



**TEKNIikka JA LIIKENNE**

**Laboratorioala**

**OPINNÄYTETYÖ**

***YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS* SEROTYYPPI O:9 LIPOPOLYSAKKARIDIN  
O-ANTIGEENIN BIOSYNTTEESIÄ OHJAAVAN GEENIKLUSTERIN KLOONAAMINEN  
JA SEKVENSOINTI**

**Työn tekijä: Tiina Kasanen  
Työn ohjaaja: Arja Miettinen-  
Oinonen  
Työpaikkaohjaaja: Mikael Skurnik**

**Työ hyväksytty: \_\_. \_\_. 2008**

**Arja Miettinen-Oinonen  
yliopettaja**



## **ALKULAUSE**

Tämä opinnäytetyö tehtiin Haartman-instituutin bakteriologian ja immunologian osastolle Mikael Skurnikin tutkimusryhmässä. Haluan kiittää työn ohjaajaa yliopettaja Arja Miittinen-Oinosta, työpaikkaohjaajaa professori Mikael Skurnikia ja korvaamattomasta avusta kaikkia niitä, jotka kyseisenä kesänä työskentelivät Yersinia-laboratoriossa.

Helsingissä 13.11.2008

Tiina Kasanen

## OPINNÄYTETYÖN TIIVISTELMÄ

<b>Työn tekijä:</b> Tiina Kasanen	
<b>Työn nimi:</b> <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> serotyyppi O:9 lipopolysakkaridin O-antigeenin biosynteesiä ohjaavan geeniklusterin kloonaminen ja sekvensointi	
<b>Päivämäärä:</b> 13.11.2008	<b>Sivumäärä:</b> 52 s. + 9 liitettä
<b>Koulutusohjelma:</b> Laboratorioala	<b>Suuntautumisvaihtoehto:</b>
<b>Työn ohjaaja:</b> yliopettaja Arja Miettinen-Oinonen	
<b>Työpaikkaohjaaja:</b> professori Mikael Skurnik	
<p><i>Yersinia pseudotuberculosis</i> on gramnegatiivinen bakteeri, jonka soluseinässä oleva ulkomembraani koostuu pääosin lipopolysakkaridista sekä fosfolipideistä ja proteiineista. Lipopolysakkaridi on tärkeä antigeeninen rakenne, joka koostuu lipidi A:sta, ydinoligosakkaridista sekä O-polysakkaridista eli O-antigeenista. O-antigeenisen osan rakenne vaihtelee hyvin paljon eri bakteereilla ja samankin bakteerilajin eri kannoilla, mihin perustuu bakteerikantojen jako eri serotyyppeihin.</p> <p>Tutkimuksen kohteena oli <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> serotyypin O:9 lipopolysakkaridin O-antigeenin biosynteesiä ohjaavan geeniklusterin kloonaminen ja sekvensointi. Kloonausvektorina käytettiin kosmidia, jolloin puhutaan kosmidikloonauksesta. Lyhyesti kuvattuna tämä tehtiin seuraavasti: <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> O:9 genomisen DNA digestoitettiin <i>Sau3AI</i>-restriktioentsyymillä ja kosmidi pHCT9 <i>Bam</i>HI:llä. Tuotteet ligoitiin, pakattiin in vitro lambda-faagiin ja transdukoitiin <i>E. coli</i> LE 392 -soluihin.</p> <p>Kosmidikirjaston valmistuttua se seulottiin. Geeniklusterin geeneistä <i>wzz</i>-geenin sekvenssi on tiedossa, mikä on mahdollistanut spesifisen PCR- eli polymeerasiketjureaktio- menetelmän kehittämisen geeniklusterin identifioimiseksi. <i>wzz</i>-positiivisten kloonien sisältämät kosmidit eristettiin ja kosmidien inserttien ääripäät sekvensoitiin.</p> <p>Sekvensoinnista saatuja tuloksia verrattiin geenipankin <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> -kantojen DNA-sekvensseihin ja varsin ajoissa heräsi epäily siitä, että insertit sisältävät monta lyhyttä <i>Sau3AI</i>-digestiotuotetta, jotka ovat ligoituneet toisiinsa.</p> <p>Kosmidikirjasto tehtiin uudelleen. Suuri määrä genomista DNA:ta digestoitettiin osittain ja tällä kertaa lyhyet <i>Sau3AI</i>-digestiotuotteet poistettiin sokerigradienttialajolla. Saadut pitkät genomiset DNA-fragmentit ligoitiin kosmidiin, pakattiin ja transdukoitiin <i>E. coli</i>in. Tämän seurauksena saatiin yli 20000 kloonin kosmidikirjasto. Positiivisten kloonien seulonta tulee olemaan seuraava tehtävä tässä projektissa.</p>	
<b>Avainsanat:</b> <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> , O-antigeeni, kosmidi, kloonaus, sekvensointi	

## ABSTRACT

<b>Name:</b> Tiina Kasanen	
<b>Title:</b> Cloning and Sequence Analysis of the O-antigen Gene Cluster of <i>Yersinia Pseudotuberculosis</i> Serotype O:9.	
<b>Date:</b> 13 November 2008	<b>Number of pages:</b> 52 + 9 appendices
<b>Department:</b> Laboratory sciences	<b>Study Programme:</b>
<b>Instructor:</b> Arja Miettinen-Oinonen, Principal Lecturer	
<b>Supervisor:</b> Mikael Skurnik, Professor	
<p>The aim of this research was to clone the O-antigen gene cluster of <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> serotype O:9 and to perform a sequence analysis. The cloning vector was a cosmid, hence the cloning is called cosmid cloning. Briefly, <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> O:9 genomic DNA was digested with restriction enzyme <i>Sau3AI</i> and cosmid pHCT9 was digested with <i>BamHI</i>. Digestion products were directly ligated, packaged in vitro into a lambda-phage using a packaging extract and transduced into <i>E. coli</i> LE 392 cells.</p> <p>The created cosmid library was then screened for positive clones that carry the O-antigen gene cluster. The sequence of the <i>wzz</i>-gene of the gene cluster is known which made it possible to design a specific PCR (polymerase chain reaction) method for the identification of the presence of the gene cluster [1]. <i>wzz</i>-positive cosmids were isolated and the extreme ends of the inserts in the cosmids were sequenced.</p> <p>The obtained sequences were compared to known genome sequences of <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> strains in data banks. The results indicated that the constructed genomic library was of poor quality since inserts contained many short <i>Sau3AI</i> fragments ligated to each other.</p> <p>Therefore a new cosmid library was created. A large amount of genomic DNA was digested partially by <i>Sau3AI</i> and this time the short <i>Sau3AI</i> fragments were removed from the digest using sucrose gradient fractionation. The obtained long genomic DNA fragments were ligated to the cosmid vector, packaged and transduced into <i>E. coli</i>. This resulted in cosmid library with &gt;20000 clones. The screening for positive clones will be the next task in the project.</p>	
<b>Keywords:</b> <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> , O-antigen, cosmid, cloning, sequencing	

# SISÄLLYS

## ALKULAUSE

## TIIVISTELMÄ

## ABSTRACT

## LYHENTEITÄ

<b>1</b>	<b>JOHDANTO</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>KIRJALLISUUSKATSAUS</b>	<b>2</b>
<b>2.1</b>	<b>Lipopolysakkaridi (LPS)</b>	<b>3</b>
2.1.1	<i>Lipidi A:n ja ydinpolysakkaridin biosynteesit</i>	<u>4</u>
2.1.2	<i>O-antigeenin biosynteesi</i>	<u>5</u>
<b>2.2</b>	<b>Yersinia-suku</b>	<b>6</b>
2.2.1	<i>Patogeeniset Yersiniat</i>	<u>6</u>
2.2.2	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	<u>7</u>
<b>2.3</b>	<b>DNA-kirjasto</b>	<b>9</b>
2.3.1	<i>Defosforylaatio</i>	<u>10</u>
2.3.2	<i>Osittaisdigestio</i>	<u>10</u>
2.3.3	<i>In vitro -pakkaus</i>	<u>11</u>
<b>2.4</b>	<b>Sekvensointi</b>	<b>13</b>
<b>3</b>	<b>TYÖN TAVOITE</b>	<b>14</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAALIT JA MENETELMÄT</b>	<b>15</b>
<b>4.1</b>	<b>Kannat ja materiaalit</b>	<b>15</b>
<b>4.2</b>	<b>Yleisiä menetelmiä</b>	<b>15</b>
<b>4.3</b>	<b>Kosmidikloonaus ja DNA-kirjaston valmistus</b>	<b>17</b>
4.3.1	<i>Genomisen DNA:n eristäminen</i>	<u>17</u>
4.3.2	<i>Sau3AI-digestio</i>	<u>17</u>
4.3.3	<i>BfuCI-digestiot</i>	<u>18</u>
4.3.4	<i>Sokerigradianttiajo</i>	<u>19</u>
4.3.5	<i>Y. pstb O:9 genomisen DNA:n defosforylointi</i>	<u>19</u>
4.3.6	<i>pHC79-kosmidin käsittely</i>	<u>20</u>
4.3.7	<i>Ligaatiot</i>	<u>21</u>
4.3.8	<i>In vitro -pakkaus</i>	<u>21</u>
<b>4.4</b>	<b>Kirjaston seulonta</b>	<b>22</b>
4.4.1	<i>Seulonta wzz-spesifisellä PCR:llä</i>	<u>23</u>
4.4.2	<i>Kosmidien eristys</i>	<u>25</u>
4.4.3	<i>Kosmidien karakterisointi</i>	<u>25</u>
<b>4.5</b>	<b>Sekvensointi</b>	<b>26</b>

<b>5</b>	<b>TULOKSET JA TULOSTEN TARKASTELU</b>	<b><u>27</u></b>
5.1	Kosmidikloonaus ja DNA-kirjaston valmistus	<u>27</u>
5.2	Kirjaston seulonta	<u>29</u>
5.2.1	<i>wzz-spesifinen PCR</i>	<u>30</u>
5.2.2	<i>Kosmidien karakterisointi</i>	<u>35</u>
5.3	Kosmidien sekvensointi	<u>39</u>
5.4	Uuden genomisen kosmidikirjaston valmistus	<u>42</u>
5.4.1	<i>BfuCI-digestiot</i>	<u>42</u>
5.4.2	<i>Sokerigradianttiajo</i>	<u>44</u>
5.4.3	<i>Ligaatit ja in vitro -pakkaus</i>	<u>46</u>
<b>6</b>	<b>POHDINTA</b>	<b><u>47</u></b>
	<b>VIITELUETTELO</b>	<b>49</b>
	<b>LIITTEET</b>	<b>—</b>

**LIITE 1 (4) Kosmidin 299 sekvenssit elektroferogrammeina**

**LIITE 2 (2) Kosmidin 195 sekvenssit elektroferogrammeina**

**LIITE 3 Kosmidin 251 sekvenssi elektroferogrammina**

**LIITE 4 Kosmidin 255 sekvenssi elektroferogrammina**

**LIITE 5 Kosmidin 402 sekvenssi elektroferogrammina**

## LYHENTEITÄ

AGE	<i>Agarose gel electrophoresis</i> . Agaroosigeelielektroforeesi.
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> . Naudan seerumialbumiini.
bp	<i>Basepair</i> . Emäspari.
DDH	<i>3,6-dideoxyhexose</i> . 3,6-dideoksiheksosi.
GlcNAc	<i>N-acetylglucosamine</i> . N-asetyyli-glukosamiini.
<i>gsk</i>	geeni, joka koodaa inosiini-guanosiini kinaasia.
<i>hemH</i>	geeni, joka koodaa ferrokelataasia.
kb	<i>Kilobase</i> . Kiloemäs.
LPS	<i>Lipopolysaccharide</i> . Lipopolysakkaridi.
NDP	<i>Nucleoside diphosphate</i> . Nukleosididifosfaatti.
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> . Polymeraasiketjureaktio.
rpm	<i>Rounds per minute</i> . Kierrosta minuutissa.
SAP	<i>Shrimp alkaline phosphatase</i> . Katkaravun alkaalinen fosfataasi.
<i>wzz</i>	geeni, joka säätelee O-antigeeni ketjun pituutta.

## 1 JOHDANTO

*Yersinia pseudotuberculosis* (*Y. pstb*) kuuluu gramnegatiivisiin bakteereihin, joille on ominaista soluseinä, jossa on plasmamembraanin ja ohuen peptidoglykaanikerroksen ulkopuolella ylimääräinen biologinen kalvo, niin sanottu ulkomembraani. Ulkomembraanin massasta noin puolet on lipopolysakkariidia (LPS), joka koostuu lipidi A:sta, ydinoligosakkaridista sekä O-polysakkaridista (O-antigeeni). O-antigeenin rakenne vaihtelee hyvin paljon eri bakteereilla ja samankin bakteerilajin eri kannoilla. Tämä osa on kuitenkin aina sokerirakenteinen ja rakenteeltaan huomattavan monimutkainen, yksinkertaisista oligosakkaridiosista koostuva polymeeri. Koska O-antigeeni on LPS:n uloin osa ja aivan solun ulkopinnalla, se on eräs bakteerin tärkeimmistä pinta-antigeeneistä.

Tutkimuksen kohteena on *Y. pstb* serotyypin O:9 LPS:n O-antigeenin biosynteesiä ohjaavan geeniklusterin kloonaminen ja sekvensointi. Kloonausvektorina käytetään kosmidia, jolloin puhutaan kosmidikloonauksesta. Yksinkertaisesti tämä tapahtuu seuraavasti: *Y. pstb* O:9 genomisen DNA digestoidaan *Sau3AI*-restriktioentsyymillä ja kosmidi pHC79 *Bam*HI:llä. Tuotteet ligoidaan, pakataan in vitro lambda-faagiin ja transduktoidaan *E. coli* LE392 -soluihin.

Genomisen DNA-kirjaston valmistuttua se seulotaan. *Yersinia*-laboratorio (Haartman-instituutti) on yhteistyössä ulkomaisten kumppanien avulla selvittänyt *Y. pstb* O:9 O-antigeenin kemiallisen rakenteen, ja rakennetta ohjaavan geeniklusterin sijainnin kromosomissa tiedetään olevan *hemH*- ja *gsk*-geenien välillä [1]. Geeniklusterin geneeistä on ainoastaan *wzz*-geenin sekvenssi tiedossa, mikä on mahdollistanut spesifisen PCR-menetelmän kehittämisen geeniklusterin identifiointiseksi [1]. *wzz*-positiivisten kloonien sisältämät kosmidit eristetään ja alustava karakterisointi tehdään erilaisilla restriktiodigestioilla.

Edellä saatujen kosmidien inserttien ääripäät sekvensoidaan ja sekvenssejä vertaillaan geenipankin (NCBI) sekvensseihin. Sekvensointi tapahtuu primerkävetyllä, subkloonamisella ja/tai transpositio in vitro -menetelmällä.



Bakteriofagi  $\Phi$ R1-37 on *Y. enterocolitica* O:3 bakteerille spesifinen, mutta sen huomattiin pystyvän infektoimaan myös *Y. pstb* O:9 bakteereita.  $\Phi$ R1-37:n reseptorina toimii kummassakin tapauksessa LPS. *Y. enterocolitica* O:3 bakteerilla se on LPS:n uloin ydinsokeri (heksasakkaridi), mutta *Y. pstb* O:9 bakteerilla tämän O-antigeeni. [2.] Jos O-antigeenin biosynteesiä ohjaava geeniklusterin sekvenssi saadaan selvitettyksi, niin siitä on varmasti hyötyä tutkittaessa esimerkiksi tekijöitä, jotka vaikuttavat faagien isäntäspesifisyyteen.

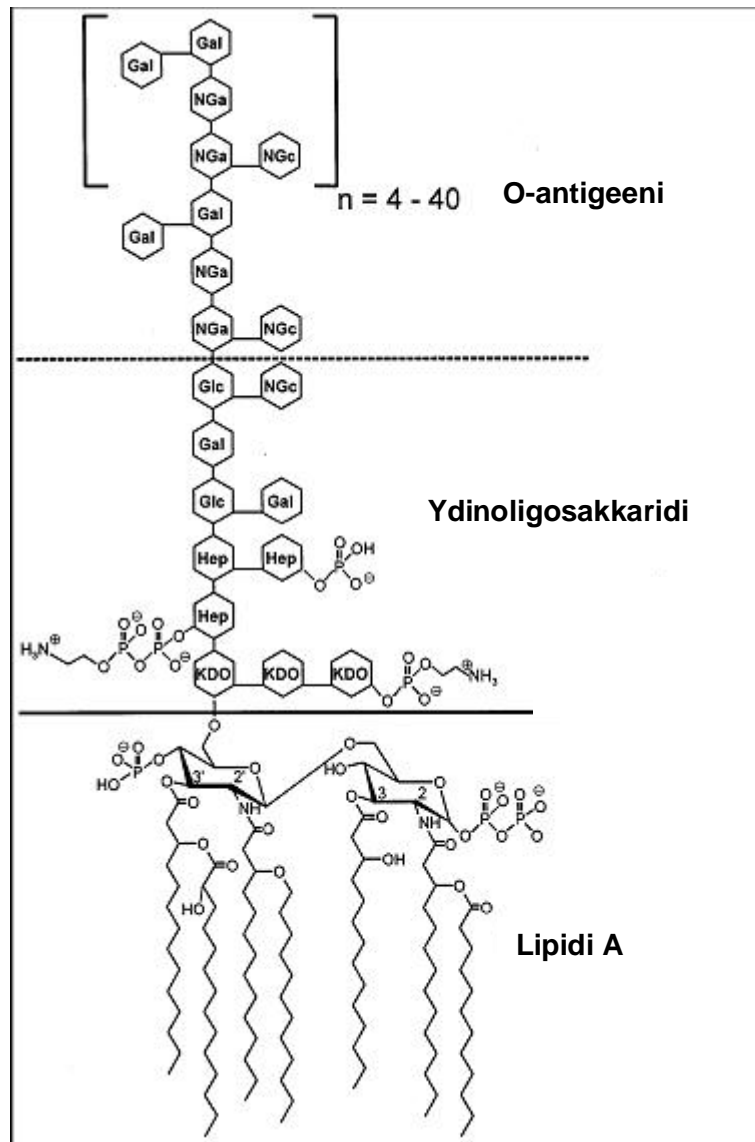
## 2 KIRJALLISUUSKATSAUS

Gramnegatiivisilla bakteereilla on soluseinässään erityinen, ylimääräinen biologinen kalvo, jota kutsutaan ulkomembraaniksi. Sen perusrakenne on sama kuin biologisten kalvojen yleensä, mutta se on kuitenkin monin tavoin poikkeuksellinen. Noin puolet sen massasta on lipopolysakkaridia (LPS), ja muuten se koostuu pääosin fosfolipideistä ja proteiineista. Ulkomembraanin tärkein tehtävä on suojata bakteeria ulkoa tulevilta haitallisilta aineilta. Estämällä suurimolekyylisten vesiliukoisten aineiden pääsyn solun sisempiin kerroksiin ulkomembraani tekee gramnegatiiviset bakteerit resistenteiksi monille grampositiivisiin bakteereihin vaikuttaville bakteerilääkkeille. Useat gramnegatiiviset bakteerit ovat grampositiivisia resistentimpiä myös monille rasvaliukoisille aineille ja detergenteille. Näiden bakteerien ulkomembraani pystyy LPS:nsa avulla estämään tällaisten aineiden pääsyn solun sisään. LPS:n happamat varaukset ja niihin liittyneet divalentit kationit ovat tässä tehtävässä avainasemassa. Ulkomembraani suojaa bakteereja tehokkaasti myös isäntäelimistön puolustusmekanismeilta, vaikka toisaalta monet ulkomembraanin rakenneosat aiheuttavat infektion aikana isännässä monia oireita ja vaikuttavat myös immuunipuolustukseen. [3, s. 63 - 64.]

## 2.1 Lipopolysakkaridi (LPS)

LPS on tärkeä antigeeninen rakenne. Se on osa bakteerin suojakuorta. Lisäksi se vaikuttaa huomattavan toksisesti isäntäelimistöön, ja siksi sitä kutsutaan myös endotoksiiniksi.

