



Tapio Lehtimäki

GEENIEN EKSPRESSIOTASOJEN MITTAUSMENETELMÄT

GEENIEN EKSPRESSIOTASOJEN MITTAUSMENETELMÄT

Tapio Lehtimäki

Opinnäytetyö

Syksy 2011

Laboratorioalan koulutusohjelma

Oulun seudun ammattikorkeakoulu

TIIVISTELMÄ

Oulun seudun ammattikorkeakoulu
Laboratorioalan koulutusohjelma, bioteknologia

Tekijä: Tapio Lehtimäki

Opinnäytetyön nimi: Geenien ekspressiotasojen mittausmenetelmät

Työn ohjaaja: Elsa Kumpulainen

Työn valmistumislukukausi ja -vuosi: Syksy 2011

Sivumäärä: 35 + 4 liitesivua

Opinnäytetyön alkuperäisenä tarkoituksena oli ottaa käyttöön ja testata lähetti-RNA-tasojen mittauksiin soveltuva Transcript Analysis with the aid of Affinity Capture (TRAC) -menetelmä Oulun yliopiston bioprosessiteknikan laboratoriossa, sekä laatia selkeät englanninkieliset käyttöohjeet TRAC-mittauksia varten. Erinäisistä viivästyksistä johtuen työn aiheeksi kuitenkin valikoitui kirjallinen selostus erilaisista geenien ekspressiotasojen mittaus menetelmistä.

Opinnäytetyössä käyn läpi joitakin yleisimmin käytössä olevia geenien ekspressiotasojen mittausmenetelmiä ja näiden uusimpia sovelluksia bioprosessiteknikassa. Läpikäytyt menetelmät käsittävät ekspressiotasojen mittausmenetelmät perinteisistä hybridisaatio-, Northern-blot ja *in situ*-, liuoshybridisaatio menetelmistä ja sen sovellukseen aina geenisiruihin asti.

TRAC-mittauksia varten ehdin tehdä RNA-eristyksiä *Pichia pastoris* -hiivan soluista, mitkä myös on otettu mukaan opinnäytetyöhön.

Asiasanat:

Ekspressio, geeni, ilmentyminen, menetelmät, mittaus, transkriptio

SISÄLTÖ

TIIVISTELMÄ

SISÄLTÖ

1	JOHDANTO	6
2	GEENIN EKSPRESSIOTASOJEN MITTAUSMENETELMÄT.....	7
2.1	Northern-hybridisaatio	8
2.1.1	Agarosegeelelektroforeesi (AGE)	10
2.1.2	RNA:n analysointi geelillä.....	11
2.2	<i>In situ</i> -hybridisaatio (ISH).....	12
2.3	Liushybridisaatio	12
2.3.1	Sandwich-hybridisaatio.....	13
2.3.2	eTag Multiplex mRNA -menetelmä.....	13
2.3.3	Transkript analysis with aid of affinity capture (TRAC).....	14
2.4	Geenisirut	16
2.5	Polymeraasketjureaktio	18
2.5.1	Reaaliaikainen PCR	20
2.5.2	PCR:n sovellukset bioprosessien seurannassa	20
3	RNA:N ERISTÄMINEN HERKKYYS- JA LINEAARISUUSMITTAUKSIA VARTEN.....	22
4	RNA EKSPRESSIOTASOJEN MITTAUKSISSA	25
5	RNA:N ERISTYS	28
5.1	RNA:n eristäminen spin-kolonnilla.....	29
5.2	Työskentely RNA:n kanssa	30
5.3	RNA:n pitoisuuden ja puhtauden määrittäminen	31
6	POHDINTA	33
	LÄHTEET.....	34

LIITE 1

LIITE 2

1 JOHDANTO

Biotekniikassa yhdistyvät biologian ja kemian osaaminen kemian insinööritieteisiin. Biotekniikan sovellukset ovat osa elintarvike- lääke-, diagnostiikka- ja kemian teollisuutta sekä maataloutta ja ympäristötekniikkaa. Biotekniikka on hyvin vanhaa tekniikkaa; esimerkiksi perinteiset leivän, juuston, hapatettujen maitotuotteiden sekä oluiden ja viinien valmistusprosessit hyödynsivät bakteerien ja hiivojen aineenvaihduntaa, vaikka näiden mikro-organismien olemassa olo varmistui vasta paljon myöhemmin. Moderni biotekniikka hyödyntää molekyylibiologian alueella tehtyjä löytöjä, joista merkittävimpiä ovat olleet DNA:n ja entsyymien rakenteen ja toiminnan ymmärtäminen, solujen aineenvaihdunnan selvittäminen sekä geenitekniikan menetelmien nopea kehittyminen. (Aittomäki, Eerikäinen, Leisola, Ojamo, Suominen, von Weyerman 2002, 12–13.)

Suurin osa teollisista entsyymeistä tuotetaan nykyisin geneettisesti muokatuilla mikro-organismeilla, joiden entsyymien tuotantotasoa on saatu nostettua erittäin korkeaksi. Jotta bioprosesseja kyettäisiin sekä ymmärtämään että kontrolloimaan paremmin, tarvitaan sellaisten menetelmien kehitystä joiden avulla saadaan yksityiskohtaista informaatiota organismien fysiologisesta tilasta. Geenien ilmentyminen on tärkeä osa solujen fysiologiaa. Fokusoidun ja tiheään tapahtuvan geenien ilmentymisen mittausten on osoitettu olevan tehokas työkalu bioprosessien optimoinnissa. Genominlaajuiset ilmentymisanalyysit ovat mahdollistaneet pienempien geeniryhmien identifioinnin. Tiettyjen geeniryhmien avulla voidaan selvittää olennainen informaatio kiinnostuksen kohteena olevasta biologisesta systeemistä. Näiden menetelmien kehittyminen on puolestaan lisännyt tarvetta nopeille ja edullisille geenien transkriptien mittaustekniikoille. (Aittomäki, Eerikäinen, Leisola, Ojamo, Suominen, von Weyerman 2002, 12–13.)

Transkriptien mittaukset perustuvat pääosin nukleiinihappojen hybridisaatioon ja sen sovelluksiin. Työssä käydään läpi joitakin yleisimmin käytössä olevia transkriptien mittausten menetelmiä ja niiden sovelluksia bioprosessien seurannassa. Työssä tutustutaan Northern-hybridisaatioon, liuoshybridisaatioon ja sen sovelluksiin, geenisiruihin sekä PCR-menetelmiin.

2 GEENIN EKSPRESSIOTASOJEN MITTAUSMENETELMÄT

Puutteelliset tiedot mikro-organismien fysiologiasta ovat suurin rajoittava tekijä geenien ja muiden molekyylitason markkereiden käytössä mikrobiviljelmien seurannassa. Uudet tiedot transkriptomeista (solussa tietyllä hetkellä olevien mRNA-molekyylien joukko) ja muut järjestelmätason tiedot yhdessä uusien bioinformatiikan työkalujen kanssa tekevät markkerigeenien ja prosessien ennustamisesta entistä luotettavampaa. (Rautio 2007, 43.)

Toinen selvä tutkimusta vaikeuttava tekijä on pula sopivista työkaluista, joiden avulla valittuja geneja voidaan tehokkaasti seurata. Vaikka sirutekniikalla kerätyt tiedot ovat tärkeitä tämän kaltaiselle tutkimukselle, se ei useinkaan sovi mikroviljelmien analysointiin. Valittujen geenien ekspressiotasojen mittaaminen sekä kliinisessä ja bioteknisessä diagnostiikassa vaatii menetelmiä, jotka voidaan suorittaa nopeasti ja mieluiten useammasta näytteestä kerralla. Lisäksi on järkevää käyttää vaihtoehtoisia menetelmiä ja kohdennettuja tutkimuksia tutkittaessa tutkimuksen kohteena olevien geenien mielenkiintoisiksi koettuja geenien osajoukkoja. (Rautio 2007, 43.)

Yhteistä geenien ekspressioanalyysille on se, että ne kaikki perustuvat nukleiinihappojen hybridisaatioreaktioihin. Nukleiinihappojen hybridisaatio perustuu siihen, että yksinauhaiset nukleiinihapot pystyvät liittymään toisiinsa eli hybridisoitumaan. Hybridisaatio voi kuitenkin tapahtua vain, jos olosuhteet ovat sopivat (lämpötila ja ionivahvuus) ja nauhat ovat toisilleen komplementaariset. Hybridisaatioreaktion nopeutta voidaan kasvattaa nostamalla lämpötilaa tiettyyn pisteeseen, joka on riippuvainen sulamislämpötilasta (T_m). Myös korkea suola- ja nukleiinihappopitoisuus voi nopeuttaa hybridisaatioreaktiota. Inerttejä, korkean molekyyllipainon omaavia polymeerejä, kuten polyeteteeni-glykolia ja dekstraanisulfaattia, voidaan käyttää nukleiinihappojen konsentroiintiin ja hybridisaatioreaktion kasvattamiseen. Formamidi destabiloi nukleiinihappoja, ja sen vuoksi sitä voidaan käyttää sulamislämpötilan alentamiseen. Näin voidaan alentaa korkeita hybridisaatiolämpötiloja. Hybridisaatioreaktion jälkeen tehtävillä pesuilla on suuri merkitys hybridisaation lopputulokseen: mitä korkeampi lämpötila ja alhaisempi ioni-

vahvuus, sitä tehokkaammat pesut. Hybridisaatio- ja pesuolosuhteet vaihtelevat käytetyn menetelmän mukaan. Pesujen jälkeen tehdään vaadittavat mittaukset havaitsemisreaktioiden perusteella. (Rautio 2007, 44; Haajanen, Pelkonen Pärssinen, Suominen 2010, 194.)

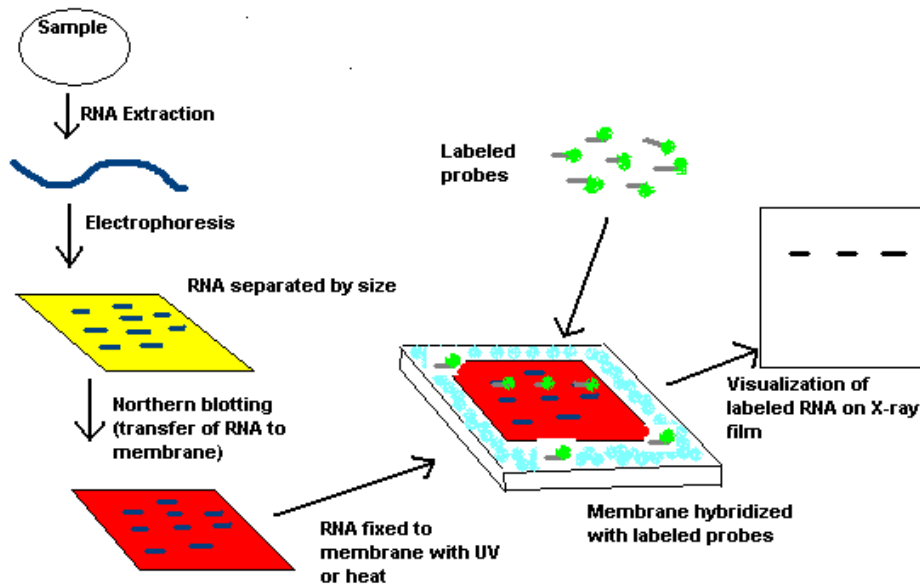
Toinen hybridisoituvista nauhoista voidaan leimata jollain merkkiaineella. Tällöin syntynyt hybridi voidaan havaita leiman tuottaman signaalin avulla. Leimattua nukleiinihappojaksoa kutsutaan koettimiksi (probe). Aikaisemmin leima-aineina on käytetty erilaisia radioisotooppeja, mutta nykyään käytössä on pääasiassa erilaisia ei-radioaktiivisia menetelmiä, joilla hybridin havaitseminen perustuu esimerkiksi valo- tai värireaktioon tai leiman aiheuttamaan fluoresenssiin. (Haajanen, Pelkonen Pärssinen, Suominen 2010, 193.)

