

Juha Laitinen

Itsemurhavektorin valmistaminen *Yersinia enterocolitica* O:3:n ligaasigeenin inaktivoimista varten

Metropolia Ammattikorkeakoulu  
Laboratorioanalyttikko (AMK)  
Laboratorioala  
Opinnäytetyö  
27.11.2011

Tekijä(t) Otsikko  Sivumäärä Aika	Juha Laitinen Itsemurhavektorin valmistaminen <i>Yersinia enterocolitica</i> O:3:n ligaasigeenin inaktivoimista varten  27 sivua 27.11.2011
Tutkinto	Laboratorioanalyytikko (AMK)
Koulutusohjelma	Laboratorioala
Suuntautumisvaihtoehto	
Ohjaaja(t)	Yliopettaja Arja Miettinen-Oinonen Bakteriologian professori Mikael Skurnik
<p>Haartman-instituutissa tutkitaan lipopolysakkaridien merkitystä bakteerien taudinaiheuttamiskyvylle. Tämä opinnäytetyö tehtiin osana tätä tutkimusta. Tavoitteena oli valmistaa <i>waaL<sub>os</sub></i>-geenin deleetion sisältävä pSW23T itsemurhavektori, joka siirrettiin <i>Yersinia enterocolitica</i> kantoihin O:3-wt ja <i>Y. enterocolitica</i> O:3-c myöhempää tutkimusta varten.</p> <p><i>Yersinia</i> -bakteerit ovat eläinperäisiä elintarvikepatogeenisiä bakteereja. Ne voivat päätyä ruokaan huonon teurastushygienian vuoksi, mutta myös kasvien osuus bakteerin lähteenä on lisääntynyt. Yersiniat ovat psykrotrofeja, eli ne kykenevät kasvamaan jääkaappiolosuhteissa. Lisäksi ne kestävät jopa 5 %:n suolapitoisuuksia ja laajaa pH:n vaihtelua. Yleisimmät infektion aiheuttajat ovat <i>Y. enterocolitica</i> tai <i>Y. pseudotuberculosis</i>. Bakteerit aiheuttavat ihmisellä yersinioosin. Yersinioosi on suolistotulehdus, jota voi seurata akuutti niveltulehdus.</p> <p>Yersinioilla on enterobakteerien tapaan ulkokalvon rakenteessa molekyylijä, joita kutsutaan lipopolysakkarideiksi eli LPS:ksi. LPS auttaa bakteeria infektion alkuvaiheessa kätkeään antigenejä sekä suojautumaan makrofageilta ja erilaisilta antimikrobisilta aineilta. Bakteerin hajotessa LPS hajoaa ja siitä vapautuu endotoksinen rakenneosia, jota kutsutaan lipidi A:ksi. Lipidi A aiheuttaa myrkytysoireita isäntäelimestössä kemiallisten ominaisuuksiensa vuoksi.</p> <p>Työn ensimmäisenä vaiheena valmistettiin itsemurhavektori pSW23T-<i>waaL<sub>os</sub></i>. Geeniä monistettiin PCR-reaktiolla ja se ligoitiin osaksi vektoria, joka transformoitiin <i>Escherichia coli</i> soluihin. Tämän jälkeen geeni katkaistiin PCR-reaktiolla ja geenin väliin liitettiin ligaatiolla tetrasykliiniresistenssigeeni. Plasmidi pSW23T-<i>waaL<sub>os</sub>::tet</i> transformoitiin ω7249 soluihin, josta inaktivoitu geeni siirrettiin osaksi <i>Y. enterocolitica</i> O:3 wt ja O:3-c solujen genomia. <i>Y. enterocolitica</i> soluista rikastettiin sykloseriini-rikastuksella kloramfenikoli herkkiä ja tetrasykliinille resistenttejä bakteereja.</p>	
Avainsanat	<i>Yersinia enterocolitica</i> , lipopolysakkaridi, itsemurhavektori

Author(s) Title	Juha Laitinen Construction of a suicide vector for ligase gene inactivation in <i>Yersinia enterocolitica</i> O:3
Number of Pages Date	27 pages 27 November 2011
Degree	Laboratory technologist
Degree Programme	Bachelor of Laboratory Sciences
Specialisation option	
Instructor(s)	Arja Miettinen-Oinonen, Principal Lecturer Mikael Skurnik, Professor of Bacteriology
<p>One research subject in the Haartman institute is the importance of lipopolysaccharides for bacterial virulence. This study was part the research to construct a suicide vector pSW23T with a deletion for gene <i>waaL<sub>os</sub></i> inserted in BamHI digestion site. The second aim was to inactivate <i>waaL<sub>os</sub></i> the gene of <i>Yersinia enterocolitica</i> O:3 wt and <i>Y. enterocolitica</i> O:3-c strains using the allelic exchange method.</p> <p><i>Yersiniae</i> are foodborne pathogens which cause infections in livestock and feral animals. They are psychrotrophic organisms and capable of proliferating in refrigerated conditions. In addition, they are able to endure variation in pH and high salt concentrations up to 5 %. Two of the most common causes of infection in humans are <i>Y. enterocolitica</i> and <i>Y. pseudotuberculosis</i>. These bacteria cause an infectious disease, yersiniosis, which is gastroenteritis which can be followed by reactive arthritis.</p> <p><i>Yersiniae</i> have an outer membrane which holds a molecule known as LPS. LPS assist bacteria in the early stages of infection by concealing part of antigens, protecting them from macrophages and protecting them from antimicrobial molecules. Lipopolysaccharide have a subunit in them called lipid-A. This structure has endotoxic effects when it is released from LPS.</p> <p>The first objective of the study was to construct the plasmid with the <i>waaL<sub>os</sub></i> gene ligated as part of it. The gene was amplified using PCR-reaction, which was followed by digestions and ligation into the vector. The ligation mixture was transformed into <i>Escherichia coli</i> cells. The plasmid was isolated from the cells and the gene was interrupted introducing tetracycline resistance gene in the middle of the <i>WaaL<sub>os</sub></i> gene. Plasmid pSW23T-<i>waaL<sub>os</sub>::tet</i> was transformed into <math>\omega</math>7249 cells which were used to conjugate with <i>Y. enterocolitica</i> O:3 wt and <i>Y. enterocolitica</i> O:3-c and introduce the deletion as part of genomic DNA via allelic exchange. Bacteria with deletion were selected using cycloserine enrichment. The method employed a process which resulted in colonies sensitive to chloramphenicol and resistant to tetracycline.</p>	
Keywords	<i>Yersinia enterocolitica</i> , lipopolysaccharide, suicide vector

# Sisälllys

Lyhenteet

<b>1 Johdanto</b>	<b>1</b>
<b>2 Kirjallisuuskatsaus</b>	<b>2</b>
2.1 <i>Yersinia</i> -suku	2
2.2 <i>Yersinia enterocolitica</i>	3
2.3 Lipopolysakkaridit	3
2.3.1 LPS biosynteesi	5
2.3.2 WaaL-proteiinit	6
2.4 pSW itsemurhavektorit	6
<b>3 Materiaalit ja menetelmät</b>	<b>8</b>
3.1 Kannat ja materiaalit	8
3.2 DNA:n manipulointi	9
3.2.1 Fenoli-kloroformiuutto	9
3.2.2 Etanolisaostus	9
3.2.3 Agarosigeelielektroforeesi	9
3.3 Rekombinantti-DNA -tekniikat	10
3.3.1 PCR-reaktio	10
3.3.2 Restriktioentsyymidigestio	11
3.3.3 Defosforylaatio	12
3.3.4 Ligaatio	12
3.3.5 Transformaatio ja elektroporaatio	12
3.3.6 Restriktioentsyymin tunnistuskohdan mutageneesi	13
3.3.7 Konjugaatio	14
3.4 Sekvensointi	14
3.5 Sykloseriirikastus	15
<b>4 Tulokset ja tulosten tarkastelu</b>	<b>15</b>
4.1 Vektorin pSW23T-waaL <sub>os</sub> valmistus	15
4.2 Restriktioentsyymi BglII tunnistuskohdan mutageneesi	18
4.3 <i>tetM</i> -geenin liittäminen pSW23T- $\Delta$ waaL <sub>os</sub> vektoriin	19
4.4 Sykloseriirikastus	23

5 Pohdintaa

25

Lähteet

26

## Lyhenteet

ABC-transporter	ATP-binding cassette transporter. ATP:tä sitova kuljetin. Solukalvolla sijaitseva kuljetinproteiini, joka käyttää ATP:tä pienten molekyylien kuljettamiseen kalvon läpi.
ACP	Acyl carrier protein. Asyylikantajaproteiini.
bp	base pair. Emäspari.
GFP	Green fluorescent protein. Vihreää valoa fluoresoiva fuusio proteiini.
LPS	Lipopolysaccharide. Lipopolysakkaridi, gramnegatiivisten bakteerien ulkopinnalla sijaitseva rakenne.
Kdo	3-deoxy-D-manno-octulosonic acid.
NDP	Nucleoside diphosphate. Nukleosididifosfaatti.
PCR	Polymerase chain reaction. Polymeerasiketjureaktio.
SAP	Shrimp alkaline phosphatase. Katkaravun alkaalinen fosfa-taasi.
UDP	Uridine diphosphate. Uridiinidifosfaatti.
UDP-GlcNAc	UDP-N-asetyyli-D-galaktosamiini uronihappo.
WaaL	OPS-ligaasiproteiini.
Wzx	lps-flippaasiproteiini.
Wzy	OPS-polymeraasiproteiini.

YadA	Yersinia adhesin A. Bakteriaa komplementilta suojaava pintaproteiini.
Yop	Yersinia outer protein. <i>Yersinia</i> -bakteerien solukalvon pintaproteiini.

## 1 Johdanto

Opinnäytetyön kohteena oli tutkia *Yersinia enterocolitica* serotyyppi O:3 genomisessa DNA:ssa sijaitseva *waaL*-geeniä ja sen vaikutusta bakteerin ulkomembraanissa sijaitsevan lipopolysakkaridin rakenteeseen. *waaL*-geeni koodaa LPS-ligaasi proteiinia, joka on osana gramnegatiivisten bakteerien lipopolysakkaridien synteesiä. Opinnäytetyössä valmistettiin *Y. enterocolitica* kantoja, joiden genomisessa DNA:ssa oleva *waaL*-geeni oli tehty toimintakyvottomäksi alleelinvaihtomenetelmällä.

