

Opinnäytetyö (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikka

Biotekniikka

2012

Anna Sulkakoski

HIIVAVEKTOREIDEN MUOKKAUS GOLDEN GATE SHUFFLING –MENETELMÄÄ VARTEN



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

OPINNÄYTETYÖ (AMK) | TIIVISTELMÄ

TURUN AMMATTIKORKEAKOULU

Bio- ja elintarviketekniikka | Biotekniikka

Syksy 2012 | Sivumäärä: 40

Jarno Pusa Ins., Kaj Sjöblom FM, Ilari Suominen FT, Petri Susi FT

Anna Sulkakoski

HIIVAVEKTOREIDEN MUOKKAUS GOLDEN GATE SHUFFLING –MENETELMÄÄ VARTEN

Golden Gate Shuffling on tyypin IIs restriktioentsyymeihin perustuva kloonausmenetelmä. Sen tarkoituksena on nopeuttaa moniosaiten inserttien yhdistämistä ja kloonausta geenivektoriin.

Tässä työssä oli tarkoitus muokata kahta *Pichia pastoriksessa* käytettävää plasmidivektoria (pPICZ A ja pGAPZ A; Invitrogen) siten, että niihin voidaan siirtää inserttejä Golden Gate Shuffling -kloonausmenetelmällä.

Vektoreista poistettiin ensin kolme Bsal-tunnistuskohtaa. Tämä tapahtui PCR:n ja mutatoitujen koettimien avulla. Tämän jälkeen suunniteltiin ja tehtiin kaksi uutta Bsal-tunnistuskohtaa plasmidien monikloonausalueille. Golden Gate Shuffling -kloonausmenetelmän toimivuus testattiin ja tehtiin tuottotesti *Pichia pastoriksessa*.

Suunnitellut muokkaukset suoritettiin kummallekin vektorille. Shuffling-menetelmän käyttö vaatii kuitenkin optimointia riippuen käytettävien inserttien määrästä.

Vastaavanlaisten vektorimuokkauksen kannattavuutta tulee harkita tulevaisuudessa DNA-syntetiikan kehittyessä ja tullessa yhä edullisemmäksi. Tällä hetkellä *in vitro* DNA-synteesillä kyetään jo helposti tuottamaan yli 3 kb:n kappaleita ja tilattuna tämän kokoisen palan hinnaksi tulisi hieman yli 1000 euroa. Hinta on erittäin alhainen tehtyyn työmäärään ja reagenssimäärään nähden.

ASIASANAT:

Golden Gate Shuffling, pPICZ A, pGAPZ A, *Pichia pastoris*, kohdennettu mutageneesi

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Bio Technology and Food Technology | Bio Technology

2012 | Number of pages: 40

Jarno Pusa B.Eng., Kaj Sjöblom M.Sc., Ilari Suominen Ph.D., Petri Susi Ph.D.

Anna Sulkakoski

MODIFICATION OF YEAST VECTORS FOR THE CLONING METHOD GOLDEN GATE SHUFFLING

Golden Gate Shuffling is a cloning strategy based on the function of type II restriction enzymes. It was created to facilitate the combination of multiple-part gene inserts and their incorporation into cloning vectors.

The purpose of this study was to modify two plasmid vectors (pPICZ A, pGAPZ A; Invitrogen) made for the yeast *Pichia pastoris* so that gene inserts could be incorporated in them by the cloning method Golden Gate Shuffling.

Three recognition sites for the BsaI restriction enzyme were first altered by mutated primers and PCR. Two new recognition sites were introduced to the MCSs of the vectors. Lastly the cloning method was tested with the modified vectors and a protein expression test was performed in *Pichia pastoris*.

The alterations were carried out as planned. The cloning method, Golden Gate Shuffling, needs case-specific optimization depending on the number of gene inserts introduced into the vector.

With the increasing affordability of artificial gene synthesis, this type of vector modifications should be considered. Today size 3 kb DNA fragments can easily be produced *in vitro* and the cost for one 3 kb piece would be a little over 1000 €. The price is low compared to the amount of work and reagents put into the process.

KEYWORDS:

Golden Gate Shuffling, pPICZ A, pGAPZ A, Pichia pastoris, site-directed mutagenesis

SISÄLTÖ

KÄYTETYT LYHENTEET JA SANASTO	7
1 JOHDANTO	6
2 <i>PICHIA PASTORIS</i>	7
2.1 <i>Pichia pastoris</i> ksen kaupalliset vektorit pPICZ ja pGAPZ	7
3 GOLDEN GATE SHUFFLING (GGS)	10
4 PLASMIDIN KOHDENNETTU MUTAGENEESI PCR-MENETELMÄLLÄ	13
4.1 Menetelmä	13
4.2 Phusion	15
5 STADEN-PAKETTI SEKVENSSESIANALYTIKKAAN	16
6 KÄYTETYT MENETELMÄT	17
6.1 Kohdennetut pistemutaatiot	17
6.1.1 Alukkeiden suunnittelu	17
6.1.2 PCR	18
6.1.3 Ligaatio ja elektroporaatio	20
6.1.4 Mutaatioiden varmentaminen	21
6.2 Monikloonauksen muokkaus	21
6.2.1 Dimeerin rakenne ja dimerisointi	21
6.2.2 Vektorien pPICZ S ja pGAPZ S muodostus	23
6.3 Sekvensointi ja datan käsittely	24
6.4 Golden gate shuffling –kokeilu	25
6.4.1 Kloonaus	25
6.4.2 <i>Pichian</i> transformointi	26
6.4.3 Tuottokasvatukset	26
6.4.4 Näytteiden käsittely ja analysointi	27
7 TULOKSET JA TARKASTELU	28
7.1 Vektorien muokkaukset	28
7.2 Sekvenssi ja mutaatiot	32
7.3 Shuffling	34
7.4 Tuottotestit	36

8 YHTEENVETO JA LOPPUPÄÄTELMÄT	38
9 LÄHDELUETTELO	39

LIITTEET

Liite 1. Elektrokompetentit XL1 ja X-33 solut	
Liite 2. Mediumit	
Liite 3. BLAST1: pPICZ S:n konsensussekvenssin ja odotussekvenssin vertailu	
Liite 4. BLAST 2: pGAPZ S:n konsensussekvenssin ja odotussekvenssin vertailu	
Liite 5. Mutaatiot	
Liite 6. Tuottokasvatusten mittaustulokset	

KUVAT

Kuva 1. pGAPZ A:n ensimmäinen PCR-mutatointi: yhdistetty sykli-, templaattimäärä- ja puskuritestit.	29
Kuva 2. PCR: denaaturaatiovaiheen keston ja reaktiivilavuuden vaikutus reaktion onnistumiseen.	29
Kuva 3. pPICZ A mutaatintikierrokset 1, 2 ja 3.	30
Kuva 4. pGAPZ A:n mutaatintikierrokset 1,2 ja 3.	31
Kuva 5. pPICZ S ja pGAPZ S entsyymidigestoinnit MCS:n muokkauksen jälkeen.	32
Kuva 6. Emästen lukeminen huonolaatuisesta sekvenssistä gap4:ssa.	32
Kuva 7. Shuffling-tuotteiden ja kontrollireaktioiden ero.	34
Kuva 8. Shuffling-menetelmällä yhdistettyjen vektorien restriktioanalyysi.	35

KAAVIOT

Kaavio 1. pPicz A ja pGapz A vektorien rakennekartat (Invitrogen. 2010c,d).	8
Kaavio 2. NotI ja BsaI -entsyymien tunnistus ja leikkauskohdat DNA:ssa.	10
Kaavio 3. Golden Gate Shuffling-kloonastrategian soveltaminen. hydrobody-projektissa. (Sulkakoski, A.H. 2012)	12
Kaavio 4. Erilaisten mutaatioiden tekeminen plasmidiin alukemuokkauksen avulla. (Finnzymes 2009)	13
Kaavio 5. Yhden emäksen kohdennettu pistemutaatio PCR:lla. (Sulkakoski, A.H. 2012)	14
Kaavio 6. Dimeerin muodostuminen ja sen toiminta osana vektoria (Sulkakoski, A.H. 2012)	22

TAULUKOT

Taulukko 1. Alukkeet pistemutaatioita varten.	18
Taulukko 2. PCR-ohjelma	19
Taulukko 3. PCR-reaktioseoksen komponenttisuhteet	19
Taulukko 4. PCR-tuotteiden ligoatioseokset	20
Taulukko 5. Elektroporaatioasetukset	20
Taulukko 6. Oligomeerien sekvenssit	22
Taulukko 7. Dimeerisaatioseos	22
Taulukko 8. Dimerisaatio-ohjelma	23
Taulukko 9. Dimeeri-vektorisio	23
Taulukko 10. Shuffling-reaktioseos	Error! Bookmark not defined.

KUVIOT

Kuvio 1. Supernatanttien ja kasvatusmediumin fluoresenssi.	36
Kuvio 2. Pellettilyysaattien fluoresenssi.	36

KÄYTETYT LYHENTEET JA SANASTO

AOX1	Alkoholioksidaasi 1
BLAST	Basic Logical Alignment Search Tool
CYC1TT	Sytokromi c:n terminaattitekijä heterologisen proteiinin transkription terminaatioon <i>P. pastoriksessa</i>
EGFP(y)	Enhanced Green Fluorescent Protein (kodonikäytöltään optimoitu <i>P. pastorikselle</i>)
ER	Endoplasmic reticulum, endoplasmakalvosto
FW	Forward(-aluke)
GGS	Golden Gate Shuffling
MN	Macherey Nagel
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NEB	New England Biolabs
P _{AOX1}	Alkoholioksidaasi 1:n promoottori
PCR	Polymeraasiketjureaktio
P _{EM-7}	Synteettinen <i>E. colissa</i> toimiva promoottori
P _{GAP}	Glyseraldehydi-3-fosfaattidehydrogenaasin promoottori
P _{TEF1}	<i>S. cerevisiaesta</i> eristetty <i>P. pastoriksessa</i> toimiva promoottori
RE	Reverse(-aluke)
XL1	Eräs yleisesti käytetty <i>Escherichia coli</i> -kanta
YPER	Yeast protein extraction reagent, hiivasolujen hajottamiseen käytettävä reagenssi (Thermo Scientific Inc.)
Konsensussekvenssi	sekvenssin kappaleista matemaattisin menetelmin laskettu ja rakennettu, limittäisyyksiin perustuva jatkumo.
Hiusneulasilmukka	DNA:han (tai RNA:han) mahdollisesti muodostuva rakenne, kun juosteen sekvenssi sisältää toisilleen komplementaariset, päinvastaisiin suuntiin kulkevat alueet.
Heterologinen ekspressio	Eri isännästä peräisin olevan geenin ilmentäminen toisessa organismissa.

Dimeeri	Esimerkiksi kahdesta, joko samasta tai eri alukkeista syntyvä kaksijuosteinen rakenne, kun alukkeet sisältävät oisilleen komplementaarisia osia.
Forward-alue	Lähdesekvenssin kanssa identtinen lyhyt DNA-juoste , joka tarttuu komplementaariseen juosteeseen PCR:n alukekiinnitymisvaiheessa.
Reverse-alue	Lähdesekvenssin komplementaarijuosteen kanssa identtinen lyhyt DNA-juoste , joka tarttuu lähdejuosteeseen PCR:n alukekiinnitymisvaiheessa
(Yli)Glykolysointi	Proteiinien postranslatorinen muokkaus, jossa proteiiniin kiinnitetään sokeriosa. Joillekin hiivalajeille on tyypillistä liittää proteiiniin huomattavasti enemmän sokeriosia kuin muilla organismeilla.
Terminaatiotekijä	Alue sekvenssissä, joka saa RNA-polymeraasin lopettamaan transkription.

1 JOHDANTO

Rekombinantti-DNA-tekniikat ovat kehittyneet huomattavasti viime vuosikymmenen aikana. Vaikka perinteiset menetelmät ovat edelleen joltain osin käytössä, eri tutkimusryhmät kehittävät jatkuvasti uusia kloonaustategioita työn nopeuttamiseksi ja helpottamiseksi. Yksi tällaisista menetelmistä on tyypin IIs restriktioentsyymeihin perustuva Golden Gate Shuffling (Engler ym. 2009).

Tässä työssä oli tarkoitus muokata kahta *Pichia pastorikselle* suunniteltua pPICZ A- ja pGAPZ A (Invitrogen) – nimisiä plasmidivektoreja siten, että niitä voidaan käyttää Golden Gate Shuffling-kloonausmenetelmässä. Työ suoritettiin neljässä vaiheessa. Ensimmäisessä vaiheessa plasmideista poistettiin kolme Bsal-entsyymien tunnustuskohtaa kohdennettujen pistemutaatioiden ja PCR:n avulla. Toisessa vaiheessa suunniteltiin ja tehtiin kaksi uutta Bsal-tunnustuskohtaa plasmidien monikloonausalueille. Molemmat muokatut plasmidit sekvensoitiin GATC Biotech:lla Saksassa. Kolmannessa vaiheessa testattiin kloonausmenetelmän ja plasmidien toimivuutta siirtämällä muokattuihin kohdevektoreihin EGFP:n ja hydrofobiini-proteiinin yhdistelmä. Lopuksi rekombinanttiplasmidi siirrettiin *Pichia pastorikseen*, jossa suoritettiin testikasvatukset. Lopuksi analysoitiin proteiinituottoa. Käytännön työ suoritettiin kokonaisuudessaan Turun ammattikorkeakoulun Lemminkäisenkadun toimipisteen laboratorio-tiloissa ja soveltuvin osin Hydrobody:n työohjeita mukaillen. Osassa työvaiheita noudatettiin artikkelien ja reagenssivalmistajien ohjeita.

Työn toimeksiantaja oli Hydrobody-projekti, joka on Turun ammattikorkeakoulun tutkimus ja kehityspuolen sekä VTT:n yhteistyöprojekti. Hydrobodyn päämääränä on saada aikaan teollisuuden rekombinanttiproteiineille uusi tuotto- ja puhdistusstrategia, joka perustuu hydrofobiini-proteiinin ominaisuuksiin. Projektia rahoittavat Tekes, Genecor/Danisco, Roal, Thermo Fischer (Finnzymes,) sekä GMP Medipolis.

2 *PICHIA PASTORIS*

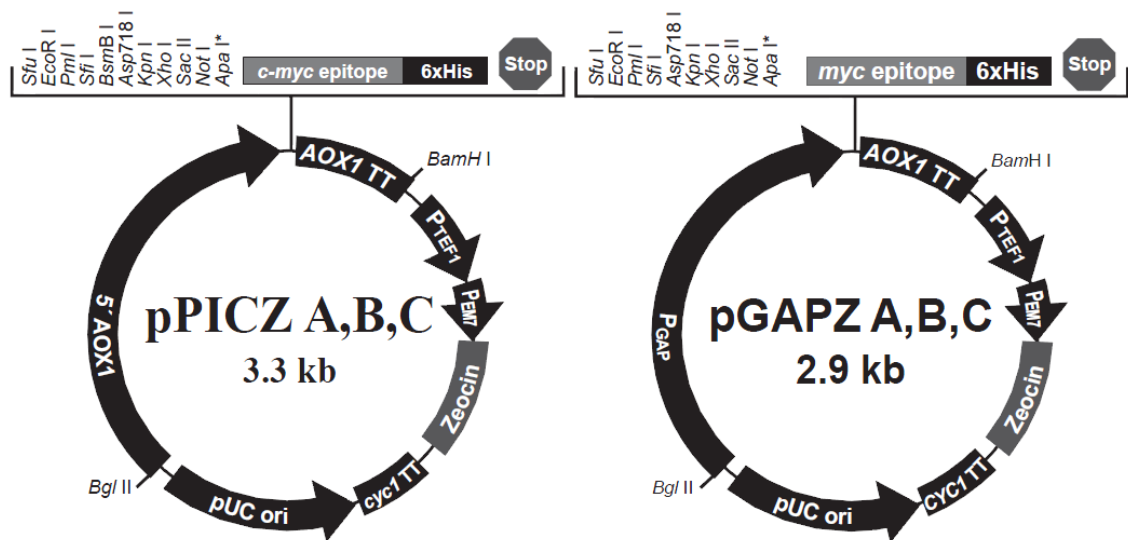
P. pastoriksen etuina muihin tuotto-organismeihin nähden ovat mm. sen korkea tuottotaso, tarkasti säädelty alkoholioksidaasi (AOX1) -promootorin alla toimiva tuottosysteemi ja sen kyky kasvaa suureen solutiheyteen yksinkertaisessa ja edullisessa elatusliuoksessa. Yksinkertainen medium aiheuttaa myös vähemmän ongelmia proteiinipuhdistuksessa. Ekspressoitava geeni liitetään osaksi vektoria, jonka jälkeen kokonaisuus linearisoidaan ja integroidaan suoraan osaksi *P. pastoriksen* genomia. Tämä tuo edun perinteiseen plasmidista tapahtuvaan tuottoon nähden, sillä kohdegeeniä ei voida menettää tytärsolun kuroutuessa irti emosolusta. Nämä seikat tekevät *P. pastoriksesta* erinomaisen tuotto-organismien ajatellen etenkin suuremman mittakaavan tuottoa. (Zhang ym. 2009) Lisäksi *P. pastoris* voi tarjota eukaryoottisolun paremmat mahdollisuudet tuottaa toimivia proteiineja erilaisiin laskostumiseen ja posttranslatatorisiin muokkauksiin liittyvissä ongelmatapauksissa. *Pichia pastoriksen* ja *Saccharomyces cerevisiaen* samankaltaisuuden ansiosta, *S. cerevisiaelle* tehtyä laajaa tutkimustyötä voidaan soveltaa pitkälti myös *Pichiassa*. *S. cerevisiaeen* verrattuna *P. pastoris* ei tavallisesti kuitenkaan yliglykosyloi tuottamia proteiineja ja on siksi mahdollisesti parempi tuottoisäntä. (Invitrogen 2010b)

2.1 *Pichia pastoriksen* kaupalliset vektorit pPICZ ja pGAPZ

Molekyylibiologiassa vektoriksi kutsutaan välinettä, jonka avulla vierasta DNA:ta saadaan vietyä kohdesoluun. Yleisesti käytetyt plasmidivektorit ovat kahden DNA-juosteen muodostamia renkaita, jotka sisältävät ainakin alueen, joka mahdollistaa niiden replikoitumisen itsenäisesti, erillään bakteerin kromosomaalisesta DNA:sta. Lisäksi tyypillinen vektori sisältää geenin heterologisen ekspresion mahdollistavia osia kuten promootorin ja transkription terminaatiotekijän (eukaryoottisoluille) sekä usein seulontaa helpottavan selektio-osan esim. antibiootiresistenssigeenin. (Lodish ym. 2000)

Invitrogen on tuonut markkinoille useita plasmidivektoreita heterologisten proteiinien ilmentämiseen *Pichia pastoriksessa*. Työssä keskitytään niistä kahteen,

pPICZ ja pGAPZ –vektoreihin. pPICZ sisältää indusoitavan promoottorin ja pGAPZ:ssa tuotto on jatkuvatoimista. Kumpaakin vektoria on saatavilla kolmessa eri lukukehyksessä A, B ja C sekä kohdeproteiinin eritykseen liittyvän alfatekijän kanssa että ilman. Vektorien rakenne on esitetty kaaviossa 1.