Kun DNA-liuos kuumennetaan noin 100 °C:seen tai altistetaan hyvin emäksisiin oloihin ($\text{pH} \geq 12$), nukleotidien emästen välillä olevat vetysidokset katkeavat ja vastinnauhat irtoavat toisistaan. Tällainen DNA:n denaturaatio on reversiibeli eli palautuva tapahtuma. Kun kuumennetun DNA-liuoksen annetaan jäähtyä hitaasti, komplementaariset vastinnauhat pariutuvat uudelleen. Nukeiinihappoja voidaan sitoa erilaisille pinnoille, kuten nitroselluloosakalvolle tai kuoppalevyjen ja mikrosirujen pinnoille. Sitoutuminen estää DNA:n renaturoitumisen, eli DNA saadaan sidottua yksinauhaisena. Sitoutunut DNA tai RNA voi edelleen sitoutua eli hybridisoidua liuoksessa olevan koettimien kanssa. (Haajanen, Pelkonen Pärssinen, Suominen 2010, 194.)

2.1 Northern-hybridisaatio

Northern-hybridisaatiossa RNA erotetaan agarosielektroforeesilla (AGElla), siirrostetaan eli ”blotataan” suodatinkalvolle ja hybridisoidaan koettimen kanssa. Aluksi tutkimuksen kohteena olevasta solulinjasta, kudoksesta, bakteerista, tms. eristetään RNA:t. RNA:t erotetaan denaturoivalla AGE:lla. Tällä pyritään estämään RNA:ta muodostamasta paikallisia kaksijuosteisia alueita, kuten hiusneularakenteita. AGE:n jälkeen RNA:t siirrostetaan geeliltä suodatinkalvolle, esimerkiksi nitroselluloosakalvolle, minkä jälkeen RNA:t hybridisoidaan koettimien kanssa (kuva 1). Koettimina voidaan käyttää

DNA-koettimia tai *in vitro* -transkriptiolla valmistettuja RNA-koettimia. (Haajanen, Pelkonen Pärssinen, Suominen 2010, 203.)



KUVA 1. Northern-hybridisaation periaate (Wikipedia 2011, Hakusanalla Northern blot)

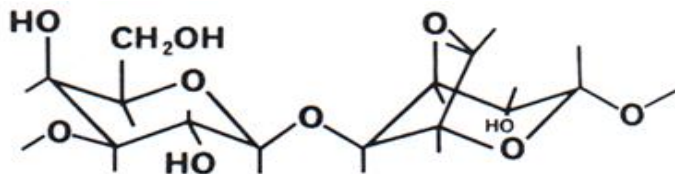
Hybridisaation jälkeen suodatinkalvo pestään ennalta suunnitellulla tavalla, jolloin epäspesifisesti sitoutuneet koetinmolekyylit irtoavat ja vain komplementaarisesti sitoutuneet koetinmolekyylit jäävät kiinni. Pesujen jälkeen suoritetaan käytetyn leiman mukainen detektointireaktio. Esimerkiksi käytettäessä kromogeenistä leimaa suodatinkalvo voidaan kuvata ja analysoida suoraan kuvantamislaitteella. Tuloksena saadaan kalvosta kuva, jossa vyöhyke on näkyvissä vain siinä kohtaa, jossa geelillä oli alun perin koettimille komplementaarista RNA:ta. RNA-jakson kokoa ja määrää analysoimalla saadaan tietoa tutkittavasta RNA-alueesta. (Haajanen, Pelkonen Pärssinen, Suominen 2010, 203.)

Northern-hybridisaatiolla voidaan tutkia muun muassa geenien ekspressiotasoja eri kudoksissa tai eri erilaistumisvaiheissa. Tekniikalla voidaan esimerkiksi selvittää, ekspresoiuuko jokin geeni ollenkaan tietyssä kloonausisännässä tai kudoksessa. Northern-blottauksella voidaan selvittää eri yhdisteiden, esimerkiksi hormoneiden, myrkkujen tai muiden ympäristötekijöiden vaikutusta tietyn geenin toimintaan. Useimmiten tämän kaltaiset tutkimukset tehdään kuitenkin käyttäen kvantitatiivista PCR:ää tai näytteen

koko transkriptomin analysoinnin mahdollistamia DNA-siruja. (Haajanen, Pelkonen Pärssinen, Suominen 2010, 203.)

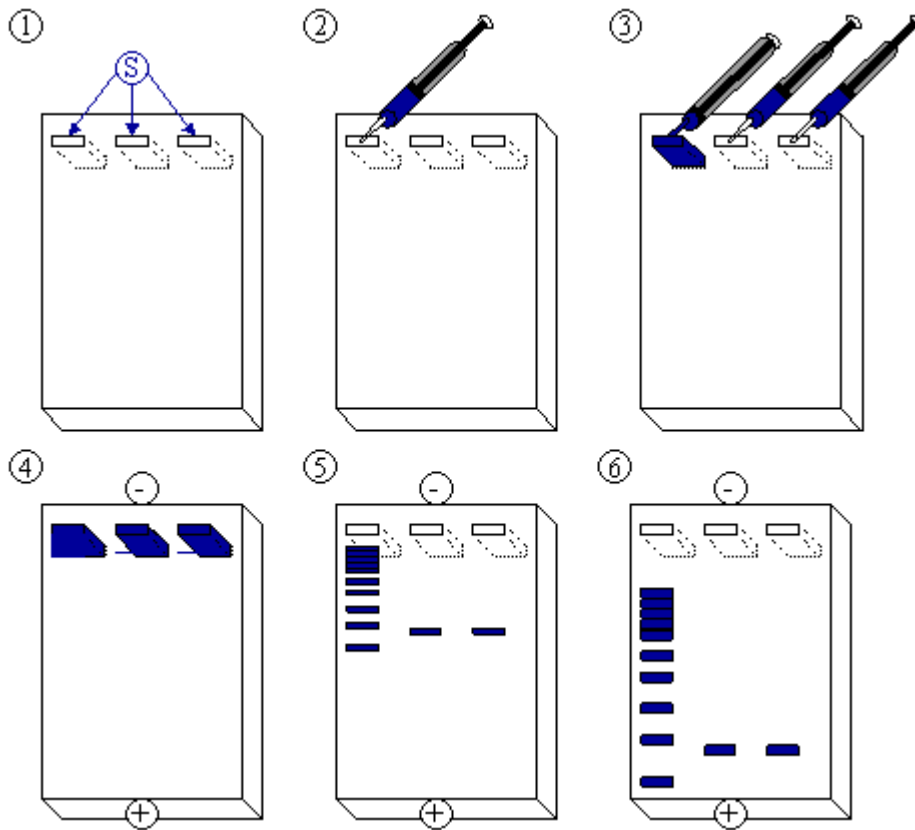
2.1.1 Agarosigeelielektroforeesi (AGE)

Agarosielektroforeesia käytetään yhtenä osana tutkittaessa geenien ekpressiotasoa. Agarosii on merileivistä eristetty sokeripolymeeri (kuva 2), joka liukenee veteen kiehua-
tettaessa. Jäähdyessään noin 45 °C:seen se muodostaa hyytelömäisen geelin. (Kumpulai-
nen 2011.)



KUVA 2. Agarosin perusrakenne (Kumpulainen 2011)

Agarosigeelielektroforeesissa RNA/DNA-näyte ajetaan geelillä sähköjännitteen avulla. Nukleehapojen kulkeutuminen geelillä perustuu siihen, että nukleehapot ovat fosfaattiryhmiensä ansioista negatiivisesti varautuneita, joten ne kulkeutuvat sähkökentässä kohti positiivista napaa. Verkkomaisen rakenteensa ansioista agarosigeelillä voidaan erotella erisuuruiset RNA/DNA-molekyylit toisistaan. Agarosigeelin verkkomainen rakenne hidastaa isompien molekyylien kulkua, jolloin pidemmät RNA/DNA-molekyylit kulkeutuvat hitaammin kuin lyhyemmät. RNA/DNA-ketjut kulkeutuvat ajon aikana niiden pituudelle ominaisella nopeudella, ja lopputuloksena on kullekin jaksolle oma vyöhyke (Kuva 3). (Haajanen, Pelkonen Pärssinen, Suominen 2010, 122–123.)



KUVA 3. Agarosigeelielektroforeesin periaate (Wipedia. 2011, hakusanalla agarosigeelielektroforeesi)

DNA- ja RNA-molekyylit eivät sellaisenaan näy agarosigeelissä, mutta fluoresoivan merkkiaineen, esimerkiksi EtidiumBromidin tai GelStarin läsnä ollessa DNA- ja RNA-molekyylit voidaan havaita UV- tai sinivalo-pöydän avulla. Koska fluoresoivat merkkiaineet eivät näy normaalivalossa on näytteeseen laitettava värillistä ajopuskuria, jotta ajoa voidaan seurata. (Haajanen, Pelkonen Pärssinen, Suominen 2010.)

2.1.2 RNA:n analysointi geelillä

RNA:n analysointi agarosigeelillä poikkeaa jonkin verran DNA:n analysoinnista. Optimaalista elektroforeesia varten RNA täytyy denaturoida. Lisäksi yksiketjuisena RNA ei muodosta kompleksia etidium-ionin kanssa yhtä helposti kuin kaksijuosteinen DNA. MOPS-puskuri/formaldehydi-ohje (liite 1) on yleisesti käytetty menetelmä RNA:n analysointiin agarosigeelillä. (Promega RNA Analysis Notebook, 4.)

2.2 *In situ* -hybridisaatio (ISH)

In situ -hybridisaatiolla saadaan informaatiota väliaikaisista ja paikallisista geenien transkriptioiden ekspressioista soluissa. Tekniikka perustuu leimattuihin nukleiinihappo-koettimiin, jotka sitoutuvat kohdespesifisesti soluissa. *In situ* -hybridisaatiossa (ISH) käytetään leimattuja DNA- tai RNA-koettimia paikallistamaan spesifisiä mRNA- tai DNA-alueita jonkin tietyn kudoksen osassa, kudoksenleikkeessä tai, jos eliö on riittävän pieni, niin jopa kokonaisessa organismissa. Yleisimmin koettimien leimaamiseen käytetään fluoresoivia merkkiaineita. Tällöin menetelmästä käytetään lyhennettä FISH. Myös erilaisia entsyymileimoja voidaan käyttää. Tavallisesti hybridisaatiota havainnoidaan fluoresenssimikroskoopilla tai elektronimikroskoopilla. (Rautio 2007, 50; Haajanen, Pelkonen Pärssinen, Suominen 2010, 203.)

