

Johanna Pesonen

**CRISPR-MENETELMÄ POISTOGEENISEN SOLULINJAN VAL-
MISTUKSESSA**

CRISPR-MENETELMÄ POISTOGEENISEN SOLULINJAN VAL- MISTUKSESSA

Johanna Pesonen
Opinnäytetyö
Syksy 2014
Laboratorioalan koulutusohjelma
Oulun ammattikorkeakoulu

TIIVISTELMÄ

Oulun ammattikorkeakoulu
Laboratorioalan koulutusohjelma, bioteknologian sv.

Tekijä: Johanna Pesonen

Opinnäytetyön nimi: CRISPR-menetelmä poistogeenisen solulinjan valmistuksessa

Työn ohjaajat: Sakari Kellokumpu ja Matti Nieminen

Työn valmistumislukukausi ja -vuosi: Syksy 2014 Sivumäärä: 35 + 7 liitettä

CRISPR on uusi tarkka menetelmä geeniteknikan alalla. Se perustuu alun perin bakteerien virustorjuntaan, jossa viruksen DNA:ta lisätään osaksi bakteerin omaa genomia. CRISPR on luotettava, melko edullinen ja yksinkertainen geenimuokkausmenetelmä.

Työn tarkoituksena oli luoda poistogeeninen solulinja CRISPR-menetelmän avulla. Geeni, joka työssä pyrittiin poistamaan, vastaa AE2-proteiinin tuotannosta Golgin laitteessa. AE2-proteiinin tehtävänä solussa on siirtää ainioneita solukalvon läpi ja säädellä Golgin laitteen pH:ta. Proteiini on todennäköisesti soluille tärkeä pH:n ylläpidossa, ja solulinjan luomisella haluttiin todistaa sen merkitys niille.

Solulinjan valmistamisessa ei onnistuttu, vaikka klooneja onnistuttiinkin saamaan työssä 4 kpl. On mahdollista, että proteiini AE2, jonka tuotannon poistogeenisyys lopettaa, oli soluille liian tärkeä elämisen kannalta ja onnistuneen transfektion solu kuolivat. Toisena syynä tähän saattoi olla plasmidin ihmisperäisyyden ja solulinjan apinaperäisyyden yhteensopimattomuus. Tästä johtuen sekvenssissä kriittisessä kohtaa sijainnut yhden emäsparin eroavaisuus saattoi estää halutun poistogeenisen DNA-palan siirtymisen solun genomiin.

Työ tehtiin Oulun yliopiston biokemian ja molekyyli lääketieteen tiedekunnassa syksyllä 2014 Sakari Kellokummun ryhmässä. Tämä oli ensimmäinen kerta, kun tätä geenimuokkausmenetelmää käytettiin kyseisessä ryhmässä.

Asiasanat: CRISPR, geeniteknikka, kloonauk, soluviljely

SISÄLLYS

| | |
|--|----|
| TIIVISTELMÄ | 3 |
| SISÄLLYS | 4 |
| 1 JOHDANTO | 4 |
| 2 ELÄINSOLU | 5 |
| 2.1 Tuma ja nukleiinihapot | 6 |
| 2.1.1 DNA | 6 |
| 2.1.2 RNA | 7 |
| 2.2 Golgin laite | 7 |
| 2.2.1 Tehtävä | 8 |
| 2.2.2 AE2-proteiini | 8 |
| 3 CRISPR JA MUUT KÄYTETYT MENETELMÄT | 10 |
| 3.1 CRISPR | 10 |
| 3.1.1 Alkuperä | 10 |
| 3.1.2 CRISPR menetelmän käyttö eläinsolussa | 11 |
| 3.2 PCR ja agarosigeelielektroforeesi | 12 |
| 3.3 Sekvensointi | 13 |
| 3.4 Transfektio | 14 |
| 3.5 Virtaussytometri | 14 |
| 3.6 Immunofluoresenssivärjäys | 15 |
| 4 ELÄINSOLUJEN VILJELY | 17 |
| 4.1 Aseptinen työskentely | 17 |
| 4.2 Eläinsoluviljely | 17 |
| 4.3 Eläinsolujen jakaminen uudelle alustalle | 18 |
| 4.4 Solulinjat | 19 |
| 5 TYÖN KOKEELLINEN OSUUS | 20 |
| 5.1 Plasmidin lisäys | 20 |
| 5.2 COS 7 -solut | 21 |
| 5.3 Genomisen DNA:n eristys ja PCR | 21 |
| 5.4 Sekvensointi | 23 |

| | |
|--------------------------------------|----|
| 5.5 Transfektio | 24 |
| 5.6 Sorteeraus | 24 |
| 6 KLOONIEN KASVATUS JA TARKISTAMINEN | 26 |
| 6.1 Kloonien kasvatus | 26 |
| 6.1 Immonofluoresenssivärjäys | 27 |
| 6.2 Mikroskopia | 27 |
| 7 TULOKSET JA POHDINTA | 28 |
| 8 YHTEENVETO | 30 |
| LÄHTEET | 32 |

1 JOHDANTO

Eläinsolut kuuluvat eukaryoottisiin eli aitotumallisiin soluihin. Ne ovat hyvin monipuolinen ja erilaistunut solutyyppeiksi ja poikkeavat näin ollen muista eukaryooteista eli hiiva- ja kasvisoluista. Eläinsolut koostuvat useista eri soluelimistä. Näitä ovat esimerkiksi solukalvo, mitokondrio, tuma ja Golgin laite.

Työn tavoitteena oli luoda poistogeeninen solulinja CRISPR-menetelmää käyttäen. CRISPR-menetelmä on vuonna 2013 julkaistu geeninmuokkausmenetelmä, joka perustuu bakteerien puolustusmekanismiin viruksia vastaan. Menetelmä mahdollistaa DNA:n tarkan muokkaamisen, ja se on huomattavasti luotettavampi kuin edelliset muokkausmenetelmät. CRISPR-menetelmällä pystytään muokkaamaan elävien solujen genomia ja sillä onkin saatu lupaavia tuloksia laboratorionkokeissa geneettisten sairauksien osalta.

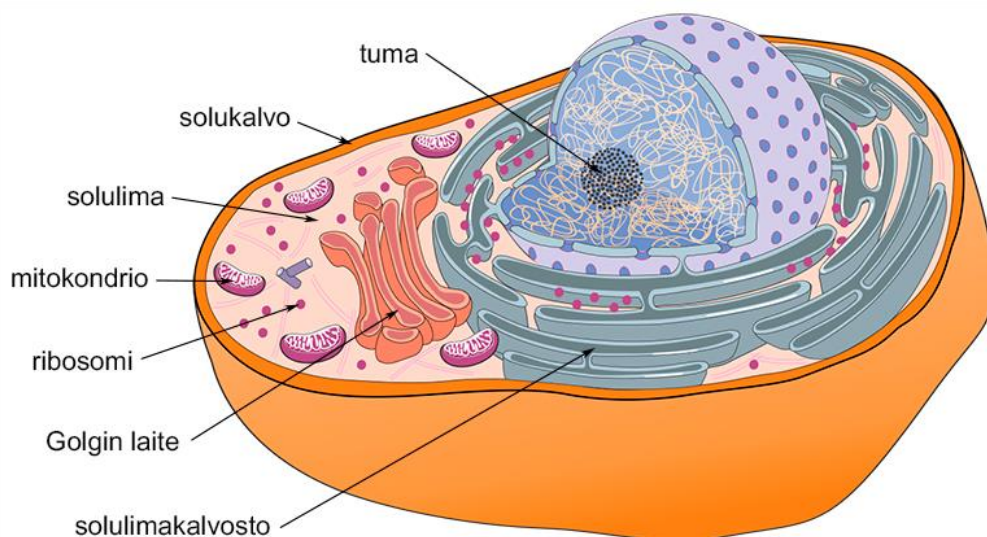
Geeni, jonka poistaminen työn tavoitteena oli, vastaa Golgin laitteessa sijaitsevista AE2-proteiinin tuotannosta. Tämän proteiinin tehtävänä on solukalvolla ja Golgin laitteessa vastata kloridi- ja bikarbonaattianionien kuljettamisesta solukalvon läpi ja siten solun ja Golgin laitteen pH:n säätelystä. Geenin poistamisella solusta haluttiin nähdä, mitä vaikutuksia kyseisen proteiinin puuttuminen aiheuttaa Golgin laitteen toiminnassa, erityisesti sen sokerirakenteiden muokkauksessa.

Työ tehtiin Oulun yliopiston Biokemian ja molekyyliääkätieteen tiedekunnassa syksyllä 2014, ja sen tavoitteena oli saada aikaiseksi poistogeeninen solulinja jatkotutkimuksia varten.

2 ELÄINSOLU

Eläinsolut kuuluva eukaryooteihin eli aitotumallisiin soluihin, joita ovat hiivat, homeet ja kasvisolut. Niillä on useita soluelimiä, kuten solukalvo, solulima, mitokondrio, ribosomit, solulimakalvosto, tuma ja Golgin laite. (Kuva 1.) Eläinsoluja ympäröivä ohut solukalvo muodostuu kaksoiskerroksisesta lipidikalvosta. Siihen on myös kiinnittynyt kolesterolia ja useita eri proteiineja, joista monissa on liittyneenä sokeriketjuja. Ohuen solukalvon takia eläinsolut ovat varsin hauraita ja ne vaurioituvat herkästi mekaanisen rasituksen voimasta. (1, s. 24–25; 2; 3.)

Solulima on solun välitysaine, jossa osa biokemiallisista reaktioista tapahtuu. Se on suurimmaksi osaksi vettä, mutta siinä on myös lipidejä, epäorgaanisia ioneita ja proteiineja. Proteiinien synteesi soluissa tapahtuu ribosomien pinnalla. Nämä pienet soluelimet koostuvat RNA:sta ja proteiineista. Ne kelluvat yleensä solulimassa, mutta saattavat olla myös kiinnittyneenä solulimakalvostoon. Solulimakalvostossa valmistetaan ja muokataan proteiineja ja lipidejä. Se myös osallistuu aineiden, kuten mitokondrion muokkaamien orgaanisten molekyylien kuljetukseen. Mitokondrio vastaa soluissa energia-aineenvaihdunnasta. Sille kuuluu niin kemiallisen energian muuttaminen käyttökelpoiseen muotoon kuin soluhengitysikin. (2; 4, s. 70, 78.)



