

Rosa Korhonen

POISTOGEENISTEN *MYCOBACTERIUM* *MARINUM* -MUTANTTIEN VALMISTUS

Lääketieteen ja terveysteknologian tiedekunta
Kandidaatin tutkielma
Huhtikuu 2021

TIIVISTELMÄ

Rosa Korhonen: Poistogeenisten *Mycobacterium marinum* -mutanttien valmistus
Kandidaatin tutkielma
Tampereen yliopisto
Bioteknologian ja biolääketieteen tekniikan tutkinto-ohjelma
Huhtikuu 2021

Mycobacterium tuberculosis -bakteeri aiheuttaa ihmisessä vakavan ja vaikeasti hoidettavan tuberkuloosi-infektion. Nykyiset infektion hoitomuodot eivät ole aina tehokkaita ja *M. tuberculosis* -bakteerit reagoivat heikosti antibiootteihin. Antibioottihoidoista huolimatta tuberkuloosiin kuolee vuosittain noin 1,2 miljoonaa ihmistä. *M. tuberculosis* -bakteerin lähisukulainen *Mycobacterium marinum* on kalojen luonnollinen patogeeni, joka aiheuttaa kaloissa tuberkuloosin kaltaisen infektion. *M. marinum* -bakteerit soveltuvat tuberkuloosi-infektion mallintamiseen *in vivo*.

Työssä valmistettiin kolme knockout-plasmidia, joilla tehtiin koko geenin deleetit *M. marinum* -bakteeriin. Kohdegeeneiksi valittiin vähän tutkittuja geenejä, jotka vaikuttavat mykobakteerien biofilmiin tai antibioottien sietokykyyn. Kohdegeeneiksi valittiin lamA-, mmaA4- ja mmp11-geenit. LamA on mykobakteerien jakautumisessa vaikuttava proteiini, joka vaikuttaa populaation homogeenisyyteen. LamA-mutantit on havaittu reagoivan herkemmin antibiootteihin. MmaA4 on bakteerin kuoren mykolihappojen valmistuksessa tarvittava metyyliitransferraasi. Mmp11 on solukalvon rasvojen transportteri, joka vaikuttaa biofilmin muodostuskykyyn.

Plasmidi transformoidaan bakteeriin elektroporaatiolla. Plasmidi liittyy bakteerin kromosomiin homologisella rekombinaatiolla. Tavoitteena on saada tapahtumaan double crossover (DCO) mutaatio, jossa hygromysiiniresistenssigeeni liittyy kohdegeenin tilalle bakteerin kromosomiin. DCO-mutaatioiden löytämiseen käytetään negatiivisena selektiona lacZ-, sacB- ja kanamysiiniresistenssigeenejä.

Työssä onnistuttiin valmistamaan kolme uutta mutanttibakteerikantaa. Onnistunut DCO-mutaatio varmennettiin polymeerasiketjureaktiolla, restriktioanalyysillä ja sekvensoinnilla.

Avainsanat: *Mycobacterium marinum*, lamA, mmaA4, mmp11, elektroporaatio, geenimuokkaus

Tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck –ohjelmalla.

ALKUSANAT

Tämä opinnäytetyö on tehty Tampereen yliopiston Lääketieteen ja terveysteknologian tiedekuntaan osana kandidaatin tutkintoa. Työn mahdollistamisesta haluan kiittää yliopistoa ja tiedekuntaa.

Isoimmat kiitokset haluan osoittaa ohjaajalleni Leena-Maija Vanha-aholle, joka ohjasi niin kirjoitusprosessissa kuin laboratoriossa. Kiitokset haluan osoittaa myös Hannaleena Piipolle, joka on jaksanut auttaa niin pienissä kuin suurissa ongelmissa, mitä laboratoriossa vastaan on tullut. Kiitos kuuluu myös Matalena Parikalle, joka mahdollisti tämän tutkimuksen tekemisen. Kiitokset haluan sanoa myös muille työkavereille, jotka ovat olleet piristämässä työpäiviä.

Tampereella, 27.4.2021

Rosa Korhonen

SISÄLLYSLUETTELO

1. JOHDANTO	4
1.1 Geenimuokkauksen tavoite ja kohdegeenit.....	4
1.2 Menetelmän periaate	5
1.2.1 Knockout-plasmidi	5
1.2.2 Elektroporaatio.....	7
1.2.3 Selektiomenetelmät ja mutaation varmennus.....	7
2. MATERIAALIT JA MENETELMÄT	8
2.1 Elektrokompenttien bakteerien valmistus ja elektroporaatio	8
2.2 Selektio, PCR ja sekvensointi	9
3. TULOKSET.....	11
4. YHTEENVETO	14
LÄHTEET	14

1. JOHDANTO

Mycobacterium tuberculosis -bakteerin aiheuttama tuberkuloosi-infektio tappaa vuosittain ihmisiä noin 1,2 miljoonaa maailmanlaajuisesti ja vuonna 2019 10 miljoonaa ihmistä sairastui tuberkuloosiin. (Global Tuberculosis Report 2020) *M. tuberculosis* aiheuttaa aktiivisen infektion lisäksi oireetonta latenttia infektiota, joka voi aktivoitua vuosia bakteerille altistumisen jälkeen. Aktiivista tuberkuloosi-infektiota hoidetaan tyypillisesti useilla antibiooteilla vähintään kuusi kuukautta. Vaikka antibioottihoito on pitkä, noin 5 % potilaista hoito epäonnistuu ja infektio uusiutuu. (Koul ym. 2011) Mykobakteerien antibiootin sietokykyyn uskotaan vaikuttavan niiden kyky muodostaa biofilmiä, jossa ne muodostavat tiiviin bakteeriyhteisön. (Esteban ja Garcia-Coca 2017)

Mycobacterium marinum on mykobakteerien sukuun kuuluva kalan luonnollinen patogeeni. *M. marinum* aiheuttaa kalassa tuberkuloosin kaltaisen infektion ja siten soveltuu tuberkuloosi-infektion mallintamiseen *in vivo* seeprakaloissa (*Danio rerio*). (Parikka ym. 2012) *M. marinum* soveltuu kasvunopeutensa ja patogeenisyytensä osalta myös paremmin tutkimuskohteeksi kuin *M. tuberculosis*. Vaikka *M. marinum* luokitellaan hitaasti kasvavaksi mykobakteeriksi, kasvaa se huomattavasti nopeammin kuin *M. tuberculosis*. *M. marinum* on BSL-2-luokan patogeeni, joka voi aiheuttaa ihmisessä paikallisinfection ihoon (Hashish ym. 2018).

