

Opinnäytetyö (AMK)

Bioanalytiikka

2010

Sari Pitkänen

MYKOPLASMAN TESTAA- MINEN SOLUVILJELYNÄYT- TEISTÄ KAHTA ERI MENE- TELMÄÄ KÄYTTÄEN



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Sari Pitkänen

MYKOPLASMAN TESTAAMINEN SOLUVILJELYNÄYTTEISTÄ KAHTA ERI MENETELMÄÄ KÄYTTÄEN

Mykoplasmat ovat pienempiä itsestään jakautuvia bakteereja, jotka ovat hyvin yleisiä soluviljelyn saastuttajia. Mykoplasmat aiheuttavat paljon huolta ja ongelmia soluviljelyssä, koska niiden läsnäoloa ei voi huomata ilman erillistä testausta. Mykoplasman saastuttamat soluviljelmit aiheuttavat huomattavia vääristymiä tutkimustuloksissa.

Mykoplasmojen selvittämiseen ja tunnistamiseen on käytettävissä monia erilaisia testejä. Tässä työssä selvitettiin ELISA- ja PCR-menetelmiä mykoplasman tunnistamiseksi ja tutkittiin kumpi menetelmänä soveltuisi parhaiten työyhteisömme tarpeisiin. Tutkimusmenetelmänä oli vertaileva tutkimus, jonka mittarina oli koe.

Testattavia näytteitä oli 50 kappaletta. Näytteet otettiin solujen kasvatusmediumista ennen solujen jakamista, uutta soluampullia sulatettaessa, sekä ennen solujen pakastusta.

Samoista näytteistä 26 kpl (52 %) oli positiivisia ELISA-menetelmällä ja 38 kpl (76 %) PCR-menetelmällä. PCR-menetelmä tunnisti positiivisiksi 12 kpl sellaisia näytteitä, jotka ELISA-menetelmällä olivat negatiivisia. ELISA-testi tunnisti vähemmän mykoplasmoja kuin PCR-testi, mutta oli kuitenkin spesifinen niille neljälle lajille kuin testi lupasikin. PCR-testi antoi positiivisiksi sellaisia näytteitä, jotka ELISA-testi antoi negatiiviseksi. Todennäköistä siis on, että näytteissä oli jokin muu mykoplasma kuin ne neljä, joita ELISA-testi tunnisti. Osa näytteistä oli ELISA-testillä positiivisia sellaisen mykoplasman osalta, joka leviää soluviljelyyn ihmisen kautta. Tämä on selvästi ongelma, sillä soluviljelylaboratoriossa työskentelevien tutkijoiden määrä on suuri. Ainoastaan järkevällä ja varovaisella menettelyllä voidaan eliminoida tällaiset mykoplasmat pois.

ASIASANAT:

(ELISA, KONTAMINAATIO, MYKOPLASMA, PCR, SOLUVILJELY)

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Degree programme in Biomedical Laboratory Science

December 2010 | 30

Marja Kelderer

Sari Pitkänen

COMPARING TWO DIFFERENT METHODS TO TEST MYCOPLASMA IN CELL CULTURES

Mycoplasma are the smallest self-replicating bacteria, and contaminations caused by mycoplasmas are alarmingly common in cell cultures. Mycoplasmas comprise a serious problem in cell culturing, since their detection is practically impossible without specific tests. Scientific results from mycoplasma-contaminated cell cultures are not reliable.

Many methods for detecting contaminant mycoplasmas have been described. In this work, ELISA- and PCR-detection methods were used to recognize mycoplasmas from cell cultures, and the goal was also to find out which of these two methods would be more suitable to our research group. The research method was a comparative research, of which a *test* was used as an indicator.

Totally 50 samples were tested. The samples were taken from cell culture media, both before the cells were cultured, when the cells were melted from frozen cell ampoules, and also before the cells were frozen again.

The results showed that from the same samples, 26 (52 %) were positive by ELISA and 38 (76 %) were positive by PCR-detection method. 12 samples which were negative by ELISA were positive by PCR. ELISA recognized four different mycoplasma species, one of which was originally from human. However, since PCR recognized over hundred mycoplasma species and still some of the samples were negative by PCR and positive by ELISA, it is likely that some of the cell cultures were mycoplasma-contaminated by the person who was culturing the cells. This is a severe problem, since cell culturing is usually done by a huge amount of different researchers. Only with extremely careful and sterile work these human-originated mycoplasma contaminations can be avoided.

