

Anabaena 90 -syanobakteerin villityypin ja apd⁻-mutantin
proteomien ja anabaenopeptilidigeenien ilmentymisen vertailu

Asta Partanen
Maisterintutkielma
Helsingin yliopisto
Elintarvike- ja ympäristötieteiden laitos
Mikrobiologia
Syksy 2013



Tiedekunta/Osasto Fakultet/Sektion – Faculty Maatalous-metsätieteellinen tiedekunta		Laitos/Institution – Department Elintarvike- ja ympäristötieteiden laitos	
Tekijä/Författare – Author Asta Partanen			
Työn nimi / Arbetets titel – Title <i>Anabaena</i> 90 -syanobakteerin villityypin ja apd ⁻ -mutantin proteomien ja anabaenopeptilidigeenien ilmentymisen vertailu			
Oppiaine / Läroämne – Subject Mikrobiologia			
Työn laji/Arbetets art – Level Pro gradu		Aika/Datum – Month and year Syyskuu 2013	Sivumäärä/ Sidoantal – Number of pages 64 + 5 liitesivua
Tiivistelmä/Referat – Abstract <p>Syanobakteerit ovat vesistöissä ja maaperässä eläviä yhteyttäviä organismeja. Ne jaetaan morfologiansa perusteella Chroococcales-, Pleurocapsales-, Oscillatoriales-, Nostocales- ja Stigonematales-lahkoihin. <i>Anabaena</i> 90 -syanobakteerikanta on Nostocales-lahkoon kuuluva, rihmamainen syanobakteeri. Se eristettiin Vesijärvestä vuonna 1986. Kanta tuottaa erilaisia bioaktiivisia yhdisteitä, joista tutkituimpia ovat mikrokystiinit, anabaenopeptiinit ja anabaenopeptilidit. Bioaktiivisia yhdisteitä tuotetaan ei-ribosomaalisten peptidisyntetaasien (NRPS) avulla, mutta yhdisteiden merkitys syanobakteereille on epäselvä. <i>Anabaena</i> 90 -villityyppikannasta (WT) on valmistettu anabaenopeptilidimutanti (apd⁻), joka ei muodosta anabaenopeptilidejä.</p> <p>Työn tavoitteena oli selvittää WT- ja apd⁻-kannan proteomien välisiä eroja kuusipäiväisen kasvatuskokeen aikana. Samanaikaisesti tutkittiin kantojen anabaenopeptilidi (apd) -syntetaasigeenien ilmentymistä. Tavoitteena oli kartoittaa mahdollisia kantojenvälisiä eroja yksittäisten proteiinien tuotossa ja apd-syntetaasigeenien ilmentymisessä. Tämän toivottiin lisäävän <i>Anabaena</i> 90 -syanobakteerin aineenvaihdunnan tuntemusta.</p> <p>Proteomeja tutkittiin kaksisuuntaisen erottelevan geelielektroforeesin (2D-DIGE) avulla. Proteomien välisten erojen tilastolliseen tarkasteluun käytettiin t-testiä. Anabaenopeptilidigeenien ilmentymistä tutkittiin käänteiskopioijapolymeraasiketjureaktiolla (RT-PCR).</p> <p>Tulosten perusteella voitiin todeta, että WT- ja apd⁻-kannan proteomit poikkesivat toisistaan. 18 proteiinin määrässä havaittiin tilastollisesti merkitsevä ero kantojen välillä. Yksittäisten proteiinien määrät olivat useammin koholla apd⁻-kannassa. Molempien kantojen apd-syntetaasigeenit ilmentyivät, joten mutaatio apd⁻-kannassa ei estänyt apd-transkriptien muodostumista. Jatkoa ajatellen tilastollisesti merkitsevien proteiinien tunnistaminen olisi oleellista. Se paljastaisi syytä WT- ja apd⁻-kannan proteomien eroavaisuuksiin ja antaisi lisätietoa <i>Anabaena</i> 90 -syanobakteerin aineenvaihdunnasta.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords <i>Anabaena</i> , syanobakteeri, proteomiikka, 2D-DIGE, anabaenopeptilidisyntetaasi			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited Elintarvike- ja ympäristötieteiden laitos, Mikrobiologian osaston käsikirjasto			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information Pro gradu -työtä ohjasivat Kaarina Sivonen ja jatkotutkinto-opiskelija Julia Österholm.			



Tiedekunta/Osasto Fakultet/Sektion – Faculty Faculty of Forestry and Agriculture		Laitos/Institution– Department Department of Food and Environmental Sciences	
Tekijä/Författare – Author Asta Partanen			
Työn nimi / Arbetets titel – Title The comparison of proteomics and transcription of anabaenopeptilide genes in two <i>Anabaena</i> sp. 90 cyanobacterium a wild type and an anabaenopeptilide mutant			
Oppiaine /Läroämne – Subject Microbiology			
Työn laji/Arbetets art – Level Master's thesis		Aika/Datum – Month and year September 2013	Sivumäärä/ Sidoantal – Number of pages 64 + 5 appendixes
Tiivistelmä/Referat – Abstract <p>Cyanobacteria are aquatic and terrestrial organisms that have photosynthetic capabilities. Cyanobacteria are classified to five orders according to their morphology. These are Chroococcales, Pleurocapsales, Oscillatoriales, Nostocales and Stigonematales. <i>Anabaena</i> sp. 90 is a filamentous cyanobacterium in the order of Nostocales. A sample of this cyanobacterium was isolated from the lake Vesijärvi in 1986. <i>Anabaena</i> sp. 90 produces a variety of bioactive peptides such as microcystins, anabaenopeptins and anabaenopeptilides which are the most commonly studied of the peptides produced by the strain. Majority of the bioactive peptides are produced by non-ribosomal peptide synthetases (NRPS). The way these compounds affect cyanobacteria is currently unclear. Anabaenopeptilide deficient mutant (<i>apd</i>⁻) variety has been developed from the <i>Anabaena</i> sp 90 wild type (WT). The mutant is unable to produce anabaenopeptilides.</p> <p>The aim of my Master's thesis was to study the changes in proteomes of WT and <i>apd</i>⁻ strains by conducting a six day cultivation experiment. The purpose was to evaluate the possible differences in the amount of proteins that the different cultivation stocks were able to produce. The secondary purpose was to examine the transcription of anabaenopeptilide synthetase genes.</p> <p>Proteomic study was performed using a procedure called two dimensional differential gel electrophoresis (2D DIGE). The differences in the proteomes' statistics were examined by using the Student's t test. Transcription of anabaenopeptilide synthetase genes were studied using a reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR).</p> <p>The data collected from these studies concluded that there were differences in the proteomes of WT and <i>apd</i>⁻ strains. In eighteen cases there were significant differences in the protein amounts between the strains. The single protein counts were often higher in the <i>apd</i>⁻ than in the WT strain. Anabaenopeptilide synthetase genes were transcribed in both strains which suggests that the mutation in the <i>apd</i>⁻ strain did not hinder the ability of the strain to produce anabaenopeptilide transcripts. The identification of significant proteins would yield more detailed knowledge of the metabolic functions of WT and <i>apd</i>⁻ strains.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords <i>Anabaena</i> , cyanobacterium, proteomics, 2D DIGE, anabaenopeptilide synthetase			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited Department of Food and Environmental Science, the Library of the Division of Microbiology			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information Master's thesis was supervised by professor Kaarina Sivonen and PhD student Julia Österholm.			

SISÄLLYSLUETTELO

1 JOHDANTO	7
1.1 Syanobakteerit	8
1.1.1 <i>Anabaena</i> 90 -villityyppikanta	9
1.1.2 <i>Anabaena</i> 90 -mutanttikanta.....	10
1.2 ANABAENOPEPTILIDIT.....	11
1.2.1 Anabaenopeptilidien rakenne.....	11
1.2.2 Anabaenopeptilidien merkitys.....	12
1.3 EI-RIBOSOMAALISET PEPTIDISYNTETAASIT.....	13
1.3.1 Syntetaasien rakenne ja toimintaperiaate.....	13
1.3.2 Anabaenopeptilidisyntetaasit	15
1.4 PROTEOMIIKKA	16
1.4.1 Proteiinien erottelu.....	18
1.4.2 Proteiinien havaitseminen	19
1.5 TRANSKRIPTOMIIKKA	20
1.5.1. RNA-näytteiden käsittelyn vaatimukset	22
1.5.2 Yksittäisten transkriptien tutkiminen	22
1.6 STUDENTIN T-TESTI	23
2 TUTKIMUKSEN TAVOITTEET	24
3 MATERIAALIT JA MENETELMÄT	24
3.1 Syanobakteerikannat	24
3.2 Koeasetelma.....	24
3.2.1 Esikoe	24
3.2.2 Varsinainen kasvatuskoe.....	25
3.2 Näytteiden käsittely	26
3.2.1 Proteiininäytteet	26
3.2.2 RNA-näytteet	27
3.3 Solutiheyden mittaaminen	27
3.4 Proteomien tutkiminen.....	27
3.4.1 Proteiinien eristäminen	27
3.4.2 Proteiinipitoisuuden määrittäminen	28
3.4.3 Proteiininäytteiden pH-arvon mittaaminen ja säätäminen.....	28

3.4.4 Proteiininäytteiden leimaaminen	29
3.4.5 Proteiinien isoelektrinen fokusointi.....	29
3.4.6 Erotteleva geelielektroforeesi.....	31
3.4.7 Geelien kuvaus.....	32
3.4.8 Geelien analysointi.....	32
3.4.9 Geelien hopeavärjäys ja kuivaus.....	33
3.5 Transkriptien tutkiminen	33
3.5.1 RNA:n eristäminen	34
3.5.2 Eristetyn RNA:n DNAasikäsittely	34
3.5.3 DNA:n eristäminen.....	35
3.5.4 Nukleinihappojen pitoisuuden ja puhtauden määrittäminen	35
3.5.5 RNA:n kääntäminen cDNA:ksi.....	36
3.5.6 16S rRNA PCR	36
3.5.7 Alukkeiden suunnittelu <i>apd</i> -syntetaasigeeneihin	37
3.5.8 Anabaenopeptilidi-PCR	38
3.5.9 PCR-tuotteiden agarosigeelielektroforeesi.....	38
4 TULOKSET	38
4.1 Esikoe	38
4.2 Varsinainen kasvatuskoe.....	41
4.3 Proteiinien kvantitatiivinen esiintyminen.....	44
4.4 cDNA-näytteiden puhtaus.....	48
4.5 Anabaenopeptilidisyntetaasigeenien ilmentyminen	48
5 TULOSTEN TARKASTELU.....	49
5.1 WT- ja <i>apd</i> ⁻ -kannan ominaisuudet esi- ja varsinaisessa kasvatuskokeessa	50
5.2 Proteomien erot.....	51
5.3 Anabaenopeptiliditranskriptien esiintyminen	54
6 JOHTOPÄÄTÖKSET	56
KIITOKSET	58
LÄHTEET	59
LIITTEET	65

LYHENTEET

2D-DIGE	kaksisuuntainen erotteleva geielektroforeesi
<i>apd</i>	anabaenopeptilidisyntetaasigeeni
<i>apd</i> ⁻ -kanta	mutatoitu <i>Anabaena</i> 90 -syanobakteerikanta, joka ei tuota anabaenopeptilidejä
APS	ammoniumpersulfaatti
CaCl ₂	kalsiumkloridi
cDNA	komplementaarinen deoksiribonukleiinihappo
DNA	deoksiribonukleiinihappo
DNaasi	deoksiribonukleiinihappoa hajottava entsyymi
DTT	DL-ditiotreitoli
EDTA	etyleenidiamiinitetraetikkahappo
HCl	vetykloridi eli suolahappo
HEPES	4-(2-hydroksietyyli)-1-piperasiinietaanisulfonihappo
IEF	Isoelektrinen fokusointi
IPG	immobilized pH gradient eli liikkumaton pH-gradientti
kDa	kilodalton
mRNA	lähettiribonukleiinihappo
NaOH	natriumhydroksidi
OD	optical density eli solutiheys
PCR	polymeraasiketjureaktio
pI	isoelektrinen piste
RNA	ribonukleiinihappo
RNAasi	ribonukleiinihappoa hajottava entsyymi
rRNA	ribosomaalinen ribonukleiinihappo
SDS	natriumdodesyyli-sulfaatti
SPS	sample preparation solution eli näytteenkäsittelyliuos
TAE	Tris/etikkahappo/EDTA
TCA	trikloorietikkahappo
TEMED	N',N',N',N'-tetrametyylietyleenidiamiini
TGS	Tris/glysiini/SDS
Tris	2-amino-2-hydroksimetyylipropaani-1,3-dioli
WT-kanta	<i>Anabaena</i> 90 -villityyppisyanobakteerikanta

1 JOHDANTO

Syanobakteerit ovat yhteyttäviä organismeja, joita esiintyy vesistöissä ja maaperässä. Syanobakteereilla on merkittävä rooli maapallon historiassa, koska ne muuttivat maapalloa ympäröineen kaasukehän hapelliseksi yhteyttämistuotteena muodostamansa hapen avulla (Knoll 2008). Syanobakteerit jaetaan morfologiansa perusteella Chroococcales-, Pleurocapsales-, Oscillatoriales-, Nostocales- ja Stigonematales-lahkoon (Hendricks Bergey ja Holt 1994). *Anabaena* 90 -syanobakteerikanta on Nostocales-lahkoon kuuluva, rihmamainen syanobakteeri, joka eristettiin Vesijärvestä vuonna 1986 (Sivonen ym. 1992). *Anabaena* 90 -kanta tuottaa erilaisia bioaktiivisia yhdisteitä, joista tutkituimpia ovat mikrokystiinit, anabaenopeptiinit ja anabaenopeptilidit. Bioaktiivisia yhdisteitä muodostetaan ei-ribosomaalisten peptidisyntetaasien avulla, joiden toiminta on riippumaton lähetti-RNA-molekyyleistä (Singh ym. 2012). *Anabaena* 90 -villityypikannasta (WT) on valmistettu anabaenopeptilidimutantti (apd^-), joka ei tuota anabaenopeptilidejä (Rouhiainen ym. 2000).

Anabaenopeptilidien esiintymistä on tutkittu aikaisemmin WT- ja apd^- -kannan eri kasvuvaiheissa (Repka ym. 2004). Anabaenopeptilidien merkitys tuottajalleen on epäselvä, mutta yhdisteiden ajatellaan vaikuttavan syanobakteerisolujen aineenvaihduntaan. Yhdisteet eivät kuitenkaan ole välttämättömiä solujen kasvulle, sillä apd^- -kannan ei ole todettu muodostavan anabaenopeptilidejä (Rouhiainen ym. 2000). Mutaation vaikutus anabaenopeptilidisyntetaasigeenien (*apd*) ilmentymiseen on selvittämättä. *Anabaena* 90 -syanobakteerin aineenvaihdunnasta ja bioaktiivisten yhdisteiden tuottoon vaikuttavista tekijöistä halutaan saada lisätietoa. Proteomiikkaan pohjautuvat tutkimusmenetelmät ovat tässä merkittävässä osassa, koska ne antavat kokonaisvaltaisen kuvan eliön yhtenä hetkenä tuottamista proteiineista.

Työn tarkoituksena oli vertailla *Anabaena* 90 -syanobakteerin WT- ja apd^- -kannan proteomien välisiä eroja kaksisuuntaisen erottelevan geelielektroforeesin avulla (2D-DIGE). Kantojen *apd*-geenien ilmentymistä tutkittiin käänteiskopioijapolymeraasiketjureaktiolla (RT-PCR). Tavoitteena oli selvittää mahdollisia kantojenvälisiä eroja proteiinien tuotossa ja *apd*-geenien ilmentymisessä.

1.1 Syanobakteerit

Syanobakteerit ovat laajalle levinneitä fototrofisia bakteereja, jotka ovat vaikuttaneet merkittävästi maapallon historiaan. Syanobakteereiden yhteyttämistuotteena muodostama happi muutti maapalloa ympäröineen kaasukehän hapettomasta hapelliseksi ja mahdollisti uusien elämänmuotojen synnyn. Syanobakteerit ovat tärkeitä primaarituottajia, ja niillä on merkittävä rooli hiilen ja typen kierrossa (Knoll 2008).

Syanobakteerit jaetaan morfologiansa perusteella viiteen eri ryhmään, joita ovat Chroococcales, Pleurocapsales, Oscillatoriales, Nostocales ja Stigonematales (Hendricks Bergey ja Holt 1994). Solut voivat esiintyä lajista riippuen joko yksittäin, ryhminä tai pitkänomaisina rihmoina. Soluseinä koostuu peptidoglykaanista ja on samankaltainen kuin gramnegatiivisilla bakteereilla. Osa lajeista muodostaa erikoistuneita solurakenteita, kuten typensidontaan keskittyneitä heterokysteja, leposoluina tunnettuja akineetteja ja solujen kellunnan mahdollistavia kaasuvakuoleja. Jotkut lajeista tuottavat solun ulkopuolelle limakerroksen, mikä mahdollistaa solujen tarttumisen yhteen (Hendricks Bergey ja Holt 1994).

Syanobakteereiden sytoplasmassa on tarkoin järjestäytyneitä kalvostoja eli tylakoideja, joissa yhteyttäminen tapahtuu (Hendricks Bergey ja Holt 1994). Valonkerääjinä toimivat fykobiliproteiinipigmentit, joita ovat esimerkiksi klorofylli a, fykoerytriini ja fykosyaniini. Pigmentit vaikuttavat myös syanobakteerisolujen väriin. Esimerkiksi klorofylli a ja fykosyaniini antavat syanobakteereille niiden tyypillisen sinivihreän värin. Syanobakteereissa esiintyy myös punaisia, violetteja ja ruskeita lajeja (Hendricks Bergey ja Holt 1994).

Syanobakteereita esiintyy vesistöissä ja maaperässä, mutta osa lajeista kasvaa äärimmäisissä ympäristöissä, kuten suolajärvissä ja aavikoilla (Hendricks Bergey ja Holt 1994). Syanobakteereiden ravintoainevaatimukset ovat niukat, ja useat lajit kykenevät typensidontaan. Monet lajit tuottavat bioaktiivisia molekyyliä, joista tutkituimpia ovat toksiinit (Sivonen ja Börner 2008). Myrkyllisiä yhdisteitä tuottavat syanobakteerit muodostavat vesistöissä laajoja syanobakteerikukintoja, joista voi olla välitöntä vaaraa sekä ihmisille että eläimille. Syanobakteereiden muodostamien

toksiinien ohella kiinnostusta ovat herättäneet myös lääke- ja reagenssikäyttöön soveltuvat yhdisteet.

1.1.1 *Anabaena* 90 -villityyppikanta

Anabaena-suvun lajit ovat rihmamaisia syanobakteereja (Kuva 1), joita esiintyy sisämaiden makeissa järvissä sekä murtovesissä, kuten Itämeressä (Hendricks Bergey ja Holt 1994). Ne kuuluvat vesistöjen planktoniin ja muodostavat massakukintoja varsinkin rehevöityneissä vesistöissä lämpimään kesäaikaan. *Anabaena*-suvun lajit ovat ehdottomia fototrofeja. *Anabaena*-sukuun kuuluvat syanobakteerisolut ovat kooltaan 2 - 10 µm. Solut ovat pyöreitä tai ovaaleja ja muodostavat jakautuessaan rihmamaisia rakenteita. Lajeilla esiintyy heterokysteja, akineetteja ja kaasuvakuoleja ja monet niistä kykenevät liikkumaan (yleensä alle 1 µm sekunnissa).



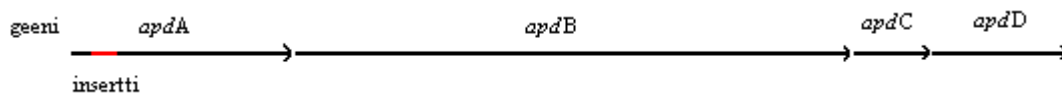
Kuva 1. *Anabaena* 90 -syanobakteerikanta 1000x-suurennoksessa Leica-mikroskoopilla kuvattuna.

Nostocales-lahkoon kuuluva *Anabaena* 90 -syanobakteerikanta on eristetty vuonna 1986 Vesijärvestä Suomessa (Sivonen ym. 1992). Kannan ominaisuudet vastaavat lähinnä *Anabaena circinalis* -lajia, mutta lajinimestä ei ole varmuutta (Sivonen ym. 1992). Laboratorio-olosuhteissa kasvaessaan kannan solumorfologia on muuttunut, mikä hankaloittaa lajitason tunnistusta. Kannan genomi on sekvensoitu ja se on kooltaan 5,3 miljoonaa emäsparia (Wang ym. 2012). Genomi koostuu 4738 geenistä, joista noin 5 % tuottaa bioaktiivisia peptidejä.

Anabaena 90 -kannan tuottamista bioaktiivisista peptideistä tutkituimpia ovat mikrokystiinit. Kannan on havaittu muodostavan kolmea mikrokystiiniä, jotka sisältävät vaihtelevasti joko leusiinia ja arginiinia (LR-mikrokystiini), arginiinia (RR-mikrokystiini) tai asparagiinihappoa, leusiinia ja arginiinia ([D-Asp³]-LR-mikrokystiini) (Sivonen ym. 1992). Lisäksi kanta tuottaa anabaenopeptilidejä 90A ja 90B sekä anabaenopeptiinejä A, B ja C (Fujii ym. 2002). Mikrokystiinien on todettu estävän proteiinifosfataaseja 1 ja 2A (MacKintosh ym. 1990, Yoshizawa ym. 1990) ja anabaenopeptilidien ja anabaenopeptiinien puolestaan proteaasien toimintaa (Namikoshi ja Rinehart 1996). Yhdisteiden tuotanto on toisistaan riippumatonta (Fujii ym. 2002) ja eri geeniryhmien säätelemää (Rouhiainen ym. 2000 ja 2004). Peptidien biologinen vaikutus tunnetaan osittain, mutta tuoton varsinainen merkitys *Anabaena* 90 -kannalle on epäselvä (Repka ym. 2004). Kanta ei välttämättä itse hyödynnä peptidejä aineenvaihdunnassaan, vaan niillä voi olla ulkoinen kohde.