1.1 Geenimuokkauksen tavoite ja kohdegeenit

Tutkimuksen tavoitteena on luoda kolme uutta eri poistogeenistä bakteerikantaa. Bakteeriin on tarkoitus tehdä koko geenin deletio ja liittää positiiviseksi selektioksi poistetun geenin tilalle hygromysiiniresistenssigeeni. Poistogeenisillä mutanttikannoilla voidaan tutkia geenin vaikutuksia viljelytyppiin verraten sekä *in vitro*, että *in vivo* seeprakaloilla. Tämän vuoksi mykobakteerien suvusta bakteeriksi valittiin villityypin *M. marinum* (ATCC 927). Tutkimuksen kohdegeenit valittiin kirjallisuuden perusteella, ja tavoitteena oli valita geenejä, jotka ovat melko tuntemattomia ja jotka vaikuttavat joko mykobakteerien biofilmin muodostukseen tai antibioottien sietokykyyn. Kohdegeeneiksi valittiin *mmaA4*-, *mmp11*- ja *lamA*-geenit.

MmaA4-geeni koodaa mykolihappojen valmistukseen tarvittavaa metyyliitransferraasia. Mykobakteerien solukalvoa ympäröi pitkistä rasvahapoista, mykolihapoista, koostuva kerros. Mykolihapot muodostavat solukalvon rasvojen kanssa kaksoiskalvon, joka tekee huonosti läpäisevän suojaavan kerroksen bakteerille. *MmaA4* osallistuu α -mykolihappojen kaksoissidoksen metylointiin. Metyloinnin jälkeen mykolihaposta voidaan tehdä hydroksimykolihappo liittämällä metyloituun hiileen hydroksiryhmä. Hydroksimykolihaposta voidaan valmistaa toimivia ketomykoli- ja metoksimykolihappoja, jotka ovat tärkeä osa mykobakteerien suojaavaa kerrosta. Dubnaun ym. (2000) tutkimuksessa havaittiin *M. tuberculosis* *mmaA4*-poistogeenisessä mutanttikannassa suojaajuoren

läpäisevän huonommin muun muassa glyserolia ja sekä suojakuoren olevan kestävämpi vetyperoksidille. Keuhkoissa, pernassa ja maksassa *mmaA4*-mutanttikannan elinkelpoisuus oli laskenut verrattuna villityypin *M. tuberculosis* -bakteeriin. (Dubnau ym. 2000)

Mmpl11 on solukalvon rasvojen transportteri, ja sillä on merkittävä tehtävä mykobakteerien biofilmin muodostuksessa. Mmpl11 kuuluu mycobacterial membrane protein large eli *mmpL*-geeniperheeseen, johon kuuluu rasvatransporttereita, jotka vaikuttavat mykobakteerien fysiologiaan ja *M. tuberculosis* -bakteerin patogeenisyyteen. Wright ym. (2017) osoittivat *M. tuberculosis* *mmpL11*-mutantilla olevan heikentynyt selviytyminen vähäravinteisessa ja vähähappisessa kasvatuksessa. Biofilmikasvatuksessa mutantilla on muuttunut biofilmi ja muutoksia biofilmin rasvoissa etenkin mykolaattivahaestereissä ja triglyserideissä. *In vivo* -tutkimuksissa hiiren *mmpL11*-mutantin aiheuttamassa infektiossa ei ollut eroa infektion alkuvaiheissa, mutta kroonisen infektion loppuvaiheilla bakteerin selviytymien oli heikentynyt verrattuna villityypin *M. tuberculosis* -bakteeriin. Mmpl11 uskotaan vaikuttavan siis mykobakteerien kasvuun, persistenssiin ja latenssiin. (Wright ym. 2017)

MmpS3 eli *lamA*-geenin merkitys ja toiminta mykobakteereissa on melko tuntematon. Geeni on hyvin konservoitunut mykobakteereissa, mutta sille ei löydy lainkaan homologeja muista organismeista. Rego ym. (2017) tutkimuksien mukaan *lamA* on osa mykobakteerien jakautumiskompleksia eli divisomia. Normaaleissa olosuhteissa mykobakteerien jakautuminen on epäsymmetristä, eli tytärsolut eivät ole samankokoisia ja identtisiä. *LamA*-mutanteissa bakteerin jakautuminen on symmetrisempää, vaikka bakteerin ja populaation kasvunopeudessa ei ole eroja verrattuna villityypin bakteeriin. *LamA* vaikuttaa siis bakteeripopulaation homogeenisyyteen. Tutkimuksessa havaittiin myös *Mycobacterium smegmatis* *lamA*-mutantin kuolevan paremmin vankomysiinissa, teikoplaniinissa ja rifampisiinissa. *M. tuberculosis* *lamA*-mutantti reagoi myös herkemmin vankomysiiniin ja rifampisiiniin. (Rego ym. 2017)

