

Jenna Roivas

# Transgeenisten kasvien geneettinen ja fenotyyppinen analysointi

Opinnäytetyö raportti

---

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Bioanalyttikko AMK

Bioanalytiikan koulutusohjelma

Opinnäytetyö

13.5.2014

Tekijä(t) Otsikko Sivumäärä Aika	Jenna Roivas Transgeenisten kasvien geneettinen ja fenotyyppinen analysointi 35 sivua 13.5.2014
Tutkinto	Bioanalyttikko (AMK)
Koulutusohjelma	Bioanalytiikan koulutusohjelma
Suuntautumisvaihtoehto	
Ohjaaja(t)	Lehtori Hannele Pihlaja Vastuututkija Kristiina Himanen
<p>Opinnäytetyö on osa Helsingin yliopiston Maatalous-metsätieteellisen tiedekunnan, Maataloustieteiden laitoksen projektia ”The characterization of Flower related Ubiquitin Proteasome System in Arabidopsis” (FUPS). Tutkimuksessa pyritään löytämään ne proteiinit, joita FUPS-kandidaatit hajottavat ja näin selvittää niiden tarpeellisuus kukan täydelliseen kehittymiseen.</p> <p>Opinnäytetyön tavoitteena oli seuloa fenotyyppisesti sekä eri geneettisin analyysein projektissa tuotettuja siirtogeenisiä kasvilinjoja. Genotyyppausta tehtiin kasvilinjojen seulontavaiheessa, jonka tarkoituksena oli selvittää onko siirretyn geenin periytyminen tapahtunut oikein. Seulonta tehtiin toisen ja kolmannen sukupolven kasveille, joilla periytyminen oletettiin tapahtuvan Mendelin periytymissäännön mukaan. Arabidopsissiemenet kerättiin, steriloitiin ja istutettiin kasvatusmaljoille, josta suoritettiin seulonta muutaman viikon kasvatuksen jälkeen. Kolmannen sukupolven kasvit joiden oletettiin olevan homotsygootteja transgeenin suhteen, fenotyyppitettiin. Proteiinien ilmentymistä selvitettiin coomassie-värjäys ja immunoblotausmenetelmillä sekä geenin olemassaolo selvitettiin PCR:sta saadun monistetun geenituotteen ilmentymisellä geelielektroforeesissa. Coomassie-värjäys ja immunoblotausmenetelmissä havaittiin ainoastaan toinen integroitu geeni diploidihomotsygoottisista kasvilinjoista. Kyseisissä analyyseissä pystyttiin kuitenkin havaitsemaan tuntematon proteiiniraita kokojen 150 ja 250 kDa:n välissä. Ennen siirtogeenien havaitsemiseen tehtyä geelielektroforeesia suoritettiin PCR-testaus määrittämään optimaalinen monistuskierrosten määrä kullekin geenille. Testauksen yhteydessä huomattiin että geeni, joka ei ilmentynyt proteiini-analyyseissä, ei myöskään ilmentynyt elektroforeesissa. Toisen geenin ilmentyminen voidaan olettaa tapahtuneen, sillä PCR tuotteen pituus vastasi geenin pituutta.</p> <p>Geeni, jota ei pystytty havaitsemaan tämän opinnäytetyön aikana tehdyissä analyyseissä, vaatii lisätutkimuksia sekä uusia sovelluksia ja olosuhteita, joissa mahdollisesti havaitaan geenituote sekä sen tuottama proteiini. Mukana olleet kontrollit toimivat moitteetta proteiinin ja geenin löytämiseksi käytetyissä menetelmissä. Tuntematon proteiiniraita jätti pohdittavaa tutkimusryhmälle sekä tarpeen luoda optimaaliset olosuhteet toisen integroidun geenin havaitsemiseksi.</p>	
Avainsanat	Arabidopsis, FUPS, genotyyppitys, transgeeni, ubikitiini-proteasomijärjestelmä

Author(s) Title	Jenna Roivas Genotyping and fenotyping of transgenic plants
Number of Pages Date	35 pages 13 May 2014
Degree	Bachelor of Health Care
Degree Programme	Biomedical Laboratory Science
Specialisation option	
Instructor(s)	Senior Lecturer, Hannele Pihlaja Academy researcher, Kristiina Himanen
<p>The thesis is a part of a project called "The Characterization of Flower Related Ubiquitin Proteasome System in Arapidopsis" (FUPS), conducted in the Faculty of Agriculture and Forestry, Department of Agricultural Sciences, University of Helsinki. The objective of the study was to determine the proteins degraded by FUPS candidates and thereby determine their importance in the development of flower.</p> <p>The aim of the study was to screen previously produced transgenic plant lines by fenotyping them and with the use of genetic analyses. Fenotyping was done in the screening phase of the plant lines for second and third generations to determine if the gene had transmitted correctly as expected by Mendel's law. Arabidopsis seeds were collected, sterilized and planted in agar plates where they were let to grow a few weeks before screening. Genetic analyses were done to the plants of the third generation which were assumed to be homozygote with regard to the transgene. Immunoblotting and coomassie-staining were used to detect proteins and the existence of the gene was determined by using gel electrophoresis for the PCR multiplied gene.</p> <p>Only one of the transmitted genes was detected from the results obtained from immunoblotting and coomassie-staining in diploid homozygote plant lines. However, there was an unknown protein band between sizes 150 and 250 kD's detected from the results obtained. A PCR cycle test was run to optimize the amount of cycles needed for multiplying each gene before running the gel electrophoresis for detecting the genes. During testing it was observed that the gene that wasn't detected in protein analyses could neither be detected in electrophoresis. The detection of the second/other gene could be assumed as the length of the PCR product corresponded with the length of the gene.</p> <p>The gene that could not be determined in this study requires further research, new applications and circumstances where its gene product and protein produced can be detected. The controls used in this study worked well and were applicable for detecting the protein and gene with the methods applied. The unknown protein band and the creation of optimal circumstances for determination of the integrated gene left the research group with something to ponder on.</p>	
Keywords	Arabidopsis, FUPS, genotyping, transgene, Ubiquitin Proteasome System

## Sisällys

1	Johdanto	6
1.1	”FUPS:n rooli kukkien kehityksessä” – projektin tavoitteet	6
1.2	Opinnäytetyön tavoitteet	7
2	Ubikitiini-proteasomijärjestelmä	7
2.1	Toimintamekanismit	8
2.2	Kasvien ubikitiini-proteasomijärjestelmä	8
3	Kasvien tärkeys maataloudelle ja ruoantuotannolle	9
4	Geenin siirto bakteerisoluun	10
4.1	Agrobakteeri luonnossa	10
4.2	Agrobakteerin hyödyntäminen geenitekniikassa	11
4.3	Floral-dip	11
5	Arabidopsis thaliana	11
6	Menetelmäperiaatteet	12
6.1	Käänteistranskriptio ja cDNA synteesi	12
6.2	Polymeraasiketjureaktio PCR	13
6.3	SDS-PAGE	14
6.4	Coomassie-värjäys	14
6.5	Western-blotting	15
6.6	Solukkoviljely	15
7	Kasvilinjat	16
8	Työn toteutus	17
8.1	Opinnäytetyössä käsitellyt T2-siemenet	17
8.2	Opinnäytetyössä käsitellyt T3-siemenet	18
8.3	Siementen esikäsitely	18
8.4	Taimien proteiini-analyysit	19
8.4.1	Proteiinin eristäminen ja konsentraation mittaaminen	20
8.4.2	SDS-PAGE	21
8.4.3	Coomassie-värjäys	21
8.4.4	Immunoblottaus	21
8.5	RNA:n eristäminen ja optimaalisten RT-PCR kierrosmäärän testaus	22

9	Tulokset	22
9.1	Optimaaliset PCR-kierrosmäärät	23
9.2	PCR-tulokset	25
9.3	Proteiinimittausten tulokset	27
10	Pohdinta	31
	Lähteet	34

## 1 Johdanto

Opinnäytetyöni kuuluu Helsingin yliopiston Maatalous-metsätieteellisen tiedekunnassa, Maataloustieteiden laitoksella suoritettavaan projektiin ”The characterization of Flower related Ubiquitin Proteasome System in Arabidopsis” eli FUPS:n rooli kukkien kehityksessä. Vastuututkijana toimii Kristiina Himanen ja työelämäohjaajani on Marcelina Bilicka, kuka toimii kaiken laboratoriotyöskentelyn ohjaajana. Opinnäytetyöni ohjaajana Metropolian puolesta toimii lehtori Hannele Pihlaja ja opponijana toimii Tiia Nikkilä.

Opinnäytteeni osuus FUPS-projektissa liittyy transgeenisten kasvien T-DNA-mutanttilinjojen geneettiseen analysointiin ja itse tuotettujen yliekspressiolinjojen fenotyyppitykseen. (Himanen 2013.) FUPS tarkoittaa kukan ubikitiini-ohjattua proteasomijärjestelmää, jossa tiettyyn kukan proteiiniin kiinnittyy ubikitiinimolekyyli, jonka proteasomi tunnistaa ja tuhoaa. Proteiini ei näin ollen pääse ilmentymään aikuisessa kasvissa. Jos muutos näkyy kasvin ilmiössä, olisi kyseistä proteiinia tarvittu täydelliseen kehittymiseen. Himanen tutkimusryhmän tavoitteena on löytää ja tunnistaa ne proteiinit, joita FUPS-kandidaatit hajottavat integroimalla kasviin ubikitiinin toimintaan vaikuttavan mutatoituneen geenin. (Mäki-Kihniä 2013.)

Tutkimusta tehdään, koska kasvien hedelmät ja marjat sekä kukkien tuottamat siemenet ovat äärimmäisen tärkeitä maataloudelle ja ruoantuotannolle. Ubikitiini-proteasomijärjestelmä hajottaa proteiineja ja tämän tutkimuksen tarkoituksena on selvittää tuottaisivatko geenimuunnellut kasvit parempia proteiineja. Tällöin saisimme enemmän ja suurempia kasveja, jotka tuottaisivat näin ollen enemmän siemeniä. Näitä tutkimustuloksia voisi tulevaisuudessa hyödyntää viljelykasveilla. (Mäki-Kihniä 2013.)

### 1.1 ”FUPS:n rooli kukkien kehityksessä” – projektin tavoitteet

Projektin – jossa opinnäytteeni on osa – tutkimustavoitteet on tunnistaa ja toiminnallisesti luonnehtia kukalle spesifiset ubikitiini-proteasomijärjestelmän komponentit, joita kutsutaan nimellä FUPS. Projektin tavoitteet kokonaisuudessaan ovat:

- luetteloida kukalle spesifiset ubikitiini-proteasomijärjestelmän komponentit, jotka ovat osallisena kukan kehitykseen.
- tunnistaa FUPS:stä riippuvaiset taustalla olevat prosessit sekä saada vastauksia solukko -ja kukanosaspesifisiin kehityshäiriöihin. (Himanen, 2012).
- löytää kehitysbiologian ”katkaisijat”, jotka estävät kukan kehityksen etenemisen eri vaiheiden välillä. Siksi on tärkeää löytää ne proteiinit, joita löydetty FUPS-kandidaatit hajottavat sekä milloin ja missä kukan osissa tämä tapahtuu. (Himanen 2013.)

