

Proteiinituoton reaaliaikainen seuranta panossyöttökasvatuksessa GFP-anturin avulla

**Diplomityö
Turun Yliopisto
Bioteknologian laitos
Biotekniikka
Toukokuu 2021
Anttoni Korkiakoski**

Turun yliopiston laatujaarjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.

KORKIAKOSKI, ANTTONI: Proteiinituoton reaaliaikainen seuranta
panossyöttökasvatuksessa GFP-anturin avulla.

Diplomityö, 63 s
Biotekniikka
Toukokuu 2021

Panossyöttökasvatus on bioprosessiteollisuudessa käytetyin kasvatustyyppi. Se alkaa kuten panoskasvatus, mutta alkuperäisten raaka-aineiden loputtua kasvatukseen syötetään lisää ravinteita. Näin kasvatus pidentyy, minkä ansiosta solumassa moninkertaistuu. Korkeampi solumassa johtaa samalla myös korkeampaan tuottoproteiinin loppukonsentraatioon. Tuottoproteiinin korkea tuottotaso edellyttää kuitenkin usean parametrin optimointia, kuten syötettävien lisäravinteiden pitoisuutta ja syöttönopeutta, happamuutta, lämpötilaa sekä induktiohetkeä. Näiden parametrien optimointia hankaloittaa kuitenkin se, että tuotettavia proteiineja voidaan harvoin havaita reaaliaikaisesti. Tämän lisäksi tuottoproteiinin pitoisuuden mittaamiseen tehtävät spesifiset määritykset voidaan joissain tapauksissa tehdä vasta jälkeempään puhdistusvaiheiden jälkeen.

Diplomityön tavoitteena oli kehittää menetelmä ja laitteisto tuottoproteiinigeenin ekspressiota ohjaavan promoottorin aktivoitumisen reaaliaikaiseen seurantaan *Escherichia coli*-panossyöttökasvatuksessa. Tämä tehtiin kehittämällä tuottoplasmidi, jossa kohdeproteiinin geenin lisäksi plasmidiin lisättiin vihreää fluoresoivaa proteiinia (engl. *Green fluorescent protein*, GFP) koodaava geeni. Kummankin proteiinin tuottoa ohjattiin oman lac-promoottori-operaattorinsa avulla, minkä johdosta indusoidessa molemmat proteiinit tuottuvat samanaikaisesti. GFP:n mittaamiseksi suunniteltiin mittalaite, joka kykenee virittämään ja mittaamaan GFP:n fluoresoivaa valoa bioreaktorista reaaliajassa. Tämä toteutettiin kierrättämällä kasvatusta jatkuvatoimisesti mittalaitteen läpi käyttäen peristalttipumppuja. Valon mittaamiseen tutkittiin fotodiodin, kameran sekä pienikokoisen valomonistinputken soveltavuutta.

GFP ei vaikuta negatiivisesti kohdeproteiinin tuottoon, ja fluoresenssisignaali korreloi kohdeproteiinin tuottopitoisuuden kanssa, kun GFP:n maturaatioaika otetaan huomioon. Pienikokoinen valomonistinputki ja kamera olivat valoantureista herkimät ja niiden avulla havaittiin lac-promoottori-operaattorin aktivoituminen kahdessa eri *E. coli*-panossyöttökasvatuksessa. Reaaliaikasta seuranta ei saavutettu GFP:n kromoforin maturaointiin vievästä ajasta sekä kierrätykseen kuluva viiveestä johtuen. Tulosten perusteella kehitettyä menetelmää voidaan kuitenkin käyttää proteiinituoton seurantaan ja optimointiin.

Asiasanat: Panossyöttökasvatus, bioprosessi, proteiinituotto, GFP

UNIVERSITY OF TURKU
Department of Life Technologies / Faculty of Technology

KORKIAKOSKI, ANTTONI: Real-time monitoring of protein production in
fed-batch fermentation using GFP-sensor

Master's Thesis in Technology, 63 p
Biotechnology
May 2021

Fed-batch fermentation is the most used process type in biopharmaceutical industry. It starts as a batch fermentation but when the original nutrients are depleted, new nutrients are fed to the bioreactor. This will prolong the process and high cell-density can be reached. Higher cell-densities will help producing higher concentrations of product. For attaining high concentrations of product numerous factors, such as feed strategy, pH, temperature, and induction time, need to be optimised. The optimisation is hindered by the lack of possibility for real-time monitoring of the target protein. Some specific assays for the target protein can only be done after purification steps.

The goal of the thesis was to develop a method and a device for real-time monitoring of lac-promoter activation in *Escherichia coli* fed-batch fermentation. A production plasmid was cloned containing the gene for the target protein and the gene for green fluorescent protein (GFP) with their individual lac-promoters. This dual-promoter structure guarantees the maximum control and concomitant gene expression. A measurement device capable of exciting and measuring the emitted fluorescence was constructed for real-time monitoring of GFP. The culture broth was continuously recycled through the measurement device using peristaltic pumps. Photodiode, camera and photomultiplier tube (PMT) were compared as detectors.

GFP does not affect negatively to the production of target protein. Fluorescence signal correlates with the product concentration when the maturation delay of GFP chromophore is taken into account. PMT and camera were the most sensitive detecting GFP in saline solution and were used in two separate fed-batch *E. coli* fermentations for monitoring the lac-promoter activation. Both detectors were successful in detecting the protein production. Real-time monitoring was hindered by the maturation time of GFP chromophore and recycling delay. Based on the results, the method can be used for monitoring protein production, albeit not in real-time, and for process optimisation.

Key words: Fed-batch fermentation, bioprocess, protein production, GFP

Sisällys

Lyhenteet.....	3
1 Johdanto	4
1.1 Rekombinanttiproteiinien tuotto.....	4
1.2 Bakteerisolujen kasvatus	11
1.3 Laboratoriomittakaavan bioreaktori	15
1.4 GFP ja sen käyttö bioprosessin optimoinnissa	17
1.5 Työn tavoitteet.....	23
2 Materiaalit ja menetelmät.....	24
2.1 GFP:n mittaaminen.....	24
2.1.1 Kierrätysmenetelmä	24
2.1.2 Kierrätysviive.....	24
2.1.3 Mittalaitteen kokoonpano	25
2.1.4 Mittalaitteen elektroniikka	26
2.1.5 Mittalaitteen ohjaus.....	29
2.1.6 Anturivertailumittaukset	32
2.2 Konstrukti	32
2.2.1 ppGFP-kasetin valmistelu.....	32
2.2.2 pAK400-NB- α CH1-ppGFP:n kloonaukset.....	33
2.2.3 pLK06H-Fab- α NP-ppGFP:n kloonaukset	34
2.2.4 ppGFP-kasetin orientaation vaikutus tuottovektorissa	35
2.2.5 ppGFP-kasetin vaikutus kohdeproteiinin tuottoon ja funktionaalisuuteen	36
2.2.6 ppGFP:n ja kohdeproteiinin tuoton seuraaminen	36
2.3 Panossyöttökasvatus	37
2.3.1 Fermentorin ja mittausaseman valmistelu	37
2.3.2 pAK400-NB- α CH1-ppGFP:n panossyöttökasvatus	37
2.3.3 pLK06H-Fab- α NP2-ppGFP:n panossyöttökasvatus.....	38

3 Tulokset.....	40
3.1 GFP:n mittaaminen.....	40
3.1.1 Kierrätysmenetelmä	40
3.1.2 Kierrätyksestä aiheutuva viive.....	40
3.1.3 Mittausasema	41
3.1.4 Spektrien mittaus	42
3.1.5 Anturien vertailu.....	43
3.2 Konstrukti.....	44
3.2.1 Tuottovektorien kloonaukset	44
3.2.2 ppGFP-kasetin orientaation vaikutus tuottovektorissa	46
3.2.3 ppGFP-kasetin vaikutus kohdeproteiinin tuottoon ja funktionaalisuuteen	47
3.2.4 ppGFP:n ja kohdeproteiinin tuoton seuraaminen	47
3.3 Panossyöttökasvatus	49
3.3.1 pAK400-NB- α CH1-ppGFP:n panossyöttökasvatus	49
3.3.2 pLK06H-Fab- α NP2-ppGFP:n panossyöttökasvatus.....	49
4 Pohdinta	51
Lähteet.....	58

Lyhenteet

cDNA	Komplementaarinen DNA (engl. <i>complementary DNA</i>)
CHO	Kiinalaisen hamsterin munasarjasolu (engl. <i>chinese hamster ovary</i>)
CMOS	Digitaalikameroissa käytetty kennotyyppi (engl. <i>complementary metal oxide semiconductor</i>)
DNA	Deoksiribonukleiinihappo
DO	Liuennut happi (engl. <i>dissolved oxygen</i>)
Fab	Vasta-aineen antigeeniin sitoutuva fragmentti (engl. <i>fragment antigen-binding</i>)
Fab-AP	Alkalisella fosfataasilla fuusioitu Fab-fragmentti
GFP	Vihreä fluoresoiva proteiini (engl. <i>Green fluorescent protein</i>)
IgG	Immunoglobuliini G, vasta-aine molekyyli
IPTG	Isopropyyli- β -D-tiogalaktopyranosidi, yleisesti käytetty indusori
lacPO	lac-promoottori-operaattori, yleisesti käytetty säätelymekanismi
LED	Hohtodiodi (engl. <i>light emitting diode</i>)
MOSFET	Eristehilatransistori (engl. <i>metal-oxide-semiconductor field-effect transistor</i>)
N-proteiini	Viruksen nukleokapsidiproteiini
OD	Solutiheyden ilmoittamiseen käytetty yksikkö (engl. <i>optical density</i>)
PCR	Polymeraasiketjureaktio (engl. <i>polymerase chain reaction</i>)
pH	Happamuuden ilmoittamiseen käytetty arvo
p-HOBDI	GFP:n kromofori (engl. <i>p-hydroxybenzylidene-2,3-dimethylimidazolinone</i>)
PMT	Valomonistinputki (engl. <i>photomultiplier tube</i>)
ppGFP	Parallelipromoottori-GFP-geenikasetti. Työssä käytetyn geenikasetin nimi
RNA	Ribonukleiinihappo
SARS-CoV-2	Vakavaa hengitystieoireyhtymää aiheuttava koronavirus (engl. <i>severe acute respiratory syndrome coronavirus</i>)
UV	Ultraviolettivalo
μ PMT	Pienikokoinen valomonistinputki

1 Johdanto

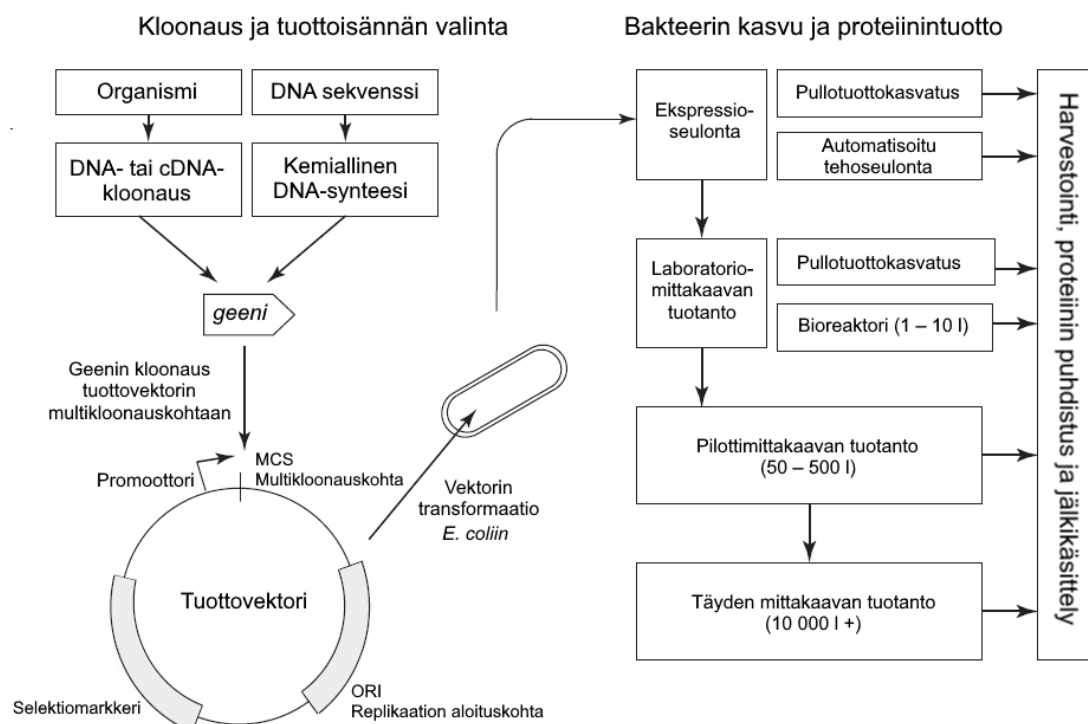
1.1 Rekombinanttiproteiinien tuotto

Proteiinit ovat niin monimutkaisia molekyyliä, ettei niitä voida valmistaa kemiallisesti, vaan niiden tuottamiseen käytetään biologisia prosesseja. Proteiineja, joita tuotetaan eri organismeissa kuin ne ovat alkuperäisesti peräisin ja joita on geeniteknisesti muokattu, kutsutaan rekombinanttisiksi proteiineiksi. Tuottoisännän valintaan vaikuttaa tuotettavan proteiinin ominaisuudet. (Overton 2014.) Mikäli proteiini tarvitsee sokeriryhmien liittämistä eli glykosylaatiota tai muita posttranslacionaalaisia modifikaatioita toimiakseen, tuottoisännäksi valitaan eukaryoottisolun, koska prokaryoottisoluilla yleisesti tällaiset muokkaukset eivät ole mahdollisia. Tyypillisesti näitä muokkauksia vaativat terapeuttiset proteiinit tuotetaan eukaryoottisoluissa kuten kiinalaisen hamsterin munasarjasolulinjan (engl. *chinese hamster ovary*, CHO) soluissa. (Walsh 2010.) Mikäli halutussa proteiinissa ei ole posttranslacionaalaisia modifikaatioita tai niiden puute ei vaikuta sen funktionaalisuuteen, tuotto voidaan tehdä prokaryoottisoluissa eli käytännössä bakteereissa. Bakteerisolut ovat paljon yksinkertaisempia kuin eukaryoottisolut, eivätkä ne vaadi monimutkaisia, eli käytännössä kalliita, kasvatusliuoksia kasvaakseen. Tämän lisäksi niiden kasvu on merkittävästi nopeampaa, mikä puolestaan lyhentää tuotto-prosessin pituutta ja samalla prosessiin liittyviä kustannuksia. Rekombinanttiproteiinien tuotannossa *Escherichia coli* on käytetyin bakteeri. *E. coli* metaboliareitit ovat hyvin tunnettuja, sen genomi on sekvensoitu, rekombinanttiproteiinien kloonaus ja tuotto on hyvin tutkittu ja sitä on käytetty onnistuneesti monien erilaisten proteiinien tuottamisessa. *E. coli* on mahdollista tuottaa disulfididoksia eli rikkisiltoja vaativia proteiineja, kuten vasta-aineita, kun ne tuotetaan bakteerin periplasmaan. (Terpe 2006.) Rekombinanttisia vasta-aineita tai niiden fragmentteja käytetään tieteellisessä tutkimuksessa, diagnostiikassa sekä lääkehoidossa (Kuhn ja muut 2016). *E. coli* lääkehoitoon tuotettujen proteiinien haittana on bakteerin lipopolysakkaridien eli endotoksiinien kertyminen, mikä aiheuttaa kuumetta ihmisessä. Tämän takia tuotettu proteiini tulee puhdistaa erityisellä huolella. (Petsch ja Anspach 2000.) Eri tuottoisäntien ominaisuuksia on vertailtu taulukossa 1, mutta tässä tekstissä keskitytään *E. coli* eli bakteerisoluisuuteen tehtävään rekombinanttiproteiinien tuottoon, jonka pääpiirteet on esitetty kuvassa 1.

Taulukko 1. Tuottoisäntien vertailu rekombinatti-proteiinien tuotannossa. Yksi asteriski merkitsee huonointa tulosta ja viisi asteriskia merkitsee parasta tulosta. Glykosylaatiolla tarkoitetaan, kuinka hyvin se vastaa ihmisen glykosylaatiota. Muokattu lähteestä Tripathi ja Shrivastava 2019.

Tuottoisäntä	Prosessin nopeus	Tuotteen laatu	Glykosylaatio	Edullisuus
<i>E. coli</i>	*****	**	-	*****
Hiivasolut	****	***	*	****
Hyönteissolut	***	****	***	***
Nisäkässolut	**	*****	*****	*

Ensimmäisessä vaiheessa tuotettavan proteiinin geeni kloonataan tuottovektoriin. Geeni voidaan kloonata organismin genomisesta deoksiribonukleiinihappo (DNA)-kirjastosta, komplementaarisesta DNA-kirjastosta (engl. *complementary DNA*, cDNA) tai syntetisoimalla geeni kemiallisesti, mikäli sen sekvenssi tunnetaan. Jos geeni on peräisin eukaryoottisolusta ja tuottoisäntänä on prokaryoottisolusta, niin kloonauksen tulee tehdä introneista poistetusta cDNA-kirjastosta, koska prokaryoottisolut eivät itse kykene poistamaan introneja. Sama pätee myös käytettäessä syntetisoitua geeniä, eli sekvenssistä tulee olla poistettuna kaikki intronit, jotta prokaryoottisolut voivat ilmentää haluttua proteiinia. (Suominen 2002; Overton 2014.)



Kuva 1. Yleiskuvaus rekombinanttiproteiinin tuotannosta *E. colissa*. Muokattu lähteestä Overton 2014.

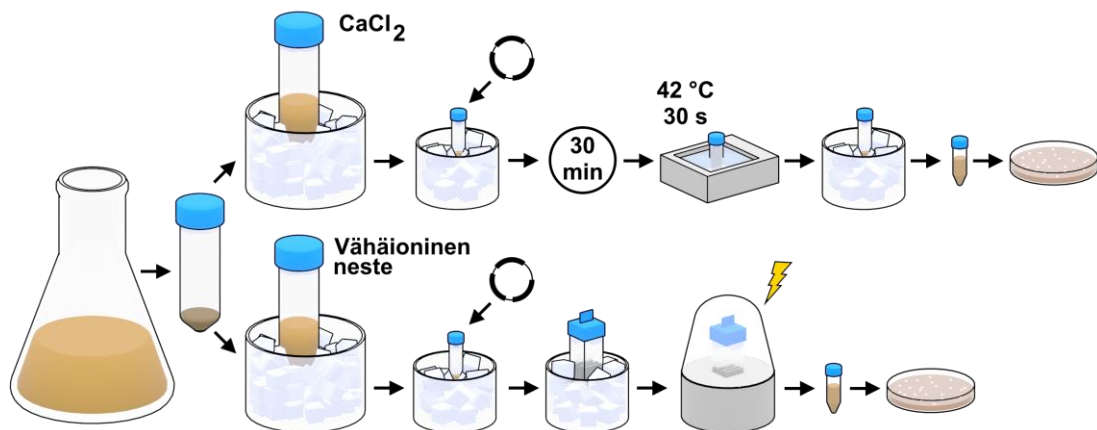
Eristetty geeni kloonataan tuottovektorin multikloonauskohtaan restriktioimalla eli katkaisemalla sekä vektori että geeni samalla restriktioentsyymillä ja ne yhdistetään toisiinsa käyttämällä DNA-ligaatioentsyymiä. Tuottovektoreina yleensä käytetään plasmideja, ja ne ovat suunniteltu niin että useiden eri restriktioentsyymien katkaisukohtia, joita on vain yksi koko plasmidissa, on sijoitettu peräjälkeen pienelle alueelle plasmidissa. Tätä aluetta kutsutaan multikloonauskohdaksi ja se mahdollistaa useiden eri geenien liittämisen vektoriin eri restriktioentsyymejä käyttäen. Multikloonauskohtaa edeltää promoottori ja operaattori. Promoottori on sellainen alue DNA:ssa, johon ribonukleiinihappo (RNA)-polymeraasi sitoutuu ja aloittaa geenin transkription. Operaattori on sellainen alue DNA:ssa, johon repressoriproteiini sitoutuu, mikä estää RNA-polymeraasia sitoutumasta promoottoriin ja geenin transkription aloituksen. Operaattoria säädellään induosorilla eli kemiallisella yhdisteellä, joka sitoutuu repressoriproteiiniin, minkä seurauksena se irtoaa operaattorista. Kun repressoriproteiini ei ole enää sitoutuneena promoottorin edessä, RNA-polymeraasi pystyy aloittamaan geenin transkription. (Suominen 2002.) Yksi tunnetuimmista *E. coli*n säätelymekanismeista on lac-promoottori-operaattori (lacPO) (Terpe 2006). Sen luonnollinen induosori on laktoosi, mutta käytännössä laktoosin sijasta käytetään sen analogia isopropyyl- β -D-tiogalaktopyranosidia (IPTG), joka ei hajoa reaktiossa laktoosin tapaan. Saannon maksimoimiseksi induosori lisätään kasvatukseen tyypillisesti vasta, kun solumassa on kasvanut suureksi, sillä proteiinintuotanto vie paljon resursseja soluilta. (Donovan ja muut 1996.) Glukoosin pitoisuus vaikuttaa epäsuorasti myös lacPO:n säätelyyn glukoosiefektin vaikutuksesta. Glukoosiefektissä *E. coli* priorisoi glukoosimetaboliaan tarvittavien proteiinien valmistusta, minkä vaikutuksesta muiden hiilenlähteiden, kuten laktoosin, metaboliaan tarvittavien proteiinien valmistus on inhiboitu. (Postma ja muut 1989; von Weymarn 2002.) Näihin kuuluu muun muassa laktoosipermeaasi, jonka avulla solu kuljettaa laktoosia tai sen analogia IPTG:tä tehokkaasti solun sisälle (Fernández-Castané ja muut 2012). Eli korkea glukoosipitoisuus inhiboi IPTG:n siirtymistä soluihin ja täten estää lac-repressoriproteiiniin sitoutumista.

Tuotettava proteiini on harvoin hyödyllinen soluille, minkä takia ne solut, jotka tuottavat haluttua proteiinia, ovat epäedullisessa asemassa verrattuna niihin soluihin, jotka eivät tuota kohdeproteiinia. Kohdeproteiinin tuottoon kuluvien resurssien lisäksi plasmidin replikaatioon kuluu myös resursseja riippuen käytettävästä replikaation aloituskohdasta. Replikaation aloituskohta määrää sen, kuinka monta kopiota

plasmidista on joka solussa. Suurempi kopiomäärä tuottaa enemmän kohdeproteiinia, mutta on myös suurempi rasite soluille, mikä aiheuttaa plasmidin hylkimisen, mikäli riittävää selektiopainetta ei ole läsnä. Tämän takia plasmidit sisältävät selektiomarkkerin, joka antaa hyödyn plasmidin sisältäville soluille. Useimmiten selektiomarkkereina käytetään antibiootiresistenttien antavaa geeniä, minkä ansiosta plasmidin sisältävät solut voivat elää antibioottia sisältävässä ympäristössä, kun taas plasmidia sisältämättömät solut kuolevat tai niiden kasvu inhiboituu antibiootin vaikutuksesta. Antibiootiresistenttiydellä on kuitenkin haittapuolensa. Antibiootiresistenttien antamat proteiinit tuhoavat antibioottia läpi kasvatuksen, mikä vähentää antibiootin määrää kasvatuksen jatkuessa, mikä vähentää vuorostaan selektiopainetta mitä pidemmälle kasvatusta jatketaan. Mikäli proteiinia tuotetaan lääkekäyttöön, puhdistettaessa tulee varmistaa, että kaikesta antibiootista päästään eroon mahdollisten antibiooteista johtuvien sivuoireiden poistamiseksi. Tämän lisäksi antibiootiresistenttien bakteerien määrä kasvaa koko ajan, mikä takia antibioottien käyttöä pyritään vähentämään. Antibiootiresistenttien tilalla voidaan käyttää metabolisia selektiomarkkereita. Nämä perustuvat siihen, että tuottoisännän genomista puuttuu jokin kasvulle välttämätön geeni, joka löytyy vain plasmidista. Tämän ansiosta vain ne solut, jotka sisältävät plasmidin voivat kasvaa. (Overton 2014.)

Seuraavassa vaiheessa tuottovektori siirretään tuottoisäntään. Tätä kutsutaan transformaatioksi, kun tuottoisäntänä on mikä tahansa muu solu kuin eläinsolu. DNA:n siirtämistä eläinsoluihin kutsutaan transfektioksi (Suominen 2002). Tyypillisiä tapoja transformointiin *E. coli*ssa on kemiallinen transformointi sekä elektroporaatio (kuva 2) (Lessard 2013). Kemiallisessa transformointissa solujen kasvatuliukseen lisätään solukalvon läpäisevyyttä lisäävää kalsiumkloridia ennen vektorin lisäämistä. Vektorin lisäämisen jälkeen soluille tehdään lyhyt lämpöshokki, jonka vaikutuksesta vektori siirtyy solujen sisälle. (Cohen ja muut 1972.) Elektroporaatio tehdään vähäionisessa puskurissa sille erikseen suunnitellussa kyvetissä, jonka vastakkaisilla seinillä olevien elektrodien kautta johdetaan lyhyt korkeajännitteinen sähkövirta. Sähköpulsin lisää hetkellisesti solukalvon läpäisevyyttä, minkä seurauksena vektori siirtyy solujen sisälle. Transformoinnin jälkeen soluja kasvatetaan vähän aikaa antibiootteja sisältämättömässä kasvatulioksessa, minkä jälkeen ne maljataan antibioottia sisältäville maljoille, joissa vain vektoria sisältävät solut voivat kasvaa ja muodostaa pesäkkeitä. (Lessard

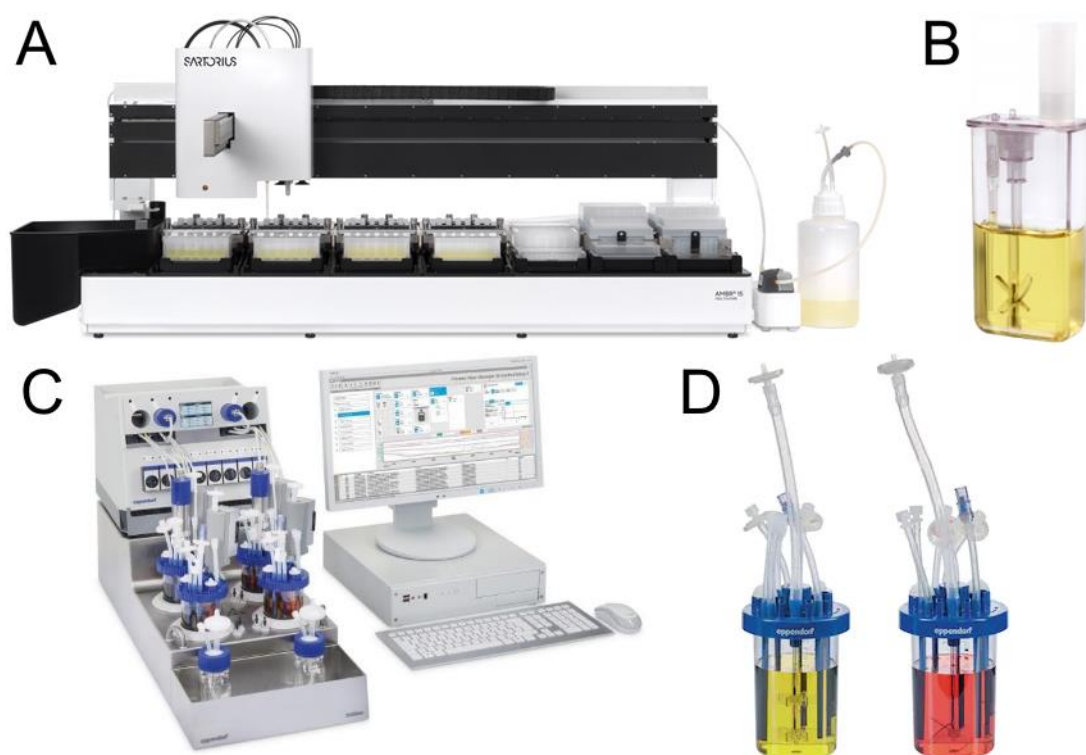
2013.) Yhden pesäkkeen solut ovat geneettisesti samankaltaisia toistensa kanssa, eli ne ovat toistensa klooneja (Suominen 2002).