KEYWORDS:

(CELL CULTURE, CONTAMINATION, ELISA, MYCOPLASMA, PCR)

SISÄLTÖ

1 JOHDANTO	4
2 MYKOPLASMA TUTKIMUSLABORATORIOSSA	5
2.1 Soluviljely	5
2.2 Mykoplasma	6
2.2.1 Miten mykoplasma pääsee soluviljelyyn?	6
2.3 PCR eli polymeraasiketjureaktio	8
2.3.1 PCR-reaktion osat	9
2.3.2 PCR-reaktion kulku	9
2.4 ELISA eli entsyymivälitteinen immunosorbentti määrittäminen	10
2.4.1 Suora ja epäsuora menetelmä	11
2.4.2 Sandwich-ELISA	12
3 TYÖN TARKOITUS JA TUTKIMUSONGELMAT	14
3.1 Testien käytettävyys	15
3.2 Tutkimusmenetelmä	15
3.2.1 Mittauksen validointi	16
3.2.2 Mittauksen reliabiliteetti	17
3.3 Tutkimuksen eettisyys ja luotettavuus	17
3.4 Tutkimusongelmat	18
4 TUTKIMUKSEN TOTEUTUS	19
4.1 Tutkimusaineiston keruu ja analysointi	19
4.1.1 Solulinjat	19
4.1.2 Näytteenotto	19
4.2 ELISA:n työvaiheet	20
4.3 PCR:n työvaiheet	22
4.4 Menetelmien vertailu	23
5 TULOKSET	24
6 POHDINTA	27
LIITE	
ELISA- ja PCR-näytteiden tulokset	

KUVAT

Kuva 1. Soluviljelyä kontaminoivat tekijät	5
Kuva 2. PCR-reaktion kulku	9
Kuva 3. ELISA:n periaate	14
Kuva 4. Anti-coating vasta-aineen pipetointi levyille	20
Kuva 5. Anti-detection vasta-aineen pipetointi levyille	21
Kuva 6. PCR-tulokset agarosigeelillä	25

TAULUKOT

Taulukko 1. Mykoplasman leviäminen soluviljelyyn	6
Taulukko 2. PCR-ajo-ohjelma	22
Taulukko 3. Positiiviset mykoplasmaalajit näytteissä	24
Taulukko 4. Testien kriteerit	26