*Y. enterocolitica* O:3 ja *Y. enterocolitica* O:8 serotyypeistä on löydetty kolme ligaasia  $WaaL_{os}$ ,  $WaaL_{ps}$  ja  $WaaL_{xs}$ , jotka vaikuttavat osaltaan lipopolysakkaridin rakenteeseen. Geenien inaktivointi saa aikaan erilaisia muutoksia bakteerien lipopolysakkaridirakenteeseen.  $waaL_{os}$ -mutantissa O-antigeenin ja ulomman ydinsokerin lisääminen lipopolysakkaridirakenteeseen estyy melkein kokonaan, kun taas  $waaL_{ps}$ -mutantissa vaikutus on pienempi.

Tutkimuksen tavoitteena oli selvittää kunkin ligaasin merkitys bakteerin taudinaiheuttamiskyvylle. Tämä voidaan tehdä valmistamalla kantoja, joista on deletoitu ligaasigeenejä. Taudinaiheuttamiskykyä voidaan tutkia esimerkiksi eläinkokeilla. Eläinkokeilla voidaan tutkia mutantin virulenssia. Koe voidaan suorittaa yhteisinfektiokokeella, jossa käytetään villityyppiä ja mutanttia infektoimaan esimerkiksi hiiri, jolloin voidaan verrata mutantin virulenssia pelkkään villityyppiin. *Y. enterocolitica* O:8 antaa mahdollisuudet muodostaa tautimalleja hiirille, joista voidaan saada käsitys siitä miten eri rakenteet vaikuttavat bakteerin virulenssiin.

Työn tavoitteena oli luoda itsemurhavektori, jossa oli tetrasykliiniresistenssigeenillä katkaistu *waaL<sub>os</sub>*-geeni. Lisäksi tavoitteena oli siirtää plasmidin avulla katkaistu geeni osaksi kantojen *Y. enterocolitica* O:3 wt ja *Y. enterocolitica* O:3-c genomia alleelinvaihtomenetelmällä.



## 2 Kirjallisuuskatsaus

### 2.1 *Yersinia* -suku

*Yersinia* -bakteerit ovat *enterobacteriaceae*-heimoon kuuluvia fakultatiivisesti anaerobisia gramnegatiivisia sauvabakteereita. *Yersinia* -sukuun kuuluu yhteensä 17 eri lajia, joista kolme on ihmiselle patogeenisiä: *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pestis* ja *Yersinia pseudotuberculosis*. [1]

*Y. enterocolitica* ja *Y. pseudotuberculosis* aiheuttavat ihmisellä yersinioosin, jonka oireina ovat tyypillisesti kuume, ripuli ja vatsakipu. Lisäksi jälkitautina voi ilmetä niveltulehduksia. Yersinioosiin sairastuvat tyypillisesti pienet lapset ja nuoret aikuiset. *Y. pestis* on puolestaan zoonoosi, joka aiheuttaa paiseruttoa. Yersiniat ovat fakultatiivisesti anaerobisia psyktrotrofeja, jotka kykenevät kasvamaan jääkaappiolosuhteissa. Yersinioiden optimikasvulämpötila on noin 28 °C, mutta ne voivat kasvaa -5 °C:sta +42 °C:seen. Esimerkiksi *Y. enterocolitica* on todettu selviävän pitkiä aikoja pakastetussa ruoassa ja kestävän useita sulatus- ja pakastuskertoja. Tämän lisäksi yersiniat kestävät suurta pH vaihtelua (pH 4-10) ja natriumkloridipitoisuutta (5,0 %:iin asti). [2]

Patogeeniset yersiniat sisältävät 70 kb kokoisen pYV virulenssiplasmidin. Plasmidi sisältää geenejä, jotka mahdollistavat infektion alkamisen ja taudin kehittymisen. Geenien koodittamat virulenssitekijät antavat bakteereille kyvyn kiinnittyä erilaisiin pintoihin ja tunkeutua isäntäeläimen soluihin muodostamalla YadA proteiinia. Lisäksi bakteerin YadA:lla on isäntäeläimestön komplementilta suojaava vaikutus. Toisena virulenssitekijänä ovat Yop proteiinit, jotka Tyypin III eritysjärjestelmä siirtää isäntäsoluun. Yop proteiinit haittaavat immuunijärjestelmän toimintaa ja esimerkiksi YopJ ja YopP proteiinit estävät makrofagien fagosytoosin käynnistämällä niissä apoptoosin. Virulenssiplasmidin lisäksi muutama virulenssitekijöistä on kromosomaalisessa DNA:ssa, jotka sisältävät epiteelisoluihin kiinnittymiseen ja tunkeutumiseen liittyviä ominaisuuksia. [2, 3, 4]

## 2.2 *Yersinia enterocolitica*

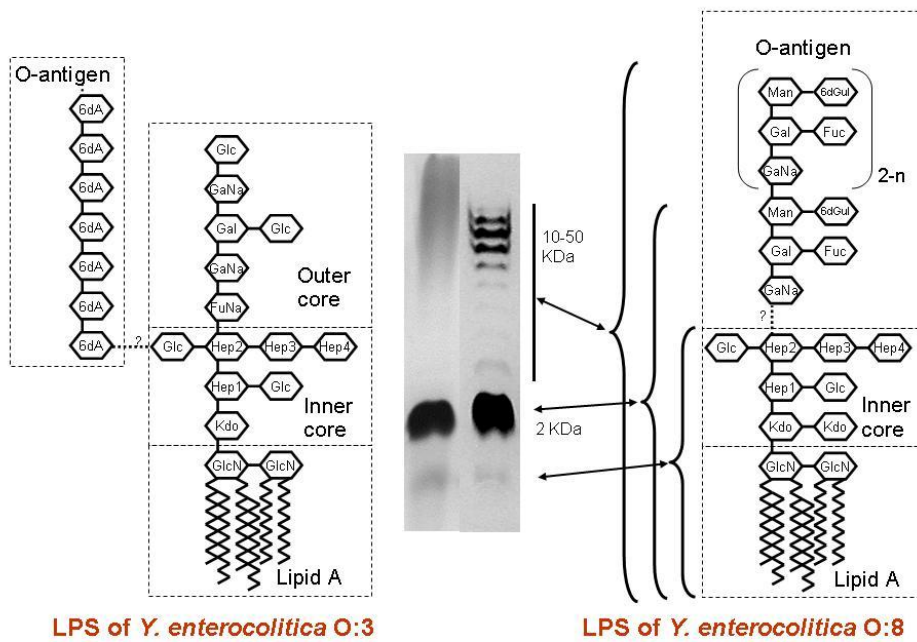
*Y. enterocolitica* on osa eläinten nielun luonnollista bakteeristoa, ja sitä löytyy erityisesti sikojen nielurisoista. *Y. enterocolitica* kasvaa eläinten ja ihmisen suolistossa, bakteeria löytyy kuitenkin runsaasti myös eläinperäisen saastumisen vuoksi luonnonvesistä. Tartunnan voi saada erityisesti huonosti kypsennetystä sianlihasta tai muusta saastuneesta elintarvikkeesta. Suomessa esiintyy vuosittain 600–900 tartuntaa, joista suurin osa on peräisin vihanneksista. Yleisimmät suolistotulehdusten aiheuttajat Euroopassa ovat salmonella ja kampylobakteeri. *Y. enterocolitica* on tällä hetkellä Euroopan kolmanneksi yleisin suolistotulehdusten aiheuttaja. [1, 2, 3]

*Y. enterocolitica* ja sen sukuiset lajit voidaan jakaa ainakin 76 serotyyppiin, jotka muokkautuvat O-antigeenirakenteen perusteella. *Y. enterocolitica* liikkuu peritriikkisten flagellojen avulla 25 °C lämpötilassa, mutta pysyy paikallaan 37 °C:ssa. Tämän lisäksi se pystyy anaerobisten ominaisuuksiensa vuoksi fermentoimaan glukoosia ja muita hiilihydraatteja. Bakteeri antaa oksidaasitestistä negatiivisen tuloksen ja katalaasitestistä positiivisen. [1, 2, 3]

## 2.3 Lipopolysakkaridit

Lipopolysakkaridit (LPS) ovat lipidistä ja polysakkaridista koostuvia molekyylejä, jotka muodostavat yhdessä pintaproteiinien ja fosfolipidikalvon kanssa gramnegatiivisten bakteerien ulkomembraanin. Lipopolysakkaridit toimivat monella tapaa osana solukalvoa. Ne auttavat infektion alkaessa infektoimaan isäntäelimestä suojaamalla bakteerisolua muun muassa makrofageilta sekä bakteereja tunnistavilta aineilta piilottamalla osan pinta-antigeeneistä. [4]

Lipopolysakkaridin rakenne jaetaan kolmeen pääosaan: lipidi A:han, ydinsokeriin ja polysakkaridiin. Hydrofobinen lipidi A muodostaa LPS:n rungon ulkomembraanin osana solun sisälle. Ulompana osana on hydrofiilinen polysakkaridi, joka muodostaa O-antigeenin. Kahta rakenneosaa yhdistää keskellä oleva ydinsokeri. Kuvassa 1 on havainnollistettu lipopolysakkaridien rakennetta esittämällä *Y. enterocolitica* O:3 ja *Y. enterocolitica* O:8 rakenteet. [4]



**Kuva 1. *Y. enterocolitica* O:3:n ja *Y. enterocolitica* O:8:n lipopolysakkaridirakenteiden kaava-kuva [muokattu lähteestä 4]**

O-antigeenien rakenne vaihtelee suuresti, tai se voi puuttua kokonaan. Rakenteet voidaan jakaa homopolymeerisiin ja heteropolymeerisiin. *Y. enterocolitica* O:3:n O-antigeeni on muodostunut toistuvista monosakkarijaksista, ja sitä kutsutaan homopolymeeriseksi. *Y. enterocolitica* O:8:n O-antigeeni on muodostunut useasta eri sokerista, jolloin sitä kutsutaan heteropolymeeriseksi. Lisäksi lipopolysakkaridien muu rakenne vaihtelee serotyypeittäin. Esimerkiksi serotyyppi O:8:lta puuttuu ulompi ydinsokeri, joka on oleellinen tekijä bakteerin kyvyssä kestää kationisia bakteereita tuhoavia peptidejä. [1,4]

Lipidi A koostuu kahden glukosamiinin muodostamasta disakkaridista ja niihin liittyneistä  $\beta$ -hydroksihapoista. Lipidi A:ta kutsutaan myös endotoksiiniksi, koska kyseinen molekyyli vapautuu bakteerin hajotessa fagosytoosin tai muun syyn seurauksena, ja aiheuttaa myrkytysoireita. Oireet vaihtelevat kuumeesta tulehduksiin ja aina verenmyrkytykseen asti. [4, 5]

### 2.3.1 LPS biosynteesi

LPS:n biosynteesi on monimutkainen prosessi, johon osallistuu monia entsyymejä ja entsyymikomplekseja. LPS:n biosynteesi tapahtuu kahdessa osassa. Lipidi A syntetisoidaan ydinsokerin kanssa ja O-antigeeni syntetisoidaan omana yksikkönään.

