



**TURUN AMMATTIKORKEAKOULU  
ÅBO YRKESHÖGSKOLA**

**Opinnäytetyö**

**RCA -MENETELMÄN  
HYÖDYNTÄMINEN  
GEENIKIRJASTOJEN  
KEHITTÄMISESSÄ**

**Marja Julin**

**Bio- ja elintarviketekniikka**

**2011**

TURUN TIIVISTELMÄ  
AMMATTIKORKEAKOULU

Koulutusohjelma:	
Bio- ja elintarviketekniikka	
Tekijä: Marja Julin	
Työn nimi: RCA -menetelmän hyödyntäminen geenikirjastojen kehittämisessä	
Bioteknikka	Ohjaajat: FM Kari Haajanen FT Urpo Lamminmäki FM Tuomas Huovinen
Opinnäytetyön valmistumisajankohta Kesä 2011	Sivumäärä 54
<p>Geenikirjastojen kokoa rajoittava tekijä on DNA:n transformaatio bakteereihin. Transformaatiota saadaan tehostettua lisäämällä DNA:n määrää. Silmukoimismenetelmän (RCA) avulla rengasmaista DNA:ta voidaan monistaa suuria määriä transformaatiota varten. Ongelmakohtana on kuitenkin RCA:n tuotteena syntyvän DNA-konkatameerin muokkaus transformoitavaan muotoon.</p> <p>Perinteisesti tämä tehdään digestoimalla DNA-konkatameeri yhden perusyksikön pituisiksi juosteiksi ja liittämällä ne itsensä kanssa. Toinen kokeellisempi menetelmä on rekombinaation hyödyntäminen konkatameerin silmukoimisessa perusyksiköiksi. Tämän työn tarkoituksena oli vertailla menetelmien tehokkuuksia sekä optimoida digestio-ligaatio ja rekombinaatio-menetelmät mahdollisimman hyvän monistetun DNA:n transformaatiotehokkuuden saavuttamiseksi</p> <p>Työssä kloonattiin cre-rekombinaasin tunnistuselementtinä toimiva LoxP kohdeplasmidiin. Tämän jälkeen monistettiin plasmidia RCA -menetelmällä ja testattiin entsyymi- ja DNA-konsentraatioiden sekä reaktioajan vaikutusta konkatameerin uudelleenjärjestämisessä transformoitavaan muotoon. Reaktioiden onnistumista seurattiin agaroosigeelielektroforeesin ja bakteeritransformaatioiden avulla.</p> <p>Työssä havaittiin, että hypoteesi osui oikeaan ja rekombinaatiomenetelmä toimi paremmin kuin perinteinen menetelmä. Plasmidilla pIX/PAK100r-LoxP1 digestio-ligaatio-menetelmä tuotti pesäkkeen muodostavia yksiköitä 10 ng RCA reaktioseosta kohden <math>4,54E+07</math>, kun rekombinaatio-menetelmällä päästiin <math>1,19E+08</math> määrään.</p>	
Hakusanat: geenikirjasto, RCA, transformaatio, rekombinaatio, LoxP	
Säilytyspaikka: Turun ammattikorkeakoulun kirjasto	

Degree Programme:	
Biotechnology and Food Technology	
Author: Marja Julin	
Title: RCA method in development of gene libraries	
Specialization line Biotechnology	Instructors: Kari Haajanen, MSc Urpo Lamminmäki, PhD Tuomas Huovinen, MSc
Date Summer 2011	Total number of pages 54
<p>DNA transformation to bacteria is a size-limiting factor in the construction of gene libraries. By increasing the DNA amount, the transformation can be enhanced. By rolling circle amplification (RCA), circular DNA can be replicated in large quantities for the transformation. However, the RCA product is a concatemer and has to be re-circularized for more efficient transformation.</p> <p>Traditionally, re-circularization has been done by digesting the DNA concatemer into monomer units and ligating them with themselves. One alternative method is the use of recombination for circularization of the concatemer into basic units. The purpose of this study was to compare the methods and to optimize digestion-ligation and recombination to achieve the most optimal transformation efficiency.</p> <p>In this thesis, the cre- recombination element tag LoxP was cloned to a target plasmid. Subsequently, the plasmid was amplified by the RCA method, and the effect of enzyme and DNA concentrations and reaction time was tested. The reactions were monitored by agarose gel electrophoresis and transformation to bacteria.</p> <p>It was observed that the hypothesis was correct, and recombination worked better than the traditional method. The digestion-ligation method yielded <math>4.54 \times 10^7</math> cfu/ 10 ng of RCA reaction mixture while recombination produced <math>1.19 \times 10^8</math> cfu/ 10 ng RCA reaction mixture with plasmid pIX/PAK100r-LoxP1.</p>	
Keywords: gene library, RCA, transformation, recombination, LoxP	
Deposit at: TUAS Library	

# SISÄLTÖ

<b>1</b>	<b>JOHDANTO</b>	<b>7</b>
<b>2</b>	<b>REKOMBINAASIN TUNNISTUSELEMENTIN KLOONAUS</b>	<b>8</b>
2.1	Komponentit	8
2.2	DNA:n eristys ja puhdistus	9
2.3	DNA:n muokkaus	11
2.3.1	Digestio	11
2.3.2	Ligaatio	11
2.3.3	Defosforylointi	13
2.3.4	Hybridisaatio	13
2.3.5	PCR	13
2.4	Transformaatio	13
2.5	Agaroosigeelielektroforeesi	14
2.6	Sekvenssointi	15
<b>3</b>	<b>KONKATAMEERIN TUOTTO RCA - MENETELMÄLLÄ</b>	<b>15</b>
3.1	Komponentit	19
<b>4</b>	<b>REKOMBINAATIO</b>	<b>21</b>
4.1	Cre-rekombinaasi	22
4.2	Sovellukset	23
<b>5</b>	<b>TYÖN SUORITUS</b>	<b>25</b>

5.1	Kloonaus	25
5.1.1	Vektorin digestio	25
5.1.2	LoxP-insertin hybridisaatio ja vektorin fosforylointi	26
5.1.3	Separatiivinen agarosigeelelektroforeesi	27
5.1.4	Ligaatio	28
5.1.5	Transformaatio	29
5.1.6	Agarosigeelelektroforeesi	30
5.1.7	Miniprep -eristykset ja sekvenssointi	30
5.2	Menetelmien vertailu	31
5.2.1	Konkatameerin tuotto	31
5.2.2	Digestio- ligaatio	32
5.2.3	Rekombinaatio	33
5.2.4	Etanolisaostus	33
5.2.5	Taustan poistaminen	33
5.3	Optimointi	34
5.4	Testaus	37
<b>6</b>	<b>TULOKSET JA ARVIOINTI</b>	<b>38</b>
<b>7</b>	<b>YHTEENVETO</b>	<b>53</b>

## LIITTEET

## KUVAT

Kuva 1: pIX-TetR-LoxP1-plasmidi.	9
Kuva 2: Vektorin ja insertin liittäminen ligaatioreaktiolla.	12
Kuva 3: RCA -menetelmän periaate.	17
Kuva 4: Cre-rekombinaasin sitomiskohdat.	23
Kuva 5: pIX/PAK100r-LoxP1 sekä pIX/PAK100r-LoxP2 KpnI-Cfr24I-digestio.	38
Kuva 6: pIX/PAK100r-LoxP1 ja pIX/PAK100r-LoxP2 KpnI-Cfr24I-digestio valmistettuna 1:1000 laimennetuista inserteistä.	39
Kuva 7: HindIII-digestio pIX/PAK100r-LoxP1 ja pIX/PAK100r-LoxP2 näytteille.	40
Kuva 8: pIX/PAK100r-LoxP2 digestoituna Cfr24I- ja KpnI-entsyymeillä.	41

Kuva 9: Plasmidin pIX/PAK100r-pLoxP2 HindIII-digestiot.	42
Kuva 10: DpnI digestio plasmidille pIX/PAK100r-LoxP1.	43
Kuva 11: DpnI-digestio plasmidille pIX/PAK100r-LoxP1r.	44
Kuva 12: DpnI-digestio plasmidille pIX/PAK100r-LoxP1-LoxP1.	44
Kuva 13: SfiI-digestiot plasmideille pIX/PAK100r-LoxP1r ja pIX/PAK100r-LoxP2r.	45

## KUVIOT

Kuvio 1: LoxP1-insertti, jossa on hybridisoitu yksijuosteisten nauhojen suora- ja käänteinen orientaatio.	27
Kuvio 2: LoxP2- insertti, jossa on hybridisoitu yksijuosteisten nauhojen suora- ja käänteinen orientaatio.	27
Kuvio 3: pIX/PAK100r-LoxP1-plasmidin testaaminen.	47
Kuvio 4: pIX/PAK100r-LoxP1r-plasmidin testaaminen.	47
Kuvio 5: pIX/PAK100r-LoxP1-LoxP1-plasmidin testaaminen.	48
Kuvio 6: Rekombinaation vertailu.	49
Kuvio 7: Entsyymipitoisuuden vaikutus.	51
Kuvio 8: Reaktiutilavuuden vaikutus.	52

## TAULUKOT

Taulukko 1: HindIII digestiot.	25
Taulukko 2: BsmI digestiot.	25
Taulukko 3: Oligonukleotidien reaktioseokset.	27
Taulukko 4: Plasmidin pIX/PAK100 ligaatioreaktio.	29
Taulukko 5: Plasmidin pIX/PAK100r ligaatioreaktio.	29
Taulukko 6: KpnI–Cfr42I-reaktioseos (1 x).	30
Taulukko 7: Konkataameerin tuotto 30 °C:ssa yön yli. Lämpöinaktivointi 70 °C:ssa 10 min.	32
Taulukko 8: RCA:ssa valmistetun konkataameerin digestio.	32
Taulukko 9: Ligaatioreaktio digestoidusta konkataameerista.	32
Taulukko 10: Rekombinaation reaktioseos.	33
Taulukko 11: DpnI-käsittely.	34
Taulukko 12: Digestio-ligaatio-menetelmän optimointi, suuri tilavuus ja korkea entsyymikonsentraatio.	34
Taulukko 13: Digestio-ligaatio -menetelmän optimointi, normaalitilavuus ja korkea entsyymikonsentraatio.	35

Taulukko 14: Digestio-ligaatio-menetelmän optimointi, suuri tilavuus ja alhainen entsyymikonsentraatio.	35
Taulukko 15: Digestio-ligaatio-menetelmän optimointi, normaalitilavuus ja alhainen entsyymikonsentraatio.	35
Taulukko 16: Rekombinaation optimointi, korkea entsyymikonsentraatio ja suuri reaktiotilavuus.	36
Taulukko 17: Rekombinaation optimointi, korkea entsyymikonsentraatio ja normaali reaktiotilavuus.	36
Taulukko 18: Rekombinaation optimointi, alhainen entsyymikonsentraatio ja suuri reaktiotilavuus.	36
Taulukko 19: Rekombinaation optimointi, alhainen entsyymikonsentraatio ja normaali reaktiotilavuus.	37
Taulukko 20: SfiI-digestion reaktioseos plasmideille pIX/PAK100r-LoxP1r ja pIX/PAK100r-LoxP2r.	37
Taulukko 21: Sekvenssoitinäytteiden tuloksia.	40
Taulukko 22: Sekvenssoitinäytteiden tuloksia.	42

# 1 JOHDANTO

Geenimutanttikirjastot ovat välttämätön osa sellaisessa teollisuusentsyymien ja sitojamolekyylien tuotekehityksessä, jossa hyödynnetään *in vitro* evoluutiotekniikoita. Geenimutanttikirjaston monimuotoisuus ja laajuus ovat kynnyskysymyksiä etsittäessä haluttujen ominaisuuksien suhteen kehittyneitä variantteja. Faaginäyttötekniikassa geenikirjastojen kokoa rajoittava tekijä on DNA:n transformaatio bakteereihin. Transformaatiota voidaan tehostaa lisäämällä DNA:n määrää.

Työn tarkoituksena oli testata vaihtoehtoisia menetelmiä perinteisen digestion ja ligaation avulla tapahtuvalle DNA:n muokkaukselle transformoitavaan muotoon. Työssä tutkittiin rekombinaation avulla tapahtuvaa konkatameerin silmukoimista halutun pituisiksi rengasmaisiksi yksiköiksi. Kiinnostuksen kohteena oli, voisiko DNA:ta muokata rekombinaation avulla ja millaisin tuloksin. Tietoa kokeellisen menetelmän toimivuudesta ei ollut, eikä tutkimuksesta löytynyt sellaisenaan kirjallisuusviitteitä. Perinteisempi digestio-ligaatio-menetelmä valittiin tutkimukseen mukaan, koska sen tiedettiin toimivan. Menetelmää voidaan hyödyntää geenikirjastojen kehittämisessä.

Tässä työssä käytetään rolling circle amplification -menetelmälle lyhennystä RCA. Opinnäytetyössä käydään läpi ensin teoriaa, rekombinaasin tunnistuselementin kloonauksen, konkatameerin tuotto RCA -menetelmällä, sekä rekombinaatio. Tämän jälkeen työssä esitellään tutkimuksen suorittaminen ja tulokset johtopäätöksineen.

Työ suoritettiin Turun yliopiston Bio- ja Elintarvikekemian laitoksella huhtikuussa 2009 ja tutkimus valmistui heinäkuussa 2009.



## 2 REKOMBINAASIN TUNNISTUSELEMENTIN KLOONAUS

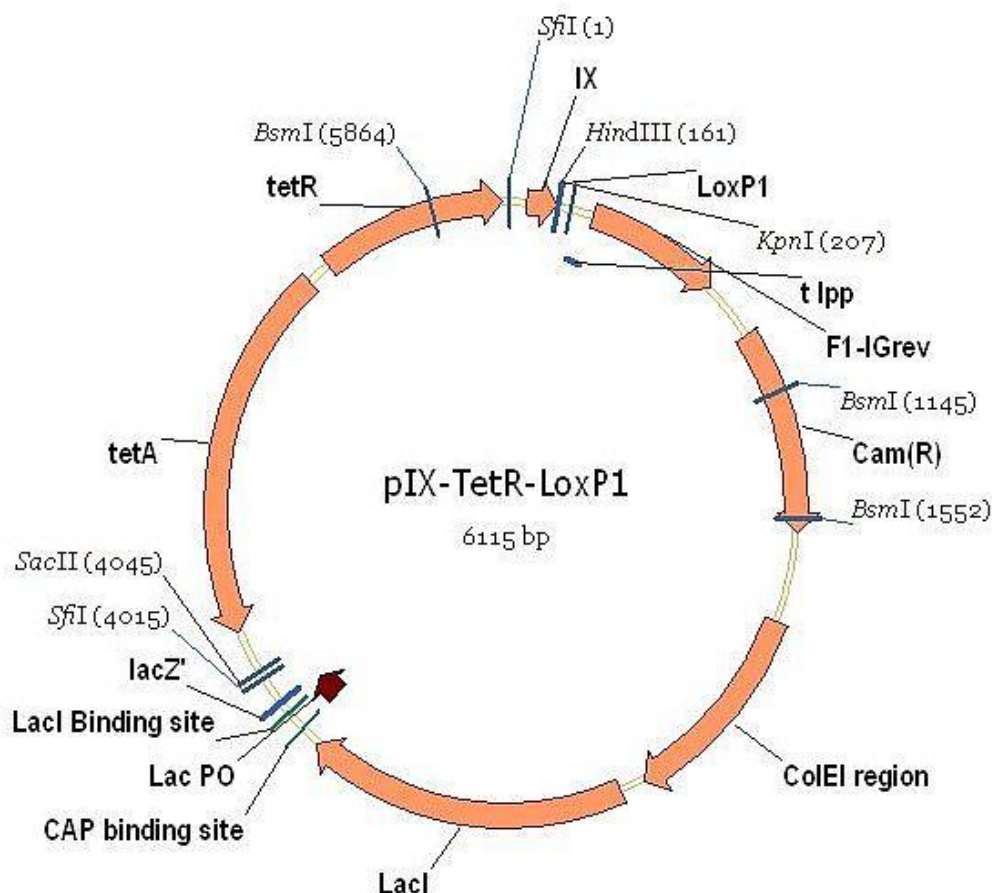
Työssä käytettiin *Escherichia coli* -bakteereita. Kyseinen bakteeri jakautuu edullisissa oloissa 20 minuutin välein. Mutaatio tulee bakteerin haploidisessa kromosomissa näkyviin heti<sup>1</sup>.

Tehdyssä työssä käytettiin plasmidia, joka sisältää mm. Lac-promootterin halutun proteiinin tuottoa varten, sekä antibioottiresistenssigeenin halutunlaisten transformanttien löytämisen helpottamiseksi.