Kaavio 1. pPICZ A ja pGAPZ A vektorien rakennekartat (Invitrogen 2010c,d).

P. pastoris alkaa tuottaa alkoholioksidaasia kun metanoli on ainoa saatavilla oleva hiililähde. Alkoholioksidaasi hapettaa metanolin formaldehydiksi metaboli- sen kierron ensimmäisessä vaiheessa. Koska solu tuottaa luonnostaan korkeita määriä alkoholioksidaasia, on AOX:n promoottori päätetty eristää käytettä- väksi myös rekombinanttiproteiinien tuottoa varten ja liitetty pPICZ-vektoreihin. Kohdegeenin transkription terminaatiosta hiivasolussa vastaa sekä pPICZ- että pGAPZ-vektoreihin sisällytetty AOX1 geenin terminaatiotekijä AOX1 TT. (Invitrogen 2010b)

Suuremman mittakaavan tuotossa metanoli-indusointi aiheuttaa kuitenkin on- gelmia metanolin varastoinnin ja kuljetuksen suhteen turvallisuudessa ja kus- tannuksissa. Tämän vuoksi alalla on ollut paineita kehittää *P. pastorikselle* uu- sia, hyvätuottoisia promoottoreja. Jatkuvatoimista GAP-geenin promoottoria on käytetty onnistuneesti usean heterologisen proteiinin tuotossa. (Zhang ym. 2009) Monet organismit, mukaan lukien *Pichia pastoris*, tuottavat jatkuvatoimi-

sesti suuria määriä glyseraldehydi-3-fosfaattidehydrogenaasia katalysoimaan glykolyysia. GAP-geenin promoottorin alla on onnistuttu saavuttamaan hiililähteestä riippuen jopa hieman parempia tuottoja kuin AOX1-promoottorin alla. P_{GAP} on liitetty osaksi pGAPZ vektoreita. Jatkuvatoiminen vektori ei kuitenkaan sovellu käyttöön, mikäli tuotettava proteiini on herkkä kasvatusolosuhteille tai suuremmissa pitoisuuksissa toksinen tuottosoluille.

Kumpaankin vektoriin on liitetty Zeocin-selektiomarkkerin vaatimat osat. Tähän sisältyvät itse resistenssigeeni (*Sh ble*) sekä kaksi promoottoria ja terminaatio-tekijä. P_{EM-7} on synteettinen promoottori antibioottiresistanssigeenin ekspresion käynnistämiseen *E. coli*ssa. P_{TEF1} tekee vastaavan hiivasolussa ja geenin transkriptio loppuu CYC1TT:n alueella.

Kummankin vektorin sekvenssiin on sisällytetty kohdeproteiinin C-terminaaliin fuusioituva *myc*-epitoppi, jonka tarkoitus on helpottaa proteiinin detektiota sekä kuuden histidiinin pituinen merkkihäntä, jolla proteiini voidaan haluttaessa puhdistaa. Jotta fuusioituminen olisi mahdollista, ekspressoitavan geenin tulee olla lisäosien kanssa samassa luentakehyksessä. (Invitrogen 2010e; Invitrogen 2010c; Invitrogen 2010d)

3 GOLDEN GATE SHUFFLING (GGS)

Perinteisesti haluttua proteiinia koodaava geeni eristetään ja siirretään vektoriin erilaisten restriktioentsyymien avulla. Tämä yksinkertainen perusajatus on edelleen käyttökelpoinen, mutta sen ongelma on, ettei geenin alkupäätä välttämättä saada täsmällisesti kloonattua vektorissa olevan promoottorin perään. Golden Gate Shuffling -menetelmä mahdollistaa usean työvaiheen samanaikaistamisen ja tekee etenkin moniosaisten geeniyhdistelmien luomisesta huomattavasti helpompaa, koska se perustuu tyyppin IIs restriktioentsyymien toimintaan.

Yleisesti käytetyt tyyppin II restriktioentsyymit leikkaavat DNA:n tunnistuskohtansa sisällä (Kaavio 2). Kun kantajavektorien tunnistuskohtia käytetään geenin irrottamisessa, geeniin jää joskus huomattavankin paljon ylimääräistä sekvenssiä. Etenkin yhdistelmäproteiinien kohdalla ongelmia luovat lisäksi sopivien katkaisukohtien löytyminen jokaisesta osasta, eri restriktioentsyymien erilaiset toimintaolosuhteet (lämpötila, puskuri) sekä useat aikaa vievät työvaiheet. Jos halutaan esimerkiksi siirtää kahden geenin yhdistelmä samaan vektoriin, on tavallista, että kohdegeenit joudutaan ensin katkaisemaan, eristämään (geelelektroforeesilla) ja yhdistämään toisiinsa ennen kuin ne liitetään erikseen käsiteltyyn kohdevektoriin.

Perinteiset entsyymit esim. NotI:



Tyyppin IIS restriktioentsyymit esim. BsaI:

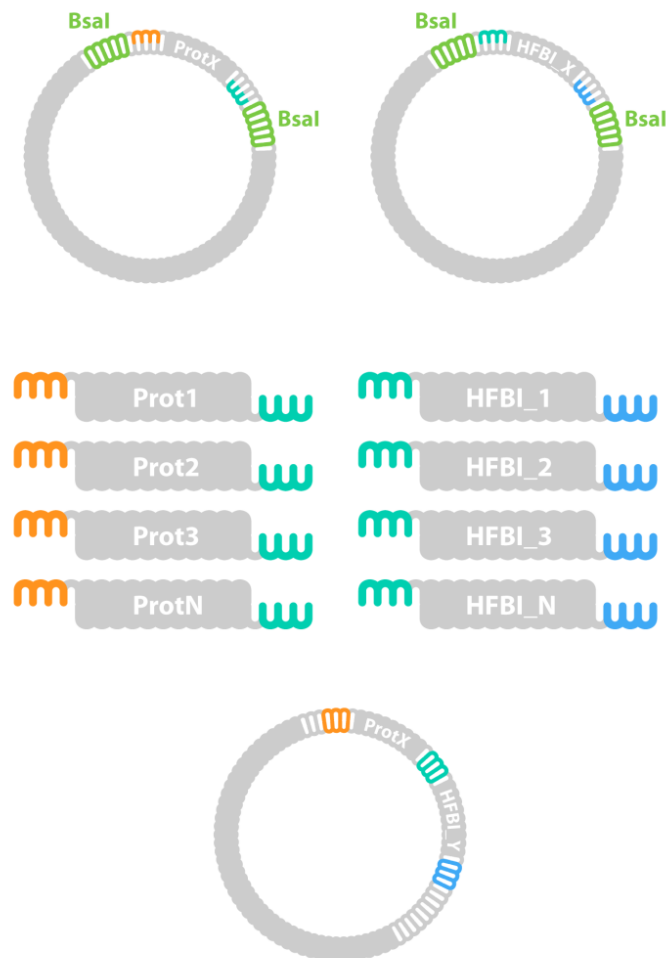


N= mikä tahansa emäs

Kaavio 2. NotI ja BsaI -entsyymien tunnistus ja leikkauskohdat DNA:ssa. Vihreällä merkitty on kyseisen entsyymin tunnistussekvenssi, punainen viiva kuvaa leikkauskohtaa.

Alatyypin IIs entsyymit leikkaavat tietyllä etäisyydellä tunnustuskohtansa ulkopuolella, jolloin juosteeseen jää kyseiselle entsyymille tyypillinen pää. Bsal-entsyymien tapauksessa leikkaus synnyttää neljän emäksen ulkoneman, mikä tarkoittaa että kyseisellä entsyymillä pystytään teoriassa luomaan $256 (4^4)$ erilaista leikkauspäätä (Kaavio 2). Tähän perustuen voidaan valmistaa synteettisesti sekvenssejä, joissa kyseisen entsyymien tunnustuskohta jää leikattaessa siirrettävän osan ulkopuolelle ja kohdegeeniin jää mahdollisimman vähän ylimääräisiä emäksiä. Tämän lisäksi menetelmässä on monia muitakin etuja. Etenkin kun halutaan valmistaa moniosainen kohdeproteiini, voidaan jokainen osa sekä kohdevektori suunnitella siten, että ne voivat leikkauspäidensä erilaisuuden vuoksi tarttua toisiinsa ja vektoriin vain tietyssä järjestyksessä. Samojen kappaleiden liittyminen toisiinsa ja yhdistelmän liittyminen väärinpäin kohdevektoriin on siten mahdotonta. Katkaistu vektori ilman inserttejä ei voi myöskään ligatoitua itsensä kanssa. Yksi merkittävimmistä eduista on myös että restriktio ja ligaatio voidaan suorittaa yhtenä työvaiheena samassa putkessa. Koska restriktio tehdään kussakin osassa samalla entsyymillä, ei synny ongelmaa puskurien yhteensopimattomuudesta. Geenin yhdistyminen uudelleen kantajavektoriinsa on kyllä mahdollista, mutta koska kohdevektori sisältää lisäksi jonkin selektiomarkkerin, esimerkiksi antibioottiresistenssigeenin, väärinyhdistyneillä plasmideilla transformoituneet yksilöt seuloutuvat pois selektiomaljalla. (Engler ym. 2008)

Hydrobody projektissa tuotettava kohdeproteiini fuusioidaan hydrofobiini-proteiinin kanssa. Hydrofobiinit ovat pieniä, alunperin rihmasienistä löydettyjä proteiineja, joita on helppo puhdistaa kaksifaasimenetelmällä perustuen niiden pinta-aktiivisiin ominaisuuksiin. Puhdistusmenetelmä on edullinen ja sovellettavissa suuren mittakaavan proteiinituotolle (Joensuu ym. 2010). Puhdistamisen helpottumisen lisäksi, yhdistäminen hydrofobiinin kanssa voi parantaa isäntä-proteaaseille herkkien kohdeproteiinien stabiliteettia kasvatuksen aikana. (Hydrobody 2011) Projektissa testattavia kohdeproteiineja ja hydrofobiineja on useita, joten shuffling-menetelmän käyttö kloonauksessa nopeuttaisi huomattavasti erilaisten kombinaatioiden rakentamista (kaavio 3).



Kaavio 3. Golden Gate Shuffling-kloonastrategian soveltaminen Hydrobody-projektissa. Kaavio on periaatteellinen, ei mittasuhteessa.

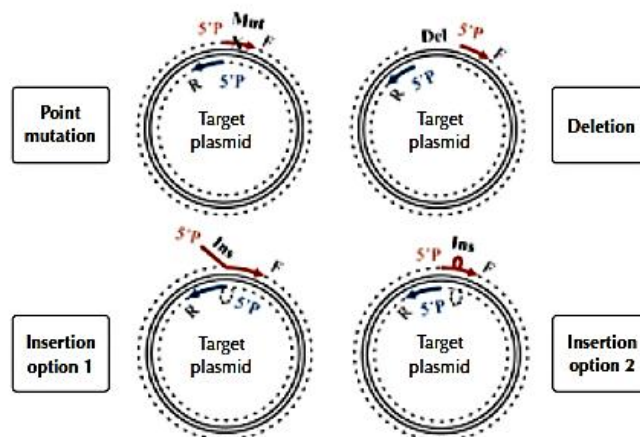
Kantajavektorissa saapuneet geenit irrotetaan ja kohdevektori käsitellään Bsal-entsyymillä, jolloin geeneihin ja kohdevektoriin muodostuu vain tietyllä tavalla toisiinsa sopivat kohessiiviset päät. (Sulkakoski, Antti 2012)

4 PLASMIDIN KOHDENNETTU MUTAGENEESI PCR-MENETELMÄLLÄ

4.1 Menetelmä

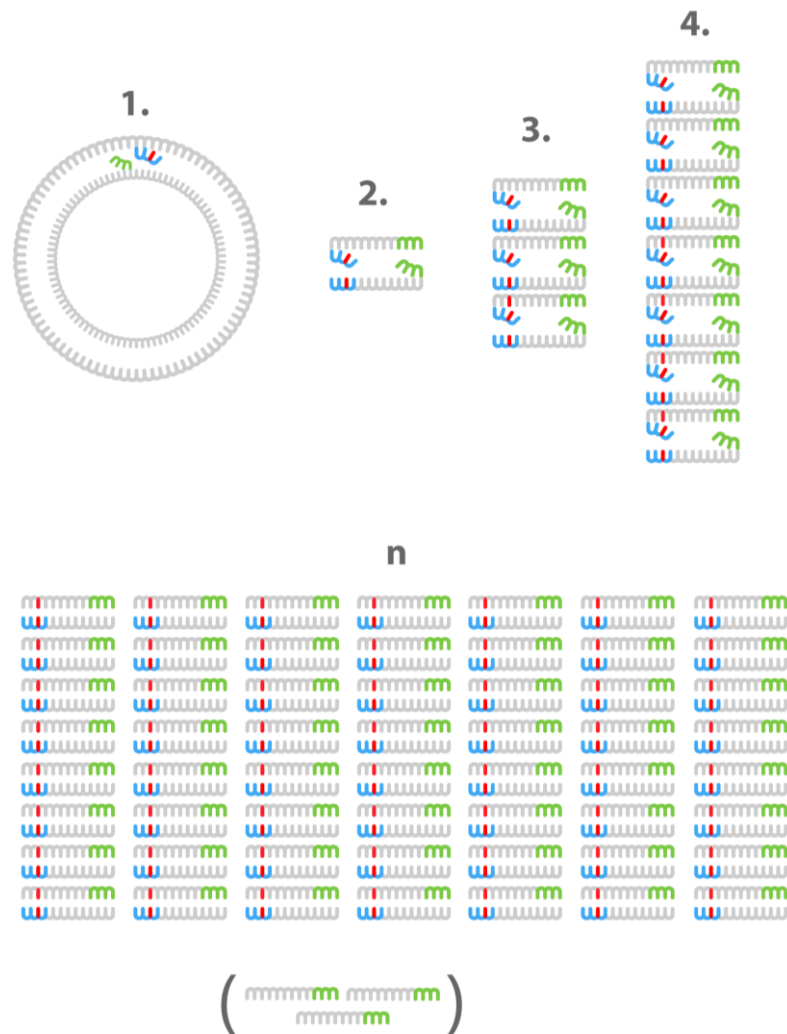
Kohdennettu mutageneesi, jossa DNA:han tehdään tarkoituksellinen muutos haluttuun kohtaan, on rekombinantti-DNA-tekniikan edellytys. Esimerkiksi tavallinen geenin siirto plasmidiin voidaan ajatella kohdennettuna insertiomutageneesinä. Tällaiset DNA:n muokkaukseen tarkoitettavat menetelmät luovat perustan geenitekniikalle.