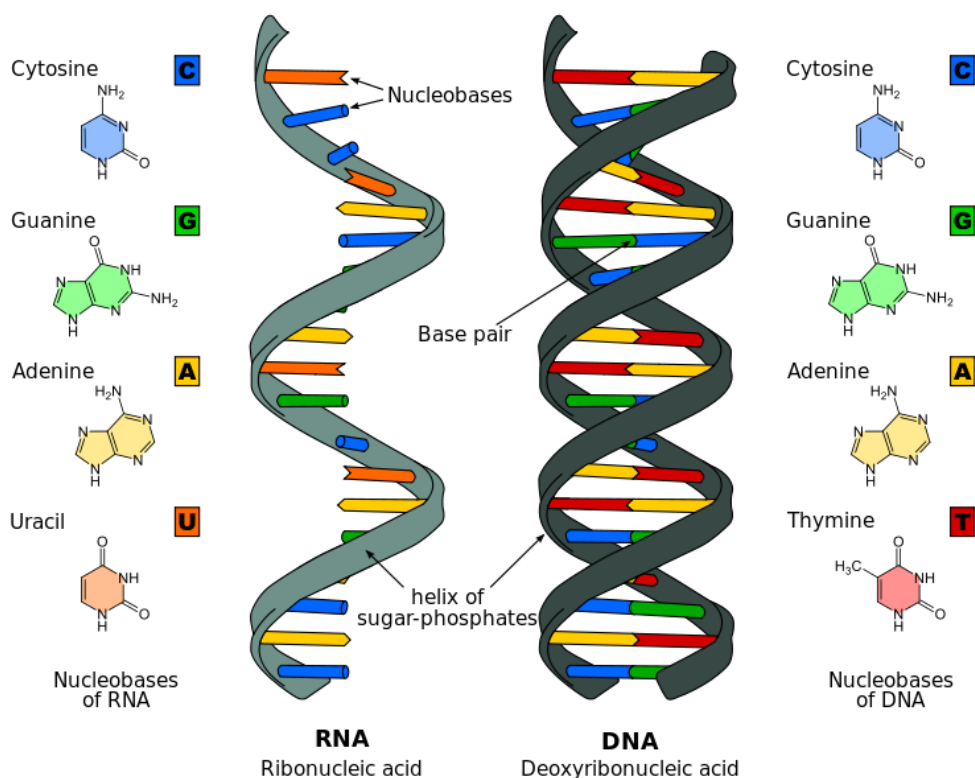
KUVA 1. Eläinsolun rakenne (5)

2.1 Tuma ja nukleiinihapot

Tuma on eukaryoottisolussa perintöaineksen sisältävä soluorganelli. Se rakentuu kaksinkertaisen kalvon muodostamasta tumakotelosta, tumahuokosista, jotka mahdollistavat nukleiinihappojen ja proteiinin liikkumisen solussa sekä tuomplasmasta, jossa solun perintöaines eli geenit sisältävä kromatiini lepäävät. Kromatiini koostuu pakkautuneesta kaksoiskierteisestä DNA-rihmastosta, joka on kiertynyt histoni-proteiinien ympärille. (4, s. 74; 6.)

2.1.1 DNA

DNA on kaksijuosteinen kierteinen nukleiinihappo, joka koostuu lukuisista toisiinsa liittyneistä nukleotideista. Nukleotidit muodostuvat neljästä erilaisesta emäksestä (adeniini, tymiini, guaniini ja sytosiini) sekä sokeri- ja fosfaattiosasta (kuva 2). (7; 8, s. 15–22.)



KUVA 2. RNA:n ja DNA:n rakenne (9)

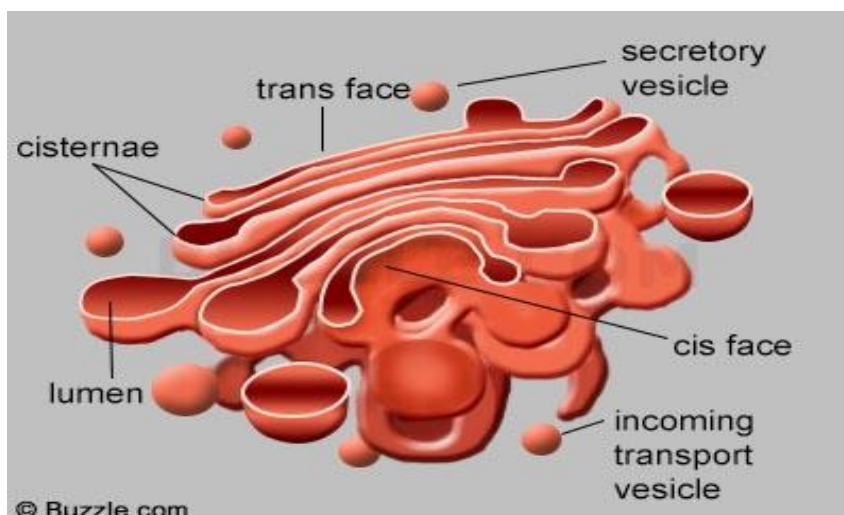
2.1.2 RNA

RNA koostuu DNA:n tavoin nukleotideistä, mutta sen rakenne on yksijuosteinen ja se on yleensä kooltaan pienempi molekyyli kuin DNA. RNA:n poikkeaa myös emäskoostumukseltaan DNA:sta. Siinä tymiini-emäksen tilalla on urasiili-niminen emäs (kuva 2). RNA:ta tuotetaan DNA:sta ja RNA välittää informaation proteiinien tuottoa varten. (8, s. 15–22.)

2.2 Golgin laite

Golgin laite on soluelin, joka sijaitsee eläinsoluissa yleensä tuman lähellä. Se löydettiin vuonna 1898, jonka jälkeen tutkijat ovat pyrkineet selvittämään tämän soluelimen tarkoitusta ja rakennetta. Kuitenkaan Golgin laitteen tapaa kuljettaa muokattavia proteiineja ei vielä kukaan tunneta täysin. (10, s. 21)

Golgin laite rakentuu 5–10:stä kaksikerroksen lipidikalvon ympäröimästä ontelosta eli kisternoista (kuva 3). Kisternat ovat asettuneet päällekkäin ja muodostavat matalaa kupolia muistuttavan pussipinkan. Golgin laite erotellaan kahteen puoleen, cis- ja trans-puoleen. Cis-puoli sijaitsee kupolin kuperalla ja trans-puoli kupolin koveralla puolella. Molekyylit liikkuvat Golgin laitteessa cis-puolelta trans-puolelle. (10, s. 21; 11; 12, s.75.)



KUVA 3. Golgin laitteen rakenne (13)

2.2.1 Tehtävä

Golgin laitteen tehtävänä on muokata proteiineja ja lipideja lisäämällä niihin hiilihydraattiosia eli sokereita. Proteiinien liikkumiseen Golgin laitteessa on kaksi eri teoriaa. Ensimmäisen mukaan proteiinit liikkuvat kisternoista toiseen vesikkeleissä eli kalvostosta irtoavissa rakkuloissa. Toisen teorian mukaan kisternat kulkeutuvat hitaasti eteenpäin cis-puolelta trans-puolelle ja kypsyvät siinä samalla. Päästyään pinon päällimmäiseksi kisterna jakautuu useiksi vesikkeleiksi ja vesikkelit kulkeutuvat muualle soluun. Samalla pinon alimmaksi muodostuu aina uusi kisterna. Ei tiedetä, kumpi teorioista on oikea, ja on mahdollista, että Golgin laitteistossa käytetään molempia tapoja: nopeaa vesikkeleissä kulkemista ja hidasta kisternojen kulkeutumista. (10, s. 24; 12, s. 75.)

Eri kisternoissa vallitsevat erilaiset olosuhteet aina pH:sta entsyymeihin. Näin jokaisessa kisternassa tapahtuva proteiinin muokkaus on erilaista kuin toisessa. Valmiit proteiinit Golgin laite erittää ympäröivään solulimaan kalvorakkuloissa, joista ne kulkeutuvat ympäri solua. Muina tehtävinä Golgin laitteella on lajitella proteiineja solukalvolle, lysosomeihin tai solun ulkopuolelle sekä valmistaa kalvomateriaalia solun käyttöön. (10, s. 24; 11; 12, s. 333.)

2.2.2 AE2-proteiini

Proteiinit ovat elintoiminnoille välttämättömiä valkuaisaineita, joilla on useita eri tehtäviä soluissa. Ne voivat toimia entsyymeinä, jolloin ne toimivat solun sisällä katalysaattoreina useille kemiallisille reaktioille. Proteiinit voivat myös sitoa solulle tärkeitä aineita tai osallistua aineiden kuljetukseen. Ne myös toimivat viestinviejinä eli hormoneina toisille soluille, esimerkiksi kasvuhormonina. Osa proteiineista toimii myös solujen tukirakenteina, kuten tubuliini tai aktiini. (14.)

Primaarirakenteeltaan proteiinit koostuvat peptidisidoksin toisiinsa kiinnittyneistä aminohapoista eli polypeptidiketjuista. Nämä ketjut poimuttuvat tai kiertyvät serpentiinimäiseksi kierteeksi muodostaen vetysidoksien kanssa sekundaarirakenteen. Kun primaari- ja sekundaarirakenteet sekoittuvat

keskenään ja niiden aminohapot muodostavat toisiinsa erilaisia sidoksia, puhutaan kolmiulotteisesta tertiäarirakenteesta. Kvartaarirakenne eli lopullinen proteiinimolekyylä muodostuu tällöin useista tertiäarirakenteisista aminohappoketjuista. (14; 15.)

AE2-proteiini (Anion Exchanger) sijaitsee Golgin laitteessa. Sen tehtäviä ovat toimiminen anioneiden kuljetusproteiinina solukalvolla, säädellä Golgin laitteen pH:ta ja lisätä veren kykyä kuljettaa hiilidioksidia keuhkoihin. AE2-proteiini on todennäköisesti soluille merkittävä proteiini, koska sen puuttuessa soluihin kertyy liikaa bikarbonaattianioneita. Tämä puolestaan aiheuttaa solun pH:n tason nousun ja vaikuttaa siten solun kykyyn lisätä sokerirakenteita proteiineihin ja lipideihin. Pahimmillaan pH:n nousu voi aiheuttaa jopa solukuoleman. (16; 17.)

3 CRISPR JA MUUT KÄYTETYT MENETELMÄT

Geenitekniikka on biotekniikan osa, joka keskittyy geneettiseen muunteluun. DNA:n samankaltainen rakenne jokaisella eliölajilla ja nukleotidijärjestyksen tietäminen on mahdollistanut suunnitellun geneettisen muuntelun. Nykyisin käytettyjä menetelmiä geenin muokkaukseen ovat TALENs (Transcription activator-like effector nucleases), sinkkisormiproteiinit ja CRISPR. TALENs menetelmässä genomista poistetaan pala. Sinkkisormiproteiinimenetelmä on samankaltainen kuin TALENs, mutta siinä sinkkisormet sitoutuvat katkaistavaan kohtaan ja katkaisevat genomin. Molemmat menetelmät ovat laajasti käytettyjä, mutta eivät yhtä tarkkoja ja luotettavia menetelmiä kuin uusi CRISPR-menetelmä. (18; 19.)

3.1 CRISPR

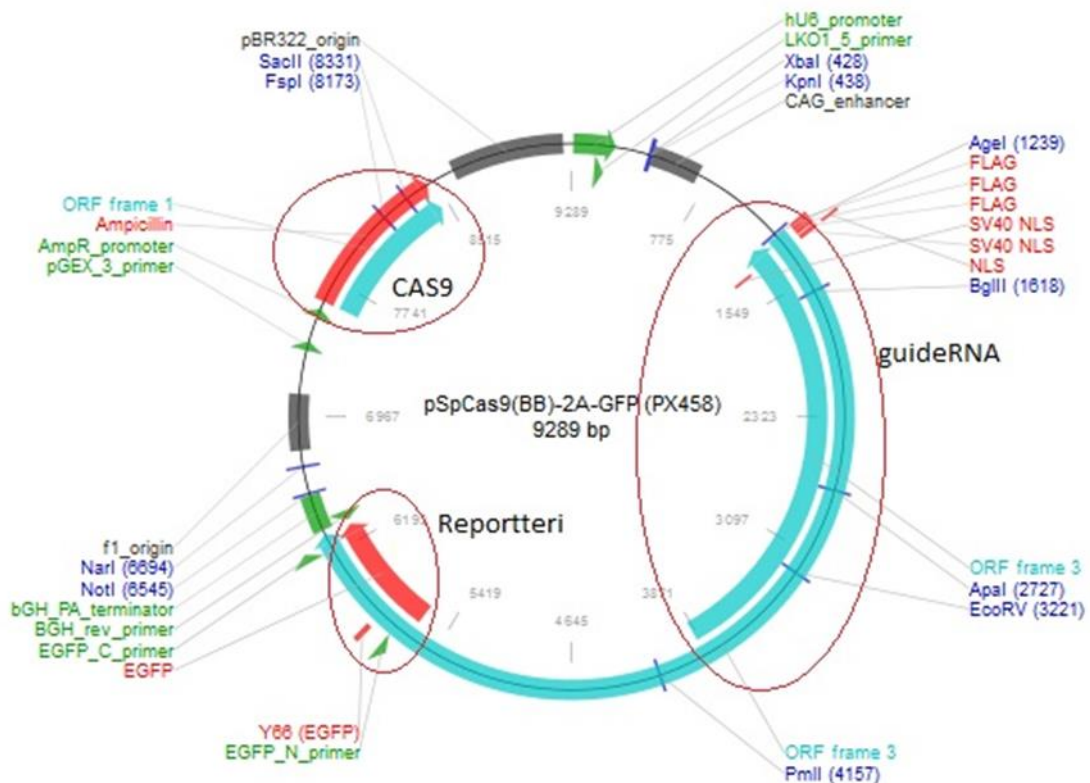
CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) on geenimuokkaustekniikka, jolla voidaan muokata elävien solujen genomia. Se perustuu bakteerien virusinfektioiden puolustusjärjestelmään ja sen kopioimiseen muissa soluissa. (20.)