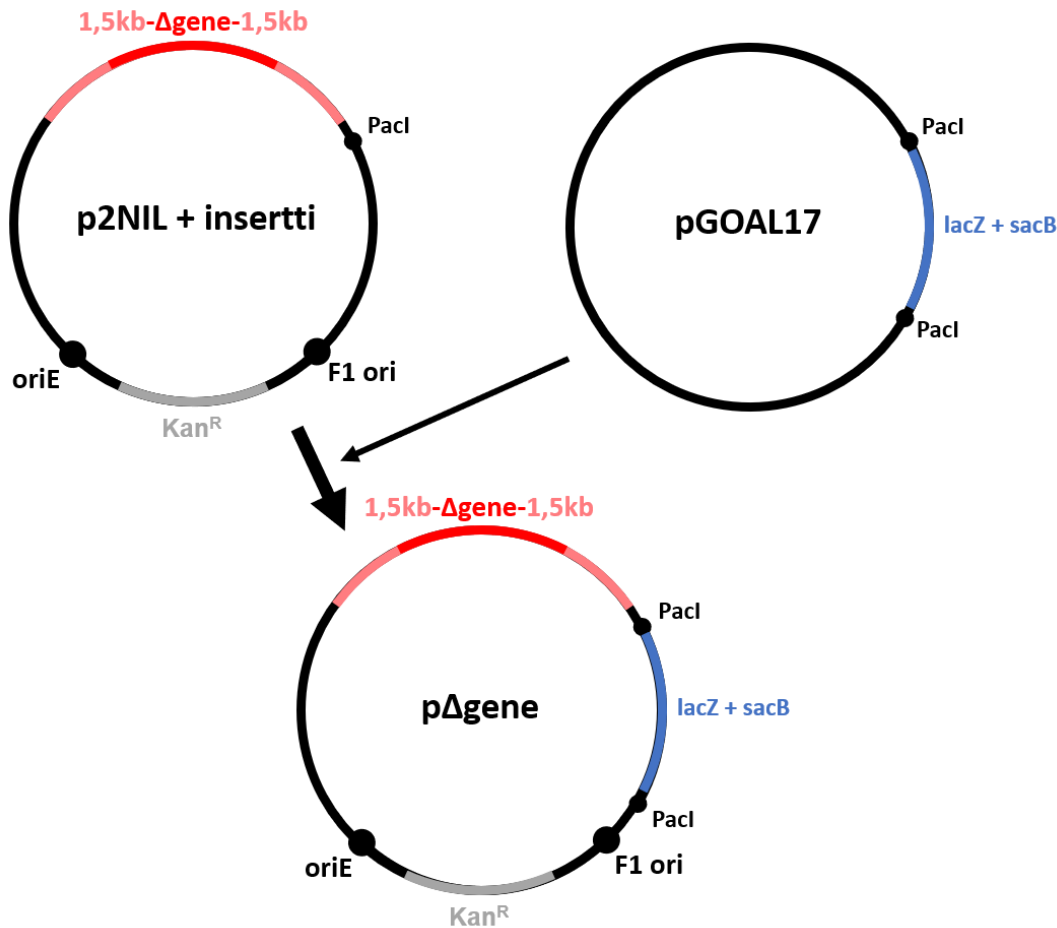
1.2 Menetelmän periaate

1.2.1 Knockout-plasmidi

Koko geenin deleetio tehdään *M. marinum* -bakteeriin knockout-plasmidilla. Plasmidi sisältää DNA-konstruktin, jossa on kohdegeeni korvattu hygromysiiniresistenssigeenillä, ja selektiomarkkereita, joilla mutaation onnistuminen voidaan varmistaa. DNA-konstruktin sisältää 1000–1500 emäsparin pituiset DNA-sekvenssit kohdegeenin ulkopuolelta 5'- ja 3'-päistä. Tämä flanking region on identtinen villityypin *M. marinum* -bakteerin kanssa. Kohdegeeni on konstruktissa kokonaan poistettu ja tilalle on kloonattu hygromysiiniresistenssigeeni ja EM7-promoottori. Plasmidissa selektiomarkkereina hygromysiinin lisäksi toimivat kanamysiiniresistenssi-, *lacZ*- ja *sacB*-geenit.

Plasmidi valmistetaan kloonamalla siihen DNA-konstruktin ja selektiomarkkerit sisältävä kasetti. Plasmidina toimii p2NIL-plasmidi. DNA-konstruktin päihin suunnitellaan KpnI-restriktioentsyymille leikkauskohta, jolla liitetään DNA-konstruktin p2NIL-plasmidiin. Selektiomarkkerit sisältävä kasetti,

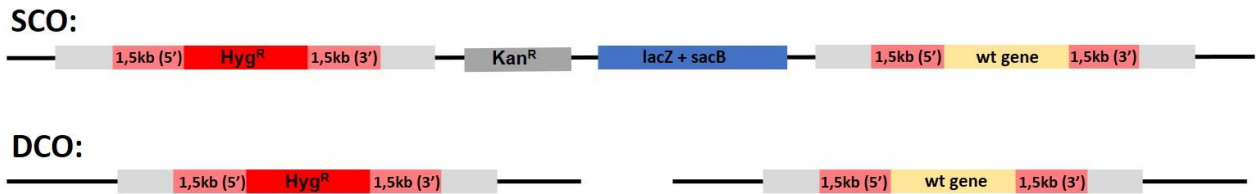
P_{Ag85} -lacZ- P_{hsp60} -sacB, leikataan irti pGOAL17-plasmidista PacI-restriktioentsyymillä ja liitetään p2NIL-plasmidiin. P2NIL-plasmidissa ovat replikaation aloituskohdat, oriE ja f1 ori, sekä kanamysiiniresistenssigeeni, Kan^R. Valmis knockout-plasmidi, pΔgene ja pGOAL17 on kuvattu kuvassa 1.



Kuva 1. P2NIL-, pGOAL17 ja knockout-plasmidien rakenne.

