

Sofia Itkonen

# Bakteriofagi $\phi$ R1-RT:n reseptorin tunnistaminen *Yersinia enterocolitica* O:3:sta

Metropolia Ammattikorkeakoulu  
Laboratorioanalyttikko (AMK)  
Laboratorioalan koulutusohjelma  
Opinnäytetyö  
26.11.2015

Tekijä(t) Otsikko Sivumäärä Aika	Sofia Itkonen Bakteriofagi $\phi$ R1-RT:n reseptorin tunnistaminen <i>Yersinia enterocolitica</i> O:3:sta 26 sivua + 2 liitettä 26.11.2015
Tutkinto	Laboratorioanalytikko (AMK)
Koulutusohjelma	Laboratorioalan koulutusohjelma
Ohjaaja(t)	Tutkimusryhmän johtaja, Bakteriologian professori, Mikael Skurnik Tuntiopettaja, FT, Katri Juuti
<p>Työn tavoitteena oli selvittää, mitä rakennetta bakteriofagi <math>\phi</math>R1-RT käyttää tarttuessaan bakteeri-isäntäänsä, <i>Yersinia enterocolitica</i> O:3:een.</p> <p>Käytännössä tutkimuksen kohteena olivat CatMu-transposonikirjastosta eristetyt faagille <math>\phi</math>R1-RT resistentit mutantit, joiden CatMu-insertiokohdan tunnistamiseen käytettiin satunnaista PCR:ää. Toinen käytetyistä alukkeista oli CatMu:lle spesifinen ja toinen sattumanvarainen. Monistuneet PCR-fragmentit puhdistettiin ja sekvensoitiin. Bioinformatiikan työkaluja käyttäen paikallistettiin löydetty sekvenssit, eli insertiokohdat.</p> <p>Yleisin ja täten luotettavin hakutulos oli geeni Y11_04441, joka koodaa ulkomembraanin proteiinia OmpF. OmpF on lähes identtinen niissä kannoissa, joita faagi <math>\phi</math>R1-RT infektoi, ja erilainen niissä, joita ei infektoi. Tämä tukee ajatusta tuloksen oikeellisuudesta. Lisäksi faagi <math>\phi</math>R1-RT infektoi nimenomaan huoneenlämmössä, mistä johtuu sen nimikin. Tämänkin osalta OmpF on oikeantyyppinen osuma, sillä sitä <i>Y. enterocolitica</i> ei juurikaan tuota huoneenlämpöä korkeammissa lämpötiloissa, eikä faagi voi infektoida bakteeria ilman oikean reseptorin löytämistä.</p> <p>Työssä siis saavutettiin sille asetettu tavoite. Tällä tuloksella edistettiin Yersinia-tutkimusryhmän yleisluontoisia tavoitteita mallintaa bakteerien taudinaiheuttamiskykyä, eli patogeenisuutta yersinia-bakteerien avulla, ja myös ryhmän uutta tavoitetta mallintaa bakteriofagien toimintaa siinä määrin, että niitä voidaan turvallisesti alkaa käyttää antibioottien korvikkeena bakteerisairauksien torjunnassa.</p>	
Avainsanat	$\phi$ R1-RT, OmpF, transposonikirjaston seulonta, satunnainen PCR, faagireseptori

Author(s) Title Number of Pages Date	Sofia Itkonen Recognition of the receptor of bacteriophage $\phi$ R1-RT in <i>Yersinia enterocolitica</i> O:3 26 pages + 2 appendices 26 November 2015
Degree	Bachelor of Laboratory Sciences (UAS)
Degree Programme	Laboratory Sciences
Instructor(s)	Mikael Skurnik, Research Group Leader, Professor of Bacteriology Katri Juuti, Lecturer, Ph.D.
<p>The goal of this thesis was to find out which structure works as a receptor for bacteriophage <math>\phi</math>R1-RT in its host, <i>Yersinia enterocolitica</i> O:3.</p> <p>In practice, <math>\phi</math>R1-RT resistant mutants were isolated from CatMu libraries, and their CatMu insertion sites were identified by arbitrary PCR so that one primer was CatMu specific and the other one was arbitrary. Fragments yielded by this PCR were purified and sequenced. Bioinformatics tools were then used for locating the insertion sites.</p> <p>The most common and thus most reliable hit was gene Y11_04441, which encodes OmpF, short for an outer membrane protein F. OmpF appears nearly identical in species <math>\phi</math>R1-RT can infect and different in those <math>\phi</math>R1-RT cannot infect. This supports the idea of OmpF being a correct result. Furthermore, phage <math>\phi</math>R1-RT infects specifically in room temperature, which is even part of its name. This also indicates that OmpF is a correct result because <i>Y. enterocolitica</i> does not produce OmpF much at temperatures higher than room temperature; consequently, a phage cannot infect a host without finding its receptor.</p> <p>The goal of this thesis was reached. This result advanced Yersinia Research Group's goals to model bacterial pathogenesis with yersinia and the group's new goal to model the behavior of bacteriophages enough to allow the phage medicine to replace antibiotics as medicine against bacterial diseases.</p>	
Keywords	$\phi$ R1-RT, OmpF, screening of transposon library, arbitrary PCR, phage receptor

# Sisällys

## Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Teoria	2
2.1	<i>Yersinia</i>	2
2.2	Virukset ja bakteriofagit eli faagit	3
2.2.1	Rakenne	4
2.2.2	Elämänkierto	6
2.2.3	Bakteriofagi $\phi$ R1-RT	7
2.3	CatMu-kirjastot	7
2.4	Sattumanvarainen PCR	8
3	Toteutus	10
3.1	Pseudolysogeenien seulonta	10
3.2	Sattumanvarainen PCR	11
4	Tulokset ja tulosten käsittely	13
4.1	Pseudolysogeenien seulonnan tulokset	13
4.2	Alukkeiden kiinnityslämpötilojen optimoinnin tulokset	14
4.3	Sekvenssit	20
5	Johtopäätökset	23
	Lähteet	24
	Liitteet	
	Liite 1. Käytettyjä sekvenssejä	27
	Liite 2. E.Z.N.A. Gel Extraction kit - Spin protocol	28

## Lyhenteet

Artemis	Ohjelma, jolla voi selata genomeita ja visualisoida sekvenssejä ja niiden ominaisuuksia.
BLAST	Nukleeiinihappojen ja proteiinien sekvenssien paikallisia yhteneväisyyksiä etsivä työkalu. ( <i>Basic Local Alignment Search Tool</i> )
DNA	Deoksiribonukleiinihappo. ( <i>Deoxy RiboNucleic Acid</i> )
OmpC	Ulkomembraanin huokosproteiini C, ja samalla nimi tätä koodaavalle geenille. ( <i>Outer membrane porin protein C</i> )
OmpF	Ulkomembraanin proteiini F ja samalla nimi tätä koodaavalle geenille. ( <i>Outer membrane protein F</i> )
PCR	Polymeraasiketjureaktio. ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> ) DNA:n monistamismenetelmä.
RNA	Ribonukleiinihappo. ( <i>RiboNucleic Acid</i> )
RT	Huoneenlämpötila. ( <i>Room Temperature</i> )
UV	Lyhennelmä sanasta ultravioletti. Viittaa valon aallonpituuteen.
$\phi$	Faagi.
$\infty$	Ääretön.

## 1 Johdanto

Työn tavoitteena oli selvittää, mitä rakennetta bakteriofagi  $\phi$ R1-RT käyttää kiinnittymiskohtanaan tarttuessaan bakteeri-isäntäänsä, *Yersinia enterocolitica* O:3:een. Tällä tutkimuksella edistettiin Yersinia-tutkimusryhmän yleisluontoisia tavoitteita mallintaa bakteerien taudinaiheuttamiskykyä, eli patogeenisyyttä yersinia bakteerien avulla ja myös ryhmän uutta tavoitetta mallintaa bakteriofagien toimintaa siinä määrin, että niitä voidaan turvallisesti alkaa käyttää antibioottien korvikkeena bakteerisairauksien torjunnassa.

Käytännössä tutkimuksen kohteena oli CatMu-transposonikirjastosta eristettyjä faagille  $\phi$ R1-RT resistenttejä mutanteja, joiden CatMu-insertiokohdan tunnistamiseksi kokeiltiin kahta menetelmää, joita vastaavissa selvityksissä oli aikaisemmin käytetty. Tarkoitus oli valita käyttöön sitten menetelmistä parempi. Kokeiltavia menetelmiä olivat satunnainen PCR CatMu-kirjastolle niin, että toinen käytetyistä alukkeista on CatMu:lle spesifinen ja toinen sattumanvarainen (1.;2.;3.), sekä genomisen DNA:n fragmentointi ja kloonaminen plasmidiin (3.). CatMu:n sisältävät kloonit valikoitiin sen välittämän kloramfenikoliresistenttiyden avulla. Kloonausta ei saatu lainkaan toimimaan, joten sattumanvaraisesta PCR:stä tuli valittu menetelmä.

Työn tekopaikka, bakteriologian ja immunologian osasto, sijaitsee Haartman instituutissa ja kuuluu Helsingin yliopiston lääketieteelliseen tiedekuntaan. Immunobiologia on yksi lääketieteellisen tiedekunnan tutkimusohjelmayksikön tutkimusohjelmista. Tutkimuksen kohteena ovat mikrobien aiheuttamat infektioaudit ja elimistön immunologinen puolustus niitä vastaan. Tämän työn tutkimusta suoritettiin Yersinia-laboratoriossa, jossa tutkitaan toisaalta, miten bakteerit aiheuttavat tauteja ja toisaalta bakteriofageja ja niiden hyödyntämistä antibiooteille resistenttien bakteereiden hoitamisessa.(4.)

Faagitutkimuksen ensimmäiset havainnot taas tehtiin 1915, ja hyvin pian tämän jälkeen, d'Herelle ryhtyi tutkimaan faagien terapeuttisia käyttömahdollisuuksia. Faageja testattiin aluksi lääkkeenä ruttoa vastaan eläimillä, ja sitten ihmisillä. Nämä kokeet onnistuivat; sillä faagilääkkeet taltuttivat ruton potilailla. Seuraavaksi tehtiin massakokeita koleraa vastaan. Näiden kokeiluiden tulokset olivat vaihtelevia, aina vaikutuksen puuttumisesta hyvään hoitovasteeseen. Yleensä faagilääke toimi lieventäen koleran vaikutuksia lyhentäen taudin kestoa. Useimmat kaikista faagiterapiakokeiden tuloksista ovat kuitenkin olleet hyviä. Tutkimus taukosi toisen maailmansodan aikoihin antibioottien viedessä bakteerisairauksia vastaan tarkoitetun tutkimuksen päähuomion. Antibioottiläskäresistentit sairaalabakteerit ovat nyt uudelleen herättäneet henkiin faagiterapiatutkimukset. (5, s. 3-14.)

## 2 Teoria

### 2.1 *Yersinia*

Yersiniat ovat pieniä gramnegatiivisia sauvoja. Ne ovat vaihtoehtoisia anaerobeja ja viihtyvät paremmin huoneenlämmössä kuin 37°C:ssa (6, s. 21-26). *Yersinia*-sukuun kuuluu 14 alalajia. Näistä useimmat elävät maaperässä. *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* ja *Y. enterocolitica* -kannoista jotkut ovat kuitenkin ihmisen taudinaiheuttajia. *Y. pestis* tunnetaan paiseruton aiheuttajana ja *Y. pseudotuberculosis* ja *Y. enterocolitica* aiheuttavat lähinnä ruokamyrkytyksiä, joiden merkittäviä oireita ovat kuume ja ripuli. Merkittävä yersinioosin lähde Suomessa ovat sika-valmisteet. (7, s. 12-13; 6, s. 21-26, 45.)

