

# Bradavidiinista johdetun bradpeptidin karakterisointi ja soveltuvuus affiniteettikromatografiaan

Pro gradu tutkielma

Toni Grönroos

Biotekniikka

Bio- ja ympäristötieteiden laitos

Jyväskylän yliopisto

6.2.2012

## Alkusanat

Tämä työ tehtiin Tampereen yliopiston Lääketieteellisen teknologian instituutissa molekyylibioteknologian tutkimusryhmässä lukuvuoden 2009-2010 aikana.

Haluan kiittää erityisesti ohjaajiani Jenni Leppiniemeä ja Vesa Hytöstä perehdytyksestä avidiinien maailmaan, sekä kaikesta avusta ja tuesta mitä sain pro gradu -työni aikana. Myös se kärsivällisyys, jota olette osoittaneet minua kohtaan tämän työn aikana, ansaitsee oman erillisen kiitoksensa.

Haluan myös kiittää laboratorioteknikko Ulla Kiiskistä suunnattomasti työni helpottamisesta ja osoittaa vielä kiitokset koko tutkimusryhmälle hienon työympäristön luomisesta.

Lopuksi haluan kiittää vielä perhettäni ja ystäviäni kaikesta siitä tuesta, mitä olette minulle antaneet sekä pro gradu -työn että koko opiskeluni ajan. Ilman teidän tukeanne olisin tuskin koskaan selvittänyt tätä taivalta.

Tampereella 6. helmikuuta 2012

Toni Grönroos

---

<b>Tekijä:</b>	Toni Grönroos	
<b>Tutkielman nimi:</b>	Bradavidiinista johdetun bradpeptidin karakterisointi ja soveltuvuus affiniteettikromatografiaan	
<b>English title:</b>	Characterization and applicability of bradavidin derived bradpeptide for affinity chromatography	
<b>Päivämäärä:</b>	06.02.2012	<b>Sivut:</b> 57 + 2
<b>Laitos:</b>	Bio- ja ympäristötieteiden laitos	
<b>Oppiaine:</b>	Biotekniikka	
<b>Tutkielman ohjaaja(t):</b>	Jenni Leppiniemi (DI) ja Vesa Hytönen (FT)	

---

### Tiivistelmä:

Bradavidiini on *Bradyrhizobium japonicum* bakteerista löydetty avidiinin ja streptavidiinin kaltainen proteiini. Avidiini on peräisin kanasta ja streptavidiini *Streptomyces avidinii* bakteerista. Bradavidiinin aminohaposekvenssi on noin 30 % samankaltainen avidiinin ja streptavidiinin ydinalueiden sekvenssien kanssa. Bradavidiini koostuu 138 aminohaposta ja C-terminaalisesti pienennetty bradavidiini, ns. bradcore, 118 aminohaposta. Bradavidiinilla on useimpien avidiinien tapaan tetrameerinen kvaternaarirakenne ja se muistuttaa sekä rakenteeltaan että toiminnaltaan avidiinia ja streptavidiinia. Bradavidiinilla on muiden avidiinien tapaan kyky sitoa voimakkaasti D-biotiinia.

Avidiinien sitoutuminen biotiiniin on johtanut niiden laajaan käyttöön avidiini-biotiini teknologiassa, esim. lääketieteessä geeniterapiaan ja kuvantamiseen. Avidiini ja streptavidiini ovat myös stabiileja lämmön ja pH:n vaihteluille sekä proteolyttisille entsyymeille. Immunologisilta ominaisuuksiltaan bradavidiini on kuitenkin (strept)avidineista poikkeava. Jäniksen ja ihmisen streptavidiinia tunnistavat seerumit eivät reagoineet bradavidiinin kanssa merkittävästi. Avidiinista ja streptavidiinista poiketen, täysimittaisen bradavidiinin karboksyyli päässä on lyhyt aminohappohäntä, joka kykenee sitoutumaan viereisen monomeerin biotiinia sitovaan kohtaan ja mahdollisesti estämään biotiinin sitoutumisen.

Strep-tag ja Strep-tag II ovat yhdeksän aminohappotähteen mittaisia peptidejä, jotka sitoutuvat luontaisesti ja palautuvasti streptavidiinin biotiinia sitovaan kohtaan. Strep-tag/Strep-tag II peptidejä käytetään mm. affiniteettikahvoina rekombinanttiproteiinien puhdistuksessa sekä analyttisinä työkaluina immunokemiallisissä määrityksissä. Strep-tag II kykenee Strep-tagista poiketen sitoutumaan streptavidiinin biotiinia sitovaan kohtaan sekä C- että N-terminaalisenä fuusiona. Brad-tag on kahdeksan aminohappotähteen pituinen peptidi, jonka sekvenssi (SEKLSNTK) löydettiin bradavidiinin karboksyyli päässä olevasta aminohappohännästä.

Isotermisellä tiruskalorimetrillä (ITC) tehtyjen mittausten perusteella bradpeptidi sitoutuu bradavidiiniin, mutta ei sitoudu avidiiniin tai rhizavidiiniin. Bradpeptidin affiniteetti bradavidiinin C-terminaalisesti lyhennettyyn muotoon, bradcoreen, on hieman suurempi kuin Strep-tag/Strep-tag II peptidien affiniteetti streptavidiiniin. Näiden lupaavien tutkimusten perusteella tuotettiin tehostetun vihreä fluoresoivan proteiinin (EGFP) kanssa bradtag-EGFP fuusioproteiineja. Fuusio tehtiin joko EGFP:n C- tai N-terminaaliin. Tarkoituksena oli selvittää toimiiko Brad-tag fuusioproteiinissa ja onko C- tai N-terminaalilla fuusioilla eroa. Mutatoitujen bradpeptidien affiniteettia bradcoreen pyrittiin selvittämään ITC-mittauksilla.

Bradtag-EGFP fuusioproteiineja saatiin tuotettua, kuitenkin N-terminaalisen Brad-tagin sisältävien fuusioproteiinien tuottotasot olivat huomattavasti C-terminaalista Brad-tag fuusioproteiineja korkeammat. Erilaisilla bradcore-resiiniin tehdyillä sitoutus- ja puhdistuskokeilla selvitettiin, että Brad-tag sitoutuu EGFP:n aminoterminaalisenä fuusiona bradcoren biotiinia sitovaan kohtaan ja sitä voidaan käyttää aminoterminaalisenä affiniteettikahvana. Mutaatioilla havaittiin olevan heikentävä vaikutus bradpeptidien ja bradcoren välisessä sitoutumisessa.

---

**Avainsanat:** avidiini, affiniteettikahva, fuusioproteiini, brad-tag

---

**Author:** Toni Grönroos  
**Title of thesis:** Characterization and applicability of bradavidin derived bradpeptide for affinity chromatography  
**Finnish title:** Bradavidiinista johdetun bradpeptidin karakterisointi ja soveltuvuus affiniteettikromatografiaan  
**Date:** 06.02.2012 **Pages:** 57 + 2  
**Department:** Department of Biological and Environmental Science  
**Chair:** Biotechnology  
**Supervisor(s):** Jenni Leppiniemi (M.Sc. (Tech.)) and Vesa Hytönen (PhD)

---

**Abstract:**

Bradavidin has been found from the *Bradyrhizobium japonicum* bacteria and it is an avidin- and streptavidin-like protein. Avidin has been found from chicken and streptavidin from *Streptomyces avidinii* bacteria. Bradavidin bears an amino acid sequence identity of about 30 % over the core region with avidin and streptavidin. Bradavidin consists of 138 amino acids and its C-terminally truncated form consists of 118 amino acids. Bradavidin has tetrameric quaternary structure, which is typical for most of the avidins and it is structurally and functionally similar to avidin and streptavidin. Like other avidins bradavidin has also a high affinity towards D-biotin.

The biotin-binding of avidins and avidin like proteins has led to wide use in avidin-biotin technologies for example in medical applications such as gene therapy and imaging. Avidin and streptavidin are stable in a broad range of temperature and pH and resistant towards proteolytic enzymes. Bradavidin differs from (strept)avidins immunologically, as polyclonal rabbit and human antibodies raised towards streptavidin did not show significant cross-reactivity towards it. Wild type bradavidin has in contrast unique short amino acid tail, which is able to bind to biotin-binding pocket of neighboring monomers and possibly inhibit biotin binding.

Strep-tag and Strep-tag II are nine amino acid residues long oligopeptides, which can reversibly bind to the biotin-binding pocket of streptavidin. Strep-tag/Strep-tag II is used, for example, as affinity tag in recombinant protein purification and as an analytical tool in immunohistochemistry. Strep-tag II is able to bind streptavidin when fused to N- and C-terminus of the target protein differing from Strep-tag, which has to be fused to the C-terminus of the target protein to enable good binding affinity. Brad-tag is eight amino acid residues long oligopeptide (SEKLSNTK) found from the carboxyl-terminal tail of bradavidin.

Based on the isothermal titration calorimetry (ITC) measurements, bradpeptide binds to bradavidin but does not bind avidin or rhizavidin. Bradpeptide has slightly higher affinity towards bradcore than Strep-tag/Strep-tag II peptide has towards streptavidin. Based on these experiments we produced bradtag fusion proteins with enhanced green fluorescent protein (EGFP), bradtag-EGFP fusion proteins. Fusions were prepared by attaching bradpeptide to the C- or N-terminus of EGFP. Our aim was to find out if Brad-tag functions in fusion proteins and if there are differences between N- and C-terminal fusions. We also intended to measure the binding affinity of mutated bradpeptides towards bradavidin's C-terminally truncated form, bradcore, by ITC.

We were able to produce EGFP fusion proteins. However, EGFP with N-terminal Brad-tag showed considerable higher production levels when compared to their C-terminal equivalents. Affinity and purification experiments done with bradcore-resin revealed that Brad-tag is able to bind to biotin-binding pocket of bradcore as an amino terminal fusion partner of EGFP. We also found out that Brad-tag can be used as an amino terminal affinity tag. Bradpeptide mutations seemed to have an unfavorable effect on its bradcore binding properties.

---

**Keywords:** avidin, affinity tag, fusion protein, brad-tag

## Sisällysluettelo

Alkusanat.....	ii
Pro gradu -tutkielman tiivistelmä.....	iii
Abstract of Master's Thesis.....	iv
Sisällysluettelo.....	v
Lyhenteet.....	viii
1 Johdanto.....	9
1.1 Proteiinien tutkiminen.....	9
1.2 Fuusioproteiinit.....	9
1.3 Affiniteetikromatografia ja proteiinien puhdistus.....	10
1.4 Käytössä olevia affiniteetikahvoja.....	12
1.4.1 Strep-tag.....	12
1.4.2 Strep-tag II.....	13
1.4.3 His-tag.....	14
1.4.4 Muita avidiineihin sitoutuvia affiniteetikahvoja.....	14
1.5 Avidiini ja avidiinin kaltaiset proteiinit.....	15
1.5.1 Avidiinit ja niiden ominaisuuksia.....	15
1.5.2 Avidiinien käyttösovelluksia.....	17
1.5.3 Bradavidini.....	18
1.6 Vihreä fluoresoiva proteiini.....	19
2 Tutkimuksen tavoitteet.....	20
3 Materiaalit ja menetelmät.....	21
3.1 Rekombinantti-DNA-vektorien valmistaminen.....	21
3.1.1 Monistustransformaatio TOP10 soluihin.....	21
3.1.2 pHis-EGFP TOP10 solujen jatkokasvatus.....	21
3.1.3 pHis-EGFP plasmidin eristys TOP10 soluista.....	21
3.2 Bradtag-EGFP-fuusioproteiinia koodaavien DNA-sekvenssien valmistus.....	22
3.2.1 DNA-sekvenssien valmistaminen PCR:lla.....	22
3.2.2 Geelielektroforeesi ja geelieristys.....	24
3.3 Bradtag-EGFP sekvenssien subkloonaus pET101/D-TOPO-plasmidiin.....	24
3.3.1 Kloonausreaktio.....	24
3.3.2 Transformaatio.....	24

3.3.3	Jatkokasvatus ja plasmidien eristys .....	25
3.3.4	Sekvensointi.....	25
3.4	Fuusioproteiinien tuotto .....	25
3.4.1	Siemenkasvatus.....	26
3.4.2	Tuottokasvatus .....	26
3.4.3	His-tag fuusioproteiinien Ni-NTA puhdistus .....	26
3.5	Bradcore-resiinin valmistus .....	27
3.5.1	Bradcoren puhdistus 2-iminobiotiiniagaroosilla.....	27
3.5.2	Bradcoren sitoutus resiiniin .....	28
3.6	Fuusioproteiinien sitoutuskokeet .....	28
3.6.1	Bradtag-EGFP-histag sitoutus bradcore-resiiniin.....	28
3.6.2	Fuusioproteiinien puhdistaminen bradcore-resiinin avulla.....	29
3.7	Fuusioproteiinien analysointi .....	30
3.7.1	SDS-PAGE .....	30
3.7.2	Vasta-ainevärjäykset .....	30
3.7.3	Fluoresenssispektrofotometria .....	31
3.7.4	Isoterminen titrauskalorimetria.....	31
4	Tulokset .....	33
4.1	Fuusioproteiinituotot .....	33
4.2	His-tagillisten fuusioproteiinien Ni-NTA puhdistukset:.....	33
4.2.1	Bradtag-EGFP-histag.....	33
4.2.2	EGFP-histag-bradtag .....	34
4.3	Bradcore-resiiniin sitoutumiskoe .....	35
4.4	Bradcore-resiini affiniteettipuhdistuskokeet .....	36
4.4.1	Bradtag-EGFP-histag.....	36
4.4.2	Bradtag-EGFP.....	37
4.4.3	EGFP-bradtag .....	37
4.5	Vasta-ainevärjäykset .....	39
4.6	Fluoresenssispektrofotometria .....	41
4.7	Isoterminen titrauskalorimetri .....	43
5	Tulosten tarkastelu .....	47
5.1	Brad-tag aminoterminaalisen fuusiona.....	47

5.1.1	Bradtag-EGFP-histag.....	47
5.1.2	Bradtag-EGFP.....	48
5.2	Brad-tag karboksyyliterminaalisenä fuusiona.....	49
5.2.1	EGFP-histag-bradtag .....	49
5.2.2	EGFP-bradtag .....	49
5.3	Fluoresenssispektrofotometria .....	50
5.4	Isoterminen titrauskalorimetri: Bradpeptidit ja bradtag-EGFP-histag.....	50
5.5	Loppupäätelmät.....	51
6	Lähdeluettelo .....	54
	Liite 1. Käytetyt PCR ohjelmat.....	58
	Liite 2. Liuokset.....	59

## Lyhenteet

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
GFP	vihreä fluoresoiva proteiini ( <i>engl. green fluorescent protein</i> )
EGFP	tehostettu GFP
GST	glutathioni S-transferaasi ( <i>engl. glutathione S-transferase</i> )
MBP	maltoosinsitojaproteiini ( <i>engl. maltose binding protein</i> )
$K_d$	dissosiaatiovakio
ELISA	entsyymivälitteinen immunosorbenttimääritys ( <i>engl. enzyme-linked immunosorbent assay</i> )
SBP-tag	streptavidiiniiin sitoutuva peptidi ( <i>engl. streptavidin-binding peptide</i> )
<i>R. etli</i>	<i>Rhizobium etli</i>
<i>B. japonicum</i>	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>
bradcore	bradavidiinin C-terminaalisesti pienennetty proteiinin ydin
ITC	isoterminen titrauskalorimetri ( <i>engl. isothermal titration calorimetry</i> )
amp	ampisilliini
LB	Luria Bertani, elatusliemi
IPTG	isopropyyli- $\beta$ -D-tiogalaktosidaasi
PCR	polymeraasiketjureaktio ( <i>engl. polymerase chain reaction</i> )
U	entsyymiyksikkö ( <i>engl. enzyme unit</i> )
AGE	agaroosigeelielektroforeesi
TAE	Tris-aldehydi-EDTA
S.O.C.	ravinnerikas LB-elatusliemi
OD	absorbanssi ( <i>engl. absorbance/optical density</i> )
SDS-PAGE	natriumdodekyylisulfaattipolyakryyliamidigeelielektroforeesi
$K_a$	assosiaatiovakio, sitoutumisvakio



# 1 Johdanto

## 1.1 Proteiinien tutkiminen

Proteiineja tutkitaan useiden erilaisten menetelmien avulla jotta saataisiin aikaan eri käyttötarkoituksiin parhaiten soveltuvia molekyyliä. Proteiinin toiminnan ymmärtämiseksi voi olla hyödyllistä selvittää ko. proteiinin rakenne ja koostumus, jolloin voidaan selvittää mistä proteiinin ominaisuudet johtuvat. On myös mahdollista tehdä vertailevaa tutkimusta samaan proteiiniperheeseen kuuluvien proteiinien kanssa. Proteiineja voidaan käyttää kliinisiin käyttötarkoituksiin esim. lääkeaineina tai lääkeaineen kuljetuksessa haluttuun kohteeseen. Jo tunnetun lääkeproteiinin korvaamiseksi voidaan etsiä samankaltaista proteiinia, jonka immunologiset ominaisuudet olisivat paremmat. Haluttaessa tutkia jotakin tiettyä proteiinia, sitä on ensin pystyttävä tuottamaan, minkä jälkeen haluttu proteiini on vielä saatava eroteltua muista proteiineista ja epäpuhtauksista.

Proteiinitutkimuksissa optimaalinen tilanne olisi, että tutkittavaa proteiinia, joka vastaisi rakenteellisesti proteiinin luontaista muotoa, olisi käytettävissä huomattavia määriä, eikä mukana olisi muita epäpuhtauksia. Proteiinien puhdistaminen on monimutkainen ja aikaa vievä prosessi eikä kaikkia proteiineja voida puhdistaa samalla menetelmällä, vaan on pyrittävä löytämään proteiinin käyttötarkoituksesta riippuen optimaalinen puhdistusmenetelmä.

## 1.2 Fuusioproteiinit

Fuusioproteiinit ovat seurausta kahden tai useamman geenin yhdistymisestä, jolloin fuusioproteiinilla ilmenee yleensä kunkin geenin ohjaamat ominaisuudet. Fuusioproteiineja voi muodostua luonnollisesti tai niitä voidaan tuottaa yhdistelmä-DNA-tekniikan avulla. Rekombinanttifuusioproteiineja tuotetaan esim. kun halutaan tutkia tai määrittää jonkin proteiinin ominaisuuksia. Tällöin tutkimuksen kohteena olevaan proteiiniin voidaan liittää esim. toinen, ominaisuuksiltaan tunnettu proteiini tarkastelua varten tai ns. affiniteettikahva (puhdistuskahva) proteiinin puhdistusta varten. Fuusiopartnerin avulla tarkastelua voidaan tehdä mm. siihen sitoutuvien vasta-aineiden avulla tai, fluorokromin ollessa kyseessä, esimerkiksi fluoresenssimikroskoopin avulla. *Escherichia coli* on yleisin käytetty isäntäorganismi rekombinanttiproteiinien tuotannossa (Kain ym., 1995; Baneyx, 1999).

Fuusioproteiinitutkimuksissa yleinen käytetty fuusiopartneri on vihreä fluoresoiva proteiini (engl. green fluorescent protein, GFP). GFP on käytännöllinen, sillä se voidaan liittää tarkasteltavan proteiinin amino- ja karboksyyli-päähän sekä sen keskelle. GFP:n vahvuuksiin kuuluu proteiinin spesifisesti tunnistavat vasta-aineet sekä mahdollisuus tarkastella fuusioproteiinia reaaliaikaisesti fluoresenssin avulla. Esim. fluoresenssin avulla tapahtuva proteiinin ilmentymisen seuraaminen solun sisällä ei häiritse solun toimintaa (Kain ym., 1995).

Affiniteettikromatografisessa rekombinanttiproteiinin puhdistuksessa käytetään hyväksi affiniteettikahvoja. Affiniteettikahva liitetään yleensä tarkasteltavan proteiinin karboksyyli- tai aminoterminukseen, jolloin se häiritsee proteiinien luonnollista rakennetta mahdollisimman vähän. Affiniteettikahvan avulla pystytään teoriassa puhdistamaan mikä tahansa proteiini ilman aiempaa tietämystä proteiinin ominaisuuksista. Fuusoidun kahvan sijoittamista kohdeproteiiniin tulee kuitenkin tarkastella tapauskohtaisesti ja paras sijaintipaikka riippuu mm. tuotetun proteiinin ominaisuuksista, laskostumisesta ja translaation jälkeisestä muokkautumisesta (ks. yleiskatsaukset Waugh, 2005; Arnau, ym., 2005). Affiniteettikahvoja ja niiden käyttöä esitellään yleisesti kappaleissa 1.3 ja 1.4 sekä keskitytään tarkemmin avidiineihin sitoutuviin kahvoihin.

### 1.3 Affiniteettikromatografia ja proteiinien puhdistus

Affiniteettikromatografialla erotellaan palautuvaan vuorovaikutukseen perustuen proteiineja heterogeenisestä lähtömateriaalista esim. solulysaatista. Affiniteettiin perustuva puhdistus vaatii onnistuakseen proteiinille spesifisen ligandin, johon haluttu proteiini kykenee sitoutumaan. Ligandina voi toimia esim. substraattianalogi tai jokin muu spesifisesti proteiiniin sitoutuva molekyyli. Affiniteettikromatografiassa ligandi on liitetty kiinteään kantajaan, kuten agarosiin. Kantajaan sitoutunut proteiini voidaan vapauttaa spesifisesti lisäämällä liukoisessa muodossa olevaa ligandia tai esim. reversiibelisti denaturoivaa kemikaalia. Yleensä proteiinin vapauttamista edeltää kiinteän faasin pesu epäpuhtauksien poistamiseksi, jolloin ligandin on pystyttävä säilyttämään spesifinen sitoutuminen kohdemolekyylinsä pesun ajan (Amersham, Pharmacia, Biotech). Hyvä esimerkki proteiinin ja ligandin välisestä vuorovaikutuksesta on avidiinin affiniteetti biotiiniin (Green, 1975). Avidiinia on kyetty eristämään affiniteettikromatografisesti käyttäen kiinteään aineeseen kiinnitettyä biotiinia tai biotiinin analogia, 2-iminobiotiinia

(Honey ja Orr, 1981). Kyseistä tiukkaa vuorovaikutusta voidaan käyttää myös toisin päin: kromatografiapylväässä olevaan matriisiin sidottu avidiini tunnistaa biotinyloidut molekyylit muiden mennessä pylvään läpi (Finn ym., 1984; Fischer ja Howden, 1990).

