

Eeva Seppänen

**ENDOTELIINI-1-FUUSIOPROTEIININ KLOONAAMINEN JA
TUOTTAMINEN**

ENDOTELIINI-1-FUUSIOPROTEIININ
KLOONAAMINEN JA TUOTTAMINEN

Eeva Seppänen
Opinnäytetyö
Syksy 2010
Laboratorioalan koulutusohjelma
Oulun seudun ammattikorkeakoulu

Koulutusohjelma	Opinnäytetyö	Sivuja	+	Liitteitä
Laboratorioalan koulutusohjelma	Opinnäytetyö	56	+	11
Suuntautumisvaihtoehto	Aika			
Bioteknologia	15.10.2010			
Työn tilaaja	Työn tekijä			
Oulun yliopisto, Fysiologian laitos	Eeva Seppänen			
Työn nimi	Endoteliini-1-fuusioproteiinin kloonaminen ja tuottaminen			
Avainsanat	endoteliini-1, fuusioproteiini, geenitekniikka			

Verenpaineen säätelyyn osallistuu useita elimistön tuottamia peptidejä, joista yksi tärkeimpiä on endoteliini-1. Opinnäytetyön tarkoituksena oli tuottaa tioredoksiini-endoteliini-1- (TRX-ET-1) ja glutationi-s-transferaasi-endoteliini-1-fuusioproteiineja (GST-ET-1) *Escherichia coli* -soluissa. Työ oli osa laajempaa Oulun yliopiston ja VTT:n yhteistyöprojektia, jossa kehitetään molekyyllityökaluja ja vasta-aineisiin perustuvaa pikatestiä sydänmarkkereiden määrittämiseksi ihmisnäytteistä.

Työ alkoi endoteliini-1-fuusioplasmidien rakentamisella. Valmiit plasmidikonstruktit transformoitiin XL1-Blue- ja T7express-soluihin kemiallisella transformatiolla. Transformoiduista soluista seulottiin proteiinintuottoa varten sopivimmat klooniehdokkaat miniprep-eristyksellä ja entsyymikäsittelyllä. Tuotetut proteiinit puhdistettiin lopuksi affiniteetikromatografialla ja puhdistuksen aikana kerätyt näytteet sekä eluoidut proteiinifraktiot analysoitiin SDS-PAGE:lla.

SDS-PAGE-geelien perusteella todettiin, että GST-ET-1-fuusioproteiinin tuotto onnistui ja proteiini saatiin puhdistettua affiniteetikromatografialla. TRX-ET-1-fuusioproteiinin kohdalla tuotto ei kuitenkaan onnistunut. Sekvensoinnissa paljastui, että tuottokloonien sisältämä plasmidi olikin GST-ET-1-fuusioproteiinin tuottoon rakennettua pGEX4T-vaso A -fuusioplasmidia. Jotta rakennettujen fuusioplasmidien proteiinin tuottoa voitaisiin vertailla, tulisi TRX-ET-1-fuusioproteiinia ekspressoiva plasmidikonstrukti valmistaa uusiksi. Jatkossa proteiinin tuottoon paremmin soveltuvammalla fuusioplasmidilla voitaisiin tuottaa endoteliini-1-fuusioproteiinia vasta-aineisiin perustuvia pikatestejä varten.

SISÄLTÖ

1 JOHDANTO	6
2 VERENPAINEEN SÄÄTELY.....	8
2.1 Paikallinen säätely.....	8
2.2 Hermostollinen säätely.....	9
2.3 Humoraalinen säätely.....	10
3 SOLUJEN VÄLINEN VIESTINTÄ	12
3.1 Endokriininen viestintä	12
3.2 Autokriininen viestintä	13
3.3 Parakriininen viestintä	13
4 VERENPAINETTA SÄÄTELEVÄT PEPTIDIT.....	14
4.1 Reniini-angiotensiini-järjestelmä.....	14
4.2 Vasopressiini	14
4.3 Bradykiniini	15
4.4 Endoteliini.....	15
4.4.1 Endoteliini-1:n rakenne.....	16
4.4.2 Endoteliini-1:n toiminta	16
5 GEENITEKNIIKAN MENETELMÄT REKOMBINANTTIPROTEIINIEN TUOTOSSA.....	18
5.1 Plasmidikonstruktion valmistus.....	18
5.1.1 Plasmidit	18
5.1.2 DNA:n digestointi.....	19
5.1.3 DNA:n ligaatio.....	20
5.2 Transformaatio	20
5.2.1 Kemiallinen transformaatio	20
5.2.2 Elektroporaatio	21
5.3 DNA:n analysointi agarosigeelielektroforeesilla	21
5.4 Rekombinanttiproteiinin puhdistaminen affiniteettikromatografialla	23
5.4.1 HisPur Cobalt Resin	24
5.4.2 Glutationi-sepharose.....	25
5.5 Proteiinien analysointi natriumdodekyylisulfaattipoly- akryyliamidigeelielektroforeesilla (SDS-PAGE)	26
6 pET32-VASO A -PLASMIDIKONSTRUKTION VALMISTUS.....	28
6.1 pET32-vektorin valmistus	28

6.2 Vaso A -insertin valmistus	30
6.3 pET32-vektorin ja vaso A -insertin tarkistus	31
6.4 Vaso A -insertin ligaatio pET32-vektoriin.....	32
7 pET32-VASO A -PLASMIDIKONSTRUKTIN TRANSFORMOINTI JA SOPIVIEN KLOONIEHDOKKAIDEN SEULONTA.....	33
7.1 pET32-vaso A -plasmidikonstruktin transformointi soluihin	33
7.2 Kloonien seulonta.....	33
8 GST-ET-1-FUUSIOPROTEIININ TUOTTO JA PUHDISTUS.....	35
8.1 XL1 BLUE/pGEX4T-vaso A -klooniehdokkaiden seulonta	35
8.2 Herätekasvatus	36
8.3 Nuorennuskasvatus.....	36
8.4 GST-ET-1-fuusioproteiinin tuotto.....	37
8.5 GST-ET-1-fuusioproteiinin puhdistus	37
9 TRX-ET-1-FUUSIOPROTEIININ TUOTTO JA PUHDISTUS.....	39
9.1 Herätekasvatus	39
9.2 Nuorennuskasvatus.....	39
9.3 TRX-ET-1-fuusioproteiinin tuotto.....	39
9.4 TRX-ET-1-fuusioproteiinin puhdistus	40
10 PROTEIINIEN ANALYSOINTI SDS-PAGE:LLA	42
11 TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU	43
11.1 pET32-vaso A -plasmidikonstruktin valmistus	43
11.1.1 pET32-vektorin ja vaso A -geenin tarkistus	43
11.1.2 Ligaatio ja transformaatio	44
11.2 pET32-vaso A -klooniehdokkaiden seulonta	45
11.3 pGEX4T-vaso A -klooniehdokkaiden seulonta.....	46
11.4 GST-ET-1-fuusioproteiinin tuotto ja puhdistus	46
11.5 TRX-ET-1-fuusioproteiinin tuotto ja puhdistus.....	48
12 POHDINTA	49
LÄHTEET.....	51
LIITTEET	56

1 JOHDANTO

Yksi elämän tärkeimpiä perusedellytyksiä on verenpaine. Sitä vaaditaan veren kuljettamiseksi ympäri kehoa. Verenpaine muodostuu sydämen pumppaustehosta ja verisuonten vastuksesta. Verisuonia ympäröivät sileät lihassolut vaikuttavat verisuonten läpimittaan supistamalla tai rentoutumalla. Verisuonten läpimitta vaikuttaa verisuonten aiheuttamaan vastukseen: mitä korkeampi vastus on, sitä korkeampi verenpaine, ja mitä matalampi vastus on, sitä matalampi verenpaine. (McConnell 2007, 273.)

Korkea verenpaine on haitaksi terveydelle. Pitkään jatkunut korkea verenpaine voi vahingoittaa verisuonia ja useita elämälle välttämättömiä elimiä, kuten munuaisia, sydäntä ja aivoja. Korkea verenpaine saa sydämen työskentelemään kovempaan tahtiin, ja tämä voi johtaa sydämen suurentumiseen tai sydän voi pettää kokonaan. Korkea verenpaine onkin johtava sydänkohtauksen ja muiden sydän- ja verisuonisairauksien aiheuttaja. Suomessa verenkiertoelinten sairauksiin kuolee vuosittain noin 40 % kaikista kuolleista. (Gregson 2001, 6; Kuolleet kuolemansyyn, iän ja sukupuolen mukaan 1986-2008. 2010; OHSU Health Information. 2010.)

Verenpaineeseen vaikuttaa kolme eri tekijää: sydämen lyöntitiheys eli syke, sydämen pumppaama verimäärä sekä verisuonten aiheuttama vastus. Näitä tekijöitä säätelee paikallinen, hermostollinen ja humoraalinen säätely. Humoraaliossa säätelyssä elimistö tuottaa useita verisuonia supistavia ja laajentavia peptidejä, joista yksi tärkeimpiä on endoteliini-1. (Arstila – Björkqvist – Hänninen – Nienstedt 2006, 223; How the Body Controls Blood Pressure. 2010.)

Opinnäytetyön tarkoituksena oli tuottaa tioredoksiini-endoteliini-1- (TRX-ET-1) ja glutationi-s-transferaasi-endoteliini-1-fuusioproteiineja (GST-ET-1) *Escherichia coli* -soluissa. Työ tehtiin syksyllä 2009 Oulun yliopiston Biolääketieteen laitoksella Fysiologian yksikössä Johanna Veijolan ohjauksessa. Työ oli osa laajempaa kokonaisuutta Oulun yliopiston ja VTT:n yhteistyöprojektissa, jossa

kehitetään molekyylyökaluja ja vasta-aineisiin perustuvaa pikatestiä sydänmarkkereiden määrittämiseen ihmisnäytteistä.

2 VERENPAINEN SÄÄTELY

Verenpaineen säätely on elämälle välttämätöntä, sillä jos kaikki verisuonet olisivat samanaikaisesti täysin laajentuneita, mahtuisi ihmisen koko verimäärä toisen alaraajan pikkusuoniin ja tilaa jäisi vielä ylikin. Siispä verisuonten on oltava jatkuvasti supistuneina. Tähän verisuonten supistustilan säätelyyn osallistuvat paikallinen säätely, hermostollinen säätely ja humoraalinen säätely. Tämä verisuonten supistustilan säätely määrää veren jakaantumisen eri elimille vaikuttamalla eri elimiin verta vievien valtimoiden läpimittaan. (Arstila ym. 2006, 223.)

2.1 Paikallinen säätely

Verenkierron paikallista säätelyä sanotaan myös verenkierron autoregulaatioksi eli itsesäätelyksi. Autoregulaatiossa pikkuvaltimoiden eli arterioliin seinämät reagoivat joko venytykseen, kudosten lämpötilaan tai kudoksissa oleviin erilaisiin aineisiin. Paikalliseen säätelyyn osallistuvat myös prekapillaarisfinkterit eli sileän lihaksen muodostavat hiussuonten sulkijat. Paikallisen säätelyn vaikutuksia voidaan tarkkailla ihosta, joka on jonkin aikaa ollut puristuksessa ja siksi verenpuutteessa. Puristuksen helpottaessa ihoalue alkaa punoittaa, sillä arteriolit laajenevat ja prekapillaarisfinkterit avautuvat. (Arstila ym. 2006, 223 - 225.)

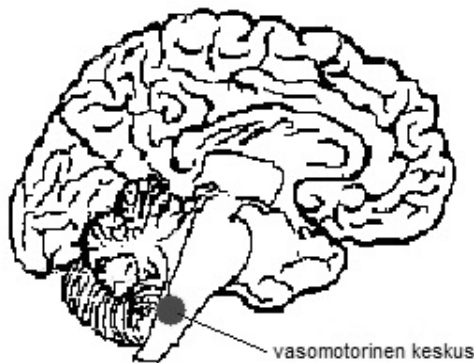
Arterioliin seinämien sileät lihassyöt reagoivat verenpaineen aiheuttamaan venytykseen. Verenpaineen kasvaessa ne supistuvat ja laskiessa ne veltostuvat. Näin veren virtaus säilyy monessa elimessä suunnilleen samana. Myös sydänlihas reagoi venytykseen. Mitä enemmän sydämeen palaava veri venyttää sydänlihasta, sitä voimakkaammin sydänlihas supistuu. Näin sydänlihas pumpaa automaattisesti saman määrän verta eteenpäin, kuin mitä siihen on tullut. (Arstila ym. 2006, 223 - 225.)

Monet aineenvaihduntareaktioiden myötä kudoksiin kertyneet aineet, kuten hiilidioksidi, kaliumionit ja maitohappo aiheuttavat verisuonten laajenemista eli vasodilaatiota. Samoin vaikuttavat myös hapen väheneminen, happamuuden

lisääntyminen ja lämpötilan nousu kudoksissa. Verisuonten supistumista eli vasokonstriktiota aiheuttaa muun muassa lämpötilan lasku ja verenvuodon sattuessa trombosyyteistä vapautuvat tromboksaani ja serotoniini. (Arstila ym. 2006, 223 - 225.)

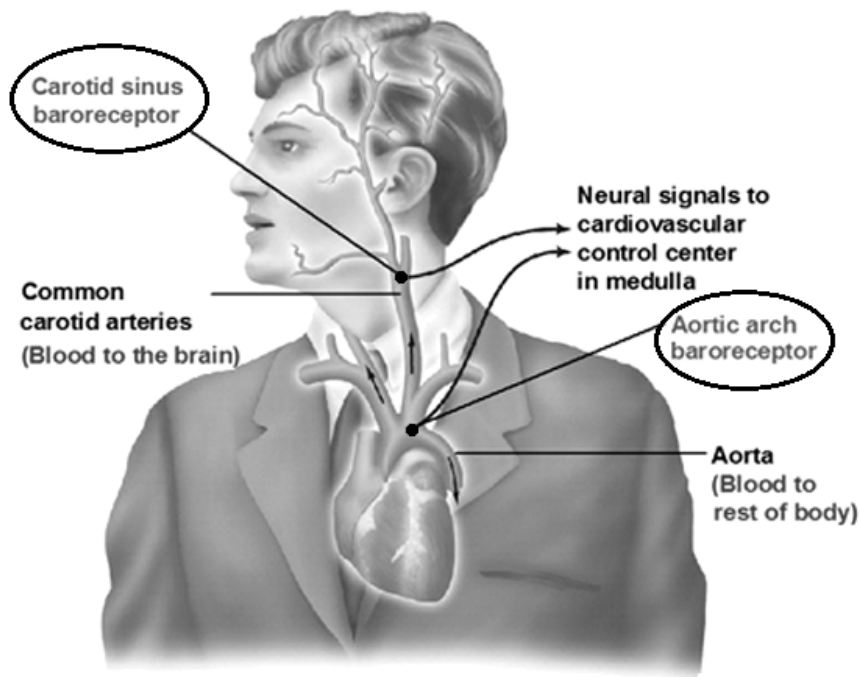
2.2 Hermostollinen säätely

Verenkierron hermostollisen eli neuraalisen säätelyn palveluksessa on ydinjatkessa ja aivosillassa sijaitseva vasomotorinen keskus (kuva 1). Sillä on eri tavoin toimivia alakeskuksia ja runsaasti yhteyksiä muihin verenkiertoon vaikuttaviin aivojen osiin, kuten aivoverkoston, hypotalamukseen ja liiketoiminnoista huolehtiviin alueisiin. Vasomotorinen keskus kuuluu osana heijastekaariin, jota pitkin refleksit, eli heijasteet, välittyvät hermostossa. Vasomotorisen keskuksen toimintaan vaikuttavat myös monet aivojen eri keskuksista tulevat impulssit. (Arstila ym. 2006, 225 - 226.)



KUVA 1. Vasomotorinen keskus (Lappi 2010)

Baroreseptoreita eli pressoreseptoreita eli tensioreseptoreita on aortankaaren ja yhteisen kaulavaltimon haarautumiskohdan eli karotispoukaman seinämissä (kuva 2). Nämä reseptorit mittaavat verenpaineen aiheuttamaa venytystä suonien seinämässä ja ilmoittavat vasomotoriseen keskuksen verenpaineen muutoksista. Vasomotorinen keskus pyrkii tiedon saatuaan palauttamaan verenpaineen ennalleen. (Arstila ym. 2006, 225 - 226.)



KUVA 2. Aortankaaren ja karotispoukaman baroreseptorien sijainti (Blood flow and control of blood pressure. 2008)

Vasomotorisen keskuksen toimintakäskyt sydämelle ja verisuonille kulkevat autonomisen hermoston välityksellä. Autonomisen hermoston muodostavat sympaattinen ja parasympaattinen hermosto. Sympaattisten hermosyiden vaikutuksesta sydänlihaksen ärtyvyys ja supistuvoima kasvavat ja syke nopeutuu. Vaikutus johtuu hermopäätteistä vapautuvasta noradrenaliinista ja lisämunuaisytimestä verenkierron mukana tulevasta adrenaliinista ja noradrenaliinista. Parasympaattisten hermosyiden ärsytys johtaa asetyylikoliinin vapautumiseen hermopäätteistä, mikä taas hidastaa sydämen rytmiä. (Arstila ym. 2006, 225 - 226.)

2.3 Humoraalinen säätely

Elimistö tuottaa myös useita verisuonia supistavia ja laajentavia peptidejä, jotka osallistuvat verenpaineen säätelyyn. Monet verenkierron säätelyyn osallistuvat tekijät kulkeutuvat elimistössä verenkierron mukana paikasta toiseen. Tällöin puhutaan verenkierron humoraalisesta säätelystä. (Arstila ym. 2006, 223 - 225.)

Humoraalisessa säätelyssä aineet vaikuttavat osaksi vasomotorisen keskuksen välityksellä, osaksi suoraan verisuoniin ja sydämeen. Munuaiset pystyvät muun muassa reniiniä tuottamalla säätelemään verenpaineen yleistaso ja saamaansa verimäärää. Lisämunuaisytimen hormoneista adrenaliini lisää sydämen lyöntitiheyttä ja noradrenaliini verisuonten seinämien jännitystilaa eli tonusta. Sydämen eteisten erittämä atriopeptidi taas vähentää verisuonten tonusta. (Arstila ym. 2006, 223 - 225.)

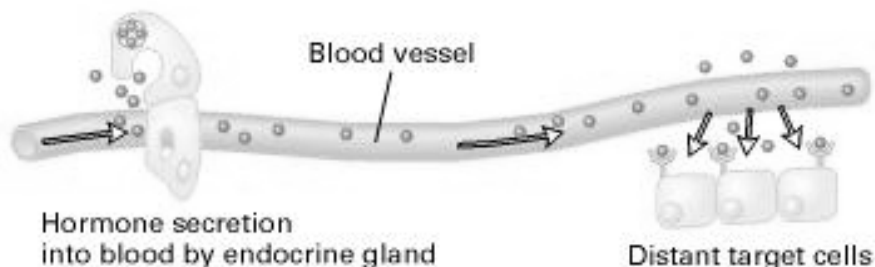
Verisuonten endoteelisoluissa syntyy verisuonien laajentajia, joista tärkein on typpioksidi (NO). Typpioksidi vaikuttaa lisäämällä verisuonia laajentavan sykli- sen guanosiinimonofosfaatin (cGMP) muodostumista. Nitrolääkkeiden vaikutus perustuukin siihen, että ne vapauttavat typpioksidia. (Arstila ym. 2006, 223 - 225.)