Plasmidin liittyminen bakteerin kromosomiin perustuu homologiseen rekombinaatioon. Bakteerin DNA-korjausmekanismiin kuuluva recA-proteiini voi sitoutua plasmidiin ja muodostaa plasmidin kanssa nukleoproteiinifilamentin. Jos recA havaitsee samankaltaisuutta bakteerin genomisessa DNA:ssa sen sitoman plasmidin kanssa, saattaa se liittää plasmidin alkuperäisen geenin tilalle. Tässä rekombinaatiossa voi tapahtua joko single crossover (SCO) mutaatio tai double crossover (DCO) mutaatio. Kuvassa 2 on kuvattuna SCO-mutaatio ja mahdolliset DCO-mutaatiot. SCO-mutaatiossa koko plasmidi on liittynyt bakteerin kromosomiin, eli bakteerilla on sekä villityypin kohdegeeni että konstruktin sisältämä mutaatio eli hygromysiiniresistenssigeeni. SCO-mutantilla on myös lacZ-, sacB- ja kanamysiiniresistenssigeenit. DCO-mutaatiossa vain plasmidin DNA-konstrukti on liittynyt bakteerin kromosomiin, eli genomissa ei enää ole villityypin toimivaa kohdegeeniä, vaan se on korvautunut konstruktin hygromysiiniresistenssigeenillä. Koska DCO-mutaatio

vaatii bakteerin kromosomin leikkaamisen kahdesta kohtaa, on sen tapahtuminen merkittävästi epätodennäköisempää kuin SCO-mutaation tapahtuminen. SCO-mutaation jälkeen voi tapahtua myös DCO-mutaatio, jossa bakteerin kromosomista irtoaa koko knockout-plasmidi, ja bakteeri palautuu villityypin bakteeriksi. (Parish ja Roberts 2015)



Kuva 2. SCO- ja DCO-mutaatiot.

1.2.2 Elektroporaatio

Knockout-plasmidi transformoidaan *M. marinum* -bakteeriin elektroporaatiolla. Elektroporaatiossa seos elektrokompetentteja bakteereja ja haluttua plasmidia altistetaan korkealle ja nopealle sähkövirralle. Sähkövirta rikkoo hetkellisesti bakteerin solukalvon ja vapaa plasmidi pystyy kulkeutumaan solun sisälle. Elektroporaation tehokkuuteen vaikuttavat kompetenttien bakteerien valmistus, elektroporaatiomedium, jännitepulssi ja bakteerien palautuminen elektroporaation jälkeen. (Parish ja Roberts 2015) *M. marinum* elektrokompetenttien bakteerien valmistuksessa tärkeää on kasvattaa bakteerit logaritmisen kasvun loppupuolelle ja pestä bakteerit huoneenlämmössä (Talaat ja Trucksis 2000). Plasmideja on oltava riittävästi elektroporaatio mediumissa, ja niiden tulee olla tasaisesti bakteerien läheisyydessä. Liian suuri tilavuus plasmidisuspensiota voi aiheuttaa mediumin johtavuuden muutoksen ja valokaaren syntymisen. Jännitepulssin optimaalinen kesto on 15–25 ms. Elektroporaation jälkeen bakteerit siirretään välittömästi ravinteikkaaseen mediumiin palautumaan usean tunnin ajaksi. (Parish ja Roberts 2015) *M. marinum* -bakteerin elektroporaatiotehokkuus on 1 µg plasmidia kohti noin 100 transformaatiota (Talaat ja Trucksis 2000).

1.2.3 Selektiomenetelmät ja mutaation varmennus

Plasmidin integraation positiivisena selektiona toimii hygromysiini, sekä negatiivisena selektiona lacZ, sacB ja kanamysiini. Onnistuneessa DCO-mutaatiossa bakteerin genomiin on liittynyt vain hygromysiiniresistenssi. SCO-mutaatiossa koko plasmidi on integroitunut bakteerin genomiin. SCO-mutantti on hygromysiiniresistentti sakkaroosille sensitiivinen sininen pesäke X-gal -maljalla. DCO-mutantti on hygromysiiniresistentti valkoinen pesäke X-gal -maljalla. LacZ- ja sacB-selektion jälkeen varmistetaan hygromysiiniresistenssi sekä kanamysiiniresistenssi. Lopuksi mutaatio varmistetaan polymeraasiketjureaktiolla eli PCR:llä, tarvittaessa restriktioanalyysillä ja sekvensoinnilla. (Parish ja Roberts 2015)

LacZ-geeni koodaa β -galaktosidaasia, joka hydrolysoi galaktosideja monomeereiksi. X-gal eli 5-bromo-4-kloro-3-indoli- β -D-galaktopyranosidi on väritön molekyyli, jota käytetään lacZ-geenin tunnistamiseen. β -galaktosidaasi hydrolysoi X-galin, ja syntyy galaktoosia ja 5-bromo-4-kloro-3-hydroksi-indoli, joka spontaanisti dimerisoituu ja tuottaa sinisen liukenemattoman molekyylin. Bakteeripesäkkeet, joissa on toimiva lacZ-geeni, havaitaan siis X-galia sisältävällä maljalla sinisenä pesäkkeenä. (Juers ym. 2012)

SacB-geeni koodaa entsyymiä, joka polymerisoi sakkaroosia haaroittuneeksi fruktoosipolymeeriksi. Mykobakteereissa ja useissa muissa bakteerilajeissa aktiivinen sacB-geeni aiheuttaa tappavan herkkyuden sakkaroosille. Sakkaroosin toksisuuden syytä ei täysin tunneta, mutta fruktoosipolymeerien epäillään kertyvän solun sisälle ja haittaavan solun normaalia toimintaa. (Pelacic ym. 1996)

