

STADIA

HELSINGIN AMMATTIKORKEAKOULU

Torque teno –viruksen proteiinien tuotto ja puhdistus

Bioanalytiikan koulutusohjelma,
bioanalyttikko
Opinnäytetyö
16.4.2007

Eija Lönn



Koulutusohjelma		Suuntautumisvaihtoehto	
Bioanalytiikan koulutusohjelma			
Tekijä/Tekijät			
Eija Lönn			
Työn nimi			
Torque teno -viruksen proteiinien tuotto ja puhdistaminen			
Työn laji	Aika	Sivumäärä	
Opinnäytetyö	Kevät 2007	27+5 liitettä	
<p>TIIVISTELMÄ</p> <p>Torque teno -virus (TTV, TT-virus) on uusimpia löydettyjä ihmisviruksia ja se on erittäin yleinen täysin terveissäkin ihmisissä. Sitä kantaa ihmisistä yli 80 % kantajan maantieteellisestä sijainnista tai iästä riippumatta. Vielä ei osata sanoa, aiheuttaako torque teno -virus tiettyjä tauteja vai onko se osa normaaliflooraa, mikä olisi viruksista puhuttaessa täysin uutta. Helsingin yliopiston virologian laitoksella Haartman instituutissa toimiva professori Klaus Hedmanin tutkimusryhmä on kehittänyt sopivia menetelmiä TT-viruksen proteiinien tuottoon ja puhdistamiseen. Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli optimoida näitä menetelmiä.</p> <p>Proteiinien tuottoon ja puhdistukseen valittiin mukaan TTV:n genomin koodittamista kuudesta proteiinista oletettavasti kapsidiproteiinina toimiva ORF1-Arg (ORF1-proteiini, josta on poistettu arginiinirikas alue) ja ei-rakenneproteiinina toimiva ORF2/2. Proteiinit tuotettiin Sf9- ja High Five -hyönteissoluissa, ja vektorina ekspressoinnissa oli baculovirus. Puhdistukseen käytettiin agaroosigeelielektroforeesia (AGE) ja vaihtoehtoisesti histidiiniaffiniteettikromatografiaa.</p> <p>Proteiinien tuotossa optimoitiin solujen infektiossa käytettävän baculoviruksen määrää ja selvitettiin, että proteiineja saatiin tuotettua suunnilleen yhtä paljon sekä Sf9- että High Five -soluissa. AGE-menetelmällä saatiin puhdistettua ORF2/2-proteiinia ja menetelmää yritettiin kehittää niin, että saataisiin puhdistuksen yhteydessä enemmän proteiineja talteen. Histidiiniaffiniteettipuhdistusta ei ollut aikaisemmin käytetty hyönteissoluissa tuotettujen TTV:n proteiinien puhdistukseen. Menetelmällä saatiin tuotettua ORF1-proteiinia, mutta puhdistusmenetelmä vaatii vielä kehittelyä.</p> <p>Tämän opinnäytetyön avulla saatiin menetelmien kehitystyötä eteenpäin, ja havaittiin ongelmakohtia, joihin tulee kiinnittää jatkossa huomiota. Histidiiniaffiniteettipuhdistusta ei vielä saatu toimivaksi ja AGE:n kehittelyä täytyy myös vielä jatkaa. TTV:n puhdistettuja proteiineja tullaan käyttämään apuna määrittäessä TTV:n mahdollista patogeenisuutta ja biologista merkitystä. Proteiinien avulla kehitellään laboratoriomenetelmiä TTV:n virusinfektioiden ja sairauksien löytämiseen ja diagnosointiin mm. tuottamalla proteiinien avulla spesifisiä vasta-aineita TTV:tä vastaan. Opinnäytetyössä puhdistettuja ORF2/2-proteiineja käytettiin tutkimusryhmässä TTV-spesifisen T-soluumuniteetin tutkimiseen.</p>			
Avainsanat			
torque teno -virus, proteiinien tuotto, proteiinien puhdistus			



Degree Programme in		Degree	
Biomedical Laboratory Science		Bachelor of Health Care Services	
Author/Authors			
Eija Lönn			
Title			
The Expression and Purification of Proteins of Torque Teno Virus			
Type of Work	Date	Pages	
Final Project	Spring 2007	27+5 appendices	
<p>ABSTRACT</p> <p>Torque teno virus (TTV, TT- virus) is one of the novel human viruses. It is not known yet, whether TTV causes any diseases or whether it is part of the normal flora of humans. In the Department of Virology at the Haartman institute at the University of Helsinki Klaus Hedman' s research group has developed methods for expression and purification for proteins of torque teno virus. The purpose of this final project was to optimize these methods.</p> <p>Two proteins of TTV were chosen for the examination, those were the putative capsid protein ORF1 and the non-structural protein ORF2/2. The proteins were expressed in Sf9 and High Five insect cells with baculovirus as a vector. The purification was performed by agarose gel electrophoresis (AGE) and by histidine affinity chromatography.</p> <p>In this study I found that Sf9 cells were as good as High Five cells for the expression of TTV proteins. The purification of ORF2/2 was successful by the AGE method, but the method was quite labourous and should be developed further. The purification of ORF1 protein was successful by histidine affinity chromatography, however, a few problems were encountered.</p> <p>The purified proteins are used for research of TTV pathogenity. The purified ORF2/2 protein was already used to study TTV specific T-cell immunity.</p>			
Keywords			
torque teno virus, expression of proteins, purification of proteins			

1 JOHDANTO

Torque teno -virus (TTV, TT-virus) on uusimpia löydettyjä ihmisviruksia, ja virusta on tutkittu ympäri maailmaa kymmenen vuoden ajan. TTV on erittäin yleinen virus, jopa yli 80 % ihmisistä kantaa sitä elimistössään, mutta vielä ei osata sanoa, aiheuttaako se tiettyjä tauteja vai onko se osa ihmisen normaaliflooraa. Viruksen genomi on saatu tutkittua melko hyvin, mutta genomien koodaamien proteiinien tutkimus on vasta alussa. Viruksen tutkimusta hidastaa mm. se, ettei ole löydetty sopivia soluja, joissa TTV monistuisi. (Biagini ym. 2006: 298; Maggi ym. 2006; Tommiska – Kakkola – Hedman – Söderlund-Venermo 2001: 19.)

Helsingin yliopiston virologian osastolla Haartman instituutissa toimivan professori Klaus Hedmanin tutkimusryhmä tutkii uusia ihmisviruksia ja yksi näistä viruksista on TT-virus. Professori Hedmanin tutkimusryhmän TTV-tutkimuksen tavoitteena on määrittää TTV:n biologinen ja patogeeninen merkitys. Tätä varten ryhmässä kehitellään menetelmiä virusinfektioiden ja sairauksien löytämiseen ja diagnosointiin. Muun muassa TTV:n proteiineja tarvitaan näiden menetelmien kehittämiseen, ja proteiinien avulla voidaan tuottaa vasta-aineita tutkimustarkoituksiin sekä käyttää proteiineja antigeeneinä tutkittaessa B- ja T-soluvasteita. Nämä soluvastetutkimukset liittyvät serodiagnostisten menetelmien kehittelyyn.

Proteiinien tuotto ja puhdistaminen ovat arkipäivää teollisuudessa ja tutkimuksessa. Jokainen proteiini vaatii kuitenkin omanlaisten rakenteidensa ja ominaisuuksiensa vuoksi erilaiset tuotto- ja puhdistusmenetelmät. Professori Hedmanin tutkimusryhmä on kehitellyt sopivia menetelmiä mm. TT-viruksen proteiinien tuottoon ja puhdistukseen. Menetelmät ovat olleet jo käytössä ja niitä haluttaisiin saada tehokkaammiksi. Tämän opinnäytetyön tarkoituksena on optimoida TT-viruksen proteiinien tuottoon ja puhdistuksen valittuja menetelmiä.

TT-viruksen genomien koodittamista kuudesta proteiinista tuottoon ja puhdistukseen on valittu kaksi proteiinia. Nämä proteiinit ovat oletettavasti kapsidiproteiineina toimiva ORF1-Arg (ORF1-proteiini, josta on poistettu arginiinirikas alue) ja ei-rakenneproteiiniina toimiva ORF2/2. Kaikkia kuutta proteiinia on jo saatu tuotettua *E. colissa* ja/tai hyönteissoluissa ja osaa proteiineista on jo puhdistettu. ORF1-Arg on mielenkiinnon kohteena, koska sen oletetaan rakenneproteiiniina synnyttävän immuunivas-

teita, ja ORF2/2 valittiin, koska sitä on ollut helppo tuottaa soluissa. Valittuja proteiineja tuotetaan Sf9- ja High Five -nimisissä hyönteissoluissa. Proteiinien tuotossa käytetään hyväksi vektorina toimivaa bakulovirusta, jonka genomiin on yhdistelmä-DNA-tekniikalla liitetty viruksen proteiinia koodaava osa. Proteiinien puhdistuksessa pyritään saamaan proteiini erilleen muista solun partikkeleista, ja tässä työssä siihen käytetään kahta eri menetelmää, agarosigeelielektroforeesia (AGE) ja histidiiniaffiniteettipuhdistusta. AGE on aikaa vievä ja siitä saatavien puhdistettujen proteiinien määrä ei ole kovin suuri, joten menetelmää täytyisi saada tehokkaammaksi. Histidiiniaffiniteettipuhdistusta ei ole aikaisemmin kokeiltu hyönteisissä tuotettujen TTV:n proteiinien puhdistukseen, ja sitä haluttaisiin kokeilla nyt ensimmäistä kertaa.

2 TORQUE TENO -VIRUS

Torque teno -virus on uusimpia löydettyjä ihmisviruksia. Se löydettiin vuonna 1997 Japanista verensiirron jälkeistä hepatiittia eli maksatulehdusta sairastaneen potilaan verestä. TTV on ensimmäinen ihmisvirus, jolla on rengasmaisen, yksinauhainen DNA-genomi. Virus on vaipaton, sen proteiiniuori (kapsidi) on todennäköisesti muodoltaan ikosahedraalinen ja DNA-juoste on negatiivisäikeinen. TTV on pieni virus, se on vain noin 30 nm halkaisijaltaan ja sen DNA käsittää 3.6-3.9 kiloemästä (kb). Kansainvälisen taksonomiakomitean (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV) circovirustyöryhmä on ehdottanut TT-viruksen kuuluvan perusteilla olevaan anellovirusten sukuun. Tähän sukuun kuuluisi TT-virus, TTMV (torque teno mini -virus) ja eläimistä löydetty TTV:n kaltaiset virukset. (Biagini - Bendielli 2004: 335-341; Biagini ym. 2006: 298; Hino 2002: 151; Tommiska ym. 2001: 19.)

Ei ole vielä löydetty sopivia soluja, joissa TT-virus pystyisi monistumaan tehokkaasti ja tämä viivästyttää TTV:n monistumisen ja sen geenien ilmentymisen tutkimista. Serologisia menetelmiä ei myöskään ole vielä saatu kehitettyä, joten TTV:n tutkimiseen käytetyt menetelmät perustuvat ainoastaan DNA:n havaitsemiseen PCR (polymerase chain reaction) -tekniikalla seerumista. (Maggi ym. 2006: 2571; Qiu ym. 2005: 6505.)

2.1 Taudinaiheuttamiskyky

TT-virus on erittäin yleinen kaikkialla maailmassa ja sitä on myös täysin terveissä ihmisissä. Yli 80 % ihmisistä kantaa verenkierrassaan erilaisia määriä kyseistä virusta riippumatta ihmisen maantieteellisestä asuinpaikasta, sukupuolesta, iästä tai terveydentilasta. Usein ihmiset kantavat samaan aikaan monia genomien emäsjärjestykseltään paljonkin toisistaan eroavia virustyyppieitä. TTV:n on osoitettu voivan aiheuttaa aivan terveillä ihmisillä kroonisen vireman eli virus jää pysyvästi verenkiertoon. (Maggi ym. 2006; Biagini ym. 2006: 303.)

