

POISTOGEENISEN *ESCHERICHIA COLI* -
KANNAN LUOMINEN P1-
BAKTERIOFAGIMENETELMÄLLÄ

Ville Moilanen
2011
Oulun seudun ammattikorkeakoulu

POISTOGEENISEN *ESCHERICHIA COLI* -
KANNAN LUOMINEN P1-
BAKTERIOFAGIMENETELMÄLLÄ

Ville Moilanen
Opinnäytetyö
22.03.2011
Laboratorioalan koulutusohjelma
Oulun seudun ammattikorkeakoulu

SISÄLTÖ

SISÄLTÖ.....	3
1 JOHDANTO	5
2 BAKTERIOFAGIT	6
2.1 Bakteriofagien historia	6
2.1.1 Bakteriofagien rakenne	7
2.1.2 Fagien elämän syklit	8
2.1.3 Bakteerispesifiset fagit.....	9
2.1.4 <i>E.coli</i> fagi P1	10
2.1.5 Fagitiitterin määrittäminen	12
2.2 Yleinen transduktio	13
3 TRIOSEFOSFAATTI ISOMERAASI	14
4 KÄYTETYT GEENITEKNIIKAN MENETELMÄT	15
4.1 Polymeraasiketjureaktio eli PCR.....	15
4.2 Agaroosigeelielektroforeesi	17
4.3 Sekvensointi	19
5 POISTOGEENISEN <i>E. COLI</i> –KANNAN LUOMINEN.....	21
5.1 Työn suoritus	21
5.2 Fagilysaatin valmistus.....	22
5.3 Fagitiitterin määrittäminen	23
5.4 Geneettisen materiaalin siirtäminen.....	24
5.5 Poistogeenisen bakteerin varmentaminen	26
5.6 Poistogeenisen kannan jatkokäsittely	29
6 TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU.....	30
6.1 Fagitiitteri	30
6.2 Transduktio.....	31
6.3 Poistogeenisen kannan varmentaminen.....	31
7 POHDINTA.....	34
LÄHTEET	36
LIITTEET	38

Koulutusohjelma	Opinnäytetyö	Sivuja	+	Liitteitä
Laboratorioanalyytikon koulutusohjelma	Opinnäytetyö	36	+	9
Suuntautumisvaihtoehto	Aika			
Biotekniikka	Syksy 2010 – Kevät 2011			
Työn tilaaja	Työn tekijä			
Bioprosessitekniikan laboratorio, Oulun Yliopisto	Ville Moilanen			
Työn nimi	Poistogeenisen <i>Escherichia coli</i> -kannan luominen P1-bakteriofagimenetelmällä			
Avainsanat	Poistogeeninen, P1, bakteriofagi, <i>E. coli</i>			

Työn aiheena on poistogeenisen *Escherichia coli* -kannan luominen molekyylibiologian tarpeisiin käyttäen P1-bakteriofagimenetelmää. Tavoitteena oli kehittää toistettava ja suoraviivainen menetelmä poistogeenisen bakteerin luomiseen käyttäen P1-bakteriofagia transduktiossa.

Työssä käytettiin perinteisiä mikrobiologian ja geenitekniikan menetelmiä kohdebakteerin kasvatuksessa, sekä geneettisen materiaalin monistamisessa, puhdistamisessa ja varmentamisessa. P1-bakteriofagimenetelmän kehittäminen aloitettiin kokeilemalla ja kehittämällä jo olemassa olevia P1-menetelmiä. Näitä menetelmiä toistettiin ja käytäntöjä muutettiin saatujen tulosten mukaisesti.

Työn tuloksena kehitettiin toistettava menetelmä, joka perustuu bakteriofagi P1:den kykyyn toimia transduktiopartikkelina ja siirtää geneettistä materiaalia isäntäsolusta toiseen. Halutun geenin siirtämiseen tarvitaan riittävän suuri populaatio P1-fageja. Koska geneettisen materiaalin pakkaaminen muodostuviin uusiin fageihin on sattumanvaraista, on fagi-populaation oltava riittävän suuri kattamaan isäntäbakteerin perintöaineksen.

1 JOHDANTO

Tämä opinnäytetyö on yleiseen transduktioon perustuvan menetelmän kehittäminen. Yleinen transduktio, josta käytetään myös nimitystä P1-bakteriofagimenetelmä on menetelmä, jossa bakteriofagi P1 siirtää geneettistä materiaalia isäntäsolusta toiseen. Bakteriofagimenetelmän kehittämisessä käytettiin yleisiä geenitekniikan ja mikrobiologian menetelmiä kohdebakteerin kasvatuksessa ja geneettisen materiaalin monistamisessa, puhdistamisessa ja varmentamisessa transduktion jälkeen.

Lähtökohtana oli jatkaa poistogeenisen *Escherichia coli* perimän muokkaamista kohti haluttua tavoitetta. Kohdebakteerilta oli jo saatu poistettua LacY - ja EndA -geenit. LacY koodaa β -galaktosidaasi permeaasia, joka on membraaniproteiini. Tämä proteiini pumppaa laktoosia solun sisälle. EndA -geeni taas koodaa endonukleasientsyymiä, joka pilkkoo geneettistä materiaalia solun sisällä. Nämä geenit haittaavat kohde -entsyymien tutkimista.

Opinnäytetyön tarkoituksena oli poistogeenisen *E. coli* -kannan luominen molekyylibiologian tutkimustarpeisiin ja yleiseen transduktioon perustuvan menetelmän kehittäminen. Kohteena olevan *E. coli* perimää pyritään muuttamaan, jotta mutatoitun kohde-entsyymien, triosefosfaatti isomeraasin toimintaa kyettäisiin tutkimaan tarkemmin. Pääkohteena oli kuitenkin itse menetelmän kehittäminen. Haluttujen geenien poisto bakteerin perimästä oli osa pidempiaikaista tutkimusta, jota tämä opinnäytetyö sivusi. Tämän tutkimuksen tavoitteena oli saada poistettua bakteerilta ne geenit, jotka haittaavat mutatoitun A-TIM-entsyymien tutkimista. (10.)

2 BAKTERIOFAGIT

Bakteriofagit ovat bakteerien viruksia. Kuten tavalliset virukset, myös bakteriofagit ovat loisia, jotka tunkeutuvat isäntäsoluun ja käyttävät hyväkseen solun metaboliakoneistoa itsensä monistamiseen. Yksittäinen bakteriofagi kykenee selviytymään pitkiäkin aikoja yksistään, mutta ei kykene kasvamaan tai monistumaan ilman isäntäsolua.(15.)

2.1 Bakteriofagien historia

Ensimmäinen havainto bakteriofagien olemassaolosta tuli vuonna 1896, kun brittiläinen bakteriologi Ernest Hankin huomasi, että Ganges- ja Jumna jokien saasteinen vesi Intiassa sisälsi jotain tunnistamatonta substanssia, joka läpäisi tiheän suodattimen ja kykeni tappamaan *Vibrio cholerae* -bakteereja. Hankin huomasi, että tämä suodatettu substanssi auttoi säätelemään jokiveden patogeenisten bakteereiden määrää tappamalla niitä. Hän ei kuitenkaan yrittänyt tunnistaa tätä vaikuttavaa substanssia. (15.)

Vuonna 1915 Frederick Twort kohtasi samanlaisen suodatetun substanssin ja ehdotti sen olevan mahdollisesti virus, mutta ei kehittänyt ideaa sen pidemmälle. Kaksi vuotta myöhemmin ranskalainen lääkäri Felix d'Herelle huomasi, että punataudista toipumassa olleiden ranskalaissoitilaiden ulostenäytteistä tehty bakteerivapaa suodos kykeni tappamaan bakteereita, jotka aiheuttivat punatautia. Jatkotutkimukset osoittivat, että suodos sai samean bakteeriviljelmän selkeytymään ihan kuin vaikuttava aine olisi syönyt bakteereita. Tämän vuoksi d'Herelle kutsui ainetta bakteriofagiksi (Kr. Phago, syöä). Tämä termi ja sen lyhennetty versio fagi tai faagi säilyvät yleisessä käytössä bakteerien viruksista vielä nykyäänkin. (15.)

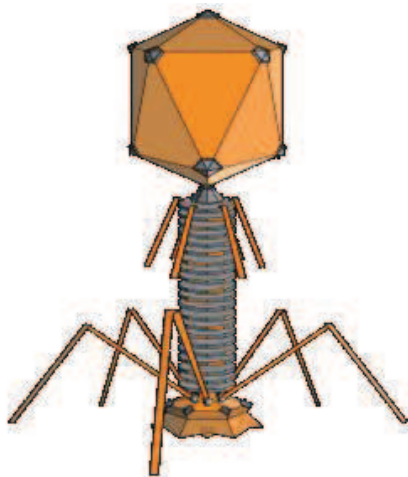
d'Herelle ajatteli, että bakteriofageista voisi olla hyötyä hoidettaessa bakteerinfektioita. Vaikkakin alustavat kliiniset tutkimukset näyttivät tukevan tätä olettamusta, eivät kattavammat tutkimukset tuottaneet toistettavia hoitomuotoja. Bakteriofagien epäonnistuminen bakteerien aiheuttamien sairauksien parantamisessa johtui pikäلتi bakteriofagiresistenttien bakteerien esiintymisestä

ja osittain siitä, että potilaan ruoansulatus- ja immuunijärjestelmä tuhosivat fagit. (15.)

Antibioottien löytämisen jälkeen kiinnostus hoitaa bakteerien aiheuttamia sairauksia bakteriofageilla väheni ja vain muutamia tutkimuksia tehtiin tämän asian parissa moniin vuosiin. Nykyään kiinnostus on herännyt uudestaan bakteri-infektioiden potentiaalisella hoitamisella bakteriofageilla, kun monet patogeeniset kannat ovat tulleet antibioottiresistensseiksi (15.)

2.1.1 Bakteriofagien rakenne

Bakteriofagit jakautuvat kolmeen luokkaan rakenteen mukaisesti: ikosaedrinen hännätön, ikosaedrinen hännällinen (kuva 1) ja filamenttinen. Molemmissa ikosaedrisissa, niin hännällisessä kuin hännättömässä perintöaines sijaitsee ontossa kapselin muodostamassa osassa, niin sanotussa päässä. Perintöaines on hyvin tiiviisti pakattuna. Filamenttisessa fagissa perintöaines on sulautunut kapseliin ja on pitkässä kierteisessä muodossa. Häntä koostuu useista eri komponenteista ja päättyy häntäkuituihin. Ikosaedrisilla fageilla DNA-molekyylin pituus on huomattavasti suurempi kuin pään tilavuus, joten DNA-molekyylit pakkaantuu hyvin tiiviiksi.



KUVA 1. Ikosaedrinen hännällinen fagi. (3.)

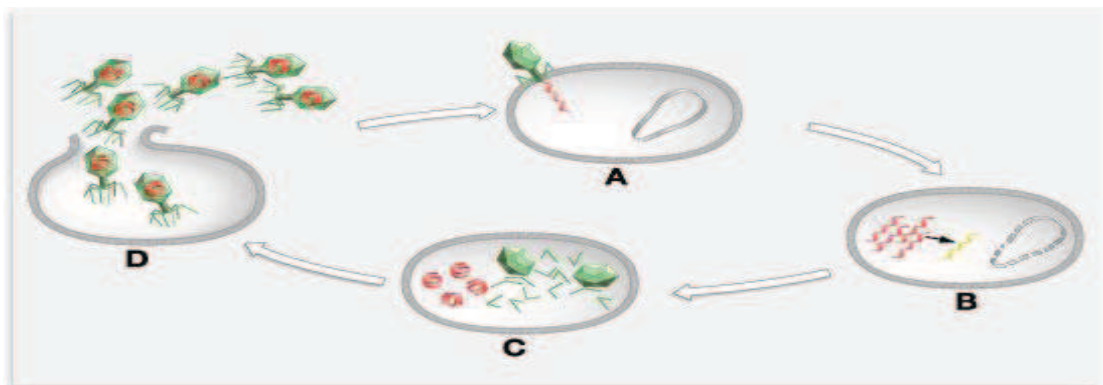
Hännällisten fagien perusrakenne vaihtelee suuresti. Pään pituus ja leveys voivat olla samoja, tai pituus voi olla suurempi kuin leveys. Kuitenkaan lyhyitä ja

leveitä päitä ei ole havaittu. Häntä voi olla hyvinkin lyhyt tai jopa nelinkertainen pään pituuteen nähden. Häntäosa voi olla myös joustava tai jäykkä. Usein hännän alaosassa on myös monimutkainen aluslevy, josta usein lähtee yhdestä kuuteen häntäkuitua. (15.)

