

Opinnäytetyö (AMK)  
Bioanalytiikan koulutusohjelma  
Solu- ja molekyylibiologia  
2013

Jenni Tuominen

# HIIREN TSH- RESEPTORIGEEENIN PISTEMUTAATIO

– Geenikonstruktion rakentaminen



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU  
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

OPINNÄYTETYÖ (AMK) | TIIVISTELMÄ

TURUN AMMATTIKORKEAKOULU

Bioanalytiikan koulutusohjelma | Solu- ja molekyylibiologia

Toukokuu 2013 | Sivumäärä 41+6

FT Sanna Virtanen, FT Leena Strauss

Jenni Tuominen

# HIIREN TSH-RESEPTORIGEEENIN PISTEMUTAATIO – GEENIKONSTRUKTIN RAKENTAMINEN

TSH-reseptorigeenin mutaatiot, jotka saavat aikaan reseptorin muuttumisen konstitutiivisesti aktiiviseksi eli aktiiviseksi ilman tyreotropiinihormonia, ovat merkittävien molekyyli- ja solutasojen syy kilpirauhasen liikatoiminnan eli hypertyreoosin taustalla.

Opinnäytetyö on osa laajempaa tutkimusta, jonka tavoitteena on selvittää hypertyreoosin etiologiaa ja patogeneesia, joka ei johdu autoimmunitetistä. Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli rakentaa geenitekniikan avulla geenikonstruktin, jossa TSH-reseptorigeeniin on tehty pistemutaatio, joka johtaa reseptorissa D633H mutaatioon. D633H-mutaatio valittiin siksi, että se on tunnistettu potilailla, joilla on toksinen kilpirauhaskyhy. D633H-mutaatiossa asparagiinihappo (D) on vaihtunut histidiiniksi (H).

Tässä opinnäytetyössä tutkimustehtävää ei saatu valmiiksi, koska käytännön suorituksen aikana kohdattiin monia ongelmia.

ASIASANAT: geenikonstruktin, TSH-reseptori, hypertyreoosi, pistemutaatio, geenitekniikka

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Biomedical Laboratory Science | Cell and Molecular Biology

May 2013 | Total number of pages 41+6

PhD Sanna Virtanen, PhD Leena Strauss

Jenni Tuominen

# POINT MUTATION IN THE MOUSE TSH RECEPTOR GENE – GENERATING A GENE CONSTRUCT

The TSH receptor gene mutations that cause constitutively active mutations of the receptor are the major molecular causes of nonautoimmune hyperthyroidism.

This thesis is a part of a larger study aiming to determine the aetiology and pathogenesis of hyperthyroidism, which is not caused by autoimmunity. The purpose of this thesis was to create through genetic engineering a gene construct where a point mutation leads to D633H mutation in the TSH receptor gene. The D633H mutation was chosen because it has been identified in patients with toxic thyroid nodules (TTNs). In D633H mutation aspartic acid (D) has changed to histidine (H).

The research could not be completed thoroughly in this thesis, since many problems were encountered during the practical work that hindered the actual research process.

**KEYWORDS:** gene construct, TSH receptor, hyperthyroidism, point mutation, genetic engineering

# SISÄLTÖ

<b>1 JOHDANTO</b>	<b>6</b>
<b>2 TUTKIMUKSEN TEOREETTINEN TAUSTA</b>	<b>7</b>
2.1 Tutkimuksen keskeinen teoria	7
2.1.1 DNA	7
2.1.2 Geenikonstrukt	8
2.1.3 Geenitekniikka	9
2.1.4 Siirtogeeninen hiiri	9
2.1.5 Kilpirauhanen	10
2.1.6 TSH-reseptori	11
2.1.7 Hypertyreoosi	12
2.1.8 Pistemutaatio	12
2.2 Geenitekniikan menetelmiä	13
2.2.1 Red/ET- rekombinaatio	13
2.2.2 Bakteerisolujen transformaatio	13
2.2.3 Antibioottiselektio	14
2.2.4 Ensivaiheen seulontamenetelmä	15
2.2.5 Digestio	17
2.2.6 Ligaatio	19
2.2.6.1 Kohessiivisten ja tylppien päiden ligaatio	19
2.2.6.2 Erilaisten päiden ligaatio	20
2.2.6.3 DNA:n 5'-päiden defosforylointi	21
2.2.7 Polymeraasiketjureaktio (PCR)	21
2.2.8 Agarosigeelielektroforeesi (AGE)	25
<b>3 OPINNÄYTETYÖN TAVOITE, TARKOITUS JA TUTKIMUSTEHTÄVÄ</b>	<b>27</b>
<b>4 OPINNÄYTETYÖN TOTEUTUS</b>	<b>28</b>
4.1 Opinnäytetyön metodologiset ratkaisut	28
4.2 Opinnäytetyön eteneminen	28
4.2.1 Alkuperäisten bakteerisolujen kasvatus (BAC, jossa Tshr)	28
4.2.2 Transformaatio (ET-plasmidi)	29
4.2.3 Kloonien kasvatus	30
4.2.4 ET-proteiinien ilmentäminen	30

4.2.5 Homologisten alueiden luominen minivektoriin	31
4.2.6 Tshr-palan siirtäminen BAC-plasmidista minivektoriin, ET-rekombinaatiolla	31
4.2.7 Alakloonaus, pala eksoni-10:n alueelta pGEM4Z-plasmidiin	32
<b>5 TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU</b>	<b>34</b>
5.1 Homologisten alueiden luonti	34
5.2 ET- rekombinaatio	35
5.3 Transformaatio TOP10-soluihin	35
<b>6 POHDINTA</b>	<b>37</b>
6.1 Tutkimustehtävän onnistuminen	37
6.2 Tutkimuksen luotettavuuden tarkastelu	37
6.3 Eettinen pohdinta	38
6.3.1 Tutkijan ammattietiikka	38
6.4 Jatkotutkimusaiheet	39
<b>LÄHTEET</b>	<b>40</b>

## LIITTEET

- Liite 1. Opinnäytetyön toimeksiantosopimus
- Liite 2. QIAquick Gel Extraction Kit Protocol
- Liite 3. Miniprep DNA isolation protocol
- Liite 4. High-Speed Plasmid Mini Kit Protocol

## KUVAT

Kuva 1. Nukleotidin perusrakenne. ....	7
Kuva 2. TSH-reseptori. ....	11
Kuva 3. Yhdistelmä-DNA-vektoriin käytettävä plasmidi.....	14
Kuva 4. Sinisen värin muodostumisen periaate $\alpha$ -komplementaatiossa. ....	17
Kuva 5. BamHI:n tunnistussekvenssi. ....	18
Kuva 6. DNA-jaksojen päiden liittäminen yhteen T4-DNA-ligaasin avulla.....	20
Kuva 7. PCR-syklin vaiheet. ....	23
Kuva 8. Polymeraasiketjureaktion periaate. ....	24
Kuva 9. Agarosigeelielektroforeesissa käytettävä ajolaite. ....	26
Kuva 10. Red-ET:n transformaatio E.coliin, jossa BAC ja Tshr. ....	30
Kuva 11. Geelikuva minivektorista PCR:n jälkeen.....	34
Kuva 12. Geelikuva plasmidi-DNA:sta digestion jälkeen. ....	35

# 1 JOHDANTO

Tämä opinnäytetyö on osa laajempaa tutkimusta, jonka tavoitteena on selvittää hypertyreoosin etiologiaa ja patogeneesia, joka ei johdu autoimmunitetistä. TSH-reseptorigeenin mutaatiot, jotka saavat aikaan reseptorin muuttumisen konstitutiivisesti aktiiviseksi eli aktiiviseksi ilman tyreotropiinihormonia, ovat merkittävin molekyylitason syy kilpirauhasen liikatoiminnan eli hypertyreoosin taustalla.

Tutkimus on tärkeä, koska se antaa lisätietoa hypertyreoosin patogeneesistä eli taudin synnystä, jolloin voidaan myös kehittää entistä parempia ja tehokkaampia hoitomuotoja. Aikaisemmissa tutkimuksissa on huomattu, että TSH-reseptorigeenissä tapahtuva pistemutaatio (S505R, jossa seriini on vaihtunut arginiiniksi ja P639S, jossa proliini on vaihtunut seriiniksi) johtaa hypertyreoosiin. (Pohlenz ym. 2006; Agretti ym. 2012).

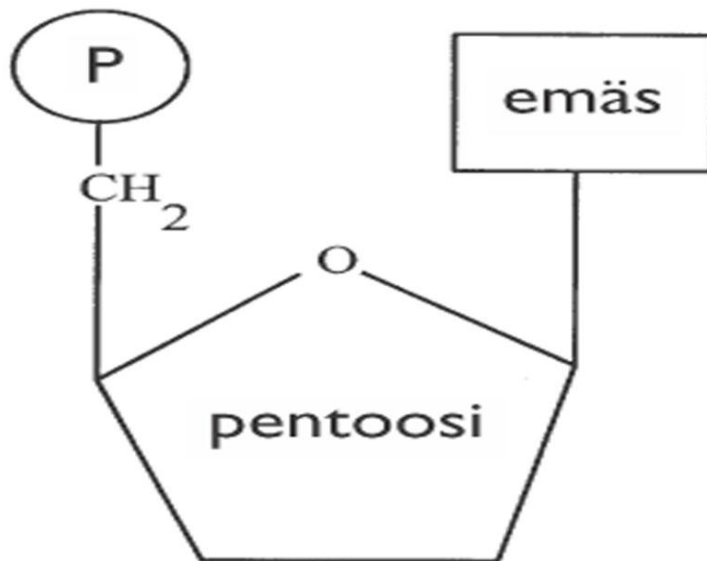
Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli valmistaa geenikonstruktin, jossa TSH-reseptorigeeniin on tehty pistemutaatio, joka johtaa TSH-reseptorissa D633H-mutaatioon. D633H-mutaatio valittiin siksi, että se on tunnistettu potilailla, joilla on toksinen kilpirauhaskyhy. D633H-mutaatiossa asparagiinihappo (D) on vaihtunut histidiiniksi (H). Valmis konstruktin siirretään siirtogeenihiirimalleihin, joissa on tarkoitus tutkia mutaation vaikutuksia hiiren ilmiäsuun.

## 2 TUTKIMUKSEN TEOREETTINEN TAUSTA

### 2.1 Tutkimuksen keskeinen teoria

#### 2.1.1 DNA

DNA eli deoksiribonukleiinihappo sisältää kaiken solun perinnöllisen tiedon. Nukleiinihapot koostuvat toisiinsa peräkkäin liittyneistä nukleotideista, jotka muodostavat pitkiä ketjumaisia molekyyliä. DNA:n rakenneosat, nukleotidit (Kuva 1) koostuvat fosfaattiryhmästä (P), pentoosisokerista, joka on viisihiilinen monosakkaridi ja orgaanisesta emäksestä. (Suominen ym. 2010, 15.)



Kuva 1. Nukleotidin perusrakenne. (Suominen ym. 2010, 15)

Kaksi nukleiinihappujuostetta pariutuu emäspariperiaatteen mukaisesti. DNA:ssa esiintyy neljä erilaista emästä: adeniini (A), guaniini (G), tymiini (T) ja sytosiini (C). (Ulmanen ym. 2009, 11-13) Pariutuneiden vastinemästen välille syntyy vetysidoksia niin, että adeniini ja tymiini sekä sytosiini ja guaniini muodostavat parit. A- ja T-emästen välille syntyy kaksi vetysidosta, G- ja C-emästen välille kolme vetysidosta. Tästä syystä G- ja C- sidos on vahvempi kuin A- ja T- sidos. DNA:ta kuumennettaessa vetysidokset emästen välillä purkautuvat eli

DNA denaturoituu. Denaturaatioon tarvitaan korkeampi lämpötila mitä enemmän DNA:ssa on G-C pareja. (Heino & Vuento 2010, 40-41.) DNA on kaksijuosteinen ja juosteiden suunta on toisilleen vastakkainen. Nukleiinihappojen emäs-järjestys kirjoitetaan aina yhteen suuntaan eli 5' → 3'- suunnassa. (Suominen ym. 2010, 18-19.)

Geeni on perättäisten emästen muodostama jakso, joka sisältää tiedon proteiinin tai RNA:n eli ribonukleiinihapon rakenteesta. Geeni koostuu säätelyalueesta, RNA:ta koodaavasta alueesta ja RNA-synteesin lopetuskohdasta. Säätelyalue vastaa geenin perusaktiivisuudesta, lisäksi se ohjaa RNA-polymeraasin RNA-synteesin aloituskohtaan ja määrää synteesin suunnan. Koodaava alue koostuu eksonijaksoista sekä intronijaksoista. Geneettinen koodi eli tieto proteiinien aminohappojärjestyksestä on kolmen nukleotidin ryhmissä eli kodoneina. Tietty kodoni vastaa tiettyä aminohappoa ja näiden lisäksi on kolme kodonia, jotka määräävät proteiinisynteesin lopetuksen. Neljä erilaista nukleotidia ( $4^3$ ) voi muodostaa 64 erilaista kolmikkoa. Aminohappoja on 20 erilaista, joten yhtä aminohappoa voi vastata useampi emäskolmikko. Peräkkäisten kodonien järjestys eli lukukehys määrää syntyvän proteiinin aminohappojärjestyksen. (Ulmanen ym. 2009, 23-26.)

### 2.1.2 Geenikonstrukti

Geenikonstrukti eli yhdistelmä-DNA on DNA-molekyyli, johon on keinotekoisesti liitetty, jopa toisesta lajista peräisin olevia DNA-jaksoja. Mitä tahansa DNA-molekyyliä, joka on rakennettu laboratoriossa, kutsutaan yhdistelmä-DNA:ksi. (Alberts ym. 2009, 330.) Geenitekniikan avulla voidaan pilkkoa pitkiä DNA-pätkiä sopivan kokoisiksi ja liittää ne takaisin yhteen, jolloin saadaan uusia yhdistelmiä. Yhdistelmä-DNA voidaan kopioida bakteerisolun sisällä, joka kerta kun bakteeri kopioi oman DNA:nsa, se kopioi myös plasmidin, jossa yhdistelmä-DNA on. (Ulmanen ym. 2009, 180.)



