

VaVa:n biologian harkat 23.5.

Mikrobiologia ja biotekniikka

Päivän ohjelma

Toivottu soluhengityksen kertaus

Tärkeimpiä aiheita

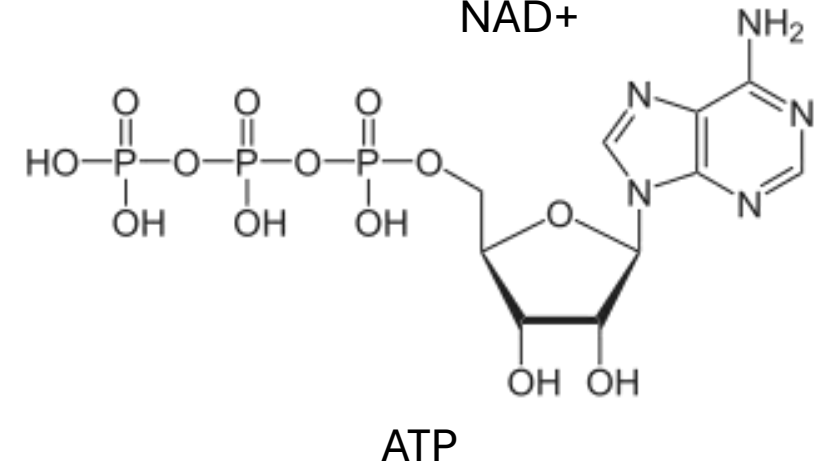
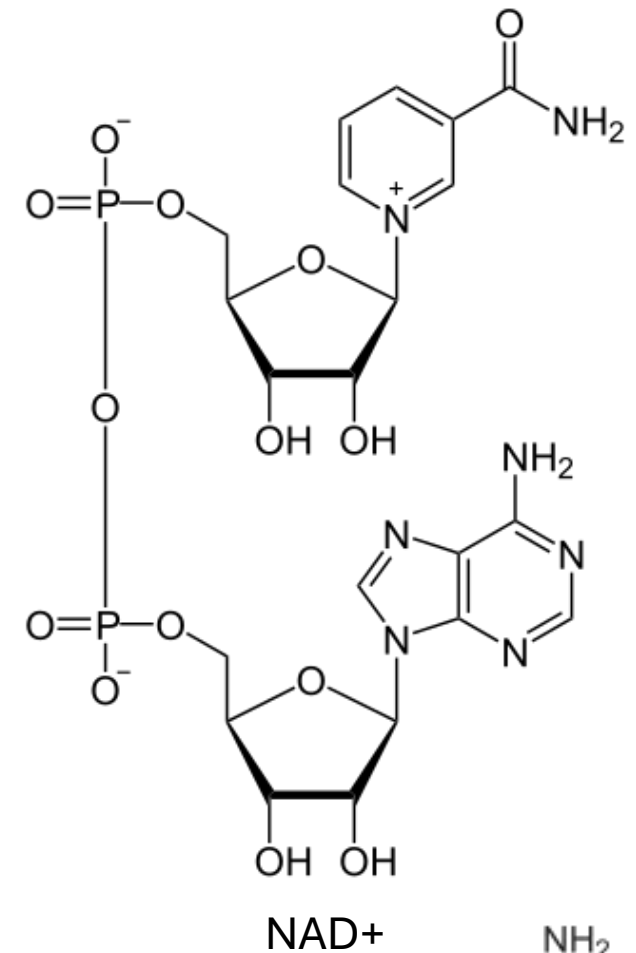
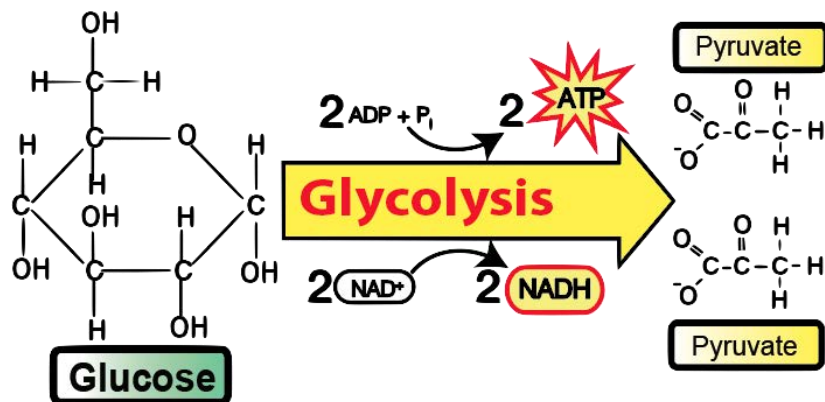
- PCR (t. 1)
- Bakteerien geeninsiirto (t. 2)
- CRISPR/Cas (t. 5)

10min tauko

Restriktio-insertio-kloonauk (t. 3 + 4)

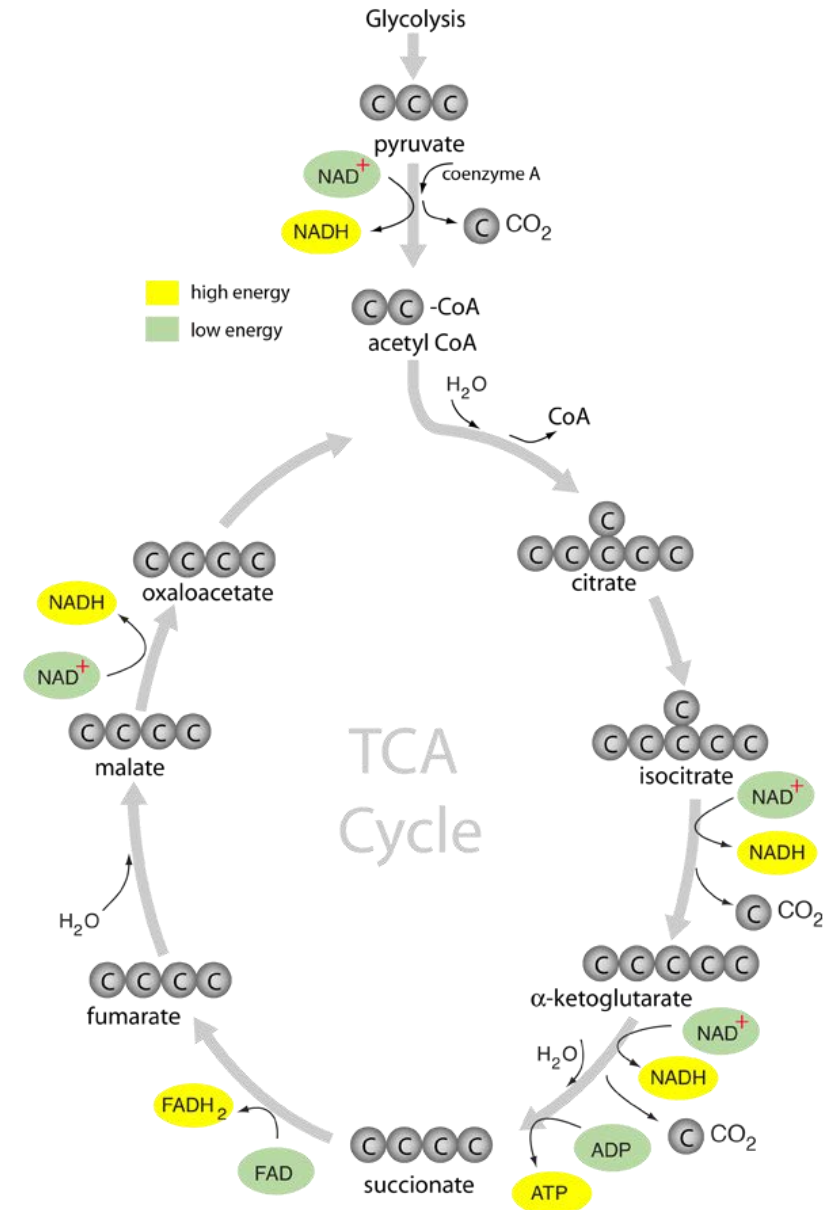
Glykolyysi

- Solulimassa tapahtuva reaktiosarja, jossa glukoosi hajotetaan pyruvaatiksi, ATP:ksi ja pelkistyspotentiaaliksi (NADH)
- Pyruvaatti muokataan edelleen mitokondrioissa asetyylikoentsyymi-A:ksi
- Tärkein anaerobinen energianlähde



Sitruunahappokierto

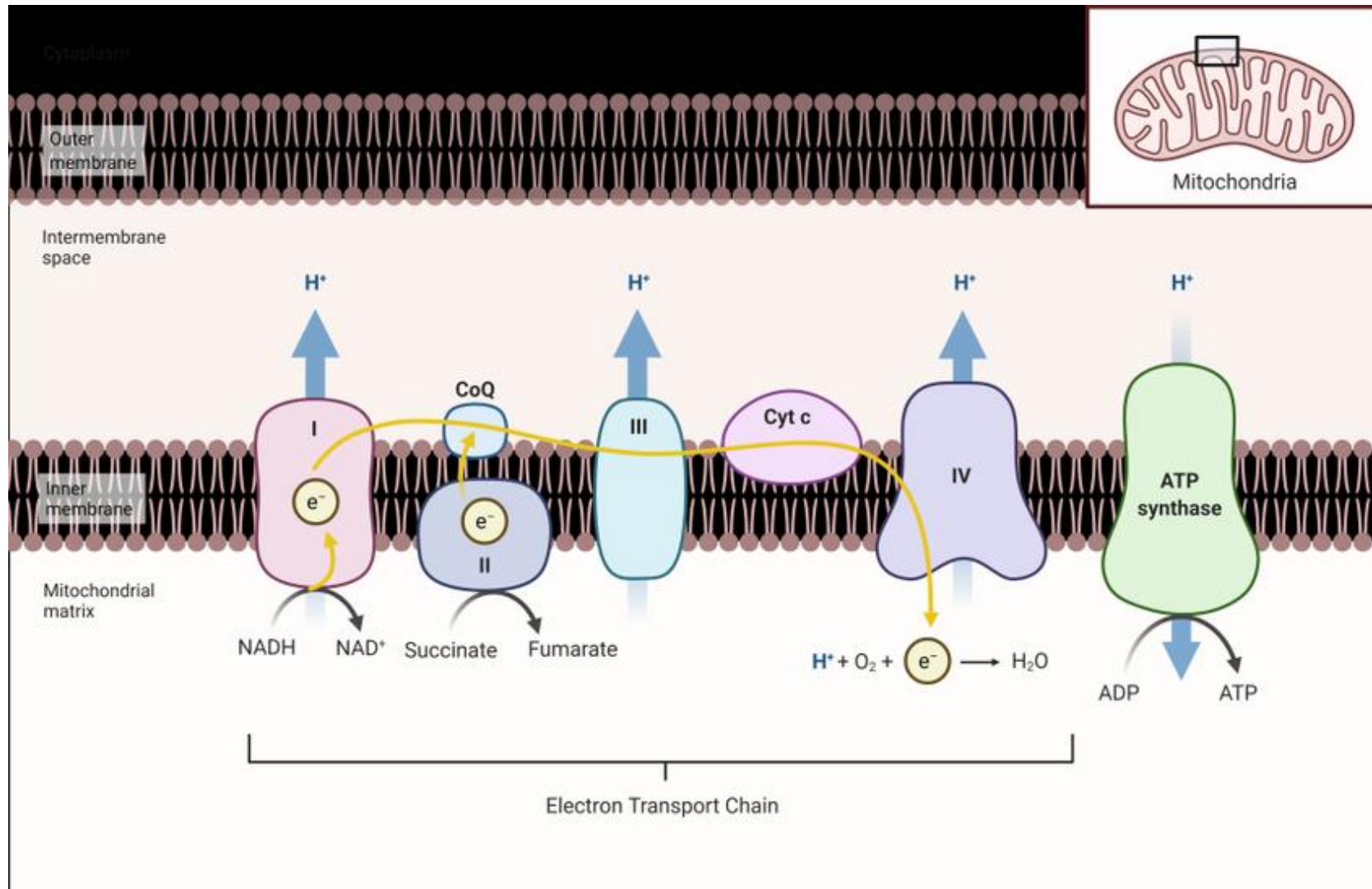
- Mitokondrioissa asetyylikoentsyymi-A hyödynnetään hiilen lähteenä sitruunahappokierrolle
- Syklinen reaktioreitti, jonka aikana muodostuu energiaa (ATP), hiilidioksidia (CO_2) sekä pelkistyspotentiaalia (NADH, FADH_2)
- Pelkistyspotentiaali siirtyy edelleen elektroninsiirtoketjuun

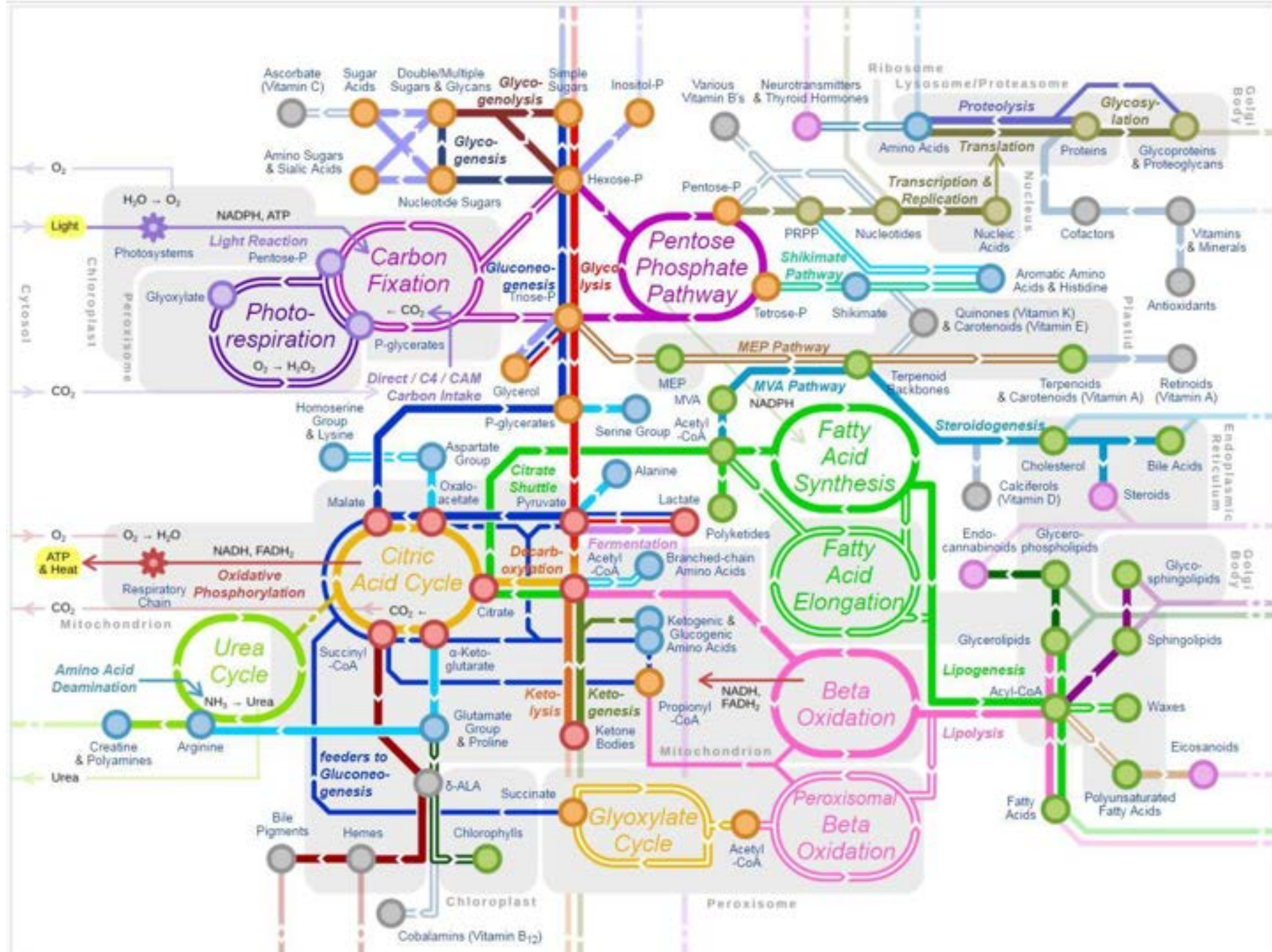


Elektroninsiirtoketju

- Pelkistyspotentiaalia (NADH, FADH₂) käyttämällä happea pelkistetään mitokondrian sisäkalvolla vedeksi (O₂ -> 2 H₂O)
- Samalla protoneita (H⁺) siirtyy mitokondrian sisätilasta kalvojen välitilaan
- Sisäkalvon yli muodostuu elektrokemiallinen konsentraatiogradientti
- Gradientin energiaa hyödynnetään ATP:n muodostamiseen