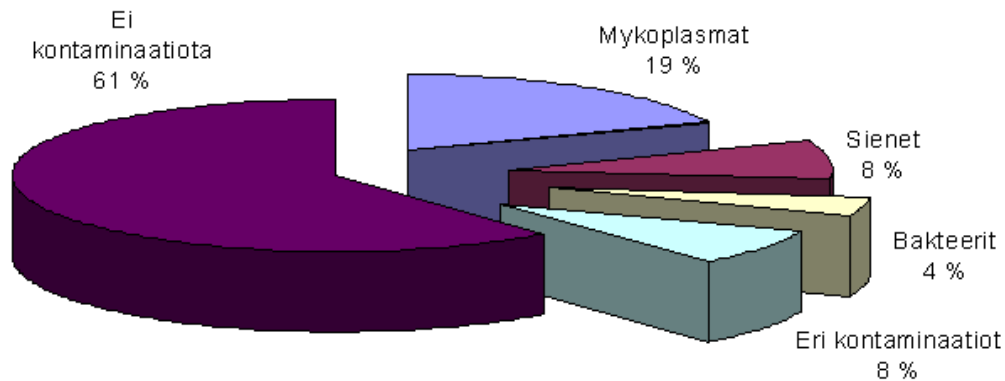
1 Johdanto

Soluihin perustuva tutkimus on lisääntynyt valtavasti. Useat tutkimusryhmät ympäri maailman käyttävät soluviljelyä yhtenä tärkeimmästä tutkimustekniikoistaan. Solujen toiminnan tutkiminen erilaisin soluviljelytekniikoin on välttämätöntä esimerkiksi uusien lääkeaineiden tai geeniterapeuttisten sovellutusten kehittämisessä. Kuitenkin soluviljelyssä esiintyy ajoittain paljon ongelmiakin. Solulinjojen kontaminaatiot ovat suuri takaisu esimerkiksi solupankeille ja ne aiheuttavatkin rahallisesti mitattuna miljoonien dollareiden tappiot vuodessa (Mirjalili, Parmoor, Moradi Bidhendi & Sarkari 2005, 81.) Kustannuksia tulee reagensseista, vasta-aineista sekä soluviljelyssä käytettävistä kertakäyttötavaroista. Menetettyä työtä ja siihen kulunutta aikaa ei voida rahallisesti mitata.

Yleisimmin kontaminaatiota aiheuttavat sienet, parasiitit, virukset sekä bakteerit. (Kuva 1.) Mykoplasmat ovat bakteereja, jotka ovat hyvin yleisiä soluviljelyn saastuttajia. Niitä on erittäin vaikea havaita paljaalla silmällä, joten vasta muutokset solujen kasvamisessa ja muutokset niiden pinnalla antavat aiheita epäillä mykoplasmakontaminaatiota. Mykoplasmaa on löytynyt niin kauan kuin on ollut soluviljelyäkin (Gopalkrishna, Verma, Kumbhar, Tomar & Patil 2007, 366.) Nämä bakteerit ovat resistenttejä useille antibiooteille, joita soluviljelyssä yleisimmin käytetään (Drexler & Uphoff 2002, 75). Mykoplasmat aiheuttavat paljon huolta ja ongelmia soluviljelyissä, koska niiden läsnäoloa soluviljelyssä ei voi huomata ilman erillistä testausta. Mykoplasman saastuttamat soluviljelmät aiheuttavat huomattavia vääristymiä tutkimustuloksissa. Tämän vuoksi on tärkeää, että solulinjoja testataan säännöllisesti.

Mykoplasmojen selvittämiseen ja tunnistamiseen on käytettävissä monia erilaisia testejä. Menetelmistä käytetyin ja herkin on PCR eli polymeraasiketjureaktio. Mikään menetelmä ei kuitenkaan ole täysin varma ja on olemassa mahdollisuus, että mykoplasma jää havaitsematta soluviljelmistä. Tässä työssä tullaan käsittelemään ELISA- ja PCR-menetelmiä mykoplasman

tunnistamiseksi ja selvittämään kumpi menetelmänä soveltuu parhaiten työyhteisöimme tarpeisiin.



Kuva 1. Soluviljelyä eniten kontaminoivat tekijät. (Mirjalili ym. 2005)

2 Mykoplasma tutkimuslaboratoriossa

2.1 Soluviljely

Elävien solujen biologian tuntemus on edistynyt sen ansiosta, että on opittu laboratorio-olosuhteissa keinotekoisesti kasvattamaan eläin- ja kasvipäisiä soluja. Soluviljelyolosuhteissa pyritään luomaan soluille mahdollisimman luonnollinen ympäristö (Niemi, Korhonen & Virtanen 1992, 40.) Soluviljelyolosuhteissa kasvaakseen solut tarvitsevat tarkasti säädellyn ympäristön lämpötilan, ravintoaineiden sekä pH-arvon suhteen (Solunetti 2010).

Solut kasvavat kiinnittyneinä kasvualustaansa tai suspensiossa soluviljelynestessä (Virtanen 2008, 1). Suspensiossa voidaan kasvattaa isompia solumääriä, mutta monet eläinsolulinjat eivät kykene kasvamaan irti alustastaan. Tällaisia soluja kasvatetaan yleensä kasvatusliuoksessa muovi- tai lasipinnoilla, joissa ne kasvaessaan muodostavat yksikerroksisen solupeitteen. (Solunetti 2010.)

Soluviljely vaatii ehdotonta aseptiikkaa ja huolellisuutta. Soluviljelylaboratoriossa on erikseen käytössä soluviljelykaapit sekä puhtaille,

testatuille solulinjoille sekä testaamattomille solulinjoille. Tämä auttaa estämään kontaminaatioita toisista solulinjoista toisiin. Solulinjalla tarkoitetaan solupopulaatiota, joka pystyy kasvamaan rajattomasti.