2.1.2 Fagien elämän sykli

Bakteriofagit, kuten kaikki muutkin virukset, eivät ole eläviä organismeja siinä mielessä, että ne tarvitsevat isäntäsolun metaboliajärjestelmää ja ribosomeja lisääntymiseen. Termi fagin elämän sykli on yleisesti käytössä kuvaamaan useita vaiheita virusperäisessä infektiossa aina viruksen kosketuksesta isäntäsolun kanssa uusien viruspartikkeleiden vapautumiseen asti. On havaittu kolme erilaista sykliä: lyyttinen, lysogeeninen ja krooninen sykli. (15.)

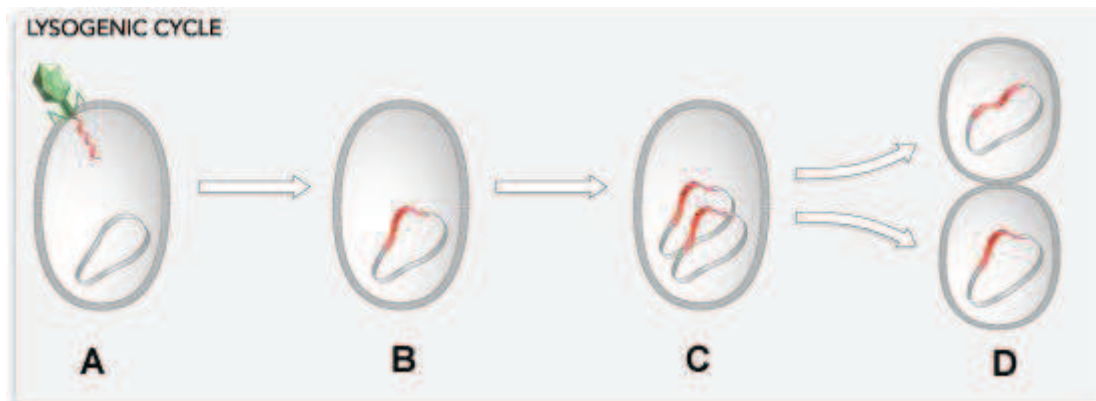
Lyyttisessä syklissä (kuva 2) bakteriofagin perintöaines tunkeutuu isäntäsoluun ja muuttaa bakteerin fagitehtaaksi. Tunnin sisällä, aika vaihtelee eri fagien suhteen, infektoituneen bakteerin soluseinä hajoaa ja sadat uudet virukset vapautuvat. Tätä solun hajoittavaa mekanismia kutsutaan lyyksiksi ja fagien suspensiota kutsutaan fagilysaatiksi. Fagit, jotka kykenevät vain lyyttiseen sykliin, tappavat aina isäntäsolun. (15.)



KUVA 2. Lyyttinen sykli. (13.)

Bakteerit, jotka käyvät läpi lysogeenisen syklin (kuva 3), sisältävät kaksijuosteisen DNA:n. Tämä mahdollistaa kaksi erilaista vaihtoehtoa bakteriofagin tunkeutuessa isäntäsoluun. Se muuttaa bakteerin fagien tuotantolaitokseksi, joka tuottaa suuren määrän uusia fageja. Muodostuneet

uudet fagit vapautuvat solun lyysaantumisen jälkeen. Toisessa vaihtoehdossa fagin DNA integroituu osaksi isäntäsolun kromosomia ja monistuu osana bakteerin kromosomia. Joissain tapauksissa se muodostaa autonomisesti monistuvan rengasrakenteisen DNA:n. Integroitunutta DNA:ta, joka ei infektoi, kutsutaan profagiksi. Normaaleissa kasvuolosuhteissa profagi pysyy integroituneena bakteerin kromosomiin. Kun profagin perintöaines irtoaa bakteerin kromosomista, se saa bakteerin tuottamaan uusia fageja, jotka vapautuvat solulyysin kautta. Bakteerisolua, joka kantaa profagia kutsutaan lysogeeniseksi soluksi profagin mahdollisesti aiheuttaman solulyysin vuoksi. Fagi, jota esiintyy myös profagina, kutsutaan maltilliseksi fagiksi (temperate phage).(15.)



KUVA 3. Lysogeeninen sykli. (12.)

Bakteriofagit, jotka käyvät läpi kroonisen infektoivan syklin, vapauttavat jatkuvalla syötöllä uusia fageja tuhoamatta solun ulkorakennetta tai tappamatta isäntäsolua. Tämänkaltaisia fageja kutsutaan kroonisiksi fageiksi. (15.)

2.1.3 Bakterispesifiset fagit

Yli tuhat erilaista bakterifagia on eristetty. Yksittäisen fagin kyky infektoida bakteeri rajoittuu aina vain tiettyyn bakteerilajiin tai muutamaan tietyn lajin kantaan. *E. coli*n fagien joukossa, jotka ovat eniten tutkittuja, on havaittu epätavallista spesifisyyttä. Esimerkiksi fagi Φ X174 kasvaa hyvin *E. coli* kanta C:ssä, mutta ei kasva useimmissa laboratorioskannoissa. On myös poikkeuksia kuten *E.coli* fagi T4. Se kykenee kasvamaan useissa eri *E.coli* -kannoissa ja tietyissä *Shigella* -suvuissa. (15.)

Useat tekijät vaikuttavat fagien spesifisyyteen. Yksi näistä on kyky adsorboitua, mikä ei ole odottamatonta, koska bakteerisolun vaipassa on oltava useita spesifisiä reseptoreita, jotta fagien adsorbtio voi tapahtua. Toki kyky adsorboida fageja on bakteereille haittapuoli, koska nämä joko tappavat isäntäsolun tai estävät niiden kasvua. Evoluution myötä solun pintarakenteen komponenttien täytyy kehittyä tunnistamattomiksi useimmille fageille, mutta myös fagit ovat kehittyneet, jotta ne tunnistaisivat tiettyjä bakteereita. Mikäli fagit eivät olisi kyenneet siihen, niitä ei esiintyisi nykyään. Toinen spesifinen tekijä on bakteerin transkriptiokoneiston kykenemättömyys tunnistaa vieraat fagegenit. (15.)

2.1.4 *E.coli* fagi P1

P1-bakteriofagilla (kuva 5) on häntä, joka muodostuu häntäputkesta. Häntäputki koostuu joustavasta tupesta ja on kiinnittyneenä toisesta päästä ikosaedriin päähän. Toisessa päässä on aluslevy, johon on kiinnittyneenä kuusi sykkyräistä häntäkuitua. Pään sisällä on lineaarinen kaksoisjuosteinen DNA-molekyylä, jonka koko on 93 601 emäsparia (bp). DNA-molekyylin päässä on kymmenestä viiteentoista kiloemästä (kb) ylimääräistä, ja se on ympyrämuotoisesti muuntuneessa järjestyksessä. Virus adsorboituu bakteerin pintarakenteessa oleviin lipopolysakkarideihin. (15.)



KUVA 5. Bakteriofagi P1. (4.)

P1:llä on suhteellisen laaja isäntävalikoima. Se infektoi *E.colia* kuin myös muutamia muita gramnegatiivisia bakteerilajeja. P1-fagilla olevan joustavan tupen vuoksi P1-fagin DNA:n on oletettu injektoituvan bakteerisolun. Isäntäsolun rekombinaatiojärjestelmä muuntaa bakteriofagin lineaarisen kaksijuosteisen DNA:n kovalenttiseen rengasrakenteeseen sen terminaaleista päistä. Bakteerin topoisomeraasi muuntaa tämän ympyrämuotoisen DNA:n superkierteiseksi, joka voi mennä lyyttiseen tai lysogeeniseen sykliin. Transkriptiokoneiston kautta toimiva geneettinen kytkin päättää lyyttisen ja lysogeenisen syklin välillä.

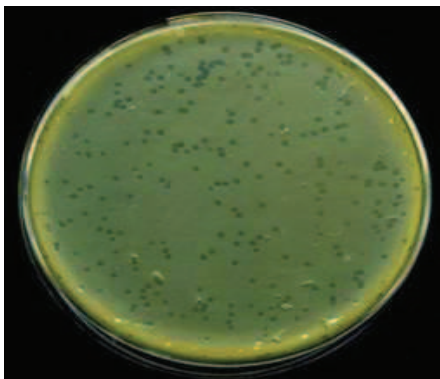
Lyyttisessä syklissä DNA-synteesi alkaa θ -replikaatiolla ja vaihtuu aaltoilevaan kehäreplikaatioon. Noin 45 minuutin kuluttua infektiosta bakteerisolun on täynnä yhtäjaksoista, toistuvaa DNA:ta, tyhjiä päitä ja fagin häntiä ja häntäkuituja. DNA:n pakkaaminen alkaa kun P1-fagin terminaasi-entsyymi katkaisee yhtäjakkoisen DNA:n spesifisesti 162 bp:n, niin kutsutun *pac*-sekvenssin kohdalta. Katkaistu DNA pakataan yksisuuntaisesti katkaistusta *pac*- päästä tyhjään ikosaedriseen päähän, kunnes se on täynnä. Kun pakkaaminen on valmis, DNA katkaistaan terminaalista kohdasta. Jäljelle jäänyt DNA:n loppu käytetään seuraavan P1-fagin pään pakkaamiseen. Jokainen pää sisältää 110 –115 kbp:tä tai noin kymmenestä viiteentoista prosenttia enemmän DNA:ta kuin viruksen genomissa. Koska virus pakkaa tästä yhtäjatkoisesta DNA:sta vain pään verran, on katkaistu DNA jokaisessa viruspartikkelissa terminaalista päästä tarpeeton. (15.)

Infektion jälkeen muodostunut ympyrämainen P1-DNA voi myös mennä lysogeeniseen sykliin, jolloin se käyttäytyy kuten plasmidi ja säilyy solun jakautumisessa muodostuneissa uusissa soluissa. Fagi-DNA kopioituu kerran yhden bakteerin elämänsyklin aikana, joten kun bakteeri jakautuu, jokainen tytär solu saa P1-DNA-molekyylin. (15.)

2.1.5 Fagitiitterin määrittäminen

Bakteriofagit lisääntyvät huomattavasti nopeammin kuin bakteerit. Tyypillinen *E. coli* kaksinkertaistaa määränsä noin puolessa tunnissa, kun taas yksittäinen fagipartikkeli, esim. T4-fagi tuottaa samassa ajassa yli 100 uutta fagipartikkelia. Virulentit fagipartikkelit ovat helposti laskettavissa tekniikalla, jota kutsutaan ”plague”menetelmäksi. Kun 10^8 bakteeria viljellään agar – maljalle (kuva 4), bakteerit muodostavat yhtenäisen samean mattomaisen kasvuston. Jotta saavutettaisiin mahdollisimman tasainen sameus koko kasvustoon, bakteerit suspensoidaan pieneen tilavuuteen lämmintä, nestemäistä agaria, joka kaadetaan kiinteään agarin pinnalle. Nestemäinen agar, jossa on vain 0,7 % agaria verrattuna kiinteään agarin 1,5 %, muodostaa pehmeän kerroksen jäähtyessään. Niin kutsuttu Top agar muodostaa hyvän alustan bakteerikasvustolle, jolloin ne kasvavat yhtenäisesti. Kun nestemäisen agarin joukkoon lisätään fagipartikkeleita ennen valamista kiinteään agarin pinnalle, ne adsorboituvat bakteereihin agarista. (15.)

Jokainen infektoitunut bakteerisolua lyysaantuu ja vapauttaa noin 100 uutta fagia, jotka tarttuvat heti lähellä oleviin bakteereihin. Nämä taas puolestaan vapauttavat uusia fageja, jotka tarttuvat niiden lähellä oleviin bakteereihin ja niin edelleen. Tämän syklin jatkuessa muutaman tunnin ajan fagit tuhoavat kaikki bakteerit lähialueeltaan agarista. Tämä näkyy selkeänä läpikuultavana läiskänä agarissa. Tätä kohtaa kutsutaan plagueksi.



KUVA 4. Fagitiitterimalja. (8.)

Koska yksittäinen fagi muodostaa yhden plagen, näin ollen yksittäisten infektiivien fagipartikkelien määrä alkuperäisessä fagisuspensiossa pystytään laskemaan. (15.)