LPS koostuu lipidi A -osasta, ydinoligosakkaridiosasta sekä O-antigeenisestä osasta (kuva 1). Lipidi A on rakenteeltaan varsin ainutlaatuinen lipidi. Lisäksi se on ulkomembraanin ulkopinnan käytännöllisesti katsottuna ainoa lipidirakenteinen aine. Sen runkona on kahden N-asetyyli-glukosamiinin (GlcNAc) muodostama disakkaridi, johon liittyy rasvahappoja, muun muassa vain tälle molekyylille ominaisia  $\beta$ -hydroksihappoja. LPS:n endotoksiinivaikutukset perustuvat lipidi A:han, mutta ilman polysakkaridiosaa LPS ei olisi vesiliukoinen eikä siten niin toksinen. O-antigeenisen osan rakenne vaihtelee hyvin paljon eri bakteereilla ja samankin bakteerilajin eri kannoilla, mihin perustuu bakteerikantojen jako eri serotyyppeihin. Tämä osa on aina sokerirakenteinen ja rakenteeltaan huomattavan monimutkainen, yksinkertaisista oligosakkaridiosista koostuva polymeeri. Koska O-antigeeni on LPS:n uloin osa ja aivan solun ulkopinnalla, se on eräs bakteerin tärkeimmistä pinta-antigeeneista. Se on myös kapselipolysakkaridien tavoin solua suojaava ainesosa. [3, s. 64 - 65.]



Kuva 1. LPS koostuu lipidi A -osasta, ydinoligosakkaridiosasta sekä O-antigeenisestä osasta [4]. Mukailtu versio.

### 2.1.1 Lipidi A:n ja ydinpolysakkaridin biosynteesit

LPS:n kolmen eri osan biosynteesiä ohjaavat geenit sijaitsevat bakteerin genomissa eri puolilla genomia olevissa geeniryhmissä (geeniklustereissa). O-antigeenin biosynteesiä ohjaavien geeniklustereiden vaihtelevuus kuvastaa hyvin eri kantojen O-antigeenien erilaisuutta ja on hyvä todiste geenien (DNA:n) horisontaalisesta siirtymisestä bakteerien ja mahdollisesti muidenkin organismien välillä. LPS:n osien biosynteesi tapahtuu bakteerin sytoplasmassa kahta reittiä myöten. Lipidi A:n ja ydinpolysakkaridin biosynteesit ovat kytkeytyneet toisiinsa siten, että ensin muodostuu sytoplasmisen mem-

braanin sisäpinnalle lipidi A, jonka lipidiosan 4 - 7 rasvahappoketjua on osa membraania. Ydinoligosakkaridi rakentuu lipidi A:n toisen GlcNAc:n päälle siten, että spesifiset glykosyylitransferaasit siirtävät sokeryyksiköitä NDP (nukleosidi difosfaatti) -aktivoituneista sokereista oligosakkaridien päälle. Glykosyylitransferaasit ovat spesifisiä sokerille, jota ne siirtävät, ja vastaanottavalle rakenteelle ja muodostavat sokerien välille spesifisen glykosididoksen. Valmis lipidi A -ydinoligosakkaridirakenne pyörähtää sytoplasmisen membraanin ulkopinnalle niin, että oligosakkaridiosa on periplasmisessa tilassa. Osa tällaisista LPS-molekyyleistä jatkaa edelleen ulkomembraanille ja osaan liittyy O-antigeeni ydinoligosakkaridin jatkeeksi. [5; 6, s. 215 - 218.]

### 2.1.2 *O-antigeenin biosynteesi*

Toisena reittinä on O-antigeenin biosynteesi, joka tapahtuu samoin sytoplasmisen membraanin sisäpinnalla. O-antigeenin biosynteesille on havaittu kaksi erilaista tapaa toistuvan yksikön luonteesta riippuen. Jos toistuva oligosakkaridiyksikkö koostuu 2 - 8 erilaisesta monosakkaridista, toistuvat yksiköt liittää yhteen O-antigeenipolymeraasi ja syntynyt O-antigeeni on heteropolymeerinen. Jos toistuva yksikkö koostuu yhdestä monosakkaridista (homopolymeerinen O-antigeeni), yksiköiden liittäminen tapahtuu ilman O-antigeenipolymeraasia. Heteropolymeerisen O-antigeenin toistuva yksikkö rakentuu undekaprenyylifosfaatin (55-hiiliatominen isoprenoidi, joka toimii kantaja lipidinä) päälle glykosyylitransferaasien siirtäessä sokeryyksiköitä NDP-aktivoituneista sokereista kasvavaan oligosakkaridiin. Kun O-yksikkö on valmis, syntyneen oligosakkaridipyrofosforyyliundekaprenolin pyöräyttää niin sanottu flippaasiproteiini sytoplasmisen membraanin ulkopinnalle, jossa O-antigeenipolymeraasi liittää yksiköt peräkkäin pitkäksi heteropolymeeriseksi polysakkaridiketjuksi. Homopolymeerinen O-antigeeni rakentuu koko pituudeltaan sytoplasmisella puolella undekaprenyylifosfaatin päälle, ja sen siirtämisestä periplasmiselle puolelle huolehtii erityinen ATP:tä käyttävä siirtäjäsysteemi. O-antigeeniligaasi siirtää molemmilla tavoilla syntyneet O-antigeenit lipidi A -ydinoligosakkaridin päälle, ja näin valmistunut LPS-molekyyli siirtyy ulkomembraanille vielä tuntemattomalla mekanismilla. [5; 6, s. 215 - 218.]

## 2.2 *Yersinia*-suku

*Yersinia* on gramnegatiivisten sauvabakteerien suku, joka kuuluu heimoon *Enterobacteriaceae*. Niiden luonnollinen kasvuympäristö on pääasiassa eläinten ja ihmisten suolisto, jonka vuoksi niitä kutsutaankin enterobakteereiksi, mutta eräitä löytyy myös maaperästä ja vesistä, ja ne ovat tällöin todennäköisesti seurausta eläinkontaminaatiosta. [7, s. 380, 393 - 394.] *Yersiniat* ovat kapselittomia, noin 0,5 - 0,8 µm x 1-3 µm kokoisia fakultatiivisia anaerobeja, jotka ovat oksidaasi-negatiivisia ja katalaasi-positiivisia. Ne liikkuvat flagellojen avulla 22 - 29 °C:ssa, mutta ovat liikkumattomia 37 °C:ssa, poikkeuksena *Yersinia pestis*, joka ei liiku missään lämpötilassa. Ihanteellinen kasvulämpötila *Yersinioille* on 28 - 29 °C, mutta ne kykenevät kasvaamaan aina 4 °C:sta 42 °C:seen. Optimaalinen pH on 7,2 - 7,4. [8, s. 10.]

### 2.2.1 Patogeeniset *Yersiniat*

Kolme suvun neljästätoista lajista on patogeenisiä ihmisille; *Yersinia pestis*, *Yersinia enterocolitica* ja *Yersinia pseudotuberculosis*. *Y. pestis* aiheuttaa paiseruttoa, kun taas *Y. enterocolitica* ja *Y. pseudotuberculosis* aiheuttavat tavallisesti elintarvikeperäisen yersinioosin, joka on ripulinen ja kuumeinen suolistotulehdus. [9.]

Yhteistä kaikille patogeenisille *Yersinioille* on noin 70 kiloemäksen suuruinen virulenssitekijöiden geenejä sisältävä virulenssiplasmidi pYV, minkä lisäksi virulenssitekijöitä on kooditettuna myös kromasomaalisessa DNA:ssa [7, s. 393]. Virulenssitekijät antavat bakteereille ominaisuuksia, joiden avulla ne voivat aiheuttaa taudin. Virulenssitekijöitä ovat muun muassa spesifiset adheesio- eli tarttumisproteiinit, invaasio- eli tunkeutumisproteiinit, fagosytoosin estäjät, bakteerin pintarakenteet, jotka estävät isäntäorganismien liukoisia puolustusmekanismeja, sekä erilaiset toksiinit eli solumyrkyt. Bakteerin virulenssi eli taudinaiheuttamiskyky on useiden virulenssitekijöiden vaikutuksen yhteissumma. Useimmissa bakteeri-infektioissa virulenssitekijät vaikuttavat infektiotaudin alkamiseen eivätkä ole varsinaisesti vastuussa taudin oireista. Yhdenkin virulenssitekijän eliminoiminen voi heikentää huomattavasti bakteerin taudinaiheuttamiskykyä tai poistaa sen kokonaan. [10.]

### 2.2.2 *Yersinia pseudotuberculosis*

*Y. pseudotuberculosis*, joka muistuttaa virulenssigeeniensä suhteen hyvin paljon *Y. enterocoliticaa*, on tyypillinen eläinpatogeeni ja aiheuttaa yleisinfektioita erityisesti linnuilla ja jyrsijöillä. Sen niille aiheuttamaan tautiin liittyvät kuduskuoliot muistuttavat tuberkuloosin aiheuttamia muutoksia. Ihmisellä bakteeri, kuten jo edellä osittain mainittiin, aiheuttaa *Y. enterocolitica* -bakteerin kaltaisia suolistoalueen infektoita, ja joissakin tapauksissa se voi aiheuttaa vakavan systeemisen infektion. *Y. pseudotuberculosis* on yleensä herkkä ampisilliinille. [3, s. 191.]

*Yersinia pseudotuberculosis* jaetaan, O-antigeenin rakenteen perusteella, 15 O-serotyyppiin, joista serotyypit O:1 ja O:2 on edelleen jaettu alatyyppeihin a, b ja c sekä O:4 ja O:5 alatyyppeihin a ja b [1]. Jaottelu serotyyppeihin perustuu noin 30 O-tekijään (taulukko 1). Serotyypit O:1:stä O:7:ään on osittain määritetty O-antigeenin erilaisen 3,6-dideoksiheksosin (DDH) läsnäololla; serotyyppien O:1a, O:1b ja O:3 O-antigeenit sisältävät paratoosia (Par), O:2a, O:2b ja O:2c abequosia (Abe), O:4a ja O:4b tyveloosia (Tyv), O:5a askaryloosia (Asc) sekä O:6 ja O:7 kolitoosia (Col). Serotyyppi O:5b sisältää 6-deoksi-L-altrofuranoosia (6d-Alt<sub>f</sub>). [9.] Ihmisistä eristettyjen serotyyppien esiintyvyydessä on huomattu maantieteellisesti joitakin eroavaisuuksia. Euroopassa suurin osa eristetyistä kuuluu serotyyppeihin O:1 - O:3, kun taas Japanissa O:4b, O:3, O:5a ja O:5b ovat yleisimpiä. Kannat, jotka eivät kanna virulenssiplasmidia, kuuluvat apatogeenisiin eli ympäristöserotyyppeihin [6].



Myös O-antigeenin biosynteesistä vastaavien geenien (geeniklusterin) sijainnit on kromosomaalisesti paikallistettu, ja ne ovat yleisimmin ryhmittyneet *hemH*- ja *gsk*-geenien välille (kuva 3). Geeniklusterin geeneistä on ainoastaan *wzz*-geenin sekvenssi tiedossa, mikä on mahdollistanut spesifisen PCR-menetelmän kehittämisen geeniklusterin tunnistamiseksi. [1.]



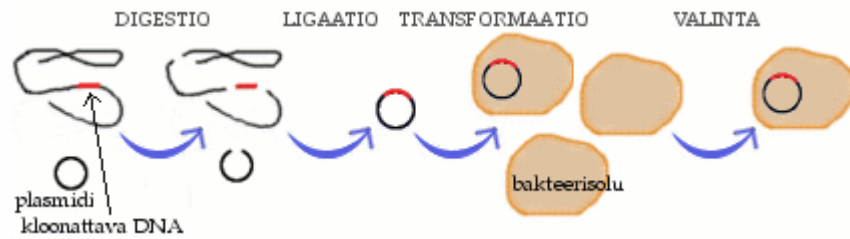
Kuva 3. *Y. pestis*:n yleinen genomialue [5], mukailtu versio

### 2.3 DNA-kirjasto

DNA-kirjasto on mahdollisimman kattava kokoelma klooneja organismin kromosomaalisesta DNA:sta (genominen DNA-kirjasto) tai tutkittavien solujen mRNA:sta (cDNA-kirjasto). DNA-kirjastosta voidaan seuloa kiinnostuksen kohteina olevia DNA-jaksoja, esimerkiksi jotakin tiettyä geeniä. [16.]

Genominen DNA-kirjasto valmistetaan digestoimalla ensin eliön DNA jollakin restriktioentsyymillä. Geelielektroforeesin avulla syntyneistä DNA-palasisista valitaan sopivan kokoiset palat ja ligoidaan ne restriktioentsyymillä katkaistuihin vektoriin (yhteen vektoriin yksi DNA-pala). Ligaatiossa syntyy suuri joukko yhdistelmä-DNA-plasmideja, joissa on eripituisia jaksoja tutkittavan organismin genomisen DNA:n koko alueelta. Vektoritaustaa voidaan vähentää vektorin defosforylaatiolla (kpl 2.3.1). Kirjasto valmistetaan yleensä käyttäen *E. coli*a transformaatioisäntänä. Transformaatiosta saadaan tuhansia tai jopa satojatuhansia yhdistelmä-DNA-plasmidilla transformoituneita klooneja, joiden joukosta haluttuja DNA-jaksoja pitää seuloa. Kirjasto voidaan säilöä myös ligaatioseoksena, toisin sanoen ennen transformointia, jolloin jokaista seulontaa varten tehdään uusi transformaatio. [16.] Kuvassa 4 nähdään kuvasarja kloonauksesta.





Kuva 4. Kuvasarja kloonamisesta [17]

### 2.3.1 Defosforylaatio

Defosforylointi estää esimerkiksi vektoria ligatoitumasta itsensä kanssa. Alkaalinen fosfataasi poistaa restriktioentsyymien jättämät 5'-fosfaatit, jolloin fosfodiesterisidosta ei voi syntyä. Yleisimpiä alkaalisia fosfataaseja ovat katkaravun alkaalinen fosfataasi eli SAP (engl. *Shrimp Alkaline Phosphatase*) ja vasikan suolen alkaalinen fosfataasi eli CIP (engl. *Calf Intestinal Alkaline Phosphatase*). [18.]

### 2.3.2 Osittaisdigestio

Kromosomaalinen DNA katkotaan DNA-kirjastoja varten usein osittaiskatkaisuna (osittaisdigestio). Digestioon valitaan sellainen restriktioentsyymi, jolla on katkaisukohtia DNA:ssa tiheään; joko viiden tai useimmiten neljän nukleotidin tunnustaja. Yleisimmin tähän tarkoitukseen käytetään restriktioentsyymiä *Sau3AI*, jonka jättämät kohessiiviset päät ovat samat kuin *BamHI*:n, eli ne voidaan DNA-ligaasientsyymillä liittää *BamHI*:llä katkaistuun vektoriin. Koska *Sau3AI* on neljän nukleotidin tunnustaja (GATC), sillä on siten katkaisukohta DNA:ssa keskimäärin n. 250 nukleotidiparin välein. Jos genominen DNA:n katkottaisiin täydellisesti *Sau3AI*:llä, tuloksena olisi aivan liian pienikokoisia DNA-jaksoja. Sen sijaan annetaankin *Sau3AI*:n toimia vain vähän aikaa, jolloin ainoastaan pieni osa katkaisukohdista ehtii aueta, ja pysäytetään katkaisureaktio ennen aikojaan. Pysäytyksen ajankohtaa säätämällä saadaan sopivan kokoisia reaktiotuotteita. Menetelmän etuna on se, että katkaisu osuu melko sattumanvaraisesti DNA:n koko alueelle ja tuloksena syntyy esimerkiksi kustakin geenistä vaihtoehtoisia DNA-jaksoja, joista ainakin joissain geeni on säilynyt kokonaan ehjänä.

Ennen ligoitua suurimmista ja pienimmistä DNA-jaksoista halutaan yleensä päästä eroon. Edelliset ovat tehottomasti kloonautuvia ja jälkimmäiset ovat liian pieniä sisältääkseen kokonaisia geenejä. Sopivan kokoiset DNA-jaksot voidaan eristää kätevimmin preparatiivisella AGE:lla tai kuten tässä työssä, sokerigradianttijolla. Sokerigradianttijolla tarkoitetaan DNA-jaksojen erottumista kokonsa mukaan, kun niitä sentrifugoidaan sokeriliemessä ultrasentrifugissa noin vuorokausi.

### 2.3.3 *In vitro* -pakkaus

Genomisten kirjastojen valmistamiseen *in vitro* -pakkausmenetelmällä käytetään usein *E. coli*  $\lambda$ -faagiin perustuvia lambdafaagi- ja kosmidivektoreja eikä plasmideja. Tämä johtuu lähinnä siitä, että plasmidivektorien insertiokapasiteetti on melko pieni, yleensä < 15 kb (insertiokapasiteetilla tarkoitetaan sitä vieraan DNA:n maksimikokoa, joka voidaan liittää vektoriin). Syy pieneen insertiokapasiteettiin johtuu siitä, että suurempien kuin 10 - 15 kb kokoisten plasmidien siirtyminen soluihin on tehotonta. Sitä vastoin lambdafaagivektorien kapasiteetti on noin 20 kb ja kosmidivektorien jopa lähes 50 kb, koska ne toimivat eri tavalla kuin plasmidivektorit. [19, s. 56 - 57.]

Kosmidi on plasmidi, johon on liitetty  $\lambda$ -faagin cos-alue. Sen ansiosta se voidaan pakata faagin proteiiniin sisään *in vitro*, kunhan koko on sopiva eli lähellä  $\lambda$ -faagin genomien kokoa, noin 50 kb. Tällainen koko saadaan aikaan, kun kosmidiin liitetty vieras DNA on riittävän suuri. Transfektion jälkeen kosmidit replikoituvat solussa itsenäisesti plasmidien tapaan. Ne eivät kuitenkaan tuota lisää faagipartikkeleja eivätkä hajota soluja, koska kosmideista puuttuvat  $\lambda$ -faagin muut geenit cos-aluetta lukuun ottamatta. [19, s. 56 - 57.]

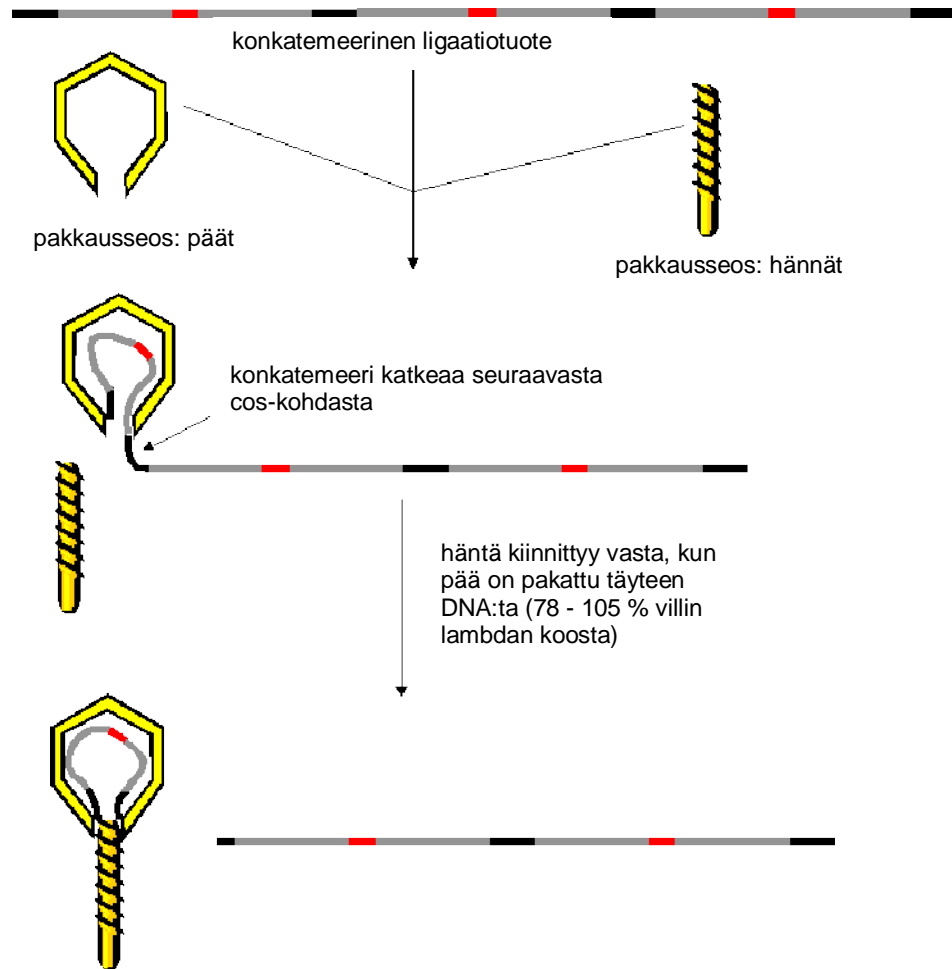
*In vitro* -pakkauksessa käytetään tietyn tyyppisistä faageista tätä tarkoitusta varten valmistettuja pakkausseoksia. Yksinkertaistaen voisi sanoa, että yhdessä seoksessa on faagin häntiä ja toisessa seoksessa faagin "tyhjiä" päitä, eli päitä, joissa ei vielä ole DNA:ta. Kun pakkausseokset yhdistetään pakkattavan DNA:n kanssa samaan putkeen, faagin päässä oleva tietty proteiini tunnistaa pakkattavassa DNA:ssa olevan cos-kohdan, DNA katkeaa tältä kohdasta ja kiinnittyy cos-päästään faagipään sisäänmenoaukkoon. Sen jälkeen DNA alkaa työntyä pään sisään, mikä jatkuu kunnes saavutetaan seuraava cos-alue. Jos näiden kahden cos-alueen välimatka on sopiva, DNA katkaistaan tästä kohdasta ja se kiinnittyy cos-päästään faagipään suuaukkoon. Tämän jälkeen häntä asettuu paikalleen sulkien suuaukon ja faagipartikkeli

on valmis. Loppuosa konkatemeerista (engl. *concatemer*) eli DNA:sta, on tämän jälkeen valmis kiinnittymään johonkin toiseen faagipäähän ja aloittamaan seuraavan cos-alueiden välisen jakson pakkautumisen. Tämä kaikki saadaan siis aikaan koeputkessa, kun käytössä on edellä mainitut kaksi pakkausseosta ja sopivaan muotoon ligoitu DNA, jossa cos-alueet ovat oikean välimatkan päässä toisistaan. [20.]

