



Osaamista
ja oivallusta
tulevaisuuden
tekemiseen

Mirva Taipale

Fluoresoivan menetelmän soveltuvuuden tutkiminen eksonukleaasiaktiivisuuden osoittamiseksi proteiinipitoisista näytteistä

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalyttikko (AMK)

Laboratorioanalytiikka

Opinnäytetyö

25.3.2021

Tekijä Otsikko	Mirva Taipale Fluoresoivan menetelmän soveltuvuuden tutkiminen eksonukleaasiaktiivisuuden osoittamiseksi proteiinipitoisista näytteistä
Sivumäärä Aika	52 sivua + 2 liitettä 25.3.2021
Tutkinto	laboratorioanalytiikka (AMK)
Tutkinto-ohjelma	laboratorioanalytiikka
Ohjaajat	vanhempi tutkija Heli Haakana tutkija Linda Vartema lehtori Tiina Soininen
<p>Opinnäytetyössä tutkittiin, soveltuvatko hiuspinnirakenteiset <i>Molecular Beacon</i> -koettimet eksonukleaasiaktiivisuuden osoittamiseksi näytteistä rekombinanttiproteiinin puhdistusprosessissa sekä laadunvalvonnassa. Tutkimustyö tehtiin Mobidiag Oy:n Espoon toimipisteessä tuotannon yksikössä. Yritys valmistaa PCR-tekniikkaan pohjautuvia diagnostiikkatestejä kliinisen mikrobiologian laboratorioille kansainvälisesti.</p> <p>Rekombinanttiproteiinin tuottosolut sisältävät paljon erilaisia proteiineja ja DNA:ta, jotka ovat ei-toivottuja epäpuhtauksia lopputuotteessa. Nämä kontaminantit on puhdistettava kohdeproteiinista, polymeraasientsyymistä, onnistuneiden PCR-reaktioiden tuottamiseksi. Eksonukleaasit ovat yksi lopputuotetta kontaminoivista proteiineista. Nämä entsyymit pilkkovat DNA- ja RNA-juosteita niiden vapaista päistä 3'- tai 5'-suuntaisesti. Tutkimuksissa käytettiin kolmea erilaista <i>Molecular Beacon</i> -koetinta, tylppäpäistä, 3'- sekä 5'-häntäistä, joihin oli liitetty fluoroforiksi 6-FAM ja sammuttajamolekyyliksi Iowa Black© FQ. Koettimien oli tarkoitus säilyttää silmukkarakenteensa reaktio-olosuhteissa ja potentiaalinen eksonukleaasiaktiivisuus havaittaisiin fluoresenssin nousuna, mikäli eksonukleaasientsyymit kykenisivät irrottamaan fluoroforin tai sammuttajamolekyylin.</p> <p>Opinnäytetyössä tutkittiin kaupallisten puskureiden korvaamismahdollisuutta yhdellä puskurilla, Taq-puskurilla. Koetinseoksen käyttökonsentraatiota arvioitiin titrauksen avulla. Taq-polymeraasin 5'-eksonukleaasiaktiivisuuden osoittamista reaktioista tutkittiin yksittäisillä koettimilla sekä näiden seoksena. Lisäksi analysoitiin <i>Escherichia coli</i> -bakteerin solulysaatin vaikutusta tuloksiin sellaisenaan ja ioninvaihtokromatografian avulla tuotettuina eksonukleaasipitoisina fraktioina. Tuotetut fraktiot analysoitiin myös radioaktiivisella menetelmällä yrityksen työhöjeen mukaisesti.</p> <p>Tutkimustulosten perusteella reaktiot oli mahdollista tuottaa onnistuneesti kaikissa käytetyissä puskureissa. Taq-polymeraasin 5'-eksonukleaasiaktiivisuus oli mahdollista osoittaa puhtaammista näytteistä, jotka eivät sisältäneet paljon eksonukleaasiaktiivisuutta. Sekä tutkitulla fluoresoivalla menetelmällä että yrityksessä käytössä olleella radioaktiivisella menetelmällä saatiin samankaltaiset eksonukleaasiprofiilit kromatografian avulla tuotetuille eluutiofraktioille. Tämän opinnäytetyön tuloksia tullaan hyödyntämään fluoresoivan menetelmän käyttöönottoa varten tehtävissä tutkimuksissa, joita tullaan käsittelemään toisen opinnäytetyön aiheena.</p>	
Avainsanat	<i>E. coli</i> , eksonukleaasit, <i>Molecular Beacon</i> -koettimet, qPCR

Author Title Number of Pages Date	Mirva Taipale Feasibility Study of Exonuclease Activity Detection by a Fluorescent Method in Protein-rich Samples 52 pages + 2 appendices 25 March 2021
Degree	Bachelor of Laboratory Services
Degree Programme	Laboratory Sciences
Instructors	Heli Haakana, Senior Scientist Linda Vartema, Scientist Tiina Soininen, Senior Lecturer
<p>The purpose of this thesis work was to examine whether exonuclease activity from protein-rich samples can be detected using a fluorescent method instead of a radioactive method. This thesis work was made in collaboration with Mobidiag Oy, a company manufacturing PCR-based diagnostic tests for clinical microbiology laboratories internationally.</p> <p>Host cells for producing recombinant proteins contain a variety of endogenous proteins and DNA that are unwanted impurities in the final product. These contaminants must be purified from the polymerase target protein to produce successful PCR reactions. Exonucleases are one type of proteins contaminating the final product. These enzymes cleave off nucleotide bonds from the 3' or 5' ends of DNA and RNA chains.</p> <p>This thesis work studied the suitability of hairpin shaped Molecular Beacon probes for exonuclease activity detection in the purification process and quality control of recombinant proteins. Three different Molecular Beacon probes; blunt-ended, 3' and 5' tailed with 6-FAM as a fluorophore and Iowa Black® FQ as a quencher molecule, were used in the examinations. The probes were intended to retain their loop structure under the reaction conditions, and therefore the potential exonuclease activity could be detected as an increase in the fluorescence if the exonucleases were able to release the fluorophore or the quencher molecule.</p> <p>The work aimed to find out whether it is possible to demonstrate exonuclease activity from protein-rich samples using this fluorescent method. The possibility of replacing the buffers supplied with commercial exonucleases was examined with the Taq buffer. The optimal concentration of the probe mix was evaluated by titration. The 5' exonuclease activity of Taq polymerase was examined using single probes as well as a probe mix. The effect of <i>Escherichia coli</i> cell lysate on the results was examined using unpurified lysate and lysate purified with ion exchange chromatography. The produced fractions were also analyzed with the radioactive method according to the company's instructions.</p> <p>Based on the results of the study, the reactions were successful in all buffers. It was possible to demonstrate the 5' exonuclease activity of Taq polymerase from the purer samples that did not contain much exonuclease activity. When analyzing the chromatography fractions, similar exonuclease profiles were obtained with both the fluorescent and radioactive methods. The results of this thesis work will be utilized in an upcoming thesis study addressing the implementation of the fluorescent method in the company.</p>	
Keywords	<i>E. coli</i> , exonucleases, Molecular Beacon probes, qPCR

Sisällys

Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Rekombinanttiproteiinien tuotto ja puhdistus	2
2.1	Entsyymit	3
2.2	<i>E. coli</i> -bakteeri tuottosoluna	4
2.3	Rekombinanttiproteiinien puhdistus tuottosoluista	6
3	PCR ja <i>Molecular Beacon</i> -koettimet	9
3.1	Reaaliaikainen PCR	9
3.2	Fluoresoivat hiuspinnikoettimet	10
4	Eksonukleaasien määrittäminen tuikeilmaisimella	13
5	Alustavat tutkimukset yrityksessä	13
6	Käytännön työ ja tulosten tarkastelu	18
6.1	Puskureiden vaikutus fluoresenssitason	20
6.2	<i>Molecular Beacon</i> -seoksen titraus	24
6.3	Koettimien vertailu yksittäin sekä seoksena entsyymien kanssa	27
6.4	<i>E. coli</i> -bakteerin lyaatin supernatantin vaikutus reaktioissa	30
6.5	Eksonukleaasipitoisten fraktioiden analysointi kahdella menetelmällä	35
6.5.1	Kolonnin pakkaus, solujen käsittely sekä kromatografinen erottelu	35
6.5.2	Fraktioiden analysointi fluoresoivalla menetelmällä	37
6.5.3	Fraktioiden analysointi radioaktiivisella menetelmällä	42
7	Päätelmät	45
	Lähteet	48
	Liitteet	
	Liite 1. Radioaktiivisen menetelmän tulokset - sarja 1	
	Liite 2. Radioaktiivisen menetelmän tulokset - sarja 2	

Lyhenteet

CV	<i>Column volume</i> . Kolonnilavuus.
Da	Dalton, molekyylien koon yksikkö, joka vastaa lähes molekyylimassan yksikköä.
DNA	Deoksiribonukleiinihappo.
dsDNA	<i>Double-stranded DNA</i> . Kaksijuosteinen DNA.
FAM	Fluoreseiiniväriaine oligonukleotidikoettimissa.
FRET	<i>Fluorescence resonance energy transfer</i> . Fluoresenssiresonanssin siirtoenergia.
FT	<i>Flow-through</i> . Kromatografiassa kolonnista läpi tullut sitoutumaton materiaali.
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> . Polymeerasiketjureaktio.
qPCR	<i>Quantitative polymerase chain reaction</i> . Kvantitatiivinen tai reaaliaikainen polymeerasiketjureaktio.
RFU	<i>Relative fluorescence unit</i> . Suhteellinen fluoresenssiyksikkö.
RNA	Ribonukleiinihappo.
RT	<i>Reverse transcriptase enzyme</i> . Käänteiskopioijaentsyymi.
ssDNA	<i>Single-stranded DNA</i> . Yksijuosteinen DNA.
TE	Tris-EDTA-liuos.
U	<i>Unit</i> . Entsyymien katalyyttisen aktiivisuuden yksikkö.

1 Johdanto

Geenitekniikkaa hyödynnetään monilla teollisuuden osa-alueilla, kuten elintarvikkeiden, lääkkeiden ja teollisuusentsyymien tuotannossa, tutkimustoiminnassa ja diagnostiikassa. Laajin soveltamisalue on erityyppisten entsyymien tuottaminen bakteeri- ja soluviljelmissä. [1, s. 134–135.] Bakteerit kasvavat nopeasti edullisissa elatusaineissa ja tuottomäärät ovat moninkertaiset nisäkässoluihin verrattuna. *Escherichia coli*-bakteeri oli ensimmäinen organismi, jossa tuotettiin vieraita proteiineja, rekombinanttiproteiineja, jo 1970-luvulla. [2.] Rekombinanttiproteiinien soluviljelytuotanto johtaa aina proteiinituotteeseen, joka on kontaminoitunut isäntäsolun DNA:lla [3] ja proteiineilla. Näiden kontaminanttien puhdistamiseksi on kehitetty erilaisia menetelmiä, kuten saostustekniikat sekä nestekromatografinen erottelu.

Onnistunut molekyylibiologinen tutkimus vaatii puhtaita reagensseja, jotka eivät sisällä nukleaaseja ja proteaaseja kontaminantteina [4]. PCR-reaktioihin tuotettujen proteiinien, polymeraasientsyymien, on oltava erittäin puhtaita reaktioiden onnistumiseksi. Nukleaasit ovat RNA- ja DNA-juosteita hajottavia entsyymejä. Nämä jaotellaan eri luokkiin: endonukleaaseihin, eksonukleaaseihin, DNAaseihin, RNAaseihin, juostespesifisiin nukleaaseihin sekä muihin nukleaaseihin. Eksonukleaasit ovat entsyymejä, jotka pilkkovat DNA- tai RNA-juosteita vapaista päistä 3'- tai 5'-suuntaisesti. Eri eksonukleaaseilla on spesifiset substraatit, jotka ovat yksi- tai kaksijuosteista DNA:ta tai RNA:ta. [5.] Nykyisen kirjallisuuden mukaan *E. coli*-bakteerista on tunnistettu 17 eri DNA-eksonukleaasia. Eksonukleaaseja on puhdistettu jo 1960-luvun alkupuolelta biokemiallisesti ja ne on pyritty luokittelemaan niiden ominaisuuksien perusteella. [6.]

Opinnäytetyö tehtiin Mobidiag Oy:n Espoon toimipisteessä tuotannon yksikössä. Mobidiag Oy on suomalais-ranskalainen bioteknologian yritys, joka valmistaa ja markkinoi PCR-tekniikkaan pohjautuvia testejä infektioitautien diagnostiikkaan. Opinnäytetyön aiheena oli tutkia, soveltuuko fluoresoiva menetelmä eksonukleaasien havaitsemiseen proteiinipitoisista näytteistä puhdistusprosessissa sekä laadunvalvonnassa. Menetelmässä käytettiin kolmea erilaista *Molecular Beacon* -koetinta, tylppäpäistä, 3'- ja 5'-häntäistä, jotka koostuivat kuuden nukleotidin silmukkaosasta ja 14 emäsparin mittaisista toisilleen komplementaarista varsista

(vastakkaiset nukleiinihappojuosteet, jotka sitoutuvat toisiinsa). 3'- ja 5'-hännäisillä koettimilla hännät koostuivat 12 nukleotidista. Koettiin oli liitetty kaksi fluoresoivaa värimolekyyliä, 6-karbofluoreseiini ja Iowa Black® FQ. Potentiaalisten eksonukleaasien pilkkoessa koettimien juosteita värimolekyylit irtoaisivat, mikä johtaisi detektoitavaan fluoresenssimuutokseen.

2 Rekombinanttiproteiinien tuotto ja puhdistus

Proteiinit eli valkuaisaineet ovat tyypittöisiä orgaanisia yhdisteitä, joilla on erilaisia tehtäviä soluissa, ja niiden kemialliset ominaisuudet ovat hyvin monimuotoisia. Aminohapot muodostavat kovalenttisin sidoksin polypeptidejä, joista proteiinit koostuvat. Näiden makromolekyylien molekyylipaino vaihtelee 30–500 kilodaltoniin. [7.]

Rekombinanttiproteiinit ovat natiivien proteiinien manipuloituja muotoja. Niitä tuotetaan eri tavoin proteiinituotannon kasvattamiseksi, geenisekvenssien muokkaamiseksi sekä hyödyllisten kaupallisten tuotteiden valmistamiseksi. Kiinnostuksen kohteena olevan proteiinin geeni eristetään, yleensä lähetti-RNA:sta käänteiskopioitu DNA, ja se liitetään ekspressiovektoriin, joka tukee geenin ilmentämistä tuottosolussa. [8.] Ekspressiovektorit voidaan transformoida eli viedä solun sisään erilaisilla menetelmillä. Näitä ovat esimerkiksi mikroinjektointi ohuella lasikapillaarilla sekä sähköiset ja kemialliset menetelmät, joiden avulla solukalvo tehdään DNA:ta läpäiseväksi. [1, s. 67.] Tuottosolu ja -systeemi valitaan tuotettavan proteiinin ja sen käyttötarkoituksen mukaan. Tuottosoluina voidaan käyttää esimerkiksi bakteereita, hiivoja sekä hyönteis-, eläin- ja kasvisoluja. [9.]

2.1 Entsyymit

Biologisina katalyytteinä toimivat proteiinit, entsyymit, ovat keskeisessä roolissa biosynteesissä. Entsyymit eivät vaikuta katalysoimiensa reaktioiden termodynamiikkaan tai reaktiotasapainoon, vaan niiden tehtävä on nopeuttaa reaktioita alentamalla reaktioon vaadittavaa aktivaatioenergiaa. [10.] Elävät organismit tuottavat proteiineja DNA:n ohjeen mukaan, mutta ne myös hajottavat monimutkaisia yhdisteitä. Teollisissa sekä arkipäiväisissä prosesseissa hyödynnetään elävien organismien entsyymejä. Niitä käytetään esimerkiksi elintarvikkeiden ja pesuaineiden valmistuksessa. [11.] Entsyymejä käytetään myös lääketieteessä sekä biologisissa tutkimuksissa [8]. Teollisuudessa ja lääketieteessä käytetyt entsyymit ovat pääsääntöisesti rekombinanttiproteiineja [11].

DNA-polymeraasit ovat ainoita entsyymejä, jotka kykenevät luomaan kopion DNA:n geneettisistä tiedoista. Nämä polymeraasit ovat välttämättömiä elävien organismien genomien replikoimiseksi (DNA:n kahdentumiseksi) ennen solujen jakautumista sekä geneettisen tiedon eheyden ylläpitämiseksi. [12.] DNA-synteesi etenee 5'–3'-suuntaan DNA-polymeraasin luodessa nukleotideista uutta juostetta templaatti-DNA:n pariaksi. *E. coli* -bakteerilla tämä on DNA-polymeraasi III. Jotta synteesi olisi mahdollista, DNA-polymeraasi III vaatii alukkeen, johon se alkaa liittää nukleotideja. Kun synteesi on edennyt seuraavaan alukkeeseen asti ja DNA-polymeraasi on irronnut, 5'–3'-eksonukleaasiaktiivisuuden omaava DNA-polymeraasi poistaa alukkeet (*E. coli* -bakteerilla DNA-polymeraasi I). [13.] PCR-reaktioissa yleisesti käytetyllä lämpöstabiililla *Thermus aquaticus* -bakteerin polymeraasilla, Taq-DNA-polymeraasilla, on polymeraasiaktiivisuuden lisäksi 5'–3'-eksonukleaasiaktiivisuus, jolla se kykenee hajottamaan kaksijuosteista DNA:ta (dsDNA) syntetisoidessaan uutta DNA-juostetta. Se hajottaa toissijaiset alukkeet, jotka ovat sitoutuneet samaan juosteeseen. [14.] Käänteiskopioijaentsyymi (RT, engl. *reverse transcriptase enzyme*), jota kutsutaan myös RNA-suunnatuksi DNA-polymeraasiksi, pystyy tuottamaan komplementaarisen DNA-juosteen lähetti-RNA:sta. [1, s. 63]. RT-entsyymillä ei ole Taq-DNA-polymeraasin kaltaista eksonukleaasiaktiivisuutta [15, s. 5].

2.2 *E. coli* -bakteeri tuottosoluna

Bakteerit toimivat hyvin bioteknisinä tuottosoluina. Ne kasvavat nopeasti edullisissa kasvuliuksissa, niillä on korkea transformaatiotehokkuus ja niitä on helppo muokata geenitekniikan avulla. [1, s. 135.] Proteiinien ilmentäminen *E. coli* -bakteerissa on suosittu tapa tuottaa rekombinanttiproteiineja. Yleisimmin käytetty kompetentti solukanta, joka kykenee ottamaan vierasta DNA:ta sisäänsä ympäristöstään, on *E. coli* BL21(DE3). Nämä solut ovat resistenttejä (vastustuskykyisiä) lyyttisille eli hajottaville bakteriofaageille T1 ja T5. BL21(DE3) -kanta on *E. coli* B:n johdannainen, jonka lon- ja ompT-proteaaasi taso on vajavainen, minkä vuoksi eheiden rekombinanttiproteiinien eristäminen on tehokkaampaa. DE3 ilmaisee solukannan sisältävän λ DE3 lysogeenin, joka kuljettaa T7-RNA-polymeraasin lacUV5 promootorin kontrolloimana. Proteiiniekspressio indusoidaan eli käynnistetään IPTG-lisäyksellä, joka estää lac-repressoriproteiinin toiminnan. T7-RNA-polymeraasi pystyy tämän jälkeen aloittamaan kohdegeenin transkription ja tuotettu lähetti-RNA muokataan RNA-polymeraasin avulla proteiiniksi. [16; 17; 18, s. 16.]

Nukleaasit ovat entsyymejä, jotka hydrolysoivat nukleiinihappojen fosforidiesterisidoksia. Eksonukleaaseiksi luokitellaan entsyymit, jotka hajottavat lineaarisen DNA:n tai RNA:n sidoksia yksitellen 3'- tai 5'-päistä. Eksonukleaaseilla on tärkeä rooli DNA:n korjaamisessa, geneettisessä rekombinaatiossa sekä mutaation välttämiseksi kaikissa organismeissa. [19.] *E. coli* -bakteerista on tunnistettu ainakin 17 erilaista DNA-eksonukleaasia (taulukko 1), jotka poikkeavat toisistaan substraattispesifisyyden sekä biokemiallisten ominaisuuksien suhteen, ja niillä kaikilla on erityiset biologiset tehtävät. Eksonukleaasi I oli ensimmäinen eksonukleaasi, joka puhdistettiin ja karakterisoitiin *E. coli* -bakteerista. Sillä on voimakas 3'–5'-aktiivisuus, ja se pystyy hajottamaan yksijuosteisesta lineaarisesta DNA:sta (ssDNA) jopa 10 000 nukleotididisidosta minuutissa. Eksonukleaasi I pystyy poistamaan muutamia nukleotidejä myös dsDNA:n tylpistä päistä, mikäli sen konsentraatio on riittävä [20]. Sen biologinen rooli solun aineenvaihdunnassa on osallistua rekombinaatioon sekä vaurioiden korjaamiseen. [6.]