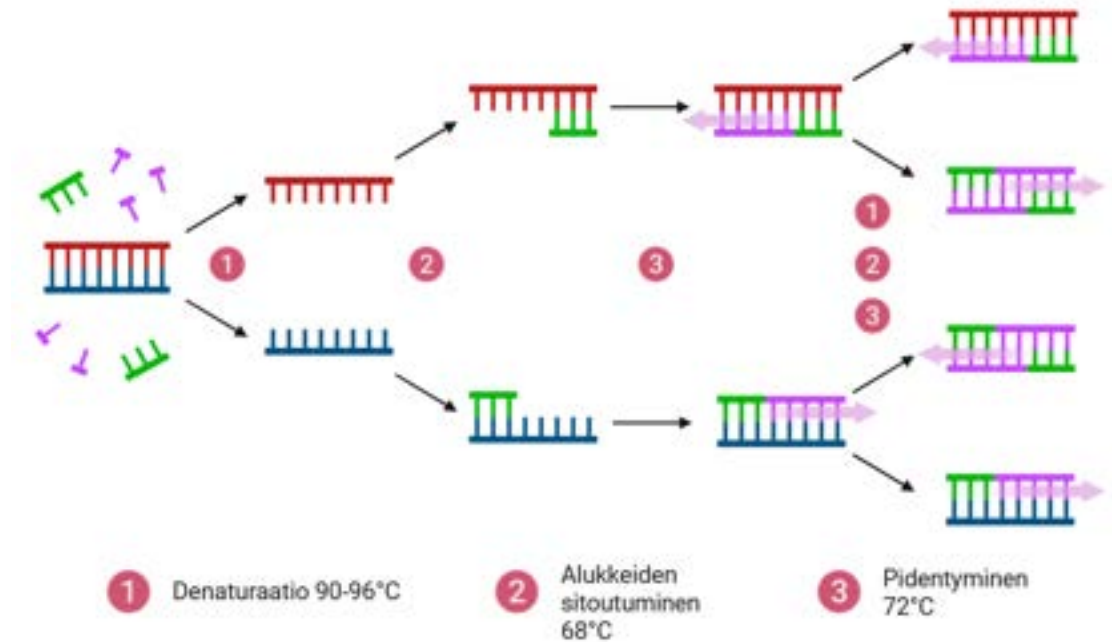
Elektroninsiirtoketju



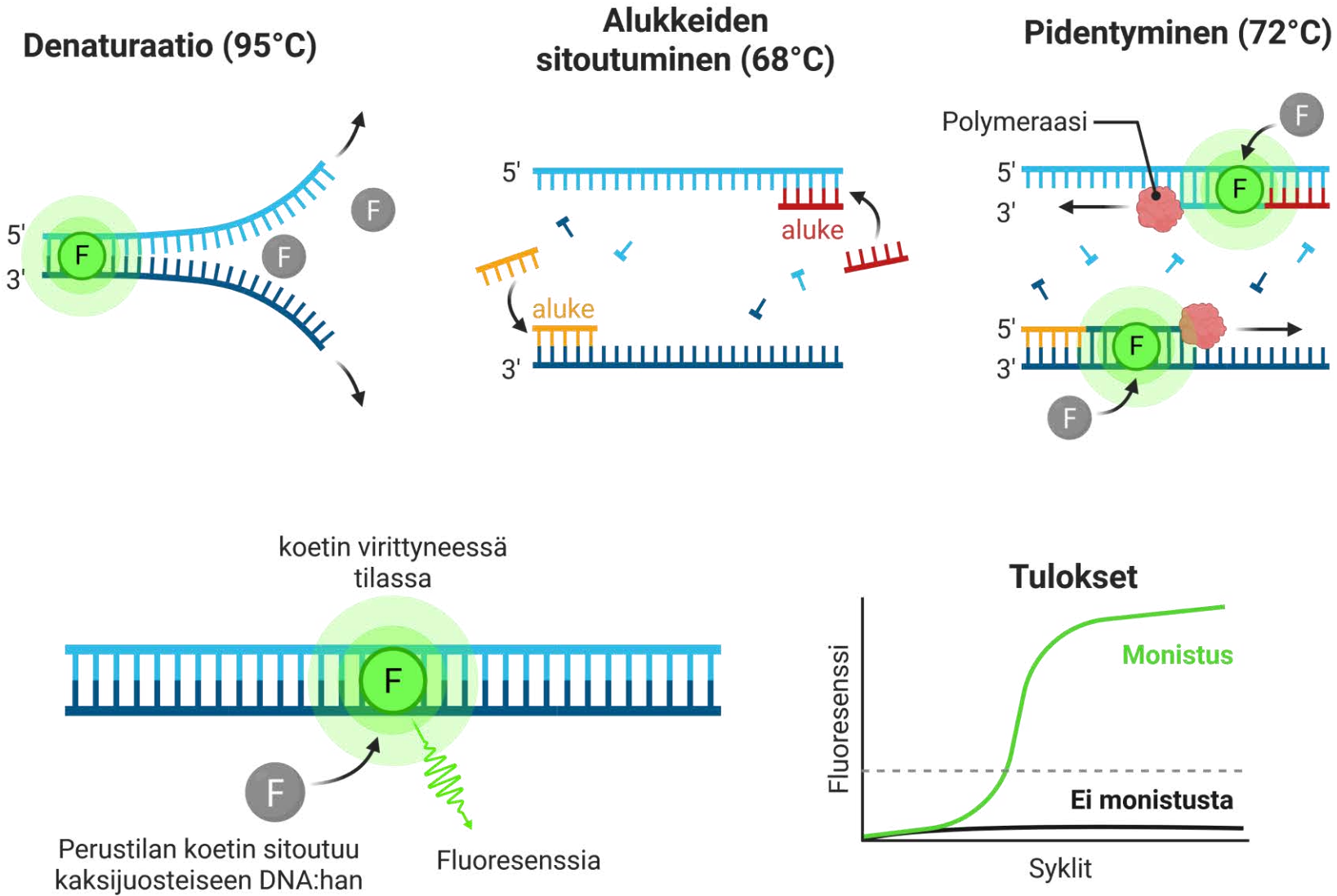


PCR

- Ketjureaktio, jolla monistetaan DNA:ta
- Tarvitsee mallin, alukkeet, nukleotideja sekä DNA-polymeraasientsyymin
- Alukkeet ovat ~20 nukleotidin mittaisia, sitoutuvat vain tiettyyn kohtaan
- DNA-polymeraasi aloittaa monistamisen alukkeista



Reaaliaikainen PCR (qPCR)



Lue alla oleva teksti, joka liittyy DNA:n monistamiseen reaaliaikaisella PCR-menetelmällä. Täydennä puuttuvat kohdat valitsemalla sopivin vastausvaihtoehto.

Reaaliaikaisessa PCR:ssä proteiinia koodaavaa geeniä monistetaan kolmivaiheisissa sykleissä. Vaiheessa 1 tapahtuu DNA:n **denaturaatio**, jolloin DNA-juosteet eroavat toisistaan. Tämä vaihe tapahtuu 95 °C:n lämpötilassa. Vaiheessa 2 käytettävät alukkeet ovat **yksinauhaisia DNA-pätkiä**, ja ne sitoutuvat emäspariutumisperiaatteen mukaisesti tiettyihin kohdesekvenssin kohtiin. Nämä alukkeet toimivat **polymeraasin** kiinnityskohtina. Vaiheessa 3 tämä entsyymi liittää muodostuvaan sekvenssiin nukleotidejä mallijuosteen mukaisessa järjestyksessä. Geenimonistuksen aikana PCR-laite mittaa merkkiaineen (koettimen) **fluoresenssia**. PCR-syklejä toistetaan keskimäärin **30** kertaa.

Oletetaan, että AD16-proteiinia koodaava *AD16*-geeni ja sen ilmentymistä ohjaavat säätelyalueet sijaitsevat ihmisen X-kromosomissa. *AD16*-geenin mutatoitunut muoto (*AD16mut*) on merkittävä Alzheimerin taudin riskitekijä. *AD16mut*-geenialueen mallinauhan sekvenssi säätelyalueineen on seuraava:

TAA TAC GAC TCA CTA TGG ATC GTC CGT TTC ACT GGA GGA CGC GTA TTC TAG ATG TAG

Tämän sekvenssin 18 ensimmäistä nukleotidia kuuluvat transkription säätelyalueeseen (promoottoriin). Niitä seuraavan *AD16mut*-geenin mallinauhan koodaavan alueen kolme ensimmäistä nukleotidiä ovat **ATC**. Sekvenssialue GGA GGA CGC on geenin ensimmäinen introni-alue.

Kirjoita transkriptiossa ja translaatiossa muodostuneiden sekvenssien rakenteet. Perustele vastauksesi.

Vastaus:

Transkripti on

UAG CAG GCA AAG UGA CAU AAG AUC UAC AUC.

Translaatiota ei tapahdu.

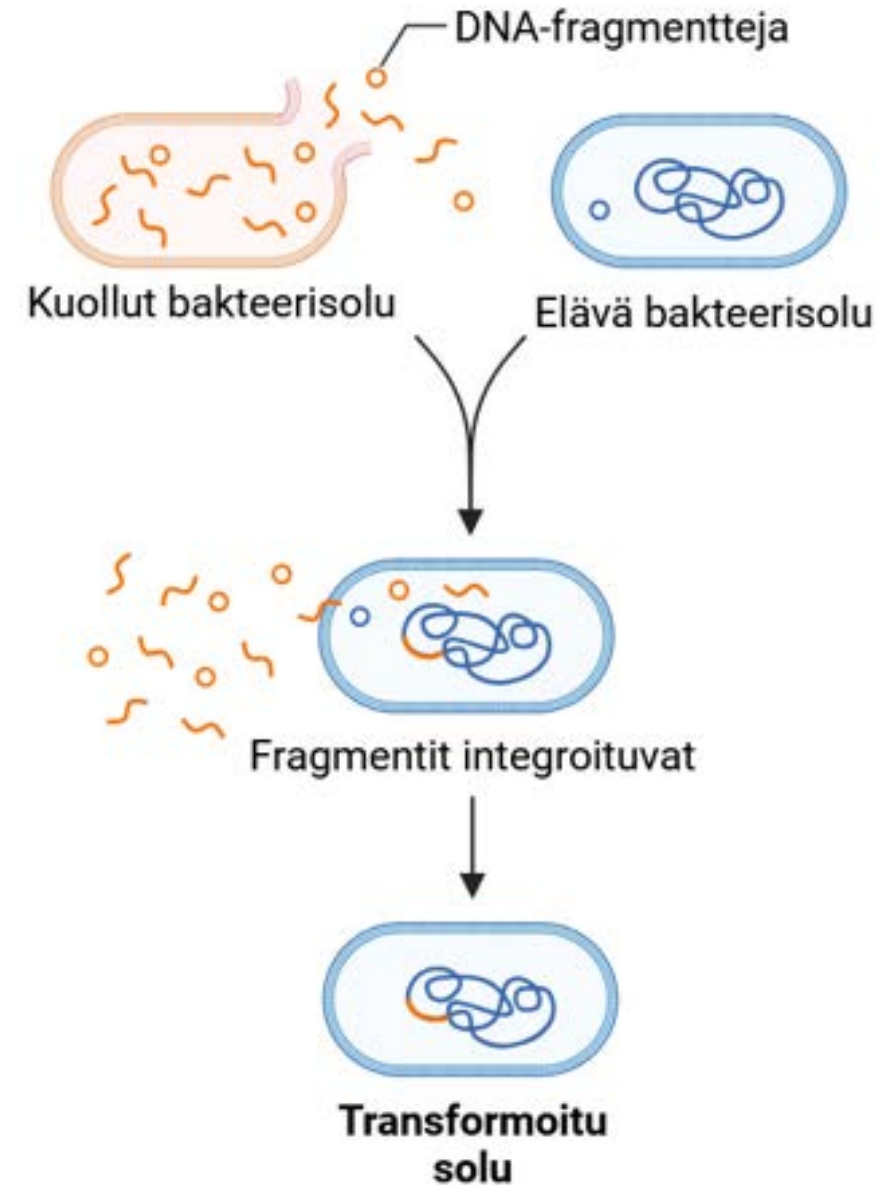
Säätelyalueita ei koodata lähetti-RNA:n (mRNA) osaksi, eli transkriptista jää pois 18 ensimmäistä nukleotidia. Lähetti-RNA-juosteen esiaste-RNA (esilähetti-RNA) muodostuu transkriptiossa vastinnauhaksi mallijuosteelle A/T- ja C/G-pariutumissäännön mukaisesti. RNA-rakenteessa urasiiliemäs (U) korvaa tyymiinin (T). Esiaste-RNA:sta poistetaan intronialue silmukoimalla, jolloin muodostuu valmis mRNA. Translaatiota ei tapahdu, koska *AD16mut*-geenin koodaavan sekvenssin ensimmäinen kodoni on mutatoitunut, eli sekvenssistä puuttuu translaation aloituskodoni (AUG).

Bakteerien horisontaalinen geeninsiirto

- Varsinkin bakteereille ominaisia tapoja siirtää geenejä yksilöiden välillä (horisontaalinen)
- Kolme päätapaa: transformaatio, transduktio ja konjugaatio
- Erittäin tärkeitä mikrobien evoluutiossa
 - Antibioottiresistenssin kehittyminen bakteeripopulaatioon

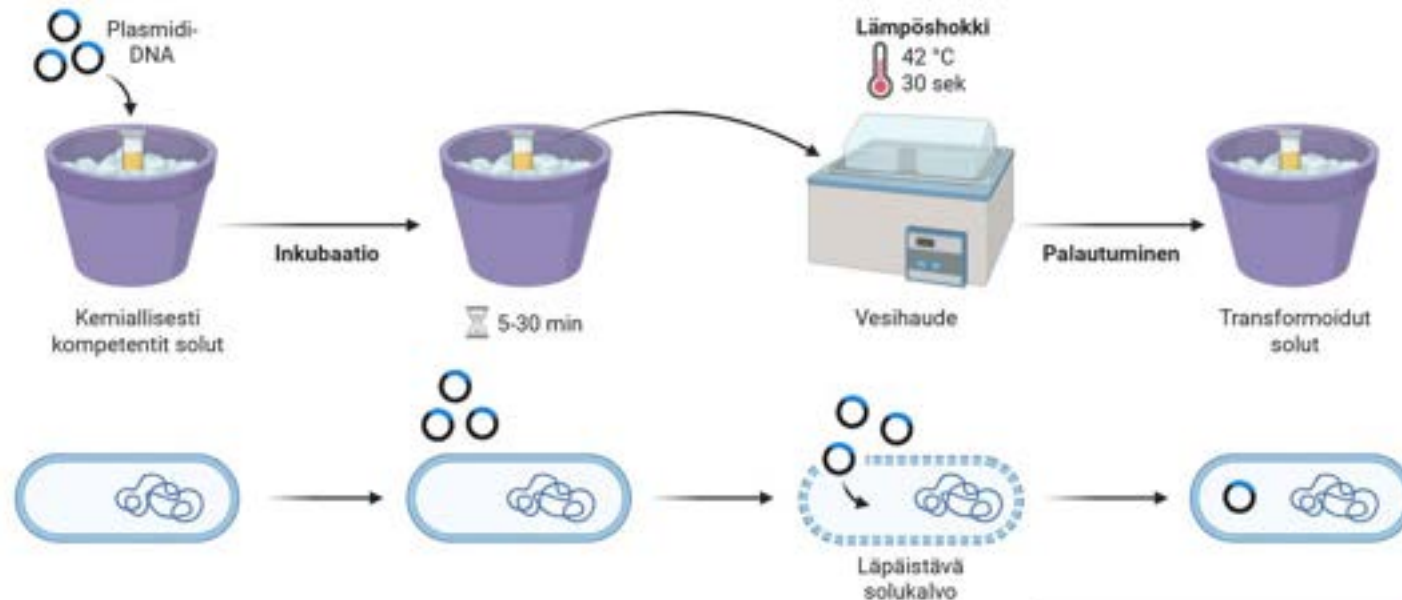
Transformaatio

- Bakterisolu ottaa sisäänsä sille vierasta DNA:ta ympäristöstään
 - Usein peräisin kuolleista bakteereista
- DNA:n täytyy päästä solukalvon läpi
 - Kompetenssi
 - Solukalvon muutokset vasteina ympäristöön
- DNA integroituu osaksi genomia
 - Valintapaine, esim. antibioottiresistenssi



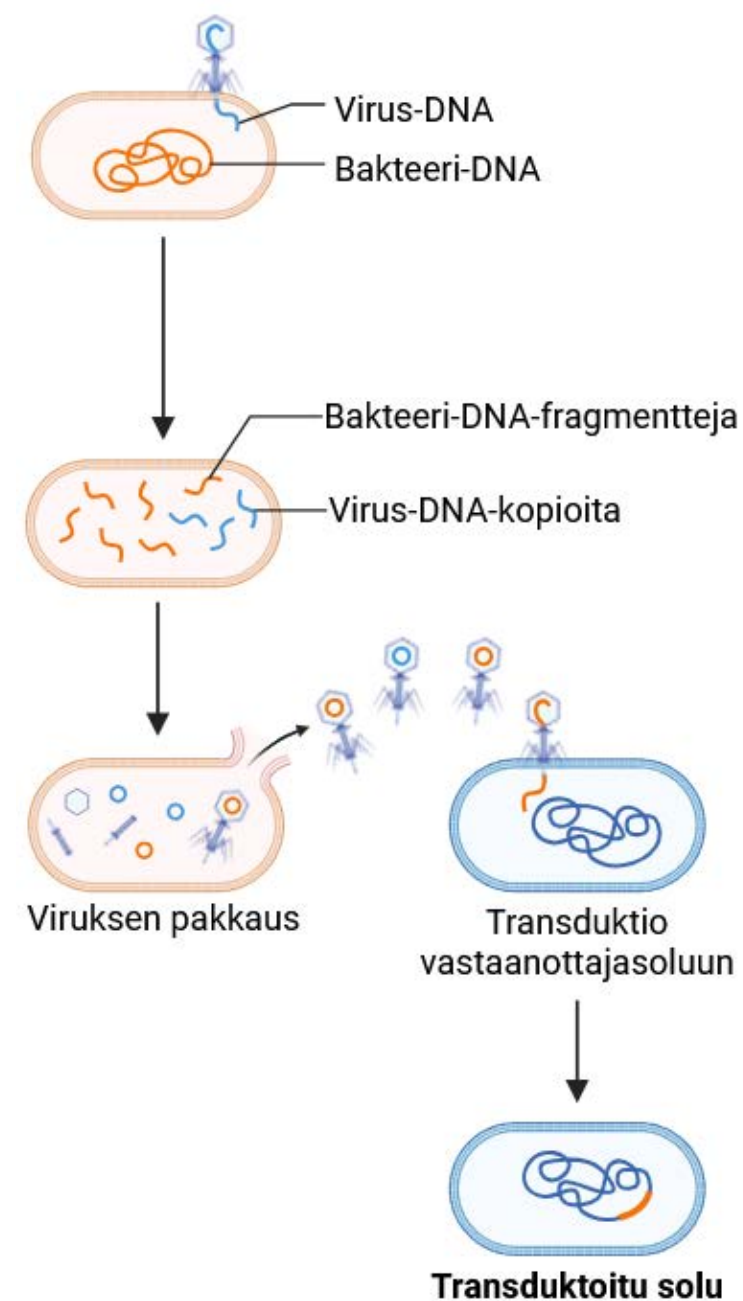
Transformaatio geenitekniikan menetelmänä

