



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Opinnäytetyö

**EPHA3-RESEPTORIPROTEIININ
LIGANDIA SITOVAN OSAN
TUOTTO ERI
ISÄNTÄORGANISMEISSA SEKÄ
PUHDISTUS JA KARAKTERISOINTI**

Eerika Päivänsäde

Bio- ja Elintarviketekniikka

2009

TURUN AMMATTIKORKEAKOULU
TIIVISTELMÄ

Bio- ja elintarviketekniikka	
Tekijä: Eerika Päivänsäde	
EphA3-reseptoriproteiinin ligandia sitovan osan tuotto eri isäntäorganismeissa sekä puhdistus ja karakterisointi.	
Biotekniikka	Ohjaajat: Ilari Suominen, FT; Sari Paavilainen FT
Opinnäytetyön valmistumisajankohta: Elokuu 2009	Sivumäärä: 62
<p>Tämä opinnäytetyö tehtiin osa Joint Biotechnology Laboratory:n Eph-reseptoriproteiinien ja efriniligandien tutkimusprojektia. Opinnäytetyön tavoitteena oli tuottaa EphA3 reseptoriproteiinin ligandia sitovaa osaa kahdessa eri isäntäorganismissa <i>Escherichia colissa</i> ja <i>Pichia pastoriksessa</i> sekä puhdistaa tuotettu proteiini ja karakterisoida sen sitoutumisominaisuuksia eri efriniligandien kanssa.</p> <p>Proteiinin tuottamiseksi EphA3LBD:n geeni kloonattiin kahteen ekpressiovektoriin pET32a sekä pPIC9 ja transformoitiin tuottokantoihin (<i>E. coli</i> Origami B, <i>P. pastoris</i> GS115). Proteiinin puhdistus tehtiin metalliaffiniteettikromatografian avulla. Eri työvaiheiden tuloksia analysoitiin agarosielektroforeesin ja SDS-PAGE menetelmien avulla.</p> <p>Geenin kloonaus ja transformointi molempiin tuottokantoihin onnistui, mutta proteiinia tuotettiin onnistuneesti ainoastaan <i>Escherichia colin</i> avulla. Onnistuneesti puhdistetun proteiinin avulla tutkittiin EphA3LBD sitoutuvuutta efriniligandien A5, A3 ja B1 kanssa. Sitoutumiskokeen tulokseksi todettiin EphA3LBD reseptoriproteiinin sitoutuvan A3 ja B1 efriniligandien kanssa.</p>	
Hakusanat: Eph reseptori, efrini	
Säilytyspaikka: Turun ammattikorkeakoulun kirjasto	

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES
ABSTRACT

Biotechnology and Food Technology	
Author: Eerika Päivänsäde	
Title: Production, purification and characterization of receptor protein EphA3LBD	
Specialization line: Biotechnology	Instructors: Ilari Suominen, PhD; Sari Paavilainen, PhD
Date: August 2009	Total number of pages 62
<p>This thesis is part of a research project by the Joint Biotechnology Laboratory concerning Eph receptor proteins and ephrins. The goal of this thesis was to produce a receptor protein called EphA3LBD (LBD = Ligand Binding Domain) with <i>Escherichia coli</i> and <i>Pichia pastoris</i> and then purify and characterize the protein.</p> <p>The production of the protein was enabled by cloning the EphA3LBD gene into two plasmids, pPET32a and pPIC9, and transforming the plasmids into <i>Escherichia coli</i> and <i>Pichia pastoris</i>. The purification was performed by immobilized metal ion affinity chromatography using Ni Sepharose. The different stages and final results of the thesis were analysed by agarose electrophoresis and SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis).</p> <p>The EphA3LBD gene was successfully transformed into <i>E. coli</i> and <i>P. pastoris</i> but successfully produced only with <i>E. coli</i>. The produced protein EphA3LBD was purified and used for determination of the binding ephrin ligands A5, A3 and B1. By Pull-Down analysis it was shown that the EphA3LBD receptor protein binds ephrin ligands A3 and B1.</p>	
Keywords: Eph receptors, ephrins	
Deposit at: The Library of Turku University of Applied Sciences	

SISÄLTÖ

1	Johdanto	2
1.1	Reseptorit ja ligandit solukommunikaatiossa	2
1.2	Eph-reseptorit ja efriiniligandit	4
1.3	Plasmidivektorit	7
1.3.1	pET32a	8
1.3.2	pPIC9	10
1.4	Geenin kloonaus	11
1.4.1	PCR	11
1.4.2	Digestio ja ligaatio	12
1.4.3	Transformaatio	13
1.5	Proteiinin tuotto <i>Esherichia colissa</i> ja <i>Pichia pastoriksessa</i>	14
1.6	Proteiinin talteenotto ja puhdistus	16
1.6.1	Soluhajotus	16
1.6.2	Affiniteettikromatografia	16
1.7	Tulosten analysointi	18
1.7.1	Agaroosielektroforeesi	18
1.7.2	SDS-PAGE	19
2	Materiaalit ja menetelmät	20
2.1	Geenin kloonaus	20
2.1.1	PCR	20
2.1.2	Digestio	22
2.1.3	Ligaatio ja transformaatio	25
2.1.4	Plasmidien eristys ja karakterisointi	26
2.2	Proteiinin tuotto <i>Esherichia colissa</i>	27
2.2.1	Transformaatio tuottoisäntään	27
2.2.2	Kasvatus	28
2.2.3	Soluhajotus	28
2.2.4	Proteiinin puhdistus	30
2.3	Proteiinin tuotto <i>Pichia pastoriksessa</i>	31

2.3.1	Transformaatio tuottoisäntään	31
2.3.2	Kasvatus	32
2.3.3	Hiivan kromosomaalisen DNA:n erityys ja karakterisointi	35
2.4	SDS-PAGE	37
2.5	Sitoutumiskoe	38
3	Tulokset ja arviointi	42
3.1	Geenin kloonauk	42
3.2	Proteiinin tuotto ja puhdistus	48
3.3	Sitoutumiskoe	57
4	Yhteenveto	60
5	LÄHTEET	61

LIITTEET

LIITE 1 EphA3-reseptoriproteiinin ligandia sitovan osan DNA &

Alukkeet PCR-reaktiota varten

LIITE 2 Agaroosigeelielektroforeesi

LIITE 3 LB (Luria-Bertani) Medium & LB agar plates

LIITE 4 Bradford

LIITE 5 MD, BMGY & BMMY

LIITE 6 SDS-PAGE- valmistusohje kahdelle geelille

KUVA

Kuva 1. Eph-reseptorin ja efriniA- ja B-ligandien pääpiirteinen rakenne. ² 5

Kuva 2. Eph-reseptorien ja efrini-ligandien sitoutuminen ja kaksisuuntaisen signaaliketjun aktivoituminen. ³ 5

Kuva 3. Humaanin EphA3-reseptoriproteiinin kolmiulotteinen mallinnuskuva. ⁴	6
Kuva 4. pET-systeemin toimintaperiaatteet. ⁷	8
Kuva 5. pET-32a plasmidivektorin geenikartta. ⁸	9
Kuva 6. pPIC9 fuusiovektorin geenikartta ⁹	11
Kuva 7. Affiniteetikromatografian puhdistuksen vaiheet. ¹¹	17
Kuva 9. EphA3LBD PCR	42
Kuva10. EphA3LBD ja pPIC9 digestio	43
Kuva 11. pPIC9 digestio	44
Kuva 12. pET32a ja EphA3LBD digestio	45
Kuva 13. Minipreparaattien 1-4 pPIC9+EphA3LBD analyyttinen digestio	46
Kuva 14. Minipreparaattien 1-6 EphA3LBD+pET32a analyyttinen digestio	47
Kuva 15. <i>E. coli</i> kasvatuksen eri vaiheet	48
Kuva 16. <i>E. colilla</i> tuotetun liukoisen EphA3LBD proteiinin puhdistus	49
Kuva 17. <i>E. colilla</i> tuotetun liukenemattoman EphA3LBD proteiinin puhdistus	50
Kuva 18. Liukoisen EphA3LBD proteiinin puhdistusfraktiot	51
Kuva 19. Liukenemattoman EphA3LBD proteiinin puhdistusfraktiot	52
Kuva 20. Hiivakasvatus 1	54
Kuva 21. <i>P. pastoris</i> DNA:n PCR-analyysi	55
Kuva 22. <i>Pichia pastoris</i> , toinen pääkasvatus	56
Kuva 23. Efriini-EphA3LBD sitoutumiskoe proteiini A-palloilla	57
Kuva 24. Efriini-EphA3-sitoutumiskoe Ni-palloilla	58

TAULUKOT

Taulukko 1. PCR pipetoinnit	21
Taulukko 2. PCR ohjelma	21
Taulukko 3. Digestio pPIC9 ja EphA3LBD, inkubointiaika yön yli	23
Taulukko 4. Digestio pPIC9, inkubointiaika 2 h	23
Taulukko 5. pET32a ja EphA3LBD digestio	24
Taulukko 6. Analyyttinen digestio	26
Taulukko 7. <i>P. pastoris</i> pääkasvatuksen pipetoinnit	33
Taulukko 8. <i>Pichia pastoris</i> pääkasvatuksen pipetoinnit	35

Taulukko 9. Pipetoinnit, hiivan DNA:n karakterisointi PCR:n avulla.	36
Taulukko 10. PCR-ohjelma, <i>Pichia</i> -DNA:n analysointi	37
Taulukko 11. Sitoutumiskoe proteiini A-palloilla	39
Taulukko 12. Sitoutumiskoe Ni-palloilla	40
Taulukko 13. Puhdistetun proteiinin EphA3LBD pitoisuudet	52
Taulukko 14. Mut ⁺ ja Mut ^S fenotyyppien seulonta	53

Lyhenneluettelo:

RTKs = Engl. Receptor Tyrosine Kinases. Tyrosoonikinaasireseptorit.

LBD = Engl. Ligand Binding Domain. Reseptoriproteiinin ligandia sitova osa.

SAM = sterile alpha motif

PDZ = PDZ-binding motif

JM = juxtamembrane region

GPI = glycosylphosphatidylinositol linkage

IMAC = Engl. immobilized metal ion affinity chromatography.
Metalliaffiniteettikromatografia.

1 Johdanto

Tämä opinnäytetyö tehtiin osana Joint Biotechnical Laboratoryn (JBL) Eph-reseptoritutkimusta, jonka päätavoitteena on määrittää Eph-ryhmän reseptorien kolmiulotteinen rakenne. JBL-laboratorio on Turun yliopiston kemian laitoksen alaisuuteen kuuluva tutkimusyksikkö. Opinnäytetyön tavoitteena oli tuottaa EphA3-LBD -reseptoriproteiinia (engl. Ligand Binding Domain, ligandia sitova osa) kahdessa eri isäntäorganismissa, *Esherichia coli* -bakteerissa ja *Pichia pastoris* -hiivassa rakennetutkimusta varten. Ennen tuottoa reseptoriproteiinia koodittava geeni kloonattiin kahteen eri plasmidivektoriin (pET32a ja pPIC9) ja plasmidit transformoitiin tuottoisäntiin. Tuotettu proteiini puhdistettiin affiniteetikromatografian avulla. Työn eri vaiheita ja tuloksia analysoitiin agarosielektroforeesi-, ja SDS-PAGE- menetelmien avulla.

1.1 Reseptorit ja ligandit solukommunikaatiossa

Monisoluisten organismien solut kommunikoivat vapauttamalla kemiallisia lähetettä, jotka voivat vaikuttaa lähellä (parakriininen ja synaptinen viestinvälitys), kaukana (endokriininen viestinvälitys) tai solu-soluvuorovaikutteisesti (juktakriininen viestinvälitys). Solut sisältävät toiminnalleen ominaisia reseptorimolekyylejä, jotka sitovat spesifisesti molekyylejä joita kutsutaan ligandeiksi. Erilaisten viestimolekyylien kuten hormonien ja kasvutekijöiden sitoutuminen reseptorimolekyyliin saa aikaan muutoksia solun aineenvaihdunnassa, signaalinvälitysketjiksi kutsutun tapahtumasarjan kautta.¹

Reseptoriproteiinit jaetaan neljään ryhmään, joita ovat membraaniproteiineihin kuuluvat G-proteiinikytkentäiset reseptorit, tyrosiinikinaasireseptorit, ionikanavareseptorit sekä solunsisäiset reseptorit. Muut paitsi solunsisäiset reseptorit ovat membraaniproteiineja.¹

Tietyt aineet kuten steroidit pystyvät läpäisemään solumembraanin, mutta suurin osa signaalimolekyyleistä on vesiliukoisia ja liian suuria läpäistäkseen sitä. Vesiliukoiset signaalimolekyylit tarttuvat solukalvoon uppoutuneiden reseptoreiden spesifisiin kohtiin. Spesifisen ligandin kiinnittyä reseptori siirtää solun ulkopuolelta tulleen informaation muuttamalla muotoaan tai aggregoitumalla. Reseptorin aktivoituminen käynnistää solunsisäisen signaalinvälitysketjun, jossa informaatio välittyy eri vaiheiden ja välittäjämolekyylien avulla eteenpäin ja johtaa lopulta tietyn toiminnon aktivaatioon. Signaalinvälitysketju koostuu pääpiirteittäin kolmesta eri kohdasta. Solunulkoisen signaalin vastaanotto, signaalin välitys eteenpäin transduktion avulla sekä solun vaste. Signaalinvälitysketjun etuna on yksittäisen signaalin voimistuminen sen siirtyessä molekyyliltä toiselle solussa, jolloin sen vaikutukset voivat olla solunaineenvaihdunnan kannalta suuret.¹

Eph-reseptorit ovat suurin tyrosiinikinaaseihin kuuluva alaryhmä.² Tyrosiinikinaasireseptorit on suuri solukalvoreseptoreihin kuuluva ryhmä, joilla on tunnistettu olevan entsyymäminen aktiivisuus sekä kyky aktivoida useita signaalinvälitysketjuja solussa samanaikaisesti. Tyrosiinikinaasireseptorit koostuvat solunulkoisesta ligandia sitovasta osasta, yksittäisestä α -kierteestä ulottuen solukalvon lävitse ja solunsisäisestä osasta, joka sisältää useita tyrosiini aminohappoja. Solunsisäinen osa toimii entsyyminä, jota kutsutaan tyrosiinikinaasiksi. Tyrosiini kinaasireseptorit toimivat yhdessä toisen reseptorin kanssa. Kahden reseptorin aktivoituttua, niiden solunsisäiset osat aggregoituvat muodostaen dimeerin, joka aktivoi tyrosiinialueet.¹

Solukommunikaation selvittämiseksi on tehtävä perustutkimusta, jossa määritetään reseptoriproteiinien, ligandien ja signaalinvälitysketjuun osallistuvien proteiinien rakennetta ja sitoutuvuusominaisuuksia. Näitä ominaisuuksia tutkittaessa tulee näitä proteiineja tuottaa suhteellisen suuria määriä solun ulkopuolelle. Reseptoriproteiinien tuottamisessa ongelmaksi nousevat proteiinin hydrofobiset alueet, joilla proteiini kiinnittyy solun lipidikaksoiskalvoon. Niiden tuottaminen onnistuu ainoastaan

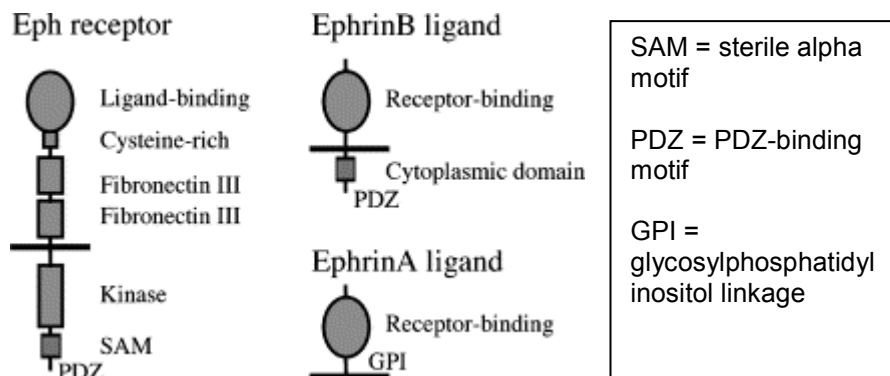
tietyissä ylemmän tason eukaryoottisoluissa ja niiden eristys ja puhdistus on varsin hankalaa.

Tutkimuksessa tutkittavien Eph-reseptoreiden ja muiden reseptoreiden mielenkiintoisin osa niiden rakenteessa on ligandia sitova osa. Määritettäessä ligandin sitovan osan tarkkaa rakenneta ja sen sitoutumisominaisuuksia eri ligandien kanssa, saadaan tärkeää tietoa esimerkiksi solujen vuorovaikutuksesta. Opinnäytetyössä käsiteltyjen Eph-reseptoreiden ligandia sitova osa on solunulkoinen eikä sisällä hydrofobisia alueita. Koska reseptoriproteiinin DNA-sekvenssi tunnetaan on mahdollista tuottaa ainoastaan reseptoriproteiinin solunulkoista ligandia sitovaa osaa. Hydrofobisten alueiden puuttuminen mahdollistaa myös reseptoriproteiinin osan tuottamisen muualla kuin niissä soluissa, joissa proteiini normaalisti ekspressoituu.

Tässä opinnäytetyössä tuotettiin kahden eri isäntäorganismien *Escherichia coli* -bakteerin ja *Pichia pastoris* -hiivan avulla käyttäen tehokkaita tuottokantoja (*E. coli* Origami B, *P. pastoris* GS115). Tuottokannat ovat yleisiä ekpressiokantoja, joilla pyritään proteiinin maksimaaliseen tuottoon lyhyessä ajassa, sekä proteiinin helppoon puhdistettavuuteen.

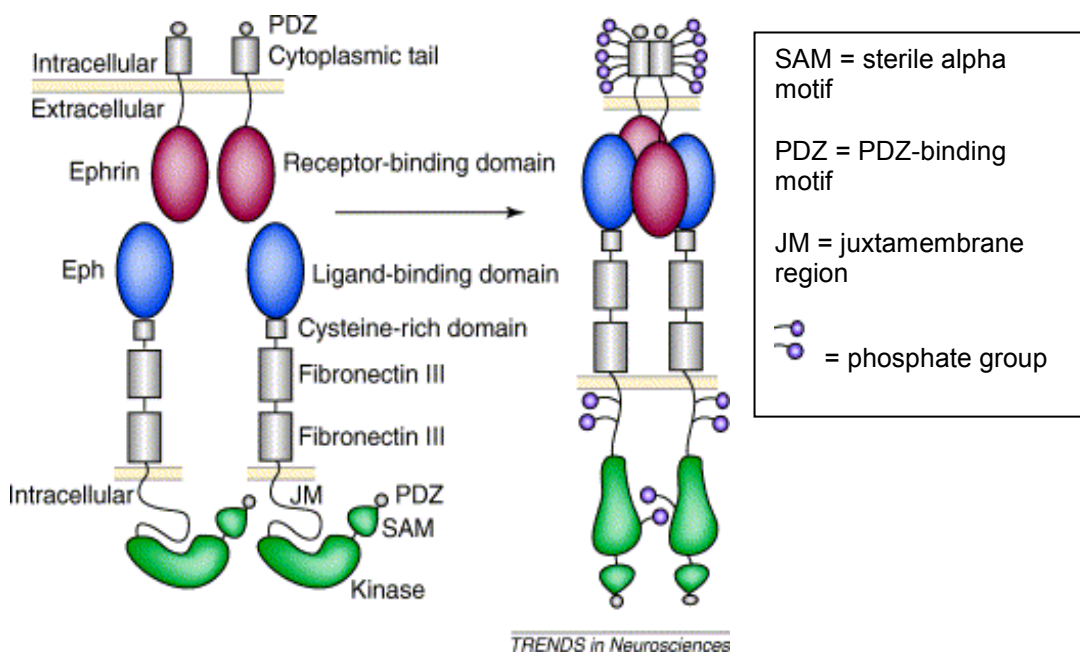
1.2 Eph-reseptorit ja efriniligandit

Tärkeisiin solukommunikaation välittäjiin kuuluvat Eph-reseptorit ovat suurin reseptorityrosiinkinasaaseihin (RTKs = receptor tyrosine kinases) kuuluva alaryhmä, jotka säätelevät solu-solukommunikaatiossa solujen kiinnittymistä, muotoa ja liikkuvuutta yhdessä reseptoreihin spesifisesti kiinnittyvien efriniligandien kanssa. Monien kudosten ja elinten, mukaan lukien hermoston sekä sydän ja verisuoniston kehittymiselle Eph signaali on ratkaisevan tärkeää. Solukalvokiinnitteiset Eph-reseptorit ja efriniligandit aloittavat solu-solukiinnittymiskohdassaan ainutlaatuisen kaksisuuntaisen signaaliketjun, jossa tieto siirtyy sekä reseptoria että ligandia ekspressoivaan soluun.²



Kuva 1. Eph-reseptorin ja efriniA- ja B-ligandien pääpiirteinen rakenne. ²

Eph-reseptoriryhmä koostuu 14 jäsenestä, joihin efrineiksi kutsutut solukalvoihin kiinnittyneet ligandit pystyvät sitoutumaan. Perustuen DNA sekvenssiin ja sitoutumisaffiniteettiin Eph-reseptorit ja efriniit on jaettu kahteen luokkaan A ja B. Kuvassa 1 on kuvattuna Eph-reseptorin sekä efriniA- ja B-ligandien pääpiirteinen rakenne. Yleisesti EphA- alaluokan kahdeksan eri reseptoria (EphA1-A8) vuorovaikuttavat satunnaisesti viiden eri efriniA-ligandin (efriiniA1-A5) kanssa ja EphB-alaluokan kuusi eri reseptoria vuorovaikuttavat kolmen eri efriniB-ligandin (efriiniB1-B3) kanssa. ²