3.1.1 Alkuperä

Bakteerien puolustusmekanismi viruksia vastaan perustuu siihen, että bakteerit lisäävät itseensä hyökänneen viruksen DNA:sta osia omaan genomiinsa. Ne kääntävät vieraan DNA:n RNA:ksi, pilkkovat RNA:n palasiin sekä liittävät paloihin guide- eli ohjain-RNA:n ja CRISPR-entsyymit. Tämän jälkeen ne muodostavat yhdessä Cas9-entsyymin kanssa kompleksin. Cas9-entsyymi etsii ohjain-RNA:n mukaisen kohdan bakteerin DNA:sta ja irrottaa juosteet toisistaan. Sen jälkeen CRISPR-entsyymit leikkaavat yksijuosteisesta DNA:sta ohjain-RNA:n määrittelemän palan pois. Tässä vaiheessa bakteerin korjaajaentsyymit alkavat nopeasti korjata rikkoutunutta DNA:ta ja kääntävät kuljetetusta vieraasta RNA:sta ketjuun uuden DNA-sekvenssin. (20; 21.)

3.1.2 CRISPR menetelmän käyttö eläinsolussa

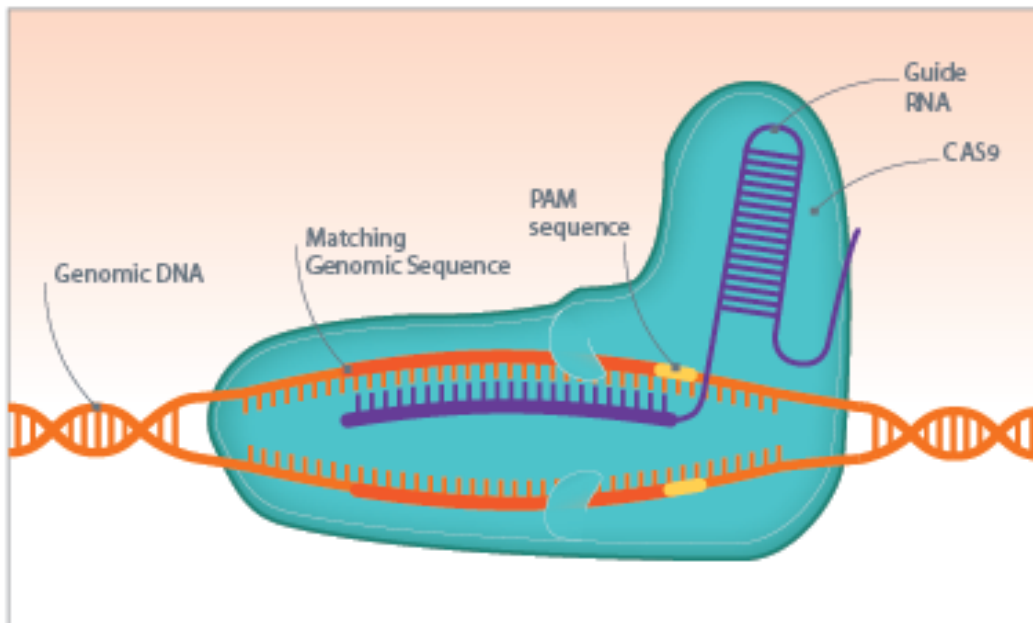
CRISPR-menetelmässä solujen sisälle viedään plasmidi, johon on liitetty haluttu maksimissaan 20 emäsparin pituinen sekvenssi, ohjain-RNA sekä CRISPR-entsyymien RNA:t, jotka vastaavat Cas9-entsyymien ja reporteriproteiinin (fluoresoiva EGFP) muodostuksesta (kuva 4).



KUVA 4. AE2 Clone 1 P x 458-plasmidin rakenne (22)

Solu alkaa tuottaa plasmidista Cas9-entsyymiä ja EGFP-proteiinia RNA:n ohjeen mukaan. Syntyneet Cas9-entsyymit muodostavat plasmidista kopioidun ohjain-RNA:n kanssa kompleksin, joka etsiytyy oikeaan kohtaan solun genomissa (kuva 5). EGFP-proteiini jää loistamaan hetkeksi solun sisään merkkinä siitä, että solu on ottanut halutun plasmidin sisäänsä. Myöhemmin solu poistaa

itsestään tämän plasmidin, jolloin sekä Cas9-entsyymin että EFGP-proteiinin tuotto loppuu. (21; 23.)



KUVA 5. CRISPR-menetelmä eläinsolussa (24)

3.2 PCR ja agarosigeelielektroforeesi

PCR eli polymeerasiketjureaktio (eng. polymerase chain reaction) on menetelmä, jolla pystytään joustavasti monistamaan DNA-jaksoja. Se perustuu monistettavan alueen rajaaviin alukkeisiin ja korkeita lämpötiloja sietäviin DNA-polymeraaseihin, jotka löydettiin kuumissa lähteissä elävistä mikrobeista. Menetelmän keksi Kary Mullis vuonna 1983, ja se on nykyisin yleisesti käytössä eri alojen laboratorioissa. PCR-työskentely vaatii erityistä huolellisuutta pienten pipetointimäärien vuoksi. Lisäksi siinä on huomioitava tarkkaan oikeat lämpötilat, ohjelman aikataulut sekä lähtö-DNA:n puhtaus. Esimerkiksi veri sisältää kopiointia häiritseviä tekijöitä. PCR:ssä pitää myös varoa näytteen hajoamisesta. (8, s. 153–156; 25.)

PCR-tekniikka perustuu kolmeen vaiheeseen. Ensimmäisessä vaiheessa eli denaturaatiossa reaktioseoksen lämpötila nostetaan korkealle (esim. 95 °C:seen), jolloin DNA denaturoituu eli juosteet irtoavat toisistaan. Toisessa vaiheessa lämpötilaa lasketaan (usein 50–64 °C:seen) hetkellisesti niin, että alukkeet voivat sitoutua yksijuosteisiin DNA-molekyyleihin. Tätä vaihetta kutsutaan annealing-reaktioksi. Viimeisessä vaiheessa lämpötilaa jälleen nostetaan (esim. 72 °C:seen) DNA-polymeraasin toiminnalle suotuisaksi, jolloin DNA-syntetisoi yksijuosteisesta DNA:sta kaksijuosteista DNA:ta. Viimeistä vaihetta kutsutaan elongaatio-reaktioksi. Näitä kolmea vaihetta eli sykliä toistetaan, kunnes saadaan monistettua haluttu määrä DNA:ta. Viimeisen syklin elongaatio on yleensä pidempi, jotta kaikki DNA:n yksijuosteet saataisiin varmasti syntetisoitua kaksijuosteiseksi. (8, s. 153–156; 25.)

3.3 Sekvensointi

Sekvensoinnilla tarkoitetaan DNA:n nukleiinihappojärjestyksen selvittämistä. Menetelmiä käytetään yleisesti esimerkiksi mutaatioiden havainnoinnissa tai sukulaisuuden selvittämisessä. Sekvensointiin on käytössä kaksi eri menetelmää, Sangerin menetelmä ja Maxam-Gilbertin menetelmä. Nykyisin sekvensoinnit suoritetaan lähes aina Sangerin menetelmällä sen myrkyttömyyden vuoksi. Menetelmä perustuu DNA-juosteiden aukeamiseen kuumennuksen johdosta, jolloin niihin liitetään jokin neljästä diseoksinukleotidista. Tämän jälkeen DNA jaetaan 4 eri koeputkeen, joista jokaisessa on vain yhtä tiettyä diseoksinukleotidia. Diseoksinukleotidin tehtävänä on pysäyttää DNA:n kahdentumisreaktio ja pilkkoa DNA paloihin aina tietyn emäksen kohdalta, esimerkiksi tyymiinin. Kun näytteet tämän jälkeen erotellaan elektrofooresilla, saadaan selville DNA:n sekvensin emäsjärjestys. Myös sekvensointilaitteet perustuvat useimmiten Sangerin menetelmään. (26; 27.)

3.4 Transfektio

Transfektioilla tarkoitetaan DNA:n siirtymistä joko luonnollisesti tai keinotekoisesti elävän eläinsolun sisälle. Transfektion tulos voi olla joko pysyvä tai väliaikainen ekspressio eli geenin ilmentyminen. Pysyvässä eli stabiilissa ekspressiossa DNA integroituu isäntäsolun genomiin ja siirtyy solun jakautuessa tytärsoluun. Väliaikaisessa eli transientissa ekspressiossa ominaisuus katoaa solun jakautuessa. (8. s.143–144; 28, s.17.)

Eläinsolujen transfektioon on kehitetty lukuisia menetelmiä, ja monet näistä menetelmistä ovat spesifisiä tietyille solulinjoille. Yksi laboratoriossa suosittu menetelmä on liposomimenetelmä. Siinä DNA viedään solun sisälle pienten lipidirakuloiden sisällä, koska DNA on hydrofiilinen ja ei sen takia pääse hydrofobisen solun sisään itsestään. Positiivisesti varautuneet kationilipidit ympäröivät DNA-molekyylin, joka on fosfaattien takia on negatiivisesti varautunut. DNA-lipidikompleksin osuessa soluun lipidikerros joko sulautuu solukalvoon ja työntää DNA:n solun sisälle tai menee solukalvon läpi endosytoosin avulla. Muita yleisesti käytettyjä menetelmiä ovat mm. kalsiumfosfaattikopresipitaatio ja mikroinjektio. Viimeksi mainittua voidaan käyttää ainoastaan hyvin suurikokoisille soluille esim. hedelmöittyneille munasoluille. (8, s.143–144; 28, s.17.)

3.5 Virtaussytometri

Solujen sortteeraus eli lajittelu perustuu virtaussytometriaan. Menetelmässä solut pakotetaan kulkeutumaan yksitellen virtauskammioon ja lasersäteen ohitse. Tietyn aallonpituuden omaavan lasersäteen osuessa fluoresoivilla leimoilla merkattuihin soluihin (yleensä käytetään aallonpituutta 488 nm) fluorokromi virittyy ja melkein välittömästi purkautuu eli alkaa lähettää virittäneen laserin aallonpituutta pidempää valoa. Tätä purkautuvaa valoa ohjataan sitten halutulle detektorille peilien ja suodattimien läpi. Detektoriin tulevan valon avulla solut voidaan jakaa spesifisimpiin ryhmiin. Laitteen sisällä pieni anturi lajittelee halutut solut

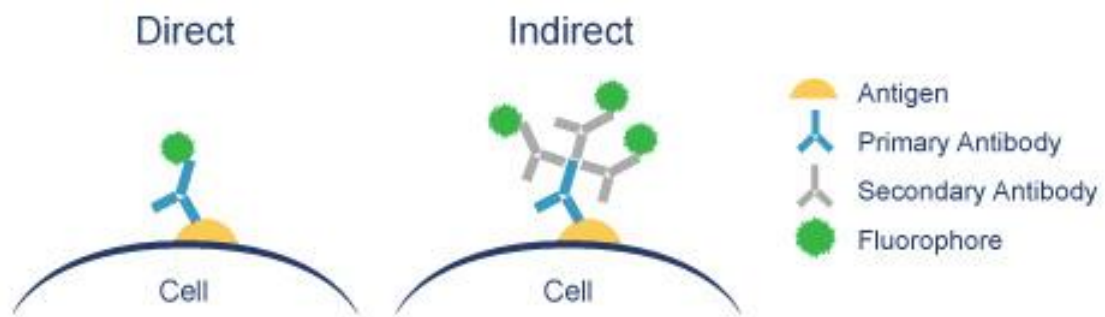
keräysputkeen. Sortteerauksessa käytettävällä virtaussytometrillä on lisäominaisuus, jolla pystytään jakamaan solut yksitellen 96-kuoppalevyn kuoppaan. (28, s. 17; 29.)

