

**Avidiini- ja AVR4/5-geenien ilmentymisen
tutkiminen kaksoismolekyylimajakka-
FRET-menetelmällä**

**Pro gradu -tutkielma
Tampereen yliopisto
Lääketieteellisen teknologian instituutti
Maaliskuu 2007
Tiia Koho**

Kiitokset

Tämä pro gradu -tutkielma tehtiin Lääketieteellisen teknologian instituutissa (IMT), Tampereen yliopistossa. Haluan kiittää professori Markku Kulomaata siitä, että sain tehdä tutkielman mukavassa työympäristössä molekyylibioteknologian ryhmässä. Lisäksi kiitän Pirkanmaan sairaanhoitopiiriä taloudellisesta tuesta, jolla tutkielma voitiin rahoittaa.

Lämpimät kiitokset myös työni ohjaajalle Henri Nordlundille tuesta, neuvoista, auttavasta asenteesta ja työn kommentoinnista sekä työn epäviralliselle ohjaajalle Teemu Ihalaiselle asiantuntevista käytännön neuvoista ja avusta, jotka sain sähköpostin välityksellä. Kiitokset myös Ulla Kiiskiselle, Kati Porkalle, Sami Oikariselle sekä Peter Martinssonille teknisestä avustamisesta työn eri osa-alueilla.

Lopuksi haluan kiittää perhettäni ja ystäviäni tuesta ja kannustuksesta sekä erityisesti Tommi Arosta kärsivällisyydestä ja avusta tutkimus- ja kirjoitustyön aikana. Omistan tutkielman Isälleni (5.12.1949–30.8.2003), jonka ansiosta päädyin tälle alalle, mutta joka ei ehtinyt nähdä valmistumistani.

Tampere, maaliskuu 2007

Tiia Koho

PRO GRADU -TUTKIELMA

Paikka: TAMPEREEN YLIOPISTO
Lääketieteellinen tiedekunta
Lääketieteellisen teknologian instituutti (IMT)
Molekyylibioteknologian tutkimusryhmä

Tekijä: KOHO, TIIA MARIANNA

Otsikko: Avidiini- ja AVR4/5-geenien ilmentymisen tutkiminen kaksoismolekyyylimajakka-FRET-menetelmällä

Sivumäärä: 101

Ohjaaja: Dosentti Henri Nordlund

Tarkastajat: Professori Markku Kulomaa, Professori Seppo Parkkila

Aika: Maaliskuu 2007

Tiivistelmä

Tutkimuksen tausta ja tavoitteet: Kanan avidiini (AVD) ja avidiinin kaltaiset geenit 1–7 (AVR:t 1–7) kuuluvat samaan geeniperheeseen. AVD-geenin ilmentymistä on aikaisemmin tutkittu proteiinitasolla, ja sen tiedetään ilmentyvän toisaalta progesteronisäätelyn alaisuudessa ja toisaalta tulehduksen tai kudosisvaurion indusoimana. Ilmentymisen säätelyn molekyylitason yksityiskohtia ei kuitenkaan tunneta. AVR-geenien ilmentymistä on tutkittu vasta alustavasti. Kaksoismolekyyylimajakka-FRET-koettimet (*dual FRET molecular beacons*) ovat erittäin herkkä ja vähäisen taustasignaalin tuottava menetelmä, joka mahdollistaa spesifisen kohdegeenin ilmentymisen ja lokalisaation tutkimisen sekä kvantitatiivisen mittaamisen reaaliajassa elävissä soluissa. Tutkimuksen päätavoitteina olivat kaksoismolekyyylimajakka-FRET-menetelmän kehittäminen AVD- ja AVR4/5-geenien ilmentymisen ja lokalisaation tutkimiseen elävissä soluissa sekä kvantitatiivisen RT-PCR -menetelmän kehittäminen AVD- ja AVR4/5-geenien ilmentymisen mittaamiseen.

Tutkimusmenetelmät: AVD- ja AVR4/5-mRNA:ta tuotettiin bakulovirus-tuottosysteemin avulla hyönteissoluissa. Tuoton onnistuminen varmistettiin proteiinitasolla Western blotilla; RNA-tasolla agarosigeelillä ja tavallisella RT-PCR:llä. mRNA-pitoisuudet määritettiin kvantitatiivisella reaaliaikaisella RT-PCR:llä. AVD:n ja AVR4/5:n mRNA:n kuvantaminen elävissä soluissa tehtiin kaksoismolekyyylimajakoiden avulla, jotka kuljetettiin soluihin elektroporaatiolla. Elävät solut kuvattiin elävien solujen fluoresenssimikroskoopilla.

Tutkimustulokset: AVD- ja AVR-proteiinien sekä mRNA:iden tuotto hyönteissoluissa onnistui. Avidiinin mRNA-pitoisuus kasvoi infektion edetessä sekä tavallisessa että kvantitatiivisessa RT-PCR:ssä. AVR4/5:n kohdalla ei voitu havaita samanlaista kasvua, minkä lisäksi menetelmien tuloksissa oli ristiriitaa. Kaksoismolekyyylimajakkaparien signaali-tausta-suhde oli *in vitro* -kokeissa huono, mutta FRET-tehokkuus hyvä. Kaksoismolekyyylimajakat lokalisoituivat elävissä soluissa tumaan, mikä ei todennäköisesti vastannut oikean kohteen lokalisaatiota. Luovuttajamolekyyylimajakkan epäspesifinen taustasignaali väheni FRET-signaalisissa.

Johtopäätökset: AVD- ja AVR4/5-geenien ilmentymisen mittaaminen kvantitatiivisella RT-PCR -menetelmällä onnistui, ja menetelmää voidaan jatkossa hyödyntää AVD- ja AVR-geenien ilmentymisen tutkimisessa. Kaksoismolekyyylimajakoiden tumalokalisoinnin syynä elävissä soluissa oli todennäköisesti käytössä ollut liian suuri koetinpitoisuus. Menetelmää varten joudutaan vielä tekemään lisäkokeita.

MASTER'S THESIS

Place: UNIVERSITY OF TAMPERE
Faculty of Medicine
Institute of Medical Technology (IMT)
Molecular Biotechnology research group
Author: KOHO, TIIA MARIANNA
Title: Dual FRET molecular beacons for studying avidin and *AVR4/5* gene expression
Pages: 101
Supervisor: Docent Henri Nordlund
Reviewed by: Professor Markku Kulomaa, Professor Seppo Parkkila
Date: March 2007

Abstract

Background and aims: Chicken avidin (*AVD*) and avidin-related genes 1–7 (*AVRs 1–7*) all belong to the same gene family. The *AVD* gene expression has previously been studied only at protein level. In the chicken, it is synthesized in the oviduct in response to progesterone and in several tissues of both sexes in connection with inflammation and tissue damage. Molecular details of the regulation of expression are still unknown. Only preliminary studies exist on the expression of *AVR* genes. Dual FRET molecular beacons are highly sensitive novel probes that convert target recognition into a fluorescence signal with low background even in the presence of unbound probes. Approach provides sensitive real time detection, localization, and quantification of specific mRNA in living cells. The main aims of this study were to establish a dual FRET molecular beacon method for studying *AVD* and *AVR4/5* gene expression and localization in living cells, and to develop a quantitative RT-PCR assay for determining the levels of *AVD* and *AVR4/5* gene expression.

Methods: mRNAs for *AVD* and *AVR4/5* were produced using a baculovirus–insect cell expression system. The outputs of proteins and mRNAs were verified with Western blot and RT-PCR assays, respectively. The levels of *AVD* and *AVR4/5* gene expression were determined with quantitative RT-PCR. The live cell imaging of *AVD* and *AVR4/5* mRNAs were done with dual FRET molecular beacons, which were delivered in cells by electroporation. Live cells were photographed with live cell fluorescence microscope.

Results: The production of both *AVD* and *AVR4/5* proteins and mRNAs in insect cells were successful. mRNA levels of avidin increased with infection time in both RT-PCR and qRT-PCR assays. Same pattern was not seen in *AVR4/5* expression, in addition which there were discrepancy between method results. Signal-to-background ratios of dual FRET molecular beacon pairs were low *in vitro*, but their relative FRET efficiencies were high. In live cell imaging with dual FRET molecular beacons, nuclear localization was seen. Nuclear localization was most probably non-specific. Background fluorescence from the donor molecular beacon decreased when using FRET optics.

Conclusions: The determining of *AVD* and *AVR4/5* gene expression with quantitative RT-PCR was successful, and the method can be utilized in studying *AVD* and *AVR* gene expression in the future. Non-specific nuclear localization was most likely due to too high probe concentration in use. Additional tests are needed for the dual FRET molecular beacons to achieve better signal-to-background ratios and the method to function properly.

Sisällysluettelo

LYHENTEET JA VIERASPERÄISET SANAT	6
1. JOHDANTO.....	7
2. KIRJALLISUUSKATSAUS	10
2.1. Avidiini ja geeniperhe.....	10
2.1.1. Avidiini	10
2.1.2. Avidiinin kaltaiset geenit	11
2.2. RNA-analytiikka	12
2.2.1. Perinteiset menetelmät	12
2.2.2. Muita hybridisaatioon perustuvia menetelmiä	14
2.2.3. RNA-detektio elävissä soluissa.....	15
2.3. Tutkimuksessa käytettävien menetelmien teoreettinen tausta	19
2.3.1. Bakulovirukset ja hyönteissoluntuottosysteemi.....	19
2.3.1.1. Baculovirusten biologiaa.....	20
2.3.1.2. Bakulovirusinfektion vaiheet	21
2.3.1.3. Bakulovirustuottovektoreiden valmistaminen	22
2.3.2. qRT-PCR.....	23
2.3.2.1. LightCycler® 1.5 Instrument	23
2.3.2.2. Detektiomenetelmät	24
2.3.2.3. Kynnysarvo (Cp).....	25
2.3.2.4. Standardisuora.....	26
2.3.3. Molekyylimajakat.....	27
2.3.3.1. Perinteiset molekyylimajakat	27
2.3.3.2. Aallonpituutta vaihtavat molekyylimajakat.....	29
2.3.3.3. Kaksoismolekyylimajakat	29
2.3.3.4. Fluoresenssi.....	31
2.3.3.5. Fluoresenssin vaimennus.....	33
2.3.3.6. Fluoresenssin resonanssienergian siirto.....	34
2.3.3.7. Fluoresenssin resonanssienergian siirron mittaaminen.....	35
2.3.3.8. Detektioherkkyys	36
3. TUTKIMUKSEN TAVOITTEET	38
4. MATERIAALIT JA MENETELMÄT	39
4.1. Spodoptera frugiperda -hyönteissolujen elvytys ja kasvatus.....	39
4.2. Rekombinanttisten bakulovirusten valmistaminen	39
4.2.1. Transpositio ja oikeiden kloonien valinta.....	39
4.2.2. Virus-DNA:n eristäminen	41
4.2.3. Hyönteissolujen transfektio	42
4.2.4. Rekombinanttisten virusten monistaminen	43
4.3. Western blot -analyysi.....	43
4.3.1. SDS-PAGE.....	43

4.3.2.	<i>Immunoblottaus</i>	44
4.4.	Totaali-RNA:n tuottaminen ja todentaminen	45
4.4.1.	<i>Totaali-RNA:n eristäminen</i>	45
4.4.2.	<i>Denaturoiva RNA-elektroforeesigeeli</i>	46
4.4.3.	<i>Agaroosigeelielektroforeesi</i>	47
4.5.	RT-PCR	47
4.5.1.	<i>cDNA-synteesi</i>	47
4.5.2.	<i>PCR ja agaroosigeelielektroforeesi</i>	48
4.6.	Kvantitatiivinen RT-PCR	49
4.6.1.	<i>Ulkoisen standardin valmistus</i>	49
4.6.2.	<i>LightCycler® 1.5 Instrument</i>	50
4.7.	Kaksoismolekyylimajakka-FRET	52
4.7.1.	<i>Molekyylimajakoiden suunnittelu ja valmistus</i>	52
4.7.2.	<i>Spektrofluorometri</i>	53
4.7.3.	<i>Fluoresenssimikroskopia</i>	54
4.7.3.1.	<i>Hyönteissolujen infektiio ja elektroporaatio</i>	54
4.7.3.2.	<i>Mikroskopia</i>	55
4.8.	Liuokset ja reagenssit	57
5.	TULOKSET	61
5.1.	Rekombinanttien bakulovirusten valmistaminen	61
5.2.	Proteiinien tuottaminen ja Western blot -analyysi	62
5.3.	Totaali-RNA:n tuottaminen ja todentaminen	64
5.3.1.	<i>Denaturoiva RNA-elektroforeesigeeli</i>	64
5.3.2.	<i>Agaroosigeelielektroforeesi</i>	65
5.4.	RT-PCR	66
5.5.	Kvantitatiivinen RT-PCR	67
5.6.	Kaksoismolekyylimajakka-FRET	71
5.6.1.	<i>Spektrofluorometri</i>	71
5.6.2.	<i>Fluoresenssimikroskopia</i>	73
6.	POHDINTA	75
6.1.	LightCycler® 1.5 Instrument	75
6.2.	Kaksoismolekyylimajakka-FRET	77
6.2.1.	<i>Spektrofluorometrimittaukset</i>	77
6.2.2.	<i>Fluoresenssimikroskopia</i>	82
6.3.	Tulevaisuuden suunnitelmia	87
7.	JOHTOPÄÄTÖKSET	88
8.	LÄHDELUETTELO	90

Lyhenteet ja vierasperäiset sanat

AcMNPV	<i>Autographa californica</i> multiple nuclear polyhedrosis virus
AVD	Avidin (avidiini)
AVR4/5	Avidin related gene 4/5 (avidiinin kaltainen geeni 4/5)
cDNA	complementary DNA (mRNA:lle komplementaarinen DNA)
DD	Differential display
<i>Ex vivo</i>	kehon ulkopuolella
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FRET	fluorescence resonance energy transfer (fluoresenssin resonanssienergian siirto)
GFP	Green fluorescent protein
<i>In situ</i>	paikanpäällä, paikallaan
<i>In vitro</i>	keinotekoisissa olosuhteissa, kuten koeputkessa tai kasvatusalustalla
<i>In vivo</i>	elimistössä tai solussa
NASBA	Nucleic acid sequence based amplification
MB	Molecular beacon (molekyyliajakka, MM)
mRNA	messenger ribonucleic acid (lähetti-ribonukleinihappo)
ODN	oligodeoxynucleotide (oligodeoksinukleotidi)
pi	<i>post infection</i> (infektion jälkeen)
PNA	peptide nucleic acid (peptidi-nukleinihappo)
qRT-PCR	Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction
QUAL-koettimet	Quenched auto-ligation probes
RDA	Representational difference analysis
RNAi	RNA interference
RPA	RNase protection assay
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
SAGE	Serial analysis of gene expression
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (natriumdodekyylisulfaattipolyakryyliamidigeelielektroforeesi)
Sf9	<i>Spodoptera frugiperda</i> -hyönteissolulinja
SNP	single nucleotide polymorphism (yhden emäksen monimuotoisuus)
SNR	signal-to-noise ratio (signaali-tausta-suhde)
ssDNA	single stranded DNA (yksijuosteinen deoksiribonukleinihappo)
TMA	Transcription mediated amplification

1. Johdanto

Geeniekspression säätely on olennainen osa prosessia, jossa genomien sisältämä informaatio herätetään eloon. Tumallisten solujen geenien ilmentymistä säädellään monella tasolla, joiden integroinnista ja koordinoinnista solujen on huolehdittava toteuttaessaan genomien sisältämää informaatiota. Historiallisista ja teknisistä syistä laajimmin on tutkittu geenien transkriptiotason säätelyä, mutta nykyään tiedetään, että posttranskriptiotason säätely, sisältäen transkriptien prosessoinnin, kuljetuksen, lokalisaation, vaihtumisnopeuden ja translaation kontrolloinnin, muodostaa olennaisen osan geeniekpressiota (Mata ym., 2005). Viime vuosina on lisäksi käynyt ilmi, että RNA-molekyylit toimivat laaja-alaisissa tehtävissä: Ne fyysisesti kuljettavat ja tulkitsevat elävien solujen geneettistä informaatiota. Niillä on tärkeä katalyyttinen rooli. Ne tukevat rakenteellisesti molekulaarisia koneistoja ja välittävät geenivaimennusta. Näiden toimintojen kontrolloinnissa vaikuttavat sekä spesifisten RNA:iden ilmentymistasot että spatiaalinen jakautuminen soluun (Santangelo ym., 2004).

Nykyään laajimmin käytössä olevat menetelmät, joilla voidaan määrittää geenien ilmentymisen säätelyä kvantitatiivisesti, perustuvat joko valikoivaan monistamiseen (kuten PCR) tai kyllästettyyn sitoutumiseen, jota seuraa ylimääräisten koettimien poistaminen spesifisyyden saavuttamiseksi (kuten geenilastut tai *in situ* -hybridisaatio). Kumpikaan menetelmä ei sovellu käytettäväksi elävissä soluissa (Santangelo ym., 2004). Geenien ilmentymisen molekyyli-tason tutkimisessa spesifisen mRNA:n pitoisuuden kvantitatiivinen määrittäminen on kuitenkin välttämätöntä esimerkiksi useiden molekyylibiologian ja tautien patofysiologian takana olevien toimintojen selvittämiseksi. Lisäksi spesifisten RNA:iden kuvantaminen reaaliajassa elävissä soluissa voi tarjota tärkeää tietoa siitä, kuinka ulkopuolinen ärsyke muuttaa geenin ilmentymistasoa soluissa, mitkä prosessit vaikuttavat RNA:n lokalisaatioon, kuljetukseen ja vaimentumiseen sekä siitä, miten RNA:t ovat vuorovaikutuksessa proteiinien tai proteiinikompleksien kanssa (Santangelo ym., 2004).

Yksi vaihtoehto detektoida, lokalisoida, määrittää ja monitoroida spesifisten geenien ilmentymistä elävissä soluissa on kaksoismolekyyylimajakka-FRET-menetelmä (*dual FRET molecular beacons*). Menetelmässä käytetään kahta molekyyylimajakkaa, jotka muodostavat fluoresenssin resonanssienergian siirtoparin hybridisoituessaan peräkkäin spesifiseen kohteeseensa (Santangelo ym., 2004). Molekyyylimajakat ovat kaksois-leimattuja hiuspinnirakenteisia oligonukleotidikoettimia, joiden toisessa päässä on

fluorofori ja toisessa fluoresenssin vaimentaja (Tyagi & Kramer, 1996). Kohteeseen sitoutumattoman koettimen hiuspinnirakenne tuo molekyyli-majakkan päät niin lähelle toisiaan, että vaimentaja estää fluoroforin toiminnan. Hybridisaatio komplementaarisen ja antiparalleelin kohteen kanssa johtaa hiuspinnirakenteen avautumiseen, jolloin leimat joutuvat etäälle toisistaan ja fluoroforin toiminta palautuu (Bernacchi & Mely, 2001). Fluoresenssin resonanssienergian siirto tapahtuu kahden erilaisen molekyyli-majakkan fluoroforien välillä, kun koettimet ovat hybridisoituneena kohteeseen riittävän lähelle toisiaan (1–10 nm). Kun ensimmäisessä koettimessa olevaa luovuttajafluoroforia viritetään sille spesifisellä energialla, osa virittyneen fluoroforin energiasta siirtyy, virityksen purkautuessa, toisen koettimen vastaanottajafluoroforille, joka virittyy ja virityksen purkautuessa emittoi sille tyypillistä valoa. Koska prosessissa menetetään energiaa osaksi lämpönä, on emittoituvan fluoresenssin energia absorboituvaa energiaa matalampi, ja siksi emissio tapahtuu pidemmällä aallonpituudella kuin absorptio (eksitaatio) (Marras, 2006). Vastaanottajafluoroforin emissiofluoresenssia mitataan. Näin ollen mitattavissa oleva FRET-signaali syntyy vain, kun kummatkin molekyyli-majakat ovat sitoutuneena kohteeseen. Kahden itsenäisen hybridisaatio-tapahtuman ansiosta kaksoismolekyyli-majakka-FRET on spesifinen ja herkkä menetelmä. Lisäksi molekyyli-majakoiden suljetun rakenteen vuoksi sitoutumattomat koettimet aiheuttavat vain vähäistä taustafluoresenssia (Santangelo ym., 2004).

Kanan avidiinin sekä avidiinin kaltaisten geenien (*AVR:t*) geenialueet sekä geeninsäätelyalueet on kloonattu ja sekvensoitu Kulomaan ryhmän toimesta (Keinänen ym., 1988; Keinänen ym., 1994; Ahlroth ym., 2000). Avidiinigeenin tiedetään ilmentyvän toisaalta progesteronisäätelyn alaisuudessa kanan munanjohtimessa ja toisaalta tulehduksen indusoimana useimmissa kanan ja kukon kudoksissa, mutta ilmentymisen säätelyn molekyyli-tason yksityiskohtia ei tunneta (Tuohimaa ym., 1989). *AVR*-geenien ilmentymistä on tutkittu vasta alustavasti (Kunnas ym., 1993). Aikaisemmat tutkimukset avidiinigeenin ilmentymisestä erilaisten hormonikäsittelyjen ja tulehdusten yhteydessä on suoritettu proteiinitasolla, mutta nykyään on jo tarjolla useampia mRNA:n kvantitatiiviseen analysointiin käytettäviä menetelmiä, minkä takia geenien ilmentymistä voidaan tutkia RNA-tasolla. Nykyisin käytössä olevat mRNA:n määritysmenetelmät soveltuvat sellaisenaan kuitenkin huonosti tutkimuksiin, joissa mRNA-pitoisuuksia voitaisiin määrittää ja detektoida reaaliajassa elävissä soluissa. Tämä olisi kuitenkin tärkeää selvitettyä esimerkiksi erilaisten fysiologisten tai

patologisten tilanteiden ja spesifisten geenien ilmentymisen välisiä solutason yhteyksiä sekä tutkittaessa RNA:iden kuljetus- ja prosessointidynaamiikkaa yksittäisissä soluissa.

Tämän *pro gradu* -tutkielman tavoitteena on kehittää fluoresenssin resonanssienergian siirtoon perustuva kaksoismolekyylimajakamenetelmä, jonka avulla voidaan määrittää ja tutkia *AVD*- ja *AVR4/5*-geenien mRNA:iden pitoisuutta ja lokalisaatiota reaaliajassa elävissä soluissa. Menetelmää voidaan tulevaisuudessa hyödyntää avidiinin ja avidiinin kaltaisten geenien ilmentymisen säätelyn tutkimisessa sekä soveltaa laajemmin spesifisten RNA-molekyylien ilmentymistasojen, keskinäisten vuorovaikutusten sekä lokalisaation tutkimiseen elävissä soluissa.

2. Kirjallisuuskatsaus

2.1. Avidiini ja geeniperhe

2.1.1. Avidiini

Avidiini on useiden lintu- ja matelijalajien munanvalkuaisessa sekä sammakkoeläinlajien munahyytelössä esiintyvä emäksinen glykoproteiini (Korpela ym., 1981a; Korpela ym., 1981b), joka sitoutuu ei-kovalenttisella sidoksella erityisen voimakkaasti biotiiniin ($K_d \approx 10^{-15}$ M) (Green, 1975). Luonnossa tetrameerinä esiintyvä avidiini koostuu neljästä identtisestä 128 aminohapon mittaisesta alayksiköstä (molekyylipaino 15 500–15800 daltonia), joista jokainen pystyy sitomaan yhden biotiinimolekyylin (DeLange & Huang, 1971). Biotiiniin sitoutuneena avidiini kestää ankaria olosuhteita, kuten äärimmäisiä lämpötiloja, pH:ta, suolapitoisuuksia ja jopa proteolyttisiä entsyymejä (Green, 1975).

Avidiinin ja sen bakteerianalogin streptavidinin voimakasta affiniteettia biotiiniin on jo kauan käytetty hyväksi useissa biokemiallisissa sovelluksissa, esimerkiksi monien erilaisten biomolekyylien detektoinnissa ja puhdistamisessa (Wilchek & Bayer, 1990a; Wilchek & Bayer, 1990b). Nykyään (strept)avidini–biotini-teknologiaa sovelletaan laajasti myös lääketieteessä ja diagnostiikassa, kuten syöpäsolujen kuvantamisessa ja lokalisaatiota ilmaisevissa menetelmissä sekä lääkkeiden ja radionuklidien kohdentamisessa kasvaimiin (Schetters, 1999; Guttinger ym., 2000; Paganelli ym., 2006). Lisäksi muita sovelluskohteita, esimerkiksi biomateriaali- ja kudosteknologiassa, tutkitaan (Pannier & Shea, 2004; Tsai & Wang, 2005).

Avidiinia tuotetaan munivan tai estrogeenilla käsitellyn kanan (*Gallus gallus*) munanjohtimessa progesteronihormonin säätelemänä (Hertz & Sebrell, 1942; O'Malley ym., 1969; Tuohimaa ym., 1989). Se eritetään kehittyvään munanvalkuaiseen, jossa sen ajatellaan toimivan kananalkiota suojelevana puolustusproteiinina bakteeritulehduksia vastaan (Elo ym., 1980a). Sitoessaan liukoista biotiinia avidiinin arvellaan inhiboivan biotiinia tarvitsevien mikrobien kasvua. Lisäksi avidiinia tuotetaan munanjohtimessa progesteronisäätelystä riippumatta sekä useissa muissa kummankin sukupuolen kudoksissa bakteeri- ja virustulehdusten sekä kudostulehdusten yhteydessä (Elo ym., 1979a, 1979b; Elo ym., 1980a; Korpela ym., 1982). Tällainen tulehduksesta aiheutuva avidiinin tuotanto voidaan vaimentaa anti-inflammatorisilla lääkkeillä (Nordback ym.,

1982; Niemelä, 1986). Myös soluviljelmissä, kuten kanan fibroblasteissa sekä makrofageissa, voidaan tuottaa avidiinia progesteronista riippumatta virustransformaation tai soluvaurion seurauksena (Korpela ym., 1983; Korpela, 1984). Progesteronin tai tulehduksen indusoiman avidiinin ajatellaan olevan saman geenin koodaama, mutta monitekijäisen säätelyn alainen (Kunnas ym., 1993).

Avidiinia on myöhemmin havaittu esiintyvän myös kehittyvän kananalkion luurankolihaksissa sekä ruston hypertrofisessa kasvulevyssä, missä sen arvellaan osallistuvan rustosolujen sekä myoblastien erilaistumiseen (Zerega ym., 2001). Lisäksi avidiinin on todistettu toimivan pseudokatalyyttinä vahvistamalla sitoutuneen biotinyyli *p*-nitrofenyyliesterin emäksistä hydrolyysiä (Huberman ym., 2001). Avidiinin on osoitettu sitoutuvan myös DNA:han (Morpurgo ym., 2004), mikä olisi mahdollinen uusi rooli vielä muutenkin epäselvän fysiologisen toiminnan ohella.

2.1.2. Avidiinin kaltaiset geenit

Kanan avidiinin aminohapposekvenssi selvitettiin vuonna 1971 (DeLange & Huang, 1971), ja sen cDNA kloonattiin sekä sekvensoitiin vuonna 1987 (Gope ym., 1987). Avidiinin kolmiulotteinen rakenne kuin myös avidiini–biotiini-kompleksin kolmiulotteinen rakenne on määritetty (Livnah ym., 1993; Pugliese ym., 1993). Avidiinigeenin (AVD) kloonauksen yhteydessä löydettiin ensin useita avidiinille homologisia genejä, jotka nimettiin avidiinin kaltaisiksi geneiksi 1–5 (avidin-related genes, AVR:t 1–5) (Keinänen ym., 1988; Keinänen ym., 1994). Lopulta myös itse avidiinigeeni kloonattiin ja sekvensoitiin vuonna 1995 (Wallen ym., 1995). Lisäksi selvitetessä geeniperheen kromosomaalista lokalisaatiota (27 kb:n alueella sukupuolikromosomi Z:n lokuksessa q21) ja järjestystä löydettiin vielä kaksi muuta geeniperheen jäsentä: avidiinin kaltaiset geenit 6 ja 7 eli AVR:t 6 ja 7 (Ahlroth ym., 2000). AVR-geenien lukumäärän ja tyyppien arvellaan vaihtelevan kanayksilöiden välillä (Ahlroth ym., 2001).

Avidiinin kaltaisten geenien havaittiin olevan erittäin konservatiivisia; geeniperheen jäsenten välinen identtisyys vaihtelee 91–100 %:n välillä (Ahlroth ym., 2000). AVR4- ja AVR5-geenit ovat koodaavalta alueeltaan täysin identtiset (Keinänen ym., 1994), minkä takia geeneihin viitataan usein termillä AVR4/5. Geeniperheen jäsenistä todennäköisesti juuri AVR4- ja AVR5-geenit ovat läheisintä sukua avidiinille (Wallen ym., 1995). AVR-geenit ovat 1113 bp pitkiä ja koostuvat avidiinin lailla neljästä eksonista sekä kolmesta intronista; eksonien ja intronien välissä on selväpiirteiset rajat sekä silmukoitumissignaali. Oletetut promoottorisekvenssit 5'-päässä sekä polyadenylaatio-signaalit 3'-päässä

viittaavat geenien olevan toimivia (Ahlroth ym., 2001). RT-PCR-tutkimusten perusteella on todella havaittu pieniä määriä sekä AVR2-mRNA:ta kanan munanjohtimessa että AVR3-mRNA:ta kanan suolessa intraperitoneaalisesti indusoidun bakteerinfektion jälkeen (Kunnas ym., 1993). Lisäksi AVR1-mRNA:ta tuotetaan kanan makrofageissa, *in vitro*, mutta vielä ei tiedetä tuotetaanko AVR-geenejä proteiinitasolla tai progesteroni-induktion jälkeen (Lappalainen ym. käsikirjoitus).

Rekombinantti-AVR-proteiinien avulla tehtyjen tutkimuksien perusteella AVR-proteiineilla on joitakin erilaisia fysikokemiallisia ominaisuuksia verrattuna avidiiniin, kuten alempi pI sekä lisääntynyt glykosylaatiotaso (Laitinen ym., 2002). Biotiinisitomiskyky on konservoitunut kaikissa AVR-proteiineissa, vaikkakin AVR1 ja AVR2 sitovat biotiinia reversiibelisti toisin kuin avidiini sekä AVR3-7, jotka sitoutuvat biotiiniin käytännössä pysyvästi. Lisäksi AVR4/5-proteiinilla näyttäisi olevan avidiinia parempi lämmönkestävyys sen silti menettämättä korkeaa affiniteettiaan biotiiniin ($K_d \approx 3.6 \times 10^{-14}$ M) (Hytönen ym., 2004).

2.2. RNA-analytiikkaa

RNA-tasolla tehtävä geenien ilmentymisen tutkiminen on noussut yhä tärkeämmäksi aiheeksi genomitutkimuksen tuottaman aineiston tulkitsemisessa. Siinä missä genomitutkimuksesta saatava informaatio on riippumaton kontekstista (eli yleisesti jokainen normaali solu sisältää saman DNA-sekvenssin samoine mutaatioineen ja polymorfismineen), on transkriptomitutkimuksesta saatava tieto riippuvainen kontekstista; mRNA-tasot ja -koostumukset vaihtelevat solun tai kudoksen fysiologisen ja patologisen tilan sekä kehityksen ja erilaistumisen tason mukaan. Lisäksi transkriptiotason tietoa tautiin liittyvien kohdemolekyylien tai niiden yhdistelmien ilmentymisestä ja säätelystä, myös lääkehoidon jälkeen, voidaan hyödyntää rationaalisen lääkekehityksen piirissä (Kozian & Kirschbaum, 1999; Bustin & Nolan, 2004). Tietyn mRNA:n identifikaatiota ja rakenteen analysointia sekä suhteellista (yleensä semikvantitatiivista) määrittystä varten on kehitetty useita erilaisia menetelmiä.

2.2.1. Perinteiset menetelmät

Transkriptiotason geenien ilmentymisen tutkimuksessa ja kvantitoinnissa yleisesti käytössä olevia *in vitro* -menetelmiä ovat Northern blot, RPA (*RNase protection assay*), *in situ* -hybridisaatio sekä RT-PCR. Ensimmäinen edistysaskel geenien ilmentymisen tutkimisessa oli Northern blot -menetelmän kehittäminen vuonna 1977 (Alwine ym.,

1977). Northern blot -menetelmä perustuu leimattujen cDNA- tai RNA-koettimien hybridisaatioon denaturoivassa agarosigeelissä eroteltujen ja nailonkalvolle siirrettyjen RNA-molekyylien kanssa. Menetelmä soveltuu mRNA-molekyylien detektioon, niiden koon, ja sitä kautta myös erilaisten silmukoitusvarianttien ja pseudogeenien, arviointiin sekä niiden suhteellisten määrien määrittämiseen; tosin heikohkon herkkyytensä takia, menetelmä rajoittuu vain runsaiden mRNA:iden määrittämiseen. Yksinkertaisena, kohtuullisen spesifisenä ja edullisena menetelmänä se on kuitenkin säilyttänyt asemansa uudempien RNA:n määrittämiseen kehitettyjen menetelmien ohella (Kozian & Kirschbaum, 1999; Dvorak ym., 2003).

RNase protection assay -menetelmässä analysoitava mRNA-molekyyli hybridisoidaan leimatus yksijuosteisen RNA- tai cDNA (*SI-mapping*) -koettimen kanssa, jolloin kaksijuosteiset hybridit ovat suojassa yksijuosteista ribonukleiinihappoa hajottavilta entsyymiltä. Muut hybridisoitumattomat mRNA:t sekä ylimääräiset koettimet hajoavat käsittelyn aikana. Lopuksi hybridisoituneet fragmentit voidaan analysoida geelielektroforeesilla. RPA-menetelmä voi parhaimmillaan antaa tietoa transkriptin tarkasta rakenteesta (transkription aloitus- ja lopetuspaikka, introni/eksoni-liitokset jne.), vaihtoehtoisesta silmukoitumisesta ja jopa pistemutaatioista. Menetelmä on erittäin spesifinen tiettyjen transkriptien detektiossa, ja sen avulla voidaan erotella Northern blotissa samalla lailla ajautuvat transkriptit toisistaan, mutta sen käyttö kvantitoinnissa on rajallista (Rapley, 2000; Dvorak ym., 2003).

Nukleiinihappojen *in situ* -hybridisaatiotekniikalla voidaan havaita tai paikantaa geenejä ja spesifisiä DNA- tai RNA-sekvenssejä kudoksissa, soluissa, tumissa tai kromosomeissa (Raap, 1998). Menetelmä julkaistiin ensimmäisen kerran vuonna 1969 (Gall & Pardue, 1969; John ym., 1969), ja se perustuu leimatus nukleiinihappo-koettimen hybridisaatioon kohdemolekyylin kanssa objektilasille fiksatussa kudosis- tai kromosominäytteessä. Alun perin koettimissa käytettiin vain radioaktiivisia leimoja, joiden erottelukyky on heikko, mutta myöhemmin ei-radioaktiivisten leimaustekniikoiden (kemiallisesti muokatut nukleotidit, fluoresenssi, entsyymireporterit ja kultapartikkelit) kehittäminen on muuttanut *in situ* -hybridisaatiomenetelmän aikaisempaa helpommaksi, nopeammaksi ja tarkemmaksi (Marras ym., 2006). Solujen fiksaus ja esikäsittelyssä käytetyt kemikaalit voivat kuitenkin vääristää RNA:iden lokalisaatiosta saatavaa signaalia sekä jossain määrin pilata solun sisäistä morfologiaa (Dirks ym., 2001).

Kohdetranskriptin kokonaismäärä on näytteissä usein hyvin matala, jolloin hybridisoituihin koettimiin perustuvien menetelmien herkkyys ei enää riitä tuottamaan havaittavaa signaalia. Tämän puutteen korvaamiseksi on kehitetty erilaisia kohteen monistamiseen perustuvia menetelmiä. Näistä laajimmin käytössä on RT-PCR-menetelmä (*reverse transcription polymerase chain reaction*), jossa eristetty RNA käännetään ensin cDNA:ksi käänteiskopioijaentsyymien avulla ja monistetaan sen jälkeen tavallisen PCR-reaktion avulla. Tulokset analysoidaan geielektroforeesilla. Herkkyytensä ansiosta RT-PCR-menetelmän avulla voidaan detektoida, ja jossain määrin kvantitoida, myös harvinaisia tai vähälukuisia mRNA-molekyylejä. Elektroforeesin kvantitatiivinen erottelukyky on kuitenkin huono, ja erottelu tapahtuu vain molekyylin koon mukaan, jolloin samankokoiset molekyylit eivät erotu (O'Driscoll ym., 1993; Bustin, 2000). Menetelmästä on myös herkempi, mRNA-pitoisuuksien määrittämiseen sopiva, reaaliaikainen muunnos (qRT-PCR), jota käsitellään myöhemmin.

Muita tuntemattomampia kohde-RNA-sekvenssin monistamiseen perustuvia määritysmenetelmiä ovat esimerkiksi NASBA (*nucleic acid sequence based amplification*), jossa nukleiinihappojen monistusreaktiot tapahtuvat tasaisessa lämpötilassa (Guatelli ym., 1990), ja sitä hyvin paljon muistuttava TMA (*transcription mediated amplification*) sekä erityisesti eri näytteiden vertailevaan analysointiin soveltuvat menetelmät: DD (*differential display*) ja RDA (*representational difference analysis*). Sekvensointiin perustuva SAGE (*serial analysis of gene expression*) soveltuu hyvin myös kvantitointiin (Kozian & Kirschbaum, 1999; Yamamoto ym., 2001).

2.2.2. Muita hybridisaatioon perustuvia menetelmiä

Viime vuosien aikana yhdeksi jännittävimmistä geenien ilmentymisen tutkimiseen kehitetyistä menetelmistä on noussut DNA array -menetelmä (cDNA-siru, geenilastu, myös *microarray*). Menetelmän avulla voidaan määrittää ja analysoida geenien ilmentymistä sekä ilmentymistason muutoksia suuressa mittakaavassa. Menetelmässä alustalle (lasi, piilevy tai nailonkalvo) on kiinnitetty kokoelma DNA-molekyylejä (oligonukleotideja tai cDNA:ita), jotka hybridisoituvat liuoksessa olevan koko organismista, tietyistä kudoksesta tai solutyypistä eristetyn ja fluoresoivasti leimatun mRNA-, cDNA- tai DNA-kokoelman kanssa. Tällä tavalla saadaan tietoa geenin lokalisaatiosta, ilmentymisen temporaalisista tai indusoiduista muutoksista sekä geenin suhteesta muiden geenien ilmentymisessä tapahtuviin muutoksiin. Perinteisesti menetelmää on käytetty DNA-kopioluvun muutoksien identifioinnissa ja geenien

ilmentymisen profiloinnissa, mutta pääasiallisten sovelluskohteidensa lisäksi menetelmää voidaan hyödyntää laajasti myös muiden erilaisten molekyyli- ja solubiologisten ilmiöiden tutkimisessa sekä lääkeainekehityksessä. Uusimpia sovellus-alueita edustaa muun muassa mikrofluidistiikkateknologia (Gabig & Wegrzyn, 2001; Howbrook ym., 2003; Panda ym., 2003).