### 2.1.3 Geenitekniikka

Geenitekniikkaa pidetään yleisnimityksenä tekniikoille, joissa tutkitaan tai käsitellään geneettistä materiaalia, joko kokonaan tai osittain *in vitro* eli eliön ulkopuolella, koeputkessa. Geenitekniikka ei ole oma tieteenalansa vaan biotekniikan haara. Sitä hyödynnetään laajasti ja käytetään moniin eri tarkoituksiin mm. lääketieteessä, genetiikassa, molekyylibiologiassa ja solubiologiassa. (Suominen ym. 2010, 63-65.)

### 2.1.4 Siirtogeeninen hiiri

Siirtogeenisellä hiirellä on perimään liitetty vieras yhdistelmä DNA-molekyyli. Syntyneellä jälkeläisellä on kaikissa soluissaan kyseinen yhdistelmä DNA-molekyyli, joka periytyy edelleen seuraaville jälkeläisille. Siirtogeenisen hiiren tuottaminen voidaan jakaa neljään vaiheeseen. Ensiksi rakennetaan geenitekniikan avulla geenikonstruktin eli yhdistelmä-DNA. Tämän jälkeen DNA injisoidaan hedelmöittyneeseen munasoluun mikroinjektiolla tai jos geenikonstruktin halutaan tiettyyn kohtaan genomia, siirretään se alkion kantasoluihin, joista valikoidaan ne, joissa konstruktin on liittynyt oikeaan kohtaan. Nämä kantasolut injisoidaan blastokystivaiheen alkioon. Injektoidut alkion siirretään vastaanottajahiirten, valeraskaiden naaraiden, munanjohtimiin. Lopuksi syntyneiden poikasten perimästä (genotyyppi) tunnistetaan siirtogeeni PCR:n avulla, joko häntä- tai korvanäytteestä eristetyistä DNA:sta. Kantahiiret, jotka osoittautuvat siirtogeeniksi, käytetään siirtogeeniä ilmentävien hiirilinjojen tuottamiseksi. Geenimuuntelun muutokset ilmiössä (fenotyyppi) tutkitaan. (Strauss 2012.)

Siirtogeenisten hiirten tuottaminen ja ylläpito on tarkoin säädeltyä ja valvottua toimintaa ja niiden tuottamiseen tarvitaan koe-eläinlupa. (Eläinkoelautakunta 2013). Siirtogeenisiä hiiriä käytetään eniten perustutkimuksessa, mutta myös mm. tautimallinnuksessa ja lääkekehityksessä. (Strauss 2012)

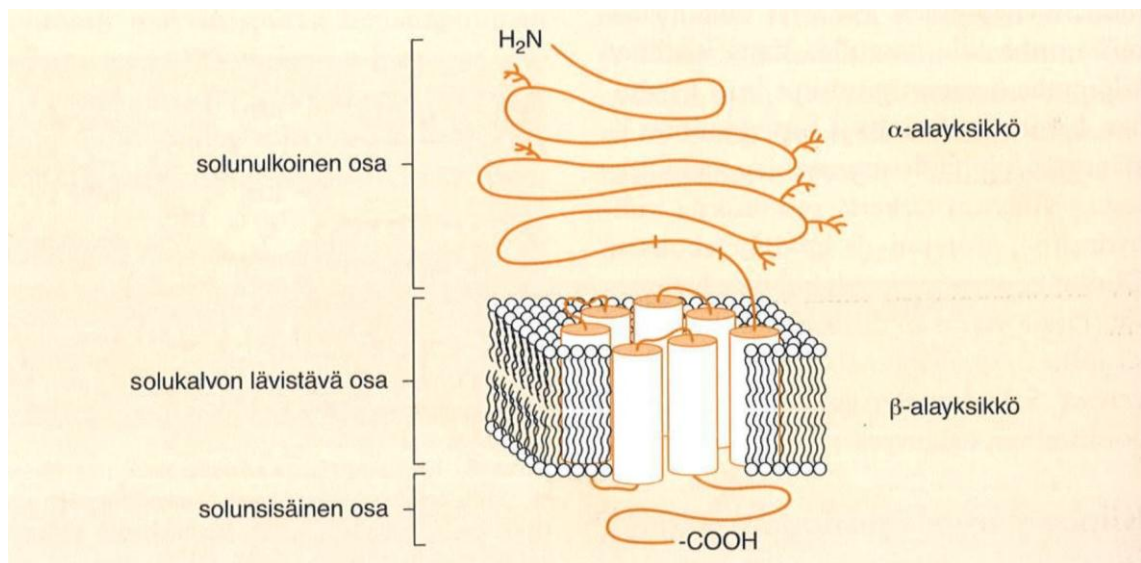
### 2.1.5 Kilpirauhanen

Kilpirauhanen sijaitsee henkitorven etupuolella, kilpiruston alapuolella ja se painaa noin 10-40 g. Kilpirauhasen muodostaa kaksi lohkoa ja näitä yhdistävä kannas. (Nienstedt ym. 2009, 414.) Kilpirauhaslohkojen pituus on noin 4 cm ja leveys ja paksuus 2-2,5 cm. Kilpirauhanen on muodostunut rakkuloista eli follikuleista, jotka ovat sen toiminnallisia perusyksiköjä. Follikkelin muodostaa yksikerroksisen epiteelin verhoama ontelo, joka sisältää hyytelömäistä ainetta, kolloidia. Epiteelisolut ovat lepotilassa litteitä, mutta muuttuvat joko kuution tai lieriön muotoisiksi toiminnan lisääntyessä. Kolloidi sisältää tyreoglobuliinia, jonka glykoproteiinirakenteeseen varastoituvat kilpirauhashormonit, tyroksiini ( $T_4$ ) ja trijodityroniini ( $T_3$ ). (Välimäki & Schalin-Jäntti 2009, 175.)

Kilpirauhasfollikkelit erittävät päivittäin noin 110 nmol tyroksiinia ( $T_4$ ), mutta vain noin 10 nmol trijodityroniinia ( $T_3$ ). Tyroksiinissa on neljä jodiatomia ja trijodityroniinissa kolme. Trijodityroniini on varsinainen biologisesti aktiivinen kilpirauhashormoni, koska suurin osa tyroksiinista muuttuu kudoksissa trijodityroniiniksi ennen vaikuttamistaan. (Välimäki & Schalin-Jäntti 2009, 177.) Kilpirauhashormoneilla on useita laaja-alaisia vaikutuksia aineenvaihduntaan, fyysiseen ja psyykkiseen kasvuun ja kehitykseen lapsuusiässä ja aikuisiällä aineenvaihduntaan. Tyroksiini on välttämätön sikiön hermoston, luuston ja keuhkojen kehitykselle. Samoin lapsuusiässä riittävä kilpirauhashormonien erityis on normaalin ruumiillisen ja henkisen kehityksen edellytys. (Nienstedt ym. 2009, 414-415.) Kilpirauhasen follikkelien välissä olevista C-soluista erittyy kalsitoniinia verenkiertoon, joka vaikuttaa kalsiumaineenvaihduntaan, mutta sitä ei lueta varsinaisiin kilpirauhashormoneihin kuuluvaksi. Kilpirauhasella on myös keskeinen osuus jodiaineenvaihdunnassa elimistössä. Kilpirauhashormonien vaikutukset korostuvat etenkin kilpirauhasen liikatoiminnan eli hypertyreoosin aikana. (Välimäki & Schalin-Jäntti 2009, 175-177.)

### 2.1.6 TSH-reseptori

TSH (thyroid stimulating hormone) eli tyreotropiini on aivolisäkkeen etulohkon erittämä kilpirauhasen kasvua ja toimintaa stimuloiva hiilihydraattipitoinen proteiinihormoni. (Nienstedt ym. 2007, 752; Nienstedt ym. 2009, 416) Kilpirauhasolussa tyreotropiini kiinnittyy omaan reseptoriinsa, joka kuuluu G-proteiinivälitteisten reseptoreiden perheeseen. Reseptori muodostuu suuresta ekstrasellulaari eli solunulkoisesta osasta, seitsemän kertaa solukalvon lävistävästä osasta ja solunsisäisestä osasta, joka välittää viestin G-proteiineille (Kuva 2). Tyreotropiini kiihdyttää kilpirauhasen toimintaa samalla stimuloiden jodidin kertymistä kilpirauhaseen, hormonien synteesiä ja niiden vapautumista verenkiertoon. TSH-reseptorin toimintaa lisäävät mutaatiot ovat useimmiten reseptorin solukalvon lävistävässä osassa. (Välimäki & Schalin-Jäntti 2009, 182, 210)



Kuva 2. TSH-reseptori. (Välimäki & Schalin-Jäntti 2009, 182)

Reseptorin aktivoituessa se jakaantuu  $\alpha$ - ja  $\beta$ -alayksiköihin, jotka voivat tuottaa useita aktiivisia tai inaktiivisia reseptoreita. Aktiivisia on  $TR\alpha_1$ ,  $TR\beta_1$ ,  $TR\beta_2$  ja  $TR\beta_3$ , reseptorit ilmentyvät kudoksissa eri tavoin.  $TR\beta_2$  on keskeinen hypotalamuksessa ja aivolisäkkeessä, kun taas  $TR\alpha_1$  ilmentyy kaikissa kudoksissa, etenkin munuaisissa, maksassa, aivoissa ja sydämässä. (Välimäki & Schalin-Jäntti 2009, 180-182.)

### 2.1.7 Hypertyreoosi

Hypertyreoosilla tarkoitetaan kilpirauhasen liikatoimintaa, siinä tyroksiinineritys ( $T_4$ ) saattaa kasvaa jopa 15-kertaiseksi. Hypertyreoosin syynä ei ole yleensä tyreotropiinin (TSH) liikaeritys, usein sen määrä on vähentynyt palautevaikutuksen takia. Potilaiden verestä sen sijaan löytyy tavallisesti tyreotropiinin tavoin vaikuttavia, kilpirauhasta stimuloivia vasta-aineita (T<sub>sab</sub>, thyroid-stimulating immunoglobulins or antibodies). (Nienstedt ym. 2009, 417-418.) T<sub>sab</sub>-vastaaineet kiinnittyvät TSH-reseptoriin ja kiihdyttävät kilpirauhasen toimintaa. (Välimäki & Schalin-Jäntti 2009, 192)

Hypertyreoosin oireet johtuvat liiallisen kilpirauhashormonin aiheuttamasta kiihdyneestä aineenvaihdunnasta, elimistö käy ”ylikierroksilla”. (Nienstedt ym. 2009, 417) Oireita ovat mm. hermostuneisuus, lisääntynyt hikoilu, painon lasku, kiihdytynyt sydämen syke. Oireet voivat syntyä asteittain viikkojen ja kuukausien aikana. Osalle kehittyy silmäoireita: hiekan ja vierasesineen tunnetta, kaksoiskuvat, valonarkuutta ja toisinaan silmät pullistuvat ulospäin (eksoftalmus). (Välimäki & Schalin-Jäntti 2009, 195; 212.)

### 2.1.8 Pistemutaatio

Mutaatiolla tarkoitetaan joko yhdessä tai useammassa geenissä tapahtuvaa rakenteellista muutosta, joka sukusolussa ollessaan voi siirtyä jälkeläisille. Mutaation vaikutus riippuu siitä mihin kohtaan perimän osaa tai geeniä se kohdistuu. (Ulmanen ym. 2009, 24-25.) Pistemutaatiossa yksi emäs on muuttunut, mikä johdosta kyseisen emäskolmikon määräämä aminohappo saattaa korvautua toiseksi proteiinisynteesissä. (Nienstedt ym. 2007, 471) Tämä voi vaikuttaa tai olla vaikuttamatta proteiinin biologiseen aktiivisuuteen. Mikäli emäskolmikko muuttuu proteiinisynteesin lopetuskolmikoksi, syntyy yleensä toimintakyvytön proteiini, koska aminohappoketju jää normaalia lyhyemmäksi tai proteiinin toiminta lisääntyy tai muuttuu jollakin muulla tavalla. (Ulmanen ym. 2009, 24-25.) Tässä opinnäytetyössä TSH-reseptorigeenin pistemutaatio saa aikaan resepto-

rin muuttumisen konstitutiivisesti aktiiviseksi, eli aktiiviseksi ilman tyreotropiinihormonia.

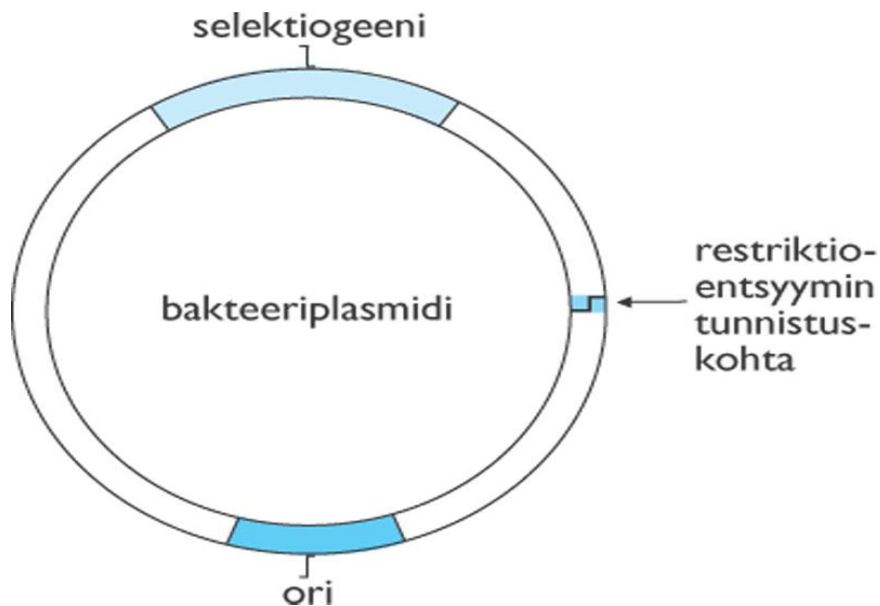
## 2.2 Geenitekniikan menetelmiä

### 2.2.1 Red/ET- rekombinaatio

Red/ET- rekombinaatio perustuu homologiseen rekombinaatioon, ja se on yksi menetelmä DNA-konstruktin rakentamisessa. Se mahdollistaa rajoittamattoman kloonauksen, alakloonauksen ja muutokset DNA:n mihin tahansa haluttuun kohtaan. Se mahdollistaa kaikenkokoisten DNA-molekyylien täsmällisen suunnittelun. Red/ET- rekombinaatio toimii L-arabinoosin ohjauksessa. Tämä aikaan saa Red/ET- rekombinaatioproteiinien ilmentymisen. Nämä proteiinit taas saavat aikaan homologisen rekombinaation. (Genebridges 2013.)

