

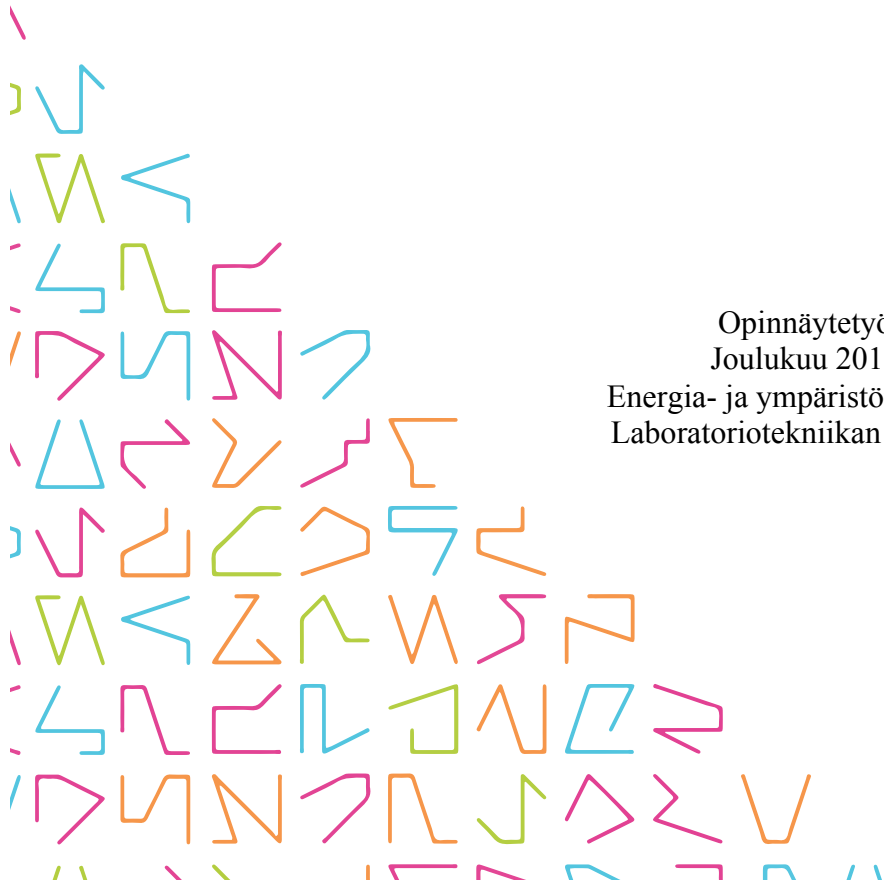


TAMPEREEN
AMMATTIKORKEAKOULU

2A-PROTEAASIN KLOONAUS, TUOTTO JA KARAKTERISOINTI

Meelike Soosaar

Opinnäytetyö
Joulukuu 2016
Energia- ja ympäristötekniikka
Laboratoriotekniikan koulutus



TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu
Energia- ja ympäristötekniikka
Laboratoriotekniikan koulutus

SOOSAAR, MEELIKE:

2A-proteaasien kloonaukset, tuotto ja karakterisointi

Opinnäytetyö 62 sivua, joista liitteitä 15 sivua
Joulukuu 2016

Enterovirus-suvun edustajat tunnetaan laajalti patogeeneinä, jotka aiheuttavat ihmisille muun muassa polion, enterorokon, yleisen flunssan ja sydänläppätulehduksen kaltaisia tauteja. Viruksen lisääntymisen ja siten infektioiden leviämisen kannalta olennaisessa roolissa ovat viruksen omat post-translacionaaliset polypeptidin pilkkoutumiseen osallistuvat 2A- ja 3C-proteaasit. Tutkimalla kyseisten proteaasien aktiivisuuksia ja etsimällä niiden aktiivisuutta inhiboivia yhdisteitä, voidaan mahdollisesti kehittää antiviraalisia yhdisteitä, joilla estetään virusten aiheuttamia vakavia tauteja.

Työn tavoitteena oli tuottaa 2A-proteaaseja *E.coli*-bakteerisoluihin ja tutkia niiden ominaisuuksia sekä mahdollista aktiivisuutta. Työn kohteena oli yhdeksän eri enteroviruslajin 2A-proteaasia. Työn tarkoituksena oli kloonata his-tagilliset 2A-proteaasien geenit osaksi plasmidi-vektoria ja transformoida ne haluttua proteiinia yli-ilmentäviin *E.coli*-bakteerisoluihin. Tuotto-olosuhteiden optimoinnin jälkeen 2A-proteaasit puhdistettiin affiniteettikromatografialla, jonka jälkeen niiden ominaisuuksia tutkittiin erilaisin biokemiallisin menetelmin. Työ suoritettiin Tampereen Yliopiston proteiinidynamiikan tutkimusryhmään vakiintuneilla ja hyväksi todetuilla biokemiallisilla menetelmillä.

Työn tulokset olivat mielenkiintoiset ja paikoin odottamattomat. Suurin osa kohdeproteiineista tuottuivat. Kuitenkin johtuen joidenkin proteiinien pienestä konsentraatiosta, niiden havaitseminen ei ollut selkeää vasta-aineväryksissä. Samasta syystä myös aktiivisuuskokeiden ja vasta-ainevärysten tulokset olivat paikoin ristiriidassa. Useassa tapauksessa proteiinia menetettiin dialyysissä aggregoitumisen vuoksi. Kaikilla aktiivisuuskokeissa mukana olleilla 2A-proteaaseilla mitattiin kyky pilkkoa kohdepeptidiä. Työn ohella, ilman varsinaista tarkoitusta, todettiin nikkelin ja EDTA:n vaikuttavan merkittävästi 2A-proteaasien aktiivisuuksiin.

Työ tehtiin osana suurempaa virustutkimusta ja työn tuotteita sekä tuloksia tullaan käyttämään tulevaisuudessa tieteellisen julkaisun kirjoittamiseen ja jatkotutkimuksien tekemiseen. Proteaasien tutkimus jatkuu eri 2A-proteaasien kineettisten ominaisuuksien määrittämisen sekä niiden aktiivisuutta inhiboivien pienmolekyylien etsimisen parissa.

Asiasanat: 2A-proteaasi, bakteerisoluihin, tuotto, karakterisointi

ABSTRACT

Tampereen ammattikorkeakoulu
Tampere University of Applied Sciences
Degree Programme in Laboratory Engineering

SOOSAAR, MEELIKE:
2A Protease Cloning, Production and Characterization

Bachelor's thesis 62 pages, appendices 15 pages
December 2016

Representatives of *enterovirus* family are known as big virus pathogens, which cause a variety of diseases in humans, for example polio, hand, food and mouth disease, common cold and inflammation of the cardiac valve. 2A- and 3C proteases have a significant role in the onset of virus infection and reproduction. These proteases cleave virus's own post-translational polyprotein which allows formation of many vital functional protein for the virus. By studying these proteases, their activity and finding possible inhibitors for them, it is possible to develop antiviral medicine that prevents serious virus infection.

The aim of this thesis was to produce 2A proteases in *E.coli* bacterial cell and study their properties and possible activities. Nine different *enterovirus* species were studied. The main objective was to clone his-tagged 2A protease genes into plasmid vector and transform them into protein production *E.coli* cells in which the target protein would be over-expressed. After optimizing protein production conditions the 2A proteases were purified by affinity chromatography. After purification, it was possible to study the target proteins' properties via various biological techniques. Methods established and proven by the protein dynamics research group at Tampere University were followed in the process.

The results of this study were interesting and surprising. Most of the target protein were successfully produced. Sometimes reading a positive result from antibody staining was not easy because the concentration of target protein was low. For the same reason, the activity tests' results and western blot results were at odds with each other in some situations. There were also challenges with dialysis due to target protein aggregation. The ability to cleave target polypeptide was measured from those constructs which were subjected to an activity test. As a side product of the analyses conducted, it was detected that nickel and EDTA influence the activities of 2A proteases.

This thesis was made as a part of a more extensive virus research and in future its products and results will be used in scientific publication and further research. Protease research will continue by measuring kinetic feature of various 2A proteases and searching small molecular inhibitors for them.

Key words: 2A protease, bacteria cell, production, characterization

SISÄLLYS

1	JOHDANTO.....	8
2	VIRUSTEN TIETEELLINEN LUOKITTELU	9
3	PROTEAASIT	11
4	MITTAUS- JA MÄÄRITYSMENETELMÄT	14
4.1	Näytteiden kuvaus	14
4.2	TOPO-kloonaus	15
4.2.1	Transformaatio Top10 <i>E.coli</i> -soluhin	15
4.2.2	Plasmidin eristys ja sekvensointi	16
4.3	Proteiinin tuotto BL21 <i>E.coli</i> -solussa.....	17
4.3.1	Geenin ilmentyminen.....	17
4.3.2	Solujen hajotus.....	18
4.4	Proteiinin puhdistus	19
4.4.1	IMAC-tekniikka	19
4.4.2	Dialyysi ja lyofilisointi	21
4.5	Karakterisointi	21
4.5.1	SDS-PAGE ja proteiinivärjäys	21
4.5.2	Western blot ja vasta-ainevärjäys	22
4.5.3	Aktiivisuusmittaukset fluoresenssispektrometrilla	23
5	TYÖN SUORITUS	24
5.1	Kloonaus, plasmidin eristys ja sekvensointi	25
5.2	Tuotto.....	26
5.3	Puhdistus.....	27
5.4	Karakterisointi	28
6	TULOKSET	31
6.1	Plasmidin eristys ja sekvensointi	31
6.2	Tuotto, puhdistus, vasta-aine- ja totaaliproteiinivärjäys.....	31
6.3	Aktiivisuusmittaukset	35
6.4	Yhteenvedo aktiivisuusmittaukset, vasta-aine- ja totaaliproteiinivärjäys	39
7	TULOSTEN TARKASTELU	40
7.1	Kloonaus, plasmidin eristys ja sekvensointi	40
7.2	Tuotto ja puhdistus	40
7.3	Aktiivisuusmittaukset	42
8	POHDINTA	44
	LÄHTEET.....	46
	LIITTEET	48
	Liite 1. TOPO-kloonausprotokolla.....	48

Liite 2. Miniprep-protokolla.....	49
Liite 3. Soilin sekvensointireaktio ohje.....	50
Liite 4. Lista käytetyistä laitteista ja tuotteista.....	51
Liite 5. Esimerkki NanoDrop-spektrometrin antamasta tuloksesta (plasmidi)	52
Liite 6. BL21-tuotto RVC3 ja CDC7 vasta-aine- ja totaalivärjäys	53
Liite 7. BL21-tuotto CDC16, HRV16 ja PV1 vasta-aine- ja totaalivärjäys.....	54
Liite 8. BL21-tuotto CDC16, HRV16 vasta-aine- ja totaalivärjäys.....	56
Liite 9. BL21-tuotto EV71, CDC11 & 3Nancy vasta-aine- ja totaalivärjäys ..	57
Liite 10. BL21-tuoton dialysoidut näytteet vasta-aine- ja totaalivärjäys	59
Liite 11. C43-tuotto HRV16, CDC11 & 3Nancy vasta-aine- ja totaalivärjäys	60
Liite 12. C43-tuotto CDC7, RVC3 & PV1 vasta-aine- ja totaalivärjäys	61
Liite 13. C43-tuotto EV71 & CDC16 vasta-aine- ja totaalivärjäys	62

ERITYISSANASTO

Blokkaus	tapahtuma, jossa estetään ei-toivotut sitoutumiset kalvoon kyllästämällä sitoutumiskohdat haittattomalla yhdisteellä
DABCYL	työssä FRET-parin toinen osa, joka toimii parin sammuttajana absorboimalla EDANS:lta saadun energian
Dialyysi	näyteliuoksen puskurin vaihtomenetelmä, jossa puskuri vaihtuu diffuusion avulla puoliläpäisevän kalvon läpi
dsDNA	kaksijuosteinen DNA
Domeeni	työssä proteiinin itsenäisesti toimiva toiminnallinen- tai rakenteellinen yksikkö
EDANS	työssä FRET-parin ensimmäinen osa, joka absorboi siihen tulleen energian ja emittoi sen
Elektroforeesi	tapahtuma, jossa sähkövirran avulla ajetaan varautuneita partikkeleita geelimatriisissa
Etanolipresipitaatio	etanolisaostus, menetelmä jolla puhdistetaan ja konsentroidaan näytettä
FRET-pari	fluoresenssiresonanssienergian siirtopari
Histidiini	aminohappo
IMAC	immobilisoitu metalliaffiniteettikromatografia
Imidatsoli	heterosyklinen aromaattinen yhdiste
Imidatsoligradietti	nouseva imidatsolipitoisuus
Immobilisoida	tehdä liikkumattomaksi
Indusointi	proteiinituoton käynnistys
IPTG	isopropyylitiogalaktosidi, työssä laktoosianalogi
Kemiallisesti kompetentti solu	solu, jonka solukalvo on kemiallisesti herkistetty ottamaan sisäänsä geneettistä materiaalia
Laktoosianalogi	aine, joka on kemiallisilta ominaisuuksiltaan laktoosin kaltainen
Lyofilisointi	kylmäkuivaus
Monoklonaalinen	vasta-aineelle spesifinen

mRNA	lähetti-RNA
pI	isoelektrinen piste
Plasmidi	useissa bakteerisoluiissa luonnostaan esiintyvä rengasmaisen kaksijuosteinen DNA
Proteaasi	yleisnimitys proteiinia pilkkovalle entsyymille
Proteiinin aggregaatio	proteiinin laskostuminen joko osittain tai täysin inaktiiviseen muotoon
Rekombinantti	geneettisesti muunneltu
SDS	natriumdodekyylisulfaatti
Sekvensointi	nukleotidi- tai aminohappojärjestyksen selvittäminen, useita menetelmiä
Sonikointi	solunhajotusmenetelmä ultraäänillä
ssRNA	yksijuosteinen RNA
String-konstrukti	lineaarinen muunneltu DNA
Supernatantti	sedimentoituneen suspension kirkas liuos
Suuntaava kloonauus	kloonauusmenetelmä, jossa geenisekvenssi voi asettua vain yhdellä oikealla tavalla osaksi vektorin ylijosteiden avulla
TOPO-kloonauus	kloonauustekniikka, jossa ligaasina ja energian lähteenä toimii topoisomeraasi-entsyymi
Transformaatio	geneettisen materiaalin siirtyminen organismista toiseen
Vektori	DNA:n kuljettaja esim. plasmidi tai virus

1 JOHDANTO

2A-proteaasi on useissa viruksissa esiintyvä, tiettyä viruksen toiminnan kannalta tärkeää polypeptidiä pilkkova proteiini. 2A-proteaasien aktiivisuuden häiriintyessä oletetaan koko viruksen infektointimekanismin ja lisääntymisen häiriintyvän. Työssä tutkitaan *Enterovirus*-sukuun kuuluvien kuuden eri lajin 2A-proteaaseja. Nämä lajit ovat *Enterovirus A-C* ja *Rhinovirus A-C*. Tutkittavia 2A-proteaaseja on yhteensä yhdeksän kappaletta eri viruslajeista, jotta saataisiin mahdollisimman kattava kokonaisvaltainen kuva 2A-proteaaseista ja niiden mahdollisista eroavaisuuksista.

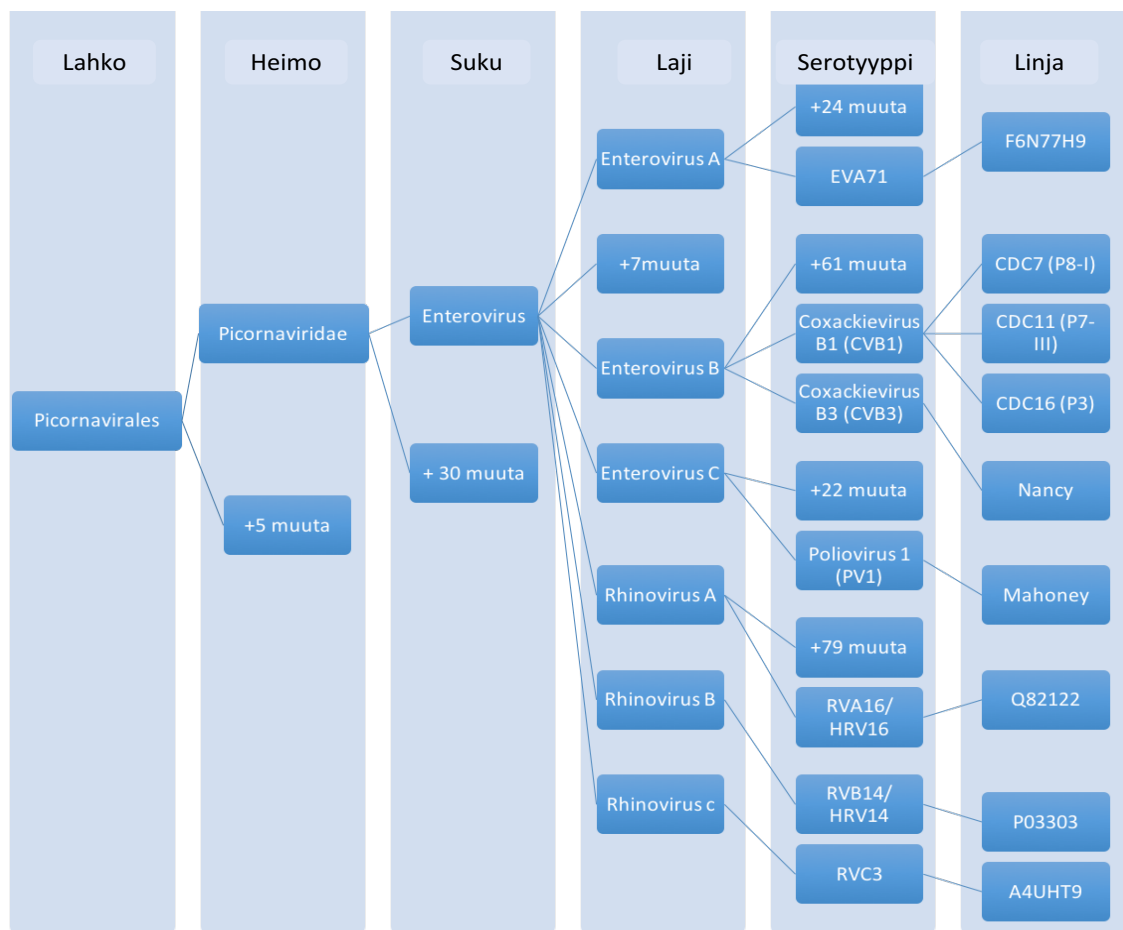
Työn tavoitteena oli tuottaa 2A-proteaaseja rekombinanttisenä *E.coli*-bakteerisoluisissa ja karakterisoida 2A-proteaasien ominaisuuksia. Lisäksi tavoitteena oli myös määrittää 2A-proteaasien kyky pilkkoa niiden kohdepeptidiä. Työn tarkoituksena oli optimoida haluttujen rekombinanttiproteiinien tuotto sekä tarkastella tuoton, eristyksen ja puhdistuksen onnistumista erilaisin biokemiallisin menetelmin. Tarkoituksena oli havainnollistaa 2A-proteaasien ominaisuuksia ja niiden aktiivisuuksiin vaikuttavia tekijöitä.

Työssä käsitellään tarkemmin, niiden virussukujen taksonomiaa, joiden 2A-proteaaseja työssä tutkitaan. Lisäksi esitellään mitä 2A-proteaasit ovat, miten ne liittyvät viruksen elämänsykliin ja mikä niiden tehtävä on siinä. Työssä tutkitaan myös 2A-proteaasien mahdollisia eroavaisuuksia eri työvaiheiden aikana.

2 VIRUSTEN TIETEELLINEN LUOKITTELU

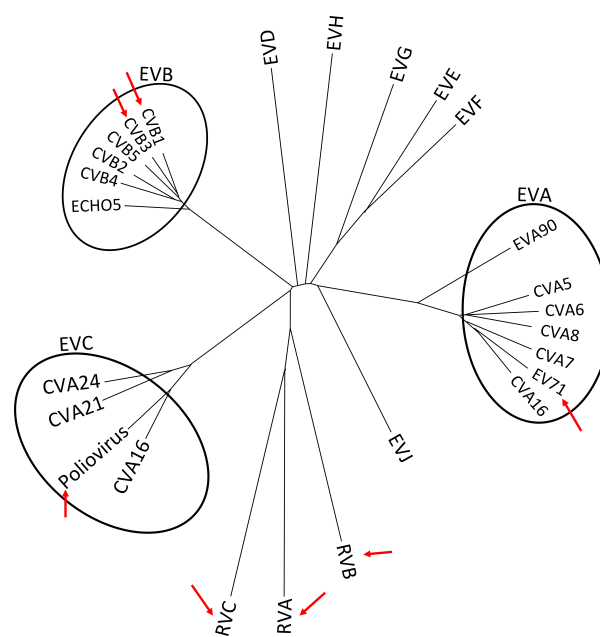
Baltimoren luokituksen mukaan, joka perustuu virusten genomityyppiin ja transkriptiotaan, työssä käytetyt 2A-proteaasien virukset kuuluvat ryhmään 4. Tähän ryhmään kuuluvien virusten genomi on positiivisen yksijuosteisen RNA:n muodossa. Infektoidakseen isäntäsolun virus transkriptoi positiivisen ssRNA-juosteen negatiiviseksi isäntäsolun transkriptiomekanismilla. Negatiivinen ssRNA-juoste on komplementaarinen mRNA-juosteelle. (Carter&Saunders 2013, 65–66, 85–86.)

Virusten taksonomia muuttuu tutkimuksen myötä jatkuvasti. Alla olevassa kuviossa 1 on työssä käytettyjen 2A-proteaasien virusten taksonomia tämänhetkisen tiedon mukaan. Kuvion 1 taksonomiajärjestys perustuu The PirBright instituutin (2016) sivustolta ja Adams ym. (2013) julkaisusta ”Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses” saatuihin tietoihin.



KUVIO 1. Työssä tutkittujen virusten taksonomia

Virukset, joiden 2A-proteaaseja työssä tutkittiin, kuuluivat *Picornavirales*-lahkoon, joka jakautuu muun muassa *Picornaviridae*-heimoon ja *Enterovirus*-sukuun, joka jakautuu 13:een eri lajiin. Näistä 13:ta lajista tutkittavana on kuusi eri lajia *Enterovirus A-C* ja *Rhinovirus A-C*. Lajit jakautuvat vielä useisiin serotyyppeihin ja linjoihin. Virukset, joiden 2A-proteaaseja työssä tutkitaan, näkyvät kuviossa 1 nimettyinä viimeisessä sarakkeessa. Työn helpottamiseksi nimettiin tutkittavat virukset uudelleen työn ajaksi. Käytetyt nimet käyvät ilmi taulukosta 1 kappaleesta 4.1 näytteiden kuvaus. Viruslajien ja serotyyppien sukulaisuussuhde näkyy vielä paremmin alla olevassa kuviossa 2, johon on punaisiin nuolin merkitty työssä tutkitut serotyypit.