Lipidi A:n biosynteesi tapahtuu sisämembraanin sytoplasmisessa tilassa, jossa kaksi rasvahappoketjua liittyy kahteen eri UDP-sokeriin 3OH-C14-ACP (3-hydroksi-C14-assylikantajaproteiini) ja UDP-GlcNAc (UDP-N-asetyyli-D-galaktosamiiniuronihappo). Muodostuneet sokeri-rasvahappokompleksit liittyvät yhteen ja muodostavat lipidi A:n esiasteen lipidi IVa:n. Lipidi IVa:han liittyy lisää Kdo (3-deoxy-D-manno-octulosonic acid) ydinsokereita jotka muodostavat uuden välituotteen Kdo-lipidi A:n. Kdo-lipidi A toimii vastaanottajana, johon glykosyylitransferaasit kiinnittävät NDP-sokeriosia. Reaktion tuotteena muodostuu lipidi A –ydinoligosakkaridi. Valmistunut lipidi A – ydinoligosakkaridi siirretään sisämembraanin ulkopinnalle, jossa siihen kiinnittyy O-antigeeni. Lipidi A:n biosynteesiä ohjaavat geenit ovat sijoittuneet ympäri genomia esiintyvät ja O-antigeenin biosynteesissä geeniklustereihin sijoittuneet geenit. Rakenteen valmistuttua flippaasi Wzx kääntää LPS:n O-antigeenipään membraanin ulkopuolelle ja ligaasi WaaL liittää sen lipidi A:han. O-antigeenin synteesi tapahtuu lipidi A:n synteessin tavoin sisämembraanin sytoplasmisessa tilassa. Reaktio voi tapahtua kolmella eri tavalla: wzy-, syntaasi- tai ABC-transporter-riippuvaista reittiä. [4, 8]

wzy-reittiä kutsutaan myös heteropolymeeriseksi reitiksi, koska siinä OPS-polymeraasi liittää erilaisia sokeriyksiköitä toisiinsa (vrt. homopolymeerinen). Reaktio saa alkunsa sokerifosfaatin liittymisellä undekaprenyylifosfaattiin, joka toimii kantajamolekyylinä reaktiossa. Tuotteena syntyy monosakkaridi-P-P-Und, joka on oligosakkaridin esiaste. Kullekin NDP-sokerille spesifit glykosyylitransferaasit liittävät monosakkaridi-P-P-Und –molekyyliin sokeriosia muodostaen O-yksikkökettuja, jotka flippaasi Wzx kääntää sisäkalvon toiselle puolelle periplasmiseen tilaan. Periplasmisessa tilassa OPS-polymeraasi Wzy liittää molekyylit pitkiksi ketjuiksi. Lopuksi OPS-ligaasi WaaL liittää O-antigeenin lipidi A – ydinsokeriin. ABC-transporter-riippuvaisessa reitissä ja syntaasireaktioreitissä olevat entsyymit toimivat hieman eri tavoin muihin reaktioihin verrattuna. [4, 8]

### 2.3.2 WaaL-proteiinit

WaaL-proteiinit ovat ligaasiproteiineja, jotka liittävät O-antigeenin lipidi A-oligosakkaridimolekyylisiin. Ne ovat tällä hetkellä ainoat tunnetut proteiinit, jotka osallistuvat reaktioon.

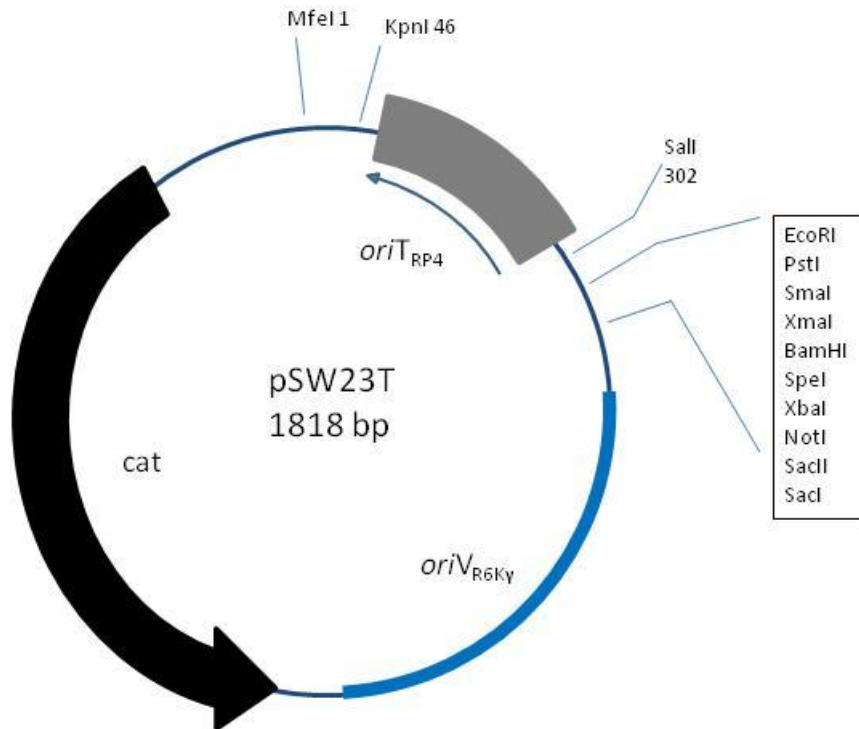
WaaL-ligaasit muodostavat reaktioissa glykosididoksisia siirtäessään undekaprenyylipyrofosfaatin luovuttaman oligosakkaridin tai polysakkaridin lipidi A-oligosakkaridimolekyylisiin. WaaL-ligaasien periaate muistuttaa glykosyylitransferaasien toimintaa, mutta ne poikkeavat rakenteellisesti glykosyylitransferaaseista, jotka siirtävät monosakkarideja luovuttajamolekyyleiltä. Ligaasien oletetaan toimivan osana isomppaa kompleksia, joka osallistuu O-polysakkaridin välituotteen ja lipidi A:n liittämiseen toisiinsa. Entsyymien kyky tunnistaa luovuttajamolekyylisen rakenteita on rajallinen. Tämän takia ne voivat helposti tunnistaa undekaprenyylipyrofosfaatin ja toimia reaktiossa. Tämä voi aiheuttaa muutoksia lipidi A-ydinsokerikompleksin rakenteeseen. [7]

WaaL-proteiinien rakennetta solukalvolla on kartoitettu entsyymiaktiivisuuskokeilla ja orientaatiota GFP-fuusioproteiinikokeilla. Kokeissa käytettiin alkaalista fosfataasia ja  $\beta$ -galaktosidaasia määrittämään proteiinin periplasmista ja sytoplasmista osaa. Entsyymiaktiivisuus havaittiin käyttämällä entsyymeille spesifisiä substraatteja joihin oli liitetty kromofori. Proteiinin huomattiin muodostavan 12 solukalvon lävitse kulkevaa segmenttiä. Nämä muodostivat solukalvon ulko- ja sisäpuolelle erikokoisia silmukoita. Silmukoita testattiin entsyymiaktiivisuuden määrittämiseksi. [11]

### 2.4 pSW itsemurhavektorit

Itsemurhavektorit ovat plasmideja, jotka voivat replikoitua vain isäntäsolussa, jossa on replikaatiotekijä. Tätä voidaan käyttää tehokkaina työkaluina tutkittaessa geenien toimintoja ja vaikutuksia isäntäsolun toimintaan. Itsemurhavektoreihin liitettyjä DNA-fragmentteja voidaan käyttää vaihtamaan DNA:ta isäntäsolun genomisesta DNA:sta vektorissa olevaan muokattuun DNA:han. Tätä menetelmää kutsutaan alleelinvaihdoksi. Isäntäsolut valitaan siten, että vektori ei voi enää replikoitua niissä, jolloin vektori tuhoutuu solun jakautuessa. Tämän seurauksena valmistetuissa mutanteissa ei ole haittaavia tekijöitä, mikäli kantaan tehdään useampi mutaatio. [9, 10, 15]

Kuvassa 2 on esitetty vektorin pSW23T rakenne. Mustalla merkitty nuoli on kloramfenikoliasetyylitransferaasigeeni *cat*, joka antaa resistenssin kloramfenikolia vastaan. Harmaalla merkitty *oriT<sub>RP4</sub>* on konjugaatiossa siirtyvän DNA:n aloituskohta ja sinisellä merkitty alue on replikaation aloituskohta *oriV<sub>R6KY</sub>* [9]



**Kuva 2. Itsemurhavektorin pSW23T rakenne [lähde 9 mukailen]**

pSW itsemurhavektoreista on poistettu *pir*-geeni, joka muodostaa  $\pi$ -proteiinin ja toimii replikaatiotekijänä. Geenin poisto mahdollistaa sen, että vektorissa oleva R6K replikaationaloituskohta toimii vain sellaisissa valituissa bakteereissa, joissa on *pir*-geeni. *Pir*-geeni voidaan tarvittaessa siirtää transduktiolla soluun ja näin luoda kantoja joissa itsemurhavektori voi replikoitua. Plasmideihin on myös liitetty RP4 konjugaatiosysteemi, joka mahdollistaa plasmidin sisältävän solun konjugaation vastaanottajan kanssa. Systemiä voidaan käyttää erityisesti siirrettäessä vierasta DNA:ta bakteereihin, jotka eivät tavallisesti ole transformoitavissa. [9,10,15]

### 3 Materiaalit ja menetelmät

#### 3.1 Kannat ja materiaalit

Työssä käytetyt bakteerit ja alukkeet on listattu taulukoissa 1 ja 2. Bakteerien elatusaineet on esitetty taulukossa 3. Elatusaineisiin lisättiin tarvittaessa tarvittavia antibiootteja 20 µg/ml, lisäksi ω7249 kannan elatusaineisiin lisättiin 0,3 mM diaminopimeliinihappoa.

