

Heidi Heiniluoto

Vasta-ainegeenikirjastojen luominen ja seulonta kahdelle siitepölyallergeenille

Metropolia Ammattikorkeakoulu
Laboratorioanalyttikko (AMK)
Laboratorioalan koulutusohjelma
Opinnäytetyö
3.12.2013

Tekijä Otsikko Sivumäärä Aika	Heidi Heiniluoto Vasta-ainegeenikirjastojen luominen ja seulonta kahdelle siitepölyallergeenille 47 sivua + 4 liitettä 3.12.2013
Tutkinto	Laboratorioanalyttikko (AMK)
Koulutusohjelma	Laboratorioalan koulutusohjelma
Ohjaajat	Tutkimusprofessori Kristiina Takkinen Lehtori Tiina Soininen
<p>Valtion teknillisessä tutkimuskeskuksessa (VTT) suoritettuna opinnäytetyön tarkoituksena oli kloonata vasta-ainegeenikirjastot koivun (Bet v 1) ja timotein (Phl p 1) allergeeneille. Vasta-ainegeenit oli eristetty aiemmin immunoisoitujen hiiren cDNA-fragmenteista.</p> <p>Kevyen ja raskaan ketjun vasta-ainegeenifragmentit kloonattiin faaginäyttövektoriin ja niistä tehtiin faaginäyttökirjastoja. Näistä kirjastoista eristettiin kohdeallergeenejä tunnistavia vasta-aineita faaginäyttötekniikan avulla. Eristettyjä kloonveja karakterisoitiin immunologisin menetelmin ELISAlla ja Western blottauksella.</p> <p>Molemmista faaginäyttökirjastoista onnistuttiin eristämään positiivisia kloonveja. Koivun faaginäyttökirjaston analysointi lopetettiin seulontojen jälkeen. Timotein faaginäyttökirjastoilla infektoitiin <i>Escherichia coli</i> XL-1 Blue soluja, jossa niitä kasvatettiin ja tehtiin Fab-pIII fuusioproteiinin induktio.</p> <p>Jatkotestejä varten valittiin 12 kloonja toiselta seulontakierrokselta ja 12 kloonja kolmannelta seulontakierrokselta. Fuusioproteiinien sitoutumista antigeeniin testattiin ELISAlla. Tämän perusteella valittiin 12 positiivista kloonja jatkoon, jossa kloonien affiniteettiä ja spesifisyyttä antigeeniin testattiin ELISAlla ja Western blottauksella. Näiden tulosten perusteella saatiin viisi kloonja, joita voidaan käyttää vasta-aineiden tuotossa.</p> <p>Valitut kloonit voidaan liittää tuottovektoriin, jossa niitä voidaan tuottaa liukoisessa muodossa ja transformoida tuottosoluihin. Tuotettuja allergeeniä tunnistavia vasta-aineita voidaan puhdistaa kromatografisin menetelmin jatkokäyttöä varten. Vasta-aineita tullaan hyödyntämään allergeenien osoitus- ja pitoisuusmäärityksissä.</p>	
Avainsanat	Faaginäyttötekniikka, vasta-aine, allergeeni

Author Title Number of Pages Date	Heidi Heiniluoto Creation and Screening of Antibody Gene Libraries for Two Pollen Allergens 47 pages + 4 appendices 3 December 2013
Degree	Bachelor of Laboratory Sciences
Degree Programme	Laboratory Sciences
Instructor(s)	Kristiina Takkinen, Research professor Tiina Soininen, Principal Lecturer
<p>This thesis was carried out at the VTT Technical Research Centre of Finland. The purpose of the study was to create antibody gene libraries for allergens in birch (<i>Betula pendula</i>, Bet v 1) and timothy grass (<i>Phleum pratense</i>, Phl p 1). Antibody gene fragments were isolated from cDNA fragments of mice that were earlier immunized with the allergens.</p> <p>Light and heavy chain gene fragments were cloned in phagemid vector and turned into phage display libraries. Antigen binding antibodies were enriched with a phage display technique (<i>panning</i>). Isolated clones were tested with ELISA and Western blotting.</p> <p>Positive clones were found in libraries for both allergens. Analyzing the birch antibody library was quitted after panning due to lack of time. The phage display library of Phl p 1 was used to infect <i>Escherichia coli</i> XL1-Blue cells in which the expression of fusion protein Fab-pIII was induced.</p> <p>12 clones from the second panning round and 12 clones from the third panning round were chosen for further testing. The fusion protein binding to antigen was analyzed with ELISA. 12 positive antibody producing clones were chosen and their affinity and specificity was tested with ELISA and Western blotting. Five clones were chosen according to these results. The clones chosen can be used in producing antibodies.</p> <p>The clones chosen can be cloned in an expression vector and transformed in <i>E.coli</i> cells for production of soluble proteins. Produced proteins or their modified versions can be purified with chromatographic methods. These allergen specific recombinant antibodies will be applied in detection and quantification assays.</p>	
Keywords	Phage display, antibody, allergen

Sisälllys

1	Johdanto	1
2	Teoria	3
2.1	Vasta-ainekirjastot	3
2.1.1	Vasta-aineiden rakenne	3
2.1.2	Vasta-ainekirjastotyypit	5
2.1.3	cDNA-kirjastojen valmistaminen	6
2.1.4	cDNA:n liittäminen vektoriin	7
2.2	Faaginäyttökiteknikka	9
2.2.1	Faaginäyttökirjastojen valmistus	9
2.2.2	Faaginäyttökirjastojen seulonta	11
3	Työn suoritus	14
3.1	Vasta-ainefragmenttien kloonauus ja pilkonta	15
3.2	Ligaatiot	16
3.3	cDNA-kirjastojen muuttaminen faaginäyttökirjastoiksi	21
3.4	Valmistettujen faagikirjastojen seulonta	22
3.4.1	Allergeenien biotinylointi ja biotinyloitujen allergeenien analysointi	22
3.4.2	Biotinyloitujen allergeenien käyttö faagikirjastojen seulonnoissa	23
3.5	Faagikirjastojen analysointi	25
3.6	Phl p 1 Fab-pIII -fuusioproteiinin tuottokasvatus	26
3.7	Sitoutumisominaisuuksiltaan lupaavien kloonien analysointi	28
4	Tulokset	30
4.1	Massaligaatioiden testaus	30
4.2	Allergeenien biotinylointi	32
4.3	Faagikirjastojen seulonnat ja faagitiitterien määrittäminen	35
4.4	Faagikirjastojen analysointi eri seulontakierroksilla	37
4.5	Yksittäisten kloonien Fab-pIII fuusioproteiinin tuoton analysointi ELISAlla	39
5	Yhteenveto	45
	Lähteet	46
	Liitteet	
	Liite 1. PCR-reaktiossa käytetyt alukkeet	
	Liite 2. Seulottujen faagikirjastojen A_{405} arvot	
	Liite 3. Phl p 1 Fab-pIII-tuottokasvatus A_{405}	
	Liite 4. Valittujen kloonien Fab-pIII-fuusioiden tarkistus ELISAlla	

Lyhenteet

ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)
Bp	Base pair
BSA	Bovine Serum Albumin
cDNA	Complimentary DNA
DDIW	Distilled De-ionized Water
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
Fab	Fragment antibody binding
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiothiogalactopyranoside
kDa	Kilodalton
LB	Luria broth
LMW	Low Molecular Weight
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	Phosphate Buffered Saline
PEG	Polyethylene glycol
Pfu	Plaque forming unit
RB	Reducing Buffer
RNA	Ribonucleic acid
SA	Streptavidin
SB	Super broth
scFv	Single-chain variable fragment
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SOB	Super optimal broth
SOC	Super optimal broth with catabolite repression
TBS-T	Tris Buffered Saline - Tween 20
TCA	Trichloroacetic acid

1 Johdanto

Allergia on immunoglobuliini E:n (IgE) aiheuttamaa hypersensitiivisyyttä, mikä vaikuttaa yli 25 %:iin väestöstä. Allergiaa voidaan hoitaa allergeenispesifisellä immunoterapialla, jossa potilaalle annetaan siedätyshoitona luontaista allergeeniä sisältävää rokotetta, mikä muokkaa potilaan immuunivastetta. Tällä on todettu olevan pitkäkestoisia vaikutuksia. Hoito perustuu vasta-IgG-reaktioon, joka häiritsee allergeenin aiheuttamaa IgE-vastetta. Menetelmän ongelmana on käytettyjen allergeeniuutteiden heikko laatu, sekä mahdolliset vakavat sivuvaikutukset. Viimeisen 25 vuoden aikana on kehitetty molekyylärisiä kloonaustekniikoita, joiden avulla voidaan eristää allergeeniä koodaava cDNA ja tuottaa allergeeniä rekombinanttimuodossa. Näiden rekombinanttiallergeenien koostumus tunnetaan paremmin, joten niitä voidaan muokata erilaisia käyttötarkoituksia varten. [1.]

Koivun siitepöly on yksi yleisimmistä ykköstyyppin allergian aiheuttajista. Ykköstyyppin allergeenit sitoutuvat IgE:hen. Koivun siitepöly sisältää monia allergeeneja, mutta merkittävin niistä on Bet v 1. Se kuuluu patogeenisyyden perusteella proteiiniperheeseen 10 (*PR = Pathogenesis related*). PR-10-perheen proteiinit ovat kasveissa yleisesti esiintyviä proteiineja. Monet siitepölyn ja kasvipölyjen ruoka-aineiden pääallergeenit kuuluvat tähän ryhmään, jonka takia koivun siitepölylle allergiset ihmiset voivat usein myös saada allergisen reaktion joistakin tietyistä hedelmistä ja vihanneksista. [2.]

Timotein Phl p 1 on myös yksi pääallergeeneista, joka aiheuttaa ykköstyyppin allergiaa. Heinäkasveissa esiintyvät allergeenit jaetaan 11 ryhmään niiden fysiokemiallisten ja immunologisten ominaisuuksien mukaan. Tämän perusteella Phl p 1 kuuluu ryhmään 6 yhdessä *Poa pratensis*- ja *Anthoxanthum odoratum* -lajien kanssa. Tämän ryhmän allergeenit ovat happamia, ei glykosyloituja proteiineja, joiden molekyylipaino on 13 kDa. Aminohappopään sekvenssin perusteella ryhmän allergeeneilla on yhtäläisyyksiä ryhmän 5 allergeenien kanssa, mikä aiheuttaa ristireagointia. Ryhmän 5 muodostavat *Pooideae* lajin kasvit. [3.]

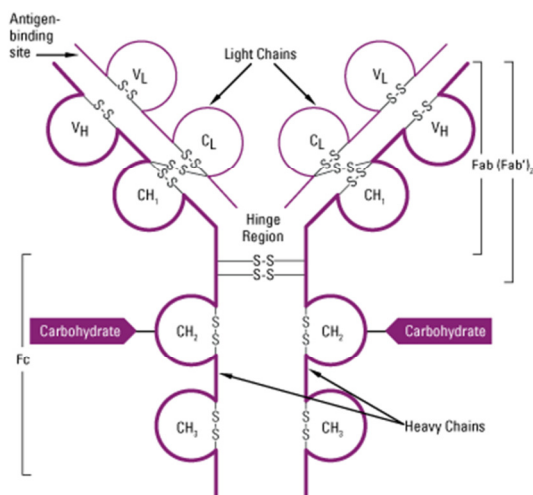
Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli kloonata vasta-ainegeenikirjastot edellä mainituille allergeeneille ja eristää allergeenejä tunnistavia vasta-aineita jatkomäärityksiä varten. Kyseisiä allergeenejä vastaan on saatavilla kaupallisia vasta-aineita hyvin vähän tai ei ollenkaan. Vasta-aineita voidaan käyttää esimerkiksi allergeenien kromatografiseen puhdistukseen affiniteetin perusteella.

2 Teoria

2.1 Vasta-ainekirjastot

2.1.1 Vasta-aineiden rakenne

Vasta-aineet eli immunoglobuliinit ovat proteiineja, joiden perusrakenteen muodostavat neljä polypeptidiketjua. Kaksi näistä on identtisiä kevyitä (L-) ketjuja, ja kaksi on identtisiä raskaita (H-) ketjuja. Kummassakin ketjussa on vakio-osa (*C- constant region*), sekä vaihteleva osa (*V- variable region*). Kevyessä ketjussa on yksi vakio-osa ja raskaassa ketjussa on kolme vakio-osaa. Ketjut ovat kiinnittyneet toisiinsa disulfididisidoksilla. Kuvassa 1 on esitetty vasta-ainemolekyylin rakenne.

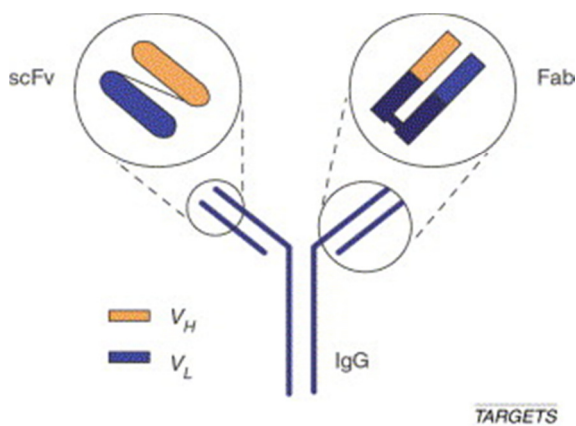


Kuva 1. IgG:n rakenne [5]

Vasta-aineet ryhmitellään viiteen eri luokkaan raskaan ketjun ominaisuuksien mukaan. Nämä luokat ovat IgA, IgD, IgE, IgG ja IgM. Kevyet ketjut ryhmitellään kahteen tyyppiin, kappaan (κ) ja lambdaan (λ). Molempia esiintyy kaikissa vasta-aineluokissa. Vasta-aineiden polypeptidiketjut muodostavat kolme rakenteellista yksikköä. Kaksi näistä yksiköistä on identtisiä ja mahdollistaa vasta-aineen sitoutumisen antigeeniin. Näitä yksiköitä kutsutaan nimellä Fab (*fragment antigen binding*). Fab-fragmenttiin kuuluvat kevyen ketjun VL- ja CL-domeenit, sekä raskaan ketjun VH- ja CH1-domeenit. Kolmas yksikkö on nimeltään Fc (*Fragment crystalline*), joka osallistuu vuorovaikutukseen

efektorisysteemien kanssa. Fc-alueella on sitoutumiskohdat komplementtiin osallistuville komponenteille, sekä erilaisille solun reseptoreille. Fc-fragmenttiin kuuluu raskaan ketjun 2. ja 3. vakiodomeenit (CH2- ja CH3-domeenit). Fab-Fc:n sitoutuminen ja Fc-alue aiheuttavat suurimmat erot eri vasta-aineluokkien välillä. [4, s. 3.1.]

Vasta-ainegenekirjastoja voidaan muodostaa Fab-fragmenteista tai scFv-fragmenteista (*Single-chain variable fragment*). Kuvassa 2 on esitetty vasta-ainemolekyylin rekombinanttimuotojen rakenne, jossa näkyvät myös Fab- ja scFv-fragmentit. ScFv-fragmentit ovat yksiketjuisia vasta-aineita, jotka sisältävät vasta-aineen vaihtelevat alueet. Siinä VH- ja VL-domeenit ovat yhdistettynä joustavalla polypeptidiketjulla. Fab-fragmenttien etuna on niiden stabiilisuus, niillä ei myöskään tapahdu dimerisaatiota, joka on hyvin yleinen ilmiö scFv-fragmenteilla. Fab-fragmentit ovat myös helpompia muuttaa kokonaisiksi IgG-molekyyleiksi. scFv-fragmenttien dimerisaatio tapahtuu, kun fragmentin VH-domeeni vaikuttaa toisen fragmentin VL-domeeniin. Dimerisaatioon vaikuttaa scFv-fragmenttien polypeptidiketjun aminohappokoostumus. [6.]



Kuva 2. Vasta-ainemolekyylin rekombinanttimuotojen rakenne [12]

Fab-faagivasta-ainekirjastojen rakentamiseksi VH-CH1- alueiden täytyy ilmentyä plasmidissa samanaikaisesti VL-alueiden kanssa. Kirjaston kokoamisessa VH-CH1- ja VL-CL1- alueet monistetaan PCR:n avulla ja ne kloonataan joko eri vektoreihin ja yhdistetään tai kloonataan ensimmäinen kirjasto (esimerkiksi VH-CH1) toiseen vektorina käytettyyn kirjastoon (esimerkiksi VL-CL1). Menetelmässä on tärkeää käyttää sellaisia restriktioentsyymejä, jotka eivät leikkaa vaihtelevaa osaa koodaavien geenien

keskeltä. Kloonausmenetelmän etuna on sen suoraviivaisuus muodostaa laajoja erillisiä vasta-ainegeenikirjastoja. [6.]

2.1.2 Vasta-ainekirjastotyytit

Vasta-ainekirjastot voidaan jakaa kolmeen eri tyyppiin: immunisoituihin-, naïveihin- ja synteettisiin vasta-ainekirjastoihin. Immunisoidut kirjastot kootaan antigeenillä immunisoitujen hiiren pernan B-solujen IgG-geeneistä. Kirjastot voidaan koota myös B-soluista, jotka on eristetty immuuneilta luovuttajilta saaduista verinäytteistä. Immunisoidun kirjaston etuna on se, että se sisältää paljon vasta-aineita, joilla on korkea affiniteetti. Haittapuolena on se, että kirjasto täytyy koota jokaiselle antigeenille erikseen, sillä immunisoidusta kirjastosta voidaan tuottaa vasta-ainetta yleensä vain yhtä antigeeniä vastaan. Immunisoituja kirjastoja voidaan käyttää muun muassa humoraalisen vasteen tutkimiseen autoimmuunisairauksissa tai *in vitro* tapahtuvien immunisaatiomenetelmien tutkimiseen. [7.]

Naivit kirjastot eivät ole mitään tiettyä antigeeniä vastaan rakennettuja. Ne sisältävät suuren määrän IgM-vasta-aineita, jotka tunnistavat monia antigeenejä. Vasta-ainegeenejä voidaan eristää muun muassa immunisoimattomien luovuttajien, hiiren pernan tai luuytimen B-solujen mRNA:sta. Eristetty mRNA muutetaan cDNA:ksi ja vasta-aineen kevyet ja raskaat ketjut yhdistetään sattumanvaraisesti ja kloonataan kirjastoksi, joka sisältää scFv- tai Fab-vasta-ainefragmentteja. Näin saadaan tuotettua vasta-aineita, jotka eivät vielä ole kohdanneet antigeeniä. Näiden vasta-aineiden ilmentyminen riippuu B-solujen lähteestä. Kirjastoja käytetään vasta-aineiden nopeaa eristystä varten, sekä humaanien vasta-aineiden eristämiseen. Naivien kirjastojen etuna on se, että yksittäisestä kirjastosta voidaan eristää vasta-aineita mitä tahansa antigeeniä vastaan kirjaston ollessa tarpeeksi laaja. Haittapuolena on kuitenkin se, että kirjaston täytyy olla tarpeeksi laaja, jotta voidaan eristää vasta-aineita, joilla on hyvä affiniteetti. [7.]