3.6 Immunofluoresenssivärjäys

Immunofluoresenssivärjäyksellä tarkoituksena on osoittaa fiksatuista soluista tai kudoksista haluttuja proteiineja tai antigeenejä käyttämällä fluoresoivalla merkkiaineella eli fluorokromilla merkittyjä vasta-aineita. Fluorokromeina käytetään fluoresenssimikroskopiassa yleisesti mm. fluoreseiiniä ja rodamiiniä, koska ne absorboivat lyhytaaltoista valoa. Samassa värjäyksessä voidaan osoittaa useita eri antigeenejä tai proteiineja käyttämällä eri väreissä fluoresoivia sekundaarivasta-aineita. (29.)

Immunofluoresenssivärjäyksestä on kaksi menetelmää, suora ja epäsuora. Molemmissa menetelmissä värjättävä näyte blokataan ensin proteiinilla, esimerkiksi BSA:lla (Bovine serum albumin eli albumiini-proteiinia naudan seerumista), jotta vasta-aineet sitoutuvat vain oikeisiin kohteisiin. Blokkaminen myös vähentää taustan värjäytymistä, jolloin proteiinit tai antigeenit erottuvat paremmin materiaalista. Suorassa menetelmässä käytetään ainoastaan yhtä vasta-ainetta. Se sitoutuu suoraan tarkoitettuihin antigeeneihin tai proteiineihin. (30; 31)

Epäsuorassa menetelmässä käytetään kahta erilaista vasta-ainetta. Ensimmäiseksi materiaalille laitetaan primäärivasta-aine, jonka tehtävänä on sitoutua antigeeniin tai proteiiniin kuten suorassa menetelmässäkin. Sen jälkeen materiaalille laitetaan fluoresoiva sekundaarivasta-aine, jonka tehtävä on taas sitoutua primaarivasta-aineeseen. Molemmat menetelmät kuitenkin näyttävät samalla tavalla materiaalista värjäystuloksen. Epäsuora menetelmä on herkempi kuin suora menetelmä, koska siinä useampi fluorofori sitoutuu samaan paikkaan. (Kuva 6.) (30; 31.)



KUVA 6. Suora ja epäsuora immunofluoresenssivärjäys (31)

4 ELÄINSOLUJEN VILJELY

Soluviljelyn avulla soluja voidaan tutkia tarkasti kontrolloiduissa olosuhteissa. Laboratorio-olosuhteissa kasvaakseen solut tarvitsevat tarkkaan säädelyt ympäristön ravintoaineet, lämpötilan ja pH-arvo. Lisäksi soluviljely vaatii aseptista työskentelyä. (32.)

4.1 Aseptinen työskentely

Soluviljelyssä noudatetaan aseptista työskentelyä, jotta mahdolliset soluille haitalliset bakteeri-, sieni- ja mykoplasmaakontaminaatiot voitaisiin estää tehokkaasti. Aseptisen työskentelyn periaatteena on myös suojata solulinjoja ristikon-taminaatioilta sekä työntekijöitä työskentelyyn liittyviltä riskeiltä. Soluviljely tapahtuu puhdastilassa eli suljetussa tilassa, johon tuleva ilma suodatetaan HEPA-suodattimilla sekä tilan ylipaineistuksella. Puhdastilassa työntekijä pukee ylleen suojavaatetuksen, johon kuuluvat laboratoriotakki, työjalkineet, kertakäyttöiset hanskat ja mahdolliset kasvo- ja hiussuojukset. (33.)

Työskentely tapahtuu laminaarivirtauskaapissa, joka voi olla suljettu tai avoin pysty- tai vaakavirtauskaappi. Siinä ilmavirtaus estää huoneilman pääsemisen kaapin sisälle, jolloin kaapin sisäinen työtila pysyy steriilinä ja suojaa työntekijää käsiteltäviltä materiaaleilta. Laminaarin sisälle vietävät esineet tulee desinfioida hyvin 70-prosenttisellä alkoholilla, jotta laminaarin sisäpuoli pysyisi steriilinä. (33.)

4.2 Eläinsoluviljely

Eläinsolut kasvavat laboratoriossa normaalisti kiinteillä pinnoilla, koska kudoksissa olevat solut ovat tiiviisti kontaktissa toisiinsa erilaisten soluliitosten välityksellä. Alustoina eläinsoluja viljeltäessä käytetään yleensä lasipintoja tai käsiteltyä muovia, jonka pinnalla on negatiivisesti varautuneita ryhmiä. Solut erittävät viljelyastian pintaan kollageeniä ja muita soluväliaineen komponentteja, joilla ne

sitoutuvat kiinni viljelyastian pintaan. Näille alustoille solut muodostavat yksisolukerroksen ja alkavat kuolla kerroksen täytettyä kasvualustan kokonaan. (32; 34.)

Alustojen pinnalla käytetään tarkkaan määriteltyä kasvatusliuosta, josta solut saavat ravinteensa. Soluille tarkoitettu kasvatusliuos sisältää runsaasti epäorgaanisia suoloja, aminohappoja, vitamiineja, glukoosia ja typpilähteen. Epäorgaanisilla suoloilla, kuten kalium, magnesium, natrium, kloridi ja fosfaatti, säädetään liuoksen happamuus ja osmoottinen paine soluille sopivaksi. Aminohapoista liuos sisältää eniten glutamiinia, koska nisäkässolut käyttävät sitä glukosiin lisäksi hiilen lähteenä ja energiana. Kasvatusliemeen lisätään myös usein seerumia 5–20 prosenttia tilavuudesta. Seerumi sisältää aminohappoja, hivenaineita, proteiineja, lipidejä, vitamiineja, hormoneja ja kasvutekijöitä. Seerumin käyttö lisää solujen jakautumista, sitoo raskasmetalleita ja suojaa nisäkässoluja. Kasvatusliuos sisältää myös eri antibiootteja, kuten penisilliiniä bakteereita ja streptomysiiniä hiivoja vastaan. (32; 34.)

4.3 Eläinsolujen jakaminen uudelle alustalle

Eläinsolut jaetaan uudelle alustalle normaalisti siinä vaiheessa, kun sen hetkinen alusta alkaa olla kasvanut täyteen. Alustaa ei saa kuitenkaan päästää kasvamaan aivan täyteen, etteivät solut ala kuolemaan tilan tai ravinteiden loputtua. Myös kasvatusliemen pH:n lasku aiheuttaa soluissa muutoksia ja pahimmillaan kuoleman. Aluksi jaettavista soluista poistetaan kasvatusliemi ja ne pestään sopivalla pesuliuoksella (PBS lähes aina). Tämän jälkeen solujen päälle tiputetaan juuri kasvatusalustan pohjan peittävä määrä joko trypsiiniä tai EDTA:ta, joiden tarkoituksena on irrottaa solut kasvatusalustasta. Irtoamista varten kasvatusalustat laitetaan 1–2 minuutiksi + 37 °C:seen. Irrotettaessa ajan kanssa kannattaa olla varovainen, jottei trypsiini tai EDTA pääse hajottamaan myös solukalvoa, jolloin solu kuolee. (34.)

Irrottamisen jälkeen kasvatusalustalle lisätään kasvatuslientä, joka neutralisoi trypsiinin tai EDTA:n hajottavan vaikutuksen. Solut sisältävä liuos voidaan siirtää falcon-putkeen, jossa solut sentrifugoidaan varovasti putken pohjalle. Kierrosnopeus pidetään matalana, jotteivät solut hajoaisi rasituksen vaikutuksesta. Kun solut on saatu painumaan pohjaan, poistetaan liuos niiden päältä ja solut suspensoidaan kasvatusliemeen. Eläinsolut voidaan myös siirtää suoraan irrotuslioksessa uudelle kasvualustalle. Tämä ei kuitenkaan ole suotavaa irrotuslioksen soluja hajottavan ominaisuuden vuoksi. Pieninä määrinäkin se voi heikentää solujen jakautumista. Yleensä solut lasketaan suspensoidusta liuoksesta, jotta tiedettäisiin, kuinka paljon niitä siirretään uudelle kasvatusalustalle kasvamaan. Lopuksi lisätään solujen päälle kasvatusliemi ja kasvatusalustat siirretään + 37 °C:seen CO₂-inkubaattoriin kasvamaan. (34.)

4.4 Solulinjat

Solulinjalla tarkoitetaan jatkuvasti jakautuvaa solupopulaatiota, jonka elinikä on rajaton. Pysyvät eläinsolulinjat ovat usein eristetty kasvainkudoksista tai geneettisesti muunnellusta primaarisoluviljelmästä, joka on transformoitunut kemiallisten mutageenien, säteilyn tai virusten vaikutuksesta. Sen vuoksi ne ovat alkaneet käyttäytyä kasvainsolumaisesti. (35; 36.)

Tällaiset nopeakasvuiset ja kuolemattomat eläinsolulinjat sopivat hyvin tutkimusmateriaaliksi. Niillä on kuitenkin geneettisestä muuntelusta johtuvia poikkeavia ominaisuuksia, kuten epänormaali kromosomilukumäärä. Myös niiden kasvukontrolli poikkeaa normaalista, ja ne voivat kasvaa ilman alustaan kiinnittymistä. Tämän vuoksi ne myös voivat aiheuttaa kasvaimia päästessään isäntäorganismiinsa ja aiheuttavat sen vuoksi turvallisuusriskin. (35; 36)

Tunnetuin varsin erilaistumaton solulinja on amerikkalaisen Henrietta Lacksin kohdunkaulansyövästä eristetty HeLa-solulinja. HeLa-soluja käytetään laboratorioissa paljon perustutkimukseen esimerkiksi solun rakenteiden, DNA:n tai RNA:n tutkimiseen. (35; 36.)

5 TYÖN KOKEELLINEN OSUUS

Työ ensimmäisessä vaiheessa valittiin muokattava solulinja ja tuotettiin lisää plasmidia. Seuraavassa vaiheessa plasmidi tarkistettiin solulinjaan sopivaksi ja transfektoitiin soluihin. Viimeisessä vaiheessa transfektoidut solut lajiteltiin kasvamaan yksittäin ja eloon jääneet tarkistettiin. Työ suoritettiin kesällä ja syksyllä 2014 Oulun yliopiston Biokemian ja molekyyli lääketieteen tiedekunnassa.

5.1 Plasmidin lisäys

Työn aluksi lisättiin plasmidin AE2 Clone 1 P x 458 määrää. Lisäämistä varten plasmidi oli siirrettävä bakteerin sisälle, josta se voitiin eristää riittävän bakteerikasvun jälkeen. Plasmidi transformoitiin kaupallisiin XL1 Blue -kompetenttisoluihin ohjeen mukaan (liite 2). DNA:n pitoisuus transformaatiossa oli 570 ng/μl. Transformoidut solut laitettiin kasvamaan LB-ampisilliinimaljalle yön yli. Seuraavana päivänä siirrostettiin silmukalla maljalle kasvaneista pesäkkeistä yksittäinen pesäke uudelle LB-ampisilliinimaljalle ja lopuksi silmukkaa heiluteltiin 4 ml:ssä LB-ampisilliinilientä. Näin saatiin siirrettyä saman pesäkkeen bakteereja myös testikasvustoon.