2.2 Yleinen transduktio

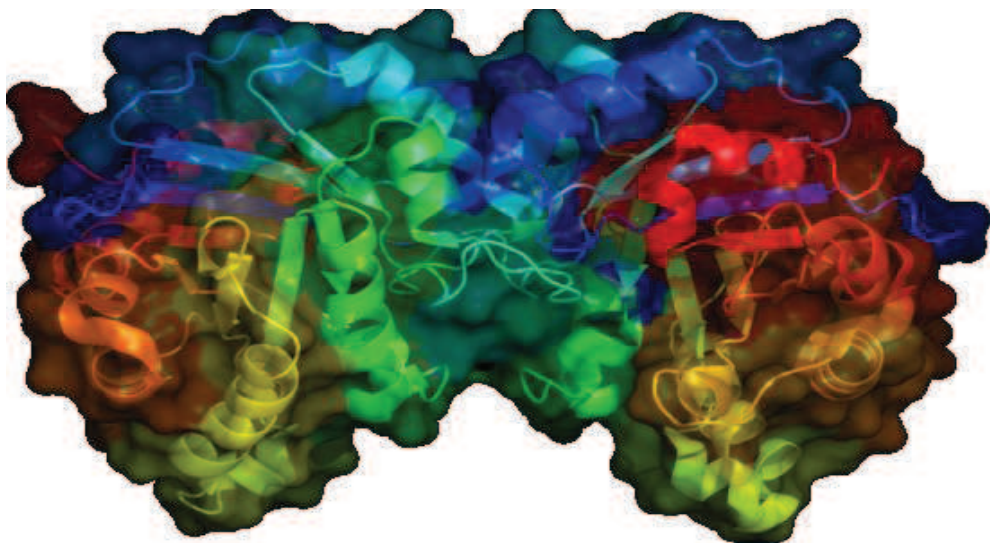
Fagi P1 on ollut hyvin tärkeä työkalu molekyylibiologiassa, koska sen avulla voidaan siirtää geenejä yhdestä bakteerisolusta toiseen. Tätä prosessia, jossa fagipartikkeli siirtää satunnaisia DNA-pätkiä bakteerista toiseen, kutsutaan yleiseksi transduktioksi. Sen havaitsivat Joshua Lederber ja Norton D. Zinder vuonna 1952. Fagipartikkeleita, jotka kantavat bakteerigeenejä, kutsutaan yleisiksi transduktioiviksi partikkeleiksi. (15.)

Fagi P1:llä on kaksi ominaispiirrettä, jotka tekevät siitä hyvän kohteen yleisen transduktion partikkeliksi. Ensimmäiseksi, se koodaa nukleaasia, joka hitaasti hajoittaa bakteerin DNA:ta, jotta kun DNA:n pakkaaminen alkaa, isäntäsolun DNA on suurina palasina. Toiseksi, P1 fagin pakkausmenetelmä ei ole kovin vaativa, joten pakatun DNA-molekyylin koon ei tarvitse olla saman kokoinen kaikissa partikkeleissa. Tuloksena on, että bakteerisolun lyysaantuessa vapautuvien fagien joukossa on muutamia partikkeleita, jotka pitävät sisällään palasia bakteerin DNA:sta. Koska isäntäsolun DNA:n pilkkoutuminen on satunnainen prosessi, nämä harvat partikkelit sisältävät satunnaisia palasia koko isäntäsolun DNA:sta. Näin ollen tarpeeksi suuri populaatio P1 fagin jälkikasvua sisältää jokaisen isännän geenin. Keskimäärin yhtä tiettyä geeniä kohden suurin piirtein yksi viruspartikkeli 10^6 partikkelin joukosta sisältää bakteeri-DNA fragmentin. Nämä harvinaiset partikkelit eivät tuota uusia fageja, kun ne infektoivat uuden bakteerin. Tämä johtuu siitä, että nämä eivät sisällä P1:n DNA:ta. Sen sijaan partikkelin sisällä oleva bakteeri-DNA injektoidaan isäntäsoluun ja liittyy osaksi sen kromosomia. (15.)

3 TRIOSEFOSFAATTI ISOMERAASI

TIM eli triosefosfaatti isomeraasi on alun perin eristetty *Trypanosoma brucei brucei*stä. TIM on dimeerinen glykolyttinen entsyymi (kuva 6), joka katalysoi dihydroksiasetonifosfaatin (DHAP) ja D-glyseraldehydi-3-fosfaatin (D-GAP) muuntamista toisikseen. A-TIM - entsyymi on monomeerinen muoto Triosefosfaatti isomeraasi -entsyymistä. (2.)

Monomeerisellä A-TIM -entsyymillä on laajennettu substraatin sitomiskohta, joten se voi sitoutua pidempiin substraatteihin kuin villityypin TIM. Tavoitteena on muokata entsyymiä siten, että itse reaktiomekansimi pysyy samana, mutta kohdesubstraattien valikoima laajenee. Tutkimuksen tavoitteena oli muokata A-TIM -entsyymiä siten, että se saa myös D – ksyloosi isomeraasi ja L – arabinoosi isomeraasi aktiivisuudet. Nämä aktiivisuudet ovat hyvin kiinnostavia siinä mielessä, että niiden pitäisi nostaa mahdollisuutta käyttää biomassaa, etenkin pentoosisokereita paremmin hyödyksi bioprosesseissa. Pentoosisokerit ovat tärkeä komponentti biomassassa, kuten puussa, ja niiden biotekninen hyödyntäminen on osoittautunut haastavaksi. Pentoosisokereiden hyödyntämiseksi bioprosesseissa on siis löydettävä uusi biokatalyytti, joka pystyy muuntamaan ne helpommin hyödynnettäviksi välimuodoiksi. (10.)



KUVA 6. Triosefosfaatti isomeraasi. (16.)

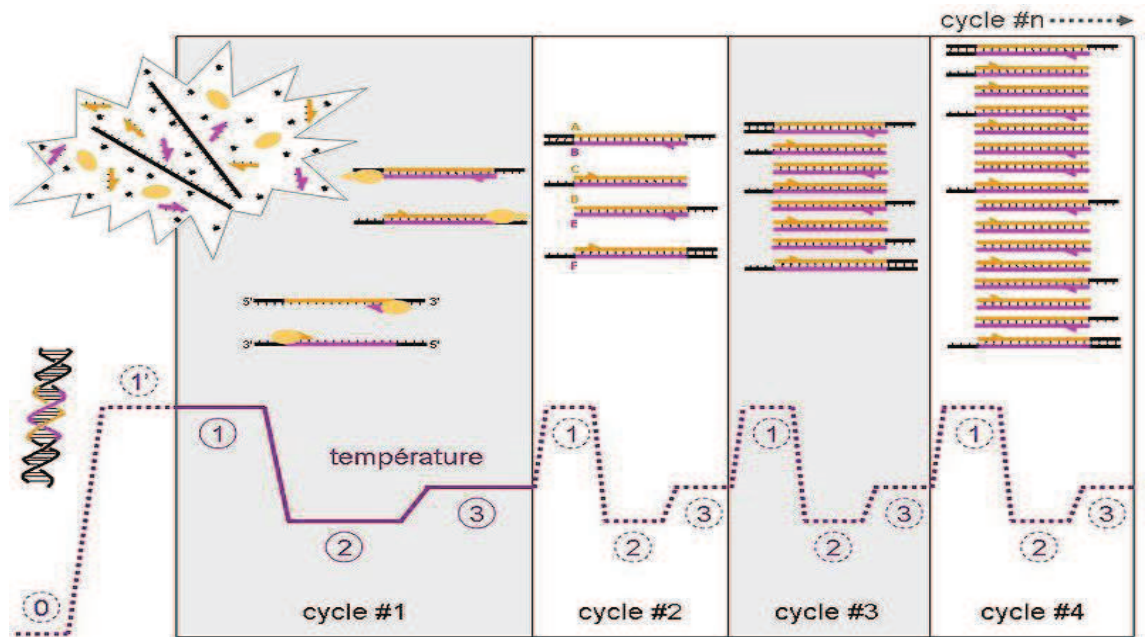
4 KÄYTETYT GEENITEKNIIKAN MENETELMÄT

Poistogeenisen bakteerin luomisessa käytettiin perinteisiä geenitekniikan menetelmiä. Menetelmiä käytettiin halutun geenijakson monistamisessa, eristämisessä sekä puhdistamisessa.

4.1 Polymeraasiketjureaktio eli PCR

Polymeraasiketjureaktio eli PCR on nopea tapa monistaa tiettyjä alueita DNA:sta. Lähtömateriaalina voidaan käyttää mikrobi-, kudosa-, veri- sekä solunäytteitä. PCR-reaktioon (Kuva 7.) tarvitaan templaatti-DNA, alukkeet, neljän nukleotidin seos ja polymeraasientsyymi.

Templaatti-DNA:n sekvenssi on tunnettava ainakin tutkittavan geenin alueen reunoilta, jotta alukkeet voivat sitoutua siihen. Alukkeet, joita kutsutaan myös primeereiksi tai oligonukleotideiksi, ovat synteettisesti valmistettuja yksijuosteisia DNA-jaksoja. Ne ovat noin 15 - 30 emästä pitkiä ja komplementaarisia templaatti-DNA:lle. PCR-reaktiossa on mukana sekä Forward eli koodaavaa juostetta monistava aluke sekä Reverse eli ei-koodaavaa juostetta monistava aluke. Reverse luetaan koodaavan juosteen vastakkaiseen suuntaan ja on koodaavalle komplementaarinen sekvenssi. Nukleotidiseos, dNTP sisältää kaikki neljä nukleotidiä, joita DNA:ssa esiintyy. Polymeraasientsyymi liittää nämä nukleotidit DNA ketjuun. Yleisimmin käytettyjä polymeraasientsyymejä ovat Taq- ja Pfu-polymeraasit. Taq-polymeraasi on eristetty alun perin *Thermus aquaticus* -bakteerista, joka on termofiilinen bakteeri. Se kestää hyvin korkeitakin lämpötiloja. Pfu-polymeraasi on eristetty *Pyrococcus furiosus* -arkkieliöstä, joka elää myös korkeissa lämpötiloissa. Pfu-polymeraasin etu muihin polymeraaseihin verrattuna on sen hyvä oikeinluku uutta DNA-molekyyliä tuottaessa. (11.)



KUVA 7. PCR-reaktio. (14.)

Itse PCR-reaktio tapahtuu kolmessa vaiheessa. Denaturaatio-, annealing- ja ekstensiovaihe. Denaturaatiossa reaktioseoksen lämpötila nostetaan 95 °C:seen, jolloin DNA:n juosteet eroavat toisistaan. Annealing-vaiheessa lämpötila lasketaan alukkeille sopivaksi, jolloin ne kiinnittyvät templaatti DNA:han emäspariutumisen johdosta. Annealing-lämpötila on yleensä 48 °C:n ja 64 °C:een välillä. Annealing-lämpötila voidaan laskea alukkeen emästen perusteella. Tämä saadaan sulamislämpötilasta T_m , joka tarkoittaa lämpötilaa, jossa puolet alukkeesta on kiinnittynyt templaatti-DNA:han. Emäkset A ja T vastaavat 2 °C:ta ja C ja G vastaavat 4 °C:ta. Tämän tiedon avulla siis voidaan laskea ensin T_m , ja yleinen sääntö on, että $T_m > T_a$ (annealing-lämpötila). Annealing-lämpötila on 5 °C pienempi kuin sulamislämpötila. Ekstensio- eli synteesivaiheessa lämpötila nostetaan polymeerasientsyymille sopivaan lämpötilaan. Ekstensiovaiheessa polymeerasi liittyy uuden nukleotidin syntyvän ketjun vapaaseen 3' pään OH -ryhmään. Synteesi tapahtuu siis 5' -> 3' suunnassa. Tämä kolmen vaiheen lämpötilasarja on sykli, joita toistetaan yleensä 15–40 kertaa, jolloin pienestä määrästä templaatti DNA:ta saadaan monistettua suuri määrä haluttua DNA-jaksoa. (9, 11.)

4.2 Agaroosigeelielektroforeesi

Elektroforeesiin perustuvia nukleiinihappojen analysointimenetelmiä on useita, ja ne vaihtelevat analysoitavan nukleiinihappojakson koon mukaan. Pieniä, alle sadan nukelotidin tai nukleotidiparin jaksoja voidaan analysoida polyakryyliamidigeelielektroforeesilla (PAGE). Keskikokoisia fragmentteja, jotka ovat noin 0,1-50 kiloemästä, analysoidaan agaroosigeelielektroforeesilla (AGE) ja tätä suurempia DNA- ja RNA- molekyyliä ja jopa kokonaisia kromosomeja tutkitaan pulssikenttäelektroforeesin (PFGE) erilaisilla variaatioilla. Perinteiseen kaksinapaiseen sähkökenttään perustuvasta elektroforeesista poiketen nämä tekniikat perustuvat useammansuuntaisten sähkökenttien käyttöön. Tämä tapahtuu sähkökenttiä vuorottelemalla. Vuorottelupulssi voi tapahtua tasavälein tai siten, että pulssin pituutta kasvatetaan vähitellen.

Agaroosigeelielektroforeesi perustuu merilevästä eristettyyn polysakkaridiin, agaroosiin. Agaroosi liukenee veteen kiehautettaessa ja jäähtyessään alle 45 °C:een se muodostaa hyytelömäisen geelin. Nukleiinihappojen kulkeutuminen geelissä perustuu negatiivisesti varautuneisiin happamiin fosfaattiryhmiin. Kun DNA tai RNA joutuu sähkökenttään, se kulkeutuu positiivista napaa kohti. Nukleiinihapot kulkeutuvat AGE:ssa, jonka verkkomainen rakenne hidastaa niiden kulkua sitä enemmän, mitä suurempia fragmentit ovat. Tämä saa erikokoiset DNA/RNA-jaksot erottumaan ajon aikana omiksi vyöhykkeikseen, jotka kulkeutuvat niiden pituudelle ominaisella nopeudella. Lopputuloksena on kullekin jaksolle oma vyöhyke eli ”bändi”. (9, 11.)