### 2.1 Komponentit

Plasmidit ovat yleisiä vektoreita eli DNA-molekyyliä, jotka monistuvat itsestään isäntäsolussa. Plasmidivektori sisältää antibioottiresistenssin, eli geenin, joka tuottaa inaktivoivaa tai antibioottia hajottavaa entsyymiä. Antibioottiresistenssi toimii selektiomenetelmänä. Tässä työssä plasmidi sisälsi tetrasykliiniresistenssin. Vektorissa on kertaalleen restriktioentsyymien katkaisukohta useammalle restriktioentsyymille. Lisäksi plasmidissa on monistumista kontrolloiva alue<sup>2</sup>. DNA:n kaksoiskierre avautuu tästä erityisestä kohdasta, jota kutsutaan ORI -alueeksi (origin of replication)<sup>3</sup>.

Vektoriin voidaan kloonata pala DNA:ta. Käyttökelpoinen vektori voidaan siirtää isäntäsoluun ja vektorin sisältävä solu voidaan valikoida heti määrityksen yhteydessä<sup>4</sup>. Tutkimuksessa rekombinaasin tunnistuselementti, eli insertti LoxP1 tai LoxP2, kloonattiin plasmidivektoriin. Ne ovat oligonukleotideista valmistettuja juosteita. Plasmidivektorista käytettiin työssä nimitystä pIX/PAK100-LoxP1 ja pIX/PAK100-LoxP2. Vaihtoehtoinen nimitys plasmidivektorille on pIX-TetR-LoxP1. Tämä plasmidi on esitetty kuvassa numero 1.



Kuva 1: pIX-TetR-LoxP1-plasmidi. Kuvassa ColEI region tarkoittaa *E.coli* replikaation aloituskohtaa. LacI-repressori on galaktoosi-indusoituvan promootterin säätelytekijä. LacI- ja CAP-sitomiskohdat ovat LacPO-promootterin säätelytekijöitä. TetA ja TetR muodostavat tetrasykliinikasetin. IX tarkoittaa filamenttifagin P9-geeniä. t IPP on terminaattori, joka estää RNA polymeraasin etenemistä. F1-IGrev on filamenttifagin replikaation käännetty aloituskohta. Cam(R) tarkoittaa kloroampfenikoliastetyylitransferaasin geeniä. Lisäksi kuvassa näkyy restriktioentsyymien katkaisukohdat. Työssä käytettiin myös restriktientsyymiä Cfr42I, jonka restriktiokohta on sama kuin kuvassa näkyvän SacII:en.

## 2.2 DNA:n eristys ja puhdistus

Mikä tahansa eristysmenetelmä perustuu erotettavien kohteiden eroavaisuuksiin. Varaukseen ja kokoon perustuvat erotusmenetelmät ovat yleisimpiä<sup>3</sup>.

Tutkimuksessa käytettyjä puhdistusmenetelmiä olivat PCR-puhdistus, plasmidi-DNA:n puhdistus sekä DNA:n puhdistaminen agarosigeelistä. Lisäksi työssä käytettiin etanolisaostusta.

PCR-puhdistusmenetelmä on tarkoitettu yksi- tai kaksijuosteisten DNA-palojen (100bp - 10kb) puhdistamiseen PCR- ja muista entsymaattisista reaktioista. DNA-palat puhdistetaan alukkeista, nukleotideista, polymeraaseista ja suoloista QIAquick-pylväiden avulla<sup>5</sup>. Plasmidi-DNA:n puhdistuksen ohjeistus on suunniteltu korkeakopioisen plasmidi-DNA:n puhdistukseen 20 µg määrään saakka yön yli kasvatetuista *Escherichia coli* -soluviljemistä<sup>6</sup>.

DNA (70bp - 10kb) voidaan puhdistaa standardi- tai alhaisessa lämpötilassa sulavasta agarosigeelistä, joka on tehty TAE- tai TBE-puskuriin. Tässä työssä käytettiin TAE-puskuria. Jopa 400 mg agarosia voidaan käsitellä yhdessä pylväässä. Tätä menetelmää voidaan käyttää myös DNA:n puhdistamiseksi entsymaattisissa reaktioissa<sup>5</sup>.

Puskuriliuokset vastustavat pH:n heittelyä kun liuokseen lisätään vahvaa emästä tai happoa. Entsyymireaktioiden puskuriliuoksissa on sopiva  $pK_a$ . Se ei häiritse reaktiota tai määrittystä, siinä on sopiva ionivahvuus, eikä se saosta reaktantteja tai tuotteita<sup>3</sup>.

Etanolisaostuksessa käytettiin erityistä pelletin värjäysainetta, nimeltään Pellet Paint Co-Precipitant. Se on suunniteltu käytettäväksi erityisesti etanolisaostuksessa väriaineensa vuoksi. Sekä RNA että DNA voidaan saostaa tehokkaasti jo hyvin laimeista liuoksista (2 ng/ml) ja pelletti on hyvin erotettavissa vaaleanpunaisen värinsä ansiosta. Väriaine ei häiritse monia molekyylibiologisia menetelmiä kuten ligaatiota, digestiota ja transformaatiota. Nukleiinihappojen pitoisuus voidaan määrittää UV:n absorbanssilla. Saostettu pelletti kiinnittyy voimakkaammin putken seinään etanolissa kuin isopropanolissa. Etanoli on haihtuvampaa, joka helpottaa sen poistamista. Tässä työssä käytettiin natriumasetaattia, jota suositellaan rutiinikäyttöön. Puhdistuksen toinen vaihe tehtiin etanolilla<sup>7</sup>.

## 2.3 DNA:n muokkaus

Geeninsiirrossa pilkotaan ensin haluttu kiinnostuksen kohteena oleva DNA restriktioentsyymillä ja vektoriplasmidi aukaistaan samalla entsyymillä. Tällöin DNA-ketjujen päissä on samat tartuntavalmiit emäsryhmät. Jotta plasmidi ei liity yhteen itsensä kanssa, sille tehdään fosfataasikäsittely. Haluttu DNA liitetään aukaistuun plasmidiin ligaasientsyymillä ja tämän jälkeen DNA siirretään bakteeriin transformaatiolla<sup>1</sup>.

DNA:ta on sekä yksi- että kaksijuosteisena ja molempia voi ilmetä sekä lineaarisessa että rengasmaisessa muodossa. Prosessi, jossa yksi kaksijuosteinen DNA-molekyyli kahdentuu kahdeksi molekyyliksi, on monimutkainen. DNA:n syntetisointi tapahtuu 5'-päästä 3'-pään suuntaan<sup>3</sup>.

### 2.3.1 Digestio

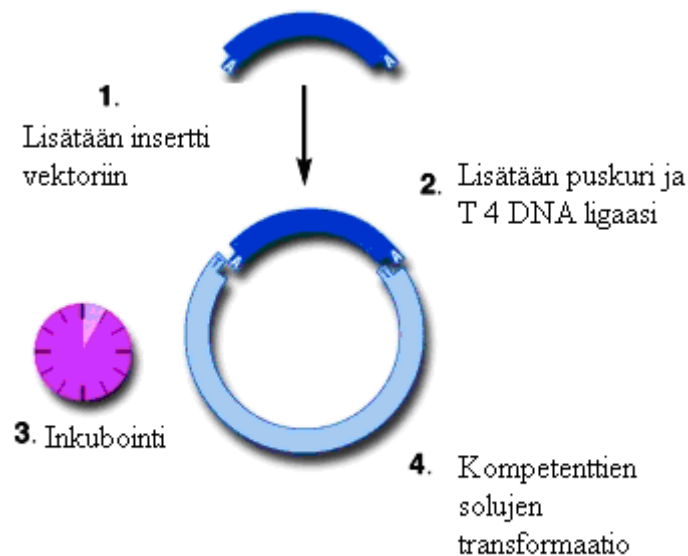
Restriktioentsyymit ovat nukleaaseja ja ne koostuvat sekvenssispesifisistä entsyymeistä, jotka lohkaisevat DNA:n aina, kun se sisältää entsyymin katkaisukohdan kanssa samanlaisen nukleotidisekvenssin. Suurin osa restriktioentsyymeistä tunnistaa vain lyhyen emäsjärjestyksen, yleensä 4-6 nukleotidin parin. Entsyymi sitoutuu DNA:n kanssa näihin kohtiin katkaisten DNA:n, tuottaen samalla 3'-OH ja 5'-P -ryhmiä jokaiseen katkaisukohtaan. Restriktioentsyymeitä on useita satoja ja jokaisella on oma katkaisukohtansa<sup>4</sup>. Geenin kloonauksessa halutaan selvittää kloonatun DNA:n rakenne. Tällöin restriktioentsyymien tunnistuskohtien perusteella muodostetaan restriktiokartta<sup>1</sup>.

### 2.3.2 Ligaatio

DNA-jaksot liitetään toisiinsa kovalenttisillä fosfodiesterisidoksilla. Näitä entsyymejä kutsutaan yleisesti DNA-ligaaseiksi. Tässä työssä käytetty T4 DNA -ligaasi on *E.colin* T4-faagin tuottama entsyymi. Yhteen liitettävien DNA-päiden lisäksi tarvitaan ATP:tä, Mg<sup>2+</sup> -ioneja sekä ditiothreitolilla aikaansaadut pelkistävät olot<sup>2</sup>.

T4 DNA -ligaasi katalysoi fosfodiesterisidosten muodostumista vierekkäisten 5'-fosfaatin ja 3'-hydroksyylipään välillä kaksijuosteisessa DNA:ssa tai RNA:ssa. Entsyymi korvaa yksijuosteiset nauhat kaksijuosteisella DNA, RNA tai DNA-RNA hybridillä, mutta ei omaa aktiivisuutta yksijuosteisissa nukleiinihapoissa. T4 DNA -ligaasi vaatii ATP:tä kofaktoriksi<sup>8</sup>.

Kloonattaessa inserttiä vektoriin, reaktioseokseen lisätään puskuri ja T4 DNA -ligaasi. Inkuboinnin jälkeen plasmidivektorit ovat plasmidin muodossa, jolloin ne voidaan transformoida kompetentteihin soluihin. Vektorin ja insertin liittämistä ligaatioreaktiolla havainnollistaa kuva 2.



Kuva 2: Vektorin ja insertin liittäminen ligaatioreaktiolla.<sup>9</sup>

Ligaation avulla kohessiivisista lineaarisista DNA-paloista valmistetaan rengasmaisia DNA-molekyylejä. Ligaatio on tehontonta erityisesti jos yhdistettäviä DNA-paloja on enemmän kuin kaksi<sup>11</sup>.

### 2.3.3 Defosforylointi

Kun tietyt ligaatiotapahtumat halutaan estää, se voidaan tehdä alkaalisen fosfataasin avulla poistamalla 5'-fosfaatit. Alkaalisena fosfataasina voidaan käyttää bakteerista (BAP) tai vasikan suolesta (CIP) eristettyä fosfataasia. Tässä työssä käytettiin fosfataasina CIP:tä. Tämä tarvitsee toimiakseen  $Mg^{2+}$  lisäksi  $Zn^{2+}$ . Työssä haluttiin estää plasmidivektorin ligaatio itsensä kanssa. Defosforyloimalla saatiin aikaan vierasta DNA:ta sisältäviä vektoreita. Vieraassa DNA-insertissä, tässä tapauksessa insertissä LoxP, on 5'-fosfaatit tallella, jolloin se saadaan sitoutumaan vektoriin<sup>2</sup>.

### 2.3.4 Hybridisaatio

Hybridisaatio liittyy DNA:n emäsparien sidosten vahvuuteen. A-T paria yhdistää kaksi vetysidosta ja G-C paria kolme. Tämän vuoksi ensin mainitut sidokset katkeavat helpommin. Yksiketjuisten nukleiinihappojen yhteenliittymistä kutsutaan hybridisaatioksi<sup>1</sup>.

### 2.3.5 PCR

Polymeraasiketjureaktiossa (PCR) voidaan lisätä DNA:n määrä moninkertaiseksi ilman kloonauksia. PCR kopioi molemmat komplementaariset juosteet halutusta DNA sekvenssistä. Prosessin alussa kaksi DNA-juostetta erotetaan kuumentamalla, jonka jälkeen oligonukleotideja lisätään ylimäärin, ja jäähtyessä DNA-juosteet pitenevät. Tämän jälkeen lämpötila nostetaan jälleen, jolloin synteesi jatkuu<sup>3</sup>.

## 2.4 Transformaatio

Itsestään replikoituvat, rengasmaiset DNA -molekyylit ja niiden transformaatio bakteereihin tulivat tietoon vuonna 1972 Bergin ja hänen työtoveriensä ansiosta.<sup>10</sup>

Plasmidi-DNA:n siirtämistä bakteerisoluihin kutsutaan transformaatioksi. Lineaarinen DNA ei käytännössä transformoidu, ja tämän vuoksi DNA-molekyylit muutetaan ensin plasmideiksi. Työssä käytettiin valmiita kompetentteja soluja XL-1 sekä SS320.

Transformaatioissa kompetenttien solujen joukkoon lisätään transformoitavaa DNA:ta. Työskentely tapahtuu jäällä. Transformaatio saadaan aikaan, kun jääkylmille soluille annetaan lämpöshokki ja kasvatetaan elatusaineessa (LB). Kasvatukset pidetään 37 °C:ssa yhden tunnin ajan, ja tämän jälkeen kasvatukset maljataan selektiivisille maljoille. Näille kasvavista transformanttipesäkkeistä voidaan valmistaa puhtasviljemiä ja edelleen eristää plasmideja<sup>2</sup>.

Bakteerien transformaatioissa bakteerisolut ottavat sisäänsä geenejä vapaista DNA-molekyyleistä ympäröivässä mediumissa. DNA:ta siirtyy vain osaan soluista<sup>4</sup>. Vähemmän kuin yksi  $10^2$ :sta molekyylistä rengasmaista superkoillattua plasmidia voidaan transformoida menestyksekkäästi. Lineaarisilla molekyyleillä tehokkuus on jopa alhaisempi, alle yksi  $10^5$ :sta. Jotta voidaan saavuttaa suuri määrä rekombinanttiklooneja, on välttämätöntä käyttää suuria määriä DNA:ta ligaatioissa<sup>11</sup>.

## 2.5 Agaroosigeelielektroforeesi

Geelielektroforeesilla voidaan analysoida sekä kaksijuosteista että yksijuosteista DNA:ta<sup>4</sup>. Elektroforeesi perustuu varautuneiden partikkelien liikkumiseen sähkökentässä. Makromolekyyleillä on erilainen liikkuvuus riippuen niiden varauksesta, muodosta ja koosta. Nukleiinihapot ja oligonukleotidijuosteet ovat negatiivisesti varautuneita neutraalissa pH:ssa fosfaattiryhmien vaikutuksesta ja kulkevat näin sähkökentän positiivista napaa kohti<sup>3</sup>.

Agaroosigeelissä DNA:n erottuminen perustuu verkkorakenteeseen, jossa pienikokoisin DNA kulkee nopeiten. Erikokoiset DNA-jaksot erottuvat vyöhykkeiksi. Agaroosigeelielektroforeesilla analysoidaan keskikokoisia DNA-jaksoja (n. 0,1-50kb). Jotta DNA havaitaan geelillä, on käytettävä värjäysmenetelmää. Tässä työssä värjäysmenetelmänä oli etidiumbromidi, joka saadaan näkyviin UV-valolla<sup>2</sup>.

Yleisin väliaine on agaroosi tai akryyliamidipolymeeri<sup>3</sup>. Agaroosi on kiehautettaessa veteen liukeneva polysakkaridi, joka jäähtyessään muodostaa geelin<sup>2</sup>. Näytteet pipetoidaan koloihin, jotka muodostuvat väliaineeseen<sup>3</sup>.

## 2.6 Sekvenssointi

Sekvenssointimenetelminä käytetään kemiallista Maxam-Gilbert-menetelmää sekä entsyymaattista Sangerin dideoksimenetelmää. Entsyymaattinen menetelmä on yleisin ja siihen kuuluvat seuraavat vaiheet: templaatti siirretään M-13 faagivektoriin, yksinauhainen DNA-templaatti eristetään, suoritetaan annealing-reaktio, sekä tehdään varsinaiset sekvenssointireaktiot. Sekvenssointireaktiossa alukkeen kiinnittymisen jälkeen muodostuu komplementaarista vastinnauhaa nukleosiditriposfaateista<sup>2</sup>.

Sekvenssoitava DNA sekoitetaan lyhyiden oligonukleotidien kanssa, jotka toimivat alukkeina komplementaarisen juosteen valmistuksessa. Reaktioseokset sisältävät kaikkia neljää deoksiribonukleosiditriposfaattia (dNTP) sekä pieniä määriä fluoresoivia dideoksinukleotideja<sup>3</sup>. Seosten DNA denaturoidaan ja analysoidaan sekä sekvenssi luetaan ja talletetaan tietokoneelle<sup>2</sup>.