### 2.2.2 Bakteerisolujen transformaatio

Transformaatioksi kutsutaan tapahtumaa, jossa geneettistä materiaalia viedään eläviin soluihin ja DNA on paljasta plasmidi-DNA:ta. Solujen tulee olla kompetentteja eli ne ovat joko luonnostaan tai käsittelyn seurauksena laboratorioolosuhteissa kykeneviä transformoitumaan eli ottamaan vierasta DNA:ta sisäänsä. (Suominen ym. 2010, 140-141.) Plasmidit (Kuva 3) ovat pieniä rengasmaisia, itsenäisesti monistuvia DNA-molekyyliä. Niitä esiintyy etenkin bakteereilla, mutta myös hiivoilla ja homeilla. Plasmideja käytetään geenitekniikassa kuljettimina eli vektoreina ja niitä voidaan myös katkaista restriktioentsyymeillä sekä liittää uudelleen yhteen DNA-ligaasilla, jolloin rengasmaisen rakenteen palautuu. (Suominen ym. 2010, 66-67.) Plasmidivektorilta vaaditaan tiettyjä perusominaisuuksia. Näitä ovat muun muassa ori eli replikaation aloituskohta, selektiogeeni joka mahdollistaa kasvun esimerkiksi antibiootin läsnä ollessa sekä MCS eli monikloonausalue, joka sisältää katkaisukohtat useille restriktioentsyymeille. (Suominen ym. 2010, 76-77.)



Kuva 3. Yhdistelmä-DNA-vektorina käytettävä plasmidi. (Suominen ym. 2010, 76)

DNA voidaan viedä bakteerisoluun eli transformoida erilaisin menetelmin, yksi tehokkaimmista menetelmistä on elektroporaatio. Siinä solukalvoon luodaan lyhytikäisiä aukkoja antamalla lyhytkestoinen ja voimakas sähköpulssi, jolloin DNA siirtyy aukkojen kautta solun sisään. (Suominen & Ollikka 2004, 85.) Elektroporaatiota varten solut kasvatetaan maljalla, pestään vedellä ja lisätään solususpensioon glyserolia ja ne pakastetaan  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ :een. Transformaatiota varten solut sulatetaan jäähauteessa ja jaetaan transformaatiokyvetteihin, joiden sivuilla on elektrodit. Elektroporaatio tehdään mielellään kylmässä ( $0\text{--}4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) ja se edellyttää tarkoitukseen valmistetun laitteen. (Suominen ym. 2010, 143.)

### 2.2.3 Antibioottiselektio

Transformaatiossa saadaan vain osa soluista ottamaan DNA:ta sisäänsä. Jotta tunnistetaan ja saadaan kasvamaan ainoastaan transformoituneet solut, pitää olla käytössä jokin tehokas tunnistuskeino eli selektio. Antibioottiresistenssi on yleisesti käytetty selektiomenetelmä, joka antaa solulle resistenssin tiettyä anti-

bioottia kohtaan. Antibioottiresistenssi syntyy, kun bakteerin perimässä tapahtuu mutaatioita tai bakteeri saa plasmidin, jossa on antibioottiresistenssigeeni. Yhdessä plasmidissa voi olla useita geenejä, jotka tuovat bakteerille resistenssiä eri antibiooteille. Tällaiset geenit koodaavat yleensä antibioottia hajottavaa tai tehottomaksi muuttavaa entsyymiä. Näin voidaan halutun resistenssigeenin sisältävät solut valikoida kasvattamalla soluja tämän antibiootin kanssa. (Suominen ym. 2010, 144-146.)

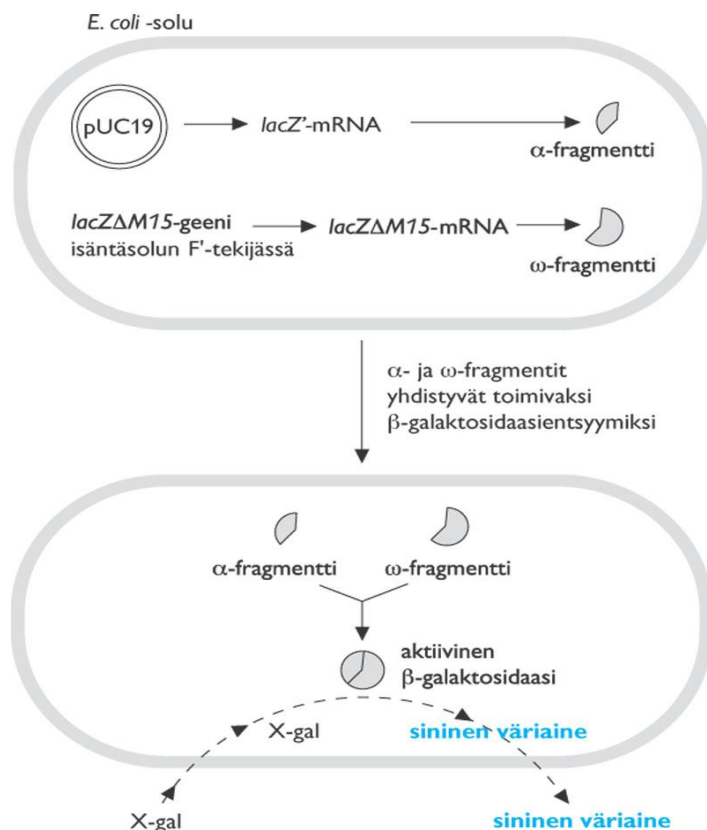
Yleisin bakteriselektion antibiootti on penisilliinijohdannainen ampicilliini, joka estää bakteerien soluseinän kasvun ja tappaa kasvavia bakterisoluja. Ampisilliiniresistenssi eli Amp<sup>r</sup> johtuu *bla*-geenistä, joka tuottaa ampicilliinia hajottavaa  $\beta$ -laktamaasientsyymiä. (Suominen ym. 2010, 146.) Muita käytettyjä antibiootteja on mm. tetrasykliini, kloramfenikoli ja kanamysiini eli neomysiini, ne estävät bakteerien proteiinisynteesin kiinnittymällä bakteerin ribosomin eri osiin. (Medicina 2013.)

#### 2.2.4 Ensivaiheen seulontamenetelmä

Nykyään käytetyin ensivaiheen seulontamenetelmä on  $\alpha$ -komplementaatio, josta käytetään nimitystä sini-valkoseuranta (Kuva 4). Tämä on yleisin ensivaiheen seulontamenetelmä *Escherichia coli*-bakteerilla työskenneltäessä. Menetelmä perustuu *E.colin lac*-operonin toimintaan. (Suominen ym. 2010, 79-80.) Yhdistelmä-DNA molekyyliä valmistettaessa syntyy joukko muitakin kuin haluttuja klooneja. Mukana on useimmiten myös pelkällä vektorilla transformoituneita klooneja. Seulonnan ensivaiheessa tulisi saada selville, mitkä kloonit ovat saaneet sisäänsä insertin sisältävän yhdistelmä-DNA-molekyylin. (Suominen & Ollikka 2004, 93) Menetelmän avulla voidaan värireaktion perusteella erottaa yhdistelmä-DNA-plasmidin ja pelkän vektoriplasmidin sisältämät transformantit toisistaan. Edelliset kasvavat maljalla valkeina pesäkkeinä ja jälkimmäisiä klooneja sisältävät pesäkkeet sinisinä. (Suominen ym. 2010, 79.)

Tätä varten näissä vektoreissa on  $\beta$ -galaktosidaasientsyymien aminotermiinalista  $\alpha$ -fragmenttia (alkuosassa oleva) koodaava geeninosa, *lacZ*. *lacZ*-geenin

loppuosa, koodaa  $\beta$ -galaktosidaasin loppupään,  $\omega$ -fragmentin muodostumista.  $\beta$ -galaktosidaasientsyymi hajottaa normaalisti laktoosia glukoosiksi ja galaktoosiksi, mutta se pystyy myös hajottamaan ainetta, josta käytetään lyhennelmää X-gal (5-bromi-4-kloori-3-indolyyli-D-galaktopyranosidi). Se on laktoosintapainen synteettinen yhdiste, jonka hajoamistuote on sininen. Jos vektoriin on siirretty vierasta DNA:ta, *lacZ*-geeni lakkaa toimimasta eli se ei enää tuota  $\beta$ -galaktosidaasin  $\alpha$ -fragmenttia.  $\omega$ -fragmentti ei yksinään ole aktiivinen, niin tällaisen yhdistelmäplasmidin sisältämä pesäke on maljalla valkea. Valkeista pesäkkeistä voidaan lähteä seulomaan halutunlaista yhdistelmä-DNA-plasmidia. *lacZ*-geeni voidaan indusoida lisäämällä transformoitujen bakteerien kasvualustalle IPTG:tä (isopropyyli- $\beta$ -D-galaktopyranosidi). Transformaatioseokset maljataan ampicilliinia, IPTG:tä ja X-gal:ia sisältäville maljoille. (Suominen ym. 2010, 79-81, 84.)





Kuva 4. Sinisen värin muodostumisen periaate  $\alpha$ -komplementaatiossa. (Suominen ym. 2010, 81)

### 2.2.5 Digestio

Restriktioentsyymidigestiossa restriktioentsyymit tunnistavat ja katkaisevat DNA:n tietystä kohdasta tai sen lähetyviltä. Restriktioentsyymit ovat bakteerien tuottamia endonukleaaseja, jotka ovat nukleiinihappoa juosteen keskeltä pilkkovia entsyymejä. (Suominen ym. 2010, 112.) Ne tunnistavat yleensä erityisiä 4-8 emäsparin sekvenssejä. Näitä kohtia kutsutaan restriktiokohdiksi, josta restriktioentsyymit pilkkovat molemmat DNA-juosteet tarkalleen määrätystä kohdasta. (Lodish ym. 2004, 361.) Bakteereilta löytyy myös metylaasientsyymi, joka muokkaa bakteerin omaa DNA:ta metyloimalla sitä vastaavan restriktioentsyymin kohdasta. Tämä siis suojaa bakteerin omaa DNA:ta sen omalta restriktioentsyymiltä. Siirretty vieras DNA bakteerissa ei ole samalla lailla metyloitua, vaan restriktioentsyymi pystyy katkaisemaan sitä. Restriktioentsyymejä on kolme päätyyppiä, joista tyyppi II on geeniteknikan kannalta tärkein ja se tunnistaa DNA:ssa palindromisen sekvenssin. (Suominen ym. 2010, 112-113.) Restriktiokohdat ovat yleisesti lyhyitä palindromisia sekvenssejä, jossa kummankin DNA-nauhan sekvenssi on sama, kun se luetaan 5' → 3'- suunnassa. (Lodish ym. 2004, 361)

Restriktioentsyymejä voidaan eristää monista eri bakteerilajeista. Entsyymit on nimetty lyhenteellä siitä organismin nimestä, joista ne on eristetty. Laji- ja sukunimestä koostuva etuosa kirjoitetaan kursivoidulla kun taas kannan ja entsyymin tunnisteosa kursivoimattomalla tekstillä. Esimerkiksi *Bam*HI on *Bacillus amyloliquefaciens*-bakteerin kannan H restriktioentsyymi numero I (roomalainen ykkönen). (Suominen ym. 2010, 113.)

Jokaisella restriktioentsyymillä on oma tunnistekohtansa (Kuva 5), esimerkiksi *Bam*HI tunnistaa kaikki GGATCC- sekvenssit DNA:ssa ja katkaisee DNA:n näistä kohdista, edellyttäen että tunnistuskohtia ei ole metyloitua.



Kuva 5. BamHI:n tunnistussekvenssi. Tunnistuskohdita kirjoittaessa katkaisukohtat merkataan yleensä nuolilla. (Suominen ym. 2010, 113)

*Bam*HI on ns. 5'-entsyymi eli DNA:n katkaisun yhteydessä syntyy 5'-päihin kohessiiviset päät. Entsyymejä jotka tuottavat 3'-päähän kohessiiviset päät esim. (*Pst*I), kutsutaan 3'-entsyymeiksi ja ei-kohessiivisiä päitä tuottavia entsyymejä esim. (*Sma*I) kutsutaan tylppäentsyymeiksi. Tylppäentsyymit katkaisevat kummankin DNA-nauhan samasta kohtaa. Restriktioentsyymin katkaistua DNA:n, sen 5'-päähän jää vapaa fosfaattiryhmä ja 3'-päähän OH-ryhmä. Tämä mahdollistaa sen, että päät voidaan halutessaan liittää yhteen, koska restriktioentsyymi ei poista fosfaattiryhmää vaan katkaisee kummastakin nauhas- ta yhden fosforiesterisidoksen. (Suominen ym. 2010, 113-115.)

Eri restriktioentsyymeillä on oma aktiivisuusyksikkö, josta käytetään lyhennystä U eli unit. 1 U kertoo kuinka paljon entsyymiä tarvitaan katkaisemaan 1 µg (λ-) DNA:ta tunnissa ilmoitetussa reaktio-oloissa. Yleensä katkaisureaktiossa käytetään jonkin verran ylimäärin entsyymiä, 1-5 U entsyymiä per 1 µg DNA:ta. Reaktio-olosuhteet vaikuttavat suuresti entsyymien toimintaan. Ne vaativat sopivan suolakonsentraation, puskurin, lämpötilan ja pH:n. (Suominen ym. 2010, 116.)

Tietyillä restriktioentsyymeillä esiintyy ns. tähtiaktiivisuutta, joka tarkoittaa sitä, että entsyymien tunnistuskohdan spesifisyys alenee. Esimerkiksi suuri glyseroli- pitoisuus, alhainen suolakonsentraatio, korkea pH tai entsyymiylimäärä saattaa aiheuttaa tähtiaktiivisuutta. Reaktion jälkeen osa restriktioentsyymeistä voidaan inaktivoida kuumennuksella, mutta jotkut ovat niin lämmönkestäviä että niihin tarvitaan muita menetelmiä. (Suominen ym. 2010, 116-117.)