**Taulukko 1. Käytetyt bakteerikannat [10, 12, 13]**

Kanta	Genotyyppi
<b><i>Escherichia coli</i></b>	
ω7249	B2163Δnic35, <i>E. coli</i> kanta itsemurhavektorien mobilisointiin, vaatii kasvualustaan 0,3 mM diaminopimeliinihapon, KanR
S17-1λ pir	S17-1 kannan λ- <i>pir</i> lysogeeni, <i>E. coli</i> kanta itsemurhavektorien mobilisointiin
<b><i>Yersinia enterocolitica</i></b>	
6471/76 (YeO3)	villityyppi
6471/76-c (YeO3-c)	(cured) virulenssiplasmidi pYV poistettu villityypistä

**Taulukko 2. Käytetyt alukkeet**

Aluke	Sekvenssi	Käyttö
O3ligYe1727R	AGGTCAGTACTTTATTCTGTTTGTTCCATTTCTAA	Sekvenssoinnissa <i>tetM</i> -insertin toteamiseen <i>waaL<sub>os</sub></i> -insertin keskeltä
O3ligYe1727F2	GCGCTCGCTGTATCGTATCT	<i>waaL<sub>os</sub></i> -geenin amplifiointi, jossa mukana flanking region
O3ligYe1727R2	CGGagatctCAGCTTCGTTTGTTTCGTG	<i>waaL<sub>os</sub></i> -geenin amplifiointi, jossa mukana flanking region. 3'-päässä BglII restriktiokohta
O3ligYe1727F3	CGGAGATCTCATCGGAAGGGCATTATT	<i>waaL<sub>os</sub></i> -geenin deleetioalue. 3'-päässä BglII restriktiokohta.
O3ligYe1727R3	CGGagatctCGGGCAAAGTAGCAGAAGAA	<i>waaL<sub>os</sub></i> -geenin deleetioalue 3'-päässä BglII restriktiokohta.
O3ligYe1727delF	AAGCTCGAGAAGCCGCGATACTCGCTATGTGAA	<i>waaL<sub>os</sub></i> -insertin tarkistus
O3ligYe1727delR	AGGCCTCGAGGTTCAACAGCACGGTTTGCACTA	<i>waaL<sub>os</sub></i> -insertin tarkistus
tetM-F	ccggagatct TGCCACCTGACGTCTAAGAA	<i>tetM</i> -geenin amplifiointiin käytetty aluke pBR322-plasmidista
tetM-R	ccggagatct GGAGTGGTGAATCCGTTAGC	<i>tetM</i> -geenin amplifiointiin käytetty aluke pBR322-plasmidista

**Taulukko 3. Bakteerien elatusaineet [14]**

<b>Elatusaine</b>	<b>Kasvatettava bakteeri</b>
Luria broth	nestemäinen yleisalusta
Luria agar	kiinteä yleisalusta
Cin agar	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:3 ja <i>Yersinia enterocolitica</i> O:3-c, yersinia selektiivinen kasvualusta

### 3.2 DNA:n manipulointi

#### 3.2.1 Fenoli-kloroformiuutto

DNA puhdistettiin fenoli-kloroformiuutolla. DNA:ta sisältävään putkeen lisättiin vastaava tilavuus 1:1 valmistettua fenoli-kloroformiliuosta DNA-liuosta kohden. DNA-liuos sekoitettiin varovasti ja sentrifugoitiin 3 minuuttia  $16,1 \cdot 10^3$  g. Vesifaasi pipetoitiin uuteen putkeen ja lisättiin siihen fenolijäämien poistamiseksi DNA-liuoksen tilavuutta vastaava tilavuus kloroformia. Sentrifugoitiin kuten edellä ja siirrettiin vesifaasi uuteen putkeen. Tarvittaessa uuttovaiheita toistettiin muutamia kertoja paremman saannon saamiseksi. [6]

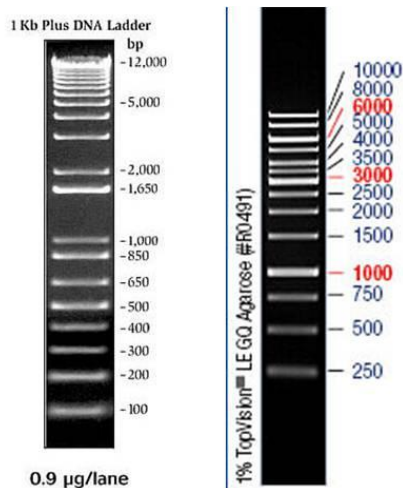
#### 3.2.2 Etanolisaostus

DNA saostettiin lisäämällä 10 µl:a 100 µl:a kohden 3M natriumasetaatiliuosta ja kolmekertainen tilavuus etanolia. Liuosta säilytettiin pakastimessa -20 °C:ssa 1 tunti tai -70 °C:ssa 30 minuuttia, jonka jälkeen sitä sentrifugoitiin 20 minuuttia 16100 g. DNA pestiin 200 µl:lla etanolia ja sentrifugoitiin uudelleen samalla tavalla. Lopuksi DNA-pelletti ilma-kuivattiin ja suspensoitiin veteen.

#### 3.2.3 Agarosigeelielektroforeesi

Entsyyminereaktioiden onnistumisia sekä DNA:n konsentraatiota arvioitiin agarosigeelielektroforeesilla. Geelien ajamiseen käytettiin 100 V:n jännitettä 60 minuutin ajan. DNA:n värjäykseen käytettiin 0,5 µg/ml vahvuista etidiumbromidi-vesiliuosta. Yleisimmät käytetyt geelien konsentraatiot olivat 1 % ja 1,5 %. DNA:n koon määrittämiseen käytettiin kuvassa 3 esitetyjä standardeja 1kb plus DNA ladder (Invitrogen) ja 1 kb Generuler DNA ladder (Fermentas).





**Kuva 3. 1 kb plus DNA ladder (vas.) ja 1kb Generuler DNA ladder (oik.)**

### 3.3 Rekombinantti-DNA -tekniikat

#### 3.3.1 PCR-reaktio

DNA:n monistamiseen käytettiin erilaisia PCR-reaktioita. Reaktiot pohjautuivat taulukon 4 osoittamaan PCR-reaktioon. Käytetyt ohjelmat pohjautuivat taulukon 5 mukaiseen ohjelmaan. Finnzymes Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase entsyymille käytettiin erillistä reaktiota ja ohjelmaa, jotka oli suunniteltu kyseiselle entsyymille. Reaktio ja ohjelma on esitetty taulukon 4 oikeanpuoleisissa sarakkeissa. Phusionille käytetty ohjelma on esitetty taulukossa 6.

**Taulukko 4. Tavallinen PCR-reaktio (vas.) ja Phusion PCR-reaktio (oik.)**

Reagenssi	µl	Loppukon- sentraatio	Reagenssi	µl	Loppukon- sentraatio
DNA-templaatti	1	-	DNA-templaatti	1	-
10 x Optimized DyNAzyme™ Buffer	5	1 x	5 x Phusion HF Buffer	10	1 x
Aluke 1	1	0,2 µM	Aluke 1	1	0,2 µM
Aluke 2	1	0,2 µM	Aluke 2	1	0,2 µM
dNTP (10 mM)	1	0,2 mM	dNTP (10 mM)	1	0,2 mM
F501-L Dynazyme II DNA-polymeraasi	1	2 U	F530-S Phusion® High- Fidelity DNA-polymeraasi	1	2 U
H <sub>2</sub> O	40	-	H <sub>2</sub> O	40	-
Totaaltilavuus	50	-	Totaaltilavuus	50	-

**Taulukko 5. Tavallinen PCR-ohjelma**

Vaihe	T (°C)	aika	Syklien määrä
Alkudenaturaatio	95	1 min	1
Denaturaatio	95	30 s	27
Annealing	55	10 s	
Ekstensio	72	2 min	
Jäähdytys	4	∞	1

**Taulukko 6. Phusion entsyymille käytetty PCR-ohjelma**

Vaihe	T (°C)	aika	Syklien määrä
Alkudenaturaatio	98	30 min	1
Denaturaatio	98	10 s	27
Annealing	60	30 s	
Ekstensio	72	45 s	
Jäähdytys	4	∞	1

### 3.3.2 Restriktioentsyymidigestio

DNA pilkottiin restriktioentsyymeillä ligaatioreaktioita varten. Reaktioita inkuboitiiin valmistajien entsyymeille ilmoittamissa optimilämpötiloissa kaksi tuntia tai yön ylitse. Digestioihin käytettiin taulukon 7 kaltaista tai siitä muunneltua reaktiota.

**Taulukko 7. Digestioreaktio**

Reagenssi	µl
DNA	17,5
Restriktioentsyymin puskuri 10 x	2
Restriktioentsyymi	0,5
H <sub>2</sub> O	-
Totaalivolavuus	20

### 3.3.3 Defosforylaatio

Entsyympilkotut vektorit defosforyloitiin Fermentaxen shrimp alkaline phosphatase entsyymillä (Cat. No.: EF0511). Reaktiota inkuboitiin 37 °C lämpötilassa 30 minuuttia. Käytetty reaktio on esitetty taulukossa 8. Entsyymin inaktivoitiin inkuboimalla reaktiota 15 minuuttia 70 °C:ssa.

**Taulukko 8. SAP-reaktio**

Reagenssi	µl
BamHI pilkottu pSW23T	20
10 x SAP buffer	3
SAP	1
H <sub>2</sub> O	6
totaalilavuus	30

### 3.3.4 Ligaatio

DNA-fragmentit liitettiin toisiinsa ligaatiolla. Ligaatioissa käytettiin New England Biolabs T<sub>4</sub> DNA ligaasientsyymiä. Reaktioita inkuboitiin 4 °C:ssa yön yli. Reaktiot tehtiin taulukossa 9 esitetyn reaktion mukaan.