Edellisen päivän 4 ml:n kasvatuksesta tehtiin mini-prep eli eristettiin plasmidi E.Z.N.A® Plasmid DNA Mini Kit I -kitillä. Eristyksellä tarkistettiin, että transformoitu DNA on säilynyt entisellään ja sen kloonaminen on onnistunut. Tämän jälkeen DNA:sta tehtiin digestio ohjeen mukaan (liite 2) ja digestioista laitettiin agarosigeelille ajo tulemaan. Ajossa käytettiin markkerina kaupallista Thermo Scientificin GeneRuler 1 kb DNA Ladderia. Geeli ajettiin 300 V:n teholla, jolloin se kesti vain 22 minuuttia. Ajosta näkyi, että kloonattu DNA oli onnistuttu säilyttämään. Sen johdosta laitettiin DNA:n suurempaa eristystä varten 1-1-klooniaskamaan 100 ml:aan LB-lientä, johon oli lisätty antibioottina 1ml ampisilliinia.

Midi-prep eli DNA:n suurempi eristys tehtiin Nucleobond® Xtra Midi -kitillä. Sen avulla saatiin eristettyä melko puhdasta DNA:ta 1,8 μg/μl, mikä on hyvä saanto. Puhdistetut ja käyttövalmiit kloonit pakastettiin odottamaan tulevaa transfektiota.

5.2 COS 7 -solut

Työssä käytettiin kaupallista COS 7 -solulinjaa, joka on eristetty apinan munuaisesta ja transfektoitu SV40-viruksella. Transfektion takia solut voivat jakautuvat loputtomasti. Yleensä niiden käyttö kuitenkin lopetetaan 20–30 jakamiskerran jälkeen, koska silloin solulinja on ehtinyt muuttua liikaa alkuperäisistä soluista. COS 7 -solut ovat jakautumisnopeudeltaan melko hyviä. Valintaan vaikutti myös solujen aiempi käyttö kyseisessä tutkimuksessa ja näin ollen tulevien tulosten mahdollinen liittäminen vanhoihin tutkimustuloksiin. Työhön mietittiin myös käytettäväksi ihmisen ihon fibroblasti-primaarisolulinjaa, mutta se hylättiin solujen hitaan jakautumisnopeuden takia.

5.3 Genomisen DNA:n eristys ja PCR

COS 7 -solujen genomisen DNA:n selvittämiseksi piti soluista ensiksi eristää DNA ja monistaa sitä lisää nukleotidijärjestyksen selvittämistä varten. Järjestys oli tärkeä saada selville, jotta nähtäisiin, missä kohdin genomia transfektoitava plasmidivektori vaikuttaisi. Aluksi COS 7 -soluja jaettiin kahdelle 10 cm:n maljalle kasvamaan. Kahden päivän kuluttua irrotettiin hyvin jakautuneet solut 2 ml:lla 2 x trypsiiniä, jonka annettiin irrottaa soluja 10 minuutin ajan. Soluihin lisättiin trypsiinin neutraloimiseksi DMEM-kasvatuslientä, siirrettiin solut ja liuokset 15 ml:n falcon-putkeen ja sentrifugoitiin solut pohjaan 4 minuuttia 1000 x g voimalla. Solupelletin päältä poistettiin erottunut neste ja solupelletti suspensioitiin 900 µl:aan DMEM-lientä. Suspensioista otettiin 5 µl 1,5 ml:n eppendorf-putkiin ja lisättiin joukkoon 50 µl DNA Extraction Solution -liosta. Putkia sekoitettiin 15 sekuntia Vortex-laitteella. Tämän jälkeen putket laitettiin inkuboitumaan + 65 °C:n lämpöblokkiin 15 minuutiksi. Lämpöblokin lämpötilaa nostettiin + 68 °C:seen ja annettiin solujen vielä inkuboitua 15 minuutin ajan. Putket siirrettiin toiseen + 98 °C:n lämpöblokkiin ja annettiin olla siinä 10 minuuttia. Kaiken jälkeen sakka sentrifugoitiin putken pohjaan 700 rpm:n voimalla pöytäfuugissa minuutin ajan.

PCR-reaktioita varten reaktioliuokset pipetoitiin pieniin eppendorf-putkiin taulukon 1 mukaan.

TAULUKKO 1. Pipetointi ohje PCR-reaktiota varten

| PCR - reaktio yht. 50 µl X 4 kpl | | |
|---|---------------------|---|
| <i>Liuos</i> | <i>Määrä (µl)</i> | <i>Muuta</i> |
| Eristetty genominen DNA - liuos | 3 | |
| Forward - primer 10 µM | 1,25 | |
| Reverse - primer 10 µM | 1,25 | |
| dNTP - mix | 1 | Fermetas - merkinen |
| PCR - puskuri | 5 | sisältää MgCl |
| iProof - PCR entsyymi | 0,5 | Pidettävä kylmänä ja lisätään viimeisenä ennen vettä. |
| de. ion. H ₂ O | 38 | |

Pipetoinnin jälkeen putket käytettiin minuutin ajan sentrifugissa, jotta kaikki liuokset saatiin painumaan pohjalle ja sekoittumaan keskenään. Tämän jälkeen putket asetettiin PCR-laitteeseen. Laitteelle syötettiin taulukon 2 mukainen ohjelma.

TAULUKKO 2. PCR-laitteelle syötetty ajo-ohjelma

| PCR - ohjelma | | | |
|----------------------|---------------|--------------------------|-------------|
| | <i>Vaihe</i> | <i>Lämpötila (° C)</i> | <i>Aika</i> |
| | Denaturaatio | 98 | 2 min |
| Sykli | Denaturaatio | 98 | 20 s |
| x | Annealing | 67 | 20 s |
| 35 krt | Elongaatio | 72 | 30 s |
| | Loppu | 72 | 3 min |
| | Odottamistila | 4 | - |

PCR-laitteen toimiessa tehtiin DNA:n tarkistusta varten 1,5 prosenttinen agarosigeeli. Geeliä tehtiin 100 ml:n annos, johon tuli 1,5 g agarosijauhetta ja 5 µl etidiumbromideja. Aluksi agarosijauhe keitettiin mikrossa deionisoidussa vedessä, minkä jälkeen siihen lisättiin sekaan etidiumbromidia. Agarosigeelin annettiin jäähtyä kädenlämpöiseksi ja kaadettiin se valukelkalle. Valukelkalla geelistä puhkottiin neulalla kaatamisessa syntyneet ilmakuplat ja siihen asetettiin 10 kaivon kampa. Annettiin geelin jäähmettyä ja poistettiin kaivokampa varovasti.

Valukelka käännettiin laitteessa ajoasentoon ja geelin päälle kaadettiin valmista 1 x TAE-puskuria, kunnes pusku peitti geelin täysin. Plasmideille tehtiin digestio ohjeen mukaan (liite 2) ja tehdyt digestiot pipetoitiin geelin kaivoihin. Markkerina käytettiin jälleen Thermo Scientificin GeneRuler 1 kb DNA Ladderia. Ajo-ohjelmaksi laitteeseen asetettiin 1 tunnin ajoaika ja 300 V tehoa. Ajo pysäytettiin hieman aikaisemmin, koska markkerin väri oli kulkeutunut tarpeeksi alas. Lopuksi geeli kuvattiin UV-kameralla ja siitä tulostettiin kuva 7. Kuvassa näkyy keskimmäisenä markkeri ja reunoilla oikeassa kohdassa olevat vyöhykkeet.



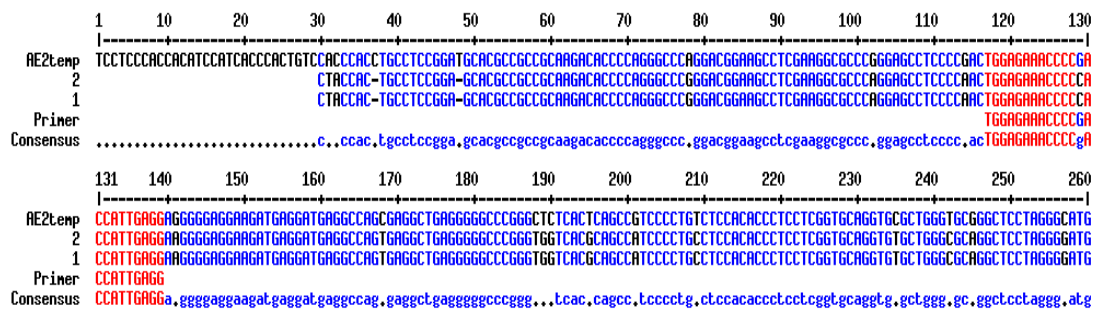
KUVA 7. Plasmidien vyöhykkeet ja markkeri agarosigeelillä

5.4 Sekvensointi

Sekvensoinnin tarkoituksena oli selvittää plasmidin sekvenssi ja tarkistaa sen sopivuus COS 7 -soluihin. Sekvensointinäytteet lähetettiin Biocenterin sekvensointilaboratorioon. Näytteet esivalmisteltiin seuraavasti. Normaaliin eppendorf-putkeen pipetoitiin 1 µl näytettä, 0,5 µl Forward-primeria ja 6 µl steriiliä ultra-puhdasta vettä.

Tulosta verrattiin jo tiedossa olevaan COS 7 -solujen genomiin. Vertailussa todettiin aminohappojärjestyksessä olevan yksi poikkeavuus sekvenssin 129.

emäksen kohdalla (kuva 8).



KUVA 8. AE2-plasmidin, primerin ja COS 7 -solujen sekvensit

5.5 Transfektio

COS 7 -solut transfektoitiin eli solun genomia muokattiin Clone 1 P x 458 -plasmidilla. Transfektion aluksi COS 7 -solut jaettiin kuusikuoppalevyille. Seuraavana päivänä tehtiin varsinainen transfektio. PS-putkiin pipetoitiin 150 µl puhdasta DMEM:iä (Dulbecco's Modified Eagle Medium). Siihen lisättiin 7 µl FuGene 6:ta eli lipidirakkulaliuosta ja sekoitettiin liuosta pipetin kärkeä putkessa heilutellen. Liuoksen annettiin tasaantua 5 minuuttia. Liuoksen sekaan pipetoitiin 1 µl eli 1,8 µg plasmidia ja liuosta sekoitettiin jälleen pipetinkärkeä heiluttamalla. Liuoksen annettiin seisoa 20 min, jolloin lipidirakkulat sitoutuivat plasmideihin. Tämän jälkeen putkien plasmidiliuos pipetoitiin tiputtelemalla tippoja solujen päälle ympäri kuoppaa. Kuoppalevy siirrettiin mahdollisimman varovasti takaisin CO₂-inkubaattoriin kasvamaan + 37 °C:n lämmössä.