*Y. enterocolitica* -kannat jaotellaan kuuteen biotyyppiin (1A, 1B, 2, 3, 4 ja 5) biokemiallisten ominaisuuksien perusteella. Lisäksi ne voidaan jaotella yli 50:een O-serotyyppiin lipopolysakkaridin O-antigeenien immunologisten eroavaisuuksien pohjalta. Serotyypit merkitään numeroinnilla, jossa numero erotetaan kaksoispisteellä O:sta, kuten otsikossa. (6, s. 21-26.) Tarkempi nimi tässä työssä käytetylle kannalle on *Y. enterocolitica* subspecies *paleoartica* bioserotyyppi 4/O:3.

*Y. enterocolitica* esiintyy eniten maaperässä, mutta myös paljon sioissa. *Y. enterocolitica* on erittäin kirjava kanta. *Y. enterocolitica* on psykrotrofinen, eli kylmähakuinen. Se kestää todella huonosti kuumaa, se elää laajaalla pH-alueella, ja sietää jopa 5 %:a suolaa. Jotkin *Y. enterocolitica* ovat ihmisen taudinaiheuttajia. Yleisin *Y. enterocolitica* maailmassa on bioserotyyppi 4/O:3. (6, s. 21-26.) Sen geeni OmpF (Outer membrane protein F) koodaa ulkokalvon proteiinia F, ekspressoituu noin kuusinkertaisesti huoneenlämmössä verrattuna 37 °C:een, jossa se ei ekspressoitunut juuri yhtään (8). Tämä tieto on saatu käyttäen hyväksi proteomiikan ja RNA-transkriptomiikan menetelmiä (8).

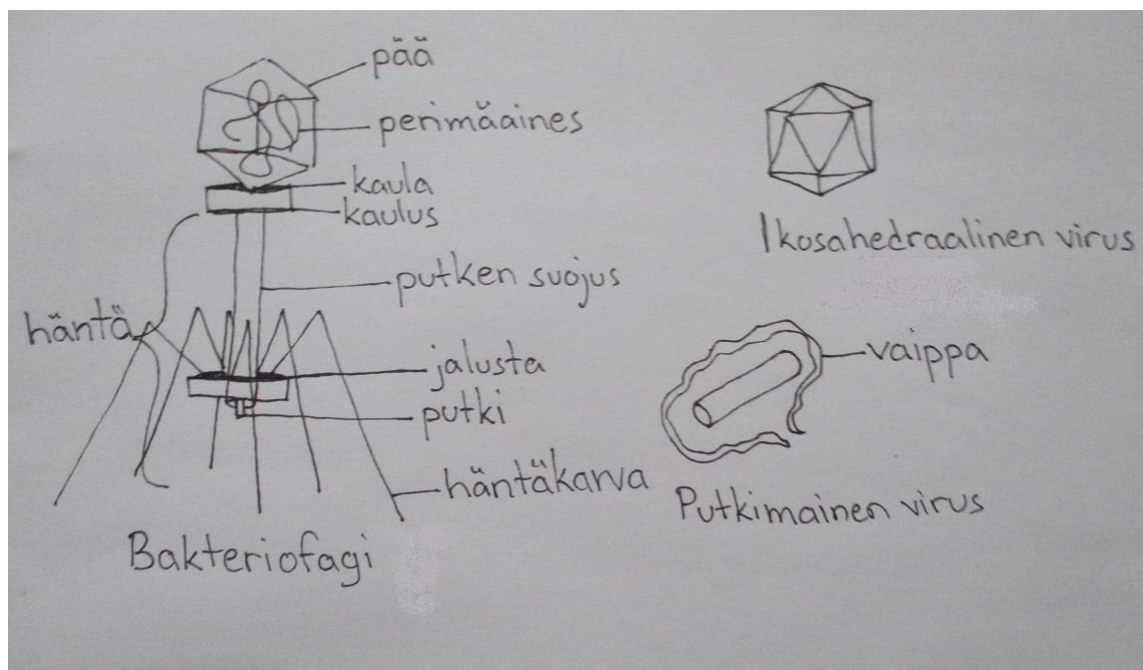
## 2.2 Virukset ja bakteriofagit eli faagit

Faagit ovat bakteeriviruksia. Viruksilla ei ole solurakennetta, joskin niillä on aina yhden-tyyppistä nukleiinihappoja, ja ne ovat ehdottomia loisia eivätkä siis pysty lisääntymään ilman isäntää. Faageja luokitellaan ryhmiin usein isäntiensä perusteella, mutta virallinen luokitus tehdään nykyään sen mukaan, millaisia nukleiinihappoja virus sisältää, ovatko ne tyyppiltään yksijuosteisia vai kaksijuosteisia ja millainen viruksen kapsidi on ja onko sillä vaippaa. Vasta näiden jälkeen luokituksessa tulee isäntäorganismi. (9, s. 333, 349-350.)



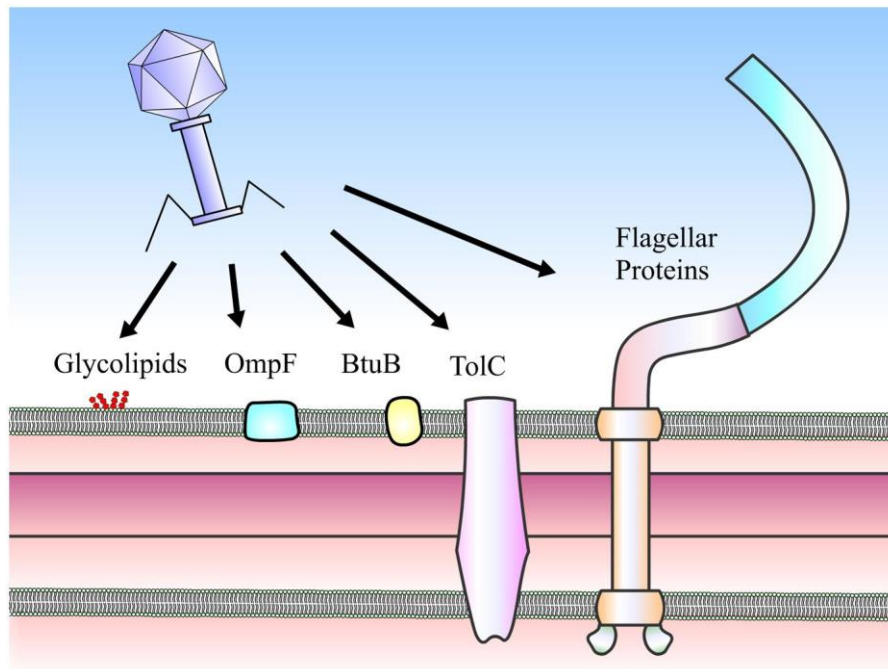
## 2.2.1 Rakenne

Virusten perusrakenteeseen kuuluu nukleotideja suojaava kuori, eli kapsidi ja perimäaines, joka voi olla DNA:ta tai RNA:ta. Viruksia voidaan lajitella sen mukaan, millainen kuori niillä on. Esimerkiksi ikosahedraalinen ja helikaalinen muoto ovat mahdollisia, ja useimmat bakteriofagit ovat yhdistelmiä näistä molemmista, ja sisältävät lisäksi häntiä, minkä vuoksi niitä kutsutaan kompleksisiksi viruksiksi. Monilla viruksilla on lisäksi vaippa, joka voi muodostua ainakin proteiineista tai kalvolipideistä. Eläinfaageilla vaippa on usein otettu mukaan isäntäsolusta, ja auttaa välttämään immuunipuolustuksen soluja tunnistamasta sitä tunkeilijaksi. Bakteriofageilla ei useimmiten ole vaippaa. Vaippa voi myös olla viruksen itse koodaama. (9, s. 340-347.)  
 Kuva 1 kuvaa bakteriofagin rakennetta ja kahta muuta mahdollista viruksen muotoa.



Kuva 1. Erilaisia viruksia ja niiden osia.

Viruksen rakenne osaltaan määrittelee, mikä isäntä sillä on, sillä vallatakseen solun viruksen täytyy ensin tunnistaa jollain ulkokuorensa osalla jokin solun ulkorakenteista ja kiinnittyä siihen. (9, s. 356-357.) Faagit voivat kiinnittyä suureen määrään erilaisia bakteerin ulkopinnan rakenteita, mukaanlukien glykolipidien O-antigeenin, solukalvon proteiinit, kuten OmpF, ja flagellat kuvassa 2 (10).

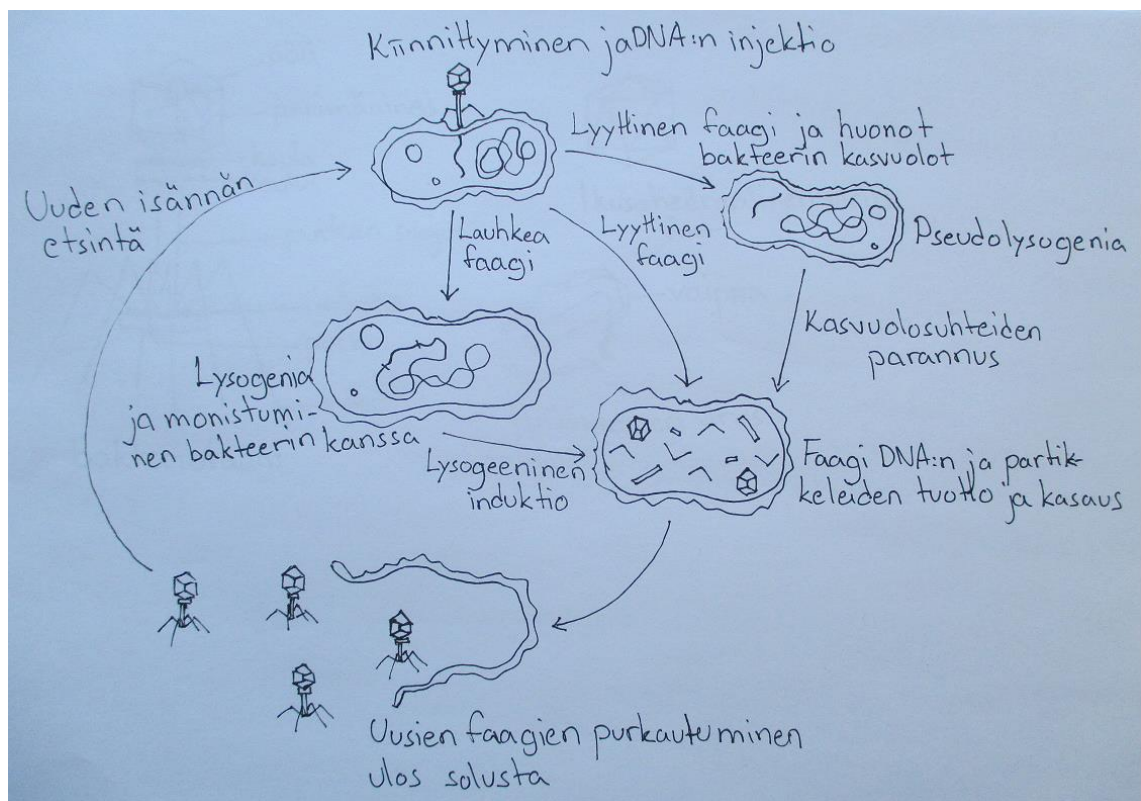


Kuva 2. Faagin mahdollisia reseptoreita bakteerin pinnassa (10).

Bakteriofagilla tunnistava osa on usein häntä. Tämän jälkeen virus injektoi perimänsä solun sisään, tai viruksen perimä jotenkin muuten päätyy solun sisälle. Joskus kiinnityskohtia on useampia. Mikä tahansa solun ulkorakenne: lipidi, sokeritähde tai proteiini voi toimia reseptorina. (9, s. 356-357.)