Aivan toinen lähestymistapa tutkia geenien ilmentymistä ja toimintaa soluissa on niiden sekvenssispesifinen vaimentaminen. Menetelmä perustuu hybridisoituvien antisense-nukleotidien sekvenssispesifiseen sitoutumiseen kohde-mRNA:nsa kanssa, mikä johtaa menetelmästä riippuen joko kohdemolekyylin hajotukseen, sen rakenteen muokkaamiseen tai translaation inhiboimiseen. Aikaisemmat käytössä olleet vaimennusta välittävät antisense-nukleotidit, kuten synteettiset ODN:t (*oligodeoxynucleotides*) ja katalyyttiset RNA:t (ribozyymit) ja DNAzyymit, ovat saaneet väistyä viime vuosina paljon huomiota saaneen RNAi-menetelmän tieltä (Scherer & Rossi, 2003). RNAi:llä (*RNA interference*) tarkoitetaan ilmiötä, jossa solun tuottama tai sinne infektion tai kokeellisen manipulaation vaikutuksesta syntynyt kaksijuosteinen RNA (dsRNA) estää sen kanssa homologisen RNA:n ilmentymisen (Saksela, 2002). Nimityksen RNAi otti vuonna 1998 käyttöön Andrew Fire, jonka työtovereineen teki tutkimuksia laakamadoilla (*Caenorhabditis elegans*) (Fire ym., 1998). Myöhemmin RNAi:n havaittiin toimivan myös nisäkässoluissa (Caplen ym., 2001; Elbashir ym., 2001). RNAi-menetelmän avaamat lupaavat tutkimusnäkökulmat on nopeasti ymmärretty. Transgeenisiiä hiiriä, joissa kohdegeenin ilmentyminen on estetty siRNA:ta tuottavan siirtogeenin avulla, on jo tehty (Rubinson ym., 2003; Tiscornia ym., 2003). Menetelmää voidaan hyödyntää jo esimerkiksi tautimallien tutkimisessa (Zamore & Aronin, 2003). Tulevaisuudessa RNAi:tä voitaisiin mahdollisesti käyttää myös virustautien torjunnassa, tautien hoidossa (Morris, 2006; Rondinone, 2006) tai kehitettäessä antigeenivapaita kudoksia transplantointia varten (Hunter ym., 2005).

2.2.3. RNA-detektio elävissä soluissa

Spesifisten RNA-molekyylien kuvantaminen elävissä soluissa reaaliajassa voi tuottaa merkittävää tietoa RNA-synteesistä, niiden prosessoinnista, kuljetuksesta, lokalisaatiosta sekä niistä dynaamisista muutoksista, joita RNA:iden ilmentymisessä ja lokalisaatiossa tapahtuu vasteena ulkoisiin ärsykkeisiin. Solunsisäisten RNA:iden biologian tutkimista varten on kehitetty useita menetelmiä, jotka perustuvat leimattujen täyspitkien RNA:iden muodostamiseen solussa tai RNA-kohdentuvien koettimien

käyttöön. Useimmiten leimat ovat fluoresoivia tai radioaktiivisia, mutta myös magneettisia leimoja voidaan käyttää (Santangelo ym., 2006).

RNA-molekyylien suora leimaus elävissä soluissa on mahdollista solunvietyjen fluorokromi-leimattujen nukleotidien avulla, jotka inkorporoituvat tehokkaasti kehittyviin RNA-molekyyliin RNA-synteesin aikana. Menetelmä on muunnos toisesta tekniikasta, jossa kehittyviin RNA-molekyyliin inkorporoidaan bromi-leimattuja urasiilitrifosfaatteja (Br-UTP) (Jackson ym., 1993; Wansink ym., 1993). Tekniikan ilmeisin puute on sen kykenemättömyys havaita spesifisiä RNA-molekyyliä (Dirks ym., 2001).

RNA-molekyylien lokalisaatiosta sekä dynaamisesta käyttäytymisestä soluissa, erityisesti niiden prosessoinnin ja kuljetuksen aikana, voidaan saada paljon tietoa eksogeenisten fluoresoivien RNA-molekyylien avulla. Tavallisesti nämä spesifiset RNA-molekyylit valmistetaan syntesoimalla ne *in vitro* täysimittaisista cDNA:ista (*in vitro transcription*) ja leimaamalla ne joko synteesin aikana fluoresoivien nukleotidien avulla tai lopuksi 3'-päähän kemiallisella leimalla. Tuloksia analysoitaessa on kuitenkin otettava huomioon, että eksogeenisesti soluun tuotujen RNA-molekyylien kuljetusreitit ja -kinetiikka voivat poiketa endogeenisiin RNA:hin verrattuna. Lisäksi solun normaalit kuljetusreitit voivat ruuhkautua ylimääräisten eksogeenisten RNA:iden takia (Dirks ym., 2001).

Vuonna 1998 esiteltiin epäsuora, spesifisten RNA-molekyylien liikkeen visualisointiin elävissä soluissa kehitetty menetelmä, joka perustuu GFP-proteiiniin (*green fluorescent protein*) käyttöön signaalimolekyylinä (Bertrand ym., 1998). Menetelmä rakentuu kahden ilmentymiskonstruktiin varaan: toiseen konstruktiin on fuusioitu jäljitettävän RNA:n DNA-sekvenssi ja kuusi faagin kapsidiproteiini MS2:n sitoutumispaikkaa sekä toiseen MS2:ta ja GFP:tä koodaavat sekvenssit. GFP-MS2-kimera sisälsi lisäksi tumalokalisatiosignaalin. Kun kumpiakin konstrukteja ilmennetään solussa, jäljitettävä RNA-molekyylä voidaan detektoida sytoplasmassa siihen sitoutuneiden GFP-MS2-kimeraproteiinien avulla. Menetelmän avulla on saavutettu jopa yhden RNA-molekyylin herkkyys (Shav-Tal ym., 2004). Menetelmän haasteena on saada aikaan endogeenistä vastinettaan toiminnallisesti vastaava transgeeni. Esimerkiksi transgeenin endogeenistä vastinettaan voimakkaampi ilmentäminen voi johtaa poikkeavaan lokalisaatioon solussa (Dirks ym., 2001; Santangelo ym., 2006).

Endogeenisiä mRNA:ita voidaan seurata elävissä soluissa myös fluoresoivasti leimattujen oligonukleotidikoettimien avulla, jotka tunnistavat kohde-RNA:nsa spesifisesti Watson–Crick-emäspariutumisen mukaisesti. Jotta ne todella kuvastaisivat mRNA:n ilmentymistä *in vivo*, on koettimien täytettävä useita kriteerejä: niiden avulla on pystyttävä erottamaan todellinen signaali taustasta, muuttamaan kohteen tunnistus suoraan mitattavaksi signaaliksi ja erottamaan todellinen signaali vääristä positiivisista. Lisäksi koettimien tulee olla herkkiä ja kinetiikaltaan nopeita, jotta reaaliaikaisia muutoksia ilmentymisessä voidaan seurata (Santangelo ym., 2006).

RNA-molekyylien spesifinen visualisointi elävissä soluissa voidaan tehdä samoilla lineaarisilla koettimilla, joita käytetään myös tavallisessa fluoresenssi *in situ* -hybridisaatiossa (FISH). Tällaisia koettimia ovat esimerkiksi ODN:t sekä nukleiinihappoanalogit 2'-O-metyyli-RNA:t ja PNA:t (*peptide nucleic acids*). Lineaaristen, vaimentamattomien koettimien suurimpana ongelmana on todellisen signaalin erottaminen hybridisoitumattomien koettimien ja solun omien fluoresoivien komponenttien aiheuttamasta taustasignaalista. Signaali–tausta-suhdetta ja spesifisyyttä on pyritty parantamaan kahden lineaarisen koettimen ja niiden välisen fluoresenssin resonanssienergian siirron (FRET) avulla (Tsuji ym., 2000), mutta taustasignaali saattaa silti jäädä korkeaksi vastaanottajafluoroforin suoran virittymisen ja luovuttajafluoroforin emission takia. Lisäksi lineaaristen koettimien avulla on vaikea erottaa yhden pistemutaation eroa kohteissa (Dirks ym., 2001; Santangelo ym., 2006).

Hybridisoitumattomista koettimista johtuvaa taustasignaalia voidaan tehokkaasti vähentää vaimennettujen oligonukleotidikoettimien avulla. Vaimennetut koettimet ovat lyhyitä DNA-koettimia, jotka sisältävät fluoroforin lisäksi vaimentajamolekyylin (*quencher*). Rakenteellisen tai konformaatioon liittyvän esteen takia fluorofori ja vaimentaja joutuvat tarpeeksi lähelle toisiaan, jolloin vaimentaja hiljentää fluoroforin signaalin. Näin ollen hybridisoitumaton koetin on ”pimeä”, mutta sitoutuessaan kohteensa kanssa koettimen rakenteen tai konformaation muutos erottaa fluoroforin ja vaimentajan, jolloin fluoresenssisignaali palautuu. Vaimennetut oligonukleotidikoettimet voidaan jakaa kahteen kategoriaan sen mukaan, purkautuuko vaimentuminen koettimen konformaatiossa tapahtuvan muutoksen takia (molekyyylimajakat) vai kemiallisen reaktion takia (QUAL-koettimet). Molekyyylimajakoita (*molecular beacons*) käsitellään myöhemmin (ks. kpl 2.3.3). QUAL-koettimet (*quenched auto-ligation probes*) perustuvat koettimien yhdistämiseen autoreaktiivisen kemiallisen sidoksen avulla. Koettimien hybridisoituessa vierekkäin kohteeseensa ensimmäisen koettimen 3'-

päässä oleva nukleofiilinen fosforotioaatti yhdistää koettimet kemiallisesti ja samalla syrjäyttää jälkimmäisen koettimen 5'-päässä olevan vaimentajan, jolloin vaimentajan lähellä, jälkimmäisessä koettimessa, olevan fluoroforin vaimentuminen purkautuu (Xu ym., 2001; Silverman & Kool, 2005).

QUAL-koettimet ovat ehkä vähemmän alttiita muodostamaan epäspesifistä signaalia kuin lineaariset koettimet tai molekyyliajakat, koska signaalin muodostamiseen tarvitaan kemiallinen reaktio. Tällöin esimerkiksi proteiinien sitoutuminen koettiin tai nukleaasien toiminta ei todennäköisesti aiheuta signaalia. Taustasignaalia voi kuitenkin muodostua epätäydellisestä vaimennuksesta, vaimentajan ja fluoroforin erkanemisesta toisistaan nukleaasien hajottaessa niiden väliset nukleotidit sekä erityisesti vaimentajan hitaasta autohydrolyysistä (Silverman & Kool, 2005).

Spesifisten RNA:iden detektio elävissä soluissa vaatii koettimilta suurta spesifisyyttä, herkkyyttä ja kykyä erottaa todellinen signaali taustasta, erityisesti tutkittaessa matalakopiolukuisia RNA:ita ja kliinisiä näytteitä. Lisäksi geneettisten muutosten, kuten mutaatioiden ja deleetioiden, havaitsemiseen vaaditaan kykyä tunnistaa yhden emäksen monimuotoisuuksia (*single nucleotide polymorphisms*, SNPs). On myös toivottavaa, että RNA-taso voidaan määrittää yksittäisestä solusta suurella tarkkuudella. Tämä edellyttää hyvää käsitystä koettimien rakenteen ja toiminnan suhteesta, koettimien stabiliteetista, RNA:n rakenteellisesta dynamiikasta sekä koettimien ja kohteen vuorovaikutuksesta elävissä soluissa. Oleellista on myös pystyä kuljettamaan koettimet tehokkaasti soluun ja määrittämään, mitä vaikutuksia hybridisoituvilla koettimilla on kohde-mRNA:n translaatioon sekä muihin solun normaaleihin prosesseihin. Lisäksi koettimia suunniteltaessa on huolehdittava, että hybridisaatio kohde-RNA:n kanssa ei häiritse transkriptiota, RNA:iden prosessointia ja kuljetusta tai aiheuta kohde-RNA:n hajotusta. Vaikka näitä edellytyksiä on harvoin mahdollista toteuttaa, koettimia ei pidä suunnitella komplementaariseksi ilmiselvien alueiden kanssa, kuten silmukointialuille tai aluille, jotka edesauttavat polyadenylaatiota. On selvää, että olemassaolevia menetelmiä on edelleen kehitettävä ja muokattava, jotta nämä vaatimukset täyttyvät (Dirks ym., 2001; Silverman & Kool, 2005; Santangelo ym., 2006).

2.3. Tutkimuksessa käytettävien menetelmien teoreettinen tausta

2.3.1. Bakulovirukset ja hyönteissoluntuottosysteemi

Bakuloviruksia on jo 1980-luvulta lähtien käytetty rekombinanttisten proteiinien tuottamiseen hyönteissoluissa. Siitä lähtien bakulovirusten avulla hyönteissoluissa on tuotettu esimerkiksi viruksista, bakteereista, kasveista ja eläimistä peräisin olevia proteiineja lähinnä tutkimuksen tarpeisiin (Miller, 1993). Menetelmän avulla saadut tuottotasot ovat usein korkeita verrattuna muihin eukaryoottisiin tuottosysteemeihin. Lisäksi eukaryoottinen hyönteissoluympäristö mahdollistaa muun muassa proteiinien oikeanlaisen laskostumisen, kuljettamisen ja oligomerisoitumisen sekä useimmat samankaltaiset (vaikkakin ei aina identtiset) aidon proteiinin tuottamiseen tarvittavat translaation jälkeiset muokkaukset, kuten proteolyysit, glykosylaatiot, fosforylaatiot jne. (Luckow, 1991; O'Reilly ym., 1992). Sf9-hyönteissoluissa voidaan tuottaa biologisesti aktiivisia avidiinin ja AVR-proteiinien glykosyloituja muotoja (Airenne ym., 1997; Laitinen ym., 2002).

Rekombinanttisten bakulovirusten valmistaminen infektoita varten oli menetelmän alkuaikoina varsin työlästä ja hidasta, mutta useiden teknisten uudistusten myötä alkuperäisten menetelmien aikaa vievistä pullonkauloista, liittyen rekombinanttisten virusten identifiointiin ja eristykseen, on päästy eroon. Nykyisillä menetelmillä virusten valmistaminen onnistuu noin viikossa, mikä on lisännyt menetelmän suosiota (Luckow ym., 1993; Kost ym., 2005).

Rekombinanttisten proteiinien tuottamisen lisäksi bakulovirusten käyttöä on kokeiltu tuhohyönteisten biologisessa torjunnassa (Moscardi, 1999; Lacey ym., 2001). Lisäksi bakulovirusten käyttöä geeniterapiassa ja muissa *in vivo* -sovelluksissa tutkitaan. Bakulovirukset näyttäisivät olevan ominaisuuksiensa puolesta ihanteellisia vektoreita juuri *in vivo* -sovelluksissa, sillä ne eivät pysty replikoitumaan nisäkässoluissa ja niillä on alhainen sytotoksisuus, mutta niiden avulla pystytään tehokkaasti viemään ja ilmentämään geenejä useissa nisäkässolulinjoissa (Shoji ym., 1997; Kost & Condreay, 2002). Menetelmän *in vivo* -käyttöä vaikeuttavat ihmisen komplementtisysteemi, joka aktivoituu nopeasti ja inaktivoi systeemissä verenkierrossa olevat virukset, sekä bakulovirusten ohimenevä (*transient*) ekspressio. Ongelmia on pyritty ratkaisemaan monin eri tavoin (Hofmann & Strauss, 1998; Kost & Condreay, 2002).

2.3.1.1. *Baculovirusten biologiaa*

Baculovirukset ovat hyvin laajalti levinnyt virusryhmä, joka infektoi lajispesifisesti niveljalkaisia (*Arthropoda*); pääsääntöisesti hyönteisten lahkoihin perhoset (*Lepidoptera*), pistiäiset (*Hymenoptera*) sekä kaksisiipiset (*Diptera*) kuuluvia lajeja. Baculovirukset voidaan jakaa kahteen sukuun, nukleopolyhedroosivirukset (NPV) ja granulovirukset (GV), niiden muodostamien okkluusiorakenteiden morfologian perusteella. Nukleopolyhedroosivirukset tuottavat infektoitujen hyönteissolujen tumissa suurina okkluusiorakenteita, joiden sisällä on useita virioneja pakkautuneena kiteisen proteiinimatriksin sisälle. Granulovirussuvun partikkeleiden sisällä on vain yksi virioni, ja niitä tavataan ainoastaan *Lepidoptera*-lahkon lajeilla (Miller, 1997).

Baculovirusten virionit ovat rakenteeltaan sauvamaisia ja kooltaan 40–50 nm leveitä ja 200–400 nm pitkiä. Niiden genomi muodostuu kaksinauhaisesta sirkulaarisesta DNA:sta, joka on 88–200 kb:n mittainen (O'Reilly ym., 1992). Baculoviruksiksi luokiteltuja viruksia tunnetaan yli 500, joista alle kolmenkymmenen genomi on sekvensoitu (Jehle ym., 2006). Intensiivisimmin on tutkittu alun perin *Autographa californica*:sta eristettyä AcMNPV-virusta (*Autographa californica* multiple nuclear polyhedrosis virus), jonka hyödyntämiseen perustuvat useimmat käytetyt tuottovektorit (O'Reilly ym., 1992).

AcMNP:n lisääntymissyklin aikana tuotetaan kahta erilaista infektiivistä virusmuotoa: niin sanottuja okkluusioperäisiä viruksia (*occlusion derived virus*, ODV) ja silmikoituvia viruksia (*budded virus*, BV, myös *extra-cellular virus* eli EV). Okkluusiovirukset muodostuvat suurista kiteisistä polyhedriinimatrikseista, jotka sisältävät useita viruspartikkeleita. Polyhedriinimatriksia ympäröi lisäksi lipidivaippa, joka on saatu jo partikkeleiden kokoamisvaiheessa tumassa. Okkluusioperäisten virusten tehtävänä on levittää virusta hyönteisyksilöstä toiseen kontaminoituneen ravinnon välityksellä (horisontaalinen transmissio), jolloin kiteinen polyhedriinimatriksi on tarpeen suojaamaan virusta ympäristössä. Joutuessaan viruksen syöneen hyönteisen ruuansulatuksen alkaaliseen ympäristöön polyhedriinimatriksi hajoaa vapauttaen ODV-virionit. Nämä ensimmäisen aallon virionit ovat hyvin tehokkaita tartuttamaan hyönteisen suoliston epiteelisoluja. Primaarisen virusinfektion seurauksena syntyy BV-viruksia, jotka ovat erikoistuneet levittämään infektiota solusta soluun ja edelleen kudoksesta toiseen hyönteisen hemolymfan välityksellä. Niiden tehtävänä on levittää infektiota systeemiseksi. Jokainen BV-partikkeleiden infektoima solu tuottaa suuria määriä ODV-virioneja, jotka vapautuvat solulyysin yhteydessä. BV-partikkelit

koostuvat yksittäisistä viruskapseleista, joita ympäröi oma isäntäsolun solukalvosta silmukoituessa saatu lipidivaippa. Toisin kuin okklusioperäisillä viruksilla, silmukoituvilla viruksilla ei ole polyhedriinimatriksia eivätkä ne selviydy elossa isäntäorganismien ulkopuolella (Miller, 1997). Viljeltyjä soluja infektoitaessa käytetään rekombinanttisia BV-partikkeleita.

2.3.1.2. *Bakulovirusinfektion vaiheet*

Viruspartikkeleiden soluunpääsyn kaikkia vaiheita ei toistaiseksi tunneta, eikä myöskään olla täysin selvillä siitä, miten viruksen kapsidi päätyy solun tumaan. Solukalvon läpi viruspartikkelit pääsevät todennäköisesti endosytoosin välityksellä. Endosomin happamoituminen saa aikaan viruksen vaipan ja endosomin kalvon fuusion, joka vapauttaa nukleokapsidin sytoplasmaan. Viruksen kapsidi kuljetetaan tämän jälkeen tumaan (Miller, 1997). Ensimmäiset viruksen koodaamat RNA-molekyylit voidaan havaita noin puolen tunnin kuluttua infektion alkamisesta (Chisholm & Henner, 1988).

AcMNPV:n infektiocykli voidaan jakaa kolmeen vaiheeseen: aikainen vaihe, myöhäinen vaihe ja erittäin myöhäinen vaihe. Aikainen vaihe edeltää virus-DNA:n replikaatiota, ja sen aikana transkriptoidaan replikaatiossa sekä myöhäisten geenien ilmentymisen säätelyssä tarvittavia geenejä (O'Reilly ym., 1992). Aikaisten geenien transkriptiosta vastaa isäntäsolun RNA-polymeraasi II, ja geenien ilmentymistä lisäävät bakuloviruksen *trans*-aktivoivien geenituotteiden, kuten IE-1:n, sitoutuminen toistuviin *cis*-aktiivisiin kohdesekvensseihinsä (*hr:t*) viruksen genomissa (Passarelli & Miller, 1993). Siirtyminen myöhäiseen vaiheeseen osuu ajallisesti yhteen virus-DNA:n replikaation kanssa, joka tapahtuu noin 6 tuntia infektion jälkeen. Myöhäisen vaiheen aikana ilmennetään rakenneproteiineja koodaavia geenejä sekä BV-partikkeleiden tuottoon ja silmukoitumiseen osallistuvia geenejä (O'Reilly ym., 1992). Erittäin myöhäinen vaihe alkaa noin 20 tunnin kuluttua infektiosta ja jatkuu aina 72 tuntiin asti. Erittäin myöhäisessä vaiheessa ilmennetään okklusiospesifisiä geenejä (erityisesti polyhedriini ja p10), jotka osallistuvat ODV-partikkeleiden muodostamiseen. ODV-partikkeleiden tuottaminen alkaa noin 18–24 tuntia infektion jälkeen (O'Reilly ym., 1992). Myöhäisen ja erittäin myöhäisen vaiheen geenit transkriptoidaan uudenlaisen, viruksen indusoiman polymeraasin toimesta (Beniya ym., 1996), mutta transkriptio on kuitenkin riippuvaista aikaisen vaiheen geenituotteista sekä virus-DNA:n replikaatiosta (Rice & Miller, 1986).

Nykyiset bakuloviruksiin perustuvat tuottovektorit perustuvat useimmiten voimakkaan polyhedriinigeenin (*polh*) korvaamiseen halutulla, heterologista proteiinia koodaavalla cDNA:lla tai geenillä, jossa ei ole introneita. Tällöin okklusioviruksia ei tuoteta infektion yhteydessä lainkaan, mutta infektiio etenee soluviljelmässä normaalisti BV-partikkeleiden välityksellä. BV-partikkeleiden tuotannossa muutoksia ei juuri havaita, sillä polyhedriini-promoottorin aktivoituessa erittäin myöhäisen infektiiosyklin vaiheessa suurin osa BV-partikkeleista on jo tuotettu. Hyönteissoluissa voidaankin tuottaa jopa soluille haitallisia proteiineja ilman, että se vaikuttaa virustuotantoon. Vieraan insertin deleetiolle ei tällöin ole valintapainetta (Miller, 1997).

2.3.1.3. Bakulovirustuottovektoreiden valmistaminen

Rekombinanttisia bakuloviruksia ei voida tuottaa perinteisin plasmidikloonaustekniikoin lähinnä siksi, että AcMNPV:n genomi on liian suuri (130 kb) ja se sisältää useimpien tunnettujen restriktioentsyymien tunnustuskohtia. Perinteisesti ongelma on ratkaistu kaksivaiheisesti. Ensin rakennetaan siirtäjävektoriin ekspressiokasetti (sopiva promoottori, vieras geeni ja terminaatio-signaali), jonka molemmilla puolilla sijaitsevat fragmentit viruksen genomista. Seuraavaksi siirtäjävektori ja virusgenomi kotransfektoidaan hyönteissoluihin, joissa geeni insertoituu viruksen genomiin homologisen rekombinaation seurauksena. Yleensä fragmentit valitaan esimerkiksi molemmilta puolilta *polh*-lokuksesta, jolloin homologinen rekombinaatio tapahtuu tähän lokukseen, polyhedroosipromoottorin säätelyn alle (Davies, 1994).

Rekombinanttiset virukset voidaan tunnistaa muuntuneen plakkimorfologian perusteella, sillä niissä ei tuoteta lainkaan okklusioviruksia. Tyypillisesti vain noin 0.1–1 %:ia homologisella rekombinaatiolla syntyvistä viruksista on rekombinanttisia, jolloin rekombinanttisten virusten erottelu villityypin viruksista edellyttää toistuvia plakkipuhdistuksia. Tämä on hidasta ja työlästä, minkä takia prosessia on yritetty nopeuttaa ja helpottaa monin keinoin (Davies, 1994).

Tässä työssä käytetty tapa valmistaa rekombinanttisia bakuloviruksia perustuu kohdennettuun transposiioon *Escherichia coli* -soluissa (Luckow ym., 1993). Bakulovirusgenomin *polh*-lokukseen on liitetty mini-F-replikoni, jolloin se kykenee replikoitumaan itsenäisesti *E. coli* -soluissa isona plasmidina, bakmidina. Lisäksi lokukseen on lisätty *lacZ*-geeni sekä *attTn7*-sekvenssi, joka toimii transposoni Tn7:n kohteena. Haluttu geeni kloonataan siirtäjävektoriin, jonka ekspressiokasetin päissä on Tn7-transposonialueet. Kun valmiilla siirtäjävektorilla transformoidaan *E. coli* -soluja,

siirtyy ekspressiokasetti siirtäjävektorista bakmidin *attTn7*-kohtaan. Transpositiossa tarvittavat *trans*-aktiiviset proteiinit tuotetaan avustajaplasmidista, joka on valmiina transformoitavissa *E. coli* -soluissa. Rekombinanttisten bakulovirusten eristäminen tapahtuu *lacZ*-geeniin perustuvan väriselektion avulla. Bakmidiin transpositiolla siirtynyt insertti rikkoo *lacZ*-geenin ilmentymisen, jolloin rekombinanttisia viruksia sisältävät bakteerit tuottavat valkoisia pesäkkeitä sinisten sijaan. Menetelmä on nopea (7–10 vuorokautta), eikä työläitä plakkipuhdistuksia tarvita.

2.3.2. qRT-PCR

Kvantitatiivisen RT-PCR:n (*quantitative reverse transcription PCR*, *qRT-PCR*) avulla PCR-tuotteen monistusreaktiota voidaan seurata reaaliajassa, mikä myös mahdollistaa näytteessä olevan tuotteen kvantitoinnin. Nykyään kvantitatiivisia RT-PCR -laitteita löytyy useilta eri valmistajilta, ja ne eroavat toisistaan pääasiassa eksitaatio- ja emissioaallonpituuksien, nopeuden sekä yhtä aikaa ajettavien reaktioiden lukumäärän osalta (Kubista ym., 2006). Lisäksi reaktiosäiliöt eroavat. Suosituin muoto on 96-kuoppalevy, joita voidaan käyttää Applied Biosystems'in 7300- ja 7500-laitteissa, Bioneerin Exicyclerissa, useissa BioRadin laitteissa (Chromo4, DNAEngine opticon, iCycler, iQ, MyiQ sekä iQ5), Eppendorfin RealPlex-laitteessa, Stratagenen Mx3000-, Mx3005p- ja Mx4000-laitteissa sekä Techneen Quantica-laitteessa. Markkinoilla on myös jo kaksi 384-kuoppalevyjä käyttävää laitetta: ABI PRISM 7900HT (Applied Biosystems) sekä LightCycler 480 (Roche) (Kubista ym., 2006). Johtuen tutkielman sisällöstä, jatkossa keskitytään kuitenkin lähinnä Roche'n LightCycler 1.5 -laitteen käsittelyyn.

2.3.2.1. *LightCycler*[®] 1.5 Instrument

LightCycler[®] 1.5 Instrument -laitteessa (Roche Diagnostics, Mannheim, Saksa) määrittäminen tapahtuu ohuissa lasikapillaareissa, pienessä tilavuudessa (5–20 µl). Roottorimaisessa karusellissa olevia kapillaareja lämmitetään ja jäähdytetään kiertävän ilmavirran avulla. Karuselliin mahtuu korkeintaan 32 kapillaaria kerralla. Laitteessa on sinistä valoa emittoiva diodi eksitaatiota varten, jonka emissiomaksimi on 470 nm:ssä. Detektiota varten laitteessa on kolme fotodiodia erilaisilla aallonpituusfilttereillä varustettuna (530 nm, 640 nm ja 710 nm), mikä mahdollistaa erilaisilla fluoresenssispektreillä varustettujen koettimien käytön (Wittwer ym., 1997). Käytännössä kvantitatiivisen RT-PCR:n monistusreaktiot, lämmitys- ja jäähdytyssykleineen, ovat toiminnaltaan samanlaiset kuin tavallisessa PCR:ssä (Kubista ym., 2006).

2.3.2.2. Detektiomenetelmät

Määrittämissä voidaan käyttää kaksijuosteiseen DNA:han sitoutuvaa leima-ainetta (*SYBR Green I*), hydrolysoituvia koettimia ("*TaqMan*" *Probes*) sekä hybridisoituvia yksöis- tai kaksoiskoettimia (*SimpleProbe* ja *HybProbe*). Hybridisoituvien kaksoiskoettimien protokolla voidaan lisäksi muokata sopivaksi muille koetinmenetelmille, kuten molekyylijakoille (*molecular beacons*), skorpioneille (*Scorpions*TM) ja iFRET-koettimille (*Bi-Probes*) (Bustin, 2000; Thelwell ym., 2000; Howell ym., 2002).

Määrittäminen LightCycler[®] 1.5 -laitteella voidaan suorittaa joko suhteellisesti referenssi-geenin avulla tai absoluuttisesti. Tässä tutkielmassa käytettiin absoluuttista kvantitointia ulkoisen standardin avulla, joka on mahdollista suorittaa vain SYBR Green I -väriä tai kaksoiskoettimia ja niiden protokollaan mukautettuja koettimia käyttäen (Technical Notes No. LC 18/2004 ja LC 11/2003, Roche Diagnostics).

SYBR Green I -menetelmässä fluoresenssileima kiinnittyy DNA-kaksoiskierteen pieneen uurteeseen. Liuoksessa oleva sitoutumaton väriaine ei juuri fluoresoi, mutta sitoutuessaan DNA:han fluoresenssisignaali vahvistuu huomattavasti. Tästä seuraa, että reaaliajassa monitoroitaessa fluoresenssisignaali (mitataan 530 nm:ssä) lisääntyy synteesivaiheen aikana ja vähentyy, kun värimolekyylit irtoavat denaturaatiovaiheen aikana. Fluoresenssi mitataan joka elongaatiovaiheen lopussa, jotta monistuneen DNA:n määrää voidaan seurata. Koska menetelmän spesifisyys määräytyy ainoastaan hyvin suunniteltujen alukkeiden varaan, on monistusreaktioon aiheellista liittää sulamiskäyräanalyysi (Ririe ym., 1997). Sulamiskäyräanalyysin avulla voidaan tarkastaa, että oikeaa tuotetta on syntynyt (Morrison ym., 1998).

Hybridization Probes -menetelmässä reaktioseos sisältää kaksi eri oligonukleotidiä, jotka hybridisoituvat peräkkäin monistettavassa fragmentissa olevaan sekvenssiin annealing-vaiheen aikana. Ensimmäisen koettimen (luovuttaja) 3'-pää on leimattu fluoreseiinilla (*fluorescein*) ja toisen koettimen (vastaanottaja) 5'-pää on leimattu LightCycler Red640 -fluoroforilla. Vastaanottajakoettimen 3'-pää on lisäksi fosforyloitu, ettei koetinta voida käyttää alukkeena syklien aikana. Kun koettimet hybridisoituvat kohdesekvenssiin lähelle toisiaan, fluoreseiini virittyy LightCycler-laitteen eksitaatiovalon avulla ja siirtää osan virittymisenergiastaan LightCycler Red fluoroforille. Tapahtumaa kutsutaan fluoresenssin resonanssienergian siirroksi (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*, FRET). LightCycler Red -fluoroforista emittoitua fluoresenssiä mitataan. Detektiomenetelmät, joissa käytetään sekvenssi-

spesifisiä fluoresenssileimattuja koettimia, ovat erittäin spesifisiä, sillä fluoresenssi-signaali kasvaa ainoastaan silloin, kun spesifistä kohdetta on läsnä reaktioliuoksessa. Siksi monistunutta tuotetta ei yleensä tarvitse identifioida sulamiskäyräanalyysin avulla (Wittwer ym., 1997).

2.3.2.3. Kynnysarvo (C_p)

Tarkka ja toistettava kvantitointi fluoresenssipohjaisella qRT-PCR:llä perustuu kynnysarvon (*crossing point*, C_p) käsitteeseen. Fluoresenssiarvot mitataan jokaisen kierroksen aikana, ja ne edustavat monistetun tuotteen määrää siihen vaiheeseen mennessä monistusreaktiota. Mitä enemmän näytteessä on templaattia reaktion alussa, sitä vähemmän monistuskierroksia tarvitaan saavuttamaan kohta, jossa fluoresenssi-signaali ensimmäisen kerran, tilastollisesti merkittävästi, ylittää taustasta johtuvan fluoresenssin. Tämä kohta määritellään kynnysarvoksi, ja se sijaitsee aina eksponentiaalisen kasvun (log-linearisessa) vaiheessa. Näytteiden kvantitoinnissa otetaan huomioon vain eksponentiaalisen kasvun vaiheessa mitatut fluoresenssiarvot, minkä takia kvantitointiin ei vaikuta reaktiokomponenttien loppuminen reaktion myöhäisemmässä tasankovaiheessa (*plateau phase*). Eksponentiaalinen kasvun vaiheessa tapahtuva monistuminen lasketaan teoreettisesti kaavalla 1, ja se on riippuvaista näytteen alkuperäisestä määrästä (N_0) ja monistustehokkuudesta (E).

$$N = N_0 \times (E_{\text{vakio}})^n, \text{ jossa} \quad (1)$$

N = molekyylien lukumäärä tietyn syklin aikana
 N_0 = molekyylien alkuperäinen lukumäärä
 n = monistussyklien lukumäärä
 E = monistustehokkuus (pysyy vakiona)

Monistustehokkuus kuvaa PCR:n kinetiikkaa reaktion aikana, ja se voidaan laskea kulmakertoimen (*slope*) avulla kaavalla 2. Maksimaalinen monistustehokkuus on kaksi, jolloin jokainen monistettava tuote kahdentuu jokaisen syklin aikana. Todellisuudessa PCR-tehokkuus kuitenkin vaihtelee näytteiden välillä. Eroja PCR-tehokkuuteen aiheuttavat muun muassa monistettavan sekvenssin ominaisuudet (korkea GC-pitoisuus ja pituus) sekä näytteen laatu. Standardien ja näytteiden monistustehokkuuksien on oltava identtiset, kun näytteitä kvantifioidaan ulkoisen standardin avulla.

$$E = 10^{-1/\text{slope}} \quad (2)$$

Kynnysarvo mitataan jokaiselle näytteelle, ja se voidaan muuttaa kvantitatiiviseksi tuloksiksi standardikäyrän avulla. LightCycler[®]-menetelmässä reportterifluoroforin emissiosignaali normalisoidaan jollakin muulla kolmesta fluoroforista saadulla signaalilla. Normalisointi korjaa fluoresenssisignaalin ilmenevää pientä vaihtelua, joka johtuu reaktioseosten tilavuuksissa ja pitoisuuksissa olevista eroista (Bustin, 2000; Technical Note No. LC 11/2003, Roche Diagnostics).

2.3.2.4. Standardisuora

Kvantitatiivinen määrittäminen voidaan suorittaa joko suhteellisesti tai absoluuttisesti. Suhteellisen määrittämisen avulla voidaan selvittää geenin ilmentymisen tasapainotilassa ilmenevät muutokset. Suhteellinen standardi muodostetaan referenssisekvenssin avulla, jonka pitoisuus ja pituus tiedetään. Referenssisekvenssistä tehdään laimennossarja, joiden yksiköt ovat mielivaltaiset. Suhteellisen qRT-PCR-määrittämisajan aikana monistettavan kohteen Cp-arvoa verrataan referenssisekvenssin Cp-arvoon ja tulokset ilmaistaan suhteessa referenssigeeniin (Bustin, 2000).

Absoluuttisen määrittämisavun avulla näytteelle voidaan selvittää tarkka arvo, kuten kopyoluku solua, totaali-RNA-pitoisuutta tai kudoksen massayksikköä kohti. Määrittäminen edellyttää absoluuttisen standardisuoran valmistamista jokaista yksittäistä monistettavaa fragmenttia kohti, jotta tarkkuus käänteiskopioinnissa ja monistustehokkuudessa voidaan varmistaa. Absoluuttinen määrittäminen perustuu näytteessä olevan tuntemattoman nukleinihapon monistumisen vertaamiseen samasta kohdesekvenssistä tehtyyn standardisuoraan (homologinen standardi), jonka pitoisuus tiedetään. Tyypillisesti standardisuora muodostetaan viiden näytteen laimennossarjana kantaliuoksesta. Laimennokset monistetaan tuntemattomien näytteiden kanssa samassa LightCycler[®]-ajossa, mutta eri kapillaareissa. Standardisuora on monistuskierrosten lukumäärän ja standardinäytteen pitoisuuden logaritmin funktiosta saatu lineaarinen regressiosuora. Tarkka määrittäminen edellyttää, että standardien ja tuntemattomien näytteiden monistustehokkuus on samankaltainen. Jos ulkoisena standardina ei voida käyttää määritettävälle sekvenssille homologista sekvenssiä, on monistustehokkuuden oltava muuten identtinen (Bustin, 2000; Technical Note No. LC 11/2003, Roche Diagnostics).