Kuva 2. Eph-reseptorien ja efriini-ligandien sitoutuminen ja kaksisuuntaisen signaaliketjun aktivoituminen.³

Kuvassa 2 nähdään kuinka spesifisesti sitoutuvat ligandit ja reseptorit muodostavat sitoutumiskohdassa 2:2 pyöreän heterotetrameerin. Muodostelma käynnistää signalointiprosessin ja samalla aiheuttaa fosforyloitumisen niiden solunsisäisissä osissa. Eph-reseptorin solunsisäiset tyrosiinikinaasit ja samoin efriinin solunsisäiset osat (sytoplasmisen häntä + PDZ) fosforyloituvat kuten näkyy kuvan 2 oikeassa kulmassa.²



Kuva 3. Humaanin EphA3-reseptoriproteiinin kolmiulotteinen mallinnuskuva.⁴

Kuvassa kolme on esitettyä tietokonemallinnuskuva human EphA3-reseptoriproteiinin koko kolmiulotteisesta rakenteesta, josta tässä opinnäytetyössä tuotettiin ligandia sitovaa osaa (LBD), joka ei sisällä hydrofobisia alueita. Tulevaisuudessa Eph ja efriini tunnistuksen, rakenteellisten sekä

sitoutumismekanismien selvityksellä toivotaan saavutettavan uusien terapeuttisten verenkierto-, hermosto- ja syöpälääkeaineiden kehitys.²

1.3 Plasmidivektorit

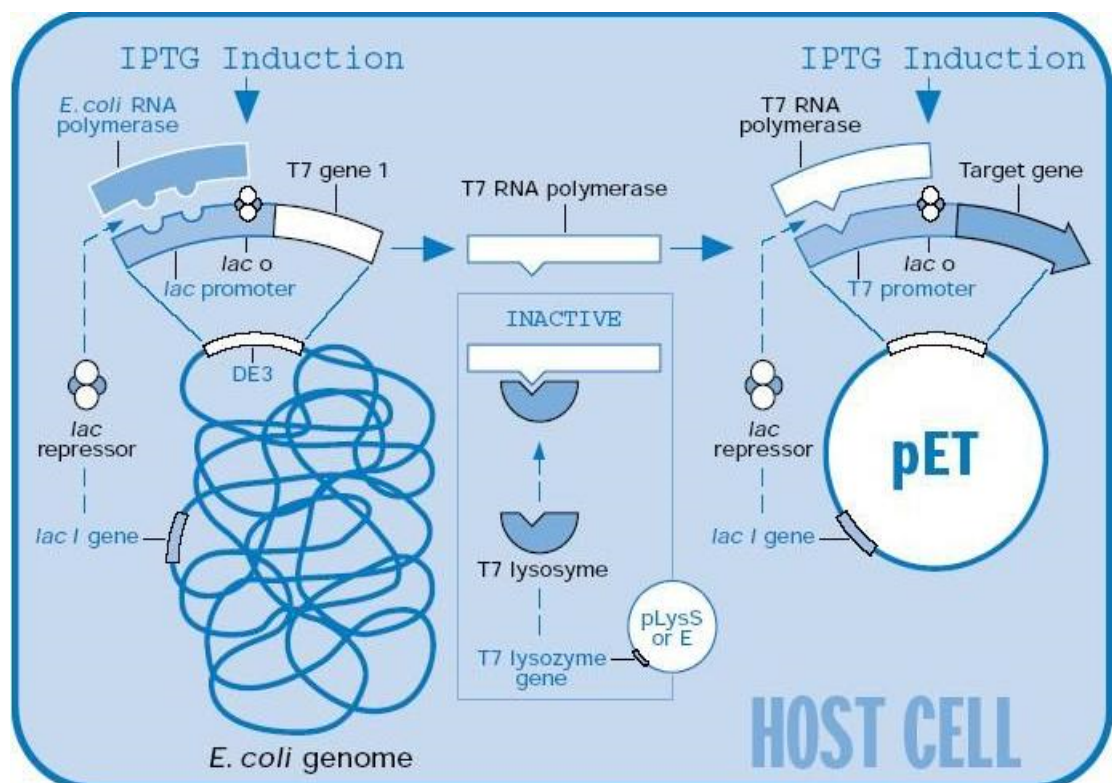
Plasmidit ovat rengasmaisia DNA-molekyylejä, joita esiintyy luonnostaan eri bakteerilajeilla ja joillakin eukaryooteilla, kuten hiivoilla. Yhdistelmä DNA-tekniikassa plasmideja käytään yleisesti vektoreina, haluttaessa siirtää vierasperäistä DNA:ta isäntäsoluun. Plasmidit replikoituvat itsenäisesti erillään isäntäsolun kromosomaalisesta DNA:sta ja voivat aiheuttaa isäntäsolulle erilaisia ominaisuuksia, kuten antibioottiresistenssin. Nämä ominaisuudet mahdollistavat sen, että plasmideja voidaan käyttää avuksi esimerkiksi tutkittaessa tai ilmentäessä plasmidin sisältämää vierasta DNA:ta.⁵

Toimivan yhdistelmä-DNA-vektorin luomiseksi tulee plasmidin sisältää isäntäsolunmukainen ori-alue (engl. origin of replication), selektiogeneeni esimerkiksi resistenssi jollekin antibiootille, sekä tunnistuskohta/kohtia restriktioentsyymeille. Nykyään plasmidivektoreissa käytetään usein MCS-alueeksi (engl. multiple cloning site) kutsuttua synteettistä polylinkkerialuetta, joka sisältää spesifiset katkaisukohtat usealle restriktioentsyymille.⁵

Osaksi plasmidien genomia voidaan liittää eri restriktioentsyymien ja ligaasientsyymien avulla vierasta DNA:ta ja muodostaa näin yhdistelmä-DNA-vektori. Yhdistelmä-DNA-vektori voidaan siirtää eli transformoida vieraaseen isäntäsoluun, jolloin se replikoituu itsenäisesti ja sen avulla voidaan myös ekpressoida oikeiden säätelyalueiden kanssa vektorin sisältämän geenin koodittavaa proteiinia.

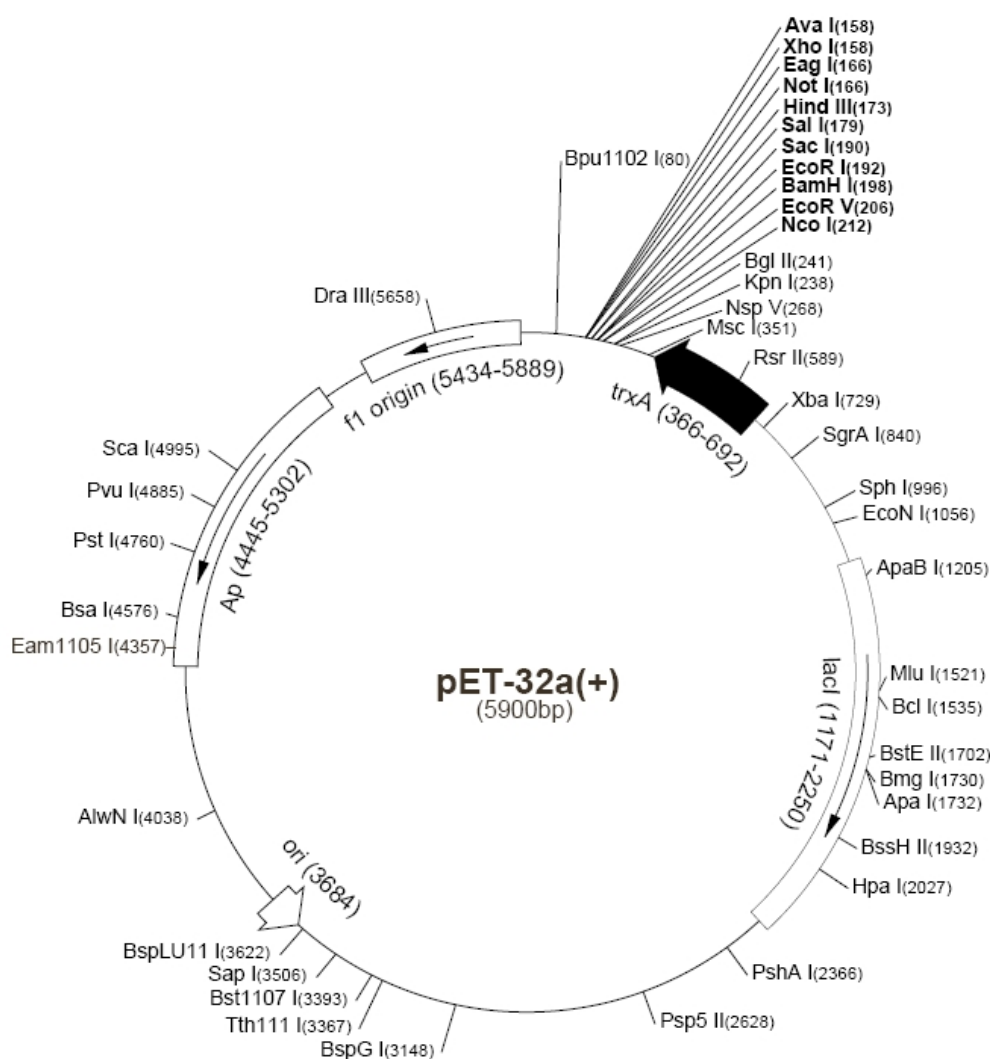
1.3.1 pET32a

Tässä opinnäytetyössä käytettiin pET32a vektoria tuottaessa rekombinanttiproteiinia Eph-A3-LBD *Escherichia coli* -bakteerin avulla. Novagen -yhtiön (USA) kehittämä ja markkinoiva pET-systeemi on tehokas työkalu, jota voidaan käyttää kloonaukseen ja rekombinanttiproteiinien tuottoon *E. coli* bakteereissa. Haluttu geeni kloonataan pET-plasmidin T7-promootterialueen perään, jolloin T7 RNA-polymeraasi indusoi geenin ekssiota. Proteiinin tuottamiseksi tulee käyttää isäntäsolukantaa, joka sisältää geenin T7 RNA polymeraasin ilmentämiseksi. T7 RNA polymeraasi on niin aktiivinen ja selektiivinen että indusoidaessa sitä täydellä teholla, lähes kaikki solun voimavarat käytetään rekombinanttiproteiinin tuotantoon ja halutun proteiinin määrä voi nousta jopa 50 %:iin solun kokonaisproteiinimäärästä.⁶



Kuva 4. pET-systeemin toimintaperiaatteet.⁷

pET-systeemin toiminta ja ekpressointivoimakkuuden säätely perustuu indusointiin, joko IPTG:n tai laktoosin kanssa (kuva 4.). Normaalisti solu tuottaa *lacI* repressoria muodostaen neljän repressorialayksikön kanssa tetrameerin, joka sitoutuu *lac*-operonin operaattorialueelle. Sitoutuminen estää RNA polymeraasin kiinnittymisen sekä transkription T7 geenin 1 alueella, jolloin T7 RNA polymeraasia ei pääse muodostumaan. Lisättäessä IPTG:tä tai laktoosia, aine sitoutuu *lacI* repressorin terameeriin, jolloin repressorin toiminta estyy ja RNA polymeraasi pääsee kiinnittymään *lacI* operaattorin alueelle. Tällöin tuottuu T7 RNA polymeraasia, joka indusoi isäntäsoluun siirretyn pET-plamidin T7 promoottin ja sen perässä sijaitsevan halutun geenin toimintaa.⁶

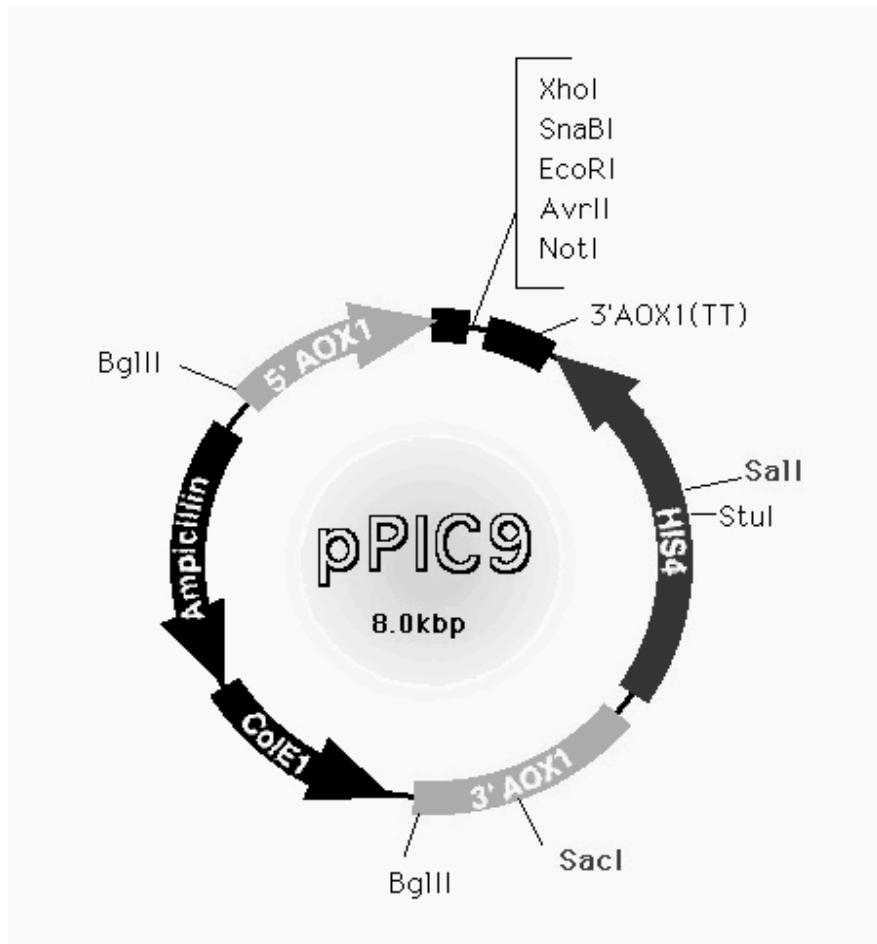


Kuva 5. pET-32a plasmidivektorin geenikartta.⁸

Opinnäytetyössä käytetty plasmidi pET32a (kuva 5.) sisälsi T7 promoottorin lisäksi *lacI* geenin sekä *lacI* operaattorin, jotka toimivat samaan tapaan estäen T7 RNA polymeraasin kiinnittymisen induktorin puuttuessa.

1.3.2 pPIC9

Tuotettaessa reseptoriproteiinia EphA3-LBD *Pichia pastoris* -hiivan kanssa käytettiin vektorina pPIC9-plasmidia, joka on osa *Pichia pastoris* -hiivan ekpressiosysteemiä. pPIC9-plasmidi (kuva 6.) on 8023 bp (engl. base pair) kokoinen sukkulavektori, joka sisältää AOX1-alueita, α -eritys signaalin, ampicilliiniresistenssigeenin, *E. coli* ORI-alueen sekä restriktioentsyymien katkaisukohtia. Näiden ominaisuuksien avulla plasmidin kanssa voidaan työskennellä sekä *E. coli* -bakteereissa että *Pichia pastoris* -hiivassa. Haluttu geeni liitetään osaksi plasmidia AOX1 (engl. alcohol oxidase promoter) TT-alueen perään. Transformoitaessa plasmidi *Pichia pastoris* -hiivaan plasmidi tulee linearisoida katkaisemalla se tietyllä yksittäisellä restriktioentsyymillä. Linearisoitu plasmidi liittyy osaksi hiivan kromosomistoa homologisen rekombinaation kautta, transformoitavan DNA:n ja hiivan genomien sisältävien homologisten alueiden välillä. Proteiinin tuottoa säädellään ja indusoidaan metanolin avulla, sillä *Pichia pastoris* käyttää hiililähteenään metanolia tuottamansa alkoholioksidiaasin avulla. Alkoholioksidiaasin tuottoa säätelevä promoottori eli AOX1 geenit säätelevät samalla myös rekombinanttiproteiinin expressiosta *Pichia pastoris* -hiivassa.⁹



Kuva 6. pPIC9 fuusiovektorin geenikartta⁹

1.4 Geenin kloonauus

1.4.1 PCR

Kahden nukleotidijärjestykseltään tunnetun DNA-jakson välissä olevia DNA-jaksoja voidaan monistaa polymeraasiketjureaktion (PCR, engl. Polymerase chain reaction) avulla. DNA:n monistuminen PCR-reaktioiden avulla tapahtuu mikrosentrifuugiputkissa ($\leq 0,5$ ml), joiden lämpötilaa kontrolloidaan PCR-laitteen avulla. Reaktion mahdollistaa lämpöä kestävä DNA-polymeraasientsyymi, joka ei inaktivoidu korkeissakaan lämpötiloissa. Monistumiseen tarvitaan DNA-polymeraasin

lisäksi kahta spesifistä aluketta, jotka sitoutuvat templaattina toimivan kaksinauhaisen DNA:n eri juosteisiin ja vastakkaisiin päihin, sekä lisäksi nukleotideja.⁵

PCR-laitteen lämmönvaihteluihin perustuen, saadaan tuotettua toistuvaa sykliä, joka koostuu sarjasta denaturointi-annealing-pidennys. Denaturointivaiheessa kaksinauhaisen DNA:n juosteet irtoavat toisistaan kuumennuskäsittelyn avulla. Kun lämpötilaa lasketaan tämän jälkeen hetkellisesti, alukkeet pystyvät kiinnittymään tempaattiin lyhyessä annealing-reaktiossa. Tämän jälkeen nostetaan lämpötilaa, jolloin DNA-polymeraasi alkaa liittää nukleotideja alukkeen 3`-päästä lähtien, käyttäen mallina templaattia. Tässä templaatin pidennysreaktiossa kahden eri spesifisen alukkeen avulla syntyy kummallekin templaatin nauhalle vastinnauha, alukkeiden väliselle alueelle.⁵

Tässä opinnäytetyössä käytettiin PCR-menetelmää, jotta saataisiin monistettua templaattina käytettävästä koko EphA3 reseptorista vain tiettyä solunulkoista LBD:ksi (ligand binding domain) kutsuttua ligandin sitovaa reseptorin osaa. PCR-reaktiota varten suunniteltiin spesifiset alukkeet EphA3-LBD-reseptoriproteiinia koodittavan DNA-alueen monistamiseksi. Alukkeiden suunnittelussa otettiin huomioon myös tulevat työvaiheet, suunnittelemalla restriktioentsyymien katkaisukohtat (EcoR1 ja Not1), stop- kodoni sekä kuuden histidiini aminohapon koodaava DNA-alue his-tagin muodostumiseksi.

1.4.2 Digestio ja ligaatio

Digestiolla tarkoitetaan DNA:n katkaisemista restriktioentsyymien avulla. Restriktioentsyymit ovat bakteerien tuottamia entsyymejä, joilla bakteeri puolustautuu vierasta DNA:ta vastaan. Restriktioentsyymejä on erilaisia ja kunkin entsyymi tunnistaa kaksinauhaisessa DNA:ssa spesifisiä jaksoja ja katkaisee DNA:n tietyistä kohdasta. Bakteeri suojelee omaa DNA:ta restroktioentsyymiltä metylaasientsyymien avulla. Restriktioentsyymejä käytetään hyväksi yhdistelmä-DNA-tekniikassa juuri sen vuoksi, että ne tunnistavat kaksinauhaisessa DNA:ssa spesifisiä 4-8 nukleotidiparin

mittaisia jaksoja ja katkaisevat molemmat DNA:n juosteista tarkalleen määrätystä kohdasta.⁵

Ligaatiossa liitetään DNA-jaksoja toisiinsa kovalenttisin fosfodiesterisidoksin DNA-ligaasi entsyymien avulla. Yleisimmin ja myös tässä opinnäytetyössä käytetty DNA-ligaasi on *E. coli* T4-faagin tuottama T4-DNA-ligaasi. Halutessa liittää yhteen katkaistua DNA:ta tulee digestiossa ottaa huomioon, että restriktioentsyymi katkaisee DNA:n siten että sen 5'-päässä on vapaa fosfaattiryhmä ja 3'-päässä OH-ryhmä, jotta DNA-ligaasi voi liittää DNA-jaksot yhteen.⁵

Opinnäytetyössä käytettiin hyväksi digestiota ja ligaatiota EphA3-LBD-reseptoriproteiinia koodittavan insertin liittämiseksi sekä pET32a-plasmidivektoriin että pPIC9-plasmidivektoriin. Yhdistelmä-DNA-vektorien luomisen jälkeen vektorit siirrettiin eli transformoitiin isäntäsoluihin, jota käsitellään seuraavassa kappaleessa.

1.4.3 Transformaatio

Transformaatiolla tarkoitetaan DNA:n saattamista solun sisälle. Eri menetelmistä ja soluista riippuen, käytetään myös termiä transfektio (korkeampien eukaryootisolujen transformointi). Esimerkiksi *E. coli* -bakteerisoluihin voidaan siirtää ehjiä plasmidirenkaita lämpöshokkimenetelmällä, jossa solut tehdään ensin kompetenteiksi CaCl₂-käsittelyllä. Soluja käsitellään ensin jääkylmällä CaCl₂-liuoksella, jolloin solut saatetaan tilaan, jossa ne ovat kykeneviä eli kompetenteja vastaanottamaan DNA:ta sisäänsä. CaCl₂ kompleksoituu DNA:n kanssa ja destabiloi solukalvoja. Transformoituminen tapahtuu, kun jääkylmille soluille annetaan lyhyt lämpöshokki. Suurin osa soluista kuolee tässä käsittelyssä ja harva saa DNA:ta sisäänsä. Menetelmällä saadaan kuitenkin noin 10⁵ – 10⁷ transformanttia µg:aa plasmidia kohden.⁵

Elektroporaation avulla voidaan transformoida eläin-, bakteri-, hiiva-, home-, ja kasvisoluja. Elektroporaatio perustuu lyhytaikaiseen, voimakkaaseen ja

korkeajännitteiseen sähköpulsssiin, joka saa aikaan lyhytikäisiä aukeamia soluseinään, joiden kautta DNA siirtyy suoraan sisään. Jännitepulssien pituus ja voimakkuus valitaan eri solutyypin mukaan.⁵

Tässä työssä haluttiin saattaa yhdistelmä-DNA-vektoria *E. coli* -bakteerisoluihin sekä *P. pastoris* -hiivasoluihin. Transformaatiomenetelminä käytettiin lämpöshokkia kompetenteille *E. coli* -soluille ja elektroporaatiota *P. pastoris* -hiivasoluille.

