

Oskari Torppa

# *Lactobacillus amylovorus* -kantojen pintakerrosproteiinien kloonauk ja ilmentäminen

---

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalyttikko

Laboratorioalan koulutusohjelma

Opinnäytetyö

18.6.2013

Tekijä Otsikko  Sivumäärä Aika	Oskari Torppa <i>Lactobacillus amylovorus</i> -kantojen pintakerrosproteiinien kloonaus ja ilmentäminen 26 sivua + 1 liite 18.6.2013
Tutkinto	Laboratorioanalyytikko
Koulutusohjelma	Laboratorioalan koulutusohjelma
Ohjaajat	Yliopistonlehtori Silja Åvall-Jääskeläinen Lehtori Tiina Soininen
<p>Tämä opinnäytetyö toteutettiin Helsingin yliopiston eläinlääketieteellisen tiedekunnan eläinlääketieteellisten biotieteiden osastolla, mikrobiologian ja epidemiologian oppiaineessa.</p> <p>Pintakerrosproteiinit ovat molekyylipainoltaan 40 - 200 kDa:n painoisia proteiineja, jotka muodostavat monien bakteerien ja arkkien soluseinän uloimman kerroksen. Ne järjestäytyvät solun pinnalle huokoisiksi hilarakenteiksi. Pintakerrosproteiinien on todettu muun muassa suojaavan solua, toimivan kiinnityskohtana entsyymeille ja auttavan bakteeria kiinnittymään kudosten pinnoille.</p> <p>Tämän työn tavoitteena oli kloonata kolmen eri <i>Lactobacillus amylovorus</i> -kannan (GRL1114, GRL1116 ja GRL1117) pinnalleen ilmentämien pintakerrosproteiinien koodaavat geenit ja puhdistaa rekombinanttipintakerrosproteiineja tulevaisuudessa tehtäviä jatkotutkimuksia varten.</p> <p><i>L. amylovorus</i> -kantojen kromosomaalisesta DNA:sta monistettiin PCR:llä pintakerrosproteiineja koodaava <i>slp</i>-geeni. GRL1114- ja GRL1116-kannoista monistettiin molemmista yksi <i>slp</i>-geeni ja GRL1117-kannasta kaksi eri <i>slp</i>-geeniä. Geenit ligoitiin pET-28b(+) -vektoriin ja transformoitiin <i>Escherichia coli</i> XL1 Blue -kantaan.</p> <p>Rekombinanttipintakerrosproteiinit tuotettiin <i>E. coli</i> ekspressiosoluissa IPTG-induktion avulla. Proteiinit puhdistettiin affiniteetikromatografian avulla. Kaikkien pintakerrosproteiinigeenien kloonaus ja ilmentäminen onnistui. Tuotettujen pintakerrosproteiinien koot vaihtelivat 45 ja 66 kDa:n välillä ja niiden saannot olivat 1,76 - 3,76 mg.</p>	
Avainsanat	<i>Lactobacillus amylovorus</i> , pintakerrosproteiini, affiniteetikromatografia

Author Title Number of Pages Date	Oskari Torppa The cloning and expression of <i>Lactobacillus amylovorus</i> surface layer proteins 26 pages + 1 appendice 18 June 2013
Degree	Bachelor of Laboratory Sciences
Degree Programme	Laboratory Sciences
Instructors	Silja Åvall-Jääskeläinen, University Lecturer Tiina Soininen, Lecturer
<p>This study was carried out at the University of Helsinki in the Faculty of Veterinary Medicine, Department of Veterinary Biosciences, in the subject of Veterinary Microbiology and Epidemiology.</p> <p>Surface layer proteins have a molecular weight of 40 to 200 kDa and they make up the outermost layer of the cell envelope of many bacteria and archaea. They form a highly porous lattice structure. The S-layer proteins have been found to, among other things, protect the cell, act as adhesion sites for exoenzymes and help the bacteria to adhere to different host tissues.</p> <p>The aim of this study was to clone the S-layer protein coding genes from three <i>Lactobacillus amylovorus</i> strains (GRL 1114, GRL1116 and GRL1117) and purify the recombinant S-layer protein for follow-up studies.</p> <p>The S-layer protein coding <i>slp</i> gene was amplified from chromosomal DNA using PCR. One <i>slp</i> gene was amplified from GRL1114 and GRL1116 strains and two <i>slp</i> genes from GRL1117 strain. The genes were ligated into the pET-28b(+) vector and transformed into <i>Escherichia coli</i> XL1 Blue strain.</p> <p>The recombinant S-layer proteins were produced in <i>E. coli</i> expression cells using IPTG-induction. The protein purification was carried out using affinity chromatography. The cloning and expression of every <i>slp</i>-gene was successful. Surface layer protein product sizes ranged from 45 to 66 kDa and the yields were between 1.76 and 3.76 mg.</p>	
Keywords	<i>Lactobacillus amylovorus</i> , surface layer protein, affinity chromatography

# Sisällys

## Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Kirjallisuuskatsaus	2
2.1	Bakteerien pintakerrosproteiinit	2
2.2	<i>Lactobacillus</i> -suku	4
2.3	<i>Lactobacillus</i> -suvun pintakerrosproteiinit	5
2.4	<i>Lactobacillus amylovorus</i>	5
3	Materiaalit	7
3.1	Työssä käytetyt bakteerikannat	7
3.2	Alukkeet ja niiden suunnittelu	9
4	<i>Slp</i> -geenien kloonaukset sekä proteiinien tuotto ja puhdistus	11
4.1	Kaavio geenin kloonaukset ja ilmentämisprosessista	11
4.2	Kromosomaalisen ja plasmidi-DNA:n eristys	11
4.3	<i>Slp</i> -geenien kloonaukset	12
4.4	Rekombinanttiproteiinin lokalisaatio	17
4.5	Rekombinanttiproteiinin tuotto ja puhdistus	17
5	Tulokset ja tulosten tarkastelu	19
5.1	<i>L. amylovorus</i> -bakteereiden pintakerrosproteiinien karakterisointi	19
5.2	Pintakerrosproteiinigeenien kloonaukset	20
5.3	Rekombinanttiproteiinin tuotto	23
6	Yhteenveto	26
	Lähteet	27

## Liitteet

Liite 1. pET-28b(+) -plasmidi

## Lyhenteet

MRS	de Man, Rogosa ja Sharpe, bakteerikasvatusalusta erityisesti laktobasillien kasvatukseen
LB	Luria-Bertani, bakteerikasvatusalusta
PBS	Phosphate Buffered Saline, fosfaattipuskuroitu suolaliuos
PCR	Polymerase chain reaction, polymeerasiketjureaktio
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, natriumdodekyylisulfaattipolyakryyliamidigeelielektroforeesi
Slp	Surface layer protein, pintakerrosproteiini
TAE	Tris/Acetate/EDTA-puskuri
TBE	Tris/Borate/EDTA-puskuri

## 1 Johdanto

Opinnäytetyö tehtiin Helsingin yliopiston Eläinlääketieteellisen tiedekunnan mikrobiologian ja epidemiologian oppiaineelle. Tämä työ muodostaa osan v. 2009 alkanutta EU:n rahoittamaa tutkimushanketta INTERPLAY (Interplay of microbiota and gut function in the developing pig – Innovative avenues towards sustainable animal production). Interplay-hankkeessa on tarkoituksena parantaa eläinten terveyttä ja ruuan turvallisuutta tutkimalla suoliston toimintaa suolistomikrobiston ja niiden vuorovaikutuksien kautta. Tutkimusprojektin päämääränä on mikrobiologian ja epidemiologian oppiaineessa sekvensoida kymmenen sian suolistosta eristetyn *Lactobacillus amylovorus* -kannan genomit ja tutkia näiden kantojen pintakerrosproteiinien merkitystä kiinnittymisessä sian suolistoon.

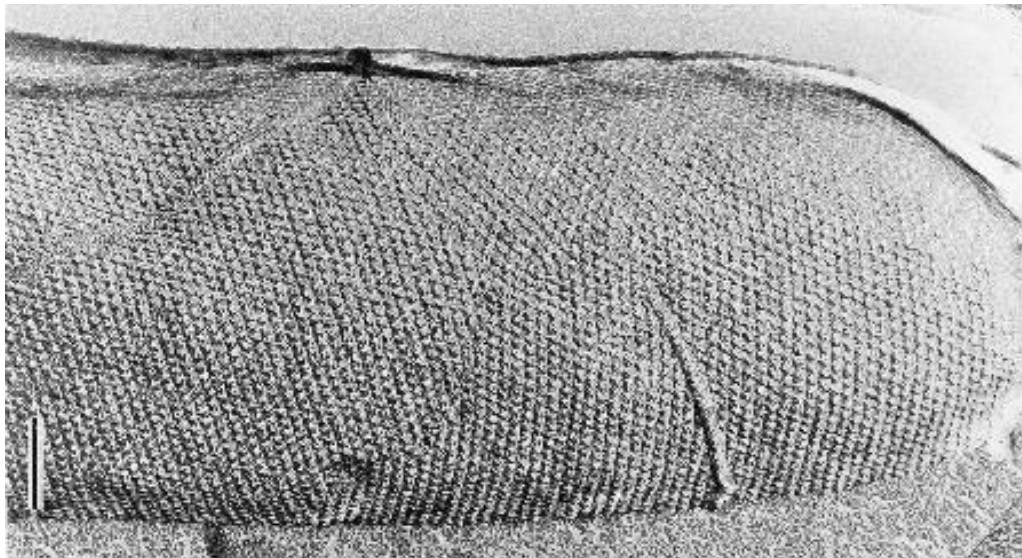
Pintakerrosproteiinit muodostavat monien bakteerien ja arkkien solun uloimman kerroksen, pintaproteiinkerroksen. Pintakerros on koostumukseltaan huokoinen hilarakenne. Pintakerrosproteiinit ovat mielenkiintoinen tutkimuskohde, sillä niillä on todettu olevan monia potentiaalisia käyttökohteita ja niitä on hyödynnetty mm. matriisina vasta-aineiden, allergeenien ja muiden proteiinien sitomisessa.

Tämän opinnäytetyön tavoitteena oli kloonata kolmen *L. amylovorus* -kannan pintakerrosproteiineja koodaavat geenit pET-menetelmän avulla, minkä jälkeen pintakerrosproteiineja tuotetaan *E. coli* -isännässä. Tutkittavat *L. amylovorus* -kannat on eristetty emakon ulosteesta tai ohutsuolen jejunumista.

