

TARTU ÜLIKOOL
Loodus- ja tehnoloogiateaduskond
Keemia instituut

Kaisa Mihklepp

**BIOÄRATUNDMISSÜSTEEM *STREPTOCOCCUS UBERIS*'E
MÄÄRAMISEKS**

Magistritöö (30 EAP)

Juhendajad: vanemteadur Toonika Rinke
vanemteadur Meeme Utt

Tartu 2015

KASUTATUD LÜHENDID	4
SISSEJUHATUS	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	7
1.1 <i>STREPTOCOCCUS UBERIS</i>	7
1.2 <i>STREPTOCOCCUS UBERIS</i> 'E ADHESIOONI MOLEKUL	7
1.3 BIOSENSOORIKA TÖÖPÕHIMÕTE	8
1.3.1 Immunosensordid	9
1.3.2 Antikehad	9
1.3.3 Antigeen	11
1.3.4 Antikeha interaktsioonid antigeeniga	11
1.3.5 Immuunvastuse tekkimine	11
1.4 PEPTIIDISÜNTEES	12
1.4.1 Tahke faasi peptiidisüntees	12
1.4.2 Kaitserühmad	15
1.4.3 Peptiidide puhastamine	16
1.4.3.1 Pöördfaasi kõrgefektiivne-vedelikkromatograafia	16
1.4.3.2 MALDI-TOF mass-spektromeetria	16
2. EKSPERIMENTAALNE OSA	18
2.1 KASUTATUD REAGENDID, MATERJALID JA APARATUUR	18
2.1.1 Peptiidisüntees	18
2.1.2 Peptiidi ELISA	19
2.1.3 Antikehade puhastamine vereseerumist	20
2.1.4 Kasutatud seadmed	20
2.1.5 Lahused	21
2.2 KASUTATUD MEETODID	22
2.2.1 <i>Streptococcus uberis</i> 'e SUAM valgu antigeensete piirkondade määramine	22
2.2.2 Peptiidide süntees ja puhastamine	22
2.2.2.1 Pöördfaasi kõrgefektiivne-vedelikkromatograafia	23
2.2.2.2 MALDI-TOF mass-spektromeetria	23
2.2.3 Sünteesitud peptiidide struktuuri määramine	24
2.2.4 Immuniseerimine	24
2.2.5 <i>Streptococcus uberis</i> 'e kasvatamine ja suspensiooni valmistamine	24

2.2.6 Peptiidi ELISA	25
2.2.7 Aglutinatsioon.....	25
2.2.8 Sünteesitud peptiidi sidumine HiTrap NHS-aktiveeritud kolonnile	25
2.2.9 Antikehade puhastamine küüliku vereseerumist.....	26
3. TULEMUSED JA ARUTELU	28
3.1 SUAM VALGU ANTIGEENSETE PIIRKONDADE MÄÄRAMINE	28
3.2 PEPTIIDISÜNTEES	31
3.3 SÜNTEESITUD PEPTIIDIDE STRUKTUURI MÄÄRAMINE	33
3.4 PUHASTATUD ANTIKEHADE ISELOOMUSTAMINE ELISA JA AGLUTINATSIOONI TESTIGA	33
3.5 <i>S. UBERIS</i> ’E VASTASTE ANTIKEHADE PUHASTAMINE VERESEERUMIST	36
3.6 PUHASTATUD ANTIKEHADE ISELOOMUSTAMINE	37
KOKKUVÕTE	39
TÄNUAVALDUSED.....	40
KASUTATUD KIRJANDUS	41
SUMMARY.....	44
LISAD.....	45
LIHTLITSENTS	49

KASUTATUD LÜHENDID

AcN	atsetonitril
BSA	veise seerumi albumiin
CD	tsirkulaarne dikroism
CDR	komplementaarsust määrav piirkond
DCM	diklorometaan
CFU	kolooniat moodustav üksus
DIEA	N,N-diisopropüületüülamiin
DMF	dimetüülformamiid
DMSO	dimetüülsulfoksiid
ELISA	ensüüm-seotud immuunsorptsioon analüüs
Fmoc	9-fluoroenüülmetüüloksükarbonüül rühm
HBTU	N-(1)-N-metüülmetaanamiinium heksafluorofosfaat N-oksiid
HCCA	α -tsüano-4-hüdrosükaneelhape
HOBt	1-hüdrosübensotriasool
HRP	mädarõika peroksidaas
IgG	immunoglobuliin G
KLH	meriteo hemotsüaniin
Lf	laktoferriin
MALDI-TOF MS	maatriks-assisteeritud laser-desorptsioon-ionisatsioon-lennuajaanalüsaator mass-spektomeeter (ingl. k <i>matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry</i>)
MBHA	4-metüülbenshüdrüülamiid

Npys	3-nitro-2-püridiinsulfenüül
OBt	hüdrosüülbensotriasool ester
PBS	fosfaatpuhver soolaga
PCR	polümeraasi ahelreaktsioon
RP-HPLC	pöördfaas kõrgefektiivne vedelikkromatograafia (ingl. k. <i>reversed-phase high-performance liquid chromatography</i>)
<i>t</i> -Bu	<i>tert</i> -butüül rühm
Tris	Tris(hüdrosümetüül)-aminmetaan
SUAM	<i>Streptococcus uberis</i> 'e adhesiooni molekul (ingl. k <i>Streptococcus uberis</i> adhesion molecule)
TFA	trifluoroäädikhape
TIS	triisopropüülsilaan
TMB	3, 3', 5, 5'-tetrametüülbensidiin

SISSEJUHATUS

Tänapäeval kasutatakse mikroobide määramiseks peamiselt aeganõudvaid klassikalisi mikrobioloogilisi meetodeid. Samal ajal tehakse suuri jõupingutusi uudsete tehnoloogiate väljatöötamiseks, mis võimaldaksid patogeenide määramist oluliselt kiirendada. Üks võimalus patogeensete bakterite kiireks määramiseks on bioselektiivsete sensorsüsteemide kasutamine. Patogeenide identifitseerimiseks kasutatakse peamiselt immunosensoreid, kus süsteemi keskseks komponendiks on antikehadel põhinev selektiivne äratundmisreaktsioon.

Valdkond, kus patogeenide kiire määramine on ülimalt oluline, on veterinaaria. Lüpsilehmadel mastiiti tekitavate patogeenide kiire identifitseerimine lüpsstavas piimas võimaldab alustada loomade õigeaegset ravi sobivate antibiootikumidega ning seega vähendada ravi tõttu tekkiva praakpiima hulka ja parandada loomade tervist. Ehkki mastiiti tekitavaid patogeene on üle 100, moodustab kolme enamlevinud mikroobi poolt tekitatud haigusjuhtumite arv ligikaudu poole kõikidest mastiidijuhtudest. Nende patogeenide detekteerimiseks on käesoleval ajal kommertsiaalselt saadaval antikehad *Escherichia coli* ja *Staphylococcus aureus*'e jaoks, kuid mitte *Streptococcus uberis*'e jaoks.

Antud magistritöö eesmärgiks on luua selektiivne bioäratundmissüsteem *Streptococcus uberis*'e määramiseks, mida saaks kombineerida teiste olulisemate patogeenide määramisega ning rakendada mastiiditekitajate kiireks üheaegseks määramiseks toorpiimas immunosensoriga. Bioäratundmissüsteemi disainimiseks valiti esmalt välja *Streptococcus uberis*'e pinnal paikneva spetsiifilise valguga potentsiaalsed antigeensed järjestused. Seejärel sünteesiti Fmoc/t-Bu tahke faasi peptiidisünteesi kasutades kolm erinevat peptiidi, mis puhastati ja analüüsiti ning mida kasutati *Streptococcus uberis*'e spetsiifiliste antikehade valmistamiseks. Eraldati vereseerumist spetsiifilised antikehad ja iseloomustati nende seondumisvõimet *Streptococcus uberis*'e rakkudele.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 *Streptococcus uberis*

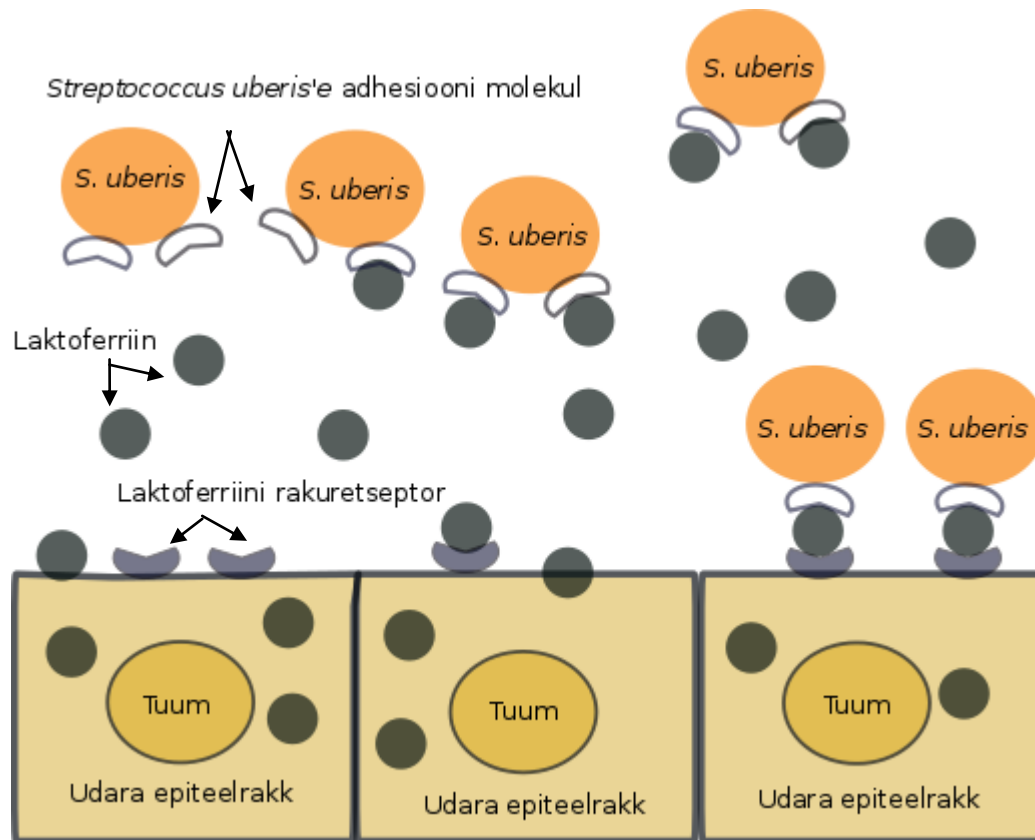
Streptococcus uberis (*S. uberis*) on Streptococcaceae perekonda kuuluv gramm-positiivne mikroorganism, mis levib peamiselt allapanuga [1,2]. 2013. aasta andmete alusel põhjustas *Streptococcus uberis* koos *Escherichia coli* ja *Staphylococcus aureus*'ega ligikaudu 50 % kõikidest mastiidijuhtudest Eestis [3]. Mastiit ehk udarapõletik on piimalehmade levinuim haigus, mis põhjustab suurt majanduslikku kahju – eeskätt suurenenud ravikulude, halvenenud piimakvaliteedi ning lehmade enneaegse karjast välja praakimise tõttu [4]. Mastiit jaguneb subkliiniliseks ja kliiniliseks. Subkliinilise seisundi korral puuduvad loomal nähtavad haigustunnused, kliinilise mastiidi korral on aga haiguslikud muutused märgatavad nii looma udaras kui ka piimas. Sümptomite põhjal ei ole võimalik kindlaks teha, millise haigustekitajaga on tegemist. Seepärast on looma efektiivseks ravimiseks kõikidel haigusjuhtudel oluline identifitseerida konkreetne patogeen.

Mastiiti ravitakse enamasti antibiootikumidega ning ligikaudu 70 % piimakarjas kasutatavatest antibiootikumidest on mõeldud kliinilise mastiidi raviks. Viimastel aastakümnetel on Eestis kliinilise mastiidi raviks kasutatud põhiliselt laia spektriga antibiootikume, mis aga soodustavad infektsioonide ja resistentsete patogeenide teket [4]. Mastiidi diagnoosimine subkliinilises faasis on oluline, vältimaks haiguse arenemist kliiniliseks vormiks. Hetkel rakendatakse patogeenide määramiseks peamiselt mikrobioloogilisi meetodeid, mille läbiviimiseks kulub 1–2 päeva. Samuti on hakatud patogeenide identifitseerimiseks kasutama polümeraasi ahelreaktsiooni (PCR) meetodit, mis on küll kallis, kuid võimaldab saada tulemusi ligikaudu 6 tunni jooksul [5]. Seetõttu pööratakse üha enam tähelepanu kohapeal kasutatavate kiirete tehnoloogiate väljatöötamisele.

1.2 *Streptococcus uberis*'e adhesiooni molekul

S. uberis'e pinnalt on identifitseeritud ja eraldatud adhesioonivalk SUAM (*S. uberis*'e adhesiooni molekul) [6]. Kirjanduses on vastavat valku varasemalt nimetatud ka *Streptococcus*'e laktoferrini siduvaks valguks või laktoferrini siduvaks valguks [7]. Laktoferrin (Lf) on lehmapiimas esinev rauda siduv glükoproteiin, mille kontsentratsioon kasvab looma udarainfektsioonide korral. Lf on antibakteriaalse toimega, inhibeerides bakterite raua omastamist. Streptokokid, sealhulgas ka *S. uberis*, on Lf antibakteriaalse mõju suhtes resistentsed tõenäoliselt vähese raua vajaduse tõttu [8]. Seetõttu funktsioneerib Lf

S. uberis’e korral hoopis molekulaarse sillana patogeeni ja veise udara epiteelrakkude vahel (joonis 1). Ka varasemad uuringud on kinnitanud SUAM valgu seondumisvõimet Lf-le [9].



Joonis 1. *Streptococcus uberis*’e seundumine veise udara epiteelrakkudele SUAM valgu abil läbi laktoferriini [7].

Seepärast on SUAM-il keskne osa *S. uberis*’e seundumisel veise udara epiteelrakkudele [9] ja seetõttu keskenduvad mastiidi leviku pidurdamisele suunatud uurimistööd SUAM-le, kui potentsiaalsele immunogeenile [6]. Immunogeensete peptiidide kasutamine on varasemaltki leidnud rakendust nakkuslike haiguste ennetamisel [10].

1.3 Biosensorika tööpõhimõte

Biosensorid on analüütilised seadmed, milles on ühendatud bioloogiline selektiivne element ning selle poolt genereeritud äratundmisreaktsiooni signaali detekteeriv seade [11]. Biosensorsüsteemi keskne osa on analüüdi bioäratundmisreaktsiooni genereeriv bioretseptor. Selleks, et vältida valepositiivseid tulemusi segavate ainete poolt, on oluline tagada bioloogiliste elementide selektiivsus ja tundlikkus kindla analüüdi suhtes [11].

Biosensorite bioäratundmisreaktsiooni genereerimiseks kasutatakse ensüüme, antikehasid, nukleiinhappeid (DNA), rakke ja mitmesuguseid biomimeetikuid. Bioselektiivse

materjali valik sõltub analüütilistest vajadustest ning see võib olla selektiivne teatud spetsiifilise analüüdi või ka laiemal analüütide grupi suhtes [12,13].

1.3.1 Immunosensordid

Immunosensordid on olulisel kohal toidu kvaliteedi hindamisel ja kliinilises analüüsis, kus on vajalik kiire detekteerimisvõime, kõrge tundlikkus ja spetsiifilisus. Immunosensoris on bioselektiivseks materjaliks antikehad, mis tagavad antigeeni bioäratundmisreaktsiooni [13]. Antud bioäratundmisreaktsioon omab kõrget selektiivsust ja afiinsust – interaktsioonil moodustuva antigeen-antikeha kompleksi dissotsiatsioonikonstant K_d on tavaliselt suurusjärgus 1 nM [14].