5.6 Sorteeraus

Sortteeraus eli solujen jakaminen yksittäin kaivoihin kasvamaan suoritettiin Oulun yliopiston Aapistien kampuksella Mikrobiologian laitoksella sijaitsevalla virtaussytometrillä. Solut kuljettiin sinne 6-kuoppalevyllä, jonka ympärille oli kääritty parafilmiä estämään mahdolliset kontaminaatiot. Solut irrotettiin maljalta vasta paikan päällä trypsiinillä ja ne vietiin 15 ml falcon-putkissa virtaussytometrilaitteen luokse. 96-kuppallevyille jaettiin etukäteen 100 µl kasvatuslientä soluja varten. Laite asetettiin jakamaan soluja vihreimmän absorbanssin kohdalta yksi-

tellen kaivoihin (liite 6). Jokaiseen alareunan viimeisiin kaivoihin laitettiin kuitenkin tulemaan 10 solua kerralla vertailun vuoksi. Aluksi laite jakoi soluja hyvin hitaasti 96-kuoppalevyille, kunnes se tukkeutui täysin. Tässä vaiheessa levyjä oli jaettu jo 6 kpl. Kun tukkeuma saatiin poistettua laitteistosta, jaettiin vielä kaksi levyä kyseisen vihreän kohdan soluja kaivoihin. Solujen absorboimiskohtaa vaihdettiin viimeisen kahden levyn kohdalla. Sortteerauksen jälkeen 96-kuoppalevyt käärittiin parafilmiin kontaminaatioiden estämiseksi ja kuljetettiin solut takaisin Linnanmaan kampuksen soluviljelyyn. Soluviljelyssä 96-kuoppalevyihin lisättiin vielä 100 µl lisää kasvatuslientä ja kuoppalevyt laitettiin varovasti kasvaamaan CO₂-inkubaattoriin + 37 °C:seen.

6 KLOONIEN KASVATUS JA TARKISTAMINEN

6.1 Kloonien kasvatus

Sortteerauksen jälkeen kloonien annettiin olla rauhassa viikon ajan. Sen jälkeen käytiin jokainen 960 kuopasta lävitse ja niistä 12 kaivosta löydettiin jakautuneita soluja. Jokaisesta kaivosta myös poistettiin 100 µl kasvatuslientä ja tilalle laitettiin 150 µl uutta kasvatuslientä. Tuosta liemestä 50 µl oli varattu mahdolliseen haihtumiseen. Viikon päästä jokainen kaivo tarkastettiin jälleen uudelleen ja huomattiin, että muutoksia oli enää 9 kaivossa. Kaikkiin kaivoihin vaihdettiin kuitenkin varalta edellisellä tavalla kasvatusliemi, mahdollisten huomaamattomien kloonien jakautumisen takaamiseksi. Noin kuukauden tarkkailun jälkeen ja kloonien hitaan jakautumisen takia alettiin klooneille laittaa alkuperäisten COS 7 -solujen puhdistettua vanhaa kasvatusliemiseosta. Tässä seoksessa oli puolet kaksi kertaa puhdistettua (kasvatusliemi sentrifugoitiin ja kerättiin ainoastaan varovasti nesteen yläpintaa) COS 7 -soluilla ollutta kasvatuslientä ja puolet uutta puhdasta kasvatuslientä. Tämä sai aikaan sen, että kolme silloisesta 6 kloonista alkoi jakautua paremmin.

Viikon kuluttua vanhan kasvatusliemen antamisen jälkeen ensimmäinen 8C12-klooni jaettiin 24-kuoppalevyille. Viikon päästä sen jakamisesta 8C12 jaettiin pienille 3,5 cm:n maljoille, joissa oli pohjalla steriilit peitinlasit. Samalla jakokerralla jaettiin 24-kuoppalevyille uusi klooni 8G6. Neljä päivää sopeutunut 8G6 jaettiin myös pienelle peitinlasilliselle maljalle. Seuraavana päivänä nämä solut värjätettiin ensimmäisen kerran, mutta värjäys epäonnistui voimakkaan taustavärin vuoksi. 8G6- ja 8C12-soluja hoidettiin jakamalla niitä isompiin maljoihin ja parin viikon kuluttua jaettiin 8D2-klooni 24-kuoppalevyille. 8D2 jaettiin viikon kuluttua jälleen 6-kuoppalevyille kasvamaan. Tämän jälkeen siirryttiin pitämään soluja vain elossa jakamalla ne säännöllisesti, kunnes värjäysmetodi saatiin toimivaksi. Viimeisenä jaettiin 2C6-solut, jotka olivat olleet hyvin kitukasvuisia koko ajan. Samalla kertaa jaettiin myös 4D5-solut, mutta ne eivät kestäneet jakami-

sen aiheuttamaa rasiitusta ja kuolivat jakamisen yhteydessä. Kun 2C6-solut saatiin kasvamaan tarpeeksi värjäystä varten, jaettiin loputkin 3 kloonin värjäystä varten pienelle peitinlasimaljalle.

6.1 Immonofluoresenssivärjäys

Immunofluoresenssivärjäyksen tarkoituksena oli kertoa, oliko soluista onnistuttu poistamaan haluttu geeni. Koska kyseinen geeni vastaa AE2-proteiinin tuotannosta, käytettiin värjäyksessä primaarivasta-aineena AE2-vasta-ainetta. Tällöin pystyttiin näkemään solusta siinä oleva AE2-proteiini. Toisena vasta-aineena käytettiin GM130-vasta-ainetta, joka sitoutuu Golgin laitteessa tuotettavaan toiseen proteiiniin ja näin ollen paljastaa Golgin laitteen sijainnin solussa. Värjäykset tehtiin ohjeen mukaan (liite 3).

Immunofluoresenssivärjäyksen kanssa oli alkuun ongelmia taustavärin voimakkuuden takia, ja sen syytä selviteltiin useiden viikon ajan toistuvilla värjäyksillä. Koska värjäykset epäonnistuivat useita kertoja, värjättiin pitkän aikaa vain kontrollisoluna käytettyjä COS 7 -soluja. Näin ollen klooneja tyydyttiin vain jakamaan hengissä selviämisen vuoksi uudelle maljalle. Lopulta syyksi selvisi primaarivasta-aineen liian vähäinen määrä, jolloin solujen normaali fluoresointi tuli värjäyksen läpi.

6.2 Mikroskopia

Mikroskooppina käytettiin Olympus BX51 -fluoresenssimikroskooppia. Näytteet kuvattiin aina 60x objektiivilla immersioöljyn kanssa. GM130-vasta-aineen vihreään väriin käytettiin FITC-suodatinta ja AE2-vasta-aineen punaiseen väriin TRITC-suodatinta. Jos solut oli värjätty lisäksi Hoechst-värjäyksellä, ne tarkastettiin DAPI-suodatinta käyttämällä. Jokaisesta vasta-aineesta otettiin kuvat ja niistä tehtiin kuvakollaasi, jotta kuvien vertailu toisiinsa olisi helpompaa.

7 TULOKSET JA POHDINTA

Lopullisia kloonereita saatiin selviytymään vain 4 kpl, joista kolme sijaitsi viimeisellä onnistuneella 96-kuoppalevyllä. Immunofluoresenssivärjäyksissä kuitenkin selvisi, ettei mikään kloonereista ollut poistogeeninen. Geeni, jota soluista yritettiin poistaa, tuottaa AE2-proteiinia Golgin laitteeseen, ja värjäyksissä keskityttiin todentamaan AE2-proteiinin olemassa olo. Näin ollen poistogeenistä solulinjaa ei saatu valmistettua. Kuten liitteessä 7 näkyy, GM130- ja AE2-vasta-aineet ovat värjäytyneet täysin samasta kohdasta.

Mahdollisia syitä solulinjan valmistuksen epäonnistumiseen on useita. Geeni, joka siirrettiin COS 7 -soluihin, on ihmisperäinen. Kuitenkin solut on alun perin eristetty apinasta, joten geneettinen yhteensopivuus ei ollut paras mahdollinen. Sekvensoinnin tuloksena näkyvässä emäsparijärjestyksessä näkyy yhden emäksen ero oleellisessa kohtaa sekvenssiä. Koska CRISPR-menetelmä on hyvin tarkka ja muuttaa enimmillään vain 20 emäsparin ketjua, on hyvin mahdollista, että kyseinen eroavaisuus on osunut juuri tunnistusalueelle. Jos näin on käynyt, ei soluissa ole tapahtunut halutun AE2-geenin muutosta.

Toinen mahdollinen syy epäonnistumiselle oli proteiinin tärkeys solujen elintoiminnoille. Koska kloonien saanto oli hyvin huono, vain 4 kloonista 960 mahdollisuudesta, on tarpeen epäillä, etteivät onnistuneet poistogeeniset kloonit pysyneet hengissä. Tätä teoriaa tukee myös 8 kloonipopulaation kuoleminen heti kasvatuksen alkuvaiheessa. Nämä 8 populaatiota eivät juuri jakautuneet ja näyttivät mikroskoopilla katsottuina hyvin kitukasvuisilta. Kyseisten populaatioiden soluissa oli myös havaittavissa poikkeavuuksia: normaalia suurempaan kokoa, tavallisen soikiomaisen rakenteen sijaan neliskanttisen pitkulaista rakennetta ja solujen jakautumista toistensa päälle vierekkäin levittymisen sijasta. Tämä selittäisi myös, miksi kaikki neljä kloonista olivat vain tavallisia COS 7 -soluja.

On myös mahdollista, että selvinneet kloonit ehtivät korjaamaan omaa genomiaan pitkän kasvatusajan puitteissa. Solut pyrkivät aina korjaamaan

niissä vallitsevat epätasapainot, mutta korjaamisen onnistumiseksi DNA:n toisen juosteen olisi pitänyt jäädä katkeamatta. Vaikka tämä onkin epätodennäköistä, ei vaihtoehtoa voi täysin sulkea pois.

Viimeisenä mahdollisena syynä poistogeenisen solulinjan valmistuksen epäonnistumiseen on solujen lajittelu ja sen ongelmat. Lähes kaikki kloonit olivat samalta kuoppalevyiltä. Kyseinen levy oli sortteerattu sen jälkeen, kun laitteessa ilmeni tukkeuma. Samainen levy oli myös viimeinen, joka otettiin vielä vihreän absorbanssin alueelta. Tarkkaa syytä työn epäonnistumiselle on kuitenkin mahdotonta antaa.

8 YHTEENVETO

Opinnäytetyön tavoitteena oli valmistaa poistogeeninen solulinja CRISPR-menetelmällä. Solulinja haluttiin valmistaa, jotta olisi voitu tutkia poistetun geenin ja siitä tuotettavan proteiinin vaikutuksia solulle. Menetelmää ei ollut aiemmin kehitetty tämän solulinjan valmistamiseen.

Työn alussa poistogeenistä plasmidia tuotettiin lisää bakteereilla ja valittiin käyttöön sopiva solulinja. Koska tukimusta oli jo aikaisemmin tehty COS 7 -solulinjalla, päätettiin tässäkin työssä käyttää samaista solulinjaa. Lisäksi COS 7 -solut jakautuvat melko nopeasti ja ovat selkeitä värjättyinä.

Kasvatuksen ja puhdistamisen jälkeen plasmidi transfektoitiin soluihin. Kun transfektiosta oli kulunut kaksi päivää, solut laskettiin ja jaettiin onnistuneen transfektion solut eli ne, joissa näkyi fluoresenssileima omalle 6-kuoppalevyille. Tämän jälkeen solut vietiin sortteerattaviksi omiin kaivoihinsa 96-kuoppalevyille, joita oli yhteensä 10 kpl.

Loppuaika opinnäytetyön teosta oli hidasta solujen jakautumisen odottamista ja niiden elossa pitämistä. Hieman myöhemmin aloitettiin hiomaan immunofluoresenssivärjäysmetodia paremmaksi ja lopulta värjättiin myös klooneja. Klooneja saatiin tuotettua 4 kpl 960 kpl:sta, joista kaikki olivatkin samankaltaisia alkuperäisen solulinjan kanssa. Tämä viittaisi soluista poistetun proteiinin olleen liian tärkeä solun toimintojen kannalta.

Koska yksi todennäköinen syy solulinjan valmistamisen epäonnistumiseen oli solulinjan apinaperäisyys ja plasmidin ihmisperäisyys, voisi tätä menetelmää kokeilla uudelleen jossain ihmisperäisessä solulinjassa. Tällöin mahdollinen emäsmuutos tärkeimmän koodausalueen reunoilla ei aiheuttaisi koko solulinjan kuolemista.