Kuva 2. *E. coli* transformaatio sekä kemiallisella transformaatiolla että elektroporaatiolla. Kemiallisessa transformaatiossa soluista tehdään kompetentteja lisäämällä kasvatusliuokseen kalsiumkloridia, ja elektroporaatiossa kasvatusliuos vaihdetaan vähäioniseen nesteeseen. Lämpöshokki ja sähköpulsssi muodostavat solukalvolle hetkellisesti huokosia, joiden ansiosta solukalvon läpäisevyys kasvaa ja mahdollistaa vektorin siirtymisen solujen sisälle.

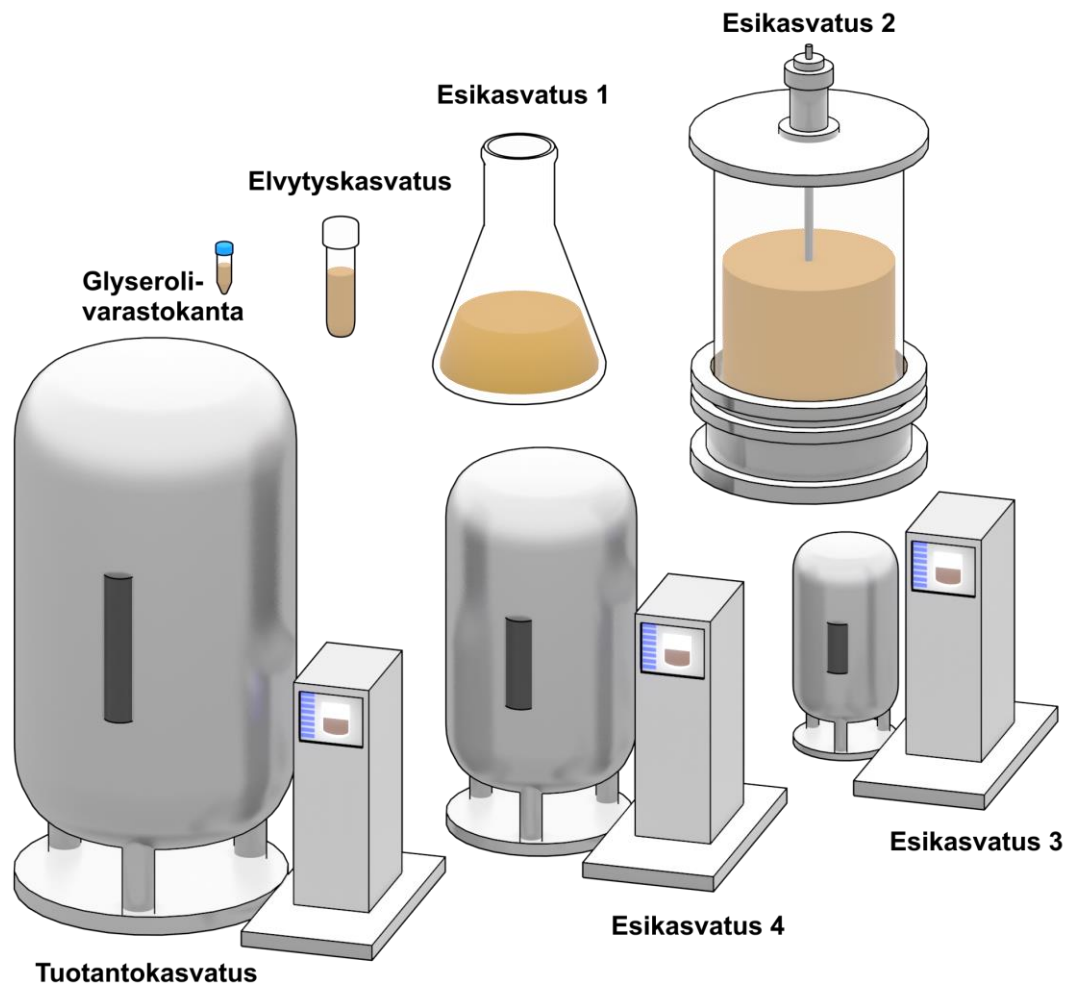
Maljalta valitaan eri klooneja, joita kasvatetaan erikseen omina kasvatuksinaan ekspressioseulonnassa. Tässä vaiheessa tuotokasvatus tehdään pienessä mittakaavassa, eikä tavoitteena ole tuottaa suuria määriä proteiinia, vaan enemmänkin tutkia jokaisen kloonin tuottaman proteiinin ominaisuuksia, kasvatusolosuhteiden vaikutusta tuottoon sekä puhdistettavuutta. (Overton 2014; Tripathi ja Shrivastava 2019.) Proteiinin ominaisuuksia parannetaan suunnatulla evoluutiolla. Tässä menetelmässä alkuperäisen proteiinin geeniin tehdään muutoksia, minkä jälkeen mutatoituneista proteiineista seulotaan ominaisuuksiltaan parhaimmat proteiinit jatkoon. Muutoksia geeniin tehdään joko kohdennetusti tai sattumanvaraisesti. Jatkoon päässeille proteiineille tehdään uusia jalostuskiertoja, kunnes ollaan saavutettu ominaisuuksiltaan parhaimmat mahdolliset proteiinit. (Yuan ja muut 2005.) Tämän lisäksi parantuneet tuotto-ominaisuudet voivat perustua myös kodonioptimisaatioon, jonka vaikutuksesta rekombinanttiproteiinin tuotto tehostuu tai laatu paranee (Kane 1995). Kasvatukseen liittyvät tekijät, kuten kasvatusliuos, lämpötila, sekoitusnopeus, ilmastus (Castro-Martínez ja muut 2012), happamuus (Wang ja muut 2014), liuenneen hapen (engl. *dissolved oxygen*, DO) määrä (Sandoval-Basurto ja muut 2005), solutiheyttä kuvaava optinen tiheys (engl. *optical density*, OD) (Peck ja muut 2014), syöttöstrategia (Manderson ja muut 2006) sekä indusorin

pitoisuus (Gutiérrez-González ja muut 2019) vaikuttavat proteiinintuottoon. Näiden tekijöiden optimointi on todella tärkeää saannon maksimoimiseksi, mutta suuressa mittakaavassa niiden optimointi on todella kallista. Tämän takia ne pyritään optimoimaan mahdollisimman pienessä mittakaavassa. Tämä vaihe on perinteisesti tehty manuaalisesti mikrotiitterilevyillä, pienissä soluviljelyputkissa tai -pulloissa, mutta nykyään tähän vaiheeseen on saatavilla myös eri mittakaavaan soveltuvia kasvatuslaitteistoja (kuva 3). Näiden laitteistojen avulla rinnakkaisia kasvatuksia voidaan tehdä eri olosuhteissa, mikä tehostaa parhaimman kloonin sekä optimaalisten kasvatusolosuhteiden löytämistä. (Tripathi ja Shrivastava 2019.)



Kuva 3. Bioprosessin optimointia voidaan tehostaa pienessä mittakaavassa useampaan rinnakkaiseen kasvatukseen kykenevillä kasvatuslaitteistoilla. Jokaiselle kasvatukselle voidaan säätää ainutlaatuiset lämpötilat ja sekoitusnopeudet sekä pH:ta ja DO:ta tarkkaillaan kasvatuskohtaisesti (A) Sartoriuksen Ambr 15-suuritehoinen kasvatuslaitteisto kykenee prosessoimaan 48:aa eri kasvatusta samanaikaisesti. Laite kykenee automaattisesti lisäämään reaktioihin aineita sekä ottamaan näytteitä. (B) Sen mikrobioreaktoriin mahtuu 10 – 15 ml:aa kasvatusta. Sen yläosassa on ilmastusputki, sekoittaja ja pipetointikanava. Reaktorin pohjassa on ikkuna OD:n mittaukselle sekä kontaktipinnat pH:n ja DO:n mittaukselle. (C) Eppendorfin DASbox Minillä voidaan tehdä neljä rinnakkaista kasvatusta per yksikkö. Yksiköitä voidaan liittää yhteen, jolloin kaikkia reaktiota voidaan kontrolloida samalta tietokoneelta. (D) Sen bioreaktoreihin mahtuu 60 – 250 ml:aa kasvatusta. Vasemmalla puolella olevan bioreaktorin sekoitin on potkurityyppiä, joka sopii paremmin nisäkässolujen kasvatukseen ja oikealla puolella olevan bioreaktorin sekoitin on Rushton-tyyppiä, joka sopii paremmin mikrobikasvatuksille. Kuvat A ja B muokattu lähteestä Sartorius 2021 ja kuvat C ja D lähteestä Eppendorf 2021.

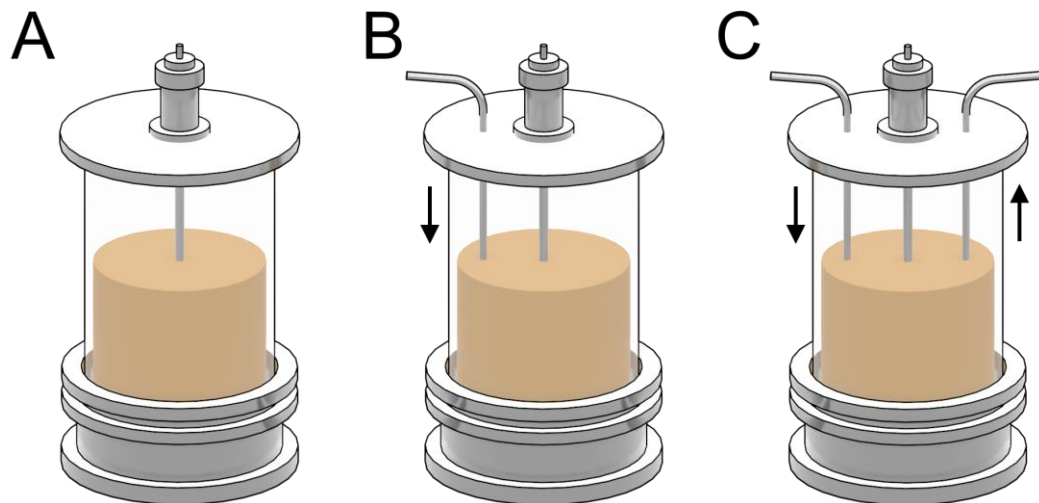
Kun halutunkaltaista proteiinia tuottava solukanta on löydetty, se varastoidaan. Tämä yleensä tehdään jakamalla eksponentiaalisen kasvuvaiheen solut useampaan eri putkiloon, jotka varastoidaan syväjähän glyseroliin liuotettuna (Tuttle ja muut 2021). Tuotettavan proteiinin määrän tarve vaikuttaa kuinka suuressa tilavuudessa tuotto tehdään. Laboratoriossa tutkimuskäyttöön tuleva proteiini voidaan tuottaa pienemmässä mittakaavassa eli pullokasvatuksessa tai laboratoriomittakaavan bioreaktorissa. Suurempia määriä tuottaessa tuotanto tehdään suuren mittakaavan teollisissa bioreaktoreissa. (Overton 2014.) Proteiinintuotannossa glyserolivarastokannasta siirrostetaan pieni määrä soluja elvytyskasvatukseen, josta soluja siirrostetaan esikasvatukseen, josta lopulta siirrostetaan soluja varsinaiseen pääkasvatukseen (von Weymarn 2002). Teollisessa proteiinintuotannossa bioreaktorien suuruuden takia joudutaan tekemään useampi esikasvatus ennenkuin proteiinia voidaan tuottaa halutussa mittakaavassa (kuva 4). Esikasvatuksien määrä riippuu lopullisesta mittakaavasta, koska siirrostussuhde kasvatuksesta toiseen tyypillisesti on 5 – 10 tilavuusprosenttia. Siirrostussuhde halutaan pitää korkeana, sillä matala siirrostussuhde johtaa pidempään kasvuaikaan ja vähentää tuottavuutta. (Chisti 2014.) Tämän lisäksi ylimääräistä solunjakaantumista pyritään välttämään etenkin epästabiliinien solukantoja käytettäessä, sillä mutaatioiden todennäköisyys kasvaa solunjakaantumislukumäärän kasvaessa (von Weymarn 2002). Siirrostukset pyritään tekemään eksponentiaalisen kasvuvaiheen lopussa solujen aktiivisuuden takia sekä solutiheyden maksimoimiseksi (von Weymarn 2002; Chisti 2014). Stationääri- tai kuolemavaiheen soluja siirrostettaessa osa tuotetuista soluista inaktivoituu, prosessi pidentyy ja solunjakaantumismäärä kasvaa, mikä vähentää tuottavuutta. Yleensä elvytyskasvatus sekä ensimmäinen esikasvatus tehdään ravintorikkaassa kasvatusliuoksessa, mutta tämän jälkeen pyritään käyttämään tuotantokasvatuksessa muistuttavaa kasvatusliuosta. (von Weymarn 2002.)



Kuva 4. Teollisen proteiinin tuotannon vaiheet. Glyserolivarastokannasta siirrostetaan pieni määrä soluja elvytyskasvatukseen, josta siirrostetaan soluja esikasvatukseen. Esikasvatuksien määrä riippuu tuotantokasvatuksen tilavuudesta, johon vaikuttaa tuotettavan proteiinin määrän tarve. Siirrostukset tehdään tyypillisesti 5 – 10 tilavuusprosentin siirrostussuhteella.

1.2 Bakterisolujen kasvatus

Bakterisoluja voidaan kasvattaa kolmella eri tapaa: panos-, panossyöttö- sekä jatkuvatoimisena prosessina (kuva 5). Panosprosessissa kaikki raaka-aineet sekä solut lisätään prosessin alussa bioreaktoriin ja reaktio etenee suljetussa järjestelmässä, kunnes se lopetetaan tuotteen muodostumisen loppuessa tai hidastuessa. Reaktio ei tapahdu täysin suljetussa järjestelmässä, sillä bioreaktoriin lisätään kaasuja, vaahdonestoainetta sekä emästä tai happoa happamuuden säätämiseksi. (von Weymarn 2002.)



Kuva 5. Bakteerisoluja voidaan kasvattaa eri tavoilla. (A) Panoskasvatuksessa solut sekä raaka-aineet lisätään prosessin alussa ja reaktio etenee suljetussa järjestelmässä, kunnes prosessi lopetetaan tuotteen muodostumisen loppuessa tai hidastuessa. (B) Panossyöttökasvatuksessa prosessi alkaa kuten panoskasvatus, mutta raaka-aineiden lopputtua kasvatukseen aletaan syöttämään ravinneliuosta. Prosessi pitenee ja saavutetaan korkeampi solumassa, minkä ansiosta tuotetta syntyy myös lisää. (C) Jatkuvatoinen kasvatus tapahtuu kuten panossyöttökasvatus, mutta syötettäessä ravinneliuosta bioreaktorista poistetaan kasvatusta niin että, bioreaktorissa tilavuus pysyy samana. Jatkuvatoinisessa prosessissa saavutetaan korkea solumassa ja mitä kauemmin prosessia jatketaan, sitä enemmän tuotetta muodostuu.

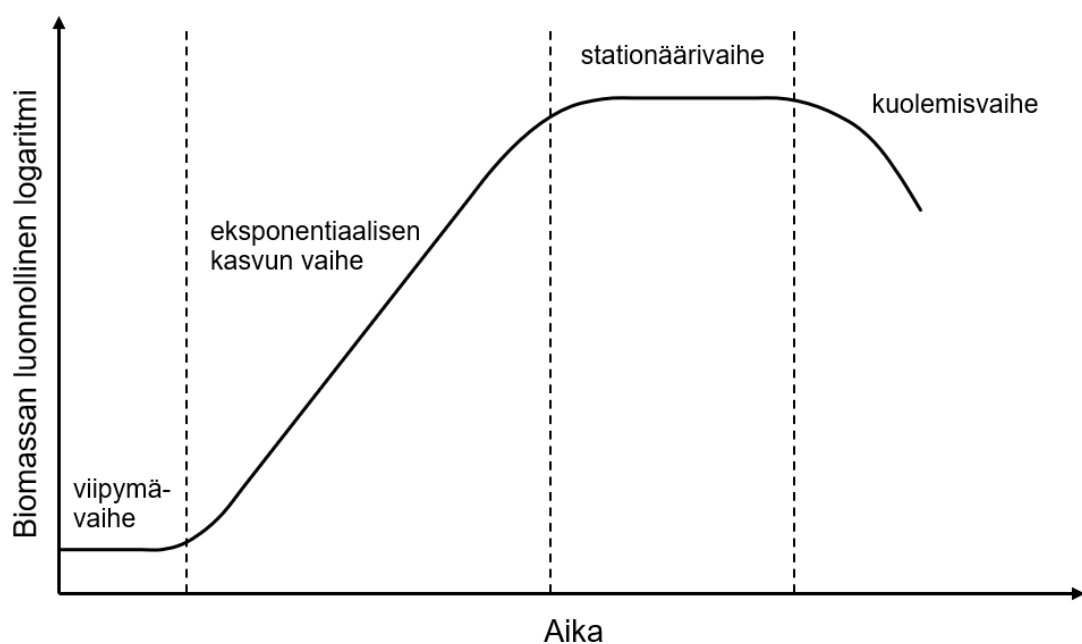
Kuvassa 6 on esitetty panosprosessille tyypillinen solujen kasvukäyrä. Viipymävaiheessa solut siirrostetaan uuteen kasvatusliuokseen. Solut eivät lisäänty tässä vaiheessa, vaan ne mukautuvat uuteen kasvuympäristöönsä tuottamalla entsyymejä ja proteiineja, joiden avulla ne voivat käyttää hyväksi uuden kasvatusliuoksen ravinteita. Viipymävaiheen kestoon vaikuttaa eniten se, että kuinka paljon edellinen kasvatusliuos eroaa uudesta, mutta tyypillisesti bakteereilla tämä kestää usein vain minuutteja. Kun solut ovat mukautuneet uuteen ympäristöönsä, ne alkavat kasvaa ilman rajoitusta eli eksponentiaalisesti. Eksponentiaalisen kasvun vaiheessa solujen spesifinen kasvunopeus saavuttaa maksimaalisen arvonsa ja pysyy vakiona. Spesifinen kasvunopeus lasketaan yhtälön 1 mukaisesti. (von Weymarn 2002.)

$$\mu = \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{t} \quad (1)$$

Yhtälössä 1 μ on spesifinen kasvunopeus, t on kasvatukseen kulunut aika, X_2 on solujen määrä ajanhetken t lopussa ja X_1 on solujen määrä ajanhetken t alussa. Tästä yhtälöstä voidaan laskea solujen generaatioaika eli kaksinkertaistumisaika yhtälöllä 2.

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (2)$$

Yhtälössä 2 t_d on generaatioaika ja μ on solujen spesifinen kasvunopeus. (von Weymarn 2002.) Solujen kasvunopeuteen ja siten myös kaksinkertaistumisaikaan vaikuttaa moni tekijä. Eri lajeilla (Mason 1935) ja saman lajin eri kannoilla (Luli ja Strohl 1990) on erilaiset spesifiset kasvunopeudet. Kasvunopeuteen vaikuttaa myös kasvatusolosuhteet, kuten hiilen lähde (Paliy ja Gunasekera 2007), ravinteiden pitoisuus (Shehata ja Marr 1971), lämpötila (Ocampo-López ja muut 2015), happamuus (Presser ja muut 1997) sekä aerobisilla lajeilla DO-pitoisuus (Sandoval-Basurto ja muut 2005). *E. colin* tyypillinen kaksinkertaistumisaika kasvatettaessa 37 °C:ssa runsaravinteisessa kasvatusliuoksessa on 20 minuuttia (Tuttle 2021). Solujen käyttämän ravinteiden loppuminen kasvatusliuoksesta tai jonkin kasvua inhiboivan aineenvaihduntatuotteen liiallinen kertyminen johtaa biomassan kasvun hidastumiseen ja lopulta se pysähtyy kokonaan. Stationäärivaiheessa biomassa pysyy vakiona, kun soluja syntyy ja kuolee yhtä paljon. Kun soluja kuolee, kasvatusliuokseen vapautuu uusia ravinteita elossa oleville soluille, mikä auttaa niitä kasvamaan. Stationäärivaiheessa solut alkavat tuottaa sekundaariaineenvaihdunta-tuotteita, jotka eivät ole välttämättömiä solujen kasvulle tai ylläpidolle, kuten antibiootteja. Kun soluja alkaa kuolla enemmän kuin niitä syntyy, kasvatus siirtyy kuolemavaiheeseen. (von Weymarn 2002.)



Kuva 6. Bakteerisolujen panoskasvatuksen eri vaiheet. Muokattu lähteestä von Weymarn 2002.

Panoskasvatuksen etuina ovat sen helppo toteutus ja alhainen kontaminaatoriski. Haittapuolena on matala saanto, joka johtuu siitä, että kasvatusta joudutaan tekemään suhteellisen alhaisessa ravinnepitoisuudessa, mikä estää korkean solutiheyden saavuttamisen, mikä puolestaan johtaa matalaan tuotesaantoon. (von Weymarn 2002.) Liian suuri määrä ravinteita voi johtaa osmoottiseen stressiin, joka inhiboi ravinteiden kuljetusta (Roth ja muut 1985). Tämän lisäksi suuri määrä ravinteita voi johtaa ylivuotomekanismiin, jossa substraattia on liikaa solun aineenvaihduntakapasiteetin kannalta, minkä takia osa substraatista pilkotaan yhdisteiksi, jotka korkeissa pitoisuuksissa inhiboivat solujen kasvua (von Weymarn 2002). Esimerkiksi suuri määrä glukoosia kasvatuliuoksessa aiheuttaa kasvua inhiboivan asetaatin muodostumista (Jung ja muut 2019). Tämän lisäksi panoskasvatuksessa tuotantoerien välille muodostuu paljon hukka-aikaa, jota syntyy steriloinnista, bioreaktorin asentamisesta, esikasvatuksista sekä pesuista. (von Weymarn 2002.)

Panosyöttökasvatus aloitetaan panoskasvatuksena, mutta ravinteiden loputtua kasvatukseen aletaan syöttämään lisää ravinteita eli kasvatuksen tilavuus suurenee prosessin edetessä. Ravinteita syötetään rajoitetusti, jotta korkean substraattipitoisuuden haitoilta vältytään. Tämä tehdään niin, että syöttövaiheessa solujen spesifinen kasvunopeus on alhaisempi kuin niiden maksimaalinen spesifinen kasvunopeus. Uusien ravinteiden jatkuvan syötön vaikutuksesta solujen eksponentiaalisen kasvun vaihe pitenee ja saavutetaan hyvin korkea biomassa, mikä johtaa myös korkeisiin tuotepitoisuuksiin. Panosyöttöprosessi vaatii enemmän optimointia parhaiden syöttöpitoisuuksien ja -nopeuksien löytämiseksi sekä enemmän seuranta, kuten hapen ja ravinteiden seuranta, kuin pelkkä panosprosessi. Tämä monimutkaistaa prosessia ja mahdollisesti sitoo enemmän työvoimaa, mikäli seuranta ei voida tehdä automaattisesti bioreaktorin sisältä. Muita haittapuolia ovat kontaminaatoriskin kasvaminen panosprosessiin verrattuna pidemmän prosessin ja jatkuvan syötön takia sekä hukka-ajan muodostuminen. Hukka-aikaa syntyy vähemmän kuin panosprosessissa, koska prosessi on pidempi sekä tuotetta muodostuu paljon enemmän, mikä kompensoi hukattua aikaa. (von Weymarn 2002.)

Jatkuvatoimisissa prosessissa uusia ravinteita syötetään bioreaktoriin ja samalla reaktorista poistetaan kasvatusta niin, että kasvatuksen tilavuus bioreaktorissa pysyy vakiona (Chisti 2014). Jatkuvatoimisessa kasvatuksessa pyritään vakaaseen tilaan,

jossa solujen kasvunopeus, ravinteiden ja tuotteen pitoisuus bioreaktorissa pysyy vakiona. Vakiotilassa olevan jatkuvatoimisen kasvatuksen spesifinen kasvunopeus määräytyy laimennosnopeuden mukaan (yhtälö 3). (von Weymarn 2002; Ziv ja muut 2013.)

$$\mu = D = \frac{F}{V} \quad (3)$$

Yhtälössä 3 μ on spesifinen kasvunopeus, D on laimennosnopeus, F on syöttöliuoksen syöttönopeus ja V on bioreaktorissa olevan kasvatuksen tilavuus. Jatkuvatoimisessa kasvatuksessa tuotepitoisuus vakaassa tilassa on alhaisempi kuin panossyöttökasvatuksessa, mutta kasvatusta jatkamalla tuottavuus kasvaa. Jatkuvatoimisista kasvatuksista on monia variaatioita, jotka tehostavat tuottavuutta. Esimerkiksi poistoliuosta kierrätetään takaisin bioreaktoriin niin, että kasvatusliuoksesta tuote suodatetaan pois solujen pysyessä kierrätyksessä, minkä ansiosta bioreaktorissa oleva biomassa pysyy korkeampana ja puhdistusprosessi yksinkertaistuu. (von Weymarn 2002.) Jatkuvatoimisessa prosessissa hukka-aikaa muodostuu vähän ja prosessi on helpompi automatisoida, mikä vähentää tarvittavaa työvoimaa. Tämän lisäksi prosessi voidaan tehdä pienemmässä tilavuudessa, kuin saman tuotepitoisuuden saavuttamiseksi tehtävä panossyöttöprosessi, mikä mahdollistaa tuotannon pienemmissä tiloissa. (Croughan ja muut 2015.) Haittapuolina ovat prosessin monimutkaistuminen lisääntyvän seurannan myötä, poistettavaa kasvatusta täytyy käsitellä jatkuvatoimisesti, kasvavat kontaminaatio- ja mutaatoriskit mitä pidemmällä prosessi etenee. (von Weymarn 2002; Croughan ja muut 2015.)