Vielä ei osata sanoa luotettavasti, aiheuttaako TTV tiettyjä sairauksia vai onko se osa normaaliflooraa. Ihmisen normaaliflooraan ei ole tähän mennessä todettu kuuluvan yhtään viruslajia, joten TTV olisi näin sen ensimmäinen edustaja. (Simmonds ym. 1999.) Aikaisemmissa tutkimuksissa on esitetty hepatiitin, HIV-infektion, syövän sekä diabeteksen olevan yhteydessä TT-virusinfektioon. On oletettavaa, että raportoitu lisääntynyt TT-virusinfektioiden yleisyys edellä mainituissa ryhmissä on ollut vain näennäistulos ja kertoo siitä, että kyseisten ryhmien potilailla on ollut korkeammat viruskuormitukset. Tämän tutkimuksen jälkeen on vielä saatu viitteitä siitä, että TT-virus liittyy lasten nuhaan ja akuutteihin ylempien hengitysteiden sairauksiin. (Biagini ym. 2006: 301-302.)

Tällä hetkellä ajatellaan, että TT-viruksella saattaa olla yhteyttä joihinkin sairauksiin, mutta ei tiedetä vielä mihin. Aikaisemminkin on ollut tapauksia, joissa viruksen ja sen aiheuttaman taudin välisen syy-yhteyden selvittäminen on vienyt aikaa. B19-virus (parvovirus) löydettiin vuonna 1975 ja sen yhteys aplastiseen anemiaan havaittiin vasta vuonna 1981. Anellovirusten moninaisuuteen voi verrata papilloomaviruksia, joita on olemassa lähes sata eri tyyppiä. Ne ovat yleisiä ihmisen epiteelisoluissa, ja eri virustyyppit aiheuttavat samanaikaisia infektoita. Ja tiedetään myös, että vain tietyt virustyyppit aiheuttavat sairauksia, samalla tavalla saattaa olla myös TTV:n kohdalla. (Biagini ym. 2006: 302.)

2.2 TTV:n genomi

Genomin tutkiminen on osoittanut, että TT-virus on erittäin heterogeeninen. Siltä on löydetty jopa noin 40 eri genotyyppiä, ja ne on jaoteltu viiteen selvästi erilaiseen fylogeneettiseen ryhmään. (Maggi ym. 2006: 2571.) Ryhmien maantieteellinen jakautuminen ei ole selvillä. Eräässä tutkimuksessa mukana olleista TTV-infektion saaneista ih-

misistä yhden fylogeneettisen ryhmän virusta oli 58 prosentilla tutkituista ja kahden tai useamman fylogeneettisen ryhmän virusta 42 prosentilla. Tämä osoittaa, että monen ryhmän yhtäaikaista infektioita ovat yleisiä. (Biagini 2006: 302; Devalle – Niel 2004: 166.)

2.3 TTV:n tuottamat proteiinit

On saatu selville, että TTV:n genomi tuottaa kolmea lähetti-RNA:ta, joista saadaan vaihtoehtoisilla translaation aloituskohdilla vähintään kuusi eri proteiinia. Kolme lähetti-RNA:ta ovat kooltaan 2.8, 1.2 ja 1.0 kb:ta. Tuotetuista proteiineista kaksi on löydetty pääasiassa tumasta, kaksi pääasiassa sytoplasmasta ja kaksi kaikkialta solua. Tästä jakautumisesta voidaan päätellä, että pääosin tumasta löytyneet ORF2/2- ja ORF2/3-proteiinit ovat oletettavasti osallisina genomien replikaatiossa ja ekspressoimisessa. ORF1- ja ORF2-proteiinit esiintyvät pääosin sytoplasmasta, ja tästä päätellen ne ovat oletettavasti rakenneproteiineja. ORF1/1- ja ORF1/2-proteiinit sijaitsivat tasaisesti sekä sytoplasmassa että tumassa. (Qiu ym. 2005: 6505-6510)

3 PROTEIINIEN TUOTTO JA PUHDISTUS

Proteiineja tuotetaan tieteellisen tutkimuksen käyttöön sekä lääketeollisuudessa lääkkeiksi ja rokotteiksi. Lisäksi proteiineihin kuuluvia entsyymejä tuotetaan pesuaine-, rehu-, tärkkelys-, tekstiili-, meijeri- ja elintarviketeollisuuden käyttöön. (Aittomäki ym. 2002: 112, 103, 105.) Tuotossa apuna on isäntäsolu, johon on geeniteknisesti (rekombinantti- eli yhdistelmä-DNA-tekniikalla) siirretty haluttua proteiinia koodittava geeni. Tuotettuja proteiineja voidaan kutsua rekombinanttiproteiineiksi. Isäntänä voi toimia bakteeri-, eläin-, hiiva- tai homesolu. Isäntäsolua on muunneltu niin, että se tuottaa suuria määriä juuri haluttua proteiinia samalla kun se muodostaa omia proteiinejaan. Yhdistelmä-DNA-tekniikka on mahdollistanut lähes minkä tahansa proteiinin tuoton. (Aittomäki ym. 2002: 71-72; Hatti-Kaul – Mattiasson 2003: ix.)

Lääketeollisuudessa tuotettavat proteiinit toimivat kasvutekijöinä, korvaushoitona ja spesifisiä proteiineja tai soluja tunnistavina molekyyleinä. Tällaisia ovat esimerkiksi insuliini diabeteksen hoitoon, erytropoietiini anemian hoitoon sekä interferonit ja interleukiinit syövän hoitoon. (Aittomäki ym. 2002: 103; Brown 2006: 310.) Rokotteiden

valmistamisessa käytetään hyväksi rekombinanttiproteiineja siten, että tutkitaan mikä osa (proteiini) viruksesta toimii antigeenina eli aiheuttaa immuunivasteen. Tämän jälkeen siirretään tätä osaa koodittava geeni isäntäsoluun ja saadaan tuotettua näin anti-geenia, jota voidaan käyttää rokotteenä. (Aittomäki ym. 2002: 105.)

Proteiinien tuottoon kuuluvat työvaiheet ovat isäntäsolujen kasvatus ravintoliuoksessa, solujen hajotus, solun rippeiden ja proteiinien erottaminen toisistaan, haluttujen proteiinien puhdistus, uudelleen laskostaminen ja konsentroidi eli väkevöinti. Soluja voidaan kasvattaa joko soluviljelmässä tai fermentorissa, joka on massatuotantoon tarkoitettu bioreaktori. (Hatti-Kaul – Mattiasson 2003: ix.) Proteiinit voivat erittyä ulos solusta tai jäädä solun sisälle, ja jos proteiini on solun sisäinen, täytyy solut hajottaa ennen kuin päästään jälkikäsitteilyyn. Solujen hajotuksessa käytettäviä mekaanisia menetelmiä ovat ultraäänikäsitteily (sonikaatio), korkeapainehomogenisointi ja jauhaminen. Hiiva- ja homesoluja hajotetaan jauhamalla. Ei-mekaanisia menetelmiä ovat kuivaus, lämpöshokki, osmoottisen paineen käyttö sekä erilaisten kemikaalien ja entsyymien hyväksikäyttö. Solurippeiden erotus tapahtuu suodattamalla tai sentrifugoimalla ja proteiinin puhdistamiseen käytetään yleensä kiteytystä, kalvosuodatusta tai kromatografiaa. (Aittomäki ym. 2002: 183-184; Hatti-Kaul ym.2003: xii.)

4 SOLUVILJELY

Soluviljelyssä soluja kasvatetaan ja niiden annetaan jakautua *in vitro* eli elimistön ulkopuolella pulloissa, maljoilla tai kuoppalevyllä. Soluviljelyyn voidaan ottaa soluja lähes mistä tahansa kudoksesta, ja soluviljelmät luokitellaan primaarisoluviljelmiin ja solulinjoihin. Primaariviljelmän solut ovat peräisin suoraan kudoksesta, ja ne ovat jakautumiskykyisiä yleensä vain rajallisen ajan. Solulinjaviljelmän solut ovat peräisin syöpäkasvaimista tai muuntuneista soluista ja useimmat näistä viljelmistä voivat jakautua ikuisesti. Solulinjojen solut voidaan saada myös primaariviljelmästä muuntamalla (transformaatio) niitä. Transformaatio voidaan tehdä kemiallisilla karsinogeneilla, ionisoivalla säteilyllä tai virusten avulla. Transformaatio voi tapahtua myös spontaanisti soluviljelmässä. (Aittomäki ym. 2002: 174-178; Davis 2002: 135-136.)

Useimpia kiinteistä kudoksista otettuja soluja kasvatetaan kiinteällä alustalla, jolla solut kasvavat yleensä yhtenä kerroksena ja soluja kutsutaan tällöin adherenteiksi soluiksi

(Freshney 2005: 454). Hematopoeettiset (verisolut) ja jotkut transformoidut solut voivat sen sijaan kasvaa irrallaan soluviljelynesteesä (suspensioviljelmä). Kiinteä kasvatusalusta on muovia, jonka sähkövaraus on poistettu, tai se on lasia, jolla on negatiivinen varaus. Kiinteällä alustalla viljeltäessä solujen täytyy kiinnittyä alustaansa ennen kuin ne voivat alkaa lisääntyä. (Freshney 2005: 31-32.)

Useimmat adherentit soluviljelmät lopettavat jakautumisensa siinä vaiheessa, kun kasvualusta on peittynyt kokonaan soluilla. Soluviljelmä täytyisi jakaa juuri vähän ennen tätä vaihetta. Jakaminen voidaan tehdä niin, että otetaan kaikki solut jaettavasta soluviljelmästä ja jaetaan ne useisiin viljelyastioihin tai voidaan ottaa vain osa soluista ja laitetaan ne vastaavankokoiseen viljelyastiaan kuin alkuperäisessä soluviljelmässä. Yleensä tehdään niin, että ylläpidetään solubarastoa yhdessä soluviljelypulloissa ja käytetään jäljelle jääviä soluja kokeisiin. (Davis 2002: 201.)

Solujen ylläpitoon tarvitaan *in vivo* -tilaa vastaavat olosuhteet. Tähän kuuluvat oikea happi- ja hiilidioksidipitoisuus, pH, osmolaliteetti ja oikeat ravinteet. Nämä ominaisuudet on säädetty sopivaksi kasvatuliukseen (ravintoliuos, medium), jossa soluviljelmän solut kasvavat. Kasvatuliuos on tärkein yksittäinen tekijä soluviljelyssä, koska se varmistaa solujen hengissä pysymisen ja jakautumisen. Se myös takaa sellaisten kemiallisten aineiden saannin, joita solu ei itse pysty syntetisoimaan. Aikaisemmin käytettiin luonnollisia kasvatulioksia, kuten plasmaa, kudostestettä, seerumia ja alkioita. Nykyisin kun kasvatulioksien tarve on lisääntynyt, on alettu valmistaa myös kemiallisesti kasvatusteiteitä. (Davis 2002: 69-74; Freshney 2005: 115.) Kasvatulioksissa voidaan käyttää seerumia, joka sisältää aminohappoja, vitamiineja, kasvutekijöitä, proteiineja, hivenaineita, lipidejä ja hormoneja. Lisäksi seerumi kelatoi (sitoo) raskasmetalleja ja nostaa ravintoliuksen puskurikapasiteettia. Kasvatulioksiin lisätään yleensä myös antibiootteja estämään mikrobien kasvua. (Aittomäki ym. 2002: 176.)