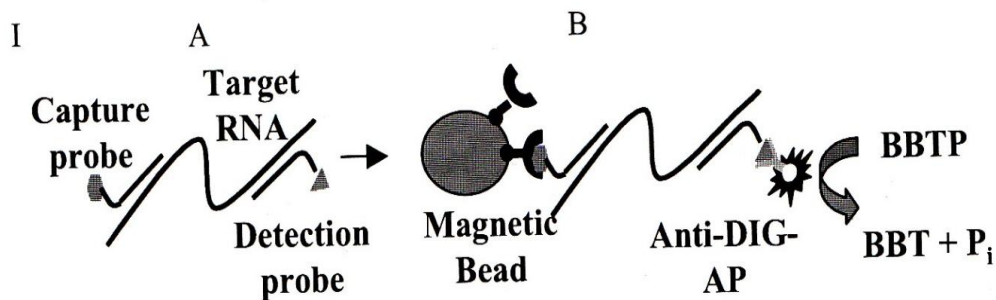
FISH:ssa kudospala tai -leike fiksoidaan mikroskooppilasille ja sen jälkeen solut käsitellään esimerkiksi proteinaasi K-entsyymillä. Proteinaasi K-entsyymi lisää solujen läpäisevyyttä, minkä seurauksena leimattu koetin pääsee helpommin solujen sisään. Hybridisaatioreaktio kestää tavallisesti yön yli. Hybridisaation jälkeen tehdään tarvittavat pesut ylimääräisten, hybridisoitumattomien koetinmolekyylien poistamiseksi. Entsyymileimoja käytettäessä tehdään tarvittava entsyymireaktio ennen tulosten tarkastelua mikroskoopilla. DNA-FISH:iä voidaan käyttää esimerkiksi *in vitro* -diagnostiikassa kromosomivaurioiden analysointiin kasvainkudoksissa. RNA-FISH:illä puolestaan tutkitaan näytteen geenien ekspressiota hybridisoimalla koetin geenin tuottaman mRNA:n kanssa. (Haajanen, Pelkonen Pärssinen, Suominen 2010, 203.)

2.3 Liushybridisaatio

Ensimmäiset transkriptien analysoimiseen soveltuvat menetelmät on kehitetty jo yli 20 vuotta sitten. Nämä menetelmät perustuivat liushybridisaatioon. Näistä menetelmistä on sittemmin kehitetty myös uusia paranneltuja, esimerkiksi sandwich-hybridisaatioon perustuvia, menetelmiä. (Rautio 2007, 50–54.)

2.3.1 Sandwich-hybridisaatio

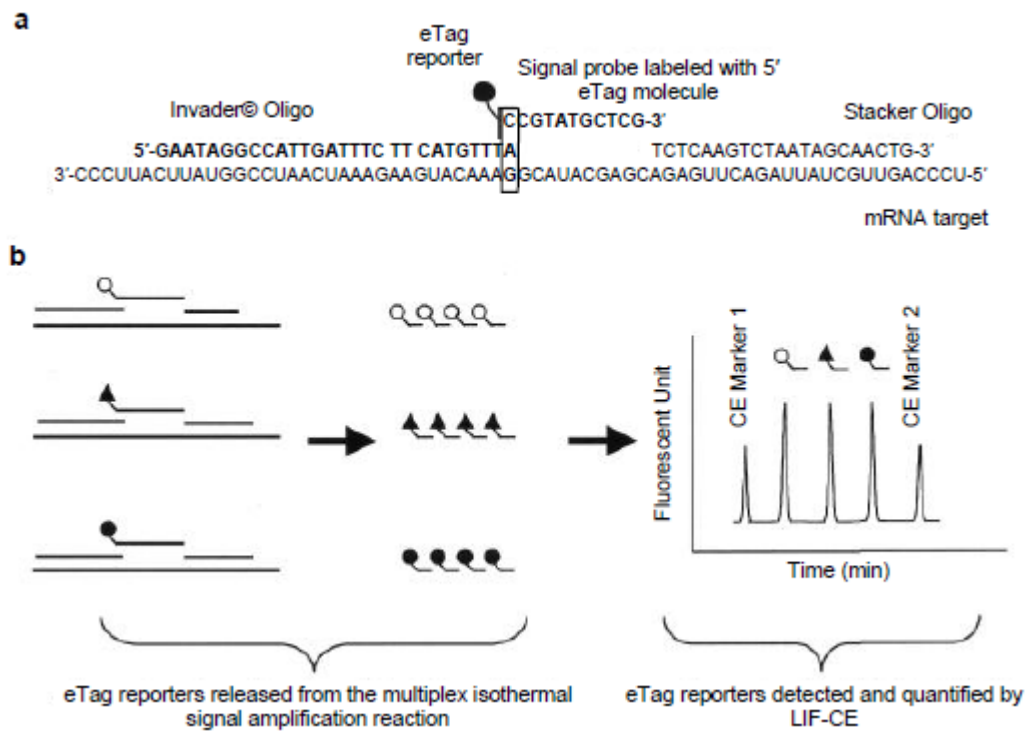
Yleinen liuoshybridisaatioon perustuva menetelmä RNA:n kvantifointiin liuoksesta on niin sanottu sandwich-hybridisaatio (kuva 4). Tässä menetelmässä kohde RNA:t hybridisoidaan koettimien (probe) kanssa. Toinen koettimista immobilisoi kohde RNA:n kiinteään pintaan (capture probe) ja toinen koettimista on varustettu leimalla joka mahdollistaa kohde RNA:n detektoinnin ja kvantifioinnin (detection probe). Hybridisaatio ja detektointi voidaan suorittaa usealla eri tavalla. Immobilisointi voidaan suorittaa joko ennen hybridisaatiota tai hybridisaation jälkeen. Immobilisoinnissa voidaan käyttää joko päällystettyjä magneettihelmiä tai kuoppalevyn pintaa. Detektointi voi perustua fluoresoiviin väriaineisiin, radioaktiivisiin leima-aineisiin tai entsyymaattisiin reaktioihin. (Rautio 2007, 50–54.)



KUVA 4. Sandwich-hybridisaation periaate (Rautio 2007, 60)

2.3.2 eTag Multiplex mRNA -menetelmä

Toinen liuoshybridisaatioon perustuva menetelmä on eTag Multiplex mRNA-menetelmä (kuva 5). Tässä menetelmässä käytetään kahta kohde-spesifistä oligonukleotidi probea (signal probe, jossa eTag-molekyylä ja Invader oligonukleotidi), jotka muodostavat invasiivisen rakenteen hybridisoitumalla mRNA:n kanssa. Stacker oligonukleotidia käytetään nostamaan sulamislämpötilaa. Cleavase, lämmönkestävä 5' nukleaasi, tunnistaa invasiivisen rakenteen ja vapauttaa eTag-molekyylin 5'-emäksestä. Vapautunut eTag toimii reporterina joka voidaan kvantitoida. Multiplexing saavutetaan kohdistamalla eri ETAG-molekyylit useille erilaisille kohdespesifisille signaalikoettimille. Kapillaarielektroforeesilla voidaan tunnistaa kohde mRNA:t migraatioaikojen perusteella. (Rautio 2007, 52–53.)



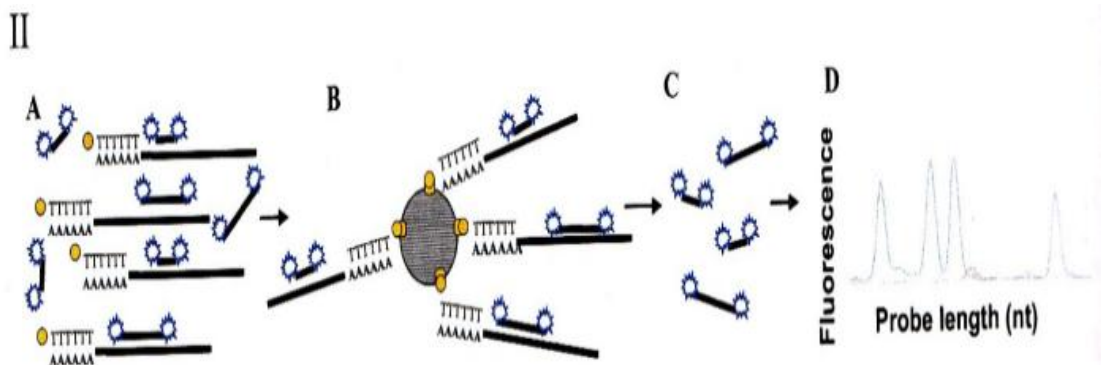
KUVA 5. *eTag multiplex mRNA -menetelmän periaate (Rautio 2007. 53)*

2.3.3 Transkript analysis with aid of affinity capture (TRAC)

Perinteiset sandwich-hybridisaatioon perustuvat menetelmät, useat mikroarray-menetelmät ja RT-PCR:ään perustuvat menetelmät ovat jo rutiinianalytiikkaa monissa diagnostisissa laboratorioissa. Nämä menetelmät eivät kuitenkaan sovellu laajamittaiseen transkriptioiden mittaukseen. Mikroarray-menetelmät ovat pääsääntöisesti kalliita eivätkä ne ole kovin herkkiä menetelmiä. RT-PCR:ään perustuvat menetelmät ovat herkkiä, mutta kärsivät suuresta kontaminaatoriskistä. Lisäksi ne tarvitsevat tarkat alukkeiden suunnittelut korkeatasoisen RNA:n valmistamiseksi. (Rautio 2007, II/1–II/2.)

Edellämainittujen menetelmien rinnalle on kehitty menetelmä nimeltä Transcript Analysis with the aid of Affinity Capture (TRAC). TRAC mahdollistaa tehokkaan geenien ekspressiotasojen mittauksen ja seurannan. TRAC perustuu liuoshybridisaatioon kohdespesifisillä koettimilla. Analyysi on nelivaiheinen. Soluista eristetty kohde RNA hybridoidaan biotin-leimattujen immobilisointi-koettimien kanssa (nämä niin sanotut affiinityprobet sitoutuvat eukariotien mRNA:ssa olevaan poly-A-sekvenssiin) ja erivärisillä

fluoresenssileimoilla varustettuja koettimia sisältävään koetinseokseen. Hybridisoidut kohde RNA:t immobilisoidaan magneettihelmien avulla, minkä jälkeen ylimääräiset sitoutumattomat koettimet pestään pois. Koettimet irrotetaan kohde RNA:sta eluoimalla, minkä jälkeen näytteet ajetaan kapilaarielektroforeesilaitteella. Sitoutuneet koettimet voidaan luokitella koon ja värileiman perusteella. Sitoutuneet koettimet tunnistetaan tietokoneohjelmalla, ja niiden perusteella lasketaan kohde RNA:n konsentraatio näytteessä. Kuvassa 6 on esitetty TRAC mittauksen toimintaperiaate. (Rautio 2007, II/1–II/2.)