Synteettisiä vasta-ainekirjastoja voidaan rakentaa eristämällä monoklonaalisen vasta-aineen geenejä. Geenejä voidaan muunnella ja yhdistellä. Kirjastojen rakentaminen perustuu luontaisten CDR-alueiden (*complementarity determining regions*) korvaamiseen synteettisillä alueilla. Luodut kirjastot voivat olla osin tai kokonaan synteettisiä. Osin synteettisissä kirjastoissa osa CDR-alueista on luontaisia ja osa synteettisiä. Kokonaan synteettisissä kirjastoissa kaikki CDR-alueet on korvattu

keinotekoisilla alueilla. Kirjastojen etuna on se, että vasta-aineiden sidonta-ominaisuuksia, kuten affiniteettiä ja spesifisyyttä, saadaan paranneltua. Kirjastojen kokoaminen on kuitenkin työlästä ja kirjastojen tulee olla hyvin laajoja, jotta saadaan sitoja, joilla on korkea affiniteetti. [8.]

2.1.3 cDNA-kirjastojen valmistaminen

cDNA-kirjastoja valmistetaan geenien ekspresion tutkimista varten. cDNA edustaa näytteen mRNA-populaatiota tietyllä hetkellä. mRNA-kirjot voivat olla hyvinkin erilaisia kehittyneimpien organismien kudoksissa. Kaikki geenit eivät ilmenny samanaikaisesti kaikissa kudoksissa, minkä avulla saadaan aikaan erilaistuminen. cDNA-kirjaston valmistus aloitetaan eristämällä kudoksenäytteen mRNA-molekyylit. mRNA edustaa vain pientä osaa solun kokonais-RNA-määrästä ja se on myös hyvin nopeasti hajoavaa. Elinikä elävissä soluissa on yleensä korkeintaan muutama minuutti, joskin vaihtelua esiintyy mRNA- ja solukohtaisesti. RNA:ta pilkkovat RNAasit, jotka ovat solujen omia ribonukleasientsyymejä. RNAaseja on kaikkialla ympäristössä, joten ne muodostavat merkittävän ongelman, kun halutaan eristää ehjiä ja täyspitkiä mRNA-molekyylejä. [9, s. 108 - 109.]

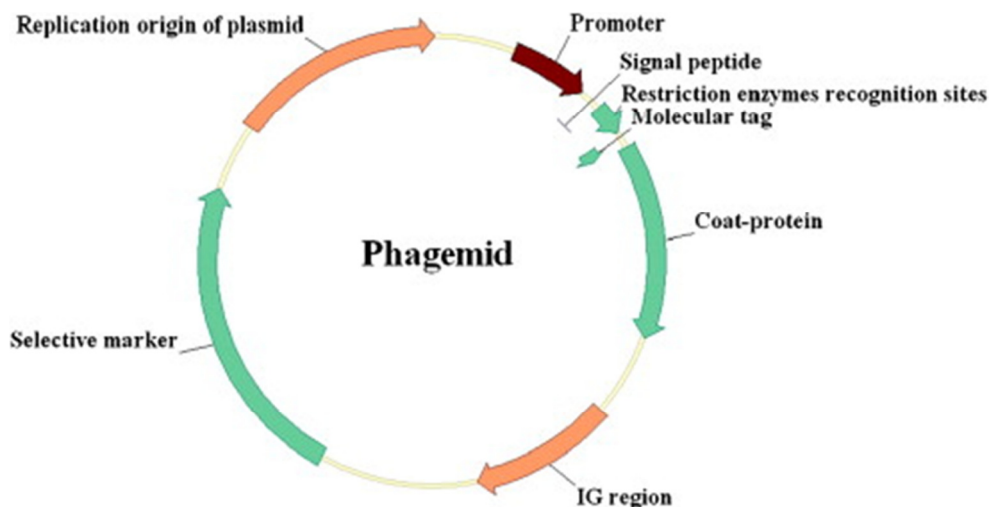
Nykyään eristys tehdään pääasiallisesti erilaisten kaupallisten menetelmävalmisteiden avulla. cDNA-kirjastojen valmistuksessa mRNA:t halutaan eristää muiden RNA:iden joukosta. Tämä voidaan tehdä esimerkiksi oligo-(dT)-pylväällä. Menetelmä perustuu mRNA:n tarttumiseen poly-(A)-hännistään pylväässä oleviin selluloosaan sidottuihin lyhyisiin deoksitymidiniketjuihin(oligo-(dT)), jolloin syntyy vetysidoksia A- ja dT-vastinemästen välille. Tarttumattomat RNA:t voidaan pestä pois, minkä jälkeen mRNA eluoidaan olosuhteita muuttamalla. Menetelmässä voidaan käyttää myös magneettipartikkeleita. Siinä oligo-(dT)-ketjut kiinnitetään magneettipartikkeleihin ja ketjuihin tarttunut mRNA kerätään talteen magneetin avulla. [8, s. 110.] Eristetetyistä mRNA-molekyyleistä valmistetaan käänteistranskriptaasin avulla cDNA:ta. Käänteistranskriptaasi toimii transkriptiolle käänteiseen suuntaan. Se siis valmistaa cDNA:n ensimmäisen juosteen käyttäen dNTP:itä lähtöaineina, ja templaattina toimii mRNA:n nukleotidijärjestys. [9, s. 151 - 152.]

Jotta tuotettu cDNA voidaan liittää vektoriin, se täytyy ensin muuttaa kaksijuosteiseksi. Yksijuosteinen cDNA-nauha toimii synteisissä templaattina. Ensin cDNA-nauhan

kanssa pariutunut mRNA täytyy poistaa osittain RNAasi H -entsyymien avulla. Tällöin jäljelle jääneet RNA-juosteiden osat toimivat alukkeina toisen nauhan synteesissä. Polymeerasientsyymi syntetisoi cDNA:n toisen nauhan, jolloin jäljelle jääneet RNA-juosteiden osat poistetaan ja korvataan DNA-juosteella. Tämän jälkeen kaksijuosteiseen cDNA:han voidaan ligoida DNA-sekvenssejä, joissa on sopiva restriktioentsyymien katkaisukohta, koska tylypääpääisenä vektori ligoituu tehottomasti. Vektori, johon cDNA halutaan liittää, katkaistaan näillä restriktioentsyymeillä ennen ligoitumista. [10, s. 92.]

2.1.4 cDNA:n liittäminen vektoriin

Tuotettu cDNA liitetään vektoriin ligoation avulla. Vektorit ovat luontaisesti lähes kaikilla bakteerilajeilla esiintyviä autonomisesti replikoituvia DNA-molekyylejä, joihin voidaan liittää vieraita DNA-fragmentteja. Ligoatiossa vektorina voidaan käyttää phagemid-vektoria, jonka rakenne on esitetty kuvassa 3.

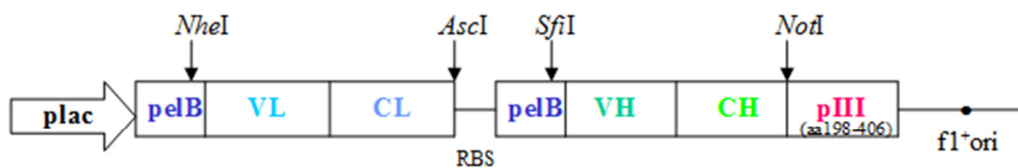


Kuva 3. Phagemid-vektorin rakenne [10]

Phagemidit ovat F_f-faagin johdannaisvektoreita sisältäen signaalipeptidiä koodaavan DNA-alueen, selektiivisen markkerin, promoottorin, restriktioentsyymien katkaisukohtat, faagipintaproteiinigeenin, plasmidin replikaation aloitusalueen sekä IG-alueen (*Intergenic region*), joka sisältää faagien pakkaussekvenssin ja plus- ja miinusjuosteiden replikaation aloitusalueet. Vektoriin voidaan myös liittää molekyyläarinen leima, jonka avulla mahdollistetaan phagemid-pohjaisten kirjastojen seulonta.

Verrattaessa faagivektoreihin phagemid-vektorit ovat laajemmin käytettyjä. Tämä johtuu phagemid-vektorien pienemmästä koosta ja siitä, että niihin voidaan ligoida suurempia DNA-fragmentteja. Ne ovat myös geneettisesti stabiilimpia. Phagemid-vektorit ovat tehokkaampia transformaatioissa, jolloin saadaan laaja faaginäyttökirjasto. Vektorin genomissa on myös laajalti restriktioentsyymien katkaisukohtia, sekä fuusioproteiinien ekspressiota voidaan hallita ja muunnella. [11.]

Phagemid 9.2 on VTT:n kehittämä Fab-fragmentin phagemid-vektori. Vektorin rakenne on esitetty kuvassa 4. Vektorin kevyttä ketjua kloonauksella alueella on 5'-päässä katkaisukohta *NheI*-restriktioentsyymille ja 3'-päässä lopetuskodoni ja katkaisukohta *AscI*-restriktioentsyymille. Vektorissa on vastaavasti katkaisukohdat raskasta ketjua pilkkoville *SfiI*- ja *NotI*-restriktioentsyymeille. Raskas ketju tuotetaan phagemid-vektorissa pIII-proteiinin fuusiona, jotta Fab-fragmentti voidaan tuottaa faagipartikkelin pinnalle. Vektorissa on 5'-päässä *pelB*-signaalisekvenssiä koodaava geenialue, joka ohjaa proteiinin gram-negatiivisen bakteerin periplasmaan, missä signaalipeptidi pilkkotaan signaalipeptidaasilla. Tämän jälkeen tapahtuu proteiinin laskostuminen.

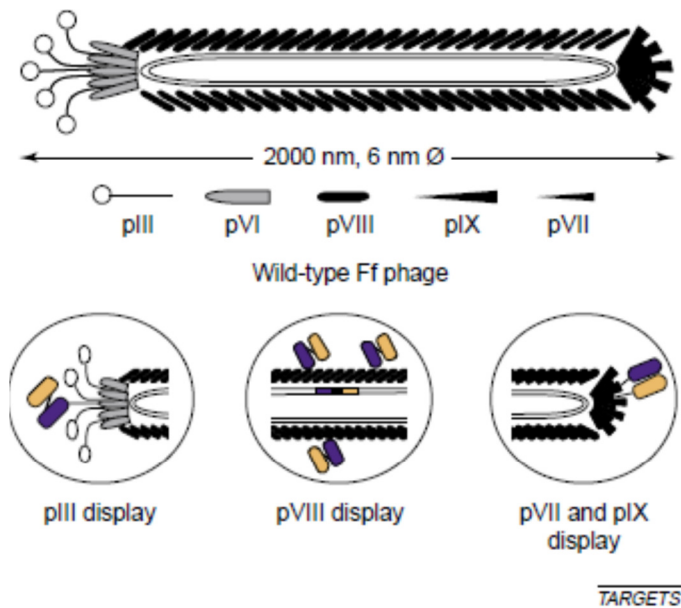


Kuva 4. VTT:n Phagemid 9.2 Fab-vektorin rakenne [Lähde: VTT:n materiaaleja]

2.2 Faaginäyttötekniikka

2.2.1 Faaginäyttökirjastojen valmistus

Faaginäyttötekniikka (*Phage display*) on laajalti käytetty tekniikka, jonka avulla pystytään kartoittamaan laajoja rekombinanttideptidi- ja proteiinkirjastoja tietyn kloonin löytämiseksi, sekä tutkimaan proteiinien ja proteiini-DNA-vuorovaikutuksia. Phagemid-vektorit eivät pysty itsenäisesti replikoitumaan, joten ne muutetaan filamenttifaageiksi infektoimalla auttajafaageilla, kuten R408, M13KO7 tai VCSM13. [11.] *E. coli* filamenttifaageista tutkituimpia ovat F pilukseen spesifisesti sitoutuvat faagit (Ff-faagit), jotka jaetaan f1-, M13- ja fd -faageihin. Ff-faagit ovat sauvamaisia filamenttifaageja, joiden ohuen lieriön muotoinen proteiiniuori muodostuu 2700 kappaleesta pVIII-proteiineja, joita koodaa geeni VIII. Filamenttifaagin päissä on myös pIII-, pVI- ja pIX-proteiineja. [9, s. 98.] Kuvassa 5 on esitetty Ff-filamenttifaagin rakenne.



Kuva 5. Filamenttifaagin rakenne [14]

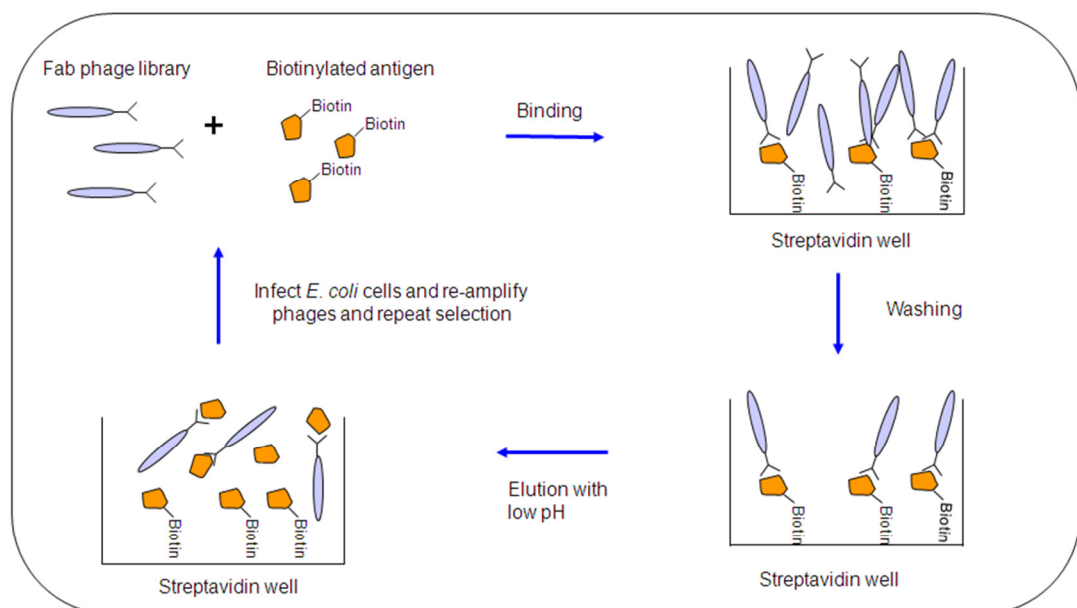
pVIII on tärkein pintaproteiini, joka on vain 50 aminohapon kokoinen. Filamenttifaagin pinnalla olevat pVIII-proteiinit ovat kiinnittyneinä toisiinsa hydrofobisilla sidoksilla. pVII, pIX, pIII ja pVI ovat pienempiä pintaproteiineja. Virionin kokoamisvaiheessa pintaproteiinit pVII ja pIX tunkeutuvat ensin ulos solusta. Nämä pintaproteiinit ovat pieniä hydrofobisia proteiineja, jotka ovat kooltaan vain 32 (pVII) ja 33 (pIX)

aminohappoa. Proteiinit pIII ja pVI lisätään virioniin kokoamisvaiheen lopussa. Ne pitävät virionin rakenteen stabiilina ja niitä tarvitaan myös virionin kokoamisen lopettamiseen. Proteiini pIII on huomattavasti suurempi kuin muut virionin pintaproteiinit. Se koostuu kolmesta domeenista (N1, N2 ja C). Domeenien välissä on pitkiä glysiinipitoisia ketjuja. N2-domeeni sitoutuu F-pilukseen infektion aikana, jolloin N1-domeeni vapautuu. N1-domeeni vuorovaikuttaa bakteerin pintaproteiinin kanssa. C-domeenia tarvitaan faagin kokoamisen lopettamiseen, se myös osallistuu virionin kuoren rakentamiseen ja faagi-infektion loppuvaiheisiin. [12.]

Auttajafaagit sisältävät osat faagipartikkelien kokoamiseksi, jolloin phagemid kykenee tuottamaan viruspartikkeleja, joiden sisällä on phagemid-DNA:ta. Filamenttifaagit pystyvät infektoimaan pääasiallisesti gram-negatiivisia bakteereja, esimerkiksi *E. colia*. Infektiossa faagin DNA pääsee bakteerisolun sisään ja alkaa käyttää hyväkseen isäntäsolun DNA-polymeraaseja, jolloin faagin DNA muuttuu kaksinauhaiseen muotoon. Tällöin faagi kykenee replikoitumaan bakteerin sisällä. [9, s. 96.] Faagin pintaproteiini (pIII, pVI tai pVIII) sitoutuu *E. colin* pilukseen, jolloin syntyvät fuusioproteiinit jäävät periplasmiseen tilaan. Fab-fragmentti liittyy faagin pintaproteiinin pIII:n aminohappopäähän.[12.] Tietyissä vaiheissa faagi-DNA:n replikaatiotapa vaihtuu ja se alkaa taas muodostaa yksinauhaista DNA:ta isäntäsolun sisällä. Vaippaproteiinit kerrostuvat yksinauhaisen DNA:n ympärille sitä mukaa kuin sitä syntyy. Periplasmisessa tilassa tapahtuu faagipartikkelien kokoaminen ja kootut faagit vapautuvat ympäröivään liuokseen aiheuttamatta solun lyysautumista. Ympäröivästä liuoksesta ne ovat helppo eristää. Menetelmän etuna on infektiosyklin tehokkuus, jolloin saadaan konsentroituja faagiliuoksia. [14.]

2.2.2 Faaginäyttökirjastojen seulonta

Seulonnassa kuoppalevyn pohjalle immobilisoidaan antigeeni. Sidontaselektio voidaan tehdä myös liuoksessa. Esimerkiksi voidaan käyttää biotinyloitua antigeeniä, johon kiinnittyneet vasta-ainefaagit voidaan eristää streptavidiinilla pinnoitetuilla kaivoilla tai partikkelilla. Tämä on esitetty kuvassa 6. Tämän jälkeen lisätään tutkittava faagikirjasto, jolloin faagipartikkeliin liittyneet proteiinit sitoutuvat spesifisesti antigeeniin. Sitoutumattomat faagipartikkelit pestään pois, jolloin jäljelle jäävät haluttua proteiinia sisältävät faagit, jotka sitoutuvat vahvimmin. Faagit eluoidaan, minkä jälkeen niitä voidaan tuottaa suurempia määriä ja niistä voidaan eristää DNA jatkokäsittelyjä ja -tutkimuksia varten. Seulontaa voidaan myös jatkaa, jolloin saadaan valittua enemmän spesifisesti sitoutuvia faageja. [8, s. 98.] Halutut faagit saadaan seulottua tehokkaasti muuttamalla pesuja tehokkaammiksi jokaisella seulontakierroksella. Näin saadaan valikoitua jatkotestejä varten ne faagit, joilla on vahvin sitoutumiskyky. [9, s. 100.]