Affiniteettikahvoja kehitettiin alun perin rekombinanttiproteiinien puhdistukseen ja havainnointiin. Tämän lisäksi joillakin affiniteettikahvoilla on myös pystytty parantamaan fuusiopartnerinsa tuotannollisia ominaisuuksia. Rekombinanttiproteiiniin liitetty affiniteettikahva voi olla lyhyt peptidi tai kokonainen proteiini (ks. yleiskatsaus Waugh, 2005). Affiniteettikromatografiassa käytettäviä lyhyitä peptidikahvoja ovat mm. streptavidiin sitoutuvat Strep-tag ja Strep-tag II (Korndörfer ja Skerra, 2002), metallilikationiin ( $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ) sitoutuva His-tag (Hengen, 1995), sekä vasta-aine M1:n sitoutuva FLAG-tag (Hopp ym., 1996). Proteiinikahvoina käytetään mm. glutathioni S-transferaasia (engl. glutathione S-transferase, GST) (Smith ja Johnson, 1988) sekä maltoosia sitovaa proteiinia (engl. maltose binding protein, MBP) (Walker ym., 2010).

Affiniteettikahvoihin liittyy useita käytännön ongelmia, jotka johtuvat joko itse kahvasta tai käytettävistä olosuhteista. Yleensä kahvat pitää pystyä irrottamaan, jotta saadaan eristettyä proteiinia sen luonnollisessa ja puhtaassa muodossa esimerkiksi kliinisiä käyttötarkoituksia varten. Proteiinikahvat, kuten GST- ja MBP-tag, joudutaan joskus poistamaan proteolyttisesti proteiinin luonnollisen laskostumisen aikaansaamiseksi (Nygren ym., 1994).

Proteolyttisen poiston lisäksi on kehitetty itseleikkautuvia kahvoja, joiden toiminta perustuu luonnollisiin itseleikkautuviin inteiineihin (engl. inteins). Proteiinien muokkausmenetelmien avulla inteiinejä ja affiniteettikahvoja on pystytty yhdistelemään ja saatu täten tuotettua erilaisia itseleikkautuvia kahvoja (Banki ym., 2005). Yksinkertaisilla muutoksilla kuten tiolin lisäyksellä, pH:n tai lämpötilan muutoksilla voidaan saada aikaiseksi vaste, jonka seurauksena kahvat leikkautuvat itsenäisesti pois ja fuusioproteiini-esiasteesta muodostuu proteiinin luonnollinen muoto (Wu ym., 2006).

Vasta-ainekahvoja sisältävien fuusioproteiinien ongelma puhdistuksessa on yleensä niiden vapauttaminen kantajastaan, sillä sitoutuneen vasta-aineen vapauttamiseen tarvitaan yleensä denaturoivia olosuhteita (Brizzard ym., 1994). Kaksoisaffiniteettipuhdistuksessa (engl. tandem affinity purification) kaksi erilaista puhdistuskahvaa sisältävä fuusioproteiini ajetaan kahden affiniteettipylvään läpi, jolloin jälkimmäisellä

kerralla puhdistuksesta poistetaan ensimmäisessä puhdistuksessa jäänyt puhdistuskahva sekä muut näytteeseen jääneet epäpuhtaudet (Rigaut ym., 1999).

Affiniteettikromatografian lisäksi proteiinien puhdistukseen on olemassa useita muita puhdistusmenetelmiä, jotka perustuvat yleensä proteiinien luontaisiin ominaisuuksiin. Ioninvaihtokromatografiassa molekyylit saadaan sitoutumaan kiinteään kantajaan varauksensa mukaisesti (Hamilton, 1963; Janson ym., 2011). Molekyylien kokoon perustuvassa kromatografiassa käytetään kiinteänä kantajana huokoista materiaalia, jonka läpi proteiinit kulkevat. Proteiinit kulkevat huokoisen materiaalin läpi kokonsa mukaisesti, jolloin ne voidaan erotella kokoon perustuen muista epäpuhtauksista (Batas ym., 1999). Ultrasentrifuugin käyttö proteiinien puhdistuksessa taas perustuu proteiinien tiheyteen (Bocchini ja Angeletti, 1964). Hydrofobinen puhdistus perustuu proteiinin hydrofobisiin aminohappoihin ja niiden sitoutumiseen korkeissa suolapitoisuuksissa hydrofobisiin rasvahappoketjuihin, joilla pylväskromatografian jyväset on päällystetty (Shaltiel ja Er-El, 1973). Hydrofobisen osan sisältäviä proteiineja voidaan erotella myös misellien avulla faasien erottelua hyväksikäyttämällä (ks. yleiskatsaus Tani ym., 1998). Haluttaessa erittäin puhdasta proteiinituotetta käytetään usein useampaa puhdistusmenetelmää yhdessä ja tästä johtuen pyritään koko ajan kehittämään uusia tehokkaita, halpoja ja yksivaiheisia puhdistusmenetelmiä.

## 1.4 Käytössä olevia affiniteettikahvoja

### 1.4.1 Strep-tag

Strep-tag on peptidikirjaston seulontatutkimuksissa löydetty keinotekoinen yhdeksän aminohappotähteen (AWRHPQFGG) mittainen peptidi, joka sitoutuu luontaisesti ja palautuvasti streptavidiinin biotiinia sitovaan kohtaan. Strep-tagia käytetään mm. affiniteettikahvana rekombinanttiproteiinien puhdistuksessa voimakkaan ja selektiivisen sitoutumiskykyensä vuoksi ( $K_d$  37  $\mu\text{M}$ ). Strep-tagin etuna on fuusioproteiinin helppo vapauttaminen vain yhdellä vaiheella streptavidiinista ilman, että proteiinin luonnollinen rakenne muuttuu. Vapauttaminen voidaan suorittaa käyttämällä matalaa biotiinikonsentraatiota kilpailevaa uuttamista hyväksi käyttäen. Biotiinin sijaan voidaan proteiinin vapauttamisessa käyttää biotiinin kaltaisia yhdisteitä, kuten iminobiotiinia (Schmidt ym., 1993; Schmidt ym., 1996).

Strep-tagilla on useita vahvuuksia, jotka tekevät siitä käytännöllisen affiniteettikahvan fuusioproteiinin affiniteettipuhdistuksessa. Strep-tag on mm. riippumaton metalli-ioneista (vrt. His-tag), se ei sitoudu epäspesifisesti muihin proteiineihin eikä se häiritse proteiinin luonnollista laskostumista. Ensimmäinen Strep-tagin avulla puhdistettu polypeptidi oli bakteereissa tuotettu D1.3 vasta-aineen anti-lysotsyymin  $F_v$  fragmentti. Tämän lisäksi Strep-tag on saatu fuusioitua useisiin muihin liukoisiin proteiineihin ja sen on havaittu soveltuvan sekä prokaryootti- että eukaryoottisoluihin peräisin olevien proteiinien puhdistukseen (Schmidt ja Skerra, 1993; Korndörfer ja Skerra, 2002).

Strep-tag soveltuu fuusioproteiinien puhdistuksen lisäksi myös analyttiseksi työkaluksi immunokemiallisissa määrityksissä. Strep-tag fuusioproteiinit pystytään tunnistamaan sekä denaturoituneessa että luonnollisessa konformaatiossaan, kuten entsyymivälitteisessä immunosorbenttimäärityksessä (engl. enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA). Strep-tagin ja streptavidiinin välistä vuorovaikutusta on edellä mainittujen analyysien lisäksi käytetty vielä mm. kalvoproteiinien *in situ* tutkimuksessa, jossa esim. fluoresenssimikroskoopin avulla tunnistetaan fluorokromilla leimattua streptavidiniä. (Schmidt ja Skerra, 1993; Skerra ja Schmidt, 1999).

Rekombinanttiproteiinin fuusio Strep-tagin karboksyyli-päähän estää fuusioproteiinin sitoutumisen streptavidiniin Strep-tagin välityksellä. Strep-tagin C-terminaalisen Gly-tähteen vapaa karboksyyli-ryhmä osallistuu suolasillan muodostamiseen streptavidiinin Arg84:n guanidium-pääteryhmän kanssa. Tästä johtuen Strep-tagia voidaan käyttää ainoastaan karboksyyli-terminaalisen fuusiona fuusioproteiinien puhdistuksessa (Schmidt ym., 1996). Rajoituksensa vuoksi Strep-tag ei ole käyttökelpoinen mm. sellaisten proteiinien puhdistuksessa, joilla tapahtuu translaation jälkeen C-terminaalista muokkautumista (Maier ym., 1998).

#### 1.4.2 Strep-tag II

Strep-tag peptidin rajoituksiin haluttiin löytää ratkaisu ja geneettisiä peptidikirjastoja seulomalla löydettiin Strep-tag II. Strep-tag II koostuu, kuten Strep-tag, yhdeksästä aminohappotähteestä (NWSHPQFEK). Strep-tag II kehitettiin samaan käyttötarkoitukseen kuin Strep-tag ja se toimii vastaavalla tavalla. Strep-tag II:n tapauksessa suolasillan streptavidiinin Arg84 tähteen kanssa muodostaa peptidiketjun toiseksi viimeisen aminohapon, glutamiinihapon, sivuketju. Strep-tag II peptidin etuna Strep-tagiin nähden on

sen kyky sitoutua sekä C- että N-terminaalisen fuusiona streptavidiinin biotiinia sitovaan kohtaan. Myös Strep-tag II voidaan vapauttaa streptavidiinista liuoksilla, jotka sisältävät biotiinia tai biotiinin kaltaisia yhdisteitä. Strep-tag II:n heikkoutena on kuitenkin peptidin huomattavasti heikompi sitoutuminen streptavidiiniiin ( $K_d$  72  $\mu\text{M}$ ). Strep-tag II:n sitoutumisvoimakkuutta streptavidiiniiin on parannettu mutatoimalla luonnollista streptavidiniä (ks. 1.5.1 Avidiinit ja niiden ominaisuuksia) (Voss ja Skerra, 1997; Korndörfer ja Skerra, 2002). Strep-tag II:n käyttöä on tutkittu mm. metalloentsyymien puhdistuksissa ja sen on havaittu olevan joissakin tilanteissa His-tagia käyttökelpoisempi ja tehokkaampi (Maier ym., 1998).

### 1.4.3 His-tag

His-tag on yleensä kuuden histidiinin mittainen peptidi, joka on fuusioitu yhdistelmä-DNA-tekniikan avulla kohdeproteiinin N- tai C-terminukseen. His-tagia voidaan käyttää mm. puhdistettaessa *E. colissa*, tai muissa prokaryooteissa, tuotettuja fuusioproteiineja. Tämä affiniteettikahva mahdollistaa nopean ja tehokkaan fuusioproteiinin puhdistuksen epäpuhtauksista, esim. *E. colin* tuottamista omista proteiineista, metallikelaattiaffiniteetikromatografian avulla. His-tag sitoutuu metallikationiin, kuten  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  tai  $\text{Cu}^{2+}$ , joka voidaan immobilisoida kelatoimalla esim. agarosiin. Halutun fuusioproteiinin puhdistus suoritetaan laskemalla esim. nikkeli-agarosiin sitoutettu proteiiniliuos affiniteetikromatografiapylvään läpi. Fosfaattipuskuripesujen jälkeen pylvääseen jääneeseen nikkeli-agarosiin sitoutunut fuusioproteiini voidaan eluoida pylväästä ulos mm. ammoniumkloridilla, imidatsolilla tai EDTA:lla (Hengen, 1995).

Vaikka His-tag on yksi yleisimpiä käytettyjä affiniteettikahvoja, sillä on myös epäedulliset puolensa. His-tag voi muuttaa proteiinin biokemiallisia ominaisuuksia vaikuttamalla mm. isoelektriseen pisteeseen. Puhdistuksen aikana fuusioproteiinin vapauttamisessa joudutaan käyttämään suuria suolapitoisuuksia, jolloin proteiini saattaa inaktivoitua. Pienemmillä suolapitoisuuksilla taas epäpuhtauksia saattaa kertyä puhdistetun proteiinin joukkoon. Ongelmia tuottaa myös metallikelaatteihin sitoutuneet epäpuhtaudet, jotka voivat sitoutua His-tag peptidiin (Essen ja Skerra, 1993; Maier ym., 1998).

### 1.4.4 Muita avidiineihin sitoutuvia affiniteettikahvoja

Edellä esiteltujen affiniteettikahvojen lisäksi käytössä on monia muita peptidikahvoja, joiden pituudet vaihtelevat muutamasta aminohappotähteestä useisiin kymmeneen.

Streptavidiniin sitoutuva peptidi (engl. Streptavidin-Binding-Peptide, SBP-tag) on 38 aminohappotähteen pituinen ja se kykenee sitoutumaan streptavidiniin ( $K_d$  2,5 nM). SBP-tag on todettu toimivaksi *E. colissa* tuotettujen rekombinanttiproteiinien puhdistuksessa. SBP-tagin nanomolaarinen affiniteetti streptavidiniin tarjoaa herkän menetelmän tutkittaessa rekombinanttiproteiineja ja niiden välisiä vuorovaikutuksia muiden molekyylien kanssa (Keefe ym., 2001).

Avidiinia on käytetty proteiinien puhdistuksessa kantajana, joka sitoutuu biotinyloituihin yhdisteisiin. Tämän lisäksi avidiinia ja sen deglykosyloitua ja neutraloitua muotoa, NeutrAvidiinia, voidaan käyttää hyväksi myös peptidikahvan, Avi-tag (DRATBY), kanssa. AviD-tag on Avi-tag peptidin divalentti muoto ja nämä peptidit tunnistavat spesifisesti avidiinin ja NeutrAvidiinin eivätkä sitoudu esim. streptavidiniin (Gaj ym., 2007). SBP-tagin lisäksi streptavidiniin sitoutuvia affiniteettikahvoja ovat Nano-tag peptidit; Nano-tag<sub>15</sub>, Nano-tag<sub>9</sub> sekä Nano-tag, joista kukin sitoutuu nanomolaarisella affiniteetilla streptavidinin biotiinin sitomiskohtaan. Nano-tag peptidien käyttö on rajoittunut ainoastaan rekombinanttiproteiinien aminoterminukseen (vrt. Strep-tag) johtuen peptidin N-terminaalissa olevista *N*-formyyliamino- ja tryptofaanitähdeistä, jotka osallistuvat streptavidiniin sitoutumisessa hydrofobisten vuorovaikutusten ja vetysidosten syntyyn (Lamla ja Erdmann, 2004; Perbandt ym., 2007). Tässä kappaleessa käsiteltiin ainoastaan avidiineihin sitoutuvat affiniteettikahvat sekä His-tag. Näiden lisäksi on olemassa vielä suuri joukko muita affiniteettikahvoja, joita ei käsitelty.

## 1.5 Avidiini ja avidiinin kaltaiset proteiinit

### 1.5.1 Avidiinit ja niiden ominaisuuksia

Avidiini ja streptavidiini ovat rakenteellisesti ja toiminnallisesti toisiaan vastaavia proteiineja, joista avidiini on peräisin kanasta (Green, 1975) ja streptavidiini *Streptomyces avidinii* bakteerista (Chaiet ja Wolf, 1964). Muita tunnettuja avidiineja ovat sammakosta löydetty xenavidini (Määttä ym., 2009), sienen *Pleurotus cornucopiae* tamavidini (Takakura ym., 2009), *Rhizobium etli* bakteerin rhizavidini (Helppolainen ym., 2007), *Burkholderia pseudomallei* bakteerin burkavidini (Sardo ym., 2011), sekä bradavidini, joka on löydetty *Bradyrhizobium japonicum* bakteerista (Nordlund ym., 2005). Avidiineille ominaista on niiden kyky sitoa voimakkaasti ja spesifisesti D-biotiinia, mistä johtuen avidiinien käyttöä on tutkittu laajalti biotieteiden alalla. Avidiinia ja streptavidiinia on

myös muokattu monin tavoin erilaisiin käyttötarkoituksiin (Hytönen ym., 2005; ks. yleiskatsaus Laitinen ym., 2006).

Rakenteellisesti useimmat avidiinit ovat homotetrameereja, jotka rakentuvat keskenään identtisistä monomeereista. Alayksiköt muodostuvat kahdeksasta antiparalleelista  $\beta$ -juosteesta ja niiden välisistä silmukoista, jotka laskostuvat antiparalleeliksi  $\beta$ -tynnyriksi. Lopullinen tetrameerinen kvaternaarirakenne syntyy näiden neljän identtisen  $\beta$ -tynnyrin yhdistymisestä. Kvaternaarirakenne sisältää kolme erilaista monomeerien välistä vuorovaikutusaluetta. Rakenteellisesti tärkein on monomeerien 1 ja 4 sekä 2 ja 3 väliset vuorovaikutukset, jotka saavat aikaan (strept)avidiinien rakenteelliset dimeerit. Toiminnalliset dimeerit taas muodostuvat monomeereista 1 ja 2 sekä 3 ja 4, joissa biotiinin sitomisessa tärkeät tryptofaanit (avidiiini: Trp110, streptavidiiini: Trp120) sijaitsevat betajuosteiden 7 ja 8 välisessä silmukassa. Biotiinin sitoutuminen tapahtuu kunkin (strept)avidiiini monomeeritynnyrin toisessa päässä, joten kukin tetrameerinen rakenne pystyy sitomaan neljä biotiniimolekyyliä (Livnah ym., 1993; Nordlund ym., 2003; ks. yleiskatsaus Laitinen ym., 2006).

Streptavidiinin ja avidiinin voimakas sitoutuminen biotiiniin on johtanut niiden laajaan käyttöön avidiini-biotiini teknologiassa. Vaikka molemmat proteiineista sietävät hyvin lämmön ja pH:n vaihteluita sekä proteolyttisiä entsyymejä, on niiden ominaisuuksia pyritty parantelemaan mm. geneettisillä ja kemiallisilla muokkauksilla. Muokkausten avulla avidiinien stabiiliutta ja sitomisvoimakkuuksia on saatu paranneltua erilaisia käyttötarkoituksia varten (ks. yleiskatsaus Laitinen ym., 2007).

Geneettistä muokkausta hyväksi käyttäen pistemutaation avulla on tuotettu avidiinia, jonka biotiinin sitoutumista voidaan säädellä pH:n muutoksilla. Aminohappoja mutatoimalla avidiinin denaturaatiolämpötilaa on pystytty nostamaan, jonka seurauksena avidiinin stabiiliutta on onnistuttu parantamaan (ks. yleiskatsaus Laitinen ym., 2007). NeutrAvidiini taas on avidiinin kemiallisesti deglykosyloitu ja neutraali muoto. Näillä kemiallisilla muutoksilla on vähennetty proteiinin epäspesifisiä vuorovaikutuksia, kuitenkin säilyttäen proteiinin sitomisominaisuudet biotiiniin (Hiller ym., 1990; Gaj ym., 2007).

Streptavidiinista on kehitetty kaksi mutatoitua muotoa, joilla on korkeampi affiniteetti Strep-tag II peptidiä kohtaan. Näiden kahden streptavidiinin mutaatiot tuotettiin streptavidiinin aminohappoihin 44, 45 ja 47. Mutatoitu alue sijaitsee lähellä biotiinin



sitoutumiskohtaa olevassa silmukassa, jonka rakenne on joustava. Mutatoiduilla aminohappotähteillä ei kuitenkaan havaittu suoraa rakenteellista kontaktia peptidin sitoutumisessa (Korndörfer ja Skerra, 2002). Streptavidiinista on kehitetty pistemutaatiolla myös dimeerinen muoto, joka on saatu muokattua liukoiseen muotoon (Sano ym., 1997).

Rhizavidiini on avidiinien kaltainen biotiinia voimakkaasti sitova proteiini, joka on löydetty *R. etli* bakteerista. *R. etli* on pavun, *Phaseolus vulgaris*, tyypeä sitova symbioottinen bakteerilaji. Rhizavidiinin monomeeri rakentuu avidiinien lailla kahdeksasta antiparalleelista betajuosteesta, jotka laskostuvat antiparalleeliksi betatynnyriksi. Vaikka rhizavidiinin aminohapposekvenssi on 20-30 prosenttisesti identtinen muiden avidiinien kanssa, se poikkeaa dimeerisellä kvaternaarirakenteellaan muista avidiineista, jotka ovat tetrameereja. Rhizavidiini on ensimmäinen löydetty luontainen dimeerinen avidiini-perheeseen kuuluva proteiini. Biotiinin sitomiskohdassa avidiinin toiminnallisesti tärkeää Trp110 vastaavassa kohdassa rhizavidiinin aminohappoketjua sijaitsee proliini (Helppolainen ym., 2007; Meir ym., 2008).

