

Ville Viitanen

# Uuden seulontamenetelmän kehittäminen re- kombinanttivasta-aineille

Metropolia Ammattikorkeakoulu  
Laboratorioanalyttikko (AMK)  
Laboratorioalan koulutusohjelma  
Opinnäytetyö  
14.6.2014

Tekijä Otsikko  Sivumäärä Aika	Ville Viitanen Uuden seulontamenetelmän kehittäminen rekombinattivasta-aineille 48 sivua + 6 liitettä 14.6.2014
Tutkinto	Laboratorioanalyttikko (AMK)
Koulutusohjelma	Laboratorioalan koulutusohjelma
Ohjaajat	Tiiminjohtaja Tarja Nevanen Lehtori Tiina Soininen
<p>Tämä opinnäytetyö tehtiin VTT:n immunodiagnostiikan työryhmässä, ja sen tavoitteena oli uuden seulontamenetelmän kehittäminen rekombinanttivasta-aineille.</p> <p>Mallivasta-aineena tutkimuksessa käytettiin testosteronin ja sitä tunnistavan primäärisen vasta-aineen muodostamaa immunokompleksia tunnistavaa single chain variable fragment-alkaalista fosfataasi-fuusioproteiinia (scFv-AP). scFv-AP:tä koodaava synteettinen geeni transformoitiin <i>Escherichia coli</i> -bakteerisoluihin. Fuusioproteiinin toimivuus testattiin ELISA- ja immunoblot -menetelmillä, minkä jälkeen siirryttiin käyttämään aiemmasta kirjastoseulonnasta saatuja vasta-ainegeenipooleja.</p> <p>Geenipoolit transformoitiin <i>E. coli</i> -soluihin ja niiden tuottotasoa tarkasteltiin ELISAlla. Poolit seulottiin yksittäispesäkkeinä VTT:n robotiasemalla, jolloin löydettiin 20 positiivista kloonina. Näiden kloonien plasmidi-DNA lähetettiin sekvensoitavaksi. Niille tehtiin myös tuottosomääritykset Western blotilla, ELISAlla sekä alkaalisen fosfataasin entsyymiaktiivisuutta mittaamalla, minkä pohjalta valittiin kaksi kloonia suuren mittakaavan vasta-ainetuottoon.</p> <p>Tuotetut vasta-aineet puhdistettiin IMAC-menetelmällä, minkä jälkeen niitä voitiin hyödyntää ELISA-pohjaisen immunokompleksimenetelmän kehityksessä. Puhdistetuilla vasta-aineilla optimoitiin ELISA-testiformaattia testaamalla eritasoisia vasta-aine- ja testosteronipitoisuuksia, sekä eri bakteerikasvatusmedieja.</p> <p>Tutkittua scFv-AP-fuusioproteiinia pystyttiin tuottamaan bakteerisoluisissa, ja se kykeni tunnistamaan anti-tes-vasta-aineen ja testosteronin muodostaman immunokompleksin. Sen proteiinituottotasot jäivät kuitenkin vielä melko mataliksi.</p> <p>Kehitetty ELISA-määritysmenetelmä vaikuttaa toimivalta, mutta sitä olisi vielä kokeiltava eri olosuhteissa, jotta voitaisiin varmistua sen yleispätevyydestä.</p>	
Avainsanat	kloonaus, vasta-aineet, robotiikka

Author Title Number of Pages Date	Ville Viitanen Development of a New Screening Method for Recombinant Antibodies 48 pages + 6 appendices 14 June 2014
Degree	Bachelor of Laboratory Sciences
Degree Programme	Degree Programme of Laboratory Sciences
Instructor	Tarja Nevanen, Team Leader Tiina Soininen, Principal Lecturer
<p>This thesis was carried out in the immunodiagnostics research team at VTT Technical Research Center of Finland. The purpose of the thesis project was the development of a new screening method for recombinant antibodies.</p> <p>The model antibody used in this thesis project was a fusion protein consisting of a single chain variable fragment attached to an alkaline phosphatase enzyme (scFv-AP), which recognizes an immune complex formed by testosterone bound to a primary antibody. The synthetic gene which codes the fusion protein was transformed into <i>Escherichia coli</i> bacterial cells. After the functionality of the fusion protein was confirmed by ELISA and immunoblotting tests, the rest of the thesis project was carried out with antibody gene pools from an earlier library screening.</p> <p>The gene pools were transformed into <i>E. coli</i> cells, and their antibody yields were measured by ELISA. The pools were screened with VTT's robotic screening station, and 20 positive clones were found. The plasmid DNA of the positive clones was extracted, and samples were sent to Gatc Biotech for sequencing. The antibody yields of the clones were determined by ELISA, immunoblotting and by enzyme activity measurements of the alkaline phosphatase. On the basis these tests, two clones were selected for larger scale fusion protein production.</p> <p>The produced fusion proteins were purified with IMAC, after which they were utilized in the development of an ELISA-based immune complex assay. The assay method was optimized by testing different antibody and testosterone levels as well as by using different bacterial growth mediums.</p> <p>The studied scFv-AP fusion protein could be produced in bacterial cells, and it was capable of identifying antibody-testosterone immune complex. Its protein yields were, however, still quite low. The developed ELISA-assay appears to be working, but it would still be prudent to test it in different conditions to determine its general validity.</p>	
Keywords	cloning, antibodies, robotics

## Sisällys

Lyhenteet

Lyhenteet	3
1 Johdanto	1
2 Vasta-aineet	2
2.1 Vasta-aineiden rakenne	2
2.2 Monoklonaalisten ja rekombinanttivasta-aineiden vertailu	5
2.3 Immunologiset määrittymenetelmät	6
2.4 Vasta-ainekirjastot	7
2.5 Anti-immunokompleksivasta-aineet	8
3 Työn suoritus	10
3.1 pJexpress401 anti-testosteroni scFv-AP plasmidin siirto XL1-blue-bakteerikantaan	11
3.2 Anti-Tes220-vasta-aineen biotinylointi ELISA-määrittäjä varten	11
3.3 scFv-AP-fuusioproteiinin tuottotasokokeet	13
3.3.1 Western blot	13
3.3.2 Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)	14
3.3.3 Eri kasvatusmediumien vaikutus scFv-AP-fuusioproteiinin tuottotasoon	16
3.4 Vasta-ainegeenipoolien siirto pJexpress401-vektoriin	19
3.4.1 Inserttidigestio	19
3.4.2 Ligaatio pJexpress401-vektoriin	20
3.4.3 Transformaatio XL1-blue-kantaan	20
3.4.4 Poolien tarkastelu immunokompleksi-ELISalla	21
3.5 Robottiseulonnan positiivisten kloonien poiminta, kasvatus ja induktio	22
3.6 Positiivisten kloonien tuottotasonmäärittäykset	23
3.6.1 Western blot	23
3.6.2 Tuottotason määrittäminen suoraan supernatantista entsyymiaktiivisuuden avulla	23
3.6.3 Immunokompleksi-ELISA	24
3.7 Jatkoon valittujen kloonien immunokompleksi-ELISA	25

3.8	Yksittäisen kloonin tuotto suuressa mittakaavassa	26
3.8.1	IMAC-puhdistus	27
3.8.2	Fraktioiden puhtauden ja proteiinipitoisuuden tarkastelu	27
3.9	Immunokompleksimääritysmenetelmän kehitys puhdistetulla scFv-AP-fuusioproteiinilla	28
4	Tulokset	32
4.1	pJexpress401 scFv-AP plasmidin siirto XL1-blue -bakteerikantaan	32
4.2	Anti-Tes220-vasta-aineen biotinylointi	32
4.3	scFv-AP-fuusioproteiinin tuottotasokokeet	33
4.4	Vasta-aine geenipoolien siirto pJexpress401-vektoriin	36
4.4.1	Vasta-ainepoolien tarkastelu immunokompleksi-ELISAlla	38
4.5	Positiivisten kloonien tuottotasomääritykset	38
4.6	Jatkoon valittujen kloonien immunokompleksi-ELISA	40
4.7	Yksittäisten kloonien puhdistus suuressa mittakaavassa	40
4.8	Immunokompleksimääritysmenetelmän kehitys puhdistetulla scFv-AP fuusioproteiinilla	42
5	Yhteenveto	46
	Lähteet	47
	Liitteet	
	Liite 1. ELISA biotinyloidulle anti-tes220 -vasta-aineelle, absorbanssimittaustulokset (A <sub>405</sub> )	
	Liite 2. ScFv-AP-fuusioproteiinin tuottotasokokeet, absorbanssimittaustulokset (A <sub>405</sub> )	
	Liite 3. Eri kasvatusliuosten vaikutus scFv-AP -fuusioproteiinin tuottotasoon, absorbanssimittaustulokset (A <sub>405</sub> )	
	Liite 4. Vasta-ainepoolien immunokompleksi-ELISA, absorbanssimittaustulokset (A <sub>405</sub> )	
	Liite 5. Jatkoon valittujen kloonien immunokompleksi-ELISA, absorbanssimittaustulokset (A <sub>405</sub> )	
	Liite 6. Immunokompleksimääritysmenetelmän kehitys, absorbanssimittaustulokset (A <sub>405</sub> )	

## Lyhenteet

AP	Alkaline phosphatase
BCA	Bicinchoninic Acid Assay
BSA	Bovine Serum Albumin
CDR	Complementarity Determining Region
DDIW	Distilled De-ionized Water
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
Fab	Fragment antigen-binding
HSA	Human Serum Albumin
Hepes	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
IMAC	Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography
IPTG	Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside
kDA	Kilodalton
LB	Luria Broth
MWCO	Molecular Weight Cut-off
PAGE	Polyacrylamide Gel electrophoresis
PBST	Phosphate Buffered Saline-Tween 20
PNPP	Para-nitrophenylphosphate
SB	Super Broth
scFv	Single-chain variable fragment
SDS	Sodium dodecyl sulphate

SOC Super optimal broth with catabolite repression

TB Terrific broth

## 1 Johdanto

Vasta-aineet (immunoglobuliinit) ovat tärkeä osa immuunijärjestelmää. Ne ovat proteiineja, jotka tunnistavat ja tuhoavat elimistölle vieraita partikkeleita, antigeenejä. Yksittäisen vasta-aineen kyky tunnistaa tarkasti tietty antigeeni, sekä erilaisten vasta-aineiden valtava monimuotoisuus [1, s.19], tekevät niistä erittäin hyödyllisiä työkaluja useissa terapeuttisissa ja diagnostisissa sovelluksissa. Vasta-aineita hyödynnetään esimerkiksi syöpien ja erilaisten virus- ja autoimmuunisairauksien hoidossa sekä näytteenkäsittelyssä [2, s.4].

Diagnostiikassa vasta-aineita käytetään esimerkiksi ELISA-, RIA-, IRMA- ja DELFIA-testeissä sekä immunokromatografisissa pikatesteissä (muun muassa raskaustestit). Vasta-ainepohjaisilla testeillä pyritään havainnoimaan spesifisesti vasta-aineen tunnistama analyytti, ja niillä pystytään havaitsemaan hyvin matalia analyyttipitoisuuksia. Vasta-ainetestejä valmistavat Suomessa esimerkiksi Orion Diagnostica, Medix Biochemica, AniLabsystems ja Wallac.

Vasta-ainetestien heikkoutena on pitkään ollut pienikokoisten molekyylien (esimerkiksi hormonit, lääkemolekyylit, teollisuuskemikaalit) tehokas tunnistaminen. Tämän opinnäytetyön tavoitteena oli kehittää naiiville rekombinanttivasta-ainekirjastolle tehokas ja yksinkertainen seulontamenetelmä, jota voitaisiin käyttää hyväksi immunokompleksivasta-aineiden kehittämisessä pienanalyyteille. Työ suoritettiin kehittämällä immunokompleksivasta-aineita yhdelle testosteronia tunnistavalle primaarivasta-aineelle.

Opinnäytetyö suoritettiin kesällä 2013 teknologian tutkimuskeskus VTT:n immunodiagnostiikan työryhmässä Espoon Otaniemessä. Mikäli seulontamenetelmä todetaan toimivaksi, sitä hyödynnetään muissa VTT:n immunodiagnostiikan projekteissa.

VTT on yksi Pohjois-Euroopan suurimmista teknologia- ja tutkimuspalveluja tarjoavista organisaatioista. Sen toiminta perustuu monialaiseen osaamiseen. VTT on voittoa tavoittelematon organisaatio, joka kuuluu työ- ja elinkeinoministeriön hallinnonalaan ja Suomen innovaatiojärjestelmään.

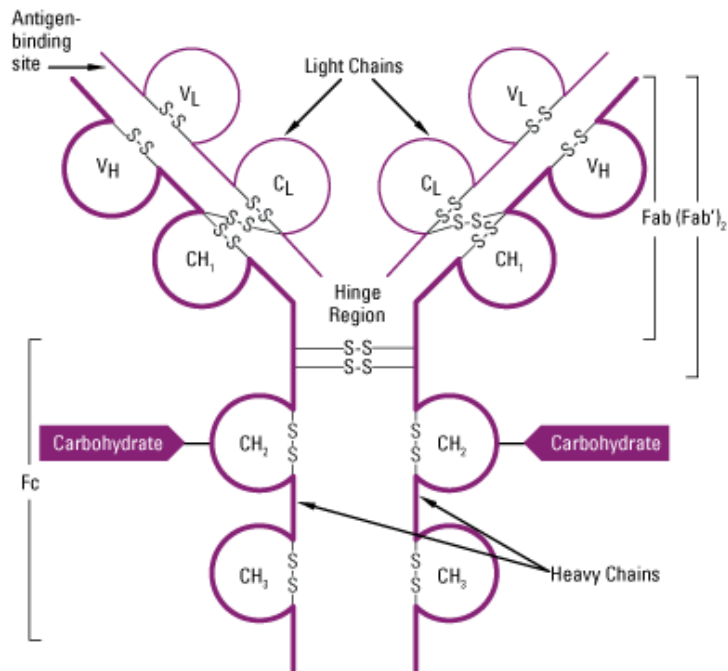


## 2 Vasta-aineet

### 2.1 Vasta-aineiden rakenne

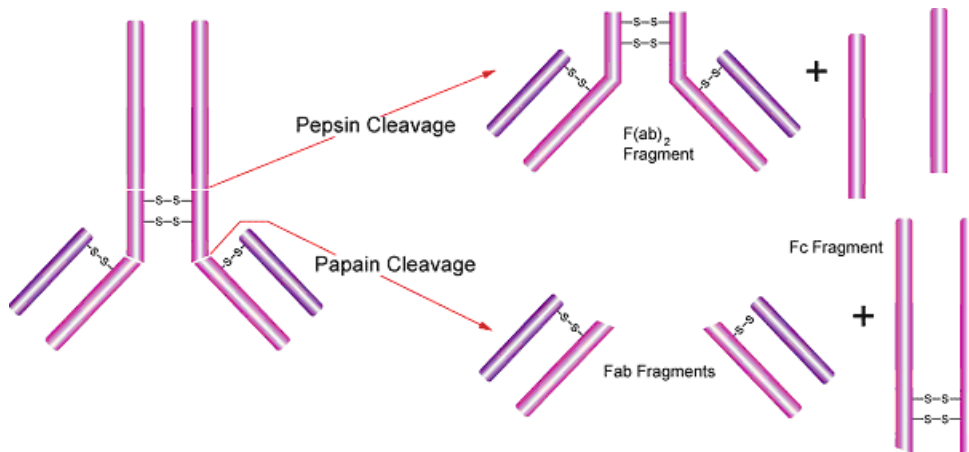
Vasta-aineiden perusyksikkö on Ig-domeeni (kuva 1), joka koostuu neljästä polypeptidiketjusta: kahdesta kevyestä ja kahdesta raskaasta. Ketjut kiinnittyvät toisiinsa disulfididoksin ja muodostavat Y:n muotoisen molekyylin. Kukin ketju sisältää vakio-osan (constant region) sekä varioivan osan (variable region). Vakio-osa jakautuu kolmeen domeeniin (CH<sub>1</sub>, CH<sub>2</sub> ja CH<sub>3</sub>) sekä joustavaan sarana-alueeseen (hinge region), jonka ansiosta vasta-aineen antigeenejä sitovat alueet pystyvät toimimaan itsenäisesti.

Varioiva osa sisältää varsinaisen antigeeniin sitoutuvan alueen. Jokainen ketju sisältää kolme vaihtelevan pituista niin kutsuttua komplementaarisuuden määrittävää aluetta (Complementarity-Determining Region, CDR), joita kutsutaan myös hypervarioiviksi alueiksi. CDR-alueiden aminohapposekvenssit vaihtelevat suuresti eri vasta-aineiden välillä. Juuri tämän vaihtelevuuden ansiosta vasta-aineet pystyvät tunnistamaan niin valtavan määrän eri molekyyliä. Varioivassa osassa on myös neljä kehysaluetta (framework region), joiden rakenne säilyy melko samanlaisena kaikilla vasta-aineilla. Kehysalueet toimivat tukirakenteina sekä vaikuttavat vasta-aineen laskostumiseen, mutta eivät yleensä ole suorassa kontaktissa antigeenin kanssa. [1, s 20–22; 3 s.118; 4 s.85]



Kuva 1: IgG-vasta-aineen rakenne [5]

Vasta-aineiden domeenirakenteen ansiosta vasta-aineen sitomisominaisuuksien hyödyntämiseen ei tarvita kokonaista vasta-ainemolekyyliä. Jos vasta-aine digestoidaan papaiini-nimisellä proteaasientsyymillä (kuva 2), se katkeaa sarana-alueen kohdalta, jolloin saadaan kaksi niin kutsuttua Fab-fragmenttia. Fab-fragmentti (Fragment antigen-binding) sisältää vasta-aineen koko kevyen ketjun (VL ja CL -domeenit) sekä raskaan ketjun varioivan ja ensimmäisen vakio-domeenin (VH ja CH<sub>1</sub>). Jos digestiossa käytetään papaiinin sijaan pepsiinientsyymiä, Fab-fragmentit pysyvät yhdessä, ja muodostavat F(ab')<sub>2</sub>-fragmentin [3 s.119].



**Kuva 2: IgG-vasta-aineen digestio papaiinilla ja pepsiinillä [6]**

scFv-fragmentti (single chain variable fragment) on vielä Fab-fragmenttiakin pienempi. Se koostuu ainoastaan kevyen ja raskaan ketjun varioivista domeeneista (VH ja VL), jotka on liitetty yhteen lyhyellä, noin 10 - 25 aminohapon pituisella polypeptidiketjulla. Toisin kuin Fab- ja F(ab')<sub>2</sub>-fragmentit, scFv ei ole kokonaisesta vasta-aineesta pilkottu kappale, vaan (useimmiten hiiren) hybridomasoluista eristettyjen vasta-ainegeenien avulla rakennettu fuusioproteiini [7, s. 2 - 3].

Vasta-aineet voidaan jakaa viiteen luokkaan niiden raskasketjun rakenteen mukaan. Nämä luokat ovat IgG, IgM, IgA, IgD ja IgE. IgM on ensimmäinen vasta-aine, jota elimistö tuottaa kohdatessaan uuden antigeenin. Se on rakenteeltaan pentameeri, eli sillä on suuri määrä antigeeniin kiinnittyviä alueita. Tämän ansiosta se kiinnittyy hyvin tiukasti patogeeneihin. IgM:llä on tärkeä rooli komplementin aktivoinnissa, minkä lisäksi se aktivoi makrofaageja.