1.3 Laboriomittakaavan bioreaktori

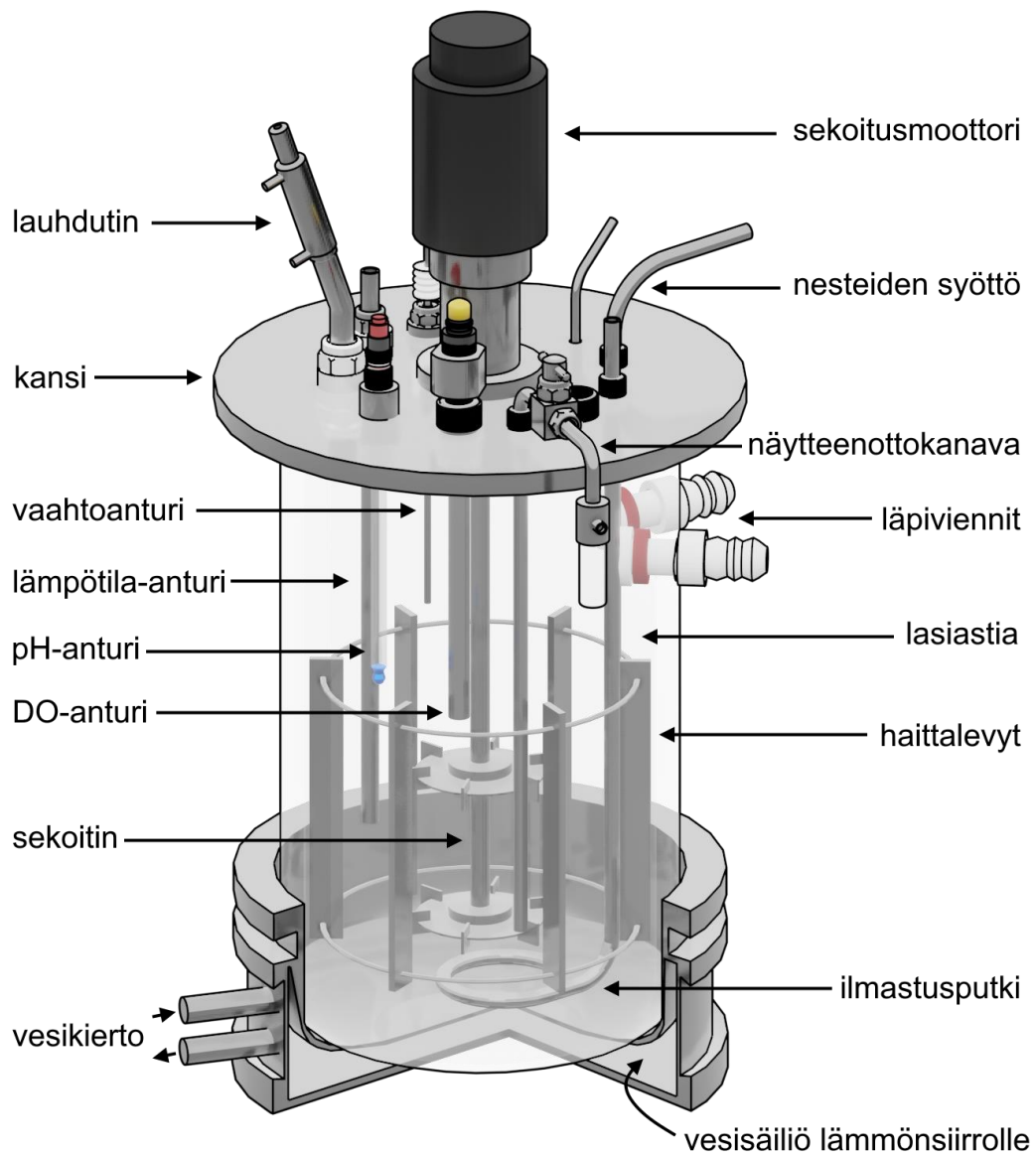
Tyypillinen mikrobikasvatukseen soveltuva laboriomittakaavan bioreaktori on esitetty kuvassa 7. Kasvatus tapahtuu lasiastian sisällä ja se suljetaan kannella, johon on liitettyä monta eri osaa. Tärkeimmät osat ovat sekoitin, ilmastusputki sekä erilaiset anturit. (von Weymarn 2002; Chisti 2014.)

Sekoittimen avulla varmistetaan, että kasvatusliuokseen ei synny lämpötila- tai ravinteiden konsentraatiogradientteja sekä parannetaan hapen liukenemistä kaasufaasista nestefaasiin. (Eerikäinen 2002.) Lasiastiaan sijoitettujen haittaleyvien ansiosta sekoitettaessa vältytään yksittäisen pyörteen muodostumiselta ja sekoitus

pysyy turbulenttina (von Weymarn 2002). Sekoitinta pyöritetään kytkemällä sekoitusmoottoriin. Ilmastusputken avulla kasvatukseen tuodaan happea. Tyypillisesti laboratoriomittakaavan bioreaktoriin kytketään antureita, joilla voidaan mitata kasvatusliuoksen lämpötilaa, pH:ta, DO:ta sekä vaahdon muodostumista. (Chisti 2014.) Mikäli tehdään jatkuvatoimista kasvatusta, bioreaktori voidaan asettaa vaa'an päälle tilavuuden seuraamiseksi (Eerikäinen 2002).

Tämän lisäksi kanteen tai lasiastiaan on lisätty yhteitä, joiden avulla voidaan lisätä nesteitä kasvatukseen tai poistaa kasvatusta bioreaktorista. Kaikissa prosesseissa bioreaktoriin lisätään emästä tai happoa happamuuden säätämiseksi sekä vaahdonestoainetta vaahdon poistamiseksi. Panosyöttöprosessissa sekä jatkuvatoimisessa prosessissa bioreaktoriin lisätään syöttöliuosta ja jatkuvatoimisessa prosessissa kasvatusta poistetaan bioreaktiosta. (von Weymarn 2002.) Näytteenottokanavan avulla prosessia voidaan seurata tarkemmin, kuten biomassan sekä ravinnepitoisuuksien määrityksellä eri aikapisteissä (Eerikäinen 2002). Lauhduksen avulla haihtuva neste palaa takaisin kasvatukseen (Chisti 2014). Bioreaktorin lämpötilaa säädetään muuttamalla kierrätettävän veden lämpötilaa. (von Weymarn 2002.)

Laboratoriomittakaavan bioreaktorit usein mahtuvat autoklaaviin, minkä takia ne steriloidaan kasattuina ja kasvatusliuos kaadettuna lasiastiaan (von Weymarn 2002; Chisti 2014). Syötettävät nesteet steriloidaan joko autoklaavaamalla tai suodattamalla, jos neste ei kestä korkeaa lämpötilaa. Vahvat hapot tai emäkset eivät vaadi sterilointia, sillä niissä ei oleteta kasvavan mitään. Ilmastusputkeen saapuva kaasustiili steriloidaan suodattamalla. (von Weymarn 2002.)



Kuva 7. Tyypillinen laboratoriomittakaavan bioreaktori ja sen osat.

1.4 GFP ja sen käyttö bioprosessin optimoinnissa

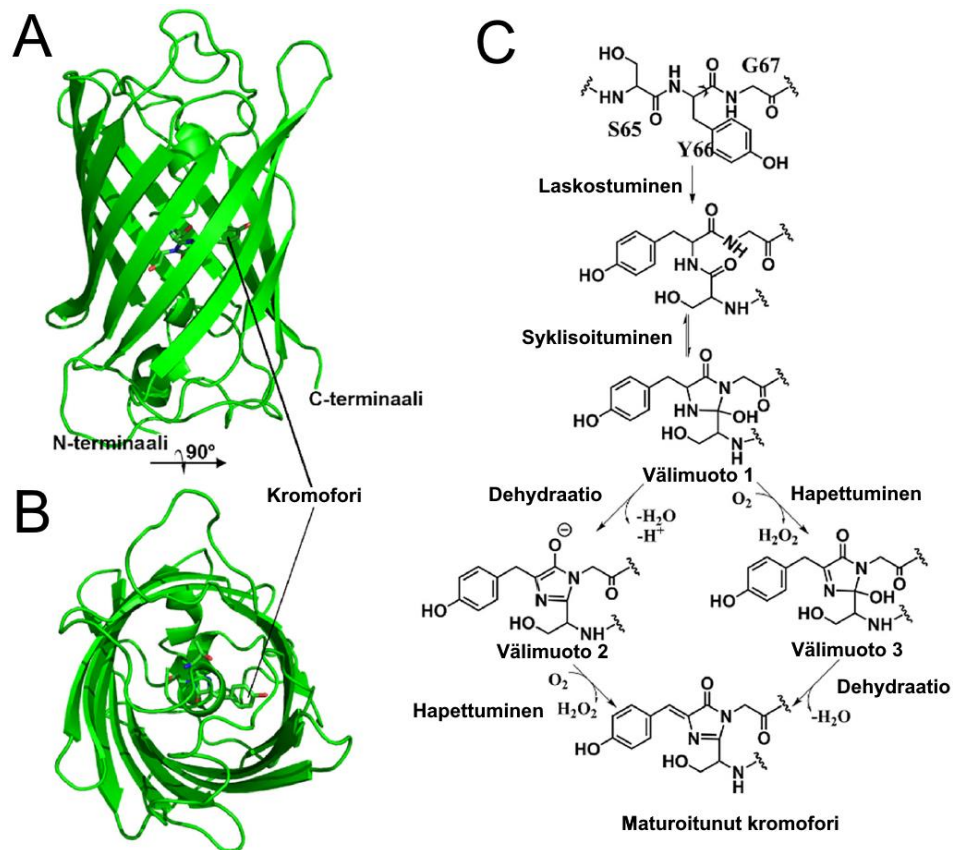
Vihreä fluoresoiva proteiini (engl. *green fluorescent protein*, GFP) löydettiin *Aequorea victoria* -meduusasta vuonna 1962 aekvoriini-lusiferaasin eristämisen yhteydessä (Shimomura ja muut 1962). Aekvoriini katalysoi reaktiota, jossa sen substraatti eli lusiferiini koelenterasiini hapettuu kalsiumionien ja hapen yhteydessä, minkä yhteydessä muodostuu sinistä valoa (Shimomura ja Johnson 1975; Shimomura ja Johnson 1978). *A. victoria* -meduusa ei kuitenkaan loista sinisenä vaan vihreänä. Tämä johtuu siitä, että aekvoriini siirtää valoenergiaa GFP:lle säteilyttömän energiansiirron avulla eli virittää sen ja viritystilan purkautuessa emittoituu vihreää valoa. GFP emittoiman valon intensiteetti on 508 nm:n kohdalla ja aekvoriinin

emittoiman valon intensiteetti on 470 nm:n kohdalla, mikä puolestaan on hyvin lähellä GFP:n pienempää virityspiikkiä, joka sijaitsee 475 nm:n kohdalla. GFP:n suurin virityspiikki sijaitsee 395 nm:n kohdalla. (Johnson ja muut 1962; Kendall ja Badminton 1998.) GFP:stä on tehty monia eri variantteja, jotka eroavat villityypistä muun muassa fluoresenssivalon voimakkuudella sekä viritys- ja emissionvalojen aallonpituuksilla (Cubitt ja muut 1998).

GFP on yleisesti käytetty proteiini biologisessa sekä lääketieteellisessä tutkimuksessa. Sitä käytetään reportterina geeniekspressiossa, proteiinien lokalisoinnissa, proteiini-proteiini-vuorovaikutusten tutkinnassa sekä biosensoreissa. (Zimmer 2002.) Sen suosio perustuu siihen, että sen kromofori pystyy muodostumaan itsenäisesti hapen läsnä ollessa ilman erillisiä kofaktoreita, substraatteja tai entsyymejä (Chalfie ja muut 1994; Zimmer 2002). Tämän lisäksi GFP:n etuina ovat sen pieni koko (Jones ja muut 2004), soluille haitattomuus (Zimmer 2002) sekä stabiilisuus (Ehrmann ja muut 2001).

GFP:n rakenne on esitetty kuvassa 8 A-B. Se koostuu 11-säikeisestä β -tynnyristä, jonka sisällä GFP:n kromofori (engl. *p-hydroxybenzylidene-2,3-dimethylimidazolinone*, *p-HOBDI*) sijaitsee (Ormö ja muut 1996). Tynnyrirakenteensa ansiosta GFP on hyvin stabiili proteiini ja se kestää hyvin lämpöä, emäksisiä olosuhteita, detergenttejä, erilaisia suoloja sekä monia proteaaseja (Ehrmann ja muut 2001). Kromoforin muodostumisen eli maturaation vaiheet on esitetty kuvassa 8 C.

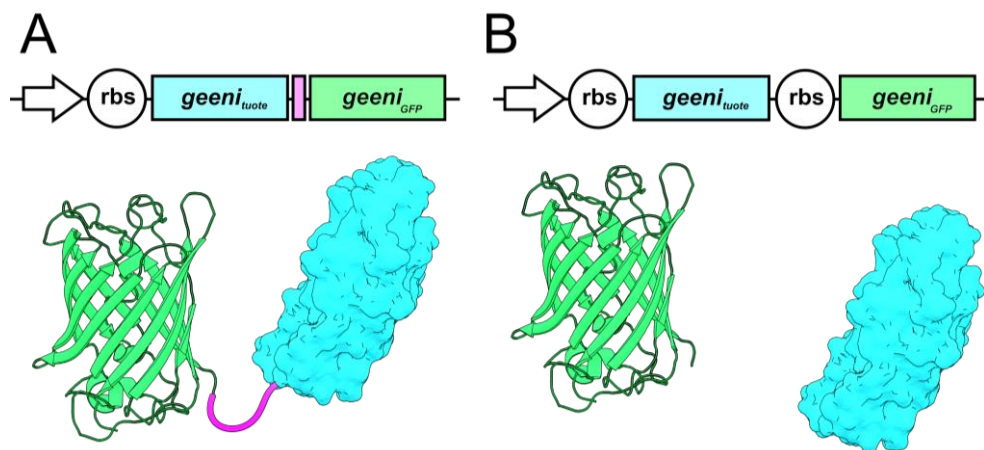
Ensin GFP laskostuu lähes natiiviin muotoonsa, minkä jälkeen aminohapoista Ser65, Tyr66 ja Gly67 muodostuu syklisoitumisen, hapettumisen ja dehydraation seurauksena maturoitunut *p*-HOBDI-kromofori (Reid ja Flynn 1997). Hapettuminen ja dehydraatio tapahtuvat paralleelista ja voivat tapahtua eri järjestyksessä, mutta yleensä hapettuminen tapahtuu ennen dehydraatiota (Zhang ja muut 2006). Itse GFP:n laskostuminen ei kestä kauan, mutta kromoforin maturaatio kestää (Reid ja Flynn 1997). Maturaatio voi kestää 37 °C:ssa noin 5 minuutista yli 50 minuuttiin GFP variantista riippuen (Iizuka ja muut 2011).



Kuva 8. GFP:n rakenne ja kromoforin maturoituminen. (A) GFP:n rakenne sivusta. (B) GFP:n rakenne ylhäältä kuvattuna (C) Kromoforin maturoitumisprosessi. Ensin GFP laskostuu lähes natiiviin muotoonsa, minkä jälkeen aminohapoista Ser65, Tyr66 ja Gly67 muodostuu syklisoitumisen, hapettumisen ja dehydraation seurauksena maturoitunut kromofori. Hapettuminen ja dehydraatio tapahtuvat paralleelista ja voivat tapahtua eri järjestyksessä, mutta yleensä hapettuminen tapahtuu ennen dehydraatiota. Muokattu lähteestä Kong ja muut 2020.

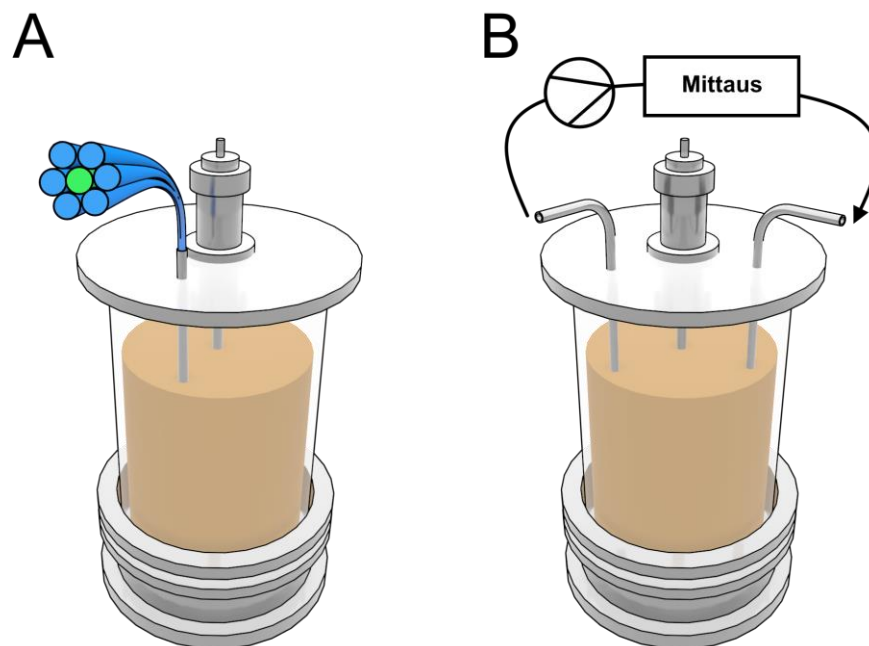
GFP:tä voidaan myös käyttää reporterigeeninä rekombinantiproteiinin tuotantoprosessin optimoinnissa. GFP:n avulla saadaan epäsuorasti tietoa tuotettavan proteiinin tilasta. Tämä voidaan tehdä joko geeni- tai operonifuusiolla (kuva 9). (Cha ja muut 1999a; Dąbrowski ja muut 1999; DeLisa ja muut 1999; Chae ja muut 2000; Jones ja muut 2004; Su ja muut 2004.) Geenifuusiolla GFP ja kohdeproteiini ovat fuusioituneet yhteen yhdeksi fuusioproteiiniksi linkkeripeptidin välityksellä (Cha ja muut 1999b; Jones ja muut 2004). Geenifuusion etuna on, että proteiinit ovat fyysisesti liitetty yhteen, minkä ansiosta GFP:n fluoresenssisignaali kuvastaa myös kohdeproteiinin tilaa. Kun kohdeproteiinin geeni sijoitetaan geenifuusiolla ennen GFP:n geeniä, voidaan kohdeproteiinin epäonnistunut laskostuminen havaita fluoresenssisignaalin laskemisena. Tämä johtuu siitä, että GFP:tä edeltävän proteiinin epäonnistunut laskostuminen estää GFP:n laskostumisen, minkä takia sen

kromofori ei voi muodostua, minkä puolestaan havaitaan fluoresenssin puutteena. (Wang ja Chong 2003.) Fuusio mahdollistaa myös tuottoproteiinin paikallistamisen, josta voi olla hyötyä esimerkiksi puhdistusvaiheessa (Cha ja muut 1999b). Geenifuusion haittana on mahdollisuus proteiinien epätäydelliselle laskostumiselle fyysisen linkkerin takia, mikä havaitaan proteiinin funktionaalisuuden heikentymisenä (Tan ja muut 2020). Tämän lisäksi täytyy erikseen vielä tutkia, onko GFP:n fuusiolla vaikutusta muihin ominaisuuksiin kuten liukenemiseen, koska lopullisena päämääränä on tuottaa pelkkää tuottoproteiinia ilman GFP-fuusiota (Jones ja muut 2004). Mikäli fuusioproteiini muuttaa tuotettavan proteiinin ominaisuuksia, optimoidut kasvatusolosuhteet eivät päde natiiville tuottoproteiinille ja optimointi on tehty turhaan. Yksi vaihtoehto on lisätä linkkerialueelle proteaasin pilkkomiskohta, jonka avulla tuottoproteiini voidaan eristää fuusioproteiinista (Cha ja muut 1999b; Jones ja muut 2004). Operonifuusiossa proteiinien geenit ovat saman promoottorin alaisuudessa, mutta ne tuotetaan erillisinä toisistaan (Dąbrowski ja muut 1999; DeLisa ja muut 1999). Tämän ansiosta välttyään fuusioproteiinin ongelmilta ja proteiinit laskostuvat natiiviin muotoonsa. Haittana on epävarmuus tuottoproteiinin tilasta, sillä GFP:n fluoresenssisignaali kuvastaa vain GFP:n tilaa. On mahdollista, että GFP tuottuu ilman ongelmia, kun taas tuottoproteiinin translaatio tai laskostuminen epäonnistuu ja hajoaa. Tässä menetelmässä täytyy varmistaa korreloiko GFP:n signaali funktionaalisen tuottoproteiinin pitoisuuden kanssa (Dąbrowski ja muut 1999; DeLisa ja muut 1999).



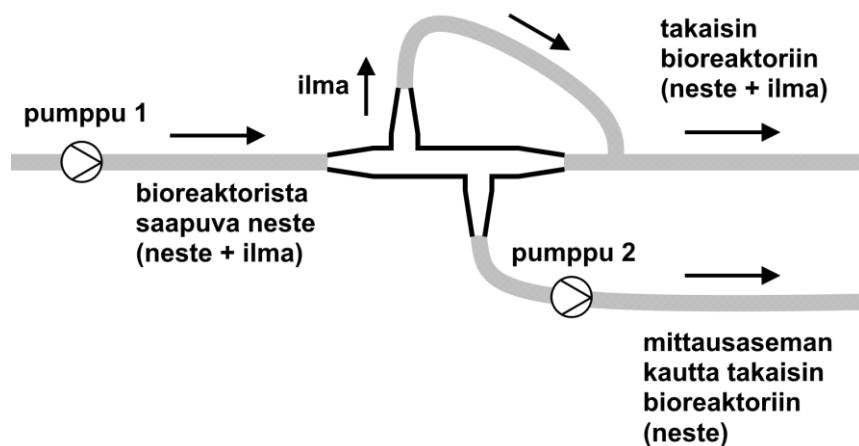
Kuva 9. GFP:n käyttö reportterina. (A) GFP (vihreällä) on geenifuusioitu tuotettavan proteiinin (sinisellä) kanssa eli molemmat proteiinit ovat yhdistyneenä toisiinsa linkkeripeptidiketjun (liila) välityksellä ja muodostavat yhtenäisen proteiinin. (B) GFP on operonifuusioitu tuotettavan proteiinin kanssa eli ne ovat saman promoottorin (nuoli) alaisuudessa, mutta ne transloidaan erikseen omien ribosomien kiinnittymiskohtien (rbs) ansiosta.

GFP:n fluoresenssin mittaus tuottoa optimoitaessa on tehty jatkuvatoimisesti ja automatisoidusti kahdella eri tapaa: suoraan bioreaktorista (Jones ja muut 2004; Su ja muut 2004) tai kierrättämällä kasvatusta mittausaseman kautta takaisin bioreaktoriin (kuva 10) (Randers-Eichhorn ja muut 1997). Suoraan bioreaktorista mitattaessa bioreaktorin kanteen on asennettu kotelo, jonka bioreaktorin sisällä oleva pää on tehty lasista. Koteloon sijoitetaan valokuitunippu, joka koostuu emissiovaloa keräävästä valokuidusta ja sitä ympäröivistä viritysväloä tuovista valokuiduista. Kotelo on ainoa steriloitava osa, minkä takia se yleensä tehdään ruostumattomasta teräksestä ja lasi safiirilasista. Tämän menetelmän etuna on mitatun fluoresenssisignaalin viiveettömyys. Haittoina ovat ilmastuksesta ja sekoituksesta johtuva korkea kohina sekä bioreaktorin erikoisvaatimukset. (Jones ja muut 2004.) Pienemmissä laboratoriomittakaavan bioreaktoreissa asennusmahdollisuus tällaiselle anturille on heikko, koska sen kannesta ei löydy paikkaa ylimääräiselle anturille. Tämä tarkoittaa, että jokin käytettävistä antureista korvattaisiin GFP-anturilla, mikä ei ole tarkoituksenmukaista kasvatusolosuhteita optimoitaessa.



Kuva 10. GFP:n mittaus bioreaktorista. (A) Mittaus tehdään suoraan kasvatuksesta bioreaktorin sisältä. Bioreaktorin kanteen on asennettu ruostumattomasta teräksestä tehty kotelo, jonka kasvatuksessa oleva pää on tehty safiirilasista. Koteloon sijoitetaan valokuitunippu, joka koostuu emissiovaloa keräävästä valokuidusta (vihreällä), jota ympäröi viritysväloä tuovat valokuidut (sinisellä). (B) Mittaus tehdään kierrättämällä kasvatusta peristalttipumpun avulla erillisen mittausaseman kautta takaisin bioreaktoriin.

Kierrätysmenetelmässä tätä ongelmaa ei ole, sillä kierrätykseen voidaan käyttää bioreaktoriin runsaasti sijoitettuja yhteitä. Kierrätysmenetelmässä GFP:n fluoresenssin mittaukseen on käytetty valokuitunipun sisältävää erikoisvalmisteista läpivirtauskammiota (Randers-Eichhorn ja muut 1997) sekä pelkkää läpivirtauskyvettä, jonka pinnalta mittaus tehdään (Kostov ja muut 2000). Ennen mittausta kasvatuksesta poistetaan ilmastuksesta johtuvat ilmakuplat kohinan välttämiseksi. Tähän on kehitetty ilmakuplia poistava letkujärjestelmä (kuva 11). (Coppella 1990.) Kasvatuksen kierrätys tehdään yleensä peristalttipumppujen avulla, joiden ansiosta vain letkut sekä läpivirtauskammio tai -kyvetti tarvitsee steriloida (Randers-Eichhorn ja muut 1997; Kostov ja muut 2000). Kierrätysmenetelmän etuna on myös mahdollisuus useiden mittausasemien liittämiseen peräjälkeen, minkä ansiosta kasvatuksesta voidaan saada lisää tietoa, kuten ravinnepitoisuuksista tai solutiheydestä spektrofotometrisilla mittauksilla. Kierrätysmenetelmän haittana on kierrätyksestä aiheutuva viive, mikä voi myös haitata solujen kasvua, kun ne poistuvat hetkellisesti bioreaktorista. Jos kierrätysnopeus ei ole tarpeeksi suuri, soluilta voi loppua ravinteet tai happi niiden ollessa letkun sisällä, mikä voi aiheuttaa tuottavuuden laskua. (Coppella 1990). Tämä voi haitata prosessin optimointia, mikäli itse kierrätyksestä aiheutuu muutoksia kasvatukseen. GFP:n mittauksessa virityslähteenä on käytetty ksenonlamppua (Su ja muut 2004) sekä sinisisen valon (Randers-Eichhorn ja muut 1997; Jones ja muut 2004) ja ultraviolettivalon (UV) hohtodiodeja (engl. *light emitting diode*, LED) (Kostov ja muut 2000). Valoanturina on käytetty fotodiodia (Kostov ja muut 2000), valomonistinputkea (engl. *photomultiplier tube*, PMT) (Randers-Eichhorn ja muut 1997; Su ja muut 2004) sekä spektrofotometriä (Jones ja muut 2004).



Kuva 11. Ilmakuplien poisto kasvatusliuoksesta ennen mittausta. Pumpun 1 pumppausteho on suurempi kuin pumpun 2, minkä vaikutuksesta kasvatusta kulkeutuu jatkuvatoimisesti alahaaran ohitse takaisin bioreaktoriin. Pumpun 2 avulla tästä ohikulkevasta nesteestä pumpataan nestettä mittausaseman kautta takaisin bioreaktoriin. Muokattu lähteestä Coppella 1990.