## 2.2.2 Elämänkierto

Bakteriofagit lisääntyvät ottamalla haltuun isäntäsolun proteiini- ja DNA-synteesireitit, ja pakottamalla isäntäsolun tuottamaan viruspartikkeleita, pikemminkin kuin omia proteiinejaan ja DNA:taan. Tämä tapahtuu muokkaamalla solun ribosomaalista RNA:ta. Faagien elämänkiertoja on kahdenlaisia: lyyttisiä ja lysogeenisiä (kuva 3). Tämä jakaa virukset lyyttisiin ja lysogeenisiin, eli lauhkeisiin. Lysogeenisessä kierrossa viruksen genomi jää tavallaan lepotilassa osaksi solun genomia, eli profaagiksi. Se tuottaa tällöin proteiineja, jotka estävät lyyttisen kierron alkamista. Se monistuu, kun solu monistaa genominsa jakautuessaan. Eli molemmat tytärsolut sisältävät jakautumisen jälkeen profaagin. Se voi myös muuttaa solun toimintaa tavoilla, jotka eivät suoranaisesti vaikuta viruksen lisääntymiseen. Kun soluun kohdistuu sopiva ärsyke, kierto muuttuu uudelleen lyyttiseksi. Tätä sanotaan induktioksi. Lyyttisessä kierrossa faagipartikkeleita monistetaan solussa sen normaalien toimintojen sijaan niin kauan, kunnes solu räjähtää. Samalla solussa kasataan näitä partikkeleita kokonaisiksi viruksiksi. (9, s. 357-362.) Seuraavana on kuva näistä kierroista.



Kuva 3. Kuva faagin mahdollisista elämänkiirroista.

Pseudolysogenia voidaan määrittää tilaksi, joka edeltää lysogeniaa tai lyyttistä kiertoa, tai tarkemmin faagin kehityksen pysähtymiseksi isäntäsolussa ilman monistumista tai monistumista osana bakteerin genomia solujakautumisessa, joka ei vahingoita faagin perimää. Näin mahdollistuu viruksen elämänsyklin jatkaminen (11). Tämä on kuvattu kuvassa kolme. Tavallisesti pseudolysogeniaa esiintyy huonoissa oloissa kasvavissa bakteereissa. Tällöin virukset tunkeutuvat bakteerisolun, mutta eivät ala lisääntyä eivätkä myöskään sulaudu osaksi bakteerin genomia. Heti kun bakteerin kasvuolosuhteet sitten taas paranevat, ottavat virukset isäntäsolun hallintaansa ja aloittavat lyyttisen kierron. (12.)

### 2.2.3 Bakteriofagi $\phi$ R1-RT

Bakteriofagi  $\phi$ R1-RT on yksi *Yersinia*-tutkimusryhmän eristämistä ja tutkimista faageista. Se infektoi lyyttisesti huoneenlämpötilassa 22°C, mistä se on saanut nimeensä päätteeksi RT (*room temperature*). Se kykenee infektoimaan useampia *Y. enterocolitica* kantoja: O:1, O:2, O:3, O:5, O5,27, O:6, O:7,8, O:9, mutta infektoi erityisesti O:3:sta (14). Se kuuluu myovirusiin morfologiansa perusteella, eli toisin sanoen se muistuttaa ulkonäöltään bakteriofagin rakennekuvaa (kuva 1). Sen perimäaine on kaksijuosteista DNA:ta. Lisäksi se vaikuttaa genotyyppityksen ja morfologiansa perusteella samankaltaiselta kuin faagi JS98 (gb|EF469154.1|). (13, s. 18.)

### 2.3 CatMu-kirjastot

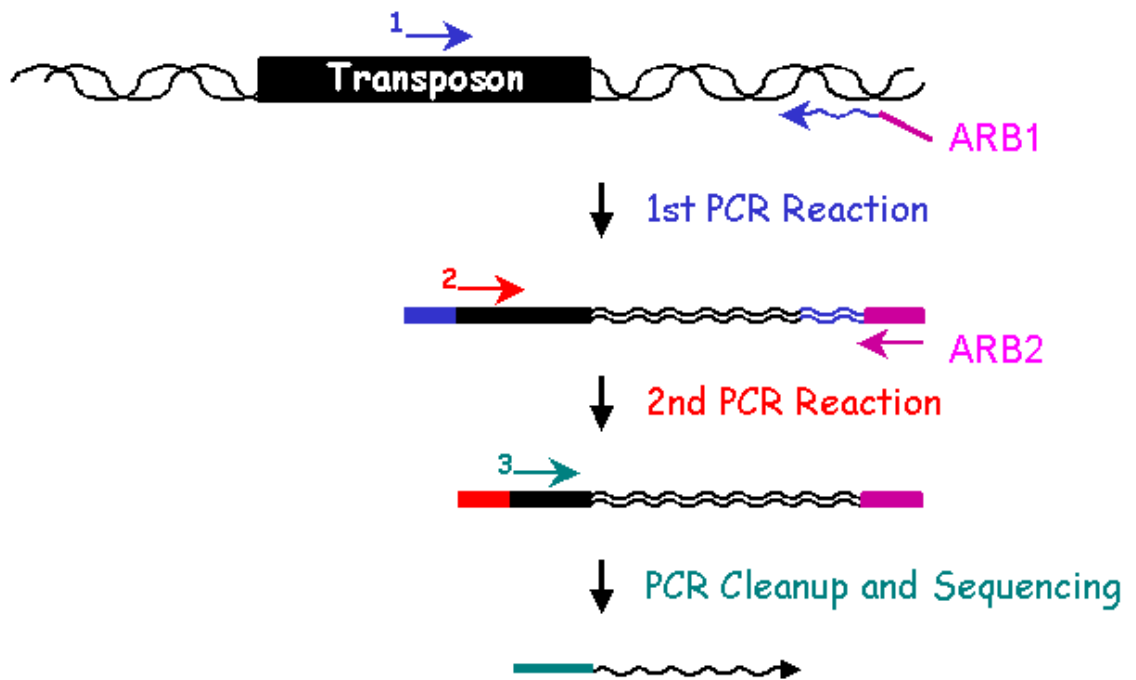
Transposonit ovat genomissa paikasta toiseen hyppiviä DNA:n pätkiä. Niiden arvellaan olevan peräisin viruksista, ja CatMu-kirjastossa käytetty transposoni onkin peräisin Mu:sta. Mu on eräs hyvin tunnettu lauhkea bakteriofagi, jonka genomi muodostaa transposonin, joka voi liittyä lähes minne vain bakteerin genomissa. Bakteereilla usein transposoni sisältää luonnossakin jonkin antibioottiresistenssigeenin. (15, s. 153-160.)

CatMu-kirjastot on luotu elektroporoimalla MuA-entsyymillä käsitelty CatMu-transposoni elektrokompetentteihin bakteerisoluihin. Magnesiumin läsnäollessa CatMu transposoituu sitten lähes satunnaiseen paikkaan osaksi bakteerin genomia. Tässä tapauksessa CatMu on kloramfenikoliresistentti, jota on käytetty hyväksi kloonien mutanttien seulonnassa. CatMu-kirjastoja voidaan hyväksikäyttää monenlaisissa bakteerin genomiin ja proteomiin liittyvissä tutkimuksissa. (1; 2.)

#### 2.4 Sattumanvarainen PCR

Sattumanvarainen PCR on sisäkkäisen PCR:n erikoistapaus. Sisäkkäisessä PCR:ssä aluksi monistetaan halutun alueen sisältävää hieman suurempaa fragmenttia, johon käydyt alukkeet eivät välttämättä ole täysin spesifisiä, mutta monistavat tehokkaasti. Tätä seuraa toinen PCR, jossa sitten monistetaan haluttua fragmenttia ihan tavallisella PCR:llä toivottavasti päätuotteeksi muodostuneesta halutusta fragmentista. Templaattina siis toimii ensimmäisen PCR-reaktion tuote. Näin voidaan varmistua oikean tuotteen monistumisesta ja monistaa vaikeasti monistettavia templaatteja. (16.)

Sattumanvaraisen PCR:n ero sisäkkäiseen PCR:ään on se, että toinen alukkeista on molemmissa vaiheissa spesifi, eli se monistaa vastinjuostetta vain oikean kohdan sisältäville DNA pätkille. Tässä tapauksessa se on spesifi CatMu-transposonille, kuten kuvassa 4, jossa on esitetty transposonikirjaston seulontaa PCR:n avulla. (17.)



Kuva 4. Sattumanvaraisen PCR:n toimintaperiaate (17).

Näin oikeita pätkiä toivon mukaan syntyy eniten. Usein kuitenkin yksi tai kaksi muutakin kohtaa monistuu lähes samalla vahvuudella. Tätä ensimmäistä PCR-reaktiota seuraa toinen, joka on edelliselle sisäkkäinen PCR, missä toinen alukkeista on edelleen spesifi transposonille ja toinen edellisen alukkeen 5'-päälle. (17.)

### 3 Toteutus

#### 3.1 Pseudolysogeenien seulonta

Projektin oli aloittanut Karolina Grabowska seulomalla kahdesta *Y. enterocolitica* O:3-kannan CatMu-kirjastosta faageille resistenttejä mutantteja. Ensimmäinen kirjasto oli kannassa YeO3-c-luc ja toinen kirjasto kannassa YeO3-R1, koska saadut faagille resistentit pesäkkeet voivat olla aidosti resistenttien mutanttien lisäksi myös pseudolysogeeniä. Koska pseudolysogeenit eivät sisällä resistenttiyttä aiheuttavaa mutaatiota, josta voitaisiin päätellä faagi  $\phi$ R1-RT:n reseptoria, niitä ei haluttu ottaa tutkimukseen mukaan. Niinpä kaikki eristetyt pesäkkeet seulottiin PCR-reaktiolla (taulukko 1), joka monistaa faagi  $\phi$ R1-RT:n DNA:ta. Templaattina käytettiin Karolinan pesäkkeistä eristämää genomista DNA:ta. Taulukon PCR on luotu kuten laboratoriomanaalin (18) luvussa 8, ohjeessa 1 neuvotaan. Tämä on tehty  $\phi$ R1-RT:n koko genomien sekvenssiä (13, s. 18) hyväksikäyttäen.

Taulukko 1. Pseudolysogeenien seulonta PCR.

<b>Pseudolysogeenien seulonta PCR</b>				
<b>PCR- ohjelma:</b>			<b>Yksi 50 <math>\mu</math>l:n reaktio sisältää:</b>	
<b>Vaihe:</b>	<b>Kesto:</b>	<b>Toistoja:</b>	<b>Reagenssi:</b>	<b>Lopullinen konsentraatio:</b>
Alkudenaturaatio 95°C	3 min	1	Steriili vesi	-
Denaturaatiovaihe 95°C	30 s	27	DyNAzyme- puskuri	10 mM Tris-HCl, 1.5 mM MgCl <sub>2</sub> , 50 mM KCl, 0.1% Triton (19)
Alukkeiden kiinnitty- minen 55°C	20 s		dATP, dCTP, dGTP ja dTTP - sekoitus	0,2 mM jokaista
Pidennysvaihe 72°C	45 s		Alukkeet r1rt-F ja r1rt-R	1 pmol molempia
Loppupidennys 72°C	7 min	1	DNA-templaatti tutkittavasta pesäkkeestä	10-100 ng DNA:ta
Pito 4°C	$\infty$	1	DyNAzyme II - entsyymi	0,5 U

Tähän PCR:ään käytettiin alukkeita r1rt-F ja r1rt-R, joiden sekvenssit löytyvät liitteestä 1. Käytetty entsyymi on DyNAzyme II ja sille käytettiin sen omaa puskuria. Faagi-DNA:n monistuminen pesäkkeestä eristetystä DNA:sta on merkki pseudolysogeniasta, koska aidosti resistentti bakteeri ei pitäisi sisällään faagi-DNA:ta laisinkaan. Karolina oli myös jo seulonut osan löytämistään pesäkkeistä PCR:llä.