## 1.2 Opinnäytetyön tavoitteet

Käsiteltävät kasvinlinjat jakautuvat moneen sukupolveen, joita kutsutaan T0-, T1-, T2- ja T3-siemeniksi tai -kasveiksi (Himanen 2013). Haluttu geeni on siirretty ensimmäiseen eli T0-kasviin agrobakteerin plasmidin avulla. Plasmidin kohta, jossa transgeeni sijaitsee ja joka plasmidista siirtyy kasvin genomiin, kutsutaan T-DNA:ksi. (Brown 2010: 113.)

Opinnäytetyön tavoitteena on seuloa geneettisesti sekä analysoida myös fenotyyppisesti projektissa tuotettuja eri vaiheissa olevia transgeenisia kasveja. Tavoitteisiin kuuluu myös varmistaa että T1-vaiheessa primääritransformaatteja on tarpeeksi, T-DNA:n liittyminen yhteen lokukseen vastaa T2-vaiheessa segregatiota sekä T3-vaiheessa linjat ovat puhtaasti homotsygootteja. Jokaisesta vaiheesta tuotetut kasvinlinjat viedään multa ja ne tuottavat itse pölyttämällä seuraavan sukupolven siemenet. Geenin haluttua vaikutusta prosessissa analysoidaan transgeenisten kasvien avulla. Tutkimuksen kohteena on kukan kehitysprosessi ja mikäli tunnettua geeniä yli-ilmennetään ja kukka muuttuu fenotyyppisesti, tiedämme geenin tuottaman proteiinin toimivan kukassa. (Himanen 2013.)

## 2 Ubikitiini-proteasomijärjestelmä

Ubikitiini-proteasomijärjestelmä on proteiinien päähajottaja sen sisältäessä yli 1200 geeniä ja niiden tuotetta. Tämä järjestelmä koostuu laajasta kirjosta tekijöitä: ubikitiini-proteiini, ubikitiini-etsyymit (E1, E2, E3), saattajaproteiinit jotka moduloivat proteiinien hajoamista (Rad23, SPA1), ubikitiinin poistajaentsyymit (DUB1) sekä proteasomi. Täs-

sä järjestelmässä 76:n aminohapon ubikitiiniproteiini sitoutuu kovalenttisesti kohdemolekyyliin ja sen liittyminen vaatii useita toimintoja. (Himanen 2012.)

## 2.1 Toimintamekanismit

E1-entsyymi aktivoi ubikitiinimolekyyliin. Tämä reaktio tarvitsee energiaa ATP:n muodossa. E2-entsyymi tunnistaa kyseisen yhdistelmän, jolloin se sitoo ubikitiinin kuljetettavakseen. E3-entsyymi tunnistaa kohdeproteiinin, jolloin E2-entsyymin ja ubikitiinin yhdistelmä kulkeutuu lähelle kohdeproteiinia, jotta ubikitiini voi siirtyä proteiiniin E2-entsyymiltä. Tämän tapahtuman jälkeen E3-entsyymi vapauttaa ubikitiinillä varustetun kohdeproteiinin. Viimeiset tapahtumat toistuvat niin kauan, kunnes proteiinilla on lyhyt ketju ubikitiinimolekyyliä tarttuneena itseensä. Ubikitiiniketju tunnistaa ja avaa proteasomijärjestelmän irrotten itse proteiinista. Proteiini kulkeutuu proteasomiin pilkottavaksi. (Ciechanover - Hershko - Rose 2004.)

Ubikitiini-proteasomijärjestelmän on huomattu olevan tehokas mekanismi, joka tekee väistämättömän siirtymisen kehitysvaiheiden välillä helpommaksi. Se myös reagoi erilaisiin ympäristöstä tuleviin signaaleihin ja solullisiin ärsykkeisiin. Ubikitiini-proteasomijärjestelmän on todettu olevan siistijän roolissa sen poistaessa toimimattomia polypeptidejä, mutta sen täsmällisempi tehtävä on valikoida hajotukseen lyhytikäisiä säätelijöitä, kuten transkriptiotekijöitä sekä valo -ja hormonireseptoreita. Hiljattain on havaittu, että ubikitiini E3:n alayksikkö TIR1 on kauan etsinnässä ollut apureseptori, joka kontrolloi auksiinihormonin transkriptiotekijöitä. Tämä on uudenlainen ja uniikki säätelymekanismi, joka edustaa huipentumaa kasvien signalointitutkimuksessa. Vaikuttaa myös siltä, että kasvin välttämätön viestintäprosessi, joka liittyy kukan kehittymiseen, on kontrolloitu ubikitiini-proteasomijärjestelmällä. (Himanen 2012.)

## 2.2 Kasvien ubikitiini-proteasomijärjestelmä

Suurin osa kasvien luonteenomaisista ubikitiini-proteasomijärjestelmän komponenteista on löydetty mutanttiseulonnoissa. Monia komponentteja on kuitenkin löydetty myös laajoissa genomiseulonnoissa, kuten myös transkriptioprofilointitutkimuksissa, geneettisissä seulonnoissa ja proteiinien keskinäisten vaikutusten tutkimuksissa. Yleistä tapaa selvittää ubikitiini-proteasomijärjestelmän roolia kasvibiologiassa ei kuitenkaan ole vielä löydetty. Siksi avainkomponentit kasvien ubikitiini-proteasomijärjestelmässä jäävät hei-



kosti kuvatuiksi. Tällä hetkellä avainnäkökulma, jolla ymmärretään kasvien ubikitii-ni-proteasomijärjestelmän biologinen rooli, on osoittaa sen biokemia kasvien kehitys-vaiheessa. (Himanen 2012.)

### **3 Kasvien tärkeys maataloudelle ja ruoantuotannolle**

Niin kasveja kuin eläimiäkin on jalostettu niin kauan kuin kasveja on viljelty ja koti-eläimiä hoidettu. Tämä on tehty risteyttämällä ja valitsemalla risteymistä parhaita yksilöitä. Risteytyksellä kasveista tuotettiin luonnonvaraisista muodoista eroavia kantoja, jotka sopeutuivat paremmin paikallisiin oloihin ja olivat satoisampia. Tämän vuoksi sukupuuttoon ovat muun muassa jo kuolleet herneen ja puuvillan luonnonkannat. Jalostuksella halutaan muuntaa perimää tiettyyn suuntaan ja se on nykyisen geenitietouden avulla helppo suorittaa. Tautien ja sään kestävyys sekä hyvä satoisuus ovat kasvijalostuksen tavoitteista tärkeimmät. (Tenhunen - Ulmanen - Yläne 2009: 51.)

Kukan toimintamekanismien sekä molekyyli-tason kehitysbiologian ymmärtäminen ovat muun muassa maataloudelle kiinnostavia. Kasvukaudella tapahtuva kukinnan oikea ajoittuminen on viljelysadon onnistumisen kannalta merkittävää. Siemen-, hedelmä- ja marjasadon määräävät kukkien koko ja niiden määrä. Ilmastonmuutos on myös antanut omat haasteensa viljelylajikkeiden kehitystyölle. Myös tästä johtuen olisi hyvä tuntea molekyylimekanismit, jotka säätelevät kukinnan ajoittumista sekä kukan kokoa ja lukumäärää. (Mäki-Kihniä 2013.)

Useat kasvit käyttävät todennäköisesti ubikitii-nisäätelyä kasvuvaiheen sekä kasvukau-den lopun risteyskohdassa kukinnan alkaessa, jossa edellinen reaktio pysäytetään ja siirrytään seuraavaan vaiheeseen. Ubikitii-nisäätelyn oletetaan liittyvän myös kasvien stressitilanteisiin sekä eri olosuhteisiin sopeutumiseen. (Mäki-Kihniä 2013.)

## 4 Geenin siirto bakteerisoluuun

Bakteereita käytetään maailmanlaajuisesti geeniteknikassa muun muassa toiminnaltaan tunnetun geenin kuljettimena. Bakteereissa on kromosomin lisäksi DNA:ta myös plasmideissa, mutta usein vain muutamien geenien muodossa. Plasmidit saadaan helposti eristettyä bakteerista ja niihin on helppo lisätä vierasta DNA:ta. (Tenhunen ym. 2009: 37.) Plasmidit ovat kaksijuosteista DNA:ta ja ne ovat irrallaan bakteerisolujen kromosomista. Ne ovat yleensä muodoltaan voimakkaasti kierteisiä ja ne replikoituvat itsenäisesti. (Solunetti 2006.) Rengasmainen plasmidi saadaan katkaistuksi entsyymien avulla ja vieraan geenin liittämisen jälkeen rengas sulkeutuu transgeenin ollessa osa plasmidia. Tällaisia plasmideja on mahdollista siirtää mekaanisesti kasvisolujen lisäksi moneen eläinkudokseen. Kun plasmidi saadaan kasvisolun sisään, siihen liitetty geeni integroituu kasvin omaan genomiin ja jakautuu sieltä tytärsoluihin. Näitä soluja kasvattamalla saadaan lopuksi solulinja, joissa kaikissa on sama transgeeni. (Tenhunen ym. 2009: 37-38.)

### 4.1 Agrobakteeri luonnossa

Tutkimuksessa käytettävä agrobakteeri (*Agrobacterium tumefaciens*) on maaperän mikro-organismi. Bakteerin päästessä kasviin sen rungon haavauman kautta aiheuttaa se useille kaksisirkkaisille kasvilajeille latvuskasvaimia. Agrobakteerin taito aiheuttaa latvuskasvaimia on yhdistetty läsnä olevaan Ti-plasmidiin. Ti-etuliite tulee englannin sanoista ”tumor inducing”, tarkoittaen ”kasvainta aiheuttava”. (Brown 2010: 113.)

Ti-plasmidi sisältää monia infektiin osallistuvaa geeniä. Yksi merkittävimmistä Ti-plasmidin ominaisuuksista on integroida osa molekyylistään kasvin DNA:han välittömästi infektion jälkeen. Tätä siirtyvää Ti-plasmidin osaa kutsutaan T-DNA:ksi. Se säilyttää stabiilin muotonsa kasvin solussa ja siirtyy näin myös tytärsoluille erottamattomana osana kromosomia. Kaikkein merkittävin muutos T-DNA:han saadaan sen sisältäessä kahdeksan kasvisolussa kasvaimen ominaisuuksia omaavaa geeniä. Nämä samat geenit myös syntetisoivat epätavallisia yhdisteitä, joita bakteeri käyttää ravintoaineenaan. Näin ollen bakteeri käyttää ja tarvitsee kasvisolua omaan tarkoitukseensa. (Brown 2010: 113.)