Proteiinien tuotossa hyönteissolujen etuna nisäkässoluihin verrattuna on niiden kyky tuottaa tehokkaasti rekombinanttiproteiineja. Tämä tuottojärjestelmä perustuu bakulovirusiin, jotka ovat yleisiä hyönteisissä, mutta eivät yleensä tartu selkärangkaisiin. Bakuloviruksen genomi sisältää polyhedrin-nimisen geenin, jolla on erittäin vahva promootori (säätealue) ja tämän ansiosta kyseisen geenin koodittamaa proteiinia tuotetaan erittäin paljon. Samalla tavalla tapahtuu myös jos polyhedrin-geenin paikalle siirretään geeniteknisesti vieras geeni. (Brown 2006: 295; Cann 2001: 46-47.)

Esimerkkejä soluviljelyissä käytettävistä hyönteissoluista ovat Sf9- ja High Five -solut. High Five -solut ovat peräisin *Trichoplusia nin* munasarjan soluista ja Sf9-solut ovat *Spodoptera frugiperda* kotelovaiheen munasarjan soluista. (Biosciences Research Association.)

5 ELEKTROFOREESI

Elektroforeesi erottelee sähkövirran avulla molekyyliä toisistaan. DNA:lla on fosfaattiryhmiensä ansiosta negatiivinen varaus, joten se liikkuu geelissä kohti positiivista varausta. Elektroforeeseja on olemassa monenlaisia eri tarkoituksiin. Polyakryyliamidigeelielektroforeesi (PAGE) on tarkoitettu pienien DNA-jaksojen erotteluun, ja keskikokoisia DNA-partikkeleita voidaan analysoida agarosigeelielektroforeesilla (AGE). Suuria DNA-molekyyliä tai kokonaisia kromosomeja voidaan erotella pulssikenttäelektroforeesilla (PFGE), ja proteiinien tutkimiseen käytetään SDS (sodium dodecyl sulphate) -PAGE:a. (Sambrook – Russel 2001: A8.40; Suominen – Ollikka 2003: 72.)

5.1 Agarosigeelielektroforeesi

Agaroosi on merilevästä saatu polysakkaridi, joka liukenee kuumennettaessa veteen ja geeliiytyy jäähtyessään muodostaen verkkomaisen rakenteen. Tämä verkkorakenne hidastaa molekyylien kulkeutumista geelissä, jolloin pienemmät molekyylit liikkuvat samassa ajassa nopeammin pidemmälle kuin isommat molekyylit. Näin näytteessä olevat erikokoiset molekyylit pystytään erottelemaan toisistaan niiden kulkeutuessa geelissä koolleen ominaisen matkan ja muodostaen näin oman vyöhykkeen eli ”bändin”. Nämä vyöhykkeet saadaan näkyviksi värjäämällä ne DNA:n emästen väliin tunkeutuvan etidiumbromidin avulla ja säteilyttämällä DNA-etidiumbromidikompleksia ultravioletilla. (Suominen – Ollikka 2003: 72.)

AGE:n ajolaite koostuu altaasta, jonka kummassakin päässä on elektrodit. Altaaseen laitetaan ajopuskuria ja geeli upotetaan siihen. Altaaseen laitettava puskuri on samaa liuosta, johon myös agaroosi liuotetaan. Agarosin liuotus tapahtuu kiehattamalla, jonka jälkeen agaroosista valetaan geeli, johon näytekammalla tehdään näytekolot näytteitä varten. Näytteiden täytyy olla tiheämpiä kuin ajopuskuri, jotta näyte painuisi näytekoloon. Tämän vuoksi näytteeseen sekoitetaan näytepuskuria, joka sisältää usein gly-

serolia. Näytepuskurissa on myös väriainetta, esimerkiksi bromfenolisinistä (bromophenolblue, BPB), jotta ajautumista voidaan seurata. Tiedetään, että BPB kulkeutuu samalla nopeudella kuin 300 emäsparin pituinen, kaksinauhainen DNA. Geelille laiteetaan myös kokostandardi, joka sisältää tunnetun kokoisia molekyylejä, ja joiden muodostamia vyöhykkeitä voidaan verrata näytteen vyöhykkeisiin. (Suominen – Ollikka 2003: 73.)

Agarooseja on olemassa markkinoilla monia erilaisia, kuten ”low-melting/gelling-temperature agarose”(LGT), joka sulaa ja jähmettyy alemmassa lämpötilassa kuin muut agarosit. Tätä agarosia käytetään DNA:n eristämiseen geeliltä. LGT-geelin etu muihin geeleihin verrattuna on se, että geeli sulaa lämpötilassa (65 °C), joka ei denaturoi DNA:ta. Näin pystytään leikkaamaan geeliltä haluttu DNA-jakso, sulattamaan geeli pois DNA:n ympäriltä ja jatkokäyttämään DNA:ta. (Sambrook – Russel 2001: 5.29; Suominen – Ollikka 2003: 72, 77.)

5.2 SDS-polyakryyliamidigeelielektroforeesi

SDS-polyakryyliamidigeelielektroforeesi (SDS-PAGE) on tarkoitettu proteiinien erotteeluun ja siinä käytettävä geeli on polyakryyliamidia. Näytepuskurin ja kuumennuksen avulla proteiinit saadaan hajotettua polypeptideiksi (proteiinin alayksikkö), joihin SDS tarttuu tehden polypeptidit negatiivisesti varautuneiksi. SDS tarttuu kaikkiin polypeptideihin samalla tavalla, joten sitoutuvan SDS:n määrä riippuu vain polypeptidin koosta. SDS-polypeptidikompleksit siis ajautuvat geelissä proteiinin koon mukaan. (Sambrook – Russel 2001: A8.40.)

SDS-PAGE-geelissä on kaksi osaa, ylägeeli ja alageeli. Näytteen polypeptidi-SDS-kompleksit ajautuvat ensin nopeasti yhteen kasaan ylägeelin alaosaan geelin huokoisuuden vuoksi ja lähtevät tästä ajautumaan yhtä aikaa alageeliin. Tämä parantaa polypeptidi-SDS-kompleksien erottelukykyä. (Sambrook – Russel 2001: A8.40.) Geeli värjätään Coomassie Brilliant Blue -värjäyksellä tai hopeasuoloilla. Coomassie Brilliant Blue sitoutuu kaikkiin proteiineihin, mutta ei itse geeliin. Väri muodostaa proteiinin kanssa vahvoja sidoksia, jotka ovat van der Waalsin voimia ja elektrostaattisia vuorovaikutuksia NH_3^+ -ryhmien kanssa. Ylimääräinen väri poistetaan diffuusion avulla, ja lopuksi geeli kuivataan kuivauslaitteessa alipainetta käyttäen (Sambrook – Russel 2001: A8.46, A8.50).

5.2.1 Immunoblottaus

Immunoblottauksessa tunnistetaan antigeeneja (yleensä proteiineja), jotka sitoutuvat spesifisen vasta-aineen kanssa. Proteiinit erotellaan ensin SDS-PAGE:lla ja siirretään sitten sähkövirran avulla esimerkiksi nitroselluloosakalvolle. Kalvolta tukitaan kaikki vapaana olevat proteiinien sitoutumiskohdat maidon proteiineilla, jonka jälkeen lisätään vasta-aine ja paikallistetaan lopuksi antigeeni-vasta-aine-kompleksi radioaktiivisella aineella, värillisellä reaktiolla tai kemiluminisenssia hyväksi käyttäen. (Sambrook – Russel 2001: A8:52.)

6 HISTIDIINIAFFINITEETTIPUHDISTUS

Proteiinien histidiiniaffiniteettipuhdistus (His-affiniteettipuhdistus) kuuluu affiniteettikromatografiaan. Se perustuu IMAC (immobilized metal ion affinity chromatography) -menetelmään, jossa metalli-ionit sitoutuvat proteiinien tiettyjen aminohapposivuketjujen kanssa. Histidiiniaffiniteettikromatografiassa nämä aminohappoketjut ovat histidiinejä, joihin nikkeli-ionit liittyvät. Nikkeli-ionit on sidottu NTA:han (nitrolotriaceic acid) ja nämä yhdessä on liitetty agarosihelmiin. Histidiiniaffiniteettikromatografialla pystytään puhdistamaan yhdistelmä-DNA-tekniikalla tuotettuja proteiineja, joiden alku- tai loppupäähän on liitetty kuuden histidiinin ketju. (Hatti-Kaul ym. 2003: 105-106; Qiagen 2003: 19.)

Rekombinantiteknikalla tuotetut proteiinit voivat kasautua solun sisälle liukenemattomiksi kasautumiksi. Useimmat kasautumissa olevat proteiinit saadaan liukoisiksi ennen puhdistusta käyttämällä esimerkiksi 8 M ureaa tai 6 M GuHCL:a (guanidiinihydrokloridi) denaturoimaan proteiinit. His-affiniteettipuhdistusmenetelmällä voi puhdistaa proteiineja sekä denaturoivissa (proteiinin muoto muuttunut) että natiiveissa (luonnollinen) olosuhteissa. (Qiagen 2003: 63.)

Puhtaamman tuloksen saamiseksi voidaan puhdistuksessa käyttää pieniä määriä imidatsolia ja β -merkapttoetanolia. Imidatsoli vähentää muiden kuin halutun proteiinin kiinnitymistä Ni-NTA-kompleksiin. Kuuden histidiinin ketju sitoutuu parhaiten ja epäpuhdistuksina toimivat proteiinit, joilla on yksittäinen histidiiniaminohappo, kilpailevat imidatsolin kanssa sitoutumisesta Ni-NTA:han. β -merkapttoetanolii estää sellaisten proteiini-

nien puhdistumisen, jotka ovat kiinnittyneet haluttuun proteiiniin solun hajotuksen yhteydessä. (Qiagen 2003: 66.)