2. MATERIAALIT JA MENETELMÄT

2.1 Elektrokompetenttien bakteerien valmistus ja elektroporaatio

M. marinum -bakteereja kasvatettiin viikon ajan +28 °C:ssa 7H10-kasvatusmaljalla. Maljalta siirrostettiin 1 μ l -siirrostusloopilla bakteereja 10 ml 7H9-mediumia (0,002 % glyseroli, 0,2 % polysorbaatti 80, 10 % ADC enrichment). Bakteereja kasvatettiin +28 °C:ssa seitsemän vuorokautta. 10 ml bakteeriliuosviljelmä siirrostettiin 100 ml 7H9-mediumia. Bakteereja kasvatettiin neljä vuorokautta +28 °C:ssa. Bakteereja sentrifugoitiin 30 minuuttia 5000 x g ja supernatantti poistettiin. Bakteerit suspensoitiin 10 ml huoneenlämpöistä 10 % glyserolia ja sentrifuugaus toistettiin. Bakteerien pesut toistettiin 10 ml ja 5 ml 10 % glyserolia. Bakteeripelletti laimennettiin 2 ml 10 % glyserolia ja jaettiin 200 μ l alieriin säilöön -80 °C:een. Seuraavana päivänä alierät sulatettiin ja glyserolin tilalle vaihdettiin uusi huoneenlämpöinen glyseroli. 200 μ l bakteerisuspensioon lisättiin 750 ng plasmidia ja suspensio siirrostettiin 2 mm -elektroporaatiokyvetiin. Bakteereihin transformoitiin p Δ lamA-, p Δ mmp11- ja p Δ mmaA4-plasmidit sekä positiivisena kontrollina pTEC27-plasmidi ja negatiivisena kontrollina plasmiditon näyte. Näytteet elektroporatoitiin 2,5 kV (1000 Ω , 25 μ F). Elektroporaation jälkeen näytteet siirrostettiin välittömästi 5 ml 7H9-mediumia (0,002 % glyseroli, 0,2 % polysorbaatti 80, 10 % ADC enrichment) ja kasvatettiin yön yli +28 °C:ssa. Näytteistä maljattiin 5 μ l 7H10-maljoille kontrollit, jotta voidaan varmistaa, että bakteerit eivät kuolleet elektroporaatiossa. Loput näytteistä maljattiin 7H10-maljoille, jotka sisälsivät 50 μ g/ml hygromysiinia ja X-galia. Bakteereja kasvatetaan maljoilla 12 vuorokautta +28 °C:ssa.

2.2 Selektio, PCR ja sekvensointi

Hygromysiinia ja X-galia sisältäviltä maljoilta valittiin 7H9-liuosviljelmiin kaikki valkoiset pesäkkeet ja 2–4 sinistä pesäkettä. Pesäkkeet siirrostettiin kasvamaan 5 ml 7H9-mediumia (0,002 % glyseroli, 0,2 % polysorbaatti 80, 10 % ADC enrichment, 50 µg/ml hygromysiini). Bakteereja kasvatettiin seitsemän vuorokautta +28 °C:ssa. Viikon kasvatuksen jälkeen näytteitä maljattiin 7H10-maljoille, joissa oli mukana 2 % sakkaroosia ja X-galia. Näytteistä maljattiin kontrollit myös X-gal 7H10-maljoille, jotta voidaan havaita sakkaroosin vaikutus pesäkkeiden määrän laskuna. Bakteereja kasvatettiin maljoilla +28 °C:ssa 12 vuorokautta. Maljoilta valittiin 20–40 pesäkettä jatkokäsittelyyn hygromysiinimaljoille ja hygromysiini-kanamysiinimaljoille. Pesäkkeet siirrostettiin yksittäin sekä hygromysiinimaljalle että hygromysiini-kanamysiinimaljalle. Maljoja kasvatettiin +28 °C:ssa seitsemän vuorokautta. Jatkokäsittelyyn PCR-ajoon valittiin pesäkkeet, jotka kasvoivat vain hygromysiinimaljalla.

PCR-primert suunniteltiin kohdegeenin flanking region -alueelle mahdollisimman lähelle geeniä. PCR-ajossa käytettiin Thermo Scientific DreamTaq DNA-polymeraasia, taulukon 1 primereita ja taulukon 2 mukaista reaktioseosta. Templaattina toimi bakteeripesäke, joka lisättiin PCR-putkeen 1 µl-siirrostusloopilla kevyesti koskien pesäkkeeseen. PCR ajettiin taulukon 3 mukaisesti. Näytteille, joilla syntyi selkeä villityypin *M. marinum* -bakteerista eroava bändi, tehtiin taulukon 4 mukaisesti restriktioanalyysi NdeI-entsyymillä. Reaktioseosta inkuboitii +37 °C:ssa 60 minuuttia.

Taulukko 1 PCR-primert.

PCR-primer	Sekvenssi
lamA forward	5'-GATGATCAATGCCGAGACGA-3'
lamA reverse	5'-TTTGGACAGGGTAGGCAAAC-3'
mmaA4 forward	5'-AAGTAGTGCATTTGCGGTCA-3'
mmaA4 reverse	5'-ATCAGGAGAACAGGACGACA-3'
mmp11 forward	5'-GATATCGCCGCTCTGTAGC-3'
mmp11 reverse	5'-TCCACATTTGTCTGCGGTAG-3'

Taulukko 2 PCR-reaktioseos.

	Reaktioseos (µl)
10X DreamTaq Buffer	5
dNTPs Mix, 2mM each	5
Forward primer, 5µM	5
Reverse primer, 5µM	5
DreamTaq DNA polymerase	0,25
templaatti DNA	1
H ₂ O	28,75

Taulukko 3 PCR-reaktio.

Vaihe	Lämpötila	Aika	Syklien määrä
Initial Denaturation	95 °C	5 min	1
Denaturation	95 °C	30 s	35
Annealing	55 °C	30 s	
Extension	72 °C	1 min	
Final extension	72 °C	15 min	1

Taulukko 4 Restriktioanalyysin reaktioseos.

	Reaktioseos (µl)
H ₂ O	8,5
10X FastDigest Green Buffer	1
DNA	5
FastDigest enzyme	0,5

PCR-tuotteet, joiden restriktioanalyysi onnistui, valittiin sekvensointiin. PCR-tuotteet puhdistettiin valmistamalla taulukon 5 mukainen reaktioseos. Näytteitä inkuboitiin +37 °C:ssa 15 minuuttia. Reaktio lopetettiin lämmittämällä +85 °C:ssa 15 minuuttia. Puhdistetusta PCR-tuotteesta valmistettiin sekvensointiin PCR-tuotetta taulukon 6 mukaisesti taulukon 1 primereilla. PCR ajettiin taulukon 7 mukaisesti. Ennen PCR-tuotteiden saostusta tuotteiden annettiin lämmitä huoneenlämmössä 10 minuuttia. Tuotteisiin lisättiin 90 µl 70 % etanolia ja inkuboitiin huoneenlämmössä 15 minuuttia. Näytteet sentrifugoitiin 4000 rpm 45 minuuttia, jonka jälkeen striippien korkit poistettiin ja näytteet käännettiin ylösalaisin paperin päälle. Näytteisiin suspensoitiin 150 µl 70 % etanolia, ja sentrifugaus ja näytteiden kääntö toistettiin. Näytteet asetettiin ilman korkkeja sentrifuugin ylösalaisin ja sentrifugoitiin 700 x g minuutin ajan. Pelletti liuotettiin 15 µl HiDI formamidia ja näytteet jäähdytettiin.