DNA ja RNA eivät sellaisenaan näy agaroosigeelissä. Tämän vuoksi geeliin lisätään ennen jähmettymistä etidiumbromidia (EtBr). Etidiumioni tunkeutuu nukleiinihappojen emästen väliin, ja kun DNA-etidiumkompleksia säteilytetään ultraviolettivalolla, emäkset absorboivat UV-säteilyä ja luovuttavat saamansa energian etidiumille. Tämä saa etidiumin fluoresoimaan oranssinpunaisena. Etidiumbromidi on ollut ja on edelleenkin käytetyin nukleiinihappojen väri AGE:ssa. Sen etuina ovat laajat käyttökokemukset ja helppokäyttöisyys, mutta sen haittoja ovat mm. mutageenisuus ja geelin kuvantamisessa tarvittava UV-valo. UV-valo tuhoaa nukleiinihappoja ja on haitallista ihmisille. EtBr:ää käytettäessä tulee suojautua hyvin ja syntyvät jätteet on käsiteltävä

ongelmajätteinä. Etidiumbromidin merkittävimmät haastajat nukeliinihappoväreinä ovat SYBR ja sen johdannaiset. Uusien värien avulla on mm. mahdollista virittää geelien fluoresoivat värjäysmolekyylit ilman UV-valoa ja lopputulos voi olla herkempi kuin EtBr –menetelmällä. Yksi näistä uudentyypisistä värjäysaineista on Gelstar –väri, jota voidaan tarkastella sinivalolla.

Agaroosigeelielektroforeesissa käytettävä laite (kuva 8.) on rakenteeltaan yksinkertainen, ja se koostuu ajoaltaasta, altaan pohjalla, päissä olevista elektrodeista ja kannesta. AGE tehdään vaakatasossa pinnanalaisessa geelissä. Geeli on ajon aikana kokonaan upotettuna ajopuskuriin. Itse geeli valmistetaan liuottamalla samaan puskuriin kuin ajopuskuri. Nestemäinen agaroosigeeli kaadetaan geelitarjottimelle ja siihen asetetaan näytekampa näytekolojen muodostamista varten. Tämän jälkeen geelin annetaan jähmettyä. Kun geeli on jähmettynyt, kampa poistetaan ja geeli asetetaan ajoaltaaseen ja peitetään ajopuskurilla.



KUVA 8. Agaroosigeelielektroforeesi – ajolaite. (1.)

Näytteet ladataan näytekamman muodostamiin koloihin eli kaivoihin. Tämän vuoksi näytteen tulee olla ajopuskuria raskaampaa. Jotta näyte asettuisi tasaisesti kaivon pohjalle, siihen lisätään näytepuskuri tiheyden lisäämiseksi. Tämä on esimerkiksi Ficoll – 400:aa tai glyserolia. Näytepuskuri sisältää yleensä joko bromifenolisiniä (BPB) tai ksyleenisyanolia väriaineena. Muitakin

merkkiväriaineita voidaan käyttää, erityisesti jos jokin tärkeä DNA- tai RNA-vyöhyke osuu juuri näiden väriaineiden kohdalle geelissä. Näytepuskurin sisältämä väriaine auttaa seuraamaan ajon edistymistä ja esimerkiksi BPB kulkeutuu ajossa samalla tavoin kuin noin 300 emäsparin pituinen, kaksijuosteinen DNA. Näytepuskuri valmistetaan siten, että sitä lisätään näytteen kokonaistilavuudesta vain noin 1/5 – 1/10 -osa, jottei geelille ladattavan näytteen tilavuus kasva liian suureksi.

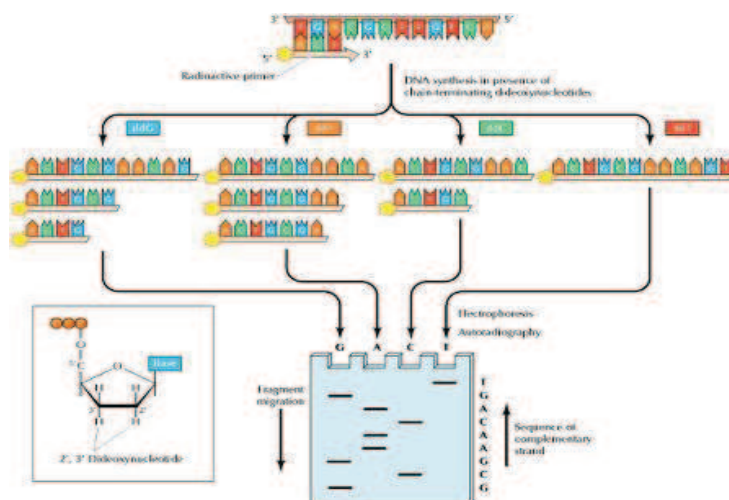
Ajo käynnistetään asettamalla turvakansi ajolaitteen päälle, kytkemällä johtimet virtalähteeseen ja kytkemällä virtalähde päälle. Napaisuus on syytä ottaa huomioon asetettaessa geeliä ajolaitteeseen. Negatiivisesti varautunut DNA kulkee kohti positiivista napaa. Yleensä AGE:ssa käytetään 20 – 200 voltin (V) jännitettä riippuen ajolaitteen ja geelin koosta. DNA:n detektointi tapahtuu väriaineen avulla, joka laitetaan joko näytepuskuriin, geeliin/ajopuskuriin, tai värjäämällä geeli ajon jälkeen. Värjäystavasta riippuen vyöhykkeet liikkuvat hieman eri tavoin, mikä tulee ottaa huomioon, mikäli tarkastellaan keskenään eri tavoin värjättyjä geelejä. Geelin tarkasteluun, analysointiin ja dokumentointiin käytetään tätä tarkoitusta varten suunniteltua CCD – kameralla varustettua kuvantamislaitetta ohjelmistoinen. Vyöhykkeiden koko määritetään näytteiden rinnalle geeliin ladatun kokostandardin avulla. Usein käytetään DNA:ta, joka on pilkottu jollain entsyymillä tunnetun kokoisiksi fragmenteiksi. On myös saatavilla kaupallisia kokostandardiseoksia. Kokostandardilla, jonka fragmenttien koot ovat tiedossa, saadaan arvio tutkittavan DNA:n koosta. (9, 11.)

4.3 Sekvensointi

DNA:n sekvensoinnilla tarkoitetaan DNA:n emäsjärjestyksen määrittämistä. DNA:n sekvensointiin on käytännössä olemassa kaksi menetelmää, Maxam – Gilbert (kemiallinen) ja Sangerin menetelmä (entsyymaattinen). Sangerin menetelmä perustuu dideoksinukleotideihin ja spesifiseen alukkeeseen, jonka avulla DNA-polymeraasi syntetisoi sekvensoitavasta DNA:sta erimittaisia DNA-pätkiä sekä polyakryyliamidigeeliin, jonka avulla voidaan erottaa yksijuosteiset DNA-pätkät toisistaan yhden emäksen pituuserolla. Sekvensoinnissa (kuva 9.)

käytetään nykyään fluoresoivilla merkkiaineilla leimattuja alukkeita tai dideoksinukleotideja. Jokaista nukleotidiä merkkää oma värinsä, joiden mukaan sekvenssi on helpompi lukea.

Paljon käytetty syklistekvensointi perustuu pitkälti Sangerin menetelmään. Syklistekvensointireaktiot tehdään PCR -laitteen avulla. Poikkeuksena perinteiseen PCR-reaktioon on se, että syklistekvensointireaktiossa on mukana vain yksi aluke ja nukleotidien lisäksi dideoksinukleotiditriposfaatit. Sekvensointireaktioissa syntyneet eripituiset leimatut DNA-pätkät analysoidaan denaturoivassa polyakryyliamidigeelissä, jossa DNA pysyy ajon aikana yksijuosteisessa muodossa. Denaturoivat olot saadaan aikaan suurella ureapitoisuudella ja ajamalla geeli noin 50 °C:n lämpötilassa. Fluoresoivilla merkkiaineilla leimatut DNA-palaset kulkevat pystygeelissä sähkökentässä alaspäin kuten tavallisessakin elektroforeesissa. Geelijaon aikana DNA-palaset erottuvat kokonsa perusteella: pienimmät kulkeutuvat nopeammin eli pisimmälle ja suuremmat jäävät hitaampana ylemmäs. Geelijaon aikana detektori havaitsee ohi kulkeutuvat vyöhykkeet. Detektiossa ohi kulkeva DNA säteilytetään tietyllä aallonpituuden omaavalla säteilyllä ja eri reaktioista peräisin olevat vyöhykkeet fluoresoivat tämän säteilyn vaikutuksesta eri aallonpituuksilla. Detektori havaitsee nämä fluoresenssit ja merkitsee ne eri väreillä. (9, 11.)



KUVA 9. Sekvensointi. (7.)

5 POISTOGEENISEN *E. COLI* –KANNAN LUOMINEN

Työn tarkoituksena oli luoda poistogeeninen *E.coli* -kanta käyttäen yleistä transduktiomenetelmää sekä kehittää toistettava työmenetelmä P1-bakteriofagilla tehtävään yleiseen transduktioon. Työssä käytettiin erilaisia geenitekniikan työmenetelmiä. Päämääränä oli saada aikaan *E. coli* -kanta, jolta oli poistettu XylA- geeni, joka koodaa D – xyloosi isomeraasia. Työn lähtömateriaalina oli *Escherichia coli* K12 W3110 -kanta, josta oli poistettu LacY- ja EndA- geenit. LacY- geeni ohjaa β -galaktosidaasi permeaasin muodostumista. β -galaktosidaasi permeaasi on solukalvoon sitoutunut proteiini, joka pumppaa laktoosia soluun. LacY- geeni haluttiin poistaa sitä varten, että A-TIM –entsyymiä tutkittaessa kyettäisiin indusoimaan sen tuotantoa soluissa herkemmin. Tämä tapahtuu säätelemällä soluille annettavan IPTG:n määrää.

Vastaanottavana kantana työssä käytettiin *E. coli* -kantaa W3110, jolta oli jo poistettu geenit LacY sekä EndA, joka koodaa endonukleaasi-entsyymiä, joka pilkkoo DNA:ta *E. coli* -solun sisällä. Luovuttavana kantana toimi *E. coli* -kanta JW3537–1, jossa XylA- geenin tilalla oli antibioottiresistenssi-geeni. Periaatteena siis oli, että transduktiopartikkelina käytettävä bakteriofagi P1 siirtäisi luovuttavasta kannasta antibioottiresistenssin vastaanottavaan kantaan XylA- geenin tilalle.

Työn perimmäinen tarkoitus oli kehittää toistettava yleiseen transduktioon perustuva menetelmä poistogeenisten bakteerien luomiseksi.

5.1 Työn suoritus

Työssä käytettiin perinteisiä geenitekniikan ja mikrobiologian menetelmiä bakteerien kasvatuksessa, selektiossa sekä myös tuotteen monistamisessa, eristämisessä, puhdistamisessa ja jatkotoimenpiteissä.

Työn tuloksena on laadittu P1-bakteriofagimenetelmäohje (liite 1.). Menetelmäohjeessa on työvaiheet esitetty tarkemmin.

5.2 Fagilysaatin valmistus

Työ aloitettiin esikasvattamalla vastaanottavaa kantaa eli *E. coli* K12 W3110 Δ lacY Δ endA. Vastaanottavalta kannalta oli valmiiksi poistettu geenit lacY ja endA. Esikasvatus aloitettiin siirrostamalla yksittäinen pesäke 5 ml LB -mediumia, johon lisättiin 25 μ l 1 Molaarista CaCl₂:a ja 50 μ l 20-prosenttista glukoosia. Esikasvatus toteutettiin kasvatuskaapissa, johon asetettiin lämpötilaksi 37 °C ja ravistukseksi 150 RPM. Kasvatusta jatkettiin, kunnes bakteerikasvuston sameus saavutti halutun arvon. Sameus mitattiin UV / Vis -spektrofotometrillä aallonpituudella 600 nm. Kun kasvuston OD₆₀₀ - arvo saavutti noin 0,1 esikasvatus lopetettiin.

Esikasvatuksen aikana valmisteltiin fagilysaatti. Fagilysaattisäilökannasta pipetoitiin 100 μ l *E.coli* K12W3110 -kannassa kasvatettua fagilysaattia eppendorf -putkeen, joka sekoitettiin nopeasti Vortex- sekoittimella. Nopean sekoituksen jälkeen eppendorf -putki asetettiin lämpökaappiin 37 °C:een tunniksi säilökannassa olevan kloroformin haihduttamiseksi.

