTTAATGGATCATGGTGGGTCAAATTTCTA
 AATCTGCAATAGCCGTTGATTTTTAGGTCAAGTATTTGCTATCTGTTAAGAGCTGATGGCACTAGTAG
 CGGATGGGTTACAATATTTCTGATACAGATTTCTCAAATAATCTTACTTCTTATAGGCGTACCAATT
 CCTTATCCATTAGCAACTCCACCTAAAACTTTTTGAAAGCTAATGGTAGTGCTTTTGATCAGGTAGCTT
 TCCCTAAATTATTAACCTATTACCCATCTGGAGTCTACCTGATCTTCGTGGAGAATTTATCCGTGGTTG
 GGACGATGGTAGAAATGTAGATACTGGACGAAATATTTTGACCAATCAGGGGGATGCTATTGCAAATATT
 ACTGGTAAATTAACGTTCTTTCTTCTCAGATGAACCATTTTCGACAGCGGATTTATTTAAATGGGCAA
 ATGAAGGTGCATTAGATATTATTAGAACAGGATTTTCACATTCCTCTGGTGGGGTGGTGGAGCTGGTGG
 GGGAGTTTCAGGTTTCACATTTGATGCATCTAAGAGTGGTGTACCAACAGCTAATGAAAAATAGACCACGA
 AATATTGCATTTAACTATATTATTAGGGCCAAAATAAgtcgacAAGCTTGCGGCCGCATAATGCTTAAGTC
 GAACAGAAAGTAATCGTATTGTACACGGCCGCATAATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGGAATTTGT
 GAGCGGATAACAATTTCCCATCTTAGTATATTAGTTAAGTATAAGAAGGAGATATACATATGGCAGATCT
 CAATTGGATATCGGCCCGCCACGCGATCGCTGACGTCggtaccATGGCAACTGATATTTTTCAAGAAGTA
 ACCATTCCTGATTCTATGACCAAAGCTGTTTTGATGGTAAATGGTTTTTGTATTTAAAGAAGGTTATGTGG
 GTACTTATAATATTTCACTCTACTACCAGAGAATATATTGGTAGTAACCGTGAGTATGTACCTGTAGGTGT
 TACTGTAGCGGCTTATGCTTATCGGGATTTACCTCCGTTTGGCTGAATATAAACAGAAAAGTAGCTGCAGGT
 GTACCTCAAGCTATTCTGCGTGCAGTAGACTATAAAGGTTGGCAGATTGTAATTGATTATAGAGGCTATA
 CTATCTATAATACCACTGATAAAACCCCTAAAGTGGTTACTTCTTTCCGGTATATTCCTACTGGATTAC
 TCTTTTAGCCCCCTACTTCAAGATTTGATGAGTGGGATGGTGTCTAAGTGGGTAGTCAATGAAAAACAAGAAA
 CTACAAGCATCTATCGATGCAGCTAACAAAACCTAAACAGACTCTGATGTCTGAAGCCCTTGAGCATATCA
 ATATTTTATCAAGATATGCTTGACTTTGAAATGGCTGATGATATTGAAGCTGTTGAAGCTAAATTTGGCTGA
 ATGGAAGAAATATCGTATTGCAGTTTATAAAATCTCTACTGTAGATCCTTCTACAATTTGATGGCCTGAA
 AAACCTGTTTCAATGTTTGGTGATAACTAAActcgaagTCTGGTAAAGAAAACCGCTGCTGCGAAATTTGAAC
 GCCAGCACATGGACTCGTCTACTAGCGCAGCTTAATTAACCTAGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACT
 AGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTGCTGAAACCTCAGGCATTTGAGAAG

CACACGGTCACACTGCTTCCGGTAGTCAATAAACCGGTAAACCAGCAATAGACATAAGCGGCTATTTAAC
 GACCCTGCCCTGAACCGACGACCGGGTCATCGTGGCCGGATCTTGGGCCCTCGGCTTGAACGAATTGT
 TAGACATTATTTGCCGACTACCTTGGTGATCTCGCCTTTACGTTAGTGGACAAATTTTCCAAGTATGATCT
 GCGCGGAGGCCAAGCGATCTTCTTCTTGTCCAAGATAAGCCTGTCTAGCTTCAAGTATGACGGGCTGAT
 ACTGGGCCGGCAGGCGCTCCATTGCCAGTCGGCAGCGACATCCTTTCGGCGGATTTTGGCCGTTACTGC
 GCTGTACCAAATGCGGGACAACGTAAGCACTACATTTTCGCTCATCGCCAGCCAGTCGGGCCGGCAGTTC
 CATAGCGTTAAGGTTTCATTTAGCGCCTCAAATAGATCCTGTTTCAGGAACCGGATCAAAGAGTTTCTCCG
 CCGCTGGACCTACCAAGGCAACGCTATGTTCTCTTGTCTTTTGTGTCAGCAAGATAGCCAGATCAATGTCGAT
 CGTGGCTGGCTCGAAGATACCTGCAAGAATGTCATTGCGCTGCCATTTCTCCAAATTCGAGTTTCGCGCTTA
 GCTGGATAACGCCACGGAATGATGTCGTCGTGCACAACAATGGTGACTTCTACAGCGCGGAGAATCTCGC
 TCTCTCCAGGGGAAGCCGAAGTTTCCAAAAGGTCGTTGATCAAAGCTCGCCGCGTTGTTTCATCAAGCCT