Taulukko 1. *E. coli* -bakteerista tunnistetut DNA-eksonukleaasit, niiden ensisijaiset substraatit sekä aktiivisuussuunta. [6.]

entsyymi	ensisijainen substraatti	aktiivisuussuunta
ExoI	ssDNA	3'–5'
ExoIII	dsDNA	3'–5'
ExoIV	oligonukleotidit	3'–5'
ExoVII	ssDNA	3'–5', 5'–3'
ExoVIII	dsDNA	5'–3'
ExoIX	-	-
ExoX	ssDNA, dsDNA	3'–5'
DNA pol I 5' Exo (ExoVI)	ssDNA	5'–3'
DNA Pol I 3' Exo (ExoII)	ssDNA	3'–5'
DNA Pol II 3' Exo	ssDNA	3'–5'
DNA Pol III 3' Exo	ssDNA	3'–5'
RecBCD	dsDNA, ssDNA	3'–5', 5'–3'
RecJ	ssDNA	5'–3'
RNase T (Exo T)	ssDNA	3'–5'
SbcCD	dsDNA	3'–5', 5'–3'
endonukleaasi IV eksonukleasiaktiivisuus	dsDNA	3'–5'
TatD (eksonukleasi XI)	dsDNA, ssDNA	3'–5'

Eksonukleaasi III:lla on 3'–5'-aktiivisuus, ja sen ensisijainen substraatti on lineaarinen dsDNA. Se kykenee hajottamaan dsDNA:ta 3'-, 5'- sekä tylpistä päistä. Eksonukleaasi III kykenee hajottamaan myös ssDNA:ta, mutta aktiivisuus tähän on noin 5–10 kertaa matalampaa kuin dsDNA:han. [20.] Eksonukleaasi III:n tehtävänä on korjata ionisoivasta säteilystä sekä hapettumisesta aiheutuneita vaurioita solussa [6]. Katkaistulla eksonukleaasi VIII:lla on 5'–3'-aktiivisuus, ja se hajottaa dsDNA:ta 3'-, 5'- ja tylpistä päistä. Se kykenee hajottamaan myös lineaarista ssDNA:ta, jos 5'-päässä on fosfaatti. [20.] Eksonukleaasi VIII osallistuu rekombinaatioon ja vaurioiden korjaamiseen. [6.]

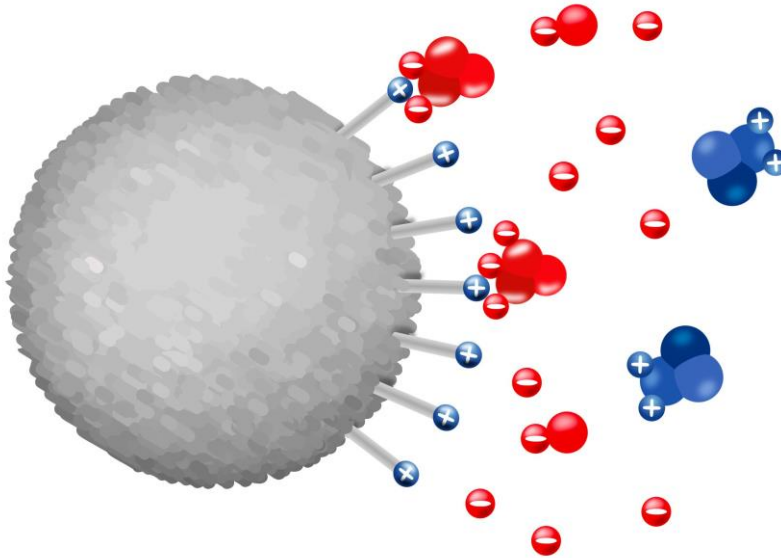
2.3 Rekombinanttiproteiinien puhdistus tuottosoluista

Jotta rekombinanttiproteiinit voidaan puhdistaa tuottosoluista, solujen rakenne on ensin hajotettava lymfaattien muodostamiseksi. Lymfaattien menetelmät voivat olla mekaanisia, kuten ultraäänikäsittely, korkeapainehomogenisointi ja jauhaminen tai ei-mekaanisia, kuten esimerkiksi kuivaus, entsyymaattinen käsittely tai orgaanisten liuottimien käyttö. [21.] Tämän jälkeen lähtöaineesta voidaan poistaa ei-toivottuja materiaaleja sentrifugoimalla tai suodattamalla. Puhdistettaessa termostabiileja entsyymejä, kuten Taq-DNA-polymeraasi, voidaan solulysaatti lämpökäsitellä kontaminoivien proteiinien, kuten esimerkiksi nukleaaasien ja proteaasien, vähentämiseksi. Lymfaattia inkuboidaan 75–80 °C:ssa 30–60 minuuttia. Lämpökäsittelyn aikana proteiineja denaturoituu sekä saostuu, ja saostuma voidaan poistaa sentrifugoimalla tai suodattamalla. [22, s. 398; 23.]

Proteiinien puhdistamiseksi on kehitetty erilaisia menetelmiä, joiden avulla voidaan erottaa kohdeproteiini kontaminoivista proteiineista sekä DNA:sta. Näitä ovat esimerkiksi geelisuodatus, erilaiset saostustekniikat sekä nestekromatografiset menetelmät. Nestekromatografia perustuu tasapainoon kolonnin kiinteän stationäärifaasin ja nestemäisen liikkuvan faasin, puskuriliuoksen, välillä. Yhdisteet sitoutuvat stationäärifaasin pintaan, matriisin funktionaalisiin ryhmiin, josta ne eluoidaan liikkuvan faasin avulla. Kromatografiset puhdistusmenetelmät perustuvat kolonnien matriiseihin liitettyjen funktionaalisten ryhmien, ligandien, ominaisuuksiin. Matriisit voivat koostua esimerkiksi agarosista, dekstraanista tai synteettisistä polymeereistä [24]. Näytteen sisältämät proteiinit havaitaan UV-detektorin avulla aallonpituudella 280 nm [25].

Kromatografiatyypit jaotellaan ligandien ominaisuuksien perusteella. Ioninvaihtokromatografiassa sitoutuminen perustuu molekyylien reversiibeliin (palautuvaan) adsorptioon vastakkaista varausta olevan ligandin kanssa [26, s. 15]. DNA on tyypillisesti negatiivisesti varautunut, ja se voidaan erottaa kohdebiomolekyylistä, jolla on samanlainen tai vastakkainen varaus käyttämällä sopivia puskuriolosuhteita [3].

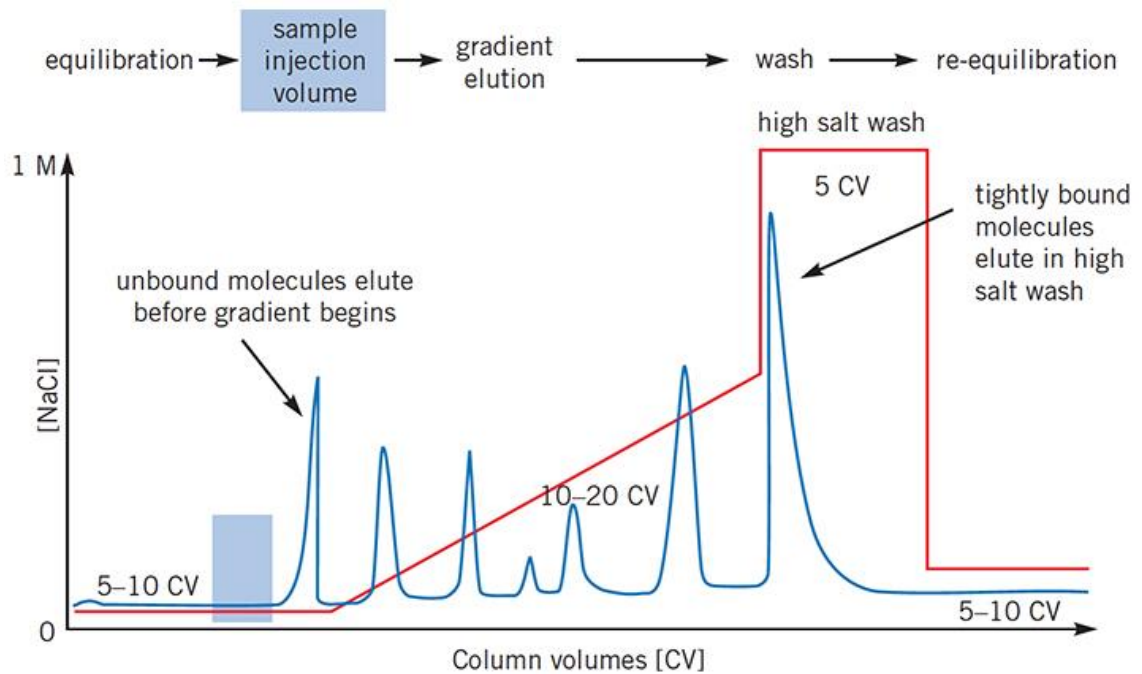
Proteiinit sitoutuvat isoelektrisen pisteen yläpuolella positiivisesti varautuneeseen anioninvaihtimeen, esitetty kuvassa 1, ja isoelektrisen pisteen alapuolella negatiivisesti varautuneeseen kationinvaihtimeen. Vaikka proteiinin nettovaraus olisi negatiivinen, on silti mahdollista, että se sitoutuu kationinvaihtimeen. Proteiinin pinnalla voi olla positiivisesti varautuneita klustereita (rykelmiä), joiden varaus on riittävä adsorption tapahtumiseksi. [26, s. 23.]



Kuva 1. Ioninvaihtokromatografia perustuu varautuneiden molekyylien reversiibeliin sitoutumiseen vastakkaista varausta olevan kiintoaineen kanssa. Kuvassa on havainnollistettu anioninvaihtokromatografiamatriisin toiminta. Positiivisesti varautuneeseen ligandiin adsorboituu negatiivisesti varautuneita molekyyliä. [27.]

Vahvan ioninvaihtimen pinnalla on sama varaustiheys laajalla pH-alueella, kun taas heikolla ioninvaihtimella pinnan varaustiheys muuttuu pH:n muuttuessa. Heikon ioninvaihtimen selektiivisyys ja kapasiteetti ovat erilaiset eri pH-alueilla. [26, s. 24.] Eluointi eli adsorboituneiden molekyylien irrottaminen ligandeista tehdään usein suolan avulla. Pienimmän isoelektrisen pisteen omaavat proteiinit eluoutuvat ensin. Eluointi on mahdollista suorittaa myös pH:n muutoksen avulla, mutta sillä ei saavuteta yleensä riittävää resoluutiota eli piikkien erottumista toisistaan. Suola syrjäyttää sitoutuneet molekyylit ja matriisin vapautuneet paikat korvataan puskurin sisältämällä vastaioneilla. [25. s. 22–23; 28.]

Kuvassa 2 on esitetty esimerkki kromatogrammi ioninvaihtokromatografiaa käytettäessä. Suolakonsentraatio on esitetty kolonnilavuuden (CV, engl. *column volume*) funktiona. Sinisellä on kuvattu absorbanssin muutos ja punaisella korkeamman suolapitoisuuden omaavan, B-puskurin, osuus käytettävästä puskuriseoksesta.



Kuva 2. Ioninvaihtokromatografian kromatogrammi, jossa NaCl-konsentraatio on esitetty kolonnilavuuden funktiona. Absorbanssin muutos on kuvattu sinisellä ja B-puskurin osuus puskurista punaisella. Kuvassa vasemmalta oikealle on kolonnin tasapainotus, näytteen injektointi, lineaarinen suolagradientti, jossa adsorboituneet molekyylit eluoituvat ja kolonnin pesu korkealla suolapitoisuudella. [28.]

Kromatogrammin alussa on kolonnin tasapainotus A-puskurilla, sinisellä alueella on kuvattu näytteen syöttö, jota seuraa vielä pesuvaihe A-puskurilla. Ennen suolagradientin alkua kromatogrammissa oleva piikki kuvaa sitoutumattomien molekyylin eluutiota, ja tätä kutsutaan *flow-through* (FT) -vaiheeksi. Matriisiin sitoutuneiden molekyylin erotus kolonnista on tehty lineaarisen suolagradientin avulla. Molekyylit erottuvat isoelektristen pisteiden mukaisessa järjestyksessä. Suolagradientin jälkeen kolonnista on erotettu voimakkaasti sitoutuneet molekyylit korkean suolapitoisuuden avulla.

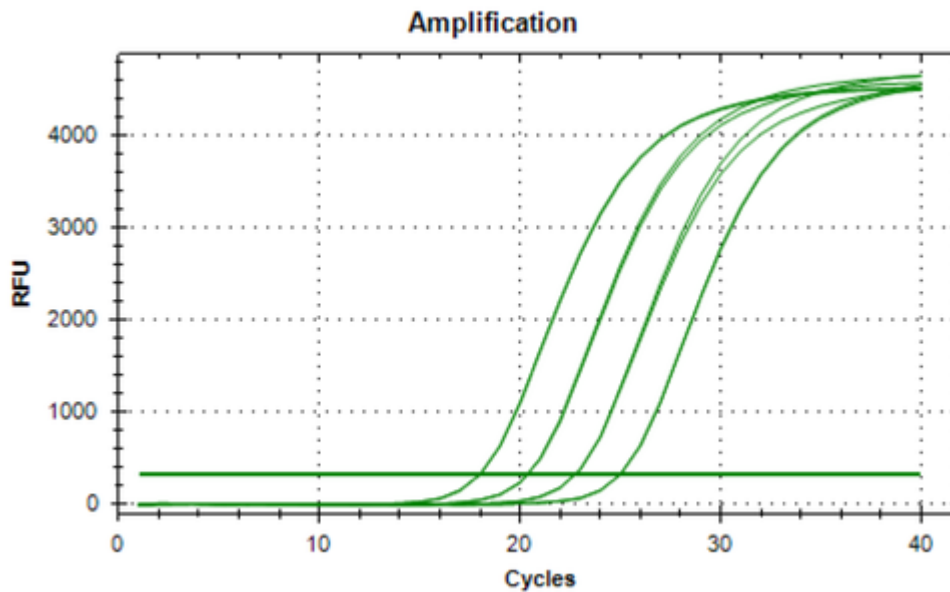
3 PCR ja *Molecular Beacon* -koettimet

Polymeraasiketjureaktio (PCR, engl. *Polymerase chain reaction*) on nopea tekniikka, jota käytetään DNA- ja RNA-sekvenssien havaitsemiseen erilaisista näytteistä. Sen avulla voidaan myös monistaa nopeasti pieni määrä DNA-näytettä riittäväksi analysointia varten. Tämä amplifikaatioksi kutsuttu reaktio tuotetaan *in vitro* eli laboratorioissa eliön tai solun ulkopuolella. DNA:n amplifikaatio on eksponentiaalista, ja yhdestä DNA-fragmentista voidaan tuottaa miljoonia kopioita muutaman tunnin aikana lämpösyklilaitteessa. Perinteiset menetelmät ekspressiovektorin valmistuksesta DNA-sekvenssin replikointiin elävässä solussa voivat viedä aikaa useita päiviä. [29.]

3.1 Reaaliaikainen PCR

Reaaliaikainen PCR, qPCR, on kvantitatiivinen menetelmä. Sen avulla voidaan seurata PCR-reaktion edistymistä reaaliajassa, toisin kuin tavallisissa päätepiste-PCR-reaktioissa, jossa reaktiotuote voidaan analysoida vasta reaktion päätyttyä esimerkiksi elektroforeesilla. PCR-reaktion reaaliaikaisen seurannan mahdollistaa fluoresoivasti leimatut sekvenssispesifiset oligonukleotidikoettimet sekä fluoresoivat väriaineet, jotka sitoutuvat kaksijuosteiseen DNA:han epäspesifisesti. Joissakin qPCR-menetelmissä käytetään myös komplementaarisia nukleiinihappokoettimia DNA-kohteen kvantifioimiseksi. [29.] Reaktioiden etenemistä lämpösyklilaitteessa seurataan fluoresenssitason muutoksena. Fluoresenssi on valosignaali, joka voidaan havaita, kun fluorofori absorboi energiaa tietyllä aallonpituudella ja virittyy. Energiatason palautuessa normaalitilaan emittoituu valoa korkeammalla aallonpituudella. [30.] qPCR-laitteissa käytetään valonlähteinä emittoivia diodeja (LEDs, engl. *light-emitting diodes*), halogeenilamppua tai laseria. Käytettyjä detektoreita ovat fotodiodi, varauskytketty CCD-detektorit sekä valomonistinputki. [31.] Fluoresenssitaso mitataan jokaisen syklin lopussa ja se ilmoitetaan suhteellisina fluoresenssiyksikköinä (RFU, engl. *relative fluorescence unit*).

Detektoitu fluoresenssi esitetään syklien funktiona amplifikaatiokuvaajalla (kuva 3). Aluksi fluoresenssitaso pysyy taustatasolla, eikä fluoresenssitason lisääntymistä voida havaita, vaikka tuotetta muodostuu eksponentiaalisesti (tuotteen määrä kaksinkertaistuu jokaisen syklin aikana). Kun tuotetta on muodostunut riittävästi fluoresoivan signaalin detektoimiseksi, se havaitaan amplifikaatiokuvaajan käyrien jyrkkänä nousuna. [32, s. 3.]



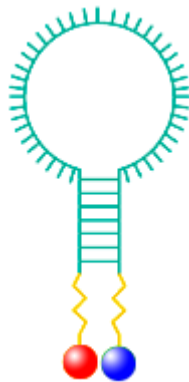
Kuva 3. Amplifikaatiokuvaaja, jossa fluoresenssin muutos on kuvattu syklien funktiona. [33.]

Reaktioiden edetessä reaktiokomponentit kuluvat, ja lopulta yhdestä tai useammasta komponentista tulee reaktiota rajoittava tekijä ja reaktiot hidastuvat. Reaktioiden hidastuminen tai päättyminen havaitaan amplifikaatiokuvaajan käyrien tasaantumisena. [32, s. 4.]

3.2 Fluoresoivat hiuspinnikoettimet

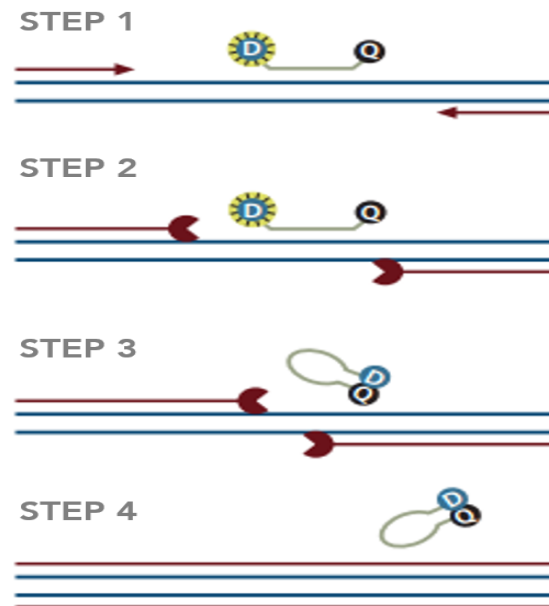
PCR-reaktioissa käytettävät spesifiset *Molecular Beacon* -koettimet ovat kaksoisleimattuja koettimia. Ne koostuvat 5'-pään fluoresoivasta väriaineesta, fluoroforista, 3'-pään fluoresenssia estävästä sammuttajasta sekä kohde-DNA:lle komplementaarisen sekvenssin sisältävästä varrellisesta silmukkarakenteesta, joka

muistuttaa hiuspinniä. [34.] Koettimen varret ovat komplementaarisia toisilleen, ja ne koostuvat noin 5–7 emäsparista. Koettimen ollessa silmukkamuodossa fluorofori on sammuttajamolekyylin vaikutuksen alaisena, eikä fluoresenssia vapaudu. [35.] Fluoresenssin muutos havaitaan koettimen silmukkarakenteen auetessa, kun fluorofori ja sammuttajamolekyylit ovat toisistaan riittävällä etäisyydellä. Fluorofori virittyy tietyllä aallonpituudella tulevasta valosta, energiatilan palautuessa normaalitilaan muodostuu pitkäaaltoisempaa emissiovaloa, joka nähdään fluoresenssina. Kuvassa 4 on esitetty *Molecular Beacon* -koettimen rakenne. Silmukka koostuu useimmiten 18–45 emäksestä. [34.]



Kuva 4. *Molecular Beacon* -koettimen rakenne. Koetin koostuu kohde-DNA:lle komplementaarisen sekvenssin sisältävästä silmukasta, toisilleen komplementaarisista varsista sekä fluoroforista ja sammuttajamolekyylistä. [35.]

Tavallisesti näitä koettimia käytetään kolmivaiheisissa qPCR-reaktioissa kuvassa 5 esitetyllä tavalla. DNA-juosteet erotetaan toisistaan ensin korkean lämpötilan avulla lämpösyklilaitteessa, minkä jälkeen lämpötila lasketaan koettimien hybridisoitumisen mahdollistamiseksi kohde-DNA:han [36]. Koettimien hybridisaatio kohdesekvenssiin erottaa fluoroforin (D) ja sammuttajamolekyylin (Q) toisistaan, mikä johtaa fluoresointiin, joka detektoidaan qPCR-laitteen avulla. Kohde-DNA:han sitoutumattomat koettimet uudistavat silmukkarakenteensa, eivätkä aiheuta fluoresenssin muutosta. [34.] Tämän jälkeen lämpötila nostetaan optimaaliseksi, jotta polymeraasit sitoutuvat alukkeisiin ja alkavat syntetisoida kohde-DNA:lle vastinjuostetta [36]. Kun polymeraasientsyymi saavuttaa koettimen, se irtoaa kohde-DNA:sta hajoamatta ja polymeraasi jatkaa DNA-juosteen syntetisointia [34]. Koettimet sitoutuvat monistettuun kohteeseen jokaisen amplifikaatiosyklin jälkeen ja detektoitu signaali on verrannollinen reaktiotuotteen määrään [35].