Kuva 6. Faagikirjaston seulonnan periaate [Lähde: VTT:n materiaaleja]

Teoriassa yhden seulontakierroksen pitäisi riittää, mutta faagien epäspesifinen sitoutuminen rajoittaa sen rikastumisen määrää, joka voidaan saavuttaa yhdellä kierroksella. Tämän takia seulontakierroksia voi olla 2 - 5. Seulontakierrosten määrä riippuu selektiomenetelmästä ja populaatioissa olevien vasta-aineiden affiniteetistä. Halutun proteiinin rikastumisaste vaihtelee jokaisella seulontakierroksella. Olosuhteita

muuttamalla saadaan myös rikastettua erilaisen sitoutumiskyvyn omaavia vasta-aineita. Esimerkiksi käyttämällä alhaista antigeenikonsentraatiota saadaan valittua sellaisia vasta-aineita, joilla on korkein affiniteetti. Selektion tehokkuus riippuu myös tutkittavaa vasta-ainetta ilmentävien phagemid-vektorien määrästä. Yleensä 1 - 10 % vektoreista ilmentää haluttua vasta-ainetta. [6.]

Seulonnan optimointi

Seulontojen spesifisyyttä voidaan lisätä erilaisilla keinoilla, kuten käyttämällä tarpeeksi isoa määrää puhdistettua antigeenia, estämällä epäspesifinen sitoutuminen, sekä käyttämällä leimattua antigeenia. Käyttämällä puhdistettua antigeenia vähennetään epäspesifistä sitoutumista. Seulottavassa faagiliuoksessa tulee myös olla tarpeeksi faageja. Yleisesti käytetty määrä on 10^{13} cfu/ml (*colony forming units*). Tämä takaa sen, että seulontojen aloitushetkellä jokainen vasta-ainetta ilmentävä faagikloni on edustettuna. Seulonnoissa voidaan myös käyttää liuosta, joka estää faagien sitoutumista epäspesifisesti. Epäspesifisen sitoutumisen estämiseen voidaan käyttää esimerkiksi maitojauhetta, BSA:a tai kaseiinia. [6.]

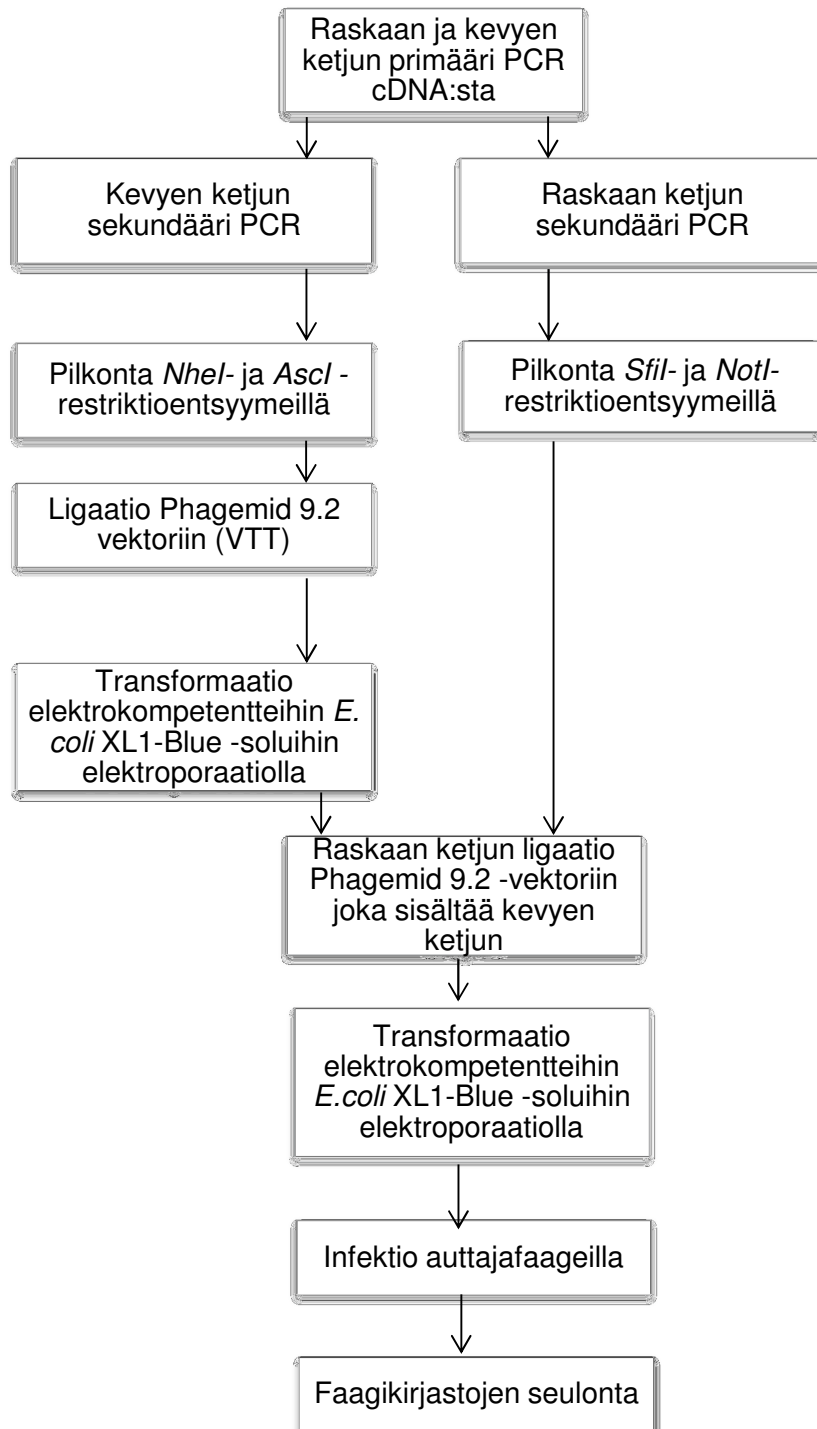
Haluttujen faagien rikastamiseksi käytetään yleensä fysikaalisia menetelmiä, kuten antigeenien adsorptiota muovipinnoille (esimerkiksi kuoppalevyille tai immunoputkiin). Fysikaalisten menetelmien ongelmana on kuitenkin se, että vasta-aineen sitoutumiskohta antigeenissä voi osittain denaturoitua immobilisaation jälkeen. Tämä voi johtaa sellaisten vasta-aineiden selektioon, jotka eivät tunnista natiivissa muodossa olevaa antigeeniä. Ongelma voidaan välttää käyttämällä epäsuoraa päälylystystä toisen antigeenispesifisen vasta-aineen avulla. [6.] Suosituin menetelmä on hyödyntää biotiini-streptavidini- teknologiaa seulonnoissa [15, s. 151 - 152]. Kemiallisesti tai laiteteknisesti biotinyloidun antigeenin ja vasta-ainekirjaston sitoutumisreaktio tehdään liuoksessa, minkä jälkeen biotinyloituun antigeeniin sitoutuneet vasta-ainefaagit eristetään streptavidiinipinnoitetuille kaivoille tai partikkeleille, joista vasta-ainefaagit voidaan eluoida jatkokäsittelyä varten. Eluointi tapahtuu esimerkiksi käyttäen matalaa tai korkeaa pH:ta tai liukoista antigeeniä. Streptavidiinipinnalle voidaan myös ensin kiinnittää antigeeni ja sitten vasta-ainefaagit. Tällöin ongelmana voi kuitenkin olla myös streptavidiniä tunnistavien vasta-ainefaagien eristäminen ellei ensin tehdä pre-inkubaatiovaihetta vasta-ainefaagikirjaston ja streptavidiinipinnan kanssa. [6.] Seulontaperiaate käyttäen biotinyloitua antigeeniä on esitetty aiemmin kuvassa 6.

Valittujen faagikloonien karakterisointi

Seulonnoissa vain osa faagikirjastosta sitoutuu antigeeniin. Yleisesti ottaen eluoitujen faagien määrä vaihtelee 10^3 - 10^6 faagipartikkelin välillä. Näistä suurin osa on epäspesifisiä taustasitojia. Karakterisointia varten faageja kasvatetaan elatusliemessä, minkä jälkeen ne maljataan. Yksittäisiä pesäkkeitä poimitaan mikrotiitterilevyille, jolloin saadaan vasta-aineita tuottavia monoklonaalisia faagiviljelmiä. Näitä viljelmiä voidaan testata ELISAlla, jolloin tunnistetaan positiiviset vasta-ainetta tuottavat kloonit, jotka sitoutuvat spesifisesti antigeeniin. Positiivisia klooneja voidaan tutkia sekvenoimalla niiden raskaan ja kevyen ketjun geenit, sekä tutkimalla sitoutumisen spesifisyyttä ja affiniteettiä ELISA-menetelmillä. Vasta-ainegeenit voidaan myös siirtää *E. coli*-tuottovektoriin liukoisen vasta-ainefragmentin tuottamiseksi. Tuotettuja fragmentteja voidaan puhdistaa kromatografisin menetelmin. Vasta-aineen toimivuutta voidaan myös evaluoida käyttötarkoituksessaan. [14.]

3 Työn suoritus

Työn kulku on esitetty seuraavassa kaaviossa.



3.1 Vasta-ainefragmenttien kloonaukset ja pilkonnat

Työ aloitettiin kevyen ketjun vasta-ainefragmenttien kloonauksella PCR:n avulla sekä koivun siitepölyn allergeenille (*Bet v 1*) että timotein siitepölyn allergeenille (*Phl p 1*). Näitä allergeenejä tunnistavien vasta-aineiden cDNA:t oli tuotettu immunisoitujen hiirien pernasoluista eristetystä RNA:sta. PCR-reaktiossa käytettiin spesifisiä alukkeita, jotka mahdollistavat kaikkien tunnettujen hiiren vasta-ainegenien kloonauksen.

Kevyen ketjun cDNA:n kloonauksessa käytettiin alukkeena #4549-aluketta. Toisena alukeparina toimi seos, joka sisältää useita eri alukkeita. Sekundäärisessä PCR:ssa käytettiin aluketta #4549, joka sisältää *AscI*-restriktioentsyymin katkaisukohtaan, sekä aluketta #4552, joka sisältää *NheI*-restriktioentsyymin katkaisukohtaan. Raskaan ketjun cDNA:n kloonauksessa käytettiin primäärisessä PCR:ssa aluketta #4640, ja toisena alukeparina toimi useaa aluketta sisältävä seos. Sekundäärisessä PCR:ssa käytettiin aluketta #4640, joka sisältää *NotI*-restriktioentsyymin katkaisukohtaan, sekä aluketta #4632, joka sisältää *SfiI*-restriktioentsyymin katkaisukohtaan. [16.] Alukkeiden sekvenssit on esitetty liitteessä 1. Taulukossa 1 on esitetty PCR-yleisreaktio.

Taulukko 1. PCR-yleisreaktio

Reagenssi	Loppukonsentraatio
H ₂ O	Tilavuus täydennettiin 50 µl:aan
10x HF-puskuri	1x
dNTP	10 mM
Aluke 1.	50 pmol/µl
Aluke 2.	50 pmol/µl
Templaatti DNA	25 ng
Phusion-polymeraasientsyymi	1 U

PCR:ssä käytettiin Phusion PCR-ohjelmaa, joka on esitetty taulukossa 2.

Taulukko 2. PCR-ohjelma

Toiminta	Sykliden määrä	Lämpötila	Aika
Alkudenaturaatio	1	98 °C	30 s
Denaturaatio	35	98 °C	10 s
Annealing		60 °C	30 s
Ekstensiovaihe		72 °C	40 s
Loppuekstensio	1	72 °C	10 min
Lopetus	1	4 °C	∞

Kevyen ketjun geenifragmentit pilkottiin *NheI*- ja *AscI*-restriktioentsyymeillä ja raskaan ketjun geenifragmentit *SfiI*- ja *NotI*-restriktioentsyymeillä. Pilkottaessa vektorista irtosi noin 660 bp:n kokoinen insertti 1 % preparatiivisella agarosigeelillä. DNA eristettiin NucleoSpin Gel and PCR Clean-up-kitin ohjeen mukaan. [17.]

3.2 Ligaatiot

Ligaatio CloneJET-vektoriin

Raskaan ja kevyen ketjun PCR-tuotteet liitettiin ensin kaupalliseen CloneJET-vektoriin. [18.] Vektorista pilkottiin kevyen ja raskaan ketjun geenifragmentit restriktioentsyymeillä ja liitettiin VTT:llä aiemmin rakennettuun Phagemid 9.2 vektoriin. Tämä välikloonauksen tehtiin, jotta varsinaista kirjastokloonausta varten saadaan mahdollisimman tehokkaasti ligoituvat vasta-ainegeenifragmentit. CloneJET-vektorista pilkottaessa fragmentit sisältävät optimaaliset päät tehokasta ligaatiota varten.

Rekombinanttikloonien selektio tapahtuu insertin liittämisen jälkeen vektorissa olevalla letaalilla restriktioentsyymillä, joka ilmenee transformaation yhteydessä. Näin saadaan kasvamaan kasvatusmaljalla vain ne rekombinanttikloonit, joihin insertin liittäminen on onnistunut. Taulukossa 3 on esitetty ligaatioreaktioon pipetoidut määrät. Vektoria, sekä PCR-tuotteita pipetoiitiin kaksinkertaiset määrät alkuperäisestä ohjeesta poiketen.

Taulukko 3. CloneJET ligaatioreaktio

Reagenssi	Tilavuus
2x reaktiopuskuri	10 µl
PCR-tuote (Bet v 1 / Phl p 1) ~ 50 ng/µl	1 µl
pJET1.2 (50 ng/µl)	2 µl
H ₂ O	6 µl
T ₄ DNA-ligaasi (1 U/µl)	1 µl
Yhteensä	20 µl

Reaktioseos sekoitettiin hyvin ja inkuboitiin huoneen lämpötilassa 30 min. Seokseen lisättiin 200 µl kompetentteja XL1-Blue *E. coli* -soluja ja inkuboitiin jäissä 30 min. Tämän jälkeen DNA saatettiin solujen sisään lämpösokin avulla. Soluja pidettiin +37 °C:ssa kaksi minuuttia, jonka jälkeen ne siirrettiin kahdeksi minuutiksi jäähautteeseen.

Reaktioon lisättiin 400 µl SOC- liuosta ja inkuboitiin 1 h (+37 °C 220 rpm), jonka jälkeen seos laimennettiin 10 ml:aan SB-liuosta (+ 10 µg/ml tetrasykliini, 100 µg/ml ampisilliini + 2 % glukoosi). Kasvatus (+37 °C 220 rpm) yön yli. DNA eristettiin Macherey-Nagelin NucleoSpin Plasmid Extraction kitillä. [19.] Kevyen ketjun sisältävä yhdistelmä-DNA-vektori pilkottiin *NheI*- ja *AscI*-restriktioentsyymeillä ja raskaan ketjun yhdistelmä-DNA-vektori *SfiI*- ja *NotI*-restriktioentsyymeillä. Pilkontareaktio on esitetty taulukossa 4.

Taulukko 4. CloneJET-vektorin pilkonta

Keuyen ketjun insertin digestio CloneJET-vektorista		
Reagenssi	Phi p 1	Bet v 1
CloneJET-yhdistelmä-DNA-molekyyli	173 µl (144,9 ng/µl)	162 µl (123,2 ng/µl)
H ₂ O	32 µl	47 µl
10×Cuts All- puskuri	25 µl	25 µl
<i>NheI</i> 10 000 U/ml	10 µl	8 µl
<i>AscI</i> 10 000 U/ml	10 µl	8 µl
Yhteensä	250 µl	250 µl
Raskaan ketjun insertin digestio CloneJET-vektorista		
Reagenssi	Phi p 1	Bet v 1
CloneJET-yhdistelmä-DNA-molekyyli	53 µl (477,7 ng/µl)	48 µl (558,2 ng/µl)
H ₂ O	30 µl	35 µl
NEB 4- puskuri	10 µl	10 µl
<i>SfiI</i> 20 000 U/ml	7 µl	7 µl
Yhteensä	100 µl	100 µl

Keuyen ketjun pilkontareaktiota inkuboitii 2 h +37 °C:ssa. Raskaan ketjun reaktiota inkuboitii ensin + 50 °C:ssa, jonka jälkeen lisättii 7 µl *NotI*- restriktioentsyymiä, 5 µl NEB 4- puskuria, sekä 38 µl H₂O ja jatkettiin inkubointia kaksi tuntia +37 °C:ssa. Tuotteet ajettiin 1 % agarosigeelille. Vektorista eristettiin noin 750 bp:n kokoinen insertti. Tämä insertti liitettiin Phagemid 9.2-vektoriin massaligaatiolla, joka on esitetty seuraavassa osiossa.

Ligaatiot phagemid-vektoriin

Kevyen ketjun ligaatiota varten Phagemid DNA pilkottiin *AscI*- ja *NheI*-restriktioentsyymeillä. DNA eristettiin 1 % preparatiiviselta agarosigeeliltä. Ennen massaligaatioita vektoria testattiin pienen mittakaavan testiligaatioilla. Siinä linearisoidulle vektorille tehtiin ligaatioreaktio ilman inserttiä, jolloin havaitaan ns. vektoritausta. Tätä vektoritaustaa verrattiin ligaatioreaktioon, jossa oli myös insertti mukana. Vektoritaustan tulisi olla alle 5 % verrattuna ligaatioon, jossa on myös insertti mukana. Näin varmistetaan, että kirjastoista tulee tarpeeksi laajoja. Taulukossa 5 on esitetty ligaatioreaktiot.

Taulukko 5. Vektoritaustan määrittäminen

Reagenssi	Vektoritausta	Testiligaatio insertillä
H ₂ O	5,5 µl	4,7 µl
150 ng phagemid-vektori-DNA (50,1 ng/µl)	3 µl	3 µl
50 ng eristettyä inserttiä (67,2 ng/µl)	-	0,8 µl
10 x T4 ligaasipuskuri	1 µl	1 µl
T4 DNA ligaasi (1 U)	0,5 µl	0,5 µl
Yhteensä	10 µl	10 µl

Reaktioita inkuboitii huoneen lämpötilassa 2 h. Ligaatioreaktiota transformoitiin 5 µl elektrokompetentteihin XL1-Blue-soluihin, joiden transformaatiotehokkuus oli 10^9 - 10^{10} transformanttia /µg DNA. Seosta sekoitettiin ja inkuboitii jäissä 15 min, jonka jälkeen soluille annettiin sähköshokki (2,5 kV, 25 µF, 200 Ω) Bio-Radin Micropulser-laitteella.

Elektroporaation jälkeen kyvetit huuhdeltii välittömästi 3x 1 ml SOC-liuoksella ja inkuboitii (220 rpm) +37 °C:ssa 1 h. Seoksesta otettiin 200 µl:n näyte, josta tehtiin laimennokset LB-ampisilliinimaljoille ja inkuboitii +37 °C:ssa yön yli. Kontrollina käytettiin 20 pg:aa Phagemid 9.2-vektori-DNA:ta. Pesäkelukumäärän perusteella laskettiin transformaatiotehokkuus, sekä vektorin taustaligaatio. Taustaligaation ollessa alle 5 % jatkettiin massaligaatioihin. Reagensseja pipetoitiin massaligaatioihin taulukon 6 mukaisesti. Reaktiota inkuboitii +16 °C:ssa yön yli.