**Taulukko 9. Ligaatioreaktio**

Reagenssi	µl
Insertti	10
Vektori	7
Ligaasi puskuri	2
Ligaasi	1
Totaalilavuus	20

### 3.3.5 Transformaatio ja elektroporaatio

Soluja transformoitiin kahdella tavalla, kemiallisella transformaatiolla ja elektroporaatiolla. Kemiallisessa transformaatioissa soluja inkuboitiin transformoitavan DNA:n kanssa jäällä 30 minuuttia. Inkuboinnin jälkeen soluille annettiin kahden minuutin mittainen lämpöshokki 42 Celsius-asteessa. Elektroporaatioon käytettiin valmiita elektrokomp-

tenteiksi tehtyjä *E. coli* S17-1  $\lambda$  pir –soluja. Kemialliseen transformaatioon käytettiin valmiita kemiallisesti kompetentteja  $\omega$ 7249 *E. coli* –soluja.

Elektroporaatio toteutettiin kemiallisen transformaation tavoin sillä erolla, että lämpöshokin sijaan käytettiin lyhytaikaista sähköshokkia. Käytetty elektroporaattori oli Bio-rad pulse controller plus. Resistanssi oli 200  $\Omega$ , kapasitanssi 25  $\mu$ F ja jännite 2,5 kV. Sähköshokki annettiin noin 4,5 ms ajan.

Lämpö- tai sähköshokin jälkeen soluja inkuboitiin jäällä kolmen minuutin ajan. Inkuboinnin jälkeen ne siirrettiin 1 ml:aan LB-lientä antibioottiresistenssin ekspressiota varten. Soluja inkuboitiin yksi tunti 850 rpm:n ravistelussa 37 °C:ssa, minkä jälkeen ne pipetoitiin sopivaa antibioottia sisältävälle maljalle. Soluja pipetoitiin maljoille 50  $\mu$ l, 100  $\mu$ l ja loput solut. Maljoja inkuboitiin lämpökaapissa 37 °C:ssa yön yli.

### 3.3.6 Restriktioentsyymien tunnistuskohdan mutageneesi

Restriktioentsyymien katkaisukohta poistettiin plasmidista täyttömenetelmällä. DNA pilkottiin entsyymillä, jonka katkaisukohta aiottiin poistaa. Jäljelle jääneet 5' -kohessiiviset päät täytettiin T<sub>4</sub> polymeraasilla taulukossa 10 esitetyn reaktion mukaan. Reaktiota inkuboitiin huoneenlämpötilassa 15 minuuttia, jonka jälkeen reaktio inaktivoitiin 75 °C:ssa 10 minuuttia.

**Taulukko 10. T<sub>4</sub> DNA polymeraasireaktio**

Reagenssi	$\mu$ l
Digestiotuote	14,5
5 x T <sub>4</sub> DNA polymeraasi puskuri	4
T <sub>4</sub> DNA polymeraasi	0,5
dNTP	1
totaalilavuus	20

5' päihin lisättiin fosfaatit T<sub>4</sub> polynukleotidikinaasilla taulukon 11 reaktion mukaan. Kiinaasireaktiota inkuboitiin 37 °C:ssa 20 minuuttia, minkä jälkeen entsyymi inaktivoitiin 75 °C:ssa 10 minuuttia. Tyypiksi tehdyt päät liitettiin yhteen T<sub>4</sub> DNA ligaasilla. Ligatitotuotteena saadulle plasmidille tehtiin digestio niiden plasmidien tuhoamiseksi, joista katkaisukohta ei ollut poistunut. Tämän jälkeen plasmidi transformoitiin bakteerisolui-

hin, minkä jälkeen tarkistettiin mutageneesin onnistuminen. Tätä varten eristettiin plasmidi joka pilkottiin restriktioentsyymillä ja lopuksi tuotteet ajettiin agarosigeelillä.

**Taulukko 11. Kinaasireaktio**

Reagenssi	$\mu\text{l}$
DNA	16
10 mM ATP	1
T <sub>4</sub> polynukleotidikinaasi	1
Buffer A (fermentas)	2
Totaalilavuus	1

### 3.3.7 Konjugaatio

Konjugaatiolla siirrettiin DNA:ta soluihin, jotka eivät olleet transformoitavissa. Bakteereja kasvatettiin LB-liemessä yön yli, minkä jälkeen mitattiin suspensioiden OD-arvo ja arvioitiin OD arvoa 1 vastaava arvo mikrolitroissa. Suspensiota pipetoitiin arvioitu määrä ja sentrifugoitiin 3 minuuttia 8000 g. Solupelletti suspensoitiin 1 ml:aan PBS-liuosta ja pipetoitiin 50  $\mu\text{l}$  E. coli  $\omega$ 7249 LB-maljalle. Suspension annettiin imeytyä maljaan minkä jälkeen maljalle pipetoitiin 50  $\mu\text{l}$  Y. enterocolitica O:3 villityyppiä. Maljaa inkuboitiin huoneenlämpötilassa yön yli. Inkuboinnin jälkeen bakteerit kerättiin suspensioksi pesemällä maljan pintaa 1 ml:lla PBS-liuosta. Suspensio kerättiin putkeen ja suspensiota pipetoitiin 50  $\mu\text{l}$  Cin-agar maljalle, joka sisälsi kloramfenikolia tai tetrasykliiniä riippuen konjugaatiosta. Maljoja inkuboitiin huoneenlämpötilassa kaksi päivää. Punaiset yersiniapesäkkeet siirrostettiin talteen Cin-agar maljalle, jolle oli lisätty kloramfenikolia tai tetrasykliiniä. Lisäksi pesäkkeet siirrostettiin LB-liemeen sykloseriiniirikastusta varten.

### 3.4 Sekvensointi

Plasmidit tarkistettiin sekvensoimalla ne Haartman-instituutin sekvensoinnin core-yksikössä. Sekvensointireaktioon käytettiin DNA:ta noin 300 ng ja 10 pmol aluketta 6  $\mu\text{l}$ :n tilavuudessa. DNA konsentraatioita arvioitiin spektrofotometrisesti sekä agarosigeelin avulla.

### 3.5 Sykloseriinirikastus

Konjugaatiossa syntyneitä *Yersinia* -bakteereita inkuboitiin 7 päivää LB-liemessä tai tetrasykliiniä sisältävässä LB-liemessä. Käytetty liemi riippui siitä oliko kanta resistentti tetrasykliinille vai ei. LB-liemi vaihdettiin uuteen päivittäin siirrostamalla 200 µl yön yli kasvatettua suspensiota 9,8 ml:aan LB-lientä. Suspension OD<sub>600</sub>-arvo mitattiin rikastuksen alussa. Tuloksen perusteella suspensiota laimennettiin kloramfenikolia sisältävällä LB-liemellä OD<sub>600</sub> -arvoon 0,05. Laimennettua suspensiota inkuboitiin 200 rpm:n ravistuksessa, kunnes OD<sub>600</sub> oli 0,20. Suspension lisättiin sykloseriiniliuos, ja suspensiota inkuboitiin 2,5 tuntia. Inkuboinnin jälkeen solut sentrifugoitiin pelletiksi ja pestiin PBS-liuoksella. PBS-liuoksesta valmistettiin laimennossarja 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup> ja 10<sup>-4</sup>. Joista pipetoitiin tetrasykliiniä sisältäville LB-maljoille 100 µl:a suspensiota. Maljoja inkuboitiin 24 tuntia huoneenlämpötilassa. Pesäkkeitä siirrostettiin 500 kpl tarkistusta varten tetrasykliiniä sisältävälle LB-maljalle sekä tetrasykliiniä ja kloramfenikolia sisältävälle LB-maljalle. Maljoja inkuboitiin huoneenlämpötilassa yön yli.

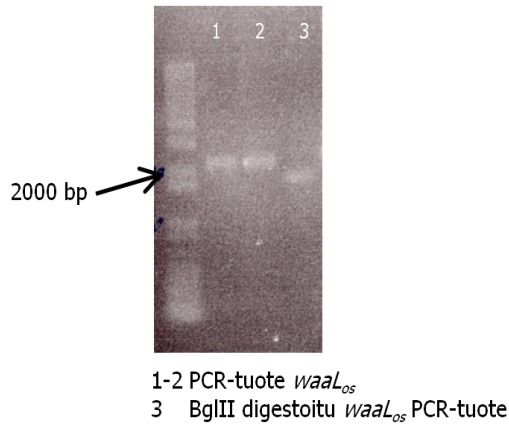
## 4 Tulokset ja tulosten tarkastelu

### 4.1 Vektorin pSW23T-waaL<sub>05</sub> valmistus

waaL<sub>05</sub>-ligaasigeeniä monistettiin PCR-reaktiolla (taulukko 4). Templaattina PCR:ssä käytettiin valmiiksi eristettyä *Y. enterocolitica* O:3:n genomista DNA:ta. Reaktiossa käytettiin waaL<sub>05</sub>-ligaasille suunniteltuja alukkeita, joihin oli lisätty BglII restriktiokohta 5'-päähen. 2290 bp kokoinen PCR-tuote puhdistettiin fenoli-kloroformiuutolla ja etanolisaostuksella, minkä jälkeen sen konsentraatio tarkistettiin agarosigeelielektroforeesilla. Geeliltä havaittiin 2290 bp kokoinen fragmentti sekä konsentraation todettiin olevan sopiva käytettäväksi seuraavassa vaiheessa.

PCR-tuote pilkottiin BglII ja vektori BamHI restriktioentsyymeillä tuotteiden yhteensovittamiseksi ligaatiota varten. BglII digestio tehtiin taulukon 8 osoittamalla reaktiolla. BamHI digestioon pipetoitiin 5,5 µl plasmidia ja lisättiin vettä lopputilavuuden tasaamiseksi 20 µl:aan.

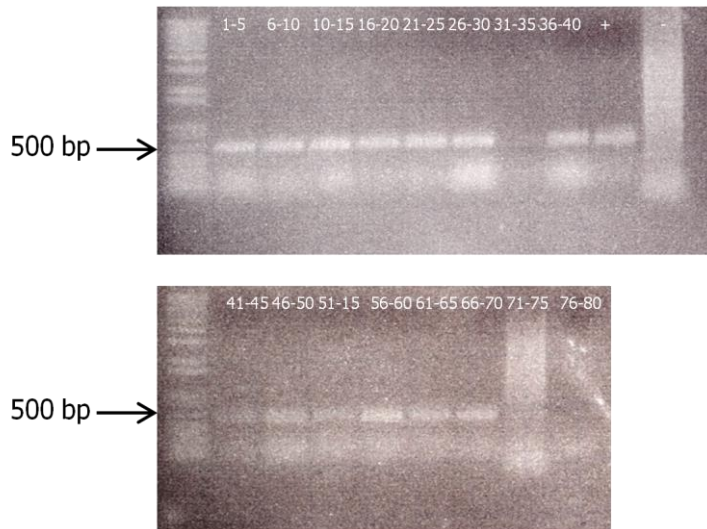
BamHI pilkottu vektori defosforyloitiin SAP-entsyymillä taulukon 9 mukaisella reaktiolla. Reaktion jälkeen tuotteet puhdistettiin fenolikloroformiuutolla ja etanolisaostuksella. Lopuksi tuotteet tarkistettiin agarosigeelillä (kuva 4), jossa havaittiin noin 2 kb kokoinen PCR-tuote ja 1,8 kb kokoinen lineaarinen muoto plasmidista.