## 2 Kirjallisuuskatsaus

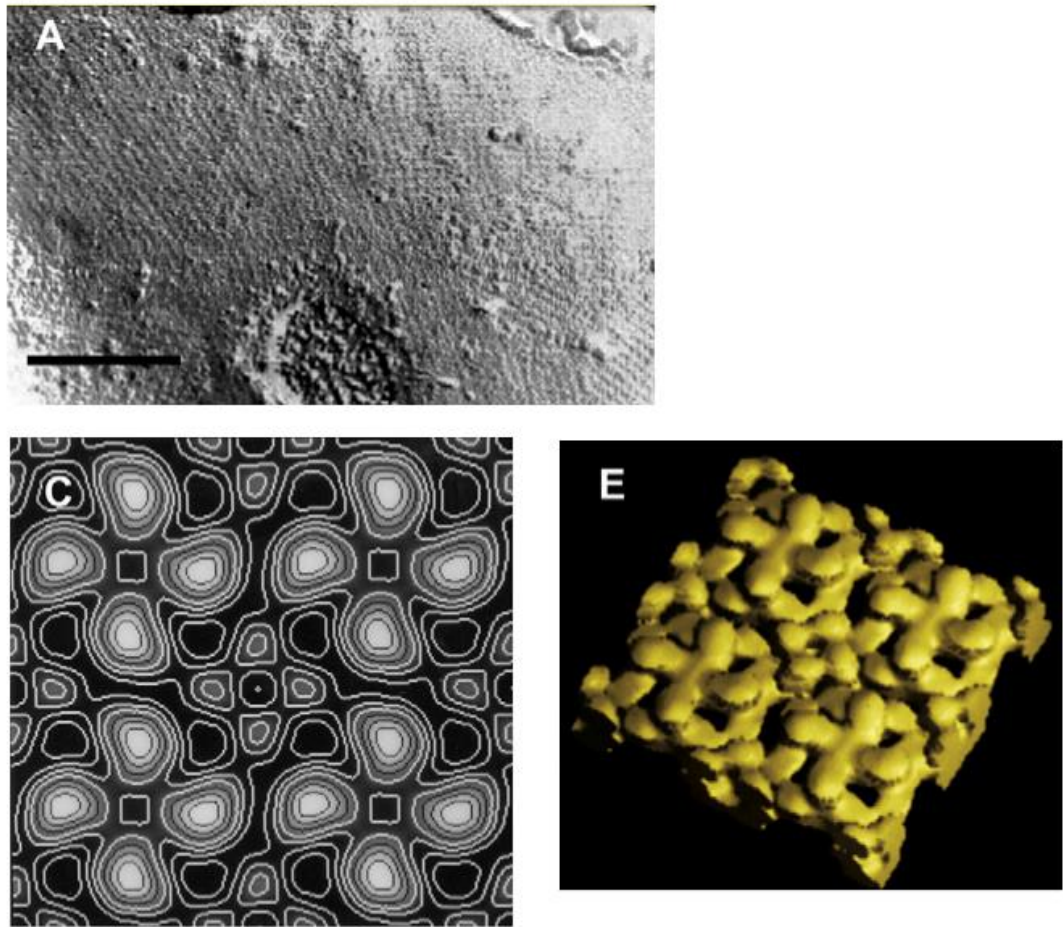
### 2.1 Bakteerien pintakerrosproteiinit

Pintakerrosproteiinit muodostavat monien bakteerien ja arkkien soluseinän uloimman kerroksen. Pintakerrosproteiinit ovat molekyylipainoltaan useimmiten 40 ja 200 kDa:n väliltä ja ne järjestäytyvät bakteerin pinnalle vinokulmaisiksi, nelikulmaisiksi tai kuusikulmaisiksi hilarakenteiksi. Pintakerrosproteiinien muodostaman pintakerroksen paksuus bakteereilla on yleensä 5 - 25 nm. Bakteerisoluista pintakerros tunnistetaan yksiselitteisesti elektronimikroskopian avulla. Parhaita elektronimikroskopiategniikoita pintakerrosproteiinien tutkimiseen ovat jäädytysetsaus ja negatiivivärjäys. Kuviossa 1 nähdään elektronimikroskooppikuva bakteerisolun pintakerrosproteiinien muodostamasta kuusikulmaisesta hilarakenteesta. [1; 2.]



Kuvio 1. Elektronimikroskooppikuva kokonaisesta jäädytetystä bakteerisolusta, jossa näkyy pintakerrosproteiinien järjestäytyminen, vasemman alakulman palkki = 100 nm [2]

Pintakerrosproteiinit muodostavat yhden molekyylin paksuisen kerroksen, joka koostuu identtisistä alayksiköistä. Jopa 70 % pintakerroksen ulkopinnasta voi koostua 2 - 8 nm:n kokoisista, muodoltaan ja kooltaan samanlaisista huokosista. Kuviossa 2 näkyy pintakerroksen huokosrakenteita. Pintakerrosproteiinien alayksiköt kiinnittyvät toisiinsa ja soluseinään ei-kovalenttisesti ja ne pystytään irrottamaan toisistaan ja soluseinästä esimerkiksi guanidiinihydrokloridilla, joka on vetysiltoja purkava kaotrooppinen suola. Kun kaotrooppinen suola poistetaan, järjestäytyvät alayksiköt uudelleen hilarakenteeksi joko kiinteälle pinnalle tai liuokseen. [2.]



Kuvio 2. A. elektronimikroskooppikuva jäädytysetsatusta ja platinapäälystetystä *Sporosarcina ureae* -bakteerin pintaproteiinkerroksesta C. Bakteerin pinnan korkeuseroja havainnollistava kuva E. 3-D rekonstruktio pintaproteiinkerroksen pinnasta. [3.]

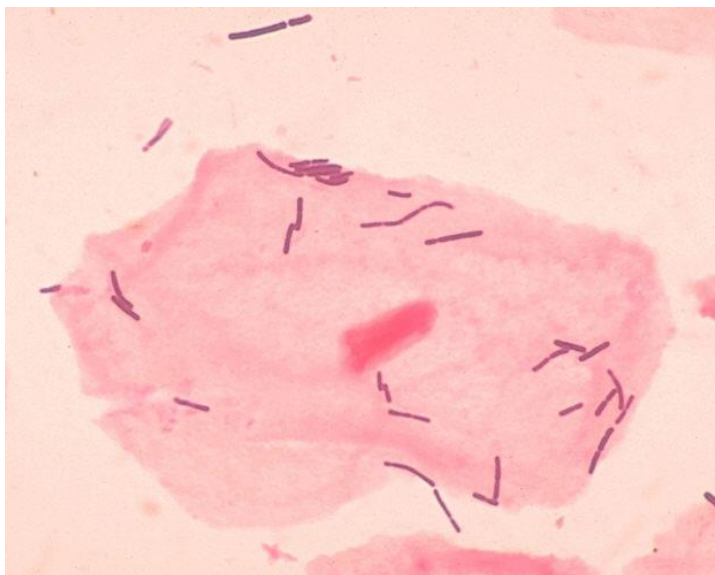
Pintakerrosproteiinien rakenteesta, biosynteesistä, molekyylibiologiasta ja genetiikasta tiedetään melko paljon, mutta niiden tehtävät ovat edelleen suhteellisen tuntemattomia. Tiedetään kuitenkin, että pintakerrosproteiineilla ei ole yhtä ja ainoaa selkeää tehtävää. Tähänastisen tutkimustiedon perusteella eri bakteerit hyötyvät niistä eri tavoin. Pintakerrosproteiinien on todettu muun muassa suojaavan solua, toimivan kiinnityskohtana entsyymeille ja auttavan bakteeria kiinnittymään kudosten pinnoille [1]. On myös esitetty, että pintakerrosproteiinit saattaisivat toimia bakteerin tukirankana, mutta tästä ei ole saatu yksiselitteistä näyttöä [3].



Pintakerrosproteiinien jaksollisen ja huokoisen rakenteen ansiosta niillä on monenlaisia lupaavia sovelluskohteita bioteknologian, nanoteknologian, nanobioteknologian ja bioniikan aloilla. Tutkimuksissa pintakerrosproteiineja on hyödynnetty mm. matriisina vasta-aineiden, allergeenien ja muiden proteiinien sitomisessa. Pintakerrosproteiineja on tutkittu myös rokotesovelluksissa. [1.]

## 2.2 *Lactobacillus* -suku

*Lactobacillus* -suvun bakteerit ovat gram-positiivisia ja fakultatiivisesti anaerobisia maitohappobakteereja. Laktobasilleja elää esimerkiksi ihmisten ja eläinten ruuansulatuselimistössä, suuontelossa ja emättimessä. Suvun bakteereille on ominaista niiden kyky fermentoida laktoosia ja muita sokereita maitohapoksi. Kuviossa 3 on laktobasilleja eräässä niiden luonnollisista elinympäristöistä. [8.]



Kuvio 3. Laktobasilleja emättimen epiteelisolun vieressä ja päällä [4]

Monet *Lactobacillus* -suvun bakteerit ovat ihmiselle hyödyllisiä. Laktobasillien käytöllä elintarviketeollisuudessa on pitkät perinteet ja niillä on GRAS (generally recognized as safe) luokitus. Joitakin *Lactobacillus* -suvun bakteereita käytetään yleisesti myös esimerkiksi probiootteina sekä ihmisille että eläimille tarkoitetuissa valmisteissa. [1.]

### 2.3 *Lactobacillus* -suvun pintakerrosproteiinit

Useilta *Lactobacillus* -suvun lajeilta on löydetty pintakerrosproteiineja. Joillakin lajeilla on todettu olevan jopa useampia pintakerrosproteiinia koodaavia geenejä, jotka saattavat ilmentyä erilaisissa olosuhteissa tai olla lainkaan ilmentymättä. Laktobasillien pintakerrosproteiinit ovat muihin pintakerrosproteiineihin nähden pieniä, vain 25 - 71 kDa:n kokoisia. [1; 12.]

Laktobasillien pintakerrosproteiinien aminohappokoostumus muistuttaa suuresti muiden pintakerrosproteiinien aminohappokoostumusta monissa piirteissä. Laktobasillien, kuten muidenkin bakteerien, pintakerrosproteiineissa on paljon hydrofobisia (31,9 - 38,7 %) ja hydroksyyliiryhmiä (23 - 33 %) sisältäviä aminohappoja. Vastaavasti rikkiä sisältäviä aminohappoja on vain vähän (korkeintaan 2 %). Erojakin aminohappokoostumuksesta löytyy. Laktobasillien pintakerrosproteiineissa positiivisesti varautuneiden aminohappojen osuus voi olla jopa 12,5 % ja se on aina korkeampi kuin negatiivisesti varautuneiden aminohappojen osuus. Tämä ominaisuus aiheuttaa laktobasillien pintakerrosproteiinien korkean isoelektrisen pisteen (9,35 - 10,4) ja erottaa ne muiden bakteerien pintakerrosproteiineista, joiden isoelektrinen piste on yleensä hieman happaman puolella. [1.]