2.2 Mykoplasma

Mykoplasmojen aiheuttama soluviljelyjen saastuminen on yksi merkittävimmistä soluviljelyä haittaavista tekijöistä. Mykoplasmat kuuluvat prokaryooteihin eli tumattomiin ja ovat pienimpiä ja yksinkertaisimpia itsestään jakautuvia bakteereja. Niiden genomi on kaikkien solullisten eliöiden pienin. Pienen genomikoon vuoksi mykoplasmat elävät usein loisina, joilla on tarkka isäntä- ja kudosspesifisyys (Volkhov , Kong, George, Anderson & Chizhikov 2008, 5384.) Päästyään sopivaan isäntäorganismiin mykoplasmat elävät ja lisääntyvät huomattavan pitkiäkin aikoja. Ne suojautuvat isäntäorganismien immuunivasteelta mm. jäljittelemällä isännän omia antigeeneja (Rottem & Barile 1993, 144-145.)

Mykoplasmaalajeja on jo yli 200 mutta yleisimmät kontaminaatiota soluviljelyssä aiheuttavat mykoplasmat ovat : *M. orale*, *M. hyorhinis*, *M. arginini*, *M. fermentans*, *M. hominis* tai *A. laidlawii* (Kong, James, Gordon, Zelynski & Gilbert 2001, 3195.) Jotkut mykoplasmat aiheuttavat tauteja sekä ihmisille että eläimille, vaikka suurin osa loisivista mykoplasmoista elääkin siten etteivät ne vahingoita isäntää (Razin, Yogev & Naot 1998, 1097).

2.2.1 Miten mykoplasma pääsee soluviljelyyn?

Muista mykoplasman kontaminoiduista soluviljelmistä:

Mykoplasmat voivat helposti levitä soluviljelmistä toisiin ja vaikuttaa mm solun kasvuun, toimintaan, aineenvaihduntaan, morfologiaan, kiinnittymiseen, kalvorakenteisiin, virusten torjumiseen ja moniin muihin tärkeisiin ominaisuuksiin. Lisäksi ne vaurioittavat soluja sekä aiheuttavat haittoja ja muutoksia kromosomeissa. Vaikka viljelmä olisikin saastunut saattaa pH pysyä

ennallaan, soluviljelmä pysyä kirkkaana sekä solut vaurioitumattomina. Mykoplasmoja on vaikea löytää ja saada soluviljelmistä kokonaan pois niiden pienen koon ja soluseinän puuttumisen vuoksi (Schmitt & Pawlita, 2009.)

Saastuneesta soluviljelmästä tarttuu helposti mykoplasmoja samassa laboratoriossa oleviin muihin soluviljelmiin (Bionique Testing Laboratories 2007). Saastuminen tapahtuu helposti esimerkiksi ilman välityksellä tai kontaminoiduista välineistä. Siksi olisi tärkeää, että testaamattomat solulinjat viljeltäisiin eri soluviljelylaminaarissa kuin mykoplasmanegatiivisiksi testatut solulinjat. Mykoplasmaa on erittäin vaikeaa hävittää soluviljelmistä ja se pystyy säilymään erilaisilla pöytien tai laminaarien pinnoilla jopa kuusi päivää. (Taulukko 1.)

Laboratoriohenkilökunnasta:

Jotkut mykoplasmoista ovat ihmisperäisiä mm. *M. orale*, *M. fermentans* ja *M. hominis* ja toiset eläinperäisiä kuten mm. *M. arginini*, *M. bovis*, *Acholeplasma laidlawii* ja *M. hyorhinae*. Mykoplasmat voivat levitä ilmaan aerosolien kautta esimerkiksi mykoplasmaa kantavan ihmisen välityksellä (Drexler & Uphoff, 2002, 75.)

Soluviljelylaboratoriossa työskentely vaatii ehdotonta aseptiikkaa. Tämä tarkoittaa, että ulkovaatteilla ei saa mennä soluviljelylaboratorioon vaan on pukeuduttava puhtaaseen työasuun sekä sisäkenkiin.