1.5 Proteiinin tuotto *E. coli* ja *Pichia pastoris*issa

Tässä opinnäytetyössä käytettiin hyväksi proteiinin tuotossa kahta eri isäntäorganismia *E. coli* ja *Pichia pastoris*, jotka ovat molemmat tehokkaita ekpressiosysteemejä plasmidivektorien pET32a:n ja pPIC9 kanssa käytettynä. Tuottokannat *E. coli* Origami B (DE3) ja *P. pastoris* GS115 valittiin käytettäväksi työssä pET- ja *Pichia* -manuaalien suositusten mukaan.^{6 & 9}

Tuotettava proteiini EphA3LBD ei sisällä hydrofobisia alueita, joka mahdollistaa proteiinin tuoton *E. coli*issa. Etuna tuotettaessa proteiinia *E. coli*in kanssa on sen kasvunopeus. Optimaalisissa kasvuolosuhteissa *E. coli* jakaantuu 20 minuutin välein. Esimerkiksi tässä opinnäytetyössä kasvatus ja proteiinin tuotto *E. coli*in kanssa kesti yhteensä vain noin vuorokauden. pET-vektorin käyttö on yksi tehokkaimmista ekpressiosysteemeistä tuottaessa proteiinia *E. coli*in kanssa. Tuottoa indusoidaan IPTG:n tai laktoosin lisäyksellä. Indusorin konsentraation avulla voidaan suoraan vaikuttaa ekspressiotasoon.⁶ pET-systeemin toiminnan tarkempi kuvaus on selostettu kappaleessa 1.3.1.

Tuottaessa proteiinia *E. coli*in kanssa proteiini tuottuu solun sisälle. Erilaisten pET-vektorien avulla on mahdollista ohjata proteiinin erityyppiseen *E. coli*in periplasmiseen tilaan signaalisekvenssin avulla. Tässä opinnäytetyössä käytetty pET32a-vektori ei kuitenkaan sisältänyt tätä signaalisekvenssiä, jolloin tuotettu proteiini jää sytoplasmaan. Sytoplasmaan tuotettuna saadaan kuitenkin suurempi ekspressiotaso.

Monet proteiinit tarvitsevat toimiakseen vakaita disulfididoksia oikean laskostumisen ja aktiivisuuden muodostumiseksi. Ilman disulfididoksien muodostumista proteiinit kasaantuvat inklusiojyväiksi. Tavallisesti disulfididoksia muodostuu *E. coli* ainoastaan proteiinien kuljetuksessa periplasmiseen tilaan. Käytetty tuottokanta *E. coli* Origami B (DE3) sisältää tryB ja gor mutaatiot, joiden ansoista disulfididosten muodostuminen parantuu proteiinin tuotossa sytoplasmaan. Proteiini tuottuu siis osaksi liukoiseen muotoon ja osaksi inklusiojyväisiin. Origami ekpressiokannan etuna on myös lon- ja ompT proteaasien puuttuminen, joka estää proteiinien tuhoutumista puhdistuksen aikana.⁶ Proteiinin tuottuminen solun sisälle ja inklusiojyväisiin aiheuttaa useampia jälkikäsittelyvaiheita proteiinin talteen ottamiseksi.

Pichia pastoris on metyloτροφinen hiiva, joka kykenee käyttämään metanolia hiililähteenään. Proteiinin tuotossa sillä on monia korkeamman eukaryoottiekpressiosysteemin etuja, kuten proteiinin prosessointi, laskostuminen ja translaation jälkeinen muokkaus (glykosylaatio). Lisäksi se on nopeampi, helpompi käsitellä ja halvempi kuin muut eukaryoottiekpressiosysteemit. Verrattuna *Saccharomyces cerevisiae*en, *P. pastoris*en ei hyperglykosyloi erittyviä proteiineja, jolloin proteiinien rakenne on lähempänä haluttua.⁹

Pichia pastoris -hiiva vaatii kasvaakseen 28 - 30 °C lämpötilan sekä runsaasti happea metaboloidakseen metanolia. Tuottamalla alkoholioksidaasi- entsyymiä, hiiva kykenee hajottamaan metanolin käyttökelpoiseen muotoon. Alkoholioksidaasin tuottoa säätelevä promootteri eli AOX1 geenit säätelevät samalla myös rekombinanttiproteiinin ekpressiosta. Transformoitaessa haluttu geeni pPIC9 vektorin avulla *P. pastoris* GS115-kantaan se ilmentää kahta erilaista fenotyyppiä Mut⁺ (engl. Methanol utilization plus) ja Mut^S (engl. Methanol utilization slow). Mut⁺ fenotyyppi kasvaa metanolia sisältävässä mediumissa nopeasti, kun taas Mut^S hitaasti. Etukäteen ei voida ennustaa kumpi fenotyyppi ekpressoii paremmin haluttua proteiinia.

Proteiinin ekspressio voi olla valinnaisesti solunsisäistä tai ulos erittyvää (α -erityssignaalin avulla), kuten tässä opinnäytetyössä. Eritettäessä proteiineja solun ulkopuolelle *P. pastoriksen* etuna on, että se tuottaa hyvin pieniä pitoisuuksia natiiveja proteiineja. Lisäksi käytetyt mediumit sisältävät hyvin pieniä pitoisuuksia proteiineja. Nämä seikat helpottavat huomattavasti proteiinin puhdistusta ja vähentävät jälkikäsittelyvaiheiden määrää. *P. pastoriksen* haittana on proteiinin tuoton hitaus verrattuna *E. coliin*, sillä kasvatus kestää kolmesta neljään vuorokautta.⁹ Tosin tämä aika voitetaan takaisin lyhyemmissä jälkikäsittelyvaiheissa, verrattuna *E. coliin* kanssa tuotettuun proteiiniin.

1.6 Proteiinin talteenotto ja puhdistus

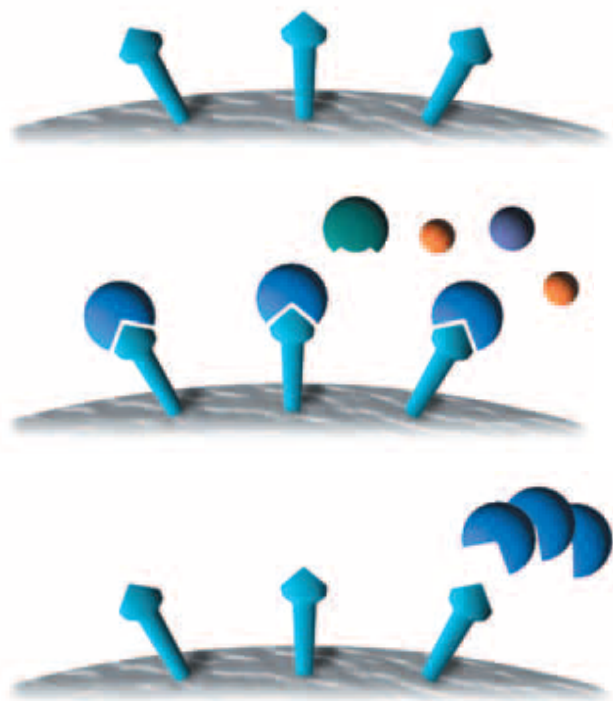
1.6.1 Soluhajotus

Escherichia coli on gramnegatiivinen bakteeri, joka tuottaa tuottoproteiinin solun sisään tai soluseinän periplasmiseen tilaan. Tämän vuoksi solut tulee hajottaa kasvatuksen jälkeen tuotteen saamiseksi ulos solusta. Soluhajotusmenetelmiä on sekä mekaanisia, että ei-mekaanisia, joita käytetään riippuen solusta ja mittakaavasta. Erilaisia soluhajotusmenetelmiä ovat muun muassa ultraäänikäsittely, korkeapainehomogenisointi, jauhaminen, kuivaus, osmoottinen paine, jäädytys-sulatus sekä erilaiset kemialliset ja entsymaattiset aineet. Opinnäytetyössä käytettiin soluhajotukseen sentrifugoinnin jälkeen jäädytys-sulatusmenetelmää yhdistettynä lysosyymin käyttöön. Lysosyymin saa aikaan soluseinän periplasmisten peptidoglykaanien hajoamisen.¹⁰

1.6.2 Affiniteettikromatografia

Affiniteettikromatografia on biomolekyylien puhdistustekniikka, joka mahdollistaa biomolekyylien puhdistuksen biologisen toiminnan ja spesifisen kemiallisen rakenteen perusteella. Affiniteettikromatografia erottelee proteiineja reversiibelin

vuorovaikutuksen perusteella, proteiinin ja matriksiin (kantaja-aine) kiinnitetyn spesifisen ligandin välillä.¹¹ Puhdistustekniikassa hyödynnetään siis biomolekyylien kykyä tunnistaa ja sitoutua toisiinsa. Puhdistus tapahtuu yleensä pylväässä, jossa on pakattuna kiinteää kantaja-ainetta ja kantaja-aineeseen on kiinnittyneenä puhdistettavaa biomolekyyliä sitovaa ligandia.¹⁰ Ligandina voidaan käyttää puhdistettavasta biomolekyylistä riippuen esimerkiksi entsyymejä, vasta-aineita, hormoneja, nukleiinihappoja ja metalli-ioneja. Tässä opinnäytetyössä käytettiin metalli-ioneihin perustuvaa affiniteettikromatografiaa, jota kutsutaan nimellä IMAC (engl. immobilized metal ion affinity chromatography). Vaatimuksena ligandin valinnassa on, että se tulee saada kovalenttisesti kiinnittymään matriksiin. Lisäksi sen tulee säilyttää sitoutumisaffiniteetti pestäessä sitoutumatonta ainesta pois ja sitoutumisen tulee olla reversiibeli, jotta haluttu biomolekyyli saadaan irrotettua aktiivisessa muodossa pois matriksista.¹¹



Kuva 7. Affiniteettikromatografian puhdistuksen vaiheet.¹¹

Affiniteettikromatografiapuhdistus kostuu pääpiirteittään seuraavista vaiheista, kuten kuva 7 esittää. Puhdistuspylvään tasapainotus, näytteen ajo pylvään lävitse spesifistä sitoutumista suosivissa olosuhteissa, kiinnittymättömän aineksen pois pesu ja proteiinin eluointi pois matriksista olosuhteissa, jotka edistävät irtoamista. Puhdistettava molekyyli voidaan eluoida irti matriksista esimerkiksi kilpailevan ligandin kanssa, pH:n tai ionivahvuuden muutoksella.¹¹

Tässä opinnäytetyössä EphA3-reseptoriproteiinien puhdistukseen käytettiin Ni-sefaroosia. Ni-sefaroosi sisältää varauksellisia Ni²⁺-ioneja, joihin kuuden histidiini aminohapon pituinen histidiini-häntä tarttuu spesifisesti.¹¹ Työn alussa PCR-reaktiossa käytettävät DNA-alukkeet suunniteltiin siten, että proteiinin mukaan tuottuu kuuden aminohapon pituinen histidiini-häntä (His-tag). Tämän his-tag:n avulla fuusioproteiini kiinnittyy spesifisesti puhdistusmatriksiin, joka sisältää ligandina toimivia nikkeli-ioneja.

1.7 Tulosten analysointi

1.7.1 Agaroosielektroforeesi

Agaroosielektroforeesia eli AGE:tä (engl. agarose gel electrophoresis) käytetään työkaluna analysoitaessa DNA:ta. AGE-menetelmä perustuu erikokoisten DNA-fragmenttien kulkeutumiseen sähkökentässä agaroosigeelin avulla. DNA:n kulkeutuminen sähkökentässä perustuu siihen, että DNA on negatiivisesti varautunutta sen sisältämien fosfaattiryhmien ansiosta. Negatiivisesti varautuneena DNA kulkeutuu sähkökentässä positiivista napaa eli anodia kohden. Agaroosigeelin verkkorakenne hidastaa DNA:n kulkua sähkökentässä siten että pidemmät DNA molekyylit kulkevat hitaammin sähkökentässä kuin lyhyemmät. Erikokoiset DNA-jaksot kulkevat ajon aikana niille ominaisella nopeudella, jolloin ne erottuvat omiksi vyöhykkeikseen.⁵

DNA vyöhykkeiden havaitsemiseksi agarosigeeli tulee värjätä esimerkiksi etidumbromidilla. Geeliin voidaan laittaa etidumbromidia jo ennen ajoa tai värjätä geeli ajon jälkeen. Tarkasteltaessa agarosigeeliä UV-valossa DNA:n nukleiinihappojen emästen väliin tunkeutuneet etidiumionit fluoresoivat oranssinpunaisena. Näin voidaan havaita AGE:n avulla erotellut erikokoiset DNA-vyöhykkeet.⁵

Haluttaessa eristää tiettyjä DNA-fragmentteja agarosigeeliltä, voidaan käyttää useita eri menetelmiä kuten LGT-agarosi, erilaiset silikamenetelmät, elektroeluutio, DEAE-membraanit jne.⁵ Tässä opinnäytetyössä DNA eristämiseksi geeliltä käytettiin kaupallista reagenssisarjaa (MACHEREY-NAGEL, NucleoSpin® Extract II), jonka toiminta perustuu silikamembraanimenetelmään.

1.7.2 SDS-PAGE

SDS-PAGE eli natriumdodekyylisulfaattipolyakryyliamidigeelielektroforeesia (engl. sodium dodecyl sulfate- polyacrylamide gel electrophoresis) käytetään muun muassa proteiinien koon, määrän ja puhtauden määrittämisessä.¹² Muiden elektroforeesien tapaan varautuneet molekyylit erotetaan sähkökentässä koon perusteella omiksi vyöhykkeikseen tiettyä matriksia apuna käyttäen.¹³ Ajettaessa proteiineja käytetään matriksina polyakryyliamidigeeliä. Ennen ajoa näytteisiin eli proteiiniseoksiin lisätään merkaptoetanolia sekä natriumdodekyylisulfaattia (SDS) ja kuumennetaan 100 °C lämpötilassa.¹²

Pelkistävä merkaptoetanoli hajottaa proteiinien rikkisillat ja SDS muuttaa proteiinien varauksen negatiiviseksi. Tuloksena saadaan negatiivisesti varautunutta lineaarista proteiinia, joka kulkee elektroforeesissa molekyylipainonsa perusteella.¹² SDS-PAGE:stä on paljon erilaisia sovelluksia käyttötarkoituksesta riippuen, joista tässä opinnäytetyössä käytettiin vertikaalista kasiosaista SDS-PAGE:a. Ajon jälkeen proteiinivyöhykkeet paikannetaan värjäämällä geeliä proteiinia värjäävillä aineilla kuten hopeavärillä tai Coomassie blue -väriaineella. Proteiinien molekyylipaino

saadaan selville ajamalla samassa ajossa proteiinistandardiseosta, jonka molekyylien painot tunnetaan.¹³

2 Materiaalit ja menetelmät

2.1 Geenin kloonauk

2.1.1 PCR

Polymeraasiketjureaktion avulla (PCR, polymerase chain reaction) saadaan monistettua haluttua kaksinauhaista DNA-jaksoa niin, että saadaan tarpeeksi suuri DNA konsentraatio tulevia työvaiheita varten. Templaattina käytettiin humanaa koko EphA3ECD-osaa (EphA3ECD, 13.10.06, 10 µg), josta monistettiin vain EphA3-reseptorin ligandia sitova osa (LBD, ligand binding domain). Ennen varsinaista DNA:n monistusta PCR:n avulla, suunniteltiin spesifiset alukkeet EphA3LBD-reseptoriproteiinia koodaavan DNA:n monistusta varten. Alukkeiden suunnittelussa otettiin huomioon EphA3LBD DNA:n monistuksen lisäksi myös tulevat työvaiheet. Alukkeisiin suunniteltiin restriktioentsyymien katkaisukohtat (EcoR1 ja Not1), stop-kodoni sekä His-tag proteiinin puhdistusta varten. Alukkeet nimettiin seuraavasti, EphA3LBD-EcoR1-For ja EphA3LBD-Not1-Stop-His-Gly-Rev. Niiden nukleotidirakenne on kuvattu LIITTEESSÄ 1. Alukkeet tilattiin Oligomer yrityksestä.

PCR-reaktiota varten pipetoitiin tarvittavat aineet samaan steriiliin mikrosentrifuugiputkeen talukossa 1 kuvatulla tavalla. Näytteitä oli yhteensä neljä kappaletta, kontrolli (templaatin tilalla vettä), sekä kolme EphA3ECD templaattia eri lähteistä, jotka nimettiin kirjaimilla A, B ja C. Putket siirrettiin PCR laitteeseen, joka mahdollistaa monistumisen tarkasti säädeltyjen lämmönvaihteluiden avulla. Käytetty PCR ohjelma kuvattu taulukossa 2.

Taulukko 1. PCR pipetoinnit

Pipetoitava aine	Määrä μl
H ₂ O	24 μl
5x phusion buffer	10 μl
2 mM dNTP s	5 μl
Aluke: EphA3LBD-EcoR1-For	5 μl
Aluke: EphA3LBD-Not1-Stop-His-Gly-Rev	5 μl
Templaatti x3	0,5 μl
Polymeraasi: Phusion DNA-polymerase 2 u/ μl (Finnzymes, F-5305)	0,5 μl
Yhteensä:	50 μl

Taulukko 2. PCR ohjelma

Vaihe	Lämpötila °C	Aika	Syklien määrä
Alku denaturointi	98 °C	30 s	1 x
Denaturointi	98 °C	10 s	30 x
Annealing	55 °C	30 s	
Pidennysreaktio	72 °C	30 s	
Loppu pidennys	72 °C	10 min	1 x
Lopetus	4 °C	∞	

PCR:n jälkeen ajettiin PCR-tuotteista näytteet agarosielektroforeesigeelille DNA:n monistumisen toteamiseksi. PCR-tuotteista otettiin 5 μl näyte, johon lisättiin 1 μl väriä (6 x DNA β). Näytteet pipetoitiin geelille näytekuppiin järjestyksessä standardi, PCR-tuotteet A, B ja C, sekä kontrolli (Ctrl) ja ajettiin 100 V jännitteellä. Agarosielektroforeesin ohje on kuvattuna LIITTEESSÄ 2.

Kuvasta 9 voidaan todeta PCR-reaktion onnistuneen, joten jatkettiin työskentelyä puhdistamalla PCR-tuotteet B ja C (EphA3LBD, PCR). Puhdistus toteutettiin NucleoSpin®-kitin (MACHEREY-NAGEL, NucleoSpin® Extract II, Cat. No 740 609.50, Lot. 605 1006) avulla, jonka puhdistus perustuu silikamembraanimenetelmään. Puhdistuksen jälkeen määritettiin spektrofotometrin kanssa DNA-konsentraatiot aallonpituudella 260 nm. DNA-konsentraatioiksi saatiin B = 139 ng/μl ja C = 110 ng / μl (EphA3LBD, PCR, puhdistettu).

2.1.2 Digestio

Digestiossa katkaistaan restriktioentsyymien avulla sekä insertin että plasmidin kaksinauhaisesta DNA:sta spesifiset DNA-alueet pois, jolloin on mahdollista liittää insertti ja plasmidi toisiinsa ligaation (ligaasientsyymien) avulla. Restriktioentsyymit tunnistavat spesifiset DNA-alueet emäsjärjestyksen perusteella ja katkaisevat ne tietyistä kohdista. Digestion tuloksena saadaan samanlaiset kohessiiviset päät, jotka voidaan liittää yhteen. Tässä työssä käytettiin restriktioentsyymeinä EcoR1 ja Not1-entsyymejä. Plasmideissa pPIC9 ja pET32a on valmiina katkaisukohdat näille entsyymeille. Insertissä nämä katkaisukohdat rakennettiin PCR:n avulla, kun alukkeisiin suunnitellut katkaisukohdat monistuivat osaksi inserttiä.

Käytännössä digestio toteutettiin pipetoimalla steriiliin eppendorf-putkeen digestoitava DNA, puskuri (Tango-puskuri 2x) sekä restriktioentsyymit (EcoR1 ja Not1). Näytteet sentrifugoitiin pohjaan ja inkuboitiin lämpökaapissa + 37 °C. Inkubointiaikaa ja pipetoitavia määriä muutettiin tuloksien perusteella. Eri toimintavat kuvattu alla taulukoissa 3 - 5. Digestion jälkeen restriktioentsyymit inaktivoitiin lämpöblokillä + 65 °C, 15 minuutin ajan. Digestoiduille plasmideille lisättiin 0,5 μl CIAP-entsyymiä, joka estää vektoria ligoitumasta takaisin yhteen itsensä kanssa. CIAP entsyymien annettiin vaikuttaa 15 minuuttia + 37 °C. Digestion tuloksia tarkasteltiin ajamalla agarosielektroforeesigeeli digestioäytteistä. Digestion onnistuttua leikattiin digestoitu DNA-pala geeliltä ja puhdistettiin se NucleoSpin®-kitin avulla.