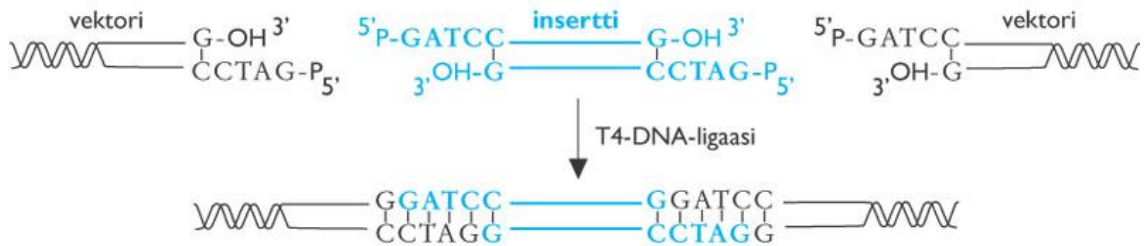
## 2.2.6 Ligaatio

Ligaatiolla DNA-jaksot liitetään toisiinsa. Siinä ligaasientsyymit kykenevät liittämään kovalenttisesti yhteen kaksi DNA-jaksoa, näitä kutsutaan DNA- ligaaseiksi. Yksi käytetyin ligaasi on T4-DNA-ligaasi, joka on *E. coli*n T4-faagin tuottama entsyymi. DNA:ssa täytyy olla 5'-päässä fosfaattiryhmä ja 3'-päässä OH-ryhmä, jotta ligaasi toimii. (Suominen & Ollikka 2004, 77-78.) Ligaasin toiminta voidaan estää poistamalla 5'-fosfaattiryhmä esimerkiksi alkalisella fosfataasilla ja näin ollen estää DNA-jaksojen yhteen liittyminen. Fosfaatti- ja OH-ryhmän lisäksi T4-DNA-ligaasi tarvitsee toimiakseen energiaa (ATP), magnesiumioneja ( $Mg^{2+}$ ) sekä pelkistävät olot. Yleisin ligaasin aktiivisuusyksikkö on Weiss-yksikkö. Ligaasin aktiivisuusmerkintä (U) löytyy ligaasiputken kyljestä ja on aina hyvä tietää minkä valmistajan ligaasia käyttää, mikä on sen aktiivisuus ja minä yksikkönä aktiivisuus on määritetty. (Suominen ym. 2010, 131.)

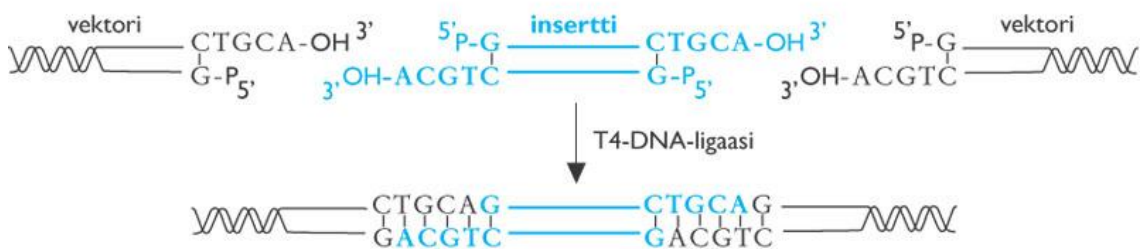
### 2.2.6.1 Kohessiivisten ja tylppien päiden ligaatio

Restriktioentsyymi jättää katkaisun yhteydessä DNA:n päät joko kohessiiviksi tai tylpiksi. Tällaiset päät voidaan kuitenkin sulkea DNA-ligaasin avulla yhteen (Kuva 6), koska restriktioentsyymi ei poista 5'-fosfaattiryhmää. Kohessiivisten päiden ollessa hetkellisesti kohdakkain ligaatioliuoksessa, vastinemästen välille syntyy vetysidokset, jolloin ligaasientsyymi tunnistaa puuttuvan fosfodiesterisidoksen ja muodostaa sen uudelleen käyttäen ATP:ta energiana. Ligaasilla voidaan sulkea vain samanlaiset kohessiiviset päät. Tylppien päiden ligaatio on paljon tehottomampaa kuin kohessiivisten päiden ligaatio. Siinä tylpät päät eivät voi liittyä vastinemästensä välityksellä, mutta jos päät osuvat yhteen liuoksessa, ligaasi voi muodostaa puuttuvat fosfodiesterisidokset. Tylppien päiden ligaatiota voidaan tarvittaessa tehostaa ja se on kuitenkin käyttökelpoinen menetelmä. Tylppien päiden ligaatiossa hyvänä puolena on se, että tylppäentsyymien jättämät päät voidaan liittää mihin tahansa toisen tylppäentsyymien jättämän pään kanssa, kunhan 5'-fosfaatit on tallella. (Suominen ym. 2010, 132-133.)

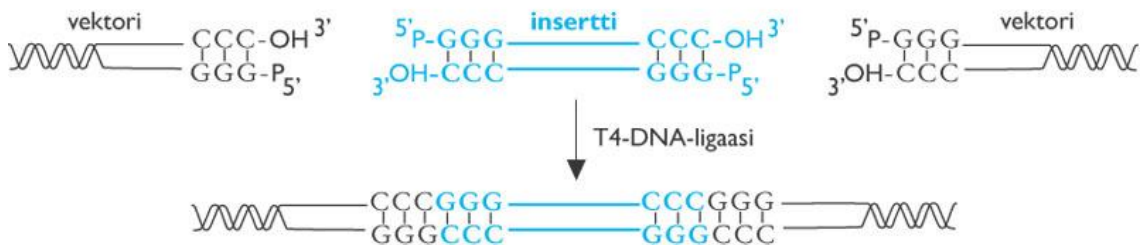
**A. 5'-kohessiivisten päiden (*Bam*HI) līgaatio**



**B. 3'-kohessiivisten päiden (*Pst*I) līgaatio**



**C. Tylppien päiden (*Sma*I) līgaatio**



Kuva 6. DNA-jaksojen päiden liittäminen yhteen T4-DNA-ligaasin avulla.

A. 5'-kohessiiviset päät, B. 3'-kohessiiviset päät, C. Tylpät päät (Suominen ym. 2010, 133)

**2.2.6.2 Erilaisten päiden līgaatio**

Tylppiä päitä ei voi liittää kohessiivisiin päihin eikä toisinpäin, myöskään erilaisia kohessiivisiä päitä ei voi liittää toisiinsa. Tylpät päät voidaan aina liittää toisiinsa ja kohessiiviset päät voidaan muuttaa tylpiksi kahdella eri tavalla. Kohessiiviset päät voidaan joko täyttää DNA-polymeraasilla tai poistaa DNA:ta hajottavalla nukleaasilla. Kohessiivisten 5'-päiden täyttämiseen käytetään yleensä *E.colin*

DNA-polymeraasi I:n fragmenttia eli Klenow-entsyymiä. Tämä entsyymi tarvitsee toimiakseen templaatin ja alukkeen, kuten muutkin polymeraasit. Kun reaktioseokseen lisätään deoksinukleosiditriposfaatteja (dNTP), Klenow-entsyymi liittää nukleotideja 3'-päähän. Huomioitavaa on, että 3'-päiden yksinauhaisia alueita ei voi tällä tavalla täyttää tylopiksi, koska toisen nauhan 5'-pää ei voi toimia alukkeena. Yksinauhaiset 5'- ja 3' päät voidaan poistaa niille spesifisillä nukleaaseilla, kuten mung bean- ja S1-nukleaaseilla. (Suominen ym. 2010, 134-135.)

#### 2.2.6.3 DNA:n 5'-päiden defosforylointi

Ligaatiossa DNA-päät, jossa on 5'-fosfaattiryhmä ja toisessa 3'-OH-ryhmä pysytään liittämään yhteen. Usein plasmidivektorin päiden ligatoituminen itsensä kanssa halutaan estää, jolloin se defosforyloidaan eli poistetaan 5'-fosfaatit alkaalisella fosfataasilla. Defosforylointiin käytetään joko bakteerista (BAP) tai vasikan suolistosta (CIP) eristettyä alkaalista fosfataasia. (Suominen & Ollikka 2004, 81.) Plasmidivektori kannattaa aina defosforyloida, jos se on katkaistu vain yhtä restriktioentsyymiä käyttäen. Näin estetään niin sanottu vektoritaustan muodostuminen. (Suominen ym. 2010, 137.)

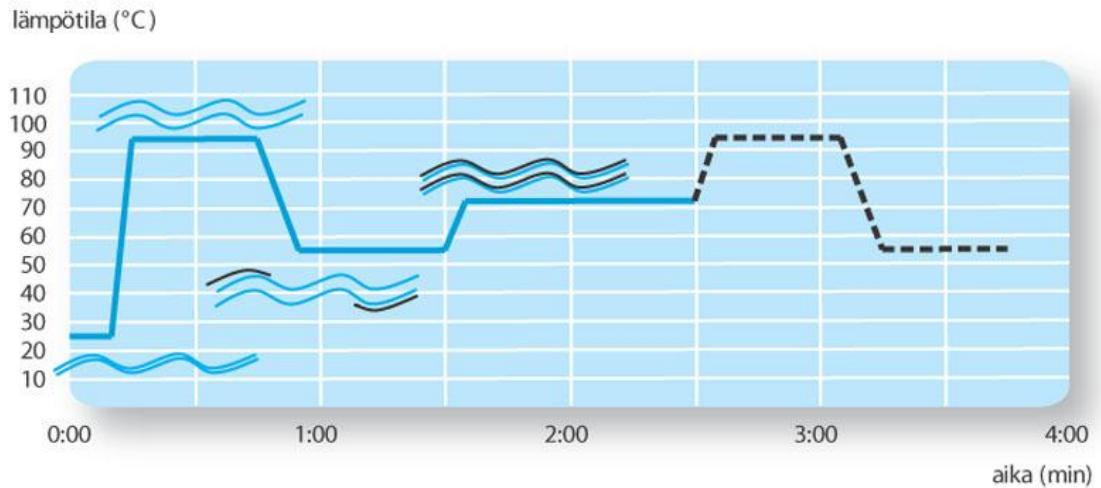
#### 2.2.7 Polymeraasiketjureaktio (PCR)

PCR (polymerase chain reaction) eli polymeraasiketjureaktiolla monistetaan DNA-jaksoja alukkeiden ja DNA-polymeraasin avulla. Monistettavat DNA-jaksot sijaitsevat kahden nukleotidijärjestykseltään tunnetun DNA-jakson välissä. PCR-reaktiot tehdään pienissä mikrosentrifuugiputkissa, joiden lämpötilaa kontrolloidaan PCR-laitteessa. (Suominen ym. 2010, 153.) PCR:n sovelluksia on monia ja PCR-tekniikkaa käytetään eri tarkoituksiin kuten, perinnöllisten sairauksien diagnostiikkaan, erilaisten virus- ja bakteerisairauksien toteamiseen tai yksilöiden tunnistamiseen. (Suominen & Ollikka 2004, 113.)

PCR-reaktio tarvitsee toimiakseen templaatin eli monistettavan DNA:n, alukkeet, DNA-polymeraasin, nukleotideja (dNTP), puskuriliuoksen ja steriiliä vettä.

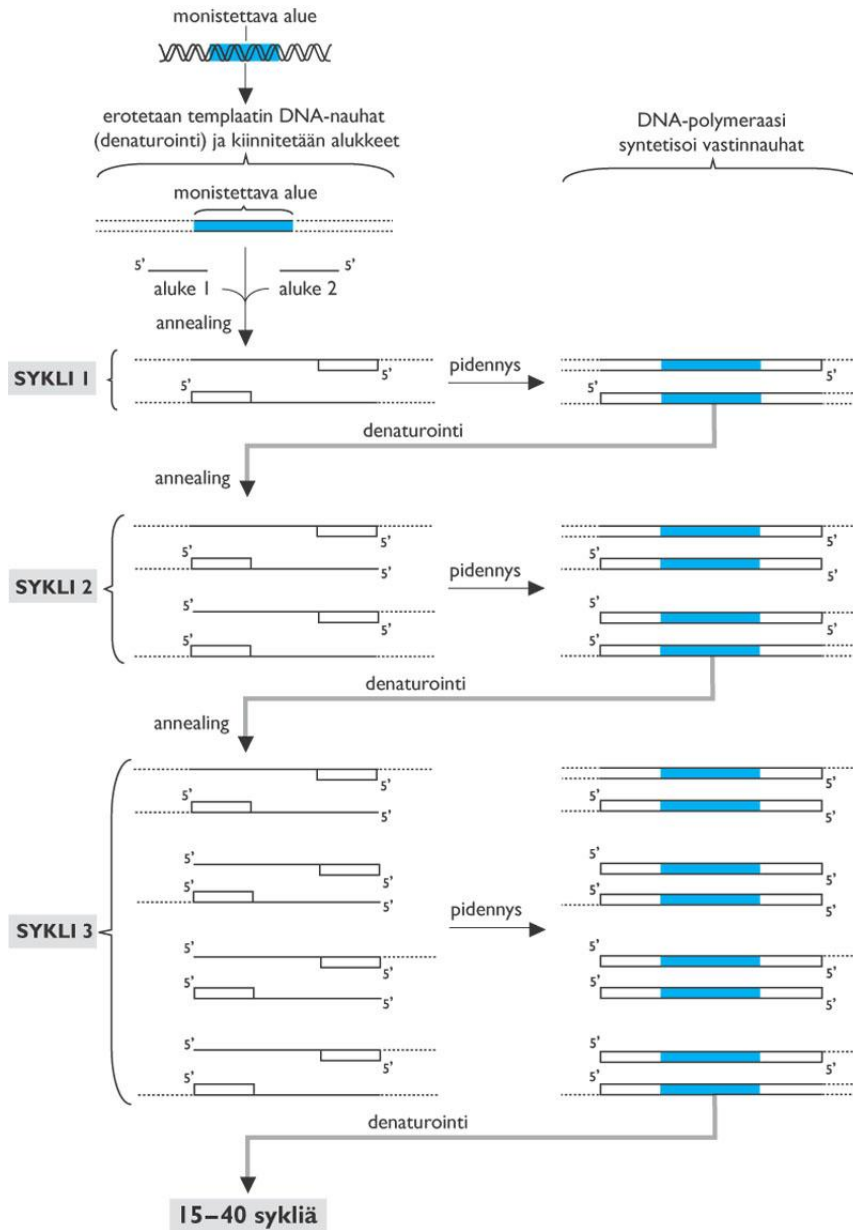
(Solunetti 2006) PCR:ssä voi templaattina toimia joko kaksijuosteinen DNA tai yksijuosteinen RNA. Tavallisimmin templaattina toimii kaksijuosteinen DNA. RNA:n ollessa lähtömateriaalina täytyy siitä ensin valmistaa yksijuosteinen cDNA käänteistranskriptaasilla, sitten kaksijuosteinen cDNA, jonka jälkeen voidaan tehdä varsinaiset monistusreaktiot. Alukkeet eli primerit ovat synteettisiä noin 15-40 nukleotidin pituisia DNA-jaksoja. (Suominen ym. 2010, 154.) Ne suunnitellaan siten, että ne kiinnittyvät kaksinauhaisen DNA:n eri juosteisiin monistettavan DNA-alueen vastakkaisiin päihin. PCR:ssä käytetään kahta aluketta, (forward ja reverse) jotka rajaavat monistettavan alueen sen 5'- ja 3'-päistä. DNA-polymeraasi on entsyymi, joka rakentaa reaktioseoksessa olevista nukleotideista (dNTP) uuden juosteen templaatin mallin mukaan. (Suominen & Ollikka 2004, 107-108.) Yksi yleisimmin käytetyistä entsyymeistä on *Thermus aquaticus*-bakteerista eristetty Taq-polymeraasientsyymi, mutta se tekee melko paljon virheitä. Siksi käytetään myös vähemmän virheitä tekeviä DNA-polymeraaseja (Vent-, Tth-, Pfu- ja DynaZyme-polymeraasit). Standardimenetelmät on kuitenkin optimoitu Taq-polymeraasille. (Suominen ym. 2010, 153.) Puskuriliuos ja siinä olevat ionit vaikuttavat reaktion olosuhteisiin ja tarkkuuteen. Yleisemmin käytetty puskuriliuos on magnesiumkloridiliuos ( $MgCl^{2+}$ -liuos). (Suominen ym. 2010, 162.)