Crueger (1990) on taulukossaan osoittanut miten ja kuinka paljon mykoplasmat voivat levitä soluviljelyyn.

Taulukko 1. Mykoplasman leviäminen soluviljelyyn

Ihmisestä	kengistä	100-1000 organismia/cm ²
	päälaesta, otsasta	106 organismia/cm ²
	aivastuksesta	104-105 organismia
	syljestä	107 organismia/ml
Steriilit vaatteet	6 tunnin jälkeen	1-6 organismia/cm ²
Ilma	ulkoilma	100-500 organismia/cm ³
	sisäilma	500-2000 organismia/cm ³

Saastuneista reagensseista:

Pienen koonsa sekä soluseinän puuttumisen vuoksi mykoplasma voi toisinaan päästä sterilisoodattavien filttareiden membraanien läpi. Siksi onkin tärkeää käyttää vähintään 0,2 µm huokoskoon omaavia filttareita reagenssien ja liuosten suodattamiseen. Kaikki soluviljelyssä käytettävät liuokset ja pulot on avattava steriilisti soluviljelykaapissa (Bionique Testing Laboratories 2007).

2.3 PCR eli polymeerasiketjureaktio

Eräs molekyylibiologian tärkeimmistä menetelmistä on PCR, jolla voidaan monistaa esimerkiksi yksittäinen geeni tai mikä tahansa DNA-pätkä käyttämällä erityistä PCR-laitetta. PCR:n avulla hyvin pienestä DNA-määrästä saadaan muutamassa tunnissa monistettua miljardikertainen määrä samaa DNA:ta (Gopalkrishna ym. 2007.)

2.3.1 PCR-reaktion osat

PCR-reaktion tilavuus on useimmiten hyvin pieni ja reaktiot tehdään pienissä mikrosentrifuugiputkissa, joiden tilavuus on 0,2 ml. Yksinkertaisimmillaan tavallinen PCR-reaktio sisältää seuraavat osat:

- Polymeraasientsyymi, joka ei inaktivoidu korkeissa (100°C) lämpötiloissa.
- Alukkeet: käytetään kahta erilaista, tarkalleen tunnettua aluketta, jotka sitoutuvat DNA:n eri juosteisiin.
- Templaatti-DNA: templaatin puhtaus ja hyvä laatu ovat ensiarvoisen tärkeitä reaktion onnistumiselle.

dNTP:t eli deoksinukleotidit: polymeerasientsyymi rakentaa uuden DNA-juosteen yksittäisistä dNTP-molekyyleistä (dATP, dTTP, dCTP ja dGTP), joiden konsentraatio reaktiossa on yleensä yhtä suuri.

Puskuriliuos: tehtävänä on muuttaa reaktion olosuhteet otollisiksi DNA:n monistumiselle ja stabiloida polymeerasientsyymiä.

Kationit: yleisimmin kationien lähteenä käytetään magnesiumkloridiliuosta ($MgCl^{2+}$). Polymeeraasit ovat herkkiä näiden konsentraatioiden vaihteluille, jonka vuoksi ne tulisi optimoida erikseen kullekin templaatti-alukeyhdistelmälle (Suominen & Ollikka 1997, 157.)