3 SOLUJEN VÄLINEN VIESTINTÄ

Monisoluisissa organismissa solujen välinen viestintä on välttämätöntä organismin toiminnan kannalta. Ihmisruumiin toiminta riippuu elinten ja kudosten kyvystä kommunikoida keskenään niin läheltä kuin kaukaa. Kaikkien solun toimintojen – kuten kasvun ja aineenvaihdunnan – tulee olla koordinoituja solun selviytymiseksi. Solut voivat vaikuttaa toisiinsa joko suoran kontaktin tai liukoisten välittäjäaineiden välityksellä. Erilaiset solujen väliset hormonaaliset viestintämuodot voidaan jaotella sen mukaan, kuinka kaukana elimistössä hormoni vaikuttaa. Endoteliini-1:n määrä verenkierrossa on vähäinen, joten se miellelläänkin enemmän paikalliseksi säätelytekijäksi kuin verenkierron mukana kulkeutuvaksi välittäjäaineeksi. (Molina 2004, 5; Rastogi 2003, 158 - 159; Vierimaa 2006, 46.)

3.1 Endokriininen viestintä

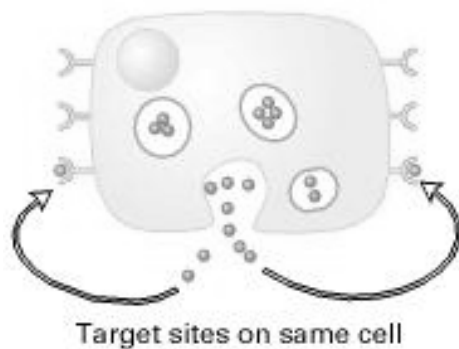
Endokriinisessä viestinnässä umpieritysrauhasten tuottamat hormonit erittyvät verenkiertoon, josta ne kulkeutuvat verenkierron mukana kohdesoluun kuvan 3 esittämällä tavalla. Esimerkkinä tästä on glukoosin talteenoton stimuloituminen insuliinin vaikutuksesta. Insuliinia tuottavat haimassa sijaitsevat beetasolut. Haimasta insuliini erittyy verenkiertoon, missä se voi kulkeutua ympäri kehoa. (Signaling and Signal Transduction. 2010.)



KUVA 3. Endokriininen viestintä (Lodish – Berk – Zipursky – Matsudaira – Baltimore – Darnell 1999)

3.2 Autokriininen viestintä

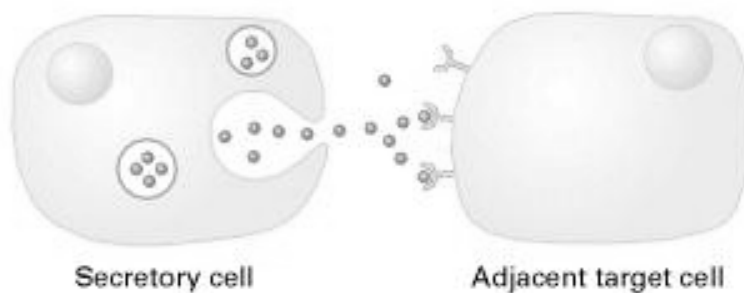
Autokriinisessä viestinnässä solun tuottama hormoni vaikuttaa soluun itseensä kuvan 4 esittämällä tavalla. Esimerkki tästä tapahtuu immunovasteen aikana. Immuunijärjestelmän T-solut auttavat kehoa tuhoamaan haitallisia tunkeutujia. Havaitessaan tunkeutujia T-solut tuottavat erilaisia kasvutekijöitä, joihin ne itse reagoivat. Tuloksena on lisääntynyt T-solujen määrä ja näin ollen lisääntynyt vastustuskyky. (Signaling and Signal Transduction. 2010.)



KUVA 4. Autokriininen viestintä (Lodish ym. 1999)

3.3 Parakriininen viestintä

Parakriinisessä viestinnässä solun tuottama hormoni vaikuttaa solun läheisyydessä oleviin muihin soluihin kuvan 5 esittämällä tavalla. Parakriininen viestintä on tavallista kehityksen aikana, jolloin vuorovaikutukset naapurisolujen kanssa määräävät solun kohtalon. (Signaling and Signal Transduction. 2010.)



KUVA 5. Parakriininen viestintä (Lodish ym. 1999)

4 VERENPAINETTA SÄÄTELEVÄT PEPTIDIT

Verenpaineen säätelyyn osallistuu joukko peptidejä. Osalla näistä, kuten angiotensiinilla, vasopressiinilla ja endoteliinilla, on verisuonia supistava vaikutus, joka näin ollen johtaa verenpaineen nousuun. Verisuonten supistajat toimivat yhdessä verisuonten laajentajien, kuten kiniinien, kanssa verenpaineen tasapainon säilyttämiseksi. (Jakubke – Sewald 2009, 123.)

4.1 Reniini-angiotensiini-järjestelmä

Reniini-angiotensiini-järjestelmän uskotaan olevan yksi tärkeimmistä sydämen ja verisuonten toiminnan tasapainon hormoonallisista säätelijöistä. Järjestelmä koostuu neljästä proteiinista: reniinistä, angiotensiinien esiasteesta angiotensinogeenistä, angiotensiiniä konvertoivasta entsyymistä (angiotensin-converting enzyme, ACE) ja angiotensiini reseptoreista. (Fukamizu – Murakami 1995.)

Munuaisten jukstaglomerulaariset solut tuottavat ja varastoivat valkuaisainetta nimeltään proreniini. Verenpaineen laskiessa munuaisesta vapautuu verenkiertoon proreniinin aktiivista muotoa, reniiniä, joka pilkkoo maksassa muodostuneen angiotensinogeenin angiotensiini I:ksi. Lopuksi ACE muokkaa tästä biologisesti inaktiivisesta peptidistä angiotensiini II:ta. Angiotensiini II puolestaan on eräs tehokkaimmista verisuonten supistumista aiheuttavista aineista. (Fukamizu – Murakami 1995, Verenpainetta säätelevät peptidit. 2006.)

4.2 Vasopressiini

Vasopressiini on yksi tärkeimmistä sydämen ja verisuonten toiminnan tasapainon säätelijöistä, sillä se kykenee vaikuttamaan moneen asiaan. Sydämen ja verisuonten lisäksi vasopressiini vaikuttaa munuaisiin ja keskushermostoon. Yksi vasopressiinin tärkeimmistä ominaisuuksista on sen verisuonia supistava vaikutus. Se on vielä angiotensiiniäkin tehokkaampi verisuonten supistaja. Verenpaineen säätelyssä vasopressiinillä on myös tärkeä rooli sydämen sykkinnän

ja pumppaustehon säätelyssä. Vasopressiini vaikuttaa myös moniin suuriin verenpaineen säätelymekanismeihin, kuten reniinin erittymiseen munuaisista. (Dunbar – Rizk – Rossi 2006; Verenpainetta säätelevät peptidit. 2006.)

Toinen vasopressiinin tärkeimmistä tehtävistä on huolehtia veren tilavuuden säilymisestä. Lisäämällä veden takaisinimeytymistä munuaisputkissa lisääntyy myös veren määrä. Vasopressiinin nesteitä imevän ominaisuuden vuoksi siitä käytetään myös nimitystä antidiureettinen hormoni. (Dunbar – Rizk – Rossi 2006; Verenpainetta säätelevät peptidit. 2006.)

4.3 Bradykiniini

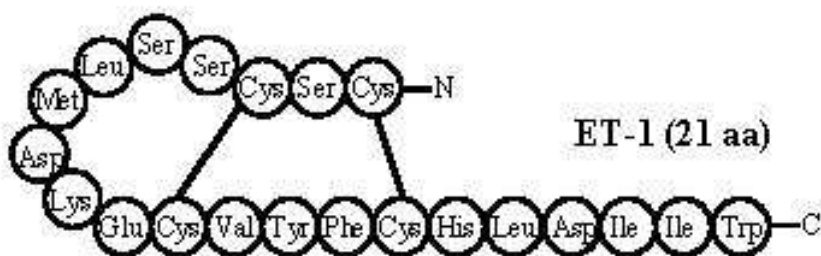
Kiniinit ovat joukko veressä ja tietyissä kudospasteissa muodostuvia peptidihormoneja, jotka ovat osallisina monissa fysiologisissa ja patologisissa tapahtumissa, kuten verenpaineen säätelyssä. Esimerkkinä kiniineistä on bradykiniini. Bradykiniini on hyvin pieni, 9 aminohapon mittainen peptidi, joka aiheuttaa verisuonten laajenemista johtaen verenpaineen laskuun. (Jakubke – Sewald 2009, 124; Verenpainetta säätelevät peptidit. 2006.)

4.4 Endoteliini

Endoteliinit ovat ryhmä peptidejä (ET-1, ET-2 ja ET-3), jotka osallistuvat sydämen ja verisuonten toiminnan säätelyyn. Verisuonissa endoteliineilla on verisuonia supistava vaikutus ja sydämässä ne vaikuttavat sydämen supistumiseen ja sykintään. Endoteliineja tuottavat verisuonten endoteelisolujen lisäksi myös monet muut solutyypit. Verenkiertoon päätyvien endoteliinien määrä on hyvin vähäinen, joten endoteliinit mielletäänkin enemmän paikallisiksi auto- tai parakriiniksi tekijöiksi kuin verenkierron kiertäviksi hormoneiksi. Endoteliinien on myös todettu olevan osallisena useiden sydän- ja verisuonitautien patofysiologiassa. (Vierimaa 2006, 46.)

4.4.1 Endoteliini-1:n rakenne

Endoteliini-1 (ET-1) on 21 aminohaposta koostuva peptidi. ET-1 syntyy verisuonten sisäkalvossa endoteelisoluissa 39 aminohaposta koostuvasta endoteeliinin esiasteesta, iso-ET-1:stä (big ET-1, bET-1). Endoteelisolun solukalvosta löytyvä endoteliinia muokkaava entsyymi (endothelin converting enzyme, ECE) muokkaa endoteeliinin esiasteesta ET-1:n. (Klabunde 2009.) Kuvassa 6 on esitetty endoteliini-1:n aminohappojärjestys sekä rikkisillat, jotka yhdistävät aminojen karboksipäät.



KUVA 6. Endoteliinin rakenne (Piihola 2002)

4.4.2 Endoteliini-1:n toiminta

Endoteliinin vapauduttua verisuonten sisäkalvon endoteeli-soluista sitoutuu se verisuonia ympäröivien sileiden lihassolujen pinnassa oleviin reseptoreihin. ET-1 reseptoreita on kahta eri perustyyppiä, ET_A ja ET_B . Reseptorit ovat liittyneenä G_q -proteiinin. Endoteliinin sitoutuessa reseptoriin aktivoi G_q -proteiini inositolitri-fosfaatin (IP_3 :n) tuoton sileässä lihassolussa. Kohonnut IP_3 :n määrä solussa aiheuttaa kalsiumin vapautumisen lihassolun sarkoplasmakalvostosta aiheuttaen lihassolun supistumisen. (Klabunde 2009.)

Lihassoluissa sijaitsevien ET_A - ja ET_B -reseptoreiden lisäksi ET_B -reseptoreita löytyy myös endoteeli-solujen pinnalta. ET-1 sitoutuessa näihin endoteeli-solujen pinnalta löytyviin ET_B -reseptoreihin käynnistyy solussa typpioksidin tuotto. Jos endoteliinin sitoutumista sileiden lihassolujen pinnassa oleviin reseptoreihin ei tapahdu, syntynyt typpioksidi aiheuttaa verisuonten laajenemi-

sen. Muodostunut typpioksidi inhiboi myös solun sisäistä ET-1:n muodostumista. (Klabunde 2009.)

Sydäimestä löytyvät ET_A- ja ET_B-reseptorit ovat myös kytköksissä G_q-proteiiniin ja IP₃:n muodostumiseen. Sydämessä kohonnut IP₃:n määrä aiheuttaa kalsiumin vapautumisen sarkoplasmakalvostosta. Lisääntynyt kalsiumin määrä sydämessä lisää sydämen supistumista ja sykintää. (Klabunde 2009.)

5 GEENITEKNIIKAN MENETELMÄT REKOMBINANTTI- PROTEIINIEN TUOTOSSA

Rekombinanttiproteiinilla tarkoitetaan proteiinia, joka on valmistettu käyttäen hyväksi yhdistelmä-DNA-tekniikkaa eli rekombinantti-DNA-tekniikkaa. Yhdistelmä-DNA-tekniikka on kokoelma eri menetelmiä, joilla geneettistä materiaalia voidaan eristää, yhdistellä, muuntaa ja siirtää toiseen organismiin. (Savilahti 2010; Ollikka – Suominen 2004, 45.)

Endoteliini-1-fuusioproteiinin tuottamiseksi täytyi ensin valmistaa tarkoitukseen sopiva plasmidikonstruktio yhdistelmä-DNA-tekniikan keinoin. Tämän jälkeen valmis konstruktio siirrostettiin eli transformoitiin bakteerisoluuksi. Proteiinia tuotettiin bakteerisoluuksissa, joista se puhdistettiin käyttäen hyväksi affiniteettikromatografiaa. Lopuksi puhdistuksessa kerätyt näytteen analysoitiin natriumdodekyylisulfaattipolyakryyliamidigeelielektroforeesilla eli SDS-PAGE:lla.

5.1 Plasmidikonstruktion valmistus

Plasmidikonstruktio valmistetaan liittämällä haluttua proteiinia ilmentävä geeni, eli insertti, sopivaan plasmidivektoriin. Vektori ja insertti täytyy digestoida ensin samoilla restriktioentsyymeillä. Näin vektorin ja insertin päät saadaan yhteneväisiksi ja ne saadaan liitettyä yhteen ligaatiossa.

5.1.1 Plasmidit

Yleisimpiä yhdistelmä-DNA-tekniikassa käytettäviä vektoreita ovat plasmidit. Plasmidit ovat kromosomaalisen DNA:n ulkopuolisia, rengasmaisia DNA-molekyylejä, joita esiintyy lähes kaikilla bakteerilajeilla ja joillakin eukaryoteilla kuten hiivoilla. Plasmidit voivat aiheuttaa isäntäsolulle erityyppisiä ominaisuuksia, joista yhdistelmä-DNA-tekniikan kannalta tärkein on antibioottiresistenssi. Antibioottiresistenssi antaa mahdollisuuden selektoida kasvualustalta sellaiset solut, joissa on tietty plasmidi. (Ollikka – Suominen 2004, 52.)

Selektiomenetelmän lisäksi plasmidissa tulee olla tarkoituksenmukainen replikaation aloitusalue eli ori-alue. Plasmidissa voi olla erilliset ori-alueet kahdelle eri lajille. Tällöin toinen ori-alue toimii yhdessä lajissa ja toinen toisessa. Ori-alue kontrolloi myös plasmidin kopiolukua eli sitä, kuinka monta plasmidimolekyyliä solussa on. (Ollikka – Suominen 2004, 52 - 53.)

Edellä esitettyjen perusvaatimusten lisäksi hyvältä plasmidivektorilta vaaditaan pientä kokoa, mikä mahdollistaa pitkienkin DNA-jaksojen liittämisen vektoriin. Vektoreiden tulisi myös mahdollistaa tehokas seulontamenetelmä, joka auttaa etsimään vierasta DNA:ta sisältäviä yhdistelmä-DNA-plasmideja transformoiduista soluista. Lopuksi, jos kloonattua geeniä halutaan ilmentää, tulee vektorissa olla voimakas, säädeltävä promoottorialue sekä tehokas transkription lopetusalue. (Ollikka – Suominen 2004, 54.)

5.1.2 DNA:n digestointi

Digestiossa DNA katkaistaan restriktioentsyymien avulla. Restriktioentsyymit ovat bakteerien endonukleaaseja, joiden avulla ne hajottavat soluun tunkeutuvaa virus-DNA:ta ja siten rajoittavat (engl. *restrict*) virusten lisääntymistä. Restriktioentsyymit tunnistavat kaksinauhaisessa DNA:ssa spesifisen nukleotidijärjestyksen ja katkaisevat DNA:n molemmat juosteet tarkalleen määrätystä kohdasta. Tätä ominaisuutta hyödynnetään myös geenitekniikassa. (Ollikka – Suominen 2004, 68 - 71; Digestio. 2006.)

Jokaisella bakteerilajilla on oma restriktioendonukleaasinsa eli restriktioentsyyminsä. Toiset restriktioentsyymit tuottavat DNA:han kohessiiviset päät, eli juosteet eivät katkea saman emäsparin kohdalta vaan tunnistuskohta on sama luetuna 5'→3' -suunnassa. Blunt-entsyymit katkaisevat DNA:n suoraan symmetriakselilta kummassakin nauhassa, ja tuloksena on tylpät päät (eng. blunt ends). Tärkeintä on, että restriktioentsyymin katkaistua DNA:n sen 5'-päässä on vapaa fosfaattiryhmä ja 3'-päässä OH-ryhmä. Restriktioentsyymi katkaisee siis kummastakin nauhasta yhden fosfodiesterisidoksen, jolloin DNA:n päät saadaan halutessa liitettyä takaisin yhteen. (Ollikka – Suominen 2004, 68 - 71; Digestio. 2006.)

Digestio on käytännössä hyvin yksinkertainen toimenpide. Tunnettu määrä DNA:ta pipetoidaan eppendorf-putkeen, johon lisätään entsyymille sopivaa puskuria ja lopuksi itse entsyymi. Reaktioseos sekoitetaan ja putkea haudutetaan entsyymille sopivassa lämpötilassa (yleensä +37 °C) reaktiivilavuudesta riippuen 1 - 24 tuntia. Katkaisutuotteet voidaan lopuksi analysoida agaroosigeelielektroforeesilla. (Ollikka – Suominen 2004, 68 - 71.)

5.1.3 DNA:n ligaatio

Ligaatiossa kohde-DNA liitetään vektoriin. Kohde-DNA:ssa, eli insertissä, ja vektorissa tulee olla komplementaariset päät, joten ne tulee katkaista samoilla restriktioentsyymeillä. Insertti liitetään vektoriin DNA-ligaasin avulla. Ligaasit ovat entsyymejä, jotka kykenevät liittämään kovalenttisesti yhteen kaksi DNA-jaksoa muodostaen kovalenttisia fosfodiesterisidoksia juosteiden päiden välille. Yleisimmin käytetty ligaasi on T4-DNA-ligaasi, joka on *Escherichia coli* T4-faagin tuottama entsyymi. (Ollikka – Suominen 2004, 77 - 78.)

Toimiakseen ligaasi vaatii yhteen liitettävien DNA-päiden lisäksi ATP:tä ja Mg^{2+} -ioneja sekä pelkistävät olot, jotka saadaan aikaan, kun reaktioseokseen lisätään dithiothreitolia (DTT). Lisäksi reaktioon voidaan lisätä spermidiiniä ligaasin aktiivisuuden tehostamiseksi. (Ollikka – Suominen 2004, 77 - 78.)

5.2 Transformaatio

Transformaatiossa plasmidi-DNA saatetaan bakteerisolun sisään. DNA saadaan transformoitua bakteerisoluuun tekemällä lämpökäsittely $CaCl_2$:lla käsitellyille kompetenteille soluille tai elektroporaation avulla. Työssä käytettiin kemiallista transformaatiota.