2.3.3. Molekyyylimajakat

2.3.3.1. Perinteiset molekyyylimajakat

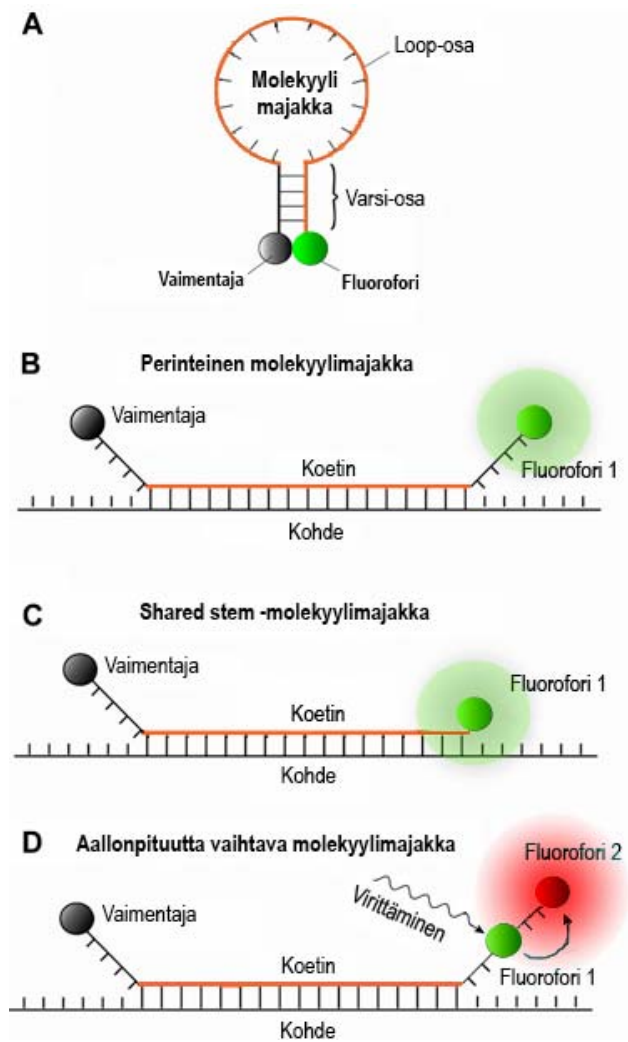
Molekyyylimajakat (*molecular beacons*) kehitettiin aluksi nukleiinihappojen reaaliaikaisia monistusmäärittäjiä varten (Tyagi, Kramer 1996), mutta niiden avaamat lupaavat tutkimusnäkökulmat *in situ* -koettimina ymmärrettiin nopeasti. Molekyyylimajakka on kaksoisleimattu oligonukleotidi, jonka toiseen päähän on kovalenttisesti kiinnitetty fluorofori ja toisessa päässä on fluoresenssin vaimentaja (*quencher*). Kun molekyyylimajakka ei ole sitoutuneena kohdesekvenssiin, se muodostaa ”stem-loop”-hiuspinnirakenteen. Tällöin koettimien päissä olevat leimat joutuvat lähelle toisiaan, mikä johtaa fluoroforin vaimentamiseen. Hybridisaatio komplementaarisen ja antiparalleelin kohteen kanssa johtaa rakenteen avautumiseen, jolloin leimat joutuvat etäälle toisistaan. Tämä johtaa fluoresenssisignaalin voimakkaaseen kasvuun.

Optimaalisissa olosuhteissa perinteisten molekyyylimajakoiden fluoresenssin intensiteetti voi lisääntyä yli 200-kertaisesti hybridisaation yhteydessä (Tyagi & Kramer, 1996). Voimakas intensiteetin lisääntyminen johtuu pikemminkin erityisen vähäisestä taustafluoresenssista kuin siitä, että fluoresenssi olisi poikkeuksellisen kirkas. Kilpailu suljetun hiuspinnirakenteen ja kohteeseen hybridisoituneen muodon välillä parantaa molekyyylimajakkan spesifisyyttä verrattuna lineaarisiin koettimiin. Toisin sanoen, hiuspinnirakenne toimii energiaesteenä molekyyylimajakkan avautuessa. Lisäksi sitoutuneet ja sitoutumattomat koettimet voidaan erottaa suoraan vaimennetun ja fluoresoivan tilan välisenä muutoksena. Kohteen tunnistaminen muutetaan siis tehokkaasti fluoresenssisignaaliksi, joka on paitsi spesifinen myös herkkä ja aiheuttaa vain vähäistä taustafluoresenssia (Tyagi ym., 1998; Tsourkas ym., 2003).

Perinteinen molekyyylimajakka rakentuu silmukka- (*loop*) ja varsiosasta (*stem*) sekä fluoroforista ja vaimentajasta (ks. kuva 2.1 A). Fluorofori ei vaikuta hiuspinnirakenteeseen (Refregiers ym., 1996), minkä takia silmukkaosa voi vapaasti hybridisoitua kohdesekvenssin kanssa. Silmukka on yleensä 15–25 nukleotidia pitkä, ja se valitaan kohdesekvenssin ja sulamislämpötilan perusteella. Kahdesta toisilleen komplementaarista sekvenssistä koostuva varsiosa on tyypillisesti 4–6 nukleotidin pituinen, ja se suunnitellaan yleensä erilliseksi kohdesekvenssistä. Molekyyylimajakat voidaan kuitenkin suunnitella myös ”*shared-stem*”-tyyppisiksi, joissa fluoroforin puoleinen pää osallistuu sekä varren muodostamiseen että hybridisaatioon kohteen

kanssa. Tällöin molekyylijalkan vaimentajan puoleinen pää osallistuu vain varren muodostamiseen (ks. kuva 2.1.C) (Tsourkas ym., 2002).

Silmukan ja varren pituudet sekä sekvenssit ovat kriittisimpiä muututtuja molekyylijalkoita suunniteltaessa, sillä juuri ne pääasiassa määräävät kuinka monta molekyylijalkaa on sitoutuneena kohteeseen tietyssä lämpötilassa (Tsourkas ym., 2003). Käytännössä silmukan osan pituus valitaan niin, että se muodostaa stabiilin sidoksen kohdesekvenssin kanssa analyysilämpötiloissa, ja varren pituus valitaan niin, että rakenne on stabiili ilman kohdetta (Marras ym., 2006). Silmukan sekvenssin valintaa taas rajoittaa monissa tutkimustilanteissa sovelluksen kohdespesifiset seikat, kuten tutkittavan SNP:n (*single nucleotide polymorphism*) ympärillä oleva sekvenssi. Lisäksi molekyylijalkan on päästävä sitoutumaan kohdesekvenssiin, mikä vaatii perustietämystä kohde-RNA:n sekundaarirakenteesta ja RNA–proteiinivuorovaikutuksista. Silmukan ja varren pituudet voidaan kuitenkin hyvin pitkälle optimoida sovelluksen toiminnan mukaan, olipa tärkein päämäärä sitten hybridisaatio-kinetiikka tai spesifisyys (Santangelo ym., 2006).



Kuva 2.1. Molekyylijalkoita. (A) Molekyylijalka on hiuspinnirakenteinen kaksoisleimattu oligonukleotidi, jonka toisessa päässä on fluorofori ja toisessa fluoresenssin vaimentaja. (B) Perinteinen molekyylijalka on suunniteltu niin, että varren komplementaariset puolet eivät osallistu hybridisaatioon kohteen kanssa. (C) ”shared-stem”-molekyylijalkassa varren fluoroforin puoleinen pää osallistuu sekä varren muodostamiseen että hybridisaatioon kohteen kanssa. (D) Aallonpituutta vaihtava molekyylijalka sisältää vaimentajan sekä kaksi fluoroforia, joista ensimmäinen absorboi valoenergiaa ja toinen emittoi valoa tietyllä aallonpituudella. Kahden fluoroforin välillä tapahtuu FRET. Kuva on muokattu lähteestä (Santangelo ym., 2006).

Molekyyylimajakoiden avulla pystytään erottelemaan jopa yhden nukleotidin muutokset kahden sekvenssin välillä (Bonnet ym., 1999; Tsourkas ym., 2003). Korkean spesifisyytensä vuoksi perinteisiä molekyyylimajakoita onkin alkuperäisen kehittämis-kohteensa lisäksi hyödynnetty jo laajasti monissa biologian ja biolääketieteen sovelluksissa, kuten reaaliaikaisissa entsyymaattisissa halkaisuanalyyseissä (Li ym., 2000b), syöpäsolujen kuvantamisessa ja tutkimuksessa (Medley ym., 2005; Peng ym., 2005), proteiini–DNA-interaktioiden tutkimisessa (Li ym., 2000a), kvantitatiivisessa PCR:ssä (Manganelli ym., 1999), genotyypauksessa ja mutaatiotutkimuksessa (Vet ym., 2002) sekä geeni-ilmentymisen tutkimisessa elävissä soluissa (Sokol ym., 1998; Bratu ym., 2003; Peng ym., 2005).

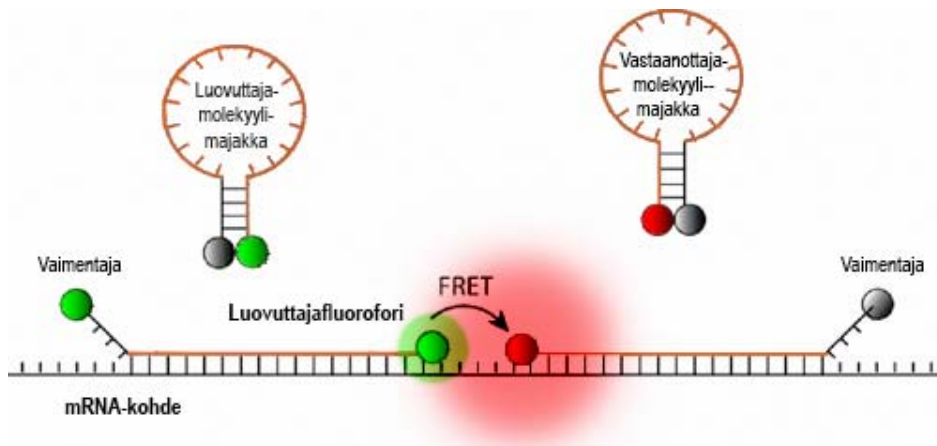
2.3.3.2. *Aallonpituutta vaihtavat molekyyylimajakat*

Uudempaa suunnittelua edustavat aallonpituutta vaihtavat molekyyylimajakat (Tyagi ym., 2000). Tässä sovelluksessa molekyyylimajakkaan on kiinnitetty kaksi fluoroforia: ensimmäiseksi on fluorofori, joka absorboi voimakkaasti yksivärisen valonlähteen aallonpituusalueella, ja toiseksi on fluorofori, jonka emittoima haluttu aallonpituus on seurausta fluoresenssin resonanssienergian siirrosta ensimmäiseltä fluoroforilta toiselle (ks. kuva 2.1 D). Tämä mahdollistaa myös useamman värin käytön, mistä on hyötyä esimerkiksi monia kohteita sisältävien näytteiden detektiossa. Aallonpituutta vaihtavat molekyyylimajakat voivat olla huomattavasti kirkkaampia kuin sellaiset perinteiset molekyyylimajakat, joiden fluorofori ei absorboi tehokkaasti valonlähteen energiaa. Aallonpituutta vaihtavia molekyyylimajakoita ei ole tätä kirjoitettaessa vielä käytetty RNA-detektioon elävissä soluissa (Silverman & Kool, 2005). Lisäksi aivan uutta muotoilua edustavat molekyyylimajakat, jossa on kolme fluoroforia (Li ym., 2006). Niiden tuottama signaali perustuu energiansiirtokaskadiin, joka muodostaa tunnusomaisen kaikkien kolmen fluoroforin emissioiden suhteesta muodostuvan fluoresenssiyhdistelmän.

2.3.3.3. *Kaksoismolekyyylimajakat*

Suurin haaste perinteisten molekyyylimajakoiden käytössä geenien ilmentymisen tutkimisessa elävissä soluissa ovat väärät positiiviset signaalit, joita aiheuttavat erityisesti molekyyylimajakoiden mahdollinen hajoaminen nukleaasien toimesta sekä aukeaminen niihin epäspesifisesti vuorovaikuttavien proteiinien takia. Uudemmassa kaksoismolekyyylimajakka-FRET-sovelluksessa (*dual FRET molecular beacons*) käytetään kahta molekyyylimajakkaa (kuva 2.2), jotka muodostavat fluoresenssin

resonanssienergian siirtoparin sitoutuessaan peräkkäin spesifiseen kohteeseensa (Santangelo ym., 2004).



Kuva 2.2. Kaksoismolekyylimajakka-FRET-menetelmän periaate. Luovuttaja- ja vastaanottajamolekyylimajakoiden hybridisaatio vierekkäisille alueille samassa kohde-mRNA:ssa sekä luovuttajafluoroforin eksitaatio saavat aikaan fluoresenssin resonanssienergian siirron fluoroforien välille. Mitattava FRET-signaali syntyy vain kun kummatkin molekyylimajakat ovat sitoutuneena kohteeseen, mikä vähentää merkittävästi vääristä positiivisista aiheutuvaa taustasignaalia sekä lisää menetelmän spesifisyyttä. Kuva on muokattu lähteestä (Santangelo ym., 2004).

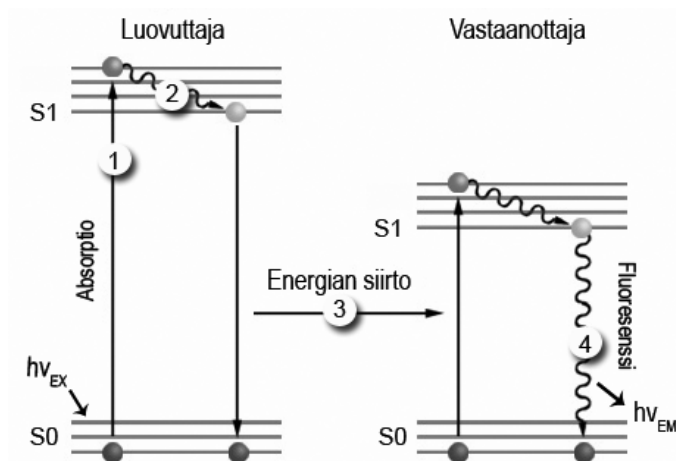
Kaksoismolekyylimajakat suunnitellaan niin, että ne sitoutuvat yksinuhaiseen nuleiinihappokohteeseen vierekkäisille alueille, jolloin luovuttajafluorofori (luovuttajakoettimen 5'-päässä) ja vastaanottajafluorofori (vastaanottajakoettimen 3'-päässä) joutuvat riittävän lähelle toisiaan. Näin ollen mitattavissa oleva FRET-signaali syntyy vain, kun kummatkin molekyylimajakat ovat sitoutuneena kohteeseen, mikä vähentää merkittävästi vääristä positiivisista aiheutuvaa taustasignaalia sekä lisää menetelmän spesifisyyttä (Santangelo ym., 2006). Lisäksi ”shared-stem”-muotoilun avulla luovuttaja- ja vastaanottajafluoroforin välinen etäisyys ja orientaatiot saadaan vakioksi ja FRET-tehokkuus paremmaksi (Tsourkas ym., 2002). Kaksoismolekyylimajakka-FRET-menetelmää on tätä kirjoittaessa käytetty mRNA-molekyylien lokalisointitutkimiseen reaaliajassa elävissä soluissa (Bratu ym., 2003; Santangelo ym., 2004; Santangelo ym., 2005). Lisäksi menetelmästä on kehitetty uusi muunnos DNA:han sitoutuvien proteiinien detektioon (Dummitt & Chang, 2006).

Vaikka kaksoismolekyylimajakoiden detektioherkkyys voi olla suurempi kuin perinteisten molekyylimajakoiden, joudutaan kaksoismolekyylimajakamenetelmässä kuljettamaan kaksinkertainen määrän koettimia soluihin. Lisäksi kahdelta koettimelta kuluu pidempi aika kohteen löytymiseen ja hybridisaatioon. Siksi sovelluksissa, joissa

nopea detektio (noin 30 min.) on tärkeää, voi perinteisten molekyyliajakoiden käyttäminen olla sopivampaa (Santangelo ym., 2004).

2.3.3.4. Fluoresenssi

Viime vuosikymmenen aikana on kehitetty useita erilaisia fluoresoivia hybridisoivia koettimia. Vaikka fluoresenssin muodostumismekanismi erilaisissa koettimissa vaihtelee, sisältävät ne aina ainakin yhden molekyylin, fluoroforin, jolla on kyky absorboida valoenergiaa, muuntaa energia sisäisesti ja emittoida energia valona, fluoroforille tunnusominaisella aallonpituudella. Fluoresenssin mekanismi on esitetty



Kuva 2.3. Fluoresenssin mekanismi. Kuvan numerointi vastaa tekstiä. Kuva on muokattu osoitteesta (mekentosj.com/science/fret/fret.html).

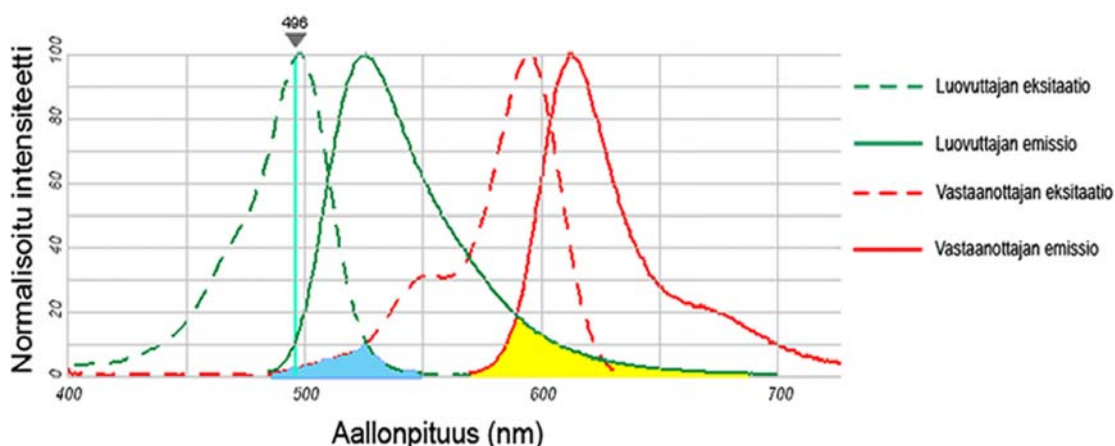
kuvassa 2.3. Valoenergian (fotonin) absorptioon seurauksena fluorofori virittyy korkeampaan singlettitilaan (1). Seuraavaksi osa virittymisenergiasta poistuu lämpönä, jolloin fluorofori palautuu alimmalle singlettitilan virittymistasolle (2). Alin singlettitilan virittymistaso on suhteellisen stabiili. Virittyneen tilan kesto on tyypillisesti 1–10 nanosekuntia. Singlettitilan alim-

malta virittymistasolta fluorofori voi palautua perustilaan joko valosäteilyn (4) tai säteilemättömän energiansiirron avulla (3). Virittyneeltä singlettitasolta emittoituvaa valoa kutsutaan fluoresenssiksi (4). Koska prosessissa menetetään energiaa lämpönä, emittoituvan fluoresenssifotonin energia ($h\nu_{EM}$) on matalampi kuin eksitoivan fotonin energia ($h\nu_{EX}$), ja siksi emissioaallonpituus on pidempi kuin eksitaatioaallonpituus (Marras, 2006).

Molekyyliajakat voidaan leimata millä tahansa halutulla fluoroforilla, sillä käytettävän fluoroforin valinta ei yleensä ole niin ratkaisevaa kuin molekyyliajakakan rakenteen suunnittelu. Harkittu fluoroforin valinta voi kuitenkin parantaa signaalin ja taustan suhdetta sekä kanavointikykyä (Tsourkas & Bao, 2003). Fluoroforien huolellisella valinnalla voidaan välttää vastaanottajafluoroforin suora virittyminen luovuttajafluoroforin eksitaatioaallonpituudella ja minimoida luovuttajan emissiosignaali vastaanottajan aallonpituudella. FRET-pareiksi soveltuvia fluoroforeja ovat esimerkiksi

Cy3 (luovuttaja) ja Cy5 (vastaanottaja), TMR ja Texas Red sekä Fluoreseiini (FAM) ja Cy3 (Santangelo ym., 2006).

Tässä tutkimuksessa luovuttajana käytettiin Oregon Green 488[®] -fluoroforia (2',7'-difluorofluorescein) ja vastaanottajana Texas Red-X[®] -fluoroforia. Oregon Green 488[®] on uudempi vaihtoehto fluoreseiinille (*fluorescein*). Sillä on fluoreseiinia parempi kestävyys valovalkaisua (*photobleaching*) vastaan, ja se on lähes riippumaton pH:sta (Rusinova ym., 2002). Texas Red[®] puolestaan on hydrofiilinen punaista väriä emittoiva sulfonyylikloridijohdannainen (Titus ym., 1982). Fluoroforien eksitaatio- ja emissioaallonpituudet vaihtelevat mittauksessa käytetyn liuotteen sekä mittalaitteen mukaan. Tutkimuksessa käytettyjen fluoroforien valmistajan (biomers.net, Ulm, Saksa) ilmoittamat eksitaatio- ja emissiomaksimiaallopituudet ovat Oregon Green 488[®] -fluoroforille 496 nm:iä (eksitaatio) ja 524 nm:iä (emissio) sekä Texas Red-X[®] -fluoroforille 583 nm:iä (eksitaatio) ja 603 nm:iä (emissio). Kuvassa 2.4. on esitetty tutkimuksessa käytettyjen kaksoismolekyylimajakoiden fluoroforien eksitaatio- ja emissiospektrit. Tutkimuksessa käytetyllä laitteella ei ollut mahdollisuutta mitata spektrejä kokeellisesti.



Kuva 2.4. Käytettyjen fluoroforien eksitaatio- ja emissiospektrit. Luovuttajafluoroforin (Oregon Green 488[®]) spektrit on esitetty vihreällä ja vastaanottajafluoroforin (Texas Red-X[®]) spektrit punaisella. Signaalin läpivuoto on esitetty sinisellä ja keltaisella: Sinisellä on esitetty vastaanottajafluoroforin suora eksitaatio luovuttajafluoroforin eksitaatioaallonpituuksilla ja keltaisella on esitetty luovuttajafluoroforin emissiosignaali vastaanottajafluoroforin emissioaallonpituuksilla. Spektrit on tehty Fluorescence Spectra Viewerillä (<http://probes.invitrogen.com/servlets/spectraviewer>) ja kuvaa muokattu.

Fluoroforien sijaan reporteriväriinä voidaan käyttää myös eri aallonpituuksia omaavia kvanttipisteitä (Chan & Nie, 1998). Puolijohteiset kvanttipisteet (*quantum dots*) ovat epäorgaanisia, nanokokoisia, valoa emittoivia partikkeleita, joilla on ainutlaatuisia optisia ja sähköisiä ominaisuuksia verrattuna orgaanisiin väriaineisiin ja fluoresoiviin

proteiineihin. Näitä ominaisuuksia ovat näkyvästä valosta infrapuna-aallonpituuksiin säädettävä emissioaallonpituus, suuret absorptiokertoimet laajalla spektrialueella, suurempi kirkkaus signaalissa ja kestävyys valovalkaisua vastaan sekä mahdollisuus virittää monta fluoresenssiväriä yhtä aikaa (Chan ym., 2002). Vaikka kvanttipiste (1,5–2 nm) ja sen vaimentajaehdokas, kultananopartikkeli (1,4 nm), vastaavat kooltaan oligonuklotidin stem–loop-hiuspinnää (3–4 nm), voi nanopartikkelikonjugaatiosta johtuva koon kasvu muuttaa molekyyli-majakana rakennetta ja toimintaa (Tsourkas ym., 2003).

2.3.3.5. *Fluoresenssin vaimennus*

Erilaiset prosessit voivat alentaa fluoresenssin intensiteettiä. Fluoresenssin intensiteetin alenemaa kutsutaan ”vaimentumiseksi” (*“quenching”*). Monet fluoresenssia hyödyntävät detektiomenetelmät perustuvat fluoresenssin energian siirtoon fluoroforilta toiselle fluoroforille tai fluoresoimattomalle molekyylille (vaimentaja). Hybridisoituvien koettimien fluoresenssia voidaan vaimentaa kahden mekanismin avulla: kontaktivaimentumisen tai fluoresenssin resonanssienergian siirron avulla (Marras, 2006). Se kumpi vaimennusmekanismi on tietyllä hetkellä vallalla, määräytyy fluoroforin ja vastaanottajamolekyylin välisen etäisyyden mukaan. Jos molekyylien spektreillä on päällekkäisyyttä ja molekyylit ovat riittävän lähellä toisiaan (1–10 nm), vaimentuminen tapahtuu fluoresenssin resonanssienergian siirron avulla. Kontaktivaimentumisesta on kyse, jos molekyylit ovat edellistä lähempänä toisiaan tai vaimentavaa nukleotidia (Marras ym., 2002). Vierekkäisissä tai sattumanvaraisesti laskostuneissa koettimissa luovuttaja- ja vastaanottajapuolet ovat usein sellaisen etäisyyden päästä toisistaan, että fluoresenssin resonanssienergian siirto on pääasiallinen vaimennusmekanismi. Hybridisoitumattomissa molekyyli-majakoissa fluoroforin energia siirtyy vaimentajalle suoraan kontaktivaimentumisen avulla, sillä osapuolet ovat suljetun rakenteen takia hyvin lähellä toisiaan (Marras ym., 2002).

Kontaktivaimentumisessa (*“contact quenching”*) luovuttaja- ja vastaanottajamolekyylit muodostavat kompleksin, jossa molekyylit vuorovaikuttavat vetysidoksien kautta. Vesiliuoksessa elektrostaattiset, steeriset ja hydrofobiset voimat säätelevät vetysidosten muodostumista. Kun tämä kompleksi absorboi valon energiaa, virittynyt tila palautuu heti perustilaan ilman ftoniemissiota. Tällöin molekyylit eivät emittoi fluoresoivaa valoa. Tunnusomaista on, että kontaktivaimennuksessa kahden molekyylin absorptiospektri muuttuu niiden muodostaessa kompleksin. FRET-mekanismissa sitä vastoin

molekyylien absorbtiospektri ei muutu (Marras, 2006). Fluoresenssin resonanssi-energian siirron mekanismista puhutaan lisää jäljempänä.

Fluoresenssin vaimentaja on fluoresoimaton kromofori, joka johtaa fluoroforilta saamansa energian pois lämpönä (Tyagi & Kramer, 1996). Kuten fluoroforien kohdalla, myös optimaalisen vaimentajan valinta voi parantaa molekyylimajakoiden signaali-tausta-suhdetta, vaikka suurin osa perinteisistä vaimentajista tuottaakin tyydyttäviä tuloksia. Orgaaniset vaimentajamolekyylit, kuten dabcy1, BHQ (*blackhole quencher*) ja Iowa Black, vaimentavat tehokkaasti laajaa valikoimaa fluoroforeja, sillä ne toimivat sekä kontaktivaimentumisen että fluoresenssin resonanssienergian siirron avulla (Tsourkas & Bao, 2003). Yleisimpien fluorofori-vaimentaja-parien ominaisuuksia on tutkittu kattavasti (Marras ym., 2002; Marras, 2006). Tässä tutkimuksessa luovuttajamolekyylimajakassa käytettiin BHQ-1[®]-vaimentajaa ja vastaanottajamolekyylimajakassa BHQ-2[®]-vaimentajaa, joiden valmistajan (biomers.net, Ulm, Saksa) ilmoittamat absorbtiomaksimiallopituudet ovat 534 nm:iä (BHQ-1[®]) ja 579 nm:iä (BHQ-2[®]). Orgaanisten vaimentajien lisäksi kultaisia nanopartikkeleita voidaan käyttää vaimentajina (Dubertret ym., 2001). On kuitenkin huomioitava, että vuorovaikutus kultapartikkelin ja fluoroforin välillä voi vaikuttaa molekyylimajakakan herkkyteen, spesifisyyteen ja hybridisaatiokinetiikkaan (Tsourkas & Bao, 2003).

2.3.3.6. Fluoresenssin resonanssienergian siirto

Fluoresenssin resonanssienergian siirto (FRET) tai Förster resonanssienergian siirto (Förster, 1948) on säteilemätön prosessi, jossa virittyneeltä fluoroforilta (luovuttaja, *donor*) siirtynyt fotoni nostaa perustilassa olevan molekyylin (vastaanottaja, *acceptor*) elektronin energiatilaa korkeammille singlettitilan värähtelytasolle. Tästä seuraa, että luovuttajafluoroforin energiataso palautuu perustilaan emittoimatta fluoresenssia (kuva 2.3, kohta 3). Energian siirto on riippuvaista luovuttaja- ja vastaanottajamolekyylien välisistä pitkän matkan dipoli-dipoli-vuorovaikutuksista, ja sitä rajoittaa luovuttajan ja vastaanottajan välinen etäisyys. Tyypillisesti kromoforien välinen tehokas etäisyys on 1–10 nm (Haugland ym., 1969), joka vastaa noin kolmesta kolmeenkymmeneen nukleotidia DNA-kaksoisheliksissä. Toinen edellytys on, että luovuttajan fluoresenssin emissiospektrin tulee olla osittain päällekkäinen vastaanottajan absorbtiospektrin kanssa. Vastaanottajamolekyyli voi olla toinen fluorofori, jolloin siirtynyt energia emittoituu fluoroforille ominaisena fluoresenssina, tai vaimentaja, jolloin absorboitu energia menetetään lämpönä (Marras, 2006).

Kaksoismolekyylimajakoiden luovuttajafluoroforit tyypillisesti emittoivat valoa lyhyemmällä aallonpituudella kuin vastaanottajat. Energian siirron tehokkuus määräytyy laajuudesta, jolla luovuttajan emissiospektri ja vastaanottajan absorbtiospektri menevät päällekkäin, luovuttajan kvanttituotosta, luovuttajan ja vastaanottajan siirtymädipolimomenttien suhteellisesta orientaatiosta (Lakowicz, 1999) sekä luovuttaja- ja vastaanottajamolekyylin välisestä etäisyydestä (yleensä neljästä viiteen emästä). Näiden ominaisuuksien optimointi on tärkeää luovuttaja- ja vastaanottajafluoroforia valittaessa, jotta vastaanottajafluoroforin suora virittyminen luovuttajafluoroforin virittymisaallonpituudella ja luovuttajan emission detektio vastaanottajan emissioaallonpituudella voidaan välttää (Santangelo ym., 2006).

Kun luovuttaja- ja vastaanottajafluoroforit on valittu asianmukaisesti, emittoituu vastaanottajamolekyylimajakasta voimakas fluoresenssisignaali vain, kun molemmat molekyylimajakat ovat hybridisoituneet vierekkäin kohteeseen ja FRET tapahtuu. Hajonneista tai proteiinien vaikutuksesta auenneista molekyylimajakoista emittoituva fluoresenssi on olennaisesti pienempi kuin luovuttajan ja vastaanottajan välisestä FRET-interaktiosta muodostuva signaali (Tsourkas & Bao, 2003).

2.3.3.7. Fluoresenssin resonanssienergian siirron mittaaminen

Kun FRET tapahtuu, virittynyt luovuttajafluorofori siirtää energiaa vastaanottajafluoroforille. Ilmiötä voidaan havaita usealla tavalla, kuten fluoresenssin eliniän ja polarisaation muutoksina, mutta tavallisimmin se näkyy luovuttajan fluoresenssin vähentymisenä ja vastaanottajan fluoresenssin kasvuna (herkistetty emissio, *sensitized emission*). Fluoresenssin resonanssienergian siirtoa voidaan mitata monella tapaa, kuten fluoroforien eliniän, herkistetyn emission sekä vastaanottajan valovalkaisun avulla. Näistä herkistetyn emission mittaamiseen perustuvat menetelmät ovat suosituimpia niiden nopeuden ja signaalin säilyttävän luonteen takia (Berney & Danuser, 2003; Mattheyses ym., 2004).

Luovuttaja- ja vastaanottajafluoroforin emissioissa tapahtuvien muutosten määrittäminen mahdollistaa FRET-tehokkuuden laskemisen. FRET-tehokkuus kuvaa sitä osuutta luovuttajan absorboimasta fotonien energiasta joka siirtyy vastaanottajalle. Koska FRET-tehokkuus on kääntäen verrannollinen fluoroforien väliseen etäisyyteen (r^6), $E = R_0^6 / (R_0^6 + r^6)$, FRET:istä on tullu suosittu menetelmä molekyylien välisten etäisyyksien tutkimisessa ja määrittämisessä. R_0 on nimeltään Förster-etäisyys, ja se vastaa

etäisyyttä, jolla tietyn fluoroforiparin FRET-tehokkuus on 50 %:ia (Berney & Danuser, 2003).

FRET-mittausten kunnollinen käyttö molekyylien vuorovaikutusten tutkimisessa ja kvantitoinnissa vaatii mitattujen arvojen korjausta. Häiriötä FRET-mittauksissa aiheuttavat luovuttajan ja vastaanottajan pitoisuudet, eksitaation läpivuoto (luovuttajan eksitaatio vastaanottajan eksitaatioaallopituudella ja toisinpäin) sekä keskinäishäiriö emission detektiossa (luovuttajan fluoresenssin detektio vastaanottajan emissioaallonpituudella ja toisinpäin). Suoran keskinäishäiriön ja läpivuotosignaalien osuutta on usein vaikea erottaa toisistaan. Lisäksi jokainen mitattu fluoresenssi-intensiteetti koostuu sekä FRET- että ei-FRET-osatekijöistä. Häiriötä aiheutuu myös taustafluoresenssista, solukomponenttien autofluoresenssista sekä valovalkaisusta (Gordon ym., 1998; Berney & Danuser, 2003).

FRET-tehokkuuden laskemiseksi on kirjallisuudessa esitetty useita erilaisia tapoja, jotka eroavat toisistaan lähinnä määrittämisessä käytettyjen filterisettien lukumäärän, näytteiden ja otettujen kuvien lukumäärän sekä muuttujien korjausasteen mukaan. Jokainen niistä sisältää erilaisia normalisointi- ja laskukaavoja ja paljastaa eri asioita tarkasteltavasta solusysteemistä. Yksinkertaisimmillaan FRET-tehokkuus (E) saadaan laskemalla luovuttajan suhteellinen fluoresenssi vastaanottajan kanssa (F_{DA}) sekä ilman vastaanottajaa (F_D) kaavalla 3 (Berney & Danuser, 2003).

$$E = 1 - F_{DA} / F_D \quad (3)$$

2.3.3.8. Detektioherkkyys

Molekyyylimajakoiden detektioherkkyys elävissä soluissa määräytyy molekyyylimajakka-kohde-hybrisisaation lisäksi fluoroforin tai fluoroforien ominaisuuksien, fluoresenssin detektio menetelmän, optisen kuvantamislaitteiston (mikroskooppi ja kamera) sekä taustasignaalin mukaan. Kaksoismolekyyylimajakka-FRET-menetelmän matala taustasignaali parantaa detektioherkkyyttä verrattuna esimerkiksi FISH-menetelmään. Mikroinjektoimalla koetin-kohde-pareja, Sokol ynnä muut selvittivät, että molekyyylimajakka menetelmällä voitiin havaita alle 1×10^{-1} ag molekyyylimajakkaa, mikä vastaa noin 10 mRNA-molekyyliä, kun molekyyylimajakat olivat konsentroituneet samalle alueelle (Sokol ym., 1998). On arvioitu, että kaksoismolekyyylimajakka menetelmällä voidaan luotettavasti havaita muutamia satoja kopioita endogeenistä mRNA:ta solua kohden, tarkasteltaessa yksittäisiä soluja. Käyttämällä uusinta teknologiaa edustavia

kvanttipisteitä tai lantanidikelaatteja ja fluoresenssidetektio menetelmiä, kuten reaaliajassa tapahtuvaa FRET:iä (*time-resolved FRET*), sekä herkempiä optisia kuvantamislaitteistoja, kuten yksittäisen fotonin laskentajärjestelmään perustuvaa tekniikkaa, on yksittäisistä soluista mahdollista havaita jopa vain 1–5 kopiota mRNA:ta. Vaihtoehtoisesti voidaan tutkia keskiarvoista mRNA-ilmentymistä suuresta määrästä soluja (esimerkiksi miljoonasta) samaan tapaan kuin RT-PCR-tutkimuksissa, jolloin FRET-pohjaista lajittelevaa virtausytometriä (*Fluorescence Activated Cell Sorter*, FACS) voitaisiin käyttää havaitsemaan fluoresenssisignaali elävissä soluissa. Kun yksittäisiä soluja voidaan hyödyntää tutkittaessa tarkemmin geeni-ilmentymisen vaihtelua solupopulaatioissa, esimerkiksi solunjakautumisen eri vaiheissa tai erilaisissa sairaustiloissa, voi keskimääräisen mRNA-ilmentymistason määrittäminen olla hyödyllisempää, kun mRNA-ilmentyminen vaihtelee suuresti solusta soluun. Suuresta määrästä soluja saadaan tällöin toistettavaa ja tilastollisesti merkittävämpää dataa kuin mRNA-tasoista, jotka on mitattu suhteellisen pienestä määrästä soluja (Santangelo ym., 2004).

3. Tutkimuksen tavoitteet

Tämän *pro gradu* -tutkielman tavoitteena on

- 1) kehittää fluoresenssin resonanssienergian siirtoon perustuva kaksoismolekyylimajakamenetelmä, jonka avulla voidaan määrittää ja tutkia mRNA:n pitoisuutta ja lokalisaatiota elävissä soluissa.
- 2) käyttää kaksoismolekyylimajakka-FRET-menetelmää mallikohteina toimivien *AVD*- ja *AVR4/5*-geenien mRNA:iden lokalisaation tutkimiseen sekä kvantitatiiviseen mittaamiseen.
- 3) kehittää kvantitatiivinen RT-PCR -menetelmä *AVD*- sekä *AVR4/5*-geenien mRNA:iden kvantitatiiviseen mittaamiseen, jonka antamiin tuloksiin kaksoismolekyylimajakka-FRET-menetelmän kvantitatiivisia tuloksia voidaan verrata.

Kaksoismolekyylimajakka-FRET-menetelmää voidaan myöhemmin hyödyntää *AVD*- ja *AVR*-geenien ilmentymisen säätelyn molekyyli-tason yksityiskohtien tutkimisessä elävissä kanan soluissa tai kudoksissa. Lisäksi tutkimuksesta saatavia tuloksia voidaan tulevaisuudessa hyödyntää kehitettäessä menetelmää sellaiseksi, että sen avulla voidaan tunnistaa ja määrittää muiden spesifisten mRNA:iden pitoisuuksia viljelyissä soluissa ja mahdollisesti jopa kudoksissa tai kudoksenäytteissä.

4. Materiaalit ja menetelmät

4.1. *Spodoptera frugiperda* -hyönteissolujen elvytys ja kasvatus

Avidiinin ja AVR4/5-proteiinin sekä totaali-RNA:iden tuottamiseen ja kuvantamiseen käytettiin *Spodoptera frugiperda* -hyönteissoluja (Sf9). Ennen käyttöä pakastetut hyönteissolut elvytettiin. Koko tutkimuksen ajan solujen kasvatuksessa käytettiin HyQ[®] SFX-Insect[™] -mediumia (HyClone, Logan, UT, USA, #SH30278), johon oli lisätty 1 ml biotiinia (170 mg/ml, Fluka, Steinheim, Saksa, #14400) litraan mediumia. 23 ml:aa esilämmitettyä (+25 °C) kasvatusmediumia pipetoitiin muoviseen 250 ml:n Erlenmeyer-kasvatuspulloon (Corning, #430183). Nestetyypessä olleet kaksi 1 ml:n soluampullia sulatettiin nopeasti kädessä ja molempien ampullien sisällöt siirrettiin mediumin avulla Erlenmeyer-pulloon. Pullon nestetilavuudeksi tuli tällöin noin 25 ml:a ja solutiheydeksi noin 0,5 miljoonaa solua ml:ssa. Solut jätettiin kasvamaan suspensiona ravistelijalle (125 rpm) +27 °C:n lämpötilaan.

Kun solut saavuttivat tiheyden 3,72 milj. solua/ml, ne jaettiin tiheyteen 0,6 milj. solua/ml sekä siirrettiin kahteen muoviseen 250 ml:n kasvatuspulloon (rinnakkaiset). Kolmas jako tehtiin tiheyteen 0,5 milj. solua/ml, jota pidettiin ylläpitotiheytenä. Neljännen jaon jälkeen solut olivat käytettävissä infektiioihin.