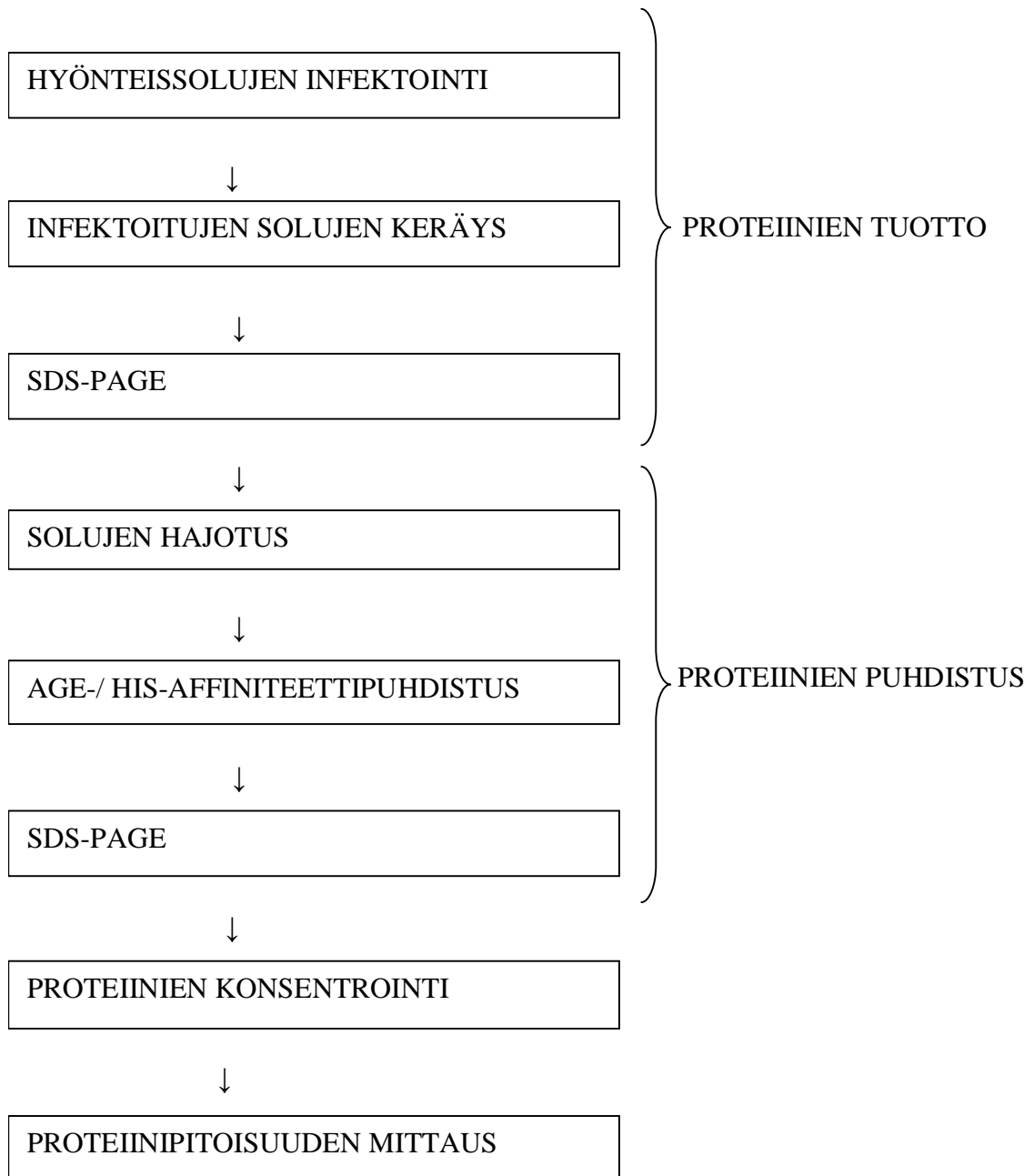
Puhdistus suoritetaan pylväässä, jonka läpi Ni-NTA-agaroosiin sekoitettu näyte laskeaan. Ni-NTA-agaroosi ja siihen kiinnittyneet halutut proteiinit jäävät pylvääseen suodattimen päälle kaiken muun valuessa suodattimen läpi. Ni-NTA-agaroosin pesulla päästään eroon epäpuhtauksista, joita aiheuttavat sellaiset proteiinit, joilla on luonnostaan histidiiniaminohappo ja jotka kiinnittyvät sen avulla NI-NTA:han. Nämä proteiinit saadaan poistettua pesun avulla, koska yleensä proteiineilla ei ole luonnostaan kuuden histidiinin ketjua, joka kiinnittyy NI-NTA:han tiukimmin, ja löyhästi Ni-NTA:han kiinnittyneet proteiinit irtoavat pesussa. Denaturoivassa puhdistuksessa pesuun käytetään pesupuskuria, jonka vaikutus perustuu pH:hon, ja natiivipuhdistuksessa käytetään imidatsolia. Lopuksi haluttu proteiini eluoidaan eli poistetaan liuottimen avulla Ni-NTA:sta. Denaturoivissa olosuhteissa tehtävässä puhdistuksessa eluointi suoritetaan eluointipuskurilla, joka alentaa pH:ta ja saa näin proteiinit irtoamaan Ni-NTA:sta. Natiiveissa olosuhteissa tehtävään eluointiin käytetään imidatsolia. (Qiagen 2003: 64, 70-71.)

7 TUTKIMUKSEN TARKOITUS

Tutkimuksen tavoitteena oli optimoida TT-viruksen proteiinien tuottoa ja puhdistusta. Lähtökohtana oli se, että käytettävissä oli kaksi puhdistusmenetelmää (AGE- ja His-affiniteettipuhdistus) ja kaksi puhdistettavaa proteiinia (ORF1-Arg- ja ORF2/2-proteiinit). Näitä proteiineja oli saatu puhdistettua aikaisemmin AGE-menetelmällä, mutta puhdistusta haluttiin saada vaivattommaksi ja proteiineja haluttiin saada enemmän talteen puhdistuksesta. His-affiniteettipuhdistusta ei ollut aikaisemmin kokeiltu hyönteissoluissa tuotettujen ORF1-Arg ja ORF2/2-proteiinien puhdistukseen. Proteiinien tuottoa myös optimoitiin jonkin verran Sf9- ja High Five -hyönteissoluissa, mutta pääpaino optimoinnissa oli puhdistusmenetelmissä. Tarkoitus oli tutkimuksen avulla saada tietoa siitä, mitkä toimenpiteet vievät puhdistusta tehokkaammaksi ja millaisiin proteiinisäantoihin näillä menetelmillä voidaan kyseessä olevien proteiinien kohdalla päästä.

8 TYÖN SUORITUS

Tutkimuksessa tuotettiin torque teno -viruksen genotyyppi 6:n kahta proteiinia (tutkimuksen vaiheet KUVIOSSA 1). Proteiinien tuotto aloitettiin infektoimalla Sf9- tai High Five -solut bakuloviruksella, jonka genomiin oli liitetty ORF1-Arg- tai ORF2/2-proteiinia koodittava geeni. Infektoidut solut kerättiin kolmen päivän kuluttua infektiosta, ja SDS-PAGE:lla analysoitiin, oliko soluissa tuottunut haluttua proteiinia.



KUVIO 1. Tutkimuksen vaiheet.

Kerätyt solut hajotettiin puhdistusta varten sonikaatiolla, ja tämän jälkeen oli vuorossa proteiinien puhdistaminen AGE:lla tai vaihtoehtoisesti His-affiniteettikromatografialla. SDS-PAGE:lla analysoitiin, kuinka puhtaaksi proteiini oli saatu, ja lopuksi proteiini konsentroidiin pienempään tilavuuteen ja mitattiin sen määrä.

8.1 Proteiinien tuotto

Proteiinien tuottoon käytettiin bakulovirusia, joiden genomiin oli yhdistelmä-DNA-tekniikalla liitetty joko TTV:n ORF1-Arg-proteiinia tai ORF2/2-proteiinia koodaava DNA-jakso. Viruksia kutsuttiin näin ollen rekombinanttibakulovirusiksi. ORF1-Arg-proteiinin DNA-jakson alusta oli poistettu arginiinia koodittava osa. Virusgenomiin oli liitettyä lisäksi kuutta histidiiniä sekä GST-proteiinia (glutationi-S-transferaasi) koodaavat osat ennen TTV-proteiinia koodaavia jaksoja. Kumpikin näistä osista tuli myös valmiisiin ORF1-Arg- ja ORF2/2-proteiineihin. Sekä GST:tä että histidiiniä vastaan on olemassa vasta-aine, jonka avulla tuotetut rekombinanttiproteiinit pystytään havaitsemaan.

ORF1-Arg- ja ORF2/2-proteiineihin geeniteknisesti liitetyn histidiiniosan avulla proteiineja pystytään puhdistamaan histidiiniaffiniteettimenetelmällä, jossa proteiineissa oleva kuuden histidiinin osa tarttuu kiinni nikkeliin ja ORF1-Arg- tai ORF2/2-proteiini pystytään näin erottamaan solun muista proteiineista. Myös GST:n avulla voidaan puhdistaa rekombinanttiproteiineja affiniteettimenetelmällä ja tällä menetelmällä puhdistettaessa proteiinit eivät saa olla denaturoituneina.

ORF1-Arg- ja ORF2/2-proteiinien tuottoon käytettiin Sf9- ja High Five -hyönteissoluja, joita kasvatettiin soluviljelypulloissa. Solujen kasvua täytyi ylläpitää jakamalla ne uusiin soluviljelypulloihin ennen kuin solujen kasvualustan tyhjä tila loppui, jotta ne eivät lopettaisi jakautumistaan ja kuolisi. Jakaminen tehtiin kaksi kertaa viikossa. Jakamisvaiheessa osa soluista siirrettiin uusiin pulloihin jatkamaan kasvuaan, ja osa soluista otettiin infektiioon. Soluviljelyssä käytetyn kasvatusliuoksen koostumus on LIITTEESSÄ 4.

8.1.1 Sopivien hyönteissolujen ja viruserien testaus

Tutkimus aloitettiin testaamalla, tuottuvatko ORF1-Arg- ja ORF2/2-proteiinit paremmin Sf9- vai High Five -soluissa, ja kumpia soluja kannattaisi tämän kokeilun perusteella käyttää jatkossa. Samalla kokeiltiin, millä bakuloviruserällä (virusmedium) olisi paras infektointikyky.

Virusmedium sisältää proteiinien tuotossa käytettäviä bakulovirusia. Kun virusmedium lisätään soluviljelmään, siinä olevat virukset infektoivat solut eli menevät solujen sisään ja monistuvat siellä samalla kun ne tuottavat omia proteiinejaan ja rekombinanttiproteiineja. Monistuneet virukset tulevat ulos solusta kasvatusliuokseen. Viruksia saadaan varastoon seuraavia infektioita varten, kun monistuneita viruksia sisältävä kasvatusliuos (seuraava virusmediumera) otetaan talteen samalla kun infektoituneet solut kerätään kolmen päivän jälkeen infektoinnista.

Sf9-soluja laitettiin kasvamaan 25 cm²-kokoisiin soluviljelypulloihin 3 miljoonaa solua per pullo ja vastaavasti High Five -soluja laitettiin 1,5 miljoonaa per pullo. Kasvatusliuosta tuli joka soluviljelypulloon 3 ml. Solujen annettiin kiinnittyä pohjaan 15 minuuttia, jonka jälkeen pulloista otettiin pois 2 ml mediumia. Tämän jälkeen lisättiin kuhunkin pulloon 300 µl virusmediumia, joka sisälsi tutkimuksessa käytettäviä rekombinanttibakulovirusia. Työssä kokeiltiin neljää eri erää (eri-ikäisiä viruksia) ORF1-Arg- ja ORF2/2-virusmediumeja sekä Sf9- että High Five -soluille. Pullot laitettiin sekoittajalle tunniksi ja sen jälkeen tunniksi pöydälle. Kummassakin vaiheessa solut olivat huoneenlämmössä. Sen jälkeen medium pipetoitiin pois ja tilalle laitettiin 4 ml puhdasta mediumia. Soluviljelypullot vietiin lämpökaappiin (ilman hiilidioksidiosapainetta) kolmeksi vuorokaudeksi +27 °C:een. Solujen keräys on kuvattu LIITTEESSÄ 1.

SDS-PAGE:lla analysoitiin, oliko infektoituissa soluissa tuottunut ORF1-Arg- ja ORF2/2-proteiineja. SDS-PAGE:ssa käytettävien geelien koostumus on kuvattu LIITTEESSÄ 2 ja liuosten koostumus LIITTEESSÄ 3. PBS:ään (phosphate buffered saline) suspensoitujen (tarkoittaa kiinteän aineen ja nesteen sekoittamista keskenään) solujen sekaan pipetoitiin näytekupkurina toimivaa LSB:tä (Laemmli Sample Buffer) siten, että solujen konsentraatioksi tuli 5 milj. solua/ml. Näyte ja LSB sekoitettiin ja laitettiin kuivahauteeseen eli ”lämpöblokkiin” 100 °C:een 5 minuutiksi. Kuumennus ja LSB saivat näytteen proteiinit denaturoitumaan ja LSB:n sisältämä SDS tarttui denaturoituneisiin proteiineihin. Näytettä pipetoitiin SDS-PAGE-geelille 10µl/näytekolo. Ajo-puskurina käytettiin Tupla Running-nimistä puskuria. Geelit laitettiin ajautumaan ajo-

laitteeseen (25 mA/geeli) noin 30 minuutiksi. Kun geelin ja LSB:n sisältämä bromofenolisininen oli ajautunut noin millimetrin päähän alareunasta, geelit otettiin pois ajolaitteesta ja ne värjättiin Coomassien Brilliant Blue-väriä sisältävällä Fast stain-liuoksella ja liika väri poistettiin Destain-liuoksella.