PCR-menetelmää käytetään tavallisesti tietyn sekvenssin detektointiin tai monistamiseen, mutta se voidaan valjastaa myös DNA:n muokkaukseen. Tekniikka perustuu siihen, ettei alukkeiden tarvitse olla täysin komplementaarisia tarttuakseen templaattijuosteeseen. Alukkeen avulla voidaan esimerkiksi plasmidiin tehdä 1) insertio lisäämällä alukkeen 5' päähän tai keskelle sekvenssi, joka ei ole lainkaan komplementaarinen templaatille, 2) deleetio suunnittelemalla alukkeet siten, että niiden väliin jää haluttu määrä emäksiä tai 3) pistemutaatio, jossa yksi tai useampi emäs muutetaan alukkeen keskellä toiseksi (Kaavio 4). (Dieffenbach ym. 1995) Nykyaikaiset polymeerasientsyymit mahdollistavat hyvin pitkienkin templaattien monistamisen järkevässä ajassa ja vähäisellä virhemäärällä.



Kaavio 4. Erialaisten mutaatioiden tekeminen plasmidiin alukemuokkauksen avulla. (Finnzymes 2009)

Mutaation onnistumiseksi tarvitsee muokata mutaatio vain toiseen alukkeeseen. Alukkeet kiinnittyvät plasmidiin 5'-päät vastakkain, vierekkäisiin emäksiin - toinen ala- ja toinen yläjuosteeseen ja polymeraasientsyymi rakentaa kopiot päinvastaisiin suuntiin täydeksi ympyräksi.



Kaavio 5. Yhden emäksen kohdennettu pistemutaatio PCR:lla. Yksi emäs (punainen) on muutettu FW-alukkeesta (sininen). RE-alue (vihreä) on täysin komplementaarinen alemmalle juosteelle. PCR:n edetessä syntyy kullakin kierroksella yksi mutatoitumaton juoste RE-alukseen kiinnittyessä uudelleen templateen. Vääränlaisten juosteiden määrä on kuitenkin häviävän pieni mutatoituihin verrattuna, kun kierroksia on riittävästi. (Sulkakoski, Antti 2012)

Kaaviossa 5 on esitetty mutaation syntymisen periaate PCR-reaktiossa. Polymeraasientsyymi ei pysty liittämään juosteiden päitä yhteen ja tuotteet ovat siksi

lineaarisia. Alukkeiden tulee lisäksi olla fosforyloituja, jotta ligatoiminen sirkulaariseseen muotoon on myöhemmin mahdollista. (Finnzymes 2009)

4.2 Phusion

Työssä käytettiin 2003 markkinoille tuotua Thermo Scientificin (Finnzymes) Phusion Hot Start II DNA-polymeraasientsyymiä, jolla on mahdollista tuottaa myös pidempiä PCR-tuotteita. Ensyymillä pystytään monistamaan jopa 7 kb:n genomisen ja 20 kb:n λ -DNA:n osia järkevässä ajassa sen korkeamman prosessointikyvyn ansiosta. Lisäksi entsyymien etuina ovat sen kyky toimia hankalissa olosuhteissa sekä alhainen virhetaso. Verrattuna esimerkiksi perinteiseen Taq-polymeraasientsyymiin, Phusion on 52 kertaa tarkempi. Hot start-entsyymiä käytettäessä reaktioseokset on mahdollista valmistaa huonelämpötilassa Affibody®-ligandin ansiosta, joka estää primerien hajoamista ja epäspesifisen ekstension. (Thermo Scientific 2010)

5 STADEN-PAKETTI SEKVENSANALYTIKKAAN

STADEN-paketti on DNA-sekvensien analysointiin kehitetty bioinformatiikkakokonaisuus, joka soveltuu etenkin laajempien sekvensointiprojektien tarpeisiin. Paketti koostuu useammasta sekvenssien käsittelyyn ja analyysiin tarkoitettuista ohjelmista, jotka pystyvät käsittelemään suuria määriä dataa kerralla.

Pregap4-osa käsittelee raakasekvenssiä ja voi analysoida siitä esimerkiksi kontaminaatioita ja sekvenssin laatua. Päätoiminto piilottaa huonolaatuiset osat, ja yhdistää raakasekvenssit yhdeksi tiedostoksi gap4 luettavaan muotoon.

Gap4:llä voidaan koota, viimeistellä ja muokata konsensussekvenssi pre-gap4:lla ajetuista raakasekvenssin paloista. Ohjelmassa on paljon erilaisia toimintoja sekvenssin muokkaukseen ja analysointiin. Työssä käytetty Shotgun Assembly-komento kokoaa raakasekvenssin palat kokonaisuudeksi limittäisyyksien perusteella. Yhdistämiselle voi asettaa useita reunaehtoja.

Kokoamisen jälkeen sekvenssiä voidaan tarkastella sekä tarvittaessa myös muokata. Ohjelma valitsee emäkset lopulliseen konsensussekvenssiin, joka perustuu limittäisten sekvenssien kromatogrammien luotettavuusasteisiin. (Bonfield ym. 2011)

6 KÄYTETYT MENETELMÄT

6.1 Kohdennetut pistemutaatiot

6.1.1 Alukkeiden suunnittelu

Pistemutaatioissa tarvittavat alukkeet suunniteltiin Thermo Scientificin Phusion-mutageneesikitin (F-541) ohjeen reunaehtojen mukaisiksi. Yhden emäksen vaihto tehtiin kussakin forward-alukkeessa oligomeerin keskelle siten, että mutaation kummallekin puolelle jäi 15 emästä. Korvaava emäs valittiin mielivaltaisesti käyttäen kuitenkin joko adeniinia tai tyymiiniä, jotta alukkeen sulamislämpö saataisiin alhaisemmaksi. Reverse-alukkeeksi valittiin 30 emäksen mittainen, yläjuosteelle komplementaarinen osa seläkkäin forward-alukkeeseen nähden. Alukkeiden pituutta säädettiin lisäämällä ja poistamalla emäksiä, kunnes kunkin alukeparin sulamislämmöt olivat riittävän lähellä toisiaan ($\Delta T_m < 3 \text{ }^\circ\text{C}$). Sulamislämmöt laskettiin käyttäen Finnzymesin T_m-laskuria (http://www.finnzymes.fi/tm_determination.html), joka käyttää päälaskumenetelmänään modifioitua Breslauerin menetelmää. Lisäksi tarkastettiin alukeparien silmukoiden ja dimeerien syntymistodennäköisyydet IDT:n OligoAnalyzer-selainohjelmalla (<http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>).

Koska pPICZ ja pGAPZ – vektorit ovat kumpikin Invitrogenin tuotteita ja suunniteltu käytettäväksi *P. pastoriksessa*, ne ovat sekvenssirakenteeltaan hyvin samankaltaisia. Bsal-tunnistuskohtien kohdalta sekvenssit ovat täysin identtiset, joten samoja alukkeita voitiin käyttää kummankin vektorin muokkauksessa.

Kaikki alukkeet (taulukko 1) tilattiin valmiiksi 5'-päistään fosforyloituina, jotta ligaatio voidaan suorittaa suoraan PCR:n jälkeen ilman erillistä fosforylointivaihetta. Alukkeiden puhdistusmenetelmäksi valittiin pelkkä suolanpoisto ja synteesiskaalaksi 50 nmol:a. Alukkeet toimitti GenScript USA Inc.

Taulukko 1. Alukkeet pistemutaatioita varten. Templaatin komplemetaarijuosten Bsal-tunnistuskohdan sekvenssi on GAGACC. Keltaisella merkitty emäs muutettu alukkeeseen tunnistuskohdassa.

Aluke	sekvenssi	pituus (emästä)	sulamis-lämpö (°C)
1 forward	AGA AGA TTA AGT GAA ACC TTC GTT TGT GC	29	68,7
1 reverse	GTA CTC TGA AGA GGA GTG GGA AAT ACC AA	29	68,8
2 forward	G AAA AGA AAA AAA AGA CCG CCT CGT T	26	69,5
2 reverse	CA AAC CTT TAG TAC GGG TAA TTA ACG ACA CC	31	69,5
3 forward	CAA GCT GGA GAT CAA CAT GTG AGC	24	69,3
3 reverse	CAA ATT AAA GCC TTC GAG CGT CC	23	68,6

6.1.2 PCR

PCR-reaktioiden lähtöaineita ja tuotteita käsiteltiin eri tiloissa, laminaarikaapissa ja pipetoinnissa käytettiin suodatinkäriä kontaminaatioiden välttämiseksi. Ensimmäisessä ajossa lähdettiin liikkeelle Phusion-polymeraasientsyymien ohjeiden (F-540S/L) mukaisesti. Työssä käytettiin Technen TouchGene Gradient-PCR laitetta. Epäonnistuneen ajon jälkeen suoritettiin erilaisia testiajoja, joissa kokeiltiin lämpötilan, puskurin ja templaatin määrän vaikutusta tulokseen. Testejä tehtiin osittain samanaikaisesti. Lämpötilatesti ajettiin neljän asteen gradientillä 68–70 °C, ja syklimäärää vaihdeltiin 25–35 välillä poistamalla putkia laitteesta ajon aikana. Templaatin määrää kokeiltiin välillä 10 pg-1 ng (ohjeenmukaiset arvot 72 °C, 25 sykliä ja 10 pg templaattia).

Testien perusteella päädyttiin vaihtamaan ajopuskuri, lisäämään PCR-syklejä sekä nostamaan templaatin määrää huomattavasti ohjeeseen nähden. Edellis-

ten lisäksi toisella mutatointikieroksella jouduttiin nostamaan denaturointivaiheen kestoa kullakin kierroksella. Testikierrosten jälkeen varsinaissa ajoissa tehtiin molemmille plasmideille kaksi 50 µl:n reaktioputkea, jotka yhdistettiin AGE-analyysin jälkeen.

Syklimäärän lisääminen ja GC-puskurin käyttö vaikuttavat teoriassa polymeerasientsyymien tarkkuuteen. Tarkkuuden muutosta arvioitiin Finnzymesin laskurilla (http://www.finnzymes.com/pcr/fidelity_calc.php), jonka mukaan tehdyt muutokset nostivat virheiden määrää kymmenen prosenttiyksikköä. Teoriassa siis joka kymmenes tuotettu plasmidi sisältää yhden virheen tarkoituksellisen pistemutaation lisäksi.

Taulukko 2. PCR-ohjelma

Segmentti	Lämpötila (°C)	Kesto	Syklit
Alkudenaturaatio	98	1 min	1
Denaturaatio	98	10 sek (7 sek 1. kierros)	32
Alukekiinnittyminen ja ekstensio	72	1 min 27 sek	
Loppuekstensio	72	7 min	1

Taulukko 3. PCR-reaktioseoksen komponenttisuhteet

5 x GC-puskuri	10 µl
10 mM dNTP-seos	1 µl (200 µM kutakin nukleotidia)
Alukesekoitus (25 µM FW + 25 µM RE)	1 µl (0,5 µM kumpaakin)
~250 pg/µl templaattilaimennos	1 µl
Phusion-polymeraasientsyymi (2U/µl)	0,5 µl
Steriili vesi	36,5 µl

6.1.3 Ligaatio ja elektroporaatio

PCR-tuote puhdistettiin ajon jälkeen tähän tarkoitettuun kaupallisella kitillä (NucleoSpin Extract II, Machery Nagel) suolamäärän laskemiseksi. Tuotteen pitoisuus ja puhtaus tarkistettiin NanoDrop-laitteella. Tämän jälkeen ligaatio suoritettiin T4-ligaasilla, jonka annettiin vaikuttaa huoneen lämmössä kolme tuntia (taulukko 4). Entsyymi inaktivoitiin pitämällä reaktioseosta 5 minuuttia +70 °C:ssa. Kontrollireaktiossa sama seos ilman T4-ligaasia (kontrolli 1 - osoittaa alkuperäisellä, mutatoitumattomalla templaatilla transformoituneiden yksilöiden määrän) sekä kerran myös ilman DNA:ta, ligaasin puhtauden toteamiseksi (kontrolli 2).

Taulukko 4. PCR-tuotteiden ligaatioseokset

	Ligaatioputki	Kontrolliputki 1	Kontrolliputki 2
10 x Puskuri	2 µl	2 µl	2 µl
Puhdistettu PCR tuote	100–150 ng	100–150 ng	-
t4-ligaasi	1 µl (5 U/µl)	-	1 µl (5 U/µl)
Steriili vesi	täytettiin 20 µl:aan	täytettiin 20 µl:aan	täytettiin 20 µl:aan

Taulukko 5. Elektroporaatioasetukset

Jännite	Resistanssi	Kapasitanssi	Elektroporaatio- kyvetin rakokoko
1,5 kV	200 Ω	25 µF	1 mm (<i>E.coli</i>), 2 mm (<i>P.pastoris</i>)

Vektorit siirrettiin elektrokompetentteihin *Escherichia coli* (XL1)–soluihin (liite 1) (suhde 1 µl:50 µl, DNA:solut) BioRad:n Gene Pulser II –laitteella. Sähköshokin jälkeen lisättiin välittömästi 1 ml SOC-mediumia (liite 2), jonka jälkeen solujen annettiin toipua noin tunnin ajan +37 °C :ssa ilman sekoitusta ennen siirrostusta maljoille. Maljoille siirrettiin 50 µl solususpensiosta. Transformoituja soluja kasvatettiin yön yli +37 °C:ssa LSLB-Zeocin-selektiomaljoilla (liite 2).

6.1.4 Mutaatioiden varmentaminen

Transformaatiomaljalta otettiin yksittäisiä pesäkkeitä plasmidikasvatuksia ja puhdasviljelmiä varten. Plasmidikasvatukset suoritettiin 5 ml:ssa LSLB+Zeocin-mediumia (liite 2) ravisteluinkubaattorissa (+37 °C/250 rpm). Mutaation onnistuneisuutta arvioitiin digestoimalla puhdistettuja plasmideja Bsal-entsyymillä. Sopivat yksilöt valittiin tämän jälkeen työn seuraavaa vaihetta, puhdasviljelmää ja pakkassäilytystä varten.

6.2 Monikloonauskohdan muokkaus

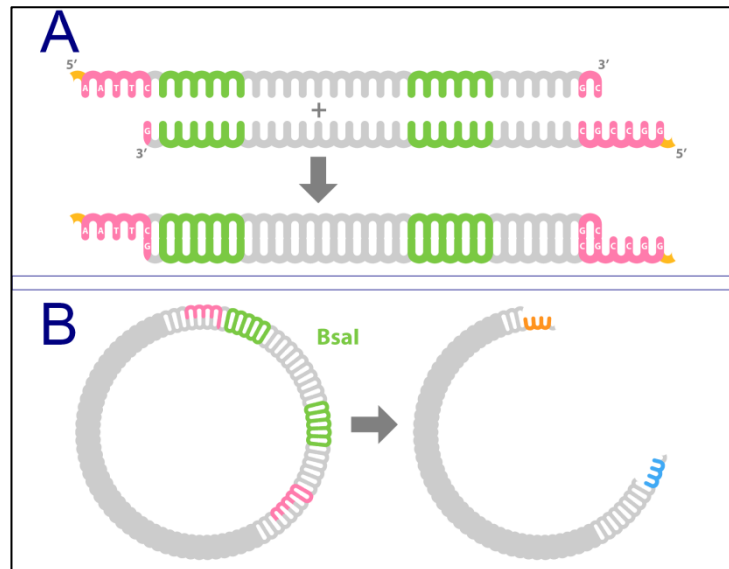
Monikloonauskohdan muokkaus olisi voitu suorittaa jatkona pistemutaatioille, esimerkiksi kohdennettuna insertiomutaationa PCR:llä. Työtä päädyttiin kuitenkin jatkamaan valmistamalla dimeeri kahdesta oligomeeristä ja liittämällä se monikloonausalueelle, sillä menetelmä on teoriassa nopea ja edullinen. Tilatut oligomeerit suunniteltiin toisilleen komplementaariseksi siten, että ne asettuvat pariutuessaan hieman limittäin. Dimeerin kohessiiviset päät ovat tällöin samantyyppiset kuin leikattaessa EcoRI ja NotI-entsyymeillä. Lisäksi oligomeerit tilattiin siten, että niiden 5'-pää oli fosforyloitu ligaatiotehokkuuden parantamiseksi.

6.2.1 Dimeerin rakenne ja dimerisointi

Dimeerin sekvenssiin suunniteltiin kaksi Bsal-tunnistuskohtaa siten, että tunniskohdat leikkautuvat pois, kun vektori käsitellään Bsal-entsyymillä (kaavio 6). Bsal-entsyymien leikkauskohtien väliin jätettiin 10 sattumanvaraista emästä, vaikka restriktioentsyymien kiinnittymiseen riittäisi suosituksen mukaan jo 5 emäsparia (Isabel Molina, Fermentuksen tekninen tuki, sähköposti, 5.6.2012). Dimeerin liittämiseen käytettävien EcoRI:n ja NotI:n leikkauskohdat säilytettiin lopullisessa sekvenssissä, jotta insertti voidaan tarvittaessa poistaa näillä entsyymeillä. Oligomeerien sekvenssit on esitettyinä taulukossa 6. Oligomeerit toimitti Oligomer Oy (Helsinki, Suomi).