2.1.2.1 Digestio pPIC9 ja EphA3LBD

Taulukko 3. Digestio pPIC9 ja EphA3LBD, inkubointiaika yön yli

Pipetoinnit	Plasmidi: (pPIC9+A5LBD, miniprep 2, 308 ng/ μ l, 9.12.08/JP)	Insertti: (puhdistettu, PCR, EphA3LBD, putki C, 110 ng / μ l, 16.01.09/EP)
DNA	14,5 μ l	14,5 μ l
Puskuri (10 x Tango Buffer with BSA, Fermentas, lot 00017765)	4 μ l	4 μ l
NotI (10 u/ μ l, Fermentas, lot. 00023583)	1 μ l (10 u)	1 μ l (10 u)
EcoRI (10 u/ μ l, Fermentas, lot. 3011)	0,5 μ l (5 u)	0,5 μ l (5 u)
Yhteensä:	20 μ l	20 μ l

Kuvan 10 tuloksista voidaan päätellä, että insertin digestio on onnistunut, mutta plasmidin pPIC9 digestiossa voidaan havaita tähtiaktiivisuutta, jossa plasmidin DNA on pilkkoutunut epäspesifisesti liian pieniksi osasiksi. Syynä saattaa olla liian suuri glyserolipitoisuus ja pitkä inkubointiaika, jolloin restriktioentsyymi EcoRI aiheuttaa DNA:n epäspesifistä pilkkoutumista. Plasmidin pPIC9 digestio tehtiin uudelleen taulukossa 4 kuvatun pipetointiohjeen mukaisesti ja inkubointiajaksi muutettiin kaksi tuntia.

Taulukko 4. Digestio pPIC9, inkubointiaika 2 h

Pipetoinnit	Plasmidi: (pPIC9+B2LBD)
DNA	2 μ l
Tango buffer (10 x Tango Buffer with BSA, Fermentas, lot 00017765)	2 μ l

NotI (10 u/ μ l, Fermentas, lot. 00023583)	1 μ l (10 u)
EcoRI (10 u/ μ l, Fermentas, lot. 3011)	1 μ l (10 u)
H ₂ O	4 μ l
Yhteensä:	10 μ l

Kuvasta 11 nähdään, että plasmidin digestio on onnistunut. Digestoitujen ja puhdistettujen pPIC9-plasmidivektorin ja ephA3LBD-insertin kanssa jatkettiin suorittamalla ligaatio ja transformaatio (kappale 3.1.3).

2.1.2.2 Digestio pET32a ja EphA3LBD

Tehtiin taulukon 5 mukaiset pipetoinnit ja inkuboitii 2h, + 37 °C. Inaktivoitiin entsyymien toiminta lämpöblokillä + 65 °C, 15 minuutin ajan. Lisättiin vektorin CIAP 0,5 μ l ja inkuboitii 15 minuuttia + 37 °C. Ajettiin agarosielektroforeesi samaan tapaan kuin aiemmin.

Taulukko 5. pET32a ja EphA3LBD digestio

Pipetoinnit	Plasmidi: (pET32a+EphA3LBD(mutaatio), miniprep 1, 38 ng/ μ l, 21.01.09/EP)	Insertti: (EphA3LBD+pPIC9, miniprep 2, 258 ng/ μ l, 10.02.09/EP)
DNA	2 μ l	2 μ l
Puskuri (10 x Tango Buffer with BSA, Fermentas, lot 00017765)	2 μ l	2 μ l
NotI (10 u/ μ l, Fermentas, lot. 00023583)	0,5 μ l (5 u)	0,5 μ l (5 u)
EcoRI (10 u/ μ l, Fermentas, lot. 3011)	0,5 μ l (5 u)	0,5 μ l (5 u)
H ₂ O	5 μ l	5 μ l
Yhteensä:	10 μ l	10 μ l

Kuvasta 12 voidaan todeta pET32a ja EphA3LBD digestioiden onnistuneen. DNA:t leikattiin geeliltä, puhdistettiin ja mitattiin DNA konsentraatio.

2.1.3 Ligaatio ja transformaatio

Ligaatiossa liitetään digestoitu lineaarinen plasmidivektori ja digestoitu insertti ligaasientsyymien avulla yhtenäiseksi rekombinantti-DNA-vektoriksi. Digestoitua inserttiä EphA3LBD haluttiin ligatoida kahteen eri digestoituu plasmidivektoriin pPIC9 ja pET32a. Työssä pipetoitiin vektoria ja inserttiä samaan eppendorffputkeen siten, että niiden molaariseksi suhteeksi saatiin noin 1:3. DNA:n lisäksi pipetoitiin 1 µl 10 x ligaatiopuskuria (Fermentas, 10 x buffer for T4 DNA ligase, lot. 00013327) ja 0,5 µl T4-ligaasientsyymiä (Fermentas, T4 DNA ligase 5 Weiss u/µl, lot. 00015463). Kokonaistilavuudeksi tuli 10 µl. Molemmassa plasmidien ligaatioissa käytettiin negatiivista kontrollia, jossa digestoitu insertti jätettiin pois ja sen tilavuus korvattiin steriilillä vedellä. Negatiivista kontrollia käytettiin vektoritaustan suuruuden toteamiseen. Näytteet sentrifugoitiin pohjaan ja inkuboitiin 1h huoneenlämmössä. Inkuboinnin jälkeen inaktivoitiin ligaasi lämpöblokillä + 65 °C, 15 minuutin ajan.

Ligaation jälkeen molemmat yhdistelmä-DNA-vektorit pPIC9+ephA3LBD ja pET32a +EphA3LBD transformoitiin *E. coli* XL1 -kantaan. Tämän transformaation tarkoituksena oli seuloa onnistuneesti ligatoituneet yhdistelmä-DNA-vektorit, ennen niiden transformaatiota varsinaiseen tuottoisäntään. *E. coli* XL1 -bakteeria (vol 50 µl) otettiin pakastimesta (-70 °C) sulamaan jäille. Ligaationäyte 10 µl pipetoitiin *E. coli* (50 µl) solujen sekaan ja inkuboitiin jäillä 30 minuuttia. Näytteille annettiin 45 sekunnin lämpöshokki lämpötilassa + 42 °C vesihautessa ja siirrettiin nopeasti takaisin jäille noin viideksi minuutiksi. Solujen sekaan pipetoitiin 900 µl SOC-mediumia ja inkuboitiin +37 °C, 200 rpm, 1 h bakteerisolujen elpymiseksi. Elpymisajan jälkeen transformoitua *E. coli* -suspensiota maljattiin ampisilliinia sisältäville LB-elatusmaljoille (valmistus LIITE 3) 200 µl ja 600 µl pitoisuuksina. Maljoja inkuboitiin yön yli lämpökaapissa + 37 °C.

2.1.4 Plasmidien eristys ja karakterisointi

Onnistuneen tranformaation jälkeen valmisteltiin minipreparaatti-kasvatukset plasmidien eristämiseksi. Maljalta LB+amp, XL1+ pET32a+ephA3LBD, 600 µl, 6.02.09/ EP silmukoitiin yhteensä neljä pesäkettä steriileihin falcon- putkiin, joissa 5 ml LB+amp (0,1 mg/ ml) mediumia (valmistus LIITE 3). Samoin maljalta XL1+ pPIC9+ephA3LBD, 200 µl, 27.02.09/EP silmukoitiin yhteensä kuusi pesäkettä minipreparaatti-kasvatuksia varten. Kasvatuksia inkuboitii + 37 °C, 250 rpm, yön yli. Seuraavana päivänä kasvatuksista valmistettiin minipreparaatit GenElute™ Plasmid Miniprep- (SIGMA®, PLN350-1KT, 036K6806) kitin avulla.

Minipreparaateille tehtiin analyttinen digestio, jotta voitaisiin arvioida oliko yhdistelmä-DNA-plasmidi halutunlainen. Analyttisessä digestiossa digestoitii yhdistelmävektori samoilla restriktioentsyymeillä (EcoR1 ja Not1), kuin aiemmassa digestiossa. Kun haluttu insertti on liittynään oikein osaksi vektoria, sen tulisi analyttisessä digestiossa irrota, jolloin voidaan havaita agarosielektroforeesigeelillä oikeankokoinen DNA-vyöhyke. Tehtiin taulukon 6 mukaiset pipetoinnit, setrifugoitiin näytteet alas ja inkuboitii lämpökaapissa + 37 °C, 2h. Ajettiin näytteistä agarosielektroforeesigeeli.

Taulukko 6. Analyttinen digestio

Pipetoinnit	Miniprepiit 1-4 (pPIC9+EphA3LBD, 10.02.09/EP)	Miniprepiit 1-6 (pET32a+EphA3LBD, 3.03.09/EP)
DNA	4 µl	4 µl
Puskuri (10 x Tango Buffer with BSA, Fermentas, lot 00017765)	2 µl	2 µl
Not1 (10 u/µl, Fermentas, lot. 00023583)	0,5 µl (5 u)	0,5 µl (5 u)

EcoRI (10 u/μl, Fermentas, lot. 3011)	0,5 μl (5 u)	0,5 μl (5 u)
H ₂ O	3 μl	3 μl
Yhteensä:	10 μl	10 μl

Pipetoitiin agarosielektroforeesigeelille standardia (3 μl standardia + 3 μl H₂O) ja näytteitä (näytettä 5 μl + 1 μl väriä) 6 μl kuoppaa kohden ja ajettiin 100 V noin puoli tuntia. Tulokuvien 13- 14 perusteella valittiin sekvensoitavaksi miniprepiit, numero 2: pPIC9+phA3-LBD (10.02.09) ja numerot 4 ja 6 pET32a+EphA3-LBD (3.03.09). Sekvensoimalla yhdistelmävektorien DNA varmistettiin, että insertti oli siirtynyt oikein vektoriin ja DNA:ssa ei ollut mutaatioita.

2.2 Proteiinin tuotto *Esheria coli*ssa

2.2.1 Transformaatio tuottoisäntään

Kun yhdistelmä-DNA-vektori pET32a+EphA3-LDB olit todettu DNA- sekvenssiltään oikeaksi, voitiin siirtää se varsinaiseen tuottoisäntään. Tuottoisäntänä käytettiin *Esheria coli* kantaa Origami B (DE3). Koska kysessä on bakteeri voitiin käyttää transformointimenetelmänä lämpöshokkia. Minipreparaatista numero 6 (pET32a+EphA3-LDB, 3.03.09/ EP) tehtiin 1:10 laimennos (2 μl DNA:ta ja 18 μl H₂O), josta pipetoiiniin 10 μl transformointia varten sulatettujen Origami B- solujen päälle. Inkuboitiin jäällä 30 minuuttia, jonka jälkeen annettiin 45 sekunnin lämpöshokki + 42 °C vesihauteessa ja siirrettiin nopeasti takaisin jäälle noin viideksi minuutiksi. Solujen sekaan pipetoitiin 900 μl SOC-mediumia ja inkuboitiin +37 °C, 150 rpm, 1 h. Elpymisajan jälkeen transformoitua *E. coli* -suspensiota maljattiin LA-elatusmaljoille, jotka sisälsivät ampicilliinia (100 μg/ml), tetrasykliini (12,5 μg/ml) ja kanamysiiniä (15 μg/ml) oikeiden transformanttien selektoimiseksi. Transformoitu plasmidi sisältää ressitenssin ampisilliinille ja Origami B -bakteerikanta tetrasykliinille ja kanamysiinille. Näin saadaan kasvatettua maljalla ainoastaan niitä

Origami B -bakteerisoluja, joihin plasmidi on transformoitunut. Maljattavat pitoisuudet olivat 200 µl ja 500 µl. Inkuboitiin yön yli lämpökaapissa + 37 °C. Maljoilla oli pesäkkeitä seuraavasti, 200 µl: 87 pesäkettä, 500 µl: 259 pesäkettä.

2.2.2 Kasvatus

Aloitettiin esikasvatukset poimimalla maljalta Ori B, EphA3-LBD+pET32a, 200 µl, 5.3.09/EP, pesäkkeet viiteen eri falcon-putkeen, joissa 5 ml LB-mediumia (sisältäen ampisilliinia 100 µg/ml, terasykliini 12,5 µg/ml, kanamysiiniä 15 µg/ml). Inkuboitiin yön yli +37 °C, 250 rpm. Valmistettiin glyserolistokki esikasvatuksesta pipetoimalla 0,9 ml esikasvatusta ja 0,1 ml 80 % glyserolia eppendorffputkeen ja sekoitettiin. Varastoitettiin pakastamalla -70 °C. Pääkasvatus toteutettiin 2 x 1 l kasvatuksina kahden litran erlenmayerpulloissa. 10 ml esikasvatuksella ympättiin 990 ml LB-mediumia (+ampisilliinia 100 µg/ml, terasykliini 12,5 µg/ml, kanamysiiniä 15 µg/ml). Pääkasvatuksia inkuboitiin +37 °C, 250 rpm, noin 3 h 45 min, jonka aikana kasvatuksista mitattiin noin puolen tunnin välein OD A₆₀₀. Induktio tehtiin lisäämällä IPTG:tä pitoisuuteen 100 µM, kun kasvatusten OD:t olivat A₆₀₀ = 0,63 ja 0,67. Induktioyhteydessä lisättiin myös lisää ampisilliinia (100 µg/ml). Induktioyhteyden jälkeen jatkettiin inkubointia yön yli kylmähuoneessa + 18 °C, 250 rpm. Seuraavana aamuna mitattiin vielä OD:t A₆₀₀, ja siirrettiin sitten kasvatussuspensiot sentrifugointipulloihin. Pullot tasapainotettiin ja sentrifugoitiin 4000 rpm, + 4 °C, 25 minuuttia. Supernatantti heitettiin pois ja pelletit säilöttiin pakastaen -70 °C. Kasvatuksen ajalta otettiin 1 ml näytteet ennen induointia, kolme tuntia induoinnin jälkeen sekä ennen inkuboinnin lopetusta. Näytteet sentrifugoitiin 13 000 rpm, 1 min ja pakastettiin pelletit jatkokäsittelyä varten.

2.2.3 Soluhajotus

Esherichia coli Origami B- isäntäorganismissa tuotettu reseptoriproteiini EphA3-LBD tuottuu solunsisäisesti sytoplasmaan sekä inkluusiojyväsiin. Tämän vuoksi proteiinin talteen ottamiseksi bakteerisolut tulee rikkoa. Tässä opinnäytetyössä käytettiin

solunhajotusmenetelmänä jäädytys- sulatustekniikkaa, jossa solut jäädytettiin nestetyypessä ja sulatettiin huoneenlämpöisessä vesihauteessa kolmeen kertaan.

Pelletit otettiin pakastimesta sulamaan, suspentoitiin lyysispuskuriin (20mM Hepes, 10 % glyseroli, 0,1 M KCl, 5 mM MgCl₂, pH 7.2, Protease inhibitor cocktail 1 ml/ 50 ml (Roche, Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Complete EDTA-free, 04 693 132 001), Dnase 100 U/ ml, 1 mM PMSF) ja siirrettiin kahteen pienenpään sentrifugointipulloon. Lyysispuskuriä pipetoitiin yhden litran kasvatusta kohden 10 ml. Kun pelletit oli suspentoitu lyysispuskuriin, lisättiin 1 ml lysotsyymiä (10 mg/ ml) 10 ml suspensiota kohden, jolloin saatiin lysotsyymien pitoisuudeksi 1 mg/ml. Suspensiot jäädytettiin upottamalla sentrifugointipullot nestetyypen, kunnes koko suspensio oli jäänyt ja siirrettiin sitten huoneenlämpöiseen vesihauteeseen sulamaan. Jäädytys, sulatus vuorottelu toistettiin yhteensä kolme kertaa. Viimeisen sulatuskerran jälkeen putket vietiin kylmähuoneeseen + 10 °C kääntelijään (10 rpm) 40 minuutiksi. Sekoituksen jälkeen lisättiin 10 ml suspensiota kohden seuraavat aineet 2,2 ml 2M KCl (pitoisuudeksi 0,4 M) , 396 µl 1M imidatsoli (30 mM) , 68 µl 0,2 M PMSF (1 mM). Jatkettiin suspensioitten sekoitusta kääntelijässä + 10 °C, 30 min ja sentrifugoitiin tämän jälkeen 15 000 rpm, 30 min. Siirrettiin supernatantit uuteen putkeen ja säilöttiin pelletit ja supernatantti pakastaen – 70 °C.

Myös kasvatuksen aikaisten näytteiden solupelletit hajotettiin jäädytys-sulatustekniikan avulla. Näytepelletit otettiin pakkasesta sulamaan ja suspentoitiin 500 µl:an puskuri A:ta (20 mM Hepes, 0.5 M KCl, 30 mM imidatsoli, pH 8.0). Näytesuspensiot jäädytettiin (nestetyypen avulla) ja sulatettiin kolmeen kertaan. Viimeisen sulatuksen jälkeen näytteet sentrifugoitiin 13 000 rpm 1 min. Näytteet valmisteltiin SDS-PAGE ajoa varten. Supernatanttia pipetoitiin 50 µl uuteen eppendorffputkeen ja lisättiin 10 µl 6 x SDS ajopuskuria. Pelletti liuotettiin 50 µl:an puskuri A:ta ja lisättiin 10 µl 6 x SDS ajopuskuria. Näytteet denaturoitiin lämpöblokkissa +95 °C, 5 min. SDS-PAGE ajettiin kappaleen 2.4 mukaisesti. Tulokset näkyvät kuvasta 15.

2.2.4 Proteiinin puhdistus

Tuotettu reseptoriproteiini EphA3-LBD puhdistettiin IMAC- (engl. immobilized metal ion affinity chromatography) affiniteettikromatografian avulla, käyttäen hyväksi osaksi proteiininrakennetta tuotettua kuuden histidiini-aminohapon muodostamaa ”hantaa”. Puhdistuksessa käytettiin pylväsmatriksina nikkelisefaroosea, johon tuotetun proteiinin histidiinihantaa kiinnittyy spesifisesti. Proteiinin puhdistus tehtiin step-puhdistuksena käyttäen kahta eri ajopuskuria, jossa eluoivana aineena käytettiin imidatsolia. Työssä puhdistettiin erikseen sekä soluhajotuksen jälkeinen supernatantti että pelletit. Puhdistuksissa käytetyt puskurit erosivat hieman toisistaan, mutta itse puhdistus tehtiin samalla tavalla. Puskuri A sisälsi 20 mM Hepes, 0.5 M KCl, 30 mM imidatsoli, pH 8.0 ja puskuri B sisälsi 20 mM Hepes, 0.5 M KCl, 500 mM imidatsoli, pH 7.5. Soluhajotuksen jälkeisten pellettien proteiinipuhdistuksessa käytetyt puskurit olivat samat, mutta niissä oli lisänä 6 M ureaa. Proteiinin puhdistukseen käytettiin Pharmacia-laitteistoa, joka koostui pääteyksiköstä, pumpusta, UV-mittausyksiköstä ja piirturista.

Näytteet valmisteltiin proteiinin puhdistusta varten seuraavasti. Soluhajotuksen jälkeinen supernatantti (tilavuus noin 30 ml) sulatettiin ja suodatettiin \varnothing 0,22 μ m suodattimen läpi. Soluhajotuksen jälkeiset pelletit pestiin käyttäen 20 mM Hepes-puskuria (pH 8.0, 10 ml/pelletti) ja sentrifugoitiin 12 000 rpm, 30 min, + 4 °C. Sentrifugoinnin jälkeen supernatantit poistettiin ja pelletin sekaan pipetoitiin 10 ml puskuri A:ta (10 ml/pelletti), joka sisälsi 6 M ureaa. Urean tarkoituksena on liuottaa inkluusiojyvät liukoiseen muotoon. Pellettejä suspentoiin 1h kääntelijässä, +10 °C, jonka jälkeen sentrifugoitiin 12 000 rpm, 30 min, +4 °C. Otettiin talteen supernatantti, joka suodatettiin \varnothing 0,22 μ m suodattimen lävitse ennen puhdistusta. Soluhajotuksen jälkeisestä supernatantista ja pellettistä ajettiin omat proteiinin puhdistusajot.

Kiinnitettiin nikkelisefarooseipylväs (Ni SepharoseTM 6 Fast Flow, GE Helthcare, lot. 10013928, itse pakattu, puhdistusmatriksin tilavuus 1,27 cm³) kiinni laitteeseen ja ajettiin laitteiston ja pylvään lävitse steriiliä vettä 10 minuutin ajan nopeudella 1.0 ml/

min, etanolin poistamiseksi pylväästä ja laitteistosta. Tasapainotettiin pylväs ajamalla puskuri A:ta laitteiston lävitse noin 7 minuutin ajan 1.0 ml/ min. Ajettiin näyte (≈30 ml) pylvääseen nopeudella 0,5 ml/ min. Käynnistettiin piirturi ja pestiin pylvästä puskuri A:n kanssa 1.0 ml/ min, kunnes piirturi laskee nollassolle. Tällöin pylvääseen heikosti tarttuneet epäpuhtaudet saatiin pestyä pois puskuri A:n sisältämän vähäisen imidatsoli- pitoisuuden avulla. Eluoiittiin pylvääseen kiinni tarttunut proteiini puskuri B:n kanssa nopeudella 0,5 ml/ min. Proteiinin irtoaminen pylväästä, havaittiin piirturin piirtämästä piikistä (kuvat 16 ja 17). Kerättiin eluoinnin aikana 0.5 ml:n fraktioita eppendorf-putkiin, kunnes piirturi laskeutui lähes nollassolle. Lopuksi pestiin laitteistoa ja pylvästä ensin vedellä ja sitten 20 % EtOH:lla. Proteiininpuhdistusfraktioista määritettiin proteiinkonsentraatio Bradford menetelmällä (LIITE 4), sekä ajettiin SDS-PAGE. SDS-PAGE ajoa varten fraktioista pipetoitiin 25 µl näytettä, johon lisättiin 5 µl 6 x SDS näytepuskuria sekä denaturoitiin lämpöblokkissa +95 °C, 5 min. SDS-PAGE ajon tulokset kuvassa 18 ja 19.