**Kuva 4. *Waal<sub>05</sub>* PCR-tuotteet ja defosforyloitu vektori pSW23T**

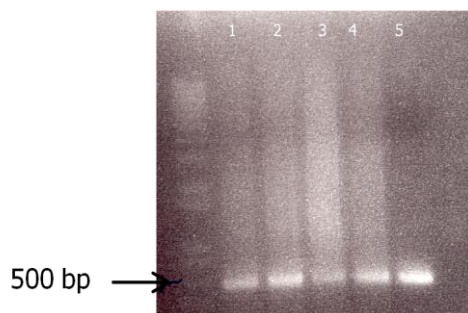
*Waal<sub>05</sub>*-geeni liitettiin pSW23T vektoriin T4 DNA ligaasilla (taulukko 10). Reaktioita tehtiin samanaikaisesti kaksi kappaletta, jotka yhdistettiin puhdistuksen yhteydessä DNA:n konsentroimiseksi. Reaktiot puhdistettiin fenoli-kloroformiuutolla ja saostettiin etanolisaostuksella elektroporaatiota varten.

Vektori transformoitiin *E. coli* S17-1λ pir soluihin elektroporaatiolla. Transformaatiossa käytettiin 30 mikrolitraa elektrokompetentteja soluja ja 10 mikrolitraa DNA:ta. Solut pipetoitiin kloramfenikolia sisältävälle LB-maljalle. Transformaatio tarkastettiin pesäke-PCR:n avulla. Reaktioon yhdistettiin viisi pesäkettä reaktiota kohden. Reaktiossa käytettiin O3ligYe1727delF ja O3ligYe1727del3 alukkeita, joilla oikea PCR-tuote oli noin 500 bp. PCR-tuotteet ajettiin agarosigeelillä. Agarosigeeliltä todettiin insertin liittyneen vektoriin kaikissa reaktioissa (kuva 5).



**Kuva 5. Plasmidi pSW23T-*waaL<sub>os</sub>* pesäke-PCR reaktiot, pesäkkeet 1-80**

Valittiin pesäkkeet 1-5 yksittäistarkastettaviksi samanlaisella reaktiolla, josta havaittiin kaikkien pesäkkeiden sisältävän insertin. Kuvassa 6 on esitetty yksittäisreaktiot agarosigeelillä.



**Kuva 6. Plasmidi pSW23T-*waaL<sub>os</sub>* pesäke-PCR reaktiot, Pesäkkeet 1-5**

Kaikista reaktioista havaittiin noin 500 bp kokoinen fragmentti. Pesäke 5 valittiin plasmidin eristystä varten, koska siinä ei näyttänyt esiintyvän epäspesifistä tuotetta.

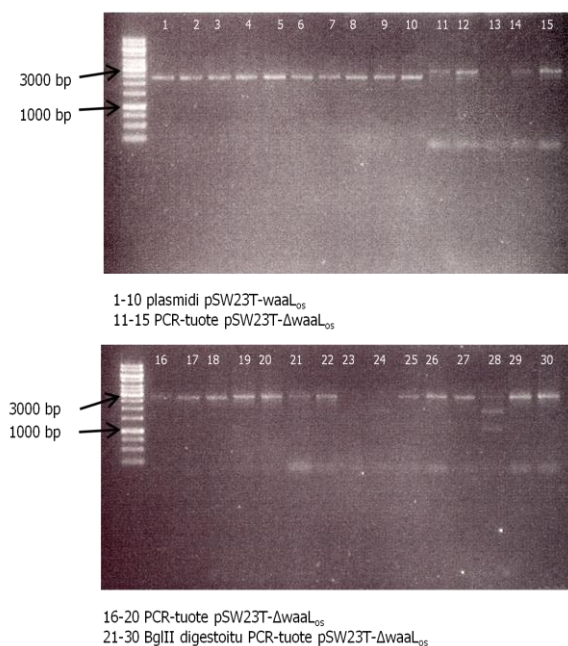


#### 4.2 Restriktioentsyymi BglII tunnistuskohdan mutageneesi

pSW23T-*waaL<sub>os</sub>*-vektorissa havaittiin BglII restriktioentsyymien tunnistuskohta. Alue piti poistaa, jotta voitiin käyttää BglII digestiota seuraavassa vaiheessa. Eristettiin plasmidi pesäkkeestä 5 Omega e.Z.N.A plasmid mini kit I –kitillä ja pilkottiin pSW23T-*waaL<sub>os</sub>* BglII entsyymillä taulukon 8 osoittamalla reaktiolla. Pilkotut 5' -kohessiiviset fragmentit täytettiin tylpiksi T<sub>4</sub> DNA polymeraasilla ligoatiota varten. Reaktio puhdistettiin fenoli-kloroformiuutolla ja saostettiin etanolisaostuksella. Vektori ligoitiin itsensä kanssa takaisin kiinni T<sub>4</sub> DNA ligaasilla. Reaktio puhdistettiin fenoli-kloroformiuutolla ja saostettiin etanolisaostuksella transformaatiota varten.

Vektori pSW23T-*waaL<sub>os</sub>* transformoitiin kemiallisesti kompetentteihin S17-1λ pir-soluihin luvussa 4.3.5 esitetyn transformaatio- ja elektroporaatiomenetelmän mukaan. Transformoituja soluja pipetoitiin kloramfenikolia sisältäville LB-maljoille.

Mutageneesin onnistuminen tarkistettiin eristämällä pesäkkeistä plasmidit Omega e.Z.N.A plasmid mini kit I –kitillä. Plasmideille tehtiin PCR-reaktiot O3ligYe1727F3 ja O3ligYe1727R3 deleetioalukkeilla. Tuotteen koko oli noin 2900 bp. PCR-tuote pilkottiin BglII entsyymillä ja tulos tarkistettiin agarosigeelillä. Kuvan 7 geeliltä havaittiin ne plasmidit joista katkaisukohta oli poistunut. PCR-tuotteiden koko oli noin 2900 bp. Pilkkoutunut näyte katkesi kahdeksi fragmentiksi, jotka voitiin havaita geeliltä.

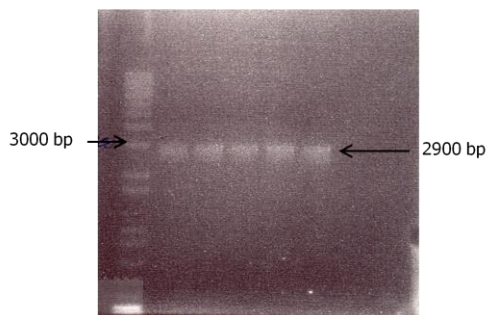


**Kuva 7. BglII mutageneesin tarkistus**

Agaroosigeelistä havaittiin (kuva 7) BglII katkaisukohtan poistuneen PCR-tuotteista kaivoissa 21, 22, 25, 26, 27, 29 ja 30. Nämä vastasivat plasmideita 1, 2, 5, 6, 7, 9 ja 10. PCR-tuotteissa 21, 22, 25, 26, 27, 29 ja 30 havaittiin yksittäinen fragmentti, kun kaivossa 28 on selkeästi havaittavissa kaksi fragmenttia, jossa katkaisukohta ei ollut poistunut. Kaivoissa 23 ja 24 konsentraatio oli liian alhainen varmuuden saamiseksi.

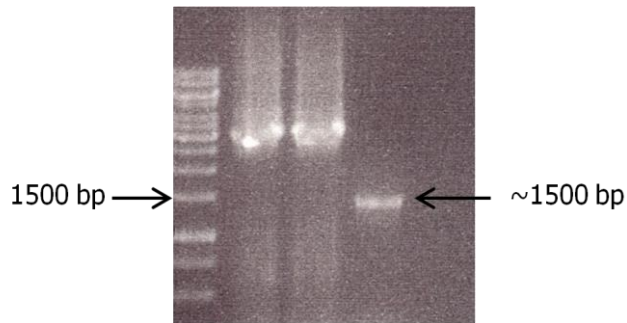
#### 4.3 *tetM*-geenin liittäminen pSW23T- $\Delta$ *waaL<sub>os</sub>* vektoriin

Vektoriin liitetty *waaL<sub>os</sub>*-geeni katkaistiin PCR-reaktiolla käyttämällä deleetioalukkeita O3ligYe1727F3 ja O3ligYe1727R3. Reaktiossa käytettiin Finnzymes Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase entsyymiä. Taulukossa 10 on esitetty Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase entsyymille muokattu reaktio(ks. luku 3.3.1). Ohjelmana käytettiin entsyymille omaa ohjelmaa joka on esitetty taulukossa 6. PCR-tuote puhdistettiin fenoli-kloroformiuutolla ja etanolisaostuksella. Tuotteen konsentraatio tarkistettiin agaroosigeelillä (kuva 8), josta havaittiin kaikista reaktioista noin 2900 bp kokoinen fragmentti.



