



Osaamista  
ja oivallusta  
tulevaisuuden  
tekemiseen

Ahmed Al-Mosawi

# DNA-polymeraasin karakterisointi, tuotantoprosessin tutkiminen ja LC-MS-menetelmän kehitys

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalytikko (AMK)

Laboratorioala

Opinnäytetyö

31.10.2019

Tekijä Otsikko Sivumäärä Aika	Ahmed Al-Mosawi DNA-polymeraasin karakterisointi, tuotantoprosessin tutkiminen ja LC-MS-menetelmän kehitys 45 sivua + 2 liitettä 31.10.2019
Tutkinto	Laboratorioanalyttikko (AMK)
Tutkinto-ohjelma	Laboratorioanalytiikka
Ohjaajat	R&D Tutkija Nina Wickstrand Lehtori Miika Kuivikko
<p>Opinnäytetyö toteutettiin Thermo Fisher Scientific Oy:n Vantaan toimipisteessä, Mikrobiologian divisioonan Food Safety Protection R&amp;D osastossa. Osaston tehtäviin kuuluu mm. kehittää PCR-tuotteita tunnistamaan patogeenisiä mikro-organismeja ruokanäytteistä.</p> <p>Työn tavoitteena oli tutkia DNA-polymeraasientsyymien ominaisuuksia ja tuotantoeräkohtaisia eroja. DNA-polymeraasientsyymi tuotteesta haluttiin kehittää LC-MS-karakterisointimenetelmiä erojen tunnistamiseksi. DNA-polymeraasin ominaisuuksista tarkastellaan konsentraatio, puhtaus ja rakenne. Proteiinikonsentraatio ja puhtaus määritettiin Bradford- ja SDS-PAGE -analyysillä.</p> <p>DNA-polymeraasin rakenteen tutkimista varten kehitettiin LC-MS-menetelmä, jossa pystyttiin tutkimaan entsyymaattisesti pilkottuja peptidejä. Työssä osallistuttiin uusimman erän tuotannossa, jossa tavoitteena on tutkia ja mahdollisesti optimoida tuotantoprosessia.</p> <p>Työssä saatiin hyödyllistä tietoa DNA-polymeraasin rakenteesta ja vaihtelusta. Vaikka tämän työn tulosten perusteella ei todettu vaihtelun olevan merkitsevä DNA-polymeraasin toimintaan, sitä tullaan tutkimaan lisää.</p> <p>LC-MS-menetelmä ei onnistunut täysin aikarajoitusten vuoksi, ja vaatii menetelmän optimointia. LC-MS-menetelmän osittaisen epäonnistumisen syy on tutkittu, ja se on todettu johtuvan osittain ionisaation stabiilisuudesta. Tässä työssä kehitettyä menetelmää tullaan käyttämään pohjana tulevissa jatkotutkimuksissa.</p> <p>Opinnäytetyöstä on saatu hyödyllistä tietoa DNA-polymeraasientsyymistä ja pystytään suunnittelemaan jatkotutkimuksia tämän työn tulosten perusteella. On myös alustavasti kehitetty LC-MS-menetelmä, josta voi jatkaa optimointia.</p>	
Avainsanat	DNA-polymeraasi, LC-MS, proteiinien karakterisointi

Author Title Number of Pages Date	Ahmed Al-Mosawi DNA Polymerase Characterization, Analysis of Production Process and LC-MS Method Development 45 pages + 2 appendices 31 October 2019
Degree	Bachelor of Laboratory Sciences
Degree Programme	Laboratory Sciences
Instructors	Nina Wickstrand, Senior R&D Scientist Miika Kuivikko, Senior Lecturer
<p>This study was conducted at Thermo Fisher Scientific Oy Vantaa site, in microbiology division's Food Safety R&amp;D department. One of this department's responsibilities include developing PCR products to identify food pathogens.</p> <p>The purpose of this study was to examine the properties of DNA polymerase enzyme and its variations between different production lots. The aim was to develop an LC-MS method to identify DNA polymerase's composition. Properties of DNA polymerase that were tested include concentration, purity and composition. This protein's concentration and purity were tested with Bradford and SDS-PAGE analysis methods.</p> <p>An LC-MS method was developed to analyze the composition of digested DNA polymerase peptides. The production of the newest lot was participated in, where the aim was to analyze and optimize the production process.</p> <p>The LC-MS method didn't fully work and requires further optimization. Reason for LC-MS method's failure was analyzed and determined to be partially due to stability issues in ionization. The developed method in this study will be used as a template for future studies.</p> <p>In this study Important information was obtained about DNA polymerase's composition and variations. Despite this study's results, the differences were determined to be not significant to the performance of DNA polymerase. Further studies will be conducted to test the significance of the variation. An LC-MS method was tentatively developed and only requires further optimization.</p>	
Keywords	DNA polymerase, LC-MS, characterization

# Sisällys

## Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	DNA-polymeraasi	1
3	Karakterisointimenetelmät	3
3.1	Trypsiinidigestio	3
3.2	Nestekromatografia-massaspektrometria	3
3.2.1	Nestekromatografia	4
3.2.2	Massaspektrometria	4
3.2.3	Sähkösumutus-ionisaatio	5
3.2.4	Orbitrap massa-analysointilaite ja detektorit	7
3.3	Geelielektroforeesi	8
3.4	Hopeavärijäys	9
3.5	Proteiinikonsentraation määrittäminen	11
3.5.1	Bradford-menetelmä	11
3.5.2	Qubit-menetelmä	11
4	DNA-polymeraasin tuotantoprosessi	12
4.1	Aktiivisuusmäärittäminen	14
5	Työn toteutus	16
5.1	Proteiinikonsentraation määrittäminen	17
5.1.1	Qubit-mittaukset	18
5.1.2	Bradford-mittaukset	18
5.2	Geelielektroforeesi	19
5.3	Hopeavärijäys	22
5.4	Trypsiinidigestio	24
5.5	Nestekromatografia-massaspektrometrian parametrit ja menetelmä	27
6	Tulokset	30
6.1	Proteiinikonsentraatio	30
6.2	Geelielektroforeesi	33
6.3	Nestekromatografia-massaspektrometria	38

7	Johtopäätökset	43
	Lähteet	45
	Liitteet	
	Liite 1. DNA-polymeraasin aminohapposekvenssi ja teoreettiset peptidimassat (salainen)	
	Liite 2. LC-MS-tulosten variointi	

## Lyhenteet

ACN	Acetonitrile, asetoniiri
Bis-Tris	Hydroksietyyli- hydroksimetyyli
BSA	Bovine serum albumin, naudan seerumin albumiini
CPM	Counts per minute, määrä minuutissa
dATP	Deoksiadenosiinitrifosfaatti
dCTP	Deoksisytidiini-trifosfaatti
dGTP	Deoksiguanosiinitrifosfaatti
DNA	Deoksiribonukleiinihappo
DTT	Ditiotreitoli
dTTP	Deoksitymidiinitrifosfaatti
EDTA	Etyleenidiamiinitetraetikkahappo
ESI	Electronspray ionization, sähkösumutusionisaatio
FA	Formic acid, muurahaishappo
FT-ICR	Fourier-muunnosionisyklotroniresonanssi
HCD	Higher-energy collisional dissociation, Korkeaenerginen törmäytysdissosiaatio
IAA	Iodoacetamide, jodiasetamidi
kDa	Kilodalton, molekyyli­massan yksikkö

LC-MS	Liquid chromatography – Mass spectrometry, Nestekromatografia - Masspektrometria
LDS	Lithium dodecyl sulfate, litium dodesyyli sulfaatti
MOPS	3-Morpholinopropane-1-sulfonic acid, 3-Morpholinopropaani-1-sulfonihappo
MWCO	Molecular weight cut-off, molekyylipainon cut-off
OMI	O-Methylisourea Hemisulfate Salt, O-Methylisourea hemisulfaatti suola
PCR	Polymerase chain reaction, Polymeraasiketjureaktio
RPM	Revolution per minute, kierrosta minuutissa
SDS-PAGE	natriumdodekyylisulfaatti-polyakryyliamidigeelielektroforeesi
SIM	Selected ion monitoring, valittujen ionien mittaus
TCA	Trikloorietikkahappo
TFA	Trifluoretikkahappo
TIC	Total ion chromatogram, kokoionikromatogrammi
Tris-	Hydroksimetyyli-
U/HPLC	Ultra/high performance liquid chromatography, erittäin korkean erotuskyvyn nestekromatografia

## 1 Johdanto

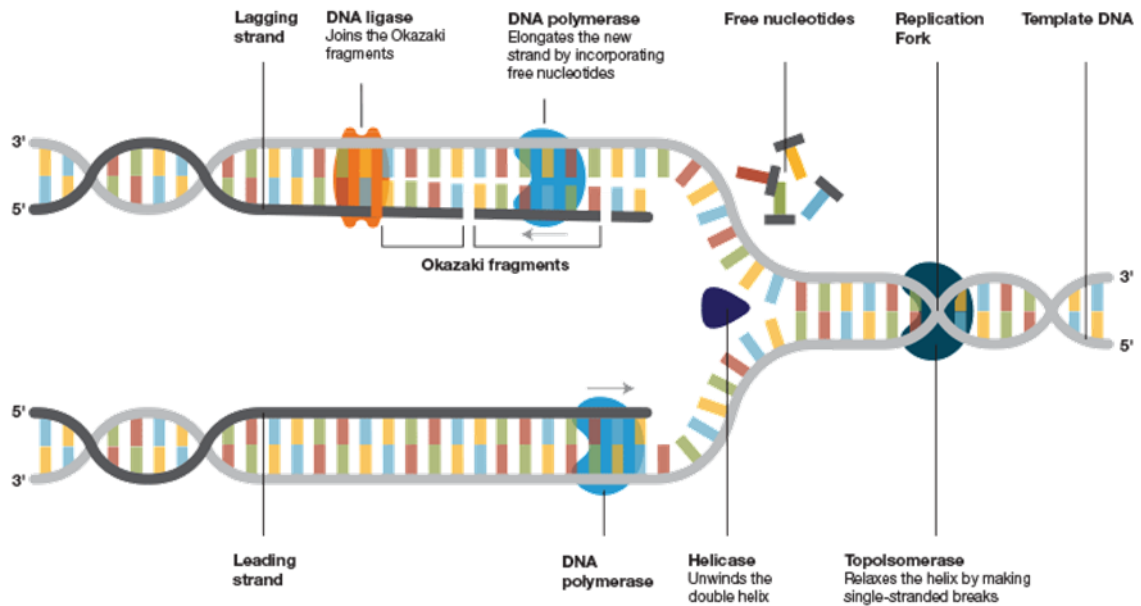
Tämän työn tavoitteena oli tutkia DNA-polymeraasientsyymien ominaisuuksia ja tuotantoeräkohtaisia eroja. DNA-polymeraasientsyymi tuotteesta halutaan tutkia eroja tuotantoerien välissä, ja tarkoitus on kehittää karakterisointimenetelmiä erojen havaitsemiseksi ja tunnistamiseksi. Proteiinin karakterisointiin käytettiin SDS-PAGE- ja LC-MS-menetelmää ja kaksi muuta eri menetelmää konsentraation määrittämiseen.

Tuotantoprosessin aikana näytteitä otettiin tutkittavaksi eri puhdistusvaiheissa ja vertailtiin proteiinin/entsyymien ominaisuuksia vanhojen tuotantoerien kanssa. Työ suoritettiin Thermo Fisher Scientific Oy:n Vantaan toimipisteessä MBD Food Safety Protection tutkimus ja tuotekehitys -osastossa. Kyseessä on yrityksen valmistama tuote, jota käytetään erilaisissa analyyseissä. Tavoitteena oli tarvittaessa muokata tuotantoprosessia erojen minimoimiseksi ja kehittää LC-MS-menetelmä DNA-polymeraasientsyymien analysointiin.

## 2 DNA-polymeraasi

DNA-polymeraasi on entsyymi, joka syntetisoi DNA-molekyylejä DNA:n rakennusosista. DNA-polymeraasi on tärkeä entsyymi DNA:n replikaatiossa, sillä se liittyy emäksiä yksijuosteiseen DNA:han. DNA-replikaatiossa kaksoiskierteinen DNA-juoste puretaan helikaasientsyymillä, jolloin muodostuu kaksi yksijuostetta eli muodostuu kahdentumishaarukka (kuva 1). Koska kaksoisjuoste on kaksisuuntainen, kun helikaasientsyymi purkaa sitä, niin muodostuu juoste suunnassa 3'–5' ja toinen juoste suunnassa 5'–3'. Näitä kahta juostetta kutsutaan johtajuosteeksi (eng. Leading strand) ja jälkijuosteeksi (eng. Lagging strand). DNA-polymeraasi lukee juostetta suunnassa 3'–5' ja voi ainoastaan koodata emäksiä suunnassa 5'–3'. DNA-polymeraasi voi koodata nukleotidejä johtajuosteessa jatkuvasti, mutta reaktion aloittamiseen tarvitaan DNA-primaasientsyymien tuottamia alukkeita (eng. Primer). Alukkeet ovat lyhyitä noin 15–20 RNA-emäspareja, ja niiden avulla polymeraasi pystyy aloittamaan DNA-synteesin. Jälkijuoste on vastakkaisuuntainen verrattuna johtajuosteeseen, joten DNA-polymeraasi ei voi koodata nukleotidejä jatkuvasti. Jälkijuosteessa DNA-polymeraasi koodaa lyhyempiä fragmentteja alukkeiden välillä, ja näitä kutsutaan Okazaki-fragmenteiksi. Monistumisen jälkeen, eksonukleaasi

entsyymi irrottaa RNA-alukkeet Okazaki-fragmenttien välistä ja DNA-polymeraasi liittää tilalle vapaita nukleotidejä. Lopuksi DNA-ligaasientsyymi liittää kaikki fragmentit yhteen ja muodostuu uusia DNA-kaksoisjuosteita. [1, s. 461]



Kuva 1. Kaavio DNA-replikaatiosta

DNA-polymeraasin toimintaa havaittiin ensimmäistä kertaa vuonna 1958, jolloin A. Kornberg havaitsi polymeraasientsyymi toimintaa *E. Coli* -kannasta. Tämä polymeraasi nimettiin Polymeraasi I (Pol I), myöhemmin havaittiin lisää DNA-polymeraaseja *E. Coli* -kannasta, jossa jokaisella entsyymillä oli omat ominaisuudet. Näillä polymeraaseilla oli erilaiset tehtävät DNA-replikaatiossa, esimerkiksi Pol I ja Pol III syntetisoivat DNA:ta joh-tojuosteessa ja jälkijuosteessa jatkuvasti tai epäjatkuvasti. DNA-polymeraasi, kuten Pol II, on tärkeä entsyymi DNA:n korjauksessa. DNA:ssa voi olla vaurioitunut emäs, joka DNA-glykosylaasi tunnistaa ja poistaa, jolloin DNA-polymeraasi korvaa sen ehjällä emäksellä. [2, s. 558.]

### 3 Karakterisointimenetelmät

Karakterisoinnilla tarkoitetaan halutun yhdisteen, molekyylin, kudoksen tai organismin tunnistusta ja ominaisuuksien tarkastelua. Proteiinin karakterisoinnissa pyritään tutkimaan proteiinia sen rakenteen, koon ja puhtauden perusteella.

#### 3.1 Trypsiinidigestio

Kun halutaan selvittää proteiinista rakennetietoja, sitä pilkotaan peptideiksi entsyymeillä. Yleisin tapa pilkkoa peptidit on trypsiinientsyymillä, joka tunnistaa ketjusta tietyt aminohapot ja katkaisee proteiinit niiden kohdalta. Trypsiinidigestio katkaisee aminohappoketjun lysiinien ja arginiinien happopuolelta. Tästä syntyneitä peptidien moolimassoja voidaan verrata peptidikirjastoon, jolloin saadaan proteiini tunnistettua. [3, s. 196.]

LC-MS-analyysyjä varten, tässä työssä käytetty kitti on suunniteltu saamaan optimaaliset ja luotettavat tulokset massaspektrometrialla. Kitissä on reagenssit proteiinin pelkistämiseen / alkylaatioon, digestioon ja guanidinaatioon. Proteiinin pelkistys ja alkylaatio vähentää tuntemattomien massojen ilmestymistä disulfidi-sidoksien muodostuessa ja parantaa kysteiiniä sisältävien peptidien detektoinnissa. Guanidinaatio on kemiallinen modifikaatio-menetelmä aminoryhmille proteiinissa. Ionisoinnin tehostamiseksi, guanidinaatio muuntaa lysiinit homoarginiineiksi, jolloin saadaan parempi signaali lysiiniä sisältävistä trypsiinidigestoituista peptidi-ioneista. [4]

#### 3.2 Nestekromatografia-massaspektrometria

Nestekromatografia-massaspektrometria (LC-MS) on yhdistelmätekniikka, jossa näyte erotellaan nestekromatografilla ja analysoidaan massaspektrollä.