### 1.5.2 Avidiinien käyttösovelluksia

Lääketieteellisissä tarkoituksissa avidiini-biotiini teknologiaa on käytetty mm. geeniterapiassa, kuvantamisessa ja kohdennetussa lääkeaineen kuljetuksessa. Lääkeaineen kuljetuksessa avidiinien avulla ongelmia on tuottanut potilaan immuunivaste. Immuunivasteesta johtuen halutaan löytää lisää avidiinin kaltaisia proteiineja, jotka olisivat immunologisilta ominaisuuksiltaan erilaisia, kuten bradavidiini (Nordlund ym., 2005).

Kohdennetussa geeniterapiassa avidiinin käyttöä on tutkittu mm. sisällyttämällä se geneettistä muuntelua hyväksikäyttämällä baculoviruksen kuoren glykoproteiiniin gp64. Näin aikaansaatu ns. Baavi-virus mahdollistaa avidiini-biotiini teknologian käyttämisen geenien kuljetuksessa. Baavin on todettu transduktoituvan huomattavasti normaalia tehokkaammin biotinyloituihin soluihin mahdollistaen kohdentamisen avidiinin avulla (Räty ym., 2004). Baculoviruksen lisäksi avidiinia ja streptavidiinia on ilmennetty HI-viruksesta johdetun lentiviruksen kuoriproteiinin kanssa (Kaikkonen ym., 2009). Avidiini-biotiini teknologiaa on tutkittu myös kasvaimiin kohdistuvassa geeniterapiassa, jossa avidiini-biotiini ”siltaa” on käytetty mm. p53 geenin transfektiossa solujen sisään (Zeng ym., 2010).

### 1.5.3 Bradavidiini

Soijapavun juurinystryöissä tyyppä sitovan *B. japonicum* bakteerin genomista on löydetty bradavidiinin geeni, jonka aminohapposekvenssi vastaa noin 30% avidiinin ja streptavidiinin ydinalueiden sekvenssejä (kuva 1). Bradavidiini koostuu 138 aminohaposta ja C-terminaalisesti pienennetty proteiinin ydin (bradcore) 118 aminohaposta. Bradavidiinilla on tetrameerinen kvaternaarirakenne ja se muistuttaa sekä rakenteeltaan että toiminnaltaan avidiinia ja streptavidiinia, sitoen myös voimakkaasti biotiinia (Nordlund ym., 2005).

Immunologisilta ominaisuuksiltaan bradavidiini on kuitenkin (strept)avidineista poikkeava. Streptavidiini-altistuksen jälkeen kerätyt jäniksen ja ihmisen seerumit eivät reagoineet bradavidiinin kanssa merkittävästi. Vasta-aineiden reagoimattomuus lisää bradavidiinin kiinnostavuutta varsinkin kliinisiin käyttö-arkoituksiin, kuten vaihtoehtoisena ratkaisuna kohdennettuun lääkeainekuljetukseen ja geeniterapiaan silloin kun (strept)avidiinin käyttö ei ole mahdollista immuunivasteen takia (Nordlund ym., 2005). Täysimittaisen bradavidiinin karboksyyli-päässä on lyhyt aminohappohäntä, joka kykenee sitoutumaan viereisen monomeerin biotiinia sitovaan kohtaan ja mahdollisesti jopa estämään biotinyloitujen molekyylien sitoutumisen (Leppiniemi ym., julkaisematon).

```

      →           →           →           →
Streptav. AAEAGITGTWYNQLGSTFIVTAG--ADGALTGTYESAVGNAESRYVLTGRYDSAPATDG-
Bradav.   ---QSVNWTWTNQYGSTLAITSFNSNTGAITGTYTNNAAANSCDEGKPOG-VTGWLAYGN-
Avidiini  ARKCSLTGKWTNDLGSNMTIGAVN-SRGEFTGTYITAVTATSNEIKESPLHGTEINTKR
          .:. .* *: **: : : :           * :***** . . . : .
          : . . . . .

      →           →           →           →
Streptav. SGTALGWTVAWKNRYRNAHSATTWVGQYVGG--AEARINTQWLLTS-GTTEANAWKSTLV
Bradav.   TGTAISFSVNFLG----CGSTTVWTGQLNN----ATGFQGLWYLS---LAEAVAWNGISA
Avidiini  TQPTFGFTVNWKES----ESTTVFETGQCFIDRNGKEVLKTMWLLRSSVNDIGDDWKATRV
          : . . . . .* :           *: * . . : * *           : : * *           . * : . .

      →
Streptav. GHDTFTKVKPSAAS
Bradav.   GADTFTFSSGDKAL
Avidiini  GINIFTRLRTQKE-
          * : * *           .

```

**Kuva 1** Bradavidiinin ydinalueen aminohapposekvenssi verrattuna streptavidiinin ja avidiinin ydinalueiden aminohapposekvensseihin. Aminohapposekvenssien vertailusta nähdään bradavidiinin samankaltaisuus avidiinin ja streptavidiinin kanssa aminohapposekvenssien kanssa. Streptav. = streptavidiini, Bradav. = bradavidiini. Kuva on muokattu alkuperäisestä versiosta, Nordlund ym., 2005.

## 1.6 Vihreä fluoresoiva proteiini

Meduusoihin kuuluvasta *Aequorea victoriasta* eristettyä GFP:n komplementaarista DNA sekvenssiä voidaan käyttää GFP:n tuottamiseen prokaryootti ja eukaryootti soluissa eikä fluoresenssin syntyyn tarvita substraatteja tai kofaktoreita (Chalfie ym., 1994). GFP on laajalti käytetty työkalu tutkittaessa erilaisia biologisia prosesseja, sillä se voidaan liittää fuusiopartneriinsa sekä karboksyyli- että aminoterminuksestaan. GFP myös säilyttää fluoresoivan ominaisuutensa ollessaan fuusiopartnerina (Niedenthal ym., 1996). Tämän lisäksi GFP voidaan fuusioda myös keskelle kohdeproteiinia, sillä sen amino- ja karboksyyli-terminukset ovat lähellä toisiaan (Kobayashi ym., 2008).

GFP:a käytetään laajasti mm. geenien ilmentymisen, proteiinien lokalisaation ja proteiini-proteiini vuorovaikutusten tutkimiseen. Nykyään on tarjolla myös useita GFP:n mutatoituja muotoja, joissa mutaation seurauksena muutetut ominaisuudet vaihtelevat proteiinin tuottumisen, absorptio- ja emissiospektrin osalta. Eräällä mutatoidulla GFP:n muodolla on korkeampi emission intensiteetti sinisen valon eksitaation jälkeen verrattuna villityypin GFP:n emissioon. Tätä paranneltua GFP:n mutatoitua muotoa kutsutaan EGFP:ksi (engl. enhanced GFP). EGFP:n emission korkeampi intensiteetti on seurausta kahden perättäisen aminohappotähteen, Phe-64→Leu ja Ser65→Thr, mutaatioista (Cinelli ym., 2000). EGFP:n eksitaatiomaksimin aallonpituus on 488 nm ja emissiomaksimi 509 nm (BioTek Instruments, Inc.). Mutaatioilla on myös paranneltu GFP:n ominaisuuksia soveltumaan prokaryooteilla tehtäviin tutkimuksiin (Stretton ym., 1998).

Erilaisten biologisten prosessien tutkimuksissa GFP on ollut käytössä, niin solun sisäisen kuin ulkoisenkin kuljetuksen tutkimisessa elävissä soluissa. GFP:n avulla on pystytty seuraamaan miten vasta tuottuneet proteiinit kulkeutuvat elävissä soluissa endoplasmakalvostolta golgin laitteeseen (Presley ym., 1997). GFP on ollut käytössä myös tutkittaessa geenien ilmentymistä (Stretton ym., 1998) sekä proteiinien lokalisoitumista bakteerisolussa (Feilmeier ym., 2000). Feilmeier ym. selvittivät, että GFP on aktiivisessa muodossaan *E. coli*n sytoplasmassa mutta ei periplasmisessa tilassa, johtuen ilmeisesti epätäydellisestä laskostumisesta muualla kuin sytoplasmassa.

## 2 Tutkimuksen tavoitteet

Bradpeptidin, Brad-tagin, sitoutumista bradavidiinin C-terminaalisesti lyhennetyin muodon, bradcoren, kanssa on määritetty isotermisellä titraatiokalorimetrialla (ITC). ITC-mittausten perusteella Bradpeptidi sitoutuu bradavidiiniin, mutta ei sitoudu avidiiniin tai rhizavidiiniin. Bradpeptidin affiniteetti bradcoreen ( $K_d = 25 \mu\text{M}$ ) (Leppiniemi ym., julkaisemattomia tuloksia) on hieman suurempi kuin alkuperäisen Strep-tagin affiniteetti streptavidiiniin ( $K_d = 37 \mu\text{M}$ ) (Schmidt ym., 1996) sekä Strep-tag II:n affiniteetti streptavidiiniin ( $K_d = 72 \mu\text{M}$ ) (Schmidt ym., 1996). Streptavidiinia mutatoimalla sen affiniteettiä saatiin kasvatettua Strep-tag II:een ( $K_d = 1 \mu\text{M}$ ) (Voss ja Skerra, 1997). Joillakin Strep-tag fuusioproteiineilla on havaittu olevan suurempi affiniteetti streptavidiiniin (Schmidt ym., 1996).

Näiden tutkimusten perusteella bradpeptidin affiniteetti bradavidiiniin vaikuttaa lupaavalta ja tarkoituksena oli tuottaa Brad-tag EGFP fuusioproteiini ja tutkia sen sitoutumista bradavidiinin kanssa. EGFP liitettiin joko C- tai N-terminaaliin. Työssä oli tavoitteena selvittää onko Brad-tag toiminnallinen myös silloin kun siitä on valmistettu EGFP:n kanssa fuusioproteiini. Toimivuuden kannalta oli tärkeää pyrkiä selvittämään toimiiko Brad-tag riittävän tehokkaasti proteiinin puhdistuksessa ja onko C-terminaalilla ja N-terminaalilla Brad-tag affiniteettikahvalla eroa. Lisäksi tutkittiin bradpeptidin mutatoituja muotoja, joissa bradpeptidin aminohappojärjestystä on muokattu yhden aminohapon verran joko poistamalla tai vaihtamalla aminohappotähde. ITC-mittauksilla tutkittiin mutatoitujen muotojen ja bradcoren välistä vuorovaikutusta ja verrattiin saatuja tuloksia bradpeptidin antamiin tuloksiin. Mittaustuloksilla kerättiin tietoa mutaation aiheuttamista muutoksista peptidien affiniteetissa bradcoreen.

## 3 Materiaalit ja menetelmät

### 3.1 Rekombinantti-DNA-vektorien valmistaminen

#### 3.1.1 Monistustransformaatio TOP10 soluihin

Ensimmäiseksi monistettiin pHis-EGFP plasmidia, joka on rakennettu aiemmissa tutkimuksissa (Saeger & Hytönen ym., julkaisematon). Plasmidi sisältää tac-promooterin ja ampicilliinin (amp) antibiootiresistenttiyseen. Plasmidi transformoitiin kemiallisesti kompetentteihin *E. coli* One Shot<sup>®</sup> TOP10 Competent soluihin (Invitrogen) lämpöshokin avulla. pHis-EGFP-plasmidia lisättiin 20 ng TOP10 -soluille eppendorf-putkeen ja pidettiin jäähauteella 20 min ajan. Inkuboinnin jälkeen suoritettiin 30 s lämpöshokki 42 °C vesihauteessa, jonka jälkeen solut siirrettiin takaisin jäähauteeseen ja soluille lisättiin 250 µl S.O.C. elatuslientä. Elatusliemen lisäyksen jälkeen putkea pidettiin tasoravistelijalla 225 kierr/min yhden tunnin ajan +37 °C:ssa. Tämän jälkeen solut maljattiin ampicilliinia (100 µg/ml) sisältävälle Luria Bertani (LB) maljalle ja inkuboitiin yön yli 37 °C:ssa.

#### 3.1.2 pHis-EGFP TOP10 solujen jatkokasvatus

Maljalta valittiin pesäkkeitä, jotka poimittiin ja siirrettiin omiin 15 ml:n koeputkiin jatkokasvatukseen. Putket sisälsivät 5 ml:n LB elatuslientä, johon oli lisättyä ampicilliinia 100 µg/ml. Kasvatus suoritettiin tasoravistelijalla 200 kierr/min yön yli +37 °C:ssa. Valituista pesäkkeistä tehtiin myös tarkistus maljaukset LB<sub>amp</sub> maljalle, johon oli lisätty 0,1mM isopropyyl-β-D-tiogalaktosidaasi (IPTG). Malja jaoteltiin neljään osaan ja tehtiin aiemmin valituista pesäkkeistä viivasiirrostukset sekä neljänneksi laitettiin negatiivinen kontrollipesäke. Kasvatus suoritettiin yön yli + 37 °C:ssa. Malja siirrettiin +4 °C:een fluoresenssin kehittymisen vuoksi ja maljaa tarkasteltiin myöhemmin UV-valolla fluoresenssin toteamiseksi.

#### 3.1.3 pHis-EGFP plasmidin eristys TOP10 soluista

TOP10 jatkokasvatuksista eristettiin plasmidi käyttäen Fermentas GeneJET<sup>™</sup> Plasmid Miniprep Kit valmistetta. Kustakin kolmesta viiden millin kasvatuksesta otettiin kolme millilitraa lähtömateriaaliksi plasmidieristykseen. Solut sentrifugoitiin (Eppendorf, Centrifuge 5415D) solupelleteiksi 2 ml:n eppendorf-putkissa 1,5 ml:n erissä. Sentrifugointi suoritettiin huoneenlämmössä 2 min, 12000 g.

Pelletoidut solut suspensoitiin uudelleen 250 µl:aan liuotusliuosta, jonka jälkeen lisättiin 250 µl solujen hajotusliuosta. Lisäyksen jälkeen putkia käänneltiin ympäri kuudesti ja lisättiin 350 µl neutralisaatioliuosta. Putkia käänneltiin jälleen ympäri varovasti kuusi kertaa. Neutralisaation jälkeen putkia sentrifugoitiin 5 min, 12000 g, huoneenlämmössä. Täten saatiin solujäte ja kromosomaalinen DNA. Liuokset siirrettiin pakkauksen mukana tulleisiin filtteriputkiin suodattimen päälle ja sentrifugoitiin (12000 g) huoneenlämmössä yhden minuutin ajan ja hylättiin läpitulleet liuokset. Filtereille lisättiin 500 µl pesuliuosta ja sentrifugoitiin huoneenlämmössä yhden minuutin ajan, 12000 g, ja hylättiin liuokset. Pesu toistettiin kertaalleen ja läpi tulleiden nesteiden poistamisen jälkeen sentrifugoitiin vielä kertaalleen huoneenlämmössä yhden minuutin ajan, 12000 g, ylimääräisen pesuliuoksen poistamiseksi. Suodatinosat siirrettiin 1,5 ml:n eppendorfputkiin ja lisättiin 50 µl eluutioliuosta filttäreiden keskelle. Lisäyksen jälkeen inkuboitiin kahden minuutin ajan ja sentrifugoitiin huoneen lämmössä kahden minuutin ajan, 12000 g. Eluution jälkeen saatujen plasmidien pitoisuudet mitattiin UV/Vis-spektrofotometrillä (NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer, Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). Plasmidit säilöttiin -20 °C:een.

## 3.2 Bradtag-EGFP-fuusioproteiinia koodaavien DNA-sekvenssien valmistus

### 3.2.1 DNA-sekvenssien valmistaminen PCR:lla

Neljä erilaista DNA inserttiä valmistettiin kuuden eri alukkeen (taulukko 1), polymeerasiketjureaktion (PCR) ja pHis-EGFP plasmidin avulla. Alukkeiden avulla oli tarkoitus liittää Brad-tag sekvenssi EGFP:n sekvenssiin, joko 5' tai 3' -päähän sekvenssiä käyttämällä aluketta, joka sisälsi Brad-tagin sekvenssin. Muutoin alukkeissa oli EGFP:n sekvenssiä tarkoituksesta riippuen, joko 5' tai 3' -päässä. Kahteen fuusioproteiiniin haluttiin lisätä vielä kuuden histidiinin jaksoa koodaava sekvenssi, His-tag. His-tag lisättiin joko jättämällä pHis-EGFP plasmidista alavirran alukkeesta pois lopetus-kodoni, jolloin His-tag tuli plasmidista, tai lisäämällä se erikseen alavirran alukkeeseen.

**Taulukko 1** Erilaisten DNA inserttien valmistamisessa käytetyt alukkeet ja niiden emäsekvenssit.

Aluke	Emäsekvenssi
5' bradtag_EGFP	5' CACCATGTCAGAAAACTGTCAAATACA AAAAGCAAGGGCGAGGAG 3'
5' EGFP	5' CACCATGAGCAAGGGCGAGGAG 3'
3' EGFP_bradtag_stop	5' GCCGCCGGGATCACTTCAGAAAACTGTC AAATACAAAATGA 3'
3' EGFP_stop	5' GCCGCCGGGATCACTTGA 3'
3' EGFP	5' GCCGCCGGGATCACT 3'
3' EGFP_histag_bradtag_stop	5' GTACCGGTCATCATCACCATCACCATTCA GAAAACTGTCAAATACAAAATGATAA 3'

PCR:n avulla halutut DNA tuotteet valmistettiin neljän eri reaktion avulla (taulukko 2). Templaattina käytettiin pHis-EGFP plasmidia. Putkiin valmistettiin 50 µl:n reaktiot (taulukko 3), joissa templaattia oli 60 ng ja kummankin alukkeen loppukonsentraatio 1 µM.

**Taulukko 2** Eri DNA inserttien valmistuksessa käytetyt alukeparit ja niistä saatu reaktiotuote.

Reaktio	Aluke I	Aluke II	Reaktiotuote
1	5' bradtag_EGFP	3' EGFP_stop	5' bradtag-EGFP 3'
2	5' bradtag_EGFP	3' EGFP	5' bradtag-EGFP-histag 3'
3	5' EGFP	3' EGFP_bradtag_stop	5' EGFP-bradtag 3'
4	5' EGFP	3' EGFP_histag_bradtag_stop	5' EGFP-histag-bradtag 3'

**Taulukko 3** DNA inserttien valmistuksessa käytetyn PCR:n reagenssit ja määrät.

Reagenssit	Konsentraatio	Tilavuus/µl
Steriili deionisoitu vesi		28,5
10X <i>Pfu</i> puskuria, sis. MgSO <sub>4</sub>	1X	5
2 mM dNTP seos	0,2 mM / nukleotidi	5
Aluke I	1 µM	5
Aluke II	1 µM	5
Templaatti DNA	1,2 ng / ml	1
<i>Pfu</i> DNA polymeraasi	1,25 u / 50 µl	0,5
Yhteensä		50

PCR:t suoritettiin annetun ohjeen (liite 1) mukaisesti käyttämällä ”hot start” menetelmää. Reaktiot 1-4 valmistettiin lisäämällä putkiin aluksi kaikki reagenssit *Pfu*-polymeraasia lukuun ottamatta ja PCR-laitteen blokki kuumennettiin (95 °C) n. 10 sekunnin ajaksi. Tämän jälkeen ohjelma pysäytettiin hetkiseksi ja lisättiin *Pfu* putkiin, 1,25 u. Lisäyksen jälkeen annettiin reaktion jatkua normaalisti loppuun asti.

### 3.2.2 Geelielektroforeesi ja geelieristys

Saaduille PCR-tuotteille tehtiin 1,5 % agarosigeelielektroforeesi (AGE) Tris-aldehydi-EDTA (TAE) puskurissa, jossa molekyylipainon vertailuun käytettiin kaupallista GeneRuler 100 bp DNA ladder (Fermentas) tuotetta. DNA-vyöhykkeet havainnoitiin UV-valossa agarosisiin sekoitetun etidiumbromidin vaikutuksesta. Kutakin PCR-tuotetta ladattiin kolmeen kaivoon, joihin kuhunkin ladattiin 18 µl (näytteiden valmistus 46 µl (näyte) ja 8 µl (6 x dye)). Vertailunäyte valmistettiin lisäämällä 1 µl (GeneRuler 100 bp DNA ladder) + 1 µl (6xDye) + 4 µl steriiliä vettä. Geelielektroforeesi suoritettiin 100 V jännitteellä yhden tunnin ajan. Geeliajon jälkeen geeli kuvattiin UV-valolla ja DNA:t eristettiin koon mukaisesti geeliltä kaupallisella Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit-pakkauksen ohjeiden mukaisesti.

## 3.3 Bradtag-EGFP sekvenssien subkloonaus pET101/D-TOPO-plasmidiin

### 3.3.1 Kloonausreaktio

Geeliltä eristetyt DNA-juosteet subkloonattiin pET101/D-TOPO® -vektoreihin (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Kloonausreaktiot tehtiin Champion™ pET Directional TOPO® Expression Kit -pakkauksen ohjeiden mukaisesti 1,5 ml eppendorf-putkiin. Ensin valmistettiin 3 µl:n kloonausreaktiot, joihin lisättiin 2 µl eristettyä PCR tuotetta (20 ng) sekä 0,5 µl suolaliuosta ja TOPO-vektoria. Kloonausreaktiot valmistettiin erikseen kustakin neljästä PCR-tuotteesta eristetyistä DNA sekvenssistä (taulukko 2). Reaktioliuosten valmistusten jälkeen eppendorf-putkia inkuboitiin 5 min huoneenlämmössä, jonka jälkeen ne siirrettiin jäähauteseen odottamaan transformaatiota.