Taulukko 6. Oligomeerien sekvenssit

Dimeerin (oligo1) 5'→3'	yläjuoste	AATTCGAGACCATATCTAACAGGTCTCCGGCCGC
Dimeerin (oligo2) 3'→5'	alajuoste	GCTCTGGTATAGATTGTCCAGAGGCCGGCGCCGG



Kaavio 6. A: Oligomeerien liittyminen dimeeriksi. Keltainen osa kuvaa synteettisesti lisättyä 5'-fosfaattia. B: Kun dimeeri on liitetty osaksi vektoria, Bsal:n tunnistuskohdat leikkautuvat irti entsyymikäsittelyssä (Sulkakoski, Antti 2012).

Oligomeerit yhdistettiin dimeeriksi TouchGene Gradient- laitteella T4- lugaasin puskurissa (taulukot 7 ja 8).

Taulukko 7. Dimeerisaatioseos

Oligo 1 ja 2	1,5 µl (10 pmol/µl) kumpaakin
Steriili vesi	37 µl
10 x Pushuri	10 µl

Taulukko 8. Dimerisaatio-ohjelma

Vaihe	Lämpötila	Kesto
Sekudäärirakenteiden hajotus	95 °C	5 min
Dimerisaatio	$\Delta - 0,02 \text{ °C /s}$	1 h (lopussa huoneenlämmössä)

6.2.2 Vektorien pPICZ S ja pGAPZ S muodostus

Kolmesti mutatoituidut plasmidit (pPICZ mutIII ja pGAPZ mutIII) katkaistiin EcoRI ja NotI restriktioentsyymeillä pitämällä seosta +37 °C:ssa noin kaksi tuntia. Entsyymit inaktivoitiin pitämällä seosta +65 °C:ssa lämpöblokissa 20 minuuttia. Reaktioseokset ajettiin agarosegeelille, josta katkenneet plasmidit eristettiin NucleoSpin Extract II –kitillä geelieristysprotokollan mukaan. Katkaistut vektorit yhdistettiin muodostetun dimeerin kanssa ligaasientsyymillä (taulukko 9).

Taulukko 9. Dimeeri-vektori-seos

Katkaistu plasmidi (pPICZ mutIII/pGAPZ mutIII)	100-150 ng
Dimeeriseos (taulukko 7)	2 µl
Ligaasipuskuri	2 µl
T4-ligaasi	1 µl(5U/µl)
Steriili vesi	Täytettiin 20 µl:aan

Elektroporaatio tehtiin XL1-soluihin kuten edellä (taulukko 5). DNA:n ja suolan yhteisvaikutus aiheutti 1 µl:n ligaatioseosmäärällä ongelmia, joten sen määrä laskettiin pPICZ:n osalta 0,7 µl:aan ja pGAPZ: osalta 0,5 µl:aan 50 µl:a soluja kohti. Kontrollina käytettiin katkaistun pPICZ mutIII ja dimeerin seosta, jota ei ollut käsitelty ligaasientsyymillä. Seulontaa varten valittiin kummankin vektorin osalta kolme pesäkettä. Tämän lisäksi yksittäinen kontrollimaljalle muodostunut pesäke otettiin tarkasteluun. Kukin plasmidi katkaistiin BsaI-entsyymillä (+37 °C/2 h), jonka jälkeen suoritettiin agarosegeelelektroforeesi ja geelin kuvaus UV-valossa. Valituista klooneista tehtiin sekä plasmidieristykset (Nucleobond

Xtra Midi, MN) että glyserolistokit kantojen säilytystä varten. Vektoreiden nimiin liitettiin S-kirjain Shuffle-sanasta, jotta ne erotettaisiin alkuperäisistä, muokkaamattomista vektoreista.

6.3 Sekvensointi ja datan käsittely

Mutatoitujen vektorien sekvenssit tarkistettiin vielä lähettämällä ne sekvensoitaviksi GATC Biotech:lle Saksaan. Sekvensointia varten tilattiin Oligomer Oy:lta alukkeet, jotka suunniteltiin toimimaan kummallekin vektorille ja LIGHTrun -ohjeiden mukaisiksi (n. 17 emästä, T_m 55 ± 3 °C). Alukkeet suunniteltiin noin 500 emäksen päähän toisistaan (LIGHTrun lukupituus noin 1000 emästä), jotta saataisiin riittävästi limittäisyyttä sekvenssin varmistamiseen. Tällöin pPICZ S:sta tehdään 6 sekvensointiajtoa (3,3 kb) ja pGAPZ S:sta 5 sekvensointiajtoa (2,9 kb). 1,5 ml:n eppendorffputkiin laitettiin ohjeistuksen mukaisesti 10 µl:n näyte, jossa oli 80–100 ng puhdistettua templaattiplasmidia ja 5µM:n primerpitoisuus.

Saadut tulokset käsiteltiin STADEN-paketin Pregap4 ja Gap4 -moduuleilla. Yhdenäinen sekvenssi koottiin osista Gap4-moduulin shotgun assembly-komennolla ja muokattiin vertaamalla limittäin olevien raakasekvenssien kromatogrammeja. Koska ohjelma ei ymmärrä DNA:n olevan sirkulaarista, alkupään ja loppupään raakasekvenssit yhdistettiin kerran erikseen, jotta vertailu pystyttäisiin suorittamaan. Lopullisia sekvenssejä muokattiin tekstinkäsittelyohjelmalla ja järjestettiin ”alkamaan” promoottorien pGAP ja pAOX1 alueiden ensimmäisestä emäksestä, kuten alkuperäisten plasmidien ilmoitetut sekvenssit (Invitrogen).

’Odotussekvenssi’ luotiin tekstinkäsittelyohjelmalla tekemällä Invitrogenin ilmoitamiin pPICZ A:n ja pGAPZ A:n sekvensseihin työssä tehdyt muutokset eli BsaI:n tunnistuskohtien poisto ja valmistetun palan sekvenssin liittäminen monikloonauskohtaan. Tämä odotussekvenssi ja STADEN-ohjelmistolla luodut, muokatut todelliset sekvenssit ajettiin Align Sequences Nucleotide BLAST –selainohjelmalla (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) mahdollisten mutaatioiden havainnoimiseksi Jokainen mutaatiokohta tarkistettiin vielä gap4:ssa kromatogrammeista.

6.4 Golden gate shuffling –kokeilu

6.4.1 Kloonaus

Käytännön työn loppupuolella testattiin shuffling-kloonausmenetelmää aikaansaaduilla sPICZ S- ja pGAPZ S-vektoreilla sekä proteiinin ekspressiota *P. pastoriksessa*. Proteiiniksi valittiin aiemmin preojektille tilattu, kodonikäytöltään hii-vatuottoon optimoitu vihreää fluoresoiva proteiini (EGFPy) sen detektointihelp-pouden tähden. Hydrofobiiniksi valittiin HFB1_2, jonka sekvenssi ohjaa proteii-nin kulkeutumaan ER:lle ja jäämään solun sisään. EGFPy ja HFB1_2 oli tilattu aikaisemmin Hydrobody-projektille. Kummankin geenin sekvenssiin on koodat-tuna BsaI:n tunnustusalueet siten, että ne leikkautuvat pois entsyymikäsittelyssä. Leikattujen palojen päät ovat yhteensopivat siten, että ne voivat järjestäytyä vektorin kanssa vain yhdellä tavalla.

Työssä mukailtiin Golden Gate -menetelmää (Engler ym. 2008). Artikkelin me-netelmistä valittiin siinä parhaiten onnistunut kuuden tunnin lämpötilavuorotte-luohjelma, joka perustuu T4-ligaasin ja BsaI-entsyymin optimilämpötiloihin. Re-aktio ajettiin TouchGene Gradient laitteessa 2 min +37 °C:ssa ja 5 min +16 °C:ssa yhteensä 45 sykliä. Rinnalle tehtiin myös kontrollit kummallekin vektoril-le ilman ligaasia. Reaktioseoksista otettiin pieni määrä AGE-tarkasteluun.

Taulukko 10. Shuffling-reaktioseos

Steriili vesi	9,5 µl
Green-puskuri (Fermentas)	2 µl
Bsa I (Fermentas)	1 µl
T4-ligaasi (Fermentas)	3 µl/ 0 µl kontrollissa
pUC57 + HFBI_2	1,5 µl (~70 ng/µl)
pUC57 + EGFPy	1,5 µl (~70 ng/µl)
pPICZ S/ pGAPZ S	1,5 µl (~70 ng/µl)
Steriili vesi	9,5 µl/ 12,5 µl kontrollissa

Shuffling-tuotteet siirrettiin kompetentteihin *E.coli*-soluihin (liite1). Transformaatiomaljoilta siirrettiin kummastakin kannasta (pPICZ S + EGFPy + HFBI_2 ja pGAPZ S + EGFPy + HFBI_2 XL1:ssa) 12 pesäkettä uusille maljoille puhtasviljelmiksi. Näistä kahdestatoista valittiin kummastakin kannasta kolme alustavia seulontakasvatuksia varten. Plasmidit eristettiin NucleoSpin Plasmid-kitillä, katkaistiin EcoRI- ja NotI- sekä SacI- (pPICZ) ja BspHI (pGAPZ) -entsyymeillä ja seulottiin agarosigeelielektroforeesilla.

6.4.2 *Pichian* transformointi

Seulonnan jälkeen valituista klooneista tehtiin 150 ml:n kasvatukset, joista tehtiin plasmidieristykset NucleoBond Xtra Midi-kitillä (Machery Nagel). pPICZ S + EGFPy + HFBI_2 linearisoitiin SacI entsyymillä (Fermentas) ja pGAPZ S + EGFPy + HFBI_2 BspHI-entsyymillä (NEB). Linearisointi suoritetaan, jotta DNA siirtyy suoraan *Pichian* genomiin elektroporaatiossa. Entsyymit inaktivoitiin lämpöblokissa (+65 °C/20 min SacI ja +80 °C/20 min BspHI). Linearisoidut DNA:t puhdistettiin NucleoSpin Extract II-kitillä.

Elektroporaatiossa käytettiin samoja asetuksia kuin XL1-soluilla (taulukko 5). 2mm:n kyvetissä sekoitettiin noin 6 mg linearisoitua DNA:ta ja 80 µl elektrokompetenteja *P. pastoris* (X-33) soluja (liite1). Kontrollireaktiossa käytettiin vettä DNA:n sijasta. Sähköshokin jälkeen kyvetteihin lisättiin välittömästi 1 ml 1 M steriiliä D-sorbitolia ja solujen annettiin toipua +30 °C:ssa noin puolitoista tuntia. YPDS + Zeocin maljoille (liite 2) siirrostettiin 100 µl:a ja 50 µl:a jokaista elektroporaatioseosta, jonka jälkeen maljoja pidettiin +30 °C:ssa noin 3 vrk:n ajan.

6.4.3 Tuottokasvatukset

Pichia-transformaatiomaljoilta valittiin sattumanvaraisesti kaksi pesäkettä kummastakin kannasta, joista tehtiin testikasvatukset ja puhtasviljelmät uusille maljoille. pPICZ S + EGFPy + HFB1_2 X-33 siirrostettiin kahteen 100 ml:n erlenmeyeriin 25 ml:aan BMGY-mediumia ja pGAPZ S + EGFPy + HFB1_2 X-

33:ssa vastaavasti kahteen 25 ml:n erään YPD mediumia (liite 2). Kasvatus suoritettiin rotaatioinkubaattorissa +27 °C:ssa 250 rpm:n sekoituksella. Metanoli-indusoitava kanta indusoitiin siirtämällä solumassa BMMY-mediumiin sentrifugoinnin (5000g/5 min) kautta noin 48 tunnin esikasvatuksen jälkeen. Metanoli-indusointia jatkettiin lisäämällä mediumiin 125 µl 100 % metanolia päivittäin. Noin 96 tunnin kuluttua kasvatusten aloittamisesta mitattiin ensimmäisen kerran sameus (OD_{600}) ja otettiin 1,5 ml:n näytteet, joista erotettiin solupelletti ja supernatantti solumassan punnitusta ja fluoresenssimittauksia varten. Näyteitä otettiin yhteensä neljä: 96 h, 168h, 192 h ja 216 h esikasvatuksen aloitushetkestä, joista viimeisellä kerralla myös lopetettiin kasvatukset. Tällöin pPICZ S + EGF-Py + HFB1_2 X-33:ssa kasvatusten indusointi oli ollut käynnissä 168 h.

6.4.4 Näytteiden käsittely ja analysointi

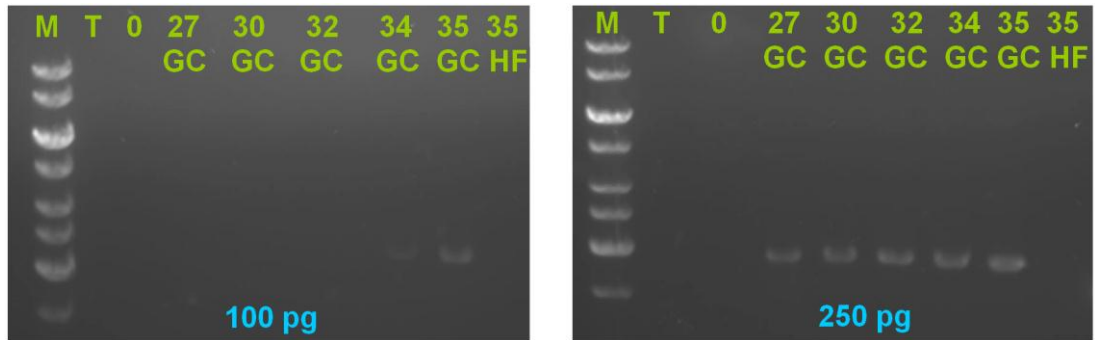
Kasvatusten aikana kerättyjä näytteitä tarkasteltiin ensin silmämääräisesti Dark Reader valotasolla (Clare Chemical Research), jonka jälkeen pelletit hajotettiin 250 µl:lla YPER-reagenssia (Thermo Sci.). Tämän jälkeen 100 µl näytteet pellettien lyaateista ja kasvatusmediumeista siirrettiin 96-kuoppalevyille ja mitattiin Victor-monileimalukijalla (perkin Elmer) aallonpituuksilla 485 nm/535 nm, yhden sekunnin mittausajalla. Vertailua varten ajettiin kaksi näytettä vanhoista, muun kuin EGFP:n tuottokannoista peräisin olevista solulysaateista. Taustasignaali mitattiin käyttämättömistä YPD- ja BMMY-mediumeista sekä YPER:sta.

7 TULOKSET JA TARKASTELU

7.1 Vektorien muokkaukset

PCR:n kohdalla tarkoitus oli tuottaa riittävä määrä tuotetta työn jatkamiseen, ei niinkään opimoida reaktiota maksimaaliselle tuotolle. Siksi testejä jatkettiin vain kunnes voitiin olla varmoja reaktion toimivuudesta (tuote havaittavissa aga-roosigeelijaossa). Koska tuotetta ei syntynyt aluksi lainkaan (havaittavaa määrää), oli syytä vaikeampi löytää, joten lämpötila-, puskuri-, syklimäärä- ja templaattipitoisuustestejä jouduttiin ajamaan useampia. Yllättävää oli, että lämpötilalla ja syklimäärällä (tietyn pisteen jälkeen) ei tuntunut olevan saannon kannalta odotetun kaltaista merkittävyyttä. Testit veivät osittain paljon aikaa myös siksi, että reaktio ei tuntunut toimivan samoillakaan asetuksilla täysin samalla tavalla jokaisella kerralla. Tämän vuoksi epäiltiin polymeraasientsyymien toimivuutta ja ostettiin tilalle uusi. Ongelmat ovat voineet johtua myös esimerkiksi pipetointivirheestä, sillä entsyymien säilytysliuos on erittäin viskoosia. Ohjearvojen toimimattomuus johtui luultavasti kuitenkin hankalasta ja pitkästä templaatista. Pidemmille templaateille on muun muassa NEB:n sivuilla suositeltu suoraan GC-puskuriin siirtymistä.

Suurimmassa osassa PCR-testeistä ajetuista AGE:ista geelit olivat täysin tyhjiä tai niissä näkyi DNA-nauhoja vain hyvin himmeästi. Tästä syystä suurimpaa osaa kuvista ei ole mielekästä esittää tässä työssä. Kun toimiva reaktioseos löydettiin, siitä tehtiin vielä lopullinen koesarja, jossa vaihdeltiin templaatin ja PCR-sykliden määrää (kuva1).



Kuva 1. pGAPZ A:n ensimmäinen PCR-mutatointi: yhdistetty sykli-, templaattimäärä- ja puskuritestit.