### 3.2.1 Nestekromatografia

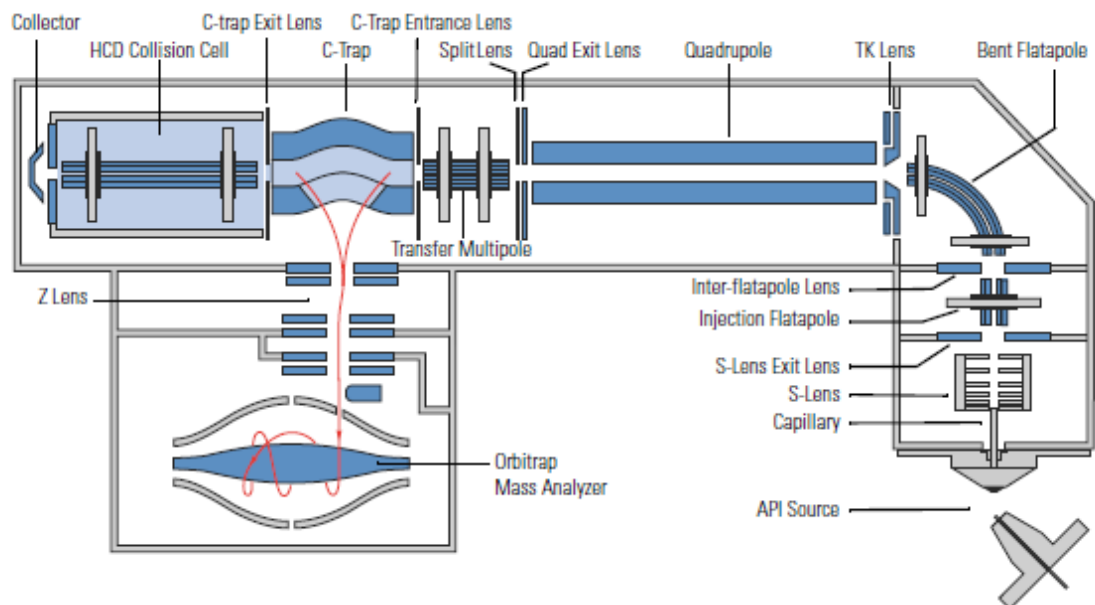
Erittäin korkean erotuskyvyn nestekromatografia (UHPLC) on yksi käytetyimmistä analyysitekniikoista, joka käytetään sekä epäorgaanisten että orgaanisten yhdisteiden erottamisessa. Kromatografiassa yhdisteiden erottuminen perustuu tasapainoon. Kromatografiakolonnissa tapahtuu jakautuminen, jossa on liikkuva faasi ja stationäärifaasi, jotka eivät liukene toisiinsa. Näytteen yhdisteet etenevät liikkuvan faasin kanssa, heikosti stationäärifaasiin tarttuvat yhdisteet liikkuvat nopeammin liikkuvan faasin kanssa. Voimakkaasti stationäärifaasiin tarttuvat yhdisteet liikkuvat hitaammin liikkuvan faasin kanssa, ja näin saadaan erilaiset yhdisteet eroteltua niiden tasapainojen mukaan eri faaseissa. Nestekromatografiassa yleensä liikkuva faasi on nestemäinen ja stationäärifaasi on kiinteä, mutta tämä vaihtelee erilaisten kolonnien välillä. [5, s. 153.]

Nestekromatografialla analysoidaan suurikokoisia orgaanisia molekyylejä, kuten proteiinit, aminohapot, lipidit ja suuret biologiset molekyylit. Nestekromatografiassa edellytetään, että näyte liukenee sopivaan liuottimeen, sillä näytteen ja liuottimen välinen reaktio voi vaikuttaa tuloksiin. Nestekromatografiassa pieni näytemäärä, tilavuudeltaan muutama kymmenen mikrolitraa, syötetään injektorin avulla liikkuvaan faasiin, joka on kapeassa kapilaarissa korkeassa paineessa. Näyte kulkeutuu kolonniin, jossa on stationäärifaasi, siellä yhdisteet erottuvat komponenteiksi. Laitteistossa on pumppu, jonka tehtävä on pumpata näytettä tasaisena virtana sykkeettömästi kolonnin läpi. Yhdisteen komponentit kulkevat kolonnista detektoriin, vuorollaan yhdisteiden tasapainon mukaan. Detektori mittaa yhdisteen antamaa signaalia ajan funktiona, jolloin muodostuu kromatogrammi. Kolonneja ja detektoreita on monenlaisia, ja ne vaihtelevat riippuen tutkittavasta näytteestä ja halutusta herkkyydestä. [5, s. 153–154.]

### 3.2.2 Massaspektrometria

Massaspektrometria on herkkä analyysimenetelmä, jossa tutkittava yhdiste ionisoidaan ja sen massafragmentit erotellaan massa-varaussuhteen ( $m/z$ ) mukaan. Massaspektri koostuu yleisesti ionisaattorista, massa-analysaattorista ja detektorista. Tyypillisesti kromatografi on kytketty massaspektriin, joka erottelee yhdisteet ennen ionisointia. Ionisointitekniikoita on monenlaisia, ja yksi yleisimmistä käytetyistä tekniikoista, jota käytetään tässä työssä, on sähkösumutus-ionisointi (ESI, electrospray ionization). [5, s. 122–123.]

Kuvassa 2 on esitetty Q Exactive HF -massaspektrin rakenne ja toimintaperiaate. Ionisoinnin jälkeen ionit johdetaan S-linsseihin, jotka kohdistavat ioneja paremman herkkyyden saavuttamiseksi. Kohdistetut ionit siirtyvät kaarevaan flatapoleen, joka suodattaa neutraalit ionit pois muista ioneista. Kvadrupoli määritetään erottamaan haluttua ionia muista ioneista, ellei kyseessä ole kaikkien ionien analysointi, jolloin kvadrupolin läpi kulkee kaikki ionit. Kvadrupolista ionit johdetaan ja kerätään paketteina C-Trapin, jossa niiden liikettä stabiloidaan ja syötetään orbiloukkuanalyssaattoriin. Jos ioneja halutaan fragmentoida, niitä johdetaan HCD -törmäyskammioon, joka fragmentoi ionit pienemmäksi. Fragmentoidut ionit sitten johdetaan orbiloukkuanalyssaattorille C-Trapin kautta. [6, Luku 3]

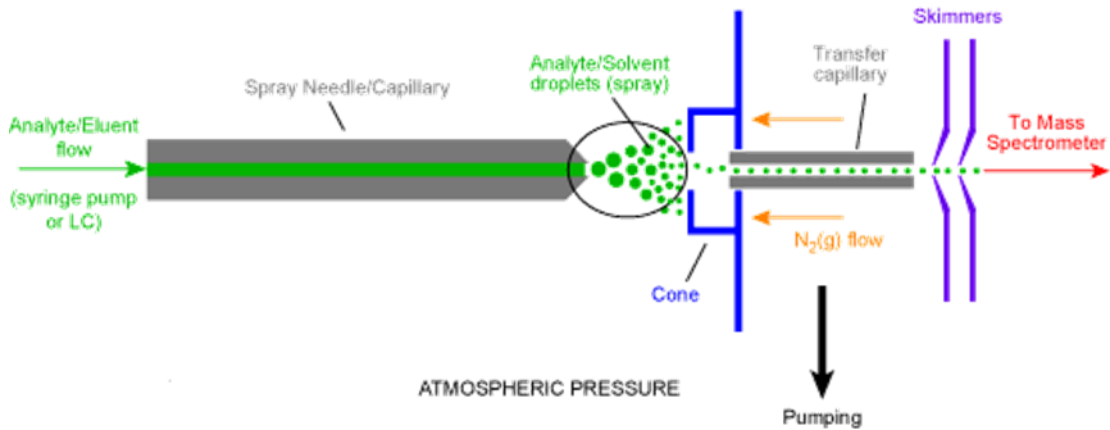


Kuva 2. Q Exactive HF massaspektrin rakenne [6]

### 3.2.3 Sähkösumutusionisaatio

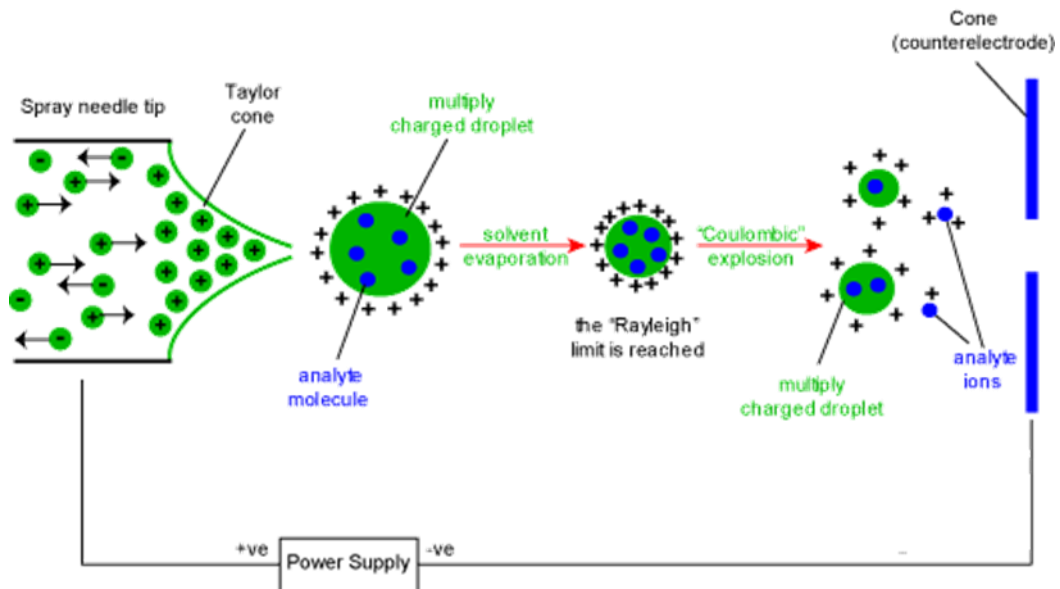
Sähkösumutusionisaatio on pehmeä ionisaatiotekniikka ja sillä voidaan analysoida yhdisteitä, joissa on heikkoja sidoksia. Sähkösumutusionisaatioissa nestekromatografista tullut liuos ajetaan ohuen kapillaarin läpi pienellä virtausnopeudella. Näyte sumutetaan sumutuskammioon kaasuna, ja typpikaasua käytetään kuivaukseen. Koska kapillaarissa on korkea jännite suhteessa sumutuskammioon, niin liuoksesta poistuu elektroneja ja

eluointiliuoksesta muodostuu pieniä sähköisesti varattuja pisaroita (kuva 3). [5, s. 211-212.]



Kuva 3. Sähkösumutusionisaation toimintaperiaate [7]

Liuottimen haihtuessa pisarat pienenevät ja sähkövaraus keskittyy pienempään tilaan. Silloin pisan varaustiheys kasvaa suureksi ja sähköisen poistovoiman takia pisarat hajoavat pienemmiksi hiukkasiksi, ts. Coulombinen räjähdys (kuva 4). Pienet varautuneet hiukkaset siirtyvät elektrodin avulla reiän kautta kvadrupoliin ja detektoriin. [7]

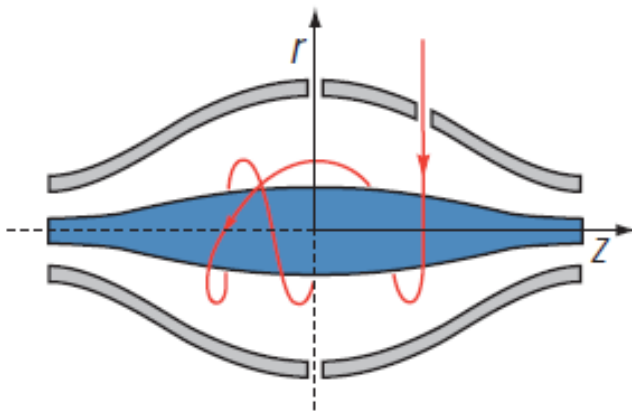


Kuva 4. Ionien erottuminen sähkösumutusionisoinnissa [7]

### 3.2.4 Orbitrap massa-analysointilaitteisto ja -detektori

Massaspektrometriassa on monenlaisia massa-analysointilaitteistoja, joista yleisimmät ovat kvadrupoli-, lentoaikamassa-analysointilaitteisto ja Fourier-muunnosionisyklotroniresonanssi (FT-ICR). Massa-analysointilaitteistojen tehtävä on erotella ja mitata ionien massa-varaus-suhte ( $m/z$ ), ja sopivan massa-analysointilaitteiston valinta vaihtelee riippuen tutkittavasta näytteestä ja halutusta herkkyydestä. Orbitrap tai orbitrap on suhteellisesti uusi massa-analysointilaitteistotyyppi, joka esitettiin ensimmäistä kertaa vuonna 1999. Orbitrap-analysointilaitteisto käyttää tasajännitettä ionien manipulointiin ja analysointilaitteisto toimii myös detektorina, jolloin ei tarvita erillistä detektorilaitteistoa. Orbitrap-laitteisto on erittäin tarkka analysointilaitteisto, jolla saavutetaan korkea resoluutio ja massatarkkuus. [3, s. 49–50.]

Orbitrap-analysointilaitteisto koostuu kahdesta elektrodista, jossa sisempi elektrodi on vääntömuotoinen ja kahdesta segmentistä muodostuva ulompi elektrodi on tynnyrimuotoinen. Molemmat elektrodit ovat samansuuntaisia. Sisempään elektrodiin johdettu jännite aiheuttaa kvadrologaritmisesti elektrodiin ioniloukun sisällä (kuva 5). Ionit johdetaan orbitrap-analysointilaitteistolle kuvan 5 punaisen nuolen osoittamasta kohdasta. Ionit saapuvat analysointilaitteistoon kohtisuorassa elektrodien suuntaan nähden, jossa ionit kulkevat ympyrämuotoisesti elektrodin ympäri. Ionien sisään-tulo-kohta ei ole analysointilaitteiston keskikohdassa, jolloin ionit saavat potentiaalienergiaa ja alkavat oskilloimaan  $z$ -suunnassa. Aksiaalisen oskillaatioliikkeen amplitudi on samanlainen kaikille ioneille, ja kulmanopeus on riippuvainen ainoastaan ionien  $m/z$ -arvosta. [3, s. 50–51.]

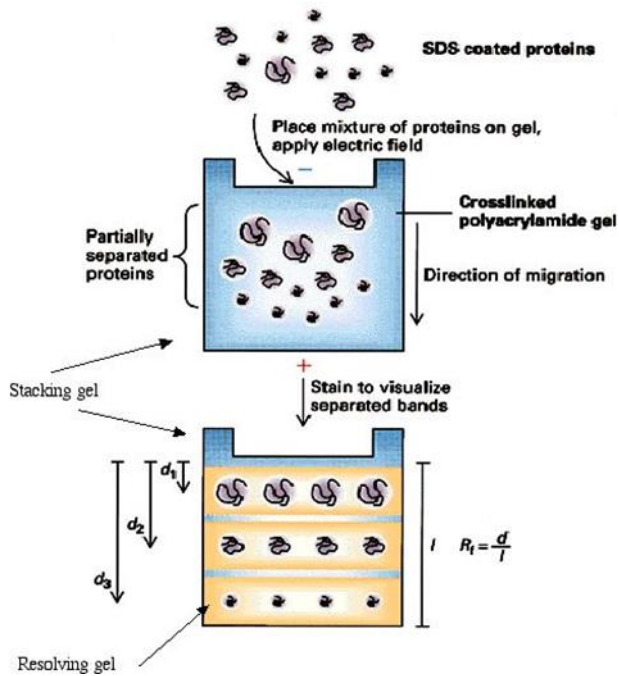


Kuva 5. Kaavio orbitrap-analysointilaitteistosta ja esimerkki stabiili-ionin kulkuradasta (punaisella)

Sisemmän elektrodin potentiaali kasvatetaan hitaasti, jotta ionipaketit stabiloidaan ennen detektointia. Ionien oskillaatioliike aiheuttaa uloimman elektrodien segmenttien välillä vaihtovirran, joka käsitellään samalla tavalla kuin FT-ICR-tekniikka. Tästä syntyy taajuusspektri, joka tuotetaan mitatun signaalin Fourier-muunnoksella ja muutetaan massaspektriiksi. [3, s. 51.]

### 3.3 Geelielektroforeesi

SDS-PAGE (natriumdodekyylisulfaatti-polyakryyliamidigeelielektroforeesi) on proteiinien erotustekniikka, joka perustuu molekyylien elektroforeettiseen liikkuvuuteen. SDS-PAGE-menetelmä erottaa proteiinit niiden molekyylipainon mukaan polyakryyliageelissä, kun siihen johdatetaan sähkövirtaa. Polyakryyliamidigeeli muodostuu akryyliamidin ja N-N'-metyleenibisakryyliamidin polymeroituessa, jolloin N-N'-metyleenibisakryyliamidi muodostaa ristsidokset polymeeriketjujen välille. Analyysiä varten proteiininäytteistä denaturoidaan kuumentamalla (+95–100°C) detergentin (SDS) ja S-S-sidoksia pelkistävän reagenssin (beta-merkaptotetanoli) kanssa, jolloin proteiinit aukeavat sekundaari- ja tertiäärirakenteesta lineaariseen primääriin muotoon. SDS on negatiivisesti varautunut detergentti, joka sitoo ja antaa proteiineille negatiivisen varauksen denaturaatiovaiheessa. Lineaariset proteiinit liikkuvat geelissä positiivista anodia kohti eri nopeuksilla, jossa pienimmät proteiinit liikkuvat nopeammin kuin suuret proteiinit (kuva 6). Elektroforeesi ajossa käytetään erilaisia puskureita, riippuen geelityypistä [1, s. 87.]