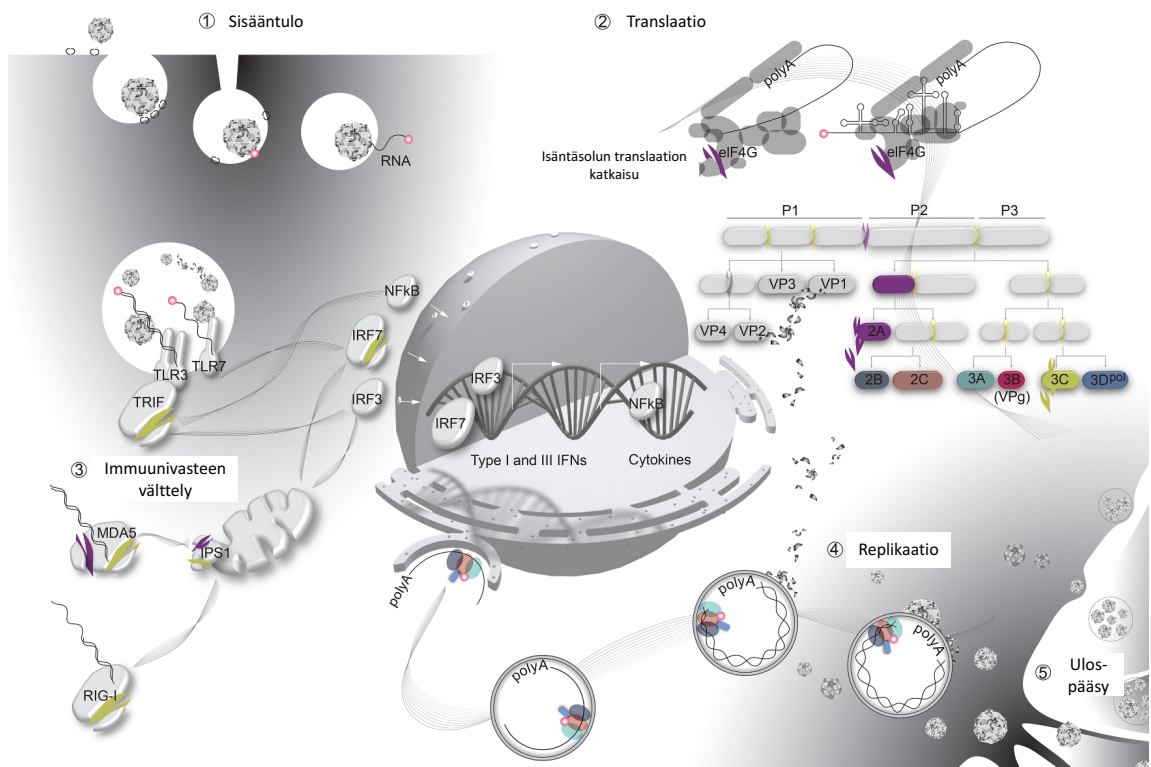
KUVIO 2. Työssä tutkittujen viruksien serotyyppien sukulaisuussuhde (Nurminen 2016, muokattu)

Picornaviridae-heimoon kuuluvat *Enterovirus*-lajit ovat tunnettuja viruspatogeenia ihmisillä. Tämän lajin edustajat aiheuttavat ihmisille muun muassa polion, enterorokkoa, yleistä flunssaa, haimatulehdusta, sydänlappätulehdusta, välikorvan tulehdusta, nenän sivuontelon tulehdusta, hepatiitti A:ta ja vastasyntyneen sepsistä. *Enterovirus*-peräisiä tullehduksia on yhdistetty myös astmaan, allergiaan ja 1 luokan diabetekseen. Tutkimukset ovat myös osoittaneet, että kyseisten patogeenivirusten 2A -ja 3C-proteaaseilla on merkittävä rooli infektioiden syntymiseen. (Laitinen ym. 2016, 251.)

3 PROTEAASIT

Proteaasit ovat yleisesti entsyymejä, jotka pilkkovat proteiineja. 2A-proteaasien kohteena on oman viruksen post-translationalisen polypeptidiketjun pilkkominen spesifisistä kohdista sekä isäntäsolun erilaisten proteiinien pilkkominen. Isäntäsolun proteiinien pilkkominen liittyy vahvasti isäntäsolun immuunivasteen aktivoitumisen estämiseen sekä erilaisiin edistystoimenpiteisiin, joiden avulla käynnistetään viruspartikkeleiden tuotanto isäntäsolun sisällä. (Laitinen ym. 2016, 252.)

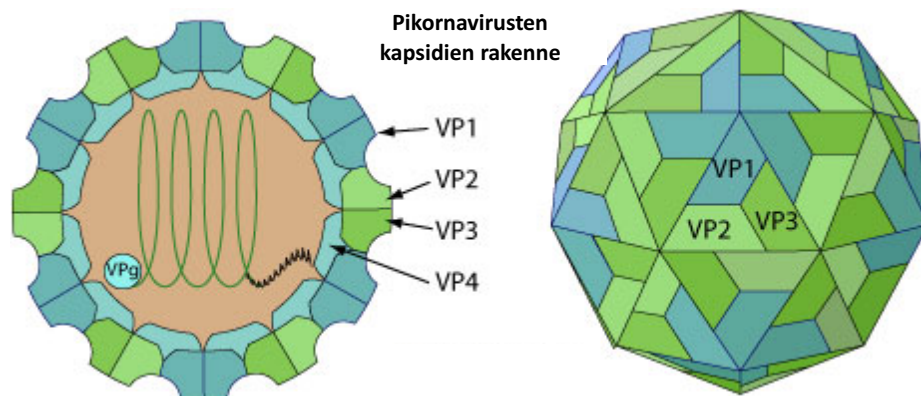
Proteaasit ja kuten kaikki muutkin viruksen rakenneosaset syntyvät samasta polypeptidistä. *Enterovirus*-lajin edustajat pääsevät isäntäsolun sisään endosytoosin avulla (kuvio 3), jolloin virusgenomi on positiivisen ssRNA:n muodossa. Ollessaan isäntäsolun sisällä, viruksen kapsidi käy läpi usean muodonmuutoksen, muun muassa VP4-proteiini irtoaa viruskapsidista, minkä seurauksena virusgenomi vapautuu isäntäsolun sytosoliin. Sytosolissa ribosomien pinnalla positiivisesta ssRNA:sta muodostuu isäntäsolun translaatiomekanismin avulla polypeptidi, josta virus itse pilkkomalla muodostaa erilaisia proteiineja. Kuviossa 3 vaiheessa 2 on esitetty polypeptidin pilkkoutumisen vaiheet. (Carter ym. 2013, 160–165; Laitinen ym. 2016, 252–254.)



KUVIO 3. *Enterovirus*-lajien elämän kierto (Laitinen ym. 2016, 253, muokattu)

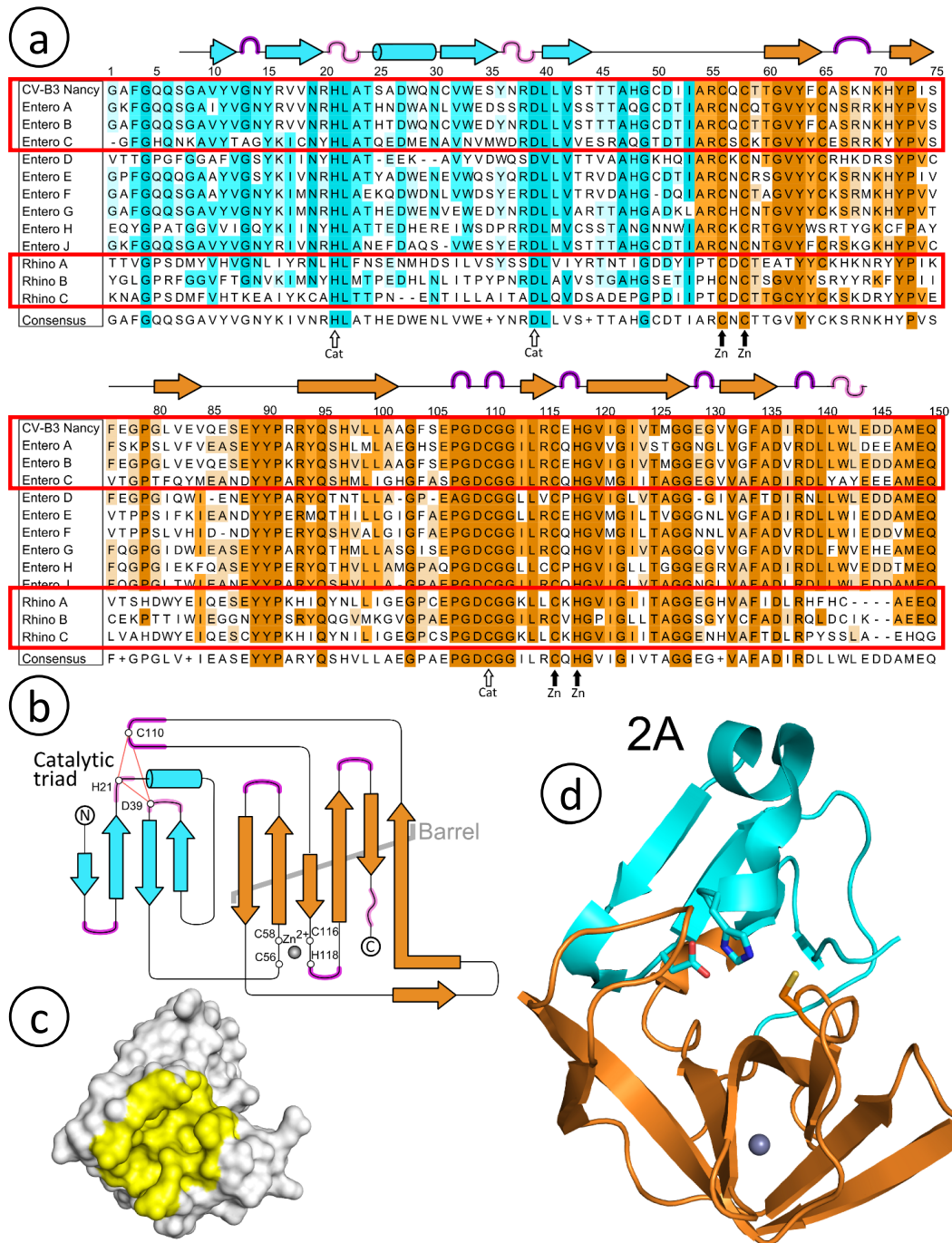
Polypeptidi on jaettu kolmeen osaan P1, P2 ja P3. P1, josta translaatio alkaa, koodaa neljää rakenteellisesti merkittävää proteiinia VP0, VP1 ja VP3, jotka ovat viruskapsidin rakenneosia (kuvio 4). P2 -ja P3-alueet koodaavat yhdessä seitsemää muuta proteiinia muun muassa ensimmäisenä translaatiossa syntyvää 2A-proteaasia ja myöhemmin 3C-proteaasia. Heti 2A-proteaasin translaation jälkeen, 2A-proteaasi erottaa P1 -ja P2-alueet toisistaan pilkkomalla polypeptidiketjua sille spesifisestä kohdasta. Kyseisen pilkkoutumisen aikana on vielä loppuosan translaatio kesken. (Carter ym. 2013, 160–165; Laitinen ym. 2016, 252–254.)

Kuviossa 4 on kuvattuna *Picornavirales*-lahkoon kuuluvien virusten kapsidien rakenne, joka koostuu edellä mainituista neljästä rakenteellisesti tärkeästä kapsidiproteiinista. Kapsidin sisällä näkyy virusgenomi, positiivinen ssRNA, jonka alkupäässä on VPg-proteiini. VPg-proteiini on merkittävä, sillä sen irtoaminen käynnistää itse virus polypeptidin translaation. Kuviossa 4 näkyy myös aiemmin mainittu VP4 (kapsidin rakenneproteiini), jonka irtoaminen käynnistää kapsidin hajoamisen. (Carter ym. 2013, 160–165; Swiss Institute of Bioinformatics 2008.)



KUVIO 4. *Picornavirales*-lahkoon kuuluvien virusten kapsidien rakenne (Swiss Institute of bioinformatics 2008, muokattu)

Alla olevassa kuviossa 5 näkyy ylempänä punaisissa laatikoissa työn *Enterovirus*-lajien 2A-proteaasien sekvenssien erot ja yhtäläisyydet. *Enterovirus A-C*-lajien väliset erot ovat selvästi pienempiä kuin *Rhinovirus A-C*-lajien väliset erot. 2A-proteaasit koostuvat kahdesta domeenista (sinisellä ja oranssilla) kuten myös 3C-proteaasit. Molempien domeenien osat osallistuvat aktiivisen kohdan muodostukseen (kuviossa 5 kohdassa c keltaisella). 2A-proteaasin aktiivinen osa koostuu kysteiniinistä, aspartaatista ja histidiinistä. (Laitinen ym. 2016, 254–255.)



KUVIO 5. 2A-proteasien aminohapposekvenssit *Enterovirus*-suvussa (a) ja 2A-proteasin rakenne toiminnallisineen osineen (b, c ja d) (Laitinen ym. 2016, 255, muokattu)

3C- ja 2A-proteasien aktiivisuuden laskemisen tai toiminnan häiritsemisen oletetaan heikentävän huomattavasti viruksen kykyä infektoida isäntäsolua sekä monistua. Siten erityisesti 2A-proteasien karakterisoinnin sekä toimintamekanismin ja aktiivisuuteen vaikuttavien tekijöiden tutkimisen seurauksena saatetaan löytää merkittävä keino antiviraalisille lääkkeille.

4 MITTAUS- JA MÄÄRITYSMENETELMÄT

4.1 Näytteiden kuvaus

Tutkittavat 2A-proteaasit valittiin työhön siten, että niiden ominaisuuksista ja eroavaisuuksista saataisiin mahdollisimman laaja kokonaiskuva. Erityisesti CVB1- ja CVB3-serotyyppejä tutkitaan niiden mahdollisen diabetesyhteyden vuoksi.

Taulukossa 1 on merkitty 2A-proteaasien työn kannalta olennaisia parametreja. Siinä näkyy 2A-proteaasien molekyylipaino, ekstinktiokerroin eli molekulaarinen absorbanssi, isoelektrinen piste (pI) sekä aminohappojen lukumäärä. Tarkkaa molekyylipainoa ja ekstinktiokerrointa tarvitaan, kun mitataan näytteiden konsentraatioita spektrofotometrisesti. Teoreettinen isoelektrinen piste on tärkeää ottaa huomioon pH:n kannalta käytettyjen liuosten valmistamisessa sekä dialyysissä. Aminohappojen lukumäärä merkitsee silloin kun suunnitellaan sopivan kokoista vektoria viemään haluttu sekvenssi solun sisään.

TAULUKKO 1. 2A-proteaasien työssä käytetty nimimerkintä ja niiden ominaisuudet

Laji: Serotyyppi: Linja	Työssä käytetty merkintä	Molekyyli-paino (Da)	Ekstinktiokerroin ($\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$)	Teoreettinen isoelektrinen piste	Aminohappojen lukumäärä
EVB:CVB1: CDC7(P8-I)	CDC7	17 414,3	30 285	5,84	156
EVB:CVB1: CDC11 (P7-III)	CDC11	17 436,3	28 795	5,91	156
EVB:CVB3: Nancy	3Nancy	17 296,2	28 795	5,69	156
EVA:EV71:(F6N7H9)	EV71	17 318,2	28 795	6,15	155
EVC: PV1: Mahoney	PV1	17 435,4	25 245	6,29	155
EVB:CVB1: CDC16(P3)	CDC16	17 316,2	28 795	5,77	156
RVA:(H)RV16:(Q82122)	HRV16	16 951,9	25 245	6,01	148
RVB:(H)RV14:(P03303)	HRV14	16 798,0	25 245	6,65	152
RVC:RVC3:(A4UHT9)	RVC3	16 555,4	22 265	5,9	148

Työssä käytössä olevat, proteaaseja koodaavat, geenit oli tilattu *E.coli*-bakteereihin koodoni-optimoituna synteettisinä lineaarisina string-konstrukteina (Thermo Fisher Scientific 2016). Luonnossa esiintyviin geneihin oli lisätty aminohapposekvenssin karboksyyli- eli C-terminaaliseen päähän kuusi histidiini-aminohappoa (6xHis), joka on toiselta nimeltään histidiini-kahva tai his-tag. Kuuden peräkkäisen histidiinin avulla rekombinanttiproteiini voidaan puhdistaa ja tunnistaa histidiini-kahvaa vastaan olevien vasta-aineiden avulla.

4.2 TOPO-kloonaus

TOPO-kloonaus on yksi yhdistelmä-DNA-tekniikka, jossa plasmideja käytetään DNA:n kuljettimina eli vektoreina. Tämän työn TOPO-kloonauksessa viruksen 2A-proteasia koodaava geeni eli insertti liitettiin osaksi vektori-plasmidia topoisomeraasin avulla. Työssä synteettiset geenit kloonattiin suuntamääritettyyn pET101/D-TOPO -vektoriin. Suuntamääritetty (directional) tarkoittaa sitä, että geenissä olevan ylijuosteen (overhang) takia insertti voi asettua osaksi plasmidia vain yhdellä tavalla, jolloin väärin luetun geenin ja sen tuottamisen mahdollisuus poistuu. Koko TOPO-kloonaus perustuu siihen, että liigaasien sijaan topoisomeraasi I entsyymi antaa tarvittavan energian halutun insertin liittämiseen vektoriin. Työssä käytetyssä pET101/D-TOPO -vektoriin on liitetty myös muita funktionaalisia osia, jotka on suunniteltu toimimaan *E.coli*-bakteereissa, kuten muun muassa T7 -ja *LacO*-promootori, T7-terminaattori ja ampisilliini resistenttiys. Kaikki nämä funktiot ovat välttämättömiä ja mahdollistavat halutun rekombinanttiproteiinin tuoton *E.coli*-soluissa. (Thermo Fisher Scientific 2006, 1–2,45.)

4.2.1 Transformaatio Top10 *E.coli*-soluihin

Bakteerisolut transformoidaan, jotta insertti-plasmidi saadaan niiden sisälle. Transformaatio eli vieraan DNA:n vieminen soluun voi tapahtua esimerkiksi elektroporaation, lämpöshokin tai geenipyssyn avulla (Suominen ym. 2013, 140-146). Osana plasmidia, haluttu geeni monistuu bakteereissa sen luonnollisen jakautumisen yhteydessä. Bakteereista monistettu plasmidi on helppo eristää ja siirtää uudelleen proteiinin tuottoon tarkoitettuihin bakteerisoluihin. Plasmidin mukana bakteerisolut saavat antibioottiresistenttiyden ja näin insertti-plasmidia sisältäviä bakteereja voidaan kasvattaa antibiootteja sisältävillä maljoilla sekä liuoksissa.

Työssä transformaatio suoritettiin Thermo Fisher Scientific (2006, V) ohjeen mukaisesti (liite 1). Rekombinantti-DNA:ta sisältävä plasmidi transformoitiin kemiallisesti kompetentteihin TOP10 *E.coli*-solujen sisään lämpöshokin avulla. Kemiallisesti kompetentti-solu tarkoittaa solua, joka on käsitelty etukäteen siten, että sen solukalvo läpäisee herkemmin vierasta DNA:ta, esimerkiksi lämpötilaa muuttamalla (Carson & Robertson 2005, 36). TOP10 *E.coli*-solulinja ei ole kuitenkaan tarkoitettu tuottosolulinjaksi, sillä niiden perimään ei ole liitetty T7 RNA-polymeraasia. T7 RNA-polymeraasin tehtävänä

on käynnistää kohdeproteiinin tuotto. Kyseistä transformaatiota ei suositella suoritettavaksi myöskään suoraan tuottosoluissa, sillä soluille mahdollisesti toksinen proteiini voisi ilmentyä siitäkin huolimatta, että liuoksessa ei olisi mukana proteiinin tuoton indusoimiseen käytettäviä yhdisteitä. Toksisen proteiinin ilmentyminen voisi häiritä plasmidien tuottoa ja aiheuttaa solukuolemaa. (Thermo Fisher Scientific 2006, 6-5.)

4.2.2 Plasmidin eristys ja sekvensointi

Plasmidin eristys suoritetaan tässä työssä Thermo Fisher Scientific GeneJET Plasmid Miniprep-puhdistussarjalla, protokollan (liite 2) mukaisesti. Kyseinen tuote on valmistettu *E.coli*-solujen plasmidieristystä varten. Miniprep perustuu spin-pylvästekniikkaan ja solun kemialliseen hajotukseen, jonka tavoitteena on saada ehjä plasmidi vapautettua supernatanttiin. Hajotuksessa vapautunut plasmidi sitoutuu spin-pylvään pohjalla olevaan silikakalvoon. Plasmidi-DNA:n ollessa kiinni silikakalvossa voidaan plasmidia pestä sekä lopulta irrottaa silikakalvosta eluoimalla plasmidi-DNA ulos siihen tarkoitettulla eluutiopuskurilla. (Thermo Fisher Scientific n.d. 2; Suominen ym. 2013, 106.)

Plasmidien konsentraatiot ja puhtaudet tarkistettiin NanoDrop-spektrometrin avulla. Plasmidien puhtaus voidaan arvioida aallonpituuksien 260/280 nm suhteesta, minkä pitäisi olla lähellä 1,8 puhtaalle DNA:lle. Mikäli liuoksessa on epäpuhtautena proteiinia, tällöin kasvaa 280 nm absorbanssin osuus ja suhdeluku pienenee. Puolestaan, jos liuoksessa on epäpuhtautena ylimäärin vapaana joitakin tiettyjä nukleotideja niin suhdeluku kasvaa, koska ne absorboivat 260 nm aallonpituudella. (Thermo Fisher Scientific 2008.)

Plasmidi-DNA:n sekvensointi oli ulkoistettu BioMediTech core-palvelulle. Heidän sekvensointitekniikkansa perustuu Sangerin sekvensointiin, joka on toiselta nimeltään myös terminaatiomenetelmä. Menetelmä ei ole kovin tehokas dsDNA:lla (työn näytteet), mutta sopii mainiosti yhdistelmä-DNA-plasmidien liitoskohtien sekvenssien tarkistamiseen (Suominen ym. 2013, 177). Näytteet lähetettiin sekvensointiin dsDNA-PCR-tuotteena, joille oli tehty etanolisaostus ja jotka oli denaturoitu kuumentamalla sekä säilötty HiDi-formamidiin, protokolla (liite 3). Ulkoistettu yksikkö suoritti sekvensoinnin sovitusta kohdasta sekvenssiä kapillaarielektroforeesilla ja tulokset saatiin sähköisesti. Tulokset analysoitiin siihen tarkoitukseen tehdyillä ohjelmistoilla kuten DNA-MAN:lla tai SnapGene:lla.

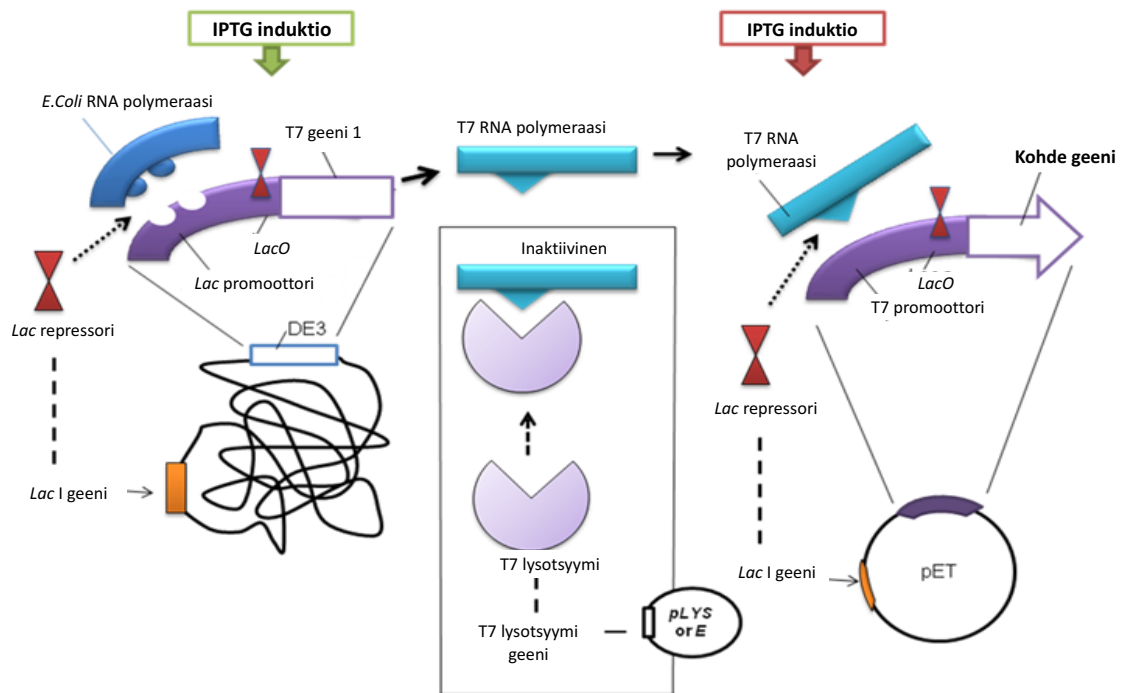
4.3 Proteiinin tuotto BL21 *E.coli*-solussa

Työssä käytetyt ja esitellyt *E.coli*-bakteerisolujen kasvatus- ja proteiinituotto menetelmät ovat vakiintuneita Tampereen yliopiston proteiinidynamiikan tutkimusryhmässä sekä yleisesti käytettyjä ja hyväksi todettuja. Fakultatiivisena anaerobina *E.coli*-bakteeri kykenee ottamaan energiansa ja lisääntymään niin hapellisissa kuin hapettomissa olosuhteissa. *E.coli*-bakteerisoluja on yleisesti käytetty proteiinin tuottosoluina viimeiset kaksi vuosikymmentä johtuen sen nopeasta lisääntymisestä, edullisuudesta ja helposta geneettisestä muunneltavuudesta.