Muutamien laktobasillien pintakerrosproteiineista on karakterisoitu soluseinään kiinnittymisestä vastaava rakenteellinen alue ja säännölliseen hilarakenteeseen järjestäytymisestä vastaava alue. Esimerkiksi *Lactobacillus acidophilus* -bakteerin SlpA-proteiinin C-terminaalinen alue on vastuussa soluseinään sitoutumisesta ja N-terminaalinen alue hilarakenteeseen järjestäytymisestä. [1.]

### 2.4 *Lactobacillus amylovorus*

*Lactobacillus amylovorus* -bakteerilaji eristettiin ensimmäisen kerran vuonna 1981 fermentoidusta maissijätteestä, tämän jälkeen bakteeria on eristetty myös porsaan suolistosta. *L. amylovorus* kykenee monista muista laktobasilleista poiketen fermentoimaan tärkkelystä. [5; 6]

*L. amylovorus* -solut ovat fakultatiivisesti anaerobisia, gram-positiivisia, itiöitä muodostamattomia sauvamaisia bakteereja. Bakteerisolut ovat leveydeltään 0,5 - 1,5

$\mu\text{m}$  ja pituudeltaan 1,5 - 10  $\mu\text{m}$ . MRS-maljalla kasvaessaan ne muodostavat sileäreunaisia, valkoisia, kuperia pesäkkeitä. [5; 6.]

### 3 Materiaalit

#### 3.1 Työssä käytetyt bakteerikannat

Työssä käytetyt bakteerit on koottu taulukkoon 1.

Taulukko 1. Opinnäytetyössä käytetyt ja tuotetut bakteerikannat

Laji	Kannan nimi mikrobiologian oppiaineen kantakokoelmassa	Alkuperäinen tunnus	Eristyslähde/ominaisuudet	Viite
<i>E. coli</i>	ERF2160	-	Sisältää plasmidin pET-28b(+)	Mikrobiologian oppiaineen kantakokoelma
<i>E. coli</i>	ERF2163	BL21	Ilmentämiskanta	Novagen
<i>E. coli</i>	-	XL1 Blue	Kloonauskanta	Agilent Technologies
<i>L. amylovorus</i>	GRL1111	DSM 20531	Fermentoitu maissijäte, tyypikanta	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ)
<i>L. amylovorus</i>	GRL1114	LAB8	Emakon uloste	[7]
<i>L. amylovorus</i>	GRL1116	LAB16b	Sian ohutsuolen jejunum	[7]
<i>L. amylovorus</i>	GRL1117	LAB31	Sian ohutsuolen jejunum	[7]
<i>E. coli</i>	ERF2462	-	Lähtökanta XL1 Blue, Sisältää plasmidin pET-28b(+), johon ligoitu GRL1114 <i>s/pB</i> geeni	Tämä työ
<i>E. coli</i>	ERF2463	-	Lähtökanta ERF2163, Sisältää plasmidin pET-28b(+), johon ligoitu GRL1114 <i>s/pB</i> geeni	Tämä työ
<i>E. coli</i>	ERF2464	-	Lähtökanta XL1 Blue, Sisältää plasmidin pET-28b(+), johon ligoitu GRL1117 <i>s/pB</i> geeni	Tämä työ
<i>E. coli</i>	ERF2465	-	Lähtökanta ERF2163, Sisältää plasmidin pET-28b(+), johon ligoitu GRL1117 <i>s/pB</i> geeni	Tämä työ
<i>E. coli</i>	ERF2472	-	Lähtökanta XL1 Blue, Sisältää plasmidin pET-28b(+), johon ligoitu GRL1117 <i>s/pA</i> geeni	Tämä työ

<i>E. coli</i>	ERF2473	-	Lähtökanta ERF2163, Sisältää plasmidin pET- 28b(+), johon ligoitu GRL1117 <i>s/pA</i> geeni	Tämä työ
<i>E. coli</i>	ERF2474	-	Lähtökanta XL1 Blue, Sisältää plasmidin pET- 28b(+), johon ligoitu GRL1116 <i>s/pA</i> geeni	Tämä työ
<i>E. coli</i>	ERF2475	-	Lähtökanta ERF2163, Sisältää plasmidin pET- 28b(+), johon ligoitu GRL1116 <i>s/pA</i> geeni	Tämä työ

### 3.2 Alukkeet ja niiden suunnittelu

Taulukkoon 2 on koottu työssä käytetyt alukkeet, niiden käyttökohteet ja sekvenssit. *Slp*-geenien kloonauksessa käytettyihin alukkeisiin lisättiin restriktioentsyymin tunnistuskohta.

Taulukko 2. Opinnäytetyön alukkeet

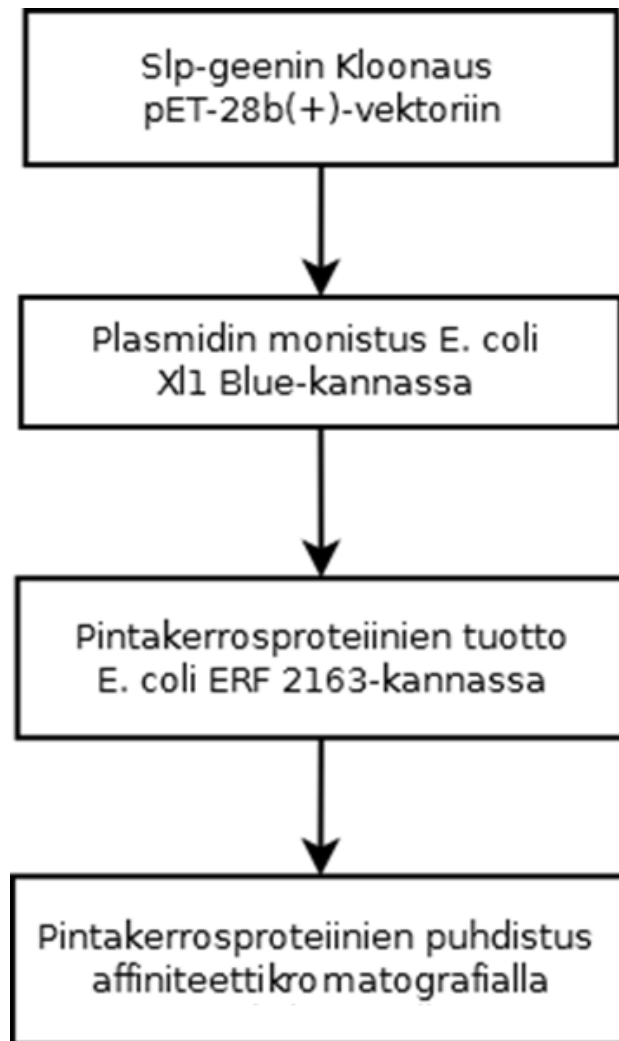
Aluke	Alukkeen tunnus oligokokoelmassa	Sekvenssi	Käyttökohte	T <sub>m</sub> (°C)
GRL1114 <i>slpB</i> forward-aluke	2147	GTCATCCATGG CTACTACAGTT AATATCAACGG TAAC	Geenin PCR ja sekvensointi	68,3
GRL1114 <i>slpB</i> reverse-aluke	2148	TCGCACTCGAG AAAGTTTGAAG CCTTAACGT	Geenin PCR ja sekvensointi	66,9
GRL1116 <i>slpA</i> forward-aluke	2162	CTACGCCATGG CTGACGCTACT ACAACTACTAC TG	Geenin PCR	71,8
GRL1116 <i>slpA</i> reverse-aluke	2163	GTCTGCTCGAG AAAGTTTGAAG CCTTTACGTAA GT	Geenin PCR	68,3
GRL1117 <i>slpA</i> forward-aluke	2158	CTACGCCATGG CTGTAGCAATT AAGGGTAACAC T	Geenin PCR	69,5
GRL1117 <i>slpA</i> reverse-aluke	2159	GTAGTCTCGAG GAAGTTTGCCT TCTTAACGTATT G	Geenin PCR	68,3
GRL1117 <i>slpB</i> forward-aluke	2154	CTACGCCATGG ACACACCAACA GTTGATACTG	Geenin PCR	69,5
GRL1117 <i>slpB</i> reverse-aluke	2155	GTAGTCTCGAG TTGAGCTGCGC TCAAGTT	Geenin PCR	68,1
GRL1114 <i>slpB</i> forward-sekvensointialuke	2152	TGCTGGTTACT TTACTGCACCA	Geenin sekvensointi	58,4
GRL1114 <i>slpB</i> reverse-sekvensointialuke	2153	GTGCAGTAAAG TAACCAGCACC A	Geenin sekvensointi	60,6
GRL1117 <i>slpA</i> forward-sekvensointialuke	2160	CAGGTCAACAA TACGTAGCA	Geenin sekvensointi	55,3

GRL1117 <i>s/pA</i> reverse- sekvensointialuke	2161	GAGTAAAGACC AAGCTTACCG	Geenin sekvensointi	57,9
pET-28b(+)- plasmidin inserttien sekvensointialuke	1568	GCTAGTTATTG CTCAGCGG	PCR-tarkistukset ja sekvensointireaktiot	56,7
pET-28b(+)- plasmidin inserttien sekvensointialuke	1569	TAATACGACTC ACTATAGGG	PCR-tarkistukset ja sekvensointireaktioit	53,2

## 4 *Slp*-geenien kloonaukseen sekä proteiinien tuotto ja puhdistus

### 4.1 Kaavio geenin kloonauksen- ja ilmentämisprosessista

Kuvioon 4 on tiivistetty *slp*-geenien kloonauksen- ja ilmentämisprosessi.



Kuvio 4. Kaavio *slp*-geenien kloonauksen- ja ilmentämisprosessista

### 4.2 Kromosomaalisen ja plasmidi-DNA:n eristys

*L. amylovorus* -kannoista GRL1111, GRL1114, GRL1116 ja GRL1117 siirrostettiin pesäke 5 ml MRS-liemiputkeen ja kasvatettiin anaerobisissa olosuhteissa yön yli +37 °C:ssa. Viljelmistä otettiin putkeen 1 ml:n näyte, josta DNA:n eristys tehtiin Promegan



Wizard Genomic DNA Purification Kitillä [9]. Eristys tehtiin kitin ohjeen mukaan, mutta solujen hajotuksessa käytettiin 1 mg lysotsyymiä ja 225 U mutanolysiiniä kuhunkin näytteeseen. DNA-pitoisuudet mitattiin NanoDrop-laitteella MilliQ-vettä vastaan ja analysoitiin 0,7 % TAE-agarosigeelillä.