4.2. Rekombinanttisten bakulovirusten valmistaminen

Rekombinanttisten bakulovirusten valmistaminen tehtiin Bac-to-Bac[®] Baculovirus Expression System -menetelmän (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) avulla. Luovuttajavektoreina käytettiin pFastBac[™] 1-vektoreita (amp^r ja gent^r), joihin oli kloonattu joko avidiini-, AVR1-, AVR2-, AVR3-, AVR4/5-, AVR6- tai AVR7-geenin cDNA-insertti. Nämä luovuttajavektorikonstruktit saatiin valmiina.

4.2.1. Transpositio ja oikeiden kloonien valinta

Kohdennettu transpositio tehtiin transformoimalla DH10Bac[™] *E. coli* -soluja (Invitrogen, #10361-012) insertin sisältävillä luovuttajavektoreilla. DH10Bac[™] -solut sisältävät bakulovirusgenomin bakmidivektorimuodossa (kan^r, lacZ α positiivinen) ja avustajaplasmidin (tet^r). Avustajaplasmidin tuottaa transpositiossa tarvittavat proteiinit *in trans* ja mahdollistaa näin halutun DNA-fragmentin liittämisen osaksi bakmidia kohdennetun transposition avulla (ks. kpl 2.3.1.3). Transpositio tapahtuu bakmidin

mini-attTn7-kohtaan (Luckow ym., 1993). Kohdennetun transposition mukana luovuttajavektorista bakmidiin siirtyvät sekä gentamysiiniresistenttiseen että haluttu DNA-fragmentti.

Transformaatiot tehtiin ”tukkimiehen” menetelmällä ”Bac-to-Bac[®] Baculovirus Expression System” -työohjetta mukailten. DH10Bac[™] *E. coli* -soluja siirrostettiin -20 °C:ssa säilytettävästä glyserolistokista LB_{kan, tet} -maljalle (kanamysiiniä 50 µg/ml, tetrasykliiniä 10 µg/ml) ja solujen annettiin kasvaa yön yli lämpökaapissa (+37 °C). 100 µl kylmää 100 mM CaCl₂-liuosta pipetoitiin Eppendorf-putkiin jäähauteella, jonka jälkeen DH10Bac[™]-soluja otettiin yön yli kasvaneelta puhdasviljelmältä siirrostus-silmukan avulla ja suspensoitiin CaCl₂-liuokseen. Putkia inkuboitiin 15 minuuttia jäällä, jonka jälkeen solususpensioon lisättiin 0,5–1,0 µl luovuttajaplasmidi-DNA:ta (noin 100 ng) ja sekoitettiin varovasti. Putkia inkuboitiin jäällä 30 minuuttia. Tämän jälkeen soluille tehtiin nopea, 45 sekunnin, lämpökäsittely +42 °C:ssa, jonka jälkeen ne siirrettiin välittömästi takaisin jäähauteelle. Jokaiseen putkeen lisättiin 450 µl SOC-liuosta, jonka jälkeen putket laitettiin kolmeksi tunniksi tasoravistelijaan (+37 °C, 250 rpm). Tämän jälkeen solut sentrifugoitiin putkien pohjalle (6000 × g, 1 min), supernatantit poistettiin ja solut suspensoitiin 100 µl:aan SOC-liuosta. Saatu suspensio maljattiin kanamysiiniä (50 µg/ml), tetrasykliiniä (10 µg/ml) ja gentamysiiniä (7 µg/ml) sisältäville LB-maljoille, joihin oli laminaarissa lisätty 50 µl X-gal-liuosta (20 mg/ml) ja 100 µl 100 mM IPTG-liuosta. Solujen annettiin kasvaa noin 24 tuntia +37 °C:n lämpötilassa, kunnes selektiossa käytettävä sininen väri kehittyi.

Bac-to-Bac[®]-ekpressiosysteemissä käytettävä bakmidi sisältää β-galaktosidaasin aminoterminaalista osaa koodaavan sekvenssin (*lacZα*). Sekvenssistä tuotettu *lacZα*-peptidi pystyy kompensoimaan DHC10Bac[™]-solulinjan *lac*-mutaation vuoksi häiriytyneen β-galaktosidaasientsyymin toiminnan (Yanisch-Perron ym., 1985). Toimiva β-galaktosidaasi katalysoi X-gal-väriaineen hydrolyysiä. Tästä syystä DHC10Bac[™]-solut, jotka sisältävät bakmidin, tuottavat sinisiä pesäkkeitä X-gal-väriainetta ja *lac*-promootoria indusoivaa IPTG:tä sisältävillä maljoilla. Onnistuneen transformaation ja transposition avulla siirtynyt DNA-fragmentti kuitenkin rikkoo *lacZα*-sekvenssin bakmidissa, jolloin muodostuu valkoisia pesäkkeitä sinisten sijaan.

Maljoilta valittiin mahdollisimman suuria valkoisia pesäkkeitä, joista siirrostettiin 3–4 cm:n viivakasvatukset uusille kanamysiiniä (50 µg/ml), tetrasykliiniä (10 µg/ml) ja

gentamysiiniä (7 µg/ml) sekä X-gal-liuosta (20 mg/ml) ja 100 mM IPTG-liuosta sisältäville LB-maljoille. Jokaiselle maljalle siirrostettiin myös värikontrolli sinisestä pesäkkeestä. Maljoja inkuboitii kuten edellä, kunnes pesäkkeiden todellinen väri varmistui.

4.2.2. Virus-DNA:n eristäminen

Bakmidi-DNA eristettiin bakteerisolusta ”Bac-to-Bac[®] Baculovirus Expression System” -työohjeen (Invitrogen) mukaisesti. Menetelmä on muunnos alkaliseen lyysikseen perustuvasta, alun perin suurten ja lukumääräisesti pienten, plasmidien eristämiseen kehitetystä menetelmästä (Engebrecht ym., 1991).

Väriselektion jälkeen valkoisiksi varmistuneista klooneista tehtiin liemiviljelmät siirrostamalla niitä 2 ml:aan LB-mediumia, johon oli lisätty kanamysiiniä (50 µl/ml) ja gentamysiiniä (7 µg/ml). Solujen annettiin kasvaa tasoravistelijassa yön yli (+37 °C, 250 rpm), minkä jälkeen jokaisesta bakteerikasvatuksesta siirrettiin 1,5 ml:aa Eppendorf-putkeen. Putkia sentrifugoitiin minuutin ajan (14 000 × g). Sentrifugoinnin jälkeen supernatanti pipetoitiin pois ja jäljelle jäänyt solupelletti resuspensoitiin 300 µl:aan kylmää Solution I:tä. Suspensioon lisättiin 300 µl huoneenlämpöistä Solution II:ta, putkea käännettiin muutaman kerran ja inkuboitii huoneenlämmössä 5 minuuttia. Tämän jälkeen putkeen lisättiin hitaasti 300 µl kylmää Solution III:ta, inkuboitii jäällä 5–10 minuuttia ja sentrifugoitiin (14 000 × g, 10 min), jolloin pohjalle muodostui muun muassa proteiineista ja *E. coli* -solun genomisesta DNA:sta koostuva valkoinen sakka. Supernatanti siirrettiin uuteen Eppendorf-putkeen, johon oli valmiiksi pipetoitu 800 µl absoluuttista isopropanolia, ja liuokset sekoitettiin käänntelemällä putkea. Putkia inkuboitii jäällä 5–10 minuuttia, jonka jälkeen niitä sentrifugoitiin 15 minuuttia (14 000 × g). Tämän jälkeen supernatanti pipetoitiin pois ja DNA-sakka pestiin 500 µl:lla etanolia (70 %), joka pipetoitiin pois sentrifugaation (14 000 × g, 5 min) jälkeen. DNA-pellettien annettiin ilmakeivua huoneenlämmössä laminaarissa 5–10 minuuttia. Lopuksi DNA-pelletit liuotettiin 40 µl:aan TE-puskuria ja niiden DNA-pitoisuudet ja puhtaus määritettiin absorbanssiin perustuen MBA 2000 -spektrometrillä (PerkinElmer[®], Boston, MA, USA). Näytteet laimennettiin steriiliin deionisoituun veteen suhteessa 1:100 ja niiden absorbanssit mitattiin aallonpituudella 260 nm. Koska yksi absorbanssiyksikkö vastaa tällä aallonpituudella kaksijuosteisen DNA:n pitoisuutta 50 µg/ml (vedessä mitattuna) voitiin näytteen DNA-pitoisuus laskea saadusta absorbanssista verrannon ja laimennoskertoimen avulla. Näytteen puhtautta arvioitiin

määrittämällä aallonpituuksilla 260 nm ja 280 nm saatujen absorbanssien suhde (A_{260}/A_{280}), joka puhtaassa näytteessä on noin 1,8 (Sambrook ym., 1989). Näytteet säilöttiin pakastamalla (-20 °C).

4.2.3. Hyönteissolujen transfektio

Rekombinanttisia proteiineja sekä mRNA:ita tuotettiin bakulovirusten avulla Sf9-hyönteissoluissa. Hyönteissolut transfektoitiin bakmidi-DNA:lla eli kokonaisilla bakulovirusgenomeilla. Menetelmä perustuu positiivisesti varautuneiden lipidien ja negatiivisesti varautuneen DNA:n kykyyn muodostaa positiivisesti varautuneita DNA-lipidi-komplekseja, jotka neutraalin fosfolipidikomponentin edesauttamana läpäisevät solukalvon (Felgner ym., 1987; Walker ym., 1996).

Transfektiot suoritettiin kuusikuoppaisilla soluviljelylevyillä (NuncTM, Roskilde, Tanska, #152795), joihin siirrostettiin 1×10^6 Sf9-hyönteissolua 2 ml:ssa HyQ SFX-Insect -mediumia (biotiini, ei antibiootteja). Solujen annettiin kiinnittyä kuoppien pohjiin tunnin ajan lämpökaapissa (+27 °C), minkä aikana valmistettiin jokaista transfektoitavaa kuoppaa kohti Eppendorf-putkiin transfektioliuokset A ja B: 10 µl eristettyä bakmidi-DNA:ta ja 100 µl HyQ SFX-Insect -mediumia (A) sekä 9 µl CELFECTIN[®]-reagenssia ja 100 µl HyQ SFX-Insect -mediumia (B). Liuokset A ja B yhdistettiin ja seosta inkuboitiin huoneenlämmössä 30 minuuttia. Inkuboinnin jälkeen putkiin lisättiin 800 µl HyQ SFX-Insect -mediumia ja sekoitettiin varovasti. Solujen kiinnittyminen varmistettiin mikroskooppisesti ja kiinnittyneiden solujen päältä imettiin vanha mediumi varovasti pois. DNA-lipidi-liuokset lisättiin solujen päälle ja solut laitettiin lämpökaappiin (+27 °C) inkuboitumaan viideksi tunniksi. Tämän jälkeen kuopat tyhjennettiin ja tilalle vaihdettiin 2 ml HyQ SFX-Insect -mediumia kuoppaa kohden. Inkubaatiota jatkettiin +27 °C:ssa 72 tuntia.

Transfektioiden onnistuminen varmistettiin inkuboinnin jälkeen mikroskoopin avulla, jolloin soluissa voitiin nähdä myöhäisen virusinfektion merkkejä. Solut irrotettiin ja kerättiin kuopassa olleen mediumin avulla ja saatu solususpensio siirrettiin 2 ml:n Eppendorf-putkeen. Putkia sentrifugoitiin ($1000 \times g$, 5 min), jolloin solut ja rekombinanttisia bakulovirusia sisältävä mediumi erottuivat. Supernatantit pipetoitiin steriilisti uusiin Eppendorf-putkiin ("P1-virusstokit"), jotka säilöttiin +4 °C:seen. Solupelleteistä valmistettiin näytteet SDS-PAGE-analyysiä varten resuspendoimalla solut 200 µl:aan SDS-PAGE-näytepuskuria (2×). Näytteet säilöttiin pakastamalla (-20 °C).

4.2.4. Rekombinanttien virusten monistaminen

P1-virusstokkien sisältämiä viruksia monistettiin infektoimalla hyönteissoluja. Sf9-hyönteissoluja jaettiin 30 ml:n solususpensioina Erlenmeyer-kasvatuspulloihin solutiheyteen 1×10^6 solua/ml HyQ SFX-Insect -mediumia. Kasvatukseen lisättiin 200 μ l P1-virusstokkia ja infektioiden annettiin tapahtua inkuboimalla soluja ravistelijalla 72 tuntia (+27 °C, 125 rpm). Inkuboinnin jälkeen infektoidut solut sentrifugoitiin 50 ml:n putkissa ($1000 \times g$, 5 min). Monistuneita bakulovirusia sisältävät supernatantit otettiin talteen uusiin 50 ml:n putkiin ("P2-virusstokit") ja säilöttiin +4 °C:n lämpötilaan myöhempää käyttöä varten.

Ennen sentrifugointia infektoiduista kasvatuksista otettiin 1 ml:n näytteet SDS-PAGE-analyysiä varten. Näytteet sentrifugoitiin (13 000 rpm, 1 min) ja supernatantista otettiin 100 μ l:n näyte, johon lisättiin 100 μ l SDS-PAGE-näytepuskuria (2 \times). Myös näytteiden solupelletit resuspensoitiin 200 μ l:aan SDS-PAGE-näytepuskuria (2 \times). Lisäksi infektoimattomista Sf9-hyönteissoluista valmistettiin samaan tapaan solupelletti- ja supernatantinäyte. Näytteet säilöttiin pakastamalla (-20 °C).

4.3. Western blot -analyysi

4.3.1. SDS-PAGE

Aiemmin kuvattujen transfektion sekä bakulovirusten monistamisen yhteydessä valmistettiin SDS-PAGE-näytteet solupelleteistä sekä supernatanteista, jotta voitaisiin varmistaa bakulovirusmenetelmän onnistuminen. Myös kimeerisestä avidiiniproteiinista ChiAVD(I117Y) valmistettiin SDS-PAGE-näyte, joka tehtiin lisäämällä 10 μ l SDS-PAGE-näytepuskuria (2 \times) 10 μ l:aan ChiAVD(I117Y)-proteiinia (300 ng/ μ l). Näytteitä kuumennettiin 10 minuuttia +95 °C:ssa ennen kuin ne pipetoitiin SDS-PAGE-geeliin.

Näytteissä olevat proteiinit eroteltiin niiden koon (molekyylipainon) mukaan SDS-PAGE-menetelmällä (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*). Avidiini- ja AVR-solupellettinäytteiden rinnalla, erillisessä SDS-PAGE-geelissä, ajettiin myös kimeeristä avidiiniproteiinia sisältävä näyte, jonka avulla oli tarkoitus testata ainoastaan AVR4/5-proteiinia tunnistamaan tarkoitetun vasta-aineen toimintaa. Kimeerinen avidiini, ChiAVD(I117Y), on rakennettu korvaamalla avidiinissa β -juoste 4 sekä sen vieressä olevat loop-alueet AVR4/5:n vastaavalla, yhteensä 21 aminohapon

kokoisella, alueella ja tekemällä avidiiniin lisäksi pistemutaatio (I117Y) AVR4/5:n sekvenssistä (Hytönen ym., 2005).

SDS-PAGE:ssa käytettiin 15 %:ista erottelugeeliä ja 5 %:ista konsentroitugeeliä. Analyysissä käytettiin Mini-PROTEAN[®] 3 Cell -laitetta (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA, #165-3301). Kaivoihin pipetoitiin 20 µl näytettä, 5 µl molekyylipainomarkkeria (PageRuler[™] Prestained Protein Ladder, Fermentas, Burlington, Canada, #SM0679) ja 5 µl avidiinimarkkeria (1 mg/ml, Belovo S/A, Bastogne, Belgia). Ajolaite täytettiin Tris-glysiini-ajopuskurilla (1×). Geeliä ajettiin ensin 100 V:n jännitteellä, kunnes väririntama saavutti erottelugeelin, jonka jälkeen jännite nostettiin 200 V:iin (Laemmli, 1970). Ajoa jatkettiin, kunnes näytepuskurin bromofenolisininen oli saavuttanut geelin alareunan.

4.3.2. Immunoblottaus

SDS-PAGE-geelissä ajetut proteiinit siirrettiin nitroselluloosakalvolle (Schleicher&Schnell, Dassel, Saksa) Mini Trans-Blot[®] Cell -laitteella (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) valmistajan ohjeen mukaisesti. Siirtopuskurina käytettiin Kodak-puskuria (+4 °C), ja jotta puskurin sisäiseen lämpötilaan ei syntyisi eroja, puskuria sekoitettiin magneettisekoittajan avulla. Siirrossa käytettiin 100 V:n jännitettä, ja siirtoaika oli noin 60 minuuttia (Towbin ym., 1979; Burnette, 1981). Siirron jälkeen nitroselluloosakalvo siirrettiin blokkausliuokseen (20 ml/kalvo) ja sitä inkuboitiin keinuttajalla yön yli +4 °C:n lämpötilassa.

Proteiinit tunnistettiin nitroselluloosakalvolta spesifisesti vasta-aineilla. Primaarivasta-aineen tunnistaman proteiinin havainnointi perustui sekundaarivasta-aineeseen liitetyn alkaalisen fosfataasin aktiivisuuteen (Blake ym., 1984). Vasta-ainevärjäyksen kaikki työvaiheet suoritettiin keinuttajalla. Maitojauheblokkauksen jälkeen kalvo pestiin kerran TBST-puskurilla (5 minuuttia). Seuraavaksi proteiineja sisältävää kalvoa inkuboitiin primaarivasta-aineliuoksessa huoneenlämmössä. Primaarivasta-aineliuos koostui jäniksen polyklonaalisesta (tuotettu Oulun yliopiston koe-eläinkeskuksessa, Oulu Suomi) tai hiiren monoklonaalisesta primaarivasta-aineesta (FIT Biotech) laimennettuna 10 ml:aan TBST-puskuria, joka sisälsi 5 %:ia rasvatonta maitojauhetta (w/v). Primaarivasta-aineiden laimennossuhteet olivat 1:2500 (jäniksen anti-avidini) ja 1:20 (hiiren anti-AVR4/5) lopputilavuudesta. Inkubointia jatkettiin vähintään tunnin ajan. Tämän jälkeen kalvo pestiin neljä kertaa TBST-puskurilla (5 minuuttia kerrallaan).

Seuraavaksi kalvoa inkuboitiin sekundaarivasta-aineliuoksessa huoneenlämmössä. Sekundaarivasta-aineena käytettiin alkaalisen fosfataasin kanssa konjugoitua vuohen IgG-vasta-ainetta, joka tunnisti joko jäniksen (Goat Anti-Rabbit IgG-AP, Santa Cruz Biotechnology, #SC-2057) tai hiiren Ig:t (Goat Anti-Mouse IgG-AP, Sigma, #A3562). Sekundaarivasta-aine laimennettiin 10 ml:aan TBST-puskuria, joka sisälsi 5 %:ia rasvatonta maitojauhetta (w/v). Kaupallisten sekundaarivasta-aineiden laimennossuhteet olivat 1:2000 (vuohen anti-jänis) ja 1:10 000 (vuohen anti-hiiri) lopputilavuudesta. Vähintään tunnin inkubaation jälkeen kalvoa pestiin TBST-puskurilla (4 × 5 minuuttia), jonka jälkeen se laitettiin tasapainottumaan APA-puskuriin viideksi minuutiksi. Värjäys tehtiin liuoksella, joka sisälsi 180 µl NBT:tä ja 60 µl BCIP:iä 6 ml:ssa APA-puskuria. Värireaktion annettiin kehittyä noin 15 minuuttia, minkä jälkeen reaktio pysäytettiin tislattulla vedellä.

4.4. Totaali-RNA:n tuottaminen ja todentaminen

Spodoptera frugiperda (Sf9) -hyönteissoluja jaettiin infektoita varten 50 ml:n solususpensioina tiheyteen $0,5 \times 10^6$ solua/ml HyQ SFX-Insect -mediumia. Infektioissa käytettiin avidiini- tai AVR4/5-insertin sisältäviä bakulovirusia P2-virusstokeista, jota laitettiin 200 µl:aa yhtä infektoitavaa kasvatusta kohden.

cDNA-insertit on kloonattu luovuttajavektorissa *Autographa californica* -viruksen (AcMNPV) polyhedriinipromootorin säätelyn alle. Polyhedriinipromootori aktivoituu viruksen lyyttisen syklin erittäin myöhäisessä vaiheessa, minkä takia transkriptio promootorista alkaa noin 18 tuntia infektion jälkeen (ks. kpl 2.3.1.2).

4.4.1. Totaali-RNA:n eristäminen

Totaali-RNA-näytteet eristettiin infektoiduista *Spodoptera frugiperda* (Sf9) -hyönteissoluista kaupallisen SV Total RNA Isolation System -kitin avulla (Promega, Madison WI, USA, #Z3101). Menetelmä on kehitetty tuottamaan korkealaatuista RNA:ta erityisesti RNA:n monistukseen perustuvien menetelmien tarpeisiin, ja se perustuu RNA:n eristämiseen sekä genomisen DNA-kontaminaation minimoimiseen guanidiini-isotiosyanaatin ja β-merkaptotetanolin sekä DNAasi I:n avulla (Brisco ym., 1997).

Koska kohde-RNA:n optimaalisinta eristysajankohtaa ei voitu tarkasti määrittää, totaali-RNA-näytteet eristettiin eri aikapisteissä: 17 tuntia, 20 tuntia ja 41 tuntia infektoimisen jälkeen (*post infection*, pi). Myös infektoimattomista Sf9-soluista eristettiin totaali-

RNA-näyte. Totaali-RNA-näytteet eristettiin valmistajan ohjeen mukaan (SV Total RNA Isolation System Technical Manual, Promega, #TM048) ja lopuksi eluoiitiin 100 µl:aan nukleasitonta vettä. Näytteiden absorbanssit mitattiin aallonpituudella 260 nm MBA 2000 -spektrometrillä (PerkinElmer[®], Boston, MA, USA). Koska yksi absorbanssiyksikkö vastaa tällä aallon pituudella yksijuosteisen RNA:n pitoisuutta 40 µg/ml (vedessä mitattuna) voitiin näytteen RNA-pitoisuus laskea saadusta absorbanssista verrannon ja laimennoskertoimen avulla. Näytteen puhtaus määriteltiin aallonpituuksilla 260 nm ja 280 nm saatujen absorbanssien suhteesta (A_{260}/A_{280}), joka puhtaassa näytteessä on noin 2,0 (Sambrook ym., 1989). Lopuksi näytteet jaettiin pienempiin eriin ja säilöttiin pakastamalla (-70 °C).

4.4.2. Denaturoiva RNA-elektroforeesigeeli

Totaali-RNA-näytteet ajettiin myös denaturoivassa agarosigeelissä, joka sisälsi formaldehydiä. Denaturoivassa ympäristössä RNA ei muodosta intramolekulaarisia sekundaarirakenteita, jolloin se liikkuu geelissä ainoastaan kokonsa mukaan. Agarosiformaldehydigeeli valmistettiin laminaarissa ja geelin valmistuksessa käytetyt liuokset valmistettiin DEPC-käsiteltyyn veteen. Kaikki pinnat sekä geelinajolaitteet, joiden kanssa geeli on kosketuksissa, käsiteltiin kaupallisella RNase Erase[®] -liuoksella (MP Biomedicals, Illkirch, Ranska). Pipetointiin käytettiin RNAasittomia ja filterillä varustettuja TipOne-pipetinkärkiä (Starlab).

Agarosiformaldehydigeeli sisälsi 1 % agarosia (LE, Analytical grade, Promega) ja valmistettiin Molecular Cloning. A Laboratory Manual -ohjetta hieman muunnellen (Sambrook ym., 1989). 0,5 g agarosia kuumennettiin 36 ml:ssa DEPC-vettä ja sen hieman jäähtyttyä lisättiin 10,0 ml 5 × MOPS-puskuria, 8,8 ml 37 %:ista formaldehydiä (J.T. Baker, Deventer, Hollanti) sekä 2,5 µl etidumbromidia (10 mg/ml), jonka loppupitoisuudeksi tuli tällöin noin 0,5 µg/ml. Geeli valettiin ja sen annettiin jähmettyä. Näytteet valmistettiin seuraavasti: 3 µl:aan RNA-näytettä lisättiin 6 µl RNA-näytepuskuria, jonka jälkeen putkea kuumennettiin +65 °C:ssa 5 minuuttia, pidettiin jäällä 2 minuuttia ja lopuksi näytteeseen lisättiin 2 µl RNA-latauspuskuria. Geeliä ajettiin 1 × MOPS-puskurissa, jännitteellä 4 V/cm, ensin ilman näytteitä 10 minuuttia, jonka jälkeen näytteet lisättiin ja niitä ajettiin kunnes latauspuskurissa ollut bromofenolisininen oli ajautunut $\frac{3}{4}$ geelin pituudesta. Geeli kuvattiin UV-valon avulla GeneSnap-ohjelmalla (Syngene, Cambridge, Englanti).

4.4.3. Agaroosigeelielektroforeesi

Totaali-RNA-näytteet ajettiin lopulta tavallisessa elektroforeesigeelissä, joka sisälsi 1 % agaroosia (LE, Analytical grade, Promega). Agaroosi valmistettiin käyttämättömään 1 × TAE-puskuriin ja hieman jäähtyneeseen geeliin lisättiin etidiumbromidia (10 mg/ml) niin, että loppupitoisuudeksi tuli 0,5 µg/ml. Näytettä otettiin 2–10 µl:aa (noin 1 µg), johon lisättiin 6 × latauspuskuriä, ja näytteet pipetoitiin geeliin. Molekyylipainomarkkerina käytettiin 5 µl:aa GeneRuler™ 1 kb DNA Ladderia (Fermentas). Näytteitä ajettiin geelissä 80 V:n jännitteellä noin tunnin ajan, jonka jälkeen geeli kuvattiin UV-valon avulla GeneSnap-ohjelmalla (Syngene, Cambridge, Englanti).

4.5. RT-PCR

Ennen varsinaista kvantitatiivista RT-PCR -ajoa, totaali-RNA-näytteistä tehtiin edullisempi tavallinen kaksivaiheinen RT-PCR. Tavallisen RT-PCR-kokeen avulla varmistuttiin, että RNA-näytteistä todella saadaan oikeankokoiset DNA-kopiot, ja että kvantitatiivista RT-PCR -koetta varten suunnitellut alukkeet todennäköisesti toimivat myös siinä. RT-PCR-reaktioiden suunnittelussa käytettiin apuna GeneBank-tietokannassa julkaistuja avidiinin ja AVR4/5:n mRNA- ja DNA-sekvenssejä (*accession numbers* X05343 ja Z22883), jotka käännettiin cDNA:iksi EMBOSS-ohjelmistopakettin (*The European Molecular Biology Open Software Suite*) extractseq- ja seqret-ohjelmilla sekä rinnastettiin Clustal W (1.82) -ohjelmistolla (EMBL-EBI).

4.5.1. cDNA-synteesi

cDNA-synteesireaktioissa käytettiin sekvenssispesifistä 3'-pään aluketta 5'-TTACTCCTTCTGTGTGCG-3' (nukleotidit 485–502 (cDNA)AVD ja 448–465 (cDNA)AVR4/5), jolla voitiin kääntää sekä avidiinin että AVR4/5:n mRNA, ja jonka sitoutumispaikka on PCR:llä monistettavasta sekvenssistä alavirtaan. Entsyyminä käytettiin linnun retroviruksesta (*Avian Myeloblastosis Virus*) eristettyä AMV-käänteiskopioentsyymiä, jolla on RNA-ohjautuvan polymeeraasiaktiivisuuden lisäksi DNA-ohjautuva polymeeraasiaktiivisuus sekä voimakas RNAasi H -aktiivisuus (Sambrook ym., 1989).

Reaktiota varten valmistettiin templaatiksi 10 µl:n RNA-aluke-liuos, joka sisälsi 1 µl näytettä (vastasi näytteestä riippuen noin 90–665 ng totaali-RNA:ta), 1 µl AVD:lle ja AVR4/5:lle yhteistä 3'-pään aluketta (20 pmol/µl) sekä 8 µl DEPC-käsiteltyä vettä. RNA-aluke-liuosta kuumennettiin +70 °C:n lämpötilassa 10 minuuttia ja jäädytettiin

jäillä. Valmistettu templaattiliuos käytettiin kokonaisuudessaan synteisireaktioon, jonka sisälsi: 9 µl tislattua vettä, 2,5 µl 10 × AMV puskuriliuosta (Finnzymes, #F570B), 2,5 µl dNTP-seosta (10 mM, Finnzymes, #F560L), 1 µl AMV-entsyymiä (20 U/µl, Finnzymes, #F570S) sekä 10 µl templaattiliuosta. Synteisireaktion kokonaistilavuus oli 25 µl:aa. cDNA-synteesi tehtiin PCR-laitteessa (PTC-200 DNA Engine Thermal Cycler, MJ Research) ohjelmalla: +42 °C 60 minuuttia ja +70 °C 10 minuuttia. Syntesoidut cDNA:t pakastettiin (-20 °C) myöhempää käyttöä varten.

4.5.2. PCR ja agarosigeelielektroforeesi

Syntesoidut cDNA:t monistettiin polymeerasiketjureaktio-menetelmällä (PCR). Alun perin Kary B. Mullisin vuonna 1985 kehittämän menetelmän avulla pieni määrä DNA:ta voidaan monistaa eksponentiaalisesti *in vitro* (Mullis ym., 1986). Avidiinin ja AVR4/5:n cDNA:iden monistukseen käytettiin sekvenssispesifistä 5'-pään (F1-RT) ja 3'-pään (R1-RT) aluketta (taulukko 4.1), jotka suunniteltiin tunnistamaan sama 5'-pään ja 3'-pään sekvenssi sekä avidiinin että AVR4/5:n cDNA:sta. Alukkeiden tunnistuskohdat sijaitsevat eri eksoneissa. Alukeparin suunnittelussa huomioitiin lisäksi, että molekyyli-majakoiden komplementaarinen alue sisältyy alukeparin väliin ja tulee näin monistetuksi. Alukkeilla monistettu PCR-tuote on joko 341 emäsparin (AVD) tai 335 emäsparin (AVR4/5) mittainen. Alukepari tilattiin TAG Copenhagen A/S:ltä.

Taulukko 4.1. RT-PCR-alukkeiden sekvenssit.

Aluke	Sekvenssi	Nukleotidit (cDNA)
F1-RT	5'-CCCGCTGCTGCTGCTGCTG-3'	61–79 (AVD), 30–48 (AVR)
R1-RT	5'-TGGTCTTCAGGACCTCCTT-3'	383–401 (AVD), 446–464 (AVR)

Polymeerasiketjureaktioissa käytetty reaktioseos sisälsi: 15 µl steriloitua vettä, 2,5 µl 10 × Pfu-puskuriliuosta sisältäen 20 mM MgSO₄ (Fermentas), 2,5 µl dNTP-seosta (2 mM, Fermentas, #R0241), 2 µl F1-RT-aluketta (20 pmol/µl), 2 µl R1-RT-aluketta (20 pmol/µl), 0,5 µl Pfu DNA-polymeerasia (2,5 U/µl, Fermentas, #EP0501) sekä 1 µl cDNA-templaattia. Reaktioseoksen tilavuus yhteensä oli 25,5 µl:aa.

Kaikki reaktioseoksen reagenssit, entsyymiä lukuun ottamatta, pipetoitiin jäillä 0,2 ml:n PCR-putkiin, minkä jälkeen reaktiot ajettiin PCR-laitteella (PTC-200 DNA Engine Thermal Cycler, MJ Research). PCR-ajon ohjelma koostui 10 minuutin alkudenaturaatiosta +95 °C:ssa (vaihe 1), minkä jälkeen putkiin lisättiin Pfu-entsyymi (*hot start*), 30 sekunnin denaturaatiosta +95 °C:ssa (vaihe 2), minuutin annealing-

vaiheesta +50 °C:ssa (vaihe 3) ja 1,5 minuutin elongaatio-vaiheesta +72 °C:ssa (vaihe 4) 26 syklin ajan, joita seurasi vielä 10 minuutin elongaatio-vaihe +72 °C:ssa sekä jäähdytys +4 °C:seen.

Ajon jälkeen PCR-tuotteet ajettiin elektroforeesigeelissä, joka sisälsi 1,5 % agarosia (LE, Analytical grade, Promega). Monistettu DNA-fragmentti ajautuu agarosigeelissä kokonsa mukaan (Sambrook ym., 1989), jolloin se on helppo identifioida ja eristää. Agarosigeeli valmistettiin 1 × TAE-puskuriin ja hieman jäähtyneeseen geeliin lisättiin etidiumbromidia (10 mg/ml) niin, että loppupitoisuudeksi tuli 0,5 µg/ml. Etidiumbromidi on DNA:han interkaloituva, fluoresoiva väriaine, jonka avulla agarosigeelissä ajautunut DNA voidaan havaita UV-valossa (Sharp ym., 1973). Näytteisiin (10 µl) lisättiin 1,7 µl 6 × latauspuskuria ja ne pipetoitiin geeliin. Molekyyli-painomarkkerina käytettiin 5 µl GeneRuler™ 100 bp DNA Ladderia (Fermentas). Näytteitä ajettiin geelissä 80 V:n jännitteellä noin tunnin ajan, jonka jälkeen geeli kuvattiin UV-valon avulla GeneSnap-ohjelmalla (Syngene, Cambridge, Englanti).

4.6. Kvantitatiivinen RT-PCR

Alkuperäisistä totaali-RNA-näytteistä määritettiin avidiinin ja AVR4/5:n mRNA-pitoisuudet kvantitatiivisella RT-PCR:llä (LightCycler® 1.5 Instrument, Roche Diagnostics) käyttäen totaali-RNA:sta käännettyä cDNA:ta templaattina (ks. kpl 4.5.1). Määritykset tehtiin absoluuttisesti käyttäen ulkoista standardia ja ajot suunniteltiin valmistajan ohjeita noudattaen (Technical Notes No. LC 10 ja LC 11/update 2003 sekä No. 3/99, Roche Diagnostics).

4.6.1. Ulkoisen standardin valmistus

Edellä kuvatulla tavallisella RT-PCR-menetelmällä tuotetuista 41 tuntia pi -näytteistä valmistettiin standardien kantanäyte kvantitatiivista RT-PCR -ajoa varten monistamalla niitä edelleen PCR:llä, ajamalla näytteet 1,5 %:iseen agarosigeeliin ja eristämällä ne geelistä. PCR toistettiin kuten edellä, eroten vain ohjelman osalta siinä, että vaiheet 2–4 toistettiin 36 kertaa (ks. kpl 4.5.2). Myös 1,5 %:inen agarosigeeli valmistettiin ja suoritettiin kuten edellä. DNA-fragmentit eristettiin agarosigeelistä Nucleospin® Extract II -kitin (Macherey-Nagel, Düren, Saksa, #740609) avulla valmistajan ohjeen mukaan. Menetelmä perustuu DNA:n sitomiseen piidioksidikalvolle kaatrooppisen suolan avulla (Vogelstein & Gillespie, 1979). DNA-fragmentit eluoiitiin 30 µl:aan kitin eluutiopuskuria NE (5 mM Tris/HCl, pH 8.5) ja näytteiden DNA-pitoisuudet (A_{260}) sekä

puhtautta indikoivat r-arvot (A_{260}/A_{280}) mitattiin sekä MBA 2000 -spektrometrillä (PerkinElmer[®], Wellesley, MA, USA) että Ultrospec[™] 1100 pro -spektrofotometrillä (Amersham Pharmacia Biotech, Cambridge, UK). Näytteet laimennettiin ennen mittaamista steriiliin deionisoituun veteen suhteissa 1:20, 1:50 ja 1:100. Näytteen DNA-pitoisuus laskettiin keskiarvona eri laimennoksista saaduista pitoisuusarvoista, jättäen kuitenkin pois laimennokset, joissa oli epäilyttävät r-arvot tai suuret poikkeamat muihin laimennoksiin verrattuna. Standardien kantaliuokset säilöttiin pakastamalla (-20 °C).

4.6.2. LightCycler[®] 1.5 Instrument

Kvantitatiivinen RT-PCR (qRT-PCR) suoritettiin LightCycler[®] 1.5 Instrument -laitteella (Roche Diagnostics, Mannheim, Saksa). Reaktioihin käytettiin FastStart DNA Master HybProbe-kittiä (Roche Diagnostics), joka on suunniteltu käytettäväksi kohteen kanssa hybridisoituvien fluoresenssileimattujen koettimien kanssa. Kitti sisälsi LightCycler[®] FastStart -entsyymien, FastStart HybProbe -reaktioseoksen, magnesiumkloridin (25 mM) sekä nukleasitonta PCR-vettä. Hybridisaatioon perustuvassa detektiossa käytettiin fluoresoivien koettimien tilalla fluoresenssileimattuja kaksoismolekyyylimajakoita (biomers.net, Ulm, Saksa). Sekä avidiinin että AVR4/5:n mRNA:n tunnistamiseen oli suunniteltu omat molekyyylimajakkarinsa (ks. kpl 4.7.1). Alukkeina sen sijaan käytettiin samaa avidiinin sekä AVR4/5:n cDNA:n tunnistavaa alukeparia kuin edellä (ks. taulukko 4.1 kpl 4.5.2). Standardina käytettiin edellä monistettua PCR-tuotetta (avidini, 41 h pi). Negatiivisena kontrollina käytettiin nukleasitonta, PCR-laatuista vettä. Molekyyylimajakoista (100 µM), alukkeista (100 µM), standardista (42,62 ng/µl) sekä näytteistä valmistettiin laimennokset steriiliin veteen. Laimennokset on esitetty taulukossa 4.2.

Taulukko 4.2. qRT-PCR-reaktiokomponenttien laimennossuhteet.

<i>Reaktiokomponentti</i>	<i>Laimennos</i>	<i>Loppupitoisuus</i>
Molekyyylimajakat	1:10	10 µM
Alukkeet	1:10	10 µM
Standardi	1:40	1,066 ng/µl
Näytteet (cDNA)	1:50	

1:40 laimennetusta standardista valmistettiin edelleen viiden standardin laimennossarja laimentamalla aina edellistä suhteessa 1:5. Kaksinauhaista DNA:ta olevat standardit muutettiin kopiolutukuiksi kaavalla 4, jotta näytteiden tulokset olisivat verrattavissa kaksinauhaisen DNA:n ja yksinauhaisen RNA:n välillä.

$$\frac{6 \times 10^{23} [\text{kopiota/mol}] \times \text{pitoisuus} [\text{g}/\mu\text{l}]}{\text{MW} [\text{g/mol}]} = [\text{kopiota}/\mu\text{l}], \text{ jossa} \quad (4)$$

MW = monistettavan sekvenssin pituus emäspareina \times 660 Da/emäspari

Jokaiseen reaktiopipilaariin laitettiin 2 μl standardia, joten standardien määrät vastasivat lopulta $1,136 \times 10^9$, $2,272 \times 10^8$, $4,532 \times 10^7$, $9,064 \times 10^6$ sekä $1,813 \times 10^6$ kopiota/2 μl kaksijuosteista DNA:ta. Laimennossarjasta valmistetut standardit monistettiin erillisissä kapillaareissa samassa ajossa näytteiden kanssa. Laimennossarjasta saaduista tuloksista laite muodosti standardikäyrän.