Proteiinien tuotot suoritettiin siihen tarkoitetuissa BL21 STAR DE3 -sekä C43 (myöhemmin BL21 ja C43) *E.coli*-tuottosoluissa. BL21 -ja C43 -tuottosolujen transformaatio suoritettiin samalla tekniikalla kuin TOP10-solujen transformaatio. Transformoituja soluja kasvatettiin maljoilla, joilta valittiin muutamia pesäkkeitä siemenkasvatuksia varten. Siemenkasvatukset siirrettiin osaksi suurempaa tuottotilavuutta, joita inkuboitiin kunnes ne saavuttivat optisentiheyden arvon 0,4.

4.3.1 Geenin ilmentyminen

Tuoton saavuttaessa sopivan optisen tiheydensä se indusoidaan IPTG:llä, joka on laktoosianalogi ja käynnistää *lac*-operonin avulla halutun proteiinin tuoton (kuvio 6). *Lac*-operoni säätelee T7 RNA-polymeraasin tuottoa, joka puolestaan sitoutuessaan insertti-plasmidissa olevaan T7-promoottorialueelle käynnistää kohdesekvenssin transkriptoitumisen ja sitä kautta kohdeproteiinin tuoton. Tuotto päättyy, kun sekvenssiä lukeva yksikkö kohtaa insertti-plasmidissa olevan T7-terminaattorin. *Lac*-operonin toiminnan kannalta on välttämätöntä, että kasvatusliuoksessa on laktoosianalogin (IPTG) lisäksi myös glukosia, joka inhiboi transkriptiota eli estää proteiinin tuoton ennen induktiota. (Alberts ym. 2010, 277; Campbell & Farrell, 2012, 371; Carter ym. 2013, 257.)



KUVIO 6. *Lac*-operonin säätelemä proteiinituotto (NPTEL n.d., muokattu)

Indusoinnin jälkeen bakteereja kasvatettiin yön yli 28 °C:ssa tasoravistelijassa. Lämpötilaa laskettiin, koska kokemus on osoittanut, että useimmissa tapauksissa inkubaation lämpötilan laskeminen indusoinnin jälkeen lisää kohdeproteiinin tuottavuutta. Tuotto pysäytettiin ja solut kerättiin sentrifugoimalla.

4.3.2 Solujen hajotus

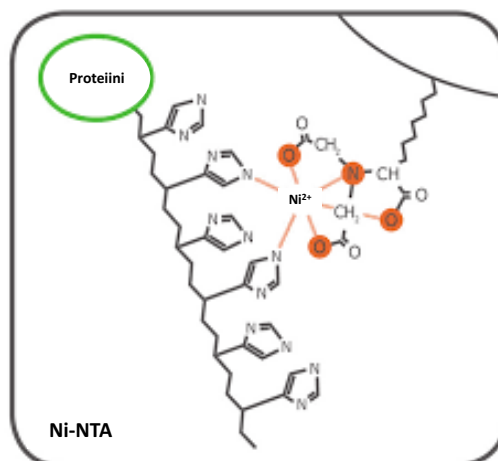
Ennen proteiinin puhdistusta proteiini vapautetaan ulos solusta. Monien mahdollisuuksien joukosta tähän työhön solun hajotusmenetelmäksi valittiin korkeapaineeseen perustuvan Emulsiflex-laite (Liite 4). Korkeapainehajotusta käytetään yleisesti solun hajotusmenetelmänä proteiinidynamiikan tutkimusryhmässä ja sitä pidetään tehokkaampana ja sopivampana suurempien näytemäärien käsittelyyn, kuin esimerkiksi sonikointia. Näyte ajetaan korkeapaineen avulla pienen reiän läpi useamman kerran, jolloin solut hajoavat muodostuneen paineen vuoksi. Syntynyt hajotustuote setrifugoidaan, jolloin supernatantti sisältää muiden liukoisten proteiinien lisäksi myös kohdeproteiinia. Pohjalle kerrostunut pelletti sisältää kaikkia tämän työn kannalta tarpeettomia solupartikkeleita. Proteiiniin suunnitellun puhdistuskahvan (6xHis) ansiosta rekombinanttiproteiini voidaan eristää supernatantista.

4.4 Proteiinin puhdistus

4.4.1 IMAC-tekniikka

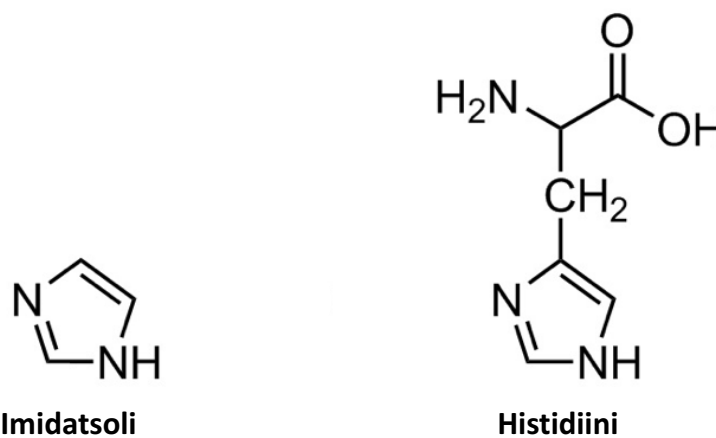
Työn puhdistustekniikka perustuu IMAC-tekniikkaan eli immobilisoitu metalliaffiniteettikromatografiaan. Histidiini-kahvan ansioista kohdeproteiini sitoutuu reversiibelisti agarosiin, mikä tarkoittaa sitä, että kohdeproteiini voidaan myös irrottaa agarosista eluamalla sitä imidatsoligradientilla. Tekniikka on jo perinteinen ja yleisesti käytetty his-kahvan omaavien proteiinien puhdistukseen (Gasser 2014, 1). Työssä käytettiin Ni-NTA-agarosia, jonka valmistajan ilmoittama kapasiteetti on 50 mg/ml eli yhden ml:n agarosia pitäisi pystyä sitouttamaan 50 mg:a proteiinia (Macherey-Nagel 2013, 8).

Histidiinillä on aminohapoista tunnetusti vahvin affiniteetti siirtymämetalleihin, joita ovat muun muassa Ni^{2+} , Co^{2+} ja Zn^{2+} . Siirtymämetallit kelatoidaan agarosimatriisiin ke-laatio ligandilla (NTA) liikkumattomiksi eli metallit immobilisoidaan. Histidiinissä oleva imidatsolirengas muodostaa kovalenttisen koordinaatiosidoksen agarosissa olevan siirtymämetallin kanssa, toimien elektronien luovuttajana. Työssä nikkeli (Ni^{2+}) toimii vastaavasti elektronien vastaanottajana (kuvio 7). Imidatsolin lisäksi myös muilla pienimolekyyllisillä yhdisteillä on luontaista taipumusta sitoutua immobilisoituihin siirtymämetalleihin. Tämä kuitenkin ehkäistään kuudella vierekkäisellä histidiini-molekyyllillä, joiden affiniteetti on voimakkaampi. (Bornhorst & Falke 2000, 245; Gasser 2014, 2–4.) His-kahvapuhdistus ei ole kovin selektiivinen, mutta sen etuna on, että kuuden histidiinin lisäksi proteiinin aminohapposekvenssin jälkeen ei vaikuta suuresti itse proteiinin rakenteseen tai toimintaan (Suominen ym. 2013. 89).



KUVIO 7. Ni-NTA-agarosin toimintamekanismi (Geno technology 2014, muokattu)

Ni-NTA-agarosiin sitoutuneena kohdeproteiini pakataan avopylvääseen, jonka läpi pesuliuokset sekä eluutioliuokset ajetaan painovoiman avulla. Kuten aikaisemmin mainittu histidiini-aminohappo sisältää imidatsoli-renkaan (rakennekuva kuvio 8 alla). Ennen eluutiota on sitoutuspuskurissa imidatsolipitoisuus matala. Tämän tarkoituksena on estää muut heikot ei-toivotut interaktiot immobilisoituneen nikkelin kanssa. Eluutioliuoksissa kasvava imidatsolipitoisuus johtaa siihen, että siinä oleva imidatsoli kilpailee kohdeproteiinissa olevan kuuden histidiinin kanssa sitoutumisesta agarosiin. Kokemus on osoittanut, että haluttu proteiini eluoituu ulos viimeistään imidatsolipitoisuuden ollessa 500 mM olettaen, että eluutiotilavuus on riittävä.



KUVIO 8. Imidatsolin ja histidiinin rakennekaava (IGEM 2015, muokattu)

Eluutiofraktioista voidaan määrittää proteiinikonsentraatit NanoDrop-spektrometrin avulla. Mittaamalla absorbanssia aallonpituudella 280 nm, voidaan proteiinin konsentraatio laskea Beerin- ja Lambertin lain avulla:

$$A = \epsilon b c \quad (1)$$

$$c = \frac{A}{b\epsilon}$$

Yhtälössä (1) A on absorbanssi, ϵ molaarinen absorptiokerroin (ekstinktiokerroin), b on säteen kulkema matka näytteen läpi ja c konsentraatio. Molaarinen absorptiokerroin ϵ voidaan määrittää aminohapposekvenssin perusteella (ilmoitettu konstruktikohtaisesti taulukossa 1 kappale 4.1), kun tiedetään kuinka monta tryptofaania, tyrosiinia ja fenyylialaniinia proteiini sisältää. (Thermo Fisher Scientific 2009, 3–16.)

4.4.2 Dialyysi ja lyofilisointi

Dialyysin tarkoituksena on siirtää proteiini eluutiopuskurista proteiiniin ja erilaisten mitausten kannalta neutraalimpaan puskuriin. Työssä imidatsolipitoisessa eluutioliuoksissa olevat proteiininäytteet dialysoitiin dialyysikasettien tai dialyysikalvojen avulla liuokseen, jossa oli 25 mM HEPES, 100 mM NaCl ja 1 mM ZnCl. Dialyysissä on tärkeää ottaa huomioon proteiinin isoelektrinen piste pI ja liuoksen pH proteiinin sakkautumisen välttämiseksi. Myös dialyysikasettien- ja kalvojen on oltava oikean huokoskoon omaavia, jotta vältetään proteiinin karkaamisesta näyteliuoksesta. Lyofilisointi tarkoittaa näytteen kylmäkuivaamista esimerkiksi vakuumin avulla.

4.5 Karakterisointi

4.5.1 SDS-PAGE ja proteiinivärjäys

SDS-PAGE on yleisesti proteiinin havaitsemiseen käytetty menetelmä, joka perustuu siihen, että proteiininäyte denaturoidaan natriumdodekyylisulfaatilla (SDS) ja ajetaan sähkövirran avulla geelin läpi. Työssä proteiinien liikkumisen geelissä erottaa ainoastaan niiden koko, sillä proteiinit ovat lähes samanmuotoiset ja näytteenkäsittelyn vuoksi myös negatiivisesti varautuneita. Sähkövirran pakottamana negatiivisesti varautuneet proteiinit liikkuvat geelimatriisissa kohti positiivista napaa eri nopeuksilla, suuremmat molekyylit liikkuvat hitaammin ja pienemmät nopeammin. (Campbell ym. 2012, 126). Tämä mahdollistaa sen, että proteiinit erottuvat toisistaan ja niiden koko on siten helppo määrittää proteiinimarkkerin avulla. Elektroforeesin jälkeen geeleille tehtiin totaaliproteiinivärjäys sinisellä PageBlue-värillä (Thermo Fisher Scientific). Rinnakkaisgeeleiltä proteiinit siirrettiin nitroselluloosakalvolle Western blot -menetelmällä kohdeproteiinin spesifistä vasta-aineanalyysiä varten.

4.5.2 Western blot ja vasta-ainevärjäys

Työn blotit valmistettiin puolikuivalla sandwich- menetelmällä. Menetelmässä kostutettujen sellutyynyjen välissä on nitroselluloosakalvo ja elektroforeesilla ajettu SDS-PAGE geeli. Sähkövirran avulla voidaan siirtää geelillä olevat proteiinit nitroselluloosakalvolle. Blottauksen jälkeen kalvo käsiteltiin blokkauслиuoksella, mikä estää muiden ei-toivottujen proteiinien tarttumisen kalvolle.

Blokkauksen jälkeen kalvolle lisättiin primäärivasta-aine. Tässä työssä primäärivasta-aine oli hiiressä valmistettu monoklonaalinen vasta-aine histidiini-puhdistuskahvaa vastaan, (α -His). Monoklonaalisuus tarkoittaa vasta-aineen hyvin spesifistä sitoutumista substraattiinsa. Primäärivasta-aineessa inkuboinnin jälkeen lisättiin sekundäärivasta-aine, joka tarttui puolestaan primäärivasta-aineeseen ja vahvisti signaalia. Tämän työn sekundäärivasta-aineena oli vuohessa valmistettu monoklonaalinen vasta-aine hiiren vasta-aineita vastaan (Goat Anti Mouse, GAM), joka oli leimattu fluoresoivalla komponentilla, IRDye 800 CW. Sekundäärivasta-aineen infrapunafluoresenssi pystyttiin kuvantamaan, tarvittaessa myös kvantitatiivisesti, LI-COR Odyssey- laitteella.

Muita työn vasta-ainevärjäyksen optimoinnin aikana käytettyjä vasta-ainemenetelmiä olivat muun muassa kemiluminesenssi ja kolorimetrinen vasta-ainevärjäys. Kemiluminesenssissä primäärivasta-aineena käytettiin hiiressä tuotettua entsyymikonjugoitua vasta-ainetta (α -His HRP), mikä mahdollistaa suoran kuvantamisen ilman sekundäärivasta-ainetta. Tällöin ennen kuvausta kalvolle lisättiin Western bright-reagensseja, jotka saivat aikaan näkyvän hetkellisen kemiluminesenssin vetyperoksidin energialla.

Kolorimetrisessä vasta-ainevärjäyksessä oli sama primäärivasta-aine kuin odyssey-vasta-ainevärjäyksessä, mutta sekundäärivasta-aine oli anti mouse goat AP, missä AP on alkaalinen fosfataasi (GAM-AP). Substraattien BCIP:n ja NPT:n avulla saatiin näkyviin kolorimetrinen reaktio, joka nähtiin silmin ja voitiin kuvata tavallisella kameralla tai skannerilla.

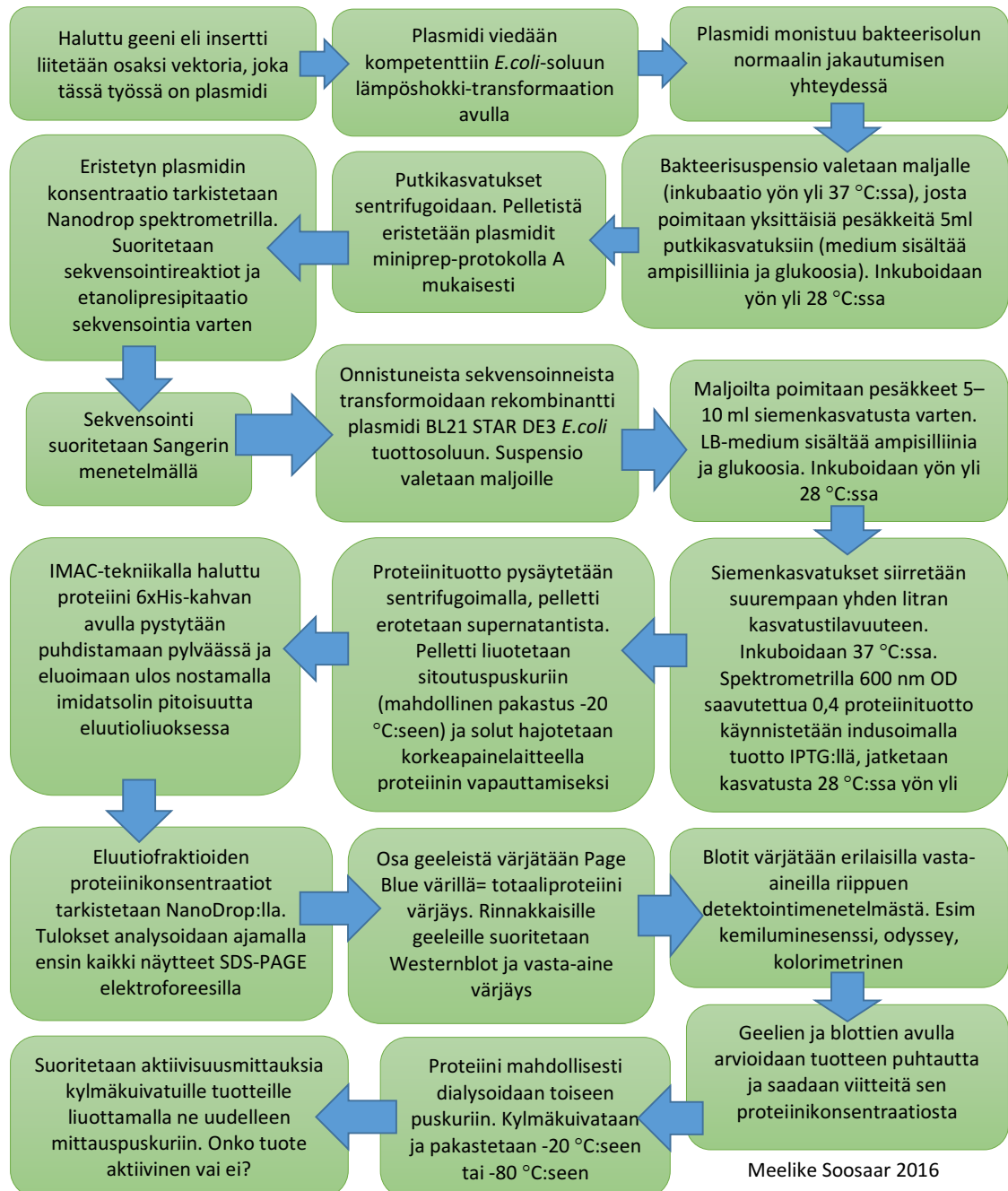
4.5.3 Aktiivisuusmittaukset fluoresenssispektrometrilla

Aktiivisuuskokeet suoritettiin spektrofluorometrilla. Työn mittaukset perustuivat siihen, että 2A-proteaasi pilkkoo translaatioinisaatiotekijä 4G (translation initiation factor 4G; eIF4G) -peptidiä (aikaisemmin mainittu polypeptidinä). Peptidin päihin on liitetty kovalenttisesti EDANS -ja DABCYL-molekyylit, jotka muodostavat fluoresenssiresonanssienergian siirtoparin (FRET). EDANS absorboi eksitoitavan energian aallonpituudella 335 nm ja emittoi aallonpituudella 493 nm, joka on taas lähellä DABCYL:n absorptiomaksimia. Tuloksena DABCYL sammuttaa jatkuvasti EDANS:n emittoimaa energiaa. Mikäli 2A proteaasi on aktiivinen ja pilkkoo FRET-parin välissä olevan peptidin, parin etäisyys toisistaan kasvaa suuresti. Välimatkan kasvaessa ei DABCYL pysty sammuttamaan EDANS:n emittoimaa aallonpituutta ja EDANS:n kasvava fluoresenssi pystytään havaitsemaan ja mittaamaan aallonpituudelta 493 nm. (Määttä & Hytönen 2006, 1.)

Proteaasien aktiivisuus voidaan havaita intensiteetin kasvuna ajan funktiona. Saatujen tulosten pisteistä ajan funktiona piirretään suora, joka on nouseva, mikäli 2A-proteaasi on aktiivinen ja pilkkoo FRET-peptidiä. Mitä jyrkempi suora on, sitä suurempi kulmakerroin sillä on. Mitä enemmän näyte absorboi valoa, sitä suurempi on proteaasin konsentraatio liuoksessa tai sen ominaisaktiivisuus. Näytteiden ominaisaktiivisuuksien lisäksi työn ohella tutkittiin 1 mM (mmol/l) nikkelin, 5 mM imidatsolin ja 5 mM EDTA:n vaikutusta aktiivisuuksiin.

5 TYÖN SUORITUS

Työ suoritettiin pääpiirteittäin alla olevan kuvion 9 mukaisesti. Työssä käytetyt laitteet ja reagenssit ovat liitteessä 4.



KUVIO 9. Opinnäytetyön vaiheet lyhyesti

5.1 Kloonaus, plasmidin eristys ja sekvensointi

Tuotteet saapuivat *E.coli*-bakteerisoluille kodonioptimoituna DNA:na, jonka 5' (karboksyyli) päässä oli CACC-ylijuoste, joka mahdollisti suuntaavan kloonauksen pET101/D -vektoriin. Tuotteita säilytettiin -20 °C:ssa ja työskentelyn aikana jäällä. Saapuneet tuotteet olivat kylmäkuivattuja ja ne liuotettiin veteen niin, että jokaisen tuotteen pitoisuus oli 20 ng/μl. TOPO-kloonauksen kitin tiedot (liite 4) ja protokolla löytyy liitteestä 1. Näytteet laimennettiin pitoisuuteen 1 ng/μl. TOPO-kloonaukseen laimennettua tuotetta otettiin 1,5 μl, steriiliä vettä 2,5 μl ja suolaliuosta sekä vektoria 1 μl reaktioseokseen.

Ohjeesta poiketen kloonausreaktiota ja *E.coli* TOP10-soluja inkuboitiin jäällä vain viisi minuuttia. Lisäksi inkubointi SOC-mediumin jälkeen ravistelijassa kesti yhden tunnin. Inkuboitunut bakteerisuspensio valettiin lämpimille 37 °C:lle LB-medium, 5 mM gluukoosi, 100 μg/ml ampisilliini maljoille. Maljoille pipetoitiin bakteerisuspensiota 20 μl sekä 200 μl ja inkuboitiin lämpökaapissa 37 °C:ssa yön yli.

Maljoilta poimittiin neljä erillistä pesäkettä erillisiin 15 ml putkiin, joissa oli nestemäistä 5 ml LB-mediumia, 5 mM gluukoosia ja 100 μg/ml ampisilliinia. Putkia inkuboitiin joko huoneenlämmössä (25 °C:ssa) tai 37 °C:ssa ravistelijassa yön yli. Seuraavana aamuna solut sentrifugoitiin alas (liite 4, fermentorin sentrifuugi) 4000xg 10 minuutin ajan. Pelletöitynyt bakteerikasvusto eristettiin. Tämän jälkeen bakteerisolu-pelletistä eristettiin plasmidit Miniprep-kitin avulla tai pelletti pakastettiin myöhempää käsittelyä varten -20 °C:seen. Miniprep-käsittely suoritettiin Miniprep-kitin (liite 4) ohjeen protokolla A mukaisesti (liite 2).

Ennen plasmidin säilytystä -20 °C:ssa mitattiin tuotteiden plasmidipitoisuudet NanoDrop UV-Vis-spektrometrillä (liite 4). NanoDrop-spektrometrillä varmistetaan, ettei plasmidieristuksen aikana esimerkiksi hajotuksessa plasmidia hajonnut tai hävinnyt. Mikäli plasmidikonsentraatio oli normaali, näyte sekvensoitiin.