Faagipää ei tunnista mitään muita alueita DNA:ssa kuin cos-alueet, joten niiden välissä saa olla mitä DNA:ta tahansa; kosmidien käyttö perustuu juuri tähän. In vitro -pakkauksen periaate on esitetty kuvassa 5.

---

cos    vasen k.    ins.    oikea k.    cos



Kuva 5.  $\lambda$ -DNA:n *in vitro* -pakkaus [20], mukailtu versio

## 2.4 Sekvensointi

Geenien eli DNA:n emäsjärjestyksen selvittämiseen tarvitaan sekvensointia. Sekvensointi mahdollistui kloonauksen keksimisen myötä ja ensimmäiset sekvensointimenetelmät, Maxam-Gilbertin ja Sangerin dideoksimenetelmä, kehitettiin 1970-luvun puolivälissä.

Maxam-Gilbertin menetelmä on historiallisesti ensimmäinen käytetty sekvensointimenetelmä ja perustuu radioaktiivisten merkkiaineiden käyttöön [21]. Sangerin dideoksimenetelmä sen sijaan on entsymaattinen sekvensoin-

timenetelmä [22]. Nyt, 2000-luvulla, on käytössä automaattinen sekvensointi, jonka toimintaperiaate perustuu Sangerin menetelmään.

Automaattinen sekvensointi ei olisi mahdollista ilman polymeerasiketjureaktiota (engl. *Polymerase Chain Reaction = PCR*). Menetelmä koostuu sykliittäisestä sekvensoinnista ja sen vaiheet ovat DNA-kaksoisjuosteen denaturaatio (engl. *denaturation*), alukkeen kiinnittyminen (engl. *annealing*) ja fragmentin pidentyminen (engl. *extension*). Sekvensointireaktioiden analysointi suoritetaan elektroforeesin avulla. Elektroforeesiin perustuvia analysointimenetelmiä ovat muun muassa geelielektroforeesi ja kapillaarielektroforeesi. Kun käytetään merkkiaineina esimerkiksi fluoresoivia väriaineita, ei tarvita radioaktiivisia isotooppeja tai muita myrkyllisiä aineita, kuten Maxam-Gilbertin menetelmässä [21]. Fluoresoivalla värillä leimatut nukleotidit ovat leimautuneet oman värisikseen, ja värit erottuvat, kun laser havaitsee nukleotidien lähettämän fluoresenssin.

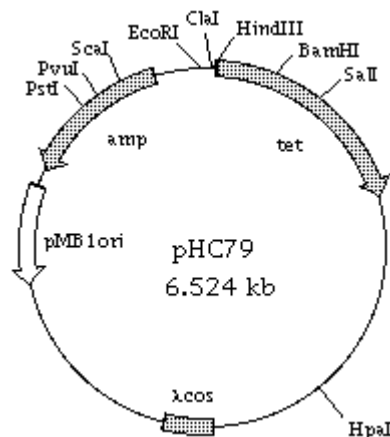
### 3 TYÖN TAVOITE

Työn tavoitteena oli kloonata ja sekvensoida *Yersinia pseudotuberculosis* serotyyppi O:9 lipopolysakkaridin O-antigeenin biosynteesiä ohjaava geeniklusteri. Työ oli perustutkimusta, joka pohjautui muihin *Yersinia*-lajien O-polysakkaridi geeniklusteritutkimuksiin.

## 4 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

### 4.1 Kannat ja materiaalit

Työssä käytettiin *Yersinia pseudotuberculosis* O:9 bakteerikanta R708:a (referenssikanta Fukushima [14]) ja kloonauksvektorina toimi pHC79-kosmidi (kuva 6).



Kuva 6. pHC79-kosmidi [23]

### 4.2 Yleisiä menetelmiä

#### *Etanolisaostus*

DNA saostettiin sen saamiseksi erilleen muista partikkeleista ja kiinteään muotoon. Saostus tehtiin lisäämällä 1/10 -tilavuus 3 M Na-asetaatiliuosta (pH 5.2), kaksi tilavuutta jääkylmää absoluuttista etanolia ja jäähdyttämällä seosta -20 °C:ssa 30 minuuttia. DNA-saostuma eristettiin sentrifugoimalla 13 200 rpm:n nopeudella 20 minuuttia ja se pestiin kahdella tilavuudella jääkylmää 70-prosenttista etanolia (sentrifugoitiin kuten edellä). Supernatantti poistettiin ja etanolijäämät haihdutettiin lämpöhauteessa (45 °C, 10 minuuttia). Kuivattu DNA-saostuma liuotettiin käyttötarkoitukseen sopivaan määrään TE (pH 8.0) -puskuria tai vettä. [24; 25, s. A8.12 - A8.15.]

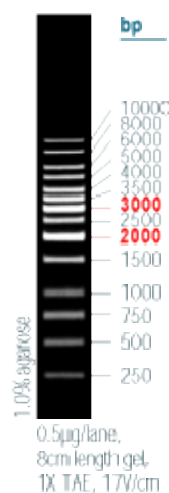
### *Fenoli-kloroformiuutto*

Fenoli-kloroformiuuttoa käytettiin proteiinien poistamiseen DNA-liuoksista. Liuos uutettiin lisäämällä yksi tilavuus fenoli-kloroformia (1:1) ja sekoitettiin voimakkaasti, kunnes muodostui emulsio. Se sentrifugoitiin (13 000 rpm, 5 minuuttia) ja vesifaasi otettiin talteen. Tarpeen vaatiessa prosessi toistettiin samalla tavalla yhdestä kolmeen kertaan. Fenolin poistamiseksi liuos uutettiin lopuksi pelkällä kloroformilla. [24; 25, s. A8.9 - A8.10.]

### *Agaroosigeelielektroforeesi (AGE)*

Agaroosigeelielektroforeesia käytettiin erikokoisten DNA-jaksojen erottamiseen ja tunnistamiseen. Agaroosigeeli valmistettiin DNA-jaksojen kokojen perusteella 0,6 - 1,5 %:seksi 1 x TAE- tai 0,5 x TBE-elektroforeesipuskuriin. Näytteitä, joissa oli 1/6-tilavuus 6 x DNA-näytepuskuriin, ajettiin 80 - 110 V:n jännitteellä 40 - 90 minuuttia. Ajon jälkeen geeliä värjättiin etidiumbromidiliuoksella (0,5 µgEtBr / ml) noin 10 minuuttia ja se kuvattiin Gel Doc 1000 (BIO-RAD) -laitteistolla.

DNA-kokostandardina käytettiin GeneRuler™ 1 kb DNA -standardia (Fermentas) (kuva 7).



Kuva 7. 1 kb GeneRuler™ DNA-kokostandardi [26]

### *Keittohajotus -menetelmä*

Solujen keittohajotus (engl. *boilate*) tehtiin seuraavasti: Eppendorf-putkeen otettiin 100 µl kasvustoa ja bakteerimassa sentrifugoitiin pelletiksi (13 200 rpm, 4 minuuttia). Supernatantti pipetoitiin pois ja pelletti suspensoitiin 100 µl:aan vettä. Putki siirrettiin 100 °C:n lämpöhauteeseen 10 minuutiksi, josta suoraan jäihin toiseksi 10 minuutiksi ja sentrifugoitiin samoin kuin edellä. Supernatantti otettiin talteen.

## **4.3 Kosmidikloonaus ja DNA-kirjaston valmistus**

### *4.3.1 Genomisen DNA:n eristäminen*

*Yersinia pseudotuberculosis* (*Y. pstb*) O:9 bakteerikantaa kasvatettiin Luria-Bertani (LB) -kasvatusalustalla (1 % tryptoni, 0,5 % hiivauute, 1 % NaCl, 15 % agar) yön yli 37 °C:n lämpötilassa. Maljalta poimittiin yksi pesäke 20 ml:aan LB-kasvatuslientä ja suspensiota kasvatettiin ravistelussa (200 rpm) yön yli huoneenlämpötilassa, 22 - 25 °C:ssa.

Bakteerisuspensiosta otettiin neljä 5 ml:n näytettä 15 ml:n falcon-putkiin ja DNA:n eristäminen tehtiin JETFLEX Genomic DNA Purification Kit / 500 (cat no. 600500, GENOMED) -protokollan mukaan.

Eristetyt *Y. pstb* O:9 genomiset DNA -näytteet (4 kpl) liuotettiin 200 µl:aan DNA-liuotuspuskuria ja niille mitattiin DNA-pitoisuudet BioPhotometer (Eppendorf) -laitteella sekä ne ajettiin 1 ja 3 µl:n näytteinä AGE:lla 1 % agarosigeelillä.

### *4.3.2 Sau3AI-digestio*

*Y. pstb* O:9 genomiselle DNA:lle tehtiin osittaisdigestio *Sau3AI* -restriktioentsyymillä (New England BioLabs) taulukon 2 osoittamalla reaktiolla.



Taulukko 2. *Sau3AI*-digestioreaktio

Reagenssi	Pitoisuus	μl
<i>Y. pstb</i> O:9 gen. DNA	~ 9 μg	36
10 x NEBuffer <i>Sau3AI</i>	1 x	10
100 x BSA	1 x	1
<i>Sau3AI</i>	2 U	1
H <sub>2</sub> O		52
Reaktiutilavuus		100

Digestioita valmistettiin kaksi erilaisen inkubointiajan omaavaa reaktiota; toista inkuboitii 1,5 tuntia (1) ja toista 10 minuuttia (2) 37 °C:ssa. Molemmat inaktivoitiin 65 °C:ssa 20 minuuttia, jonka jälkeen niistä ajettiin 10 μl:n näytteet AGE:lla 1 % agarosigeelillä.

Ligaatioon valittu digestiotuote uutettiin fenoli-kloroformilla, jonka jälkeen talteen otetulle yläfaasille tehtiin etanolisaostus. Näyte liuotettiin 15 μl:aan H<sub>2</sub>O, josta ajettiin 2 μl tarkistukseksi AGE:lla 0,8 % geelillä.

#### 4.3.3 *BfuCI*-digestiot

*Y. pstb* O:9 genomiselle DNA:lle tehtiin osittaisdigestio *BfuCI*-restriktioentsyymillä (New England BioLabs), joka on vastaava restriktioentsyymi *Sau3AI*:lle. Digestioita tehtiin kolme 500 μl:n reaktiutilavuuksista, joissa oli eri pitoisuus *BfuCI*-entsyymiä (taulukko 3).

Taulukko 3. *BfuCI*-digestioreaktiot

Reagenssi	Pitoisuus	$\mu\text{l}$
<i>Y. pstb</i> O:9 gen. DNA	~ 140 $\mu\text{g}$	100
10 x NEBuffer <i>BfuCI</i>	1 x	50
100 x BSA	1 x	10
<i>BfuCI</i>	0,4 / 0,8 / 1,6 U	1 / 2 / 4
H <sub>2</sub> O		339 / 338 / 336
Reaktiutilavuus		500

Putkia inkuboitin huoneenlämpötilassa 10 minuuttia ja inaktivointi tehtiin 80 °C:ssa 20 minuutissa. Digestiotuotteet ajettiin AGE:lla 0,8 % geelillä; 6  $\mu\text{l}$  / reaktio.

Ensimmäistä *BfuCI*-digestiota jatkettiin huoneenlämmössä lisäämällä siihen 1  $\mu\text{l}$  *BfuCI*-entsyymiä (4 U/ $\mu\text{l}$ ) ja inaktivoimalla (80 °C, 20 minuuttia) siitä 6  $\mu\text{l}$ :n näytteitä 10, 15, 20, 25 ja 30 minuutin kohdalla. Toista ja kolmatta *BfuCI*-digestiota jatkettiin lisäämällä 0,2  $\mu\text{l}$  *BfuCI*-entsyymiä (4 U/ $\mu\text{l}$ ) ja inkuboimalla huoneenlämmössä 5 minuuttia. Inaktivointi tapahtui samoin kuin edellä. Jatketut digestiot ajettiin AGE:lla 0,8 % geelillä; 6  $\mu\text{l}$  / reaktio.

#### 4.3.4 Sokerigradienttiajo

Halutulle *BfuCI*-digestiotuotteelle suoritettiin sokerigradienttiajo "Molecular Cloning, a laboratory manual" -kirjan, "Protocol 18: Partial Digestion of Eukaryotic DNA for Use in Genomic Libraries: Preparative Reactions" mukaan. [25, 2.81 - 2.83].

#### 4.3.5 *Y. pstb* O:9 genomisen DNA:n defosforylointi

Sokerigradienttiajon jälkeen osalle *BfuCI*-digeroidusta *Y. pstb* O:9 genomisesta DNA:sta tehtiin defosforylointi eli SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase, 1U/ $\mu\text{l}$ ; Fermentas) -käsittely seuraavasti:

*Bfu*CI-digestioseos (50 µl)  
 + 5 µl 10 x SAP -reaktiopuskuri  
 + 0,5 µl SAP

Seosta inkuboitii 1 tunti 37 °C:ssa ja inaktivoitiin 20 minuuttia 70 °C:ssa. Tuote uutettiin fenoli-kloroformilla, etanolisaostettiin ja liuotettiin 10 µl:aan H<sub>2</sub>O, josta ajettiin 2 µl:n (+ 3 µl H<sub>2</sub>O) näyte AGE:lla 1 % geelillä.

#### 4.3.6 *pHC79*-kosmidin käsittely

*pHC79*-kosmidille tehtiin kaksi digestiota *Bam*HI-restriktioentsyymillä (Fermentas) taulukossa 4 olevalla reaktiolla. Erona digestioilla oli, että toiselle tehtiin defosforylointi.

Taulukko 4. *Bam*HI-digestioreaktio.

Reagenssi	Pitoisuus	µl
<i>pHC79</i> -DNA	2,52 µg	30
10 x Buffer <i>Bam</i> HI	1 x	10
100 x BSA	1 x	1
<i>Bam</i> HI	5 U	0,5
H <sub>2</sub> O		58,5
Reaktiutilavuus		100

Digestioita inkuboitii 2 tuntia 37 °C:ssa ja inaktivoitiin 20 minuuttia 80 °C:ssa. Kummastakin digestiotuotteesta tehtiin veden kanssa seos (2 µl digestiotuotetta + 3 µl H<sub>2</sub>O) ja ne ajettiin AGE:lla 1 % geelillä.

Toiselle *Bam*HI-digestoidulle *pHC79*-kosmidille tehtiin defosforylointi seuraavalla tavalla:

*Bam*HI-digestioseos (< 100 µl)  
 + 10 µl 10 x SAP reaktiopuskuri  
 + 1 µl SAP

Seosta inkuboitiin 1 tunti 37 °C:ssa ja inaktivoitiin 20 minuuttia 70 °C:ssa. Tästä jatkettiin molemmilla *Bam*HI-digestioilla, joille tehtiin fenoli-kloroformiuutto ja talteen otetulle yläfaasille tehtiin etanolisaostus. Näytteet liuotettiin 10 µl:aan H<sub>2</sub>O ja molemmista ajettiin tarkistukseksi 1 µl (+ 3 µl H<sub>2</sub>O) AGE:lla 0,8 % geelillä.

#### 4.3.7 Ligaatiot

##### *Ligaatio 1*

*Sau*3AI / *Bfu*CI-käsitellylle *Y. pstb* O:9 genomiselle DNA:lle ja *Bam*HI-digestoidulle, SAP-käsitellylle pH79-kosmidille tehtiin huoneenlämpötilassa yön yli kestävä ligaatio T4 DNA ligaasilla (Fermentas) taulukon 5 mukaan:

Taulukko 5. T4 DNA -ligaatio

Reagenssi	Pitoisuus	µl
pH79	0,3 µg	6
10 x ligaatiopuskuri	1 x	1
T4 DNA ligaasi	5 U	1
<i>Y. pstb</i> gen. DNA	250 ng	2
Reaktiutilavuus		10

##### *Ligaatio 2*

*Bfu*CI-digestoidulle, SAP-käsitellylle *Y. pstb* O:9 genomiselle DNA:lle ja *Bam*HI-digestoidulle pH79-kosmidille tehtiin huoneenlämpötilassa yön yli kestävä ligaatio T4 DNA ligaasilla myös taulukon 5 mukaan.

#### 4.3.8 *In vitro* -pakkaus

*In vitro* -pakkaus tehtiin Packagene® Lambda DNA Packaging (cat no. K3152, Promega) -kitillä seuraavasti:

*E.coli* LE 392 -bakteerikantaa kasvatettiin LB -kasvatusalustalla yön yli 37 °C:n lämpötilassa. Maljalta poimittiin 1 pesäke 10 ml:aan LB -lientä, jossa oli 0,2 % maltoosia ja 10 mM MgSO<sub>4</sub>, ja bakteerisuspensiota kasvatettiin ravis-

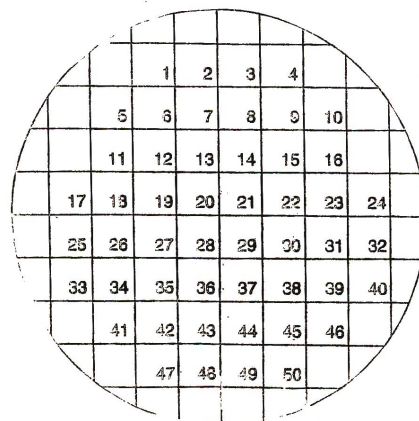
tuksessa (200 rpm) 37 °C:ssa yön yli. Kasvatuksesta otettiin 500 µl 50 ml:aan LB-maltoosi-MgSO<sub>4</sub> -lientä ja sitä kasvatettiin kuten edellä, kunnes OD<sub>600</sub> oli 0,77.

Ligaatioseos (kpl 4.3.7) lisättiin 50 µl:aan jäällä sulatettua ja nopeasti sentrifugoitua Packagene® Extract -liuosta. Seosta inkuboitettiin 3 tuntia huoneenlämpötilassa, jonka jälkeen siihen lisättiin 445 µl SM-puskuria [100 mM NaCl, 8 mM MgSO<sub>4</sub>, 50 mM Tris-Cl (pH 7,5), 0,01 % gelatiini] ja 25 µl kloroformia. Putkea sekoitettiin käänтелеvellä sitä ylösalaisin ja lopuksi seisotettiin kloroformin asettumiseksi pohjalle.

100 µl 1/10 SM-puskuriin laimennettua pakattua kosmidia lisättiin 100 µl:aan *E. coli* LE 392 -soluja ja annettiin kosmidin absorboitua 30 minuuttia 37 °C:ssa. Seos siirrostettiin LB-ampisilliini (100 µl/ml ampisilliini) -maljalle (malja 1) ja kasvatettiin yön yli 37 °C:ssa. Saadun pesäkemäärän mukaan lopuista kosmideista tehtiin 1/4 laimennos SM-puskuriin, jolloin kosmidiseosta oli 2 ml, ja se lisättiin 2 ml:aan *E. coli* LE 392 -soluja. Kosmidin annettiin jälleen absorboitua 37 °C:ssa 30 minuuttia ja seos maljattiin; 200 µl / LB-ampisilliini -malja. Maljoja 2 - 20 inkuboitettiin 37 °C:ssa yön yli.