## 3 KONKATAMEERIN TUOTTO RCA -MENETELMÄLLÄ

*In vitro* -evoluutiotekniikoihin perustuva proteiiniimuokkaus vaatii yleensä laajojen rekombinantti-DNA-kirjastojen kehittämistä. Ideana on valikoida vaihtoehtoisten kloonien joukosta halutun ominaisuuden suhteen parantunut klooni. Menetelmää voidaan soveltaa mm. teollisuusentsyymien ja vasta-aineiden kehittämisessä. Geenivariantit on yleensä kloonattu fagi- tai plasmidi-vektoreihin. Kiinnostuksen kohteena ovat myös ilmentyvän geenin aiheuttamat isäntäorganismin ilmiasun muutokset, sekä esimerkiksi antibioottiresistenttiyttä aiheuttavien proteiiniuunnosten tutkiminen<sup>11</sup>.

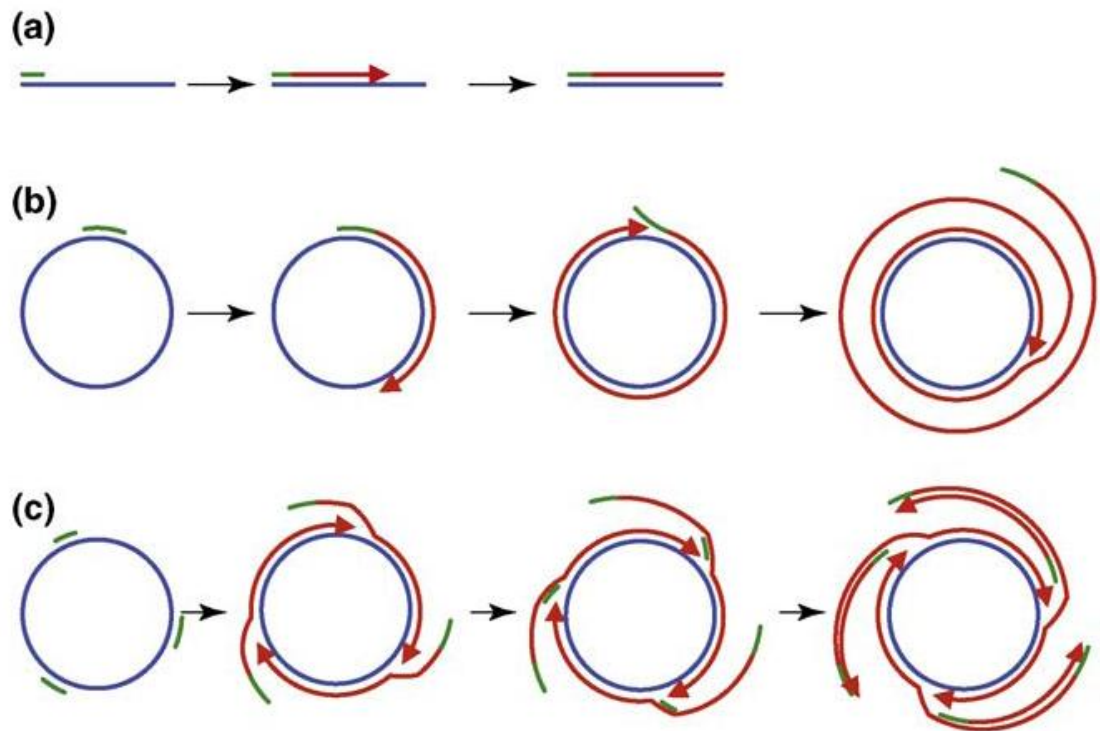
Kohdegeenit lisätään yleensä rengasmaisiin vektoreihin, monistetaan biologisessa isäntäorganismissa ja eristetään fysikaalisin menetelmin. Luonnossa rengasmaisen DNA:n kahdentuminen tapahtuu silmukoimismenetelmällä<sup>15</sup>. RCA:ta on testattu *in vitro* vuodesta 1989 alkaen, käyttäen useita DNA polymeraaseja ja erilaisia



rengasmaisia DNA-templaatteja. Monialukkeinen monistusmenetelmä on todettu erittäin tehokkaaksi<sup>13</sup>.

RCA -menetelmässä DNA-juoste syrjäyttää 5'-pää. Kun DNA-synteesi ja syrjäyttäminen jatkuvat, entsyymi tuottaa yksijuosteista, komplementaarista konkatameeria rengasmaisesta templaattista<sup>14</sup>. Monistus johtaa lineaariseen kaksinauhaiseen DNA-konkatameeriin, jossa jokainen aluke on monena toistuvana kopiona. Monistettu DNA-konkatameerikin toimii templaattina tehostaen DNA:n monistumista edelleen monimutkaiseksi vyyhdeksi. Menetelmällä on tuotettu suuri määrä lineaarista DNA:ta sekvensointiin ja hybridisaatioon sopivaksi<sup>11</sup>.

Kahdentumisessa DNA-polymerisaatio aloitetaan terminaalilla proteiinilla, joka on ensin kovalenttisesti liitetty nukleotidiin ja sitten käytetty alukkeena lineaarisen kaksijuosteisen DNA-genomin kahdentumiseksi. Jos kaksijuosteisia alueita esiintyy templaattimolekyylissä, komplementaarinen juoste korvataan ja DNA-synteesi jatkuu. Kun käytetään rengasmaisia molekyyliä templaatteina, suuret konkatameeriset molekyylit tuotetaan korvaamalla uudesti syntetisoitu juoste yhden molekyylireplikaatiokierroksen jälkeen ja jatkuva synteesi tuottamalla uusia kopioita templaattisekvensistä<sup>13</sup>. RCA -menetelmää havainnollistaa kuva 3.



Kuva 3: RCA -menetelmän periaate. Sininen viiva tarkoittaa DNA-sekvenssejä, vihreät viivat esittävät oligonukleotidialukkeita ja punaiset valmistettua DNA:ta. a. lineaarinen templaatti ja yksittäinen aluke. Alukkeen sitomisen jälkeen polymeeraasi valmistaa yhtä komplementaarista juostetta. b. rengasmainen templaatti ja yksittäinen aluke. Polymeeraasi valmistaa komplementaarista juostetta aloittaen sidotusta alukkeesta. Yhden kierroksen jälkeen aluke ja valmistettu juoste on korvattu ja DNA-synteesi jatkuu. Tällä tavoin pitkä konkatameerinen yksijuosteinen DNA on valmistettu. c. rengasmainen templaatti ja satunnaiset moninkertaiset alukkeet. Synteesi aloitetaan sitomalla moninkertaiset alukkeet templaattiin. DNA-synteesin avulla juosteen korvaus tehdään kuten kohdassa b. Alukkeet ovat edelleen läsnä reaktioseoksessa sitoutuneena korvautuneeseen juosteeseen ja niitä käytetään lisäämään aloituskohtia DNA:n monistusta varten. Moninkertaiset tuotteet ovat pitkiä konkatameerisia molekyylejä kaksijuosteista DNA:ta<sup>13</sup>.

Rengasmainen templaatti on vain osittain kaksijuosteinen monistumisen aikana, jolloin tuotteen juoste korvataan alkaen silmukasta. Polymeeraasi ei kulje kahdentumisessa rengasmaista templaattia pitkin vaan rengasmaisen templaatti on kierteinen molempiin suuntiin. Nilson *et al.* saivat selville, että koettimet ovat huonoja templaatteja RCA:lle niin kauan kun ne ovat kiinnitettynä pitkiin kohdejuosteisiin, mutta niistä saadaan restriktioentsyymien avulla tehokkaita alukkeita jos niiden loppuosa on samankaltainen kuin kohdejuosteen sitoutumiskohta<sup>12</sup>.

DNA -ligaaseissa entsymaattinen toiminta on hyvin herkkä yhteensopimattomuudelle. Silmukoimisreaktio on spesifinen, se voi tapahtua ainoastaan koettimien hybridisaatiolla kohdesekvenssiin<sup>12</sup>. Restriktiodigestion jälkeen DNA-palaset voidaan liittää ligaatiolla. Ligaatiotuotetta voidaan monistaa heksameerialukkeiden ja Phi29 DNA -polymeraasin avulla hauduttamalla reaktiota 30 °C:ssa yön yli, jolloin RCA -mekanismi muodostaa konkatameerista ligaatiotuotetta. Lineaariset konkatameerit leikataan restriktioendonukleaseilla ja plasmidit silmukoidaan ligoimalla ne uudelleen itsensä kanssa alhaisessa DNA-konsentraatiossa<sup>11</sup>.

Kun monistustehokkuus heikkenee silmukoidun DNA-templaatin pidentyessä, on RCA epäsopivampi suuremmille genomeille. Erittäin pitkien rengasmaisten templaattien RCA:n monistustehokkuus voidaan olettaa olevan samanlainen kuin lineaarisilla molekyyileillä<sup>13</sup>. Monen isäntäorganismien suhteen konkatameerin silmukointi lisää transformaatiotehokkuutta. Tosin toiset organismit – kuten hiiva – saattavat olla suoraan transformoituvia lineaarisella DNA:lla<sup>11</sup>.

RCA -menetelmää on sovellettu myös sellaisten virusten tutkimukseen, joiden DNA on rengasmaista. Monia uusia viruksia on löydetty. Tähän asti RCA -tekniikkaa on sovellettu onnistuneesti kuudesta tunnetusta virusperheestä peräisin oleville viruksille. Voitaisiin olettaa, että RCA sopii myös muille virusperheille, joilla on rengasmaisen DNA<sup>13</sup>.

Sato *et al.* saivat toistamalla kolmesti RCA-reaktiota tuloksen, jonka mukaan suunnilleen  $4,7E+09$  -kertainen DNA:n monistus on mahdollinen ilman nukleotidimuutoksia. Sato *et al.* havaitsivat myös, että monistustuotteet toimivat hyvin transformoiduissa soluissa<sup>14</sup>.

RCA -menetelmällä voidaan saada aikaan 10 000 -kertainen monistus. Tämä poistaa pidennysreaktioiden ja perinteisten DNA-eristysmenetelmien tarpeen. Reaktiotuotteet voidaan sekvenssoida fosfataasikäsittelyn jälkeen. Tuotteet voidaan käyttää myös *in vitro* kloonaukseen, kirjaston valmistamiseen, ja muihin molekyylibiologian sovellutuksiin<sup>15</sup>.

RCA:ssa käytettävä bakteriofagi Phi29 DNA -polymeraasi monistaa rengasmaista DNA:ta ja lisää siten näytteestä saatavien transformanttien määrää. RCA -menetelmä mahdollistaa nopean geenikirjaston kehittämisen pienestä määrästä DNA:ta. Esimerkiksi Christin *et al.* tutkimuksessa osoitettiin, että kun testattiin rinnakkain alkuperäistä ja RCA-monistettua vasta-ainegeenikirjastoa, monistetusta kirjastosta saatiin luotua laajempi fagivasta-ainekirjasto. Laajennetusta kirjastosta pystyttiin eristämään useampia erilaisia kohdeantigeenia tunnistavia vasta-aineita kuin alkuperäisestä. Siten Phi29 DNA -polymeraasin avulla voidaan lisätä kloonien määrää ja ylläpitää geenikirjaston monimuotoisuutta<sup>11</sup>.

RCA -menetelmän etu on se, että se ei vaadi lämpösyklilaitetta. Lämmittäminen inaktivoi nukleaaseja, vapauttaa DNA:n soluista ja denaturoi DNA:n sallien annealing-reaktion. Ylihaaroittunutta RCA:ta tuotetaan kahden alukkeen avulla. Aikaisemmin RCA:ta on käytetty lisäämään pieniä DNA silmukoita, maksimissaan 100 nt pituisia. Plasmidin kokoisten kohteiden kopiointitehokkuus on normaalisti vain noin 20 kopiota tunnissa. Monikertaisesti alukkeistettu RCA ja rengasmaisen templaatti tuottavat moninkertaisia kahdentumishaarukoita. Rengasmaisen vektorin monistus on erittäin selektiivinen, joka tekee siitä tehokkaan<sup>15</sup>.

### 3.1 Komponentit

RCA -menetelmä vaatii toimiakseen Phi29 DNA -polymeraasia, dNTP:tä sekä satunnaissekvenssiä sisältäviä heksanukleotidialukkeita.

Phi29 DNA -polymeraasi voi monistaa ligaatioreaktion DNA:n *in vitro* ilman mitattavaa systemaattista virhettä tuottaen milligrammamäärän DNA:ta ja mahdollisesti lisääntyvän määrän transformantteja<sup>11</sup>. Phi29 DNA -polymeraasi on replikoituva polymeraasi, joka on peräisin *Bacillus Subtilis* -fagista phi29<sup>16</sup>. Se kuuluu B-perheeseen replikoituvia polymeraaseja ja koostuu yksittäisestä proteiinista, jonka molekyylimassa on 68 kDa<sup>13</sup>.

Phi29 DNA -polymeraasi koostuu yhdestä polypeptidistä, joka kykenee liittämään yli 70 000 nt kasvavaan juosteeseen yhdessä polymerisaatiotapahtumassa eli irtautumatta välillä DNA:sta. Phi29 DNA -polymeraasilla on erinomainen juosteen korvausaktiivisuus, stabiilius ja lineaarinen reaktiokinetiikka: 30 °C:ssa yli 12 tuntia. Phi29 DNA -polymeraasin stabiilius sallii tehokkaan DNA synteesin jatkumisen usean tunnin ajan. Phi29 DNA -polymeraasilla on tehokas eksonukleaasiaktiivisuus, jonka estämiseksi käytetään fosfotioaattisidoksia sisältäviä alukkeita<sup>15</sup>.

Transformoitavan DNA:n lisäämiseksi voidaan käyttää bakteriofagi Phi29 DNA -polymeraasia. Entsyymi lisää rengasmaista DNA:ta lyhyiden lineaaristen DNA -molekyylien kustannuksella jopa suoraan ligaatioreaktiosta. Phi29 DNA -polymeraasi pystyy syrjäyttämään polymerisaation yhteydessä edellä olevaa 5'-juostetta ja syntetisoimaan uuden juosteen tilalle. Korkeina pitoisuuksina lyhyet synteettiset oligonukleotidit vastinpariutuvat riittävässä määrin toimiakseen alukkeina phi29 DNA -polymeraasille<sup>11</sup>.

Satunnaissekvenssiä sisältävät heksanukleotidialukkeet (random hexamers) ovat sekoitus yksijuosteisia satunnaisia heksanukleotidejä 5'- ja 3'-hydroksyyli-päillä. Alukkeet on tarkoitettu käyttövalmiiksi. Ne ovat eksonukleasiresistantteja ja valmistettu käyttämällä tiofosfaattisidoksia. Dean *et al.* saivat tutkimuksessaan selville, että eksonukleasiresistanttien alukkeiden avulla RCA:n tuotto lisääntyi käytettäessä 5u Phi29 DNA -polymeraasin määrää. Heksanukleotidialukkeita ei tarvitse poistaa ennen sekvenssointia, koska ne eivät pidenny nostetuissa lämpötiloissa, joita käytetään sekvenssointireaktioissa. Satunnaissekvenssiä sisältävien heksanukleotidialukkeiden käyttö 3'-tiofosfaatti-suojatuilla päillä on myös tärkeää, sallien rengasmaisten DNA-molekyylien valmistuksen suojaamalla alukkeet 3'-pään eksonukleasiaktiivisuudelta<sup>15</sup>.

Heksanukleotidialukkeet sallivat molempien juosteiden syntetisoinnin, tuottaen kaksijuosteista DNA:ta<sup>15</sup>. Heksanukleotidialukkeet sitoutuvat denaturoituun rengasmaiseen templaattiin sallien Phi29 DNA -polymeraasin toiminnan. Reaktion

keskimääräinen tuotteen pituus on arvioitu suuremmaksi kuin 40 kb ja sillä voidaan monistaa koko genomi<sup>14</sup>.

## 4 REKOMBINAATIO

Rekombinaatiomenetelmää ja sen sovelluksia voidaan käyttää hyödyksi fagi-vasta-ainekirjastojen luomisessa. Kun useita nukleiinihappomolekyylejä tuodaan yksittäiseen soluun, spesifinen rekombinaatio voidaan saada aikaan jos nukleiinihappomolekyylit sisältävät kohdan spesifiselle rekombinaatiolle. Työssä hyödynnettiin tätä ominaisuutta, jolloin cre-rekombinaasi tunnisti loxP-kohdan. Bakteerien avulla voidaan ilmentää rekombinaasia, joka toimii näissä halutuissa kohdissa<sup>17</sup>.

Ensimmäisen kerran *in vivo* rekombinaatiota käytettiin fagi-vasta-ainekirjastojen luomisessa vuonna 1993 ja myöhemmin sitä sovellettiin Fab-kirjaston luomisessa. Tyrosiinirekombinaaseihin kuuluu yli 100 entsyymiä, mukaan lukien lambda-integraasi ja cre-rekombinaasi. Näitä molempia käytetään laajojen vasta-ainekirjastojen luomisessa<sup>17</sup>.