Kuva 5. *Molecular Beacon* -koettimien toiminta PCR-reaktiossa. Koettimet sitoutuvat kohde-DNA:han, jolle polymeraasi syntetisoi vastinjuosteen. Synteesin aikana polymeraasientsyymit irrottavat koettimet ja ne palaavat takaisin silmukamuotoonsa ja vastinjuosteen rakentaminen etenee loppuun. [34.]

Molecular Beacon -koettimien detektiokemia pohjautuu fluoresenssiresonanssin energiansiirtoon (FRET), joka on etäisyydestä riippuvaista vuorovaikutusta kahden virittyneen värimolekyylin välillä. Siinä luovuttajafluorofori virittyy valonlähteestä ja siirtää energiaa lähellä olevaan vastaanottajafluoroforiin, sammuttajaan, aiheuttamatta emissiota. [30; 37.] Energiansiirron toteutumiseksi värimolekyylien täytyy olla lähekkäin ja analysoidavan fluoroforin emissiospektrin sekä sammuttajakemolekyylin absorptiospektrin on oltava päällekkäisiä [30]. 6-karboksifluoreseiini (6-FAM) on yleisimmin käytetty fluoresoiva väriaine oligonukleotidien leimaamiseen. Sen absorptiospektri on 495 nm:n ja emissiospektri 520 nm:n kohdalla, joten se emittoi vihreää fluoresenssia. 6-FAM-fluoroforia sisältävissä koettimissa käytetään yleensä BHQ-1-sammuttajaa, koska niiden spektrit vastaavat hyvin toisiaan. [38.] Iowa Black FQ -sammuttajalla on laaja absorptiospektri, 420–620 nm, ja absorptiospektri on aallonpituudella 531 nm. Iowa Black FQ -molekyyliä voidaan käyttää sammuttajana 6-karboksifluoreseiinin kanssa. Se soveltuu myös käytettäväksi fluoresoivien väriaineiden kanssa, jotka emittoivat spektrialueella vihreästä vaaleanpunaiseen. [39.] BHQ-1- ja Iowa Black FQ -molekyylien absorptiospektrit vastaavat toisiaan, mutta Iowa Black

FQ:lla on 100 nm laajempi spektrialue, kuin BHQ-1:llä (480–580 nm) [40]. FAM-fluorofori on molekyylipainoltaan 569,5 Da ja Iowa Black FQ 442,4 Da [39, 41]. Yhden DNA-emäsparin molekyylipaino on keskimäärin 650 Da [42, s. 3, 43], joten nukleotidien keskimääräinen paino on pienempi, kuin käytettyjen värimolekyylien.

4 Eksonukleaasien määrittäminen tuikeilmaisimella

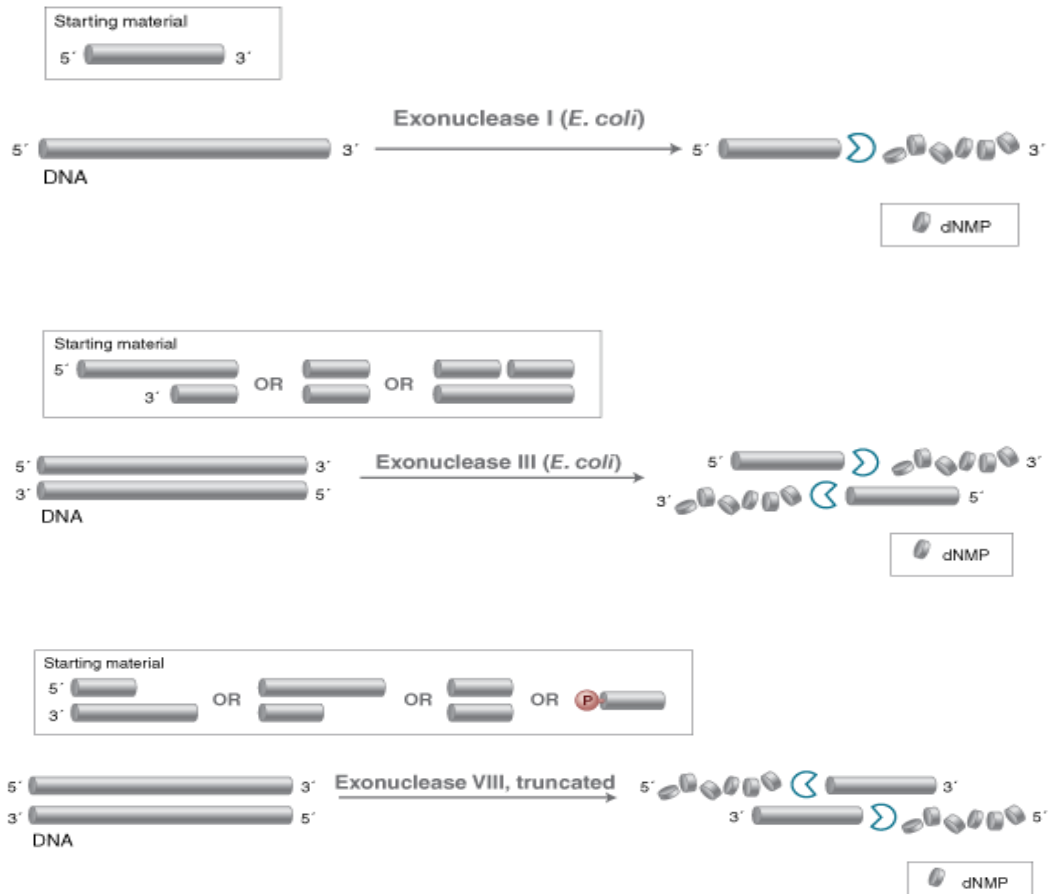
Eksonukleaaseja voidaan analysoida näytteistä semikvantitatiivisesti radioaktiivisesti leimattujen DNA-substraattien avulla nestetuikeilmaisimella. Näytteitä inkuboidaan ensin optimaalisessa lämpötilassa substraatin sekä puskurin kanssa, jonka aikana näytteen potentiaaliset eksonukleaasit voivat pilkkoa substraattia. Inkuboinnin jälkeen näytteistä saostetaan pitkät DNA-juosteet trikloorietikkahapon (TCA) avulla. Supernatantti analysoidaan tuikeilmaisimella tuikenesteen kanssa. Eksonukleaasiaktiivisuus havaitaan, mikäli DNA-substraattia on pilkkoutunut riittävästi ja käytettyä radioaktiivista leimaa on jäänyt supernatanttiin. [44.]

Nestetuikeilmaisinta käytetään matalaenergisten radioaktiivisten isotooppien, enimmäkseen beeta- ja alfasäteilevien isotooppien, radioaktiivisuuden kvantifioimiseksi nestemäisistä näytteistä [45]. Yleisimmät beetasäteilijät ovat ^3H ja ^{14}C . Ilmaisimen tärkeimmät komponentit ovat orgaaninen tuikeneste sekä valomonistinputki. Säteilyenergia absorboituu tuikenesteessä radioaktiivisiin atomeihin ja virittää ne korkeammalle energiatilalle, jonka purkautuessa emittoituu fotoneja. Valofotonien emissio detektoidaan valomonistimen avulla. Emittoituneet fotonit irrottavat fotokatodin metallipinnasta elektroneja, jotka monistetaan elektrodien, dynodien, avulla. Monistetut elektronit detektoidaan anodilla, jossa syntynyt sähkösignaali voidaan mitata. [46, s. 123–125.]

5 Alustavat tutkimukset yrityksessä

Vuosina 2018–2019 yrityksessä oli tehty alustavia tutkimuksia *Molecular Beacon* -koettimien soveltuvuudesta eksonukleaasiaktiivisuuksien määrittämiseksi. Tutkimuksiin oli sisällytetty koettimien käyttö yksittäin sekä seoksena, joka sisälsi tylyppäpäistä, 3'-häntäistä ja 5'-häntäistä koetinta. Koettimien soveltuvuutta oli tutkittu *E. coli* -bakteerin

kaupallisten eksonukleaasien kanssa. *Molecular Beacon* -koettimien silmukkaosot olivat koostuneet kuudesta nukleotidistä, toisilleen komplementaariset varret kumpikin 14 nukleotidistä ja hännät 12 nukleotidistä. Koettiin liitetyt värimolekyylit olivat olleet 6-FAM 3'-päässä ja Iowa Black FQ 5'-päässä. Entsyymeiksi oli valittu eksonukleaasi I, eksonukleaasi III sekä katkaistu eksonukleaasi VIII. Näiden entsyymien toiminta, niiden aktiivisuussuunnat sekä mahdolliset DNA-substraatit on esitetty kuvassa 6.



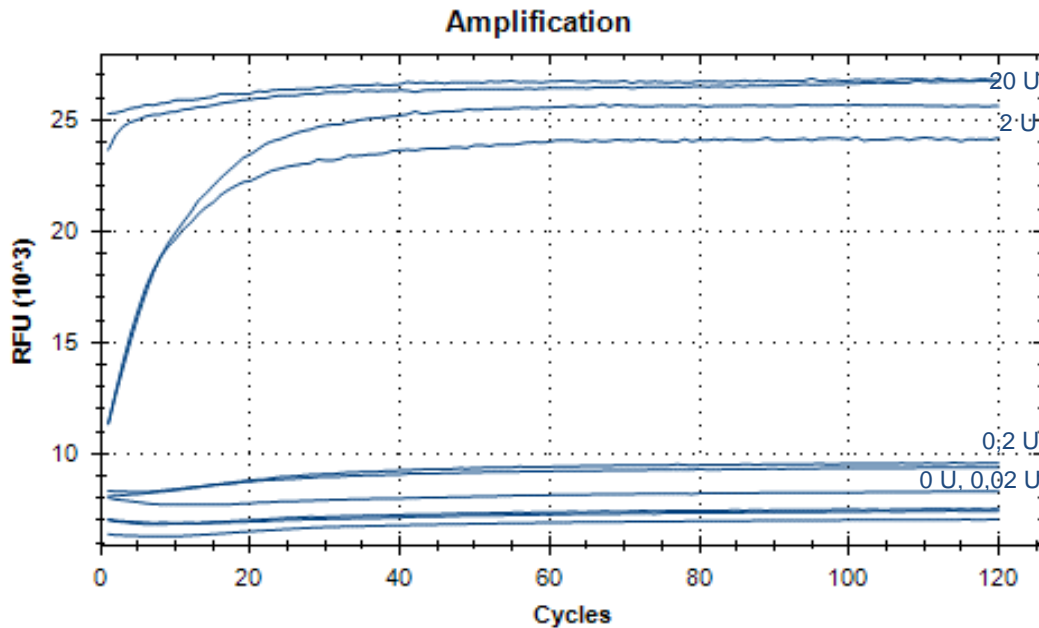
Kuva 6. Eksonukleaasi I:n, III:n ja katkaistun VIII:n aktiivisuussuunnat sekä substraatit. Eksonukleaasi I hajottaa ssDNA:ta 3'-päistä, eksonukleaasi III dsDNA:ta 3'-päistä ja katkaistu eksonukleaasi VIII dsDNA:ta 5'-päistä. [47; 48; 49].

Koettimia oli käytetty reaktioissa 10 μ M konsentraatiossa. Entsyymit sekä koettimet olivat laimennettu Tris-EDTA (TE) -puskuriin ja esiseoksissa oli käytetty eksonukleaasien mukana toimitettuja kaupallisia puskureita. Eksonukleaasien aktiivisuussuunnat, ensisijaiset substraatit ja puskureiden koostumukset on koottu taulukkoon 2.

Taulukko 2. Kaupallisten eksonukleaasientsyymien aktiivisuussuunnat, ensisijaiset substraatit ja käytettyjen puskureiden koostumukset [47; 48; 49].

entsyymi valmistajan tuotekoodi	aktiivisuussuunta ja ensisijainen substraatti	puskuri	1X puskurin koostumus
eksonukleaasi I M0293S	3' – 5' ssDNA	eksonukleaasi I reaktiopuskuri, pH 9,5	67 mM glysiini-KOH 6,7 mM MgCl ₂ 10 mM β-ME
eksonukleaasi III M0206S	3' – 5' dsDNA	NEBuffer™ 1 - puskuri, pH 7	10 mM Bis-tris-propaani-HCl 10 mM MgCl ₂ 1 mM DTT
eksonukleaasi VIII, katkaistu M0545S	5' – 3' dsDNA	NEBuffer™ 4 - puskuri, pH 7,9	50 mM kaliumasetaatti 20 mM trisasetaatti 10 mM magnesiumasetaatti 1 mM DTT

Kuvassa 7 on esimerkki 3'-häntäistä koetinta sekä eksonukleaasi I:stä sisältävästä reaktiosta. qPCR-kuvaajalta ei voida havaita nollatasosta poikkeavaa fluoresenssin muutosta reaktioissa, joissa eksonukleaasientsyymiaktiivisuuksien määrät ovat 0,02 ja 0,2 U. 2 U:n aktiivisuudella reaktion eteneminen, *Molecular Beacon* -koettimien pilkkoutuminen eksonukleaasien vaikutuksesta, havaitaan selkeästi syklille 40 asti, jonka jälkeen reaktiotuotteiden vähentyessä fluoresenssitaso tasaantuu. 20 U:n aktiivisuudella reaktio on edennyt jo lähes loppuun qPCR-ajon alussa, fluoresenssitaso on hyvin korkea eikä kuvaajalta voida havaita reaktion etenemistä. Eri entsyymimäärillä oli saavutettu toisistaan poikkeavia päätepisteiden RFU-arvoja.



Kuva 7. Esimerkki qPCR-reaktiosta eksonukleaasien määrittämiseksi *Molecular Beacon* -koettimilla. Fluoresenssinmuutos on kuvattu syklien funktiona. Reaktioissa oli käytetty eksonukleaasi I:stä 3'-hätäisen koettimen kanssa. Reaktiot 0,02 ja 0,2 U:n määrillä jäävät nollassa, 2 U:n aktiivisuudella havaitaan reaktion eteneminen eri sykleillä, kunnes fluoresenssi tasaantuu reaktiokomponenttien vähentyessä. 20 U:n aktiivisuudella reaktiot ovat edenneet lähes loppuun ennen ajon aloitusta, sillä fluoresenssitaso on hyvin korkea eikä reaktioiden etenemistä voida havaita kuvaajalta.

Taulukkoon 3 on koottu alustavien tutkimusten tulosten perusteella arvioidut optimaaliset entsyymimäärät, joilla oli saatu aikaan sopiva fluoresenssitason muutos käytettäessä kolmea eri *Molecular Beacon* -koetinta yksittäin tai niiden seoksena. Isothermaalinen qPCR-ajo oli koostunut 120:stä minuutin syklistä 37 °C:ssa. Optimaaliset määrät olivat vaihdelleet eri entsyymien sekä koettimien kesken.

Taulukko 3. Alustavien tutkimusten perusteella määritetyt optimaaliset entsyymimäärät *Molecular Beacon* -koettimia sisältäviin qPCR-reaktioihin.

	seos (U)	tylppä (U)	3'-häntä (U)	5'-häntä (U)
eksonukleaasi I	2	20	2	20
eksonukleaasi III	0,1	0,1	1	0,1
eksonukleaasi VIII	1	10	10	1

Kaupalliset eksonukleaasit oli analysoitu myös radioaktiivisella menetelmällä. Reaktioissa oli käytetty tritium-leimattua *E. coli*-bakteerin ss- ja dsDNA:ta substraattina. Näytteitä oli inkuboitu 4 h 37 °C:ssa. Aktiivisuusprosentit oli laskettu vertaamalla näytteiden aktiivisuuksia totaaleihin eli reaktioihin, joissa saostajan (TCA) sijasta käytettiin Milli-Q-vettä [46]. Tulokset on koottu taulukkoon 4.

Taulukko 4. Radioaktiivisella menetelmällä analysoitujen näytteiden tulokset. Analyseissä oli käytetty yksi- ja kaksijuosteista DNA:ta.

entsyymi	U	aktiivisuus (%)
eksonukleaasi I	9	24,9
	0,9	1,0
	0,09	0,3
eksonukleaasi III	45	87,4
	4,5	30,5
	0,45	5,8
	0,045	0,6
eksonukleaasi VIII	4,5	18,6
	0,45	0,2
	0,045	0,1

E. coli-bakteerin solulysaatin supernatantin eksonukleaasiaktiivisuutta oli tutkittu myös yhden kromatografisen puhdistusvaiheen jälkeen radioaktiivisella menetelmällä käyttäen ss- ja dsDNA-substraattia. Laimentamattomia näytteitä oli lisätty 5 µl reaktioihin. Saadut aktiivisuudet olivat olleet 19–120 %.

6 Käytännön työ ja tulosten tarkastelu

Opinnäytetyössä tutkittiin, onko mahdollista määrittää proteiinipitoisista näytteistä *E. coli* -bakteerin eksonukleaasien aktiivisuutta *Integrated DNA Technologies (IDT)* -yrityksen *Molecular Beacon* -koettimien avulla. Mikäli näyte sisältäisi eksonukleaaseja, ne pystyisivät pilkkomaan koettimien juosteita vapaista päistä, joko irrottamalla fluoroforin, sammuttajan tai molemmat, ja näin havaittaisiin fluoresenssimuutos qPCR-ajon aikana. Koettimien oli tarkoitus säilyttää hiuspinnimuotonsa reaktioiden aikana. Reaktiolämpötilana käytettiin 37 °C. Käytössä oli kolme erilaista koetinta, tylppäpäinen (IDT, ref. 226328204) ja koettimet 3'- (IDT, ref. 226328206) sekä 5'-hännällä (IDT, ref. 226328205). Detektointitasoa tutkittiin aluksi kaupallisten *New England BioLabs* -yrityksen tuottamien eksonukleaasi I:n (M0293S), eksonukleaasi III:n (M0206S) sekä katkaistun eksonukleaasi VIII:n (M0545S) avulla. Kaupallisten entsyymien valinta perustui siihen, että näillä oli tehty yrityksessä jo aiempia tutkimuksia vuosina 2018–2019.

Kaupallisten eksonukleaasien mukana toimitettujen puskureiden fluoresenssitasoa verrattiin yrityksen omassa Taq-puskurissa (10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl) tuotettuihin reaktioihin. Tämän vertailun avulla haluttiin tutkia kolmen eri puskurin korvaamismahdollisuutta yhdellä puskurilla. *Molecular Beacon* -koetinseokselle määritettiin nollatasoa sekä optimaalista käyttökonsentraatiota titrauksen avulla. Taq-polymeraasin 5'-eksonukleaasiaktiivisuuden osoittamista tutkittiin reaktioiden avulla, joissa koettimia käytettiin yksittäin sekä niiden seoksena. Vertailukohteena reaktiot tuotettiin myös RT-entsyymien kanssa. Rekombinanttiproteiinin tuottosolun lymaatin vaikutusta reaktioihin tutkittiin lämpökäsitellyn sekä lämpökäsittelemättömän supernatantin avulla. Reaktioihin lisättiin myös kaupallisia eksonukleaaseja sekä Taq-polymeraasia, ja tämän avulla haluttiin selvittää, pystytäänkö entsyymilisäykset havaitsemaan lymaattia sisältävistä reaktioista. Lopuksi tutkittiin ioninvaihtokromatografian avulla tuotettujen fraktioiden eksonukleaasiprofiileja, sekä fluoresoivalla että radioaktiivisella menetelmällä. Työnkulku on kuvattu myös vuokaaviossa (kuva 8).



Kuva 8. Vuokaavio opinnäytetyön etenemisestä.

Näytelaimennokset valmistettiin Taq-puskuriin ja *Molecular Beacon* -koettimien laimennokset TE-puskuriin. Koetinseos valmistettiin yhdistämällä koetinlaimennoksia (10 μM) samassa suhteessa yhteen. Yksittäisten koettimien konsentraatio seoksessa oli 3,33 μM . Kaikki reaktiot tehtiin CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System -laitteilla. Näytteet pipetoitiin 96-kuoppalevyille kylmäblokin päällä ja kuoppalevyt sentrifugoitiin ennen qPCR-ajoa. Ajon reaktiolämpötila oli 37 °C ja reaktioaika 120–240 minuuttia, jonka aikana fluoresenssitason muutosta mitattiin minuutin sykleissä. Tuloksia tarkasteltiin Bio-Rad CFX Manager (3.1) -ohjelman avulla, käyttäen *No Baseline subtraction* -asetusta. Kuvaajissa fluoresenssin muutos on esitetty syklien funktiona, yksi sykli vastaa minuutin jaksoa. Projektin aikana syntynyt biologinen ja kemiallinen jäte käsiteltiin ja hävitettiin yrityksen ohjeiden mukaisesti.