Taulukko 5 PCR-tuotteet puhdistuksen reaktioseos.

	Reaktioseos (µl)
PCR-tuote	5
Exonuclease I	0,5
FastAP™ Thermosensitive Alkaline Phosphatase	1

Taulukko 6 PCR-reaktioseos sekvensointia varten.

	Reaktioseos (µl)
BigDye terminal reaction mix	1
5X Dilution buffer	2
Primer (forward tai reverse), 2µM	1
H ₂ O	5
Puhdistettu PCR-tuote	1

Taulukko 7 PCR-reaktio sekvensointia varten.

Vaihe	Lämpötila	Aika	Syklien määrä
Initial Denaturation	94 °C	5 min	1
Denaturation	94 °C	1 min	45
Annealing	55 °C	40 s	
Extension	60 °C	3 min 20 s	
Final extension	60 °C	10 min	1

3. TULOKSET

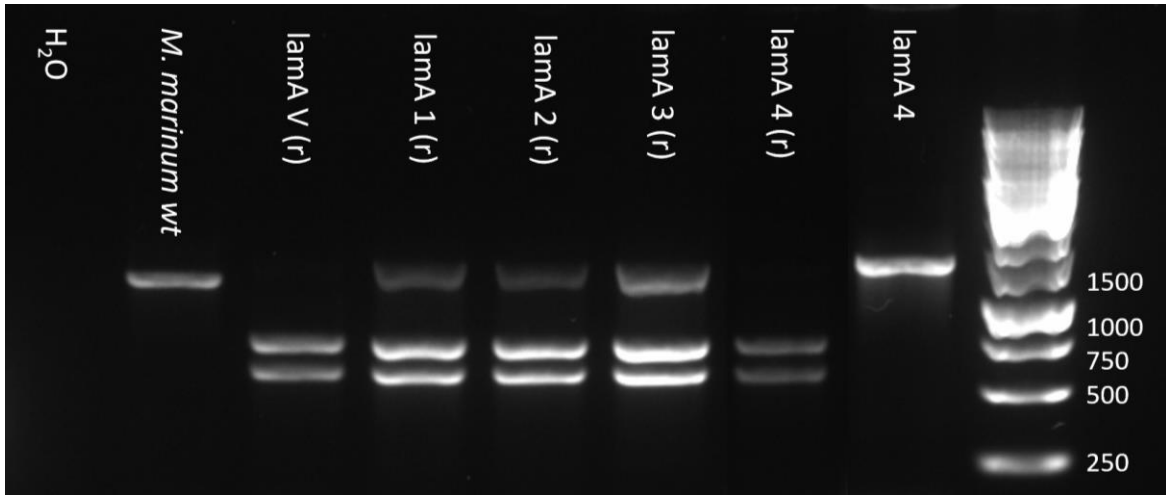
Kaikkien mutanttien elektroporaatio onnistui, ja maljoille syntyi sekä sinisiä että valkoisia pesäkeitä. LamA-maljoilla havaittiin yhteensä yksi valkoinen ja kaksi sinistä pesäkettä. MmaA4-maljoilla havaittiin kaksi valkoista ja seitsemän sinistä pesäkettä. Mmpl11-maljoilla havaittiin kaksi valkoista ja viisi sinistä pesäkettä. Kaikki valkoiset, lamA:n molemmat siniset ja mmaA4:n ja mmpl11:n neljä sinistä pesäkettä valittiin liuosviljelmään. Elektroporaatiossa käytettiin 750 ng plasmidia. *M. marinum* -bakteereilla on saavutettu elektroporaation tehokkuudeksi 100 CFU/µg plasmidia, jolloin odotettu tehokkuus olisi elektroporaatiossa ollut 75 CFU/mutantti. Saavutettu tehokkuus oli kuitenkin

vain 12 CFU/ μ g plasmidia. PTEC27-kontrollin hygromysiinimaljoilla oli erittäin paljon pesäkkeitä. Plasmidittomalla negatiivisella hygromysiinikontrollimaljalla ei ollut lainkaan pesäkkeitä.

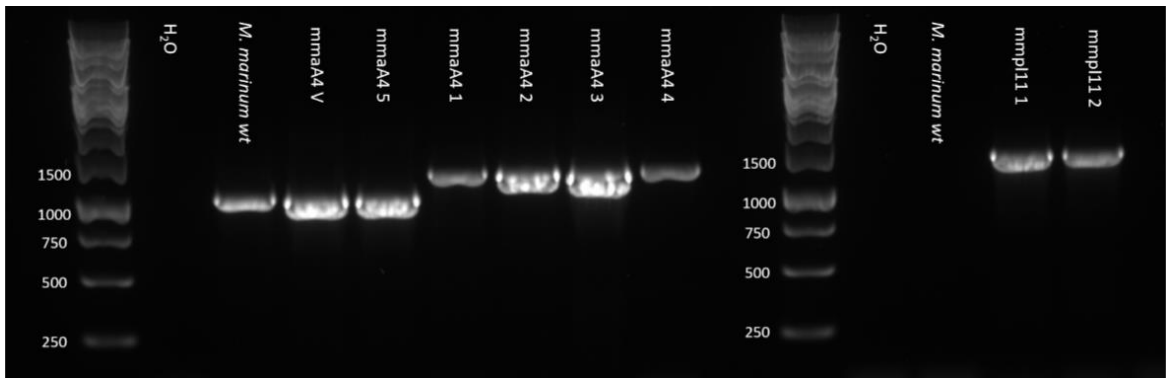
Liuosviljelmän jälkeisessä maljauksessa sakkaroosimaljoille syntyi paljon valkoisia sekä sinisiä pesäkkeitä. Vaikka SCO-mutanttien ei pitäisi selvitä sakkaroosimaljalla, maljoilla oli havaittavissa sinisiä pesäkkeitä. Osalla mmp11 maljoista oli vain sinisiä pesäkkeitä. Pesäkkeitä oli myös huomattavasti enemmän kuin muilla maljoilla. Jotta SCO-mutantti selviää sakkaroosimaljalla, pitää siinä tapahtua spontaani mutaatio. Maljoilla, joissa oli vain SCO-mutanteja, kyseinen mutaatio on tapahtunut varhaisessa vaiheessa liuosviljelmässä tai ennen sitä. MmaA4-sakkaroosimaljoilla oli havaittavissa kahdenlaisia valkoisia pesäkkeitä. Toiset näyttivät tyypillisiltä *M. marinum* -pesäkkeiltä, mutta toiset olivat tasaisemman valkoisia ja siirrostettaessa loopilla ne murenivat. Liuosviljelmässä SCO-mutaatio voi muuttua DCO-mutaatioksi, sekä takaisin villityypin bakteeriksi että toivottuun suuntaan DCO-mutantiksi. Liuosviljelmään lisättävän hygromysiinin pitäisi tappaa bakteerit, jotka palautuvat villityypin bakteeriksi. Resistenssin aiheuttama kinaasi saattaa kuitenkin vielä olla aktiivinen hetken mutaation syntymisen jälkeen.