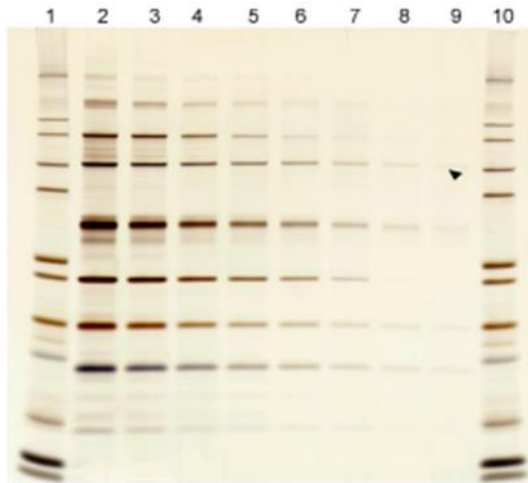


Kuva 6. Proteiinien kulku geelissä koon mukaan [1, s. 87.]

### 3.4 Hopeavärjäys

SDS-PAGE-ajon jälkeen geelille tehdään hopeavärjäys proteiinijuovien havaitsemiseksi ja värjäämiseksi. Hopeavärjäys on yksi selektiivisimmistä detektiomenetelmistä, jolla voidaan havaita proteiineja nanogramman tarkkuudella, joka on jopa 100 kertaa herkempi kuin yleisesti käytetty Coomassie Brilliant Blue -värjäys. Menetelmä on tarkka, toistettava ja antaa geelille melkein väritöntä taustaa, joka auttaa proteiinien havaitsemista huomattavasti. [8]

Tässä työssä käytetään Life Technologiesin SilverQuest™ -hopeavärjäys kittiä, jolla voi detektoida  $\geq 0,3$  ng proteiinia. Onnistuneessa värjäyksessä geeliin tulee vaalea tausta (kuva 7).



Kuva 7. Esimerkki geelin onnistuneesta hopeavärjäyksestä.

Hopeavärjäys perustuu pelkistysreaktioon, jossa hopea ionit pelkistyvät metalli hopeaksi proteiinijuovissa. Tämän reaktion takia proteiinijuovat saavat värinsä, jolloin niitä voidaan havaita. Taulukossa 1 on kuvailtu hopeavärjäyksen vaiheet ja niiden tarkoitus. [8]

Taulukko 1. Hopeavärjäyksen vaiheet ja niiden kuvaus [8]

Vaihe	Reagenssi	Selitys
Fix	Fixative	Poistaa ylimääräiset ionit ja detergentit geeliltä ja rajoittaa proteiinin poistumista geeliltä.
Sensitize	Sensitizer	Lisää värjäykseen herkyyttä ja kontrastia.
Pesu	Ultrapuhdas vesi	Poistaa ylimääräisen Sensitizer-liuoksen ja rehydratisoi geelin värjäystä varten.
Stain	Stainer	Yhdistää hopeaionit proteiiniin ja muodostaa kuvan.
Pesu	Ultrapuhdas vesi	Poistaa ylimääräinen Stain solution.
Develop	Developer	Pelkistää hopeaionit metalli-hopeaksi proteiini juovissa, jolloin proteiini juovat muodostuvat.
Stop	Stopper	Yhdistyy ylimääräiseen hopeaan, jotta värjäytyminen pysähtyy.

### 3.5 Proteiinikonsentraation määrittäminen

Proteiinikonsentraation määrittämisessä käytetään perinteistä kolorimetristä Bradford-menetelmää ja fluorometristä Qubit-menetelmää. Työssä käytetään Merck Millipore Corporationin Bradford Protein assay -kittiä ja Thermo Scientificin Qubit Protein assay -kittiä.

#### 3.5.1 Bradford-menetelmä

Bradford-menetelmä perustuu Coomassie Brilliant Blue G-250:n sitoutumiseen proteiiniin, jolloin maksimiabsorbanssi vaihtelee 465 nm:n ja 595 nm:n välillä aallonpituudella. Absorbanssiarvo aallonpituudella 595 nm on suoraan verrannollinen proteiinikonsentraatioon. Coomassie blue -väriaine sitoutuu emäksiin ja aromaattisiin aminohappoihin. Bradford-menetelmässä valmistetaan kalibraationäytteitä homogeenisestä ja puhtaasta proteiinista, yleisesti käytetty proteiini on naudan seerumin albumiini (BSA). Standardiliuoksia valmistellaan tietyllä konsentraatio välillä, tässä työssä konsentraatio väli on 0,2–1,4 mg/ml. Standardiliuosten absorbanssiarvot mitataan aallonpituudella 595 nm, jolloin tuloksista saadaan muodostettua standardisuora. Proteiininäytteen absorbanssiarvo myös mitataan, jolloin saadaan standardisuoran avulla laskettua proteiinikonsentraatio. [9]

#### 3.5.2 Qubit-menetelmä

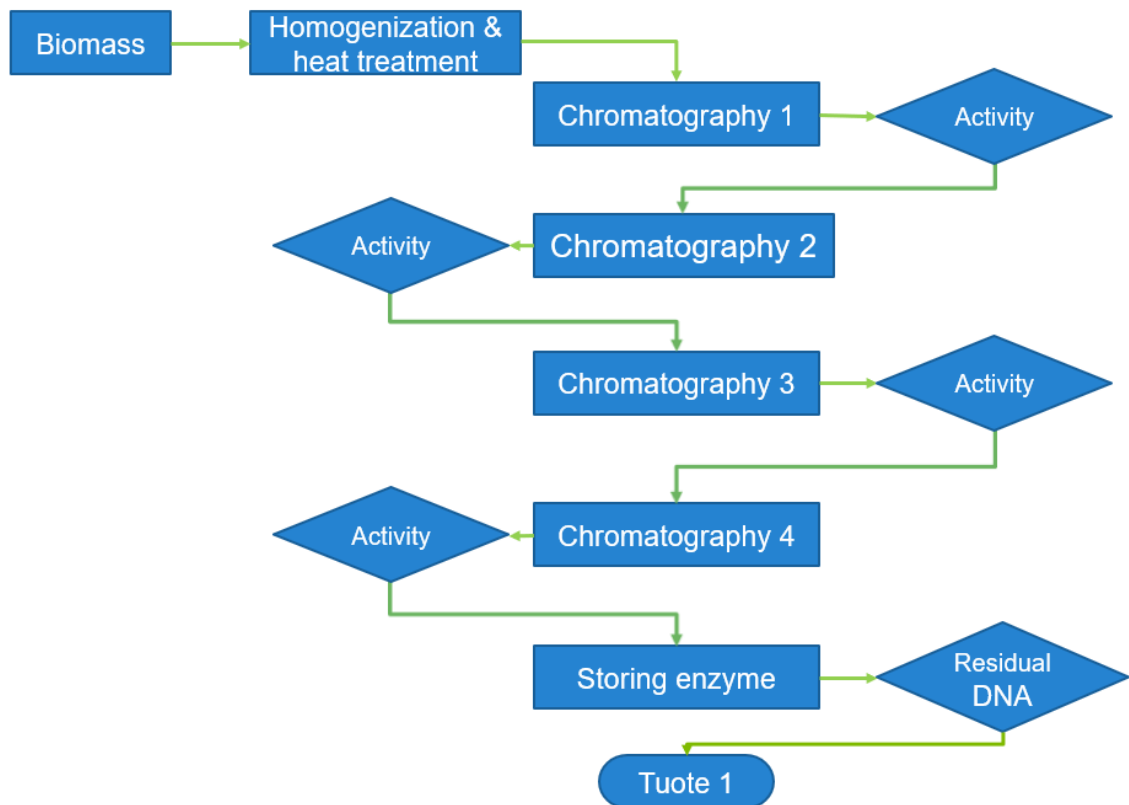
Qubit Protein Assay -kitti on tarkoitettu käytettäväksi Qubit Fluorometrin kanssa. Kitissä on valmiit reagenssit ja BSA-standardit. Fluorometriä kalibroidaan BSA-standardeilla, jonka jälkeen näytettä laimennetaan laimennospuskuriin ja mitataan fluorometrillä. Menetelmällä pystyy mittaamaan 12,5 µg/ml – 5 mg/ml:n konsentraatioalueella. Tämä menetelmä toleroi yleisiä kontaminaatteja, kuten pelkistysreagensseja, suoloja, aminohappoja tai DNA:ta. [10]

#### 4 DNA-polymeraasin tuotantoprosessi

DNA-polymeraasientsyymiä tuotettiin osaston tutkijan kanssa DNA-polymeraasi tuotanto-ohjeen mukaisesti. DNA-polymeraasin oli puhdistettu rekombinantti *E.coli* -kannasta, johon on kloonattu DNA-polymeraasi -geeni.

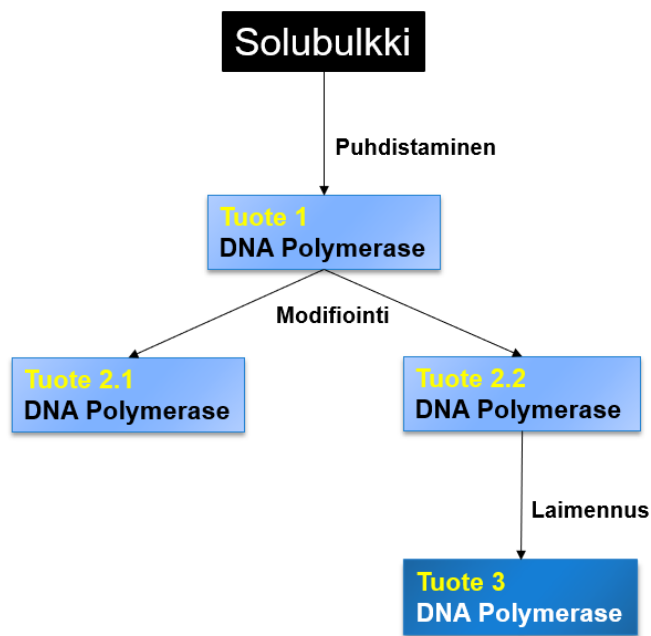
Ennen kromatografisia puhdistusvaiheita, bakteerisolunmassalle suoritettiin korkeapainehomogenisointi ja kuumennuskäsittely, jotta varmistetaan solujen rikkoutumista ja solunsisäisten proteiinien vapautumista. Kuumennuskäsittelyn jälkeen solususpensio sentrifugoitiin ja kerättiin supernatantti puhdistusvaiheita varten.

Tuotanto-ohjeesta on tietyissä vaiheissa tehty poikkeuksia, riippuen puhdistusvaiheiden jälkeisistä tuloksista. Jokaisen puhdistusvaiheen jälkeen mitattiin polymeraasiaktiivisuutta, jotta varmistetaan, että näyte ei ole eluoitunut pois eri puhdistusvaiheista. Kuvassa 8 on esitetty tuotantoprosessin vaiheet.



Kuva 8. DNA-polymeraasituotannon eri vaiheet

Lopputuotteesta (Tuote 1) tuotetaan modifioinnin avulla muita DNA-polymeraaseja eri tarkoituksiin (kuva 9).



Kuva 9. DNA-polymeraasista (Tuote 1) modifioidut tuotteet

#### 4.1 Aktiivisuusmäärittäminen

Jokaisen puhdistusvaiheen jälkeen polymeraasista mitattiin aktiivisuusarvo, jotta varmistetaan, että näyte ei ole eluoitunut pois eri puhdistusvaiheista.

Taulukko 2. Aktiivisuusmäärittämissä seoksen valmistusohje yhtä tutkittavaa entsyymiä kohti

Aktiivisuusmäärittämissä seos (45 µl)	
10 µl	Aktivoitua DNA:ta (2 µg/µl)
5 µl	10 X TAPS-puskuri
0,05 µl	100 mM dCTP
1 µl	10 mM (dATP, dGTP, dTTP)
0,5 µCi	[alfa- <sup>32</sup> P] dCTP (400 Ci/mmol)
Täytetään 45 µl:ksi ddH <sub>2</sub> O:lla	

Aktiivisuusmäärittämissä käytetyt laitteet:

- Tri-Carb 2810 TR -nestetuikelaskin, serial no. 0408095401, Perkin Elmer
- Thermocell Cooling & Heating Block, serial no. BYQ6007E-140, BIOER.

DNA-polymeraasin aktiivisuus ilmoitetaan aktiivisuusyksikössä (U). Tässä yhteydessä yksi yksikkö määritettiin tarkoittamaan se määrää entsyymiä, joka polymeroi 10 nmol dNTP:tä DNA-säikeeksi 30 minuutissa +74 °C:n lämpötilassa. Tässä reaktiossa polymeeraasi liittyy templaattiin reaktioliuoksessa olevia nukleotidejä templaatin määräämässä järjestyksessä. Tästä tuotteeksi syntyy pidentynyt DNA-säie ja pyrofosfaatti. Aktiivisuuden määrittämisessä käytetään perinteistä suodatinpaperimenetelmää, jossa yksi nukleotidi on leimattu radioaktiivisella <sup>32</sup>P-isotoopilla. Tämän jälkeen voidaan määrittää syntetisoituneen DNA:n määrä TCA (trikloorietikkahappo) -saostuksella ja nestetuikelaskijalla.

DNA-polymeraasi laimennettiin ensin pitoisuuteen 0,02 U/μl polymeeraasiaktiivisuusmäärittystä varten. 1X-reaktiopuskuria käytettiin laimennospuskurina, ja verrokkina määrittämisessä käytettiin verrokkientsyymiä, joka laimennettiin 1X-reaktiopuskurilla samaan pitoisuuteen kuin tutkittava polymeeraasientsyymi. Reaktioputket ja entsyymilaimennokset pidettiin jäällä, kunnes aktiivisuusmäärittäminen alkaa. Aktiivisuusmäärittämisessä pipetoitiin 5 μl laimennettua entsyymiä 45 μl:aan aktiivisuusmäärittämissä seokseen ja sitä sekoitettiin pipetinkärjellä nopeasti. Seos siirrettiin +74°C:n lämpöhauteeseen, jossa reaktio annettiin tapahtua tasan 10 minuuttia, jonka jälkeen reaktio pysäytettiin lisäämällä 10 μl 60 mM EDTA-liuosta ja siirrettiin jäälle. Totaali- ja taustanäytteisiin ei lisätty entsyymilaimennosta eikä reaktioita pidetty lämpöhauteessa, ja niihin lisättiin 15 μl 60 mM EDTA-liuosta.

Kun reaktio on pysäytetty, yksi entsyymilaimennoksien rinnakaisnäytteistä pipetoitiin 40 μl suodatinpaperikiekolle. Pipetoinnin jälkeen rinnakkaiset kiekot siirrettiin heti kierrätettyyn 10-prosenttiseen TCA-liuokseen. Tämä toistettiin yksi entsyymilaimennos kerrallaan, kunnes kaikista entsyymireaktioputkista on pipetoitu näyte kiekkoille ja kiekot siirretty TCA-liuokseen. Totaalinäytteistä pipetoitiin 40 μl kiekkoille, ja kiekot jätettiin pöydälle suoja-pleksin takana kuivumaan ja odottamaan nestetuikelaskentaa. Taustanäytteistä pipetoitiin 40 μl kiekkoille ja siirrettiin kylmään 10-prosenttiseen TCA-liuokseen. Kiekoja pestiin TCA-liuoksessa 3 kertaa 15 minuutin ajan magneettisekoituksessa, jossa jokai-

sen 15 minuutin jakson jälkeen vaihdettiin pesuun uusi 10-prosenttinen TCA-liuos. Viimeisin TCA-pesuliuos kaadettiin käytön jälkeen <sup>32</sup>P TCA-liuokselle tarkoitettuun kierrätyspulloon, joka käytettiin seuraavassa <sup>32</sup>P-aktiivisuusmäärittäyksessä ensimmäisenä pesuliuksena.

TCA-liuoksella pestyt kiekot huuhdeltiin kaksi kertaa pienessä määrässä isopropanolia, jonka jälkeen kiekot kuivattiin 10 minuutin ajan +65°C:n lämpökaapissa. Kuivauksen jälkeen kaikkien kikkojen (entsyymi-, totaali- ja taustanäytteet) radioaktiivisuutta määritettiin Tri-Carb 2810 TR -nestetuikelaskijalla käyttäen <sup>32</sup>P:lle tarkoitettua laskuohjelmaa ja 1 minuutin laskuaikaa. Kaikkien näytteiden CPM-arvot kerrottiin kertoimella 1,5, koska kiekkoille pipetoitiin vain 40 µl koko 60:n µl tilavuudesta. Tulokset laskettiin seuraavasti:

$$U/ml = (cpm_{näyte} - cpm_{tausta} / cpm_{totaali} - cpm_{tausta}) \times (nmol \text{ dATP}) \times (1 \text{ U} / 10 \text{ nmol}) \times (30 \text{ min} / \text{inkubointiaika}) \times \text{laimennoskerroin} \times 20 \text{ (rektiotilavuus } 50 \text{ } \mu\text{l ja aktiivisuus ilmoitetaan } 1 \text{ ml:aa kohti)} \times 4 \text{ (4dNTP:tä)} / 2 \text{ (aktivoitu DNA-substraatti on kaksijuosteinen, jolloin on kaksi kohtaa, josta polymeerasi syntetisoi verrattuna alukkeelliseen DNA:han)}.$$

## 5 Työn toteutus

Analyysit toteutettiin jokaisen työn kiitin ohjeiden mukaisesti. Vaarallisten reagenssien käyttöturvallisuustiedotteisiin tutustuttiin ennen analyysien aloittamista, vaaratekijöiden estämiseksi. Analyyseissä käytettiin steriilejä astioita ja välineitä kontaminaation estämiseksi. Jokaisen työn reagenssit, mittavälineet ja laitteet on listattu jokaisen työn osiossa (5.1–5.6).