1.1.2 *Anabaena* 90 -mutanttikanta

Anabaena 90 -villityyppikannasta (WT) on tehty anabaenopeptilidimutantti (*apd*⁻), joka ei tuota anabaenopeptilidejä (Rouhiainen ym. 2000). Mutantti eroaa WT-kannasta siten, että sen genomiin on liitetty 3,5 kiloemäksen kokoinen insertio (Kuva 2). Insertti sijaitsee 57 emäsparin jälkeen *apdA*-geenin aloituskohdasta, joka on yksi neljästä anabaenopeptilidien tuotosta vastaavasta geenistä. Insertti sisältää kloramfenikoli-O-asetyylitransferaasigeenin, joka saa aikaan kloramfenikoliresistenssin. Mutantti poikkeaa WT-kannasta myös tuottamiensa hassallidiinien eli sieniä tappavien aineiden osalta. WT ei tuota hassallidiinia, koska sen hassallidiinigeeniryhmässä on tapahtunut deleetio (Wang ym. 2012).



Kuva 2. Insertti (punainen alue), joka sijaitsee *apd*⁻-kannan *apdA*-geenissä.

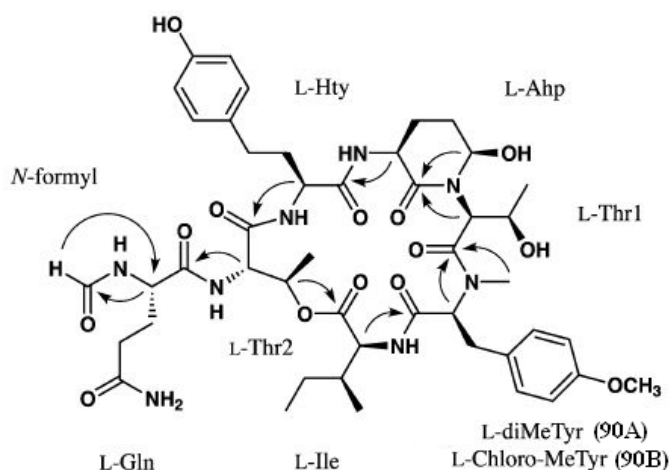
Insertti apd^- -kannan *apdA*-geenissä estää toiminnallisten anabaenopeptilidisyntetaasien muodostumisen, minkä seurauksena kannan ei ole havaittu tuottavan anabaenopeptilidejä (Rouhiainen ym. 2000). Insertti ei vaikuta apd^- -kannan kykyyn muodostaa muita bioaktiivisia peptidejä, kuten mikrokystiineja ja anabaenopeptiinejä. Insertin vaikutus anabaenopeptilidien tuotosta vastaavien geenien transkriptioon on kuitenkin epäselvä *apdA*-geenissä.

1.2 ANABAENOPEPTILIDIT

Peptidisyntetaasien muodostamat anabaenopeptilidit 90A ja 90B ovat syanopeptoliineihin luokiteltavia depsipeptidejä (Namikoshi ja Rinehart 1996). Ne ovat peptidejä, jotka sisältävät esterisidoksia amidisidosten sijaan (Stawikowski ja Cudic 2007). Molekyylejä esiintyy sekä lineaarisina että rengasrakenteisina muotoina (IUPAC 2012), ja niitä muodostavat sekä bakteerit, sienet että meressä elävät selkärangattomat (Stawikowski ja Cudic 2007). Syanobakteerisuvuista ainakin *Anabaena*, *Microcystis*, *Nostoc* ja *Oscillatoria* muodostavat depsipeptidejä (Namikoshi ja Rinehart 1996).

1.2.1 Anabaenopeptilidien rakenne

WT-kannan muodostamat anabaenopeptilidit 90A ja 90B ovat keskenään hyvin samankaltaisia (Fujii ym. 2002). Ne koostuvat kuuden aminohapon muodostamasta rengasrakenteesta ja sivuketjusta (Kuva 3). Rengasrakenteessa on runsaasti esterisidoksia ja se sisältää ainutlaatuisen (3S,6R)-3-amino-6-hydroksi-2-piperidoni Aminohapon (Ahp). Sivuketju on liittynyt rengasmuodostelmaan tyrosiinin välityksellä ja sen N-terminaaliossa oleva glutamiini on formyloitu. Peptidien syntetisointi alkaa sivuketjusta ja jatkuu edelleen rengasrakenteen muodostumisella. Anabaenopeptilidien 90A ja 90B molekyylipainot ovat 952 ja 972 daltonia, ja ne eroavat toisistaan vain yhden aminohapon osalta. 90A:ssa esiintyvän dimetyylityrosiinin korvaa 90B:ssä klooria sisältävä N-metyylityrosiini (Fujii ym. 2002).



Kuva 3. Anabaenopeptilidi 90A- ja 90B-molekyylit ovat keskenään samankaltaisia (Fujii ym. 2002). Aminohappojen lyhenteet: **L-Hty** = L-homotyrosiini, **L-Ahp** = 3-amino-6-hydroksi-2-piperidoni, **L-Thr** = L-treoniini, **L-diMeTyr** = L-dimetyylityrosiini, **L-Chloro-MeTyr** = L-kloorimetyyli-tyrosiini, **L-Ile** = L-isoleusiini, **L-Gln** = L-glutamiini.

1.2.2 Anabaenopeptilidien merkitys

Anabaenopeptilidien merkitys WT-kannalle on epäselvä. Kannan tiedetään tuottavan yhtä aikaa molempia anabaenopeptilidejä 90A ja 90B (Fujii ym. 2002). Vaikka peptideillä epäillään olevan vaikutusta syanobakteerin aineenvaihduntaan, ne eivät ole välttämättömiä solujen kasvuille (Repka ym. 2004). Solut voivat korvata anabaenopeptilidien puutteen esimerkiksi tuottamalla enemmän anabaenopeptiinejä (Repka ym. 2004).

Peptidien muodostaminen kuluttaa paljon energiaa, joten bioaktiivisten yhdisteiden tuoton on hyödytettävä soluja (Sivonen ja Börner 2008). Yleensä syanobakteerit tuottavat bioaktiivisia yhdisteitä silloin, kun soluja täytyy suojella ympäristökijöiltä, kuten osmoottiselta paineelta tai UV-säteilyltä (Scherer ym. 1988, Marin ym. 2002, Bultel-Poncé ym. 2004). Tällöin on mahdollista, että tuotetut peptidit tarjoavat kilpailuedun muita lajeja vastaan. Näyttää on myös siitä, että bioaktiivisia yhdisteitä tuotetaan suotuisissa olosuhteissa. Esimerkiksi *Anabaena*-suvun kannat tuottavat mikrokystiinejä eniten silloin, kun solujen kasvuolosuhteet ovat optimaaliset (Rapala ym. 1997). On kuitenkin huomioitava, että kasvuille optimaaliset olosuhteet ja siten myös bioaktiivisten yhdisteiden tuotto vaihtelevat eri lajien välillä.

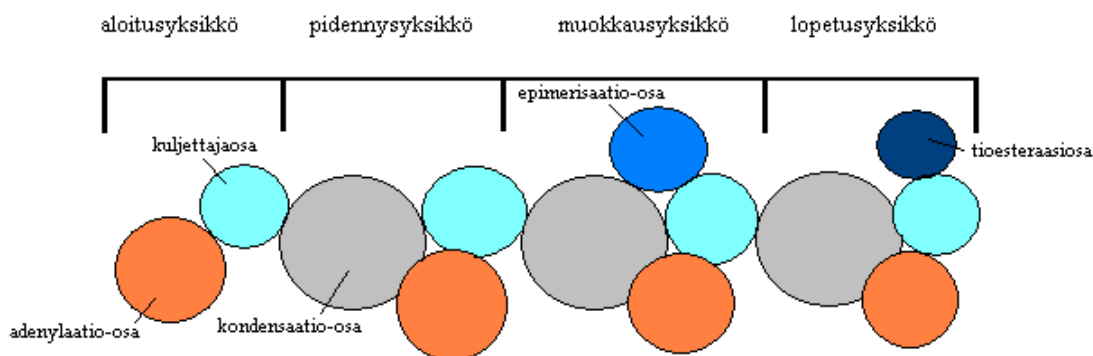
Bioaktiivisten yhdisteiden merkitystä tuottajalleen on mahdollista tutkia mutatoitujen kantojen avulla, joissa tietyn yhdisteen tuotosta vastaavan geenin toiminta on estetty mutaatiolla (Sivonen ja Börner 2008). Villityypin ja mutantin kasvun seuraaminen voi selvittää olosuhteita, joissa bioaktiivisia yhdisteitä tuotetaan ja paljastaa yhdisteiden käyttötarkoituksen.

1.3 EI-RIBOSOMAALISET PEPTIDISYNTETAASIT

Ei-ribosomaaliset peptidisyntetaasit ovat moniosaisia entsyymikokonaisuuksia, joiden toiminta on riippumatonta lähetti-RNA-molekyyleistä (Singh ym. 2012). Ei-ribosomaalisten peptidien muodostamisessa templaattina toimivat syntetaasientsyymit, eivätkä lähetti-RNA-molekyylit, kuten perinteisessä proteiinisynteessä. Kunkin peptidin syntetisoinnista vastaavat geenit ovat yhden operonin säätelemiä. Ei-ribosomaalisten peptidien muodostumiseen käytetään proteiineissa esiintyvien aminohappojen lisäksi metyloituja, glykosyloituja ja fosforyloituja aminohappoja ja jopa rasvahappojohdannaisia. Peptideissä esiintyy runsaasti funktionaalisia ryhmiä, joihin peptidien bioaktiivinen vaikutus perustuu. Ei-ribosomaaliset peptidit ovat useimmiten sekundaarisia aineenvaihduntatuotteita, joita muodostavat bakteerit, sienet ja alemmat eukaryootit (Stawikowski ja Cudic, 2007). Syanobakteereiden tuottamista yhdisteistä mm. anabaenopeptilidit ja mikrokystiinit ovat ei-ribosomaalisten peptidisyntetaasien muodostamia (Rouhiainen ym. 2000 ja 2004).

1.3.1 Syntetaasien rakenne ja toimintaperiaate

Syntetaasit koostuvat useista entsyymialayksiköistä, joista aloitus-, pidennys- ja lopetusyksiköt ovat keskeisessä asemassa peptidien syntetisoinnissa (Singh ym. 2012) (Kuva 4). Alayksiköt koostuvat edelleen adenylaatio-, kondensaatio-, kuljettaja- ja tioesteraasiosista. Lisäksi yksiköissä voi esiintyä metyyli transferaasi- tai epimerisaatio-osa. Jokainen osa vastaa yhden aminohapon mahdollisesta muuntelusta ja liittämisestä kasvavaan polypeptiketjuun.



Kuva 4. Esimerkki ei-ribosomaalisen peptidisyntetaasin rakenteesta.

Aloitussyksikkö koostuu adenylaatio-osasta ja peptidin kuljetusproteiinista, joiden tehtävänä on aktivoida oikea substraatti ja kuljettaa se seuraavalle yksikölle. Adenylaatio-osa on kooltaan noin 500 aminohappoa (Mootz ja Marahiel 1997). Se koostuu N- ja C-terminaalista alayksiköstä, joiden välissä sijaitsee molekyylin aktiivinen keskus. Adenylaatio-osa muistuttaa toiminnaltaan aminoasyyli-tRNA-syntetaaseja, koska se aktivoi peptidiketjuun liitettävän aminohapon ja siirtää sen kantajamolekyylille.

Kuljetusproteiinit ovat pienikokoisia molekyyliä, jotka koostuvat 80–100 aminohaposta (Mootz ym. 2001). Aminohapot muodostavat neljä helikaalista rakennetta, joiden välissä sijaitsee seriiniä sisältävä aktiivinen keskus. Aminohapon kuljetusta varten fosfopantetiini (PPan) -kofaktori substraatteineen sitoutuu aktiiviseen seriiniin. Kuljetusproteiinilla on kolme erilaista rakennetta, apo-, holo- ja apo/holomuodot, jotka vaihtelevat proteiinin toiminnan mukaan. Proteiini pystyy myös vaihtamaan aktiivisen keskuksen seriinin alaniiniin. Muodonmuutoksilla epäillään olevan vaikutusta proteiinin kykyyn tunnistaa molekyyliä (Finking ym. 2004).

Pidennysyksikkö vastaa uusien molekyylien liittamisestä peptidiketjuun. Pidennysyksikössä on samantapainen adenylaatio- ja kuljetusosa kuin aloitusyksikössä. Näiden lisäksi esiintyy myös kondensaatio-osa, joka muodostaa sidoksen aminohappojen välille (Linne ja Marahiel 2000). Kondensaatio-osan koko on noin 450 aminohappoa ja se koostuu kahdesta V-kirjaimen muotoisesta molekyylistä (Samel ym. 2007). Sidosta muodostettaessa kuljetusproteiinit ovat kiinnittyneinä V:n muotoisiin molekyyliin. Kondensaatio-osa katalysoi vastaanottavan kuljetusproteiinin sitoman

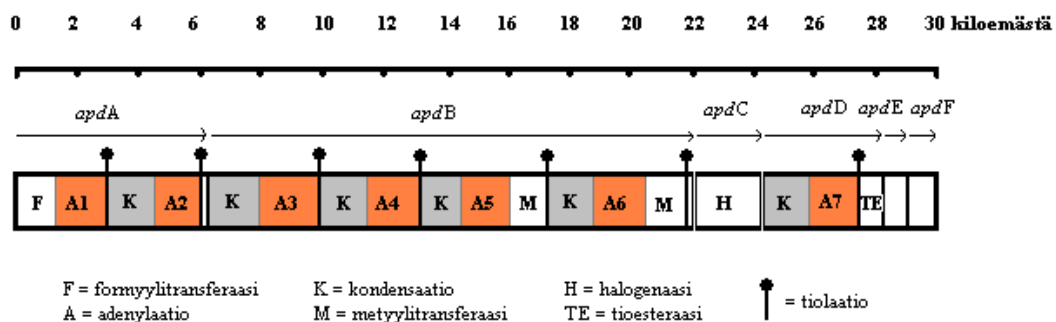
aminohapon α -aminoryhmän, joka reagoi viimeisenä ketjussa sijaitsevan aminohapon karboksyyli­ryhmän kanssa. Peptidisidos muodostuu näiden kahden funktionaalisen ryhmän välille.

Pidennysyksikössä peptidiketjuun liitettävät substraatit adenyloidaan, jolloin ne muodostavat amino­asyyli­anhydridin. Väli­tuote kuljetetaan P_{an}-kofaktorille, joka kiinnittyy peptidin kuljetusproteiiniin (PCP). Kahden kuljetusproteiinin sitoman molekyylin välille muodostuu peptidisidos ja aminohapot liittyvät yhteen (Stachelhaus ym. 1998). Sidoksen muodostumisen jälkeen peptidiketju siirretään seuraavalle yksikölle, jossa siihen lisätään uusi aminohappo.

Lopetusyksikössä sijaitseva tioesteraasiosa päättää peptidiketjun synteesin ja irrottaa ketjun entsyymitemplaatista (Kohli ym. 2001). Tioesteraasiosa koostuu noin 280 aminohaposta. Sen rakenteessa esiintyy mm. α - ja β -laskoksia, jotka ovat tyypillisiä esteraaseille ja lipaaseille. Tioesteraasi irrottaa muodostuneen peptidiketjun viimeisestä kuljettajaproteiinista ja vapauttaa sen lisämuokkausta varten. Joissain tapauksissa irrotettu peptidi kiinnitetään tioesteraasin aktiiviseen seriiniin ja muunnetaan asyyli-O-tioesteraasimolekyyliksi myöhempiä muutoksia varten. Yleisempää kuitenkin on, että tioesteraasit vapauttavat valmiin peptidiketjun syntetaasientsyymistä hydrolysoimalla tai muodostamalla ketjusta syklisen tai haarautuvan molekyylin.

1.3.2 Anabaenopeptilidisyntetaasit

Anabaenopeptilidien muodostamisesta vastaa kuusi geeniä, jotka muodostavat 30 kb kokoisen operonin (Kuva 5) (Rouhiainen ym. 2000). Geenialueelle on ominaista, että sen alussa esiintyy formyyli­transferaasia koodaava alue ja loppupäässä tioesteraasia koodaava alue. Geneistä *apdA* (6774 emäsparia), *apdB* (15180 emäsparia) ja *apdD* (4149 emäsparia) tuottavat syntetaasien osia. Neljäs geeni *apdC* on kooltaan 1875 emäsparia ja se poikkeaa muista geneistä merkittävästi. Se tuottaa ainoastaan halogenaasia, jonka tehtävänä on kiinnittää klooriatomi tyrosiiniin anabaenopeptilidi 90B -molekyyli­ssä.



Kuva 5. Anabaenopeptilidi 90A- ja 90 B -syntetaasigeeniryhmän rakenne (Rouhiainen ym. 2000).

apdA-geeni koostuu kahdesta, *apdB* neljästä ja *apdD* yhdestä yksiköstä (Rouhiainen ym. 2000), joiden koodaamat peptidisyntetaasit vastaavat anabaenopeptilidien aminohappojen aktivoinnista ja peptidisidosten muodostamisesta. Anabaenopeptilidien syntetisoinnista vastaavien geenien jälkeen on havaittu kaksi muuta geeniä, *apdE* ja *apdF*. Ne sijaitsevat samassa operonissa kuin geenit *apdA-D* ja niiden transkriptiosuunta on sama kuin peptidisyntetaasigeeneillä. *apdE*-geeni on kooltaan 789 emäsparia ja sen emäsjärjestys on samankaltainen kuin *Synechocystis*-suvun syanobakteerien metyyli transferaasigeenillä. *apdF*-geeni koostuu 735 emäsparista ja sen emäsjärjestyksessä on puolestaan yhdenmukaisuutta *Aquifex aeolicus* -lajin reduktasigeeniin. Geenien merkitys anabaenopeptilidisynteesissä on kuitenkin epäselvä (Rouhiainen ym. 2000).

1.4 PROTEOMIIKKA

Proteomiikka on laaja-alainen tieteenala, joka tutkii eliön tuottamia proteomeja eli kaikkien proteiinien muodostamaa kokonaisuutta (Liebler 2002). Proteiinit ovat elintärkeitä kaikille eläville organismeille, koska ne säätelevät solujen signaalinvälitystä, kasvuvaiheita ja transkriptiota. Proteiinien kopioluvut vaihtelevat soluissa kymmenistä jopa satoihin tuhansiin ja elinikä riippuu käyttökohteesta. Transkriptoitavat geenit ja muuttuvat olosuhteet vaikuttavat proteomien koostumukseen. Proteiineja voidaan myös muokata translaation jälkeen, mikä vaikuttaa proteomien monipuolisuuteen. Jokaisella eliöllä onkin vain yksi genomi, mutta useita proteomeja.

Proteomiikka voi olla joko massaspektrometripohjaista tai geelipohjaista, kuten tässä työssä. Karkeasti proteiinien tutkimusvaiheet voidaan luokitella kolmeen osa-alueeseen (Zhou ym. 2004). Ensimmäinen vaihe koostuu proteiinien erottelusta elektroforeesin avulla ja tunnistamisesta massaspektrometrialla. Pyrkimyksenä on kartoittaa mahdollisimman suuri määrä proteiineja, joita yksilö tuottaa yhtenä tietynä hetkenä. Toinen osa-alue keskittyy tunnistettujen proteiinien toimintaan, jolla selvitetään proteiinien rakenteen ja määrän vaihtelua solun eri kasvuvaiheissa. Viimeisessä vaiheessa selvitetään proteiinien välistä vuorovaikutusta. Proteomeja tutkimalla saadaankin kokonaisvaltainen kuva eliön aineenvaihdunnasta ja fysiologisista vasteista, toisin kuin pelkkien transkriptomien avulla (Liebler 2002). Proteomien monipuolisuus asettaa kuitenkin haasteita tutkimusmenetelmille, koska pelkkä geenien kartoittaminen ei paljasta lopullisten proteiinien rakennetta ja toimintaa.

Kaksisuuntainen (2D) geelielektroforeesi on 1970-luvulla kehitetty menetelmä proteiinien tutkimiseen ja määrän arviointiin (O'Farrell 1975). Menetelmän erottelukyky on hyvin herkkä, koska proteiinit erottuvat toisistaan sähkövarauksen ja koon perusteella. 2D-geelielektroforeesilla voidaan tutkia samanaikaisesti satoja proteiineja, mikäli elektroforeesiin yhdistetään sopiva värjäysmenetelmä ja massaspektrometrinen tunnistus (Barrios-Llerena ym. 2007). Kaksiulotteisen elektroforeesin keksimisen jälkeen (O'Farrell 1975) proteomien analysointi on helpottunut, sillä proteiinigeelien analysointiin on kehitetty automatisoituja kuvankäsittelyohjelmia. Geelistä eristetyt proteiinit voidaan edelleen pilkkoa trypsiinillä ja analysoida massaspektrometrillä. Pilkkoutumistuotteena muodostuvien peptidien massoja voidaan vertailla keskenään ja etsiä niille vastaavuuksia genomitietokannoista (Matthiesen ja Mutenda 2007).

Perinteisen 2D-geelielektroforeesin ohella tunnetaan myös erotteleva 2D-geelielektroforeesi (2D-DIGE), jossa proteiinit leimataan fluoresoivilla syaaniväreillä (Ünlü ym. 1997). Värimolekyylit ovat keskenään samankokoisia ja niiden varaus on yhtä suuri (+1), joten leimattavien proteiinien massa ja pI muuttuvat yhtenevästi. 2D-DIGE mahdollistaa kahden proteiininäytteen ja sisäisen standardin yhtäaikaisen ajamisen samalla geelillä. Näin ollen ajettavien geelien lukumäärä vähenee ja geelien välinen vertailu helpottuu (Ünlü ym. 1997). Proteomien väliset erot on helppo havaita heti elektroforeesin ja geelien kuvauksen jälkeen.

1.4.1 Proteiinien erottelu

Ensimmäiseksi tutkittavat proteiinit eristetään muusta solumateriaalista. Käytettävä menetelmä riippuu näytetyypistä, mutta pääperiaatteena on solujen hellävarainen rikkominen joko kemiallisesti tai mekaanisesti (GE Healthcare 2010). Tavoitteena on minimoida proteiinien kemiallinen muuntuminen ja määrän väheneminen, mikä voi vääristää tuloksia. Solumateriaalista eristetyt proteiinit ovat alttiita esimerkiksi proteiineja pilkkoville entsyymeille eli proteaaseille. Proteiineja voidaan suojella hajoamiselta kemikaalien ja alhaisen lämpötilan (+4 °C) avulla.