IgG on yleisin elimistön vasta-aine. Noin 80 % seerumin immunoglobuliineista on IgG-tyyppiä. Se osallistuu IgM:n tavoin komplementin ja makrofaagien aktivointiin. IgG on ainoa vasta-aine, joka voi kulkea istukan läpi äidiltä sikiölle. IgA-vasta-ainetta on verenkierrossa vähän, mutta se on yleisin syljessä, kyynelnesteessä sekä keuhkojen ja suoliston eritteissä esiintyvä vasta-aine.

IgE-vasta-aineita tavataan kudoksissa, missä ne antigeeniin kiinnittyttyään aktivoivat syöttösoluja, jotka voivat kutsua paikalle eosinofiilejä, ja näin tuhota erilaisia parasiitteja. Syöttösolut erittävät myös erilaisia amiineja, muun muassa histamiinia, ja näin aiheuttavat allergiareaktion. IgD-vasta-aineet esiintyvät kypsien B-lymfosyyttien pinnalla,

sekä pieninä määrinä erilaisissa ruumiineritteissä. Niiden varsinaista tehtävää immuunipuolustuksessa ei vielä tiedetä [3, s.120].

## 2.2 Monoklonaalisten ja rekombinanttivasta-aineiden vertailu

Vasta-aineita voidaan tuottaa useilla eri menetelmillä. Monoklonaalisten vasta-aineiden tuotto aloitetaan immunisoimalla koe-eläin (useimmiten hiiri) halutulla antigeenillä ja eristämällä B-soluja eläimen pernasta. Nämä B-solut fuusioidaan myeloomasolujen kanssa. Myeloomasolut ovat B-solujen syöpäsolukanta, joten näin aikaan saadut hybridomasolut voivat jakautua loputtomasti. Kaikki samassa hybridomasolulinjassa tuotetut vasta-aineet tunnistavat samaa epitooppia, mikä tekee monoklonaalisista vasta-aineista erittäin spesifisiä. Koska monoklonaalisten vasta-aineiden tuotto vaatii koe-eläinten immunisoimista, ei sillä voida tuottaa erittäin haitallisia antigeenejä tai eläimen omia molekyyliä tunnistavia vasta-aineita. Samasta syystä näiden vasta-aineiden tuotto on hyvin aikaa vievää. [3, s.120 - 121]

Vasta-aineita, jotka on valmistettu rekombinatti-DNA-tekniikalla, kutsutaan rekombinanttivasta-aineiksi. Fab- ja scFv-fragmentit ovat yleisimpiä *in vitro* -sovelluksissa käytettyjä vasta-ainefragmentteja. Näiden fragmenttien pieni koko mahdollistaa niiden tuottamisen bakteerisoluisissa sekä vasta-ainekirjastojen rakentamisen. Vasta-ainefragmenttien sitomisominaisuudet eivät yleensä eroa monoklonaalisista vasta-aineista. On kuitenkin mahdollista, että (erityisesti scFv-fragmenteissa) vakio-alueiden poistaminen muuttaa varioivien alueiden konformaatiota, mikä vaikuttaa sitomiskykyyn. Rekombinanttivasta-aineiden ominaisuuksia voidaan myös muokata geeniteknologian keinoin.

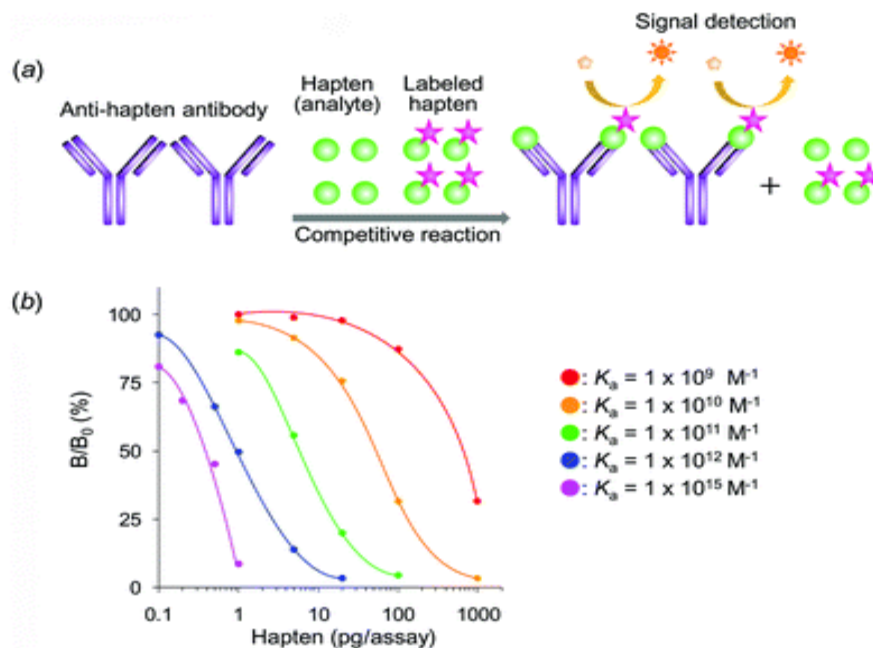
Yksi rekombinanttivasta-aineiden suurimmista eduista monoklonaalisiin vasta-aineisiin verrattuna on mahdollisuus tuottaa niitä *Escherichia coli* -bakteerisoluisissa. Bakteerin tuottamat vasta-aineet erittyvät solun sisäisen ja ulkoisen kalvon väliseen periplasmiseen tilaan. Vasta-aineiden kevyet ja raskaat ketjut transloituvat erikseen. Periplasmisen tilan hapettavat olosuhteet saavat aikaan disulfididosten muodostumisen ketjujen välille ja polypeptidien oikeanlaisen laskostumisen. Koska rekombinanttivasta-aineiden tuottamiseen ei tarvita koe-eläimiä, voidaan niitä käyttää sellaisten antigeenien tunnistamiseen, joille ei eettisistä tai käytännöllisistä syistä voida tuottaa monoklonaalisia vasta-aineita. Rekombinanttivasta-aineiden huonoja puolia monoklonaalisiin verrattuna

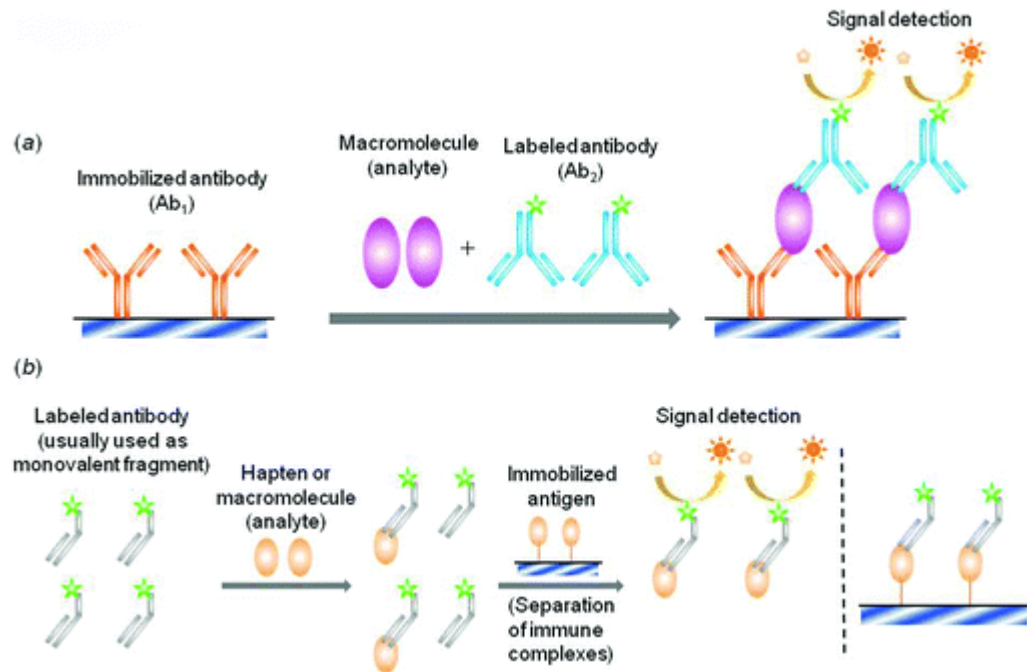
ovat niiden korkeat kehityskustannukset sekä huonompi kaupallinen saatavuus. [2, s.12; 1, s.24 - 25]

### 2.3 Immunologiset määrittämenetelmät

Immunologiset määrittämenetelmät voidaan jakaa kahteen ryhmään: nonkompetitiiviset ("sandwich"-tyyppiset) ja kompetitiiviset menetelmät. Nonkompetitiivisissä menetelmissä käytetään kahta vasta-ainetta, joista ensimmäinen kiinnittää analyysin testialustalle. Toiseen vasta-aineeseen on kiinnitetty jokin merkkiaine, joka analyysiin kiinnittyessään antaa mitattavan vasteen. Tällaisia menetelmiä käytetään useimmiten suurikokoisten molekyylien määrittämiseen.

Kompetitiivista määrittästä tarvitaan, jos analyysi on niin pieni, että siihen ei voida kiinnittää kahta vasta-ainetta yhtä aikaa. Tällaisia analyysitejä ovat esimerkiksi hormonit (mm. tässä opinnäytetyössä käytetty testosteroni) tai erilaiset synteettiset lääkkeet ja torjunta-aineet [8, s.642 - 643]. Kuvassa 3 on esitetty eri määrittämenetelmien erot.





Kuva 3: Kompetitiivinen ja nonkompetitiivinen määrittäminen [8 s.643 ja 644]

Nonkompetitiiviset määrittäykset ovat kompetitiivisia herkempiä. Niillä on myös parempi lineaarinen alue, minkä lisäksi niiden soveltaminen muihin formaatteihin, esimerkiksi immunokromatografiaan tai biosensoreihin on helpompaa. Tämän vuoksi nonkompetitiivisten määrittämenetelmien kehittäminen pienikokoisille analyteille on tärkeää. [9, s. 246]

## 2.4 Vasta-ainekirjastot

Vasta-ainegenikirjastot ovat tehokas väline uusien vasta-aineiden kehittämisessä. Ne voidaan jakaa kolmeen ryhmään: naiivit, immunisoidut ja synteettiset kirjastot

Naiivit kirjastot rakennetaan B-soluista, joiden luovuttajaa ei ole immunisoitu mitään erityistä antigeeniä vastaan. Tällainen kirjasto sisältää vain luovuttajan B-solujen luonnollisesti tuottamia vasta-aineita. Kirjastoissa käytetään yleensä usealta eri luovuttajalta saatuja B-soluja. Soluista eristetyt V-geenipoolit järjestetään uudelleen, jolloin saadaan aikaan satunnaisia kevyt- ja raskasketjupareja. Naiivit kirjastot ovat tärkeä ihmisvasta-aineiden lähde. Ne voidaan rakentaa kokonaan *in vitro* -menetelmillä. Tämä tekee niistä hyvän lähteen immuunikompleksivasta-aineille, joiden itseantigeenisuus yh-

dessä kompleksin epävakauden kanssa tekisi niiden löytämisestä immunisoidusta kirjastosta hyvin hankalaa.

Immunisoidut kirjastot valmistetaan yleensä tietyille antigeenille altistettujen luovuttajaeläinten IgG-geeneistä. Melkein mitä tahansa luovuttajaeläintä voidaan käyttää, jos sen genomi on sekvensoitu niin tarkasti, että sitä voidaan monistaa PCR-tekniikalla. Immunisoitu kirjasto voidaan rakentaa myös ihmisgeeneistä. Tällöin käytetään immunisoinnin sijaan luovuttajia, joilla on hankittu immunitetti jotakin tiettyä antigeeniä vastaan tai jokin allergia tai autoimmuunisairaus.

Immunisoitujen kirjastojen huonona puolena on se, että kirjastosta voidaan valita vain sitä antigeeniä tunnistavia vasta-aineita, jolla luovuttaja immunisoitiin, mikä tarkoittaa sitä, että koko immunisointitoimenpide on toistettava jokaista uutta antigeeniä varten. Myös eettiset seikat rajoittavat immunisoitujen kirjastojen käyttöä esimerkiksi luovuttajalle erittäin haitallisten antigeenien kanssa.

Toisin kuin naiiveissa ja immunisoiduissa kirjastoissa, Täysin synteettisissä kirjastoissa ei käytetä luovuttajista eristettyjä geenejä, mutta on olemassa myös niin kutsuttuja semisynteettisiä kirjastoja, jotka sisältävät sekä synteettisiä että luonnollisia geenejä. Synteettistä kirjastoa rakennettaessa kirjaston V-geenien CDR-alueita muokataan keino-otekoisilla nukleotideilla, jolloin voidaan ohittaa immunisointiprosessi. Kirjaston laajuutta voidaan myös kontrolloida tehokkaasti ja kirjasto voidaan suunnitella tietyn tyyppisille molekyylielle sopivaksi. [2, s.13 - 16]

## 2.5 Anti-immunokompleksivasta-aineet

Kuten kohdassa 2.1 mainittiin, on nonkompetetiivisten immunomääritysmenetelmien kehitys pienimolekyylisille yhdisteille hyvin yleisesti tutkittu ongelma. Yksi mahdollinen ratkaisu tähän ongelmaan ovat anti-immunokompleksivasta-aineet (anti-ic-vasta-aineet).

Anti-immunokompleksivasta-aineet ovat, nimensä mukaisesti, vasta-aineita jotka tunnistavat jonkin toisen vasta-aineen ja sen antigeenin muodostaman immunokompleksin. Kun vasta-aine kiinnittyy antigeeniin, sen konformaatio muuttuu, ja anti-ic-vasta-aine tunnistaa tämän konformaation muutoksen. [10, s.810] Anti-

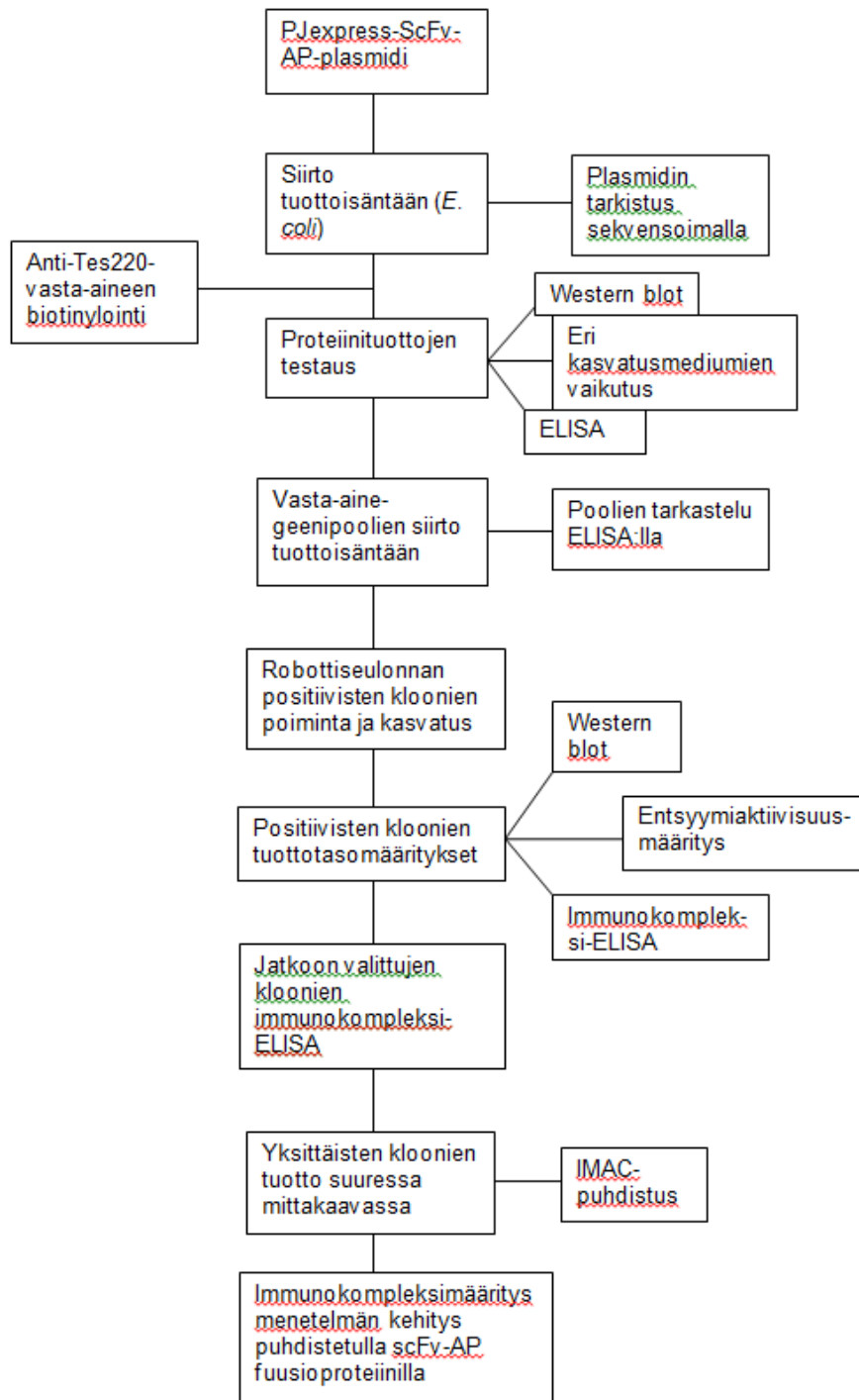
immunokompleksivasta-aineiden on arveltu toimivan jonkinlaisena immuunipuolustuksen kontrollimekanismina. [11, s.1184]

Vaikka anti-ic-vasta-aineiden käytöllä pienten analyyttien määrittämisessä on selkeitä etuja, niitä ei ole hyödynnetty kovinkaan laajasti. Syynä tähän on näiden vasta-aineiden itseantigeenisuus ja epästabiilius, jotka tekevät niiden tuottamisesta perinteisillä immunisointimenetelmillä hyvin hankalaa. Myös polyklonaalisten vasta-aineiden heterogeenisuus estää niiden käytön anti-IC-vasta-aineina. Nämä ongelmat voidaan kuitenkin kiertää käyttämällä vasta-ainekirjastosta seulottuja rekombinanttivasta-aineita. [12, s. 2637 - 2638; 13, s.38]



### 3 Työn suoritus

Opinnäytetyön työvaiheet on kuvattu pääpiirteittäin alla olevassa vuokaaviossa



Kuva 4: Opinnäytetyön vaiheet

### 3.1 pJexpress401 anti-testosteroni scFv-AP plasmidin siirto XL1-blue-bakteerikantaan

Lisättiin 1 µl pJexpress401 scFv-AP-plasmidia (13 ng/µl) 200 µl:aan kompetentteja XL1-blue-kannan *Escherichia coli* -bakteerisoluja, ja inkuboitiin jäähähteessä 30 min. Annettiin soluille lämpöshokki pitämällä niitä 2 min +37 °C:ssa ja stabiloitiin pitämällä niitä 2 min. jäähähteessä. Lisättiin 800 µl SOC-kasvatusliuosta ja pidettiin 1 h +37 °C:ssa sekoituksessa. Siirrostettiin soluja 100 µl, 10 µl, 1 µl ja 100 µl (konsentroituna) kanamysiini-maljoille ja kasvatettiin +37 °C:ssa yön yli.