5.2.1 Kemiallinen transformaatio

Kemiallisessa transformaatiossa käytetään hyväksi kompetentteja bakteerisoluja. Solut on ensin käsitelty jääkylmällä $CaCl_2$ -liuoksella, jolloin solut tulevat kompetenteiksi eli kykeneviksi vastaanottamaan DNA:ta sisäänsä. $CaCl_2$ de-

stabiloi solukalvoja ja kompleksoituu DNA:n kanssa, jolloin transformoituminen tapahtuu, kun soluille annetaan lyhyt lämpökäsittely eli lämpöshokki +42 °C:ssa. Lämpökäsittelyn aikana solut tulevat hetkeksi DNA:ta läpäiseviksi. Läheskään kaikki solut eivät kuitenkaan saa DNA:ta sisäänsä vaan suurin osa soluista kuolee tässä käsittelyssä. Lämpökäsittelyn avulla saadaan kuitenkin yleensä riittävä määrä transformoituneita soluja. (Ollikka – Suominen 2004, 83.)

5.2.2 Elektroporaatio

Elektroporaatiossa DNA saatetaan bakteerisoluun sähkökentässä korkean jännitteen avulla. Elektroporaatiossa voimakas, korkeajännitteinen, mutta lyhytaikainen sähköimpulssi saa soluseinämässä aikaan lyhytikäisiä aukeamia, joiden kautta DNA siirtyy suoraan solun sisään. Elektroporaatio on kemiallista transformaatiota nopeampi ja yksinkertaisempi menetelmä, jolla saavutetaan myös parempi transformaatiotehokkuus. (Ollikka – Suominen 2004, 85.)

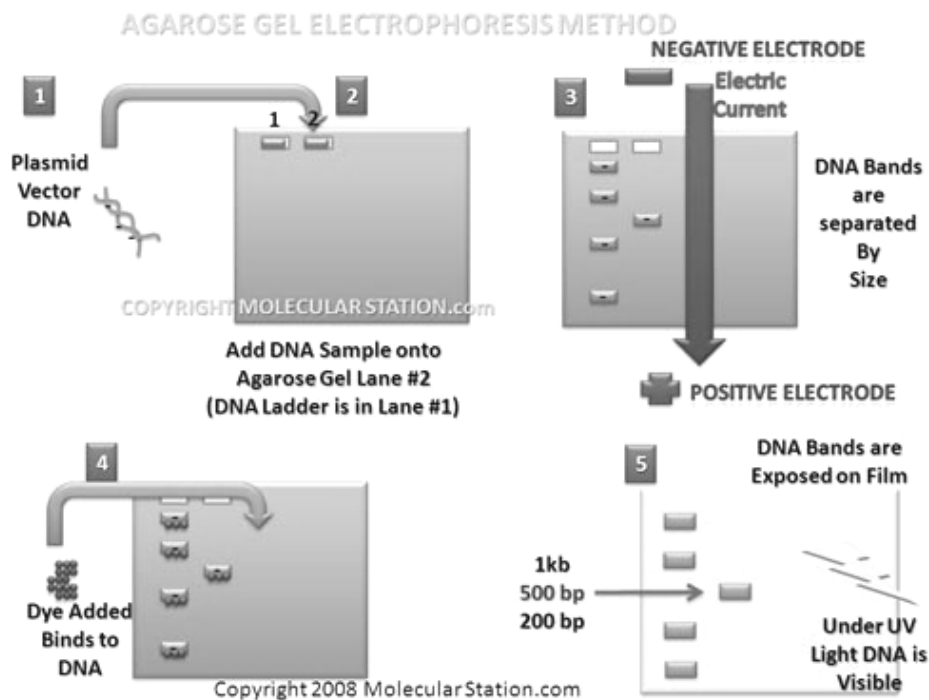
5.3 DNA:n analysointi agarosigeelielektroforeesilla

Agarosigeelielektroforeesi (AGE) on elektroforeesiin perustuva DNA:n analysointimenetelmä keskikokoisille (muutamasta sadasta muutama kymmenen tuhanteen nukleotidiparia) fragmenteille. AGE:a käytetään yleensä katkaisureaktioista saatujen tuotteiden analysointiin. AGE:ssä käytettävä agarosi on merilevästä eristettyä polysakkaridia, joka liukenee veteen kiehautettaessa. Jäähtyessään se muodostaa hyytelömäisen geelin. (Ollikka – Suominen 2004, 72; Turpeenoja 1999, 178 - 179.)

Nukleiinihappojen kulkeutuminen AGE:ssä perustuu siihen, että fosfaattiryhmiensä ansiosta ne ovat happamia ja negatiivisesti varautuneita. DNA:n joutuesssa sähkökenttään kulkeutuu se negatiivisesti varautuneena kohti positiivista napaa. (Ollikka – Suominen 2004, 72; Turpeenoja 1999, 178 - 179.)

DNA:n kulkeutumiseen geelissä vaikuttaa muun muassa kaksi käytännön kannalta tärkeää seikkaa: geelin agarosipitoisuus ja DNA:n muoto. Mitä tiheäm-

pää geeli on, eli mitä suurempi geelin agarosipitoisuus on, sitä hitaammin DNA:t kulkeutuvat geelissä. Agarosigeelin verkkorakenne hidastaa DNA:n kulkeutumista sitä enemmän, mitä suurempi DNA on. Näin pidemmät DNA-molekyylit kulkeutuvat hitaammin kuin lyhyemmät. Jos DNA-liuos sisältää useamman kokoisia DNA-jaksoja, saadaan ne eroteltua AGE:n avulla kuvan 7 osoittamalla tavalla. (Ollikka – Suominen 2004, 72; Turpeenoja 1999, 178 - 179.)



KUVA 7. Agarosigeelielektroforeesin periaate (Agarose Gel Electrophoresis 2008)

DNA ei sellaisenaan näy agarosigeelillä. Yleisin DNA:n havaitsemismenetelmä on etidumbromidivärjäys, jossa agarosigeeli värjätään fluoresoivalla etidumbromidilla (EtBr). EtBr:n etidiumioni tunkeutuu nukleinihappojen emästen väliin. Kun DNA-etidium-kompleksia säteilytetään UV-valolla, emäkset absorboivat UV-säteitä ja luovuttavat saamansa energian etidiumille, joka tällöin fluoresoi oranssinpunaisena. EtBr on karsinogeeni, ja sen kanssa työskenneltäessä tulee noudattaa tarvittavia varotoimenpiteitä. Tämän vuoksi on nykyisin saatavana myös ympäristöystävällisempiä väriaineita, kuten Invitrogenin kehittämä SYBR Safe. (Ollikka – Suominen 2004, 72.)

SYBR Safe on kaksijuosteiseen DNA:han spesifisesti sitoutuva vihreä väri, joka ei ole yhtä myrkyllinen kuin etidiumbromidi. Käytetyt geelit voidaan näin ollen hävittää normaalin jätteen mukana ja DNA voidaan havaita geeliltä sinivalopöydällä, joka on DNA:lle ja käyttäjälle turvallisempi kuin perinteinen UV-valopöytä. (Mäntylä 2005, 6.)

Ennen agarosigeeliäjon aloittamista pitää valmistaa näytteet. Koska näytteet ladataan geelille ajopuskurin peitossa oleviin näytekoloihin, täytyy näytteen olla ajopuskuria raskaampaa, jotta näyte asettuisi tasaiseksi kerrokseksi näytekolon pohjalle. Tämän vuoksi näytteisiin lisätään näytepuskuria, jossa on esimerkiksi glyserolia tiheyden lisäämiseksi ja ksyleenisyanolia väriaineena. Väriaine auttaa seuraamaan ajon edistymistä. (Ollikka – Suominen 2004, 72.)

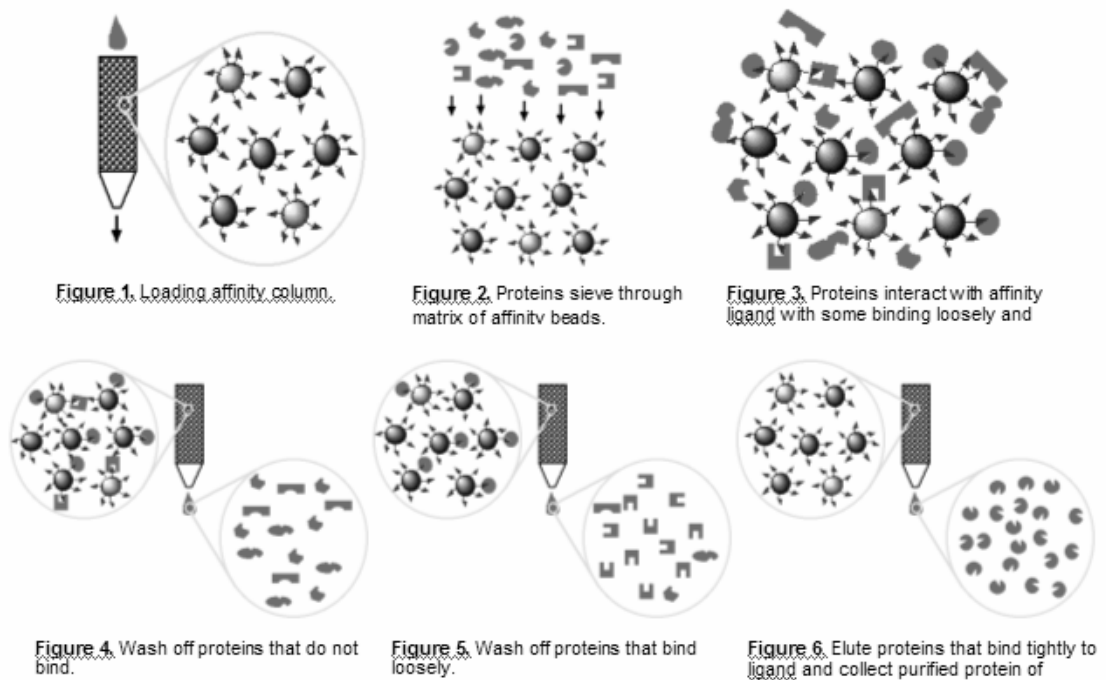
5.4 Rekombinanttiproteiinin puhdistaminen affiniteetikromatografialla

Affiniteetikromatografia on hyvin selektiivinen biomolekyylien puhdistuksessa käytetty menetelmä, joka perustuu biomolekyylien väliseen kykyyn tunnistaa ja sitoutua spesifisesti. Affiniteetikromatografia erottelee proteiineja proteiinin ja matriksiin kiinnitetyn spesifisen ligandin välillä olevan reversiibelin vuorovaikutuksen perusteella. (Affinity Chromatography. 2002, 7 - 9; Aittomäki – Eerikäinen – Leisola – Ojamo – Suominen – von Weymarn 2002, 194.)

Biologiset vuorovaikutukset ligandin ja tavoitellun proteiinin välillä voivat olla sähköstaattisia tai hydrofobisia vuorovaikutuksia, van der Waalsin voimia tai vetysidoksia. Proteiinin eluoimiseksi pylväästä voidaan proteiinin ja ligandin väliset vuorovaikutukset kumota. Ligandin ja proteiinin välisten vuorovaikutusten laadusta riippuen voidaan ne kumota joko käyttäen kilpailevaa ligandia tai vaihtamalla pH:ta, ionivahvuutta tai polarisuutta. (Affinity Chromatography. 2002, 7 - 9; Aittomäki ym. 2002, 194.)

Proteiinin puhdistus tapahtuu yleensä pylväässä, jossa on pakattuna kiinteää kantaja-ainetta ja kantaja-aineeseen on kiinnittyneenä puhdistettavaa biomolekyyliä sitovaa ligandia. Ligandina voidaan käyttää puhdistettavasta biomolekyy-

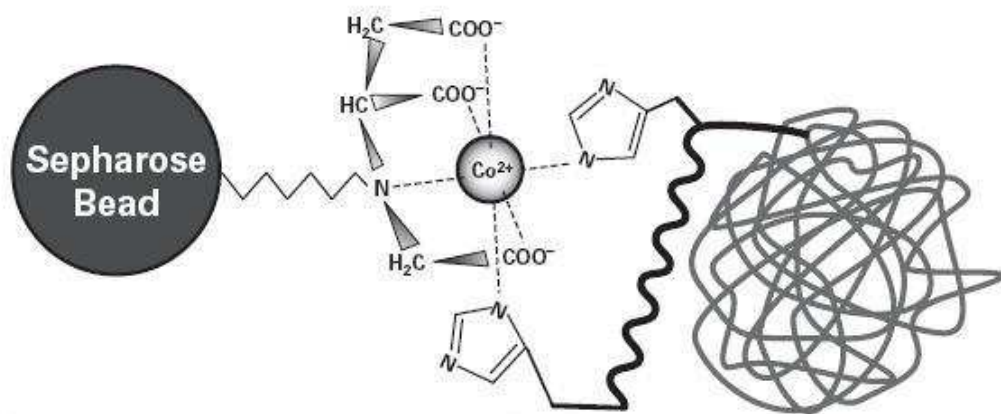
listä riippuen esimerkiksi entsyymejä, vasta-aineita, hormoneja, nukleiinihappoja ja metalli-ioneja. Kun ligandin tunnistavaa molekyyliä syötetään matriisin läpi, tapahtuu molekyylin ja ligandin välillä hyvin spesifinen sitoutuminen (kuva 8). Kolonnimateriaaliin voidaan esimerkiksi kytkeä metalli-ioneja, jotka pyydystävät eluentista proteiineja, joihin on proteiinin geeniä manipuloimalla lisätty kuudesta histidiinistä muodostuva histidiinihänkä. Histidiinisivuketjut reagoivat metalli-ionien kanssa, mistä syystä proteiini tarttuu pylvään metalli-ioneihin. (Affinity Chromatography. 2002, 9; Aittomäki ym. 2002, 194.)



KUVA 8. Proteiinien sitoutuminen affiniteettiligandeihin (Affinity Chromatography Method. 2002)

5.4.1 HisPur Cobalt Resin

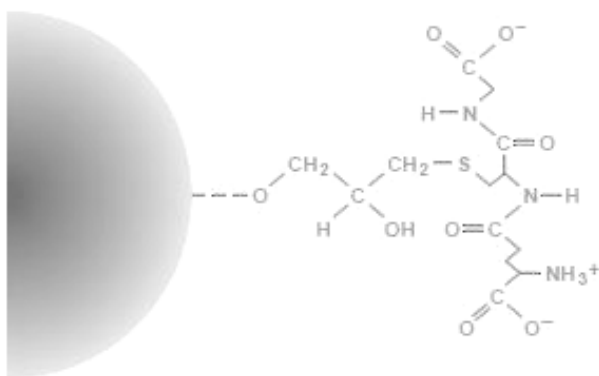
Tioredoksiini-ET-1-fuusioproteiinin puhdistuksessa käytettiin HisPur Cobalt Resin -hartsia. Hartsia sisältää varauksellisia Co^{2+} -ioneja, joihin kuuden histidiini aminohapon pituinen histidiini-hänkä (His-tag) tarttuu spesifisesti (kuva 9). ET-1:tä ekspressoiva vaso A -geeni liitettiin pET32-plasmidivektoriin, jonka ekspressoima tioredoksiini pitää sisällään His-tagin. Tämän His-tagin avulla proteiini kiinnittyy spesifisesti puhdistusmatriisin ligandina toimiviin koboltti-ioneihin.



KUVA 9. Polyhistidiini-hännän sitoutuminen Co^{2+} -ioniin (BD TALON™ Metal Affinity Resins User Manual. 2003, 5)

5.4.2 Glutationi-sepharose

Glutationi-S-transferaasi-ET-1-fuusioproteiinin puhdistuksessa käytettiin glutationi-sepharose-hartsia. Hartsia sisältää pelkistettyjä glutationi-molekyylejä, joihin glutationi-S-transferaasi tarttuu spesifisesti (kuva 10). ET-1:tä ekspressoiva vaso A -geeni liitettiin pGEX4T-plasmidivektoriin, joka ekspressoisi glutationi-S-transferaasia. Fuusioproteiini kiinnittyi spesifisesti puhdistusmatriisin ligandina toimiviin glutationi-molekyyleihin glutationi-S-transferaasin avulla.



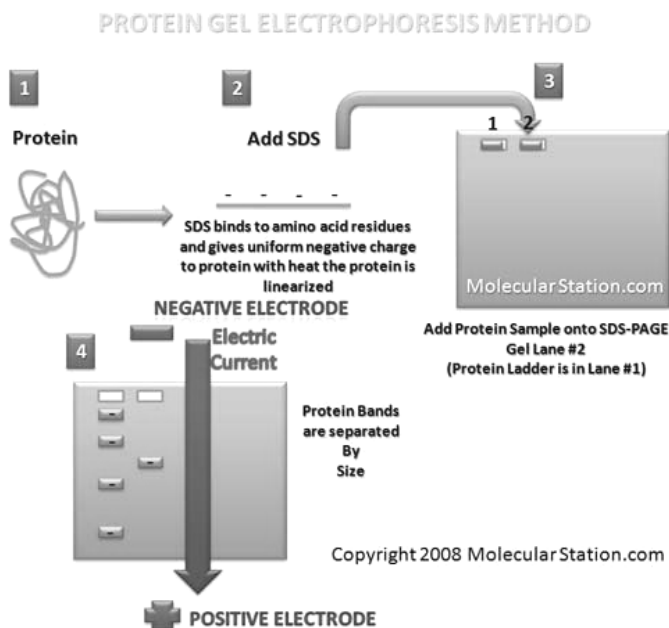
KUVA 10. Glutationi-S-transferaasin sitoutuminen glutationi-molekyyliin (The Recombinant Protein Handbook. 2000, 13)

5.5 Proteiinien analysointi natriumdodekyylisulfaattipolyakryliamidigeelielektroforeesilla (SDS-PAGE)

SDS-PAGE:ssa proteiinit erotellaan geelillä niiden molekyylikoon perusteella. Erotteluajo tehdään kaksiosaisessa polyakryliamidigeelissä. Geelin ylemmän osan muodostaa konsentroitigeeli ja alemman erotusgeeli. Geelit poikkeavat toisistaan niiden pH:n ja polyakryliamidi-pitoisuuden osilta. (Mullins 2002; Gel Electrophoresis. 2004.)

Konsentroitigeeli on lievästi hapan ja sillä on alhainen akryliamidipitoisuus, jotta geelistä saadaan huokoinen. Konsentroitigeelissä ei tapahdu varsinaista proteiinien erottumista, vaan geelin tehtävänä on koota näytteet erotusgeelin yläreunaan, jotta ne siirtyvät erotusgeelille yhtä aikaa. (Mullins 2002; Gel Electrophoresis. 2004.)

Erotusgeelin tehtävänä on erotella proteiinit toisistaan. Erotusgeeli on konsentroitigeeliä hieman emäksisempi, ja sillä on korkeampi polyakryliamidipitoisuus. Tästä johtuen geelin huokokset ovat pienempiä, ja pienemmät proteiinit pääsevät kulkemaan geelissä helpommin kuin suuremmat. (Mullins 2002; Gel Electrophoresis. 2004.) Kuvassa 11 on esitetty SDS-PAGE:n toimintaperiaate.