Näytteiden määrä yhteensä on 18, josta 12 näytettä on tuotantoprosessin eri vaiheista (Taulukko 3) ja 6 kpl edellisten tuotantoerien lopputuotteet. Tuotantoprosessin 12 näytteestä puolet ovat rinnakkaisnäytteitä, joten näytteitä on otettu kuudesta eri vaiheesta. Tuotettu erän numero on 37 ja edellisten erien numerot ovat 28, 30, 31, 33, 34 ja 35. Edellisten erien näytteet oli säilytetty glyserolilla (50 % w/w), joten glyseroli konsentroititiin pois konsentraattorilla.

Yleisesti käytetyt välineet ja laitteet:

- Pierce™ Protein Concentrator PES konsentraattori, 30K MWCO, 2-6 mL, Ref: 88522, Thermo Fisher Scientific
- DNA LoBind Tube 1,5 ml Eppendorf putket, lot: I182238G, Eppendorf
- DNA LoBind tube 2,0 ml Eppendorf putket, lot: H176812G, Eppendorf
- Centrifuge 5804 R- sentrifuugi, serial no. 5805 00328, Eppendorf
- Milli-Q Synthesis A10 laboratoriovesi, serial no. F4SN02246G, MERCK.

Taulukko 3. Tuotannon eri vaiheiden näytteet ja niiden ajankohta

Näyte	Näytteenotto ajankohta
1.1	Näyte otettu lämpökäsittelyn ja 1. sentrifugoinnin jälkeen.
1.2	
1.3	Näyte otettu lämpökäsittelyn ja 2. sentrifugoinnin jälkeen.
1.4	
2.1	Näyte otettu Kromatografia 2 vaiheen jälkeen.
2.2	
3.1	Näyte otettu Kromatografia 3 vaiheen jälkeen.
3.2	
4.1	Näyte otettu Kromatografia 4 vaiheen jälkeen.
4.2	
5.1	Lopputuote ilman glyserolia. Säilytys + 4°C.
5.2	Lopputuote ilman glyserolia. Säilytys -20°C.

### 5.1 Proteiinikonsentraation määrittäminen

Polymeraasituotannon jälkeen määritettiin näytteiden proteiinikonsentraation kahdella menetelmällä, Qubit protein assayllä ja Bradford-menetelmällä. Proteiinikonsentraation

määrää tarvittiin SDS-PAGE- ja LC-MS-analyysejä varten, joten sitä suoritettiin ensimmäisenä.

#### 5.1.1 Qubit-mittaukset

Qubit-mittauksissa käytetyt reagenssit ja mittavälineet:

- Qubit Protein Assay kit 100 assays, Lot: 2096748, Invitrogen by Thermo Fisher Scientific
- Qubit Assay putket, Lot: I3027, Invitrogen by Thermo Fisher Scientific
- Qubit 3.0 Fluorometri, Serial no.2321600466, Invitrogen by Life Technologies.

Qubit-mittaukset suoritettiin Qubit protein assay -manuaalin mukaan, jossa ensimmäisenä valmistetaan ohjeiden mukaisesti Qubit protein -puskuria, jonka reagenssit olivat valmiina kitissä, standardeja ja näytteitä varten. Mittausta varten yhteistilavuus on 200 µl, josta 180–199 µl on valmistettu puskuria ja loput proteiininäytettä tai standardia. Kitissä oli 3 BSA-standardia, jotka mitattiin ennen proteiininäytteitä. 0,5 ml PCR-putkiin pipetoitiin 190 µl puskuria ja 10 µl standardeja, vorteksoitiin 2–3 sekuntia ja annettiin inkuboida huoneenlämmössä 15 minuuttia. Inkuboinnin jälkeen putket asetettiin Qubit 3.0 -fluorometriin ja mitattiin standardit. Kun laite oli kalibroitu standardeilla, proteiininäytteet valmistettiin samalla tavalla ja mitattiin konsentraatio. Proteiininäytteet oli laimennettu 1:10 ultrapuhtaalla vedellä ennen kuin pipetoitiin puskuriiin. Mitattu tulos kerrottiin laimennoskertoimella, jotta saadaan näytteen kokonaiskonsentraatio.

#### 5.1.2 Bradford-mittaukset

Bradford-proteiinikonsentraation määrittämisessä käytetyt reagenssit ja mittavälineet:

- Bradford Reagenssi, Lot: HC99689306, Merck
- BSA 10 mg/ml (R-21), Lot: 70, Thermo Fisher Scientific

- Evolution 60S spektrofotometri, Serial no. 2R3P060001, Thermo Fisher Scientific
- 1,5 ml semi-micro kertakäyttö kyvetit, Lot: F 334-7, PLASTIBRAND
- DNA LoBind putket 5.0 ml, Lot: G172708J, Eppendorf.

Bradford-mittaukset suoritettiin Merck Millipore Corporationin Bradford Protein assay kitin manuaalin mukaan. Ensimmäisenä valmistettiin BSA-standardit laboratorioveteen välillä 0,1–1,4 mg/ml. Tuotanto vaiheiden proteiininäytteet laimennettiin suhteella 1:10 laboratorioveteen. Näytteitä ja standardeja pipetoitiin koeputkeen 50 µl, joihin lisättiin 2,5 ml Bradford -värireagenssia. Nollanäytteenä käytettiin 50 µl laboratoriovettä. Absorbanssiarvo mitattiin spektrofotometrillä aallonpituudella 595 nm. Spektrofotometri säädettiin nollassa tyhjällä kyvetillä (ilma). Mitatuista absorbanssiarvoista näytteistä ja standardeista vähennetään nollanäytteen absorbanssiarvo, jolloin saadaan lineaarinen standardisuora. Standardisuora piirrettiin BSA-standardinäytteistä Excel-ohjelmistolla, jonka avulla saatiin laskettua proteiininäytteiden konsentraatio standardisuoran yhtälön avulla. Laskettu konsentraatio kerrottiin laimennoskertoimella, jotta saadaan näytteen kokonaiskonsentraatio.

Suoritettiin proteiinkonsentraatio mittaukset myös edellisille DNA-polymeraasituotantoerille. Edellisten erien lisäksi määritettiin konsentraatiot modifioiduista DNA-polymeraasituotteista (Tuotteet 2.1, 2.2 ja 3) ja PCR master mix -liuoksesta (MM), joka sisältää DNA-polymeraasia. Edelliset tuote 1 näytteet ja modifioidut näytteet mitattiin eri päivinä käyttäen eri standardeja.

## 5.2 Geelielektroforeesi

SDS-PAGE työssä käytetyt reagenssit ja laitteet:

- NuPAGE™ 4–12% Bis-Tris geeli, 1,0 mm x 10 well, Lot: 19062070, exp: 18.10.2020, Invitrogen by Thermo Fisher Scientific

- NuPAGE™ LDS Sample Buffer (4X), Lot: 2083421, exp: 14.04.2020, Invitrogen by Thermo Fisher Scientific
- MOPS (3-Morpholinopropane-1-sulfonic acid) SDS Running Buffer (20X), Lot: 2080985, exp: 05.2020, Novex by Life technologies
- ProSieve Quadcolor Protein marker 4,6–300 kDa, Lot: 00086017, Prosieve
- 1 M DTT (Ditiotreitoli)
- Digital Dry Bath inkubaattori, Serial no. 1250 48453, BOEKEL SCIENTIFIC
- XCell SureLock elektroforeesi kammio, Serial no. 080715-0437, Invitrogen by Thermo Fisher Scientific
- WEALTEC Elite 200 virtalähde, Serial no. E2W0140, Wealtec Corp.
- Incubation Trays 10 x 14 cm, Cat no. LC2102, Invitrogen by Thermo Fisher Scientific.

Proteiinikonsentraation määrittäminen vaihtelivat Qubit- ja Bradford-menetelmien välillä, jossa Qubit-mittauksissa konsentraatio ei muuttunut näytteiden välissä. Tämän takia Bradford-menetelmällä saadut tulokset ovat luotettavampia, ja laimennokset geielektroforeesi analyysiä varten laimennetaan Bradford-tuloksien mukaan. Elektroforeesinäytteet valmistettiin ohjeiden mukaisesti, jolloin elektroforeesi näytteen kokonaistilavuudeksi saatiin 10 µl. Elektroforeesi näyte sisältää proteiininäytteen lisäksi 2,5 µl LDS-näytepuskuria, 1 µl 1 µM DTT -pelkistävä reagenssi ja laboratoriovettä 10 µl:aan. Näytteet asetettiin 70°C:n kuivalämpöhauteessa 10 minuuttia. Valmistettiin MOPS SDS-ajopuskuria 1 litraa ohjeiden mukaisesti. Geeli asetettiin XCell SureLock Mini-Cell -elektroforeesi kammioon, johon lisättiin ajopuskuria yläosaan n. 200 ml ja alaosaan. 600 ml. Proteiini-standardi ja näytteet pipetoitiin kaivoihin kutakin 10 µl, jonka jälkeen geelit ajettiin 50 minuutiksi 200 V:n jännitteellä. Ajon jälkeen geeleille tehtiin hopeavärijäys.

SDS-PAGE-työssä käytettiin valmis NuPAGE 4–12 % Bis-Tris -proteiinigeeli, jossa maksimi pipetoitava proteiinimäärä on 0,5 µg/kaivo. Proteiininäytteet laimennettiin ultra-putaalla vedellä, jolloin saatiin proteiinimääräksi 0,3–0,5 µg/kaivo (Taulukko 4).

Taulukko 4. Jokaisen näytteen geelille pipetoitu proteiinimäärä. Suluissa on merkitty jokaisen tuotteen eränumero. Tähdellä merkittyjen näytteiden Bradford-absorbanssiarvot oli standardisuoran ulkopuolella, joten konsentraatioiden tarkka määrä saattaa poiketa. Taulukossa 3 on näytteiden 1.1–5.2 tiedot

Näyte (Lot)	Geeliin lisätty proteiini, µg/kaivo
1.1	0,343
1.2	0,430
1.3	0,492
1.4	0,479
2.1	0,341
2.2	0,338
3.1	0,403
3.2	0,517
4.1	0,366
4.2	0,398
5.1	0,484
5.2	0,350
Tuote 1 (28)	0,449
Tuote 1 (30)	0,451
Tuote 1 (31)	0,311
Tuote 1 (33)	0,437
Tuote 1 (34)	0,355
Tuote 1 (35)	0,470
Tuote 2.1 (40)	0,644
Tuote 2.2 (11)	0,341
Tuote 3 (42) *	0,408
MM (32) *	0,348

### 5.3 Hopeavärjäys

Hopeavärjäyksessä käytetyt reagenssit ja mittavälineet:

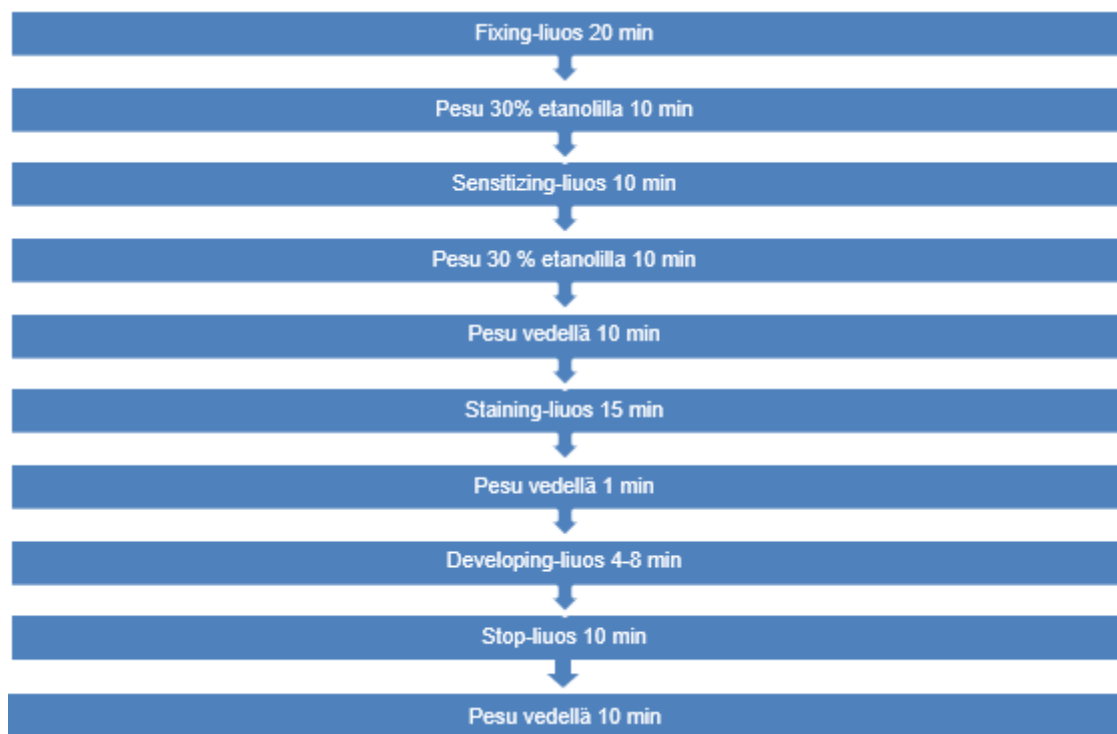
- SilverQuest silver staining kit, Lot: 2064503, Invitrogen by Life technologies:
  - SilverQuest Sensitizer, Lot: 2064504
  - SilverQuest Stainer, Lot: 2064506
  - SilverQuest Developer, Lot:2064507
  - SilverQuest Developer enhancer, Lot: 2064508
  - SilverQuest Stopper, Lot: 2064509
- Etikkahappo  $\geq 99\%$ , Lot: SZBD2830V, Sigma-Aldrich
- Etax A etanoli min. 94%, Lot: 19071, ALTIA Oyj
- Tasoravisteliija VSR23, Serial no. 0452 06759, GRANT BOEKEL
- Incubation Trays 10 x 14 cm, Cat no. LC2102, Invitrogen by Thermo Fisher Scientific.

Hopeavärjäys suoritettiin SilverQuest Silver Staining -kitin Basic Staining Protocol -ohjeiden mukaisesti, jonka mukaan valmistettiin viisi eri liuosta. Alla olevassa taulukossa on lueteltu värjäysliuokset ja niiden sisältö (Taulukko 5). Yhtä elektroforeesigeeliä kohti valmistettiin 100 ml jokaista liuosta.

Taulukko 5. Hopeavärjäysliuokset ja määrä yhtä geeliä kohden

Hopeavärjäysliuokset	Sisältö ja määrä
Fixing-liuos	Etanoli 40 ml, etikkahappo 10 ml ja vettä 100 ml:iin
Sensitizing-liuos	Etanoli 30 ml, Sensitizer 10 ml ja vettä 100 ml:iin
Staining-liuos	Stainer 1 ml ja vettä 100 ml:iin
Developing-liuos	Developer 10 ml, Developer enhancer 1 pisara ja vettä 100 ml:iin
Stop-liuos	Stopper 10 ml (Lisätään Developing-liuoksen päälle)
Pesu liuos	30 ml Etanolia ja vettä 100 ml:iin

SDS-PAGE-ajon jälkeen geeli poistettiin kasetista ja huuhdeltiin ultrapuhtaalla vedellä värjäysastiassa. Hopeavärjäysliuosten valmistelun jälkeen liuoksia lisättiin geeliin 100 ml alla olevan virtauskaavion mukaan (Kuva 10). Jokaisen vaiheen jälkeen geeliä huuhdeltiin ultrapuhtaalla vedellä ennen seuraavan liuoksen lisäystä. Kaikissa vaiheissa geeli oli tasoravistelijassa, jotta liuokset vaikuttavat koko geelin pintaan.



Kuva 10. Hopeavärjäyksen virtauskaavio

Kehitys-liuoksen lisäyksen jälkeen proteiinijuovat alkoi muodostua geelissä ja kun haluttu väri intensiteetti oli saavutettu, lisättiin lopetus-liuosta 10 millilitraa kehitys-liuoksen päälle ja annettiin sekoittua 10 minuuttia. Viimeisen pesun jälkeen geeli oli valmis ja sitä säilytettiin ultrapuhtaassa vedessä, kuivumisen estämiseksi.