1.5 Työn tavoitteet

Diplomityön tavoitteena oli kehittää sekä menetelmä että laitteisto tuottoproteiinigeenin ekspressiota ohjaavan promoottorin aktivoitumisen reaaliaikaiseen seurantaan *E. coli*-panossyöttökasvatuksessa. Menetelmän avulla toivottiin tulevaisuudessa pystyvän optimoimaan ominaisuuksiltaan erilaisten rekombinanttiproteiinien tuottoa sekä päättämään kuinka hyvin induktio onnistui ja onko kasvatuksen puhdistaminen edes kannattavaa. Oltiin myös kiinnostuttu voidaanko GFP:n fluoresenssisignaalia päätellä, kuinka paljon kohdeproteiinia oli tuotettu.

Tämän lisäksi toivottiin mahdollisuutta useamman eri mittausaseman sarjaanliittämiseksi, jotta mahdollisesti tulevaisuudessa kehitettyjä antureita voitaisiin käyttää samanaikaisesti. Laitteistosta toivottiin yksinkertaista ja matalakustannuksellista kuitenkin uhraamatta sen herkkyyttä. Haluttiin myös selvittää fotodiodin, pienikokoisen PMT:n (μ PMT) sekä kameran soveltavuutta GFP:n fluoresenssivalon mittaamisessa. Tämän lisäksi oltiin myös kiinnostuttu voiko kameralla tehdä mittaukset ilman viritys- ja emissiosuodattimia ja käyttää ainoastaan kameran omia suodattimia GFP:n emissiovalon spesifiseen mittaukseen.

2 Materiaalit ja menetelmät

2.1 GFP:n mittaaminen

2.1.1 Kierrätysmenetelmä

Kasvatuksen kierrättämiseen käytettiin 8 mm:n halkaisijan silikoniletkua ja pumppuina käytettiin kahta fermentointiin käytetyn BioFlo 3000-fermentorin (New Brunswick, Yhdysvallat) omaa peristalttipumppua. GFP:n mittausta varten silikoniletkujen väliin asetettiin 10 cm:iä pitkä lasiputki. Lasiputki tehtiin leikkaamalla 230 mm:n pituisesta lasisesta pasteur-pipetistä (VWR International, Yhdysvallat) suppilonmuotoinen osa irti. Väliastianä käytettiin 250 ml:n mittalasia, jonka korkkiin asetettiin ensimmäisessä panossyöttökasvatuksessa 0,45 µm:n ilmasuodatin, joka toisessa panossyöttökasvatuksessa korvattiin suoraan bioreaktorin yhdistetyllä silikoniletkulla. Väliastia sijoitettiin magneettisekoittajan (MR Hei-Mix S, Heidolph Instruments, Saksa) päälle solujen sedimentaation välttämiseksi.

2.1.2 Kierrätysviive

Kierrätyksestä aiheutuva viive määritettiin niin, että letkut täytettiin ensin vedellä sekä väliastiaan kerrytettiin 100 ml:a vettä, minkä jälkeen alettiin pumppaamaan letkuihin 50 %:n pumppausteholla sinistä väriainetta (2,5 mg/mL Coomassie Brilliant Blue G, Sigma) ja ottamalla videota älypuhelimella (Galaxy A50, Samsung, Etelä-Korea) mittausaseman lasiputkesta. Lasiputken viereen sijoitettiin kaksi muuta lasiputkea, jotka sisälsivät väriaineella täysin värjättyä liuosta sekä pelkkää vettä. Video analysoitiin itse kirjoitetulla Python-ohjelmalla, jossa videon joka 60. kuva analysoitiin. Tämä tehtiin niin että jokaisesta putkesta valittiin 30x30-pikselin suuruinen alue (kuva 12), joka ensin muutettiin harmaasävykuvaksi, minkä jälkeen kuvan kaikki pikseliarvot summattiin yhteen.



Kuva 12. Kierrätyksestä aiheutuvan viiveen selvitys. Ylempi lasiputki oli täytetty vedellä ja alempi lasiputki oli täytetty sinisellä väriaineella. Keskimäinen lasiputki oli nesteen kierrätykseen käytetty lasiputki. Jokaisesta lasiputkesta valittiin 30x30-pikselin suuruinen alue, joiden valoisuus laskettiin 46-minuutin mittaisen videon joka 60. kuvasta viiveen kierrätyksestä aiheutuvan viiveen selvittämiseksi.

2.1.3 Mittalaitteen kokoonpano

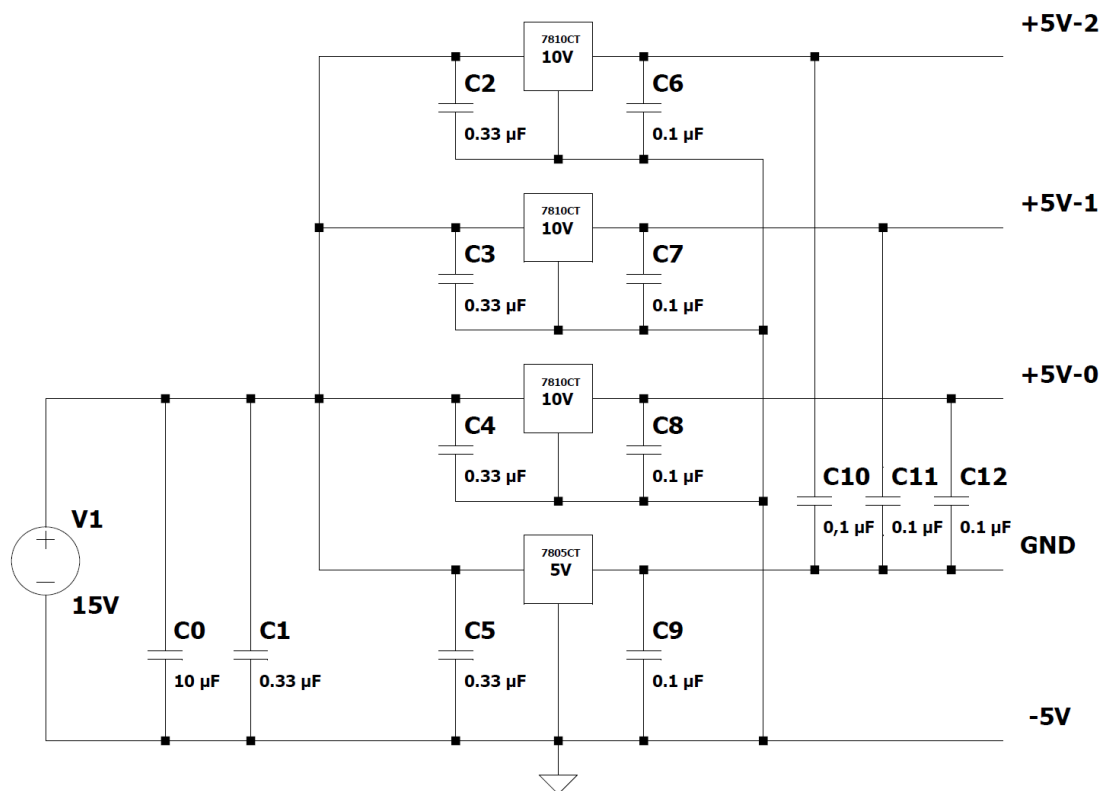
Mittalaitteen virityslähteenä käytettiin sinistä 5 mm:n LEDiä (LED 5SUK12V, Elgood Oy, Suomi). GFP:n emittoiman fluoresenssivalon mittaamiseen käytettiin fotodiodia (BPW 21, Osram, Saksa), μ PMT:tä (H12402-01, Hamamatsu, Japani) sekä 8:n megapikselin komplementaarinen metalli-oksidi-puolijohde-kameraa (engl. *complementary metal oxide semiconductor*, CMOS) (Raspberry Pi Camera Module v2, Raspberry Pi Foundation, Yhdistynyt kuningaskunta). LEDin kiinnityksessä käytettiin linssillistä LED-kaulusta (SML1083, Signal Construct, Saksa), jonka linsejä (polttoväli 15 mm) käytettiin myös viritys- ja fluoresenssivalon kohdistuksessa. LEDin valo suodatettiin 470 nm:n kaistanpäästösuodattimella (FB470-10, Thorlabs, Saksa), ja mitattava GFP:n fluoresenssivalo suodatettiin 510 nm:n kaistanpäästösuodattimella (FB510-10, Thorlabs). Molempien suodattimien kaistanleveys oli 10 nm:iä. LEDin, kaistanpäästösuodattimien sekä GFP:n (Turun Yliopisto, Suomi) spektrit mitattiin Ocean Opticsin (Yhdysvallat) HR-4000-UV-NIR-spektrofotometrillä.

Viritys- ja emissiovalojen moduulit rakennettiin suljettujen koteloiden sisälle. Taustavalon minimoimiseksi moduulien kotelot lopuksi vielä teipattiin läpikuultamattomalla alumiiniteipillä. Mittausasema sekä moduulit suunniteltiin AutoCAD (Autodesk Inc, Yhdysvallat) tietokoneavusteisen suunnittelun ohjelmistolla ja 3D-tulostettiin i3 MK3S-3D-tulostimella (Prusa Research, Tšekki) käyttämällä materiaalina polylaktidia (Prusament PLA Prusa Galaxy Black, Prusa Polymers,

Tšekki). Mittausaseman ja moduulien rakennuksessa käytettiin M4 pultteja ja muttereita.

2.1.4 Mittalaitteen elektroniikka

Mittalaitteen virtalähde suunniteltiin niin että 15 V:in hakkurivirtalähteestä (HNP18-150L6, HN Electronic Components, Saksa) reguloitiin yksi 5 V:in ulostulo (L7805CV, STMicroelectronics, Sveitsi) sekä kolme erillistä 10 V:n ulostuloa (L7810CV, STMicroelectronics) kuvan 13 mukaisesti. 5 V:in ulostulo biasoitiin maaksi, minkä johdosta 10 V:in ulostuloista saatiin +5 V:ia ja maasta -5 V:ia.



Kuva 13. Fotodiode- sekä μPMT-mittauksia varten suunniteltu virtalähde. 15 V:in hakkurivirtalähteestä reguloitiin kolme 10 V:in ulostuloa sekä yksi 5 V:in ulostulo, joka biasoitaessa maaksi saatiin oikeasta maasta -5 V:in ulostulo sekä 10 V:in ulostuloista +5 V:in ulostulot.

Fotodiodin sekä μPMT:n valosta syntyvä sähkövirta muutettiin jännitteeksi, joka vahvistettiin itse suunnitellulla vahvistinpiirillä (Kuva 14). Vahvistinpiirissä käytettiin Texas Instrumentsin (Yhdysvallat) NE5532P matalan kohinan operaatiovahvistimia -5 V ja +5 V käyttöjännitteillä. Vahvistinpiirin ensimmäinen osa koostui

transimpedanssivahvistimesta, jonka avulla sähkövirta muuttuu jännitesignaalksi kaavan 4 mukaisesti.

$$V_{out} = -I_s R_F \quad (4)$$

Kaavan I_s on fotodiodin tai μPMT :n valosta syntynyt sähkövirtasignaali ja R_F on takaisinkytkentävastus, jota säätämällä voidaan vaikuttaa syntyvän jännitesignaalin V_{out} arvoon. Takaisinkytkentävastukseksi valittiin kolme eri vastusarvon lineaarista säätövastusta sarjaankytkettynä, jotta syntyvä jännitesignaali voitiin säätää halutulle tasolle. Säätövastukset olivat vastusarvoiltaan $4,7 \text{ M}\Omega$, $47 \text{ k}\Omega$ ja $1 \text{ k}\Omega$. Tämän lisäksi transimpedanssivahvistimeen lisättiin $0,1 \text{ nF}$:in kondensaattori tasaamaan syntyvää jännitesignaalia.

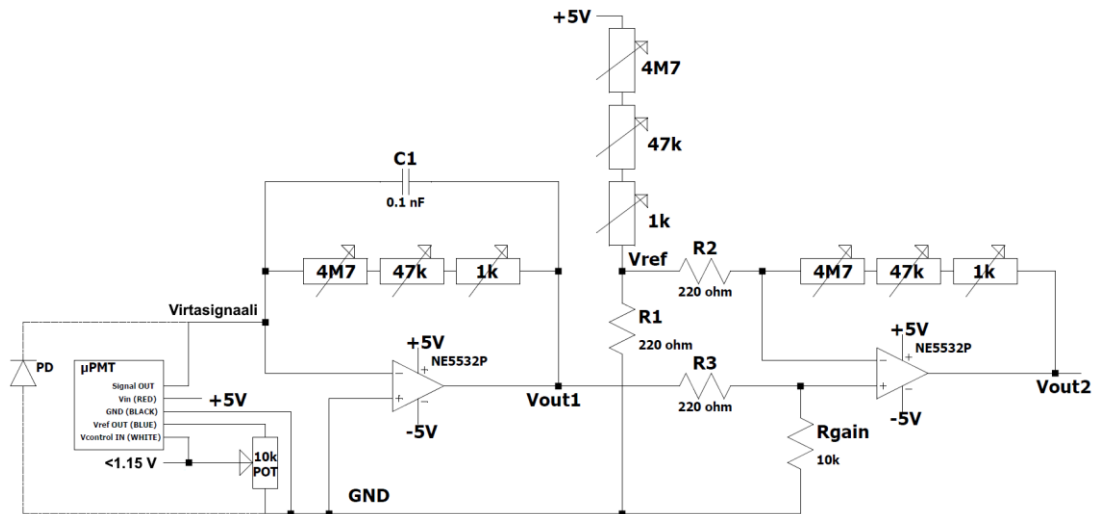
Vahvistinpiirin toinen osa koostui differentiaalivahvistimesta, joka vahvistaa kahden sisääntulevan jännitesignaalin välisen erotuksen kaavan 5 mukaisesti.

$$V_{out} = \frac{(R_f + R_1) R_g}{(R_g + R_2) R_1} V_2 - \frac{R_f}{R_1} V_1 = \left(\frac{R_1 + R_f}{R_1} \right) \cdot \left(\frac{R_g}{R_g + R_2} \right) V_2 - \frac{R_f}{R_1} V_1 \quad (5)$$

Kaavan R_f on takaisinkytkentävastus, jota säätämällä voidaan vaikuttaa vahvistuksen tasoon. Takaisinkytkentävastukseksi valittiin kolme eri vastusarvon lineaarista säätövastusta sarjaankytkettyinä. Säätövastuksien vastusarvot olivat $4,7 \text{ M}\Omega$, $47 \text{ k}\Omega$ ja $1 \text{ k}\Omega$. R_1 :ksi ja R_2 :ksi valittiin $220 \text{ }\Omega$ vastukset ja R_g :ksi valittiin $10 \text{ k}\Omega$ vastus. Kaavassa V_1 ja V_2 ovat sisääntulevia jännitesignaaleja, joista V_2 on vahvistinpiirin ensimmäisen osan eli transimpedanssivahvistimen ulostuleva jännitesignaali. Toinen sisääntuleva jännitesignaali V_1 on säädettävissä jännitteenjakajalla kaavan 6 mukaisesti.

$$V_{out} = \frac{R_2}{R_1 + R_2} \cdot V_{in} \quad (6)$$

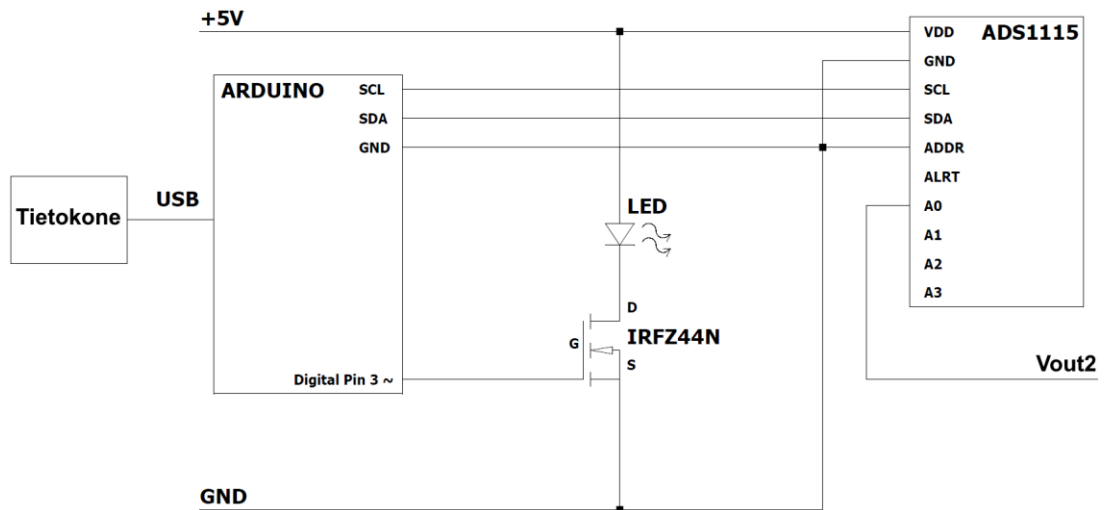
Vahvistinpiiriin kaavan R_1 :ksi valittiin kolmen lineaarisen eri vastusarvon säätövastuksen sarjakytkentä, joiden vastusarvot olivat $4,7 \text{ M}\Omega$, $47 \text{ k}\Omega$ ja $1 \text{ k}\Omega$. Vahvistinpiiriin kaavan R_2 :ksi valittiin $220 \text{ }\Omega$ vastus. Sisääntuleva jännite V_{in} oli 5 V . Jännitteenjakajan ulostulojännite V_{out} eli differentiaalivahvistimen toinen sisääntulojännitesignaaleista V_1 saadaan valittua säätämällä säätövastuksia.



Kuva 14. Fotodiodi- sekä μ PMT-mittauksia varten suunniteltu vahvistinpiiri. Aluksi fotodiodin tai μ PMT:n valosta syntyvä virta muunnettiin transimpedanssivahvistimella jännitteeksi Vout1. Tämän jälkeen jännitteen Vout1 sekä jännitteenjakajasta säädetyn jännitteen Vref muutos vahvistettiin differentiaalivahvistimella jännitteeksi Vout2. Vref säädettiin niin että Vout2 oli mahdollisimman lähellä 0 V:ia, kun mitattiin GFP:tä sisältämätöntä näytettä.

Differentiaalivahvistinta käytettiin taustasignaalin poistamiseen sekä herkkyyden maksimisoimiseen. Tämä tehtiin niin, että mittalaitetta kalibroitaessa GFP:tä sisältämätöntä näytettä mitattaessa jännitteenjakajan säätövastuksia säädettiin niin, että vahvistinpiirin ulostuleva jännitesignaali näytti mahdollisimman lähelle nollaa volttia. Tämän jälkeen suurimman halutun mitattavissa olevan GFP pitoisuuden näyte mitattiin ja sekä transimpedanssivahvistimen että differentiaalivahvistimen takaisinkytkentäsäätövastuksia säädettiin niin, että vahvistinpiirin ulostuleva jännitesignaali näytti suurinta mahdollista saturoitumatonta jännitettä. Näin tekemällä saatiin mittalaitteelle säädettyä suurin mahdollinen dynaaminen alue.

Vahvistinpiirin analoginen ulostulo muutettiin digitaaliseksi Adafruitin (Yhdysvallat) ADS1115 16-bittisellä A/D-muuntimella, joka kytkettiin Arduino Uno Rev3 mikro-ohjaimen (Arduino, Yhdysvallat) I2C-liitännällä (kuva 15). Tämän lisäksi mikro-ohjaimella ohjattiin LEDiä N-kanavaisella eristehilatransistorilla (engl. *metal-oxide-semiconductor field-effect transistor*, MOSFET) (IRFZ44N, International Rectifier, Yhdysvallat) kytkemällä MOSFETin hila mikro-ohjaimen pulssinleveysmodulaatiota tukevaan digitaaliporttiin, mikä mahdollisti LEDin kirkkauden säätämisen.



Kuva 15. Arduino-mikro-ohjaimen kytkentä. Vahvistinpiirin ulostuloanalogisignaali Vout muutettiin digitaaliseksi signaaliksi ADS1115 A/D-muuntimella, joka kytkettiin mikro-ohjaimen I2C-liitäntällä. LEDin katodin ja maan väliin kytkettiin N-kanavainen MOSFET, jonka hila oli kytketty mikro-ohjaimen pulssinleveysmodulaatiota tukevaan digitaaliporttiin LEDin kirkkauden säätöä varten. Mikro-ohjain kytkettiin tietokoneeseen USB-johdon välityksellä.

2.1.5 Mittalaitteen ohjaus

Mikro-ohjain oli kytketty tietokoneeseen (ThinkPad X220, Lenovo, Kiina) USB-johdon välityksellä. Tietokoneella itse kirjoitettu Python-ohjelma kommunikoi mikro-ohjaimen kanssa taulukon 2 mukaisilla komennoilla. Komentoviestit alkoivat isolla alkukirjaimella ja päättyivät huutomerkkiin. Ensimmäinen kirjain määrittää komentotyyppin, ja sitä voi seurata lisäparametri, ja viestin päättävä huutomerkki oli merkki mikro-ohjaimelle viestin päättymisestä.

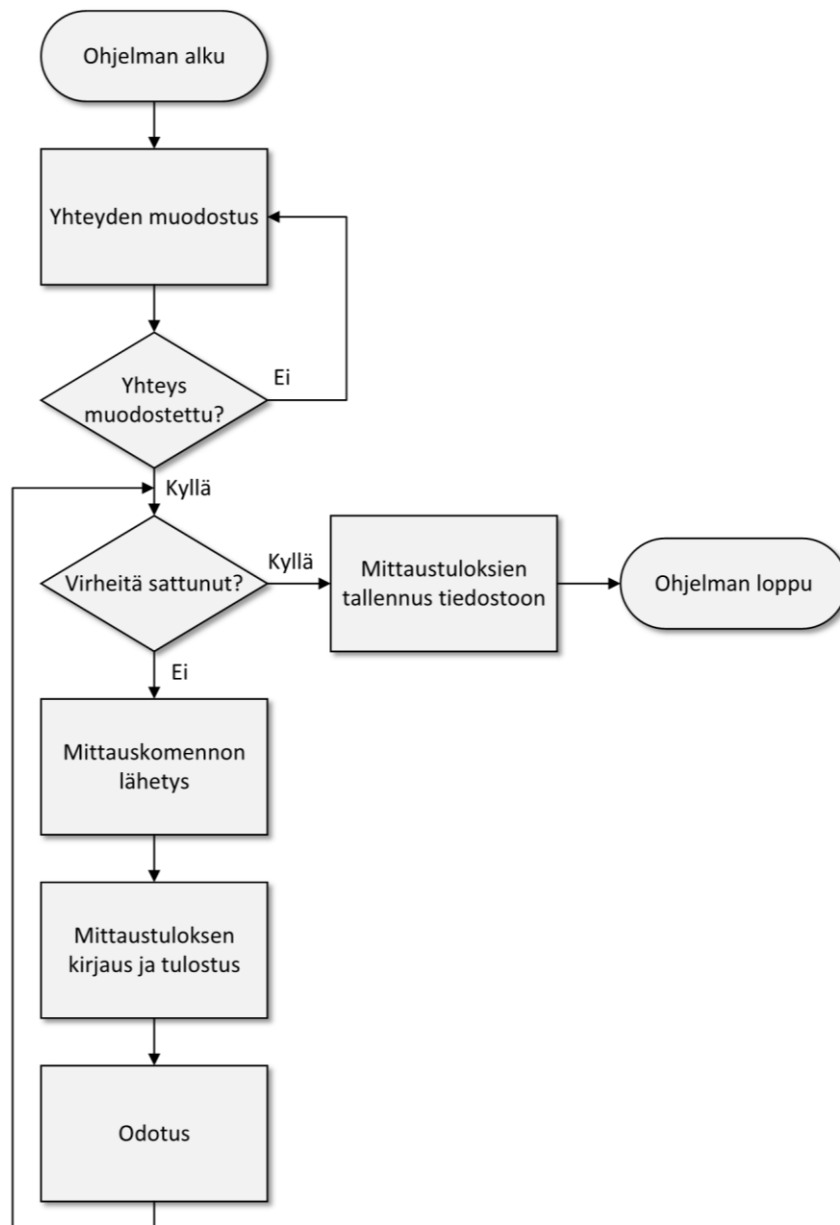
Taulukko 2. Mittalaitteen ohjaamiseen käytetyt komennot.

Komento	Vastaus	Selitys
L<0-255>!	L<0-255>	LEDin ohjaus. Komennolla “L0!” LED sammutetaan ja komennolla “L255!” LED palaa maksimikirkkaudella. Kirkkautta voidaan säätää lineaarisesti valitsemalla arvo 0 – 255 väliltä.
F!	F<lukuarvo>	Mitatun valon määrä. Mikro-ohjain vastaa kyselyyn palauttamalla 16-bittisen lukuarvon.

Python-ohjelma muodosti ensin yhteyden tietokoneen sarjaporttiin, johon mikro-ohjain on liitetty (9600 baudia), minkä jälkeen se alkoi tekemään mittauksia säännöllisin aikaväleillä (kuva 16). Mittaus tehtiin ensin sytyttämällä LED täydellä

kirkkaudella, suoritettiin mittaus, ja lopuksi LED sammutettiin. LEDin sytyttämisen ja mittauksen välillä odotettiin 10 millisekuntia LEDin syttymisen varmistamiseksi. Joka mittauksen jälkeen ohjelma tulosti komentoriville mittaustuloksen, mikä mahdollisti reaaliaikaisen seurannan. Ohjelman lopettaminen komentoriviltä aiheutti virheen, mikä johti mittaustuloksien tallentamiseen tiedostoon ja ohjelman päättymiseen.

Kameralla mitattaessa tietokoneena käytettiin Raspberry Pi -yhden piirilevyn tietokonetta (Raspberry Pi 4 Model B 2 GB, Raspberry Pi Foundation), jonka kameraporttiin oli kytketty 8:n megapikselin CMOS-kennolla varustettu kameramoduuli. Python ohjelma oli sama kuin μ PMT- ja fotodiodimittauksissa sillä erotuksella, että mitattaessa mikro-ohjaimelle ei lähetetty mittauskomentoa, vaan kameralla otettiin kuva raspistill-komentorivikomennolla (laatu 100; analoginen vahvistus 1; digitaalinen vahvistus 1; automaattinen valkotasapaino pois päältä ja valotusaika mikrosekunneissa 500000/5000000). Valon määrä määritettiin kuvasta myöhemmin käyttäen erillistä itse kirjoitettua Python-ohjelmaa. Kuva-analyysiohjelmassa kuva ensin muutettiin harmaasävykuvaksi, minkä johdosta jokainen kuvan pikseli sai arvoksi luvun 0 – 255 väliltä riippuen sen valoisuudesta. Tämän jälkeen kaikki kuvan pikseliarvot summattiin yhteen, ja tulokseksi saatiin kuvan valon määrästä kertova lukuarvo.