2.3 Proteiinin tuotto *Pichia pastoriksessa*

2.3.1 Transformaatio tuottoisääntään

Yhdistelmä-DNA-vektorin transformoimiseksi *Pichia pastoris* -hiivasoluihin käytettiin elektroporaatiota. Aluksi digestoitettiin sekvensointu plasmidi PIC9+EphA3-LBD (miniprep 2, 258 ng/ µl, 10.02.09) lineaariseen muotoon, restriktioentsyymi SacI kanssa. Ennen digestiota tarkistettiin tietokoneohjelman avulla, ettei insertissä ollut katkaisukohtaa SacI restriktioensyymille, vaan yhdistelmä-DNA-vektori katkeaisi ainoastaan PIC9-plamidissa valmiina olevasta SacI-katkaisukohdasta. Digestiota varten pipetoitiin samaan eppendorfputkeen 4 µl PIC9+ephA3-LBD-plasmidia, 4 µl H₂O, 1 µl Tango-puskuria ja 1 µl SacI-restriktioentsyymiä. Aineet sentrifugoitiin pohjaan ja inkuboitiin 2 h, + 37 °C. Restriktioentsyymi inaktivoitiin lämpöblokillä +65 °C, 15 min.

Asetettiin elektroporaatiota varten jäille *Pichia pastoris* GS115 -soluja (vol 80 µl), alumiiniseinäinen elektroporaatiokyvetti, laitteen kyvettiteline ja 1 M sorbitolipullo. Pipetoitiin sulaneiden GS115 -solujen sekaan 10 µl:n digestoitu plasmidinäyte, annettiin seistä jäillä 5 minuuttia ja pipetoitiin sitten valmiiksi alumiinikyvetiin. Asetettiin ulkopuolelta hyvin kuivattu kyvetti kiinni laitteeseen ja annettiin sähköshokki laiteasetuksin 1,5 kV, 25 µF ja 200 Ω. Pipetoitiin välittömästi solujen sekaan 1 ml jääkylmää 1 M sorbitolia ja siirrettiin kyvetti takaisin jäille. Maljattiin GS115-solususpensio kahdelle MD-elatusmaljalle (engl. Minimal Dextrose Medium Plate) ja inkuboitiin +30 °C, kolme vuorokautta. Tulokseksi saatiin yhteensä 11 transformanttipesäkettä.

MD-kasvatusmaljoille kasvaneille hiivasolujen pesäkkeille tehtiin kasvatuskoe, jotta tiedettäisiin olivatko transformantit Mut⁺ vai Mut^S tyyppiä. MD-maljalta siirrettiin kasvamaan kaikki pesäkkeet kahdelle ruudukoiduille ja numeroiduille elatusmaljalle, joista toinen oli D-glukoosia sisältävä MD-elatusmalja (engl. Minimal Dextrose Medium Plate) ja toinen metanolia sisältävä MM-elatusmalja (engl. Minimal Methanol Plate). Elatusmaljojen koostumus on kuvailtuna LIITTEESSÄ 5 Alkuperäiseltä maljalta siirrettiin yksittäinen pesäke steriilisti silmukoimalla kahdelle eri elatusmaljalle, omaan samannumeroiseen ruudukkoon. Kokeen tulokset on esitetty taulukossa 14. Tulosten perusteella aloitettiin esikasvatukset ruuduista numero 1-4 suoritettuna kokeen MD-maljalta.

2.3.2 Kasvatus

Proteiinin tuotto *Pichia pastoris* GS115 -hiivan kanssa aloitettiin esikasvatuksista. Esikasvatukset tehtiin viiteen steriiliin falconputkeen, joihin pipetoitiin 5 ml BMGY-mediumia (engl. Buffered Glycerol-complex Medium). BMGY-mediumin valmistusohje kuvattu LIITTEESSÄ 5. Falconputkien medium ympättiin silmukoimalla MD-maljalta GS115+pPIC9+EphA3 (16.02.09) kasvustoa ruuduista numero 1-4. Rinnakkaiskasvatuksena käytettiin linjaa, johon oli transformoitu

plasmidi ilman inserttiä. Rinnakkaiskasvatus aloitettiin ymppeämällä medium 50 µl:lla GS115+pPIC9 glyserolistokista. Esikasvatuksia inkuboitii +30 °C, 250 rpm, yön yli.

Pääkasvatukset tehtiin 15 ml:n kasvatuksina kuudessa eri 250 ml:n erlenmayerpullossa, joissa korkkina käytettiin steriiliä harsokangasta. Harsokangasta käyttämällä, pyrittiin mahdollisimman hyvään ilmastukseen. Mediumina käytettiin BMMY-mediumia (engl. Buffered Methanol-complex Medium), jonka sisältö ja valmistus kuvailtu LIITTEESSÄ 5. Esikasvatuksista mitattiin OD:t A_{600} , joiden perusteella laskettiin pipetoitavien ymppien ja mediumin määrät, jotta OD olisi kasvatuksen alussa $\approx 1,0$. Tehtiin taulukon 7 mukaiset pipetoinnit ja inkuboitii kasvatuksia ravistelijassa +30 °C, 250 rpm, kolmen vuorokauden ajan. Esikasvatuksista valmistettiin myös glyserolistokit, myöhempää käyttö varten. Ensimmäisen ja toisen vuorokauden jälkeen lisättiin kasvatuksiin 1 ml steriiliä vettä haihtuneen nesteen korvaamiseksi, sekä 150 µl 100 % metanolia proteiinin tuoton indusoimiseksi. Kolmen vuorokauden inkuboinnin jälkeen otettiin kustakin kasvatuksesta 1 ml näytteet eppendorffputkiin. Lopuksi hiivakasvatukset sentrifugoitiin 4000 rpm, 20 min, +4 °C. Sentrifugoinnin jälkeen otettiin supernatantti talteen (säilytys -70 °C).

Taulukko 7. *P. pastoris* pääkasvatuksen pipetoinnit

Kasvatus nro	Esikasvatusten OD:t A_{600}	Esikasvatusta ml	BMMY-mediumia ml
1	4,28	3,5	11,5
2	4,11	3,5	11,5
3	3,54	4,0	11
4	3,93	4,0	11
Std	3,29	4,0	11

Juuri ennen kasvatuksen lopetusta otetuista näytteistä haluttiin tutkia oliko haluttua reseptoriproteiinia EphA3LBD tuottunut kasvatuksen aikana, ennen ryhtymistä

proteiinin puhdistukseen. Näytteet sentrifugoitiin 10 000 rpm, 8 min ja otettiin supernatantti talteen. Näytteet valmisteltiin SDS-PAGE:a varten seuraavasti. Pipetoitiin kutakin näytettä varten 40 µl Ni-sefaroosipalloja (Ni SepharoseTM 6 Fast Flow, GE Helthcare, lot. 10013928) eppendorffputkeen. Ni-pallot sentrifugoitiin (13 000 rpm, 1 min), pipetoitiin säilytysliuos pois, pestiin 500 µl:lla puskuri A:ta (20 mM Hepes, 0.5 M KCl, 30 mM imidatsoli, pH 8.0), sentrifugoitiin ja poistettiin puskuriliuos. Kasvatusnäytteiden supernatantti 1 - 4 + std, pipetoitiin Ni-pallojen päälle. Näytteitä inkuboitiin huoneenlämmössä kääntelijässä 1 h. Näytteet sentrifugoitiin 13 000 rpm, 1min, jolloin Ni-pallot laskeutuivat pohjaan. Pipetoitiin varovasti supernatantti pois putkista ja lisättiin 500 µl puskuri A:ta. Sentrifugoitiin 13 000 rpm, 1min, ja poistettiin puskuri. Lisättiin 25 µl steriiliä MQ-vettä ja 5 µl 6 x SDS-puskuria. Ajettiin näytteistä SDS-PAGE kappaleen 2.4 mukaisesti. Tulokset näkyvät kuvasta 20.

Tuloskuvan 20 perusteella *P. pastoris* GS115+PIC9+EphA3LBD ei nähtävästi tuottanut haluttua proteiinia EphA3LBD. Tästä syystä haluttiin varmistua, että EphA3LBD:n DNA oli transformoitunut osaksi *P. pastoriksen* genomia ja tehtiin kappaleen 2.3.3 mukaiset toimenpiteet.

Hiivan genomista tehdyn PCR-analyysin tuloskuvan 21 perusteella päätettiin uusia hiivan pääkasvatus. Syynä proteiinin tuottamattomuudelle saattoivat olla kasvuolosuhteet, joten niihin tehtiin pieniä muutoksia. Toisen kasvatuksen esikasvatukset (6 kpl) aloitettiin ympäpäämällä 5 ml BMGY -mediumia falcon-putkessa 50 µl:lla GS115+EphA3-LBD+pPIC9-tuottokantaa glyserolistokista numero 1 (18.02.09/EP) ja samoin rinnakkaiskasvatus GS115+pPIC9 (18.02.09/EP). Esikasvatuksia inkuboitiin yön yli +29 °C, 250 rpm.

Pääkasvatukset suoritettiin samaan tapaan kuin aiemmin. Esikasvatusten OD:t A₆₀₀ ja pääkasvatuksen aloitusta koskevat pipetoinnit esitettyinä taulukossa 8. Kasvuolosuhteiksi muutettiin +29 °C ja 300 rpm. Ilmastusta koetettiin parantaa nostamalla ravistelijan kierrosnopeutta ja lämpötilaa laskettiin, koska laitteen itsensä

kuumentumisen johdosta lämpötila oli saattanut nousta yli +30 °C. Varotoimenpiteiksi inkubaattoriravistelijan luukku jätettiin vielä hieman raolleen. Pääkasvatuksia inkuboitiin kolmen vuorokauden ajan.

Taulukko 8. *Pichia pastoris* pääkasvatuksen pipetoinnit

Kasvatus nro	Esikasvatusten OD:t A ₆₀₀	Esikasvatusta ml	BMMY-mediumia ml
1	6,58	2,3	12,7
2	7,70	2,0	13,0
3	6,01	2,5	12,5
4	6,94	2,2	12,8
5	8,64	1,7	13,3
Standardi	3,31	4,5	10,5

Kolmen vuorokauden inkuboinnin jälkeen otettiin kustakin kasvatukselta 1 ml näytteet eppendorffputkiin ja sentrifugoitiin 10 000 rpm, 8 min. Näytteet käsiteltiin SDS-PAGE ajoa varten kuten aiemmassa kohdassa. Tulokset ilmenevät kuvasta 22. Kasvatuksen loputtua hiivakasvatukset sentrifugoitiin 4000 rpm, 20 min, +4 °C. Sentrifugoinnin jälkeen otettiin supernatantti talteen (säilytys -70 °C).

2.3.3 Hiivan kromosomaalisen DNA:n erityis ja karakterisointi

Epäspesifisten tulosten (kuva 20) jälkeen haluttiin varmistaa, että EphA3LBD:n DNA oli liittynyt *Pichia pastoris* -hiivan GS115-kannan genomiin. Tehtiin hiivan kromosomaalisen DNA:n eristys ja karakterisointi PCR:n avulla, noudattaen Invitrogenin *Pichia* manuaalissa (*Pichia* Expression Kit: Total DNA Isolation from *Pichia*, s. 62, PCR Analysis of *Pichia* Integrants, s.40) kuvailtuja ohjeita alla kuvatuin muutoksin.

DNA:n eristystä varten kasvatettiin vuorokauden ajan *Pichia pastoris* tuottokantaa GS115, johon oli transformoitu linearisoitu plasmidi pPIC+EphA3LBD, neljästä eri

glyserolistokista. Kasvatukset aloitettiin ympäällä 50 µl:lla kustakin glyserolistokista 1-4 (GS115+pPIC9+EphA3LBD, 18.2.09/EP) 5ml BMGY-mediumia steriilissä falcon-putkessa. Kasvatuksia inkuboitii +29 °C, 250 rpm, kunnes OD₆₀₀ oli >5 (ohje OD₆₀₀ 5-10). Solut kerättiin ja pestiin ohjeen mukaisesti, mutta pesuun käytettiin 5 ml steriiliä vettä 10 ml sijasta.

Ohjeiden ”Spheroplasting and Lysis, ” kappaleen kohdassa kaksi lisättiin Zymolyasen sijasta Lyticasea (3,5 mg/ml) 86 µl, sekä kohdassa viisi sentrifugoitiin 4000 rpm, 20 min, +4 °C. ”DNA precipitation” –kappaleen kohdassa kaksi sentrifugoitiin nopeudella 4000 rpm, 30 min, +4 °C, kohdassa neljä uutettiin vain 700 µl:lla kloroformia, kohdassa viisi lisättiin 5 M ammoniumasetaattia 262,5 µl, sekä kohdassa kuusi lisättiin TE-puskuria, joka ei sisältänyt EDTA:ta. Lisäksi kohdassa kuusi, ennen TE-puskurin lisäystä haihdutettiin ensin etanoli pois imukuvun alla. Lisättiin vielä 1 µl RNAaasia (10 mg/ml) ja keitettiin 15 min + 95 °C. Eristetty DNA säilytettiin seuraavaa päivää varten jääkaapissa.

Tehtiin taulukon 9 mukaiset pipetoinnit PCR monistusta varten mikrosentrifuugiputkiin. Alukkeina käytettiin AOX1-alukkeita, joiden avulla mahdollinen *Pichia pastoris* -hiivaan genomiin integroitunut pPIC9+EphA3LBD-DNA saataisiin monistumaan PCR -reaktion avulla. Jos DNA ei olisi siirtynyt *Pichia pastoris* –hiivaan, monistumista ei tapahdu. Menetelmällä ei kuitenkaan saada selville paikkaa mihin transformoitunut DNA on liittynyt hiivan genomissa.

Taulukko 9. Pipetoinnit, hiivan DNA:n karakterisointi PCR:n avulla.

PCR	Eristetty DNA 1-4 GS115+pPIC9+EphA3LBD	pPIC9	pPIC9+ EphA3LBD
5x phusion puskuri	10 µl	10 µl	10 µl
2 mM dNTP	5 µl	5 µl	5 µl
AOX1 rev	5 µl	5 µl	5 µl

-aluke5			
AOX1 for -aluke	5 µl	5 µl	5 µl
DNA	1 µl	0,5 µl	0,5 µl
Phusion- polymeraasi	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl
Steriili MQ H ₂ O	23,5 µl	24 µl	24 µl
Yhteensä:	50 µl	50 µl	50 µl

Taulukossa 10 on kuvailtu, käytetty PCR-ohjelma. PCR:n jälkeen PCR-näytteistä ajettiin agarosielektroforeesigeeli. Tulokset näkyvät kuvasta 21.

Taulukko10. PCR-ohjelma, *Pichia*-DNA:n analysointi

Vaihe	Sykli	Lämpötila	Aika
Lämpö startti	1 x	94 °C	2 min
Denaturointi	35 x	94 °C	1 min
Annealing		55 °C	1 min
Pidennysreaktio		72 °C	1 min
Loppupidennys	1 x	72 °C	7 min

2.4 SDS-PAGE

SDS-PAGE proteiinielektroforeesia käytettiin analysoitaessa opinnäytetyön proteiinintuoton ja -puhdistuksen eri vaiheita, sekä tuotetun proteiinin karakterisoinnissa. Näytteiden valmistelusta ennen SDS-PAGE-geelin ajamista on kerrottu näytteiden alkuperää käsittelevissä kappaleissa. Työssä käytetyt SDS-geelit valmistettiin LIITTEEN 6 mukaisesti.

Ennen geelin ajoa näytteet valmisteltiin lisäämällä näytteen tilavuuden mukaan (5-8 µl) 6x SDS näytenpuskuria ja denaturoimalla näytteet lämpöblokkissa +95 °C, 5 min.

SDS-geeli kiinnitettiin ajolaitteen telineeseen ja ajoallas täytettiin yhdellä litralla 1x EB + 0,1 % SDS -liuosta. Näytteet pipetoitiin geelin näytekuoppiin (isoihin näytekuoppiin 15 µl näytettä ja pieniin 9 µl). Jokaisessa ajossa pipetoitiin näytteiden lisäksi geelille 5 µl proteiinistandardia (BIO-RAD, Precision Plus Protein, All Blue Standard, Control 310005731), johon vertailtiin näyteproteiinivyohtykykkeiden kokoa tuloksia tarkasteltaessa. Näytteet ajettiin ensin ylägeelin tasolla 100 V voimakkuudella ja alageelissä 160 V voimakkuudella. Ajon jälkeen poistettiin veitsen avulla ylägeeli ja värjättiin alageeliä värjäysliuoksessa (0,1 % coomassie blue -väri, 40 % MeOH, 10 % etikkahappo) tarpeen mukaan 1h -yön yli. Värjäyksen jälkeen geeliä pestiin vedellä ja inkuboitiin värinpoistoliuoksessa (10 % EtOH, 10 % etikkahappo), kunnes proteiinivyohtykykkeet erottuivat geeliltä.

2.5 Sitoutumiskoe

EphA3LBD-reseptoriproteiinin sitoutuvuutta eri efriniligandien kanssa määritettiin erillisen kokeen avulla. Kokeessa koetettiin eri efriniligandien sitoutumista *E.colin* kanssa tuotetun ja puhdistetun EphA3LBD-reseptoriproteiinin (näytefraktio 3) kanssa. Koe tehtiin ensin käyttäen hyväksi proteiini A-palloja, joihin tarttuu spesifisesti fc-tagit, joita tässä kokeessa sisälsivät itse tuotetut (JBL-laboratoriossa tuotetut) efriniligandit. Kokeeseen valittiin efriniligandit A5-fc (770 µg/ml, 11.11.08/JP, nro 2), A3-fc (260 µg/ml, 3.12.08/JP, nro 2) ja B2-fc (5,5 mg/ml). Jokaisesta efriniligandista käytettiin kolmea eri vahvuutta 5, 10, ja 15 µg, jotka yhdistettiin 10 µg:n kanssa EphA3LBD-reseptoriproteiinia. Kontrolleina käytettiin efriniligandit A5, A3 ja B2 proteiini A:n kanssa, sekä EphA3LBD proteiini A:n kanssa ja ilman (vasta SDS-PAGE-geelille).

Koe aloitettiin pipetoimalla samaan eppendorffputkeen taulukon 11 mukaisesti efriniä, EphA3-reseptoriproteiinia ja puskuri C:tä (20 mM Hepes, 150 mM NaCl, 20 mM MgCl₂, pH 8,2 /EP 29.11.08). Seoksia inkuboitiin huoneenlämmössä 1,5 h. Proteiini A-palloja pipetoitiin kutakin sitoutumisreaktiota kohden 40 µl eppendorffputkiin ja valmisteltiin koetta varten. Palloja sentrifugoitiin 1 minuutti 13 000 rpm putken

pohjaan ja pipetoitiin säilytyspuskuri pois. Pestiin sitten kahteen kertaan 500 µl:lla puskuri C:tä (puskurin lisäys → sentrifugointi 13 000 rpm + puskurin poisto → puskurin lisäys → sentrifugointi + puskurin poisto). Lisättiin pipetoimalla efriini-reseptoriseokset proteiini A-pallojen päälle ja inkuboitiin kääntelijässä 30 minuuttia huoneenlämmössä. Pestiin kahteen kertaan 500 µl:lla puskuri C:tä (puskurin lisäys → sentrifugointi + puskurin poisto → puskurin lisäys → sentrifugointi + puskurin poisto). Näytteisiin lisättiin 25 µl steriiliä MQ vettä ja 5 µl 6x SDS-näytepuskuria. Näytteistä ajettiin SDS-PAGE kappaleen 2.4 mukaisesti. Tulokset ilmenevät kuvasta 23.

Taulukko 11. Sitoutumiskoe proteiini A-palloilla

Näyte:	EphA3LBD-reseptoriproteiini	Efriiniligandi	Puskuri C
Efn A5-fc, 5 µg + EphA3LBD 10 µg	8,5 µl	6,5 µl	485 µl
Efn A5-fc, 10 µg + EphA3LBD 10 µg	8,5 µl	13 µl	478,5 µl
Efn A5-fc, 15 µg + EphA3LBD 10 µg	8,5 µl	19,5 µl	472 µl
Efn A3-fc, 5 µg + EphA3LBD 10 µg	8,5 µl	19,5 µl	472 µl
Efn A3-fc, 10 µg + EphA3LBD 10 µg	8,5 µl	38,5 µl	453 µl
Efn A3-fc, 15 µg + EphA3LBD 10 µg	8,5 µl	58 µl	433,5 µl
Efn B2-fc, 5 µg + EphA3LBD 10 µg	8,5 µl	1 µl	490,5 µl
Efn B2-fc, 10 µg + EphA3LBD 10 µg	8,5 µl	1,9 µl	489,6 µl
Efn B2-fc, 15 µg + EphA3LBD 10 µg	8,5 µl	2,8 µl	488,7 µl

EphA3LBD 10 µg			
Kontrolli: Efn A5-fc, 10 µg		13 µl	487 µl
Kontrolli: Efn A3-fc, 10 µg		38,5 µl	461,5 µl
Kontrolli: Efn B2-fc, 10 µg		1,9 µl	498,1 µl
Kontrolli: EphA3LBD 10 µg	8,5 µl		491,5 µl

Koska kuvan 23 tulokset eivät olleet yksiselitteisiä päätettiin toistaa koe, mutta tällä kertaa käyttäen Ni-sefaroosipalloja, joihin EphA3LBD proteiinin his-tag tarttuu kiinni. Ensin valmistettiin näytepipetoinnit taulukon 12 mukaisella tavalla. Tällä kertaa efriini B2 tilalla käytettiin efriini B1-proteiinia ja eri puskuria (20 mM Hepes, 150 mM NaCl, 20 mM MgCl₂, pH 8,2, EP/29.11.08) Reseptori-efriini seoksia inkuboitii huoneenlämmössä 1h. Näytteet pipetoitiin Ni-pallojen (40 µl) joukkoon ja inkuboitii 1h kääntelijässä huoneenlämmössä. Näytteet sentrifugoitiin, pestiin kahteen kertaan puskurilla ja valmisteltiin SDS-PAGE ajoa varten samaan tapaan kuin edellisessä kappaleessa. Kokeen tulokset kuvassa 24.