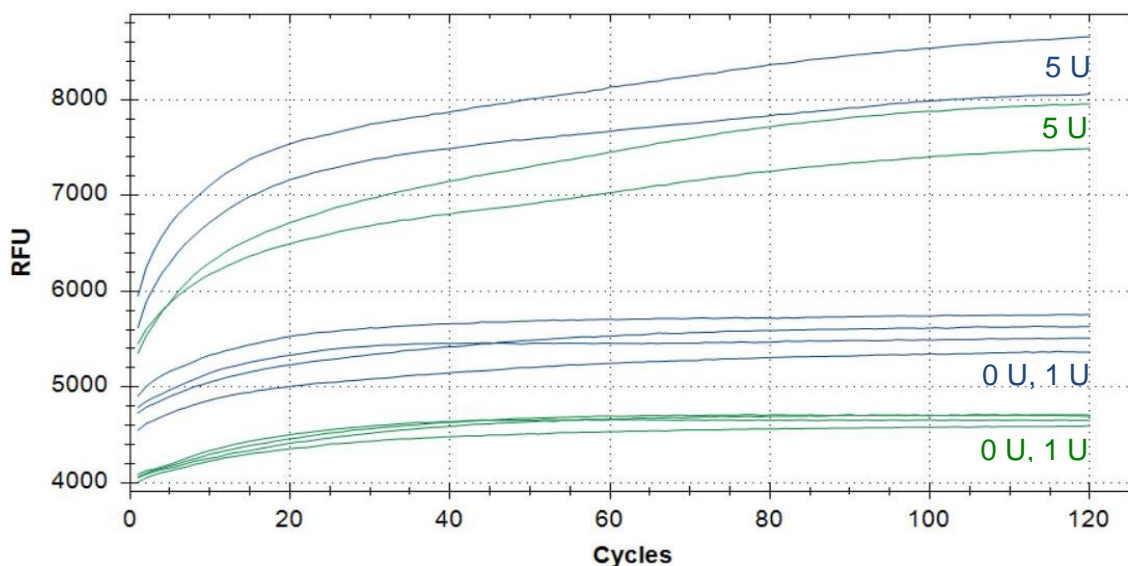
6.1 Puskureiden vaikutus fluoresenssitason

Kaupallisia eksonukleaaseja sisältävien reaktioiden fluoresenssitason eroa tutkittiin eksonukleaasien mukana toimitettujen puskurien sekä Taq-puskurin välillä. Tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää olisiko mahdollista korvata kaupalliset puskurit yhdellä puskurilla. *Molecular Beacon* -koettimia käytettiin seoksena tässä analyysissä. Entsyymeistä tehtiin rinnakkaiset laimennokset kahdessa eri konsentraatiossa, negatiivisena kontrollina käytettiin Milli-Q-vettä. Esiseoksia valmistettiin neljä. Tarkempi koostumus on esitetty taulukossa 5. qPCR-ajo koostui 120:stä minuutin mittaisesta syklistä.

Taulukko 5. Puskureiden vaikutuksen analysoimiseksi valmistetut esiseokset. Entsyymien tilavuudet on huomioitu reaktiutilavuudessa.

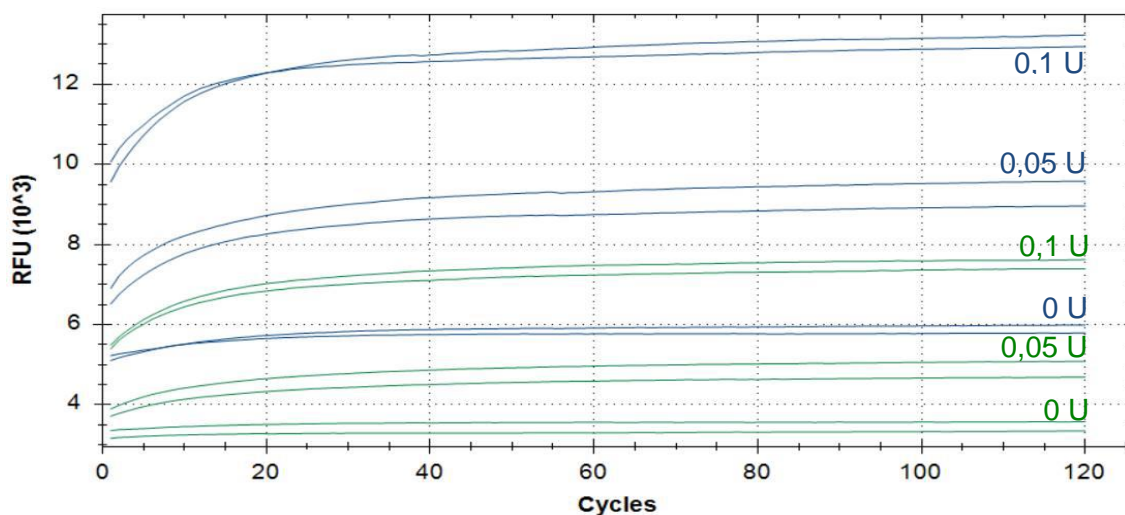
komponentti	konsentraatio reaktiossa	tilavuus (µl)
10X eksonukleaasi I reaktiopuskuri/ 10X NEBuffer™ 1 -puskuri/ 10X NEBuffer™ 4 -puskuri/ 10X Taq -puskuri	1X	2
<i>Molecular Beacon</i> -seos 3,33 µM	0,17 µM x 3	1
Milli-Q-vesi	lopputilavuuteen	20
eksonukleaasi I 0,5 ja 2,5 U	1 ja 5 U	2
eksonukleaasi III 0,025 ja 0,05 U	0,05 ja 0,1 U	
eksonukleaasi VIII 0,5 ja 5 U	1 ja 10 U	

Kuvissa 9–11 on esitetty qPCR-ajojen tulokset. Reaktiot Taq-puskurissa on merkitty kuviin sinisellä ja reaktiot kaupallisissa puskureissa vihreällä. Kuvassa 9 on qPCR-kuvaaja eksonukleaasi I:n tuloksista. Reaktioissa käytetyt entsyymimäärät olivat 1 U sekä 5 U. Suuremmalla määrällä havaitaan selkeä fluoresenssitason muutos kumpaakin puskuria käytettäessä.



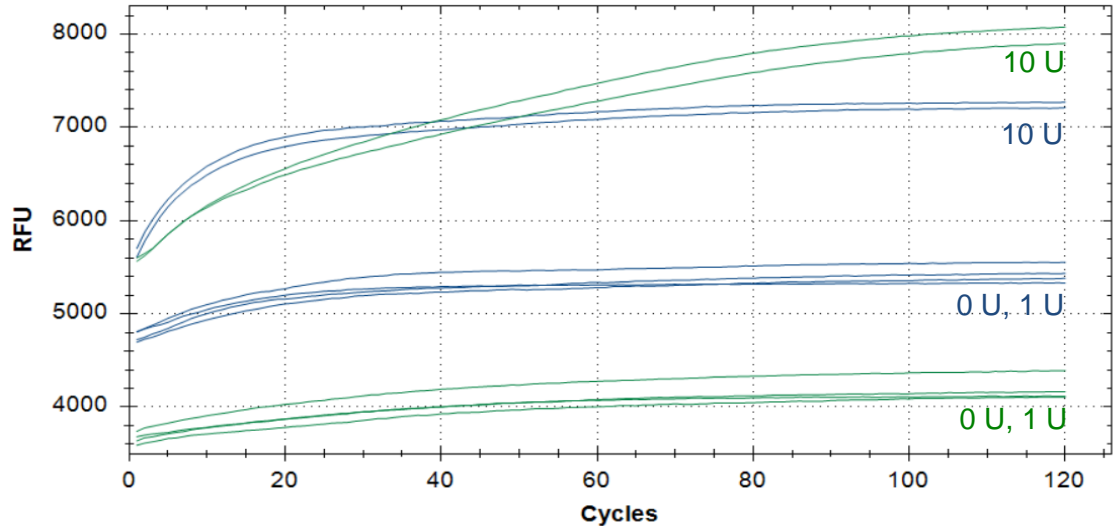
Kuva 9. qPCR-kuvaaja eksonukleaasi I:stä sisältävistä reaktioista. Entsyymimäärät ovat esitetty reaktiokäyrien yhteydessä. Reaktiot eksonukleaasi I:n reaktiopuskurissa on merkitty vihreällä ja reaktiot Taq-puskurissa sinisellä. 5 U:lla saavutetaan selkeä nollatasosta poikkeava fluoresenssitason muutos molemmilla puskureilla.

Eksonukleaasi III:n qPCR-ajon tulokset ovat esitetty kuvassa 10. Reaktioihin käytetyt entsyymimäärät olivat 0,05 U sekä 0,1 U. Eri puskureissa tuotetut reaktiot poikkeavat nollatasosta kummallakin entsyymimäärällä.



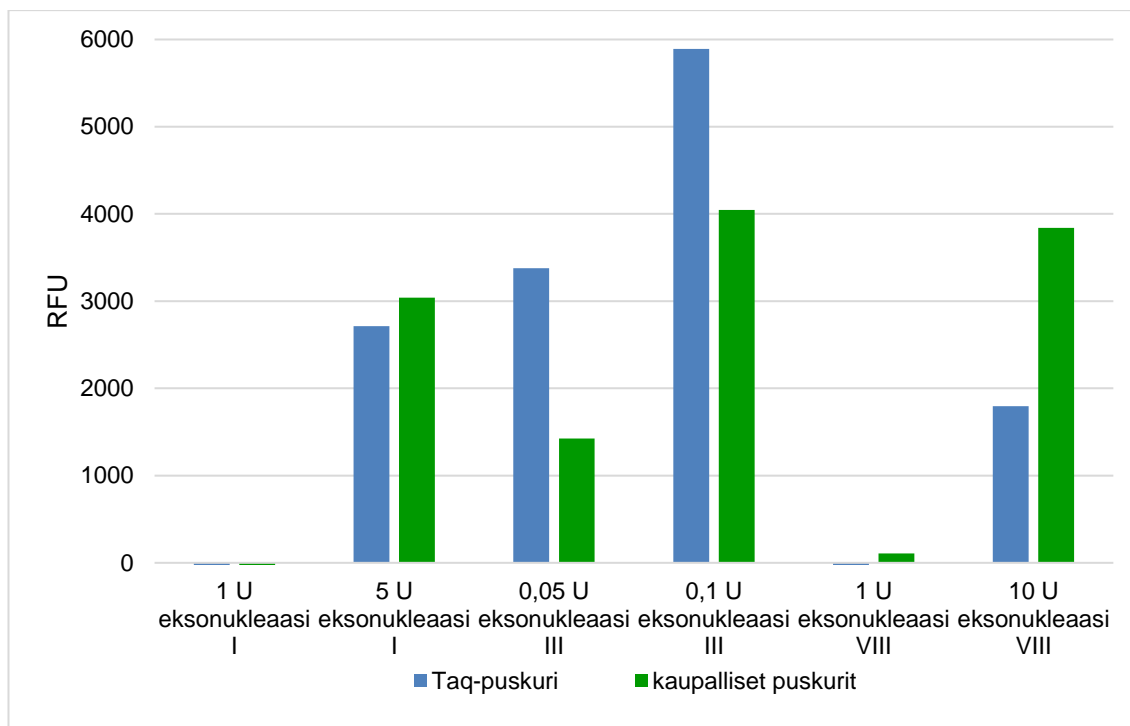
Kuva 10. qPCR-kuvaaja Eksonukleaasi III:ta sisältävistä reaktioista. Vihreällä on merkitty reaktiot kaupallisessa NEBuffer™ 1 -puskurissa ja sinisellä reaktiot Taq-puskurissa. Entsyymimäärät reaktioissa olivat 0,05 U ja 0,1 U. Kummallakin entsyymimäärällä havaitaan selkeä fluoresenssitason muutos.

Kuvassa 11 on esitetty eksonukleaasi VIII:n qPCR-kuvaaja. Reaktioissa entsyymimäärät olivat 1 U ja 10 U. Pienemmällä määrällä reaktiot jäävät nollassolle molempien puskureiden osalta, mutta 10 U:lla havaitaan selkeä fluoresenssitason nousu.



Kuva 11. qPCR-kuvaaja eksonukleaasi VIII:ta sisältävistä reaktioista. Vihreällä on merkitty reaktiot NEBuffer™ 4 -puskurissa ja sinisellä reaktiot Taq-puskurissa. Pienemmällä entsyymimäärällä reaktiot jäävät nollassolle. 10 U:lla saavutetaan selkeä fluoresenssitason muutos.

Kaupallisia puskureita käytettäessä reaktioiden lähtötasot ovat fluoresenssitasoltaan matalammat, kuin Taq-puskurissa tuotetut reaktiot. Kaaviossa (kuva 12) on havainnollistettu puskureiden päätepisteiden fluoresenssitasojen eroa, kun negatiivisten kontrollien RFU-arvojen keskiarvo on vähennetty reaktioiden RFU-arvoista.



Kuva 12. Reaktioiden päätepisteiden ero kaupallisten puskureiden ja Taq-puskurin välillä käytettäessä eri entsyymimääriä.

Eksonukleasi I:n detektoidut reaktiot tuottavat lähes yhtä suuren muutoksen fluoresenssitason. Eksonukleasi III:n reaktiot Taq-puskurissa tuottavat suuremman fluoresenssitason nousun, kuin reaktiot kaupallisessa puskurissa. Entsyymien eri määrien vaikutus havaitaan kummallakin puskurilla. Eksonukleasi VIII:n reaktiot kaupallisessa puskurissa nostavat fluoresenssitason korkeammalle, kuin reaktiot Taq-puskurissa.

Käytetty *Molecular Beacon* -konsentraatio oli matalampi, kuin alustavissa tutkimuksissa. Entsyymilaimennokset tehtiin TE-puskurin sijasta Taq-puskuriin. Alustavien tutkimusten perusteella optimaaliset määrät kaupallisille entsyymeille olivat eksonukleasi I:lle 2 U, III:lle 0,1 U ja VIII:lle 1 U käytettäessä koetinseosta 10 μM konsentraatiossa. Näiden tutkimusten perusteella käytettäessä koetinseosta 0,17 μM konsentraatiossa optimaaliset entsyymimäärät ovat 5 U eksonukleasi I:stä, 0,1 ja 0,05 U eksonukleasi III:ta ja 10 U eksonukleasi VIII:ta. Saatujen tulosten perusteella reaktiot voidaan tuottaa kaupallisissa puskureissa ja Taq-puskurissa yhtä onnistuneesti. Tulevissa reaktioissa tullaan käyttämään Taq-puskuria.

6.2 *Molecular Beacon* -seoksen titraus

Koetinseoksesta tehtiin taulukon 6 mukaiset laimennokset titrausta varten. Titrauksen avulla määritettiin koettimien nollatasoa sekä käyttökonsentraatiota. Reaktioihin lisättiin myös 10 ja 50 U Taq-polymeraasia. Lisäyksen avulla oli tarkoitus selvittää, voidaanko Taq-polymeraasin 5'-eksonukleaasiaktiivisuus havaita reaktioista.

Taulukko 6. *Molecular Beacon* -seoksesta valmistetut laimennokset titrausta varten. Laimennokset tehtiin Taq-puskuriin.

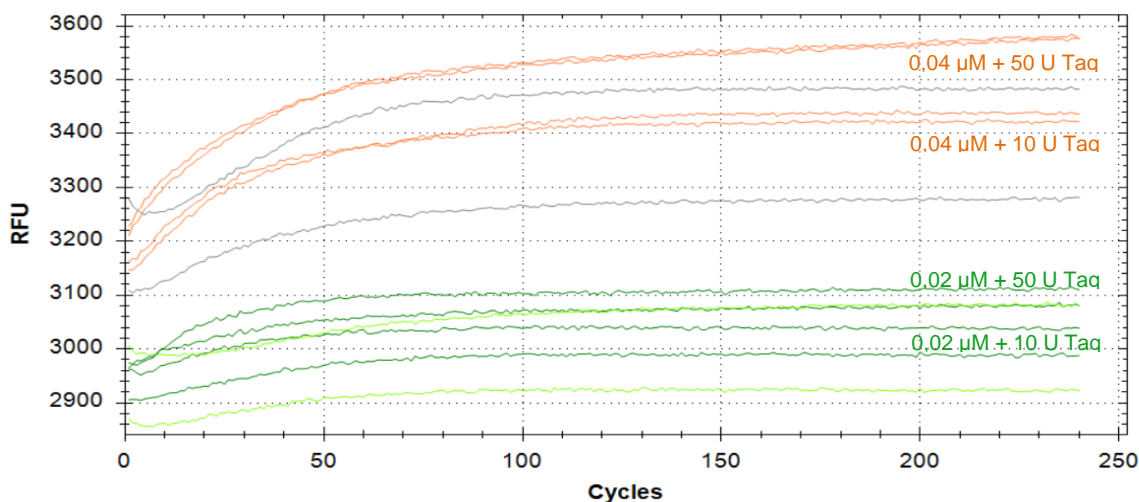
<i>Molecular Beacon</i> -seos	
laimennos	yksittäisten koettimien konsentraatio
laimentamaton	3,33 μM
1:2	1,67 μM
1:4	0,83 μM
1:10	0,33 μM

Esiseos valmistettiin vain Milli-Q-vedestä ja Taq-puskurista. Reaktiokomponentit ovat esitetty taulukossa 7. Negatiivisena kontrollina käytettiin Taq-puskuria entsyymin sijaan.

Taulukko 7. Esiseos *Molecular Beacon* -koetinseoksen titraukseen. Koetinseoksen sekä entsyymilaimennosten tilavuudet ovat huomioitu lopputilavuudessa.

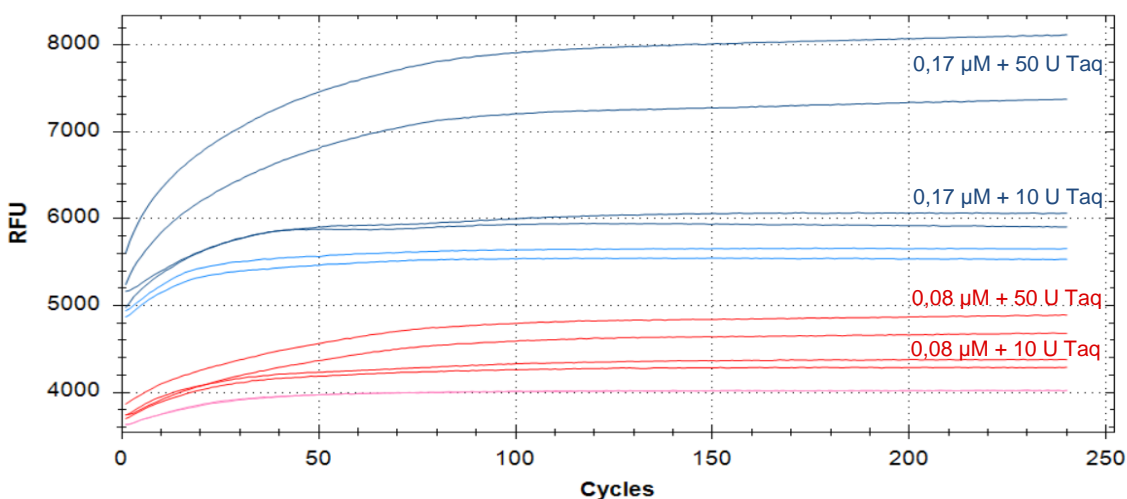
komponentti	konsentraatio reaktiossa	tilavuus (μl)
10X Taq -puskuri	1X	2
Milli-Q-vesi	lopputilavuuteen	20
<i>Molecular Beacon</i> -seos		
3,33 μM	0,17 μM x 3	1
1,67 μM	0,08 μM x 3	
0,83 μM	0,04 μM x 3	
0,33 μM	0,02 μM x 3	
Taq-polymeraasi 10 U/ μl	10 U	1
Taq-polymeraasi 50 U/ μl	50 U	

Kuvassa 13 on esitetty *Molecular Beacon* -seoksen reaktiot 1:10- (0,02 μM , tummanvihreä) ja 1:4- (0,04 μM , oranssi) laimennettuina. Näitä vastaavat negatiiviset kontrollit on merkitty vaaleanvihreällä (1:10) ja harmaalla (1:4).



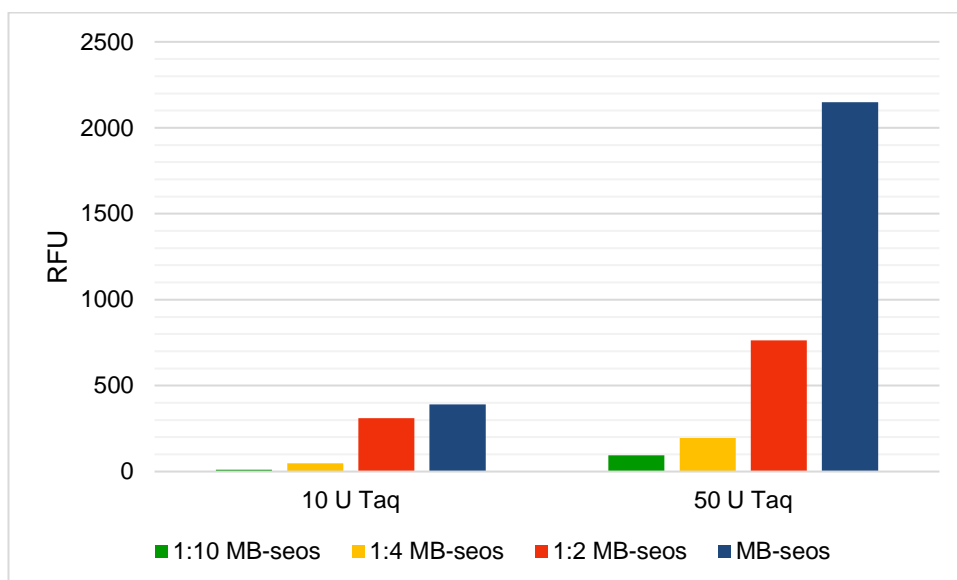
Kuva 13. *Molecular Beacon* -seoksen titraus. Tummanvihreällä 1:10-laimennettu koetinseos ja vaaleanvihreällä sitä vastaavat negatiiviset kontrollit. Oranssilla 1:4-laimennettu koetinseos ja harmaalla sitä vastaavat negatiiviset kontrollit. Taq-polymeraasin määrät reaktioissa olivat 10 U ja 50 U.