#### 4.4 Kirjaston seulonta

Maljoilta 2 - 20 numeroitiin kaikki pesäkkeet ja ne laikutettiin (engl. *patching*) LB-ampisilliini-maljoille malliruudukon avulla (kuva 8) → 1 - 50 laikkua/malja. Maljoja inkuboitettiin 37 °C:ssa yön yli.



Kuva 8. Malliruudukko

Laikutetuista pesäkkeistä tehtiin numerojärjestyksessä 20 pesäkkeen pooleja. Kukin pooli tehtiin 15 ml:n falcon-putkeen ja se koostui 3 ml:sta LB-ampisilliinilientä. Putkia inkuboitiin ravistuksessa (200 rpm) yön yli 37 °C:ssa.

#### 4.4.1 Seulonta wzz-spesifisellä PCR:llä

Maljan 1 jokaiselle pesäkkeelle tehtiin fenoli-kloroformiuutto (pesäke suspensoitiin ensin 100 µl:aan vettä) ja wzz-geenin identifiointia varten monistettiin polymeerasiketjureaktion eli PCR:n avulla 418 emäsparin pituinen alue käyttämällä wzz-spesifisiä alukkeita ypf - 20120 ja ypr - 20538 [1]. PCR-ajossa käytettiin BIO-RADin iCycler -laitetta, seuraavaa reaktioseosta (taulukko 6) ja seuraavia reagensseja:

- DyNAzyme II DNA Polymerase, FinnZymes
- 10 x buffer for DyNAzyme DNA polymerase, FinnZymes
- dNTP Set 100 mM each, Fermentas
- Aluke 1 ypf - 20120, OliGold™ Eurogentec
- Aluke 2 ypr - 20538, OliGold™ Eurogentec.

*Taulukko 6. Reaktioseos*

Reagenssi	Pitoisuus	1 x reaktioseos
aluke 1	25 pmol	2,5 µl
aluke 2	25 pmol	2,5 µl
DyNAzyme II	1 U	0,5 µl
10 x DZ-puskuri	1 x	5 µl
10 mM dNTPs	0,3 mM	1,5 µl
H <sub>2</sub> O		33 µl

1 x reaktioseosta tehtiin 12-kertaisena (engl. *master mix*) ja sitä pipetoitiin 11 reaktioputkeen 45 µl. Jokaiseen putkeen lisättiin 5 µl templaatti-DNA:ta eli kutakin fenolikloroformiuutettua pesäkettä. Reaktiot ajettiin taulukossa 7 olevalla ajo-ohjelmalla ja PCR-tuotteet ajettiin AGE:lla 0,8 % geelillä; 10 µl/reaktiotuote.

Taulukko 7. Ajo-ohjelma [1]

alkudenaturaatio	94 °C	2 minuuttia
denaturaatio *	94 °C	30 s
annealing *	60 °C	30 s
ekstensio *	72 °C	30 s
loppuekstensio	72 °C	6 minuuttia
jäähdytys	4 °C	∞

\* Kohtaa "denaturaatio - annealing - ekstensio" suoritettiin 40 sykliä.

Jokaiselle poolille tehtiin keittohajotus-menetelmä ja niille ajettiin PCR:t samalla tavalla kuin edellä. Lisäksi käytettiin toista wzz-spesifistä alukeparia: Y.pseu F (TIB MOLBIOL) ja Y.pseu A (TIB MOLBIOL) [27], jotka monistavat 208 emäsparin pituista aluetta. Positiivisina kontrolleina käytettiin *Y. pstb* O:9 genomista DNA:ta (125 ng/µl), jota pipetoitiin 2 µl 3 µl:aan vettä sekä 1 µl 4 µl:aan poolista 1 otettuun näytteeseen. Negatiivisena kontrollina käytettiin vettä. PCR-tuotteet ja kontrollit ajettiin AGE:lla 1,5 % geelillä; 10 µl/reaktiotuote.

AGE-ajon jälkeen jokaisen positiivisen tuloksen antaneen poolin perusteella laikutetuista pesäkkeistä tehtiin viiden laikun pooleja. Myös maljan 1 pesäkkeet poolattiin. Näille kaikille tehtiin keittohajotus ja ne ajettiin PCR-laitteessa molemmilla alukepareilla ja AGE:lla kuten edellä.

Edelleen positiivisen tuloksen antaneen poolin perusteella laikutetuista pesäkkeistä tehtiin puhdasviljelmät 3 ml:aan LB-ampisilliini-lientä, ne keittohajotettiin ja niille ajettiin PCR:t sekä AGE.

wzz-positiivisten kloonien sisältämien kosmidien laikut maljattiin puhtasviljelmiksi LB-ampisilliini -maljoille ja inkuboinnin (yön yli 37 °C:ssa) jälkeen yksi pesäke siirrostettiin cryoputkeen, joka sisälsi 20 % glyserolia tryptoni-soija (TS) -liemessä, ja säilöttiin -70 °C syväjäähäpakkastimeen.

#### 4.4.2 Kosmidien eristys

wzz-positiivisten kloonien sisältämien kosmidien eristys tehtiin puhtasviljelmistä sekä E.Z.N.A™ Plasmid MiniPrep (D6943-02, OMEGA BIO-TEK) että Midiprep (D6904-03, OMEGA BIO-TEK) -kiteillä protokollan yksi mukaan ja eristetyt kosmidit ajettiin AGE:lla 0,8 % geelillä; 10 µl/näyte.

#### 4.4.3 Kosmidien karakterisointi

AGE-ajon perusteella eristetyille kosmideille tehtiin digestioita seuraavilla restriktioentsyymeillä ja taulukon 8 reaktiolla:

*EcoRV* (Fermentas), *EcoRI* (New England BioLabs), *BamHI* (Fermentas), *HindIII* (Fermentas), *Clal* (New England BioLabs) ja *PstI* (Fermentas).

Taulukko 8. Digestioreaktiot

Reagenssi	Pitoisuus	µl
DNA	20 - 50 ng	10 - 30
10 x Puskuri	1 x	10
Entsyymi	10 U	1 - 2
H <sub>2</sub> O		59 - 79,5
Reaktiutilavuus		100

Digestioita inkuboitin yön yli / 2 tuntia 37 °C:ssa ja inaktivoitiin 20 minuuttia 65 / 80 °C:ssa riippuen entsyymistä. Tuotteet etanolisaostettiin ja liuotettiin 10 µl:aan H<sub>2</sub>O:ta. Koko tuote ajettiin AGE:lla 1 % geelillä.



#### 4.5 Sekvensointi

Eristetyille kosmideille tehtiin sekvensointireaktioita taulukossa 9 olevilla pBR-1 (Oligomer) ja pBR-2 (Oligomer) -alukkeilla sekä PCR-reaktioissa käytetyillä Y.pseu F ja Y.pseu A -alukkeilla.

*Taulukko 9. Sekvensointireaktion pBR-1 ja pBR-2 alukkeiden tiedot*

Aluke	Sekvenssi (5' → 3')	accession n:o	geeni	5' paikka
pBR-1	ggcgaccacacccgtcctgtg	J01749	tet	355
pBR-2	cacgatgcgtccggcgtagag	J01749	tet	402

Sekvensointireaktioon pipetoiitiin 200 - 400 ng DNA:ta sekä 5 - 10 pmol aluketta 6 µl:n tilavuuteen.

Sekvensointi tehtiin Haartman-instituutin sekvensoinnin core -yksikössä.

## 5 TULOKSET JA TULOSTEN TARKASTELO

Tuloksissa tarkastellaan kosmidikloonauksen ja DNA-kirjaston valmistusta ja sen onnistumista. Kirjastosta seulonnan perusteella valitut kosmidit karakterisoiitiin alustavasti erilaisilla digestioilla ja sekvensoitiin.

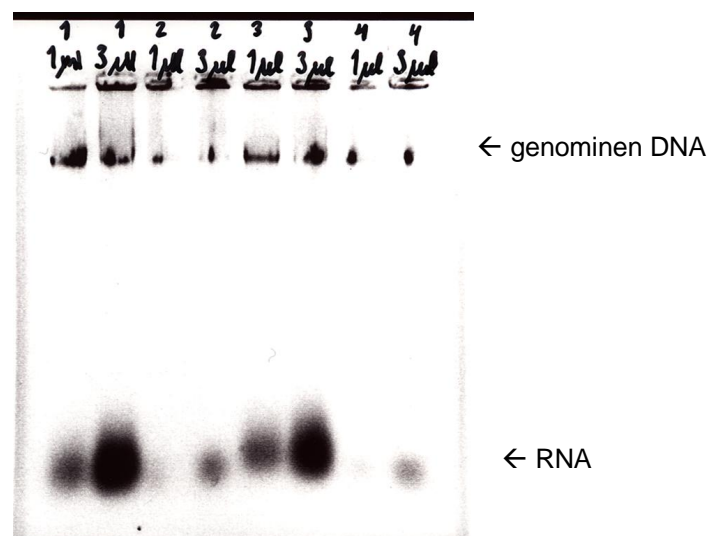
### 5.1 Kosmidikloonaus ja DNA-kirjaston valmistus

*Y. pestis* O:9 genomisen DNA eristettiin, digestoitiin ja ligoitiin digestoituun pH79-kosmidivektoriin. DNA-kirjaston saamiseksi ligoatituote pakattiin lambda-faagiin in vitro ja *E. coli* LE 392-solut infektoitiin pakkausreaktioseoksella.

Eristettyjen *Y. pestis* O:9 genomisten DNA -näytteiden pitoisuudet ja puhtaudet näkyvät taulukossa 10 ja niistä ajettut näytteet kuvassa 9.

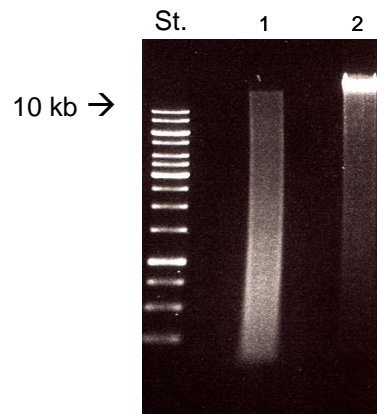
Taulukko 10. *Y. pestis* O:9 genomisten DNA-näytteiden pitoisuudet ja puhtaudet

Näyte	Pitoisuus: ng / $\mu$ l dsDNA	Puhtaus: 260 / 280
1	1405	1,81
2	1484	1,74
3	1163	1,80
4	1261	1,68



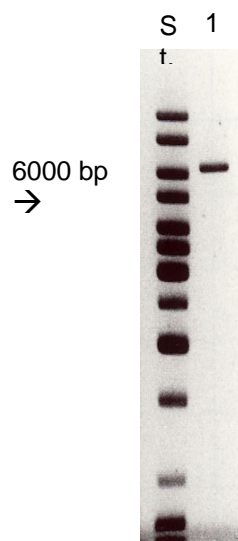
Kuva 9. *Y. pestis* O:9 genomiset 1 ja 3  $\mu$ l:n DNA -näytteet 1 % agarosigeelillä

Digestioon valittiin näyte 1, sillä se oli taulukon 9 ja kuvan 9 perusteilla hyvänlaatuista eli pitoisuudeltaan hyvää ja puhdasta. *Y. pstb* O:9 genomisen DNA digestioitiin *Sau3AI*-restriktioentsyymillä kahdella eri reaktiolla; toisessa inkubointiaika oli 1,5 tuntia ja toisessa 10 minuuttia. Kuvassa 10 havaittiin molemmat digestiotuotteet, joista radalla 1 on 1,5 tunnin ja radalla 2 10 minuutin digestio. Ligaatioon valittiin 10 minuutin digestiotuote, sillä kuvan perusteella se ei ollut digestoitunut liikaa vaan haluttua, noin 20 - 50 kb:n koosta genomista DNA:ta oli vielä jäljellä.



Kuva 10. *Y. pstb* O:9 genomisen DNA:n *Sau3AI*-digestio (st. = DNA-kokostandardi, kuva 5)

Kosmidille pHC79 tehtiin *Bam*HI-digestio ja kuvassa 11 se nähdään vyöhykkeenä noin 6500 emäsparin kohdalla.



Kuva 11. pHC79-kosmidin *Bam*HI-digestio (1)

*Y. pestis* O:9 genomisen DNA:n *Sau3AI*-digestiotuote sekä *Bam*HI-digestoitu, SAP-käsitelty pH79-kosmidi uutettiin fenoli-kloroformilla ja etanolisaostettiin. Kuvassa 12 molemmat tuotteet havaittiin selkeästi agarosigeelikuvasta, joten materiaalit ligaatiota varten olivat valmiina.



Kuva 12. *Y. pestis* O:9 genomisen DNA:n *Sau3AI*-digestion (1) sekä pH79-kosmidin *Bam*HI-digestion tarkistukset AGE:lla ennen ligaatiota (2)

Ligaation jälkeen suoritettiin *in vitro* -pakkaus Promega Packagene® Lambda DNA Packaging -kitillä. Jotta saatiin käsitys siitä, miten pakkausreaktio oli onnistunut, infektoitiin *E. coli* LE 392 -soluja 10 µl:lla pakkausreaktioseosta (kokonaistilavuus 500 µl) ja viljeltiin maljalle 1, jossa kasvoi inkuboinnin jälkeen 11 pesäkettä. Tämän perusteella laskettiin, että lopusta pakkausreaktioseoksesta tehtiin ¼-laimennos SM-puskuriin ja absorption jälkeen seos maljattiin 19 maljalle (maljat numeroitiin 2 - 20).

## 5.2 Kirjaston seulonta

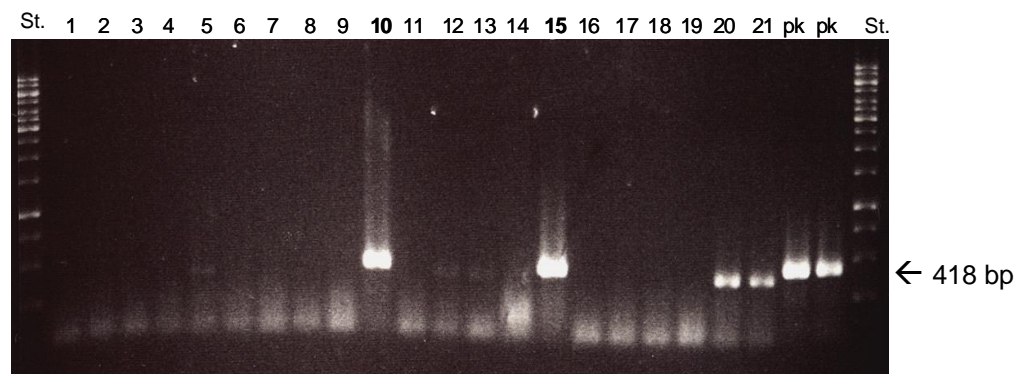
Kosmidikirjasto seulottiin *wzz*-spesifisellä PCR:llä ja positiivisen tuloksen antaneet kosmidit karakterisoitiin erilaisilla digestioilla.

Maljoilta 2 - 20 saatiin 422 pesäkettä ja ne laikutettiin LB-ampisilliini-maljoille. Laikutetuista pesäkkeistä tehtiin numerojärjestyksessä 20 pesäkkeen pooleja, joita tuli 21 putkellista.

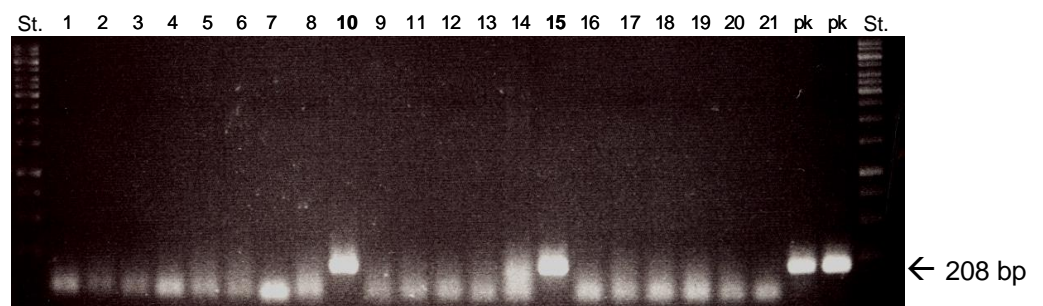
### 5.2.1 *wzz*-spesifinen PCR

Maljan 1 jokaiselle pesäkkeelle tehtiin fenoli-kloroformiuuton jälkeen *wzz*-spesifinen PCR, jota varten monistettiin 418 emäsparin pituinen alue käyttäen *wzz*-spesifisiä alukkeita *ypr* - 20120 ja *ypr* - 20538, mutta positiivisia tuloksia ei saatu.

Täten jokaiselle 21 poolille tehtiin fenoli-kloroformiuuton sijasta keittohajotusmenetelmä ja niille ajettiin PCR:t samoin kuin edellä sekä toista *wzz*-spesifistä alukeparia käyttäen (*Y.pseu* F ja *Y.pseu* A), jotka monistavat 208 emäsparin pituista aluetta. Kuvista 13 ja 14 varmoja positiivisia reaktioita havaittiin kaksi; poolit 10 ja 15, jotka molemmat antoivat positiivisen tuloksen molemmilla alukepareilla. Kuvien perusteella jatkotutkimuksiin valittiin myös poolit 5, 12, 13, 20 ja 21, joista havaittiin vain toisella alukeparilla syntynyttä PCR-tuotetta ja joka oli hiukan pienempää kuin positiivinen kontrolli.



Kuva 13. Poolien 1 - 21 PCR:t alukeparilla *ypr* - 20120 ja *ypr* - 20538 (pk = positiivinen kontrolli)



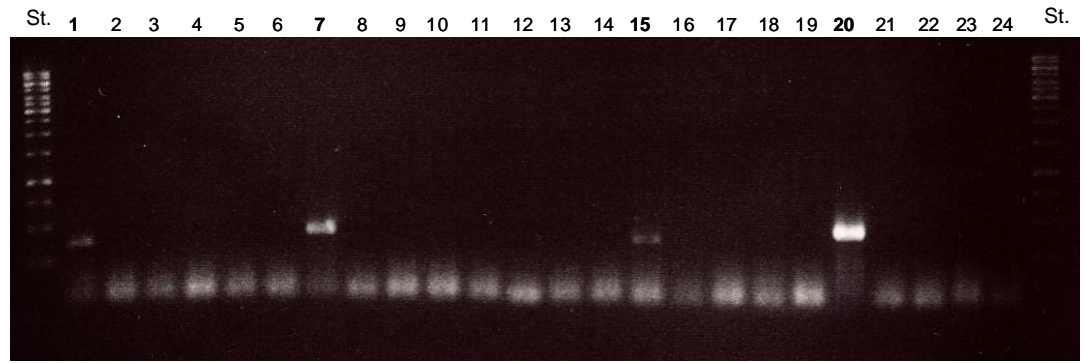
Kuva 14. Poolien 1 - 21 PCR:t alukeparilla *Y.pseu* F ja *Y.pseu* A

Positiivisen tuloksen antaneiden seitsemän poolin perusteella laikutetuista pesäkkeistä tehtiin viiden laikun pooleja (kahteen viimeiseen pooliin kuusi laikkua). Myös maljan 1 pesäkkeet poolattiin kahdeksi pooliksi ja näin ollen pooleja oli 30. Taulukossa 11 esitetään selvennykseksi poolien sisältämät pesäkkeet.