Tunnetuin 2D-geelielektroforeesin ensimmäisestä vaiheesta on proteiinien isoelektrinen fokusointi (IEF), joka perustuu proteiinien sähkövaraukseen (O'Farrell 1975). Proteiinit ovat varautuneita joko positiivisesti tai negatiivisesti tai ne ovat varauksettomia riippuen sivuketjunsä aminohappokoostumuksesta. Kun proteiinit altistetaan sähkövirralle, ne liikkuvat varauksensa mukaan kohti isoelektristä pistettä (pI) eli pH-arvoa, jossa proteiinin aminohappojen nettovaraus on nolla. Isoelektrisessä pisteessä proteiini pysähtyy paikoilleen eikä enää liiku kohti katodia/anodia. Liikkumaton pH-gradienttitekniikka (IPG eli immobilized pH gradient) auttaa rajaamaan tutkittavia proteiineja siten, että ne asettuvat tietylle pH-alueelle (Nawrocki ym. 1998) (Kuva 6).

2D-geelielektroforeesin toisessa vaiheessa käytetään natriumdodekyylisulfaattipolyakryyliamidigeelielektroforeesia (SDS-PAGE), joka erottelee proteiinit molekyylikoon perusteella (O'Farrell 1975). Proteiinin kulkematka sähkökentässä riippuu molekyylin koosta, sillä pienikokoiset proteiinit kulkevat pidemmälle kuin suurikokoiset.

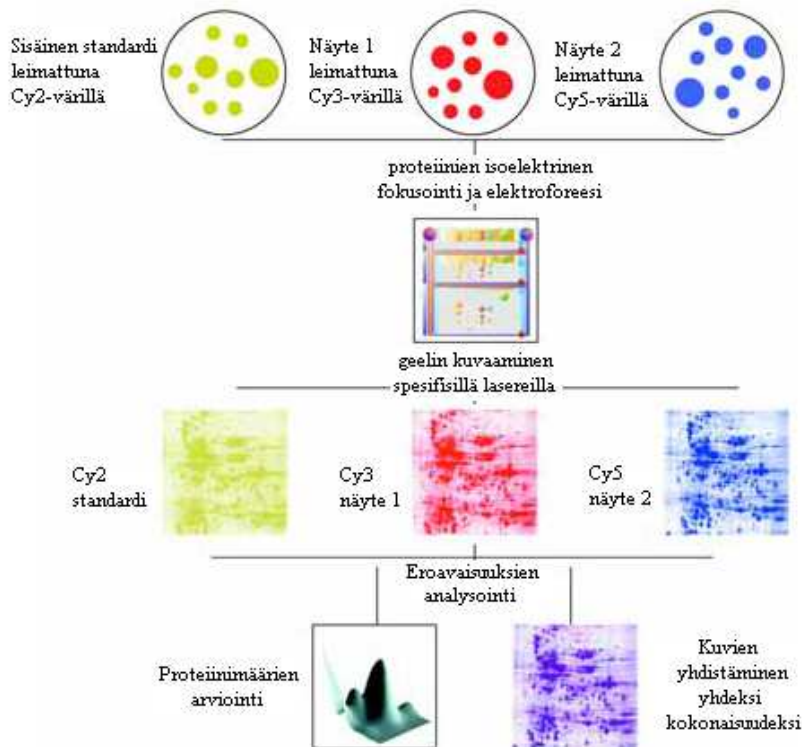


Kuva 6. Proteiinien isoelektriseen fokusointiin käytettäviä IPG-liuskoja.

1.4.2 Proteiinien havaitseminen

Proteiinien havaitseminen vaatii erityisiä värjäys- ja kuvausmenetelmiä sekä kuvankäsittelyohjelman, jotka tunnistavat proteiinit (Ünlü ym. 1997). Proteiininäytteet voidaan leimata etukäteen ennen 2D-geelielektroforeesia fluoresoivilla tai radioaktiivisilla väriaineilla, jolloin geelit kuvataan fluorografisilla tai radiografisilla menetelmillä. Vaihtoehtoisesti koko geeli voidaan värjätä elektroforeesin jälkeen. Tällöin käytetään joko fluoresoivia tai fluoresoimattomia värejä, kuten Coomassie- tai hopeavärjäystä. Jälkikäteen käytettävät värit ovat epäspesifisiä, joten niitä ei voida käyttää eri proteiininäytteiden erotteluun.

Fluoresoivien väriaineiden käyttö mahdollistaa proteiinien spesifisen erottelun (Kuva 7). Värit toimivat fluorokromeina ja ne sitoutuvat tutkittavien proteiinien sisältämiin lysiiniaminohappoihin (Amersham Biosciences 2003). Fluorokromit absorboivat valoenergiaa, minkä seurauksena yhdisteen sisältämät elektronit virittyvät perustilaa korkeammalle energiatasolle. Viritystila purkautuu nopeasti. Samalla fluorokromi emittoi energiaa näkyvinä aallonpituuksina eli fluoresenssina, joka kuvataan skannerilla. Filtterien läpi kulkeva valo käsitellään sähkövirtana ja muunnetaan analogiseksi signaaliksi (Amersham Biosciences 2002b). Signaali tallennetaan tietokoneelle digitaaliseen muotoon.



Kuva 7. Kaksiulotteisen erottelevan geielektroforeesin vaiheet käytettäessä kolmea eri fluoresoivaa väriainetta (Amersham Biosciences 2003).

Skannerin havaitsemia digitaalisia signaaleja käsitellään kuvankäsittelyohjelman avulla. Signaaleista muodostetaan proteiNIKARTTA, jossa jokainen täplä kuvaa yksittäistä proteiinia (Amersham Biosciences 2002b). Signaalin voimakkuus on verrannollinen proteiinimäärään. Kartta kattaa tietyn organismin yhtenä hetkenä tuottamat proteiinit. Sen avulla voidaan selvittää, miten solun proteomi muuttuu eri kasvuvaiheissa. Tämä puolestaan mahdollistaa olosuhteiden mukaan muuttuvien proteiinimäärien tunnistamisen.

1.5 TRANSKRIPTOMIIKKA

Transkriptomilla tarkoitetaan solun yhtenä hetkenä tuottamaa RNA-populaatiota (Zhou ym. 2004). Solun transkriptomit vaihtelevat olosuhteiden muuttuessa, aivan kuten proteomit. Transkriptomiikan pyrkimyksenä on tutkia transkriptomien koostumusta ja selvittää, miten transkriptiotuotteiden määrä muuttuu solussa esimerkiksi eri olosuhteissa tai kasvuvaiheissa. Tiedon avulla kartoitetaan genomin toimintaa ja

vaikutusta solun fysiologisiin mekanismeihin. Transkriptomeja tutkimalla on mahdollista löytää esimerkiksi uusia geenejä ja lähetti-RNA:iden (mRNA) vaihtoehtoisia yhdistelmiä (Cloonan ym. 2008).

Transkriptomit kuvastavat aktiivisten geenien toimintaa (Zhou ym. 2004). Ne sisältävät informaation kulun kannalta tärkeitä mRNA-molekyylejä, joiden avulla geenien sisältämä tieto välittyy rakentuviin proteiineihin. Transkriptomit toimivat siis muodostettavien proteiinien esiasteena. Geenien transkriptio ei kuitenkaan suoraan korreloi lopullisten proteiinien määrään, koska kaikista mRNA-molekyyleistä ei muodosteta proteiineja (Gygi ym. 1999). Tähän ovat syynä RNA:n lyhytikäisyys ja vaihtelu translaatiotehokkuudessa.

Transkriptomeja voidaan tutkia mikrosirumenetelmillä ja RNA-sekvensoinnilla. Mikrosirumenetelmät mahdollistavat tuhansien geenien yhtäaikaista tutkimista ja paljastavat aktiivisten geenien ilmentymisen RNA-tasolla (Zheng ja Zhao 2013). Menetelmät perustuvat näytteen ja tunnettujen oligonukleotidikoettimien väliseen hybridisaatioon (Schena ym. 1995). Mikrosirumenetelmien heikkoutena on, että koettimet voivat sitoutua epäspesifisesti tutkittaviin DNA-juosteisiin (Okoniewski ja Miller 2006). Menetelmien käyttö edellyttää myös, että tutkittavien nukleinihappojen emäsjärjestys on tiedossa.

Mikrosirujen rinnalle on kehitetty 2000-luvulla RNA:n sekvensointiin perustuvia menetelmiä. Yleisperiaatteena on, että RNA-molekyylit pilkotaan ja käännetään komplementaariseksi DNA:ksi (Rodríguez-Ezpeleta ja Aransay 2012). Pilkkoutumistuotteista muodostetaan kirjasto ja juosteiden emäsjärjestys määritetään sekvensoimalla. Yksittäisten transkriptien määrä saadaan selville, kun juosteiden emäsjärjestyksiä verrataan keskenään. Mitä useammin sama sekvenssi tulee esille, sitä enemmän transkriptia esiintyy. RNA:n sekvensointiin perustuvat menetelmät antavat tarkempaa tietoa transkriptomien koostumuksesta kuin mikrosirumenetelmät.

1.5.1. RNA-näytteiden käsittelyn vaatimukset

Prokaryoottien RNA on varsin lyhytikäistä. Esimerkiksi *Escherichia coli* -solujen lähetti-RNA:n keskimääräinen elinikä vaihtelee 3-8 minuutin välillä (Bernstein ym. 2002). Hajoamisnopeuteen vaikuttavat sekä solusignaalit että RNA:n irrottaminen translaatiokoneistosta. Tarpeettomat molekyylit pilkotaan solun käyttöön RNA:ta hajottavien entsyymien eli RNAasien toimesta. Mitä nopeammin RNA hajoaa, sitä vähemmän syntyy uusia proteiineja (Selinger ym. 2003).

RNA-näytteiden käsittely edellyttää huolellista laboratoriotyöskentelyä, koska RNA on altista pilkkoutumiselle ja kontaminoitumiselle. Ehjien mRNA-molekyylien eristäminen onkin hankalaa, koska RNAaseja esiintyy ympäristössä ja iholla (Suominen ja Ollikka 2003). RNAasit ovat hyvin kestäviä ja ne tuhoavat RNA:ta nopeasti, joten entsyymien toimintaa täytyy hidastaa pitämällä näytteet kylmässä. Autoklavointi ei yksistään riitä inaktivoimaan RNAaseja, vaan laboratoriovälineet ja työtasot on käsiteltävä RNAaseja tuhoavilla reagensseilla. Tähän tarkoitukseen soveltuvat esimerkiksi dietyylipyrokarbonaatti sekä useat kaupalliset valmisteet.

1.5.2 Yksittäisten transkriptien tutkiminen

Yksittäisten geenien transkriptiota voidaan tutkia käänteiskopioija-polymeraasiketjureaktiolla eli RT-PCR:llä. Käänteiskopioijaentsyymi poikkeaa DNA-polymeraasista siten, että se käyttää templaattina RNA:ta DNA:n sijaan (Temin ja Mizutami 1970). Entsyymien avulla RNA muunnetaan komplementaariseksi DNA:ksi (cDNA), mikä mahdollistaa lähetti-RNA-molekyylien havaitsemisen ja määrän arvioinnin.

Ensimmäisessä vaiheessa käänteiskopioijaentsyymi syntetisoi RNA:n emäsjärjestyksen perusteella yksijuosteisen DNA-molekyylin. cDNA:n syntetisoinnissa voidaan käyttää joko geenispesifisiä tai RNA:han satunnaisesti sitoutuvia alukkeita (Invitrogen 2004). Satunnaisalukkeet mahdollistavat sen, että koko RNA-kirjo käännetään cDNA:ksi. Toisessa vaiheessa cDNA:ta monistetaan tavanomaisen PCR-reaktion avulla. PCR:ssä

voidaan käyttää geenispesifisiä alukkeita, joilla testataan halutun geenin ilmentymistä mRNA-tasolla.

1.6 STUDENTIN T-TESTI

Studentin t-testillä tarkoitetaan tilastollista testiä, jolla mitataan normaalijakautuneiden odotusarvojen välistä eroa (Mellin 2006). Testi noudattaa Studentin jakaumaa, joka on pienen otoskoon analysointiin soveltuva todennäköisyysjakauma. Studentin t-testin avulla voidaan tutkia havaintojen ja hypoteesin eli oletusten välistä yhteyttä. Havainnoista saadun tiedon perusteella hypoteesi todetaan joko paikkansapitäväksi tai se hylätään.

Studentin t-testin käyttö edellyttää hypoteesien tekemistä testausjoukosta (Mellin 2006). Havainnot puolestaan muodostavat satunnaisotoksen, jonka yhteensopivuutta hypoteesiin testataan. Testausasetelmaa kuvaavaa oletusta sanotaan yleishypoteesiksi ja se sisältää oletukset perusjoukosta ja sen jakaumasta sekä otantamenetelmästä. Testattavaa oletusta kutsutaan nollahypoteesiksi ja siitä pidetään kiinni, mikäli havainnot tukevat oletusta. Yksinkertaisimmillaan nollahypoteesi voi olla muotoa ”on sama” tai ”eroa ei ole”. Nollahypoteesin vastakohta on vaihtoehtoinen hypoteesi. Se tulee voimaan, jos nollahypoteesi joudutaan hylkäämään.

Nollahypoteesi hyväksytään p -arvon perusteella, joka toimii satunnaisvirheen tunnuslukuna (Mellin 2006). Se on pienin merkitsevyystaso, jolla nollahypoteesi voidaan hylätä. Mitä pienempi p -arvo on, sitä vahvemmin havainnot osoittavat nollahypoteesin olevan väärässä.

2 TUTKIMUKSEN TAVOITTEET

Työn tavoitteena oli selvittää, miten *Anabaena* 90 -syanobakteerin WT ja *apd*⁻-kannan proteomit ja *apd*-syntetaasigeenien ilmentyminen eroavat toisistaan. Työ jakautui kahteen osaan, joista esikokeen tarkoituksena oli optimoida kasvatusolosuhteet ja käytetyt menetelmät varsinaista kasvatuskoetta varten. Kantojen proteomeissa tapahtuvia muutoksia seurattiin varsinaisen, kuusipäiväisen kasvatuskokeen avulla. Samanaikaisesti seurattiin solujen proteiini- ja RNA-pitoisuuksien kehittymistä ja anabaenopeptilidigeenien ilmentymistä. Tarkoituksena oli kartoittaa kantojen välisiä eroja proteiinien tuotossa ja *apd*-syntetaasigeenien ilmentymisessä.

3 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

3.1 Syanobakteerikannat

Tutkimuksessa käytettiin *Anabaena* 90 WT -kantaa ja siitä tehtyä *apd*⁻-kantaa, joka ei tuota anabaenopeptilidejä. Kannat kuuluvat Helsingin yliopiston Elintarvike- ja ympäristötieteiden laitoksen syanobakteerikantakokoelmaan.

Kantoja esikasvatettiin 7 vrk, 100 rpm, +20 °C, 8,4–12,9 μmol/s·m² valaistuksessa Climo Shaker -sekoittelijassa (Kuhner AG). Kantojen kasvatukseen käytettiin Z8X-elatusainetta (Liite 1) (Kótai, 1972) ja Tissue culture flask -soluviljelypulloja (Sarsted). Tavoitteena oli mukauttaa solut kasvatuskokeiden vaatimiin olosuhteisiin.

3.2 Koeasetelma

3.2.1 Esikoe

Ennen varsinaisen kasvatuskokeen aloittamista WT- ja *apd*⁻-kannan kasvua seurattiin seitsemän vuorokauden mittaisessa esikokeessa. Tarkoituksena oli seurata jakaantumisvaiheen solujen kasvua ja optimoida elatusaineen määrä, solususpension vahvuus sekä proteiini- ja RNA-näytteiden tilavuus. Lisäksi esikokeessa kartoitettiin

villityyppi- ja mutanttikannasta eristettyjen proteiinien isoelektristä pistettä (pI). Tarkoituksena oli selvittää aluetta, jolle proteiinien pI:t sijoittuivat.

Kokeen alussa solutiheys (OD) laskettiin vastaamaan haluttua OD₆₀₀-arvoa kaavalla

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2, \text{ jossa}$$

- C₁ = alkuperäisen soluviljelmän OD
- V₁ = alkuperäisen soluviljelmän tilavuus
- C₂ = lopullisen soluviljelmän OD
- V₂ = lopullisen soluviljelmän tilavuus.

Esikokeessa WT- ja apd⁻-kannan solususpension tilavuus oli 270 ml ja OD₆₀₀ 0,2 kokeen alussa. Proteiini-, RNA- ja solutiheysnäytteitä kerättiin kolmena ajankohtana (Taulukko 1). Molemmista kannoista tehtiin kaksi rinnakkaisnäytettä, joita käytettiin biologisina replikaatteina.

Taulukko 1. Esikokeen aikana kerättyjen näytteiden ottoajankohdat ja näytetilavuudet.

Näyte	Vrk		
	0	3	7
solutiheys	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml
proteiini	2 x 50 ml	50 ml	50 ml
RNA	2 x 10 ml	10 ml	10 ml

3.2.2 Varsinainen kasvatuskoe

Varsinaisessa kasvatuskokeessa WT- ja apd⁻-kannan kasvua seurattiin kuuden vuorokauden ajan. Kummastakin kannasta valmistettiin erilliset primäärisuspensiot, jotka jaettiin soluviljelypulloihin. Näin varmistettiin, että soluviljelmät olivat tasalaatuisia lähtötilanteessa. Kantojen solususpension tilavuus oli 130 ml / soluviljelypullo ja OD₆₀₀ 0,2 kokeen alussa. Molemmista kannoista oli kolme biologista replikaattia.

Kasvatuskokeen aikana viljelmistä kerättiin proteiini-, RNA- ja solutiheysnäytteet (Taulukko 2). Näytteenotto ajoitettiin samaan vuorokaudenaikaan ympäristökijöistä

johtuvan vaihtelun minimoimiseksi. 0 vrk näytteet otettiin suoraan primäärisuspensiosta ja 1 – 6 vrk näytteet kerättiin soluviljelypulloista. Proteiini- ja RNA-näytteiden keräämistä varten oli omat viljelypullot, jotta soluja saatiin riittävästi jatkomäärityksiä varten. Kantojen solutiheyttä seurattiin kaikissa kasvatuspulloissa.

Taulukko 2. Varsinaisen kasvatuskokeen aikana kerättyjen näytteiden ottoajankohdat ja näytetilavuudet.

Näyte	Vrk						
	0	1	2	3	4	5	6
solutiheys	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml
proteiini	2 x 50 ml	-	-	50 ml	-	-	50 ml
RNA	2 x 50 ml	-	-	50 ml	-	-	50 ml

Tutkittujen kantojen akseenisuutta eli puhtautta vieraista mikrobeista tutkittiin puhtausviljelyillä. Puhtausviljelynäytteet otettiin 0 vrk, 4 vrk ja 6 vrk kohdalla. Viljelyihin käytettiin R2A-elatusainemaljaa (LAB M), jolla osoitetaan vesinäytteissä esiintyvät bakteerit (Reasoner ja Geldreich 1985). Malja jaettiin sektoreihin, ja pisara solususpensiota levitettiin agarille kunkin sektorin kohdalle. Puhtausviljelymaljoja kasvatettiin +20 °C 7 vrk. Kasvatuksen jälkeen maljoja tarkasteltiin silmämääräisesti bakteerikasvun havaitsemiseksi.

3.2 Näytteiden käsittely

3.2.1 Proteiininäytteet

Proteiinien eristämistä varten 50 ml syanobakteeriviljelmää sentrifugoitiin 7000 g, 8 min, +4 °C. Solut pidettiin jäällä sentrifugointivaiheiden välissä. Solut pestiin 5 ml pesupuskuria (50 mM HEPES NaOH pH 7,5; 30 mM CaCl²) ja sentrifugoitiin, kuten edellä. Pesu toistettiin 1,5 ml pesupuskuria, minkä jälkeen solususpensio siirrettiin puhtaaseen muoviputkeen. Solut sentrifugoitiin 7000 g, 5 min, +4 °C ja supernatantti poistettiin. Solut jäädytettiin nestetyypessä ja säilytettiin -80 °C.

3.2.2 RNA-näytteet

RNA:n eristämistä varten 50 ml syanobakteeriviljelmää sentrifugoitiin 6000 g, 3 min, +4 °C. Solut pidettiin jäällä sentrifugointivaiheiden välissä. Supernatantti poistettiin, ja soluja sentrifugoitiin yksi minuutti elatusainejäämien poistamiseksi. Solut jäädytettiin nestetyypessä ja säilytettiin -80 °C.

3.3 Solutiheyden mittaaminen

Syanobakteerinäytteiden solutiheys mitattiin 30 min sisällä näytteenotosta BioPhotometer-spektrofotometrillä (Eppendorf). Mittaus suoritettiin muovikyvetissä aallonpituudella 600 nm ja jokaisesta näytteestä tehtiin kolme rinnakkaismittausta. Taustanäytteenä käytettiin Z8X-elatusainetta.

3.4 Proteomien tutkiminen

Anabaena 90 -syanobakteerin WT- ja *apd*⁻-kannan proteomeja tutkittiin 2D-DIGE:n avulla. Proteiininäytteitä käsiteltäessä käytettiin nitrilisuojakäsineitä, jotta välttyttiin kontaminoimasta näytteitä mahdollista myöhempää proteiinien tunnistusta häiritsevillä keratiineilla. Menetelmää varten proteiinit eristettiin syanobakteerisoluista ja leimattiin fluoresoivilla väreillä. 2D-DIGE:n jälkeen proteiinien muodostama fluoresenssi kuvattiin skannerilla, joka muuttaa fluoresenssin digitaaliseksi signaaliksi. Näytteiden sisältämistä proteiineista muodostettiin signaalien perusteella kolmiulotteinen kartta, mikä mahdollisti proteiinimäärien vertailun ja tilastollisten analyysien tekemisen.