Tarkasteltiin kanamysiinipitoisuuden vaikutusta bakteerien kasvuun valmistamalla 4 eri kasvatusliuosta (taulukko 1).

**Taulukko 1: Kanamysiinipitoisuuden tarkasteluun valmistetut kasvatusliuokset**

	Kanamysiini	Tetrasykliini
Liuos 1	50 µg/ml	10 µg/ml
Liuos 2	10 µg/ml	10 µg/ml
Liuos 3	50 µg/ml	0 µg/ml
Liuos 4	10 µg/ml	0 µg/ml

Siirrostettiin kasvatusmaljoilta 4 pesäkettä, kukin omaan putkeensa, jossa 4 ml Sb-kanamysiiniä(50 µg/ml)-tetrasykliiniä ja (10 µg/ml)- glukoosia (1 %). Kasvatettiin putkia +37 °C:ssa, 225 rpm:n ravistuksessa yön yli.

Otettiin 2 ml jokaista liuos 1-kasvatusta ja eristettiin niistä plasmidi-DNA kaupallisella kitillä (Nucleospin plasmid DNA purification kit, Macherey-Nagel) kitin ohjeiden mukaisesti. Eluointiin eristetty DNA 40 µl:aan 10 mM Tris-HCl – puskuria/putki. Lähetettiin pieni määrä eristettyä DNA:ta Gatc Biotechille sekvensoitavaksi.

### 3.2 Anti-Tes220-vasta-aineen biotinylointi ELISA-määrityksiä varten

Pipetoitiin 8 mg anti-Tes220 Fab-liuosta (2,52 mg/ml) 6 ml:aan PBS-puskuria. Tehtiin kaksi rinnakkaista näytettä. Valmistettiin 2 mg/ml Sulfo-NHS-LC-Biotiiniliuosta (Pierce) tislattuun veteen. Lisättiin toiseen anti-Tes220-näytteeseen 3x mooliyylimäärä ja toiseen 10 x mooliyylimäärä biotiinia. Biotiini lisättiin putkiin viidessä erässä, ja putkia vorteksoitiin lisäysten välissä. Inkuboitiin putkia joko 30 min tai yön yli huoneenlämmössä sekoit-

tuksessa. Tasapainotettiin 4 Econo-Pac-kromatografiapylvästä PBS-puskurilla. Ajettiin biotinyloidut anti-Tes220-näytteet pylväiden läpi (1 putki/ 2 pylvästä) ja otettiin talteen 12 kpl 500 µl:n fraktioita/pylväs.

Proteiinipitoisuuden määrittäminen tehtiin BCA-menetelmällä. Pipetoitiin 5µl jokaista fraktiota mikrotiiterilevylle ja lisättiin päälle 200 µl valmistajan ohjeen mukaan valmistettua BCA-mix:iä (Pierce). Standardisuorana käytettiin biotinyloimatonta anti-Tes220 Fab-vasta-ainetta, josta tehtiin 2,55 mg/ml - 0,3186 mg/ml puolilaimennossarja. Nollakontrollina käytettiin 5 µl:aa PBS-puskuria. Tehtiin 3 rinnakkaista standardisuoraa ja kontrollia. Inkuboitiin levyä +37 °C:ssa ravistuksessa 30 min, viilennettiin huoneenlämpöön ja mitattiin absorbanssi 405 nm:n aallonpituudella Varioskan mikrotiiterilevylukijalla (Thermo Scientific).

Testattiin biotinyloinnin vaikutusta vasta-aineen sitoutumisominaisuuksiin ELISA-määrittämisellä. Päälystettiin mikrotiiterilevy (Nunc Maxisorb) Testosteroni-HSA:lla (Human Serum Albumin) (konjugaatioaste 29,3 tes/HSA pitoisuus 1,83 mg/ml) ja kontrollikuopat HSA:lla taulukon 2 mukaisesti. Molempia lisättiin 300 ng/kuoppa.

**Taulukko 2: HSA:n ja Testosteroni-HSA:n pipetointi mikrotiiterilevylle**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	HSA	Testo-HSA					HSA						
B													
C													
D													
E													
F													
G													
H													

Inkuboitiin levyä 1 h +37 °C:ssa, ja pestiin se 3x300 µl:lla PBST-puskuria. Blokattiin levyä 250 µl:lla 1 % BSA-PBS/kuoppa. Pidettiin levyä 30 min huoneenlämmössä sekoi-tuksessa, ja pestiin 3 kertaa PBS-puskurilla.

Tehtiin kaikista neljästä biotinyloidusta Tes220 Fab-näytteestä 1 µg/ml - 0,0625 µg/ml puolilaimennossarjat. Lisäksi tehtiin kontrolliksi samanlainen laimennossarja biotinyloi-mattomasta Tes220 Fab-liuoksesta. Pipetoitiin kaikkia näytteitä mikrotiiterilevylle tau-lukon 3 mukaisesti.

Taulukko 3: Tes220 Fab -laimennosten pipetointi mikrotiitterilevyille

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	Tes220 biot. 3x 30 min 1µg/ml	Tes220 biot. 3x 30 min 0,5µg/ml	Tes220 biot. 3x 30 min 0,25µg/ml	Tes220 biot. 3x 30 min 0,125µg/ml	Tes220 biot. 3x 30 min 0,0625µg/ml		Tes220 biot. 3x o/n 1µg/ml		Tes220 biot.10x 30 min 0,5µg/ml	Tes220 biot.10x 30 min 0,25µg/ml	Tes220 biot.10x 30 min 0,125µg/ml	Tes220 biot.10x 30 min 0,0625µg/ml
<b>B</b>												
<b>C</b>												
<b>D</b>	Tes220 biot. 10x o/n 1µg/ml	Tes220 biot. 3x o/n 0,5µg/ml	Tes220 biot. 3x o/n 0,25µg/ml	Tes220 biot. 3x o/n 0,125µg/ml	Tes220 biot. 3x o/n 0,0625µg/ml		Tes220 biot. 10x o/n 1µg/ml		Tes220 biot.10x o/n 0,5µg/ml	Tes220 biot.10x o/n 0,25µg/ml	Tes220 biot.10x o/n 0,125µg/ml	Tes220 biot.10x o/n 0,0625µg/ml
<b>E</b>												
<b>F</b>												
<b>G</b>	Tes220 1µg/ml		Tes220 0,5 µg/ml		Tes220 0,25 µg/ml	Tes220 0,25 µg/ml		Tes220 0,125 µg/ml	Tes220 0,0625µg/ml			PBS
<b>H</b>												

Inkuboitiin levyä 30 min huoneenlämmössä ja pestiin 3 x PBS-puskurilla. Lisättiin jokaiseen kuoppaan 100 µl anti-Mouse-IgG Fab specific-AP-vasta-ainetta (Sigma Life Sciences) 1:2000-laimennettu 0,5 % BSA-PBS-liuokseen. Inkuboitiin 30 min huoneenlämmössä ja pestiin 3x PBS-puskurilla. Detektoitiin vasta-aine 2 mg/ml PNPP-liuoksella (Sigma-Aldrich) dietanoliiniinipuskurissa (Reagena), jota pipetoitiin 100 µl/kuoppa. Mitattiin levyjen absorbanssi 405 nm:n aallonpituudella Varioskan mikrotiitterilevylukijalla (Thermo Scientific).

### 3.3 scFv-AP-fuusioproteiinin tuottotasokokeet

Proteiinituottoa indusoitiin kahdella eri menetelmällä. Menetelmässä 1 lisättiin 150 µl kasvatuksia 4 ml:aan SB-mediumia, jossa oli 50 µg/ml kanamysiiniä, 10 µg/ml tetrasykliiniä, 0,1 % glukoosia ja 1 mM IPTG-liuosta. Kasvatettiin + 30 °C:ssa yön yli. Menetelmässä 2 lisättiin 80 µl kasvatuksia 4 ml:aan SB-mediumia, jossa 50 µg/ml kanamysiiniä ja 10 µg/ml tetrasykliiniä. Kasvatettiin +37 °C:ssa, kunnes kasvatusten OD<sub>600</sub> arvo oli noin 1. Lisättiin putkiin 4 µl 1 M IPTG-liuosta ja kasvatettiin +30 °C:ssa yön yli. Tehtiin neljä rinnakkaista näytettä kummallakin menetelmällä.

#### 3.3.1 Western blot

Tuottotasoja tarkasteltiin Western blotilla. Sentrifugoitiin induktiokasvatuksia 14 000 g:n voimalla 10 min ja otettiin supernatantit talteen. Otettiin 15 µl jokaista supernatanttia ja

lisättiin 5 µl 4x LSB-puskuria (ilman merkaptoetanolia). Lisäksi otettiin positiiviseksi kontrolliksi aiemmin tuotettua 0,4 µl MPA14 Fab+His6 -vasta-ainetta, johon lisättiin 7,1 µl DDIW:tä sekä 2,5 µl 4x näytekuskuria. Lämmitettiin näytteitä 2 min 94 °C:ssa. Suoritettiin ajo 4-15 % Miniprotean TGX -geelillä (BioRad), MiniProtean Tetra Cell -ajolaitteella (BioRad). Pipetoitiin näytteitä 15 µl/kuoppa ja kontrollia 10 µl/kuoppa. Proteiinistandardina käytettiin Dual color Precision plus standardia (BioRad) 10 µl/kuoppa. Ajettiin geeli RB-puskurissa 300 V:n jännitteellä.

Tehtiin Western blot Trans-blot Turbo -laitteella (BioRad). Siirron jälkeen blokattiin kalvo Superblock-blokkaukspuskurilla (Thermo Scientific) (+0,05 % Tween 20) 30 min sekoituksessa huoneenlämmössä. Blokkauksen jälkeen pestiin kalvo 3 kertaa 5 min TBST-puskurilla. Kaadettiin kalvon päälle anti-His6 vasta-ainetta 1:1000 Superblockiin laimennettuna, pestiin 3x 5 min TBST-puskurilla ja lisättiin goat anti-mouse IgG(H+L)-Alkaline phosphatase (AP) conjugate -vasta-ainetta (BioRad) 1:200 superblockiin laimennettuna. Pestiin kalvo 3x 5 min TBST-puskurilla. Detektoitiin vasta-aine lisäämällä kalvolle 66 µl NBT + 33 µl BCIP -substraattia + 10 ml AP-puskuria. Inkuboitiin, kunnes proteiinibandit erottuivat kalvolla. Lopetettiin reaktio pesemällä kalvoa 3 x 5 min DDIW:llä.

### 3.3.2 Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

Tutkittiin kahdella eri menetelmällä tuotettujen scFv-AP-fuusioproteiinin tuottotasoa ELISA-menetelmällä. Päälystettiin mikrotiiterilevy (Kaivogen KaiSA-96 streptavidin pinnoitettu) biotinyloidulla Tes220-vasta-aineella. Pipetoitiin osaan kuopista 2 µg vasta-ainetta 100 µl tilavuudessa PBS-puskuriin laimennettuna ja kontrollikuoppiin ainoastaan 100 µl PBS-puskuria (taulukko 4). Pidettiin levyä 30 min huoneenlämmössä ja pestiin se 3 x 300 µl:lla 0,05 % PBST-puskuria.

Taulukko 4: Mikrotiiterilevyn päällystys Tes220:llä

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2 µg Tes220									100 µl PBS		
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Blokattiin levy 100 µl:lla 0,2 µg/ml biotiinia PBS-puskurissa/kuoppa. Pidettiin 15 min huoneenlämmössä ja pestiin 3 x 300 µl:lla 0,05 % PBST-puskuria. Pipetoitiin levyllä 25 µM ja 250 µM testosteronia 1 % DMSO-PBST-puskurissa sekä kontrolliksi 1 % DMSO-PBST-puskuria taulukon 5 mukaisesti. Jokaista liuosta pipetoitiin 100 µl/kuoppa. Inkuboitiin 30 min huoneenlämmössä ja pestiin yhden kerran 300 µl:lla TBST-puskuria.

Taulukko 5: Pienmolekyylien pipetointi mikrotiiterilevylle

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	25 µM Tes			250 nM Tes			1 % DMSO-PBST			25 µM Tes		
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Pipetoitiin levyllä pJexpress401 scFv-AP-induktiosupernatantteja taulukon 6 mukaisesti. Jokaiseen kuoppaan pipetoitiin 50 µl supernatanttia ja 50 µl PBST-puskuria. Inkuboitiin levyä 1 h huoneenlämmössä ja pestiin se 3 x 300 µl:lla PBST-puskuria.

**Taulukko 6: Induktiosupernatanttien pipetointi mikrotiiterilevylle. Sinisellä merkityt supernatantit oli indusoitu menetelmällä 1 ja punaisella merkityt menetelmällä 2.**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Supernatantti 1											
B	Supernatantti 2											
C	Supernatantti 3											
D	Supernatantti 4											
E	Supernatantti 5											
F	Supernatantti 6											
G	Supernatantti 7											
H	Supernatantti 8											

Detektoitiin vasta-aine pipetoimalla jokaiseen kuoppaan 100 µl 2 mg/ml PNPP-liuosta (Sigma-Aldrich) dietanoliamiinipuskurissa (Reagena). Mitattiin levyn absorbanssi 405 nm:n aallonpituudella Varioskan mikrotiiterilevylukijalla (Thermo Scientific).

Tutkittiin myös pinnoitukseen käytetyn anti-Tes220-vasta-aineen pitoisuuden merkitystä ELISA-vasteeseen. Tätä varten toistettiin edellinen ELISA-määritys. Tämä määritys tehtiin muuten yllämainitun menetelmän mukaisesti, mutta mikrotiiterilevyn kuoppiin pipetoitiin vain 500 ng biotinyloitua Tes220-vasta-ainetta.

### 3.3.3 Eri kasvatusmediumien vaikutus scFv-Ap -fuusioproteiinin tuottotason

Siirrostettiin XL1-blue pJexpress401 scFv-AP-kasvatusta steriilillä siirrostussilmukalla 1 ml:aan SB-mediumia, jossa oli 50 µg/ml kanamysiiniä, 10 µg/ml tetrasykliiniä ja 1 % glukoosia. Maljattiin tästä 100 µl laimentamattomana, 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10 000 ja 1:100 000 laimennoksina LB-kanamysiini-maljoille, ja kasvatettiin +37 °C:ssa yön yli. Seuraavana päivänä tarkistettiin maljat ja laskettiin pesäkeluvut.

Poimittiin 1:100 -laimennoksen maljalta 86 pesäkettä mikrotiiterilevylle, jonka kuoppiin oli pipetoitu 100 µl SB-mediumia, jossa oli 50 µg/ml kanamysiiniä, 10 µg/ml tetrasykliiniä ja 1 % glukoosia (taulukko 7). Taulukossa harmaalla merkittyihin kontrollikuoppiin ei siirrostettu bakteeripesäkkeitä. Levyä kasvatettiin +37 °C:ssa 620 rpm:n ravistuksessa 80 % kosteudessa yön yli.

Taulukko 7: Yksittäispesäkkeiden kasvatus mikrotiiterilevyllä

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		■									■	
C			■		■			■		■		
D												
E												
F			■		■			■		■		
G		■									■	
H												

Lisättiin jokaiseen kuoppaan 20 µl 85 % glyserolia. Siirrettiin 6,5 µl kasvatuksia uudelle mikrotiiterilevyille, jolle oli pipetoitu eri kasvatusmedieja taulukon 8 mukaisesti. Kasvatettiin levyä +37 °C:ssa 620 rpm:n ravistuksessa 80 % kosteudessa yön yli.

Taulukko 8: Kasvatusmediumien pipetointi mikrotiiterilevyille

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	150 µl SB	150 µl LB	150 µl TB				150 µl SB	150 µl LB	150 µl TB			
C	50 µg/ml Kan	50 µg/ml Kan	50 µg/ml Kan				50 µg/ml Kan	50 µg/ml Kan	50 µg/ml Kan			
D	10 µg/ml Tet	10 µg/ml Tet	10 µg/ml Tet				10 µg/ml Tet	10 µg/ml Tet	10 µg/ml Tet			
E	1mM IPTG	1mM IPTG	1mM IPTG				1mM IPTG	1mM IPTG	1mM IPTG			
F	0,1% Glu	0,1% Glu	0,1% Glu				1mM IPTG	1mM IPTG	1mM IPTG			
G												
H												

Sentrifugoitiin kasvatuslevyä (4000 rpm 10 min). Päälystettiin kaksi mikrotiiterilevyä (Kaivogen KaiSA-96 streptavidin pinnoitettu) biotinyloidulla anti-Tes220-vasta-aineella (500 ng/kuoppa) ja blokattiin ne PBS-puskuriin laimennetulla 0,2 µg/ml biotiinilla (100µl/kuoppa) kuten kohdassa 3.3.2. Pipetoitiin levyille 250 nM testosteronia 1 % DMSO-liuoksessa ja kontrollikuoppiin 100 µl 1 % DMSO-liuosta (taulukko 9). Inkuboitiin levyjä 30 min huoneenlämmössä ja pestiin ne 3x300 µl:lla PBST-puskuria (0,05 % tween 20).



Taulukko 9: Testosteronin ja DMSO:n pipetointi levyille

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D	Tes	1 % DMSO	Tes	1 % DMSO	Tes	1 % DMSO	Tes	1 % DMSO	Tes	1 % DMSO	Tes	1 % DMSO
E												
F												
G												
H												

Pipetoitiin levyille 50 µl PBST-puskuria ja 50 µl kasvatusmediumia kasvatuslevyltä taulukoiden 10 ja 11 mukaisesti.

Taulukko 10: Kasvatusmediumien pipetointi 1. mikrotiitterilevyille

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Suppi A1	Suppi A2	Suppi A3	Suppi A4	Suppi A5	Suppi A6						
B	Suppi B1	Suppi B2	Suppi B3	Suppi B4	Suppi B5	Suppi B6						
C	Suppi C1	Suppi C2	Suppi C3	Suppi C4	Suppi C5	Suppi C6						
D	Suppi D1	Suppi D2	Suppi D3	Suppi D4	Suppi D5	Suppi D6						
E	Suppi E1	Suppi E2	Suppi E3	Suppi E4	Suppi E5	Suppi E6						
F	Suppi F1	Suppi F2	Suppi F3	Suppi F4	Suppi F5	Suppi F6						
G	Suppi G1	Suppi G2	Suppi G3	Suppi G4	Suppi G5	Suppi G6						
H	Suppi H1	Suppi H2	Suppi H3	Suppi H4	Suppi H5	Suppi H6						

Taulukko 11: Kasvatusmediumien pipetointi 2. mikrotiitterilevyille

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Suppi A7	Suppi A8	Suppi A9	Suppi A10	Suppi A11	Suppi A12						
B	Suppi B7	Suppi B8	Suppi B9	Suppi B10	Suppi B11	Suppi B12						
C	Suppi C7	Suppi C8	Suppi C9	Suppi C10	Suppi C11	Suppi C12						
D	Suppi D7	Suppi D8	Suppi D9	Suppi D10	Suppi D11	Suppi D12						
E	Suppi E7	Suppi E8	Suppi E9	Suppi E10	Suppi E11	Suppi E12						
F	Suppi F7	Suppi F8	Suppi F9	Suppi F10	Suppi F11	Suppi F12						
G	Suppi G7	Suppi G8	Suppi G9	Suppi G10	Suppi G11	Suppi G12						
H	Suppi H7	Suppi H8	Suppi H9	Suppi H10	Suppi H11	Suppi H12						

Inkuboitiin levyjä 1 tunti huoneenlämmössä tasoravistelijassa ja pestiin ne 3x300 µl:lla PBST-puskuria. Detektoitiin vasta-aine 2 mg/ml PNPP-liuosta (Sigma-Aldrich) dietano-

liamiinipuskurissa (Reagena), jota pipetoitiin 100 µl/kuoppa. Mitattiin levyjen absorbanssi kuten edellä 5,15,30 ja 45 min inkubaation jälkeen.