Taulukko 6. Massaligaatio

Reagenssi	Phl p 1	Bet v 1
1,5 µg Phagemid-vektori-DNA (50,1 ng/µl)	30 µl	30 µl
H ₂ O	33,5 µl	34 µl
0,5 µg kevyen ketjun insertti	24,5 µl	24 µl
10 x T4 ligaasipuskuri	10 µl	10 µl
T4 DNA ligaasi (10 U)	2 µl	2 µl
Yhteensä	100 µl	100 µl

Inkuboinnin jälkeen DNA puhdistettiin fenoli-kloroformiuutolla. Reaktioseokseen pipetoitiin 50 µl fenolia ja 50 µl kloroformia, sekoitettiin hyvin ja sentrifugoitiin (14 000 rpm, 5 min) huoneen lämpötilassa. Vesifaasi pipetoitiin puhtaaseen eppendorf-putkeen ja lisättiin 100 µl kloroformia, sekoitettiin ja sentrifugoitiin kuten aiemmin. Vesifaasi pipetoitiin taas puhtaaseen eppendorf-putkeen ja lisättiin 10 µl 3 M natriumasetaattiliuosta (ph 5,2) ja sekoitettiin hyvin. Seokseen lisättiin myös 250 µl 94 % etanolia ja inkuboitiin -20 °C:ssa 30 min. Seosta sentrifugoitiin (14 000 rpm, + 4 °C, 30 min), jonka jälkeen etanoli poistettiin. DNA-pellettiä pestiin kaksi kertaa lisäämällä 500 µl kylmää 70 % etanolia ja sentrifugoimalla (14 000 rpm, + 4 °C, 15 min). Etanoli poistettiin hyvin, jonka jälkeen DNA-sakka kuivatettiin + 65 °C lämpöblokkissa. DNA liuotettiin 10 µl:aan 1 mM MgCl₂-liuosta.

2 x 5 µl ligaatioseosta transformoitiin 80 µl:aan elektrokompetentteja XL1-Blue-soluja antamalla niille sähköshokki (2,5 kV, 25 µF, 200 Ω) Bio-Radin Micropulser-laitteella. Elektroporaatiokyvetit huuhdeltiin kaksi kertaa 1 ml:lla SOC-lientä ja yhdistettiin yhteen koeputkeen. Seosta inkuboitiin ravistelussa 1 h +37 °C:ssa. Tämän jälkeen lisättiin 6 ml SB-lientä (+ 20 µg/ml ampicilliini + 10 µg/ml tetrasykliini + 1 % glukoosi).

Ennen massakasvatusta otettiin 120 µl:n näyte transformaatiotehokkuuden määrittämiseksi varten. Näytteestä tehtiin 10⁻¹, 10⁻² ja 10⁻³ laimennokset LB-ampicilliini maljoille ja inkuboitiin +37 °C:ssa yön yli. Kontrollina käytettiin 20 pg:aa phagemid-vektori-DNA:ta. Pesäkelukumäärän perusteella laskettiin transformaatiotehokkuus. Tämän jälkeen maljoilta poimittiin 10 pesäkettä SB-liemeen (+ 10 µg/ml tetrasykliini + 100 µg/ml ampicilliini + 2 % glukoosi). Pesäkkeitä kasvatettiin yön yli ravistelussa +37 °C:ssa, minkä jälkeen niistä eristettiin plasmidi DNA NucleoSpin Plasmid-kitillä. Kevyen ketjun ligaationäytteiden DNA:t pilkottiin *NheI*- ja *AscI*-restriktioentsyymeillä ja raskaan ketjun

näytteet *NotI*- ja *SfiI*-restriktioentsyymeillä. Tämän jälkeen pilkotut fragmentit ajettiin 1 % agarosigeelille. Tällä varmistettiin, että vektoriin on varmasti liittynyt inserttiä.

Massakasvatus-liuosta inkuboitii ravistelussa 1 h +37 °C:ssa, jonka jälkeen ampisilliiniä lisättiin niin, että lopullinen pitoisuus oli 100 µg/ml. Inkubointia jatkettiin ravistelussa 1 h +37 °C:ssa. Seokset siirrettiin erlenmeyerpulloihin, lisättiin 80 ml SB-lientä (+ 100 µg/ml ampisilliini +10 µg/ml tetrasykliini + 2 % glukoosi) ja inkuboitii yön yli + 37 °C:ssa ravistelussa. Plasmidi-DNA eristettiin Qiagenin Plasmid Maxi-kitillä. Kevyen ketjun massaligaation jälkeen vektoria pilkottiin *NotI*- ja *SfiI*-restriktioentsyymeillä, jotta voitiin liittää CloneJET- vektorissa tuotettu raskaan ketjun insertti. Ligaatioreaktio tehtiin samalla tavalla kuin kevyen ketjun osalta.

3.3 cDNA-kirjastojen muuttaminen faaginäyttökirjastoiksi

Massaligaatioiden jälkeen transformoitii elektroporaatiolla 1 µg valmistettua kirjastoa 100 µl:aan elektrokompetenteja XL-1 Blue-soluja. Elektroporaatiokyvetti huuhdottiin kolme kertaa 1 ml:lla SOC-liuosta ja transformaatioseosta inkuboitii 1 h +37 °C ravistelussa. Liuos laimennettiin 7 ml:aan lämmintä SB-kasvatuslientä (+ 20 µg/ml karbenisilliini + 10 µg/ml tetrasykliini) ja otettiin 50 µl näytteeksi maljauksia varten. Tämän jälkeen putkia inkuboitii 1 h + 37 °C ravistelussa, jonka jälkeen karbenisilliiniä lisättiin siten, että konsentraatio oli 50 µg/ml ja jatkettiin inkubointia 1 h +37 °C ravistelussa. Kasvatusliemeen lisättiin 1 ml VCS-M13 auttajaageja (Stratagene, ~10¹² faagipartikkeli/ml) ja inkuboitii 15 - 30 min +37 °C:ssa ilman ravistelua. Tämän jälkeen liuos laimennettiin 90 ml:aan lämmitettyä SB-lientä (+ 50 µg/ml karbenisilliini + 10 µg/ml tetrasykliini) ja inkuboitii kaksi tuntia + 37 °C:ssa sekoituksessa. Inkuboinnin jälkeen lisättiin kanamysiiniä siten, että pitoisuus oli 70 µg/ml, ja inkuboitii yön yli +30 °C ravistelussa. Phagemid DNA:n stabiilisuuden tarkistamiseksi otettiin näyte DNA-eristystä ja *NheI*-*NotI*-pilkontaa varten.

Näyte siirrettiin sentrifugipulloihin ja sentrifugoitii (5000 rpm, +4 °C 15 min). Supernatantti siirrettiin puhtaaseen pulloon, jossa oli 25 ml kylmää 20 % PEG-6000-2,5 M NaCl -liuosta, sekoitettiin hyvin ja inkuboitii jäissä 30 min. Tämä sai aikaan faagien saostumisen. Seosta sentrifugoitii (9000 rpm, +4 °C, 20 min), minkä jälkeen supernatantti poistettiin huolellisesti. Faagisaostuma suspensoitii 2 ml:aan PBS-liuosta ja sentrifugoitii (14 000 rpm, +4 °C, 5 min), jotta saatiin poistettua jäljellä olevat solujäämät. Supernatantti jaettiin kahteen eppendorf-putkeen ja lisättiin 250 µl PEG-

6000-2,5 M NaCl -liuosta ja inkuboitiin jäissä 15 min faagien saostamiseksi. Faagit sentrifugoitiin sakaksi (14 000 rpm, +4 °C, 15 min), jonka jälkeen supernatantti poistettiin ja toinen faagisaostumista liuotettiin 1 ml:aan PBS-1 % BSA- liuosta ja toinen 1 ml:aan PBS-liuosta pidempää säilytystä varten. Vasta-ainefaagikirjastot säilytettiin +4 °C:ssa seulontoja varten.

3.4 Valmistettujen faagikirjastojen seulonta

3.4.1 Allergeenien biotinylointi ja biotinyloitujen allergeenien analysointi

Ennen seulontoja valmistettiin biotinyloitua Phl p 1 -allergeeniä. Samalla ohjeella valmistettua biotinyloitua Bet v 1 -allergeeniä oli jo valmiina. Kaupallista Phl p 1 -allergeeniä (Biomay) biotinyloitiin Sulfo-NHS-LC-biotinylointikitillä (Pierce) kitin ohjeen mukaisesti. [20.] Biotinyloidulle allergeenille tehtiin puskurinvaihto PBS-liuokseen Illustra NAP-5 kolonnilla (GE Healthcare). Liuos kerättiin 1 ml:n fraktioihin ja mitattiin proteiinipitoisuudet aallonpituudella 280 nm. Tulosten perusteella yhdistettiin eniten proteiinia sisältävät fraktiot.

Biotinyloidut allergeenit analysointiin ELISAlla käyttäen allergeeneilla immunisoitujen hiirien seerumeja. Tällä varmistettiin, että allergeenillä immunisoitujen hiirien vasta-ainevasteet tunnistavat myös allergeenien biotinyloidut muodot. Bet v 1 (0,411 mg/ml) ja Phl p 1 (0,911 mg/ml) -allergeeniliuoksia laimennettiin siten, että saatiin 0,5 µg/100 µl, 0,25 µg/100 µl ja 0,125 µg/100 µl laimennokset. Laimennoksia pipetoitiin streptavidiniinipinnoitetulle 96-kuoppalevyille (Kaivogen KaiSA 96-Lockwell) taulukon 7 mukaisesti 100 µl per kaivo. Negatiivisena kontrollina käytettiin PBS-0,5 % BSA-liuosta.

Taulukko 7. Biotinyloitujen allergeenien analysointi ELISA:lla

	Bet v 1	Phl p 1
A	0,5 µg	0,5 µg
B	0,5 µg	0,5 µg
C	0,25 µg	0,25 µg
D	0,25 µg	0,25 µg
E	0,125 µg	0,125 µg
F	0,125 µg	0,125 µg
G	100 µl PBS-0,5 % BSA	100 µl PBS-0,5 % BSA

Kuoppalevyä inkuboitui ravistelijassa huoneenlämpötilassa 1 h, minkä jälkeen kaivot pestiin PBS-liuksella kolme kertaa pesurissa, jolloin kuoppaan tarttumattomat allergeenit saatiin poistettua. Pesujen jälkeen kuoppiin pipetoitiin Bet v 1- tai Phl p 1-immunisoitujen hiirien seeruminäytettä, josta oli tehty 1:1000 laimennos PBS-0,5 % BSA-liukseen. Inkuboitui ravistelijassa huoneen lämpötilassa 1 h. Tämän jälkeen sitoutumattomat vasta-aineet pestiin pois PBS-liuksella. Pesu toistettiin kolme kertaa. Detektiovasta-aineena käytettiin Goat anti-mouse IgG (H+L) -vasta-ainetta (BioRad), josta tehtiin 1:1000 laimennos. Kuopat pestiin kuten edellä. Värireaktio saatiin aikaan pipetoimalla kaivoihin 100 µl 500 mM *p*-nitrofenyylifosfaattisubstraattia (Sigma), joka oli liuotettu dietanoliamiini-MgCl₂-puskuriin (Reagena). Värireaktio mitattiin 6 min päästä Thermo Scientificin Varioskan-laitteella aallonpituudella 405 nm.

3.4.2 Biotinyloitujen allergeenien käyttö faagikirjastojen seulonnoissa

Seulontaan käytettiin 0,5-1 µg biotinyloitua Phl p 1 - tai Bet v 1 -allergeeniä. Allergeeniä pipetoitiin sopiva tilavuus 5 µl:aan PBS-liuosta. Taustasitoutumista seurattiin biotinyloidun BSA:n avulla. Biotinyloitua BSA-liuosta pipetoitiin 0,5-1 µg 5 µl:aan PBS-liuosta. Seokseen lisättiin 200 µl faagiliuosta 1 % BSA-PBS- liuksessa. Seosta inkuboitui 1-1,5 h pyörijässä huoneen lämpötilassa.

200 µl allergeenien tai BSA:n kanssa inkuboitua faaginäytettä siirrettiin streptavidiniinipinnoitettuihin kaivoihin 96-kuoppalevyille. Levyä inkuboitui 30 min ravistelussa huoneen lämpötilassa. Inkuboinnin jälkeen kuopista poistettiin

sitoutumattomat faagit manuaalisesti ja pestiin kerran 200 µl:lla PBS-liuosta, minkä jälkeen kuoppalevy vietiin pesuriin. Taulukossa 8 on esitetty pesuohjelma.

Taulukko 8. Kuoppalevyn pesuohjelma

6 x 300 µl PBS - 0,05 % Tween	ei inkubaatiota pesujen välissä
6 x 300 µl PBS - 0,05 % Tween	5 s inkubaatio pesujen välissä
6 x 300 µl PBS - 0,05 % Tween	10 s inkubaatio pesujen välissä

Pesujen jälkeen sitoutuneet faagit eluoiitiin lisäämällä kuoppiin 200 µl 0,1 M glysiini-suolahappoa (pH 2,2) ja inkuboimalla huoneen lämpötilassa ravistelijassa 15 min. Eluoidut faagit siirrettiin putkiin, joissa oli 15 µl 1 M Tris-HCl-liuosta (pH 9,6), jolloin tapahtui faagien neutralointi. Neutraloiduilla faagieluaateilla infektoitiin eksponentiaalisesa kasvuvaiheessa olevia XL-1 Blue -soluja ($OD_{600} = 1,0$). Faagieluaatit lisättiin 3 ml:aan XL-1 Blue -soluja 50 ml falcon-putkeen, sekoitettiin varovasti ja inkuboitiin 15 – 30 min +37 °C:ssa ilman ravistelua. Putkiin lisättiin 7 ml SB-lientä (+ 20 µg/ml karbenisilliini + 10 µg/ml tetrasykliini). Putkista otettiin 200 µl:n näyte maljauksia varten. Näytteistä tehtiin laimennossarja LB-ampisilliinimaljoille. Putket vietiin heti inkuboitumaan +37 °C ravisteluun (220 rpm) tunniksi. BSA-taustaputkien kasvatusta ei jatkettu, niistä maljattiin vain näytteet.

Inkuboinnin jälkeen putkiin lisättiin karbenisilliiniä siten, että lopullinen pitoisuus oli 50 µg/ml, ja jatkettiin kasvatusta +37 °C ravistelussa (220 rpm) 1 h. Lisättiin 1 ml auttajaageja, sekoitettiin ja inkuboitiin ilman ravistelua +37 °C:ssa 15 min. Kasvustot laimennettiin 90 ml:aan esilämmitettyä SB-lientä (+ 50 µg/ml karbenisilliini + 10 µg/ml tetrasykliini). Kasvatettiin 2 h +37 °C ravistelijassa (220 rpm), minkä jälkeen lisättiin kanamysiiniä siten, että pitoisuus oli 70 µg/ml, ja inkuboitiin +35 °C ravistelijassa (220 rpm) yön yli.

Kasvatuksen jälkeen tehtiin faagien saostus. Ennen saostusta otettiin 3 ml:n näytteet kummastakin kasvatuksesta plasmidi-DNA-eristystä ja *NheI-NotI*-pilkontaa varten, jotta voitiin tarkastella kirjaston laatua. Solut sentrifugoitiin (5000 rpm + 4 °C, 15 min) ja supernatantit siirrettiin putkiin joissa oli 25 ml kylmää steriloitua 20 % PEG 6000–2,5 M NaCl-liuosta. Solupelletti liuotettiin 3 ml:aan SB-lientä ja eristettiin DNA Qiagenin Plasmid Maxi-kitillä.

Supernatantissa olevia faageja saostettiin jäällä 30 min, minkä jälkeen faagit sentrifugoitiin saostumaksi (9000 rpm, + 4 °C, 20 min). Supernatantti poistettiin tarkasti ja faagisaostumat suspensoitiin 2 ml:aan steriloitua PBS-liuosta. Seosta sentrifugoitiin (13 000 rpm, +4 °C, 10 min), jotta saatiin solujen jäämät poistettua. Supernatantti otettiin talteen ja faagit saostettiin uudelleen 1 ml:n erissä lisäämällä 250 µl kylmää steriloitua 20 % PEG 6000–2,5 M NaCl-liuosta. Faageja saostettiin jäällä 15 min, minkä jälkeen faagit sentrifugoitiin (13 000 rpm, +4 °C, 10 min). Supernatantti pipetoitiin tarkasti pois ja puolet faagisaostumasta liuotettiin 1 ml:aan steriloitua PBS-liuosta ja puolet steriilisuodatettuun PBS-1 % BSA-liuokseen. Seulonta suoritettiin yhteensä kolme kertaa.

Faagitiitterien määrittäminen

Jokaisella seulontakierroksella tehtiin myös kirjastojen faagitiitterien määrittäminen infektoimalla faagiliuoksista tehdyillä laimennoksilla XL-1 Blue -soluja ($OD_{600} \sim 1$). Faagiliuoksista tehtiin laimennokset 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} , 10^{-7} ja 10^{-8} . Laimennoksia 10^{-7} ja 10^{-8} pipetoitiin 5 µl 100 µl:aan XL-1 Blue soluja, sekoitettiin varovasti ja seisoitettiin +37 °C:ssa 15 min. Tämän jälkeen tehtiin maljaukset LB-ampisilliinimaljoille.

3.5 Faagikirjastojen analysointi

Seulottuja faagikirjastoja analysoitiin ELISAn avulla. Testattaviksi valittiin ensimmäisen, toisen ja kolmannen seulontakierroksen faagit. Phl p 1 -faageista tehtiin 1×10^{10} pfu/ml laimennokset PBS-1 % BSA-puskuriin. Kantaliuoksista tehtiin 10^{11} , 2×10^{11} , 4×10^{11} , 8×10^{11} ja 16×10^{11} laimennokset PBS-1 % BSA-liuokseen. Bet v 1 faagiliuoksista tehtiin 1×10^{11} pfu/ml laimennokset PBS-1 % BSA-liuokseen. Kantaliuoksista tehtiin $0,5 \times 10^{11}$, $0,25 \times 10^{11}$, $0,125 \times 10^{11}$, $0,0625 \times 10^{11}$, $0,031 \times 10^{11}$ ja $0,016 \times 10^{11}$ laimennokset PBS-1 % BSA-liuokseen.