3.4.1 Proteiinien eristäminen

Esikokeen ja varsinaisen kasvatuskokeen proteiinit eristettiin aiemmin kerätyistä ja pakastetuista syanobakteerisoluista. Solut sulatettiin jäällä ja niihin lisättiin 500 µl SPS (sample preparation solution) -reagenssia (Liite 2). Solut pidettiin jäällä työvaiheiden välissä, jotta välttyttiin lämpenemisen aiheuttamilta kemiallisilta muutoksilta. Solut hajotettiin 0,5 mm lasihelmillä (Scientific Industries) FastPrep-laitteessa (MP Biomedicals) 5 m/s 30 s. Sakka sentrifugoitiin 18 000 g, 30 min, +4 °C, jolloin liukoiset

proteiinit jäivät supernatanttiin. Supernatanttiin lisättiin puoli tilavuutta -20°C -asteista DL-ditiotreititolitrikloorietikkahapposetonia eli DTT-TCA-asetonia (TCA 10%, VWR; DTT 20 mM, Fluka Analytical; asetoni Sigma-Aldrich). Proteiinit saostettiin -20°C yön yli ja sentrifugoitiin 20 000 g, 30 min, $+4^{\circ}\text{C}$. Pelletti pestiin DTT-asetonilla ja ilmakeivattiin asetonin haihduttamiseksi. Proteiinit resuspensoitiin 200 μl SPS-reagenssia ja sentrifugoitiin 20 000 g, 20 min, $+4^{\circ}\text{C}$. Lopuksi supernatantti siirrettiin puhtaaseen putkeen ja pakastettiin -80°C .

3.4.2 Proteiinipitoisuuden määrittäminen

Syanobakteerisolujen sisältämä proteiinipitoisuus määritettiin 2-D Quant Kit -reagenssipakkauksen ohjetta mukaillen (Amersham Biosciences 2002a). Standardisuora valmistettiin BSA-liuoksesta (naudan seerumin albumiini) vastaamaan proteiinipitoisuuksia 0-25 μg . Määritykseen käytetyt näytetilavuudet olivat 2 μl ja 5 μl . Proteiinit saostettiin epäpuhtauksien poistamiseksi pakkauksen mukana tulleella saostusliuoksella, minkä jälkeen proteiinit liuotettiin kupariliuokseen. Kupari-ionit sitoutuivat proteiineihin ja sitoutumattomat kupari-ionit jäivät liuokseen. Näytteeseen lisätty väriaine muodosti värillisen yhdisteen vapaiden kupari-ionien kanssa. Värireaktion muodostama absorbanssi mitattiin Infinite-kuoppalevylukijalla (Tecan Group) aallonpituudella 480 nm. Muodostuneen värin intensiteetti oli kääntäen verrannollinen näytteen proteiinipitoisuuteen. Standardinäytteiden absorbansseista piirrettiin standardisuora, johon verrattiin näytteiden absorbanssiarvoja.

3.4.3 Proteiininäytteiden pH-arvon mittaaminen ja säätäminen

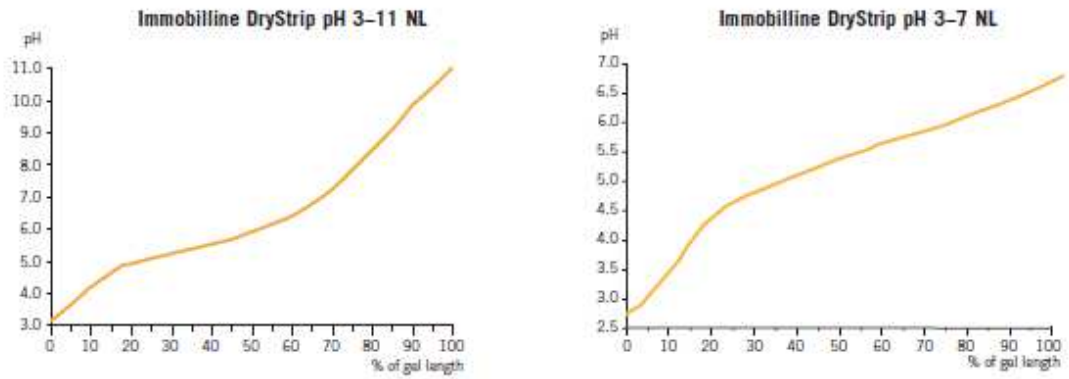
Proteiininäytteiden pH mitattiin yleisindikaattori-pH-paperilla (pH 0–14, Merck) ennen näytteiden leimaamista. Näytettä pipetoitiin 1 μl sopivan indikaattorialueen kohdalle ja tulos luettiin silmämääräisesti vertaamalla näytteen muodostamaa värireaktiota valmistajan värikarttaan. Tarvittaessa näytteiden pH-arvoksi säädettiin 8,5 100 mM natriumhydroksidilla optimaalisen leimaustuloksen saavuttamiseksi. Neutraalissa tai liian happamassa ympäristössä (pH < 8,0) proteiinit leimautuvat heikosti ja liian emäksisessä (pH > 8,5) proteiinit ylleimautuvat (GE Healthcare 2010).

3.4.4 Proteiininäytteiden leimaaminen

Esikokeen ja varsinaisen kasvatuskokeen proteiinit leimattiin fluoresoivilla CyDye™ DIGE Fluor -syaaniväreillä, jotka olivat keltainen Cy2, punainen Cy3 ja sininen Cy5 (5 nmol, GE Healthcare). Väriaineista valmistettiin kantaliuokset (1 nmol/μl) anhydriiseen dimetyyliformamidiin (99,8 %, Sigma-Aldrich®), joista laimennettiin käyttöreagenssit (400 pmol/μl). Esikokeen sisäinen standardi valmistettiin sekoittamalla 25 ng jokaista esikokeen proteiininäytettä keskenään ja varsinaisen kasvatuskokeen standardi vastaavasti sekoittamalla 25 ng jokaista varsinaisen kasvatuskokeen proteiininäytettä keskenään. Näin valmistetut sisäiset standardit leimattiin keltaisella Cy2-värillä. Esikokeen varsinaisista proteiininäytteistä leimattiin 50 ng 1 μl:lla ja varsinaisen kasvatuskokeen näytteistä 50 ng 0,65 μl:lla joko punaista Cy3- tai sinistä Cy5-väriä (Taulukko 3 ja 4). Rinnakkaisnäytteet värjättiin satunnaisesti joko Cy3- tai Cy5-värillä. Väri-näyteseokset sentrifugoitiin ja pidettiin jäällä 30 min. Lopuksi värireaktio pysäytettiin lysiiniliuoksella (10 mM, Sigma-Aldrich®), joka sitoutui vapaiden värimolekyylien NHS-esteriin.

3.4.5 Proteiinien isoelektrinen fokuointi

Isoelektrisessä fokuoinnissa (IEF) proteiinit kulkeutuvat sähkökentässä pisteeseen, jossa sivuketjujen aminohappojen nettovaraus on nolla. IEF-ajoon käytettiin 24 cm ei-lineaarisia Immobiline DryStrip -liuskoja (Amersham Biosciences), joissa pH-alueet olivat edustettuina pituuden mukaan (Kuva 8). Esikokeesta eristettyjen proteiinien isoelektriseen fokuointiin käytettiin pH-alueelle 3-11 suunniteltuja liuskoja ja varsinaisesta kasvatuskokeesta eristetyille proteiineille pH-alueelle 3-7 suunniteltuja liuskoja. Liuskat kostutettiin 450 μl kostutusliuosta 24 h (Liite 2) (GE Healthcare 2010). Yhdelle liuskalle lisättiin kahta eri väriaineilla leimattua ja eri kannoista peräisin olevaa proteiininäytettä 50 ng/näyte/liuska (Taulukko 3 ja 4). Sisäistä standardia lisättiin jokaiselle liuskalle 50 ng geelien keskinäisen vertailun mahdollistamiseksi.



Kuva 8. Esikokeessa (pH 3-11 NL) ja varsinaisessa kasvatuskokeessa (pH 3-7 NL) käytettyjen IPG-liuskojen pH-alueiden jakaantuminen (Amersham Biosciences 2004).

Taulukko 3. Esikokeesta eristettyjen proteiinien leimaamiseen käytetyt värit ja rinnakkaisnäytteiden (1 ja 2) sijoittuminen geeleissä.

Geeli	Käytetty väri ja geelin sisältämät näytteet	
	Cy3	Cy5
1	WT 1, 0 vrk	apd ⁻ 1, 3 vrk
2	apd ⁻ 1, 0 vrk	WT 1, 7 vrk
3	WT 1, 3 vrk	apd ⁻ 2, 0 vrk
4	apd ⁻ 2, 3 vrk	WT 2, 3 vrk
5	WT 2, 7 vrk	apd ⁻ 1, 7 vrk
6	apd ⁻ 2, 7 vrk	WT 2, 0 vrk

Taulukko 4. Varsinaisesta kasvatuskokeesta eristettyjen proteiinien leimaamiseen käytetyt värit ja rinnakkaisnäytteiden (1-3) sijoittuminen geeleissä.

Geeli	Käytetty väri ja geelin sisältämät näytteet	
	Cy3	Cy5
1	WT 1, 0 vrk	apd ⁻ 1, 3 vrk
2	WT 1, 3 vrk	apd ⁻ 2, 6 vrk
3	WT 2, 6 vrk	apd ⁻ 1, 0 vrk
4	apd ⁻ 1, 6 vrk	WT 2, 0 vrk
5	apd ⁻ 3, 0 vrk	WT 2, 3 vrk
6	apd ⁻ 2, 3 vrk	WT 3, 6 vrk
7	WT 3, 0 vrk	apd ⁻ 2, 0 vrk
8	apd ⁻ 3, 3 vrk	WT 3, 3 vrk
9	WT 1, 6 vrk	apd ⁻ 3, 6 vrk

Esikokeen ja varsinaisen kasvatuskokeen proteiinien isoelektrinen fokusointi tehtiin Ettan IPGphor 3 -analysointilaitteessa (GE Healthcare). Liuskat asetettiin laitteeseen siten, että niiden positiivisesti varautunut pää oli kohti anodia. Isoelektriseen fokusointiin käytettiin nelivaiheista ohjelmaa (Taulukko 5), jossa tasajännite ja gradientti vaihtelivat. Tasajännitevaiheessa jännite pysyi tasaisena koko asetetun ajan, mutta gradienttivaiheessa jännite nousi vähitellen asetettua volttimäärää vastaavaksi ennalta määritetyn ajan puitteissa. Isoelektrisen fokusoinnin jälkeen liuskat tasapainotettiin tasapainotuspuskurilla (GE Healthcare 2010), josta valmistettiin 1 % DTT-liuos (Fluka Analytical) ja 2,5 % jodoasetamidiliuos (AppliChem) ennen käyttöä (Liite 2).

Taulukko 5. Esikokeen ja varsinaisen kasvatuskokeen proteiinien isoelektrisessä fokusoinnissa käytetty ohjelma.

Vaihe	Jännite (V)	Aika (h)
Tasajännite 1	300	3
Gradientti 1	1000	6
Gradientti 2	8000	3
Tasajännite 2	8000	4

3.4.6 Erotteleva geelielektroforeesi

Esikokeen ja varsinaisen kasvatuskokeen proteiininäytteiden elektroforeesia varten valmistettiin 12 % akryyliamidigeelit 1 mm paksuisiksi (GE Healthcare 2010). 40 % akryyliamidi (akryyliamidi/bis 29:1, Bio-Rad), 1,5 M Tris (Trisma® base, Sigma) – HCl (Hydrochloric acid, Merck) -puskuri pH 8,8, 10 % natriumdodekyylisulfaatti (Sigma) ja MilliQ-vesi sekoitettiin magneettisekoittajassa (VWR™ VS-C7) 10 minuuttia. Kaasut poistettiin vesi-imulla, koska happi inhiboi polymerisoitumista. Seosta jäähdytettiin +4 °C yksi tunti tasaisen polymerisoitumisen edistämiseksi. Ammoniumpersulfaatti (APS) (10 %, AppliChem) ja tetrametyylietyleenidiamiini (TEMED) (0,03 %, Bio-Rad) sekoitettiin nopeasti liuokseen, minkä jälkeen geelit valettiin 1 mm paksuisiksi fluoresoimattomien lasilevyjen väliin. Geelien pinnalle lisättiin isopropanolia (30 % v/v) ilmakuplien poistamiseksi. Geelit peitettiin parafilmillä kuivumisen estämiseksi ja jätettiin jähmettymään yön yli.

Esikokeen ja varsinaisen kasvatuskokeen tasapainotetut IEF-proteiniiliuskat asetettiin geeleille ja peitettiin low melt -agaroosilla (0,5 %) (Liite 2). Geelit siirrettiin Ettan DALTsix -kasettiin (Amersham Biosciences). Ettan-elektroforeesilaitteisto koottiin siten, että alakammio täytettiin 1x Tris/glysiini/SDS (TGS) -puskurilla (Bio-Rad) ja yläkammio 2x TGS-puskurilla. Laitteisto kytkettiin Consort EV261 -virtalähteeseen ja MultiTempIII-jäähdyttimeen (GE Healthcare). Sähkövirraksi säädettiin 25 mA/geeli ja tehoksi 1,5 W/geeli (GE Healthcare 2008). Geelejä ajettiin 17 tuntia.

3.4.7 Geelien kuvaus

Geelit kuvattiin skannerilla, jotta proteiinimääriä voitiin analysoida tietokoneohjelman avulla. Kuvaukseen käytettiin Typhoon TRIO Variable Mode Imager -skanneria (GE Healthcare), jossa oli Typhoon Scanner Control -ohjelmisto (GE Healthcare). Proteiineihin liitetyt fluoresoivat värit eksitoitiin skannerin kolmella laserilla, joilla oli eri aallonpituudet. Syntyville signaaleille käytettiin seuraavia emissiofilttereitä: 520 BP (Cy2), 580 BP (Cy3) ja 670 BP (Cy5). Laserien tehoa ei säädetty esikokeen geelien kuvauksessa riittävästi, jotta saman geelin eri värien emittoituvat signaalit olisivat poikenneet toisistaan enintään 15 %. Laserien teho säädettiin vasta varsinaisen kasvatuskokeen yhteydessä tehdyssä esikuvauksessa manuaalisesti kokeilemalla. Saman geelin eri värien emittoituvien signaalien täytyi olla saturoitumattomia ja ne saivat poiketa toisistaan enintään 15 %, jotta kuvat olivat keskenään vertailukelpoisia.

3.4.8 Geelien analysointi

Esikokeen ja varsinaisen kasvatuskokeen geelikuvat analysoitiin DeCyder™ 2D -ohjelmalla (versio 7.0, GE Healthcare), joka tunnistaa proteiinit ja esittää niiden määrät kolmiulotteisina piikkeinä. Vertailugeeliksi valittiin yksi tasalaatuinen ja proteiinitäplien määrältään keskivertoinen geeli. Kaikissa geelikuvissa esiintyviä proteiineja ja niiden määriä verrattiin vertailugeeliin, ja proteiinimäärästä etsittiin poikkeavuuksia. Proteiinimäärien mahdollisia eroavaisuuksia testattiin ohjelman suorittaman Studentin t-testin avulla varsinaisen kasvatuskokeen geeleissä.

3.4.9 Geelien hopeavärjäys ja kuivaus

Esikokeen ja varsinaisen kasvatuskokeen polyakryyliamidigeelit värjättiin kuvaamisen jälkeen Silver Stain Plus -hopeavärillä (Liite 3) (Bio-Rad 2011). Menetelmä perustuu aminohappoihin sitoutuvien hopeaionien pelkistymiseen metalliseksi hopeaksi, minkä seurauksena proteiinit voidaan havaita geeleiltä silmämääräisesti. Geelit värjättiin kannellisissa muovilaatikoissa sekoittelijassa (VWR™ VS-C7), 30 rpm. Ensin proteiinit kiinnitettiin geeleihin kiinnitysliuoksella 20 min, jonka jälkeen geelejä huuhdottiin MilliQ-vedellä 2 x 10 min. Sitten proteiinit värjättiin hopeaväriliuoksella 20 min ja reaktio pysäytettiin etikkahappoliuoksella (5 %, Sigma-Aldrich®). Kuivattamista varten värjättyjä geelejä käsiteltiin tunnin ajan liuoksessa, joka sisälsi etanolia (20 %, Alko) ja glyserolia (4 %, Merck). Geelit kuivattiin kuivatuskehikkoon kiristettyjen sellofaanikalvojen (GE Healthcare) välissä yön yli.

3.5 Transkriptien tutkiminen

Anabaena 90 -syanobakteerin WT- ja *apd*⁻-kannan transkripteja tutkittiin cDNA:n avulla. Esikokeen solunäytteitä käytettiin ainoastaan RNA-eristyksen optimoinnissa. Varsinaisen kasvatuskokeen tavoitteena oli selvittää anabaenopeptilidisyntetaasigeenien (*apd*) ilmentymistä molemmissa syanobakteerikannoissa. Solunäytteistä eristettiin RNA, joka käännettiin cDNA:ksi. cDNA:ta monistettiin PCR-reaktioissa, joissa käytettiin eri *apd*-geenejä varten suunniteltuja alukkeita. PCR-tuotteiden esiintymistä tutkittiin agarosigeelielektroforeesilla.

RNA:ta käsiteltäessä työtasot ja pipetit pestiin RNAaseja tuhoavalla RNase AWAY -liuoksella (Molecular BioProducts). Eri työvaiheissa käytettiin aseptisia välineitä ja reagensseja. Putket suljettiin pipetointien välillä ja pidettiin jäällä RNA:n hajoamisen minimoimiseksi. Työskenneltäessä käytettiin suojakäsineitä, jotka vaihdettiin riittävän usein kontaminaation estämiseksi.

3.5.1 RNA:n eristäminen

Esikokeen ja varsinaisen kasvatuskokeen yhteydessä kerätyistä ja $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa säilytetyistä syanobakteerinäytteistä eristettiin RNA RiboPure™ Bacteria -reagenssipakkauksen (Life Technologies) avulla valmistajan ohjetta mukailien (Life Technologies 2011). Esikokeen kaikkien aikapisteiden solut ja varsinaisen kasvatuskokeen ensimmäisen aikapisteen solut liuotettiin $350\text{ }\mu\text{l}$ RNA_{WIZ}-liuosta (Life Technologies). Varsinaisen kasvatuskokeen toisen ja kolmannen aikapisteen solut liuotettiin $1050\text{ }\mu\text{l}$ RNA_{WIZ}-liuosta. Ohjeesta poiketen solut hajotettiin Lysing Matrix -putkissa (MP Bio) FastPrep®-laitteessa 5 m/s 40 s . Supernatanttia käsiteltiin $0,2$ tilavuudella kloroformia (Molecular biology grade, low pH, Amresco) 10 min $+20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ja sentrifugoitiin $16\ 000\text{ g}$, 5 min , $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ RNA:n erottamiseksi DNA:sta ja muusta orgaanisesta materiaalista. Ohjeen mukaisesti RNA liuotettiin etanoliin, sidottiin silikakalvoon ja pestiin epäpuhtauksien poistamiseksi. Pesty RNA eluoiitiin kahdesti $50\text{ }\mu\text{l}$ eluutioliuosta.

3.5.2 Eristetyn RNA:n DNAasikäsittely

Esikokeen ja varsinaisen kasvatuskokeen RNA-näytteistä poistettiin DNA-jäämät RQ1-DNAasientsyymillä ($1\text{ U}/\mu\text{l}$, Promega), joka pilkkoo sekä kaksi- että yksijuosteista DNA:ta (Promega 2009). Esikokeen RNA käsiteltiin DNAasientsyymillä kahdesti ja varsinaisen kasvatuskokeen RNA kerran. Reaktioseokseen käytettiin $1\times$ RQ1-DNAasipuskuria ($10\times$, Promega), 5 U DNAasia ja näytteen RNA-pitoisuudesta riippuen $2\text{-}100\text{ }\mu\text{g}$ eristettyä RNA-näytettä. Seoksen kokonaistilavuus oli $100\text{ }\mu\text{l}$. Seosta lämmitettiin 30 min , $+37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ohjeesta poiketen seosta ei käsitelty lopetusliuoksella, koska RNA:n uutossa käytetty fenoli-kloroformi inaktivoi deoksiribonukleiinihappoja pilkkovan entsyymin lopetusliuoksen puolesta.

Entsyymikäsittelyn jälkeen esikokeen ja varsinaisen kasvatuskokeen RNA-näytteet uutettiin happamalla fenoli-kloroformiliuoksella ja saostettiin etanolilla. RNA:n uutamisessa käytettiin Phase lock gel -putkia (5Prime), jotka sentrifugoitiin ennen käyttöä $16\ 000\text{ g}$, 30 s . Entsyymi-RNA-seos lisättiin geeliputkeen ja sekoitettiin $100\text{ }\mu\text{l}$ fenoli-kloroformi-isoamyylialkoholia ($25:24:1$, Amresco). Näyte sentrifugoitiin $16\ 000$

g, 5 min, +4 °C. Putken sisältämä geeli asettui RNA:n ja fenoliliuoksen väliin, jolloin RNA:n sisältänyt nestefaasi saatiin pipetoitua steriiliin putkeen. RNA:n saostamiseksi seokseen lisättiin 0,1 tilavuutta natriumasettaattia (3 M, Sigma) ja 2,5 tilavuutta 95 % etanolia. RNA saostettiin vaihtoehtoisesti joko 24 h -20 °C tai 60 min -80 °C ja sentrifugoitiin 12 000 g, 30 min, +4 °C. RNA-pelletti pestiin 1000 µl 70 % etanolilla ja sentrifugoitiin 10 min ajan, kuten edellä. Pelletti kuivattiin vakuumissa ja liuotettiin 80 µl RNAasittomaan veteen.