### 3.4 Vasta-ainegeenipoolien siirto pJexpress401-vektoriin

Kun oli saatu sekvensoimalla varmistettua, että pJExpress 401-scFv-AP-plasmidi sisältää oikean scFv-AP-insertin restriktioentsyymien katkaisukohtineen ja että scFv-AP-fuusioproteiinin tuotto bakteerisoluiissa onnistui, niin aloitettiin aiemmista vasta-ainekirjastoseulonnoista saatujen (Antti Tullila ja Sirpa Jylhä, VTT) neljän vasta-ainegeenipoolien siirto pJExpress 401 -tuottovektoriin.

#### 3.4.1 Inserttidigestio

Digestoitii neljää eri DNA-poolia *NcoI*- ja *NotI*-restriktioentsyymeillä (New England Biolabs) taulukon 12 mukaisesti. Lisäksi tehtiin kontrollidigestiot kahdella aiemmin eristetyllä kirjasto ScFv-plasmidilla. Pooleja inkuboitii 4,5 h +37 °C:ssa.

**Taulukko 12: DNA-poolien digestio-olosuhteet**

	<b>Pooli 1</b>	<b>Pooli 2</b>	<b>Pooli 3</b>	<b>Pooli 4</b>	<b>Kirjasto κ</b>	<b>Kirjasto λ</b>
<b>DNA</b>	12 µl	12,4 µl (10 µg)	33,7 µl (10µg)	40,5 µl (2,68µg)	14,8µl (3µg)	13,6 µl (3µg)
<b><i>NcoI</i>-entsyymi</b>	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	0,5 µl	0,5 µl
<b><i>NotI</i>-entsyymi</b>	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	0,5 µl	0,5 µl
<b>CA-puskuri+b-Me</b>	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	2 µl	2 µl
<b>BSA</b>	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl	0,2 µl	0,2 µl
<b>DDIW</b>	28,5 µl	28,1 µl	6,8 µl	0 µl	2 µl	3,2 µl
<b>Yhteensä</b>	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	20 µl	20 µl

Digestoidut DNA-poolit ajettiin 1 % agarosigeelillä (2 kaivoa/pooli). Väriä käytettiin SYBRSafe DNA gel stainia (Life Technologies), näytekurina 6x DNA loading dyeta

(Fermentas) ja DNA-kokostandardina Generuler 1 kb plus DNA ladderia (Thermo Scientific). Ajettiin 80 V:n jännitteellä, kunnes DNA-pylväät erottuivat toisistaan. Leikattiin jokaisen poolin scFv-inserttipylväät (noin 770 bp) irti geeliltä ja eristettiin niistä DNA kaupallisella kitillä (Nucleospin Gel and PCR clean-up kit, Macherey-Nagel) kitin ohjeiden mukaisesti. Eristetty DNA eluoiitiin 50 µl:aan 5mM Tris-HCl-puskuria/pylväs. Mitattiin pitoisuus Nanodrop-spektrofotometrillä (Thermo Scientific).

### 3.4.2 Ligaatio pJexpress401-vektoriin

Liitettiin geenipooleista eristetyt scFv-AP-insertit 2xNcoI/NotI-digestoituun pJexpress401-vektoriin taulukon 13 mukaisesti. Ligoitiin pooleja +15 °C:ssa yön yli.

**Taulukko 13: DNA-poolien ligaatio-olosuhteet**

	<b>Pooli 1</b>	<b>Pooli 2</b>	<b>Pooli 3</b>	<b>Pooli 4</b>	<b>Vektoritausta</b>
<b>Vektori</b>	0,8 µl (100ng)	0,8 µl (100ng)	0,8 µl (100ng)	0,8 µl (100ng)	0,8 µl (100 ng)
<b>Insertti</b>	12,8 µl (50ng)	5,1 µl (50ng)	5,2 µl (50ng)	9,6 µl (50ng)	-
<b>10x reaktiopuskuri</b>	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
<b>T4-ligaasi (Promega)</b>	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl
<b>rATP</b>	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl
<b>DDIW</b>	2,9 µl	10,6 µl	10,5 µl	6,1 µl	15,7 µl
<b>Yhteensä</b>	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl

### 3.4.3 Transformaatio XL1-blue-kantaan

Transformoitiin pJexpress401 scFv-AP plasmidit *E. coli* XL1-blue -bakteerikantaan kuten kohdassa 3.1. Otettiin 840 µl jokaista transformaatioseosta ja lisättiin niihin 5 ml

SB-kasvatusliuosta, jossa 50 µg/ml kanamysiiniä, 10 µg/ml tetrasykliiniä ja 1 % gluukoosia. Kasvatettiin +37 °C:ssa yön yli.

#### 3.4.4 Poolien tarkastelu immunokompleksi-ELISAlla

Päällystettiin mikrotiitterilevy (Kaivogen KaiSA 96 streptavidin pinnoitettu) kohdassa 3.4 valmistetulla biotinyloidulla anti-Tes220-vasta-aineella (3x mooliylimäärä biotiinia, 30 min inkubaatio). Vasta-ainetta lisättiin 500 ng/kuoppa 100 µl:n tilavuudessa. Levyä inkuboitii 30 min sekoituksessa huoneenlämmössä, minkä jälkeen se pestiin 3x300 µl:lla PBST-puskuria (0,05 % tween20).

Blokattiin levy pipetoimalla jokaiseen kuoppaan 100 µl 0,2 µg/ml biotiinia PBS-puskurissa. Inkuboitii 15 min huoneenlämmössä sekoituksessa ja pestiin 3x300 µl:lla PBST-puskuria.

Pipetoitiin levyllä 100 µl 250 nM testosteronia 1 % DMSO-PBS-liuoksessa/kuoppa ja kontrollikuoppiin 1 % DMSO-PBS-liuosta taulukon 14 mukaisesti. Inkuboitii levyä 30 min huoneenlämmössä ja pestiin se 3x300 µl:lla PBST-puskuria.

**Taulukko 14: Testosteronin ja DMSO:n pipetointi mikrotiitterilevyllä**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	250 nM Tes	1 % DMSO	250 nM Tes	1 % DMSO	250 nM Tes	1 % DMSO	250 nM Tes	1 % DMSO	250 nM Tes
B									
C									
D									
E									1 % DMSO
F									
G									
H									

Tehtiin 1:10 laimennokset kohdassa 3.5.3 tehdyistä 5 ml poolikasvatuksista PBST-puskuriin. Pipetoitiin levyllä laimentamattomia ja laimennettuja kasvatuksia sekä kontrollikuoppiin PBST-puskuria taulukon 15 mukaisesti. Inkuboitii levyä 1 h huoneenlämmössä sekoituksessa ja pestiin se 3x300 µl:lla PBST-puskuria.

Taulukko 15: XL1-blue pJexpress401 scFv-AP -kasvatusten pipetointi mikrotitterilevyille

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	Pooli 1		Pooli 2		Pooli 3		Pooli 4		Tausta 100µl PBST
B	1:1		1:1		1:1		1:1		
C	100µl		100µl		100µl		100µl		
D									
E	Pooli 1		Pooli 2		Pooli 3		Pooli 4		
F	1:10		1:10		1:10		1:10		
G	100µl		100µl		100µl		100µl		
H									

Detektoitiin vasta-aine 2 mg/ml PNPP-liuoksella (Sigma-Aldrich) dietanoliamiinipuskurissa (Reagen), jota pipetoitiin 100 µl/kuoppa. Mitattiin levyjen absorbanssi 405 nm:n aallonpituudella Varioskan mikrotitterilevylukijalla (Thermo Scientific).

### 3.5 Robottiseulonnan positiivisten kloonien poiminta, kasvatus ja induktio

Antti Tullila seuloi yllämainituista seulontakierroksista yksittäispesäkkeet VTT:n robotiasemalla ELISA-menetelmällä. Tässä työssä jatkettiin 20 positiivisella kloonilla. Positiiviset kloonit poimittiin steriileillä pipetinkärjillä mikrotitterilevyiltä ja siirrostettiin 4 ml:aan SB-kasvatusliuosta, jossa 50 oli µg/ml kanamysiiniä, 10 µg/ml tetrasykliiniä ja 1 % glukoosia. Klooneja kasvatettiin +37 °C:ssa 225 rpm:n ravistuksessa yön yli. Otettiin 1,6 ml jokaista bakteerikasvatusta ja eristettiin niistä plasmidi-DNA kuten kohdassa 3.1 ja säilöttiin -80 °C:een. Lähetettiin pieni määrä jokaisen 20 kloonin plasmidi-DNA:ta yhdessä 3:n aiemmasta seulonnasta saadun positiivisen kloonin DNA:n kanssa GATC Biotechille sekvensoitavaksi.

Indusoiitiin proteiinituotto siirtämällä 80 µl kasvatuksia 4 ml:aan SB-kasvatusliuosta, jossa oli 50 µg/ml kanamysiiniä, 10 µg/ml tetrasykliiniä, 1 % glukoosia ja 1 mM IPTG-liuosta ja kasvattamalla +30 °C:ssa sekoituksessa yön yli. Sentrifugoitiin induktiokasvatuksia 10000 g:ssä 10 min ja otettiin supernatantti talteen.

### 3.6 Positiivisten kloonien tuottotasomääritykset

Löydettyjen positiivisten kloonien tuottotaso määritettiin kolmella menetelmällä: Western blotilla, alkaalisen fosfataasin entsyymiaktiivisuuden mittauksella sekä immuunokompleksi-ELISA:lla.

#### 3.6.1 Western blot

Otettiin 15 µl kohdassa 3.6 tehtyjä induktiokasvatuksia, lisättiin jokaiseen 5 µl näytekpuskuria (6x DNA loading dye & SDS solution, Thermo Scientific), ja lämmitettiin +94 °C:ssa 2 min. Pipetoitiin 20 µl näytteitä sekä kokostandardia (Dual-color precision plus protein standard BioRad) geelille (4-15 % Miniprotean TGX, BioRad) ja ajettiin RB-puskurissa 300 V:n jännitteellä. Tehtiin Western blot kuten kohdassa 3.3.1

#### 3.6.2 Tuottotason määrittäminen suoraan supernatantista entsyymiaktiivisuuden avulla

Testattiin onko mahdollista selvittää scFv-AP:n tuottotasoa mittaamalla alkaalisen fosfataasin aktiivisuutta suoraan kasvatusliuoksesta. *E. coli* tuottaa myös hieman omaa alkaalista fosfataasiaan, joten määrittämisessä käytettiin negatiivisena kontrollina aiemmin tuotettua Fab-vasta-ainetta sisältävää supernatanttia (Henri Arola, VTT).

Valmistettiin 5 µg/ml ja 1 µg/ml – 0,0316 µg/ml puolilaimennossarja *E. coli* AP:stä 1 mM Tris-puskuriin (pH 8,0). Pipetoitiin kasvatuksia, standardeja ja kontrollia mikrotiiterilevylle 20 µl/kuoppa taulukon 16 mukaisesti. Pipetoitiin jokaiseen kuoppaan 80 µl 2 mg/ml PNPP-liuosta (Sigma-Aldrich) dietanoliiniinipuskurissa (Reagena) ja mitattiin absorbanssi aallonpituudella 405 Varioskan mikrotiiterilevylukijalla.

Taulukko 16: Bakteerikasvatusten ja AP-standardien pipetointi mikrotiiterilevylle

	1	2	3	4	5	6	7	8
<b>A</b>	AP 5 µg/ml		Pooli 1 B2		Pooli 2 H11		Pooli 4 C10	
<b>B</b>	Ap 1µg/ml		Pooli 1C3		Pooli 2 F12		Pooli 4 A7	
<b>C</b>	AP 0,5 µg/ml		Pooli 1 A7		Pooli 3 H1		Pooli 4 F7	
<b>D</b>	AP 0,25 µg/ml		Pooli 1 A8		Pooli 3 D2		Pooli 4 E1	
<b>E</b>	AP 0,125 µg/ml		Pooli 1 H4		Pooli 3 G4		Anti-IC-HT2	
<b>F</b>	AP 0,062 µg/ml		Pooli 1 C6		Pooli 3 E8			
<b>G</b>	AP 0,0316 µg/ml		Pooli 2 F4		Pooli 3 E9			
<b>H</b>			Pooli 2 B11		Pooli 4 B9			

### 3.6.3 Immunokompleksi-ELISA

Mikrotiiterilevyn päällystys ja blokkaukset tehtiin kuten kohdassa 3.5.4. Pipetoitiin levylle 250 nM testosteronia 1 % DMSO-liuoksessa ja kontrollikuoppiin 1 % DMSO-liuosta taulukon 17 mukaisesti. Inkuboitiin levyä 30 min huoneenlämmössä ja pestiin se 3x300 µl:lla PBST-puskuria.

Taulukko 17: Testosteronin ja DMSO:n pipetointi mikrotiiterilevylle

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<b>A</b>	250 nM Tes									
<b>B</b>	1 % DMSO									
<b>C</b>	250 nM Tes									
<b>D</b>	1 % DMSO									
<b>E</b>	250 nM Tes									
<b>F</b>	1 % DMSO									
<b>G</b>	250 nM Tes									
<b>H</b>	1 % DMSO									

Pipetoitiin levylle 100 µl jokaista kasvatusliuosta PBST-puskuriin 1:2 laimennettuna (taulukko 18). Inkuboitiin levyä 1 h huoneenlämmössä ja pestiin se 3x300µl:lla PBST-puskuria.

Taulukko 18: Kasvatusliuoslaimennosten pipetointi mikrotitterilevyille

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	Pooli 1 B2	Pooli 1 A7	Pooli 1 H4	Pooli 2 F4	Pooli 2 H11	Pooli 3 H1	Pooli 3 G4	Pooli 3 E9	Pooli 4 C10	Pooli 4 F7
B	Pooli 1 B2	Pooli 1 A7	Pooli 1 H4	Pooli 2 F4	Pooli 2 H11	Pooli 3 H1	Pooli 3 G4	Pooli 3 E9	Pooli 4 C10	Pooli 4 F7
C	Pooli 1 B2	Pooli 1 A7	Pooli 1 H4	Pooli 2 F4	Pooli 2 H11	Pooli 3 H1	Pooli 3 G4	Pooli 3 E9	Pooli 4 C10	Pooli 4 F7
D	Pooli 1 B2	Pooli 1 A7	Pooli 1 H4	Pooli 2 F4	Pooli 2 H11	Pooli 3 H1	Pooli 3 G4	Pooli 3 E9	Pooli 4 C10	Pooli 4 F7
E	Pooli 1 C3	Pooli 1 A8	Pooli 1 C6	Pooli 2 B11	Pooli 2 F12	Pooli 3 D2	Pooli 3 E8	Pooli 4 B9	Pooli 4 A7	Pooli 4 E1
F	Pooli 1 C3	Pooli 1 A8	Pooli 1 C6	Pooli 2 B11	Pooli 2 F12	Pooli 3 D2	Pooli 3 E8	Pooli 4 B9	Pooli 4 A7	Pooli 4 E1
G	Pooli 1 C3	Pooli 1 A8	Pooli 1 C6	Pooli 2 B11	Pooli 2 F12	Pooli 3 D2	Pooli 3 E8	Pooli 4 B9	Pooli 4 A7	Pooli 4 E1
H	Pooli 1 C3	Pooli 1 A8	Pooli 1 C6	Pooli 2 B11	Pooli 2 F12	Pooli 3 D2	Pooli 3 E8	Pooli 4 B9	Pooli 4 A7	Pooli 4 E1

Detektoitiin vasta-aine 2 mg/ml PNPP-liuoksella (Sigma-Aldrich) dietanoliamiinipuskurissa (Reagena), jota pipetoitiin 100 µl/kuoppa. Mitattiin levyjen absorbanssi 405 nm:n aallonpituudella Varioskan mikrolevylukijalla (Thermo Scientific).

### 3.7 Jatkon valittujen kloonien immunokompleksi-ELISA

Tutkittiin eri testosteronipitoisuuksien vaikutusta 12:sta jatkoon valitun kloonin ELISA-vasteisiin. Mikrotitterilevyn päällystys ja blokkaukset tehtiin kuten aiemmissa ELISA-määrittelyissä.

Pipetoitiin levyille 250 nM, 125 nM ja 62,5 nM testosteronilaimennoksia 1 % DMSO-liuoksessa (taulukko 19). Inkuboitiin levyä 30 min huoneenlämmössä ja pestiin se 300 µl:lla PBST-puskuria.

Taulukko 19: Testosteronilaimennosten ja DMSO:n pipetointi mikrotitterilevyille

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Tes 125 nM											
B	Tes 125 nM											
C	Tes 250 nM											
D	Tes 250 nM											
E	Tes 62,5 nM											
F	Tes 62,5 nM											
G	1 % DMSO											
H	1 % DMSO											

Pipetoitiin levyille 12 jatkoon valitun kloonin kasvatusliuosta 1:2 PBST-puskuriin laimennettuna (taulukko 20). Inkuboitiin levyä 1 h huoneenlämmössä ja pestiin se 3x300



$\mu$ l:lla PBST-puskuria. Detektoitiin vasta-aine 2 mg/ml PNPP-liuoksella (Sigma-Aldrich) dietanoliamiinipuskurissa (Reagena), jota pipetoitiin 100  $\mu$ l/kuoppa. Mitattiin levyjen absorbanssi 405 nm:n aallonpituudella Varioskan mikrotiitterilevylukijalla (Thermo Scientific).