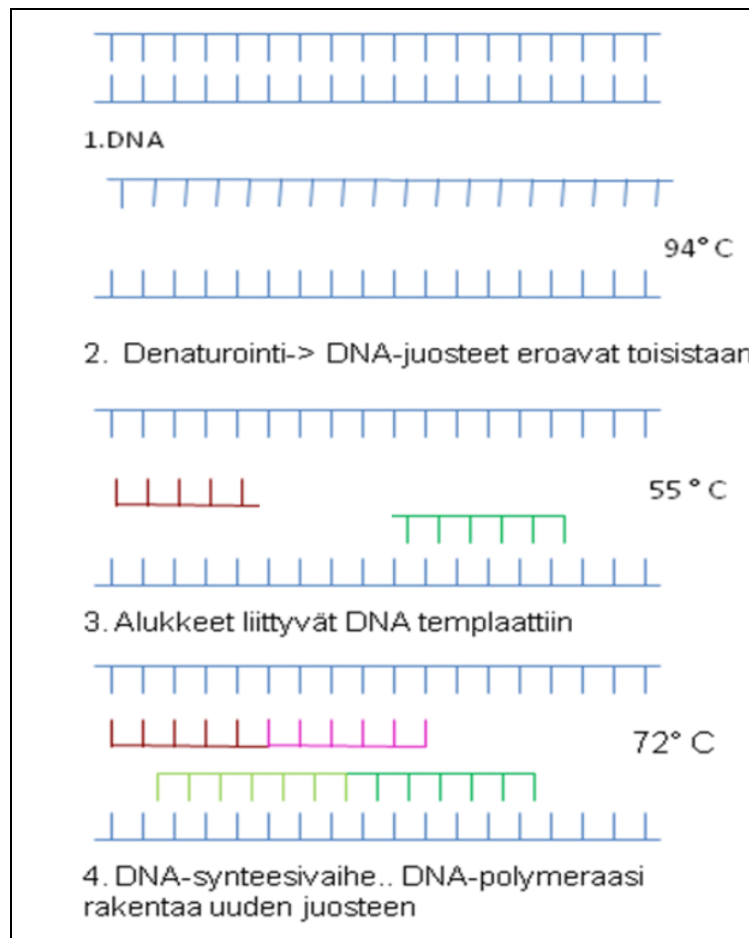
2.3.2 PCR-reaktion kulku

Polymeerasiketjureaktiossa toistetaan yksinkertaisimmillaan kolmea vaihetta:

1. Denaturaatiovaihe (engl. *denaturation*) (+94 - 96 °C), DNA denaturoituu ja vastinjuosteet irtoavat toisistaan.
2. Alukkeiden liittymisvaihe (engl. *annealing*) (+45 - 65 °C), alukkeet liittyvät yksijuosteiseen DNA:han emäsparisäännön mukaisesti.

1. Pidentymisvaihe I. elongaatio- tai ekstensiovaihe (engl. *elongation*, *extension*) (+72 °C), polymeraasi luo alukkeista alkaen uuden vastinjuosteen (DNA-synteesi). (Kuva 2.)

Näitä vaiheita peräkkäin toistamalla monistettavan alueen kopiomäärä kasvaa eksponentiaalisesti (Suominen & Ollikka 1997, 158.)



Kuva 2. PCR-reaktion kulku

2.4 ELISA eli entsyymivälitteinen immunosorbentti määrittäminen

ELISA (engl. enzyme-linked immunosorbent assay) on biokemiallinen tekniikka, jota käytetään yleensä immunologisten aineiden määrittämisessä. ELISA on menetelmä, jolla kiinteään faasiin (esim. erityismuoviin) kiinnitetty antigeeni tai

vasta-aine pystytään osoittamaan siihen sitoutuvan vasta-aineen tai antigeenin avulla. Tyypillisesti tämä osoitetaan entsyymaattisesti värireaktiona. Muodostuneen yhdisteen pitoisuus kuvastaa suoraan vasta-aineen konsentraatiota alkuperäisessä näytteessä. Tämä on paljon käytetty menetelmä erilaisissa vasta-ainemäärityksissä monin sovellutuksin (Molecular Station 2009.)

Menetelmän perustana ovat vasta-aineiden tyypilliset ominaisuudet. Vasta-aineet ovat molekyyliä, jotka ovat proteiinirakenteisia. Ne ovat hyvin spesifisiä kohdemolekyyliä kohtaan, mikä mahdollistaa sen, että tutkittava aine havaitaan jo pieninä pitoisuuksina. Kohdemolekyylit voivat olla synteettisiä tai luonnollisia molekyyliä. Kohdemolekyylin ja vasta-aineen välinen sidos on luja ja kestää määrityksen vaiheet (Davies 2005, 3-4.)

ELISA perustuu mitattavaan värinmuodostusreaktioon, jonka saa aikaan vasta-ainemolekyyliin liitetty entsyymileima sopivan substraatti- tai kromogeenilisäyksen jälkeen (Davies 2005, 4). Yleisimmin käytettyjä entsyymejä ovat alkalinen fosfataasi sekä piparjuuriperoksidaasi (horseradish peroxidase, HRP) (Crowther 2009, 61-63).