Kun vastaanottava kanta oli saavuttanut halutun sameuden, siitä pipetoitiin 2,5 ml falcon -putkeen. Falcon -putkeen lisättiin kloroformivapaa fagilysaatti ja falcon -putki asetettiin ravistimeen, joka oli säädetty nopeudelle 250 RPM lämpökaapin ollessa 37 °C:a. Uuden fagilysaatin annettiin kasvaa yön yli, jotta uusien fagien muodostuminen olisi mahdollisimman runsasta. Yön yli kasvatuksen jälkeen falcon -putkeen lisättiin kloroformia jäljellä olevien bakteerien tappamiseksi. Kloroformia lisättiin 3 tippaa millilitraan kasvustoa. Tämän jälkeen falcon -putki sekoitettiin huolellisesti ja sisältö jaettiin 1,5 ml eppendorf -putkiin. Nämä putket sentrifugoitiin nopeudella 14 000 RPM kahden minuutin ajan. Kuolleiden bakteerien soluriekaleet painuvat pohjalle ja supernatantti pipetoitiin varovasti uusiin 1,5 ml eppendorf -putkiin. Putkiin lisättiin vielä kloroformia noin 3 tippaa per millilitra. Tämä valmistettu fagilysaatti toimii kantalyasaattina työn seuraavassa vaiheessa. Fagilysaatti merkittiin nimellä P1 – W3110. Lysaatin säilyvyys on 4 kuukautta 4 °C:ssa.

Fagilysaatin tuotantovaihe toteutettiin uudestaan sillä poikkeuksella, että tällä kertaa bakteerina oli luovuttava kanta eli *E.coli* JW3537-1, joka kantaa XylA-

geenin tilalla kanamysiiniantibiottiresistenssiysgeeniä. Luovuttava kanta esikasvatettiin samalla tavoin kuin vastaanottava kantakin. Vastaanottavassa kannassa kasvatetusta fagilysaatista pipetoitiin 100 µl ja se asetettiin lämpökaappiin kloroformin haihduttamiseksi. Kun luovuttava kanta oli saavuttanut halutun sameuden, siitä pipetoitiin falcon -putkeen 2,5 ml. Fagilysaatti P1 – W3110 lisättiin luovuttavan kannan joukkoon ja kasvatus tapahtui samoissa olosuhteissa yön yli kuin vastaanottavan kannan kanssa. Valmistettu fagilysaatti, P1 – JW3537-1, toimii fagitiitterin lyaattina, sekä varsinaisena geneettisen materiaalin siirtävänä partikkelina.

5.3 Fagitiitterin määrittäminen

Fagitiitterin määrittäminen aloitettiin esikasvatamalla luovuttavaa kantaa yön yli. Kasvuolosuhteet olivat samanlaiset kuin kaikilla aikaisemmillä esikasvatuksilla, eli 5 millilitraa LB - mediumia, johon lisättiin 25 µl 1 Molarista CaCl_2 :a ja 50 µl 20-prosenttista glukoosia. Seuraavana aamuna esikasvatus laimennettiin 1:5. Tämä tapahtui pipetoimalla 1 ml kasvustoa falcon -putkeen, johon lisättiin 4 ml LB - mediumia, 20 µl CaCl_2 :a (1M) sekä 40 µl 20%:sta glukoosia.

Fagilysaatista P1 – JW3537-1 valmistettiin laimennossarja fagitiitteriä varten. Sarjan teko aloitettiin pipetoimalla fagilysaatista 10 µl eppendorf -putkeen, joissa oli 990 µl:aa MC-puskuria (0,1 M MgSO_4 + 5 mM CaCl_2). Tästä eppendorf -putkesta (10^{-2}) pipetoitiin 10 µl:aa seuraavaan putkeen (10^{-4}), jossa oli myös 990 µl:aa MC-puskuria. Tämä vaihe toistettiin vielä kerran. Kolmannesta eppendorf -putkesta (10^{-6}) pipetoitiin 50 µl neljänteen putkeen (10^{-7}), jossa oli 450 µl MC-puskuria. Tämä toistettiin vielä kerran, jolloin laimennossarja käsittää yhteensä 5 eppendorf -putkea. Viimeisen putken laimennoskerroin on 10^{-8} . Putkista 3, 4, ja 5 pipetoitiin 100 µl:aa falcon -putkiin. Putkiin lisättiin jokaiseen 250 µl:aa luovuttavan kannan bakteerisuspensiota ja 2,5 ml:aa sulaa Top agaria. Top agarin ei tule olla liian kuumaa, jotteivat bakteerit kuolisi, mutta sen tulee kuitenkin olla riittävän lämmintä ($T=+45^\circ\text{C}$) ollakseen sulaa. Falcon -putket sekoitettiin nopeasti, mutta hyvin ja seos kaadettiin tasaisesti R -maljalle. Maljojen laimennoskerroimet ovat 10^{-7} , 10^{-8} ja 10^{-9} .

Maljoja kasvatettiin vähintään 7 tuntia, ja laskenta tuli tehdä yhden vuorokauden kuluessa, etteivät maljat kasva umpeen. Tällöin fagien muodostamien reikien laskeminen ei onnistu. Fagien määrä laskettiin laskemalla maljassa olevien reikien määrä ja jakamalla se laimennoksella. Esimerkiksi: $200 \text{ "plagueta"} / 10^{-7} = 2.0 \cdot 10^9 \text{ pfu / ml}$.

5.4 Geneettisen materiaalin siirtäminen

Geneettisen materiaalin siirtäminen aloitettiin esikasvattamalla vastaanottavaa *E.coli* W3110 Δ endA Δ lacY -kanta. Kasvatusolosuhteet olivat samat kuin fagilysaatin valmistamisen yhteydessä tehdyt esikasvatukset. Poikkeuksena oli, että tällä kertaa bakteerikasvustoa piti olla enemmän, joten esikasvatusta jatkettiin kunnes OD₆₀₀ saavutti 0,8 - 1,0 lukeman. Mittauksista jäljelle jäänyt kasvusto suspensoitiin uudestaan neljäsosaan tilavuudesta. Uudelleen suspensointi toteutettiin sentrifugoimalla bakteerisolut 5 minuttin ajan nopeudella 6000 RPM. Supernatantti kaadettiin jätteisiin ja solupelletti suspensoitiin 750 μ l:aan LB - mediumia, johon lisättiin 4 μ l CaCl₂:a (1M) sekä 75 μ l MgSO₄:a (1M).

Seuraava vaihe oli laimennos- ja reaktiosarjojen valmistelu. Laimennossarja valmistettiin 1,5 ml:n eppendorf -putkiin. Neljään putkeen pipetoitiin 180 μ l LB - mediumia, jonka CaCl₂ - pitoisuus oli 5 mM ja MgSO₄ - pitoisuus oli 0,1 M. Ensimmäiseen putkeen pipetoitiin 20 μ l laimentamatonta P1 – JW3537-1 - lyaattia, josta oli ensin poistettu kloroformi. Ensimmäisestä putkesta pipetoitiin 20 μ l seuraavaan ja niin edelleen kaikkiin neljään putkeen. Näin Laimennossarjaksi tuli 1/10, 1/100, 1/1000 ja 1/10 000.

Reaktiosarja tehtiin 1,5 ml:n eppendorf -putkiin. Putket merkittiin A:sta D:hen ja ne pipetoitiin ohjeiden mukaisesti. A -putki ja neljä B -putkea, joista yksi on jokaista laimennosta kohden. A -putkeen pipetoitiin 100 μ l vastaanottavaa kantaa ja 100 μ l laimentamatonta fagilysaattia. B -putkiin pipetoitiin myös 100 μ l vastaanottavaa kantaa ja 100 μ l lyaattia laimennossarjoista. C -putki toimi kontrollina spontaanille antibioottiresistenssille, joten siihen ei lisätty

fagilysaattia ollenkaan. Sen tilalle pipetoitiin 100 µl LB - mediumia, joka sisälsi CaCl₂:a ja MgSO₄:a, sekä 100 µl vastaanottavaa kantaa. D -putki toimi kontrollina elossa olevien luovuttavan kannan solujen havaitsemiseksi. Putkeen pipetoitiin 100 µl laimentamatonta fagilysaattia sekä 100 µl LB - mediumia, kuten C -putkeen. Reaktioon annettiin toimia 30 minuuttia, jonka jälkeen se pysäytettiin 200 µl:lla 1 M Natriumsitraattia, jonka pH oli säädetty 5,5:een. Na-sitraatti katkaisee fyysisen vuorovaikutuksen bakteerisolun ja fagin välillä. Tämän jälkeen koko seos eppendorf -putkista siirrettiin falcon -putkiin ja niihin lisättiin 1 ml pelkkää LB - mediumia. Putket asetettiin lämpökaapissa olevaan ravistimeen, ja niitä inkuboitiin 1 tunti. Lämpötila oli 37 °C ja sekoituksen nopeus 200 RPM. Inkuboinnin jälkeen putket sentrifugoitiin 3 minuutin ajan nopeudella 6000 RPM ja solupelletti jälleen suspensoitiin 100 µl:aan LB - mediumia, johon oli lisätty Na-sitraattia (100 mM). Uudelleen suspensoitu bakteerisuspensio levitettiin LB – kanamysiinimaljoille, ja niitä kasvatettiin 37 °C:ssa vähintään 24 tuntia.

Yli 48 tunnin kasvatuksen jälkeen kontrollimaljalle C ilmestyi hyvin pieniä pesäkkeitä. Mikäli maljoilla A ja B:t oli pesäkkeitä näkyvissä jo seuraavana päivänä, olivat nämä hyviä ehdokkaita poistogeeniseksi *E. coli*ksi. Nämä pesäkkeet siirrettiin vielä uudelle LB - kanamysiinimaljalle, jonka pinnalle pipetoitiin ennen siirrostamista 100 µl Na-sitraattia (100 mM) mahdollisten jäljellä olevien fagien eliminoimiseksi. Tämä vaihe toistettiin varmuuden vuoksi muutamia kertoja ennen jatkokäsittelyä, jottei mahdollisten poistogeenisten bakteerien mukana tule kontaminaatioita muuhun laboratorioon.

Parhaat ehdokkaat valikoitiin vielä käyttämällä MSM ksyloosi -maljoja, joihin oli lisätty ainoaksi hiililähteeksi ksyloosia. Ohjeet käytettyihin materiaaleihin löytyy liitteestä 2. Kontrolleina käytettiin vastaanottavaa ja luovuttavaa kantaa. Näistä luovuttava ei kyennyt kasvamaan ksyloosi -maljoilla, sillä siltä puuttui XylA-geeni. Parhaat ehdokkaat jatkokäsittelyyn valittiin sillä perusteella että, ne jotka eivät kyenneet kasvamaan MSM ksyloosi –maljalla, olivat todennäköisiä poistogeenisiä pesäkkeitä.

Pesäkkeet tarkastettiin fagivapaiksi siirtämällä pesäke falcon -putkeen, jonne oli pipetoitu 2,5 ml LB – mediumia, 12,5 µl CaCl₂:a (1M) sekä 25 µl 20-prosenttista glukoosia. Bakteereita kasvatettiin minimissään 3 tuntia 37 °C:ssa ravistuksen ollessa 200 RPM. Mikäli kasvustossa ei näkynyt 3 tunnin jälkeen merkkejä solujen lyysaantumisesta eli solujen tuhoutumisesta, voitiin pesäkkeet siirrostaa jatkoa varten pelkille LB – kanamysiini – maljoille. Nestekasvustosta pipetoitiin 3 µl maljalle ja levitettiin tasaisesti. Maljoja inkuboitiin yön yli 37 °C:ssa.

5.5 Poistogeenisen bakteerin varmentaminen

Poistogeenisen bakteerin varmentamisessa käytettiin pesäke-PCR:ää (taulukko 1), agaroosigeelielektroforeesia sekä normaalia PCR:ää. Kandidaatit valittiin MSM ksyloosi -maljan perusteella niistä pesäkkeistä, jotka eivät kyenneet kasvamaan maljalla, joka sisälsi ainoastaan ksyloosia hiililähteenä. Pesäkkeistä siirrettiin hieman bakteeria PCR-putkiin LB - kanamysiinimaljoilta. Reaktiossa oligoina käytettiin XylA forward ja XylA reverse –alukkeita Biomers.net:stä. Alukkeet olivat pituudeltaan 22 – 26 nukleotidiä ja ne oli suunniteltu alkamaan hieman ennen XylA -geenijakson alkua. Alukkeista valmistettiin kantaliuokset, joiden pitoisuudet olivat 100 pmol/µl tai 100 mM. Ensimmäisten oligojen T_m oli noin 63 °C ja myöhemmin tilattujen uudempien oligojen T_m oli 51 °C. Myöhemmin hankitut oligot olivat lyhyempiä kuin ensimmäiset oligot. Tämä sen vuoksi, että geenijakson muutos näkyisi sekvenssissä aikaisemmin. Oligojen käyttöläimennos oli 10 pmol/µl.

TAULUKKO 1. Pesäke-PCR.