Kuva 16. Mikro-ohjaimen ohjaukseen käytetty python-ohjelma. Aluksi ohjelma muodosti yhteyden tietokoneen sarjaporttiin, johon mikro-ohjain oli yhdistetty. Tämän jälkeen ohjelma siirtyi ikuiseseen silmukkaan, jossa ohjelma lähetti mittauskomennon mikro-ohjaimelle, kirjasi tuloksen ja tulosti sen komentoriville, minkä jälkeen se odotti käyttäjän asettaman odotusajan verran ja aloitti silmukan uudestaan. Mittauskomennossa mikro-ohjaimelle lähetettiin komento LEDin sytyttämisestä, komento valon määrästä, ja lopuksi ohjelma lähetti komennon LEDin sammuttamisesta. Kameramittauksessa mikro-ohjaimelle lähetettiin vain LEDin sytyttämis- ja sammuttamiskomennot, joiden välissä ohjelma otti kuvan kameralla ja tallensi sen tietokoneelle. Silmukasta pääsi pois vain jos ohjelmassa tapahtuu virhe, joka tapahtuu kun käyttäjä lopettaa ohjelman. Ennen kuin ohjelma loppuu fotodiodi- tai μ PMT-mittaustulokset tallennettiin tietokoneen kiintolevyllä tiedostoon.

2.1.6 Anturivertailumittaukset

Mittauksia varten GFP:stä (Turun Yliopisto) valmistettiin 15 standardilaimennosta (10 μ M:sta 0,6 nM:een 1:1 sarjalaimennoksilla), joiden lisäksi mitattiin myös pelkkää TSA-puskuria (50 mM Tris; 150 mM NaCl, pH 7,5; 0.02% NaN₃), jota käytettiin standardien laimentamiseen. Jokaiselle standardilaimennokselle valmistettiin oma näyteputki. Näyteputki tehtiin niin että 230 mm:n pituinen lasinen pasteur-pipetti (VWR International, Yhdysvallat), jonka toinen pää oli sulatettu umpeen Bunsenlampulla, täytettiin standardilaimennoksella ja suljettiin tiiviisti 3D-tulostetulla korkilla.

Mittaukset tehtiin asettamalla näyteputki mittausasemaan ja mittaamalla valon määrä. Mittauksien aikana LED oli koko ajan päällä. Koska anturivertailumittaus tehtiin työn alkuvaiheessa, μ PMT- ja fotodiodimittaukset tehtiin mittaamalla jännite suoraan vahvistinpiirin ulostulosta Fluken (Yhdysvallat) 289 True RMS Multimeter-yleismittarilla. Kameramittaukset tehtiin sekä viritys- ja emissiosuodattimien kanssa että ilman niitä. Kameramittauksissa tietokoneena käytettiin vanhempaa Raspberry Pi-tietokonetta (Raspberry Pi Model 3 B+, Raspberry Foundation). Kuvat otettiin raspistill-komentorivikomennolla (laatu 100; analoginen vahvistus 1; digitaalinen vahvistus 1; automaattinen valkotasapaino pois päältä ja valotusaika mikrosekunneissa 1000000). Kuvat käsiteltiin "Ohjaus"-osion kuva-analyysiohjelmalla muuten samalla tavalla, mutta ilman suodattimia otetuista kuvista valon määrä laskettiin summaamalla vihreän kanavan pikselit yhteen.

Standardilaimennosten fluoresenssi mitattiin myös vertailun vuoksi Wallacin (Suomi) Victor 1420 Multilabel Counter-mittalaitteella fluoreskeiini-ohjelmalla (485 nm:n virityssuodatin, 545 nm:n emissiosuodatin, 1 sekunnin mittausaika, 24064 CW-lampun teho) triplikaatteina C12 Maxisorp-kuoppalevyiltä (Thermo Fisher, Yhdysvallat) 200 μ l per kaivo.

2.2 Konstrukti

2.2.1 ppGFP-kasetin valmistelu

Tässä työssä käytetty geenikasetti nimettiin paralleelipromoottori-GFP-kasetiksi (ppGFP). Geenikasetti, joka muodostui GFP:tä koodaavasta geenistä (F64L, S65T, Q80R, M153T, V163A) ja sitä ohjaavasta lacPO:sta, tilattiin Twist Bioscienceltä (Yhdysvallat). Kasetti monistettiin polymeraasiketjureaktiolla (engl. *polymerase*

chain reaction, PCR) Phusion Hot Start II DNA-polymeraasientsyymillä (Thermo Fisher, Yhdysvallat) 50 µL:n reaktiutilavuudessa valmistajan ohjeen mukaisesti, poikkeuksena molempien alukkeiden (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3' ja 5'-AGGGGTTATGCTAGTTATTGCTCAGCGGTG-3') pitoisuus reaktiossa oli 0,2 µM sekä geenikasettitemplaatin pitoisuus oli 1 ng/µL. Alkudenaturaatio oli 30 s 98 °C, denaturaatiovaihe 5 s 98 °C, kiinnittymisvaihe 15 s 60 °C, ekstensiovaihe 25 s 72 °C ja viimeinen ekstensio 5 min 72 °C sekä syklejä oli 35. PCR-reaktio puhdistettiin Zymo Researchin (Yhdysvallat) PCR Purification-kitillä valmistajan ohjeen mukaisesti.

2.2.2 pAK400-NB-αCH1-ppGFP:n kloonauk

ppGFP-geenikasetti kloonattiin Turun Yliopistolta saatuun ihmisen immunoglobuliini G-vasta-aineen (IgG) CH1-domeenia tunnistavan nanobodyn pAK400-tuottovektoriin (Krebber ja muut 1996). Vektori ja insertti digestoitiin HindIII-restriktioentsyymillä (Thermo Fisher) valmistajan ohjeen mukaisesti 2 h 37 °C:ssa, minkä jälkeen vektori defosforyloitiin itseligaation estämiseksi FastAP-entsyymillä (Thermo Fisher) muuten valmistajan ohjeen mukaisesti, mutta inkuboitiin 30 min 37 °C:ssa. Digestiot puhdistettiin Zymo Researchin PCR Purification-kitillä valmistajan ohjeen mukaisesti, minkä jälkeen ligaatio tehtiin T4 DNA-ligaasientsyymillä (Thermo Fisher) muuten valmistajan ohjeen mukaisesti, mutta reaktio tehtiin 10 µL:n reaktiutilavuudessa, ligaasientsyymien pitoisuus reaktiossa oli 0,25 Weiss U/µl sekä inkuboitiin 1 h huoneenlämmössä. 1 µl ligaatiota transformoitiin 40 µL:aan XL1-Blue *Escherichia coli*-soluihin (recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI^qZΔM15 Tn10 (Tet^r)] (Stratagene, Yhdysvallat) elektroporaatiolla Bio-Radin (Yhdysvallat) GenePulser Xcell-laitteella (1,25 kV/mm; 25 µF; 200 Ω). Transformoituja soluja kasvatettiin 1 mL SOC-liuoksessa (20 g/l Tryptoni; 5 g/l Hiivauute; 0,5 g/l NaCl; 2 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 0,36 % w/v Glukoosi; pH 7,0) 90 min 37 °C:ssa 300 rpm:n ravistelussa, minkä jälkeen ne maljattiin LA-maljoille (10 g/l Tryptoni; 5 g/l Hiivauute; 10 g/l NaCl; 15 g/l Agar), joihin oli lisätty 0,5 % w/v glukoosia, 25 µg/ml kloramfenikolia ja 10 µg tetrasykliiniä, ja kasvatettiin yön yli 37 °C:ssa. Maljalta siirrostettiin yksi klooni, jota kasvatettiin SB-mediumissa (30 g/l Tryptoni; 20 g/l Hiivauute; 10 g/l MOPS; pH 7,0), johon oli lisätty 1 % w/v glukoosia, 25 µg/ml kloramfenikolia ja 10 µg tetrasykliiniä, yön yli 37 °C:ssa 300 rpm:n ravistelussa. Kasvatuksesta eristettiin plasmidi-DNA käyttämällä GeneJET Plasmid

Miniprep-kittiä (Thermo Fisher) ”Protocol A. Plasmid DNA purification using centrifuges”-ohjeen mukaisesti sekä soluja säilöttiin -70 °C:een 16 % v/v glyserolissa. Plasmidierityksessä käytettiin Eppendorfin (Saksa) 5415 D-sentrifuugia 16100 g.

2.2.3 pLK06H-Fab- α NP-ppGFP:n kloonauk

ppGFP-geenikasetti kloonattiin pAK400-NB- α CH1-ppGFP-vektorista Turun Yliopistolta saatuun vakavaa hengitystieoireyhtymää aiheuttaman koronaviruksen (engl. *severe acute respiratory syndrome coronavirus*, SARS-CoV-2) nukleokapsidiproteiinia (N-proteiini) spesifisesti tunnistavan vasta-aineen antigeeniin sitoutuvan fragmentin (engl. *fragment antigen binding*, Fab) CR3009 (Van den Brink ja muut 2005) pLK06H-tuottovektoriin (Huovinen ja muut 2013). Molemmat vektorit digestoitiin HindIII-restriktioentsyymillä valmistajan ohjeen mukaisesti 90 min 37 °C:ssa, minkä jälkeen pLK06H-vektori defosforyloitiin itseligaation estämiseksi FastAP-entsyymillä valmistajan ohjeen mukaisesti, poikkeuksena inkuboitiin 1 h 37 °C:ssa. Digestoitu ppGFP-kasetti sekä linearisoitu pLK06H-tuottovektori eristettiin preparatiivesella 1 % w/v agarosigeelillä 1 h 80 V. Geelija tehtiin Bio-Radin PowerPac Basic-laitteella TAE-puskurissa (40 mM Tris; 20 mM Etikkahappo; 1 mM EDTA) ja geelin värjäyksessä käytettiin SYBR Safe DNA Gel Stain-väriainetta (Thermo Fisher) sekä lautauksessa 6X Orange Loading Dye-latausnestettä (Thermo Fisher). Leikatut geelit puhdistettiin käyttämällä GeneJET Gel Extraction-kittiä (Thermo Fisher) ”Protocol A. DNA extraction from the gel using centrifuge”-ohjeen mukaisesti. Sentrifugoinnissa käytettiin Eppendorfin 5415 D-sentrifuugia 16100 g. Geelipuhdisukset konstentroititiin Zymo Researchin DNA Clean & Concentrator-kitillä valmistajan ohjeen mukaisesti, minkä jälkeen ligaatio tehtiin T4 DNA-ligaasientsyymillä muuten valmistajan ohjeen mukaisesti, mutta ligaasientsyymien pitoisuus reaktiossa oli 0,125 Weiss U/ μ l sekä inkuboitiin 1 h huoneenlämmössä. Ligaasientsyymi lämpöinaktivoitiin 70 °C:ssa 5 min ennen transformaatiota. Transformaatio sekä sitä seuraavat vaiheet tehtiin kuten ”pAK400-NB- α CH1-ppGFP:n kloonauk”-osiossa sillä erotuksella, että maljauksessa ja kasvatuksissa kloramfenikolin ja tetrasykliinin sijasta käytettiin 100 μ g/ml ampicilliinia. Tämän lisäksi kasvatuksia tehtiin useammasta eri kloonista, joiden plasmidi-DNA:t myöhemmin sekvensoitiin (Macrogen, Etelä-Korea).

2.2.4 ppGFP-kasetin orientaation vaikutus tuottovektorissa

Esikasvatettiin pLK06H-Fab- α NP-ppGFP kloonin 1 ja 2 soluja, jotka erosivat ppGFP-kasetin orientaatiolla, 5 ml SB-mediumissa, johon oli lisätty 1 % w/v glukoosia sekä 100 μ g/ml ampicilliinia, yön yli 37 °C 300 rpm:n ravistelussa. Esikasvatuksesta inokuloitiin tuottokasvatukseen, joka koostui 5 ml SB-mediumista, johon oli lisätty 0,05 % glukoosia sekä 100 μ g/ml ampicilliinia, niin että optinen tiheys 600:n nm aallonpituudella (engl. *optical density*, OD) oli 0,05. Soluja kasvatettiin 37 °C:ssa 300 rpm:n ravistelussa, kunnes OD oli 0,6 – 0,8, minkä jälkeen proteiinintuotto indusoiittiin joko 0 μ M, 10 μ M tai 200 μ M IPTG:llä ja siirrettiin kasvamaan yön yli 26 °C:ssa 300 rpm:n ravistelussa. Tuottokasvatuksen solut pelletoitettiin sentrifugoimalla 4 °C:ssa, 10 min, 3220 g Eppendorfin Centrifuge 5810 R-sentrifugilla, minkä jälkeen supernatantti kaadettiin pois. Solupelletit suspentoitiin lyysispuskuriin (1 mg/ml lysosyymi (Alfa Aesar, Yhdysvallat); 25 U/ml Pierce Universal Nuclease For Cell Lysis (Thermo Fisher); 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄; 1,8 mM KH₂PO₄; pH 7,4) ja inkuboitettiin 30 min huoneenlämmössä rotaatiossa, minkä jälkeen solut rikottiin jäädyttämällä ja sulattamalla ne kolmesti: jäädytys -70 °C:ssa 15 min ajan ja sulatus kädenlämpöisessä vesihauteessa 5 min ajan. Tuotetut proteiinit erotettiin rikkoutuneesta solumassasta sentrifugoimalla 4 °C:ssa, 10 min, 16100 g Eppendorfin 5415 R-sentrifugilla ja ottamalla proteiinia sisältävä supernatantti talteen. Kasvatuksia toistettiin kolme kertaa erillisinä päivinä ja joka kasvatuksessa jokainen indusointi tehtiin kolmelle rinnakkaiselle kasvatukselle. Lysaatiot tehtiin samana päivänä kaikille kasvatuksille.

Lysaattien GFP-pitoisuus määritettiin mittaamalla fluoresenssia Hidexin (Suomi) Sense-levylukijalla ppGFP-ohjelmalla (485 nm:n 10 nm:n kaistanpäästö virityssuodatin, 535 nm:n 20 nm:n kaistanpäästö emissiosuodatin, 100 välähdystä ja 50 lampun teho) C12 Maxisorp-kuoppalevyltä (Thermo Fisher). Lysaattien 1:100 laimennoksia sekä GFP-standardiliuoksia (5 μ M; 2,5 μ M, 1,25 μ M; 625 nM; 312,5 nM; 156,25 nM; 78,125 nM ja nollanäyte) lisättiin triplikaatteina 100 μ l per kaivo.

Lysaattien Fab-fragmentin suhteellinen pitoisuus määritettiin mittaamalla Fab-fragmenttiin fuusioituneen alkalisen fosfaatin pitoisuus entsyymireaktiolla. C12 Maxisorp-kuoppalevylle lisättiin triplikaatteina lysaattien 1:1000 laimennosta entsyymireaktiopuskurissa (1 mg/ml p-nitrofenyyli-fosfaatti (MilliporeSigma, Saksa); 500 mM Tris; 200 mM NaCl; 10 mM MgCl₂; pH 9,0) 200 μ l per kaivo, minkä jälkeen inkuboitettiin levyravistelijassa huoneenlämmössä kevyessä ravistelussa 1 h ennen kuin

mitattiin 405 nm:n absorbanssi Wallacin (Suomi) Victor 1420 Multilabel Counter-mittalaitteella.

2.2.5 ppGFP-kasetin vaikutus kohdeproteiinin tuottoon ja funktionaalisuuteen

Kasvatus, lysaatio sekä lysaattien GFP-pitoisuuksien ja Fab-fragmenttien suhteellisten pitoisuuksien mittaus tehtiin kuten ”ppGFP-kasetin orientaation vaikutus tuottovektorissa”-osiossa on kuvattu, mutta kasvatus tehtiin pLK06H-Fab- α NP-ppGFP kloonin 1 sekä pLK06H-Fab- α NP:n soluille sekä induktio tehtiin 200 μ M IPTG:llä. Kasvatuksia toistettiin kolme kertaa erillisinä päivinä, mutta lysaatio tehtiin samana päivänä kaikille kasvatuksille.

Ensimmäisen toiston lysaattien Fab-fragmenttien funktionaalisuus määritettiin sitomalla biotinyloitua SARS-CoV-2-viruksen N-proteiinia (Turun Yliopisto) straptavidiinilla pinnoitetulle kuoppalevyn kaivoille (Kaivogen, Suomi) 13,8 nM 100 μ l määrityspuskurissa (Assay Buffer, Kaivogen) 30 min huoneenlämmössä kevyessä ravistelussa, minkä jälkeen kaivot pestiin neljästi pesupuskurilla (Wash Buffer, Kaivogen). Kaivoihin lisättiin 1:20 laimennosta lysaateista triplikaatteina 100 μ l per kaivo, ja lysaatin proteiini N:ää spesifisesti sitovien Fab-fragmenttien sitoutumista inkuboitii 30 min huoneenlämmössä kevyessä ravistelussa, minkä jälkeen kaivot pestiin neljästi pesupuskurilla. Tämän lisäksi lysaatteja lisättiin kaivoihin, joihin ei ollut sidottu biotinyloitua SARS-CoV-2-viruksen proteiini N:ää epäspesifisen sitoutumisen määrittämiseksi. Tämän jälkeen kaivoihin lisättiin 200 μ l entsyymireaktiopuskuria ja inkuboitii 1 h huoneenlämmössä kevyessä ravistelussa, minkä jälkeen mitattiin 405 nm:n absorbanssi Wallacin Victor 1420 Multilabel Counter-mittalaitteella. Kaivojen pesemisessä käytettiin Wallacin Delfia Platewash-levyepesuria.

2.2.6 ppGFP:n ja kohdeproteiinin tuoton seuraaminen

Kasvatettiin pLK06H-Fab- α NP-ppGFP:n kloonin 1 soluja kuten ”ppGFP-kasetin orientaation vaikutus tuottovektorissa”-osiossa on kuvattu, mutta tuottokasvatus tehtiin 100 ml SB-mediumissa, johon oli lisätty 0,05 % w/v glukoosia sekä 100 μ g/ml ampisilliinia. Tämän lisäksi kasvatukset tehtiin 250 rpm:n ravistelussa sekä induktio tehtiin 200 μ M IPTG:llä. Kohdeproteiinin ja ppGFP:n tuottoa seurattiin ottamalla 2

ml:n näytteitä tuottokasvatuksesta joka tunti 10 tunnin ajan, mukaan lukien ensimmäinen näyte, joka otettiin hetkeä ennen induktiota. Joka näytteestä mitattiin fluoresenssi C12 Maxisorp-kuoppalevyiltä triplikaatteina 200 µl per kaivo Hidexin Sense-levylukijalla ppGFP-ohjelmalla. Tämän lisäksi näytteestä mitattiin OD, ennen kuin se pakastettiin -20 °C. Kasvatus toistettiin kolme kertaa erillisinä päivinä, mutta kaikkien toistojen näytteiden lysaatiot tehtiin samana päivänä. Näytteiden lysaatio ja Fab-fragmentin suhteellisen pitoisuuden määrittäminen tehtiin kuten ”ppGFP-kasetin orientaation vaikutus tuottovektorissa”-osiossa, mutta soluja ei pelletoitu vaan näyte sekoitettiin suoraan lyysipuskuriin sekä näytteiden lysaatiot olivat 1:10 laimennoksia entsyymireaktiossa. Tämän lisäksi Fab-fragmenttien pitoisuuksien laskemiseksi lysaattien lisäksi entsyymireaktio tehtiin triplikaatteina saman Fab-fragmentin standardeille (100 nM; 50 nM; 25 nM; 12,5 nM; 6,25 nM; 3,125 nM; 1,5625 nM ja nollanäyte).

2.3 Panossyöttökasvatus

2.3.1 Fermentorin ja mittausaseman valmistelu

Panossyöttökasvatukset tehtiin 5 litran bioreaktorissa käyttäen BioFlo 3000-fermentoria. Kasvatukseen seuraamiseksi reaktorin kanteen liitettiin lämpö-, pH-, (TrupH, Finesse Solutions, Yhdysvallat), sekä DO-anturit (TruDO, Finesse Solutions). Fermentorin peristalttipumppuihin kytkettiin 1 litran syöttökasvatusliuos (400 g/l glukoosi; 50 mM MgSO₄; 25 µg/ml kloramfenikoli), 500 ml:n emäsluos (10 % v/v NH₄), 55 ml:n indusointiliuos (14,5 mM IPTG) sekä mittausaseman jatkuvatoimiseen kierrätykseen vaadittavat kaksi letkua.

2.3.2 pAK400-NB-αCH1-ppGFP:n panossyöttökasvatus

Esikasvatettiin siirrostamalla jäädytetyistä pAK400-NB-αCH1-ppGFP-tuottovektorin XL1-Blue *E. coli*-soluja 100 ml SB-mediumissa, johon oli lisätty 1 % w/v glukoosia, 25 µg/ml kloramfenikolia ja 10 µg tetrasykliiniä, yön yli 30 °C:ssa 250 rpm:n ravistelussa. Esikasvatuksesta inokuloitiin kolmeen 250 ml:n esikasvatusmediumia (6,7 g/l K₂HPO₄; 0,25 g/l KH₂PO₄; 1,2 g/l NaCl; 1,1 g/l K₂SO₄; 20 g/l hiivauute; 10 g/l (NH₄)₂SO₄; 0,013 g/l CaCl₂ · 2 H₂O; 0,15 g/l MgSO₄ · 7 H₂O; 10 g/l glukoosi; 25 µg/ml kloramfenikoli; pH 7,0) sisältävään pullokasvatukseen niin että seuraavana päivänä panossyöttökasvatuksen aloitettaessa jonkin pullon OD olisi 0,8 – 1.

Pullokasvatuksia kasvatettiin yön yli 26 °C:ssa, 28 °C:ssa ja 30 °C:ssa 250 rpm:n ravistelussa.

Panoskasvatusvaihe aloitettiin inokuloimalla koko 250 ml:n pullokasvatus (OD 1,2) 3,4 litralla puolisynteettisellä pääkasvatusmediumilla täytettyyn bioreaktoriin (6,7 g/l K₂HPO₄; 0,25 g/l KH₂PO₄; 1,2 g/l NaCl; 1,1 g/l K₂SO₄; 20 g/l hiivauute; 10 g/l (NH₄)₂SO₄; 0,013 g/l CaCl₂ · 2 H₂O; 10 mg/l FeSO₄ · 7 H₂O; 2,5 mg/l MnSO₄ · H₂O; 2,5 mg/l AlCl₃ · 6 H₂O; 1 mg/l CoCl₂; 0,5 mg/l ZnSO₄ · 7 H₂O; 0,5 mg/l Na₂MoO₄ · 2 H₂O; 0,25 mg/l CuCl₂ · 2 H₂O; 0,125 mg/l H₃BO₃; 0,15 g/l MgSO₄ · 7 H₂O; 10 g/l glukoosi; 25 µg/ml kloramfenikoli; pH 7,0).

Bioreaktorin lämpötilaksi asetettiin 30 °C, ilmastukseksi 4 l/min, sekoitusnopeudeksi 650 rpm, pH:ksi 7,0 ja DO:ksi 30 %. DO:ta säädettiin paineilmalla sekä puhtaalla hapella. Fermentoinnin ohjaukseen sekä seuraamiseen käytettiin Turun Yliopistossa kehitettyä BioRec-ohjelmaa. Syöttöliuoksen pumppaaminen bioreaktoriin aloitettiin manuaalisesti, kun huomattiin, että bioreaktorissa glukoosi oli loppunut enneaikaisesti eikä solujen hapenkulutus ollut kasvanut riittävän korkeaksi automaattisen syöttöliuoksen lisäämisen laukaisuksi. Syöttöliuoksen pumppausteho aloitettiin 8,3 %:lla, jota kasvatettiin kaavan 7 mukaisesti maksimitehoon 30 %:n saakka. Pumppaustehon arvo laskettiin uudestaan joka 10. minuutti.

$$P_{\text{syöttö}} = P_{\text{syöttö}} \cdot 2,7128^{\frac{1}{60}} \quad (7)$$

Indusointiliuosta pumpattiin 50 %:n teholla, ja se aloitettiin, kun syöttöliuoksen pumppausteho oli saavuttanut 20 %:ia. GFP-mittaukset aloitettiin 3 h 14 min inokuloinnin jälkeen. Mittauksessa anturina käytettiin µPMT:tä ja mittauksia tehtiin 8 minuutin välein. Fermentointi lopetettiin, kun solukuolemaan viittävä DO oli alkanut nousemaan.

2.3.3 pLK06H-Fab-αNP2-ppGFP:n panossyöttökasvatus

Panossyöttökasvatus tehtiin muuten samalla tavalla kuin pAK400-NB-αCH1-ppGFP:n panossyöttökasvatus, mutta soluina käytettiin Turun Yliopistolta saatuja XL1-Blue *E. coli* –soluja, joihin oltiin transformoitu pLK06H-Fab-αNP2-ppGFP-tuottovektori. Tämä tuottovektori oli muuten sama kuin kloonin 1 pLK06H-Fab-αNP-

ppGFP-tuottovektori, mutta Fab-fragmentin geeni oli vaihdettu uuteen paremmin SARS-CoV-2-viruksen N-proteiinia sitovan Fab-fragmentin geeniin. Tämän lisäksi pääkasvatusmediumissa käytettiin 20 g/l glukoosia sekä kaikissa mediuimeissa kloramfenikoli ja tetrasykliini oli vaihdettu 100 µg/ml karbenisilliiniin. Inokulointi tehtiin 250 ml:n pullokasvatuksella, jonka OD oli 1,7.

Kasvatus tehtiin 26 °C:ssa ja syöttöliuosta pumpattiin kaavan 7 mukaisesti, mutta aloitusteho oli 10,3 %:ia ja maksimiteho oli 32 %:ia. Indusointiliuoksen pumppauksen aloitus viivästyí glukoosin keräytymisen takia syöttövaiheen aikana, ja indusointi aloitettiin manuaalisesti vasta kun glukoosi oli kulunut bioreaktorista. Induktiohetkellä syöttökasvatusliuos vaihdettiin laimeampaan syöttöliuokseen (200 g/l glukoosi) ja ajanhetkellä 32 h se vaihdettiin vielä laimeampaan syöttöliuokseen (100 g/l glukoosi).

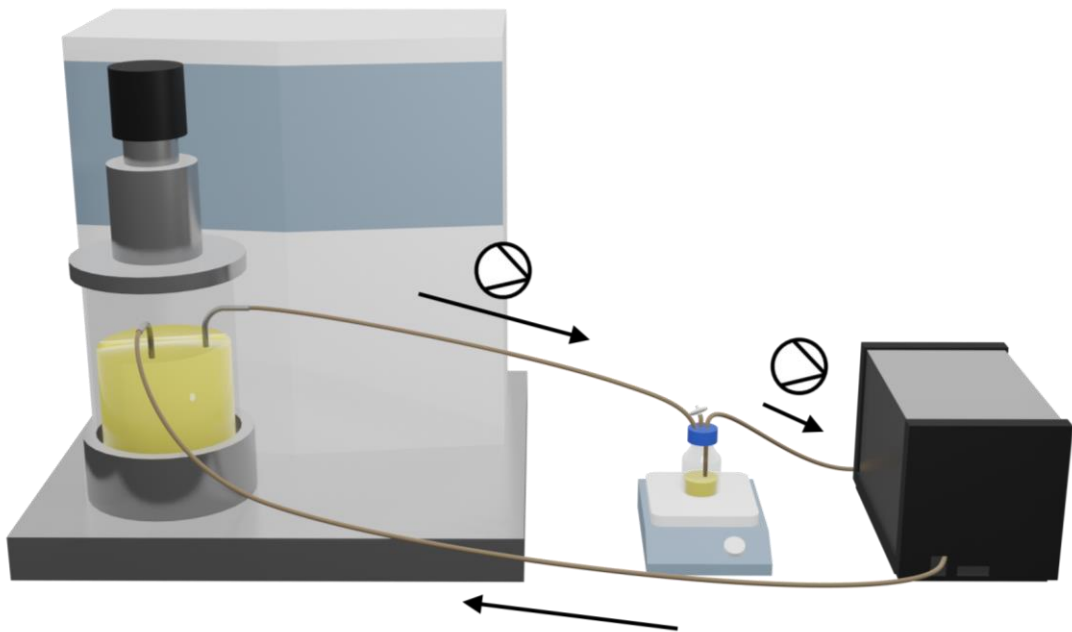
GFP-mittauksissa anturina käytettiin 8:n megapikselin kameramoduulia viritys- ja emissiosuodattimien kanssa. Joka mittauksessa otettiin kuva 5 sekunnin sekä 0,5 sekunnin valotusajalla dynaamisen alueen laajentamiseksi.