KUVA 6. TRAC- menetelmän periaate (Rautio 2007, 60)

Mittaukset voidaan suorittaa esimerkiksi käyttäen ABIprims-laitetta. ABI3130xl Genetic Analyzer -laite on Applied Biosystems'in 16-kapillaari, fluoresenssipohjainen kapilaarielektroforeesilaitte. Automatisoitu Polymer Delivery System vähentää merkittävästi analyysiin tarvittavaa aikaa. Kaikki mittauksen vaiheet ovat automatisoituja, mukaan lukien polymeerien lastaus, näytteensyöttö, erottuminen, detektointi ja tietojen analysointi. (Applied Biosystems.)

Kerätyt solut suspensoidaan sopivaan määrään lyysi-puskuria ja siirretään autoklavoi- tuun lasihelmiä sisältävään mikrosentrifugiputkeen. Solut hajotetaan kuulamylyllä, esimerkiksi FastPrep-soluhomogenisaattorilla. Solulysaatit siirretään puhtaisiin eppen- dorfputkiin ja laimennetaan sopivaan solukonsentraatioon. Mittaukset voidaan tehdä suoraan solulysaatista, eikä RNA:n eristystä tarvita. Mittaukset suoritetaan 96- kuoppalevyllä. Hybridisaatioprosessi voidaan automatisoida käyttäen esimerkiksi King- Fisher 96 -laitetta. Hybridisaatioiden ja pesujen jälkeen eluentit analysoidaan kapilaa- rielektroforeesilla, jotta toisistaan erotettuja näytteitä voitaisiin vertailla ja kvantitoida

kuhunkin näytteeseen lisätään kokostandardia, esimerkiksi GeneScan-120LIZ (Rautio 2007, II/1–II/2.)

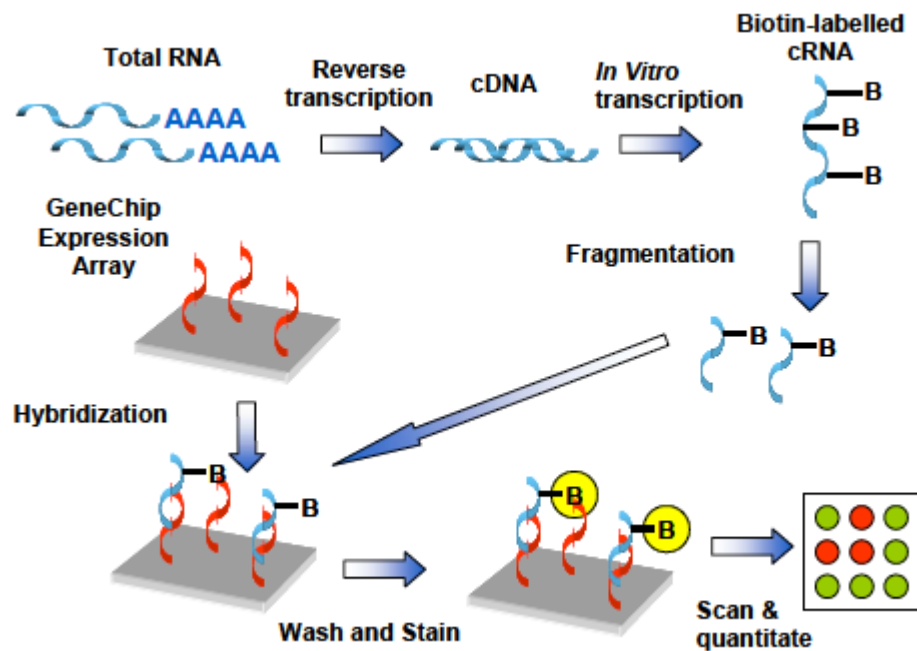
TRACille on jo olemassa useita sovelluksia. TRAC-menetelmää voidaan käyttää esimerkiksi Jari Raution väitöskirjassa tutkittujen *Trichoderma reesei* ja *Saccharomyces pastorianuksen* transkriptioiden mittaamiseen. Näiden lisäksi muita sovelluksia on kehitetty myös muille eukarioottisille mikro-organismeille kuten *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae* ja *Fusarium graminearum*. Menetelmää voidaan myös käyttää bakteerikasvustojen kvantitointiin ja onkogeneenien ekspression analysointiin paksusuolen-syöpäsolulinjoissa. (Rautio 2007, 97.)

Etenkin panimoteollisuus voi hyötyä TRAC-mittauksista ja sen tuomista eduista. TRACin mahdollistama tiheä näytteiden otto tarjoaa dynaamisen mallin geenien ekspressios-ta varsinkin kahden ensimmäisen vierteen fermentointipäivän aikana. Mittausten perusteella luodun aikaprofiilin avulla voidaan ennustaa vähintään muutamia tunteja etukä-teen, miten valittujen hiivageenien ilmentyminen ennustaa niiden fysiologisia seurauk-sia. Tämä mahdollistaa kerättyjen tietojen käytön fermentointiprosessin seurannassa ja valvonnassa. TRAC tarjoaa työkalun, jonka avulla voidaan arvioida, milloin käyminen alkaa olla valmis ja milloin säiliö voidaan täyttää uudelleen. Tiettyjen geenien seuran-nalla voidaan ennustaa myös oluen laatua (esimerkiksi väri, maku). Panimot voisivat päättää, myyvätkö käytettyä olutta sellaisenaan vai pitäisikö saatu olut sekoittaa joiden-kin toisten oluterien kanssa. TRAC:iä voitaisiin myös käyttää suunniteltaessa suuria prosesseja, joissa mahdolliset virheet voisivat tulla erittäin kalliiksi. (Rautio 2007, 95–96.)

2.4 Geenisirut

DNA-sirutekniikka perustuu niin ikään nukleiinihappojen hybridisaatioon. Geenisirut koostuvat kiinteälle alustalle kiinnitetyistä geenikoettimista, joita voi alustalla olla kymmenistätuhansista jopa miljooniin (array) Array-menetelmiä käytetään näiden pin-nalle kiinnitettyjen molekyylien ja liuoksessa olevien molekyylien välisten vuorovaiku-tusten määrittämiseen ja mittaamiseen. (Haajananen, Pelkonen Pärssinen, Suominen 2010, 206.)

Geenisirujen toimintaperiaate on seuraavanlainen: Aluksi oligonukleotidisekvenssit immobilisoidaan tai syntetisoidaan määrätuille paikoille sirun pinnalle. Sitten eristetty mRNA käännetään cDNA:ksi ja varustetaan esimerkiksi fluoresoivalla leimalla. Leimatut cDNA:t laitetaan sirulle, missä ne hybridisoituvat komplementaaristen sekvenssien kanssa. Leimatuilla näytteillä hybridisoitu siru kuvataan laserpohjaisella mikroskoopilla eli skannerilla, jolloin saadaan kuvat sirun fluoresenssista. Kunkin testipisteen, spotin, aallonpituuksien intensiteetit kuvaavat testi- ja vertailunäytteiden hybridisoitumista (kuva 7). (Rautio 2007, 44.)



KUVA 7. Geenisirun toimintaperiaate (Rautio 2007, 46)

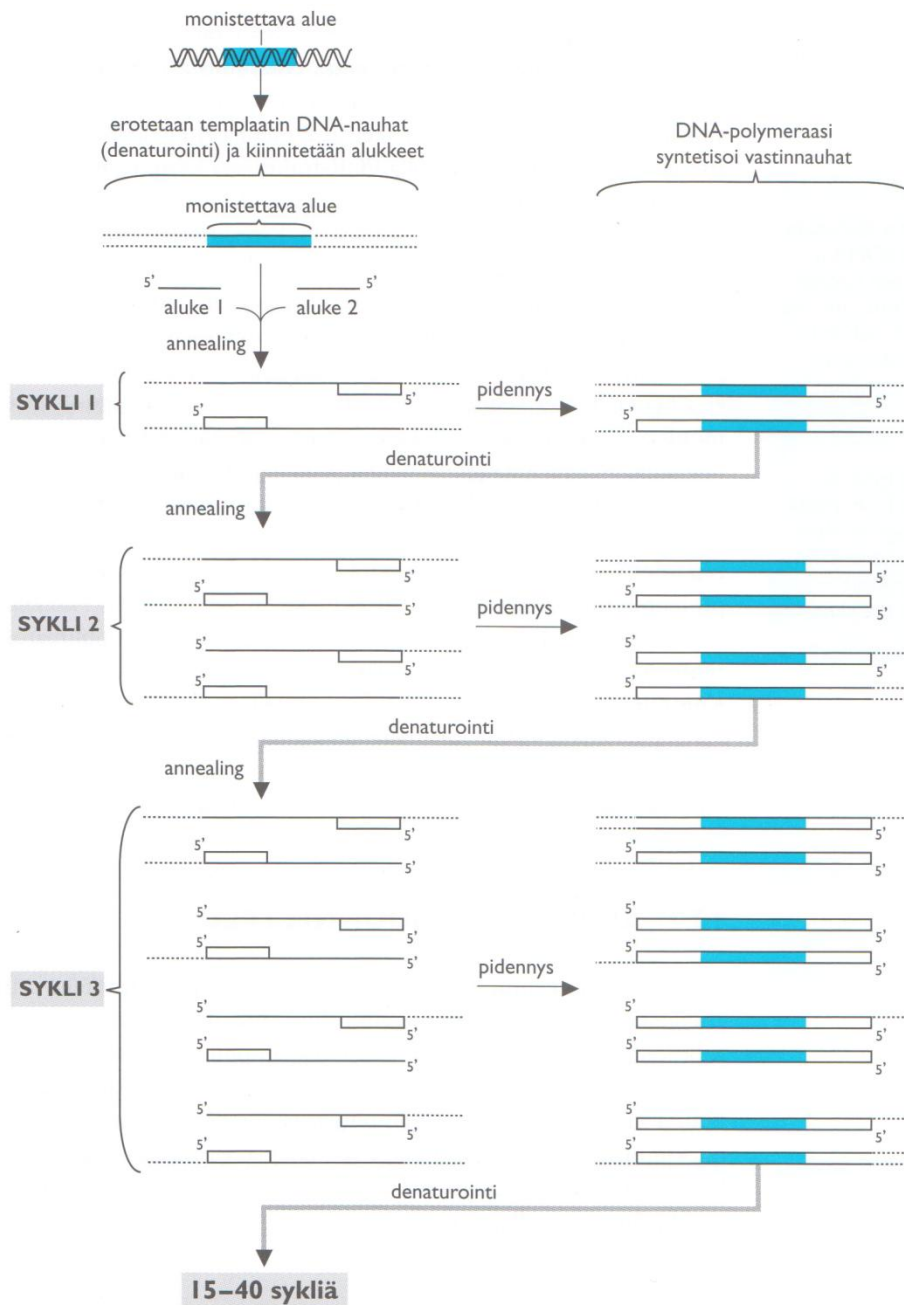
Käytettäessä vertailunäytettä ja testinäytettä menetelmästä käytetään nimeä komparatiivinen genomisen hybridisaatio (CGH). Vertailu- ja testinäytteen geenien ekspressiotasoista johtuen vastinnauhat liittyvät sirulla oleviin koettimiin eri tavoin. Tällöin saadaan kuvatuksi solun toiminnan tilaa kyseisessä näytteessä. Sitoutuneen leimatun väriaineen suhteet kuvaavat geenitoiminnan aktiivisuuden eroja testi- ja vertailunäytteissä. Näin voidaan verrata geenitoiminnan eroja esimerkiksi solun kasvaessa normaali-tilassa ja stressitilassa. (Haajanen, Pelkonen Pärssinen, Suominen 2010, 206.)