KUVA 11. SDS-PAGE:n periaate (SDS-PAGE Gel Electrophoresis 2008)

Ennen ajoa näytteisiin lisätään näytepuskuria, jolla on monta eri tehtävää. Puskurissa oleva merkaptotaanoli estää kysteiinien hapettumisen ja katkaisee proteiinien rikkisillat. Glyceroli on vettä tiheämpää, ja sen lisääminen puskuriin saa näytteet painumaan näytekaivojen pohjalle. Natriumdodekyylisulfaatti (sodium dodecyl sulphate, SDS) on anioninen detergentti, jonka aiheuttama suuri negatiivinen varaus peittää proteiinien alkuperäisen varauksen alleen, jolloin ne liikkuvat geelissä molekyylipainonsa mukaisesti. Lisäksi puskuriin lisätään bromofenolisiniä väriksi, joka auttaa seuraamaan ajon kulkua. (Mullins 2002; Proteiinien SDS-PAGE. 2006.)

6 pET32-VASO A -PLASMIDIKONSTRUKTIN VALMISTUS

Tioredoksiini-endoteliini-1-fuusioproteiinin (TRX-ET-1) tuottoa varten valmistettiin pET32-vaso A -plasmidikonstruktin. Konstruktin plasmidikartta on esitetty liitteessä 1. Plasmidikonstruktin vektori-osa, eli pET32, ekspressoii fuusioproteiinin tioredoksiini-osaa, joka pitää sisällään proteiinin puhdistuksessa tarvittavia His-tageja. Vektoriin liitetty insertti, eli vaso A, ekspressoii fuusioproteiinin endoteliini-osaa. pET32-vektori valmistettiin laboratoriossa aikaisemmin tuotetuista pET32-A1- ja pET32-B4-plasmideista ja vaso A -insertti laboratoriossa tuotetuista pGEX4T-vaso A -subklooneista.

6.1 pET32-vektorin valmistus

pET32-vektori eristettiin laboratoriossa aikaisemmin tuotetuista pET32-A1- ja pET32-B4-plasmideista, jotka leikattiin eli digestoitiin *Bam*HI- ja *Xho*I-restriktioentsyymeillä (New England Biolabs). *Bam*HI-*Xho*I-reaktiot tehtiin kaupallisessa NEB3-puskurissa (New England Biolabs) BSA:n (New England Biolabs) kanssa. Reaktiot pipetoitiin taulukon 1 mukaisesti.

TAULUKKO 1. pET32-A1- ja pET32-B4-plasmidien *Bam*HI-*Xho*I-digestiot

	pET32-A1	pET32-B4
steriili vesi	83,4 µl	82,4 µl
plasmidi (20ng)	51 µl	52 µl
puskuri NEB3	16 µl	16 µl
BSA	1,6 µl	1,6 µl
<i>Bam</i> HI	4 µl	4 µl
<i>Xho</i> I	4 µl	4 µl
kokonaistilavuus	160 µl	160 µl

Reaktioita inkuboitiin +37 °C:ssa yön yli. Aamulla reaktioihin lisättiin 2 µl alkaalista fosfataasia (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase, CIAP) ja inkuboitiin +37 °C:ssa 30 minuuttia. Reaktiot lopetettiin lisäämällä 40 µl ksyleenisyanoli-

latauspuskuria. Latauspuskurin ohje on liitteessä 3. Tämän jälkeen digestiot ajettiin 0,8 % agarosigeelillä 60 V:n jännitteellä 75 minuuttia. Molekyylipainomarkkerina oli Fermentaxen 1 kb DNA ladder SM0313 (liite 4). Agarosigeelielektroforeesin ohje on liitteessä 3. DNA:n havaitsemiseksi käytettiin etidiumbromidin sijasta SYBR® Safe:iä (Invitrogen). Geeliltä leikattiin talteen 5860 bp:n kokoiset DNA-palat, jotka punnittiin eppendorf-putkissa.

DNA eristettiin geelipaloista Macherey-Nagelin Nucleospin Extract II -kitillä liitteessä 5 olevan ohjeen mukaan. Geelipalojen sekaan lisättiin ensin kaksinkertainen määrä kitin NT-puskuria taulukon 2 mukaisesti.

TAULUKKO 2. NT-puskurin määrä

	geelipala (mg)	NT-puskuri (µl)
pET32-A1 <i>BamHI-XhoI</i>	175	350
	196	395
	211	425
pET32-B4 <i>BamHI-XhoI</i>	144	290
	163	330
	166	335

Puskurin lisäyksen jälkeen geelipalat sulatettiin lämpöblokissa +55 °C:ssa. Vektori eristettiin geeliseoksesta kahden pylvään avulla. Pylväisiin pipetoitiin geeliseosta ensin 600 µl, joka sentrifugoitiin pylväiden läpi 11 000 x g minuutin ajan. Läpi mennyt seos kaadettiin pois. Tämä toistettiin vielä kerran. Vektorin sitoutumisen varmistamiseksi pestiin pylväät välillä 600 µl:lla pesupuskuria. Pesun jälkeen voitiin loput geeliseokset sentrifugoida pylväiden läpi. Lopuksi pylväät pestiin 600 µl:lla pesupuskuria ja sentrifugoitiin vielä tyhjänä 11 000 x g 2 minuuttia.

Vektorit eluoiitiin pylväistä 40 µl:lla lämmitettyä (+60 °C) steriiliä vettä. Veden annettiin inkuboitua pylväissä 2 - 5 minuuttia ennen keräystä. Pylväät sentrifugoitiin 11 000 x g 2 minuuttia, minkä jälkeen puhdistetut vektorit siirrettiin jälle. Vektori-DNA:ta säilytettiin -20 °C:ssa.

6.2 Vaso A -insertin valmistus

Vaso A -geeni digestoitiiin laboratoriossa tuotetuista pGEX4T-vaso A - subkloonien 9, 14 ja 23 plasmideista *Bam*HI- ja *Xho*I-restriktioentsyymeillä. *Bam*HI-*Xho*I-reaktiot tehtiin NEB3-puskurissa BSA:n kanssa. Reaktioseokset pipetoitiin taulukon 3 mukaisesti.

TAULUKKO 3. pGEX4T-vaso A -subkloonien 9, 14 ja 23 *Bam*HI-*Xho*I-digestiot

	9	14	23
steriili vesi	121,4 µl	112,4 µl	121,9 µl
plasmidi (20ng)	12 µl	22 µl	12,5 µl
puskuri NEB3	16 µl	16 µl	16 µl
BSA	1,6 µl	1,6 µl	1,6 µl
<i>Bam</i> HI	4 µl	4 µl	4 µl
<i>Xho</i> I	4 µl	4 µl	4 µl
kokonaistilavuus	160 µl	160 µl	160 µl

Reaktioita inkuboitiiin +37 °C:ssa yön yli. Seuraava na aamuna reaktiot lopetetiiin lisäämällä 40 µl ksyleenisyanoli-latauspuskuria. Tämän jälkeen digestiot ajettiin 0,8 % agarosigeelillä 60 V:n jännitteellä 75 minuuttia. Molekyylipaino-markkerina oli Fermentaksen 1 kb DNA ladder SM0313 (liite 4). Geeliltä leikatiiin talteen 633 bp:n kokoiset palat.

DNA eristettiin geeliltä Macherey-Nagelin Nucleospin Extract II -kitillä, kuten vektorikin. Geelipalojen sekaan lisättiiin ensin kitin NT-puskuria taulukon 4 mukaisesti.

TAULUKKO 4. NT-puskurin määrä

	geelipala (mg)	NT-puskuri (µl)
vaso A 9	218	440
	229	460
vaso A 14	186	375
	188	380
vaso A 23	122	245
	144	290

Puskurin lisäyksen jälkeen geelipalat sulatettiin lämpöblokkissa +55 °C:ssa. DNA eristettiin geeliseoksesta kolmen pylvään avulla, yksi pylväs jokaista subkloonista kohti. Pylväisiin pipetoitiin 600 µl geeliseosta, joka sentrifugoitiin pylväiden läpi 11 000 x g minuutin ajan. Läpimennyt seos kaadettiin pois. Tämä toistettiin vielä kerran. Lopuksi pylväät pestiin 600 µl:lla pesupuskuria, minkä jälkeen pylväät sentrifugoitiin vielä tyhjänä 11 000 x g 2 minuuttia.

DNA eluoiitiin pylväistä 40 µl:lla lämmitettyä (+60 °C) steriiliä vettä. Veden annettiin inkuboitua pylväissä 2 - 5 minuuttia ennen keräystä. Pylväät sentrifugoitiin 11 000 x g 2 minuuttia, minkä jälkeen puhdistetut DNA:t siirrettiin jälle. Vaso A:ta säilytettiin -20 °C:ssa.

6.3 pET32-vektorin ja vaso A -insertin tarkistus

Ennen käyttöönottoa pET32-vektorit ja vaso A -geenit tarkistettiin 2 % agarosigeelillä, ja niiden pitoisuudet määritettiin NanoDropilla. Testiajona otettiin 5 µl jokaista näytettä, joihin kuhunkin lisättiin 2 µl ksyleenisyanoli-latauspuskuria. Näytteet ajettiin 2 % agarosigeelillä 60 V:n jännitteellä 1 h. Molekyylipainomarkkerina oli Fermentaxen 1 kb DNA ladder SM0313 (liite 4).

6.4 Vaso A -insertin ligaatio pET32-vektoriin

Ligaatiossa vaso A -insertti liitettiin pET32-vektoriin. Ligaatio-reaktioon pipetoi-
tiin vektorin ja insertin lisäksi ligaasi-entsyymiä (T4 DNA Ligase, New England
Biolabs), ligaasi-puskuria (T4 DNA Ligase Reaction Buffer (10X), New England
Biolabs) sekä spermidiiniä ligaasin aktiivisuuden lisäämiseksi. Reaktio pipetoi-
tiin taulukon 5 mukaisesti 500 µl:n PCR-putkeen.

TAULUKKO 5. Ligaatio-reaktion pipetointi

pET32-vektoria	1 µl
Vaso A -inserttiä	16 µl
Ligaasi-puskuria	1,8 µl
Spermidiiniä	0,5 µl
T4DNA-ligaasia	1,2 µl

Ligaatio-reaktio pistettiin yöksi ohjelmoitavaan lämpöblokkiin (Perkin Elmer). Li-
gaation lämpötilaohjelma on esitetty taulukossa 6.

TAULUKKO 6. Lämpötilaohjelma ligaatio-reaktiolle

Lämpötila (°C)	Aika (h)
20	1
16	2
14	10
75	15 min
10	loppusäilytys

7 pET32-VASO A -PLASMIDIKONSTRUKTIN TRANSFORMOINTI JA SOPIVIEN KLOONIEHDOKKAIDEN SEULONTA

pET32-vaso A -plasmidikonstruktin transformointi valmiisiin kaupallisiin *E. Coli* -kannan T7express-kompetentteihin soluihin. Plasmidikonstruktin vietiin bakteerisoluihin lämpöshokin avulla. Sopivia klooniehdokkaita yritettiin seuloa ensin PCR:llä, mutta tämä ei onnistunut, joten seulonta tehtiin miniprep-eristyksellä ja entsyymikäsittelyllä.

7.1 pET32-vaso A -plasmidikonstruktin transformointi soluihin

Transformaatioon lisättiin ensin 5 µl ligaatio-reaktiota sulaneisiin T7express-kompetentteihin soluihin. Soluja inkuboitiin jäissä 20 minuuttia välillä eppendorf-putkea sormella napsutellen. Tämän jälkeen soluille annettiin lämpöshokki +42 °C:ssa 1,5 minuuttia, minkä jälkeen solut siirrettiin jäihin 2 minuutiksi. Lopuksi joukkoon lisättiin 500 µl lämmintä SOC-lientä ja soluja kasvatettiin ravistelussa +30 °C:ssa 1h. Transformaatioseosta maljattiin 100 µl ja 200 µl LB-maljoille (liite 7), joissa antibioottina oli carbenisilliiniä 50 µg/l. Maljoja kasvatettiin yön yli +37 °C:ssa.

7.2 Kloonien seulonta

Maljoilta poimittiin 24 pesäkettä, joista jokaisesta tehtiin 5 ml:n kasvatus SB-MOPS-liemessä (liite 7) 12 ml:n Falcon-putkissa. SB-MOPS-liemeen lisättiin 50 mg/l carbenisilliiniä loppupitoisuuteen 50 µg/l. Pesäkkeet poimittiin maljoilta pipetin kärjellä. Kärkeä pyyhkäistiin ensin LB-carb-maljalle, johon jokainen pesäke oli numeroitu (puhdasviljelmä). Tämän jälkeen kärki laitettiin samalla numerolla varustettuun putkeen, jossa oli 5 ml SB-MOPS-carb-lientä. Soluja kasvatettiin yön yli +37 °C:ssa ravistelussa 220 rpm. Puhdasviljelmät laitettiin kasvamaan lämpökaappiin +37 °C:seen yön yli.

Seuraavana aamuna solut sentrifugoitiin pohjaan kierrosnopeudella 3500 rpm 10 minuuttia. Kerätyistä soluista eristettiin plasmidit SIGMAN miniprep-kitillä. Plasmidieristys tehtiin liitteessä 6 olevan ohjeen mukaan. Eristetyt plasmidit säilytettiin -20 °C:ssa.

pET32-vaso A -klooniehdokkaat tarkistettiin testidigestion avulla. Pieni määrä plasmidi-DNA:ta digestoitiin *Bam*HI- ja *Xho*I-entsyymeillä. Reaktioseosta valmistettiin ensin 25 reaktiolle taulukon 7 mukaisesti. Tästä reaktioseoksesta pipetoitiin 20 µl 24 eppendorf-putkeen, joihin jokaiseen lisättiin 1 µl plasmidi-DNA:ta.

TAULUKKO 7. pET32-vaso A -subkloonien BamHI-XhoI-digestiot

	Määrä (µl)
steriili vesi	295 µl
puskuri NEB3	50 µl
BSA	5 µl
<i>Bam</i> HI	12,5 µl
<i>Xho</i> I	12,5 µl
kokonaistilavuus	500 µl

Digestioita inkuboitiin +37 °C:ssa tunnin ajan, minkä jälkeen reaktioihin lisättiin 5 µl ksyleenisyanoli-latauspuskuria. Tämän jälkeen digestiot ajettiin 2 % agarosigeelillä 60 V:n jännitteellä 75 minuuttia. Molekyylipainomarkkerina oli Fermentaksen 1 kb DNA ladder SM0313 (liite 4).

8 GST-ET-1-FUUSIOPROTEIININ TUOTTO JA PUHDISTUS

GST-ET-1-fuusioproteiinin tuottoa varten laboratoriossa oli jo aiemmin valmistettu pGEX4T-vaso A -plasmidikonstruktin. Konstruktin plasmidikartta on esitetty liitteessä 2. Plasmidikonstruktin vektori-osa, eli pGEX4T, ekspressoii fuusioproteiinin puhdistuksessa tarvittavaa glutationi-S-transferaasia. Vektoriin liitetty insertti, eli vaso A, ekspressoii fuusioproteiinin endoteliini-osaa.

8.1 XL1 BLUE/pGEX4T-vaso A -klooniehdokkaiden seulonta

Laboratoriossa aiemmin valmistettu pGEX4T-vaso A -plasmidikonstruktin oli transformoitu *E. coli*-kannan XL1 Blue -soluihin. Transformoidut solut oli viljelty LB-carb-maljoille ja kasvatettu yön yli +37 °C:ssa. Maljoilta yritettiin seuloa sopivia klooniehdokkaita ensin PCR:llä, mutta tämä ei onnistunut, joten seulonta tehtiin miniprep-eristyksellä ja entsyymikäsittelyllä.

Kloonien seulontaa varten maljoilta poimittiin 24 pesäkettä, joista jokaisesta tehtiin 5 ml:n kasvatus SB-MOPS-liemessä (liite 7) 12 ml:n Falcon-putkissa. SB-MOPS-liemeen lisättiin 50 mg/l carbenisilliiniä loppupitoisuuteen 50 µg/l. Pesäkkeet poimittiin maljoilta pipetin kärjellä. Kärkeä pyyhkäistiin ensin LB-carb-maljalle (liite 7), johon jokainen pesäke oli numeroitu (puhdasviljelmä). Tämän jälkeen kärki laitettiin samalla numerolla varustettuun putkeen, jossa oli 5 ml SB-MOPS-carb-lientä. Soluja kasvatettiin yön yli +37 °C:ssa ravistelussa nopeudella 220 rpm. Puhdasviljelmät laitettiin kasvamaan lämpökaappiin +37 °C:seen yön yli.

Seuraavana aamuna solut sentrifugoitiin pohjaan kierrosnopeudella 3500 rpm 10 minuuttia. Kerätyistä soluista eristettiin plasmidit SIGMAN miniprep-kitillä. Plasmidieristys tehtiin liitteessä 6 olevan ohjeen mukaan.

pGEX4T-vaso A -klooniehdokkaat, kuten pET32-vaso A -kloonitkin, tarkistettiin testidigestion avulla. Pieni määrä plasmidi-DNA:ta digestoitii *Bam*HI- ja *Xho*I-entsyymeillä. Reaktioseosta valmistettiin ensin 25 reaktiolle taulukon 8 mukaisesti. Tästä reaktioseoksesta pipetoitiin 20 µl 24 putkeen, joihin jokaiseen lisättiin 1 µl plasmidi-DNA:ta.

TAULUKKO 8. pET32-vaso A -subkloonien *Bam*HI-*Xho*I-digestiot

	Määrä (µl)
steriili vesi	295 µl
puskuri NEB3	50 µl
BSA	5 µl
<i>Bam</i> HI	12,5 µl
<i>Xho</i> I	12,5 µl
kokonaistilavuus	500 µl

Digestioita inkuboitii +37 °C:ssa tunnin ajan, min kä jälkeen reaktioihin lisättiin 5 µl ksyleenisyanoli-latauspuskuria. Tämän jälkeen digestiot ajettiin 2 % agarosigeelillä 60 V:n jännitteellä 75 minuuttia. Molekyylipainomarkkerina oli Fermentuksen 1 kb DNA ladder SM0313 (liite 4).

8.2 Herätekasvatus

GST-ET-1-fuusioproteiinin tuottoon valittiin XL1 Blue/pGEX4T-vasoA -soluista subkloonit 9 ja 14. Herätekasvatukset tehtiin subkloonien 9 ja 14 glyserolisto-keista 100 ml:ssa SB-MOPS-carbenisilliini(50mg/ml)-liemessä yön yli +37 °C:ssa ravistelussa kierrosnopeudella 250 rpm. Kasvatus tehtiin 500 ml:n erlenmeyerissä.

8.3 Nuorennuskasvatus

Nuorennuskasvatusta varten siirrostettiin 2 ml herätekasvustoa 100 ml:aan SB-MOPS-carbenisilliini(50mg/ml)-lientä. Soluja kasvatettiin 2 tuntia +37 °C:ssa ra-

vistelussa kierrosnopeudella 250 rpm, minkä jälkeen mitattiin OD₆₀₀. Indusointia varten sameuden tulisi olla 0,8–1.