3 Tulokset

3.1 GFP:n mittaaminen

3.1.1 Kierrätysmenetelmä

Kuvassa 17 on esitetty kehitetty kierrätysmenetelmä GFP:n reaaliaikaista mittausta varten. Kierrätyksessä käytettiin kahta peristalttipumppua. Ensimmäisellä pumpulla kasvatusta siirrettiin bioreaktorista ilmakuplien poistavaan väliastiaan, josta ilmakuplia sisältämätöntä kasvatusta pumpattiin toisella peristalttipumpulla mittausaseman läpi takaisin bioreaktoriin.

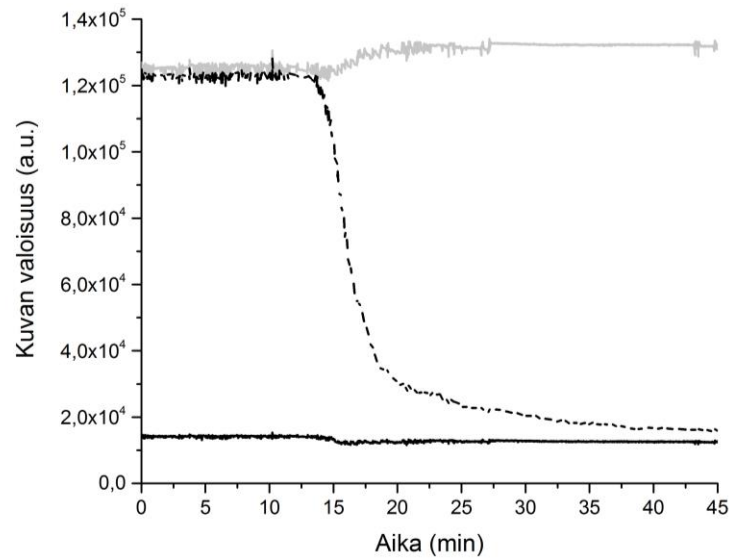


Kuva 17. Kasvatusliuoksen kierrätys. Kasvatusliuosta pumpattiin peristalttipumpun avulla ensin ilmakuplia poistavaan väliastiaan. Väliastia oli 250 ml:n mittapullo, joka oli magneettisekoittajan päällä. Ilma poistui pullosta korkissa olevan ilmasuodattimen kautta ja nestettä pumpattiin toisen peristalttipumpun avulla pullosta mittausaseman kautta takaisin bioreaktoriin.

3.1.2 Kierrätyksestä aiheutuva viive

Kuvassa 18 on esitetty kierrätyksestä aiheutuvan viiveen selvittämiseksi otetun videon kuva-analyysi. Positiivisen kontrolliputken kuvan valoisuus pysyi samalla tasolla koko kierrätyksen ajan, mutta negatiivisen kontrolliputken kuvan valoisuus alkoi kasvaa 15 minuutin kuluttua kierrätyksen aloituksesta. Bioreaktorissa oleva neste saavutti mittausaseman 15 minuutin jälkeen, mutta havaittiin, että ilmakuplien poistamiseen käytetty väliastia laimensi saapuvaa nestettä. Väliastiasta johtuva

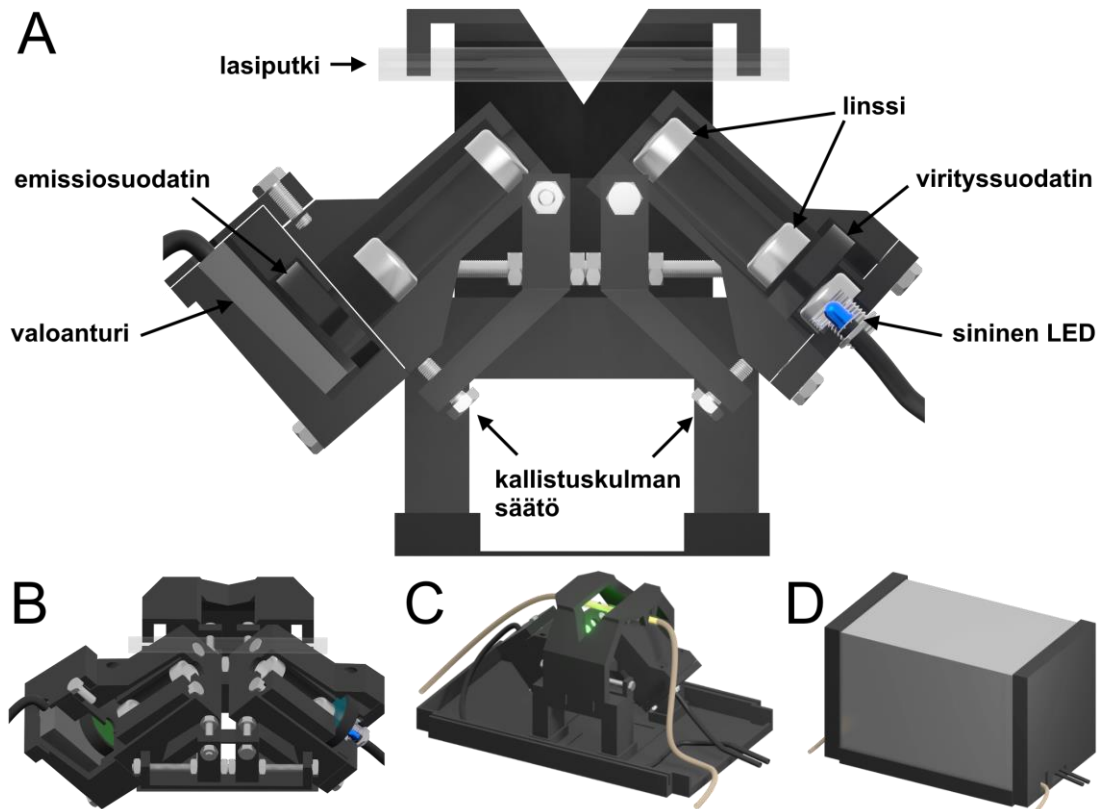
laimentuminen katsottiin hävinneen 38 minuutin kuluttua, jolloin lasiputken kuvan valoisuus ei enää muuttunut merkittävästi.



Kuva 18. Bioreaktorin ja mittausaseman välisen kierrätyksen viiveen selvitys kuva-analyysillä. Musta viiva on sinisellä väriaineella täytetyn lasiputken kuvan valoisuus. Harmaa viiva on vedellä täytetyn lasiputken kuvan valoisuus. Musta katkoviiva on bioreaktorista mittausasemaan kierrätettyyn lasiputken kuvan valoisuus.

3.1.3 Mittausasema

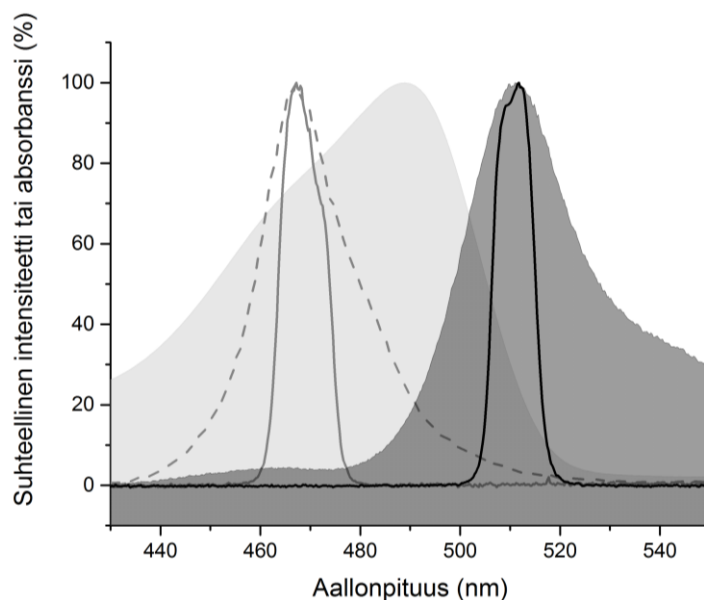
Kuvassa 19 on esitetty GFP:n fluoresenssin mittausta varten suunniteltu mittausasema. Mittausasemassa kasvatuksen kierrättämiseen käytetyt letkut ja niiden välissä oleva lasiputki oli mittalaitteen viritys- ja emissiomoduulien yläpuolella. Moduulien kohdistamiseksi mittausasema suunniteltiin niin että niitä pystyi liikuttamaan eteen- ja taaksepäin, sivuttaissuunnassa sekä muuttamaan niiden kallistuskulmaa. Koko mittausasema peitettiin suunnitellulla kannella, jonka avulla huoneen valaistuksesta mahdollisesti aiheutuva taustasignaali saatiin poistettua.



Kuva 19. Mittausaseman rakenne. Leikkauskuvat (A) sivusta ja (B) päältä katsottuna. Mittausasema suunniteltiin niin että viritys- ja emissiovalon moduuleja voitiin liikuttaa eteen ja taakse, sivuttaissuunnassa sekä muuttaa niiden kallistuskulmaa moduulin alaosaan kohdistuvalla ruuvilla, jotta ne voitiin asettaa osoittamaan lasiputken samaa pistettä. Valonsäteet kohdistettiin kahden linssin avulla. Kuvassa valoanturina μ PMT. (C) Viritys- ja emissiovalon moduulien päälle asetettava teline piti paikallaan kasvatuliuosta kierrättävän letkujen välissä olevaa lasiputkea. (D) Taustavalon poistamiseksi koko mittausasema peitettiin kannella, joka koostui 3D-tulostetuista sivuista ja alumiinilevystä.

3.1.4 Spektrien mittaus

Kuvassa 20 on esitetty GFP:n viritys- ja emissiospektrit, virityslähteenä käytetyn sinisen LEDin spektri, sekä viritys- että emissiosuodattimien spektrit. GFP:n viritysspekttrin absorbanssi on suurimmillaan 488 nm:n kohdalla (Chroma Technology 2020). LEDin spektri sijoittui 430 nm:n ja 530 nm:n välisen alueen sisälle, ja intensiteetti oli suurimmillaan 467 nm:n kohdalla. GFP:n emissiospektri sijoittui 480 nm:n ja 600 nm:n väliselle alueelle, ja intensiteetti oli suurimmillaan 510 nm:n kohdalla. Virityssuodattimella suodatettu LED-valon spektri sijoittui 466 nm:n ja 477 nm:n väliselle alueelle, ja intensiteetti oli suurimmillaan suodattamattoman LEDin intensiteettipiikin kanssa. Emissiosuodatin päästi lävitseen valoa 502 nm:n ja 519 nm:n väliseltä alueelta, joka sijoittui juuri GFP:n emissiopiikin kohdalle.

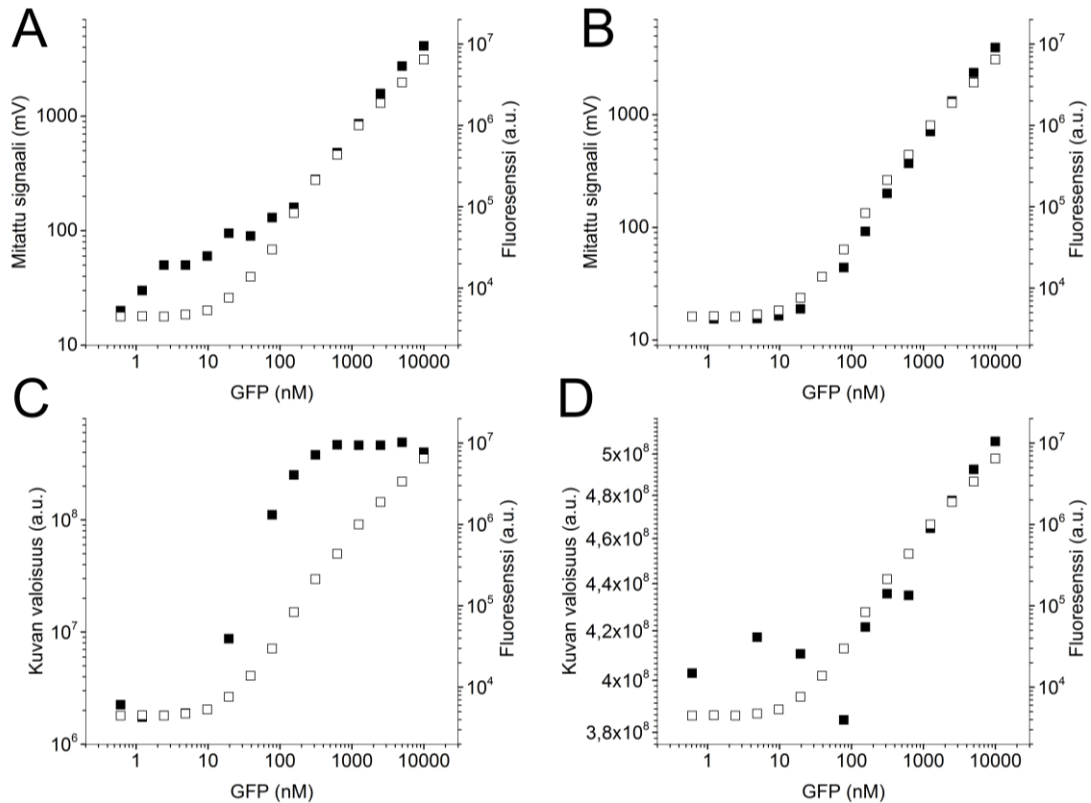


Kuva 20. GFP:n eksitaatio- ja virityspektri, mittalaitteen virityslähteenä käytetyn LEDin sekä viritys- ja emissiosuodattimien spektrit. Vaaleanharmaa alue on GFP:n virityspektri (Chroma Technology 2020). Tummanharmaa alue on GFP:n mitattu emissiospektri. Harmaa katkoviiva on virityslähteenä käytetyn sinisen LEDin spektri. Harmaa viiva on saman LEDin viritys- ja emissiosuodattimella (FB470-10, Thorlabs) suodatetun valon spektri. Musta viiva on emissiosuodattimen (FB510-10, Thorlabs) spektri.

3.1.5 Anturien vertailu

GFP:n havaitseminen onnistui kaikilla antureilla. Kuvassa 21 on esitetty fotodiodilla, μ PMT:llä sekä kameralla tehdyt GFP-standardisuoramittaukset, joita on vertailtu kaupalliseen Victor 1420 Multilabel Counter-mittalaitteeseen. Victor-mittalaitteen dynaaminen alue sijaitsi 10 μ M:n ja 9,8 nM:n välillä. Fotodiodimittauksessa dynaaminen alue sijaitsi 10 μ M:n ja 156,25 nM:n välillä (Kuva 21 A). 156,25 nM:ia alhaisempia GFP-pitoisuuksia mitattaessa huomattiin, että signaali laski mittaussijainkohdan suhteen, vaikka mitattiin samaa standardia, minkä takia tätä pitoisuutta alhaisempia pitoisuuksia ei voitu luotettavasti mitata. μ PMT-mittauksessa dynaaminen alue sijaitsi 10 μ M:n ja 19,5 nM:n välillä (Kuva 21 B). Kameramittauksessa, jossa käytettiin viritys- ja emissiosuodattimia, dynaaminen alue sijaitsi 312,5 nM:n ja 19,5 nM:n välillä (Kuva 21 C). Kameramittauksessa, jossa ei käytetty suodattimia, dynaaminen alue sijaitsi 10 μ M:n ja 312,5 nM välillä (Kuva 21 D). 625 nM:n ja 78 nM:n mittaukset poikkeasivat muiden standardien mittauksista. μ PMT- ja kameramittauksista jotkin standardipitoisuudet puuttuivat, koska

mittauksien aikana osa standardilasiputkeista särkyivät. Uusia standardilasiputkia ei valmistettu uudestaan mahdollisten eroavaisuuksien takia.



Kuva 21. Anturien vertailu Victor 1420 Multilabel Counter-mittalaitteeseen. Victor-mittalaitteen (\square) dynaaminen alue sijaitsi 9,8 nM:n ja 10 μ M:n välillä. (A) Fotodiodimittauksissa dynaaminen alue sijaitsi 156,25 nM:n ja 10 μ M:n välillä. (B) μ PMT-mittauksessa dynaaminen alue sijaitsi 19,5 nM:n ja 10 μ M:n välillä. (C) Kameramittauksessa, jossa käytettiin viritys- ja emissiosuodattimia, dynaaminen alue sijaitsi 19,5 nM:n ja 312,5 nM:n välillä. (D) Kameramittauksessa, jossa ei käytetty suodattimia, dynaaminen alue sijaitsi 312,5 nM ja 10 μ M:n välillä.

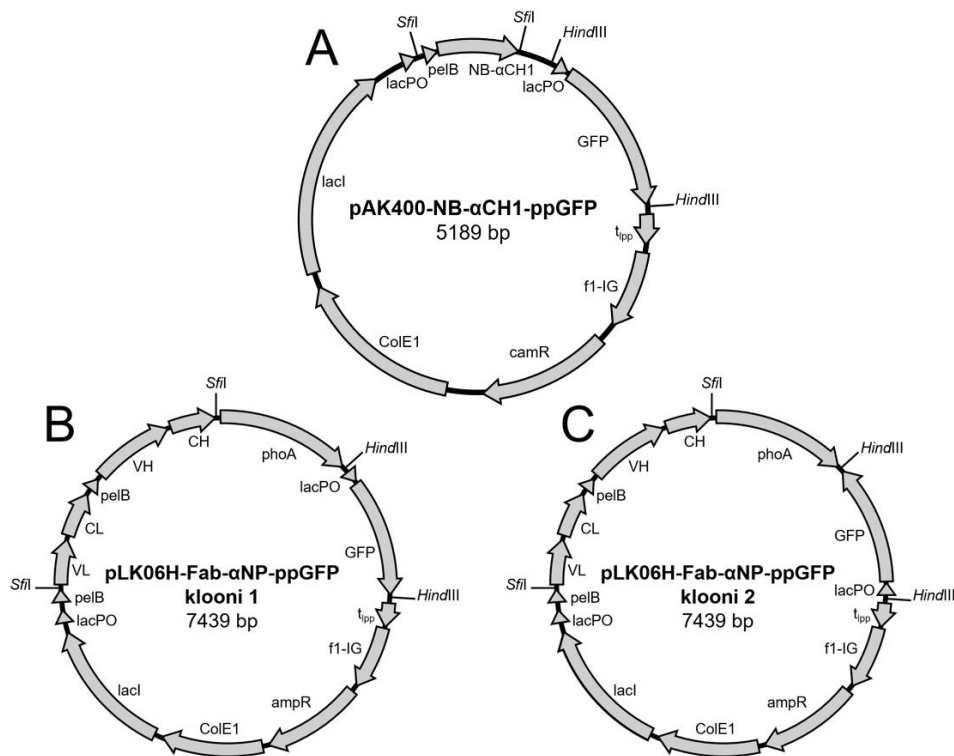
3.2 Konstrukti

3.2.1 Tuottovektorien kloonaukset

ppGFP-kasetti kloonattiin kahteen eri tuottovektoriin. pAK400-NB- α CH1-ppGFP-tuottovektorilla tuotettiin ihmisen IgG-vasta-aineen CH1-domeenia sitovaa nanobodya. Se koostui ColE1-replikaation aloituskohdasta, kloramfenikoli-resistenttiydestä, lacI-repressoriproteiinia koodaavasta geenistä sekä tuotto proteiinia ja GFP:tä koodaavista geneistä, joilla oli omat lacPO:t (Kuva 22 A). pLK06H-Fab- α NP-ppGFP-tuottovektorilla tuotettiin alkalisella fosfataasilla fuusioitua SARS-CoV-2-viruksen N-proteiinia spesifisesti tunnistavaa Fab-fragmenttia (Fab-AP). ppGFP-kasetti kloonattiin tähän tuottovektoriin kumpaankin DNA-juosteeseen, jotta kasetin

orientaation merkitystä voitaisiin tutkia; kloonissa 1 ppGFP-kasetti on samassa juosteessa kuin tuottoproteiinin geeni ja kloonissa 2 kasetti on eri juosteessa. Tuottovektori koostui ColE1-replikaation aloituskohdasta, ampicilliini-resistenttiydestä, lacI-repressoriproteiinin geenistä sekä Fab-AP:n ja GFP:n geneistä, joilla oli omat lacPO:t (Kuva 22 B-C).

pLK06H-Fab- α NP-ppGFP-tuottovektoria oli kahta eri tyyppiä ja ne nimettiin klooneiksi 1 ja 2. Kloonissa 1 ppGFP-kasetti oli samassa juosteessa kuin tuottoproteiinin geeni (Kuva 22 B), ja kloonissa 2 kasetti oli eri juosteessa (Kuva 22 C).

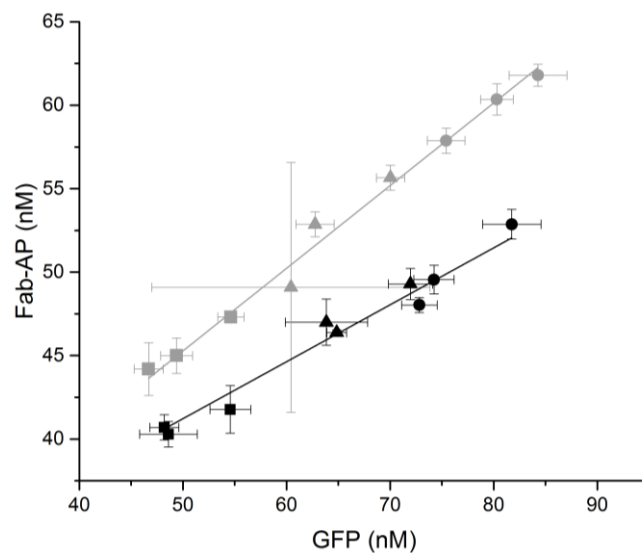


Kuva 22. Kloonatut tuottovektorit. Kaikki tuottovektorit sisälsivät lacI-repressoriproteiinin geenin, kohdeproteiinia periplasmaan ohjaavan pelB-signaalisekvenssin, ColE1-replikaation aloituskohdan, antibioottiresistenttiyden, f1-filamenttifaagin intergeenisen alueen (f1-IG), lipoproteiinin transkription lopetuskohdasta (t_{pp}). Tuottoproteiinin geeni, jota ohjattiin omalla lacPO:lla, oli kloonattu SfiI-restriktioentsyymillä ja ppGFP-kasetti, joka koostui GFP:n geenistä ja sitä ohjaavasta lacPO:sta oli kloonattu HindIII-restriktioentsyymillä. (A) pAK400-NB- α CH1-ppGFP-tuottovektori oli kloramfenikolille resistentti (camR) ja tuottoproteeinina oli ihmisen IgG-vasta-aineen CH1-domeenia sitova nanobody. pLK06H-Fab- α NP-ppGFP-tuottovektori oli ampicilliinille resistentti (ampR) ja tuottoproteiinin geeni oli alkalifosfaasilla (phoA) fuusioitu SARS-CoV-2-viruksen N-proteiinia spesifisesti sitova Fab-fragmentti (VL-, CL-, VH- ja CH-domeenit). (B) Kloonissa 1 ppGFP-kasetin promoottori oli samansuuntainen kuin Fab-fragmentin geenin promoottori ja (C) kloonissa 2 ppGFP-kasetin promoottori luettiin eri suuntaan kuin Fab-fragmentin promoottori.

3.2.2 ppGFP-kasetin orientaation vaikutus tuottovektorissa

Kuvassa 23 on esitetty pLK06H-Fab- α NP-ppGFP-tuottovektorin kloonien 1 ja 2 tuottoproteiinin eli Fab-AP:n tuottotaso GFP:n tuottotason funktiona 0, 10 ja 200 μ M:n IPTG:n indusointipitoisuuksilla. Kloni 1 tuotti jokaisella indusointipitoisuudella enemmän Fab-AP:ta kuin kloni 2. Ilman indusointia kloni 1 tuotti keskimäärin Fab-AP:ta 44,2 nM:sta 47,3 nM:iin ja GFP:tä 46,7 nM:sta 54,6 nM:iin. 10 μ M:n IPTG-indusointipitoisuudella kloni 1 tuotti keskimäärin Fab-AP:ta 49,1 nM:sta 55,6 nM:iin ja GFP:tä 60,4 nM:sta 70,0 nM:iin. 200 μ M:n indusointipitoisuudella kloni 1 tuotti keskimäärin Fab-AP:ta 57,8 nM:sta 61,8 nM:iin ja GFP:tä 75,4 nM:sta 84,3 nM:iin. Kloonin 1 sovitettu yhtälö oli muotoa $y = 0,495x + 20,5$ ja sen korrelaatiokerroin oli 0,992.

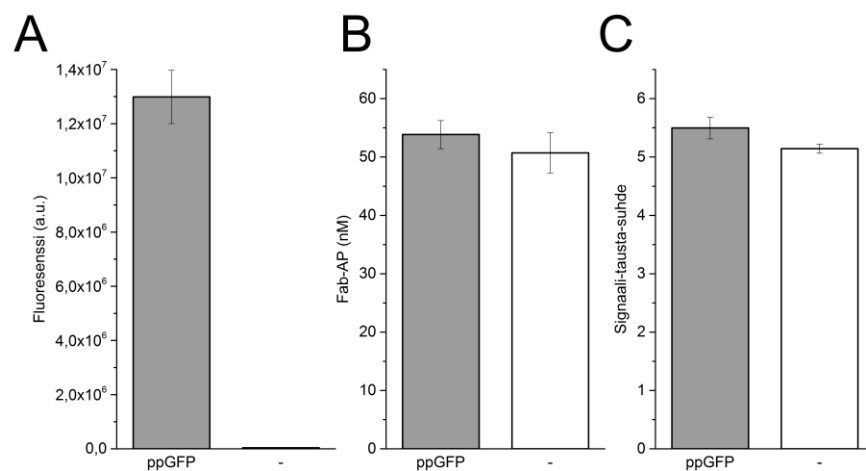
Kloni 2 tuotti ilman indusointia keskimäärin Fab-AP:ta 40,3 nM:sta 41,8 nM:iin ja GFP:tä 48,2 nM:sta 54,6 nM:iin. 10 μ M:n indusoinnilla kloni 2 tuotti keskimäärin Fab-AP:ta 46,4 nM:sta 49,3 nM:iin ja GFP:tä 63,8 nM:sta 72,0 nM:iin. 200 μ M:n indusoinnilla kloni 2 tuotti keskimäärin Fab-AP:ta 48,0 nM:sta 52,9 nM:iin ja GFP:tä 72,8 nM:sta 81,7 nM:iin. Kloonin 2 sovitettu yhtälö oli muotoa $y = 0,341x + 24,2$ ja sen korrelaatiokerroin oli 0,961.