Reaktioiden fluoresenssitasot jäivät nollatasolle, lukuun ottamatta reaktioita, jotka sisälsivät 50 U Taq-polymeraasia sekä 1:4-laimennettua koetinseosta (oranssi). Kuvassa 14 on esitetty reaktiot, jossa koetinseosta käytettiin 1:2-laimennettuna (0,08 μM , punainen) ja laimentamattomana (0,17 μM , sininen). Negatiiviset kontrollit on merkitty vaaleanpunaisella ja vaaleansinisellä.



Kuva 14. Koetinseoksen titraus. Punaisella 1:2-laimennettu koetinseos ja vaaleanpunaisella sitä vastaavat negatiiviset kontrollit. Tummansinisellä laimentamaton koetinseos ja vaaleansinisellä sitä vastaavat negatiiviset kontrollit. Taq-polymeraasin määrät reaktioissa olivat 10 U ja 50 U.

Sekä 1:2-laimennetulla että laimentamattomalla koetinseoksella saavutetaan selkeä fluoresenssitason muutos kummankin polymeraasimäärän kanssa. Laimentamattomalla koetinseoksella päätepisteiden RFU-arvojen välillä on selkeämpi ero. Kuvassa 15 on esitetty kaavio joka visualisoi koetinseosten fluoresenssitason nousua eri konsentraatioissa. Reaktioiden päätepisteiden RFU-arvoista on vähennetty negatiivisten kontrollien keskiarvot.



Kuva 15. Koetinseoksien laimennosten fluoresenssitasot, kun nollataso vähennettiin päätepisteiden RFU-arvoista.

1:2-laimennettuna ja laimentamattomana saavutettiin selkeä fluoresenssitason nousu molemmilla entsyymimäärillä. Laimentamattomalla seoksella saavutetaan selkeämpi ero eri entsyymimäärillä.

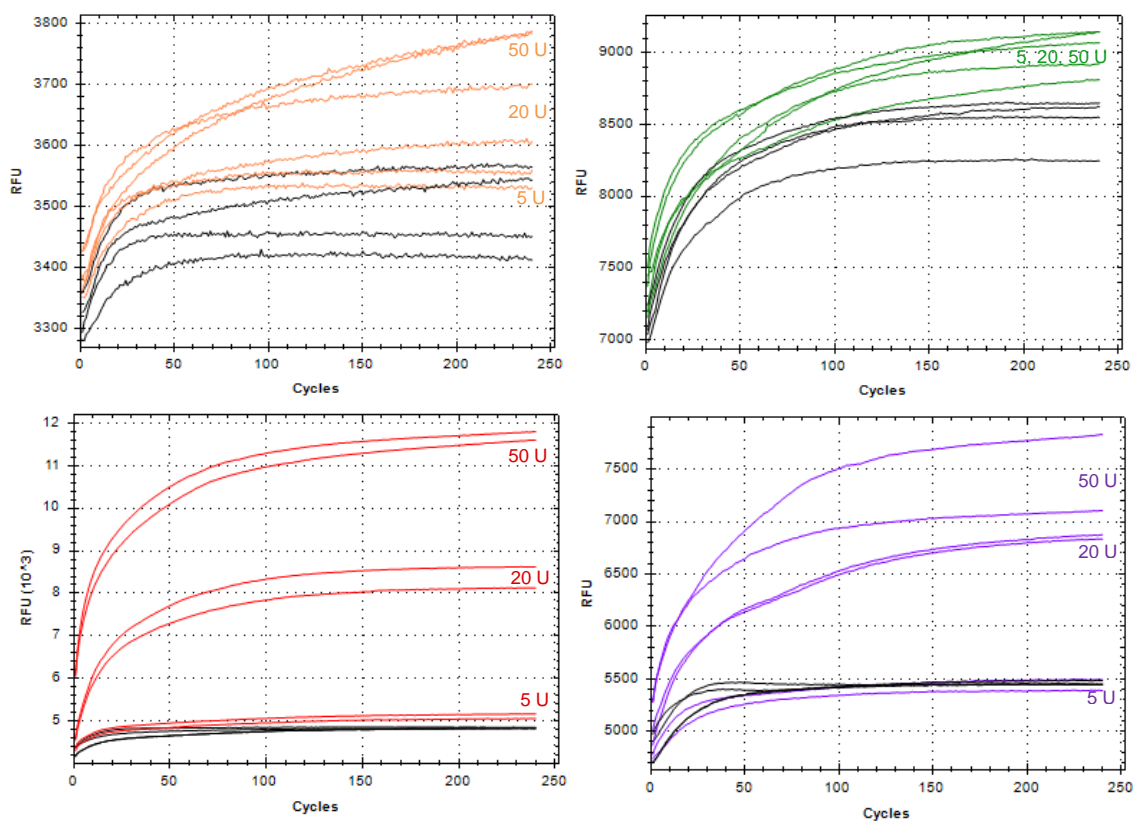
6.3 Koettimien vertailu yksittäin sekä seoksena entsyymien kanssa

Koettimien vertailua varten valmistettiin neljä erilaista esiseosta, jotka sisälsivät *Molecular Beacon* -koettimia yksittäin sekä seoksena (taulukko 8). Näytteinä käytettiin 5, 20 sekä 50 U Taq-polymeraasia sekä RT-entsyymiä. Entsyymilisäyksillä haluttiin selvittää, voidaanko Taq-polymeraasin 5'-eksonukleaasiaktiivisuutta osoittaa koettimien avulla. RT-entsyymillä ei ole vastaavaa aktiivisuutta, joten fluoresenssitason ei pitäisi nousta reaktioiden aikana. Negatiivisena kontrollina käytettiin Milli-Q-vettä.

Taulukko 8. Koettimien vertailua varten valmistetut esiseokset. Entsyymien tilavuudet on huomioitu lopputilavuudessa.

komponentti	konsentraatio reaktiossa	tilavuus (μl)
10X Taq -puskuri	1X	2
<i>Molecular Beacon</i> 5'-hännällä 10 μM/ <i>Molecular Beacon</i> 3'-hännällä 10 μM/ <i>Molecular Beacon</i> tylppäpäinen 10 μM/ <i>Molecular Beacon</i> -seos 3,33 μM	0,5 μM 0,5 μM 0,5 μM 0,17 μM x 3	1
Milli-Q-vesi	lopputilavuuteen	20
Taq-polymeraasi/RT-entsyymi 2,5, 10 ja 25 U/μl	5, 20 ja 50 U	2

Kuvassa 16 on esitetty qPCR-kuvaaja reaktioista, jotka sisältävät Taq-polymeraasia 5, 20 sekä 50 U. Tylppäpäistä koetinta sisältävät reaktiot on merkitty oranssilla, 3'-hännäistä koetinta sisältävät vihreällä, 5'-hännäistä punaisella ja koetinseosta sisältävät reaktiot violetilla. Negatiiviset kontrollit on merkitty mustalla.

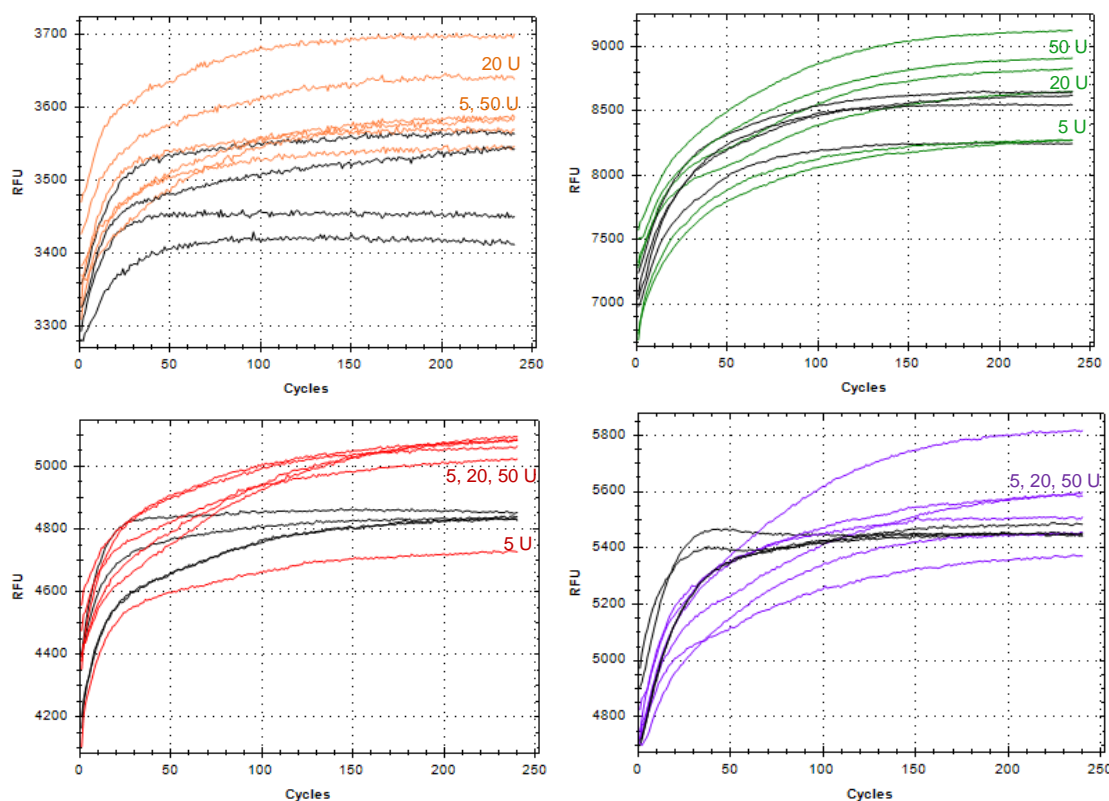


Kuva 16. qPCR-kuvaajat koettimien vertailusta. Reaktiot sisälsivät Taq-polymeraasia 5, 20 ja 50 U. Reaktiot ovat merkitty seuraavasti: tylppöpäinen koetin oranssilla, 3'-häntäinen vihreällä, 5'-häntäinen punaisella ja koetinseos violetilla. Negatiiviset kontrollit on merkitty mustalla.

Tylppöpäisen ja 3'-häntäisen koettimen kanssa fluoresenssitason nousu on huomattavasti matalampaa, kuin 5'-häntäisen koettimen sekä koetinseoksen kanssa. 3'-häntäisen koettimen kuvaajasta ei voida erottaa eri entsyymimääriä päätepisteiden fluoresenssitasoista. Syklin 100 kohdalla havaitaan eriäviä RFU-arvoja, mutta reaktiokäyrien erot eivät vastaa eri entsyymimääriä. 5'-häntäisellä koettimella ja koetinseoksella saavutetaan selkeät fluoresenssitason muutokset ja reaktiot eri entsyymimäärillä poikkeavat fluoresenssitasoltaan toisistaan. Koetinseoksessa yksittäisten *Molecular Beacon* -koettimien konsentraatiot ovat pienemmät kuin reaktioissa, joissa koettimia käytettiin yksittäin.

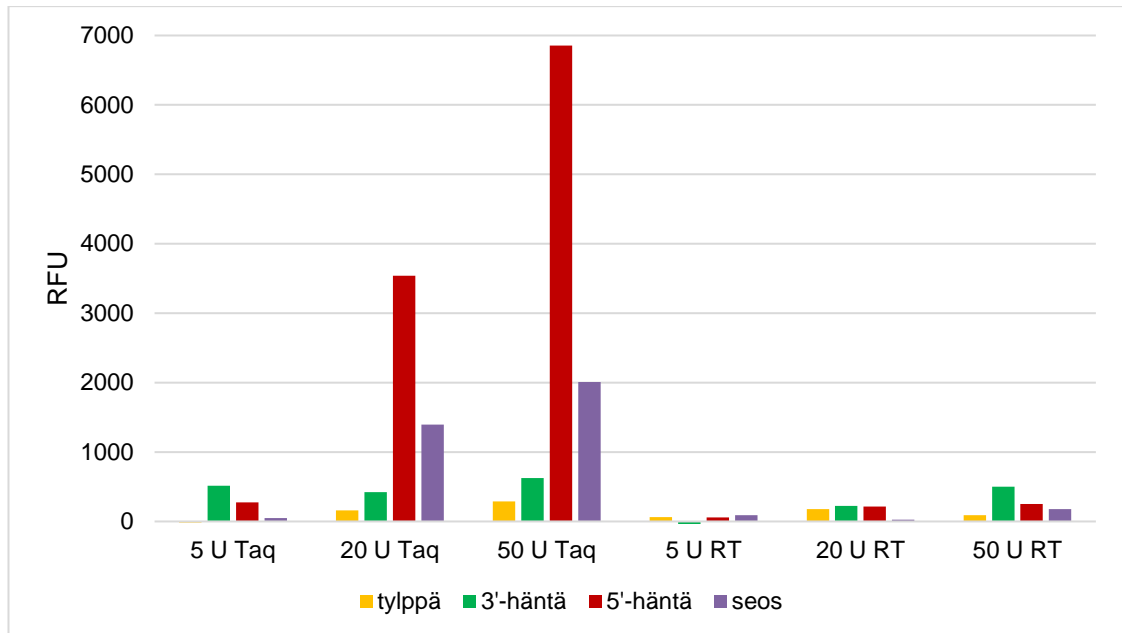
Kuvassa 17 on esitetty 5, 20 ja 50 U RT-entsyymiä sisältävien reaktioiden tulokset qPCR-ajosta. Koettimet on merkitty kuvaan seuraavasti: tylppöpäinen koetin oranssilla,

3'-hätäinen vihreällä, 5'-hätäinen punaisella ja koetinseos violetilla. Negatiiviset kontrollit on merkitty mustalla.



Kuva 17. qPCR-kuvaajat *Molecular Beacon* -koettimien vertailusta. Reaktioiden RT-entsyymimäärät olivat 5, 20 sekä 50 U. Oranssilla on merkitty tylppäpäisen koettimen reaktiot, vihreällä 3'-hätäisen, punaisella 5'-hätäisen ja violetilla koetinseoksen. Negatiiviset kontrollit on merkitty mustalla.

RT-entsyymiä sisältävien reaktioiden kuvaajat ovat hyvin samankaltaisia yksittäisillä koettimilla sekä koetinseoksella. Pieni fluoresenssitason nousu on havaittavissa suuremmilla entsyymimäärillä. Nollatasosta poikkeava fluoresenssitaso on lähes samansuuruinen kuin Taq-polymeraasia sisältävien reaktioiden, joissa käytettiin tylppäpäistä tai 3'-hätäistä koetinta. Kuvassa 18 on havainnollistettu eri koettimien sekä niiden seoksen päätepisteiden fluoresenssitason eroja Taq-polymeraasia sekä RT-entsyymiä käytettäessä. Negatiivisten kontrollien nollataso on vähennetty reaktioiden RFU-arvoista. Kuvasta nähdään Taq-polymeraasin fluoresenssitason olevan huomattavasti korkeammat kuin RT-entsyymien.



Kuva 18. Fluoresenssitason ero koettimien välillä reaktioiden sisältäessä Taq-polymeraasia ja RT-entsyymiä eri määrinä.

Taq-polymeraasin fluoresenssitason kasvatavat lineaarisemmin eri laimennosten välillä käytettäessä koetinseosta tai 5'-häntäistä koetinta. Reaktiot 5'-häntäisen koettimen kanssa aiheuttavat lähes kolminkertaisen fluoresenssitason nousun verrattuna koetinseokseen. *Molecular Beacon* -seoksessa 5'-häntäisen koettimen osuus on kolmannes. Koettimien reaktiot RT-entsyymien kanssa eivät tuota Taq-polymeraasin kaltaista suurta fluoresenssitason muutosta. Näiden tulosten perusteella voidaan todeta Taq-polymeraasin 5'-eksonukleaasiaktiivisuuden osoittamisen olevan mahdollista sekä 5'-häntäisellä koettimella että koetinseoksella.

6.4 *E. coli* -bakteerin lyaatin supernatantin vaikutus reaktioissa

Tuottosolun eksonukleaasiaktiivisuuden vaikutusta qPCR-reaktioihin tutkittiin sekä lämpökäsittelemättömän että lämpökäsitellyn lyaatin supernatantin avulla. Reaktioissa käytettiin *Molecular Beacon* -seosta ja niihin lisättiin myös Taq-polymeraasia, eksonukleaasi I:stä ja III:ta. Entsyymilisyöksillä tutkittiin, onko mahdollista havaita Taq-polymeraasin 5'-eksonukleaasiaktiivisuuden ja kaupallisten eksonukleasientsyymien vaikutusta reaktioihin.

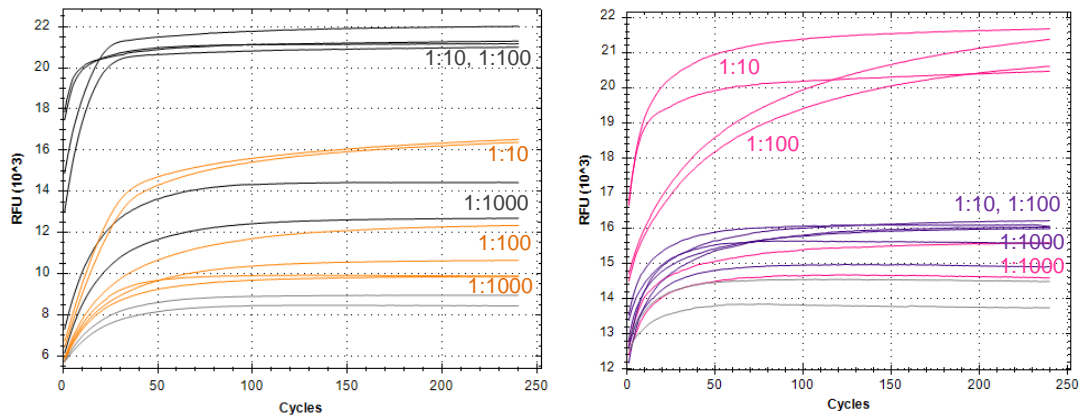
Syväjäässä olleesta *E. coli* -bakteerin solumassasta lohkaistiin pala, joka suspensoitiin Tris-HCl-pohjaiseen puskuriin. Lisätty puskurimäärä oli 1 ml/mg solumassaa. Homogeeninen solususpensio sonikoitiin Hielscher UP200Ht - ultraäänihomogenisaattorilla, käyttäen S26d2-kärkeä (10 * 10 s, pulssi 90 %, amplitudi 80 %). Lysaatti sentrifugoitiin (10 min, 4 °C, 13 300 rpm) ja supernatantti kerättiin talteen. Puolet supernatantista lämpökäsiteltiin lämpöblokillä (80 °C, 22 min), jäähdytettiin jäällä ja sentrifugoitiin uudelleen (10 min, 4 °C, 13 300 rpm). Jäljelle jäänyt supernatantti kerättiin talteen. Supernatantit analysoitiin 1:10-, 1:100- ja 1:1000-laimennettuina. Laimennokset tehtiin Taq-puskuriin.

Esiseokset valmistettiin taulukon 9 mukaan. Ajot jakautuivat kahdelle eri päivälle. Kaupallisten eksonukleaasien kanssa negatiivisena kontrollina käytettiin Milli-Q-vettä ja muissa reaktioissa negatiivisena kontrollina toimi Taq-puskuri. qPCR-ajoaika oli 240 minuuttia.

Taulukko 9. Esiseokset *E. coli* -bakteerin lysaatin supernatantin vaikutuksen analysoimiseksi. Näytetilavuus on huomioitu lopputilavuudessa.

komponentti	konsentraatio reaktiossa	tilavuus (µl)
10X Taq -puskuri	1X	2
<i>Molecular Beacon</i> -seos 3,33 µM	0,17 µM x 3	1
eksonukleaasi I 2,5 U/µl eksonukleaasi III 0,05 U/µl Taq-polymeraasi 20 U/µl ilman entsyymiä	2,5 U 0,05 U 20 U -	1
Milli-Q-vesi	lopputilavuuteen	20
lysaatin supernatantti	-	2

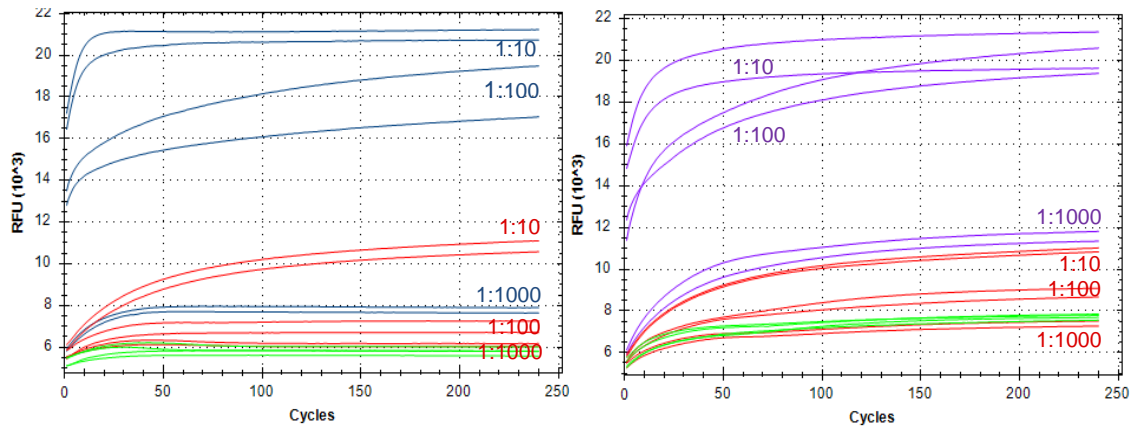
Kuvassa 19 on kaupallisten eksonukleaasientsyymien qPCR-ajojen tulokset. Vasemmalla puolella kuvassa on eksonukleaasi I:n tulokset, reaktioissa entsyymimäärä oli 2,5 U. Lämpökäsittämättömän lysaatin supernatantin reaktiot on merkitty mustalla ja lämpökäsittelyyn oranssilla. Oikealla puolella kuvassa on vastaavat reaktiot eksonukleaasi III:n osalta 0,05 U:n entsyymimäärällä. Reaktiot lämpökäsittelyyn lysaatin kanssa on merkitty vaaleanpunaisella ja lämpökäsittelyä lysaattia sisältävät reaktiot on merkitty violetilla. Negatiiviset kontrollit on merkitty vaaleanharmaalla.