8.4 GST-ET-1-fuusioproteiinin tuotto

Ennen GST-ET-1-proteiinin tuoton käynnistämistä otettiin kasvustosta kaksi 2 ml:n näytettä (N1). Näytteet sentrifugoitiin kierrosnopeudella 13 000 rpm 2 minuuttia ja solut otettiin talteen. Solut varastoitettiin -20 °C:seen. Proteiinin tuotto käynnistettiin lisäämällä kasvustoon 1M:sta IPTG:tä loppupitoisuuteen 0,1 mM (10 µl). Proteiinia tuotettiin +30 °C:ssa ravistelu ssa kierrosnopeudella 250 rpm 3 tuntia.

Tuoton jälkeen otettiin kasvustoista kaksi 2 ml:n näytettä ja kaksi 10 ml:n näytettä. Näytteistä kerättiin solut talteen sentrifugoimalla 2 ml:n näytteet mikrosentrifugissa (Galaxy 16 DH, VWR) kierrosnopeudella 13 000 rpm 2 minuuttia ja 10 ml:n näytteet isommassa sentrifugissa (SL 40R, Thermo Scientific) kierrosnopeudella 3 500 rpm 5 minuuttia. Lopuista kasvustoista kerättiin solut talteen 50 ml:n Falcon-putkiin sentrifugoimalla kierrosnopeudella 3 500 rpm 5 minuuttia. Solut varastoitettiin -20 °C:seen.

8.5 GST-ET-1-fuusioproteiinin puhdistus

Proteiinin puhdistus tehtiin tuotosta kerätyille lopuille soluille. Solusakka nostettiin huoneenlämpöön sulamaan. Tällä välin valmistettiin 15 ml lyysipuskuria liitteessä 8 olevan ohjeen mukaan.

Solut suspensoitiin 7,5 ml:aan lyysipuskuria. Solujen hajottamiseksi suspensioon lisättiin 750 µl kaupallista 10xBugBusteria (Novagen) ja inkuboitiin suspensiota huoneenlämmössä 20 minuuttia. Inkuboinnin jälkeen suspensioon lisättiin 160 µl 30 % BRIJ35-reagenssia (SIGMA). Lysaatista otettiin kaksi 20 µl:n ”tootaali proteiini” -näytettä (N2). Loppu lysaatti jaettiin 2 ml:n eppendorf-putkiin ja sentrifugoitiin soluriekaleet pohjaan kierrosnopeudella 13 000 rpm 20 minuuttia. Supernatantit kerättiin talteen pieneen dekantteriin. Supernatantista otettiin kaksi 20 µl:n ”liukoinen proteiini” -näytettä (N3). Loppu supernatantti suodatet-

tiin 0,45 µm:n ja 0,2 µm:n suodatinten läpi 50 ml:n Falcon-putkeen ja jätettiin jäälle odottamaan hartsin tasapainotuksen ajaksi.

GT-Sepharose siirrettiin pylväästä kahteen 50 ml:n Falcon-putkeen kaupallisen 1xPBS-0,6%BRIJ-puskurin avulla. Hartsia pestiin dekantoimalla 10 ml:lla 1xPBS-0,6%BRIJ-puskuria. Pesu toistettiin vielä kaksi kertaa. Tämän jälkeen näyte kaadettiin tasapainotetun hartsin joukkoon. Koska näytemäärä oli pieni, täytettiin putki 40 ml:ksi 1xPBS-puskurilla. Näyte jätettiin yli yön sekoitukseen kylmähuoneeseen.

Seuraavana aamuna GT-Sepharose-hartsia ja näyte kaadettiin pylvääseen ja läpi tuleva näyte kerättiin talteen. Tästä otettiin kaksi 50 µl:n ”sitoutumaton proteiini” -näytettä (N4). Näytteiden oton jälkeen hartsia pestiin 1xPBS-0,6%BRIJ-puskurilla kunnes A_{280} oli alle 0,02. Pesun aikana kerättiin näytteitä 10 ml:n, 30 ml:n ja 50 ml:n jälkeen (N5, N6 ja N7).

Eluointia varten valmistettiin 15 mM redusoitu GSH-50 mM Tris-HCl pH8 -puskuri lisäämällä 9 ml vettä 1ml:aan valmista kantaliuosta. Proteiini eluointiin pylväästä 10x500 µl:n fraktioina (F1 - F10). Eluointipuskuria inkuboitettiin pylväässä 4 minuuttia ennen keräystä. Lopuksi hartsia pestiin 30 ml:lla 1xPBS-puskurilla. Hartsia säilytettiin pylväässä 20 % etanolissa.

9 TRX-ET-1-FUUSIOPROTEIININ TUOTTO JA PUHDISTUS

TRX-ET-1-fuusioproteiinin tuottoon valittiin T7Express/pET32-vasoA -soluista subkloonit 3 ja 17. Työn vaiheisiin kuului herätekasvatus, nuorennuskasvatus, proteiinin tuoton indusointi, tuottokasvatus ja tuottosolujen keräys, proteiinin puhdistus sekä proteiinin analysointi.

9.1 Herätekasvatus

Herätekasvatukset tehtiin puhtasviljelmistä 100 ml:ssa SB-MOPS-liemessä, johon lisättiin 40 % glukoosia 2,5 ml ja 50 mg/ml carbenisilliiniä 100 µl. Soluja kasvatettiin yön yli +37 °C:ssa ravistelussa kierrosnopeudella 250 rpm. Kasvatus tehtiin 500 ml:n erlenmeyerissä.

9.2 Nuorennuskasvatus

Nuorennuskasvatusta varten siirrostettiin 2 ml herätekasvustoa 100 ml:aan SB-MOPS-carbenisilliini(50mg/ml)-lientä. Soluja kasvatettiin 2 tuntia +37 °C:ssa ravistelussa kierrosnopeudella 250 rpm, minkä jälkeen mitattiin OD₆₀₀. Indusointia varten sameuden tulisi olla 0,8–1.

9.3 TRX-ET-1-fuusioproteiinin tuotto

Ennen proteiinintuoton käynnistämistä otettiin kaksi 2 ml:n näytettä (N8). Näytteet sentrifugoitiin kierrosnopeudella 13 000 rpm 2 minuuttia ja solut otettiin talteen. Proteiinintuotto käynnistettiin lisäämällä kasvustoon 1M:sta IPTG:tä loppupitoisuuteen 0,1 mM (10 µl). Proteiinia tuotettiin +30 °C:ssa ravistelussa kierrosnopeudella 250 rpm 3h.

Tuoton jälkeen otettiin kasvustoista kaksi 2 ml:n näytettä (N9) ja kaksi 10 ml:n näytettä. Näytteistä kerättiin solut talteen sentrifugoimalla 2 ml:n näytteet mik-

rosentrifugissa (Galaxy 16 DH, VWR) kierrosnopeudella 13 000 rpm 2 minuuttia ja 10 ml:n näytteet isommassa sentrifugissa (SL 40R, Thermo Scientific) nopeudella 3 500 rpm 5 minuuttia. Lopuista kasvustoista kerättiin solut talteen 50 ml:n Falcon-putkiin sentrifugoimalla nopeudella 3 500 rpm 5 minuuttia. Solut varastoitettiin -20 °C:seen.

9.4 TRX-ET-1-fuusioproteiinin puhdistus

TRX-ET-1-fuusioproteiinin puhdistus tehtiin tuotosta kerätyille loppuille soluille. Solusakka nostettiin huoneenlämpöön sulamaan. Tällä välin valmistettiin 15 ml lyysipuskuria liitteessä 9 olevan ohjeen mukaan.

Solut suspensoitiin 5 ml:aan (1/20 vol kasvuston tilavuudesta) lyysipuskuria. Solujen hajottamiseksi suspensiota inkuboitiin huoneenlämmössä 20 minuuttia. Inkuboinnin jälkeen lysaatti jaettiin 2 ml:n eppendorf-putkiin ja soluriekaleet sentrifugoitiin pohjaan kierrosnopeudella 13 000 rpm 20 minuuttia. Supernatantit kerättiin talteen pieneen dekantteriin ja suodatettiin 0,45 µm:n ja 0,2 µm:n suodatinten läpi 15 ml:n Falcon-putkeen. Kloonia 17 jäi suodatuksen jälkeen jäljelle 2 ml. Supernatantin pH säädettiin noin kahdeksaan 2 M:lla TRIS:llä, jonka pH oli 8. Supernatantit jätettiin jälle odottamaan hartsin tasapainotuksen ajaksi.

2 ml:n eppendorf-putkiin otettiin HisPur Cobalt Resin -hartsia (Thermo Scientific) 2 ml, ja hartsi sentrifugoitiin pohjaan kierrosnopeudella 3000 rpm 5 minuuttia. Tämän jälkeen neste pipetoitiin pois hartsin päältä. Hartsi tasapainotettiin 3x1 ml:lla yksinkertaista NPI-5-puskuria. Hartsi sentrifugoitiin pohjaan kierrosnopeudella 3000 rpm 5 minuuttia. Tasapainotettu hartsi siirrettiin yksinkertaisen NPI-5-puskurin avulla näytteeseen. Näyte jätettiin sekoittumaan kylmähuoneeseen yön yli.

Seuraavana aamuna näyte nostettiin jälle ja hartsin annettiin laskeutua pohjaan. Pintaan jääneestä näytteestä otettiin kaksi 20 µl:n "sitoutumaton proteiini"-näytettä (N10). Näytteen oton jälkeen loppu neste pipetoitiin hartsin päältä pois. Hartsi siirrettiin pesupuskurin avulla 50 ml:n putkeen ja pestiin kolme ker-

taa 30 ml:lla. Pesuista otettiin näytteet 30 ml:n ja 80 ml:n jälkeen (N11 ja N12). Viimeisestä pesusta tarkistettiin, että A_{280} oli alle kaksi.

Pestystä hartsista otettiin 20 μ l:n näyte (N13). Proteiini eluointiin pylväästä 1,3 ml:lla puskuria, jossa oli nouseva imidatsoli-pitoisuus. Eluointipuskurit valmistettiin taulukon 9 mukaisesti. Vahvin puskuri valmistettiin liuottamalla 3,2 g imidatsolia 100 ml:aan vettä. Ennen täyttöä puskurin pH säädettiin 7,4:ään.

TAULUKKO 9. Eluointipuskurit

	150 mM	250 mM	300 mM	400 mM	450 mM	500 mM
vesi	3 ml	2 ml	1,5 ml	0,5 ml	-	-
10xPBS	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml	-
0,5 M imidatsoli	1,5 ml	2,5 ml	3 ml	4 ml	4,5 ml	-

Puskurin annettiin inkuboitua pylväässä 3 minuuttia ennen eluointia. Pylväästä eluointiin fraktiot 1 - 6 (F11 - F16). Eluoidusta hartsista otettiin 20 μ l:n näyte (N14). Lopuksi hartsi pestiin 30 ml:lla yksinkertaista NPI-5-puskuria. Säilöntää varten pylvääseen lisättiin vielä 20 % etanolia.

10 PROTEIINIEN ANALYSOINTI SDS-PAGE:LLA

Solunäytteet, eli näytteet N1, N8 ja N9, valmistettiin suspensoimalla jokainen solunappi 200 µl:aan yksinkertaista PBS-puskuria. Tämän jälkeen joukkoon lisättiin 20 µl 10xBugBusteria (Novagen) ja 0,5 µl Benzonase-entsyymiä (Sigma) solujen hajottamiseksi. Solujen annettiin hajota huoneenlämmössä 20 minuuttia. Tämän jälkeen solulysaatista otettiin 20 µl:n ”totaaliproteiini” -näyte. Näytteen oton jälkeen soluriekaleet sentrifugoitiin pohjaan kierrosnopeudella 3000 rpm 5 minuuttia ja supernatantista otettiin 20 µl:n ”liukoinen proteiini” -näyte. Lopuksi näytteisiin lisättiin 20 µl kaksinkertaista näytepuskuria, minkä jälkeen näytteitä keitettiin lämpöblokkissa +95 °C:ssa 4 min uuttia.

SDS-PAGE:n ohje liuoksineen on liitteessä 10. Näytteet valmistettiin ottamalla 10 µl jokaista näytettä. Näytteisiin lisättiin 10 µl kaksinkertaista näytepuskuria, minkä jälkeen näytteitä keitettiin lämpöblokkissa +95 °C:ssa 4 minuuttia. Ajossa käytettiin 5 % konsentroitigeeliä ja 15 % erotusgeeliä. Näytteitä pipetoitiin geelille 5-20 µl riippuen näytteen proteiinipitoisuudesta. Molekyylipainomarkkerina oli Fermentaksen Unstained Protein Molecular Weight Marker #SM0431 (liite 11). Geelejä ajettiin noin yksi tunti (kunnes sininen väri oli ajautunut geelin alalaitaan) 200 V:n jännitteellä ja 400 milliampeerin virralla.

Ajon jälkeen geelit värjättiin Coomassie Brilliant Blue -värjäysliuoksella. Geelejä pidettiin värjäyksessä noin 20 minuuttia. Tämän jälkeen väri kaadettiin pois ja geelejä huuhdeltiin 10 % etikkahappoliuoksella. Lopuksi geelit kuvattiin.

11 TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU

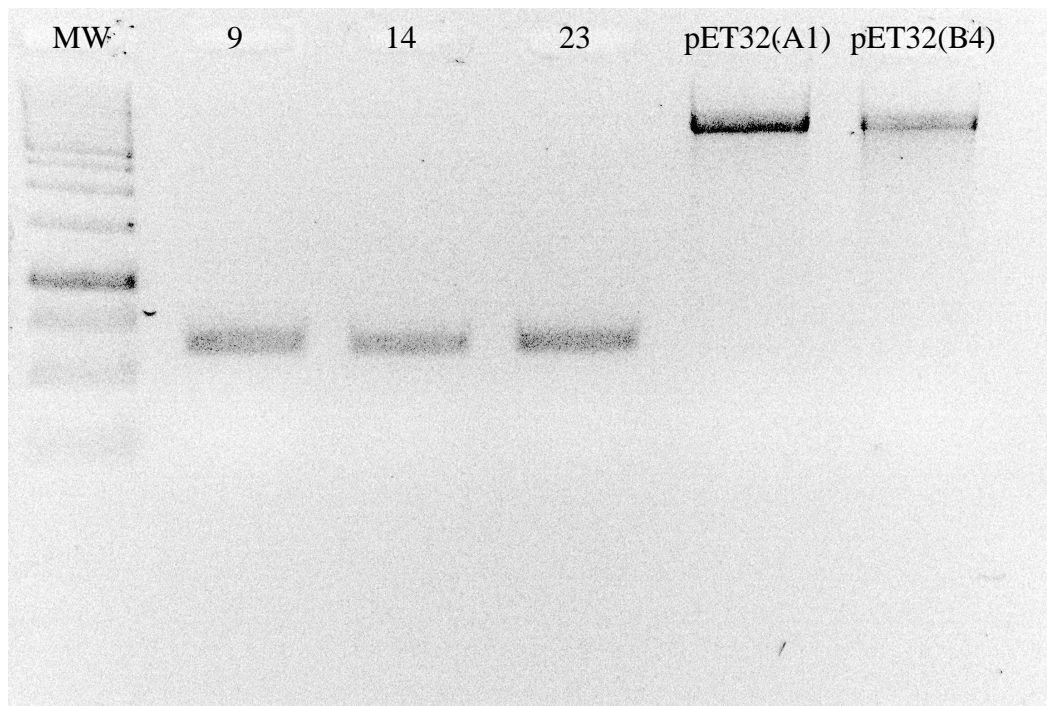
Tuloksissa on esitetty pET32-vaso A -plasmidikonstruktin valmistuksen vaiheita, ligaation ja transformaation onnistumista, sopivien klooniehdokkaiden seulonnan tuloksia sekä TRX-ET-1- ja GST-ET-1-fuusioproteiinien tuottumista ja puhdistumista. Proteiinien tuottumista ja puhdistumista seurattiin SDS-PAGE:n avulla.

11.1 pET32-vaso A -plasmidikonstruktin valmistus

Plasmidikonstrukti valmistettiin digestoimalla konstruktiin tarvittava vektori- ja insertti-osa niiden alkuperäisestä konstruktistaan ja liittämällä nämä palat yhteen ligaatioissa. Ligaation jälkeen plasmidikonstruktin valmistus näytti onnistuneen hyvin, mutta työn loppuvaiheessa (katso luku 11.5) ilmeni, että luultu pET32-vaso A -plasmidikonstrukti olikin pGEX4T-vaso A -plasmidikonstrukti.

11.1.1 pET32-vektorin ja vaso A -geenin tarkistus

Ennen vektorin ja insertin ligaatiota täytyi tarkistaa niiden koko ja puhtaus. Tarkistus tehtiin ajamalla näytteet agarosigeelielektroforeesilla. Vektori on kooltaan 5860 bp ja insertti 633 bp. Geelijon tulokset näkyvät kuvassa 12. Sekä vektorit, että vaso A -geenit näyttävät kokonsa perusteella puhtailta ja oikean kokoisilta.



KUVA 12. Testiajo vaso A -subklooneille 9, 14 ja 23 sekä pET32-plasmideille

Jotta ligaatio-reaktion tarvittavan vektorin ja insertin pipetoitava määrä voitiin minimoida, täytyi ensin tietää vektorin ja insertin pitoisuudet. Pitoisuudet määritettiin NanoDropilla, ja ne on esitetty taulukossa 10.

TAULUKKO 10. pET32-vektorin ja vaso A -geenin pitoisuudet

	Pitoisuus (ng/μl)
pET32 (A1)	78,4
pET32 (B4)	53,3
vaso A 9	30,3
vaso A 14	21,7
vaso A 23	-

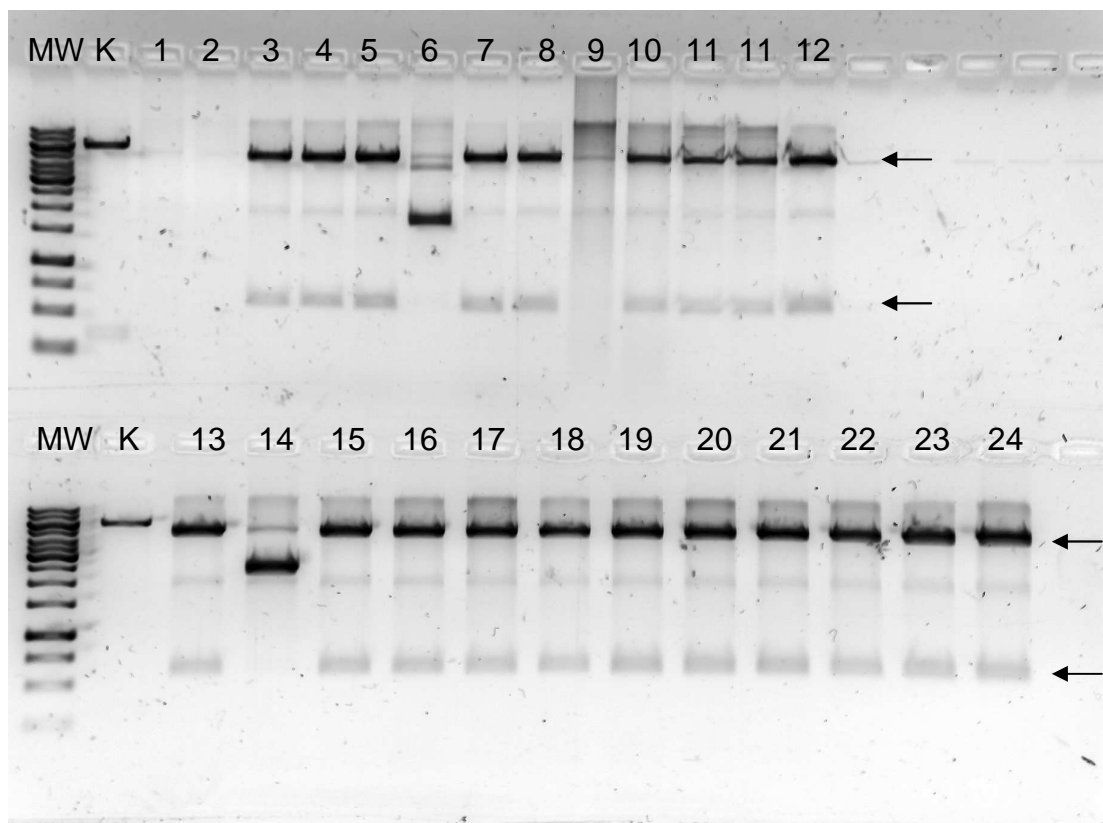
11.1.2 Ligaatio ja transformaatio

Ligaatiossa *Bam*HI- ja *Xho*I-entsyymeillä käsitellyt pET32-vektori ja vaso A -insertti liitettiin yhteen. Ligaation jälkeen plasmidikonstruktin transformoitiin T7express-soluihin. Transformoitujen solujen kasvatuksen jälkeen maljoilla oli

havaittavissa paljon oikean näköisiä pesäkkeitä. Pesäkkeiden oikeellisuus pystyttiin kuitenkin varmistamaan vasta klooniehdokkaiden seulonnassa.