#### 5.4 Trypsiinidigestio

Trypsiinidigestio suoritettiin Thermo Scientificin In-Solution Tryptic Digestion and Guanidination -kitin ohjeiden mukaisesti. DNA-polymeraasinäytteiden lisäksi digestio tehtiin myoglobiinille. Proteiini näytteiden valmistaminen massaspektri mittauksiin suoritettiin seuraavat vaiheet:

1. proteiinin denaturaatio 95°C:ssa 5 minuuttia
2. alkylaatio huoneenlämmössä pimeässä 20 minuuttia
3. digestio 37°C:ssa 5–24 tuntia
4. guanidinaatio 65°C 12 minuuttia.

Trypsiinidigestiossa käytetyt reagenssit ja mittavälineet:

- In-Solution Tryptic Digestion and Guanidination kit, Lot: UB280718, Thermo Scientific
  - Pierce™ Trypsin Protease, MS Grade, 20 µg, Lot: UD280686
  - Trypsin Storage Solution, 50 µl, Lot: UA281259
  - Ammonium Bicarbonate, 50 mg, Lot: TK278736
  - No-Weight™ DTT, 7,7 mg, Lot: TJ271901

- Iodoacetamide (IAA), 500 mg, Lot: TK278737
- O-Methylisourea Hemisulfate Salt (OMI), 400 mg, Lot: UA281375
- Ammonium Hydroxide (30 %), 1 ml, Lot: UA280290
- trifluoroetikkahappo (TFA) 10 X 1 ml Sequencing Grade, Lot: UE280423, Thermo Scientific
- analyysivaaka XSR105, Serial no. B903104702, Mettler Toledo.

Valmistettiin tarvittavat kitissä olevat reagenssit ja puskurit ohjeiden mukaisesti, jotka on lueteltu alla olevassa taulukossa 6. Liuokset valmistettiin ennen työn alkua ja säilytettiin ohjeiden mukaisesti. Ainoastaan alkylaatio puskuri valmistettiin juuri ennen käyttöä, sillä se ei ole säilytyskelpoinen.

Taulukko 6. Trypsiinidigestiossa käytettyjen reagenssien valmistusohje

Puskurit ja reagenssit	Sisältö ja valmistus
Trypsiini-kantaliuos	Kylmäkuivattuun Pierce Trypsin protease -liuos pulloon lisättiin 20 µl Trypsin Storage solution. Liuosta jaettiin neljään erään, jokaisen erän tilavuus on ~5 µl. Säilytys -20 °C:ssa.
Aktivoitu trypsiini	Yksi erä trypsiini-kantaliuosta sulatetaan jäissä, jota laimennetaan 10 kertaiseksi lisäämällä ultrapuhdastavettä 45 µl (loppukonsentraatio ~100 ng/µl. Säilytys -20 °C:ssa.
Digestiopuskuri	Punnittiin 10 mg ammoniumbikarbonaattia, jota liuotettiin 2,5 ml:aan ultrapuhdasvedellä (loppukonsentraatio ~50 mM). Säilytys 4 °C:ssa.
Pelkistyspuskuri	No-Weight DTT putkeen lisättiin 500 µl ultrapuhdasvettä (loppukonsentraatio ~100 mM). Säilytys -20 °C:ssa.
Alkylaatiopuskuri	Punnittiin 9 mg Iodoacetamide (IAA), johon lisättiin 500 µl ultrapuhdasvettä (loppukonsentraatio ~100 mM). Putki käärittiin foliolla, suojaamaan valolta.
Guanidinaatio-reagenssi	Punnittiin 50 mg O-Methyisourea hemisulfate -reagenssia, jota liuotettiin 51 µl:aan ultrapuhdasvedellä. Säilytys -20 °C:ssa.

Proteiinidigestio aloitettiin pipetoimalla 0,5 ml putkeen 15 µl digestio-puskuria ja 1,5 µl pelkistyspuskuria. Tähän lisättiin 5 µl 1:10 laimennettua proteiininäytettä ja lisättiin ultrapuhdasta vettä, kunnes lopputilavuus on 27 µl. Putken sisältö vorteksoitiin ja inkuboitiin 95 °C:ssa 5 minuuttia ja annettiin jäähtyä. Putkeen lisättiin juuri valmistettua alkylaatiopuskuria 3 µl ja putket käärittiin foliolla ja annettiin inkuboida huoneenlämmössä 20 minuuttia. Putkeen lisättiin 1 µl aktivoitua trypsiiniä ja inkuboitiin 37 °C:ssa 3 tuntia, jonka jälkeen lisättiin vielä 1 µl aktivoitua trypsiiniä ja inkuboitiin 30 °C:ssa yön yli.

Digestion jälkeen tehtiin guanidinaatio, jossa näytteeseen lisättiin 10 µl ammoniumhydroksidia ja 6 µl guanidinaatio-reagenssia. Liuos sekoitettiin vorteksoimalla ja inkuboitiin 65 °C:ssa 12 minuuttia. Reaktio pysäytettiin inkuboinnin jälkeen lisäämällä 3 µl TFA:ta.

Pipetoidut 5 µl:n proteiini näytteet sisälsivät eri määrän proteiinia, joten loppunäytteet laimennettiin LC-MS-analyysiä varten, kunnes kaikkien näytteiden ainemäärä on ~100 fmol/µl.

## 5.5 Nestekromatografia-massaspektrometrian parametrit ja menetelmä

Työssä käytetyt laitteet, reagenssit ja tarvikkeet:

- Easy-nLC 1000 nestekromatografi, serial no. LC-011432, Thermo Fisher Scientific
  - Acclaim PepMap 100 kolonni, 75 µm x 2 cm, nanoViper. C18, 3µm. Serial no. 148878, Thermo Fisher Scientific
- EASY Spray Ion Source ionilähde, serial no. ES060200, Thermo Fisher Scientific
  - EASY-Spray PepMap kolonni, C18, 3 µm, 75 µm x 15 cm. Serial no. 221192, Thermo Fisher Scientific
- Q Exactive HF Hybrid Quadrupole-Orbitrap massaspektrometri, Serial no. 05214L, Thermo Fisher Scientific
- Acetonitrile Optimal LC/MS grade, Lot: 1990675, Fisher Scientific
- Formic acid ≥99.9% for LC-MS, Lot: DK641408
- 0,2 ml Skirted 96-well Robotic Plate, AB-1300, Thermo Fisher Scientific
- Sealing Tape, Clear Polyester 236370, Lot: SPD364G, Thermo Fisher Scientific
- Myoglobin from equine skeletal muscle, Lot: SLBR4632V, Sigma-Aldrich.

Menetelmä testattiin myoglobiiniproteiinilla, jossa LC-parametrit määritettiin Easy-Spray -kolonnin laadunvalvontaraportin mukaan, jossa on testattu trypsiinidigestoitu BSA (50 fmol/ $\mu$ l). Myoglobiini valmistettiin ja laimennettiin ultrapuhtaalla vedellä + 0,1 % muurahaishappoliuoksella pitoisuuteen 100 fmol/ $\mu$ l. Myoglobiini ajettiin 4 rinnakkaista näytettä, joista 2 onnistui. Digestoidut DNA-polymeraasinäytteet laimennettiin ultrapuhtaalla vedellä + 0,1 % muurahaishappoliuoksella pitoisuuteen ~100 fmol/ $\mu$ l.

Toimitushäiriön vuoksi sopivat näyte vialit eivät saapuneet ajoissa, joten jouduttiin käyttämään 0,2ml 96-well PCR -kuoppalevyjä, jotka soveltuivat nestekromatografi-laitteeseen. Näytteitä pipetoitiin 10  $\mu$ l kuoppaan, jonka jälkeen levy peitettiin Sealing -teipillä. Nollanäytteenä käytettiin vesi + 0,1 % muurahaishappoliuos.

Nestekromatografian eri asetuksia testattiin yhteensä 8 eri asetusta, jossa muutettiin mm. gradienttia ja ionisaation asetuksia. Kaikki menetelmät eivät onnistuneet täysin, mutta muutamasta näytteestä saatiin tuloksia käyttäen taulukoiden 7 ja 8 asetuksia.

Alla olevassa taulukoissa on nestekromatografian ja ESI-kolonnin asetukset, jota käytettiin optimoinnin jälkeen.

Taulukko 7. Nestekromatografian ja ESI-ionisaation asetukset

Kolonne	Acclaim PepMap 100, 75 $\mu$ m x 2 cm, nanoViper. C18, 3 $\mu$ m
Injektio tilavuus	1 $\mu$ l
Virtausnopeus	20 $\mu$ l/min
Injektio liuos	Vesi + 0,1 % muurahaishappoa
Liikkuva faasi A	Vesi + 0,1 % muurahaishappoa
Liikkuva faasi B	Asetonitrili + 0,1 % muurahaishappoa
Injektioneulan pesuliuos	Vesi + 0,1 % muurahaishappoa
Ionisaatio kolonne	EASY-Spray PepMap, C18, 3 $\mu$ m, 75 $\mu$ m x 15 cm
Ionisaatio sumutus jännite	1,90 kV
Ionisaatiokammion lämpötila	35°C

Alla olevassa taulukossa on nestekromatografian gradientti. Gradientin virtausnopeus oli 250 nl/min.

Taulukko 8. Nestekromatografian gradientti

Aika (min)	Liikkuva faasi A (%)	Liikkuva faasi B (%)
0:00	98	2
15:00	55	45
20:00	55	45
25:00	10	90
30:00	10	90
31:00	98	2

Näytteille tehtiin kokonaisuvirta määritys (TIC), jotta testattaisiin menetelmän toimivuuden taulukon 9 asetuksilla. Koska tuloksia ei saatu kaikista näytteistä, ei voitu tutkia näytteitä tandem-massaspektrometrialla.

Taulukko 9. Massaspektrometrian asetukset

Scan Type	Full MS
Scan range	150 - 2000 m/z
Resolution	120 000
Polarity	Positive
Micro scan	1
Capillary temp.	275°C
Method duration	20 min
S-lens RF level	55.0

DNA-polymeraasin aminohapposekvenssi syötettiin laskuriin [11], joka antoi teoreettiset massat peptideille (Liite 1). Näitä massoja verrattiin saatujen tuloksien mukaan.

## 6 Tulokset

### 6.1 Proteiinikonsentraatio

Proteiinikonsentraatiomäärityksessä Qubit-mittaukset eivät vaikuttaneet luotettavilta, koska näytteiden konsentraatio oli lähes identtinen (Taulukko 10) kaikissa näytteissä. Bradford-mittauksissa näytteiden konsentraatio arvo oli vaihteleva, joten siitä laskettuja konsentraatioarvoja käytettiin muissa analyyseissä.

Taulukko 10. Qubit menetelmällä mitatut konsentraatio tulokset

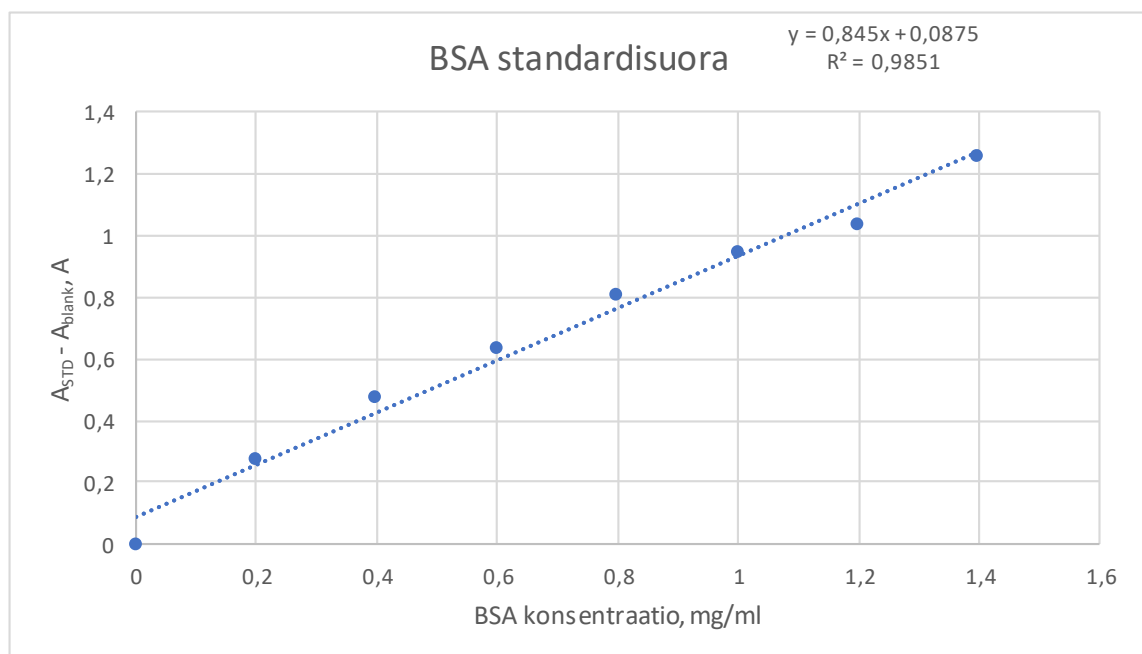
Qubit mittaustulokset	
Näyte	konsentraatio (mg/ml)
1.1	3,96
1.2	3,96
1.3	3,96
1.4	3,96
2.1	3,98
2.2	3,58
3.1	3,98
3.2	3,98
4.1	3,92
4.2	3,92
5.1	3,98
5.2	3,98

Taulukossa 11 on BSA-standardien absorbanssiarvot aallonpituudella 595 nm, josta on vähennetty ohjeiden mukaisesti nollanäytteen (blank) absorbanssiarvo. BSA-näytteistä piirrettiin standardisuora pitoisuuden funktiona (kuva 11).

Taulukko 11. BSA-proteiinistandardien absorbanssiarvot, josta on vähennetty nollanäytteen absorbanssiarvo

Standardit		
BSA (mg/ml)	Absorbanssi, A (595 nm)	$A_{\text{STD}} - A_{\text{blank}}$
0	0	0
0,2	0,854	0,277
0,4	1,050	0,473
0,6	1,211	0,634
0,8	1,384	0,807
1	1,523	0,946
1,2	1,615	1,038
1,4	1,834	1,257
Blank	0,577	

BSA-näytteiden absorbanssiarvoista, josta on vähennetty nollanäytteen arvo, piirrettiin standardisuora pitoisuuden funktiona (kuva 11).



Kuva 11. Standardisuora BSA näytteistä

Taulukossa 12 on listattu tuotantoprosessin eri vaiheiden näytteiden (kts. Taulukko 3) lasketut konsentraatiot. Konsentraatioarvot laskettiin standardisuoran yhtälön avulla. Absorbanssiarvoista on myös vähennetty ohjeiden mukaisesti nollanäytteen (blank) absorbanssiarvo.

Taulukko 12. Näytteiden absorbanssiarvot ja standardisuoran avulla lasketut konsentraatioarvot

Näyte	Absorbanssi, A (595 nm)	$A_{\text{näyte}} - A_{\text{blank}}$	Konsentraatio (mg/ml)
1.1	0,906	0,329	2,86
1.2	0,967	0,390	3,58
1.3	1,011	0,434	4,10
1.4	1,002	0,425	3,99
2.1	1,025	0,448	4,27
2.2	1,021	0,444	4,22
3.1	1,232	0,655	6,72
3.2	1,392	0,815	8,61
4.1	1,438	0,861	9,15
4.2	1,506	0,929	9,96
5.1	1,346	0,769	8,07
5.2	1,404	0,827	8,75
Blank	0,577		

Jokaisen puhdistusvaiheen jälkeen epäpuhtauksien määrä vähenee, jolloin proteiinkonsentraatio kasvaa jokaisen puhdistusvaiheen jälkeen. Tämä huomataan taulukossa 12, jossa konsentraatio kasvaa kromatografia 4 -vaiheeseen asti (näytteet 4.1 ja 4.2). Kromatografia 4:n jälkeen lopputuotetta suodatetaan, mikä voi selittää proteiinkonsentraation pienen laskun (näytteet 5.1 ja 5.2).

Taulukossa 13 on edellisten tuotanto erien ja modifioitujen DNA-polymeraasien lasketut konsentraatioarvot. Edelliset tuotantoerät ja modifioidut näytteet on mitattu eri päivinä käyttäen eri päivinä valmistettuja BSA-standardeja.

Taulukko 13. DNA polymeraasi erien (Tuote 1), sekä modifioitujen DNA polymeraasien (Tuotteet 2.1, 2.2 ja 3) konsentraatio arvot. Tähdellä merkityt polymeraasi ja PCR master mix (MM) absorbanssi-arvo oli standardi arvojen alapuolella, joten konsentraatio ei ole tarkka.