Seulontatulokset tulkittiin agarosigeelillä, joka valmistettiin ja ajettiin, kuten on kuvattu ohjeissa 1 ja 2, laboratoriomanaalin (20) luvussa 5, paitsi että käytettiin uutta Sybr-GREEN-väriä, joka on pienille DNA:n määriillekin sensitiivinen väri (21). Agarosigeeli kuvattiin UV-valossa. Löytyneistä aidoista mutanteista lähdettiin sitten etsimään Cat-Mu-transposonin insertiokohtaa bakteerien genomissa.

### 3.2 Sattumanvarainen PCR

Tässä työssä sovellettiin muualla kuvattua ohjetta (3) siten, että käytettiin Dynazyme II DNA –polymeraasia (19) ja DyNAzyme EXT -puskuria, joka on varsinaisesti tarkoitettu DyNAzyme EXT –entsyymille (22), mutta joka sisälsi valmiiksi oikean määrän haluttuja ioneita, joten se otettiin käyttöön. Menetelmä on kuvattu alla taulukossa 2. Liitteestä 1 näkyy käytettyjen alukkeiden sekvenssit.



Taulukko 2. Sattumanvarainen PCR.

<b>Ensimmäinen sattumanvarainen PCR</b>				
<b>PCR- ohjelma:</b>			<b>Yksi 100 µl:n reaktio sisältää:</b>	
<b>Vaihe:</b>	<b>Kesto:</b>	<b>Toistoja:</b>	<b>Reagenssi:</b>	<b>Lopullinen konsentraatio:</b>
Alkudenaturaatio 95°C	5 min	1	Steriili vesi	-
Denaturaatiovaihe 95°C	30 s	6	DyNAzyme EXT -puskuri	50 mM Tris-HCl, 1.5 mM MgCl <sub>2</sub> , 15 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> and 0.1 % Triton (22)
Alukkeiden kiinnitys 30°C	30 s		dATP, dCTP, dGTP ja dTTP -sekoitus	0,2 mM jokaista
Pidennysvaihe 72°C	90 s		Alukkeet Arb ja Muc2	1 pmol molempia
Alkudenaturaatio 95°C	30s	30		
Alukkeiden kiinnitys 45°C	30s			
Pidennysvaihe 72°C	2 min			
Loppupidennys 72°C	5 min	1	Templaatti tutkittavasta pesäkkeestä	n. 10 ng DNA:ta
Pito 4°C	∞	1	DyNAzyme II -entsyymi	1 U
<b>Toinen sattumanvarainen PCR</b>				
<b>PCR- ohjelma:</b>			<b>Yksi 50 µl:n reaktio sisältää:</b>	
<b>Vaihe:</b>	<b>Kesto:</b>	<b>Toistoja:</b>	<b>Reagenssi:</b>	<b>Lopullinen konsentraatio:</b>
Denaturaatiovaihe 95°C	30 s	30	Steriili vesi	-
			DyNAzyme EXT -puskuri	50 mM Tris-HCl, 1.5 mM MgCl <sub>2</sub> , 15 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> and 0.1 % Triton (22)
Alukkeiden kiinnitys 45°C	30 s		dATP, dCTP, dGTP ja dTTP -sekoitus	0,2 mM jokaista
Pidennysvaihe 72°C	2 min		Alukkeet Arb2 ja Muclnt	1 pmol molempia
Loppupidennys 72°C	5 min	1	Templaattina edellisen reaktion tuote	ei tietoa
Pito 4°C	∞	1	DyNAzyme II -entsyymi	0,5 U

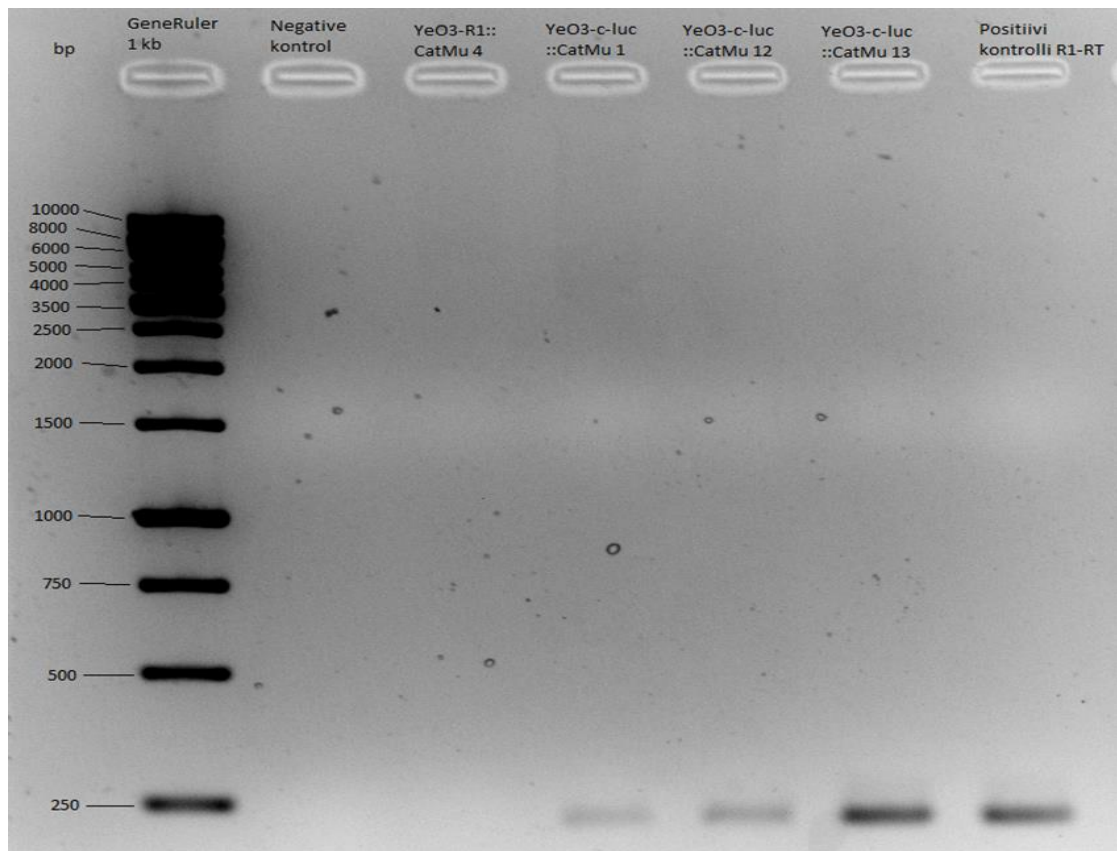
Näytteille optimoitiin omat alukkeiden kiinnityslämpötilat. Optimoinnin tulokset tulkittiin agarosigeelielektroforeesin avulla, joka valmistettiin, ajettiin ja kuvattiin kuten ohjeissa 1 ja 2, laboratoriomanuaalin (20) luvussa 5, mutta käytettiin SybrGREEN -väriä. Optimilämpötilan kriteereinä on pidetty hyvää tuotteen monistumista ja mahdollisimman pientä määrää eri tuotteita.

Niistä PCR:istä, joissa lopputuloksena oli useampi tuote, eristettiin se, jota oli syntynyt eniten. Tuotteet erotettiin agarosigeelillä, joka valmistettiin, ajettiin ja kuvattiin kuten ohjeissa 1 ja -2, laboratoriomanuaalin (20) luvussa 5, mutta tässäkin käytettiin Sybr-GREEN -väriä ja parhaiten monistuneet fragmentit leikattiin irti UV-valossa ja puhdistettiin, jotta ne voitaisiin sekvensoida. Puhdistukseen käytettiin E.Z.N.A:n geelieristyskittiä (23), ja sen metodia Spin protocol, joka löytyy liitteestä kaksi.

## 4 Tulokset ja tulosten käsittely

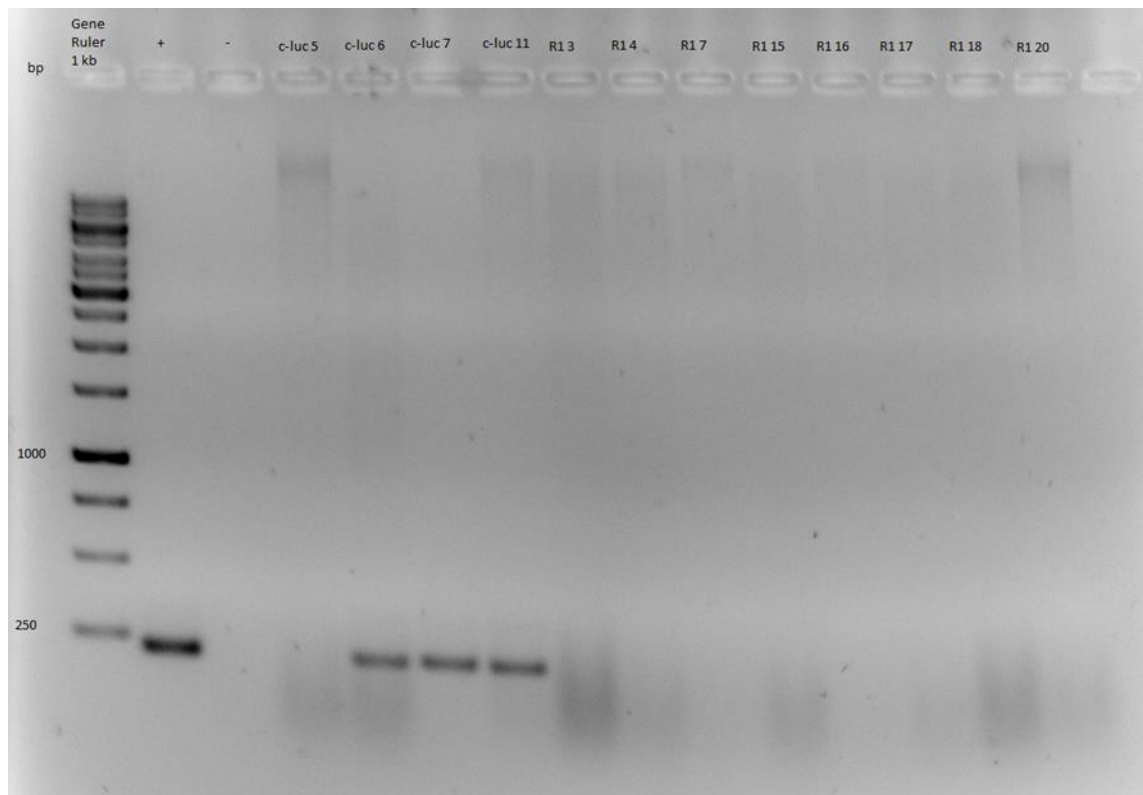
### 4.1 Pseudolysogeenien seulonnan tulokset

Kuvia ja tulkintoja pseudolysogeenien seulonnan tuloksista on esitetty kuvissa 4 ja 5. Positiivikontrollin kanssa samankokoinen fragmentti PCR:n lopputuotteena indikoi pseudolysogeeniaa. Kuvan 5 kaivojen alaosissa näkyvä sotku on joko RNA:ta tai pilkkoutunutta DNA:ta.



Kuva 4. Ensimmäisen pseudolysogeeninseulonta PCR:n tulokset.

Edellisen sivun seulonnassa löytyi vain yksi aito mutantti, YeO3-R1::CatMu kandidaatti  
4. Loput olivat pseudolysogeenejä.