Vasta-aineita on saatu fagi-vasta-ainekirjastoista. Fagit ja bakteerit vältetään kokonaan valmistamalla kirjasto *in vitro*, käyttäen menetelmää jossa mRNA käännetään proteiineiksi. Toinen vaihtoehto on käyttää fagia, mutta kloonauksen sijaan tehdä se käyttämällä *in vivo* rekombinaatiota. Kun nukleiinihappomolekyylejä siirretään yksittäiseen soluun, rekombinaatio voidaan indusoida jos nukleiinihappomolekyylit sisältävät loxP-kohdat. Rekombinaatiolle välttämätön on rekombinaation lokus, lox, sekä P1 tai P2 geeni, joka aiheuttaa rekombinaation<sup>17</sup>.

Sblattero *et al.* loivat geenikirjaston transformoimalla bakteerit plasmideilla, jotka sisälsivät raskaan ketjun kirjaston. Ne infektoitiin fagilla, joka sisälsi kevyen ketjun kirjaston. Koska rekombinaatio toimii identtisen tunnistuskohdan kanssa, he saivat raskaan ketjun yhdistettyä kirjaston kevyen ketjun kanssa. Yhdistämällä kevyen ja

raskaan ketjun geenit rekombinaation avulla solussa saatiin aiempaa suurempi kirjasto aikaiseksi. Tämä perustui siihen, että kaksi eri fagimidivektoria saatiin yhteen soluun<sup>17</sup>.

Missirlis *et al.* loivat tutkimuksessaan synteettiset loxP oligonukleotidit, jotka sisälsivät yhdistelmän käännettyjä toistettuja mutaatioita sekä mutanttisekvenssejä. He havaitsivat, että lisääntynyt guaniinipitoisuus tuotti enemmän rekombinaatioita. Cre-rekombinaasille suosituin sekvenssi oli GGGTAGGN<sup>18</sup>.

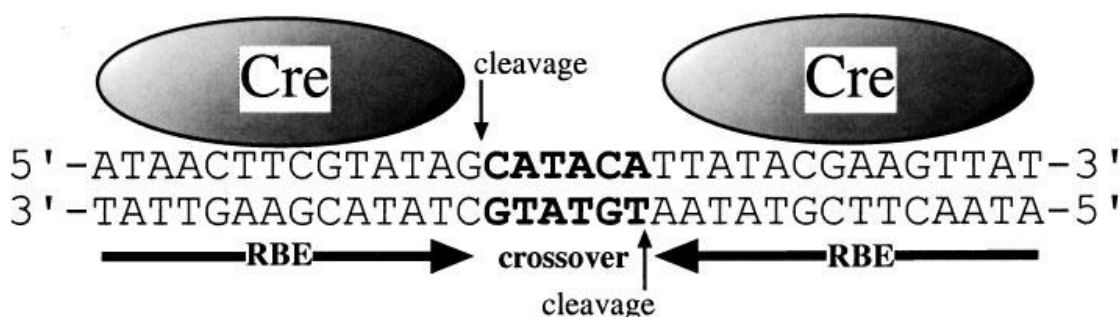
Sheren *et al.* käyttivät tutkimuksessaan satunnaistettua kirjastoa lox sekvenssin ominaisuuksien tunnistamiseen. He testasivat rekombinaation *in vivo* ja *in vitro* satunnaistetulla kirjastolla. Tulokset osoittivat, että vain kolme villityypin loxP nukleotidipositiota ovat välttämättömiä onnistuneeseen rekombinaatioon bakteereissa. Heidän tutkimuksessaan G- rikkaat sekvenssit eivät kuitenkaan olleet tehokkaimpia toisin kuin Missirliksen *et al.* tutkimustulokset osoittivat<sup>19</sup>.

#### 4.1 Cre-rekombinaasi

Cre-rekombinaasi on eristetty bakteriofagista P1 tai P2 ja se tunnistaa erityisen kohdesekvenssin nimeltä loxP, jossa rekombinaasin sitominen ja juosteen korvaus tapahtuu. Cre-loxP viittaa prosessiin, jossa kaksi loxP sekvenssiä ja cre-rekombinaasiproteiini saavat aikaan paikkasidonnaisen rekombinaation<sup>18</sup>.

Cre-rekombinaasi on I tyypin topoisomeraasi, joka katalysoi DNA:n rekombinaatiota loxP-kohtien välillä. Entsyymi ei vaadi energiaa kofaktoreilta ja rekombinaatio saavuttaa nopeasti tasapainon substraatin ja reaktiotuotteiden välillä. LoxP-tunnistuselementti on 34 emäsparin sekvenssi. Rekombinaation tuotteet riippuvat lox-kohtien sijainnista ja keskinäisestä järjestyksestä. Kaksi DNA-juostetta yksittäisillä lox-kohdilla fuusioituvat keskenään. Rengasmaisessa muodossa toistettujen lox-kohtien välillä oleva DNA leikataan pois<sup>20</sup>.

LoxP-kohdat koostuvat kahdesta rekombinaasin sitomiselementistä (RBE). Fosforyylin siirto substraattien välillä tapahtuu 6 bp crossover-alueella (kuva 4). Cre-rekombinaasisysteemin yksinkertaisuus on johtanut sen laajalle levinneeseen käyttöön DNA-molekyylien muokkauksessa. Cre-rekombinaasi on kaksidomeeninen proteiini kierteisillä N-terminaalisilla domeeneilla ja suuremmalla, pääasiassa kierteisellä C-terminaali domeenilla. Paikkakohtaiset rekombinaasit katalysoivat DNA:n uudelleenjärjestymistä, joka on ratkaisevaa useissa tärkeissä biologisissa toiminnoissa. Cre-rekombinaasin tehtävä on lineaarisen genomin ja dimeeristen kromosomien muodostumisen loppuminen DNA:n kahdentumisessa<sup>21</sup>.



Kuva 4: Cre-rekombinaasin sitomiskohdat. 34 bp kokoinen loxP koostuu kahdesta 14 bp rekombinaasin sitomiskohdasta (RBE), joihin cre-rekombinaasi sitoutuu. Restriktiokohdat (cleavage) ovat crossover- alueen yhteydessä<sup>21</sup>.

## 4.2 Sovellukset

Rekombinaation sovelluksia ovat hiirimallit sekä vasta-ainekirjastot. Hiiret ovat avaintekijöitä alkionkehityksen ja tautien tutkimuksessa. Nisäkkäiden genomien muokkaamiseen liittyy usein rekombinaatiovälitteinen geenin kohdistus tai satunnainen integraatio paikkasidonnaisilla rekombinaatiotapahtumilla<sup>22</sup>.

Cre-rekombinaasia on käytetty laajalti koe-eläinten genomin tutkimiseen. Sen hyödyllisyys on kuitenkin rajallinen tehokkaan aktiivisuuden seurannan puutteesta johtuen. Jullien *et al.* kehittivät käsitteellisesti uuden lähestymistavan säädellä cre-rekombinaasin toimintaa – tätä kutsutaan nimellä dimerisoitu cre tai DiCre. Se perustuu cre-rekombinaasin halkaisuun kahdeksi inaktiiviseksi molekyyliksi ja niiden yhdistämisestä. Ligandin aiheuttama dimerisoituminen on tehokas tapa säädellä



rekombinaasin aktiivisuutta alhaisella taustan aktiivisuudella, jolloin saadaan aikaan hyvin tehokas rekombinaatio. Jullien *et al.* hiirikokeissa siirrettiin DiCre hiiren Rosa26 lokukseen. Hiiri oli risteytetty indikaattorihiiressä ja cre-peräinen rekombinaatio tutkittiin seuraamalla DiCre-aktiivisuutta rapamysiinillä sikiön kehityksen aikana tai syntymän jälkeen jälkeläisistä. Tuloksien karakterisointi tehtiin sekä fluoresenssilla että indusoimalla ja uhraamalla indusoidut hiiret<sup>23</sup>.

Vasta-ainekirjastot ovat tärkeitä yhdistelmä-DNA-tekniikan työkaluja. DNA-kirjastoja ovat sekä genominen DNA-kirjasto että mRNA:sta tehdyt cDNA-kirjastot. Kirjastoista, joiden tulee olla mahdollisimman kattavia, voidaan seuloa geenejä tai DNA-jaksoja. Valmistettuja kirjastoja voidaan säilöä ja käyttää tarvittaessa myöhemmin<sup>24</sup>.

Mitä laajempi kirjasto on, sitä yhdenmukaisempia valitut vasta-aineet voivat olla. Tarkoituksenmukaiseen käyttöön hyödyllinen kirjasto vaatii lähes  $10^9$  toisistaan riippumatonta kloonia<sup>17</sup>. DNA-geenikirjastojen koko on usein rajallinen ligation epätehokkuuden takia, sekä lineaarisen DNA:n heikon transformaatiotehokkuuden vuoksi<sup>11</sup>.

Organismin koko genomi voidaan nykyään saada talteen, jolloin tuloksena on DNA-kirjasto. Kokonainen kirjasto voidaan säilyttää tulevaisuuden käyttöä varten, tai yksittäinen kloni voidaan valita jatkotutkimuksiin. Kokonaisen DNA-kirjaston rakentaminen voi olla melko työlästä<sup>3</sup>.

## 5 TYÖN SUORITUS

### 5.1 Kloonaus

Työssä digestoitii ensin vektoriplasmidi. Tämän jälkeen vektoriplasmidille tehtiin fosfataasikäsittely, jotta se ei liittyisi yhteen itsensä kanssa. Tässä työssä ei tarvinnut pilkkoa kiinnostuksen kohteena olevaa DNA:ta inserttiä valmistettaessa, vaan se valmistettiin oligonukleotideista hybridisoimalla LoxP1\_for ja LoxP1\_rev (suora ja käänteinen orientaatio) sekä LoxP2\_for ja LoxP2\_rev (suora ja käänteinen orientaatio).

#### 5.1.1 Vektorin digestio

Plasmidin DNA-pitoisuus mitattiin Nanodrop-laitteella, joka antoi DNA:n pitoisuudeksi 604ng/  $\mu$ l. Tämän perusteella valmistettiin reaktioseokset digestiota varten kuten taulukoissa 1 ja 2.

*Taulukko 1: HindIII digestiot.*

Reagenssi	Pipetoitava määrä $\mu$
DNA	5
Puskuri Red 10x	5
H <sub>2</sub> O	39,5
HindIII 10 U/ $\mu$ l	0,5
Yht.	50

*Taulukko 2: BsmI digestiot.*

Reagenssi	Pipetoitava määrä $\mu$
DNA	5
PuskuriIII NE 10x	5
H <sub>2</sub> O	39,5
Nb.BsmI 10 U/ $\mu$ l	0,5
Yht.	50

Tämän jälkeen siirrettiin HindIII-digestoidut putket 37 °C:een ja BsmI-digestoitu putki 65 °C:een. Lämpöinaktivointi oli 20min 80 °C, jonka jälkeen putket siirrettiin jäälle.

#### 5.1.2 LoxP-insertin hybridisaatio ja vektorin fosforylointi

HindIII-digestoidulle plasmidille tehtiin alkaalinen fosfataasi lisäämällä 1 µl CIAP. Reaktiota jatkettiin 37 °C:ssa 30 minuutin ajan. Inaktivointi tehtiin 85 °C:ssa 15 minuutin ajan.

Reaktioseokselle suoritettiin PCR-puhdistus seuraavan ohjeen mukaan.

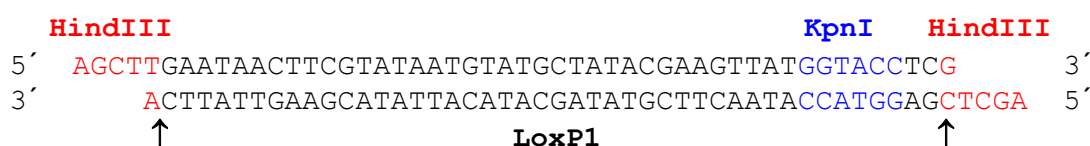
1. Lisättiin viisinkertainen tilavuus puskuria PB näytemäärään nähden ja sekoitettiin.
2. Koska pH-indikaattori oli lisätty puskuriin PB, tarkistettiin että seos oli väriltään keltainen.
3. Laitettiin pylväs 2 ml keräysputkeen.
4. DNA:n sitomiseksi siirrettiin näyte pylvääseen ja sentrifugoitiin 30–60 s.
5. Hävitettiin läpivirtaama. Sijoitettiin pylväs takaisin samaan keräysputkeen.
6. Pesuvaiheessa lisättiin 0,75 ml puskuria PE pylvääseen ja sentrifugoitiin 30–60 s.
7. Hävitettiin läpivirtaama ja sijoitettiin pylväs takaisin samaan keräysputkeen. Sentrifugoitiin 1 min.
8. Sijoitettiin pylväs puhtaaseen 1,5 ml eppendorf-putkeen.
9. DNA:n irrottamiseksi pylväästä lisättiin 50 µl puskuria EB pylvään kalvon keskelle ja sentrifugoitiin 1 min.<sup>5</sup>

Oligonukleotideista valmistettiin reaktioseokset taulukon 3 mukaan.

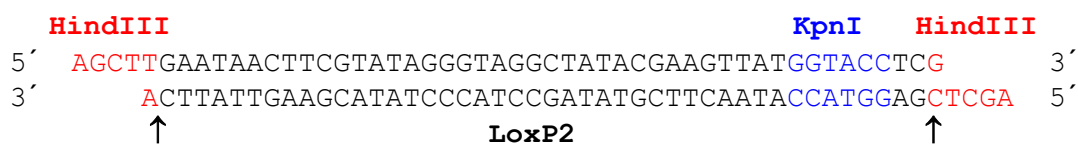
Taulukko 3: Oligonukleotidien reaktioseokset.

Reagenssi	Pipetoitava määrä $\mu$
LoxP1_for/ LoxP1_rev/ LoxP2_for/ LoxP2_rev	5
Puskuri T4 PNK 10 x	2,5
ATP 10 $\mu$ M	2
H <sub>2</sub> O	14,5
T4 PNK 100 / $\mu$ l	1
Yht.	25

Reaktioseokset käsiteltiin 37 °C:ssa 30 minuutin ajan. Inaktivointi tehtiin 70 °C:ssa 10 minuutin ajan. Tämän jälkeen yhdistettiin LoxP1\_for ja LoxP1\_rev sekä LoxP2\_for ja LoxP2\_rev. LoxP1 ja LoxP2 hybridisoitiin PCR-laitteella aloituslämpötilalla 95 °C ja loppulämpötila oli 16 °C (-1°C/ min 79x). Kuvioissa 1 ja 2 on LoxP1- ja LoxP2-insertit hybridisoituna.



Kuvio 1: LoxP1-insertti, jossa on hybridisoitu yksijuosteisten nauhojen suora- ja käänteinen orientaatio. HindIII ja KpnI -restriktiokohdat näkyvät kuviossa.



Kuvio 2: LoxP2- insertti, jossa on hybridisoitu yksijuosteisten nauhojen suora- ja käänteinen orientaatio. HindIII ja KpnI restriktiokohdat näkyvät kuviossa.

### 5.1.3 Separatiivinen agaroosigeelelektroforeesi

Valmistettiin 80 ml agaroosigeeleä (LIITE1), jolle ladattiin näytteiksi:

1. DNA kokostandardi 10 µl
2. CIAP-käsitelty HindIII-digestoitu plasmidi PIX/PAK100
3. CIAP-käsitelty HindIII-digestoitu plasmidi PIX/PAK100r

Halutut bändit leikattiin agarosigeeliltä ja niille tehtiin DNA:n puhdistus seuraavan ohjeen mukaisesti.

1. Poistettiin DNA agarosigeelistä puhtaan ja terävän skalpellin avulla.
2. Määritettiin geelin massa punnitsemalla, jonka jälkeen lisättiin näytetilavuuteen nähden kolminkertainen tilavuus puskuria QG.
3. Haudutettiin 50 °C:ssa 10 min, tai kunnes geeli oli kokonaan liuennut. Geelin liukenemista pystyi auttamaan vorteksoimalla putkea 2-3 minuutin välein hauduttamisen lomassa.
4. Kun geeli oli täysin liuennut, tarkastettiin että väri oli keltainen.
5. Lisättiin näytetilavuuteen nähden yksinkertainen tilavuus isopropanolia ja sekoitettiin.
6. Laitettiin pylväs 2 ml keräysputkeen
7. DNA:n sitomiseksi siirrettiin näyte pylvääseen ja sentrifugoitiin 60 s.
8. Hävitettiin läpivirtaama. Sijoitettiin pylväs takaisin samaan keräysputkeen.
9. Lisättiin 0,5 ml puskuria QG pylvääseen ja sentrifugoitiin 60 s.
10. Pesuvaiheessa lisättiin 0,75 ml puskuria PE pylvääseen ja sentrifugoitiin 1 min.
11. Hävitettiin läpivirtaama ja sentrifugoitiin pylvästä 1 min (13 000 rpm).
12. Sijoitettiin pylväs puhtaaseen 1,5 ml eppendorf-putkeen.
13. DNA:n irrottamiseksi lisättiin 50 µl puskuria EB pylvään kalvon keskelle ja sentrifugoitiin 1 min.<sup>5</sup>

Näille agarosigeeliltä eristetyille näytteille suoritettiin Nanodrop-mittaus, joka antoi tulokseksi CIAP-käsitellyille ja HindIII-digestoiduille plasmideille PIX/PAK100-HindIII-CIAP 34,8 ng/µl ja PIX/PAK100r-HindIII-CIAP 11,1 ng/µl pitoisuudet.