## 4.2 Agrobakteerin hyödyntäminen geenitekniikassa

On todettu jo varhain, että agrobakteerin Ti-plasmidia voidaan käyttää uusien geenien kuljettimena kasvisoluun. Prosessi ei edellytä muuta kuin uuden geenin lisäämisen Ti-plasmidiin T-DNA-osaan minkä jälkeen bakteeri itse sisällyttää geenin kasvin kromosomaaliseen DNA:han. Ti-plasmidin suuri koko vaikeuttaa sen manipulointia. Vaikka uusien tapojen kehittämiseksi on tarvetta, tällä hetkellä on kuitenkin kaksi tapaa uuden geenin sisällyttämiseen molekyyliin:

- Binaarivektoristrategia (The binary vector strategy), joka perustuu havaintoihin T-DNA tarpeettomuudesta olla fyysisesti kiinnittynyt muuhun Ti-plasmidiin. (Brown 2010:113.)
- Kumppanien yhdistämisstrategia (The co-integration strategy), joka perustuu täysin uuden, *E. colista* saadun plasmidin käyttöön, joka myös sisältää pienen osan T-DNA:ta. Jos molemmat ovat paikalla samassa agrobakteerisolussa, rekombinaatio voidaan yhdistää *E. colin* plasmidin T-DNA alueelle. (Brown 2010: 114.)

## 4.3 Floral-dip

Useat laboratoriot ovat kehittäneet yhteistyössä erilaisia tapoja agrobakteerin välittämisen arabidopsikseen. Näistä yksi on floral-dip menetelmä, jonka on todettu olevan helppoin ja yleisesti käytetyin tapa tuottaa transgeenisia arabidopsiskasveja. Menetelmässä arabidopsiskukinnot kastetaan muutaman sekunnin ajan 5 % sakkaroosiliuoksessa. Liuos sisältää 0.01-0.05 % Silwet L 77:ää (pinta-aktiivinen aine) ja suspensoituja agrobakteerisoluja, jotka kuljettavat halutut transgeenit. Kun kasvit siementävät, siemenet asetetaan valikoiduille kasvatusalustoille tulevaa seulontaa varten. Yleisesti ottaen kaikista kastetuista kasveista saavutetaan 1 % onnistuminen transgeenin siirrossa. (Zhang – Henriques - Lin - Niu - Chua 2006.)

## 5 Arabidopsis thaliana

Projektissa käytetään yksivuotista lituruohoa (*Arabidopsis thaliana*). Lituruoho on niin sanottu kasvikunnan banaanikärpänen ja laboratoriot ympäri maailmaa kasvattavat sitä geneettisiä tutkimuksia varten. (Lituruoho.)

Arabidopsis on kaukaista sukua muille eukaryoottisille organismeille, joiden genomi on ollut mahdollista sekvensoida. Sen genomi koostuu viidestä kromosomiparista ja se sisältää 25 498 geeniä. Koko genomien koko on 125 miljoonaa nukleotidiparia (Mbp) DNA:ta ja yksi geeni on keskimäärin 4.6 kilonukleotidiparia (kbp) pitkä. Se on perimältään suhteellisen pienikokoinen kasvikunnan organismi. (Lesk 2005: 95.)

Arabidopsis on erinomainen kasvi geneettisiin tutkimuksiin muuan muassa sen pienen genomikoon ja diploidisuuden myötä (Wilson 2000: 3-4). Se helpottaa tunnistamaan väistyviä piirteitä sekä saa tutkijat välttämään komplikaatioita, joita kohdataan muiden kasvilajien kanssa (NSF 2010). Kasvin elinkaari on hyvin lyhyt eikä kasvaminen ole riippuvainen vuodenaajoista. Arabidopsisin kiertokulku siemenestä siemeneen kestää vain kuudesta kahdeksaan viikkoa, mikä mahdollistaa monen sukupolven geneettiset analyysit vain yhden vuoden aikana. Yksi kasvi voi tuottaa tuhansia siemeniä ja siksi se on oiva kasvi mutageneettisiin tutkimuksiin. Arabidopsis hedelmöittää itse itsensä, mikä mahdollistaa homotsygoottisten linjojen suoraviivaisuuden. (Wilson 2000: 3-4.)

## 6 Menetelmäperiaatteet

Opinnäytetyön puitteissa siirtogeeneistä (T-DNA) ei voida käyttää niiden oikeita nimiä. Geeneistä ja niiden tuottamista proteiineista käytettiin termejä geeni1/proteiini1 sekä geeni2/proteiini2. Toteutus- ja tulososioissa voidaan käyttää termeistä vain toista, riippuen siitä tutkittiinko geeniä vai proteiinia.

### 6.1 Käänteistranskriptio ja cDNA synteesi

Jotta DNA voidaan monistaa näytteestä, on ensin syntetisoitava RNA:sta komplementaarista DNA:ta (cDNA). cDNA voidaan syntetisoida RNA:sta käänteiskopioijaentsyymien avulla, jolloin saadaan yksijuosteista cDNA:ta. Samalla menetelmällä voidaan tuottaa cDNA:lle vastinpari. RNA:sta tehdään DNA:ta, koska DNA on huomattavasti vakaampi. (Protocol Online 2013.)

## 6.2 Polymeraasiketjureaktio PCR

Polymeraasiketjureaktiolla voidaan helposti ja nopeasti monistaa miljoonia molekyyliä vain muutamista malli-DNA-juosteista. Reaktiossa tarvitaan DNA-polymeraasientsyymiä, alukkeita, nukleotidejä sekä DNA:ta jota halutaan monistaa. (Tenhunen ym. 2004: 45.) Monistettavaksi alueeksi voidaan valita mikä tahansa jakso DNA:sta, kunhan vain tiedetään sen emäsjärjestys valitulta alueelta. Tämän alueen emäsjärjestys on tiedettävä kahden lyhyen oligonukleotidin syntetisoimisen mahdollistamiseksi. Oligonukleotidit kiinnittyvät DNA:n yksijuosteisten säikeiden päihin, rajaten monistettavan alueen. Näitä oligonukleotideja kutsutaan suomeksi usein alukkeiksi. DNA-polymeraasientsyymien on oltava hyvin lämmönkestäviä, jotta sen rakenne ei auke kuumissakaan olosuhteissa eli se on resistentti denaturoinnille. Tästä syystä useimmiten käytetään kuumissa lähteissä elävän *Thermus aquaticus* bakteerin eristettyä Tag-polymeraasia. (Brown 2010: 147-148.) Sen on kuitenkin huomattu tekevän suhteellisen paljon virheitä, joten useissa PCR-sovelluksissa suositaan muita, vähemmän virhealttiita entsyymejä. Jotkin polymeraasit pystyvät korjaamaan omia virheitään oikolukuaktiivisuuden avulla. Kaikilla polymeraasientsyymeillä tätä aktiivisuutta ei kuitenkaan ole, eikä käytettävissä ole myöskään solun omia korjausentsyymejä. Virhe monistuu sen tapahduttua heti seuraavissa sykleissä ja näin lopputuotteet eivät vastaa alkuperäistä templaattia, monistettavaa kaksijuosteista DNA:ta. (Suominen ym. 2010: 153156.)

PCR-työskentely on suoritettava hyvin aseptisissa olosuhteissa, jottei DNA kontaminaatiota tapahdu. Myös kontrollit ilman alukkeita ja toinen ilman templaattia sekä tunnettu positiivinen näyte on suositeltavaa tehdä. (Suominen ym. 2010: 156.) Monistettava DNA, polymeraasientsyymi, alukkeet ja nukleotidit sekoitetaan yhdeksi reaktioseokseksi. Malli-DNA:na voi toimia vain yksikin molekyyli, sillä PCR on äärimmäisen herkkä. Denaturointivaiheessa reaktioseos kuumennetaan 94 asteiseksi, jolloin kaksijuosteisen DNA:n koossa pitävät vetysidokset hajoavat aikaansaaden kaksi yksijuosteista DNA-säiettä. Annealing- eli alukkeiden kiinnitysvaiheessa lämpötila lasketaan 50-60 asteiseksi, jolloin DNA yrittää muotoutua takaisin kaksijuosteiseksi saman aikaisesti kun alukkeet pääsevät kiinnittymään DNA:n 3' päihin. DNA-synteesi voi alkaa, joten lämpötila nostetaan 72-74 asteeseen. (Brown 2010: 148.) Tässä lämpötilassa DNA-polymeraasientsyymi alkaa muodostaa yksijuosteiselle DNA:lle vastinnauhaa liittämällä siihen reaktioseoksessa mukana olevia nukleotideja. Synteesin ollessa valmis kaikki kolme vaihetta, eli yksi sykli, toistetaan, useimmiten 15-40 kertaa. Syklien määrästä

riippuen lopputuotetta voi olla yhtä alkuperäistä molekyyliä kohden miljoona kappaletta. Eri vaiheiden lämpötilat voivat hieman vaihdella käytettävien tuotteiden mukaan. (Suominen ym. 2010: 154-155.)

### 6.3 SDS-PAGE

Proteiinien erottaminen tapahtuu SDS-PAGE:ssä (*sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis*). Sen on todettu olevan tehokas proteiinien erottelutekniikka. Elektroforeesissa sähköisesti varautuneet proteiinit vaeltavat sähkökentässä. Molekyylien nopeus liikkua geelissä riippuu niiden sähköisestä varauksesta, molekyylimassasta ja koosta sekä sähkökentän voimakkuudesta. *Sodium dodecyl sulphate* (SDS) on puhdistava anioni, joka denaturoi proteiinit sitoutumalla niiden polypeptidirankaan. Tämä tekee proteiineista negatiivisesti varautuneita. Negatiivinen varaus jakautuu tasaisesti läpi molekyylin ja näin saadaan sama varauksellinen tiheys jokaista pituusyksikköä kohden. Proteiineja käsitellään  $\beta$ -mercapthoetanolilla tai dithiothreitolilla rikkisiltojen ja satunnaisen kiertyvän muodon poistamiseksi. Näin ollen denaturoivassa SDS-PAGE erottelussa proteiinien liikkuminen geelissä määräytyy molekyylipainon mukaan, ei polypeptidien luontaisen sähköisen varauksen mukaan. (Wenk - Zefrin Fernandis 2007: 21-22.)

### 6.4 Coomassie-värjäys

Coomassie-väriaineet sitoutuvat proteiineihin ionien yhteisvaikutusten kautta sulfonihappo-ryhmän ja positiivisten amiiniryhmien välille. Geeli sijoitetaan liuokseen, jossa on coomassie-väriainetta ja siniset proteiiniraidat muodostuvat inkuboinnin aikana hyvinkin nopeasti. Inkubointiaika vaihtelee riippuen käytettävästä väriaineesta ja se voi vaihdella muutaman tunnin ja yön yli kestävästä inkubointiajan välillä. (National Diagnostics.) Coomassie-väriaine kiinnittyy epäspesifisesti kaikkiin proteiineihin, jotka ovat erottuneet geeliin SDS-PAGE-tekniikkaa käytettäessä. Inkuboinnin aikana väriaine kiinnittyy vain proteiineihin kiinnittymättä lainkaan geeliin, mikä mahdollistaa proteiinien näkemisen geelissä sinisenä raitana. (Wenk - Zefrin Fernandis 2007: 26.)

## 6.5 Western-blotting

Tutkija Southern kuvasi ensimmäisen kerran DNA:n hybridisaatiomenetelmän vuonna 1975. Tämä menetelmä sai kehittäjänsä mukaan nimen Southern Blotting. Samanlainen menetelmä kehitettiin tämän jälkeen RNA-fragmenteille, ja menetelmä nimettiin Northern Blottingiksi. Myöhemmin kehitettiin vielä samanlainen menetelmä proteiineille, jota kutsutaan Western Blottingiksi tai immunoblottaukseksi. (Kreuzer - Massey 2001: 122.) Blottaus tarkoittaa kohteen siirrostusta geeliltä kalvolle (Suominen ym. 2010: 201).