Jokainen laimennos kultakin seulontakierrokselta testattiin sekä biotinyloidun allergeenin (Phl p 1 tai Bet v 1), että biotinyloidun BSA:n kanssa. Laimennoksia pipetoitiin 125 µl eppendorf-putkeen ja lisättiin 0,5 µg biotinyloitua allergeeniä tai BSA:ta. Inkuboitiin sekoittajassa huoneenlämpötilassa 1 h, minkä jälkeen laimennoksia siirrettiin 100 µl Kaivogenin SA-kuoppalevyille. Levyä inkuboitiin 30 min ravistelijassa huoneenlämpötilassa. Levy pestiin kolme kertaa PBS-0,05 % Tween-liuoksella, minkä jälkeen lisättiin piparjuuriperoksidaasileimatusta Anti-M13 monoklonaalisesta vasta-

aineesta (GE Healthcare) tehtyä 1:5000 laimennosta PBS-0,5 % BSA-liuoksessa 100 µl/kuoppa. Levyä inkuboitii 30 min ravistelijassa, minkä jälkeen se pestiin kuten edellä. Substraattina käytettiin ABTS:ää, josta tehtiin liuos 0,05 M sitraattihappoliuokseen (pH 4) siten, että jokaista 1 ml:aa kohden 0,05 M sitraattihappoliuosta (pH 4) punnittiin 0,22 mg ABTS:ää. Seokseen lisättiin 36 µl 30 % vetyperoksidia. Substraattiliuosta pipetoitiin 100 µl/kaivo. Väireaktio mitattiin aallonpituudella 405 nm.

Puhdasviljelmien valmistus faagiliuoksista

Tulosten perusteella valittiin jatkoon Phl p 1 -allergeenin osalta toisen ja kolmannen seulontakierroksen näytteet, sekä Bet v 1 -allergeenin osalta ensimmäisen, toisen ja kolmannen seulontakierroksen näytteet. Faagiliuoksista tehtiin 1:1000-laimennokset PBS-liuokseen, joista otettiin 100 µl ja infektoitiin 3 ml XL1-Blue-soluja ($OD_{600} \sim 1$). Seosta sekoitettiin kevyesti ja inkuboitii 30 min + 37 °C ilman ravistelua. Lisättiin 7 ml esilämmitettyä SB-kasvatuslientä (+10 µg/ml tetrasykliini + 20 µg/ml karbenisilliini) ja tehtiin laimennokset 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} ja 10^{-5} LB-ampisilliinimaljoille. Maljoja inkuboitii + 37 °C yön yli. Ajan puutteen vuoksi työ Bet v 1:n osalta lopetettiin tähän.

3.6 Phl p 1 Fab-pIII -fuusioproteiinin tuottokasvatus

Puhdasviljelmiltä poimittiin yksittäisiä pesäkkeitä mikrotiiterilevyille (96 microwell plate, Thermo Scientific) kasvatettavaksi 100 µl:aan SB kasvatuslientä (+ tetrasykliini 10µg/ml + ampisilliini 100 µg/ml + 2 % glukoosi). Levyjä inkuboitii yön yli Multitron incubator microtiterplate shaker -ravistelijassa (+30 °C, 700 rpm, kosteus 80 %).

Kasvustoille tehtiin nuorennos seuraavana päivänä Fab-pIII-fuusioproteiinin induktiota varten. Syvälle mikrotiiterilevyille (Deep well microtiterplate) pipetoitiin 1 ml SB-kasvatuslientä (+ 1 mM IPTG + 0,1 % glukoosi + 10 µg/ml tetrasykliini + 100 µg/ml ampisilliini), sekä 20 µl kasvatuslientä edellisenä päivänä tehdyistä yksittäispesäkkeiden kasvatuksista. Loput yön yli kasvatuksista säilöttiin ”master”-viljelmänä lisäämällä niihin 2 µl 87 % glyserolia ja säilyttämällä ne -20 °C:ssa. Levyjä inkuboitii kuten edellä. Seuraavana aamuna solut sentrifugoitiin mikrotiiterilevysentrifuugilla (4000 rpm, 15 min, +4 °C). Supernatantit siirrettiin puhtaalle mikrotiiterilevyille ja analysoitiin ELISAlla.

Fab-pIII-fuusioproteiinin tuoton analysointi ELISA:lla

Mikroitiiterilevyn (C96 Maxisorp, Nunc-immuno) kaivoihin immobilisoitiin 0,5 µg Phl p 1 -allergeeniä (100 µl/kaivo) inkuboimalla yön yli +4 °C:ssa. Kaivot pestiin kolme kertaa PBS-liuoksella ja estettiin epäspesifinen sitoutuminen 250 µl:lla PBS-0,5 % BSA-liuosta. Levyjä inkuboitiiin 1 h huoneen lämpötilassa. Kaivot pestiin ja lisättiin 100 µl kasvatussupernatanttia per kaivo. Levyjä inkuboitiiin 1 h ravistelussa huoneen lämpötilassa. Kaivot pestiin PBS-liuoksella ja pipetoitiin 100 µl 1:1000-laimennosta Goat anti-mouse IgG (H+L) -vasta-aineesta (BioRad), minkä jälkeen levyä inkuboitiiin 1 h ravistelijassa huoneen lämpötilassa. Kaivot pestiin kuten edellä ja pipetoitiin 100 µl 2 mg/ml p-nitrofenyylifosfaattisubstraattia (Sigma), joka oli tehty dietanoliamiinipuskuriin (Reagena). Värireaktio mitattiin aallonpituudella 405 nm.

Tulosten perusteella valittiin jatkotestejä varten toiselta seulontakierrokselta 12 kloonia ja kolmannelta seulontakierrokselta 12 kloonia. Klooneista testattiin, sitoutuvatko ne spesifisesti vain biotinyloituun allergeeniin vai sitoutuvatko ne yleisesti sekä biotinyloituun allergeeniin että biotinyloituun BSA:han. Streptavidiinipinnoitetuille kuoppalevyille pipetoitiin 0,5 µg/100 µl biotinyloitua allergeeniä/BSA:ta ja inkuboitiiin tunti ravistelijassa huoneenlämmössä. Kaivot pestiin kolme kertaa PBS-liuoksella, minkä jälkeen lisättiin 100 µl valittujen kloonien kasvatussupernatanttia. Levyä inkuboitiiin 1 h ravistelijassa huoneenlämpötilassa, minkä jälkeen levy pestiin jälleen kolme kertaa PBS:llä. Detektiovasta-aineesta (Goat Anti-Mouse H+L-AP-conjugate) tehtiin 1:1000-laimennos PBS-0,5 % BSA-liuokseen. Liuosta pipetoitiin 100 µl/kaivo ja inkuboitiiin kuten aiemmin. Levy pestiin ja lisättiin 100 µl 2 mg/ml p-nitrofenyylifosfaatti substraattia (Sigma) liuotettuna dietyyliamiinipuskuriin (Reagena). Värireaktio mitattiin aallonpituudella 405 nm.

3.7 Sitoutumisominaisuuksiltaan lupaavien kloonien analysointi

NheI-NotI-pilkonta

Edellisen osion ELISA-tuloksien perusteella valittiin ne Phl p 1 -kloonit, jotka sitoutuivat tehokkaasti biotinyloituun allergeeniin. Mikroitiiterilevyviljelmiltä siirrostettiin valitut kloonit 3 ml:aan SB:tä (+ 10 µg/ml tetrasykliini + 100 µg/ml ampisilliini + 2 % glukoosi) ja kasvatettiin yön yli +37 °C ravistelijassa (220 rpm). DNA eristettiin NucleoSpin Plasmid -kitillä. Kloonien Fab-fragmenttia koodaavien geenialueiden nukleotidisekvenssit lähetettiin määrittäväksi VTT:n käyttämään sekvensointipalveluyritykseen GATC Biotechin. Klooneja pilkottiin *NheI*- ja *NotI*-restriktioentsyymeillä, jotta nähtiin sisältävätkö ne Fab-fragmentin.

Western blot

Valittujen kloonien Phl p 1 Fab-pIII tuottokasvatusnäytteille tehtiin myös Western blot-analyysi. Syväkuoppamikroitiiterilevyiltä pipetoitiin näytettä 15 µl eppendorf-putkeen ja lisättiin 5 µl 4×LSB:tä (-βMe), jolloin näytteelle saatiin ei-pelkistävät olosuhteet. Näytteitä inkuboitiin 3 min +90 °C:ssa. Kontrollina käytettiin LMW-standardia sekä puhdistettua hiiren rekombinantti-Fab-fragmenttia (TES 220 Fab, 2,51 mg/ml). Näytteet ladattiin 15 % SDS-PAGE-geelille. Puskurina käytettiin 1×RB-puskuria (+ 0,5 % SDS). Geeliä ajettiin 1 h (10 mA), jonka jälkeen näytteet siirrettiin nitroselluloosapaperille käyttäen Trans-Blot Turbo transfer -pakkausta (Mini format, 0,2 µm nitrocellulose single application, BioRad) Trans-Blot Turbo transfer -laitteella (BioRad). Membraani siirrettiin 3 min ajaksi 3 % TCA-0,3 % ponceau S -väriliuokseen, jolloin saatiin molekyylipainostandardi näkyviin. Epäspesifinen sitoutuminen membraaniin estettiin lisäämällä TBS-T-liuosta ja inkuboimalla 40 min +37 °C:ssa. Detektiovasta-aineesta (Anti-Mouse IgG - Fab specific - Alkaline Phosphatase, Sigma Aldrich) tehtiin 1:1000 laimennos TBS-T-liuokseen. Membrania inkuboitiin detektiovasta-ainelaimennoksessa 1 h keinuttajassa huoneenlämmössä. Membrania pestiin TBS-T-liuoksella 3×15 min, minkä jälkeen membraani upotettiin detektioliuokseen, jossa oli 10 ml alkaalista fosfataasipuskuria. Substraattina käytettiin 66 µl Nitro Blue Tetrazoliumia (NBT, Promega) ja 33 µl 5-bromi-4-kloro-3-indolyli-fosfaattia (BCIP, Promega). Reaktio pysäytettiin hanavedellä.

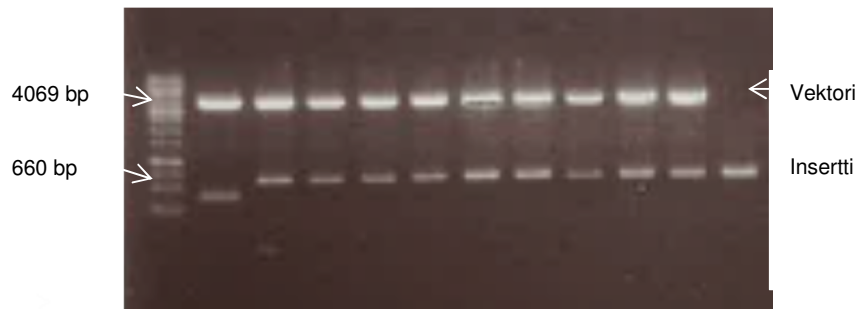
Myös induktio tarkastettiin siirrostamalla valitut kloonit mikrotiiterilevyviljelmiltä 3 ml:aan SB-lientä (+ 10 µg/ml tetrasykliini + 100 µg/ml ampisilliini + 2 % glukoosi) ja kasvattamalla yön yli +37 °C ravistelijassa (220 rpm). Kasvatuksille tehtiin nuorennos induktiota varten pipetoimalla 60 µl yön yli kasvatusta 3 ml:aan SB-lientä (+ 10 µg/ml tetrasykliini + 100 µg/ml ampisilliini) ja kasvatettiin +37 °C ravistelijassa noin 6 h. Putkiin lisättiin induktiota varten IPTG-liuosta siten, että pitoisuus oli 1 mM ja kasvatettiin yön yli +30 °C ravistelijassa (220 rpm).

Kasvatusliemiä sentrifugoitiin (14 000 rpm 2 min) ja supernatantti pipetoitiin eppendorf-putkeen. Supernatanttinäytteistä tehtiin ELISA osion 3.6 mukaan, sekä Western blot. Pelletti suspensoitiin 500 µl:aan PBS-liuosta, jonka jälkeen solut lysattiin jäädyttämällä ne -70 °C:ssa 5 min ja sulattamalla + 37 °C:ssa 3 min. Tämä tehtiin kolme kertaa, minkä jälkeen solujäänteet sentrifugoitiin (14 000 rpm, 5 min). Supernatantti, joka sisältää periplasmiseen tilaan siirtyneet vasta-ainefraktiot, siirrettiin eppendorf-putkeen mahdollisia jatkotestejä varten.

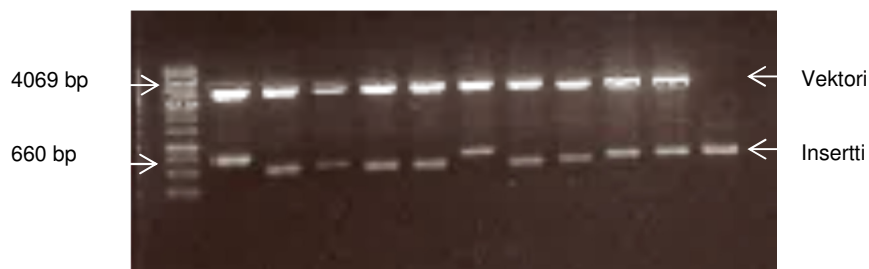
4 Tulokset

4.1 Massaligaatioiden testaus

Kuvien 7 ja 8 geelikuviissa kevyen ketjun massaligaation maljauksista oli tutkittu kymmenen plasmidi-DNA-eristystä pilkkomalla ne *NheI*- ja *AscI*-restriktioentsyymeillä. Kontrollina oli samoilla restriktioentsyymeillä pilkottu Phagemid 9.2 DNA. Vektori on kooltaan 4069 bp ja insertti 660 bp. Standardina käytettiin GeneRuler 1 kb DNA ladder -standardia. Kuvassa 7 on esitetty pilkotut Phl p 1 -näytteet ja kuvassa 8 pilkotut Bet v 1 -näytteet. Phl p 1 -allergeenin osalta 90 % vektoreista sisältää oikean insertin ja Bet v 1 -allergeenin osalta 80 %. Kuvien perusteella voidaan sanoa, että kloonaukset olivat onnistuneet hyvin molempien kohdalla.



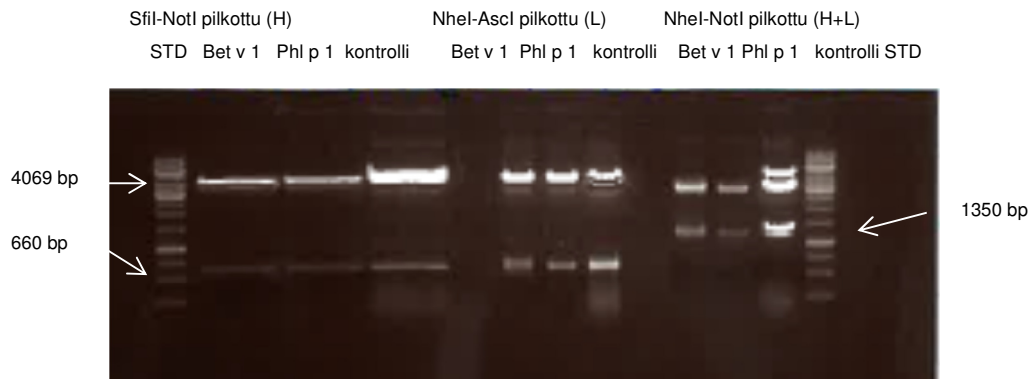
Kuva 7. Kevyen ketjun Phl p 1 -insertin *NheI*-*AscI*-pilkonta Phagemid 9.2 -vektorista



Kuva 8. Kevyen ketjun Bet v 1 -insertin *NheI*-*AscI*-pilkonta Phagemid 9.2 -vektorista

Kuvassa 9 on esitetty pilkonnat Phl p 1 - ja Bet v 1 -allergeenien cDNA:sta, jotka sisältävät raskaat ja kevyet ketjut, sekä faagikirjastojen pilkonnat. Ensimmäisenä kuvassa on Bet v 1 ja Phl p 1 cDNA-kirjastojen *SfiI*-*NotI* ja *NheI*-*AscI* pilkonnat. *NheI*-*AscI* pilkottu kevyt ketju (L) on kooltaan noin 670 bp ja *SfiI*-*NotI* pilkottu raskas ketju (H) on kooltaan noin 680 bp. Viimeisenä ovat Fab-näyttökirjastot, jotka on pilkottu *NheI*-

NotI:lla. Tässä fragmentti sisältää sekä kevyen- että raskaan ketjun (H+L), jolloin sen koko on noin 1350 bp. Kontrollina on phagemid 9.2 -vektori. Kuvasta huomataan, että kaikissa näytteissä insertit ovat oikean kokoisia, joten voidaan sanoa, että ligaatiot olivat onnistuneet. Eroa *Phl p 1*:n ja *Bet v 1*:n välillä ei juuri ole.



Kuva 9. *Phl p 1* - ja *Bet v 1* -kirjastojen testauspilkkontoja

Transformaatiotehokkuus

Transformaatiotehokkuus on laskettu transformatoidun DNA:n ja kompetenttien XL1-Blue-solujen määrän sekä maljausten pesäkelukumäärän avulla. Seuraavassa kuvassa on esitetty esimerkilasku *Phl p 1*:n kevyen ketjun massaligaation transformaatiotehokkuudesta.

1,5 µg DNA/80 µl XL-1 Blue soluja + 2 ml SOC = 2,08 ml

1 ml:aa kohden DNA:ta on 0,72 µg/ml = 721,1 ng/ml = 721,1 pg/µl

10⁻² laimennoksessa (1 µl DNA/100µl SOC) on 721,1 pg DNA = 279 pesäkettä

721,1 pg = 2,79×10²

721,1 ng = 2,79×10⁵

721,1 µg = 2,79 × 10⁸ pesäkettä

Yhtä mikrogrammaa kohden on 3,9×10⁵ pesäkettä

Taulukossa 9 on esitetty transformaatiotehokkuudet kevyen ja raskaan ketjun massaligaatioista. Tulosten perusteella voidaan sanoa, että transformatio on ollut tehokasta.

Taulukko 9. Kevyen ketjun transformaatiotulokset

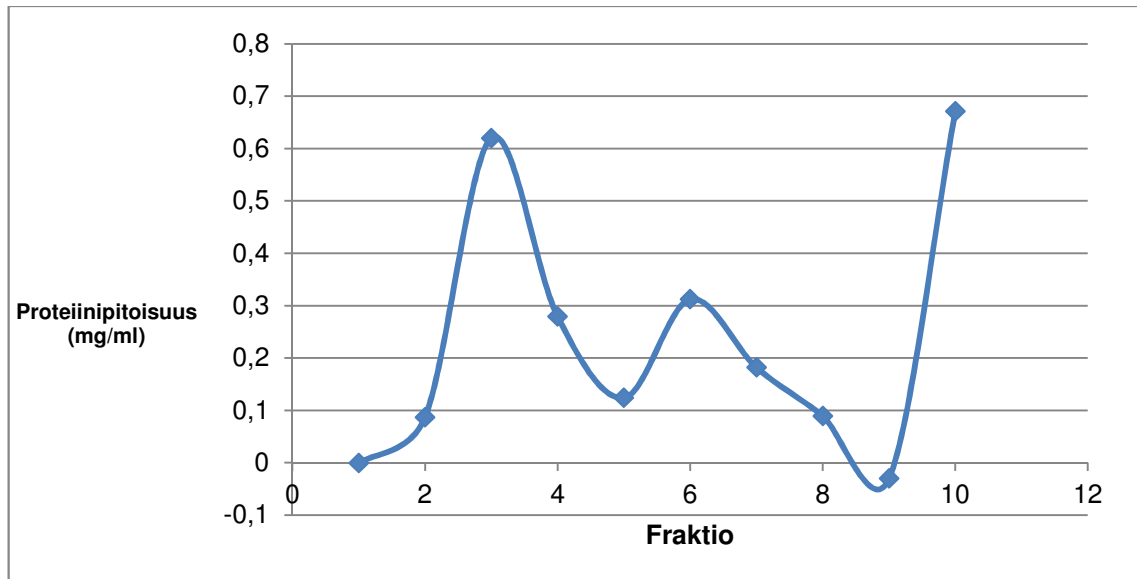
Phl p 1		Bet v 1	
Transformaatiotehokkuus		Transformaatiotehokkuus	
Kevyen ketjun ligaatio	Raskaan ketjun ligaatio	Kevyen ketjun ligaatio	Raskaan ketjun ligaatio
$3,86 \times 10^5$	$8,7 \times 10^4$	$1,0 \times 10^6$	$1,4 \times 10^5$

4.2 Allergeenien biotinylointi

Taulukossa 10 on esitetty puhdistettujen allergeenifraktioiden proteiinipitoisuudet, sekä kuvassa 10 niiden perusteella piirretty kuvaaja. Kuvaajan perusteella yhdistettiin eniten proteiinia sisältävät fraktiot 2,3 ja 4.