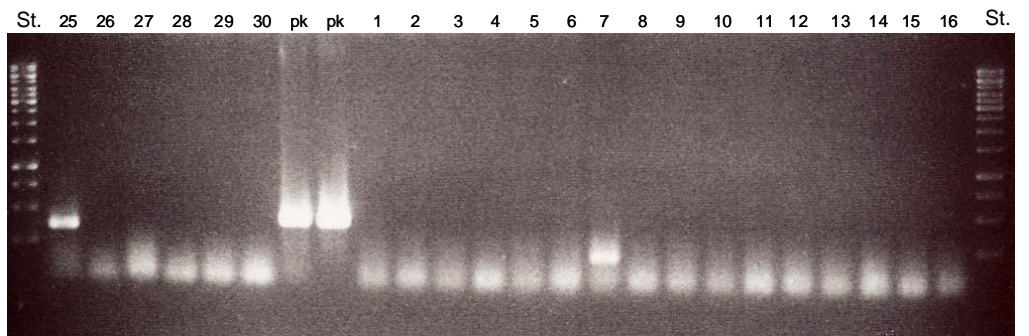
*Taulukko 11. Poolien 1 - 30 sisältämät pesäkkeet*

Poolit:	Pesäkkeet:	Poolit:	Pesäkkeet:
1	81 - 85	16	256 - 260
2	86 - 90	17	281 - 285
3	91 - 95	18	286 - 290
4	96 - 100	19	291 - 295
5	181 - 185	20	296 - 300
6	186 - 190	21	381 - 385
7	191 - 195	22	386 - 390
8	196 - 200	23	391 - 395
9	221 - 225	24	396 - 400
10	226 - 230	25	401 - 405
11	231 - 235	26	406 - 410
12	236 - 240	27	411 - 416
13	241 - 245	28	417 - 422
14	246 - 250	29	1 - 5
15	251 - 255	30	6 - 11

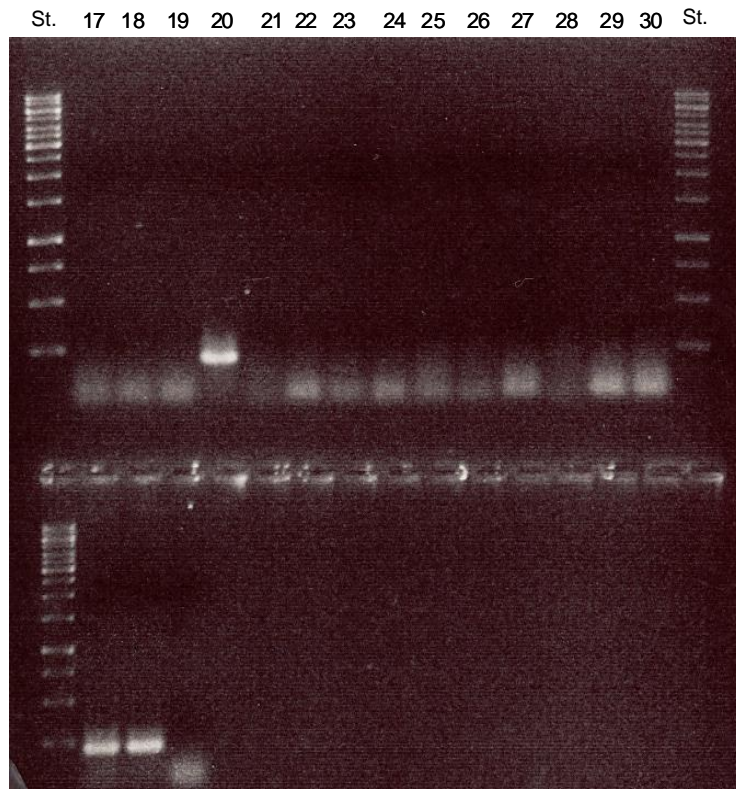
Jokaiselle poolille tehtiin keittohajotus ja ne ajettiin PCR-laitteessa molemmilla alukepareilla ja syntyneet PCR-tuotteet analysoitiin AGE:lla kuten edellä. Kuvista 15, 16 ja 17 positiivisiksi reaktioiksi, alukeparilla ypf - 20120 ja ypr - 20538, havaittiin poolit 1, 7, 15, 20 ja 25 sekä alukeparilla Y.pseu F ja Y.pseu A poolit 7 ja 20. Vaikka vain poolit 7 ja 20 antoivat positiivisen tuloksen molemmissa PCR-ajoissa, jatkettiin työskentelyä myös poolien 1, 15 ja 25 kanssa.



Kuva 15. Poolien 1 - 24 PCR:t alukeparilla *ypf* - 20120 ja *ypr* - 20538



Kuva 16. Poolien 25 - 30 PCR:t alukeparilla *ypf* - 20120 ja *ypr* - 20538 sekä poolien 1 - 16 PCR:t alukeparilla *Y.pseu F* ja *Y.pseu A*

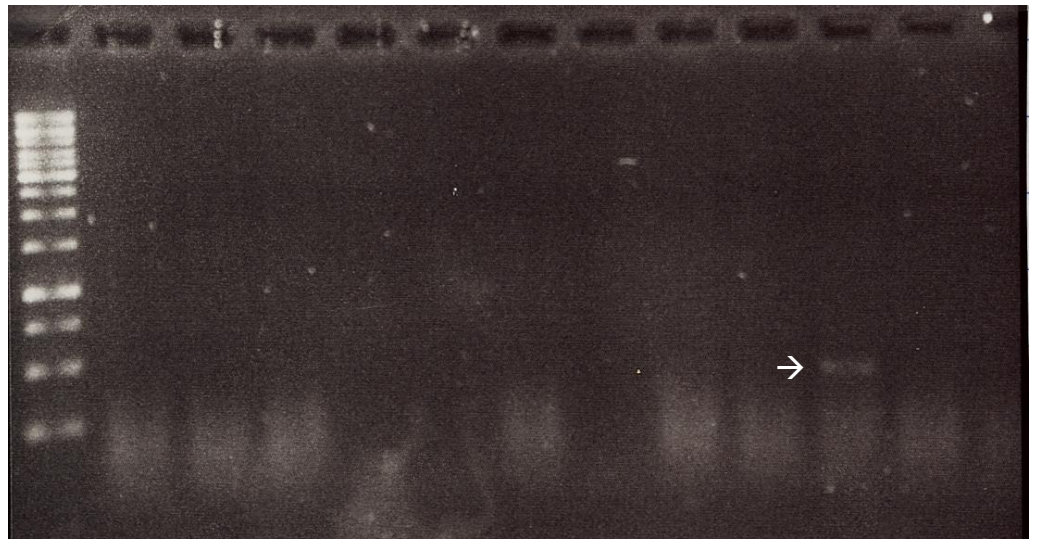


St. pk pk nk

Kuva 17. Poolien 17 - 30 PCR:t alukeparilla *Y.pseu F* ja *Y.pseu A* (nk = negatiivinen kontrolli)

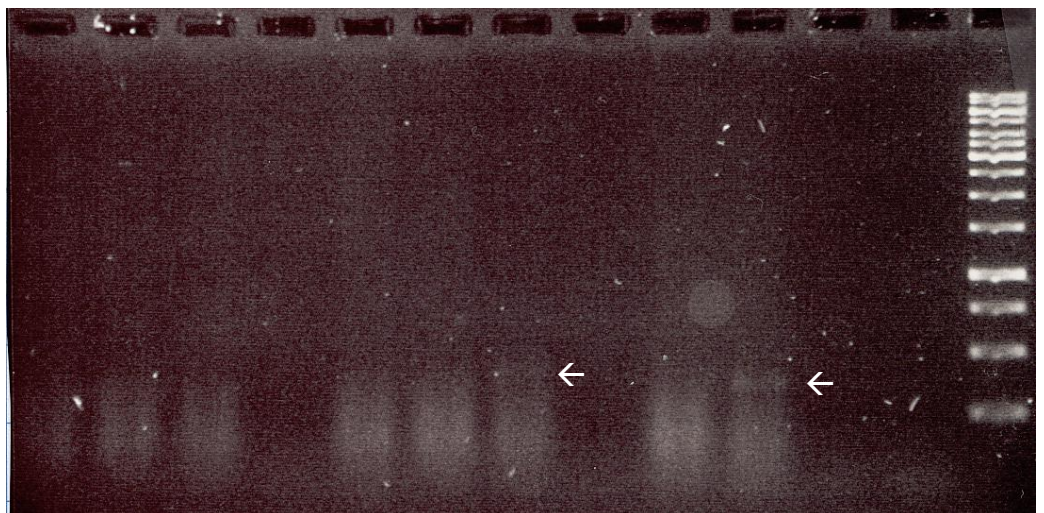
Poolien 1, 7, 15, 20 ja 25 perusteella laikutetuista pesäkkeistä tehtiin yksittäiset viljelmät LB-ampisilliini -liemeen. Jokaiselle viljelmälle tehtiin edelleen keittohajotus ja ne ajettiin PCR-laitteella sekä AGE:lla kuten edellä. Kuvissa 18, 19, 20 ja 21 havaittiin heikosti molemmilla alukepareilla positiivisia reaktioita; molemmilla alukkeilla tehtynä näytteet 299 ja 402 sekä ypf - 20120 ja ypr - 20538 -alukkeilla näyte 195.

St. 81 82 83 84 85 191 192 193 194 195 251 252



Kuva 18. Viljelmien 81 - 252 PCR:t alukeparilla ypf - 20120 ja ypr - 20538

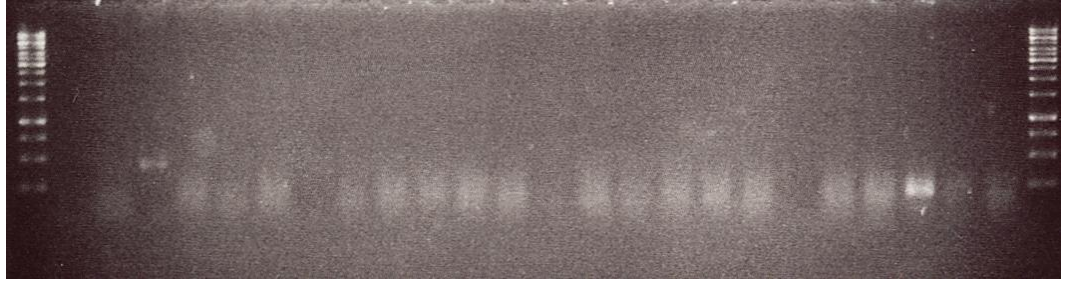
253 254 255 296 297 298 299 300 401 402 403 404 St.



Kuva 19. Viljelmien 253 - 404 PCR:t alukeparilla ypf - 20120 ja ypr - 20538

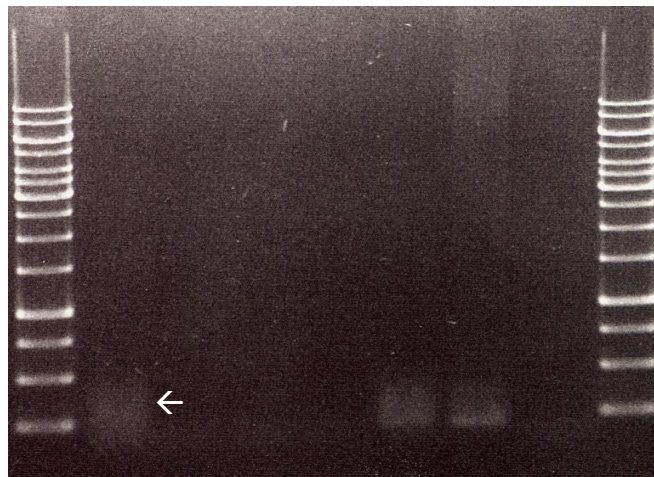


St. 405 pk 81 82 83 84 85 191 192 193 194 195 251 252 253 254 255 296 297 298 299 300 401 St.



Kuva 20. Viljelmän 405 PCR-tuote alukeparilla ypf - 20120 ja ypr - 20538 sekä viljelmien 81 - 401 PCR:t alukkeilla Y.pseu F ja Y.pseu A

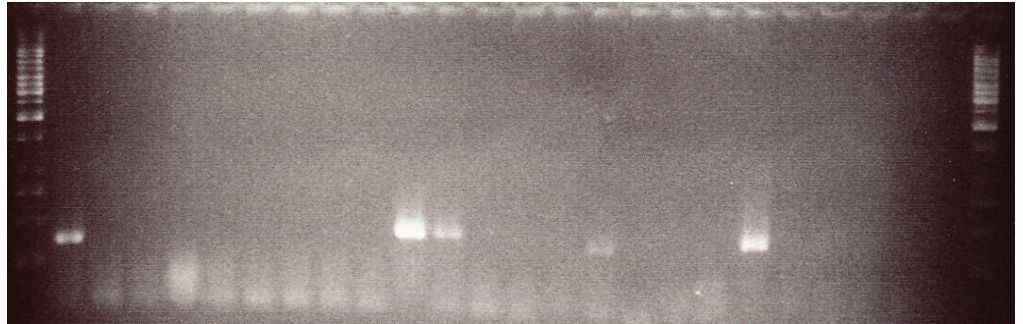
St. 402 403 404 405 pk pk nk St.



Kuva 21. Viljelmien 402 - 405 PCR:t alukeparilla Y.pseu F ja Y.pseu A

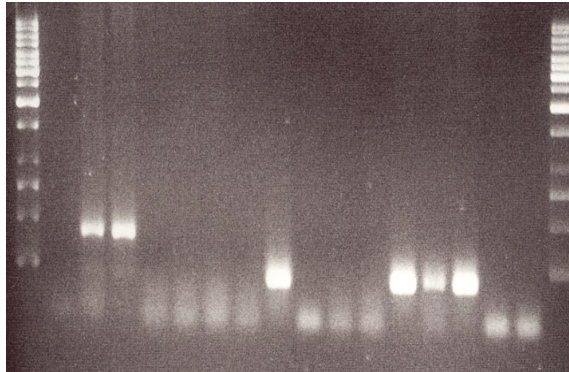
Koska näytteet näkyivät heikosti, jos ollenkaan, tehtiin kaikille 422 pesäkkeelle uudet laikutukset ja niistä uudet puhdasviljelmät edellä oleville näytteille. PCR-ajot suoritettiin niin, että alukkeilla ypf - 20120 ja ypr - 20538 ajettiin kaikki näytteet mutta alukkeilla Y.pseu F ja Y.pseu A ajettiin vain näytteet 191 - 195 sekä 296 - 300, sillä muut olivat jo antaneet joko selvästi positiivisen tuloksen tai ei mitään. Kuvissa 22 ja 23 nähtiin näytteiden 81, 195, 251, 255 ja 299 antama positiivinen tulos alukeparilla ypf - 20120 ja ypr - 20538 sekä näytteiden 195, 299 ja 300 alukkeilla Y.pseu F ja Y.pseu A.

St. 81 82 83 84 85 191 192 193 194 195 251 252 253 254 255 296 297 298 299 300 401 402 403 404 St.



Kuva 22. Viljelmien 81 - 404 PCR:t alukeparilla ypf - 20120 ja ypr - 20538

St. 405 pk pk 191 192 193 194 195 296 297 298 299 300 pk rk rk



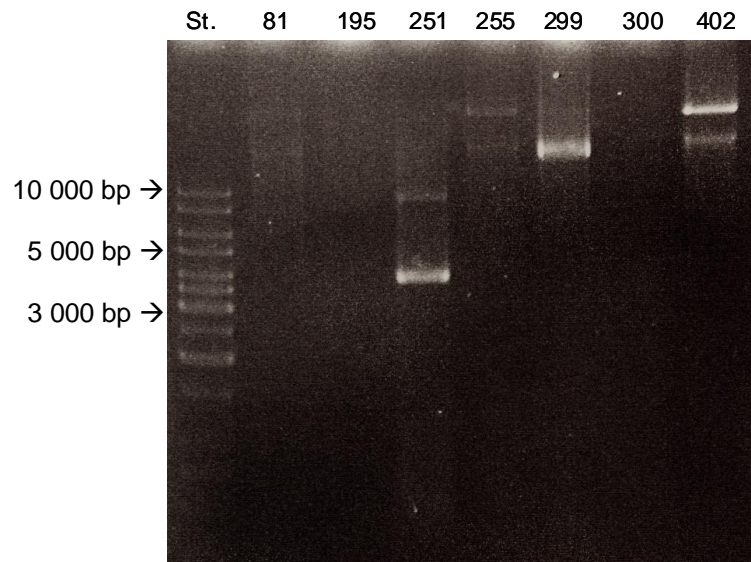
Kuva 23. Viljelmän 405 PCR alukeparilla ypf - 20120 ja ypr - 20538 sekä viljelmien 6 - 10 ja 16 - 20 PCR:t alukkeilla Y.pseu F ja Y.pseu A

### 5.2.2 Kosmidien karakterisointi

Näiden kaikkien PCR-tulosten perusteella saatujen wzz-positiivisten kloonien sisältämien kosmidien laikut (81, 195, 251, 255, 299, 300 ja 402) maljattiin puhtasviljelmiksi LB-ampisilliini -maljoille. Jokaisesta puhtasviljelmästä tehtiin kosmidin eristys E.Z.N.A™ Plasmid MiniPrep -kitillä ja niille mitattiin spektrofotometrillä pitoisuudet ja puhtaudet (taulukko 12) sekä ajettiin AGE:lla (kuva 24).

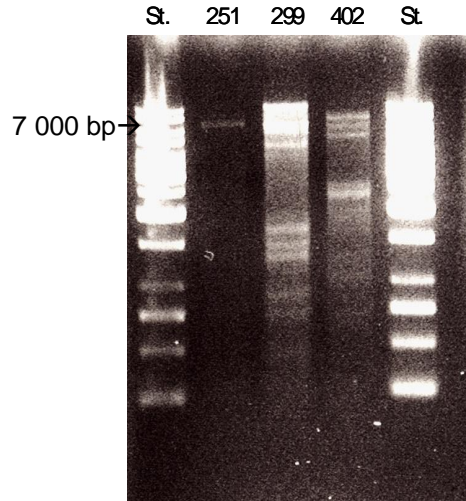
Taulukko 12. Eristettyjen kosmidien pitoisuudet ja puhtaudet

Näyte	Pitoisuus: ng / $\mu$ l dsDNA	Puhtaus: 260 / 280
81	16	1,68
195	16	2,05
251	49	1,70
255	25	1,69
299	35	1,80
300	23	2,23
402	32	1,81



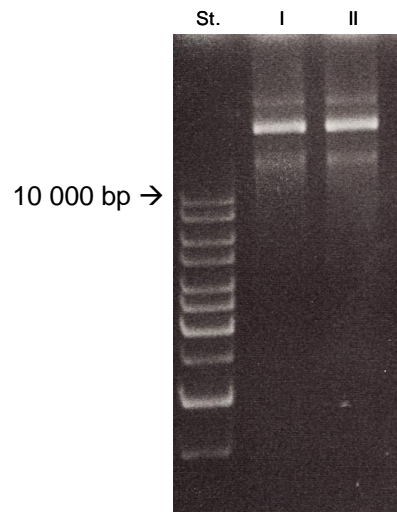
Kuva 24. Eristetyt kosmidit 0,8 % agarosigeelillä

Geeliajon perusteella kosmideille 251, 299 ja 402 tehtiin alustava karakterisointi digestoimalla ne *EcoRV*-restriktioentsyymillä (kuva 25). Alustavan karakterisoinnin tarkoituksena oli saada useita samankokoisia vyöhykkeitä, jotta saataisiin tietoa kosmidien inserteistä ja siitä, kuinka ne ovat ryhmittyneet *wzz*-geenin lähistölle. Tämä karakterisointi ei antanut juuri minkäänlaista tietoa siitä, että kosmidien 251, 299 ja 402 insertit olisivat olleet samalta alueelta, sillä niillä oli vain yksi yhteinen vyöhyke noin 7000 bp:n kohdalla.

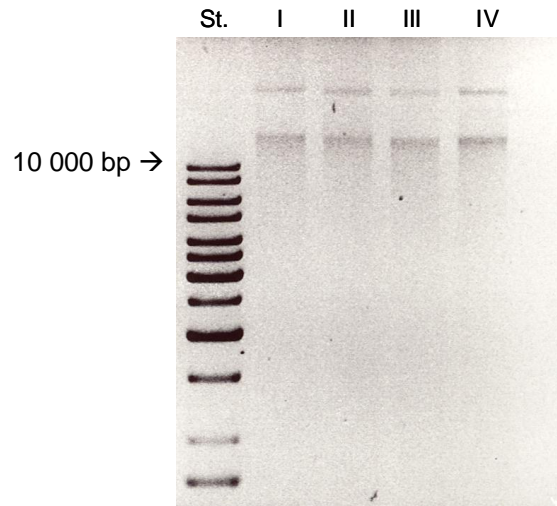


Kuva 25. *EcoRV*-digestiot näytteille 251, 299 ja 402

Kosmideille 299 ja 195 tehtiin vielä E.Z.N.A<sup>TM</sup> Plasmid MidiPrep, sillä kosmidia haluttiin eristää suurempi määrä. Näytteelle 299 tehtiin kaksi rinnakkaista eristystä (kuva 26) ja 195:lle neljä (kuva 27). Taulukossa 13 esitetään 299-kosmidin ja taulukossa 14 195-kosmidin pitoisuudet ja puhtaudet.



Kuva 26. Eristetyt 299-kosmidit



Kuva 27. Eristetyt 195-kosmidit

Taulukko 13. 299-kosmidin pitoisuudet ja puhtaudet

Näyte	Pitoisuus: ng / $\mu$ l dsDNA	Puhtaus: 260 / 280
I	21	1,73
II	20	1,72

Taulukko 14. 195-kosmidin pitoisuudet ja puhtaudet

Näyte	Pitoisuus: ng / $\mu$ l dsDNA	Puhtaus: 260 / 280
I	35	1,01
II	25	1,11
III	34	1,00
IV	32	0,94

Alustavaa karakterisointia käytettiin nyt 299- ja 195-kosmideille, joille tehtiin digestioreaktiot kuudella eri restriktioentsyymillä, sillä karakterisointi on sitä varmempaa mitä enemmän erilaisia restriktiodigestioita tehdään. Digestioihin käytettiin restriktioentsyymejä *EcoRV* (1), *EcoRI* (2), *BamHI* (3), *HindIII* (4), *Clal* (5) ja *PstI* (6). Digestiotuotteita ei havaittu AGE-geelillä. Digestiot olisi toistettu mutta siitä luovuttiin, koska samaan aikaan sekvensoitavista näytteistä saatiin sellaista tietoa, että se olisi ollut turhaa.