#### 5.1.4 Ligaatio

Geelieristetyille digestoiduille näytteille tehtiin ligaatio kuten taulukoissa 4 ja 5.

*Taulukko 4: Plasmidin pIX/PAK100 ligaatioreaktio.*

Reagenssi	$\mu\text{l}$	Kontrolli
PIX/PAK100-HindIII-CIAP	2	2
LoxP1/ LoxP2	6	
Puskuri T4	1	1
H <sub>2</sub> O	0,5	6,5
T4 DNA ligaasi	0,5	0,5
Yht.	10	10

*Taulukko 5: Plasmidin pIX/PAK100r ligaatioreaktio.*

Reagenssi	$\mu\text{l}$	Kontrolli
PIX/PAK100r-HindIII-CIAP	3	3
LoxP1/ LoxP2	3	
Puskuri T4	1	1
H <sub>2</sub> O	2,5	5,5
T4 DNA ligaasi	0,5	0,5
Yht.	10	10

Molemmat reaktiot tehtiin sekä laimennetuilla että laimentamattomilla inserteillä. Inserttien laimennos oli 1:1000. Ligaatio tehtiin huoneenlämmössä 60 minuutin ajan, jonka jälkeen se inaktivoitiin 70 °C:ssa 5 min ajan.

#### 5.1.5 Transformaatio

Ligaatiotuotteita transformoitiin kompetentteihin soluihin siirtämällä ensin kompetenttejä soluja ja ligaatiotuotetta elektroporauskyvettiin. Kyvetille annettiin sähköshokki ja suspensoitiin solut 1 ml SOC-mediumiin (LIITE1), joka siirrettiin falcon-putkeen. Kasvatus tehtiin 37 °C:ssa 60 minuutin ajan, 300 rpm ravistelulla. Laitteen asetukset olivat 1250 W, CAP 25  $\mu\text{FD}$ , sekä R 200  $\Omega$ .

Esikasvatuksen jälkeen suspensio maljattiin LA-maljoille, 100  $\mu\text{l}$  per malja. Kasvatettiin 37 °C:ssa yön yli.

Maljoilta siirostettiin pesäkkeitä LB-mediumiin (LIITE1) ja näistä tehtiin plasmidi-DNA:n puhdistus.

Transformaatio tehtiin haluttuja plasmideja valmistettaessa että rekombinaation jälkeen. Rekombinaation jälkeen laimennoksia valmistettiin 0, -1, -2, -3, joita maljattiin 100 µl LA-maljoille.

#### 5.1.6 Agaroosigeelielektroforeesi

Valmistetuista näytteistä tehtiin KpnI-Cfr42I-digestio 37 °C:ssa 2 tunnin ajan. Reaktioseoksen ohje on taulukossa 6. Reaktiosta valmistettiin 14-kertainen reaktioseos puskurista ja entsyymeistä. Reaktioseosta pipetoitiin ensin 15 µl ja DNA:ta 5µl, mutta reaktioita jouduttiin vielä jatkamaan 5 µl DNA ja 5 µl reaktioseosmäärillä, jotta saatiin aikaan täydellinen digestio.

*Taulukko 6: KpnI–Cfr42I-reaktioseos (1 x).*

Reagenssi	µl
Puskuri KpnI	0,5
H <sub>2</sub> O	3,7
Cfr42I	0,4
KpnI	0,4
Yhteensä	5

#### 5.1.7 Miniprep -eristykset ja sekvenssointi

Agaroosigeelielektroforeesin perusteella valittiin sekvenssoitaviksi halutut näytteet. Näytteistä valittiin jatkokäsittelyyn kiinnostavimmat.

Näytteille tehtiin miniprep -eristykset yön yli kasvatetuista soluviljelmistä. Soluviljemät oli tehty LA-maljoilta siirostamalla ja kasvattamalla ne 5 ml tilavuudessa LB- mediumia.

1. Suspensoitiin pelletöidyt bakteerisolut ja 250 µl puskuria P1. Siirrettiin eppendorf-putkeen.
2. Lisättiin 250 µl puskuria P2 ja sekoitettiin kääntelemällä ylösalaisin 4-6 kertaa.
3. Lisättiin puskuri N3 ja sekoitettiin välittömästi kääntelemällä putkea ylösalaisin 4-6 kertaa.
4. Sentrifugoitiin 10 min 13 000 rpm.
5. Siirrettiin supernatantti keräyspylvääseen dekantoimalla tai pipetoimalla.
6. Suoritettiin pesu lisäämällä puskuria BP ja sentrifugoitiin 60 s. Hävitettiin läpivirtaama.
7. Pestiin lisäämällä 0,75 ml puskuria PE ja sentrifugoitiin 60 s.
8. Hävitettiin läpivirtaama ja sijoitettiin pylväs takaisin samaan keräysputkeen. Sentrifugoitiin 1 min pesupuskurin poistamiseksi.
9. Sijoitettiin pylväs puhtaaseen 1,5 ml eppendorf-putkeen. DNA:n irrottamiseksi lisättiin 50 µl puskuria EB pylvään kalvon keskelle, seisotettiin 60 s ja sentrifugoitiin 1 min ajan.<sup>6</sup>

Valitut näytteet sekvenssoitiin. Reaktioseoksen primerina käytettiin EB133 0,6 µl/ näyte ja vesi 4,4 µl/ näyte, sekvenssointinäytteeseen 1 µl DNA:ta. Mikäli EB133 antoi epäselvän tuloksen ja sekvenssointi uusittiin samalle näytteelle, käytettiin primeria pAK400r.

## 5.2 Menetelmien vertailu

Tuotettiin ensin konkatameeria, josta valmistettiin ohjeiden mukaisesti joko digestio-ligaatio- tai rekombinaatioreaktio. Pelkkää konkatameerista lineaarista RCA-tuotetta pidettiin kolmantena testattavana menetelmänä. Kaikki näytetyypit transformoitiin kuten aiemmin ja lisäksi näytteistä tehtiin agaroosigeelielektroforeesi.

### 5.2.1 Konkatameerin tuotto

Tehtiin varsinaisia testauksia varten konkatameeria RCA-reaktiolla taulukon 7 mukaan.



*Taulukko 7: Konkataameerin tuotto 30 °C:ssa yön yli. Lämpöinaktivointi 70 °C:ssa 10 min.*

Reagenssi	μl
DNA (LoxP1/ LoxP1r/ LoxP1- LoxP1) 35 ng	
Puskuri Phi29 DNA polymeraasi 10x	3,5
dNTP	1,75
Eksores. Satunnais. Heksam. 500 μM	3,5
Phi29 DNA polymeraasi 10 U/ μl	1,75
H2O	
Yht.	35

### 5.2.2 Digestio- ligaatio

Ensin tehtiin digestio pitämällä putket 37 °C:ssa 2 tuntia, taulukon 8 mukaisella reaktioseoksella.

*Taulukko 8: RCA:ssa valmistetun konkataameerin digestio.*

Reagenssi	μl
Konkataameeri	10
Puskuri Red	5
H2O	34
HindIII	1
Yhteensä	50

Digestoinnin jälkeen suoritettiin PCR-puhdistus sekä ligaatio puhdistetuille näytteille. Ligaatio yön yli 16 °C:ssa, jonka jälkeen tehtiin lämpöinaktivointi 70 °C:ssa 10 min. Ligaatio tehtiin taulukon 9 reaktioseoksen mukaisesti.

*Taulukko 9: Ligaatioreaktio digestoidusta konkataameerista.*

Reagenssi	$\mu\text{l}$
Digestoitu konkatameeri	28
Puskuri T4 DNA ligaasi 10x	5
H <sub>2</sub> O	16
T4 DNA ligaasi 5 U/ $\mu\text{l}$	1
Yhteensä	50

### 5.2.3 Rekombinaatio

Konkatameeria tuotettiin ensin RCA:ssa kuten taulukossa 7. Tämän jälkeen tehtiin rekombinaatioreaktio 37 °C:ssa 2 tunnin ajan. Lämpöinaktivointi tehtiin 70 °C:ssa 10 min ajan. Rekombinaation reaktioseos on esitetty taulukossa 10.

*Taulukko 10: Rekombinaation reaktioseos.*

Reagenssi	$\mu\text{l}$
Konkatameeri	10
Puskuri cre-rekombinaasi 10x	5
H <sub>2</sub> O	34
Cre-rekombinaasi 1 U/ $\mu\text{l}$	1
Yhteensä	50

### 5.2.4 Etanolisaostus

Etanolisaostus tehtiin kaikille näytteille lisäämällä 1  $\mu\text{l}$  väriainetta sekä 5  $\mu\text{l}$  3 M natriumasetaattia (pH 5,2), jonka jälkeen sekoitettiin. Lisättiin 2 V etanolia ja vorteksoitiin. Inkuboitiin huoneenlämmössä 2 minuuttia. Sentrifugoitiin 13 000 g:ssa 5 minuutin ajan. Poistettiin supernatantti ja lisättiin 1 ml 70 % etanolia. Sentrifugoitiin 5 minuuttia. Poistettiin supernatantti ja resuspensoitiin 10  $\mu\text{l}$ :aan EB puskuria.

### 5.2.5 Taustan poistaminen

Taustaa haluttiin pienemmäksi ja tämän vuoksi suoritettiin DpnI-käsittely. Kaikista käsiteltävistä näytteistä tehtiin pitoisuusmittaus, jonka perusteella laskettiin 100 ng pitoisuus DpnI-käsittelyä varten. Reaktioseos on esitetty taulukossa 11. Reaktiot tehtiin valmistamalla entsyymistä ja puskurista ensin noin 13-kertainen seos ja

laskemalla pipetoitava DNA:n ja veden määrä näytekohtaisesti. Reaktion inkubointi tehtiin 37 °C:ssa kahden tunnin ajan ja inaktivointi 20 min 80 °C:ssa.

*Taulukko 11: DpnI-käsittely.*

Reagenssi	μl
100 ng DNA	
H <sub>2</sub> O	
DpnI	0,2
Puskuri Tango	1
Yhteensä	10

### 5.3 Optimointi

Optimoinnissa testattiin vain yksi plasmidityyppi pIX/PAK-LoxP1r. Ensimmäinen vaihe tehtiin taulukko 7 ohjeen mukaisesti.

Digestio-ligaatio-menetelmää testattaessa tehtiin ensin restriktiodigestiot näytteille kuten taulukossa 8 ja tämän jälkeen tehtiin ligaatioreaktiossa seuraavat vaihtoehtoiset reaktiot, yksi näyte per reaktio. Vaihtoehtoiset reaktioseokset on esitetty taulukoissa 12–15. Ligaatio tehtiin 16 °C:ssa yön yli ja inaktivoitiin 70 °C:ssa 10 min.

*Taulukko 12: Digestio-ligaatio-menetelmän optimointi, suuri tilavuus ja korkea entsyymikonsentraatio.*

Reagenssi	μl
Digestoitu konkatameeri	28
T4 DNA ligaasi puskuri	50
T4 DNA ligaasi 5 U/μl	10
H <sub>2</sub> O	412
Yhteensä	500μl

*Taulukko 13: Digestio-ligaatio -menetelmän optimointi, normaalitilavuus ja korkea entsyymikonsentraatio.*

Reagenssi	$\mu\text{l}$
Digestoitu konkatameeri	28
T4 DNA ligaasi puskuri	5
T4 DNA ligaasi 5 U/ $\mu\text{l}$	1
H <sub>2</sub> O	16
Yhteensä	50 $\mu\text{l}$

*Taulukko 14: Digestio-ligaatio-menetelmän optimointi, suuri tilavuus ja alhainen entsyymikonsentraatio.*

Reagenssi	$\mu\text{l}$
Digestoitu konkatameeri	28
T4 DNA ligaasti puskuri	50
T4 DNA ligaasi 5 U/ $\mu\text{l}$	2
H <sub>2</sub> O	420
Yhteensä	500 $\mu\text{l}$

*Taulukko 15: Digestio-ligaatio-menetelmän optimointi, normaalitilavuus ja alhainen entsyymikonsentraatio.*

Reagenssi	$\mu\text{l}$
Digestoitu konkatameeri	28
T4 DNA ligaasi puskuri	5
T4 DNA ligaasi 5 U/ $\mu\text{l}$	0,2
H <sub>2</sub> O	16,8
Yhteensä	50 $\mu\text{l}$

Rekombinaatiomenetelmää optimoitiin seuraavien taulukoiden mukaisilla määrillä, yksi näyte per reaktio 37 °C:ssa 2 tuntia, inaktivointi 70 °C 10 min.

*Taulukko 16: Rekombinaation optimointi, korkea entsyymikonsentraatio ja suuri reaktiotilavuus.*

Reagenssi	$\mu\text{l}$
Konkatameeri	10
Cre-rekombinaasi puskuri 10x	50
Cre-rekombinaasi 1 U/ $\mu\text{l}$	10
H <sub>2</sub> O	430
Yhteensä	500 $\mu\text{l}$

*Taulukko 17: Rekombinaation optimointi, korkea entsyymikonsentraatio ja normaali reaktiotilavuus.*

Reagenssi	$\mu\text{l}$
Konkatameeri	10
Cre-rekombinaasi puskuri 10x	5
Cre-rekombinaasi 1 U/ $\mu\text{l}$	1
H <sub>2</sub> O	34
Yhteensä	50 $\mu\text{l}$

*Taulukko 18: Rekombinaation optimointi, alhainen entsyymikonsentraatio ja suuri reaktiotilavuus.*

Reagenssi	$\mu\text{l}$
Konkatameeri	10
Cre-rekombinaasi puskuri 10x	50
Cre-rekombinaasi 1 U/ $\mu\text{l}$	2
H <sub>2</sub> O	438
Yhteensä	500 $\mu\text{l}$

*Taulukko 19: Rekombinaation optimointi, alhainen entsyymikonsentraatio ja normaali reaktiutilavuus.*

Reagenssi	$\mu\text{l}$
Konkatameeri	10
Cre-rekombinaasi puskuri 10x	5
Cre-rekombinaasi 1U/ $\mu\text{l}$	0,2
H <sub>2</sub> O	34,8
Yhteensä	50 $\mu\text{l}$

Näytteille tehtiin etanolisaostus. Saaduista näytteistä mitattiin DNA-pitoisuudet sekä digestio-ligaatio- että rekombinaatiomenetelmässä. 500  $\mu\text{l}$  tilavuuden näytteissä saostus ei onnistunut. Koska etanolisaostus ei onnistunut, 500  $\mu\text{l}$  tilavuuden näytteille tehtiin PCR-puhdistus ja eluoitiin 30  $\mu\text{l}$ :aan EB-puskuria. Näytteille tehtiin DpnI-käsittely ja transformoitiin sekä maljattiin 0, -1, -2 ja -3 maljoille.

#### 5.4 Testaus

pIX/PAK100r-LoxP1r- ja pIX/PAK100r-LoxP2r-plasmidit testattiin. Plasmidi-DNA transformoitiin ja kasvatettiin maljoilla. Maljakasvatuksista poimittiin 5 pesäkettä plasmidityyppiä kohden ja siirrettiin LB-mediumiin kasvamaan yön yli. Näytteille tehtiin plasmidi-DNA:n puhdistus. Tämän jälkeen tehtiin digestio SfiI-entsyymillä 50 °C:ssa yön yli. SfiI-digestion reaktioseos on taulukossa 20. Näistä näytteistä tehtiin agarosigeelielektroforeesi.

*Taulukko 20: SfiI-digestion reaktioseos plasmideille pIX/PAK100r-LoxP1r ja pIX/PAK100r-LoxP2r.*

Reagenssi	$\mu\text{l}$
DNA	5
SfiI	5
Green Buffer 10x	1
H <sub>2</sub> O	3,5
Yhteensä	10 $\mu\text{l}$

## 6 TULOKSET JA ARVIOINTI

Työssä saatiin ensimmäisenä kloonattua LoxP1- ja LoxP2-insertit pIX/PAK100r-vektoriin. Vaikka pesäkemäärät olivatkin tässä vaiheessa pieniä (6-22 pesäkettä), eivätkä siten laskennallisesti kovin luotettavia, kontrollinäyte pIX/PAK100r ilman inserttiä ei antanut lainkaan pesäkkeitä. Tässä tapauksessa siis insertissä oleva selektiomenetelmä toimi. Toinen plasmidityyppi pIX/PAK100 antoi kontrollinäytteessä muutaman pesäkkeen ja tämän takia jatkokäsittelyyn valittiin plasmidin pIX/PAK100r vektori-inserttikonstruktit. Pienet pesäkemäärät saattoivat johtua ligaation tai fosforyloinnin puutteellisesta onnistumisesta. Todennäköisempi ongelma kuitenkin tässä vaiheessa työtä olivat kompetentit solut (XL1) joihin plasmidit transformoitiin, sillä kompetenttien solujen kanssa oli koko tutkimuksen ajan eriasteisia ongelmia.