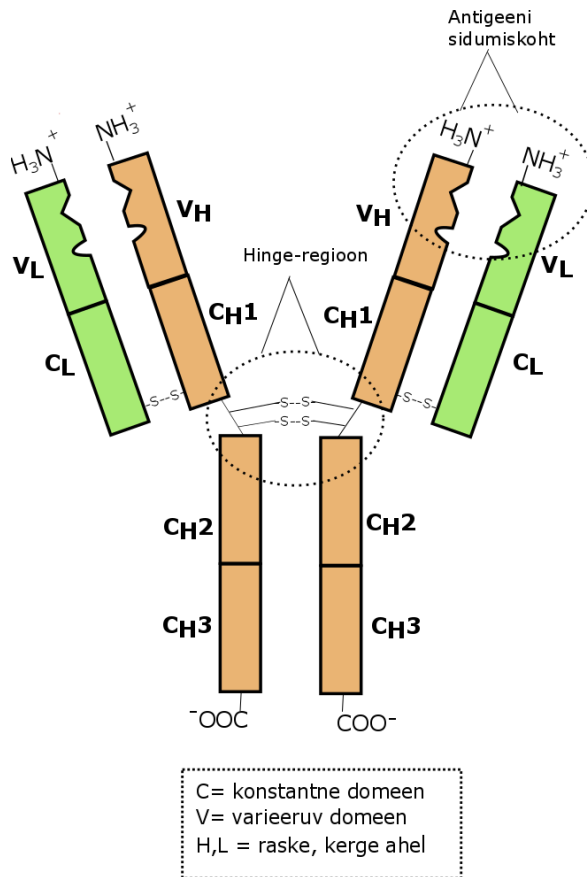
1.3.2 Antikehad

Antikehad ehk immunoglobuliinid on B-lümfotsüütide ehk B-rakkude poolt produtseeritud glükoproteiinid, mille esmane funktsioon on tunda ära ja kahjutuks teha organismile kahjulikke aineid [15]. Kõik antikehad koosnevad tüüpiliselt kahest raskest ja kahest kergest ahelast. Immunoglobuliinid jaotatakse viide klassi: IgA, IgD, IgE, IgG ja IgM, vastavalt antikeha raske ahela konstantsele piirkonnale. Lisaks on antikehadel kahte tüüpi kergeid ahelaid: kappa (κ) ja lambda (λ) [14,15]. Antikehade peamised karakteristikud on toodud tabelis 1.

Tabel 1. Immunoglobuliinide peamised karakteristikud [16].

Immunoglobuliinide klassid					
	IgG	IgM	IgA	IgD	IgE
Raske ahel	γ	μ	α	δ	E
Struktuur	Monomeer	Pentameer	Dimeer	Monomeer	Monomeer
Mass (kDa)	150	900	320	180	180
Osakaal (%)	80	5	14	1	<1
Peamised karakteristikud	Interakteerub mikroorganismide ja toksiinidega; tekib sekundaarse immuunvastuse tulemusena	Tekib primaarse immuunvastuse tulemusena	Paikneb limaskestadel ja soolepiteelidel – kaitseb rakku tungimise eest	Stimuleerib antikehade moodustumist B-rakkude poolt	Vahendab anafülaktilist reaktsiooni

Immunoglobuliin G (IgG) on antikehade peamine klass, mida leidub vereseerumis [12,14]. IgG tüüpi antikehad on sümmeetrilised molekulid, mis koosnevad neljast polüpeptiidahelast: kahest identsest glükosüülitud raskest ahelast (H) molekulmassiga (M_r) 50-75 kDa ja mitte-glükosüülitud identsete kergete ahelate (L) paarist. Kerge ahela molekulmass on ligikaudu 25 kDa [17] (joonis 2).



Joonis 2. IgG tüüpi antikeha skemaatiline struktuur.

Ahelad on omavahel seotud disulfiidsidemetega, nii et tekib kaks raske- ja kerge (H-L) ahela paari. Antikeha ahelad koosnevad sarnase struktuuriga korduvatest regioonidest ehk Ig domeenidest. IgG raske ahel koosneb neljast regioonist: ühest varieeruvast (V_H) ja kolmest konstantsest (C_H1 , C_H2 , C_H3) domeenist. Kerge ahel koosneb ühest varieeruvast (V_L) ja ühest konstantsest (C_L) domeenist [19]. C_H1 ja C_H2 domeenide vahel paikneb kergesti liikuv hinge-regioon, mis võimaldab antigeeni seondumiskoha sõltumatu liikumise ülejäänud antikeha molekulist.

IgG-l on kaks antigeeniga seondumise ala, mis sisaldavad kergete ja raskete ahelate varieeruvaid piirkondi, vastavalt V_H ja V_L . Need piirkonnad osalevad antigeeniga seondumisel, sest nendes domeenides paiknevad hüpervarieeruvad alad ehk komplementaarsust määravad regioonid (CDR). Vastavad alad asuvad polüpeptiidahela

välimestes lingudes ja on ruumis pakitud nii, et moodustavad antigeeni seondumiskoha. [19,20]

1.3.3 Antigeen

Antigeeniks võivad olla viiruste ja bakterite ehituslikud komponendid: individuaalne valk või polüsahhariidid, glükolipiidid ja nukleiinhapped. Individuaalne antikeha seondub ainult kindla antigeeni piirkonnaga. Antigeeni piirkonda, mis seondub antikehaga, nimetatakse epitoobiks ehk determinandiks. Epitoobid võivad olla lineaarsed (6–15 aminohapet) või konformatsioonilised, kus polüpeptiidahelas eemal paiknevad järjestused satuvad ruumilises struktuuris lähestikku. Molekulid molekulmassiga $M_r < 5000$ Da ei ole antigeensed ja immuunvastust ei tekita. Neid madalamolekulaarseid aineid nimetatakse hapteneideks. Selleks, et kutsuda esile selliste molekulide vastu immuunvastust, konjugeeritakse väikesed molekulid suurte valkudega. Antikehad, mis on toodetud immuunvastusena valk-seotud hapteneidega, seovad aga neid väikesi molekule. [14]

1.3.4 Antikeha interaktsioonid antigeeniga

Antigeeni sidumisel antikehaga moodustuvad antigeeni ja antikeha sidumiskoha aminohapete vahel mitmed mitte-kovalentsed sidemed. Võrreldes kovalentsete sidemetega, on antigeen-antikeha interaktsioonil moodustuvad sidemed – vesiniksidemed, elektrostaatilised jõud, Van der Waalsi ja hüdrofoobsed jõud nõrgad, kuid mitme interaktsiooni peale omavad piisavat sidumisenergiat. Selleks, et antigeenne determinant ja antikeha siduv ala saaksid interakteeruda, peab antikeha sidumiskoht sobituma epitoobiga – nii saavad mitte-kovalentsed sidemed moodustuda samaaegselt. [21]

1.3.5 Immuunvastuse tekkimine

Antikehade tootmiseks kasutatakse katseloomade mitmekordset immuniseerimist antigeeniga. Antigeeni süstimisel loomale hakkavad B-rakud primaarse immuunvastuse tulemusena tootma peamiselt madala afiinsuse ja kontsentratsiooniga IgM tüüpi antikehasid. Järgnevatel antigeeni süstimistel lülituvad B-rakud ümber IgG ja IgA tüüpi antikehade tootmisele. Sekundaarne immuunvastus kujuneb kiiremini ning omab kõrgemat antikehade tiitrit ja koosneb peamiselt IgG (vähesel määral ka IgA) tüüpi antikehadest [21]. Keskmise IgG afiinsus kasvab alates primaarsest immuunvastusest ja jätkab kasvu sekundaarse immuunvastuse korral.

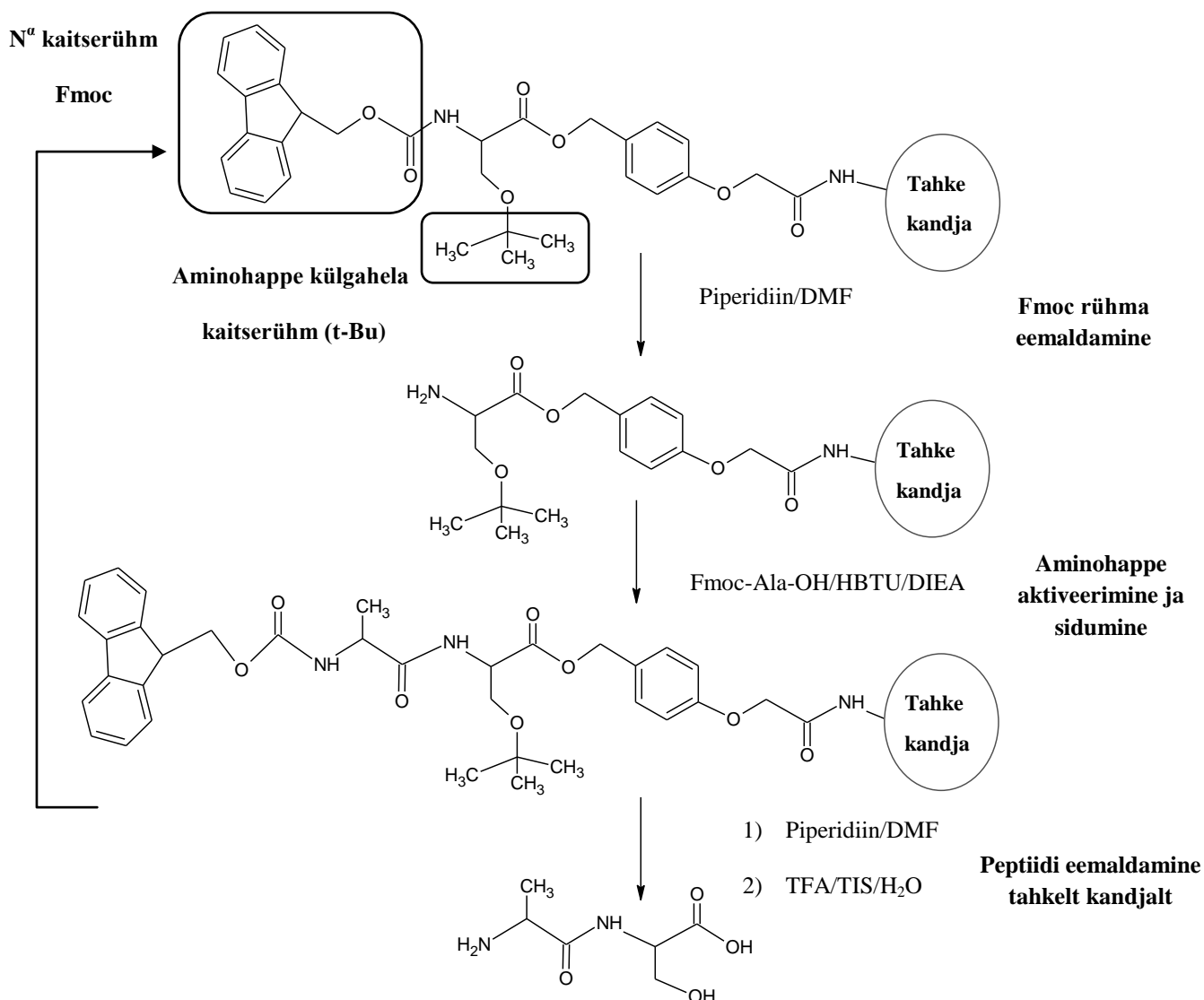
1.4 Peptiidisüntees

Sünteesilised peptiidid on leidnud rakendust mitmetes biokeemiaga seotud valdkondades: bioaktiivsete peptiidide uurimisel, valkude antigeensete piirkondade kaardistamisel ja antikehade tootmisel spetsiifiliste valgusegmentide vastu [22]. Rakenduste mitmekesisus on taganud mitmete peptiidisünteesi strateegiate välja arendamise. Immunogeensete peptiidide tootmiseks, mida saab rakendada immunosensorites kasutatavate detekteerivate antikehadena, kasutatakse peamiselt 9-fluoroenüülmethyl-oksükarbonüül/tert-butüüli (Fmoc/t-Bu) tahke faasi peptiidisünteesi strateegiat [23].

1.4.1 Tahke faasi peptiidisüntees

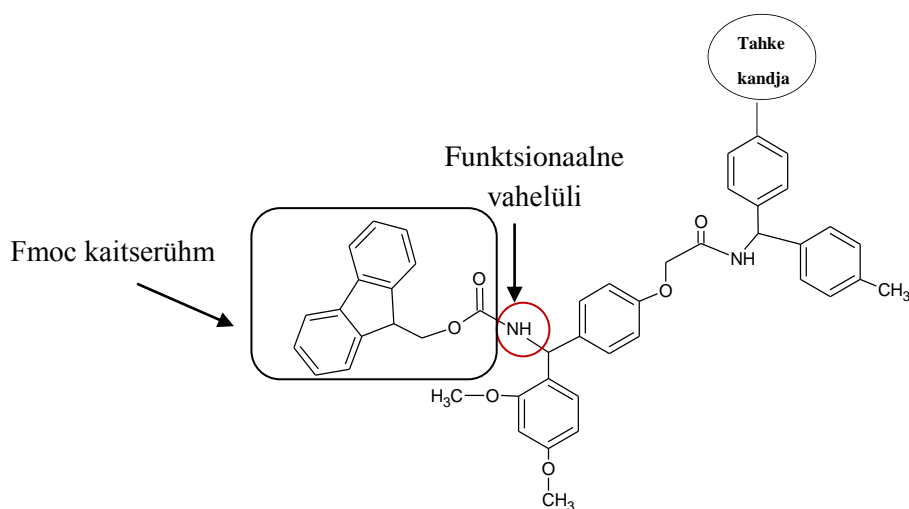
Laialdane laboratoorne peptiidisüntees algas 20. sajandil, kui Bruce Merrifield töötas välja tahke faasi peptiidisünteesi. Tahke kandja sisaldab funktsionaalset vahelüli, mille kaudu seotakse läbi ester- või amiidsideme sünteesitava peptiidi esimene N-terminaali α -aminorühma kaitstud (N^α -kaitstud) aminohape. [24]

Tahke faasi peptiidisüntees toimub etapiliselt, korrates peptiidsideme moodustumist aminohappe α -aminorühma ja N^α -kaitstud aminohappe C^α karboksüülrühma vahel. Peptiidsideme moodustamisele eelneb ajutise N^α -kaitserühma eemaldamine [22]. Iga reaktsiooni järel eraldatakse lahuses olevad üleliigsed reagentid ja kõrvalproduktid [24]. Pärast ajutise N-terminaalse kaitserühma eemaldamist saab järgmise N^α -kaitstud aminohappe liita läbi C^α karboksüülrühma aktiveerimise. Peptiidisüntees toimub suunas C-terminaalist N-terminaali suunas ($C \rightarrow N$). Protsessi korratakse seni, kuni soovitud peptiid on sünteesitud. Viimases etapis eemaldatakse peptiid tahke kandja küljest ja püsivad kaitserühmad aminohapete kõrvalahelate funktsionaalrühmadelt. Selleks kasutatakse trifluoroäädikhape (TFA) : H_2O : triisopropüülsilaani (TIS) segu. TIS on stabiliseeriv ühend, mida kasutatakse viimases etapis püsivate kaitserühmade eemaldamiseks peptiidiahelalt, sest neutraliseerib eemaldanud kaitserühmade reaktsioonivõimet. Peptiid lahustatakse vesilahuses ning ekstraheeritakse jääkülma eetriga. Vesilahus külmutatakse ja lüofiliseeritakse [22,23]. Joonisel 3 on esitatud Fmoc tahke faasi peptiidisünteesi põhimõtteline skeem.



Joonis 3. Tahke faasi peptiidsünteesi põhimõtteline skeem [25].

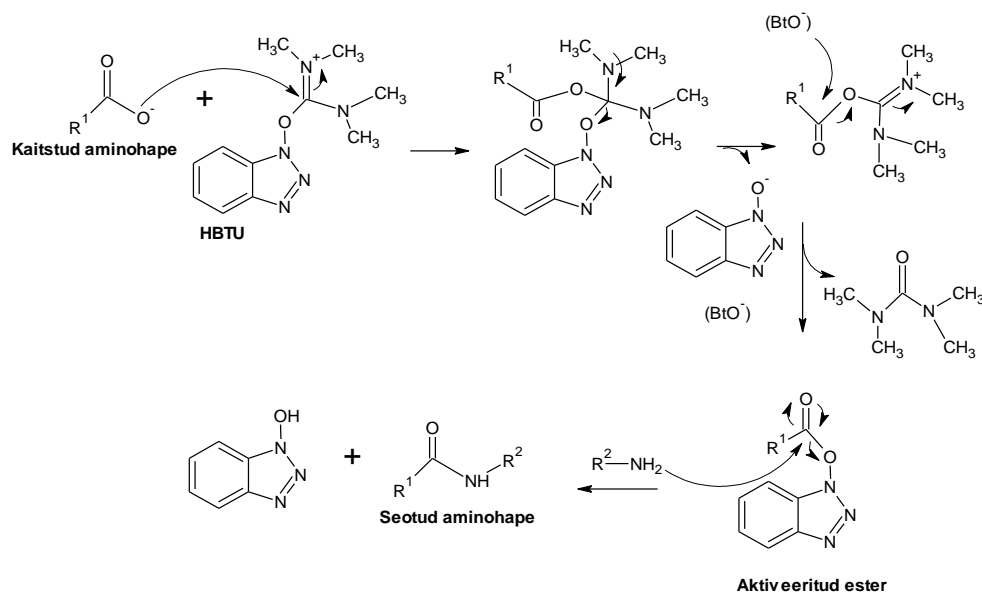
Tahke kandja all mõistetakse lahustumatut polümeeri, milles reaktsioonid toimuvad ka kandja sisemuses. Mittelahustuva kandja kasutamine võimaldab iga reaktsiooni lõpus üleliigsete reagentide väljapesemist [24,26]. Kõige laialdasemalt kasutatakse polüstüreen ja 1–2 % divinüülbenseeni polümeeride segu [27], millele on järjestikku kinnitatud kaks vahelüli. Viimane vahelüli, mille kaudu esimene aminohape seotakse tahkele kandjale, on funktsionaalne – jätab C-terminaali kindla funktsionaalrühma ja võimaldab sünteesitud peptiidi lõikamist kandjalt. Rink-amiid 4-metüülbenshüdrülamiid (MBHA) tahket kandjat kasutatakse, kui eesmärk on sünteesida C-terminaalselt amideeritud peptiidi (joonis 4).