### 5.3 Kosmidien sekvensointi

Eristetyille kosmideille tehtiin sekvensointireaktioita alukkeilla pBR-1, pBR-2, Y.pseu F ja Y.pseu A. Alukkeet pBR-1 ja pBR-2 kiinnittyvät kloonausvektorin *BamHI* -katkaisukohtaan molemmiin puolin ja Y.pseu F sekä Y.pseu A ovat *wzz*-geenin alukkeita, joilla varmistettiin kyseenomaisen geenin olemassaolo sekvenssissä. 299-kosmidia sekvensoitiin kaikkien alukkeiden avulla, 195-kosmidia vain alukkeilla pBR-1 ja pBR-2 sekä 251-, 255- ja 402-kosmidit ainoastaan alukkeella pBR-1. Liitteessä 2 ovat kosmidille 299 tehdyt sekvenssit, liitteessä 3 kosmidin 195 sekvenssit ja liitteissä 4, 5 ja 6 kosmidien 251, 255 sekä 402 sekvenssit. Kaikki sekvenssit ovat elektroferogrammi-muodossa.

Alukkeilla pBR-1 ja pBR-2 saatuja sekvenssejä verrattiin geenipankin (NCBI) *Y. pstb* -kantojen DNA-sekvensseihin (taulukot 15, 16, 17 ja 18). Kosmidin 251 insertille ei löydetty osuvia *Y. pstb*:n kannoista.

Taulukko 15. Alukkeilla pBR-1 ja pBR-2 kosmidista 299 saatujen sekvenssien vertailu geenipankissa oleviin *Y. pstb* -sekvensseihin

<u>kanta</u> *	<u>accession n:o</u>	pBR-1 sekvenssiosumat		pBR-2 sekvenssiosumat	
		<u>geenit</u> ***	<u>genomin alue</u> **	<u>geenit</u>	<u>genomin alue</u>
YP III	CP000950	YPK_3170 ( <i>ushA</i> )	3465565 - 3466515	-	ei osumia
IP 31758	CP000720	<i>ushA</i>	3411367 - 3412318	-	ei osumia
PB1/+	CP001048	YPTS_1064 ( <i>ushA</i> )	1207482 - 1206532	-	ei osumia
IP 32953	BX936398	YBTB1018 ( <i>ushA</i> )	1224939 - 1223989	-	ei osumia

\* *Y. pstb* kanta; \*\* osuman paikka genomisessa sekvenssissä; \*\*\* alueella sijaitsevat geenit.

Taulukko 16. Alukkeilla pBR-1 ja pBR-2 kosmidista 195 saatujen sekvenssien vertailu geenipankissa oleviin *Y. pstb* -sekvensseihin

<u>kanta</u>	<u>accession n:o</u>	pBR-1 sekvenssiosumat		pBR-2 sekvenssiosumat	
		<u>geenit</u>	<u>genomin alue</u>	<u>geenit</u>	<u>genomin alue</u>
YP III	CP000950	YPK_1301	1431244 - 1432162	YPK_0092	107004 - 106426
IP 31758	CP000720	<i>xseA</i>	1405652 - 1406570	<i>dppF</i>	4588471 - 4589049
PB1/+	CP001048	YPTS_2942	3266359 - 3265436	YPTS_4054	4531165 - 4531743
IP 32953	BX936398	<i>xseA</i>	3348875 - 3347952	<i>dppE</i>	4584366 - 4584944

*Taulukko 17. Alukkeella pBR-1 kosmidista 255 saadun sekvenssin vertailu geenipankissa oleviin Y. pstb -sekvensseihin*

pBR-1 sekvenssiosumat			
<u>kanta</u>	<u>accession n:o</u>	<u>geenit</u>	<u>genomin alue</u>
YP III	CP000950	-	ei osumia
IP 31758	CP000720	YpsIP31758_4058	4572458 - 4573376
PB1/+	CP001048	YPTS_4042	4515177 - 4516083
IP 32953	BX936398	YPTB3827	4568558 - 4569254

*Taulukko 18. Alukkeella pBR-1 kosmidista 402 saadun sekvenssin vertailu geenipankissa oleviin Y. pstb -sekvensseihin*

pBR-1 sekvenssiosumat			
<u>kanta</u>	<u>accession n:o</u>	<u>geenit</u>	<u>genomin alue</u>
YP III	CP000950	-	ei osumia
IP 31758	CP000720	YpsIP31758_3697	4171709 - 4170621
PB1/+	CP001048	-	ei osumia
IP 32953	BX936398	-	ei osumia



Alukkeeseen pBR-1 avulla kosmidista 299 saadulla vajaan 1000 emäsparin sekvenssillä saatiin osumat neljään *Y. pstb* genomiseen sekvenssiin, jotka sisältävät *ushA*-geenialueen (taulukko 15). Tämän geenin tiedetään sijaitsevan useimmissa yersinia-bakteereissa O-antigeeni geeniklusterin lähellä (kuva 3, s. 9) [5], noin 4000 emäsparia *wzz*-geenistä osoittaen, että kosmidi 299 sisältää ainakin O-antigeeni geeniklusterin loppupään, etenkin kun *wzz*-spesifinen PCR oli positiivinen. Alukkeella pBR-2 saatu sekvenssi ei antanut yhtään osumaa näistä genomeista.

Taulukoissa 16 -18 on esitetty kosmidien 195, 255 ja 402 osumat ja niistä selviää, että ne eivät sijaitse genomeissa sillä alueella, jolla O-antigeeni geeniklusteri sijaitsee.

Myös kosmidin 195 osalta huomattiin, että alukkeiden pBR-1 ja pBR-2 antamien sekvenssien kohdat kussakin kannassa olivat liian kaukana toisistaan. Nämä huomiot alkoivat herättää epäilyjä, että insertit olivat sisältäneet monta lyhyttä *Sau3AI*-digestiotuotetta, jotka olivat ligoituneet toisiinsa muodostaen pitkiä, jopa 35 - 50 kb:n pituisia, ligaatiotuotteita.

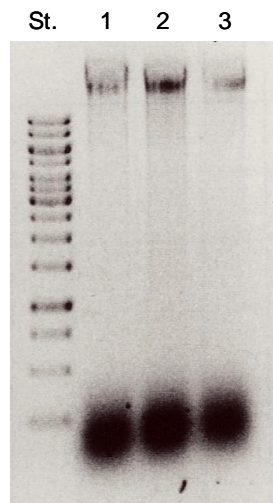
Kosmidin 299 osaltakaan sekvensointityötä ei jatkettu, sillä epäilyt digestiotuotteiden ligoitumisesta keskenään heräsivät tämänkin kosmidin kohdalla.

## 5.4 Uuden genomisen kosmidikirjaston valmistus

Sekvensointitulosten jälkeen työtä alettiin tehdä alusta niin, että *Y. pstb* O:9 genomisen DNA:n lyhyet *Sau3AI*-digestiotuotteet saataisiin ennen ligaatiota poistettua tai ainakin vähennettyä. Sitä varten eristetylle *Y. pstb* O:9 genomiselle DNA:lle tehtiin uudet digestiot, DNA-fragmenttien erottelu sokerigradienttiajolla ja ligaatiot kahdella eri tavalla.

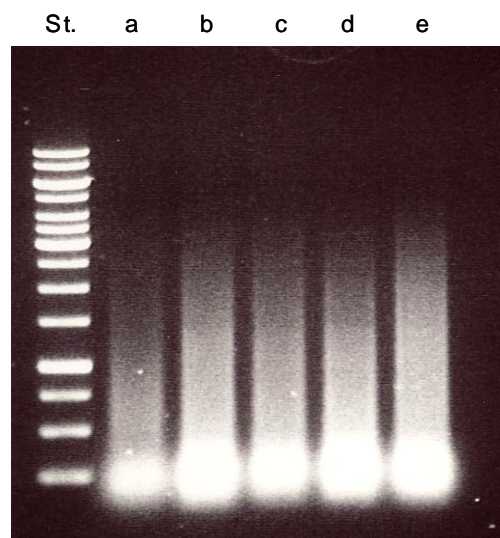
### 5.4.1 *BfuCI*-digestiot

Digestioita tehtiin *BfuCI*-restriktioentsyymillä (jonka spesifisyys on sama kuin *Sau3AI*:n) käyttämällä kolmea eri entsyymipitoisuutta. Digestoidut DNA:t (1, 2 ja 3) on esitetty kuvassa 28.

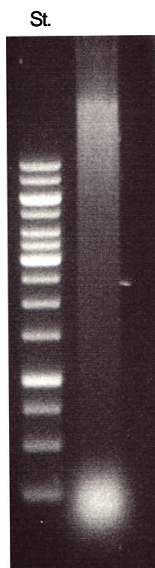


Kuva 28. *Y. pestis* O:9 genomisen DNA:n *BfuCI*-digestiot 1, 2 ja 3

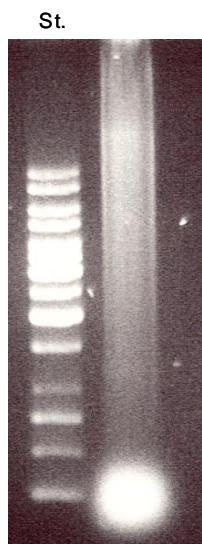
Kuvasta huomattiin digestioiden jääneen vajaiksi, joten niitä jatkettiin yksitellen. Ensimmäistä (1) *BfuCI*-digestiota jatkettiin lisäämällä siihen 4 U *BfuCI*-entsyymiä ja siitä otettiin 10 (a), 15 (b), 20 (c), 25 (d) ja 30 (e) minuutin kohdalla näytteet, jotka inaktivoitiin heti. Kuvasta 29 havaittiin jokaisen digestion menneen yli halutusta eli epäonnistuneen. Toista (2) *BfuCI*-digestiota sen sijaan jatkettiin lisäämällä 0,8 U entsyymiä ja kuvasta 30 nähtiin sen onnistuneen erinomaisesti. Tämän vuoksi kolmatta (3) *BfuCI*-digestiota jatkettiin samoin kuin toista ja se myös onnistui hyvin (kuva 31).



Kuva 29. Ensimmäinen jatkettu *BfuCI*-digestio



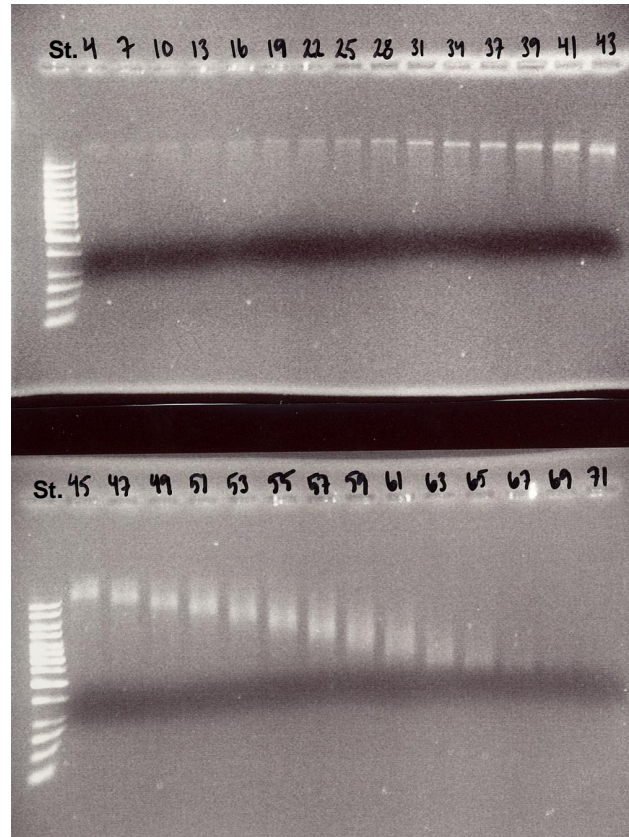
Kuva 30. Toinen jatkettu *BfuCI*-digestio



Kuva 31. Kolmas jatkettu *BfuCI*-digestio

#### 5.4.2 Sokerigradienttiajo

Digestiotuotteet 2 ja 3 valittiin sokerigradienttiajoon. Kuvasta 32 nähtiin selvästi, että *BfuCI*-digestoidut DNA:t erottuivat gradientissa kokonsa mukaan. Kuvan perusteella työtä jatkettiin fraktioilla 1 - 41, sillä niissä DNA:n koko oli yli 10 kb.



Kuva 32. Osa sokerigradienttiajon fraktioista 0,6 % agarosigeelillä

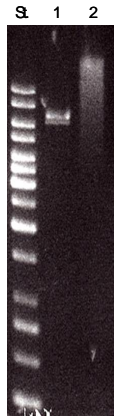
Fraktiot 1 - 41 yhdistettiin, dialysoitiin, butanoliuutettiin ja etanolisaostettiin. Kuvasta 33 tuote havaitaan selkeänä vyöhykkeenä, joka on pääasiassa noin 20 kb:n kokoista.



Kuva 33. Sokerigradienttiajon jälkeen dialysoitu, butanoliuutettu ja etanolisaostettu BfuCI-digeroitu *Y. pstb* O:9 genominen DNA

### 5.4.3 Ligaatiot ja *in vitro* -pakkaus

Ligaatio 1 tehtiin kuten edellä eli *Bfu*CI-käsitellylle *Y. pstb* O:9 genomiselle DNA:lle ja *Bam*HI-digestoidulle, SAP-käsitellylle pH79-kosmidille. Sen sijaan ligaatio 2 tehtiin *Bfu*CI-digestoidulle, SAP-käsitellylle *Y. pstb* O:9 genomiselle DNA:lle ja *Bam*HI-digestoidulle pH79-kosmidille (kuva 34). Tällä menetelmällä haluttiin ehkäistä digestoitujen DNA-palasiin ligaatioita keskenään.



Kuva 34. *Bam*HI-digestoidun pH79-kosmidin (1) ja SAP-käsitellyn *Y. pstb* O:9 genomisen DNA:n (2) tarkistus AGE:lla 1 % geelillä

Molemmat ligaatiotuotteet pakattiin erikseen *in vitro* ja jotta saatiin käsitys näiden pakkausreaktioiden onnistumisista, infektoitiin erikseen *E. coli* LE 392 -soluja 10 µl:lla molempia pakkausreaktioseoksia (kokonaistilavuus 200 µl/putki). Infektoidut solut viljeltiin maljoille 1.1 (sisältää ligaatiotuotteen 1) ja 2.1 (sisältää ligaatiotuotteen 2), joissa kasvoi inkuboinnin jälkeen 40 ja 28 pesäkettä. Näiden tulosten perusteella laskettiin, että jäljelle jääneessä 250 µl:ssa, kumpaakin pakkausseosta, kasvaisi noin 1000 ja noin 700 pesäkettä/kloonina, joten lopuista pakkausreaktioseoksista tehtiin ¼-laimennokset faagipuskuriin [20 mM Tris-HCl (pH 7,4), 100 mM NaCl, 10 mM MgSO<sub>4</sub>]. Absorption jälkeen seokset maljattiin ja molempien kirjastojen kooksi saatiin noin 20 000 kloonina, mikä on huomattavasti odotettua parempi tulos.

## 6 POHDINTA

Aikaisemmin sekvensointianalyysien lähtökohtana on käytetty genomista plasmidi- [28] tai kosmidikirjastoa [29] sekä PCR-strategiaa [30; 31]. Viimeksi mainitusta hyvänä esimerkkinä on pneumokokin kapselin biosynteesiä ohjaavien geeniklusterien tutkiminen [31]. Kapselin geeniklusterit ovat hyvin samankaltaisia O-polysakkaridi geeniklusterien kanssa, jolloin samaa tutkimusmenetelmää pystyttäisiin hyödyntämään myös tässä tutkimuksessa.

Plasmidikirjastossa saadaan yleensä paljon pieniä klooneja, sillä plasmidivektorien insertiokapasiteetti on yleensä vain alle 15 kb [18, s. 56 - 57]. Tämä johtaisi siihen, että yhteen plasmidivektoriin ei olisi saatu mahtumaan kokonaista O-polysakkaridi geeniklusteria (koko noin 20 kb). Kirjaston seulonta jouduttaisiin tämän vuoksi tekemään useassa osassa. Esimerkiksi käytettäessä *wzz*-spesifistä koetinta geeniklusterin tunnistamiseen saataisiin mahdollisesti vain muutama positiivinen kloonit, jotka sekvensoitaisiin. Sekvensointitulosten perusteella voitaisiin valmistaa uusia koettimia, joilla saataisiin taas positiivisia klooneja ja näin jatkuisi, kunnes koko geeniklusteri olisi käyty läpi. Seulonnan työläyden vuoksi emme päätyneet tähän menetelmään. Toinen menetelmä, jolla geeniklusteri olisi voitu tunnistaa, on PCR-strategia. Pitkän alueen PCR (engl. *long-range PCR*) olisi tehty suoraan *Y. pestis* O:9 genomisesta DNA:sta käyttäen spesifisiä alukkeita, jotka on suunniteltu tunnistamaan *hemH* - *gsk* geenialue, joka on yleisesti *Yersinia*-lajien genomialue, jossa O-antigeeni geeniklusteri sijaitsee [9; 30; 31]. Tämä menetelmä tuottaa noin 20 kb kokoisen PCR-tuotteen, joka voidaan esimerkiksi pilkkoa pienemmiksi fragmenteiksi ja kloonata kukin omaan plasmidivektoriin ja siten sekvensoida [31]. Tätä PCR-strategiaa oli itse asiassa yritetty tehdä aikaisemmin mutta epäonnistunein tuloksin. Siksi tutkimukseen valittiin kosmidikirjaston tekeminen, sillä sen etuja, verrattaessa muihin vaihtoehtoihin, olivat koko O-antigeeni geeniklusterin mahtuminen samaan kosmidiin sekä mahdollisesti siihen, että *Y. pestis* O:9 O-antigeeni ilmenee *E. coli*ssa, jolloin se olisi todiste siitä, että koko geeniklusteri on mukana kosmidissa [29].

Kuten tuloksissa todettiin, *Yersinia pseudotuberculosis* O:9 genomiselle DNA:lle tehtiin onnistunut eristys; DNA oli puhdasta ja pitoisuudeltaan hyvää. Myös kosmidin pH79 digestio onnistui halutulla tavalla, jolloin syy ensimmäisen DNA-kirjaston epäonnistumiseen oli genomisen DNA:n digestoituminen liian pieniksi fragmenteiksi. Fragmentit olivat ligaatioreaktiossa käyt-

täneet mahdollisesti lähes kaiken ligaasientsyymien ligoituakseen toistensa kanssa, jolloin entsyymiä ei luultavasti enää riittänytkään itse kohteille (noin 20 - 50 kb:n pituisille fragmenteille) ja osa niistä saattoi jäädä ligoitumatta.

Vaikka kosmidi 299 sisälsi O-antigeeni geeniklusterin loppupään, ei sekvensointityötä jatkettu, sillä toisella alukkeella saatu sekvenssi ei antanut yhtään osumaa *Y. pestis*:n genomeihin. Tästä huomiosta ja muiden kosmidien sekvensointituloksista johtuen, oltiin melko varmoja siitä, että tämäkin insertti oli pienistä *Sau3AI*-fragmenteista muodostunut.

Uusien kosmidikirjastojen valmistaminen uusilla menetelmillä sai aikaan jopa 50 kertaa suuremmat kirjastot kuin ensimmäinen. Se ei kuitenkaan tarkoita sitä, että ensimmäinen kirjasto olisi ollut liian pieni (433 kloonina), sillä optimitalanteessa noin 100 50 kb:n pituista kloonina riittäisi periaatteessa käymään koko genomisen DNA:n läpi. Tärkein syy uusien kirjastojen suuriin kloonimääriin on varmasti se, että genomisen DNA:n digestioon käytettiin huomattavasti enemmän DNA:ta kuin ensimmäisessä versiossa. Kirjastot valmistettiin samoista reaktiotuotteista aina ligaatioihin asti, jolloin päätettiin tehdä ne kahdella eri tavalla. Ensimmäinen ligaatio tehtiin samoin kuin edellisessä kirjaston valmistuksessa, jolloin kosmidille tehdyllä defosforylaatiolla estettiin vektorin ligoituminen itsensä kanssa. Toisen ligaation tarkoituksena oli estää edellisen kirjaston epäonnistumisen syy eli digestiotuotteiden ligoituminen toistensa kanssa, joten digestiotuotteista poistettiin 5'-fosfaatit defosforylaatiolla. Transformanttien lukumäärien perusteella molemmat menetelmät toimivat suunnilleen yhtä hyvin. Seuraava vaihe olisi kirjastojen seulonta *wzz*-positiivisten kloonien löytämiseksi, ja se tehdään kirjaston suuruuden vuoksi pesäkehybridisaatiolla.