Kuvissa 5 ja 6 on esitetty kahdella eri entsyymillä tehty digestio. Digestio jäi ohjeiden mukaisella kahden tunnin aikamäärällä ensin vajaaksi, ja digestiota jouduttiin jatkamaan samoista reaktioista, jotta saatiin aikaiseksi täydelliset digestiot. Plasmidin kloonauksen onnistumista seurattiin digestoimalla kloonattu plasmidi. Täydellinen digestio Cfr24I- ja KpnI- entsyymeillä antoi seuraavat tulokset agaroosigeelielektroforeesissa.



Kuva 5: pIX/PAK100r-LoxP1 sekä pIX/PAK100r-LoxP2 KpnI-Cfr24I-digestio. Näytteet 1 ja 8 ovat DNA kokostandardeja. Näytteet 2-4 ovat saman plasmidin

*pIX/PAK100r-LoxP1* eri klooneja, ja näytteet 5-7 ovat plasmidin *pIX/PAK100r-LoxP2* eri klooneja.



*Kuva 6: pIX/PAK100r-LoxP1 ja pIX/PAK100r-LoxP2 KpnI-Cfr24I-digestio valmistettuna 1:1000 laimennetuista inserteistä. Näytteet 9 ja 10 ovat DNA kokostandardeja. Näytteet 10-12 ovat plasmidin pIX/PAK100r-LoxP1 eri klooneja, ja näytteet 13-15 ovat plasmidin pIX/PAK100r-LoxP2 eri klooneja. Näyte numero 16 on kontrollinäyte, eli pelkkä plasmidi pIX/PAK100r ilman inserttiä.*

Näyte numero 16 (kuva 6) oli kontrolliplasmidi pIX/PAK100r, jonka avulla havaittiin, että näytteet 2, 6 ja 15 olivat epäonnistuneita eivätkä sisältäneet kloonattua inserttiä lainkaan. Plasmidin pitäisi pilkkoutua CfrI-KpnI-digestiossa niin, että ylempi bändi on kooltaan 3838bp ja alempi bändi 2277bp. LoxP-kasetti sisältää restriktiokohdan entsyymille CfrI. Tästä voidaan päätellä, ettei geelille vain yhtä bändiä tuottavassa näytteessä ole lainkaan haluttua inserttiä. Vertaamalla digestoitujen näytteiden kokoja DNA kokostandardin bändeihin, valittiin sekvenssointiin näytteet 3, 5, 11 ja 14, eli pIX/PAK100r-LoxP1 ja pIX/PAK100r-LoxP2 sekä molemmista 1:1000 inserttilaimennoksesta valmistetut plasmidit. Näytteissä 10 ja 13 oli ylempi bändi lähempänä 3500bp kokoa kuin 4000bp, joten niiden sekvenssi olisi todennäköisesti ollut puutteellinen. Osassa näytteistä näkyi hieman heikosti alemmat bändit, kuten näytteessä numero 4, ja sen takia se jätettiin pois sekvenssoinnista. Sekvenssoinnin tulokset on esitetty taulukossa numero 21.

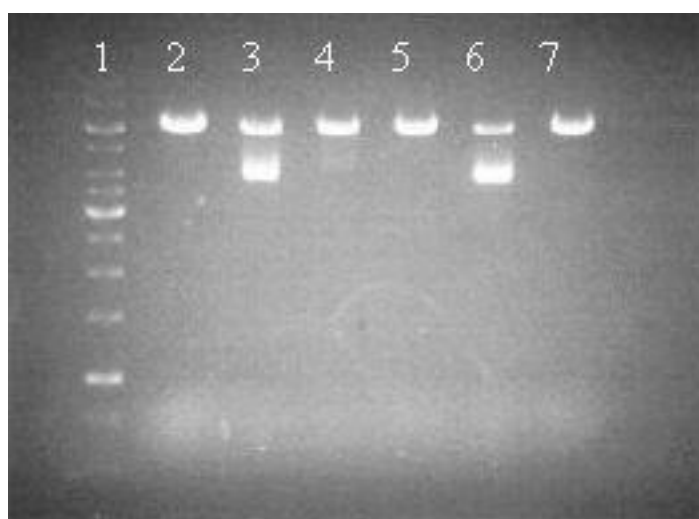


*Taulukko 21: Sekvenssointinäytteiden tuloksia.*

Näytenumero	Näytteen nimi	Tulos
3	pIX/PAK100r-LoxP1	2 inserttiä
5	pIX/PAK100r-LoxP2	Käänteinen orientaatio, KpnI restriktiokohta puuttuu.
11	pIX/PAK100r-LoxP1 (laim.)	Käänteinen orientaatio, vajavainen sekvenssitulos
14	pIX/PAK100r-LoxP2 (laim.)	Vajavainen sekvenssitulos

Ensimmäisen sekvenssoinnin mukaan näytenumero 5 oli sekvenssiltään muutoin oikeanlainen käänteisessä orientaatioissa, mutta siitä puuttui KpnI-restriktiokohta. Näyte 11:ssä insertti oli suorassa orientaatioissa, mutta sekvenssin tulos oli vajavainen. Uusi sekvenssointi eri primerilla (taulukko 22) osoitti, että plasmidi oli käänteisessä orientaatioissa, mutta muutoin konstrukti oli oikea. Sekvenssin vajavaisuutta esiintyi myös näytteessä numero 14. Näytteessä numero 3 oli kaksi inserttiä peräkkäin. Sekvenssointitulosten perusteella voidaan päätellä, että insertti voi liittyä plasmidiin suorassa että käänteisessä orientaatioissa ja niitä voi olla yksi tai kaksi peräkkäin samassa plasmidissa. Insertin mielivaltainen liittyminen plasmidiin hankaloitti haetun plasmidikonstruktin pIX/PAK100r-LoxP1 löytymistä.

Näytteet 3, 5 ja 11 digestoitiin uudestaan samoista näytteistä entsyymillä HindIII ja samalla digestoitiin myös rinnalla valmistettuja uusia näytteitä samoista plasmideista kuvan 7 mukaisesti.

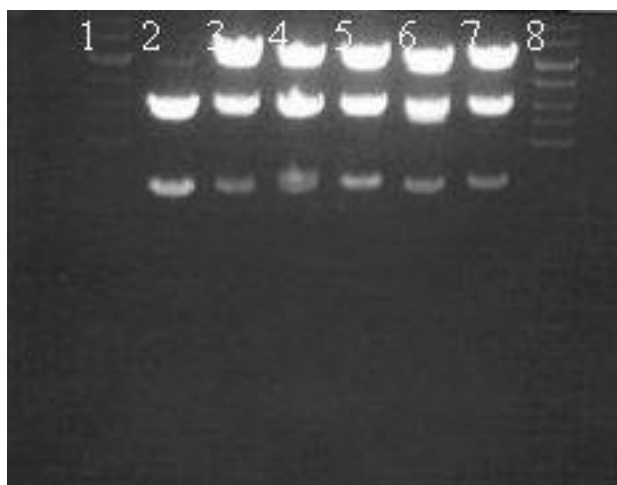


*Kuva 7: HindIII-digestio pIX/PAK100r-LoxP1 ja pIX/PAK100r-LoxP2 näytteille. Näyte 1 on DNA kokostandardi. Näyte 2 ja 5 ovat plasmidin pIX/PAK100r-LoxP1 eri kloonit, ja näytteet 3 ja 6 ovat pIX/PAK100r-LoxP2 eri kloonit. Näytteet 4 ja 7 ovat*

*plasmidin pIX/PAK100r-LoxP:n 1:1000 inserttilaimennoksesta valmistettuja eri klooneja.*

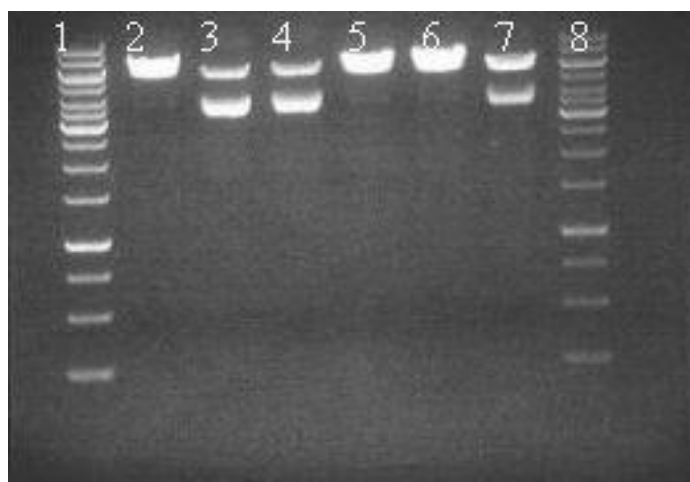
Kuvan numero 7 perusteella voidaan todeta, että pIX/PAK100r-LoxP2 ei ollut toivotunlainen, sillä se ei digestoitunut HindIII:lla (näytteet 3 ja 6). Muut reaktiot olivat kunnossa. Tässä vaiheessa epäiltiin, että näytteiden nimeämisessä olisi tapahtunut inhimillinen virhe ja ne olisi nimetty väärinpäin ja näin valittu jatkotutkimuksiin väärä näyte. Tämä vaihtoehto suljettiin kuitenkin pois digestoimalla HindIII:lla se näyte, jonka epäiltiin vaihtuneen. Tulos oli samanlainen kuin kuvan numero 7 pIX/PAK100r-LoxP2-digestiot eli se ei digestoitunut HindIII:lla.

Koska pIX/PAK100r-LoxP2 plasmidiin ei ollut onnistuttu kloonamaan haluttua inserttiä, valmistettiin lisää klooneja. Näille klooneille tehtiin Cfr24I- ja KpnI-digestiot. Kuvassa 8 on pIX/PAK100r-LoxP2-digestiot Cfr24I- ja KpnI-entsyymeillä.



*Kuva 8: pIX/PAK100r-LoxP2 digestoituna Cfr24I- ja KpnI-entsyymeillä. Näytteet 1 ja 8 ovat DNA kokostandardeja. Näytteet 2- 4 ovat plasmidin pIX/PAK100r-LoxP2 eri klooneja ja näytteet 5-7 plasmidin pIX/PAK100r-LoxP2 1:1000 laimennetuista inserteistä tehtyjä eri klooneja.*

Kuvassa 8 oli onnistunut digestio näytteessä numero 2 (pIX/PAK100r-pLoxP2) ja muissa näytteissä digestio oli jäänyt osittaiseksi. Lisäksi samoille näytteille tehtiin HindIII-digestiot. Näytteet olivat täysin samat kuin yllä olevassa kuvassa, mutta eri entsyymillä digestoituja. HindIII-digestio on esitetty kuvassa 9.



Kuva 9: Plasmidin pIX/PAK100r-pLoxP2 HindIII-digestiot.

HindIII digestiot onnistuivat näytteille 2,5 ja 6.

Vanha sekvenssinäyte numero 5 (taulukko 21) sekvenssoitiin uudestaan ja samalla sekvenssoitiin digestioissa onnistuneet näytteet: pIX/PAK100r-LoxP2, pIX/PAK100r-LoxP2 (1:1000 laimennettu insertti) ja pIX/PAK100r-LoxP1 (kuva 7). Sekvenssoinnista saatiin taulukon 22 mukaiset tulokset.

Taulukko 22: Sekvenssointinäytteiden tuloksia.

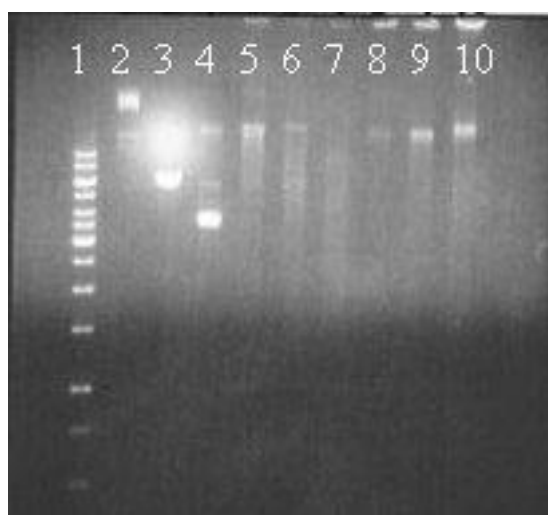
Näytenumero kuvassa	Näytteen nimi	Tulos
	1 pIX/PAK100r-LoxP2	2 inserttiä
	5 pIX/PAK100r-LoxP2 (laim.)	Vajavainen sekvenssitulos
Kuva 7, näyte 2	pIX/PAK100r-LoxP1	Oikea konstrukt
Vanha sekvenssinäyte taul.21	pIX/PAK100r-LoxP1 (laim.)	Insertti käänteisessä orientaatiassa

pIX/PAK100r-LoxP2-LoxP2 (2 inserttiä) näyte digestoitiin ja liitettiin ligaatiossa, jotta saataisiin yhdellä insertillä varustettu pIX/PAK100r-LoxP2. Tuloksena oli sekvenssianalyysissä täydellinen pIX/PAK100r-LoxP2r eli plasmidi, jonka insertti oli käänteisessä orientaatiassa.

Näytteet transformoitiin ensin ilman DpnI-entsyymikäsittelyä, mutta tällöin ongelmaksi muodostui liian suuri vektoritausta. Käsittelemättömissä näytteissä (lineaarinen RCA) transformaatio antoi tuloksena samanlaisia pesäkemääriä, kuin rekombinaatio- ja digestio-ligaatio-menetelmät. Lineaarisella DNA:lla pitäisi

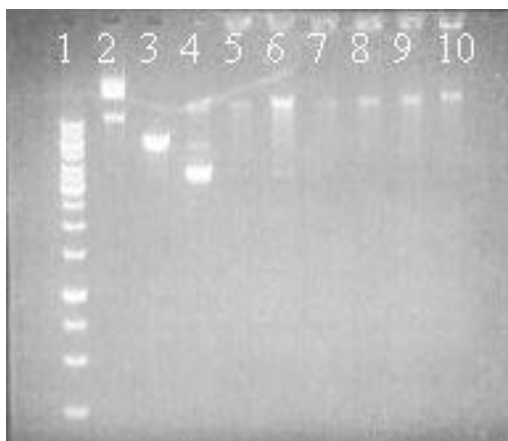
kuitenkin olla heikko transformaatiotehokkuus ja tämän vuoksi vektoritausta piti saada pienemmäksi. Taustan poistamiseksi tehtiin DpnI-käsittely. DpnI-käsittelyn jälkeen lineaariset RCA-näytteet antoivat maljoilla edelleen pesäkkeitä, mutta merkittävästi vähemmän kuin ennen käsittelyä. Näytteet olivat vertailukelpoisia keskenään, kun myös rekombinaatio- ja digestio-ligaatio-menetelmän näytteet käsiteltiin. Kaikissa kolmessa toistossa käytettiin SS320 soluja. Pesäkemäärien perusteella DpnI-käsittely toimi erinomaisesti.

Tulokset varmistivat sen, että kloonaus oli onnistunut ja rengasmaiset plasmidit olivat tehokkaampia transformaatioissa kuin käsittelemättömät vektorit. Kuvat 10,11 ja 12 ovat eri plasmidityyppien testaukset per geeli: LoxP1, LoxP1r sekä LoxP1-LoxP1. Jokaisella geelillä näytteet 1-4 ovat samoja, näytteet 5 ja 6 digestio-ligaatiomenetelmä, näytteet 7 ja 8 rekombinaatiomenetelmä sekä 9 ja 10 käsittelemätön RCA-näyte. Nämä tehtiin rinnakkaisista määrittelyistä eri klooneista. Näytteet näkyivät geelillä paikoin heikosti, vaikka niihin oli laskettu pitoisuus 100 ng DNA:ta. Näytteistä kuitenkin nähtiin, että plasmidit eri käsittelyillä tuottivat jokainen DpnI-digestoituna samanlaiset tulokset. Bändit ovat samankokoiset kuin pIX/PAK100r-kontrollin ylin bändi.