Kuva 23. ppGFP-kasetin orientaation vaikutus tuottovektorissa. Tuottovektorissa kloni 1, jossa ppGFP-kasetti oli samassa juosteessa kuin tuottoproteiinin geeni on kuvattu harmaalla värillä, ja tuottovektorissa kloni 2, jossa ppGFP-kasetti oli eri juosteessa on kuvattu mustalla värillä. Proteiinintuotto indusoiittiin 0 μ M (\square), 10 μ M (Δ) ja 200 μ M IPTG:llä (\circ). Kloonin 1 sovitettu yhtälö oli muotoa $y = 0,495x + 20,5$ ja sen korrelaatiokerroin oli 0,992. Kloonin 2 sovitettu yhtälö oli muotoa $y = 0,341x + 24,2$ ja sen korrelaatiokerroin oli 0,961.

3.2.3 ppGFP-kasetin vaikutus kohdeproteiinin tuottoon ja funktionaalisuuteen

ppGFP-kasetti ei vaikuta negatiivisesti kohdeproteiinin tuottoon eikä funktionaalisuuteen. Kuvassa 24 on esitetty pLK06H-Fab- α NP-tuottovektorilla ppGFP-kasetin kanssa ja ilman tehdyt tuottokasvatusten tulokset. ppGFP-kasetilla tehdyn kasvatuksen lyaatin fluoresenssi oli noin 330-kertainen ilman ppGFP-kasettia sisältävään tuottovektorin kasvatuksen lyaattiin verrattuna (Kuva 24 A). ppGFP-kasetilla tehty kasvatusta tuotti Fab-AP:ta keskimäärin 53,8 nM ja ilman kasettia tehty kasvatusta tuotti Fab-AP:ta keskimäärin 50,7 nM (Kuva 24 B). Molempien kasvatusten Fab-AP:t olivat funktionaalisia; ppGFP-kasetin Fab-AP:n signaali-tausta-suhde oli keskimäärin 5,5 ja ilman kasettia tehdyn kasvatuksen Fab-AP oli 5,1 (Kuva 24 C).

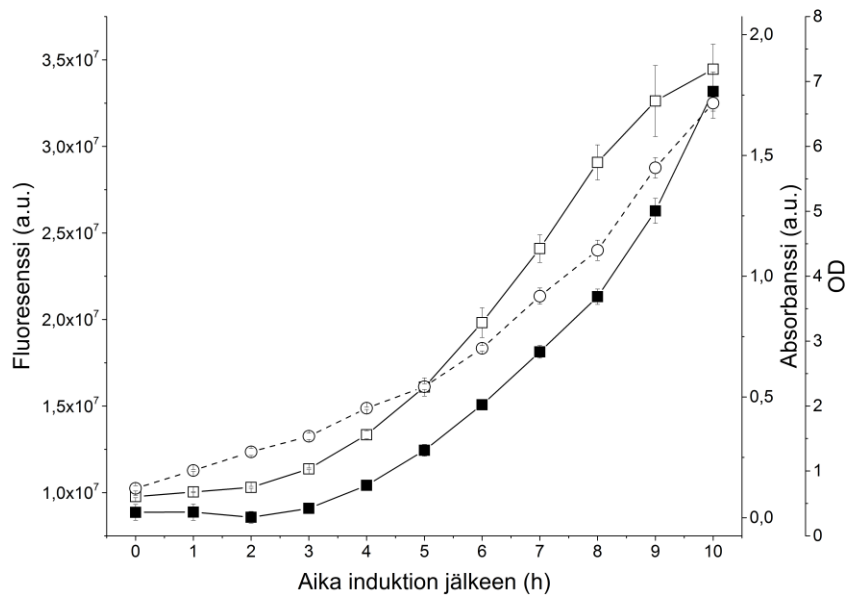


Kuva 24. ppGFP-kasetin vaikutus pLK06H-Fab- α NP-tuottovektorin tuottoon. Harmaalla on kuvattu ppGFP-kasetin sisältävää tuottovektoria ja valkoisella ilman ppGFP-kasettia sisältävää tuottovektoria. (A) ppGFP-kasetilla tehdyn kasvatuksen lyaatin fluoresenssi oli noin 330-kertainen. (B) ppGFP-kasetilla tehty kasvatusta tuotti Fab-AP:ta keskimäärin 53,8 nM ja ilman kasettia tehty kasvatusta tuotti Fab-AP:ta keskimäärin 50,7 nM. (C) Molempien kasvatusten Fab-AP:t olivat funktionaalisia; ppGFP-kasetin Fab-AP:n signaali-tausta-suhde oli keskimäärin 5,5 ja ilman kasettia tehdyn kasvatuksen Fab-AP oli 5,1.

3.2.4 ppGFP:n ja kohdeproteiinin tuoton seuraaminen

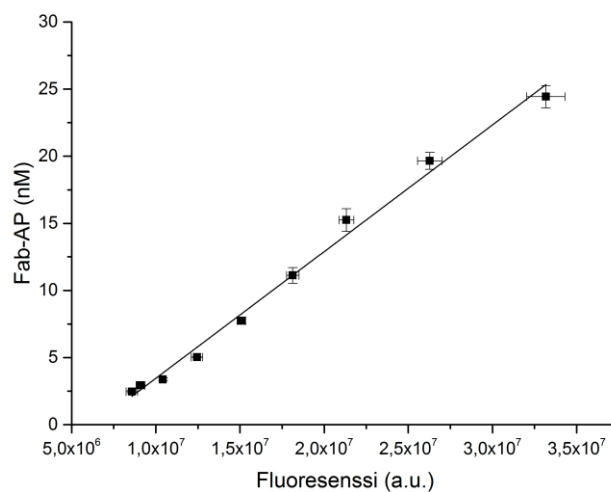
pLK06H-Fab- α NP-ppGFP kloonin 1 tuottokasvatusta seurattiin 10 tunnin ajan induktiosta määrittämällä joka tunnin välisen aikapisteen OD, fluoresenssi sekä suhteellinen tuottoproteiinin eli Fab-AP:n pitoisuus (Kuva 25). OD oli induktiohetkellä keskimäärin 0,7 ja 10 tunnin jälkeen se oli kasvanut OD:seen 6,6. Fab-AP:sta johtuva absorbanssi alkoi kasvaa heti induktion jälkeen, mutta selkeä eksponentiaalinen kasvu alkoi vasta kahden tunnin jälkeen ja jatkui 8:aan tuntiin saakka, minkä jälkeen kasvu alkoi hidastua. Reaaliaikainen fluoresenssi ei kasvanut

ensimmäisen kahden tunnin aikana, vaan alkoi kasvaa eksponentiaalisesti vasta kahden tunnin jälkeen induktiosta.



Kuva 25. Fluoresenssin ja Fab-AP-tuottoproteiinin tuoton seuranta. IPTG-induktion jälkeen seurattiin kasvatuksen fluoresenssia (■), tuottoproteiinista riippuvaa absorbanssia (□) sekä OD:ta (○).

Kuvassa 26 on esitetty tuottokasvatuksen fluoresenssisignaalin ja tuotetun Fab-AP:n välinen korrelaatio. Tuotetun Fab-AP:n pitoisuus laskettiin absorbanssiarvoista standardikäyrän avulla (ei esitetty) ja fluoresenssisignaalia siirrettiin kahdella tunnilla taaksepäin. Sovitettu yhtälö oli muotoa $y = 9,44 \times 10^{-7}x - 5,98$ ja sen korrelaatiokerroin oli 0,991.



Kuva 26. Fluoresenssisignaalin ja tuotetun Fab-AP:n välinen korrelaatio. Fluoresenssisignaalin arvoja siirretty kahdella tunnilla taaksepäin. Sovitettu yhtälö oli muotoa $y = 9,44 \times 10^{-7}x - 5,98$ ja sen korrelaatiokerroin oli 0,991.

3.3 Panossyöttökasvatus

Mittalaitteen ja ppGFP-kasetin toimivuutta testattiin tekemällä kaksi panossyöttökasvatusta, jotka erosivat sekä tuottoproteiinilla että mittalaitteen valoanturilla (Kuva 27 A-B).

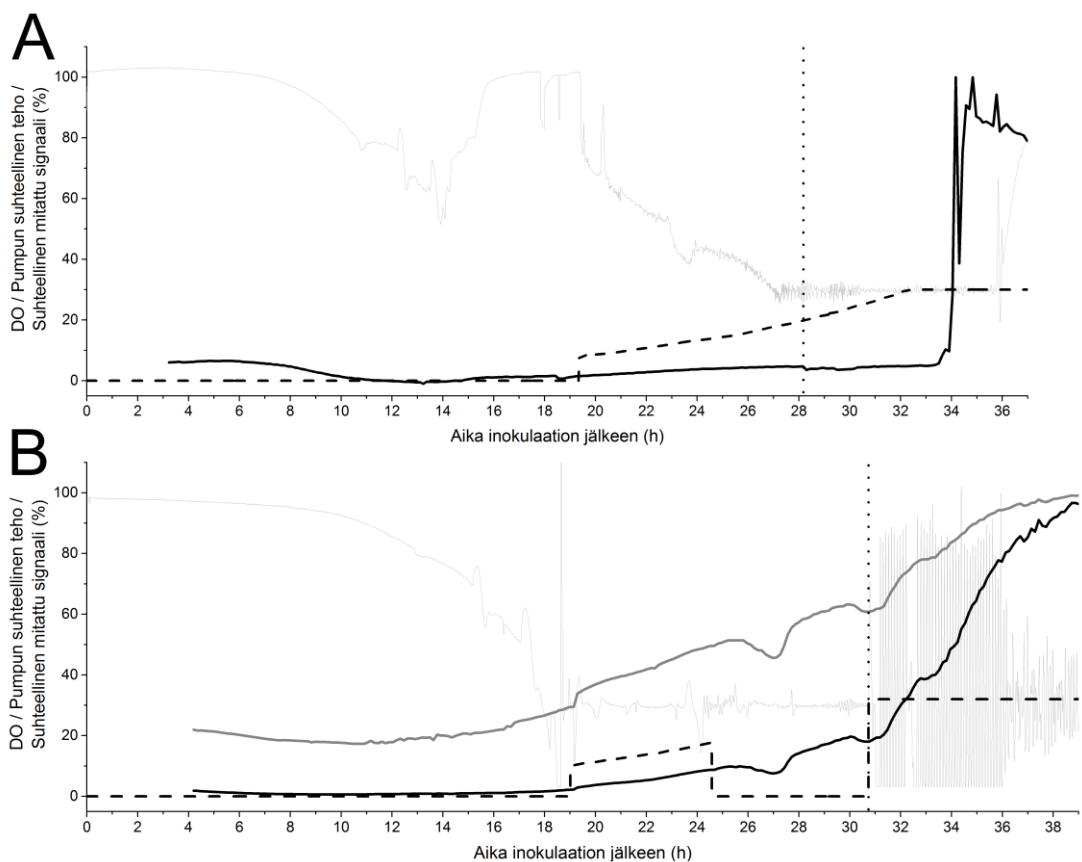
3.3.1 pAK400-NB- α CH1-ppGFP:n panossyöttökasvatus

pAK400-NB- α CH1-ppGFP-tuottovektorilla tehdyssä panossyöttökasvatuksessa tuottoproteiinina oli ihmisen IgG-vasta-aineen CH1-domeenia spesifisesti sitova nanobody sekä anturina käytettiin μ PMT:tä. DO laski 100 %:sta 52 %:iin ensimmäisten 14 h aikana, minkä jälkeen DO nousi takaisin kasvatuksen alussa olevalle tasolle. Kasvatuksen syöttövaihe aloitettiin manuaalisesti 19 h 21 min kasvatuksen aloituksesta. Syöttöliuoksen pumppaus aloitettiin 8,3 % teholla ja pumppaustehoa kasvatettiin hitaasti 32 h 21 min saakka, minkä jälkeen syöttöliuosta pumpattiin kasvatuksen lopetukseen asti 30 % teholla. DO alkoi laskea uudestaan kasvatuksen syöttövaiheessa ajanhetkellä 19 h 25 min, ja 27 h se saavutti 30 %:in, jossa se pysyi 35 h 48 min saakka, minkä jälkeen DO lähti nousuun ja kasvatus lopetettiin. Tuottoproteiinin ja GFP:n tuotto indusoitiin IPTG:llä 28 h 22 min kasvatuksen aloituksesta. Mittalaitteen signaali alkoi laskea 5 h 45 min kohdalla, kunnes 13 h 53 min kohdalla signaali alkoi nousta hitaasti. Ajanhetkellä 33 h 30 min signaali lähti selvään nousuun, minkä jälkeen signaalitaso pysyi kasvatuksen lopetukseen saakka korkealla tasolla, vaikka lopussa signaali lähtikin takaisin laskuun.

3.3.2 pLK06H-Fab- α NP2-ppGFP:n panossyöttökasvatus

pLK06H-Fab- α NP2-ppGFP-tuottovektorilla tehdyssä panossyöttökasvatuksessa tuottoproteiinina oli SARS-CoV-2-viruksen N-proteiinia spesifisesti tunnistava Fab-fragmentti, sekä mittalaitteen valoanturina käytettiin 8:n megapikselin kameramoduulia. DO laski kasvatuksen aloituksen 100 %:sta 3,2 %:iin ajanhetkellä 18 h 37 min, minkä jälkeen se asettui noin 30 %:iin. Kasvatuksen syöttövaihe aloitettiin 19 h, kun glukoosi oli loppunut pääkasvatusmediumista. Syöttöliuoksen pumppaus aloitettiin 10,3 % teholla ja pumppaustehoa kasvatettiin hitaasti 24 h 35 min saakka, jolloin huomattiin, että bioreaktoriin oli alkanut kertyä glukoosia, minkä takia syöttöliuoksen pumppaaminen lopetettiin. Ajanhetkellä 30 h 45 min kertynyt glukoosi oli kulutettu, ja syöttöliuoksen pumppausta jatkettiin 32 %:n teholla. DO:n

arvo alkoi heittelehtiä voimakkaasti ajanhetkestä 30 h 45 min ajanhetkeen 36 h, minkä jälkeen heittelehtiminen vaimeni, mutta jatkui kuitenkin kasvatuksen loppuun asti. IPTG-induktio tehtiin ajanhetkellä 30 h 45 min. Mittalaitteen kameramoduulilla otettiin kuvia 500 ms ja 5 s valotusajoilla. Mittalaitteen fluoresenssisignaalin erot näkyivät paremmin 5 sekunnin valotusajan mittauksissa 28 h saakka, minkä jälkeen signaalierot alkoivat näkyä paremmin 500 ms:n mittauksissa. Mittalaitteen signaali laski 11 h saakka, minkä jälkeen signaali alkoi nousta hitaasti. Ajanhetkellä 19 h 17 min signaali alkoi kasvaa hieman voimakkaammin ajanhetkeen 25 h 45 min saakka. Ajanhetkellä 31 h 45 min fluoresenssisignaali alkoi kasvaa entistä voimakkaammin ja 36 h jälkeen signaalin kasvu alkoi heiketä.



Kuva 27. ppGFP-kasetin ja mittalaitteen testaus panossyöttökasvatuksessa. Kuvaajissa vaaleanharmaa viiva on DO:n suhteellinen pitoisuus, katkoviiva on syöttöliuoksen pumpun suhteellinen teho, musta viiva on mittalaitteen suhteellinen signaali ja pystysuora pisteviiva on IPTG-induktion ajanhetki. (A) pAK400-NB- α CH1-ppGFP-tuottovektorilla tehdyssä kasvatuksessa tuotettiin ihmisen IgG-vasta-aineen CH1-domeenia spesifisesti sitovaa nanobodya sekä mittalaitteen valoanturina käytettiin μ PMT:tä. (B) pLK06H-Fab- α NP2-ppGFP-tuottovektorilla tehdyssä kasvatuksessa tuotettiin SARS-CoV-2-viruksen N-proteiinia spesifisesti tunnistavaa Fab-fragmenttia sekä mittalaitteen valoanturina käytettiin 8:n megapikselin kameramoduulia. Musta viiva on 500 ms:n valotusajan signaali ja harmaa viiva on 5 sekunnin valotusajan signaali.

4 Pohdinta

Tässä työssä kehitetty GFP-anturi päätettiin toteuttaa kierrätysmenetelmällä pääasiassa kahdesta syystä. Ensimmäiseksi käytössämme olevassa bioreaktorin kannessa ei ollut tilaa Jonesin (2004) tai Sunin (2004) työryhmien kaltaiselle toteutukselle, jossa valokuitunippu oli sijoitettu bioreaktorin sisään. Tämän lisäksi tämänkaltaisessa mittaamisessa haittana on sekoituksesta ja ilmastuksesta johtuva suuri hajonta mitatussa fluoresenssisignaalisissa. Sama ongelma tulee vastaan kierrätysmenetelmässä, jos ilmastuksesta aiheutuvia ilmakuplia ei poisteta ennen mittausta. Tämän lisäksi haluttiin mahdollisuus uusien anturien liittämiselle kehitetyn mittausaseman jatkeeksi, mikä on helposti tehtävissä kierrätysmenetelmässä.

Kirjallisuudessa kierrätysmenetelmää käytetyissä julkaisuissa ilmakuplat on poistettu Coppellan (1990) kehittämällä ratkaisulla, jossa ilma ja neste erotettiin kasvatusta kuljettavan letkun usealla haarautumisella. Työntekohetkellä käytössämme ei kuitenkaan ollut letkun haarautumista mahdollistavia kappaleita, minkä takia ratkaisumme poikkesi kyseessä olevasta toteutuksesta. Menetelmässämme ilmakuplat poistettiin niin, että ensin ilmakuplia sisältävää kasvatusta pumpattiin peristalttipumpun avulla 250 ml:n mittapulloon, jonka sisältävää nestettä sekoitettiin magneettisekoittajalla jatkuvatoimisesti. Sekoitus tehtiin solumassan sedimentoitumisen estämiseksi. Mittapullon korkissa oli ilmasuodatin, jonka kautta kasvatuksesta tullut ilma pääsi poistumaan. Pullosta pumpattiin nestettä kertyneen nesteen nestepinnan alapuolelta toisella peristalttipumpulla mittausaseman kautta takaisin bioreaktoriin. Tämän ratkaisun ongelmana oli kertyvän nesteen säätely, mikä johtui mittapulloon tulevan nesteen vaihtelevasta ilmapitoisuudesta. Jos nestettä kertyy liikaa, vaarana on kasvatuksen vuotaminen, ja jos nestettä kertyy liian vähän, mittausasemaan vievä letku täyttyy ilmalla. Nestepinnan säätelystä teki erityisen haastavaksi se, että kasvatusta tehtiin yön yli, jolloin ei ollut ketään, joka voisi valvoa nestepintaa. Toisessa panosyöttökasvatuksessa mittapullon ilmasuodatin korvattiin letkulla, joka yhdistettiin bioreaktoriin. Tämä poisti vaaran nesteen liiallisesta kertymisestä, sillä mikäli nestettä kertyisi liikaa se palaisi takaisin bioreaktoriin.

Mittalaitteen virityslähteeksi valittiin sininen LED sen edullisuuden sekä helpon saatavuutensa takia. Kostov työryhmineen (2000) käyttivät myös UV-valon LEDiä, joka oli parempi veteenliuotettujen matalien GFP-pitoisuuksien mittaamisessa, mutta saturoitui aikaisemmin siniseen LEDiin verrattuna. Tämän lisäksi pelkkää LB-

mediumia mitattaessa UV-LEDin signaali oli 11,8-kertaa suurempi siniseen LEDiin verrattuna, mikä johtuu UV-valosta johtuvasta korkeammasta autofluoresenssista. Tässä työssä käytetyn sinisen LEDin intensiteetti- ja sijaitsi 467 nm:n kohdalla, joka sijoittui GFP:n viritussyktrin alueelle, jossa absorbanssi on noin 75 %. Viritussyuodattimeksi valittiin LEDin intensiteetti- ja sijaitsi 470 nm:n 10 nm:n kaistanpäästösuoatatin, kuten Kostov työryhmineen (2000) sinisellä LEDillä mitattaessa. GFP:n emissiovalo oli suurimmillaan 510 nm:n kohdalla, minkä takia emissiosuoatattimeksi valittiin 510 nm:n 10 nm:n kaistanpäästösuoatatin. Viritys- ja emissiosuoatattimien valoa läpipäästävien kaistojen välinen aallonpituusero oli 18 nm:ia, minkä ansiosta valoanturille ei päässyt taustasignaalia aiheuttavaa viritysvaloa.

Valoanturivertailussa μ PMT suoriutui parhaiten ja sen dynaaminen alue oli hyvin samankaltainen kaupallisen Victor 1420 Multilabel Counter-mittalaitteen kanssa. 8:n megapikselin kamera suoriutui toiseksi parhaiten, kun mittauksessa käytettiin viritys- ja emissiosuoatattimia. Kameran lopullinen herkkyys jäi kuitenkin epäselväksi, sillä 9,8 nM:n GFP-standardinäyte oli särkynyt, minkä takia se puuttui mittauksesta. Kuvaajasta voidaan kuitenkin päätellä, että kameran herkkyys sijaitsee jossain 9,8 nM:n ja 19,5 nM:n välillä. Kameralla ilman viritys- ja emissiosuoatattimia tehdyssä mittauksessa herkkyys oli huonoin. 78 nM:n ja 625 nM:n mittauksissa signaalit olivat normaalia alhaisempia, mikä johtui todennäköisesti lasiputksessa olevista ilmakuplista. Fotodiodin herkkyys ei ollut yhtä hyvä kuin μ PMT:n tai kameran herkkyudet. Valoanturien vertailumittaukset tehtiin työn alussa, ja vahvistuspiirin kytkennät oli tehty koekytkentäalustalle hyppylangoilla ilman kunnollista häiriönpoistoa, mistä todennäköisesti johtui fotodiodimittauksessa alhaisia GFP-pitoisuuksia mitattaessa esiintynyt laskeva signaali. Aikarajoituksista johtuen mittauksia ei toistettu, sillä yksittäisten standardiliuoslasiputkien sekä etenkin valoanturien vaihtaminen oli todella aikaavievää, minkä takia kuvaajista puuttuu keskijajonta. Tämän lisäksi antureiden suorituskykyä ei alettu optimoimaan ajanpuutteen takia. Antureiden herkkyksiä sekä dynaamisia alueita olisi varmasti voitu parantaa, sillä Kostov työryhmineen (2000) saavuttivat 19 nM:n herkkyuden fotodiodilla. Toisaalta heidän ratkaisussaan mittaus tehtiin tasakylkisestä läpivirtauskvartsi- ja sijaitsi, mikä helpottaa huomattavasti viritys- ja emissiovalojen kohdistusta. Käytössämme ei kuitenkaan ollut tämänlaista läpivirtauskyvettä ja sen korkean hinnan takia sellaista ei hankittu, vaan mittaukset päätettiin tehdä hyvin edullisesta lasisesta Pasteur-pipetistä.

Tuottovektoreita valmistettiin yhteensä kolme kappaletta, joissa sekä tuottoproteiinilla että ppGFP-kasetilla oli omat lacPO:t. Kaksoispromoottorilla varmistettiin, että tuottoproteiinin ja GFP:n geenejä säädeltiin yhtä voimakkaasti, kuten Tan ja hänen työryhmänsä (2020) tekivät tuottaessaan aminolevulinaattisyntaasia *E. colissa*. pAK400-NB- α CH1-ppGFP-tuottovektorilla tuotettiin ihmisen IgG-vasta-aineen CH1-domeenia sitovaa nanobodya. Tässä vektorissa ppGFP-kasetti oli samassa juosteessa kuin nanobodyn geeni. pLK06H-Fab- α NP-ppGFP-tuottovektorilla tuotettiin alkalisella fosfataasilla fuusioitua SARS-CoV-2-viruksen N-proteiinia spesifisesti tunnistavaa Fab-fragmenttia. Tätä vektoria oli kahta eri varianttia: kloonissa 1 ppGFP-kasetti oli samassa juosteessa kuin Fab-AP:n geenit, ja kloonissa 2 ppGFP-kasetti oli eri juosteessa. Dąbrowski työryhmineen (1999) sekä Jones työryhmineen (2004) käyttivät myös lacPO:ta GFP-anturin tuottoproteiinin geenin säätelyssä, kun taas muut käyttivät arabinoosipromoottoria (Randers-Eichorn ja muut 1997; DeLisa ja muut 1999; Kostov ja muut 2000; Lu ja muut 2002). Dąbrowskin ja hänen työryhmänsä (1999) tuottovektorissa tuotettiin ihmisen proinsuliinia sekä GFP:tä, mutta molemmat olivat saman lacPO:n alaisuudessa. Jones ja hänen työryhmänsä (2004) toteutuksessa GFP oli fuusioitu mainitsemattomaan tuottoproteiiniin. Arabinoosipromoottoria käyttäneistä vain DeLisa työryhmineen (1999) tuottivat GFP:n lisäksi erillistä tuottoproteiinia, joka heidän tapauksessaan oli kloramfenikoliasetyylitransferaasi. Sekä GFP että kloramfenikoliasetyylitransferaasi olivat molemmat saman arabinoosipromoottorin alaisuudessa.

pLK06H-Fab- α NP-ppGFP-tuottovektorien eri varianttien perusteella ppGFP-kasetin orientaatiolla on vaikutusta kohdeproteiinin tuottotasoon. Kloonissa 1 tuottoproteiinia tuottui enemmän kloonin 2 verrattuna kaikilla IPTG-pitoisuuksissa. GFP:n tuotto oli molemmissa klooneissa samanlaista poislukien 200 μ M IPTG:llä indusoidut tuotot, joissa kloni 1 tuotti GFP:tä enemmän kuin kloni 2. Tämän perusteella voidaan päätellä, että ppGFP-kasetin on hyödyllisempää olla samassa juosteessa eli geeniä luetaan samansuuntaisesti tuottoproteiinin promoottorin ja sitä koodaavan geenin kanssa. Toisaalta tutkimukset tehtiin vain yhdellä tuottoproteiinilla, joten lopullinen varmuus saataisiin toistamalla koe eri tuottoproteiineilla. Tuottoproteiinien tuottokohteella voi myös olla vaikutusta tuottotasoihin. Tässä kokeessa tuottoproteiini tuotettiin periplasmaan, kun taas GFP tuotettiin sytoplasmaan.

ppGFP-kasetilla ei havaittu negatiivista vaikutusta tuottoproteiinin tuottoon eikä funktionaalisuuteen. Itse asiassa kokeiden perusteella ppGFP-kasetti lisäsi Fab-AP:n

tuottoa hyvin vähäisesti. Ero funktionaalisuudessa voidaan selittää sillä, että määrityksessä ei otettu huomioon lyaattien eri konsentraatioita, minkä takia pLK06H-Fab- α NP-ppGFP-tuottovektorin lyaatissa oli enemmän Fab-AP:ta muodostamassa väriä pLK06H-Fab- α NP-tuottovektorin lyaattiin verrattuna. Tuottoproteiinin funktionaalisuudessa ei odotettu tapahtuvan muutosta, sillä GFP:tä ja tuottoproteiinina olevaa Fab-AP:ta tuotettiin erillisinä proteiineina. Tan ja hänen työryhmänsä (2020) havaitsivat, että kun GFP oli fuusioitu heidän tuottoproteiininsa eli aminolevulinaattisyntaasin C- tai N-päähän, niin funktionaalisuus laski merkittävästi. Tämä johtui heidän mukaansa siitä, että fuusioitu GFP haittaa entsyymien laskostumista natiiviin rakenteeseensa.