Kuva 19. Vasemmalla puolella kuvassa on eksonukleaasi I:n (2,5 U) reaktiot lysaattien kanssa. Kuvassa mustalla on reaktiot lämpökäsittelmättömän ja oranssilla lämpökäsitellyn lysaatin kanssa. Oikealla puolella on eksonukleaasi III:n (0,01 U) qPCR-kuvaaja, jossa reaktiot lämpökäsittelmättömän lysaatin kanssa on merkitty vaaleanpunaisella ja lämpökäsitellyn violetilla. Negatiiviset kontrollit on merkitty vaaleanharmaalla.

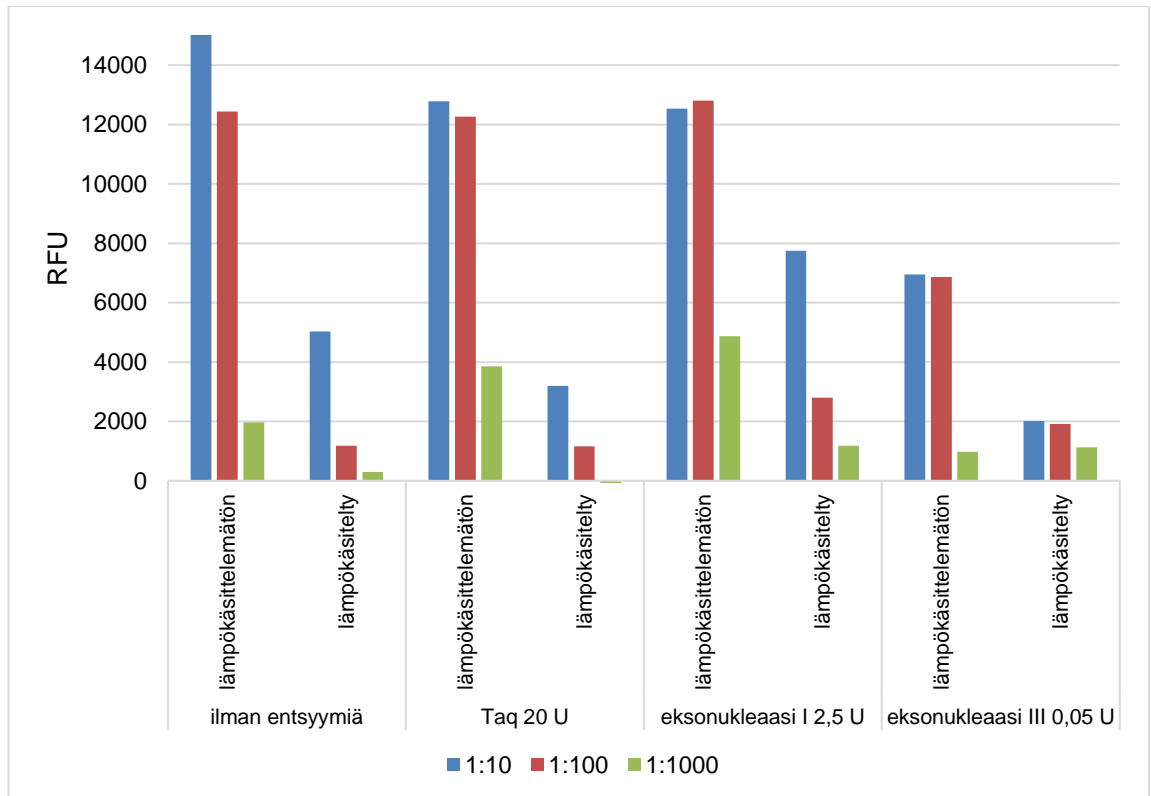
Lämpökäsittelyn vaikutus havaitaan kummankin entsyymien osalta matalampana fluoresenssitasona. 1:10- ja 1:100-laimennettujen lämpökäsittelmättömien lysaattien reaktiot eivät poikkea päätepisteiden RFU-arvoilta toisistaan. Eksonukleaasi I:n osalta laimennuksesta johtuva vaikutus havaitaan syklillä 10 ja eksonukleaasi III:n osalta ennen sykliä 60. Eksonukleaasi I:n muissa reaktioissa lysaatin laimennuksen vaikutus havaitaan selkeästi. Eksonukleaasi III:n reaktioiden päätepisteiden fluoresenssitasonot eivät poikkea toisistaan merkittävästi lämpökäsiteltyjen lysaattien osalta.

Kuvassa 20 on qPCR-ajon tulokset lysaattilaimennoksille ilman entsyymilisäystä (vasemmalla). Sinisellä on merkitty lämpökäsittelmättömät lysaatit ja punaisella lämpökäsitellyt. Kuvassa oikealla on reaktiot, joissa on mukana 20 U Taq-polymeraasia. Violetilla on merkitty lämpökäsittelmättömät lysaattilaimennokset ja punaisella lämpökäsitellyt. Negatiiviset kontrollit on merkitty vihreällä.



Kuva 20. Vasemmalla reaktiot, jotka eivät sisällä lisättyä entsyymiä. Sinisellä on merkitty laimennokset, jotka ovat tehty lämpökäsittelmästä lysaatista ja punaisella lämpökäsittellyn lysaatin laimennokset. Oikealla 20 U Taq-polymeraasia sisältävät reaktiot. Reaktiot lämpökäsittelmästä lysaatin kanssa on merkitty violetilla ja lämpökäsittellyn lysaatin punaisella. Negatiiviset kontrollit on merkitty vihreällä.

Lämpökäsittelyn vaikutus nähdään myös näissä reaktioissa selkeästi. 1:1000-laimennetut lämpökäsittellyt lysaatit jäävät nolatasolle ilman entsyymiä sekä entsyymin kanssa. Laimentamisen vaikutus havaitaan kaikissa reaktioissa. Taq-polymeraasia sekä 1:10- ja 1:100-laimennettua lämpökäsittelmästä lysaattia sisältävien reaktioiden fluoresenssitasojen ero voidaan havaita vain ennen sykliä 100. Kuvassa 21 on havainnollistettu lämpökäsittelyn vaikutusta fluoresenssitasoihin sekä reaktioiden eroa keskenään. Rinnakkaisten reaktioiden RFU-arvoista on vähennetty negatiivisten kontrollien RFU-arvojen keskiarvo. Eksonukleasiaktiivisuuden havaitaan vähentyneen lysaateissa lämpökäsittelyn vaikutuksesta kaikissa reaktioissa.



Kuva 21. Solulysaatin vaikutus qPCR-reaktioihin *Molecular Beacon* -koettimia käytettäessä.

Kaavion mukaan entsyymiä sisältämättömien reaktioiden vahvimpien laimennosten fluoresenssitaso olisi korkeampi, kuin entsyymiä sisältävien reaktioiden. Todennäköisesti lämpökäsittelemättömien 1:10- ja 1:100-laimennosten eksonukleaasipitoisuus jää niin korkeaksi, ettei eron määrittäminen näistä ole mahdollista. Lämpökäsittelemättömän 1:1000-laimennetun lysaatin reaktiot Taq-polymeraasin sekä eksonukleaasi I:n kanssa aiheuttavat suuremman fluoresenssitason nousun, kuin lysaatti ilman entsyymiä samalla laimennoksella. Eksonukleaasi I:n osalta pystytään havaitsemaan entsyymilisäyksen aiheuttama fluoresenssitason nousu lämpökäsittelyssä lysaateissa. Näiden tulosten perusteella Taq-polymeraasin 5'-eksonukleaasiaktiivisuutta ei voida osoittaa näin epäpuhtaista näytteistä, jotka sisältävät paljon eksonukleaasiaktiivisuutta jo valmiiksi.

6.5 Eksonukleaasipitoisten fraktioiden analysointi kahdella menetelmällä

Tuottosolun, *E. coli* -bakteerin, lysaatin supernatantille tehtiin kromatografinen erottelu Q-sefaroosimatriisissa. Anioninvaihtokromatografian avulla oli tarkoitus tuottaa puhdistusprosessia jäljitteleviä fraktioita, joiden eksonukleaasipitoisuudet eroaisivat toisistaan. Eksonukleaasiaktiivisuuden oletettiin olevan korkeimmillaan suolan avulla eluoiduissa fraktioissa. Tarkoituksena oli verrata, saadaanko fluoresoivalla ja radioaktiivisella menetelmällä samankaltainen eksonukleaasiprofiili eluoituneille fraktioille.

6.5.1 Kolonnin pakkaus, solujen käsittely sekä kromatografinen erottelu

Kolonnin pakkaus sekä kromatografinen erottelu tehtiin *Bio-Rad NGC Quest 100* -kromatografialaitteella. Q-sefaroosi (GE17-0510-01) pestiin ja pakattiin XK16/20-kuoreen (GE Healthcare nyk. Cytiva) virtausnopeudella 10 ml/min GE Healthcaren ohjeen (71-5009-64 AF) mukaisesti. Kolonnitilavuudeksi (CV) tuli pakkauksen jälkeen 11,5 ml.

Jäisestä *E. coli* -bakteerin solumassasta punnittiin astiaan 10 g:n pala, johon lisättiin 30 ml puskuria (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.1 mM EDTA, 0.2 % Tween 20). Solut sekoitettiin homogeeniseksi liuokseksi puskurin kanssa huoneenlämmössä jäiden päällä. Solususpensio sonikoitiin Hielscher UP200Ht -ultraäänihomogenisaattorilla S2d7-kärjellä (15 * 10 s, pulssi 90 %, amplitudi 70 %). Lyysatut solut sentrifugoitiin (11 000 rpm, 15 min, 5 °C), supernatantti kerättiin talteen ja se suodatettiin 0,45 µm:n sekä 0,2 µm:n AcroCap™-suodattimilla. Suodatuksen jälkeen lysaatin johtokyky säädettiin vastaamaan A-puskurin johtokykyä. Syötön lopullinen tilavuus oli 150 ml.

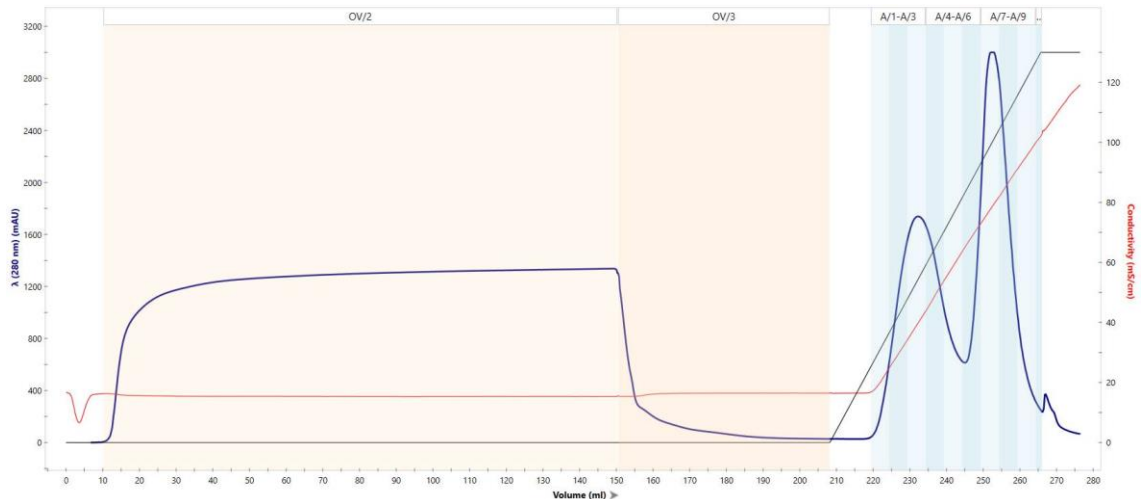
Taulukossa 10 on esitetty ajopuskurit sekä ajo-ohjelman vaiheet. Virtausnopeus oli ajon aikana 5 ml/min (149 cm/h) ja absorbanssin muutosta seurattiin aallonpituudella 280 nm. Kolonni tasapainotettiin A-puskurilla, jonka jälkeen seurasi näytteen syöttö, 5 CV:n pesuvaihe A-puskurilla sekä lineaarinen suolagradietti 0–100 %:iin B-puskuria.

Taulukko 10. Ajo-ohjelmaa ja ajo-ohjelman vaiheet.

A-puskuri	<i>Tris-HCl pH 7,5, 0,1 M NaCl</i>
B-puskuri	<i>Tris-HCl pH 7,5, 1 M NaCl</i>

metodin jakso	tilavuus	puskuri
tasapainotus	5 CV	A
syöttö	150 ml	-
pesu	5 CV	A
gradientti	5 CV	0-100 % A+B

Kuvassa 22 on esitetty ajon kromatogrammi. Näytteen syötön aikana, absorbanssin noutua, kerättiin läpituullut liuos (FT) talteen. Eluutio kerättiin 5 ml:n fraktioihin.



Kuva 22. Kromatogrammi *E. coli* -bakteerin lyaatin supernatantin erottelusta Q-sefaroosissa. Absorbanssin muutos on esitetty tilavuuden funktiona, punaisella on merkitty johtokyky ja mustalla B-puskurin osuus puskuriseoksesta.

Absorbanssi nousi syötön aikana, ja eluutiosta erottui kaksi piikkiä. Pylväs puhdistettiin ja varastoitettiin käytön jälkeen. Laite käsiteltiin ja suljettiin yrityksen ohjeiden mukaisesti.

6.5.2 Fraktioiden analysointi fluoresoivalla menetelmällä

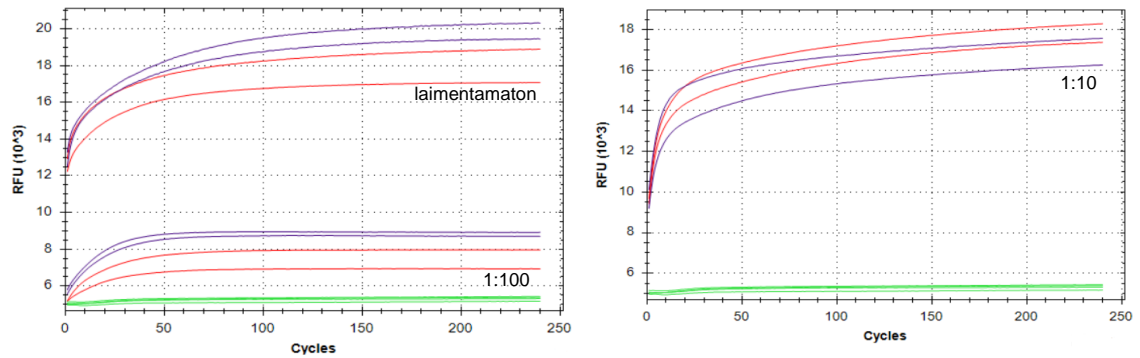
Syöttö, FT sekä fraktiot analysoitiin laimentamattomina ja niistä tehtiin 1:10-, 1:100- ja 1:1000-laimennokset. Uudet *Molecular Beacon* -koetinliuokset valmistettiin TE-puskuriin 100 µM:n konsentraatioon. Liuokset laimennettiin vielä 1:10 ja niitä yhdistettiin samassa suhteessa koetinseoksen valmistamiseksi. Esiseos tehtiin taulukon 11 mukaisesti. Positiivisina kontrolleina käytettiin kaupallisia eksonukleaaseja ja negatiivisena kontrollina Taq-puskuria.

Taulukko 11. Esiseos syötön, FT:n ja fraktioiden analysointia varten. Näytteen tilavuus on huomioitu lopputilavuudessa.

komponentti	konsentraatio reaktiossa	tilavuus (µl)
10X Taq -puskuri	1X	2
<i>Molecular Beacon</i> -seos 3,33 µM	0,17 µM x 3	1
Milli-Q-vesi	lopputilavuuteen	20
näyte	-	1

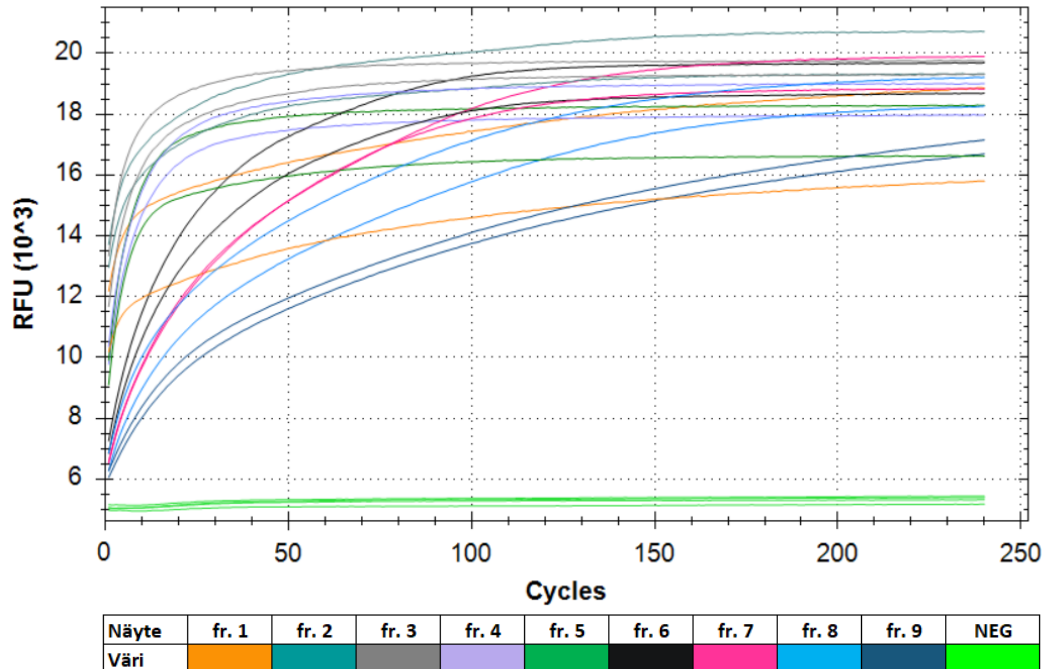
Näytteiden analysointi viivästyi ja näytteitä säilytettiin 40 minuutin ajan kylmäblokillä jääkaapissa. Näytteet olivat pipetoitu kaivojen reunalle ja kuoppalevy sentrifugoitiin vasta juuri ennen ajon aloitusta. qPCR-ajo tehtiin eri laitteella kuin aiemmat ajot. Ajoaika oli 240 min.

Kaikki 1:1000-laimennetut näytteet jäivät nollatasolle. Kuvassa 23 vasemmalla on esitetty syöttö (punainen) sekä FT (violetti) laimentamattomina sekä 1:100-laimennettuina. Oikealla puolella samat näytteet ovat 1:10-laimennettuina. Negatiiviset kontrollit on merkitty vihreällä. Kuvaajien perusteella sekä syöttö että FT sisältävät paljon eksonukleaasiaktiivisuutta.



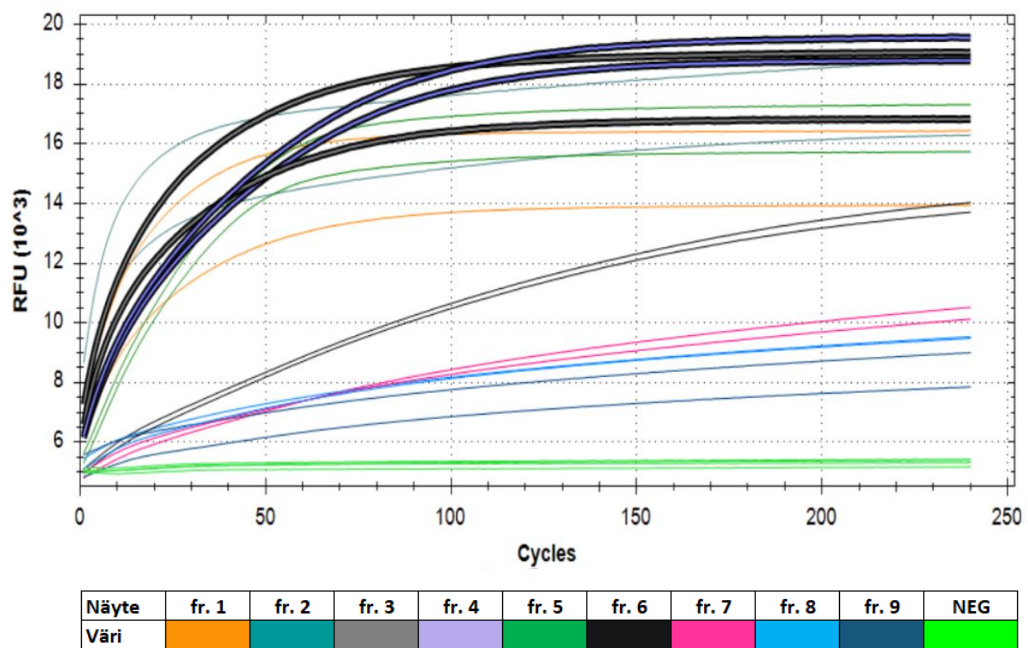
Kuva 23. Vasemmalla syöttö (punainen) sekä FT (violetti) laimentamattomina sekä 1:100-laimennettuina. Oikealla puolella samat näytteet 1:10-laimennettuina. Negatiiviset kontrollit on merkitty vihreällä.