Näytteistä tehtiin vielä immunoblottaus, jossa värjäämättömän SDS-PAGE-geelin proteiinit siirrettiin sähkövirran avulla nitroselluloosakalvolle, jolta ORF1-Arg ja ORF2/2-proteiinit saatiin näkyviksi vasta-aineen avulla. Primaarisena vasta-aineena (tarttuu proteiineihin) käytettiin hiessä tuotettua anti-GST (GST:tä vastaan tuotettu) Ab-1:tä (LabVision) ja sekundaarisena vasta-aineena (tarttuu primaariseen vasta-aineeseen) käytettiin HRP (horseradish peroxidase, piparjuuriperoksidaasi) -konjugoitua, kanissa tuotettua anti-mouse (hiirtä vastaan tuotettu) IgG:tä (DAKO). Antigeenin ja vasta-aineiden kompleksi havainnoitiin diaminobentsidiinin (DAB) ja peroksidaasin muodostaman värireaktion avulla.

8.2 AGE-puhdistus

Proteiinien puhdistus AGE-menetelmällä perustuu samaan periaatteeseen kuin DNA:n eristäminen agarosigeeliltä. AGE:lla saatiin ORF1-Arg- ja ORF2/2-proteiinit eroteltua näytteessä olevista muun kokoisista proteiineista ja muista partikkeleista. Proteiinien puhdistuksessa ajettiin näytteet low-melting-temperature -agarosigeeleillä (Cambrex) pystysuunnassa ja leikattiin ORF1-Arg- tai ORF2/2-proteiinia sisältävät geelipalat oikean kokostandardin osoittamasta kohdasta.

AGE-puhdistus tehtiin ORF1-Arg- ja ORF2/2-proteiineille. Puhdistusta kokeiltiin ensin noin puoli vuotta pakkasessa (-70 °C:ssa) olleilla infektoiduilla Sf9-soluilla. Valmistettiin 5 % agarosigeeli liuottamalla 3,5 g agarosijauhetta 70 ml:aan puskuria (ilman SDS:ää) (AGE:ssa käytettävien liuosten koostumus LIITTEESSÄ 3), ja liuos laitettiin pulloon. Tämä määrä riitti kuudelle geelille. Puskuri oli ilman SDS:ää, koska näin vältettiin liika kuohuminen agarosin liukenemisen yhteydessä. Agarosijauhe liuotettiin puskuriin mikroaaltouunissa kuumentamalla liuosta täydellä teholla 30 sekuntia kerrallaan muutamia kertoja välillä jäähdytellen heiluttelemalla. Pullo laitettiin kuumaan veteen styrox-laatikkoon, jotta geeli ei jähmettyisi pulloon. Geeli valettiin ruiskun avulla pellin ja lasin väliin. Niiden välissä reunoilla oli muoviset liuskat (speisserit), jotka jättivät tilaa geelille. Pelti ja lasi oli kiinnitetty puristimien avulla toisiinsa ja niiden välissä

oli myös näytekampa. Geelin annettiin jähmettyä ja näytekampa otettiin sen jälkeen pois.

8.2.1 Näytteiden esivalmistelu

Solujen joukkoon pipetoitiin proteaasi-inhibiittoria (protease inhibitor cocktail, PIC, Roche), jolla varmistettiin, ettei solun hajotuksessa solun sisältä vapautuvat proteaasit hajota näytteen proteiineja. 7x PIC:iä laitettiin putkeen 100 µl ja näytettä 600 µl. Näytettä otettiin 20 µl talteen myöhempää SDS-PAGE:a varten. Solunäytteestä nähdään, kuinka paljon haluttuja proteiineja on puhdistuksen lähtövaiheessa. Solu/PIC-liuoksen solut rikottiin sonikaattorilla, jonka toiminta perustuu ultraääneen. Putkia pidettiin sonikaattorissa 4 kertaa 10 sekuntia, ja joka välissä putkia jäähdyteltiin 30 sekuntia, koska ultraääni tuottaa lämpöä ja se ei ole hyväksi näytteille. Rikotut solut sentrifugoitiin (13 000 rpm, 5 min, +4 °C). Supernatantista eli sentrifugoinnin jälkeen pohjasakan päälle jääneestä nestekerroksesta otettiin 20 µl näyte putkeen SDS-PAGE:a varten. Loppu supernatantti heitettiin pois, sillä ORF1-Arg- ja ORF2/2-proteiinit eivät ole liukoisessa muodossa vaan pohjalle jäävässä pohjasakassa eli pelletissä. Tässä tapahtui proteiinien raakapuhdistus, koska pois heitetyn supernatantin mukana saatiin näytteestä pois kaikki liukoiset proteiinit. Putken pohjalla ollut pelletti suspensoitiin 300 µl LSB:tä ja 300 µl PBS:ää ja laitettiin kuivahauteeseen 100 °C:een 5 minuutiksi. Geelit asetettiin ajolaitteeseen ja kammioon kaadettiin ajopuskuria (SDS lisätty). Geelillä käytettiin värillistä kokostandardia (Amersham Biosciences), jonka sekaan lisättiin 1:1 LSB:tä. Tätä pipetoitiin geelillä olevaan pienempään näytekoloon 16 µl ja näytettä pipetoitiin geelin isompaan näytekoloon 200 µl. Geelit laitettiin ajautumaan noin 50 minuutiksi (20 mA/geeli).

8.2.2 Geelin käsittely ajon jälkeen

Geelistä leikattiin irti neljä palaa siltä kohtaa, johon halutut proteiinit olivat ajautuneet. Oikean kohdan osoitti kokostandardi. ORF2/2-proteiini oli ajautunut punaisen (66 kDa) kokostandardin kohdalle ja ORF1-Arg ruskean (97 kDa) kokostandardin kohdalle. Näiltä kohdilta leikattiin neljä palaa, joiden kunkin paino oli n. 100 mg. Geelipalat laitettiin kukin omaan putkeen ja niihin lisättiin 1 ml resuspensioliuosta. Putkia kuumennettiin 10 minuuttia kuivahauteessa 70 °C:ssa, jotta geeli sulaisi resuspensioliuoksen joukkoon. Putkia sekoitettiin kaksi kertaa tänä aikana. Lopuksi putket laitettiin jäälle 30 minuutiksi

ja varmistettiin, että näytteet olivat jähmettyneet tänä aikana hyvin. Lopuksi näytteet vietiin pakastimeen $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$:een.

Seuraavana päivänä näytteet sulatettiin jäiden päällä ja sentrifugoitiin (13 000 rpm, 30 min, $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Supernatantti otettiin sentrifugoinnin jälkeen talteen. Sen pipetointi täytyi tehdä suhteellisen nopeasti, sillä geeli alkoi vähitellen nousta pohjalta pintaan, ja geeliä ei ollut tarkoitus pipetoida mukaan.

SDS-PAGE:n avulla analysoitiin, oliko proteiinien puhdistus onnistunut. Sitä varten pipetoitiin $20\text{ }\mu\text{l}$ näytettä ja $10\text{ }\mu\text{l}$ LSB:tä putkeen, jota kuumennettiin 5 minuuttia kuivahauteessa $100\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa. Näytettä pipetoitiin geelin näytekoloon $20\text{ }\mu\text{l}$ ja kokostandardia (GE Healthcare) $3\text{ }\mu\text{l}$. Geelille laitettiin myös ne kaksi näytettä, jotka otettiin talteen puhdistuksen aikana (solut ja supernatantti).

8.2.3 AGE-puhdistuksen kehittäminen

Seuraavalla kerralla AGE-puhdistusta muutettiin niin, että geeliltä leikattavien neljän palan kokoa suurennettiin noin 150 mg :aan. Kokeiltiin, josko näin saataisiin geeliltä enemmän ORF2/2-proteiineja talteen. Resuspensioliuosta lisättiin kunkin palan joukkoon $1,5\text{ ml}$ ja geelit sulatettiin normaaliin tapaan kuivahauteessa $70\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa. Tämän jälkeen geelien annettiin olla jäiden päällä noin 20 minuuttia, jonka jälkeen ne vietiin pakastimeen $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$:een. Seuraavana päivänä näytteiden sentrifugoinnin jälkeen huomattiin, että geeli ei ollut sulanut täysin edellisenä päivänä. Supernatantti otettiin kuitenkin talteen, lisättiin osittain sulaneiden geelien päälle $1,5\text{ ml}$ resuspensioliuosta ja kuumennettiin näytteet tällä kertaa vesihauteessa $70\text{ }^{\circ}\text{C}$:een. Vain osittaiseen sulamiseen epäiltiin olevan syynä se, että isomman kokonsa vuoksi osa geelistä oli jäänyt kuivahauteessa olevan kolon yläpuolelle, eikä ollut näin kuumentunut. Tämän takia otettiin käyttöön vesihaude, jossa geelit saatiin kokonaan kuumenemaan ja sulamaan.

Kaikkien kolmen AGE-puhdistuksen ORF2/2-proteiinit konsentroidiin sentrifugoitavalla suodattimella (Millipore, Centricon Plus-20) ja proteiinin lopullinen määrä mitattiin Piercen BCA-proteiinimääritysmenetelmällä.

8.3 Histidiiniaffiniteettipuhdistus

Sf9-soluissa tuotettuja ORF1-Arg- ja GST-proteiineja (kuuden histidiinin osan sisältävä) puhdistettiin histidiiniaffiniteettikromatografialla (The QIAexpressionist, protokolla nro. 17, Qiagen). Tuottaessa TTV:n proteiineja hyönteissoluissa, nämä proteiinit muodostavat solunsisäisiä, liukenemattomia kasautumia. Proteiinit täytyi tämän vuoksi puhdistaa denaturoivissa olosuhteissa, jotta ne saatiin kasautumista liukoiseen muotoon. GST-proteiinia puhdistettiin, koska sitä haluttiin käyttää myöhemmin negatiivisena kontrollina tutkittaessa TTV:n T-solvasteita. ORF1-Arg:ia puhdistettiin 8 ml ja GST:tä 4 ml (kummassakin näytteessä pitoisuus 20 milj. solua/ml). Molempia näytteitä laimennettiin 4 ml:lla PBS:ää ja solut rikottiin sonikaattorilla. Varmistettiin mikroskoopilla, että ainakin suurin osa soluista oli hajonnut. Näyte sentrifugoitiin (12 000 g, 10 min, + 4 °C). Supernatantti heitettiin pois ja pelletti suspensoitiin imidatsolia ja β -merkaptetanolia sisältävään puskuri A:han (pH 8.0) (puhdistuksessa käytettävien puskurien koostumus LIITTEESSÄ 5). Puskuri A teki solunsisäisissä kasautumissa olevat proteiinit liukoiseksi sen sisältämän guanidiinihydrokloridin ansiosta. Puskuri A:ta lisättiin ORF1-Arg-näytteelle 11,5 ml ja GST-näytteelle 7,7 ml. Näytteet sentrifugoitiin (12 000 g, 10 min, +4 °C) ja supernatantti otettiin talteen. Lisättiin 50 prosentista Ni-NTA-agarosia ORF1-Arg-näytteelle 5,7 ml ja GST-näytteelle 3,8 ml. Näytteet laitettiin tunniksi sekoittajalle, jonka jälkeen näyte siirrettiin His-affiniteettipuhdistuspylvääseen. Agarosia pestiin pesupuskurilla (pH 6.3), joka sisälsi β -merkaptetanolia ja imidatsolia. Pesupuskuria laitettiin ORF1-Arg-näytteeseen 24 ml ja GST-näytteeseen 16 ml. Lopuksi ORF1-Arg-proteiini ja GST irroitettiin agarosista laskemalla pH:ta eluointipuskurilla (pH 4.5). Sitä lisättiin ORF1-Arg:lle 30 ml ja GST:lle 12 ml. Agarosia ei saanut kuivua missään vaiheessa, joten pylväässä täytyi olla koko ajan jonkin verran nestettä. ORF1-Arg:in suodattimesta läpi mennyt eluointipuskuri otettiin talteen viiteen putkeen, joten eluointipuskurista saatiin viisi fraktiota (osaa), ja jokaiseen fraktioon tuli 6 ml puskuria. GST:n eluointipuskuri otettiin kahteen putkeen. Lopuksi vielä otettiin näyte agarosista huuhtelemalla sitä PBS:llä. Tästä näytteestä nähdään, onko proteiinia jäänyt eluoinnin jälkeen kiinni agarosiin. Nämä näytteet analysoitiin SDS-PAGE:lla.