### 3.3.2 Transformaatio

Transformaatioissa käytettiin TOP10 soluja. Valmistetut kloonausreaktiot transformoitiin lämpöshokilla kukin erillisille soluille. Solut sulatettiin jäällä ja niille pipetoitiin valmistettu 3 µl:n kloonausreaktio varovasti sekoittaen. Sekoituksen jälkeen soluja pidettiin jäähautteella 30 min ajan. Inkuboinnin jälkeen suoritettiin 30 s lämpöshokki 42 °C vesihautteessa, jonka jälkeen solut siirrettiin takaisin jäähautteeseen, ja niille lisättiin 250 µl S.O.C. elatuslientä. Elatusliemen lisäyksen jälkeen putkia sekoitettiin 225 kierr/min yhden tunnin ajan +37 °C:ssa. Tämän jälkeen solut (100 µl ja 175 µl) maljattiin esilämmitetyille



LB<sub>amp</sub>-maljoille, joita inkuboitiin yön yli 37 °C:ssa. Seuraavana aamuna maljat siirrettiin +4 °C:een.

### 3.3.3 Jatkokasvatus ja plasmidien eristys

Jokaisen fuusioproteiinin transformaatiomaljalta poimittiin pesäkkeitä 5 ml:n jatkokasvatukseen. Kasvatukset tehtiin 15 ml:n koeputkissa LB-elatusliemessä, johon oli lisätty ampicilliinia 100 µg/ml. Siirrostuksen jälkeen putket siirrettiin kasvatukseen yön yli tasevavistelijaan 200 kierr/min +37 °C:een. Jatkokasvatuksen jälkeen plasmidit eristettiin bakteerisoluista vastaavasti TOP10 soluista tehdyn eristyksen kanssa.

### 3.3.4 Sekvensointi

Tuotettujen plasmidien fuusioproteiineja koodittavien alueiden sekvenssit sekvenssoitiin molempiin suuntiin (ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer, Applied Biosystems). Sekvenssointia varten tehtiin 10 µl:n sekvenssointi-PCR reaktioseokset, joissa vaihdeltiin sekä templaattia että sekvenssointialuketta tarpeen mukaan. Reaktioseokseen tuli BigDye Dilution Buffer v3.1 -puskuria 1,7 µl, BigDye RR mix v3.1 -liuosta 0,7 µl, sekvenssointialuketta 0,6 µl sekä templaatti DNA:ta 7 µl (125-145 ng). Sekvenssoinnissa käytettiin Champion™ pET Directional TOPO® Expression Kit pakkauksen alukkeita. Sekvenssointi PCR:n ohjelma on esitetty liitteessä 1. PCR-tuotteet etanolisoitettiin ja saostetut tuotteet uudelleen liuotettiin 12 µl:aan kylmää Hi-Di-formamidia sekvenssointia varten. Liuotuksen jälkeen vastinjuosteet denaturoitiin +92 °C:ssa kahden minuutin ajan.

## 3.4 Fuusioproteiinien tuotto

Tuotetuista ja puhdistetuista plasmideista valittiin sekvenssointien jälkeen fuusioproteiinien tuottoon sellaiset plasmidit, joiden sekvensseissä ei ollut puutteita. Ensin valmistettiin siemenkasvatukset, joista jatkettiin jatkokasvatukseen ja edelleen tuotettujen proteiinien puhdistukseen. Yhteensä tuotettiin neljää erilaista fuusioproteiinituotetta (taulukko 4).

**Taulukko 4** PCR:n avulla valmistettujen DNA inserttien koodittamat fuusioproteiinit.

Reaktio	Emäsekvenssi	Fuusioproteiini
1	5' Bradtag-EGFP 3'	N-Bradtag-EGFP-C
2	5' Bradtag-EGFP-histag 3'	N-Bradtag-EGFP-histag-C
3	5' EGFP-bradtag 3'	N-EGFP-bradtag-C
4	5' EGFP-histag-bradtag 3'	N-EGFP-histag-bradtag-C

### 3.4.1 Siemenkasvatus

Fuusioproteiinin tuotto aloitettiin sulattamalla jäällä *E. coli*, BL21 star<sup>TM</sup>(DE3) One Shot<sup>®</sup> (Invitrogen) soluja. Soluille lisättiin 40 ng tuotettua plasmidia ja sekoitettiin varovasti. Sekoituksen jälkeen bakteerisolut pidettiin jäällä 30 min ajan kunnes suoritettiin 30 s:n lämpöshokki 42 °C vesihauteessa. Lämpöshokin jälkeen putket siirrettiin välittömästi takaisin jäähauteeseen, jonka jälkeen soluille lisättiin 250 µl huoneenlämpöistä S.O.C. elatuslientä. Ennen maljausta soluja inkuboitiin tasoravistelijalla 37 °C:ssa 30 min ajan 220 kierr/min. Transformaatiotuotteista tehtiin 50 µl:n varmistusmaljaukset LB<sub>amp</sub> (c<sub>amp</sub> = 100 µg/ml) -maljoille ja annettiin kasvaa yön yli +37 °C:ssa. Loput transformaatio-liuoksista (200 µl) siirrettiin kasvamaan ns. siemenkasvatukseen 15 ml:n koeputkiin, jotka sisälsivät 10 ml LB-elatuslientä sekä ampisilliinia 100 µg/ml. Bakteerien annettiin kasvaa tasoravistelijalla yön yli +28 °C:ssa 150 kierr/min.

### 3.4.2 Tuottokasvatus

Kukin saaduista siemenkasvatuksista siirrettiin omaan 2 l:n erlenmeyer-pulloon. Pulloihin oli laitettu valmiiksi 500 ml LB-elatuslientä sekä ampisilliinia 100 µg / ml. Siemenkasvatuksen lisäyksen jälkeen pulloja pidettiin tasoravistelijalla +28 °C:ssa 200 kierr/min ja kasvatuksista otettiin näytteitä tasaisin väliajoin, joista mitattiin OD<sub>600</sub>-arvo. OD<sub>600</sub>-arvon ylittäessä 0,5 lisättiin kasvatukseen IPTG loppukonsentraatioon 1mM, minkä jälkeen kasvatukset pidettiin tasoravistelijassa yön yli +28 °C:ssa 150 kierr/min. Tuottokasvatukset pysäytettiin sentrifugoimalla (Sorvall, RC5C) kasvatusliuoksia 10 min, 4000 g, +4 °C:ssa ja saadut bakteerisolupelletit pakastettiin -20 °C:een odottamaan jatkokäsittelyä.

### 3.4.3 His-tag fuusioproteiinien Ni-NTA puhdistus

Tuotetuista fuusioproteiineista bradtag-EGFP-histag sekä EGFP-histag-bradtag puhdistettiin solupelleteistään niissä sijaitsevien histidiinitähteiden avulla nikkeli-affiniteettikromatografisesti käyttämällä Ni-NTA Superflow -resiiniä (Qiagen GmbH, Hilden, Saksa).

Bakteerikasvatusten solut uudelleen liuotettiin 20 ml:aan 50 mM Na-fosfaatti, 100 mM NaCl-puskuria (liite 2) ja otettiin käyttöön 10 ml:n osuudet, joista bakteerisolut pelletoitettiin sentrifugoimalla. Käyttöön otetut solupelletit uudelleen liuotettiin 10 ml:n NPI-10 hajotuspuskuriin (liite 2). Liuotusten jälkeen solut hajotettiin

ultrasonikoimalla (Sonics Vibra Cell) käyttäen viiden minuutin sonikointi-ohjelmaa, jossa sonikaattoria pidettiin vuorotellen päällä 5 s ajan ja pois päältä 3 s ajan amplitudin ollessa 60 %. Solususpensioita pidettiin koko ajan jäällä lämpenemisen estämiseksi. Hajotetut solumassat kerättiin sentrifugoimalla huoneenlämmössä 15000 g, 30 min.

Proteiiniliuokset suodatettiin kaksinkertaisen sideharson läpi ennen kuin kromatografiapylväissä hajotuspuskurilla esipestyt resiinit lisättiin proteiiniliuosten joukkoon 50 ml:n koeputkiin. Seoksia inkuboitiin +4 °C:ssa 1,5 h ajan verisekoittajalla, kunnes liuokset kaadettiin pylväisiin. Läpi tulleet liuokset kerättiin talteen. Pylväät huuhdeltiin kolme kertaa 20 ml:lla hajotuspuskuria, jonka jälkeen pylväät pestiin kolmesti pesupuskurilla, NPI-20 (à 20 ml)(liite 2). Pesujen jälkeen pylväät eluoiitiin eluutiopuskurilla, NPI-250 (liite 2), kymmenellä yhden millilitran erällä. Kerättyjä 1 ml:n eriä sekä puhdistuksen aikana kerättyjä näytteitä tarkasteltiin mm. UV-valolla. Puhdistuksen aikana kerätyistä näytteistä tehtiin myös natriumdodekyylisulfaatti-polyakryyliamidigeelielektroforeesi (SDS-PAGE) ja vasta-ainevärjäykset.

### 3.5 Bradcore-resiinin valmistus

#### 3.5.1 Bradcoren puhdistus 2-iminobiotiiniagarosilla

Ensimmäiseksi puhdistettiin 2-iminobiotiini-affiniteettikromatografian avulla C-terminaalisesti tyypitettyä bradavidiinia, bradcorea, jota oli tuotettu aiemmin molekulaarisen bioteknologian tutkimusryhmässä (IMT, Tampereen yliopisto). Solukasvatuksesta kerättyjä soluja liuotettiin SET-puskuriin (liite 2), 40 ml puskuria / 10 g soluja. Soluliuoksen joukkoon lisättiin lysotsyymiä 2,5 mg / 10 g soluja. Liuos pidettiin jäähauteella 30 min magneettisekoittajalla, jonka jälkeen lisättiin HilloI-puskuria (liite 2) 100 ml / 50 g soluja, ja seos jäädytettiin jäähauteen avulla. Solut hajotettiin ultrasonikoimalla, 15 min, 5 s päällä ja 3 s pois päältä amplitudin ollessa 60 %. Sonikointi tehtiin jäähauteessa. Hajotettu solumassa sentrifugoitiin huoneenlämmössä, 15000 g, 30 min. Samalla käytettävä 2-iminobiotiini-agarosoi pestiin käyttövalmiiksi pH11-puskurilla (liite 2) 20 ml:n kromatografiapylväissä.

Proteiiniliuos dekantoiitiin litran dekantterilasiin ja liuokseen lisättiin vastaava tilavuus pH11-puskuria. Puskurin lisäyksen jälkeen pH säädettiin välille 10-11. Liuokseen muodostui suoloista sakka, joka poistettiin sentrifugoimalla 15000 g, 25 min ja dekantoimalla. Puhdistettuun proteiiniliuokseen lisättiin pylväissä pesty 2-iminobiotiini-

agaroosi (Affiland S. A., Ans-Liege, Belgia) ja tämä sitoutusseos pidettiin 1,5 h ajan kylmähuoneessa magneettisekoittajalla. Inkuboinnin jälkeen agaroosi kerättiin sentrifugoimalla (Hettich Zentrifugen Rotina 48 R) 3200 g kymmenen minuutin ajan 50 ml:n koeputkissa. Sitoutusliuos kerättiin talteen ja säilöttiin +4 °C:een ja agaroosi pestiin kahdesti pH11-puskurilla sentrifugoimalla vastaavasti kuin agarosia kerättyä. Agaroo siirrettiin pH11-puskurin avulla kromatografiapylvääseen, jossa se pestiin ensin 20 ml:lla pH11-puskuria. Pesun jälkeen bradcore eluoiitiin pylvästä 0,1 M metaanikarboksylihappolla 1 ml:n erissä, joiden konsentraatiot mitattiin NanoDrop -laitteella. Kerätyt erät säilöttiin -20 °C:een, kunnes niitä käytettiin joko resiiniin sitoutuksessa tai ITC-mittauksissa. Resiiniin sitoutusta varten bradcorea dialysoitiin sitoutuspuskuriin (liite 2) ja ITC-mittauksia varten 50 mM Na-fosfaatti, 100 mM NaCl-puskuriin Puhdistuksen aikana kerätyille näytteille ja fraktioille tehtiin SDS-PAGE-analyysi.

### 3.5.2 Bradcoren sitoutus resiiniin

Bradcore-resiinin valmistuksessa sidottiin puhdistettua bradcorea NHS-carboxylate-Sepharose<sup>TM</sup> 4 fast flow (NHS-4FF) resiiniin (Affiland, Liège, Belgia). Resiinisuspensiota otettiin 5 ml ja se pestiin 50 ml:n koeputkessa 15 ml:lla kylmää vettä. Pesujen jälkeen liuokset poistettiin ja korvattiin bradcore-sitoutusliuksella ( $V = 4,5$  ml,  $c = 0,93$  mg/ml). Bradcore-liuokseen suspensoitua resiiniä inkuboitettiin verisekoittajalla yön yli +4 °C:ssa, jonka jälkeen se nostettiin huoneenlämpöön tunniksi inkuboitumaan edelleen verisekoittajalla. Inkuboinnin jälkeen resiini kerättiin talteen sentrifugoimalla 3200 g, 10 min ajan. Erotetusta liuksesta mitattiin UV/Vis-spektrofotometrillä konsentraatio sitoutuneen bradcoren määrän selvittämiseksi.

Valmistettu bradcore-resiini pestiin neljällä eri liuksella sentrifugoimalla (3200 g, 10 min), 3 x sitoutuspuskurilla, 3 x PBS (pH 4)(liite 2), 3 x PBS (pH 8)(liite 2) ja kerran PBS (pH 7,4)(liite 2), kunnes se säilöttiin 5 ml:aan PBS puskuria, pH 7,4 ja siirrettiin +4 °C:een odottamaan jatkokäyttöä.

## 3.6 Fuusioproteiinien sitoutuskokeet

### 3.6.1 Bradtag-EGFP-histag sitoutus bradcore-resiiniin

Kokeen tarkoituksena oli tutkia sitoutuuko Ni-NTA-puhdistettu bradtag-EGFP-histag fuusioproteiini bradcoren biotiinia sitovaan kohtaan. Bradtag-EGFP-histag fuusioproteiinia

lisättiin 1,5 ml:n eppendorf-putkiin, joista toisessa oli bradcore-resiiniliuosta ja toisessa biotiinilla kyllästettyä bradcore-resiiniliuosta. Biotiinilla pyrittiin kyllästämään bradcoren biotiinia sitova kohta ja estämään fuusioproteiinin sitoutuminen bradcoreen. Kumpaankin putkeen oli lisätty yhtä suuret määrät bradcore-resiiniä (50 µl) sekä fuusioproteiinia (0,03 mg). Sitoutus tehtiin 1 ml tilavuudessa sitoutuspuskuria. Fuusioproteiinia sitoutettiin 1,5 h ajan tasoravistelijalla 220 kierr/min, jonka jälkeen resiini sentrifugoitiin putkien pohjalla ja tarkasteltiin UV-valolla. Biotiinilla kyllästetyn ja kyllästämättömän bradcore-resiinien fluoresenssien voimakkuutta verrattiin silmämääräisesti keskenään, jotta voitiin nähdä tapahtuuko fuusioproteiinin konsentroitumista bradcore-resiiniin.

### 3.6.2 Fuusioproteiinien puhdistaminen bradcore-resiinin avulla

#### *Bradtag-EGFP-histag*

Puhdistuskokeissa bradtag-EGFP-Histag fuusioproteiinia sitoutettiin bradcore-resiiniin ja tutkittiin eri pesuliuosten ja pH:n vaikutusta fuusioproteiinin sitoutumiseen sekä eluointiin. Aiemmin valmistettua bradcore-resiiniä siirrettiin n. 250 µl 10 ml:n kromatografia pylvääseen ja pestiin sitoutuspuskurilla. Pesun jälkeen pylvääseen lisättiin nikkeli-affiniteetikromatografialla puhdistettua bradtag-EGFP-histag fuusioproteiinia 1,55 mg ja pylväs suljettiin molemmista päistä. Pylvästä inkuboitiin verisekoittajalla yhden tunnin ajan +4 °C:ssa, jonka jälkeen pylväs päästettiin tyhjäksi ja läpituullut neste otettiin talteen. Resiiniä pestiin ensin sitoutuspuskurilla ja sitten pesuliuksilla 2 ja 3 (liite 2), kutakin käytettiin 10 kertaa 1 ml ja fraktiot kerättiin talteen. Pesujen jälkeen suoritettiin eluointi pH11-puskurilla. Kerättyjä 1 ml eriä tarkasteltiin UV-valolla ja tarkasteltiin fluoresenssin voimakkuutta silmämääräisesti.

#### *Bradtag-EGFP ja EGFP-bradtag*

Tavoitteena oli kokeellisesti puhdistaa bradtag-EGFP ja EGFP-bradtag fuusioproteiinia Brad-tag peptidin avulla suoraan bakteerikasvatuksesta erotetusta proteiiniliuoksesta. Bakteerikasvatuksista kerätyt ja pakastetut solupelletit sulatettiin ja liuotettiin 20 ml:aan sitoutuspuskuria. Käyttöön otettiin ainoastaan 4 ml ja loput pakastettiin vastaaviin alieriin. Suspensioihin lisättiin 1 mg lysosyymiä ja inkuboitiin huoneen lämmössä 15 min. Solut hajotettiin ultrasonikoimalla jäähauhteella, 5 min, 5 s päällä ja 3 s pois päältä amplitudin ollessa 30 %. Hajotuksen jälkeen solujäte poistettiin sentrifugoimalla (15 000g, 30 min, 4 °C) ja suodattamalla vielä jäljelle jäänyt liuos kaksinkertaisen sideharson läpi.

Sentrifugoinnin aikana bradcore-resiiniä siirrettiin n. 250 µl 10 ml:n kromatografiapylvääseen ja pestiin sitoutuspuskurilla.

Suodatuksen jälkeen sitoutuspuskurilla pesty resiini siirrettiin proteiiniliuosten sekaan ja inkuboitiin +4 °C:ssa verisekoittajalla 2 h ajan. Sitoutuksen jälkeen resiinit sentrifugoitiin pohjaan 3000 g, 10 min, 4 °C. Supernatantit otettiin talteen ja resiinit siirrettiin takaisin kromatografiapylväisiin. Pylväät pestiin ensin 10 kertaa sitoutuspuskurilla ja sitten 10 kertaa pesuliuos 2:lla 1 ml:n erissä kunnes proteiinit eluoiitiin pH11-puskurilla 1 ml:n erissä. Kokeen aikana pylväitä ja kerättyjä 1 ml:n eriä tarkasteltiin UV-valolla. Kerätyille näytteille tehtiin myös SDS-PAGE-analyysi ja vasta-ainevärjäykset. Yhteensä puhdistuskokeet tehtiin yhdelle bradtag-EGFP tuotolle sekä kolmelle EGFP-bradtag tuotolle, EGFP-bradtag(1A), EGFP-bradtag(1B) ja EGFP-bradtag(2).

### 3.7 Fuusioproteiinien analysointi

#### 3.7.1 SDS-PAGE

Bradtag-EGFP-histag, EGFP-histag-bradtag(1) sekä EGFP-histag-bradtag(2) fuusioproteiinituotoista Ni-NTA puhdistusten aikana kerätyistä näytteistä suoritettiin SDS-PAGE-analyysit. Vastaavanlaisia SDS-PAGE-analyyseja suoritettiin myös bradcore-resiini puhdistuskokeista bradtag-EGFP fuusioproteiinituotolle sekä kaikille kolmelle EGFP-bradtag tuotolle. SDS-PAGE-analyyseissa käytettiin 15 % ajogeeliä ja 5 % konsentrintigeeliä. Geelijaio suoritettiin SDS-PAGE ajopuskurissa (liite 2) ensin 80 V jännitteellä 20 min ja 180 V jännitteellä 50 min ja molekyylikokomarkkerina käytettiin PageRuler™ Protein Ladder Plus (Fermentas). Geelijaion jälkeen geelit värjättiin Coomassie Brilliant Blue -värjäysliuoksella (liite 2).

#### 3.7.2 Vasta-ainevärjäykset

Vasta-ainevärjäykset aloitettiin suorittamalla SDS-PAGE:n kaltaiset geelijaio, mutta värjäyksen sijaan proteiinit siirrettiin elektroforeettisesti nitroselluloosakalvolle. Siirto suoritettiin siirtopuskurissa ajamalla 100 V jännitteellä 1 h ajan 4 °C:ssa magneettisekoittajalla. Ennen vasta-ainevärjäystä nitroselluloosakalvoja inkuboitiin yön yli maito (5 %)-TBS -liuoksessa 4 °C:ssa tasoravistelijalla. Nitroselluloosakalvoa pestiin kolme kertaa TBS-Tween (0,05 %) -liuoksella ennen käsittelyä primäärivasta-aineella (Anti-GFP Epitope Tag Polyclonal Antibody, Thermo Scientific). Primäärivasta-aineena,

anti-GFP, IgG, lisättiin kalvolle 1:5000 maito (5 %)-TBS-tween (0,05 %) -liuoksessa ja inkuboitiin huoneenlämmössä tasoravistelijalla tunnin ajan. Kalvot pestiin uudelleen ja lisättiin sekundääri-vasta-aine (Goat Anti-rabbit IgG, Sigma A 3937) 1:30000 maito (5 %)-TBS-tween (0,05 %) -liuoksessa ja inkuboitiin huoneenlämmössä tasoravistelijalla tunnin ajan, jonka jälkeen kalvot pestiin jälleen kolmesti. Pesun jälkeen lisättiin APA-puskuri (liite 2) ja pidettiin 5 min tasoravistelussa kunnes vaihdettiin värjäysliuos (Nitro Blue Tetrazolium (1 %)/5-bromi-4-kloori-3-indolyylifosfaatti (1 %)-seos) APA-puskurissa. Väriä annettiin kehittyä kunnes värjäytymisen voimakkuus oli sopiva ja kalvot huuhdeltiin vedellä värjäytymisen pysäyttämiseksi.