Ennen sekvensointia tehtiin sekvensointireaktiot, joissa oli erikseen forward -ja reverse-alukkeille omat reaktiot DNA:n kumpaankin päähän (protokolla liitteessä 3). Kaikki reaktiot suoritettiin jäällä, ellei ohjeessa toisin ohjeistettu. Sekvensointireaktiot pipetoitiin

96-kuoppaiselle PCR-levylle. Valmiit reaktiot kuumennettiin ja DNA monistettiin PCR:llä (liite 4) ja käsiteltiin sekvensointiohjeen mukaisesti. Lopulta näytteet kuivattiin, niihin lisättiin ennen sekvensointia HiDi-formamidia ja ne denaturoitiin kuumentamalla PCR:llä +95 °C:ssa kolmen minuutin ajan. Tämän jälkeen kuoppalevyssä olevat näytteet olivat valmiina sekvensoitaviksi. Sekvensointi suoritettiin ulkopuolisen palvelun toimesta Sangerin menetelmällä. Sekvensoinnin tulokset käytiin läpi manuaalisesti DNA MAN-ohjelmalla. Reverse-reaktioiden sekvenssit piti kääntää ohjelmistolla oikein päin ennen lukua. Oikean sekvenssin ohjelma löysi sinne syötetyn mallin avulla. Oikean sekvenssin sisältävät plasmidit otettiin talteen ja pakastettiin -20 °C:seen odottamaan transformaatiota tuottosoluihin.

Transformaatio *E.coli* BL21 -ja C43-soluihin tapahtui täysin samalla tavalla kuin transformaatio TOP10-bakteerisoluihin (liite 1). Transformaatio C43-soluihin poikkesi hieinan protokollasta lämpöshokin kohdalla, sillä lämpöshokki suoritettiin 2 ml eppendorf-putken sijaan 15 ml putkessa. Tuottosolut valettiin samoille maljoille ja käsiteltiin samalla lailla kuin TOP10-solut. Inkubaation jälkeen maljoja säilytettiin +4 °C:ssa.

5.2 Tuotto

Tuottoa varten tehdyiltä maljoilta poimittiin pesäke 50 ml putkiin, joissa oli 10 ml samaa medium-seosta kuin aiemmissakin putkikasvatuksissa. Putkikasvatusta ennen tuottoa kutsutaan siemenkasvatukseksi. Siemenkasvatuksia inkuboitii yön yli +28 °C:ssa ravistelijassa.

Seuraavana aamuna siemen jaettiin puoliksi kahteen erilliseen kahden litran erlenmayer pulloon (5 ml per erlenmayer). Pulloihin laitettiin ennen bakteerisuspensiota 500 ml LB-mediumia, 5 mM glukoosia ja 100 µg/ml ampisilliinia sekä vaahdonestoainetta 10 µl. Yhden tuoton kokonaistilavuus oli yksi litra. Pullon suulla kasvuston suojaamiseksi ja hapen saannin takaamiseksi käytettiin hengittävää kalvoa. Tuottokasvatusta inkuboitii 37 °C:ssa tasoravistelijassa kunnes se saavutti 600 nm aallonpituudella mitattuna optisen tiheyden arvon (OD) 0,4 (liite 4). Tämän saavutettuaan tuotto indusoitii 1 mM IPTG:llä, joka käynnisti kohdeproteiinin tuoton bakteerisoluihin. Tuottoa inkuboitii yön yli +28 °C:ssa tai +20 °C:ssa tasoravistelijassa.

Inkuboinnin jälkeen proteiinituotto pysäytettiin sentrifugoimalla solut pohjaan 5000xg 10 minuutin ajan (liite 4, ultrasentrifuugi). Tämän jälkeen proteiinia sisältävät solut kerättiin ja liuotettiin sitoutuspuskuriin. Sitoutuspuskurina käytettiin liuosta, jossa oli 20 mM NaPO₄, 500 mM NaCl ja 20 mM imidatsoli. Tässä vaiheessa solut yleensä pakastettiin (-20 °C:seen) myöhempää puhdistusta varten. Alla olevassa taulukossa 2 näkyy eri 2A-proteaasien tuottojärjestys, rinnakkaiset parit sekä käytetyt tuottosolut ja indusoinnin jälkeiset lämpötilat.

TAULUKKO 2. Työn tuottoparit tehdyssä järjestyksessä, käytetyt tuottosolut ja indusoinnin jälkeinen lämpötila

Tuottoparit	Tuottopäivä	Tuottosolu ja lämpötila indusoinnin jälkeen
1. RVC3, CDC7	24.5.2016	BL21 DE3 28 °C
2. CDC16, PV1, HRV16	14.6.2016	BL21 DE3 28 °C
3. CDC16, HRV16	10.8.2016	BL21 DE3 20 °C
4. CDC11, EV71, 3Nancy	11.8.2016	BL21 DE3 20 °C
5. CDC11, HRV16, 3Nancy	1.9.2016	C43 28 °C
6. CDC7, PV1, RVC3	8.9.2016	C43 28 °C
7. EV71, CDC16	13.9.2016	C43 28 °C

5.3 Puhdistus

Korkeapaineisesti hajotetut solut, niiden solukalvot sekä muut solun sisäiset organelit ja liukoinen proteiini eroteltiin sentrifugoimalla 20 000xg 30 minuutin ajan (liite 4, ultrasentrifuugi). Proteiinia sisältävä supernatantti puhdistettiin IMAC-tekniikalla sitouttamalla kohdeproteiinit ensin Ni-NTA-agarooseihin. Pylvääseen pakattava Ni-NTA-agarooosi (liite 4) pestiin useita kertoja sitoutuspuskurilla ennen pipetointia näytteen sekaan. Näytettä oli yleensä 60–100 ml ja agarooosia pipetoitiin 1 ml per näyte. Näytesitoutusliuosta inkuboitiin vaihtelevasti 1–16 tuntia. Inkuboinnin jälkeen agarooosi sentrifugoitiin kevyesti alas 1000xg (liite 4, fermentorin sentrifuugi) kahden minuutin ajan ja supernatantti poistettiin. Tämän jälkeen agarooosi, johon kohde proteiini oli kiinnittyneenä, siirrettiin takaisin pylvääseen sitoutuspuskurin avulla. Proteiini-agarooosia pestiin kevyesti sitoutuspuskurilla ennen varsinaista eluutioita.

Proteiini eluoiitiin ulos Ni-NTA-agarosista viidellä eri eluutioliuoksella käyttämällä imidatsoligradienttia. Eluutioliuokset olivat keskenään muuten samat, mutta niissä oli kasvava määrä imidatsolia: 50 mM, 75 mM, 100 mM, 200 mM ja 500 mM. Jokainen fraktio kerättiin omaan astiaansa. Lopulta agaroozi pestiin vielä sitoutuspuskurilla ja 20 %:lla etanolilla ja säilöttiin etanoliin myöhempää käyttöä varten. Puhdistuksen jälkeen näytteet mahdollisesti dialysoitiin toiseen puskuriin ja kuivattiin kylmäkuivurilla (liite 4).

Hajotuksen ja puhdistuksen aikana näytteitä otettiin heti hajotuksen jälkeen supernatantista ja pelletistä, jotta nähtiin, että kohdeproteiini oli tuottunut, saatu liukoiseen muotoon eikä sitä ollut jäänyt solupartikkeleiden sisään. Pesuliuoksista otettiin myös näyte, jotta varmistuttiin proteiinin kiinnittymisestä agarosoiin ja agarosoin riittävästä määrästä. Lisäksi otettiin näyte jokaisesta eluutiofraktiosta sekä viimeisestä pesusta, jotta nähtiin, missä fraktiossa kohdeproteiini eluoiutui ulos (konsentraatio suurin) ja varmistukseksi, että eluutioliuosten imidatsolikonsentraatiot sekä eluutiotilavuudet olivat riittävät.

5.4 Karakterisointi

Puhdistuksen aikana otetut näytteet käsiteltiin SDS-PAGE-puskurilla 1:5 laimennoksella ja kuumennettiin 100 °C:ssa viiden minuutin ajan. Denaturoituneet näytteet pipetoitiin rinnakkain itse valmistetuille 15 %:lle SDS-PAGE geeleille, joita ajettiin 300 V jännitteellä noin 32 minuutin ajan. Ensimmäinen geeleistä värjättiin kevyen vesipesun jälkeen sinsellä PageBlue-värillä (liite 4). Geeliä inkuboitiin värissä huoneenlämmössä yön yli, jonka jälkeen se pestiin vedellä ja laitettiin kuivumaan.

Positiivista kontrollia käytettiin yhdellä geelillä 1–3 eri pitoisuutta, 1:2, 1:5 ja 1:10, jotta saatiin havainnollistettua fraktion sisältämää proteiinikonsentraatiota. Geelissä positiivisena kontrollina toimi histidiini-kahvan omaavat Taliini-proteiinit, joiden konsentraatiot ja koot olivat 0,595 mg/ml ja 50 kDa (hTalH1) tai 0,310 mg/ml ja 48 kDa (hTalH10B). Kokomarkkereina käytettiin tunnettuja molekyyliä sisältäviä liuoksia kuten esivärjättyä (prestained) ja värjäämätöntä (unstained) proteiinimarkkeria (liite 4).

Toiselle värjäämättömälle geelille suoritettiin Western blot. Nitroselluloosa kalvo siirrettiin blottauksen jälkeen 5 %:seen maito-TBS-Tween(0,05%)-liuokseen blokkaukseen. Kalvon annettiin inkuboitua blokkauksessa yhden tunnin ajan huoneenlämmössä tasoravistelijalla, mikäli blokkauksaika oli pidempi, se tehtiin +4 °C:ssa. Kaikkien tulevien vasta-aineiden laimennokset oli tehty 5 %:seen maito-TBS-Tween(0,05%)-liuokseen.

Maitoblokkauksen jälkeen kalvo käsiteltiin primäärivasta-aineella yhden tunnin inkubointiajalla huoneenlämmössä tasoravistelijalla, pidemmissä inkubaatioajoissa blotin säilytyslämpötila oli +4 °C:ta. Vasta-aineiden optimoinnin myötä päädyttiin odyssey-tekniikkaan, jossa primäärivasta-aineesta, anti mouse α -His (liite 4), käytettiin 1:3 000 laimennosta. Inkuboinnin jälkeen primäärivasta-aine pestiin huolellisesti pois TBS-Tween (0,05%)-liuoksella 3 kertaa 5 minuutin inkubaatioajoilla.

Sekundäärivasta-aineesta, goat anti mouse IRDye 800CW (liite 4), käytettiin 1:5 000 laimennosta. Inkubaatioaika oli 1,5 tuntia huoneenlämmössä tasoravistelijalla. Inkubaation jälkeen blotti pestiin kolme kertaa 5 minuutin ajan TBS-Tween(0,05 %)-liuoksella. Viimeisessä ylimääräisessä pesussa ennen mittausta ja myös blotin säilytysliuoksena käytettiin 1xTBS-liuosta. Sekundäärivasta-aineen infrapunafluoresenssileiman ansiosta proteiini kuvattiin Odyssey Clx-laitteella (liite 4).

Aktiivisuusmittaukset spektrofluorometrilla (liite 4) suoritettiin liuottamalla kylmäkuivatut näytteet mittauspuskuriin. Mittauspuskurina oli 20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl ja 1 mM EDTA liuos. Kyseiseen puskuriin tehtiin myös 1 μ M FRET-peptidiliuos, jota aktiivinen proteiini pilkkosi. Peptidiliuokseen lisättiin myös 10 μ g/ml BSA:ta. Fluoresenssin intensiteetti mitattiin aallonpituudella 493 nm. Raot eli tulevan valon intensiteetti säädettiin 4 nm:in. Ensin kyvetistä mitattiin erikseen pelkän mittauspuskurin ja peptidiliuoksen intensiteetti 300 sekunnin ajalla. Peptidin FRET-parin ja positiivisen kontrollin toimivuus varmistettiin lisäämällä peptidiliuokseen 126 nM:sta (ensimmäisellä kerralla 1260 nM:sta) 2A-proteaasia (liite 4). Kyvetti pestiin huolellisesti ja liuokset vaihdettiin jokaisen näytteen kohdalla.

EDTA:n ja agarosista mahdollisesti irtoavan nikkelin vaikutusta näytteisiin tutkittiin työn ohella, kun todettiin ensimmäisissä mittauksissa näytteiden aktiivisuuksien olevan matalat. Mittauksessa määritettiin ensin positiivisen kontrollin intensiteetti peptidiliuoksen kanssa ja lisättiin samaan kyvetiin 1 mM:sta nikkeli(II)sulfaattia. Lopuksi vielä samaan kyvetiin lisättiin 5 mM:sta EDTA:ta ja katsottiin, että ehkäiseekö se nikkelin inhiboivaa vaikutusta. Viimeisessä mittauksessa näytteitä inkuboitiin kaksi vuorokautta 5 mM:ssa EDTA:ssa aktiivisuuksien parantamiseksi. Myös 2A-positiivista kontrollinäytettä inkuboitiin 2 vuorokautta 1 mM:ssa nikkeli(II)sulfaatti-liuoksessa. Inkuboinnin jälkeen näytteet pipetoitiin normaalisti FRET-parin omaavan peptidiliuoksen sekaan (intensiteetti mitattu ensin) ja 300 sekunnin jälkeen varmistettiin tulos vielä toimivalla 2A-proteaasikontrollilla.

6 TULOKSET

6.1 Plasmidin eristys ja sekvensointi

Plasmidien konsentraatiot määritettiin UV-Vis-spektrometrin avulla ja ne vaihtelivat välillä 50–130 ng/ml. Plasmidien puhtaus voidaan arvioida aallonpituuksien 260/280 nm suhteesta, minkä pitäisi olla lähellä 1,8 puhtaalle DNA:lle. Työssä eristetyt plasmidit olivat puhtaita niiden suhdeluvun perusteella (esimerkki tuloksesta liitteessä 5), jonka jälkeen niitä voitiin käyttää sekvensointireaktioissa. Plasmidien sisältävän geenin oikeellisuus varmennettiin sekvensoimalla. Ei-toivottuja mutaatioita ei havaittu ja plasmidit vastasivat suunniteltuja konstruktteja. HRV14 plasmidia ei onnistuttu sekvensoimaan.

6.2 Tuotto, puhdistus, vasta-aine- ja totaaliproteiinivärjäys

Tuottojen tulokset on eritelty alla oleviin taulukoihin, BL21 Star DE-soluissa tehdyt tuotot ovat taulukossa 3. Taulukoissa esiintyvät yhden tuoton eluutiofraktioiden keskimääräiset konsentraatiot on laskettu niistä eluutiofraktioista, joissa proteiini on havaittu blotilla vasta-ainevärjäyksessä. Mikäli siis fraktiossa ei ole vasta-ainevärjäyksen mukaan oikeaa proteiinia, ei kyseistä fraktiota ole huomioitu laskuissa. Suluissa esiintyvät F1-F5 osoittavat, mistä eluutiofraktioista kyseinen konsentraatio on laskettu. Osa fraktioista, joissa oli kohdeproteiinia dialysoitiin ja kylmäkuivattiin. Dialyysissä menetettiin proteiinia useimmissa tapauksissa proteiinin aggregaation takia.

TAULUKKO 3. Tuottojen tulokset BL21 Star DE3-tuottosoluissa

Työssä käytetty nimi ja tuottopari järjestys	Tuottotilavuus ja tuottosolu	Indusoinnin jälkeinen lämpötila (°C)	Puhdistuksen jälkeinen [C] (mg/ml)	Saanto per litran tuotto (mg)	Havaittu blotissa	Dialyysin jälkeinen [C] (mg/ml)	Havaittu blotissa dialyysin jälkeen
1. CDC7	500ml BL21 DE3	28	0,027 (F4-5) = 1,63µM	0,54	Kyllä	0,013 (F4-5)	ei tarkistettu
4. CDC11	1000ml BL21 DE3	20	0,136 (F4-5) = 7,8µM	0,68	Kyllä	Hävisi dialyysissä	Ei
4. 3Nancy	1000ml BL21 DE3	20	0,194 (F4-5) = 11,3µM	0,97	Kyllä	Hävisi dialyysissä	Ei
4. EV71	1000ml BL21 DE3	20	0,312 (F2-5) = 18,3 µM	3,12	Kyllä	Hävisi dialyysissä	Ei
2. PV1	500ml BL21 DE3	28	0,211(F4) = 12,1µM	2,11	Kyllä	Hävisi dialyysissä	Ei
2./3. CDC16	500ml BL21 DE3// 1000ml BL21 DE3	28//20	0,123(F1-5) = 7,1µM// Ei tuot- tunut	6,16	Kyllä/Ei	Hävisi dialyysissä// ei tuot- tunut	Ei
2./3. HRV16	500ml BL21 DE3// 1000ml BL21 DE3	28//20	Ei tuotunutta BL21 DE3 soluissa	-	-	Ei tuotunutta BL21 DE3 soluissa	-
HRV14	Sekvensointi epäonnistunut	-	-	-	-	-	-
1. RVC3	500ml BL21 DE3	28	0,020 (F4) = 1,15µM	0,20	Kyllä (F4)	0,020 (F4)	Ei tarkistettu

2A-proteaseja tuottui niukasti BL21-soluissa, joten kokeilimme soluille myrkyllisille proteiineille tarkoitettua C43 *E. coli*-kantaa. Taulukossa 4 on kyseisen tuoton tulokset.

TAULUKKO 4. Tuoton tulokset C43-tuottosoluissa

Työssä käytetty nimi	Tuottotilavuus ja tuottosolu	Indusoinnin jälkeinen lämpötila (°C)	Puhdistuksen jälkeinen [C] (mg/ml)	Saanto per litran tuotto (mg)	Havaittu blotissa	Dialyysin jälkeinen [C] (mg/ml)	Havaittu blotissa dialyysin jälkeen
2. CDC7	1000ml C43	28	0,294 (F3-5) = 16,9µM	2,21	Kyllä hen- nosti	Ei dialysoitu	-
1. CDC11	1000ml C43	28	0,187 (F2-5) = 10,7µM	1,87	Kyllä	0,156 → 0,042 (F3)	Ei
1. 3Nancy	1000ml C43	28	0,153 (F2-4) = 8,84µM	1,15	Kyllä	0,142 → 0,130 (F3)	Ei
3. EV71	1000ml C43	28	0,222 (F2-5) = 12,8µM	2,22	Kyllä	Ei dialysoitu	-
2. PV1	1000ml C43	28	Ei tuottoa C43 solussa	-	Ei	-	-
3. CDC16	1000ml C43	28	Ei tuottoa C43 solussa	-	Ei	-	-
1. HRV16	1000ml C43	28	Ei tuottoa C43 solussa	-	Ei	-	-
HRV14	Sekvensointi epäonnistui	-	-	-	-	-	-
2. RVC3	1000ml C43	28	Ei tuottoa C43 solussa	-	Ei	-	-

BL21-soluissa tuotetuissa proteaaseista tunnistettiin his-tag-värjäyksessä CDC7:n eluiofraktioista F4 ja F5 sekä RVC3:n eluiofraktiosta F4 (liite 6 vyöhyke 15 kDa kohdalla). Lisäksi RVC3:n vasta-ainevärjäyksessä oli havaittavissa vyöhyke (merkitty blottiin Flow1= supern2), joka oli sitoutuksen jälkeisessä supernatantissa sekä ennen varsinaista elutiota olevassa proteiinin-agarosin ensimmäisessä pesufraktiossa. Tämä antaisi viitteitä osittain epäonnistuneesta sitoutuksesta Ni-NTA-agarosiin ja siten selittäisi

myös kyseisen 2A-proteaasin heikon saannon. Sama tilanne oli havaittavissa CDC7:n vasta-aineväryyksessä (liite 6 fraktio flow1=supern2). Näiden fraktioiden dialyysin onnistumisesta ei voida olla varmoja, sillä dialyysituotteita ei vasta-ainevärytty uudelleen kohdeproteiinin tunnistamiseksi.

Toisessa tuotossa (tuottopareina CDC16, PV1 ja HRV16) CDC16 ja PV1 tuottuivat hyvin (taulukko 3 yllä). Vasta-aineväryyksessä CDC16:ssa näkyi vyöhyke jokaisen eluutiofraktion F1-F5 kohdalla ja myös hajotuksen jälkeen olevassa pelletissä (liite 7). Osa proteiinista oli jäänyt soluosien sisälle tai korkeapaine hajotus ei ollut täysin onnistunut. CDC16:n vahvin bändi oli eluutiofraktio F4 ja sen konsentraatio 0,295 mg/ml. Fraktiot F4 ja F5 dialysoitiin yhdessä. Ennen dialyysia proteiinkonsentraatio (F4-5) oli 0,187 mg/ml ja dialyysin jälkeen 0,047 mg/ml. PV1:n ainut vasta-aineella näkyvä fraktio oli F4. Sen konsentraatio ennen dialyysia oli 0,211 mg/ml ja dialyysin jälkeen 0,017 mg/ml. Näytteistä ei havaittu kohdeproteiinia dialysoinnin jälkeen vasta-aineväryyksessä, joten ne hävitettiin. HRV16:ssa oli vasta-aineväryyksen mukaan selkeä vyöhyke hajotuksen jälkeisen pellettifraktion kohdalla, vaikka proteiinin olisi pitänyt näkyä supernatanttifraktiossa (blotilla supern1). Proteiini siis tuottui, mutta hajotus eli proteiinin vapauttaminen solun sisältä oli jostain syystä epäonnistunut.

CDC16 ja HRV16 tuotettiin uudelleen alemmalla indusoinnin jälkeisellä inkubointilämpötilalla +20 °C:ssa, jotta nähtiin tuottuiko kyseiset proteiinit paremmin alemmilla lämpötiloilla. Lämpötilan alennus ei lisännyt proteiinin tuottoa HRV16:ssa eikä myöskään CDC16:ssa, sillä kohdeproteiinia ei tässä tuotossa tuottunut lainkaan. Kohdeproteiinista ei ollut jälkiä missään näytefraktiossa (liite 8), joten näytteet hävitettiin.

Neljännessä tuotossa (3Nancy, CDC11 & EV71), jossa lämpötilaa alennettiin indusoinnin jälkeen +20 °C:seen, 3Nancy näytti tuottuvan kohtalaisesti, sillä proteiini näkyi fraktioissa F4-F5 hyvin hennosti. Kyseisen 2A-proteaasin totaaliproteiinväryyksen mukaan eluutiofraktiossa F4 olisi paljon epäpuhtauksia, kun taas eluutiofraktio F5 näyttäisi olevan puhdas (liite 9). CDC11 tuottui taulukko 3:ssa lasketun saannon mukaan jopa heikommin kuin 3Nancy, mutta proteiinin vasta-aineväryyksen ja totaaliväryyksen mukaan silmä määräisesti katsottuna kohdeproteiinin konsentraatio oli suurempi kuin 3Nancyn fraktioissa (liite 9). CDC11:n vasta-aineväryyksen mukaan proteiinia oli eluutiofraktioissa F2-F5 sekä loppupesufraktiossa (merkitty blottiin ”last wash”). Tuntemattomasta syystä koh-

deproteiinia oli eluoitunut ulos vielä loppupesun aikana. Mahdollista myös on, että fraktioiden 2,5 ml:n eluutitilavuus ei ollut riittävä tässä kohtaa. CDC11:n selvästi vahvin vyöhyke oli eluutiofraktiossa F4 ja taas puhtain fraktio oli F5, sillä sen totaaliproteiinvärijäyksessä ei muita proteiineja näkynyt.