Kuvassa 24 on esitetty laimentamattomien eluutiopiikein fraktioiden reaktiot. Kaikki reaktiot poikkeavat suuresti nollassa. Ensimmäisen eluutiopiikein fraktioiden, 1–5, fluoresenssitasojen perusteella, ei voida osoittaa eksonukleasiaktiivisuustasojen eroja eri fraktioissa. Jälkimmäisen eluutiopiikein fraktioiden, 6–9, fluoresenssitasot laskevat fraktionumeroiden mukaisessa järjestyksessä. Tämä lasku on havaittavissa selkeämmin syklillä 50.



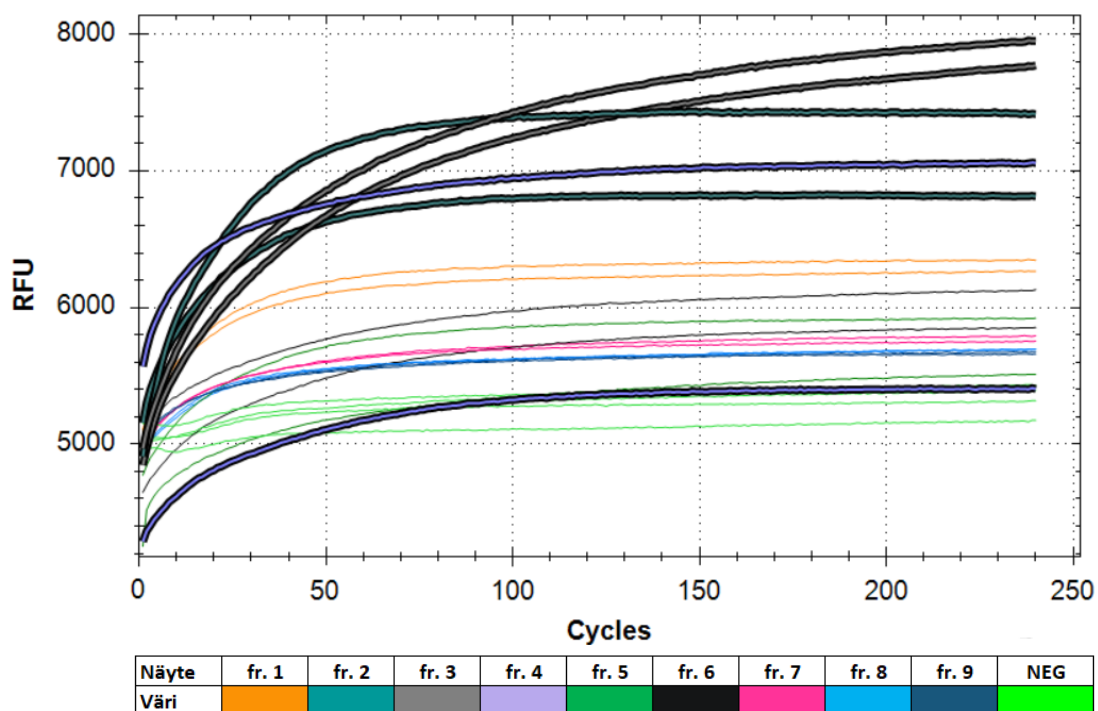
Kuva 24. qPCR-ajon tulokset laimentamattomille fraktioille.

1:10-laimennetuilla fraktioilla saadaan reaktioiden päätepisteiden RFU-arvojen välille jo selkeämmin eroja. Näiden laimennosten tulokset ovat esitetty kuvassa 25. Kuvaan on korostettu fraktiot 3 ja 4 korkeampien fluoresenssitasojensa vuoksi. Eksonukleasiaktiivisuuden huippu sijoittuu 1:10-laimennetuissa näytteissä fraktion 4 kohdalle. Tässä laimennoksessa havaitaan myös eksonukleasiaktiivisuuden sijoittuvan selkeästi ensimmäisen eluutiopiikin kohdalle. Fraktion 4 jälkeen fluoresenssitasot laskevat selvästi eri näytteiden välillä.



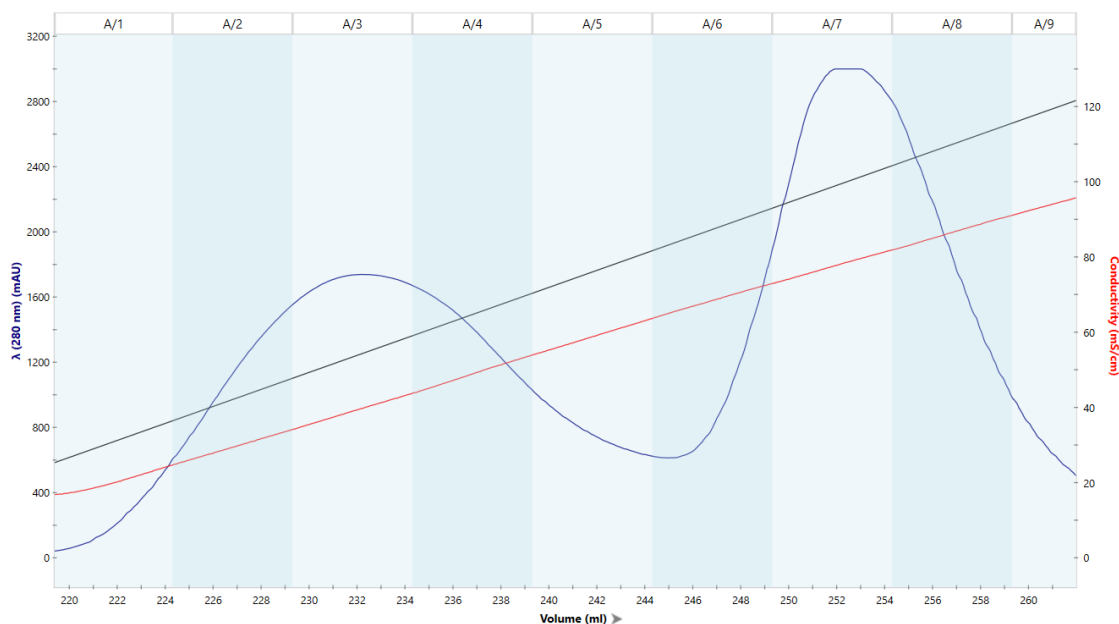
Kuva 25. 1:10-laimennettujen fraktioiden qPCR-ajon tulokset. Kuvaan on korostettu fraktiot 3 ja 4 korkeampien RFU-arvojen vuoksi.

Kuvassa 26 on qPCR-kuvaaja eluutiofraktioista, jotka ovat laimennettu 1:100. Fraktioiden 2–4 reaktiot on korostettu kuvaan korkeampien fluoresenssitasojensa vuoksi. Kaikki reaktiot poikkeavat fluoresenssitasoltaan nollassa lukuun ottamatta fraktion 4 rinnakkaista reaktiota, joka on jäänyt nollassa. Näissä laimennoksissa eksonukleasihuippu sijoittuu fraktion 3 kohdalle. Myös näissä laimennoksissa voidaan osoittaa ensimmäisen eluutiopiikin fraktioiden olevan korkeammalla fluoresenssitasolla, kuin toisen eluutiopiikin fraktioiden. Näissä laimennoksissa ei voida osoittaa eksonukleasiaktiivisuuden tasaista laskua toisen eluutiopiikin fraktioista, kuten aiemmissa laimennoksissa.



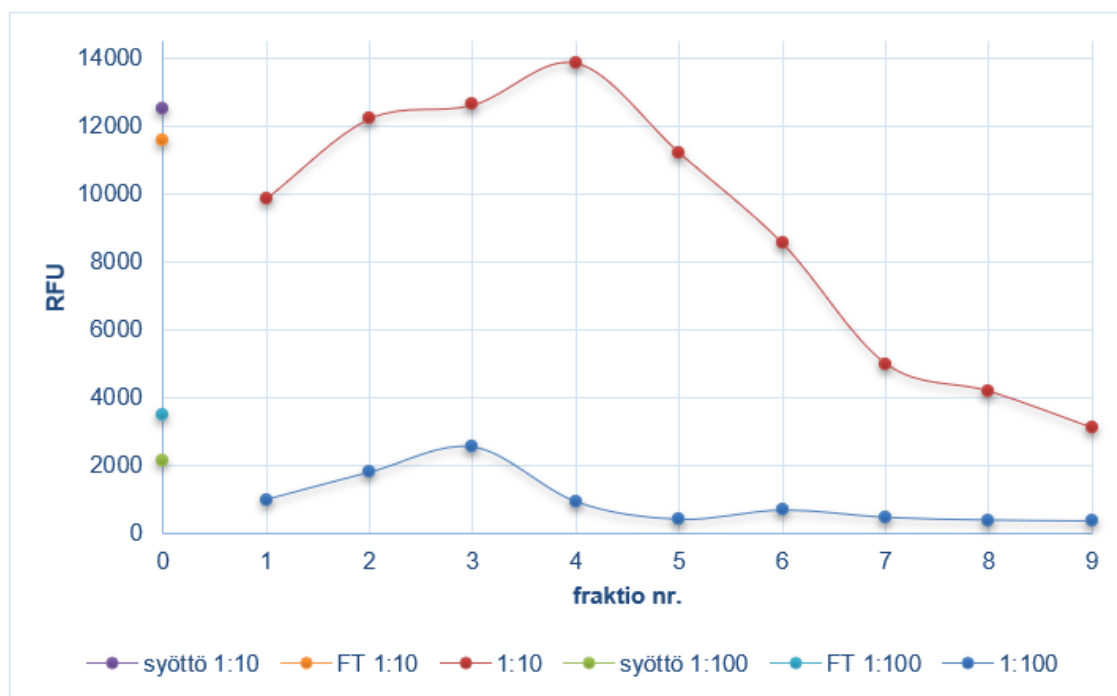
Kuva 26. qPCR-ajon tulokset fraktioiden 1–9 1:100-laimennoksista. Korostettuina fraktioiden 2–4 reaktiot, joissa fluoresenssitasot ovat korkeampia.

Kromatogrammin eluutiojakso on esitetty kuvassa 27. Fluoresoivalla menetelmällä analysoitujen fraktioiden tulosten perusteella voimakas eksonukleasiaktiivisuus sijoittuu ensimmäisen eluutiopiikin kohdalle ja aktiivisuushuippu vastaa eluutiopiikin huippua. Ensimmäisen eluutiopiikin reunojen eksonukleasiaktiivisuudet ovat korkeammat, kuin toisen eluutiopiikin. Eksonukleasiaktiivisuus alkaa laskea ensimmäisen eluutiopiikin huipun jälkeen.



Kuva 27. Kromatogrammin eluutiojakso. Fluoresoivalla menetelmällä analysoitujen näytteiden perusteella voimakkaampi eksonukleaasiaktiivisuus sijoittuu ensimmäisen eluutiopiikin kohdalle ja aktiivisuushuippu vastaa eluutiopiikin huippua.

Tällä menetelmällä on mahdollista havaita fraktioiden väliset eksonukleaasiaktiivisuuserot sekä fraktioiden laimentamisesta johtuva vaikutus. Optimaalinen laimennos on arvioitava näytekohtaisesti. 1:10- ja 1:100-laimennoksilla saavutetaan näissä analyyseissä vertailtavia tuloksia. Kuvassa 28 esitetty kuvaaja tehtiin havainnollistamaan 1:10- ja 1:100-laimennettujen näytteiden fluoresenssitason eroja eri fraktioiden välillä sekä laimentamisen vaikutusta näytteisiin. Reaktioiden RFU-arvoista on vähennetty nollataso.



Kuva 28. 1:10- ja 1:100-laimennettujen näytteiden päätepisteiden RFU-arvoista piirretty kuvaaja.

Fluoresenssihuippu sijoittuu eri laimennoksissa hieman eri kohdalle. Eri laimennoksilla saadaan kuitenkin hyvin samankaltainen profiili eksonukleaasien sijoittumisesta eluutiofraktioihin.

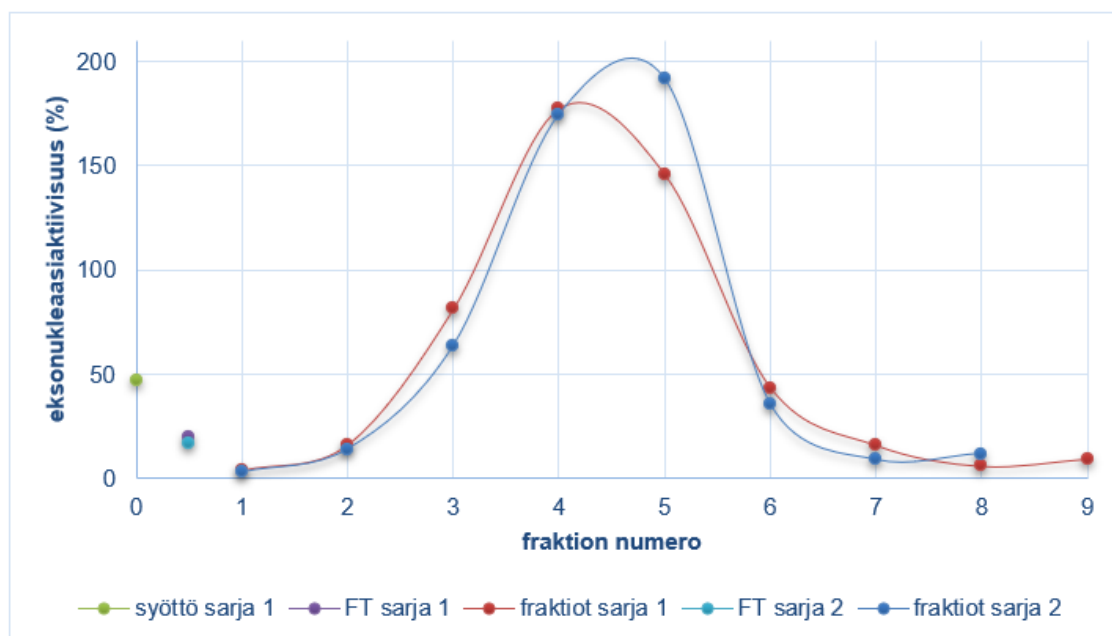
6.5.3 Fraktioiden analysointi radioaktiivisella menetelmällä

Kromatografia-ajosta saadut näytteet analysoitiin myös radioaktiivisella menetelmällä yrityksessä käytössä olleen työohjeen mukaisesti. Näytteet analysoitiin laimentamattomina, 1:2-, 1:10- sekä 1:20-laimennettuina. Kontrolleina käytettiin Taq-polymeraasia, eksonukleaasi I:stä ja eksonukleaasi III:ta. Näytteitä inkuboitii 37 °C:ssa substraatin, tritium-leimatun *E. coli* -bakteerin ssDNA:n, kanssa neljän tunnin ajan. Inkuboinnin jälkeen näytteissä olleet pitkät DNA-juosteet saostettiin TCA:n avulla ja supernatanteista analysoitiin näyte nestetuikeilmaisimella. Eri laimennokset toimivat rinnakkaisina näytteinä toisilleen tässä analyysissä. Saaduista tuloksista (liitteet 1 ja 2) rinnakkaisille näytteille laskettiin keskiarvot sarjojen sisällä. Näytekohtaiset aktiivisuudet on esitetty taulukossa 12.

Taulukko 12. Radioaktiivisen menetelmän eksonukleaasiaktiivisuuksista (liitteet 1 ja 2) lasketut keskiarvot eri sarjoille. Määritykset toistettiin peräkkäisinä päivinä.

näyte	sarja 1 aktiivisuus (%)	sarja 2 aktiivisuus (%)
syöttö	47,0	-
FT	19,8	16,9
fr. 1	4,1	3,1
fr. 2	16,4	14,2
fr. 3	81,6	63,8
fr. 4	177,5	174,5
fr. 5	145,8	191,7
fr. 6	43,5	35,9
fr. 7	16,0	9,1
fr. 8	6,0	12,0
fr. 9	9,6	-

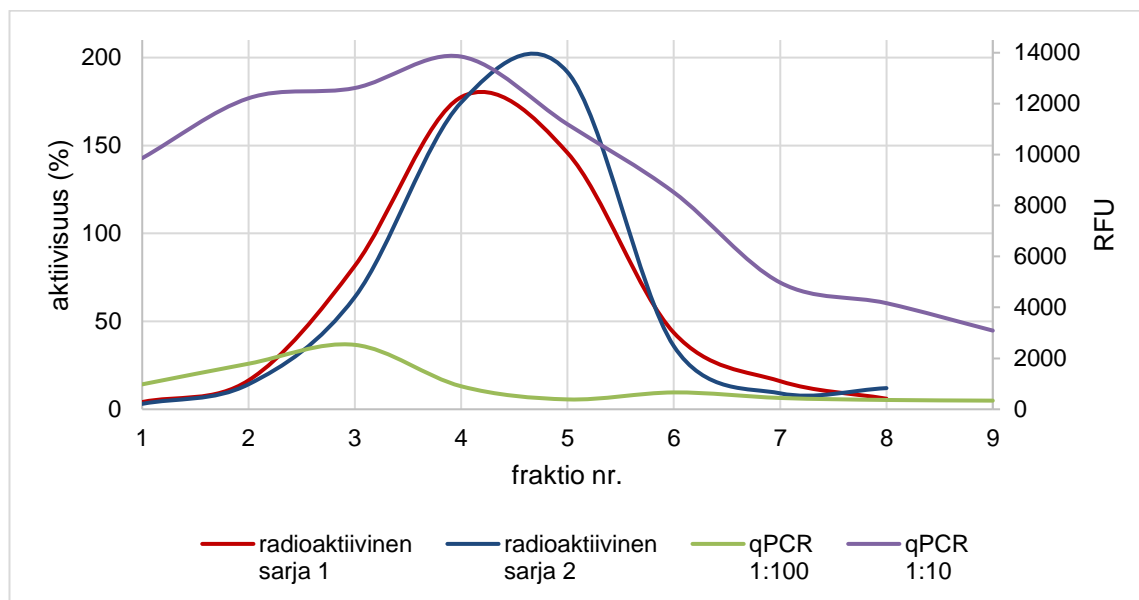
Määritetyistä aktiivisuuksista piirrettiin kuvaaja (kuva 29) havainnollistamaan eksonukleaasiaktiivisuuden jakautumista fraktioiden välillä.



Kuva 29. Radioaktiivisella menetelmällä analysoitujen fraktioiden eksonukleaasiaktiivisuuksista piirretty kuvaaja.

Radioaktiivisella menetelmällä analysoitujen näytteiden eksonukleaasiaktiivisuuden huippu sijoittuu fraktioiden 4 ja 5 kohdalle eli ensimmäisen eluutiopiikin laskevalle

puolelle. Kahden eri sarjan aktiivisuudet vastaavat hyvin toisiaan. Eri menetelmillä analysoitujen fraktioiden tuloksista piirrettiin kuvaaja (kuva 30), jossa fraktioita vastaavat eksonukleaasiaktiivisuusprosentit sekä RFU-arvot on esitetty y-akseleilla.



Kuva 30. Radioaktiivisella ja fluoresoivalla menetellä analysoitujen fraktioiden tulokset. Radioaktiivisella menetelmällä analysoitujen näytteiden tulokset on esitetty eksonukleaasiaktiivisuutta kuvaavana prosenttina ja fluoresoivan menetelmän tulokset päätepisteiden RFU-arvoina.

Kummallakin menetelmällä saadaan samankaltainen eksonukleaasiprofiili. Huippufraktio vaihtelee hieman qPCR-laimennosten sekä radioaktiivisen menetelmän sarjojen välillä, kuin myös menetelmien kesken. Kummankin menetelmän tulosten perusteella voimakas eksonukleaasiaktiivisuus sijoittuu kromatogrammin ensimmäisen eluutiopiikin kohdalle.

Fraktiot tuotettiin jäljittelemään proteiinien puhdistusprosessin kaltaisia fraktioita. Näytemateriaali sisälsi paljon erilaisia biomolekyylejä ja fraktiot olivat huomattavasti epäpuhtaampia, kuin proteiinien puhdistuksen aikana sekä laadunvalvonnassa analysoitavat näytteet. Radioaktiivista menetelmää käytettäessä saostetaan pilkkoutumaton substraatti, mikäli näyte sisältää paljon proteiineja ei TCA:n saostuskapasiteetti ole riittävä saostamaan kaikkea substraattia ja pidempiä leimattuja substraatteja voi jäädä supernatanttiin ja ne analysoidaan tuikeilmaisimella. Tämä voi nostaa virheellisesti määritettyä eksonukleaasiaktiivisuutta.