Joonis 4. Fmoc-rink amiid MBHA tahke kandja.

Sünteesi saagise määrab vahelülide arv tahke kandja kohta. Liiga suur polümeeril kasvavate ahelate arv vähendab keemiliste reaktsioonide efektiivsust steriiliste mõjude, kõrvalreaktsioonide ja reagentide vähenenud difusiooni tõttu. [26]

Aktiveeritud aminohappeid kasutatakse tahkel kandjal olevate funktsionaalrühmade suhtes 2-10-kordses ülehulgas, mis tagab efektiivse difusiooni. Aminohappe sidumiseks kulub aeg sõltub aktiveerivatest reagentidest, nende kontsentratsioonidest ja tahkele kandjale seotud peptiidahelast. Sidumisreagentid, mis muudavad N^α -kaitstud aminohappe vastavaks aktiveeritud hüdroksüülbensotriasoole (OBt) estriks, põhinevad fosfoonium ja uroonium aktivaatoritel (HBTU). Tertsiaarne amiin N,N-diisopropüületüülamiin (DIEA) on vajalik selleks, et tekitada N^α -kaitstud aminohappe karboksülaati. Joonisel 5 on toodud välja aminohappe aktiveerimise skeem.



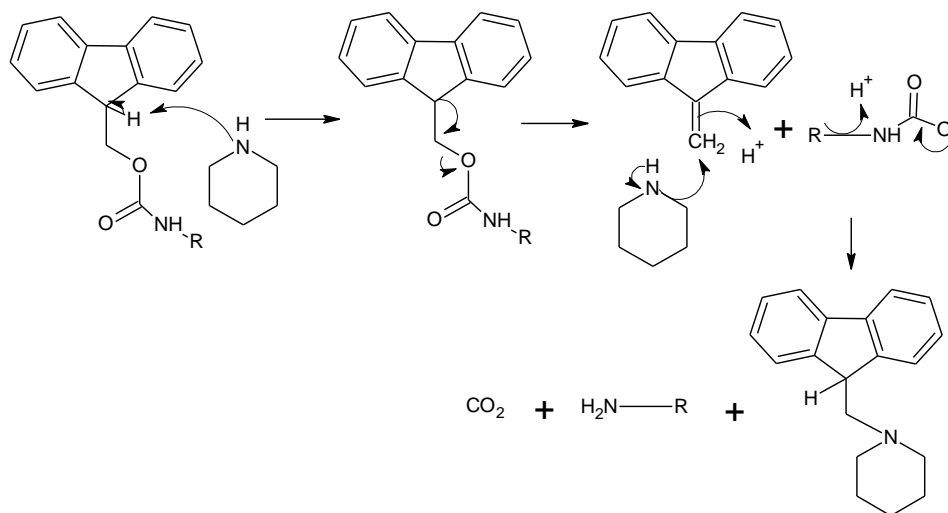
Joonis 5. Aminohappe aktiveerimine HBTU-ga [27].

1.4.2 Kaitserühmad

Aminohapete α -aminorühma kaitsmine on oluline, et vältida aktiveeritud aminohapete polümeerisatsiooni. α -aminorühma kaitserühmad peavad lahustuma enamikes solventides ja hoidma ära epimerisatsiooni aminohapete sidumisel.

Tahke faasi peptiidisünteesi käigus toimub α -aminorühma kaitserühmade eemaldamine iga aminohappe sidumise järel. Seetõttu peavad reaktsioonid toimuma võimalikult pehmetes tingimustes, et mitte mõjutada püsivaid kaitserühmasid, mis eemaldatakse peptiidisünteesi viimases etapis. Fmoc strateegia korral kasutatakse kõrvalahela funktsionaalrühmade kaitseks peamiselt happelabiilseid kaitserühmasid. [27]

Fmoc tahke faasi peptiidisüntees baseerub ortogonaalsel kaitserühmade strateegial – erinevad kaitserühmade klassid saab selektiivselt eemaldada peptiidisünteesi erinevates etappides: ajutine N^α -kaitserühm eemaldatakse alusega (20 % piperidiin/DMF-s) ning püsivad aminohapete kõrvalahelate kaitserühmad sünteesi lõpus happega (TFA-ga) [21]. Joonisel 6 on toodud skeem Fmoc-rühma eemaldamise kohta piperidiiniga.



Joonis 6. Fmoc kaitserühma eemaldamine piperidiiniga [27].

Kaitserühma eemaldamine peab olema kiire, efektiivne ja selle käigus ei tohi tekkida kõrvalprodukte. Aminohapete sidumise efektiivsuse hindamiseks kasutatakse ninhüdrüini ehk Kaiseritesti. See on kvalitatiivne test vabade aminorühmade olemasolu tuvastamiseks. Test põhineb ninhüdrüini reageerimisel primaarse amiiniga, mis reaktsiooni tulemusena annab iseloomuliku sinist värvi kompleksi, mida saab visuaalselt detekteerida [26]. Vabade aminorühmade esinemisel korratakse eelmise aminohappe seondumist või vabade aminorühmad atsetüleeritakse [27].

1.4.3 Peptiidide puhastamine

Piisava hulga soovitud peptiidi saamiseks on oluline iga sünteesietapi maksimaalne efektiivsus. Peptiidisünteesi käigus tekkivad kõrvalproduktid akumuleeruvad ja seetõttu on õiget produkti selle füüsikalise-keemiliste omaduste järgi segust keeruline eraldada.

Peptiidide efektiivseks puhastamiseks reaktsioonisegust kasutatakse pöördfaasi kõrgefektiivset vedelikkromatograafiat (RP-HPLC). Sünteetiliste peptiidide massi määramiseks kasutatakse tavaliselt maatriks-assisteeritud laser-desorptsioon-ionisatsioon-lennuaja analüsaator mass-spektromeetriat (MALDI-TOF MS) [23].

1.4.3.1 Pöördfaasi kõrgefektiivne-vedelikkromatograafia

Pöördfaasi kõrgefektiivne-vedelikkromatograafia (RP-HPLC) põhineb molekulide eraldamisel nende erineva polaarsuse alusel. Statsionaarse faasina kasutatakse n-alküülsilikaadi-põhiseid sorbente, kus silanoolrühmad on läbi kovalentse sideme asendatud mittepolaarsete alküülahelatega [28]. Mobiilse faasina kasutatakse solventide segu, et tagada proovi komponentide parem lahutusvõime, tavaliselt atsetonitriili või metanooli segu veega [30]. Lisandina kasutatakse mõlema eelnimetatud solvendi korral TFA-d, mis tagab peptiidahela funktsionaalrühmade täieliku laetuse ning soodustab lähedase polaarsusega molekulide väljumist kolonnist. Ained elueeritakse kromatograafiliselt kandjalt suureneva orgaanilise solvendi gradiendiga. Proovi retentsiooniaeg sõltub ka aine enda polaarsusest – hüdrofiilsemad peptiidid on vee molekulide poolt lihtsamini solvateeritavad ja väljuvad kolonnist varem, hüdrofoobsemate peptiidide jaoks on vaja tõsta orgaanilise solvendi gradienti. Peptiidide detekteerimiseks mõõdetakse UV-Vis kiirguse neeldumist peptiidside neelduvusele vastaval lainepikkusel 220 nm.

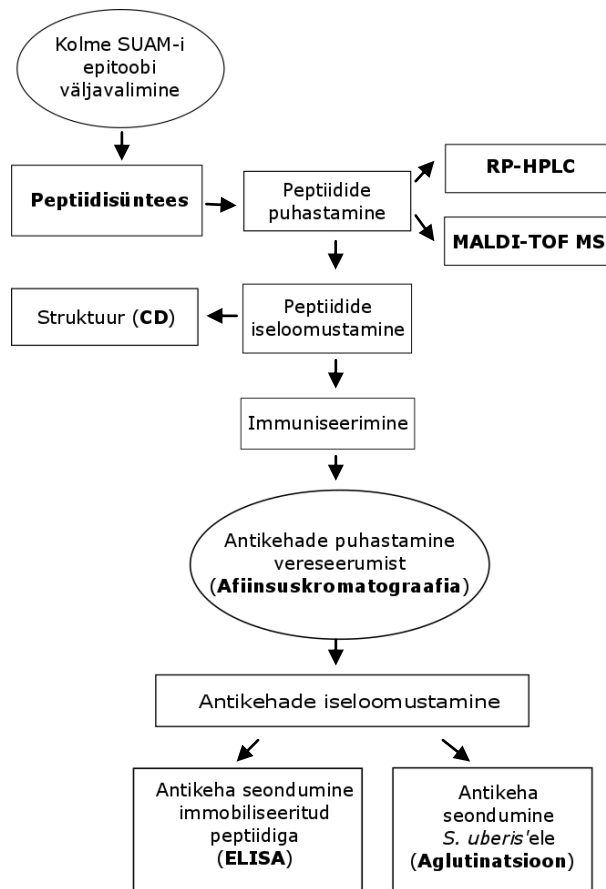
1.4.3.2 MALDI-TOF mass-spektromeetria

Maatriks-assisteeritud laser-desorptsioon-ionisatsioon-lennuaja analüsaator mass-spektromeetria (MALDI-TOF MS) on laialt levinud analüütiline meetod peptiidide, valkude ja teiste biomolekulide uurimisel [30]. MALDI-TOF MS meetodi korral segatakse uuritav ühend maatriksiga, mis kannab energia analüüdi molekulidele, et tagada polaarsete, termiliselt labiilsete ja kõrge molekulaarmassiga ühendite ionisatsioon [29]. Ioniseeritud proovi kiirendatakse elektriväljas ning määratavad molekulid jõuavad vastavalt massi/laengu (m/z) suhtele detektorisse: suurema m/z suhtega ioonid liiguvad lennutorus aeglasemalt kui väiksema m/z suhtega ioonid ja väljuvad seetõttu hiljem. Maatriksil peab olema tugev absorptsioon laserkiire poolt emiteeritaval lainepikkusel. Maatriks on aromaadne orgaaniline

ühend, mis sisaldab okso-, hüdroksüül- ja/või karboksüülrühmi. Üks levinumad maatriksiks kasutatavaid ühendeid on α -tsüano-4-hüdroksükaneelhape (HCCA) [31].

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

Magistritöö eksperimentaalne osa viidi läbi vastavalt joonisel 7 kujutatud skeemile.



Joonis 7. Eksperimentaalse töö skeem.

2.1 Kasutatud reagensid, materjalid ja aparatuur

2.1.1 Peptiidisüntees

- Fmoc-rink-amiid MBHA 0,41 mmol/g (Orpechem, Saksamaa);
- Atsetonitriil (AcN) 99,8 % (Sigma-Aldrich, USA);
- Diklorometaan (DCM) $\geq 99,8$ % (Sigma-Aldrich, USA);
- N, N-diisopropüületüülamiin ≥ 99 % (DIEA) (Sigma-Aldrich, USA);
- N, N-dimetüülformamiid $\geq 99,8$ % (DMF) (Sigma-Aldrich, USA);
- N-[1H-Bensotriasool-üül) (dimetüülamino) metüleen]-N-metüülmetaanamiinium heksa-fluorofosfaat ≥ 98 % (HBTU) (Sigma-Aldrich, USA);

- 1-hüdroksübensotriasool ≥ 99 % (HOBt) (Sigma-Aldrich, USA);
- Trifluoroäädikhape ≥ 99 % (TFA) (Sigma-Aldrich, USA);
- Triisopropüülsilaan ≥ 98 % (TIS) (Sigma-Aldrich, USA);
- Dietüüleeter $\geq 99,5$ %, (Sigma-Aldrich, USA).

Peptiidisünteesis kasutatud aminohapped (Iris Biotech GmbH, Saksamaa):

Fmoc-Ser(t-Bu)-OH	Fmoc-Glu(tBu)-OH
Fmoc-Ala-OH	Fmoc-Asp(t-Bu)-OH
Fmoc-Pro-OH	Fmoc-Gln(Trt) –OH
Fmoc-Val-OH	Fmoc-Lys(Boc)-OH
Fmoc-Tyr(t-Bu)-OH	Fmoc-Asn(Trt)-OH
Fmoc-Leu-OH	Fmoc-Phe-OH
Fmoc-Gly-OH	Fmoc-His(Trt)-OH
Fmoc-Thr(t-Bu)-OH	Fmoc-Ile-OH
Boc-Cys(Npys)-OH	

2.1.2 Peptiidi ELISA

- Detekteeriv antikeha (HRP-anti-rabbit immunoglobulins P0488; spetsiifiliste antikehade sisaldus 0,3 g/l) (Taani, Dako);
- Veise seerumi albumiin (BSA) ≥ 96 % (Sigma Aldrich, Saksamaa);
- Tween 20 (BioTop, Soome);
- 3, 3', 5, 5'-tetrametüülbensidiin (TMB) 98 %, Cas nr 54827-17-7, (Sigma Aldrich, Saksamaa);
- Dimetüülsulfoksiid (DMSO) 98 % (AppliChem, Hispaania);
- H₂O₂ 30 % (Applichem, Saksamaa);
- KCl 99,5 %, (AppliChem, Saksamaa);
- K₂HPO₄ 99,5 %, (AppliChem, Saksamaa);
- H₂SO₄ 98 % (Reachim, Venemaa);
- Sidrunhape 99,5 % (Sigma Aldrich, Saksamaa);
- ELISA plaadid, Nunc-Immuno Plate, MaxiSorp (Sigma Aldrich, Saksamaa).

2.1.3 Antikehade puhastamine vereseerumist

- HCl 35 % (Reachim, Venemaa);
- Naatriumkarbonaat-dekahüdraat ($\text{Na}_2\text{CO}_3 \times 10\text{H}_2\text{O}$) 99 %, (AppliChem, Saksamaa);
- CH_3COOH 90 % (Reachim, Venemaa);
- NaCl (AppliChem, Saksamaa);
- Naatriumvesinikfosfaat (Na_2HPO_4) 99 % (Sigma, Saksamaa);
- Naatriumvesinikfosfaat (Na_2HPO_4) 99 % (Sigma Aldrich, Saksamaa);
- Glütsiin ($\text{C}_7\text{H}_5\text{NO}_7$) 99,5 % (AppliChem, Saksamaa);
- Tris(hüdroksümetüül)-aminometaan ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$) 99,5 % (Scharlau, Hispaania);
- Naatriumasiid (NaN_3) (MERCK, Saksamaa);
- HiTrap NHS-aktiveeritud Sephadex High Performance kolonnid (1 ml) (GE Healthcare, Suurbritannia).

2.1.4 Kasutatud seadmed

- Peptiidisüntesaator nr 356017 (Biotage Initiator+Alstra, Rootsi);
- RP-HPLC (Agilent Technologies, USA);
- MALDI-TOF Microflex Lt (Bruker Daltonics, Saksamaa);
- Tsentrifuug Microfuge 16 (Beckman Coulter, USA);
- Kromatograaf ÄKTApurifier UPC 10 (GE Healthcare, Rootsi);
- UV 1800 UV-Vis Spektrofotomeeter (Shimadzu corporation, Jaapan);
- pH-meeter (Mettler Toledo, Šveits);
- Analüütiline kaal (Mettler Toledo, XS105);
- Vortex segaja (Heidolph, Saksamaa);
- Spektromeeter Multiskan MCC/340 (Labsystems, Soome);
- Chirascan Plus CD spektromeeter (Applied Photophysics, Suurbritannia).