Jokainen näyte/standardi/kontrolli ajettiin lasikapillaarissa (LightCycler[®] Capillaries, Roche Diagnostics), 20 μl :n tilavuudessa. Yhtä reaktiota varten valmistettiin PCR-reaktioseos, jonka komponentit, käytetty määrä ja loppupitoisuus on esitetty taulukossa 4.3. Näytteet tehtiin kahtena rinnakkaisena. Avidiininäytteitä, standardeja sekä kontrollivettä varten PCR-reaktioseos valmistettiin 13-kertaisena ja AVR4/5-näytteitä varten 6,5-kertaisena. Käyttövalmis $10 \times$ FastStart DNA Master HybProbe -entsyymi-seos valmistettiin yhdistämällä 60 μl FastStart HybProbe -reaktioseosta LightCycler[®] FastStart -entsyymien kanssa. PCR-reaktioseos sekoitettiin huolellisesti pipetoimalla, jonka jälkeen 18 μl :aa reaktioseosta pipetoitiin jokaiseen kapillaariin. Kapillaariin lisättiin 2 μl :aa vettä, standardia tai näytettä, jonka jälkeen kapillaari suljettiin heti korkilla kontaminaation välttämiseksi.

Taulukko 4.3. qRT-PCR-menetelmän reaktioseos.

<i>Reaktiokomponentti</i>	<i>Määrä (μl)</i>	<i>Loppupitoisuus</i>
PCR-vesi	10,6	
MgCl ₂ (25 mM)	2,4	4 mM
3'-aluke (10 μM)	1	0,5 μM
5'-aluke (10 μM)	1	0,5 μM
MM_1 ^a (10 μM)	0,6	0,3 μM
MM_v ^b (10 μM)	0,6	0,3 μM
10 \times entsyymiseos	2	1 \times
Yhteensä	18	

^aMM_1 tarkoittaa luovuttajamolekyylimajakkaa

^bMM_v tarkoittaa vastaanottajamolekyylimajakkaa

Näytteet sentrifugoitiin kapillaareihin LC Carousel -sentrifuugissa (Roche Diagnostics), ja siirrettiin LightCycler[®]-laitteeseen. Näytteille suunniteltu ajo-ohjelma alkoi 10 minuutin denaturaatiolla +95 °C:ssa, jota seurasivat 45 kierrosta, joista kukin kierros koostui sekunnin denaturaatiosta +95 °C:ssa, 10 sekunnin annealing-vaiheesta +55

°C:ssa sekä 13 sekunnin elongaatio-vaiheesta +72 °C:ssa. Fluoresenssin mittaus tapahtuu aina jokaisen kierroksen anniilauvaiheen lopussa (HybProbe Format) kanavilla F2 (640 nm) ja F1 (530 nm). LightCycler[®]-ajon tulokset analysoitiin LightCycler[®] Software 3.5.3 -ohjelmiston avulla (Roche Diagnostics). LightCycler[®]-ajon jälkeen qRT-PCR-tuotteet ajettiin 1,5 %:isessa elektroforeesigeelissä kuten edellä (ks. kpl 4.5.2).

4.7. Kaksoismolekyylimajakka-FRET

4.7.1. Molekyylimajakoiden suunnittelu ja valmistus

Tulevia tutkimuksia silmälläpitäen kaksoismolekyylimajakat suunniteltiin tunnistamaan avidiinin ja AVR4/5:n mRNA:t. Kaksoismolekyylimajakoiden suunnittelussa käytettiin apuna GeneBank-tietokannassa julkaistuja avidiinin ja AVR4/5:n mRNA- ja DNA-sekvenssejä (*accession numbers* X05343 ja Z22883), jotka käännettiin cDNA:iksi EMBOSS-ohjelmistopakettien extractseq- ja seqret-ohjelmilla sekä rinnastettiin Clustal W (1.82) -ohjelmistolla (EMBL-EBI).

Kaksoismolekyylimajakat suunniteltiin komplementaariseksi kohteidensa kanssa. Kohdesekvenssi sijaitsee kummassakin geenissä eksonissa kaksi, jossa esiintyy eniten vaihtelua geeniperheen sisällä. Lisäksi uskottiin, että alue osallistuu suoraan mahdollisimman vähän solun silmukointi- ja polyadenylaatioprosesseihin. Molekyylimajakoiden kohdesekvenssit ja muotoilut on esitetty taulukossa 4.4. Avidiini-kohdentuvat molekyylimajakat suunniteltiin hybridisoitumaan mRNA:n nukleotidien 240–304 kanssa ja AVR4/5-kohdentuvat molekyylimajakat suunniteltiin hybridisoitumaan mRNA:n nukleotideihin 199–262. Varsi-silmukka- ja molekyylimajakka-kohderakenteille laskettiin sulamislämpötilat Mfold-ohjelmiston (Zuker, 2003) ja HyTher-ohjelmiston (Peyret ym., 1999) avulla. Molekyylimajakoiden varsi-silmukka-rakenteen sulamislämpötila oli noin +51 °C:ta kaikissa molekyylimajakoissa. Molekyylimajakka-kohde-rakenteen sulamislämpötilat olivat +82,5 °C:ta ja +90,0 °C:ta avidiini-molekyylimajakoille sekä +75,7 °C:ta ja +83,9 °C:ta AVR4/5-molekyylimajakoille.

Kaikki molekyylimajakat suunniteltiin ”*shared-stem*”-tyyppisiksi, joissa fluoroforin vieressä sijaitseva varsiosa (*stem*) osallistuu hybridisaatioon kohteen kanssa, kun taas majakoiden vaimentajan puoleinen pää osallistuu vain varren muodostamiseen (Tsourkas ym., 2002). Näin fluoroforien välinen etäisyys saatiin vakioksi. Molekyylimajakoiden varsiosa suunniteltiin seitsemän emäksen pituiseksi muissa, paitsi AVR4/5-

vastaanottajamolekyylimajakassa, jossa varsiosa on kuuden emäksen pituinen. Molekyylimajakkaparin väliin jäävän alueen pituus on viisi emästä kummassakin mRNA:ssa. Luovuttajafluoroforina käytettiin Oregon Green-488 (OG) -fluoroforia, joka liitettiin luovuttajamolekyylimajakoiden 5'-päähen. Luovuttajamajakoiden 3'-päähen liitettiin BHQ-1-vaimentaja. Vastaanottajamolekyylimajakoissa 5'-pään fluoroforina käytettiin Texas Red (TxR) -fluoroforia ja 3'-päähen liitettiin BHQ-2-vaimentaja. Kaksoismolekyylimajakoiden suunnittelussa auttoivat Teemu Ihalainen ja Henri Nordlund. Kaikki molekyylimajakat syntesoiitiin biomers.netin toimesta (Ulm, Saksa).

Taulukko 4.4. Molekyylimajakoiden kohdesekvenssit ja muotoilut.

Vilityypin (cDNA) avidiini, kohde (nukleotidit 240–304)

5'-ATGAGATCAAAGAGTCACCACTGCATGGGACacaaaACACCATCAACAA
GAGGACCCAGCCCACCTTTGGC-3'

Avidiini, kaksoismolekyylimajakat

Luovuttaja 5'-/OG/GTCCCATGCAGTGGTGACTCTTTGATCTCATATGGGAC

MM: /BHQ-1/-3'

Vast.ottaja 5'-/BHQ-2/ACACCATGGTGGGCTGGGTCCTCTTGTTGATGGTGT

MM: /TxR/-3'

Avidiini, kohdeoligonukleotidi

5'-ACATCAAATGAGATCAAAGAGTCACCACTGCATGGGACacaaaACACCAT
CAACAAGAGGACCCAGCCCACCTTTGGCT-3'

Vilityypin (cDNA) AVR4/5, kohde (nukleotidit 199–262)

5'-GATAATCCAGGAAACATCACGCTATCACCACTgcttgGGATCCAACACAA
AAGAGCCAGCCAGCCCACCTTTGGC-3'

AVR4/5, kaksoismolekyylimajakat

Luovuttaja 5'-/OG/AGTGGTGATAGCGTGATGTTTCCTGGATTATCCACCACT

MM: /BHQ-1/-3'

Vast.ottaja 5'-/BHQ-2/GGATCCGCTGGCTGGCTCTTTTGTGTTGGATCC/TxR/-3'

MM:

AVR4/5, kohdeoligonukleotidi

5'-TGTAGCGGATAATCCAGGAAACATCACGCTATCACCACTgcttgGGATCC
AACACAAAAGAGCCAGCCAGCCCACCT-3'

Molekyylimajakka (MM): alleviivatut emäkset muodostavat puolet varsiosasta, mutta eivät hybridisoidu kohteen kanssa. Oregon Green (OG) ja Texas Red (TxR) ovat käytetyt fluoroforit. BHQ-1 ja BHQ-2 ovat vaimentajia. Kohde: emäkset, jotka jäävät luovuttaja- ja vastaanottajamolekyylimajakoiden väliin, on merkitty pienellä vahvistetulla tekstillä.

4.7.2. Spektrofluorometri

Molekyylimajakoiden sekä totaali-RNA-näytteiden *in vitro* -mittaukset suoritettiin Victor² Multilabel Counter -laitteella (PerkinElmer[®], Boston, MA, USA #1420-012). Laitteeseen ohjelmoitiin fluoresenssia mittaava ohjelma, jossa eksitaatio tapahtui aallonpituudella 485 nm ja emissiot mitattiin sekä aallonpituudella 615 nm että aallonpituudella 535 nm. Eksitaatio- ja emissioaallonpituudet eivät vastanneet fluorofo-reille ilmoitettuja eksitaatio- ja emissiomaksimiaallonpituuksia, mutta olivat niitä

lähimmät mahdolliset. Ohjelmaan määritettiin mitat 96-kuoppalevyllä (U-Bottom, Costar®) tapahtuvaa mittaamista varten.

Molekyylimajakoiden *in vitro* -mittaukset tehtiin 96-kuoppalevyllä. Sekä avidiinin että AVR4/5:n osalta mitattiin molemmat molekyylimajakat erikseen ilman kohdetta ja kohteen kanssa sekä molemmat molekyylimajakat yhdessä ilman kohdetta ja kohteen kanssa. Majakoiden kohteena *in vitro* -mittauksissa oli kaksoismolekyylimajakkaparille komplementaarisen sekvenssin sisältävä yksijuosteinen oligo-DNA, joka saatiin molekyylimajakoiden tilauksen yhteydessä (biomers.net, Ulm, Saksa). Mittaukset suoritettiin 200 µl:n tilavuudessa Tris-HCl-puskurissa (pH 7,4) ja niissä käytettiin molekyylimajakoiden molaarisia pitoisuuksia: 50 nM, 100 nM, 150 nM ja 200 nM. Kohde-DNA:n molaarinen pitoisuus oli näytteessä sama kuin molekyylimajakoiden. Kaikki *in vitro* -mittaukset tehtiin vähintään neljänä rinnakkaisena. Totaali-RNA-näytteet valmistettiin Tris-HCl-puskuriin, 200 µl:n tilavuuteen, joka sisälsi 50 µl totaali-RNA-näytettä ja 200 nM kaksoismolekyylimajakoita. 96-kuoppalevyllä pipetoituja näytteitä lämmitettiin ensin +65 °C:n lämpötilassa 15 minuuttia ja sitten +37 °C:n lämpötilassa 75 minuuttia. Mittaukset tehtiin huoneenlämmössä molekyylimajakoille ohjelmoidulla ohjelmalla. Tulokset analysoitiin Windows Excel -ohjelmiston (Microsoft) sekä SPSS 15.0 -ohjelmiston (SPSS Finland Oy) avulla.

4.7.3. Fluoresenssimikroskopia

4.7.3.1. Hyönteissolujen infektiio ja elektroporaatio

Spodoptera frugiperda (Sf9) -hyönteissoluja jaettiin infektiota varten 10 ml:n solususpensioina tiheyteen 1×10^6 solua/ml HyQ SFX-Insect -mediumia. Infektioissa käytettiin (cDNA)avidini- tai (cDNA)AVR4/5-insertin sisältäviä bakulovirusbakteriofageja P2-virusstokeista, jota laitettiin 40 µl:aa yhtä infektoitavaa kasvatusta kohden. Infektoidut kasvatukset jätettiin kasvamaan +27 °C:n lämpötilaan.

Hyönteissolujen elektroporaatioon käytettiin Nucleofector®-laitetta (Amara Biosystems, Köln, Saksa). Nucleofector®-teknologia on tehokas virukseton geeninsiirtomenetelmä, joka perustuu jo kauan tunnettuun elektroporaatiomenetelmään, mutta jota on merkittävästi parannettu. Elektroporaatiossa solukalvoon tehdään reikiä sähkövirran avulla, joiden kautta siirrettävät molekyylit siirtyvät sytoplasmaan ja edelleen tumaan (Chang ym., 1992). Nucleofector®-menetelmässä käytetään solutyypispesifisiä sähkö-

virran ja liuosten yhdistelmiä, joiden avulla polyanionisia makromolekyylejä voidaan siirtää soluun ja jopa suoraan tumaan (Gresch ym., 2004).

Valmistajalla ei vielä ollut varsinaisesti Sf9-hyönteissoluille optimoitua kittiä, eikä laitteeseen ollut kehitelty valmista ohjelmaa tälle solulinjalle, joten tutkimuksessa käytettiin *Drosophila melanogaster* S2 -soluille kehiteltyä kittiä (The Cell Line Nucleofector Solution Kit V, Amaxa biosystems, #VCA-1003) sekä O-20-ohjelmaa, valmistajan suosittelemana. Konfokaalimikroskopointia varten näytteet valmistettiin elektroporaation jälkeen peitelaseille (24 mm × 24 mm, Menzel-Gläser) sekä halkaisijaltaan 60 mm:n Petri-maljoille (Cellstar®).

Ennen näytteiden valmistelua tehtiin seuraavia esivalmisteluja: käytettävä Nucleofector™-liuos valmistettiin lisäämällä siihen 0,5 ml:aa Supplement-liuosta, jonka jälkeen liuos jätettiin esilämpimään huoneenlämpöön. Kolmeen 6-kuoppalevyn kuoppaan laitettiin 70 %:isella etanolilla pestyt peitelasit ja kuoppiin lisättiin 2 ml:aa HyQ SFX-Insect -mediumia. Kolmeen halkaisijaltaan 60 mm:n Petri-maljaan pipetoitiin 2,5 ml mediumia. 6-kuoppalevy, maljat sekä noin 5 ml mediumia laitettiin lämpimään +27 °C:n lämpötilaan. Jokaista näytettä varten valmistettiin 0,5 µg:aa (40 pmol) sekä luovuttavaa että vastaanottavaa molekyyli-majakkaa.

Infektio oli käynnissä 42 tuntia ennen kuin näytteet käsiteltiin elektroporaatiota varten. Infektoitujen sekä infektoimattomien solujen (SK-näyte) tiheydet määritettiin ja solususpensioista pipetoitiin noin 2×10^6 solua näytettä kohden. Näytteet sentrifugoitiin (100 × g, 10 min) ja supernatanti poistettiin tarkasti. Pelletti resuspensoitiin 100 µl:aan huoneenlämpöistä Nucleofector™-liuosta ja solususpensio yhdistettiin molekyyli-majakoiden kanssa. Näyte siirrettiin Amaxa-kyvetiin ja kyveti suljettiin korkilla, jonka jälkeen kyveti asetettiin laitteeseen ja ohjelma aloitettiin. Ohjelman jälkeen näytteeseen lisättiin 500 µl:aa esilämmitettyä mediumia ja näyte siirrettiin edellä valmisteltuun kuoppaan/maljaan. Näytteet jätettiin lopuksi inkuboitumaan +27 °C:n lämpötilaan muutamaksi tunniksi, jotta solut tarttuisivat pohjaan.

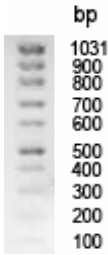
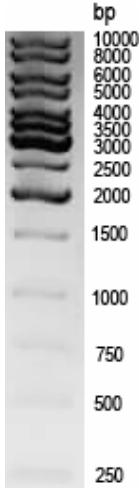
4.7.3.2. Mikroskopia

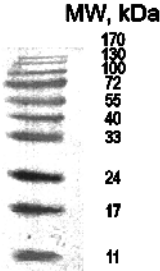
Elektroporoidut näytteet käsiteltiin fluoresenssimikroskopointia varten. Petri-maljoilla oleviin näytteisiin lisättiin, kiinnittyneitä soluja mahdollisimman vähän häiritsemättä, 3 ml esilämmitettyä mediumia, jotta mikroskoopin objektiiville saatiin riittävästi fokusointitietäisyyttä mediumissa. Peitelaseilla olevat näytteet pedattiin objektilaseille

(Menzel-Gläser) VECTASHIELD[®]-petausaineen (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA, #H-1000) kanssa, johon oli lisätty DAPI:a. DAPI (*4'6-diamidino-2-phenylindole*) on DNA:han sitoutuva, ja RNA:han interkaloituva, fluoresoiva väriaine (Kapuscinski, 1995), jonka emissiomaksimi on DNA:han sitoutuneena 461 nm:ssä (sininen alue). Sinisellä alueella emittoivan fluoresenssin takia DAPI:a voi käyttää yhdessä useamman, eri alueella fluoresoivan, väriaineen kanssa samassa näytteessä.

Peitelaseilla olevat näytteet oli tarkoitus tarkastella käänteisfluoresenssimikroskoopilla (Olympus IX70), mutta laitetta ei saatu lopulta toimimaan. Elävien solujen näytteet tarkasteltiin Olympuksen cell[^]M-kuvaussysteemin avulla, johon kuului BX61WI-kamera, MT10-valaistusjärjestelmä, ORCA-ER CCD-digitaalikamera (Hamamatsu) sekä cell[^]M-ohjelmisto järjestelmän hallintaa sekä kuvan hankkimista, muokkausta ja analysointia varten. Näytteet kuvattiin noin 46 tuntia infektion jälkeen. Eksitaatiossa käytettiin 492 nm:n filteriä ja emissiot detektoitiin aallonpituuksilla 540 nm ja 630 nm. Valotusaika oli 4 sekuntia.

4.8. Liuokset ja reagenssit

10 × AMV Buffer: (Finnzymes, #F570B)	25 mM Tris-HCl (pH 8,3) 50 mM KCl 2,0 mM DTT 5,0 mM MgCl ₂
10 × entsyymiseos:	(FastStart DNA Master HybProbe, Roche) FastStart Taq DNA polymeraasi Reaktiopuskuri dNTP-seos (sisältää dTTP:n sijasta dUTP:ia) 10 mM MgCl ₂ Säilytys -20 °C
6 × latauspuskuri: (6 × Loading Dye Solution, Fermentas, #R0611)	10 mM Tris-HCl (pH 7.6) 0.03 % bromofenolisininen 0.03 % ksyleenisyanoli FF 60 % glyseroli 60 mM EDTA
Ammoniumpersulfaatti: (Sigma, #A9164) APA-puskuri:	10 %:inen, liuotettu veteen, säilytys +4 °C 0,1 M NaHCO ₃ 1 mM MgCl ₂ ·6 × H ₂ O Liuoksen pH säädettiin NaOH:lla 9,8:aan
BCIP: (Sigma, #B8503)	5-bromo-4-kloro-3-indolyylifosfaatti 15 mg/ml liuotettuna 100 %:iseen dimetyyliformamidiin. Säilytys -20 °C
Blokkausliuos:	5 %:inen (w/v) rasvaton maitojauhe liuotettuna 1 × TBS-puskuriin
Cellfectin [®] Reagent: (Invitrogen, #10362-010)	N,N ^I ,N ^{II} ,N ^{III} -tetrametyyli-N,N ^I ,N ^{II} ,N ^{III} ,- tetrapalmityylispermiini (TM-TPS), dioletyylifosfatidyylietanoliamiini (DOPE) suhteessa 1:1,5
GeneRuler [™] 100 bp DNA Ladder: (Fermentas, #SM0241) 1,5 %:inen agarosi	
GeneRuler [™] 1 kb DNA Ladder: (Fermentas, #SM0311) 1 %:inen agarosi	

IPTG: (Fermentas, #R0392)	Isopropyyli- β -D-tiogalaktopyranosidi, säilytys -20 °C
Kodak-puskuri: kantaliuos (10 \times)	30,3 g Tris 144 g glysiini tilavuus säädetään steriilillä vedellä litraksi
Kodak-puskuri: käyttöliuos	200 ml kantaliuosta 400 ml metanolia 1400 ml steriiliä vettä
LB-maljat:	Kuten LB-liuos, mutta seokseen lisätään 15 g:aa Bacto-agaria. Agar sulatetaan liuokseen (121 °C, 20 min) ja liuos maljataan. Jäähdyneeseen (48 °C) liuokseen voidaan lisätä antibiootteja ennen maljausta. Säilytys +4 °C
LB-liuos:	10 g Bacto-tryptone 5 g Bacto-yeast extract 10 g NaCl pH säädetään 10 M NaOH:lla 7,0:aan ja tilavuus steriilillä vedellä litraksi
MOPS-puskuri (5 \times):	200 mM MOPS (pH 7,0) 50 mM natriumasetaatti 5,0 mM EDTA (pH 8,0) Liuoksen pH säädettiin NaOH:lla 7,0:aan
NBT: (Sigma, #N5514)	10 mg/ml, Nitro Blue Tetrazolium -tabletti liuotettuna 1 ml:aan deionisoitua vettä, säilytys -20 °C
PBS-puskuri:	Ca & Mg Free, Orion Diagnostica, Espoo, #VNR67026
PageRuler Prestained Protein Ladder -molekyylimarkkeri: (Fermentas, #SM0679) 15 %:inen SDS-PAGE	 <p>MW, kDa 170 130 100 72 55 40 33 24 17 11</p>
RNA-latauspuskuri:	50 % glyseroli 1 mM EDTA (pH 8,0) 0,4 % bromofenolisininen, säilytys -20 °C

RNA-näytepuskuri:	10,0 ml deionisoitu formamidi 3,5 ml 37 % formaldehydi 2,0 ml 5 × MOPS-puskuri
SDS-PAGE alageeli (15 %):	2,3 ml H ₂ O 5,0 ml 30 % akryyliamidiseos (BioRad, 29,2 % akryyliamidia ja 0,8 % N,N'- metyleenibisakryyliamidia) 2,5 ml 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8) 100 µl 10 % SDS 100 µl 10 % APS 4 µl TEMED
SDS-PAGE-näytepuskuri (2 ×):	125 mM Tris-HCl (pH 6,8) 4 % SDS 20 % glyseroli 10 % β-merkapttoetanoli 0,004 % bromofenolisininen
SDS-PAGE ylägeeli (5 %):	2,1 ml H ₂ O 0,5 ml 30 % akryyliamidiseos (BioRad) 380 µl 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8) 30 µl 10 % SDS 30 µl 10 % APS 3 µl TEMED
SOC-liuos:	2 g Bacto-tryptone 0,5 g Yeast-extract 1 ml 1 M NaCl 0,25 ml 1 M KCl pH säädetään 10 M NaOH:lla 7,0:aan ja tilavuus steriilillä vedellä 100 ml:ksi Ennen käyttöä lisätään 2 ml 1 M glukoosia
Solution I:	15 mM Tris-HCl, pH 8,0 10 mM EDTA 100 µg/ml RNasi A, säilytys +4 °C
Solution II:	0,2 N NaOH 1 % SDS
Solution III:	3 M KCH ₃ COO (pH 5,5) Säilytys +4 °C
TAE-puskuri (50 ×):	242 g Tris 100 ml 0,5 M Na ₂ EDTA (pH 8,0) 57,1 ml jääetikkahappo Tilavuus säädetään steriilillä vedellä litraksi
TE-puskuri:	10 mM Tris-HCl (pH 8) 1 mM EDTA

TBS-puskuri:	20 mM Tris-HCl (pH 7,5) 0,5 M NaCl
TBST-puskuri:	1,0 ml:aa Tween 20:tä litrassa TBS-puskuria
TEMED: (Sigma, #T7024)	N,N,N',N'-tetrametyleeniamiini, säilytys +4 °C
Tris-glysiini-ajopuskuri (5 ×):	0,5 M Tris-emäs 1,95 M glysiini 0,5 % SDS
Tris-HCl (1M, pH 7,4):	121,14 g Tris-emäs pH säädetään väkevällä HCl:lla 7,4:ään ja tilavuus sterilillä vedellä litraksi
X-gal: (Fermentas, #0401)	5-bromo-4-kloro-3-indolyyli-β-D- galaktopyranosidi, säilytys -20 °C

5. Tulokset

5.1. Rekombinanttisten bakulovirusten valmistaminen

Avidiini-, AVR1-, AVR2-, AVR3-, AVR4/5-, AVR6- tai AVR7-geenin cDNA-insertin sisältävillä luovuttajavektoreilla (amp^r, gent^r) transformoitiin DH10Bac[™] *E. coli* -soluja (kan^r, tet^r) ja kohdennetun transposition onnistuminen voitiin havaita kanamysiiniä, tetrasykliiniä ja gentamysiiniä sekä X-gal- ja IPTG-liuosta sisältäville LB-maljoille syntyneiden bakteeripesäkkeiden väristä: transposition onnistuminen tuottaa valkoisen ja epäonnistuminen sinisen pesäkkeen. Kohdennetun transposition onnistuminen pyrittiin varmistamaan jatkosiirrostamalla valkoisista pesäkkeistä viivakasvatukset uusille maljoille. Jatkosiirrostuksia tehtiin, valkoisten pesäkkeiden määrästä riippuen, 1–10:stä kloonista transformaatiota kohden, joista kaikki osoittautuivat valkoisiksi. Valkoisista viivakasvatuksista tehtiin 2 ml:n suspensiokasvatukset, joista eristetyistä bakmidi-DNA-näytteistä määritettiin DNA-pitoisuudet ja puhtaus. Bakmidi-DNA:iden puhtautta arvioivat r-arvot (A_{260}/A_{280}) ja pitoisuudet on esitetty taulukossa 5.1. R-arvot osoittavat, että eristetyt näytteet sisältävät korkealaatuista kaksijuosteista DNA:ta, sillä näytteiden r-arvot ovat lähellä arvoa 1,8. Jos r-arvo olisi alle arvon 1,8, näyte olisi todennäköisesti kontaminoitunut proteiineilla tai aromaattisilla aineilla kuten fenolilla. R-arvo 2,0 tai yli viittaa RNA-kontaminaatioon (Sambrook ym., 1989).

Taulukko 5.1. Virus-DNA:iden pitoisuudet.

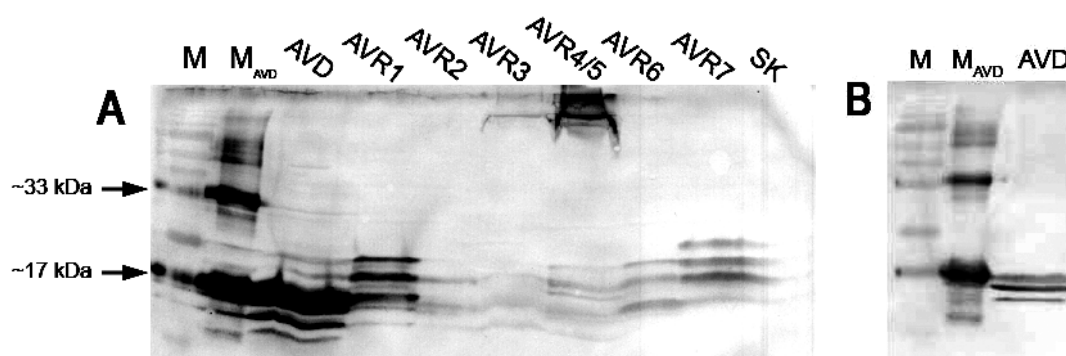
<i>Bakmidi-DNA</i>	<i>r-arvo</i>	<i>Pitoisuus (µg/ml)</i>
AVD	1,88	1804
AVR1	1,886	1782
AVR2	1,860	1719
AVR3	1,892	1224
AVR4/5	1,882	1137
AVR6	1,951	969,2
AVR7	1,898	1013

Suspensiokasvatuksista eristetyllä bakmidi-DNA:lla transfektoitiin Sf9-hyönteissoluja, joita kasvatettiin kolme päivää. Transfektion onnistumista seurattiin mikroskooppisesti kasvun ajan. Infektoidut solut olivat pullistuneita, ja osa niistä oli irronnut pohjasta tai hajonnut kolmen vuorokauden jälkeen, jolloin solut kerättiin. Solususpensioista erotettiin supernatantti ja pelletti. Supernatantti otettiin talteen ("P1-virusstokit") ja solupelletistä valmistettiin näytteet SDS-PAGE-analyysiä ja immunoblottausta varten. Vasta-ainevärijätyillä nitroselluloosakalvoilla ei voitu havaita proteiinia, minkä syynä arveltiin olevan se, että transfektiossa käytettyjen rekombinanttisten bakmidien

aikaansaama bakulovirus- ja proteiinituotto oli vielä liian heikkoa. Bakulovirusia monistettiin infektoimalla P1-virusstokilla suurempi määrä hyönteissoluja.

5.2. Proteiinien tuottaminen ja Western blot -analyysi

Avidiini ja kaikki AVR-proteiinit karakterisoitiin Western blot -menetelmällä, jotta varmistuttaisiin, että infektoidut solut tuottavat haluttua proteiinia ja siten todennäköisesti myös haluttua mRNA:ta. Kutakin proteiinia tuotettiin hyönteissoluissa 30 ml:n tilavuudessa. Kolmen päivän kasvatuksen jälkeen solususpensioista otettiin 1 ml:n näyte, joka erotettiin pelletti- ja supernatantinäytteiksi sekä analysoitiin Western blot -menetelmällä (Kuva 5.1 A ja B). Kuvassa 5.1. A on esitetty solupelletti-näytteet, joista voidaan todeta, että Sf9-hyönteissolut saatiin onnistuneesti tuottamaan avidiinia ja AVR-proteiineja. Kuvassa nähdään myös, että polyklonaalinen jäniksen anti-avidini vasta-aine tunnistaa avidiinia heikommin AVR1:n ja AVR4/5–7:t. Näitäkin heikommin vasta-aine tunnistaa AVR:t 2 ja 3. Tulos on aiemmin julkaistun tuloksen mukainen (Laitinen ym., 2002). Käytetty primaarivasta-aine ei tunnista proteiineja infektoimattomista Sf9-hyönteissoluista (SK-näytteet).

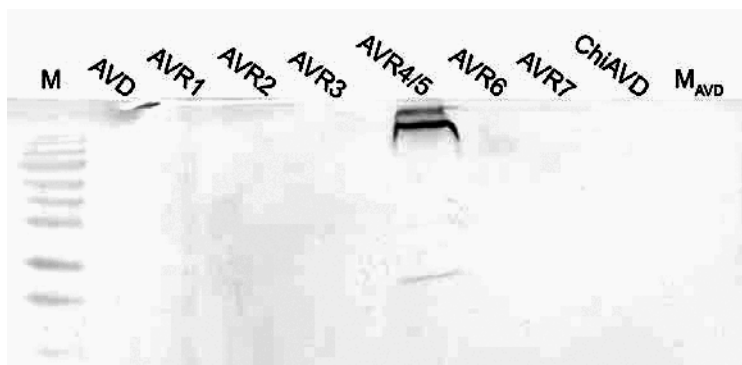


Kuva 5.1. Western blot -analyysi tuotetuille proteiineille. Kuvassa on esitetty infektoiduista Sf9-soluista eristetyt solupellettinäytteet (A) sekä supernatantinäytteet (B). Primaarivasta-aineena oli polyklonaalinen jäniksen anti-avidini ja sekundaarivasta-aineena vuohen anti-jänis IgG. Infektoidut Sf9-solut saatiin tuottamaan kaikkia haluttuja proteiineja (A, kaivot 3–9). Erikokoiset vyöhykkeet edustavat proteiinien erilailla glykosyloitua muotoja. Suurimolekyylipainoiset vyöhykkeet AVR3- ja AVR4/5-näytteiden kohdalla ovat tetrameeri- ja oligotetrameerimuotoja. Infektoimattomista soluista eristetty kontrollinäyte (SK) on negatiivinen. Vain avidiinia on eritetty selvästi mediumiin (B). M tarkoittaa molekyylipainomarkkeria, M_{AVD} on avidiinimarkkeri.

Avidiinin ilmentyminen sekä solupellettinäytteissä että mediumnäytteissä on yhtenevä aiemmin julkaistun tuloksen kanssa (Airenne ym., 1997). Avidiini esiintyy Western blot -analyysissä yleensä monomeerinä ja vähintään kolmena glykosylaatiotasoltaan erilaisena muotona. SDS-PAGE-näytteiden valmistuksessa käytettävät denaturoivat olosuhteet (näytepuskuri ja lämpökäsittely) hajottavat avidiinin monomeerimuotoon,

vaikka biotiinin läsnä ollessa sen lämpöstabiilisuus on korkeampi. Solupellettinäytteissä eniten ilmentyvä monomeerimuoto on noin 18 kDa:in kokoinen ja kahden vähemmän ilmentyvän muodon koot ovat noin 17 kDa:ia ja 15,5 kDa:ia. Supernatantinäytteissä vahvimmin ilmentyy 17 kDa:in kokoinen muoto, kahden muun muodon ilmentyessä vähemmän. Western blotissa erottuvista vyöhykkeistä pienin (15,5 kDa) edustaa todennäköisesti glykosyloimatonta avidiinia ja kaksi muuta edustavat erilailla glykosyloituja muotoja. Lisäksi avidiinimarkkerissa näkyvä voimakas noin 33 kDa:in kokoinen vyöhyke on todennäköisesti avidiinidimeeri. Avidiinimarkkeri sisältää 5 µg:aa avidiinia kaivoa kohden.

Myös AVR-proteiinit ilmentyvät Western blot -analyysissä pääasiassa monomeereina, mutta niiden glykosyloidut muodot eroavat avidiinin vastaavista (Laitinen ym., 2002). Lisäksi osa AVR-proteiineista on avidiinia lämpöstabiilimpia ja tarvitsevat tässä kokeessa käytettyä lämpökäsittelyä (10 min, +95 °C) korkeamman lämpötilan ja pidemmän inkubaatioajan denaturoitukseksi monomeereiksi. Solupellettinäytteistä (kuva 5.1 A) voidaankin todeta, ettei lämpökäsittely ollut riittävä hajottamaan kaikkea AVR3- ja AVR4/5-proteiinia monomeerimuotoon, jolloin osa proteiineista näkyy tetrameeri- ja oligotetrameerimuodoissa (Hytönen ym., 2004). Supernatantinäytteissä vain avidiinia on eritetty selvästi mediumiin (kuva 5.1 B).



Kuva 5.2. Western blot -analyysi AVR4/5-spesifisellä vasta-aineella. Kuvassa on esitetty infektoiduista Sf9-soluista eristetyt solupellettinäytteet (kaivot 2–8) sekä kimeerinen avidiini -näyte (kaivo 9). Primaarivasta-aineena käytetty hiiren monoklonaalinen anti-AVR4/5-vasta-aine tunnistaa spesifisesti vain AVR4/5-proteiinin, vaikka kimeerinen avidiini sisältää useita AVR4/5:n aminohappoja käsittävän alueen. AVR4/5 esiintyy kalvolla pääasiassa tetrameeri- ja oligotetrameerimuodoissa, mutta kalvosta voidaan erottaa myös heikko monomeerivyöhyke. Sekundaarivasta-aineena oli vuohen anti-hiiri IgG. M on molekyylipainomarkkeri, M_{AVD} on avidiinimarkkeri.

Western blot -analyysi, jossa nitroselluloosakalvolle siirrettiin avidiini- ja AVR-pellettinäytteiden rinnalla kimeerinen avidiini ChimAVD(I117Y), on esitetty kuvassa 5.2. Kuvassa nähdään, että kokeiltavana ollut hiiren monoklonaalinen anti-AVR4/5-

primaarivasta-aine tunnistaa vain AVR4/5-proteiinin, vaikka ChimAVD(I117Y)-proteiini sisältää useita AVR4/5:n aminohappoja käsittävän alueen (ks. kpl 4.3.1). Suurin osa AVR4/5-proteiinista esiintyy kalvolla tetrameeri- ja oligotetrameerina, mutta kuvassa voidaan erottaa myös heikko monomeerivyöhyke.

5.3. Totaali-RNA:n tuottaminen ja todentaminen

Avidiinin ja AVR4/5:n mRNA:ta tuotettiin infektoimalla Sf9-hyönteissoluja 50 ml:n tilavuudessa (tiheydessä $0,5 \times 10^6$ solua/ml) avidiini- tai AVR4/5-insertin sisältävillä bakuloviruksilla ja eristämällä niistä totaali-RNA aikapisteissä: 17 h pi, 20 h pi ja 41 h pi. Myös infektoimattomista Sf9-soluista eristettiin totaali-RNA-näyte. Totaali-RNA-näytteiden r-arvot (A_{260}/A_{280}) ja pitoisuudet on esitetty taulukossa 5.2. Infektoimattomista Sf9-soluista eristetty totaali-RNA-näyte on merkitty taulukkoon lyhenteellä SK (solukontrolli). R-arvot osoittavat, että eristetyt näytteet sisältävät pääasiassa korkealaatuista RNA:ta, jonka tulisi vedessä mitattuna olla noin 2,0 (Sambrook ym., 1989). Vain näytteessä AVR 41 h pi on huomattavan korkea r-arvo ja vastaavasti saatu RNA-pitoisuus on matala.

Taulukko 5.2. Totaali-RNA-näytteiden pitoisuudet.

<i>TotRNA-näyte</i>	<i>r-arvo</i>	<i>Pitoisuus ($\mu\text{g/ml}$)</i>
AVD 17 h pi	2,71	140
AVD 20 h pi	2,12	410
AVD 41 h pi	2,44	235
AVR 17 h pi	2,67	142
AVR 20 h pi	2,28	665
AVR 41 h pi	3,41	89
SK	2,007	676

5.3.1. Denaturoiva RNA-elektroforeesigeeli

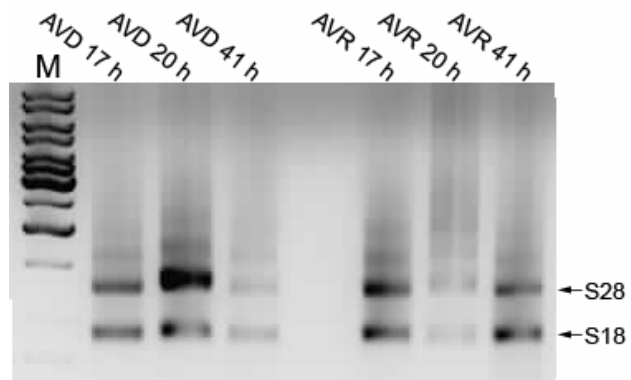
Totaali-RNA-näytteet ajettiin 1 %:iseen agarosigeeliin, joka sisälsi formaldehydiä. Jokaista näytettä käytettiin 3 μl :aa kaivoa kohden, mikä vastasi noin 0,3–2 μg totaali-RNA:ta. Etidiumbromidin loppukonsentraatio geelissä oli noin 0,5 $\mu\text{g/ml}$. RNA-geeliä ajettiin hitaasti matalalla jännitteellä (30 V), kunnes latauspuskurissa ollut väriaine (bromofenolisininen) oli saavuttanut $\frac{3}{4}$ geelin pituudesta. Agarosii-formaldehydigeeli epäonnistui (kuva ei näkyvissä). Kaikkien näytteiden todennäköisesti sisältämä totaali-RNA on täysin hajonnut ja näkyy geelissä pienimolekyyli-painoisena huntuna. RNA:n Etidiumbromidivärjäyksen tulisi erottaa (eukaryootinäytteessä) ribosomaalisen RNA:n

(rRNA) alayksiköt 18S sekä 28S, jotka ovat hyönteisillä noin 2000 ja 4000 emäksen kokoisia (*Drosophila melanogaster*) (Pellegrini ym., 1977).