- Bakteerikanta käsitellään kemiallisesti kompetentiksi
- Soluliuokseen lisätään transformoitavaa plasmidia
- Solukalvo pakotetaan läpäistäväksi
- Plasmidin antibioottiresistenssigeeni luo valintapaineen



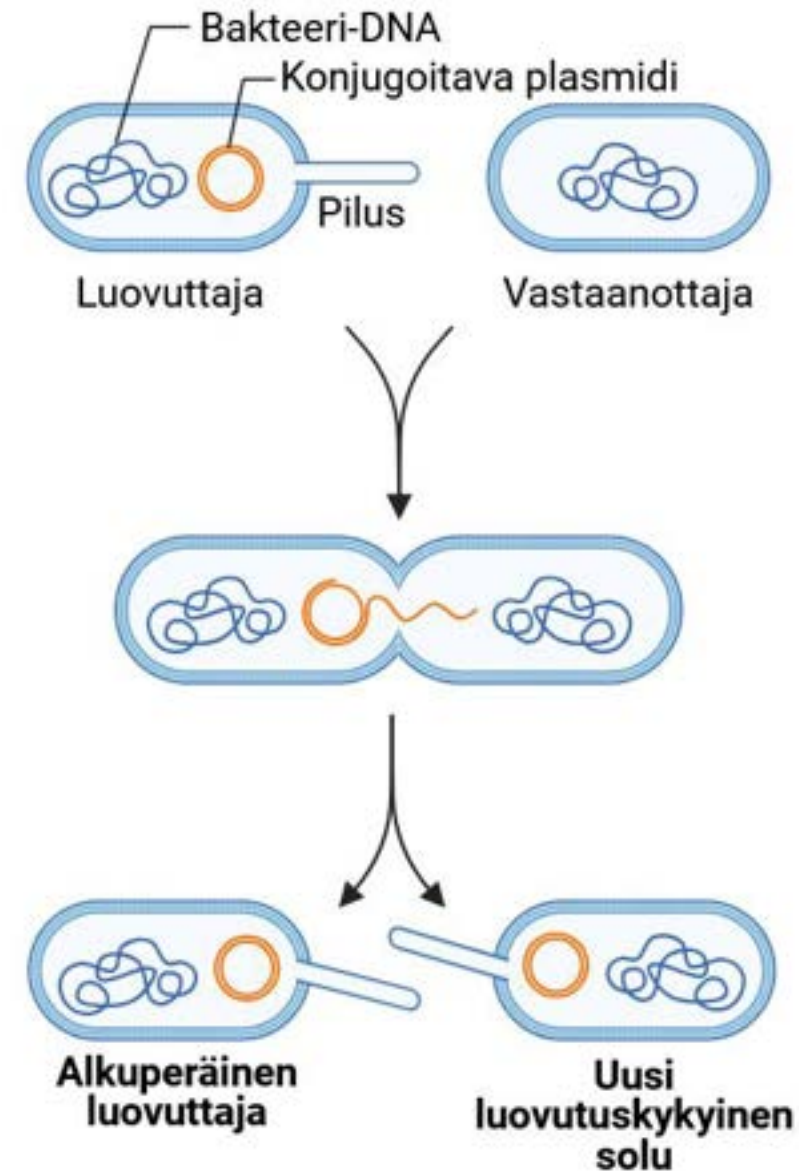
Transduktio

- Bakterisoluun pääsee vierasta DNA:ta virusvälitteisesti
- Viruksen lisääntyessä bakterisolussa siihen pakkautuu bakteerin omaa DNA:ta
 - Lisääntymiskyvyn viruspartikkeli
- Saman viruksen infektoidessa uuden bakteerin siitä siirtyy bakteeriin toisen bakteerin DNA:ta
- DNA integroituu osaksi genomia
 - Valintapaine



Konjugaatio

- Bakterisoluun siirtyy DNA:ta toiselta bakterisolulta piluksen välityksellä
 - Pilus = soluelin, joka mahdollistaa kontaktin bakterisolujen välillä
- Luovutuskyky (piluksen proteiineja koodaavat geenit) usein plasmidissa
- Plasmidi kopioidaan vastaanottajalle
- Plasmidissa mukana usein myös muita geenejä
 - Valintapaine



Bakteereja voidaan ryhmitellä muotonsa perusteella. Mitkä bakteerit ovat pallomaisia?

a) basillit

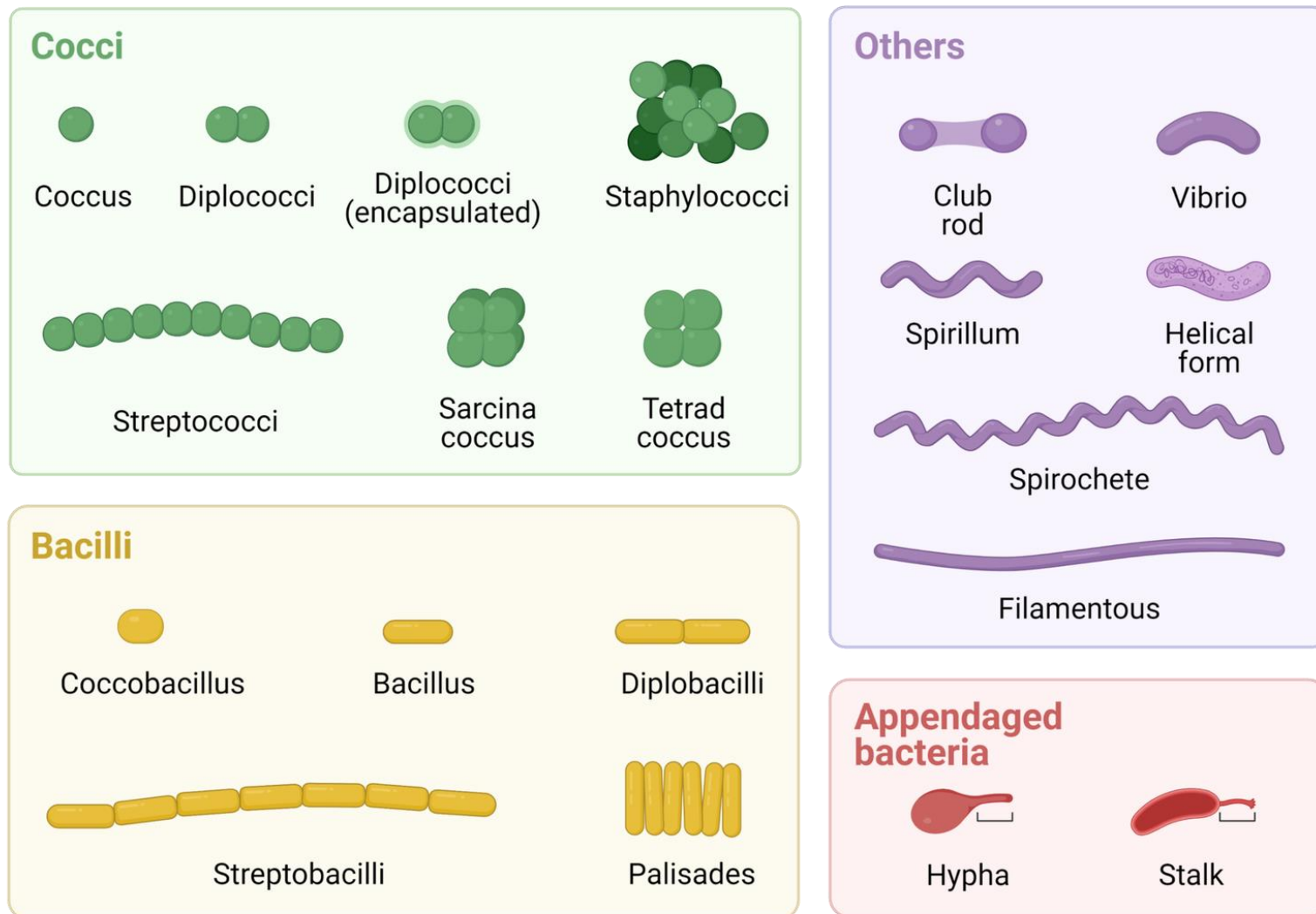
b) vibriot

c) kokit

d) spirillit

e) spirokeetat

Vastaus: C kokit



Bakteerit jakautuvat puolen tunnin välein. Kahden tunnin kuluttua bakteereita on 5 miljoonaa. Kun bakteerit jatkavat jakautumistaan liuoksessa, liuos samentuu ja bakteerien määrää voidaan arvioida mittaamalla liuoksen optista tiheyttä (optical density, OD). Mikä on liuoksen OD-arvo kuuden tunnin kuluttua oheisen kuvaajan perusteella?

a) 0,20

b) 0,45

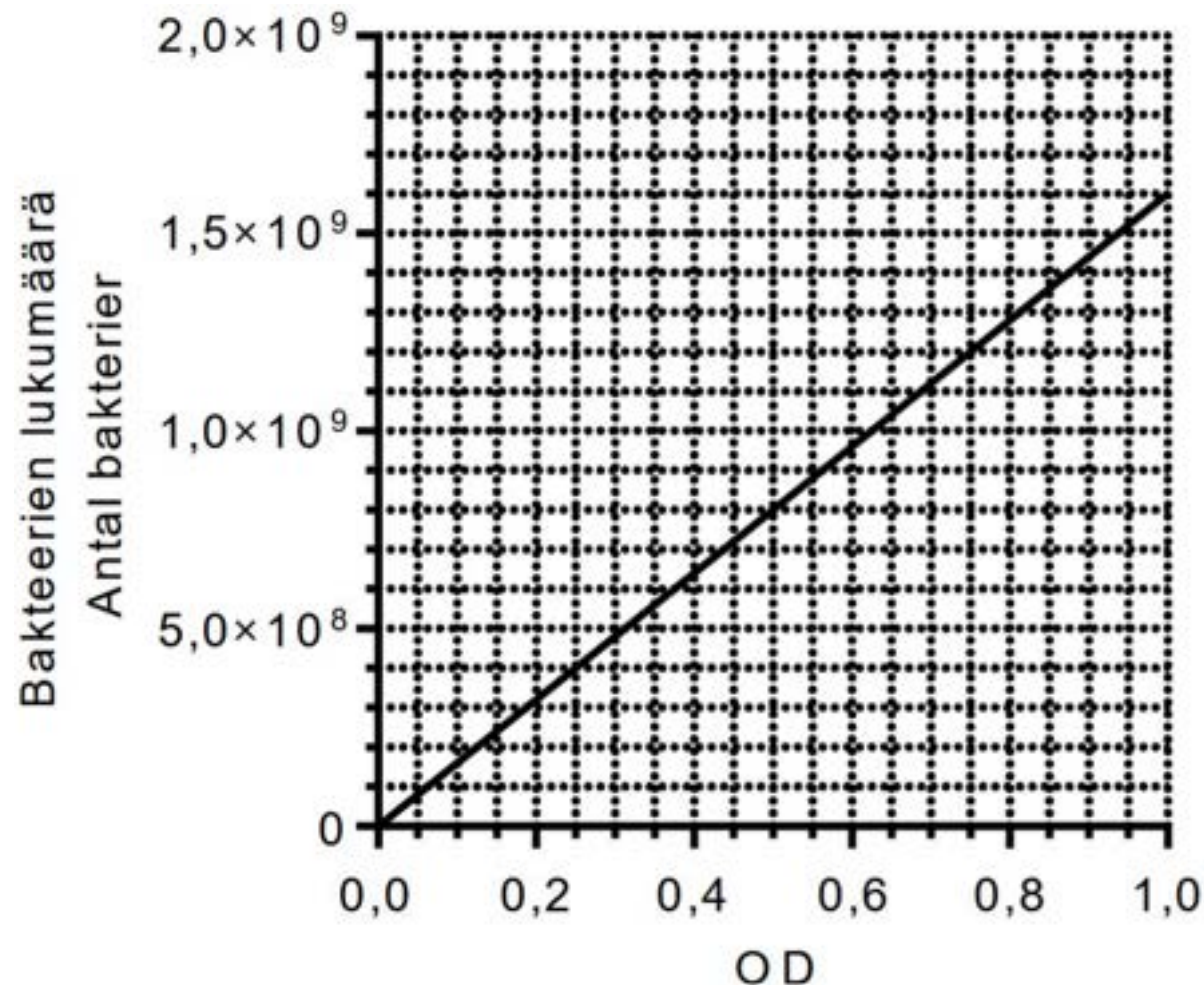
c) 0,55

d) 0,70

e) 0,80

$$5\,000\,000 \cdot 2^8 = 1\,280\,000\,000$$

Vastaus: E 0,80



Bakteeri-infektioita voidaan hoitaa antibiooteilla. Osa antibiooteista toimii sitoutumalla bakteerin ribosomaaliseen RNA:han. Mikä proteiinien valmistuksen vaihe tällöin estyy?

- a) laskostuminen
- b) transkriptio
- c) silmukointi
- d) translaatio
- e) erityys solusta

Vastaus: D translaatio

Osa antibiooteista toimii estämällä mureiinin (peptidoglykaani) synteesiä bakteerisoluissa. Minkä rakenteen toiminta tällöin häiriintyy?

- a) soluseinän
- b) solukalvon
- c) ribosomin
- d) soluhengityskalvoston
- e) DNA:n

Vastaus: A soluseinän

Antibioottihoidon aikana voi syntyä bakteeripopulaatioita, jotka ovat vastustuskykyisiä eli resistenttejä hoidossa käytetyille antibiootille. Mistä luonnonvalinnan muodosta on tällöin kyse?

- a) suuntaava valinta
- b) tasapainottava valinta
- c) seksuaalivalinta
- d) hajottava valinta

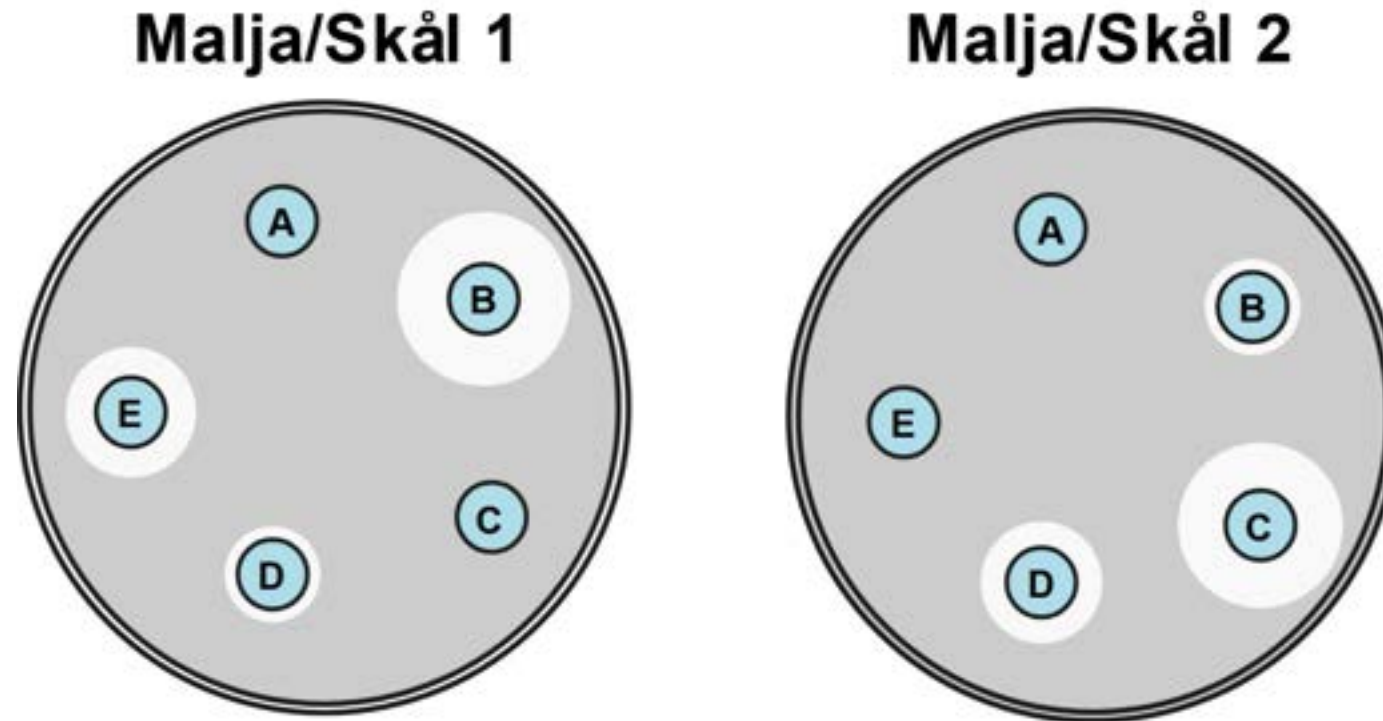
Vastaus: A suuntaava valinta

Bakteereille voi kehittyä antibioottilhoidon aikana antibioottiresistenssiä. Yksi mahdollinen antibioottiresistenssin syntymekanismi on transformaatio. Mitä transformaatioissa tapahtuu?