Immunoblottausmenetelmän avulla voidaan laskea spesifisten proteiinien massa näytteestä raitatekniikalla. SDS-PAGE-menetelmässä tapahtuneen erottelun jälkeen proteiinit siirretään sähkövirran avulla geeliltä kalvolle, joka on tavallisesti nitroselluloosa- tai PVDF-kalvo. Kalvoa inkuboidaan epäspesifisten proteiinien kanssa, jotka kiinnittyvät kaikkiin jäljellä oleviin vapaisiin kohtiin. Reaktioon lisätään ensisijainen vasta-aine, joka kiinnittyy kohdeproteiineihin. Kalvoa pestään ja inkuboidaan sekä lisätään vasta-aineen vasta-aine, joka tunnistaa ensisijaisen vasta-aineen kiinnittyen siihen. Vasta-aineen vasta-aineeseen liitetään entsyymi tai muu markkeri, joka mahdollistaa reaktion havaitsemisen. (Wenk - Zefrin Fernandis 2007: 28-29.)

## 6.6 Solukkoviljely

Kasvien jalostuksessa käytetään apuna solukkoviljelyä. Sillä saadaan tehokkaasti tuotettua homotsygoottisesta emokasvista puhdas jälkeläislinja, joka on suvuttomasti tuotettu jälkeläisklooni ja näin ollen jälkeläiset ovat perimältään täysin emokasvin kaltaisia. (Tenhunen 2009: 55.) Kasveja tuotetaan geneettisesti vain yhdestä solusta. Esimerkiksi lehtisolua voidaan geneettisesti muuntaa niin, että se on vastustuskykyinen tuhohyönteisiä vastaan. Tämän ominaisuuden täytyy kehittyä koko kasviin, jotta siitä on hyötyä viljelijöille. (Kreuzer - Massey 2001: 9.)

Pieni määrä kasvisoluja otetaan kasvin alkioista tai heteestä ja ne kasvatetaan ravintoliuoksessa tai hyytelömäisellä ravintoalustalla. Entsyymien avulla tehtävän soluseinän hajottamisen jälkeen jäljelle jää protoplasti, solu, jota ympäröi vain solukalvo. Geeniteknisessä kasvijalostuksessa tässä muodossa olevaan soluun siirretään haluttu geeni. Muutaman viikon kasvatuksen jälkeen syntyneet taimet siirretään kasvihormonia sisältävälle kasvualustalle. Seuraavaksi kasvit siirretään suurempaan kasvatuslaatikkoon,

jossa on juurien muodostumista edistävä kasvualusta. Noin kolmen viikon kuluttua kasvit siirretään kasvimaalle kasvamaan kokonaisiksi. (Tenhunen ym. 2009: 55-56.)

## 7 Kasvilinjat

Laboratoriot, jotka tekevät tutkimuksia arabidopsiksen parissa, ovat saaneet siemeniä kasvista, joista on kasvatettu T0-kasveja. T0-kasveihin siirretään T-DNA agrobakteerin avulla floral-dip-menetelmällä. Yhdestä "dipatusta" kasvista kerätään noin 1000 T1-siementä, jotka levitetään kasvatusalustalle. Kasvatusalustat sisältävät aina antibioottia tai herbisidiä, jotka estävät transgeenittömien siementen itämisen. Herbisidi on rikkaruohomyrkkä jota vastaan T-DNA antaa vastustuskyvyn ja näin ollen mahdollistaa kyseisen kasvin itämisen ja taimeksi kasvamisen. T1-siemenistä selviytyy joitakin kymmeniä, jotka kasvavat T1-taimiksi. Nämä taimet, jotka ovat ensimmäinen sukupolvi eli nk. primääritransformaattit, siirretään kasvamaan kasvihuoneelle. Kypsien siementen keräys tehdään aina täysin kuivuneesta kasvista, joten niitä kasvatetaan kasvihuoneella vähintään kuusi viikkoa. T1-kasveista kerätään siemenet, jotka steriloidaan sekä kasvatetaan kasvatusalustalla. Nämä siemenet ovat T2-siemeniä. T2-siemenistä 75 % tulisi selvittää elossa kasvatusalustalla jossa on antibioottia. Näistä T2-taimista seulotaan oikein periytyneet yksilöt, jotka kasvatetaan kasvihuoneella aikuisiksi kasveiksi, minkä jälkeen niistä voidaan kerätä T3-siemenet. T3-siemenet kasvatetaan kasvatusalustalla normaalisti steriloinnin jälkeen ja niistä kasvaneiden taimien seulonnassa etsitään homotsygoottisia kasvilinjoja. Kasvilinjojen ollessa homotsygootteja kunkin siemenen täytyy itää ja kasvaa vihreänä kasvina antibioottialustalla. T3-taimille tehdään geneettisiä analyysejä, kuten RT-PCR ja immunoblottaus. Ne voidaan myös istuttaa kasvihuoneelle ja saadaan T4-siemeniä, joille voidaan tehdä lisää geneettisiä analyysejä ja tarkastella fenotyyppiä. Myös hyväksi seulotuista T3-linjoista tarkastellaan fenotyyppiä niiden kasvettua. (Bilicka 2014.)



## 8 Työn toteutus

Yhden kasvin elinkaari tässä tutkimuksessa on noin 3 kuukautta, joten aika ei riittänyt tekemään yksittäiselle kasville sekä geneettistä että fenotyyppistä analysointia. Analyysyjä tehtiin kuitenkin projektin eri vaiheissa olevilla kasveilla.

Käytännön työ alkoi siementen esikäsittelyllä, johon kuului siementen keräys, sterilointi sekä niiden kylväminen kasvatusalustoille. Geneettisiä analyysyjä voidaan tehdä kaikille sukupolville, mutta tässä tutkimuksessa niitä tehtiin vain T3 homotsygoottisille linjoille. Analyysimenetelminä olivat RT-PCR, coomassie-värjäys sekä immunoblottaus.

Proteiinianalyyseissä näytteitä oli kuusi: kolme kasvulinjaa jotka olivat kasvatettu kahdella eri selektioalustalla, sillä ne sisälsivät kaksi integroitua geeniä. RNA-analyysyjä tehtiin vain herbisidiä sisältävällä kasvatusalustalla kasvaneille kuudelle kahden geenin linjalle sekä neljälle yhden geenin linjalle. Esikäsittelyssä seulottiin myös hieman T2-vaiheessa olevia kasveja, mutta näiden taimille ei tehty proteiini- tai RNA-analyysyjä.

### 8.1 Opinnäytetyössä käsitellyt T2-siemenet

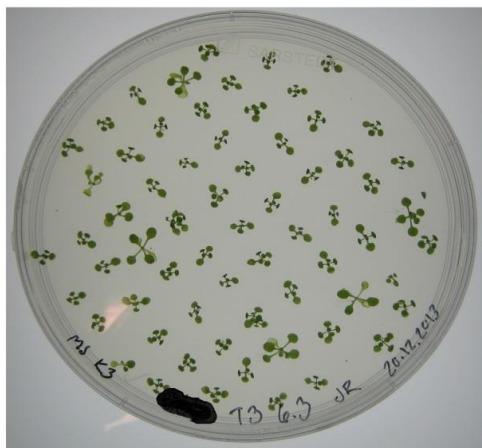
Siementen kerääminen aloitettiin 15 kasvista, joista saatiin T2-siemeniä. Vain 11 kasvista saatiin niin paljon siemeniä, että ne pystyttiin siirtämään kasvatusalustalle. Yhtä maljaa kohden siirrettiin 32 siementä. Tässä vaiheessa kasvatusmaljojen antibioottina oli aina kanamysiini.

Siementen kasvettua kaksi viikkoa kasvatushuoneessa niistä seulottiin hyvät linjat Mendelin periytymissäännön mukaan. Hyviksi todettiin ne linjat, joissa siemenistä oli lähtenyt itämään 75 %. Itämään lähteneistä siemenistä laskettiin kuolleet ja selvinneet yksilöt ja seulottiin tutkimusryhmän oman laskukaavan mukaan, mikä niistä on hyvä yksilö kasvatettavaksi kasvihuoneessa seuraavaa vaihetta varten. 11 kasvilinearjasta, joiden siemenet kylvettiin, kolme selviytyi seuraavaan vaiheeseen ja niistä kasvatettiin T2-kasveja.

## 8.2 Opinnäytetyössä käsitellyt T3-siemenet

Seuraavaksi kerättiin T3-siemeniä yhteensä 36 kasvista. Kahdella kasvilinjalla oli 10 alalinjaa joihin oli integroitu kaksi T-DNA:ta (geeni1/proteiini1 ja geeni2/proteiini2). Tämän vuoksi ne siirrettiin alustoille jotka sisälsivät sekä antibioottia (kanamysiini) että herbisidiä (basta). 16 kasvilinjaa sisälsi vain yhden T-DNA:n (geeni1/proteiini1) joten niiden siemenet siirrettiin vain bastaa sisältäville kasvatusmaljoille. Kustakin linjasta siirrettiin 69 siementä maljaa kohden ja maljojen yhteislukumäärä oli 56 kappaletta.

Siemenet kasvoivat 2-3 viikkoa kasvatushuoneessa, jonka jälkeen niistä syntyneistä taimista lähdettiin seulomaan homotsygootteja linjoja. Kaikkien itämään lähteneiden siementen oli kasvettava 100 % ollakseen homotsygootteja (kuvio 1), mikä osoittaa kaikkien kasvien sisältävän transgeenin molemmissa kromosomeissa. 56 kasvatusmaljasta 12 oli diploidihomotsygootteja, 10 heterotsygoottia ja 2 sensitiivistä kasvia.



**Kuvio 1. Homotsygootti T3-linja, josta kaikki taimet kasvavat antibioottia sisältävällä kasvualustalla.**

## 8.3 Siementen esikäsittely

Siementen esikäsittelyyn kuului kasvatusalustojen valmistus, siementen kerääminen, sterilointi ja niiden kylväminen edelleen kasvatusalustoille. Esikäsittelyä tehtiin T2- ja T3-linjan kasveille.

Kasvien kasvatusalustat valmistettiin yliopiston omissa tiloissa. Maljat tehtiin T2- ja T3-vaiheessa oleville siemenille niiden kasvatusta varten. Työskentely oli aseptista ja

maljojen valaminen täytyi tehdä täysin steriilissä laminaarissa. Ennen valamista kasvatuliukukseen lisättiin herbisidiä tai antibioottia, jotta kasvatusalustoilla itäisivät vain ne siemenet, joihin transgeeni on siirtynyt isäntäkasvista meioosin myötä. T2-siemenille valmistettiin kasvatusalustat joissa antibioottina oli vain kanamysiini, mutta T3-siemenille tehtiin lisäksi myös basta-herbisidiä sisältäviä maljoja.