M: 1 kb DNA Ladder, Fermentas, T: Templaatti 100 pg, 0: PCR kontrolli ilman templaatti DNA:ta, 27/GC: 27 sykliä, GC-puskuri, 30/GC: 30 sykliä, GC-puskuri, 32/GC: 32 sykliä GC-puskuri, 34/GC: 34 sykliä, GC-puskuri, 35/GC: 35 sykliä, GC-puskuri, 35/HF: 35 sykliä, HF-puskuri

Toisella kierroksella tehty denaturaatiovaiheen pidennys perustui epäonnistuneeseen ajoon, jossa yhdessä putkessa oli 25 µl:n reaktiutilavuus (50 µl muissa putkissa). Koska reaktio oli onnistunut vain pienemmässä tilavuudessa, eikä muista putkista saatu lainkaan näkyvää saantoa oletettiin,

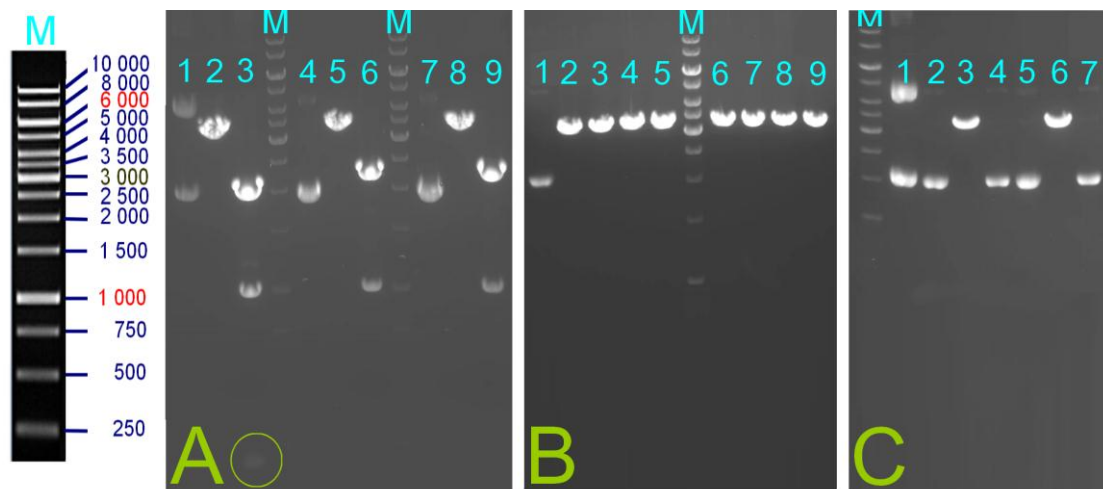


Kuva 2. PCR: denaturaatiovaiheen keston ja reaktiutilavuuden vaikutus reaktion onnistumiseen.

- | | |
|-------------------------------------|----------------------------------|
| 1) Templaatti pGAPZ mut I 250 pg, | 5) 1 kb Markkeri (Fermentas), |
| 2) PCR-kontrolli ilman templaattia, | 6) Templaatti pPICZ mut I 250 pg |
| 3) pGAPZ mut II V=25 µl, | 7) pPICZ mut II V= 25 µl, |
| 4) pGAPZ mut II V=50 µl, | 8) pPICZ mut II V= 50 µl. |

ettei lämpötila ehdi vaihtua putkissa kyllin nopeasti. Seuraavassa ajossa denaturaatiovaihetta pidennettiin kolmella sekunnilla jokaisessa syklissä. Tämän lisäksi samassa ajossa kokeiltiin vielä kahta tilavuutta rinnakkain, mutta sillä ei ollut enää vaikutusta saantoon (kuva 2).

Transformaatiot ja näin ollen myös ligaatiot onnistuivat hyvin. Tunnistuskohtien mutaatioiden onnistuminen varmistettiin työn välivaiheissa Bsal-restriktioanalyysillä. Seulontoihin valitut vektorit katkesivat samalla tavalla.



Kuva 3. pPICZ A mutatointikierrokset 1, 2 ja 3.

A: Mutatointikierrös 1. M: 1 kb DNA Ladder, Fermentas, vasemmalla markkerin nauhakoot. A1: katkaisematon pPICZ A, A2: pPICZ A/ NotI, A3: pPICZ A/Bsal (huomaa vihreällä merkityssä ympyrässä plasmidin kolmas osa, A4: Katkaisematon pPICZ mutI (I), A5: pPICZ mutI (I)/NotI, A6: pPICZ mut I (I)/Bsal, A7: Katkaisematon pPICZ mutI (II), A8: pPICZ mutI (II)/NotI, A9: pPICZ mut I (II)/Bsal

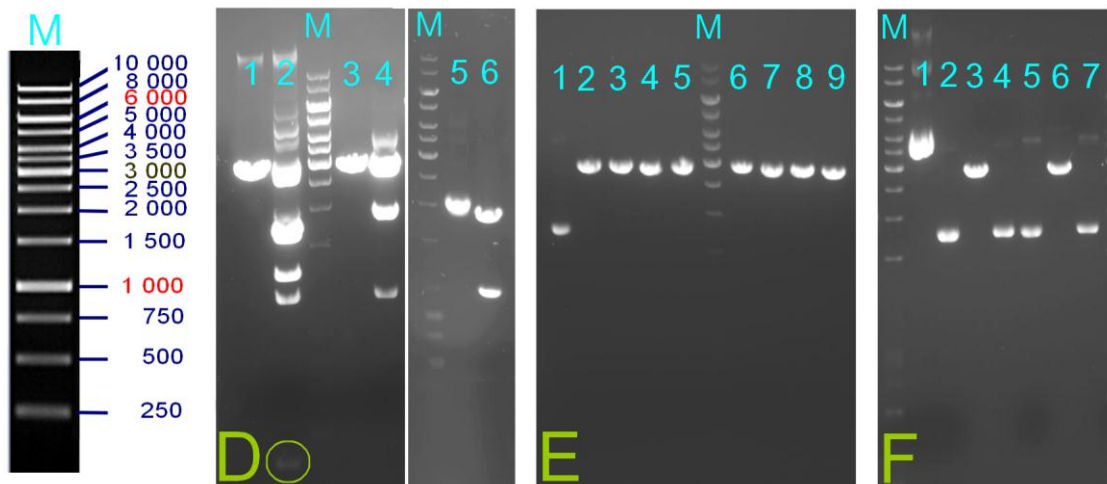
Mutatoidut plasmidit ovat leikkautuneet kahteen hieman yli 2k:bn ja 1k:n osaan.

B: Mutatointikierrös 2. B1: Katkaisematon pPICZ mutII (I), B2: pPICZ mutII (I)/NotI, B3: pPICZ mut II (I)/Bsal, B4: pPICZ mutII (II)/NotI, B5: pPICZ mut II (II)/Bsal, B6: pPICZ mutII (III)/NotI, B7: pPICZ mut II (III)/Bsal, B8: pPICZ mutII (IV)/NotI, B9: pPICZ mut II (IV)/Bsal.

Mutatoidut plasmidit ovat leikkautuneet kerran

C: Mutatointikierrös 3. C1: Katkaisematon pPICZ A, C2: Katkaisematon pPICZ mutIII (I), C3: pPICZ mutIII (I)/NotI, C4: pPICZ mut II (I)/Bsal, C5: Katkaisematon pPICZ mutIII (II), C6:pPICZ mutIII (II)/NotI, C7: pPICZ mut III (II)/Bsal

Mutatoidut plasmidit eivät leikkaudu lainkaan.



Kuva 4. pGAPZ A:n mutatointikierrokset 1,2 ja 3.

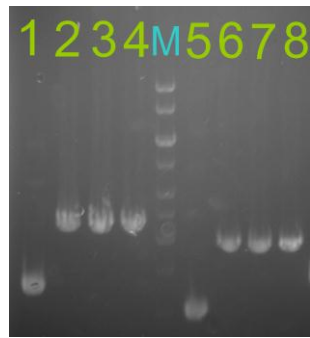
M: 1 kb DNA Ladder, Fermentas, vasemmalla markkerin nauhakoot. D: mutatointikierros 1. D1: pGAPZ A/ NotI, D2: pGAPZ A/Bsal (huomaa vihreällä merkityssä ympyrässä plasmidin kolmas osa) D3: pGAPZ mutI(I)/NotI D4: pGAPZ mutI (I)/Bsal. Ylimääräiset nauhat geelillä johtuvat DNA:n suuresta määrästä: kaikki ei ole katkennut. Uudellenajetut D5: Katkaisematon pGAPZ mut I (I) D6: pGAPZ mut I (I)/Bsal.

E: mutatointikierros 2. E1: Katkaisematon pGAPZ mutII (I) E2: pGAPZ mutII (I)/NotI, E3: pGAPZ mut II (I)/Bsal, E4: pGAPZ mutII (II)/NotI, E5: pGAPZ mut II (II)/Bsal, E6: pGAPZ mutII (III)/NotI, E7: pGAPZ mut II (III)/Bsal E8: pGAPZ mutII (IV)/NotI, B9: pGAPZ mut II (IV)/Bsal.

F: Mutatointikierros 3. F1: Katkaisematon pGAPZ A, F2: Katkaisematon pGAPZ mutIII (I) F3: pGAPZ mutIII (I)/NotI, F4: pGAPZ mut III (I)/Bsal, F5: Katkaisematon pGAPZ mutIII (II) F6:pGAPZ mutIII (II)/NotI F7: pGAPZ mut III (II)/Bsal.

Ensimmäisen mutaation lisäämisen jälkeen Bsal:n tunniruskohtia jää kaksi, jolloin vektorien tulee leikkautua kahteen osaan, toisen mutaation jälkeen vektorit leikkautuvat kerran ja kolmannella kerralla eivät enää ollenkaan (kuvat 3 ja 4). Kuvatekstissä entsyymileikkaus on merkitty kauttaviivan avulla. Suluissa oleva roomalainen numero on pesäkkeen seulontanumero.

Dimeerin valmistaminen ja liittäminen vektoreihin onnistui ensimmäisellä yrittämällä. Dimeeri on itsessään vain alle 30 emäksen mittainen, joten sitä ei voi havaita AGE-ajoista otetuista kuvista. Tässä vaiheessa dimeerin ja vektorin liigaation onnistumista arvioitiin vain varmistamalla, että se leikkautuu Bsal-entsyymillä (kuva 5).

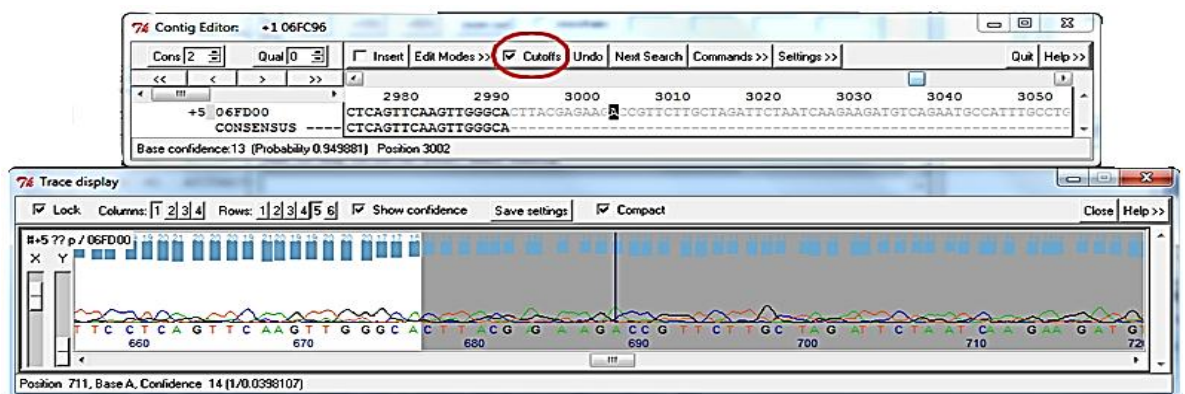


Kuva 5. pPICZ S ja pGAPZ S entsyymidigestoinnit MCS:n muokkauksen jälkeen.

1: pPICZ S (I)/ katkaisematon, 2: pPICZ S (I)/Bsal 3: pPICZ S (II)/Bsal, 4: pPICZ S (III)/Bsal, M: marker 1 kb, 5: pGAPZ S(I)/katkaisematon 6: pGAPZ S(I)/Bsal, 7: pGAPZ S(II)/Bsal, 8: pGAPZ S(III)/Bsal.

7.2 Sekvenssi ja mutaatiot

Konseksusussekvenssin rakentaminen gap4:lla oli suurimmaksi osaksi yksinkertaista, koska sekvenssi oli hyvänlaatuista. pGAPZ S:n ensimmäisen palan sekvensointi jouduttiin kuitenkin tekemään kahdesti ensimmäisen sekvenssointiajon epäonnistumisen takia. Toisellakin kerralla sekvenssin hyvänlaatuinen osa sisälsi vain noin 500 emästä (normaalisti noin 800-1000 emästä) ja pregap4 piilotti loput emäksistä. Sekvenssiä muokattiin avaamalla huonolaatuisen osan tuloskromatogrammi ja ottamalla mukaan noin 30 sekvenssien välistä puuttuvaa emästä piilotetusta sekvenssistä (kuva 6).



Kuva 6. Emästen lukeminen huonolaatuisesta sekvenssistä gap4:ssa. Kun Cutoffs-ruutu (punaisella ympyröity) on valittuna, päästään tarkastelemaan pregap4:n maskeeraamaa sekvenssiä.

Ensimmäinen kohdennettu pistemutaatio osuu vektoreissa (1382 pPICZ S ja 933 pGAPZ S) AOX1 TT-alueelle, toinen mutaatio TEF1-promootorin alueelle (1579 pPICZS S ja 933 pGAPZS) ja kolmas CYC1 TT alueelle (2581 pPICZ S ja 1130 pGAPZ S). Eukaryoottisolujen transkriptiotekijöiden toiminta on vielä osittain hämärän peitossa ja mutaatioiden vaikutusta terminaatio- ja promootio-alueilla on vaikea ennustaa. Hyvällä tuurilla mutaatiot osuvat sekvenssissä kohtiin, joilla ei ole merkitystä transkription kulkuun. TEF1-promootorin kohdalla näin on oletettavasti käynyt, sillä Zeocin-resistenssi toimii myös *E. coli*ssa normaalisti.

Sekvenssi tarkistettiin myös muiden mutaatioiden varalta vertaamalla gap4:lla saatua todellista sekvenssiä tekstinkäsittelyohjelmalla muokattuun, Invitrogenin sivuilta saatuun sekvenssiin. Sekvenssien vertailut ovat liitteinä (liite 3 ja 4) ja niissä ylimääräiset mutaatiot on merkitty sinisellä ja kohdennetut pistemutaatiot keltaisella. Ylimääräisten mutaatioiden sijainti, tyyppi ja mahdolliset vaikutukset ovat vielä erikseen taulukoituna liitteessä 5.

On hyvin epätodennäköistä, että pistemutaatiot olisivat tapahtuneet molemmissa plasmideissa juuri samaan kohtaan samoilla alueilla, joten voidaan olettaa, ettei tähdellä merkityissä kohdissa todellisuudessa ole mutaatiota, vaan että Invitrogenin sivuillaan ilmoittama sekvenssi ei edusta plasmidivektorien todellista sekvenssiä. Näin ollen kohdennettujen mutaatioiden lisäksi pPICZ S sisältää yhden ja pGAPZ S kaksi mutaatiota.

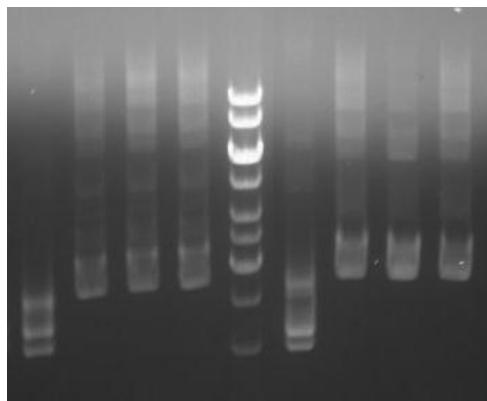
pPICZ S:n mutaatioissa polyhistidiinimerkin neljäs histidiini on vaihtunut asparagiiniksi. Näin ollen häntä ei luultavasti ole riittävän pitkä merkkiin perustuvaa puhdistusta ajatellen. pGAPZ S:n ensimmäinen mutaatio osuu niin ikään merkkihäntään. *myc*-epitootin glutamiini vaihtuu lysiiniksi eikä merkkiä siten voitaisi käyttää fuusioproteiinin detektoinnissa. Tällä ei ole kuitenkaan kyseisen projektin kannalta merkitystä, sillä projektin käyttämiin insertteihin on suunnitteluvaiheessa sisällytetty käytettävät merkkihännät, mikäli niitä tarvitaan, eikä vektoreissa olevia puhdistus-/detektiohäntiä ole tarkoitus fuusioida tuotteisiin.

pGAPZ S:n MCS:n mutaatio vaikuttaa usean ensyymien leikkauskohtaan kohteessa, kuten todennäköisesti kaikki muutkin mutaatiot. Mutaatio ei kuitenkaan vaikuttanut kohtiin, joilla olisi merkitystä Hydrobody-projektissa yleisesti käytös-

sä olevien entsyymien kannalta. Koska MCS on kuitenkin muuttunut radikaalisti myös dimeerimuokkauksen seurauksena, kummankin vektorin tunnistuskohdat kartoitetaan sekvenssistä uudelleen projektin useiten käyttämille restriktioentsyymeille.