5.3.2. Agarosigeelielektroforeesi

Koska denaturoiva RNA-elektroforeesigeeli epäonnistui, ajettiin totaali-RNA-näytteet 1 %:iseen agarosigeeliin, joka sisälsi etidiumbromidia (kuva 5.3). Agarosigeelin denaturoimattomat olosuhteet eivät ole suotuisat RNA-näytteiden erottelemiseen geelissä, sillä RNA muodostaa siinä intramolekulaarisia sekundaarirakenteita eikä tällöin ajaudu oikean kokonsa mukaan. Tarkoituksena oli kuitenkin selvittää ainoastaan, että RNA-näytteet olivat pysyneet hajoamattomina, mitä indikoi ribosomaalisen RNA:n alayksikköjen S18 ja S28 näkyminen geelissä ja minkä agarosigeeli on riittävä todentamaan (Kati Porkka, keskustelut). Jokaisista totaali-RNA-näytettä laitettiin noin 1 µg:aa kaivoa kohden.

Hyvälaatuisen RNA:n erottaa denaturoivassa agarosigeelissä siitä, että 18S- ja 28-vyöhykkeet ovat selvärajaisia, ja siitä, että 28S rRNA -vyöhyke on noin kaksi kertaa voimakkaampi kuin 18S rRNA -vyöhyke (Bryant & Manning, 1998). Kuvassa 5.3 nähdään, että rRNA-alayksiköt 18S ja 28S näkyvät kaikissa näytteissä, mutta 28 rRNA -vyöhyke on selvästi 18S rRNA -vyöhykettä



Kuva 5.3. Totaali-RNA-näytteiden todentaminen tavallisessa agarosigeelissä. Jokaisessa kaivossa on noin 1 µg näytettä. Kaikissa näytteissä voidaan erottaa ribosomaalisen RNA:n alayksiköt S28 ja S18, mikä tarkoittaa, että näytteet sisältävät RNA:ta. M on DNA-molekyylipainomarkkeri, jonka asteikko ei vastaa vastaavia RNA-molekyylipainoja.

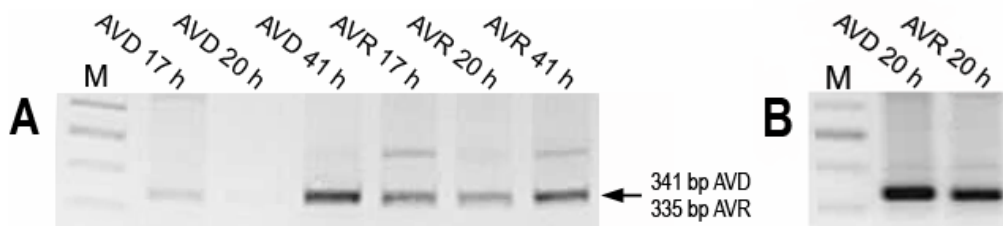
voimakkaampi vain AVD 20 h pi -näytteessä. Vyöhykkeet ovat kuitenkin tarkkarajaisia, ja osittaista RNA:n hajoamista on todennäköisesti tapahtunut vasta ajon aikana. Hajoamisen syynä on oletettavasti käytetyssä agarosissa olleet nukleaasit. Saman nukleaasit ehtivät mahdollisesti hajottamaan kaikki RNA:t denaturoivassa agarosigeelissä (kpl 5.3.1), sillä denaturoivan geelin ajaminen kestää huomattavasti pidempään kuin tavallisen agarosigeelin

Geelin perusteella RNA:n laatu ja pitoisuus ovat huonot näytteissä AVD 41 h pi ja AVR 20 h pi. Etenkin AVR 20 h pi -näytteen tulos poikkeaa aikaisemmasta absorbanssin avulla mitatusta tuloksesta. Mitattujen pitoisuuksien ja r-arvon mukaan näytteen tulisi

sisältää runsaasti korkealaatuista RNA:ta (ks. taulukko 5.2 kpl 5.3). AVR 41 h pi -näytteen sijaan näyttäisi sisältävän RNA:ta, vaikka mitatut pitoisuus- ja r-arvot ovat poikkeavahkot. Ribosomaalisten RNA:iden geelissä erottuvat koot eivät ole verrattavissa käytetyn DNA-molekyyli-markkerin (GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder) molekyylipainojen kanssa, sillä RNA kulkeutuu nopeammin kuin samankokoinen DNA (Wicks, 1986).

5.4. RT-PCR

Totaali-RNA-näytteet käännettiin cDNA:iksi käyttäen sekvenssispesifistä 3'-pään aluketta, jota laitettiin 20 pmol:a reaktiota kohden, sekä AMV-käänteiskopioentsyymiä. Totaali-RNA-näytteitä käytettiin 1 µl:aa reaktiota kohden, mikä vastasi näytteestä riippuen noin 90–665 ng:aa RNA:ta. cDNA:t monistettiin edelleen polymeraasi-ketjureaktio-menetelmällä (PCR). PCR-reaktioissa käytettiin AVD:lle sekä AVR4/5:lle yhteisiä 3'-pään ja 5'-pään alukkeita (ks. taulukko 4.1 kpl 4.5.2) ja entsyyminä Pfu DNA-polymeraasia. PCR-tuotteet ajettiin 1,5 %:iseen agarosigeeliin (kuva 5.4 A ja B).



Kuva 5.4. RT-PCR. Osassa A on esitetty jatkossa käytetyt 17 h pi ja 41 h pi -näytteet (kaivot 2, 4, 5 ja 7). 20 h pi -näytteet uusittiin myöhemmin (B), joita käytettiin jatkotutkimuksissa. RNA-eristys ja cDNA-synteesi ovat onnistuneet kaikkien näytteiden kohdalla, sillä näytteissä on monistunut oikean kokoista tuotetta (avidiini: 341 bp, AVR4/5: 335 bp).

Kuvassa 5.4 nähdään, että cDNA:sta on jokaisessa näytteessä monistunut oikean kokoista PCR-tuotetta, joka on avidiini-näytteissä 341 emäparin kokoinen ja AVR4/5-näytteissä 335 emäparin kokoinen. Näin ollen sekä RNA-eristys että cDNA-synteesi ovat onnistuneet kaikkien näytteiden kohdalla. Avidiininäytteiden osalta ilmentymistasot kasvavat 17 h pi -näytteestä 41 h pi -näytteeseen mentäessä, niin että 20 h pi ja 41 h pi -näytteiden ilmentymistasoissa ei ole paljonkaan eroa.

Myöhemmin tehtyjen 20 h pi -näytteiden geelikelkka, ja kaivojen koko, oli erikokoinen kun muiden näytteiden, mikä saattaa aiheuttaa visuaalista virhettä ilmentymistasojen tulkinnassa. AVR4/5-näytteissä vastaavaa kasvua ei voida havaita, sillä 20 h pi -näytteessä vaikuttaisi olevan eniten PCR-tuotetta. 17 h pi -näytessä on AVR4/5:nkin

kohdalla vähiten templaattia. Lisäksi voidaan kuvan ulkopuolelta todeta, että alukkeet eivät muodosta alukedimeerejä (Rychlik, 1995). Joissakin näytteissä on monistunut pidempää epäspesifistä tuotetta.

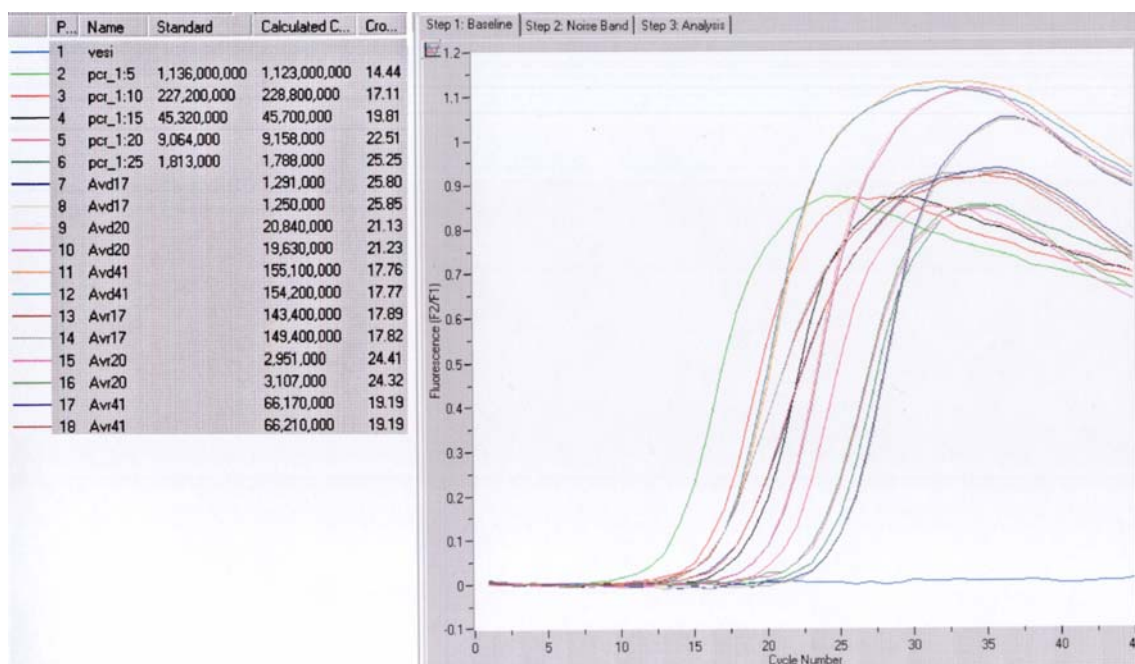
5.5. Kvantitatiivinen RT-PCR

Näytteiden avidiini- ja AVR4/5-mRNA-pitoisuudet määritettiin kvantitatiivisella RT-PCR:llä (LightCycler[®] 1.5 Instrument) ulkoisen standardin avulla käyttäen absoluuttista määritysmenetelmää. Detektioon käytettiin molekyylimajakoita. Ulkoinen standardi valmistettiin 41 h pi -näytteistä, jotka monistettiin kaksivaiheisella RT-PCR-menetelmällä. Monistetut DNA-fragmentit eroteltiin 1,5 %:isessa agarosigeelissä, eristettiin ja näytteiden DNA-pitoisuudet mitattiin. Lopullisissa LightCycler-ajoissa standardina käytettiin avidiinia, jonka pitoisuus geelieristyksen jälkeen oli 42,6 ng/μl. Standardi oli r-arvon mukaan myös puhdasta ja hyvälaatuista (r-arvo oli 1,85).

Kaksinauhaista DNA:ta olevat standardin pitoisuus muutettiin kopiolukuvuiksi ja sitä laimennettiin ensin suhteessa 1:40, josta tehtiin edelleen 1:5-laimennossarja. Kun jokaiseen kapillaariin laitettiin 2 μl standardia, standardien määrät vastasivat lopulta $1,136 \times 10^9$, $2,272 \times 10^8$, $4,532 \times 10^7$, $9,064 \times 10^6$ sekä $1,813 \times 10^6$ kopiota/2 μl kaksijuosteista DNA:ta. Laimennossarjasta valmistetut standardit monistettiin erillisissä kapillaareissa samassa ajossa näytteiden kanssa. Laimennossarjasta saaduista tuloksista laite muodosti standardikäyrän.

Templaattina käytettiin totaali-RNA:-näytteistä käännettyjä cDNA:ita, jotka laimennettiin suhteessa 1:50. Negatiivisena kontrollina käytettiin nukleaasitonta PCR-laatuista vettä. LightCycler[®]-ajon tulokset analysoitiin LightCycler[®] Software 3.5.3 -ohjelmiston avulla (Roche Diagnostics). LightCycler[®] 1.5 -laitteessa on sinistä valoa emittoiva diodi eksitaatiota varten (emissiomaksimi 470 nm:ssä) ja detektiota varten kolme fotodiodia erilaisilla aallonpituusfilttereillä varustettuna (Wittwer ym., 1997). Kolmen kanavan avulla fluoresenssia voidaan mitata aallonpituuksilla 530 nm (F1), 640 nm (F2) ja 710 nm (F3). LightCycler[®]-menetelmässä reporterifluoroforin emissiosignaali normalisoidaan jollakin muulla kolmesta fluoroforista saadulla signaalilla. Normalisointi korjaa fluoresenssisignaalin ilmenevää pientä vaihtelua, joka johtuu reaktioseosten tilavuuksissa ja pitoisuuksissa olevista eroista (Bustin, 2000). Molekyylimajakoiden fluoroforien mukaisesti tulokset analysoitiin asetuksella F2/F1, mikä tarkoittaa, että fluoresenssin signaali kanavalta 2 normalisoitiin kanavalta 1 saadulla signaalilla. Kaksoismolekyylimajakoilla saatu signaali oli normaali eli

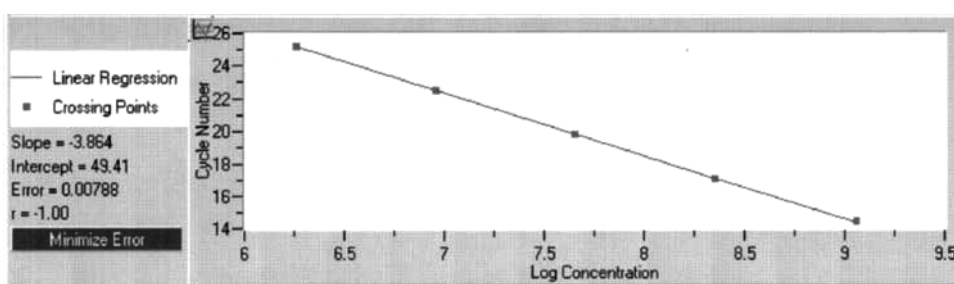
kaksoismolekyyli-majakat toimivat menetelmässä vastaavasti kuin LC-instrumentin omat hybridisoituvat koettimet.



Kuva 5.5. Kvantitatiivinen RT-PCR. Kuvassa on esitetty sekä standeille että näytteille saadut kynnsarvot sekä pitoisuudet, jotka ovat yksikössä kopiota/2 µl. Lisäksi kuvassa on esitetty näytteiden ja standardien monistuskäyrät. Kontrollina oleva vesinäyte on negatiivinen, joten reagensseissa ei ollut kontaminaatiota.

Kuvassa 5.5 esitetyt värilliset käyrät vastaavat standardien ja näytteiden fluoresenssiarvoja monistuskierrosten funktiona. Fluoresenssiarvot mitataan jokaisen monistuskierroksen aikana, ja ne edustavat monistetun tuotteen määrää siinä vaiheessa monistusreaktiota. Mitä enemmän näytteessä on templaattia reaktion alussa, sitä vähemmän kierroksia tarvitaan saavuttamaan kohta (Cp), jossa fluoresenssisignaali ensimmäisen kerran, tilastollisesti merkittävästi, ylittää koettimista/majakoista tulevan taust fluoresenssin. Cp-kohta sijaitsee aina eksponentiaalisen kasvun (log-linearisessa) vaiheessa (Bustin, 2000). Cp-arvoista voidaan standardikäyrän avulla laskea näytteen sisältämän templaatin alkuperäinen pitoisuus. Kuvassa 5.5 nähdään, että standardit monistuvat pitoisuuksiensa mukaan; suurimman standardin monistuskäyrä nousee ensin ja muut sen jälkeen todenmukaisessa järjestyksessä. Näytteet osuvat, avidiin 17 h pi -näytteitä lukuun ottamatta, standardien määrittämisalueeseen. Monistustehokkuutta ei mitattu erikseen, mutta käyrien perusteella tulkittu monistustehokkuus (log-linearisen vaiheen nousukulma) on lähes kaikissa näytteissä samakaltainen kuin standardeissa, lukuunottamatta AVR:n 17 h pi ja 41 h pi -näytteitä.

Vaikka AVD17 h pi -näytteet jäävät standardien ulkopuolelle, on ero pienimpään standardiin niin pieni, että näytteille saatua arvoa voidaan pitää edelleen luotettavana. Lisäksi kaikki standardit osuvat suoralle (kuva 5.6), josta pienimmät näytteet voidaan kohtalaisen varmasti tulkita jatkamalla suoraa hieman pienimmän standardin yli. Näyte ei myöskään ole merkitty hakasulkeisiin kuvassa 5.5, mikä on LightCycler®-laitteen tapa ilmoittaa, jos näytteen määrittämisessä standardisuoran avulla on ollut ongelmia. Kuvassa 5.5 nähdään lisäksi, että negatiivisena kontrollina toiminut vesinäyte on negatiivinen, mikä tarkoittaa, että käytetyissä reagensseissa ei ollut kontaminaatiota.



Kuva 5.6. Kvantitatiivisen RT-PCR:n standardisuora. Standardisuora on monistuskierrosten lukumäärän ja standardinäytteen pitoisuuden logaritmin funktiosta saatu lineaarinen regressiosuora. Kaikki standardit osuvat suoralle.

Näytteiden pitoisuuksien mittaamisessa käytetty standardisuora on esitetty kuvassa 5.6. Standardisuora on monistuskierrosten lukumäärän ja standardinäytteen pitoisuuden logaritmin funktiosta saatu lineaarinen regressiosuora. Standardisuora muodostamiseen käytettiin Fit Points -menetelmää, joka on toinen LightCycler® Software -ohjelmiston standardisuoran teossa käyttämä algoritmi. Standardisuorasta nähdään, että kaikki standardit osuvat suoralle, jolloin lineaarinen standardisuora pätee välillä $1,813 \times 10^6$ – $1,136 \times 10^9$ kopiota. Suoran vasemmalla puolella oleva ”virhe”-arvo (”Error”-value) on 0,00788. Hyväksyttävä ”virhe”-arvo on alle 0,2, ja se ilmaisee sitä, kuinka hyvin pisteet osuvat suoralle. Käyrän kulmakerroin (”Slope”) ilmaisee monistuksen kinetiikkaa. PCR-tehokkuus voidaan laskea kulmakertoimen avulla, kun näytteistä ja standardeista tehdään 1:10-laimennokset (ks. kaava 2 kpl 2.3.2.3). PCR-tehokkuus on tässä ajossa 1,81, mutta arvo on merkityksetön, koska standardien laimennokset eivät ole 1:10 vaan 1:5, ja näytteistä ei ole 1:10-laimennossarjoja lainkaan.

Standardeista ja näytteistä saadut tulokset on esitetty kuvassa 5.5. Tulokset on esitetty yksikössä kopiota/2 µl. Näytteiden määrät toisiinsa suhteutettuna ovat varsin erilaiset kuin tavallisella RT-PCR:llä saadut tulokset (ks. kuva 5.4 kpl 5.4). Siinä missä qRT-PCR-tulosten mukaan avidiinitemplaatin määrä kasvaa infektion edetessä, kasvun ollessa suurinta 17 h pi -näytteen ja 20 h pi -näytteen välillä (16-kertainen kasvu), ei

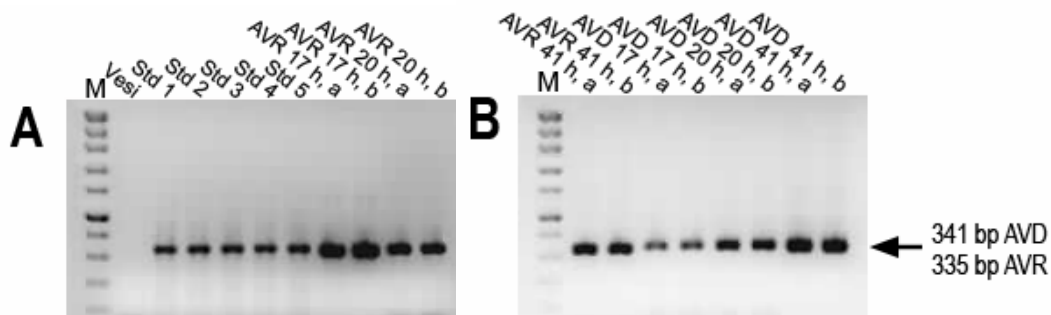
tavallisen RT-PCR:n tuloksissa voidaan havaita selvää eroa 20 h pi ja 41 h pi -näytteiden välillä. Toisaalta myös RT-PCR-tuloksissa voidaan havaita voimakas kasvu AVD 17 h pi ja 20 h pi -näytteiden välillä. AVR4/5:n osalta infektion edetessä kasvavaa ilmentymistä ei voida todeta kummassakaan menetelmässä. Myös 17 h pi -näytteen kohdalla menetelmissä on ristiriitaa: qRT-PCR-tulosten mukaan näytteessä on suurin ekspressio, kun taas tavallisen RT-PCR-tuloksissa se on pienin.

Rinnakkaisista näytteistä saadut pitoisuudet ovat lähellä toisiaan, mikä lisää varmuutta tulosten toistettavuudesta. Näytteen alkuperäinen mRNA-kopioluku saadaan, kun otetaan huomioon LightCycler[®]-ajossa käytetyn näytteen tilavuus ja laimennossuhde. Soluista eristettyjen totaali-RNA-näytteiden avidiini- ja AVR4/5-mRNA:iden lopulliset kopioluvut on esitetty taulukossa 5.3. Kopioluku on laskettu rinnakkaisten näytteiden keskiarvoista ja suhteutettu eristettyyn totaali-RNA-määrään. Taulukosta nähdään, että avidiinin kopioluku kasvaa infektiotaikaa pidentyessä. AVR4/5-näytteissä kopiolukujen kasvu ei ole aivan yhtä selkeä: 17 h pi -näytteen kopioluku/ μg totaali-RNA:ta on suurin ja 20 h pi -näytteen pienin. Kaiken kaikkiaan kopioluvut vaikuttavat melko suurilta.

Taulukko 5.3. mRNA-näytteiden lopulliset kopioluvut

<i>mRNA-näyte</i>	<i>Kopioluku (kopiota/μg totRNA)</i>
AVD 17 h pi	$2,3 \times 10^8$
AVD 20 h pi	$1,2 \times 10^9$
AVD 41 h pi	$9,4 \times 10^9$
AVR 17 h pi	$2,6 \times 10^{10}$
AVR 20 h pi	$1,1 \times 10^8$
AVR 41 h pi	$1,9 \times 10^{10}$

Ajon jälkeen qRT-PCR-tuotteet ajettiin 1,5 %:isessa elektroforeesigeelissä (kuva 5.7). Sekä standardeissa että näytteissä on monistunut oikeankokoista tuotetta. Vesinäyte on negatiivinen.



Kuva 5.7. qRT-PCR-tuotteiden varmistaminen 1,5 %:isessa agarosigeelissä. Sekä standardeissa että näytteissä on monistunut oikeankokoista tuotetta. Vesinäyte on negatiivinen.

5.6. Kaksoismolekyylimajakka-FRET

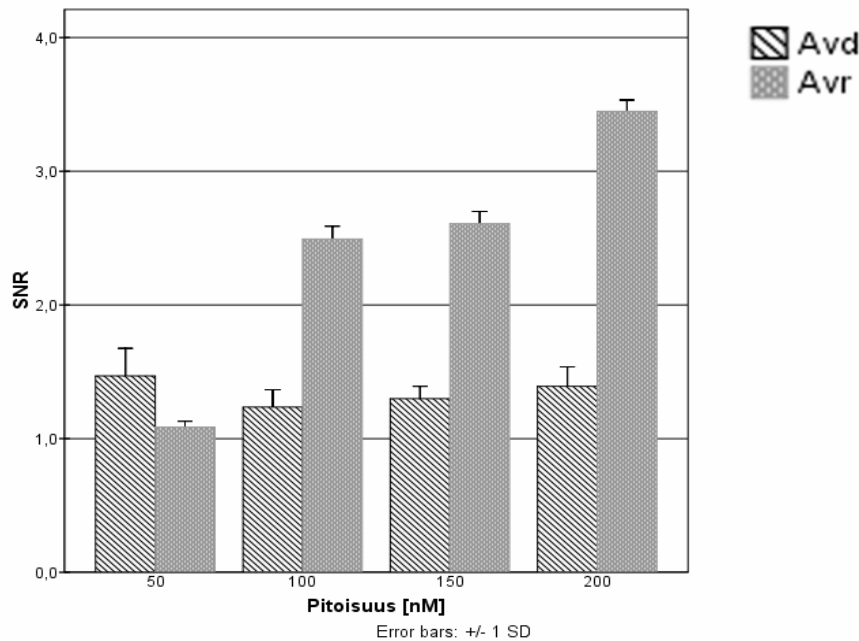
Kaksi molekyylimajakkaparia suunniteltiin ja testattiin liuoksessa *in vitro*. Jokainen FRET-pari koostui kahdesta molekyylimajakasta, joista toinen oli leimattu luovuttajafluoroforilla (luovuttajamolekyylimajakka) ja toinen vastaanottajafluoroforilla (vastaanottajamolekyylimajakka). Kaksoismolekyylimajakat suunniteltiin hybridisoitumaan vierekkäisille alueille mRNA-kohteessa niin, että niiden sitoutuessa kohteeseen vierekkäin fluoroforit olisivat FRET-etäisyydellä toisistaan. Luovuttajafluoroforin eksitaatio tuottaa tällöin fluoresenssiemission vastaanottajafluoroforin aallonpituudella, joka on helposti erotettavissa väärin positiivisten aiheuttamista ei-FRET-signaaleista (Tsourkas ym., 2003).

Kaksoismolekyylimajakkaparit suunniteltiin ”*shared-stem*”-tyyppisiksi, jossa fluoroforin puoleinen varren sekvenssi on komplementaarinen kohteen kanssa, ja osallistuu tällöin sekä varren muodostamiseen että kohdehybridisaatioon. Muotoilun tarkoituksena oli pitää sitoutuneiden fluoroforien välinen etäisyys vakiona sekä parantaa FRET-tehokkuutta. Kummassakin kaksoismolekyylimajakkaparissa luovuttajan kromoforina käytettiin Oregon Green 488 -fluoroforia (eksitaatiomaksimi 496 nm:ssä) ja vastaanottajassa Texas Red-X -fluoroforia (emissiomaksimi 603 nm:ssä). Vastaavasti luovuttajamolekyylimajakkoissa oli BHQ-1-vaimentaja ja vastaanottajamajakkoissa BHQ-2-vaimentaja. Avidiiniin sitoutuvien luovuttaja- ja vastaanottajamolekyylimajakoiden pituudet olivat 38 ja 36 emäsparia, tässä järjestyksessä. AVR4/5-sitoutuvien kaksoismolekyylimajakoiden pituudet taas olivat 39 emäsparia (luovuttaja) ja 33 emäsparia (vastaanottaja). Molekyylimajakoiden varsiosa suunniteltiin seitsemän emäksen pituiseksi muissa paitsi AVR4/5-vastaanottajamolekyylimajakassa, jossa varsiosa on kuuden emäksen pituinen. Kummassakin kohteessa kaksoismolekyylimajakoiden väliin jäävän sekvenssin pituus oli viisi emästä.

5.6.1. Spektrofluorometri

In vitro -hybridisaatiomittausten tarkoituksena oli määrittää kaksoismolekyylimajakoiden välinen suhteellinen FRET-tehokkuus sekä signaali-tausta-suhde. Samalla selvitettiin molekyylimajakoiden optimaalisinta pitoisuutta sekä mitattiin fluoresenssiintensiteetit totaali-RNA-näytteistä. Yksijuosteisen kohde-DNA:n ja molekyylimajakoiden pitoisuus oli kaikissa mittauksissa ekvimolaarinen. Ennen analysointia spektrofluorometridata normalisoitiin asettamalla luovuttajan emissiointensiteetti (535 nm:ssä) 1:seen ja suhteuttamalla vastaanottajan emissiointensiteetti (615 nm:ssä) luovuttajan

emissiointensiteettiin (535 nm:ssä). Signaalista ja taustasta poistettiin lisäksi luovuttajafluoroforin suhteellinen läpivuoto FRET-kanavalle, joka määritettiin vähentämällä hybridisoituneen luovuttajamolekyylimajakkan luovuttaja- ja vastaanottajakanavien intensiteeteistä taustat ja jakamalla vastaanottajakanavan intensiteetti saman näytteen luovuttajakanavan intensiteetillä. Vastaanottajafluoroforin läpivuoto eli vastaanottajafluoroforin virittyminen suoraan luovuttajafluoroforin eksitaatioaallonpituuksilla oli niin pieni, ettei sitä otettu huomioon läpivuodossa.



Kuva 5.8. Kaksoismolekyylimajakoiden signaali–tausta-suhteet (SNR). Signaali–tausta-suhteet mitattiin pitoisuuksilla 50, 100, 150 ja 200 nM. Kohdesekvenssinä käytettiin yksijuosteista oligo-DNA:ta. Avidiinin signaali on parhaimmillaan (50 nM) noin puoli kertaa ja AVR4/5:n signaali (200 nM) noin 2½-kertaa taustaa suurempi. AVR4/5:n signaali–tausta-suhde parantuu konsentraation myötä.

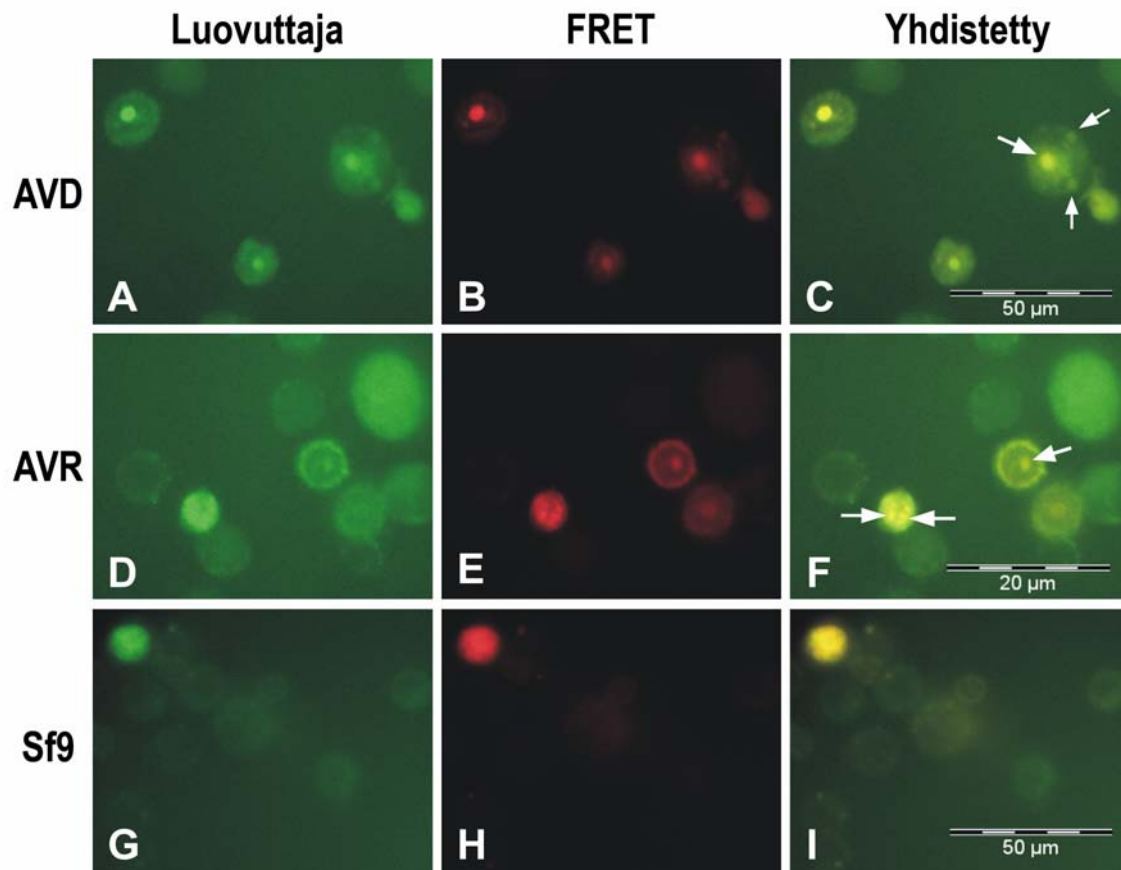
Kuvassa 5.8 on esitetty avidiinin ja AVR4/5:n signaali–tausta-suhteet (SNR) kaikilla käytetyillä pitoisuuksilla: 50 nM, 100 nM, 150 nM ja 200 nM. Avidiinin signaali on huono. Signaali on parhaimmillaan vain puoli kertaa taustaa suurempi, ja eri pitoisuuksilla ei ole vaikutusta signaalin ja taustan suhteeseen. AVR4/5:n signaali–tausta-suhde on parempi, mutta signaali on parhaimmillaankin (pitoisuudella 200 nM) vain noin kaksi ja puoli kertaa taustaa suurempi. Signaalin ja taustan suhde on huomattavasti pienempi kuin aikaisemmissa kaksoismolekyylimajakka-FRET-tutkimuksissa on saatu (Santangelo ym., 2004; Ihalainen ym., käsikirjoitus). Totaali-RNA-näyteille mitatut fluoresenssi-intensiteetit eivät ylittäneet kontrollisolujen fluoresenssia. Molekyylimajakoiden avulla ei myöskään voitu muodostaa lineaarista standardikäyrää.

Molemman molekyyylimajakparin suhteellinen FRET-tehokkuus on hyvä: avidiinilla 97 %:ia ja AVR4/5:llä 68 %:ia. Suhteellinen FRET-tehokkuus laskettiin normalisoidusta datasta, josta oli vähennetty tausta, kaavalla 3 (ks. kpl 2.3.3.7). FRET-tehokkuus kertoo kuinka paljon luovuttajan fluoresenssin intensiteetti pienenee vastaanottajan läsnä ollessa. Oletuksena on tällöin, että muut fluoresenssia pienentävät prosessit pysyvät vakiona ja intensiteetin muutos johtuu vain FRET:istä. Fluoresenssin pieneminen kertoo siis suoraan luovuttajafluoroforilta siirtyneen energiamäärän, mutta ei sitä, minne energia siirtyy. Kaavassa oletetaan lisäksi, että luovuttajafluoroforin pitoisuus pysyy samana ennen ja jälkeen vastaanottajafluoroforin lisäämisen. Lisäksi vastaanottajan suhteellinen läpivuoto oletetaan merkityksettömäksi ja havainnoitu fluoresenssi-intensiteetti oletetaan olevan peräisin vain luovuttajafluoroforista (Berney & Danuser, 2003).

5.6.2. Fluoresenssimikroskopia

Kaksoismolekyyylimajakoiden toimivuutta haluttiin kokeilla, jatkotutkimusten vuoksi, myös elävissä soluissa. Samalla testattiin myös Nucleofector[®]-laitteen soveltuvuutta molekyyylimajakoiden kuljetuksessa soluun. Elävät avidiini- ja AVR4/5-infektoidut sekä infektoimattomat Sf9-solut kuvattiin noin 46 tuntia infektion jälkeen fluoresenssimikroskoopilla. Näytteiden eksitaatio tapahtui aallonpituudella 492 nm ja emissiot kuvattiin 540 nm:n ja 630 nm:n filttareilla. Valo- tai faasikontrastimikroskoopikuvia soluista ei tehty. Näytteet on esitetty kuvassa 5.9.

Kaikissa näytteissä kaksoismolekyyylimajakat lokalisoituivat oletettavasti tumaan. Lisäksi, negatiivisissa soluissa voidaan havaita reilusti taustafluoresenssia. FRET:iä voidaan havaita kaikissa kuvissa, myös negatiivisissa soluissa, mikä viittaa siihen, että signaali on todennäköisesti epäspesifistä. Toisaalta FRET-filttereillä kuvatuissa kuvissa osa luovuttajamolekyyylimajakoiden aallonpituudella havaitusta epäspesifisestä signaalista poistuu, mikä kuvastaa menetelmällä saavutettavaa spesifisyyttä. Kuvat ovat hieman epätarkkoja, sillä ne on otettu pienillä suurennoksilla. Liukuobjektiveja ei voinut laskea mediumissa liian lähelle soluja, koska hyönteissolut kiinnittyivät huonosti alustaansa ja irtosivat helposti, jos suurennosta kasvatettiin.



Kuva 5.9. Kaksoismolekyylimajakoiden jakautuminen elävissä soluissa. Elävät avidiini- ja AVR4/5-infektoidut sekä infektoimattomat Sf9-solut kuvattiin noin 46 tuntia infektion jälkeen kaksoismolekyylimajakoiden avulla. Kuvassa näkyvät luovuttajan fluoresenssi (vihreä), FRET-signaali (punainen) sekä näiden yhdistetty kuva (keltainen). Kaikissa näytteissä molekyylimajakat lokalisoituvat rakeisesti tumaan. Signaali on todennäköisesti epäspesifisestä, sillä myös infektoimattomissa soluissa (Sf9) voidaan havaita signaalia. FRET-signaali voidaan havaita kuitenkin huomattavasti vähemmän epäspesifistä signaalia, jota voidaan vielä havaita luovuttajan fluoresenssifilterillä kuvatuissa kuvissa. Ero näkyy erityisesti kuvasarjassa D–F.

6. Pohdinta

6.1. LightCycler® 1.5 Instrument

Jotta kaksoismolekyyylimajakoilla tehtyjä tuloksia voitaisiin verrata jo vakiintuneen kvantitointimenetelmän antamiin tuloksiin, kehitettiin avidiini- ja AVR4/5-ilmentymistasojen mittaamista varten myös kvantitatiivinen RT-PCR -määritysmenetelmä. Näytteiden ilmentymistasot määritettiin absoluuttisesti ja standardisuorassa käytettiin avidiini PCR-tuotetta, jonka pitoisuus tiedettiin. Avidiinin ja AVR4/5:n cDNA-templaattien ajateltiin olevan sekvenssiltään tarpeeksi identtisiä, jotta myös AVR4/5:n ilmentymistasot voitaisiin määrittää avidiini-standardisuoran avulla. Eroja näytteiden PCR-tehokkuudessa voivat aiheuttaa monistettavan sekvenssin ominaisuudet kuten GC-pitoisuus ja pituus (monistettava AVR4/5-sekvenssi on kuitenkin vain 6 nukleotidiä avidiinisekvenssiä lyhyempi), näytteen laatu sekä ero näytteiden ja standardin monistumistehokkuudessa (Technical Note No. LC 11/2003, Roche Diagnostics). Näytteiden ja standardin monistumistehokkuudessa oleva ero aiheuttaa virheitä näytteiden ilmentymistasoissa, sillä näytteiden kvantifikaatio tapahtuu standardien kautta. Työssä käytetyt alukkeet eivät todennäköisesti aiheuta eroja monistumistehokkuudessa, sillä ne ovat samat kummallekin sekvenssille ja sitoutuvat samaan sekvenssiin.