3.5.3 DNA:n eristäminen

Anabaena 90 -syanobakteerin WT-kannan DNA:ta eristettiin -20 °C:ssa säilytetyistä soluista DNeasy Plant Mini Kit -reagenssipakkauksen (Qiagen) avulla valmistajan ohjetta mukailten (Qiagen 2012). Syanobakteerisoluja sulatettiin 50 ml, minkä jälkeen solut sentrifugoitiin 8 min, 7000 g. Supernatantti poistettiin, ja 1000 µl soluja käytettiin DNA:n eristykseen. Solut sekoitettiin 500 µl AP1-puskuria ja 6,5 µl RNAasi-liuosta. Solut rikottiin 0,5 mm lasihelmillä (Scientific Industries) FastPrep-laitteessa (MP Biomedicals) 5 m/s 40 s. Suspensiota lämmitettiin 30-60 min, +65 °C ja sentrifugoitiin 14 000 g, 2 min. Supernatantti siirrettiin uuteen putkeen ja DNA:n eristystä jatkettiin ohjeen mukaan pakkauksen mukana tulleilla reagensseilla (Qiagen 2012). WT-kannasta eristettyä DNA:ta käytettiin positiivisena kontrollina PCR-reaktioissa.

3.5.4 Nukleiinihappojen pitoisuuden ja puhtauden määrittäminen

Esikokeen ja varsinaisen kasvatuskokeen RNA-näytteiden pitoisuus ja puhtaus sekä *Anabaena* 90 -syanobakteerin WT-kannasta eristetyn DNA:n pitoisuus ja puhtaus määritettiin NanoDrop 1000 -spektrofotometrillä (Thermo Fisher Scientific) aallonpituuksilla 260 nm ja 280 nm. Puhtaus määritettiin $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ -suhteesta, joka puhtaalla RNA:lla on 2,0 ja puhtaalla DNA:lla 1,8 (Suominen ja Ollikka, 2003). RNA-mittauksessa taustanäytteenä käytettiin RNAasitonta vettä ja DNA-mittauksessa AE-puskuriliuosta (Qiagen). Mittaukseen käytettiin 1 µl joko RNA- tai DNA-näytettä.

3.5.5 RNA:n kääntäminen cDNA:ksi

Varsinaisen kasvatuskokeen DNAasi-käsitellyt RNA-näytteet käännettiin cDNA:ksi, jotta *apd*-geenien transkriptio voitiin testata PCR:llä. Kääntämiseen käytettiin SuperScript™ III Reverse Transcriptase -valmisreagenssipakkausta (Invitrogen) valmistajan ohjeen mukaisesti (Invitrogen 2004). Menetelmässä käytettiin alukkeita, jotka sitoutuivat satunnaisesti templaatteina toimiviin RNA-molekyyleihin (Invitrogen 2004). Satunnaisalukkeista valmistettiin 15,5 µM käyttöliuos. RNA-näytteitä käytettiin reaktioihin 500 ng. DNA-kontaminaation havaitsemiseksi jokaisesta näytteestä valmistettiin negatiivinen kontrolli, RT(-)-reaktio, johon ei lisätty käänteiskopioijaentsyymiä. Ohjeesta poiketen RNase Out -liuosta ei lisätty reaktioseokseen, vaan se korvattiin RNAasittomalla vedellä.

3.5.6 16S rRNA PCR

Varsinaisen kasvatuskokeen RNA-näytteiden kääntymistä cDNA:ksi ja näytteiden mahdollista DNA-kontaminaatiota tutkittiin 16S rRNA PCR:llä. Menetelmässä käytettiin syanobakteereille spesifisiä yleisalukkeita, koska 16S rRNA -geenejä esiintyy syanobakteereiden genomissa useita (Nübel ym. 1997). Käytetyt alukkeet olivat CYA359F 5'-GGG GAA TYT TCC GCA ATG GG-3', CYA781Ra 5'-GAC TAC TGG GGT ATC TAA TCC CAT T-3' ja CYA781Rb 5'-GAC TAC AGG GGT ATC TAA TCC CTT T-3'. Alukkeista valmistettiin 10 pmol/µl käyttöreagenssit. R-alukkeista valmistettiin seos, jossa a- ja b-alukkeiden pitoisuudet olivat 5 pmol/µl.

Reaktioseokseen käytettiin 2 µl Dynazyme-polymeraasientsyymille tarkoitettua 10 x puskuriliuosta (Thermo Scientific), 0,5 µl dinukleotidiseosta (0,25 mM, Thermo Scientific) ja 0,4 µl Dynazyme-polymeraasia (2 U/µl, Finnzymes). F-aluketta (Oligomer), R-alukeseosta (Oligomer) ja cDNA:ta pipetoitiin 1 µl. Reaktiutilavuus täytettiin 20 µl steriilillä vedellä. Positiivisena kontrollina käytettiin WT-kannasta eristettyä DNA:ta ja negatiivisena vettä.

Monistusreaktiot tehtiin C1000 Thermal Cycler PCR-laitteessa (Bio-Rad). Alkudenaturaatioissa lämpötila nostettiin +94 °C 5 min DNA-juosteiden irrottamiseksi

toisistaan, mutta muutoin denaturaatioaikana käytettiin 30 s. Alukkeiden kiinnittymiseksi lämpötila laskettiin +58 °C, 30 s ja pidennysvaiheessa lämpötila nostettiin polymeerasille optimaaliseen +72 °C, 30 s. Syklejä toistettiin 30 kertaa. Loppupidennys toteutettiin +72 °C 10 min.

3.5.7 Alukkeiden suunnittelu *apd*-syntetaasigeeneihin

Anabaena 90 -syanobakteerin *apdA*-, *apdB*-, *apdC*-, *apdD*-, *apdE*- ja *apdF*-geeneihin suunniteltiin F- ja R-alukkeet (Taulukko 6) Primer3-ohjelmalla (Rozen ja Skaletsky 1998). Alukkeiden sitoutumisvoimakkuutta ja spesifisyyttä *apd*-geenejä kohtaan testattiin NetPrimer-ohjelmalla (Premier Biosoft 2012). Mutanttikannassa *apdA*-alukeparin sitoutumiskohta sijaitti toiminnallisten *apd*-syntetaasien muodostumisen estävän insertion jälkeen.

Taulukko 6. Anabaenopeptilidigeeneille suunniteltujen alukkeiden emäsjärjestys, sijaintikohta ja monistustuotteen koko.

Geeni	Aluke	Emäsjärjestys	Sijainti geenissä	Monistustuotteen koko (bp)
<i>apdA</i>	F	5'-GTA GTA CCG CAA GTG GCA CA-3'	6295	148
	R	5'-AGG GAG CGA CGG TCT ATT TT-3'	6443	
<i>apdB</i>	F	5'-CGA TCG CCT CTC AAG GTA AG-3'	1653	148
	R	5'-GGC AGC CAC AGT CTG ATG TA-3'	1801	
<i>apdC</i>	F	5'-CAA GCC AAA ACA GGT TCG TT-3'	1043	149
	R	5'-TGA AGG CTA CTG GGT TTG GA-3'	894	
<i>apdD</i>	F	5'-TGA TCA ATG CGT CCC AAG TA-3'	2696	149
	R	5'-AGG TTT AGC ACG GGG CTA TC-3'	2547	
<i>apdE</i>	F	5'-TCA AAT TCC ATC TGC ACA GC-3'	356	151
	R	5'-GGT TTG GGA GCA ACT ACC AG-3'	205	
<i>apdF</i>	F	5'-TTG ACC AAG ATG CTC GAC AG-3'	642	155
	R	5'-CGC TCA CTG GCC TTA GAA AT-3'	487	

3.5.8 Anabaenopeptilidi-PCR

Sekä WT- ja *apd*⁻-kannan cDNA:ta monistettiin PCR:ssä kuudella alukeparilla, jotka oli suunniteltu sitoutumaan eri *apd*-geeneihin. Jokaista alukeparia varten tehtiin oma reaktioseos. Reaktiot tehtiin samalla tavalla kuin 16S rRNA PCR:ssä. Myös PCR-ohjelma oli sama kuin 16S rRNA PCR:ssä, paitsi syklien määrä nostettiin 35 kertaan.

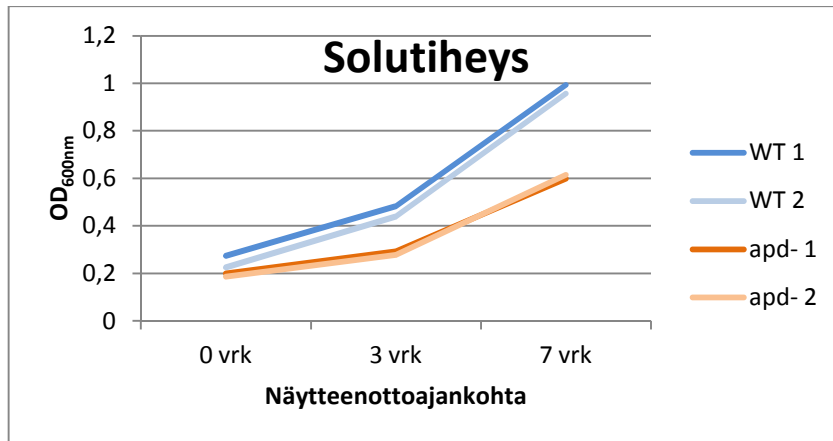
3.5.9 PCR-tuotteiden agarosigeelielektroforeesi

PCR-tuotteiden koko ja RNA-näytteiden mahdollinen DNA-kontaminaatio tarkistettiin agarosigeelielektroforeesilla. 1,5 % geeli valmistettiin 0,5 x Tris-etikkahappo-EDTA- eli TAE-puskuriin (Bio-Rad). 100 ml geeliin lisättiin yksi tippa etidiumbromidia (0,625 mg/ml, Amresco) nukleiinihappojen tarkastelemiseksi UV-valossa. Näytteisiin lisättiin latausväriä (DNA Loading dye 6x, Fermentas), ja DNA-kokostandardina käytettiin 5 µl GeneRuler™ 100 bp -valmistetta (0,1 µg/µl, Fermentas). Geelejä ajettiin sähkövirrassa, kunnes DNA-kokostandardin juosteet erottuivat toisistaan. Geelit kuvattiin UV-valossa Bio-Rad-kuvauslaitteella, jossa käytettiin Quantity One -ohjelmaa (Bio-Rad).

4 TULOKSET

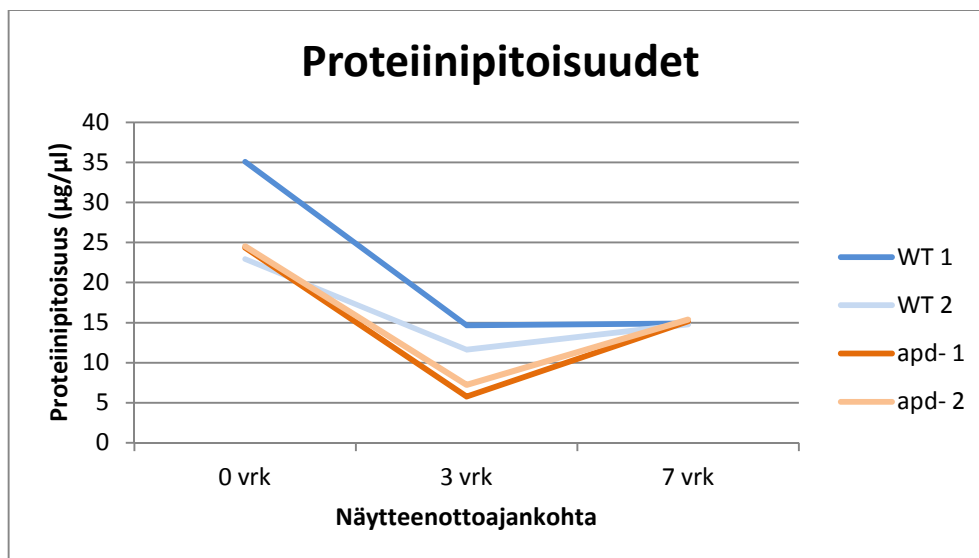
4.1 Esikoe

WT- ja *apd*⁻-kannan solutiheydet poikkesivat toisistaan, sillä WT-kanta jakautui nopeammin kuin *apd*⁻-kanta (Kuva 9). Seitsemännennen vuorokauden kohdalla WT-kannan solutiheys oli puolitoistakertainen mutanttikantaan verrattuna. Kokeen alussa vallinnut solutiheys (OD) 0,2 osoittautui sopivaksi kasvatuksen aloitustiheydeksi, koska solut alkoivat jakaantua siirrostuksen jälkeen. Alhaisen OD:n vaarana oli, että solut eivät olisi lähteneet kasvuun, vaan kannat olisivat kuolleet. Mikäli alkusiirrostuksen OD olisi ollut yli 0,2, kasvun yläraja olisi tullut nopeammin vastaan. Kokeen päättyessä solut olivat eksponentiaalisen kasvun vaiheessa.



Kuva 9. WT- ja apd⁻-kannan rinnakkaisnäytteiden (1 ja 2) solutiheys esikokeen aikana.

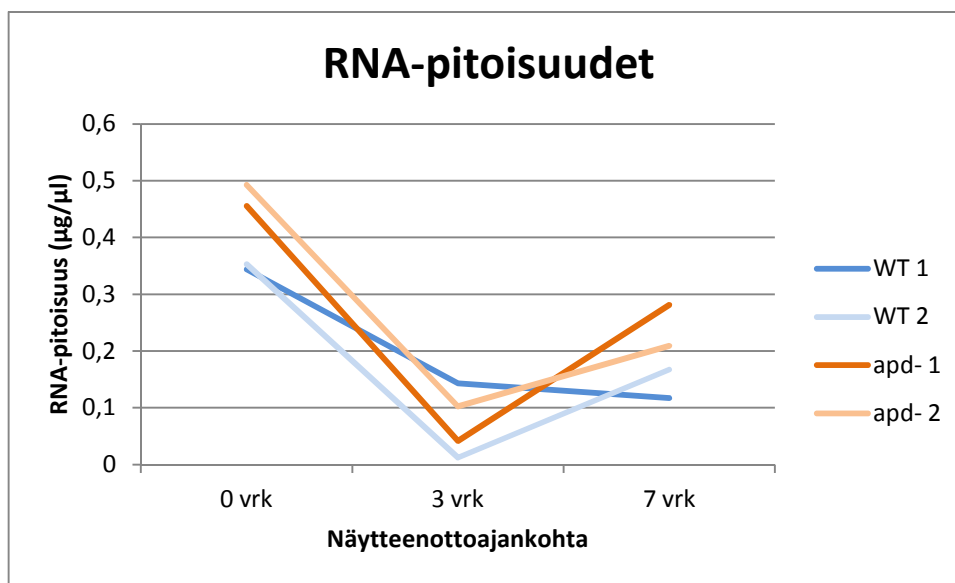
WT- ja apd⁻-kannasta eristettiin proteiineja kaikissa kolmessa aikapisteessä (Kuva 10), joten proteiininäytteiden tilavuudet todettiin riittäviksi varsinaista kasvatuskoetta varten. WT-kannan proteiinipitoisuudet olivat korkeampia kuin apd⁻-kannan, mikä saattoi johtua solutiheyseroista. Molempien kantojen proteiinipitoisuuksissa oli havaittavissa selvä lasku kolmannen vuorokauden kohdalla.



Kuva 10. WT- ja apd⁻-kannan rinnakkaisnäytteiden (1 ja 2) proteiinipitoisuudet esikokeen aikana. Proteiinipitoisuudet on normalisoitu OD₆₀₀-arvoilla.

WT- ja *apd*⁻-kannasta eristetyistä proteiineista enemmistö sijoittui pH-alueelle 3-7 isoelektrisessä fokusoinnissa. Emäksisten proteiinien määrä oli vähäinen, joten proteiinien isoelektriseen fokusointiin valittiin kapea-alainen IPG-liuska varsinaista kasvatiskoetta varten. Yksittäisten proteiinien määrien välillä olevia eroja ei voitu tutkia, koska rinnakkaisnäytteitä oli liian vähän ja geelien keskinäinen laatu oli epätasainen. Syynä tähän oli, että geelien kuvaukseen käytettyjen lasereiden tehoa ei säädetty riittävästi, jotta saman geelin eri värien emittoituvat signaalit olisivat poikenneet toisistaan enintään 15 %.

WT- ja *apd*⁻-kannasta eristettiin RNA:ta jokaisessa aikapisteessä, mutta pitoisuudet olivat alhaisia varsinkin kolmannen vuorokauden kohdalla (Kuva 11). Kokeen alussa vallinneesta alhaisesta solumäärästä huolimatta RNA-pitoisuudet olivat korkeimmillaan ensimmäisessä aikapisteessä. RNA:n riittävä saanto alussa vallinneeseen matalaan solutiheyteen nähden huomioitiinkin esikokeessa siten, että ensimmäisessä aikapisteessä kerättävien RNA-näytteiden tilavuus kaksinkertaistettiin. Varsinaista kasvatiskoetta varten solunäytteiden tilavuus viisinkertaistettiin RNA-saannon parantamiseksi.

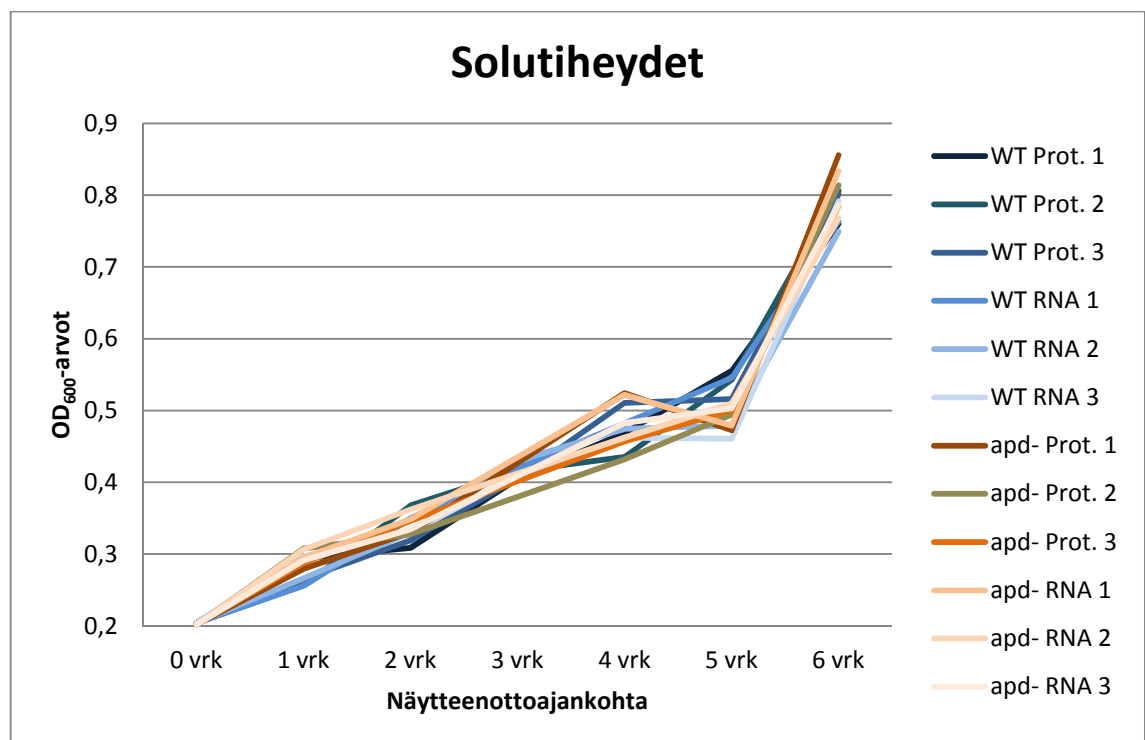


Kuva 11. WT- ja *apd*⁻-kannan rinnakkaisnäytteiden (1 ja 2) RNA-pitoisuudet esikokeen aikana. RNA-pitoisuudet on normalisoitu OD₆₀₀-arvoilla

Esikokeessa käytetyt menetelmät sopivat hyvin toteutettuun kasvatuskokeeseen, koska jokaisesta aikapisteestä saatiin eristettyä proteiineja ja RNA:ta. Esikokeen perusteella varsinaisen kasvatuskokeen näytteenottoajankohdiksi valikoituivat 0, 3 ja 6 vrk ja näytetilavuudeksi 130 ml. Kasvatuskoe päätettiin lopettaa kuudenteen vuorokautteen, koska käytetyn solususpension tilavuus kasvatuspulloissa rajoitti näytteiden keräämistä ja seurannan jatkamista. Kasvatuspulloissa käytetyn solususpension tilavuus oli muutoinkin rajallinen, koska tilavuuden kasvaessa pulloihin alkoi muodostua biofilmiä. Proteomeja haluttiin vertailla nimenomaan vapaana kasvaneista, jakaantumisvaiheen soluista, eikä biofilmimuodostelmista.

4.2 Varsinainen kasvatuskoe

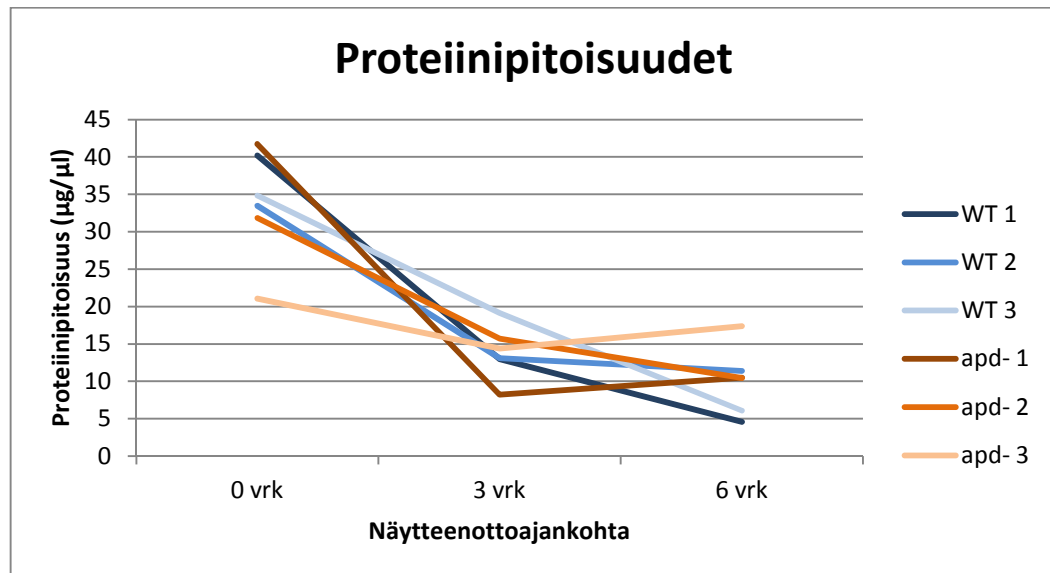
WT- ja apd^- -kannan solutiheydet lisääntyivät kasvatuskokeen edetessä (Kuva 12). Kokeen lopussa molempien kantojen solutiheydet olivat noin nelinkertaisia alkutilanteeseen verrattuna. Kolmannen vuorokauden mittauspiste jätettiin huomioimatta mittausvirheen vuoksi apd^- -kannassa. Kolmannen vuorokauden lukema saatiin toisen ja neljännen vuorokauden mittausten keskiarvoista.