2.5 Polymeraasketjureaktio

Polymeraasiketjureaktio (PCR) tarjoaa hyvän vaihtoehdon expressiotasojen mittaamiseen. PCR:llä monistetaan DNA-jaksoja, jotka sijaitsevat kahden nukleotidijärjestykseltään tunnetun DNA-jakson eli alukkeen (primer) välissä. Reaktiot tehdään kuoppalevyillä joiden lämpötilaa kontrolloidaan tarkasti PCR-laitteessa. Myös pieniä ja ohutseinäisiä mikrosentrifugiputkia voidaan käyttää. PCR:n perusajatuksena on käyttää termostabiilia eli korkeita lämpötiloja kestäväää DNA-polymeraasia, joka ei inaktivoidu korkeissa, lähellä 100 °C:tta olevissa lämpötiloissakaan. Toinen PCR:n perusajatus on käyttää tarkalleen tunnettuja alukkeita. Alukkeet tulee suunnitella siten, että ne kiinnittyvät kaksinauhaisen DNA:n eri juosteisiin monistettavan DNA-alueen vastakkaisiin päihin. Monistettava DNA-jakso sijaitsee näiden alukkeiden välissä. (Haajanen, Pelkonen Pärsinen, Suominen 2010, 153–154.)

Yleensä templaattina toimii kaksijuosteinen DNA, mutta lähtömateriaalina voi olla myös RNA. Ensin RNA:sta tulee kuitenkin valmistaa yksijuosteinen cDNA:ta käänteis-transkriptaasilla, sitten kaksijuosteinen cDNA, minkä jälkeen tehdään varsinaiset monistusreaktiot. Tällöin menetelmästä käytetään nimeä RT-PCR (reverse transkription PCR). Jotta alukkeet voisivat sitoutua templaattiin, se pitää ensin denaturoida kuumentuskäsittelyllä jolloin nukleotidien emästen välillä olevat vetysidokset katkeavat ja vastinnauhat irtoavat toisistaan. Tuloksena on kaksi yksinauhaista DNA-juostetta. Kuumentuskäsittelyn jälkeen lämpötilaa lasketaan hetkellisesti, jolloin alukkeet tarttuvat templaatin komplementaarisiin kohtiin (annealing). Kun alukkeet ovat saaneet hetken aikaa kiinnittyä nostetaan taas lämpötilaa, jolloin DNA-polymeraasi alkaa kiinnittää reaktioseoksessa olevia nukleotideja alukkeen 3'-päästä lähtien templaatin mallin mukaisesti (pidennysreaktio, extension). Nauhan synteesi on valmis muutaman minuutin kuluttua, jolloin lämpötila nostetaan jälleen noin 95 °C:seen. Tämän seurauksena nauhat irtoavat toisistaan. Sarjaa denaturointi-annealing-pidennys kutsutaan sykliksi. Yhdessä sykliissä syntyy kahdesta DNA-nauhasta neljä nauhaa, seuraavassa sykliissä saadaan neljästä nauhasta kahdeksan nauhaa, kolmannessa sykliissä kahdeksasta 16 nauhaa jne. Kun syklejä toistetaan riittävän monta kertaa, saadaan hyvin pienestä määrästä templaattidna:ta monistettua suuri määrä tarkalleen määrätyn pituisia DNA-jaksoja. Hyvin optimoidut PCR-reaktiot ovat erittäin tehokkaita. Parhaimmillaan monistuskerroin on jopa

10^6 eli yhtä templaattimolekyyliä kohti syntyy miljoona tuotemolekyyliä. Kuvassa 8 on esitetty PCR:n toimintaperiaate. (Haajanen, Pelkonen Pärssinen, Suominen 2010, 153–154.)



KUVA 8. Polymeerasiketjureaktion periaate (Haajanen, Pelkonen Pärssinen, Suominen 2010, 157)

2.5.1 Reaaliaikainen PCR

Perinteisessä PCR-menetelmässä tehdään ensin monistusreaktiot ja sen jälkeen otetaan reaktioseoksesta näyte, joka analysoidaan esimerkiksi AGE:lla. Reaaliaikaisessa PCR:ssä (real-time PCR) syntyvän tuotteen määrää voidaan seurata koko ajan reaktion edetessä käyttäen merkkiaineena fluoresoivaa merkkiainetta. Väriaineen fluoresenssisignaali vahvistuu sitoutuessaan valmistuvaan kaksinauhaiseen PCR-tuotteeseen. Ajon aikainen seuranta vaatii uudenlaista mittaamiseen kykenevää laitetta. Nykyiset laitteet pysyvät mittaamaan jopa kuutta eri väriä. (Haajanen, Pelkonen Pärssinen, Suominen 2010, 166–169.)

Signaalit saadaan mitattaviksi esimerkiksi fluoresoivan värin, SYBR GREEN, avulla. Tämä väri sitoutuu kaksinauhaiseen DNA:han muuttuen voimakkaammin fluoresoivaksi, ja näin signaalin vahvuus korreloi DNA:n määrää. Sitoutumaton väri ei juuri fluoresoi. Haittana SYBR-värillä on sen epäspesifisyys. Väri sitoutuu kaikkeen kaksinauhaiseen DNA:han eikä vain kohde DNA:han. (Haajanen, Pelkonen Pärssinen, Suominen 2010, 167.)

PCR on erittäin herkkä menetelmä. Muutamasta DNA- tai RNA-molekyylisestä voidaan saada monistettua jopa miljoonia kopioita, jotka voidaan detektoida. Herkkyys on myös yksi PCR:n haittapuolista. Hyvin pienetkin muutokset näytteessä, sen käsittelyssä PCR-oloissa voivat muuttaa tulosta dramaattisesti. Lähtökohtaisesti PCR ei siis ole kovin hyvä menetelmä kvantitatiiviseen työskentelyyn. Ratkaisu tähän ongelmaan on käyttää kaikkien tutkittavien näytteiden mukana kilpailevana templaattina toimivaa sisäistä standardia. (Haajanen, Pelkonen Pärssinen, Suominen 2010, 167.)

2.5.2 PCR:n sovellukset bioprosessien seurannassa

Kvantitatiivinen reaaliaikainen PCR (qPCR) onkin nykyisin erittäin suosittu PCR-menetelmä. Erityisesti kliinisessä *in vitro* -diagnostiikassa kehitetään jatkuvasti uusia määrittämenetelmiä. Kvantitointi voi olla suhteellista tai absoluuttista. Suhteellisessa kvantitoinnissa kohdegeenin määrää verrataan referenssigeenin määrään. Referenssigeenin tulee olla kaikissa näytteissä ja sen käyttäytyminen tulee olla vakaata eri kudok-

sissa ja olosuhteissa. Absoluuttisessa kvantitoinnissa verrataan oman tuotteen kopiointisuhdetta tunnettuun kohteeseen. (Haajanen, Pelkonen Pärssinen, Suominen 2010, 169–170.)

Reaaliaikaista PCR:ää voidaan käyttää fermentointien seuraamiseen, esimerkiksi maitohappobakteerien kvantitointiin viinien fermentoinneissa ja 17 *Clostridium thermocellum* geenien ekspression kvantitointiin etanolin tuotossa selluloosasta tai sellubioosista. Nämä menetelmät käyttävät pääasiassa SYBR GREEN I väriainetta, koska se on yksinkertaisempi ja edullisempi määrittäminen verrattuna geeni-spesifisiin koettimiin. PCR on kuitenkin erittäin herkkä ulkopuolisille kontaminaatioille, ja se vaatii tarkkaa alukkeiden suunnittelua korkeatasoisen RNA:n aikaan saamiseksi. Tästä syystä se soveltuu jokseenkin huonosti laajamittaisempaan käyttöön erilaisten bioprosessien seurannassa. Reaaliaikaisesta PCR:stä on kuitenkin kehitetty joitakin nopeita menetelmiä, joilla saadaan tuloksia jopa kahdessa tunnissa. Lisäksi jotkin tutkimukset osoittavat, että näytteitä voitaisiin analysoida niin, ettei RNA:ta tarvitsisi välttämättä eristää. Reaaliaikaiseen PCR:ään perustuvat laitteet ja menetelmät kehittyvät jatkuvasti. Nopea multiplex detektointi yhdistettynä näytteenkäsittelyyn voi tehdä reaaliaikaisesta PCR:stä potentiaalisen nopean diagnostisen at-line-menetelmän bioprosessien analysointiin. (Rautio 2007, 49–50.)

3 RNA:N ERISTÄMINEN HERKKYYS- JA LINEAARISUUSMITTAUKSIA VARTEN

Tarkoituksena oli ensin testata mittauksissa käytettävän ABI3130xl Genetic Analyzer – laitteen herkkyys ja lineaarisuus. Tätä varten eristettiin totaali RNA:ta aikaisemmin tehdyistä fermentoinneista kerätyistä *Pichia pastoris* -hiivan soluista (taulukko 1) käyttäen Qiagen RNeasy Minikittiä (catalogue No:74106). Solut olivat pakastettuina -70 °C:ssa solupelletteinä.

TAULUKKO 1. RNA:n eristykseen käytetyt fermentoinneista kerätyt solupelletit

Sample	cell wet weight (mg/ml)	Sample vol. (ml)	cell wet weight in eppie (mg)	note
6.5	46	1	46	for lysate
6.6	39	1	39	for lysate
7.5	36	1	36	for lysate
7.6	40	1	40	for lysate
8.5	45	1	45	for lysate
8.6	38	1	38	for lysate
9.5	44	1	44	for lysate
9.6	43	1	43	for lysate
4.23	137	1	137	cell pellets for probes
4.24	147	1	147	cell pellets for probes

RNA:n eristäminen tehtiin liitteen 2 ohjeiden mukaisesti. Solupelletit sulatettiin +37 °C:ssa vesihauteessa muutaman minuutin ajan. Ennen varsinaista eristystä solupelletit tuli hajottaa. Pelletit hajotettiin käyttäen FastPrep-kuulamylyä. Tätä varten punnittiin ja autoklavoitiin etukäteen mikrosentrifugiputkiin 1,6 g 450–600 µm:n suuruisia lasihelmiä (Sigma). Sulaneisiin solupelletteihin pipetoitiin 600 µl RLT-puskuria (sisälsi lisätyn β-merkaptometanolin) ja solut suspensioitiin huolellisesti vorteksoimalla. Solususpensiot pipetoitiin lasihelmiä sisältäviin mikrosentrifugiputkiin. Solut hajotettiin kuulamylyllä 45 sekunnin ajan nopeudella 6,5 m/s. Hajotuksen jälkeen näytteet siirrettiin jäihin ja lasihelmien annettiin laskeutua pohjaan. Solulysaatit siirrettiin uusiin eppendorffputkiin ja sentrifugoitiin huoneenlämmössä kahden minuutin ajan täydellä nopeudella. Supernatantit siirrettiin uusiin eppendorffputkiin ja lisättiin vastaava tilavuus 70-prosenttista etanolia lyaattiin ja sekoitettiin pipetoimalla. Liuos pipetoitiin RNeasy Minipylväeseen ja

asetettiin pylväs 2 ml:n keräysputkeen. Sentrifugoitiin huoneenlämmössä 30 sekunnin ajan täydellä nopeudella. Läpi mennyt liuos kaadettiin jätteisiin ja lisättiin pylvääseen 700 µl RW1-puskuria ja sentrifugoitiin huoneenlämmössä 30 sekunnin ajan täydellä nopeudella. Pylväs siirrettiin uuteen keräysputkeen, lisättiin pylvääseen 500 µl RPE-puskuria ja sentrifugoitiin huoneenlämmössä 30 sekunnin ajan täydellä nopeudella. Pylvääseen lisättiin toiset 500 µl RPE-puskuria ja sentrifugoitiin huoneenlämmössä kolmen minuutin ajan täydellä nopeudella. Pylväs siirrettiin uuteen epperdorffputkeen ja pipetoi-
ttiin 50 µl RNAasi-vapaata vettä suoraan silikamembraanin päälle, sentrifugoitiin huoneen lämmössä yhden minuutin ajan täydellä nopeudella. Läpimennyt liuos sisälsi eristetyn RNA:n

Eristetystä RNA:sta tehtiin puhtausanalyysit käyttäen NanoDrop-laitetta. Nanodropilla tehdyt mittaukset osoittivat eristetyn RNA:n olevan jotakuinkin puhdasta. A260/A280-suhde oli välillä 2,10 - 2,13 (taulukko 2).