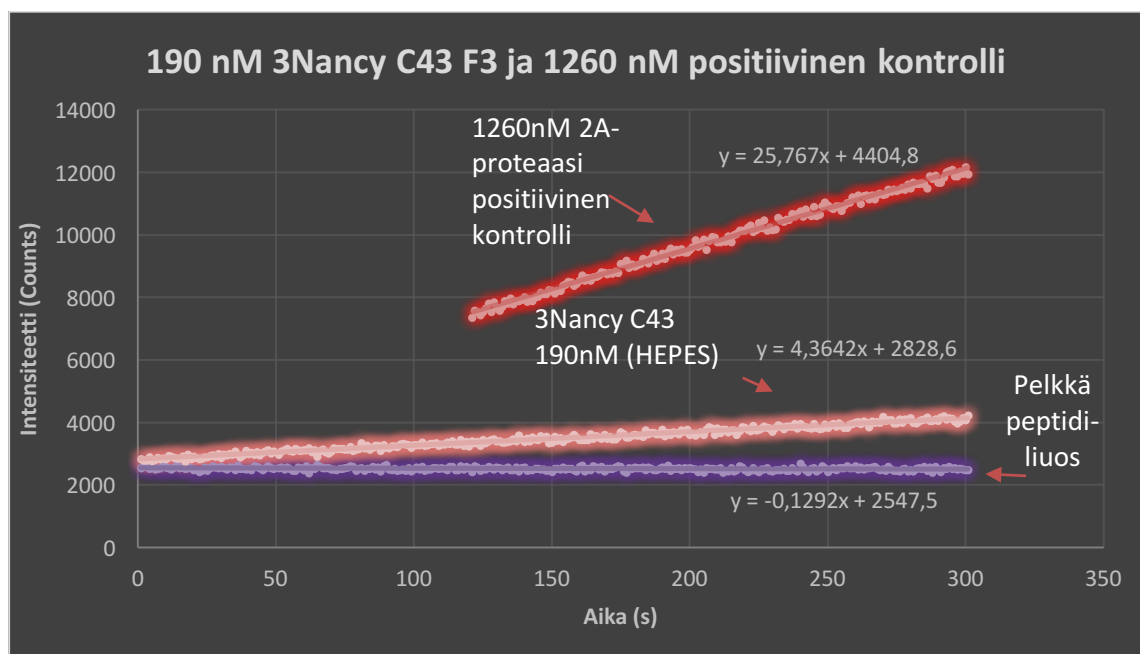
Samassa tuotossa oli myös kolmas 2A-proteaasi EV71, joka tuottui erittäin hyvin (kokonaissaanto 3,12 mg:a litrassa kasvatusliuosta). EV71 vasta-ainevärijäyksessä näkyivät vyöhykkeet kaikista eluutiofraktioista F1-F5 sekä ensimmäisen pesuliuksen fraktiossa, ennen agarosiin sitoutetun supernatanttifraktiosta sekä pellettifraktiosta (liite 9). Tästä voidaan päätellä, että kaikki haluttu proteiini ei sitoutunut täysin Ni-NTA-agarosiin ja proteiinia hävisi jo ennen puhdistusta. Vasta-ainevärijäyksessä EV71:n selvästi vahvin vyöhyke oli eluutiofraktiossa F4. Totaalivärijäyksessä vahvimmat vyöhykkeet olivat eluutiofraktioissa F2-F5, pesuliuksessa (merkittynä blottiin Wash1) ja pelletissä. Totaalivärijäyksen mukaan puhtain näyte oli eluutiofraktiossa F5. Suurin kohdeproteiinikonsentraatio oli eluutiofraktiossa F4, jossa oli myös muita epäpuhtauksia paljon.

3Nancy:n, CDC11:n ja EV71:n dialyysin jälkeiset NanoDrop-spektrometrillä mitatut konsentraatiotulokset olivat epämääräisiä, johtuen proteiinien mahdollisesta sakkautumisesta dialyysin aikana. Proteiineja ei dialyysin jälkeen tunnistettu vasta-aineella (liite 10) ja siten kyseisen tuoton näytteet hävitettiin.

C43-tuoton saannot olivat pääsääntöisesti parempia niiden proteiinien osalta, jotka siinä tuottuivat (taulukko 4). Ainut poikkeus oli EV71, joka tuottui BL21-tuoton saantoon (3,12 mg) nähden huonommin C43-solussa (2,22 mg). Kuitenkin vasta-ainevärijäyksissä EV71:n kohdeproteiini näyttää tuottuvan puhtaammin C43-soluissa (liite 13). C43-soluissa eivät tuottuneet lainkaan PV1, RVC3, CDC16 ja HRV16 vasta-ainevärijäyksien tulosten perusteella, tulokset liitteissä 11 ja 12. HRV16 ei siten tuottunut kummassakaan tuottosolussa.

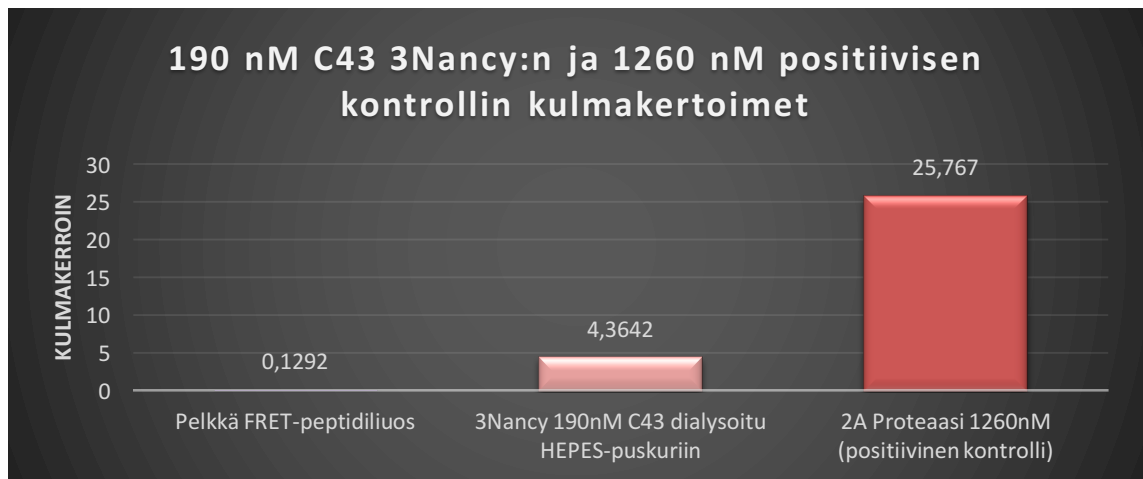
6.3 Aktiivisuusmittaukset

Tuoton ja vasta-ainevärjäyksien perusteella tehdyistä näytevalinnoista saatiin aktiivisuuskokeisiin yhteensä viisi eri 2A-proteaasia: 3Nancy, CDC11, CDC16, CDC7 ja EV71. Kuviossa 10 näkyy ensimmäisen mittauksen tulokset. Punaisena positiivisen kontrollin intensiteetin kasvu ajan funktiona. Suorien kulmakerroin vastaa proteiinin aktiivisuutta. Mitä jyrkempi suora, sitä aktiivisempi proteiini tai suurempi on proteiinkonsentraatio. Esimerkiksi pelkän FRET-peptidiä (eIF4G) sisältävän liuoksen kulmakerroin on lähellä nollan molemmilla puolilla, sillä liuoksessa ei ole peptidiä pilkkovaa 2A-proteaasia. Kuviossa 10 vaaleanpunaisella 3Nancy C43-tuotosta ja sen eluutiofraktio F3 sekä violetilla FRET-peptidiliuos.



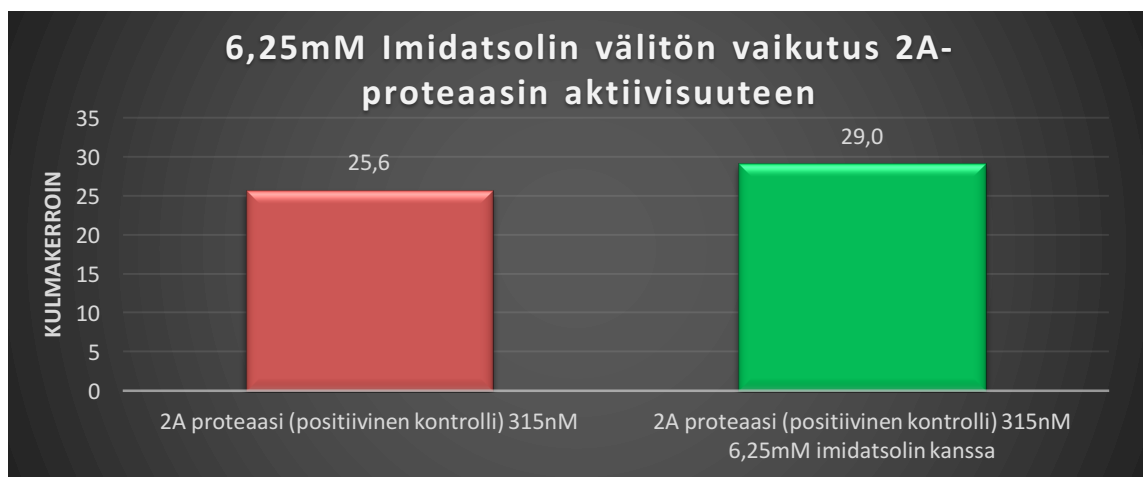
KUVIO 10. 3Nancy:n ja 2A-proteaasin positiivisen kontrollin aiheuttama intensiteetin kasvu ajan funktiona

3Nancy-näytteen positiivinen kulmakerroin 4,4 kertoo sen olevan aktiivinen ja kykenevän katkaisemaan FRET-peptidin. 3Nancy:n pienempi kulmakerroin verrattuna 2A-proteaasin positiiviseen kontrolliin johtuu näytteiden suuresta konsentraatioerosta. 3Nancy:n konsentraatio oli 190 nM:a ja positiivisella kontrollilla 1260 nM:a (kuvio 10 ja kuvio 11 alla).



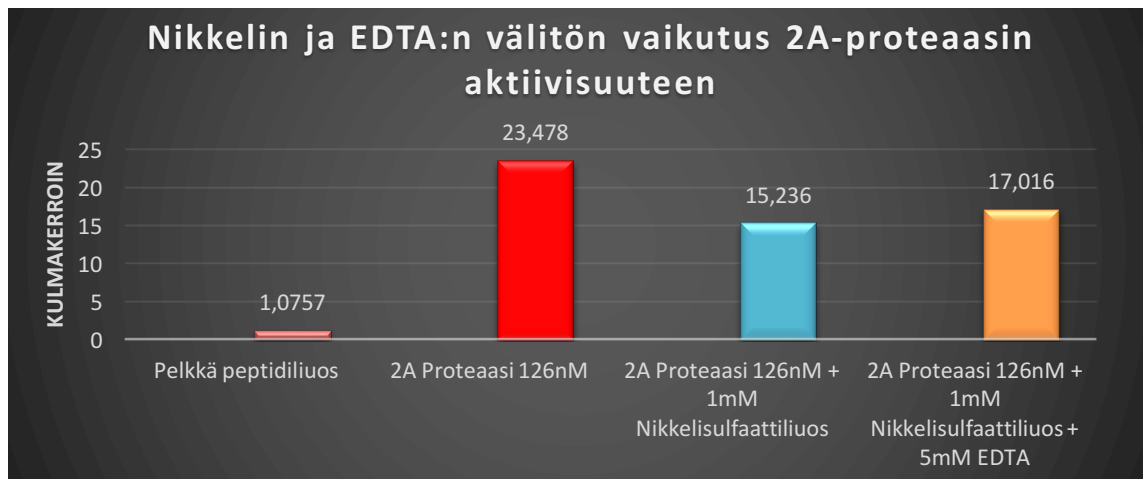
KUVIO 11. 3Nancy:n ja 2A-positiivisen kontrollin kulmakertoimet

Aktiivisuutta havaittiin myös CDC11:llä (F3) C43-soluissa tuotetulla 2A-proteasilla. Kulmakertoimeksi laskettiin noin 9,6 ja näytteen pitoisuus oli 500 nM:a. Imidatsolin sekä nikkeli(II)sulfaattiliuoksen vaikutusta tutkittiin 315 nM:een 2A-positiiviseen kontrolliin. Imidatsolin mahdollisesti inhiboiva vaikutus haluttiin sulkea pois. Kuviossa 12 alla on havaittavissa, että 6,25 mM:lla imidatsolilla (vihreä palkki) ei ollut välitöntä vaikutusta positiivisen kontrollin aktiivisuuteen.



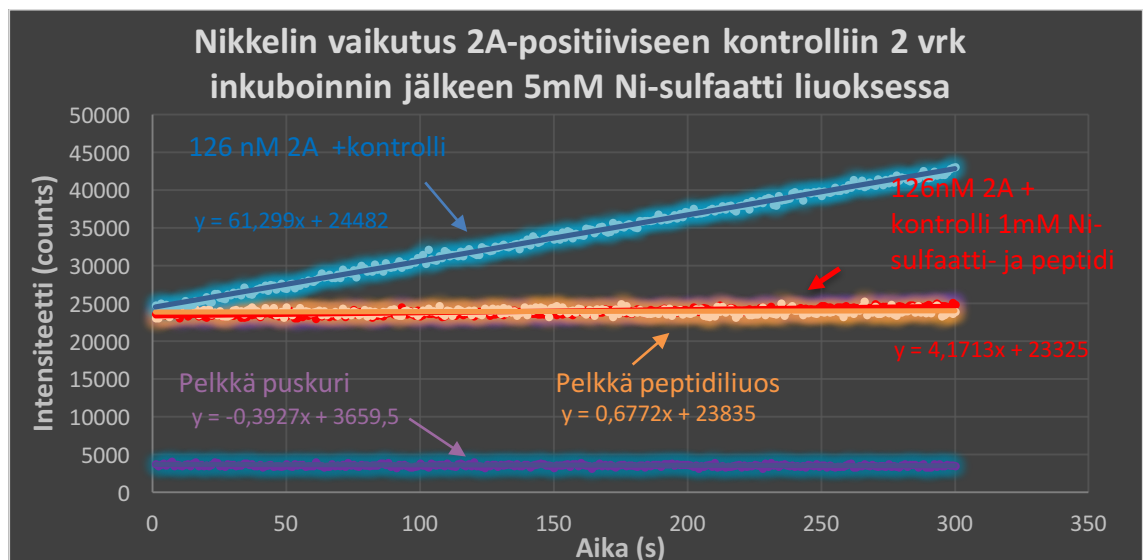
KUVIO 12. Imidatsolin välitön vaikutus 2A-positiivisen kontrollin aktiivisuuteen

Peptidiliuokseen, jossa oli jo 126 nM positiivinen kontrolli, lisättiin 1 mM nikkeli(II)sulfaattiliuos ja suoritettiin viiden minuutin mittaus (kuvio 13). Tämän jälkeen lisättiin myös 5 mM EDTA ja mitattiin uudestaan viiden minuutin ajan. Kulmakertoimista voidaan päätellä, että nikkeli inhiboi välittömästi positiivisen kontrollin aktiivisuutta (pudotus 23,5:stä 15,2:a), mutta EDTA:n lisäys tämän jälkeen ei pysty palauttamaan aktiivisuutta ennalleen.



KUVIO 13. Nikkelin ja EDTA:n välitön vaikutus 2A-positiiviseen kontrolliin

Nikkelin vaikutusta tutkittiin myös pidemmällä aikavälillä inkuboimalla 126 nM:sta positiivista kontrollia kaksi vuorokautta 1 mM:ssa nikkeli(II)sulfaattiliuoksessa. Tulos alla kuviossa 14 ja 15. Näiden mittausten tulokset ovat selkeät: nikkeli(II)sulfaatti inhiboi 2A-kontrollin aktiivisuutta. Kuvio 14:ta positiivisen kontrollin ja nikkelin seoksen (punaisella) intensiteetin olematonta kasvua ei pysty edes erottamaan FRET-peptidi liuoksen (oranssi) vastaavasta. Sinisellä on esitetty vertailukohteeksi 126 nM positiivinen kontrollin (ilman nikkeliä) intensiteetin kasvu ajan funktiona. Violetilla oleva suora on puskuriliuoksen intensiteetti, johon alun perin FRET-peptidi on laimennettu.



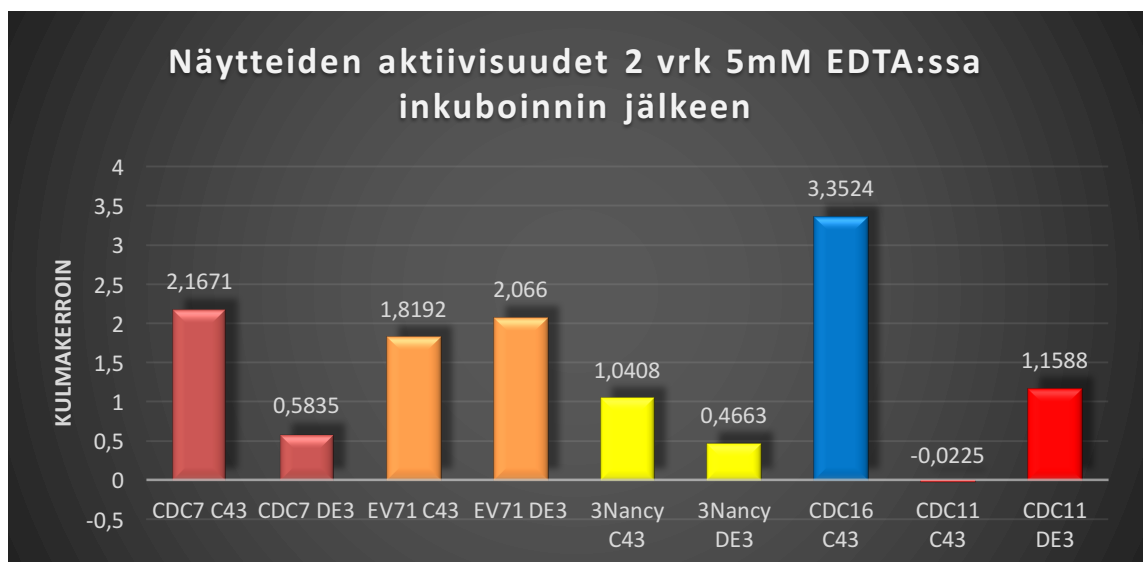
KUVIO 14. Nikkelin vaikutus positiiviseen kontrolliin kahden vuorokauden jälkeen

Kuvio 15 alla on vielä selvemmin havainnollistettu positiivisten kontrollien kulmakertoimien ero. Nikkeliä sisältävässä 126 nM positiivisen kontrollin kulmakerroin on 4,2 kun taas ilman nikkeliä sen kulmakerroin on 61,3.



KUVIO 15. Nikkelin vaikutus positiiviseen kontrolliin

Koska nikkelin todettiin inhiboivan 2A-proteaasien aktiivisuutta aikaisempien mittausten perusteella, kaikkia jäljellä olevia näytteitä inkuboitiin kaksi vuorokautta 5 mM:ssa EDTA-liuoksessa. Toiveena oli edes hieman vähentää nikkelin inhiboivaa vaikutusta näytteissä. Kuvio 16:ssa alla on havaittavissa positiivisia kulmakertoimia. Kyseisessä kuvioissa näytteiden perässä oleva lyhenne DE3 tarkoittaa BL21-tuottosolulinjaa. Kulmakertoimia ei voida verrata keskenään, sillä niiden näytepitoisuudet ovat erilaiset. Positiivisista kulmakertoimista voidaan kuitenkin päätellä, että aktiivisuutta osoittavat kaikki mittauksessa mukana olleet näytteet. Tästä mittauksesta puuttuvat RVC3 ja PV1.



KUVIO 16. Näytteiden aktiivisuudet 5mM:ssa EDTA:ssa kahden vuorokauden jälkeen

6.4 Yhteenveto aktiivisuusmittaukset, vasta-aine- ja totaaliproteiinvärjäys

Aktiivisuusmittausten näytteiden tiedot, tulokset (kulmakerroin) ja tunnistuminen vasta-aine- ja totaaliproteiinvärjäyksissä taulukoituna alla tuottosolun mukaan (taulukko 5 ja 6). Taulukoiden tarkoituksena on hahmottamaan mahdollista yhteyttä aktiivisuuksien ja vasta-ainevärjäysten välillä. Taulukossa 5 on BL21-tuoton tulokset ja vastaavasti taulukossa 6 on C43-tuoton tulokset.

TAULUKKO 5. BL21-tuoton aktiivisuuksien, vasta-aine- ja totaalivärjäyksien tulokset

Työssä käytetty nimi	Näyte BL21	Konsentraatio (mg/ml)	Kulma-kerroin	Näkyvyys vasta-ainevärjäyksessä	Näkyvyys totaaliproteiinvärjäyksessä
CDC7	F4-5 Hepes	0,013	0,58	F4-5 vahva	F4-5 (puhdas)
CDC11	F3_1 imidatsoli	0,198	1,2	F2-5 hennosti, F4 vahvin	F1-5, F4 vahvin
3Nancy	F3_1 imidatsoli	0,407	0,5	F3-5 todella hennosti	F4
EV71	F1_4 imidatsoli	0,461	2,1	F4 vahva, myös F1-5 heikosti	F4 vahva, F2-5

TAULUKKO 6. C43-tuoton aktiivisuuksien, vasta-aine- ja totaalivärjäyksien tulokset

Työssä käytetty nimi	Näyte C43	Konsentraatio (mg/ml)	Kulma-kerroin	Näkyvyys vasta-ainevärjäyksessä	Näkyvyys totaaliproteiinvärjäyksessä
CDC7	F3-5 Imidatsoli	0,284	2,2	F4-5 hennosti	F3-5 vahvasti (epäpuhdas)
CDC11	F2, F4-5 imidatsoli	0,198	-0,02	F3-5 vahvasti, F2 heikosti	F2-5 hennosti, F4 vahvasti
3Nancy	F2+F4 imidatsoli	0,159	1,04	F3-4 vahvasti, F2&F5 heikosti	F2-5, F4 vahva
EV71	F5 imidatsoli	0,163	1,8	F2-5 selkeästi	F2-5 selkeästi (epäpuhdas)
CDC16	F2 imidatsoli	0,292	3,4	negatiivinen	F2-3 hennosti (epäpuhdas)

Kuten molemmista taulukoista on havaittavissa suoraa yhteyttä vasta-ainevärjäyksen positiivisessa tuloksessa (vyöhykkeen intensiteetissä) ja aktiivisissa näytteissä ei ole. Taulukossa 5 yllä esimerkiksi EV71, jonka saanto oli DE3-tuotossa paras (3,12mg/l) kulma-kerroin oli 2,1 eli näyte oli aktiivinen. Kuitenkaan kyseinen aktiivinen näyte fraktiosta F1 luettiin negatiiviseksi sekä vasta-aine- että totaalivärjäyksessä (liite 9).

Taulukossa 6 CDC16 on C43-tuotosta selvä esimerkki siitä, että vaikka näyte ei tunnistunut vasta-ainevärjäyksessä lainkaan, se silti sisälsi aktiivista 2A-proteaasia. CDC11 puolestaan näkyi selkeästi blotilla, mutta ei jostain syystä tässä mittauksessa osoittanut aktiivisuutta. Kyseisen saman tuoton dialysoitu eluutiofraktio F3 oli aktiivinen aikaisemmassa mittauksessa.

7 TULOSTEN TARKASTELU

7.1 Kloonaus, plasmidin eristys ja sekvensointi

Itse kloonausvaiheen työsuorituksessa ei ollut käytännön haasteita. Myös plasmidin eristys miniprep-menetelmällä sujui pääpiirteittäin hyvin. Sekvensointireaktion ja etanoliprecipitaation suorittaminen oli tarkkuutta vaativa työvaihe. Työvaiheen onnistumista tai epäonnistumista on haasteellista arvioida. Mikäli sekvensointi oli onnistunut ja siten haluttu sekvenssi löydetty näytteestä, oli kaikki työvaiheet onnistuneet. Kuitenkin jos sekvensoinnissa näkyi vain vektorin sekvenssi, oli itse sekvensointireaktio onnistunut, mutta insertin liittäminen plasmidiin epäonnistunut. Usein oli myös epämääräisiä sekvensointituloksia, joista ei löytynyt haluttua sekvenssiä. Epämääräiset tulokset saattoivat johtua epäonnistuneesta sekvensoinnista, epäonnistuneesta sekvensointireaktion teosta tai siitä, että insertti-plasmidi ei ollut lainkaan transformoitunut TOP10-soluun ja siten monistettu ja eristetty DNA olisi sisältänyt jotain muuta. HRV14 sekvensoinnin epäonnistumiseen on todennäköisesti syynä jo alun perinkin tuotteen virheellinen geenisekvenssi.

7.2 Tuotto ja puhdistus

Tuoton tuloksissa on otettava huomioon, että periaatteessa vain rinnakkain tuotettuja proteiineja voidaan täysin verrata keskenään, sillä vain samassa aikaan tuotossa olleilla 2A-proteaaseilla tuotto-olosuhteet ovat olleet samat. Tuotto-olosuhteiden eroja aiheuttavat tekijät ovat muun muassa lämpötila, ilman riittävyys ja inkubointiaika.

Ilmoitettujen proteiinien konsentraatiot on annettu NanoDrop-spektrometrin ilmoittaman tuloksen mukaan ja siten mukana on myös ei-toivottuja proteiineja epäpuhtauksina. Pelkän taulukon arvojen katsominen on siis virheellistä, vaan tuloksia pitäisi arvioida käyttäen hyväksi myös vasta-ainevärijäysten ja totaalivärijäysten tuloksia.