*L. amylovorus* -kantojen GRL1111, GRL1114, GRL1116 ja GRL1117 kasvatusliemistä otettiin myös toinen 1 ml:n näyte, joka sentrifugoitiin putken pohjalle ja pestiin 1 ml:lla kylmää PBS-puskuria. Supernatantit pipetoitiin pois ja pelletit suspensoitiin 100 µl:aan Laemmli-näytenpuskuriin. Näytteitä inkuboitiin 5 min 100 °C:n lämpöhauteessa ennen ajoa 12 % SDS-PAGE:ssa.

ERF2160 -bakteerikantaa siirrostettiin kasvamaan kantakokoelman putkista LB + 30 µg/ml kanamysiinimaljalle plasmidieristystä varten. Kyseinen kanta sisältää pET-28b(+)-plasmidin (liite 1), jota tarvittiin kloonauksia varten. Yön yli aerobisesti +37 °C:ssa kasvaneelta maljalta siirrostettiin yksi pesäke 2 ml:aan 30 µg/ml kanamysiiniä sisältävään LB-liemeen (LB-kan<sup>30</sup>). Näytteitä inkuboitiin +37 °C:ssa 220 rpm ravistelussa, kunnes spektrofotometrillä 600 nm:n aallonpituudella mitattu absorbanssi oli yli 1,2. 27 µl viljelmää siirrostettiin 20 ml:aan LB-kan<sup>30</sup>-lientä. Viljelmää kasvatettiin vielä yön yli +37 °C:ssa 220 rpm ravistelussa.

PET-28b(+)-plasmidi eristettiin yön yli kasvatetusta viljelmästä QIAprep Spin Miniprep -kitillä. Eristys tehtiin ohjeen mukaan [10] käyttäen eluointiin 50 µl kitin eluointipuskuria. DNA-pitoisuus mitattiin NanoDrop-laitteella ja DNA:n laatu tarkistettiin 0,8 % TBE-geelillä.

#### 4.3 *Slp*-geenien kloonaukset

Opinnäytetyön aikana tehtiin yhteensä neljän *slp*-geenin kloonaukset ja rekombinanttiproteiinin tuotto. Työssä kloonattiin *L. amylovorus* -kannoista *slp*-geenit taulukon 3 mukaisesti.

Taulukko 3. *L. amylovorus* kantojen *slp*-geenien pituudet

<i>L. amylovorus</i> -kanta	Geeni	Pituus (bp)
GRL1114	<i>slpB</i>	1506
GRL1116	<i>slpA</i>	1401
GRL1117	<i>slpA</i>	1782
GRL1117	<i>slpB</i>	1473

Geenit nimettiin joko *slpA*- tai *slpB*-geeneiksi, sen mukaan osoittivatko ne homologiaa *L. amylovorus* DSM 16698 -kannalta jo aiemmin karakterisoituihin *slpA*- tai *slpB*-geeneihin. Pintakerrosproteiinigeenit monistettiin *L. amylovorus* -kantojen kromosomaalisesta DNA:sta taulukoissa 4 ja 5 esitetyillä reaktiokomponenteilla ja ohjelmalla. Rinnakkaisia PCR-reaktioita tehtiin kolme.

Taulukko 4. *Slp*-geenien PCR-reaktio

Reagenssi	V (µl)	Loppukonsentraatio
Phusion HF-puskuri (5x)	10	1x
Forward aluke	2,5	0,5 µM
Reverse aluke	2,5	0,5 µM
dNTP mix (10 mM)	1	0,2 mM
Phusion enzyme	0,5	1 U
Kromosomaalinen DNA	1	-
H <sub>2</sub> O	32,5	-
Kokonaistilavuus	50	-

Taulukko 5. *Slp*-geenin PCR-ohjelma

Reaktion vaihe	T (°C)	Aika	Sykliden määrä
Alkudenaturaatio	98	30 s	1
Denaturaatio	98	10 s	30
Annealing	60-64	20 s	
Ekstensio	72	37-51 s	
Loppuekstensio	72	10 min	1

Kolmen rinnakkaisreaktion PCR-tuotteet yhdistettiin ja tarkistettiin tuote 0,8 % TBE-agarosigeelillä. PCR-tuote puhdistettiin Qiagenin QIAquick PCR Purification Kitillä ohjeen [11] mukaisesti ja eluoiitiin 50 µl:aan kitin eluointipuskuria. DNA-pitoisuus määritettiin NanoDrop-laitteella ja laskettiin saanto.

Jatkettiin prosessia digestoimalla PCR-tuotteena saatu *slp*-geeni ja aiemmin eristetty pET-28b(+)-vektori *Nco*I- ja *Xho*I- restriktioentsyymeillä. Taulukossa 6 on esitetty esimerkireaktio. Käytettyjen reagenssien määrä vaihteli eri digestioiden välillä eri DNA-pitoisuuksien takia.

Taulukko 6. Digestioreaktio

Reagenssi	<i>S/p</i> -geenin digestio, V (μl)	Plasmidin digestio, V (μl)	Loppukonsentraatio
H <sub>2</sub> O	31,9	14,9	-
10x Fast Digest Buffer	6	6	1x
DNA (3 μg)	16,1	33,1	50 ng/μl
<i>Nco</i> I	3	3	3 U
<i>Xho</i> I	3	3	3 U
Kokonaistilavuus	60	60	-

Insertin digestiota inkuboitin 30 min ja vektorin digestiota 60 min. *S/p*-geenin digestiotuote puhdistettiin QIAquick PCR Purification Kitillä ja mitattiin DNA-pitoisuus. Vektorin digestoituminen tarkastettiin 0,8 % TBE-agarosigeelillä ja se defosforyloitiin Thermo Scientificin FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase -entsyymillä. Defosforylointi tehtiin lisäämällä reagenssia 3 μl vektorin digestioputkeen ja inkuboimalla 30 minuuttia +37 °C:ssa. Digestoitu ja defosforyloitu vektori puhdistettiin QIAquick PCR Purification Kitillä ohjeen mukaisesti ja eluoiitiin 30 μl:aan EB-puskuria. DNA-pitoisuus mitattiin NanoDrop-laitteella ja laskettiin saanto.

Ligaatioreaktio tehtiin digestoiduille vektorille ja insertille taulukon 7 mukaisesti. Reaktio on jälleen vain esimerkki, ja tilavuudet vaihtelivat eri ligaatioiden välillä DNA-pitoisuuksien mukaan. Vektorin ja insertin molekulaarinen suhde reaktioissa oli noin 1:1.

Taulukko 7. Ligaatioreaktio

Reagenssi	Varsinainen ligaatio, V (μl)	Kontrolli 1 (ei inserttiä), V (μl)	Kontrolli 2 (ei inserttiä eikä ligaasia), V (μl)
Vektori (noin 100 ng)	2,9	2,9	2,9
Insertti (noin 24 ng)	1,6	-	-
10x T4 puskuri	0,6	0,6	0,6
Fermentas T4 ligaasi	2,5 U	2,5 U	-
H <sub>2</sub> O	0,4	2	2,5
Kokonaistilavuus	6		

Inkuboitin kaikkia ligaatioreaktioita noin 18 h 16 °C:ssa vesihauteessa.

Ligaasi inaktivoitiin inkuboimalla reaktioseosta 10 min +65 °C:ssa. Ligaatiolle tehtiin etanolisaostus, jotta DNA saatiin transformaatioita varten sopivampaan tilavuuteen. DNA-pelletti liuotettiin 2 µl:aan steriiliä milliQ-vettä. Lisättiin varsinainen ligaatio, ligaatiokontrollit ja H<sub>2</sub>O-kontrolli elektroporaatiolla 25 µl:aan elektroporaatiokompetentteja Stratagenen XL1 Blue-soluja. Seos siirrettiin kyvetiin ja annettiin sille elektroporaatiopulssi (2,5 kV, 200 Ω, 25 kF) Bio-Radin Gene Pulser II -laitteella. Pipetoitiin pulssin jälkeen solujen päälle 1 ml SOC-liuosta ja kasvatettiin 60 min +37 °C:ssa 220 rpm ravistelussa. Maljattiin transformoidut solut taulukon 8 mukaisesti LB-kan<sup>30</sup>-maljoille ja kasvatettiin aerobisesti yön yli +37 °C:ssa.

Taulukko 8. Transformoitujen solujen maljaaminen LB-kan<sup>30</sup>-maljoille

	Totaalilaimennus maljalla ja maljojen määrä		
Transformaatio	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>
Varsinainen ligaatio	3 kpl	3 kpl	3 kpl
Ligaatiokontrolli 1	1 kpl	-	-
Ligaatiokontrolli 2	1 kpl	-	-
H <sub>2</sub> O-kontrolli	1 kpl	-	-

Laskettiin pesäkkeet maljoilta ja tehtiin enintään 15 pesäkkeestä pesäke-PCR ja puhdasviljelmät LB-maljoille. Pesäke-PCR:ää varten tehtiin ensin master mix taulukon 9 mukaisesti.

Taulukko 9. Pesäke-PCR-reaktio

Reagenssi	1x, V (µl)	17x, V (µl)	Loppukonsentraatio
10x Dynazyme-puskuri	5	85	1x
Forward aluke	2,5	42,5	0,5 µM
Reverse aluke	2,5	42,5	0,5 µM
dNTP mix (10 mM)	1	17	0,2 mM
DynaZyme II enzyme	0,5	-	1 U
H <sub>2</sub> O	38,5	654,5	-
Kokonaistilavuus	50	841,5	-

PCR-reaktion ohjelma oli taulukon 10 mukainen.

Taulukko 10. Pesäke-PCR-ohjelma

Reaktion vaihe	T (°C)	Aika	Sykliden määrä
Alkudenaturaatio	94	4 min	1
Denaturaatio	94	30 s	30
Annealing	59	30 s	
Ekstensio	72	1 min	
Loppuekstensio	72	10 min	1

Templaateiksi otettiin pipetin kärjellä hyvin pieni määrä jokaista tutkittavaa pesäkettä ja entsyymi pipetoitiin jokaiseen reaktioon erikseen. PCR-tuotteet tarkistettiin 0,8 % TBE-agarosigeelillä.

Plasmidia eristettiin enintään kolmesta pesäke-PCR:llä valitusta kloonista QIAprep Spin Miniprep Kitillä [10] ohjeen mukaan. Mitattiin eristetyn DNA:n konsentraatio, tarkistettiin sen laatu geelillä ja tehtiin PCR-tarkistus samanlaisella reaktiolla ja ohjelmalla kuin taulukoissa 9 ja 10, käyttäen alukkeita 1568 ja 1569. PCR-reaktion onnistuminen tarkistettiin geelilajolla ja puhdistettiin PCR-tuotteet QIAquick PCR Purification Kitillä. Yhden PCR:ssä oikeaksi osoittautuneen kloonin PCR-tuote lähetettiin sekvensoitavaksi Biotekniikan instituuttiin.