PCR-syklissä toistetaan kolme vaihetta: denaturointi, alukkeiden kiinnitys (annealing) ja pidennysreaktio (Kuva 7). Yleensä syklejä on 15-40 ja kokonaisajoaika vaihtelee 30 minuutista kahteen tuntiin, riippuen laitteesta ja syklien määrästä. Toistamalla näitä vaiheita peräkkäin saadaan monistettavan templaatin kopiomäärä kasvamaan eksponentiaalisesti. (Suominen ym. 2010, 155.)



Kuva 7. PCR-syklin vaiheet. (Suominen ym. 2010, 155)

Polymeraasiketjureaktiossa DNA:n kaksoisjuoste avataan eli denaturoidaan kuumennuskäsittelyllä, jotta alukkeet voivat sitoutua templaattiin eli monistettavaan DNA:han. Tämän jälkeen lämpötilaa lasketaan hetkellisesti, jotta alukkeet pystyvät kiinnittymään templaattiin eli tehdään lyhyt annealing-reaktio. Kun alukkeet ovat kiinnittyneet, nostetaan taas lämpötilaa, jolloin polymeraasi liittää reaktioseoksessa olevia nukleotideja (dNTP) alukkeen 3'-päästä lähtien templaatin mallin mukaan, jolloin templaatin kummallekin nauhalle syntyy vastinnauha. Tätä vaihetta kutsutaan pidennysreaktioksi. Synteesi on valmis muutaman minuutin kuluttua, jonka jälkeen lämpötilaa nostetaan sen verran, että kaikki vastinnauhat irtoavat toisistaan (Kuva 8). PCR-sykliksi kutsutaan sarjaa denaturointi-annealing-denaturointi. (Suominen ym. 2010, 154-155.)



Kuva 8. Polymeerasiketjureaktion periaate. (Suominen ym. 2010, 157)

PCR on herkkä myös kontaminaatioille, joten PCR-reaktioiden valmistukseen tulisi olla oma tila, joka on eristetty muusta laboratoriosta sekä omat välineet ja reagenssit. Monistusreaktioiden ohella on syytä tehdä aina kontrollireaktioita, koska kontrollien avulla saadaan selville toimiiko reaktio halutulla tavalla vai onko jokin reagenssi mahdollisesti kontaminoitunut. (Suominen ym. 2010, 156, 165-166.)



### 2.2.8 Agarosigeelielektroforeesi (AGE)

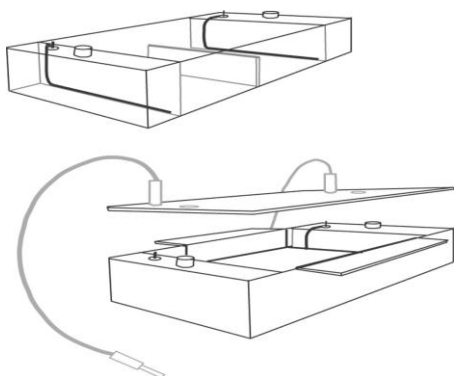
DNA:ta analysoidaan yleisimmin elektroforeesin avulla. Elektroforeesiin perustuvia menetelmiä on monia, riippuen analysoitavien fragmenttien eli palasien koosta. Pieniä DNA-jaksoja voidaan analysoida polyakryyliamidigeelielektroforeesilla (PAGE). Keskikokoisia fragmentteja (n. 0,1-50 kb) analysoidaan agarosigeelielektroforeesilla (AGE) ja suurempia DNA-molekyylejä (<2 Mb) tutkitaan pulssikenttäelektroforeesilla (PFGE). (Suominen ym. 2010, 122.)

Agarosi on merilevästä eristetty polysakkaridiseos. Kuumennettaessa se liukenee veteen ja jäähtyessään se muodostaa hyytelömäisen geelin. Koska DNA on negatiivisesti varautunut, fragmentit vaeltavat kohti positiivista elektroodia. Suuremmat fragmentit vaeltavat hitaammin, koska niiden edistymistä hidastaa agarosigeelin matriisi. DNA/RNA-jaksot kulkeutuvat pituudelle ominaisella nopeudella ja tietyn matkan. (Alberts ym. 2009, 330-331.) Pitkät DNA-jaksot kulkeutuvat hitaasti ja lyhyemmän matkan, lyhyet DNA-jaksot kulkeutuvat nopeammin ja pidemmän matkan. (Suominen ym. 2010, 122-123)

DNA-pätkät ovat näkymättömiä agarosigeelissä, ellei DNA:ta ole värjätty jollakin tavalla. Yksi käytetyin väriaine on etidiumbromidi (EtBr), jota voidaan lisätä suoraan geeliin. Se tunkeutuu nukleiinihappojen emästen väliin ja fluoresoi ultravioletivalossa oranssinpunaisena, jolloin jokainen DNA-pätkä saadaan näkyviin omana vyöhykkeenä eli "bändinä" geelissä. (Alberts ym. 2002, 494-495.) Etidiumbromidin hyvinä puolina ovat mm. laajat käyttökokemukset ja helppokäyttöisyys, haittapuolina taas sen karsinogeenisyys sekä geelin kuvauksessa tarvittava UV-valo. Etidiumbromidin kanssa työskenneltäessä tulee ottaa huomioon työturvallisuus. Suojavarustus tulee olla asianmukainen ja syntyvät jätteet ovat ongelmajätettä. UV-valo on myös haitallista ihmiselle sekä se tuhoaa nukleiinihappoja. Vaihtoehtoisia nukleiinihappovärejä löytyy, kuten SYBR ja sen johdannaiset, niiden käyttö on edelleen melko vähäistä. (Suominen ym. 2010, 123.)

AGE:ssa käytettävä laite (Kuva 9) on rakenteeltaan yksinkertainen. Laite koostuu ajoaltaasta, jonka pohjalla kummassakin päässä on elektrodit, ja kannesta.

AGE tehdään vaakatasossa ja geeli on ajon aikana upotettuna ajopuskuriin. Geeli valmistetaan keittämällä agarosia puskuriliuoksessa. Geeli jäädytetään noin 55 °C:een, siihen lisätään etidiumbromidia, sekoitetaan varovasti ja kaadetaan liuos geelitarjottimelle. Kun geeli on kaadettu tarjottimelle asetetaan geeliin näytekampa ja annetaan geelin jäähtyä ja jähmettyä. Geelin jäähdytyä poistetaan näytekampa ja asetetaan geeli ajoaltaaseen. Ajopuskurina käytetään samaa puskuria mitä geelissä on käytetty. (Suominen ym. 2010, 124.)



Kuva 9. Agarosigeelielektroforeesissa käytettävä ajolaite. (Suominen ym. 2010, 124)

Näytteet ladataan kamman muodostamiin näytekoloihin eli kaivoihin. Näytteiden pitää olla ajopuskuria raskaampaa, joten näytteisiin lisätään näytepuskuria, jossa on väriainetta. Näytepuskurin väri auttaa seuraamaan ajon edistymistä. Näytteiden rinnalle ladataan myös kokostandardi. Usein käytetään  $\lambda$ -DNA:ta, joka on pilkottu entsyymillä tunnetun kokoisiksi fragmenteiksi. Kokostandardeita on saatavana kaupallisesti, mutta niitä voi tehdä myös itse. (Suominen ym. 2010, 124-125.) Itse ajo aloitetaan laittamalla kansi päälle, laittamalla johtimet virtalähteeseen ja kytkemällä se päälle. Yleensä käytetään 20-200 V jännitettä ajolaitteen ja geelin koon mukaan. Geelin tarkasteluun käytetään UV-valoa sekä analysointiin ja dokumentointiin CCD-kameralla varustettua kuvantamislaitetta ja data tallennetaan ja käsitellään digitaalisesti. Useasti geenitekniikassa joudutaan myös eristämään DNA-jaksoja agarosigeeliltä ja siihen on kehitetty eri menetelmiä esimerkiksi erilaiset silikamenetelmät, LGTagarosi, elektroelutio. (Suominen ym. 2010, 125, 130.)

### **3 OPINNÄYTETYÖN TAVOITE, TARKOITUS JA TUTKIMUSTEHTÄVÄ**

Tämä opinnäytetyö on osa laajempaa tutkimusta ja geenikonstruktin rakennetaan yksityiselle asiakkaalle. Tutkimuksen tavoitteena oli tutkia kilpirauhasen liikatoiminnan eli hypertyreoosin syntyä, joka ei johdu autoimmunitetistä. Hypertyreoosia on tarkoitus tutkia geenimuunnellun hiiren avulla.

Tutkimustehtävänä oli valmistaa geenikonstruktin siirtogeenihiirimalleja varten. Konstruktissa TSH-reseptorigeeniin on tehty pistemutaatio, joka johtaa reseptorissa D633H mutaatioon.

## 4 OPINNÄYTETYÖN TOTEUTUS

Opinnäytetyö aloitettiin syksyllä 2012 ja se valmistui keväällä 2013. Opinnäytetyön käytännön osuus tehtiin tautimallinnuskeskuksessa, joka toimii Turun yliopiston biolääketieteen laitoksella, fysiologian osastolla. Opinnäytetyön teosta sovittiin toimeksiantosopimuksella (Liite1).

### 4.1 Opinnäytetyön metodologiset ratkaisut

Tämä opinnäytetyö on toiminnallinen opinnäytetyö, koska toiminnallisen opinnäytetyön tuloksena syntyy aina konkreettinen tuotos. Tässä tapauksessa rakennetaan geenikonstruktin. Toiminnalliseen opinnäytetyöhön kuuluvat myös käytännön toteutus ja sen raportointi. Toiminnallisessa opinnäytetyössä esitetään tutkimustehtävä tutkimusongelman sijaan. (Vilkkä & Airaksinen 2003, 9, 51.)

### 4.2 Opinnäytetyön eteneminen

Opinnäytetyön tarkoituksena oli rakentaa geenikonstruktin ja se oli tarkoitus saada valmiiksi kokonaisuudessaan syventävän harjoittelun aikana. Konstruktin valmistamiselle ei tarvittu erillistä lupaa, koska fysiologian laitoksella tehtävät GMO-työt (geenimuunneltu organismi) kuuluvat luokkaan yksi eli alhaisimman riskin luokkaan.

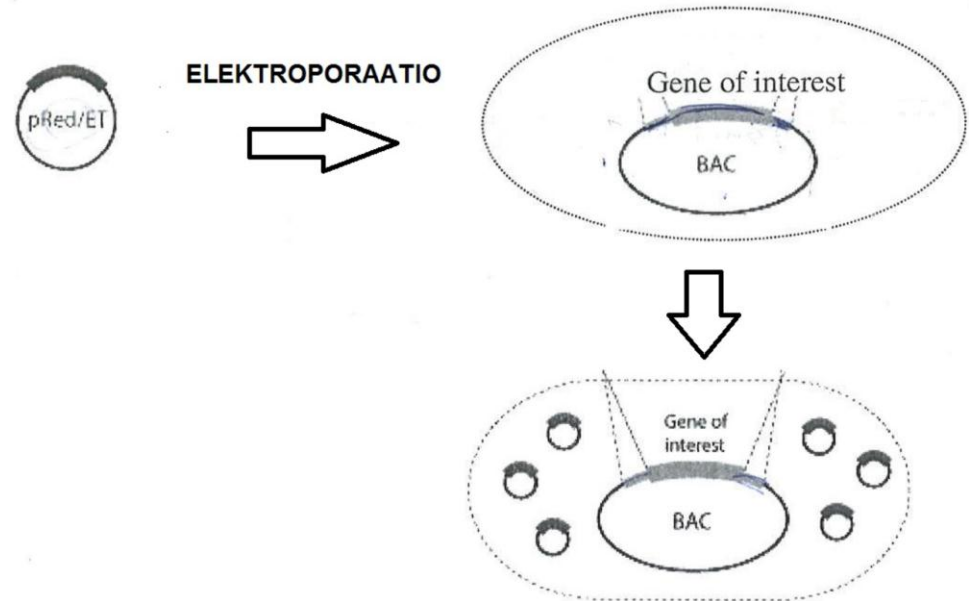
#### 4.2.1 Alkuperäisten bakteerisolujen kasvatus (BAC, jossa Tshr)

Opinnäytetyö aloitettiin kasvattamalla bakteerisoluja, joissa oli TSH-reseptorin (Tshr) sisältämä BAC-klooni. Eppendorf-putkiin laitettiin kahta erilaista Tshr-BAC:ia sisältäviä *E.coli*- bakteereja, LB-mediumia sekä kloramfenikoli antibiootia. Putkiin laitettiin reiät ja inkuboitettiin ravistelijassa yön yli +37 °C:ssa. Yön yli

kasvatusta pipetoitiin uusiin eppendorf-putkiin ja lisättiin LB-mediumia sekä kloramfenikoli antibioottia. Kasvatusta inkuboitiin ravistelijassa 2-3 tuntia +37 °C:ssa.