Kuva 12. WT- ja apd^- -kannan rinnakkaisnäytteiden (1, 2 ja 3) solutiheyden kehittyminen varsinaisen kasvatuskokeen aikana proteiini (Prot.) - ja RNA-soluviljelypulloissa.

Syanobakteeriviljelmien puhtautta tutkittiin R2A-elatusainemaljoille tehtyjen puhtausviljelyiden perusteella. WT- ja apd^- -viljelmistä otetuissa puhtausviljelyissä ei havaittu bakteerikasvua, joten viljelmät olivat akseenisia. Kaikki kasvu oli siis WT- ja apd^- -kannoista peräisin olevista soluista, joten proteiini- ja RNA-näytteitä voitiin käyttää jatkotutkimuksiin.

WT- ja apd^- -kannan proteiinipitoisuudet erosivat toisistaan eri kasvuvaiheissa (Kuva 13). Myös rinnakkaisnäytteiden tulokset poikkesivat toisistaan (Taulukko 7). WT-kannan proteiinipitoisuuksissa oli havaittavissa hienoista laskua kasvatuskokeen edetessä, sillä pitoisuudet olivat alimmillaan kuudennen vuorokauden kohdalla. Sen sijaan apd^- -kannan proteiinipitoisuudet olivat alimmillaan kolmannen vuorokauden kohdalla.

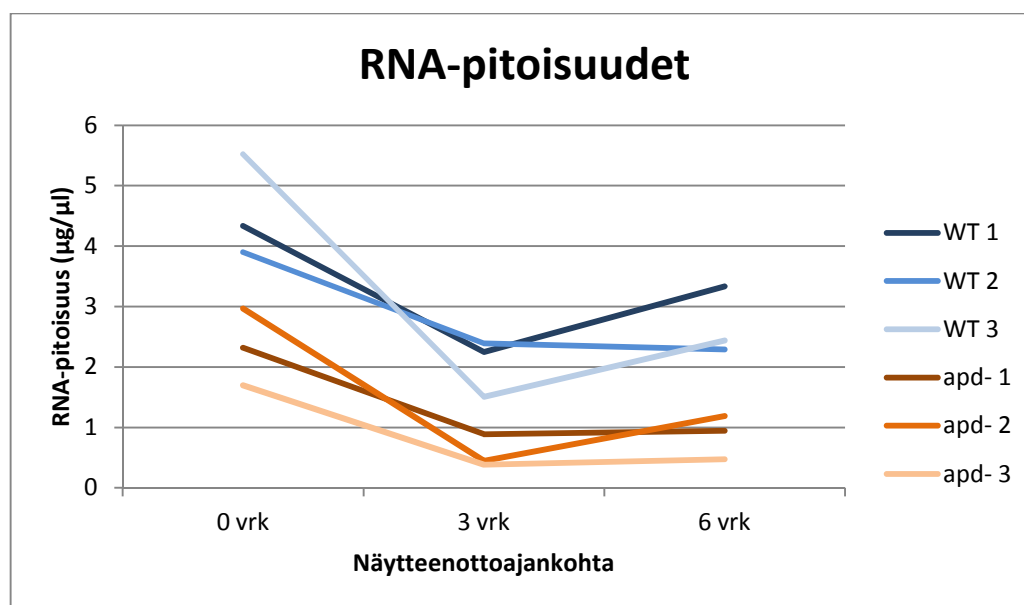


Kuva 13. WT- ja apd^- -kannan rinnakkaisnäytteiden (1, 2 ja 3) proteiinipitoisuudet OD_{600} -arvoilla normalisoituina.

Taulukko 7. WT- ja apd^- -kannan proteiinipitoisuuksien keskihajonnat aikapisteittäin. Kunkin aikapisteen kohdalla on huomioitu rinnakkaisnäytteet (1, 2 ja 3).

	0 vrk	3 vrk	6 vrk
WT	3,5	3,5	3,6
apd^-	10,3	4,0	4,0

WT- ja apd^- -kannan RNA-pitoisuudet poikkesivat toisistaan (Kuva 14). RNA-pitoisuudet olivat kuitenkin yhdenmukaisia rinnakkaisnäytteiden välillä, sillä RNA-näytteiden keskihajonnat olivat alhaisempia kuin proteiininäytteiden (Taulukko 8). WT-kannasta eristettiin RNA:ta keskimäärin 50 % enemmän kuin apd^- -kannasta. Molempien kantojen RNA-pitoisuuksissa oli havaittavissa selvä lasku kolmannen vuorokauden kohdalla.



Kuva 14. WT- ja apd^- -kannan RNA-pitoisuudet rinnakkaisnäytteissä (1, 2 ja 3) OD_{600} -arvoilla normalisoituina.

Taulukko 8. WT- ja apd^- -kannan RNA-pitoisuuksien keskihajonnat aikapisteittäin. Kunkin aikapisteen kohdalla on huomioitu rinnakkaisnäytteet (1, 2 ja 3).

	0 vrk	3 vrk	6 vrk
WT	0,8	0,5	0,6
apd^-	0,6	0,3	0,4

Eristettyjen RNA-näytteiden puhtausastetta kuvaava A_{260nm}/A_{280nm} -suhde oli näytteissä arvojen 1,9 - 2,2 välillä (Taulukko 9). Arvot 2,0 osoittivat näytteiden olevan puhtaita. Arvot alle 2,0 osoittivat, että näytteissä esiintyi proteiineja tai fenolijäämiä. Ne olivat peräisin RNA:n eristyksestä ja näytteiden DNAasikäsittelystä. Arvot yli 2,0 olivat puolestaan merkki siitä, että näytteissä esiintyi urasiilia tyymiinin sijaan, mikä on tyypillistä RNA:lle.

Taulukko 9. RNA-näytteiden puhtausarvot.

Näyte	$A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$								
	0 vrk			3 vrk			6 vrk		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
WT	2,0	2,1	1,9	2,0	2,0	2,1	2,2	2,1	2,2
apd-	1,9	1,9	1,9	2,2	2,1	2,1	2,1	2,1	1,9

4.3 Proteiinien kvantitatiivinen esiintyminen

Proteiineja kvantitoitiin DeCyder-ohjelman avulla. WT- ja apd⁻-kannan yksittäisten proteiinien välisiä ekspressiotason eroja verrattiin toisiinsa ohjelman suorittaman t-testin avulla. Yksittäisten proteiinien eroja eri aikapisteissä ei voitu vertailla rinnakkaisnäytteiden vähäisen määrän vuoksi, joten kantojen kaikkia aikapisteitä verrattiin toisiinsa yhdessä. Geelit nro 1-5 jouduttiin hylkäämään heikon laatunsa vuoksi, koska osa proteiineista oli ajautunut ulos geeleiltä. Proteiinien ekspressiotason eroja tutkittiinkin vain neljästä geelistä (geelit nro 6-9). Tämän seurauksena vain WT 6 vrk ja apd⁻ 3 vrk -näytteistä oli käytössä kahdet rinnakkaismääritykset. Muista näytteistä määrityksiä oli vain yhdet.

Vertailugeeliksi valittiin tasalaatuisin ja täplämäärältään keskivertoinen geeli, johon muista geeleistä tunnistettuja täpliä verrattiin (Taulukko 10). Keskimäärin geeleistä havaittiin 1430 täplää (n=4). Vertailugeelissä esiintyvistä täplistä 64 - 67 % löydettiin vastine muista geeleistä.

Taulukko 10. Geeleistä kokonaisuudessaan havaittujen ja vertailugeeliä (V) vastaavien täplien lukumäärät (lkm).

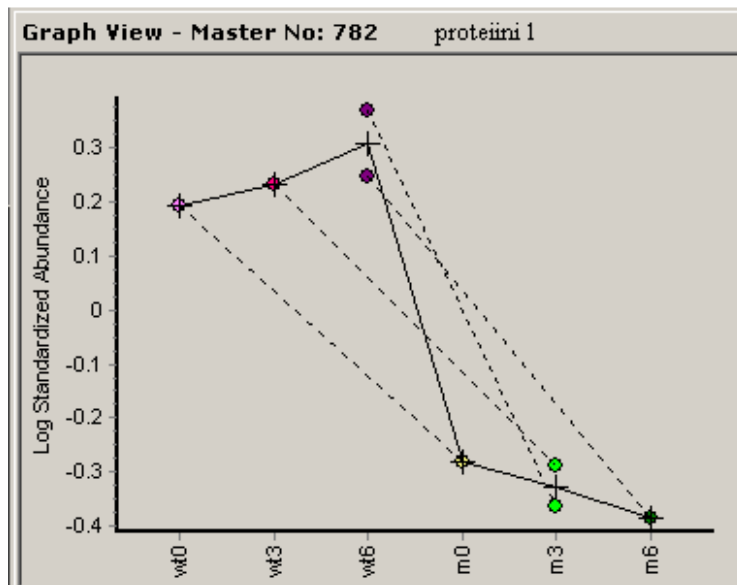
Geeli nro	Ohjelman tunnistamien täplien lkm	Vertailugeeliä vastaavien täplien lkm	Geelin sisältämät näytteet
6 (V)	1402	1402	WT 3, 6 vrk ja apd ⁻ 2, 3 vrk
7	1481	945	WT 3, 0 vrk ja apd ⁻ 2, 0 vrk
8	1402	917	WT 3, 3 vrk ja apd ⁻ 3, 3 vrk
9	1438	899	WT 1, 6 vrk ja apd ⁻ 3, 6 vrk

WT- ja apd^- -kannan proteomit poikkesivat toisistaan. Kaikkiaan 18 proteiinin ekspressiotasossa havaittiin tilastollisesti merkitsevä ero kantojen välillä, koska p -arvo oli < 0.05 (Taulukko 11). Näistä viiden proteiinin määrä oli tilastollisesti erittäin merkitsevä p -arvon ollessa $< 0,01$. Niiden proteiinien, joiden määrissä oli tilastollisesti merkitsevä ero WT- ja apd^- -kannan välillä, osuus vertailugeelin täplien kokonaismäärästä oli 1,2 %.

Taulukko 11. Proteiinit, joiden määrissä oli tilastollisesti merkitsevä ero WT- ja apd^- -kannan välillä.

Proteiini	Kanta, jossa ekspressiotaso suurempi	Ekspressiotason erotuskerroin	p-arvo
1	WT	3,91 x	0,000014
2	apd^-	1,43 x	0,00072
3	apd^-	1,66 x	0,0053
4	apd^-	1,26 x	0,0054
5	apd^-	1,39 x	0,0081
6	apd^-	2,24 x	0,011
7	apd^-	1,80 x	0,014
8	apd^-	1,50 x	0,014
9	apd^-	1,29 x	0,014
10	apd^-	1,25 x	0,019
11	WT	2,24 x	0,022
12	WT	5,58 x	0,026
13	WT	4,32 x	0,027
14	apd^-	1,46 x	0,030
15	apd^-	1,31 x	0,034
16	WT	1,39 x	0,034
17	apd^-	1,39 x	0,038
18	WT	1,33 x	0,047

Tilastollisesti merkitsevin ero oli proteiinin 1 määrässä, jota esiintyi WT-kannassa nelinkertainen määrä apd^- -kantaan verrattuna (Kuva 15). Yksittäisten proteiinien määrät olivat useammin koholla apd^- -kannassa, mutta niiden määrät olivat vain 1,5-kertaisia WT-kantaan verrattuna. Sen sijaan WT-kannassa korkeampina pitoisuuksina esiintyvien yksittäisten proteiinien määrät olivat kolminkertaisia apd^- -kantaan verrattuna.

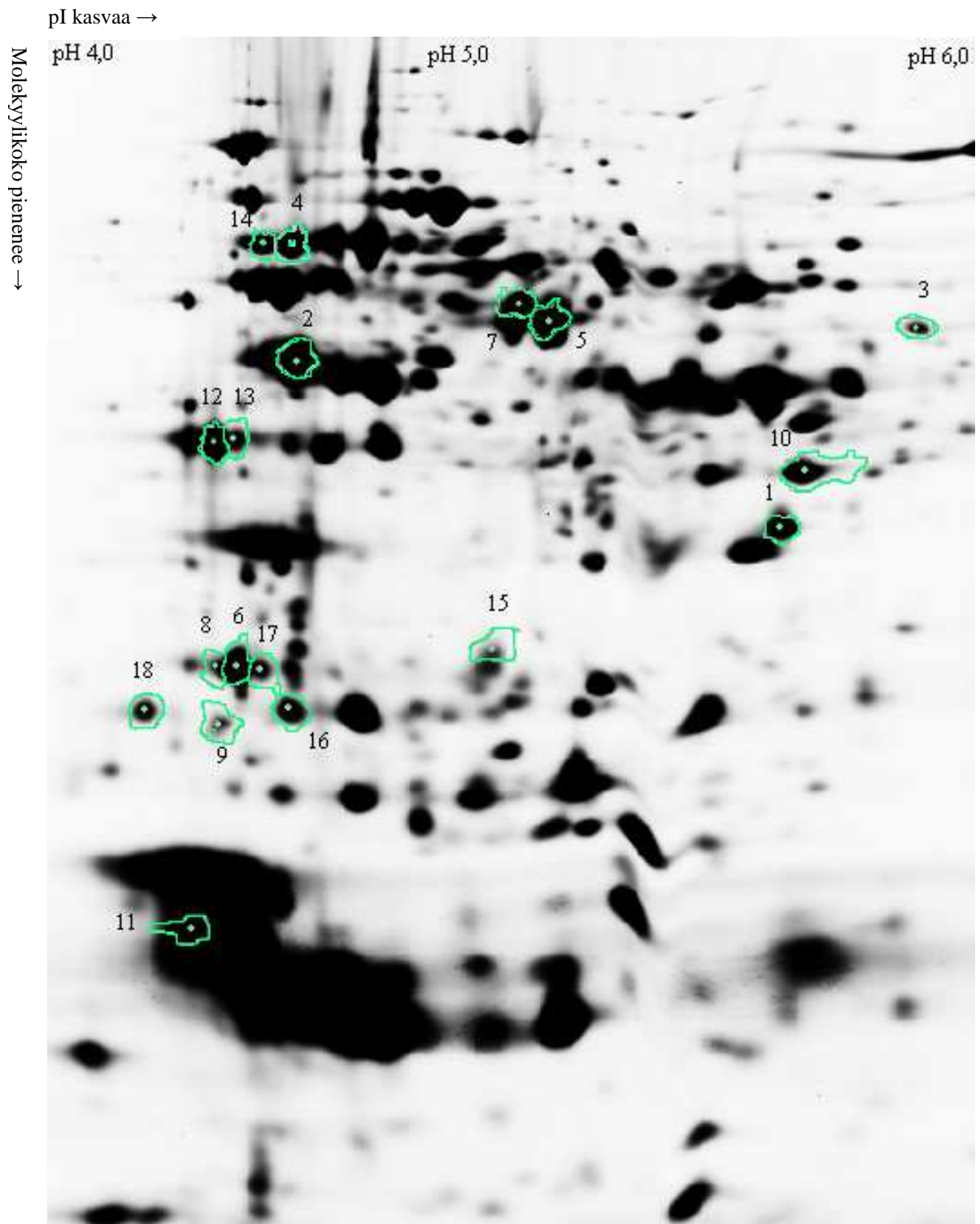


Kuva 15. Proteiinin 1 määrät WT- ja apd^- (m3) -kannassa aikapisteittäin (0, 3 ja 6).

Tutkitut geelit rajattiin pH-alueelle 4-6 (Kuva 16), koska proteiinit erottuivat 2D-DIGE:ssä vaivallisesti. Lisäksi geeleissä oli alueita, joissa täpliä ei pystytty erottamaan toisistaan. Todennäköisesti nämä alueet koostuivat useista eri proteiinitäplistä. Proteiinien erottumista olisi voitu parantaa IEF- ja elektroforesiajoja optimoimalla, esimerkiksi ajoaikaa pidentämällä. Myös emäksisen pH-alueen poissulkeminen vaikutti 2D-DIGE:ssä esiintyneisiin proteiineihin ja niiden välisiin eroihin. pH-alueen rajaaminen oli kuitenkin perusteltua, koska enemmistön tutkittavista proteiineista haluttiin erottuvan tarkasti.

Tilastollisesti merkitsevästi eroavissa proteiineissa, jotka sijaitsivat geeleillä rinnakkain, oli havaittavissa yhdenmukaisuutta. Mutanttikannassa WT-kantaa korkeampina pitoisuuksina esiintyvät proteiinit 4 ja 14 sekä 6, 8, ja 17 sijoittuivat geelillä vierekkäin. Vastaavasti WT-kannassa apd^- -kantaa korkeampina pitoisuuksina esiintyvät proteiinit

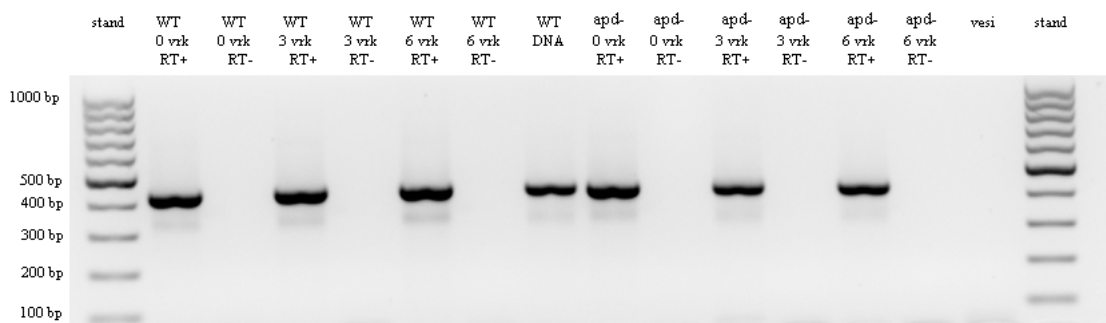
12 ja 13 olivat vierekkäin. Rinnakkain sijaitsevat proteiinit olivat todennäköisesti samojen proteiinien eri muotoja.



Kuva 16. Geelikuva sisäisestä standardista, joka sisälsi WT- ja *apd*⁻-kannasta eristetyt proteiinit. Ekspressiotasoltaan tilastollisesti merkitsevästi eroavat proteiinit on ympyröity ja numeroitu Taulukon 11 mukaisesti.

4.4 cDNA-näytteiden puhtaus

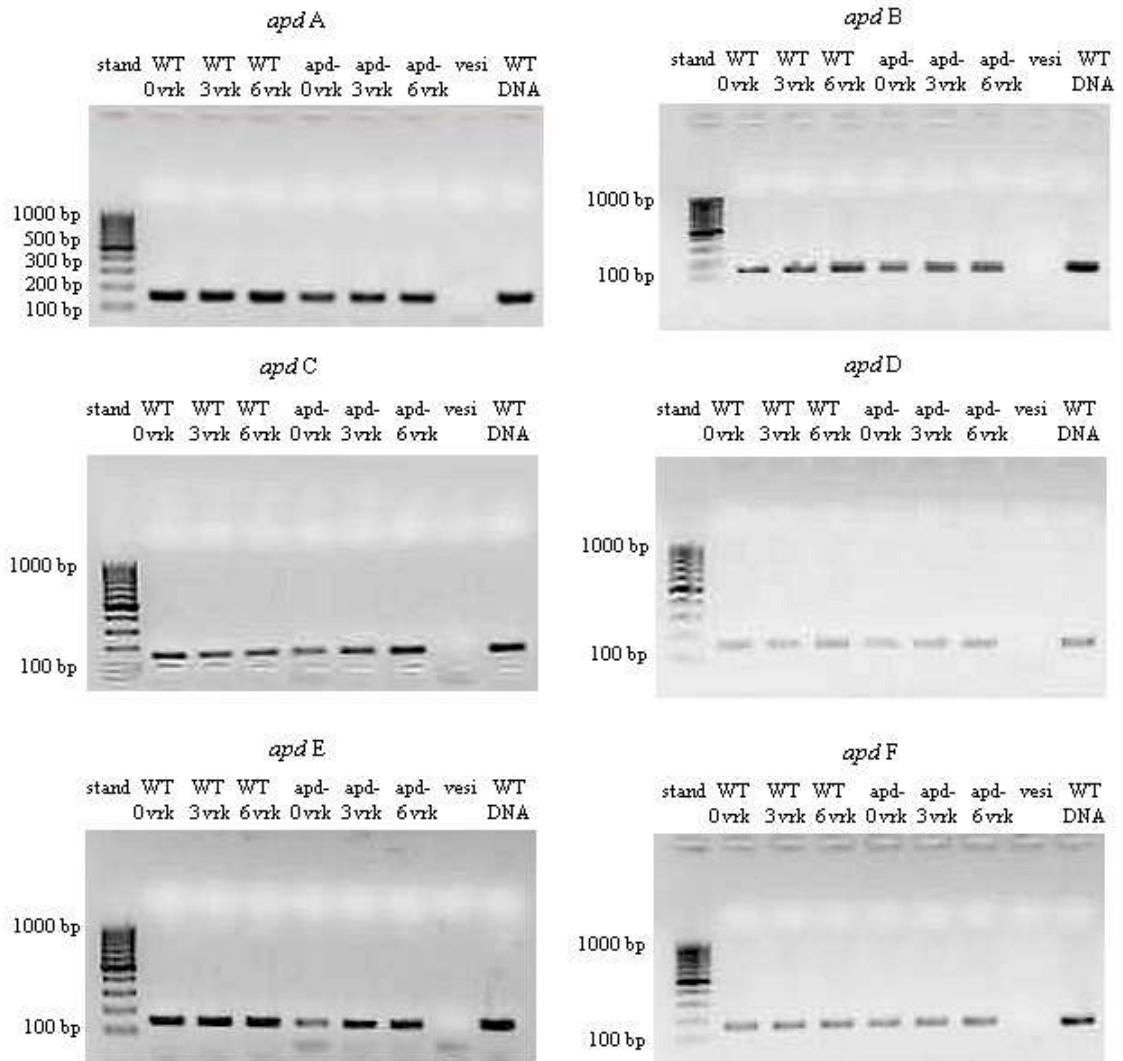
WT- ja *apd*⁻-kannan RNA-näytteiden DNA-kontaminaatiota tutkittiin 16S rRNA PCR:n avulla. Menetelmä osoitti RNA-näytteiden DNAasikäsittelyn toimivuuden. Kannoista eristetyssä RNA:ssa ei ollut DNA-kontaminaatiota, koska RT(-)-reaktioissa ei havaittu monistumista (Kuva 17). Kaikki monistustuotteet olivat peräisin cDNA:ksi käännetystä RNA:sta, koska RT+-reaktioissa havaittiin monistuminen.