Siemeniä kerättiin sukupolvista T2 ja T3. Kasvit siirrettiin ensin mullasta paperipussiin, josta tämän jälkeen kaadettiin kaikki saatavilla olevat siemenet paperialustalle. Siementen seassa olleet juuret ja muut kasvin osat kerättiin sivuun. Siemenet kaadettiin kahden millilitran koeputkeen, josta ne siirrettiin pienelle kangaspalalle. Kangaspala taiteltiin kiinni niin, etteivät siemenet päässeet sekoittumaan keskenään sterilointivaiheessa. Kaikki ylimääräiset kasvin osat hävitettiin huolellisesti roskakoriin, joka myöhemmin autoklavoitiin.

Sterilointi tapahtui laminaarissa aseptisissä olosuhteissa. Siemenpussit kastettiin ensin 70 % etanolissa kahden minuutin ajan, jonka jälkeen ne siirrettiin 10 minuutiksi klooriniliuokseen. Klooriniliuos sisälsi yhden tipan Tween20:tä. Huuhtelu tehtiin steriilissä vedessä viisi kertaa. Huuhtelujen jälkeen siemenet siirrettiin yksitellen kasvatusalustalle. T2-linjan siemeniä siirrettiin yhteensä 32 kappaletta ja T3-linjan siemeniä 69 kappaletta. Kasvatusalustat säilöttiin jääkaappilämpötilaan kahdeksi vuorokaudeksi kasvien kylmäkäsittelyä varten, jonka jälkeen ne siirrettiin kasvatushuoneeseen. Jo kahden viikon jälkeen maljoilla pystyttiin havaitsemaan kasvaneita taimia.

#### 8.4 Taimien proteiini-analyysit

Taimien ollessa 2-3 viikon ikäisiä, ne kuvattiin ja T3-vaiheessa oleville linjoille tehtiin seulonta. Seulonnasta valittiin mukaan kolme kasvulinjaa joihin oli integroitu molemmat T-DNA:t (geeni1/proteiini1 ja geeni2/proteiini2), ja jotka kasvoivat homotsygootteina kummallakin kasvatusalustalla (basta ja kanamysiini). Näistä kuudesta linjasta eristettiin kyseisten geenien koodaamia proteiineja, jotka eroteltiin geelielektroforeesilla rai-doiksi coomassie-värjäystä ja immunoblottausta varten. T2-linjan kasveille tehtiin seulonta ja ne istutettiin multaan.

Proteiinimittaustesteissä näytteet analysoitiin ja niihin laitettiin eri määrä vasta-aineita testattaessa eri proteiineja. Geenien tuottamiin proteiineihin liitettiin erillinen peptidiosa, jonka ensisijainen vasta-aine pystyy tunnistamaan. Proteiini1:een liitettiin 5 kertaa myc-

peptidi sekä proteiini2:een liitettiin 3 kertaa HA-peptidi. Kokonaisista nimistä muodostui proteiini1\_5myc sekä proteiini2\_3HA. Taulukosta 1. voi nähdä kunkin geelin numeron ja näytemäärän, etsityn proteiinin ja sen massan sekä primääri vasta-aineen ja sekundaari vasta-aineen suhteet. Kontrollina analyyseissä toimi CHS-proteiini.

Taulukko 1. Proteiininäytteet ja vasta-aine-suhteet coomassie-värijäys- ja immunoblotaus-analyyseissä.

Geeli + näytemäärä	Proteiini	1 SB	2 LD	3 SB	4 LD	5 SB	6 LD
Geeli 10: 15 µl	proteiini1_5myc 88 kD	Primääri 1 : 10 000, sekundaari 1 : 25 000					
Geeli 11: 7,5 µl	CHS 43 kD	Primääri 1 : 2 500, sekundaari 1 : 8 000					
Geeli 12: 12 µl	proteiini2_3HA 81,5 kD	Primääri 1 : 1 000, sekundaari 1 : 10 000					
Geeli 13: 12 µl	proteiini2_3HA 81,5 kD	Primääri 1 : 2 500, sekundaari 1 : 25 000					

#### 8.4.1 Proteiinin eristäminen ja konsentraation mittaaminen

Proteiinin eristykseen otettiin 10 tainta/näyte ja niiden joukkoon lisättiin uuttopuskuri. Taimet hajotettiin sekä sekoitettiin puskurin kanssa käyttäen survinta. Näytteet sentrifugoitiin, ja supernatantista mitattiin konsentraatio tulevaa coomassie-värijäystä ja immunoblottausta varten. Näytteet pakastettiin -20 asteiseen pakastimeen.

Näytteisiin lisättiin SB (*sample buffer*) eli Laemmli-näytempuskuria. Toiseen näytesarjaan kokeiltiin LD (*loading dye*)-puskuria. SB-puskuria keitetäessä siinä oleva  $\beta$ -merkaptotetanolini denaturoi proteiinit, mistä johtuen proteiinien muodot eroavat toisistaan. SB-puskurin kanssa proteiinit ovat avautuneet ja LD-puskurin kanssa ne ovat omassa laskostuneessa muodossaan, mikä voi vaikuttaa proteiinien esiintyvyyteen ja näkyvyyteen tuloksissa.

#### 8.4.2 SDS-PAGE

Ensin tehtiin geelit SDS-PAGE menetelmällä. Geelejä tehtiin rinnakkaiset ja niissä eroteltiin kaikki kuusi näytettä. Näytteet valmistettiin niin, että ne kaikki sisälsivät saman proteiinipitoisuuden 65 µg/µl. Näytteeseen lisättiin puskuria ja vettä saavuttaen 97.5 µl tilavuus. Ennen näytteiden pipetoimista geeliin, SB-puskuria sisältäviä näytteitä keitettiin viiden minuutin ajan ja niiden annettiin jäähtyä huoneen lämpöiseksi. Geeli numero 10 ajettiin 15 µl:n ja geeli numero 11 7.5 µl:n näytemäärillä ja geelit 12 ja 13 12 µl:n näytemäärillä. Kaikille geeleille suoritettiin rinnakkaisajo ja geelit jaettiin coomassie-värjäyksen ja immunoblottauksen kesken.

#### 8.4.3 Coomassie-värjäys

Puolet SDS-PAGE-geleistä siirrettiin coomassie-värjäykseen. Ensin niitä pestiin tislattulla vedellä 3 x 10 minuuttia. Tämän jälkeen geelejä inkuboitiin tunnin ajan Gel Code Blue Stain Reagent -liuoksessa, joka antoi proteiiniraidoille sinisen värin. Coomassie-värjäys näyttää kaikki proteiinit joita geeliin on erottunut elektroforeesissa.

#### 8.4.4 Immunoblottaus

SDS-PAGE:lla erotellut proteiinit siirrettiin geeliltä kalvolle sähkövirran avulla. Kalvot pestiin puskurilla 3 x 10 minuutin ajan, jonka jälkeen niitä inkuboitiin vuorokauden ajan ensisijaisen vasta-aineen kanssa. Ylimääräiset vasta-aineet pestiin puskurilla 6 x 5 minuutin ajan ja sen jälkeen kalvoja inkuboitiin vasta-aineen vasta-aineella yhden tunnin ajan. Tämän jälkeen näytekalvoja inkuboitiin muutaman minuutin ajan ECL-kemiluminesenssireagenssilla, jolloin merkkiaine kiinnittyy vasta-aineen vasta-aineeseen ja tekee proteiiniraidoista näkyvät. Viimeisessä vaiheessa kemiluminesenssin annettiin valottaa filmi pimeässä huoneessa.

## 8.5 RNA:n eristäminen ja optimaalisten RT-PCR kierrosmäärän testaus

Kolmesta kahden eri transgeenin sisältävästä kasvista kerättiin 5 tainta RNA-eristystä sekä PCR:ää varten. Seitsemästä muusta kasvista kerättiin 20 tainta. Näytteiden lisäksi koeputkeen laitettiin pieni kuula, jonka tehtävänä oli hajottaa taimet pieniksi paloiksi sekoittajassa. RNA-eristys tehtiin InviTrap Spin Plant RNA Mini -kitillä. RNA-näytteet pidettiin aina jäähauteessa ja yön yli ne säilöttiin -70 asteiseen pakastimeen.

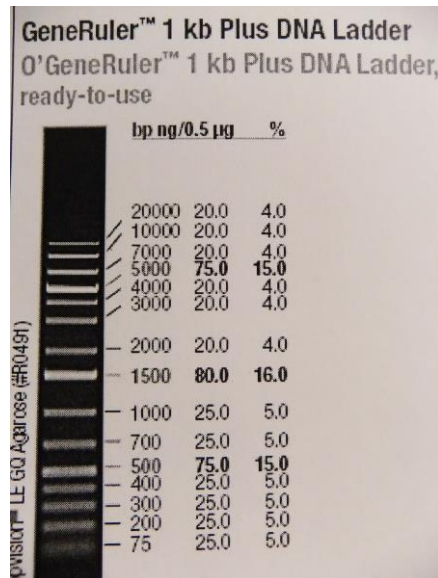
Kymmenestä näytteestä eristettiin cDNA sekä cDNA johon lisättiin DNase-entsyymi. Näistä näytteistä valittiin kolme kutakin PCR kierrostestaukseen. Kierrostestauksia tehtiin neljällä eri kierrosmäärällä, jotta tiedettäisiin millä kierrosmäärällä näytteistä saadaan geenituotteet parhaiten esille. Kierrostestaukset tehtiin  $\beta$ -tubulinin sekä molempien siirtogeenien raitojen havaitsemiseksi. Jokaiseen PCR-näyteputkeen laitettiin 1  $\mu$ l näytettä ja 11,5  $\mu$ l PCR Mixiä ja näin saatiin neljä kuuden näytteen sarjaa. Mix oli valmistettu sen mukaan, mitä geenituotetta geelielektroforeesissa etsittiin. Sarja sisälsi aina kolme näytettä jossa oli tuotteena cDNA sekä kolme samaa näytettä tuotteena cDNA ja DNase-entsyymi. Yksi sarja otettiin pois kunkin kierrosmäärän täytyttyä ja kun kaikki näytteet olivat käyneet PCR laitteessa, ne pipetoitiin elektroforeesiin.

## 9 Tulokset

Tuloksissa käsitellään selvinneet optimaaliset PCR-kierrosmäärät sekä RT-PCR tulokset kymmenen kasvin osalta. Myös kolmen T3-linjan kasvin proteiini-analyysien tuloksia coomassie-värjäyksen ja immunoblotausmenetelmän osalta on kuvattu myöhemmin. Näissä proteiini-analyysissä oli mukana kaksi eri puskuria sekä myös kolmatta tapaa proteiini-näytteiden saamiseksi kokeiltiin RNA-eristyksen yhteydessä.