### 3.7.3 Fluoresenssispektrofotometria

Fluoresenssispektrofotometriassa näytteen lähettämä fluoresenssivalo muutetaan sähkövirraksi valomonistinputkella. Saadut sähkövirran arvot luetaan tietokoneella edelleen fluoresenssin intensiteetiksi. Laitteistossa käytetään yleensä kahta monokromaattoria, joita käytetään eksitaatio- ja emissioaallonpituuksien valitsemiseen (Lakowicz, 1983).

Puhtaalla bradtag-EGFP-histag proteiinilla määritettiin eksitaatiomaksimi valitsemalla emissioksi 510 nm ja mittaamalla eksitaatiospektri välillä 300 – 500 nm. Käyttäen määritettyä eksitaatiomaksimia, 485 nm, mitattiin emissiospektrit välillä 495 – 650 nm. Puhdistettua bradtag-EGFP-histag proteiinia käytettiin emission voimakkuuden vertailukohtana arvioitaessa mahdollista EGFP:n määrää EGFP-histag-bradtag tuotoissa. Fluoresenssispektrofotometrillä (QuantaMaster™ spectrofluorometer, Photon Technology International, Inc., Lawrenceville, NJ, USA) tehtiin mittauksia kahdelle eri EGFP-histag-bradtag tuotolle: EGFP-histag-bradtag(1) ja EGFP-histag-bradtag(2), sekä kolmelle EGFP-bradtag tuotolle: EGFP-bradtag(1A), EGFP-bradtag(1B) sekä EGFP-bradtag(2).

### 3.7.4 Isoterminen titrauskalorimetria

Isotermisellä titrauskalorimetrillä (engl. isothermal titration calorimetry, ITC) mitataan suoraan kemiallisen reaktion aiheuttamaa lämpö määrän muutosta, joka on seurausta esim. kahden eri molekyylin sitoutumisesta. ITC-kokeessa voidaan lisätä injeksiolla asteittain toista reagenssia mittaussolussa olevaan toiseen reagenssiseokseen. Injektiolla luodaan eri reagensseille, kuten proteiinille ja sen ligandille, sarja kemiallisia reaktiota joiden aiheuttamia energianmuutoksia voidaan mitata. Lämmön ( $q_i$ ) sitoutuminen tai

vapautuminen on suoraan verrannollinen reaktiossa proteiiniin sitoutuvaan ligandin määrään ja reaktiolle ominaiseen sitoutumisentalpiaan ( $\Delta H$ ). Gibbsin energia muutos on lämpötilasta riippuvainen seuraavan yhtälön mukaisesti,  $\Delta G = -RT \ln K_b = \Delta H - T\Delta S$ . Dissosiaatiovakio ( $K_d$ ) voidaan selvittää käyttämällä seuraavaa yhtälöä,  $K_a = K_b = 1/K_d$ . (Leavitt ja Freire, 2001).

ITC:n avulla tutkittiin bradcoren affiniteettia mutatoituihin bradpeptideihin (GenSript, Piscataway, NJ, USA) (taulukko 5). Mittaukset suoritettiin VP-ITC MicroCalorimeter -laitteella (GE Healthcare, MicroCal, Northampton, MA, USA). Mittauksilla tarkasteltiin eroja alkuperäisen/luontaisen bradpeptidin ja mutanttipeptidien affiniteeteissa. Mittaukset suoritettiin 50 mM Na-fosfaatti, 100 mM NaCl-puskurissa kahdessa eri referenssisolun lämpötilassa,  $T = 25^\circ\text{C}$  ja  $T = 15^\circ\text{C}$ . Bradpeptidiä titrattiin 10  $\mu\text{l}$ :n erissä toistuvasti 30 kertaa 200 s välein sekoittaen 440 kierr/min. Alkuperäisen bradpeptidin mittaukset suoritti Jenni Leppiniemi. Bradcoren affiniteettia tutkittiin myös bradtag-EGFP-histag fuusioproteiiniin ja mittaukset tehtiin vastaavalla tavalla.

Mittauksissa ruiskussa olleen bradpeptidin (bradpeptidit2-4) konsentraatio oli kymmenkertainen (1 mM) verrattuna näytesolussa olleeseen bradcoren konsentraatioon (0,1 mM) nähden. Fuusioproteiinimittauksissa konsentraatioiden suhde pidettiin vastaavasti kymmenkertaisena mutta konsentraatiot olivat alemmat; 0,15 ja 0,015 mM. Saadut mittaustulokset käsiteltiin Microcal Origin 7.0 (MicroCal LLC, Northampton, MA, USA) -ohjelmalla.

**Taulukko 5** Bradpeptidit ja aminohapposekvenssit. Mutatoidut aminohappotähteet lihavoitu ja alleviivattu.

Nimi	Oligo
Bradpeptidi	SEKLSNTK
Bradpeptidi2	SE <del>S</del> LSNTK
Bradpeptidi3	S <del>S</del> KL <del>S</del> NTK
Bradpeptidi4	SEKLSNT-



## 4 Tulokset

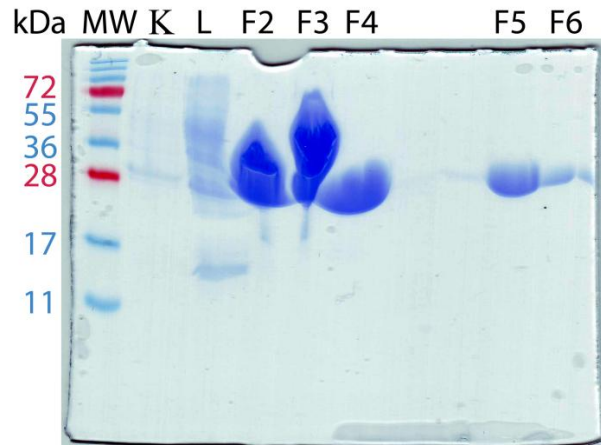
### 4.1 Fuusioproteiinituotot

Tutkimuksen tavoitteena oli tuottaa neljää toisistaan poikkeavaa vaihtoehtoa Brad-tag peptidin sisältävästä EGFP fuusioproteiinista ja tarkastella näiden fuusioproteiinien ominaisuuksia Brad-tagin toiminnan kannalta. Työ aloitettiin valmistamalla DNA-konstruktit, joiden avulla transformoitiin *E. coli* soluja ja saatiin aikaan rekombinantti-proteiinien tuottuminen bakteerisoluihin. Bakteerituotot, joissa Brad-tagin oli tarkoitus sijaita fuusioproteiinin aminoterminuksessa, olivat vuorokauden kasvatuksen jälkeen väriltään vihertäviä ja fluoresoivat voimakkaasti UV-valossa. Kasvatukset, joissa Brad-tagin oli tarkoitus sijaita fuusioproteiinin karboksyyli-terminuksessa, olivat kaikki väriltään ruskehtavan kellertäviä eivätkä ne fluoresoineet UV-valon vaikutuksesta. Bakteerikasvatusten jälkeen jatkettiin sitoutus- ja puhdistuskokeisiin fuusioproteiinien ominaisuuksien karakterisoimista varten.

### 4.2 His-tagillisten fuusioproteiinien Ni-NTA puhdistukset:

#### 4.2.1 Bradtag-EGFP-histag

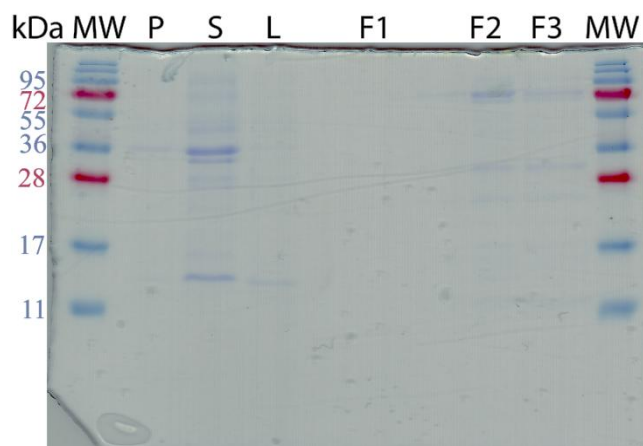
Ensimmäisenä tuotetuista fuusioproteiineista puhdistettiin bradtag-EGFP-histag fuusioproteiinia His-tagia hyväksikäyttämällä. Ni-NTA affiniteettikromatografisella puhdistuksella oli tavoitteena saada käyttöön mahdollisimman puhdasta fuusioproteiinia alustavia analyysejä varten. Eluutiosta kerätyistä näytteistä ajetun SDS-PAGE:n (kuva 2) perusteella, tuotosta puhdistetun proteiinin molekyylipaino oli ~30 kDa. Bradtag-EGFP-histagin teoreettinen molekyylipaino on 30,32 kDa. Kuvassa 2 olevan geelin tarkastelussa on hyvä ottaa huomioon se, että fuusioproteiinia on eluoitunut fraktioihin F2 ja F3 niin paljon, että se häiritsee elektroforeettista analyysiä.



**Kuva 2** SDS-PAGE-analyysi bradtag-EGFP-histag fuusioproteiinin Ni-NTA puhdistuksesta. Analyysissä näytteissä F2-F6 erottuu halutun fuusioproteiinin kokoa vastaavat vyöhykkeet n. 30 kDa:n alueella. Lyhenteiden selitykset: MW = molekyylikomarkkeri (PageRuler™ Protein Ladder Plus, Fermentas), K= kasvatusnäyte uudelleen liuotetusta bakteeripelletistä. L= pylvään läpi tullut liuos. F2-F6= fraktiot 2-6.

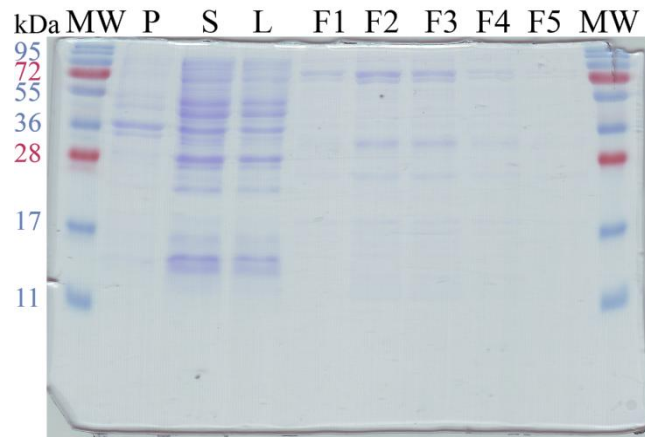
#### 4.2.2 EGFP-histag-bradtag

EGFP-histag-bradtagille tehtiin yhteensä kaksi tuottoa bakteerisoluisissa. Kasvatukset tehtiin eri plasmideista. Molemmille tuotoille suoritettiin Ni-NTA affiniteettikromatografiset puhdistukset ja kerätyistä näytteistä SDS-PAGE-analyysit. Ensimmäisestä, EGFP-histag-bradtag(1) tuotosta tehdyn puhdistuksen geeliajossa (kuva 3) nähdään eluutionäytteiden fraktioissa 2 ja 3 useita vyöhykkeitä, joista yksi sijaitsee ~30 kDa:n kohdalla. Fuusioproteiinin teoreettinen molekyylipaino 30,32 kDa.



**Kuva 3** SDS-PAGE-analyysi EGFP-histag-bradtag(1) fuusioproteiinin Ni-NTA puhdistuksesta. F2 ja F3 näytteistä erottuvat fuusioproteiinin kokoa vastaavat vyöhykkeet n. 30 kDa:n alueelta. Lyhenteiden selitykset: MW = molekyylikomarkkeri (PageRuler™ Protein Ladder Plus, Fermentas), P = pellettinäyte, S = supernatantinäyte, L= pylvään läpi tullut liuos, F1-F3= fraktiot 1-3.

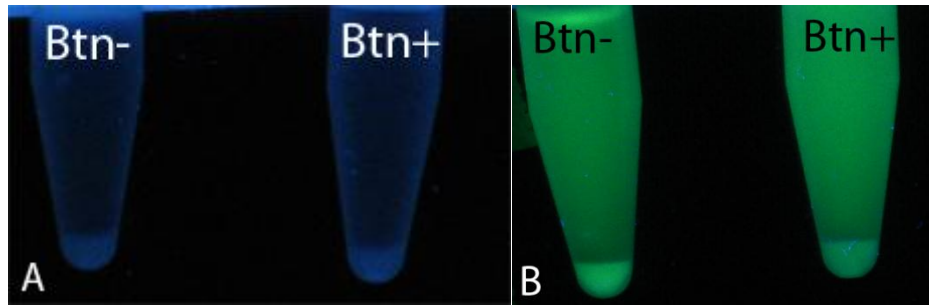
Toiselle tuotolle, EGFP-histag-bradtag(2), tehdystä puhdistuksesta kerättyjen näytteiden SDS-PAGE:lla (kuva 4) nähdään vastaavanlaiset vyöhykkeet EGFP-histag-bradtag(1) tuoton kanssa (kuva 3). Voimakkaimmat vyöhykkeet eluutiovaiheen fraktioista nähdään fraktioissa kaksi ja kolme ~30 ja ~70 kDa:n kohdalla, mutta geeliltä erottuu selkeästi myös muitakin vyöhykkeitä.



**Kuva 4** SDS-PAGE-analyysi EGFP-histag-bradtag(2) fuusioproteiinin Ni-NTA puhdistuksesta. Fuusioproteiinia vastaavat vyöhykkeet erottuvat selkeimmin n. 30 kDa:n kohdalla näytteissä F2 ja F3. Lyhenteiden selitykset: MW = molekyylikomarkkeri (PageRuler™ Protein Ladder Plus, Fermentas), P = pellettinäyte, S = supernatantinäyte, L= pylvään läpi tullut liuos, F1-F5= fraktiot 1-5.

### 4.3 Bradcore-resiiniin sitoutumiskoe

Bradtag-EGFP-histag fuusioproteiinin sitoutumista bradcore-resiiniin testattiin yksinkertaisella kokeella. Kokeessa käytettiin kahta bradcore-resiiniliuosta, joista toiseen oli lisätty ylimäärin biotiinia ja toiseen ei lisätty lainkaan biotiinia. Sitouttamisen jälkeen liuoksia tarkasteltiin UV-valossa (kuva 5). Kokeen perusteella havaittiin pohjalle laskeutuneen bradcore-resiinin fluoresoivan UV-valossa voimakkaammin, jos bradcore-resiiniliuoksessa ei ollut biotiinia. Resiiniin oli sitoutettuna bradcorea 2,3 mg/ml.

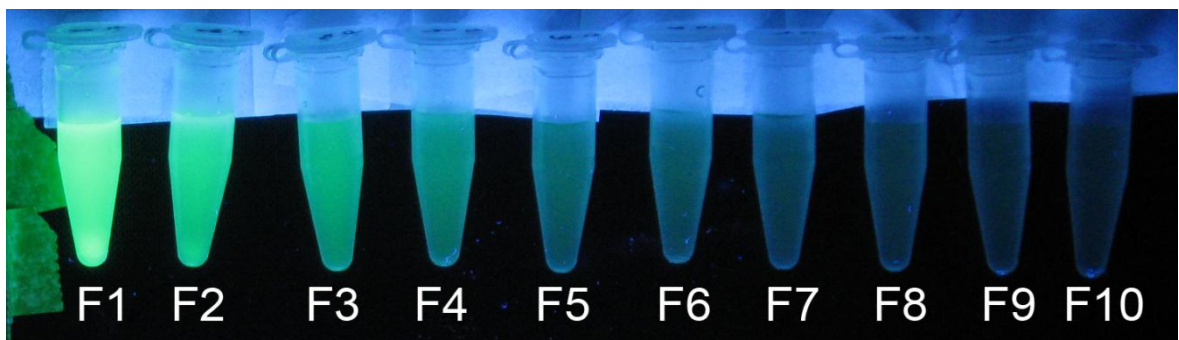


**Kuva 5** Bradtag-EGFP-histag fuusioproteiinin sitoutuskoe bradcore-resiiniin. Biotiinilla kyllästetyn bradcore-resiinin, Btn+, fluoresenssi oli huomattavasti heikompaa verrattuna resiiniin, jossa ei ollut biotiinia, Btn-. **A)** ennen fuusioproteiinin lisäystä ja **B)** fuusioproteiinin lisäyksen jälkeen.

#### 4.4 Bradcore-resiini affiniteettipuhdistuskokeet

##### 4.4.1 Bradtag-EGFP-histag

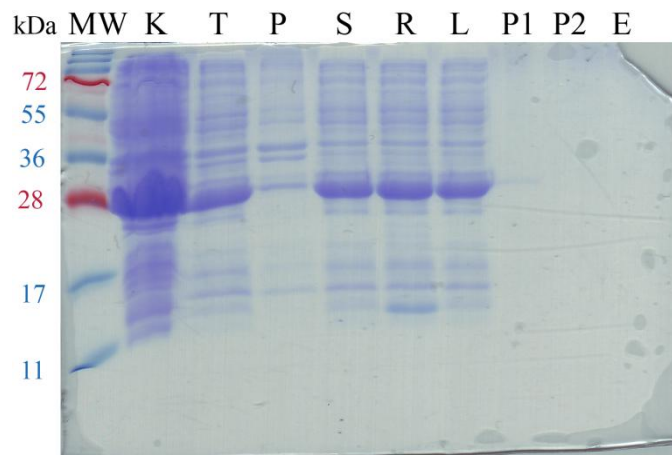
Ni-NTA puhdistetulle bradtag-EGFP-histag fuusioproteiinille tehtiin pylväskromatografinen affiniteettipuhdistuskoe bradcore-resiinin avulla. Pesu- ja eluutio-vaiheissa kerättyjä 1 ml:n näyte-eriä tarkasteltiin UV-valossa. Kerätyissä näytesarjoissa havaittiin ensimmäisen pesuvaiheen ensimmäisten näytteiden (kuva 6, F1-F4) selvästi fluoresoivan UV-valon vaikutuksesta. Sarjan viimeisissä näytteissä fluoresenssi heikkenee ja lopulta häviää kokonaan. Fluoresenssia ei myöskään havaittu enää seuraavien pesu- ja eluutiiovaiheiden näytteissä.



**Kuva 6** Bradtag-EGFP-histag bradcore-resiiniin puhdistuskokeen ensimmäisen pesuvaiheen fraktiot UV-valossa. Näytteet F1-F4 fluoresoivat voimakkaasti, jonka jälkeen fluoresenssi heikkenee ja häviää lopulta kokonaan. F1-10: pesuvaiheiden fraktiot 1-10 keräämisjärjestyksessä.

#### 4.4.2 Bradtag-EGFP

Bradtag-EGFP fuusioproteiinille suoritettiin puhdistuskoe suoraan bakteerikasvatuksesta erotettuun proteiiniliuokseen. Kokeessa pyrittiin sitouttamaan fuusioproteiinia bradcore-resiiniin ja puhdistamaan fuusioproteiini muista proteiineista pylväskromatografialla. Kokeessa kerätyistä näytteistä tehdyllä SDS-PAGE-analyysillä (kuva 7) nähdään sitoutusvaiheen näytteissä muita vyöhykkeitä voimakkaammat vyöhykkeet ~27 kDa:n kohdalla. Bradtag-EGFP:n teoreettinen koko 26,78 kDa. Uudelleenliuotetusta solupelletistä kerätyssä näytteessä (P) vyöhyke näkyy selkeästi heikompana muihin näytteisiin verrattuna. Ensimmäisen pesun kolmannesta fraktiosta otetussa näytteessä P1 havaitaan myös heikko vyöhyke ~27 kDa:n kohdalla.

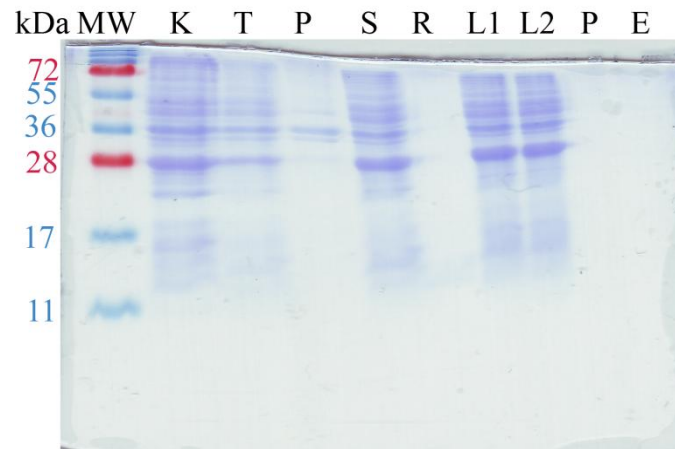


**Kuva 7** SDS-PAGE-analyysi bradtag-EGFP puhdistuskokeesta bradcore resiiniin. Bradtag-EGFP fuusioproteiinia vastaavat vyöhykkeet erottuvat voimakkaana 27 kDa:n kohdalla ennen affiniteetikromatografiaa kerätyissä näytteissä sekä heikkona vielä pesuvaiheessa kerätyssä näytteessä P1. Lyhenteiden selitykset: MW = molekyylikokomarkkeri (PageRuler™ Protein Ladder Plus, Fermentas), K= kasvatusnäyte uudelleen liuotetusta bakteeripelletistä, T = totaalinäyte hajotetuista bakteerisoluiista, P = pellettinäyte, S = supernatantinäyte, R = resiininäyte ennen pesuvaihetta, L= pylvään läpi tullut liuos, P1 = ensimmäisen pesuvaiheen näyte (fraktio 3), P2 = toisen pesuvaiheen näyte (fraktio 3), E = eluutiovaiheen näyte (fraktio 2).