Sekvensoinnissa oikeaksi varmistuneet kloonit säilöttiin kantakokoelmaan seuraavasti. Siirrostettiin yhden oikean kloonin puhtasviljelmästä bakteeria 50 ml:aan LB-kan<sup>30</sup>-lientä ja kasvatettiin 220 rpm ravistelussa kunnes absorbanssi-arvo  $A_{600}$  oli noin 0,8. Tällöin osa viljelmästä pakastettiin kantakokoelmaan 10 % glyserolipitoisuudessa. Plasmidit transformoitiin ERF2163-soluihin Hanahanin menetelmällä [13]. Käytettiin transformaatioissa 2 µl (noin 45 ng) plasmidia ja tehtiin myös kontrollitransformaatio 2,5 µl:lla vettä. Plasmidin ja kontrollin päälle pipetoitiin jäällä sulaneita ERF2163 -kompetenttisoluja 50 µl. Reaktioseosta sekoitettiin pipetoimalla ja pidettiin jäällä 30 min. Soluille annettiin lämpöshokki pitämällä niitä 45 s +42 °C:ssa ja jäähdyttämällä sen jälkeen 2 min jäähauteessa. Solujen päälle pipetoitiin 500 µl esilämmitettyä SOC-liuosta ja kasvatettiin 60 min +37 °C:ssa 220 rpm ravistuksessa.

Plasmiditransformaatiot maljattiin viidelle LB-kan<sup>30</sup>-maljalle laimentamattomana ja kontrollitransformaatio yhdelle LB ja yhdelle LB-kan<sup>30</sup>-maljalle. Kasvatettiin aerobisesti

yön yli +37 °C:ssa ja tehtiin enintään kuudesta pesäkkeestä puhdasviljelmät ja pesäke-PCR-reaktiot taulukoissa 11 ja 12 aiemmin kuvatulla tavalla.

Oikeaksi varmistunut klooni pakastettiin kantakokoelmaan 10 % glyseroliin kuten edellä. Säilytettiin loppuosa viljelmästä +4 °C:ssa.

#### 4.4 Rekombinanttiproteiinin lokalisaatio

Rekombinanttiproteiinin lokalisaatio tutkittiin seuraavasti. Siirrostettiin +4 °C:ssa yön yli säilytyksessä ollutta viljelmää 1 ml 25 ml:aan +37 °C LB-kan<sup>30</sup>-lientä ja kasvatettiin kunnes A<sub>600</sub> oli noin 0,6. Viljelämä jaettiin kahtia ja toiseen puoliskoon lisättiin 26 µl 50 mM IPTG-liuosta, jolloin loppupitoisuudeksi saatiin 1 mM. Jatkettiin kasvatusta 4 h ja otettiin molemmista viljelmistä 1 ml:n näyte 2 ja 4 h kohdalla. Sentrifugoitiin näytteet ja pestiin 1 ml:lla PBS-puskuria. Solupelletit säilöttiin -80 °C pakkaseen odottamaan solujen hajotusta.

Suspensoitiin solupelletit 100 µl:aan PBS-puskuria ja hajotettiin solut sonikoimalla niitä ultrasonikaattorilla 15 s:n jaksoissa 40 %:n teholla, kunnes A<sub>600</sub> oli alle 0,1. Sentrifugoitiin soluja 3000 g:n voimalla +4 °C:ssa 5 min ja otettiin supernatantit talteen. Sentrifugoitiin supernatantti, tällä kertaa 15 000 g:n voimalla 20 min. Otettiin jälleen supernatantti talteen ja resuspensoitiin ensimmäisen ja toisen sentrifugoinnin solupelletit 100 µl:aan PBS-puskuria. Lisättiin jokaiseen näytteeseen 100 µl 2x Laemmli-puskuria ja analysoitiin ne 12 % SDS-PAGE-geelillä.

Geeli värjättiin Bio-Rad Coomassie Brilliant Blue -liuoksella yön yli, poistettiin väri vesipesulla ja otettiin geelistä kuva. Geelikuvan perusteella pääteltiin, oliko puhdistettava proteiini liuenneena supernatanttiin vai aggregaatteina soluriekaleissa.

#### 4.5 Rekombinanttiproteiinin tuotto ja puhdistus

Seuraavaksi aloitettiin varsinainen proteiinintuottoprosessi. Siirrostettiin yön yli kasvanutta proteiinintuottokantaa yksi pesäke 20 ml:aan LB-kan<sup>30</sup>-lientä ja kasvatettiin yön yli 220 rpm ravistuksessa +37 °C:ssa. Siirrostettiin seuraavana päivänä 10 ml viljelmää 200 ml:aan M9ZB-lientä. Inkuboitiin +37 °C:ssa ravistuksessa, kunnes A<sub>600</sub> absorbanssi-arvoksi mitattiin 0,6. Otettiin viljelmästä 1 ml:n näyte, joka sentrifugoitiin ja säilöttiin pelletinä -20 °C pakkaseen. Lisättiin viljelmään IPTG-liuosta

loppupitoisuuteen 1 mM ja inkuboitin viljelmää vielä 4 h. Otettiin jälleen 1 ml:n näyte ja säilöttiin pellettinä -20 °C:n pakkaseen. Loppuosa viljelmästä sentrifugoitiin 5000 g:n voimalla 15 min +4 °C:n lämpötilassa ja pestiin kerran 200 ml:lla PBS-puskuria. Säilöttiin pelletti -80 °C pakkaseen odottamaan HisTrap-puhdistusta.

Pakastettu solupelletti sulatettiin jäällä ja resuspensoitiin 7 ml:aan MilliQ-vettä, johon oli liuotettu Rochen proteaasi-inhibiittoritabletti. Hajotettiin soluja ultrasonikaattorilla kunnes  $A_{600}$  laski alle 0,1. Suspensiota sentrifugoitiin 3000 g:n voimalla 5 min huoneenlämmössä ja otettiin supernatantti talteen. Sentrifugoitiin supernatanttia 15 000 g:n voimalla 20 min huoneenlämmössä ja jatkettiin proteiinin puhdistusta joko supernatantista tai pellettistä, riippuen lokalisaation tarkistuksessa saadusta tuloksesta.

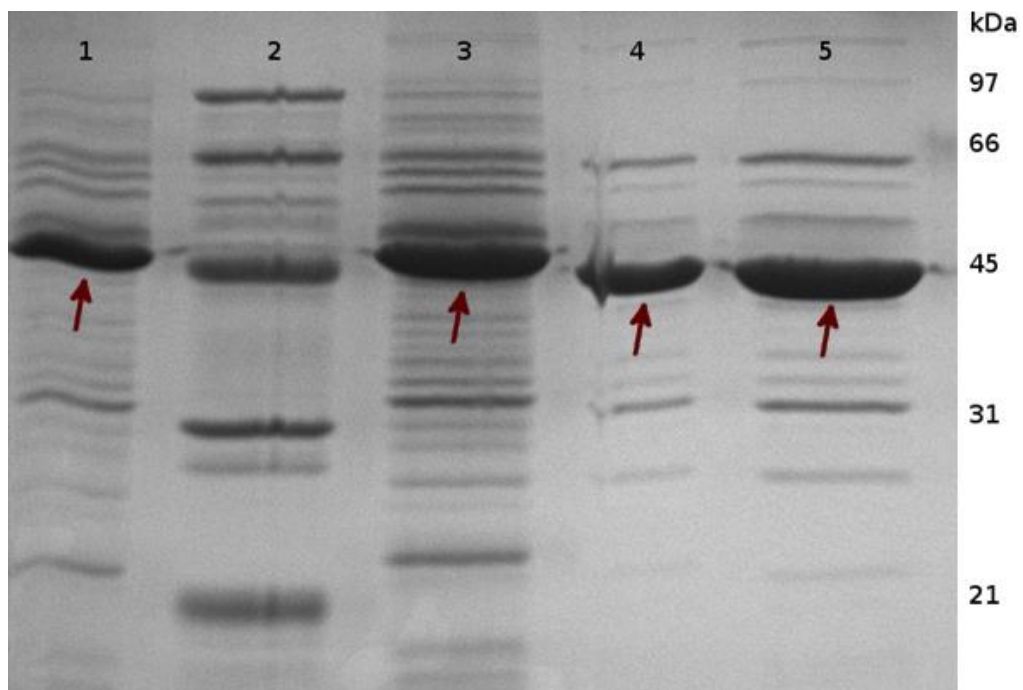
Proteiinin sisältämään fraktioon lisättiin GHCl-liuosta loppupitoisuuteen 4 M ja imidatsolia loppupitoisuuteen 20 mM. Jos kyseessä oli pelletti, liuotettiin se ennen GHCl- ja imidatsolilisäyksiä 5 ml:aan 1x fosfaattipuskuria (pH 7,4; 20 mM fosfaattia ja 0,5 M natriumkloridia). Näytettä inkuboitin 2 h huoneenlämmössä ja sentrifugoitiin sitten 5000 g:n voimalla 5 min. Supernatantti otettiin talteen ja steriilisuodatettiin 0,45 µm suodattimella. Proteiinit puhdistettiin GE Healthcaren 5 ml HisTrap HP-pylväällä valmistajan suositteleman ohjeen mukaan. HisTrap-pylväs pestiin 20 ml:lla vettä ja tasapainotettiin 1x fosfaattipuskurilla, joka sisälsi 4 M GHCl ja 20 mM imidatsolia. Ruiskutettiin näyte pylvääseen ja pestiin 60 ml:lla tasapainotuspuskuria. Eluoiitiin proteiini 4 ml:n fraktioissa 24 ml:lla 1x fosfaattipuskuria, jossa oli 500 mM imidatsolia.

Ensimmäiset 20 ml eluentista dialysoitiin 5 l vettä vastaan +4 °C:n lämpötilassa magneettisekoituksessa tunnin ajan. Vaihdettiin tämän jälkeen dialyysiletku uuteen vesiasiaan ja dialysoitiin yön yli. Seuraavana päivänä otettiin dialyssaatti talteen ja sentrifugoitiin sitä 15 000 g:n voimalla 20 min +4 °C:n lämpötilassa. Sakka suspensoitiin 0,5 ml:aan MilliQ-vettä ja määritettiin proteiinipitoisuudet sakka- ja supernatanttifraktioista Bradfordin menetelmällä käyttäen Protein assay-väriä valmistajan (Bio-Rad) ohjeen mukaan. Proteiinipitoisuuden määrittämiseen käytettiin BSA-standardisuoraa. Tarkistettiin vielä sakka- ja supernatanttifraktiot 12 % SDS-PAGE-geelillä, jotta nähtiin vastasiko puhdistetun proteiinin molekyylipaino niiden laskennallista molekyylipainoa.