#### 4.2.2 Transformaatio (ET-plasmidi)

Kasvatuksen jälkeen solut, joissa oli Tshr:n sisältämä BAC-klooni, transformoitiin ET-plasmidilla. Solut valmisteltiin elektroporaatioon (Kuva 10) setrifugoimalalla +4 °C:ssa 30 sekunnin ajan, jonka jälkeen supernatantti kaadettiin pois ja pipetoitiin vettä tilalle. Tämä vaihe toistettiin kahteen kertaan. Viimeisellä kerralla vettä ei enää pipetoitu vaan supernatantti kaadettiin pois ja eppendorf-putket laitettiin jäihin. Eppendorf-putkien ollessa koko ajan jäissä, lisättiin ET-plasmidi pelletin päälle. Tämän jälkeen putkien sisältö pipetoitiin elektroporaatiokyvetteihin, jonka jälkeen kyveti laitettiin elektroporaatiolaitteeseen. Elektroporaatiossa käytettiin 1350V ja pyrittiin 5 ms sähköpulssiin. Elektroporaation jälkeen liuokseen lisättiin LB-mediumia, joka sekoitettiin varovasti pipetillä liuokseen ja siirrettiin takaisin kyvetistä eppendorf-putkeen. Eppendorf-putkia inkuboitiin ravistelijassa +30 °C:ssa tunnin verran, jotta solut saivat ”elpyä”. Inkuboinnin aikana valmistettiin LB-agarmaljat, joihin oli lisätty tetrasykliini- ja kloramfenikoli antibioottia. Tunnin inkuboinnin jälkeen solususpensiosta pipetoitiin maljalle tietty määrä ja levitettiin maljalle. Maljoja inkuboitiin yön yli +30 °C:ssa ja valolta suojassa. Itse maljojen teko, solususpension levitys ja inkubointi tehtiin mahdollisimman hyvin valolta suojattuna, koska tetrasykliini on valoherkkä. Myös +30 °C:een inkubointilämpötila oli tarkka, koska muuten ET-plasmidi häviää.



Kuva 10. Red-ET:n transformaatio E.coliin, jossa BAC ja Tshr.

#### 4.2.3 Kloonien kasvatus

Seuraavana päivänä maljalta poimittiin viisi kolonia per eppendorf-putki, jossa oli LB-mediumia, tetrasykliinia ja kloramfenikolia. Eppendorf-putkiin tehtiin reiät ja niitä inkuboitii yön yli +30 °C:ssa, pimeässä ja ravistelijassa.

#### 4.2.4 ET-proteiinien ilmentäminen

Seuraavana päivänä ET-proteiinia ilmennettiin L-arabinoosin avulla. Rei'itettyihin eppendorf-putkiin laitettiin LB-mediumia, tetrasykliinia, kloramfenikolia ja yön yli kasvatettuja klooneja. Eppendorf-putkia inkuboitii +30 °C:ssa 2 tuntia, ravistelijassa. Tämän jälkeen eppendorf-putkiin lisättiin 10% L-arabinoosia ja inkuboitii tunnin ajan +37 °C:ssa, ravistelijassa.

#### 4.2.5 Homologisten alueiden luominen minivektoriin

PCR-reaktion avulla luotiin lineaarinen minivektori, jossa homologiset alueet Tshr:n kanssa 5' ja 3'-päissä. Reaktioseos sisälsi: vettä, puskuria, nukleotideja, entsyymiä, DNA:ta (minivektori) sekä alukeparit. PCR-syklejä oli 32, jonka jälkeen PCR-tuote pipetoitiin 0,8% agaroosigeelille. Geeliajon jälkeen pala leikatettiin irti geelistä ja puhdistettiin (Liite 2). Puhdistettu PCR-tuote digestoitiin. Reaktioseos sisälsi: puhdistetun PCR-tuotteen (minivektori), puskuria, restriktioentsyymiä ja vettä. Reaktioseosta inkuboitiin +37 °C:ssa yön yli. Tämän jälkeen digestiotuote ajettiin 0,8% LE-agaroosigeelille ja puhdistettiin (Liite 2).

#### 4.2.6 Tshr-palan siirtäminen BAC-plasmidista minivektoriin, ET-rekombinaatiolla

Minivektori, jossa homologiset alueet Tshr:n kanssa, transformoitiin bakteerisoluihin, joissa olivat BAC-klooni ja ET-entsyymit. Inkuboinnin jälkeen solut valmisteltiin elektroporaation setrifugoimalla +4 °C:ssa 30 sekunnin ajan, jonka jälkeen supernatantti kaadettiin pois ja pipetoitiin vettä tilalle, tämä vaihe toistettiin kahteen kertaan. Viimeisellä kerralla vettä ei enää pipetoitu vaan supernatantti kaadettiin pois ja eppendorf-putket laitettiin jäihin. Eppendorf-putkien ollessa koko ajan jäissä, lisättiin minivektori pelletin päälle. Tämän jälkeen putkien sisältö pipetoitiin elektroporaatiokyvetteihin, jonka jälkeen kyveti laitettiin elektroporaatiolaitteeseen. Elektroporaatiossa käytettiin 1350V ja pyrittiin 5 ms sähköpulsseen. Elektroporaation jälkeen liuokseen lisättiin LB-mediumia, joka sekoitettiin varovasti pipetillä liuokseen ja siirrettiin takaisin kyvetistä eppendorf-putkeen. Eppendorf-putkia inkuboitiin ravistelijassa +37 °C:ssa kahden tunnin ajan, jonka aikana ET-rekombinaatio tapahtuu. Kahden tunnin jälkeen eppendorf-putkesta levitettiin solususpensiota silmukalla LB-agarmaljalle, joka sisälsi ampisilliinia. Maljoja inkuboitiin yön yli +37 °C:ssa. Yön yli kasvatuksista eristettiin plasmidi-DNA:ta (Liite 3)

Eristetystä plasmidi-DNA:sta tarkistettiin restriktioentsyymidigestiolla oliko ET-rekombinaatio tapahtunut. Reaktioseos sisälsi DNA:ta, restriktioentsyymiä, pus-

kuria ja vettä. Seosta inkuboitiin +37 °C:ssa, 1-1,5 tuntia. Oikeat kloonit, joissa rekombinaatio oli tapahtunut, transformoitiin uudelleen *E.colin* DH10B-soluihin. Tämän jälkeen ne vielä puhdistettiin kitillä ohjeen mukaan (Liite 4).

#### 4.2.7 Alakloonaus, pala eksoni-10:n alueelta pGEM4Z-plasmidiin

Pala TSH-reseptorin eksoni-10:stä monistettiin PCR:llä. Reaktioseos sisälsi: vettä, puskuria, nukleotideja, entsyymiä, DNA:ta (Tshr eksoni-10) sekä alukeparit. PCR-syklejä oli 32, jonka jälkeen PCR-tuote pipetoitiin 0,8% LE-agarosigeelille. Geelijonon jälkeen PCR-pala leikattiin irti geelistä ja puhdistettiin (Liite 2).

Puhdistettu PCR-tuote digestoitiin. Reaktioseos sisälsi: puhdistetun PCR-tuotteen (Tshr), puskuria, restriktioentsyymiä ja vettä. Reaktioseosta inkuboitiin +37 °C:ssa yön yli. Tämän jälkeen digestiotuote ajettiin 0,8% LE-agarosigeelille ja puhdistettiin (Liite 2).

pGEM4Z-plasmidi digestoitiin restriktioentsyymillä. Reaktioseos sisälsi: pGEM4Z-plasmidia, puskuria, restriktioentsyymiä ja vettä. Seosta inkuboitiin kolme tuntia +25 °C:ssa, jonka jälkeen seosta inaktivoitiin 15 minuuttia +75 °C:ssa.

Tämän jälkeen tehtiin alkaalisella fosfaatilla 5'-päiden fosfaattiryhmien poisto. Näin estetään vektorin päitä ligatoitumasta uudelleen yhteen ja estetään niin sanotun vektoritaustan muodostuminen. Reaktioseokseen lisättiin puskuria, alkaalista fosfataasia ja vettä, seosta inkuboitiin tunnin +37 °C:ssa. Inkuboinnin jälkeen seos ajettiin 0,8% LE-agarosigeelille ja puhdistettiin (Liite 2).

Seuraavaksi tehtiin ligaatio, reaktioseos oli koko ajan jäissä. Reaktioseos sisälsi, pGEM4Z-plasmidia, palan TSH-reseptorin eksoni-10:stä, ligaasipuskuria, ATP:ta, T4DNA- ligaasia ja vettä. Reaktioseosta inkuboitiin yön yli +16 °C:ssa.

Seuraavana päivänä transformointiin ligaatiotuote TOP10-soluihin, jonka jälkeen se laitettiin 30 minuutiksi jäihin. Tämän jälkeen seosta pidettiin +42 °C:ssa 30 sekuntia, jonka jälkeen seokseen pipetoitiin SOC-mediumia ja inkuboitiin



+37 °C:ssa tunnin ajan, ravistelijassa. Inkuboinnin jälkeen seos levitettiin agar-maljalle, jossa oli ampicilliinia, malja oli päällystetty IPTG:llä ja X-gal:lla. Maljaa inkuboitiin +37 °C:ssa yön yli.

Tämän pidemmälle ei konstruktin rakentamisessa päästy, koska aika loppui kesken. Eri vaiheita jouduttiin toistamaan useampaan kertaan ja se vei paljon aikaa. Varsinaista syytä ei löydetty sille miksi eri vaiheet eivät onnistuneet.

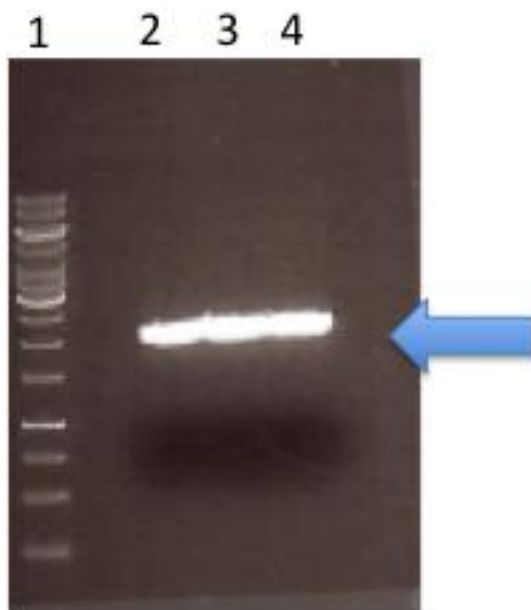
Tekemättä jäi vielä mutaatio PCR:n avulla, PCR-tuotteen ja loxPGK-tn5-Neo-Lox-P-palan elektroporaatio ET+BAC-yhdistelmään sekä oikean DNA:n sekvensointi ja oikean sekvensoinnin sisältävien bakteereiden kasvatus.

## 5 TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELO

Konstruktin teko jäi kesken, koska eri vaiheita jouduttiin toistamaan useampaan kertaan. Epäselväksi jäi miksi konstruktin rakentamisen eri vaiheissa oli niin paljon ongelmia.

### 5.1 Homologisten alueiden luonti

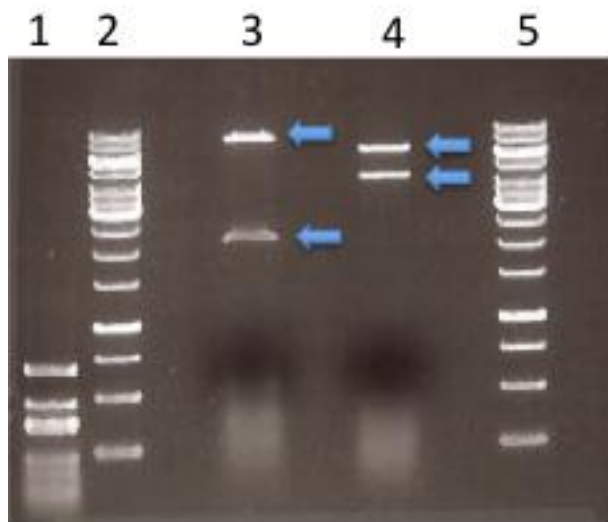
Minivektoriin luotiin homologiset alueet PCR:n avulla. PCR-tuote ajettiin aga-roosigeelille ja puhdistettiin. Puhdistettu PCR-tuote digestoititiin, jonka jälkeen se ajettiin geelille ja puhdistettiin. Tästä otettiin geelikuva ja tarkastettiin, että digestio oli onnistunut. (Kuva 11).



Kuva 11. Geelikuva minivektorista PCR:n jälkeen. Nuoli osoittaa monistunutta minivektoria. Kaivossa 1 on kokostandardi (GeneRuler 1kb) ja kaivoissa 2,3 ja 4 on *Sma*I:llä digestoitua minivektoria.

## 5.2 ET- rekombinaatio

Eristetystä plasmidi-DNA:sta tarkistettiin restriktioentsyymidigestiolla oikeat kloonit (Kuva 12). Oikeat kloonit transformoitiin *E.colin* DH10B-soluihin. Vaikka geelikuvan avulla oli tarkastettu oikeat kloonit, voi olla että ne eivät siltikään olleet oikeat. Mahdollista voi olla myös se, että minivektorissa tai DH10B-soluissa saattoi olla joku vika.