#### 4.4.3 EGFP-bradtag

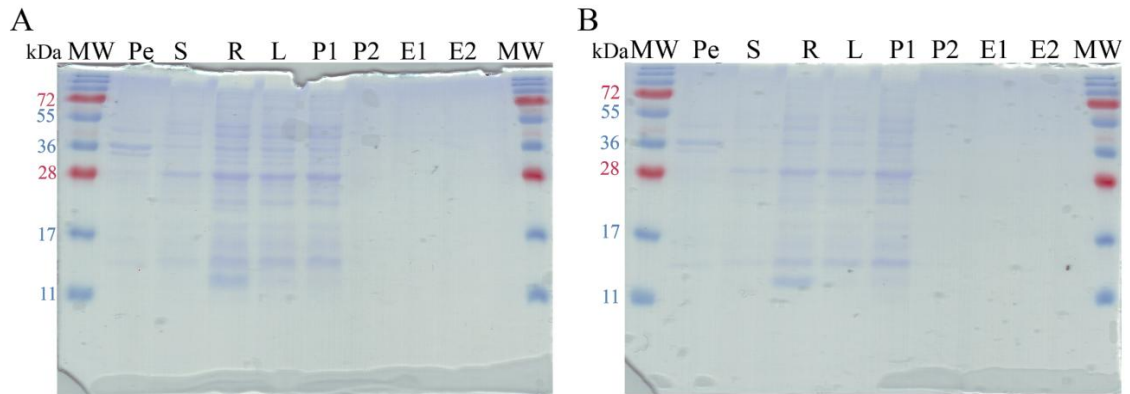
EGFP-bradtag fuusioproteiinista tehtiin yhteensä kolme eri tuottoa, joista kahdessa käytettiin samaa plasmidia. Ensimmäisen EGFP-bradtag tuoton, EGFP-bradtag(1A), puhdistuskokeesta kerättyjen näytteiden pohjalta tehdyllä SDS-PAGE-analyysillä (kuva 8) nähdään voimakkaimmat vyöhykkeet ~27 kDa:n kohdalla. EGFP-bradtagin teoreettinen

molekyylipaino 26,78 kDa. Pesu- (P) ja eluutiofraktioissa (E) ei havaittu halutunkokoista proteiinia.



**Kuva 8** SDS-PAGE-analyysi EGFP-bradtag(1A) fuusioproteiinin puhdistuskoe bradcore resiiniin. Tuotettua EGFP-bradtag(1A) fuusioproteiinia vastaavat voimakkaat vyöhykkeet erottuvat n. 27 kDa:n kokoisina. Lyhenteiden selitykset: MW = molekyylikomarkkeri (PageRuler™ Protein Ladder Plus, Fermentas), K= kasvatusnäyte uudelleen liuotetusta bakteeripelletistä. T = totaalinäyte hajotetuista bakteerisoluista, P = pellettinäyte, S = supernatantinäyte, R = resiininäyte ennen pesuvaihetta, L1= sitoutusliuos ennen pylväskromatografiaa, L2 = pylvään läpi tullut liuos, P1 = pesuvaiheen (kolmas fraktio) näyte, E = eluutiovaiheen näyte.

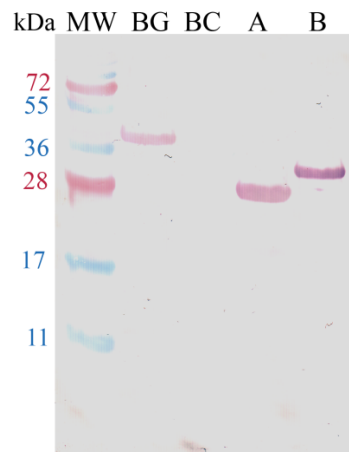
Myöhemmistä EGFP-bradtag tuotoista, EGFP-bradtag(1B) ja EGFP-bradtag(2), tehdyistä puhdistuskokeista kerättyjen näytteiden SDS-PAGE-analyyseissa (kuva 9) erottuu ensimmäisen tuoton kanssa vastaavankokoiset, muita selkeästi voimakkaammat, vyöhykkeet ~27 kDa:n kohdalla. Vyöhykkeet erottuvat lähinnä sitoutusvaiheen näytteissä. Merkittävimmin huomattakoon sitoutusliuksesta (L) ja ensimmäisestä pesusta (P1) kerättyjen näytteiden ~27 kDa vyöhykkeet. P2 ja E1-E2-fraktioissa ei havaittu 27 kDa proteiinia.



**Kuva 9** SDS-PAGE-analyysit toisista EGFP-bradtag fuusioproteiinituottojen Bradcore puhdistuskokeista. **A)** EGFP-bradtag(1B) ja **B)** EGFP-bradtag(2). Lyhenteiden selitykset: MW = molekyylikomarkkeri (PageRuler™ Protein Ladder Plus, Fermentas), Pe = pellettinäyte, S = supernatantinäyte, R = resiininäyte ennen pesuvaihetta, L = sitoutusliuosnäyte ennen pylväskromatografiaa, P1-P2 = pesuvaiheen fraktiot 1 ja 2, E1-E2 = eluutiovaiheen fraktiot 1 ja 2.

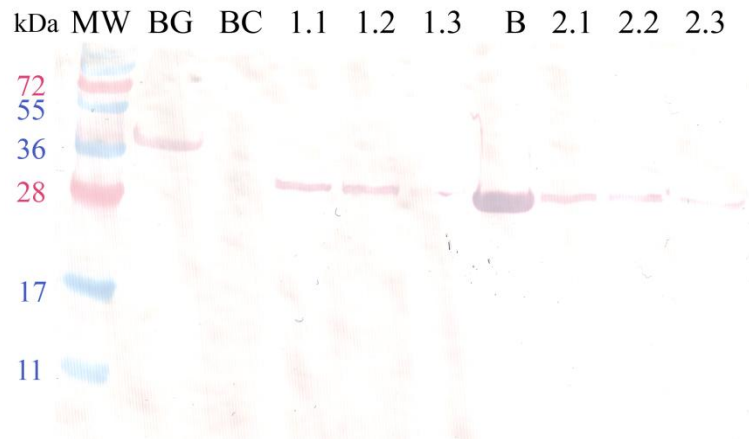
#### 4.5 Vasta-ainevärijäykset

Bradtag-EGFP (26,78 kDa) puhdistuskokeessa ja bradtag-EGFP-histag (30.32 kDa) Ni-NTA puhdistuksessa kerätyille sitoutusliuosnäytteille tehdyissä vasta-ainevärijäyksissä erottuu värjäytymistä kummankin fuusioproteiinin tapauksessa (kuva 10). Bradtag-EGFP näyte on värjäytynyt ~27 kDa:n ja bradtag-EGFP-histag näyte ~30 kDa:n kohdalla. Vasta-aineen toimivuus varmistettiin biotinyloidulla GFP:lla ja negatiivisena kontrollina käytettiin bradavidiinin C-terminaalisesti lyhennettyä muotoa.



**Kuva 10** Vasta-ainevärijäys bradtag-EGFP ja bradtag-EGFP-histag tuottojen Bradcore-resiiniin sitoutusliuosista. Kummankin fuusioproteiinin tapauksessa erottuu selkeä ja voimakas vyöhyke fuusioproteiinin teoreettista molekyylipainoa vastaavalta alueelta. Lyhenteiden selitykset: MW = molekyylikomarkkeri (PageRuler™ Protein Ladder Plus, Fermentas), BG = biotinyloitu GFP, BC = bradcore, A=bradtag-EGFP, B= bradtag-EGFP-histag.

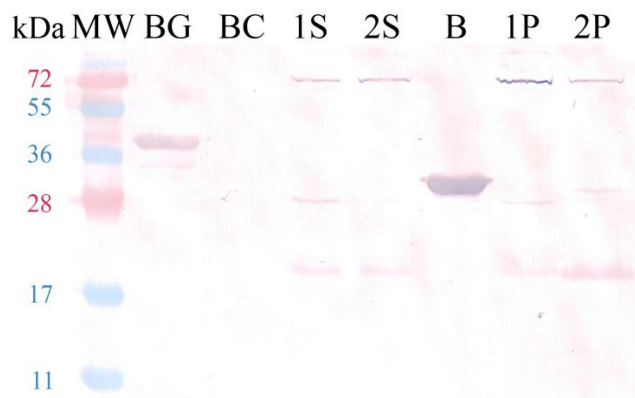
EGFP-histag-bradtag (30,32 kDa) tuottojen Ni-NTA puhdistuksen eluutiovaiheessa kerätyistä 1 ml:n näyte-eristä valmistetuissa näytteissä (kuva 11) havaitaan värjäytyneet vyöhykkeet ~30 kDa:n kohdalla. Vastaavanlainen värjäytynyt vyöhyke erottuu myös bradtag-EGFP-histag (30,32 kDa) tuoton näytteessä. Signaali on kuitenkin merkittävästi heikompi verrattuna N-terminaalisen Brad-tagin kohdalla havaittuihin (Kuva 10).



**Kuva 11** Vasta-ainevärjäys EGFP-histag-bradtag tuottojen eluutionäytteistä. Fuusioproteiineja vastaavat värjäytymiset n. 30 kDa:n kohdalla. Lyhenteiden selitykset: MW = molekyylikomarkkeri (PageRuler™ Protein Ladder Plus, Fermentas) BG = biotinyloitu GFP, BC = bradcore, 1.1-1.3 = EGFP-histag-bradtag(1) puhdistuksen eluutiofraktiot 1-3, 2.1-2.3 = EGFP-histag-bradtag(2) puhdistuksen eluutiofraktiot 1-3.

EGFP-bradtag fuusioproteiinille (26,78 kDa) tehtiin yhteensä kolme eri bakteerikasvatusta proteiinien tuottoa varten. Kasvatukseen käytettiin kahta eri plasmidia. Vasta-ainevärjäykseen valittiin näytteitä molemmilla plasmideilla tehdyistä tuotoista. Vasta-ainevärjäyksessä käytetyt näytteet olivat hajotetusta bakteerisolunmassasta sekä siitä erotetusta proteiiniliuoksesta. EGFP-bradtag(1B) tuoton proteiiniliuos näytteessä erottuu vasta-ainevärjäyksellä vyöhyke ~27 kDa:n kohdalla (kuva 12), kun taas EGFP-bradtag(2) tuotolla ei vastaavaa vyöhykettä nähdä. Solujätenäytteissä vyöhykkeitä erottuu molemmilla tuotoilla. Vyöhykkeet erottuvat ~27 (1B) ja ~30 (2) kDa:n kohdalla. Kasvatuksista valmistetuilla näytteillä molemmilla tuotoilla vyöhykkeitä esiintyy myös n. 70 ja 20 kDa:n kohdilla sekä proteiiniliuoksissa, että solujätenäytteissä.



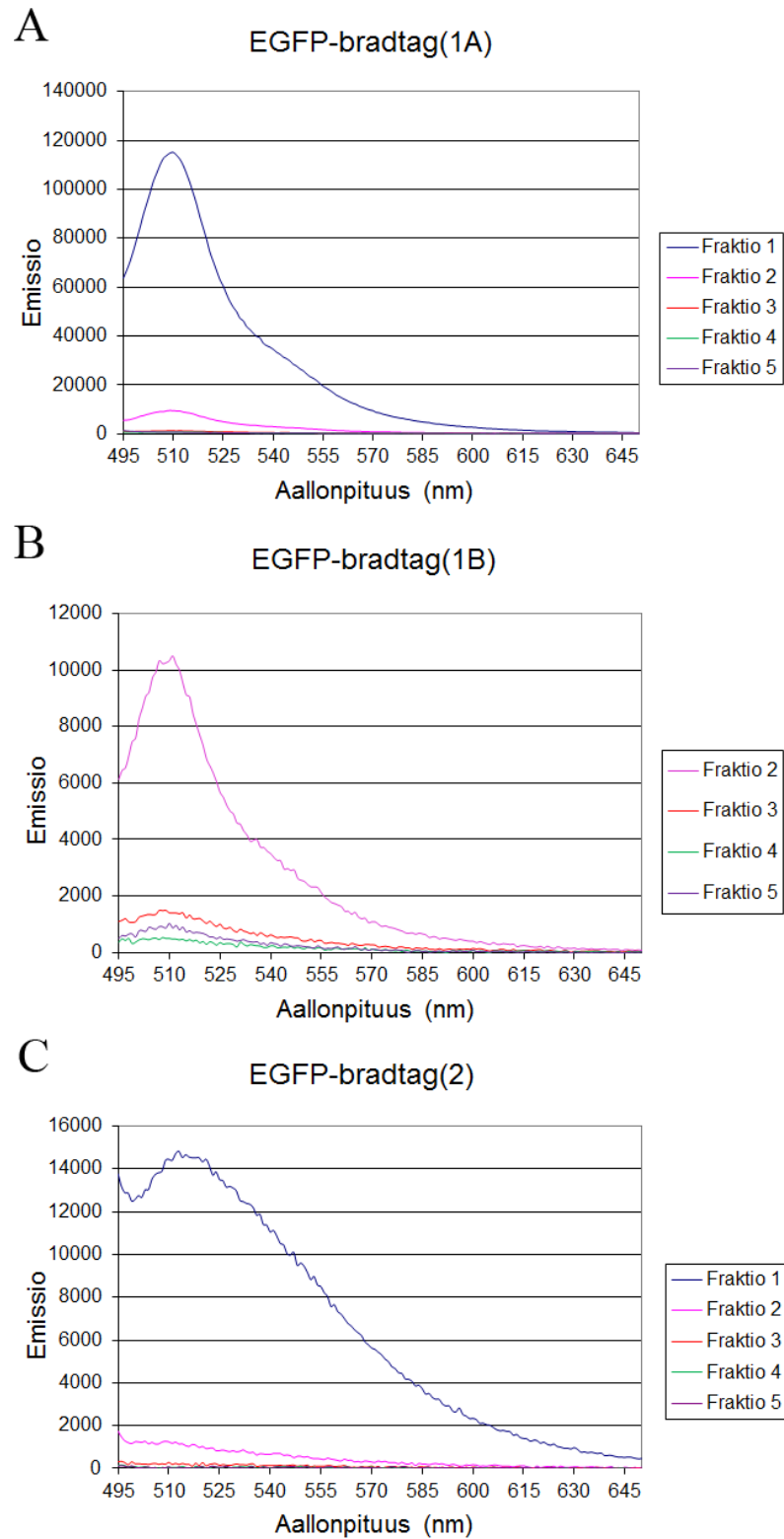


**Kuva 12** Vasta-ainevärijäys EGFP-bradtag tuottojen solupelletti ja -suspensio näytteistä bradcore-resiiniin tehdyistä puhdistuskokeista. EGFP-bradtag tuottojen näytteissä erottuu fuusioproteiinin molekyylipainoa vastaavat vyöhykkeet n. 27 kDa:n kohdalla. Lyhenteiden selitykset: MW = molekyylipainomarkkeri (PageRuler™ Protein Ladder Plus, Fermentas) BG = biotinyloitu GFP (positiivinen kontrolli), BC = bradcore (negatiivinen kontrolli), A=bradtag-EGFP, B= bradtag-EGFP-histag. 1S = EGFP-bradtag(1B) supernatanttinäyte, 2S = EGFP-bradtag(2) supernatanttinäyte, B = bradtag-EGFP-histag kontrolli, 1P = EGFP-bradtag(1B) pellettinäyte, 2P = EGFP-bradtag(2) pellettinäyte.

#### 4.6 Fluoresenssispektrofotometria

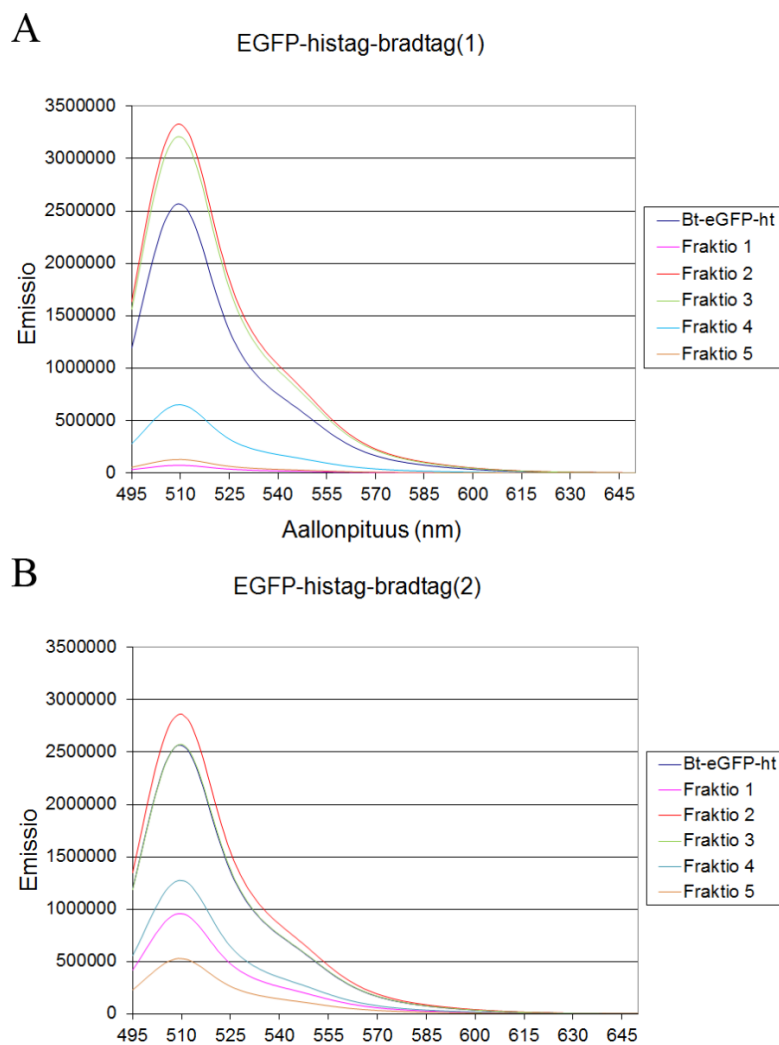
Fluoresenssispektrofotometrillä tehtiin mittauksia kaikille proteiinituotoille, joissa Bradtag sijaitti C-terminaalisisena fuusiona (EGFP-bradtag ja EGFP-histag-bradtag). EGFP-histag-bradtag mittaukset tehtiin Ni-NTA puhdistuksen eluutiivaiheessa kerätyille 1 ml:n erille. EGFP-bradtag mittaukset tehtiin bradcore-resiinin sitoutuskokeessa kerätyistä pesuvaiheen 1 ml:n näytteistä. Bradtag-EGFP-histag tuotosta puhdistettua fuusioproteiinia (15,51 µg/ml) käytettiin positiivisena kontrollina.

Kaikissa kolmessa tuotossa (kuva 13) havaittiin kahdessa ensimmäisessä fraktionäytteessä muita näytteitä suurempi emissio, mikä viittaisi EGFP:n tuottumiseen kyseisissä näytteissä. EGFP-bradtag(1A):n ja EGFP-bradtag(1B):n emissiospektrit ovat hyvin yhteneviä EGFP:n luonnollisen emissiospektrin kanssa, emissiomaksimin sijaitessa 509 nm:n kohdalla. EGFP-bradtag(2) tapauksessa spektri on muodoltaan litteämpi.



**Kuva 13** Fluoresenssispektrofotometrisesti mitatut emissiospektrit EGFP-bradtag fuusioproteiinin bradcore-resiini puhdistuskokeista. **A)** EGFP-bradtag(1A), **B)** EGFP-bradtag(1B), **C)** EGFP-bradtag(2). Kuvien A ja B emissiospektrit vastaavat EGFP:n luonnollista emissiospektriä. Emissiomaksimit sijaitsevat kussakin kuvassa 509 nm:n kohdalla.

Ni-NTA puhdistuksessa kerättyjen EGFP-histag-bradtag tuottojen näytteiden emissiomaksimit olivat selkeästi suurempia verrattuna EGFP-bradtag näytteisiin. EGFP-histag-bradtag tuotoista verrattiin eluutiovaiheen fraktioita käytettyyn positiiviseen, bradtag-EGFP-histag, kontrolliin (15,51 µg/ml) (kuva 14).