Hyvä syy eri solulinjan kokeiluun on myös työn alkuvaiheessa tehdyt virheet. Työssä olisi säästetty paljon aikaa, jos heti soluihin transfektoitumisen jälkeen

solut olisi sekvensoitu. Tällöin olisi nähty, onko plasmidi oikeasti muokannut genomia eikä vain käynyt hetkellisesti solun sisällä. Näin ollen ei olisi tarvinnut odottaa 6:ta viikkoa ensimmäisen kloonin jakamista.

Tätä menetelmää voisi myös kehittää käyttämällä klooneilla vain osittain vanhaa kasvatuslientä, jolloin solukloonit saisivat niille tarpeellisia solujen erittämiä kemiallisia viestejä jakaantumisesta. Jos näin olisi tehty alusta asti, olisi 12 alkuperäisestä kloonista voinut selvitä hengissä useampikin kuin 4 kpl.

LÄHTEET

1. Aittomäki, Esa – Eerikäinen, Tero – Leisola, Matti – Ojamo, Heikki - Suominen, Ilari – Von Weymarn, Niklas 2002. Bioprosessitekniikka. Helsinki: WSOY.
2. Solu on toimiva kokonaisuus. Peda.net. Saatavissa: <https://peda.net/oppimateriaalit/e-oppi/lukio/biologia/n%C3%A4yteluvut/symbioosi2/luku2>. Hakupäivä 20.11.2014.
3. Solukalvo. 2006. Solunetti. Saatavissa: <http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/solukalvo/>. Hakupäivä 18.10.2014
4. Heino, Jyrki – Vuento, Matti 2002. Solubiologia. Porvoo: WSOY.
5. Eläinsolu. 2013. Peda.net. Saatavissa: https://peda.net/oppimateriaalit/e-oppi/lukio/biologia/n%C3%A4yteluvut/Symbioosi1/kuvamappi/luku_22/kuvat/el%C3%A4insolu. Hakupäivä 17.11.2014.
6. Kromatiini 2006. Solunetti. Saatavissa: http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/kromatiinin_rakenne/. Hakupäivä 18.10.2014
7. Clark, Jim 2013. DNA – structure. Saatavissa: <http://www.chem-guide.co.uk/organicprops/aminoacids/dna1.html>. Hakupäivä 14.11.2014.
8. Haajanen, Kari – Pelkonen, Jani – Pärssinen, Raimo – Suominen, Ilari 2010. Geenitekniikka. Turku: Turun ammattikorkeakoulu.
9. Difference DNA RNA 2010. Saatavissa: http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Difference_DNA_RNA-EN.svg. Hakupäivä 16.11.2014
10. Tapani, Pentti 2010. Elävä solu. Helsinki: Gaudeamus.
11. Aromäki, Kirsi – Huuhka, Emma 2008. Golgin laite. Saatavissa: <https://wiki.helsinki.fi/display/solu/Golgin+laite>. Hakupäivä 14.11.2014.
12. Becker, Wayne M. – Bretoni, Gregory Paul – Hardin, Jeff – Kleinsmith, Lewis J. 2008. The World of the Cell. 7., painos. San Francisco: Benjamin Cummings.
13. Chatterjee, Titotama 2013. Organelles and Their Functions. Saatavissa: <http://www.buzzle.com/articles/organelles-and-their-functions.html>. Hakupäivä 17.11.2014.

14. Proteiinien tehtäviä 2006. Solunetti. Saatavissa: http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/valkuaisaineiden_tehtavia/2/. Hakupäivä 12.11.2014.
15. Proteiinit 2006. Solunetti. Saatavissa: <http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/valkuaisaineet/2/>. Hakupäivä 12.11.2014.
16. SLC4A2 (Solute Carrier Family-4 Anion Exchanger Member-2). Saatavissa: http://www.proteinlounge.com/biosyn/view_datasheet.asp?pname=SLC4A2. Hakupäivä 10.11.2014.
17. Kellokumpu, S. – Neff, L. – Jämsä-Kellokumpu, S. – Kopito, R. – Baron, R. 1988. A 115-kD polypeptide immunologically related to erythrocyte band 3 is present in Golgi membranes. *Science* vol. 242. S. 1308-1311.
18. Zinc Finger Nuclease (ZFN) Genome-Editing. Saatavissa: <http://www.horizon-discovery.com/about-us/our-science/discover-our-science/gene-editing/zinc-finger-nuclease-zfn-genome-editing>. Hakupäivä 24.11.2014.
19. Joung, J. Keith – Sander, Jeffrey D. 2013. TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. Saatavissa: <http://www.nature.com/nrm/journal/v14/n1/full/nrm3486.html>. Hakupäivä 24.11.2014.
20. Bikard, David – Cox, David – Jiang, Wenyan – Marraffini, Luciano A. – Zhang, Feng 2013. RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. *Nature Biotechnology* vol. 3. S. 233 – 239.
21. CRISPR Genome Engineering. Saatavissa: <https://www.addgene.org/CRISPR/guide/>. Hakupäivä 13.11.2014.
22. Plasmid 48138 2013. Saatavissa: <https://www.addgene.org/48138/>. Hakupäivä 13.11.2014.
23. Boyer, Rodney 2000. *Modern experimental biochemistry*. 3., painos. San Francisco: Benjamin Cummings.
24. CRISPR (Cas9) Genome-Editing. Horizon. Saatavissa: <http://www.horizon-discovery.com/about-us/our-science/discover-our-science/gene-editing/crispr-cas9-genome-editing>. Hakupäivä. 15.10.2014
25. Nukleiinihappojen monistamien 2006. Solunetti. Saatavissa: http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/nukleiinihappojen_monistaminen/2/. Hakupäivä 22.10.2014

26. Sekvensointi 2006. Solunetti. Saatavissa: <http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/sekvensointi/2/>. Hakupäivä 22.10.2014
27. Sangerin menetelmä 2006. Solunetti. Saatavissa: http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/sangerin_menetelma/2/. Hakupäivä. 20.10.2014.
28. Hassinen, Antti – Kokkonen, Nina – Paakkola, Teija – Reini, Kaarina – Rivinoja, Antti 2012. Cell biology practical part – opetusmateriaali. Oulun yliopisto.
29. Flow Cytometry - How Does It Work? 2014. Oregon State University. Saatavissa: http://www.unsolvedmysteries.oregonstate.edu/flow_06. Hakupäivä 21.10.2014.
30. Cook, Deborah – Odell, Ian D. 2013. Immunofluorescence Techniques. Journal of Investigative Dermatology vol. 133, nro. 1. Saatavissa: <http://www.nature.com/jid/journal/v133/n1/full/jid2012455a.html>. Hakupäivä 8.10.2014.
31. Vancells, Javier Conde. Direct vs indirect immunofluorescence. Saatavissa: <http://www.abcam.com/secondary-antibodies/direct-vs-indirect-immunofluorescence>. Hakupäivä 8.10.2014
32. Soluviljely 2006. Solunetti. Saatavissa: http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/soluviljely_1/1/. Hakupäivä 20.10.2014
33. Coté, Rosalie J. 1998. Aseptic technique for cell culture. Current Protocols in Cell Biology. S. 35 – 44. Saatavissa: <http://biotechengineeringyuvraj.files.wordpress.com/2008/02/current-protocols-in-cell-biology.pdf>. Hakupäivä 8.10.2014
34. Phelan, Mary C 1998. Basic techniques for mammalian cell tissue culture. Current Protocols in Cell Biology. S. 10 – 19. Saatavissa: <http://biotechengineeringyuvraj.files.wordpress.com/2008/02/current-protocols-in-cell-biology.pdf>. Hakupäivä 8.10.2014
35. Animal Cell Culture Protocols & Applications. Qiagen. Saatavissa: <http://www.qiagen.com/fi/resources/molecular-biology-methods/animal-cell-culture/>. Hakupäivä: 12.10.2014
36. Solulinjat 2006. Solunetti. Saatavissa: http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/solulinjat_/2/. Hakupäivä: 10.11.2014.

LIITTEET

Liite 1 Työssä käytetyt reagenssit ja laitteisto

Liite 2 Transformaatio ja Digestiot

Liite 3 Method for Immunofluorescence staining on Coverslips

Liite 4 Plasmid DNA Mini Kit – työohje

Liite 5 Nucleobond® Xtra Midi – työohje

Liite 6 Sortteerauksen solujen valintakohdat.

Liite 7 Tulokset

TYÖSSÄ KÄYTETYT REAGENSsit JA LAITTEISTO**Reagenssit**

AE2ct, Teetetty

Agaroosi, agarose multi-purpose, Bioline

Albumin from bovine serum, Sigma

Alexa fluor 488, Invitrogen

Alexa fluor 594, Invitrogen

Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM), Sigma

Dulbecco's phosphate buffered saline 10x (PBS), Sigma

FuGene 6 transfektion reagent, Promega

GeneRuler 1 kb DNA ladder, Thermo Scientific

GM130, BD Biosciences

Immu-Mount, Thermo Scientific

iProof high fidelity DNA polymerase, Bio-Rad

Nonident P40, Roche

Pensilliini (10 kU/ml – streptomysiini (10 mg/ml), Sigma

Saponin, Calbiochem

Laitteet

BLOWIZARD Golden Line, Kojair

Centrifuge 5415 D, Eppendorf

CO2 Inkubator, Binder

Easy-Cast Elektroporesis system

Electrophoresis power supply

GE Healthcare EPS 301 Electrophoresis Power Supply

High performance 2UV transilluminator, UVP

Leica DM IL LED microscope

Mastercycler personal PCR, Eppendorf

Megafuge 1.9 R, Heracus

SUB Agua 26, Grant

System microscope BX51 BX2 series

Vortex-genie

Transformaatio

Transformaation of bacterial cell

1. Add DNA (ligation mix 1-2 µg pDNA) into 200 µl competent cells.
2. Incubate on ice for 30 min.
3. Heat shock + 42 C, 45 s. (critical step, be accurate with the incubation time!)
4. Incubate on ice for 2min after which add 300 µl LB-medium without antibodies.
5. Grow cells 1h in tabletop shaker + 37 C, 300 rpm.
6. Inoculate suspension into LB-plate with proper antibiotics (depends on a plasmid)
7. Grow cells overnight in + 37 C.

Next day prepare mini-prep cultures if any bacterial colonies exist.

Digestiot

Tehtiin digestiot PCR_ille seuraavan ohjeen mukaan:

PCR-tuote:

| | |
|-------|--|
| 25 µl | PCR-tuotetta |
| 5 µl | 10* restriktioentsyymiin sopivaa puskuria (Fastdigest Green tai Tango) |
| 1 µl | BSA:ta (jos tarvitsee, kuten esim. Kpn I) |
| 1 µl | 5' entsyymi (10 U) |
| 1 µl | 3' entsyymi (yleensä XbaI) (10 U) |

Inkuboidaan 1-1,5h +37 °C:ssa

Ohje immunofluoresenssivärjäykseen

Method for Immunofluorescence staining on Coverslips

1. Wash cells twice with 1 ml PBS pH 7.4 (RT)
2. Fix coverslips in 4% paraformaldehyde, 1 ml (diluted in PBS, pH 7.4) for 15 min RT
3. Wash with several changes (3x) PBS (1 ml)
4. Block non-specific staining by incubating in 1 ml PBS + 5% BSA (or FBS) + 0.1% Saponin for 1h at RT.
5. Incubate in primary antibody (100 μ l; diluted in previous buffer) for 1h at RT.
6. Wash 2 x (1ml) PBS + 5% BSA + 0.1% Saponin
7. Incubate in fluorescent labeled secondary antibody (1: 500; 100 μ l) for 1h at RT in the dark to protect the fluorescence.
8. a) wash with 2 x PBS + 5% BSA + 0.1% Saponin
b) wash in dH₂O
9. Mount with Immu-Mount

Hoechst staining :

Before mounting (and wash with water) incubate the cells with 1 μ g/ml Hoechst –stain (1 ml) diluted in PBS for 5min. After incubation wash the cells once with PBS and once with water before mounting.