Seuraavaksi proteiineja konsentroidiin sentrifugoitavalla suodattimella (Millipore, Centricon Plus-20), jonka koko oli 5 NMWL:aa. Se tarkoittaa, että kaikki 5 kilodaltonia (kDa) isommat molekyylit eivät mene suodattimen lävitse. Suodattimen koko valitaan niin, että konsentroitava proteiini ei pääse suodattimesta läpi. Konsentroidiin otettiin His-affiniteettikromatografialla puhdistetut ORF1-Arg- ja GST-proteiinit. Konsentroidin

ei sujunut loppuun asti odotetulla tavalla, vaan suodattimet menivät tukkoon. Näytteistä otettiin talteen osa, joka oli mennyt suodattimesta läpi ja osa joka ei ollut mennyt läpi (eli jossa konsentroitavien proteiinien täytyisi olla). Näistä näytteistä mitattiin proteiinipitoisuudet Piercen BCA-proteiininmääritysmenetelmällä. Lisäksi näytteet analysoitiin SDS-PAGE:lla.

Seuraavalla kerralla His-affiniteettipuhdistuksessa oli mukana Sf9-soluissa tuotettua GST-proteiinia ja High Five -soluissa tuotettua ORF1-Arg-proteiinia. Tällä kertaa ei käytetty β -merkaptotetanolia eikä imidatsolia puskuri A:ssa ja pesupuskurissa. Puhdistettiin 8 ml ORF1-Arg-proteiinia ja 2,7 ml GST-proteiinia (kummassakin näytteessä pitoisuus 20 milj. solua/ml). Puhdistus suoritettiin samoin kuin edellisellä kerralla, ja myös pylvään läpi menneestä pesupuskurista otettiin SDS-PAGE-geelille näyte, josta nähtiin, oliko pesupuskurin mukana irronnut GST- ja ORF1-Arg-proteiinia. Tällä kertaa proteiineja ei konsentroitunut vaan tehtiin ainoastaan dialysointi Piercen dialysointikasetilla, jolla saatiin proteiinit natiiviin muotoonsa poistamalla näytteistä His-affiniteettipuhdistuksen puskureista peräisin oleva proteiineja denaturoiva urea. Dialysointiin otettiin mukaan vain GST.

9 TULOKSET JA NIIDEN TULKINTA

Seuraavassa on esitetty optimoinnin tulokset ja pohdittu optimoinnissa eteen tulleiden ongelmien syitä.

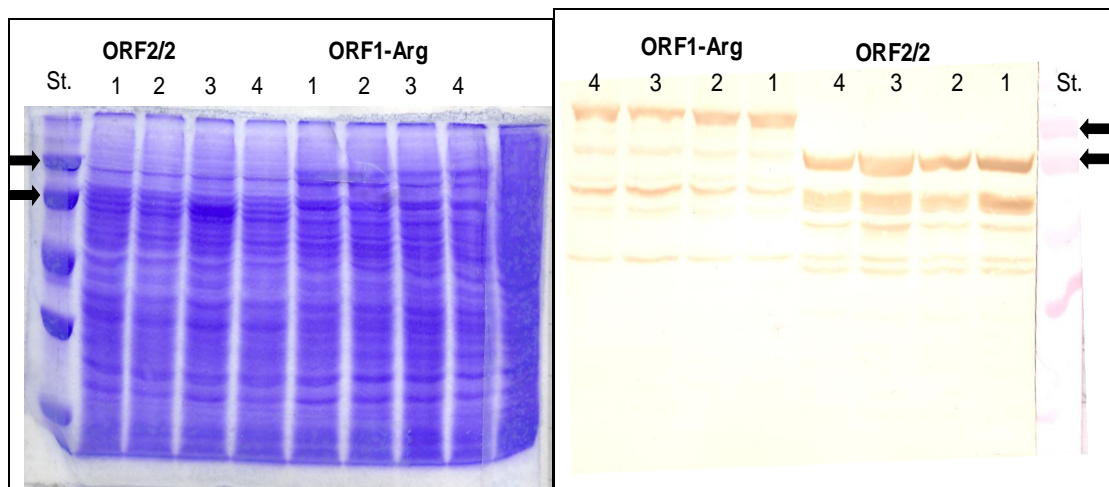
9.1 Proteiinien tuotto

Fast stain -värjäyksen perusteella proteiinit näyttivät tuottuvan yhtä hyvin sekä Sf9- että High Five -soluissa. Tämän värjäyksen perusteella ei voitu kuitenkaan olla varmoja, oliko geelillä oleva vyöhyke juuri haluttu proteiini. Tämän vuoksi näytteistä tehtiin vielä immunoblottaus, jolla saatiin värjättyä proteiinit spesifisesti rekombinanttiproteiineihin sitoutuvan GST-vasta-aineen avulla. Fast stain -värjäyksen ja immunoblottauksen geelit ovat KUVIOISSA 2 ja 3.

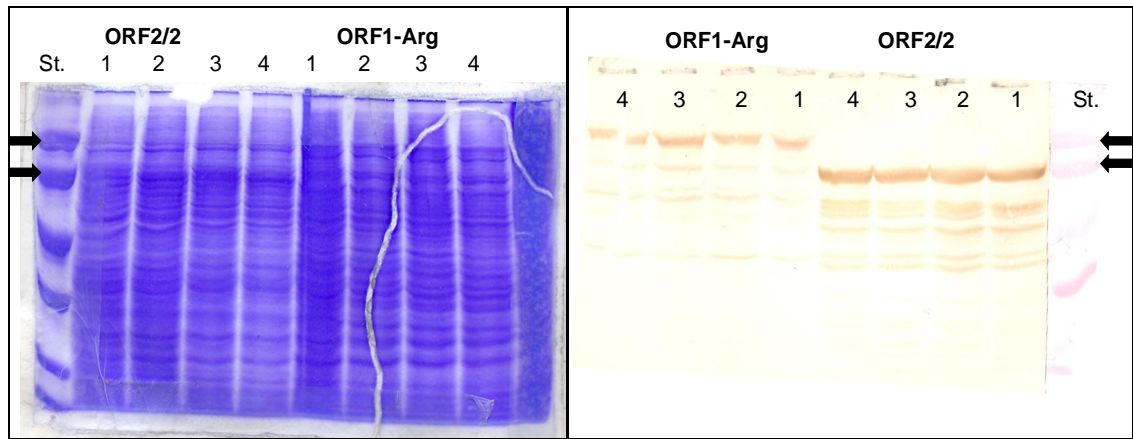
Immunoblottaus vahvisti, että ORF1-Arg- ja ORF2/2- proteiinit tuottuivat yhtä hyvin sekä Sf9- että High Five-soluissa. ORF1-Arg- ja ORF2/2-vyöhykkeiden alapuolella

näkyi myös haaleampia vyöhykkeitä. Ne johtuivat siitä, että solussa proteiinien rakentumisvaiheessa on syntynyt jostain syystä myös sellaisia ORF1-Arg- ja ORF2/2 -proteiineja, jotka eivät ole muodostuneet kokonaisiksi. Jokaisen ORF1-Arg- ja ORF2/2-proteiinin alkuun on kuitenkin rakentunut GST-proteiini. ORF2/2-proteiini näytti tuotuvan kummissakin soluissa paremmin kuin ORF1-Arg. Viruserien kesken ei ollut huomattavia eroja tuottokyvyssä. Päätettiin valita ORF2/2-virusmediumeista 3. viruserän ja ORF1-Arg-virusmediumeista 4. viruserän, koska näiden viruserien tuotto näytti hieman paremmalta kuin muiden erien. Näitä viruseriä käytettiin seuraavissa solujen infektioidissa.

Kun saatiin selville, mitkä viruserät tuottivat parhaiten proteiineja, kokeiltiin seuraavaksi, mikä määrä näitä ORF1-Arg- ja ORF2/2-viruseriä solujen infektiossa olisi optimaalinen. Sf9- ja High Five -soluja infektoitiin eri määrillä virusmediumeja, ja kokeilusta kävi ilmi, että optimaalisin proteiinin tuotto saatiin infektoimalla solut 100-300 µl:lla virusmediumia/3 miljoonaa Sf9-solua tai 100-300 µl:lla virusmediumia/1.5 miljoonaa High Five -solua.



KUVIO 2. Vasemmalla on Fast stain -värjätty SDS-PAGE-geeli High Five -soluissa tuotetuista ORF1-Arg- ja ORF2/2-proteiineista. Numerot osoittavat eri virusmediume-riä. Ylimmän nuolen kohdalla on ORF1-Arg-proteiinia vastaava kokostandardi (St.) ja alemman nuolen kohdalla ORF2/2-proteiinia vastaava kokostandardi. Oikealla on samoista näytteistä tehty immunoblottaus.

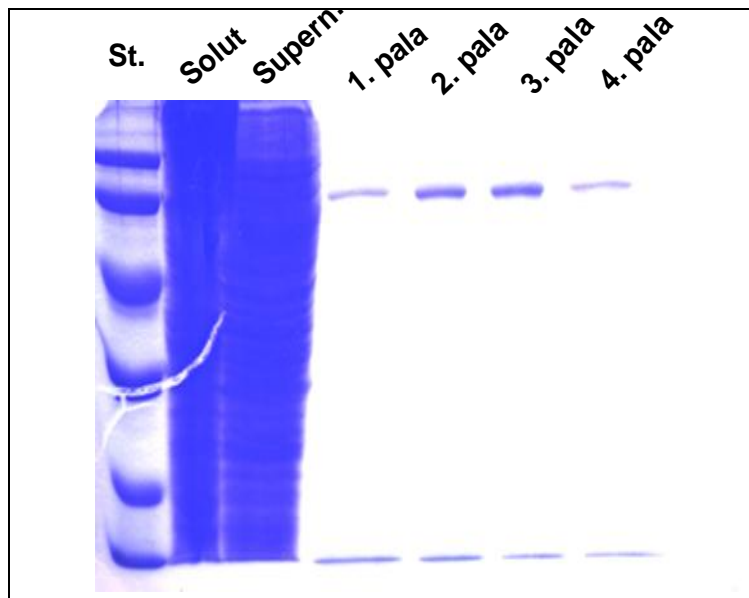


KUVIO 3. Sf9-soluissa tuotettujen ORF1-Arg- ja ORF2/2-proteiinien vyöhykkeet. (Ks. KUVIO 2. kuvatekstiä.)

9.2 AGE-puhdistus, proteiinien konsentrointi ja pitoisuuden määrittäminen

Proteiinien puhdistuksen jälkeen tehtävässä SDS-PAGE:ssä nähdään, kuinka puhdasta proteiini on eli onko geelillä vyöhykkeitä myös muualla kuin halutun proteiinin kohdalla. AGE-puhdistuksen jälkeisessä SDS-PAGE:ssä nähdään, onko geelipalat leikattu oikeilta kohdilta AGE-geeliä, eli onko SDS-PAGE-geelillä ylipäättään vyöhykettä oikean proteiinin kohdalla.