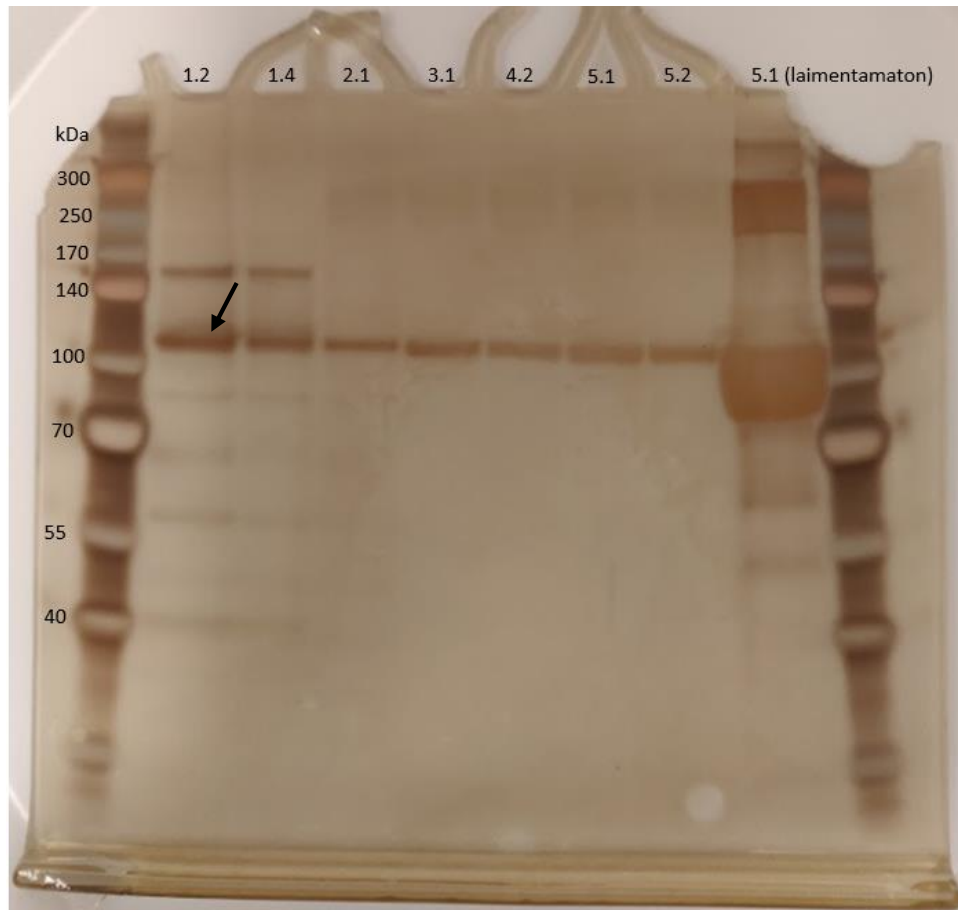
Näyte (Lot)	Konsentraatio (mg/ml)
Tuote 1 (28)	7,49
Tuote 1 (30)	11,27
Tuote 1 (31)	5,18
Tuote 1 (33)	7,28
Tuote 1 (34)	5,92
Tuote 1 (35)	7,83
Tuote 2.1 (40)	8,05
Tuote 2.2 (11)	3,41
Tuote 3 (42)	0,82*
MM (32)	0,07*

DNA-polymeraasi (Tuote 1) erissä on suuri vaihtelu proteiinkonsentraatiossa, eli tuotannon saanto voi vaihdella, jopa kaksinkertaisesti. DNA-polymeraasikonsentraatio vaihtelu ei välttämättä vaikuta DNA-polymeraasin toimintaan, sillä sitä tuotetaan aktiivisuusarvon mukaisesti.

## 6.2 Geelielektroforeesi

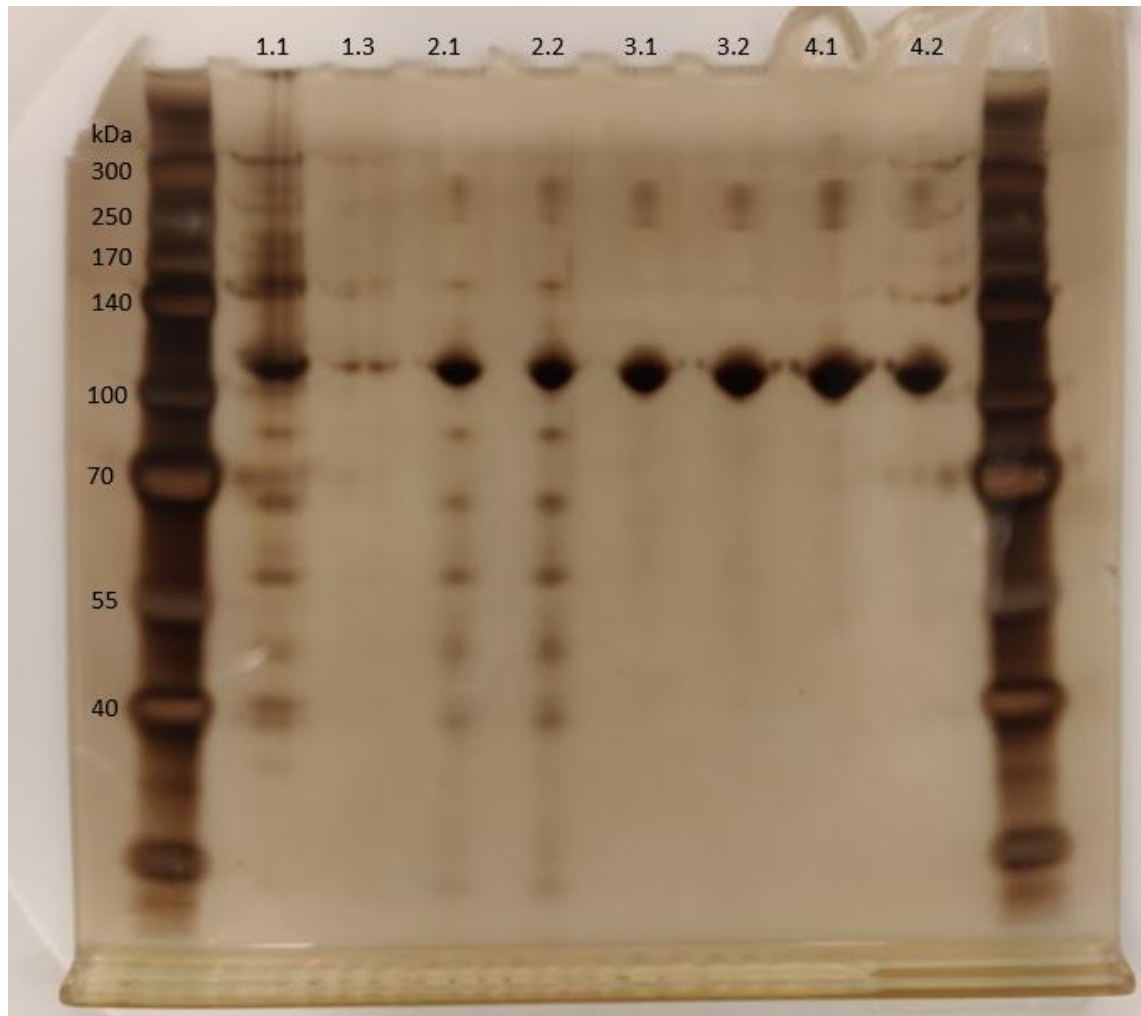
SDS-PAGE-analyseissä on käytetty NuPage 4–12% Bis-Tris -gradienttigeeli, jossa Bis-Tris -pitoisuus vaihtelee geelin eri kohdissa. Tässä työssä käytetylle geelille oli tilattu sopiva proteiinistandardi, mutta toimitushäiriöiden vuoksi standardi ei saapunut. Tästä johtuen on käytetty toisenlainen proteiinistandardi, jonka standardit näkyvät geelissä hieman väärässä paikassa. Koska tässä työssä tutkitaan puhtautta, tarkka proteiininmassa ei ole merkitsevä. DNA-polymeraasin massa on ~94 kDa, mutta SDS-PAGE testeissä se näkyy hieman yli 100 kDa:n alueella.

Alla olevassa kuvassa näkyy hopeavärjätty geeli tuotannon eri vaiheiden näytteistä.



Kuva 12. Hopeavärjätty geeli tuotannon eri vaiheiden näytteistä. Kaivossa 9 on pipetoitu laimentamaton DNA polymeerasin lopputuote. Nuolen osoittama juova on DNA polymeerasientsyymi

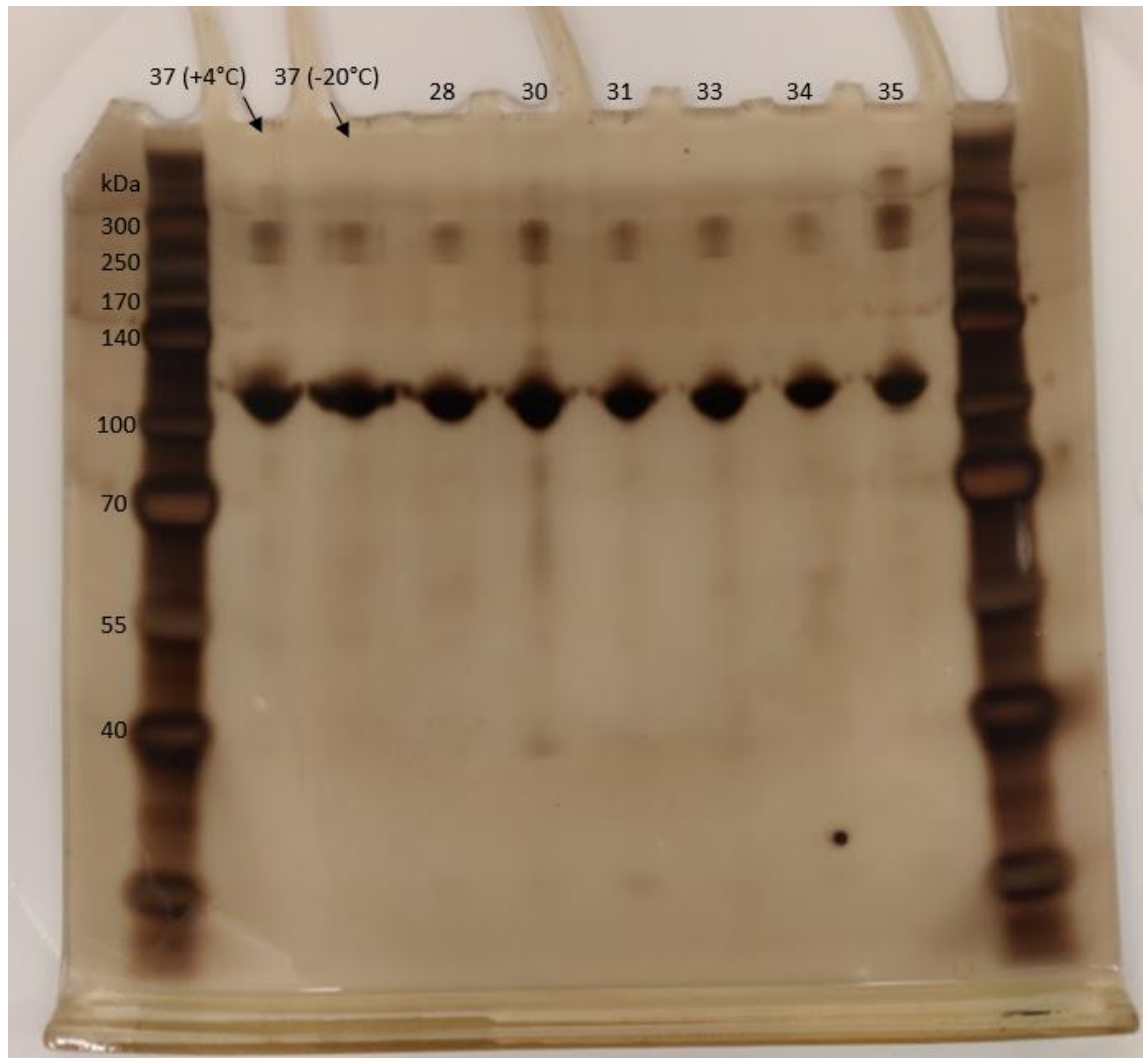
Geelistä huomataan, että lopputuotteessa on polymeerasin lisäksi toinen proteiini 250–300 kDa:n alueella. Tässä työssä haluttiin selvittää tuotanto erien välistä puhtautta, joten ajettiin tuotantovaiheiden näytteet uudelleen, mutta tällä kertaa hopeavärjäys intensiteettiä lisättiin (kuva 13).



Kuva 13. Hopeavärjätty geeli tuotannon eri vaiheiden näytteistä, jossa hopeavärjäys annettiin vaikuttaa pitempään aikaan.

Kun hopeavärjäyksen intensiteettiä lisättiin, niin epäpuhtaudet näkyivät paremmin. Kuvissa 12 ja 13 huomataan, että jokaisen puhdistus vaiheen jälkeen epäpuhtauksien ja ylimääräisten proteiinien määrä vähenee. Kun hopeavärjäyksen kehitysvaihe pidennettiin, proteiinijuoviin tarttuu enemmän hopea molekyyliä, mikä johtaa proteiinijuovien pyöreään muotoon. Kun kehitysvaihe pidennetään, silloin ei saada näkyviin juovien oikea muoto, mutta hyötynä on epäpuhtauksien parempi näkyvyys.

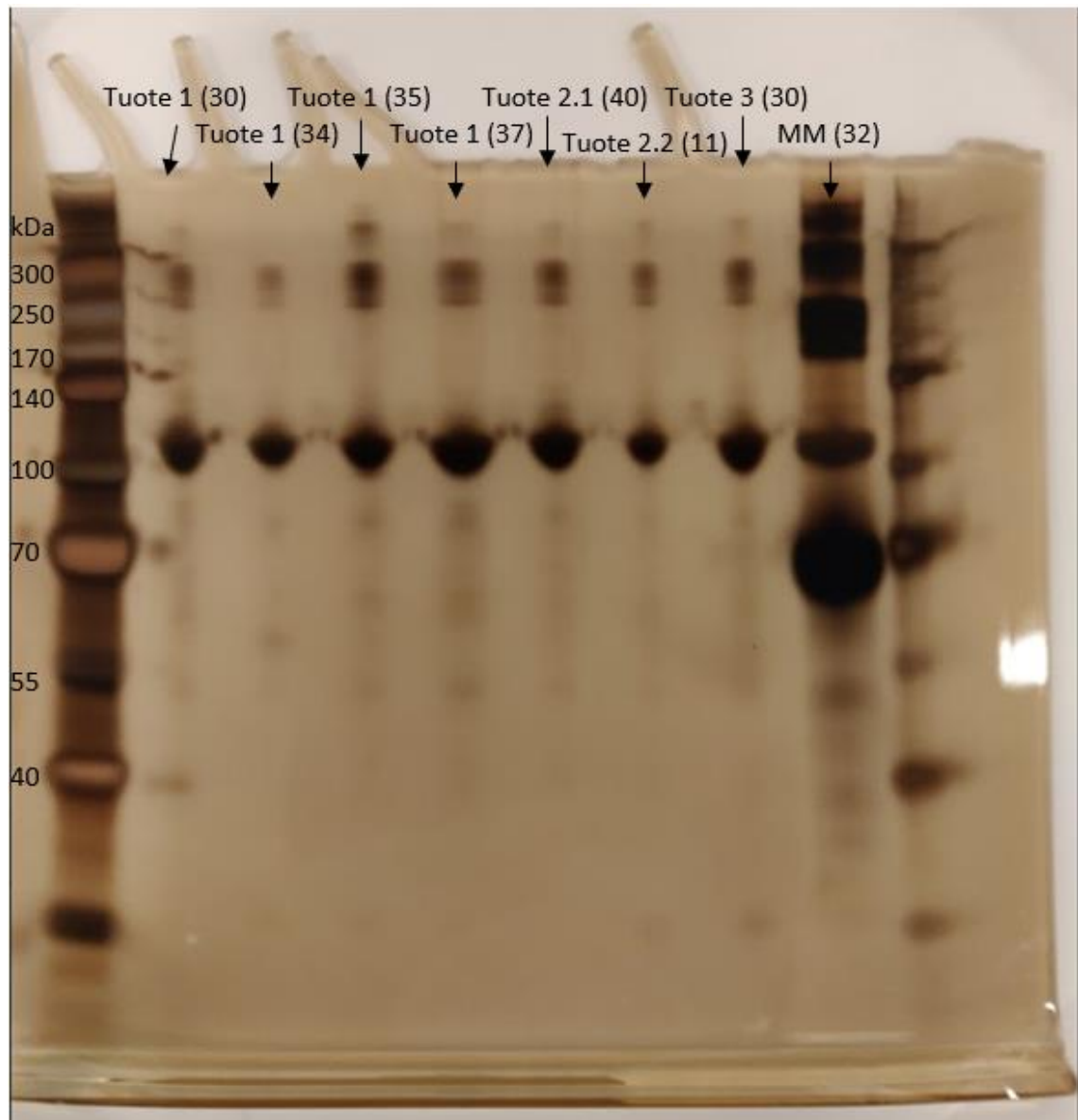
Tämän jälkeen ajettiin edelliset DNA-polymeraasi erät ja uusimman erän loppunäytteet 5.1 ja 5.2 (Lot 37). Tässä vertailtiin erien välistä puhtauseroa (kuva 14).



Kuva 14. Hopeavärjätty geeli DNA-polymeraasin (Tuote 1) eri tuotantoeristä. Numerot merkitsevät tuotantoerien numerot, jossa erä 37 oli uusin tuotettu erä, mikä säilytettiin kahdessa eri lämpötilassa ilman glyserolia. Muista vanhemmista eristä oli konsentroitua glyserolia pois.