- a) Bakterisolu erittää DNA:ta solunulkoiseen vesikkeliin.
- b) DNA:ta siirtyy kahden bakterin välillä solujen kiinnittyessä toisiinsa.
- c) Virus siirtää DNA:ta bakterisolun sisään.
- d) Bakterin DNA:ssa tapahtuu spontaani mutaatio.
- e) Solun ulkopuolinen vapaa DNA siirtyy bakterisolun sisään

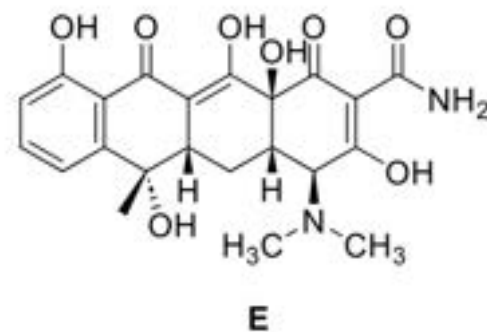
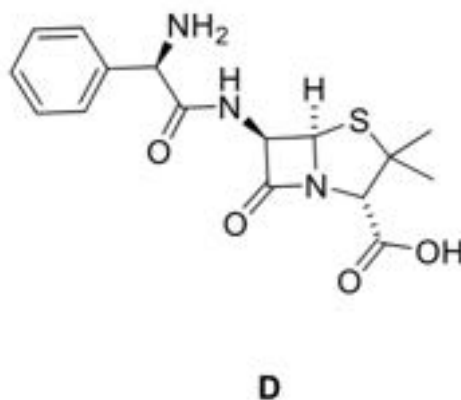
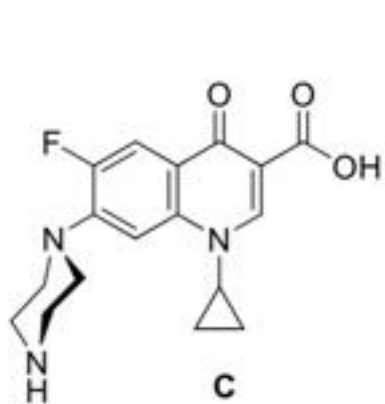
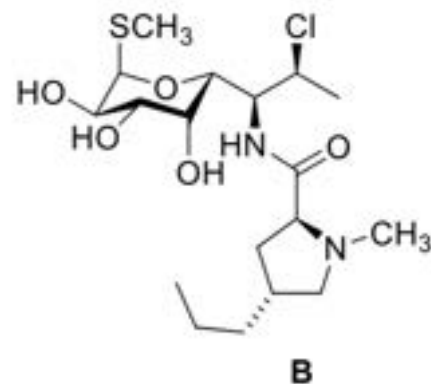
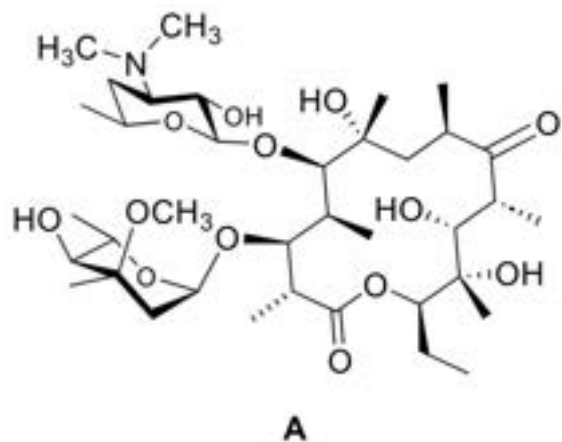
Vastaus: E Solun ulkopuolinen vapaa DNA siirtyy bakterisolun sisään

Antibioottien tehoa eri bakteereihin voidaan tutkia kasvattamalla bakteereja petrimaljalla ja laittamalla maljalle antibioottikiekkot (siniset, kirjaimin merkityt ympyrät kuvassa; samat kiekkot molemmilla maljoilla). Kiekosta leviää antibioottia sen ympäristöön. Antibiootin teho nähdään bakteerikasvustosta vapaana olevana alueena antibioottikiekkon ympärillä (kuvan valkoiset alueet). Maljalla 1 kasvaa gramnegatiivisia bakteereita ja maljalla 2 grampositiivisia. Fidaksomisiini on antibiootti, joka tehoaa grampositiivisiin bakteereihin, mutta jolle gramnegatiiviset bakteerit ovat vastustuskykyisiä. Mikä oheisen kuvan kiekkoista (A–E) sisältää todennäköisimmin fidaksomisiinia?



Vastaus: C

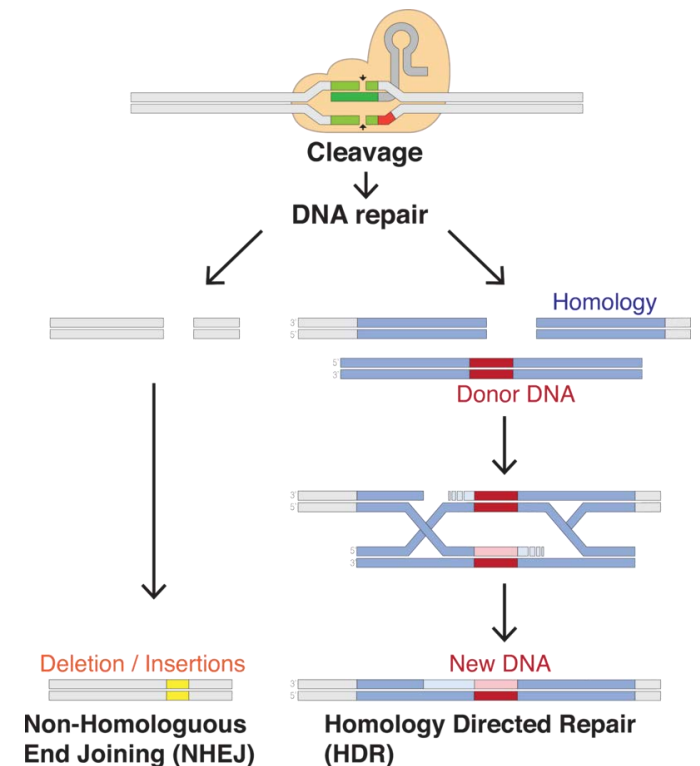
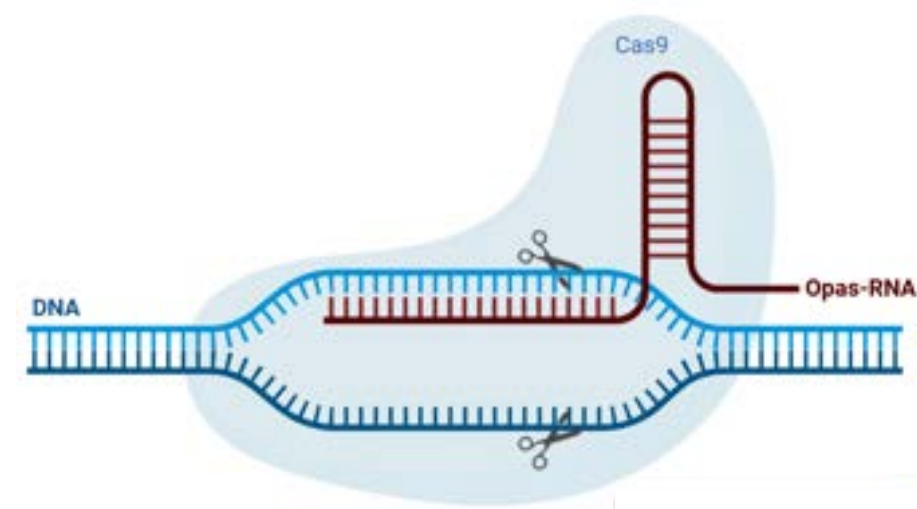
Klavulaanihappo on lääkeaine, jota voidaan käyttää tehostamaan antibioottihoitoa. Se estää bakteerien tuottaman beetalaktamaasientsyymin toimintaa. Beetalaktamaasi katalysoi antibioottimolekyylissä olevan laktaamin eli syklisen amidin hydrolyysiä, jolloin antibiootin teho häviää. Minkä oheisessa kuvassa esitetyn antibiootin tehoa klavulaanihappo voi lisätä?



Vastaus: D

CRISPR/Cas9

- Mahdollistaa kohdistetun geenien leikkaamisen
- Perustuu bakteerien Cas9-viruspuolustusjärjestelmään
- Opas-RNA-Cas9-kompleksi siirretään soluun usein sähköimpulssilla tai mikroinjektiolla
- Opas-RNA pariutuu pariutumissääntöjen mukaisesti kohde-DNA:han, Cas9-entsyymi leikkaa DNA:n osoitetusta paikasta
- Solun omat järjestelmät korjaavat DNA:n vauriot
 - Leikkaus + korjaus → poistogeeninen solu
 - Homologinen sekvenssi → muuntogeeninen solu



Tehtävä 5 (Biologian YO syksy 2021, t. 8):

CRISPR/Cas-menetelmällä voidaan tuottaa poistogeenisiä eläimiä, joiden perimästä on tutkimustarkoituksessa poistettu kokonaan jokin geeni. Yksi yleisimmin käytetyistä poistogeenisistä koe-eläimistä on hiiri.

- a) Selitä miten poistogeeninen hiiriyksilö voidaan tuottaa CRISPR/Cas-tekniikalla.

“Poistogeenisellä yksilöllä jokin geeni on tehty toimimattomaksi. CRISPR/Cas menetelmässä hedelmöitettyyn munasoluun siirretään esimerkiksi sähköimpulssilla opas-RNA-Cas9-kompleksi. Opas-RNA on syntetisoitu komplementaariseksi poistettavan geenin kanssa. Se sitoutuu munasolun tumassa geenin toiseen juosteeseen. Opas-RNA on sitoutuneena myös Cas9-proteiiniin, joka kykenee katkaisemaan DNA-juosteen halutusta kohdasta Opas-RNA:n ohjaamana. Solu pyrkii itsenäisesti korjaamaan aiheutetun vaurion, jolloin geeni vioittuu eikä enää toimi. Munasolu siirretään valeraskaaseen hiireen, jolloin kehittyvä yksilö on poistogeeninen.”

b) Tutkijat haluavat luoda uuden poistogeenisen eläinkannan, jonka kaikilta yksilöiltä puuttuu tietty geeni. Kerro, miten poistogeeninen kanta tehdään.

“Poistogeeninen kanta luodaan valitsemalla tuotetuista poistogeenisistä yksilöistä ne, jotka ilmentävät poistogeenisyyttä. Valinta voi perustua esimerkiksi kohdegeenin eristämiseen ja monistamiseen PCR:llä, josta nähdään, millä yksilöistä on geenissä poistuma. Poistogeenisiä yksilöitä risteytetään, kunnes kaikilta jälkeläisiltä puuttuu kohdegeeni. Näin homotsygoottinen poistogeeninen kanta on valmis.”

c) Pohdi, mitä poistogeenisten eläinkantojen avulla voidaan tutkia

“Poistogeenisillä eläinkannoilla voidaan tutkia monin tavoin, miten tietty geeni vaikuttaa yksilöön. Näin saadaan selville geenin vaikutukset alkionkehityksen alkuvaiheista alkaen. Poistogeenisiä eläinkantoja käytetään hyväksi esimerkiksi vakavia geneettisiä sairauksia tutkittaessa.”

10min tauko

Kysymyksiä?

Restriktio-insertio-kloonauus

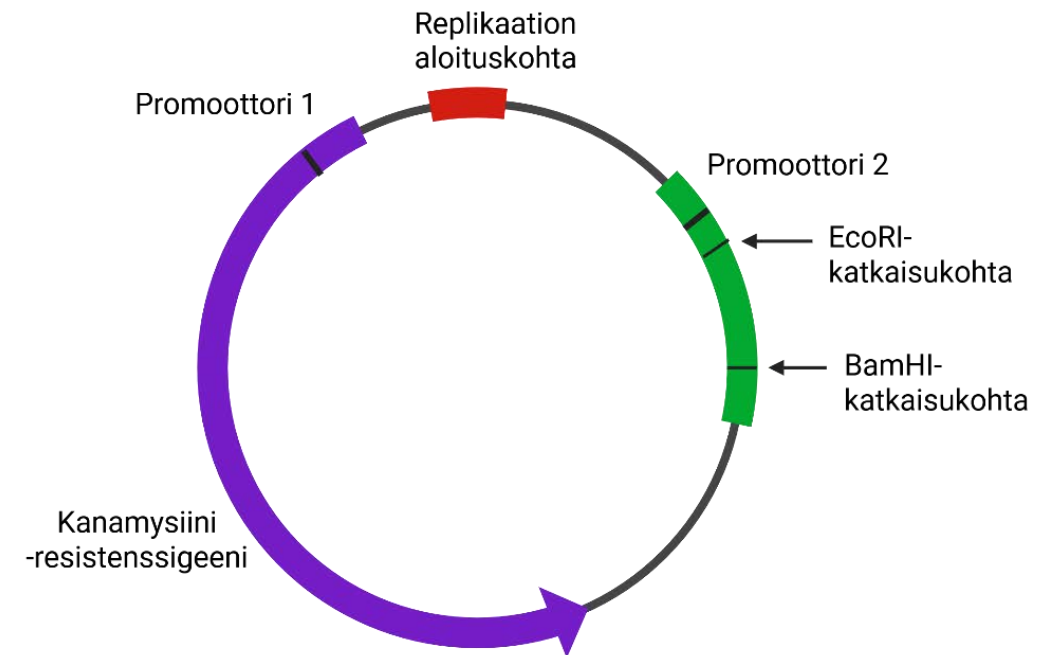
- Samankaltaisia tehtäviä on ollut YO-kokeissa, lääkiksen pääsykokeissa, viime vuoden pääsykokeessa C sekä muissa pääsykokeiden alojen kokeissa
 - Joko laaja yleiskuva (C 2025) tai syventyminen tiettyyn osaan
- Erittäin tärkeä geenitekniikan perusmenetelmä
- Testaa laajalti alueen kannalta keskeistä tietoa
- Hyvin mahdollisesti samankaltainen tehtävä tämän kevään valintakokeessa B

4.1

Sinulla on ihmisen insuliinia tuottavan geenin koodaava DNA, jossa on 5'-päässä restriktioentsyymien EcoRI katkaisukohta ja 3'-päässä restriktioentsyymien BamHI katkaisukohta. Sinulla on myös proteiinien ilmentämiseen soveltuva plasmidi, jossa on EcoRI- ja BamHI-katkaisukohdat sekä kanamysiini-nimiselle antibiootille resistenssiä koodaava geeni. Tarkoituksesi on valmistaa näistä yhdistelmäplasmidi ja siirtää se ampisilliini-antibiootille resistenttiin *E. coli* -kantaan plasmidin monistamista varten.

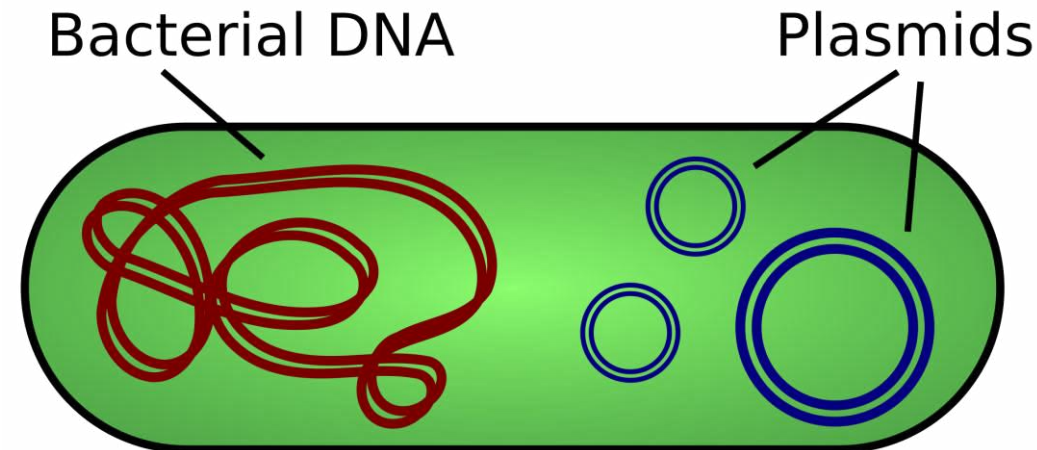
Käytössäsi on geenitekniikan laboratorion normaali varustus, EcoRI- ja BamHI-restriktioentsyymejä, ligaasia, bakteerimaljoja ja molempia antibiootteja. Miten valmistat näillä varusteilla yhdistelmäplasmidin ja siirrät sen kyseiseen *E. coli* -kantaan?

Alla kuva käytössäsi olevasta plasmidista.