**Kuva 8. pSW23T- $\Delta$ *waaL<sub>os</sub>* PCR-reaktiot**

Tetrasykliiniresistenssigeeniä *tetM* monistettiin PCR-reaktiolla. Templaattina käytettiin *tetM*-geenin sisältävää pBR322 plasmidia. Reaktiossa käytetyt tetM-F ja tetM-R alukkeet sisälsivät BglII entsyymien katkaisukohtaa, joka mahdollisesti BglII digestion *tetM* PCR-tuotteeseen. PCR-tuote puhdistettiin fenoli-kloroformiuutolla ja etanolisaostuksella ja tuotteen konsentraatio tarkistettiin agaroosigeelillä. Kuvassa 9 esitetyssä geelissä havaittiin noin 1500 bp kokoinen DNA-fragmentti, joka vastasi *tetM*-geenin kokoa



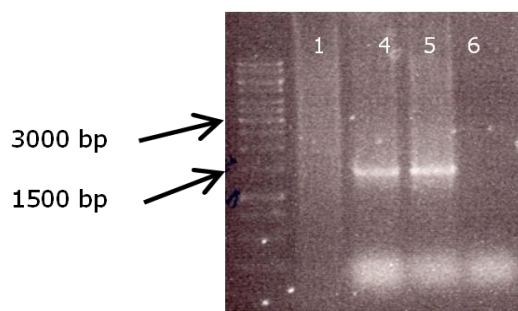
**Kuva 9. *tetM*-geenin PCR-tuote**

pSW23T- $\Delta waaL_{os}$  ja *tetM* PCR-tuotteet pilkottiin BglII entsyymillä. Digestiotuotteet tarkistettiin agarosigeelillä ja puhdistettiin. Saostusvaiheessa *tetM*-insertti yhdistettiin samaan putkeen PCR-reaktiolla linearisoidun vektorin pSW23T- $\Delta waaL_{os}$  kanssa.

Insertti ja vektori oli saostettu samaan putkeen edellisen vaiheen lopussa. Putkeen lisättiin 17  $\mu$ l vettä, johon DNA-pelletti liuotettiin. Vektori ja insertti ligoitiin yhteen T<sub>4</sub> DNA ligaasin avulla 20  $\mu$ l:n tilavuudessa muutoin taulukon 10 osoittamalla reaktiolla.

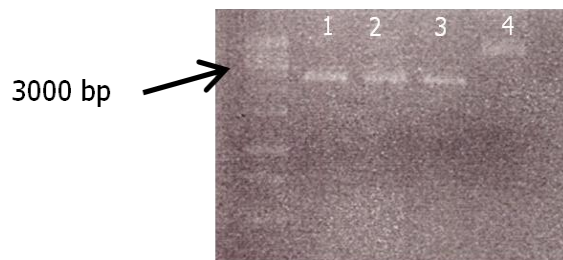
Vektori transformoitiin kemiallisesti kompetentteihin *E. coli*  $\omega$ 7249 soluihin. Transformaatiossa käytettiin 50  $\mu$ l soluja ja 10  $\mu$ l DNA:ta. Transformoituja soluja pipetoitiin tetrasykliiniä ja kloramfenikolia sisältäville LB-maljoille.

Transformantteja tarkistettiin pesäke-PCR:n avulla. Reaktiossa käytettiin tetM-F ja tetM-R alukkeita. Reaktiot tarkistettiin agarosigeelillä (kuva 10), josta havaittiin tuotteiden 4 ja 5 kohdalla noin 1500 bp kokoinen fragmentti.



**Kuva 10. Plasmidin pSW23T-*waaL<sub>os</sub>* tarkistus pesäke PCR:llä**

Plasmidit 1 ja 4 tarkistettiin sekvensoimalla. Bakteereista eristettiin plasmidit Macherey-Nagel Nucleospin plasmid kitillä (Ref. No. 740588.250) sekvensointia varten. Plasmidien konsentraatio tarkistettiin agarosigeeliltä. Geeliltä havaittiin plasmidin 4 olevan selkeästi suurempikokoinen verrattuna plasmideihin 1-3, joten sen arveltiin sisältävän *tetM*-insertin (kuva 11).



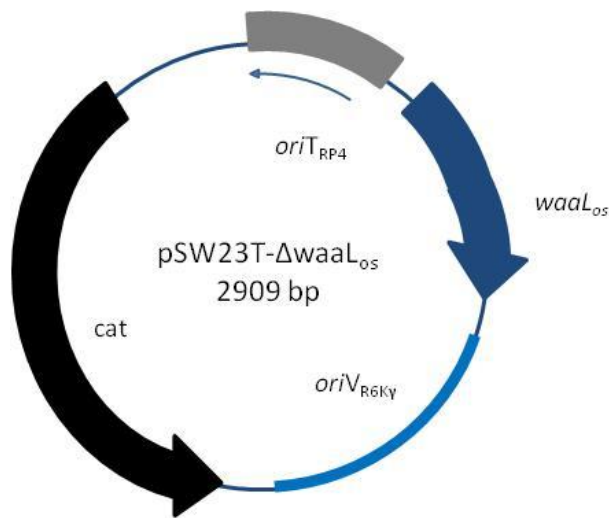
**Kuva 11. Sekvensointia varten eristetyt pSW23T- $\Delta$ *waaL<sub>os</sub>* ja pSW23T-*waaL<sub>os</sub>:tet* plasmidit**

Sekvensointi tehtiin O3ligYe1727F3 ja O3ligYe1727R alukkeilla. O3ligYe1727F3 on *waaL<sub>os</sub>*-geenin deleetioaluke, jota käytettiin toteamaan insertin läsnäolo vektorissa, koska aluke alkaa insertin loppuosasta ja jatkuu vektoriin. Tällä ei kuitenkaan voida todistaa tetrasykliiniresistenssin läsnäoloa. Sekvensoinnissa ei voitu käyttää *waaL<sub>os</sub>*-geenin monistamiseen käytettyä O3ligYe1727R2 aluketta, koska alukkeen sisältämä sekvenssi oli katkaistu pois liitettäessä geeni vektoriin. Tämän vuoksi käytettiin *waaL<sub>os</sub>*-geenin aluketta O3ligYe1727R. Auke on *waaL<sub>os</sub>*-geenin päästä lähtevä aluke ilman flanking-aluetta, jolla voitiin todentaa tetrasykliiniresistenssigeeni *tetM* läsnäolo.

Plasmidin 1 O3ligYe1727F3 alukkeella saatua sekvenssiä verrattiin NCBI nucleotide BLAST:n avulla vektorin pSW23T-*waaL<sub>os</sub>* sekvenssiin. Tietokanta antoi yhteensopivuuden nukleotidien yhdestä viiteensataan kahteenkymmeneen välillä. Samaa sekvenssiä verrattiin vektorin pSW23T sekvenssiin, tulokseksi saatiin samankaltaisuus nukleotidien 521–1198 väliltä. Yhtenäisen sekvenssin perusteella voitiin todeta insertin ja plasmidin olevan oikeita ja insertin kiinnittyneen oikeaan kohtaan plasmidissa.

Sekvenssiä O3Ye1727R verrattiin *waaL<sub>os</sub>*-geenin sekvenssiin, johon oli lisätty lyhyt sekvenssi plasmidista. Saatiin yhteensopivuudeksi 86–629. Verrattaessa vektorin pBR322 sekvenssiin, ei löytynyt samankaltaista sekvenssiä. Tarkistetun vektorin sekvenssiin ei jäänyt aukkoja verrattessa sitä insertin ja vektorin sekvensseihin. Verrattaessa *tetM*-

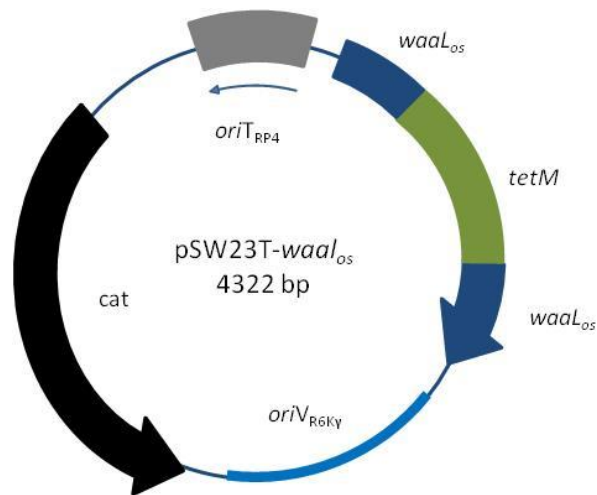
geenin sekvenssiin ei löytynyt yhteensopivuutta. Voitiin todeta ettei plasmidi sisältänyt *tetM*-geeniä ja siinä oli pelkkä inaktivoitu *waaL<sub>os</sub>*-geeni (kuva 12).



**Kuva 12. Plasmidin 1 pSW23T-ΔwaaL<sub>os</sub> rakenne [lähde 9 mukailen]**

Plasmidin 4 O3ligYe1727F3 alukkeella saatua sekvenssiä verrattiin *waaL<sub>os</sub>*-geenin sekvenssiin, jossa oli lisätty lyhyt osa sekvenssiä plasmidista. Yhteensopivuudeksi saatiin nukleotidien 34–522 välillä. Verrattaessa vektorin pSW23T sekvenssiin saatiin yhteensopivuus nukleotidien 523–964 välillä. Näistä voitiin päätellä *waaL<sub>os</sub>*-insertin olevan pSW23T-vektorissa.

Plasmidille 4 O3ligYe1727R alukkeella saadusta sekvenssistä tarkistettiin *tetM*-geenin läsnäolo plasmidissa. Sekvenssille tehtiin samanlainen haku kuin plasmidille 1 *waaL<sub>os</sub>*-geenin sekvenssiä vastaan. Yhteensopivuudeksi saatiin nukleotidien 4–83 välillä. Tästä voitiin päätellä *waaL<sub>os</sub>*-insertin loppuvan sitä seuraavan *tetM*-geeni. Sekvenssille tehtiin vertaus plasmidin pBR322 sekvenssiin. Tästä saatiin yhteensopivuus välillä 221–1008. Yhteensopivuudesta tietokannan *tetM*-geenin sekvenssin kanssa voitiin päätellä *tetM*-insertin liittyneen *waaL<sub>os</sub>*-geenin väliin (kuva 13).



**Kuva 13. Plasmidi 4 pSW23T-*Δ*waal<sub>Os</sub>::tet [lähde 9 mukailen]**

#### 4.4 Sykloseriirikastus

Sykloseriirikastuksen tarkoituksena oli lisätä tetrasykliinille resistenttien, mutta kloramfenikolille herkkien bakteerien osuutta hyödyntämällä niiden antibioottiresistenssiä. Käsitellyllä on tarkoitus tuhota noin 99 % kaikista bakteereista, jolloin jäljelle jääneiden joukossa on teoreettisesti suurempi osuus kloramfenikolille herkkiä bakteereja.