Yksikään mmaA4- ja mmp11-pesäke ei kasvanut hygromysiini-kanamysiinimaljoilla. Sen sijaan kolme lamA-pesäkettä kasvoi sekä hygromysiini- että hygromysiini-kanamysiinimaljoilla. Kaikilla mutanteilla yli puolet pesäkkeistä ei kasvanut hygromysiinimaljoilla. Mmp11-pesäkkeet, jotka olivat elektroporaation jälkeen valkoisia, kasvoivat hygromysiinimaljalla. LamA:n vastaava valkoinen pesäke kasvoi hygromysiinimaljalla, mutta mmaA4:n valkoiset pesäkkeet eivät kasvaneet. MmaA4-pesäkkeet, jotka näyttivät epänormaaleilta sakkaroosimaljoilla, kasvoivat hygromysiinimaljoilla.

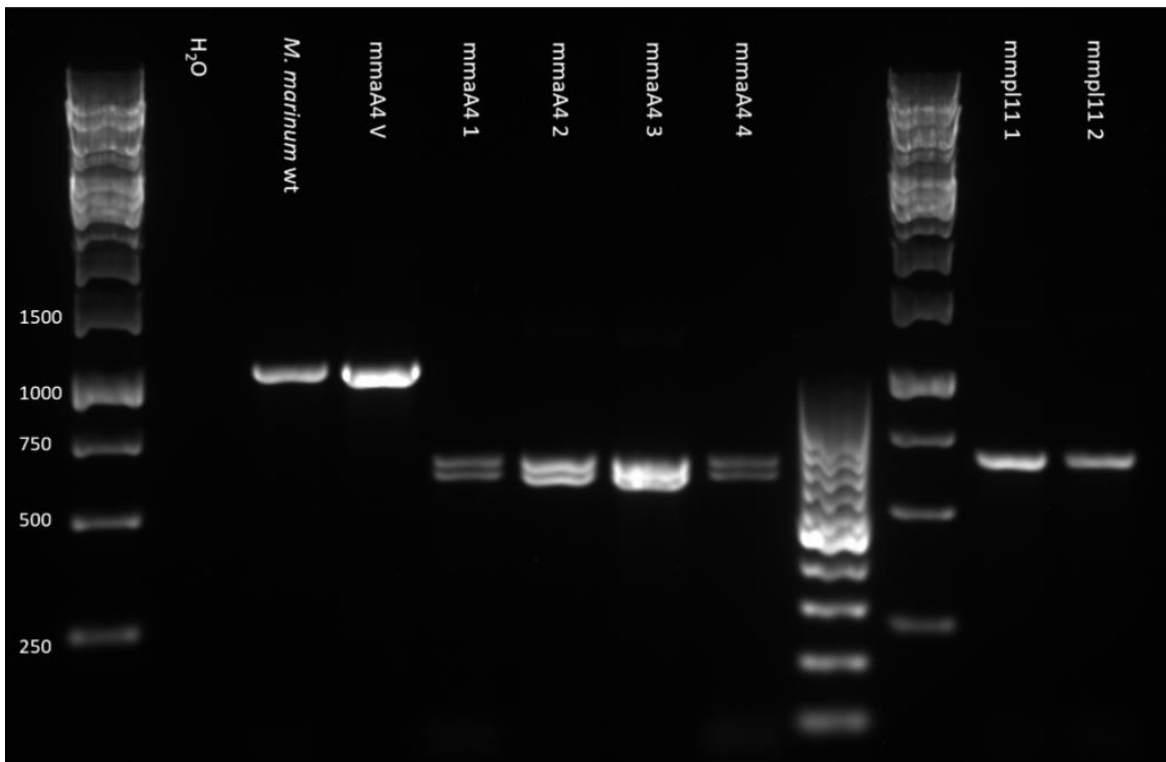
PCR-ajoihin valittiin pesäkkeet, jotka kasvoivat vain hygromysiinimaljoilla, koska DCO-mutantit kasvavat vain hygromysiinimaljoilla. Kaikkia pesäkkeitä ei testattu PCR:llä ja restriktioanalyysillä, koska tavoitteena oli löytää vain yksi DCO kustakin mutantista. Kuvassa 3 on osa lamA mutanttien PCR-tuloksista ja restriktioanalyysin tulokset. Onnistuneen DCO-mutaatio koko on 1374bp ja villityypin geenin koko on 1201bp. Restriktion jälkeen lamA PCR-tuotteiden koot ovat 771bp ja 608bp. Kuvassa 4 on mmaA4- ja mmp11-mutanttien PCR-tulokset. Onnistuneen mmaA4 DCO-mutaation koko on 1256bp ja villityypin geenin koko on 1035bp. Onnistuneen mmp11 DCO-mutaation koko on 1339bp ja villityypin geenin koko on 3236bp. Koska villityypin *M. marinum* -bakteerin mmp11-geeni on merkittävästi pidempi, ei PCR-ajon extension-vaiheen aika riittänyt PCR-tuotteen syntymiseen. Kuvassa 4 on mmaA4- ja mmp11-mutanttien restriktioanalyysin tulokset. Restriktion jälkeen mmaA4 PCR-tuotteesta syntyy 609bp ja 653bp pituiset DNA-pätkät. Mmp11:sta syntyy 681bp ja 664bp pituiset DNA-pätkät. Koska koossa ei ole paljoa eroa, geelikuvassa DNA-pätkät ovat päällekkäin.