**Taulukko 20: Kasvatusliuoslaimennosten pipetointi mikrotiitterilevylle**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	Pooli 1	Pooli 1	Pooli 1	Pooli 1	Pooli 3	Pooli 3	Pooli 3	Pooli 3	Pooli 4	Pooli 4	Pooli 4	Pooli 4
	B2	C3	A7	H4	H1	G4	E8	E9	B9	C10	A7	F7
<b>B</b>	Pooli 1	Pooli 1	Pooli 1	Pooli 1	Pooli 3	Pooli 3	Pooli 3	Pooli 3	Pooli 4	Pooli 4	Pooli 4	Pooli 4
	B2	C3	A7	H4	H1	G4	E8	E9	B9	C10	A7	F7
<b>C</b>	Pooli 1	Pooli 1	Pooli 1	Pooli 1	Pooli 3	Pooli 3	Pooli 3	Pooli 3	Pooli 4	Pooli 4	Pooli 4	Pooli 4
	B2	C3	A7	H4	H1	G4	E8	E9	B9	C10	A7	F7
<b>D</b>	Pooli 1	Pooli 1	Pooli 1	Pooli 1	Pooli 3	Pooli 3	Pooli 3	Pooli 3	Pooli 4	Pooli 4	Pooli 4	Pooli 4
	B2	C3	A7	H4	H1	G4	E8	E9	B9	C10	A7	F7
<b>E</b>	Pooli 1	Pooli 1	Pooli 1	Pooli 1	Pooli 3	Pooli 3	Pooli 3	Pooli 3	Pooli 4	Pooli 4	Pooli 4	Pooli 4
	B2	C3	A7	H4	H1	G4	E8	E9	B9	C10	A7	F7
<b>F</b>	Pooli 1	Pooli 1	Pooli 1	Pooli 1	Pooli 3	Pooli 3	Pooli 3	Pooli 3	Pooli 4	Pooli 4	Pooli 4	Pooli 4
	B2	C3	A7	H4	H1	G4	E8	E9	B9	C10	A7	F7
<b>G</b>	Pooli 1	Pooli 1	Pooli 1	Pooli 1	Pooli 3	Pooli 3	Pooli 3	Pooli 3	Pooli 4	Pooli 4	Pooli 4	Pooli 4
	B2	C3	A7	H4	H1	G4	E8	E9	B9	C10	A7	F7
<b>H</b>	Pooli 1	Pooli 1	Pooli 1	Pooli 1	Pooli 3	Pooli 3	Pooli 3	Pooli 3	Pooli 4	Pooli 4	Pooli 4	Pooli 4
	B2	C3	A7	H4	H1	G4	E8	E9	B9	C10	A7	F7

### 3.8 Yksittäisen kloonin tuotto suuressa mittakaavassa

Siirrostettiin pooli 3 C10 -kloonista kohdassa 3.6 tehtyä kasvatusta 50 ml:aan SB-kanamysiini(50  $\mu$ g/ml)-tetrasykliini (10 $\mu$ g/ml)-glukoosi (1 %) -liuosta. Kasvatettiin +37 °C:ssa ravistuksessa yön yli. Lisättiin 7 ml yön yli kasvatusta seitsemään pulloon, joissa jokaisessa 350 ml Sb-kanamysiini-tetrasykliini-glukoosiliuosta. Inkuboitiin +37 °C:ssa kunnes liuosten OD<sub>600</sub> oli noin 2,5. Lisättiin jokaiseen pulloon 350  $\mu$ l 1 M IPTG-liuosta, 1,75 ml kanamysiiniä ja 700  $\mu$ l tetrasykliiniä. Kasvatettiin +30 °C:ssa 225 rpm ravistuksessa yön yli.

Sentrifugoitiin kasvatuksia 10 min Sorval RC6 sentrifugilla 8000 rpm:ssä +4 °C:ssa, ja otettiin supernatantti talteen. Lisättiin supernatanttiin 2 mg/l DNAasi-entsyymiä, inkuboitiin 1 h huoneenlämmössä ja siirrettiin +4 °C:seen.

### 3.8.1 IMAC-puhdistus

Puhdistettiin tuotettu anti-IC tes220-scFv-AP-fuusio immobilisoidulla metalli-ioni-affiniteettikromatografi-menetelmällä (immobilized metal ion affinity chromatography, IMAC). Suodatettiin sentrifugoitu kasvatusliuos haitarusodattimen läpi ja jaettiin se neljään erään (noin 500 ml/erä). Lisättiin jokaiseen pulloon 450 ml 10 mM Hepes- (pH 7,4), 1 M NaCl-, 10 % glyseroli-, 1 mM imidatsolipuskuria ja 5 ml Cu-sepharosia. Pidettiin pulloja sekoituksessa +4 °C:ssa yön yli.

Kaadettiin kasvatusliuos ja sepharosia kahteen kromatografiapylvääseen (GE Healthcare) ja annettiin sepharosin laskeutua pylväiden pohjalle. Pestiin sepharosia eri vahvuisilla imidatsoli-Hepes-NaCl-glyseroli-puskureilla taulukon 21 mukaisesti. Otettiin kaikki fraktiot talteen.

**Taulukko 21: Sepharosin pesu- ja eluutioliuokset**

	<b>V</b>	<b>Imidatsoli</b>	<b>Hepes</b>	<b>NaCl</b>	<b>Glyseroli</b>
<b>1</b>	100 ml	1 mM	10 mM	1 M	10 %
<b>2</b>	75 ml	10 mM	10 mM	1 M	10 %
<b>3</b>	50 ml	20 mM	10 mM	1 M	10 %
<b>4</b>	20 ml	50 mM	10 mM	1 M	10 %
<b>5</b>	10 ml	75 mM	10 mM	1 M	10 %
<b>6</b>	10 ml	100 mM	10 mM	1 M	10 %
<b>7</b>	10 ml	200 mM	10 mM	1 M	10 %
<b>8</b>	5x10 ml	500 mM	10 mM	1 M	10 %

Tehtiin samanlainen tuotto ja puhdistus myös Pooli 4 F7 -kloonista.

### 3.8.2 Fraktioiden puhtauden ja proteiinipitoisuuden tarkastelu

Tehtiin Western blot kummankin suuressa mittakaavassa tuotetun kloonin IMAC-fraktioille kuten kohdassa 3.3.1. Yhdistettiin korkeimman proteiinipitoisuuden omaavat fraktiot.

Vaihdettiin puhdistettujen vasta-aineiden puskuri 1 mM Hepes 150 mM NaCl -puskuriin dialyysillä, käyttäen dialyysimembraania (MWCO 12-14 kDa, Mediacell International) Siirrettiin dialyysiastia +4 °C:seen ja pidettiin siellä sekoituksessa yön yli. Seuraavana päivänä vaihdettiin puskuri ja jatkettiin dialyysiä vielä 3 h.

Dialyysin jälkeen siirrettiin vasta-aineet Falcon-putkiin ja mitattiin niiden absorbanssit aallonpituudella 280 nm Nanodrop-spektrofotometrillä (Thermo Scientific). Laskettiin absorbanssien perusteella vasta-aineliuosten proteiinipitoisuudet. Proteiinipitoisuuden laskemiseen tarvittava ekstinktiokerroin ( $\epsilon$ ) selvitettiin syöttämällä vasta-aineen aminohapposekvenssi ProtParam-työkaluun ([web.expasy.org/protparam](http://web.expasy.org/protparam)).

$$\text{Pooli 4 C10 -kloni: } A_{280} = 0,066 \quad \epsilon = 1,855 \quad c = \frac{A_{280}}{2\epsilon} = \frac{0,066}{2 \cdot 1,855} = 0,0178 \text{ mg/ml}$$

$$\text{Pooli 4 F7-kloni: } A_{280} = 0,234 \quad \epsilon = 1,855 \quad c = \frac{A_{280}}{2\epsilon} = \frac{0,234}{2 \cdot 1,855} = 0,0631 \text{ mg/ml}$$

Päätettiin konsentroida vasta-aineliuokset proteiinipitoisuuden nostamiseksi. Konsentroidi suoritettiin Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter device -suodattimella (Millipore) valmistajan ohjeen mukaisesti.

### 3.9 Immunokompleksimääritysmenetelmän kehitys puhdistetulla scFv-AP-fuusioproteiinilla

Tutkittiin vasta-aineiden optimaalista suhdetta immunokompleksimäärityksessä kiinnittämällä eri määriä biotinyloitua anti-Tes220-vasta-ainetta streptavidinipinnoitetulle levyille ja käyttämällä sellaisia pitoisuuksia anti-ic-Tes220 scFv-AP (C10)-vasta-ainetta, jotka vastasivat mahdollisia *E.coli* tuottotasoja. Testosteronin pitoisuutena käytettiin korkeaa 125 nM:n pitoisuutta.

Kiinnitettiin mikrotiitterilevyille (Kaivogen KaiSa 96 streptavidin päällystetty) eri määriä PBS-puskuriin laimennettua, biotinyloitua anti-Tes220-vasta-ainetta taulukon 22 mukaisesti. Inkuboitiin levyä 30 min huoneenlämmössä sekoituksessa ja pestiin se 3 x 300 ml:lla PBST-puskuria.

Blokattiin levy pipetoimalla jokaiseen kuoppaan 150  $\mu$ l 0,2  $\mu$ g/ml biotiinia. Inkuboitiin 15 min ja pestiin 3x300  $\mu$ l:lla PBST-puskuria. Pipetoitiin levyille PBS-puskuriin laimennet-

tua 125 nM testosteronin ja kontrollikuoppiin 1 % DMSO-PBS-liuosta, kumpaakin 100 µl/kuoppa (taulukko 22). Inkuboitii 30 min huoneenlämmössä ja pestiin 3x300 µl:lla PBST-puskuria.

**Taulukko 22: Biotinyloidun anti-Tes220-vasta-aineen pipetointi mikrotitterilevyllä**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	200 ng / kuoppa		500 ng / kuoppa		1 µg / kuoppa		200 ng / kuoppa		500 ng / kuoppa		1 µg / kuoppa	
<b>b</b>												
<b>C</b>												
<b>D</b>												
<b>E</b>												
<b>F</b>												
<b>G</b>												
<b>H</b>												
	<b>125 nM Testosteroni</b>						<b>1 % DMSO-PBS</b>					

Lisättiin jokaiseen kuoppaan 100 µl puhdistettua anti-IC tes220-vasta-ainetta eri pitoisuuksina taulukon 23 mukaisesti. Inkuboitii levyä 1 h huoneenlämmössä ja pestiin se 3x300 µl:lla PBST-puskuria.

**Taulukko 23: Anti-IC tes220-vasta-aineen pipetointi mikrotitterilevyllä**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	6 µg/ml scFv-AP											
<b>b</b>	5 µg/ml scFv-AP											
<b>C</b>	4 µg/ml scFv-AP											
<b>D</b>	3 µg/ml scFv-AP											
<b>E</b>	2 µg/ml scFv-AP											
<b>F</b>	1 µg/ml scFv-AP											
<b>G</b>	0,5 µg/ml scFv-AP											
<b>H</b>	0,25 µg/ml scFv-AP											

Detektoitiin vasta-aine pipetoimalla jokaiseen kuoppaan 100 µl 2 mg/ml PNPP-liuosta (Sigma-Aldrich) dietanoliiniinipuskurissa (Reagen). Mitattiin levyn absorbanssi 405 nm:n aallonpituudella Varioskan mikrolevylukijalla (Thermo Scientific).

Toisessa ELISA-testissä käytettiin korkeaa testosteronipitoisuutta (125 nM) ja realistisia putki- ja mikrotitterilevykasvatusten tuottotasoa vastaavia anti-IC tes220-scFv-AP-fuusiomääriä (3 µg/ml, 1 µg/ml ja 0,25 µg/ml). Pipetoitiin jokaiseen mikrotitterilevyn

kuoppaan 5 µg/ml laimennettua biotinyloitua anti-Tes220 -vasta-ainetta 100 µl/kuoppa (=500 ng). Inkuboitii 30 min huoneenlämmössä sekoituksessa ja pestiin 3 x300 µl:lla PBST-puskuria.

Blokattiin kuopat 0,2 µg/ml biotiinilla kuten edellisissä kokeissa. Pipetoitiin levyille Testosteroni ja kontrollikuoppiin 1 % DMSO-PBS-liuosta taulukon 24 mukaisesti. inkuboitii 30 min huoneenlämmössä, ja pestiin kuopat 3 x 300 µl:lla PBST-puskurilla.

**Taulukko 24: Testosteronin ja DMSO:n pipetointi mikrotiitterilevyllä**

	1	2	3	4	5	6	7	8
<b>A</b>	125 nM Testosteroni				1 % DMSO-PBS			
<b>b</b>								
<b>C</b>								
<b>D</b>								
<b>E</b>								
<b>F</b>								
<b>G</b>								
<b>H</b>								

Pipetoitiin levyllä puhdistettua anti-IC tes220-scFv-AP-fuusiota laimennettuna sekä Hepes-puskuriin, että kolmeen eri kasvatusliuokseen (2x TY, SB ja TB) taulukon 25 mukaisesti. Inkuboitii levyä 1 h huoneenlämmössä ja pestiin se 3x300 µl:lla PBST-puskuria.

**Taulukko 25: Anti-IC tes220-vasta-ainelaimennosten pipetointi mikrotiitterilevyllä**

		1	2	3	4	5	6	7	8
<b>3 µg/ml</b>	<b>A</b>	Hepes		2x TY		Hepes		2x TY	
<b>1 µ/ml</b>	<b>B</b>								
<b>0,25 µg/ml</b>	<b>C</b>								
<b>3 µg/ml</b>	<b>D</b>	Sb		TB		SB		TB	
<b>1 µg/ml</b>	<b>E</b>								
<b>0,25 µg/ml</b>	<b>F</b>								

Detektoitiin vasta-aine pipetoimalla jokaiseen kuoppaan 100 µl 2 mg/ml PNPP-liuosta (Sigma-Aldrich) dietanoliamiinipuskurissa (Reagena). Mitattiin levyn absorbanssi 405 nm aallonpituudella Varioskan mikrotiitterilevylukijalla (Thermo Scientific).

Kolmannessa kokeessa tutkittiin pienempien testosteronikonsentraatioiden vaikutusta ELISA-vasteeseen. Biotinyloidun anti-Tes220-vasta-aineen kiinnitys levyille ja blokkaukset biotiinilla tehtiin kuten edellisissä kokeissa. Testosteronilaimennoksia ja 1 % DMSO-kontrollia pipetoitiin levyille 100 µl/kuoppa taulukon 26 mukaisesti. Levyä inkuboitiin 1 h huoneenlämmössä ja se pestiin 3 x300 µl:lla PBST-puskuria.

**Taulukko 26: Testosteronilaimennosten ja DMSO:n pipetointi mikrotiiterilevyille**

	1	2	3	4	5	6	7	8
<b>A</b>	1 % DMSO-PBS							
<b>b</b>	Tes 2,5 ng/ml							
<b>C</b>	Tes 5 ng/ml							
<b>D</b>	Tes 10 ng/ml							
<b>E</b>	Tes 25 ng/ml							
<b>F</b>	Tes 50 ng/ml							
<b>G</b>	Tes 100 ng/ml							
<b>H</b>	Tes 200 ng/ml							

Lisättiin levyille Pooli 4 F7 ja C10 anti-IC Tes220 scFv-AP-vasta-aineiden puhdistamattomia kasvatusliuoksia sekä 2xTY-kasvatusliuokseen, 3 µg/ml pitoisuuteen laimennettuja, puhdistettuja vasta-aineita (taulukko 27). Inkuboitiin levyä 1 h huoneenlämmössä ja pestiin se 3x300 µl:lla PBST-puskuria.

**Taulukko 27: Anti-IC Tes220-vasta-aineiden pipetointi mikrotiiterilevyille**

	1	2	3	4	5	6	7	8
<b>A</b>	C10 kasvatusliuos		C10 2xTY		F7 kasvatusliuos		F7 2xTY	
<b>b</b>								
<b>C</b>								
<b>D</b>								
<b>E</b>								
<b>F</b>								
<b>G</b>								
<b>H</b>								

Detektoitiin vasta-aine pipetoimalla jokaiseen kuoppaan 100 µl 2 mg/ml PNPP-liuosta (Sigma-Aldrich) dietanoliiniinipuskurissa (Reagen). Mitattiin levyn absorbanssi 405 nm:n aallonpituudella Varioskan mikrotiiterilevylukijalla (Thermo Scientific).

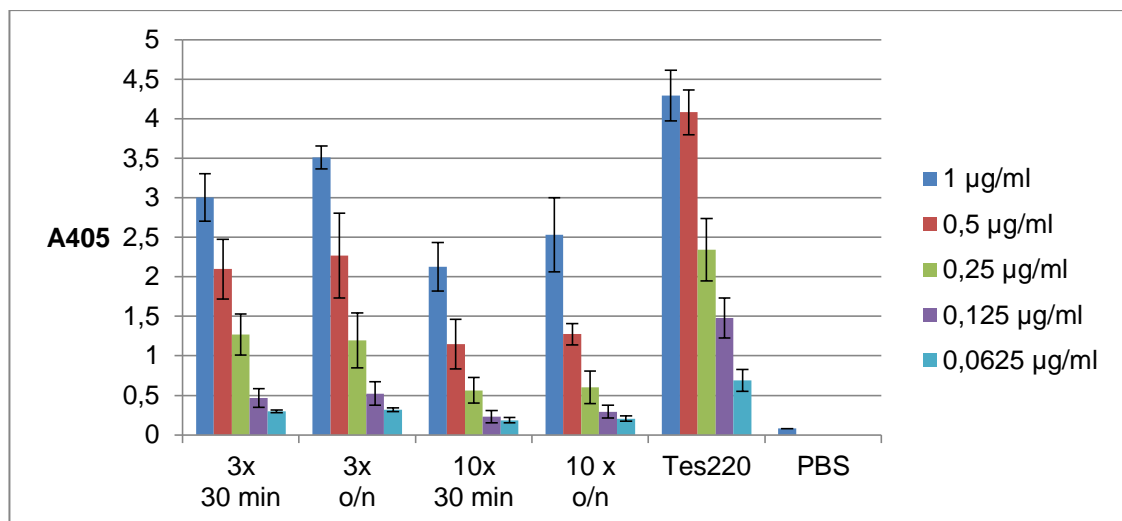
## 4 Tulokset

### 4.1 pJexpress401 scFv-AP plasmidin siirto XL1-blue -bakteerikantaan

Plasmidin siirto *E. coli* XL1-blue -kantaan onnistui odotetusti. Ensimmäisessä tuotto-kokeessa tarkasteltiin kanamysiini- ja tetrasykliini-antibioottien pitoisuuksien vaikutusta plasmidin sisältävien bakteerien kasvuun. Yli yön kasvatuksessa ei silmämääräisesti tarkastellessa havaittu eroja eri antibioottipitoisuuksia sisältävien kasvatusten välillä.