Sykloseriirikastus tehtiin kappaleessa 3.5 esitellyn protokollan mukaisesti. Rikastettaessa *Y. enterocolitica* O:3-c:tä yön yli kasvatetun suspension OD<sub>600</sub>-arvoksi mitattiin 1,022. Suspensiota otettiin 1 ml alkutilanteen kvantitointia varten. Kvantitointia varten tehtiin laimennossarja 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup> ja 10<sup>-4</sup>, josta pipetoitiin tetrasykliiniä sisältäville LB-maljoille 100 µl:a suspensiota. Rikastettava suspensio laimennettiin 20 kertaista arvoon OD<sub>600</sub>=0,05. OD<sub>600</sub>-arvon 0,20 saavuttaminen kesti noin 2,5 tuntia, jonka jälkeen solut sentrifugoitiin pelletiksi ja pestiin PBS-liuoksella. PBS-liuoksesta valmistettiin kvantitointia vastaava laimennossarja 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup> ja 10<sup>-4</sup>, josta soluja pipetoitiin tetrasykliiniä sisältäville LB-maljoille. Maljoilta laskettiin pesäkkeet sykloseriinikäsittelyn tehokkuuden arvioimiseksi. Taulukossa 13 on esitetty maljoilta lasketut pesäkelukumäärät.

**Taulukko 6. *Y. enterocolitica* O:3-c sykloseriinirikastuksesta lasketut pesäkkeet**

Laimennos 0-tilanne	pmy	Laimennos rikastuksen jälkeen	pmy
10 <sup>-2</sup>	>300	10 <sup>-2</sup>	>300
10 <sup>-3</sup>	>300	10 <sup>-3</sup>	316
10 <sup>-4</sup>	>300	10 <sup>-4</sup>	68

Pesäkelukumääristä voitiin havaita käsittelyn tappaneen bakteereista arviolta vähintään 90 %. Tarkkaa prosenttia ei voitu laskea, koska 0-tilanteesta tehtyä suspensiota ei laimennettu riittävästi. Vähäisen tehokkuuden vuoksi käsittelyä optimoitiin esitetystä protokollasta.

Sykloseriirikastus tehtiin *Y. enterocolitica* O:3 villityypille muuttamalla protokollaa tietyiltä osin luvussa 4.5 esitetystä protokollasta. Käsittelyä kloramfenikolin kanssa lisättiin 3 tuntiin ja inkubointia sykloseriinin kanssa lisättiin 4 tuntiin. Rikastuksesta tehtiin kvantitointi muutoksien arvioimiseksi. Rikastuksen tulokset on esitetty taulukossa 14, josta havaitaan käsittelyn olleen tehokkaampi kuin aiemmalla kerralla. Laimennoksia 0-tilanteen määrittämiseksi olisi pitänyt jatkaa pidemmälle  $10^{-6}$  tai  $10^{-8}$  asti, jotta olisi voitu määrittää tarkka pmy/ml.

**Taulukko 7. *Y. enterocolitica* O:3 wt sykloseriirikastuksesta lasketut pesäkkeet**

Laimennos 0-tilanne	pmy	Laimennos rikastuksen jälkeen	pmy
$10^{-2}$	>300	$10^{-2}$	135
$10^{-3}$	>300	$10^{-3}$	43
$10^{-4}$	>300	$10^{-4}$	5

Villityypille tehdyn käsittelyn voidaan kuitenkin arvioida tuhonneen bakteereista noin 99 %. Tämän pitäisi lisätä todennäköisyyttä kloramfenikoliherkän bakteerin löytämiseksi tarkistettavista pesäkkeistä. Kuitenkin tarkastetuista 183 pesäkkeestä kaikki olivat kloramfenikoliresistenttejä.

Sykloseriirikastuksessa havaittiin tetrasykliiniresistenttien ja kloramfenikolisensitiivisten bakteerien frekvenssin olevan todella pieni. Menetelmää optimoitiin lisäämällä inkubointiaikoja kloramfenikolin ja sykloseriinin kanssa. Tästä huolimatta tetrasykliinille resistenttien ja kloramfenikolille sensitiivisten bakteerien frekvenssi oli niin pieni, ettei niitä saatu eristettyä.

## 5 Pohdintaa

Tavoitteena oli valmistaa *waaL<sub>os</sub>*-deleetion sisältävä itsemurhavektori pSW23T-*waaL<sub>os</sub>*::tet ja pSW23T- $\Delta$ *waaL<sub>os</sub>*. Lisäksi vektorin avulla oli tarkoitus luoda *Y. enterocolitica* O:3 wt ja *Y. enterocolitica* O:3-c kantoja joista *waaL<sub>os</sub>*-geeni oli inaktivoitu.

Vektorin rakentamisessa onnistuttiin, mutta tästä huolimatta mutaation toimivuutta ei ehditty saada tarkastetuksi yersiniassa erilaisten viivästyksien vuoksi. Joissakin vaiheissa menetelmiä jouduttiin optimoimaan kyseiseen tilanteeseen sopiviksi, sekä vektorista jouduttiin poistamaan BglII restriktiokohta.

Mutaatio voidaan todeta eri menetelmillä kuten esimerkiksi DOC-page geeliltä tai western blot –menetelmällä, joissa erottuvat lipopolysakkaridin eri rakenteet. Deleetiomutantin lipopolysakkaridista puuttuvat O-antigeeni ja ulompi ydinsokeri, kun villityypissä ja O:3-c:ssä ne ovat tallella. Toimiakseen alleelinvaihdon tulee tapahtua geenin alku- ja loppuosassa. Yhden alleelinvaihdon jälkeen genomissa on ehjä *waaL*-geeni sekä mutaoitu muoto.

Jatkossa plasmidia voidaan käyttää jatkotutkimuksissa myös muilla serotyypeillä tehtäviin mutageneeseihin. Lisäksi samaa menetelmää käyttämällä voidaan valmistaa samanlaisia itsemurhavektoreita geeneille *waaL<sub>ps</sub>* ja *waaL<sub>xs</sub>*. Näitä valmistettaessa kannattaa kuitenkin huomioida tarkemmin vektorien ominaisuudet, jolloin vältytään esimerkiksi restriktiokohdan poistamiselta ja säästetään aikaa. Työssä käytetty sykloseriini-rikkasvaihe vaatisi lähtökohtaisesti protokollaa tehokkaamman tai laajemman seulonnan, koska työn loppuun mennessä ehdittiin tarkastaa *Y. enterocolitica* O:3-c pesäkkeitä 1800 kpl ja *Y. enterocolitica* O:3 wt pesäkkeitä 483 kpl löytämättä mutaation sisältävää kantaa.

Mutatoituja kantoja voidaan käyttää myöhemmissä tutkimuksissa lipopolysakkaridirakenteiden virulenssimerkityksen tutkimiseen. Eläinkoemallit tarjoavat mahdollisuuden verrata mutatoitujen kantojen virulenssia villityypin virulenssiin.



## Lähteet

- [1] Hallanvuo, Saija. 2009 Foodborne Yersinia Identification and molecular epidemiology of isolates from human infections. Helsinki. Terveyden ja hyvinvoinnin laitos.
- [2] Yersiniabakteerit. Evira. verkkodokumentti. [http://www.evira.fi/portal/fi/elintarvikkeet/hygieniaosaaminen/tietopaketti/ruokamyrkytykset/ruokamyrkytyksia\\_aiheuttavia\\_bakteereja/yerseniabakteesit/](http://www.evira.fi/portal/fi/elintarvikkeet/hygieniaosaaminen/tietopaketti/ruokamyrkytykset/ruokamyrkytyksia_aiheuttavia_bakteereja/yerseniabakteesit/) Luettu 4.10.2011.
- [3] Yersinia enterocolitica. Verkkodokumentti. [http://www.ktl.fi/portal/suomi/tietoa\\_terveydesta/terveys\\_ja\\_sairaudet/infektioaudit/suolistoinfektiot/yersinia/](http://www.ktl.fi/portal/suomi/tietoa_terveydesta/terveys_ja_sairaudet/infektioaudit/suolistoinfektiot/yersinia/) Luettu 4.10.2011
- [4] Pinta, Elise. 2010 Biosynthesis of Yersinia enterocolitica serotype O:3 lipopolysaccharide outer core. Turun yliopisto: SARJA - SER D OSA - TOM 927 MEDICA - ODONTOLOGICA. Turku.
- [5] Frederick C. Neidhardt. 1996 Escherichia coli and Salmonella cellular and molecular biology. Volume 1. s. 1035-1053
- [6] Suominen, Ilari & Ollikka, Pauli. 2004 Yhdistelmä-DNA-tekniikan perusteet. Helsinki. Opetushallitus.
- [7] Kaniuk, Natalia ym. 2004 Investigation of the structural requirements in the lipopolysaccharide core acceptor for ligation of O antigens in the genus *Salmonella*. The Journal of biological chemistry vol. 279, 35/2004 s. 36470–36480.
- [8] Skurnik, Mikael & José A. Bengoechea. 2003 The biosynthesis and biological role of lipopolysaccharide O-antigens of pathogenic Yersiniae. Carbohydrate Research. Vol. 338, s. 2521-2529.
- [9] Demarre, Gaëlle ym. 2004. A new family of mobilizable suicide plasmids based on broad host range R388 plasmid (IncW) and RP4 plasmid (IncPa) conjugative machineries and their cognate *Escherichia coli* host strains. Research in Microbiology 156/2005, p. 245-255.
- [10] Babic, Ana ym. 2008. Construction of an improved RP4 (RK2)-based conjugative system. Research in microbiology 159/2008, p. 545-549.
- [11] Salim, Islam T. ym. 2010. Membrane topology mapping of the O-antigen flippase (Wzx), polymerase (Wzy) and ligase (WaaL) from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 reveals novel domain architectures. mBIO vol. 1, 3/2010.

- [12] Skurnik, Mikael. 1984. Lack of correlation between the presence of plasmids and fimbriae in *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*. *Journal of Applied Microbiology* 56/1984 s. 316-330.
- [13] Wilson, KJ. ym. 1995. beta-Glucuronidase (GUS) transposons for ecological and genetic studies of rhizobia and other gram-negative bacteria. *Microbiology* 141/1995, p. 1691–1705.
- [14] Sambrook, Joseph. Russel, David W. *Molecular cloning a laboratory manual*. Volume 3. 2001. New York. p. A2.2–A2.5.
- [15] Denarié, J. ym. 1977. *DNA insertion elements, Plasmids and Episomes*. Cold spring harbor laboratory. New York. s. 507–520.