Tuotantoerien välinen ero on pieni, mutta se on huomattavissa. Väri Intensiteetin perusteella voidaan todeta tiettyjen näytteiden sisältävän hieman enemmän epäpuhtauksia kuin toiset. Esimerkiksi näytteissä 30 ja 35 huomataan väri intensiteetin olevan vahvempi eri kDa alueilla. Väri intensiteetin vaihtelu voi johtua pipetoidusta proteiinimäärästä, mutta esimerkiksi näytteiden 28 ja 30 pipetoitu määrä on lähes sama (0,449 ja 0,451 µg) ja niissä on silti vaihtelua.

Kuvassa 15 on vertailtu DNA-polymeraasista modifioidut tuotteet (Tuotteet 2.1, 2.2 ja 3.0), sekä PCR master mix (MM).

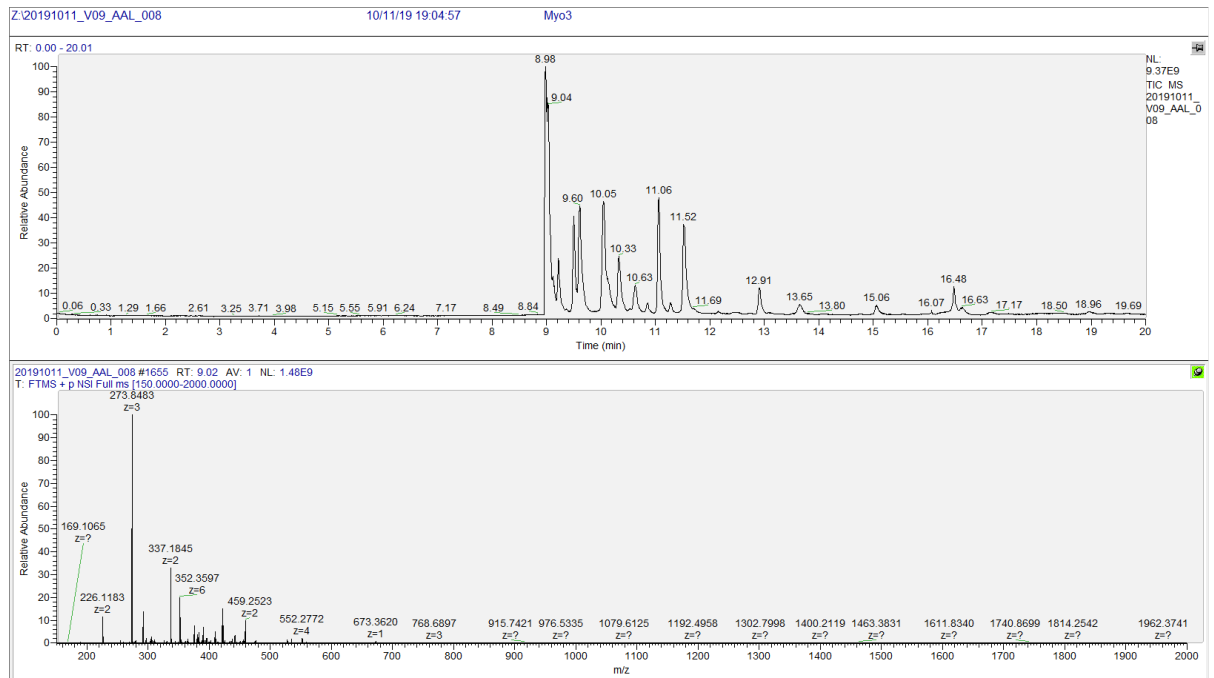


Kuva 15. Hopeavärjätty geeli DNA-polymeraasin eri tuotteista. Suluissa oleva numero on erän numero

Modifioidut DNA-polymeraasituotteet ovat saman näköisiä kuin ei modifioitu DNA-polymeraasi. Modifioiduissa tuotteissa huomataan myös epäpuhtaudet samoilla kDa alueilla.

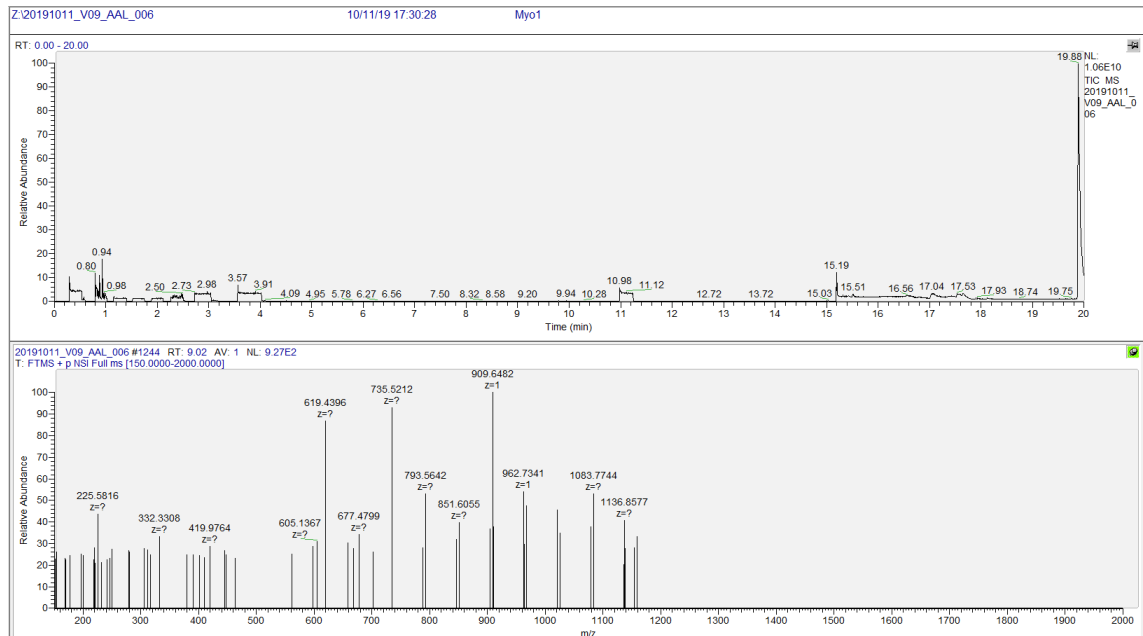
### 6.3 Nestekromatografia-massaspektrometria

LC-MS ajoista suurin osa ei onnistunut, joka huomattiin nestekromatografian kromatogrammeissa. Kuvassa 16 on onnistunut myoglobiini näytteen analyysi.



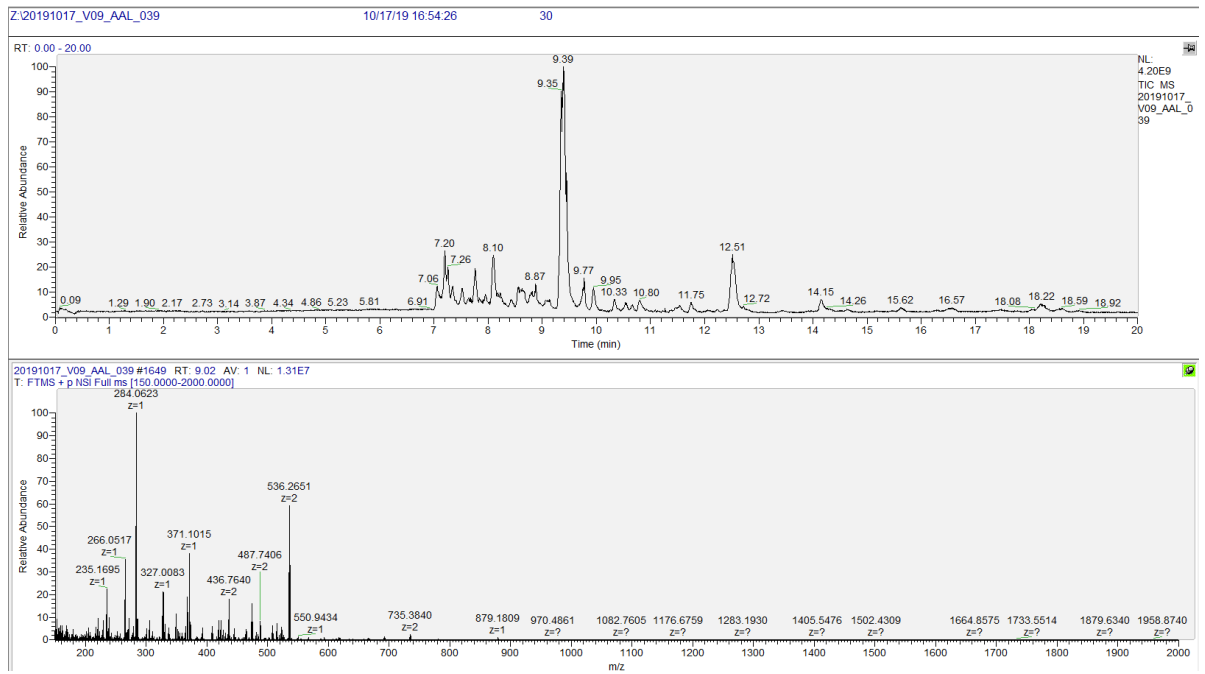
Kuva 16. TIC- kromatogrammi ja massaspektri myoglobiini näytteestä.

Myoglobiini rinnakaisia näytteitä oli yhteensä 4, jotka oli käsitelty samalla tavalla. Kuvassa 17 on myoglobiinin epäonnistunut ajo, vaikka on ajettu samoilla asetuksilla.



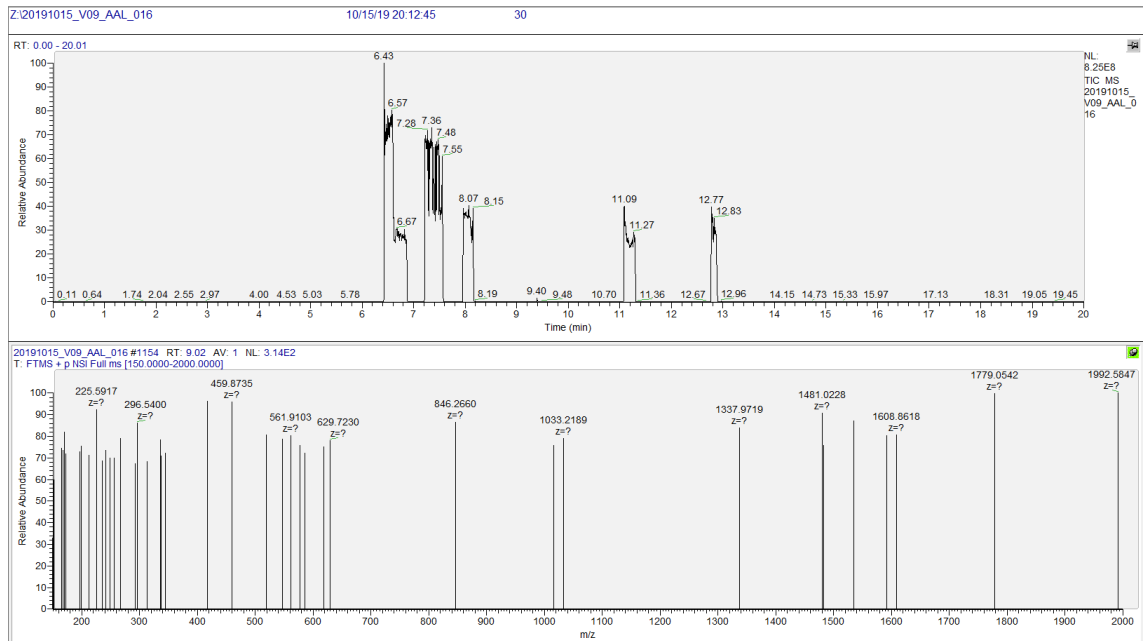
Kuva 17. TIC- kromatogrammi (yläpuolella) ja massaspektri (alapuolella) myoglobiini näytteestä. Kyseessä on rinnakaisnäyte kuvan 16 näytteestä, joka oli käsitelty samalla tavalla.

Menetelmää testattiin DNA-polymeraasinäytteisiin, jossa huomattiin sama ongelma tuloksien kanssa (kuvat 18 & 19). Analyysi suoritettiin seitsemälle eri tuotantoerän tuotteille. Osa näytteiden LC-erotus oli onnistunut ja osa näytteistä LC-erotus oli onnistunut osittain. Onnistuneet näytteet testattiin uudestaan samoilla asetuksilla, mutta tulokset vaihtelivat.



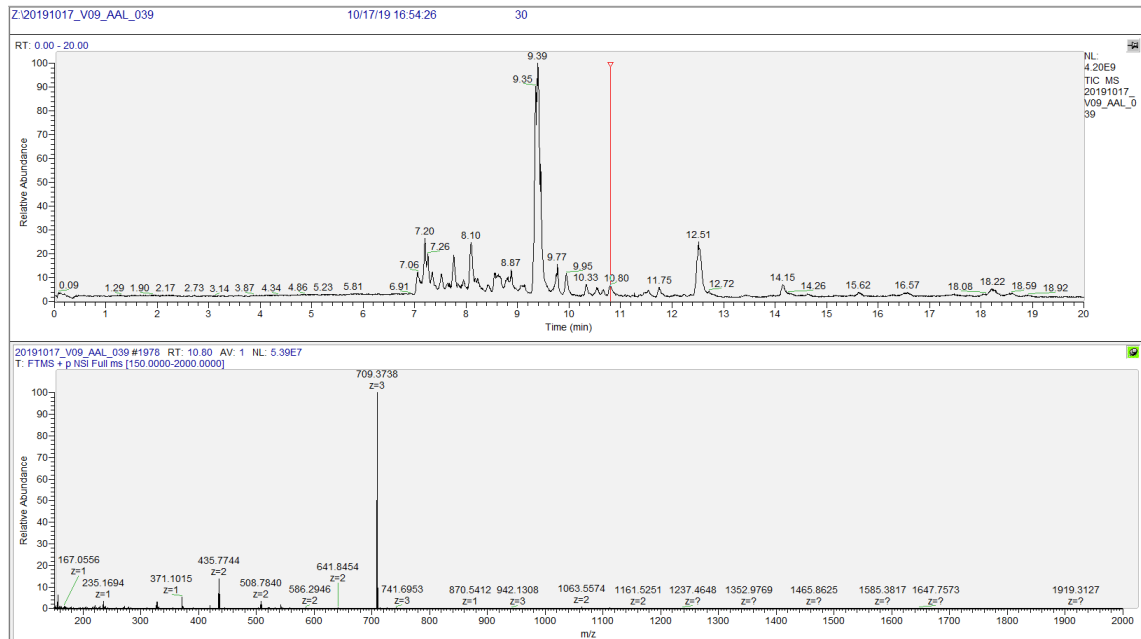
Kuva 18. DNA-polymeraasi (erä 30) näytteen TIC- kromatogrammi ja massaspektri. Tässä on onnistunut LC-erottelu, jossa näkyy eri peptidien massat.

Kuvissa 18 ja 19 on saman näytteen tulokset, jotka on ajettu samoilla asetuksilla eri aikoina.



Kuva 19. DNA-polymeraasi (erä 30) näytteen TIC- kromatogrammi ja massaspektri. Tässä on epäonnistunut LC-erottelu, jossa kromatogrammissa näkyy heikko signaali ja huono LC-erottelu.

Onnistuneista ajoista tutkittiin saadut massafragmenttien massa arvot, joita vertailtiin teoreettisiin peptidimassoihin (Liite 1). Kuvassa 20 on esimerkki kolmesti varautuneesta massafragmentista, jota vertailtiin teoreettiseen peptidimassaan.



Kuva 20. DNA-polymeraasi (erä 30) massaspektristä on tutkittu peptidi retentioajalla 10,90.

Kuvassa 20, piikki  $m/z = 709,3736$  retentioajalla 10,90 min on  $[M+H]^+$  ioni, jonka varaus on +3. Tämän peptidin moolimassa saadaan laskettua kertomalla  $m/z$ -arvo varauksen lukuun. Tästä arvosta vähennetään protonien moolimassa, joka tässä tapauksessa on  $3 \times [H] = 3 \times 1,007$ . [3, s.194]

Peptidin moolimassaksi saadaan 2125,1004, jota verrattiin teoreettiseen peptidimassataulukon (liite 1), jossa löytyi peptidi samalla moolimassalla kahden desimaalin tarkkuudella. Tämän peptidin massa on 2125,1036. Koska onnistuneista ajoista on löydetty DNA-polymeraasin peptidejä, voidaan toteuttaa, ettei ongelma ole digestiossa.

Liitteessä 2 on esimerkkejä eri kromatogrammeista, jossa huomataan eroa eniten LC:n signaaleissa, mikä merkitsee stabiilisuusongelmaa LC-menetelmässä tai ionisaatiossa. LC-erottelu on kuitenkin onnistunut satunnaisesti jossain ajoissa, mikä tarkoittaa ionisaation olevan enemmän epästabiili. Proteiinkonsentraationmäärityksissä ja SDS-PAGE -puhtaustesteissä huomattiin pienijä eroja erien välillä. Tämän ei kuitenkaan pitäisi vaikuttaa LC-MS -tuloksiin, sillä jos näytteessä on ylimääräinen proteiini, se näkyisi erillisenä piikkinä kromatogrammissa. Näin voidaan todeta, ettei näytteen sisältö vaikuta ionisointiin tai kromatografiseen erotteluun huomattavasti. Vaikka on testattu eri LC- ja ionisaatioasetuksia, ongelma ilmenee silti, joten on tutkittava ionisaatioasetuksia tarkemmin.