 TACGGTACCCTAACCGCAAAATCAATATCACTGTGTGCTTCAGGCCCATCCACTGCGGAGCCGTAC
 AAATGTACGGCCAGCAACGTCGGTTTCGAGATGGCGCTCGATGACGCCAACTACCTCTGATAGTTGAGTTCG
 ATACTTCGGCGATCACCGCTTCCCTCATACTCTTCTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTA
 TTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGATTTAGAAAAATAAAACAAATAGCTAGCTCACTCGGTTCG
 TACGCTCCGGGCGTGAGACTGCGGCGGGCGCTGCGGACACATACAAAAGTTACCCACAGATTCCGTTGGATA
 AGCAGGGGACTAACATGTGAGGCAAAAACAGCAGGGCCGCGCCGGTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCT
 CCTGCCAGAGTTACATAAACAGACGCTTTTTCCGGTGCATCTGTGGGAGCCGTGAGGCTCAACCATGAAT
 CTGACAGTACGGGCGAAAACCGACAGGACTTAAAGATCCCACCGTTTCCGGCGGGTTCGCTCCCTCTTGC
 GCTCTCTGTTCCGACCCCTGCCGTTTACCGGATACCTGTTCCGCTTTTCTCCCTTACGGGAAGTGTGGCG
 CTTTCTCATAGCTCACACACTGGTATCTCGGCTCGGTGTAGGTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTAAGCA
 AGAAGTCCCGTTCAGCCCGACTGCTGCGCCTTATCCGGTAACTGTTCACTTGAGTCCAACCCGAAAAG
 CACGGTAAAACGCCACTGGCAGCAGCCATTGGTAACTGGGAGTTTCGAGAGGATTTGTTTAGCTAAACAC
 GCGGTTGCTCTTGAAGTGTGCGCCAAAAGTCCGGCTACACTGGAAGGACAGATTTGGTTGCTGTGCTCTGC
 GAAAGCCAGTTACCACGGTTAAGCAGTTCCCAACTGACTTAACTTCGATCAAACCACCTCCCCAGGTG
 GTTTTTTCGTTTACAGGGCAAAAAGATTACCGCGAGAAAAAAGGATCTCAAGAAAGATCCTTTGATCTTTT
 CTACTGAACCGCTCTAGATTTTCAAGTGAATTTATCTCTTCAAATGTAGCACCTGAAGTCAAGCCCATACG
 ATATAAGTTGTAATTCTCATGTTAGTCAATGCCCCGCGCCACCGGAAGGAGCTGACTGGGTTGAAGGCTC
 TCAAGGGCATCGGTCGAGATCCCGGTGCATTAAGTGAAGTAACTTACATTAATTGCGTTGCGCTCACT
 GCCCGCTTTCCAGTTCGGGAAACCTGTCTGTCAGCTTAAATGAATCGGCCAACCGCGGGGAGAGGC
 GTTTTGCGTATTGGGCGCCAGGGTGGTTTTTCTTTTACCAGTGAGACGGGCAACAGCTGATTTGCCCTTC
 ACCGCTGGCCCTGAGAGAGTTGAGCAAGCGGTCCACGCTGGTTTTGCCCCAGCAGGCGAAAATCCTGTT
 TGATGGTGGTTAACGGCGGGATATAACATGAGCTGTCTTTCGGTATCGTCTGATCCCACTACCGAGATGTC
 CGCACCAACGCGCAGCCCGGACTCGGTAATGGCGCGCATTGCGCCAGCGCCATCTGATCGTTGGCAACC
 AGCATCGCAGTGGGAACGATGCCCTCATTGAGCATTGTCATGGTTTTGTTGAAAACCGGACATGGCACC
 AGTCCGCTTCCCGTTCCGCTATCGGCTGAATTTGATTGCGAGTGAGATATTTATGCCAGCCAGCCAGACG
 CAGACGCGCCGAGACAGAACTTAATGGGCCCGCTAACAGCGGATTTGCTGGTGACCAATGCGACCAGA
 TGCTCCACGCCCAGTCCGCTACCGTCTTTCATGGGAGAAAATAATACTGTTGATGGGTGTCTGGTCAGAGA
 CATCAAGAAATAACGCCGGAACATTAGTGCAGGCAGCTTCCACAGCAATGGCATCCTGGTCACTCCAGCGG
 ATAGTTAATGATCAGCCACTGACGCGTTGCGCGAGAAAGATTGTGCACCGCCGCTTTACAGGCTTCGACG
 CCGCTTTCGTTTACCATCGACACCACCGCTGGCACCCAGTTGATCGGCGCGAGATTTAATCGCCGCGCA
 CAATTTGCGACGGCGGTCGAGGGCCAGACTGGAGGTGGCAACGCCAATCAGCAACGACTGTTTGGCCGCG
 CAGTTGTTGTGCCACGCGGTTGGGAATGTAATTCAGCTCCGCCATCGCCGCTTCCACTTTTTCCCGCGTT
 TTCGAGAAAACGTGGCTGGCTGGTTTACCACGCGGGAAAACGGTCTGATAAGAGACACCGGCATACCTCTG
 CGACATCGTATAACGTTACTGGTTTTACATTCACCACCCTGAATTGACTCTCTTCCGGGCGCTATCATGC
 CATACCGGAAAAGTTTTGCGCCATTGATGGTGTCCGGGATCTCGACGCTCTCCCTTATGCGACTCCTG
 CATTAGGAAATTAATACGACTCACTATA