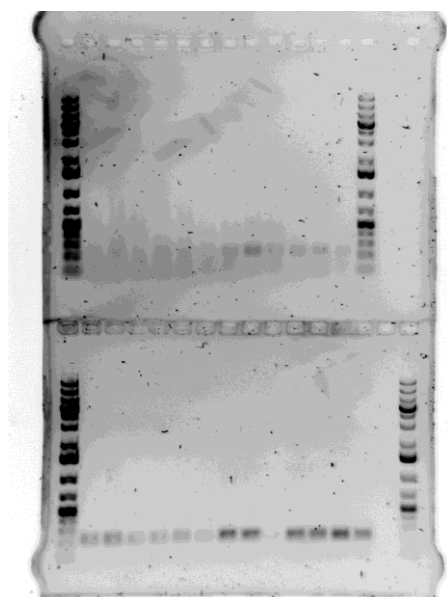
## 9.1 Optimaaliset PCR-kierrosmäärät

PCR-testausta tehtiin jotta saatiin selvitettyä optimaalinen kierrosmäärä kullekin geenille. Geeliin pipetoitiin näytteiden lisäksi DNA:n pituuskontrolli, joka on esitetty kuviossa 2.



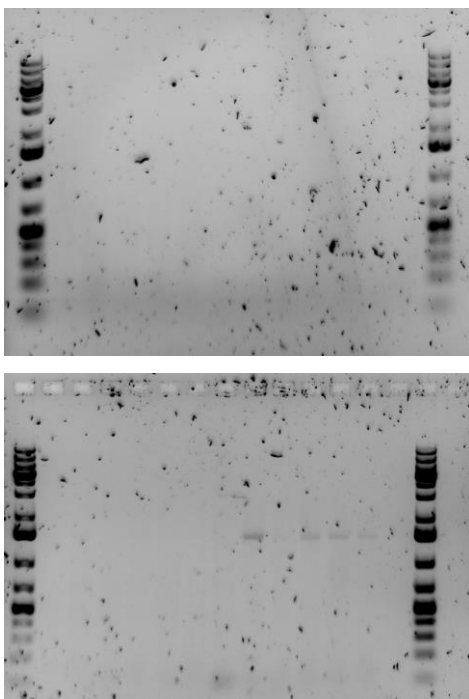
Kuvio 2. DNA:n pituuskontrollikartta

$\beta$ -tubulin ja geeni2 testattiin kierrosmäärillä 15, 20, 25 ja 30. Kuvio 3 osoittaa 25 kierrosmäärän olevan optimaalinen havaitsemaan  $\beta$ -tubulin raidat kohdassa 232 bp, kun elektroforeesia oltiin eroteltu 35 minuuttia. Kuviota 3 katsottaessa pituuskontrolli näkyy ensimmäisellä rivillä pipetoituna kaivoihin 1 ja 14, 15:n kierrosmäärän näytteet ovat kaivoissa 2-7 ja 20:n kierrosmäärän näytteet kaivoissa 8-13. Toisella rivillä pituuskontrolli on kaivoissa 1 ja 16 ja 25:n kierrosmäärän näytteet ovat kaivoissa 2-7 ja 30:n kierrosmäärän näytteet kaivoissa 8-9 ja 11-14, sekä negatiivinen kontrolli kaivossa 15. PCR kierrosmäärien ollessa 15 ja 20 raidat näkyvät hieman haaleina, kun taas kierrosmäärällä 30 raidat ovat liian tummia.



Kuvio 3. Kierrostestaus  $\beta$ -tubulin geenituotteen havaitsemiseksi.

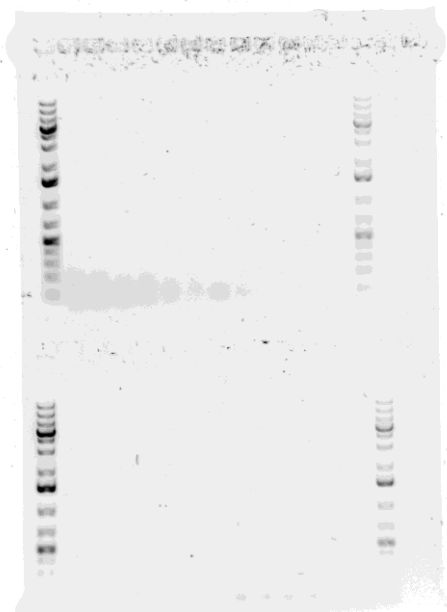
Kuviosta 4 voidaan nähdä kierrosmäärän 30 olevan optimaalinen geeni2 raitojen havaitsemiseksi kohdassa 1432 bp. Ensimmäisellä rivillä jossa pituuskontrollien välillä on eroteltu kierrosmäärät 15 ja 20, ei pystytä havaitsemaan laisinkaan geenin raitoja, kuten ei myöskään toisella rivillä kierrosmäärä 25 kohdalla, joka sijoittuu kaivoihin 2-7. PCR:n kierrosmäärä 30 erottuu himmeästi toisella rivillä kaivoissa 8-13. Geelielektroforesia eroteltiin 45 minuuttia.



Kuvio 4. Kierrostestaus geeni2:n havaitsemiseksi.



Geeni1:n geenituotetta testattiin kierrosmäärillä 20, 25, 30 ja 35. Geenituotteen pitäisi näkyä kohdassa 1492 bp, mutta kuten kuviosta 5 näkyy, geenituotetta ei pystytä havaitsemaan laisinkaan elektroforeesissa, jota oli eroteltu 40 minuuttia. Pituuskontrollit näkyvät kuitenkin selvästi reunoilla.



**Kuvio 5. Kierrostestaus geeni1:n havaitsemiseksi.**

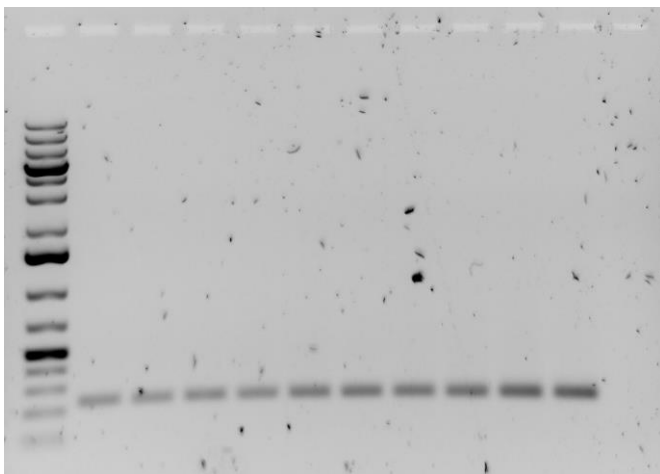
Kierrostestauksen jälkeen päätettiin, että kaikille kymmenelle näytteelle tehdään optimaalinen määrä PCR-kierroksia ja ne erotellaan geelielektroforeesilla 90 V 40 minuutin ajan. Näytteinä päätettiin käyttää ainoastaan cDNA näytteitä ja  $\beta$ -tubulinin havaitsemiseksi PCR kierrosmäärää 25 ja geeni2:n havaitsemiseksi 30 PCR kierrosta. Tulimme siihen tulokseen, että geeni1:n geenituotetta ei lähdetä erottelemaan näytteistä laisinkaan, koska sitä ei pystytty havaitsemaan kierrostestauksissa.

## 9.2 PCR-tulokset

Geelielektroforeesilla analysoitiin kymmenen T3-näytettä, jotka olivat monistettua cDNA:ta. Geeni2:n lisäksi analysoitiin  $\beta$ -tubulinin DNA:n pituus.  $\beta$ -tubulin toimii kontroligeeninä, jonka avulla pystytään havaitsemaan onko analyysi tehty oikein. Näytteet eroteltiin geelielektroforeesissa 90 V, 40 minuuttia.

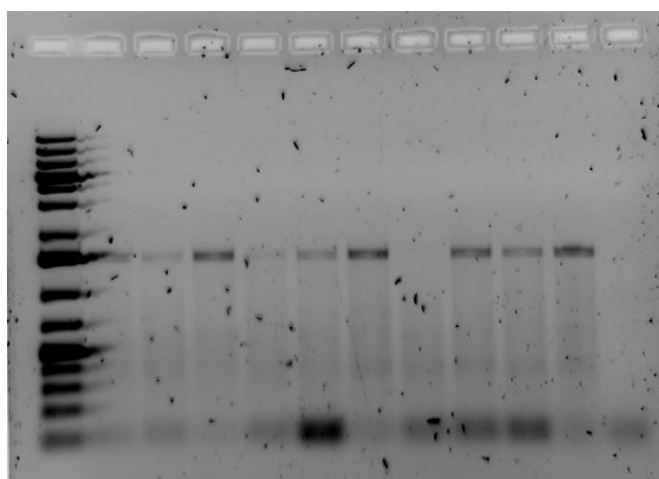
Näytteistä etsittiin  $\beta$ -tubulinin geenituotetta kohdasta 232 bp, joka kaikkien arabidopsis kasvien tulisi ilmentää. Kuviossa 6 aivan geelin alareunassa voidaan havaita välillä 200

ja 300 bp geeniraidat jokaisen näytteen kohdalla. Voimme olettaa tämän olevan etsimämme  $\beta$ -tubulinin geenituote ja näin ollen voidaan olettaa analyysin onnistuneen ongelmitta myös geeni2:n havaitsemiseksi. Geenituotetta ei näy kuitenkaan kaivon 12 kohdalla, johon negatiivinen kontrolli on pipetoituna.



**Kuvio 6. Geelielektroforeesi  $\beta$ -tubulin geenituotteen havaitsemiseksi.**

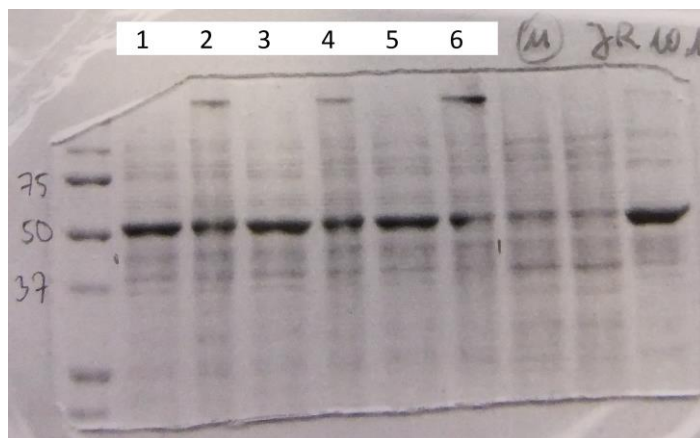
Kuviossa 7 geeliin on pipetoitu näytteet havaitsemaan geeni2. Ensimmäisessä kaivossa on DNA:n pituuskontrolli ja näytteet on pipetoitu kaivoihin 2-11. Kaivossa 12 on negatiivinen kontrolli. Geeni2:n pituus on 1432 bp ja raita joka voidaan nähdä 1500 bp kohdalla, voidaan olettaa sen olevan etsimämme geeni2. Jostain tuntemattomasta syystä näyte joka on pipetoitu kaivoon 8, ei ilmennä laisinkaan etsimäämme geeniä. Myöskään negatiivinen kontrolli ei ilmennä geeniä.