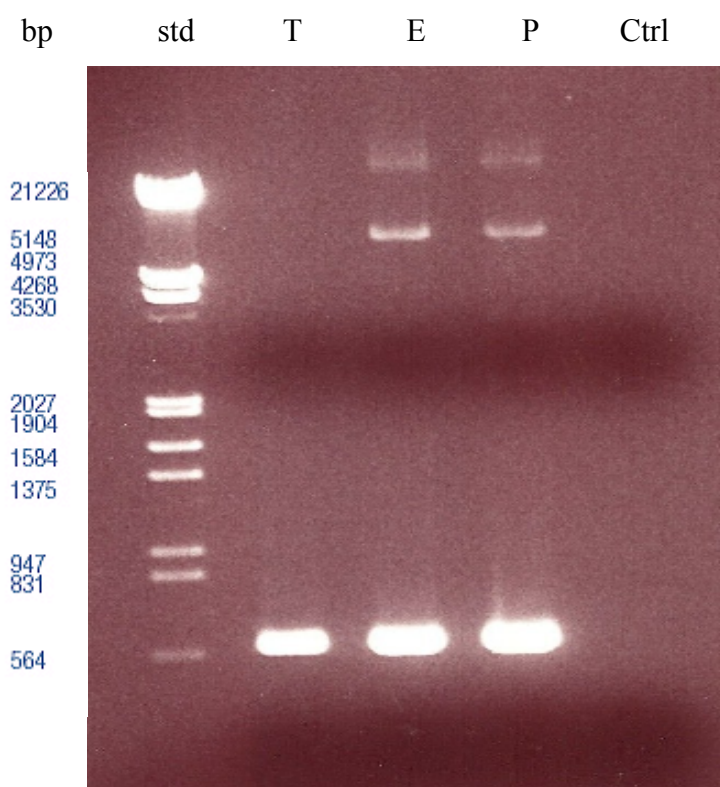
Taulukko12. Sitoutumiskoe Ni-palloilla

Näyte:	EphA3LBD-reseptoriproteiinia	Efriiniligandia	Puskuria
Kontrolli: Efr A5-fc 40 µg		64,5 µl	435,5 µl
Kontrolli: EphA3LBD 20 µg	16,9 µl		483,1
Efn A5-fc, 20 µg + EphA3LBD 20 µg	16,9 µl	32,3 µl	450,8 µl

Efn A5-fc, 30 µg + EphA3LBD 20 µg	16,9 µl	48,4 µl	434,7 µl
Efn A5-fc, 40 µg + EphA3LBD 20 µg	16,9 µl	64,5 µl	418,6 µl
Efn A3-fc, 15 µg + EphA3LBD 20 µg	16,9 µl	57,7 µl	425,4 µl
Efn A3-fc, 20 µg + EphA3LBD 20 µg	16,9 µl	76,9 µl	389,3 µl
Efn A3-fc, 30 µg + EphA3LBD 20 µg	16,9 µl	115,4 µl	333,9 µl
Efn B1-fc, 15 µg + EphA3LBD 20 µg	16,9 µl	1 µl	482,1 µl
Efn B1-fc, 20 µg + EphA3LBD 20 µg	16,9 µl	1,3 µl	481,8 µl
Efn B1-fc, 30 µg + EphA3LBD 20 µg	16,9 µl	2 µl	481,1 µl

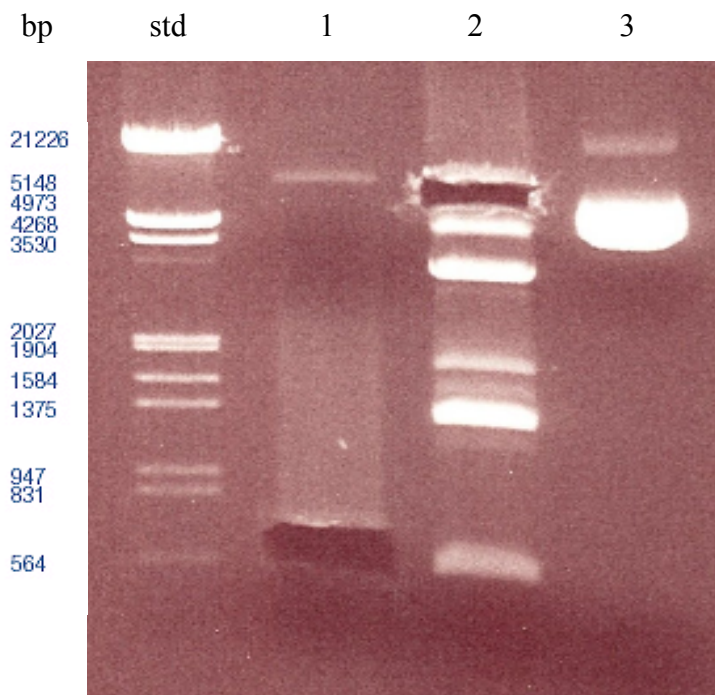
3 Tulokset ja arviointi

3.1 Geenin kloonauk



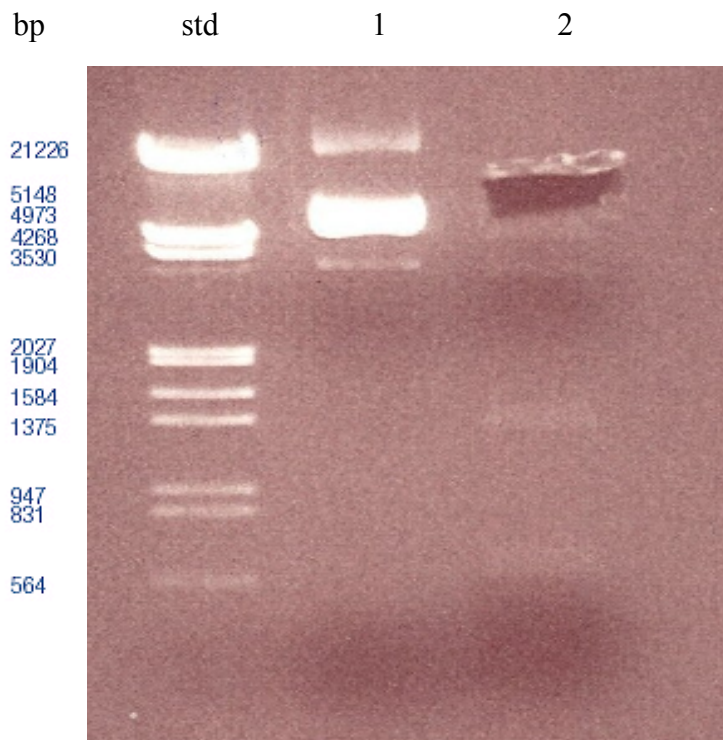
Kuva 9. EphA3LBD PCR

Kuvassa 9 nähdään agaroselektroforeesigeelillä PCR-ajon jälkeiset tulokset. Kirjaimilla T, E ja P on nimetty monistettava EphA3LBD:n DNA eri alkulähteistä. Kuvasta nähdään, että halutun DNA-alueen monistuminen on onnistunut kohdissa E ja P. Monistuminen havaitaan vyöhykkeenä korkeudella 570 bp verrattaessa DNA-standardiin. Kontrollin kohdalla ei havaita vyöhykkeitä, joka osoittaa etteivät reaktioissa käytetyt aineet olleet kontaminoituneita.



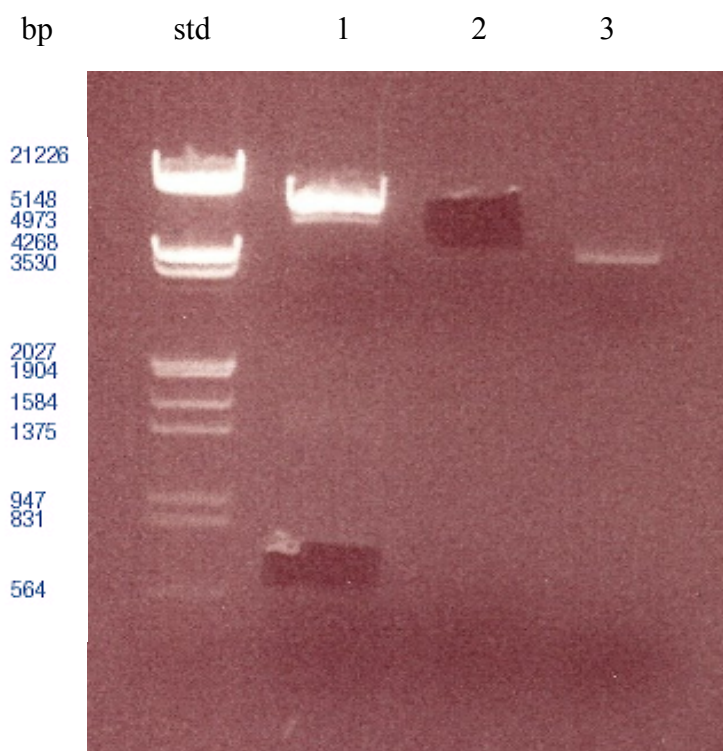
Kuva10. EphA3LBD ja pPIC9 digestio

Kuvassa 10 tulokset EphA3LBD:n ja pPIC9:n digestiosta. Kohdassa yksi EphA3LBD digestio on onnistunut, sillä 570 bp korkeudella havaitaan vyöhyke, joka on leikattu talteen jatkokäsittelyä varten. Kohdassa kaksi pPIC9, näkyy liiallista DNA:n pilkkoutumista verrattuna kohdan kolme digestoimattomaan pPIC9 plamidiin. Inkubointiaika oli asetettu yön yli, käytetyssä puskurissa (Tango 2x) heikommin toimivan restriktioensyymien Not1 mukaan. Ilmeisimmin EcoR1 restriktioentsyymi on aiheuttanut tähtiaktiivisuutta liian pitkän digestioajan vuoksi. Seuraavassa digestiossa inkubointiaikaa vähennettiin kahteen tuntiin.



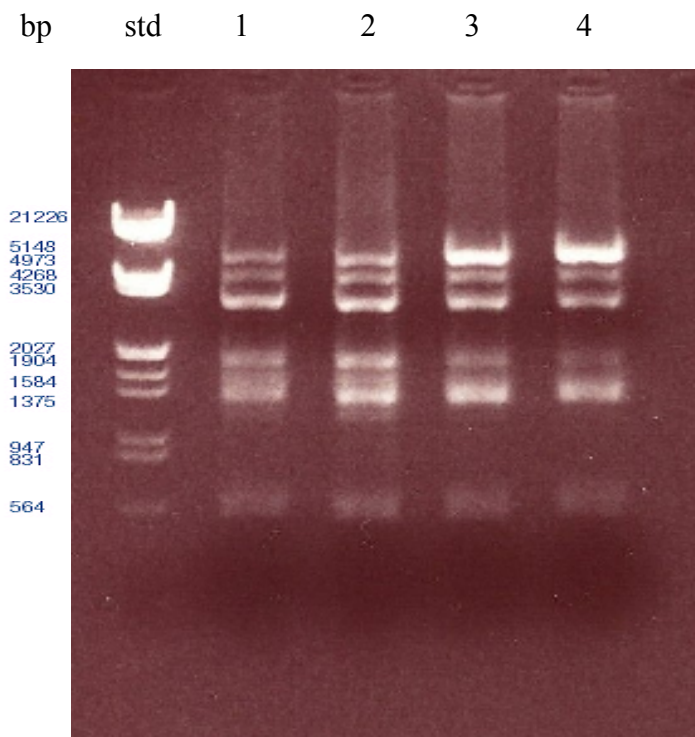
Kuva 11. pPIC9 digestio

Digestoitaessa pPIC9 plasmidia pienennettiin digestioaika kahteen tuntiin. Kuvasta 11 nähdään, että digestio on onnistunut eikä tähtiaktiivisuutta ole havaittavissa. Kohdassa yksi digestoimaton pPIC9 plasmidi ja kohdassa kaksi digestoitu plasmidi, josta on leikattu DNA talteen korkeudelta 8 000 pb jatkotoimenpiteitä varten.



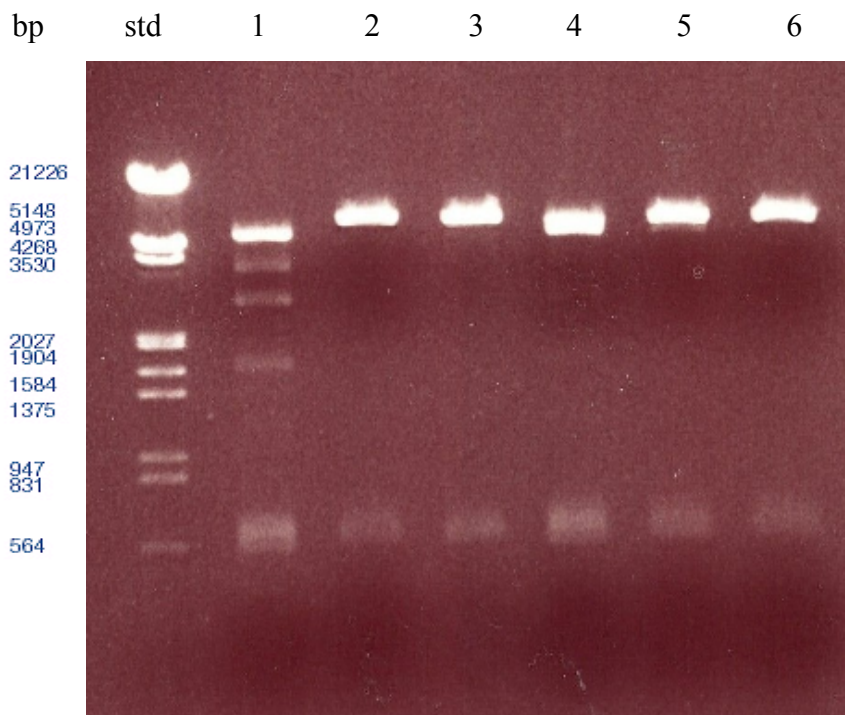
Kuva 12. pET32a ja EphA3LBD digestio

Kuvassa 12 digestoituna pET32a plasmidi (kohta 2) ja EphA3LBD (kohta 1). Kohdassa kolme digestioimatonta plasmidiä. Tässä kahden tunnin digestioaika on ollut riittävä ja digestio on onnistunut. Jatkotoimenpiteitä varten on otettu talteen EphA3LBD:n DNA vyöhyke korkeudelta 550 bp ja pET32a linearisoitu plasmidi korkeudelta 5900 bp.



Kuva 13. Minipreparaattien 1-4 pPIC9+EphA3LBD analyttinen digestio

Geenin kloonauksen onnistumisen toteamiseksi tehtiin analyttinen digestio (restriktioentsyymeillä EcoR1 ja Not1) transformanteista eristetyille yhdistelmä-DNA-vektoreille. Kuvasta 13 nähdään, että kaikissa 1-4 minipreparaateissa insertti EphA3LBD ligatoitunut plasmidiin pPIC9, koska korkeudella 570 bp näkyy analyttisessä digestiossa irronnut insertti. Geelikuvassa havaitaan myös tähtiaktiivisuutta, joka saattaa johtua liian suuresta glyseroli konsentraatiosta.

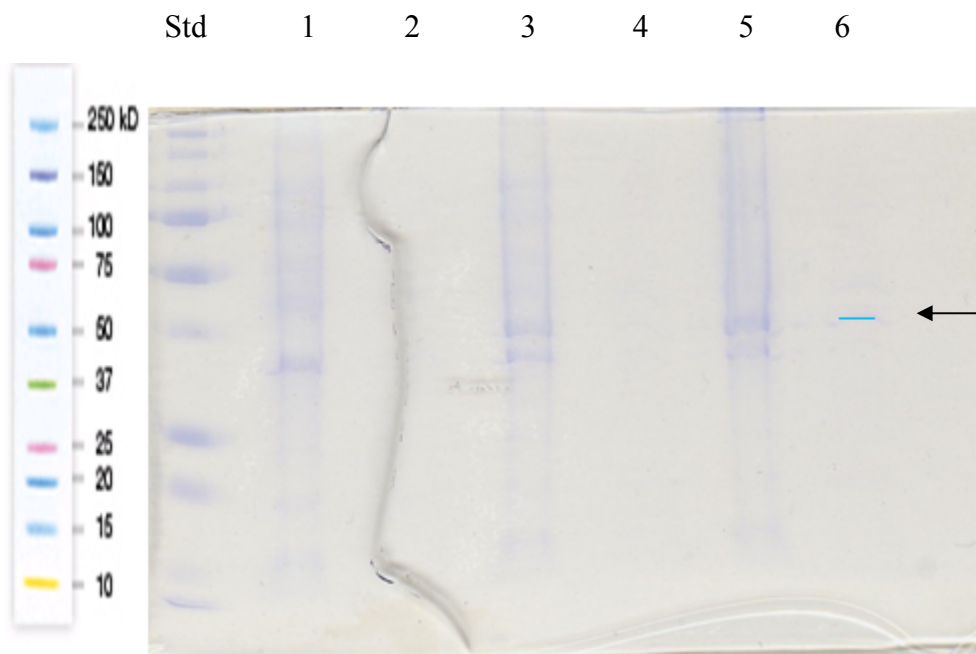


Kuva 14. Minipreparaattien 1-6 EphA3LBD+pET32a analyytinen digestio

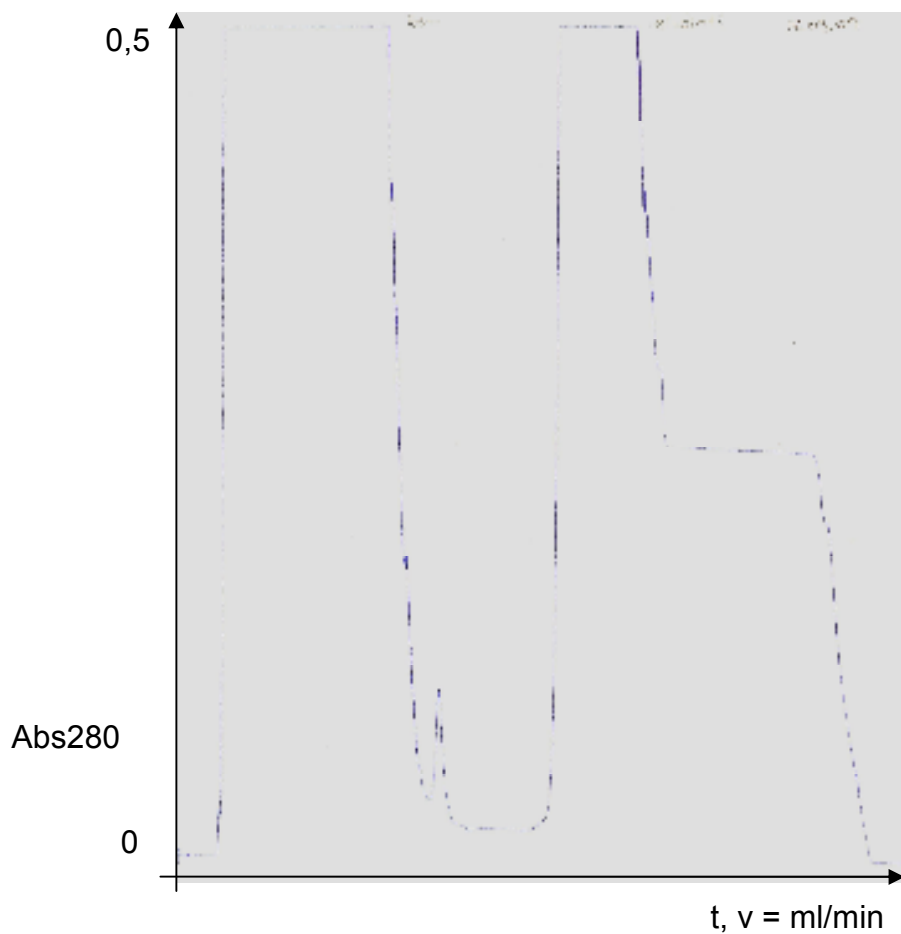
Kuvassa 14 nähdään toisen yhdistelmä-DNA-vektorin analyttisen digestion tulokset. Tuloksien perusteella kaikissa minipreparaateissa 1-6 on muodostunut oikea EphA3LBD+pET32a yhdistelmä-DNA-vektori, koska digestoitunut insertti nähdään korkeudella 570 bp.

Tuloskuvien 13- 14 perusteella valittiin sekvensoitavaksi minipreparaatit numero 2: pPIC9+phA3-LBD (10.02.09) ja numerot 4 ja 6 pET32a+EphA3-LBD (3.03.09). Sekvensoimalla yhdistelmävektorien DNA varmistettiin, että insertti oli siirtynyt oikein vektoriin ja DNA:ssa ei ollut mutaatioita.