TAULUKKO 2. NanoDrop-mittaukset eristetyistä RNA-näytteistä

Sample ID	Date	Time	ng/µl	A260	A280	260/280
6.5	23.8.2011	9:51	362,21	9,055	4,162	2,18
6.6	23.8.2011	9:52	239,52	5,988	2,754	2,17
7.6	23.8.2011	9:53	435,44	10,886	5,013	2,17
8.5	23.8.2011	9:56	254,33	6,358	2,899	2,19
9.5	23.8.2011	9:57	65,36	1,634	0,816	2,00
9.6	23.8.2011	9:59	68,75	1,719	0,846	2,03

Eristetyt RNA:t siirrettiin -70 °C:seen ja lähetettiin seuraavana päivänä kuivajäihin pakattuna Helsinkiin TRACin toimittajalle. RNA-näytteiden mukana lähetettiin myös muutama solupelletti. Tarkoituksena oli että TRACin toimittaja rakentaisi näytteiden perusteella mittauksissa tarvittavat koettimet ja testikitin jonka avulla suoritettaisiin testausmittaukset.

Tarkoituksena siis oli testata ja ottaa käyttöön TRAC-menetelmä Bioprosessiteknikan laboratoriossa. TRACin toimittajasta johtuvista toimitusvaikeuksista johtuen testi- ja mittauskittejä ei saatu toimitettua määräajassa, mistä johtuen opinnäytetyötä ei pystytty tekemään suunnitellusti. Aikaa oli kuitenkin kulunut jo lähes puolitoista kuukautta ja

toriaosuus oli lähes vamis, minkä vuoksi ei koettu järkeväksi vaihtaa opinnäytetyön aihetta. Työnaiheen vaihtamisen sijaan päätettiin laajentaa työ koskemaan geenien ekspressiotasojen mittaamenetelmiä yleisemmin ja tehdä työstä tutkimuskatsaus kirjallisuuslähteiden pohjalta.

TRACin toimittajalle lähetetyt RNA-näytteet eivät kuitenkaan menneet hukkaan. Näytteet ovat tallessa ja niiden perusteella on tarkoitus rakentaa TRAC-mittauksissa tarvittavat kitit ja menetelmä aiotaan edelleen ottaa jossain vaiheessa käyttöön bioprosessiteknikan laboratoriossa.

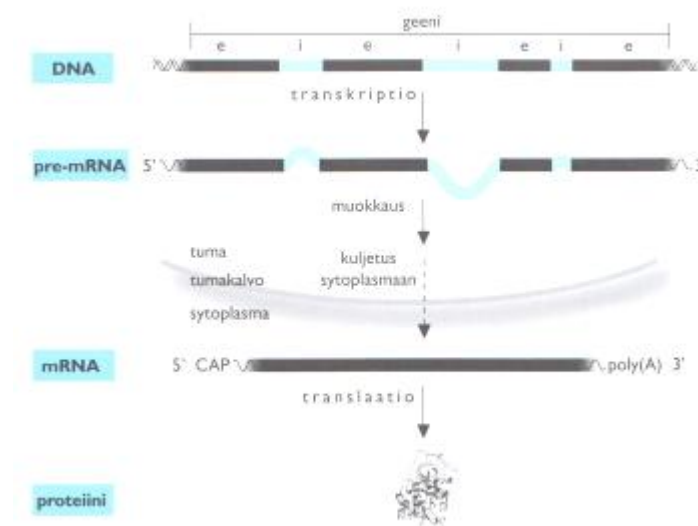
4 RNA EKPRESSIOTASOJEN MITTAUKSISSA

Geenien ekspressiotasojen mittausten menetelmät perustuvat pääosin mRNA:n mittauksiin ja havainnointiin. Geenit sijaitsevat kromosomien DNA:ssa. DNA sisältää kaiken tarvittavan informaation kaikkien RNA-tyyppien muodostamiseksi. DNA-jaksoja, joiden informaatio kopioidaan transkriptiossa RNA:lle, kutsutaan koodaavaksi DNA:ksi. Klassiset RNA:n perustyyppit ovat lähetti-RNA (mRNA), siirtäjä-RNA (tRNA) sekä ribosomaalinen-RNA (rRNA). Transkriptiossa DNA:n sisältämä informaatio (emäsjärjestys, nukleotidisekvenssi) välittyy RNA:lle. mRNA toimii informaation välittäjänä DNA:n ja proteiinien välillä. tRNA ja rRNA toimivat myös translaatiossa, mutta vain mRNA:n kopioitunut informaatio siirtyy translaatiossa proteiineille. Näiden lisäksi on havaittu kahta muuta RNA-tyyppiä siRNA ja mikro-RNA (miRNA tai μ RNA). Näiden tehtävät liittyvät ilmeisesti moniin solun geneettisiin prosesseihin, esimerkiksi geenien ekspression säätelyyn. (Haajanen, Pelkonen Pärssinen, Suominen 2010, 29–31.)

Sama geeni voi koodata useampia proteiineja. Tämä on mahdollista intronien vaihtoehdoilla silmukoinneilla sekä proteiinien synteessin erilaisilla muokkausreaktioilla. Geenejä koodaavien DNA alueiden välissä on ei-koodaavaa DNA:ta. Suurin osa tästä DNA:sta ei ehkä toimi mitenkään aktiivisesti, mutta kaikkia sen mahdollisia toimintoja ei vielä tunneta. Eukariotella jopa valtaosa koko genomista voi olla tällaista ei-koodaavaa DNA:ta. Eukariotella ja arkkeliöillä on geeneissä itsessäänkin koodaamattomia DNA-alueita, introneita, jotka poistetaan mRNA:sta silmukoinnilla ennen translaatiota. Bakteereilla ei ole geeneissään tällaisia koodaamattomia DNA-jaksoja. (Haajanen, Pelkonen Pärssinen, Suominen 2010, 29–31.)

Eukarioteilla tumakalvo erottaa transkriptio- ja translaatiotapahtumat toisistaan sekä ajallisesti, että paikallisesti (kuva 9). Transkriptiossa tumassa sisällä oleva DNA kopioituu aluksi hnRNA:ksi (heterogenous nuclear RNA). Proteiineja koodaavien geenien tuottama pre-mRNA siirretään sytoplasmaan translaatiota varten, ja samalla geeneissä olevat intronialueet poistetaan silmukoimalla. pre-mRNA:n 5'-päähän liitetään muokkauksen aikana myös mRNA:ta stabiloiva ja ribonukleaaaseilta suojaava ns. CAP-rakenne. pre-mRNA:n 3'-päähän liitetään lisäksi poly(A)-häntä myös poly(A)-hännän tehtävänä

on suojata mRNA:ta ribonukleaaseilta. Lisäksi sillä on tärkeitä tehtäviä transkription lopetuksessa, mRNA:n kuljetuksessa tumasta sytoplasmaan sekä translaatiossa. Näiden muokkausreaktioiden ja sytoplasmaan kuljetuksen jälkeen transkriptiotuote on valmista mRNA:ta, joka sisältää vain geenin koodaavat alueet. Translaatio käynnistyy vasta siten, kun mRNA muokattu valmiiksi ja se on kuljetettu sytoplasmaan. Myös rRNA ja tRNA läpikäyvät erilaisia muokkausreaktioita, ennen kuin ne ovat valmiita toimimaan translaatiossa. (Haajanen, Pelkonen Pärssinen, Suominen 2010, 29–31.)

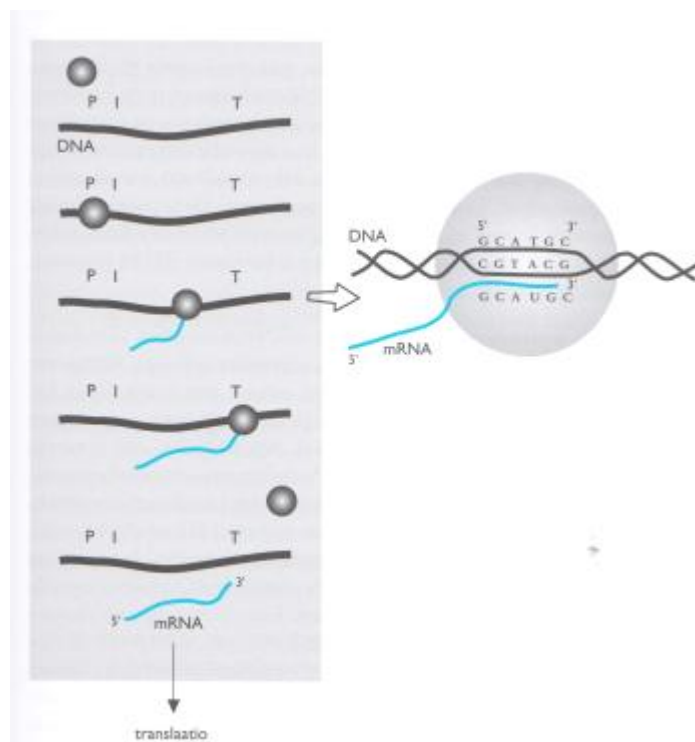


KUVA 9. Eukariotien transkriptio (Haajanen, Pelkonen Pärssinen, Suominen 2010, 31)

Transkriptiossa RNA-polymeraasi syntetisoi RNA:ta käyttäen DNA:ta templaattina. Kumpi tahansa kaksinauhaisen DNA:n juosteista voi koodata yksittäisen geenin informaatiota. Juostetta, joka toimii templaattina, kutsutaan kyseisen geenin ei-koodaavaksi juosteeksi. Kumpikin DNA:n juoste voi siis toimia templaattina, mutta yhdessä geenissä vain toinen niistä. Esimerkiksi vierekkäisiä geenejä saattavat koodata DNA:n eri nauhat, tällöin niiden transkriptio- eli lukusuunta on toisilleen vastakkainen. Lähtöaineina RNA-polymeraasi käyttää ribonukleosiditrifosfaatteja samaan tapaan kuin DNAn replikaatiossakin. (Haajanen, Pelkonen Pärssinen, Suominen 2010, 29–31.)