2.1.5 Lahused

Kõik lahused valmistati Milli-Q (Millipore Corporation) veega. Puhverlahuste pH määrati pH-meetriga täpsusega $\pm 0,02$ ühikut. Reagendid kaaluti täpsusega $\pm 0,01$ mg. Lahused säilitati 4 °C juures. Töös kasutati järgnevaid lahuseid:

- 0,05 M $\text{Na}_2\text{CO}_3 \times 10\text{H}_2\text{O}$ (pH 9,6);
- 0,2 M $\text{Na}_2\text{CO}_3 \times 10\text{H}_2\text{O}$; 0,5 M NaCl (pH 8,3);
- CH_3COOH ; 0,5 M NaCl (pH 4,0);
- 0,05 M naatriumfosfaatpuhver (pH 7,0);
- 0,02 M naatriumfosfaatpuhver; 0,15 M NaCl (pH 7,4);
- 2 M glütsiin-HCl puhver (pH 2,5);
- PBS-puhver: 10 mM Na_2HPO_4 , 2 mM K_2HPO_4 , 140 mM NaCl, 3 mM KCl (pH 7,4);
- PBS-Tween 20 puhver: 10 mM Na_2HPO_4 , 2 mM K_2HPO_4 , 140 mM NaCl, 3 mM KCl, 1 % Tween 20 (pH 7,4);
- 0,1 M atsetaat-tsitraatpuhver (pH 6,0).

2.2 Kasutatud meetodid

2.2.1 *Streptococcus uberis*'e SUAM valgu antigeensete piirkondade määramine

Antikehasid saab loodusliku antigeeni puudumisel toota valgu teadaoleva aminohappelise järjestuse alusel. Sellisel juhul valmistatakse sünteetilised peptiidid, mis vastavad valgu väljavalitud regioonile [22]. SUAM valgu pinnal immunogeensete järjestuste leidmiseks kasutati bioinformaatilist analüüsi.

Esmalt leiti SUAM valgu aminohappeline järjestus *UniProt Knowledgebase (UniProtKB)* andmebaasist [33], kasutades valgu nimetust SUAM, mille vastav tunnusnumber on Q2VEB5. SUAM valgust potentsiaalsete antigeensete piirkondade leidmiseks rakendati *EMBOSS Antigenic* programmi, mis järjestab epitoobid antigeensuse skoori alusel. Programm põhineb poolempiirilisel meetodil, mis ennustab antigeenseid piirkondi aminohappejääkide füüsikalise-keemiliste omaduste ja eksperimentaalselt teadaolevate epitoobi segmentide kaudu. Kui valgu pinnal paiknevad hüdrofoobsed aminohappejäägid, nagu tsüsteiin, leutsiin ja valiin, siis on tõenäolisem, et need on osa antigeenset piirkonnast [34].

Pärast antigeensete piirkondade väljavalimist kasutati nende täpsemaks iseloomustamiseks *NetSurfP Protein Surface Accessibility and Secondary Structure Predictions* programmi, mis ennustab aminohappejääkide eksponeeritust valgumolekuli välispinnale ja ahelas olevate aminohappejääkide sekundaarset struktuuri [35].

Lisaks kasutati valitud epitoopide iseloomustamiseks *TMHMM Prediction of transmembrane helices in proteins* programmi [36], mis ennustab valgu domeenide paiknemise, kas intratsellulaarselt, ekstratsellulaarselt või transmembraanselt.

2.2.2 Peptiidide süntees ja puhastamine

Valitud peptiidide sünteesiks kasutati Fmoc/t-Bu tahke faasi peptiidisünteesi. Peptiidid sünteesiti 0,1 mmol skaalas nii käsitsi kui ka peptiidisüntesaatoriga (Biotage Initiator+ Alstra, 356017). Tahke kandjana kasutati 240 mg rink-amiid MBHA-t funktsionaalsete vahelülide (NH₂) hulgaga 0,41 mmol/g. Aminohappeid võeti 5-kordses ülehulgas. Liidetavad aminohapped aktiveeriti, kasutades 4-kordses ülehulgas 0,5 M HCTU/DMF ja 0,5 M HOBt/DMF ning 8-kordses ülehulgas 5,8 M DIEA. Ajutiste aluslabiilsete Fmoc kaitserühmade eemaldamiseks kasutati 20 % piperidiini/DMF-i lahust. Käsitsi läbiviidud peptiidisünteesi korral kontrolliti Fmoc rühma eemaldamist ja uue aminohappe liitumise efektiivsust ninhüdrini testiga. Vajadusel korrati aminohappe sidumise etappi või blokeeriti vabad aminorühmad atsetüleerimisega (HOBt/AcO₂/DIEA/NMP). Kõikide peptiidide

sünteesiprotsessi puhul lisati N-terminaali tsüsteiin (3-nitro-2-püridiinsulfenüül (Npys)), kus Npys tähistab kõrvalahela kaitserühma. Lisatud Npys rühma kasutati hiljem peptiidide konjugeerimisel meriteo hemotsüaniiniga (KLH-ga).

Peptiidijärjestuse eemaldamine tahkelt kandjalt ja kõrvalahelate kaitserühmade eemaldamine toimus 95 % TFA 2,5 % TIS ja 2,5 % Milli-Q vee lahusega. Seejärel eraldati peptiid tahkelt kandjalt, milleks seda pesti 1 ml TFA-ga. Seejärel lisati saadud lahusele peptiidi lahustamiseks 5 ml vett. Vesilahusele valati 45 ml jääkülma dietüületrit ning saadud lahust loksutati lahustunud orgaaniliste kõrvalühendite ekstraheerimiseks. Tekkinud kahefaasilist lahust külmutati vesifaasi jäätumiseni. Eeter eemaldati ning vesifaasi jäänud peptiid kuivatati lüofilisaatoril ja säilitati 4 °C juures.

2.2.2.1 Pöördfaasi kõrgefektiivne-vedelikkromatograafia

Sünteesitud peptiidid puhastati kõrvalproduktidest RP-HPLCga C3 kolonnis (Agilent Zorbax 9,4 × 250 mm, osakese suurusega 5 µm) AcN/ 0,1 % TFA ja H₂O/ 0,1 % TFA lahustega. Peptiidid lahustati 10 % AcN/ 0,1 % TFA lahuses ning kasutati tabelis 2 toodud gradiendiprogrammi eluendi voolukiirusel 5 ml/min, kus AcN % on atsetonitriili protsendiline sisaldus.

Tabel 2. Gradiendiprogramm peptiidide puhastamiseks eluendi voolukiirusel 5 ml/min.

Aeg (min)	0	5	40	45	50
AcN (%)	10	10	35	100	100

2.2.2.2 MALDI-TOF mass-spektromeetria

Saadud produktide määramiseks kasutati MALDI-TOF mass-spektromeetrit. 1 µl peptiidilahust segati 1 µl α-tsüano-4-hüdroksükaneelhape (HCCA) maatriksiga massi-spektromeetria prooviplaadil ning lasti kuivada. Maatriks ja analüüt aurustati laserkiire toimel ning kiirendati elektriväljas (20 kV). Ioniseeritud molekulide lennuaeg registreeriti lennutorusiooni molekulmassi ja laengu suhte alusel. Mass-spektromeetri abil mõõdetud analüüdi molekulmassi võrreldi peptiidi arvutusliku molekulmassiga ning identifitseeriti õiged produktid.

MALDI-TOF mass-spektromeetria mõõtmised viidi läbi Tartu ülikooli kliinikumi ühendlaboris Piret Arukuuse poolt.

2.2.3 Sünteesitud peptiidide struktuuri määramine

Tsirkulaarset dikroisimi (CD) kasutati, et määrata peptiidide struktuuri 1 mM vesilahuses. Tsirkulaarse dikroismi spektrite mõõdeti Chirascan Plus CD spektromeetriga (*Applied Photophysics*, Suurbritannia) 20 °C juures vahemikus 180–360 nm. Mõõtmiseks kasutati 0,1 mm optilise teepikkusega kvartsküvette (Hellma Analytics, nr 106-QS). Proovi kulus 25 µl.

2.2.4 Immuniseerimine

Küülikute immuniseerimine toimus tellimustööna firmas LabAs Ltd. Sünteesitud peptiidid konjugeeriti meriteo hemotsüaniiniga (KLH-ga) ja süstiti küülikutele. Immuniseerimiseks süstiti küülikuid kolm korda kolme nädalase intervalliga. Seejärel koguti veri ja eraldati vereseerum. Vereseerumit säilitati 1 ja 2 ml plastiktubides -20 °C juures.

2.2.5 *Streptococcus uberis* 'e kasvatamine ja suspensiooni valmistamine

Streptococcus uberis 'e (ATCC BAA-854/0140J, USA) rakkude kasvatamiseks külvati bakterikultuur Tartu ülikooli mikrobioloogia instituudis kahele erinevale söötmele:

- a) Petri tassis olevale defibrineeritud lambaverega TSB (sojaoa valkude trüpsiinilüsaat) töödeldud agarplaatidele ja inkubeeriti 48 h aeroobses keskkonnas 37 °C juures (ATCC poolt soovitatud sööde).
- b) Petri tassis olevale defibrineeritud tsitreeritud lambavere söötmele (Mikrolabor OÜ) ja inkubeeriti 24 h aeroobses keskkonnas 37 °C juures.

Kolooniad korjati statsionaarses kasvufaasis steriilse tamponiga ja viidi fosfaatpuhvrise (10 mM PBS; 0,15 M NaCl; pH 6,5). Bakterite suspensiooni pesti 5 ml PBS-ga, segati ja tsentrifuugiti (4000×rpm 5 min (Jouan CR3)), pesemist korrati kolm korda. Viimasena lisati 3 ml proteaaside kompleksinhibiitorit cOplete (*BoehringerMannheim*) ja PBS-i, et suspensiooni optiline tihedus vastaks 10⁸ CFU/ml. Suspensiooni optiline tihedus mõõdeti DEN-1B densiomeetriga (*McFarland Densitometer 1B Biosan*) McFarlandi standardi alusel täpsusega ±3 % McFarlandi ühikut. *Streptococcus uberis* 'e suspensiooni säilitati 4 °C juures.

2.2.6 Peptiidi ELISA

Ensüüm-seotud immunosorbent analüüsi (ELISA) kasutati antikeha kiireks tuvastamiseks ja kvantiseerimiseks proovis.

ELISA plaadi süvendid kaeti 100 µl peptiidilahusega (10 µg/ml) karbonaatpuhvriss (0,05 M Na₂CO₃ × 10H₂O; pH 9,6) ja lasti üleöö inkubeerida 4 °C juures. Peptiidi poolt katmata jäänud pinnad blokeeriti 3 % BSA lahusega PBS-s (30 minutit toatemperatuuril). Seejärel pesti plaadid 200 µl PBS-Tween 20 puhvriga (0,1 %) viis korda ning lisati süvenditesse 100 µl küüliku vereseerumit (või puhastatud antikehade fraktsiooni) PBS-Tween 20 puhvriss ning inkubeeriti 1 h toatemperatuuril. Süvendid pesti PBS-Tween 20 puhvriga kolm korda ning lisati 100 µl HRP-märgisega detekteerivat antikeha (2000-kordne lahjendus PBS-Tween 20 puhvriss) ja inkubeeriti 30 minutit toatemperatuuril, millele järgnes substraadilahuse lisamine (2 ml atsetaat-tsitraadi puhver, 20 µl substraati tetrametüülbensidiin (10 mg/ml) (TMB) dimetüülsulfoksiidis (DMSO-s), (8 µl 30 % H₂O₂)). Reaktsioonil lasti toimuda 10 minutit pimedas ja seejärel reaktsioon peatati 50 µl 1 M H₂SO₄ lisamisega. Optiline tihedus mõõdeti lainepikkustel 450 ja 620 nm kasutades spektromeetrit Multiskan MCC/340 (Labsystems, Soome).

2.2.7 Aglutinatsioon

Aglutinatsiooniks on vaja vähemalt kahe sidumistsentriga molekuli ja osakest, mille pinnal on sobiv seondumispartner (näiteks IgG ja bakter). Antikehade seondumisel erinevate bakterite pinnal paiknevate antigeenidega moodustavad antikeha-antigeeni agregaadid ehk toimub aglutinatsioon [37].

Antikehade olemasolu määramiseks küüliku vereseerumis segati 50 µl *S. uberis*'e suspensiooni (6×10^8 CFU/ml) ja 50 µl lahjendatud vereseerumit või afiinsuskromatograafiliselt puhastatud antikeha lahust (1,3 mg/ml) PBS-s ja inkubeeriti 2 h toatemperatuuril. Aglutinatsiooni detekteerimiseks pipeteeriti 8 µl proovi alusklaasile ja uuriti aglutinatsiooni mikroskoobi (Brighfield green LED illumination) abil kasutades 40-kordset suurendust (piksli suurus 8 µm, NA 0.95; Olympus).

2.2.8 Sünteesitud peptiidi sidumine HiTrap NHS-aktiveeritud kolonnile

HiTrap NHS-aktiveeritud Sepharose 4B maatriks on mõeldud ligandide kovalentseks sidumiseks läbi primaarse aminorühma.

Afiinsuskoloni tegemiseks kasutati Merit Nikopensiuse poolt väljatöötatud optimeeritud protokoll [38]. Afiinsuskolonn (1 ml) ühendati kromatograafia ÄKTA10

UPC10 (GE Healthcare, Rootsi) ja voolutati läbi 6 ml jääkülma 1 mM HCl lahust voolukiirusel 0,25 ml/min (piirrõhuks 0,6 MPa). Seejärel süstiti sisse peptiid (1 ml; 15 mg/ml) sidumispuhvril (0,2 M Na₂CO₃ × 10H₂O; 0,5 M NaCl; pH 8,3) voolukiirusel 0,1 ml/min. Peptiidi seondumiseks maatriksiga lasti kolonnil 30 minutit toatemperatuuril seista. Vabade aktiivsete rühmade deaktiveerimiseks töödeldi kolonni etanoolamiiniga (voolukiirusel 0,25 ml/min) järgmiselt:

- 6 ml A lahus (0,5 M etanoolamiin; 0,5 M NaCl; pH 8,3);
- 6 ml B lahus (CH₃COOH; 0,5 M NaCl; pH 4,0);
- 6 ml A lahus (0,5 M etanoolamiin; 0,5 M NaCl; pH 8,3).

Seejärel lasti kolonnil 30 minutit toatemperatuuril seista ja jätkati mitteseondunud ligandide väljapesemist:

- 6 ml B lahus (CH₃COOH; 0,5 M NaCl; pH 4,0);
- 6 ml A lahus (0,5 M etanoolamiin; 0,5 M NaCl; pH 8,3);
- 6 ml B lahus (CH₃COOH; 0,5 M NaCl; pH 4,0).

Viimaks voolutati kolonni 2 ml fosfaatpuhvriga (0,05 M Na₂HPO₄; pH 7). Kolonni säilitati 4 °C juures.

Seostunud peptiidi kontsentratsiooni määramiseks mõõdeti peptiidilahuse neelduvust enne sissesüstimist ja pärast (väljatulev fraktsioon) UV-Vis spektrofotomeetriga (UV-Vis Spektrofotometer, Shimadzu Corporation, Jaapan) lainepikkusel 280 nm. Selleks segati 1 ml eluaati 1 ml 2 M glütsiin-HCl puhvriga (pH 2,5) ja mõõdeti valguse neelduvus (NHS segav mõju on <0,005) ning määrati peptiidi kolonni seondumise saagis.

2.2.9 Antikehade puhastamine küüliku vereseerumist

Küüliku vereseerum (vastavalt lahjendusele 1 ml või 2 ml) sulatati üles 4 °C juures ning tsentrifugeeriti (10000×g 10 min), supernatant eemaldati ja lahjendati (100, 50, 40, 33, 25 ja 20 % vereseerumi lahjendus) seostumispuhvriga (20 mM Na₂HPO₄; pH 7,4) kogu ruumalal 2 ml. Lahjendatud vereseerum sisestati afiinsuskolonni voolukiirusega 0,25 ml/min (piirrõhuks 0,6 MPa). Kolonni voolutati 6 ml, et eralduksid mittespetsiifilised antikehad ja muud vereseerumi valgud. Seejärel vahetati puhver elueerimispuhvri (100 mM glütsiin; pH

2,5) vastu. Antikeha voolutati kolonnist välja ning viidi neutraalse pH juurde neutraliseerimispuhvri (1 M Tris; pH 9,0) lisamisega.