Taulukko 10. Allergeenifraktioiden proteiinipitoisuudet

Fraktio	Proteiinipitoisuus (mg/ml)
1	-0,001
2	0,087
3	0,62
4	0,279
5	0,124
6	0,312
7	0,182
8	0,089
9	-0,03
10	0,671



Kuva 10. Puhdistetun allergeenin fraktioiden proteiinipitoisuudet

Allergeenin absorbanssiksi saatiin 0,163 aallonpituudella 280 nm ja laskettiin konsentraatio Lambert-Beerin lain mukaan seuraavalla kaavalla.

$A = c \cdot \varepsilon \cdot l$, jossa

A = absorbanssi

c = konsentraatio

ε = molaarinen absorptiokerroin

$$c = \frac{A}{\varepsilon \cdot l} = \frac{0,163}{0,1789 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} \cdot 1 \text{ cm}} = 0,9111 \text{ mg/ml}$$

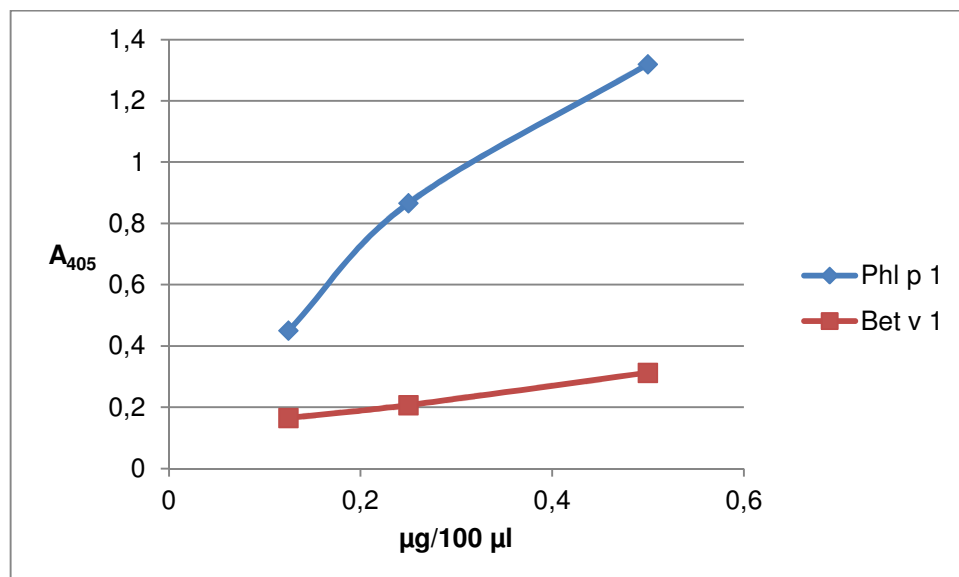
Biotinyloitujen allergeenien testaus

Biotinyloitujen allergeenien toimivuutta testattiin ELISA-testillä. Taulukossa 11 on esitetty absorbanssiarvot substraatin lisäyksen jälkeen 6 min inkubaatiolla. Mitattujen arvojen perusteella piirrettiin kuvaajat. Molemmista allergeeneistä tuli hyvä vaste, koska piirretty suora kasvoi lineaarisesti. Biotinylointi oli siis onnistunut ja allergeenejä voitiin käyttää jatkomäärityksiin.

Taulukko 11. A_{405} 6 min inkubaatiolla

Phl p 1		Betv1	
Pitoisuus ($\mu\text{g}/100\mu\text{l}$)	A_{405}	Pitoisuus ($\mu\text{g}/100\mu\text{l}$)	A_{405}
0,5	1,32	0,5	0,313
0,25	0,866	0,25	0,207
0,125	0,45	0,125	0,165

Kuvassa 11 on esitetty aallonpituudella 405 nm mitatut absorbanssiarvot 6 minuutin inkubaatiolla Phl p 1 - ja Bet v 1 -allergeenien osalta. Absorbanssiarvot kasvoivat lineaarisesti pitoisuuden kasvaessa.



Kuva 11. Biotinyloitujen allergeenien testaus

4.3 Faagikirjastojen seulonnat ja faagitiitterien määrittäminen

Seulontoja tehtiin yhteensä kolme kierrosta. Taulukossa 12 on esitetty LB-ampisilliini-maljoilla kasvaneiden pesäkkeiden lukumäärät eri laimennoksissa ensimmäisellä seulontakerralla. Taulukossa on esitetty ensin itse näyte (+) ja vieressä sitä vastaava BSA-taustasidontakontrolli (-).

Taulukko 12. Eri seulontakierrosten maljausten pesäkkeiden lukumäärät

Ensimmäinen seulontakierros				
Laimennos	Phl p 1 + Pesäkemäärä	Phl p 1 – Pesäkemäärä	Bet v 1 + Pesäkemäärä	Bet v 1 – Pesäkemäärä
10 ⁰	~152 000	~8000	~10 000	Maljat olivat kasvaneet lähes täyteen
10 ⁻¹	~15 200	~800	972	
10 ⁻²	1520	79	109	323
Toinen seulontakierros				
Laimennos	Phl p 1 + Pesäkemäärä	Phl p 1 – Pesäkemäärä	Bet v 1 + Pesäkemäärä	Bet v 1 – Pesäkemäärä
10 ⁰	~66 200	~2130	~4430	~2660
10 ⁻¹	~6620	213	443	266
10 ⁻²	662	2	18	21
Kolmas seulontakierros				
Laimennos	Phl p 1 + Pesäkemäärä	Phl p 1 – Pesäkemäärä	Bet v 1 + Pesäkemäärä	Bet v 1 – Pesäkemäärä
10 ⁰	~3190	~2150	~6470	~3660
10 ⁻¹	319	215	647	366
10 ⁻²	7	4	65	47
10 ⁻³	1	2	9	1

Ensimmäisen seulontakierroksen jälkeen eroa oli havaittavissa Phl p 1:n seulonnassa, sillä 10⁻²-maljauksessa Phl p 1:een sitoutuneiden vasta-ainefaagien määrä on noin 19 kertaa korkeampi verrattuna taustaan. Bet v 1 -seulonnan kohdalla taustasitoutuminen oli hieman korkeampi.

Toisella seulontakierroksella maljoja tarkasteltaessa Phl p 1:n osalta huomattiin nyt selvästi, että allergeeniä tunnistavat vasta-ainefaagit olivat alkaneet rikastua, sillä pesäkkeitä oli näytemaljalla huomattavasti enemmän kuin taustamaljalla. Bet v 1:n osalta vasta-ainefaagin rikastuminen ei ollut näin selkeää.

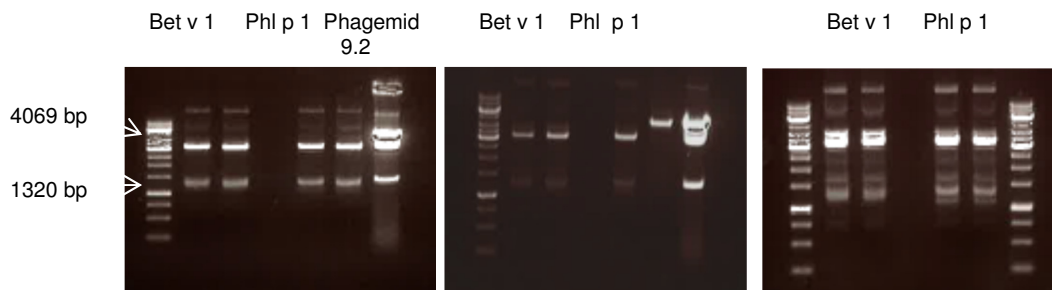
Kolmannella seulontakierroksella havaittiin, että merkittävää rikastumista ei enää tapahtunut, joten seulonnat voitiin lopettaa. Toinen syy seulontojen lopettamiselle kolmannen kierroksen jälkeen oli se, että tavoitteena oli eristää klooneja, joilla olisi erilaisia sitomisominaisuuksia.

Jokaisella seulontakierroksella määritettiin myös faagitiitterit. Tämä suoritettiin tekemällä sopivat laimennokset faagiliuoksista ja infektoimalla niillä XL-1 Blue-soluja. Näytteet maljattiin L-amp-maljoille. Taulukossa 13 on esitetty laimennokset ja pesäkkeiden lukumäärät. Pesäkkeiden lukumäärän avulla laskettiin, kuinka monta plakin muodostavaa yksikköä (plaque-forming unit) on ml:ssa. Tämä laskettiin kertomalla pesäkkeiden lukumäärä laimennuskertoimella ja faaginäytteen määrällä ml:ssa. Laskuissa käytettiin maljoja, joista pesäkkeiden lukumäärän pystyi laskemaan tarkasti. Tiitterit eri seulontakierroksilta eristetyistä faaginäytteistä määritetään, jotta nähdään, että infektiot ovat toimineet eri kierroksilla samankaltaisella tavalla ja että ELISAan saadaan lähes sama määrä faageja per kierros.

Taulukko 13 Pesäkkeiden lukumäärät faagitiitterien määrittämistä varten tehdyillä maljauksilla

	Lähtötilanne		Ensimmäinen seulontakierros		Toinen seulontakierros		Kolmas seulontakierros	
	Bet v 1	Phl p 1	Bet v 1	Phl p 1	Bet v 1	Phl p 1	Bet v 1	Phl p 1
10^{-6}	~2100	~746	-	-	-	-		
10^{-7}	-	-	~4600	~6100	~889	~1500	~884	~647
10^{-8}	1	1	46	61	67	316	83	46
10^{-9}	0	0	-	-	4	29	8	2
Tiitteri (pfu/ml)	$4,2 \times 10^{11}$	$1,5 \times 10^{11}$	$9,2 \times 10^{11}$	$1,1 \times 10^{12}$	$5,8 \times 10^{12}$	$1,3 \times 10^{12}$	$1,7 \times 10^{12}$	$9,2 \times 10^{11}$

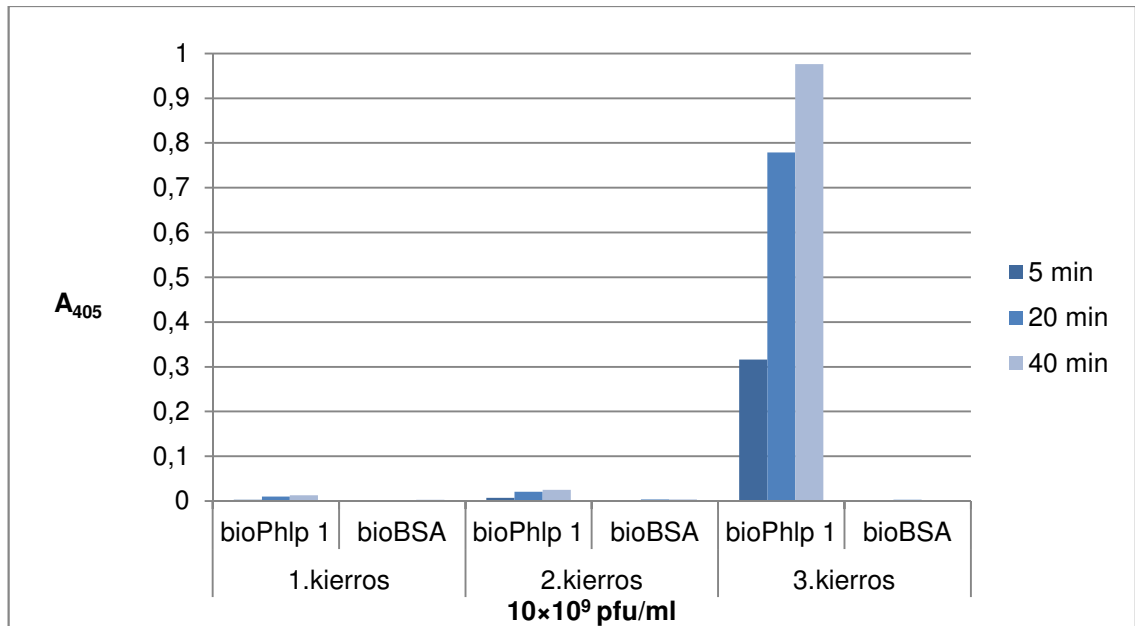
Kuvassa 12 on esitetty ennen faagien saostusta otettujen näytteiden DNA-eristyksen *NheI-NotI*-pilkottujen fragmenttien geelikuvat ensimmäisen, toisen ja kolmannen seulontakierroksen jälkeen. Kaikista pilkonnoista tehtiin rinnakkaisnäytteet. Toisen seulontakierroksen toinen Phl p 1:n rinnakkaisnäyte ei ollut pilkkoutunut. Kuvista havaitaan, että kaikki näytteet sisältävät Fab-fragmentin 1320 bp:n kokoisen geenialueen. Kolmannella kierroksella oli jo havaittavissa myös jonkin verran Fab-fragmentin geenialueen epästabiilisuutta. Tämä aiheutuu siitä, että seulonnat ovat saavuttaneet vaiheen, jossa rikastumista antigeeniin nähden ei enää tapahdu. Tämä on merkki siitä, että seulontoja ei enää kannata jatkaa.



Kuva 12. Phl p 1 ja Bet v 1 *NheI-NotI* -pilkontanäytteet ennen faagien saostusta. ensimmäinen, toinen ja kolmas seulontakierros

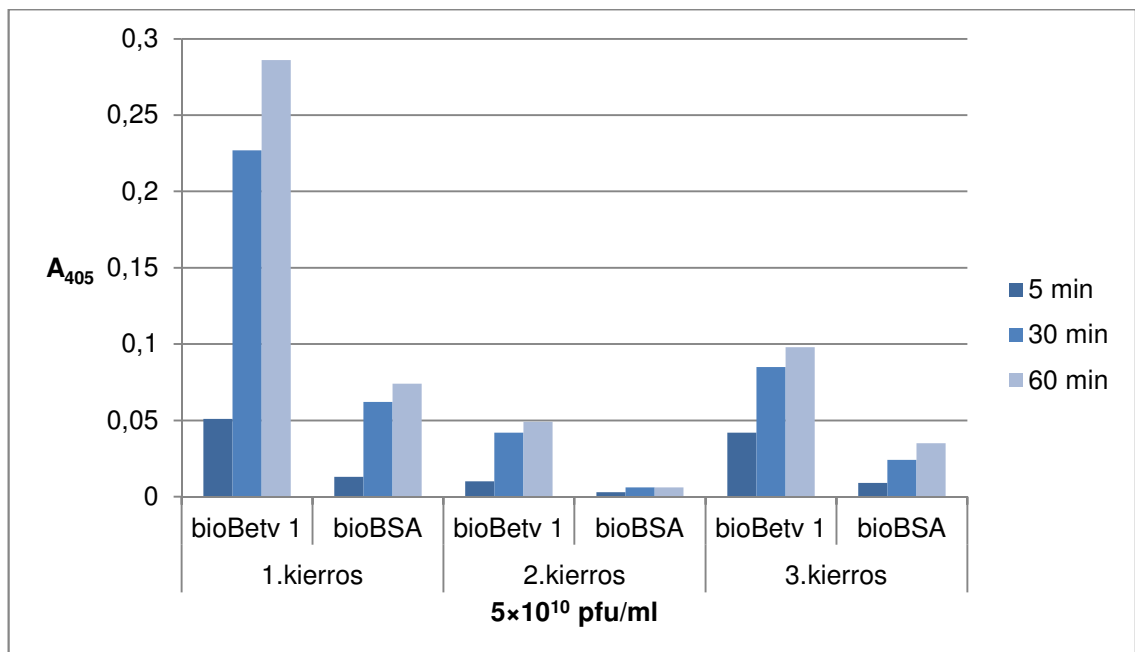
4.4 Faagikirjastojen analysointi eri seulontakierroksilla

Faagikirjastoja analysoitiin ELISA-testillä. Mitatut A_{405} -arvot on esitetty liitteessä 2 sekä Phl p 1 - että Bet v 1 -allergeenin osalta. Kuvassa 13 on esitetty absorbanssiarvot Phl p 1 -allergeenin 1:10 laimennokselle eri inkubointiajoilla. Tulosten perusteella voidaan sanoa, että eniten allergeenin tunnistavia klooneja on kolmannen seulontakierroksen näytteessä. Muilla kierroksilla allergeenia tunnistavien kloonien rikastumista ei ole vielä tapahtunut.



Kuva 13. Phl p 1 ELISA 1:10 laimennos

Kuvassa 14 on esitetty absorbanssiarvot Bet v 1 -allergeenin 1:2 laimennokselle. Bet v 1:n osalta tulokset eivät ole yhtä selviä kuin Phl p 1:llä, sillä allergeenin tunnistavia positiivisia klooneja näyttäisi olevan joka kierroksella. Eniten positiivisia klooneja on kuitenkin ensimmäisen seulontakierroksen näytteessä. Tämä tulos ei ole yhteneväinen maljaustulosten kanssa, joiden perusteella taustasitoutuminen oli Bet v 1:n ensimmäisellä seulontakierroksella korkeampi verrattuna allergeenin sitoutumiseen (Taulukko 12).