Reagenssi	Määrä
10* Taq - pushuri	5 µl
25mM dNTP	0,5 µl
XylA F	5 µl
XylA R	5 µl
25mM MgCl ₂	4 µl
Templaatti DNA	Pesäkkeestä
5 U / µl Taq - polymeraasi	0,25 µl
H ₂ O	30,25 µl
Kokonaistilavuus	50 µl

Pesäke-PCR:n reaktio-olosuhteet pysyivät muuten samana koko työn ajan, mutta oligojen annealing-lämpötiloja vaihdeltiin, jotta kyettäisiin saamaan mahdollisimman paljon tuotetta. Pesäke-PCR:ssä PCR-putkeen siirrostetaan pesäkkeestä bakteerisoluja, jotka denaturoituivat PCR:ssä korkean lämpötilan ($T = +95^{\circ}\text{C}$) takia. Annealing-lämpötilana käytettiin noin 5°C :ta pienempää lämpötilaa kuin oligojen T_m -lämpötila.

PCR-reaktion tuotteet ajettiin agarosigeelielektroforeesilla. Geeli tehtiin liuottamalla 1 gramma agarosia 100 ml:aan $1 \times \text{TAE}$ -puskuria (Tris-Asetaatti-EDTA). Seosta lämmitettiin mikroaaltouunilla 3 - 5 minuutin ajan välillä sekoittaen, jotta seos homogenisoituisi hyvin. Tämän jälkeen seoksen annettiin jäähtyä hetken ja siihen lisättiin $10\mu\text{l}$ SYBR safe- DNA-väriä (Invitrogen). Seos kaadettiin geelitarjottimelle ja seokseen upotettiin sopivan kokoiset näytekammat. Kun geeli oli jähmettynyt, näytekampana poistettiin ja geeli siirrettiin ajolaitteeseen ja peitettiin $1 \times \text{TAE}$ -puskurilla. Näytekaivojen tilavuus oli $30\mu\text{l}$, joten yksi näyte pipetoitiin kahteen rinnakkaiseen kaivoon. Näytteen joukkoon lisättiin $10\mu\text{l}$ $6 \times$ Orange loading dye -väriä. DNA markkerina käytettiin Orange ruler 200bp- ja Orange ruler DNA ladder mix- kokostandardeja (Fermentas). Ajo-olosuhteina käytössä oli 70 V, maksimissaan 190 mA.

Haluttujen tuotteiden koot olivat melko lähellä toisiaan, joten käytetyt kokostandardit olivat lähinnä suuntaa antavia, jotta tiedettiin tuotteen olevan melko varmasti oikea. Pesäke-PCR tehtiin, jotta geneettistä materiaalia saataisiin monistettua tarpeeksi sekvensointia varten, eikä mahdollisuutta genomisen DNA:n sekvensointiin ollut. Lopulliseen varmistukseen käytettiin sekvensointia. Kanamysiiniresistenssi -geenin koko oli noin 1638bp ja XylA-geenin koko noin 1831pb.

PCR:llä monistetut tuotteet eristettiin geelistä käyttäen kaupallista Macherey – Nagel yhtiön Nucleo spin extract II – kittiä (liite 3.). Eristys toteutettiin täysin kitin ohjeiden mukaisesti. Eristetty DNA eluoiitiin $30\mu\text{l}$ Nucleo spin extract II -kitin eluointipuskuria ja säilöttiin $1,5\text{ ml}$ eppendorf -putkiin. Tätä DNA:ta käytettiin templaattina seuraavassa vaiheessa, joka oli DNA:n monistaminen sekvensointia varten. Tämä DNA:n monistaminen tehtiin vain jos ensin tehtiin pesäke-PCR. ABI-PCR:ssä jokainen näyte monistettiin sekä forward-, että

reverse -oligolla. Oligoina käytettiin samoja kuin pesäke-PCR:ssä. Näin jokaisesta näytteestä saatiin kaksi sekvensointinäytettä, joista toinen alkaa geenin 5' -päästä ja toinen 3' -päästä. Myös PCR-reaktio poikkesi pesäke-PCR:stä. ABI-PCR:ssä (taulukko 2) käytettiin templaatin lisäksi ainoastaan oligoja sekä R - mix -seosta, joka sisälsi sekvenssoinnissa tarvittavat merkatut nulkeotidit, dideoksinukleotiditriposfaatit, entsyymit ja puskuriin.

TAULUKKO 2. ABI-PCR.

ABI-PCR	
Templaatti	Max 7,5 µl
Oligo	0,5 µl
R-MIX	2 µl
Kokonaistilvauus	10 µl

Käytetyn templaatin määrä riippuu templaatin pitoisuudesta.
Reaktioseos täytetään 10 µl H₂O:lla.

PCR-tuote puhdistettiin sekvensointia varten. PCR-tuotteet pipetoitiin PCR -putkista 1,5 ml eppendorf -putkiin ja merkittiin sekvensointia varten. Jokaisen eppendorf –putkeen pipetoitiin 2 µl:aa 1,5 M Na-Asetaattia, joka sisälsi 50 mM EDTA:a. Seos oli PCR-tuotteiden puhdistukseen käytettävää kaupallista (Macherey – Nagel) saostusliuosta. Tämän lisäksi putkiin pipetoitiin 25 µl 95-%:sta jääkylmää etanolia. Näytteitä inkuboitiin pakasteessa 30 minuuttia. Inkuboinnin jälkeen näytteet sentrifugoitiin nopeudella 13200 RPM puolen tunnin ajan. Sentrifugointi tehtiin kylmissä olosuhteissa, joten käytettävä sentrifugi voitiin jäähdyttää 4 °C:een. Sentrifugoinnin jälkeen supernatantti pipetoitiin hyvin varovaisesti pois, tämän jälkeen putkiin pipetoitiin 150 µl 70-%:sta etanolia. Tuote sekoitettiin nopeasti, jonka jälkeen tuotteet sentrifugoitiin uudestaan samalla nopeudella, mutta 7 minuutin ajan. Supernatantti pipetoitiin hyvin varovasti pois, ja putkiin jääneen etanolin annettiin kuivua huoneenlämmössä. Putket vietiin Oulun yliopiston biokemian laitokselle sekvensoitaviksi.

5.6 Poistogeenisen kannan jatkokäsittely

Sekvenssoinnista saatujen tulosten huonon luettavuuden vuoksi työtä ei kertaakaan päästy jatkamaan sekvenssointia pidemmälle lukuisista yrityksistä huolimatta. Seuraava vaihe olisi kuitenkin ollut poistogeenisen kannan antibioottiresistenssin poistaminen. Tässä vaiheessa bakteeri-soluun olisi tuotu elektroporaatiota käyttäen apuplasmidi, joka korvaa antibioottiresistenssigeenin. Plasmidin siirtämisen jälkeen bakteeria olisi kasvatettu 43 °C:ssa, jolloin se olisi apu - plasmidin vaikutuksesta menettänyt antibioottiresistenssin. Tämän jälkeen antibioottiresistenssin poisto olisi varmennettu kasvattamalla bakteeria kanamysiinimaljalla. Mikäli se ei olisi enää siinä kasvanut, olisi resistenssi saatu onnistuneesti poistettua. Tämän jälkeen muodostuneesta poistogeenisestä *E. coli* -kannasta olisi tehty säilökanta jatkoa varten.

6 TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELO

Työn tuloksena kehitettiin toistettava P1 bakteriofagi -menetelmä (liite 1). Työn suorituksen aikana tätä menetelmää hiottiin ja toistettiin useita kertoja. Lopussa jokaisella kerralla oli havaittavissa mahdollisia poistogeenisiä kandidaatteja, mutta täydellistä varmuutta toivotun geenin eli XylA- geenin poistumisen ja sen tilalle liitetyn kanamysiiniantibioottiresistenttiyksen vaihtumisesta ei saatu. Varsinainen työohje P1-bakteriofagi -menetelmään on liitteenä tässä opinnäytetyössä. Työohjeen pohjana käytettiin eri P1-bakteriofagi -menetelmiä, joista kokeilemalla koottiin toistettava ja mahdollisimman suoraviivainen menetelmä.

6.1 Fagitiitteri

Fagien tuottamista transduktiota varten kehitettiin, jotta fagipartikkelien määrä saataisiin sopivaksi. Jos bakteriofageja on liian vähän, ei transduktio tapahdu. Jos fageja on taas liikaa bakteerien määrään nähden, ne tappavat kaikki bakteerit. Tämä parantaa mahdollisuuksia transduktioon, jossa mahdollisimman suuri joukko fagipartikkeleita sisältää suurimmalla todennäköisyydellä halutun geenijakson. Tämä parantaa halutun kohdegeenin siirtymistä vastaanottavaan kantaan halutulle paikalle. Suurin määrä fagipartikkeleita saadaan yön yli kasvatuksella, jonka aikana fageilla on tarpeeksi aikaa infektoida tarpeeksi suuri määrä isäntäsoluja ja vapauttaa uusia fageja. Alla on taulukot 3, 4 ja 5 fagitiitteri -maljoista.

Taulukko 3. Fagitiitteri-malja 1. Taulukko 4. Fagitiitteri-malja 2.

P1, JW3537-1, 13.10.2010

Laimennos	Kpl	Pfu/ml
10 ⁻⁷	180	1,8*10 ⁹
10 ⁻⁸	14	7,0*10 ⁸
10 ⁻⁹	0	-

Fagilysaattia kasvatettu yön yli
Vanha fagistokki

P1, JW3537-1, O.N, 26.11.2010

Laimennos	Kpl	Pfu/ml
10 ⁻⁷	363	3,63*10 ⁹
10 ⁻⁸	52	2,6*10 ⁹
10 ⁻⁹	3	1,5*10 ⁹

Fagilysaattia kasvatettu yön yli

Taulukko 5. Fagitiitteri-malja 3.

P1, JW3537-1, 3h, 26.11.2010

Laimennos	Kpl	Pfu/ml
10 ⁻⁷	173	1,73*10 ⁹
10 ⁻⁸	16	8,0*10 ⁸
10 ⁻⁹	1	5,0*10 ⁸

Fagilysaattia kasvatettu 3 tuntia

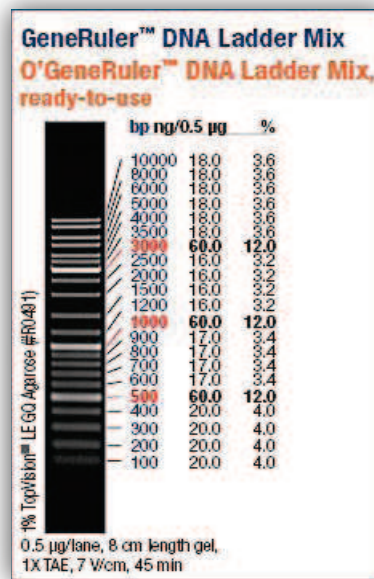
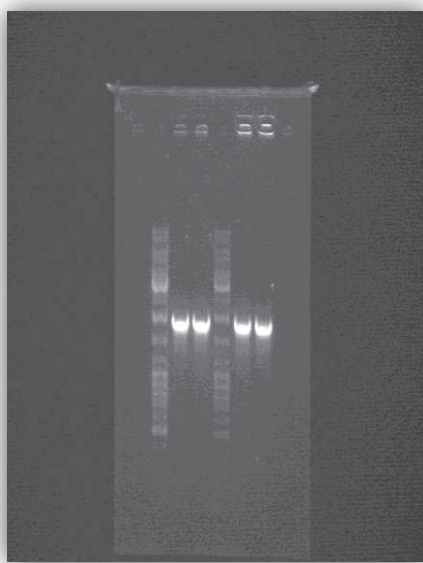
6.2 Transduktio

Transduktio tehtiin työohjeen mukaisesti (liite 1). Bakterisuspensio levitettiin LB + Na-sitraatti -maljalle ja kasvatettiin yön yli 37 °C:ssa. Seuraavana päivänä näkyvät pesäkkeet siirrettiin uudelle LB + sitraatti -maljalle. Tämä toistettiin muutaman kerran, jotta mahdollisista fageista päästään eroon. Natriumsitraatti katkaisee fagien ja bakteerien välisen vuorovaikutuksen ja estää fageja kiinnittymästä bakteereihin. Ne pesäkkeet, jotka näkyivät ensimmäisillä LB + Na-sitraatti -maljoilla hyvin pieninä pesäkkeinä vasta noin 48 tunnin jälkeen hylättiin. Nämä pesäkkeet ovat suurella varmuudella satelliittipesäkkeitä. Ne muodostuvat pitkän ajan kuluessa antibioottimaljoille, eivätkä ole mahdollisia poistogeenisiä bakteereita. Pesäkkeet, jotka olivat näkyvissä 24 - 48 tunnin välillä ja olivat selkästi suurempia kuin myöhemmät satelliittipesäkkeet, siirrettiin selektiivisille MSM-ksyloosi -maljoille alustavaa varmentamista varten. Tässä vaiheessa pesäkkeet siirrettiin myös tavallisille LB -maljoille.