Puhastatud antikehade kontsentratsioon määrati spektrofotomeetri abil. Võttes eelduseks, et IgG osakaal vereseerumis on ligikaudu 80 % kõikidest antikehast [16], arvutati puhastatud antikehade ligikaudne kontsentratsioon. IgG neeldumine 1 % (10 mg/ml) lahuse korral on 13,7 lainepikkusel 280 nm ja see suurus ei erine oluliselt IgM ja IgA väärtustest, vastavalt 13,2 ja 11,8 [39].

3. TULEMUSED JA ARUTELU

3.1 SUAM valgu antigeensete piirkondade määramine

SUAM valgu antigeensete piirkondade määramiseks kasutati bioinformaatilist analüüsi. SUAMi aminohappeline järjestus leiti andmebaasist *UniProt Knowledgebase (UniProtKB)*. Otsingusõnana kasutati lühendit SUAM (*Streptococcus uberis* adhesion molecule) ning vastena saadi 905 aminohappeline valgu järjestus (lisa 1). Potentsiaalsed antigeensed piirkonnad SUAM valgust leiti EMBOSS *Antigenic* programmi abil, mis järjestas tulemused antigeensuse skoori alusel. Kümme kõrgeima skooriga tulemust on toodud tabelis 3.

Tabel 3. SUAM-i potentsiaalselt immunogeensed järjestused antigeensuse skoori alusel.

Jrk nr	Järjestus	Amino-happe-jääkide arv	Antigeensuse skoor	Asukoht SUAM-s
1.	SAPVYLGVSTE	11	1.168	512-522
2.	DQGVVAKVADN	11	1.154	838-848
3.	THYVIFPASNIVNAS	15	1.146	529-543
4.	QQIVLLKNH	9	1.142	747-755
5.	FSKQVVSGLTTV	13	1.140	545-557
6.	SEALVVSAQRKVDGLAAKLQK	21	1.134	589-609
7.	PDNLSVEVQNELAVFAATLINSVRQQFGLSAVEV	37	1.130	363-399
8.	VATQVLTQS	9	1.130	182-190
9.	YLNTFYALKDQLVSKAEVGYLNHYVDIA	29	1.129	326-354
10.	RAGIVMLAAAGLTGY	15	1.115	883-897

Immuniseerimiseks kasutatavad peptiidid on harva lühemad kui kaheksa aminohappejääki. Samuti ei kasutata peptiide, mis koosnevad rohkem kui 20 aminohappejäägist, sest antigeeni spetsiifilisus väheneb. Lisaks võivad pikemad aminohappejärjestused omandada konformatsioone, mis ei sarnane loodusliku valgu struktuuriga.

Leitud epitoopidest kaks kõige suurema antigeensuse skooriga peptiidi (tabel 3, 1. ja 2. järjestus) võeti aluseks *S. uberis*'e vastase antikeha valmistamiseks vajalike peptiidide sünteesil. Lisaks nendele valiti sünteesimiseks epitoop, millele kui potentsiaalselt perspektiivsele on viidatud kirjanduses [9]. Nimetatud epitoobis on 15 aminohappejääki ja

selle järjestus oli järgmine: PFFNYNQPGKNGHIG. Nimetatud epitoobi asukoht SUAM valgu järjestuses on 420-434. Väljavalitud SUAM-i epitoobid *S. uberis*'e vastase antikeha tootmiseks koos peptiidijärjestuste ja epitoopide asukohtadega SUAM valgus on toodud tabelis 4.

Tabel 4. *S. uberis*'e vastase antikeha tootmiseks valitud SUAM-i epitoobid, peptiidijärjestused ja epitoopide asukoht SUAM valgus. III peptiid on võetud artiklist [10].

Peptiidi nr	Aminohappeline järjestus	Asukoht SUAM-s
I	SAPVYLGVSTE	512-522
II	DQGVVAKVADN	838-848
III	PFFNYNQPGKNGHIG	420-434

Kuna kolmanda peptiidi aminohappeline järjestus kajastub ka EMBOSS *Antigenic* programmi tulemustes, siis võib eeldada, et ka esimese ja teise peptiidi vastu saab toota antikehasid.

Kõik tabelis 4 toodud peptiidid lülitati järgnevasse bioinformaatilisse analüüsi ning iseloomustati valitud aminohappejärjestuste ligipäasetavust SUAM valgus ja paiknemist *S. uberis*'e raku pinnal.

Väljavalitud potentsiaalseid antigeenseid piirkondi analüüsiti NetSurfP (*Protein Surface Accessibility and Secondary Structure Predictions*) programmiga, et selgitada välja, kas valitud aminohappelised järjestused on eksponeeritud SUAM valgu pinnal. Saadud tulemused on toodud tabelis 5.

Tabel 5. Valitud peptiidide aminohapete eksponeeritus SUAM valgu pinnal.

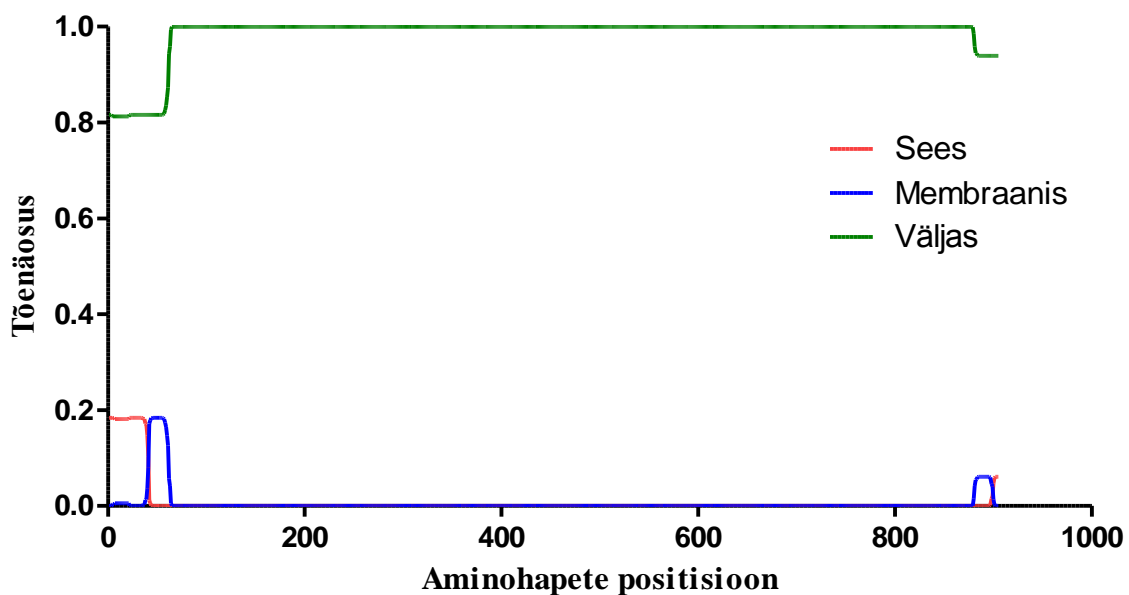
I peptiid (512-522)											
AH	S	A	P	V	Y	L	G	V	S	T	E
E/B	E	E	E	E	E	B	E	E	E	E	E

II peptiid (838-848)											
AH	D	Q	G	V	V	A	K	V	A	D	N
E/B	E	E	E	B	E	E	E	B	E	E	E

III peptiid (420-434)															
AH	P	F	F	N	Y	N	Q	P	G	K	N	G	H	I	G
E/B	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E

Tabelis 5 kajastuvad karakteristikud E ja B tähistavad vastavalt eksponeeritud ja peidus olevat aminohappejääki, AH tähistab aminohapet. Saadud tulemustest selgub, et valitud peptiidide aminohappejäägid peaksid SUAM valgu pinnal olema tõenäoliselt hästi eksponeeritud, sest esimese peptiidi puhul ei ole ainult 6. positsioonis paiknev leutsiini jääk ning teise peptiidi puhul positsioonides 4 ja 8 asuvad kaks valiini jääki tõenäoliselt pinnal eksponeeritud, vaid asuvad valgu struktuuri sees. Eksponeerituse seisukohalt on kirjanduse põhjal valitud peptiid täielikult valgu pinnal eksponeeritud ning seega väga sobiv immuniseerimiseks [10].

SUAM valgu asukohta määramiseks *S. uberis*'e membraanis kasutati TMHMM (*Predictions of transmembrane helices in proteins*) programmi, mis ennustab SUAM-i aminohappejääkide asukohta. Joonisel 8 on SUAM-i aminohappejääkide paiknemise tõenäosus üle kõigi võimalike asukohtade (sisemine/membraanne/välmine).



Joonis 8. SUAM valgu tõenäoline paiknemine *Sterptococcus uberis*'e rakumembraanis.

Kõikide SUAM-i aminohappejääkide korral on välmise paiknemise tõenäosus kõige suurem, olles alati suurem kui 0,8. SUAM valgu N-terminaali järjestus (1-36) vastab signaaljärjestusele, mis vastutab valgu transportimise eest raku pinnale või rakust välja. Valitud epitoobid paiknevad kõik suure tõenäosusega raku pinnal ja on seega sobivad *S. uberis*'e vastase antikeha tootmiseks.

3.2 Peptiidisüntees

Antud töös sünteesiti kolm peptiidi, mille järjestused on toodud tabelis 4. Peptiidide sünteesil kasutati Fmoc/t-Bu tahke faasi peptiidisünteesi strateegiat. Kõigi kolme peptiidi N-terminaali lisati tsüsteiin (Npys). Tabelis 6 on toodud välja peptiidide sünteesi saagised ja peptiidide teoreetilised molekulmassid (Da).

Tabel 6. Sünteesitud peptiidide molekulmassid (Da) ja saagised (%)

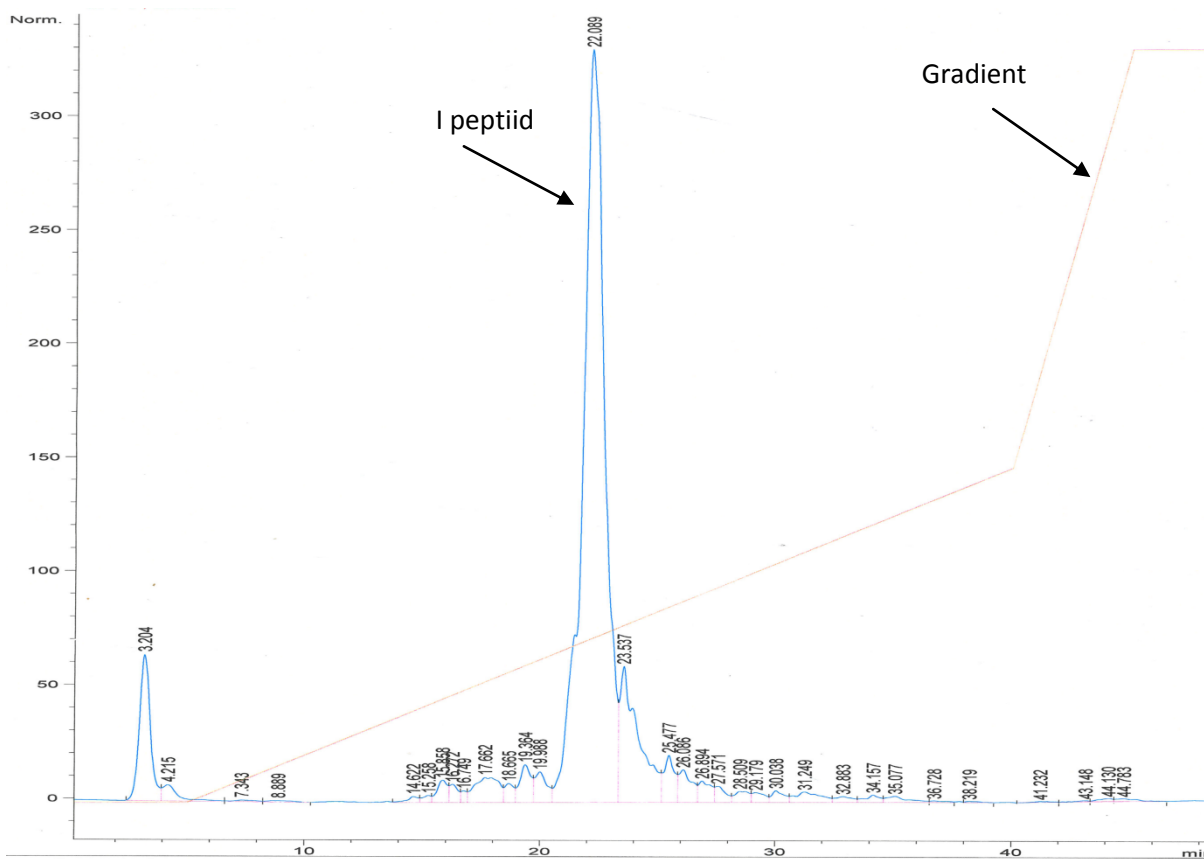
Nr	Järjestus	Molekulmass (Da)	Eksperimentaalne saagis (%)
1.	C(Npys)SAPVYLGVSTE-NH ₂	1378	10
2.	C(Npys)DQGVVAKVADN-NH ₂	1371	14
3.	C(Npys)PFFNYNQPGKNGHIG-NH ₂	1945	10

Sünteesitud peptiidide puhastamiseks kõrvalproduktidest kasutati RP-HPLC-d. Lüofiliseeritud peptiidid lahustati 1,8 ml-s AcN/H₂O 0,1 % TFA-s. Tabelis 7 on toodud atsetonitriili (AcN) kontsentratsioonid, mille juures peptiidid kolonnist elueerusid.

Tabel 7. Peptiidide atsetonitriili kontsentratsioon (%) peptiidide elueerimisel.

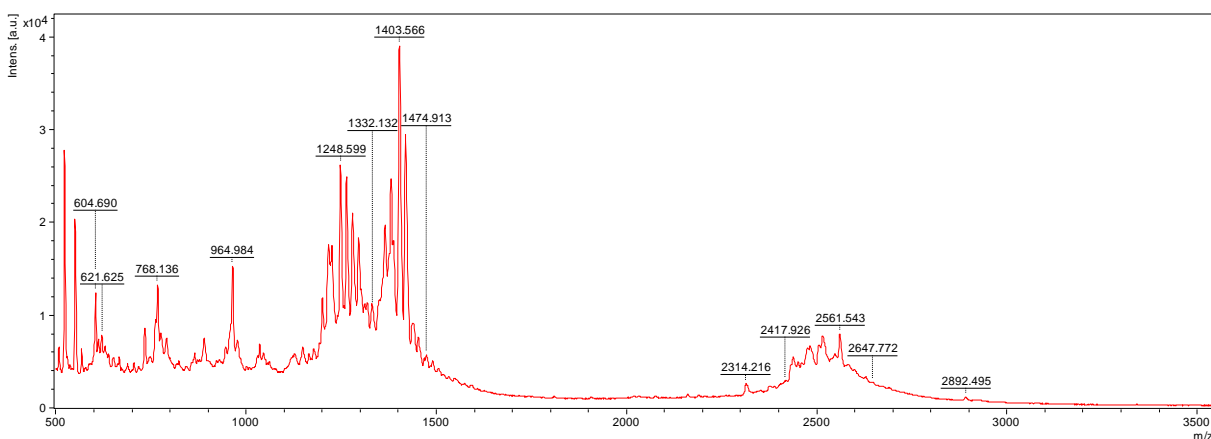
Järjekorra nr	Järjestus	AcN (%)
1.	C(Npys)SAPVYLGVSTE-NH ₂	28
2.	C(Npys)DQGVVAKVADN-NH ₂	20
3.	C(Npys)PFFNYNQPGKNGHIG-NH ₂	26

Kõigi kolme peptiidi korral jäid atsetonitriili kontsentratsioonid (AcN %) vahemikku 20–28 %. Joonisel 9 on toodud näitena I peptiidi RP-HPLC kromatogramm. II ja III peptiidi kromatogrammid on toodud lisana 2. Peptiidi sisaldavad fraktsioonid koguti, külmutati ja kuivatati lüofilisaatoril.



Joonis 9. I peptiidi puhastamine RP-HPLC-ga. Gradiendiprogramm on toodud tabelis 2.

MALDI-TOF mass-spektromeetriga määrati peptiidide molekulmassid enne ja pärast puhastamist RP-HPLC-ga. Joonisel 10 on toodud I peptiidi MALDI-TOF massispekter enne puhastamist RP-HPLC-ga. Massispektrilt on näha I peptiidi ja Na^+ kompleksipiik (1403,56 m/z).



Joonis 10. I peptiidi MALDI-TOF massispekter enne puhastamist RP-HPLC-ga.