Kuva 12. Geelikuva plasmidi-DNA:sta digestion jälkeen. Nuolet osoittavat digestoitunutta plasmidia. Kaivossa 1 kokostandardi (PBS), kaivoissa 2 ja 5 kokostandardi (GeneRuler 1kb), kaivossa 3 *EcoRI*:llä ja kaivossa 4 *SacII*:llä digestoitua plasmidia.

## 5.3 Transformaatio TOP10-soluihin

Myöskään transformaatio TOP10-soluihin ei onnistunut. Mahdollisia virheitä on voinut tapahtua PCR:ssä tai digestiossa, niissä jokin reagenssi ei ole esimerkiksi toiminut kunnolla. Puhdistuksessa on myös jokin voinut epäonnistua.

pGEM4Z-plasmidi digestoitui restriktioentsyymillä, tässä on myös mahdollista, että jokin reagenssi ei ole toiminut kunnolla tai reaktio-olosuhteet eivät ole olleet kohdallaan. Myös 5'-päiden fosfaattiryhmien poistossa on voinut tapahtua niin,

että plasmidi on ligatoitunut pelkästään itsensä kanssa eikä yhdistelmä-DNA ole ligatoitunut plasmidiin. Ligaatiotuote transformoitiin TOP10-soluihin, tässä on voinut myös tapahtua jotain, jolloin ligaatiotuote ei ole transformoitunut TOP10-soluihin. Mahdollisesti IPTG:ssa ja X-gal:ssa on voinut olla myös jotain vikaa, jolloin sini-valkoseuranta ei ole toiminut halutulla tavalla.

## 6 POHDINTA

### 6.1 Tutkimustehtävän onnistuminen

Tutkimustehtävä ei onnistunut odotusten mukaisesti, vaikka työvaiheet tehtiin ohjeiden mukaisesti ja toistettiin useampaan kertaan. Mahdollisia virhelähteitä pohdittiin samalla, kun työvaiheita toistettiin uudestaan. On mahdotonta sanoa, missä vaiheessa virheitä on tapahtunut, koska virhelähteitä voi olla useita.

### 6.2 Tutkimuksen luotettavuuden tarkastelu

Tutkimuksen työvaiheet kirjattiin laboratoriapäiväkirjaan ja tehtiin työohjeiden mukaan. Tarvittaessa työvaiheet voitiin toistaa laboratoriapäiväkirjan merkintöjen ja työohjeiden avulla. Opinnäytetyön vaiheet onnistuivat vaihtelevasti, joten työohjeita jouduttiin muuttamaan ja soveltamaan. Opinnäytetyön tekijä teki käytännön osuuden lähiohjaajan kanssa yhdessä, joten toistettavuus jossain työvaiheessa saattoi kärsiä.

Aikaisempien tutkimusten vähyyks vaikeutti teoreettisen viitekehyksen luomista, koska pistemutaatiota ei oltu ennen tehty D663H kohtaan. Kirjallisuutta molekyylibiologiasta löytyi runsaasti ja käytettävä kirjallisuus oli alle kymmenen vuotta vanhaa. Yhdistelmä-DNA-molekyylin rakentamiseen liittyvää kirjallisuutta oli niukemmin saatavissa.

Näytteiden, reagenssien ja entsyymien säilytyksessä ei ollut ongelmia, koska ne säilytettiin niille määrättyissä lämpötiloissa. Myös reaktio- ja inkubaatiolämpötilo- ja sekä aikoja noudatettiin tarkasti.

Eniten ongelmia oli restriktio- ja ligaasientsyymeiden kanssa. Toisaalta myös muut käyttivät osittain samoja reagensseja ja entsyymejä niin mahdolliset kontaminaatiot tai väärät säilytyslämpötilat saattoivat vaikuttaa niiden toimintaan.

Nämä seikat otettiin huomioon ja uusia entsyymejä tilattiin lisää, mutta se ei aina poistanut ongelmaa.

Tämän opinnäytetyön käytännön osuuden toteutuksessa tuli vastaan monia ongelmia. Teoriassa tämän opinnäytetyön olisi pystynyt tekemään annetussa ajassa, mutta tutkimustyössä on tavallista, että eteen tulee uusia ongelmia. Tässä opinnäytetyössä ei pystytty kohdistamaan, missä vaiheessa ja missä kohtaa ongelma aina oli.

Opinnäytetyön tekeminen kuitenkin syvensi tekijän teoria- ja käytännön taitoja solu- ja molekyylibiologian alueelta. Toisaalta oppimisen kannalta oli hyvä, että joitain kohtia opinnäytetyössä jouduttiin toistamaan, joten ongelmakohtia tuli toistettua monta kertaa.

### 6.3 Eettinen pohdinta

Opinnäytetyön teossa noudatettiin hyvää tieteellistä käytäntöä. Tieteellinen tutkimus on eettisesti hyväksyttävä ja luotettava vain, jos tutkimus on suoritettu hyvän tieteellisen käytännön edellyttämällä tavalla. Hyvä tieteellinen käytäntö on myös olennainen osa tutkimusorganisaatioiden laatu järjestelmää. (Tutkimuseettinen neuvottelukunta 2012.)

Tässä opinnäytetyössä ei käsitelty kliinisiä potilasnäytteitä, joten eettisiä ongelmia ei ollut esimerkiksi anonymiteetin tai yksityisyyden kanssa. (Hirsjärvi ym. 2009, 23-27) Erillistä lupaa opinnäytetyön tekemiselle ei tarvittu, koska tutkimukselle oli jo hankittu tarvittavat luvat.

#### 6.3.1 Tutkijan ammattietiikka

Hyviä tieteellisen käytännön keskeisiä lähtökohtia muun muassa ovat: noudatetaan tiedeyhteisön tunnustamia toimintatapoja eli rehellisyyttä, huolellisuutta ja tarkkuutta, otetaan huomioon muiden tutkijoiden työt ja saavutukset, toisten tekstiä ei plagioida, tutkimus on suunniteltu, toteutettu ja raportoitu vaatimusten

mukaisesti ja tiedonhankinta-, tutkimus- ja arviointimenetelmiä sovelletaan teollisen tutkimuksen kriteerien mukaisesti. (Hirsjärvi ym. 2009, 24; Tutkimuseettinen neuvottelukunta 2012)

#### 6.4 Jatkotutkimusaiheet

Konstrukti pyritään saamaan valmiiksi tulevaisuudessa, jonka jälkeen se injisoidaan hiiren hedelmöittyneeseen munasoluun eli valmistetaan geenimuunnellut hiiret, joilla on kyseessä oleva mutaatio. Hiirten ilmiasu tutkitaan ja niiden avulla pyritään selvittämään mutaation vaikutuksia hypertyreosin syntymekanismeihin.

## LÄHTEET

Agretti, P.; De Marco, G.; Biagioni, M.; Iannilli, A.; Marigliano, M.; Pinchera, A.; Vitti, P.; Cherubini, V.; & Tonacchera, M. 2012. Sporadic congenital nonautoimmune hyperthyroidism caused by P639S mutation in thyrotropin receptor gene. *Eur J Pediatr*. Vol.171,1133–1137.

Alberts, B.; Bray, D.; Hopkin, K.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K. & Walter, P. 2009. *Essential cell biology*. Third edition. New York, USA and London, UK: Garland Science, Taylor & Francis Group.

Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K. & Walter, P. 2002. *Molecular biology of the cell*. Fourth edition. New York, USA: Garland Science, Taylor & Francis Group.

Eläinlääketieteellinen tutkimuskeskus 2013. Koe-eläintoiminta. Viitattu 26.3.2013. <http://www.laaninhallitus.fi/lh/etela/hankkeet/ellapro/home.nsf/pages/indexfin>

Genebridges 2013. How Red®/ET® Works. Viitattu 18.3.2013. [http://www.genebridges.com/gb/red\\_et\\_principles.php](http://www.genebridges.com/gb/red_et_principles.php)

Heino, J. & Vuento, M. 2010. *Biokemian ja solubiologian perusteet*. 2., uudistettu painos. Helsinki: WSOYPro Oy.

Hirsjärvi, S.; Remes, P. & Sajavaara, P. 2009. *Tutki ja kirjoita*. 15., uudistettu painos. Helsinki: Tammi.

Lodish, H.; Berk, A.; Matsudaira, P.; Kaiser, C.; Krieger, M.; Scott, M.; Zipursky, L. & Darnell, J. 2004. *Molecular cell biology*. Fifth edition. New York, USA: W.H. Freeman and Company.

Medicina 2013. Proteiinisynteesiä estävät mikrobilääkkeet. Viitattu 5.2.2013. [http://www.medicina.fi/index.php?option=com\\_content&view=article&id=122&Itemid=78](http://www.medicina.fi/index.php?option=com_content&view=article&id=122&Itemid=78)

Nienstedt, W.; Hänninen, O.; Arstila, A. & Björkqvist S-E. 2009. *Ihmisen fysiologia ja anatomia*. 18., uudistettu painos. Helsinki: Werner Söderström Oy.

Nienstedt, W. ym. (toim.) 2007. *Lääketieteen termit*. 5., uusittu painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.

Pohlenz, J.; Pfarr, N.; Kruger, S. & Hesse, V. 2006. Subclinical hyperthyroidism due to a thyrotropin receptor (TSHR) gene mutation (S505R). *Acta Pædiatrica*. Vol. 95, 1685-1687.

Solunetti 2006. DNA:n replikaatio. Viitattu 28.1.2013. [http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/dna-n\\_replikaatio/2/](http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/dna-n_replikaatio/2/)

Solunetti 2006. Nukleiinihappojen monistaminen. Viitattu 28.1.2013. [http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/nukleiinihappojen\\_monistaminen/2/](http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/nukleiinihappojen_monistaminen/2/)

Strauss, L. 2012. Transgeeniset kannat, geneettinen laadunvalvonta, alkioiden pakastaminen. PP-esitys, Koe-eläinopetuskeskus 29.10.2012.

Suominen, I. & Ollikka, P. 2004. *Yhdistelmä-DNA-tekniikan perusteet*. 3-2. painos. Helsinki: Hakapaino Oy.

Suominen, I.; Pärssinen, R.; Haajanen, K. & Pelkonen, J. 2010. *Geenitekniikka*. Turku: Turun ammattikorkeakoulu.




Tutkimuseettinen neuvottelukunta 2012. Hyvä tieteellinen käytäntö. Viitattu 3.4.2013.  
<http://www.tenk.fi/fi/htk-ohje/hyva-tieteellinen-kaytanta>

Ulmanen, I.; Tenhunen, J. & Yläne, J. 2009. Geeni ja biotekniikka. 6-8. painos. Helsinki: WSOY Oppimateriaalit Oy.

Vilka, H & Airaksinen, T. 2003. Toiminnallinen opinnäytetyö. Jyväskylä: Gummerus Kirjapaino Oy.

Välimäki, M. & Schalin-Jäntti, C. 2009. Kilpirauhanen. Teoksessa Endokrinologia. 2. painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.

# Opinnäytetyön toimeksiantosopimus

 <b>OPINNÄYTETYÖN TOIMEKSIANTOSOPIMUS</b> <span style="float: right;">1</span>	
TURUN AMMATTIKORKEAKOULU TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES	
<b>OPISKELIJAN TIEDOT</b>	
Nimi	JENNI TUOMINEN
Osoite	EERIKINKATU 9B B 25 20100 TURKU
Puhelin koti	040 8355555
Puhelin työ	
Sähköposti	jenni.tuominen@students.turkuamk.fi
Koulutusohjelma	BIOANALYTIKKAUS KOULUTUSOHJELMA
<b>OPINNÄYTETYÖ</b>	
Aihe/ työnimi	<sup>GEENIN</sup> HIIREN TSH-RESEPTORIN PISTEMUTAATIO - GEENIKONSTRUKTIIVIN RAKENTAMINEN
Aikataulu	LOKAKUU 2012 - HUHTIKUU 2013
<b>TOIMEKSIANTAJA</b>	
Organisaatio	TURUN YLIOPISTO
Työn ohjaaja / yhteyshenkilö	Leena Strauss / LEENA STRAUSS
Osoite	KIVINMYLLYNK. 10 20520 TKU
Puhelin	3337521
Sähköposti	leena@utu.fi
<b>OHJAAVAN OPETTAJAN YHTEYSTIEDOT</b>	
Ohjaava opettaja	Sanna Virtanen / Sanna Virtanen
Puhelin	
Sähköposti	sanna.virtanen@turkuamk.fi
Turun ammattikorkeakoulu Joukahaisenkatu 3 A, 20520 Turku puh. 02 263 350 faksi 02 2633 5791 sposti etunimi.su.kunimi@turkuamk.fi	



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU  
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

## OPINNÄYTETYÖN TOIMEKSIANTOSOPIMUS

2

### OPINNÄYTETYÖN SOPIMUSEHDOT

#### OHJAUS JA VASTUUT

Vastuu opinnäytetyön tekemisestä ja tuloksista on opiskelijalla. Turun ammattikorkeakoulu vastaa opinnäytetyön ohjauksesta. Toimeksiantaja sitoutuu antamaan opiskelijan käyttöön kaikki opinnäytetyön tekemisessä tarvittavat tiedot ja aineistot sekä ohjaamaan opinnäytetyötä toimeksiantajajärjestäntien näkökulmasta.

#### OIKEUDET

Opinnäytetyön tekijänoikeus kuuluu tekijälle tai opiskelijalle. Tekijänoikeuden lisäksi myös muiden immateriaalioikeuksien osalta noudatetaan kulloinkin voimassa olevaa kyseessä olevan oikeutta koskevaa lainsäädäntää.

#### TYÖSUHDE JA KUSTANNUKSET

Mahdollisesta työsuhteesta, työstä maksettavasta palkista ja työstä mahdollisesti aiheutuvien kustannusten korvaamisesta toimeksiantaja ja opinnäytetyön tekijä sopivat erikseen.

#### TULOSTEN JULKISTAMINEN JA LUOTTAMUKSELLISUUS

Opinnäytetyöstä laaditaan Turun ammattikorkeakoulun ohjeen mukainen kirjallinen raportti.