Ennen varsinaisen transkription alkua RNA-polymeraasi sitoutuu geenin ylävirta-alueella sijaitsevaan promoottoriin. Transkriptio alkaa promoottorialueella tarkalleen määrätystä aloitus- eli initaatiokohdasta. Muodostuneessa transkriptiokompleksissa

DNA:n kaksoiskierre on avautunut ja toinen juosteista toimii mallina RNA:n muodostumiselle. RNA-polymeraasi liikkuu pitkin DNA:ta ja lukee samalla DNA:n nukleotidijärjestystä. DNA:n informaation mukaisesti RNA-juosteeseen lisätään uusia ribonukleotideja. Transkriptiokompleksin ohitettua kunkin kohdan DNA:ssa DNA sulkeutuu jälleen kaksoiskierteeksi. Kun DNA:ssa tulee vastaan lopetus- eli terminaatioalue, RNA-polymeraasi ja RNA irtoavat transkriptiokompleksista. Muodostunut RNA siirtyy translaatioon ja RNA-polymeraasi on vapaa aloittamaan seuraavan transkriptiotapahtuman (kuva 10). (Haajanen, Pelkonen Pärssinen, Suominen 2010, 29–31.)



KUVA 10. Transkriptioyksikkö ja transkriptiokompleksin rakenne (Haajanen, Pelkonen Pärssinen, Suominen 2010, 33)

5 RNA:N ERISTYS

RNA:ta, erityisesti mRNA:ta eristetään muun muassa cDNA-kirjastojen valmistusta varten. mRNA on erittäin nopeasti hajoavaa; yleensä sen elinikä soluissa on vain muutamia minutteja, ja sitä on solun kokonais-RNA:sta joitakin prosentteja. Lisäksi solun omat RNAsit pilkkovat eristettävää RNA:ta. RNAaseja löytyy myös lähes kaikkialta ympäristöstä ja ne ovat erittäin vaikeasti inaktivoitavissa. (Haajanen, Pelkonen Pärssinen, Suominen 2010, 108–109.)

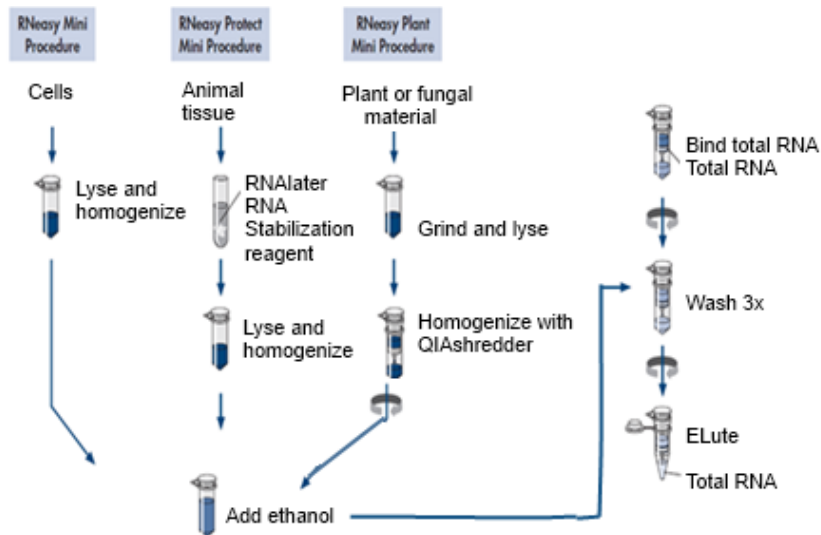
RNA:n eristys aloitetaan eristämällä solujen kokonais-RNA. Saadussa preparaattissa on yleensä jäljellä jonkin verran DNA:ta, josta voidaan päästä eroon käsittelemällä näyte RNAasivapaalla DNAasi I:llä. Lisäksi on saatavilla kaupallisten reagenssivalmistajien tarjoamia erikoismenetelmiä DNA:n poistamiseksi selektiivisesti RNA-raakauutteesta ilman DNAasikäsittelyä. Useimmiten käytetyt mRNA:n eristysmenetelmät perustuvat kudosten tai viljeltyjen solujen nopeaan hajotukseen guanidiinitiosyanaatin tai guanidiini-isotiosyanaatin läsnä ollessa. Esikäsitellyt solut hajoavat näissä liuoksissa lähes välittömästi ja samalla myös RNAsit inaktivoituvat. Bakteerisoluille voidaan käyttää solujen hajotukseen detergenttejä (esimerkiksi SDS Triton X-100) ja ultraäänikäsitelyä. Solujen hajotuksen jälkeen seuraa usein proteiinien poisto fenoli-kloroformiuutolla. DNA poistetaan tapauksesta riippuen DNAasi I-käsittelyllä tai RNA:n selektiivisellä LiCl-saostuksella. (Haajanen, Pelkonen Pärssinen, Suominen 2010, 108–109.)

RNA:n eristyksessä ja puhdistuksessa ollaan siirtymässä hankalien uuttojen sijaan siliakantajaperustaisiin menetelmiin. Kaupallisilta valmistajilta on lisäksi saatavilla muun muassa omia hajotuspuskureita ja muita erikoisreagensseja. Lisäksi sekä spin-kolonne, vakuumi-imu, että kuoppalevyformaatteja on saatavilla. Nämä yhdessä monikäyttöisten liuostenkäsittelytyöasemien kanssa mahdollistavat RNA:n eristysten ja puhdistusten automatisoinnin. (Haajanen, Pelkonen Pärssinen, Suominen 2010, 108–109.)

5.1 RNA:n eristäminen spin-kolonnilla

RNA:n eristämiseen voidaan käyttää siihen varta vasten suunniteltuja kaupallisia kittejä, esimerkiksi Qiagenin RNeasy Mini Kittä. RNeasy Mini Kit on suunniteltu RNA:n eristämiseen pienistä määristä lähtömateriaalia. Se mahdollistaa yksinkertaisen ja nopean menetelmän valmistaa puhdasta ja korkealaatuista RNA:ta pienestä näytemäärästä. Kitti soveltuu totaali-RNA:n eristämiseen eläinsoluista- ja kudoksista ja hiivoista sekä RNA:n puhdistamiseen RNA-raakauutteista. RNeasy Kittä voidaan myös käyttää RNA:n eristämiseen bakteerisoluista, tällöin on kuitenkin suositeltavaa käyttää sitä yhdessä RNeasy Protect Mini Kitistä saatavan Bacteria Reagentin kanssa, mikä mahdollistaa *in vivo* RNA:n stabilisaation ja varmistaa luotettavan geenien ekspressioanalyysin. Puhdistettu RNA on valmista sellaisenaan myöhempää käyttöä varten. (Qiagen RNeasy Mini Kit Handbook.)

RNA:n eristäminen RNeasy Mini Kitillä perustuu silica-pohjaisen membraanin selektiivisiin sitomisominaisuuksiin ja korkeanopeuksiseen microspin teknologiaan. Aluksi solut hajotetaan ja homogenisoidaan denaturoivassa guanidine-thiocyanate-puskurissa. Guanidine-thiocyanate-puskuri denaturoi RNA:ta ja varmistaa että eristetty RNA säilyy vahingoittumattomana. Näytteeseen lisätty etanoli mahdollistaa RNA:n sitoutumisen silika-membraaniin. Näyte siirretään RNeasy Mini spin-kolooniin, ja sentrifukoidaan, jolloin RNA sitoutuu kolonnissa olevaan membraaniin ja epäpuhtaudet peseytyvät pois. Näytettä pestään vielä muutaman kerran. Lopuksi puhdistettu RNA eluoidaan pois kolonnista käyttäen RNAasi-vapaata vettä. Kuvassa 11 on esitetty RNeasy Mini Kitin toimintaperiaate. (Qiagen RNeasy Mini Kit Handbook.)



KUVA 11. RNeasy Mini Kitin toimintaperiaate (Qiagen RNeasy Mini Kit Handbook)

5.2 Työskentely RNA:n kanssa

Ribonukleaaseja ja RNAaseja löytyy lähes joka paikasta. Ne ovat erittäin kestäviä ja vaikeasti inaktivoitavissa. Työskenneltäessä RNA:n kanssa onkin kiinnitettävä erityishuomiota ribonukleaasi vapaaseen ympäristöön. On erittäin tärkeää pyrkiä säilyttämään RNAasi-vapaa ympäristö koko työskentelyn ajan. (Promega.RNA Analysis Notebook, 2.)

Yleisin RNAasi kontaminaatiolähde on paljaat kädet (iho), myös bakteerit ja homeet jotka voivat olla läsnä laboratorion ilmassa tai lasitarvikkeissa sisältävät RNAaseja. Kontaminaatioita voidaan pyrkiä välttämään käyttämällä hanskoja koko työskentelyn ajan ja kiinnittämällä huomiota steriilitekniikkaan valmistettaessa reagensseja RNA-työskentelyyn. Steriilejä, kertakäyttöisiä muovitarvikkeita tulisi käyttää aina kun se on mahdollista. Yleisesti ottaen nämä tarvikkeet ovat RNAasivapaita, eivätkä ne näin ollen vaadi esikäsitteilyä RNAasien inaktivoimiseksi. RNA-työskentelyyn tulisi käyttää vain siihen varattuja kemikaaleja ja kemikaalit tulisi säilyttää erillään muista kemikaaleista. Lasiset ja muut ei-kertakäyttöiset tarvikkeet tulee esikäsitellä ennen käyttöä. Tällä varmistetaan se, etteivät ne sisällä RNA:ta tuhoavia RNAaseja. Lasiastiat kuumennetaan 250 °C:ssa yön yli. Muovitarvikkeet voi huuhdella 0,1 M NaOH/1 mM EDTA:lla ja sen jälkeen vielä DEPC-käsitellyllä vedellä. DEPC-käsittelyssä esimerkiksi veteen lisätään DEPC:tä (Dietyylipyrokarbonaatti), ja liuoksen annetaan seistä yön yli seuraavaan päi-

vään. Liuos autoklavoidaan ylimääräisen DEPC:n poistamiseksi. (Promega.RNA Analysis Notebook, 2.)

Punnitsemisessa on käytettävä hanskoja ja välineitä, joihin ei ole koskettu paljain käsin. Pelkästään autoklavointi ei ole riittävä menetelmä inaktivoimaan RNAaseja. Kaikki liuokset tulisi käsitellä DEPC:llä ja autoklavoida seuraavana päivänä ylimääräisen DEPC:n poistamiseksi. On kuitenkin huomioitava, että Tris-pohjaisia puskureita ei voi käsitellä DEPC:llä. DEPC reagoi vapaiden aminoryhmien kanssa, minkä johdosta Tris menettää puskurointitehonsa. Työskentelyssä on käytettävä RNAasi vapaaksi todettua Trisiä ja DEPC-käsiteltyä tai nukleasivapaata vettä Tris-puskureiden valmistukseen. DEPC:tä ei enää saa olla läsnä valmiissa RNA-preparaatissa. Ylimääräisestä DEPC:stä päästään eroon huuhtelemalla välineet runsaalla DEPC-käsitellyllä steriilillä vedellä tai autoklavoimalla DEPC-käsitellyt liuokset. DEPC hajoaa autoklavoidessa hiilidioksidiksi ja etanoliksi. DEPC:n käytön haittapuolena on sen myrkyllisyys. Saatavilla on myös tehokkaita kaupallisia RNAasi-inhibiittoreita jotka ovat tehokkaita ja turvallisia käyttää (Promega RNA Analysis Notebook, 2–3.)