11.2 pET32-vaso A -klooniehdokkaiden seulonta

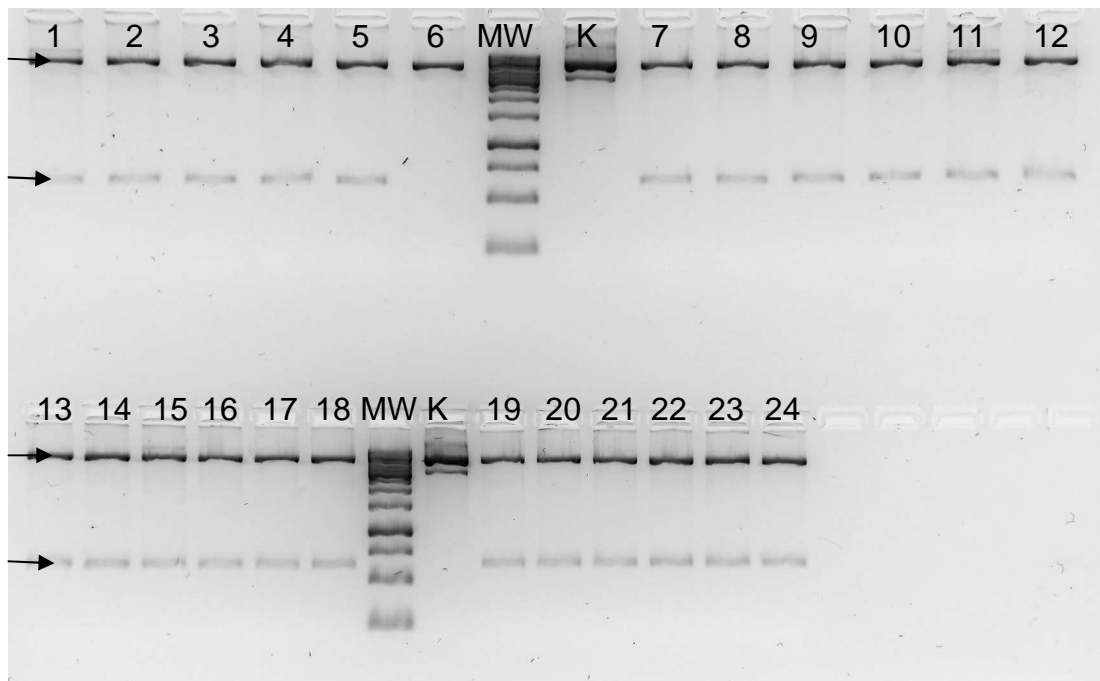
Suurin osa seulontaan poimituista T7express/pET32-vaso A -klooniehdokkaista sisälsivät pET32-vaso A -plasmidikonstruktiin. Digestoitaessa pET32-vaso A -plasmidikonstrukti *Bam*HI- ja *Xho*I-restriktioentsyymeillä vaso A -geeni irtoaa pET32-vektorista. Agarosegeelillä ajettaessa nähdään tällöin kaksi vyöhykettä: vektori (5860 bp) ja vaso A (633 bp). Kuvasta 13 nähdään, että lukuun ottamatta subklooneja 1, 2, 6, 9 ja 14, kaikki subkloonit sisälsivät pET32-vaso A -plasmidikonstruktiin. Klooniehdokkaiden seulonnan perusteella ligaatio ja transformaatio olivat onnistuneet ja proteiinintuottoa varten löydettiin useita sopivia klooniehdokkaita, joista proteiinintuottoa varten valittiin subkloonit 3 ja 17.



KUVA 13. pET32- vaso A -subkloonien 1 - 24 *Bam*HI-*Xho*I-digestiot

11.3 pGEX4T-vaso A -klooniehdokkaiden seulonta

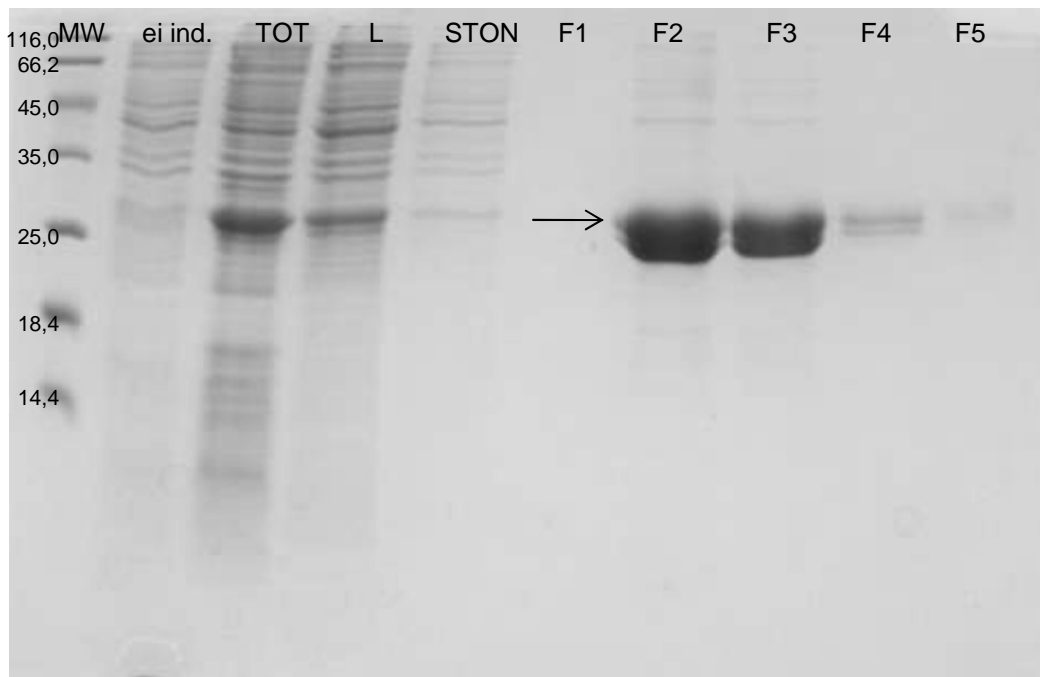
Suurin osa seulontaan poimituista XL1 Blue/pGEX4T-vaso A -klooniehdokkaista sisälsivät pGEX4T-vaso A -plasmidikonstruktiin. Digestoitessa pGEX4T-vaso A -plasmidikonstrukti *Bam*HI- ja *Xho*I-restriktioentsyymeillä vaso A -geeni irtoaa pGEX4T-vektorista. Agarosigeelillä ajettaessa nähdään tällöin kaksi vyöhykettä: vektori (4945 bp) ja vaso A (633 bp). Kuvasta 14 nähdään, että lukuun ottamatta subkloonina 6 kaikki muut subkloonit sisälsivät pGEX4T-vaso A -plasmidikonstruktiin. Transformaatio oli näin olleen onnistunut ja proteiinintuottoa varten löydettiin useita sopivia klooniehdokkaita, joista proteiinintuottoa varten valittiin subkloonit 9 ja 14.



KUVA 14. pGEX4T- vaso A -subkloonien 1-24 BamHI-XhoI-digestiot

11.4 GST-ET-1-fuusioproteiinin tuotto ja puhdistus

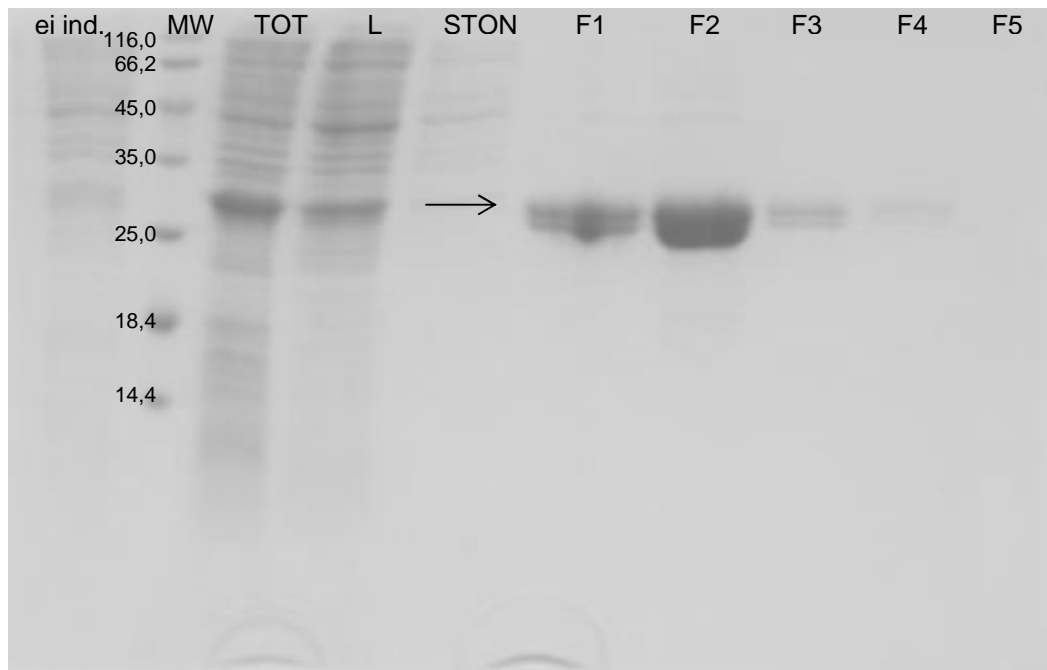
Kuvassa 15 on esitetty SDS-PAGE-geelille ajettut pGEX4T-ET-1-subkloonilla 9 tuotetun GST-ET-1-fuusioproteiinin puhdistuksesta kerätyt näytteet. Geelillä on ajettu näytteet "ei indusoitu" (N1), "totaaliproteiini" (N2), "liukoinen proteiini" (N3), "sitoutumaton proteiini" (N4) sekä eluinnista kerätyt fraktiot 1 - 5 (F1 - F5).



KUVA 15. GST-ET-1-fuusioproteiinin tuoton testaus subkloonilla 9

GST-ET-1-fuusioproteiini on molekyylipainoltaan noin 29,6 kD. Fraktioiden kohdalla on nähtävissä selvät vyöhykkeet 25 kD:n yläpuolella. Vyöhykkeet on merkitty nuolella, ja kokonsa puolesta ne vastaavat haluttua proteiinia. Samankokoiset vyöhykkeet on havaittavissa myös totaaliproteiinin ja liukoisen proteiinin kohdalla.

Kuvassa 16 on esitetty pGEX4T-ET-1-subkloonilla 14 tuotetun GST-ET-1-fuusioproteiinin puhdistuksesta kerätyt näytteet. Geelillä on ajettu näytteet "ei indusoitu" (N1), "totaaliproteiini" (N2), "liukoinen proteiini" (N3), "sitoutumaton proteiini" (N4) sekä eluinnista kerätyt fraktiot 1 - 5 (F1 - F5). Myös tällä geelillä nähdään fraktioiden, totaaliproteiinin ja liukoisen proteiinin kohdalla selvät vyöhykkeet 25 kD:n yläpuolella. Näin ollen GST-ET-1-fuusioproteiinin tuotto onnistui XL1 Blue -bakteerisolussa ja proteiini saatiin eristettyä solusta ja puhdistettua GT-Sepharosen avulla.



KUVA 16. GST-ET-1-fuusioproteiinin tuoton testaus subkloonilla 14

11.5 TRX-ET-1-fuusioproteiinin tuotto ja puhdistus

TRX-ET-1-fuusioproteiinin tuottaminen epäonnistui. Geelillä ajettiin näytteet "ei induoitu" (N8), "totaaliproteiini" (N9 lyaatti), "liukoinen proteiini" (N9 supernatantti), "sitoutumaton proteiini" (N10) sekä eluinnista kerätyt fraktiot 1 - 5 (F11 - F15), mutta ajon jälkeen geelillä ei ollut nähtävissä minkäänlaisia vyöhykkeitä. Myöhemmin analysoitaessa subklooneja sekvensoimalla kävi ilmi, että kloonien sisältämä plasmidi olikin pGEX4T-vaso A -plasmidikonstruktia. Epäonnistumisen syyksi epäillään, että valmista pGEX4T-vaso A -plasmidikonstruktia oli jossain vaiheessa päässyt lugaatio-reaktioon ja tämä oli selittänyt lugaatio-reaktion komponentit monistamalla rakenteilla olevaa konstruktia nopeammin. TRX-ET-1-fuusioproteiinin tuoton osalta ei näin ollen saatu tuloksia.

12 POHDINTA

Työn tarkoituksena oli aluksi rakentaa endoteliini-1-fuusioplasmidi, jossa restriktioentsyymeillä muokattuun vektorirunkoon liitettiin kaupallinen, restriktioentsyymeillä yhteensopivaksi muokattu geeni. Tämän jälkeen työssä testattiin kahden eri fuusioplasmidin proteiinin tuottoa *Eschericia coli* -soluissa. Proteiinit puhdistettiin affiniteetikromatografialla, ja niiden tuottoa sekä puhdistusta seurattiin SDS-PAGE:n avulla.

Koska kohdegeenin tuottama proteiini, eli endoteliini-1, sisältää rikkisiltoja ja on näin ollen rakenteeltaan hieman monimutkaisempi, fuusioitiin se kahteen eri kantajaan, joiden käyttökelpoisuutta ja paremmuutta voitiin arvioida vertaamalla tuottoplasmeilla saatua liukoisen proteiinin määrää ja alustavaa sitoutumista fuusioproteiinien puhdistuksessa käytettyyn affiniteettihartsiin. Työssä kohdegeeninä oli endoteliini-1:tä ekspressoiva vaso A, joka liitettiin glutationi-S-transferaasia (GST) ekspressoivaan pGEX4T-vektoriin ja tioredoksiinia (TRX) ekspressoivaan pET32-vektoriin. Kohdegeeni ja vektori muokattiin yhteensopiviksi *Bam*HI- ja *Xho*I-restriktioentsyymeillä. Koska eri restriktioentsyymit muokkaavat geenipalojen päistä erilaisia, olisi työssä ollut hyvä testata useampia entsyymipareja, mutta ajan puutteen vuoksi tätä ei ehditty tekemään. GST-ET-1-fuusioproteiinin tuotossa voitiin kuitenkin todeta *Bam*HI-*Xho*I-entsyymiparin toimivan.

GST-ET-1-fuusioproteiinin tuotto onnistui. Tämä kävi ilmi SDS-PAGE-geelejä tarkasteltaessa. Geeleillä oli selvästi nähtävissä molekyylipainoltaan fuusioproteiinia vastaavat vyöhykkeet.

TRX-ET-1-fuusioproteiinin tuotto ei onnistunut ja tämä kävi ilmi siitä, että proteiinia vastaavia vyöhykkeitä ei näkynyt SDS-PAGE-geelillä. TRX-ET-1-fuusioproteiinin tuoton epäonnistumisen syytä tutkittiin sekvensoimalla proteiinin tuottoon valitut pET32-vaso A -kloonit. pET32-vaso A -kloonien sekvensointi ei toiminut pET-vektorin oligoilla. Myös oletetun pET32-vaso A -kloonien tuottaman fuusioproteiinin puhdistus ei onnistunut Co^{2+} -hartsilla. Sekvensoinnissa

ilmeni, että tuottokloonit olivat itse asiassa GST-ET-1-tuottoklooneja. Tuottokanta oli siis ilmeisesti kontaminoitunut. Ilmeisesti pGEX4T-vaso A -kloonia oli päässyt jossain vaiheessa mukaan, ja se oli selittänyt ligaatio-reaktion komponentit. TRX-ET-1-fuusioproteiinin tuoton epäonnistuminen oli hyvin harmillista, koska ei voitu vertailla tuottokantojen paremmuutta. Tämän vuoksi yksi iso osa kokeesta jäi tekemättä.

Jatkotutkimusten osalta TRX-ET-1-fuusioproteiinin tuotto täytyisi tehdä uudestaan, jotta nähtäisiin, kumpi fuusioplasמידeista soveltuu proteiinintuottoon paremmin. Fuusioplasmidien vertailu proteiinin tuottamisen kannalta on tärkeää. Eri fuusioplasmidien välillä voi olla laadullisia eroja, jotka ilmenevät esimerkiksi tuotettavan proteiinin määränä. Tässä tutkimuksessahan ei saatu selville pET32-vaso A -fuusioplasmidin toimivuutta, joten fuusioplasmidien paremmuutta ei voitu vertailla.

Arvio oikean proteiinin tuotosta tässä tutkimuksessa perustui proteiinin molekyylipainoon. Tämä tulos ei kuitenkaan ole absoluuttinen ja siihen sisältyy virhemahdollisuus. Vaikka virhemahdollisuus on pieni, usein tämäntyyppisissä kokeissa proteiinin oikeellisuus tarkistetaan vielä lisätutkimuksilla. Endoteliini-1-proteiinin tuottaminen, eli siis käytännössä havaitun proteiinin oikeellisuus, voitaisiin varmistaa vielä esimerkiksi matriisiavusteisella laser-desorbtiointisaatio-lentoaikamassaspektrometrillä tai muilla vastaavankaltaisilla menetelmillä.

Opinnäytetyö on osa laajempaa tutkimusta, jonka tarkoituksena on valmistaa vasta-aineisiin perustuvia pikatestejä sydänmarkkereiden määrittämiseksi ihmisnäytteistä. Tutkimuksen tavoitteena on, että tulevaisuudessa sairauksia voitaisiin todeta helpommin ja tarkemmin pelkän verinäytteen avulla. Tässä kokeessa tuotettua endoteliini-1-proteiinia tuotetaan vasta-aineisiin perustuvia pikatestejä varten. Pikatesteillä tutkitaan erilaisten proteiinien määrää verenkierrossa, ja tuloksista voidaan päätellä esimerkiksi mahdollisia sydän- ja verisuonisairauksia.