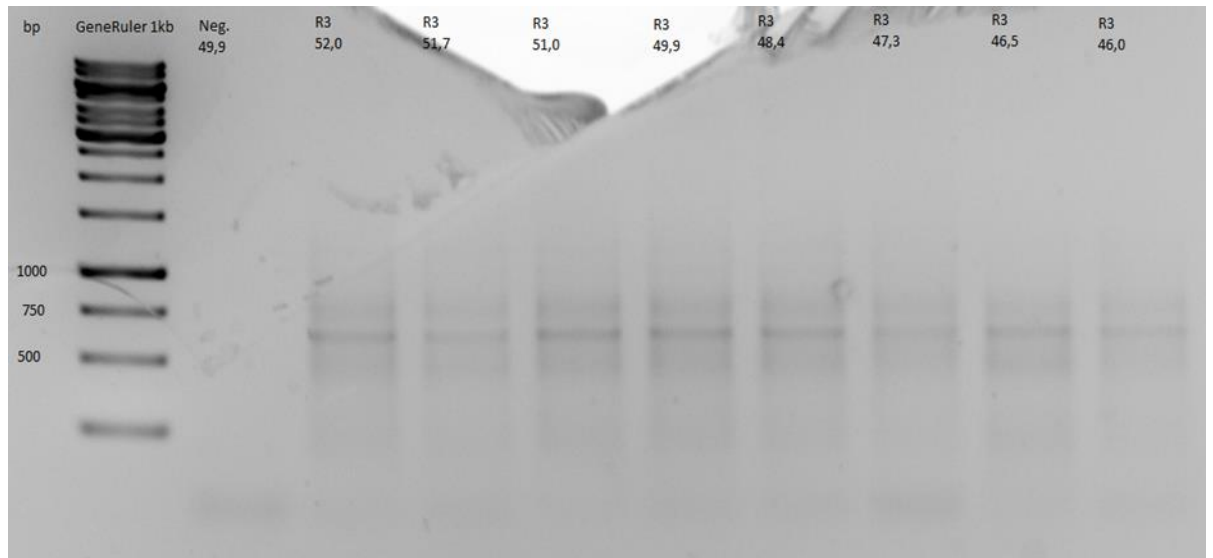


Kuva 5. Toisen pseudolysogeenienseulonta PCR:n tulokset.

Kaikki YeO3-c-luc kirjaston bakteriofagi  $\phi$ R1-RT-resistantit pesäkkeet osoittautuivat pseudolysogeeneiksi, paitsi näyte YeO3-c-luc pesäke 5. Yksikään YeO3-R1-kirjaston vastaavista pesäkkeistä ei ollut pseudolysogeeni. Näistä mutanteista lähdettiin sitten etsimään CatMu-transposonin insertiokohtaa bakteerien genomissa.

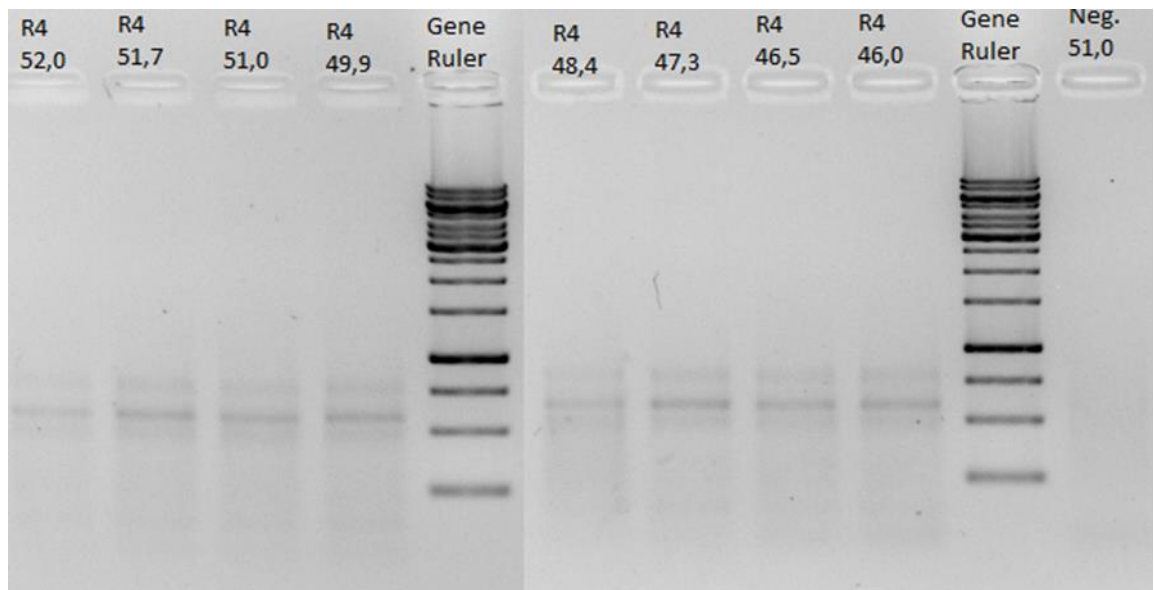
#### 4.2 Alukkeiden kiinnityslämpötilojen optimoinnin tulokset

Osasta tutkittavista mutanteista saatiin selkeä PCR-tuote, toisista huonommin ja osasta ei ollenkaan. Näistä optimoinnista on esitetty kuvia alla (kuvat 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14). Optimilämpötilan kriteereinä on pidetty hyvää tuotteen monistumista ja mahdollisimman pientä määrää eri tuotteita.



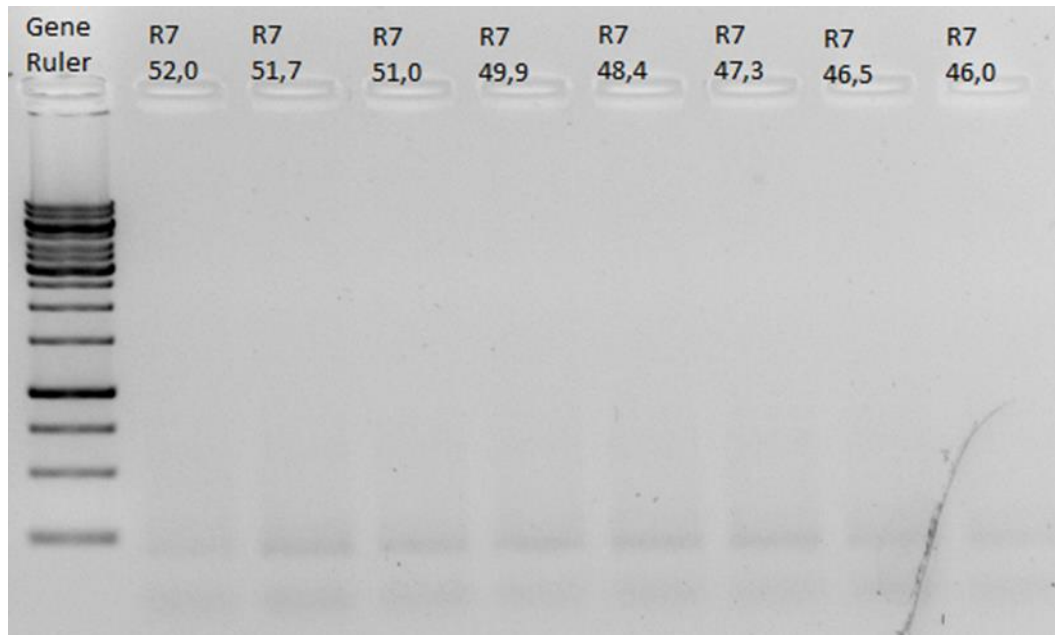
Kuva 6. Kirjaston YeO3-R1, kandidaatin 3 seulontatulokset.

Kuvassa 6 parhaaksi alukkeiden kiinnittymislämpötilaksi on tulkittu 51,0 °C. Kuvan geeli on myös pudonnut lattialle ja hajonnut.



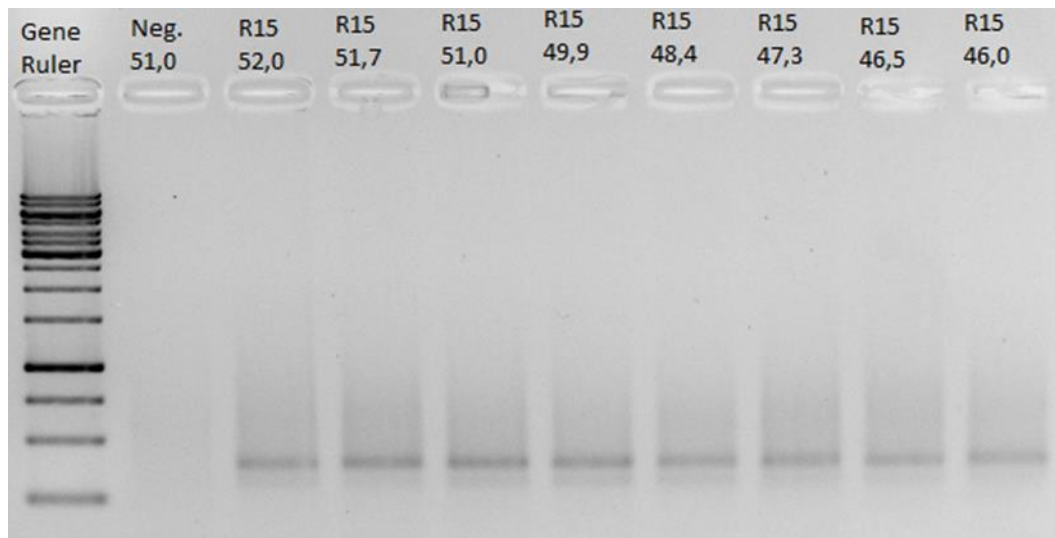
Kuva 7. Kirjaston YeO3-R1, kandidaatin 4 seulontatulokset.

Kuvassa 7 parhaaksi alukkeiden kiinnittymislämpötilaksi on tulkittu 47,3 °C. Tämä kuva on koottu kahdelta eri riviltä samaa geeliä.



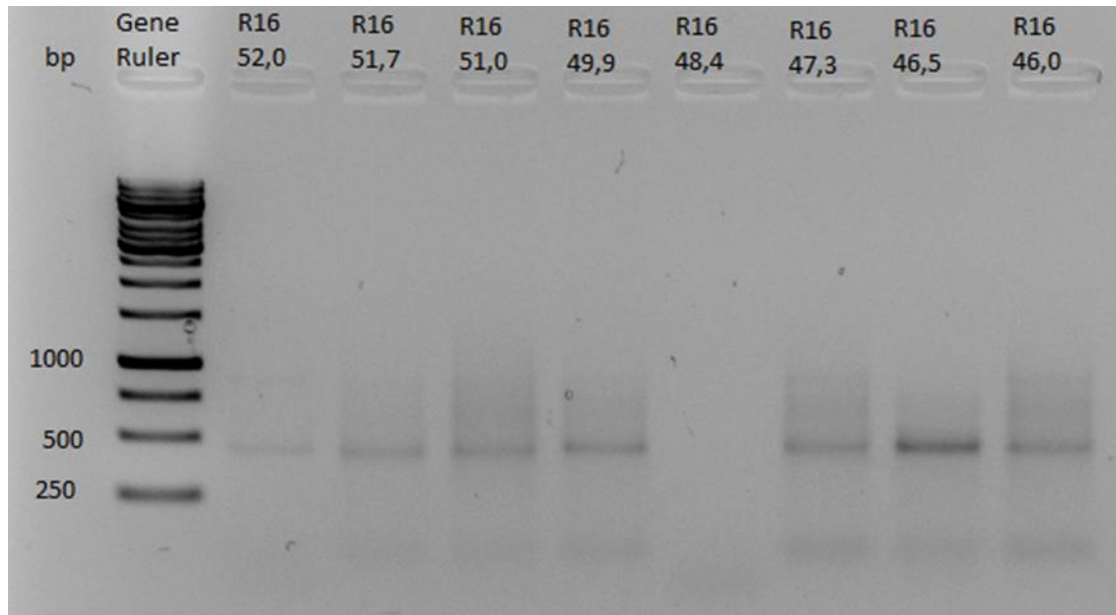
Kuva 8. Kirjaston YeO3-R1, kandidaatin 7 seulontatulokset.