Kuva 17. WT- ja *apd*⁻-kannan cDNA:n monistuminen RT+ ja RT(-)-näytteissä 16S rRNA PCR:ssä. Stand = kokostandardi GeneRuler™ 100 bp.

4.5 Anabaenopeptilidisyntetaasigeenien ilmentyminen

Anabaenopeptilidisyntetaasigeenien ilmentymistä tutkittiin monistamalla cDNA-näytteitä spesifisillä alukkeilla. WT- ja *apd*⁻-kannan kaikki *apd*-geenit ilmentyivät RNA-tasolla koko kokeen ajan, koska *apdA*-, B-, C-, D-, E- ja F-geenit monistuivat kaikissa kolmessa aikapisteessä (Kuva 18). Monistettujen juosteiden koko oli noin 150 emäsparia, mikä vastasi alukkeiden monistamaa aluetta cDNA:ssa.



Kuva 18. WT- ja *apd*⁻-kannan kaikki kuusi *apd*-geeniä ilmentyivät. Stand = kokostandardi GeneRuler™ 100 bp.

5 TULOSTEN TARKASTELU

Työn tarkoituksena oli selvittää *Anabaena* 90 -syanobakteerin WT- ja *apd*⁻-kannan proteomien välisiä eroja ja *apd*-syntetaasigeenien ilmentymistä. Työ jakautui esikokeeseen ja varsinaiseen kasvatuskokeeseen. Esikokeessa optimoitiin kasvatusolosuhteet ja käytetyt menetelmät varsinaista kasvatuskoetta varten. Kantojen proteomeissa tapahtuvia muutoksia ja *apd*-syntetaasigeenien ilmentymistä vertailtiin varsinaisen kasvatuskokeen aikana.

5.1 WT- ja apd⁻-kannan ominaisuudet esi- ja varsinaisessa kasvatuskokeessa

WT- ja apd⁻-kannan solutiheys kasvoi esikokeen aikana eri tahtiin. Ero korostui kasvatuskokeen edetessä, sillä seitsemännen vuorokauden kohdalla ero oli WT-kannan eduksi yli 1,5-kertainen mutanttiin verrattuna. Tulos poikkesi aiemmista havainnoista, sillä WT- ja apd⁻-kannan on todettu kasvavan yhtäläisesti (Repka ym. 2004). Toisaalta soluja ei altistettu tässä kasvatuskokeessa fosforin ja valon osalta vaihteleville olosuhteille, kuten Repkan ym. (2004) tutkimuksessa, mikä saattoi vaikuttaa biomassan määrään. Esikokeessa havaittu ero saattoi selittyä alkutilanteen epätasaisella solutiheydellä, koska WT-kannan solutiheys oli lähtötilanteessa hieman korkeampi kuin apd⁻-kannan.

Myös varsinaisessa kasvatuskokeessa WT- ja apd⁻-kannan solutiheydet poikkesivat toisistaan, sillä kokeen lopussa apd⁻-kannan solutiheys oli korkeampi kuin WT-kannan. Kolmannen vuorokauden kohdalla apd⁻-kannan solutiheydessä havaittiin muutoinkin poikkeava nousu, jonka seurauksena kolmannen vuorokauden mittauspiste jätettiin huomioimatta solutiheyskäyrässä. OD₆₀₀-mittaus ei välttämättä ollut riittävän tarkka menetelmä rihmamaisten syanobakteereiden solutiheyden seurantaan, koska solut asettuivat mittauskyyvetiin epätasaisesti. Näytteet sekoitettiin huolellisesti ennen solutiheyden mittaamista, mutta solut laskeutuivat nopeasti kyyvetin pohjalle. Solujen epätasainen jakautuminen vaikutti kyyvetin läpi kulkevan valoon ja näin ollen myös absorbanssilukemiin. Syanobakteerisolujen biomassa olisi voitu määrittää vaihtoehtoisesti klorofylli a:n avulla (Garcia-Gil ja Abella 1986) tai solujen kuivapainon mittaamisella (Repka ym. 2004). Eri mittausmenetelmien tuloksia vertaamalla biomassan vaihtelusta olisi saatu luotettavampi käsitys kuin pelkillä OD₆₀₀-mittaustuloksilla.

Esikokeessa WT- ja apd⁻-kannan proteiini- ja RNA-pitoisuudet laskivat kolmannen vuorokauden kohdalla. Samaan aikaan solujen jakaantumisessa oli havaittavissa viivevaihe, minkä takia transkriptio- ja translaatiotasot saattoivat laskea. Tulosten perusteella solujen eksponentiaalinen kasvu alkoi myöhemmin kuin oli odotettavissa, sillä *Anabaena* 90 -solujen eksponentiaalisen kasvun on todettu alkavan uudessa kasvuympäristössä vuorokauden kuluttua siirrostuksesta (Repka ym. 2004). Tässä työssä WT- ja apd⁻-kanta sopeutuivat uusiin kasvuolosuhteisiin hitaammin kuin

aiemmissä tutkimuksissa, millä saattoi olla vaikutusta solujen RNA-synteesiin ja proteiinien muodostumiseen.

Varsinaisessa kasvatuskokeessa proteiinipitoisuuksien odotettiin kasvavan kokeen loppua kohti, koska kantojen solutiheys lisääntyi. Kuudennen vuorokauden proteiinisaantoa odotettiin kokeen korkeimmaksi, koska eksponentiaalisessa kasvuvaiheessa olevat solut ovat muutoinkin herkempiä hajottamiskäsittelyille kuin stationäärivaiheen solut (Ryssel ym. 2013). Paikoin kuudennen vuorokauden proteiinisaanto oli kokeen alhaisin, mikä saattoi selittyä solujen hajoamattomuudella eristysvaiheessa. Proteiinien eristykseen olisi voitu käyttää puolta pienempiä näytetilavuuksia toteutuneen sijaan, koska käytetyt reagenssimäärät eivät välttämättä olleet riittäviä korkean solutiheyden näytteille menetelmän optimoinnista huolimatta. Toisaalta WT- ja apd^- -kannan peptidipitoisuuksien on todettu olevan kasvatuskokeissa korkeimmillaan 13:nnesta vuorokaudesta eteenpäin (Repka ym. 2004). Nämä muutokset eivät välttämättä tulleet esille lyhyessä kasvatuskokeessa.

Varsinaisessa kasvatuskokeessa apd^- -kannan korkea solumäärä selitti sen, että soluista eristetyt proteiinipitoisuudet olivat korkeammat kuin WT-solujen. Alhaiset RNA-pitoisuudet apd^- -kannassa olivat kuitenkin ristiriidassa proteiinipitoisuuksien kanssa. Näytteiden kerääminen eri kasvatuspulloista vaikutti todennäköisesti proteiini- ja RNA-pitoisuuksissa havaittuihin eroihin kantojen välillä. Proteiineja ja RNA:ta saatiin kuitenkin eristettyä kaikissa aikapisteissä, joten käytetyt menetelmät soveltuivat toteutettuihin kasvatuskokeisiin.

5.2 Proteomien erot

WT- ja apd^- -kannan proteomien välisiä eroja tutkittiin kahtena ryhmänä aikapistevertailun sijaan, koska rinnakkaisnäytteiden tulokset olivat vaillinaisia. Lopulliseen tarkasteluun ja tilastolliseen analyysiin valittiin neljä geeliä alkuperäisen yhdeksän geelin sijaan. Mikäli proteomien vertailu olisi voitu tehdä alkuperäissuunnitelman mukaisten näytteiden välillä, molemmista kannoista olisi ollut kolme biologista replikaattia jokaisessa aikapisteessä. Yksittäisten proteiinien erot olisivat olleet tällöin luotettavampia kuin parhaimmillaan kahden rinnakkaisnäytteen

perusteella tehty tilastollinen analyysi. Eri aikapisteiden niputtaminen yhteen saattoi tosin vääristää tuloksia, mikäli jotakin proteiinia esiintyi tietyssä aikapisteessä enemmän kuin muissa.

Oletuksena oli, että WT- ja apd^- -kannan proteomit poikkeaisivat toisistaan, koska apd^- -kanta ei tuota anabaenopeptilidejä (Rouhiainen ym. 2000). 18 proteiinin määrässä olikin tilastollisesti merkitsevä ero kantojen välillä. Yksittäisten proteiinien määrät olivat useimmin koholla apd^- -kannassa, mikä voi selittyä kannan tuottamalla, anabaenopeptilidejä korvaavilla yhdisteillä. Mutanttikannan on todettu täydentävän anabaenopeptilidien puutetta anabaenopeptiinien muodostumisella (Repka ym. 2004). Syynä on mahdollisesti se, että edellä mainittujen peptidien biologinen vaikutus on samankaltainen (Namikoshi ja Rinehart, 1996). Anabaenopeptilidien muodostamisen tuomaa hyötyä on kuitenkin vaikea arvioida, koska yhdisteiden merkitys syanobakteereille on epäselvä. Se hankaloittaa osaltaan myös apd^- -kannan anabaenopeptilidien puutetta vastaan muodostuneiden vasteiden selvittämistä.

Proteomien erot eivät kuitenkaan selittyneet suoraan anabaenopeptilidien ja anabaenopeptiinien eriävillä määrillä, koska 2D-DIGE suosii yli 10 kDa kokoisten proteiinien ilmaantumista (Barrios-Llerena ym. 2007). Anabaenopeptilidit ja anabaenopeptiinit ovat kooltaan alle 1 kD (Fujii ym. 2002), joten molekyylit eivät erottuneet 2D-DIGE:ssä. Geeleistä havaittujen täplien kokonaismäärä jäi muutoinkin pienemmäksi kuin proteiineja oli teoreettisesti odotettavissa. WT-kannan genomista on löydetty 4738 lukukehystä (Wang ym. 2012), jonka perusteella kannan tuottama proteiinimäärä tässä työssä olisi voinut olla yli kolminkertainen havaittuihin täpliin verrattuna. Kaikkia täpliä ei kuitenkaan tarkastettu manuaalisesti, jolla olisi varmistettu, että kyseessä oli todellinen proteiini roskan sijaan. Ainoastaan ne proteiinitäplät tarkistettiin, joiden määrässä oli tilastollisesti merkitsevä ero. Kaikki havaitut täplät eivät siis välttämättä olleet proteiineja, joten oletettujen proteiinien kokonaismäärä jäi todennäköisesti alhaisemmaksi kuin havaittujen täplien määrä. Toisaalta myös proteiinien vaillinainen erottuminen saattoi vääristää havaittujen täplien kokonaismäärää. Geeleillä havaitut laaja-alaiset täplät sisälsivät useita eri proteiineja, jotka eivät erottuneet selkeästi toisistaan. DeCyder-ohjelma saattoi tulkita tällaisten täplien sisältävän yksittäisiä proteiineja vähemmän kuin todellisuudessa oli. Proteiinien horisontaalista erottumista olisi mahdollisesti parantanut pidempi IEF-ajo.

Geelielektroforeesiajaja pidentämällä olisi puolestaan saatu erilleen eri molekyylimassaiset proteiinit.

Proteomien välisiä eroja vertailtaessa oli syytä huomioida, että osa täplien sisältämistä proteiineista saattoi olla keskenään samoja. Samaa proteiinia on havaittu esiintyvän eri täplissä, koska proteiineja muunnellaan translaation jälkeen (Huang ym 2002). Muokkauksen seurauksena proteiinien pI muuttuu, mutta molekyylipaino säilyy ennallaan. Tämän takia saman proteiinin eri muodot asettuvat geelille rinnakkain. Geeleissä rinnakkain esiintyvien täplien kohdalla oli toki huomioitava, että osa proteiinien pI:n muutoksista saattoi johtua myös eristyksen ja 2D-DIGE:n aikana tapahtuneesta proteiinien hajoamisesta ja kemiallisista muutoksista, eikä yksistään translaation jälkeisistä muokkauksista.

Käytetyt olosuhteet vaikuttivat muutoinkin proteiinien erottumiseen. Emäksisen pH-alueen poissulkeminen suosi esimerkiksi sytoplasman proteiineja, koska niiden pI:n on todettu olevan alhaisempi kuin solukalvon proteiinien (Schwartz ym. 2001). Kaiken kaikkiaan vain pieni osa WT- ja apd^- -kannan todennäköisistä proteiineista saatiin eroteltua, sillä solukalvon proteiineja ei eristetty lainkaan tässä työssä. Nestekromatografiin liitetty massaspektrometrinen analyysi olisi soveltunut laajamittaiseen proteiinien tunnistamiseen, sillä menetelmä erottelee pienikokoiset peptidit ja solukalvoproteiinit paremmin kuin 2D-DIGE (Barrios-Llerena ym. 2007). Siitä huolimatta 2D-DIGE:n käyttö oli perusteltua, koska menetelmän avulla proteomien eroja oli helppo visualisoida.

Tilastollisesti merkitsevien proteiinien tunnistaminen olisi ollut mielenkiintoista, koska se olisi selvittänyt mahdollisia eroja kantojen aineenvaihdunnassa. Hopeavärjättyjä geelejä ei kuitenkaan voitu hyödyntää proteiinien eristämiseen, koska proteiinitäplät värjäytyivät geeleissä vaillinaisesti. Tulos on ristiriitainen kirjallisuuden kanssa, koska syanobakteereista peräisin olevia proteiineja sisältäviä geelejä on värjätty onnistuneesti hopeavärillä (Suzuki ym. 2006). Värjäysaika tässä työssä saattoi olla liian lyhyt, vaikka geelit värjättiin valmistajan suositusten mukaisesti (Bio-Rad 2011). Proteiinit eivät kuitenkaan olleet identtisiä, joten pidempi värjäysaika olisi voinut parantaa lopputulosta. Toinen mahdollinen syy heikkoon värjäytyvyyteen saattoi olla kiinnitysvaiheesta peräisin olevat etikkahappojäämät, jotka estävät proteiinien

värjäytymistä (Bio-Rad 2011). Kiinnostavien proteiinien visualisoiminen ja poimiminen geeleiltä tunnistusta varten oli mahdotonta, joten syy proteomien välisiin eroihin jäi avoimeksi. Määriltään eriävät proteiinit liittyivät todennäköisesti tunnistamattomiin aineenvaihduntareaktioihin.

Tulosten vertailua muihin tutkimuksiin rajoitti se, että *Anabaena* 90 -kannan proteomeja ei ole kartoitettu aiemmin. Sen sijaan *Anabaena variabilis* -kannan proteomianalysistä saadut tulokset ovat osoittaneet, että yhdeltä DIGE-geeliltä on ollut tulkittavissa noin 470 proteiinitäplää (Barrios-Llerena ym. 2007). Tässä työssä yksi geeli sisälsi aina kahdesta kannasta peräisin olevat proteiinit sekä sisäisen standardin, joten havaittujen täplien kokonaismäärä saattoi olla sen takia korkea. Silti on huomioitava, että kaikki havaitut täplät eivät välttämättä olleet proteiiniperäisiä. Vastaavanlaista proteomien vertailua villityyppi- ja mutanttisyanoobakterikantojen välillä on tehty lähinnä *Synechococcus*-sukuun kuuluvilla syanoobakteereilla, joiden solunjakaantumiseen liittyviä vasteita on vertailtu keskenään (Koksharova ym. 2007). Koksharovon ym. (2007) tutkimuksessa käytettiin *Synechococcus*-suvun villityyppikantaa ja siitä valmistettuja, jakaantumaan kykenemättömiä mutantteja. Tutkimuksessa todettiin, että 44 proteiinin määrässä oli tilastollisesti merkitsevä ero villityypin ja mutanttien välillä. Tässä työssä käytetty kapea-alainen IPG-liuska saattoi selittää sen, että tilastollisesti merkitsevästi eroavien proteiinien määrä oli alhainen WT- ja *apd*⁻-kannan välillä.

5.3 Anabaenopeptiliditranskriptien esiintyminen

RNA-näytteiden DNA-kontaminaatiota tutkittiin 16S rRNA PCR:n avulla. Alukkeiksi valittiin syanoobakteriyleisalukkeet, koska 16S rRNA-geenejä esiintyy syanoobakteereiden genomissa useita (Nübel ym. 1997). RNA:n puhtauden tarkistaminen olisi onnistunut myös *apd*-alukkeiden avulla, mutta *apd*-syntetaasigeenejä esiintyy WT- ja *apd*⁻-kantojen genomissa vain kerran. Mikäli juosteet olisivat olleet heikkoja agarosigeelillä, RNA-näytteiden DNA-kontaminaatio olisi voinut jäädä havaitsematta. Jos kannat eivät olisi ilmentäneet *apd*-syntetaasigeenejä, myös DNA-kontaminaatio olisi jäänyt havaitsematta. 16S rRNA:n monistaminen oli muutoinkin perusteltua, koska rRNA:ta koodaavat geenit ovat vakaampia kuin proteiineja koodaavat geenit (Nübel ym. 1997).

RT(-) -näytteissä ei havaittu monistumista, joten DNA-kontaminaatiota ei esiintynyt. Tuloksen perusteella voitiin todeta, että RNA-näytteiden DNAasikäsittely oli riittävä. Mikäli näytteet olisivat sisältäneet DNA-jäämiä, *apd*-PCR:stä saadut positiiviset tulokset olisivat kuvastaneet mahdollisten *apd*-syntetaasigeenien ilmentymisen lisäksi myös DNA-kontaminaatiota. Sen sijaan RT+ -näytteissä oli monistumista, jonka perusteella RNA:n eristäminen ja kääntäminen cDNA:ksi käänteiskopioijaentsyymien avulla onnistuivat. Tuloksen perusteella cDNA-näytteitä voitiin käyttää *apd*-syntetaasigeenien ilmentymisen tutkimiseen.

WT- ja *apd*⁻-kannan kykyä muodostaa anabaenopeptilidejä on tutkittu aiemmin (Rouhiainen ym. 2000), mutta *apd*-syntetaasigeenien ilmentymisestä ei ole tutkimustietoa. Tämän työn perusteella WT- ja *apd*⁻-kannan kaikki kuusi *apd*-syntetaasigeeniä ilmentyivät. Juosteiden koko agarosigeelielektroforeesissa vastasi alukkeiden monistamaa aluetta cDNA:sta. Juosteiden vahvuuden perusteella ei kuitenkaan voitu arvioida yksittäisten transkriptien määrää, koska polyakryyliamidigeeli ei ollut riittävän tarkka transkriptien kvantitatiiviseen analysointiin. Kantojen välisiä eroja transkriptien tuottomäärissä olisi voitu tutkia kvantitatiivisen PCR:n avulla. Menetelmällä olisi saatu selville *apdA*-geenin sisältämän insertin vaikutus *apd*⁻-kannan tuottamien transkriptien määrään, mikä olisi paljastanut mahdollisia eroja WT- ja *apd*⁻-kannan transkriptien tuotossa.

Insertin ajateltiin estävän ainakin *apdA*-geenin toimintaa, joten *apd*-syntetaasigeenien ilmentyminen *apd*⁻-kannassa oli yllättävää. Kloramfenikoli-O-asetyyli transferaasigeeni ei kuitenkaan ollut este *apd*-transkriptien muodostumiselle. Kantojen *apdA*-geeniin sitoutuva aluke suunniteltiin siten, että se kiinnittyi *apdA*-geenin loppuosaan, *apd*⁻-kannassa insertin jälkeen. Tällä varmistettiin se, että *apdA*-geenin ilmentyminen havaittiin kokonaisuudessaan. *apdA*-geeni olisi voinut muodostaa mRNA:ta inserttiin saakka, jonka jälkeen geenin ilmentyminen olisi pysähtynyt mutaation takia. Mikäli aluke olisi suunniteltu *apdA*-geenin alkuun, vaillinainen ilmentyminen olisi jäänyt paljastumatta. Tosin on mahdollista, että insertti vaikutti tuotettujen transkriptien määrään. Siitä huolimatta *apd*⁻-kanta ei voi koostaa transkripteista toimivia anabaenopeptilidisyntetaaseja, jolloin anabaenopeptilidien muodostuminen estyy. Tätä tukee havainto, että *apd*⁻-kannan ei ole havaittu muodostavan anabaenopeptilidejä 90A ja 90B, toisin kuin WT-kannan (Rouhiainen ym. 2000).

6 JOHTOPÄÄTÖKSET

Tässä työssä vertailtiin *Anabaena* 90 -syanobakteerin WT ja apd^- -kannan proteomien välisiä eroja ja anabaenopeptilidisyntetaasigeenien ilmentymistä. Kantojen proteomit poikkesivat toisistaan, mikä viittaa eroihin kantojen aineenvaihdunnassa. Anabaenopeptilidisyntetaasigeenit ilmentyivät molemmissa kannoissa, joten *apdA*-geenissä sijaitseva insertti ei vaikuttanut apd^- -kannan kykyyn tuottaa *apd*-transkripteja. Toimivien *apd*-syntetaasien puute apd^- -kannassa saa kuitenkin aikaan vasteita, jotka poikkeavat WT-kannasta. Tämä selittää kantojen proteomeissa havaittuja eroja.