7.3 Shuffling

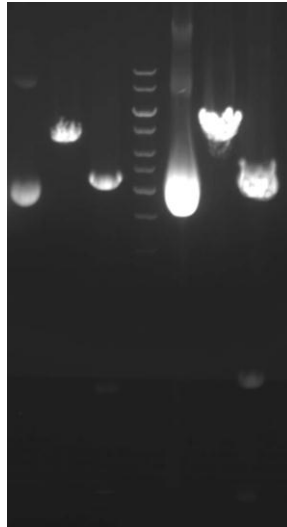
Shuffling-reaktion ajauduttua tehtiin AGE-tarkastelu kiinnostuksen vuoksi. Geeliltä on lähinnä havaittavissa, että jotakin on tapahtunut. Koska DNA on ainakin suurimmaksi osaksi sirkulaarisena, geeliltä ei voi arvioida kokoa.



Kuva 7. Shuffling-tuotteiden ja kontrollireaktioiden ero.

1: kontrolli pGAPZ S+ (pUC57+ HFB1_2) + (pUC57 + EGFPy)/Bsal ilman ligaasia 2-4: edellä mainittu reaktio ligaasin kanssa eri reaktioputkista 5) Marker 1 kb (fermentas) 6: kontrolli pPICZ S + (pUC57+ HFB1_2) + (pUC57 + EGFPy)/Bsal ilman ligaasia 7-9: edellä mainittu reaktio ligaasin kanssa eri reaktioputkista.

Kun shuffling-menetelmällä yhdistetyt vektorit oli siirretty E. coliin, inserttien ja vektorien yhdistyminen varmistui restriktioanalyysissä (kuva 8).

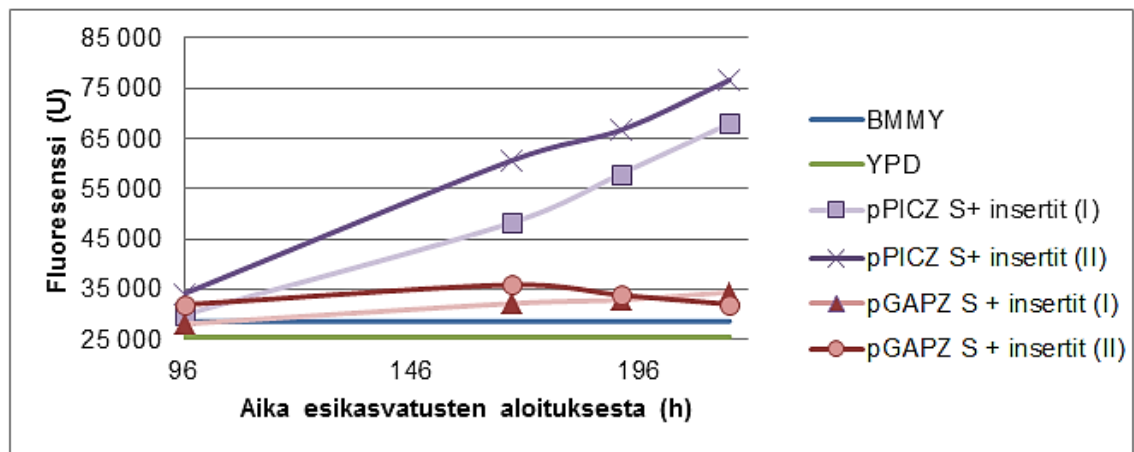


Kuva 8. Shuffling-menetelmällä yhdistettyjen vektorien restriktioanalyysi.

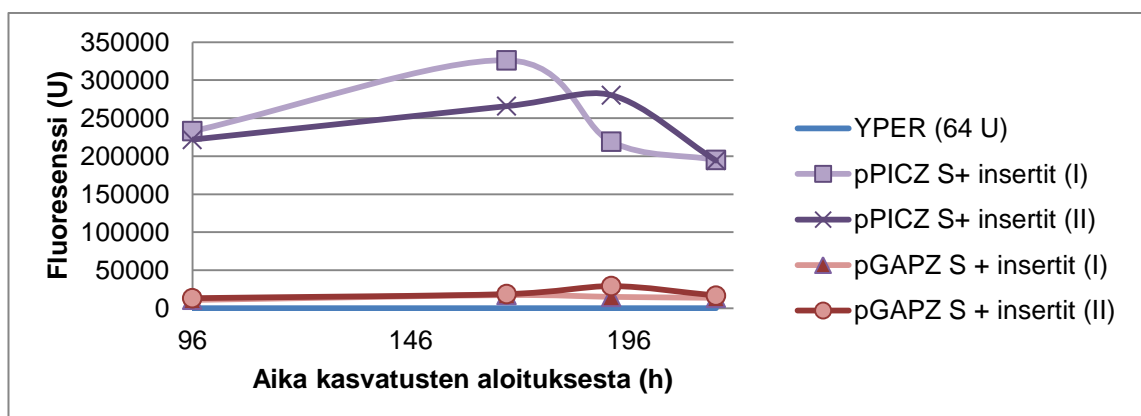
1: katkaisematon pGAPZ S + HFB1_2 + EGFPy 2: pGAPZ S + HFB1_2 + EGFPy/BspHI 3: pGAPZ S + HFB1_2 + EGFPy/ EcoRI + NotI 4: Marker 1 kb (Fermentas) 5: katkaisematon pPICZ S +HFB1_2 + EGFPy 6: pPICZ S +HFB1_2+EGFPy/SacI 7: pPICZ S + HFB1_2+ EGFPy/ EcoRI + NotI

7.4 Tuottotestit

Tuottokasvatusten mittaustulokset on taulukoitu liitteeseen 6. Lisäksi fluoressimmittauksista tehtiin erikseen kuvaajat. Tuloksia tulkittaessa on otettava huomioon, ettei niiden perusteella voi päätellä mitään perustavaa näin suppeassa kokeessa. Solun osat, intra- ja ekstrasellulaariset natiiviproteiinit ja muut molekyylit fluoresoivat myös jonkin verran nostaen taustasignaalia. Lisäksi silmämääräisen tarkastelun perusteella sekä pPICZ S + EGFPy + HFB1_2 X-33 että pGAPZ S + EGFPy + HFB1_2 X-33 – kannan pellettien YPER-hajotuksissa osa proteiineista oli niin tiukasti kiinni solunosissa, ettei se irronnut käsittelyssä.



Kuvio 1. Supernatanttien ja kasvatusmediumin fluoresenssi.



Kuvio 2. Pellettilysaattien fluoresenssi.

pGAPZ S + EGFPy + HFB1_2 X-33 – kannan fluoresenssimittaustuloksista voidaan todeta, että proteiinia on tuottunut kasvatuksissa vähän jos ollenkaan. Heikko tuottotaso voi viitata moneen asiaan. Solukasvu oli itsessään pGAPZ S:n osalta heikkoa (yli kolme kertaa heikompi pPICZ S kasvatuksiin nähden), mikä on saattanut aiheutua ravinnon riittämättömyydestä tai muusta ongelmasta mediumin koostumuksessa. Huono kasvu ei kuitenkaan yksin riitä selittämään tuloksia. Esimerkiksi linearisoidun vektorin sijainnilla ja peräkkäin liittyneiden vektorien määrällä *Pichia* genomissa voi olla vaikutusta tuottotasoon. Parhaimman tuottotason kanta pitääkin normaaliolosuhteissa seuloa huomattavasti laajemmassa testisarjassa.

8 YHTEENVETO JA LOPPUPÄÄTELMÄT

Työ oli periaatteeltaan hyvin selkeä ja edistyi odotetulla tavalla, kun ongelmat PCR:ssä saatiin selvitettyä. Työssä saavutettiin sille asetettu tavoite muokata kaksi plasmidivektoria *Pichia pastorikselle*, joiden monikloonausalueet sisältävät kaksi tunnistuskohtaa Bsal-entsyymille.

Shuffling-menetelmä vaatii vielä optimoimista ennen lopullisen työohjeen kirjoittamista projektille. Restriktio-ligaatioon kuluva aika voidaan luultavasti lyhentää käytetystä, sillä työ perustui menetelmään, jolla on valmistettu huomattavasti monimutkaisempia, jopa kahdeksan osan fuusioinserttejä. Uusia osia suunniteltaessa on tarkistettava, etteivät myöskään inserttien sekvenssit sisällä Bsal:n tunnistuskohtia.

Tuottotestauksia pystyttiin aikataulun puitteissa tekemään vain yksi. Testin tuloksista voitiin todeta pPICZ S-vektorin toimivan edeltäjänsä tapaan. Ekspressi-
on epäonnistuminen testin pGAPZ S:llä transformoiduissa kannoissa oletetaan olevan riippumaton plasmidiin tehdyistä muokkauksista, koska toiselle vektorille tehdyt muutokset ovat samat. Mutaatioiden vaikutuksen mahdollisuus tulee kuitenkin ottaa huomioon, mikäli ongelmat jatkuvat projektin edetessä.

Vastaavien vektorien syntetisointi olisi tullut tänä päivänä maksamaan noin 2300 € kokonaisuudessaan (Swily Li, tekninen asiakastuki, sähköposti, Genscript USA Inc.), joten ottaen huomioon työhön kuluneen työmäärän ja reagenssit, tulee vastaavanlaisen työn kannattavuutta harkita tulevaisuudessa.

9 LÄHDELUETTELO

Bonfield, J., Beal, K., Jordan, M. Cheng, Y. & Staden, R. (2011) The Staden Package Manual.

Dieffenbach, C. W. & Dveksler, G. S. (1995). PCR Primer: a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.

Engler, C., Gruetzner, R., Kandzia, R. & Marillonet, S. (2009). Golden Gate Shuffling: A One-Pot DNA Shuffling Method Based on Type IIs Restriction Enzymes. *PLoS ONE*, 4(5).

Engler, C., Kandzia, R. & Marillonet, S. (2008). A One Pot, One Step, Precision Cloning Method With High Throughput Capability. *PLoS ONE*, 3(11).

Finnzymes. (2009). Phusion Site-Directed Mutagenesis Kit. (1.3).

Finnzymes. Polymeraasientsyymien tarkkuuslaskuri. Noudettu osoitteesta http://www.finnzymes.com/pcr/fidelity_calc.php

Finnzymes. Sulamislämpöläskuri. Noudettu osoitteesta http://www.finnzymes.fi/tm_determination.html

Hydrobody. (2011). Haettu 1.9.2012 osoitteesta Hydrobody-projektin verkkosivu: hydrobody.turkuamk.fi

IDT. Oligo Analyzer. Noudettu osoitteesta <http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer>

Invitrogen. (2010a). EasySelect Pichia Expression Kit. *MAN0000042/25-0172*. Saatavilla myös http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/easyselect_man.pdf

Invitrogen. (2010b). Multi-Copy Pichia Expression Kit. *MAN0000041/25-0170*. Saatavilla myös http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/pichmulti_man.pdf

Invitrogen. (2010c). pGAPZ A, B, and C Pichia expression vectors for constitutive expression and purification of recombinant proteins.

MAN0000043/25-0174. Saatavilla myös

http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/pgapz_man.pdf

Invitrogen. (2010d). pPICZ A, B, and C Pichia expression vectorsa for selection on Zeocin and purification of recombinant proteins. MAN0000034/25-0146.

Saatavilla myös http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/ppicz_man.pdf

Invitrogen. (2010e). ZeoCassette Vectors. Saatavissa myös

http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/zeocassette_man.pdf

Isabel, M. (5. 6 2012). Fermentaksen teknisen tuen vastaus.

Joensuu, J., Conley, A., Lienemann, M., Brandle, J., Linder, M. & Menassa, R. (2010). Hydrophobin Fusions for High-Level Transient Protein Expression and Purification in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Physiology*(152), 622.

Li, S. (22. 08 2012). Genscript, asiakaspalvelun sähköpostivastaus.

Lodish, H., Berk, A., Lawrence, Z., Matsudaira, P., Baltimore, D. & Darnell, J. (2000). *Molecular Cell Biology* (4 p.). Macmillan Higher Education, New York, USA.

NCBI. Sekvenssivertailu. Haettu osoitteesta (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>)

Thermo Scientific . (2010). Advanced PCR Enzymes. *Euro Literature # PB_2010_94*. Saatavilla esim.

http://www.dharmacon.com/uploadedFiles/Home/Products/PCR_Research_Products/PCR_Reagents/Phusion_Product_Family/phusion_and_phire_brochure.pdf

Zhang, A.-L., Luo, J.-X., Zhang, T.-Y., Pan, Y.-W., Tan, Y.-H., Fu, C.-Y. (2009). Recent Advances on the GAP Promoter Derived Expression System of *Pichia Pastoris*. *Molecular Biology Reports*, 36(6), 1611.

Kaaviot 3, 5 ja 6 on tätä työtä varten piirtänyt medianomi Antti Sulkakoski.

Elektrokompetentit XL1 ja X-33 solut

E. coli (XL1) elektrokompetentit solut

- Esikasvatus 5 ml LB-medium (→ 1 pesäke maljalta silmukalla) +37°C, 250 rpm, O/N
- 5 ml esikasvatusten siirto n. 200 ml:aan LB-mediumia.
- Kasvatus +37°C, 250 rpm, kunnes OD₆₀₀ on noin 0,7 (0,6-0,8) (kestää noin 3 h)
- Siirrä kasvusto jälle → 15 min
- sentrifugoi 2000 g, 15 min, +4°C. Kaada supernatantti pois.
- Suspendoi pelletti 200 ml:aan kylmää steriiliä H₂O. sentrifugoi 2000 g, 15 min, +4°C. Kaada supernatantti pois. **(SUORITA TYÖVAIHE 2 KERTAA)**
- Suspendoi pelletti jäljelle jääneeseen nesteeseen.
- Siirrä suspensio 50 ml falconiin.
- Lisää noin 25 ml kylmää, steriiliä 20% glyserolia.
- Sentrifugoi 2000 g, 15 min, +4°C. Kaada supernatantti pois
- Suspendoi pelletti 500 µl:aan kylmää steriiliä 20% glyserolia.
- Jaa suspensio 110 µl eriin eppareihin.
- Upota putket nestetyypeen muutaman sekunnin ajaksi, kunnes liuos on täysin jäänytynyt
- Siirrä jäädytetyt epparit -80°C pakastimeen

P. pastoris (X-33) elektrokompetentit solut

- 100 ml:n kasvatus (200-300 µl käyttösoluja)
- Aloita 5 ml kasvatus pesäkkeestä 250 rpm/ 30 °C YPD -medium
- siirrä kasvatus 95 ml:aan YPD -mediumia (250 ml erlenmeyer)
- Kasvata kunnes OD₆₀₀ noin 1 (yön yli, n 12 h) +25 °C/250 rpm

- Sentrifugoi solut 2000 g/4 min. Heitä pois supernatantti
- Resuspenoi 20 ml:aan YPD + 200 mM HEPES pH 8
- Lisää 500 µl 1 M DTT ja sekoita kevyesti
- Inkuboi kevyssä sekoituksessa + 30 °C:ssa 15 min
- Lisää 30 ml jääkylmää steriiliä vettä (pidä solut jäällä valmistuksen loppu-aika)
- Sentrifugoi 2000 g/4 min/ +4 °C. Poista supernatantti
- Resuspenoi 50 ml:aan jääkylmää vettä
- Sentrifugoi 2000 g/4 min/ +4 °C. Poista supernatantti
- Resuspenoi 5 ml:aan jääkylmää steriiliä 1M sorbitolia
- Sentrifugoi 2000 g/4 min/ +4 °C. Poista supernatantti
- Resuspenoi 150 µl:aan jääkylmää steriiliä 1M sorbitolia
- Käytä solut heti tai jaa eriin ja pakasta -70 °C

Mediumit

SOC-medium 1L

5 g Hiivauute

5 g NaCl

20 g Peptoni

2,5 ml 1 M KCl

1000 ml H₂O

LSLB (Low Salt *Luria-Bertani*) -medium 1 L

5 g Hiivauute

5 g NaCl

10 g Peptoni

1000 ml H₂O

LSLB + Zeocin -medium/-agar 1 L

5 g Hiivauute

5 g NaCl

10 g Peptoni

(15 g Agar)