7 Päätelmät

Opinnäytetyön tavoitteena oli tutkia fluoresoivan menetelmän soveltuvuutta eksonukleaasiaktiivisuuden osoittamiseksi *E. coli* -bakteerin solulysaatista puhdistetuista proteiinipitoisista näytteistä. Fluoresoivassa menetelmässä käytettiin kolmea erilaista *Molecular Beacon* -koetinta, tylppäpäistä, 3'- ja 5'-häntäistä, joissa oli fluoroforina 6-FAM ja sammuttamolekyylinä Iowa Black FQ. Tutkimuksissa käytettiin kolmea kaupallista *E. coli*-bakteerin eksonukleaasientsyymiä. Eksonukleaasi I:llä on 3'-5'-aktiivisuus ja se käyttää ensisijaisena substraattinaan ssDNA:ta, mutta se pystyy poistamaan myös muutamia nukleotidejä dsDNA:n tylpistä päistä, jos sen konsentraatio on riittävä. Eksonukleaasi III:lla on sama 3'-5'-aktiivisuus, mutta ensisijaisena substraattina se käyttää dsDNA:ta. Eksonukleaasi III kykenee hajottamaan dsDNA:n tylppiä päitä ja sillä on myös 5'-3'-aktiivisuutta. Lisäksi sillä on kyky hajottaa ssDNA:ta, aktiivisuus tähän substraattiin on lähes kymmenen kertaa matalampi, kuin dsDNA-substraattiin. Katkaistulla eksonukleaasi VIII:lla on vastakkainen 5'-3'-aktiivisuus, ja ensisijaisena substraattina se käyttää dsDNA:ta. Myös tällä entsyymillä on kyky hajottaa dsDNA:ta 3'- sekä tylpistä päistä. Eksonukleaasi VIII kykenee hajottamaan myös ssDNA:ta, jos 5'-päässä on fosfaatti. Optimaalisimmillaan nämä kolme entsyymiä pystyisivät hajottamaan kaikkia käytettyjä *Molecular Beacon* -koettimia. Kaikilla kaupallisilla eksonukleaaseilla pystyttiin tuottamaan reaktioita, joissa fluoresenssitason nousivat. Eksonukleaasi III:n osalta käyttömäärä olivat huomattavasti matalampi kuin kahdella muulla.

Puskureiden vaikutusta fluoresenssitason tutkimiseen reaktioiden avulla, jotka sisälsivät *Molecular Beacon* -koetinseosta sekä kaupallisia eksonukleaasientsyymejä. Tarkoituksena oli selvittää, voidaanko kolme kaupallista puskuria korvata Taq-puskurilla. Saatujen tulosten perusteella qPCR-reaktiot pystyttiin tuottamaan kaikissa käytetyissä puskureissa yhtä onnistuneesti. Käytetyn koetinseoksen konsentraatio oli reaktioissa pienempi, kuin alustavissa tutkimuksissa. Tämän takia optimaaliset eksonukleaasientsyymimäärät olivat suuremmat kuin alustavissa tutkimuksissa. *Molecular Beacon* -koetinseoksen optimaalista käyttökonsentraatioita arvioitiin reaktioiden avulla, jotka sisälsivät 10 ja 50 U Taq-polymeraasia. Koetinseokset, jotka sisälsivät eri koettimia 0,08 ja 0,17 μM konsentraatioissa nostivat fluoresenssitason riittävän korkeaksi Taq-polymeraasin eksonukleaasiaktiivisuuden detektoimiseksi eri

entsyymimäärissä. 0,17 μM :n konsentraatiolla ero oli huomattavasti suurempi. Taq-polymeraasin 5'-eksonukleaasiaktiivisuuden osoittamista tutkittiin yksittäisten koettimien sekä niiden seoksen avulla. Reaktiot jotka sisälsivät koetinseosta tai 5'-häntäistä koetinta nostivat fluoresenssitasoja huomattavasti.

Tuottosolun, *E. coli* -bakteerin, lyaatin vaikutusta reaktioihin tutkittiin lämpökäsittämättömän sekä lämpökäsitellyn lyaatin supernatantin avulla. Reaktioihin lisättiin Taq-polymeraasia, eksonukleaasi I:stä ja III:ta. Entsyymilisäyksillä oli tarkoitus tutkia, voidaanko lisättyjen entsyymien eksonukleaasiaktiivisuuden aiheuttamaa fluoresenssia havaita reaktioista. Lämpökäsittelyn vaikutus havaittiin kaikissa reaktioissa matalampana fluoresenssitasona. Eksonukleaasi I:n osalta voitiin havaita entsyymilisäykset kaikissa reaktioissa, jotka sisälsivät lämpökäsiteltyä lyaattia. Taq-polymeraasin aiheuttamaa lisäfluoresenssia ei kuitenkaan voitu osoittaa näin epäpuhtaista näytteistä, jotka sisälsivät paljon eksonukleaasiaktiivisuutta.

Solulysaatin lämpökäsittämättömästä supernatantista tuotettiin kromatografisen erottelun avulla eksonukleaasipitoisia fraktoita, jotka jäljittelivät puhdistusprosessin aikana analysoitavia näytteitä. Tarkoituksena oli vertailla, saadaanko fluoresoivalla ja radioaktiivisella menetelmällä eluutiofraktoista samankaltaiset eksonukleaasiprofiilit. Kummassakin menetelmässä reaktiolämpötila oli 37 °C ja reaktioaika 4 tuntia. Näytteiden laimentamisen vaikutus tuloksiin havaittiin kummallakin menetelmällä. Kromatogrammin eluutiossa erottui kaksi piikkiä. Sekä fluoresoivalla että radioaktiivisella menetelmällä pystyttiin osoittamaan eksonukleaasiaktiivisuushuipun sijoittuvan ensimmäisen eluutiopiikin kohdalle. Aktiivisuuden huippuarvot vaihtelivat fraktioiden 3–5 välillä eri laimennoksilla ja sarjoilla. Kromatogrammissa ensimmäisen eluutiopiikin absorbanssihuippu sijoittui fraktion 3 kohdalle. Kromatografisella erottelulla ei ole välttämättä saavutettu riittävää resoluutiota, ja eluutiopiikki voi koostua myös useammasta piikistä. Radioaktiivisen menetelmän tuloksiin on voinut vaikuttaa TCA:n saostuskapasiteetin ylittyminen, jolloin pilkkoutumaton substraatti on voinut jäädä saostumatta näytteissä, joiden proteiinipitoisuus on korkea. Tämän vuoksi analysoitava supernatantti on voinut sisältää enemmän tritiumia, mikä johtaa korkeampaan eksonukleaasiaktiivisuustulokseen. Fluoresoivassa menetelmässä reaktioiden etenemiseen vaikuttaa eri eksonukleaasien läsnäolo ja ensisijaisen substraatin

saatavuus. Käytetyt fluoresoivat värimolekyylit voivat olla myös liian suurikokoisia irrotettaviksi joillekin eksonukleaaseille.

Näiden tutkimusten perusteella fluoresoivalla menetelmällä voidaan osoittaa eksonukleaasiaktiivisuuksia proteiinipitoisista näytteistä. *Molecular Beacon* -koetinseosta käytettäessä pystytään Taq-polymeraasin 5'-eksonukleaasiaktiivisuus osoittamaan puhtaammista näytteistä, joissa eksonukleaasiaktiivisuus on matala. Fluoresoivalla menetelmällä saatiin hyvin samankaltainen eksonukleaasiprofiili, kuin radioaktiivisella menetelmällä analysoitaessa anioninvaihtokromatografian avulla tuotettuja eksonukleaasipitoisia fraktioita. Fluoresoivaa sekä radioaktiivista menetelmää tulisi tutkia enemmän rinnakkain, jotta voitaisiin arvioida tulosten vertailukelpoisuutta keskenään. Menetelmän käyttöönottoa vaativia tutkimuksia tullaan käsittelemään toisessa opinnäytetyössä.

Lähteet

- 1 Ulmanen, Ismo; Tenhunen, Jukka; Ylännä, Jari; Valste, Juha & Viitanen, Pertti. 1999. *Biologia – Geeni*. 1.-2. painos. Porvoo. WSOY.
- 2 Makarow, Marja; Simonen, Marjo & Ulmanen, Ismo. 1996. Geenistä koeputken kautta proteiiniksi. Verkkoaineisto. Duodecim. <duodecimlehti.fi/duo60080>. Luettu 15.1.2021.
- 3 Practical Guide: Selecting the Optimal Resins for Removal of DNA Contamination during Process Purification. Verkkoaineisto. Bio-Rad. <https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/psd/literature/Bulletin_6881.pdf>. Luettu 22.1.2021.
- 4 Nuclease and Protease Testing: Laboratory and Commercial Considerations. Verkkoaineisto. Thermo Fisher Scientific. <<https://www.thermofisher.com/fi/en/home/references/ambion-tech-support/nuclease-enzymes/general-articles/nuclease-and-protease-testing.html>>. Luettu 22.1.2021.
- 5 Nucleases. Verkkoaineisto. Biocompare. <<https://www.biocompare.com/Nucleic-Acid-Purification/6510-Nucleases/>>. Luettu 9.1.2021.
- 6 Lovett, Susan T. 2011. The DNA exonucleases of *Escherichia coli*. Verkkoaineisto. The National Center for Biotechnology Information. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4238392/>>. Luettu 12.12.2020.
- 7 Proteiinit. Verkkoaineisto. Solunetti. <<https://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/valkuaisaineet/2/>>. Luettu 5.11.2020.
- 8 Kumar, Arun. Why do we need Recombinant Proteins? Verkkoaineisto. Enzo Life Sciences. <<https://www.enzolifesciences.com/science-center/tech-notes/2020/january/why-do-we-need-recombinant-proteins?/>>. Luettu 5.11.2020.
- 9 Proteiinien tuottaminen. Verkkoaineisto. Solunetti. <https://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/proteiinien_tuottaminen/2/>. Luettu 5.11.2020.
- 10 Entsyymit. Verkkoaineisto. Solunetti. <<https://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/entsyymit1/2/>>. Luettu 6.11.2020.
- 11 Biosanasto. Verkkoaineisto. Biotekniikan neuvottelukunta. <www.btnk.fi/biosanasto.html>. Luettu 6.11.2020.
- 12 DNA Polymerases. Verkkoaineisto. ScienceDirect. <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128012383621852>>. Luettu 28.11.2020.

- 13 DNA:n replikaatio. Verkkoaineisto. Solunetti. <https://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/dna-n_replikaatio/2/>. Luettu 29.12.2020.
- 14 Will the 5'→3' flap endonuclease activity of Taq DNA Polymerase degrade primers? Verkkoaineisto. FAQs, New England Bio Labs. <<https://international.neb.com/faqs/2011/11/05/will-the-5-rarr-3-exonuclease-activity-of-em-taq-em-dna-polymerase-degrade-primers>>. Luettu 13.1.2021.
- 15 Biochemistry of Reverse Transcription. Verkkoaineisto. Bookshelf, The National Center for Biotechnology Information. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK19435/?report=reader/>>. Luettu 14.11.2020.
- 16 BL21(DE3). Verkkoaineisto. Nzytech. <<https://www.nzytech.com/products-services/molecular-biology/competent-cells-media/competent-cells/expression-strains/mb006/>>. Luettu 22.1.2021.
- 17 IPTG Induction Protein Expression. Verkkoaineisto. Biologics International Corp. <<https://www.biologicscorp.com/blog/iptg-induction-protein-expression/#.YEm1m7DitPY>>. Luettu 11.3.2021.
- 18 Bacterial Strains for Protein Expression. Verkkoaineisto. Promega. <<https://www.promega.com/-/media/files/resources/product-guides/proteomics/bacterial-strains-for-protein-expression.pdf?la=en>>. Luettu 22.1.2021.
- 19 Exonucleases. Verkkoaineisto. Biocompare. <<https://www.biocompare.com/Nucleic-Acid-Purification/7252-Exonucleases/>>. Luettu 17.10.2020.
- 20 Properties of Exonucleases and Non-specific Endonucleases. Verkkoaineisto. New England BioLabs. <<https://international.neb.com/tools-and-resources/selection-charts/properties-of-exonucleases-and-nonspecific-endonucleases>>. Luettu 24.1.2021.
- 21 Traditional Methods of Cell Lysis. Verkkoaineisto. Thermo Fisher Scientific. <<https://www.thermofisher.com/fi/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/traditional-methods-cell-lysis.html#:~:text=Several%20methods%20are%20commonly%20used%20to%20physically%20lyse,have%20been%20reviewed%20extensively%20in%20protein%20methods%20books.>>. Luettu 11.2.2021.
- 22 Engelke, David R.; Krikos, Alexandra; Bruck, Mary E. & Ginsburg, David. 1990. Purification of *Thermus aquaticus* DNA Polymerase Expressed in *Escherichia coli*. *Analytical Biochemistry*. Vol 191, s. 396-400.

- 23 Purification of Thermostable DNA Polymerases. Verkkoaineisto. Gene and Cell Technologies. <<https://www.geneandcell.com/blogs/molecular-biology-methods/9505231-purification-of-thermostable-dna-polymerases>>. Luettu 22.1.2021.
- 24 How Column Chromatography Works to Separate Proteins. Verkkoaineisto. GoldBio. <<https://www.goldbio.com/articles/article/how-column-chromatography-works-to-separate-proteins>>. Luettu 11.3.2021.
- 25 NGC Detector Modules and Components. Verkkiaineisto. Bio-Rad. <<https://www.bio-rad.com/en-fi/product/ngc-detector-modules-components?ID=MFCVJEC4S>>. Luettu 23.1.2021.
- 26 Strategies for Protein Purification. Verkkoaineisto. GE Healthcare. <<https://cdn.cytivalifesciences.com/dmm3bwsv3/AssetStream.aspx?mediaformatid=10061&destinationid=10016&assetid=15680>>. Luettu 10.10.2020.
- 27 Ion exchange chromatography (IEX). Verkkoaineisto. Bio-Works. <<https://www.bio-works.com/separation-techniques/>>. Luettu 6.1.2021.
- 28 Ion Exchange Chromatography Troubleshooting. Verkkoaineisto. Merck. <<https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/ion-exchange-chromatography/troubleshooting.html>>. Luettu 6.1.2021.
- 29 Introduction to PCR. Verkkoaineisto. Promega. <<https://fi.promega.com/resources/guides/nucleic-acid-analysis/pcr-amplification/>>. Luettu 24.10.2020.
- 30 Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) assays. Verkkoaineisto. abcam. <<https://www.abcam.com/content/fluorescence-resonance-energy-transfer-fret-assays#:~:text=An%20introduction%20to%20FRET.%20Fluorescence%20is%20the%20light,transfers%20its%20energy%20to%20a%20nearby%20acceptor%20fluorophore>>. Luettu 9.1.2020.
- 31 Introduction to qPCR Instrumentation. Verkkoaineisto. Bio-Rad. <<https://www.bio-rad.com/en-fi/applications-technologies/introduction-qpcr-instrumentation?ID=LUSO5YMNI>>. Luettu 19.1.2021.
- 32 Real-Time PCR Applications Guide. Verkkoaineisto. Bio-Rad. <https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_5279.pdf>. Luettu 19.1.2021.
- 33 AAV Titration by qPCR Using SYBR Green Technology. Verkkoaineisto. Addgene. <<http://www.addgene.org/protocols/aav-titration-qpcr-using-sybr-green-technology/>>. Luettu 7.1.2021.

- 34 Molecular beacon probes. Verkkoaineisto. Integrated DNA Technologies. <<https://sg.idtdna.com/pages/products/qpcr-and-pcr/custom-probes/molecular-beacons>>. Luettu 7.11.2020.
- 35 Molecular Beacons. Verkkoaineisto. Premier Biosoft. <http://www.premierbio-soft.com/tech_notes/molecular_beacons.html>. Luettu 12.12.2020.
- 36 Polymerase Chain Reaction - PCR. Verkkoaineisto. GoldBio. <<https://www.goldbio.com/goldbios-pcr-overview>>. Luettu 17.7.2020.
- 37 Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET). Verkkoaineisto. Thermo Fisher Scientific. <<https://www.thermofisher.com/fi/en/home/references/molecular-probes-the-handbook/technical-notes-and-product-highlights/fluorescence-resonance-energy-transfer-fret.html>>. Luettu 10.1.2021.
- 38 Fam-5' (6-fluorescein amidite (6-FAM)). Verkkoaineisto. Gene Link. <http://genelink.com/newsite/products/mod_detail.asp?modid=33>. Luettu 10.1.2021.
- 39 Iowa Black® Dark Quenchers Modifications. Verkkoaineisto. Integrated DNA Technologies. <<https://www.idtdna.com/site/Catalog/Modifications/Category/4>>. Luettu 10.1.2021.
- 40 BHQ®-1. Verkkoaineisto. Metabion. <<https://www.metabion.com/learning-platform/modifications/quenchers/bhq-1/>>. Luettu 11.1.2021.
- 41 3' 6-FAM (Fluorescein). Verkkoaineisto. Integrated DNA Technologies. <<https://www.idtdna.com/site/Catalog/Modifications/Product/1203>>. Luettu 11.1.2021.
- 42 Molecular Facts and Figures. Verkkoaineisto. Integrated DNA Technologies. <https://sfvideo.blob.core.windows.net/sitefinity/docs/default-source/biotech-basics/molecular-facts-and-figures.pdf?sfvrsn=4563407_4>. Luettu 13.1.2021.
- 43 DNA and RNA Molecular Weights and Conversions. Verkkoaineisto. Thermo Fisher Scientific. <<https://www.thermofisher.com/fi/en/home/references/ambion-tech-support/rna-tools-and-calculators/dna-and-rna-molecular-weights-and-conversions.html>>. Luettu 13.1.2021.
- 44 SOP-MDE-200 Working instruction for exonuclease assay V1-0. Yrityksen sisäinen dokumentti. Mobidiag Oy.
- 45 Liquid Scintillation Counting. Verkkoaineisto. PerkinElmer. <<https://www.perkinelmer.com/lab-products-and-services/application-support-knowledgebase/radiometric/liquid-scintillation-counting.html>>. Luettu 9.1.2021.

- 46 Säteilyn ilmaisimet. Verkkoaineisto. STUK. <https://www.stuk.fi/documents/12547/494524/kirja1_4.pdf/3f6c3115-afa3-4b1e-9fb6-8cba27fb2a1a>. Luettu 9.1.2021.
- 47 Exonuclease I (E. coli). Verkkoaineisto. New England BioLabs. <<https://international.neb.com/products/m0293-exonuclease-i-e-coli#Product%20Information>>. Luettu 3.1.2021.
- 48 Exonuclease III (E. coli) Verkkoaineisto. New England BioLabs. <<https://international.neb.com/products/m0206-exonuclease-iii-e-coli#Product%20Information>>. Luettu 3.1.2021.
- 49 Exonuclease VIII, truncated. Verkkoaineisto. New England BioLabs. <<https://international.neb.com/products/m0545-exonuclease-vii-ituncated#Product%20Information>>. Luettu 3.1.2021.

Radioaktiivisen menetelmän tulokset - sarja 1

näyte	CPM	DPM	TDCR	ka. DPM	aktiivisuus (%)
3H standardi	161133	242488	0,664		
Bkg standardi	50	199	0,254		
nolla	8519	16931	0,503	16959	
nolla	8914	17829	0,5		
nolla	8108	16116	0,503		
totaali	145534	279210	0,521	271325	
totaali	132993	252164	0,527		
totaali	146775	282601	0,519		
Taq-polymeraasi 50 U	10556	21105	0,5		1,63
syöttö	71655	144225	0,496		50,03
syöttö 1:20	11115	22540	0,493		2,19
FT	47106	94578	0,498		30,51
FT 1:20	9035	18103	0,499		0,45
fr 1	13705	27370	0,5		4,09
fr 1 1:20	8395	17058	0,492		0,04
fr 2	37654	74929	0,502		22,79
fr 2 1:20	9172	18238	0,502		0,50
fr 3	130660	263024	0,496		96,74
fr 3 1:20	12742	25410	0,501		3,32
fr 4	144684	290369	0,498		107,49
fr 4 1:20	24129	48444	0,498		12,38
fr 5	153369	305332	0,502		113,37
fr 5 1:20	20058	39634	0,506		8,91
fr 6	67162	133640	0,502		45,87
fr 6 1:20	11148	22199	0,502		2,06
fr 7	29032	57655	0,503		16,00
fr 7 1:20	8956	17874	0,501		0,36
fr 8	16273	32254	0,504		6,01
fr 8 1:20	8695	17719	0,49		0,30
fr 9	11453	22976	0,498		2,37
fr 9 1:20	9200	19093	0,481		0,84

Radioaktiivisen menetelmän tulokset – sarja 2

näyte	CPM	DPM	TDCR	ka. DPM	aktiivisuus (%)
3H standardi	160804	242043	0,664		
Bkg standardi	23	115	0,208		
nolla	8897	18363	0,484	18022	
nolla	8269	16732	0,494		
nolla	9315	18971	0,491		
totaali	124891	238470	0,523	241707	
totaali	130056	248011	0,524		
totaali	125640	238641	0,526		
Taq-polymeraasi 50 U	9683	19701	0,491		1,08
FT 1:2	21715	44768	0,485		10,93
FT 1:10	9510	19987	0,475		1,19
fr 1 1:2	10215	20960	0,487		1,57
fr 1 1:10	8826	17737	0,497		0,31
fr 2 1:2	19396	39898	0,486		9,02
fr 2 1:10	9518	19607	0,485		1,04
fr 3 1:2	60205	120833	0,498		40,84
fr 3 1:10	14415	28663	0,502		4,60
fr 4 1:2	121490	243743	0,498		89,16
fr 4 1:10	30292	60374	0,501		17,07
fr 5 1:2	128532	258821	0,496		95,08
fr 5 1:10	33210	66117	0,502		19,33
fr 6 1:2	31148	61879	0,503		17,66
fr 6 1:10	13183	26246	0,502		3,65
fr 7 1:2	15363	30382	0,505		5,28
fr 7 1:10	9606	18893	0,508		0,76
fr 8 1:2	11065	21966	0,503		1,97
fr 8 1:10	9186	19299	0,476		0,92
fr 9 1:2	9196	18925	0,485		0,77
fr 9 1:10	8531	17181	0,496		0,09