3.2 Proteiinin tuotto ja puhdistus

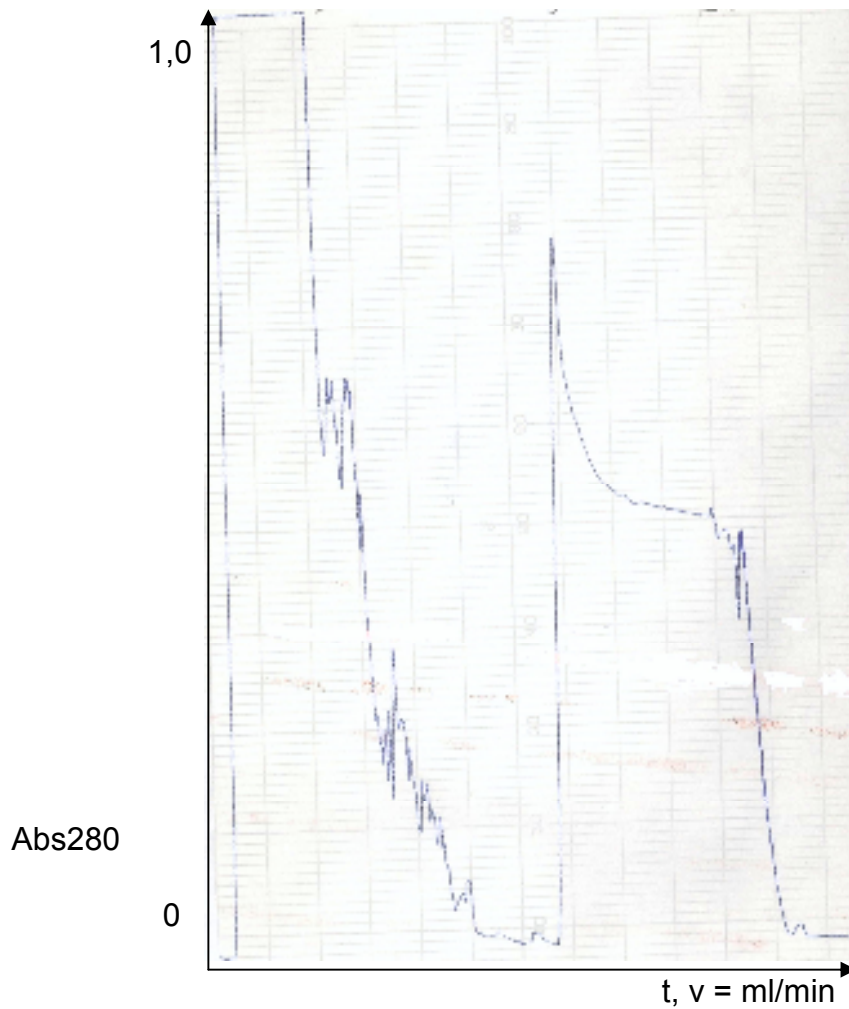
Kuva 15. *E. coli* kasvatuksen eri vaiheet

Kuvassa 15 nähdään *E. coli* kasvatuksen ajalta otetut näytteet soluhajotuksen jälkeen, ajettuna SDS-PAGE geelillä. Geelille ajettiin näytteistä sekä soluhajotuksen jälkeistä pellettiä että supernatanttia seuraavassa järjestyksessä. Näyte ennen indusointia (1 ja 2), kolme tuntia indusoinnin jälkeen (3 ja 4) sekä ennen inkuboinnin lopetusta (5 ja 6). Tuloksista nähdään, että proteiinia on tuottunut jo kolmen tunnin jälkeen indusoinnista (näytekuoppa 3). Tuottunut proteiini EphA3LBD (sisältää pET32a plasmidin mukana tuottuneita tageja) havaitaan korkeudella 37 kD (korkeus merkitty nuolella). Kolmen tunnin jälkeen ei kuitenkaan vielä havaita proteiinia tuottuneena liukoiseen muotoon tai sen konsentraatio on liian alhainen näkyäkseen geelillä. Ennen kasvatuksen lopetusta proteiinia havaitaan geelillä myös liukoisessa muodossa (näytekuoppa 6, vahvistettu vyöhyke), liukenemattoman lisäksi (näytekuoppa 5). Koska proteiinia on selvästi havaittavissa jo kolmen tunnin jälkeen indusoinnista, kasvatusta olisi mahdollista optimoida lyhentämällä inkubointiaikaa.



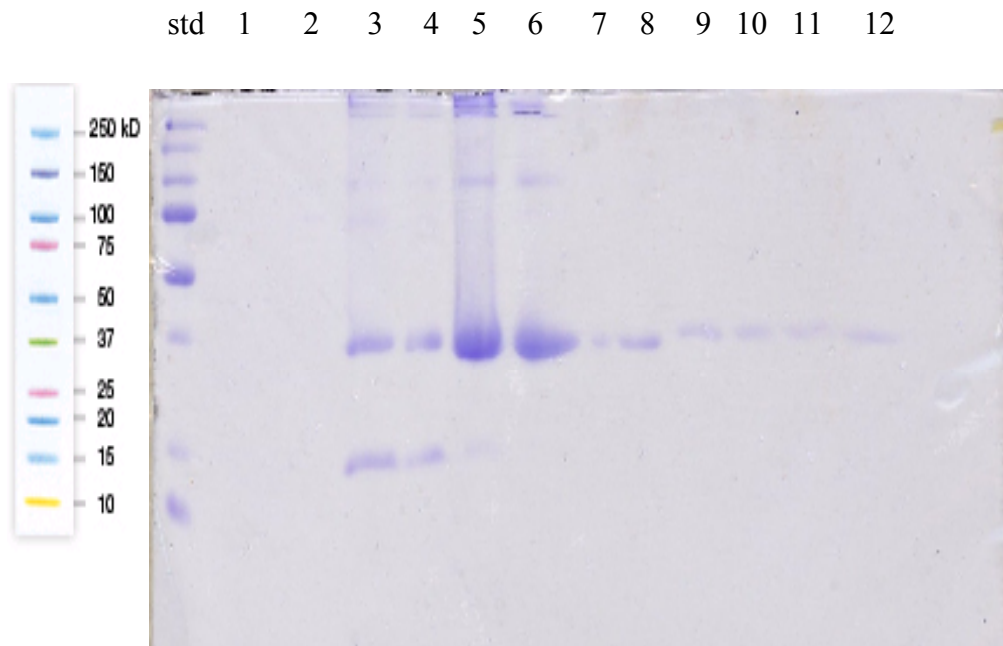
Kuva 16. *E. coli*lla tuotetun liukoisin EphA3LBD proteiinin puhdistus

Kuvassa 15 nähdään soluhajotuksen jälkeisen *E. coli* (Origami B) kanssa tuotetun liukoisin proteiinin puhdistus Ni-sefaroosin avulla. Ensimmäisestä piikistä nähdään näytteen ajo kiinni pylvääseen. Pestäessä sitoutumatonta ainesta pois pylväästä, piirturi on laskenut takaisin lähes nollassolle. Toisesta piirturin piirtämästä piikistä nähdään proteiinin irtoaminen pois pylväästä eluimalla imidatsolia (500 mM) sisältävän puskuri B:n avulla. Eluoinnin aikana kerättiin noin 0,5 ml fraktoita proteiinin talteenottamiseksi. 280



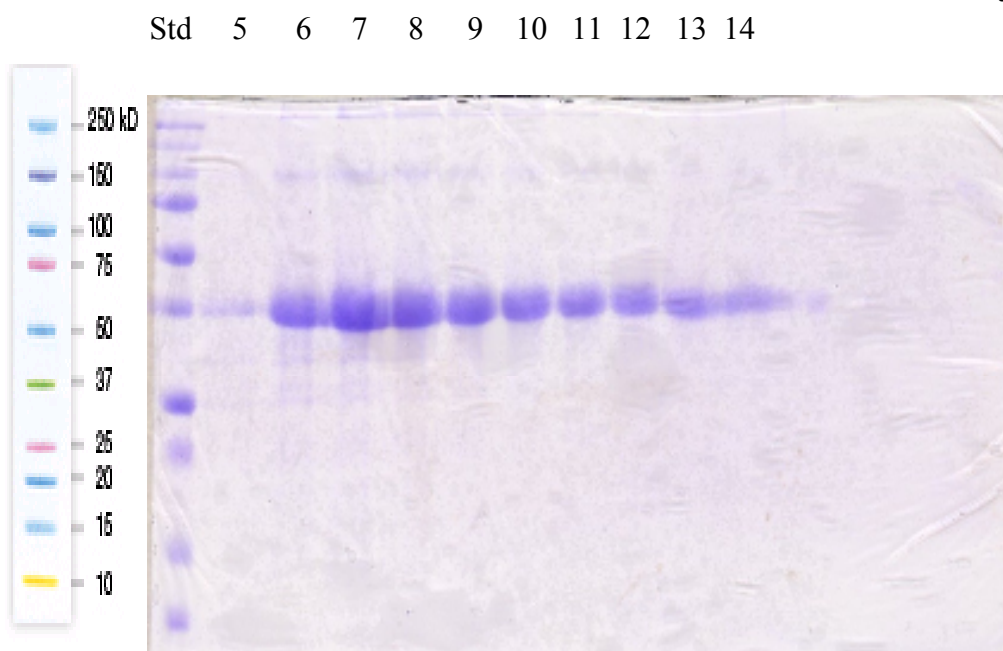
Kuva 17. *E. coli*lla tuotetun liukenemattoman EphA3LBD proteiinin puhdistus

Vastaavasti kuvassa 17. on puhdistettu *E. coli*lla tuotettu inkluusiojyväsiin laskostunut proteiini, joka on soluhajotuksen jälkeen pesty ja liuotettu ureaa sisältävään puskuriin. Myös tässä proteiininpuhdistuskuvassa havaitaan näytteen sisäänajo, pesu ja eluointipiikki. Kuvien 16 ja 17 eluointipiikkien korkeuksia ei tule verrata keskenään sillä absorbanssin mittausalueet olivat ajoissa erilaiset.



Kuva 18. Liukoisen EphA3LBD proteiinin puhdistusfraktiot

EphA3LBD proteiinin puhdistuksen fraktiot nähdään kuvasta 18 ajettuna SDS-PAGE geelille. Näytteet on numeroitu samoilla numeroilla, kuin kerätyt fraktiot. Kuvasta nähdään, että puhdistuksessa on saatu kerättyä haluttua proteiinia EphA3LBD, jonka proteiinvyöhyke näkyy korkeudella 37 kD. Fraktioissa kolme ja neljä näkyy myös 15 kD tasolla jonkinlaista epäpuhtautta. Proteiinvyöhykkeiden vahvuuden perusteella, suurimmat proteiinkonsentraatiot näyttäisivät olevan fraktioissa 5 ja 6.



Kuva 19. Liukenemattoman EphA3LBD proteiinin puhdistusfraktiot

Kuvassa 19 nähdään inklusiojyväksi laskostuneiden EphA3LBD proteiinien puhdistuksen fraktiot. Geelille valittiin fraktiot 5-14, mittamalla ensin karkea proteiinikonsentraatio spektrofotometrillä A 280 nm. Verrattaessa kuvia 18 ja 19 näyttäisi proteiini tuottuneen vyöhykkeiden vahvuuden perusteella enimmäkseen inklusiojyväksi. EphA3LBD vyöhyke havaitaan korkeudella 37 kD.

Taulukko 13. Puhdistetun proteiinin EphA3LBD pitoisuudet

Puhdistettu liukoinen proteiini EphA3LBD mg/ml	Puhdistettu inklusiojyväsiin laskostunut proteiini EphA3LBD mg/ml
Näytefraktio 3: 1,704 mg/ml	Näytefraktio 6: 1,3 mg /ml
Näytefraktio 4: standardisuoran ulkopuolella, vahvin näyte	Näytefraktio 7: 1,452 mg/ml
Näytefraktio 5: 1,308 mg/ml	Näytefraktio 8: 1,104 mg/ml

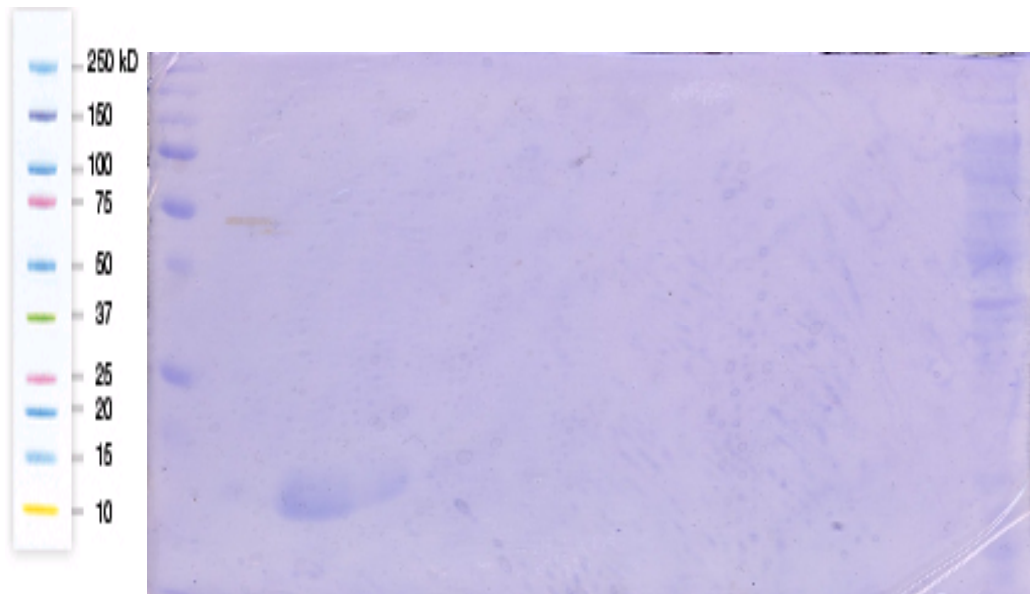
Taulukossa 13. nähdään Bradford menetelmän avulla määritetyt puhdistetun proteiinin konsentraatiot. Vertailemalla keskenään liukoista ja inklusiojyväsiin laskostunutta proteiinimäärää huomataan, että liukoista proteiinia on tuottunut enemmän tai eri jälkikäsitteilyvaiheiden jälkeen sen saanto on parempi kuin liukenemattoman proteiinin.

Taulukko 14. Mut⁺ ja Mut^S fenotyyppien seulonta

Ruudun numero	MD-malja (+ = kasvua, - = hidas kasvu)	MM-malja (+ = kasvua, - = hidas kasvu)
1	+	+
2	+	+
3	+	+
4	+	+
5	+	+
6	+	+
7	+	-
8	+	+
9	+	+
10	+	+
11	+	+

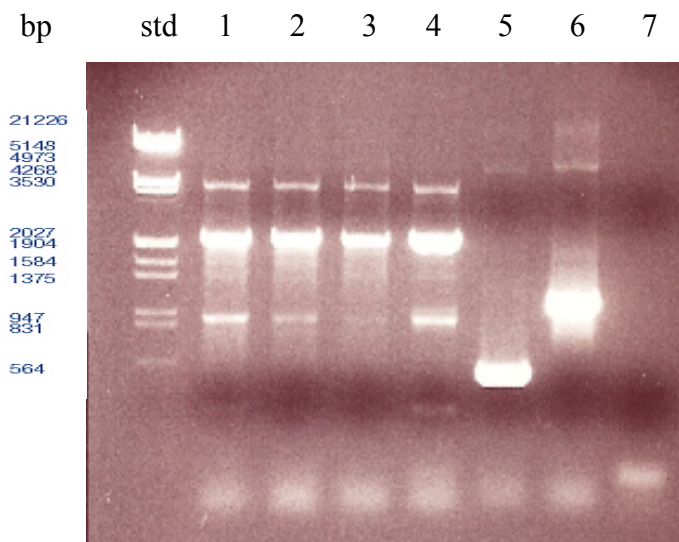
Yllä olevasta taulukosta 14 nähdään transformaation jälkeisten *Pichia pastoris* GS115 solujen fenotyyppi. Samasta pesäkkeestä viljeltiin soluja kahdelle eri maljalle, josta toisen sisältämä elatusmaljan metanoli hidastaa fenotyypin Mut^S kasvua. Fenotyyppi Mut⁺ taas kasvaa metanolia sisältävällä elatusmaljalla normaalisti. Tuloksista nähdään, että yhdestätoista eri transformantista ainoastaan yksi oli fenotyyppiltään Mut^S tyyppiä. MD-maljaa käytettiin vertailupohjana, josta nähdään kaikkien solujen kasvavan normaalisti. MD-maljalta myös siirrostettiin pesäkkeet esikasvatuksia varten. Kasvatus päätettiin suorittaa Mut⁺ fenotyypin avulla, sillä kokemukset JBL-laboratoriossa ovat osoittaneet sen tuottavan paremmin samantyyppisiä proteiineja,

kuin tässä opinnäytetyössä haluttiin tuottaa. Lisäksi Mut⁺ fenotyypillä tuotto prosessi on paljon nopeampi.



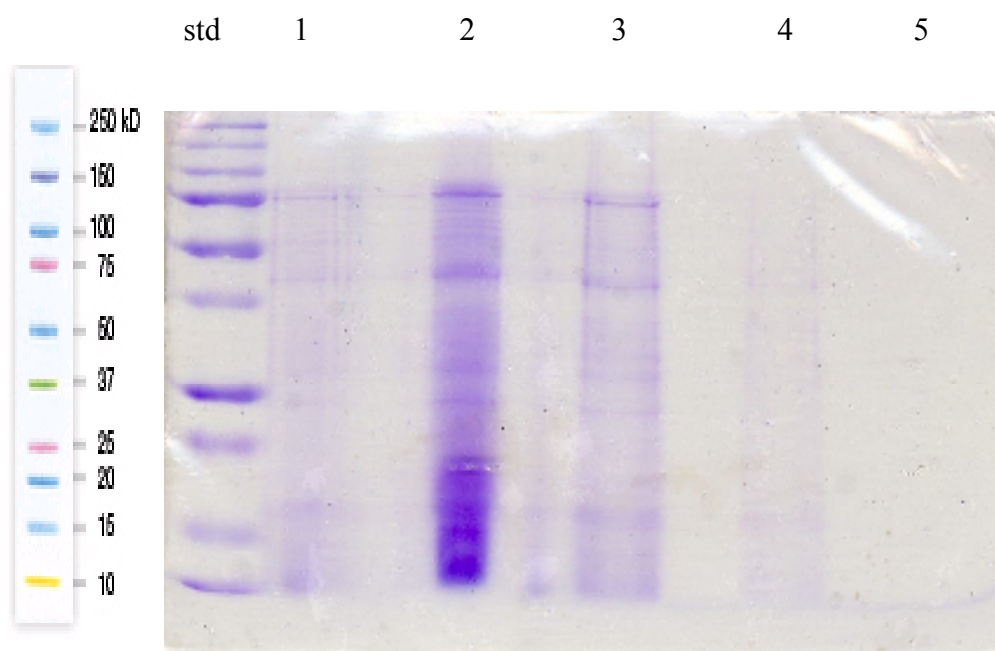
Kuva 20. Hiivakasvatus 1

Kuvassa 20 nähdään ensimmäisen hiivakasvatuksen jälkeiset tulokset. Kuvasta nähdään, ettei haluttua proteiinia ole tuotettu sillä sen pitäisi näkyä korkeudella ≈ 20 kD. Syitä tähän voisivat olla esimerkiksi tuoton aikaiset kasvatusolosuhteet (+30 °C, 250 rpm). Kasvatuksen aikainen lämpötila ei saisi nousta korkeammaksi kuin +32 °C. Ravistelijainkubaattorin lämpötila oli säädetty lämpötilaan +30 °C, mutta laite on saattanut ylikuumentua jolloin lämpötila on noussut liian korkeaksi. Myöskään ilmastus ei ole välttämättä ollut riittävää, jolloin alkoholioksidaasin tuotto on rajoittunut ja samalla myös proteiinin tuotto.



Kuva 21. *P. pastoris* DNA:n PCR-analyysi

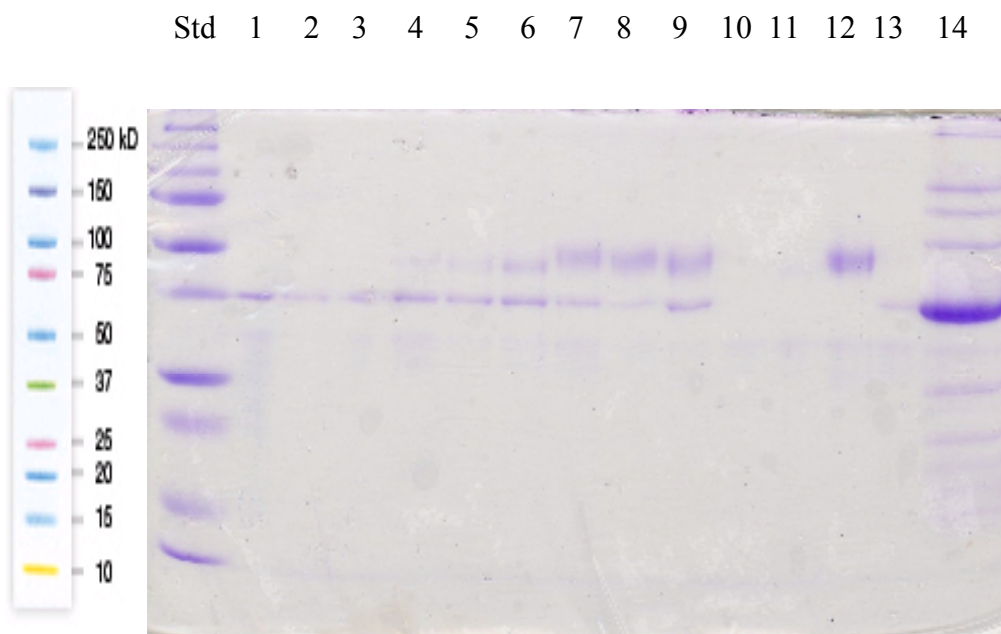
Epäonnistuneen proteiinin tuoton jälkeen, tehtiin *P. pastoriksesta* eristetylle DNA:lle PCR analyysi, jossa tutkittiin oliko haluttu insertti siirtynyt osaksi hiivan genomia. Kuvassa 21 nähdään DNA standardin lisäksi kohdissa 1- 4 tutkittava eristetty DNA neljästä eri transformantista, kohdassa 5 pPIC9 plasmidi ilman inserttiä (8,0 kbp) ja kohdassa 6 pPIC9 plasmidi insertin EphA3LBD (8,57 kbp) kanssa. Numerolla 7 on kontrolli (templaatin tilalla vettä). Kohdasta 5 nähdään AOX1 alukkeiden avulla pPIC9 plasmidista monistettu alue noin korkeudella 550 bp. Vastaavasti kohdassa 6 nähdään monistunut vyöhyke noin 1120 bp korkeudella, joka sisältää sekä plasmidin AOX1 alueiden ja insertin monistumat (570 bp + 550 bp). Eristetyssä DNA:ssa kohdissa 1 – 4 nähdään vyöhyke noin korkeudella 890 bp, joten haluttu insertti esiintyy DNA:ssa. Lisäksi kohdissa 1 – 4 havaitaan myös korkeudella 2 kbp vyöhyke, joka kertoo fenotyypin olevan Mut+ tyyppiä. Tulosten tulkinnassa käytettiin hyväksi Pichia manualia (kappale, PCR Analysis of Pichia Integrants). Koska kaikissa edellisessä kasvatuksessa käytetyissä transformanteissa haluttu insertti EphA3LBD oli liittyneenä osaksi hiivan genoamia, päätettiin tehdä kasvatus uudestaan ja muuttaa kasvatusolosuhteita.