1000 ml H₂O

250 µl 100 mg/ml Zeocin

YPD-medium 1L

10 g Hiivauute
20 g Peptoni
900 ml H₂O
100 ml 20 % Dekstroosi

YPDS+ Zeocin –agar 1L

10 g Hiivauute
20 g Peptoni
182,2 g Sorbitoli
900 ml H₂O
100 ml 20 % Dekstroosi
15 g Agar
1 ml 100 mg/ml Zeocin

BMGY/BMMY 1L

10 g Hiivauute
20 Peptoni
700 ml H₂O
100 ml 1 M kaliumfosfaattipuskuri pH 6,0
100 ml 13,4 % YNB (Yeast Nitrogen Base with Ammonium Sulfate without amino acids)
100 ml 10 % Glyseroli (BMGY)/ 5 % Metanoli (BMMY)

BLAST1: pPICZ S:n konsensussekvenssin ja odotussekvenssin vertailu

Query= Tekstinkäsittelyllä luotu sekvenssi, Subject= todellinen konsensus
gap4:sta. Ylimääriset mutaatiot merkitty sinisellä, kohdennetut keltaisella.

```

Length=3314
Score = 6030 bits (3265), Expect = 0.0
Identities = 3300/3316 (99%), Gaps = 5/3316 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1 AGATCTAACATCCAAAGACGAAAGGTTGAATGAAACCTTTTGGCCATCCGACATCCACAG 60
      |||
Sbjct 1 AGATCTAACATCCAAAGACGAAAGGTTGAATGAAACCTTTTGGCCATCCGACATCCACAG 60

Query 61 GTCCATTCTCACACATAAGTGCCAAACGCAACAGGAGGGGATACACTAGCAGCAGACCGT 120
      |||
Sbjct 61 GTCCATTCTCACACATAAGTGCCAAACGCAACAGGAGGGGATACACTAGCAGCAGACCGT 120

Query 121 TGCAAACGCAGGACCTCCACTCCTCTTCTCCTCAACACCCACTTTTGGCCATCGAAAAACC 180
      |||
Sbjct 121 TGCAAACGCAGGACCTCCACTCCTCTTCTCCTCAACACCCACTTTTGGCCATCGAAAAACC 180

Query 181 AGCCCAGTTATTGGGCTTGATTGGAGCTCGCTCATTCCAATTCCTTCTATTAGGCTACTA 240
      |||
Sbjct 181 AGCCCAGTTATTGGGCTTGATTGGAGCTCGCTCATTCCAATTCCTTCTATTAGGCTACTA 240

Query 241 ACACCATGACTTTATTAGCCTGTCTATCCTGGCCCCCTGGCGAGGTTTCATGTTGTTTA 300
      |||
Sbjct 241 ACACCATGACTTTATTAGCCTGTCTATCCTGGCCCCCTGGCGAGGTTTCATGTTGTTTA 300

Query 301 TTTCCGAATGCAACAAGCTCCGCATTACACCCGAACATCACTCCAGATGAGGGCTTTCTG 360
      |||
Sbjct 301 TTTCCGAATGCAACAAGCTCCGCATTACACCCGAACATCACTCCAGATGAGGGCTTTCTG 360

Query 361 AGTGTGGGGTCAAATAGTTTCATGTTCCCAAATGGCCAAAACACTGACAGTTTAAACGCT 420
      |||
Sbjct 361 AGTGTGGGGTCAAATAGTTTCATGTTCCCAAATGGCCAAAACACTGACAGTTTAAACGCT 420

Query 421 GTCTTGGAACCTAATATGACAAAAGCGTGATCTCATCCAAGATGAACTAAGTTTGGTTTCG 480
      |||
Sbjct 421 GTCTTGGAACCTAATATGACAAAAGCGTGATCTCATCCAAGATGAACTAAGTTTGGTTTCG 480

Query 481 TTGAAATGCTAACGGCCAGTTGGTCAAAAAGAACTTCCAAAAGTCGGCATAACCGTTTGT 540
      |||
Sbjct 481 TTGAAATGCTAACGGCCAGTTGGTCAAAAAGAACTTCCAAAAGTCGGCATAACCGTTTGT 540

Query 541 CTTGTTGGTATTGATTGACGAATGCTCAAAAATAATCTCATTAAATGCTTAGCGCAGTCT 600
      |||
Sbjct 541 CTTGTTGGTATTGATTGACGAATGCTCAAAAATAATCTCATTAAATGCTTAGCGCAGTCT 600

Query 601 CTCTATCGCTTCTGAACCCGGTGCACCTGTGCCGAAACGCAATGGGGAAACACCCGCT 660
      |||
Sbjct 601 CTCTATCGCTTCTGAACCCGGTGCACCTGTGCCGAAACGCAATGGGGAAACACCCGCT 660

Query 661 TTTTGGATGATTATGCATTGTCTCCACATTGTATGCTTCCAAGATTCGGTGGGAATACT 720
      |||
Sbjct 661 TTTTGGATGATTATGCATTGTCTCCACATTGTATGCTTCCAAGATTCGGTGGGAATACT 720

Query 721 GCTGATAGCCTAACGTTTCATGATCAAAATTTAACTGTTCTAACCCCTACTTGACAGCAAT 780
      |||
Sbjct 721 GCTGATAGCCTAACGTTTCATGATCAAAATTTAACTGTTCTAACCCCTACTTGACAGCAAT 780

```



```

Query 781 ATATAAACAGAAGGAAGCTGCCCTGTCTTAAACcttttttttATCATCATTATTAGCTT 840
          |||||||
Sbjct 781 ATATAAACAGAAGGAAGCTGCCCTGTCTTAAACCTTTTTTTTATCATCATTATTAGCTT 840

Query 841 ACTTTCATAATTGCGACTGGTTCCAATTGACAAGCTTTTGATTTTAACTGACTTTTAAACGA 900
          |||||||
Sbjct 841 ACTTTCATAATTGCGACTGGTTCCAATTGACAAGCTTTTGATTTTAACTGACTTTTAAACGA 900

Query 901 CAACTTGAGAAGATCAAAAAACAATAATTATTCGAAACGAGGAATTCGAGACCATATCT 960
          |||||||
Sbjct 901 CAACTTGAGAAGATCAAAAAACAATAATTATTCGAAACGAGGAATTCGAGACCATATCT 960

Query 961 AACAGGTCTCCGGCCGCGCCGAGCTTGGGCCGAACAAAACTCATCTCAGAAGAGG 1020
          |||||||
Sbjct 961 AACAGGTCTCCGGCCGCGCCGAGCTTGGGCCGAACAAAACTCATCTCAGAAGAGG 1020

Query 1021 ATCTGAATAGCGCCGTCGACcatcatcatcatcatcatTGGATTTTAGCCTTAGACATGA 1080
          |||||||
Sbjct 1021 ATCTGAATAGCGCCGTCGACCATCATATAATCATCATTTAGTTTTAGCCTTAGACATGA 1080

Query 1081 CTGTTCTCAGTTCAGTTGGGCACTTACGAGAAGACCGTCTTGCTAGATTCTAATCAA 1140
          |||||||
Sbjct 1081 CTGTTCTCAGTTCAGTTGGGCACTTACGAGAAGACCGTCTTGCTAGATTCTAATCAA 1140

Query 1141 GAGGATGTCAGAATGCCATTTGCCTGAGAGATGCAGGCTTCATTTTTGATACTTTTTTAT 1200
          |||||||
Sbjct 1141 GAGGATGTCAGAATGCCATTTGCCTGAGAGATGCAGGCTTCATTTTTGATACTTTTTTAT 1200

Query 1201 TTGTAACCTATATAGTATAGGAttttttttGTCATTTTGTCTTCTCGTACGAGCTTGC 1260
          |||||||
Sbjct 1201 TTGTAACCTATATAGTATAGGATTTTTTTTGTCTTCTCGTACGAGCTTGC 1260

Query 1261 TCCTGATCAGCCTATCTCGCAGCTGATGAATATCTTGTGGTAGGGTTTGGGAAAATCAT 1320
          |||||||
Sbjct 1261 TCCTGATCAGCCTATCTCGCAGCTGATGAATATCTTGTGGTAGGGTTTGGGAAAATCAT 1320

Query 1321 TCGAGTTTGATGTTTTCTTGGTATTTCCCACTCCTCTTCAGAGTACAGAAGATTAAGTG 1380
          |||||||
Sbjct 1321 TCGAGTTTGATGTTTTCTTGGTATTTCCCACTCCTCTTCAGAGTACAGAAGATTAAGTG 1380

Query 1381 AAACCTTCGTTTGTGCGGATCCCCACACCATAGCTTCAAATGTTTCTACTCCTTTT 1440
          |||||||
Sbjct 1381 AAACCTTCGTTTGTGCGGATCCCCACACCATAGCTTCAAATGTTTCTACTCCTTTT 1440

Query 1441 TTAATCTTCCAGATTTTCTCGGACTCCGCGCATCGCCGTACCACTTCAAACACCCAAGC 1500
          |||||||
Sbjct 1441 TTAATCTTCCAGATTTTCTCGGACTCCGCGCATCGCCGTACCACTTCAAACACCCAAGC 1500

Query 1501 ACAGCATACTAAATTTCCCTCTTTCTCTCTAGGGTGTGTTAATTACCCGTAATAA 1560
          |||||||
Sbjct 1501 ACAGCATACTAAATTTCCCTCTTTCTCTCTAGGGTGTGTTAATTACCCGTAATAA 1560

Query 1561 GGTGGGAAAAGaaaaaaagAACCGCCTCGtttcttttcttcgtaaaaaaggcaataa 1620
          |||||||
Sbjct 1561 GGTGGGAAAAGAAAAAAGAACCGCCTCGTTTCTTTTCTTCGTAaaaaaggcaataa 1620

Query 1621 aaatttttatcacgttttcttttcttgaaa-ttttttttttcttttttCTCTTTCAG 1679
          |||||||
Sbjct 1621 AAATTTTATCACGTTTCTTTTCTTGAAAATTTTTTTTTTGAATTTTTTCTCTTTCGA 1680

Query 1680 TGACCTCC-ATTGATATTTAAGTTAATAAACGGTCTTCAATTTCTCAAGTTTCAGTTTCA 1738
          |||||||
Sbjct 1681 TGACCTCCCATGATATTTAAGTTAATAAACGGTCTTCAATTTCTCAAGTTTCAGTTTCA 1740

Query 1739 TTTTCTTGTCTATTACAACtttttttACTTCTGTTCATTAGAAAGAAAGCATAGCAA 1798
          |||||||
Sbjct 1741 TTTTCTTGTCTATTACAACTTTTTTACTTCTGTTCATTAGAAAGAAAGCATAGCAA 1800

Query 1799 TCTAATCTAAGGGCGGTGTTGACAATTAATCATCGGCATAGTATATCGGCATAGTATAA 1858
          |||||||
Sbjct 1801 TCTAATCTAAGGGCGGTGTTGACAATTAATCATCGGCATAGTATATCGGCATAGTATAA 1859
    
```

Query	1859	TACGACAAGGTGAGGAACTAAACCATGGCCAAGTTGACCAGTGCCGTTCCGGTGCTCACC	1918
Sbjct	1860	TACGACAAGGTGAGGAACTAAACCATGGCCAAGTTGACCAGTGCCGTTCCGGTGCTCACC	1919
Query	1919	GCGCGGACGTCGCCGGAGCGGTTCGAGTTCTGGACCGACCGGCTCGGGTTCTCCCGGGAC	1978
Sbjct	1920	GCGCGGACGTCGCCGGAGCGGTTCGAGTTCTGGACCGACCGGCTCGGGTTCTCCCGGGAC	1979
Query	1979	TTCGTGGAGGACGACTTCGCCGGTGTGGTCCGGGACGACGTGACCCGTTCATCAGCGCG	2038
Sbjct	1980	TTCGTGGAGGACGACTTCGCCGGTGTGGTCCGGGACGACGTGACCCGTTCATCAGCGCG	2039
Query	2039	GTCCAGGACCAGGTGGTGCCGGACAACACCCCTGGCCTGGGTGTGGGTGCGCGGCCTGGAC	2098
Sbjct	2040	GTCCAGGACCAGGTGGTGCCGGACAACACCCCTGGCCTGGGTGTGGGTGCGCGGCCTGGAC	2099
Query	2099	GAGCTGTACGCCGAGTGGTCGGAGGTCGTGTCCACGAACCTCCGGGACGCCTCCGGGCCG	2158
Sbjct	2100	GAGCTGTACGCCGAGTGGTCGGAGGTCGTGTCCACGAACCTCCGGGACGCCTCCGGGCCG	2159
Query	2159	GCCATGACCGAGATCGGCGAGCAGCCGTGGGGCGGGAGTTCGCCCTGCGCGACCCGGCC	2218
Sbjct	2160	GCCATGACCGAGATCGGCGAGCAGCCGTGGGGCGGGAGTTCGCCCTGCGCGACCCGGCC	2219
Query	2219	GGCAACTGCGTGCACCTTCGTGGCCGAGGAGCAGGACTGACACGTCCGACGCGCGCCAC	2277
Sbjct	2220	GGCAACTGCGTGCACCTTCGTGGCCGAGGAGCAGGACTGACACGTCCGACGCGCGCCGAC	2278
Query	2278	GGGTCCAGGCCTCGGAGATCCGTCCCCCTTTTCTTTGTTCGATATCATGTAATTAGTTA	2337
Sbjct	2279	GGGTCCAGGCCTCGGAGATCCGTCCCCCTTTTCTTTGTTCGATATCATGTAATTAGTTA	2338
Query	2338	TGTCACGCTTACATTACGCCCTCCCCCACATCCGCTCTAACCGAAAAGGAAGGAGTTA	2397
Sbjct	2339	TGTCACGCTTACATTACGCCCTCCCCCACATCCGCTCTAACCGAAAAGGAAGGAGTTA	2398
Query	2398	GACAACTGAAGTCTAGGTCCCTattttatTTTTTTatagttatgtagtattaagaacgt	2457
Sbjct	2399	GACAACTGAAGTCTAGGTCCCTATTTATTTTTTTATAGTTATGTTAGTATTAAGAACGT	2458
Query	2458	tatttatatttcaaatttttctTTTTTTCTGTACAGACGCGTGTACGCATGTAACATTA	2517
Sbjct	2459	TATTTATATTTCAAATTTTCTTTTTTTCTGTACAGACGCGTGTACGCATGTAACATTA	2518
Query	2518	TACTGAAAACCTTGCTTGAGAAGGTTTTGGGACGCTCGAAGGCTTTAATTTGCAAGCTGG	2577
Sbjct	2519	TACTGAAAACCTTGCTTGAGAAGGTTTTGGGACGCTCGAAGGCTTTAATTTGCAAGCTGG	2578
Query	2578	AGATCAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAGGCCGCGTTGC	2637
Sbjct	2579	AGATCAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAGGCCGCGTTGC	2638
Query	2638	TGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTC	2697
Sbjct	2639	TGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTC	2698
Query	2698	AGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCC	2757
Sbjct	2699	AGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCC	2758
Query	2758	TCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTT	2817
Sbjct	2759	TCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTT	2818
Query	2818	CGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCAATGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCG	2877
Sbjct	2819	CGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCAATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCG	2878
Query	2878	TTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCGTTTCAGCCGACCGCTGCGCCTTAT	2937
Sbjct	2879	TTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCGTTTCAGCCGACCGCTGCGCCTTAT	2938

```

Query 2938 CCGGTAAC TATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAG 2997
          |||
Sbjct 2939 CCGGTAAC TATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAG 2998

Query 2998 CCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGT 3057
          |||
Sbjct 2999 CCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGT 3058

Query 3058 GGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGC 3117
          |||
Sbjct 3059 GGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGC 3118

Query 3118 CAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTA 3177
          |||
Sbjct 3119 CAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTA 3178

Query 3178 GCGGTGGtttttttGTTTGAAGCAGCAGATTACGCGCAGaaaaaaaaGGATCTCAAGAAG 3237
          |||
Sbjct 3179 GCGGTGGTTTTTTTGGTTTGAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAAAAGGATCTCAAGAAG 3238

Query 3238 ATCCTTTGATCTTTTCTACGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACACGTTAAGGGA 3297
          |||
Sbjct 3239 ATCCTTTGATCTTTTCTACGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACACGTTAAGGGA 3298

Query 3298 TTTTGGTCATGAGATC 3313
          |||
Sbjct 3299 TTTTGGTCATGAGATC 3314