Kuvassa 8 parhaaksi alukkeiden kiinnittymislämpötilaksi on tulkittu 51,0 °C.



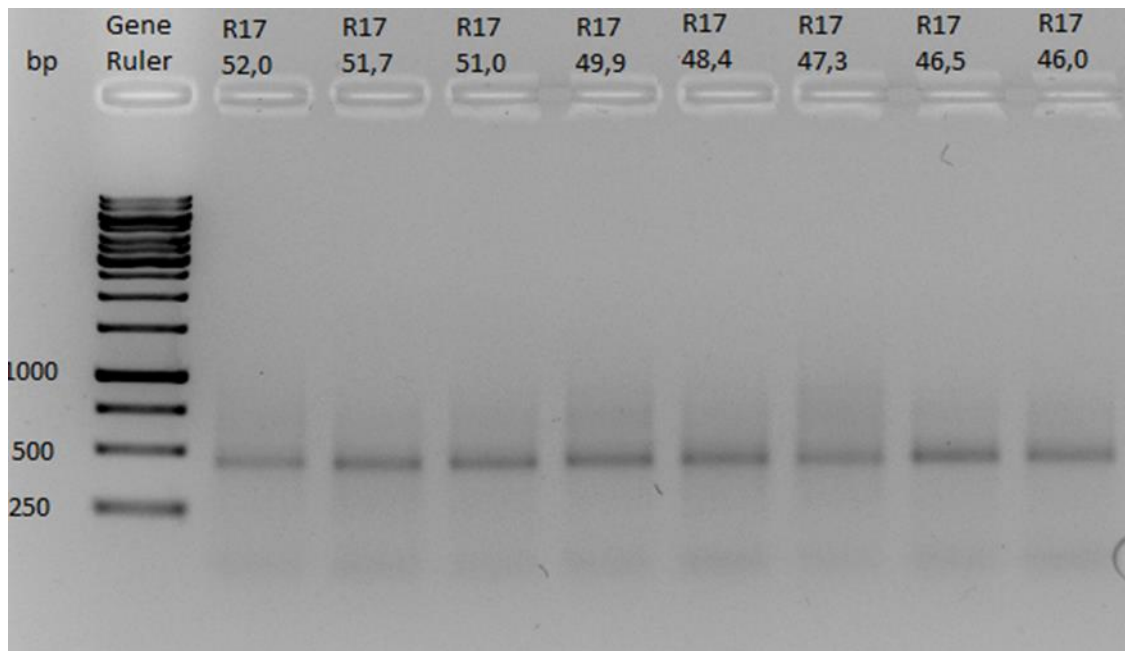
Kuva 9. Kirjaston YeO3-R1, kandidaatin 15 seulontatulokset.

Kuvassa 9 parhaaksi alukkeiden kiinnittymislämpötilaksi on tulkittu 51,0 °C.



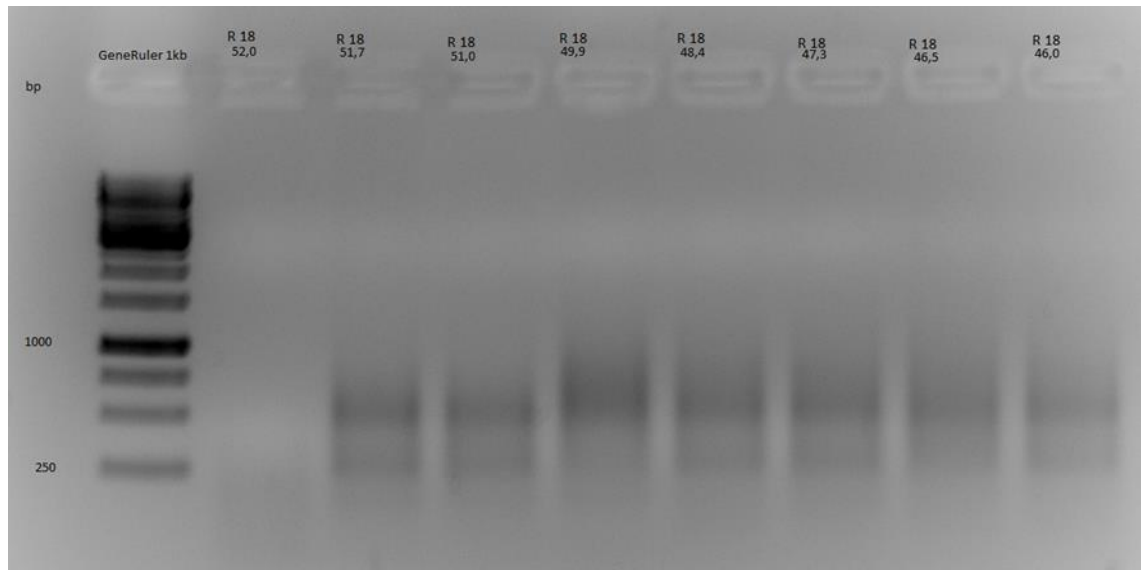
Kuva 10. Kirjaston YeO3-R1, kandidaatin 16 seulontatulokset.

Kuvassa 10 parhaaksi alukkeiden kiinnittymislämpötilaksi on tulkittu 46,5 °C.



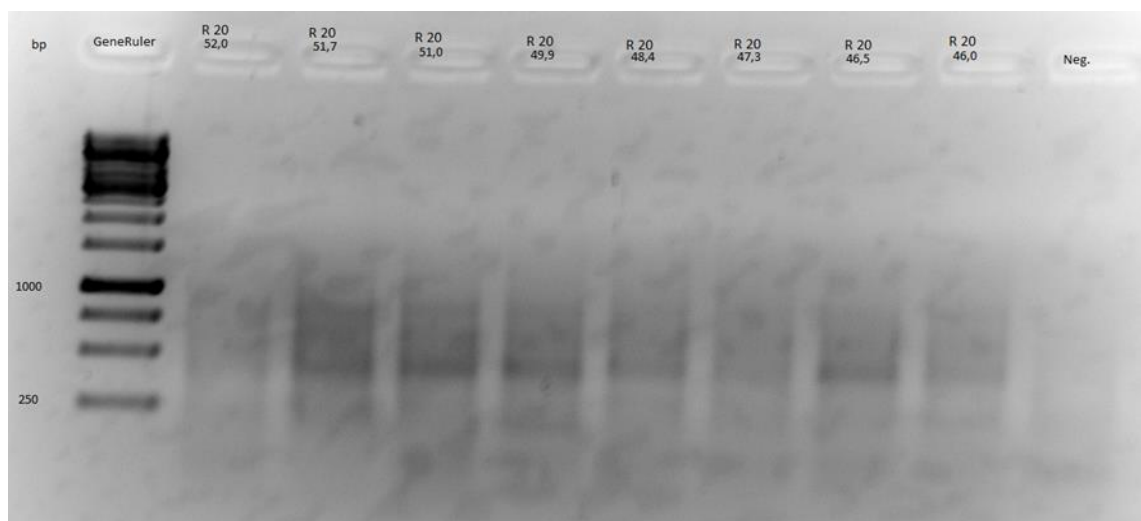
Kuva 11. Kirjaston YeO3-R1, kandidaatin 17 seulontatulokset.

Kuvassa 11 parhaaksi alukkeiden kiinnittymislämpötilaksi on tulkittu 48,4 °C.



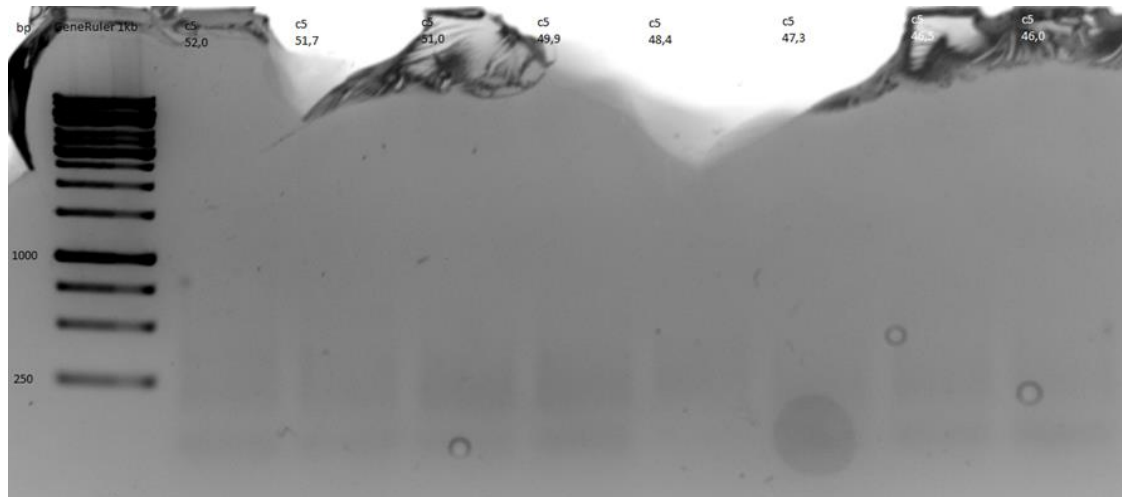
Kuva 12. Kirjaston YeO3-R1, kandidaatin 18 seulontatulokset.

Kuvassa 12 parhaaksi alukkeiden kiinnittymislämpötilaksi on tulkittu 51,0 °C.



Kuva 13. Kirjaston YeO3-R1, kandidaatin 20 seulontatulokset.

Kuvassa 13 parhaaksi alukkeiden kiinnittymislämpötilaksi on tulkittu 51,0 °C. Geeli on pudonnut kuvausvaiheessa käsipyyhepaperille, mikä aiheuttaa häiritsevää taustasing-naalia.



Kuva 14. Kirjaston YeO3-c-luc, kandidaatin 5 seulontatulokset.

Kaikista näytteistä paitsi kuvan 14 YeO3-c-luc-kandidaatista 5 saatiin erotettavaa lopputuotetta. Kuvan geeli on myös pudonnut lattialle ja hajonnut.



### 4.3 Sekvenssit

Sekvensointia varten pipetoitiin näytteet yliopiston sekvensointiyksikön ohjeen mukaan ja lähetettiin yliopiston sekvensointiyksikköön sekvensoitaviksi (24). Tähän käytettiin alukkeita Arb2 ja Muclnt, kuten käytetyssä menetelmässä (3) kehoitetaan ja optimoituja alukkeiden kiinnittymislämpötiloja. Monissa sekvensseissä alusta ja lopusta n. 20 nukleotidia ovat epäluotettavia laadultaan, joten niitä ei ole käytetty vastaavuuksien etsimiseen. Saadut sekvenssit näkyvät taulukossa 3. Numerot viittaavat niiden PCR-temperatuurina toimineiden pesäkkeiden numeroihin, jotka on todettu aidoiksi mutanteiksi, ja R viittaa siihen, että pesäkkeet ovat kirjastosta YeO3-R1.

Taulukko 3. Sekvenssoinnin tulokset.