Tekniset hankaluudet estivät proteomien vertailun eri aikapisteiden välillä, joten eroja tarkasteltiin yleisesti WT ja apd^- -kannan välillä. Kokeen toistaminen useammilla rinnakkaisnäytteillä olisi paikallaan, jotta tulosten paikkansapitävyydestä saataisiin lisävarmuutta. Rinnakkaisnäytteet mahdollistaisivat myös kantojen sisäisen ja -välisen aikapistevertailun, mikä antaisi jatkossa arvokasta tietoa yksittäisten proteiinien vaihtelusta eri aikapisteissä. Kasvatuskoetta olisi ollut myös mahdollista täydentää bioaktiivisten yhdisteiden analysoinnilla, mikä olisi selventänyt eroja esimerkiksi kantojen tuottamissa anabaenopeptiinien ja anabaenopeptilidien määrissä. Työssä päädyttiin kuitenkin keskittymään kantojen proteomien ja *apd*-transkriptien ilmentymisen tutkimiseen ja menetelmien omaksumiseen.

Proteomiikassa käytettävien menetelmien hallitseminen on avainasemassa, koska eri työvaiheita on useita ja monet niistä vaativat käsityötä. Työvaiheissa esiintyviä epäkohtia on mahdollista havaita kokemuksen myötä ja pohtia niihin vaihtoehtoisia ratkaisuja. Menetelmien optimointi valittuja olosuhteita vastaaviksi on myös tärkeää, jotta menetelmät sopivat käyttötarkoitukseensa. Toisaalta olisi ollut mielekäästä perehtyä muiden työtapoihin ja toteuttaa menetelmiä eri valmistajien ohjeistuksella. Nyt työvaiheet suoritettiin GE Healthcaren ja Amersham Biosciencesin ohjeistuksia mukaillen, koska käytössä olleet laitteet ja reagenssit olivat heidän valmistamiaan.

Tulokset antoivat kuitenkin viitteitä siitä, että WT- ja apd^- -kannan proteomien vertailu oli perusteltua. Jatkoa ajatellen tilastollisesti merkitsevien proteiinien tunnistaminen ja *apd*-transkriptien määrän analysointi olisi oleellista. Ne paljastaisivat syitä WT- ja apd^- -kannan proteomien eroavaisuuksiin ja antaisivat lisätietoa *Anabaena* 90 -syanobakteerin

aineenvaihdunnasta. Tiedon avulla olisi mahdollista oppia ymmärtämään niitä mekanismeja, joilla *Anabaena* 90 -syanobakteerikanta säätelee bioaktiivisten yhdisteiden tuottoa. Tämä lisäisi mahdollisesti myös tietämystä molekyylien merkityksestä tuottajalleen.

KIITOKSET

Haluan kiittää professori Kaarina Sivosta mahdollisuudesta työskennellä innostavassa syanobakteeritutkimusryhmässä. Työn ohjaamisesta kiitän Julia Österholmia, joka kärsivällisesti jakoi perehdyttää proteomiikassa käytettyjen menetelmien pariin ja neuvoa työn kirjallisessa toteuttamisessa. Hanna Siparia kiitän RNA:n käsittelyyn ja eristämiseen liittyvien oppien jakamisesta. Työn lukemisesta ja kommentoinnista haluan kiittää Anne Ylistä. Lopuksi kiitän kotiväkeä ja ystäviä kannustuksesta työn eri vaiheissa.

LÄHTEET

- Amersham Biosciences. 2002a. 2-D Quant Kit. Instructions. 2-D electrophoresis. Amersham Biosciences Corp. San Francisco, USA. 4 s.
- Amersham Biosciences. 2002b. Typhoon User's Guide v3.0 for Microsoft Windows. Amersham Biosciences Corp. Sunnyvale, USA. 260 s.
- Amersham Biosciences. 2003. CyDye DIGE fluors and labeling kits. 2-D DIGE data file. Amersham Biosciences Corp. New Jersey, USA. 4 s.
- Amersham Biosciences. 2004. Immobiline DryStrip gels. 2-D electrophoresis data file. Amersham Biosciences Corp. 10 s.
- Barrios-Llerena M, Reardon K ja Wright P. 2007. 2-DE proteomic analysis of the model cyanobacterium *Anabaena variabilis*. Electrophoresis. 28: 1624-1632.
- Bernstein J, Khodursky A, Lin P-H, Lin-Chao S ja Cohen S. 2002. Global analysis of mRNA decay and abundance in *Escherichia coli* at single-gene resolution using two-color fluorescent DNA microarrays. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 15: 9697-9702.
- Bio-Rad. 2011. Silver Stain Plus. Bio-Rad Laboratories, Inc. Life Science Group. München, Saksa. 7 s.
- Bultel-Poncé V, Felix-Theodose F, Sarthou C, Ponge J-F ja Bodo B. 2004. New pigments from the terrestrial cyanobacterium *Scytonema* sp. collected on the Mitaraka Inselberg, French Guyana. Journal of Natural Products. 67: 678-681.
- Cloonan N, Forrest A, Kolle G, Gardiner B, Faulkner G, Brown M, Taylor D, Steptoe A, Wani S, Bethel G, Robertson A, Perkins A, Bruce S, Lee C, Ranade S, Peckham H, Manning J, McKernan K ja Grimmond S. 2008. Stem cell transcriptome profiling via massive-scale RNA sequencing. Nature Methods. 7: 613-619.
- Finking R, Mofid M ja Marahiel M. 2004. Mutational analysis of peptidyl carrier protein and acyl carrier protein synthase unveils residues involved in protein-protein recognition. Biochemistry. 43: 8946-8956.
- Fujii K, Sivonen K, Nakano T ja Harada K. 2002. Structural elucidation of cyanobacterial peptides encoded by peptide synthetase gene in *Anabaena* species. Tetrahedron. 58: 6863-6871.
- Garcia-Gil J ja Abella C. 1986. Growth parameters in green phototrophic bacteria pure cultures: a study on *in vivo* absorption values. Scientia. 12: 59-66.

- GE Healthcare. 2008. Ettan™ DIGE Basic Course. From sample labeling to scanning. GE Healthcare Europe. München, Saksa. 24 s.
- GE Healthcare. 2010. 2-D electrophoresis. Principles and methods. Uppsala, Ruotsi. 160 s.
- Gottlieb M ja Chavko M. 1987. Silver staining of native and denatured eukaryotic DNA in agarose gels. *Analytical Biochemistry*. 165: 33-37.
- Gygi S, Rochon Y, Franza R ja Aebersold R. 1999. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Molecular and Cellular Biology*. 3: 1720-1730.
- Hedricks Bergey D ja Holt J. 1994. Bergey's manual of determinative bacteriology. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, USA. s. 399-404.
- Huang F, Parmryd I, Nilsson F, Persson A, Pakrasi H, Andersson B ja Norling B. 2002. Proteomics of *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803. Identification of plasma membrane proteins. *Molecular and cellular proteomics* 1.12. 956-966. DOI 10.1074/mcp.M200043-MCP200.
- Invitrogen. 2004. SuperScript™ III Reverse Transcriptase. Invitrogen Corporation. Kalifornia, USA. 6 s.
- IUPAC. 2012. International Union of Pure and Applied Chemistry. Compendium of Chemical Terminology. Gold Book. Versio 2.3.2. 19.8.2012. s. 393-394.
- Knoll A. 2008. Cyanobacteria and Earth history. Teoksessa *The Cyanobacteria. Molecular biology, genetics and evolution*. Herrero A ja Flores E. 2008. Caister Academic Press. Norfolk, UK. s. 1-2.
- Kohli R, Trauger J, Schwarzer D, Marahiel M ja Walsh C. 2001. Generality of peptide cyclization catalyzed by isolated thioesterase domains of nonribosomal peptide synthetases. *Biochemistry*. 40: 7099-7108.
- Koksharova O, Klint J ja Rasmussen U. 2007. Comparative proteomics of cell division mutants and wild-type *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *Microbiology*. 153: 2505-2517.
- Kótai J. 1972. Instruction for preparation of modified nutrient solution Z8 for algae. Norwegian institute for water research. Oslo, Norja. Blindern B-11/69. 5 s.
- Liebler D. 2002. Introduction to Proteomics. Tools for the New Biology. Humana Press Inc. New Jersey, USA. s. 1-24.
- Life Technologies. 2011. RiboPure™-Bacteria Kit. Protocol. Life Technologies Corporation. California, USA. 20 s.

- Linne U ja Marahiel M. 2000. Control of directionality in nonribosomal peptide synthesis: role of the condensation domain in preventing misinitiation and timing of epimerization. *Biochemistry*. 39: 10439-10447.
- MacKintosh C, Beattie K, Klumpp S, Cohen P ja Codd G. 1990. Cyanobacterial microcystin LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants. *FEBS Letters*. 264: 187-192.
- Marin K, Huckauf J, Fulda S ja Hagemann M. 2002. Salt-dependent expression of glucosylglycerol-phosphate synthase, involved in osmolyte synthesis in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Journal of Bacteriology*. 184: 2870-2877.
- Matthiesen R ja Mutenda K. 2007. Introduction to proteomics. Teoksessa *Mass Spectrometry Data Analysis in Proteomics*. Matthiesen R. Humana Press. Totowa, USA. s. 1-35.
- Mellin I. 2006. Tilastolliset menetelmät: Tilastolliset testit. Teknillinen korkeakoulu. Espoo. s. 129-160.
- Mootz H, Finking R ja Marahiel M. 2001. 4'-phosphopantetheine transfer in primary and secondary metabolism in *Bacillus subtilis*. *The Journal of Biological Chemistry*. 40: 37289-37298.
- Mootz H ja Marahiel M. 1997. The tyrocidine biosynthesis operon of *Bacillus brevis*: complete nucleotide sequence and biochemical characterization of functional internal adenylation domains. *Journal of Bacteriology*. 21: 6843-6850.
- Namikoshi M ja Rinehart K. 1996. Bioactive compounds produced by cyanobacteria. *Journal of Industrial Microbiology*. 17: 373-384.
- Nawrocki A, Larsen M, Podtelejnikov A, Jensen O, Mann M, Roepstorff P, Görg A, Fey S ja Larsen P. 1998. Correlation of acidic and basic carrier ampholyte and immobilized pH gradient two-dimensional gel electrophoresis patterns based on mass spectrometric protein identification. *Electrophoresis*. 19: 1024-1035.
- Nübel U, Garcia-Pichel F ja Muyzer G. 1997. PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 8: 3327-3332.
- O'Farrell P. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *The Journal of Biological Chemistry*. 250: 4007-4021.
- Okoniewski M ja Miller C. 2006. Hybridization interaction between probesets in short oligo microarrays lead to spurious correlations. *BMC Bioinformatics*. 2006. 7: 276.

- Premier Biosoft. 2012. Primer Premier 6.20. Primer analysis software. Premier Biosoft. Verkkodokumentti. <<http://www.premierbiosoft.com/crm/jsp/com/pbi/crm/clientside/ProductList.jsp>> Käytetty 5.6.2012.
- Promega. 2009. Certificate of analysis. RQ1 RNase-Free DNase. Promega Corporation. Wisconsin, USA. 2 s.
- Qiagen. 2012. DNeasy® Plant Handbook. USA. 56 s.
- Rapala J, Sivonen K, Lyra C ja Niemelä S. 1997. Variation of microcystin, cyanobacterial hepatotoxins, in *Anabaena* spp. as a function of growth stimuli. *Applied and Environmental Microbiology*. 63: 2206-2212.
- Reasoner D ja Geldreich E. 1985. A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Applied and Environmental Microbiology*. 1: 1-7.
- Repka S, Koivula M, Harjunpää V, Rouhiainen L ja Sivonen K. 2004. Effects of phosphate and light on growth of and bioactive peptide production by the cyanobacterium *Anabaena* strain 90 and its anabaenopeptilide mutant. *Applied and Environmental Microbiology*. 70: 4551-4560.
- Rodríguez-Ezpeleta N ja Aransay A. 2012. Introduction. Teoksessa Rodríguez-Ezpeleta N, Hackenberg M ja Aransay A. 2012. Bioinformatics for high throughput sequencing. Springer. New York, USA. s. 6-7.
- Rouhiainen L, Paulin L, Suomalainen S, Hyytiäinen H, Buikema W, Haselkorn R ja Sivonen K. 2000. Genes encoding synthetases of cyclic depsipeptides, anabaenopeptilides, in *Anabaena* strain 90. *Molecular Biology*. 37: 156-167.
- Rouhiainen L, Vakkilainen T, Lumbye Siemer B, Buikema W, Haselkorn R ja Sivonen K. 2004. Genes coding for hepatotoxic heptapeptides (microcystins) in the cyanobacterium *Anabaena* strain 90. *Applied and Environmental Microbiology*. 70: 686-692.
- Rozen S ja Skaletsky H. 1998. Primer3: www primer tool. Whitehead Institute. Verkkodokumentti. <www.biotoools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi> Käytetty 5.6.2012.
- Ryssel M, Duan Z ja Siegmundfeldt. 2013. *In situ* examination of cell growth and death of *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiology Letters*. 343: 82-88.
- Samel S, Schoenafinger G, Knappe T, Marahiel M ja Essen L-O. 2007. Structural and functional insights into a peptide bond-forming bidomain from a nonribosomal peptide synthetase. *Structure*. 7: 781-792.

- Schena M, Shalon D, Davis R ja Brown P. 1995. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*. 5235: 467-470.
- Scherer S, Chen T ja Böger P. 1988. A new UV-A/B protecting pigment in the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune*. *Plant Physiology*. 88: 1055-1057.
- Schwartz R, Ting C ja King J. 2001. Whole proteome pI values correlate with subcellular localizations of proteins for organisms within three domains of life. *Genome Research*. 11: 703-709.
- Selinger D, Saxena R, Cheung K, Church G ja Rosenow C. Global RNA half-life analysis in *Escherichia coli* reveals positional patterns of transcriptional degradation. *Genome Research*. 13:216-223.
- Singh R, Singh P, Sharma R ja Mohapatra T. 2012. Nonribosomal peptide synthesis in microbes. Teoksessa Tiwari S, Sharma R ja Singh R. 2012. Recent advances in microbiology. Volyymi 1. 1. painos. Nova Science Publishers. New York, USA. s. 183-194.
- Sivonen K ja Börner T. 2008. Bioactive compounds produced by cyanobacteria. Teoksessa *The Cyanobacteria. Molecular biology, genetics and evolution*. Herrero A ja Flores E. 2008. Caister Academic Press. Norfolk, UK. s. 159-174.
- Sivonen K, Namikoshi M, Evans W, Carmichael W, Sun F, Rouhiainen L, Luukkainen R ja Rinehart L. 1992. Isolation and characterization of a variety of microcystins from seven strains of the cyanobacterial genus *Anabaena*. *Applied and Environmental Microbiology*. 58: 2495-2500.
- Stachelhaus T, Mootz H, Bergendahl V ja Marahiel M. 1998. Peptide bond formation in nonribosomal peptide biosynthesis. *The Journal of Biological Chemistry*. 35: 22773-22781.
- Stawikowski M ja Cudic P 2007. Depsipeptide synthesis. Teoksessa *Methods in molecular biology. Peptide characterization and application protocols*. Osa 386. Fields G. Humana Press, Inc. New Jersey, USA. s. 321-339.
- Suominen I ja Ollikka P. 2003. Yhdistelmä-DNA-tekniikan perusteet. Opetushallitus. Hakapaino Oy. Helsinki. s. 65-68.
- Suzuki I, Simon W ja Slabas A. 2006. The heat shock response of *Synechocystis* sp. PCC 6803 analysed by transcriptomics and proteomics. *Journal of Experimental Botany*. 57: 1573-1578.

- Temin H ja Mizutani S. 1970. RNA-dependent DNA polymerase in virions of rous sarcoma virus. *Nature*. 226: 1211-1213.
- Thermo Fisher Scientific. 2010. NanoDrop 1000 Spectrophotometer. V3.8. User's manual. 51 s.
- Ünlü M, Morgan M ja Minden J. 1997. Difference gel electrophoresis: A single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis*. 18: 2071-2077.
- Wang H, Sivonen K, Rouhiainen L, Fewer D, Lyra C, Rantala-Ylinen A, Vestola J, Jokela J, Rantasärkkä K, Li Z ja Liu B. 2012. Genome-derived insights into the biology of the hepatotoxic bloom-forming cyanobacterium *Anabaena* sp strain 90. *BMC Genomics*. 13: 613.
- Yoshizawa S, Matsushima R, Watanabe M, Harada K, Ichihara A, Carmichael W ja Fujiki H. 1990. Inhibition of protein phosphatases by microcystins and nodularin associated with hepatotoxicity. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 116: 609-614.
- Zheng Z-L ja Zhao Y. 2013. Transcriptome comparison and gene coexpression network analysis provide a systems view of citrus response *Candidatus Liberibacter asiaticus* infection. *BMC Genomics*. 2013 14: 27.
- Zhou J, Thompson D ja Tiedje T. 2004. Genomics: Toward a genome-level understanding of the structure, functions and evolution of biological systems. Teoksessa Zhou J, Thompson D, Xu Y ja Tiedje T. 2004. Microbial functional genomics. John Wiley and Sons, Inc. New Jersey, USA. s. 1-19.

LIITTEET

LIITE 1: Z8X-elatusaineen valmistaminen (Kótai 1972)

Kantaliuos Z8XI

MgSO₄·7H₂O 2,5 g
 CaCl₂·2H₂O 3,7 g
 NaCl 32,1 g
 H₂O 1000 ml

Kantaliuos Z8II

K₂HPO₄·3H₂O 2,5 g
 Na₂CO₃ 2,1 g
 H₂O 1000 ml

Kantaliuos Z8III

<u>Fe-liuos:</u>	<u>EDTA·Na₂·2H₂O-liuos:</u>
FeCl ₃ ·6H ₂ O 2,8 g	EDTA 3,9 g
0,1 M NaCl 100 ml	0,1 M NaOH 100 ml

10 ml Fe-liuosta sekoitettiin 900 ml MilliQ-vettä. Joukkoon lisättiin 9,5 ml EDTA-liuosta ja täytettiin 1000 ml asti.

Hivenaineliuos

Kantaliuokset:

1. Na₂WO₄·2H₂O 0,330 g/100 ml
2. (NH₄)₆Mo₇O₂₄·H₂O 0,880 g/100 ml
3. KBr 1.200 g/100 ml
4. KJ 0,830 g/100 ml
5. ZnSO₄·7H₂O 2,870 g/100 ml
6. Cd(NO₃)₂·4H₂O 1,550 g/100 ml
7. Co(NO₃)₂·6H₂O 1,460 g/100 ml
8. CuSO₄·5H₂O 1,250 g/100 ml
9. (NH₄)₂Ni(SO₄)₂·6H₂O 1,980 g/100 ml
10. Cr(NO₃)₃·9H₂O 0,410 g/100 ml
11. V₂O₅ 0,089 g/l
12. Al₂(SO₄)₃·K₂SO₄·24H₂O 4,740 g/100 ml

Liuoksia 1-10 sekoitettiin 1 ml ja liuoksia 11 ja 12 10 ml 700 ml MilliQ-vettä. Liuos täytettiin 1000 ml asti MilliQ-vedellä ja säilytettiin valolta suojattuna.

Z8X-elatusaine

Z8XI 5 ml

Z8II 5 ml

Z8III 5 ml

hivenaineliuos 5 ml

250 ml MilliQ-vettä kuplitettiin hiilidioksidilla, jotta ravinteet eivät sakanneet. Veteen lisättiin kantaliuokset ja hivenaineliuos. Liuos täytettiin 500 ml asti MilliQ-vedellä ja autoklavoitiin.

LIITE 2: Proteomiikassa käytetyt liuokset (GE Healthcare 2010)**Kostutusliuos**

7M urea 21 g
2 M tiourea 7,6 g
4 % CHAPS 2 g
1 % bromfenolisininen 200 µl
MilliQ-vesi 50 ml

Aineet punnittiin, sekoitettiin keskenään ja jaettiin 1,5 ml putkiin. Putket pakastettiin -20 °C. Putkiin lisättiin 30 mg DTT:tä ja 30 µl IPG-puskuria (pH 4-7) ennen käyttöä.

Low melt -agaroosi 0,5 %

Agaroosi 0,5 g
10 x TGS-puskuri 100 ml
1 % bromfenolisininen 200 µl

Agar punnittiin ja sulatettiin puskuriin. Lopuksi seokseen lisättiin bromfenolisininen ja seos jaettiin 2 ml putkiin. Putkia säilytettiin huoneenlämmössä. Agar sulatettiin mikroaaltouunissa ennen käyttöä.

SPS-reagenssi

7 M urea 21 g
2 M tiourea 7,6 g
4 % CHAPS 2 g
30 mM Tris-emäs 182 g
MilliQ-vesi 50 ml

Aineet punnittiin ja liuotettiin MilliQ-veteen. Liuoksen pH säädettiin 8,5 0,1 M NaOH:lla. Liuos jaettiin 1,5 ml putkiin ja pakastettiin -20 °C.

Tasapainotusliuos

6 M urea 144,2 g
75 mM Tris-emäs-HCl pH 8,8
30 % glyseroli 168,4 g
2 % SDS 8,0 g
1 % bromfenolisininen 800 µl

Aineet punnittiin ja liuotettiin keskenään. Liuos jaettiin 50 ml putkiin ja pakastettiin -20 °C. Liuoksista valmistettiin DTT-tasapainostupuskuria ja jodoasetamidipuskuria juuri

ennen käyttöä. DTT-liuos valmistettiin lisäämällä 0,5 g DTT:tä / putki ja jodoasetamidiliuos lisäämällä 1,25 g jodoasetamia / putki.

LIITE 3: Hopeavärjäys yhdelle isolle geelille (Gottlieb ja Chavko 1987)**Kiinnitysliuos**

Metanoli 200 ml 50 % v/v
Etikkahappo 40 ml 10 % v/v
Fiksatiivi 40 ml 10 % v/v
MilliQ-vesi 120 ml 30 % v/v

Hopeaväriliuos

MilliQ-vesi 50 ml
Hopealiuos 7,5 ml
Pelkistysliuos 7,5 ml
Kehitysliuos 7,5 ml
Värimuodostusliuos 75 ml

Hopea-, pelkistys- ja kehitysliuos sekoitettiin MilliQ-veteen magneettisekoittajassa. Värimuodostusliuos lisättiin edellisten joukkoon juuri ennen käyttöä.

Pysäytysliuos

Etikkahappo 200 ml 5 % v/v