Mitä liike- tai ammattisalaisuuksiin liittyviä asioita ei esitetä opinnäytetyöraportissa?

Kirjallinen raportti luovutetaan toimeksiantajalle ja asetetaan kirjaston kokoelmiin tai julkaistaan elektronisessa muodossa verkkokirjastossa.

Julkaistava opinnäytetyöraportti on laadittava niin, ettei se sisällä liike- tai ammattisalaisuuksia tai muita julkisuuslaissa (laki viranomaisten toiminnan julkisuudesta) salassa pidettäväksi määritettyjä tietoja, vaan ne jätetään työn lausua-aineistoon. Opinnäytetyön arvioinnissa otetaan huomioon sekä julkaistava että salassa pidettävä osa.


Opinnäytetyön toimeksiantaja ja opiskelija sitoutuvat pitämään salassa kaikki opinnäytetyön tekemisessä ja sitä edeltävissä tai sen jälkeisissä neuvotteluissa osiin tulevat luottamukselliset tiedot ja asiakirjat.

Toimeksiantajan edustajalle varataan mahdollisuus tutustua opinnäytetyöraporttiin viimeistään neljätoista (14) päivää ennen aiotun julkaisemista. Toimeksiantaja antaa työstä ennen edellä mainittua julkaisemisajankohtaa lausunnon, jossa voidaan määrittellä opinnäytetyöraporttiin mahdollisesti sisällytettävä liike- tai ammattisalaisuudet, joita ei julkaista.

### OLEMME YHTEISESTI SOPINEET OPINNÄYTETYÖN TOTEUTUKSESTA YLLÄ ESITETTYLLÄ TAVALLA

14.3.2013

19.3.2013

 JENNI TUOMINEN

Opiskelija Laila Piippo

Toimeksiantaja

### LIITE : OPINNÄYTETYÖSUUNNITELMA

Tulosta lomake

Turun ammattikorkeakoulu  
Seukahaisenkatu 3 A, 20520 Turku  
puh. 02 263 350 faksi 02 2633 5791  
posti etunimi.sukunimi@turkuamk.fi

## QIAquick Gel Extraction Kit Protocol

### QIAquick Gel Extraction Kit Protocol

using a microcentrifuge

This protocol is designed to extract and purify DNA of 70 bp to 10 kb from standard or low-melt agarose gels in TAE or TBE buffer. Up to 400 mg agarose can be processed per spin column. This kit can also be used for DNA cleanup from enzymatic reactions (see page 8). For DNA cleanup from enzymatic reactions using this protocol, add 3 volumes of Buffer QG and 1 volume of isopropanol to the reaction, mix, and proceed with step 6 of the protocol. Alternatively, use the MinElute Reaction Cleanup Kit.

#### Important points before starting

- The yellow color of Buffer QG indicates a pH  $\leq 7.5$ .
- Add ethanol (96–100%) to Buffer PE before use (see bottle label for volume).
- All centrifugation steps are carried out at 17,900  $\times g$  (13,000 rpm) in a conventional table-top microcentrifuge at room temperature.

#### Procedure

1. **Excise the DNA fragment from the agarose gel with a clean, sharp scalpel.**  
Minimize the size of the gel slice by removing extra agarose.
2. **Weigh the gel slice in a colorless tube. Add 3 volumes of Buffer QG to 1 volume of gel (100 mg ~ 100  $\mu$ l).**  
For example, add 300  $\mu$ l of Buffer QG to each 100 mg of gel. For >2% agarose gels, add 6 volumes of Buffer QG. The maximum amount of gel slice per QIAquick column is 400 mg; for gel slices >400 mg use more than one QIAquick column.
3. **Incubate at 50°C for 10 min (or until the gel slice has completely dissolved). To help dissolve gel, mix by vortexing the tube every 2–3 min during the incubation.**  
**IMPORTANT:** Solubilize agarose completely. For >2% gels, increase incubation time.
4. **After the gel slice has dissolved completely, check that the color of the mixture is yellow (similar to Buffer QG without dissolved agarose).**  
If the color of the mixture is orange or violet, add 10  $\mu$ l of 3 M sodium acetate, pH 5.0, and mix. The color of the mixture will turn to yellow.  
The adsorption of DNA to the QIAquick membrane is efficient only at pH  $\leq 7.5$ . Buffer QG contains a pH indicator which is yellow at pH  $\leq 7.5$  and orange or violet at higher pH, allowing easy determination of the optimal pH for DNA binding.
5. **Add 1 gel volume of isopropanol to the sample and mix.**  
For example, if the agarose gel slice is 100 mg, add 100  $\mu$ l isopropanol. This step increases the yield of DNA fragments  $\leq 500$  bp and  $\geq 4$  kb. For DNA fragments between 500 bp and 4 kb, addition of isopropanol has no effect on yield. Do not centrifuge the sample at this stage.

Gel Extraction  
Spin Protocol

*→ use despite the size, not harmful.*

6. Place a QIAquick spin column in a provided 2 ml collection tube. *13000*
7. To bind DNA, apply the sample to the QIAquick column, and centrifuge for 1 min. The maximum volume of the column reservoir is ~~800~~ *750*  $\mu$ l. For sample volumes of more than 800  $\mu$ l, simply load and spin again.
8. Discard flow-through and place QIAquick column back in the same collection tube. Collection tubes are reused to reduce plastic waste.
9. Recommended: Add 0.5 ml of Buffer QG to QIAquick column and centrifuge for 1 min. This step will remove all traces of agarose. It is only required when the DNA will subsequently be used for direct sequencing, in vitro transcription, or microinjection.
10. To wash, add 0.75 ml of Buffer PE to QIAquick column and centrifuge for 1 min. *additional 5 min RT before centrifugation.*  
**Note:** If the DNA will be used for salt-sensitive applications, such as blunt-end ligation and direct sequencing, let the column stand 2–5 min after addition of Buffer PE, before centrifuging.
11. ~~Discard the flow-through~~ and centrifuge the QIAquick column for an additional 1 min at 17,900  $\times$  g (13,000 rpm). *vaahda eppari*  
**IMPORTANT:** Residual ethanol from Buffer PE will not be completely removed unless the flow-through is discarded before this additional centrifugation.
12. Place QIAquick column into a clean 1.5 ml microcentrifuge tube. *uusi eppari*
13. To elute DNA, add 50  $\mu$ l of Buffer EB (10 mM Tris-Cl, pH 8.5) or water (pH 7.0–8.5) to the center of the QIAquick membrane and centrifuge the column for 1 min. Alternatively, for increased DNA concentration, add 30  $\mu$ l elution buffer to the center of the QIAquick membrane, let the column stand for 1 min, and then centrifuge for 1 min. *30ml Chapman*  
**IMPORTANT:** Ensure that the elution buffer is dispensed directly onto the QIAquick membrane for complete elution of bound DNA. The average eluate volume is 48  $\mu$ l from 50  $\mu$ l elution buffer volume, and 28  $\mu$ l from 30  $\mu$ l.  
 Elution efficiency is dependent on pH. The maximum elution efficiency is achieved between pH 7.0 and 8.5. When using water, make sure that the pH value is within this range, and store DNA at  $-20^{\circ}\text{C}$  as DNA may degrade in the absence of a buffering agent. The purified DNA can also be eluted in TE (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, pH 8.0), but the EDTA may inhibit subsequent enzymatic reactions.
14. If the purified DNA is to be analyzed on a gel, add 1 volume of Loading Dye to 5 volumes of purified DNA. Mix the solution by pipetting up and down before loading the gel. *let it stand 10 min before elution*  
 Loading dye contains 3 marker dyes (bromophenol blue, xylene cyanol, and orange G) that facilitate estimation of DNA migration distance and optimization of agarose gel run time. Refer to Table 2 (page 15) to identify the dyes according to migration distance and agarose gel percentage and type. *Minä mästä 10 min. eluoidaan kahteen kertaan*

Gel Extraction Spin Protocol

## Miniprep DNA isolation protocol

### Miniprep DNA isolation protocol

A simple plasmid DNA isolation protocol is given below:

1. Spin down the 1.5 ml overnight cultures for 1 min at 6,000 rpm.
  2. Discard the supernatant and resuspend the cell pellet in 200  $\mu$ l buffer P1 with RNase.
  3. Add 200  $\mu$ l of buffer P2 and mix by inverting the tube several times.   
*→ plysis → hajottaa*
  4. Add 200  $\mu$ l of buffer P3 and mix by inverting the tube several times.   
*→ neutraloi lyysistufferin toiminnan*
- (Leave the sample on ice for 10 min.)
5. Spin down the white lysate at the maximum speed for 10 min. *+4°C 13,000*
  6. Transfer the clear *600  $\mu$ l* supernatant into a new 1.5 ml-microfuge tube and add 0.50 ml of 2-propanol.
  7. Mix by inverting the tube and spin down the DNA at the maximum speed for 10 min. *+4°C*
  8. Discard the supernatant and add 0.5 ml of 70% ethanol to rinse the pellet.
  9. Spin down the DNA at the maximum speed for 5 min and carefully discard the supernatant.   
*+4°C 13,000*
  10. Dry the pellet under the speed vacuum for 2 min or leave the tube open on the bench for 5 to 10 min until the DNA pellet is completely dry. Do not overdry the pellet otherwise the DNA will become difficult to re-dissolve.   
*+70°C (min to dry it)*
  11. Carefully resuspend the dry DNA pellet in 50  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O or 10 mM Tris/HCl.   
*→ sama kuin kasin eristyksessä*

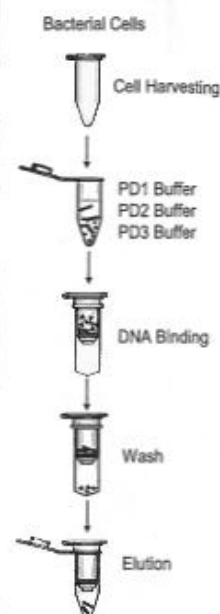
6. Vältä sakkaa, älä koske putken sisäpuolelle

# High-Speed Plasmid Mini Kit Protocol

## High-Speed Plasmid Mini Kit Protocol

- > Add provided RNase A to the PD1 Buffer and store at 4°C; if precipitates have formed in the PD2 Buffer, warm the buffer in a 37°C water bath, followed by gentle shaking to dissolve.
- > Add absolute ethanol to the Wash Buffer prior to initial use (see the bottle label for volume).
- > Additional requirements: microcentrifuge tubes

Step 1 Harvesting	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Transfer 1.5 ml of cultured bacterial cells to a microcentrifuge tube.</li> <li>● Centrifuge at 14-16,000 x g for 1 minute and discard the supernatant.</li> <li>● If more than 1.5 ml of cultured bacterial cells is used, repeat the Harvesting Step.</li> </ul>
Step 2 Re-suspension	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Add 200 µl of PD1 Buffer (RNase A added) to the tube and resuspend the cell pellet by vortex or pipetting.</li> </ul>
Step 3 Lysis	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Add 200 µl of PD2 Buffer and mix gently by inverting the tube 10 times. <b>Do not vortex</b> to avoid shearing the genomic DNA.</li> <li>● Let stand at room temperature for 2 minutes or until the lysate is homologous.</li> </ul>
Step 4 Neutralization	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Add 300 µl of PD3 Buffer and mix immediately by inverting the tube 10 times. <b>Do not vortex.</b></li> <li>● Centrifuge at 14-16,000 x g for 3 minutes.</li> </ul>
Step 5 DNA Binding	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Place a PD Column in a 2 ml Collection Tube.</li> <li>● Add the supernatant from Step 4 to the PD Column and centrifuge at 14-16,000 x g for 30 seconds.</li> <li>● Discard the flow-through and place the PD Column back in the 2 ml Collection Tube.</li> </ul>
Step 6 Wash	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Add 400 µl of W1 Buffer into the PD Column.</li> <li>● Centrifuge at 14-16,000 x g for 30 seconds.</li> <li>● Discard the flow-through and place the PD Column back in the 2 ml Collection Tube.</li> <li>● Add 600 µl of Wash Buffer (ethanol added) into the PD Column.</li> <li>● Centrifuge at 14-16,000 x g for 30 seconds.</li> <li>● Discard the flow through and place the PD Column back in the 2 ml Collection Tube.</li> <li>● Centrifuge at 14-16,000 x g again for 3 minutes to dry the column matrix.</li> </ul>
Step 7 DNA Elution	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Transfer the dried PD Column to a new microcentrifuge tube.</li> <li>● Add 50 µl of Elution Buffer or TE into the center of the column matrix.</li> <li>● Let stand for 2 minutes or until the Elution Buffer or TE is absorbed by the matrix.</li> <li>● Centrifuge at 14-16,000 x g for 2 minutes to elute the DNA.</li> </ul>



## Troubleshooting

Problem	Possible Reasons/Solution
Low Yield	<p><b>Bacterial cells were not lysed completely</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● If more than 10 OD<sub>600</sub> units of bacterial culture are used, dilute into multiple tubes.</li> <li>● Following PD3 Buffer addition, pipetting or inverting will help to ensure the sample is homologous.</li> </ul> <p><b>Incorrect DNA Elution Step</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● Ensure that Elution Buffer is added into the center of the PD Column matrix and is completely absorbed.</li> </ul> <p><b>Incomplete DNA Elution</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● If plasmid DNA are larger than 10 Kb, use preheated Elution Buffer (60-70°C) in the Elution step.</li> </ul>
Eluted DNA does not perform well in downstream applications	<p><b>Residual ethanol contamination</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● Following the Wash step, dry the PD Column with additional centrifugation at 14-16,000 x g for 5 minutes.</li> </ul> <p><b>RNA contamination</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● Prior to using PD1 Buffer, be sure RNase A is added.</li> </ul> <p><b>Genomic DNA contamination</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● Do not use overgrown bacterial cultures.</li> <li>● During PD2 and PD3 Buffer addition, mix gently to prevent genomic DNA shearing.</li> </ul> <p><b>Nuclease contamination</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● Following the DNA Binding step, add 400 µl of W1 Buffer into the PD Column and incubate for 2 minutes at room temperature. Centrifuge the PD Column at 14-16,000 x g for 30 seconds and proceed with the standard Wash step.</li> </ul>