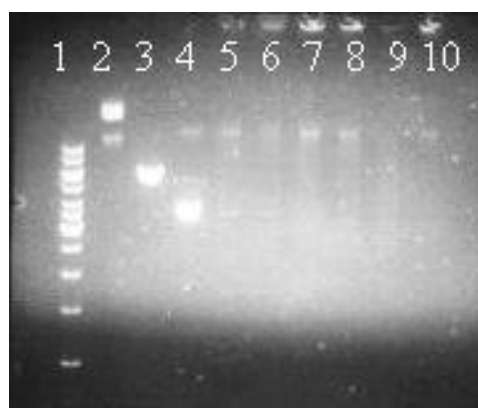


Kuva 10: DpnI digestio plasmidille pIX/PAK100r-LoxP1. Näyte 1 on DNA kokostandardi. Näyte 2 on BsmI-digestoitu pIX/PAK100. Näyte 3 on HindIII-digestoitu pIX/PAK100. Näyte 4 on pIX/PAK100r. Näytteet 5 ja 6 ovat plasmidin pIX/PAK100r-LoxP1 digestio-ligaationäytteen, 7 ja 8 rekombinaationäytteen. Näytteet

9 ja 10 ovat käsittelemättömät DpnI-digestoidut näytteet eli RCA:n konkatameerista valmistettuja.

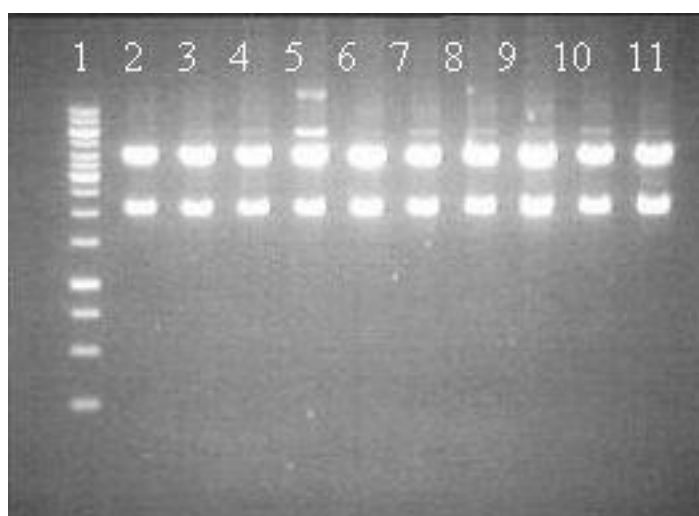


Kuva 11: DpnI-digestio plasmidille pIX/PAK100r-LoxP1r. Näyte 1 on DNA kokostandardi. Näyte 2 on BsmI-digestoitu pIX/PAK100. Näyte 3 on HindIII-digestoitu pIX/PAK100. Näyte 4 on pIX/PAK100r. Näytteet 5 ja 6 ovat plasmidin pIX/PAK100r-LoxP1r digestio-ligaationäytteet, 7 ja 8 rekombinaationäytteet. Näytteet 9 ja 10 ovat käsittelemättömät DpnI-digestoidut näytteet eli RCA:n konkatameerista valmistettuja.



Kuva 12: DpnI-digestio plasmidille pIX/PAK100r-LoxP1-LoxP1. Näyte 1 on DNA kokostandardi. Näyte 2 on BsmI-digestoitu pIX/PAK100. Näyte 3 on HindIII-digestoitu pIX/PAK100. Näyte 4 on pIX/PAK100r. Näytteet 5 ja 6 ovat plasmidin pIX/PAK100r-LoxP1-LoxP1 digestio-ligaationäytteet, 7 ja 8 rekombinaationäytteet. Näytteet 9 ja 10 ovat käsittelemättömät DpnI-digestoidut näytteet eli RCA:n konkatameerista valmistettuja.

SfiI-digestiolla vertailtiin samaa inserttityyppiä eli plasmideita pIX/PAK100r-LoxP1r ja pIX/PAK100r-LoxP2r. Täydellistä pIX/PAK100r-LoxP2 konstruktia ei tämän tutkimuksen aikana saatu tehtyä, jotta sitä olisi voitu vertailla plasmidityypin pIX/PAK100r-LoxP1. Näytteet (kuva 13) olivat kaikki samojen plasmidityyppien eri klooneja. Plasmidit osoitettiin vertailukelpoisiksi keskenään, sillä niissä ei ollut kokovaihtelua. Näyte 5 oli hieman poikkeava sen vuoksi, ettei se ollut täysin digestoitunut.



*Kuva 13: SfiI-digestiot plasmideille pIX/PAK100r-LoxP1r ja pIX/PAK100r-LoxP2r. Näyte 1 on DNA kokostandardi. Näytteet 2-6 ovat pIX/PAK100r-LoxP1r eri klooneja ja näytteet 7-11 ovat pIX/PAK100r-LoxP2 eri klooneja.*

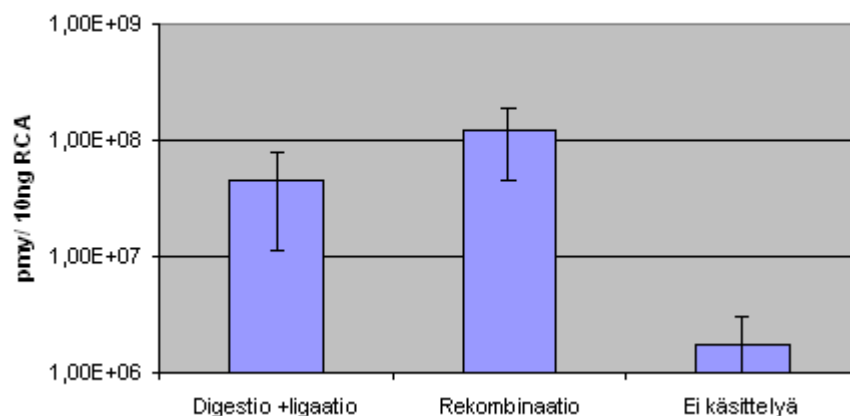
Vajavainen digestio tuli ilmi muutamaa otteeseen tutkimuksen aikana. Ongelma esiintyi sellaisissa näytteissä, joissa DNA:n olisi kuulunut digestoitua kokonaan. Digestioissa käytettiin kontrollinäytteitä ja nämä takaavat sen, että geelielektroforeesin tulokset ovat luotettavia. Syitä digestion vajavaisuuteen voi olla monia. Restriktiodigestioissa käytettiin kuitenkin aina entsyymien valmistajan ohjeistamaa lämpötilaa- ja aikaa. Myös entsyymien inaktivoinnit tehtiin aina tarvittaessa ja tällöinkin noudatettiin valmistajan ohjeita. Ajan seuraaminen oli suurpiirteistä joten reaktioaika ei aina ollut täsmällinen. Kuva 13 osoittaa, että vajaa digestio voi esiintyä myös silloin, kun reaktio-olosuhteet ovat täysin samoja kaikille näytteille.

Lämpökaappia käytettäessä lämpötila pysyi melko tasaisena, vaikka pientä heittelyä saattoi tulla kaapin oven avaamisesta ja sulkemisesta, sillä samoja laitteita ja välineitä käytti useampi henkilö. Myös lämpöhaudetta käytettiin ja niissä lämpötila oli vaikea saada pysymään stabiilina. Termostaatti lämmitti hauteen liian kuumaksi tai sammui ennen aikojaan jolloin lämpötila ei noussut riittävän ylös. Hauteeseen asennettu lämpömittari auttoi lämpötilan seurantaan, mutta ei estänyt lämpötilan heittelyä. Sellaisissa digestioissa, joissa kaikkien näytteiden digestiot jäivät vajaiksi ja digestiota jouduttiin jatkamaan, saattoi osatekijänä vaikuttaa myös reagenssit. Jatkuva sulatus ja pakastaminen rasittavat reagensseja ja myös käyttöpäivä saattaa olla vanha. Kuvan 13 osittain digestoituneessa näytteessä hyvin todennäköinen syy heikentyneeseen digestioon on pipetointivirhe. Etenkin projektin alkuvaiheilla tuli ilmi rutiinin puutteesta johtuvia pipetointivirheitä. Työssä tehtiin esimerkiksi laimennettu kontrollinäyte, jossa pipetoitava määrä oli 1 µl. Agarosigeelielektroforeesissa ei näkynyt bändiä tämän näytteen kohdalla. Tämä johtui pipetointivirheestä. Myös näytteiden puhdistuksissa oli epätarkkuutta pipetoinneissa.

Näytteiden puhdistuksissa pellettejä suspensoitiin ja siirrettiin putkista toisiin. DNA:ta jää herkästi vanhan putken seinämille, jolloin näytettä menetettiin. Puhdistuskiteissä käytettävät reagenssit olivat laadultaan vaihtelevia. Välillä sama reagenssi eri eränumerolla antoi näytesarjaan esimerkiksi vaaleamman värin kuin toisen erän vastaava reagenssi. Puhdistusnäytteissä, joissa muodostui sakka (kuten plasmidi-DNA:n puhdistuksessa), kaikkea supernatanttia ei saanut pienelläkään pipetillä täysin talteen ilman, että sakkaa olisi tullut mukaan. Supernatantissa oli haluttu DNA, jolloin puuttumaan jäävä supernatantti vaikutti näytteen pitoisuuteen. Plasmidi-DNA:n eristämisessä agarosigeelillä saatiin tarkastettua plasmidin koko ja puhdistettua plasmidi. Vektorin puhdistaminen tällä menetelmällä on välttämätöntä, sillä ilman sitä vektori-insertti ja pelkkä vektorikontrolli antavat yhtä paljon pesäkkeitä maljauksissa.

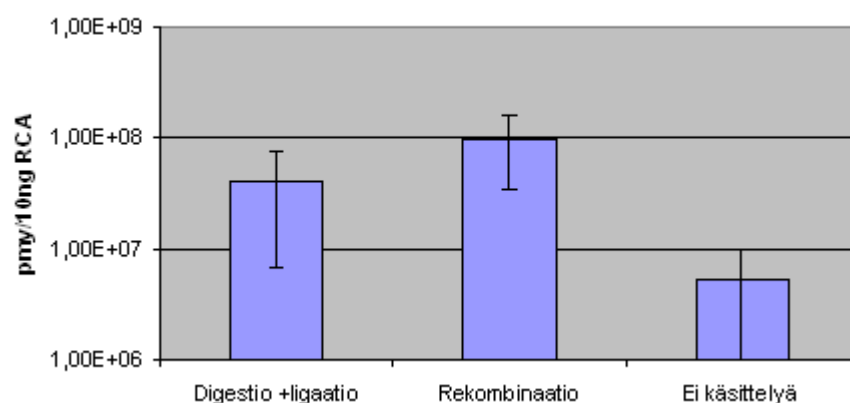
Tutkimuksen mielenkiinnon kohde oli se, voisiko DNA:ta muokata rekombinaation avulla ja hyödyntää sitä geenikirjastojen kehittämisessä. Tulokset olivat erittäin lupaavia. Testeistä laadittiin kaikille testatuille plasmidikonstrukteille (pIX/PAK100r-LoxP1, pIX/PAK100r-LoxP1r sekä pIX/PAK100r-LoxP1-LoxP1) pylväsdiagrammi,

joissa vertailtiin samalle plasmidille tehtyjä testejä (digestio-ligaatio, rekombinaatio sekä pelkkä RCA-konkatameeri eli käsittelemätön näyte). Jokaisella plasmidilla suoritettiin kolme toistoa kaikilla testeillä. Näitä tuloksia esittävät kuviot 3-5.



Kuvio 3: *pIX/PAK100r-LoxP1*-plasmidin testaaminen.

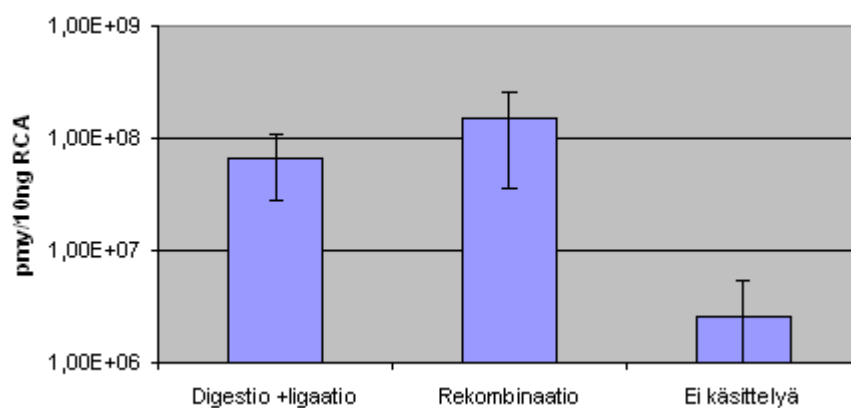
Varsinaisena kiinnostuksen kohteena olleet tutkimusmenetelmien tulokset päädyttiin ilmoittamaan pesäkkeen muodostavina määrinä 10 nanogrammaa RCA reaktioseosta kohden. Kuviossa 1 on plasmidi *pIX/PAK100r-LoxP1*, jossa käsittelemätön näyte antoi keskiarvona 1,77E+06 pmy/ 10 ng RCA reaktio (CV-% 75,7). Digestio-ligaatiomenetelmä antoi 4,54E+07 pmy/ 10 ng RCA (CV-% 74,7) ja rekombinaatio selvästi suurimman määrän eli 1,19E+08 pmy/ 10ng RCA (CV-% 61,2).



Kuvio 4: *pIX/PAK100r-LoxP1r*-plasmidin testaaminen.



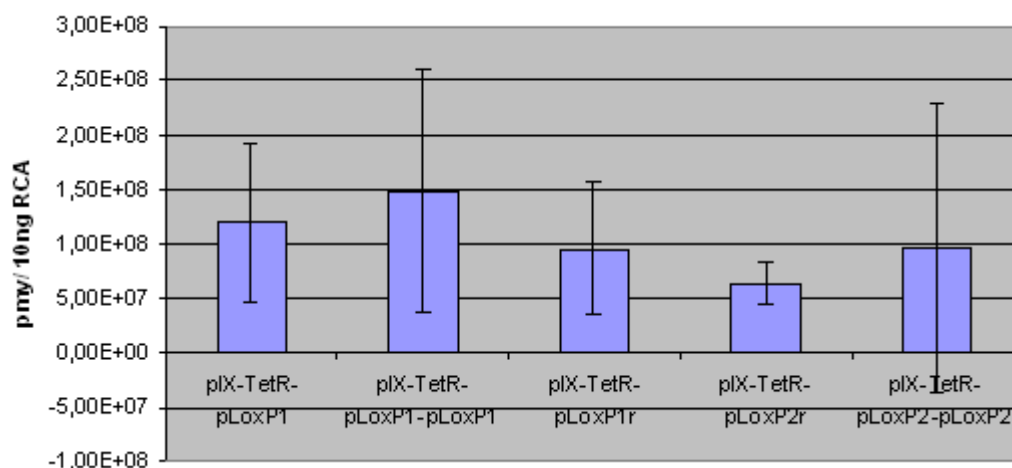
Plasmidi pIX/PAK100r-LoxP1r antoi digestio-ligaatio-menetelmälle  $4,14\text{E}+07$  pmy/10 ng RCA (CV-% 83,6), rekombinaatio  $9,59\text{E}+07$  pmy/ 10 ng RCA (CV-% 64,2) ja käsittelemätön näyte  $5,36\text{E}+06$  pmy/ 10 ng RCA (CV-% 90).



Kuvio 5: pIX/PAK100r-LoxP1-LoxP1-plasmidin testaaminen.

Plasmidi pIX/PAK100r-LoxP1-LoxP1 antoi keskiarvona digestio-ligaatio-menetelmälle  $6,68\text{E}+07$  pmy/ 10 ng RCA (CV-% 59,1), rekombinaatio  $1,48\text{E}+08$  pmy/ 10 ng RCA (CV-% 75,5) ja käsittelemätön  $2,67\text{E}+06$  pmy/ 10 ng RCA (CV-% 99,6).

Keskimäärin digestio-ligaatio-menetelmä tuotti noin 20-kertaisen ja rekombinaatiomenetelmä noin 50-kertaisen transformaatiotehokkuuden lineaariseen konkatameeriin verrattuna. Plasmidin konstruktilla ei ollut vaikutusta tehokkuuteen, vaan kaikissa plasmidikonstrukteissa rekombinaatio oli tehokkain. Tämä osoitettiin vielä vertaamalla eri plasmidien rekombinaatioita keskenään ja vertailuun otettiin mukaan myös pIX/PAK100r-LoxP2r ja pIX/PAK100r-LoxP2-LoxP2. Rekombinaation vertailu on esitetty kuviossa 6.



Kuvio 6: Rekombinaation vertailu.

pIX/PAK100r-LoxP2r- ja pIX/PAK100r-LoxP2-LoxP2-plasmidit testattiin ainoastaan rekombinaatiolla, sillä mielenkiinnon kohteena oli se, miten tehokkaasti se toimii rekombinaatiossa verrattaessa pIX/PAK100r-LoxP1 plasmideihin. pIX/PAK100r-LoxP2r antoi tulokseksi  $6,36E+07$  pmy/ 10ng RCA (CV- % 30,4) ja pIX/PAK100r-LoxP2-LoxP2  $9,68E+07$  pmy/ 10 ng RCA (CV-% 137,8). Insertillä ei siis ole rekombinaation ja transformaatiotehokkuuden kannalta väliä.