### 4.2 Anti-Tes220-vasta-aineen biotinylointi

Anti-tes220 vasta-ainetta biotinyloitiin kahdella eri biotiiniylimäärällä (3x ja 10x) sekä kahdella eri inkubaatioajalla (30 min ja yön yli). Tuloksista (liite 1) piirretyn kaavion (kaavio 1) perusteella näyttäisi siltä, että biotinylointi onnistui. Kaikkien näytteiden vasteet olivat kuitenkin matalampia kuin biotinyloimattoman vasta-aineen. Tämä saattoi johtua biotiinin kiinnittymisestä antigeenin sitoutumiskohtaan tai sen lähelle

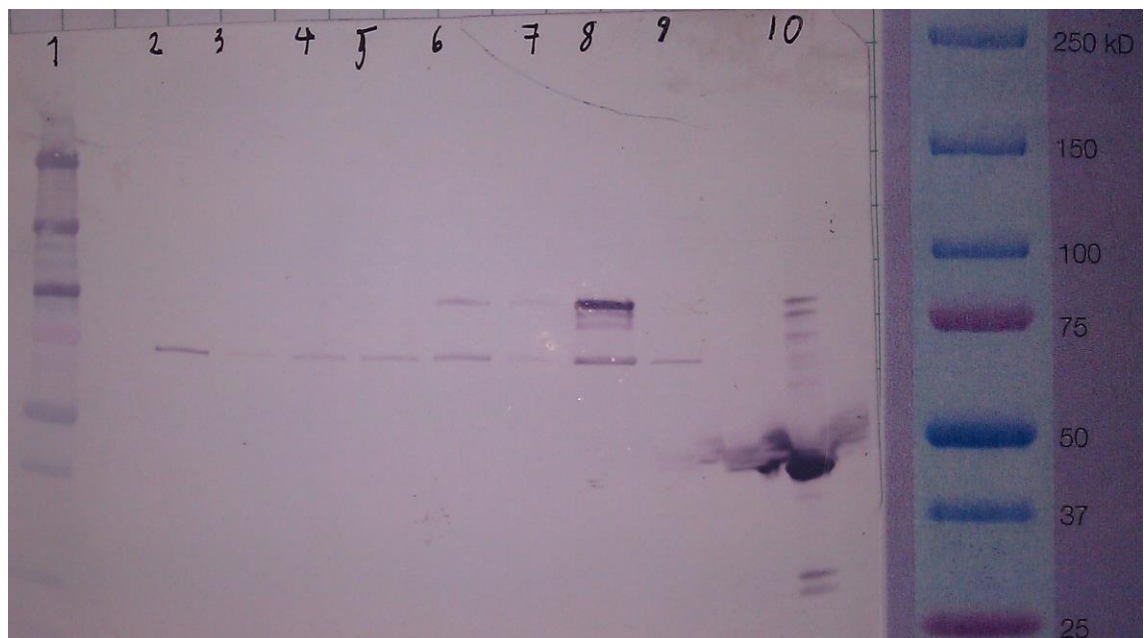


Kaavio 1: Biotinyloidun anti-tes220-vasta-aineen ELISA 20 min entsyymireaktion jälkeen

#### 4.3 scFv-AP-fuusioproteiinin tuottotasokoheet

scFv-AP fuusioproteiinin tuotantoa bakteerisoluisissa tarkasteltiin kahdella eri menetelmällä. Toinen oli aiemmin kehitetty tuottomenetelmä mikrotiiterilevyn kuopissa tapahtuvaan suurten pesäkemäärien kasvatukseen ja toinen menetelmä on yleisesti käytetty 4 ml:n kasvatukseen koeputkissa. Mikrotiiterilevykasvatuksissa kaikki reagenssit laitetaan jo kasvatuksen alussa, jolloin fuusioproteiinin tuotto käynnistyy, kun glukoosin määrä laskee ja IPTG:n aikaan saama tuotto alkaa. Toisessa menetelmässä IPTG lisätään vasta, kun solut ovat kasvaneet ja kuluttaneet proteiinituottoa inhihoivan glukoosin.

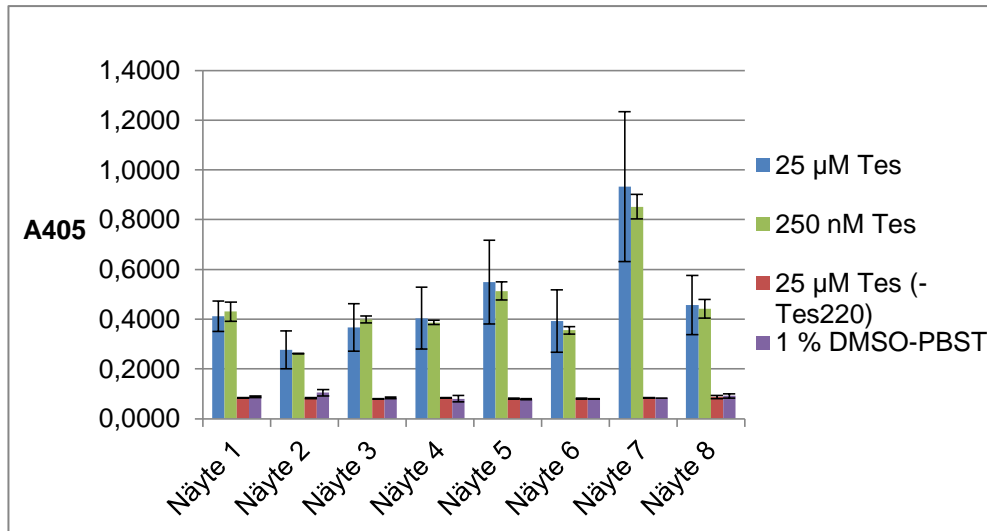
Western blotin tulos (kuva 5) vastasi odotuksia. Induktiomenetelmä 2, jossa IPTG lisättiin vasta kasvatuksen jälkeen, antoi voimakkaamman tuloksen. Menetelmällä 1 saatiin kuitenkin myös tuotettua fuusioproteiinia, joten tätä menetelmää voidaan käyttää suuremman näytemäärän seulonnoissa.



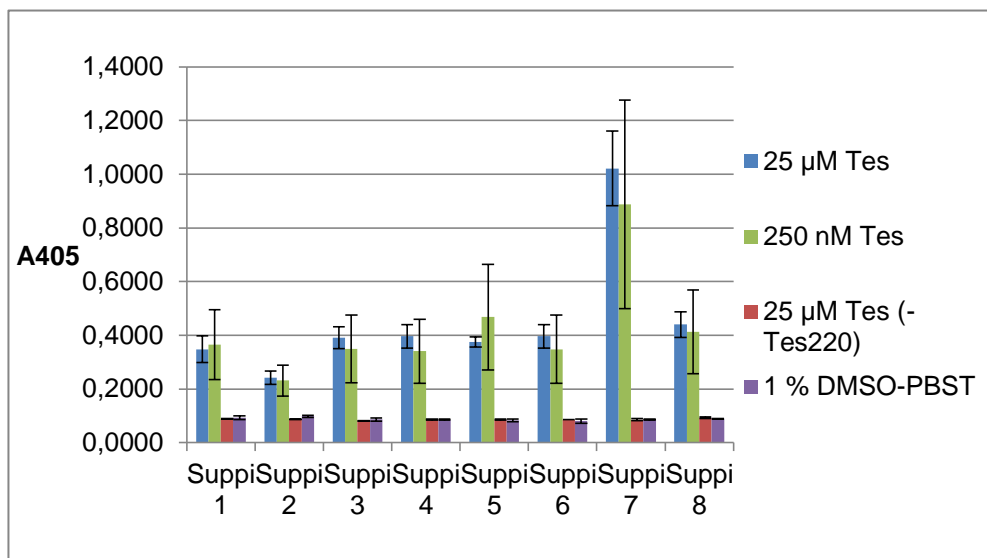
**Kuva 5: Eri induktiomenetelmien vertailu Western blotilla. Kaivo 1: proteiiniokostandardi, kaivot 2-5: induointimenetelmä 1, kaivot 6-9: induointimenetelmä 2 ja kaivo 10: kontrolli-Fab (MPA14)**

Laskettiin absorbanssimittaustuloksista (liite 2) keskiarvot kolmesta rinnakkaisesta kuopasta jokaiselle supernatantille ja piirrettiin niiden pohjalta pylväskaaviot (kaaviot 2 ja 3).





**Kaavio 2: ScFv-AP -fuusioproteiinin absorbanssimittaustulosten keskiarvot, 2 µg anti-Tes220 38 min entsyymireaktion jälkeen**



**Kaavio 3: ScFv-AP -fuusioproteiinin absorbanssimittaustulosten keskiarvot, 500 ng anti-Tes220 38 min entsyymireaktion jälkeen**

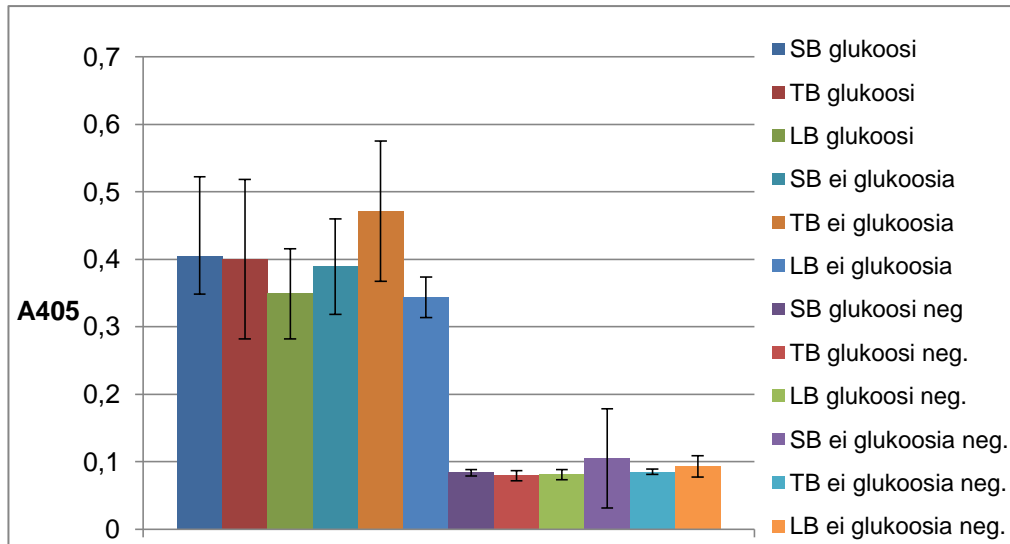
Tulosten perusteella voidaan sanoa, että tutkituilla supernatanteilla saadaan vaste anti-Tes220-testosteroni-immunokompleksin kanssa, kun taas pelkän testosteronin tai anti-Tes220:n kanssa vastetta ei synny. Kaavioista nähdään myös, että vasteiden erot eri Tes220- ja testosteronipitoisuuksien välillä jäävät melko pieniksi. Tämä voi johtua siitä, että molemmat testosteronikonsentraatiot ovat niin korkeita, että ne antavat maksimivasteen. Rinnakkaisten kuoppien väliset keskihajonnat olivat suuria, mutta koska tässä määrittäksessä haluttiin vain tutkia vain, saadaanko tällä fuusioproteiinilla ylipäättään

minkäänlaista vastetta, ja onko eri menetelmillä vaikutusta tuottotasoon, ELISA-menetelmää ei lähdetty optimoimaan.

Suurimmalla osalla supernatanteista vasteet ovat suunnilleen samaa tasoa, mutta supernatantin 7 vaste on huomattavasti keskitasoa korkeampi ja supernatantin 2 hieman keskitasoa alhaisempi. ELISA-menetelmällä saatu tulos on samansuuntainen Western blotin mukaisen tuottotason kanssa. Päätelmänä voidaan sanoa, että koeputkessa tehtävä fuusioproteiinin tuottomenetelmä on hieman tehokkaampi kuin mikrotiitterilevyn kuopille kehitetty menetelmä. Työn jatkon kannalta on kuitenkin tärkeää, että myös mikrotiitterilevykasvatuksille kehitetyllä menetelmällä saadaan fuusioproteiinin tuottoa aikaiseksi siinä määrin, että voidaan tarkastella yksittäisten kloonien ELISA-aktiivisuutta.

Pinnoitusvasta-aineen määrää nostamisella 2 µg:aan/ kuoppa ei ollut vaikutusta ELISA-menetelmän vasteiden suuruuteen. Jo 500ng biotinyloitua anti-Tes220-vastaainetta riittää maksimaaliseen signaaliin tässä ELISA-menetelmässä.

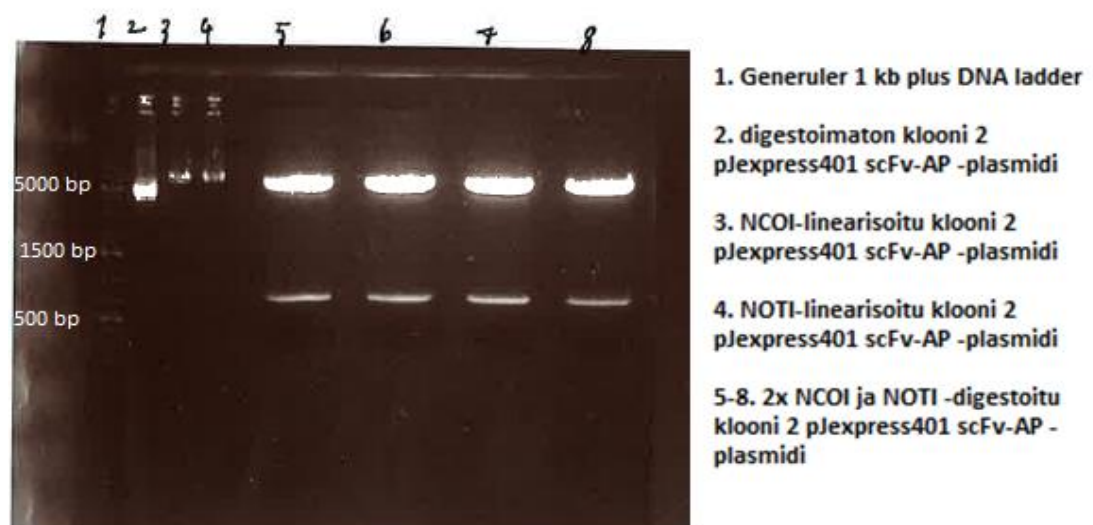
Eri kasvatusmediumien vaikutusta tutkittaessa laskettiin mittaustuloksien (liite 3) keskiarvot ja -hajonnat eri mediuumeille ja piirrettiin niiden pohjalta alla oleva kaavio 4. Kaaviosta nähdään, että fuusioproteiinia saatiin tuotettua kaikissa mediuumeissa. Glukoosin pois jättämisellä ei myöskään näyttäisi olevan kovin suurta vaikutusta tuottotasoon. Rinnakkaisten näytteiden väliset keskihajonnat ovat kuitenkin erittäin suuria kaikilla mediuumeilla, joten koetta olisi vielä uusittava, mikäli siitä halutaan tehdä päätelmiä.



**Kaavio 4: ScFv-AP -fuusioproteiinin absorbanssimittaustulosten keskiarvot eri kasvatusliuoksissa 30 min entsymireaktion jälkeen**

#### 4.4 Vasta-aine geenipoolien siirto pJexpress401-vektoriin

PJexpress 401-plasmidien digestointi onnistui odotetusti. Geelistä otetusta kuvasta (kuva 6) nähdään, että vektorifragmentit (noin 5400 bp) ja inserttifragmentit (noin 770 bp) erottuivat hyvin toisistaan eikä geelillä havaittu ylimääräisiä fragmentteja tai epäpuhtauksia.



**Kuva 6: NcoI/NotI -digestoidut pJexpress 401 scFv-AP plasmidit**

Vasta-ainepoolien digestio (kuva 7) ei ollut aivan yhtä onnistunut. Kaivoihin 6-9 pipetoi-  
tiin ilmeisesti liian paljon DNA:ta, joten niissä näkyy jonkin verran fragmenttien diffun-  
doitumista sekä ylimääräisiä fragmentteja. Insertti on kuitenkin oikean kokoinen, joten  
jatkettiin eristykseen ja ligaatioon



Kuva 7: Vasta-ainepoolien *NcoI*/*NotI* -digestio

Kun ligoidut plasmidit oli transformoitu *E. coli* -bakteereihin, maljattu LB-kanamysiini-  
maljoille ja kasvatettu yön yli, laskettiin maljojen pesäkemäärät (taulukko 28).

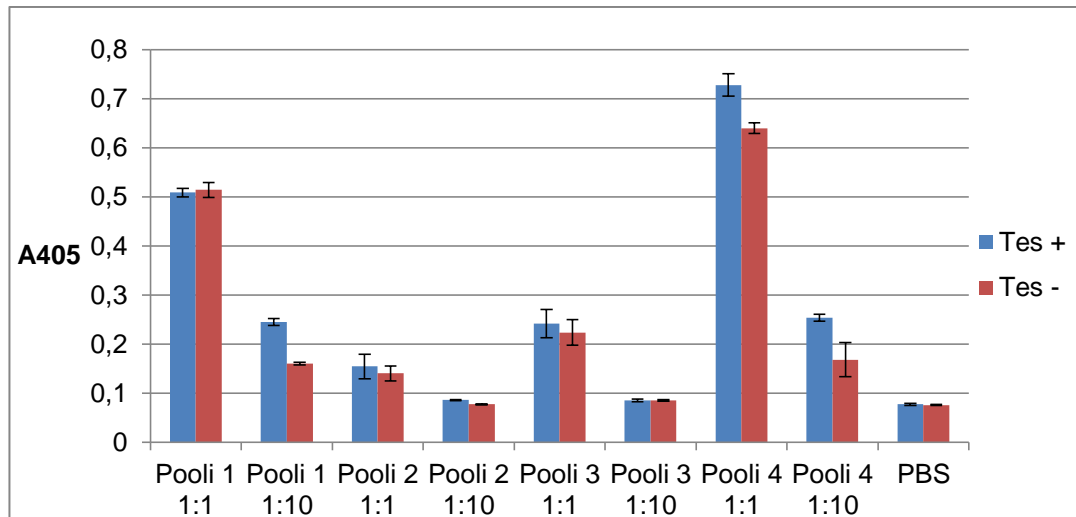
Taulukko 28: Ligaatiomaljojen pesäkemäärät

	100 $\mu$ l	50 $\mu$ l	10 $\mu$ l
<b>Pooli 1</b>	1972	1980	1428
<b>Pooli 2</b>	2409	1600	1532
<b>Pooli 3</b>	2072	1976	799
<b>Pooli 4</b>	2616	2140	1384
<b>Vektoritausta</b>	156	101	18

Bakteerikasvu oli hyvää kaikilla ligaatiomaljoilla. Vektoritausta jäi kaikilla laimennoksilla  
alle 10 %:iin, mitä voidaan pitää erinomaisena tuloksena.

#### 4.4.1 Vasta-ainepoolien tarkastelu immunokompleksi-ELISAlla

Vasta-ainepooleilla tuotettua fuusioproteiinia tutkittiin immunokompleksi-ELISAlla. Laskettiin rinnakkaisten näytteiden mittaustulosten (liite 4) keskiarvot ja keskihajonnat ja koottiin tulokset pylväskaavioon (kaavio 5).



**Kaavio 5: Vasta-ainepoolien immuokompleksi-ELISA 120 min entsyymireaktion jälkeen**

Pooli 4 antoi voimakkaimman vasteen. Tes+:n ja Tes-:n välinen ero jäi miltei kaikilla näytteillä hyvin pieneksi. Poikkeuksena poolin 4 molemmat laimennokset sekä poolin 1 1:10 -laimennos. Koska menetelmää ollaan vasta kehittämässä, kaikki poolit tutkittiin yksittäispesäkkeinä Antti Tullilan toimesta. Valittujen yksittäispesäkkeiden jatkotutkimukset tehtiin tässä opinnäytetyössä (kohta 3.6).

#### 4.5 Positiivisten kloonien tuottotasomääritykset

Edellä valittujen kloonien tuottotaso määritettiin Western blotilla, alkaalisen fosfataasin entsyymiaktiivisuusmäärityksellä ja immunokompleksi-ELISAlla. Kaikkien kolmen määrittämenetelmän tulokset on koottu taulukkoon 29.