## 5 Tulokset ja tulosten tarkastelu

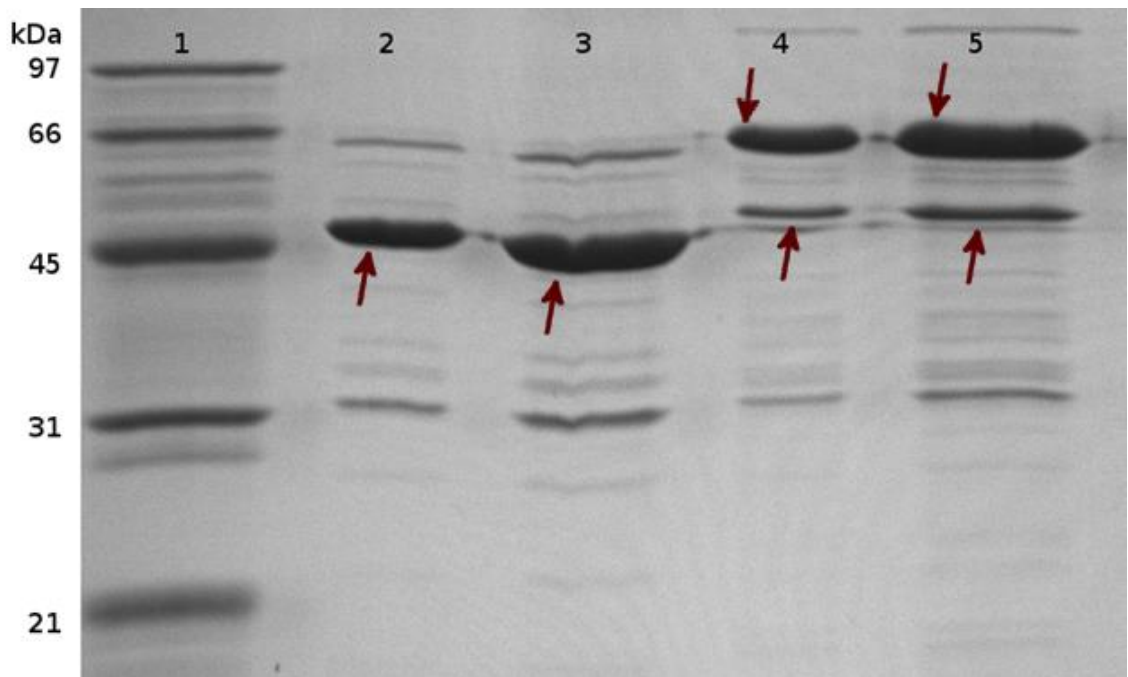
### 5.1 *L. amylovorus* -bakteereiden pintakerrosproteiinien karakterisointi

Työssä käytettyjen *L. amylovorus* -kantojen käsittelemättömät solupelletit analysoitiin SDS-PAGE-geelillä. Kuvista 5 ja 6 nähdään bakteerikantojen sisältämät proteiinit 12 % geelille ajettuna. Kuvista voidaan päätellä, että vahvimpana vyöhykkeenä näkyvien pintakerrosproteiinien osuus kokonaisproteiinimäärästä on suuri ja ne ovat molekyylipainoltaan samaa kokoluokkaa (n. 45 kDa) lähes kaikilla tutkituilla *L. amylovorus* -kannoilla. GRL1117 -kannan geelikuvassa näkyy kaksi eri pintakerrosproteiinivyöhykettä (kuva 6). Näistä toinen pintakerrosproteiini on kooltaan suurempi kuin muilla tutkituilla *L. amylovorus* -kannoilla havaitut pintakerrosproteiinit.



Kuvio 5. SDS-PAGE analyysi *L. amylovorus* -kantojen proteiineista. Pintakerrosproteiinit on merkitty kuvaan nuolilla. 1. 4 µl GRL1111 2. LMW kokostandardi (Bio-Rad) 3. 10 µl GRL1111 4. 4 µl GRL1114 5. 10 µl GRL1114





Kuvio 6. SDS-PAGE analyysi *L. amylovorus* -kantojen proteiineista. Pintakerrosproteiinit on merkitty kuvaan nuolilla. **1.** LMW kokostandardi (Bio-Rad) **2.** 4  $\mu$ l GRL1116 **3.** 10  $\mu$ l GRL1116 **4.** 4  $\mu$ l GRL1117 **5.** 10  $\mu$ l GRL1117

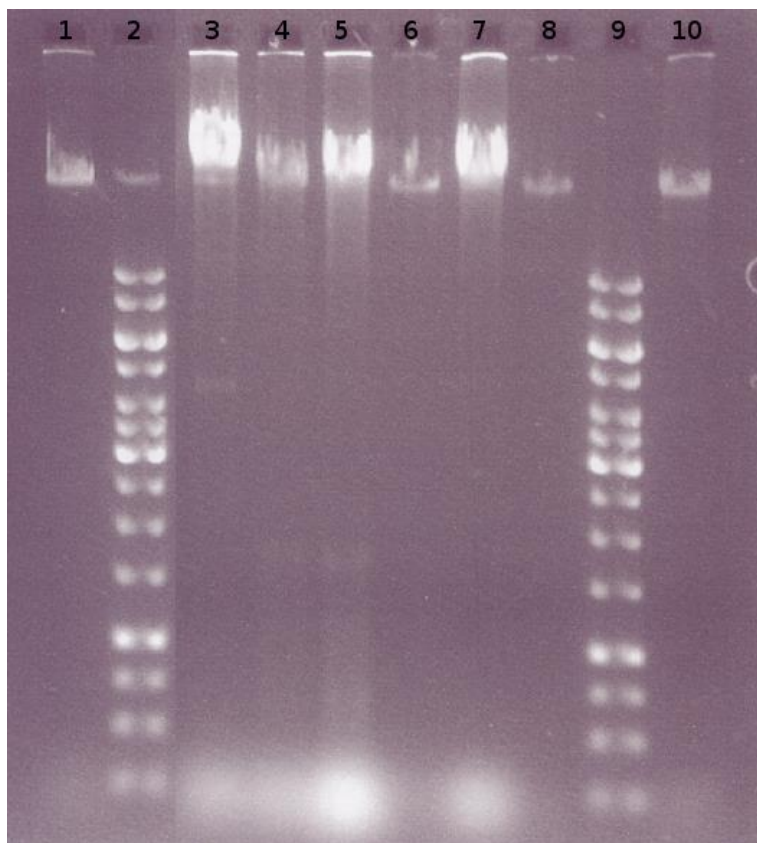
## 5.2 Pintakerrosproteiinigeenien kloonauus

*L. amylovorus* -kannoista eristettiin kromosomaalista DNA:ta *slp*-geenien monistusta varten. Taulukkoon 11 on koottu *L. amylovorus* -kannoista eristetyn kromosomaalisen DNA:n NanoDrop-laitteella mitattuja pitoisuuksia ja saantoja.

Taulukko 11. Kromosomaalisen DNA:n pitoisuudet ja saannot NanoDrop-laitteen määrittämisen perusteella.

Bakteerikanta	DNA-pitoisuus (ng/ $\mu$ l)	Saanto ( $\mu$ g)
GRL1111	620	62
GRL1114	1015,2	101,5
GRL1116	494,9	49,5
GRL1117	86	8,6

Eristetyt DNA:t tarkistettiin myös 0,7 % TAE-agarosigeelillä (kuvio 7).



Kuvio 7. Kromosomaalinen DNA 0,7 % TAE-agarosigeelillä **1.** 2 µl GRL 1111 **2.** Generuler 1 kb DNA Ladder kokostandardi **3.** 4 µl GRL 1111 **4.** 2 µl GRL 1114 **5.** 4 µl GRL 1114 **6.** 2 µl GRL 1116 **7.** 4 µl GRL 1116 **8.** 2 µl GRL 1117 **9.** Kokostandardi **10.** 4 µl GRL 1117

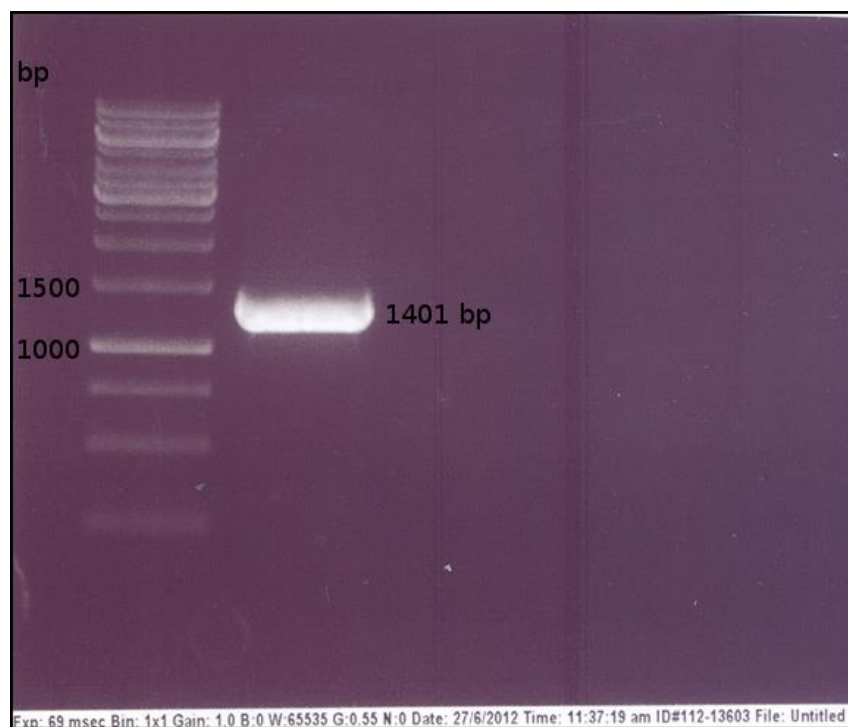
DNA-pitoisuudet arvioitiin myös geelikuvan perusteella. Verrattiin kromosomaalisen DNA:n intensiteettiä geelillä silmämääräisesti DNA kokostandardin vahvimpiin vyöhykkeisiin, joissa DNA:ta oli noin 70 ng. Kaikissa näytteissä kromosomaalisen DNA:n 2 µl:n vyöhykkeet olivat vahvuudeltaan samaa luokkaa (kuvio 7, kaivot 1, 4 ja 6) tai jopa alhaisemmat (kuvio 7, kaivo 8), kuin kokostandardin 70 ng:n vyöhyke. Geelijon perusteella kaikkien eristettyjen kromosomaalisten DNA-näytteiden konsentraatiot olivat siis alhaisemmat verrattuna NanoDrop-laitteen antamiin tuloksiin. Työvaiheissa, joissa kromosomaalisen DNA:n määrä oli oleellista, käytettiin geelikuvan perusteella tehtyä pitoisuusarviota.