Monistumistehokkuus voidaan määrittää standardeille ja näytteille kaavalla 2 (ks. kpl 2.3.2.3), jos näytteistä ja standardista tehdään erilliset LightCycler-määritykset 1:10-laimennoksilla. Tutkielman tiukan budjetin takia monistumistehokkuuksia pelkille standardeille ja näytteille ei mitattu, joten tuloksia voidaan sanoa vain suuntaantaviksi. Vaikka AVR4/5:n koko cDNA-sekvenssi on noin 90 %:sesti homologinen avidiinin cDNA-sekvenssin kanssa (ClustalW-tulos), sisältyy qRT-PCR:ssä monistettavaan sekvenssiin, molekyyylimajakoiden erotettavuuden takia, myös eniten eroavaisuuksia sisältävä alue. Monistettava sekvenssi on 89 %:sesti homologinen avidiinin ja AVR4/5:n välillä (ClustalW-tulos). Tällöin AVR4/5-näytteiden epätavallisesti kasvavat kopiolumäärät voivat selittyä näytteiden ja standardien monistustehokkuuksissa sekä näytteiden laaduissa olevista eroista. Avidiinin osalta määrittäminen on todennäköisesti tarkka, sillä monistettava sekvenssi on täysin sama kuin standardien.

Tosiasiassa erittäin tarkkaa määrittäystä on vaikeaa saavuttaa. Ulkoisen standardin avulla suoritettavaa määrittäystä sanotaan ”absoluuttiseksi” kvantitaatioksi, koska näytteelle

saadaan määrittämisessä absoluuttinen DNA-arvo. Määrittämissä tarkkuus on kuitenkin täysin riippuvainen standardien tarkkuudesta. Laimennetun näytteen sekä monistuskäyrien kynnysarvojen suhde on hyvin monistettavissa, mikä takaa täsmällisen ja toistettavissa olevan määrittämisen. Se ei silti välttämättä takaa oikeaa määrittäystä. Koska jopa kaupallisilla laatulaboratorioilla on vaikeuksia standardien kalibroinnissa, on kaikkiin väitteisiin absoluuttisesta kopioluvuista suhtauduttava terveellä skeptisyydellä. Lopulliset tulokset tulisikin aina ilmoittaa suhteessa johonkin, esimerkiksi kopiota/solu, kopiota/kudosgramma tai kopiota/millilitraa verta (Technical Note No. LC 11/2003, Roche Diagnostics). Tässä tutkielmassa DNA-standardin pitoisuus määritettiin mittaamalla sen absorbanssi 260 nm:ssä, mikä on muiden tutkimusten kanssa yhdenmukainen menetelmä standardien kalibroinnissa (Technical Note No. LC 11/2003, Roche Diagnostics). Tarkan arvon saamiseksi standardin pitoisuusmittaukset tehtiin eri laimennoksilla. Kantaliuoksesta valmistettujen standardien laimennosten tarkkuudesta kertoo standardikäyrän hyvin matala virhe-arvo (0,00788), joka ilmaisee kuinka paljon standardikäyrän pisteet poikkeavat suoralta.

Kvantitatiivisen RT-PCR:n avulla määritettyjen mRNA-ilmentymistasojen tulokset suhteutetaan yleensä siihen totaali-RNA-määrään, joka on lisätty alkuperäiseen RT-PCR-reaktioon. Tällöin tulos ilmoitetaan kohde-mRNA:n määränä yhtä μg :aa totaali-RNA:ta kohti. Tällaisessa lähestymistavassa on kuitenkin monia haittapuolia. Ensinnäkin, mRNA-kopioiden määrä solua kohti on usein biologisesti merkittävämpi suure kuin mRNA-määrä μg :aa totaali-RNA:ta kohti. RNA-sisältö vaihtelee laajasti erilaisten solutyypin välillä sekä kudosten ja viljeltyjen solujen välillä johtuen erilaistumisasteesta ja metabolisesta tilasta, joita aiheuttavat esimerkiksi tutkimuksissa käytettävät erilaiset stimuloivat aineet. Toiseksi, se asettaa rajan sille kuinka pieniä solunäytteitä voidaan kvantifioida, sillä RNA-eristyksessä saatu määrä tulee olla mitattavissa tavallisilla menetelmillä, kuten spektrofotometrillä. Vaikka RNA-eristykseen käytettävien solujen määrä tunnettaisiin, estää määrittäystä RNA-eristyksen arvaamaton saanto, erityisesti pienissä solunäytteissä. RNA-eristyksestä saatavat totaali-RNA- tai mRNA-saannot vaihtelevat myös paljon käytössä olevan menetelmän mukaan. Kolmanneksi, RNA-eristyksen lisäksi myöskään cDNA-synteesin tehokkuutta ei tiedetä. Ei ole myöskään tietoa siitä sisältääkö puhdistettu RNA tai syntesoitu cDNA kaikkia mRNA-tyyppejä samassa suhteessa kuin niitä esiintyy lähtömateriaaleissa. Tulosten ilmoittaminen suhteessa μg :aa totaali-RNA:ta voi olla virheellistä, koska totaali-RNA sisältää vain 1–5 %:ia mRNA:ta. Lisäksi mRNA-pitoisuudet voivat

vaihdella, vaikka totaali-RNA-pitoisuus pysyy vakiona. Tällaisia ongelmia on pyritty ratkaisemaan kehittämällä RT-PCR-menetelmä suoraan solulysaateista ja kudoksenäytteistä (Edmands ym., 1994). Tällöin ongelmaksi jää kuitenkin totaali-RNA:n tai solumäärän arvoiminen alkuperäisessä näytteessä (Stemme ym., 2001; Mitsunashi ym., 2006).

Myös tässä tutkimuksessa saattaa olla kyse RNA-eristyksen saannon epätasaisuudesta näytteiden välillä, sillä eristetyt totaali-RNA-pitoisuudet vaihtelivat välillä 89–665 ng/μl (ks. taulukko 5.2 kpl 5.3). Myös cDNA-synteesin tehokkuudessa on voinut olla eroja. Nämä syyt yhdessä LightCycler[®]-määrityksen epätarkkuus AVR4/5-näytteiden kanssa voivat selittää suuret mRNA-kopioiluvut μg:aa totaali-RNA:ta kohti sekä näytteiden väliset suuret erot (ks. taulukko 5.3 kpl 5.5).

6.2. Kaksoismolekyylimajakka-FRET

6.2.1. Spektrofluorometrimittaukset

Spektrofluorometrillä suoritettiin liuoksessa useita molekyylimajakoiden ja niiden kohteen välisiä hybridisaatiokokeita, jotta voitiin määrittää molekyylimajakoiden ja niiden oligonukleotidikohteiden välillä tapahtuvia hybridisaatioreaktiota. Tarkemmin, *in vitro* -hybridisaatiomittausten tarkoituksena oli määrittää kaksoismolekyylimajakoiden välinen FRET-tehokkuus sekä signaali–tausta-suhde. Samalla selvitettiin molekyylimajakoiden optimaalisinta pitoisuutta sekä mitattiin fluoresenssi-intensiteetit mRNA-näytteistä. Molekyylimajakoiden spesifisyyttä ja herkkyyttä ei ollut mahdollista tutkia.

Avidiinin ja AVR4/5:n signaali–tausta-suhteet kaikilla käytetyillä pitoisuuksilla (50 nM, 100 nM, 150 nM ja 200 nM) olivat huomattavasti huonommat kuin aikaisemmin on raportoitu samankaltaisissa kaksoismolekyylimajakka-FRET-tutkimusasetelmissä, joissa signaali–tausta-suhteeksi on saatu noin 9 (Santangelo ym., 2004) ja yli 200 (Ihalainen ym., käsikirjoitus). Avidiinin signaali on vain puoli kertaa taustaa suurempi, ja eri pitoisuuksilla ei ole eroa signaalin ja taustan suhteeseen. AVR4/5:n signaali–tausta-suhde on parempi, mutta signaali on parhaimmillaankin (pitoisuudella 200 nM) vain noin kaksi ja puoli kertaa taustaa suurempi.

Kaksoismolekyylimajakoiden huono signaali voi johtua monesta tekijästä. Ensinnäkin, huonon signaalin takana voivat olla kaksoismolekyylimajakoiden ominaisuuksista ja suunnittelusta johtuvat syyt. Muita tekijöitä voivat olla molekyylimajakoiden

käsittelyyn ja spektrofluorometriin liittyvät syyt. Fluoroforien emissio- ja eksitaatio-spektrien päällekkäisyys ei todennäköisesti ole tässä tapauksessa syynä huonoon signaali-tausta-suhteeseen. Valituissa fluoroforeissa taustaa lisäävä läpivuoto, eli luovuttajan emissiospektrin detektio vastaanottajan emissioaallonpituuksilla sekä vastaanottajafluoroforin suora virittyminen luovuttajan eksitaatioaallonpituuksilla, on vähäistä (ks. kuva 2.4 kpl 2.3.3.4). Lisäksi luovuttajafluoroforin emissiospektri peittää riittävästi vastaanottajan eksitaatio-spektrin, jotta fluoroforien välinen energiansiirto on mahdollista. Kohteeseen sitoutuneena luovuttaja- ja vastaanottajafluoroforin välinen etäisyys (5 nukleotidia) on myös riittävä FRET:n tapahtumiseen ja toisaalta riittävän pitkä estämään kontaktivaimentuminen fluoroforien välillä. Vaikka kohde-RNA:n ja molekyyli-majakoiden sekundaarirakenteita pystytään mallintamaan erilaisilla ohjelmilla (esim. mfold), mallit eivät välttämättä aina näytä oikeata tulosta johtuen biofysikaalisten teorioiden rajoitteista. Lisäksi sekvensseistä, joihin proteiinit sitoutuvat RNA:ssa, on vielä vain rajallisesti tietoa. Siksi jokaista kohde-RNA:ta varten joudutaankin usein suunnittelemaan, syntesoimaan ja kokeilemaan käytännössä useampia molekyyli-majakkoita, jotka sitoutuvat eri kohdesekvensseihin kohde-RNA:ssa, kunnes saavutetaan korkea signaali-tausta-suhde.

Koska suhteellinen FRET-tehokkuus, mitattuna luovuttajafluoroforin intensiteetin pienenemisenä vastaanottajan läsnäollessa, on hyvä kummallakin molekyyli-majakka-parilla, on mahdollista, että fluoroforien välissä ja lähellä olevat nukleotidit vaimentavat signaalia. Luovuttajafluoroforin energiaa siis siirtyy lähellä oleville nukleotideille vastaanottajafluoroforin sijasta. Nukleotidit vaimentavat eri fluoroforien fluoresenssia vaihtelevasti. Guaniininukleotidi on useimmissa tapauksissa tehokkain vaimentaja, ja sitä seuraavat adeniini, sytosiini ja tyymiini. Texas Red -fluoroforin kohdalla adeniini on merkittävin vaimentaja (Marras ym., 2002). Kohdesekvensseissä fluoroforien ympäristössä on tosiaan jonkun verran guaniininukleotideja, ja erityisesti AVR4/5:n kohdalla fluoroforeja ympäröivä sekvenssi koostuu lähes pelkästään adeniinista. Näin ollen, nukleotidit todennäköisesti ainakin osittain vaimentavat fluoresenssia.

Signaali-tausta-suhdetta huonontaa myös suuri taustasignaalin määrä. Tausta- ja ei-spesifistä signaalia voivat aiheuttaa molekyyli-majakoiden tahaton aukeaminen nukleaasien tai proteiinien ja muiden pienten molekyylien toiminnan vaikutuksesta, molekyyli-majakoiden sitoutuminen keskenään sekä vaimentajamolekyylin epätäydellinen toiminta (Silverman & Kool, 2005). Koska kokeet suoritettiin kontrolloidussa *in vitro* -ympäristössä, on molekyyli-majakoiden aukeaminen nukleaasien toimesta toden-

näköisesti pientä. Proteiinien ja muiden molekyylien sitoutumisesta johtuva aukeaminen on ongelma lähinnä soluympäristössä. Lisäksi käytettyjen vaimentajamolekyylien on todettu vaimentavat tehokkaasti käytettyjä fluoroforeja (Marras ym., 2002).

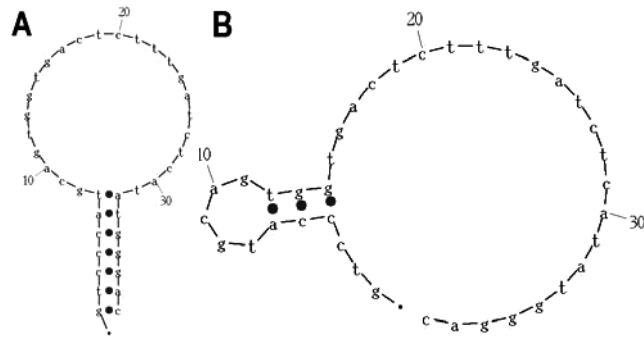
Molekyyylimajakoille ei ollut mahdollista tehdä sulamiskäyräanalyysiä, mutta suunnitteluohjelmilla laskettujen sulamislämpötilojen mukaan kummankin molekyylimajakkaparin molekyylimajakat aukeavat samassa lämpötilassa. Koska kohteeseen hybridisoituminen on useimmiten molekyylimajakon aukeamista ajava voima, ja tapahtumat ovat yleensä yhteydessä toisiinsa, ei sulamislämpötiloilla todennäköisesti ole sinänsä vaikutusta molekyylimajakoiden sitoutumisnopeuteen ja sitä kautta myös huonoon signaali–tausta-suhteeseen. Myöskään kohdesekvenssien ei todettu muodostavan molekyylimajakoiden sitoutumista estäviä sekundaarirakenteita. Toinen asia on, miten mittausreaktioiden käsittelyssä käytetyt lämpötilat ja hybridisoitumisajat ovat vaikuttaneet taustan syntyyn.

Mittausreaktioissa mahdollisten sekundaarirakenteiden avaamiseen käytetty lämpötila (+65 °C) oli ehkä liian korkea. Korkea lämpötila on voinut pienentää fluoroforien kvanttituoton (*quantum yield*) määrää ja edelleen intensiteettiä. Kvanttituotto tarkoittaa tehokkuutta, jolla fluorofori pystyy muuttamaan absorboidun valon emittoiduksi valoksi, ja se on ominainen jokaiselle fluoroforille. Fluoresenssin intensiteetti kasvaa kvanttituoton myötä. Kvanttituotto on herkkä lämpötilan ja pH:n vaihteluille. Texas Red -fluoroforin intensiteetti ei muutu korkeissakaan lämpötiloissa, mutta esimerkiksi Oregon Green -fluoroforiin verrattavan fluoreseiinin intensiteetti alkaa pienentyä merkittävästi jo +50 °C:n lämpötilassa. +65 °C:n lämpötilassa fluoreseiinin intensiteetti on enää 50 %:ia täydestä (Marras, 2006). Toisaalta, huoneenlämmössä tehtyjä mittauksia edelsi hybridisaatioaika +37 °C:ssa, missä fluoresenssin intensiteetti ei vielä kärsi.

Toinen molekyylimajakoiden käsittelyyn liittyvä signaali–tausta-suhteeseen vaikuttava tekijä on hybridisaatioreaktioihin käytetty aika. Hybridisaatioajan pidentäminen, esimerkiksi yli kahteen tuntiin, olisi voinut parantaa signaalia. Käytettyjen molekyylimajakoiden varsiosa koostui kuudesta tai seitsemästä nukleotidista, mikä huomattavasti hidastaa molekyylimajakoiden sitoutumisnopeutta verrattuna lyhyempiin varsiosiin (Tsourkas ym., 2003). Lisäksi, kahden molekyylimajakon kohteen löytämiseen ja hybridisoitumiseen tarvitaan enemmän aikaa kuin vain yhden (Santangelo ym., 2004). Molekyylimajakoiden sitoutumisvakioita on pienentänyt todennäköisesti myös reaktioliuoksissa käytetyn puskurin täydellinen suolattomuus

(lähinnä Na^+ - ja Mg^{2+} -ionien puute). Molekyyylimajakoiden sitoutumisvakiot ja signaali-tausta-suhteet parantuvat huomattavasti suurissa suolapitoisuuksissa (Kuhn ym., 2002; Tsourkas ym., 2003). Na^+ - ja Mg^{2+} -ionien läsnäolo vaikuttaa myös siihen, että molekyyylimajakoiden sekundaarirakenne on halutunlainen (kuva 6.1). Molekyyylimajakat suunniteltiin pieneen suolapitoisuuteen (20 mM Na^+ , 1 mM Mg^{2+}), mutta mitattiin suolattomissa olosuhteissa. Suolattomissa olosuhteissa molekyyylimajakat muodostavat useita vääriä sekundaarirakenteita ja vastaavat käytännössä lineaarisia koettimia, mikä voi selittää myös suuren taustafluoresenssin.

Kolmanneksi, huonoon signaali-tausta-suhteeseen voivat vaikuttaa spektrofiorometristä johtuvat syyt. Vaikka valmistajan mukaan laiteella pystytään mittaamaan alle 10 femtomoolin määriä kaivoa kohti (fluoreseiinia), oli tässä työssä molekyyylimajakoiden pitoi-



Kuva 6.1. Suolojen vaikutus rakenteeseen. Pienessä suolapitoisuudessa suunnitellut molekyyylimajakat muodostavat vain halutunlaisia rakenteita (A). Suolattomissa olosuhteissa molekyyylimajakat muodostavat useita erilaisia vääriä sekundaarirakenteita, joista tässä esimerkkinä yksi (B). Rakenteet on mallinnettu Mfold-ohjelmalla (Zuker, 2003).

suudet nostettava korkeiksi, että signaali saatiin ylittämään edes pelkän puskurin saamat arvot. Suurien pitoisuuksien käyttö lisäsi fluoroforien taustan määrää suhteessa signaaliin. Fluoroforien huono emissiointensiteetti voi johtua myös siitä, että eksitaatio-aallonpituudeksi ei ollut mahdollista valita luovuttajafluoroforin eksitaatiomaksimissa olevaa viritysaallonpituutta. Eksitaatiomaksimia matalammalla tai korkeammalla aallonpituudella viritetyn fluoroforin emissiointensiteetti jää aina matalammaksi, kun jos viritettäisiin eksitaatiomaksimissa olevalla aallonpituudella. Sama pätee myös emissiointensiteettiä mitattaessa: mitä kauempana maksimiaallonpituudesta mittausaallonpituus on, sitä matalampi on fluoresenssin intensiteetti (Lakowicz, 1999). Tässä työssä käytetty eksitaatioaallonpituus (485 nm) on matalampi kuin luovuttajafluoroforille ilmoitettu maksimiaallonpituus (496 nm), jolloin luovuttajafluoroforin emissiointensiteetti, ja siitä johtuen myös vastaanottajafluoroforin emissiointensiteetti, on jäänyt matalammaksi kuin olisi ollut mahdollista. Vastaavasti myös aallonpituudet, joilla fuoresenssia detektoitiin (535 nm:ia ja 615 nm:ia) olivat kaukana ilmoitetuista

emissiomaksiaallonpituuksista (524 nm:ia luovuttajalle ja 603 nm:ia vastaanottajalle), mikä on edelleen huonontanut fluoresenssien intensiteettiä.

LightCycler[®]-menetelmässä kaksoimolekyyylimajakoiden saatu signaali oli kuitenkin hyvä, vaikka detektiossa käytetyt eksitaatio- ja emissioaallonpituudet eivät vastanneetkaan fluoroforien maksiaallonpituuksia. Kaksoimolekyyylimajakat ovat todennäköisesti toimineet halutulla tavalla suolallisessa puskuriliuoksessa. Nopeat lämpösyklit eivät todennäköisesti myöskään haitanneet fluoroforien kvanttituottoa. Lisäksi LC-menetelmässä signaalin suhde taustafluoresenssiin on erilainen. LC-menetelmässä molekyyylimajakoista tuleva taustafluoresenssi pysyy koko ajan samana molekyyylimajakoiden vakiona pysyvän pitoisuuden takia, jolloin templaatin monistuessa signaali kasvaa koko ajan suhteessa taustafluoresenssiin.

Spektrofluorometrillä mitattujen totaali-RNA-näytteiden mRNA-pitoisuus oli liian pieni, että fluoresenssi olisi noussut kontrollisolusta saadun fluoresenssi-intensiteetin yli. Tosin myös näytteiden kohdalla pätevät samat fluoresenssin intensiteettiä pienentävät tekijät kuin oligo-DNA-kohteiden kanssa. Tässä työssä kokeiltu tutkimusasetelma, jossa haluttua mRNA:ta kvantitoidaan kaksoimolekyyylimajakka-FRET-menetelmällä eristetyistä totaali-RNA-näytteistä *in vitro*, ei ole toteuttamiskelpoinen. Absoluuttista kohde-mRNA-määrää ei voida määrittää molekyyylimajakoiden avulla, sillä standardisuoran muodostaminen molekyyylimajakoiden ja oligo-DNA-kohteen kanssa ei ole mahdollista. Fluoresenssiin vaikuttaa menetelmässä liian moni tekijä, kuten vaimentajat ja kaksi fluoroforia, jotta fluoresenssisignaali edes kasvaisi lineaarisesti pitoisuuden kasvaessa. Lisäksi standardien kohteena käytettävä vapaa oligo-DNA ja näytteiden mRNA ovat hyvin erilaisia sitoutujia.

Molekyyylimajakoita voitaisiin hyödyntää tutkimusasetelmassa, jossa totaali-RNA-näytteistä määritettäisiin sisältävätkö ne spesifistä RNA-molekyyliä vai ei (positiivinen/negatiivinen tulos). Tutkimusasetelma, jossa eristettyjä totaali-RNA-näytteitä ja kontrollinäytteitä on hybridisoitu molekyyylimajakoiden kanssa ja verrattu detektoitua fluoresenssi-intensiteettiä, on myös toteutettu (Sokol ym., 1998). Lisäksi kaksoimolekyyylimajakat toimisivat hyvin tutkimusasetelmassa, jossa kaksoimolekyyylimajakoiden avulla mitataan kohdegeenin suhteellisia ilmentymiseroja stimuloitujen, patologisten tai yliekspressoituneiden solujen ja normaalitilan välillä. Totaali-RNA-näytteiden eristämisen taustalla oli ajatus siitä, että eristämällä tutkittavat mRNA:t solu ympäristöstä kvantitaatiota varten, päästään eroon kontrolloimattomasta

ympäristöstä, jossa molekyyylimajakoiden signaaliin vaikuttaa moni muukin tekijä kuin vain kohteiden määrä, mikä taas vaikeuttaa kvantitointia. Toisaalta taas tällöin RNA-eristyksen onnistuminen nousee vaihtelevaksi tekijäksi.

6.2.2. Fluoresenssimikroskopia

Kaksoismolekyyylimajakat sopivat ominaisuuksiltaan erityisesti eri RNA-tyyppien lokalisaation tutkimiseen ja monitorointiin elävissä soluissa. Perinteisten yhden koettimen molekyyylimajakoiden käyttöä elävissä soluissa haittaa vääristä positiivista aiheutuva signaali, joka muodostuu nukleaasien tai nukleinihappoihin sitoutuvien proteiinien toimesta avautuneista molekyyylimajakoista. Kahden molekyyylimajakan fluoroforien muodostaman FRET-parin avulla todellinen signaali voidaan erottaa helposti väärin positiivisten aiheuttamasta signaalista, sillä FRET voidaan detektoida vain kun kummatkin molekyyylimajakat ovat hybridisoituneet oikein vierekkäisille kohdealueilleen. Lisäksi hiuspinnirakenteessa sitoutumattomat molekyyylimajakat ovat vaimentuneina, mikä takia taustafluoresenssi on matala. Tällöin erillisiä pesuja ei tarvita poistamaan ylimääräiset sitoutumattomat koettimet näytteistä, kuten *in situ* ja DNA array -menetelmissä. Solujen fiksausta ei myöskään tarvita, jos molekyyylimajakat kuljetetaan soluun mahdollisimman hellävaraisella metodilla, kuten palautuvalla permeabilisaatiolla (*reversible permeabilization*) tai mikroinjektiolla. Rakenteen aukeamiseen tarvittava energia myös parantaa menetelmän spesifisyyttä verrattuna lineaarisiin FRET:iin perustuviin koettimiin (Silverman & Kool, 2005; Santangelo ym., 2006).

Kaksoismolekyyylimajakka-FRET-menetelmä voi parhaimmillaan antaa selkeän ja yksityiskohtaisen kuvan mRNA:n lokalisaatiosta elävissä soluissa, mikä voi paljastaa tärkeää tietoa mRNA:iden prosessoinnista, kuljetuksesta ja proteiinituotannosta (Santangelo ym., 2004). Tavoitteena hyödyntää näitä ominaisuuksia tulevissa tutkimuksissa, myös tässä tutkimuksessa testattiin suunniteltujen molekyyylimajakoiden toimivuutta elävissä soluissa. Kokeen tulokset on esitetty kuvassa 5.9. On ilmeistä, että sekä avidiini- että AVR4/5-näytteiden signaali ei ole satunnaisesti jakautunut soluun, vaan lokalisoitunut lähes kokonaan tumaan. Tumassa niiden voidaan havaita organisoituneen erityisesti pieniin rakenteisiin. Tulos on yllättävä, sillä näytteiden kuvaushetkellä (noin 46 tuntia infektion jälkeen) sekä avidiinin että AVR4/5:n mRNA:ita tulisi sijaita myös sytoplasmassa. Tulos on kuitenkin yhdenmukainen aiempien havaintojen kanssa, joiden mukaan antisense-oligonukleotidikoettimet

nopeasti akkumuloituvat tumaan (Leonetti ym., 1991; Lorenz ym., 2000; Dirks ym., 2001; Dias & Stein, 2002; Gifford ym., 2005). On kuitenkin epäselvää, onko tumalokalisatioilmiön taustalla aitoa biologista syytä.

On mahdollista, että signaalin solunsisäinen jakautuminen on yhteydessä tapaan, jolla koettimet kuljetetaan soluun. Jos kuljetus tapahtuu esimerkiksi endosyyttistä kuljetusreittiä hyväksikäyttäen (kuten liposomipohjaisessa transfektiossa), on antisense-oligonukleotidikoettimilla tapana jäädä loukkuun endosyyttisiin vesikkeleihin ja tulla lopulta hajotetuksi lysosomeissa (Dokka & Rojanasakul, 2000; Nitin ym., 2004). Tutkimukset soluun mikroinjektiolla kuljetettujen antisense-oligonukleotidien (myös molekyyylimajakoiden) lokalisaatiosta ovat ristiriitaisia. Kertyvää näyttöä on siitä, että sytoplasmaan mikroinjektoidut fluoresoivat oligonukleotidikoettimet kertyvät nopeasti tumaan ilman, että ne sitoutuvat kohde-mRNA:iden kanssa sytoplasmassa (Chin ym., 1990; Leonetti ym., 1991; Fisher ym., 1993; Gifford ym., 2005). Oligonukleotidikoettimien on ajateltu diffundoituvan sytoplasmassa tumaan, sillä jäädyttäminen, ATP-depleetio tai vehnänalkion agglutiniini (WGA), joka inhiboi tumahuokosten kautta kulkevaa kuljetusta, eivät inhiboi sytoplasmaan mikroinjektoidujen koettimien akkumuloitumista tumaan (Chin ym., 1990; Leonetti ym., 1991). Vaikka tämä sulkee pois moottoriproteiinien avulla tapahtuvan aktiivisen kuljetuksen, on vielä epäselvää johtuuko oligonukleotidikoettimien kulkeutuminen tumaan diffuusiosta, mikroinjektion aiheuttamasta virrasta vai ehkä jonkin signalointireitin käynnistymisestä (Santangelo ym., 2006).

Toisaalta on myös jonkun verran näyttöä siitä, että mikroinjektoidut molekyyylimajakat löytävät kohteensa sytoplasmassa (Sokol ym., 1998; Perlette & Tan, 2001; Bratu ym., 2003). Sokolin ynnä muiden työssä mikroinjektioissa käytettiin tosin kohdesekvenssiä yhdessä molekyyylimajakoiden kanssa. Bratun ynnä muiden työssä taas tutkittiin oskar mRNA:n kuljetusta ja lokalisaatiota hedelmäkärpäsen (*Drosophila melanogaster*) munasolun emosolussa (oosyytti). Oosyytin sisärsolun (*nurse cell*) sytoplasmaan mikroinjektoidut molekyyylimajakat akkumuloituivat ensin totutusti tumaan, mutta levisivät myöhemmin sytoplasmaan laikuittain. Kokeessa käytettiin perinteisiä molekyyylimajakoita, joiden nukleotidirunko oli modifioitu (2'-*O*-metyyliribonukleotidirunko) sekä myös ensimmäisen kerran kaksoismolekyyylimajakka-FRET-menetelmää (Bratu ym., 2003). Ilman ei-toivottua tuma-akkumulaatiotakin mikroinjektio on kuitenkin teknisesti haastava menetelmä, ja sopii käytettäväksi tehokkaasti

vain pieneen määrään soluja. Lisäksi menetelmää voidaan käyttää vain *ex vivo* -sovelluksissa.

Mikroinjektion ohella myös muita ei-endosyyttisiä kuljetusmenetelmiä, kuten elektroporaatiota, streptolysiini O:ta (SLO) sekä solukalvon läpäisevien peptidejä (*cell penetrating peptides*, CPP), on käytetty oligonukleotidikoettimien kuljetukseen soluun. Solukalvon läpäiseviä peptidejä lukuun ottamatta, myös näillä menetelmillä saadut tulokset soluun kuljetettujen oligonukleotidien solunsisäisen signaalin jakautumisesta ovat ristiriitaisia. Solukalvon läpäisevien peptidien avulla oligonukleotidit voidaan kuljettaa tehokkaasti soluun. Menetelmässä oligonukleotidikoettimet lokalisoituvat sytoplasmaan ja edelleen tumaan (Allinquant ym., 1995; Troy ym., 1996). Solukalvotranslokaatioaktiivisuuden omaavia peptidejä ovat esimerkiksi antennapedia, HSV-1:n VP22 sekä HIV:n Tat-peptidi ja sen johdannaiset. Solukalvon läpäisevien peptidien translokaatiomekanismi on kuitenkin vielä epäselvä. Solukalvon läpäisevien peptidien avulla eläviin soluihin ja kudoksiin on kuljetettu proteiineja, nukleiinihappoja ja muita biomolekyylejä (Brooks ym., 2005; Wadia & Dowdy, 2005). Nitin ynnä muut raportoivat ensimmäisinä liittäneensä solukalvon läpäisevän peptidin molekyylimajakoihin (Nitin ym., 2004). Peptidiinliitettyjen molekyylimajakoiden havaittiin siirtyvän soluun nopeasti ja lähes 100 %:sella tehokkuudella. Signaalia havaittiin hyvin vähän tumassa. Lisäksi molekyylimajakoiden spesifinen kohdentuminen sytoplasmassa ja koettimien hybridisaatiosta aiheutuva fluoresenssisignaali eivät häiriytyneet peptidipohjaisen kuljetuksen takia.

Streptolysiini O on bakteeritoksiini, joka sitoutuu monomeerina solukalvon kolesteroliin ja oligomerisoituu renkaanmuotoiseksi rakenteeksi muodostaen näin kalvolle noin 25–30 nm:n kokoisia aukkoja. Aukkojen läpi ionit ja makromolekyylit pääsevät sisään soluun (Santangelo ym., 2006). Permeabilisaatio on palautuva (Spiller & Tidd, 1995). Kolesteroliin sitoutuvan luonteensa takia streptolysiini O sopii käytettäväksi monipuolisesti erilaisten solutyypin läpäisyyn (Santangelo ym., 2004). SLO-permeabilisaation avulla soluun kuljetetut oligonukleotidikoettimet voivat kulkeutua joko tumaan tai sytoplasmaan. Esimerkiksi, verratessaan SLO:n, elektroporaation ja lipofiilisen konjugaation kuljetusominaisuuksia toisiinsa Spiller ja muut havaitsivat, että sekä elektroporaation että SLO:n avulla soluunkuljetetut oligonukleotidikoettimet akkumuloituvat nopeasti tumaan (Spiller ym., 1998). Myös Berganin ynnä muiden tutkimuksissa elektroporoidut oligonukleotidikoettimet kerääntyivät tumaan (Bergan ym., 1993). Toisaalta Santangelo ynnä muut tutkivat SLO-permeabilisaatiolla soluun

kuljetettujen kaksoimolekyylimajakoiden avulla K-ras- ja survivin-mRNA:iden lokalisaatiota elävissä soluissa (Santangelo ym., 2004). Tuloksissa ei K-ras-mRNA:n osalta havaittu molekyylimajakoiden nopeaa akkumuloitumista tumaan, vaan suurin osa signaaleista voitiin havaita sytoplasmassa järjestäytyneinä säikeisiksi rakenteiksi. Survivin lokalisoitui epäsymmetrisesti, usein vain toiselle puolelle tumaa. Vastaavasti ten Asbroekin ynnä muiden tutkimuksissa elektroporaatiolla kuljetettujen fluoresoivien oligonukleotidikoettimien signaali oli täysin sytoplasmista ja myös riippumatonta oligonukleotidien pääketjun muokkauksista (ten Asbroek ym., 2002). Lisäksi on syytä ottaa huomioon, että valmistajan mukaan Nucleofector[®]-laitteen avulla oligonukleotidit voidaan, ilman eri ohjelmaa, kuljettaa suoraan tumaan (Gresch ym., 2004), joten tumalokalisaaation syynä voivat olla myös laitetekniset ominaisuudet.

Tähän päivään mennessä useimmat tutkimustulokset viittaavat siihen, että sytoplasmiaan viedyt oligonukleotidikoettimet vaeltavat nopeasti tumaan. Tämä herättää monia biologisia kysymyksiä, esimerkiksi: Mitä biologisia päätelmiä koettimien lokalisaatiosta voidaan tehdä? Kuinka koettimet kuljetetaan tumaan ja kuinka kohde tunnistetaan? Tunnistavatko koettimet kohteensa tumassa aiheuttaen signaalin lisäksi kohdegeenin ilmentymisen vaimentumista, vai kuljetetaanko ne sinne hajonneina tai hajotettaviksi? Tumalokalisaaatiossa ei näytä olevan eroa muokkaamattomien ja enemmän nukleasi-resistenteiksi muokattujen oligonukleotidikoettimien välillä, mutta muokatut koettimet säilyttävät signaalin kauemmin (Fisher ym., 1993; Lorenz ym., 2000). Tunnistavatko koettimet kohteensa sytoplasmassa ennen niiden kuljettamista tumaan? Tapahtuuko tämä kuljetus komplekseina kohteen kanssa? Tässä työssä tehtyjen fluoresenssimikroskooppikuvien signaali tumissa on todennäköisesti epäspesifistä, sillä negatiivisissakin soluissa voidaan havaita runsaasti fluoresenssia. Epäspesifinen fluoresenssi tumassa voi johtua esimerkiksi molekyylimajakoiden tarkoituksettoman hajoamisen tai aukeamisen ja suuren pitoisuuden yhteisvaikutuksesta, jolloin fluoroforit ovat voineet joutua riittävän kauas vaimentajistaan ja kuitenkin niin lähelle toisiaan, että FRET fluoroforien välillä on ollut mahdollista.

Toinen tumalokalisaaatioon todennäköisesti vaikuttava tekijä on solujen transfektiossa käytettävä koetinpitoisuus. Tietenkin käytettävä transfektiomenetelmällä määrittä paljonti sen millaisia koetinpitoisuuksia voidaan käyttää, mutta näyttää siltä, että suuret koetinpitoisuudet johtavat todennäköisemmin epäspesifiseen tumalokalisaaatioon. Onnistuneesti sytoplasmiaan lokalisoituneissa töissä (Allinquant ym., 1995; Perlette & Tan, 2001; ten Asbroek ym., 2002; Nitin ym., 2004; Santangelo ym., 2004) koetinpitoi-

suudet ovat olleet pääsääntöisesti huomattavasti alhaisempia (40 nM–1 μ M) kuin tässä tutkielmassa (noin 80 μ M) sekä muissa tumalokalisatioon päätyneissä töissä käytetyt pitoisuudet (20–150 μ M). Pienillä koetinpitoisuuksilla todennäköisyys, että koettimet kulkeutuvat tumaan korkean pitoisuuden johdosta, on paljon pienempi. Lisäksi suuria koetinpitoisuuksia käytettäessä hautautuu vähäisten mRNA-kohteiden kanssa sitoutuneiden oligonukleotidikoettimien fluoresenssi helposti suhteellisesti suuren taustasignaalin alle.

Kuvien toinen ongelma liittyy mRNA-ilmentymisen mittaamiseen elävissä soluissa. mRNA:iden tarkan lukumäärän mittaaminen solua kohti on haastavaa sekä molekyyylimajakoiden (kuten myös muiden kuvantamismenetelmien) avulla. Kuvantamisessa on esimerkiksi välttämätöntä erottaa todellinen signaali taustasta, mukaan lukien läpivuoto kaksoismolekyyylimajakka-FRET-menetelmässä, mitata se murto-osa mRNA:ista, jotka ovat hybridisoituneena koetinten kanssa sekä määrittää mahdollinen repotterifluoroforin itsevaimentuminen, varsinkin kun mRNA-kohteet ovat erittäin lokalisoituneet. Lisäksi reportterifluoroforin fluoresenssin intensiteetti voi muuntua solunsisäisessä ympäristössä (Santangelo ym., 2004). Onkin perusteltua puhua mRNA:iden ilmentymisen semikvantitatiivisesta mittaamisesta.

Avidiinin ja AVR4/5:n mRNA:iden ilmentymisen kvantitointi ei ollut mahdollista otetuista fluoresenssimikroskooppikuvista. Semikvantitatiivisia FRET-mittauksia olisi voinut tehdä, jos kuvia olisi ollut mahdollista tehdä lisää. Yksinkertaisimmillaan kvantitointiin olisi tehtyjen näytteiden sekä käytetyn kahden filtteriparin lisäksi tarvittu näyte, jossa on pelkkä luovuttajamolekyyylimajakka kohteen kanssa. Näiden näytteiden perusteella olisi voinut poistaa läpivuoto FRET-kanavalle ja saada näytteelle FRET-intensiteetti sekä FRET-intensiteettijakauma, jonka avulla tiedettäisiin miltä näytteen alueelta tulee eniten FRET-signaalia (Damelin & Silver, 2000). Monimutkaisempia FRET-mittausmenetelmiä, jotka sisältävät useampia filtteripareja ja näytteitä, on käsitelty kattavasti aiemmin (Gordon ym., 1998; Berney & Danuser, 2003). Jos Nucleofector[®]-laitteen käyttöaika ei olisi tullut yllätyksenä ja kokeen suunnittelu ei siksi olisi jäänyt olemattomaksi, olisivat ylimääräisten fluoresenssikuvien lisäksi valomikroskooppi- tai faasikontrastimikroskooppikuvat fluoresenssikuvien ohien paljastaneet tarkemmin solujen rakenteita.