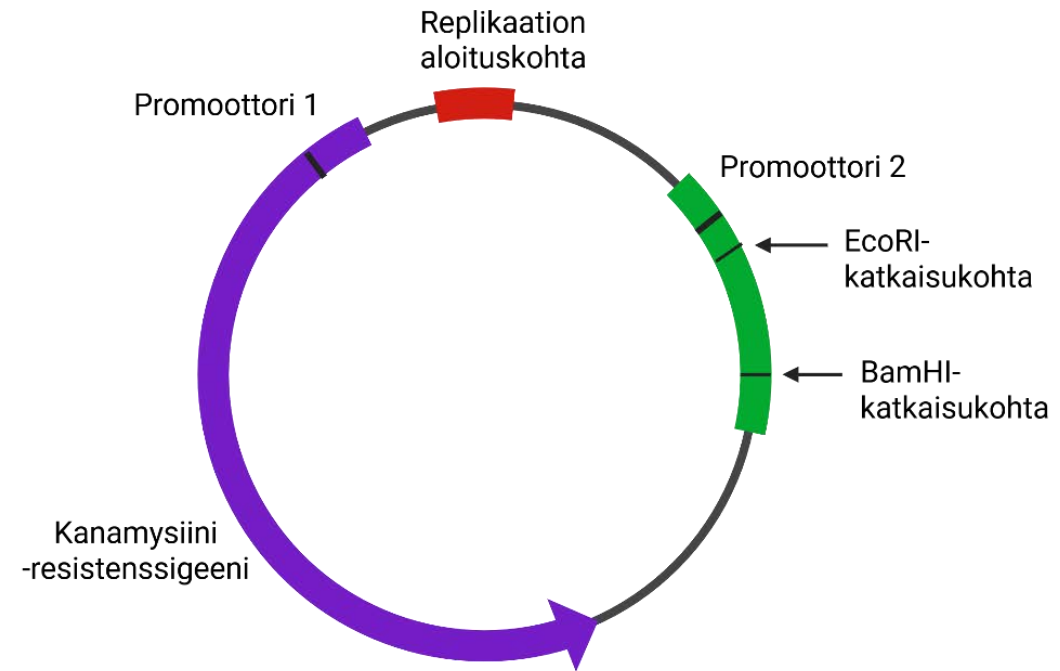
Plasmidit

- Rengasrakenteinen kromosomin ulkopuolinen DNA-molekyyli, usein noin 1000 – 100 000 emäsparia pitkä
- Varsinkin bakteereilla, tavataan myös arkeoneilla ja joillain aitotumaisilla.
- Kykenee replikoitumaan omana yksikkönään
 - Replikaation aloituskohta (ORI)
- Kantavat usein muita geenejä
- Erittäin tärkeitä geenitekniikassa



Plasmidit geenitekniikassa

- Käytetään yleisesti uusien geenien siirtämiseen bakteereihin
- Plasmidivektorit sisältävät vähintään ORI:n, antibioottiresistenssigeenin sekä kloonauksen kohdan, johon haluttu geeni voidaan kloonata.
- Yleisesti plasmidit transformoidaan bakteerisoluihin, joskus myös konjugaatiolla



Restriktioentsyymit ja ligaasit

- Restriktioentsyymit

- Entsyymejä, jotka tunnistavat tietyn kohdan kaksijuosteisesta DNA:sta ja katkaisevat sen molemmat juosteet
- Tunnistuskohda on spesifinen entsyymille, kaikilla on oma tunnistuskohtansa
- Alun perin bakteerien puolustusmekanismi viruksilta
- Käytetään geenitekniikassa yhdessä ligaasien kanssa

- Ligaasit

- Entsyymejä, jotka korjaavat DNA:ssa tapahtuneita toisen juosteen katkeamisia
- Liittävät esimerkiksi RE:n katkaiseman DNA:n takaisin yhteen

EcoR I



BamH I

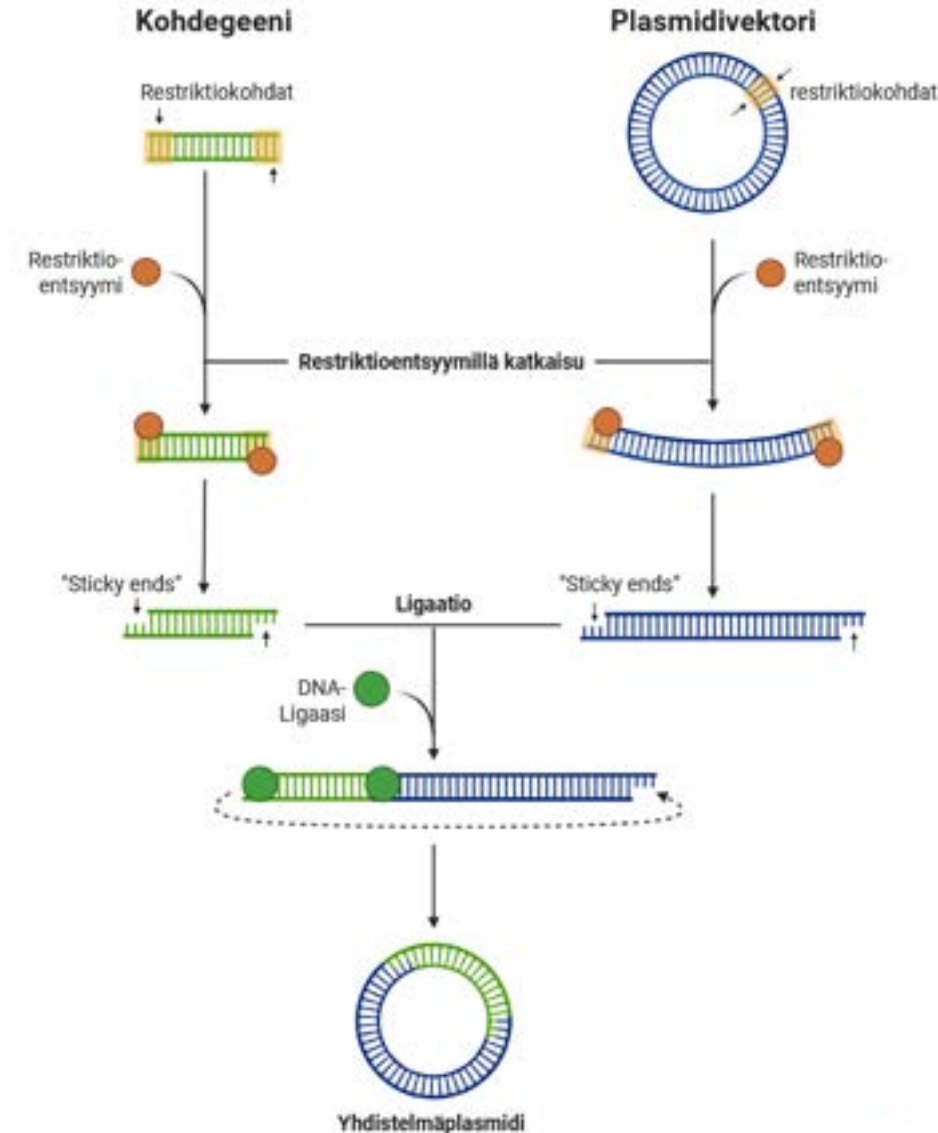


Pst I



Restriktio-insertio-kloonaus

- Lisätään kohdegeenin päihin restriktiokohdat
 - Tehtävänannossa valmiina, muuten esim. PCR
- Katkaistaan kohdegeenistä ja plasmidista samoilla entsyymeillä
- Yhdistetään kohdegeeni plasmidiin ligaasilla
- Lopputuloksena yhdistelmäplasmidi, transformoidaan *E. coli* -kantaan



Huomioita antibioottiresistenssistä:

- Antibiootti = aine, joka on haitallinen bakteereille
- Antibioottiresistenssi = bakteerin kyky kasvaa antibiootin läsnäollessa
 - Esimerkiksi antibioottia hajoittava entsyymi
- Plasmidin antibioottiresistenssigeeni kanamysiinille
 - Saadaan aikaiseksi valintapaine
- *E. coli* –kannan resistenssi ampisilliinille
 - Vain halutut bakteerit kasvavat
- Kasvatetaan bakteerit maljalla, jossa molempia antibiootteja
 - Näin maljalla pitäisi kasvaa vain tietyn *E. coli* –kannan niitä yksilöitä, joihin plasmidi on transformoitu onnistuneesti

4.1

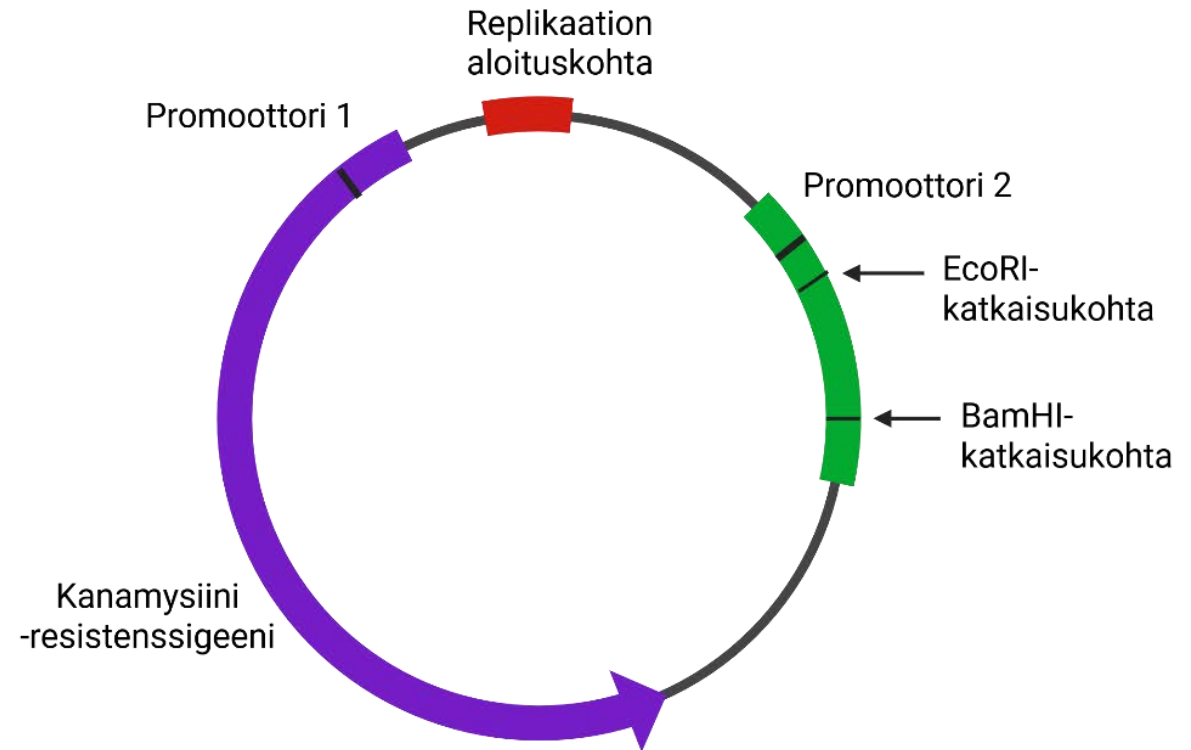
Sinulla on ihmisen insuliinia tuottavan geenin koodaava DNA, jossa on 5'-päässä restriktioentsyymien EcoRI katkaisukohta ja 3'-päässä restriktioentsyymien BamHI katkaisukohta. Sinulla on myös proteiinien ilmentämiseen soveltuva plasmidi, jossa on EcoRI- ja BamHI-katkaisukohdat sekä kanamysiini-nimiselle antibiootille resistenssiä koodaava geeni. Tarkoituksesi on valmistaa näistä yhdistelmäplasmidi ja siirtää se ampicilliini-antibiootille resistenttiin *E. coli* -kantaan plasmidin monistamista varten.

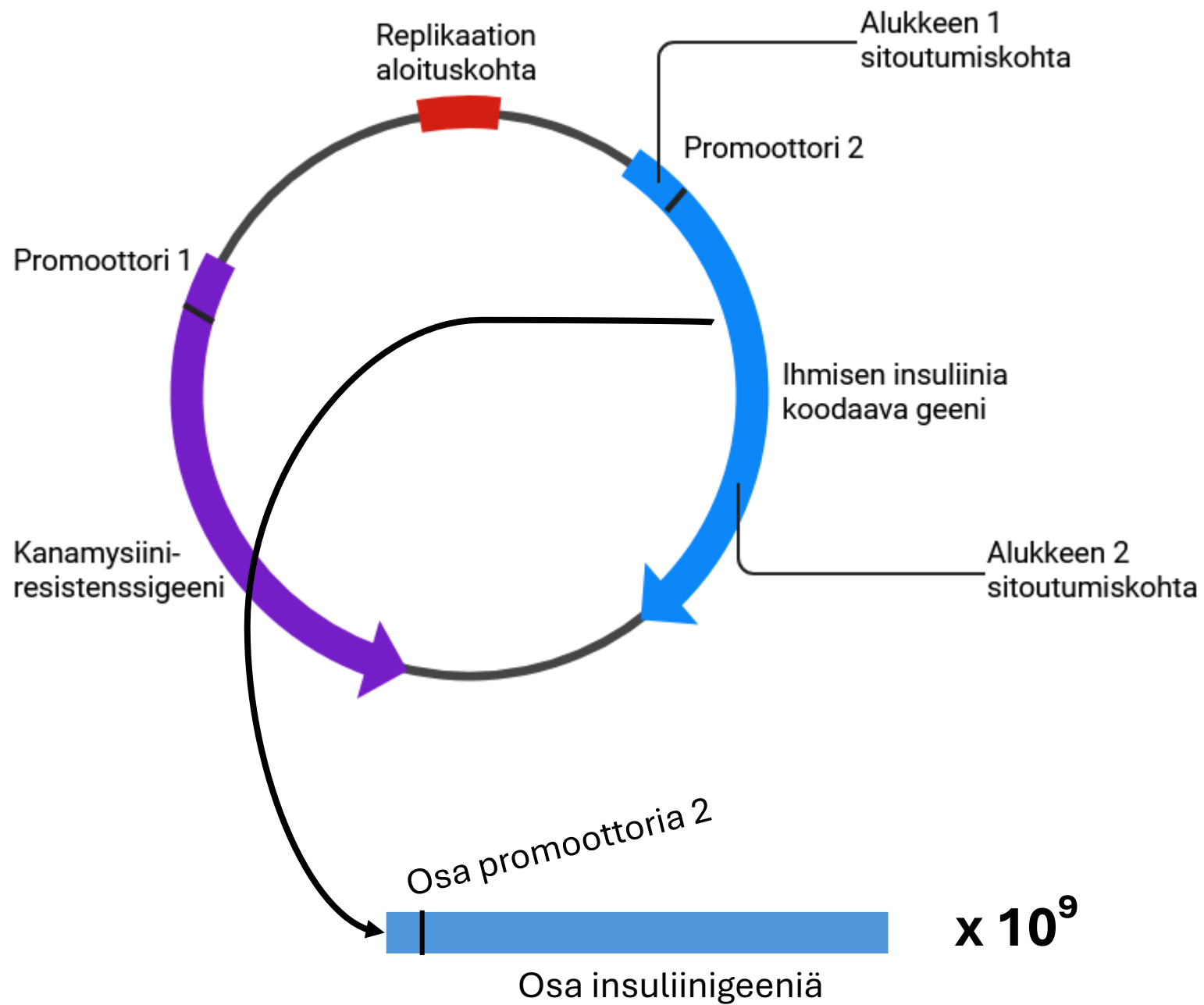
Käytössäsi on geenitekniikan laboratorion normaali varustus, EcoRI- ja BamHI-restriktioentsyymejä, ligaasia, bakteerimaljoja ja molempia antibiootteja. Miten valmistat näillä varusteilla yhdistelmäplasmidin ja siirrät sen kyseiseen *E. coli* -kantaan?

“Katkaistaan sekä plasmidi että ihmisen insuliinia tuottava geeni restriktioentsyymeillä eri reaktioseoksissa. Yhdistetään tämän jälkeen katkaistu plasmidi ja kohdegeeni ja lisätään ligaasia. Ligaasi liittää geenin plasmidiin. Toteutetaan tämän jälkeen transformaatio, jossa yhdistelmäplasmidi siirretään bakteerikantaan. Kasvatetaan bakteereita maljalla, jolla on sekä ampicilliinia että kanamysiinia. Tällöin vain bakteerit, joilla on sekä luontainen ampicilliiniresistenssi, että yhdistelmäplasmidin antama kanamysiiniresistenssi, kasvavat maljoilla.”

4.2

Luulet onnistuneesi yhdistelmäplasmidisi siirtämisessä *E. coli* -bakteerikantaan. Haluat kuitenkin varmistaa siirroksen onnistumisen PCR-kokeella. Sinulla on alukkeet, joista toinen sitoutuu plasmidin promoottorialueelle 2 ja toinen siirtämään ihmisen insuliinigeeniin. Miten tarkistat PCR:n ja geelielektroforeesin avulla, onko bakteerikannassasi yhdistelmäplasmidi? Miksi alukkeiden on hyvä sitoutua eri osiin plasmidia?