Kaikkien neljän *s/p*-geenin monistus kromosomaalisesta DNA:sta onnistui agarosigeelijon perusteella. Kuviossa 8 näkyy GRL1116-kannasta PCR:llä monistettu, n. 1,4 kb:n kokoinen *s/pA*-geeni. Kromosomaalisen DNA:n eristyksessä mukana olleesta GRL1111 -kannasta ei monistettu pintakerrosproteiinigeeniä, koska

tämän kannan genomisekvenssi ei ehtinyt valmistua työn suoritusaikana. Taulukkoon 12 on koottu eri *slp*-geenien PCR-tuotteiden DNA-saantoja ja kokoja.

Taulukko 12. *L. amylovorus* -kantojen GRL1114, 1116 ja 1117 kromosomaalisesta DNA:sta monistetun pintakerrosproteiinigeenien koot, pitoisuudet ja saannot.

Geeni	DNA-pitoisuus (ng/μl)	Saanto (μg)	Koko (bp)
GRL1114 <i>slpB</i>	15	0,75	1506
GRL1116 <i>slpA</i>	315,8	15,9	1401
GRL1117 <i>slpA</i>	199,6	10	1782
GRL1117 <i>slpB</i>	186,1	9,31	1473



Kuvio 8. GRL1116 -kannan kromosomaalisesta DNA:sta PCR:llä monistettu *slpA*-geeni

Taulukkoon 13 on koottu eri *slp*-geenien transformaatioiden tuloksia.

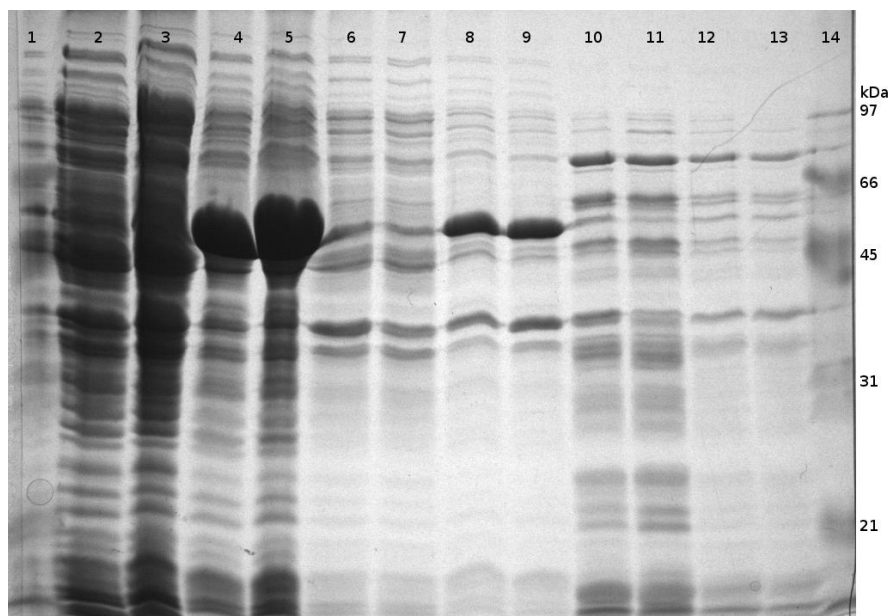
Taulukko 13. Transformaatiotuloksia

Geeni	XL1 Blue transformaatiotehokkuus (cfu/μg)	ERF2163 transformaatiotehokkuus (cfu/μg)
GRL1114 <i>slpB</i>	$5,9 \cdot 10^4$	40
GRL1116 <i>slpA</i>	$13 \cdot 10^4$	1400
GRL1117 <i>slpA</i>	$1,3 \cdot 10^4$	680
GRL1117 <i>slpB</i>	$5,7 \cdot 10^4$	100

Taulukosta nähdään, että ERF2163-kannan transformaatiotehokkuus oli äärimmäisen heikko. Tämä oli jossain määrin odotettavissa, sillä kyseessä oli proteiinintuottoon tarkoitettu kanta. ERF2163-kannalla transformaatiotehokkuus on kirjallisuuden mukaan noin 1/10 muiden *E. coli* -kantojen transformaatiotehokkuudesta [14].

### 5.3 Rekombinanttiproteiinin tuotto

Opinnäytetyössä tuotettiin ja puhdistettiin rekombinanttiproteiinit GRL1114 SlpB, GRL1116 SlpA, GRL1117 SlpA ja GRL1117 SlpB. Kuten kuviosta 9 nähdään, alkaa rekombinanttiproteiinin tuotto vasta kun liemeen lisätään IPTG. Lokalisaation tutkimisessa saatiin selville, että lähes jokainen rekombinanttiproteiini oli aggregaatteina soluriekaleissa. Poikkeuksena oli GRL1117 SlpB-proteiini, jossa puolet proteiinista oli supernatantissa. Tästä huolimatta kaikkia rekombinanttiproteiineja lähdettiin puhdistamaan soluriekaleista.

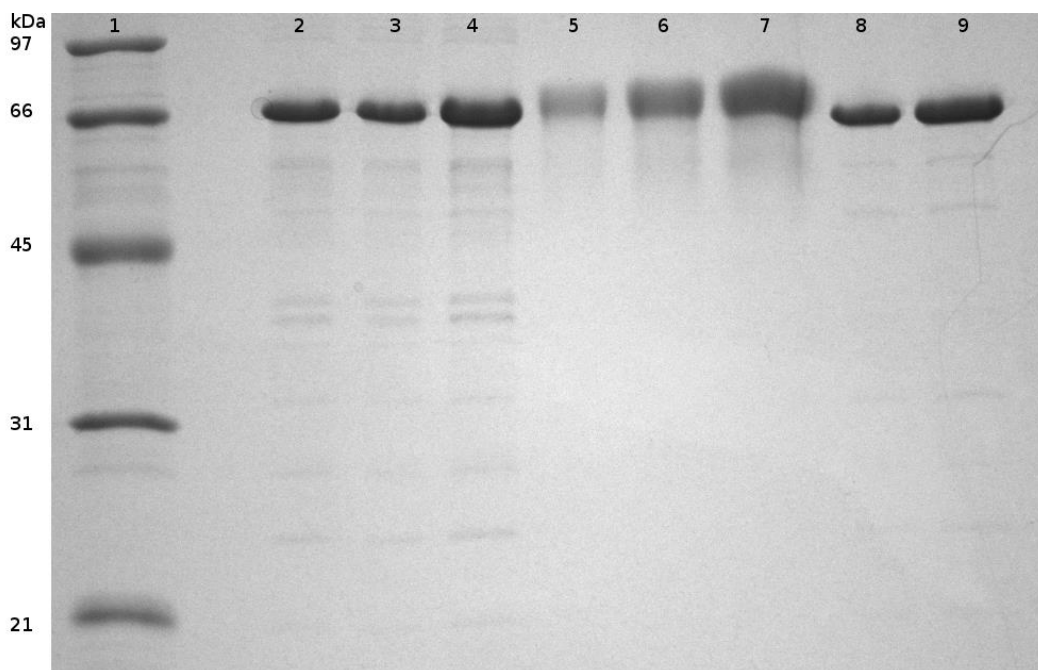


Kuvio 9. IPTG-induktion vaikutus GRL1117 SlpA-rekombinanttiproteiinin (n. 62 kDa) ekspressioon ja proteiinin lokalisaation tutkiminen. Rinnakkaiskaivoihin on pipetoitu 2 (\*) ja 4 (#) h kasvatusten näytteet. Pelletti 1 tarkoittaa pellettiä ultraäänikäsittelyn jälkeisestä ensimmäisestä sentrifugoinnista (3000 g 5 min) ja pelletti 2 pellettiä toisesta sentrifugoinnista (15 000 g 20 min). Supernatantti 2 on toisen sentrifugoinnin jälkeen saatu supernatantti. 1. LMW kokostandardi 2\*. & 3#. Pelletti 1, ei IPTG lisäystä 4\*. & 5#. Pelletti 1, IPTG lisäystä 6\*. & 7#. Pelletti 2, ei IPTG lisäystä 8\*. & 9#. Pelletti 2, IPTG lisäystä 10\*. & 11#. Supernatantti 2, ei IPTG lisäystä 12\*. & 13#. Supernatantti 2, IPTG lisäystä. 14. LMW kokostandardi (Bio-Rad)

Affiniteettikromatografiapuhdistuksen ja dialysoinnin jälkeen jokaisesta rekombinanttiproteiinista mitattiin proteiinipitoisuudet Bradfordin menetelmällä. Ne on kerätty taulukkoon 14. Dialyysin aikana proteiininäytteestä poistuivat kaotrooppiset suolat (GHCl), jolloin rekombinanttiproteiini järjestäytyi jälleen hilarakenteiksi ja liuokseen muodostui proteiinisakka. Osa proteiinista saattoi kuitenkin jäädä liukoiseen muotoon supernatanttiin, joten proteiinipitoisuudet mitattiin dialysoinnin jälkeen sekä sakasta että supernatantista. Proteiinipitoisuusmittauksen jälkeen tuotteet tarkistettiin SDS-PAGE-analyysillä, josta nähdään esimerkki kuviossa 10. Tarpeen vaatiessa sekä supernatantti- että sakanäytteet analysoitiin SDS-PAGE-geelillä. Taulukossa 14 on myös SDS-PAGE-geelien perusteella arvioidut rekombinanttiproteiinien koot.

Taulukko 14. Proteiinien koot ja proteiinieristysten pitoisuudet ja saannot

Proteiini	Koko (kDa)	Pitoisuus (mg/ml)	Saanto (mg)	Saanto yhteensä (mg)
GRL1114 SIpB sakka	45	2,02	1,21	3,39
GRL1114 SIpB supernatantti	45	0,29	2,18	
GRL1116 SIpA sakka	45	2,28	1,76	1,76
GRL1117 SIpA sakka	66	5,21	3,13	3,13
GRL1117 SIpB sakka (kaksi eristystä)	48	1,66 2,71	1,05 2,71	3,76



Kuvio 10. Affiniteettikromatografiapuhdistettu- ja dialysoitu GRL1117 SIpA-proteiini 12 % SDS-PAGE-geelillä, **1.** LMW kokostandardi **2.** 0,5 µg SIpA-proteiinia sakasta **3.** 1 µg SIpA-proteiinia sakasta **4.** 2 µg SIpA-proteiinia sakasta **5.** 0,5 µg BSA **6.** 1 µg BSA **7.** 2 µg BSA **8.** 0,5 µg proteiinia supernatantista **9.** 1 µg proteiinia supernatantista

Kaikkien rekombinanttiproteiinien puhdistukset onnistuivat hyvin, sillä SDS-PAGE-geelikuvissa nähtiin vain himmeitä proteiinijuovia muistan kuin puhdistetuista rekombinanttiproteiineista. Puhdistettujen rekombinanttiproteiinien saannot vaihtelivat 1,76 mg:n ja 3,76 mg:n välillä.