<b>Mutantti</b>	<b>Saatu sekvenssi ja sekvensointiin käytetty aluke</b>
<b>R3</b>	<b>Muclnt</b> cagagtggcgcgcttcactcggcgagacatatgactcctatctaccccggcctgattattgaccacgccc gaaccgacaacagggttcaattgtttcagatgggtgcctgtcatccccctctaccgattatcaacaagat caccacctgcgttacggtacagctggggctctcaacaattattctttgtttaccctgcctgagggcct ccggaacatctatccggtccagac
	<b>Arb2</b> agggtgtgagctcaatgttatcagctgtgaatgagccactgcggtttctcgtctggagtggtaccgca ccatttctggctttcacgctgtattcaaaagatgggtgggtaacgggtgaaaacctggccgattccctaaa cggtaattgacaatcgtttctcctatgcctacccctgggtgagttctcagctttgactccagggtgctga atatccactcctaccctgcacgtttccaaaaaaccaaacctatacac
<b>R4</b>	<b>Muclnt</b> ccgcgcttctgtcctcttcagacttttattatttgcctgcccgaacaggcctcgatctgtcttgcgagtgcc cacacagattgtctgataattgttaaacagcgtttgttacctgtgtgccttgcggcaaatcggaccgtaacg cgggaggttgaatacgttcccgcgtgaagagtaagagttatttggtaactctgcatgatcgggttcaacgt cctaggccccgcgatacacaatcaataggatccactcaatcagacctctgattcaaacgta ataatgccttctggcattatgtctgctgattgacaaccagataatctctgtaggatcc
	<b>Arb2</b> aatgagtaagcgtccgcgccaaggatagcacggcttgagccatcggggacgattttacggcgtctttatga tctacctgtttcacgctgaggttttgacaaaagtgtcaacctatcaggactagtcatttttcaccgatttgc tgttttgccgattggtgagcgggtgaaaagttactgcaagtagacattaccggctggatggaccgcccc ataactcggcagaaaaaaaaa
<b>R7</b>	<b>Muclnt</b> – ei sekvenssiä <b>Arb2</b> – ei sekvenssiä
<b>R15</b>	<b>Muclnt</b> tcggcaaaactaacaaggtagagagataccgaagccgtcggccgttctgatctttcaggttgcacca gtgtaaacaccgccc
	<b>Arb2</b> – ei sekvenssiä
<b>R16</b>	<b>Muclnt</b> tgtttagtacatagtttcaatgagacatattcaggttaattggtagcattttcggcttggattataacctcgc gaatggaacactgcgtcagacacagacacacaaactctcaacaatagtccaaaaaattattggc ggcagtggcaggtgtccgaataacaccaatgagggaataataatgatgaagcgaatattctgacgta gtaatcccagcattgttagtagctggtgcagctaatgcagcagaaatctacaacaaagacggcaacaaa cttgacctgtacggtaaagtgacgcacgtcaccagttctctgacaacgctggccaagacggaactaatctt atgttcgtttcggctccctgaagcggcgcagaaaaacgcga
	<b>Arb2</b> – ei sekvenssiä

<b>R17</b>	<p><b>Muclnt</b>  ggcgcgcttcatgagccgaacgaacataagattcgtcgccgcttggccagcgttgcagagaactggtgacgtgctcaactttaccgtacaggtaagtttggtgccgctttggtgtagattctgctgcattagctgcaccagctactaacaatgctgggattactactgcaagaatattgcgctcatcattattaccctcattggtgttattcggacacctgccactgccccaataatTTTTTggaactattggtgagagttggtgctgctgtgctgaacgcagtggtccattcgcgagggtataatccagaccgaaaatgctaccaattacctgaatatgtctcattgagaaactatgttactaaatgtaaatc</p> <p><b>Arb2 – ei sekvenssiä</b></p>
<b>R18</b>	<p><b>Muclnt</b>  ggcgcgctcattggtgtgtctctcatagcgcgctgttataaccacctgggtggggggaactatgttccagcgcggtaatgctattgaccgcagagcttaaccactgaccggtacattttatcggcggctattgccgcccgttcattttgaaatgcgccc aaatccgaaactcattgtttaaactccaagcctccccattactctgccaggaaactatcctgctattgcttccaaacagggccgggctgctcacctaacaaaataccgcataatccggaatcactgtttgtgaggagcatgccatcggaggcgggtcaa atgagaacgtcaagactgcatcgtgccaccgtgtgacaactggggcttaactatagctt</p> <p><b>Arb2</b>  tctaataaacgtgtcacttaataataagcttcatattatgctcaatcaaaaaataaagccggcggcaattgcgcccgataaaactgtgtcttgcctctattcaccactgcttcaatatcactacctgcacttgaacatctttaccacaccttgggtgattgcaggcgtcaatgaagagataactaacaatgaagcggcgcacgaaaaacgcgaaagcgttcacgataaatgcgattgagcgaagctggcgcataaaaatgggggtgtcacaggtaatacggtagagcctgaaatattcattccagtgccgtgacattttaccaatggggatacagagcagttgaaccaccaaggtaggaagaagcgacaacgcccggatgttctcccgcattggtcgtcggggatataaaccttaccgc</p>
<b>R20</b>	<p><b>Muclnt</b>  tgcgcgcttcatgagccgaacgaacataagattcgtcgccgcttggccagcgttgcagagaactggtgacgtgctcaactttaccgtacaggtaagtttggtgccgctttggtgtagattctgctgcattagctgcaccagctactaacaatgctgggattactactgcaagaatattgcgctcatcattattaccctcattggtgttattcggacacctgccactgccccaataatTTTTTggaactattggtgagagttggtgctgctgtgctgaacgcagtggtccattcgcgagggtataatccagaccgaaaatgctaccaattacctgaatatgtctcattgagaaactatgttactaaatgtaaatca</p> <p><b>Arb2</b>  atcaaatacatatagttgctcatgagacatattcaggtaattggtagcattttcggctctggattataaccctcggatggaactgctcagacacagacacacaaactctcaacaatagttccaaaaaattattggcggcagtggcaggtgtccgaataacaccaatgaggtaataataatgatgaagcgaatattctgtagtaatacccagcattgttagtagctggtgcagcta atgcagcagaaatctacaacaaagacggcaacaaacttgacctgtacggtaaagttgacgcacgtcaccagttcttgacaacgctggccaagacggcgacaatcttatgttcgtttcggcttcatgaagcggcgcacgaaaaacgcgaaagcgttcacgataaatgcga</p>

Useimmat Arb2-sekvensoinnit eivät syystä tai toisesta toimineet. Saatuja sekvenssejä verrattiin BLAST-ohjelman, eli nukleiinihappojen ja proteiinien sekvensseistä paikallisia yhteneväisyyksiä etsivän työkalun (25) avulla kantaan *Y. enterocolitica* subsp. *paleartica* Y11 (NC\_017564.1) ja CatMu-transposonin sekvenssiin (liite 1). Tulokset mutanttien BLAST:eista osumatarkkuuksineen olivat seuraavanlaiset:

- Sekvenssi alukkeilla Muclnt ja Arb2 R3:lle ei tuottanut luotettavia osumia.
- Sekvenssit alukkeilla Muclnt ja Arb2 R4:lle tuottivat saman tuloksen, eli monta melko samanarvoista tulosta joista korkein oli rRNA-16S ribosomal RNA cold shock protein (95 %).
- Sekvenssi alukkeella Muclnt R18:lle tuotti tuloksen O6-methylguanine-DNA methyltransferase (91%) ja monia muita lähes yhtä hyviä osumia, kun taas Arb2 R18:lle tuotti osuman CatMu transposoniin (100%), mikä ei kerro mitään transposonin insertiokohdasta.
- Sekvenssit alukkeilla Muclnt R15:lle, R16:lle, R17:lle, R20:lle ja Arb2 R20:lle tuottivat kaikki saman tuloksen, Outer membrane porin protein C (99 %).

Tuloksia on tarkasteltu Artemis-ohjelmalla. Artemis on ohjelma, jolla voi selata genomeita ja visualisoida sekvenssejä ja niiden ominaisuuksia (26). Artemiksen mukaan OmpC (*Outer membrane porin protein C*) on *Y. enterocolitica*n geeni Y11\_04441. Kohdesekvenssiltään rajoittamaton BLAST geeni Y11\_04441:n sekvenssillä antaa kuitenkin enimmäkseen tuloksia nimellä OmpF, ja ainoastaan yksi osuma on nimeltään OmpC. Lisäksi OmpF-geeni on lähes identtinen niissä kannoissa, joita faagi  $\phi$ R1-RT infektoi, ja erilainen niissä, joita ei infektoi. Tämä kävi ilmi verrattaessa faagi  $\phi$ R1-RT:n infektoimia kantoja niihin BLAST-osumiin, joita saatiin OmpC:n sekvenssillä.

## 5 Johtopäätökset

Työssä saavutettiin sille asetettu tavoite, eli faagi  $\phi$ R1-RT:n todennäköinen reseptori isännässä *Yersinia enterocolitica* O:3 löydettiin. Tämä tulos on geeni Y11\_04441, joka vaikuttaa oikeantyyppiseltä, koska se koodaa ulkomembraanin proteiinia, ja lisäksi sillä on tuloksissa monta osumaa. Jokin muukin tietenkkin voi aiheuttaa resistenttiyttä, mutta varmasti ainakin tämä.

BLAST OmpC -geeni Y11\_04441:n sekvenssillä antaa enimmäkseen tuloksia nimellä OmpF (*Outer membrane protein F*), joten käytetyssä genomissa on luultavasti sattunut tämän geenin kohdalla nimeämisvirhe, ja geenin oikea nimi on OmpF. OmpF-geeni on lähes identtinen niissä kannoissa, joita faagi  $\phi$ R1-RT infektoi, ja erilainen niissä, joita ei infektoi. Tämä tukee ajatusta tuloksen oikeellisuudesta. Lisäksi faagi  $\phi$ R1-RT infektoi nimenomaan huoneenlämmössä, mistä johtuu sen nimikin. Tämänkin osalta OmpF on oikeantyyppinen tulos, sillä sitä ei *Y. enterocolitica* juurikaan tuota huoneenlämpöä korkeammissa lämpötiloissa (8), ja faagi vaatii infektoidakseen oikean reseptorin.

Tämä tulos kertoo vain pienen osan siitä, miten faagi  $\phi$ R1-RT toimii ja mitä vaikutuksia sillä mahdollisesti on isäntäänsä tappamisen lisäksi. Vaikuttaa kuitenkin siltä, että faagi kykenee pseudolysogeniaan ja että sen reseptori on löydetty. Lisäksi faagin  $\phi$ R1-RT koko genomi on sekvensoitu ja siitä on otettu elektronimikroskooppikuvia (13). Niinpä faagin  $\phi$ R1-RT vuorovaikutuksessa isäntänsä kanssa on vielä paljon tutkittavaa, varsinkin ennenkuin siitä voidaan väittää tiedettävän tarpeeksi, jotta sitä voitaisiin käyttää lääkkeenä *Y. enterocolitica*-infektioita vastaan.