Tuottoproteiinin todellisen pitoisuuden ja reaaliaikaisen GFP:stä johtuvan fluoresenssin välillä vaikuttaisi olevan noin kahden tunnin viive, koska Fab-AP:sta johtuva absorbanssi alkoi kasvaa heti induktion jälkeen, mutta fluoresenssi alkoi kasvaa vasta kahden tunnin jälkeen induktiosta. Tätä tukee myös kirjallisuudessa GFP-antureilla havaitut viiveet. Randers-Eichorn työryhmineen (1997) sekä Jones työryhmineen (2004) havaitsivat 85 minuutin ja DeLisa työryhmineen (1999) havaitsivat 95 minuutin ja Lu työryhmineen (2002) havaitsivat 20 minuutin viiveen GFP:n maturoimisessa natiiviin fluoresoivaan rakenteeseensa. Randers-Eichorn ja DeLisa työryhmineen tekivät kasvatukset 30 °C:n lämpötilassa ja Lu työryhmineen teki kasvatukset 35 °C:n lämpötilassa. Tämän lisäksi Iizuka työryhmineen (2011) määrittivät sellaisen GFP-variantin maturoitumisviiveeksi 15 min 37 °C:n lämpötilassa, joka on hyvin samankaltainen tässä työssä käytetyn GFP-variantin kanssa. Tässä työssä tehty koe tehtiin 26 °C:ssa, mikä mahdollisesti selittää pidemmän maturoitumisviiveen verrattuna kirjallisuudessa esiintyviin arvoihin, joiden perusteella matalampi lämpötila pidentää maturoitumisviivettä. Kun reaaliaikasta fluoresenssisignaalia siirrettiin kahdella tunnilla taaksepäin, niin tuotetun proteiinin eli Fab-AP:n pitoisuus korreloi hyvin vahvasti fluoresenssisignaalin kanssa. DeLisa työryhmineen (1999) havaitsivat saman asian, kun he siirsivät heidän fluoresenssisignaalia 95 minuutilla taaksepäin. Tämän perusteella fluoresenssisignaalia voidaan käyttää tuottoproteiinin pitoisuuden arvioinnissa, kun ottaa huomioon GFP:n maturoitumisviiveen.

Bioreaktorin ja mittausaseman kierrätysviiveen määrityksessä havaittiin ilmakuplien poistoon käytetystä väliastiasta johtuva laimentuminen. Bioreaktorista saapuva neste laimeni jo väliastiassa olevan nesteen kanssa, ja tällä laimentuneella nesteellä

kesti 15 minuuttia saapua mittausasemaan. Laimennoksen katsottiin hävinneen 38 minuutin kuluttua melkein kokonaan. Tämä tarkoittaa sitä, että pelkästään mittausaseman ja bioreaktorin väliseen kierrätykseen kuluu 38 minuuttia, ja kun ottaa huomioon GFP:n maturoitumisviiveen, niin yhteenlaskettu viive on noin 2 – 2,5 tuntia lämpötilasta riippuen. Tämä väistämättä haittaa tuottoproteiinin reaaliaikaista seuraamista. Kierrätyksestä aiheutuvaa viivettä voitaisiin parantaa käyttämällä nopeampia peristalttipumppuja, mutta työssä päädyttiin käyttämään fermentorin omia peristalttipumppuja käyttönoton yksinkertaistamiseksi. Tämän lisäksi ilmakuplien poistamiseen käytetyssä väliastiassa eli 250 ml:n mittapullossa olevan nesteen tilavuus vaikuttaa myös viiveeseen. Jos nestettä kertyy enemmän pulloon, laimennuksesta johtuva viivekin kasvaa. Kirjallisuudessa Coppellan (1990) kehittämässä ilmakuplien poistamisratkaisussa kierrätyksestä aiheutuva viive on paljon pienempi väliastian puuttumisen johdosta, ja viiveeseen vaikuttaa pelkästään peristalttipumppujen nopeus. Eli kierrätyksestä aiheutuvan viiveen voi minimoida helposti käyttämällä tehokkaita peristalttipumppuja sekä lyhyitä letkuja. Tulevaisuudessa työn jatkuessa olisi kannattavaa ottaa käyttöön Coppellan kehittämä ratkaisu, niin väliastian aiheuttamista haitoista päästäisiin eroon.

pAK400-NB- α CH1-ppGFP-tuottovektorin panossyöttökasvatus tehtiin 30 °C:ssa ja mittalaitteen valoanturina käytettiin μ PMT:tä. Mittalaitteen signaalin lasku kasvatuksen alussa johtui todennäköisesti solujen määrän kasvusta eli kasvatusliuoksen autofluoresenssi laski kasvatuksen sameutumisen vaikutuksesta. Tämän jälkeen signaali alkoi nousta hyvin hitaasti. Tämä johtui joko soluista johtuvasta autofluoresenssista eli solumassan kasvaessa myös autofluoresenssi kasvaa tai lacPO:n vuotamisesta, minkä seurauksena solut tuottavat pieniä määriä GFP:tä, vaikka glukoosia olisikin läsnä kasvatusliuoksessa. Mittalaitteen signaali alkoi kasvaa selvästi 5 h 8 min IPTG-induktiosta, mikä on noin 3 tuntia myöhemmin, kuin noin 2 tunnin viiveen perusteella voisi odottaa. Tämä ylimääräinen viive saattoi johtua syötetyn glukoosin ylimääräisellä kertymisellä kasvatusliuokseen eli solujen kasvu ei ollut glukoosiriippuvaista koko syöttövaiheen ajan. Glukoosiriippuvuutta testattiin ajanhetkellä 20 h 18 min, jolloin syötettävän glukoosin pumppaus pysäytettiin hetkellisesti, kunnes havaittiin DO:n nousu, mikä kertoi solujen käyttämän ravinnon loppumisesta. Syötettävää glukoosia pumpattiin syöttövaiheen aikana eksponentiaalisesti solujen eksponentiaalisen kasvun kompensoimiseksi. On kuitenkin mahdollista, että glukoosia on jossain vaiheessa alettu pumppaamaan liikaa

bioreaktoriin, minkä takia glukoosia olisi alkanut kertymään kasvatusliuokseen. Glukoosiriippuvuudesta tehtiin niin varhaisessa vaiheessa syöttövaihetta eikä sitä enää toistettu, että on mahdotonta tietää mikä oli glukoosin tilanne induktiohetkellä. Glukoosi repressoi lacPO:n aktivoitumista, mikä voisi selittää miksi GFP:n tuottuminen tapahtui niin suurella viivellä.

pLK06H-Fab- α NP2-ppGFP-tuottovektorin panossyöttökasvatus tehtiin 26 °C:ssa ja mittalaitteen valoanturina käytettiin 8:n megapikselin kameraa 500 ms:n ja 5 sekunnin valotusajoilla. Kuten edellisessä kasvatuksessa, mittalaitteen signaali ensin laskee, minkä jälkeen se alkaa nousta hitaasti. Ajanhetkellä 24 h 35 min tehtiin glukoosiriippuvuudesta, jolloin huomattiin, että kasvu ei ollut glukoosiriippuvaista, koska DO ei lähtenyt nousuun. Syötettävän glukoosin pumppaaminen lopetettiin hieman yli 6 tunniksi, kunnes huomattiin, että kertynyt glukoosi oli kulutettu loppuun kasvatusliuoksesta. Tämän jälkeen tehtiin IPTG-induktio ja samalla jatkettiin syötettävän glukoosin pumppaamista. 500 ms:n valotusajan signaali lähti nousuun tunnin kuluttua induktiosta, mikä taas oli noin 1,5 tuntia liian aikaisin ottaen huomioon odotetun 2,5 tunnin viiveen. Tämä todennäköisesti tarkoitti sitä, että lacPO ehti aktivoitua sillä aikaa, kun odotettiin kertyneen glukoosin loppumista kasvatusliuoksesta. Tämän lisäksi, kun glukoosin huomattiin loppuneen kasvatusliuoksesta, syötettävän glukoosin pumppausta jatkettiin siinä toivossa, että siitä hetkestä eteenpäin kasvu pysyisi glukoosiriippuvaisena. Tämä kuitenkin jälkikäteen ajateltuna saattoi olla virhe, sillä ylimääräisen glukoosin pumppaus induktiovaiheen jälkeen todennäköisesti vain haittasi lacPO:n aktivaatiota. DO:n voimakas heittelehtiminen johtui todennäköisesti siitä, että soluille alettiin antamaan pitkän tauon jälkeen paljon glukoosia jokaisella pumppauskierroksella, jolloin DO laski hetkellisesti todella alhaiseksi, ja kun glukoosi kulutettiin loppuun DO nousi äkillisesti ravinnon loppumisen seurauksena. Tästä seurasi se, että soluille ikään kuin tehtiin jatkuvatoimisesti glukoosiriippuvuustestiä. Mittalaitteen 5 sekunnin valotusajan mittauksissa signaali alkoi satureitua noin 25 tunnin jälkeen ja samoin 500 ms:n mittauksissa signaali alkoi satureitua noin 35 tunnin jälkeen. Molemmissa valotusaikojen signaaleissa näkyi 27, 31 ja 33 tunnin kohdalla signaalin hetkellinen lasku, mikä todennäköisesti johtui ilmakuplista, joita pääsi letkuihin, kun väliastian nestepinta oli päässyt laskemaan liikaa yön aikana.

Kasvatus tulisi toistaa, sillä niin moni asia meni pieleen. Tämän lisäksi kameran valotusajoiksi valittiin selvästi liian korkeat arvot signaalien satureoitumisien takia, ja

olisi kannattavaa kokeilla lyhyempiä valotusaikoja tai pienentää LEDin tehoa, mikäli kasvatuskoe toistetaan.

Tässä työssä kehitettiin onnistuneesti sekä menetelmä että laitteisto panossyöttökasvatuksessa tuottoproteiinin geenin ekspressiota ohjaavan lacPO:n aktivoitumisen seuranta varten. Kehitettyssä menetelmässä lacPO:n ohjaaman tuottoproteiinin geenin sisältävä tuottovektori sisältää myös GFP:n geenin, jota ohjataan omalla lacPO:lla. Tämän ansiosta lacPO:n aktivoituessa molempien geenien transkriptio alkaa samanaikaisesti, ja GFP:n fluoresenssia mittaamalla voidaan päätellä tuottoproteiinin tuoton tilasta. Menetelmää voidaan soveltaa myös muihin bioprosesseihin kuin panossyöttökasvatukseen, kunhan bioeaktori mahdollistaa kasvatuksen kierrätyksen. Työssä menetelmän reaaliaikaisuus jäi saavuttamatta, johtuen osin kasvatuksen kierrätystoteutuksesta sekä GFP:n maturoitumisajasta. Vaikka kierrätyksestä aiheutuva viive voidaankin minimoida muuttamalla kasvatuksen ilmakuplien poistamisratkaisua, GFP:n maturoitumisaika tulee silti aiheuttamaan ongelmia. Maturoitumisesta johtuvaa viivettä voidaan laskea lämpötilaa kasvattamalla, mutta etenkin, kun tuottoproteiininä on Fab-fragmentti prosessin tuottovaihetta ei voida tehdä korkeassa lämpötilassa (Rodríguez-Carmona ja muut 2012). Mittalaitteistossa käytettiin virityssuodattimena 470 nm:n ja emissiosuodattimena 510 nm:n kaistanpäästösuodatinta sekä virityslähteenä käytettiin sinistä LEDiä ja valon antureina testattiin fotodiodia, μ PMT:tä sekä 8:n megapikselin kameraa. Kameramittaukset tehtiin sekä valosuodattimilla että ilman. Antureista herkimpiä eli μ PMT:tä että kameraa (valosuodattimien kanssa) käytettiin kahdessa eri panossyöttökasvatuksessa, joissa molemmissa lacPO:n aktivaatio havaittiin GFP:n fluoresenssin kasvamisen seurauksena. Kasvatuksien perusteella GFP:tä muodostuu prosessissa niin paljon, että todennäköisesti vähemmän herkkien valoantureiden, eli fotodiodin sekä ilman viritys- ja emissiosuodattimia asennetun kameran, käyttö on myös mahdollista. Olisi mielenkiintoista kokeilla etenkin kameran käyttöä ilman suodattimia, sillä ne ovat mittalaitteessa kalliimpia osia μ PMT:n jälkeen. GFP-anturi viiveestään huolimatta antaa spesifistä tietoa tuottoproteiinin tuotannosta sekä myös glukoosin tilasta prosessissa, sillä glukoosin loppuminen laukaisee kohdeproteiinin tuotannon. Saatua tietoa voidaan käyttää prosessin optimoimisessa sekä puhdistusvaiheen kannattavuuden arvioinnissa.

Lähteet

Castro-Martínez, C., Luna-Suárez, S. & Paredes-López, O. (2012) Overexpression of a modified protein from amaranth seed in *Escherichia coli* and effect of environmental conditions on the protein expression. *J Biotechnol* **158**:59-67.

Cha, H.J., Dalal, N.G., Pham, M.Q., Vakharia, V.N., Rao, G. & Bentley, W.E. (1999a) Insect larval expression process is optimized by generating fusions with green fluorescent protein. *Biotechnol Bioeng* **65**:316-324.

Cha, H.J., Dalal, N.G., Pham, M.Q. & Bentley, W.E. (1999b) Purification of human interleukin-2 fusion protein produced in insect larvae is facilitated by fusion with green fluorescent protein and metal affinity ligand. *Biotechnol Prog* **15**:283-286.

Chae, H.J., DeLisa, M.P., Cha, H.J., Weigand, W.A., Rao, G. & Bentley, W.E. (2000) Framework for online optimization of recombinant protein expression in high-cell-density *Escherichia coli* cultures using GFP-fusion monitoring. *Biotechnol Bioeng* **69**:275-285.

Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W. & Prasher, D.C. (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **263**:802-805.

Chisti, Y. (2014) Fermentation (industrial): Basic considerations. Kirjassa: Batt, C.A. & Tortorello, M.L. (toim.), Encyclopedia of food microbiology, 2. painos, s. 751-761. Academic Press, Lontoo.

Chroma Technology. GFP Spectrum. <<https://www.chroma.com/spectra-viewer?fluorochromes=10504>> (Luettu 9.12.2020).

Cohen, S.N., Chang, A.C.Y. & Hsu, L. (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-Factor DNA. *Proc Nat Acad Sci U S A* **69**:2110-2114.

Coppella, S.J. (1990) Analysis of a fermentation recycle loop for on-line measurements. *Biotechnol Tech* **4**:155-160.

Croughan, M.S., Konstantinov, K.B. & Cooney, C. (2015) The future of industrial bioprocessing: batch or continuous? *Biotechnol Bioeng* **112**:648-651.

Cubitt, A.B., Woollenweber, L.A. & Heim, R. (1998) Understanding structure – function relationships in the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. Kirjassa: Sullivan, K.F. & Kay, S.A. (toim.), Methods in cell biology, s. 19-30. Academic Press, Lontoo.

Dąbrowski, S., Brillowska, A. & Kur, J. (1999) Use of the green fluorescent protein variant (YFP) to monitor MetArg human proinsulin production in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* **16**:315-323.

DeLisa, M.P., Li, J., Rao, G., Weigand, W.A. & Bentley, W.E. (1999) Monitoring GFP-operon fusion protein expression during high cell density cultivation of *Escherichia coli* using an on-line optical sensor. *Biotechnol Bioeng* **65**:54-64.

Donovan, R.S., Robinson, C.W. & Glick, B.R. (1996) Review: optimizing inducer and culture conditions for expression of foreign proteins under the control of the lac promoter. *J Ind Microbiol* **16**:145-54.

Eerikäinen, T. (2002) Mittaus, mallinnus ja säätö. Kirjassa: Aittomäki, E., Eerikäinen, T., Leisola, M., Ojamo, H., Suominen, I. & von Weymarn, N, Bioprosessiteknikka, s. 20-77. WSOY, Porvoo.

Ehrmann, M.A., Scheyhing, C.H. & Vogel, R.F. (2001) *In vitro* stability and expression of green fluorescent protein under high pressure conditions. *Lett Appl Microbiol* **32**:230-234.

Eppendorf. DASbox® Mini Bioreactor System. <<https://online-shop.eppendorf.us/US-en/Bioprocess-44559/Bioprocess-Systems-60767/DASbox-Mini-Bioreactor-System-PF-133566.html>> (Luettu 30.03.2021).

Fernández-Castané, A., Vine, C.E., Caminal, G. & López-Santín, J. (2012) Evidencing the role of lactose permease in IPTG uptake by *Escherichia coli* in fed-batch high cell density cultures. *J Biotechnol* **157**:391-398.

Gutiérrez-González, M., Farías, C., Tello, S., Pérez-Etcheverry, D., Romero, A., Zúñiga, R., Ribeiro, C.H, Lorenzo-Ferreiro, C. & Molina, M.C. Optimization of culture conditions for the expression of three different insoluble proteins in *Escherichia coli*. *Sci Rep* **9**:16850.

Huovinen, T., Syrjänpää, M., Sanmark, H., Brockmann, E.C., Azhaye, A., Wang, Q., Vehniäinen, M. & Lamminmäki, U. (2013) Two ScFv antibody libraries derived from identical VL-VH framework with different binding site designs display distinct binding profiles. *Protein Eng Des Sel* **26**:683–693.

Iizuka, R., Yamagishi-Shirasaki, M. & Funatsu, T. (2011) Kinetic study of *de novo* chromophore maturation of fluorescent proteins. *Anal Biochem* **414**:173-178.

Johnson, F.H., Shimomura, O., Saiga, Y., Gershman, L.C., Reynolds, G.T. & Waters, J.R. (1962) Quantum efficiency of *Cypridina* luminescence, with a note on that of *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol* **60**:85-103.

Jones, J.J., Bridges, A.M., Fosberry, A.P., Gardner, S., Lowers, R.R., Newby, R.R., James, P.J., Hall, R.M. & Jenkins, O. (2004) Potential of real-time measurement of GFP-fusion proteins. *J Biotechnol* **109**:211-211.

Jung, H.M., Im, D.K., Lim, J.H., Jung, G.Y. & Oh, M.K. (2019) Metabolic perturbations in mutants of glucose transporters and their applications in metabolite production in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact* **18**:170.

Kane, J.F. (1995) Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol* **6**:494-500.

Kendall, J.M. & Badminton, M.N. (1998) *Aequorea victoria* bioluminescence moves into an exciting new era. *Trends Biotechnol* **16**:216-224.

Kong, J., Wang, Y., Qi, W., Huang, M., Su, R. & He, Z. (2020) Green fluorescent protein inspired fluorophores. *Adv Colloid Interface Sci* **285**:102286.

Kostov, Y., Albano, C.R. & Rao, G. (2000) All solid-state GFP sensor. *Biotechnol Bioeng* **70**:473-477.

Krebber, A., Bornhauser, S., Burmester, J., Honegger, A., Willuda, J., Bosshard, H. R., & Plückthun, A. (1997). Reliable cloning of functional antibody variable domains from hybridomas and spleen cell repertoires employing a reengineered phage display system. *Journal of Immunological Methods*, 201(1), 35–55. doi:10.1016/s0022-1759(96)00208-6

Kuhn, P., Fühner, V., Unkauf, T., Moreira, G.M., Frenzel, A., Miethe, S. & Hust, M. (2016) Recombinant antibodies for diagnostics and therapy against pathogens and toxins generated by phage display. *Proteomics Clin Appl* **10**:922-948.

Lessard, J.C. (2013) Transformation of *E. coli* via electroporation. *Methods Enzymol* **529**:321-327.

Lu, C., Albano, R., Bentley, W.E. & Rao, G. (2002) Differential rates of gene expression monitored by green fluorescent protein. *Biotechnol Bioeng* **78**:429-437.

Luli, G.W. & Strohl, W.R. (1990) Comparison of growth, acetate production, and acetate inhibition of *Escherichia coli* strains in batch and fed-batch fermentations. *Appl Environ Microbiol* **56**:1004-1011.

Manderson, D., Dempster, R. & Chisti, Y. (2006) A recombinant vaccine against hydatidosis: production of the antigen in *Escherichia coli*. *J Ind Microbiol Biotechnol* **33**:173-182.

Mason, M.M. (1935) A comparison of the maximal growth rates of various bacteria under optical conditions. *J Bacteriol* **29**:103-110.

Ocampo-López, C., Colorado-Arias, S. & Ramírez-Carmona, M. (2015) Modeling of microbial growth and ammonia consumption at different temperatures in the production of a polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolymer. *J Appl Res Technol* **13**:498-503.

Ormö, M., Cubitt, A.B., Kallio, K., Gross, L.A., Tsien, R.Y. & Remington, S.J. (1996) Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science* **273**:1392-1395.

Overton, T. W. (2014) Recombinant protein production in bacterial hosts. *Drug Discov Today* **19**:590-601.

Paliy, O. & Gunasekera, T.S. (2007) Growth of *E. coli* in minimal media with different gluconeogenic carbon sources and salt contents. *Appl Microbiol Biotechnol* **73**:1169-1172.

Peck, G.R., Bowden, T.R., Shiell, B.J. & Michalski, W.P. (2014) Increased bacterial cell density and recombinant protein yield using a commercial microbial cultivation system. *Prep Biochem Biotechnol* **44**:217-230.

Petsch, D. & Anspach, F.B. (2000) Endotoxin removal from protein solutions. *J Biotechnol* **76**:97-119.

Postma, P.W., Broekhuizen, C.P. & Geerse, R.H. (1989) The role of PEP: carbohydrate phosphotransferase system in the regulation of bacterial metabolism. *FEMS Microbiol Rev* **63**:69-80.

Presser, K.A., Ratkowsky, D.A. & Ross, T. (1997) Modelling the growth rate of *Escherichia coli* as a function of pH and lactic acid concentration. *Appl Environ Microbiol* **63**:2355-2360.

Randers-Eichhorn, L., Albano, C.R., Sipior, J., Bentley, W.E. & Rao, G. (1997) On-line green fluorescent protein sensor with LED excitation. *Biotechnol Bioeng* **55**:921-926.

Reid, B.G. & Flynn, G.C. (1997) Chromophore formation in green fluorescent protein. *Biochemistry* **36**:6786-6791.

Rodríguez-Carmona, E., Cano-Garrido, O., Dragosits, M., Maurer, M., Mader, A., Kunert, R., Mattanovich, D., Villaverde, A. & Vázquez, F. (2012) Recombinant Fab expression and secretion in *Escherichia coli* continuous culture at medium cell densities: influence of temperature. *Process Biochem* **47**:446-452.

Roth, W.G., Leckie, M.P. & Dietzler, D.N. (1985) Osmotic stress drastically inhibits active transport of carbohydrates by *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* **126**:434-441.

Sandoval-Basurto, E.A., Gosset, G., Bolívar, F. & Ramírez, O.T. (2005) Culture of *Escherichia coli* under dissolved oxygen gradients simulated in a two-compartment scale-down system: metabolic response and production of recombinant protein. *Biotechnol Bioeng* **89**:453-463.

Sartorius. Introducing Ambr® 15 cell culture: high throughput, automated bioreactor system. <<https://www.sartorius.com/en/products/fermentation-bioreactors/ambr-multi-parallel-bioreactors/ambr-15-cell-culture>> (Luettu 30.03.2021).

Shehata, T.E. & Marr, A.G. (1971) Effect of nutrient concentration on the growth of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **107**:210-216.

Shimomura, O., Johnson, F.H. & Saida, Y. (1962) Extraction, purification, and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol* **59**:223-239.

Shimomura, O. & Johnson, F.H. (1975) Regeneration of the photoprotein aequorin. *Nature* **256**:236-238.

Shimomura, O. & Johnson, F.H. (1978) Peroxidized coelenterazine, the active group in the photoprotein aequorin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**:2611-2615.

Su, W.W., Guan, P. & Bugos, R.C. (2004) High-level secretion of functional green fluorescent protein from transgenic tobacco cell cultures: characterization and sensing. *Biotechnol Bioeng* **85**:610-619.

Suominen, I. (2002) Solujen rakenne ja toiminta. Kirjassa: Aittomäki, E., Eerikäinen, T., Leisola, M., Ojamo, H., Suominen, I. & von Weymarn, N, Bioprosessitekniikka, s. 20-77. WSOY, Porvoo.

Tan, S.I., You, S.C., Shih, I.T. & Ng, I.S. (2020) Quantification, regulation and production of 5-aminolevulinic acid by green fluorescent protein in recombinant *Escherichia coli*. *J Biosci Bioeng* **129**:387-394.

Terpe, K. (2006) Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl Microbiol Biotechnol* **72**:211-222.

Tripathi, N.K. & Shrivastava, A. (2019) Recent developments in bioprocessing of recombinant proteins: expression hosts and process development. *Front Bioeng Biotechnol* **7**:420.

Tuttle, A.R., Trahan, N.D. & Son, M.S. (2021) Growth and maintenance of *Escherichia coli* laboratory strains. *Curr Protoc* **1**:e20.

Van den Brink, E. N., Ter Meulen, J., Cox, F., Jongeneelen, M. A. C., Thijsse, A., Throsby, M., ... Goudsmit, J. (2005). Molecular and Biological Characterization of Human Monoclonal Antibodies Binding to the Spike and Nucleocapsid Proteins of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus. *Journal of Virology*, *79*(3), 1635–1644. doi:10.1128/jvi.79.3.1635-1644.2005

von Weymarn, N. (2002) Valmistusprosessit. Kirjassa: Aittomäki, E., Eerikäinen, T., Leisola, M., Ojamo, H., Suominen, I. & von Weymarn, N, Bioprosessiteknikka, s. 20-77. WSOY, Porvoo.

Walsh, G. (2010) Post-translational modifications of protein biopharmaceuticals. *Drug Discov Today* **15**:773-780.

Wang, H. & Chong, S. (2003) Visualization of coupled protein folding and binding in bacteria and purification of heterodimeric complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:478-483.

Wang, H., Wang, F., Wang, W., Yao, X., Wei, D., Cheng, H. & Deng, Z. (2014) Improving the expression of recombinant proteins in *E. coli* BL21 (DE3) under acetate stress: an alkaline pH shift approach. *PLoS One* **9**:e112777.

Yuan, L., Kurek, I., English, J. & Keenan, R. (2005) Laboratory-directed protein evolution. *Microbiol Mol Biol Rev* **69**:373-392.

Zhang, L., Patel, H.N., Lappe, J.W. & Wachter, R.M. (2006) Reaction progress of chromophore biogenesis in green fluorescent protein. *J Am Chem Soc* **128**:4766-4772.

Zimmer, M. (2002) Green fluorescent protein (GFP): applications, structure, and related photophysical behavior. *Chem Rev* **102**:759-781.

Ziv, N., Brandt, N.J. & Gresham, D. (2013) The use of chemostats in microbial systems biology. *J Vis Exp* **80**:50168.