Western blotin tulos oli melko heikko. 20 tutkitusta kloonista vain 8 antoi minkäänlaisen vasteen ja näistä 6 oli hädin tuskin paljain silmin havaittavissa. Liukoisen AP:n määrittäksen ja immunokompleksi-ELISAn tuloksia verratessa nähdään, että immunokompleksi-ELISA antoi kautta linjan korkeamman vasteen. Tulokset kuitenkin korreloivat

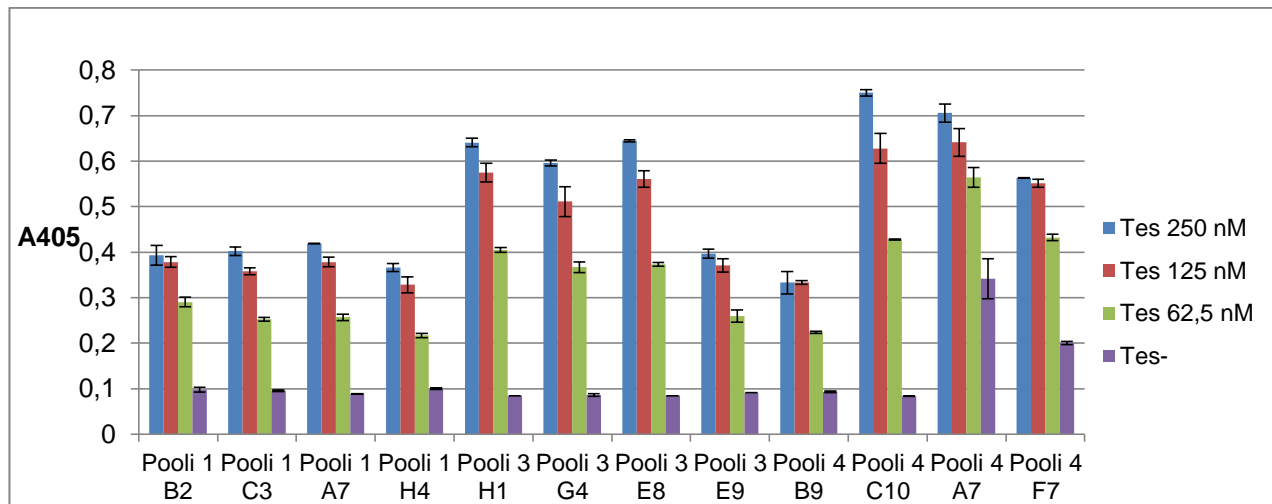
keskenään. Poikkeuksina pooli 4 C10 (1,5 ja 2,5) sekä pooli 4 E1 (2 ja 1,6). Parhaan +tes/-tes-suhteen omaavat 12 kloonia valittiin jatkoon. Jatkoon valituille tehtiin immunokompleksimääritys kolmella tes-pitoisuudella ja nollanäytteellä

**Taulukko 29: Positiivisten kloonien tuottotasotestien tulokset**

Klooni	WB	Liuk. AP	ic-ELISA	Valitut
		A405	+/-suhde	tes titraus
Pooli 1 B2	-	0,7	1,9	x
Pooli 1 C3	-	0,8	1,8	x
Pooli 1 A7	-	0,8	2	x
Pooli 1 A8	-	0,7	1,7	
Pooli 1 H4	-	0,8	1,7	x
Pooli 2 I6	-	0,6	1,6	
Pooli 2 F4	-	0,7	1,6	
Pooli 2 B11	-	0,7	1,6	
Pooli 2 H11	-	0,8	1,5	
Pooli 2 F12	-	0,8	1,6	
Pooli 3 H1	+	1,2	2,5	x
Pooli 3 D2	+	1,6	1,6	
Pooli 3 G4	+	1,1	2,3	x
Pooli 3 E8	++	1,4	2,3	x
Pooli 3 E9	+	0,8	1,9	x
Pooli 3 B9	-	0,8	1,8	x
Pooli 4 A7	++	2,2	2	x
Pooli 4 C10	+	1,5	2,5	x
Pooli 4 F7	+	2,1	1,8	x
Pooli 4 E1	-	2	1,6	
Anti-IC HT-2		0,8		

#### 4.6 Jatkon valittujen kloonien immunokompleksi-ELISA

Piirrettiin mittaustulosten (liite 5) perusteella kaavion 6 mukainen pylväskaavio. Taulukosta nähdään, että näytteiden ELISA-vaste käyttäytyy lineaarisesti suhteessa testosteronipitoisuuteen. 250 nM ja 125 nM pitoisuuksien välinen ero jää kuitenkin useimmissa näytteillä hyvin pieneksi. Rinnakkaisten näytteiden välinen keskihajonta on myös melko alhainen.



**Kaavio 6: Jatkon valittujen kloonien immunokompleksi-ELISA, 180 min entsyymireaktion jälkeen**

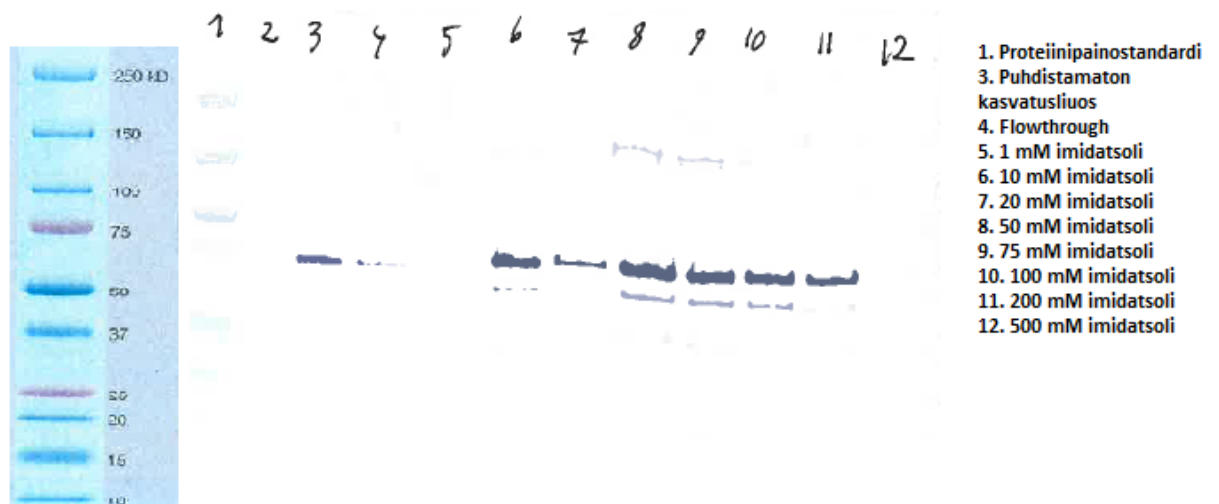
Valittiin kloonit Pooli 3 H1, pooli 3 E9, pooli 4 C10 ja pooli 4 F7 jatkotutkimuksiin. Vaikka pooli 4 A7 -kloni antoi hyvän vasteen, ei sitä korkean taustavasteen takia valittu jatsoon.

GATC:itä saaduista sekvensointituloksista nähtiin, että tutkituista yksittäispesäkkeistä 15 oli samaa kloonia. Pooli 4 A7 ja F7 olivat eri kloonia ja pooli 3 H1 ilmeisesti seka-kloni.

#### 4.7 Yksittäisten kloonien puhdistus suuressa mittakaavassa

Elisan ja sekvenssidatan perusteella valittiin puhdistettavaksi kaksi kloonia: pooli 4 C10 ja pooli 4 F7.

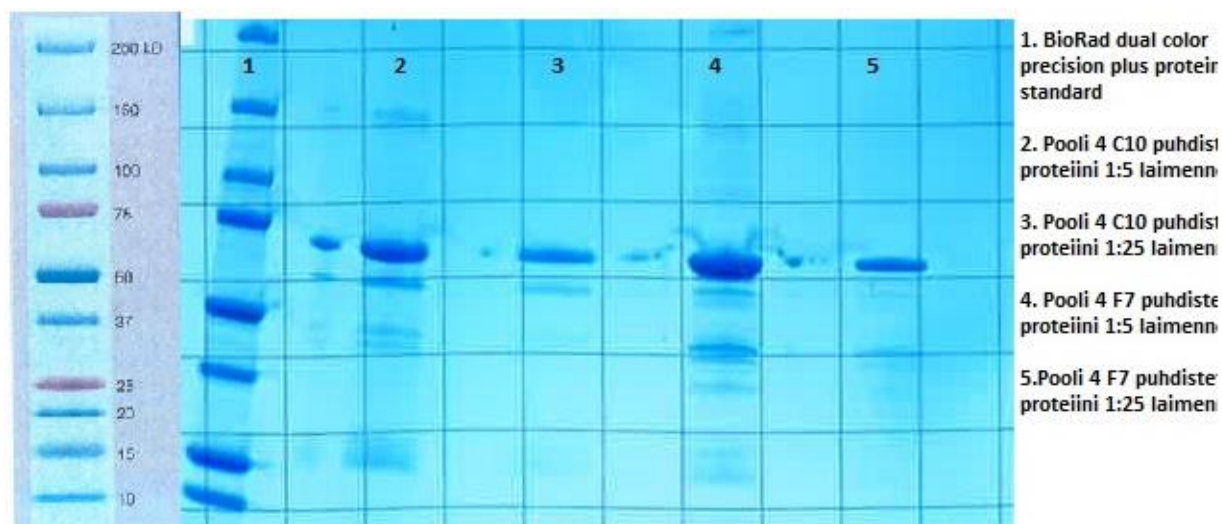
Pooli 4 C10 -kloonin IMAC-fraktioista tehdyn Western blotin (kuva 8) tuloksista nähdään, että läpitullessa on hieman fuusioproteiinia, mikä saattaa johtua siitä, että IMAC-matriksin kapasiteetti ei ole ollut riittävä. Jostakin syystä myös matalissa imidatsolikonsentraatioissa nähdään pieni määrä proteiinia, mutta suurin osa siitä on eluoitettu 50–500 mM:n konsentraatioilla



**Kuva 8: Pooli 4 C10 kloonin IMAC-fraktiot**

Kuvaan 9 on koottu molemmat puhdistetut proteiinit puhtaustason tarkastelua varten. Kuvasta huomataan että voimakkain bandi (noin 75 kD) saadaan fuusioproteiinista. Proteiinin alapuolella olevat bandit ovat sen hajoamistuotteena syntyvää alkaalista fosfaasia sekä muita epäpuhtauksia. Nämä epäpuhtaudet eivät kuitenkaan haittaa immunokompleksimääritystä.





Kuva 9: Puhdistettujen fuusioproteiinien SDS-Page

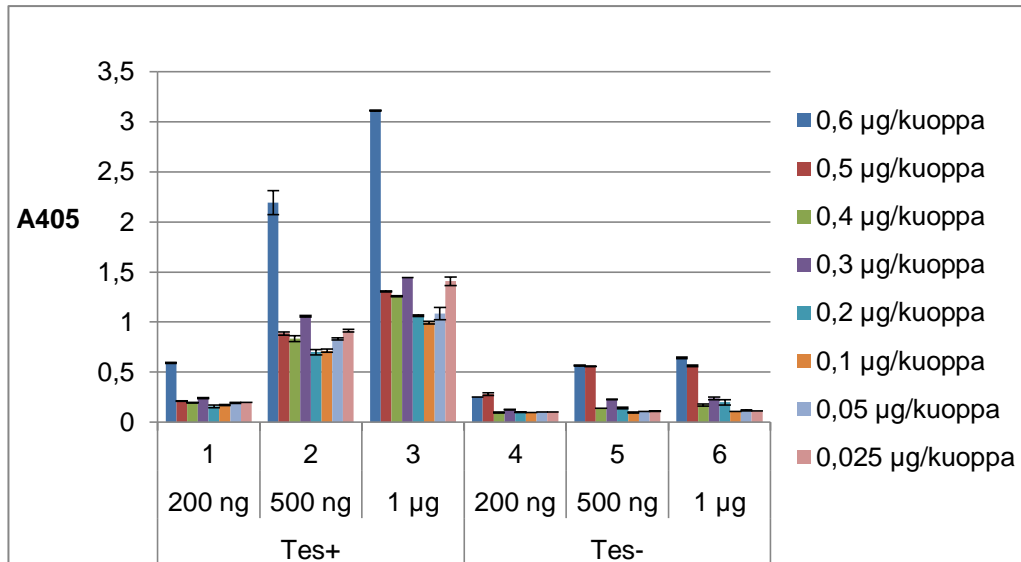
Taulukossa 30 on kahdesta puhdistetusta proteiinituotosta eristetyn fuusioproteiinin lopullinen tilavuus ja pitoisuus. Kloonien proteiinisaannot ovat samaa tasoa, F7-kloonin ollessa hieman korkeampi.

Taulukko 30: Suuren mittakaavan proteiinituottojen saannot

	Pitoisuus (mg/ml)	Tilavuus (ml)	Määrä (mg)
Klooni C10	0,37	3	1,11
Klooni F7	0,39	4,8	1,88

#### 4.8 Immunokompleksimääritysmenetelmän kehitys puhdistetulla scFv-AP fuusioproteiinilla

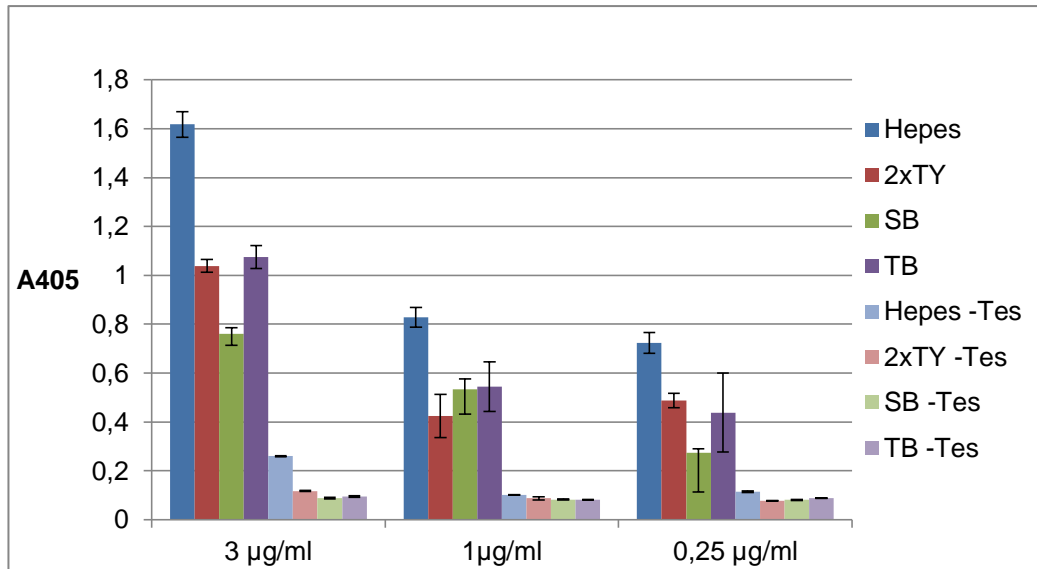
Mittaustulosten (liite 6) pohjalta piirretystä kaaviosta (kaavio 7) havaitaan, että vasta-aineiden pitoisuuksien muuttaminen vaikuttaa voimakkaasti sekä kokonais- että taustavasteeseen. Anti-tes220-vasta-aineen pitoisuuden noustessa myös vaste nousee lineaarisesti. Anti-ic-tes-scFv-AP-fuusiolla pitoisuuden vaikutus vasteeseen ei ole aivan yhtä suora. 0,6 µg:n pitoisuus antaa huomattavasti muita voimakkaamman signaalin, mutta matalampien pitoisuuksien välinen ero jää paljon pienemmäksi. Määrittystä olisi vielä toistettava, jotta siitä voisi tehdä päätelmiä.



**Kaavio 7: Määritysmenetelmän kehitys, 1. ELISA: vasta-ainesuhteiden vaikutus vasteeseen 120 min entsyymireaktion jälkeen**

Toisessa kokeessa (kaavio 8) tarkasteltiin immunokompleksimääritysmenetelmän toimivuutta erilaisissa bakteerikasvatusliuoksissa. Hepes-puskuri antoi parhaan vasteen, mutta myös kasvatusliuosten vasteet olivat selkeästi taustasignaalia korkeampia.

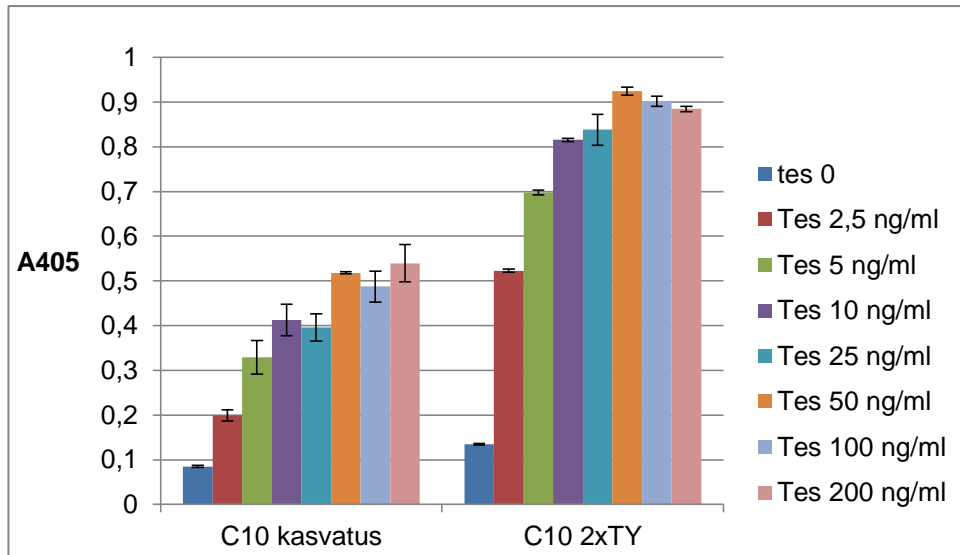
Matalammilla anti-ic-tes -vasta-ainepitoisuuksilla rinnakkaisten näytekuoppien välinen keskihajonta kasvoi melko suureksi. Tulosten perusteella näyttäisi siltä, että kasvatusliuokset eivät haittaa määritysmenetelmää.



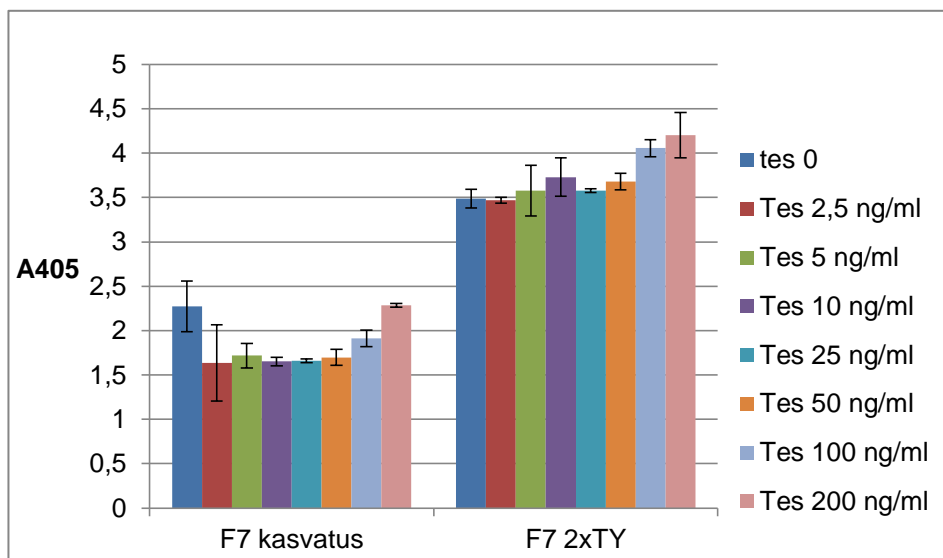
**Kaavio 8: Määritysmenetelmän kehitys, 2. ELISA: eri kasvatusliuosten vaikutus vasteeseen 120 min entsyymireaktion jälkeen**

Puhdistetuilla anti-ic-TES220-scFv-AP-klooneilla C10 ja F7 tarkasteltiin vielä vasteen riippuvuutta testosteronin pitoisuudesta. C10 (kaavio 9) toimi hyvin. ELISA-vaste oli lineaarinen ja rinnakkaisten näytteiden keskihajonta pieni. F7-kloonin tulos (kaavio 10) ei ollut yhtä onnistunut. Vaikka sen kokonaisvaste oli paljon korkeampi kuin C10-kloonin, olivat tulosten lineaarisuus ja keskihajonta paljon huonommat.