Aikaisemmin samassa laboratoriossa tuotetut 2A proteaasit (linja *Nancy*) ovat tuottuneet hyvin, jolloin saanto on ollut 20 mg yhdessä litrassa tuottoliuosta. Kyseinen *Nancy*-linja tuotettiin ja puhdistettiin samalla protokollalla kuten tämänkin työn 2A proteaasit, paitsi dialyysin sijaan puskurin vaihtoon käytettiin geelisuodatusta. Kuitenkin myös silloin oli

ollut ongelmia proteiinin aggregaation takia. Lisäksi kyseinen *Nancy*-linjan näytteitä käytettiin tämän työn aktiivisuusmittauksissa positiivisena kontrollina.

Vasta-ainevärjäyksen tulosten perusteella useissa tapauksissa sitoutuksen jälkeiseen supernatanttiin (merkitty FLOW1=Supern2) ja alun pesuliukuksiin (merkitty wash1 tai 2) oli jäänyt kohdeproteiinia. Tämä johtuu mahdollisesti siitä, että Ni-NTA-agarosia oli proteiinien nähden liian vähän, sitoutumisen inkubaatioaika oli liian lyhyt. On myös mahdollista, että näyteliuoksessa oli kohdeproteiinin kanssa sitoutumisesta agarosiiin kilpaileva yhdiste esimerkiksi näyteliuoksen liian korkea imidatsolipitoisuus. Agarosin vähäisyys on hyvin epätodennäköistä, sillä valmistajan ilmoittaman tiedon mukaan 1 ml Ni-NTA-agarosia pitäisi sitoa 50 mg kohdeproteiinia, työn korkein proteiinipitoisuus oli vain noin 0,3 mg/ml.

Vasta-ainevärjäyksissä havaittiin kohdeproteiinin olevan usein ei-toivotusti hajotuksen jälkeisessä pelletissä. Tämä on merkki siitä, että kohdeproteiinia ei saatu vapautettua solun sisältä. Syy siihen on joko se, että hajotus ei ole ollut tarpeeksi tehokas tai sitten proteiini oli niin syvällä soluosien sisällä esimerkiksi inkluusiobodeissa. Kohdeproteiinin vapauttaminen soluosien sisältä onnistuisi ainoastaan denaturoivissa olosuhteissa esimerkiksi 8 M:sen urean avulla. Mainittakoon myös, että työn ensimmäisen tuottoparin BL21-tuotossa (CDC7:n ja RVC3:n) solun hajotukseen kokeiltiin korkeapaineen sijaan sonikointia, joka myös saattaisi selittää niiden heikon saannon muihin 2A-proteaaseihin nähden (taulukko 3). Sonikointia eli solun hajotusta ultraäänillä pidetään yleisesti tehottomampana solun hajotusmenetelmänä kuin korkeapaineista hajotusta.

Vasta-aine- ja totaalivärjäyksistä huomattiin myös, että fraktiossa F4 kohdeproteiinit eluoituivat parhaiten ulos (imidatsolipitoisuus noin 200 mM:a). Kuitenkin usein puhtain fraktio näyttäisi olevan F5, sen imidatsolipitoisuus on noin 500 mM. Tämä tulos antaa merkkejä siitä, että agarosiiin on kiinnittynyt halutun proteiinin lisäksi muita epäpuhauksia, joiden sitoutuminen Ni-NTA-agarosiiin ei kuitenkaan ole yhtä voimakasta kuin kohdeproteiinilla.

Vasta-ainevärjäyksissä on aina ollut vähintään yksi positiivinen kontrolli. Kaikki tulokset on annettu ainoastaan niistä vasta-ainevärjäyksistä, joissa positiivinen kontrolli on ollut positiivinen. Työn ohessa oli myös huomattavissa eroja esivärjätyn ja värittömän proteiini-

nikokomarkkerin (Page Blue prestained ja Page Blue unstained protein ladder) vyöhykkeiden liikkuvuudessa geelissä. Positiivisen kontrollin ja näytteiden annettujen molekyylipainojen perusteella vaikuttaisi värjäämätön markkeri olevan hieman parempi 15% SDS-PAGE-geelissä. Värjäämätön markkeri tuntuu liikkuvan geelissä paremmin ja sen proteiinivyöhykkeet ovat kapeampia ja tarkempia.

Dialyysissä on otettu huomioon dialysoinnin suoritus viileässä ja dialyysi-puskurin pH, jonka on oltava eri kuin kohdeproteiinin isoelektrinen piste. Halutun proteiinin häviäminen dialysoinnin aikana on selitettävissä sillä, että usein dialysoinnissa muodostui näyteliuokseen sakkaa. Sakkaa tosin saattoi muodostua jo ennen dialysointia. Esimerkiksi näytteen pakastamista ja sulattamista ei suositella tehtävän usein, koska ne voivat saada aikaan proteiinin aggregoitumista. Proteiinin aggregaatio tarkoittaa proteiinin laskostumista esimerkiksi vesiliuoksessa täysin tai osittain inaktiiviseen muotoon. Syitä siihen, miksi proteiinit saostuvat on monia, mutta niiden laaja-alainen tutkiminen on usein työlästä. Myös näytteen liian pitkäaikainen säilytys huoneenlämmössä on saattanut johtaa proteiinin hajoamiseen ja siten häviämiseen näyteliuoksessa.

Syytä kohdeproteiinien tuottumattomuuteen ei tiedetä. Merkillistä on myös, että HRV16:ta, jonka 2A-proteasista nähtiin merkkejä BL21-tuoton pelletissä, ei ollut merkkiäkään edes C43-tuoton hajoitus tuotteen pelletissä. Tuloksia tarkasteltaessa on huomioitava, että kyseiset tuotot tehtiin vain muutaman kerran ja eri indusoinnin jälkeisillä lämpötiloilla. Tulokset eivät siis ole täysin verrattavissa keskenään, mutta ne ovat kuitenkin suuntaa antavia.

7.3 Aktiivisuustaukset

Nikkelin inhiboiva vaikutus 2A-proteasien aktiivisuuteen on selkeä. Selvä linjaus on, että dialysoidut näytteet ja näytteet joita oli inkuboitu kaksi vuorokautta EDTA:ssa olivat aktiivisia. Nikkeli siis ilmeisesti häviää tai vähenee dialyysin yhteydessä EDTA:n avustuksella. Nikkelin inhiboiva vaikutus voi johtua siitä, että se sitoutuu 2A-proteasien aktiiviseen kohtaan tai se mahdollisesti syrjäyttää proteasien luonnollisen koordinaatiometallin sinkin, jonka uskotaan olevan välttämätön proteasien aktiivisuudelle.

Näytteen aktiivisuuteen ja kulmakertoimen suuruuteen vaikuttivat näytteiden aktiivisen kohdeproteiinin pitoisuus. Mikäli näyte oli jo ennestään laimea esimerkiksi CDC7 BL21-tuotosta, ei sen kulmakerroin voisi kovin suuri ollakaan, vaikka kyse oli puhtaasta eluutiiofraktiosta. Kyseisen näytteen tuotosta saatu konsentraatio oli 0,013 mg/ml ja aktiivisuusmittauksissa käytettiin pitoisuutta 74,7 nM. Aktiivisten näytteiden, joiden luultiin vasta-ainevärjäyksien perusteella hävinneen dialyysissä, näkymättömyys blotilla voidaan selittää pienellä kohdeproteiinikonsentraatiolla.

Kuten positiivisen kontrollin testeistä on todettu kulmakertoimen suuruus pitäisi olla melko suoraan verrannollinen näytteen 2A-proteaasin konsentraatioon. Näin ei kuitenkaan tämän työn mittausten perusteella yhtäjaksoisesti ollut johtuen erinäisistä työnsuorituksellisista virheistä. 126 nM:sen positiivisen kontrollin kulmakertoimet olivat ensimmäisissä mittauksissa 23–29 välillä kun taas yhdessä mittauksessa 61,3. Syy tähän saattaa olla, että vaikka kyseinen kontrolli oli samasta erästä kuin edellisetkin, on jossain vaiheessa saattanut käydä pipetointivirhe tai epäonnistunut homogenisointi, jolloin kyseiseen putkeen on päätenyt enemmän positiivista kontrollia.

Imidatsolin vaikutus 2A-proteaaseihin todettiin tässä työssä olevan olematon. Kuitenkin taas on otettava huomioon, että imidatsolin vaikutukseen ei suuresti paneuduttu. Työssä tehtiin vain yksi mittausta 6,25 mM imidatsolin välittömästä vaikutuksesta. Koko työn aikana imidatsoli oli kuitenkin läsnä työn näytteissä pitoisuudella 20-500mM kaikissa dialysoimattomissa fraktioissa.

8 POHDINTA

Työn lopputulos on hyvin monipuolinen. Tuottumisen kannalta 2A-proteasit näyttivät suosivan eri tavoin BL21- ja C43-tuottosoluja. Toisin kuin oletettiin, indusoinnin jälkeinen inkubaatiolämpötilan lasku esimerkiksi CDC16:n (BL21-tuotto) kohdalla ei lisännyt kohdeproteiinin tuottoa vaan laski sitä. Dialyysin sijaan työssä voisi käyttää toista puskurinvaihtotekniikkaa. Esimerkiksi geelisuodatus PD-10-pylväillä (liite 4) voisi olla hyvä vaihtoehto, sillä työssä käytetyn positiivisen kontrollin puskuri oli vaihdettu geelisuodattamalla. Epäonnistuneista dialyysistä ja muutamasta onnistuneesta dialyysistä oli kuitenkin hyötyä. Ilman niitä, ei välttämättä olisi kiinnitetty huomiota nikkelin inhiboivaan vaikutukseen ja EDTA:n vaikutukseen estää nikkelin inhibointia.

Työssä saavutettiin merkittävä johtopäätös: 1mM nikkeli inhiboi 2A-proteasien aktiivisuutta huomattavasti ja inkubointi 5 mM EDTA:ssa ehkäisee nikkelin inhiboivaa vaikutusta. Jatkossa voidaan nikkelin haitallinen vaikutus ehkäistä automaattisesti lisäämällä dialyysiliuoksiin sekä näytteisiin EDTA:ta. Mielenkiintoinen fakta on myös se, että positiivisen kontrollin valmistuksessa ei käytetty lainkaan EDTA:ta, joten pelkästään geelisuodatuksen käyttö puskurin vaihdossa poistaa aktiivisuutta inhiboivan nikkelin näyteliuoksesta. Nämä tulokset osoittavat myös, että nikkelin vaikutus proteiiniin ei ole pysyvä (irreversiibeli sitoutuminen) vaan palautuva (reversiibeli sitoutuminen). Vielä ei tunneta mekanisme, jolla nikkeli inhiboi 2A-proteasien aktiivisuutta, mutta epäillään, että nikkeli sitoutuu kohdeproteiinin aktiiviseen kohtaan. Siten työn kannalta olisi vielä mielenkiintoista yrittää tutkia tätä mekanisme ja esimerkiksi määrittää pienin nikkelikonsentraatio, joka riittää inhiboimaan 2A-proteasien. Lisäksi voisi tutkia inhiboiko nikkeli myös 3C-proteasia.

Tuloksista yhteenvedona voidaan myös sanoa, että vasta-ainevärjäysten ja näytteiden aktiivisuuksien välillä ei ole suoraa yhteyttä. Siten voidaan kyseenalaistaa vasta-ainevärjäysmenetelmät ja välineet 2A-proteasien tuotossa. Mahdollista myös on, että työssä käytettyjen vasta-aineiden ikä (vuodelta 2013) on vaikuttanut niiden toimintakykyyn ja siten huonoon tunnistautumiseen blotilla. Lisäksi kyseinen kohdeproteiini voi laskostua siten, että vasta-aine ei rakenteellisista syistä pääse tarttumaan 6xHis-kahvaan. Työn aktiivisuusmittaustekniikka on kuitenkin lähes varmaa, sillä minkään muun proteiinin, kuin

2A-proteaasien, ei pitäisi pilkkoa työssä käytettyä FRET-peptidiä (FT Määttä, 2016). Lisäksi näiden aktiivisuuskokeiden perusteella 2A-proteaasien eroja tai yhtäläisyyksiä ei pystytä kvantitoimaan, sillä mittauksia tehtiin hyvin vähän ja erilaisilla näytepitoisuuksilla. Siten jatkoa ajatellen aktiivisuuskokeita olisi hyvä tehdä lisää useilla toistoilla, jolloin satunnaisen ja systemaattisen virheen mahdollisuus voitaisiin määrittää. Tutkimuksen kannalta olisi myös arvokasta tietoa saada jokin yhteys 2A-proteaasien sekvenssien erojen ja aktiivisuuksien välille.

Kyseinen tutkimus jatkuu ja parasta aikaakin tutkitaan muita inhiboivia pienikokoisia molekyyliä, jotka nikkelin tapaan inaktivoivat proteaaseja. Työn tuotteita ja tuloksia käytetään tieteellisen julkaisun kirjoittamisessa ja 2A-proteaasien inhibiittorien etsinnässä sekä 2A-proteaasien suuremman mittakaavan tuotoissa. Mikäli selkeä inhibiittori ja sen mekanismi löydetään, ollaan taas askelta lähempänä löytämässä antiviraalinen lääke ehkäisemään *Enterovirus*-lajien aiheuttamia vakavia sairauksia.

LÄHTEET

- Adams, M., King, A. & Carstens, E. 2013. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch Virol* 158: 2023.
- Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, Peter. 2010. *Essential cell biology*. 3. painos. New York: Garland Science.
- Bornhorst, J. & Falke, J. 2000. Purification of proteins using polyhistidine Affinity Tags. *Methods Enzymol* 326:245-254.
- Campbell, M. & Farrell, S. 2012. *Biochemistry*. 7 kansainvälinen painos. Australia. Brooks/Cole, Cengage learning.
- Carson, S., & Robertson, D. 2005. *Manipulation and Expression of Recombinant DNA*. 2. Painos. Lontoo, US: Academic Press.
<http://site.ebrary.com.elib.tamk.fi/lib/tamperepoly/reader.action?docID=10138111>
- Carter, J. & Saunders, V. 2013. *Virology: principles and applications*. 2. painos Chichester, US: John Wiley & Sons.
- Gasser, G. 2014. *Inorganic Chemical Biology: Principles, Techniques and Applications*. 1. painos. Somerset, US: Wiley. Luettu 17.11.16
<http://site.ebrary.com.elib.tamk.fi/lib/tamperepoly/detail.action?docID=10862624>
- Geno technology. 2014. What you need to know about NTA and IDA ligands. Luettu 16.11.16
<http://info.gbiosciences.com/blog/bid/200711/What-You-Need-to-Know-About-NTA-and-IDA-Ligands>
- IGEM. 2015. *The Biochemistry Behind Protein Purification*. Luettu 16.11.2016
http://2015.igem.org/Team:Freiburg/Project/Protein_Purification
- Laitinen, O., Svedin, E., Kapell, S., Nurminen, A., Hytönen, V. & Flodström-Tullberg, M. 2016. Enteroviral proteases: Structure, host interactions and pathogenicity: Pathogenicity of enteroviral proteases. *Reviews in Medical Virology* 26:4, 251-267.
- Lehtonen, S. 23.05.2011. Sequencing-PCR for 96-well-plates. Tampere: Tampereen yliopisto.
- Macherey-Nagel. 2013. Purification of His-Tag proteins. German. Luettu 28.10.2016
<http://www.mn-net.com/tabid/11434/default.aspx>
- Määttä, J. Filosofian tohtori. 2016. Henkilökohtainen tiedonanto. Tampereen yliopisto. Biolääketieteellisen teknologian yksikkö. Proteiiniidynamiikan tutkimusryhmä.
- Määttä, J. & Hytönen, V. 16.5.2016. Kurssi BTK4322. Työ 3. 2A Proteaasin katkaisunopeuden määrittäminen FRET leimatun eIF4GI:n avulla. Tampere: Tampereen yliopisto.

NPTEL.n.d. course material: Molecular Cloning-II. India: Indian insitute of technology & Indian institute of Science. Luettu 04.09.2016
<http://nptel.ac.in/courses/102103045/module4/lec24/5.html>

Nurminen, A. 2016. Enterovirus serotyypien sukulaisuussuhde. Proteiindynamiikan tutkimusryhmä. Tampere: Tampereen yliopisto.

Suominen, I. Pärssinen, R. Haajanen, K. & Pelkonen, J. 2013. Geenitekniikka. 2. korjattu painos. Turku: Turun ammattikorkeakoulu.

Swiss Institute of Bioinformatics. 2008. Picornaviridae. Luettu 13.10.2016
http://viralzone.expasy.org/all_by_species/33.html

The Pirbright Institute. 2016. Picornaviridae.UK. Luettu 20.09.2016
<http://www.picornaviridae.com/enterovirus/enterovirus.htm>

Thermo Fisher Scientific. 2016. GeneArt Strings DNA fragments and Libraries.USA. Luettu 14.11.2016
<https://www.thermofisher.com/fi/en/home/life-science/cloning/gene-synthesis/gene-strings-dna-fragments.html>

Thermo Fisher Scientific. 2009. NanoDrop 2000/2000c spectrometer. V1,0 user manual. Wilmington, USA.

Thermo Fisher Scientific. 2008. T009-Technical Bulletin- 260/280 and 260/230 Ratios. Wilmington USA. Luettu 23.11.2016
<http://www.nanodrop.com/Library/T009-NanoDrop%201000-&-NanoDrop%208000-Nucleic-Acid-Purity-Ratios.pdf>

Thermo Fisher Scientific. 30.10.2006. Invitrogen- Champion pET Directional TOPO Expression Kits. User manual. Carlsbad USA.

Thermo Fisher Scientific. n.d. Production information: GeneJET plasmid miniprep Kit. 2. User manual. USA.

LIITTEET

Liite 1. TOPO-kloonausprotokolla

(Lähde: Thermo Fisher Scientifics 2006, V)

TOPO® Cloning Procedure for Experienced Users

Introduction

This quick reference sheet is provided for experienced users of the TOPO® Cloning procedure. If you are performing the TOPO® Cloning procedure for the first time, we recommend that you follow the detailed protocols provided in the manual.

Step	Action										
Design PCR Primers	<ul style="list-style-type: none"> • Include the 4 base pair sequences (CACC) necessary for directional cloning on the 5' end of the forward primer. • Design the primers such that your gene of interest will be optimally expressed and fused in frame with any epitope tags, if desired. 										
Amplify Your Gene of Interest	<ol style="list-style-type: none"> 1. Use a thermostable, proofreading DNA polymerase and the PCR primers above to produce your blunt-end PCR product. 2. Use agarose gel electrophoresis to check the integrity and yield of your PCR product. 										
Perform the TOPO® Cloning Reaction	<ol style="list-style-type: none"> 1. Set up the following TOPO® Cloning reaction. For optimal results, use a 0.5:1 to 2:1 molar ratio of PCR product:TOPO® vector. Note: If you plan to transform electrocompetent <i>E. coli</i>, use Dilute Salt Solution in the TOPO® Cloning reaction. <table style="margin-left: 20px; border: none;"> <tr> <td>Fresh PCR product</td> <td style="text-align: right;">0.5 to 4 µl</td> </tr> <tr> <td>Salt Solution</td> <td style="text-align: right;">1 µl</td> </tr> <tr> <td>Sterile water</td> <td style="text-align: right;">add to a final volume of 5 µl</td> </tr> <tr> <td>TOPO® vector</td> <td style="text-align: right;"><u>1 µl</u></td> </tr> <tr> <td>Total volume</td> <td style="text-align: right;">6 µl</td> </tr> </table> 2. Mix gently and incubate for 5 minutes at room temperature. 3. Place on ice and proceed to transform One Shot® TOP10 chemically competent <i>E. coli</i>, below. 	Fresh PCR product	0.5 to 4 µl	Salt Solution	1 µl	Sterile water	add to a final volume of 5 µl	TOPO® vector	<u>1 µl</u>	Total volume	6 µl
Fresh PCR product	0.5 to 4 µl										
Salt Solution	1 µl										
Sterile water	add to a final volume of 5 µl										
TOPO® vector	<u>1 µl</u>										
Total volume	6 µl										
Transform TOP10 Chemically Competent <i>E. coli</i>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Add 3 µl of the TOPO® Cloning reaction into a vial of One Shot® TOP10 chemically competent <i>E. coli</i> and mix gently. 2. Incubate on ice for 5 to 30 minutes. 3. Heat-shock the cells for 30 seconds at 42°C without shaking. Immediately transfer the tube to ice. 4. Add 250 µl of room temperature S.O.C. medium. 5. Incubate at 37°C for 1 hour with shaking. 6. Spread 100-200 µl of bacterial culture on a prewarmed selective plate and incubate overnight at 37°C. 										

Control Reaction

We recommend using the Control PCR Template and the Control PCR Primers included with the kit to perform the control reaction. See the protocol on pages 37-39 for instructions.

Liite 2. Miniprep-protokolla

(Lähde: Thermo Fisher Scientifics, n.d.)

PURIFICATION PROTOCOLS

Note

- Read IMPORTANT NOTES on p.3 before starting.
- All purification steps should be carried out at **room temperature**.
- All centrifugations should be carried out in a table-top microcentrifuge at $>12000 \times g$ (10 000-14 000 rpm, depending on the rotor type).

Use 1.5 mL of *E. coli* culture in LB media for purification of **high-copy** plasmids.

For **low-copy** plasmids use up to 10 mL of culture.

Protocol A. Plasmid DNA purification using centrifuges

Step	Procedure
1	Resuspend the pelleted cells in 250 μL of the Resuspension Solution . Transfer the cell suspension to a microcentrifuge tube. The bacteria should be resuspended completely by vortexing or pipetting up and down until no cell clumps remain. Note: Ensure RNase A has been added to the Resuspension Solution (as described on p.3)
2	Add 250 μL of the Lysis Solution and mix thoroughly by inverting the tube 4-6 times until the solution becomes viscous and slightly clear. Note: Do not vortex to avoid shearing of chromosomal DNA. Do not incubate for more than 5 min to avoid denaturation of supercoiled plasmid DNA.
3	Add 350 μL of the Neutralization Solution and mix immediately and thoroughly by inverting the tube 4-6 times. Note: It is important to mix thoroughly and gently after the addition of the Neutralization Solution to avoid localized precipitation of bacterial cell debris. The neutralized bacterial lysate should become cloudy.
4	Centrifuge for 5 min to pellet cell debris and chromosomal DNA.
5	Transfer the supernatant to the supplied GeneJET spin column by decanting or pipetting. Avoid disturbing or transferring the white precipitate. Note: Close the bag with GeneJET Spin Columns tightly after each use!

4

6	Centrifuge for 1 min. Discard the flow-through and place the column back into the same collection tube. Note: Do not add bleach to the flow-through; see p.8 for Safety Information.
7	<i>Optional:</i> use this preliminary washing step only if EndA+ strains which have high level of nuclease activity are used. Wash the GeneJET spin column by adding 500 μ L of Wash Solution I (#R1611, diluted with isopropanol) and centrifuge for 30-60 sec. Discard the flow-through. Note: This step is essential to remove trace nuclease activity.
8	Add 500 μL of the Wash Solution (diluted with ethanol prior to first use as described on p.3) to the GeneJET spin column. Centrifuge for 30-60 seconds and discard the flow-through. Place the column back into the same collection tube.
9	Repeat the wash procedure (step 8) using 500 μL of the Wash Solution .
10	Discard the flow-through and centrifuge for an additional 1 min to remove residual Wash Solution. This step is essential to avoid residual ethanol in plasmid preps.
11	Transfer the GeneJET spin column into a fresh 1.5 mL microcentrifuge tube (not included). Add 50 μL of the Elution Buffer to the center of GeneJET spin column membrane to elute the plasmid DNA. Take care not to contact the membrane with the pipette tip. Incubate for 2 min at room temperature and centrifuge for 2 min. Note: An additional elution step (optional) with Elution Buffer or water will recover residual DNA from the membrane and increase the overall yield by 10-20%. For elution of plasmids or cosmids >20 kb, prewarm Elution Buffer to 70°C before applying to silica membrane.
12	Discard the column and store the purified plasmid DNA at -20°C.