LÄHTEET

Affinity Chromatography. 2002. Principles and Methods. Amersham Biosciences. Saatavissa: <http://fachschaft.biochemtech.uni-halle.de/downloads/chromatography/affchr.pdf>. Hakupäivä 20.3.2010.

Affinity Chromatography Method. 2002. Saatavissa: <http://www.bio.davidson.edu/Courses/genomics/method/Affinity.html>. Hakupäivä 20.3.2010.

Agarose Gel Electrophoresis. 2008. Molecular station. Saatavissa: <http://www.molecularstation.com/agarose-gel-electrophoresis/>. Hakupäivä 17.5.2010.

Aittomäki E. – Eerikäinen T. – Leisola M. – Ojamo H. – Suominen I. – von Weymarn N. 2002. Bioprosessiteknikka. 1. painos. Porvoo: WSOY.

Arstila, Antti – Björkqvist, Stig-Eyrik – Hänninen, Osmo – Nienstedt, Walter 2006. Ihmisen fysiologia ja anatomia. 15. - 16. painos. Helsinki: WSOY.

BD TALON™ Metal Affinity Resins User Manual. 2003. BD Biosciences. Saatavissa: http://teachline.ls.huji.ac.il/72682/Booklets/CLONTECH_TalonUserManual.pdf. Hakupäivä 9.5.2010.

Blood flow and control of blood pressure. 2008. Saatavissa: <http://www.colorado.edu/intphys/Class/IPHY3430-200/013bloodpressure.htm>. Linkit: Baroreceptors. Hakupäivä 8.4.2010.

Digestio. 2006. Solunetti. Saatavissa: <http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/digestio/2/>. Hakupäivä 8.4.2010

Dunbar, Joseph C. – Rizk, Natalie N. – Rossi, Noreen F. 2006. Cardiovascular Peptides: Vasopressin. Teoksessa Kastin, Abba (toim.). Handbook of biologically active peptides. U.S.A: Academic Press. S. 1223 - 1226.

Fukamizu, Akiyoshi – Murakami, Kazuo 1995. New Aspects of the Renin-Angiotensin System in Blood Pressure Regulation. Trends in Endocrinology & Metabolism, vol. 6, no. 8. S. 279 - 284. Elsevier.

Gel Electrophoresis. 2004. Saatavissa:

http://www.science.smith.edu/departments/Biochem/Biochem_353/sdspage.html. Hakupäivä 17.3.2010.

Gregson, Susan R. 2001. High Blood Pressure. U.S.A: Capstone Press.

How the Body Controls Blood Pressure. 2010. EhealthMD. Saatavissa:

http://www.ehealthmd.com/library/highbp/hbp_how.html. Hakupäivä 17.5.2010.

Jakubke, Hans-Dieter – Sewald, Norbert 2009. Peptides: Chemistry and biology. 2. painos. Saksa: WILEY-VCH.

Klabunde, Richard E. 2009. Cardiovascular Physiology Concepts: Endothelin.

Saatavissa: <http://www.cvphysiology.com/Blood%20Flow/BF012.htm>.

Hakupäivä 8.2.2009.

Kuolleet kuolemansyyn, iän ja sukupuolen mukaan 1986-2008. 2010. Tilastokeskus. Saatavissa: <http://pxweb2.stat.fi/Dialog/Saveshow.asp>. Hakupäivä

17.5.2010.

Lappi, Otto 2010. Aivojen rakenne ja psyykkisten toimintojen lokalisatio. Saatavissa: <http://wiki.helsinki.fi/display/cog121moniste1/5.+Lokalisatio>. Hakupäivä

8.4.2010.

Lodish, Harvey – Berk, Arnold – Zipursky, S. Lawrence – Matsudaira, Paul – Baltimore, David – Darnell, James E. 1999. Molecular cell biology: Figure 20-1. General schemes of intercellular signaling in animals. Saatavissa: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=mcb&part=A5719&rendertype=figure&id=A5719>. Hakupäivä 3.5.2010.

McConnell, Thomas H. 2007. The nature of disease: pathology for the health professions. U.S.A: Lippincott Williams & Wilkins.

Molina, Patricia E. 2004. Endocrine Physiology. U.S.A: The McGraw-Hill Companies.

Mullins, Dyche 2002. How does an SDS PAGE gel really work? Saatavissa: http://mullinslab.ucsf.edu/Protocols%20HTML/SDS_PAGE_protocol.htm. Hakupäivä 17.3.2010.

Mäntylä, Katja 2005. Hyvästit etidiumbromidille ja UV-valopöydille. The Zymes, nro 15. S. 6. Saatavissa: http://suomi.finnzymes.fi/zymes/thezymes15_webbi.pdf. Hakupäivä 13.3.2010.

OHSU Health Information. 2010. Vital Signs (Body Temperature, Pulse Rate, Respiration Rate, Blood Pressure). Saatavissa: <http://www.ohsu.edu/xd/health/health-information/topic-by-id.cfm?ContentTypeld=85&ContentId=P00866>. Hakupäivä 17.5.2010.

Ollikka, Pauli – Suominen, Ilari 2004. Yhdistelmä DNA-tekniikan perusteet. 3-2. painos. Helsinki: Hakapaino Oy.

Piuhola, Jarkko 2002. Regulation of cardiac responses to increased load: Role of endothelin-1, angiotensin II and collagen XV. Acta Univ. Oul. D 679, 2002. Oulu: Oulun yliopisto. Saatavissa: <http://herkules oulu.fi/isbn9514267214/html/x576.html>. Hakupäivä: 17.5.2010.

Proteiinien SDS-PAGE. 2006. Solunetti. Saatavissa:
http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/proteiinien_sds-page/2/. Hakupäivä
17.3.2010.

Rastogi, S.C 2003. Cell and Molecular Biology. 2. painos. Intia: New Age International Publishers.

Savilahti, Harri 2010. Mitä tarkoitetaan käsitteellä rekombinanttiproteiini? Miten niitä tuotetaan ja mihin niitä käytetään? Saatavissa:
http://www.bioteknologia.info/FAQ/yleiset_kysymykset/fi_FI/yleiset_kysymykset_2/. Hakupäivä 17.5.2010.

SDS-PAGE Gel Electrophoresis 2008. Molecular station. Saatavissa:
<http://www.molecularstation.com/sds-page-gel-electrophoresis/>. Hakupäivä
17.5.2010.

Signaling and Signal Transduction. 2010. Biology Reference. Saatavissa:
<http://www.biologyreference.com/Se-T/Signaling-and-Signal-Transduction.html>.
Hakupäivä 2.5.2010.

The Recombinant Protein Handbook. 2000. Protein Amplification and Simple Purification. Amersham Pharmacia Biotech. Saatavissa:
http://teachline.ls.huji.ac.il/72682/Booklets/AMERSHAM_TheRecombProtHandbook.pdf. Hakupäivä 9.5.2010.

Turpeenoja, Leena 1999. Biokemiaa. 3. painos. Vantaa: Tummavuoren Kirjapaino Oy.

Verenpainetta säätelevät peptidit. 2006. Solunetti. Saatavissa:
http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/verenpainetta_saatelevat_peptidit/2/. Hakupäivä 8.4.2010.

Vierimaa, Heidi 2006. Salmon cardiac peptide as a model for natriuretic peptide secretion: The role of mechanical load, temperature and endothelin-1. Acta Univ. Oul. D 890, 2006. Oulu: Oulun yliopisto. Saatavissa: <http://herkules.oulu.fi/isbn9514282000/isbn9514282000.pdf>. Hakupäivä 15.2.2009.

LIITTEET

LIITE 1: pET32-VASO A -PLASMIDIKARTTA

LIITE 2: pGEX4T-VASO A -PLASMIDIKARTTA

LIITE 3: AGAROOSIGEELIELEKTROFOREESIN OHJE

LIITE 4: MOLEKYYLIPAINOMARKKERI

LIITE 5: PLASMIDIN ERISTYS NUCLEOSPIN EXTRACT II -KITILLÄ

LIITE 6: PLASMIDIN ERISTYS SIGMAN MINIPREP-KITILLÄ

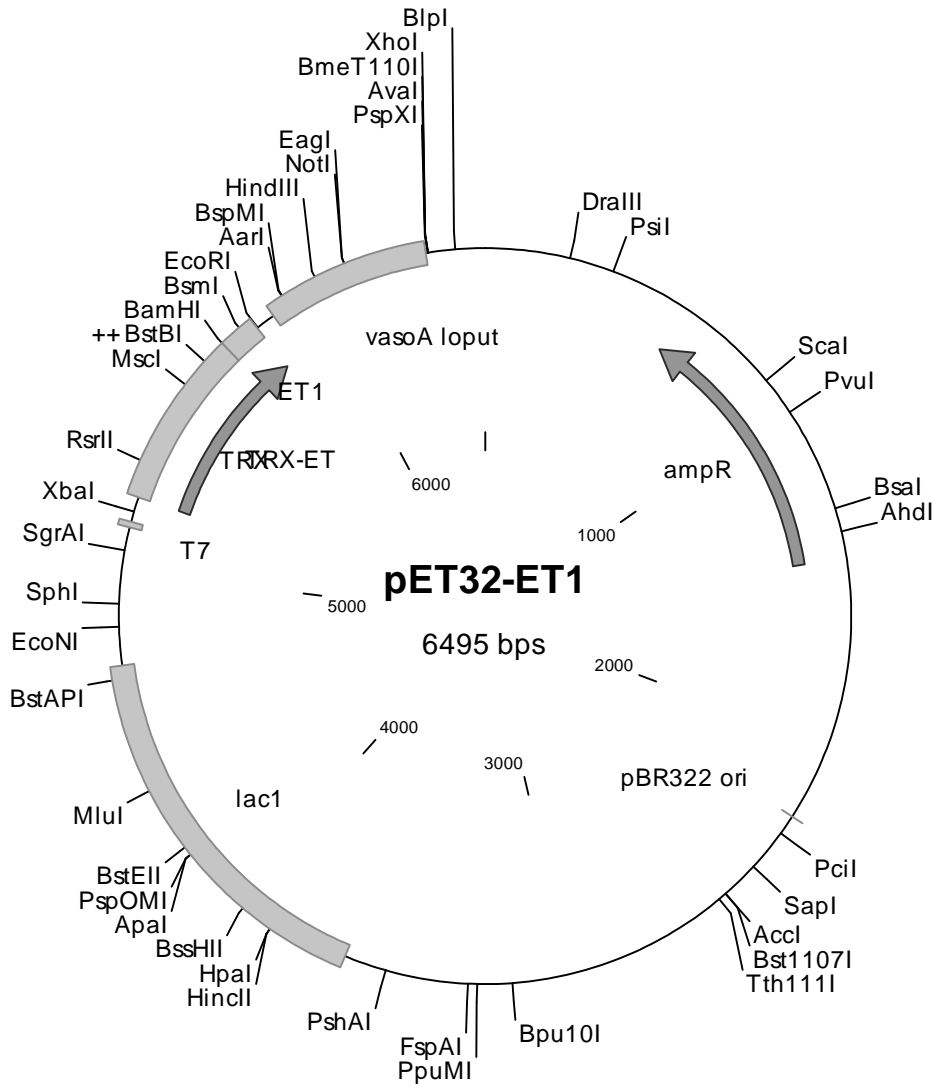
LIITE 7: KASVATUSLIEMET

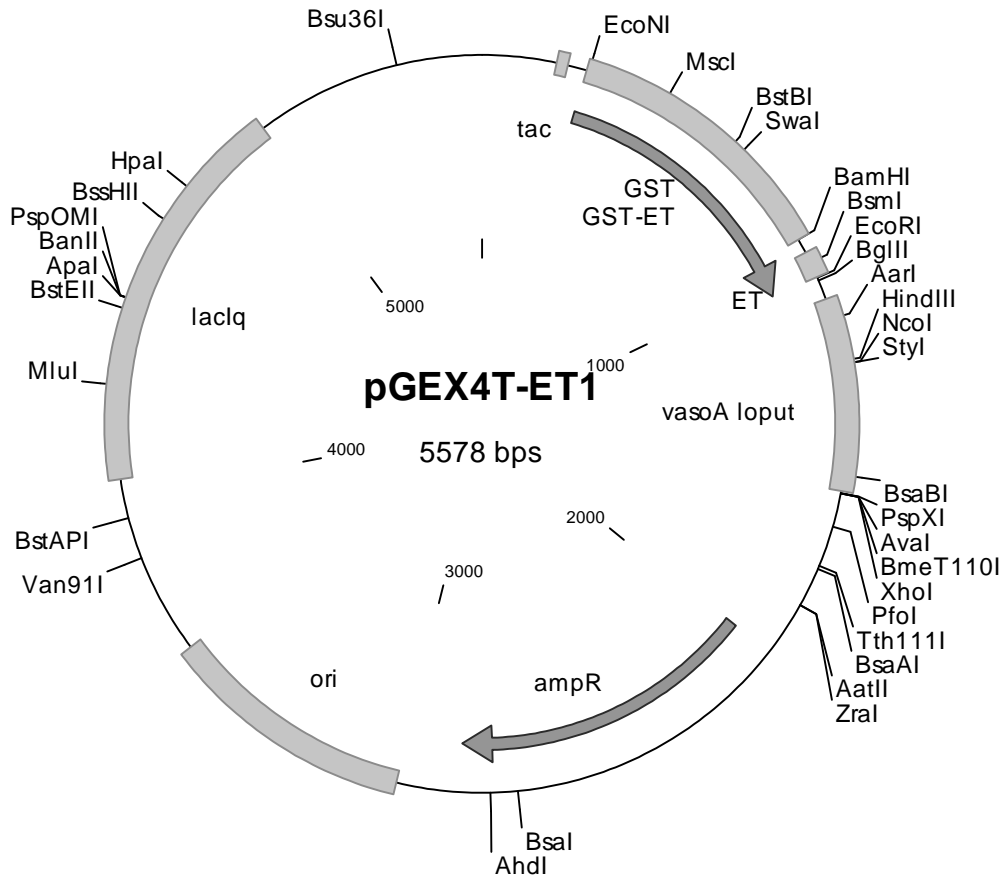
LIITE 8: LYYSIPUSKURI GST-ET-1-PROTEIININ PUHDISTUKSEEN

LIITE 9: LYYSIPUSKURI TRX-ET-1-PROTEIININ PUHDISTUKSEEN

LIITE 10: SDS-PAGE

LIITE 11: MOLEKYYLIPAINOMARKKERI





GEELIN VALU

- * muovikelkan molemmat päät teipataan
- * punnitse agarosia 1% geeliä varten: esim. 0.8g/ 80 ml, 1g/100 ml
- * liuota agarosia ajopuskuriin (1xTBE tai 1xTAE) kuumentamalla mikrossa hitaasti, välillä sekoittaen
- * lisää jäähtyneeseen (n. 50-60C) liuokseen 1/10000 vol 10mg/ml EtBromidia (karsinogeeni) ja kaada ajokelkkaan.
- * aseta kampa paikoilleen. Poista ilmakuplat kammalla tai pipetillä
- * anna hyytyä (n. 15 -30 min, kylmässä nopeammin)
- * poista kammot
- * voit varastoida geelit kylmähuoneeseen pakattuna tiiviisti tuorekelmuun, ja leikata tarvitsemasi kokoisen palan kulloistakin ajoa varten

GEELIN AJO

- * Nosta geeli kelkan kanssa tai ilman kelkkaa ajoastiaan
- * lisää ajopuskuria (1xTBE tai 1xTAE) niin, että nesteeseen pinta on hieman yli geelin pinnan
- * pipetoi "latauspuskuria" sisältävät näytteet vasemmalta oikealle.
- * Yleensä rivin eka kaivon laitetaan markkeri
- * sulje kansi ja säädä virta maximille (400 mA) ja rajoita ajoa jännitteellä 80V-100V. Pienelle geelille pienempi jännite. Käytä myös ajoaikakytkintä, niin geeliasiossi ei voi unohtua päälle. Noin 40-60 min ajo on tavallisin. Usein jopa 20-30 min ajo riittää, jos vain haluat todentaa reaktion onnistumisen tms.

Jos olet puhdistamassa geelillä DNA:ta, aja pienemmalla jännitteellä, jopa vain 60V, jolloin geeli lämpenee vähemmän, ja erottuminen ja puhdistus onnistuu paremmin.

Pieneen kaivon (10 µl) ei kannata pipetoida enempää kuin pari ug DNA:a. 10-20 µg annoksia varten tee leveät kaivot, jotta DNA mahtuu kulkemaan geelissä.

Valokuvaa tai tarkastele geeliä ajon jälkeen UV-valopöydällä. Suojaa paljas iho ja silmäsi UV-valolta. Käsittele geeliä hansikkain. Pyyhi pinnat, joissa geeli on ollut.

Voit varastoida geelin kylmähuoneeseen, pakattuna tuorekelmuun, ja tarkastella geeliä uudestaan tai ajaa lisää tarvittaessa.

10xTBE (=TRIS-Boraatti-EDTA) kantaliuos, autoklavoi

1xTBE, laimenna edellisestä deionisoidulla vedellä, käytetään perusajoihin

50xTAE (=TRIS-asetatti-EDTA) kantaliuos, autoklavoi

=2 M:TRIS - 5.65 % Etikkahappo-100 mM EDTA

tai ... Liuota 242,2 g TRIS a. 700 ml deion.veteen. Lisää 57,1 ml jäätikkää sekä 100 ml 0.5M EDTA pH 8.0 puskuria. Täytä tilavuus 1 litraksi. pH on n. 8,3.

1xTAE, laimenna edellisestä steriilillä deionisoidulla vedellä, käytetään DNA:n puhdistamiseen geelillä

10mg/ml EtBr DNA:n osoittamiseen,
käytetään 1/10 000 vol eli 10 ul per 100 ml geeliä

SybrSafe 10000x kantaliuos DMSO:ssa, kaupallinen valmis seos. Käytetään EtBromidin tilalla. DNA katsotaan sinivalopöydällä. Geelit voi laittaa ajon jälkeen tavalliseen roskeen.