F7-kloonin toimi hyvin aiemmassa ELISA-määrityksessä (kohta 4.7), jossa käytettiin korkeampia testosteronipitoisuuksia. Kloonin pitäisi vielä testata eri vasta-ainesuhteilla ja testosteronipitoisuuksilla, jotta sen toimivuudesta voitaisiin olla varmoja, mutta koska C10-kloonin näyttöä toimivan paremmin, ei F7:llä jatkaminen olisi kovinkaan kustannus-tehokasta.



Kaavio 9: Määritysmenetelmän kehitys 3. ELISA: C10-kloonin kasvatusliuos vs. puhdistettu proteiini 120 min entsyymireaktion jälkeen



Kaavio 10: Määritysmenetelmän kehitys 3. ELISA: F7-kloonin kasvatusliuos vs. puhdistettu proteiini 120 min entsyymireaktion jälkeen

## 5 Yhteenveto

Tässä opinnäytetyössä pyrittiin kehittämään VTT:n naiiville vasta-ainekirjastolle nopea ja tehokas seulontamenetelmä, jota voitaisiin käyttää hyväksi immunokompleksivasta-aineiden kehittämisessä pienanalyyteileille.

Tutkittu scFv-Ap-fuusioproteiini todettiin toimivaksi. Sen tuotto *E. coli* -bakteerisoluisissa onnistui, ja sitä voitiin soveltaa naiivin vasta-ainekirjaston seulonnan jälkeisessä yksittäispesäkkeiden testauksessa. Seulotuista pesäkkeistä pystyttiin löytämään parhaan sitomisominaisuuden omaavia vasta-aineita tuottavat kloonit. Fuusioproteiinin tuotossa on kuitenkin vielä parantamisen varaa. Proteiinisaanto 2 l:n bakteerikasvatuksesta oli puhdistuksen jälkeen vain 1 mg. Saantoa voitaisiin mahdollisesti parantaa käyttämällä eri vektoria tai bakteerikantaa sekä optimoimalla bakteerien kasvatusolosuhteita.

Kehitetty ELISA-määritysmenetelmä osoittautui toimivaksi pienimolekyylisten yhdisteiden analysoimisessa. Opinnäytetyössä testattiin kaksi kloonia C10 ja F7, joista C10-klooni osoittautui luotettavammaksi. Tämä kloonin ELISA-vaste eri testosteronipitoisuuksilla (2,5 ng/ml - 200 ng/ml) oli huomattavasti F7-kloonin lineaarisempi. Myös eri näytteiden välinen keskihajonta puhdistetulla proteiinilla oli C10-kloonilla miltei 15 kertaa pienempi kuin F7-kloonilla. Menetelmää olisi kuitenkin vielä tutkittava useammilla klooneilla sekä eri testosteroni- ja vasta-ainemäärillä, jotta sen yleispätevyydestä voitaisiin tehdä päätelmiä.

## Lähteet

- [1] T. Nevanen. 2004. Enantioselective antibody fragments. Väitöskirja. VTT Technical Research Centre of Finland. Espoo. s. 19 –22, 24 – 25.
- [2] H. Arola. 2011. Development of novel antibodies by phage display technology. Aalto University School of Chemical Technology. Helsinki. s. 4, 12, 13 – 16.
- [3] D. Hames, N. Hooper. 2005. Bios instant notes in biochemistry, 3rd ed. Taylor & Francis. New York. s.118, 119 – 121.
- [4] T. Kindt, R. Goldsby, B. Osborne, J. Kuby. 2007. Kuby Immunology 6th ed. W.H. Freeman. New York. s.85.
- [5] Antibody Structure and Classes of Immunoglobulins. Verkkodokumentti. Luettu 17.01.2014 <http://www.piercenet.com/method/antibody-structure-classes>
- [6] Pepsin. Verkkodokumentti. Luettu 20.05.2014  
<http://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/analytical-enzymes/pepsin.html>.
- [7] Z. Ahmad, S. Yeap, A. Ali, ym. 2012. ScFv antibody: principles and clinical application. Clinical and developmental Immunology. Volume 2012. Article id 980250. s. 2 – 3.
- [8] N. Kobayashi, H. Oyama. 2010. Antibody engineering toward high-sensitivity high-throughput immunosensing of small molecules. Analyst, 2011. s.642 – 644.
- [9] H. Kim, M. McCoy, S. J. Gee, ym. 2011. Noncompetitive phage anti-immunocomplex real-time polymerase chain reaction for sensitive detection of small molecules. Analytical chemistry, vol. 83 No.1. s. 246.
- [10] M. Niemi, L. Turunen, T. Pulli, ym. 2010. A structural insight into the molecular Recognition of a (-)- $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol and the development of a sensitive, one-step, homogeneous immunocomplex-based assay for its detection. Journal of molecular biology, 2010. s.810.

[11] E. F. Ullman, G. Milburn, J. Jelesko, ym. 1993. Anti-immune complex antibodies enhance affinity and specificity of primary antibodies. Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America, vol 90. Washington D.C. s.1184.

[12] T. Pulli, M. Höyhtyä, H. Söderlund, K. Takkinen. 2005. One-step homogenous immunoassay for small analytes. Anal. chem. 77. s. 2637 – 2638.

[13] H. Kim, M. A. Rossotti, K. Ahn, ym. 2010. Development of a noncompetetive phage anti-immunocomplex assay for brominated diphenyl ether 47. Analytical Biochemistry 401. s.38.

**ELISA biotinyloidulle anti-tes220 -vasta-aineelle, absorbanssimittaustulokset (A<sub>405</sub>)****20  
min**

Results of Photometric1

	Plate:1 - Wave-length:405											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	0,08	3,424	2,494	1,531	0,464	0,308	0,078	3,452	2,544	1,538	0,7	0,338
<b>B</b>	0,079	2,745	2,211	1,361	0,616	0,315	0,076	3,706	2,746	1,331	0,53	0,332
<b>C</b>	0,078	2,837	1,583	0,917	0,32	0,273	0,077	3,367	1,519	0,721	0,335	0,288
<b>D</b>	0,072	2,393	1,546	0,711	0,314	0,23	0,076	2,72	1,459	0,887	0,347	0,243
<b>E</b>	0,08	2,285	1,112	0,643	0,255	0,169	0,079	2,985	1,21	0,498	0,352	0,214
<b>F</b>	0,076	1,701	0,779	0,337	0,128	0,158	0,089	1,886	1,152	0,415	0,181	0,164
<b>G</b>	0,085	0,087	3,916	3,742	4,054	2,735	2,342	1,897	1,797	0,673	0,865	0,078
<b>H</b>	0,09	4,701	4,255	4,442	1,798	2,417	2,872	1,187	1,452	0,531	0,081	0,078



**ScFv-AP-fuusioproteiinin tuottotasokokeet, absorbanssimittaustulokset  
(A<sub>405</sub>)**

**2 µg Tes 38 min**

Plate:1 - Wavelength:405

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>Näyte 1</b>	0,328	0,436	0,472	0,482	0,39	0,42	0,085	0,093	0,085	0,083	0,083	0,084
<b>Näyte 2</b>	0,179	0,288	0,365	0,26	0,262	0,261	0,121	0,103	0,09	0,081	0,083	0,085
<b>Näyte 3</b>	0,232	0,439	0,431	0,386	0,394	0,419	0,084	0,088	0,08	0,079	0,079	0,082
<b>Näyte 4</b>	0,23	0,517	0,464	0,375	0,388	0,396	0,085	0,092	0,063	0,082	0,083	0,084
<b>Näyte 5</b>	0,313	0,685	0,65	0,462	0,538	0,539	0,08	0,081	0,076	0,081	0,078	0,084
<b>Näyte 6</b>	0,215	0,499	0,462	0,343	0,347	0,377	0,079	0,08	0,081	0,078	0,081	0,083
<b>Näyte 7</b>	0,513	1,202	1,086	0,911	0,79	0,854	0,083	0,083	0,082	0,085	0,083	0,084
<b>Näyte 8</b>	0,288	0,549	0,531	0,424	0,407	0,495	0,091	0,102	0,081	0,082	0,083	0,097

**500 ng Tes 38 min**

Plate:1 - Wavelength:405

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>Näyte 1</b>	0,166	0,398	0,481	0,363	0,364	0,369	0,089	0,103	0,089	0,089	0,09	0,089
<b>Näyte 2</b>	0,179	0,269	0,28	0,223	0,237	0,236	0,114	0,093	0,09	0,084	0,088	0,09
<b>Näyte 3</b>	0,314	0,432	0,428	0,344	0,338	0,368	0,086	0,088	0,086	0,073	0,086	0,084
<b>Näyte 4</b>	0,331	0,43	0,43	0,337	0,331	0,354	0,089	0,087	0,082	0,087	0,084	0,088
<b>Näyte 5</b>	0,347	0,367	0,413	0,396	0,497	0,512	0,087	0,076	0,088	0,085	0,084	0,089
<b>Näyte 6</b>	0,338	0,418	0,433	0,332	0,357	0,354	0,086	0,069	0,087	0,085	0,087	0,086
<b>Näyte 7</b>	0,781	1,144	1,14	0,846	0,897	0,92	0,086	0,085	0,088	0,087	0,089	0,081
<b>Näyte 8</b>	0,337	0,514	0,469	0,4	0,408	0,432	0,09	0,087	0,091	0,088	0,1	0,094

### Eri kasvatustuotosten vaikutus scFv-AP-fuusioproteiinin tuottotasoon, absorbanssimittaustulokset (A<sub>405</sub>)

**Levy 1 30 min**

	Suppi 1	Suppi 1 neg.	Suppi 2	Suppi 2 neg.	Suppi 3	Suppi 3 neg.	Suppi 4	Suppi 4 neg.	Suppi 5	Suppi 5 neg.	Suppi 6	Suppi 6 neg.
A	0,385	0,085	0,453	0,091	0,402	0,092	0,418	0,078	0,33	0,081	0,267	0,08
B	0,437	0,084	0,083	0,084	0,482	0,091	0,432	0,073	0,351	0,107	0,331	0,08
C	0,452	0,088	0,377	0,085	0,081	0,077	0,444	0,073	0,072	0,08	0,362	0,08
D	0,309	0,083	0,36	0,071	0,272	0,09	0,424	0,077	0,343	0,073	0,331	0,08
E	0,426	0,08	0,343	0,083	0,328	0,081	0,23	0,072	0,292	0,076	0,228	0,074
F	0,218	0,079	0,368	0,084	0,08	0,081	0,167	0,077	0,075	0,076	0,372	0,077
G	0,535	0,091	0,077	0,08	0,341	0,071	0,511	0,07	0,358	0,077	0,378	0,084
H	0,458	0,084	0,498	0,088	0,598	0,089	0,559	0,077	0,414	0,088	0,525	0,079
	SB	SB	SB	SB	TB	TB	TB	TB	LB	LB	LB	LB
	glukoosi	glukoosi	glukoosi	glukoosi	glukoosi	glukoosi	glukoosi	glukoosi	glukoosi	glukoosi	glukoosi	glukoosi

**Levy 2 30 min**

	Suppi 7	Suppi 7 neg.	Suppi 8	Suppi 8 neg.	Suppi 9	Suppi 9 neg.	Suppi 10	Suppi 10 neg.	Suppi 11	Suppi 11 neg.	Suppi 12	Suppi 12 neg.
A	0,352	0,086	0,409	0,088	0,326	0,092	0,42	0,086	0,389	0,084	0,349	0,142
B	0,34	0,086	0,496	0,09	0,479	0,087	0,693	0,087	0,087	0,081	0,352	0,096
C	0,256	0,086	0,083	0,086	0,514	0,084	0,085	0,085	0,317	0,085	0,385	0,087
D	0,33	0,085	0,426	0,077	0,58	0,077	0,436	0,085	0,321	0,086	0,373	0,093
E	0,425	0,389	0,431	0,083	0,445	0,079	0,599	0,085	0,343	0,073	0,359	0,097
F	0,342	0,086	0,072	0,086	0,414	0,084	0,089	0,084	0,288	0,082	0,344	0,117
G	0,373	0,084	0,376	0,089	0,334	0,091	0,344	0,083	0,085	0,087	0,342	0,09
H	0,545	0,089	0,344	0,086	0,562	0,084	0,457	0,089	0,289	0,103	0,361	0,089
	SB	SB	SB	SB	TB	TB	TB	TB	LB	LB	LB	LB

**Vasta-ainepoolien immunokompleksi-ELISA, absorbanssimittaustulokset  
(A<sub>405</sub>)**

120 min

Plate:1 - Wavelength:405

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	0,513	0,523	0,117	0,115	0,203	0,195	0,692	0,624	0,081	0,037	0,038	0,04
<b>B</b>	0,495	0,534	0,148	0,145	0,233	0,2	0,748	0,644	0,078	0,036	0,038	0,041
<b>C</b>	0,508	0,497	0,17	0,149	0,247	0,247	0,724	0,638	0,076	0,041	0,041	0,04
<b>D</b>	0,518	0,502	0,183	0,154	0,283	0,252	0,746	0,653	0,075	0,035	0,04	0,038
<b>E</b>	0,242	0,158	0,088	0,076	0,097	0,083	0,256	0,147	0,076	0,039	0,035	0,04
<b>F</b>	0,237	0,16	0,085	0,078	0,094	0,084	0,247	0,147	0,075	0,045	0,038	0,035
<b>G</b>	0,245	0,165	0,085	0,079	0,096	0,087	0,248	0,152	0,075	0,031	0,039	0,036
<b>H</b>	0,256	0,159	0,086	0,077	0,101	0,088	0,264	0,228	0,078	0,036	0,04	0,05

**Jatkoon valittujen kloonien immunokompleksi-ELISA, absorbanssimit-  
taustulokset (A<sub>405</sub>)****2 h 50 min**

Plate:1 - Wavelength:405

	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>
<b>A</b>	0,367	0,35	0,368	0,311	0,554	0,544	0,543	0,385	0,329	0,595	0,671	0,542
<b>B</b>	0,39	0,366	0,389	0,346	0,595	0,478	0,579	0,356	0,338	0,661	0,611	0,56
<b>C</b>	0,415	0,393	0,42	0,357	0,631	0,602	0,647	0,387	0,308	0,743	0,686	0,564
<b>D</b>	0,372	0,411	0,418	0,375	0,65	0,589	0,642	0,407	0,358	0,757	0,725	0,563
<b>E</b>	0,28	0,257	0,264	0,222	0,4	0,379	0,377	0,273	0,222	0,429	0,586	0,425
<b>F</b>	0,301	0,248	0,25	0,212	0,41	0,355	0,369	0,246	0,226	0,427	0,543	0,439
<b>G</b>	0,103	0,094	0,089	0,098	0,085	0,083	0,085	0,091	0,092	0,083	0,298	0,197
<b>H</b>	0,093	0,097	0,088	0,102	0,085	0,089	0,085	0,091	0,095	0,085	0,386	0,204

## Immunokompleksimääritysmenetelmän kehitys, absorbanssimittaustulokset ( $A_{405}$ )

### Eri vasta-ainesuhteiden vaikutus vasteeseen

120 min

	Tes+						Tes-					
	200 ng		500 ng		1 µg		200 ng		500 ng		1 µg	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
6 µg/ml	0,588	0,599	2,072	2,31	3,116	3,104	0,252	0,254	0,574	0,562	0,654	0,635
5 µg/ml	0,209	0,213	0,87	0,904	1,311	1,302	0,27	0,293	0,558	0,562	0,573	0,558
4 µg/ml	0,198	0,196	0,808	0,865	1,255	1,261	0,094	0,101	0,138	0,142	0,164	0,184
3 µg/ml	0,235	0,247	1,064	1,053	1,446	1,443	0,127	0,129	0,231	0,228	0,224	0,252
2 µg/ml	0,172	0,146	0,671	0,728	1,07	1,054	0,104	0,1	0,153	0,137	0,172	0,227
1 µg/ml	0,177	0,169	0,697	0,733	1,01	0,979	0,1	0,098	0,102	0,094	0,109	0,108
0,5 µg/ml	0,191	0,198	0,844	0,823	1,148	1,025	0,104	0,103	0,109	0,11	0,123	0,116
0,25 µg/ml	0,198	0,199	0,903	0,929	1,366	1,451	0,105	0,103	0,107	0,116	0,114	0,113

### Eri kasvatusliuosten vaikutus vasteeseen

120 min

Plate:1 - Wavelength:405

	Tes+								Tes-			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
3 µg/ml	1,67	1,566	1,064	1,013	0,262	0,257	0,115	0,119	0,041	0,043	0,047	0,044
1 µg/ml	0,788	0,869	0,336	0,513	0,103	0,1	0,081	0,094	0,043	0,047	0,043	0,046
0,25 µg/ml	0,681	0,765	0,458	0,517	0,112	0,117	0,077	0,078	0,042	0,043	0,043	0,043
3 µg/ml	0,738	0,785	1,027	1,122	0,092	0,085	0,092	0,098	0,039	0,047	0,044	0,045
1 µg/ml	0,49	0,577	0,646	0,442	0,084	0,081	0,08	0,082	0,043	0,043	0,042	0,043
0,25 µg/ml	0,26	0,289	0,276	0,6	0,078	0,083	0,09	0,088	0,042	0,042	0,041	0,041
0 µg/ml	0,051	0,049	0,044	0,045	0,061	0,047	0,053	0,048	0,041	0,04	0,041	0,04
0 µg/ml	0,044	0,05	0,095	0,062	0,1	0,054	0,093	0,055	0,043	0,044	0,043	0,041

**Kasvatusliuos vs puhdistettu proteiini**

120 min

	FASC(B2) C10 suppi		FACS(B2) C10 2xTY		FACS(B2) F7 suppi		FACS(B2) F7 2xTY	
<b>tes 0</b>	0,083	0,087	0,136	0,133	1,988	2,561	3,382	3,591
<b>Tes 2,5 ng/ml</b>	0,211	0,186	0,526	0,519	1,205	2,065	3,439	3,5
<b>Tes 5 ng/ml</b>	0,367	0,291	0,692	0,703	1,581	1,858	3,295	3,861
<b>Tes 10 ng/ml</b>	0,448	0,377	0,812	0,819	1,601	1,701	3,514	3,945
<b>Tes 25 ng/ml</b>	0,426	0,365	0,803	0,873	1,638	1,682	3,559	3,601
<b>Tes 50 ng/ml</b>	0,516	0,52	0,916	0,933	1,61	1,787	3,589	3,776
<b>Tes 100 ng/ml</b>	0,522	0,453	0,913	0,891	1,822	2,008	3,961	4,151
<b>Tes 200 ng/ml</b>	0,581	0,498	0,879	0,891	2,264	2,305	3,95	4,456