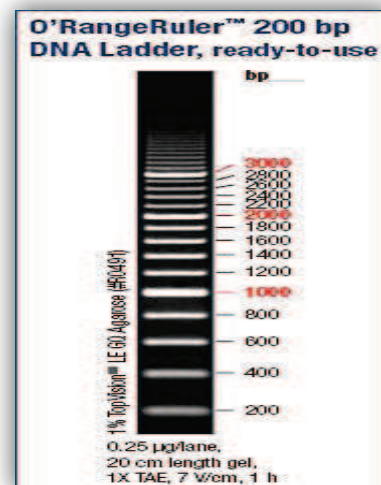
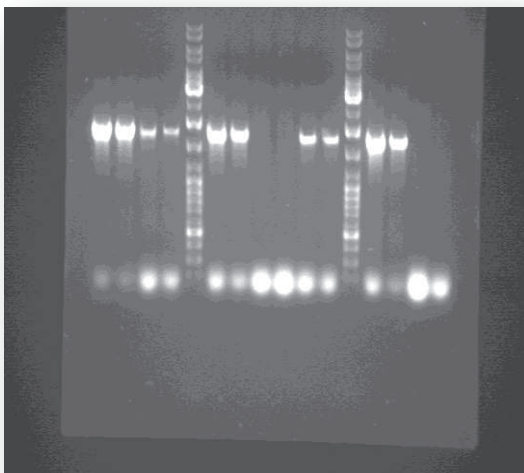
6.3 Poistogeenisen kannan varmentaminen

Poistogeenisen kannan varmentamisessa käytettiin selektiivisiä MSM-ksyloosi -maljoja. Näissä maljoissa ainoana hiilenlähteenä oli käytetty ksyloosia. Kontrolleina käytettiin vastaanottavaa ja luovuttavaa kantaa. Näistä ainoastaan vastaanottava kykeni hyödyntämään ksyloosia. Transduktion jälkeen

antibioottimaljoilla kasvaneet bakteerit siirrettiin sekä normaalille LB -maljalle että MSM-ksyloosi -maljalle. Ne transduktiossa muodostuneet, mahdolliset poistogeenisten bakteerien kandidaatit, jotka eivät kyenneet kasvamaan MSM-ksyloosi -maljoilla, siirrettiin tarkempaan varmennukseen. Näitä pesäkkeitä vastaavat pesäkkeet poimittiin LB -maljoilta pesäke-PCR:ään. Pesäke-PCR:n tuotteet eristettiin agarosigeeliltä ja eristetystä DNA-jaksosta tehtiin sekvensointi-PCR.



AGE – kuva luovuttasta ja vastaanottavasta kannasta (kuva 10). Ensimmäisen ladderin (6.) jälkeen luovuttava- ja toisen ladderin jälkeen vastaanottava kanta.



AGE – kuva mahdollisista poistogeenisistä bakteereista (kuva 11), sekä DNA koko ladderi (5.).

PCR-tuote leikattiin geelistä ja tuote eristettiin kaupallista kittiä käyttäen (liite 3). Seuraavaksi eristetyt PCR-tuotteet monistettiin uudelleen sekvensointia varten. Sekvensoinnista saadut tulokset olivat luettavia ainoastaan alkupäästä, eikä geenijakson muuttumista kyetty halutulla varmuudella toteamaan.

7 POHDINTA

Geneettisen materiaalin siirtämisen jälkeen MSM-ksyloosi -maljoilla oli havaittavissa erittäin hyviä kandidaatteja poistogeenisiksi bakteereiksi. ABI-PCR:ää yritettiin hioa lukuisia kertoja muuttamalla annealing-lämpötilaa, sekä käytetyn templaatin ja R - MIX -seoksen määrää paremman sekvensoinnin saavuttamiseksi, huonolla menestyksellä. Jopa käytetyt oligot vaihdettiin lähemmäs kohde-geeniä, jotta ero XylA- ja kanamysiiniresistenssi- geenien välillä ilmenisi aikaisemmin sekvenssiä luettaessa. Yleensä sekvenssin signaali heikkeni 200 - 300 emäsparin jälkeen niin huonoksi, että sekvenssin lukeminen oli täysin mahdotonta. MSM-ksyloosi -maljoilla kontrolleina käytettiin vastaanottavaa ja luovuttavaa *E.coli* -kanta, ja havaittavissa oli selkeästi, ettei luovuttava kanta kyennyt kasvamaan, kun ainoa hiilenlähde oli ksyloosi. Vastaanottava kanta taas kasvoi maljalla normaalisti. Näin ollen lähtökantojen tulisi olla kunnossa.

Myös itse transduktio voi vaatia lukuisia yrityksiä ennen onnistumista. Kun bakteriofagi P1 infektoi isäntäsolun ja alkaa pilkkoa sen geneettistä materiaalia, on täysin sattumanvaraista, mitä geneettistä materiaalia uudet muodostuvat P1-fagit sisälleen saavat. Kun nämä fagit infektoivat seuraavat bakteerisolut, on mahdollista, että osa muodostuvista bakteereista saa antibioottiresistenssin, mutta se voi olla eri kohdassa kuin on tarkoitus. Lisäselvitystä vaatisi mielestäni mekanismi, jonka mukaisesti bakteriofagi P1:n vastaanottavaan kantaan lisäämä geneettinen materiaali korvaa alkuperäisen geenijakson. Bakteriofagi-menettelmää käytettäessä aikaa voi kulua halutun lopputuloksen saavuttamiseen hyvinkin paljon.

Kuitenkin työn varsinainen tarkoitus eli yleiseen transduktioon perustuvan menetelmän kehittäminen onnistui. Jokaisella kerralla saatiin vähintään kaksi poistogeenisen *E. coli*:n kandidaattia, ja bakteriofagien tuotto saatiin sille tasolle, että transduktion mahdollistavien partikkelien eli P1-fagien määrä oli riittävän suuri. Jo 3 tunnin kasvatuksella fagien määrä oli $1,73 \cdot 10^9$ pfu / ml, ja kun fageja kasvatettiin yön yli oli määrä $3,63 \cdot 10^9$ pfu / ml. Kun fageja

kasvatetaan pidempi aika, on olemassa suurempi todennäköisyys siihen, että jokin näistä fagipartikkeleista pitää sisällään halutun geenin.

LÄHTEET

1. AGE - laitteisto. Saatavissa:
http://biotek.com.au/products/catalog/popup_image.php?plD=39.
Hakupäivä 21.03.2011
2. Alahuhta, M., Salin, M., Casteleijn, M. G., Kemmer, C., El-Sayed, I., Koen, A., Neubauer, P., Wierenga, R. K. 2007. A new monomeric TIM with new binding properties.
3. Bakteriofagi. Saatavissa: <http://en.wikipedia.org/wiki/Bacteriophage>.
Hakupäivä 21.03.2011.
4. Bakteriofagi P1. Saatavissa:
<http://jb.asm.org/content/vol186/issue21/cover.dtl>. Hakupäivä 21.03.2011.
5. DNA-kokostandardi. O'range ruler 200bp. Saatavissa:
http://www.fermentas.de/product_info.php?info=p1089. Hakupäivä.
21.03.2011
6. DNA kokostandard. O'gene ruler DNA ladder mix. Saatavissa:
<http://fermentas.com/en/products/all/dna-electrophoresis/ogeneruler-dna-ladders/sm117-ogeneruler-mix>. Hakupäivä 21.03.2011
7. DNA - sekvensointi. Saatavissa:
<http://www.dnassequencing.com/2011/01/06/dna-sequencing-5/>.
Hakupäivä 21.03.2011
8. Fagitiitterimalja. Saatavissa:
http://parts.mit.edu/igem07/index.php/Image:Phage_titer.jpg. Hakupäivä
21.03.2011.
9. Haajanen, Kari - Pelkonen, Jani - Pärssinen, Raimo - Suominen, Ilari
2010. Geenitekniikka, Turun amk oppimateriaaleja 52.
10. Krause, Mirja. 2007. Directed evolution of TIM towards new substrate activity, Diploma thesis.

11. Kumpulainen, Elsa 2009. T460206, Geenitekniikan menetelmät. Oppimateriaali keväällä 2009. Oamk oppimateriaaleja. Oulu: Oulun seudun ammattikorkeakoulu, tekniikan yksikkö.
12. Lysogeeninen sykli. Saatavissa:
http://wps.prenhall.com/esm_freeman_biosci_1/7/1952/499794.cw/index.html 7.2.11. Hakupäivä 21.03.2011.
13. Lyytinen sykli. Saatavissa:
http://wps.prenhall.com/esm_freeman_biosci_1/7/1952/499794.cw/index.html 7.2.11. Hakupäivä 21.03.2011.
14. PCR - reaktio. Saatavissa:
http://fi.wikipedia.org/wiki/Tiedosto:PCR_basic_principle1.jpg. Hakupäivä 21.03.2011.
15. Tropp, Burton E. 2008. Jones and Bartlett. New York. Molecular biology – Genes to proteins, third edition. Department of chemistry and biochemistry, Queens college, City university of New York Flushing.
16. Triosefosfaatti isomeraasi. Saatavissa:
http://en.wikipedia.org/wiki/File:TPI1_structure.png. Hakupäivä 21.03.2011.

LIITTEET

Liite 1. P1 bakteriofagi metodin työohjeet

Liite 2. Käytetyt liuokset

Liite 3. Nucleo Spin Extract II - eristysohje

P1 Fagi menetelmä

(Muokattu P1 - fagi protokollasta. Laatinut Brian San Francisco, Kranz Lab. 2008)

Ville Moilanen

Vaihe 1: P1 Bakteriofagien kasvatus vastaanottavassa kannassa

Tässä vaiheessa fagit kasvatetaan kannassa, joka tulee vastaanottamaan geneettisen muunnoksen. Tämä on vain alustava vaihe, jossa varmistetaan, että riski siirtää vierasta DNA:ta pienenee huomattavasti. Kalsium helpottaa fagin ja bakteerisolun välistä fyysistä vuorovaikutusta.

Materiaalit:

LB – mediumi

1M CaCl₂

20% Glukoosi

Kloroformi

1. Valmista nestemäinen esikasvatus vastaanottavasta kannasta.
 - 5ml LB + 25µl CaCl₂ (1M) + 50µl glukoosi (20%)
 - Siirrosta yksittäinen pesäke vastaanottavaa kantaa.
 - Kasvata kunnes OD₆₀₀ – lukema on 0.1 – 0.2 (~1.5h, 37°C, 150 RPM)
2. Valmista fagilysaatti.
 - Ota 100µl fagi – kantaliuoksesta.
 - Ravistele sitä hetken ja anna sen seisoa avonaisena 30min - 1h (37°C) kloroformin haihduttamiseksi.
 - Ota 2.5ml nestemäistä kasvustoa (vastaanottava kanta) falcon – putkeen ja lisää siihen 100µl fagi - kantaliuoksesta (kloroformi vapaa).
 - Kasvata fagit vastaanottavassa kannassa yön yli 37°C ravistuksen kanssa. (200RPM)
 - Lisää yön yli kasvustoon 3 tippaa kloroformia per millilitra kasvustoa. (Kloroformi tappaa jäljellä olevat vastaanottavan kannan bakteerit), sekoita hetken.
 - Siirrä kasvusto sentrifugiputkiin (tai eppendorf - putkiin) ja sentrifugoi 14000 RPM, 1min. Siirrä supernatantti uusiin eppendorf - putkiin ja lisää 3 tippaa kloroformia per ml. Sekoita hetken.

Lysaatti voidaan säilöä 4°C 4 kuukautta. Vaiheessa 1. valmistetut fagit toimivat vaiheen 2. fagi – kantaliuoksena.

Vaihe 2 : Bakteriofagien kasvatus luovuttavassa kannassa

Tässä vaiheessa fagit, jotka on kasvatetty vaiheessa yksi, kasvatetaan bakterikannassa, jonka geneettinen muunnos halutaan siirtää. Tämä vaihe on muuten identtinen vaihe 1. kanssa sillä erolla, että fagit kasvatetaan luovuttavassa kannassa

Toista vaihe 1 käyttäen luovuttavaa kantaa vastaanottavan sijasta.

Fagi tiitterin määrittämien

Fagi tiitterin määrittämien tehdään bakteriofagien lukumäärän selvittämiseksi.

Materiaalit:

LB – mediumi

1M CaCl₂

20% Glukoosi

MC puskuri (0.1M MgSO₄ + 0.005M CaCl₂)

R – maljat

R-Top agar

1. Valmista nestemäinen yön yli kasvusto luovuttavasta kannasta.
 - 5ml LB + 25µl CaCl₂ (1M) + 50µl glukoosi (20%)
 - Siirrosta yksittäinen pesäke luovuttavaa kantaa.
 - Kasvata yön yli 37°C, 150RPM.
2. Laimenna yön yli kasvusto 1:5.