AGE-puhdistukseen valittu ORF2/2-proteiini oli puhdistunut hyvin, ja SDS-PAGE-geeliltä (KUVIO 4) nähtiin, että keskimmaisissa paloissa oli proteiinia eniten, joten palat oli leikattu juuri oikeasta kohtaa geeliä. Solunäytteeseen oli laitettu liikaa soluja, eikä geeliltä pystynyt näin ollen erottamaan erillisiä vyöhykkeitä. SDS-PAGE-geelille laitettavaksi solunäytteen solumääräksi optimoitiin myöhemmin 20 000 solua/näytekolle. Solujen hajotuksen ja sentrifugoinnin jälkeen otetussa supernatantinäytteessä ei ollut proteiinia, joten kaikki proteiini oli pelletissä niin kuin pitikin olla.



KUVIO 4. SDS-PAGE-geeli ORF2/2:n AGE-puhdistuksesta. 1. pala tarkoittaa ylintä AGE-geeliltä leikattua palaa ja 4. pala alinta palaa. Solunäytteestä (Solut) täytyisi nähdä, kuinka paljon soluissa on ORF2/2-proteiinia puhdistuksen lähtötilanteessa, mutta tästä geelistä sitä ei voi kunnolla havainnoida, sillä näyttekoloon on laitettu liikaa soluja. Supernatantinäytteessä (Supern.) ei näy ORF2/2-proteiinin vyöhykettä.

ORF1-Arg-proteiinin SDS-PAGE-geelillä proteiinia ei näkynyt geelipaloista otetuissa näytteissä lainkaan, joten ORF1-Arg ei ollut puhdistunut. Joko geelipalat oli leikattu vääriltä kohdilta AGE-geeliä tai proteiinia ei ollut näytteessä ollenkaan, vaan se oli hajonnut esimerkiksi pakastuksen yhteydessä. SDS-PAGE-geelin solunäytteestä ei pystynyt tarkistamaan, oliko ORF1-Arg-proteiinia ylipäättään ollut soluissa, sillä solunäytteeseen oli laitettu liikaa soluja geelille ja näin ollen yksittäisiä vyöhykkeitä on vaikea havainnoida. Jälkimmäinen vaihtoehto olisi varteenotettavampi, koska aikaisemmin on havaittu, että proteiinit saattavat kärsiä ja hajota pitkäaikaisen pakastamisen vuoksi. Edellinen vaihtoehto voidaan lähes täysin pois sulkea, sillä geelipalat oli leikattu luotettavasti oikean kokostandardin osoittamasta kohdasta, ja palat oli leikattu niin laajalta alueelta, että ainakin jossakin niistä olisi täytynyt olla proteiinia.

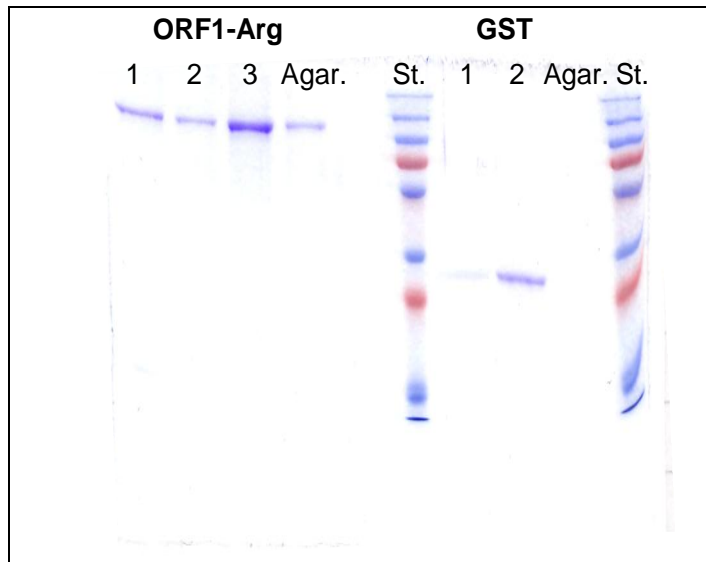
Seuraavalla kerralla tehdyssä AGE-puhdistuksessa ORF2/2-proteiinia oli irronnut geelistä, vaikka geeli ei ollut täysin sulanut kuumennuksen yhteydessä. Proteiini oli lisäksi puhdasta. Sen sijaan proteiinia ei ollut näytteessä, joka otettiin talteen sen jälkeen, kun huonosti sulaneet geelit oli kuumennettu ja sentrifugoitu uudelleen. Tämä johtui oletettavasti siitä, että näytteet pääsivät laimenemaan liian paljon uuden resuspensioliuoksen lisäämisen yhteydessä. Resuspensioliuosta lisättiin 1,5 ml huolimatta siitä, että jokaisen koeputken pohjalle oli jäänyt hieman vanhaa resuspensioliuosta edellisen supernatantin pois pipetoinnin jälkeen. Isompien geelipalojen leikkaamista kokeiltiin vielä yhden ker-

ran, mutta silloin kokeilu kariutui teknisiin ongelmiin, ja ORF2/2-proteiinia saatiin puhdistettua vain vähän. Ei siis saatu selville olisiko isompien geelipalojen leikkaamisella saatu talteen enemmän proteiinia geeliltä.

ORF2/2-proteiinin konsentrointi onnistui hyvin ja proteiinin lopullinen määrä oli 192 µg/ml.

9.3 Histidiiniaffiniteettipuhdistus, konsentrointi ja pitoisuuden määrittäminen

Sf9-soluissa tuotettujen ORF1-Arg- ja GST-proteiinien His-affiniteettipuhdistus oli onnistunut (KUVIO 5). ORF1-Arg- proteiini oli puhdistunut hyvin, mutta sitä oli jäänyt myös agarosiin. GST:tä ei sen sijaan ollut jäänyt agarosiin kiinni.



KUVIO 5. SDS-PAGE-geeli ORF1-Arg- ja GST-proteiinin His-affiniteettipuhdistuksesta. Geelillä on näytteet ORF1-Arg-proteiinin ensimmäisestä, toisesta ja kolmannelta fraktiosta sekä näyte agarosista (Agar.). GST:stä on näyte kummastakin fraktiosta sekä näyte agarosista.

Puhdistettujen ORF1-Arg- ja GST-proteiinien konsentroidin jälkeen tehdyssä proteiininmäärityksessä saatiin selville, että puhdistuksessa käytettyjen puskurien sisältämä β-merkaptetaanoli ja/tai imidatsoli antaa positiivisen tuloksen proteiininmäärityksessä. Proteiininmittaustuloksiin ei siis voinut luottaa, koska β-merkaptetaanoli ja imidatsoli vääristivät tuloksia.

Konsentroidin jälkeen tehdyssä SDS-PAGE-geelissä oli vain pieni vyöhyke ORF1-Arg-näytteessä, joka oli otettu talteen konsentraatiossa osasta, joka ei ollut mennyt suo-

dattimen läpi (jossa konsentroitujen proteiinien täytyisi olla). Vastaavassa GST-näytteessä ei näkynyt vyöhykettä ollenkaan. Proteiinit olivat hävinneet konsentroidin aikana. His-affiniteettikromatografian jälkeen ei ole aikaisemmin käytetty 5 NMWL:n suodatinta, joka on valmistettu eri materiaalista kuin muun kokoiset suodattimet. Ajateltiin, että olisiko mahdollisesti suodattimen materiaali haurastunut puhdistuksessa käytettävien puskurien vuoksi ja päästänyt proteiinit lävitseen. Mutta näin ei ollut voinut käydä, sillä suodattimen läpi menneistä näytteistä tehdyssä SDS-PAGE-geelissä ei näkynyt ORF1-Arg- eikä GST-proteiinien vyöhykkeitä. Varteenotettavimmaksi vaihtoehdoksi jäi, että proteiinit olivat jääneet kiinni suodattimeen, joka ei siis ollut suotavaa.

Toisessa His-affiniteettipuhdistuksessa ORF1-Arg-proteiinin puhdistus ei onnistunut odotetulla tavalla. SDS-PAGE-geelistä nähtiin että ORF1-Arg-proteiinia oli irronnut eluointipuskuriin vain vähän jokaisessa eluoinnissa ja suurin osa proteiinista oli jäänyt kiinni Ni-NTA-agarosiin. Muutoksena edelliseen puhdistuskertaan oli, että puhdistuksessa ei käytetty β -merkaptotetanolia eikä imidatsolia, ja proteiini oli tuotettu High Five-soluissa Sf9-solujen sijasta. Ajanpuutteen vuoksi koetta ei ehditty toistaa, jotta olisi tiedetty, johtuiko epäonnistuminen mahdollisesti siitä, että ei käytetty β -merkaptotetanolia eikä imidatsolia tai siitä, että proteiinit oli tuotettu High Five -soluissa vai oliko kokeessa tapahtunut jotain muuta esimerkiksi oliko agarosi päässyt kuivumaan kesken suorituksen.

Toisessa His-affiniteettipuhdistuksessa GST puhdistui hyvin, mutta sitä jäi kiinni Ni-NTA-agarosiin yhtä paljon kuin sitä irtosi eluointipuskuriin. Näin ollen seuraavilla kerroilla näytettä täytyisi eluoida suuremmalla määrällä eluointipuskuria, jotta saataisiin proteiinia irtoamaan enemmän Ni-NTA-agarosista. SDS-PAGE-geelillä nähtiin myös, ettei pesupuskurin mukana ollut irronnut GST-proteiinia, joten puhdistus vaikutti tältä osin onnistuneelta. Puhdistettu GST-proteiini dialysoitiin, ja dialysoinnin jälkeen mitattu GST-proteiinikonsentraatio oli 32 $\mu\text{g/ml}$.

10 POHDINTA

Tutkimuksen tarkoituksena oli optimoida torque teno -viruksen ORF1-Arg- ja ORF2/2-proteiinien tuottoa Sf9- ja High Five -hyönteissoluissa sekä puhdistusta AGE- ja His-affiniteettipuhdistuksella. ORF1-Arg- ja ORF2/2-proteiinien tuotto ja puhdistus osoittautuivat aikaa vieväksi työksi, ja myös menetelmien kehittelyyn mennyt aika oli mitta-

va. Optimoinnissa saatiin kuitenkin kehitysaskelia aikaan. Kehittelyssä täytyy aina muuttaa vain yhtä asiaa kerrallaan, jotta tiedettäisiin mikä on kunkin muuttujan osuus lopputulokseen. Muuttamalla jotain osatekijää laboratoriomenetelmässä lopputulos voi olla edullinen tai epäedullinen, mutta kokeiluun menee kuitenkin sama aika, oli lopputulos sitten kumpi tahansa. Näin tutkimuksessa edetään.

Tutkimuksen suoritus ja tulokset on kirjoitettu empiirisen tutkimuksen aikana kirjoitetun päiväkirjan perusteella, ja ne on pyritty kirjoittamaan niin tarkasti, että ne ovat toistettavissa myöhemmin. Toistettavuutta olisi voitu nostaa toistamalla kaikki laboratorion kokeet, mutta koska menetelmät olivat aikaa vieviä, ei tällaiseen ollut mahdollisuutta. Luotettavuutta lisää se, että ongelmatilanteet on selvitetty ja niiden syitä on pohdittu.

ORF1-Arg- ja ORF2/2-proteiinien tuotossa hyönteissoluissa ei ilmennyt ongelmia, ja proteiineja saatiin tuotettua riittäviä määriä. Proteiinien tuotto onnistui yhtä hyvin Sf9- kuin High Five -hyönteissoluissa. Tuottoa kehiteltiin testaamalla optimaalisin viruserä ja infekioon käytettävän virusmediumin määrä. Proteiinien tuotto ei juuri vaadi enempää kehittelytyötä, vaan jatkossa kannattaa keskittyä puhdistusmenetelmien kehittelyyn, koska niissä havaittiin ongelmia ja niitä täytyisi saada tehokkaammiksi.