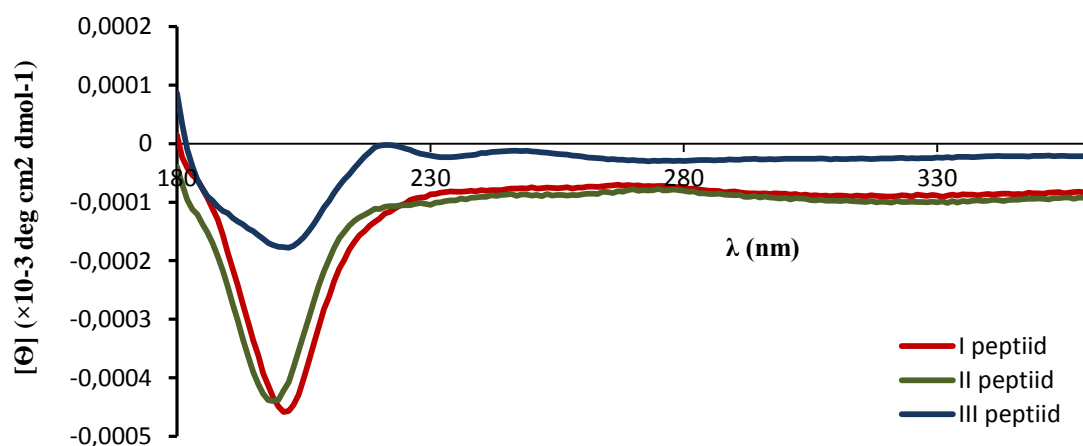
Lisana (lisa 3) on toodud II ja III peptiidi MALDI-TOF massispektrid. Kõigi kolme peptiidi (I-III) teoreetilised ja eksperimentaalsed molekulmassid on toodud tabelis 8.

Tabel 8. Teoreetilised ja mass-spektromeetriliselt määratud molekulmassid pärast RP-HPLCga puhastamist.

Järjekorra nr	Järjestus	Teoreetiline molekulmass	Ekspereimntaalne molekulmass
1.	C(Npys)SAPVYLGVSTE-NH ₂	1378	1378
2.	C(Npys)DQGVAKVADN-NH ₂	1371	1371
3.	C(Npys)PFFNYNQPGKNGHIG-NH ₂	1945	1945

3.3 Sünteesitud peptiidide struktuuri määramine

Sünteesitud peptiidide iseloomustamiseks uuriti nende struktuuri CD spektroskoopiaga ja saadud tulemusi analüüsiti kasutati olemasolevate andmebaaside alusel [40]. Saadud spektritest (joonis 11) selgus, et kõik peptiidid omavad mitteregulaarset struktuuri. Seega võib eeldada, et nende peptiidide vastased antikehad tekivad immuniseerimisel lineaarsete peptiidjärjestuste põhjal.

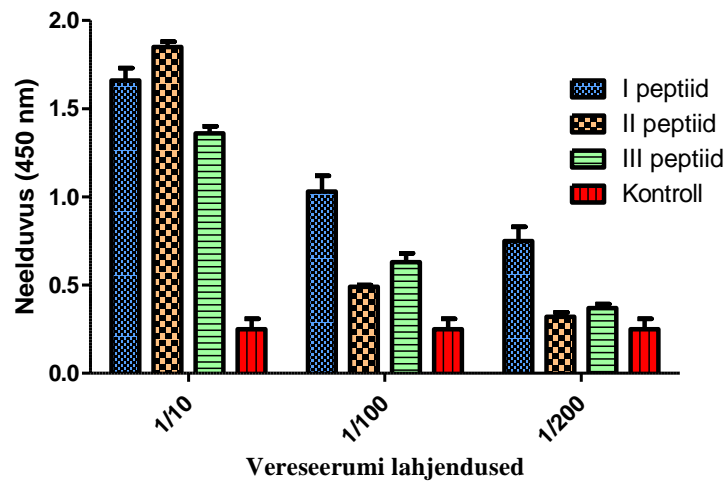


Joonis 11. 1 mM peptiidide vesilahuste CD spektrid. Mõõtmised viidi läbi 20 °C juures; kvartsküveti läbimõõt 0,1 mm.

3.4 Puhastatud antikehade iseloomustamine ELISA ja aglutinatsiooni testiga

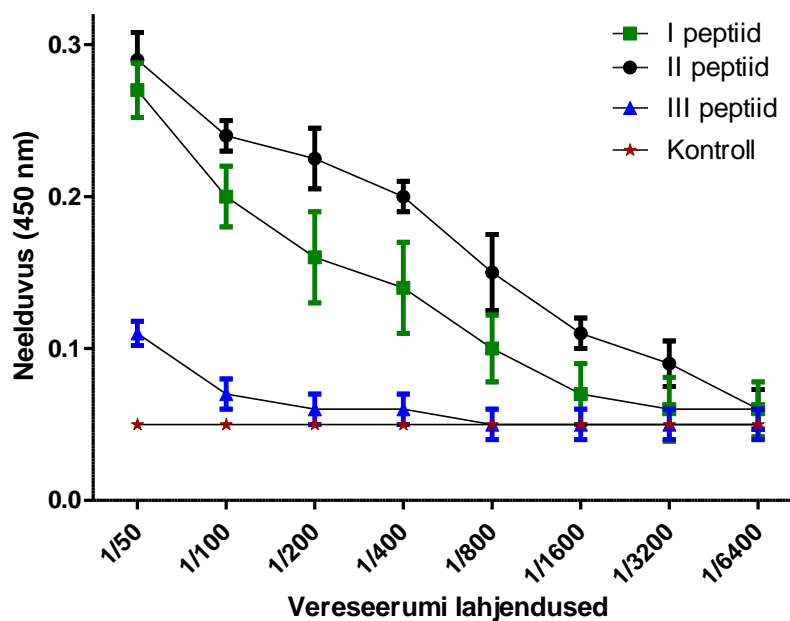
Selleks, et kontrollida antikehade olemasolu vereseerumis küülikute immuniseerimisel, viidi kõigi kolme peptiidiga immuniseerimisel saadud küülikute vereseerumitega läbi ELISA test. ELISA plaat kaeti peptiidilahusega (10 µg/ml). Vereseerumitest tehti lahjendused 1:10, 1:100 ja 1:200 (joonis 12), lisaks tehti negatiivne kontrollproov immuniseerimata küüliku vereseerumiga. Kõikide peptiidide vastaste vereseerumite korral toimus reaktsiooni värvimuutus (detekteeriti neelduvuse alusel 450 nm

juures) veel lahjenduse 1:100 juures, mis näitas immuniseerimiseks kasutatud peptiidide vastaste antikehade olemasolu.



Joonis 12. Antikehade esinemine küülikute vereseerumis ELISA testi alusel. Detekteeriva antikeha kasutati küüliku IgG vastaseid kitse antikehasid, mis oli märgistatud HRP-ga.

IgG tüüpi antikehade suhtelise sisalduse määramiseks vereseerumis tehti vereseerumist lahjendusseeriad (1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200, 1:6400, 1:128000). Detekteeriva antikehana kasutati IgG vastaseid HRP-ga märgistatud (2000-kordne lahjendus). ELISA tulemused näitavad IgG tüüpi antikehade leidumist vereseerumis, mis aga ei välista IgA ja IgM tüüpi antikehade olemasolu (joonis 13).

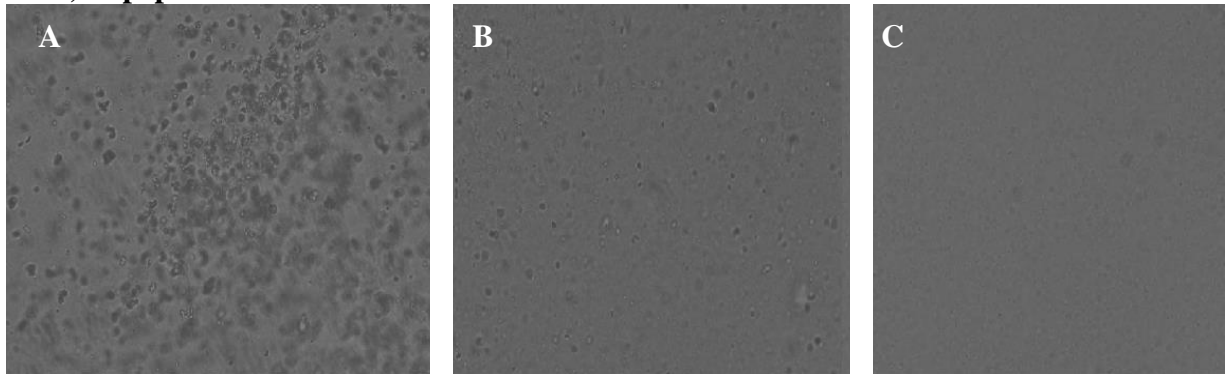


Joonis 13. Antikehade suhtelise sisalduse määramine vereseerumis.

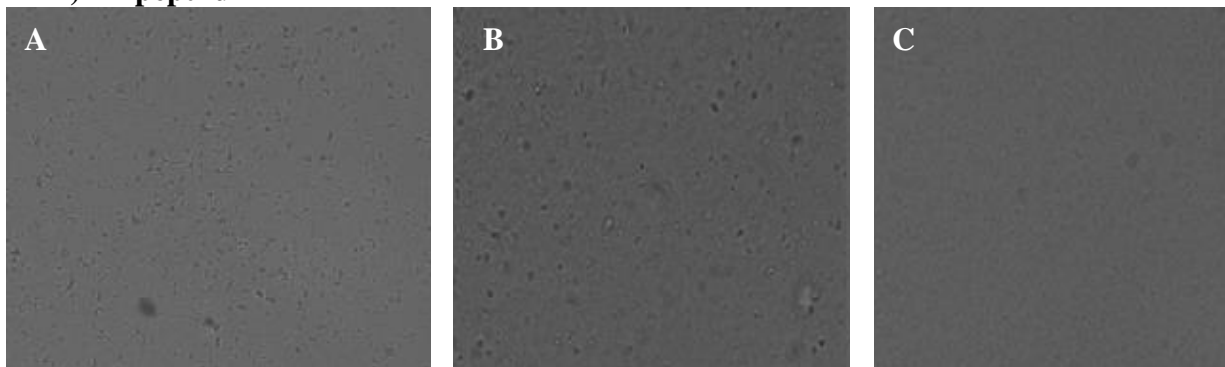
Selgus, et kõige rohkem oli IgG tüüpi antikehasid vereseerumis, mille puhul oli immuniseerimiseks kasutatud I peptiidi ja II peptiidi, samas III peptiidi poolt tekitatud IgG tüüpi antikehade tiiter oli madal.

Selleks, et kontrollida, kas vereseerumis olevad antikehad seonduvad ka *S. uberis*'e pinnal paiknevale naturaalsele SUAM valgule, viidi läbi aglutinatsiooni test vereseerumi ja *S. uberis*'e rakkude suspensiooniga (joonis 14).

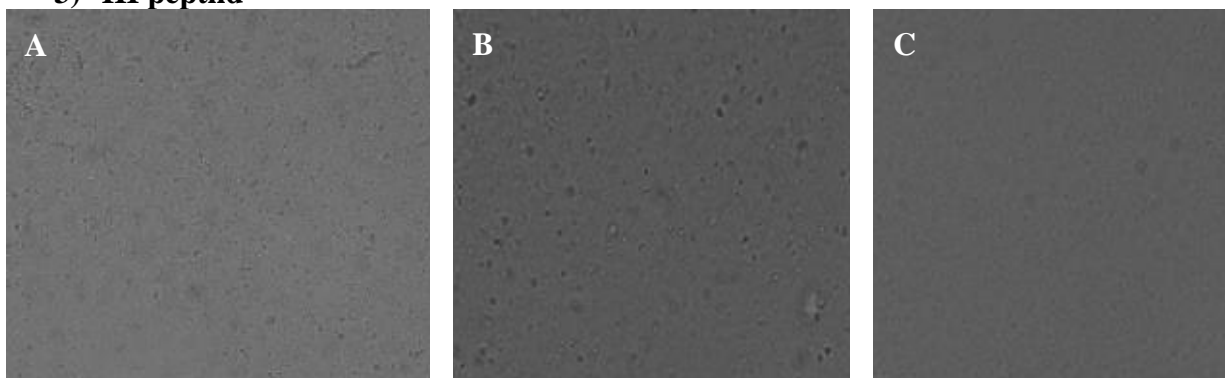
1) I peptiid



2) II peptiid



3) III peptiid



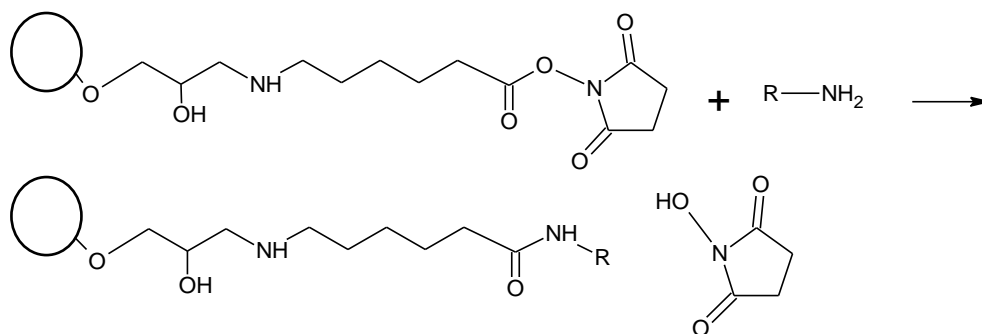
Joonis 14. Peptiidide (I-III) vastaste antikehade määramine vereseerumis aglutinatsiooni testiga. *S. uberis*'e bakterirakkude hulk oli 1×10^9 CFU/ml. Aglutinatsiooni detekteeriti mikroskoobi (Brighfield green LED illumination) abil kasutades 40-kordset suurendust (piksli suurus 8 μm , NA 0.95; Olympus). A) Bakterisuspensioon ja peptiidi vastane küüliku vereseerum B) Bakterisuspensioon ja kontrollproov (immuniseerimata küüliku veri) C) Bakterisuspensioon ja vesi.

Kõige parema tulemuse andis I peptiidiga immuniseeritud vereseerum, kus *S. uberis*'e ja vereseerumi vahel moodustusid detekteeritavad agregaadid (joonis 14 1A). II ja III peptiidiga immuniseeritud vereseerumite puhul (joonis 14 2A ja 3A) ei õnnestunud aglutinatsiooni detekteerida. Põhjuseks võis olla vale *S. uberis*'e rakkude ja vereseerumi kontsentratsioonide vahekord või vastavate peptiidijärjestuste vähene eksponeeritus bakteri pinnal, mille tõttu aglutinatsiooni ei toimunud. See aga ei välista antud vereseerumis antikehade olemasolu.

ELISA ja aglutinatsiooni testi tulemuste põhjal valiti välja I peptiidiga immuniseeritud küüliku vereseerum, millest antikehade puhastamiseks kasutati afiinsuskromatograafiat.