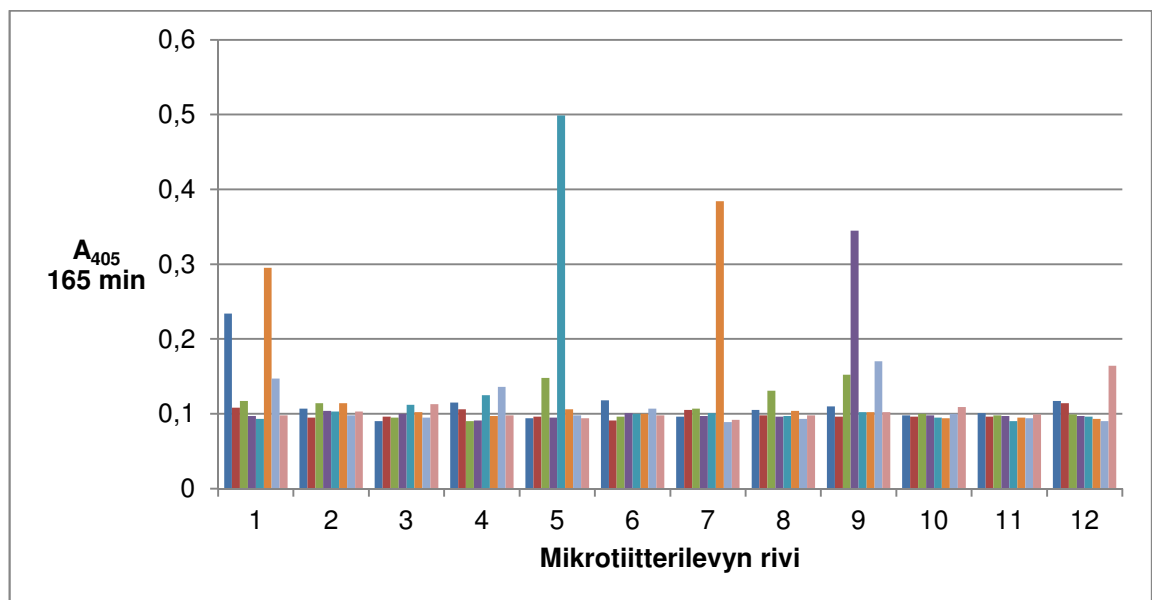


Kuva 14. Bet v 1 ELISA 1:2 laimennos

4.5 Yksittäisten kloonien Fab-pIII fuusioproteiinin tuoton analysointi ELISAlla

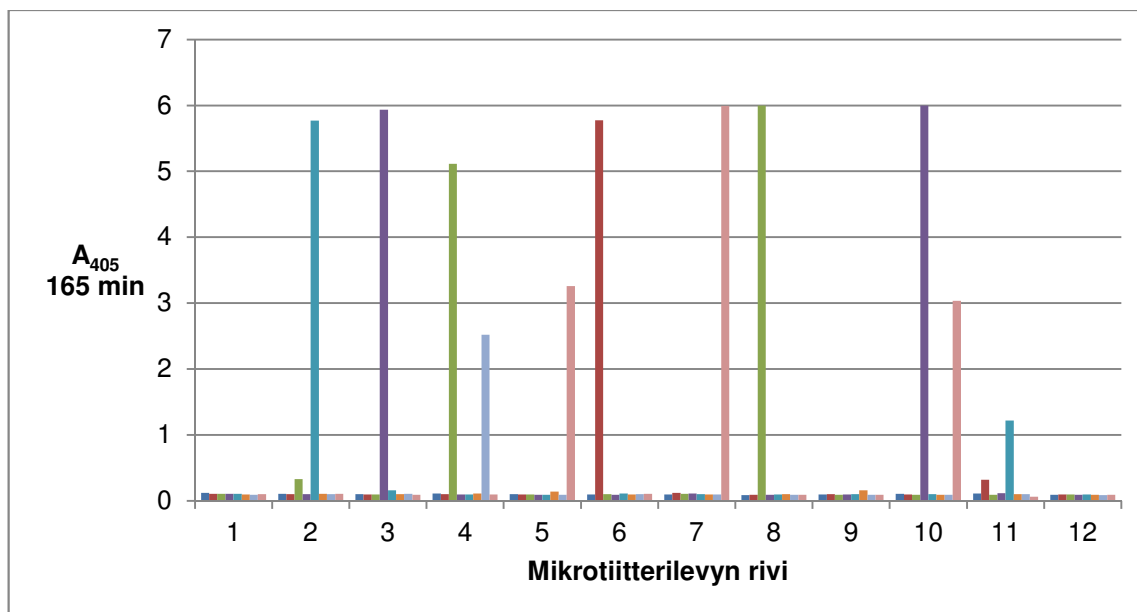
Faagikirjastojen analysoinnin perusteella jatkoon valittiin PhI p 1:n osalta toinen ja kolmas seulontakierros, sillä positiivisia kloonija näytti olevan eniten näillä seulontakierroksilla. Kloonille tehtiin Fab-pIII fuusioproteiinin tuotto ja kasvatusliemen supernatanttia analysoitiin ELISA-menetelmällä.

Kuvassa 15 on esitetty ELISAn tulokset PhI p 1:n toisen seulontakierroksen osalta 165 min inkubaatiolla. Substraattireaktio oli hitaampi verrattuna aiempaan ELISA-testiin allergeenien biotinyloinnin kohdalla. PhI p 1 ELISAn primääritulokset on esitetty liitteessä 3. Kuvasta havaitaan selvästi muutama kloni, joka sitoutuu selvästi allergeeniin.



Kuva 15. Fab-pIII-tuottokasvatuksen analysointi ELISAlla, toinen seulontakierros

Kuvassa 16 on esitetty tulokset PhI p 1:n kolmannen seulontakierroksen osalta. Tällä kierroksella vahvasti sitoutuvia kloonija oli enemmän ja värireaktio oli voimakkaampi. Tulosten perusteella valittiin vahvinten sitoutuvat kloonit jatkotestauksia varten. Molemmilta seulontakierroksilta valittiin 12 kloonija.



Kuva 16. Fab-pIII-tuotokasvatuksen analysointi ELISA:lla, kolmas seulontakerros

Sitoutumisominaisuuksiltaan lupaavien Phl p 1 -kloonien jatkoanalysointi

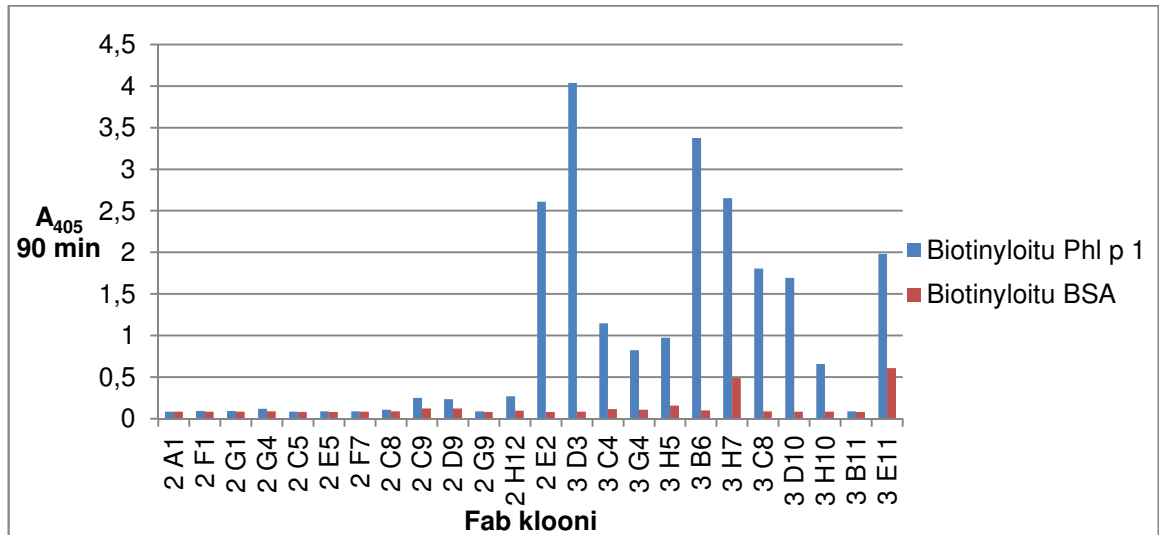
Jatkotestejä varten valittiin taulukossa 14 esitetyt kloonit. Valitut kloonit on myös merkitty liitteen 3 taulukkoon. Jatkotesteissä tutkittiin vasta-aineen sitoutumisen spesifisyyttä biotinyloidun Phl p 1 -allergeenin ja biotinyloidun BSA:n avulla.

Taulukko 14. Jatkotestejä varten valitut Phl p 1 -kloonit

	bio Phl p 1	bio BSA	bio Phl p 1	bio BSA	bio Phl p 1	bio BSA
A	2 A1	2 A1	2 C9	2 C9	3 H5	3 H5
B	2 F1	2 F1	2 D9	2 D9	3 B6	3 B6
C	2 G1	2 G1	2 G9	2 G9	3 H7	3 H7
D	2 G4	2 G4	2 H12	2 H12	3 C8	3 C8
E	2 C5	2 C5	3 E2	3 E2	3 D10	3 D10
F	2 E5	2 E5	3 D3	3 D3	3 H10	3 H10
G	2 F7	2 F7	3 C4	3 C4	3 B11	3 B11
H	2 C8	2 C8	3 G4	3 G4	3 E11	3 E11

Valittujen kloonien absorbanssiarvot aallonpituudella 405 nm on esitetty liitteessä 4. Kuvasta 17 havaitaan, että sitoutuminen biotinyloituun allergeeniin on suurempaa kuin sitoutuminen biotinyloituun BSA:han. Tämä havaitaan selkeästi varsinkin kolmannelle

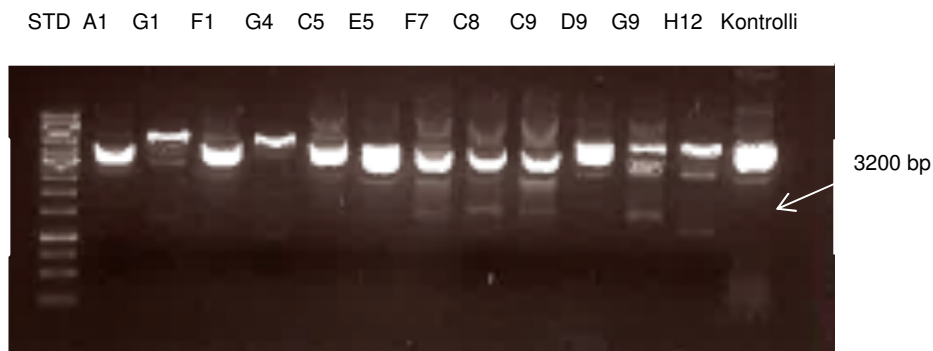
kierrokselle valittujen kloonien kohdalla. Sitoutuminen on siis spesifistä, ja syntynyt vasta-aine tunnistaa kohdeallergeenin. Voidaan siis sanoa, että Phl p 1:n osalta vasta-ainegeenikirjaston kloonaminen ja seulonta ovat onnistuneet hyvin.



Kuva 17 Valittujen kloonien Fab-pIII fuusioiden tarkistus ELISA

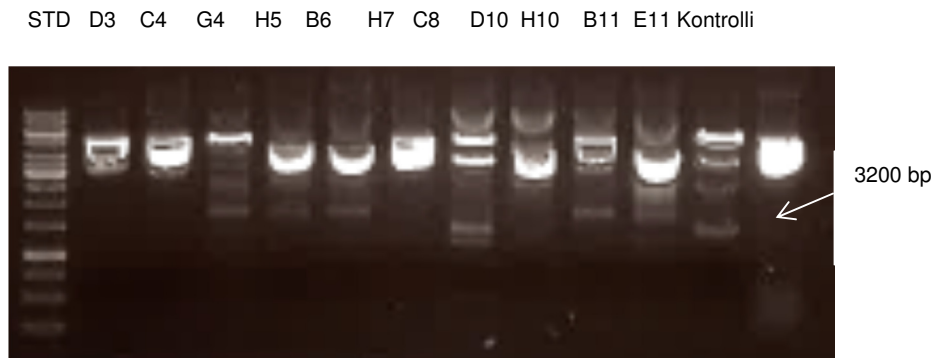
Fab-fragmentin DNA:n analysointi

Tulosten perusteella valittiin vahvimmin sitoutuvat kloonit *NheI-NotI*-pilkontaa varten. Kuvassa 18 on esitetty geelikuva toisen seulontakierroksen osalta. Pilkonnassa irronneen insertin koko on noin 3200 bp. Jatkoon valittiin sellaiset kloonit, joissa on haluttua inserttiä. Toiselta seulontakierrokselta valittiin kloonit F7, C8, C9 ja G9.



Kuva 18. Valittujen kloonien *NheI-NotI*-pilkonta, toinen seulontakierros

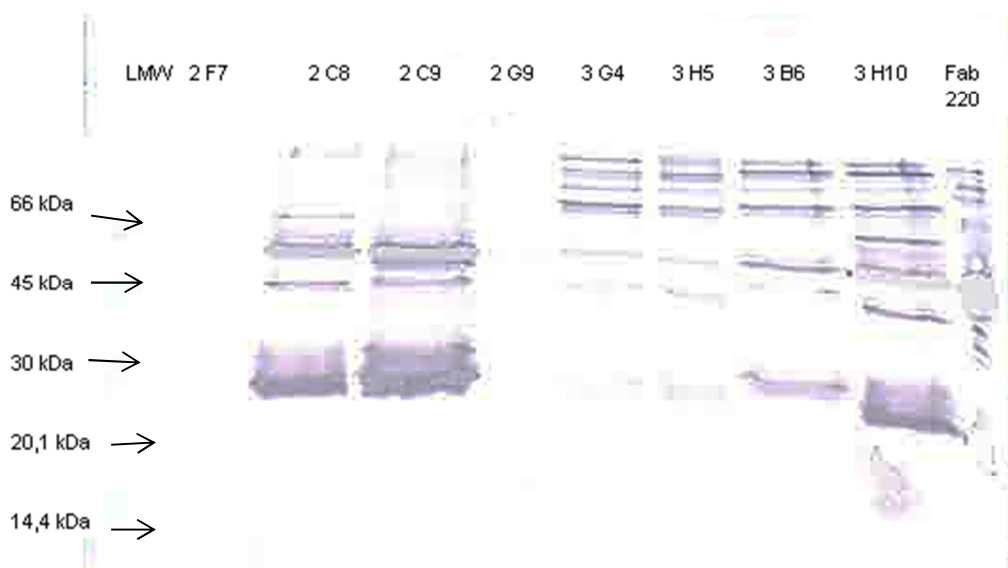
Kuvassa 19 on esitetty geelikuva kolmannen seulontakierroksen näytteiden pilkonnasta. Jatkoon valittiin kloonit G4, H5, B6 ja H10. B11-kloonia ei valittu, koska ELISA-testissä havaittiin, ettei se sitoudu allergeeniin yhtä hyvin kuin muut kloonit, vaikka se sisältää oikean kokoisen insertin.



Kuva 19. Valittujen kloonien *NheI-NotI*-pilkonta kolmas seulontakierros

Phl p 1 -Fab-pIII-fuusioproteiinin tuoton analysointi

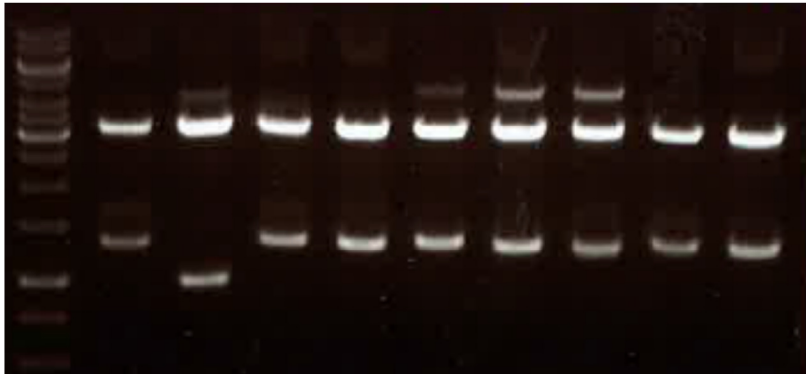
Kuvassa 20 on valittujen kloonien SDS-PAGE:n Western blot. Kontrollina käytettiin hiiressä tuotettua puhdistettua Fab 220 -fragmenttia. Fab-fragmentin koko ei-pelkistävässä olosuhteissa on noin 46 kDa ja kevyen ja raskaan ketjun fragmentit ovat noin 23 kDa:n kokoisia. Kaikki muut kloonit tuottavat haluttua vasta-ainetta paitsi toisen seulontakierroksen kloni F7. Tuottotasoa ei pystytä määrittämään, koska induktio ei välttämättä ole tapahtunut kaikissa klooneissa samalla teholla. Määritys on lähinnä kvalitatiivinen ja sen avulla pystytään määrittämään jatkotestejä varten valittavat kloonit.



Kuva 20. Phl p 1-Fab-pIII -fuusioproteiinin tuoton analysointi Western blotilla

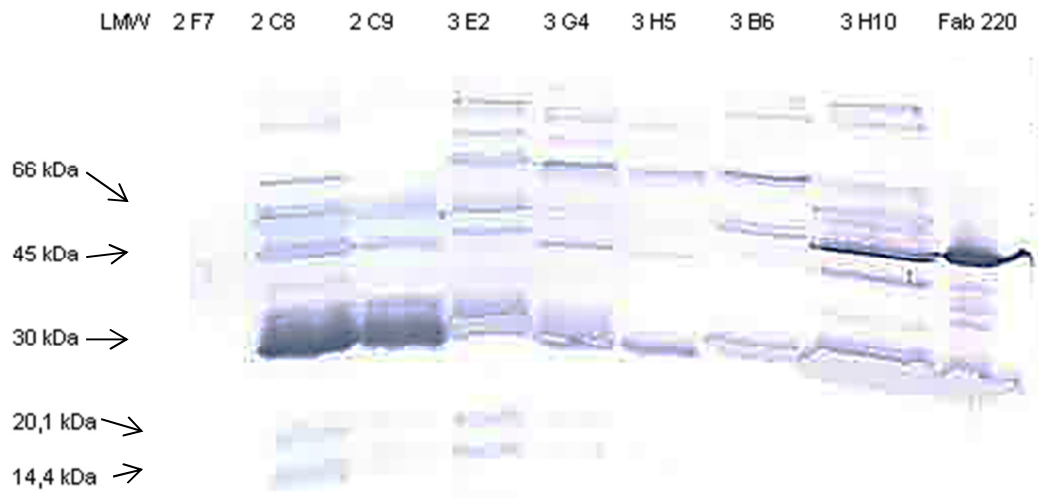
Valitut kloonit pilkottiin *NheI*- ja *NotI*-restriktioentsyymeillä. Tällä varmistettiin, että valituissa klooneissa on oikean kokoinen Fab-fragmentin geenialue (~ 1320 bp). Kuvassa 21 on esitetty kuva agarosigeelistä. Kuvasta havaitaan, että kloni F7 toiselta seulontakierrokselta sisältää väärän kokoisin insertin ja tämän takia se ei tuota haluttua Fab-fragmenttia.

STD 2 G9 2 F7 2 C8 2 C9 3 E2 3 G4 3 H5 3 B6 3 H10



Kuva 21. Valittujen kloonien *NheI-NotI* pilkonta

Tulokset varmistettiin vielä tuottamalla yksittäiset kloonit koeputki-induktiolla. Kuvassa 22 on esitetty kuva SDS-PAGE:n Western blotista. Tulosten perusteella varmistettiin, että kaikki muut kloonit tuottavat vasta-ainetta paitsi toisen seulontakierroksen klooni F7.