```

BLAST2: pGAPZ S:n konsensussekvenssin ja odotussekvenssin vertailu

Query= Tekstinkäsittelyllä luotu sekvenssi, Subject= todellinen konsensus gap4:sta. Ylimääriset mutaatiot merkitty sinisellä, kohdennetut keltaisella.

```

Length=2869
Score = 5208 bits (2820), Expect = 0.0
Identities = 2855/2871 (99%), Gaps = 5/2871 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1      AGATCTTTTTGTAGAAATGTCTTGGTGTCCCTCGTCCAATCAGGTAGCCATCTCTGAAAT 60
             |||
Sbjct 1      AGATCTTTTTGTAGAAATGTCTTGGTGTCCCTCGTCCAATCAGGTAGCCATCTCTGAAAT 60

Query 61     ATCTGGCTCCGTTGCAACTCCGAACGACCTGCTGGCAACGTAAAATTCTCCGGGGTAAAA 120
             |||
Sbjct 61     ATCTGGCTCCGTTGCAACTCCGAACGACCTGCTGGCAACGTAAAATTCTCCGGGGTAAAA 120

Query 121    CTTAAATGTGGAGTAATGGAACCAGAAACGTCTCTTCCCTTCTCTCTCCTTCCACCGCCC 180
             |||
Sbjct 121    CTTAAATGTGGAGTAATGGAACCAGAAACGTCTCTTCCCTTCTCTCTCCTTCCACCGCCC 180

Query 181    GTTACCGTCCCTAGGAAATTTTACTCTGCTGGAGAGCTTCTTCTACGGCCCCCTTGACGC 240
             |||
Sbjct 181    GTTACCGTCCCTAGGAAATTTTACTCTGCTGGAGAGCTTCTTCTACGGCCCCCTTGACGC 240

Query 241    AATGCTCTTCCCAGCATTACGTTGCGGGTAAAACGGAGGTCGTGTACCCGACCTAGCAGC 300
             |||
Sbjct 241    AATGCTCTTCCCAGCATTACGTTGCGGGTAAAACGGAGGTCGTGTACCCGACCTAGCAGC 300

Query 301    CCAGGGATGGAAAAGTCCCGCCGTCGCTGGCAATAATAGCGGGCGGACGCATGTCATGA 360
             |||
Sbjct 301    CCAGGGATGGAAAAGTCCCGCCGTCGCTGGCAATAATAGCGGGCGGACGCATGTCATGA 360

Query 361    GATTATTGGAACCACCAGAATCGAATATAAAAAGGCGAACACCTTTCCCAATTTGGTTT 420
             |||
Sbjct 361    GATTATTGGAACCACCAGAATCGAATATAAAAAGGCGAACACCTTTCCCAATTTGGTTT 420

Query 421    CTCCTGACCCAAAGACTTTAAATTTAATTTATTGTCCCTATTTCAATCAATTGAACAAC 480
             |||
Sbjct 421    CTCCTGACCCAAAGACTTTAAATTTAATTTATTGTCCCTATTTCAATCAATTGAACAAC 480

Query 481    TATTTGAAACGAGGAATTCGAGACCATATCTAACAGGTCTCCGGCCGGCCGCCA GCT 540
             |||
Sbjct 481    TATTTGAAACGAGGAATTCGAGACCATATCTAACAGGTCTCCGGCCGGCCGCCA CT 539

Query 541    TGGGCCCGAACAAAACACTCATCTCA AAGAGGATCTGAATAGCGCCGTCGACc catcatca 600
             |||
Sbjct 540    TGGGCCCGAACAAAACACTCATCTCA AAGAGGATCTGAATAGCGCCGTCGACCATCATCA 599

Query 601    tcatcatcatTGAGTTTTAGCCTTAGACATGACTGTTCCCTCAGTTCAAGTTGGGCACTTA 660
             |||
Sbjct 600    TCATCATCATTGAGTTTTAGCCTTAGACATGACTGTTCCCTCAGTTCAAGTTGGGCACTTA 659

Query 661    CGAGAAGACCGGTCTTGCTAGATTCTAATCAAGAGGATGTCAGAATGCCATTTGCCTGAG 720
             |||
Sbjct 660    CGAGAAGACCGGTCTTGCTAGATTCTAATCAAGAGGATGTCAGAATGCCATTTGCCTGAG 719

Query 721    AGATGCAGGCTTCATTTTTGATACTTTTTATTGTAACTATATAGTATAGGAtttttt 780
             |||
Sbjct 720    AGATGCAGGCTTCATTTTTGATACTTTTTATTGTAACTATATAGTATAGGATTTTTT 779

```

Query	781	ttGTCATTTTGTCTTCTCGTACGAGCTTGCTCCTGATCAGCCTATCTCGCAGCTGATG	840
Sbjct	780	TTGTCATTTTGTCTTCTCGTACGAGCTTGCTCCTGATCAGCCTATCTCGCAGCTGATG	839
Query	841	AATATCTTGTGGTAGGGTTTGGGAAAATCATTCGAGTTTGATGTTTTCTTGGTATTTT	900
Sbjct	840	AATATCTTGTGGTAGGGTTTGGGAAAATCATTCGAGTTTGATGTTTTCTTGGTATTTT	899
Query	901	CCACTCCTCTTCAGAGTACAGAAGATTAAGTGAACCTTCGTTTGTGCGGATCCCCACA	960
Sbjct	900	CCACTCCTCTTCAGAGTACAGAAGATTAAGTGAACCTTCGTTTGTGCGGATCCCCACA	959
Query	961	CACCATAGCTTCAAATGTTTCTACTCCTTTTTTACTCTTCCAGATTTTCTCGGACTCCG	1020
Sbjct	960	CACCATAGCTTCAAATGTTTCTACTCCTTTTTTACTCTTCCAGATTTTCTCGGACTCCG	1019
Query	1021	CGCATCGCCGTACCACTTCAAACACCCAAGCACAGCATACTAAATTTCCCTCTTTCTT	1080
Sbjct	1020	CGCATCGCCGTACCACTTCAAACACCCAAGCACAGCATACTAAATTTCCCTCTTTCTT	1079
Query	1081	CCTCTAGGGTGTGCGTTAATTACCCGTACTAAAGGTTTGGAAAAGaaaaaaagACCCGCT	1140
Sbjct	1080	CCTCTAGGGTGTGCGTTAATTACCCGTACTAAAGGTTTGGAAAAGAAAAAAGACCCGCT	1139
Query	1141	CGtttcttttcttctcgtcgaaaaaggcaataaaaaatttttatcacgtttcttttcttga	1200
Sbjct	1140	CGTTTCTTTTCTTCGTCGAAAAGGCAATAAAAAATTTTATCACGTTTCTTTTCTTGA	1199
Query	1201	aa tttttttttttt ag ttttttttCTCTTTCAGTGACCTCCATTGATATTTAAGTTAATA	1258
Sbjct	1200	AAATTTTTTTTTTTGATTTTTTCTCTTTCGATGACCTCCATTGATATTTAAGTTAATA	1259
Query	1259	AACGGTCTTCAATTTCTCAAGTTTCAGTTTCATTTTTCTGTTCTATTACAACttttttt	1318
Sbjct	1260	AACGGTCTTCAATTTCTCAAGTTTCAGTTTCATTTTTCTGTTCTATTACAACTTTTTTT	1319
Query	1319	ACTTCTTGTCATTAGAAAGAAAGCATAGCAATCTAATCTAAGGGCGGTGTGACAATTA	1378
Sbjct	1320	ACTTCTTGTCATTAGAAAGAAAGCATAGCAATCTAATCTAAGGGCGGTGTGACAATTA	1379
Query	1379	ATCATCGGCATAGTATATCGGCATAGTATAATACGACAAGGTGAGGAACTAAACCATGGC	1438
Sbjct	1380	ATCATCGGCATAGTATATCGGCATAGTATAATACGACAAGGTGAGGAACTAAACCATGGC	1439
Query	1439	CAAGTTGACCAGTGCCGTTCCGGTGCTCACCGCGCGACGTCGCCGGAGCGGTTCGAGTT	1498
Sbjct	1440	CAAGTTGACCAGTGCCGTTCCGGTGCTCACCGCGCGACGTCGCCGGAGCGGTTCGAGTT	1499
Query	1499	CTGGACCGACCGGCTCGGGTTCTCCCGGACTTCGTGGAGGACGACTTCGCCGGTGTGGT	1558
Sbjct	1500	CTGGACCGACCGGCTCGGGTTCTCCCGGACTTCGTGGAGGACGACTTCGCCGGTGTGGT	1559
Query	1559	CCGGGACGACGTGACCCGTTCATCAGCGCGGTCCAGGACCAGGTGGTGCCGGACAACAC	1618
Sbjct	1560	CCGGGACGACGTGACCCGTTCATCAGCGCGGTCCAGGACCAGGTGGTGCCGGACAACAC	1619
Query	1619	CCTGGCCTGGGTGTGGGTGCGCGGCCTGGACGAGCTGTACGCCGAGTGGTCGGAGGTCGT	1678
Sbjct	1620	CCTGGCCTGGGTGTGGGTGCGCGGCCTGGACGAGCTGTACGCCGAGTGGTCGGAGGTCGT	1679
Query	1679	GTCCACGAACTTCCGGGACGCCTCCGGGCCGGCCATGACCGAGATCGGCCGAGCAGCCGTG	1738
Sbjct	1680	GTCCACGAACTTCCGGGACGCCTCCGGGCCGGCCATGACCGAGATCGGCCGAGCAGCCGTG	1739
Query	1739	GGGGCGGGAGTTCGCCCTGCGCGACCCGGCCGCAACTGCGTGCACCTTCGTGGCCGAGGA	1798
Sbjct	1740	GGGGCGGGAGTTCGCCCTGCGCGACCCGGCCGCAACTGCGTGCACCTTCGTGGCCGAGGA	1799
Query	1799	GCAGGACTGACACGTCCGACGCGGCCACGGGTCCAGGCCTCGGAGATCCGTCCCC	1857
Sbjct	1800	GCAGGACTGACACGTCCGACGCGGCCACGGGTCCAGGCCTCGGAGATCCGTCCCC	1858

Query	1858	TTTTCTTTGTCGATATCATGTAATTAGTTATGTCACGCTTACATTCACGCCCTCCCCC	1917
Sbjct	1859	TTTTCTTTGTCGATATCATGTAATTAGTTATGTCACGCTTACATTCACGCCCTCCCCC	1918
Query	1918	ACATCCGCTCTAACC GAAAAGGAAGGAGTTAGACAACCTGAAGTCTAGGTCCCTat	1977
Sbjct	1919	ACATCCGCTCTAACC GAAAAGGAAGGAGTTAGACAACCTGAAGTCTAGGTCCCTATTTAT	1978
Query	1978	ttttttatagttatgtagtattaagaacgttatatttcaaat	2037
Sbjct	1979	TTTTTTATAGTTATGTTAGTATTAAGAACGTTATTTATATTTCAAATTTTCTTTTTTTT	2038
Query	2038	CTGTACAGACGCGGTACGCATGTAACATTATACTGAAAACCTTGCTTGAGAAGGTTTTG	2097
Sbjct	2039	CTGTACAGACGCGGTACGCATGTAACATTATACTGAAAACCTTGCTTGAGAAGGTTTTG	2098
Query	2098	GGACGCTCGAAGGCTTTAATTTGCAAGCTGGAGATCAACATGTGAGCAAAGGCCAGCAA	2157
Sbjct	2099	GGACGCTCGAAGGCTTTAATTTGCAAGCTGGAGATCAACATGTGAGCAAAGGCCAGCAA	2158
Query	2158	AAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCT	2217
Sbjct	2159	AAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCT	2218
Query	2218	GACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAA	2277
Sbjct	2219	GACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAA	2278
Query	2278	AGATACCAGGCGTTTCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCTGCCG	2337
Sbjct	2279	AGATACCAGGCGTTTCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCTGCCG	2338
Query	2338	CTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATGCTCA	2397
Sbjct	2339	CTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATGCTCA	2398
Query	2398	CGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAA	2457
Sbjct	2399	CGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAA	2458
Query	2458	CCCCCGTTCAGCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCG	2517
Sbjct	2459	CCCCCGTTCAGCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCG	2518
Query	2518	GTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGG	2577
Sbjct	2519	GTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGG	2578
Query	2578	TATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGC	2637
Sbjct	2579	TATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGA	2638
Query	2638	ACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGC	2697
Sbjct	2639	ACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGC	2698
Query	2698	TCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTtttttttGTTTGAAGCAGCAG	2757
Sbjct	2699	TCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTGTTGAAGCAGCAG	2758
Query	2758	ATTACGCGCAGaaaaaaGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGAC	2817
Sbjct	2759	ATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGAC	2818
Query	2818	GCTCAGTGGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGCATGAGATC	2868
Sbjct	2819	GCTCAGTGGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGCATGAGATC	2869

Mutaatiot

pPICZ S			
Emäs nro (todellinen)	Sijainti	Mutaatiotyyppi	Mahdolliset vaikutukset
1051	Polyhis	p/v (C=A)	missense, polyhis-merkkihännän neljäs histidiini vaihtuu asparagiiniin
1517*	TEF1-promoottorin sisältävä alue	p/v (T=C)	-
1651*	TEF1-promoottorin sisältävä alue	p/ins (+A)	-
1663-64*	TEF1-promoottorin sisältävä alue	2-trans (AG=GA)	-
1679-80*	TEF1-promoottorin sisältävä alue	2-trans (AG=GA)	-
1689*	TEF1-promoottorin sisältävä alue	p/ins (+C)	-
1777*	TEF1-promoottorin sisältävä alue	p/v (T=C)	-
1813-14*	TEF1-promoottorin sisältävä alue	p/del (-G)	-
2269-70*	CYC1 TT alue	p/del (-G)	-
2275*	CYC1 TT alue	p/ins (+G)	-
2285*	CYC1 TT alue	p/v (C=G)	-
2842-43*	pUC origin	2-trans (AT=TA)	-
3088*	pUC origin	p/v (G=A)	-
pGAPZ S			
Emäs nro (todellinen)	Sijainti	Mutaatiotyyppi	Mahdolliset vaikutukset
537-538	MCS	del (-G)	mm. SacII-entsyymien tunnistuskohta häviää ja yksi BglI-entsyymien tunnistuskohta tulee lisää
566	c-myc epitooppi	p/v (G=A)	missense, c-myc:n seitsemäs aminohappo, glutamiini vaihtuu lyysiiniksi
1068*	TEF1-promoottorin sisältävä alue	p/v (T=C)	-
1202*	TEF1-promoottorin sisältävä alue	p/ins (+A)	-
1214-15*	TEF1-promoottorin sisältävä alue	2-trans (AG=GA)	-
1230-31*	TEF1-promoottorin sisältävä alue	2-trans (AG=GA)	-
1240*	TEF1-promoottorin sisältävä alue	p/ins (+C)	-
1328*	TEF1-promoottorin sisältävä alue	p/v (T=C)	-
1820-21*	CYC1TT	p/del (-G)	-
1828*	CYC1TT	p/ins (+G)	-
1837*	CYC1TT	p/v (C=G)	-
2392-93*	pUC origin	2-trans (AT=TA)	-
2638*	pUC origin	p/v (G=A)	-

Tuottokasvatusten mittaustulokset

1 Sameus ja solupaino

Aika h (esikasvatusten aloituksesta)	Näyte	Solupaino (g)	OD ₆₀₀
96	PI	0,1105	16,32
	PII	0,0993	18,43
	GI	0,0625	6,23
	GII	0,0509	5,89
168	PI	0,0965	36,44
	PII	0,145	39,8
	GI	0,0825	13,16
	GII	0,0577	12,2
192	PI	0,1499	34,48
	PII	0,1504	38,16
	GI	0,0921	14,04
	GII	0,1099	13,36
216	PI	0,1102	43,9
	PII	0,1085	44,85
	GI	0,065	12,5
	GII	0,0597	15,15

2 Fluoresenssi

Insertti/organismi	Näyte	Fluoresenssi (U) 485 nm/535 nm, 1.0 s (pesäke I)/(pesäke II)
-	BMMY-medium	28 668
pPICZ S+EGFPy+HFB1_2/X-33	supernatantti, 48 h indusoinnista	29 974/34 127
	s, 120h i	48 247/60 602
	s, 144 h i	57 960/66 640
	s, 168 h i	67 987/76 655
-	YPER	64
pPICZ S+EGFPy+HFB1_2/X-33	pelletti, 48 h indusoinnista	232 836/221 831
	p, 120 h i	326 161/265 798
	p, 144 h i	219 057/280 298
	p, 168 h i	195 114/194 216
-	YPD-medium	25 519
pGAPZ S+EGFPy+HFB1_2/X-33	supernatantti, 96 h kasvatuksen aloituksesta	28 139/31 967
	s, 168 h k	32 195/35894
	s, 192 h k	32 897/33 843
	s, 216 h k	34 455/32 069
-	YPER	64
pGAPZ S+EGFPy+HFB1_2/X-33	pellettilysaatti, 96 h kasvatuksen aloituksesta	10 902/13 206
	p, 168 h k	17 309/18 603
	p, 192 h k	14 955/29114
	p, 216 h k	13 722/16707
pPICZ A+Chymosin+HFB1_2 /X-33 (vanha näyte 23.3.12 AS)	pellettilysaatti, 145 h aloituksesta	15 545
pGAPZ A+ Laccase+HFB1_2 (vanha näyte 13.3.12 JT)	pellettilysaatti, 192 h aloituksesta	14 415