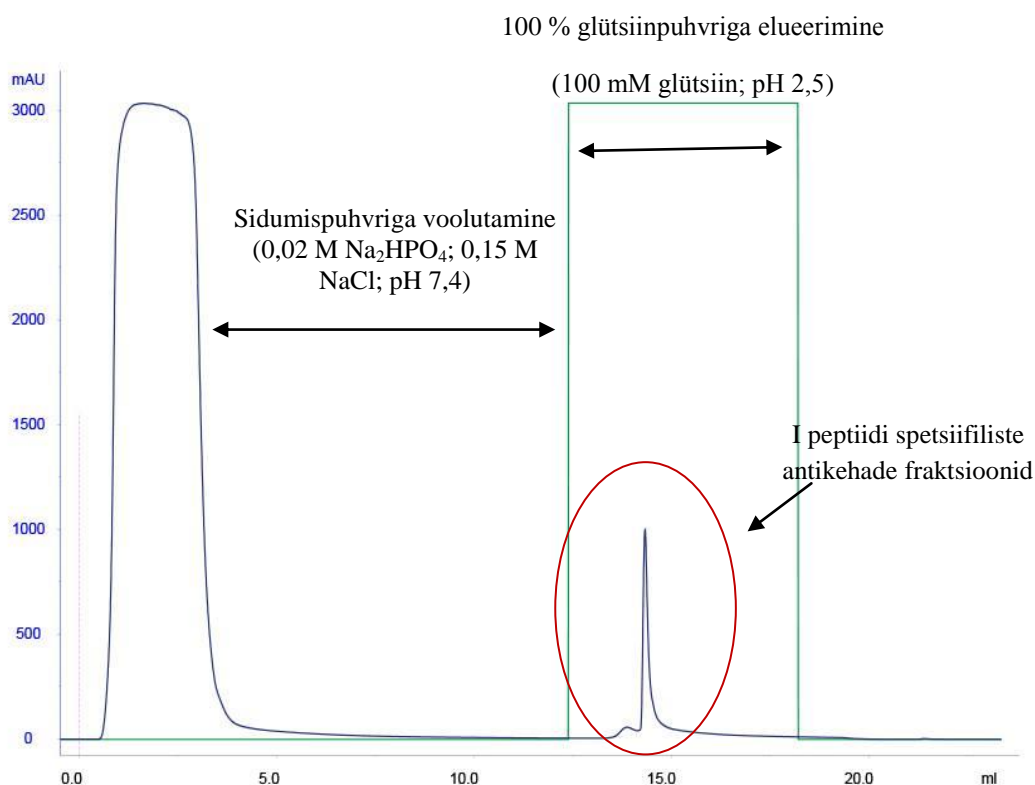
3.5 *S. uberis* 'e vastaste antikehade puhastamine vereseerumist

Antikehade puhastamiseks vereseerumist kasutati afiinsuskromatograafiat, mille afiinsuskoloni valmistamisel kasutati ligandina I peptiidi (vt. tabel 4), mida kasutati ka küülikute immuniseerimiseks antikehade tootmisel. Joonisel 15 on esitatud peptiidi sidumise skeem HiTrap NHS-aktiveeritud afiinsuskolonnile.



Joonis 15. Peptiidi sidumine HiTrap NHS-aktiveeritud maatriksile.

Jooniselt 16 on näha, et glütsiinpuhvriga elueerub kaks piiki – esmalt madalama afiinsusega antikehad ning seejärel kõrgema afiinsusega antikehad. Seega võib järeldada, et esimene väiksem piik võib vastata I peptiidi vastasele IgM tüüpi antikehale ja selle järgnev piik IgG tüüpi antikehale. IgM tüüpi antikehad tekivad primaarse immuunvastuse tulemusena ja omavad madalamat afiinsust võrreldes IgG tüüpi antikehadega, mis tekivad suurel hulgal sekundaarse vastuse korral. Sekundaarse immuunvastuse korral moodustavad IgG tüüpi antikehad ligikaudu 80 % antikehade koguhulgast [16].



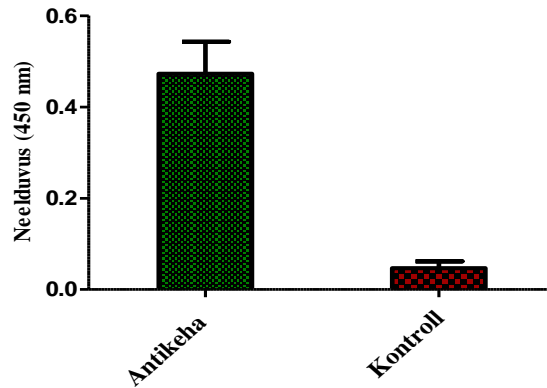
Joonis 16. Spetsiifiliste antikehade puhastamine küüliku vereseerumist (immuniseeritud I peptiidiga) afiinsuskromatograafiaga. Afiinsuskoloni ligand on I peptiid (tabel 4), seondunud antikehad elueeriti glütsiinpuhvriga (pH 2,5).

Selleks, et hinnata elueerimise efektiivsust, korraldati glütsiinpuhvriga pesemist. Teistkordsel elueerimisel 100 % glütsiinpuhvriga (pH 2,5) eraldus väike fraktsioon antikehasid, mis moodustas esimese vereseerumi antikeha pindala piigist 1 %.

Ülaltoodud eeldustele tuginedes – piik vastab IgG-le – määrati antikehade kontsentratsioon spektrofotomeetriliselt, kasutades IgG koefitsienti 13,7 (10 mg/ml lahuse korral). 2 ml suuruse vereseerumi proovi puhastamisel saadi antikehade kontsentratsiooniks piigile vastavas fraktsioonis 1,30 mg/ml ($\pm 0,04$ mg/ml).

3.6 Puhastatud antikehade iseloomustamine

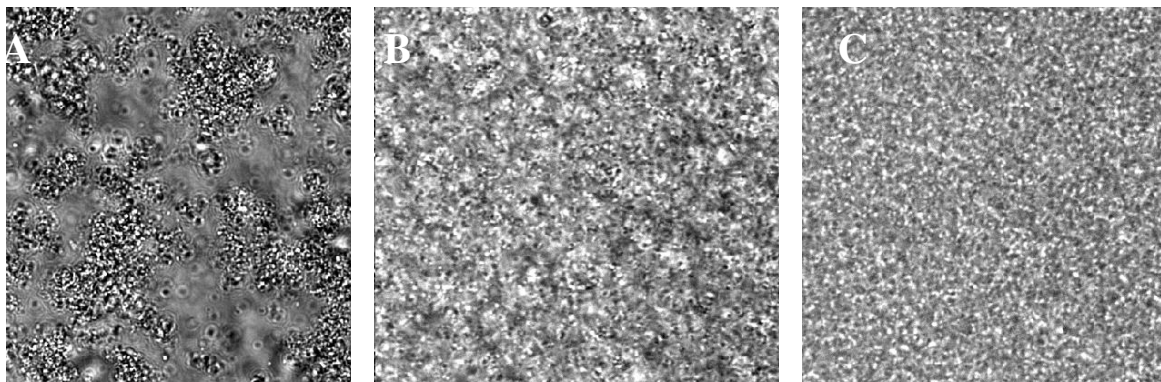
Afiinsuskromatograafiliselt puhastatud I peptiidi vastase antikeha aktiivsuse kontrolliks kasutati ELISA testi. Antikeha kontsentratsioon oli 1,3 mg/ml (joonis 17)



Joonis 17. I peptiidi vastaste antikehade aktiivsuse määramine ELISA testiga. ELISA plaat oli kaetud I peptiidiga (10 µg/ml) 0,05 M karbonaatpuhvrts (pH 9,6).

ELISA testi tulemused näitasid, et puhastatud antikeha fraktsioon on pärast glütsiinpuhvrtsiga (pH 2,5) elueerimist ja Tris'ga neutraliseerimist endiselt aktiivne ning seondub I peptiidiga.

Aglutinatsiooni testi abil kontrolliti ka puhastatud antikeha fraktsiooni sidumisvõimet *S. uberis*'e pinnal paiknevale SUAM-le. Bakteri suspensioonist (1×10^9 CFU/ml) tehti 5-, 10-, 25-, 50- ja 100-kordne lahjendus PBS puhvrts (0,01 M PBS; 0,15 M NaCl; pH 7.4). Kõige suuremad antikehade ja *S. uberis*'e agregaadid detekteeriti 5-kordse bakterisuspensiooni lahjenduse korral. Kontrollproovina kasutati immuniseerimata küüliku vereseerumit. Aglutinatsiooni pildid on toodud välja joonisel 18.



Joonis 18. Antikehade aktiivsuse kontrollimine pärast puhastamist afiinsuskromatograafiaabil. *S. uberis*'e kontsentratsioon oli $11,4 \times 10^7$ CFU/ml. Aglutinatsiooni detekteeriti mikroskoobi (Brighfield green LED illumination) abil kasutades 40-kordset suurendust (piksli suurus 8 µm, NA 0.95; Olympus). A) Vereseerumist puhastatud antikehade ja *S. uberis*'e vaheline aglutinatsioon B) Kontrollproov ja *S. uberis* C) Vesi ja *S. uberis*.

Puhastatud antikehad seondusid *S. uberis*'e rakkudele, mis näitab aktiivse antikeha fraktsiooni puhastamist vereseerumist. Aglutinatsiooni tulemused tõestavad bioinformaatilise analüüsi paikapidavust – välja valitud SUAM-i epitoobi vastane antikeha seondub *S. uberis*'ele.

KOKKUVÕTE

Magistritöö eesmärgiks oli disainida ja valmistada antikeha-antigeen äratundmisreaktsioonil põhinev bioäratundmissüsteem mastiiti tekitava patogeeni *Streptococcus uberis*'e määramiseks. Kasutades bioinformaatilist lähenemist, valiti *S. uberis*'e pinnal asuvast SUAM valgust kaks potentsiaalset antigeenset piirkonda, mille alusel sünteesida peptiidid *S. uberis*'e vastase antikeha valmistamiseks. Kolmandaks peptiidiks valiti kirjanduse põhjal juba varasemalt leitud SUAM valgu epitoop. Kõigi kolmele aminohappejärjestuse jaoks hinnati aminohappejääkide eksponeeritust valgu pinnal ning kontrolliti SUAM valgu paiknemist rakumembraani pinnal. Peptiidide sünteesiks kasutati Fmoc/t-Bu tahke faasi peptiidisünteesi strateegiat. Sünteesitud peptiididega immuniseeriti küülikuid, et toota peptiidide vastaseid antikehasid. Antikehade olemasolu määramiseks vereseerumis viidi läbi peptiidi ELISA test, mis kinnitas peptiidi vastaste antikehade olemasolu. Aglutinatsiooni test kinnitas, et vastavad antikehad on võimelised seonduma ka *S. uberis*'e pinnale. Afiinsuskromatograafiat kasutades puhastati polükloonaalsest vereseerumist monospetsiifilised SUAM-i epitoobi (I peptiid) vastased antikehad. Puhastatud antikeha fraktsioonide aktiivsust kontrolliti peptiidi ELISA ja aglutinatsiooni testiga.

Vastavate analüüside tulemused kinnitavad bioinformaatilise analüüsi paikapidavust: sünteesitud peptiid (SAPVYLGVSTE) on immunogeenne ning vastav aminohappeline järjestus on eksponeeritud bakteri pinnal. See loob eelduse vastavate antikehade rakendamiseks *S. uberis*'e detekteerimiseks immunosensoris ning ühtlasi ka kolme enamlevinud mastiiti tekitava patogeeni: *E. coli*, *S. aureus*'e ja *S. uberis*'e üheaegseks kiireks määramiseks toorpiimas.

TÄNUAVALDUSED

Täna oma juhendajaid, Toonika Rinke ja Meeme Utti, heade nõuannete ja abi eest antud töö koostamisel. Lisaks eriline tänu Piret Arukuusele peptiidsünteesi õpetamise ja mass-spektroskoopiliste mõõtmiste eest. Samuti täna Liina Kangurit tsirkulaarse dikroismi spektrite mõõtmiste ja Sergei Kopantšuki aglutinatsiooni testi tulemuste pildistamise eest.

KASUTATUD KIRJANDUS

1. P. N. Ward, M. TG. Holden, J. A Leigh, N. Lennard, A. Bignell, A. Barron, L. Clark, M. A. Quail, J. Woodward, B. G. Barrell, S. A. Egan, T. R. Field, D. Maskell, M. Kehoe, C. G Dowson, N. Chanter, A. M. Whatmore, S. D. Bentley, J. Parkhill, Evidence for niche adaptation in the genome of the bovine pathogen *Streptococcus uberis*. BMC Genomics. 10 (2009) 1.
2. D. Patel, R. A. Almeida, J. R. Dunlap, S. P. Oliver, Bovine lactoferrin serves as a molecular bridge for internalization of *Streptococcus uberis* into bovine mammary epithelial cells. Vet. Microbiol. 137 (2009) 297.
3. Veterinaar- ja toidulaboratooriumi aastaaruanded – mastiit, <http://www.vetlab.ee/?a=page&page=42f088c48f3e323aa1bbc> viimati alla laetud 15.05.2015.
4. P. Kalmus, Clinical Mastitis in Estonia: diagnosis, treatment efficacy and antimicrobial resistance of pathogens in Estonia. Doctor Thesis, Estonian University of Life Sciences, 2013.
5. B. E. Gillespie, S. P. Oliver, Simultaneous Detection of Mastitis Pathogens, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, and *Streptococcus agalactiae* by Multiplex Real-Time Polymerase Chain Reaction. J. Dairy Sci. 88 (2005) 3510.
6. R. A. Almeida, D. A. Luther, H-M. Park, S. P. Oliver, Identification, isolation, and partial characterization of a novel *Streptococcus uberis* adhesion molecule (SUAM). Vet. Microbiol. 115 (2006) 183.
7. S. P. Oliver, R. A. Almeida, D. A. Luther, H-M. Park, *Streptococcus uberis* adhesion molecule. US 8629249 B2, 2000.
8. W. Fang, S. P. Oliver, Identification of lactoferrin-binding proteins in bovine mastitis-causing *Streptococcus uberis*. FEMS Microbiol. Lett. 176 (1991) 91.
9. D. Patel, R. A. Almeida, J. R. Dunlap, S. P. Oliver, Bovine lactoferrin serves as a molecular bridge for internalization of *Streptococcus uberis* into bovine mammary epithelial cells. Vet. Microbiol. 137 (2009) 297.
10. R. A. Almeida, D. A. Luther, D. Patel, S. P. Oliver, Predicted antigenic regions of *Streptococcus uberis* adhesion molecule (SUAM) are involved in adherence to and internalization into mammary epithelial cells. Vet. Microbiol. 148 (2011) 323.
11. V. Perumal, U. Hashim, Advances in biosensors: Principle, architecture and applications. J. Appl. Biomed. 12 (2014) 1.

12. N. B. Ramirez, A. M. Salgado, B. Valdman, The evolution and developments of immunosensors for health and environmental monitoring: problems and perspectives. *Braz. J. Chem. Eng.* 26 (2009) 227.
13. A. C. Donahue, M. Albitar, Antibodies in biosensing, in *Recognition Receptors in Biosensors*, Springer Science, New York, 2010, pp. 221-248.
14. D. L. Nelson, M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry* (5th Ed), Freeman, New York, 2009, pp. 158-179.
15. C. J. Padoa, N. J. Crowther, Engineered antibodies: a new tool for use in diabetes research. *Diab. Res. Clin. Pract.* 74S (2006) S51.
16. L. M. Prescott, J. P. Harley, D. A. Klein, *Microbiology* (6th Ed), Wm. C. Brown Publishers, USA, 1990, pp. 593-656.
17. G. M. Edelman, B. Benacerraf, On structural and functional relations between antibodies and proteins of the gamma-system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 48 (1962) 1035.
18. M. Kehry, C. Sibley, J. Fuhrman, J. Schilling, L.E. Hood, Amino acid sequence of a mouse immunoglobulin mu chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76 (1979) 2932.
19. T. T. Wu, E. A. Kabat, An analysis of the sequences of the variable regions of Bence-Jones proteins and myeloma light chains and their implication for antibody complementarity. *J. Exp. Med.* 132 (1970) 211.
20. E. A. Kabat, T. T. Wu, Attempts to locate complementarity determining residues in the variable positions of light and heavy chains. *Ann. NY Acad. Sci.* 190 (1971) 382.
21. I. Roitt, J. Brostoff, D. Male, *Immunology* (6th Ed), Mosby, New York, 2001, pp. 65-141.
22. U. Soomets, A. Karlström, M. Zilmer, Ü. Langel, *Solid Phase Peptide Synthesis of Glutathione and IT Analogs by Fmoc – and tert-Boc-Chemistry*, Tartu University Press, Tartu, 1998, pp. 4-37.
23. N. H. Trier, P. R. Hansen, G. Housen, Production and characterization of peptide antibodies. *Methods.* 56 (2012) 136.
24. R. B. Merrifield, Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* 14 (1963) 2149.
25. W. C. Chan, P. D. White, *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A practical approach*, Oxford University Press, Oxford, 2000, pp. 10-40.
26. G. B. Fields, *Methods in Enzymology: Solid-Phase Peptide Synthesis*, Academic Press, New York, 1997, p. 289.