**Kuvio 7. Geelielektroforeesi geeni2:n havaitsemiseksi.**

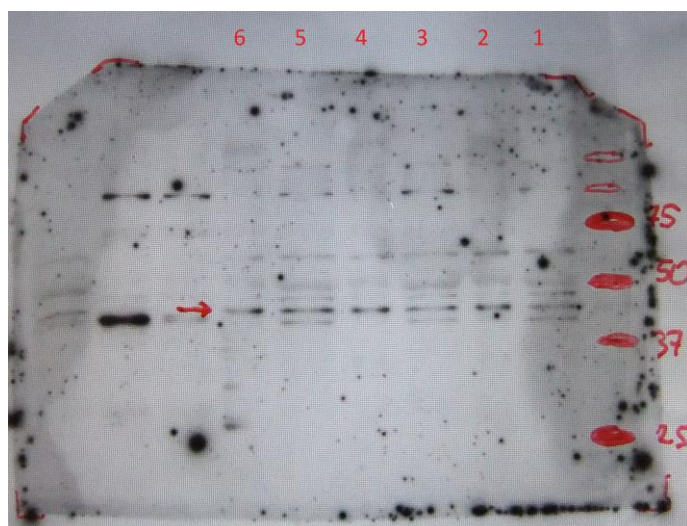
### 9.3 Proteiinimittausten tulokset

Geelissä numero 11 käytettiin CHS-proteiiniin kiinnittyvää primaarivasta-ainetta, joka toimi tässä menetelmässä kontrollinäytteenä. CHS-proteiiniraita näkyy coomassie-värjäyksessä himmeästi kohdassa 43 kD (kuvio 8). 50 kDa kohdalla näkyvä voimakas proteiiniraita kuuluu tunnetulle taustaproteiinille (Rubisco).



Kuvio 8. Coomassie-värjäys CHS-proteiinin havaitsemiseksi.

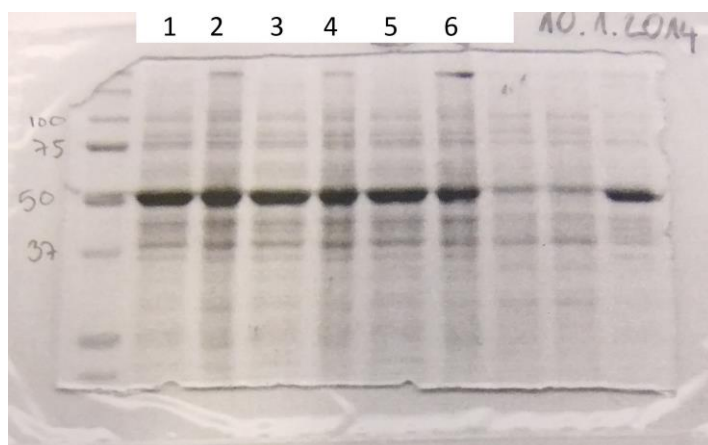
Myös immunoblottaus-kuvasta (kuvio 9) voidaan olettaa, että näkemämme raita massan 43 kD kohdalla on CHS-proteiini.



Kuvio 9. Immunoblottaus CHS-proteiinin havaitsemiseksi.

Proteiniiraidat näkyvät sekä SB- että LD-puskuria käytettäessä. Näissä kuvissa näkyy myös muita proteiini-raitoja, mitkä voivat johtua pienemmistä vasta-ainemääristä, primaarivasta-aineen ollessa 1:2 500 ja sekundaarivasta-aineen 1:8 000. Nämä CHS-proteiinikuvat kertovat, että coomassie-värijäys ja immunoblottaus ovat onnistuneet ja ne on tehty oikein.

Geelissä numero 10 selvitimme, löytyikö proteiinimassaltaan 88 kD olevan geeni1/proteiini1\_5myc tuotteen proteiiniiraitaa käyttämällä 5myc-osaan tarttuvaa primaarivasta-ainetta. Kuvioista 10 ja 11 voidaan nähdä ettei massan 88 kohdalla ole havaittavissa mitään, joten etsimäämme proteiinia ei voida havaita tällä testillä. Tämä voi johtua liian laimeasta vasta-aineiden laimennussuhteesta, jotka olivat primaarivasta-aineella 1:10 000 ja vasta-aineen vasta-aineella 1:25 000. Myöskään ei ole vielä pystytty luomaan tarvittavia ja spesifisiä olosuhteita havaitsemaan geeni1:n proteiinituotetta.

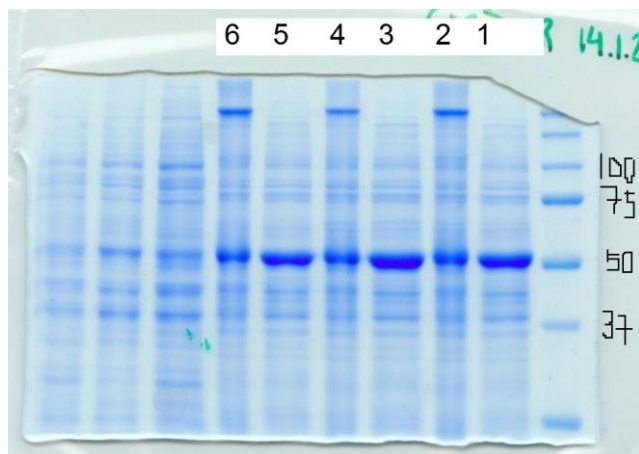


Kuvio 10. Coomassie-värijäys proteiini1\_5myc:n havaitsemiseksi.

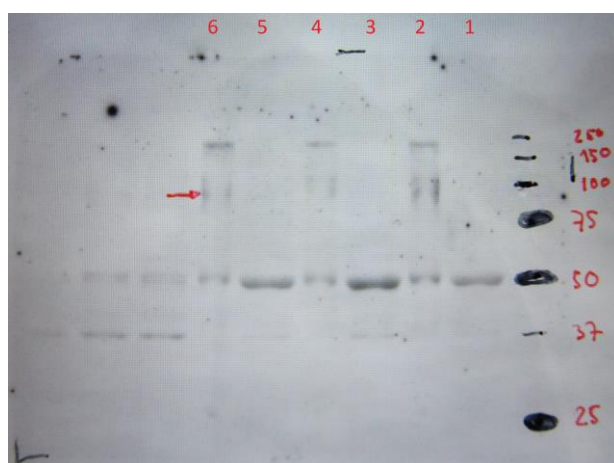


Kuvio 11. Immunoblottaus proteiini1\_5myc:n havaitsemiseksi.

Seuraavissa kahdessa geelissä (12 ja 13) etsittiin samaa proteiinia, proteiini2\_3HA:a, jonka 3HA-osaan primaarivasta-aine tarttuu. Proteiinin yhteismassa on 81,5 kD. Testeissä käytettiin eri vasta-aiheen laimennossuhteita. Geelissä 12 käytetyt vasta-ainemäärät olivat suuremmat ja kyseisessä geelissä voidaan havaita näytteissä 2, 4 ja 6 proteiiniiraidan reunat massan 81,5 kD kohdalla (kuvio 12 ja 13).



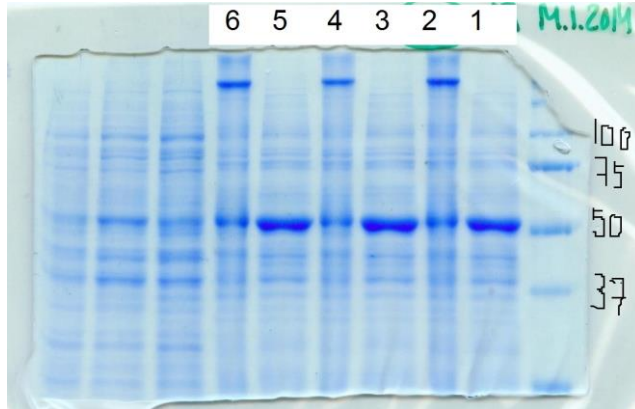
Kuvio 12. Coomassie-värijäys proteiini2\_3HA:n havaitsemiseksi.



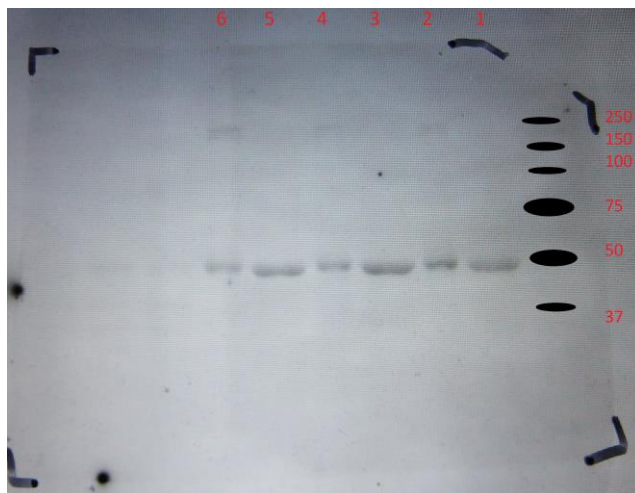
Kuvio 13. Immunoblottaus proteiini2\_3HA:n havaitsemiseksi.

Voimme olettaa kyseisten proteiiniiraitojen olevan etsimämme proteiini2\_3HA:n tuottama proteiiniiraita. Proteiiniiraitojen päät näkyvät siis vain näytteissä, joissa puskurina on käytetty LD-puskuria. Näissä näytteissä proteiinit ovat omassa ominaisessa muodossaan, koska niitä ei ole denaturoitu keittämällä. Koska sekä coomassie-värijäyksessä että immunoblottauksessa voidaan havaita vain proteiiniiraitojen päät on mahdollista, että SDS-PAGE:ssä näytteet on eroteltu geelissä liian nopeasti.

Geelissä 13 vasta-aineiden laimennussuhteet olivat laimeammat. Mahdollisesti tästä syystä proteiini2\_3HA:n proteiiniraidat eivät ole havaittavissa coomassie-värjäyksessä eikä immunoblottausmenetelmällä massan 81,5 kD kohdalla (kuvio 14 ja 15).



Kuvio 14. Coomassie-värjäys proteiini2\_3HA:n havaitsemiseksi.



Kuvio 15. Immunoblottaus proteiini2\_3HA:n havaitsemiseksi.

Kaikissa neljässä näytteessä voidaan havaita proteiiniraita massojen 150 ja 250 kD välissä, LD-puskuria sisältävissä näytteissä. Tätä ei voitu selvittää rajallisen ajankäytön vuoksi, mutta pohdittiin voisiko se mahdollisesti olla jotain, jossa on mukana sekä proteiini1\_5myc ja proteiini2\_3HA proteiinituotteet. Näiden yhteismassa kun on 169.5 kD.



## 10 Pohdinta

Opinnäytetyöni tavoitteena oli seuloa eri arabidopsislinjoja ja selvittää siirtykö transgeeni Mendelin periaatteen mukaisesti sukupolvelta toiselle. Näitä transgeenisia linjoja seulottiin geneettisin analyysein selvittäen proteiinien ilmentymistä coomassie-värjäys- ja immunoblottausmenetelmillä sekä geenien olemassa oloa RT-PCR-tekniikalla. Alkuperäisten suunnitelmien mukainen kasvien fenotyyppinen tarkastelu ei onnistunut yhtä laajasti kuin oli odotettu. Työskentelyvaiheessa tarkastelimme taimien fenotyyppisiä, mutta aika ei riittänyt T3-kasvien fenotyyppien tarkasteluun kasvihuoneella.