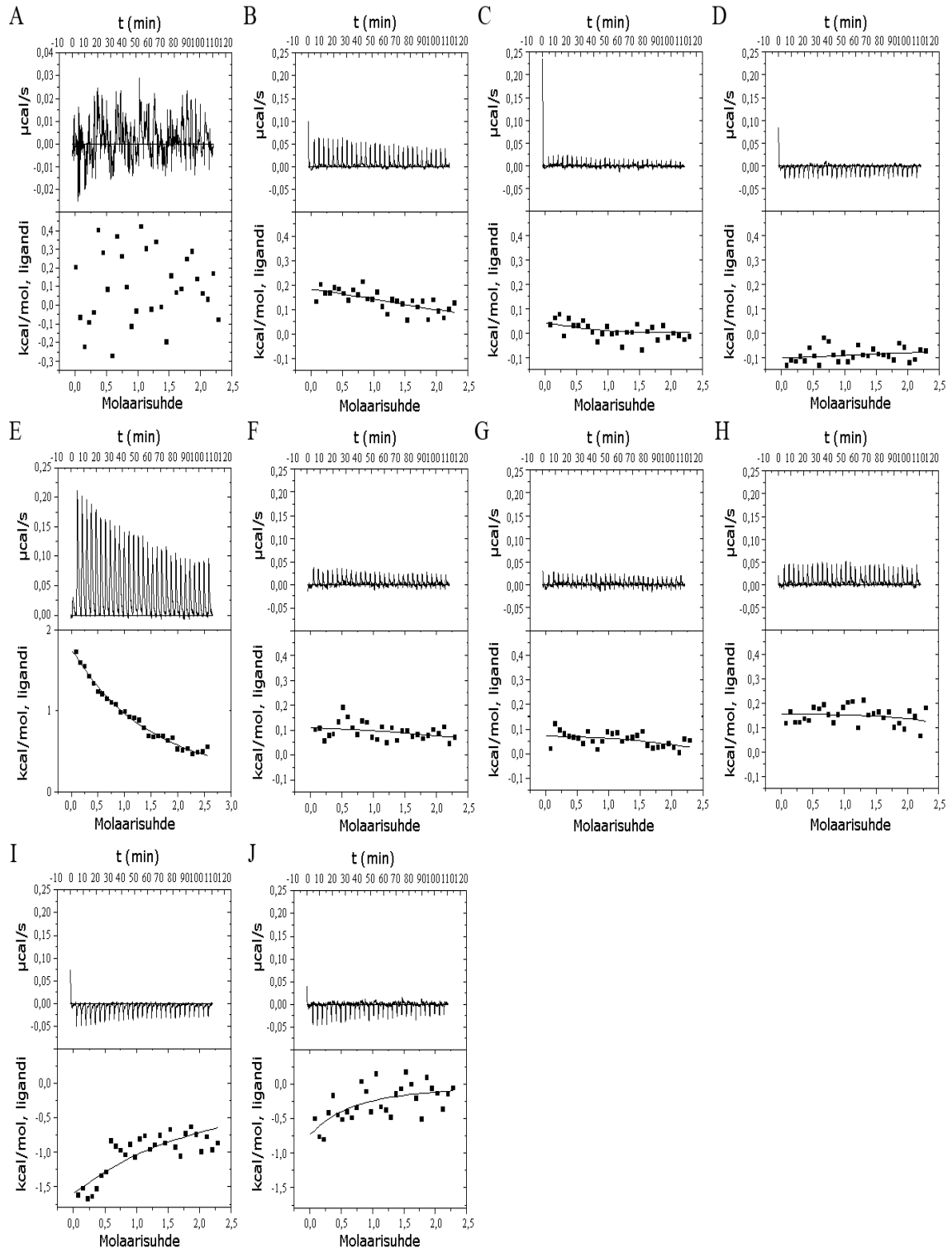
**Kuva 14** Fluoresenssiemissiospektrit EGFP-histag-bradtag Ni-NTA affiniteettikromatografisen puhdistuksen eluutiofraktioille 1-5. **A)** EGFP-histag-bradtag(1), **B)** EGFP-histag-bradtag(2). Kuviin lisätty vertailun helpottamiseksi bradtag-EGFP-histag (Bt-eGFP-ht, 15,51 µg/ml) fuusioproteiinin emissiospektri.

#### 4.7 Isoterminen titrauskalorimetri

ITC:lla mitattiin alkuperäisestä bradpeptidistä muokattujen bradpeptidien (taulukko 5) sitoutumista bradavidiniin C-terminaalisesti tyypistettyyn core-muotoon. Alkuperäiselle bradpeptidille (SEKLSNTK) on esitetty Jenni Leppiniemen suorittamien mittauksien

tulokset ( $K_d = 25 \mu\text{M}$  15 °C:ssa, lämpötilassa 25 °C bradpeptidin lisäämisen ei havaittu aiheuttavan entalpiamuutosta). Muiden bradpeptidien ITC-mittaukset suoritettiin kahdessa eri lämpötilassa,  $T = 25 \text{ °C}$  ja  $T = 15 \text{ °C}$  (kuva 15, taulukko 6).

Bradpeptidien lisäksi mitattiin myös bradtag-EGFP-histag fuusioproteiinin sitoutumista bradcoreen. Fuusioproteiinin mittaukset suoritettiin samoja lämpötiloja käyttäen, mutta huomattavasti alemmilla konsentraatioilla verrattuna peptidimittauksiin.



**Kuva 15** Mittaustulokset isothermisella titrauskalorimetrialla, ITC. Bradcoreen titrattiin bradpeptidejä 25°C: **A)** Bradpeptidi (Leppiniemi ym, julkaisemattomia tuloksia), **B)** Bradpeptidi2, **C)** Bradpeptidi3, **D)** Bradpeptidi4. Mittaukset toistettiin 15°C: **E)** Bradpeptidi (Leppiniemi ym, julkaisemattomia tuloksia), **F)** Bradpeptidi2, **G)** Bradpeptidi3, **H)** Bradpeptidi4. Bradcoreen titrattiin myös tuotettua fuusiopeptiiniä, bradtag-EGFP-histag: **I)** 25°C, **J)** 15°C.

**Taulukko 6** ITC mittausten tulokset. (Bradpeptidi-bradcore mittaukset T =15 ja T = 25: Leppiniemi ym, julkaisemattomia tuloksia). \* Ei pystytty määrittämään.

Kammion sisältö	Kammion lähtö- konsentraatio [mM]	Ruiskun sisältö	Ruiskun lähtö- konsentraatio [mM]	T [°C]	$\Delta H$ [kcal/mol]			$T\Delta S$ [kcal/ mol]	$\Delta G$ [kcal/ mol]	$K_d$ [M]
Bradcore	0,05	Bradpeptidi	0,25	25	*	±	*	*	*	*
Bradcore	0,1	Bradpeptidi2	1	25	*	±	*	*	*	*
Bradcore	0,1	Bradpeptidi3	1	25	*	±	*	*	*	*
Bradcore	0,1	Bradpeptidi4	1	25	*	±	*	*	*	*
Bradcore	0,073	Bradpeptidi	0,985	15	1,7	±	0,2	7,7	-6,1	$2,5 \times 10^{-5}$
Bradcore	0,1	Bradpeptidi2	1	15	*	±	*	*	*	*
Bradcore	0,1	Bradpeptidi3	1	15	*	±	*	*	*	*
Bradcore	0,1	Bradpeptidi4	1	15	*	±	*	*	*	*
Bradcore	0,015	Bradtag-EGFP- histag	0,15	25	*	±	*	*	-5,9	$1,0 \times 10^{-4}$
Bradcore	0,015	Bradtag-EGFP- histag	0,15	15	*	±	*	*	-6,2	$2,2 \times 10^{-5}$

## 5 Tulosten tarkastelu

Tulosten tarkastelussa esitetään saadut tulokset fuusioproteiiniryhmittäin sen mukaan sijaitseeko Brad-tag fuusioproteiinin amino- vai karboksyyli-terminuksessa. Fluoresenssi-spektroskopi tulokset liitetään kuitenkin kaikki yhteen, jonka jälkeen tehdään yhteenveto eri fuusioproteiineista. Bradpeptideille tehtyjen ITC-mittausten tulokset esitetään lopuksi omana kohtanaan.

### 5.1 Brad-tag aminoterminaalisenä fuusiona.

Bradtag-EGFP-histag ja bradtag-EGFP *E. coli* kasvatusliuokset olivat kaikki väriltään vihertäviä. Kasvatuksia tarkasteltiin myös UV-valossa ennen proteiinien eristystä ja molempien fuusioproteiinien kaikkien tuottojen kasvatusliuosten havaittiin fluoresoivan voimakkaasti. Voimakasta vihreää fluoresenssia pidettiin alustavana merkinä EGFP:n voimakkaasta tuottumisesta bakteerisoluisissa.

#### 5.1.1 Bradtag-EGFP-histag

Bradtag-EGFP-histag (30,32 kDa) fuusioproteiinin tuottuminen oli voimakasta, kuten kasvatuksen vihreästä väristä ja voimakkaasta fluoresenssistakin voitiin päätellä. Ni-NTA puhdistuksessa kerättyjen fraktioiden voimakkaat vyöhykkeet SDS-PAGE-analysissä n. 30 kDa:n kohdalla (kuva 2), sekä suuret saannot eluutiosta (ei näytetty) osoittivat proteiinin hyvän tuottumisen *E. coli*:ssa.

Ni-NTA puhdistuksella eristettyä fuusioproteiinia käytettiin myös fuusioproteiinin sitoutuskokeissa bradcore-resiiniin. Sitoutuskokeiden avulla oli tarkoituksena selvittää sitoutuuko Brad-tag myös EGFP:hen liitettynä bradcoren biotiinia sitovaan kohtaan. Biotiinilla kyllästetty bradcore-resiini (kuva 5) ei fluoresoinut UV-valossa yhtä voimakkaasti verrattuna biotiinittomaan bradcore-resiiniin. Sitoutumiskokeen perusteella pääteltiin, että fuusioproteiini sitoutuu bradcoreen ja erityisesti sen biotiinia sitovaan kohtaan. Lisäksi olisi voitu tehdä kontrollikokeita fuusioproteiinille, josta puuttuu joko His-tag tai Brad-tag. Näillä olisi voitu mm. selvittää sitoutuuko His-tag mahdollisesti bradcore-resiiniin.

Affiniteettipuhdistuskokeella pyrittiin selvittämään Brad-tagin affiniteettikromatografisia ominaisuuksia liittyneenä toiseen proteiiniin (EGFP). Puhdistuskokeessa kerätyistä 1 ml:n näyte-eristä nähtiin, että bradtag-EGFP-histag irtosi jo ensimmäisen

pesuvaiheen aikana bradcore-resiiniä (kuva 6). Tuloksia tarkasteltaessa on hyvä huomioida, että kokeessa käytettiin melko suurta pesutilavuutta, jonka ansiosta proteiini tihkui resiiniä ulos. Pesutilavuuden pienentäminen ja affiniteettipylvään pidentäminen voisivat auttaa saannon parantamisessa.

Ni-NTA puhdistuksessa sitoutusliuksesta kerätylle näytteelle tehtiin vasta-aine-analyysi (kuva 10), jonka avulla voitiin varmistaa EGFP:n läsnäolo fuusioproteiinissa. Värjäytynyt vyöhyke sijaitsee n. 30 kDa:n kohdalla, joka vastaa bradtag-EGFP-histag fuusioproteiinin teoreettista molekyylipainoa 30,32 kDa. Myöhemmin, Ni-NTA puhdistettua, bradtag-EGFP-histagia käytettiin suhteellisenä molekyylipainon vertailunäytteenä muille tuotoille tehdyissä vasta-ainevärjäyksissä (kuvat 11/12).

Bradtag-EGFP-histag fuusioproteiinia ei varsinaisesti tarkasteltu fluoresenssispektrofotometrillä, mutta sitä käytettiin positiivisena kontrollina tutkittaessa EGFP-bradtag ja EGFP-histag-bradtag fuusioproteiinituottoja (kuva 13). Bradtag-EGFP-histag toimi myös suhteellisenä konsentraatiomittana fluoresenssispektrofotometrillä tehdyissä mittauksissa (kuva 14).

### 5.1.2 Bradtag-EGFP

Bradtag-EGFP-fuusioproteiinia (26,78 kDa) pyrittiin puhdistamaan kokeellisesti bradcore-resiiniä suoraan *E. coli* -lysaatista. Kokeen aikana kerätyistä näytteistä tehdyillä SDS-PAGE-analyysillä (kuva 7) erottuvat voimakkaat vyöhykkeet ~27 kDa:n kohdalla viittaavat oikeaan proteiinituotteeseen. Ensimmäisen pesuvaiheen kolmannessa fraktiossa erottuu vielä heikko vyöhyke samalla 27 kDa:n alueella. Toisen pesu- ja eluutiovaiheen näytteistä ei vyöhykkeitä enää erotu. Puhdistuskokeen tulokset ovat vastaavia bradtag-EGFP-histagin kanssa tehdyn bradcore-resiini puhdistuskokeen kanssa.

Fuusioproteiinin sitoutusliuksesta bradcore-resiinin kerätystä näytteestä tehdyssä vasta-ainevärjäyksessä erottuu vyöhyke ~27 kDa:n kohdalla (kuva 10). Vasta-ainevärjäyksessä erottuva vyöhyke osoittaa EGFP:n läsnäolon oikeankokoisessa proteiinituotteessa, jonka voitaneen olettaa olevan haluttu fuusioproteiini. Näiden kokeiden perusteella voidaan todeta, että EGFP:n aminoterminukseen sijoitettua Brad-tagia voidaan käyttää puhdistuskahvana affiniteetikromatografiassa. Puhdistuksen optimointi erityisesti pesuolosuhteiden suhteen olisi tarpeellista. Eristetty proteiini (pesu 1, fraktio 3 (Kuva 7)) vaikuttaa Coomassie-värjätyin SDS-PAGE geelin perusteella melko puhtaalta ja homogeeniselta.



## 5.2 Brad-tag karboksyyliterminaalisenä fuusiona

EGFP-histag-bradtag ja EGFP-bradtag kasvatusliuokset olivat väriltään ruskehtavan kellertäviä. Kasvatuksia tarkasteltiin myös UV-valossa ennen proteiinien eristystä eikä kummarkaan konstruktin tapauksessa havaittu fluoresenssia ennen tai jälkeen solujen hajotusta, verrattuna bradtag-EGFP-histag ja bradtag-EGFP kasvatuksien voimakkaaseen fluoresenssiin.

### 5.2.1 EGFP-histag-bradtag

Molempien EGFP-histag-bradtag (30,32 kDa) fuusioproteiinituottojen Ni-NTA puhdistuksista ajetuissa SDS-PAGE-analyysissä (kuvat 3 ja 4) havaittiin vyöhykkeet n. 30 kDa:n kohdassa, jotka vastaavat fuusioproteiinien teoreettista molekyyliainoa. Kuvissa nähdään myös muita vyöhykkeitä, joista osa saattaa olla seurausta proteiinin eri oligomeereista. Vyöhykkeet voivat olla myös seurausta *E. coli*n huonosta translaation lopetustehokkuudesta, jonka korjaaminen voisi olla mahdollista lisäämällä toinen lopetus-kodoni sekvenssin loppuun.

Vasta-ainevärjäyksissä nähtiin, että tuotetut fuusioproteiinit vastasivat molekyyliainoltaan bradtag-EGFP-histag fuusioproteinia, 30,32 kDa (kuva 11). Tämän perusteella voitiin päätellä, että tuotettu fuusioproteiini olisi haluttu EGFP-histag-bradtag. Kokeella ei kuitenkaan voitu varmistaa fuusioproteiinien sisältävän Brad-tag peptidiä, sillä pelkän bradpeptidin puuttuminen ei vielä tekisi riittävän suurta eroa molekyyliainoon ( $M_{(\text{Brad-tag})} = 906 \text{ Da}$ ).

### 5.2.2 EGFP-bradtag

EGFP-bradtag(1A) tuoton puhdistuskokeen näytteistä tehdyllä SDS-PAGE-analyysillä (kuva 8) näkyy voimakkaimmat vyöhykkeet n. 27 kDa:n kohdalla, mikä vastaisi EGFP-bradtagin teoreettista molekyyliainoa, 26,78 kDa. Kahden myöhemmän tuoton SDS-PAGE tulokset olivat vastaavanlaiset (kuva 9).

Vasta-ainevärjäyksellä varmistettiin, että bakteerikasvatukset sisälsivät EGFP:n. EGFP-bradtag(1B) fuusioproteiinituoton proteiiniliuosnäytteestä erottuu ~27 kDa:a vastaavasta kohdasta vyöhyke (kuva 12), jonka voidaan olettaa olevan EGFP-bradtag. Solujätenäytteistä tehdyissä vasta-ainevärjäyksissä nähdään EGFP-bradtag(1B) tuotolla proteiiniliuosnäytettä vastaava vyöhyke. EGFP-bradtag(2) tuotolla taas ei vyöhykettä erotu proteiiniliuosnäytteessä ja solujätenäytteenkin vyöhyke on hieman

ylempänä vastaten ennemminkin bradtag-EGFP-histag (30,32 kDa) tuoton aiheuttamaa vyöhykettä. Analyysissa käytetyillä bradtag-EGFP-histag tuotoilla (1B ja 2) esiintyy muitakin vyöhykkeitä 20 ja 70 kDa:n alueilla (kuva 12). Teoreettisesta molekyylipainosta poikkeavat vyöhykkeet voivat olla seurausta proteiinien proteolyttisestä pilkkoutumisesta tai proteiinien eri oligomeereista.

### 5.3 Fluoresenssispektrofotometria

Fluoresenssispektrofotometrisilla mittauksilla vahvistettiin, että EGFP-bradtag ja EGFP-histag-bradtag proteiinituotot sisälsivät EGFP:n (kuvat 13 ja 14). Molempien fuusio-proteiinien tapauksissa saadut emissiospektrit vastasivat EGFP:n luonnollista emissiospektriä. Samoin kontrollina käytetyn bradtag-EGFP-histagin emissiospektri vastasi GFP:n emissiospektriä. Fluoresenssispektrofotometrin tuloksien perusteella voidaan myös päätellä, ettei Brad-tag vaikuta EGFP:n laskostumiseen.

Vaikka EGFP-histag-bradtag ja bradtag-EGFP-histag tuottavatkin toistensa kanssa vastaavanlaiset emissiospektrit on ero proteiinien pitoisuuksissa Ni-NTA puhdistusten aikana kerätyissä näytteissä kuitenkin huomattava. Fluoresenssispektrofotometrin perusteella EGFP-histag-bradtagin pitoisuudet ovat huomattavasti alhaisempia verrattuna bradtag-EGFP-histagin vastaaviin. Käytettyä positiivista kontrollia oli laimennettu merkittävästi mittauksiin verrattuna EGFP-histag-bradtag näytteisiin. Emissiointensiteettien perusteella arvioituna Bradtag-EGFP-histag fuusioproteiinin tuottuminen on jopa 1000-kertaista verrattuna EGFP-histag-bradtag fuusioproteiinin tuottumiseen.

### 5.4 Isoterminen titrauskalorimetri: Bradpeptidit ja bradtag-EGFP-histag

Isotermisellä titrauskalorimetrillä saatujen mittaustulosten perusteella muokatut bradpeptidit (bradpeptidi2-4) sitoutuvat heikommin bradcoreen kuin alkuperäinen bradpeptidi (kuva 15). Mittauksissa ei kyetty määrittämään luotettavasti sitoutumisvakioita (taulukko 6). Bradtag-EGFP-histag fuusioproteiinilla tehtyjen ITC-analyysien perusteella bradcoren sitoutuminen Brad-tag fuusioproteiiniin olisi eksotermistä (taulukko 6). Mittauksista saatujen entalpia-arvojen hajonnan takia kuvaajien sovittaminen oli hankalaa ja saatuja tuloksia pitääkin tarkastella varauksin (kuva 15). Virherajat huomioon ottaen saatuja  $K_d$  arvoja ei voida pitää kovinkaan luotettavina vaan lähinnä suuntaa antavina. Mittausten epäluotettavuuteen voi vaikuttaa myös mittauksissa käytetyt alhaiset proteiini-

konsentraatiot, joita kasvattamalla voitaisiin saada luotettavampia mittaustuloksia. Muita fuusioproteiineja ei saatu joko tuotettua tai puhdistettua riittävästi ITC-mittauksia varten, joten niillä ei pystytty suorittamaan vastaavia mittauksia.

## 5.5 Loppupäätelmät

Vasta-aineväryjysten perusteella voitiin päätellä, että saatiin tuotettua fuusioproteiineja, joissa Brad-tag oli aminoterminaalisen fuusiona, ja proteiinien tuottuminen käytetyissä olosuhteissa oli voimakasta. Bradcore-resiiniin tehtyjen sitoutus- ja puhdistuskokeiden perusteella voitiin myös olettaa, että Brad-tag on osana tuotettua fuusioproteiinia ja sitä voidaan käyttää aminoterminaalisen affiniteettikahvana, Strep-tagista poikkeavalla tavalla, joka kykenee toimimaan ainoastaan karboksyyliaminoacidien affiniteettikahvana. Brad-tag sitoutui bradcoren biotiinia sitovaan kohtaan ja sen avulla pystyttiin puhdistamaan tuotettua fuusioproteiinia muista bakteerin tuottamista proteiineista. Brad-tag tosin vapautui bradcore-resiinistä nopeasti pesuvaiheen aikana.

EGFP-histag-bradtag tuotoissa saatiin fluoresenssispektrofotometrin ja vasta-aineväryjysten perusteella tuotettua EGFP:n sisältävää proteiinia, johon oli Ni-NTA puhdistuksen perusteella liittynyt myös His-tag. Brad-tag peptidin olemassaoloa ei pystytty näillä kokeilla vahvistamaan, koska Brad-tag sijaitsee fuusioproteiinissa vasta Histagin jälkeen. Kun Brad-tag oli fuusioproteiinissa karboksyyliaminoacidien liitettynä, oli fuusioproteiinin ekspressio *E. coli*:ssa huomattavasti heikompi verrattuna vastaavaan aminoterminaalisen Brad-tag-sekvenssin sisältävään fuusioproteiiniin (kuvat 2-4). Vertaamalla His-tag fuusioproteiinien SDS-PAGE-analyysituloksia (kuvat 2-4) havaittiin selkeästi voimakkaammat vyöhykkeet aminoterminaalisen Brad-tag tuoton eluutiovaiheen näyte-erissä verrattuna Brad-tagin karboksyyliaminoacidien fuusioproteiinituottoihin. Kyseessä oli keskenään toisiaan vastaavat tuotot ja puhdistusmenetelmät. Tämä vahvisti teoriaa aminoterminaalisen Brad-tag fuusioproteiinin voimakkaammasta tuottumisesta verrattuna sen karboksyyliaminoacidien vastineeseen. Samaan johtopäätökseen tultiin myös fluoresenssispektrofotometrinen mittausten emissiospektrien perusteella.

EGFP-bradtag fuusioproteiinin tuottuminen oli EGFP-histag-bradtag fuusioproteiinin tapaan erittäin heikkoa. Suoritettujen kokeiden perusteella ei voitu olla varmoja, että ko. fuusioproteiini olisi tuottunut ja samalla jäi luonnollisesti myös varmistamatta Brad-tagin sisältyminen tutkittuun fuusioproteiiniin.