6.3. Tulevaisuuden suunnitelmia

Tutkimusaiheen parissa on tarkoitus jatkaa toistamalla molekyylimajakoiden *in vitro* -kokeet paremmalla ja ainoastaan spektrofluorometriaan tarkoitettulla laitteella (QM-6/2003, Photon Technology International), jossa eksitaatio- ja emissioaallonpituudet voidaan valita portaattomasti. Tällä kertaa mittaukset tehdään puskurissa, joka sisältää 20 mM Na⁺- ja 1 mM Mg²⁺-ioneja. Molekyylimajakoiden käsittelylämpötilaa myös lasketaan ja hybridisaatioaikaa pidennetään. Fluoresenssin mittaamista kokeillaan uudelleen myös totaali-RNA-näytteille.

LightCycler-kokeita ei todennäköisesti uusita, koska totaali-RNA-näytteiden kvantitointi spektrofluorometrillä ei onnistu ja tulosten vertailua ei tällöin tarvitse tehdä. Jos tutkimusasetelma muuttuu niin, että ilmentymistasoja elävissä soluissa verrataan kvantitatiivisella RT-PCR:llä saatuihin tuloksiin, LightCycler-kokeet uusitaan niin, että ensin mitataan standardisuoran ja näytteiden monistustehokkuudet. Jos monistustehokkuuksissa on eroja, AVR4/5-näytteille tehdään oma standardisuora PCR-tuotteesta. Tämän jälkeen kvantitatiivista RT-PCR -menetelmää voidaan käyttää jatkossa AVD- ja AVR4/5-geenien ilmentymisen tutkimiseen.

Geeni-ilmentymisen tutkimista on tarkoitus jatkaa kaksoismolekyylimajakka-FRET-menetelmän avulla elävissä soluissa. Jatkossa molekyylimajakoiden kuljetuksessa kokeillaan mikroinjektiota sopivalla pitoisuudella. Tutkittavat solut kiinnitetään kasvu-alustan pohjaan, jotta mikroskooppikuvat voidaan ottaa isommalla suurennoksella. Kuvasarjaan liitetään myös faasikontrasti- tai valomikroskooppikuvat solun morfologian parempaa tutkimista varten. Kun menetelmä saadaan toimimaan, hyödynnetään menetelmää edelleen AVD- ja AVR-geenien ilmentymisen säätelyn yksityiskohtien tutkimisessa. Avidiinigeenin ilmentyminen progesteronin vaikutuksesta ja tulehdusten yhteydessä tarjoaa mielenkiintoisen tutkimus- ja eläinmallin vastaavien ilmiöiden tutkimiseen myös lääketieteessä. Tavoitteiden muuttuessa on myös mahdollista, että tutkittavaa kohdegeeniä vaihdetaan. Jos tumalokalisaatiota ilmenee myös pienemmillä molekyylimajakkapitoisuuksilla, voisi ilmiön tarkempi tutkiminen olla mielenkiintoinen tutkimussuunta. Tässä työssä molekyylimajakat lokalisoituivat pieniin granulaarisiin rakenteisiin tumassa. Voitaisiin tutkia, mihin monista mahdollisista tumarakenteista molekyylimajakat lokalisoituvat. Tumarakenteita voidaan värjätä ja selvittää, mihin niistä molekyylimajakat mahdollisesti kolokalisoituvat. Lisäksi haastavaa olisi tutkia tumalokalisaation mahdollista biologista taustaa. Löytävätkö molekyylimajakat tumassa

kohteensa vai onko signaali epäspesifistä, esimerkiksi seurausta tahattomasta aukeamisesta tai hajottamisesta? Mikä on tuman rakenteiden tehtävä? Onko tumalokalisatio osa solun luontaisia mRNA:n prosessointi- ja kuljetusreittejä vai poikkeako eksogeenisesti tuotujen DNA-molekyylien kuljetus normaalista? Miten molekyylimajakat ylipäättään kulkeutuvat solu ympäristössä? Viitteitä on esimerkiksi siitä, että sytoplasmian moottori-proteiinit ja solun tukiranka osallistuvat ainakin mRNA-molekyylien kuljetukseen ja ankkurointiin (Knowles *ym.*, 1996; Tekotte & Davis, 2002). On siinä selvittämistä.

7. Johtopäätökset

Työn päätavoitteena oli fluoresenssin resonanssienergian siirtoon perustuvan kaksoismolekyylimajakamenetelmän kehittäminen *AVD*- ja *AVR4/5*-geenien mRNA:iden mittaamiseen sekä lokalisaation tutkimiseen hyönteissoluissa. Kaksoismolekyylimajakka-FRET-menetelmä on parhaimmillaan herkkä ja vain vähäisen taustasignaalin tuottava menetelmä, jonka avulla voidaan detektoida, kvantitoida ja lokalisoida spesifisiä mRNA-molekyylejä, ja jota voidaan suoraan soveltaa myös reaaliaikaiseen tutkimiseen elävissä soluissa.

Tässä työssä kaksoismolekyylimajakka-FRET-menetelmää käytettiin mallikohteina toimivien *AVD*- ja *AVR4/5*-geenien mRNA:iden lokalisaation tutkimiseen sekä kvantitatiiviseen mittaamiseen. Menetelmä sopii erittäin hyvin spesifisten RNA-molekyylien lokalisaation tutkimiseen elävissä soluissa, joista pystytään suhteellisen tarkasti myös kvantitoimaan fluoresenssin intensiteettiä. Tässä työssä kaksoismolekyylimajakat lokalisoituivat todennäköisesti epäspesifisesti tumaan. Saadut tulokset vahvistavat jo aikaisempaa käsitystä, jonka mukaan soluihin kuljetettujen koettimien liian suuri pitoisuus johtaa epäspesifiseen lokalisaatioon. Lokalisaatiotutkimuksia ei kuitenkaan ollut mahdollista enää toistaa pienemmillä pitoisuuksilla. Samasta syystä myös kvantitaatioon tarvittavia lisänäytteitä ei tehty. FRET-signaalissa voitiin havaita kuitenkin vähemmän pelkän luovuttajamolekyylimajakakan sitoutumisesta johtuvaa epäspesifistä signaalia, mikä kuvastaa menetelmällä saavutettavaa spesifisyyttä.

Työssä testattu tutkimusasetelma, jossa haluttua mRNA:ta kvantitoidaan kaksoismolekyylimajakka-FRET-menetelmällä eristetyistä totaali-RNA-näytteistä *in vitro*, ei ole toteuttamiskelpoinen, sillä standardisuoran muodostaminen molekyylimajakoiden ja oligo-DNA-kohteen kanssa ei ole mahdollista. Tutkimusasetelmissa, joissa joko yksinkertaisesti detektoitaisiin spesifisen RNA-molekyylin olemassaoloa totaali-RNA-näytteistä tai määritettäisiin kohdegeenin suhteellisia ilmentymiseroja stimuloitujen,

patologisten tai yliekspressoituneiden solujen ja normaalitilan välillä, kaksoismolekyylimajakat toimisivat hyvin.

Kaksoismolekyylimajakat eivät toimineet halutulla tavalla yksijuosteisen oligo-DNA-kohteen kanssa tehdyissä *in vitro* -kokeissa. Kaksoismolekyylimajakoiden välinen suhteellinen FRET-tehokkuus oli hyvä, mutta signaali–tausta-suhde huono. Huonoon signaali–tausta-suhteeseen johtavat todennäköiset syyt ovat kuitenkin tässä työssä saatujen tulosten ansiosta selvillä. Menetelmää varten joudutaan vielä tekemään lisäkokeita, jotta kaksoismolekyylimajakaparien signaali–tausta-suhteet saadaan paremmiksi, ja jotta menetelmä saadaan toimimaan halutulla tavalla.

Tutkitut mRNA:t tuotettiin hyönteissoluissa bakulovirustuottosysteemin avulla, mikä onnistui ongelmitta. Hyönteissolutuottosysteemin toimivuus tarkistettiin proteiinitasolla Western blot -analyysin avulla. Lisäksi pelkästään AVR4/5-proteiinin tunnistamiseen tuotettu hiiren monoklonaalinen vasta-aine osoittautui spesifiseksi. Spesifisesti AVR4/5-proteiinin tunnistavaa vasta-ainetta voidaan jatkossa hyödyntää AVR4/5:n esiintymisen ja lokalisaation tutkimisessa kanan kudoksissa, jolloin voidaan saada tietoa muun muassa avidiini-geeniperheen toiminnasta ja tarkoituksesta.

Kvantitatiivisessa RT-PCR:ssä molekyylimajakat toimivat hyvin, ja *AVD*- ja *AVR*-geenien ilmentymistasojen mittaamiseen kehitettyä menetelmää voidaan muutaman varmistuskokeen ja riittävien toistomittausten jälkeen hyödyntää jatkossa kontrollimenetelmänä.

8. Lähdeluettelo

Ahlroth MK, Ahlroth P, Kulomaa MS. Copy-number fluctuation by unequal crossing-over in the chicken avidin gene family. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;288:400-406.

Ahlroth MK, Kola EH, Ewald D, Masabanda J, Sazanov A, Fries R, Kulomaa MS. Characterization and chromosomal localization of the chicken avidin gene family. *Anim Genet* 2000;31:367-375.

Airenne KJ, Oker-Blom C, Marjomäki VS, Bayer EA, Wilchek M, Kulomaa MS. Production of biologically active recombinant avidin in baculovirus-infected insect cells. *Protein Expr Purif* 1997;9:100-108.

Allinquant B, Hantraye P, Mailleux P, Moya K, Bouillot C, Prochiantz A. Downregulation of amyloid precursor protein inhibits neurite outgrowth in vitro. *J Cell Biol* 1995;128:919-927.

Alwine JC, Kemp DJ, Stark GR. Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977;74:5350-5354.

Beniya H, Funk CJ, Rohrmann GF, Weaver RF. Purification of a virus-induced RNA polymerase from *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus-infected *Spodoptera frugiperda* cells that accurately initiates late and very late transcription in vitro. *Virology* 1996;216:12-19.

Bergan R, Connell Y, Fahmy B, Neckers L. Electroporation enhances c-myc antisense oligodeoxynucleotide efficacy. *Nucleic Acids Res* 1993;21:3567-3573.

Bernacchi S, Mely Y. Exciton interaction in molecular beacons: a sensitive sensor for short range modifications of the nucleic acid structure. *Nucleic Acids Res* 2001;29:E62-62.

Berney C, Danuser G. FRET or no FRET: a quantitative comparison. *Biophys J* 2003;84:3992-4010.

Bertrand E, Chartrand P, Schaefer M, Shenoy SM, Singer RH, Long RM. Localization of ASH1 mRNA particles in living yeast. *Mol Cell* 1998;2:437-445.

Blake MS, Johnston KH, Russell-Jones GJ, Gotschlich EC. A rapid, sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody on Western blots. *Anal Biochem* 1984;136:175-179.

Bonnet G, Tyagi S, Libchaber A, Kramer FR. Thermodynamic basis of the enhanced specificity of structured DNA probes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:6171-6176.

Bratu DP, Cha BJ, Mhlanga MM, Kramer FR, Tyagi S. Visualizing the distribution and transport of mRNAs in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:13308-13313.

Brisco P, Sankbeil J, Kephart D. RNA Purification: A Rapid and Versatile Protocol for the Isolation of Total RNA. *Promega Notes* 1997;64:1-7.

- Brooks H, Lebleu B, Vives E. Tat peptide-mediated cellular delivery: back to basics. *Adv Drug Deliv Rev* 2005;57:559-577.
- Bryant S, Manning DL. Formaldehyde gel electrophoresis of total RNA. *Methods Mol Biol* 1998;86:69-72.
- Burnette WN. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* 1981;112:195-203.
- Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 2000;25:169-193.
- Bustin SA, Nolan T. Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *J Biomol Tech* 2004;15:155-166.
- Caplen NJ, Parrish S, Imani F, Fire A, Morgan RA. Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:9742-9747.
- Chan WC, Maxwell DJ, Gao X, Bailey RE, Han M, Nie S. Luminescent quantum dots for multiplexed biological detection and imaging. *Curr Opin Biotechnol* 2002;13:40-46.
- Chan WC, Nie S. Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection. *Science* 1998;281:2016-2018.
- Chang DC, Chassy BM, Saunders JA, Sowers AE. *Guide to Electroporation and Electrofusion*. Academic Press, Inc., New York, 1992.
- Chin DJ, Green GA, Zon G, Szoka FC, Jr., Straubinger RM. Rapid nuclear accumulation of injected oligodeoxyribonucleotides. *New Biol* 1990;2:1091-1100.
- Chisholm GE, Henner DJ. Multiple early transcripts and splicing of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus IE-1 gene. *J Virol* 1988;62:3193-3200.
- Damelin M, Silver PA. Mapping interactions between nuclear transport factors in living cells reveals pathways through the nuclear pore complex. *Mol Cell* 2000;5:133-140.
- Davies AH. Current methods for manipulating baculoviruses. *Biotechnology* 1994;12:47-50.
- DeLange RJ, Huang TS. Egg white avidin. 3. Sequence of the 78-residue middle cyanogen bromide peptide. Complete amino acid sequence of the protein subunit. *J Biol Chem* 1971;246:698-709.
- Dias N, Stein CA. Antisense oligonucleotides: basic concepts and mechanisms. *Mol Cancer Ther* 2002;1:347-355.
- Dirks RW, Molenaar C, Tanke HJ. Methods for visualizing RNA processing and transport pathways in living cells. *Histochem Cell Biol* 2001;115:3-11.
- Dokka S, Rojanasakul Y. Novel non-endocytic delivery of antisense oligonucleotides. *Adv Drug Deliv Rev* 2000;44:35-49.

Dubertret B, Calame M, Libchaber AJ. Single-mismatch detection using gold-quenched fluorescent oligonucleotides. *Nat Biotechnol* 2001;19:365-370.

Dummitt B, Chang YH. Molecular beacons for DNA binding proteins: an emerging technology for detection of DNA binding proteins and their ligands. *Assay Drug Dev Technol* 2006;4:343-349.

Dvorak Z, Pascussi JM, Modriansky M. Approaches to messenger RNA detection - comparison of methods. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2003;147:131-135.

Edmands S, Kirk J, Lee A, Radich J. Rapid RT-PCR amplification from limited cell numbers. *PCR Methods Appl* 1994;3:317-319.

Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 2001;411:494-498.

Elo HA, Kulomaa MS, Tuohimaa PJ. Avidin induction by tissue injury and inflammation in male and female chickens. *Comp Biochem Physiol B* 1979a;62:237-240.

Elo HA, Kulomaa MS, Tuohimaa PJ. Progesterone-independent avidin induction in chick tissues caused by tissue injury and inflammation. *Acta Endocrinol* 1979b;90:743-752.

Elo HA, Räisänen S, Tuohimaa PJ. Induction of an antimicrobial biotin-binding egg white protein (avidin) in chick tissues in septic *Escherichia coli* infection. *Experientia* 1980a;36:312-313.

Engbrecht J, Brent R, Kaderbhai MA. Prepare bacmid DNA by alkaline lysis miniprep. In: Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (eds), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons Inc, 1991, pp. 1.6.1-1.6.2.

Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Ringold GM, Danielsen M. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84:7413-7417.

Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998;391:806-811.

Fisher TL, Terhorst T, Cao X, Wagner RW. Intracellular disposition and metabolism of fluorescently-labeled unmodified and modified oligonucleotides microinjected into mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 1993;21:3857-3865.

Förster T. Intermolecular energy migration and fluorescence. *Ann. Phys.* 1948;2:55-75.

Gabig M, Wegrzyn G. An introduction to DNA chips: principles, technology, applications and analysis. *Acta Biochim Pol* 2001;48:615-622.

Gall JG, Pardue ML. Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1969;63:378-383.

Gifford LK, Opalinska JB, Jordan D, Pattanayak V, Greenham P, Kalota A, Robbins M, Vernovsky K, Rodriguez LC, Do BT, Lu P, Gewirtz AM. Identification of antisense nucleic acid hybridization sites in mRNA molecules with self-quenching fluorescent reporter molecules. *Nucleic Acids Res* 2005;33:e28.

Gope ML, Keinänen RA, Kristo PA, Conneely OM, Beattie WG, Zarucki-Schulz T, O'Malley BW, Kulomaa MS. Molecular cloning of the chicken avidin cDNA. *Nucleic Acids Res* 1987;15:3595-3606.

Gordon GW, Berry G, Liang XH, Levine B, Herman B. Quantitative fluorescence resonance energy transfer measurements using fluorescence microscopy. *Biophys J* 1998;74:2702-2713.

Green NM. Avidin. *Adv Protein Chem* 1975;29:85-133.

Gresch O, Engel FB, Nesic D, Tran TT, England HM, Hickman ES, Korner I, Gan L, Chen S, Castro-Obregon S, Hammermann R, Wolf J, Muller-Hartmann H, Nix M, Siebenkotten G, Kraus G, Lun K. New non-viral method for gene transfer into primary cells. *Methods* 2004;33:151-163.

Guatelli JC, Whitfield KM, Kwoh DY, Barringer KJ, Richman DD, Gingeras TR. Isothermal, in vitro amplification of nucleic acids by a multienzyme reaction modeled after retroviral replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:1874-1878.

Guttinger M, Guidi F, Chinol M, Reali E, Veglia F, Viale G, Paganelli G, Corti A, Siccardi AG. Adoptive immunotherapy by avidin-driven cytotoxic T lymphocyte-tumor bridging. *Cancer Res* 2000;60:4211-4215.

Haugland RP, Yguerabide J, Stryer L. Dependence of the Kinetics of Singlet-Singlet Energy Transfer on Spectral Overlap. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1969;63:23-30.

Hertz R, Sebrell WH. Occurrence of avidin in the oviduct and secretions of the genital tract of several species. *Science* 1942;96:257.

Hofmann C, Strauss M. Baculovirus-mediated gene transfer in the presence of human serum or blood facilitated by inhibition of the complement system. *Gene Ther* 1998;5:531-536.

Howbrook DN, van der Valk AM, O'Shaughnessy MC, Sarker DK, Baker SC, Lloyd AW. Developments in microarray technologies. *Drug Discov Today* 2003;8:642-651.

Howell WM, Jobs M, Brookes AJ. iFRET: an improved fluorescence system for DNA-melting analysis. *Genome Res* 2002;12:1401-1407.

Huberman T, Eisenberg-Domovich Y, Gitlin G, Kulik T, Bayer EA, Wilchek M, Livnah O. Chicken avidin exhibits pseudo-catalytic properties. Biochemical, structural, and electrostatic consequences. *J Biol Chem* 2001;276:32031-32039.

Hunter CV, Tiley LS, Sang HM. Developments in transgenic technology: applications for medicine. *Trends Mol Med* 2005;11:293-298.

Hytönen VP, Määttä JA, Nyholm TK, Livnah O, Eisenberg-Domovich Y, Hyre D, Nordlund HR, Horha J, Niskanen EA, Paldanius T, Kulomaa T, Porkka EJ, Stayton PS,

Laitinen OH, Kulomaa MS. Design and construction of highly stable, protease-resistant chimeric avidins. *J Biol Chem* 2005;280:10228-10233.

Hytönen VP, Nyholm TK, Pentikäinen OT, Vaarno J, Porkka EJ, Nordlund HR, Johnson MS, Slotte JP, Laitinen OH, Kulomaa MS. Chicken avidin-related protein 4/5 shows superior thermal stability when compared with avidin while retaining high affinity to biotin. *J Biol Chem* 2004;279:9337-9343.

Jackson DA, Hassan AB, Errington RJ, Cook PR. Visualization of focal sites of transcription within human nuclei. *Embo J* 1993;12:1059-1065.

Jehle JA, Blissard GW, Bonning BC, Cory JS, Herniou EA, Rohrmann GF, Theilmann DA, Thiem SM, Vlak JM. On the classification and nomenclature of baculoviruses: a proposal for revision. *Arch Virol* 2006;151:1257-1266.

John HA, Birnstiel ML, Jones KW. RNA-DNA hybrids at the cytological level. *Nature* 1969;223:582-587.

Kapuscinski J. DAPI: a DNA-specific fluorescent probe. *Biotech Histochem* 1995;70:220-233.

Keinänen RA, Laukkanen ML, Kulomaa MS. Molecular cloning of three structurally related genes for chicken avidin. *J Steroid Biochem* 1988;30:17-21.

Keinänen RA, Wallen MJ, Kristo PA, Laukkanen MO, Toimela TA, Helenius MA, Kulomaa MS. Molecular cloning and nucleotide sequence of chicken avidin-related genes 1-5. *Eur J Biochem* 1994;220:615-621.

Knowles RB, Sabry JH, Martone ME, Deerinck TJ, Ellisman MH, Bassell GJ, Kosik KS. Translocation of RNA granules in living neurons. *J Neurosci* 1996;16:7812-7820.

Korpela J. Chicken macrophages synthesize and secrete avidin in culture. *Eur J Cell Biol* 1984;33:105-111.

Korpela J, Kulomaa M, Tuohimaa P, Vaheri A. Avidin is induced in chicken embryo fibroblasts by viral transformation and cell damage. *Embo J* 1983;2:1715-1719.

Korpela J, Kulomaa M, Tuohimaa P, Vaheri A. Induction of avidin in chickens infected with the acute leukemia virus OK 10. *Int J Cancer* 1982;30:461-464.

Korpela JK, Elo HA, Tuohimaa PJ. Avidin induction by estrogen and progesterone in the immature oviduct of chicken, Japanese Quail, duck, and gull. *Gen Comp Endocrinol* 1981a;44:230-232.

Korpela JK, Kulomaa MS, Elo HA, Tuohimaa PJ. Biotin-binding proteins in eggs of oviparous vertebrates. *Experientia* 1981b;37:1065-1066.

Kost TA, Condreay JP. Recombinant baculoviruses as mammalian cell gene-delivery vectors. *Trends Biotechnol* 2002;20:173-180.

Kost TA, Condreay JP, Jarvis DL. Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nat Biotechnol* 2005;23:567-575.

Kozian DH, Kirschbaum BJ. Comparative gene-expression analysis. *Trends Biotechnol* 1999;17:73-78.

Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonak J, Lind K, Sindelka R, Sjoback R, Sjogreen B, Strombom L, Stahlberg A, Zoric N. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* 2006;27:95-125.

Kuhn H, Demidov VV, Coull JM, Fiandaca MJ, Gildea BD, Frank-Kamenetskii MD. Hybridization of DNA and PNA molecular beacons to single-stranded and double-stranded DNA targets. *J Am Chem Soc* 2002;124:1097-1103.

Kunnas TA, Wallen MJ, Kulomaa MS. Induction of chicken avidin and related mRNAs after bacterial infection. *Biochim Biophys Acta* 1993;1216:441-445.

Lacey LA, Frutos R, Kaya HK, Vail P. Insect Pathogens as Biological Control Agents: Do They Have a Future? *Biological Control* 2001;21:230-248.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-685.

Laitinen OH, Hytönen VP, Ahlroth MK, Pentikäinen OT, Gallagher C, Nordlund HR, Ovod V, Marttila AT, Porkka E, Heino S, Johnson MS, Airene KJ, Kulomaa MS. Chicken avidin-related proteins show altered biotin-binding and physico-chemical properties as compared with avidin. *Biochem J* 2002;363:609-617.

Lakowicz JR. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Second Edition. Kluwer-Plenum, New York, 1999.

Leonetti JP, Mechti N, Degols G, Gagnor C, Lebleu B. Intracellular distribution of microinjected antisense oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:2702-2706.

Li JJ, Fang X, Schuster SM, Tan W. Molecular Beacons: A Novel Approach to Detect Protein - DNA Interactions. *Angew Chem Int Ed Engl* 2000a;39:1049-1052.

Li JJ, Geyer R, Tan W. Using molecular beacons as a sensitive fluorescence assay for enzymatic cleavage of single-stranded DNA. *Nucleic Acids Res* 2000b;28:E52.

Li X, Li Z, Marti AA, Jockusch S, Stevens N, Akins DL, Turro NJ, Ju J. Combinatorial fluorescence energy transfer molecular beacons for probing nucleic acid sequences. *Photochem Photobiol Sci* 2006;5:896-902.

Livnah O, Bayer EA, Wilchek M, Sussman JL. Three-dimensional structures of avidin and the avidin-biotin complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:5076-5080.

Lorenz P, Misteli T, Baker BF, Bennett CF, Spector DL. Nucleocytoplasmic shuttling: a novel in vivo property of antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *Nucleic Acids Res* 2000;28:582-592.

Luckow VA. Cloning and expression of heterologous genes in insect cells with baculovirus vectors. In: Prokop A, Bajpai K, Ho C (eds), *Recombinant DNA technology and Applications*, McGraw-Hill, New York, 1991, pp. 97-152.

- Luckow VA, Lee SC, Barry GF, Olins PO. Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli*. *J Virol* 1993;67:4566-4579.
- Manganelli R, Dubnau E, Tyagi S, Kramer FR, Smith I. Differential expression of 10 sigma factor genes in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol* 1999;31:715-724.
- Marras SA. Selection of fluorophore and quencher pairs for fluorescent nucleic acid hybridization probes. *Methods Mol Biol* 2006;335:3-16.
- Marras SA, Kramer FR, Tyagi S. Efficiencies of fluorescence resonance energy transfer and contact-mediated quenching in oligonucleotide probes. *Nucleic Acids Res* 2002;30:e122.
- Marras SA, Tyagi S, Kramer FR. Real-time assays with molecular beacons and other fluorescent nucleic acid hybridization probes. *Clin Chim Acta* 2006;363:48-60.
- Mata J, Marguerat S, Bahler J. Post-transcriptional control of gene expression: a genome-wide perspective. *Trends Biochem Sci* 2005;30:506-514.
- Mattheyses AL, Hoppe AD, Axelrod D. Polarized fluorescence resonance energy transfer microscopy. *Biophys J* 2004;87:2787-2797.
- Medley CD, Drake TJ, Tomasini JM, Rogers RJ, Tan W. Simultaneous monitoring of the expression of multiple genes inside of single breast carcinoma cells. *Anal Chem* 2005;77:4713-4718.
- Miller LK. *The Baculoviruses*. Plenum Press, New York, 1997.
- Miller LK. Baculoviruses: high-level expression in insect cells. *Curr Opin Genet Dev* 1993;3:97-101.
- Mitsubishi M, Tomozawa S, Endo K, Shinagawa A. Quantification of mRNA in whole blood by assessing recovery of RNA and efficiency of cDNA synthesis. *Clin Chem* 2006;52:634-642.
- Morpurgo M, Radu A, Bayer EA, Wilchek M. DNA condensation by high-affinity interaction with avidin. *J Mol Recognit* 2004;17:558-566.
- Morris KV. Therapeutic potential of siRNA-mediated transcriptional gene silencing. *Biotechniques* 2006;Suppl:7-13.
- Morrison TB, Weis JJ, Wittwer CT. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques* 1998;24:954-958, 960, 962.
- Moscardi F. Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. *Annu Rev Entomol* 1999;44:257-289.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1986;51 Pt 1:263-273.

- Niemelä AO. Regulation of avidin accumulation by prostaglandins in chick oviduct culture. *J Steroid Biochem* 1986;24:709-713.
- Nitin N, Santangelo PJ, Kim G, Nie S, Bao G. Peptide-linked molecular beacons for efficient delivery and rapid mRNA detection in living cells. *Nucleic Acids Res* 2004;32:e58.
- Nordback I, Joensuu T, Tuohimaa P. Effects of glucocorticoids and disodium cromoglycate on avidin production in chick tissues. *J Endocrinol* 1982;92:283-291.
- O'Driscoll L, Daly C, Saleh M, Clynes M. The use of reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) to investigate specific gene expression in multidrug-resistant cells. *Cytotechnology* 1993;12:289-314.
- O'Malley BW, McGuire WL, Kohler PO, Korenman SG. Studies on the mechanism of steroid hormone regulation of synthesis of specific proteins. *Recent Prog Horm Res* 1969;25:105-160.
- O'Reilly DR, Miller LK, Luckow VA. Baculovirus expression vectors. *A Laboratory Manual*, Oxford University Press, New York, 1992.
- Paganelli G, Bartolomei M, Grana C, Ferrari M, Rocca P, Chinol M. Radioimmunotherapy of brain tumor. *Neurol Res* 2006;28:518-522.
- Panda S, Sato TK, Hampton GM, Hogenesch JB. An array of insights: application of DNA chip technology in the study of cell biology. *Trends Cell Biol* 2003;13:151-156.
- Pannier AK, Shea LD. Controlled release systems for DNA delivery. *Mol Ther* 2004;10:19-26.
- Passarelli AL, Miller LK. Three baculovirus genes involved in late and very late gene expression: *ie-1*, *ie-n*, and *lef-2*. *J Virol* 1993;67:2149-2158.
- Pellegrini M, Manning J, Davidson N. Sequence arrangement of the rDNA of *Drosophila melanogaster*. *Cell* 1977;10:213-214.
- Peng XH, Cao ZH, Xia JT, Carlson GW, Lewis MM, Wood WC, Yang L. Real-time detection of gene expression in cancer cells using molecular beacon imaging: new strategies for cancer research. *Cancer Res* 2005;65:1909-1917.
- Perlette J, Tan W. Real-time monitoring of intracellular mRNA hybridization inside single living cells. *Anal Chem* 2001;73:5544-5550.
- Peyret N, Seneviratne PA, Allawi HT, SantaLucia J, Jr. Nearest-neighbor thermodynamics and NMR of DNA sequences with internal A.A, C.C, G.G, and T.T mismatches. *Biochemistry* 1999;38:3468-3477.
- Pugliese L, Coda A, Malcovati M, Bolognesi M. Three-dimensional structure of the tetragonal crystal form of egg-white avidin in its functional complex with biotin at 2.7 Å resolution. *J Mol Biol* 1993;231:698-710.
- Raap AK. Advances in fluorescence in situ hybridization. *Mutat Res* 1998;400:287-298.

- Rapley R. Molecular cloning and gene analysis. In: Wilson K, Walker J (eds), *Principles and Techniques of Practical Biochemistry*, Cambridge University Press, Cambridge, 2000, pp. 184-185.
- Refregiers M, Laigle A, Jolles B, Chinsky L. Fluorescence resonance energy transfer analysis of the degradation of an oligonucleotide protected by a very stable hairpin. *J Biomol Struct Dyn* 1996;14:365-371.
- Rice WC, Miller LK. Baculovirus transcription in the presence of inhibitors and in nonpermissive *Drosophila* cells. *Virus Res* 1986;6:155-172.
- Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 1997;245:154-160.
- Rondinone CM. Therapeutic potential of RNAi in metabolic diseases. *Biotechniques* 2006;Suppl:31-36.
- Rubinson DA, Dillon CP, Kwiatkowski AV, Sievers C, Yang L, Kopinja J, Rooney DL, Ihrig MM, McManus MT, Gertler FB, Scott ML, Van Parijs L. A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference. *Nat Genet* 2003;33:401-406.
- Rusinova E, Tretyachenko-Ladokhina V, Vele OE, Senear DF, Alexander Ross JB. Alexa and Oregon Green dyes as fluorescence anisotropy probes for measuring protein-protein and protein-nucleic acid interactions. *Anal Biochem* 2002;308:18-25.
- Rychlik W. Selection of primers for polymerase chain reaction. *Mol Biotechnol* 1995;3:129-134.
- Saksela K. RNA-interferenssi virustautien torjuntaan? *Duodecim* 2002;188:2191-2198.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.
- Santangelo P, Nitin N, Bao G. Nanostructured probes for RNA detection in living cells. *Ann Biomed Eng* 2006;34:39-50.
- Santangelo PJ, Nitin N, Bao G. Direct visualization of mRNA colocalization with mitochondria in living cells using molecular beacons. *J Biomed Opt* 2005;10:44025.
- Santangelo PJ, Nix B, Tsourkas A, Bao G. Dual FRET molecular beacons for mRNA detection in living cells. *Nucleic Acids Res* 2004;32:e57.
- Scherer LJ, Rossi JJ. Approaches for the sequence-specific knockdown of mRNA. *Nat Biotechnol* 2003;21:1457-1465.
- Schettters H. Avidin and streptavidin in clinical diagnostics. *Biomol Eng* 1999;16:73-78.
- Sharp PA, Sugden B, Sambrook J. Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis. *Biochemistry* 1973;12:3055-3063.
- Shav-Tal Y, Darzacq X, Shenoy SM, Fusco D, Janicki SM, Spector DL, Singer RH. Dynamics of single mRNPs in nuclei of living cells. *Science* 2004;304:1797-1800.

Shoji I, Aizaki H, Tani H, Ishii K, Chiba T, Saito I, Miyamura T, Matsuura Y. Efficient gene transfer into various mammalian cells, including non-hepatic cells, by baculovirus vectors. *J Gen Virol* 1997;78:2657-2664.

Silverman AP, Kool ET. Quenched probes for highly specific detection of cellular RNAs. *Trends Biotechnol* 2005;23:225-230.

Sokol DL, Zhang X, Lu P, Gewirtz AM. Real time detection of DNA:RNA hybridization in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:11538-11543.

Spiller DG, Giles RV, Grzybowski J, Tidd DM, Clark RE. Improving the intracellular delivery and molecular efficacy of antisense oligonucleotides in chronic myeloid leukemia cells: a comparison of streptolysin-O permeabilization, electroporation, and lipophilic conjugation. *Blood* 1998;91:4738-4746.

Spiller DG, Tidd DM. Nuclear delivery of antisense oligodeoxynucleotides through reversible permeabilization of human leukemia cells with streptolysin O. *Antisense Res Dev* 1995;5:13-21.

Stemme V, Rymo L, Risberg B, Stemme S. Quantitative analysis of specific mRNA species in minute cell samples by RT-PCR and flow cytometry. *J Immunol Methods* 2001;249:223-233.

Tekotte H, Davis I. Intracellular mRNA localization: motors move messages. *Trends Genet* 2002;18:636-642.

ten Asbroek AL, van Groenigen M, Nooij M, Baas F. The involvement of human ribonucleases H1 and H2 in the variation of response of cells to antisense phosphorothioate oligonucleotides. *Eur J Biochem* 2002;269:583-592.

Thelwell N, Millington S, Solinas A, Booth J, Brown T. Mode of action and application of Scorpion primers to mutation detection. *Nucleic Acids Res* 2000;28:3752-3761.

Tiscornia G, Singer O, Ikawa M, Verma IM. A general method for gene knockdown in mice by using lentiviral vectors expressing small interfering RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:1844-1848.

Titus JA, Haugland R, Sharrow SO, Segal DM. Texas Red, a hydrophilic, red-emitting fluorophore for use with fluorescein in dual parameter flow microfluorometric and fluorescence microscopic studies. *J Immunol Methods* 1982;50:193-204.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979;76:4350-4354.

Troy CM, Derossi D, Prochiantz A, Greene LA, Shelanski ML. Downregulation of Cu/Zn superoxide dismutase leads to cell death via the nitric oxide-peroxynitrite pathway. *J Neurosci* 1996;16:253-261.

Tsai WB, Wang MC. Effect of an avidin-biotin binding system on chondrocyte adhesion, growth and gene expression. *Biomaterials* 2005;26:3141-3151.

Tsourkas A, Bao G. Shedding light on health and disease using molecular beacons. *Brief Funct Genomic Proteomic* 2003;1:372-384.

- Tsourkas A, Behlke MA, Bao G. Structure-function relationships of shared-stem and conventional molecular beacons. *Nucleic Acids Res* 2002;30:4208-4215.
- Tsourkas A, Behlke MA, Xu Y, Bao G. Spectroscopic features of dual fluorescence/luminescence resonance energy-transfer molecular beacons. *Anal Chem* 2003;75:3697-3703.
- Tsuji A, Koshimoto H, Sato Y, Hirano M, Sei-Iida Y, Kondo S, Ishibashi K. Direct observation of specific messenger RNA in a single living cell under a fluorescence microscope. *Biophys J* 2000;78:3260-3274.
- Tuohimaa P, Joensuu T, Isola J, Keinänen R, Kunnas T, Niemelä A, Pekki A, Wallen M, Ylikomi T, Kulomaa M. Development of progesterin-specific response in the chicken oviduct. *Int J Dev Biol* 1989;33:125-134.
- Tyagi S, Bratu DP, Kramer FR. Multicolor molecular beacons for allele discrimination. *Nat Biotechnol* 1998;16:49-53.
- Tyagi S, Kramer FR. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nat Biotechnol* 1996;14:303-308.
- Tyagi S, Marras SA, Kramer FR. Wavelength-shifting molecular beacons. *Nat Biotechnol* 2000;18:1191-1196.
- Wadia JS, Dowdy SF. Transmembrane delivery of protein and peptide drugs by TAT-mediated transduction in the treatment of cancer. *Adv Drug Deliv Rev* 2005;57:579-596.
- Walker S, Sofia MJ, Kakarla R, Kogan NA, Wierichs L, Longley CB, Bruker K, Axelrod HR, Midha S, Babu S, Kahne D. Cationic facial amphiphiles: a promising class of transfection agents. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:1585-1590.
- Wallen MJ, Laukkanen MO, Kulomaa MS. Cloning and sequencing of the chicken egg-white avidin-encoding gene and its relationship with the avidin-related genes Avr1-Avr5. *Gene* 1995;161:205-209.
- Wansink DG, Schul W, van der Kraan I, van Steensel B, van Driel R, de Jong L. Fluorescent labeling of nascent RNA reveals transcription by RNA polymerase II in domains scattered throughout the nucleus. *J Cell Biol* 1993;122:283-293.
- Vet JA, Van der Rijt BJ, Blom HJ. Molecular beacons: colorful analysis of nucleic acids. *Expert Rev Mol Diagn* 2002;2:77-86.
- Wicks RJ. RNA molecular weight determination by agarose gel electrophoresis using formaldehyde as denaturant: comparison of RNA and DNA molecular weight markers. *Int J Biochem* 1986;18:277-278.
- Wilchek M, Bayer EA. Applications of avidin-biotin technology: literature survey. *Methods Enzymol* 1990b;184:14-45.
- Wilchek M, Bayer EA. Avidin-biotin technology. *Methods in enzymology* 1990a;184:100-101.

Wittwer CT, Ririe KM, Andrew RV, David DA, Gundry RA, Balis UJ. The LightCycler: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. *Biotechniques* 1997;22:176-181.

Vogelstein B, Gillespie D. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979;76:615-619.

Xu Y, Karalkar NB, Kool ET. Nonenzymatic autoligation in direct three-color detection of RNA and DNA point mutations. *Nat Biotechnol* 2001;19:148-152.

Yamamoto M, Wakatsuki T, Hada A, Ryo A. Use of serial analysis of gene expression (SAGE) technology. *J Immunol Methods* 2001;250:45-66.

Yanisch-Perron C, Vieira J, Messing J. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 1985;33:103-119.

Zamore PD, Aronin N. siRNAs knock down hepatitis. *Nat Med* 2003;9:266-267.

Zerega B, Camardella L, Cermelli S, Sala R, Cancedda R, Descalzi Cancedda F. Avidin expression during chick chondrocyte and myoblast development in vitro and in vivo: regulation of cell proliferation. *J Cell Sci* 2001;114:1473-1482.

Zuker M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res* 2003;31:3406-3415.