Kaikissa kuvioissa on esitetty virhepalkit ja kuviossa 6 plasmidien tehokkuuksien välinen vaihtelu mahtuu virhepalkkien rajoihin. CV-prosenti on kuitenkin analyttisen suorituskyvyn mittari ja se kertoo kokeen sisäisestä toistettavuudesta. CV-prosenti lasketaan rinnakkaismäärityksistä ja tämä kielii siitä, että rinnakkaismäärityksien pesäkemäärissä on ollut suuria eroja. Eroja oli useita kymmeniä prosenttiyksiköitä joten tulokset ovat suuntaa-antavia.

Suuret erot pesäkemäärissä johtuivat hyvin pitkälti kompetenteista soluista. Plasmidien kloonaukseen tehtiin XL-1 soluissa, mutta niiden loputtua siirryttiin käyttämään SS320- kompetentteja soluja. Kaksi rinnakkaista määritystä saatiin tehtyä saman eränumeron soluilla, mutta erän loppuessa kesken vaihdettiin uuteen erään samoja soluja. Soluerien välillä oli huomattavaa vaihtelua transformaatiotehokkuudessa ja tämä aiheutti virhettä tutkimustuloksiin. Kompetenttien solujen erien epätasaisuus yllätti. Aiemmin oli saatu hyvät tulokset ja

kun työtä yritettiin toistaa samoilla soluilla eri erästä, pesäkkeitä tulikin vain hyvin vähän. Pesäkelaskuissa tuli myös laskuvirheitä, sillä joissakin maljoissa pesäkkeet olivat niin pieniä ja läpikuultavia, että niitä oli vaikea havaita.

Transformaatiossa käytettiin valmiita kompetentteja soluja. Kyseiset solut kuolevat helposti. Ne eivät kestä lämpimässä pitämistä eivätkä ravistelua (paitsi elatusaineeseen suspensoituna). Työskentelyn tuli olla solujen herkkyyden takia niin ripeää, että DNA:n pipetointi solujen joukkoon onnistui vaihtelevalla menestyksellä. Transformaation epäonnistuessa soluja ei tullut lainkaan maljoille ja tällöin koetta piti jälleen toistaa

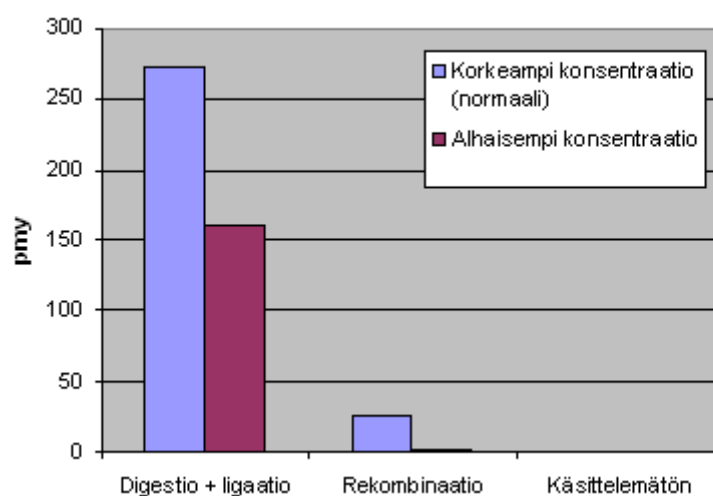
Vertailukelpoisempia tuloksia varten ja variaatiokertoimen alentamiseksi pitäisi koetta toistaa useita kertoja. Tutkimuksen ongelmakohdaksi koitui ajan loppuminen kesken. Oikeanlaisten vektori-inserttikonstruktien kloonaminen vei oletettua enemmän aikaa ja ajan loppuessa jätettiin pIX/PAK100r-LoxP2-plasmidin kloonaminen pois tutkimuksesta.

Näistä tuloksista voidaan kuitenkin vetää pääpiirteinen johtopäätös, että rekombinaatiolla on suurempi transformaatiotehokkuus kuin digestio-ligaatiomenetelmällä, riippumatta inserttikonstruktista.

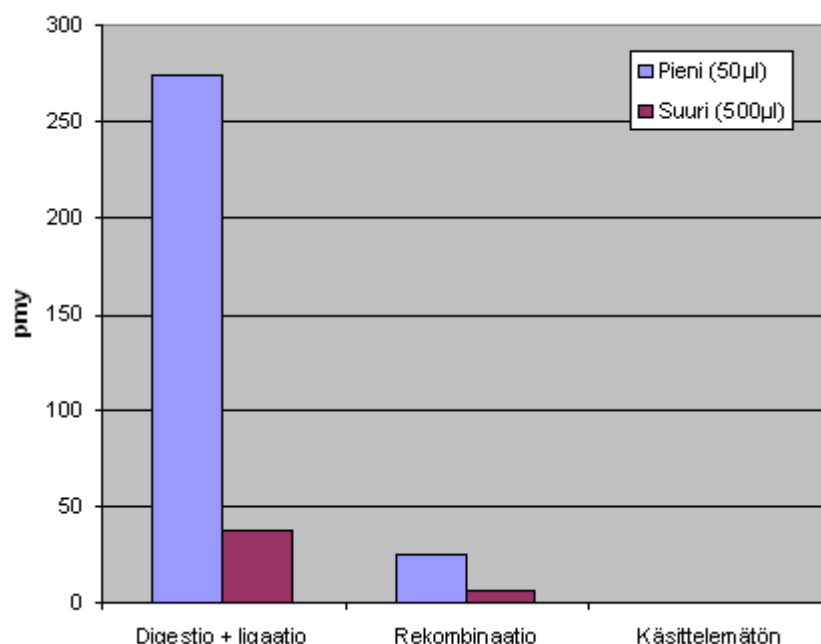
Lisäksi rekombinaatio on helpompi ja nopeampi toteuttaa kuin digestio-ligaatiomenetelmä. Digestio-ligaatiomenetelmässä tarvitaan kaksi entsymaattista reaktiota ja yksi puhdistusvaihe. Ligaatio on tehokkain yön yli tehtynä, jolloin työvaiheet vaativat kaksi päivää. Rekombinaatiossa ei tarvita puhdistusvaihetta ja entsymaattisia reaktioita tehdään vain yksi. Rekombinaatiomenetelmä on siis huomattavasti nopeampi ja siinä on vähemmän työvaiheita.

Menetelmien vertailun lisäksi kiinnostuksen kohteena oli reaktioiden optimointi. Työssä haluttiin optimoida sekä rekombinaatio- että digestio-ligaatiomenetelmää reaktioutilavuuksien ja entsyymikonsentraation suhteen. Normaalisti reaktiot tehtiin 50 µl määrässä, joten mielenkiinnon kohteena oli, voisiko reaktioutilavuuksia kasvattaa tai

entsyymien määrää vähentää. Mikäli reaktioita pystyttäisiin tekemään alhaisella entsyymikonsentraatiolla, siitä seuraisi kustannussäästöjä. Optimoinnista piirrettiin pylväsdiagrammit ja tulokset on ilmoitettu pesäkkeen muodostavina yksiköinä (pmy). Tulokset eivät siis ole suoraan verrannollisia menetelmien testauksessa käytettyyn tulosten ilmoittamistapaan pmy/ 10 ng RCA. Optimoinnin tulokset on esitetty kuvioissa 7 ja 8.



Kuvio 7: Entsyymipitoisuuden vaikutus.



Kuvio 8: Reaktiotilavuuden vaikutus.

Optimoinnista ehdittiin tehdä vain yksi onnistunut toisto, joten tulokset eivät ole luotettavia. Tulosten mukaan digestio-ligaatio-reaktiossa alhainen entsyymikonsentraatio on noin 60 % tehottomampi kuin normaalireaktiossa, ja rekombinaatioreaktiossa se on noin 8% tehottomampi. Prosentit laskettiin vertailemalla pesäkemääriä. Tulokset antavat ymmärtää, että entsyymipitoisuus ei vaikuta rekombinaatioon niin paljoa kuin digestio-ligaatio-menetelmässä. Kompetentit solut olivat toistossa huonot ja tuottivat vain vähän pesäkkeitä (lineaarinen käsitlemätön näyte ei yhtään pesäkkeitä). Optimoinnissa oli epävarmuustekijöitä hyvin paljon, mutta tuloksista pystytään päättämään, ettei entsyymimäärää kannata vähentää. Optimointia yritettiin toistaa, mutta kelvollisia pesäkemääriä ei ehditty saamaan tutkimuksen aikana.

Reaktiotilavuuden optimoinnissa suuri reaktiotilavuus oli ongelmallinen. Digestio-ligaatio-menetelmässä suuri näytetilavuus oli noin 14 % tehottomampi kuin normaali 50 µl näytetilavuus ja rekombinaatiossa suuri näytetilavuus oli noin 23% tehottomampi kuin normaalitilavuus. Vain yhden tehdyn toiston takia voidaan vetää johtopäätös, ettei reaktiotilavuutta kannata nostaa. Reaktiotilavuuden nostamisessa oli muitakin ongelmia etenkin etanolisaostuksessa.

Etanolisaostuksessa pelletti oli usein pieni ja vaikeasti nähtävä. Etenkin optimoinnissa etanolisaostus koitui ongelmaksi suuren 500 µl tilavuuden näytteissä. Pellettiä ei näyttänyt muodostuvan lainkaan ja optimoinnissa todettiin lopulta, että DNA:n pitoisuus oli kyseisissä näytteissä käyttökelvottoman pieni. Saostusmenetelmä jouduttiin tällöin vaihtamaan PCR-puhdistukseen.

Transformaatioissa laimennossarjoissa virheiden todennäköisyys kasvoi samalla, kun näytemäärät kasvoivat. Näytteitä oli enimmillään useita kymmeniä. Myös mahdolliset laskuvirheet näytteiden ja reaktioseosten pitoisuuksissa vaikuttivat tuloksiin. Plasmidia tehdessä laskettiin vektorin molaarisesta pitoisuudesta, paljonko inserttiä lisätään µl määränä. Inserteistä käytettiin työssä myös 1:1000 laimennosta. Laimennokset tuskin olivat kovin tasaisia, sillä 1000µl pipetti ei ole kovin tarkka.

Työn toteutus olisi ollut selkeämpi, mikäli osia ei olisi testattu päällekkäin. Työssä saatiin siis esimerkiksi yksi plasmidityyppi valmiiksi vasta siinä vaiheessa, kun toinen oli jo testattu digestio-ligaatio- ja rekombinaatio-menetelmillä.

Fujii *et al.* transformoivat kokeissaan lineaarista DNA:ta suoraan RCA-reaktiosta.<sup>25</sup> Tässä tutkimuksessa kyettiin kuitenkin osoittamaan, että lineaarisella DNA:lla on heikko transformaatiotehokkuus, ja huomattavasti tehokkaampi vaihtoehtoinen menetelmä on rekombinaation hyödyntäminen. Menetelmää voisi kehittää edelleen toistamalla koetta ja hyödyntää sitä esimerkiksi satunnaismutageenesissä, jolloin näytteistä voisi seuloa variantteja geenikirjastoja varten.

## 7 YHTEENVETO

Työssä verrattiin eri menetelmiä tuottaa DNA:ta. Tietoa menetelmän käyttökelpoisuudesta perinteisen tuottotavan rinnalla ei ollut. Työssä kyettiin osoittamaan, että rekombinaatio-menetelmällä päästiin vähintään yhtä hyvin ja jopa

parempiin tuloksiin kuin perinteisellä menetelmällä. Lisäksi rekombinaatiomenetelmä oli perinteiseen digestio-ligaatio-menetelmään verrattuna vähemmän työläämpi. Työssä osoitettiin myös, että ilman konkatameerin minkäänlaista käsittelyä transformaatiotehokkuus oli lähes olematon.

Saadun tiedon avulla rekombinaatio-tekniikkaa voitaisiin kehittää edelleen ja toistamalla koetta saataisiin varmempaa tietoa menetelmän luotettavuudesta. Löydöstä voitaisiin käyttää geenikirjastojen rakentamisessa entistä helpommalla ja tehokkaammalla tavalla, mutta käytännössä geenikirjastojen rakentamisessa sovellusten käyttöaste on niin pieni, ettei kehitetystä tekniikasta tule läpimurtoa. Työtä kannattaisi jatkaa tekemällä siihen useita toistoja, jolloin virhemarginaali saataisiin pienemmäksi ja tulokset olisivat luotettavampia. Kolme toistoa oli vähimmäismäärä, jolla työ voitiin toteuttaa.

---

## LÄHDELUETTELO

- <sup>1</sup> Niemi, M., Virtanen, I., Vuorio, E. (1993) Solu- ja molekyylibiologia, 5.painos, WSOY, Porvoo, s. 19; 116; 148; 150.
- <sup>2</sup> Suominen, I., Ollikka, P.(1999) Yhdistelmä-DNA-tekniikan perusteet, 3.painos, Hakapaino Oy, Helsinki.
- <sup>3</sup> Campbell, M.K, Farrell, S.O. (2009) Biochemistry, Thomson Brooks/Cole, Canada, s;53; 129; 262; 263; 364-403.
- <sup>4</sup> Hartl, D.L (1994)Genetics, 3.painos, Jones and Bartlett Publishers, England, s;118; 288; 352; 354.
- <sup>5</sup> QIAquick Spin Handbook 03/2008
- <sup>6</sup> QIAprep Miniprep Handbook 12/2006
- <sup>7</sup> Novagen (2003) User Protocol TB146 Rev. A 0204
- <sup>8</sup> Fermentas, T4 DNA Ligase #EL0011
- <sup>9</sup> <http://www.promega.com/enotes/features/9910a/images/Rapidlig2.jpg> [online, viitattu 15.7.2009].
- <sup>10</sup> Jackson, D.A, Symons, R.H, Berg,P.(1972) Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of Simian Virus 40: circular SV40 DNA molecules containing lambda phage genes and the galactose operon of Escherichia coli. Proc. Natl Acad. Sci. Usa, 69, 2904-2909.
- <sup>11</sup> Christ, D., Famm, K., Winter, G. (2006) Nucleic Acids Research, Vol.34, No.16, Tapping diversity lost in transformations–*in vitro* amplification of ligation reactions.
- <sup>12</sup> Nilsson, M. (2006) Histochem Cell Biol, Lock and roll: single-molecule genotyping in situ using padlock probes and rolling-circle amplification.
- <sup>13</sup> Johne, R., Muller, H., Rector, A., van Ranst, M., Stevens, H. (2009) Trends in Microbiology Vol.17, Rolling-circle amplification of viral DNA genomes using phi29 polymerase.



- 
- <sup>14</sup> Sato, M., Ohtsuka, M., Ohmi, Y. (2004) Nucleic Acids Symposium Series No. 48, Repeated GenomiPhi, phi29 DNA polymerase-based rolling circle amplification, is useful for generation of large amounts of plasmid DNA.
- <sup>15</sup> Dean, F.B, Nelson, J.R, Giesler, T.L, Lasken, R.S (2001) Genome Research, Rapid Amplification of Plasmid and Phage DNA Using Phi29 DNA Polymerase and Multiply- Primed Rolling Circle Amplification.
- <sup>16</sup> <http://www.neb.com/nebecomm/products/productM0269.asp> [online, viitattu 2.6.2011].
- <sup>17</sup> Sblattero, D., Lou, J., Marzari, R., Bradbury, A. (2001) Reviews in Molecular Biotechnology 74, 303-315, In vivo recombination as a tool to generate molecular diversity in phage antibody libraries.
- <sup>18</sup> Missirlis, P.I, Smailus, D.E, Holt,R. (2006) BMC Genomics, A high-throughput screen identifying sequence and promiscuity characteristics of the loxP spacer region in Cre- mediated recombination .
- <sup>19</sup> Sheren, J., Langer S.J, Leinwand, L.A (2007) Nucleic Acids Research, Vol.35, No.16, A randomized library approach to identifying functional lox site domains for the Cre-recombinase.
- <sup>20</sup> Biolabs, <http://www.neb.com/nebecomm/products/productM0298.asp> [online, viitattu 2.6.2011].
- <sup>21</sup> Van Duyne, G.D, (2001) Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 30:87-104 A Structural view of Cre-loxP site-specific recombination.
- <sup>22</sup> Hadjantonakis, A-K., Pirity, M., Nagy A. Methods in Molecular Biology, Vol.461, Cre Recombinase Mediated Alterations of the Mouse Genome Using Embryonic Stem Cells.
- <sup>23</sup> Jullien, N., Goddard, I., Selmi-Ruby, S., Fina, J-L., Cremer, H., Herman, J-P. (2007) PLoS ONE, Conditional Transgenesis Using Dimerizable Cre (DiCre).
- <sup>24</sup> Opetushallitus, <http://www.edu.fi/oppimateriaalit/dnatekniikka/> [online, viitattu 20.10.2009].
- <sup>25</sup> Fujii, R, Kitaoka, M., Hayashi, K. (2004) Nucleic Acids Res.32, e145, One-step random mutagenesis by error-prone rolling circle amplification.