Kuva 22. Valittujen kloonien koeputki-induktion Western blot

5 Yhteenveto

Tämän opinnäytetyön tavoitteena oli kloonata vasta-ainegeenikirjastoja timotein ja koivun allergeeneille ja eristää allergeenejä tunnistavia vasta-aineita jatkomäärityksiä varten. Timotein allergeenin (Phl p 1) osalta vasta-ainegeenikirjaston kloonaminen onnistui hyvin, sillä seulonnoista saatiin viisi kloonaa, jotka sitoutuvat spesifisesti allergeeniin. Koivun allergeenin (Bet v 1) osalta vasta-ainekirjaston kloonaminen onnistui siltä osin, että vektori sisältää oikean kokoisen insertin, sekä faagikirjastojen seulonnoissa löytyi positiivisia klooneja. Ajan puutteen vuoksi Bet v 1:n mahdollisesti sitovia klooneja ei analysoitu pidemmälle. Kirjastoja analysoitiin ELISA-testillä, sekä Western Blot-menetelmällä positiivisten kloonien löytämiseksi.

Kirjastojen kloonaukseen cDNA:sta voi vaikuttaa se, että immunisoidun hiiren pernan mRNA on monipuolista, joten vasta-ainefragmenttien tuottaminen PCR:llä voi olla haastavaa. Kevyen ketjun osalta PCR onnistui hyvin jo ensimmäisellä kerralla, mutta raskaan ketjun fragmentteja jouduttiin monistamaan useasti, sillä saanto oli todella alhainen, eikä oikean kokoinen geenifragmentti aina monistunut.

Toinen ratkaiseva tekijä työn onnistumiselle oli transformaatio. Transformaatioolosuhteiden tulisi olla optimaaliset, jotta plasmidi pääsisi tehokkaasti *E. coli*-solun sisään. Näin saadaan luotua laaja kirjasto. Transformaation tehokkuuteen vaikuttavat muun muassa elektroporaatiosolut, DNA:n laatu sekä elektroporaatiomedia. Kolmas ratkaiseva tekijä on seulontaolosuhteiden optimointi niin, että saadaan eristettyä vasta-ainefaageja, joilla on toivotut sitoumisominaisuudet.

Faaginäyttökirjastoista eristettyjä vasta-aineita voidaan käyttää kaikkiin niihin sovelluksiin, joihin monoklonaalisia vasta-aineita käytetään. Käyttösovelluksiin kuuluvat muun muassa Western blot, immunohistokemialliset menetelmät sekä allergeenien kromatografiset puhdistukset. Vasta-ainegeenit voidaan myös liittää *E.coli* -tuottovektoriin, jolloin niitä voidaan tuottaa liukoisessa muodossa, sekä transformoida tuottosoluihin.

Vasta-aineteknologia osoittautui opinnäytetyössä hyvin toimivaksi vaihtoehdoksi allergeenejä spesifisesti sitovien vasta-aineiden eristämiseksi. Tulevaisuudessa menetelmää tullaan laajemmin hyödyntämään VTT:llä allergeenispesifisten vasta-aineiden tuottamiseksi, sillä niitä on huonosti saatavilla kaupallisesti.

Lähteet

- 1 B. Linhart & R. Valenta. 2012. Vaccines for allergy. *Current Opinion in Immunology*. Issue 24, s. 354 - 360.
- 2 Schenk, Cordewner, America, ym. 2011. Proteomic analysis of the major birch allergen Bet v 1 predicts allergenicity for 15 birch species. *Journal of Proteomics* Vol. 74, s.1290 - 1300.
- 3 M. Hrabina, G. Peltre, R. Van Ree, ym. 2008. Grass pollen allergens. *Clinical and Experimental Allergy Reviews*. 8, s. 7 - 11.
- 4 C. Barbas, D. Burton, J. Scott & G. Silverman. 2001. *Phage Display: A Laboratory Manual*. New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- 5 Antibody Structure and Classes of Immunoglobulins. Verkkodokumentti. Luettu 15.10.2013.
<http://www.piercenet.com/method/antibody-structure-classes>
- 6 A. Bradbury, J. Marks. 2004. Antibodies from phage antibody libraries. *Journal of Immunological Methods* 290 (2004), s. 29 - 49.
- 7 H. Hoogenboom, A. de Bruïne, S. Hufton, ym. 1998. Antibody phage display technology and its applications. *Immunotechnology*. Volume 4. Issue 1. s. 1 - 20.
- 8 N. Inbar & I. Benhar. 2012. Selection of antibodies from synthetic antibody libraries. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 526. s. 87-98.
- 9 I. Suominen, R. Pärssinen, K. Haajanen, ym. 2010. *Geenitekniikka*. Turun ammattikorkeakoulu.
- 10 I. Suominen & P. Ollikka. 2006. *Yhdistelmä-DNA-tekniikan perusteet*. Hakapaino Oy. Helsinki. Opetushallitus.
- 11 H. Qi, H. Lu, H. Qiu, ym. 2012. Phagemid Vectors for Phage Display: Properties, Characteristics and Construction. *Journal of Molecular Biology*. Volume 417. Issue 3. s. 129 - 143
- 12 J. Rakonjac, N. Bennett, J. Spagnuolo, ym. 2011. Filamentous Bacteriophage: Biology, Phage Display and Nanotechnology Applications. *Current Issues in Molecular Biology*. 13. s. 51-76.
- 13 S. Zebedee, C. Barbas, Y. Hom, ym. 1991. Human combinatorial antibody libraries to hepatitis B surface antigen. *Biochemistry*. Vol 89. s. 3175 - 3179.

- 14 Z. Konthur & G. Walter.2002. Automation of phage display for high throughput antibody development. TARGETS. Vol.1, No. 1. s. 30
- 15 R. Kontermann & S. Dübel. 2010 Antibody Engineering. Volume 1. Springer.
- 16 A. Krebber, S. Bornhauser, J. Burmester, ym.1997. Reliable cloning of functional antibody variable domains from hybridomas and spleen cell repertoires employing a reengineered phage display system. Journal of Immunological methods 201. s. 35 - 55.
- 17 User manual NucleoSpin Gel and PCR Clean-up. Verkkodokumentti. Luettu 3.10.2013
http://www.mn-net.com/Portals/8/attachments/Redakteure_Bio/Protocols/DNA%20clean-up/UM_PCRcleanup_Gelex_NSGelPCR.pdf
- 18 Thermo Scientific CloneJET PCR Cloning Kit. Verkkodokumentti. Luettu 2.11.2013.
<http://www.thermoscientificbio.com/uploadedFiles/Resources/k1230-product-information.pdf>
- 19 User manual NucleoSpin Plasmid. Verkkodokumentti. Luettu 22.8.2013.
http://www.mn-net.com/Portals/8/attachments/Redakteure_Bio/Protocols/Plasmid%20DNA%20Purification/UM_pDNA_NS.pdf
- 20 EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotinylation Kit. Verkkodokumentti. Luettu 2.11.2013.
<http://www.piercenet.com/instructions/2161776.pdf>

PCR reaktiossa käytetyt alukkeet

Kevyen ketjun primäärinen PCR:

#4549 sisältää hiiren kappa-ketjun vakioalue cDNA aluke + stop + Ascl katkaisukohta:

'5 ATA TAT TAT AGG CGC GCC TCA TTA ACA CTC ATT CCT GTT GAA GCT CTT
G 3'

Alukeseos:

- #4531 5' GCA ATG GCA GAY ATC CAG CTG ACT CAG CC 3'
- #4532 5' GCA ATG GCA GAY ATT GTT CTC WCC CAG TC 3'
- #4533 5' GCA ATG GCA GAY ATT GTG MTM ACT CAG TC 3'
- #4534 5' GCA ATG GCA GAY ATT GTG YTR ACA CAG TC 3'
- #4535 5' GCA ATG GCA GAY ATT GTR ATG ACM CAG TC 3'
- #4536 5' GCA ATG GCA GAY ATT MAG ATR AMC CAG TC 3'
- #4537 5' GCA ATG GCA GAY ATT CAG ATG AYD CAG TC 3'
- #4538 5' GCA ATG GCA GAY ATY CAG ATG ACA CAG AC 3'
- #4539 5' GCA ATG GCA GAY ATT GTT CTC AWC CAG TC 3'
- #4540 5' GCA ATG GCA GAY ATT GWG CTS ACC CAA TC 3'
- #4541 5' GCA ATG GCA GAY ATT STR ATG ACC CAR TC 3'
- #4542 5' GCA ATG GCA GAY RTT KTG ATG ACC CAR AC 3'
- #4543 5' GCA ATG GCA GAY ATT GTG ATG ACB CAG KC 3'
- #4544 5' GCA ATG GCA GAY ATT GTG ATA ACY CAG GA 3'
- #4545 5' GCA ATG GCA GAY ATT GTG ATG ACC CAG WT 3'
- #4546 5' GCA ATG GCA GAY ATT GTG ATG ACA CAA CC 3'
- #4547 5' GCA ATG GCA GAY ATT TTG CTG ACT CAG TC 3'

Kevyen ketjun sekundäärinen PCR:

#4549 sisältää hiiren kappa-ketjun vakioalueen cDNA-alukkeen + stop + AscI katkaisukohdan:

5' ATA TAT TAT AGG CGC GCC TCA TTA ACA CTC ATT CCT GTT GAA GCT CTT
G 3'

#4552 sisältää hiiren kappa-ketjun 5' VL reamplifikaatioalukkeen + *pelB* koodaavan alueen + NheI- katkaisukohdan

5' ATA TAC TAC TAG CTA GCT GCA CAA CCA GCA ATG GCA GA 3'

Raskaan ketjun primäärinen PCR:

#4640 sisältää hiiren IgG1 -Fd- ketjun vakioalueen cDNA-alukkeen - stop + NotI katkaisukohdan

Alukeseos:

#4552 5' CCG GCC ATG GCC GCC GAK GTR MAG CTT CAG GAG TC 3'

#4553 5' CCG GCC ATG GCC GCC GAG GTB CAG CTB CAG CAG TC 3'

#4554 5' CCG GCC ATG GCC GCC CAG GTG CAG CTG AAG SAS TC 3'

#4555 5' CCG GCC ATG GCC GCC GAG GTC CAR CTG CAA CAR TC 3'

#4556 5' CCG GCC ATG GCC GCC CAG GTY CAG CTB CAG CAR TC 3'

#4557 5' CCG GCC ATG GCC GCC CAG GTY CAR CTG CAG CAG TC 3'

#4558 5' CCG GCC ATG GCC GCC CAG GTC CAC GTG AAG CAG TC 3'

#4559 5' CCG GCC ATG GCC GCC GAG GTG AAS STG GTG GAA TC 3'

#4560 5' CCG GCC ATG GCC GCC GAV GTG AWG YTG GTG GAG TC 3'

#4561 5' CCG GCC ATG GCC GCC GAG GTG CAG SKG GTG GAG TC 3'

#4564 5' CCG GCC ATG GCC GCC GAK GTG CAM CTG GTG GAG TC 3'

#4565 5' CCG GCC ATG GCC GCC GAG GTG AAG CTG ATG GAR TC 3'

#4566 5' CCG GCC ATG GCC GCC GAG GTG CAR CTT GTT GAG TC 3'

#4567 5' CCG GCC ATG GCC GCC GAR GTR AAG CTT CTC GAG TC 3'

#4568 5' CCG GCC ATG GCC GCC GAA GTG AAR STT GAG GAG TC 3'

#4569 5' CCG GCC ATG GCC GCC CAG GTT ACT CTR AAA GWG TST G 3'

#4570 5' CCG GCC ATG GCC GCC CAG GTC CAA CTV CAG CAR CC 3'

#4571 5' CCG GCC ATG GCC GCC GAT GTG AAC TTG GAA GTG TC 3'

#4629 5' CCG GCC ATG GCC GCC GAG GTG AAG GTC ATC GAG TC 3'

Raskaan ketjun sekundääri PCR:

#4640 sisältää hiiren IgG1 Fd-ketjun vakioalueen cDNA alukkeen – stop + NotI katkaisukohdan

5' TAA TAT AGT TTA TGC GGC CGC ACA ATC CCT GGG CAC AAT TTT CTT GTC
C 3'

#4632 sisältää hiiren Fd-ketjun 5' VH-reamplifikaatioalukkeen + *peIB* koodaavan alueen/SfiI katkaisukohdan

5' GGA TTG TTA TTA CTC GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC GCC 3'

Seulottujen faagikirjastojen A₄₀₅ arvot

Phl p 1

5 min

Faagiliuos laimennos	1. kierros		2. kierros		3. kierros	
	bioPhlp 1	bioBSA	bioPhlp 1	bioBSA	bioPhlp 1	bioBSA
1:10	0,061	0,055	0,063	0,056	0,371	0,061
1:20	0,061	0,057	0,061	0,054	0,224	0,058
1:40	0,057	0,056	0,06	0,056	0,14	0,058
1:80	0,057	0,054	0,058	0,056	0,097	0,059
1:160	0,056	0,058	0,055	0,055	0,08	0,063
PBS-1 % BSA	0,058	0,056	0,056	0,055	0,055	0,06

20 min

Faagiliuos laimennos	1. kierros		2. kierros		3. kierros	
	bioPhlp 1	bioBSA	bioPhlp 1	bioBSA	bioPhlp 1	bioBSA
1:10	0,075	0,064	0,08	0,063	0,838	0,068
1:20	0,069	0,065	0,071	0,059	0,47	0,063
1:40	0,07	0,074	0,066	0,06	0,271	0,063
1:80	0,064	0,064	0,066	0,061	0,162	0,064
1:160	0,063	0,065	0,061	0,059	0,116	0,069
PBS-1 % BSA	0,065	0,062	0,059	0,059	0,059	0,065

40 min

Faagiliuos laimennos	1. kierros		2. kierros		3. kierros	
	bioPhlp 1	bioBSA	bioPhlp 1	bioBSA	bioPhlp 1	bioBSA
1:10	0,08	0,066	0,086	0,064	1,036	0,069
1:20	0,072	0,066	0,076	0,06	0,572	0,065
1:40	0,07	0,075	0,069	0,061	0,321	0,065
1:80	0,066	0,06	0,069	0,063	0,187	0,066
1:160	0,065	0,068	0,064	0,06	0,128	0,071
PBS-1 % BSA	0,067	0,063	0,061	0,06	0,06	0,067

Bet v 1

5 min

Faagiliuos laimennos	1. kierros		2. kierros		3. kierros	
	bioBetv 1	bioBSA	bioBetv 1	bioBSA	bioBetv 1	bioBSA
1:2	0,117	0,074	0,07	0,064	0,102	0,079
1:4	0,089	0,064	0,065	0,061	0,083	0,066
1:8	0,073	0,062	0,063	0,06	0,068	0,057
1:16	0,069	0,061	0,06	0,058	0,073	0,065
1:32	0,064	0,057	0,061	0,059	0,063	0,065
1:64	0,065	0,058	0,06	0,063	0,067	0,067
PBS-1 % BSA	0,066	0,061	0,06	0,061	0,06	0,07

30 min

Faagiliuos laimennos	1. kierros		2. kierros		3. kierros	
	bioBetv 1	bioBSA	bioBetv 1	bioBSA	bioBetv 1	bioBSA
1:2	0,305	0,132	0,113	0,079	0,155	0,107
1:4	0,181	0,096	0,095	0,071	0,111	0,08
1:8	0,131	0,084	0,079	0,071	0,087	0,064
1:16	0,105	0,082	0,075	0,068	0,089	0,076
1:32	0,082	0,07	0,073	0,068	0,075	0,073
1:64	0,088	0,07	0,072	0,072	0,08	0,077
PBS-1 % BSA	0,078	0,07	0,071	0,073	0,07	0,083

60 min

Faagiliuos laimennos	1. kierros		2. kierros		3. kierros	
	bioBetv 1	bioBSA	bioBetv 1	bioBSA	bioBetv 1	bioBSA
1:2	0,366	0,147	0,123	0,083	0,17	0,112
1:4	0,206	0,102	0,102	0,073	0,118	0,082
1:8	0,146	0,089	0,082	0,074	0,091	0,064
1:16	0,114	0,086	0,082	0,069	0,093	0,077
1:32	0,086	0,074	0,076	0,07	0,078	0,075
1:64	0,094	0,073	0,075	0,074	0,082	0,076
PBS-1 % BSA	0,08	0,073	0,074	0,077	0,072	0,077

PhI p 1 Fab-pIII-tuottokasvatus A_{405} 2. seulantakierros, A_{405} 165 min

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,234	0,107	0,09	0,115	0,094	0,118	0,096	0,105	0,11	0,098	0,101	0,117
B	0,108	0,095	0,096	0,106	0,096	0,091	0,105	0,098	0,096	0,096	0,096	0,114
C	0,117	0,114	0,095	0,09	0,148	0,096	0,107	0,131	0,152	0,1	0,098	0,099
D	0,097	0,104	0,1	0,091	0,095	0,101	0,097	0,096	0,345	0,098	0,097	0,097
E	0,093	0,103	0,112	0,125	0,499	0,1	0,101	0,097	0,102	0,095	0,09	0,096
F	0,295	0,114	0,102	0,097	0,106	0,1	0,384	0,104	0,102	0,094	0,095	0,093
G	0,147	0,098	0,095	0,136	0,098	0,107	0,089	0,093	0,17	0,1	0,094	0,09
H	0,098	0,103	0,113	0,098	0,094	0,098	0,092	0,098	0,102	0,109	0,099	0,164

3. seulantakierros, A_{405} 165 min

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,119	0,108	0,099	0,11	0,103	0,095	0,098	0,087	0,098	0,104	0,113	0,091
B	0,106	0,099	0,095	0,102	0,094	5,775	0,122	0,09	0,102	0,097	0,321	0,095
C	0,104	0,33	0,098	5,113	0,096	0,101	0,105	6	0,092	0,09	0,092	0,096
D	0,108	0,1	5,934	0,097	0,089	0,091	0,111	0,089	0,094	6	0,116	0,093
E	0,108	5,769	0,157	0,098	0,092	0,111	0,103	0,098	0,103	0,099	1,217	0,096
F	0,096	0,104	0,101	0,109	0,14	0,096	0,094	0,103	0,158	0,091	0,103	0,093
G	0,093	0,103	0,105	2,519	0,091	0,101	0,095	0,092	0,09	0,093	0,099	0,088
H	0,099	0,104	0,091	0,095	3,26	0,105	5,991	0,091	0,093	3,035	0,063	0,091

Valittujen kloonien Fab-pIII-fuusioiden tarkistus ELISAlla

	bio Phl p 1	bio BSA	bio Phl p 1	bio BSA	bio Phl p 1	bio BSA
A	0,086	0,083	0,25	0,124	0,975	0,157
B	0,094	0,085	0,235	0,125	3,375	0,099
C	0,091	0,083	0,088	0,081	2,651	0,487
D	0,12	0,088	0,268	0,098	1,806	0,087
E	0,086	0,082	2,611	0,082	1,694	0,084
F	0,089	0,082	4,036	0,086	0,657	0,084
G	0,087	0,084	1,146	0,117	0,087	0,081
H	0,108	0,089	0,824	0,107	1,983	0,608