5.3 RNA:n pitoisuuden ja puhtauden määrittäminen

Nukleiinihappojen pitoisuutta ja puhtautta voidaan määrittää UV-spektrofotometrillä mittaamalla näytettä aallonpituuksilla 260 nm ja 280 nm. käyttäen nollaliuoksena vettä tai puskuria johon eristetyt nukleiinihapot on liuotettu. Analysointiin voidaan käyttää NanoDrop-laitetta, joka antaa suoraan näytteiden DNA- tai RNA pitoisuuden, mutta nukleiinihappojen pitoisuus voidaan myös laskea aallonpituudella 260 nm seuraavasti:

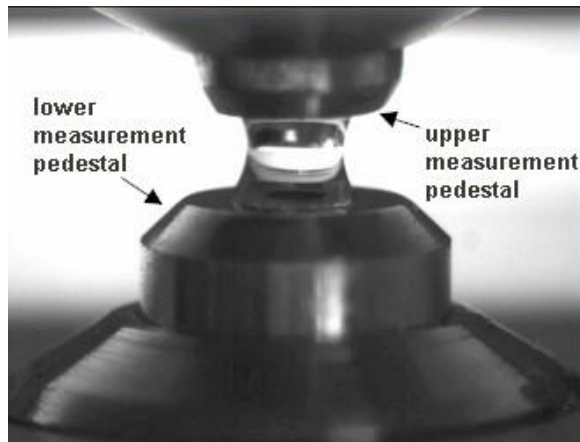
yksijuosteinen DNA: $A_{260} \cdot 1 = 33 \mu\text{l/ml}$

kaksijuosteinen DNA: $A_{260} \cdot 1 = 50 \mu\text{l/ml}$

yksijuosteinen RNA: $A_{260} \cdot 1 = 40 \mu\text{l/ml}$

$A_{260}/280$ -suhde ilmoittaa nukleeiinihaponäytteen puhtauden, sillä proteiineilla on absorptiomaksimi aallonpituudella 280 nm ja nukleiinihapoilla 260. Puhtaalle DNA:lle $A_{260}/280$ -suhde on noin 1,8 ja puhtaalle RNA:lle noin 2,0. (Kumpulainen 2011.)

Nanodrop-laitteella voidaan luotettavasti mitata 2–3700 ng/ μ l nukleehappopitoisuuksia ilman että näytettä tarvitsee laimentaa. Näytetilavuutena käytetään 1–2 μ l. Näyte pysyy paikoillaan pintajännityksen ansioista. Näytepisara muodostaa pylvään ja ”siltaa” kaksi optista kuitua toisiinsa (kuva 12). Näytesillan muodostuminen ja se että näyte peittää kunnolla näytepedestaalit on erittäin tärkeää mittauksen onnistumisen ja luotettavuuden kannalta. (NanoDrop ND-1000 User’s Manual.)



KUVA 12. Näytesillan muodostuminen näytepedestaalien välille (NanoDrop ND-1000 User’s Manual)

6 POHDINTA

Opinnäytetyö poikkesi jonkin verran alan tyypillisistä opinnäytetöistä. Käytännön osuudessa aiheutuneista viivästyksistä johtuen päädyttiin tekemään kirjallisuuskatsaus geenien ekspressiotasojen mittaamenetelmistä. Kirjallisuuskatsauksen avulla sain syvennettyä tietojani erilaisista menetelmistä, joiden avulla voidaan seurata geenien ilmentymistä soluissa ja monitoroida erilaisia bioprosesseja. Kirjallisuuden avulla syvensin tietojani myös niistä periaatteista joihin nämä menetelmät perustuvat. Mielestäni onnistuin poimimaan oleellisen teorian tiedon erilaisista geenien ekspressiotasojen mittaamenetelmistä ja periaatteista joihin nämä menetelmät perustuvat.

Opinnäytetyön käytännönsuuden peruuntuminen laski hetkellisesti kirjoittamismotivaatiota. Kirjoittamisprosessi oli kuitenkin opettavainen kokemus. Käytetyt materiaalit olivat pääosin englanninkielisiä, mikä ei sinällään ole ongelma, mutta tieteellisessä tekstissä käytetty terminologia ja tieteellisen tekstin fraasit ovat minulle outoja. Tämä teki tekstin suomentamisesta ja kirjoittamisesta haasteellista.

LÄHTEET

Aittomäki, Esa – Eerikäinen Tero – Leisola, Matti – Ojamo, Heikki – Suominen, Ilari – von Weymarn, Niklas 2002. Bioprosessitekniikka, Porvoo: WS Bookwell Oy.

Applied Biosystems. Applied Biosystems 3130 and 3130xl Genetic Analyzers. Sytem profile. Saatavissa:

http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_marketing/documents/generaldocuments/cms_041990.pdf. Hakupäivä 25.8.2011.

Haajanen, Kari – Pelkonen, Jani – Pärssinen, Raimo – Suominen, Ilari 2010. Geenitekniikka, Turku: Turun ammattikorkeakoulu.

Hakala, Eija 2009. T420208 Kromatografia 2, 8 op. Opintojakson kurssimateriaa-lit ja laboratoriotöiden työohjeet lukuvuonna 2009–2010. Oulu: Oulun seudun ammattikorkeakoulu, tekniikan yksikkö.

Kumpulainen, Elsa 2011. T460206, Geenitekniikan menetelmät, 6 op. Opintojakson kurssimateriaalit ja laboratoriotöiden työohjeet lukuvuonna 2010–2011. Oulu: Oulun seudun ammattikorkeakoulu, tekniikan yksikkö.

NanoDrop ND-1000. Users Manual. Saatavissa:

<http://www.nanodrop.com/Library/nd-1000-v3.7-users-manual-8.5x11.pdf>. Hakupäivä 25.8.2011.

Promega: RNA Analysis Notebook.

Qiagen RNeasy Mini Kit Handbook. Saatavissa: <http://www.qiagen.com/hb/rneasymini>. Hakupäivä 25.8.2011.

Rautio, Jari 2007. VTT publications 661 Development of rapid gene expression analysis and its application to bioprocess monitoring, Helsinki: Edita Prisma Oy.

Wikipedia 2011. The Free Encyclopedia. Saatavissa:
http://en.wikipedia.org/wiki/main_page. Hakupäivä 11.02.2011.

MOPS PUSKURI OHJE

1. Valmista 1 % agarooosi/formaldehydi geeli (0,5 µg/ml etidumbromidi):
20,0 ml 5X MOPS Puskuri
72,0 ml DEPC käsitelty vesi
1,0 g Agarooosi
2. Kuumenna kiehuvaksi (mikroaaltouunissa) ja anna jäähtyä noin 55 °C:seen. Lisää vetokaapissa 17,6 ml 37-prosenttista formaldehydiä ja 5 µg 10 mg/ml etidumbromidia. Sekoita varovasti.
3. Vala geeli, aseta näytekampa paikoilleen ja anna jäähtyä
4. Valmista RNA-näytteet lisäämällä yksi osa RNA-näytettä ja kaksi osaa RNA näytepuskuria kokonaistilavuuteen 10–30 µl, riippuen näytekaivojen koosta. Kuumenna näytteitä 65 °C 5 minuutin ajan ja anna jäähtyä jäissä 2 minuutin ajan. Lisää 2 µl RNA latauspuskuria
5. Ennen näytteiden pipetoimista esiaja geeliä 10 minuuttia 1X MOPS puskurissa. Pipetoi RNA-näytteet näytekaivoihin ja aja geeli 4–5 V jännitteellä/cm. Jatka ajoa, kunnes bromifenoli sininen on migroitunut 2/3–3/4 geelin pituudesta.

5X MOPS PUSKURI

0,2 M MOPS (pH 7,0)
0,05 M Natrium asetaatti
0,005 M EDTA (pH 8,0)

Punnitse 41,86 g MOPS:ia ja 4,12 g natriumasetaattia ja liuota ne 800 ml:aan DEPC-käsiteltyä vettä. Sekoita, kunnes aineet ovat liuenneet kokonaan. Lisää 10 ml DEPC-käsiteltyä 0,5 M EDTA:ta. Säädä pH 0,7 10 M NaOH:lla. Täytä litraksi DEPC-käsitellyllä vedellä. Jaa liuos 200 ml:n eriin ja autoklavoi.

RNA NÄYTEPUSKURI

10,0 ml Deionisoitu formamidi
3,5 ml 37% formaldehydi
2,0 ml 5X MOPS

Jaetaan 7,0 µl eriin 1,5 ml:n eppendorf-putkiin. Säilytetään pakkasessa -20 °C:ssa

RNA LATAUSPUSKURI

50 % glyseroli
1 mM EDTA
0,4 Bromifenoli sini

Valmistetaan DEPC-käsiteltyyn veteen. Jaetaan 10 µl eriin 1,5 ml:n eppendorf-putkiin. Säilytetään pakkasessa -20 °C:ssa

Materials required:

- Qiagen RNeasy Minikit, catalogue No: 74106.
- Acid washed glass beads 600 µm size

Protocol:

1. Prior the extraction, 1,6 g of acid-washed glass beads (Sigma) are filled into a tube and autoclaved.
2. Centrifuge the yeast sample for 10 minutes at 5000rpm in an Eppendorf Mini-centrifuge. Decant the supernatant and carefully remove the remaining media by aspiration.
3. Loosen the cell pellet thoroughly by flicking the tube and add 600µl of RLT buffer (contains β- mercaptoethanol) and vortex to resuspend the cell pellet. Add the sample to the prepared tubes containing the glass beads.
4. Vortex for 1 minute and agitate in a bead-mill homogenizer (Fast Prep) for 45 seconds at 6.5m/s. After that put the samples on ice and let the beads settle down.
5. Transfer the lysate to a new eppendorf tube and centrifuge for 2 minutes at room temperature and full speed in an eppendorf mini-centrifuge. Transfer the supernatant to a new clean tube and add one volume of 70% ethanol to the lysate. Mix them while pipeting.
6. Apply the solution including any precipitate that may have formed to an Rneasy mini column placed in a 2ml collection tube. Centrifuge for 0.5 minutes at full speed and room temperature
7. Discard the flow-through.
8. Add 700µl of RW1 buffer to the column and centrifuge 0.5 minutes at full speed and room temperature.
9. Discard the flow-through and put the column into a new clean collection tube.
10. Add 500µl of RPE buffer to the column and centrifuge for 0.5 min at full speed and room temperature. Discard the flow-through.
11. Add another 500µl of RPE buffer and centrifuge for 3 minutes to eliminate any chance of possible buffer RPE carryover.

12. For elution transfer the RNeasy column to a clean new eppendorf tube and pipette 30 to 50µl of Rnase-free water directly onto the silica-gel membrane.
13. Centrifuge for one minute at full speed and room temperature.
14. Store at -70 °C