Latauspuskuri eli "Loading Dye", jota lisätään näytteeseen

832 mg EDTA-Na₄*2 H₂O

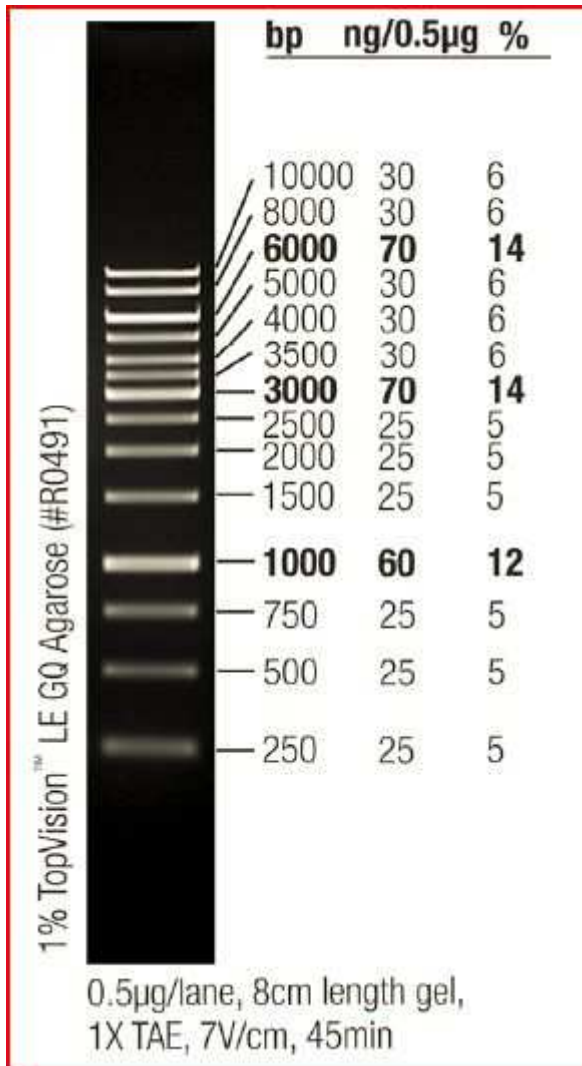
4.6 ml 87% glyserolia (lisää punnitsemalla 4.6 g)

Ripaus siniväriä, joko BromPhenol-Blue tai Xylene Cyanol tai molempia

Täytä tilavuus 10 ml:ksi steriilillä vedellä.

BPB liikkuu geelissä kuten noin 300-400bp kokoinen DNA











XC liikkuu geelissä kuten noin 3000-4000bp kokoinen DNA



PCR clean-up, Gel extraction

Protocol-at-a-glance (Rev.09)

NucleoSpin® Extract II

	PCR clean-up	Gel extraction
1 PCR clean-up: Adjust binding condition Gel extraction: Excise DNA fragment / Solubilize gel slice	 200 µl NT / 100 µl PCR	  200 µl NT / 100 mg gel 50°C 5 - 10 min
2 Bind DNA	  11,000 x g 1 min	
3 Wash silica membrane	  700 µl NT3 11,000 x g 1 min	
4 Dry silica membrane	 11,000 x g 2 min	
5 Elute DNA	  15 - 50 µl NE RT 1 min 11,000 x g 1 min	

PLASMIDIN ERISTYS

1. Fuugaa solut 3-5ml kasvustosta plasmidin eristystä varten 3500 rpm 10 min tai 2krt 2 ml epparissa 13000 rpm 1 min.

Tee suspensointi ja lyysaus kasvatusputkessa/ epparissa. Tee supin ja sakan erotus fuugaukset epparifuugissa.

2. Suspensoi solupelletti **300 ul RESUSPENSIO PUSKURIIN** pipetoimalla. Käytä suspensointiin filtterikärkiä, ettei pipetin suuaukko sotkeudu soluilla.
3. Lisää **300 ul LYYSIPUSKURIA**. Sekoita kääntelemällä putkea 6-7 kertaa. Käynnistä kello. Voit käänellä vielä pari kertaa putkia tai koko telinettä. Kun solut hajoavat, liuos muuttuu venyväksi ja viskoosiksi.
4. Lisää **3-5 min kuluttua 525 ul NEUTRALIZATION/BINDING** puskuria ja kääntele putkia 6-7 kertaa.
5. Fuugaa sakka pohjalle epparifuugissa 13000 rpm 10 min.
6. Fuugauksen aikana tasapainota DNA-pylväät:

Pipetoi keräysputkissa oleviin vaaleansinisiin DNA-pylväisiin

500 ul COLUMN PREPARATION puskuria.

Fuugaa epparifuugissa 13000 rpm 1 min.

Nosta pylväs keräysputkesta, ja kaada läpitullut puskuri jätekippon.

Laita pylväs takaisin keräysputkeen odottamaan näytettä.

DNA:n SITOUTUMINEN PYLVÄÄSEEN ja EPÄPUHTAUKSIEN PESU

7. Siirrä kahdessa erässä **500 ul solulysaatin supernatanttia** (=kirkas liuos sakan yläpuolelta) tasapainotettuun omaan merkattuun pylvääseen.
8. **Fuugaa 13000 rpm 1 min.** Kaada läpitullut liuos jätekippon, ja toista kohta 6. eli lisää toisen kerran 500 ul saman solulysaatin supernatanttia samaan pylvääseen. Toista fuugaus ja läpimenneen liuoksen poisto jätekippon.
9. Pese pylväs **500 ul OPTIONAL wash** puskurilla. Fuugaa **13000 rpm 1 min**, ja heitä puskuri pois.
10. Pese pylväs 750 ul WASH SOLUTIONilla, johon on lisätty EtOH
Fuugaa 13000 rpm 1 min. Kaada liuos jätekippon.
11. Toista pesu 500 ul:lla WASH SOLUTION puskuria. Fuugaa ja poista liuososa.
12. Fuugaa pylväs "tyhjänä" **vielä 13000 rpm 2 min**, jotta kaikki mahdollinen pesupuskuri saadaan pois. Se häiritsee myöhempiä reaktioita.

DNA:n ELUOINTI ELI IRROTTAMINEN PYLVÄÄSTÄ PUHTAASEN EPPARIIN

12. Siirrä kuivat pylväät merkittyihin steriileihin eppareihin.
13. Pipetoi tarkasti pylvään keskelle 50 ul lämmitettyä (65C) 10 mM TRIS,pH 8.0 Puskuria= eluointi puskuri. Anna vaikuttaa 2-5 min.
14. Siirrä pylväät eppareissa fuugiin. Aseta epparit aina pareittain niin, että kannet ovat keskustan suuntaan ristikkäin.
15. Fuugaa DNA pylvästä epparin pohjalle 1300 rpm 2 min.
Poista pylväs epparista (tarkista ensin, että liuos on tullut siihen !).
16. Siirrä DNA-epparit jälle, ja näytteiden oton jälkeen -20C pakasteeseen.
17. Ota jokaisesta DNA:sta kahteen eri putkeen näytteet ja pakasta loput -20C.
 - a) 2 ul DNA-pitoisuuden mittausta varten (Nanodrop)
 - b) 5 ul DNA:n entsyymikäsittelyä varten (testidigestio)
18. Mittaa DNA pitoisuus 2ul näytteistä Nanodropilla, Päärakennuksen 4. krs. nollana 10 mM Tris puskuri.

SB-MOPS

tryptoni 30 g

hiivauute 20 g

MOPS 10 g

vesi 1 l

LB-maljat

tryptoni 10 g

hiivauute 5 g

NaCl 5 g

Bacto Agar 17,5 g

vesi 1l

LYYSIPUSKURI 15 ml	
Vettä	12,9 ml
10xPBS	1,5 ml
Benzonase	15 µl
CLA	15 µl
AEPSF	150 µl
Pepstatin	15 µl
Leupeptin	15 µl
Antipain	15 µl

LYYSIPUSKURI 15 ml	
Vettä	11,4 ml
10xPBS	1,5 ml
10xBug Buster	1,5 ml
Brij 35	240 µl
Benzonase	15 µl
Pepstatin	15 µl
Leupeptin	15 µl
Antipain	15 µl
CLA	15 µl
AEBSF	150 µl
Benz.amid	150 µl

SDS-PAGE - SDS POLYAKRYYLIAMIDI GEELIELEKTROFOREESI**TARVIKKEET**

Suojakäsineet

Työskentelysuojapaperi

Puhtaita isoja takalaseja

Puhtaita matalampia etulaseja

Teflon spacerit 2 kpl per geeli

Teflon kampa 1 kpl per geeli

Valukehikot: 1 kpl per geeli

Valuteline sekä siihen harmaat kumityynyt

Tussi kaivon ja kamman paikkojen merkitsemiseen

2 kpl 50 ml putkia tai 100 ml pulloja (puhdas, epästeriili käy)

2 kpl 14 ml putkia (puhdas, epästeriili käy)

10 ml ja 25 ml kertakäyttöpipettejä

1000 ul , 200 ul, 40 ul ja 10 ul pipetti ja niihin kärjet

Whatman suodatinpaperin liuskoja

Lämpöblokki (95C tai 56C).

Labrakello

Virtalähde, jolla saa 200V-400mA.

Pakasterasioita tms. kannellisia astioita geelin värjäyksen ja värinpoistoon.

REAGENSIT Geelinvaluun

30% AA-BIS liuos (37.1:1) , säilytä 4C. Laita kylmään käytön jälkeen.

HUOM ! myrkyllistä liuoksena.

Hyydytä aina jäte APSilla ja TEMEDillä ennen roskeen laittoa.

Kerää geelit omaan geeliroskeen vetokaapissa.

1.5M TRIS/HCl pH 8.8 (valmista 500ml, autoklavoi)

0.5M TRIS-HCl, pH 6.8 (valmista 500 ml , autoklavoi)

20% SDS

HUOM!hyvin hienojakoista pölyä → punnitse suusuojuksen kanssa..

Kiteytyy jo noin 20C lämmössä. Lämmitä tarvittaessa.

Deionisoitu Millipore vesi

TEMED: Lisää tätä ainoastaan valettavaa geeliä varten, EI KOKO SEOKSEEN:

Esim. Lisää 6.5 ul 10 ml geeliannokseen, jota tulee kaksi MINI geeliä.

10% APS (Ammoniumpersulfaatti). Lisää ainoastaan valettavaan geeliannokseen,

EI KOKO SEOKSEEN. Esim. lisää 50 ul 10 ml geeliannokseen.

Säilytä 10% APS 100 – 500 ul annoksina -20C.

Vie putki takaisin pakkaseen käytön jälkeen.

0.1% SDS liuosta voi lisätä varovasti (noin 1 ml) alageelin pinnalle heti geelivalun jälkeen. Liuos imetään imupaperilla pois ennen ylägeelin valua.

GEELISEOKSET

Valmista erilaisia %-seoksia alageelejä = erotusgeelejä, jotka voi varastoida kylmähuooneessa, miel. valolta suojattuna jopa kuukausia.

Seoksiin ei lisätä TEMEDIä eikä APSIa ennekuin vasta juuri ennen käyttöä ja vain tarvittavaan annokseen- EI KOKO MÄÄRÄÄN.

EROTUSGEELIT =alageeli, pipetointi 50 ml annoksia varten

Valetaan ensin, alemmaksi geeliksi.

prosenttisuus	7.5%	10%	12%	15%
30% AA/BIS seos	12.5 ml	16,7ml	20.0 ml	25.0 ml
1.5M TRIS/HCl pH 8.8	12.5ml	12.5 ml	12.5ml	12.5 ml
20% SDS	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml
Deion vesi	24.5 ml	20.3 ml	17.0 ml	12.0 ml
Yhteensä	50 ml	50 ml	50 ml	50 ml

KONSENTRIOINTIGEELIT = ylägeeli, pipetointi 50 ml annoksia varten

Valetaan viimeiseksi alageelin päälle. Laita varovasti kampa paikalleen.

prosenttisuus	3%	4%	5%
30% AA/BIS seos	5.0 ml	6,6ml	8.25 ml
0.5M TRIS/HCl pH 6.8	12.5ml	12.5 ml	12.5ml
20% SDS	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml
Deion vesi	32.0 ml	30.4 ml	28.8 ml
Yhteensä	50 ml	50 ml	50 ml

Kokoa lasti valukehikkoon, korkeampi lasi muovia vasten, väliin spacerit ja etummaisiksi matalampi lasi. Ruuvaa 4 ruuvia tasaisesti. Tarkista spacerit ja lasien reunat, että ovat tasan pöytäpinnan kanssa. Käännä lasit niin, että mahdolliset lohkeamat tai kuprut tulevat yläosaan, missä ne eivät vaikuta lasien painumista tiiviisti kumialustaan. Nap-sauta lasi-velukehikko valutelineeseen matalampi lasi itseesi päin. Merkitse kamman avulla kaivojen ja kamman paikat tussilla.

Kahta minigeeliä varten riittää noin 10 ml molempia geeliseoksia. Ota tarvittava määrä fuugiputkeen, ja laita lopun seokset takaisin kylmään.

Lisää ensin alageeliseokseen (10 ml) 6.5 ul TEMEDIä ja 50 ul 10% APSia.

Sekoita hyvin ja kaada tai pipetoi puhtaiden lasien väliin valukehikossa.

Lisää pinnalle lopuksi n. 0.5ml 0.1% SDS liuosta.

Geeli hyytyy noin 15 minuutissa.

Poista neste hyytyneen alageelin pinnalta suodatinpaperilla.

Ota 5% ylägeeliseosta noin 6 ml, johon lisää 5 ul TEMEDIä ja 50 ul 10% APS.

Kaada seos lasien väliin ja aseta kampa paikalleen kulma edellä varoen ilmakehien muodostumista. Voit kopsautella lasia ulkopuolelta, jotta mahdolliset pienet kuplat nousevat pintaan. Älä liikuttele kampa pitkään, muuten kaivot menevät huonoiksi.

Geeli hyytyy noin 15 minuutissa.

Valmiit geelit voi varastoida kylmähuoneeseen käärimällä ne deion. veteen kostutettuihin papereihin ja pakkaamalla muovipussiin. Poista kammat, jotta muut voivat tarvittaessa valaa geelejä. Puhdista lasin yläreuna kaivojen yläpuolelta mahdollinen geelijäte vedellä ja paperilla. Merkitse pvm ja nimikirjaimet pakettiin.

Liuosmainen jäte pitää aina hyydyttää ennen roskeen laitoa.

Lisää nesteeseen jonkin verran TEMEDIä (esim. 10 ul) ja 10% APSia (esim. 100 ul). Hyytynyt geeli ei ole myrkyllinen, mutta se kerätään kuitenkin omaan jäteastiaan.

REAGENSIT Geelinajoon ja näytteiden käsittelyyn

2x Laemmli SDS-PAGE näytepuskuri =

4% SDS-20% glyseroli-0.125M TRIS-HCL pH 6.8. Sekoita seuraavia reagensseja:

0.5M TRIS pH 6.8 2,5 ml

20% SDS 2.0 ml

50% glyseroli 4.0 ml

Deion vesi 0.5 ml

Bromphenol blue ripaus

Yhteensä 9 ml, jaa tämä 20 kpl 450 ul annokseen pakasteeseen (-20C).

Lisää yhteen putkeen kerrallaan 50 ul beta merkaptotanolia VETOKAAPISSA !

→ **valmis 2x red.SDS-näytepuskuri.** Varastoidaan -20C. Merkitse B-MEn lisäys: +

Lisää puskuria näytteeseen **1 vol** eli saman verran kuin näytettäkin on. (Usein 10 ul.)

Kuumenna proteiininäyte heti SDS-näytepuskurin lisäyksen jälkeen **95C 3 -5 min.** Tee epparin kanteen reikä neulalla, ettei kansi pöksähda auki. Fuugaa neste pohjalle. Voit pakasta näytteet -20C, jos et heti aja niitä geelillä.

Pakastetut näytteet lämmitetään 56C 20 min ennen geelijaota SDS-proteiini-misellien liuottamiseksi.

10x PAGE ajopuskurin kantaliuos=

1.92M Glysiini-0.25M TRIS, valmistaa 1 litra ja autoklavoi säilyvyyden takia.

1x SDS-PAGE ajopuskuri

192mM Glysiini-25mM TRIS-0.1% SDS

Valmistaa 10x kantaliuoksesta ja 20% SDS:stä laimentamalla vedellä 2-5 litraa.

1 litraan 100 ml 10x kantaliuosta, vettä ja 5 ml 20% SDS

2 litraan 200 ml 10x kantaliuosta, vettä ja 10 ml 20% SDS

5 litraan 500 ml 10x kantaliuosta, vettä ja 25 ml 20% SDS

Kaada ajokammion pohjalle 1x SDS-ajopuskuria.

Irrota geeleistä kammat ja puhdista lasin reuna (kaivojen yläpuoli) deion. vedellä ja paperilla.

Napsauta geeliteline ajotelineeseen. Piikki puoli ja kaivopuoli ylöspäin. Laita molemmille puolille geeliteline. Jos ajat vain yhden geelin, toiseen geelitelineeseen pitää ruuvata muovilevy tiukka. Muuten ajoastiaan ei muodostu kahta elektrodikammiota eikä virta kulje. Kaada sisempään kammioon nestettä niin, että sitä on noin 5-10 mm kaivojen yläpuolella. Jos sisäkammio tyhjenee, kaada nestettä tankkiin sisä- ja ulkopuolen kammioiden yhtä paljon eli kaivojen yläpuolelle, MUTTA EI YLI TELINEEN.

Pipetoi geelille noin 10 ul näytteitä sekä 5 ul standardeja (MW, GST tms.)

Punainen napa punaiselle puolelle. Säädot: 200V-400mA-40min.
Aja kunnes sininen väri menee lasin alareunaan.

Ennen kuin purat geelin, mieti, miten päin geeli on eli missä reunassa on eka kaivot ja missä viimeiset näytekaivot. Kun avaat geelilasin, leikkaa geelin yläreunasta kulmapala pois joko eka tai vimpan näytteen puolelta. Tärkeintä on, että pystyt sanomaan, kumpi reuna on kumpi, kun geeli sitten värjäysastiassa pyörii.

Geelin voi **fiksata 10% etikkahapolla**: 10 min inkubointi kiinnittää proteiinin akryyliamidiin, joten sen jälkeen ne eivät diffundoitu tai uutu pois geeliltä.

CBB-Värjäysliuos: = 40% etanoli-8% etikkahappo-0.05% Coomassie brilliant blue = 500 ml deion. vettä + 400 ml etanolia + 80 ml väk. Etikkahappoa + 0.5g CBB

Täytä tilavuus vedellä litraksi. Lisää CBB-väri ja sekoita magneetin kanssa y/y. Suodata väriliuos suodatinpaperin läpi, jotta liukenematon jauhe saadaan pois.

Väriä voidaan käyttää useita kertoja. Kaada väri käytetyn värin astiaan. Pidä kuitenkin puhdas väri ja käytetty erillään eli kaada käytetty väri aina omaan astiaansa. Geeliä värjätään 20 – 30 min.

Geeliä pestään 8% tai 10% etikkahappoliuoksella.

Pese pienillä määrillä useita kertoja. Geelin voi jättää kannellisessa astiassa y/y värinpoistoon.

Värinpoistoliuosta voidaan käyttää useita kertoja. Pidä puhdas värinpoistoliuos ja käytetty liuos omilla astioissaan. Käytetyn liuoksen astiaan voi laittaa vaahtokumin palasia tai se suodatetaan aktiivihiihen läpi. Käytä puhdasta 8 – 10 % etikkahappoa lähinnä viimeisiin pesuihin. Pesua voi tehostaa viemällä astia lämpöhuoneeseen (37) sekä laittamalla mukaan tufferipaperinyyttejä tai vaahtokumin palasia.

Kaada nesteet geeliastiasta pitämällä toisen käden etusormella geelistä kiinni. Kaada nesteet johonkin kaatoastiaan, jottei geeli mene viemäriin, jos ote vahingossa lipsahtaa.

Valokuvaamista varten geeli pitää pestä 3 krt 5 min vedellä, jotta etikkahapon haju saadaan pois. Geeli turpoaa tällöin huomattavasti, ja tulee ohuemmaksi ja vaikeammaksi nostella.

Kuivumaan päässyt geeli (jos astia ei ole ollut tiiviisti kiinni) saadaan takaisin entiseen muotoonsa lisäämällä vettä, ja inkuboimalla noin 30 min.