## VIITELUETTELO

- [1] Bogdanovich, T. ym. Use of O-Antigen Gene Cluster-Specific PCRs for the Identification and O-Genotyping of *Yersinia Pseudotuberculosis* and *Yersinia pestis*. *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 41, no. 11. 2003, p. 5103 - 5112.
- [2] Kiljunen, S. ym. Yersiniophage  $\Phi$ R1-37 is a tailed bacteriophage having a 270 kb DNA genome with thymidine replaced by deoxyuridine. *Microbiology* vol. 151. 2005, p. 4093 - 4102.
- [3] Huovinen, P. ym. *Mikrobiologia ja infektiosairaudet, kirja 1*. Helsinki: Duodecim. 1. painos. 2003.
- [4] *Methods of Endotoxin Removal from Biological Preparations: a Review* [verkkodokumentti]. 2007 [viitattu 5.8.2008.] Saatavissa: [http://www.ualberta.ca/~csps/JPPS10\\_3/MS\\_996/MS\\_996.html](http://www.ualberta.ca/~csps/JPPS10_3/MS_996/MS_996.html)
- [5] Skurnik, M. - Bengoechea J.A., The Biosynthesis and biological role of lipopolysaccharide O-antigens of pathogenic *Yersinia*e. *Carbohydrate Research* 338, p.2521-2529. Elsevier 2003.
- [6] Carniel, E. - Hinnebusch, B.J., *Yersinia molecular and cellular biology*. Chapter 11, Lipopolysaccharides of *Yersinia*. Wymondham: Horizon Bioscience. 2004.
- [7] Tiilikainen, A.S. - Vaara, M. - Vaheri, A., *Lääketieteellinen mikrobiologia*. Helsinki: Duodecim. 7. painos. 1996.
- [8] Nykänen, S., *Yersinia enterocolitica -bakteerin seerumiresistenssitekijöiden vaikutus komplementtijärjestelmän solukalvoa tuhoavan kompleksin muodostumisessa*. Pro gradu -tutkielma. Helsingin yliopisto, biotieteellinen tiedekunta. Helsinki. 2008.
- [9] Skurnik, M., Molecular genetics of *Yersinia* lipopolysaccharide. In *Genetics of Bacterial Polysaccharides*. Goldberg, J. (ed.). Boca Raton, FL: CRC Press. 1999, s. 23 - 51.

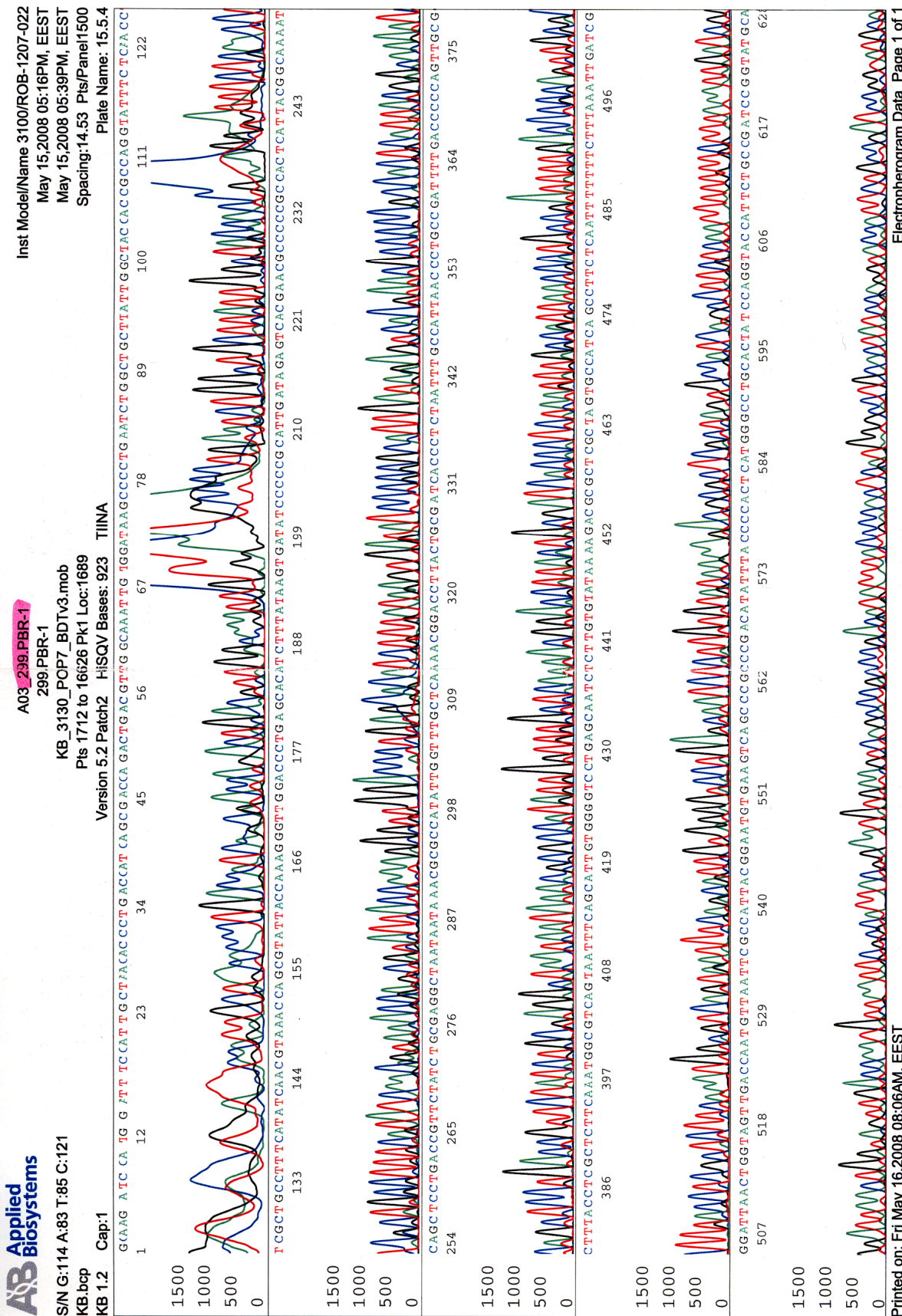


- [10] Haartman-instituutti, Bakteriologia ja immunologia, Mikael Skurnikin tutkimusryhmä [verkkodokumentti]. [Viitattu 22.7.2008.] Saatavissa: <http://www.hi.helsinki.fi/content.asp?route=356.2708.2824.3552>
- [11] Bogdanovich, T.M. - Carniel, E. - Fukushima, H. - Skurnik, M., Genetic (sero)typing of *Yersinia pseudotuberculosis*. In *The Genus Yersinia: entering the functional genomic era*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers. 2003, s. 337 - 340.
- [12] Reeves, P.R. - Pacinelli, E. - Wang, L., O antigen Gene Clusters of *Yersinia pseudotuberculosis*. In *The Genus Yersinia: entering the functional genomic era*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers. 2003, s. 199 - 206.
- [13] Skurnik, M., Molecular genetics, biochemistry and biological role of *Yersinia* lipopolysaccharide. In *The Genus Yersinia: entering the functional genomic era*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers. 2003, s. 187 - 189.
- [14] Tsubokura, M. - Aleksic, S., A simplified antigenic scheme for serotyping of *Yersinia pseudotuberculosis*: Phenotypic characterization of reference strains and preparation of O and H factor sera. *Contrib. Microb. Immunol.* 13. 1995, s. 99 - 105.
- [15] Beczala, A., *Samples of Yersinia pseudotuberculosis O:9 R708 lipopolysaccharide for phage  $\phi$  R1-37 Inhibition tests*. [Julkaisematon].
- [16] *DNA-kirjastot* [verkkodokumentti]. [Viitattu 23.8.2008.] Saatavissa: <http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/dna-kirjastot/2/>
- [17] *Kloonaus* [verkkodokumentti]. [Viitattu 23.8.2008.] Saatavissa: <http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/kloonaus/2/>
- [18] *Linearisoidun plasmidin defosforylaatio* [verkkodokumentti]. [Viitattu 29.8.2008.] Saatavissa: <http://www.edu.fi/oph/abc/dna/sippaus.html>
- [19] Suominen, I. - Ollikka, P., *Yhdistelmä-DNA-tekniikan perusteet*. Helsinki: Opetushallitus. 1997.

- [20] *Faagivektorit* [verkkodokumentti]. [Viitattu 29.8.2008.] Saatavissa: <http://www.edu.fi/oph/abc/dna/perus.html>
- [21] Maxam, A. - Gilbert, W., A new method of sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 74, 560-4 (1977).
- [22] Sanger, F. - Nicklen, S. - Coulson, A.R., DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceeding of the National Academy of Sciences, USA*, 74, 5463-7 (1977).
- [23] *pHC79-kosmidi* [verkkodokumentti]. [Viitattu 19.9.2008.] Saatavissa: <http://gillnet.lab.nig.ac.jp/~cvector/map/pHC79.gif>
- [24] *Nukleiinihappojen eristys ja puhdistus* [verkkodokumentti]. [Viitattu 21.8.2008.] Saatavissa: <http://www.edu.fi/oph/abc/dna/nhpuid1.html>
- [25] Sambrook, J. - Russell D.W., *Molecular Cloning, A laboratory manual, Volume 1 -3*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. 3. painos. 2001.
- [26] *DNA -kokostandardi* [verkkodokumentti]. [Viitattu 3.9.2008.] Saatavissa: <http://www.cosmobio.co.jp/product/raku/01490004.asp>
- [27] Matero, P. ym., *Real-time multiplex PCR assay for detection of Yersinia pestis and Yersinia pseudotuberculosis*. [Lähetetty julkaistavaksi, 2008].
- [28] Zhang, L. ym., Molecular and chemical characterization of the lipopolysaccharide O-antigen and its role in the virulence of *Yersinia enterocolitica* serotype O:8. *Molecular Microbiology* (1997) 23 (1), s. 63 - 76.
- [29] Zhang, L. - Toivanen, P. - Skurnik, M., The gene cluster directing O-antigen biosynthesis in *Yersinia enterocolitica* serotype O:8: identification of the genes for mannose and galactose biosynthesis and the gene for the O-antigen polymerase. *Microbiology* (1996), 142, s. 277 - 288.

- [30] Skurnik, M. - Peippo, A. - Ervelä, E., Characterization of the O-antigen gene clusters of *Yersinia pseudotuberculosis* and the cryptic O-antigen gene cluster of *Yersinia pestis* shows that the plague bacillus is most closely related to and has evolved from *Y. pseudotuberculosis* serotype O:1b. *Molecular Microbiology* (2000), 37 (2), s. 316 - 330.
- [31] Bentley, S.D. ym., Genetic Analysis of the Capsular Biosynthetic Locus from All 90 Pneumococcal Serotypes. *PLoS Genetics*, 2006, s. 262 - 269.