Geelielektroforeesi

- Varautuneiden aineiden erottelumenetelmä
- Luodaan sähkökenttä geeliin, jossa varautuneet aineet pääsevät kulkemaan
- DNA on negatiivisesti varautunut → kulkee kohti positiivista anodia
- DNA-molekyylin kulkunopeus sähkökentässä riippuu sen pituudesta
 - Lyhyt DNA kulkee pidemmälle kuin pitkä
- DNA saadaan eroteltua pituuden mukaan



Kuva: Fattahi Bafghi ym. (2019)

4.2

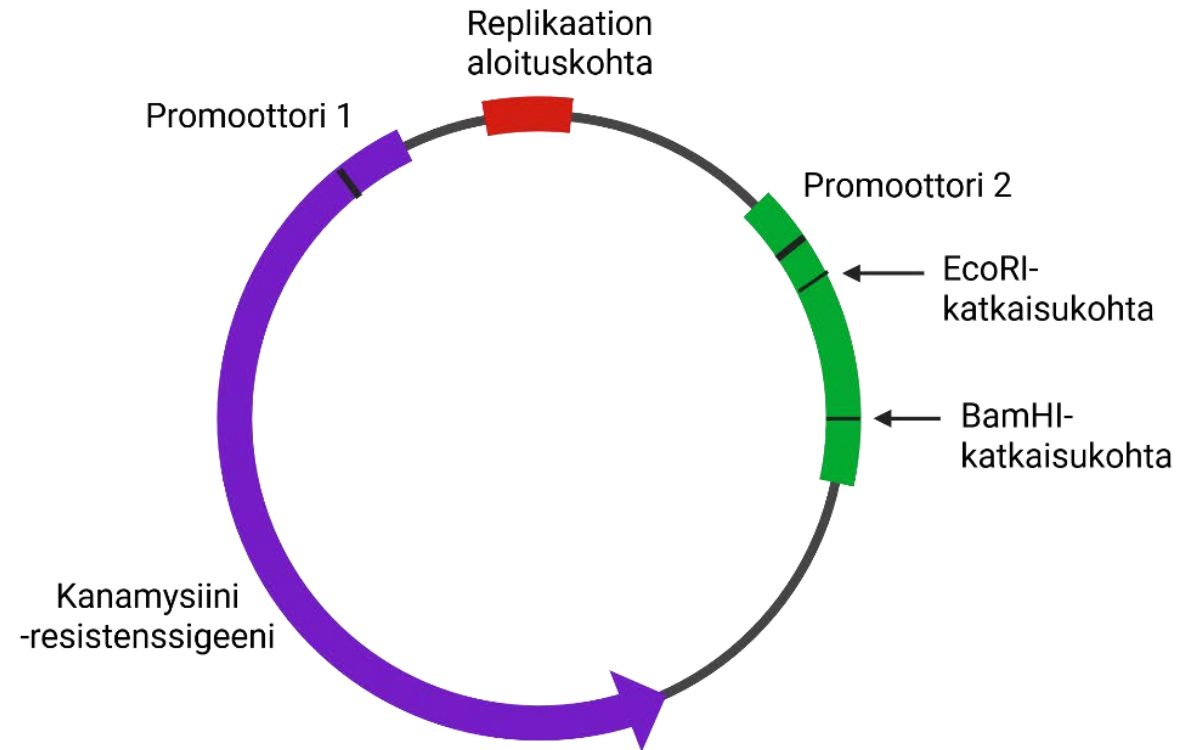
Luulet onnistuneesi yhdistelmäplasmidisi siirtämisessä *E. coli* -bakteerikantaan. Haluat kuitenkin varmistaa siirroksen onnistumisen PCR-kokeella. Sinulla on alukkeet, joista toinen sitoutuu plasmidin promoottorialueelle 2 ja toinen siirtääsi ihmisen insuliinigeeniin. Miten tarkistat PCR:n ja geelielektroforeesin avulla, onko bakteerikannassasi yhdistelmäplasmidi? Miksi alukkeiden on hyvä sitoutua eri osiin plasmidia?

“Eristetään bakteereista plasmidi-DNA ja toteutetaan sille PCR-monistus. Monistuksessa tuotetaan alukkeiden rajaamaa fragmenttia, joka ilmenee tasan tarkkaan yhdistelmäplasmidissa. Monistuksen jälkeen reaktioseos erotellaan geelielektroforeesilla. Tällöin eripituiset DNA-fragmentit erottuvat toisistaan. Bakteerisoluiissa, joissa on yhdistelmäplasmidia, pitäisi näkyä tuotetun fragmentin pituinen, muuta DNA:ta paljon selkeämpi, raita.

Alukkeiden on hyvä sitoutua eri osiin plasmidia, jotta monistetun fragmentin tiedetään olevan yhdistelmäplasmidista. Jos esimerkiksi molemmat alukkeet sitoutuisivat alkuperäiseen plasmidiin, emme tietäisi onko plasmidissa insuliinigeeniä.“

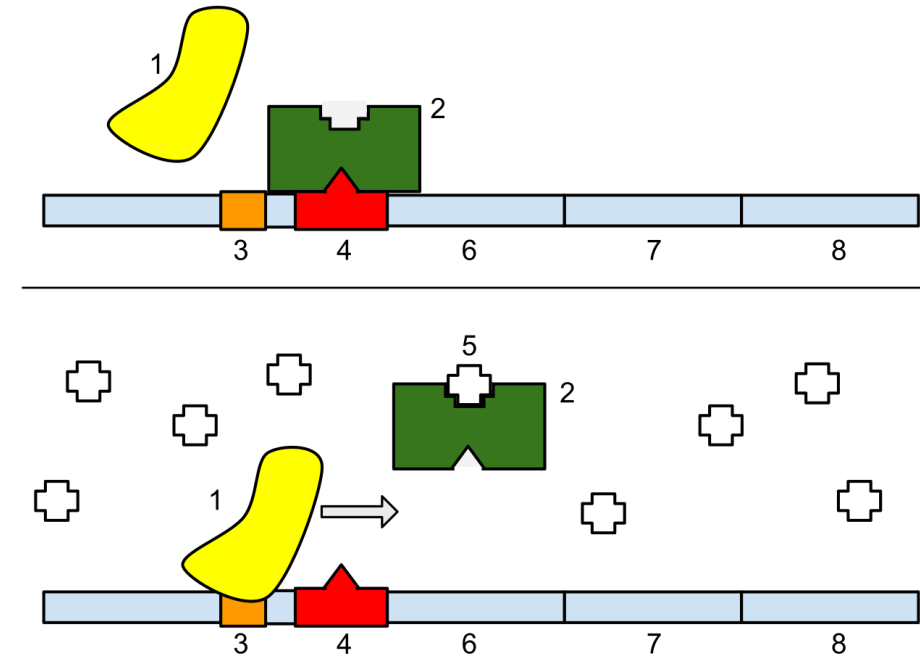
4.3

E. coli -bakteerikantasi on monistunut onnistuneesti. Eristät yhdistelmäplasmidisi monistuskannasta ja siirrät sen uuteen *E. coli* -kantaan insuliinin tuottamista varten. Plasmidisi promoottori 1 on aina aktiivinen, kun taas promoottori 2 toimii vain, kun se indusoidaan aktiiviseksi IPTG-nimisellä yhdisteellä. Minkä takia haluat vaihtaa bakteerikantaa? Minkä takia plasmidissasi on kaksi erilaista promoottoria?



Promoottorit

- Transkription ulkopuolinen geenin osa, joka säätelee transkriptiokoneiston sitoutumista geeniin
- Sekä esitumallisilla että aitotumaisilla, rakenteessa ja toiminnassa eroja
- Promoottori voi olla aina toiminnallinen tai se voi tarvita signaalin aktivoituakseen
- Hyvin tärkeä geenisäätelyn mekanismi



Kuva: Wikimedia Commons

4.3

E. coli -bakteerikantasi on monistunut onnistuneesti. Eristät yhdistelmäplasmidisi monistuskannasta ja siirrät sen uuteen *E. coli* -kantaan insuliinin tuottamista varten. Plasmidisi promoottori 1 on aina aktiivinen, kun taas promoottori 2 toimii vain, kun se indusoidaan aktiiviseksi IPTG-nimisellä yhdisteellä. Minkä takia haluat vaihtaa bakteerikantaa? Minkä takia plasmidissasi on kaksi erilaista promoottoria?

“Eri bakteerikannoilla on erilaisia ominaisuuksia. Plasmidin monistamiseen käytetty bakteerikanta ei sovellu yhtä hyvin insuliinin tuotantoon kuin siihen erikoistunut tuotantokanta. Kanta vaihdetaan, jotta insuliinin tuotto onnistuisi mahdollisimman hyvin.

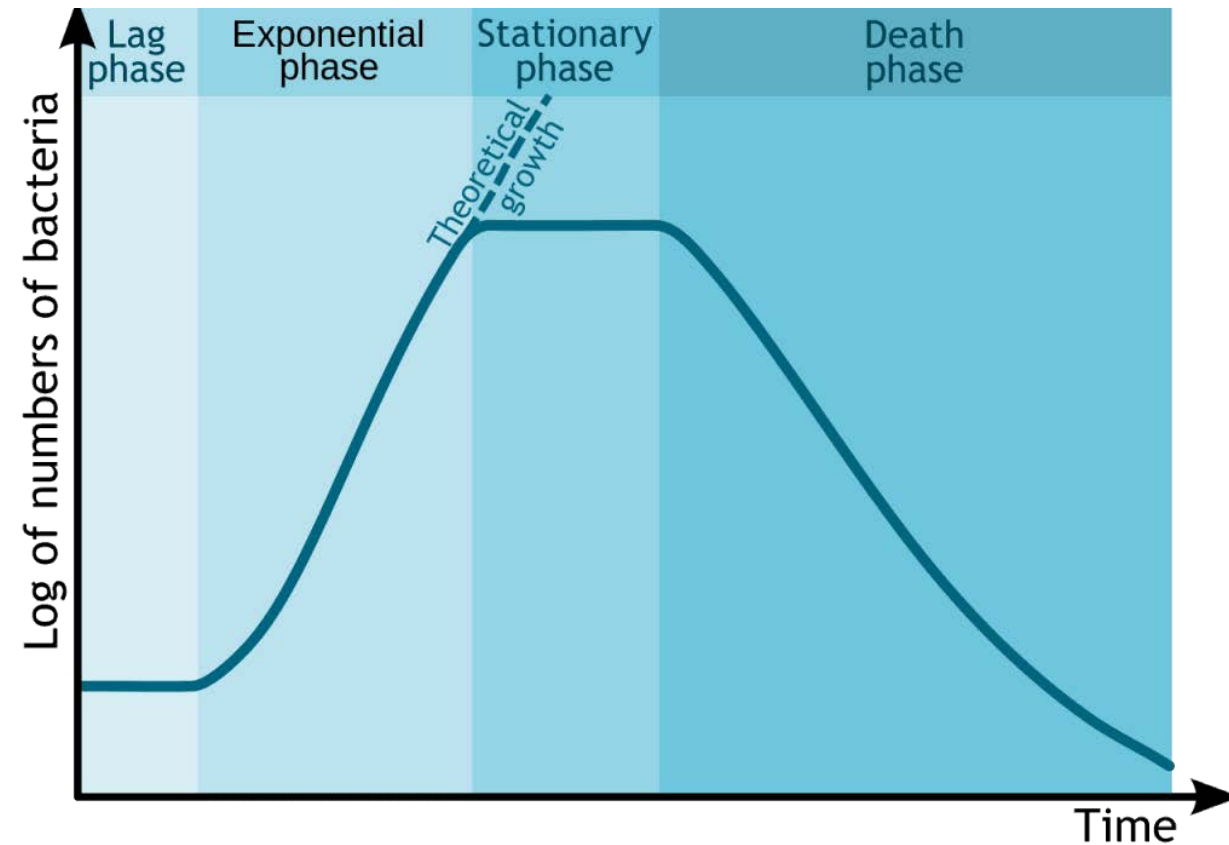
Plasmidissa on kaksi erilaista promoottoria, koska sen kahta geenituotetta halutaan tuottaa eri tilanteissa. Kanamysiiniresistenssin promoottori on koko ajan aktiivinen, koska bakteeri tarvitsee geenin tuotetta selvittääkseen kanamysiinia sisältävillä maljoilla. Toisaalta insuliinia halutaan tuottaa kontrolloidusti, joten on tärkeää, että sitä säätelee promoottori, joka ei ole aina aktiivinen. Näin insuliinin tuotanto voidaan käynnistää vasta, kun sille on tarvetta eivätkä bakteerit kuluta kaikkia resurssejaan ylimääräiseen proteiinisynteesiin.”

4.4

Siirrostat kasvatusmaljalta yhden pesäkkeen uuden *E. coli* -kantasi bakteereja ravintoliuokseen insuliinin tuottamiseksi. Annat kasvuston kasvaa ravistelijassa noin muutaman tunnin ajan ennen kuin lisäät liuokseen IPTG:tä. Lisäämisen jälkeen alennat ravistelijan lämpötilaa ja annat kasvuston kasvaa yön yli. Seuraavana aamuna eristät kasvatetuista bakteereista niiden liukoiset proteiinit. Miksi annoit kasvuston kasvaa ennen IPTG:n lisäämistä? Miten varmistat, että kasvustosi on tuottanut insuliinia?

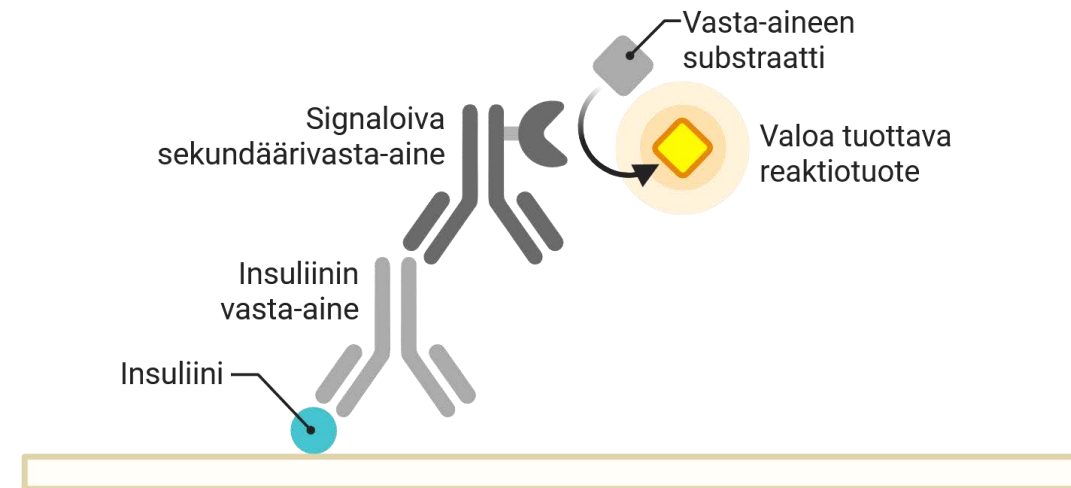
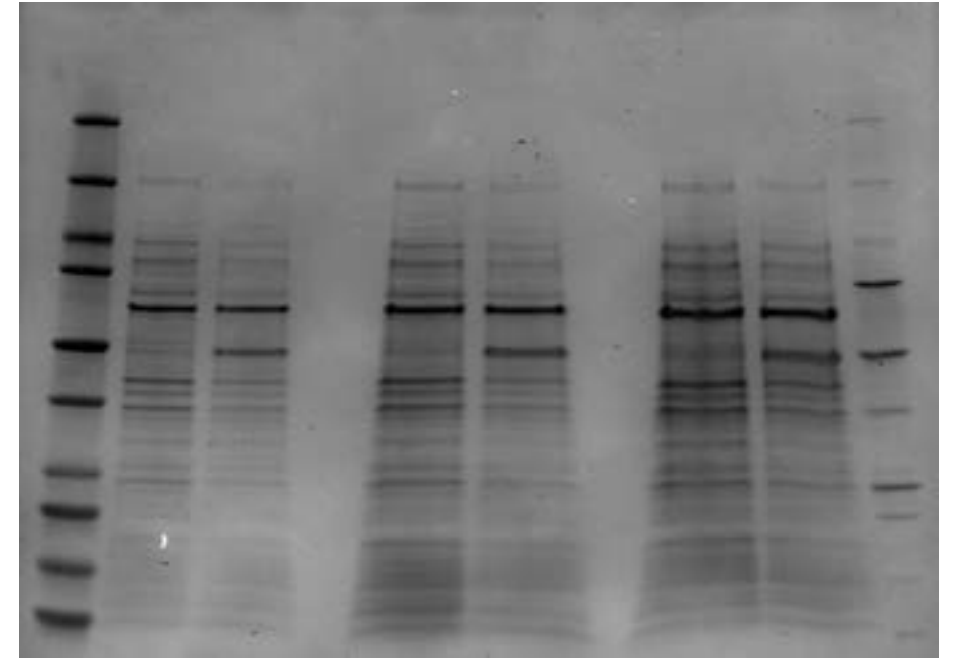
Bakteerien kasvu

- Bakteerit lisääntyvät jakautumalla
- Bakteerien kasvu ei kuitenkaan ole koko aikaa eksponentiaalista
 - “Lag phase”, eli ympäristöön sopeutuminen
 - Ympäristön kantokyky
- Bakteeripopulaatio on vahvimmillaan eksponentiaalisen kasvun vaiheessa



Proteiinin tutkiminen

- SDS-PAGE (natriumdodekyylisulfaatti-polyakryyliamidigeelielektroforeesi)
 - Proteiineille tarkoitettu geelielektroforeesi
- Spesifinen tarkastelu vasta-aineilla
 - Insuliiniin sitoutuva vasta-aine + tapa signaloida sitoutumista
- Kromatografinen eristäminen
 - Affiniteettikromatografia