E.Z.N.A.® Plasmid DNA Mini Kit I Spin Protocol

E.Z.N.A.® Plasmid DNA Mini Kit I Protocol - Spin Protocol

All centrifugation should be performed at room temperature unless otherwise noted. For low copy number plasmids refer to Page 21. This protocol is designed to isolate plasmid DNA from *E. coli* grown in an overnight 1-5 mL LB culture.

Materials and Equipment to be Supplied by User:

- 100% ethanol
- Microcentrifuge capable of at least 13,000 x *g*
- Nuclease-free 1.5 mL or 2 mL microcentrifuge tubes
- Culture tubes
- Optional: sterile deionized water
- Optional: water bath or incubator capable of 70°C
- Optional: 3M NaOH solution

Before Starting:

- Heat Elution Buffer to 70°C if plasmid DNA is >10 kb
- Prepare DNA Wash Buffer and Solution I according to the instructions in the Preparing Reagents section on Page 6

1. Isolate a single colony from a freshly streaked selective plate, and inoculate a culture of 1- 5 mL LB medium containing the appropriate selective antibiotic. Incubate for ~12-16 hours at 37°C with vigorous shaking (~ 300 rpm). Use a 10-20 mL culture tube or a flask with a volume of at least 4 times the volume of the culture. It is strongly recommended that an endA negative strain of *E. coli* be used for routine plasmid isolation. Examples of such strains include DH5a® and JM109®.
2. Centrifuge at 10,000 x *g* for 1 minute at room temperature.
3. Decant or aspirate and discard the culture media.
4. Add 250 µL Solution I/RNase A. Vortex or pipet up and down to mix thoroughly. Complete resuspension of cell pellet is vital for obtaining good yields.

Note: RNase A must be added to Solution I before use. Please see the instructions in the Preparing Reagents section on Page 6.

5. Transfer suspension into a new 1.5 mL microcentrifuge tube.
6. Add 250 µL Solution II. Invert and gently rotate the tube several times to obtain a clear lysate. A 2-3 minute incubation may be necessary.

Note: Avoid vigorous mixing as this will shear chromosomal DNA and lower plasmid purity. Do not allow the lysis reaction to proceed more than 5 minutes. Store Solution II tightly capped when not in use to avoid acidification from CO₂ in the air.
7. Add 350 µL Solution III. Immediately invert several times until a flocculent white precipitate forms. **Note:** It is vital that the solution is mixed thoroughly and immediately after the addition of Solution III to avoid localized precipitation.
8. Centrifuge at maximum speed (≥13,000 x *g*) for 10 minutes. A compact white pellet will form. Promptly proceed to the next step.
9. Insert a HiBind® DNA Mini Column into a 2 mL Collection Tube.

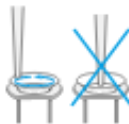
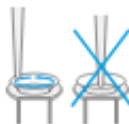
Optional Protocol for Column Equilibration:

1. Add 100 µL 3M NaOH to the HiBind® DNA Mini Column.
 2. Centrifuge at maximum speed for 30-60 seconds.
 3. Discard the filtrate and reuse the collection tube.
10. Transfer the cleared supernatant from Step 8 by CAREFULLY aspirating it into the HiBind® DNA Mini Column. Be careful not to disturb the pellet and that no cellular debris is transferred to the HiBind® DNA Mini Column.
 11. Centrifuge at maximum speed for 1 minute.
 12. Discard the filtrate and reuse the collection tube.
 13. Add 500 µL HB Buffer.
 14. Centrifuge at maximum speed for 1 minute.

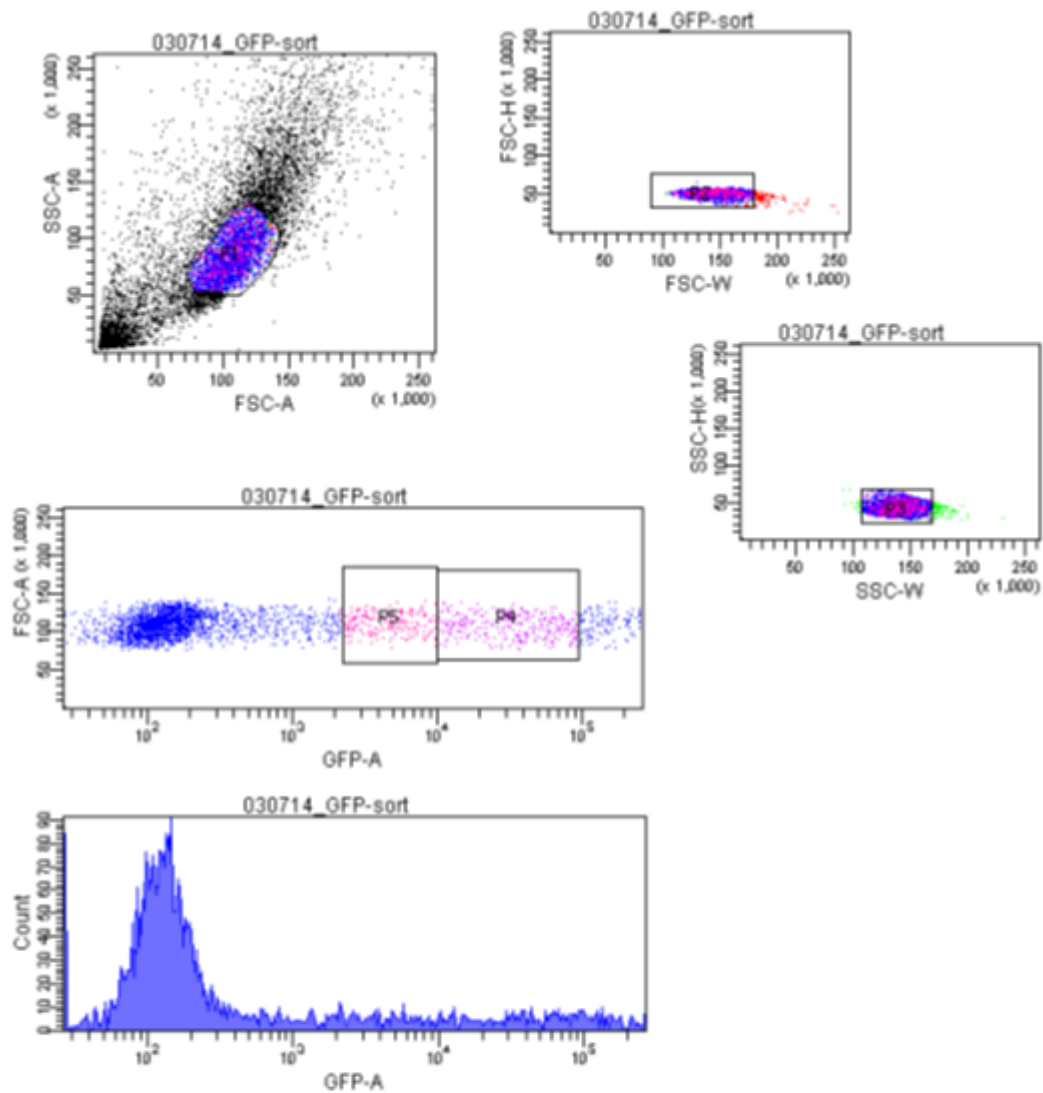
15. Discard the filtrate and reuse collection tube.
16. Add 700 μ L DNA Wash Buffer.
Note: DNA Wash Buffer must be diluted with 100% ethanol prior to use. Please see Page 6 for instructions.
17. Centrifuge at maximum speed for 1 minute.
18. Discard the filtrate and reuse the collection tube.
Optional: Repeat Steps 16-18 for a second DNA Wash Buffer wash step.
19. Centrifuge the empty HiBind® DNA Mini Column for 2 minutes at maximum speed to dry the column matrix.
Note: It is important to dry the HiBind® DNA Mini Column matrix before elution. Residual ethanol may interfere with downstream applications.
20. Transfer the HiBind® DNA Mini Column to a clean 1.5 mL microcentrifuge tube.
21. Add 30-100 μ L Elution Buffer or sterile deionized water directly to the center of the column membrane.
Note: The efficiency of eluting DNA from the HiBind® DNA Mini Column is dependent on pH. If using sterile deionized water, make sure that the pH is around 8.5.
22. Let sit at room temperature for 1 minute.
23. Centrifuge at maximum speed for 1 minute. **Note:** This represents approximately 70% of bound DNA. An optional second elution will yield any residual DNA, though at a lower concentration.
24. Store DNA at -20°C.

Plasmid DNA purification (NucleoBond® Xtra Midi / Maxi)

Protocol-at-a-glance (Rev. 12)

| | Midi | | Maxi | |
|---|---|---|---|---|
| 1-3 Cultivation and harvest | 4,500-6,000 x g 4 °C, 15 min | | | |
| 4-5 Cell lysis <i>(Important: Check Buffer LYS for precipitated SDS)</i> | High-copy / low-copy 8 mL / 16 mL Buffer RES 8 mL / 16 mL Buffer LYS RT, 5 min | | High-copy / low-copy 12 mL / 24 mL Buffer RES 12 mL / 24 mL Buffer LYS RT, 5 min | |
| 6 Equilibration of the column and filter | 12 mL Buffer EQU |  | 25 mL Buffer EQU | |
| 7 Neutralization | 8 mL / 16 mL Buffer NEU Mix thoroughly until colorless | | 12 mL / 24 mL Buffer NEU Mix thoroughly until colorless | |
| 8 Clarification and loading of the lysate | Invert the tube 3 times Load lysate on NucleoBond® Xtra Column Filter | | | |
| 9 1 st Wash | 5 mL Buffer EQU ! |  | 15 mL Buffer EQU ! | |
| 10 Filter removal | Discard NucleoBond® Xtra Column Filter | | Discard NucleoBond® Xtra Column Filter | |
| 11 2 nd Wash | 8 mL Buffer WASH ! | | 25 mL Buffer WASH ! | |
| 12 Elution | 5 mL Buffer ELU | | 15 mL Buffer ELU | |
| 13 Precipitation | NucleoBond® Xtra Midi | NucleoBond® Xtra Midi Plus | NucleoBond® Xtra Maxi | NucleoBond® Xtra Maxi Plus |
| | 3.5 mL Isopropanol 4,5-15,000 x g 4 °C, 30 min | 3.5 mL Isopropanol RT, 2 min Load NucleoBond® Finalizer | 10.5 mL Isopropanol 4,5-15,000 x g 4 °C, 30 min | 10.5 mL Isopropanol RT, 2 min Load NucleoBond® Finalizer Large |
| 14 Washing and drying | 2 mL 70% ethanol 4,5-15,000 x g RT, 5 min 10-15 min | 2 mL 70% ethanol ≥ 6 x air until dry | 4 mL 70% ethanol 4,5-15,000 x g RT, 5 min 15-30 min | 4 mL 70% ethanol ≥ 6 x air until dry |
| 15 Reconstitution | Appropriate volume of TE buffer | 200-800 µL Buffer TRIS | Appropriate volume of TE buffer | 400-1000 µL Buffer TRIS |

Sortteerauksen solujen valintakohtat.



| Population | #Events | %Parent | %Total |
|------------|---------|---------|--------|
| All Events | 10,000 | ### | 100.0 |
| P1 | 3,337 | 33.4 | 33.4 |
| P2 | 3,195 | 95.7 | 32.0 |
| P3 | 3,071 | 96.1 | 30.7 |
| P4 | 323 | 10.5 | 3.2 |
| P5 | 205 | 6.7 | 2.1 |

Tulokset 1.10.2014