### Kosmidin 299 sekvenssit elektroferogrammeina





S/N G:23 A:19 T:20 C:28

KB.bcp

KB 1.2 Cap:3

B03\_239.PBR-2

299.PBR-2

KB\_3130\_PCP7\_BDTV3.mob

Pts 1703 to 16626 Pk1 Loc:1680

Version 5.2 Patch2 HISQV Bases: 732 TIINA

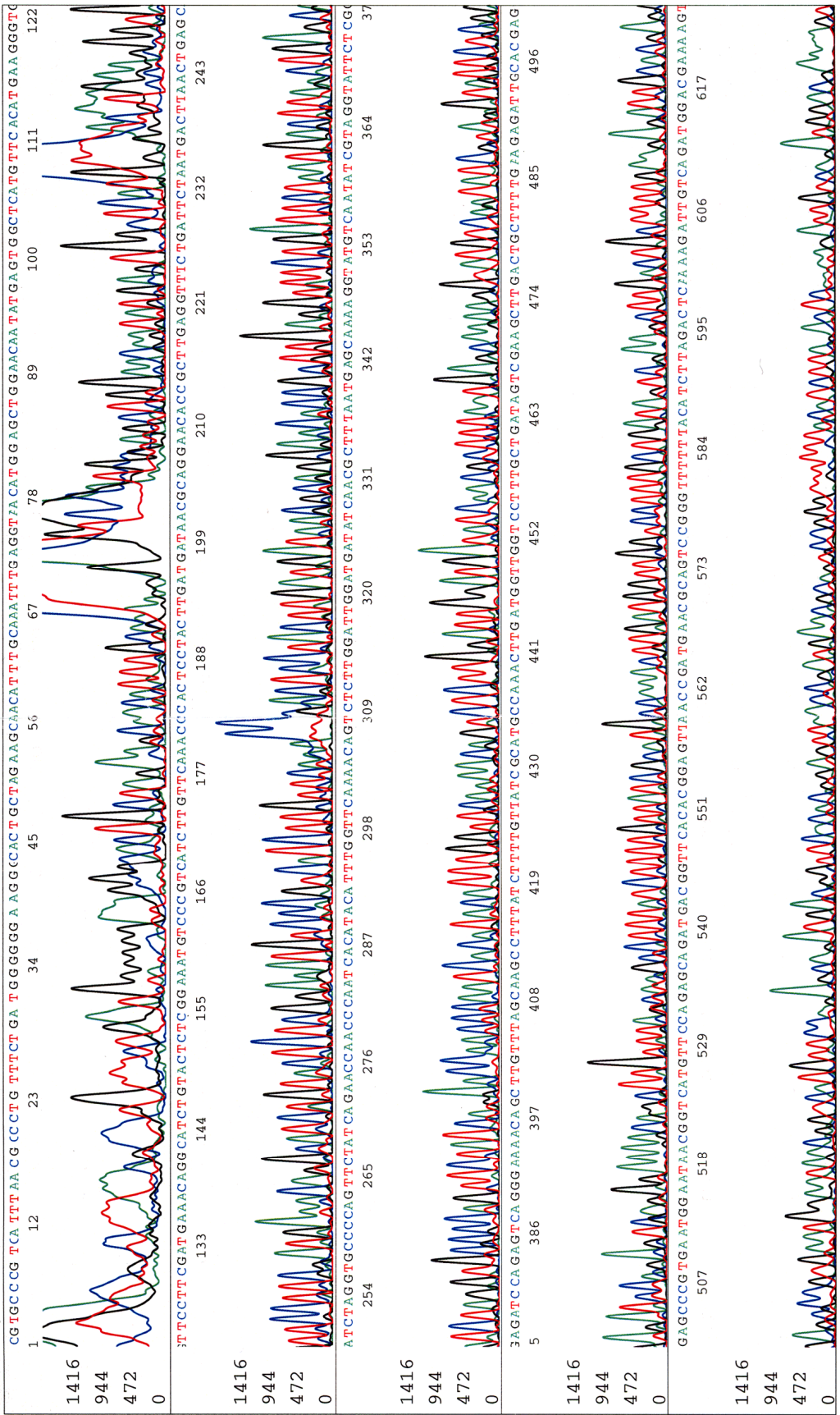
Inst Model/Name 3100/ROB-1207-022

May 15,2008 05:16PM, EEST

May 15,2008 05:39PM, EEST

Spacing:14.36 Pts/Panel1500

Plate Name: 15.5.4





S/N G:112 A:93 T:96 C:108  
KB.bcp

KB 1.2 Cap:3

B03\_4.299.YpseuF

4.299.YpseuF

KB\_3130\_POP7\_BDTV3.mob  
Pis 1869 to 16626 Pk1 Loc:1846

Version 5.2 Patch2 HISQV Bases: 982 itina

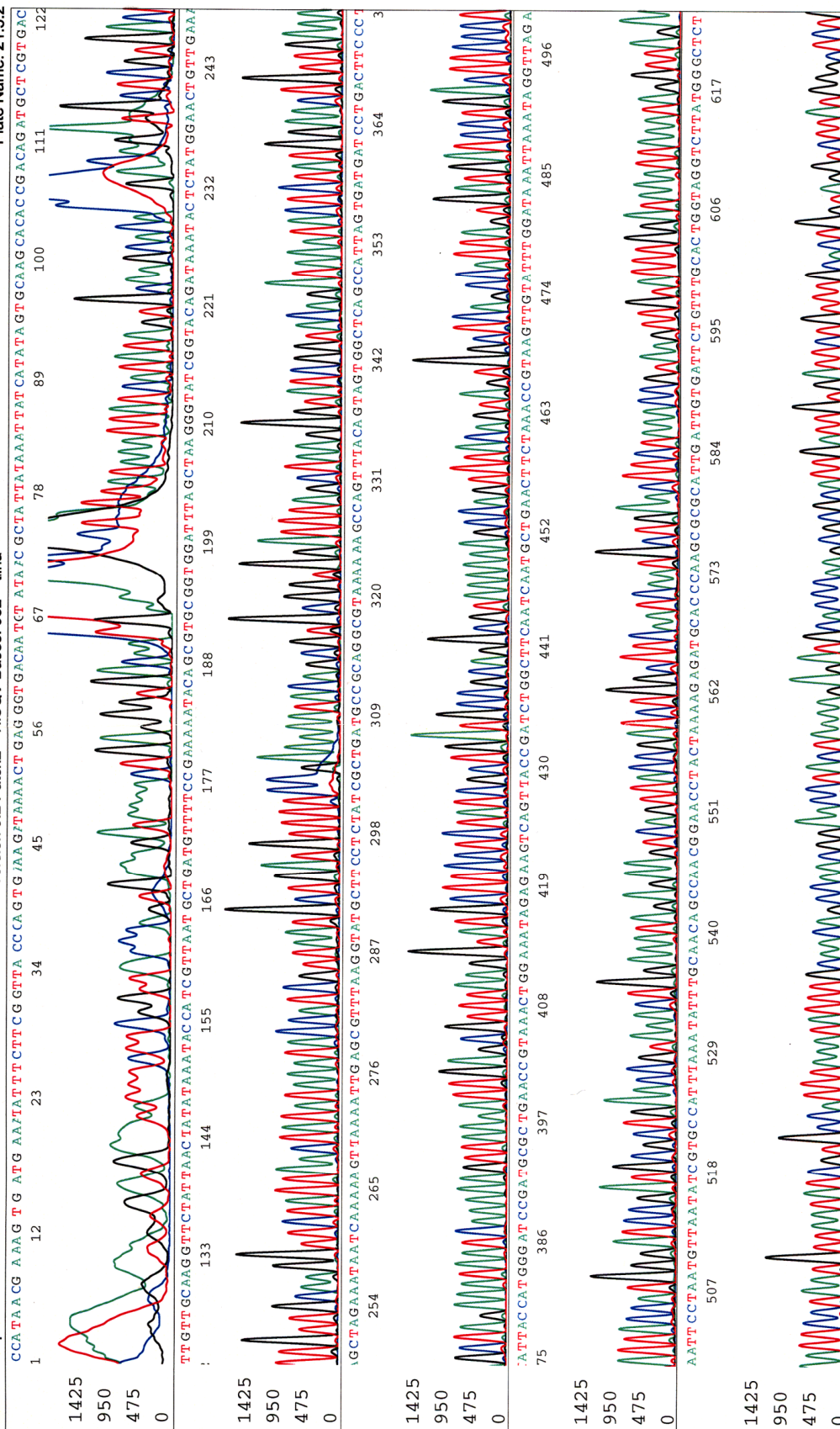
Inst Model/Name 3100/ROB-1207-022

May 21,2008 12:32PM EEST

May 21,2008 01:06PM EEST

Spacing:15.23 Pts/Panel1500

Plate Name: 21.5.2





S/N G:111 A:119 T:138 C:148  
KB.bcp

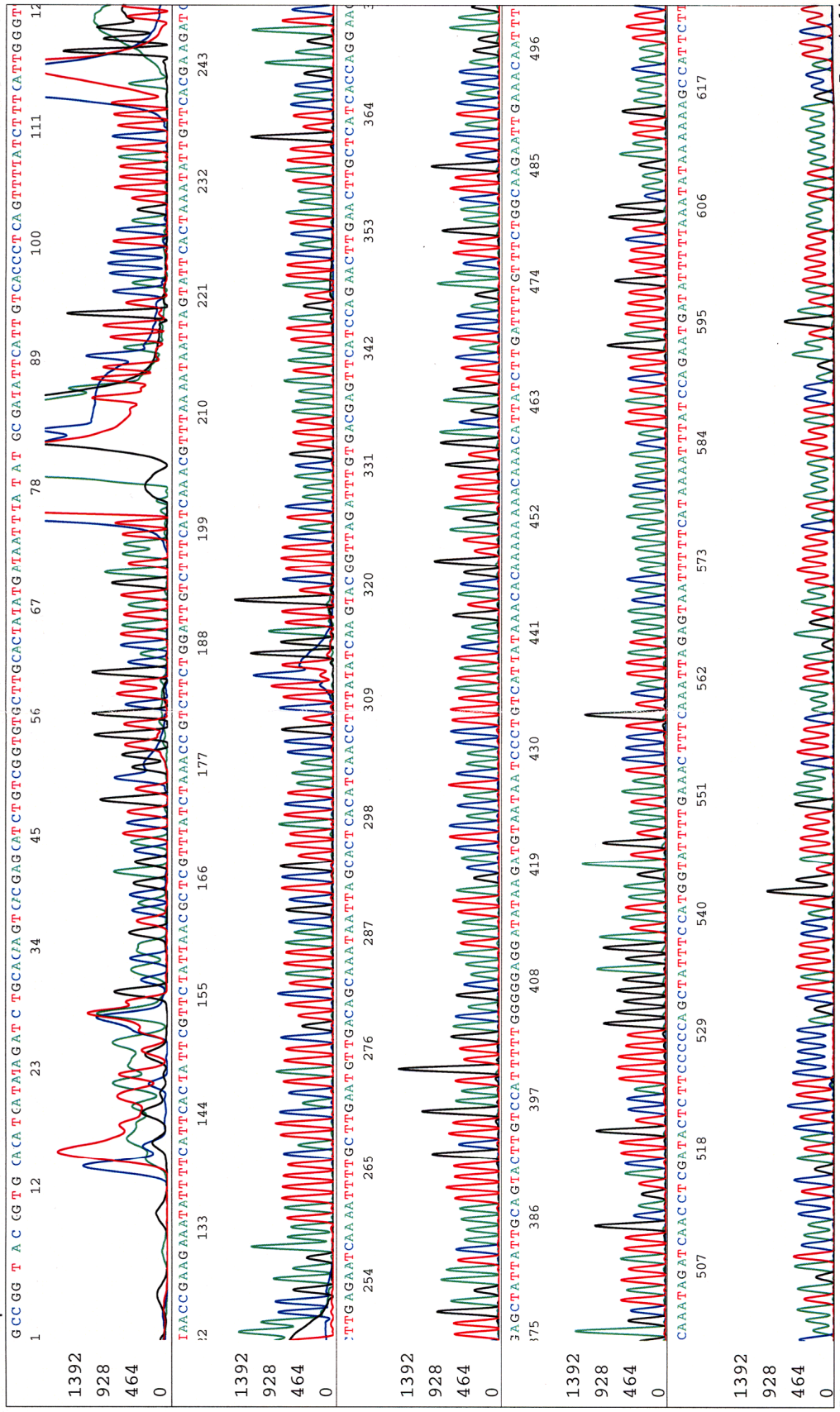
KB 1.2 Cap:5

C03\_5.299.YpseuA  
5.299.YpseuA

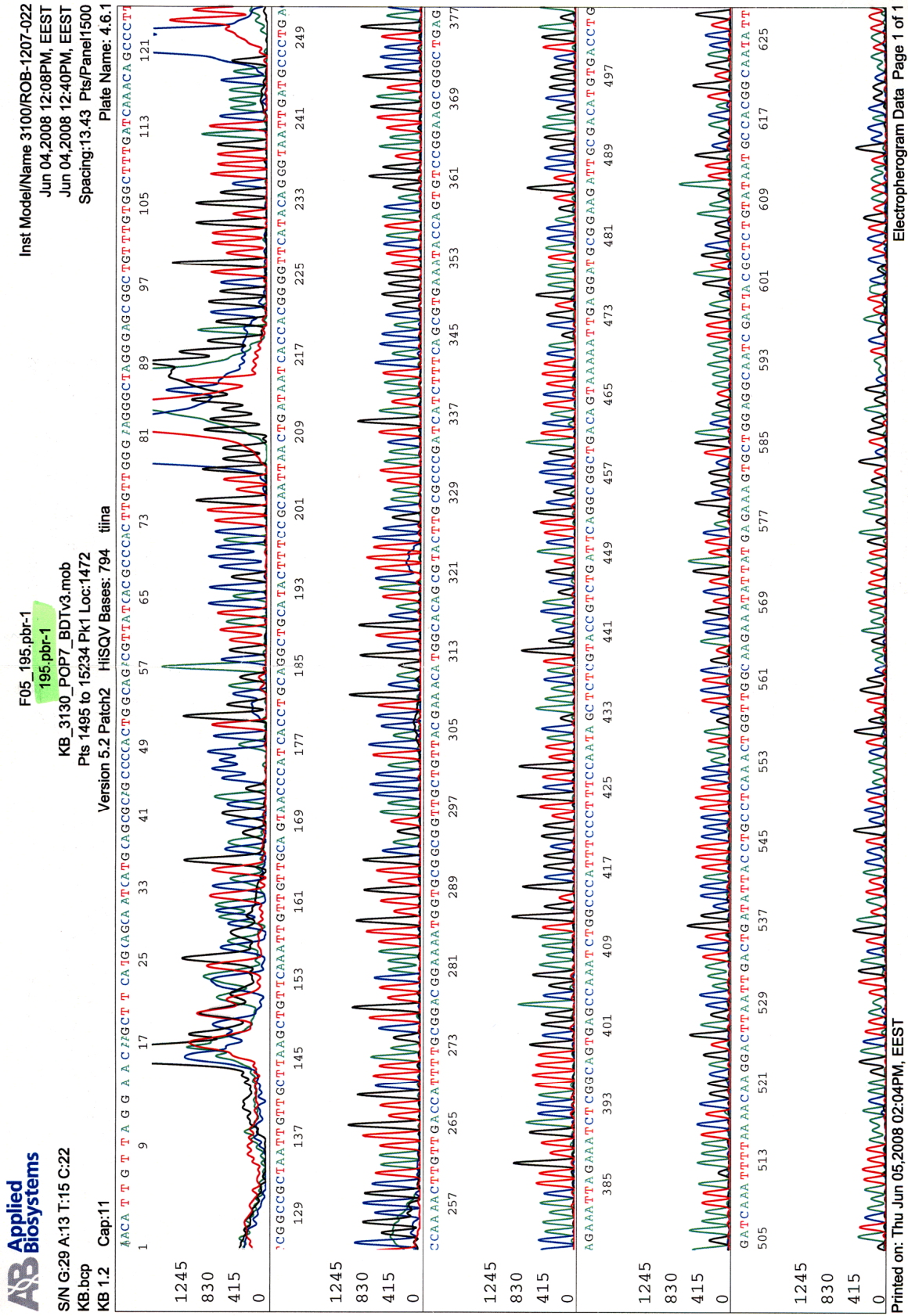
KB\_3130\_POP7\_BDTV3.mob  
Pls 1741 to 16626 Pk1 Loc:1718

Version 5.2 Patch2 HISQV Bases: 794 iiina

Inst Model/Name 3100/ROB-1207-022  
May 21,2008 12:32PM, EEST  
May 21,2008 01:06PM, EEST  
Spacing:15.06 Pls/Panel1500  
Plate Name: 21.5.2



Kosmidin 195 sekvenssit elektroferogrammeina







SIN G:15 A:10 T:10 C:14  
KB.bcp

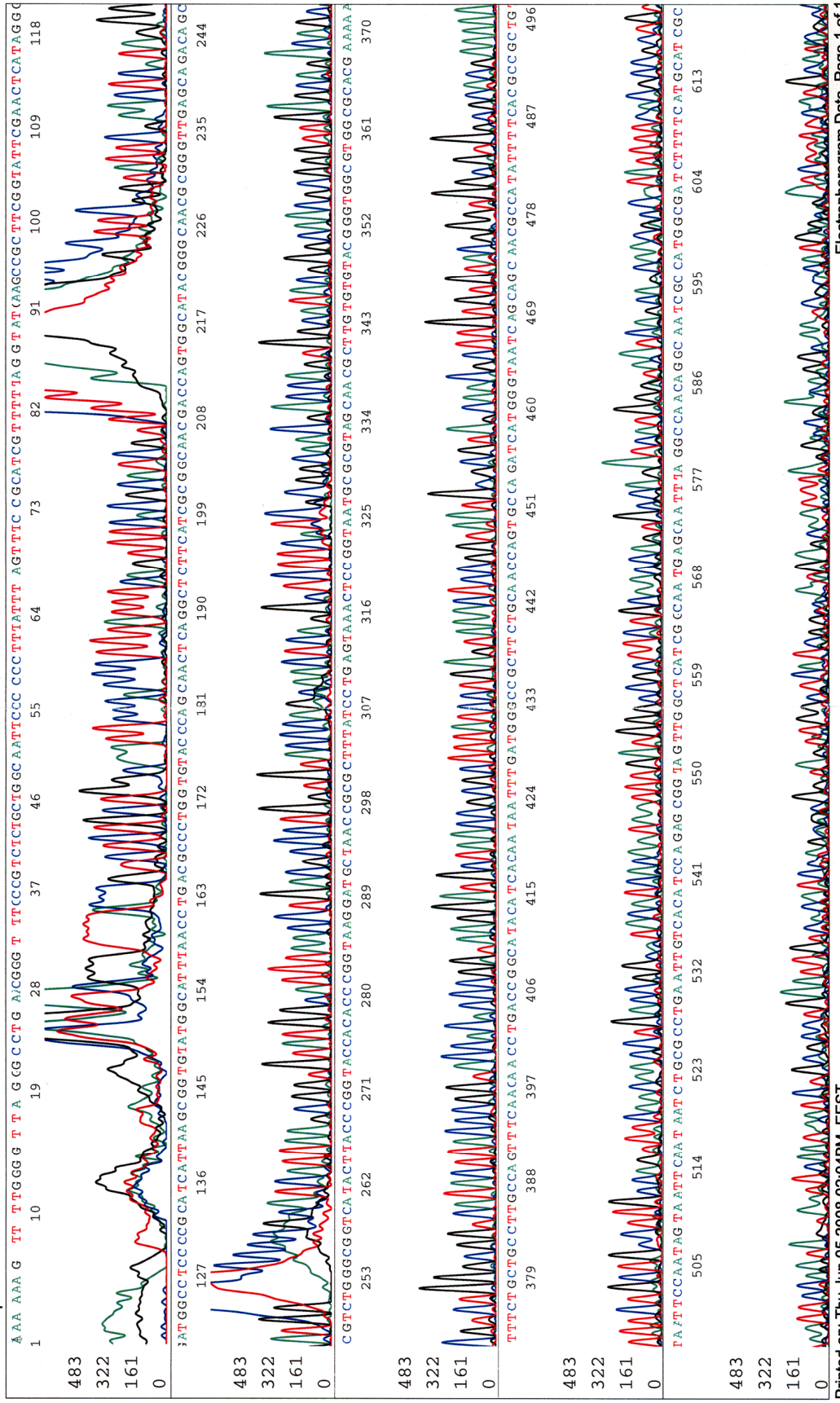
KB 1.2 Cap:13

G05\_195.pbr-2  
195.pbr-2

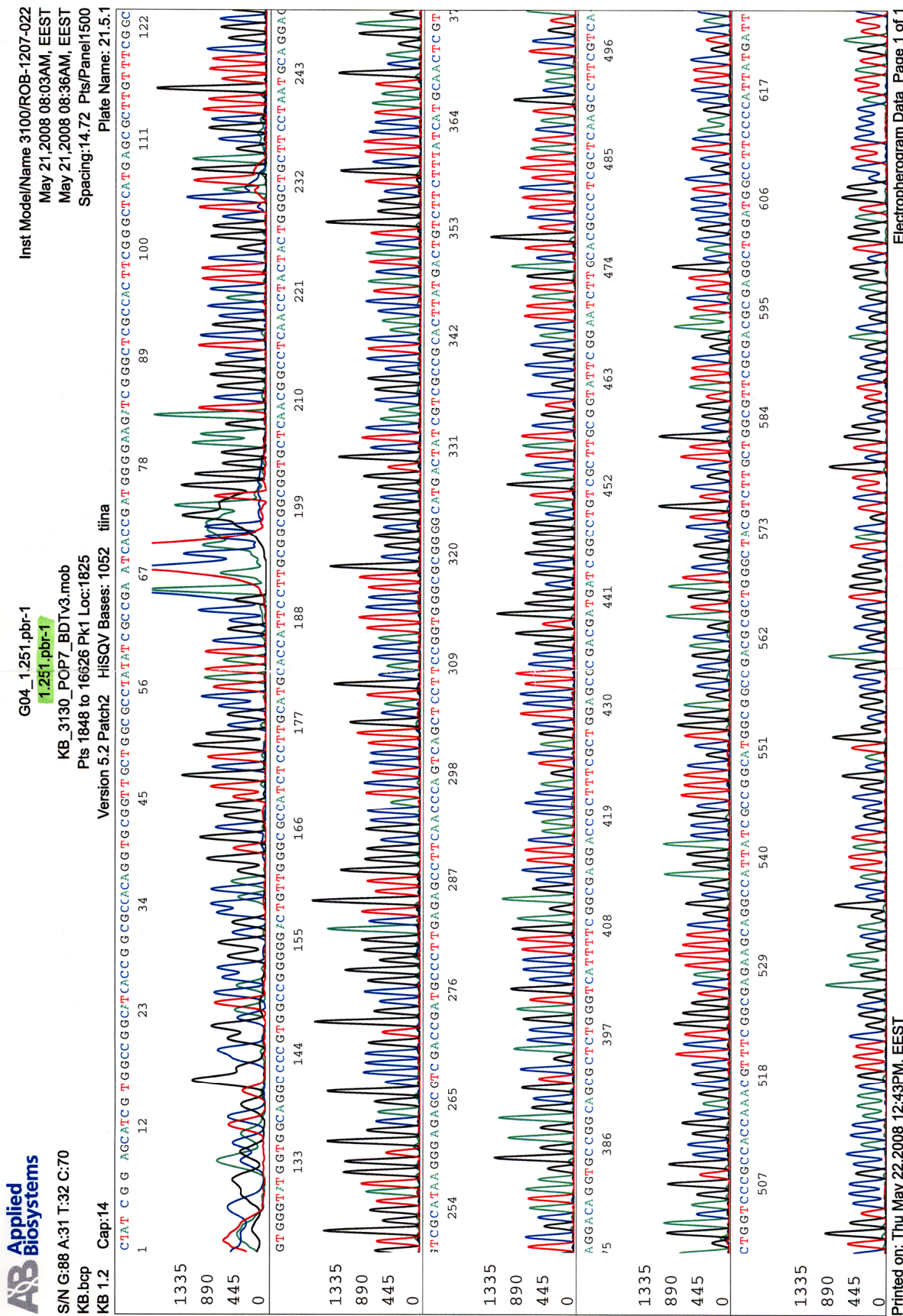
KB\_3130\_POP7\_BDTV3.mob  
Pts 1398 to 14899 Pk1 Loc:1375

Version 5.2 Patch2 HISQV Bases: 570 tina

Inst Model/Name 3100/ROB-1207-022  
Jun 04,2008 12:08PM, EEST  
Jun 04,2008 12:40PM, EEST  
Spacing:13.2 Pts/Panel1500  
Plate Name: 4.6.1



Kosmidin 251 sekvenssi elektroferogrammina



Kosmidin 255 sekvenssi elektroferogrammina

Inst Model/Name: 3100/ROB-1207-022  
May 21, 2008 08:03AM, EEST  
May 21, 2008 08:36AM, EEST  
Spacing: 14.69 PIs/Panel1500  
Plate Name: 21.5.1

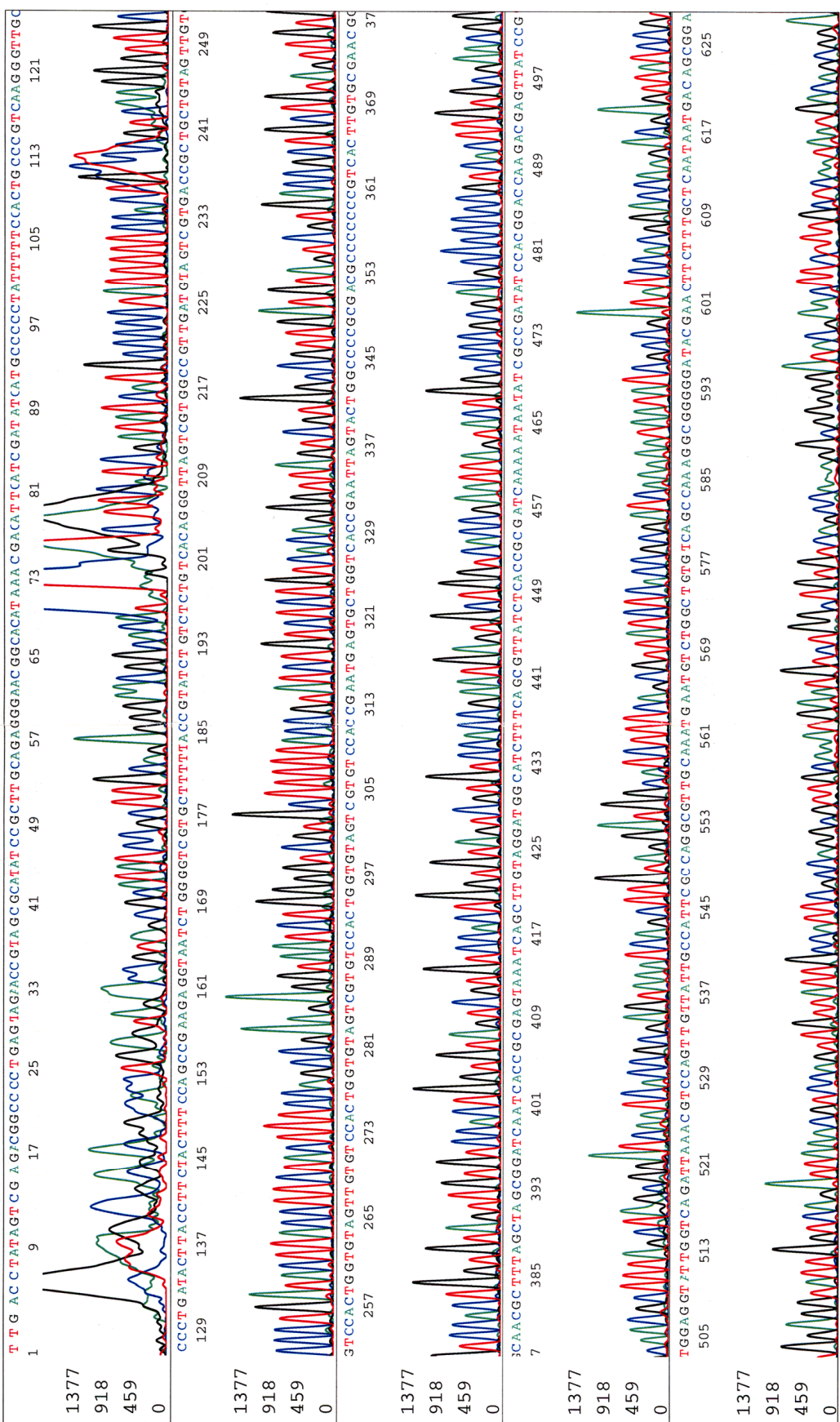
H04\_2\_255.pbr-1  
2.255.pbr-1  
KB\_3130\_POP7\_BDTV3.mob  
Pis 1808 to 16626 Pk1 Loc:1785

Version 5.2 Patch2 HISQV Bases: 809 tiina



S/N G:16 A:8 T:10 C:15  
KB.bcp

KB 1.2 Cap:16



Kosmidin 402 sekvenssi elektroferogrammina



S/N G:84 A:59 T:56 C:64

KB.bop

KB 1.2

Cap:1

A03\_3.402.pbr-1

3.402.pbr-1

KB 3130\_POP7\_BDTv3.mob

Pts 1747 to 16626 Pk1 Loc:1724

Version 5.2 Patch2 HISQV Bases: 1019 tiina

Inst Model/Name 3100/ROB-1207-022

May 21,2008 12:32PM, EEST

May 21,2008 01:06PM, EEST

Spacing:15.15 Pts/Panel/500

Plate Name: 21.5.2