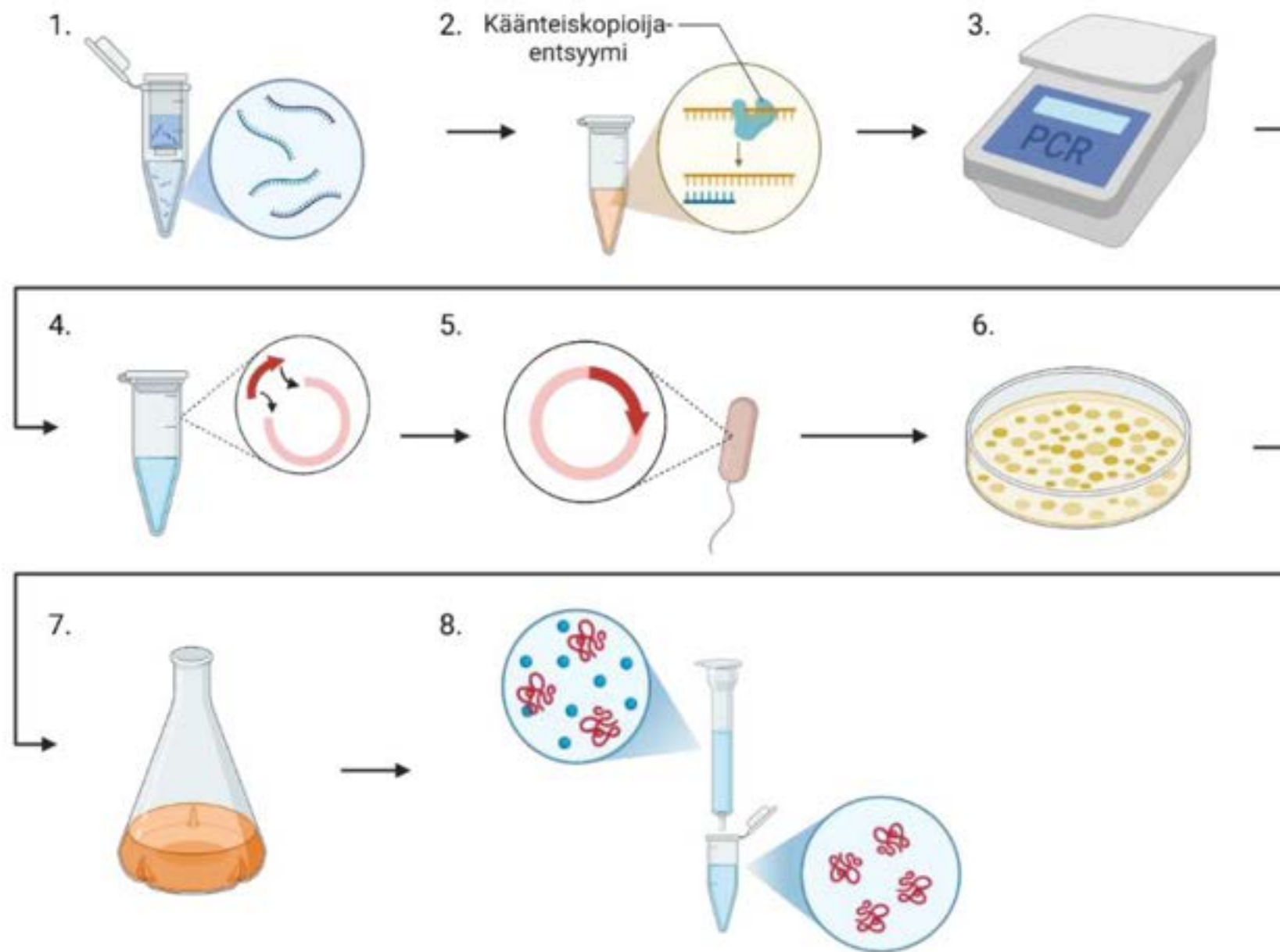


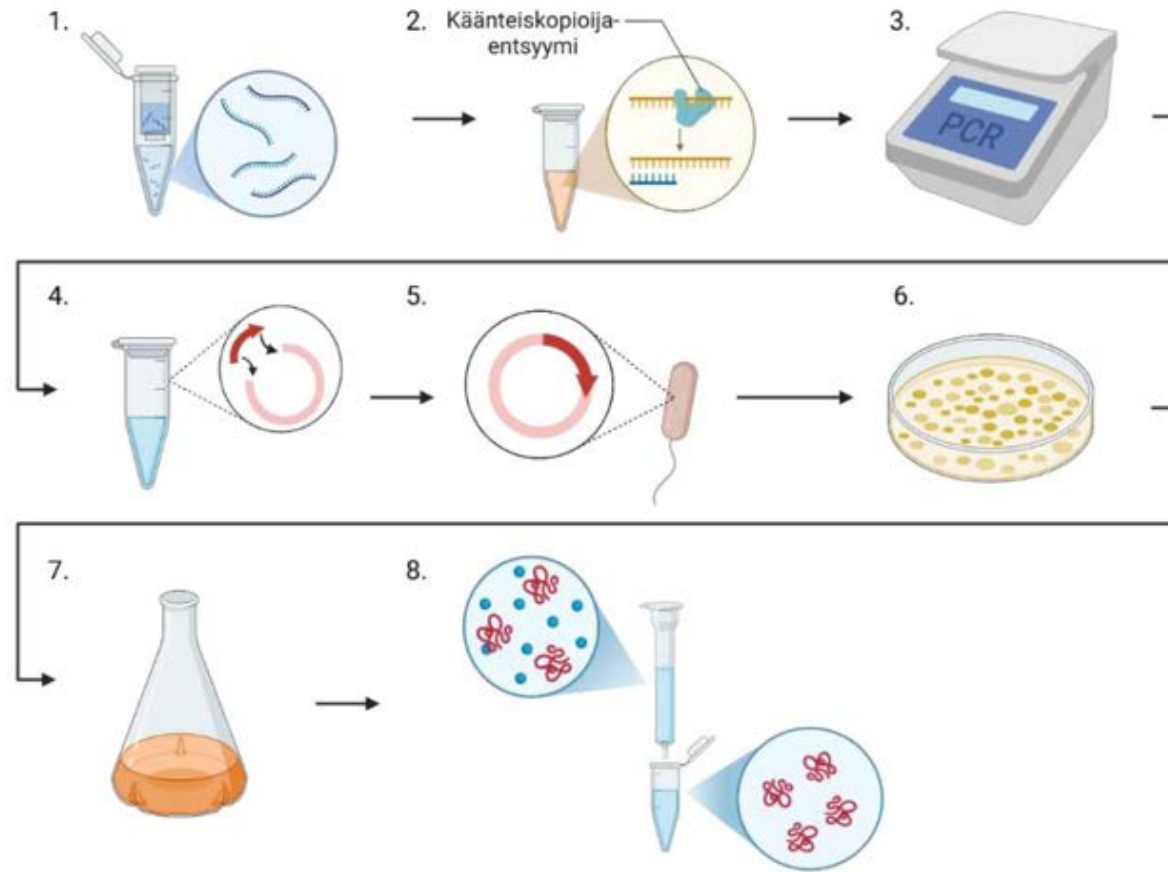
4.4

Siirrostat kasvatusmaljalta yhden pesäkkeen uuden *E. coli* -kantasi bakteereja ravintoliuokseen insuliinin tuottamiseksi. Annat kasvuston kasvaa ravistelijassa noin muutaman tunnin ajan ennen kuin lisäät liuokseen IPTG:tä. Lisäämisen jälkeen alennat ravistelijan lämpötilaa ja annat kasvuston kasvaa yön yli. Seuraavana aamuna eristät kasvatetuista bakteereista niiden liukoiset proteiinit. Miksi annoit kasvuston kasvaa ennen IPTG:n lisäämistä? Miten varmistat, että kasvustosi on tuottanut insuliinia?

“Bakteerikanta kasvaa eksponentiaalisesti, mutta sillä kestää aikaa päästä eksponentiaalisen kasvun vaiheeseen. Proteiinin tuoton maksimoimiseksi bakteerikannan tulee olla kasvuvaiheessa, mutta silti kaukana ympäristönsä kantokyvyn rajoilta.

Insuliinin tuotanto voidaan varmistaa esimerkiksi vertaamalla bakteerikasvustosta otettuja näytteitä ennen ja jälkeen IPTG:n lisäyksen. SDS-PAGE elektroforeesia käyttämällä voidaan nähdä vahvasti ekspressoituva uusi proteiini, jonka voidaan olettaa olevan insuliini. Tarkemmin insuliinin tuotanto voidaan varmistaa esimerkiksi käyttämällä insuliinia sitovaa vasta-ainetta tai puhdistamalla insuliini affiniteettikromatografialla.”

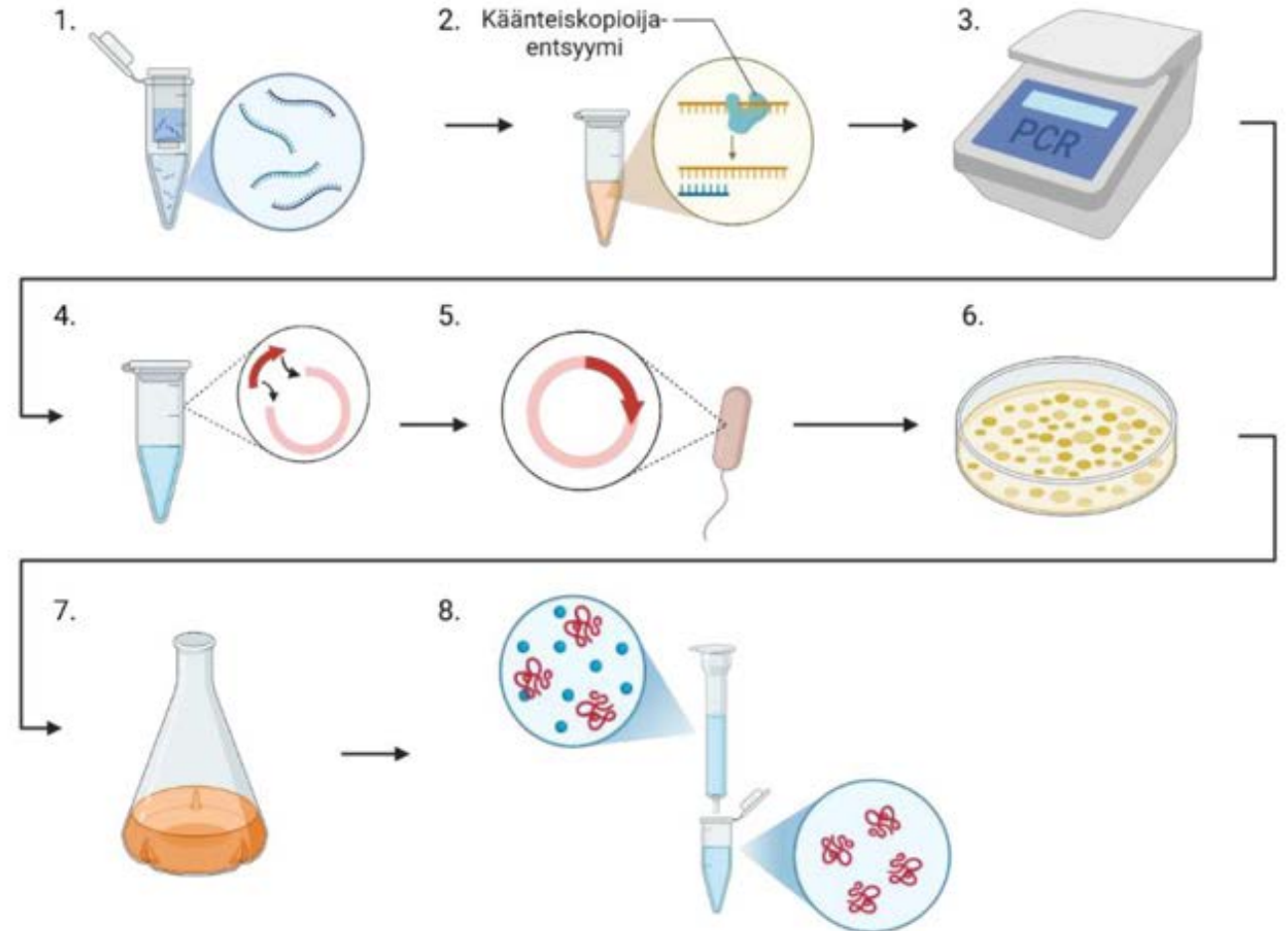




Rekombinanttiproteiinituotanto on prosessi, jossa tuotetaan proteiineja käyttämällä geenitekniikkaa. Tämä tapahtuu siirtämällä haluttu geeni, joka koodaa tiettyä proteiinia, isäntäsoluun (esim. bakteeriin tai hiivaan). Isäntäsolu tuottaa sitten tätä proteiinia, jota voidaan kerätä ja käyttää erilaisiin tarkoituksiin, kuten lääkkeisiin, tutkimukseen tai teollisuuteen. Yllä olevan kuvan ja aiemmin oppimasi avulla vastaa seuraaviin kysymyksiin

Mikä tapahtuu kuvan kohdassa 1?

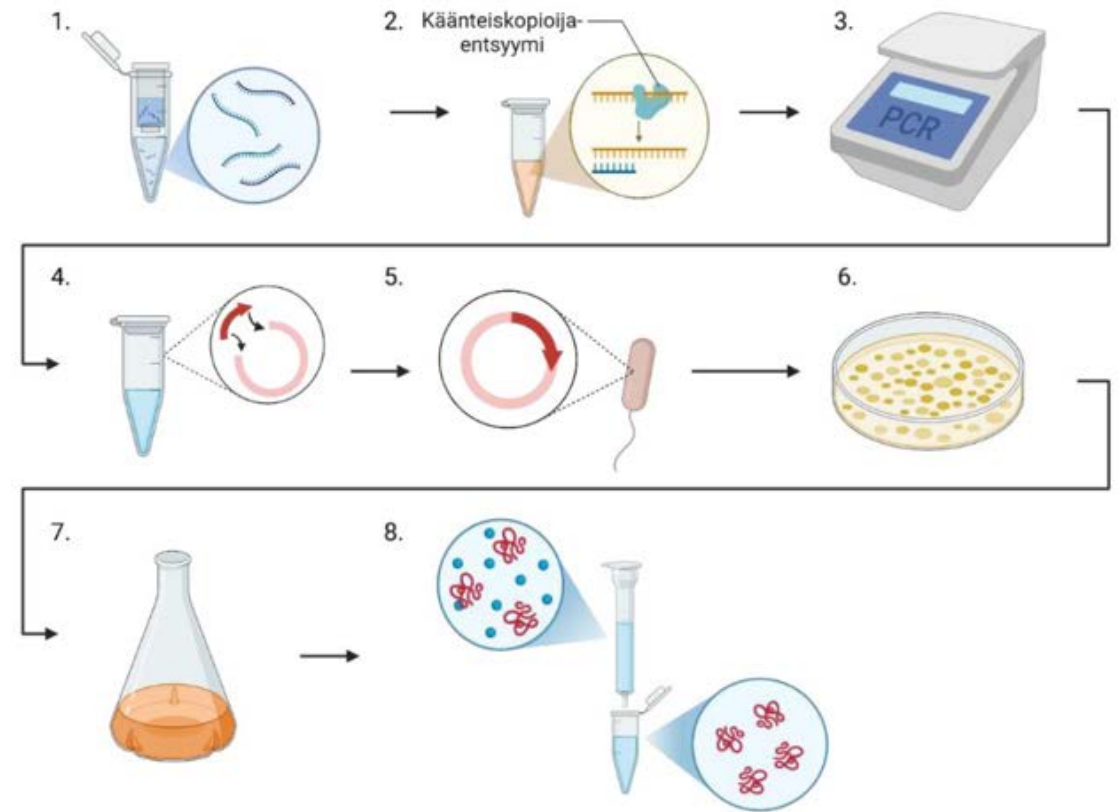
- a) proteiinin puhdistus
- b) geenin kloonauus
- c) solujen kasvatus
- d) proteiinin eristäminen



Vastaus: B Geenin kloonauus

Miksi kohdassa 2 hyödynnetään käänteiskopioijaentsyymiä?

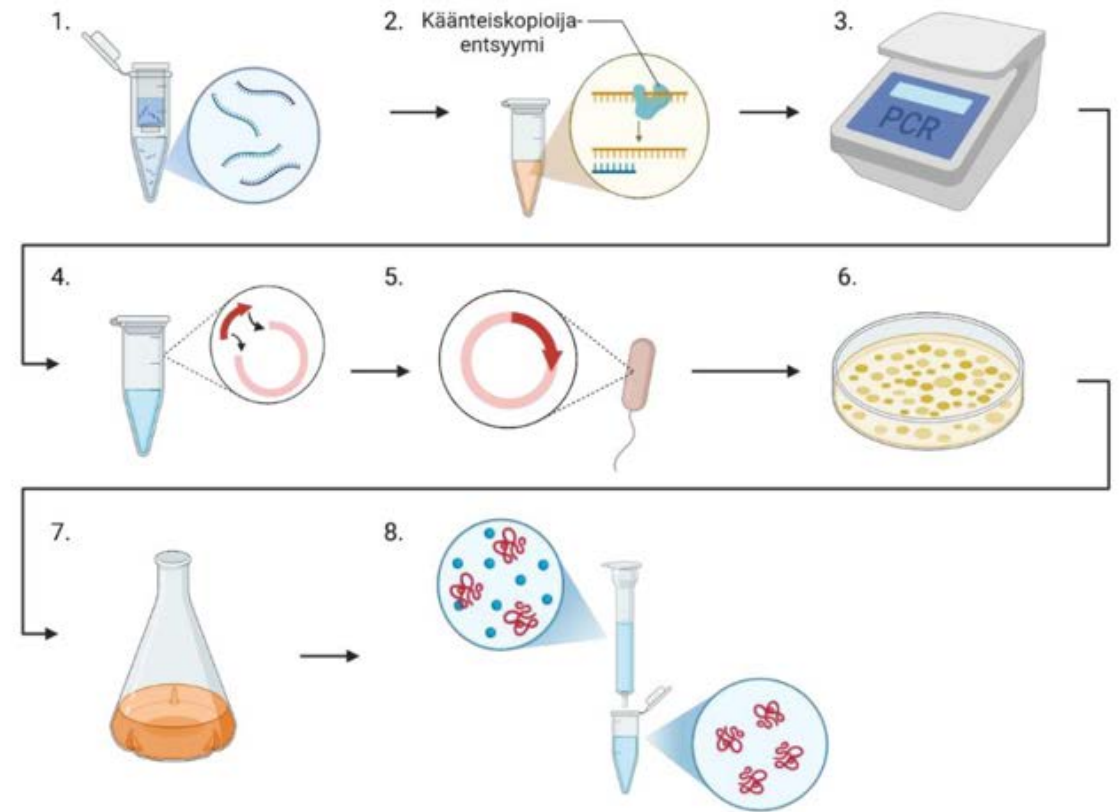
- a) Kohdegeenin monistamiseksi
- b) Nukleiinihappojen eristämiseksi
- c) Geenin mRNA:n muuttamiseksi DNA:ksi
- d) Restriktioentsyymien katkaisukohtien lisäämiseksi geenin päihin



Vastaus: C Geenin mRNA:n muuttamiseksi DNA:ksi

Mitä seuraavista menetelmistä käytetään geenin siirtämiseen isäntäsoluun?