Protocol B. Plasmid DNA purification using vacuum manifolds

Step	Procedure
1	Perform cell lysis and lysate clearing steps according to steps 1 - 4 in Protocol A on page 4.
2	Prepare the vacuum manifold according to the supplier's instructions. Place the GeneJET spin column(s) onto the manifold.
3	Transfer the supernatant to the supplied GeneJET spin column by decanting or pipetting. Avoid disturbing or transferring the white precipitate. Note: Close the bag with GeneJET Spin Columns tightly after each use!

5

Liite 3. Soilin sekvensointireaktio ohje

(Lähde: Lehtonen 2011)

SEQUENCING-PCR FOR 96-WELL-PLATES

230511 SIH

Measure concentration of the samples.

Use **non-skirted** 96-well-plate. (e.g. Thermo-Fast® 96, non-skirted by Abgene)

Do reactions on ice.

Always remember to use some sealing on top of the PCR-plate and be sure it is well attached! Sealing has to be suitable for PCR!**Reaction mixture:**

1-7 µl	plasmid DNA (100-300 ng)	Master mix:	
X µl	H ₂ O (to total volume of 10 µl)	0,6 µl	primer (1:10)
3 µl	master mix	1,7 µl	5x sequencing buffer
10 µl	TOTAL	0,7 µl	BigDye Dilution buffer v.3.1
		3,0 µl	TOTAL

Make master mix ready for the reactions according to the number of the samples with the same primer e.g. 100-fold for the 96 samples. Make sure it is carefully mixed!

Check that the reactions are at the bottom of the wells – if not, spin briefly with the centrifuge at 3rd floor (rotor for 96-well-plates).**Amplification with PCR:**

PCR-machine for PCR with 96-well-plate (big PCR-machine in the phage lab).

PCR-program (Soili – Seq96)

1. 96 °C	1:00
2. 96 °C	0:10
3. 50 °C	0:10
4. 60 °C	4:00
5. GOTO 2, 29x	
6. 10 °C	forever

Before starting the PCR

- make sure sealing on top of the PCR-plate is well attached!
- o use either reusable sealing from Ulla's lab **or** tape sealing designed for PCR

Ethanol precipitation of the PCR-product with 96-well-plate:

1. Make at least 100-fold mixture containing following and vortex it carefully.

96 % EtOH	25 µl
3 M NaAc, pH 5.2	1 µl
total	26 µl per sample

e.g. 3 ml 96 % EtOH + 120 µl 3 NaAc pH 5.2

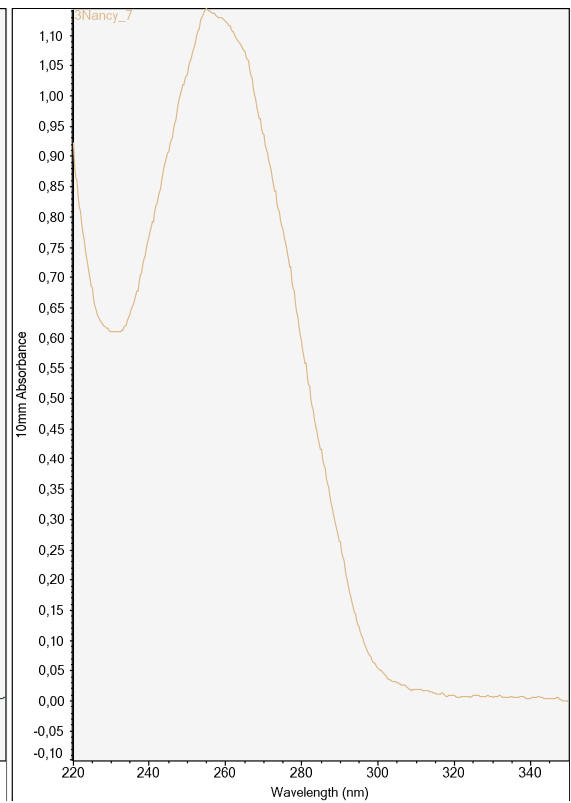
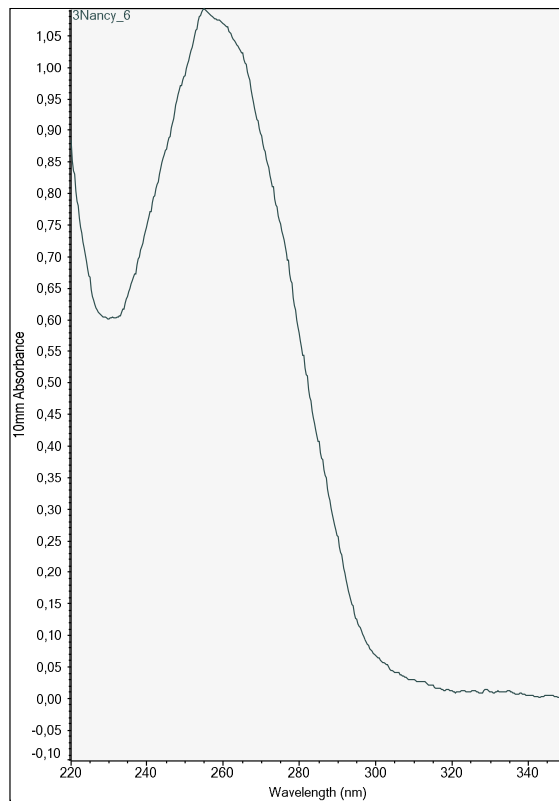
2. Add 26 µl of the mixture to the samples
3. Incubate in RT for 10 min
4. Centrifuge 3500 rpm, 30 min at 3rd floor. **Remember to make a reservation beforehand.**
5. Turn plate upside down on a paper to get rid of the liquid. Then centrifuge upside down on a paper 2000 rpm, 1 min.
6. Add 100 µl of 70 % ethanol.
7. Centrifuge 3500 rpm, 10 min.
8. Turn plate upside down on a paper to get rid of the liquid. Then centrifuge upside down on a paper 2000 rpm, 1 min.
9. Dry the DNA pellets for 5 minutes +37 °C and/or in RT. At this point samples can be frozen (-20 C)
10. Add 12 µl HiDi-formamide (ice cold) to the wells to resuspend the pellets. Check that the liquid is at the bottom of the wells – if not, spin briefly with the centrifuge at 3rd floor.
11. Denature 95 °C, 3 min with PCR-machine for PCR with 96-well-plate (big PCR-machine in the phage lab. **Soili – denat**, remember the sealing!) and put the plate on ice.
12. **Check that the reactions are at the bottom of the wells – if not, spin briefly with the centrifuge at 3rd floor.** Take the plate to the cold room 3-338.
 - o Fill in information about your samples to form found on a table outside cold room. Each row of the form has a running number. **Add this number clearly to post-it slip found on the shelf and attach the slip to your sample rack.**
 - o Remember to fill the sequencing table and send it in txt-format to Aulikki via email sequencing(at)uta.fi
 - o More information about sequencing can be found at <http://cotfa.uta.fi>

Liite 4. Lista käytetyistä laitteista ja tuotteista

pET101/D-TOPO-vektori	Champion pET101/D-TOPO, Thermo life Science, USA ks. TOPO-kloonaus kitti
Solujen hajotus korkeapainelaite	Emulsiflex C3, Avestin incorporated, Kanada
SDS-PAGE-5xpuskuri	SDS-PAGE 5xBuffer, Thermo Fisher Scientific, USA
PageBlue-väri	PageBlue Protein Staining Solution, #24620, Thermo Fisher Scientific, USA
Primäärivasta-aine	α -His, mosc8036, Santa Cruz Biotechnology, UK
Sekundäärivasta-aine	GAM IRDye 800CW, #926-32210, LI-COR, USA
Western bright-reagenssi	Western Bright ECL HRP Substrate #K12045, Advansta, USA
Fluoresenssispektrometri	QuantaMaster 400, PTI, USA
TOPO-kloonauskitti	Champion PET101, #45-0172, Thermo Life Science, USA
Fermentorin sentrifuugi	Hereus multifuge 3SR+, Thermo Fisher Scientific, USA
Miniprep-kitti	GeneJET Plasmid Miniprep Kit, #K0503, Thermo Fisher Scientific, USA
Uv-Vis-spektrometri	Nanodrop 3000, Thermo Fisher Scientific, USA
PCR-laite	ICycler, Bio-Rad, USA
OD600-spektrometri	Biophotometer OD600, Eppendorf, Saksa
Ultrasentrifuugi	Sorvall Lynx 4000, Thermo Fisher Scientific, USA
Ni-NTA-agaroosi	Protino Ni-NTA agarose , #745400, Macherey Nagel, Saksa
Kylmäkuivuri	ScanSpeed MaxiVac, Labogene, Tanska
Positiiviset kontrollit	hTalH1 ja hTalH10B
Proteiinikokomarkkerit	Prestained & Unstained PageRuler Protein Ladder, ThermoFisher Scientific, USA
Odyssey-kuvantamislaitte	Odyssey Clx, LI-COR, USA
2A-proteaasiposiitiivinen kontrolli	CVB3 Nancy, Tampereen yliopisto, NK
PD-10 pylväät (ei käytetty)	PD-10 Gel Filtration Colum, #170851-01, GE Health Care, UK

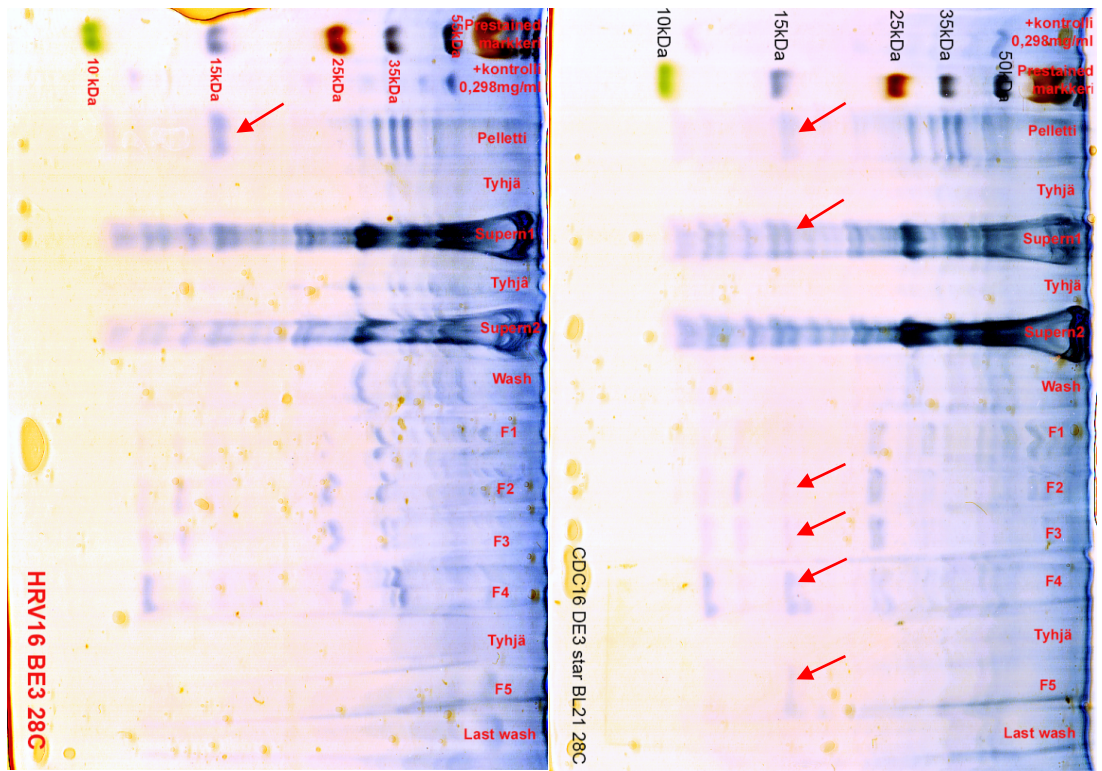
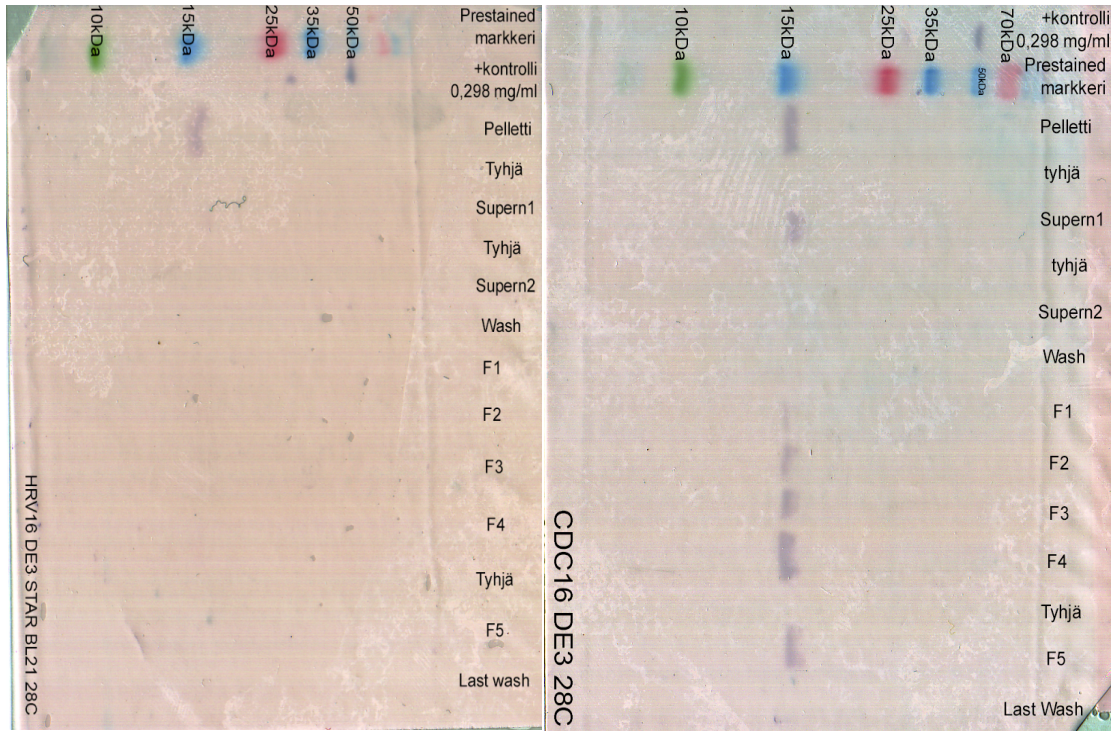
Liite 5. Esimerkki NanoDrop-spektrometrin antamasta tuloksesta (plasmidi)

#	Sample ID	User name	Date and Time	Nucleic Acid Conc.	Unit	A260	A280	260/280	260/230	Sample Type	Factor
1	Blank Elution Buffer	imt	15.6.2016 15:01:12	0,2	ng/µl	0,003	0,002	1,82	2,27	DNA	50,00
2	3Nancy_1	imt	15.6.2016 15:02:42	58,3	ng/µl	1,166	0,636	1,83	1,72	DNA	50,00
3	3Nancy_2	imt	15.6.2016 15:03:10	51,7	ng/µl	1,033	0,539	1,92	1,58	DNA	50,00
4	3Nancy_3	imt	15.6.2016 15:03:36	55,6	ng/µl	1,111	0,600	1,85	1,58	DNA	50,00
5	3Nancy_4	imt	15.6.2016 15:03:59	55,5	ng/µl	1,110	0,594	1,87	1,77	DNA	50,00
6	3Nancy_5	imt	15.6.2016 15:04:29	78,0	ng/µl	1,560	0,830	1,88	1,88	DNA	50,00
7	3Nancy_6	imt	15.6.2016 15:04:53	53,4	ng/µl	1,068	0,576	1,85	1,79	DNA	50,00
8	3Nancy_7	imt	15.6.2016 15:05:17	56,1	ng/µl	1,121	0,592	1,89	1,85	DNA	50,00
9	3Nancy_8	imt	15.6.2016 15:05:42	58,1	ng/µl	1,161	0,610	1,90	1,63	DNA	50,00
10	blank	imt	15.6.2016 15:06:40	-0,8	ng/µl	-0,016	-0,021	0,76	0,76	DNA	50,00
11	CDC11_1	imt	15.6.2016 15:07:11	64,0	ng/µl	1,280	0,671	1,91	1,76	DNA	50,00
12	CDC11_2	imt	15.6.2016 15:07:35	79,1	ng/µl	1,581	0,825	1,92	1,64	DNA	50,00
13	CDC11_3	imt	15.6.2016 15:08:00	61,4	ng/µl	1,228	0,622	1,97	1,75	DNA	50,00
14	CDC11_4	imt	15.6.2016 15:08:27	53,1	ng/µl	1,061	0,544	1,95	1,64	DNA	50,00
15	CDC11_5	imt	15.6.2016 15:08:53	77,9	ng/µl	1,557	0,783	1,99	1,92	DNA	50,00
16	CDC11_6	imt	15.6.2016 15:09:16	74,3	ng/µl	1,485	0,713	2,08	2,03	DNA	50,00
17	CDC11_7	imt	15.6.2016 15:09:47	50,6	ng/µl	1,011	0,530	1,91	1,70	DNA	50,00
18	CDC11_8	imt	15.6.2016 15:10:11	64,1	ng/µl	1,283	0,650	1,97	1,95	DNA	50,00

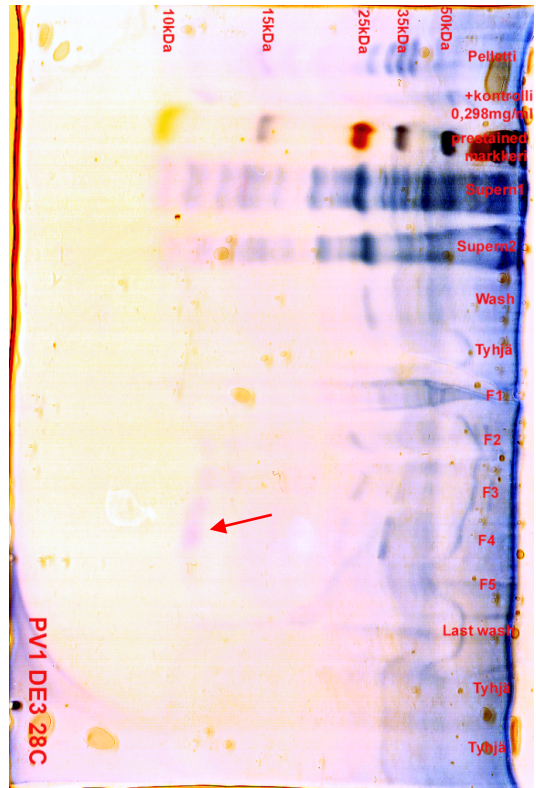
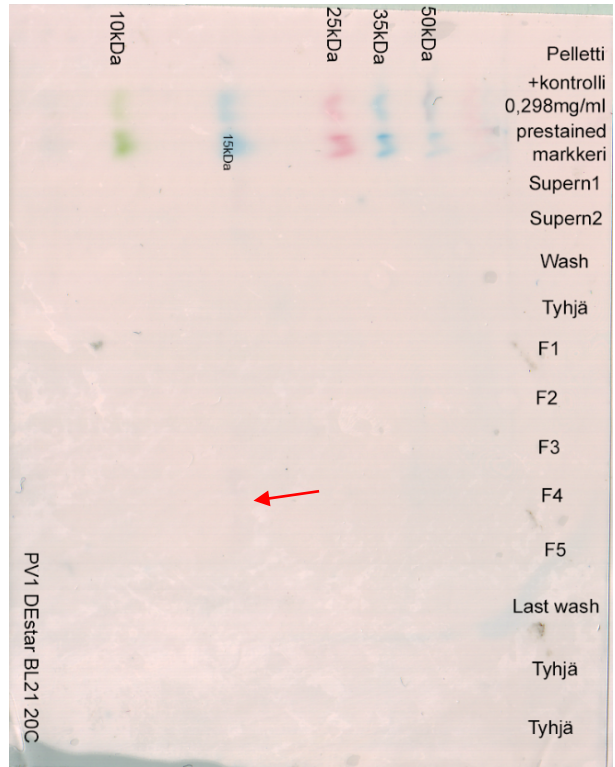


Liite 7. BL21-tuotto CDC16, HRV16 ja PV1 vasta-aine- ja totaalivärjäys

1(2)

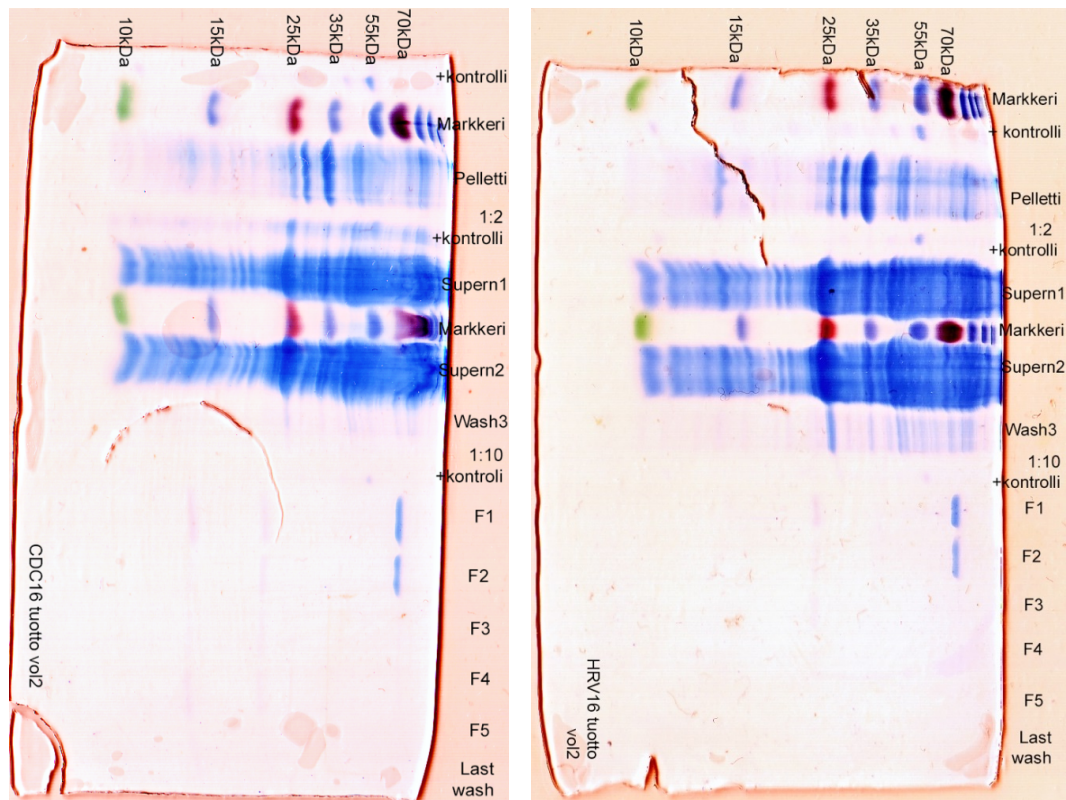
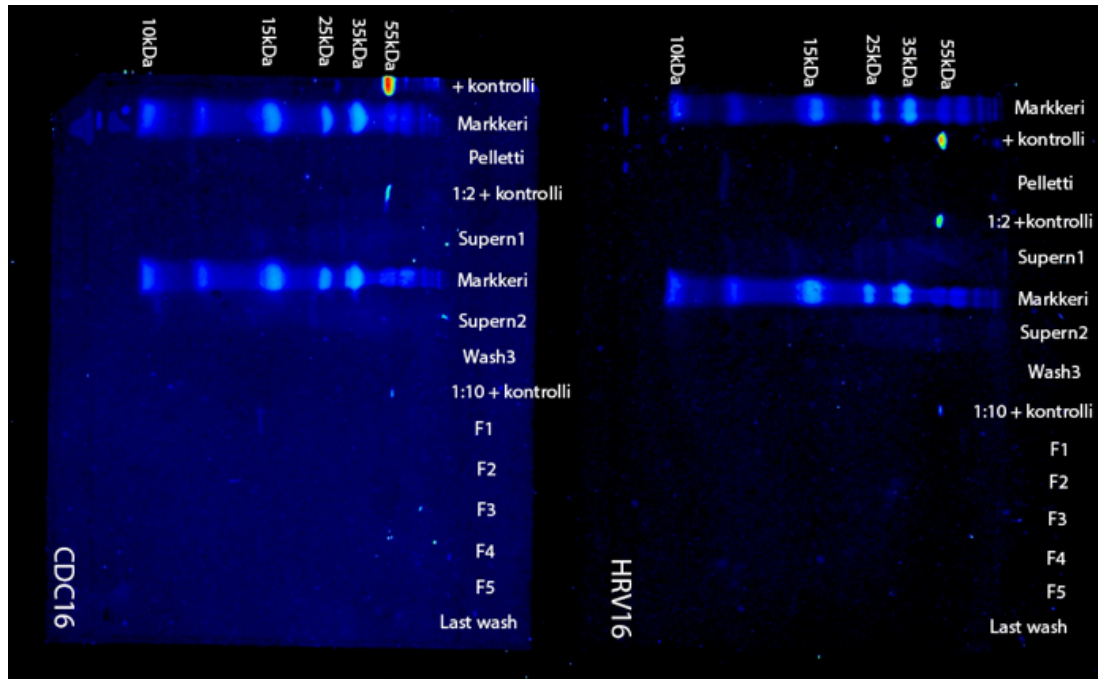