## Lähteet

- 1 Pajunen, M., Pinta, E. and Skurnik, M. 2012. Construction and Screening of a Transposon Insertion Library of *Yersinia enterocolitica* (YeO3-R1). *Bio-protocol* 2(15): e246. Verkkodokumentti. <<http://www.bio-protocol.org/e246>>. Viitattu 8.8.2015.
- 2 Lamberg et al. 2/2002. Efficient Insertion Mutagenesis Strategy for Bacterial Genomes Involving Electroporation of In Vitro-Assembled DNA Transposition Complexes of *Bacteriophage Mu*. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 68:2, 705–712.
- 3 Pinta, E. et al. 2012. Identification of three oligo-/polysaccharide-specific ligases in *Yersinia enterocolitica*. *Molecular Microbiology*, 83:1, 125–136.
- 4 Helsingin Yliopisto. 2015. Yersinia Research Laboratory. <<http://research.med.helsinki.fi/immuno/skurnik/research.html>>. Viitattu 15.10.2015.
- 5 Waldor, M.; Friedman, D.; Adhya, S. 2005. PHAGES - Their role in bacterial phageogenesis and biotechnology. Washington DC. ASM Press.
- 6 Hallanvuo, S. 2009. Foodborne Yersinia: Identification and molecular epidemiology of isolates from human infections. Helsinki. Terveystieteiden tutkimuskeskus ja Metsätieteiden laitos.
- 7 Pinta, E. 2010. Turun yliopiston julkaisuosa 927. medica-ontologica: BIOSYNTHESIS OF YERSINIA ENTEROCOLITICA SEROTYPE O:3 LIPOPOLYSACCHARIDE OUTER CORE. Turun Yliopisto.
- 8 Skurnik & Leskinen. 14.9.2015. Yersinia tutkimusryhmän johtaja, bakteriologian professori & tutkija, mikrobiologian kandidaatti. Henkilökohtainen tiedonanto.
- 9 Prescott, Harley, Klein. 1996. Microbiology. USA. Wm. C. Brown Publishers.
- 10 Chaturongakul S and Ounjai P (2014) Phage–host interplay: examples from tailed phages and Gram-negative bacterial pathogens. *Front. Microbiol.* 5:442. Verkkootikkeli. <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2014.00442/full>>. Viitattu 25.10.2015.
- 11 Łoś, M. & Węgrzyn, G. 2012. Advances in Virus Research. Science Direct. Verkkokirja. <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123946218000194>>. Viitattu 10.9.2015.

- 12 Cenes, W. et. al. 3/2013. Phage –host interactions during pseudolysogeny. *Bacteriophage* 3:1, e25029. Landes Bioscience. Verkkoartikkeli. <<http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=a9h&AN=88925530&site=eehost-live&scope=site>>. Viitattu 10.9.2015.
- 13 Nawaz, A. 11.9.2012. Genome annotation of six Yersinia bacteriophages. Projektiraportti. Helsingin Yliopisto.
- 14 Skurnik, Mikael. 14.9.2015. Yersinia tutkimusryhmän johtaja, bakteriologian professori. Julkaisematon tieto.
- 15 Srivastava, S. 2013. *Genetics of Bacteria*. London. Springer.
- 16 Davidson college, Department of Biology. 2002. Nested Primers for PCR. Verkkodokumentti. <<http://www.bio.davidson.edu/courses/genomics/method/nestedpcr.html>>. Viitattu 21.10.2015.
- 17 MGH-ParaBioSys:NHLBI Program for Genomic Applications, Massachusetts General Hospital and Harvard Medical School. 2004. PA14 Transposon Insertion Mutant Libraries. Verkkodokumentti. <[http://pga.mgh.harvard.edu/Parabiosys/projects/host-pathogen\\_interactions/library\\_construction.php](http://pga.mgh.harvard.edu/Parabiosys/projects/host-pathogen_interactions/library_construction.php)>. Viitattu 21.10.2015.
- 18 Sambrook and Russel. 2001. *Molecular cloning: A laboratory manual, volume 2, 3. painos*. Cold Spring Harbor, New York. Cold spring harbor laboratory press.
- 19 Thermo Fisher Scientific. 2015. DyNAzyme II DNA Polymerase (2 U/μl). Verkkodokumentti. <<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/F501S>>. Viitattu 25.10.2015.
- 20 Sambrook and Russel. 2001. *Molecular cloning: A laboratory manual, volume 1, 3. painos*. Cold Spring Harbor, New York. Cold spring harbor laboratory press.
- 21 Lonza. SYBR® Green I Nucleic Acid Stain. Verkkodokumentti. <<http://www.lonza.com/products-services/bio-research/electrophoresis-of-nucleic-acids-and-proteins/nucleic-acid-electrophoresis/nucleic-acid-gel-stains/sybr-green-i-nucleic-acid-stain.aspx>>. Viitattu 20.9.2015.
- 22 Thermo Fisher Scientific. 2015. DyNAzyme EXT DNA Polymerase (1 U/μl). Verkkodokumentti. <<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/F505L?ICID=search-product>>. Viitattu 25.10.2015.
- 23 E.Z.N.A. 9/2012. Gel Extraction Kit. Verkkodokumentti. <<http://omegabiotek.com/store/wp-content/uploads/2013/04/D2500.pdf>>. Viitattu 25.10.2015.

- 24 Helsingin Yliopisto. 2006. Sekvensointiyksikkö.  
<<http://www.hi.helsinki.fi/tietoa/sekvensointi.html>>. Viitattu 21.9.2015.
- 25 NCBI. BLAST- Basic Local Alingment Search Tool. Verkkotyökalu.  
<<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>. Viitattu 27.10.2015.
- 26 Wellcome Trust Sanger Institute. 1/2015. Artemis: Genome Browser and Annotation Tool. Verkkodokumentti.  
<<https://www.sanger.ac.uk/resources/software/artemis/>>. Viitattu 27.10.2015.

## Liite 1. Käytettyjä sekvenssejä

Taulukko 4.  $\phi$ R1-RT spesifit alukkeet.

<b>r1rt-F</b> aac ata aaa ggc cca gaa cg
<b>r1rt-R</b> ttg gtg aag att ttg att ctg gt

Taulukko 5. Sattumanvaraisen PCR:n alukkeiden sekvenssit.

<b>Arb2</b> ggc cac gcg tcg act agt ca
<b>MucInt</b> cgc att tat cgt gaa acg ctt acg (transposonille spesifi)
<b>Arb1</b> ggc cac gcg tcg act agt can nnn nnn nnn gat at
<b>Muc2</b> ttc cgt cac agg tat tta ttc ggt (transposonille spesifi)

### CatMu-transposonin sekvenssi:

aagcttagat ctgaagcggc gcacgaaaaa cgcgaaagcg tttcacgata aatgcgaaaa cggatccttt  
 tcgaccgaat aaataacctgt gacggaagat cacttcgcag aataaataaa tctgtgtgc cctgttgata  
 ccgggaagcc ctgggccaac ttttgccgaa aatgagacgt tgatcggcac gtaagaggtt ccaactttca  
 ccataatgaa ataagatcac taccgggctt atttttgag ttgtcgagat ttcaggagc taaggaagct  
 aaaatggaga aaaaaatcac tggatatacc accgttgata tatcccaatg gcatcgtaa gaacattttg  
 aggcatttca gtcagttgct caatgtacct ataaccagac cgttcagctg gatattacgg ccttttaaa  
 gaccgtaaag aaaaataagc acaagtttta tccggccttt attcacattc ttgcccgcct gatgaatgct  
 catccggaat tacgtatggc aatgaaagac ggtgagctgg tgatatggga tagtgttcac cctgttaca  
 ccgttttcca tgagcaaact gaaacgtttt catcgctctg gagtgaatac caccagcatt tccggcagtt  
 tctacacata tattcgcaag atgtggcgtg ttaccggtgaa aacctggcct atttcctaa agggtttatt gagaatatg  
 tttcgtctc agccaatccc tgggtgagtt tcaccagttt tgattaaac gtggccaata tggacaactt ctcgcccc  
 gttttacca tgggcaaata ttatcgcaa ggcgacaagg tgctgatgcc gctggcgatt caggttcatc  
 atgccgtttg tgatggcttc catgtcggca gaatgcttaa tgaattaca cagtactgcg atgagtggca  
 gggcggggcg taatttttt aaggcagtta ttggtgccct taaacgcctg gttgctacgc ctgaataagt  
 gataataagc ggatgaatgg cagaaattcg aaagcaaatt cgacccggtc gtcggttcag ggcagggctc  
 ttaaatagcc gcttatgtct attgtcgttt taccggttta ttgactaccg gaagcagtg gaccgtgtc ttctaaatg  
 cctgaggcca gtttgctcag gctctccccg tggaggaat aattgacgat aggatccgtt ttcgcattta  
 tcgtgaaacg ctttcgctt tttcgtcgc cgcttcagat ctgaattc



## **Liite 2. E.Z.N.A.® Gel Extraction Kit - Spin Protocol**

### ***Materials and Equipment to be Supplied by User:***

- Heat block or water bath capable of 60 °C
- Microcentrifuge capable of at least 13,000 x g
- Vortexer
- Nuclease-free 1.5 mL microcentrifuge tubes
- 100 % ethanol
- Optional: 5M Sodium Acetate, pH 5.2
- Optional: Sterile deionized water

### ***Before starting:***

- Prepare SPW Wash Buffer according to the "Preparing Reagents" section on Page 5
- Set heating block or water bath to 60 °C

**Note:** *The yellow color of the Binding Buffer (XP2) signifies a pH of  $\leq 7.5$ .*

- 1.** Perform agarose gel/ethidium bromide electrophoresis to fractionate DNA fragments. Any type or grade of agarose may be used. However, it is strongly recommended that fresh TAE buffer or TBE buffer be used as running buffer. Do not reuse running buffer as its pH will increase and reduce yields.
- 2.** When adequate separation of bands has occurred, carefully excise the DNA fragment of interest using a wide, clean, sharp scalpel. Minimize the size of the gel slice by removing extra agarose.
- 3.** Determine the appropriate volume of the gel slice by weighing it in a clean 1.5 mL microcentrifuge tube. Assuming a density of 1 g/mL, the volume of gel is derived as follows: a gel slice of mass 0.3 g will have a volume of 0.3 mL.
- 4.** Add 1 volume Binding Buffer (XP2).
- 5.** Incubate at 60 °C for 7 minutes or until the gel has completely melted. Vortex or shake the tube every 2-3 minutes.

**Important:** *Monitor the pH of the Gel/Binding Buffer mixture after the gel has completely dissolved. DNA yields will significantly decrease when the pH > 8.0. If the color of the mixture becomes orange or red, add 5  $\mu$ L 5M sodium acetate (pH 5.2) to bring the pH down. After this adjustment, the color of the Gel/Binding Buffer mixture should be light yellow.*

- 6.** Insert a HiBind® DNA Mini Column in a 2 mL Collection Tube.
- 7.** Add no more than 700  $\mu$ L DNA/agarose solution from Step 5 to the HiBind® DNA Mini Column.
- 8.** Centrifuge at 10,000 x g for 1 minute at room temperature.

9. Discard the filtrate and reuse collection tube.
10. Repeat Steps 7-9 until all of the sample has been transferred to the column.
11. Add 300 µL Binding Buffer (XP2).
12. Centrifuge at maximum speed ( $\geq 13,000 \times g$ ) for 1 minute at room temperature.
13. Discard the filtrate and reuse collection tube.
14. Add 700 µL SPW Wash Buffer.

**Note:** SPW Wash Buffer must be diluted with 100% ethanol prior to use. Please see Page 5 for instructions.

15. Centrifuge at maximum speed for 1 minute at room temperature.
16. Discard the filtrate and reuse collection tube. E.Z.N.A.® Gel Extraction Kit - Spin Protocol

**Optional:** Repeat Steps 14-16 for a second SPW Wash Buffer wash step. Perform the second wash step for any salt sensitive downstream applications.

17. Centrifuge the empty HiBind® DNA Mini Column for 2 minutes at maximum speed to dry the column matrix.

**Note:** It is important to dry the HiBind® DNA Mini Column matrix before elution. Residual ethanol may interfere with downstream applications.

18. Transfer the HiBind® DNA Mini Column to a clean 1.5 mL microcentrifuge tube.
19. Add 30-50 µL Elution Buffer or deionized water directly to the center of the column membrane.

**Note:** The efficiency of eluting DNA from the HiBind® DNA Mini Column is dependent on pH. If eluting DNA with deionized water, make sure that the pH is around 8.

20. Let sit at room temperature for 2 minutes.
21. Centrifuge at maximum speed for 1 minute.

**Note:** This represents approximately 70 % of bound DNA. An optional second elution will yield any residual DNA, though at a lower concentration.

22. Store DNA at -20 °C (23.