Näytteille oli tarkoitus tehdä tandemmassaspektrometria analyysi ja vertailla tuloksia tietokantaan, mutta sitä varten ei saatu tuloksia.

## 7 Johtopäätökset

Työn tavoitteena oli tutkia DNA-polymeraasin ominaisuuksia ja tuotantoprosessia, tuotantoerien erojen havaitsemiseksi ja tarvittaessa tuotannon optimoimiseksi. Tässä työssä saatiin paljon tietoja DNA-polymeraasiominaisuuksista ja tuotantoerien välisistä eroista. Konsentraation ja puhtaustestien perusteella tuotantoerät vaihtelevat hieman, mutta tämä vaihtelu ei ole näiden tuloksien perusteella merkitsevä. SDS-PAGE -tuloksien perusteella on ehdotettu tutkimaan ja tunnistamaan löydetyt proteiinit, niiden vaikutuksen selvittämiseksi. Nämä proteiinit ja epäpuhtaudet tullaan tutkimaan tarkemmin mm. 2D-elektroforeesilla ja massaspektrometrian menetelmillä. Jos epäpuhtauksien vaikutuksen todetaan vaikuttavan lopputuotteeseen, tullaan muuttamaan tuotantoprosessia paremmaksi. Puhtaustestien perusteella on ehdotettu muutoksia tuotantoprosessiin. DNA-polymeraasi tuotannossa lopputuotteen konsentraatiolla ei ole raja-arvoa, vaan sitä tuotetaan aktiivisuusarvon mukaisesti. Tämän takia on ehdotettu tämän työn perusteella, että asetetaan raja-arvoja proteiinkonsentraatiolle laadunvalvontavaiheessa. Tämän työn tuloksien perusteella on saatu tärkeää tietoa mahdollisista vaikuttavista tekijöistä, jolle tullaan tekemään lisätutkimuksia.

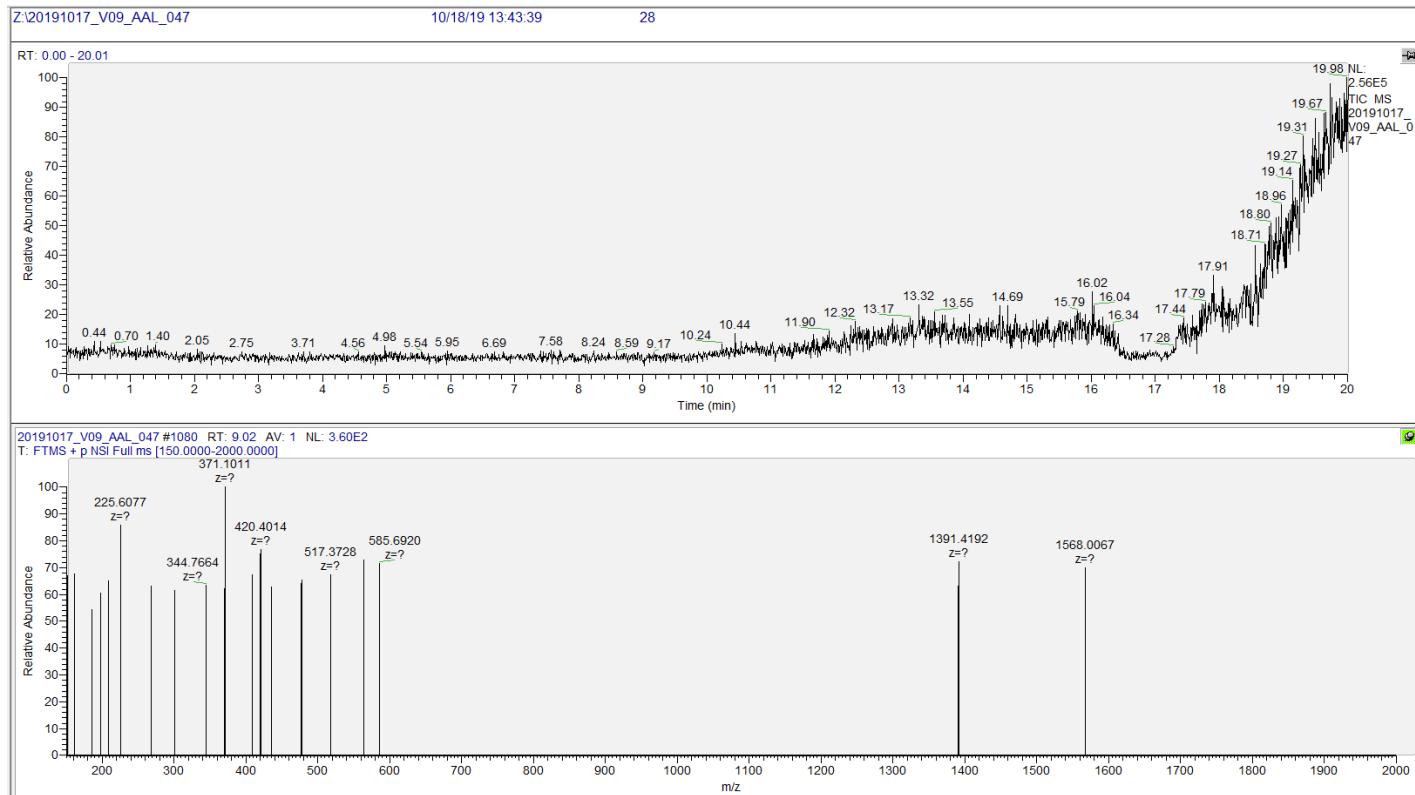
Vaikka LC-MS-menetelmän kehitys ei onnistunut täysin, on saatu alustava menetelmä DNA-polymeraasin tutkimiselle. Tässä työssä käytetty menetelmää käytetään pohjana tulevia testejä varten, jossa menetelmä optimoidaan ja kehitetään sopivaksi. Syy LC-MS-tuloksien epäonnistumiseen on rajattu ionisaation stabiiliuuteen, jota tullaan tutkimaan ja testaamaan. Stabiiliusongelma voi johtua myös käytetystä nano-flowin nestekromatografista, sillä eräessä Melbournen yliopiston tutkimuksessa on vertailtu nano-flowin ja tavallisen nestekromatografian eroja, jossa todettiin mm. retentioajan olevan enemmän stabiili tavallisessa nestekromatografiassa [12]. LC-erotusta on mahdollista myös parantaa lisäämällä ajoliuokseen trifluoretikkahappoa, vaikka siitä muodostunut massaspektri on heikompi [3, s.199]. LC-erotusta on saatu onnistumaan jostain näytteistä, mikä merkitsee menetelmän olevan optimoinnin tarpeessa.

Opinnäytetyöstä on saatu hyödyllistä tietoa DNA-polymeraasientsyymistä ja pystytään suunnittelemaan jatkotutkimuksia tämän työn tulosten perusteella. On myös alustavasti kehitetty LC-MS-menetelmä, josta voi jatkaa optimointia.

## Lähteet

- 1 Lodich; Berk; Zipursky; Matsudaira; Baltimore; Darnell. 1999. Molecular cell biology, 4th edition. New York: W.H freeman.
- 2 Miller J.H. 2001, Encyclopedia of Genetics. USA: Elsevier.
- 3 Ketola, Raimo; Kostiainen, Risto; Kotiaho, Tapio & Vainiotalo, Pirjo. 2010. Massaspektrometrian perusteet. Helsinki: Hakapaino.
- 4 In-solution tryptic digestion and guanidination kit. Ref: 1859663. Instruction manual. Thermo Fisher Scientific.
- 5 Jaarinen, Soili & Niiranen, Jukka. 2008. Laboratorion analyysitekniikka. Helsinki: Edita.
- 6 Exactive Series Operating Manual. Revision B, 1344742. 2015. Thermo Scientific.
- 7 Dr Paul Gates. High Performance Liquid Chromatography Mass Spectrometry. University of Bristol: School of Chemistry. Verkkoaineisto <<http://www.bris.ac.uk/nerclsmf/techniques/hplcms.html>> Luettu 10.09.2019
- 8 SilverQuest™ Silver Staining Kit. Ref: LC6070. Novex by Life technologies.
- 9 Protein (Bradford Method) kit manual, Ref: 10306, Merck Millipore Corporation
- 10 Qubit Protein assay kit manual, Ref: Q33211, Invitrogen by Life technologies
- 11 SIB Swiss Institute of Bioinformatics, peptidimassa verkkolaskuri. <[https://web.expasy.org/peptide\\_mass/](https://web.expasy.org/peptide_mass/)> Luettu 20.09.2019.
- 12 Blaine Roberts, PhD. Comparison of Nano and Standard Flow Proteomics for Tissue and Plasma Samples, university of Melbourne. 2017. Verkkoaineisto <[https://www.agilent.com/cs/library/eseminars/public/Roberts\\_Omics\\_webinar\\_10192017.pdf](https://www.agilent.com/cs/library/eseminars/public/Roberts_Omics_webinar_10192017.pdf)> Luettu 29.10.2019

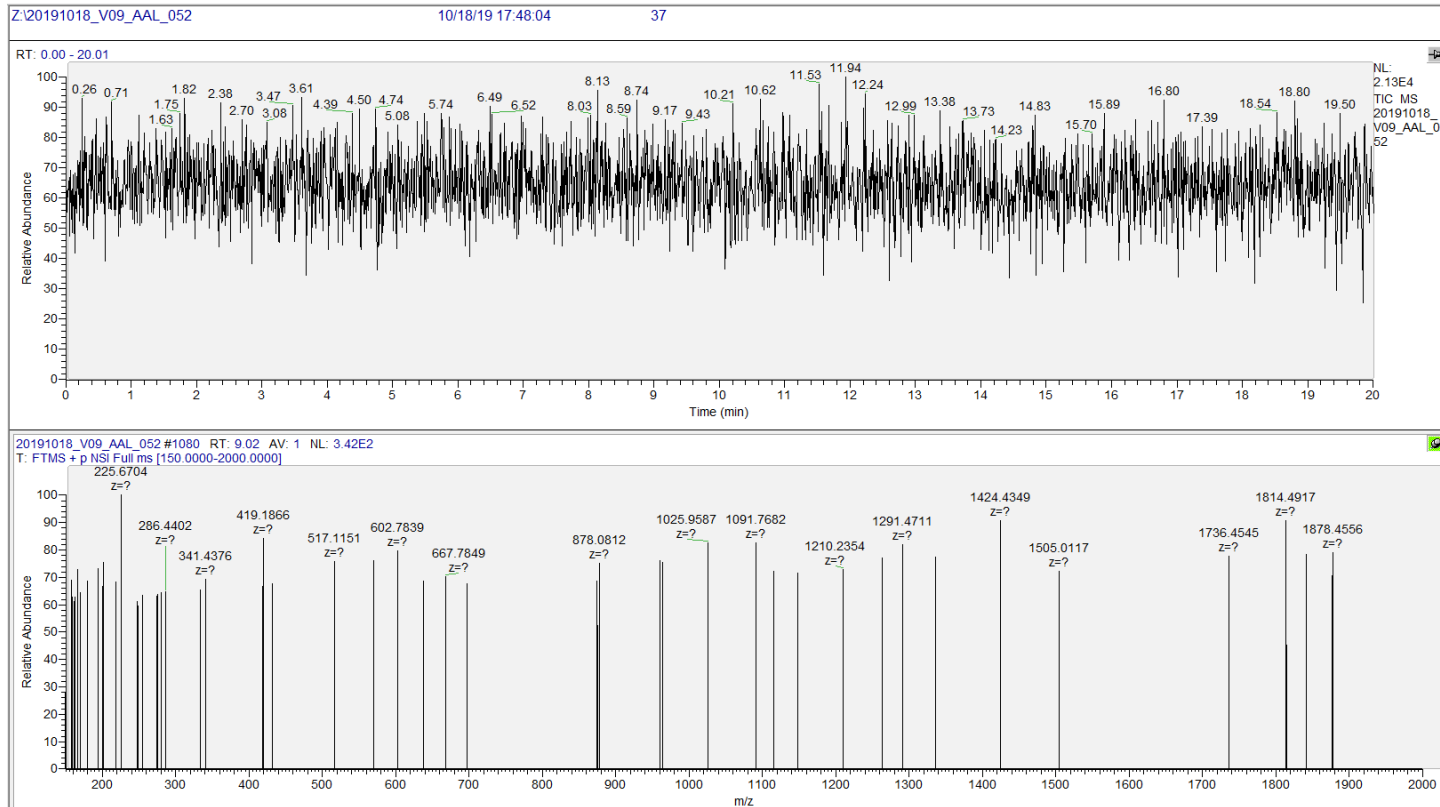
## LC-MS-tulosten variointi



Kuva 21. DNA polymeerasi (erä 28) näytteen TIC- kromatogrammi ja massaspektri. Tässä on epäonnistunut LC-erottelu, jossa kromatogrammissa näkyy huono signaali.

2 (3)

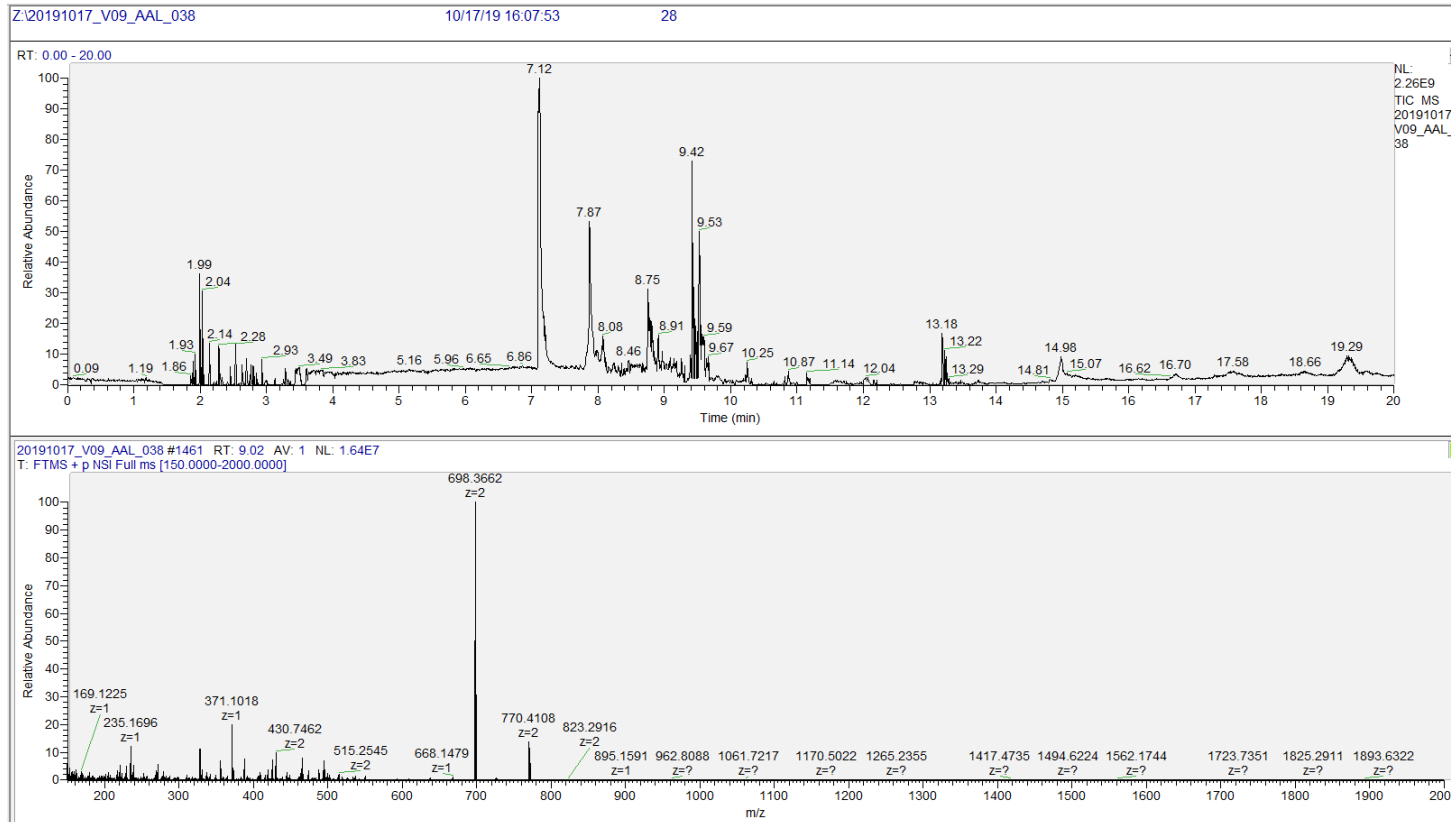
## LC-MS tulosten variointi



Kuva 22. DNA polymeraasi (erä 37) näytteen TIC- kromatogrammi ja massaspektri. Tässä on epäonnistunut LC-erottelu, jossa kromatogrammissa näkyy huono signaali

3 (3)

## LC-MS tulosten variointi



Kuva 23. DNA polymeraasi (erä 28) näytteen TIC- kromatogrammi ja massaspektri. Tässä on osittain onnistunut LC-erottelu, jossa kromatogrammissa näkyy huono signaali retentioajalla 2–3