- Ota 1ml luovuttavan kannan yön yli kasvustoa ja lisää 4ml LB + 40µl glukoosia (20%) + 20µl CaCl₂ (1M)

3. Valmista fagi tiitterin laimennossarja.

- Ota fagi-kantaliuos, joka on kasvatettu luovuttavassa kannassa (Vaihe 2.). Sentrifugoi 14 000 RPM 1 min ajan. Kloroformi painuu pohjalle. Pipetoi fagit lyaatin pinnalta. Valmista laimennossarja 1.5ml eppendorf – putkiin. Sekoita jokaisen pipetoinnin välillä ja vaihda pipetin kärki pipetoidessasi uutta laimennosta.
- Laimennos no 1: 10⁻²: Ota fagi - kantaliuoksesta 10µl ja lisää se 990µl:aan MC puskuria.
- Laimennos no 2: 10⁻⁴: Ota 10µl laimennos no 1:tä ja lisää se 990µl:aan MC puskuria.
- Laimennos no 3: 10⁻⁶: Ota 10µl laimennos no 2:ta ja lisää se 990µl:aan MC puskuria.
- Laimennos no 4: 10⁻⁷: Ota 50µl laimennos no 3:a ja lisää se 450µl:aan MC puskuria.
- Laimennos no 5: 10⁻⁸: Ota 50µl laimennos no 4:ää ja lisää se 450µl:aan MC puskuria.
- Ota eppendorf – putkista 3, 4 ja 5 100µl fagilaimennosta falcon – putkiin.
- Lisää falcon – putkiin 250µl luovuttavaa kantaa ja 2.5ml lämmintä (T=+45°C) R-top agarua. Sekoita nopeasti ja kaada R – maljoille, jotka on esilämmitetty + 37°C:een.
- Laimennokset maljoilla ovat 10⁻⁷, 10⁻⁸ and 10⁻⁹.
- Maljoja kasvatetaan 7 tuntia tai kauemmin 37°C:ssa.

4. Laske “plague” määrät maljoilla.

- Plagues / laimennos = pfu/ml
- esimerkki: $200/10^{-7} = 2.0 * 10^9$ pfu/ml

Vaihe 3: Geneettisen muutoksen siirtäminen vastaanottavaan kantaan

Tässä vaiheessa, bakteriofagit (kantavat geneettistä muutosta luovuttavasta kannasta, vaihe 2) kasvatetaan vastaanottavassa kannassa geneettisen muuutoksen siirtämiseksi siihen kantaan.

Materiaalit:

LB – mediumi

1M CaCl₂

20% Glukoosi

LB + 5 mM CaCl₂ + 0.2% glukoosi, LB + 5 mM CaCl₂ + 100 mM MgSO₄

1 M NaSitraatti pH 5.5

LB + 100 mM NaSitraatti

LB + antibiootti – maljat

1. Valmista nestemäinen kasvatus vastaanottavasta kannasta.
 - 5ml LB + 25µl CaCl₂ (1M) + 50µl glukoosi (20%)
 - Siirrosta yksittäinen pesäke vastaanottavaa kantaa.
 - kasvata kunnes OD₆₀₀ – lukema on 0.8 – 1.0.

2. Sentrifugoi ja suspensoi nestemäinen kasvusto neljäsosaan jäljellä olevasta tilavuudesta. (~4ml)
 - Sentrifugoi nopeudella 6000 RPM, 5min.
 - Hylkää supernatantti ja suspensoi solu pelletti 1ml:aan LB + 5µl CaCl₂ (1M) + 100µl MgSO₄ (1M)

3. Valmista laimennossarja.
 - Valmista laimennokset 1.5ml eppendorf – putkiin.
 - 1:10 – laimennos: 20µl laimentamatonta fagilysaattia (vaiheesta 2) + 180µl LB (5mM CaCl₂ + 100mM MgSO₄), sekoita hetki.
 - 1:100 – laimennos: 20µl laimennoksesta 1:10 + 180µl LB (+5mM CaCl₂ + 100mM MgSO₄), sekoita lyhyesti.
 - 1:1000 – laimennos: 20µl laimennoksesta 1:100 + 180µl LB (+5mM CaCl₂ + 100mM MgSO₄), sekoita lyhyesti.
 - 1:10 000 – laimennos: 20µl laimennoksesta 1:1000 + 180µl LB (+5mM CaCl₂ + 100mM MgSO₄), sekoita lyhyesti.

4. Reaktiosarjan valmistelu.
 - Valmistele reaktiosarja 1.5ml eppendorf – putkiin.
 - Merkitse putket A:sta D:hen, neljä kappaletta B – putkia. Yksi jokaiselle laimennokselle.
 - A: 100µl vastaanottavaa kantaa, 100µl laimentamatonta fagilysaattia (vaiheesta 2).
 - B - putket: 100µl fagilysaattia laimennossarjan mukaisesti, 100µl vastaanottavaa kantaa.
 - C: 100µl LB (+5mM CaCl₂ + 100mM MgSO₄), 100µl vastaanottavaa kantaa. Spontaanin antibioottiresistenssin kontrolli.
 - D: 100µl laimentamaton fagilysaatti (vaiheesta 2.), 100µl LB (+5mM CaCl₂ + 100mM MgSO₄), kontrolli elossa olevien luovuttavan kannan havaitsemiseksi.
 - Inkuboi 30min 37°C:ssa.
 - Pysäytä reaktio 200µl:lla 1M NaSitraattia, pH 5.5. Sekoita hetki. (NaSitraatti toimii kalsiumin kelaattina, jota käytetään keskeyttämään fyysinen vuorovaikutus fagin ja bakteerisolun välillä.)

- Kokonaistilavuus 400µl.
- Siirrä koko reaktioseos (400µl) falcon – putkiin. Lisää 1ml LB – mediumia.
- Inkuboi 1h, 37°C, 200 RPM.
- Inkuboinnin jälkeen sentrifugoi kasvustoa nopeudella 6000 RPM, 3min. Hylkää supernatantti ja uudelleen suspensoi solupelletti 100µl LB(100mM NaSitraatti)
- Levitä 100µl solususpensiota LB + antibiootti – maljoille.
- Kasvata maljat 37°C, 24h - 48h.

Vaihe 4: Transduktanttien eristämien

Seuraavana päivänä maljoilla (reaktioseoksista A ja B) pitäisi olla näkyvissä useita pesäkkeitä. Mikäli pesäkkeitä ei 24 – 48 tunnin jälkeen ole näkyvissä, transduktio ei onnistunut ja pitää toistaa. Tyypillisesti spontaaneja antibioottiresistenttejä mutantteja ilmestyy ensimmäiselle kontrollimaljalle (malja – C) 48h jälkeen ja ne ovat hyvin pieniä. Mikäli pesäkkeitä ilmestyy toisessa kontrollimaljassa (malja – D), silloin fagilysaatti voi olla kontaminoitunut vastaanottavan kannan soluista.

Tämä seuraava vaihe toistetaan kahdesta kolmeen kertaan, jotta mahdollisista jäljelle jääneistä fageista päästään eroon. Pesäkkeitä kasvatetaan LB + antibiootti – maljoilla, joihin on lisätty Na-Sitraattia. Na-Sitraatti estää mahdollisia läsnäolevia fageja infektoimasta bakteerisoluja ja näin ollen estää uusien fagien muodostumisen.

Materiaalit:

1M NaSitraatti, pH 5.5

LB + antibiootti – maljat

1. Pipetoi 100µl NaSitraattia LB + antibiootti – maljoille ja anna niiden kuivua. Siirrä yksittäinen pesäke LB + antibiootti + NaSitraatti – maljalle. Kasvata maljoja 1-2 vrk. 37°C:ssa, jonka jälkeen pesäkkeet siirretään uudelle LB + antibiootti + NaSitraatti – maljalle.
2. Fagien läsnäolon testaamiseksi valmista nestekasvatus mahdollisista poistogeenisistä pesäkkeistä.
 - 2.5ml LB + 12.5µl CaCl₂ (1M) + 25µl glukoosi (20%)
 - Siirrosta yksittäinen pesäke LB + antibiootti + NaSitraatti – maljoilta.
 - Kasvata vähintään kolmesta neljään tuntia.
 - Tarkista nestemäinen kasvatus fagien läsnäolo havaitsemiseksi. Mikäli fageja on läsnä, tulisi kasvustossa näkyä lyysaantuneita bakteerisoluja(hajonneita soluja).

- Mikäli kasvustossa ei näy merkkejä solujen lyysaantumisesta, voi työskentelyä transduktanttien kanssa jatkaa.

- Ohjeet käytettyihin materiaaleihin löytyvät liitteestä 2.

Käytetyt materiaalit

R – maljat

Tryptoni – 10g

Hiiva uute – 1g

Agar – 12g

NaCl – 8g

1l – H₂O

-Autoklavoinnin jälkeen

2ml 1M CaCl₂

5ml 20% Glukoosia

R-Top - agar

Tryptoni – 10g

Hiiva uute – 5g

NaCl – 10g

Agar – 8g

1l – H₂O

- Sulatettava ennen käyttöä

LB – kanamysiini – maljat

Tryptoni – 10g

Hiiva uute – 5g

NaCl – 10g

Agar – 15g

1l – H₂O

-Autoklavoinnin jälkeen

Kanamysiini (10mg/ml)

käyttöpitoisuus 30µg/ml

MC puskuri

0,1M MgSO₄

5mM CaCl₂

ad. merkkiin H₂O

LB (Luria Bertani) agar

Tryptoni – 10g

Hiiva uute – 5g

NaCl – 10g

Agar – 15g

1l – H₂O

LB - medium

Tryptoni – 10g

Hiiva uute – 5g

NaCl – 10g

1l – H₂O

MSM (mineral salt medium) – maljat

KH₂PO₄ – 2,72g

Na₂HPO₄ – 7,16g

NaCl – 5g

Na₂SO₄ – 1,1g

FeCl₃ * 6H₂O – 8,5mg

MnCl₂ * 4H₂O – 6,3mg

NH₄Cl – 0,5g

Agar – 14g

Xyloosi – 6g

1l – H₂O

pH – 7,0 - 7,2 (10M NaOH)

-Liuokset autoklavoitava ennen käyttöä ja maljojen valamista.

6 Protocol for DNA extraction from agarose gels

Before starting the preparation:

- Check if Wash Buffer NT3 was prepared according to section 3.

1 Excise DNA fragment/Solubilize gel slice

Take a clean scalpel to excise the DNA fragment from an agarose gel. Excise gel slice containing the fragment carefully to minimize the gel volume.

Note: Minimize UV exposure time to avoid damaging the DNA.

Determine the weight of the gel slice and transfer it to a clean tube.

For each **100 mg of agarose gel** add **200 µl Buffer NT**.

For gels containing >2% agarose, double the volume of Buffer NT. The maximum amount of gel slice per NucleoSpin® Extract II Column is 400 mg or 200 mg of a high percentage gel >2%. In this case 2 loading steps are required (step 2).

Incubate sample for **5 – 10 min** at **50°C**. Vortex the sample briefly every 2 – 3 min until the gel slice is **completely** dissolved!



**+ 200 µl NT
per
100 mg gel**

**50°C
5 – 10 min**

2 Bind DNA

Place a **NucleoSpin® Extract II Column** into a Collection Tube (2 ml) and load the sample.

Centrifuge for **1 min** at **11,000 x g**. Discard flow-through and place the column back into the collection tube.



Load sample

**11,000 x g
1 min**

3 Wash silica membrane

Add **700 µl Buffer NT3** to the NucleoSpin® Extract II Column. Centrifuge for **1 min** at **11,000 x g**. Discard flow-through and place the column back into the collection tube.

Note: Carry-over of chaotropic salt may result in low A_{260}/A_{230} values. To prevent problems in very sensitive downstream applications or if the entire eluate has to be used, follow the instructions given in section 8.1 ("Suboptimal performance of DNA in sequencing, restriction, or ligation reactions - Carry-over of chaotropic salts").



+ 700 µl NT3



11,000 x g
1 min

4 Dry silica membrane

Centrifuge for **2 min** at **11,000 x g** to remove **Buffer NT3** completely. Make sure the spin column does not come in contact with the flow-through while removing it from the centrifuge and the collection tube.

Note: Residual ethanol from Buffer NT3 might inhibit enzymatic reactions. Total removal of ethanol can be achieved by incubating the columns for 2 – 5 min at 70°C prior to elution.



11,000 x g
2 min

5 Elute DNA

Place the NucleoSpin® Extract II Column into a **new** 1.5 ml microcentrifuge tube (not provided). Add **15 – 50 µl Buffer NE** and incubate at **room temperature** (18 – 25°C) for **1 min**. Centrifuge for **1 min** at **11,000 x g**.

Note: Yield of larger fragments (>5 – 10 kbp) can be increased by using prewarmed elution buffer (70°C).



+ 15 – 50 µl NE

1 min
RT



11,000 x g
1 min