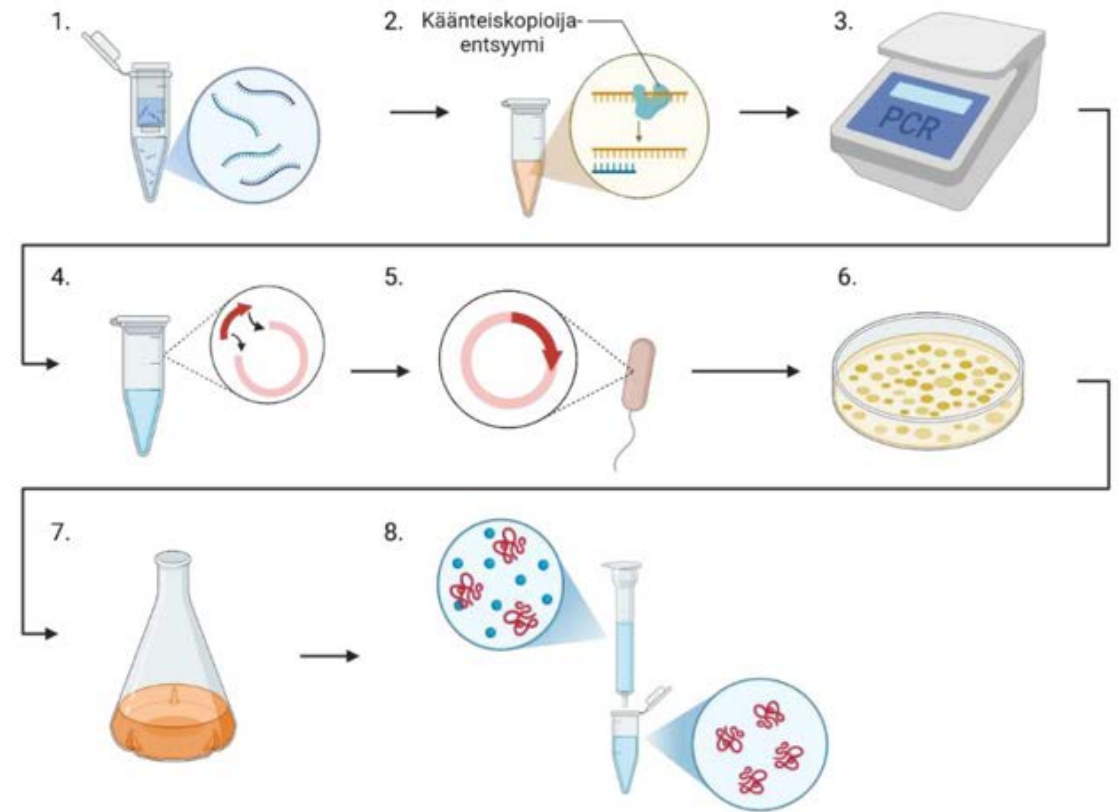
- a) elektroforeesi
- b) PCR (polymeraasiketjureaktio)
- c) transformaatio
- d) kromatografia



Vastaus: C transformaatio

Missä muodossa geeni on isäntäsolussa?

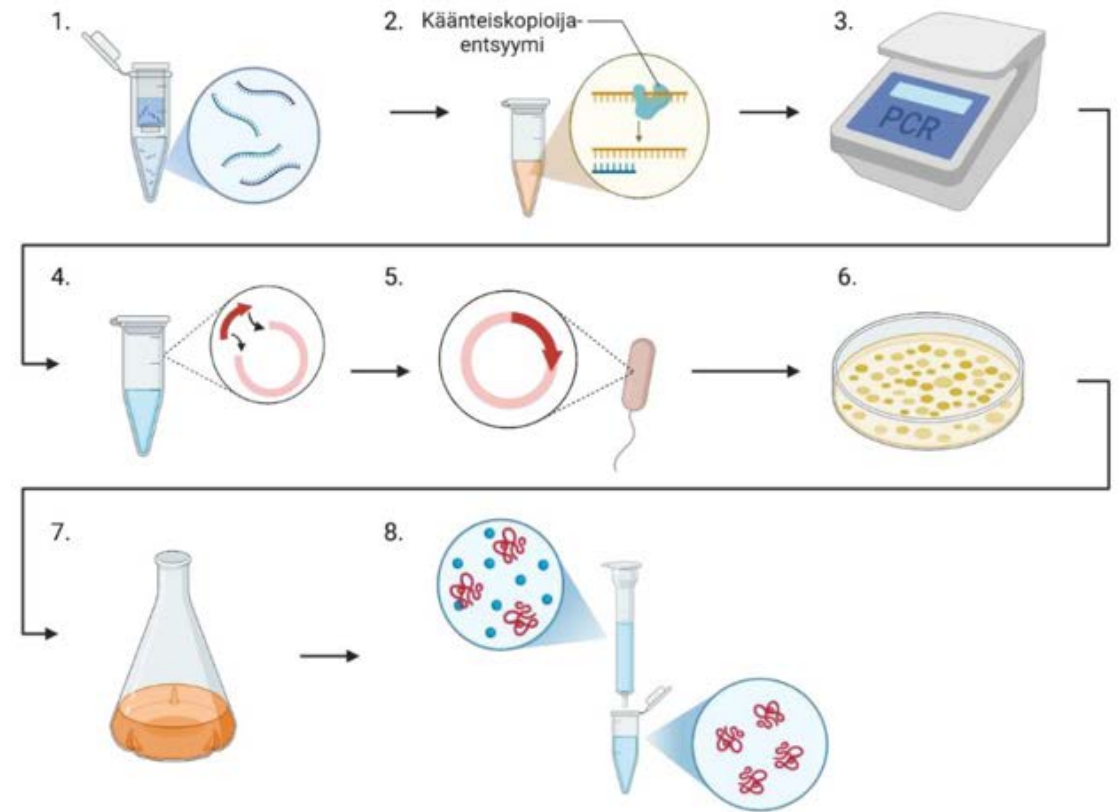
- a) rengasmaisena plasmidina
- b) integroituna isäntäsolun genomiin
- c) mRNA:na
- d) yksijuosteisena DNA:na



Vastaus: A rengasmaisena plasmidina

Miksi isäntäsolua kasvatetaan maljalla kohdassa 6?

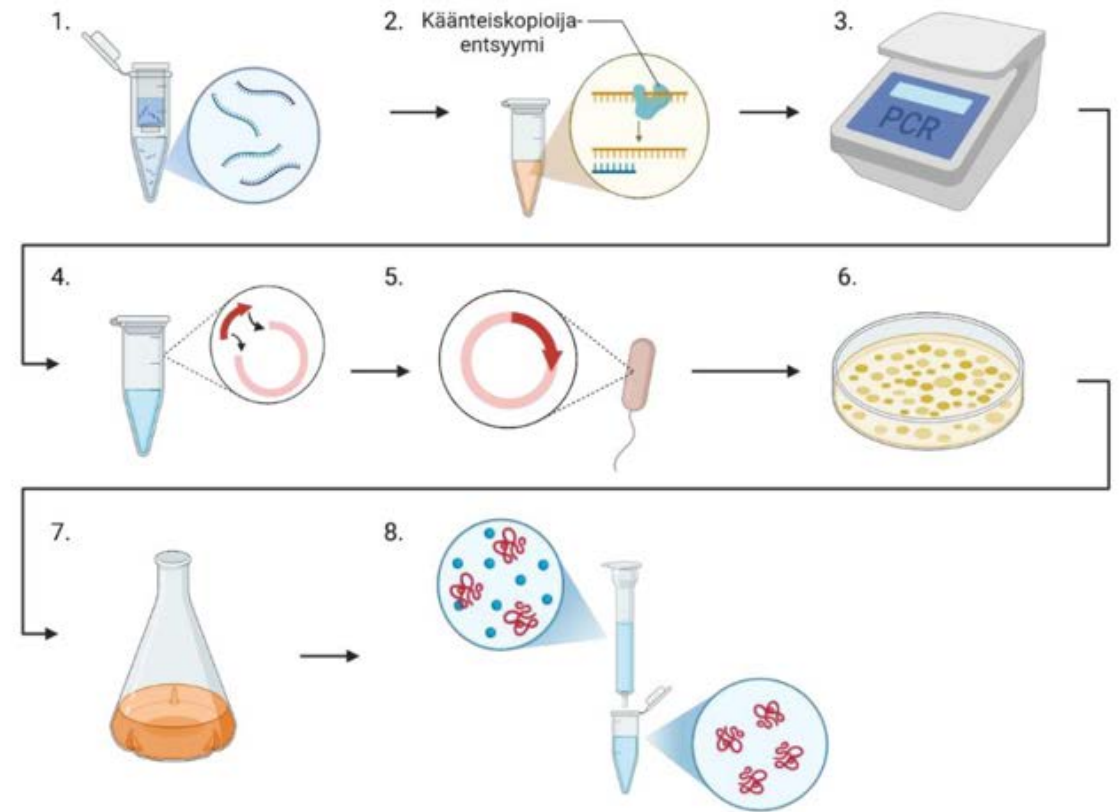
- a) kohdeproteiinin tuottamiseksi
- b) ylimääräisen DNA:n poistamiseksi
- c) antibiootin tehon tutkimiseksi
- d) kohdegeenin siirtymisen varmistamiseksi



Vastaus: D kohdegeenin siirtymisen varmistamiseksi

Mikä tapahtuu kuvan kohdassa 7?

- a) kohdeproteiinin tuotto
- b) kohdegeenin eristäminen
- c) isäntäsolujen värjääminen
- d) kohdegeenin leikkaus entsyymeillä



Vastaus: A kohdeproteiinin tuotto

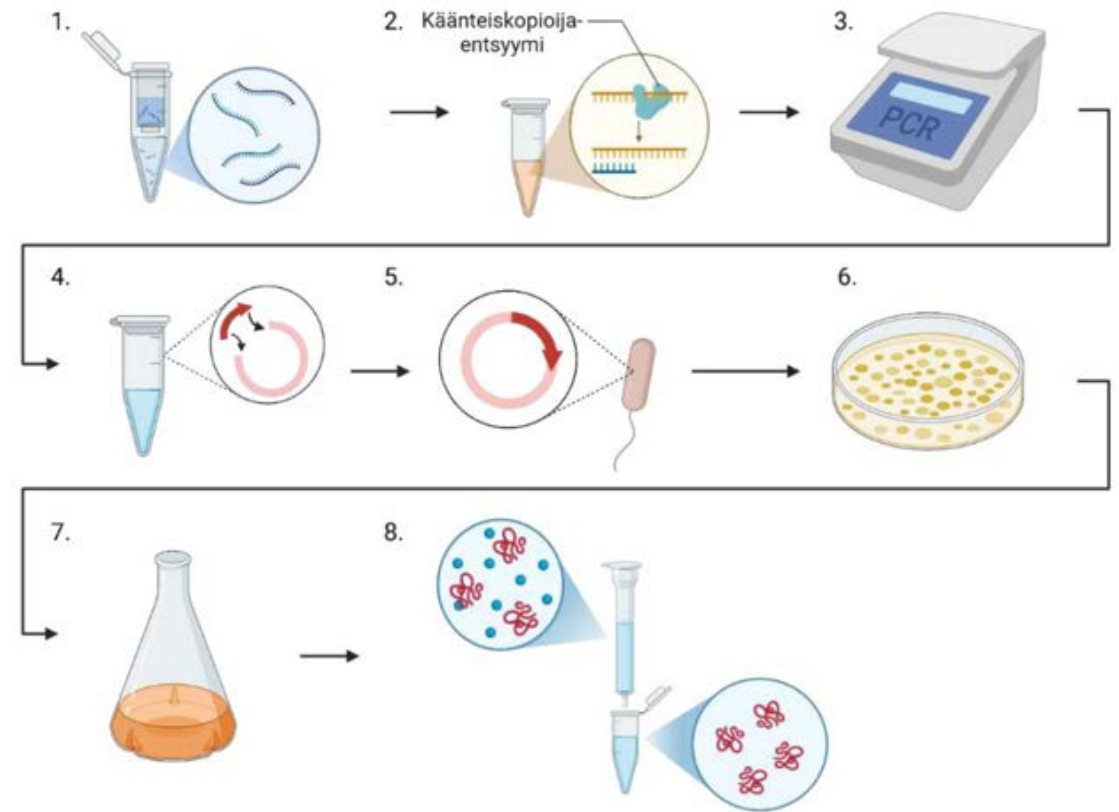
Mikä rekombinanttiproteiinin puhdistusmenetelmää visualisoidaan kuvan kohdassa 8?

a) affiniteettikromatografia

b) elektroforeesi

c) spektroskopia

d) massaspektrometria



Vastaus: A affiniteettikromatografia

Mitkä kohdista hyödyntävät proteiinien katalysoimia reaktioita? Mitä proteiineja kohdissa hyödynnetään?

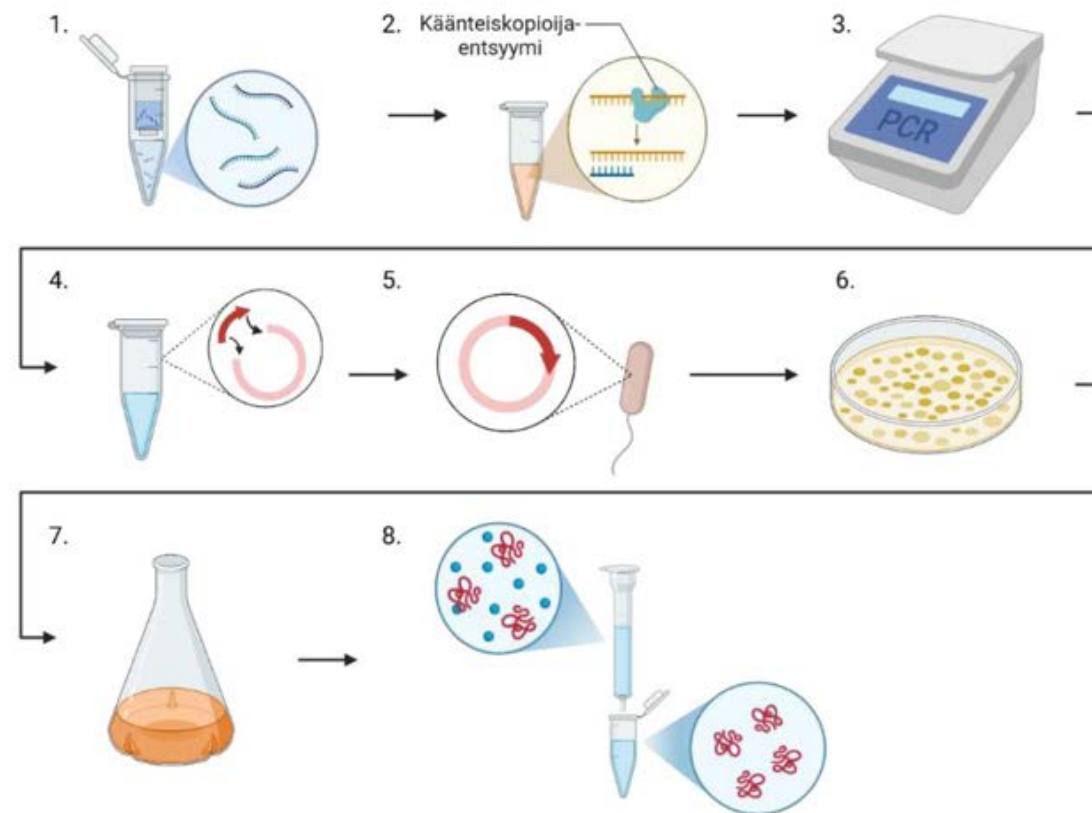
Vastaus:

Kohdassa 2 hyödynnetään käänteiskopioijaentsyymiä

Kohdassa 3 hyödynnetään polymeraasientsyymiä

Kohdassa 4 hyödynnetään restriktioentsyymejä ja ligaasia

(Kohdissa 6 ja 7 hyödynnetään antibioottiresistenssiä antavia proteiineja)



Miksi isäntäsoluna käytetään usein bakteeria tai hiivaa?

Vastaus:

“Bakteereja ja hiivoja käytetään usein rekombinanttiproteiinien tuotossa isäntäsoluina, koska ne ovat halpoja, toiminnoiltaan yksinkertaisia, helppoja käsitellä, kasvavat nopeasti, eivät vaadi erikoisia olosuhteita ja tuottavat paljon proteiinia. Bakteereja käytetään erityisesti, kun tarkoituksena on tuottaa proteiinia mahdollisimman tehokkaasti. Hiivasoluja käytetään, jos tarkoituksena on tuottaa eukaryoottiproteiinia, joka vaatii esimerkiksi translaation jälkeisiä muokkauksia.”

Kiitos osallistumisesta,
tsemppiä opiskeluun!