GFP on laajalti käytetty ja siihen voidaan yleensä tehdä fuusioita sekä karboksyyli- että aminoterminuksen lisäksi vielä proteiinin keskelle (Niedenthal ym., 1996). On kuitenkin huomioitava, että jokainen muutos on ainutlaatuinen eikä fuusion tulosta voida ennalta tietää. Tehdyissä kokeissa Bradtag-EGFP-histag fuusioproteiinin tuottotaso oli jopa 1000-kertainen EGFP-histag-bradtag fuusioproteiiniin nähden. Saatujen tulosten perusteella on mahdollista, että Brad-tag aiheuttaa EGFP:n karboksyyli-terminaalisenä fuusiona ongelmia fuusioproteiinin tuottumisessa, laskostumisessa tai stabiiliudessa. Tulos on aminoterminaalisen Brad-tag fuusion osalta odotettu, sillä EGFP on tunnetusti tehokkaasti laskostuva ja stabiili proteiini. Affiniteettikahvan sijainnilla rekombinanttiproteiinien tuottumisessa voi olla hyvinkin suuri merkitys ja juuri se näyttäisi olevan tärkeä seikka EGFP:n ja Brad-tagin tapauksessa. Luonnollisessa bradavidiinissa bradpeptidi kuitenkin sijaitsee kunkin monomeerin karboksyyli-terminuksessa. Luonnollisesta lokalisaatiostaan johtuen Brad-tagin odotettiin olevan bradcoreen tiukemmin sitoutuva C-terminaalisenä affiniteettikahvana, kuten myös alkuperäinen Strep-tag, joka kykenee sitoutumaan streptavidiiniin ainoastaan karboksyyli-terminaalisenä fuusiona. Emme kuitenkaan saaneet tuotettua haluttuja määriä Brad-tag-EGFP fuusioproteiineja, joissa Brad-tag olisi sijainnut fuusioproteiinin C-terminuksessa. Tulevaisuudessa olisi tärkeää tehdä vastaavia kokeita jonkin muun proteiinin kuin EGFP:n kanssa ja selvittää saadaanko tuotettua karboksyyli-terminaalisia Brad-tag fuusioproteiineja ja paraneeko Brad-tag peptidin ominaisuudet affiniteettikahvana. Käytimme EGFP-histag-bradtag fuusioproteiinin tapauksessa 32 aminohapon mittaista sekvenssiä EGFP:n ja ja Brad-tagin välissä. Käytetyllä sekvenssillä ei havaittu olevan tässä tapauksessa merkittävää eroa EGFP-bradtag fuusioproteiinin kanssa, jossa Brad-tag oli liitetty suoraan kiinni EGFP:n karboksyyli-terminukseen.

Vaikka Strep-tag sitoutuu voimakkaasti ja selektiivisesti streptavidiiniin voidaan sitä käyttää affiniteettikahvana ainoastaan fuusioproteiinin karboksyyli-terminuksessa (Schmidt ym., 1993). Rajoituksista johtuen peptidikirjastojen seulontaa jatkettiin ja löydettiin Strep-tag II, joka kykeni sitoutumaan streptavidiiniin sekä amino- että karboksyyli-terminaalisenä fuusiona (Voss ja Skerra, 1997). Seuraava ongelma oli Strep-tag II:n Strep-tagia heikompi sitoutuminen streptavidiiniin, jolloin Strep-tag II peptidin sitoutumisvoimakkuutta saatiin parannettua streptavidiinia muokkaamalla ja kehitettiin Strep-Tactin (Korndörfer ja Skerra, 2002). Nykyisin kaiken tämän kehitystyön

jälkeen käytetäänkin rekombinanttiproteiinien puhdistuksessa Strep-tag II/Strep-Tactin paria. Bradpeptidi-bradavidiini paria voitaisiin pyrkiä kehittämään vastaavalla tavalla. Bradpeptidiä mutatoimalla voitaisiin saada parannettua sen sitoutumista bradcoreen. Bradpeptidin pituutta voitaisiin myös muuttaa nykyisestä kahdeksasta aminohaposta lisäämällä aminohappotähteitä.

Tutkimuksissa tehtiin mittauksia mutatoiduilla bradpeptideillä, mutta käytetyt kolme peptidiä kattavat kuitenkin hyvin pienen osan eri mahdollisuuksista joita peptidille voitaisiin tehdä. Jos peptidimuutoksilla ei päästä parempiin tuloksiin, voidaan vaihtoehtoisesti bradcoren sekvenssiä mutatoimalla saada toivottuja muutoksia. Lopulta tuloksena voisi olla affiniteettikahva-kohdeproteiini pari, jossa on muokattu sekä bradpeptidin että bradcoren sekvenssiä. Bradavidiinille voidaan myös etsiä peptidikirjastoista keinotekoisia ligandeja, jotka sitoutuvat bradavidiinin biotiinia sitovaan kohtaan. Nykyistä Brad-tag-bradcore paria voitaisiin pyrkiä kehittämään tutkimalla bradpeptidin sitoutumista bradcoreen eri lämpötiloissa eli optimoimalla sitoutumislämpötilaa.

## 6 Lähdeluettelo

- Amersham Pharmacia Biotech AB. 2001. Affinity Chromatography: Principles and Methods.
- Arnau, J., C. Lauritzen, G.E. Petersen, ja J. Pedersen. 2005. Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins. *Protein Expr. Purif.* 48:1-13.
- Baneyx, F. 1999. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.* 10:411-421.
- Banki, M.R., L. Feng, ja D.W. Wood. 2005. Simple bioseparations using self-cleaving elastin-like polypeptide tags. *Nat. Methods.* 2:659-662.
- Batas, B., C. Schiraldi, ja J.B. Chaudhuri. 1999. Inclusion body purification and protein refolding using microfiltration and size exclusion chromatography. *J. Biotechnol.* 68:149-158.
- BioTek Instruments, Inc. 2011. <http://www.biotek.com/>. 2011.
- Bocchini, V., ja P.U. Angeletti. 1969. The nerve growth factor: purification as a 30,000-molecular-weight protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 64:787-794.
- Brizzard, B.L., R.G. Chubet, ja D.L. Vizard. 1994. Immunoaffinity purification of FLAG epitope-tagged bacterial alkaline phosphatase using a novel monoclonal antibody and peptide elution. *Biotechniques.* 16:730-735.
- Chaiet, L., ja F.J. Wolf. 1964. The properties of streptavidin, a biotin-binding protein produced by streptomycetes. *Arch. Biochem. Biophys.* 106:1-5.
- Chalfie, M., Y. Tu, G. Euskirchen, W.W. Ward, ja D.C. Prasher. 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science.* 263:802-805.
- Cinelli, R.A.G., A. Ferrari, V. Pellegrini, M. Tyagi, M. Giacca, ja F. Beltram. 2000. The enhanced green fluorescent protein as a tool for the analysis of protein dynamics and localization: local fluorescence study at the single-molecule level. *Photochem. Photobiol.* 71:771-776.
- Essen, L.O., ja A. Skerra. 1993. Single-step purification of a bacterially expressed antibody Fv fragment by immobilized metal affinity chromatography in the presence of betaine. *J Chromatogr. A.* 657:55-61.
- Feilmeier, B.J., G. Iseminger, D. Schroeder, H. Webber, ja G.J. Phillips. 2000. Green fluorescent protein functions as a reporter for protein localization in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 182:4068-4076.
- Finn, F.M., G. Titus, D. Horstman, ja K. Hofmann. 1984. Avidin-biotin affinity chromatography: application to the isolation of human placental insulin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81:7328-7332.
- Fischer, P.M., ja M.E. Howden. 1990. Direct enzyme-linked immunosorbent assay of anti-peptide antibodies using capture of biotinylated peptides by immobilized avidin. *J. Immunoassay.* 11:311-327.
- Gaj, T., S.C. Meyer, ja I. Ghosh. 2007. The AviD-tag, a NeutrAvidin/avidin specific peptide affinity tag for the immobilization and purification of recombinant proteins. *Protein Expr. Purif.* 56:54-61.
- Green, N.M. 1975. Avidin. *Adv. Protein Chem.* 29:85-133.
- Hamilton, P.B. 1963. Ion Exchange Chromatography of Amino Acids. A Single Column, High Resolving, Fully Automatic Procedure. *Anal. Chem.* 35:2055-2064
- Helppolainen, S.H., K.P. Nurminen, J.A.E. Määttä, K.K. Halling, J.P. Slotte, T. Huhtala, T. Liimatainen, S. Ylä-Herttuala, K.J. Airene, A. Närvänen, J. Jänis, P. Vainiotalo, J. Valjakka, M.S. Kulomaa, ja H.R.

- Nordlund. 2007. Rhizavidin from *Rhizobium etli*: the first natural dimer in the avidin protein family. *Biochem. J.* 405:397-405.
- Heney, G., ja G.A. Orr. 1981. The purification of avidin and its derivatives on 2-iminobiotin-6-aminohexyl-Sepharose 4B. *Anal. Biochem.* 114:92-96.
- Hengen, P.N. 1995. Purification of His-tag fusion proteins from *Escherichia coli*. *Trends Biochem. Sci.* 20:285-286.
- Hiller, Y., E.A. Bayer, ja M. Wilchek. 1990. Nonglycosylated avidin. *Methods Enzymol.* 184:68-70.
- Hopp, T.P., B. Gallis, ja K.S. Prickett. 1996. Metal-Binding properties of a calcium-dependent monoclonal antibody. *Mol. Immunol.* 33:601-608.
- Hytönen, V.P., H.R. Nordlund, J. Hörhä, T.K.M. Nyholm, D.E. Hyre, T. Kulomaa, E.J. Porkka, A.T. Marttila, P.S. Stayton, O.H. Laitinen, ja M.S. Kulomaa. 2005. Dual-affinity avidin molecules. *Proteins.* 61:597-607.
- Janson, J.C., E. Karlsson, ja I. Hirsh. 2011. Protein purification: principles, high resolution methods, and applications, third edition. Chapter 4. Ion exchange chromatography.
- Kaikkonen, M.U., H.P. Lesch, J. Pikkarainen, J.K. Rätty, T. Vuorio, T. Huhtala, M. Taavitsainen, T. Laitinen, P. Tuunanen, O. Gröhn, A. Närvänen, K.J. Airene, S. Ylä-Herttua. 2009. (Strept)avidin-displaying lentiviruses as versatile tools for targeting and dual imaging of gene delivery. *Gene Ther.* 16:894-904.
- Kain, S.R., M. Adams, A. Kondepudi, T.T. Yang, W.W. Ward, ja P. Kitts. 1995. Green fluorescent protein as a reporter of gene expression and protein localization. *Biotechniques.* 19:650-655.
- Keefe, A.D., S.D. Wilson, B. Seelick, ja J.W. Szostak. 2001. One-step purification of recombinant proteins using a nanomolar-affinity streptavidin-binding peptide, the SBP-Tag. *Protein Expr. Purif.* 23:440-446.
- Kobayashi, T., N. Morone, T. Kashiyama, H. Oyamada, N. Kurebayashi, ja T. Murayama. 2008. Engineering a novel multifunctional green fluorescent protein tag for a wide variety of protein research. *PLoS One.* 3:e3822.
- Korndörfer, I.P., ja A. Skerra. 2002. Improved affinity of engineered streptavidin for the Strep-tag II peptide is due to a fixed open conformation of the lid-like loop at the binding site. *Protein Sci.* 11:883-893.
- Laitinen, O.H., V.P. Hytönen, H.R. Nordlund, ja M.S. Kulomaa. 2006. Genetically engineered avidins and streptavidins. *Cell. Mol. Life Sci.* 63:2992-3017.
- Laitinen, O.H., H.R. Nordlund, V.P. Hytönen, ja M.S. Kulomaa. 2007. Brave new (strept)avidins in biotechnology. *Trends Biotechnol.* 25:269-277.
- Lakowicz, J.P. 2004. Principles of fluorescence spectroscopy. Springer, United States of America. 1-62.
- Lamla, T., ja V.A. Erdmann. 2004. The Nano-tag, a streptavidin-binding peptide for the purification and detection of recombinant proteins. *Protein Expr. Purif.* 33:39-47.
- Leavitt, S., ja E. Freire. 2001. Direct measurement of protein binding energetics by isothermal titration calorimetry. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 11:560-566.
- Livnah, O., E.A. Bayer, M. Wilchek, ja J.L. Sussman. 1993. Three-dimensional structures of avidin and the avidin-biotin complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:5076-5080.
- Maier, T., N. Drapal, M. Thanbichler, ja A. Böck. 1998. Strep-tag II affinity purification: an approach to study intermediates of metalloenzyme biosynthesis. *Anal. Biochem.* 259:68-73.

- Meir, A., S.H. Helppolainen, E. Podoly, H.R. Nordlund, V.P. Hytönen, J.A. Määttä, M. Wilchek, E.A. Bayer, M.S. Kulomaa, ja O. Livnah. 2008. Crystal structure of rhizavidin: insights into the enigmatic high-affinity interaction of an innate biotin-binding protein dimer. *J. Mol. Biol.* 386:379-390.
- Määttä, J.A.E., S.H. Helppolainen, V.P. Hytönen, M.S. Johnson, M.S. Kulomaa, T. Airene, ja H.R. Nordlund. 2009. Structural and functional characteristics of xenavidin, the first frog avidin from *Xenopus tropicalis*. *BMC Struct. Biol.* 9:63.
- Niedenthal, R.K., L. Riles, M. Johnston, ja J.H. Hegemann. 1996. Green fluorescent protein as a marker for gene expression and subcellular localization in budding yeast. *Yeast.* 12:773-786.
- Nordlund, H.R., V.P. Hytönen, O.H. Laitinen, S.T.H. Uotila, E.A. Niskanen, J. Savolainen, E. Porkka, ja M.S. Kulomaa. 2003. Introduction of histidine residues into avidin subunit interfaces allows pH-dependent regulation of quaternary structure and biotin binding. *FEBS Lett.* 555:449-454.
- Nordlund, H.R., V.P. Hytönen, O.H. Laitinen, ja M.S. Kulomaa. 2005. Novel Avidin-like protein from a root nodule symbiotic bacterium, *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Biol. Chem.* 280:13250-13255.
- Nygren, P.A., S. Ståhl, ja M. Uhlén. 1994. Engineering proteins to facilitate bioprocessing. *Trends Biotechnol.* 12:184-188.
- Perbandt, M., O. Bruns, M. Vallazza, T. Lamla, Ch. Betzel, ja V.A. Erdmann. 2007. High resolution structure of streptavidin in complex with a novel high affinity peptide tag mimicking the biotin binding motif. *Proteins.* 67:1147-1153.
- Presley, J.F., N.B. Cole, T.A. Schroer, K. Hirschberg, K.J. Zaal, ja J. Lippincott-Schwartz. 1997. ER-to-Golgi transport visualized in living cells. *Nature.* 389:81-85.
- Rigaut, G., A. Shevchenko, B. Rutz, M. Wilm, M. Mann, ja B. Séraphin. 1999. A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat. Biotechnol.* 17:1030-1032.
- Räty, J.K., K.J. Airene, A.T. Marttila, V. Marjomäki, V.P. Hytönen, P. Lehtolainen, O.H. Laitinen, A.J. Mähönen, M.S. Kulomaa, ja S. Ylä-Herttua. 2004. Enhanced gene delivery by avidin-displaying baculovirus. *Mol. Ther.* 9:282-291.
- Sano, T., S. Vajda, C.L. Smith, ja C.R. Cantor. 1997. Engineering subunit association of multisubunit proteins: a dimeric streptavidin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:9153-6158.
- Sardo, A., T. Wohlschlagel, C. Lo, H. Zoller, T.R. Ward ja M. Creus. 2011. Burkavidin: a novel secreted biotin-binding protein from the human pathogen *Burkholderia pseudomallei*. *Protein Expr. Purif.* 77:131-139.
- Schmidt, T.G., ja A. Skerra. 1993. The random peptide library-assisted engineering of a C-terminal affinity peptide, useful for the detection and purification of a functional Ig Fv fragment. *Protein Eng.* 6:109-122.
- Schmidt, T.G.M., J. Koepke, R. Frank, ja A. Skerra. 1996. Molecular interaction between the *Strep*-tag affinity peptide and its cognate target, streptavidin. *J. Mol. Biol.* 255:753-766.
- Shaltiel, S., ja Z. Er-El. 1973. Hydrophobic chromatography: use for purification of glycogen synthetase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 70:778-781.
- Skerra, A., ja T.G.M. Schmidt. 1999. Applications of a peptide ligand for streptavidin: the *Strep*-tag. *Biomol. Eng.* 16:79-86.
- Smith, D.B., ja K.S. Johnson. 1988. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene.* 67:31-40.



- Stretton S., S. Techkarnjanaruk, A.M. McLennan, ja A.E. Goodman. 1998. Use of green fluorescent protein to tag and investigate gene expression in marine bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:2554-2559.
- Takakura, Y., M. Tsunashima, J. Suzuki, S. Usami, Y. Kakuta, N. Okino, M. Ito, ja T. Yamamoto. 2009. Tamavidins - novel avidin-like biotin-binding proteins from the Tamogitake mushroom. *FEBS J.* 276:1383-1397.
- Tani, H., T. Kamidate, ja H. Watanabe. 1998. Aqueous Micellar Two-Phase Systems for Protein Separation. *Anal. Sci.* 14:875-888.
- Voss, S. ja A. Skerra, 1997. Mutagenesis of a flexible loop in streptavidin leads to higher affinity for the Strep-tag II peptide and improved performance in recombinant protein purification. *Protein Eng.* 10:975-982.
- Walker, I.H., P.C. Hsieh, ja P.D. Riggs. 2010. Mutations in maltose-binding protein that alter affinity and solubility properties. *Appl Microbiol Biotechnol.* 88:187-197.
- Waugh, D.S. 2005. Making the most of affinity tags. *Trends Biotechnol.* 23:316-320.
- Wu, W.Y., C. Mee, F. Califano, R. Banki, ja D.W. Wood. 2006. Recombinant protein purification by self-cleaving aggregation tag. *Nat. Prot.* 1:2257-2262.
- Zeng, X., Y.X. Sun, W. Qu, X.Z. Zhang, and R.X. Zhuo. 2010. Biotinylated transferrin/avidin/biotinylated disulfide containing PEI bioconjugates mediated p53 gene delivery system for tumor targeted transfection. *Biomaterials.* 31:4771-4780.

## Liite 1. Käytetyt PCR ohjelmat

Bradtag-EGFP fuusioon käytetty PRC-ohjelma.

	T / °C	Aika	Toistot
Alkudenaturaatio (Initial denaturation)	95	30 s	1
Denaturaaiovaihe (Denaturation)	95	30 s	
Alukkeiden liittymisvaihe (Primer annealing)	55	1 min	25
Pidentymisvaihe (Extension)	72	2 min	
Loppupidennys (Final extension)	72	10 min	1

Sekvensointireaktioiden PCR-ohjelma.

	T / °C	Aika	Toistot
Alkudenaturaatio (Initial denaturation)	96	1min	1
Denaturaaiovaihe (Denaturation)	96	10s	
Alukkeiden liittymisvaihe (Primer annealing)	50	10s	29
Pidentymisvaihe (Extension)	60	4min	
Loppupidennys (Final extension)	10	∞	1

## Liite 2. Liuokset

50 mM Na-fosfaatti, 100 mM NaCl	32 ml 0,5 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 61 ml 0,5 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 20 ml 5 M NaCl
APA puskuri	0,1 M NaHCO <sub>3</sub> ; 1 mM MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O
Coomassie Brilliant Blue - väriliuos	0,05 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250; 40 % (v/v) etanoli; 10 % (v/v) jäätikka; 50 % H <sub>2</sub> O
HilloI (pH 8)	2 mM EDTA pH 8; 150 mM NaCl; 1 % (v/v) Triton X-100; 50 mM Tris pH8
Ni-NTA, NPI-10	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 300 mM NaCl; 5 mM imidatsoli
Ni-NTA, NPI-20	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 300 mM NaCl; 20 mM imidatsoli
Ni-NTA, NPI-250	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 300 mM NaCl; 250 mM imidatsoli
PBS	276 mM NaCl; 16 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 10,7 mM KCl; 2,9 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; H <sub>2</sub> O
Pesuliuos 2	50 mM Tris-HCl; 1M NaCl; pH 7,5
Pesuliuos 3	50 mM Tris-HCl; 100 mM NaCl; pH 8,9
pH 11 -puskuri	50 mM natriumasetaatti; pH säädetty
SDS-PAGE ajopuskuri, 10x kantaliuos	30,3 g Tris; 144 g glysiini; 1 % (w/v) SDS; H <sub>2</sub> O
SDS-PAGE ajopuskuri, käyttöliuos	100 ml 10x SDS-PAGE ajopuskuria; 900 ml H <sub>2</sub> O
SET -puskuri (pH 8)	20 % Sukroosi; 2 mM EDTA; pH 8; 30 mM Tris pH 8
TAE, 50x kantaliuos	242 g Tris; 100 ml 0,5 m EDTA pH 8; 57,1 ml väkevää etikkahappoa; H <sub>2</sub> O
TAE, 10x käyttöliuos	200 ml 50x TAE-kantaliuos; 800 ml H <sub>2</sub> O
TBS, 10x kantaliuos	242,28 g 1M Tris; 350,64 g 3M NaCl
TBS, käyttöliuos	100 ml 10x TBS-kantaliuos; 900 ml H <sub>2</sub> O
Sitoutusliuos	10mM; NaHCO <sub>3</sub> ; 0,9 % HCl; pH 7,5
Vasta-ainevärjäys siirtopuskuri, 10x kantaliuos	30,3 % (w/v) Tris; 30,3 % (w/v) glysiiniä; H <sub>2</sub> O
Vasta-ainevärjäys siirtopuskuri, käyttöliuos	100 ml 10x-siirtopuskuria; 200 ml Metanoli; 700 ml H <sub>2</sub> O