AGE-puhdistus oli työläs ja aikaa vievä menetelmä proteiinien puhdistukseen. Menetelmän työläyden vuoksi sitä haluttiin kehitellä niin, että saataisiin mahdollisimman paljon proteiinia talteen geeliltä ja näin saataisiin puhdistuksesta kaikki hyöty irti. Tässä ei kuitenkaan aivan onnistuttu. ORF2/2-proteiineja saatiin kuitenkin puhdistettua.

Tutkimusryhmä oli käyttänyt hyönteissoluissa tuotettujen TTV:n proteiinien puhdistukseen aiemmin AGE-puhdistusta, ja haluttiin kokeilla, onnistuisiko puhdistus myös jollakin toisella menetelmällä. Kokeiluun valittiin histidiiniaffiniteettipuhdistus, jonka suoritus kesti vain yhden päivän, kun AGE-puhdistus vei aikaa kaksi päivää ja oli paljon työläämpi menetelmä johtuen esimerkiksi geelien valamisesta ja leikkaamisesta. His-affiniteettipuhdistus ei kuitenkaan sujunut täysin vaivattomasti. Sillä saatiin kyllä ensimmäisellä kokeilukerralla puhdistettua ORF1-Arg- ja GST- proteiinia, mutta oletettavasti puhdistuksessa käytetyt puskurit häiritsivät proteiinin jatkokäsittelyä niin, että proteiini menetettiin. Seuraavalla kerralla puhdistuksen puskureissa käytettiin sellaista koostumusta, jonka ei ajateltu häiritsevän proteiinin jatkokäsittelyä, mutta puhdistus ei toiminut tällä tavalla. Joka tapauksessa oli positiivista, että His-affiniteettimenetelmällä

saatiin ylipäättään puhdistettua TTV:n proteiineja. Menetelmällä saadaan varmasti jatkossa hyviä puhdistustuloksia, kunhan vain sitä kehitellään lisää ja se saadaan sovellettua toimivaksi juuri torque teno -viruksen proteiinien puhdistukseen. Histidiiniaffiniteetikromatografia on tervetullut vaihtoehto AGE-puhdistukselle sen nopeuden ja vaivattomuuden ansiosta.

Tämän opinnäytetyön avulla saatiin menetelmien kehitystyötä eteenpäin, ja havaittiin ongelmakohtia, joihin tulee kiinnittää jatkossa huomiota. Työssä puhdistettujen proteiinien avulla saatiin TTV-tutkimusta menemään eteenpäin: tutkimusryhmässä tutkittiin puhdistetuilla GST- ja ORF2/2-proteiineilla T-solvasteita. Myös puhdistettua ORF1-Arg- proteiinia olisi oletettuna kapsidiproteiinina ollut mielenkiintoista saada T-soluimmunitetitutkimukseen, mutta se ehditään tehdä tutkimusryhmässä myöhemmin, kunhan ORF1-Arg-proteiinia saadaan puhdistettua.

Opinnäytetyötä tehdessä opin paljon uutta tieteellisen tutkimuksen tekemisestä. Sain kuvan siitä, miten pienin askelin tutkimusmaailmassa mennään eteenpäin ja miten pitkäjänteistä työtä perustutkimus vaatii. Oli kiehtovaa olla mukana tekemässä tutkimusta, jolla on merkitystä myös kansainvälisesti. Työtä tehdessä harjaannuin lukemaan tutkimusartikkeleita ja löytämään niistä oleellisen tiedon.

LÄHTEET

- Aittomäki, Esa – Eerikäinen, Tero – Leisola, Matti – Ojamo, Heikki – Suominen, Ilari – von Weyman, Niklas 2002: Bioprosessiteknikka. 1. painos. Porvoo: WS Bookwell Oy.
- Biagini, P. – Bendielli, M 2004: Anellovirus. Teoksessa Fauquet, C. M. (toim.): Virus Taxonomy: Eight Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Lontoo: Elsevier/Academic Press. 335-341.
- Biagini, Philippe – Gallian, Pierre – Cantaloube, Jean-Francois – Attoui, Houssam – De Micco, Philippe – De Lamballerie, Xavier 2006: Distribution and Genetic Analysis of TTV and TTMV Major Phylogenetic Groups in French Blood Donors. *Journal of Medical Virology* 78. 298-304.
- Brown, T.A 2006: Gene Cloning & DNA analysis. 5.painos. Faculty of Life Sciences. University of Manchester UK: Blackwell Publishing.
- Cann, Alan J. 2001: Principles of Molecular Virology. 3. painos. UK: Academic Press.
- Davis, J. M. (toim.) 2002: Basic Cell Culture. 2. painos. New York: Oxford University Press.
- Devalle, Sylvie – Niel, Christian 2004: Distribution of TT Virus Genomic Groups 1-5 in Brazilian Blood Donors, HBV Carriers, and HIV-1-Infected Patients. *Journal of Medical Virology* 72. 166-173.
- Freshney, R. Ian 2005: Culture of Animal Cells. A manual of basic technique. 5. painos. Yhdysvallat: A John Wiley & Sons, inc., publication.
- Hatti-Kaul, Rajni – Mattiasson, Bo 2003: Isolation and Purification of Proteins. Yhdysvallat: Marcel Dekker.
- Hino, Shigeo 2002: TTV, a new human virus with single stranded circular DNA genome. *Journal of Medical Virology* 12. 151-158.
- Insect Cell Culture. Biosciences Research Assosiation, Inc. Verkkodokumentti. <<http://www.cbrlabs-inc.com/incelcul.html>>. Luettu 21.3.2007.
- Maggi, Fabrizio – Andreoli, Elisabetta – Lanini, Letizia – Meschi, Silvia – Rocchi, Jara – Fornai, Claudia – Vatteroni, Maria Linda – Pistello, Mauro – Bendinelli, Mauro 2006: Rapid Increase in Total Torquetenovirus (TTV) Plasma Viremia Load Reveals an Apparently Transient Superinfection by a TTV of a Novel Group 2 Genotype. *Journal of Clinical Microbiology* 44 (7). 2571-2574.
- Qiagen 2003: A handbook for high level expression and purification of 6xHis-tagged proteins. Ohjekirja.
- Qiu, Jianming – Kakkola, Laura – Cheng, Fang – Ye, Chaoyang – Söderlund-Venermo, Maria – Hedman, Klaus – Pintel, David J. 2005: Human Circovirua TT

Virus Genotype 6 Expresses Six Proteins following Transfection of a Full-Length Clone. *Journal of Virology* 79 (10). 6505-6510.

Sambrook, Joseph – Russell, David W. 2001: *Molecular Cloning*. 3. painos. Yhdysvallat: CSHL Press.

Simmonds, P. – Prescott, L. E. – Logue C. – Davidson, F. – Thomas A. E. – Ludlam C. A. 1999: TT virus – part of the normal human flora? *Journal of Infectious Diseases*. 1748-1749.

Suominen, Ilari – Ollikka, Pauli 2003: *Yhdistelmä-DNA-tekniikan perusteet*. 3-1. painos. Helsinki: Hakapaino Oy.

Tommiska, Johanna – Kakkola, Laura – Hedman, Klaus – Söderlund- Venermo, Maria 2001: TT-virus, ihmisen uusi seuralainen. *Solubiologi* 19. 19-25.

SISÄLLYS

1 JOHDANTO	1
2 TORQUE TENO -VIRUS	2
2.1 Taudinaiheuttamiskyky	3
2.2 TTV:n genomi	3
2.3 TTV:n tuottamat proteiinit	4
3 PROTEIINIEN TUOTTO JA PUHDISTUS	4
4 SOLUVILJELY	5
5 ELEKTROFOREESI	7
5.1 Agaroosigeelielektroforeesi	7
5.2 SDS-polyakryyliamidigeelielektroforeesi	8
5.2.1 Immunoblottaus	9
6 HISTIDIINIAFFINITEETTIPUHDISTUS	9
7 TUTKIMUKSEN TARKOITUS	10
8 TYÖN SUORITUS	11
8.1 Proteiinien tuotto	12
8.1.1 Sopivien hyönteissolujen ja viruserien testaus	12
8.2 AGE-puhdistus	14
8.2.1 Näytteiden esivalmistelu	15
8.2.2 Geelin käsittely ajon jälkeen	15
8.2.3 AGE-puhdistuksen kehittäminen	16
8.3 Histidiiniaffiniteettipuhdistus	16
9 TULOKSET JA NIIDEN TULKINTA	18
9.1 Proteiinien tuotto	18
9.2 AGE-puhdistus, proteiinien konsentrointi ja pitoisuuden määrittäminen	20
9.3 Histidiiniaffiniteettipuhdistus, konsentrointi ja pitoisuuden määrittäminen	22
10 POHDINTA	23
LÄHTEET	26
LIITTEET 1-5	

INFEKTOITUJEN SOLUJEN KERÄYS:

- Irrota solut pohjasta taputtelemalla pulloa.
- Kerää pullon medium sopivan kokoiseen putkeen (Eppendorf tai Falcon).
- Sentrifugoi 5000-10 000 g 10 min.
- Heitä supernatantti pois.
- Suspensoi pelletti PBS:ään, niin että solujen pitoisuudeksi tulee 20 milj. solua/ml.

10 % SDS-PAGE-GEELIEN OHJE:

Riittää 10 geelille.

Alageeli:

30 % Akryyliamidi-bis	20,212 ml
3 M Tris, pH 8,8	7,5 ml
H ₂ O	32,388 ml
20 % SDS	300 µl
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine)	38 µl
10% APS (ammoniumpersulfaatti)	200 µl

Ylägeeli:

30 % Akryyliamidi-bis	4 ml
1 M Tris, pH 6,8	5 ml
H ₂ O	30 ml
20 % SDS	200 µl
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine)	40 µl
10 % APS (ammoniumpersulfaatti)	200 µl
BPB (Bromofenolisininen), kyllästetty	67 µl

ELEKTROFOREESIEN LIUOKSIA:**LSB:**

Tris	1,51 g
SDS	4 g
Glyseroli	20 g
β -merkaptetaanoli	10 g
Bromofenolisininen	4 mg
Lisätty H ₂ O	100 ml

FAST STAIN:

Etikkahappo	100 ml
Isopropyylialkoholi	200 ml
H ₂ O	650 ml
Coomassie Brilliant Blue	1 g

DESTAIN:

Etikkahappo	150 ml
H ₂ O	1450 ml
Metanoli	400 ml

TUPLA RUNNING (SDS-PAGE:N AJOPUSKURI):

Tris	30 g
Glysiini	144 g
SDS	5 g
H ₂ O	5 l

RESUSPENSIO LIUOS:

50 mM Tris, pH 8
1 mM EDTA
50 mM
Lisätty 1 L H₂O

AGE:N AJOPUSKURI:

90 mM Tris
90 mM Boorihappo
(0,1 % SDS)
Lisätty 1L H₂O

KASVATUSLIUOKSEN KOOSTUMUS:

BioWhittaker: Insect Xpress 500 ml

Lisätty:

50 ml FCS (fetal calf serum), suodatettu
5 ml glutamiini – penisilliini - streptomysiini
5 µl fungizone (sienimyrkky)

HIS-TAG-PUHDISTUKSESSA KÄYTETTÄVIÄ LIUOKSIA:

Puskuri A:

100 mM NaH₂PO₄
10 mM Tris
6 M GuHCl (guanidiinihydrokloridi)
pH 8.0

Voidaan lisätä:

15 mM Imidatsoli
15 mM β-merkaptetaanoli

Pesupuskuri C:

100 mM NaH₂PO₄
10 mM Tris
8 M Urea
pH 6.3

Voidaan lisätä:

15 mM Imidatsoli
15 mM β-merkaptetaanoli

Eluointipuskuri E:

100 mM NaH₂PO₄
10 mM Tris
8 M Urea
pH 4.5