Kuva 22. *Pichia pastoris*, toinen pääkasvatus

Kuvassa 22 nähdään toisen pääkasvatuksen jälkeiset näytteet Ni-pallokäsittelyn jälkeen. Näytekuopissa 1 – 4 varsinaiset kasvatusnäytteet ja kuopassa numero 5 rinnakkaiskasvatus pPIC9+GS115. Näytteissä ei havaita haluttua proteiinia EphA3LBD korkeudella 20 kD. Jotakin proteiinia näytteissä on kuitenkin havaittavissa, joka on tarttunut kiinni Ni-sefaroosiin. Epäpuhtauksia on voinut kulkeutua myös pallojen pesusta huolimatta. Näiden tulosten perusteella ei voida kuitenkaan todeta, että proteiinin tuotto olisi onnistunut *Pichia pastoriksessa*.

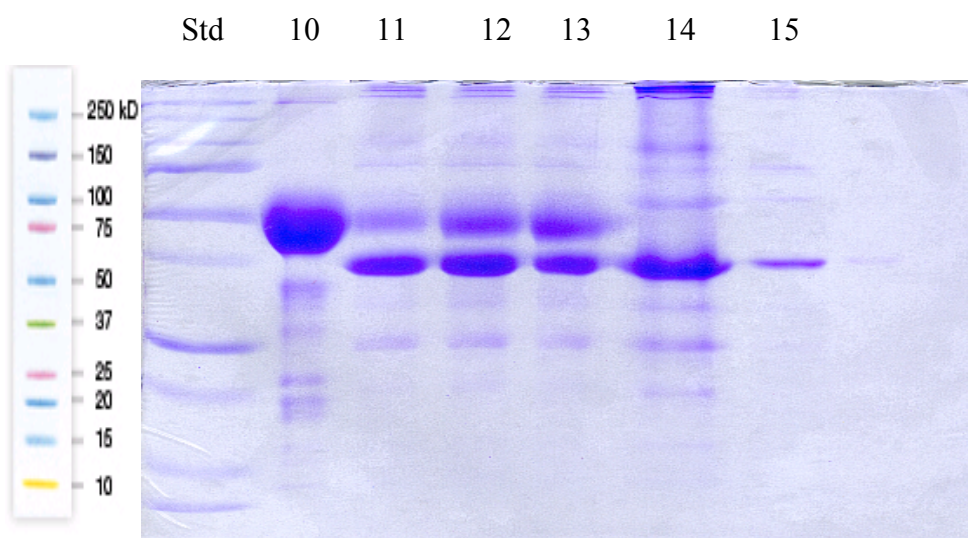
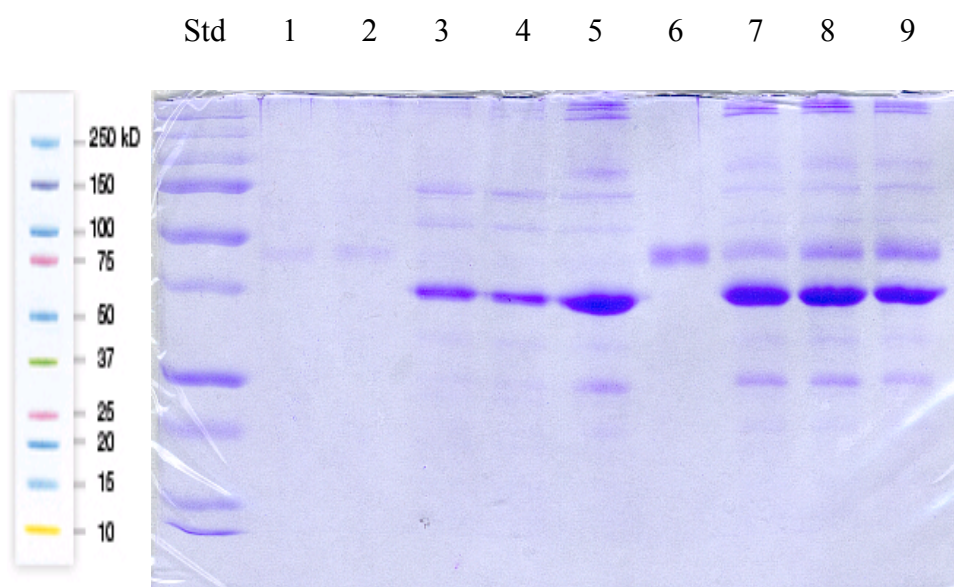
3.3 Sitoutumiskoe



Kuva 23. Efriini-EphA3LBD sitoutumiskoe proteiini A-palloilla

Efriini- EphA3LBD sitoutumiskokeen tulokset näkyvät kuvasta 23. Sitoutumista EphA3LBD (10 µg) kokeiltiin kolmen eri efriinin kanssa, A5, A3 ja B2 kolmella eri pitoisuudella (5 µg, 10 µg ja 15 µg). Efriinit sisälsivät fc-tagin joka tarttuu spesifisesti proteiini A:lla päällystettyihin palloihin. Jos EphA3LBD proteiini tarttuu kiinni efriiniligandiin, tulisi geelillä näkyä kaksi vyöhykettä. Näytekuopissa 1-3 on efriini A5 eri pitoisuuksina EphA3LBD:n kanssa (5 µg, 10 µg ja 15 µg), näytekuopissa 4 - 6 efriini A3 (+EphA3LBD) ja näytekuopissa 7-8 efriini B2 (EphA3LBD). Näytekaivoissa 10 - 12 ovat efriini kontrollit, josta tulisi näkyä sitoutuminen proteiini A:n kanssa. Näytekaivoissa 13 ja 14 ovat EphA3LBD reseptorin kontrollit, proteiini A pallojen kanssa (13) ja ilman (14). Efriinien proteiinivyöhykkeiden tuli näkyä 40 – 50 kD korkeudella. Efriini A5 vyöhykettä ei näy kuitenkaan ollenkaan kohdissa 1 – 3 ja 10, jossa sen tulisi näkyä. Tämän proteiinin pitoisuus on luultavimmin liian pieni. Lisäksi efriini A3 kontrollia ei näy kohdassa 11, joten sen pitoisuus (10 µg) näyttäisi olevan myös liian alhainen, koska vastaavan pitoisuuden sitoutumiskokeessa vyöhyke on myös hyvin heikko. Huolestuttavinta kuitenkin on, että EphA3LBD (korkeudella

37 kD) proteiini näyttäisi tarttuneen proteiini A palloihin kontrollissa 13. Kontrollin ollessa positiivinen ei voida luottaa sitoutumisnäytteiden 1 – 9 tuloksiin, joissa kaikissa nähdään EphA3LBD:n proteiinivyöhyke. Lisäksi situtumisen tulisi olla suhteellinen efriinin pitoisuuteen, mutta EphA3LBD:n proteiinivyöhyke näyttäisi olevan samanvahvuinen jokaisessa sitoutumisnäytteessä. Epäilyttävää on myös se, että EphA3LBD tarttuisi efriini B2 kanssa. Alkuoletuksena pidettiin sitä, että efriini A ryhmä tarttuu EphA ryhmän reseptoreiden kanssa ja Efriini B ryhmä EphB ryhmän kanssa.



Kuva 24. Efriini-EphA3-sitoutumiskoe Ni-palloilla

Sitoutumiskoe toistettiin käyttäen hyväksi Ni-sefaroosipalloja, jonka tulokset näkyvät kuvassa 24 kahdella eri geelillä. Menetelmä on samantapainen edellisen kanssa, mutta tässä kokeessa EphA3LBD-His tarttuu kiinni Ni-sefaroosiin ja mahdollisesti sitoutuva efriini EphA3LBD proteiiniin. Positiivinen sitoutuminen nähdään kahtena vyöhykkeenä geelillä. Näytekaivossa 1 nähdään kontrolli sitoutuuko efriini A5 Ni-sefaroosin kanssa. Kohdassa 1 nähdään vyöhyke, mutta se on saattanut valua myös viereisestä kuopasta 2, jossa on suoraan geelille pipetoitua efriiniä (20 µg, ilman Ni-sefaroosia) efriinin koon havaitsemiseksi. Kontrollin 1 luotettavuuden tekee epäilyttäväksi, myös se ettei sitoutumisnäytteissä EphA3LBD kanssa 3 – 5 (erfiinipitoisuuksilla 20 µg, 30 µg ja 40 µg) havaita vyöhykettä noin korkeudella 40 kD. Muista efrineistä ei tehty sitoutumiskontrollia Ni-sefaroosin kanssa, koska alkuoletuksena pidettiin, ettei efrineiden tulisi tarttua sen kanssa. Nämä olisivat olleet hyödyllisiä, koska kontrolli numero 1 on hieman kyseenalainen. Näytekuopassa 6 nähdään efriini A3 ligandin kontrolli (20 µg), josta nähdään proteiinin koko. Kohdissa 7 - 8 sitoutumisnäytteet efriini A3 (15 µg, 20 µg, 30 µg) + EphA3LBD (20 µg). Samoin kohdassa 10 efriini B1 kontrolli (20 µg) ja sitoutumisnäytteet 11 – 13 efriini B1 + EphA3LBD (20 µg). Kohdissa 14 ja 15 nähdään EphA3LBD (20 µg) kontrollit ilman Ni-sefaroosia (14) ja sitoutuminen sen kanssa (15), jotka havaitaan vyöhykkeinä korkeudella 37 kD. Tuloksien perusteella EphA3LBD proteiini näyttäisi sitoutuvan efriiniligandien A3 ja B1 kanssa. Sitoutuminen efriini A3 kanssa oli odotettavissa rakenneyhtäläisyyksien vuoksi, mutta sitoutuminen B1 kanssa on yllättävää. Sitoutuvuutta B1 kanssa voisi jatkossa tarkistaa uusien testien.

4 Yhteenveto

Tämän opinnäytetyön tavoitteena oli tuottaa EphA3 reseptoriproteiinin ligandia sitovaa osaa kahden eri isäntäorganismien *Esheria coli* ja *Pichia pastoris* kanssa, sekä puhdistaa tuotettu proteiini ja karakterisoida sen sitoutumisominaisuuksia eri erfiiniligandien kanssa.

Työssä EphA3LBD:n geeni kloonattiin onnistuneesti kahteen eri ekpressiovektoriin pET32a ja pPIC9. Vektorit transformoitiin tuottoisäntiin pET32a+EphA3LBD + *Esheria coli* Origami B ja pPIC9+EphA3LBD + *Pichia pastoris* GS115. Insertin integroituminen osaksi *Pichia pastoris* GS115 hiiivan genomia tarkastettiin erikseen PCR-menetelmän avulla. Proteiini tuotto saatiin tuloksien perusteella onnistumaan ainoastaan pET32a+EphA3LBD + *Esheria coli* Origami B tuottoisännän kanssa.

Esheria coli kanssa tuotettu proteiini (liukoinen ja inkusiojyväsiin laskostunut) puhdistettiin onnistuneesti IMAC affiniteettikromatografiaan perustuvan Ni-sefaroosin ja EphA3LBD proteiinin sisältämän his-tagin avulla.

Tuotetun ja puhdistetun proteiinin EphA3LBD sitoutuvuutta erfiiniligandien A5, A3 ja B1 kanssa testattiin sitoutuvuuskokeella (engl. Pull-Down Analysis) onnistuneesti käyttäen hyväksi testissä Ni-sefaroosia. Sitoutumiskokeen tuloksena todettiin EphA3LBD reseptoriproteiinin sitovan erfiini A3 ja B1 ligandia.

5 LÄHTEET

¹ Campbell N. A. & Reece J. B. (2002). Biology. Sixth Edition, Benjamin Cummings, San Francisco 2002.

² Himanen J.-P. & Nikolov D. B. (2002). Eph receptors and ephrins. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. (2003). Volume 35, Issue 2. ss. 130- 134. Saatavilla www- muodossa: www.elsevier.com/locate/ijbcb

³ Himanen J.-P. & Nikolov D. B. (2002). Eph signaling: a structural view, Trends in Neurosciences, Volume 26, Issue 1, Pages 46-51 (January 2003). Saatavilla www- muodossa: <http://www.sciencedirect.com>

⁴ Kuva saatavilla www- muodossa: <http://www.sgc.utoronto.ca>

⁵ Suominen I. & Ollikka P. (1994). Yhdistelmä- DNA- tekniikan perusteet. 3-3 painos, Hakapaino Oy, Helsinki 2006.

⁶ Novagen. (2006). pET System Manual. 11th edition. Saatavilla www-muodossa: <http://www.merckbiosciences.co.uk/docs/docs/PROT/TB055.pdf>

⁷ Kuva saatavilla www-muodossa:
http://bioenergy.asu.edu/photosyn/courses/BIO_343/lab/Fig-exp1-01.jpg

⁸ Kuva saatavilla www-muodossa:
http://www.nordichardware.com/skrivelser_img/506/vektor.jpg

⁹ Invitrogen. (2002). *Pichia* Expression Kit. Catalog no. K1710-01. Saatavilla www- muodossa: http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/pich_man.pdf

¹⁰ Aittomäki E. & Eerikäinen T. & Leisola M. & Ojamo H. & Suominen I & von Weymarn N. (2002). Bioprosessitekniikka. 1.painos, WS Bookwell Oy, Porvoo 2002.

¹¹ GE Healthcare. (2006). Life Sciences Handbook Collection, Affinity Chromatography.

¹² Hames B. D. & Rickwood D. (1998). Gel electrophoresis of proteins. Third edition, The Practical Approach Series, Oxford University Press. Saatavilla www- muodossa: <http://books.google.com>

¹³ Törrönen K. Solunetti (2006). Kuopion Yliopisto. Saatavilla www-muodossa: http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/proteiinien_sds-page/2/

EphA3-reseptoriproteiinin ligandia sitovan osan DNA

5'-gaagttaatctactagattcгааааcaattcaaggagagctgggctggatctcctacccatcccatgggtgggaagagat
cagtgggtgtgatgaacattacacaccaatcaggactaccaggtgtgcaatgcatggatcacagccaaataattggctga
ggacaaactgggtaccagaaactcagctcagaagatctatgtggagctaaagttcacactcgggactgtaacagcattc
cattggttttgggacttgcaaggagaccttaacctgtactacatggagtctgatgatgatcatggcgtcaaattccgagagc
atcagttcacgaagattgacaccattgccgctgatgaaagttcactcagatggatctcggggatcgcattctgaaactcaac
actgagattagagaagtgggaccagtcaaaaaaggggtttatttggcctttcaagatgttggctgtgttgccttggtgt
ctgtgagagtgtacttcaaaaagtcccgtttacagtgaag-3'

Alukkeet PCR-reaktiota varten

EphA3LBD-EcoR1-For

actgaattcgaagttaatctactagattcg

EphA3LBD-Not1-Stop-His-Gly-Rev

act atg gcggccgc tca atg gtg atg gtg atg gtg tcc tcc cttcactgtaaacgggcactt

Agaroosigeelielektroforeesi

1. Punnitse 0,6 g agaroosia (1 % geeli)
2. Lisää 60 ml 1 x TAE-puskuria
3. Kuumenna mikrossa 2 minuuttia
4. Jäähdytä noin 60 °C asteiseksi
5. Lisää 4 µl etidiumbromidia
6. Kaada sula geeli tarjottimelle ja lisää kampa.
7. Anna jähmettyä noin 30 minuuttia

Geelin ajaminen:

Aseta geeli tarjotin ajoaltaaseen ja kaada ajopuskuri päälle (1x TAE puskuri).

Pipetoi näytteet geelille. (Näytteen sekaan 6x DNA β 1 µl/ 5 µl näytettä)

Aja geeliä 90 -120 V voimakkuudella noin 30 minuuttia.

From *Pichia pastoris* -manual

LB (Luria-Bertani) Medium

1% Tryptone

0.5% Yeast Extract

1% NaCl

pH 7.0

1. For 1 liter, dissolve 10 g tryptone

5 g yeast extract

10 g NaCl

in 950 ml deionized water

2. Adjust the pH of the solution to 7.0 with NaOH and bring the volume up to 1 liter.

3. Autoclave for 20 minutes at 15 lb./sq. in. Let cool to ~55°C and add desired antibiotics at this point.

4. Store at room temperature or at +4°C.

LB agar plates

1. Make LB Medium above and add 15 g/liter agar before autoclaving.

2. Autoclave for 20 minutes at 15 LB/sq. in.

3. Let cool to ~55°C and add desired antibiotics at this point. Pour into 10 cm petri plates. Let the plates harden, then invert, and store at +4°C.

Bradford

1. Valmista standardilaimennokset albumiinista (1 mg/ml) blank, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 mg/ml ja pipetoi kutakin laimennosta 10 μ l näytekuoppaan kolme rinnakkaista peäkkäin.
2. Pipetoi näytteet 10 μ l/ näytekuoppa, kustakin näytteestä kolme rinnakkaista.
3. Pipetoi kuhunkin näytekuoppaan 200 μ l Bradford reagenssia. (Laimennos: Bradford-liuosta 1 osa ja 4 osaa vettä)
4. Ravistelijassa 30 s huoneenlämmössä ja anna sitten seistä 5 min.
5. Mittaa absorbanssi (Program in Victor: Wallac/Photometry/Absorbance 595 nm 1s)
6. Piirrä tuloksista standardisuora ja määritä näytteiden proteiinipitoisuus suoran avulla.

From *Pichia pastoris* -manual**MD and MDH Minimal Dextrose Medium + Histidine (1 liter)**

1.34% YNB 4×10^{-5} % biotin
2% dextrose

1. For medium, autoclave 800 ml of water for 20 minutes on liquid cycle.
2. Cool to about 60°C and then add:
100 ml of 10X YNB (13.4% Yeast Nitrogen Base with Ammonium Sulfate without amino acids)
2 ml of 500X B (0.02% Biotin)
100 ml of 10X D (20% Dextrose)
3. To make MDH, add 10 ml of 100X H (0.4% Histidine) stock solution. Mix and store at +4°C.
4. For plates, add 15 g agar to the water in Step 1 and proceed.
5. If preparing plates, pour the plates immediately. MD stores well for several months at +4°C.

**BMGY and
BMMY****Buffered Glycerol-complex Medium
Buffered Methanol-complex Medium (1 liter)**

1% yeast extract
2% peptone
100 mM potassium phosphate, pH 6.0
1.34% YNB
 4×10^{-5} % biotin
1% glycerol or 0.5% methanol

1. Dissolve 10 g of yeast extract, 20 g peptone in 700 ml water.
2. Autoclave 20 minutes on liquid cycle.
3. Cool to room temperature, then add the following and mix well:
100 ml 1 M potassium phosphate buffer, pH 6.0
100 ml 10X YNB (13.4% Yeast Nitrogen Base with Ammonium Sulfate without amino acids)
2 ml 500X B (0.02% Biotin)
100 ml 10X GY (10% Glycerol)
4. For BMMY, add 100 ml 10X M (5% Methanol) instead of glycerol.
5. Store media at +4°C. The shelf life of this solution is approximately two months.

SDS-PAGE- valmistusohje kahdelle geelille

Ylägeeli

325 µl 30 % akryyliamidi

1,525 ml steriili MilliQ H₂O

625 µl 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8

25 µl 10 % SDS

12,5 µl 10 % ammonium persulfaatti

2,5 µl TEMED (pipetointi viimeisenä!)

Kokonaistilavuus 2,5 ml

Alageeli

3,2 ml 30 % akryyliamidi

2,7 ml steriili MilliQ H₂O

2 ml 1,5 M Tris HCl, pH 8,8

80 µl 10 % SDS

40 µl 10 % ammonium persulfaatti

4 µl TEMED (pipetointi viimeisenä!)

Kokonaistilavuus 8 ml

Kokoa lasit kiinni telineeseen ja pipetoi alageeliä lasien väliin.

Pipetoi noin 0,5 cm etanolia geelin päälle.

Anna geelien jähmettyä noin 20 minuuttia.

Poista etanoli geelien päältä.

Pipetoi ylägeeli ja aseta kampa lasien väliin.

Anna jähmettyä noin 20 minuuttia.

Poista kampa geelin jähmetyttyä. Geelit ovat valmiita käytettäväksi.