Seulonta aloitettiin T2-vaiheen kasveista, joista kolme linjaa 11:sta oli oikein periytyneet. Nämä taimet laitettiin kasvamaan kasvihuoneelle T3-vaiheen seulontaa varten, joita tässä opinnäytetyössä ei kuitenkaan ehditty tarkastella. T3-vaiheen kasveille tehdyssä seulonnassa periytymisen täytyy tapahtua 100 %, joten kaikkien samalle kasvatusaljalle kasvamaan laitettujen siementen on idettävä ja kasvettava. Tässä työssä 56 kasvista 12 seulottiin homotsygooteiksi. Proteiini-analyysejä tehtiin kolmelle homotsygoottiselle kasvinjalalle jotka kasvoivat antibioottia ja herbisidiä sisältävillä kasvatusaljoilla. Geneettisiä analyysejä puolestaan tehtiin näiden kuuden linjan lisäksi myös neljälle mutanttilinjalle.

Coomassie-värjäys- ja immunoblottausmenetelmillä pyrittiin selvittämään ilmentävätkö integroidut geenit proteiineja. Näiden geenien tuottamien proteiinien massa tiedettiin ennalta. Geeni1:n tuottamaa proteiiniä ei pystytty havaitsemaan kummassakaan analyysissä, mikä voi johtua käyttämästämme liian laimeasta vasta-aineen laimennussuhteesta. Proteiinin havaitsemiseksi ei myöskään ole vielä pystytty luomaan spesifisiä olosuhteita. Geeni2:n koodaamaa proteiinia selvitettiin kahdella eri vasta-ainemäärällä. Geelissä ja kalvolla jossa proteiinit oli eroteltu pienemmällä vasta-ainemäärällä, ei pystytty havaitsemaan kyseistä proteiinituotetta. Geelissä ja kalvolla joissa on käytetty suurempia vasta-ainemääriä, proteiinien päät pystytään havaitsemaan käytettäessä LD-puskuria. Vain proteiinien päiden näkyminen geelissä voi johtua liian nopeasta erottelusta. Voimme siis olettaa havaitun raidan olevan etsimämme proteiinituote. Koska proteiinit pystyttiin havaitsemaan vain näytteissä, joissa on käytetty LD-puskuria, voimme arvella tämän menetelmän sopivan kun proteiinit ovat omassa ominaisessa muodossaan, ei kun ne ovat denaturoituna SB-puskurilla. Jatkossa voidaan kokeilla

näytteiden käsittelemistä vain LD-puskurilla sekä proteiinien erottelua geeliin hieman hitaammin.

Saadaksemme parempia tuloksia proteiini-analyyseistä ja jotta meillä olisi kontrollinäytteen laadun arvioimiseen, samat analyysit tehtiin myös CHS-proteiinille. Voimme olettaa kontrollina toimivan CHS-proteiinin näkyvän molempien analyysien tuloksissa oman massansa kohdalla, ja näin ollen voimme luottaa oman työmme tuloksiin coomassie-värijäyksen ja immunoblottauksen osalta. Mikäli aika olisi riittänyt rinnakkaisanalyysiin, olisimme voineet kokeilla eri vasta-aineiden laimennussuhteita sekä geeliin erottelua hitaammalla nopeudella.

Geenituotteita monistettiin PCR:llä cDNA ja cDNA ja DNase-ensyymi näytteistä. Näillä kahdella vertailunäytteellä tehtiin monistuksen kierrostestaus, selvittääksemme optimaalinen kierrosmäärä kunkin geenin havaitsemiseen. Kutakin geeniä monistettiin neljällä eri kierrosmäärällä, jonka jälkeen ne eroteltiin geelielektroforeesissa havaittaviksi raidoiksi. Kontrolligeeninä käytettiin  $\beta$ -tubulin-geeniä, jonka optimaaliseksi kierrosmääräksi todettiin 25. 15 ja 20 monistuskierrokset antoivat hieman epätarkat raidat sekä 30 liian tummat. Geeni2:n DNA-raita pystyttiin havaitsemaan himmeästi ainoastaan PCR-monistuskierroksien ollessa 30, muilla kierrosmäärillä (15, 20 ja 25) geenituotetta ei pystytty havaitsemaan laisinkaan. Geeni2:n kohdalla optimaalisen monistuskierrosmäärän määrittämisen suhteen ei siis ollut epäselvyyttä. Ajan salliessa olisimme voineet kokeilla vieläkin useampaa monistuskierrosta. Emme onnistuneet luomaan optimaalisia olosuhteita geeni1:n havaitsemiseen, joten tämän geenin kohdalla emme saaneet näkyviä geenituotteita elektroforeesissa laisinkaan. Tästä syystä emme monistaneet näytteitä geeni1:n löytämiseksi.

PCR-kierrostestauksen jälkeen työstimme tuloksia kymmenestä näytteestä  $\beta$ -tubulinin ja geeni2:n osalta. Tiesimme optimaalisen kierrosmäärän monistukselle ja päätimme käyttää ainoastaan cDNA:sta koostuvia näytteitä. Kaikkien kasvien tulisi ilmentää etsimäämme geenituotetta, sillä olimme seuloneet ne aikaisemmin homotsygooteiksi. Geelielektroforeesi geeni2:n havaitsemiseksi onnistui hyvin ja siinä pystyttiin havaitsemaan geenituote oikealla kohdalla. Voimme olettaa sen olevan etsimämme geeni2. Tuntemattomasta syystä johtuen kaivossa 8 oleva kasvi ei ilmentänyt kyseistä geenituotetta tässä analyysissä. Kontrollina toiminut  $\beta$ -tubulinin geenituote pystyttiin havaitsemaan oikealla kohdalla sekä jokaisessa näytteessä. Tämän tuloksen myötä voimme luottaa työmme laatuun PCR:n ja elektroforeesin kohdalla.



Sekä proteiini- että geenituotteiden havaitsemiseksi tehdyissä analyyseissa mukana olleet kontrollit toimivat moitteetta. Tästä johtuen voimme luottaa työmme tuloksiin sekä käyttää tuloksia jatkossa. Joitakin tuloksia voidaan käyttää jatkojalostuksessa luomaan optimaalisia olosuhteita, kuten geeni1/proteiini1 kohdalla huomattiin. Vaikka kasvit on seulottu homotsygooteiksi, kyseinen geeni on vaikea saada ilmentymään geneettisissä analyyseissä niin kauan, kunnes sille pystytään luomaan optimaaliset olosuhteet.

Työskentely tutkimuslaboratoriossa oli erittäin antoisaa ja mielenkiintoista, vaikkakin tutkimuksen ymmärtäminen ja asioiden yhdistäminen oli aika-ajoin todella haastavaa. Haastetta ymmärtämiseen lisäsi työnteko englanninkielellä sekä aikaisempi vähäinen tieto kasveista. Työskentely ja opinnäytetyön tekeminen tutkimusryhmässä oli erittäin opettavainen kokemus ja se antoi mahdollisuuden tutustua erilaiseen bioanalyytikon työskentely-ympäristön. Olen erittäin tyytyväinen saadessani kosketusta ihmisbiologian lisäksi myös kasvien biologiaan.

## Lähteet

About Arabidopsis. Functional Genomics of Arabidopsis P450s. NSF 2010. Verkkodokumentti. <[http://arabidopsis-p450.biotech.illinois.edu/About\\_Arabidopsis.shtml](http://arabidopsis-p450.biotech.illinois.edu/About_Arabidopsis.shtml)>. Luettu 10.2.2014.

Bilicka, Marcelina 2014. Training and thesis of Jenna Roivas – entry presentation. PowerPoint.

Brown, T.A. 2010. Gene Cloning and DNA analysis. 6th ed. West Sussex: Wiley-Blackwell.

Ciechanover, Aaron - Hershko, Avram - Rose, Irwin 2004. "The 2004 Nobel Prize in Chemistry - Popular Information". Nobelprize.org. Nobel Media AB 2013. Verkkodokumentti.

<[http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/2004/popular.html](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2004/popular.html)>. Luettu 30.9.2013.

Himanen, Kristiina <kristiina.himanen@helsinki.fi> 2013. Opinnäytetyön suunnitelma. Henkilökohtainen sähköpostiviesti 20.12.2013.

Himanen, Kristiina 2012. Projektisuunnitelma. Helsinki.

Kreuzer, Helen - Massey, Adrienne 2001. Recombinant DNA and Biotechnology, A Guide for Students. 2nd ed. Washington, DC: ASM Press.

Lesk, Arthur M. 2005. Introduction to Bioinformatics. 2nd ed. New York: Oxford University Press Inc.

Lituruoho. Luontoportti. Verkkodokumentti.  
<<http://www.luontoportti.com/suomi/fi/kukkakasvit/lituruoho>>. Luettu 26.9.2013.

Mäki-Kihniä, Nina 2013. Kukan kehitystä ohjaavat ubikitiinisignaalit. Suomen akatemia. Verkkodokumentti. <[http://www.aka.fi/fi/T/Nuoret/Uusin-silmin/Esittelyssa-kuukauden-tutkija/Kukan-kehitysta-ohjaavat-ubikitiinisignaalit/-/](http://www.aka.fi/fi/T/Nuoret/Uusin-silmin/Esittelyssa-kuukauden-tutkija/Kukan-kehitysta-ohjaavat-ubikitiinisignaalit/)>. Luettu 3.12.2013.

Protocol Online 2013. Verkkodokumentti. <[http://www.protocol-online.org/prot/Molecular\\_Biology/RNA/cDNA/index.html](http://www.protocol-online.org/prot/Molecular_Biology/RNA/cDNA/index.html)>. Päivitetty 7.12.2013. Luettu 6.2.2014.

Solunetti 2006. Solubiologia. Plasmidit. Verkkodokumentti. <<http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/plasmidit/2/>>. Luettu 17.10.2013.

Staining Protein Gels with Coomassie Blue. Electrophoresis. National diagnostics. Verkkodokumentti.

<<https://www.nationaldiagnostics.com/electrophoresis/article/staining-protein-gels-coomassie-blue>>. Luettu 11.2.2014.

Suominen, Ilari - Pärssinen, Raimo - Haajanen, Kari - Pelkonen, Jani 2010. Geeniteknikka. Turun ammattikorkeakoulun oppimateriaaleja 52. Saarijärvi: Saarijärven Offset Oy.

Tenhunen, Jukka - Ulmanen, Ismo - Yläne, Jari 2009. Geeni ja biotekniikka. 6.8. painos. Helsinki: WSOY Oppimateriaalit Oy.

Wenk, Markus R. - Zefrin Fernandis, Aaron 2007. A Manual for Biochemistry Protocols. Manuals in Biomedical Research Vol. 3. Singapore: World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd.

Wilson, Zoe A. 2000. Arabidopsis: a practical approach. New York: Oxford University Press Inc.

Xiuren, Zhang – Rossana, Henriques - Shih-Shun, Lin - Qi-Wen, Niu - Nam-Hai, Chua 2006. Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana using the floral dip method. Nature Protocols 1. 641-646. Luettavissa myös sähköisesti osoitteessa <<http://www.nature.com/nprot/journal/v1/n2/full/nprot.2006.97.html>>.