Kuva 3. LamA-pesäkkeiden PCR- ja restriktioanalyysitulokset.



Kuva 4. MmaA4- ja mmp111-pesäkkeiden PCR-tulokset.



Kuva 5. MmaA4- ja mmp111-pesäkkeiden restriktiotulokset.

PCR:n, restriktioanalyysin ja sekvensoinnin perusteella onnistuneita lamA-mutanteja löytyi neljä, mmaA4-mutanteja löytyi neljä ja mmp11-mutanteja löytyi kaksi. Elektroporaatiossa syntyneet valkoiset lamA ja mmp11 DCO-mutantit vahvistettiin DCO-mutanteiksi PCR:llä ja sekvensoinnilla. Sakkaroosimaljoilla epänormaaleilta näyttäneet valkoiset mmaA4-pesäkkeet olivat DCO-mutanteja ja normaalit valkoiset pesäkkeet olivat villityypin *M. marinum* -bakteeria.

4. YHTEENVETO

Knockout-plasmidilla ja elektroporaatiolla koko geenin deleetioiden tekeminen *M. marinum* -bakteeriin onnistui, ja menetelmällä onnistuttiin tekemään lamA-, mmaA4- ja mmp11-poistogeeniset bakteerikannat. Toivottuja DCO-mutaatioita syntyi jo suoraan transformaation jälkeen. Jotta aikaa säästettäisiin, syntyneet DCO-mutantit kannattaisi varmistaa PCR:llä heti elektroporaation jälkeen. Näin välttyttäisiin turhilta selektiomenetelmiltä, joissa on pitkiä inkubaatioaikoja, ja mutanttien valmistus olisi merkittävästi nopeampaa. SCO-mutaation jälkeen DCO-mutaatioita syntyi tehokkaasti. Liuosviljelmän aikana SCO-mutaatioita muuttuu DCO-mutaatioksi, sekä toivottuun suuntaan että takaisin villityypin bakteeriksi. PCR, restriktioanalyysi ja sekvensoinnilla pystyttiin helposti varmistamaan onnistunut DCO-mutaatio. Kokonaisuudessaan menetelmä on toimiva tapa geenimuokata *M. marinum* -bakteereja.

LÄHTEET

Dubnau, E., Chan, J., Raynaud, C., Mohan, V.P., Lanéelle, M.A., Yu, K., Quémard, A., Smith, I. & Daffé, M. 2000, "Oxygenated mycolic acids are necessary for virulence of Mycobacterium tuberculosis in mice", *Molecular microbiology*, vol. 36, no. 3, pp. 630-637.

Esteban, J. & García-Coca, M. 2018, "Mycobacterium Biofilms", *Frontiers in microbiology*, vol. 8, pp. 2651.

Global tuberculosis report 2020. Geneva: World Health Organization; 2020. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

Hashish, E., Merwad, A., Elgaml, S., Amer, A., Kamal, H., Elsadek, A., Marei, A. & Sitothy, M. 2018, "Mycobacterium marinum infection in fish and man: epidemiology, pathophysiology and management; a review", *The Veterinary quarterly*, vol. 38, no. 1, pp. 35-46.

Juers, D.H., Matthews, B.W. & Huber, R.E. 2012, "LacZ β -galactosidase: structure and function of an enzyme of historical and molecular biological importance", *Protein science : a publication of the Protein Society*, vol. 21, no. 12, pp. 1792-1807.

Koul, A., Arnoult, E., Lounis, N., Guillemont, J. & Andries, K. 2011, "The challenge of new drug discovery for tuberculosis", *Nature*, vol. 469, no. 7331, pp. 483-490.

Parikka, M., Hammarén, M.M., Harjula, S.K., Halfpenny, N.J., Oksanen, K.E., Lahtinen, M.J., Pajula, E.T., Iivanainen, A., Pesu, M. & Rämetsä, M. 2012, "Mycobacterium marinum causes a latent infection that can be reactivated by gamma irradiation in adult zebrafish", *PLoS pathogens*, vol. 8, no. 9, pp. e1002944.

Pelacic, V., Reyrat, J.M. & Gicquel, B. 1996, "Expression of the Bacillus subtilis sacB gene confers sucrose sensitivity on mycobacteria", *Journal of Bacteriology*, vol. 178, no. 4, pp. 1197-1199.

Rego, E.H., Audette, R.E. & Rubin, E.J. 2017, "Deletion of a mycobacterial divisome factor collapses single-cell phenotypic heterogeneity", *Nature*, vol. 546, no. 7656, pp. 153-157.

Talaat, A.M. & Trucksis, M. 2000, "Transformation and transposition of the genome of Mycobacterium marinum", *American Journal of Veterinary Research*, vol. 61, no. 2, pp. 125-128.

Tanya Parish & David M. Roberts 2015, *Mycobacteria Protocols*, Third Edition edn, Humana Press.

Wright, C.C., Hsu, F.F., Arnett, E., Dunaj, J.L., Davidson, P.M., Pacheco, S.A., Harriff, M.J., Lewinsohn, D.M., Schlesinger, L.S. & Purdy, G.E. 2017, "The Mycobacterium tuberculosis MmpL11 Cell Wall Lipid Transporter Is Important for Biofilm Formation, Intracellular Growth, and Nonreplicating Persistence", *Infection and immunity*, vol. 85, no. 8, pp. e00131-17. Print 2017 Aug.