## 6 Yhteenveto

Tämän opinnäytetyön tavoitteena oli saada *L. amylovorus* GRL1114, GRL1116 ja GRL1117 -kantojen pintakerrosproteiinigeenit kloonattua ja ilmentettyä *E. coli* -tuottoisännässä. Tuotetut proteiinit oli lisäksi tarkoitus puhdistaa *E. coli* -bakteerista.

*L. amylovorus* -soluista onnistuttiin monistamaan niiden Slp-proteiineja koodaavat geenit. Geenit ligatoitiin pET-28b(+)-vektoriin, joka transformoitiin *E. coli* XL1 Blue -kantaan. Plasmidia monistettiin tässä kannassa ja monistettu plasmidi transformoitiin *E. coli* ERF2163 -kantaan. ERF2163 -kantaa käytettiin proteiinin tuottamiseen IPTG-induktion avulla. Tuotettu proteiini puhdistettiin affiniteettikromatografialla. Halutut proteiinit onnistuttiin tuottamaan ja puhdistamaan.

Opinnäytetyötä tehdessä törmättiin myös moniin ongelmiin. Tulossiossa jo sivuttiin sitä, että selkeästi virhealtteimpia työvaiheita olivat transformaatiot. Niitä jouduttiin uusimaan moneen otteeseen. Kompetenttisolut ovat melko herkkiä ja esimerkiksi ylimääräiset sulamis- ja jäätymissyklit saavat ne menettämään transformaatiotehokkuuttaan nopeasti. Olisikin siis tärkeää välttää niiden turhaa sulamista.

Yksi mahdollisesti paljonkin hidastuksia työssä aiheuttanut asia oli se, että DNA-pitoisuuksien mittaukset NanoDrop-laitteella eivät ole välttämättä kovin luotettavia. NanoDrop-laitteen toiminta perustuu absorbaation mittaamiseen aallonpituudella 260 nm, joten mahdolliset näytteessä olevat 260 nm:n aallonpituudella valoa absorboivat epäpuhtaudet kuten RNA vääristävät herkästi mittaustuloksia. Tästä johtuen PCR- ja kloonausreaktioihin on mahdollista tulla liian vähäinen määrä DNA:ta, jolloin on vaarana koko reaktion epäonnistuminen. Luotettavampi tapa mitata DNA-pitoisuuksia olisi käyttää menetelmää, jossa fluoresoiva merkkiaine sitoutuu ainoastaan kaksijuosteisiin DNA-molekyyleihin. Näin näytteiden mahdolliset epäpuhtaudet eivät vaikuttaisi mittaustulokseen.

Jatkossa opinnäytetyössä puhdistettuja proteiineja tullaan käyttämään sitoutumiskokeissa, joissa tutkitaan pintakerrosproteiinien osuutta bakteerien kiinnittymisessä porsaan epiteelisoluihin. Proteiineja voidaan käyttää myös antigeeneinä polyklonaalisten vasta-aineiden tuottamista varten.

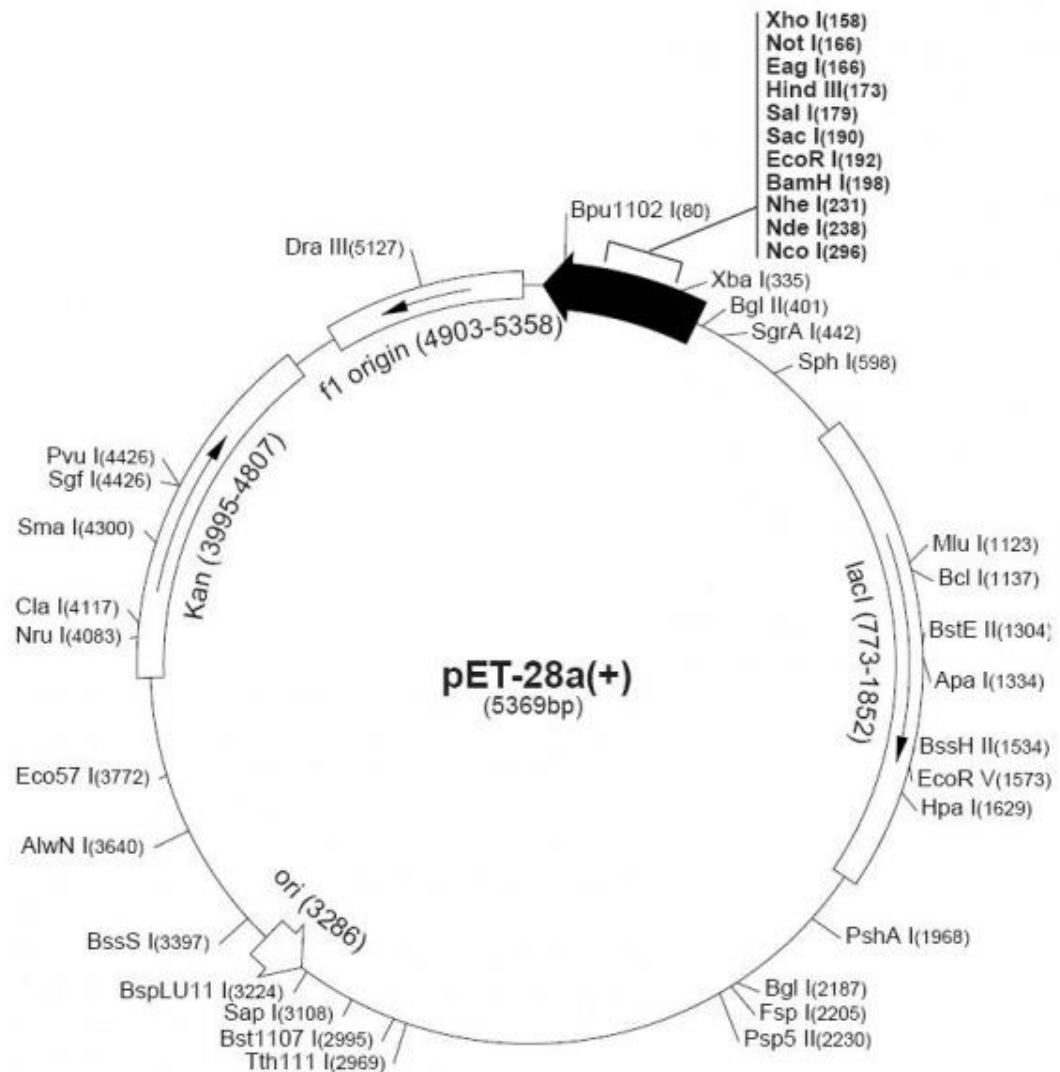
## Lähteet

- 1 Åvall-Jääskeläinen, S. & Palva, A. Lactobacillus surface layers and their applications. FEMS Microbiology Reviews. 3/2005, s. 511 - 529.
- 2 Sára, M. & Sleytr, U. S-Layer Proteins. Journal of Bacteriology. Feb. 2000. s. 859 - 868.
- 3 Engelhardt, H. Are S-layers exoskeletons? The basic function of protein surface layers revisited. Journal of Structural Biology 160. 2007. s. 115 - 124.
- 4 Centers for Disease Control and Prevention. Public Health Image Library. 1982. Verkkodokumentti. <http://phil.cdc.gov/phil/details.asp?pid=1048>. Luettu 1.6.2013.
- 5 Nakamura, L. *Lactobacillus amylovorus*, a New Starch-Hydrolyzing Species from Cattle Waste-Corn Fermentations. International Journal of Systematic Bacteriology. Jan. 1981. s. 56 - 63.
- 6 Fujisawa, T. et al. Taxonomic Study of the *Lactobacillus acidophilus* Group, with Recognition of *Lactobacillus gallinarum* sp. nov. and *Lactobacillus johnsonii* sp. nov. and Synonymy of *Lactobacillus acidophilus* Group A3 (Johnson et al. 1980) with the Type Strain of *Lactobacillus amylovorus* (Nakamura 1981). International Journal of Systematic Bacteriology. July 1992. s. 487 - 491.
- 7 Jakava-Viljanen, M & Palva, A. Isolation of surface (S) layer protein carrying Lactobacillus species from porcine intestine and faeces and characterization of their adhesion properties to different host tissues. Veterinary Microbiology 124 (2007) s. 264 - 273.
- 8 Axelsson, L. Lactic acid bacteria: Classification and physiology. In *Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects*. Edited by Salminen S., von Wright, A., New York: Marcel Dekker Inc, 1998, s. 1 - 73.
- 9 Promega. 2010. Wizard® Genomic DNA Purification Kit Technical Manual. Verkkodokumentti. <http://fi.promega.com/~media/Files/Resources/Protocols/Technical%20Manuals/0/Wizard%20Genomic%20DNA%20Purification%20Kit%20Protocol.pdf>. Luettu 1.6.2013.
- 10 Qiagen. 2012. QIAprep ® Miniprep Handbook. Verkkodokumentti. <http://www.qiagen.com/resources/Download.aspx?id={04DD00DF-952E-47AF-8634-534F108210D8}&lang=en&ver=1>. Luettu 1.6.2013.
- 11 Qiagen. 2012. QIAquick ® Spin Handbook. Verkkodokumentti. <http://www.qiagen.com/resources/Download.aspx?id={05356D52-FF29-4AC2-BE49-48CBA2381CFA}&lang=en&ver=1>. Luettu 1.6.2013.
- 12 Boot, H. et al. Interchange of the active and silent S-layer protein genes of *Lactobacillus acidophilus* by inversion of the chromosomal slp segment. Molecular Microbiology Volume 21, Issue 4. August 1996. s. 799 - 809.



- 13 Sambrook, J., Russel D.W., *Molecular cloning: a laboratory manual*. N.Y., Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 3<sup>rd</sup> ed. 2001. s. 1105 - 1111.
- 14 Novagen. pET System Manual, 11th Ed. Verkkodokumentti.  
[http://www.merckmillipore.com/chemdat/en\\_CA/Merck-US-Site/USD/ViewProductDocuments-File?ProductSKU=EMD\\_BIO-71867&DocumentType=USP&DocumentId=/emd/biosciences/userprotocols/en-US/TB055.pdf&DocumentSource=GDS](http://www.merckmillipore.com/chemdat/en_CA/Merck-US-Site/USD/ViewProductDocuments-File?ProductSKU=EMD_BIO-71867&DocumentType=USP&DocumentId=/emd/biosciences/userprotocols/en-US/TB055.pdf&DocumentSource=GDS). Luettu 14.6.2013.

# pET-28b(+)-plasmidi



pET-28a(+)-plasmidi, joka on pET-28-plasmidin kaltainen, mutta yhden emäsparin pidempi. Kuvaan on merkitty tummalla T7-promoottorialue.