27. J. M. Palomo, Solid-phase peptide synthesis: an overview focused on the preparation of biologically relevant peptides. *Roy. Soc. Ch.* 4 (2014) 32568.
28. E. Kaiser, R. Colescott, C. Bossinger, P. Cook, Color test for detection of free terminal amino groups in the solid - phase synthesis of peptides. *Anal. Biochem.* 34 (1970) 595.
29. M-I. Aguilar, *Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatograph*, Vol. 251. Humana Press, Totowa, New Jersey, 2004, pp. 9-22.
30. R. E. Ardrey, *Liquid Chromatography – Mass Spectrometry: An Introduction*, Wiley, Huddersfield, 2003, pp. 12-101.
31. J. K. Lewis, J. Wei, G. Siuzdak, Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry in Peptide and Protein Analysis, in *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 2000, pp. 5880-5894.
32. G. Montaudo, R. P. Lattimer, *Mass Spectrometry of polymers*, CRC press LLC, New York, 2002, pp. 428-509.
33. Universal Protein Resource, <http://www.uniprot.org/> viimati külastatud 24.05.15.
34. European Molecular Biology Open Software Suite, <http://emboss.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/antigenic> viimati alla laetud 17.05.2015.
35. B. Peterson, T. N. Peterson, P. Andersen, M. Nielsen, C. Lundegaard, A generic method for assignment of reliability scores applied to solvent accessibility predictions. *BMC Struct. Biol.* 9 (2009) 1.
36. Prediction of transmembrane helices in proteins, <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/> viimati külastatud 24.05.2015.
37. K. Murphy, P. Travers, M. Walport, *Janeway's immunobiology* (7th Ed), Garland Science, New York and London, 2008, pp. 111-138.
38. M. Nikopensius, *Streptococcus uberis*'e vastaste antikehade puhastamine vereseerumist, Bakalaureusetöö, Tartu Ülikool, 2015.
39. I. V. Nikolayenko, O. Y. Galkin, N. I. Grabchenko, M. Y. Spivak, Preparation of highly purified human IgG, IgM, and IgA for immunization and immunoanalysis. *Ukr. Bioorg. Acta.* 2 (2005) 3.
40. M. K. Sharon, T. J. Jess, N. C. Price, How to study proteins by circular dichroism, *Biocim. Et Biophys. Acta.* 1758 (2005) 119.

Biorecognition system for detection of *Streptococcus uberis*

Kaisa Mihklepp

SUMMARY

Streptococcus uberis is an important environmental mastitis pathogen that causes subclinical and clinical mastitis throughout the world. Mastitis cause large economic impact because of the reduction of milk production and quality and public health significance.

The aim of this work was to generate selective biorecognition system for detection of *Streptococcus uberis* based on antibody-antigen biorecognition. Firstly, the objective was to predict surface exposed peptides and select peptide sequences for production of synthetic peptides. The three SUAM epitopes were selected by bioinformatic analysis. Next step was to synthesize three peptides by Fmoc/t-Bu solid phase strategy. These peptides were used to immunize rabbits and produce detective antibodies against *Streptococcus uberis*. Produced monospecific antibodies were purified from rabbit blood serum by affinity chromatography and characterized their activity against *Streptococcus uberis* using peptide ELISA and agglutination tests. Results suggest that I peptide has the most potential to be used in biorecognition system for the detection of *Streptococcus uberis*.

The results of this thesis will be useful to design immunosensor for detection of *Streptococcus uberis*. Further idea is to develop technology for the rapid and simultaneous detection of several pathogens in raw milk.

LISAD

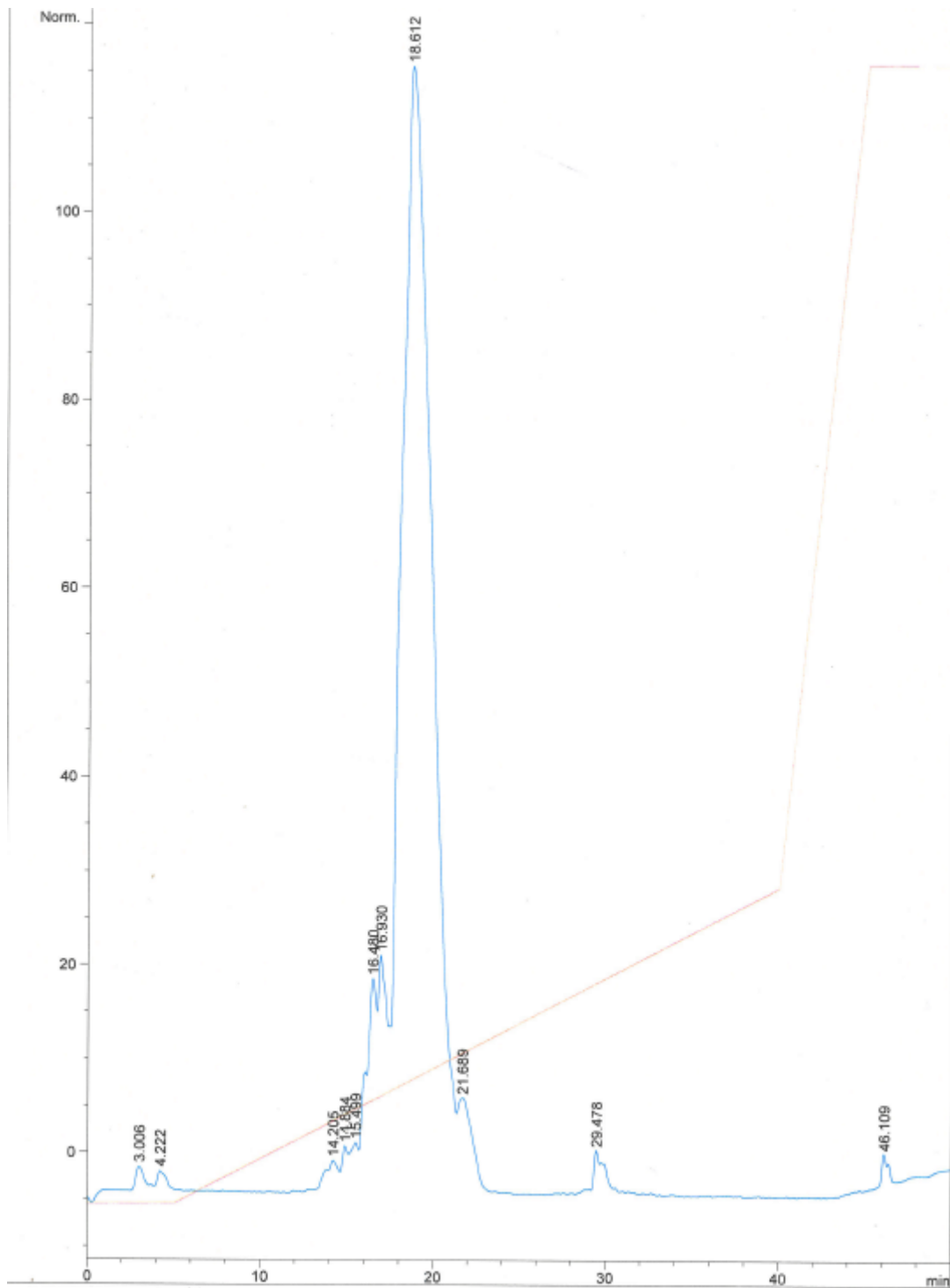
Lisa 1

SUAM valgu aminohappeline järjestus. Kollasega on näidatud sünteesitud peptiidide asukohad (I peptiid violetne, II peptiid roheline ja III peptiid kollane).

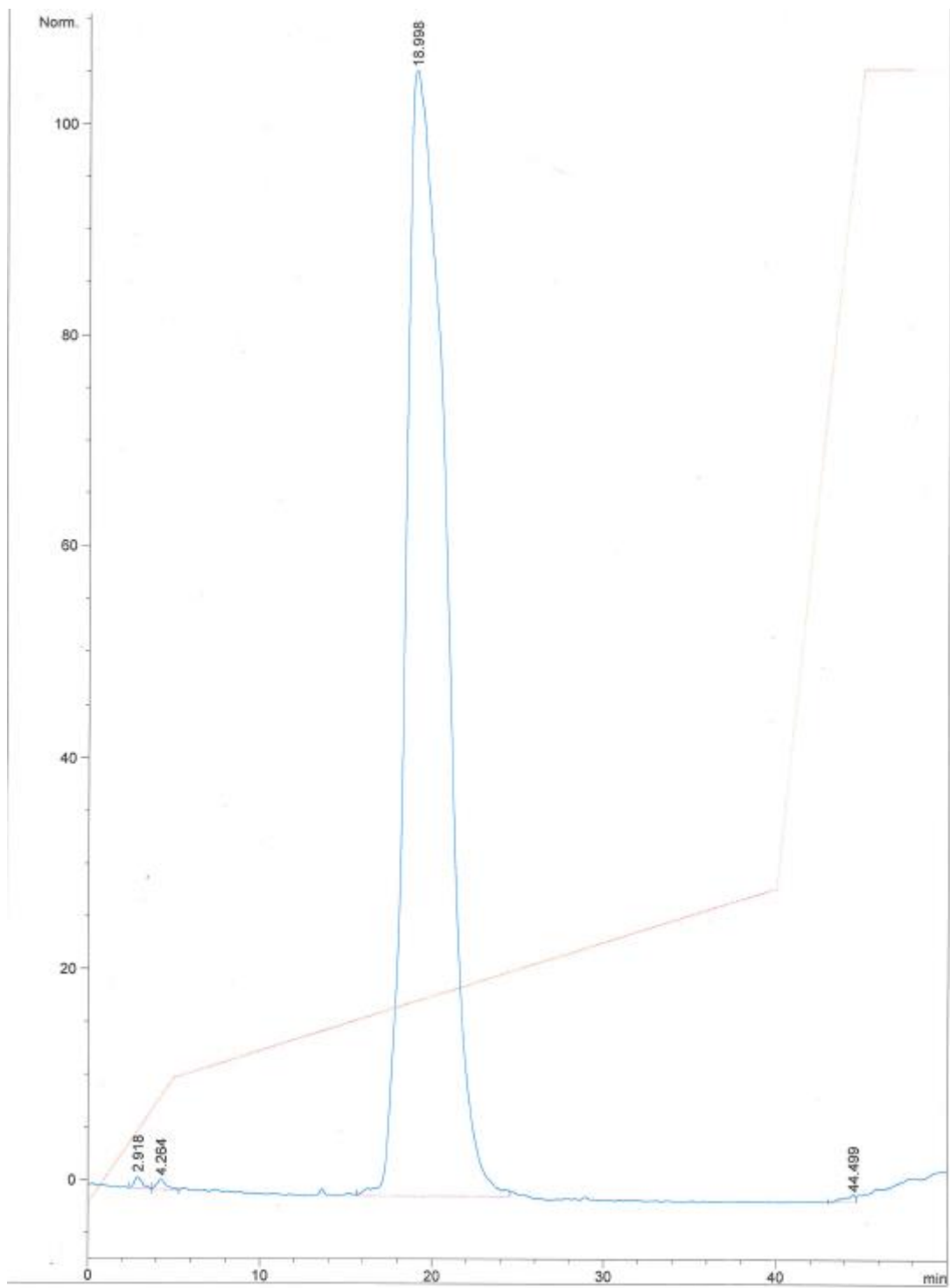
MSRTIKSSSLKLGIFLTIYNVWREKGNIMELENTKSNQIKTTLALTSTLALLGTGVGMGHT
VNADDMTTADQSPKLQGEATLAPTNIEDTKAAIDTKTATLAEQTDALNTVNETITSTNE
ELATLEGGLADKETAVADAECTLESVSNASEEEFNQLAEQNKADLAKTQEELKLAEATKE
EVATQVLTQSDEVTAANEAKKMAEKVAQAETKVSDDLTKMVNQPEAITAQVEIEQNNVKI
ISEDLAkakTDLVAVTDNTKTQLANDLATAQSSLSAKQNELAKVQSQTSNVAVNVMGANK
MVAPTNYPIINEIKKLMSSGYIGTQSYLNTFYALKDQLVSKAEVGGAYLNHYVDIASDLNRI
VNPDLNSVEVQNELAVFAATLINSVRQQFGLSAVEVTQGAQEFARTLTQNYKATHGNTVP
FFNYNQPGKNGHIGIGPHDRTIIEQAATSVGLKANDDNMYENIGFFDDVHTVNGIKRSIY
NSIKYMLFTDLTYGNTFGHTVNLLRSDKTNPSAPVYLGVSTETVGGLNTHYVIFPASNIV
NASQFSKQVVSGLTTVDNSAKISTLQASIASVESKIQTLQKRIANISSEALVISAQRKV
DGLAAKLQKAESNVEKAKAQLQQLKDSKEDLHKQLAFALSTRKDLKGQLDESLVHLNQSK
ILFHSLEEKQSQVASQINVLTLLKKAQLEKELAFNSHPNREKVAKKVEEAQKALTETLSQ
IKTKKAILNDLTQEKAKLTSAITTTEQQIVLLKNHLANQVANAPKISSIVQRSENNGVRP
DVSDTREKAVDTAQEATILAQAEETMAEEVITNSAKAIVANAQNVAQEIMKVAPEVTPDQG
VVAKVADNIIKKNAPASKSYGASSSTVGNATSSRDESTKRALRAGIVMLAAAGLTGYKLR
RDG

Lisa 2

II peptiidi RP-HPLC kromatogramm, retentsiooniajaga 18,612 min.

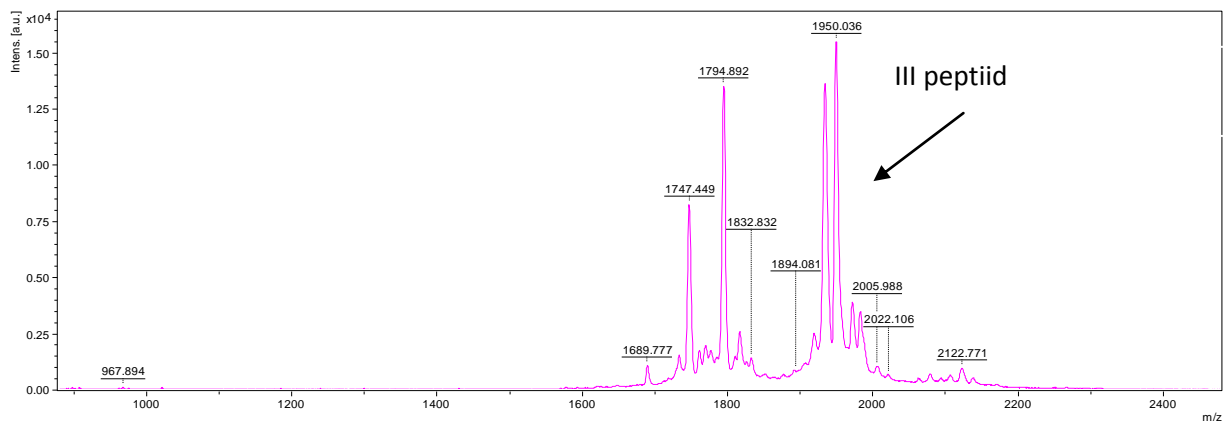
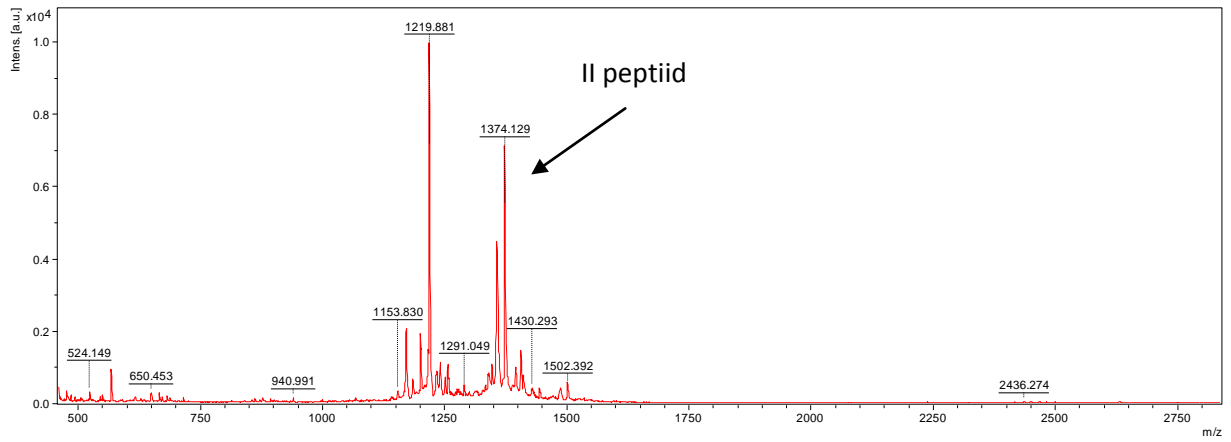


III peptiidi RP-HPLC kromatogramm, retentsiooniajaga 18,998 min.



Lisa 3

II ja III peptiidi MALDI-TOF massispektrid enne puhastamist RP-HPLC-ga



Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Kaisa Mihklepp,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose
Bioäratundmisreaktsioon *Streptococcus uberis*'e määramiseks,

mille juhendajad on Toonika Rincken ja Meeme Utt

1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **01.06.2018** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, **25.05.2015**