(jatkuu)



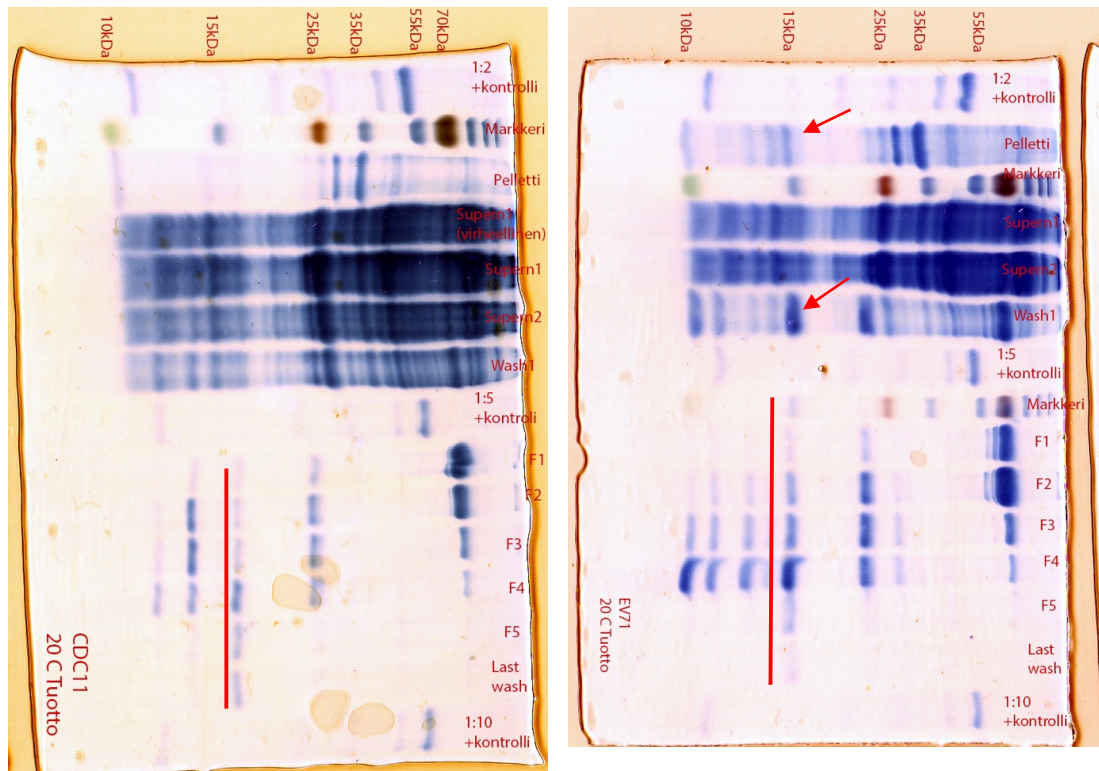
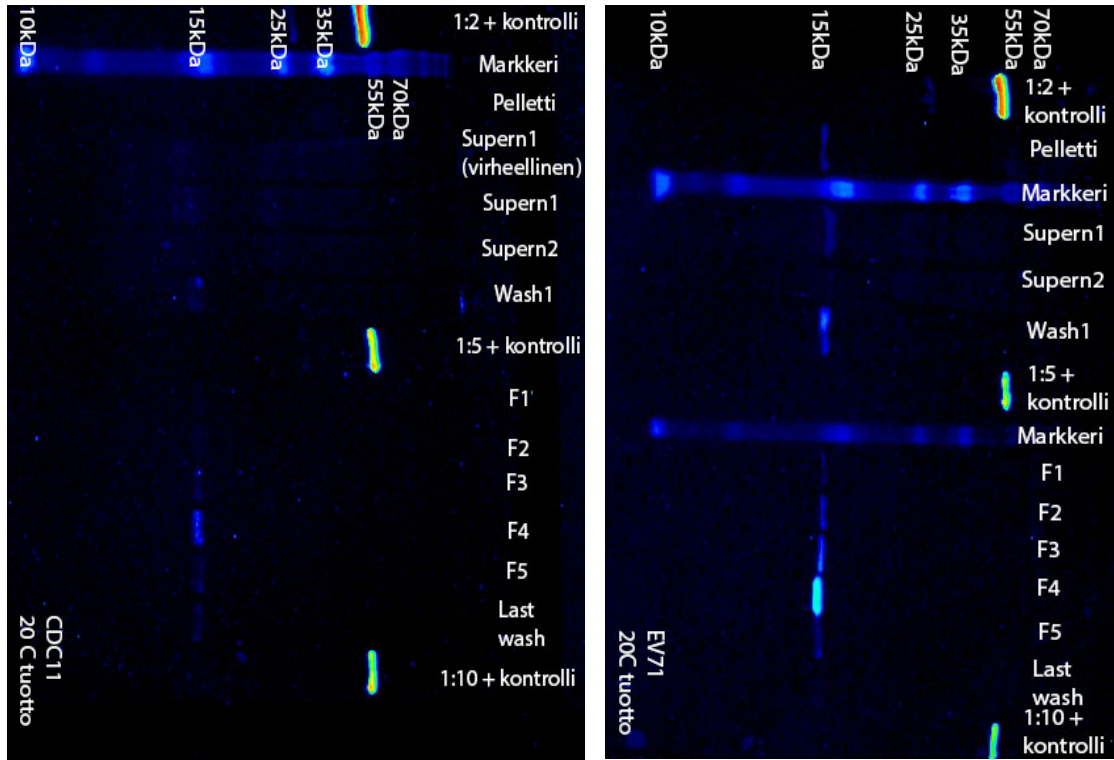
Liite 8. BL21-tuotto CDC16, HRV16 vasta-aine- ja totaalivärjäys

Indusoinnin jälkeinen lämpötila +20 °C:tta



Liite 9. BL21-tuotto EV71, CDC11 & 3Nancy vasta-aine- ja totaalivärjäys

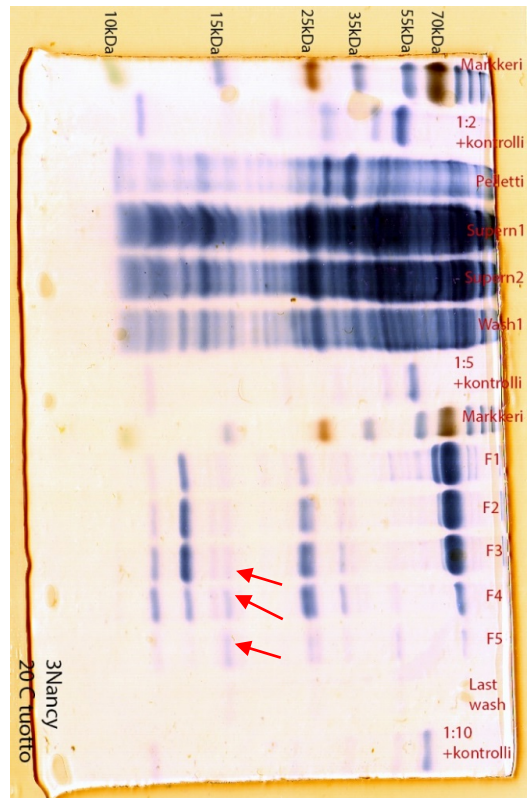
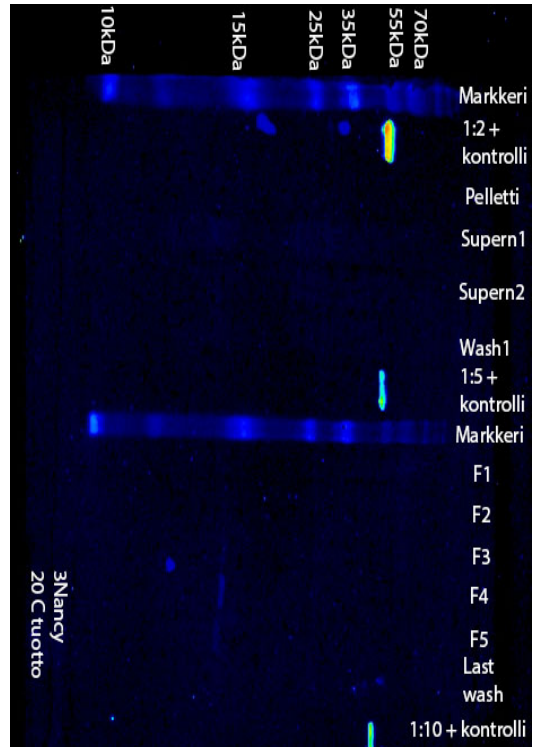
1(2)



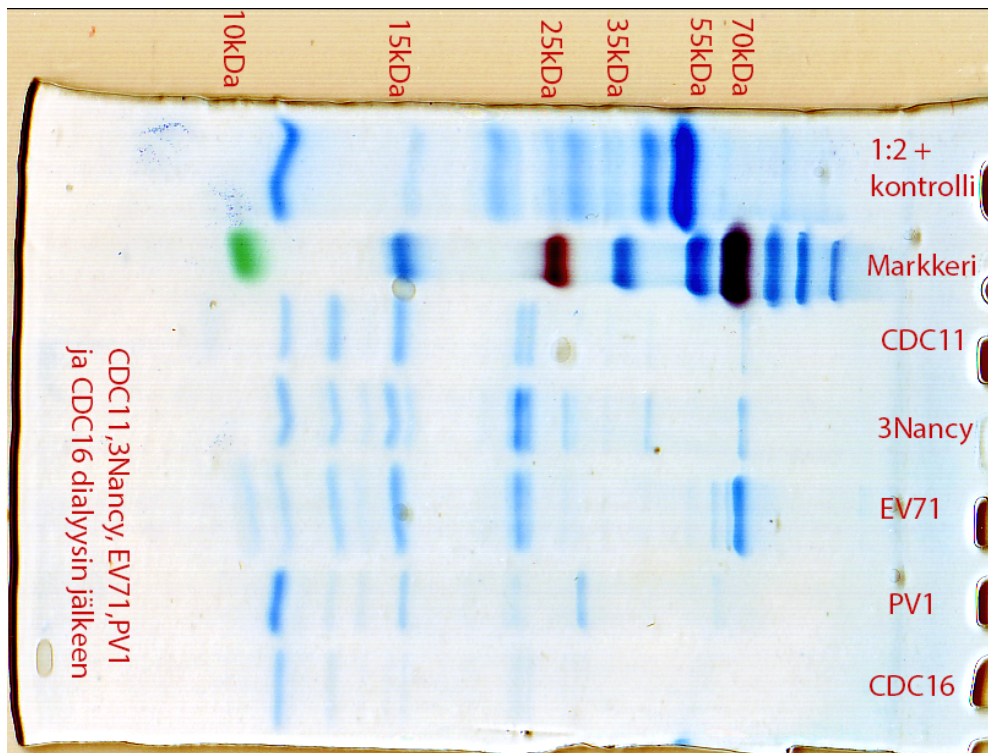
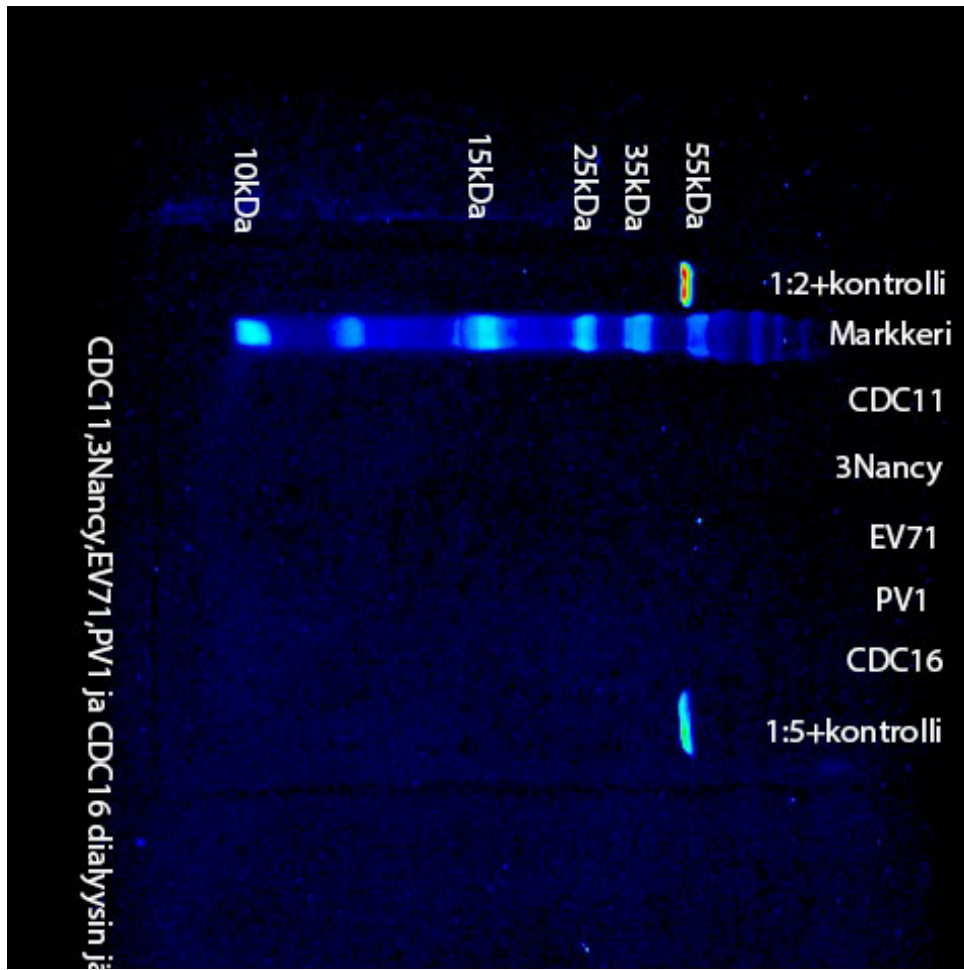
(jatkuu)

Liite 9. Jatkuu BL21-tuotto 3Nancy

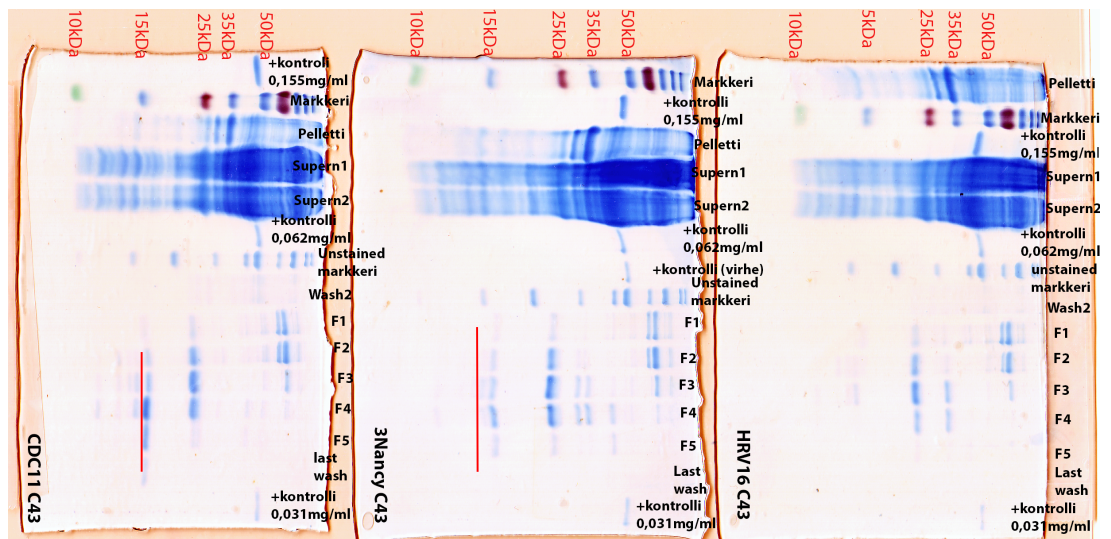
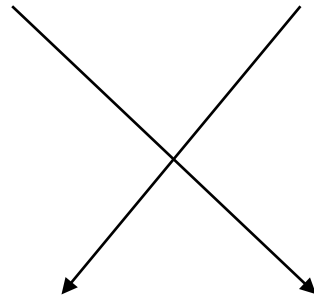
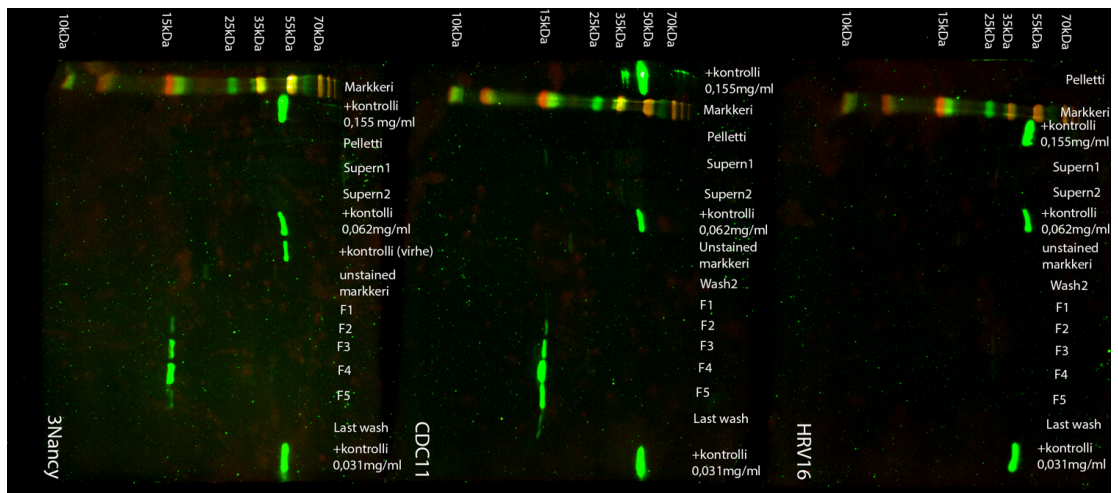
2(2)



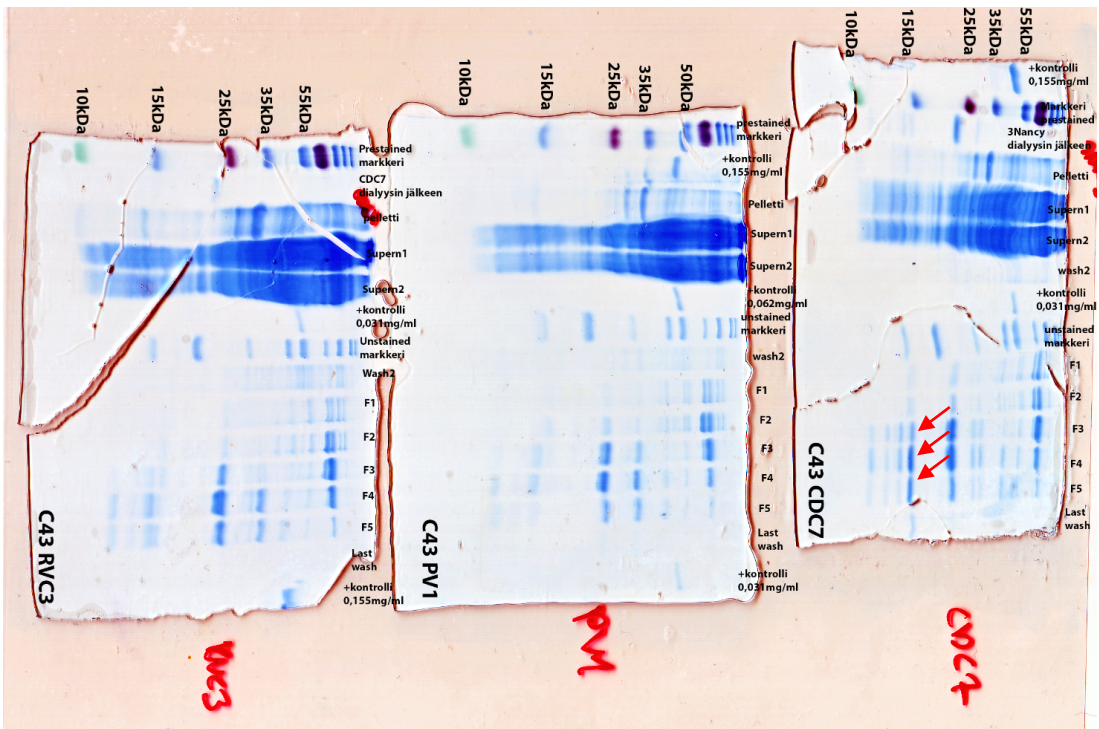
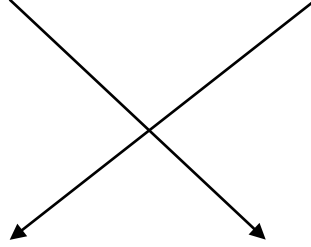
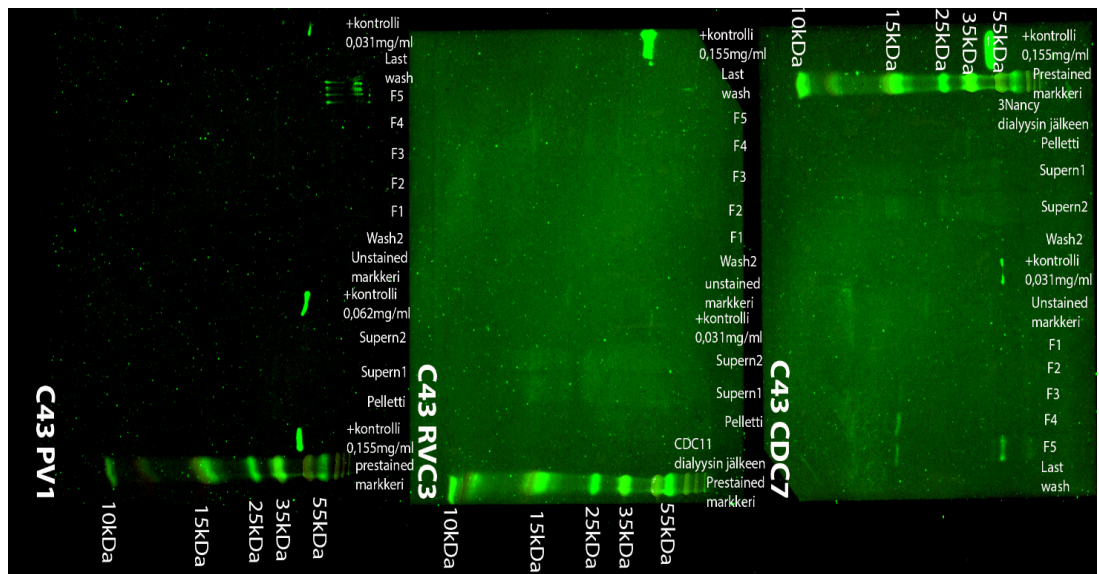
Liite 10. BL21-tuoton dialysoidut näytteet vasta-aine- ja totaalivärjäys



Liite 11. C43-tuotto HRV16, CDC11 & 3Nancy vasta-aine- ja totaaliivärjäys



Liite 12. C43-tuotto CDC7, RVC3 & PV1 vasta-aine- ja totaalivärjäys



Liite 13. C43-tuotto EV71 & CDC16 vasta-aine- ja totaaliivärjäys