ELISA jaotellaan kolmeen eri päätyyppiin: suoraan ja epäsuoraan menetelmään sekä sandwich-ELISA:an, joka voidaan myös jakaa suoraan ja epäsuoraan menetelmään. Kaikkia kolmea menetelmätapaa voidaan soveltaa myös inhiboivana menetelmänä tai kilpailevana (kompetitiivisena) menetelmänä (Crowther 2009, 12-13, 16.)

2.4.1 Suora ja epäsuora menetelmä

Suora menetelmä on ELISA:n yksinkertaisin muoto. Siinä antigeeni, jota määritetään laimennetaan sopivalla puskuriliuoksilla, yleensä PBS:llä (phosphate buffered saline) tai korkean pH:n karbonaattipuskurilla. Inkuboinnin aikana antigeeni sitoutuu kiinteään faasiin, joka useimmiten on muovinen 96-kuoppalevy. Proteiinit tarttuvat siihen passiivisesti. Inkuboinnin jälkeen sitoutumaton osa näytteestä pestään pois puskuroidulla pesuliuoksella. Pesun jälkeen kuoppalevylle lisätään vasta-ainetta, joka on antigeenille spesifistä.

Tähän vasta-aineeseen on liitetty entsyymileima. Vasta-aine laimennetaan puskurilla, joka sisältää blokkausyhdistettä, esimerkiksi proteiinia. Tällöin voidaan estää vasta-aineen passiivinen adsorptio kuoppalevyn pohjaan ja epäspesifinen sitoutuminen. Antigeenin ja vasta-aineen spesifinen sitoutuminen on silti mahdollista. BSA:ta (bovine serum albumin) eli naudan seerumin albumiinia tai puskuriin liotettua rasvatonta maitojauhetta käytetään usein blokkauspuskurina (Crowther 2009, 13-14, 58-60.)

Entsyymileimattu vasta-aine sitoutuu inkuboinnin aikana spesifisesti kiinteään faasiin sidottuun antigeeniin. Sitoutumaton vasta-aine pestään pois ja entsyymille sopivaa substraattia tai substraatti-kromogeeni-yhdistelmää lisätään kuoppalevylle, jolloin entsyymi katalysoi värinmuodostusreaktion. Reaktio pysäytetään tietyn ajan kuluessa sopivalla STOP-liuoksella. Näytteiden antigeenipitoisuus mitataan käyttämällä spektrofotometriä sopivalla aallonpituudella (Crowther 2009, 14.)

Epäsuoran ELISA-menetelmän erottaa suorasta menetelmästä kuoppalevylle lisättävä leimaamaton vasta-aine, joka inkuboinnin aikana tarttuu kiinteään faasiin sidottuun antigeeniin. Pesun jälkeen levylle lisätään entsyymikonjugoitu anti-vasta-aine, joka sitoutuu aiemmin lisättyyn vasta-aineeseen. Tämän vaiheen jälkeen määrittystä jatketaan samalla tavoin kuin suorassa menetelmässä (Crowther 2009, 14.)

2.4.2 Sandwich-ELISA

Sandwich-ELISA-menetelmässä kiinteään faasiin eli kuoppalevyn pohjaan sidotaan vasta-aine (capture antibody), jonka jälkeen lisätään näyte. Näyte laimennetaan sopivan pitoisuuden blokkausproteiinia sisältävään puskuriin. Tämä estää antigeenin epäspesifisen sitoutumisen. Näytettä inkuboidaan kuoppalevyllä, jonka jälkeen se osa näytteestä, joka ei ole sitoutunut pestään pois puskuroidulla pesuliuoksella (Crowther 2009, 16-17.)

Pesuvaiheen jälkeen kuoppalevylle lisätään entsyymikonjugoitu antigeenille spesifinen vasta-aine (sekundäärivasta-aine). Tämä sitoutuu antigeeniin inkuboinnin aikana. Inkuboinnin jälkeen toistetaan pesuvaihe ja lisätään

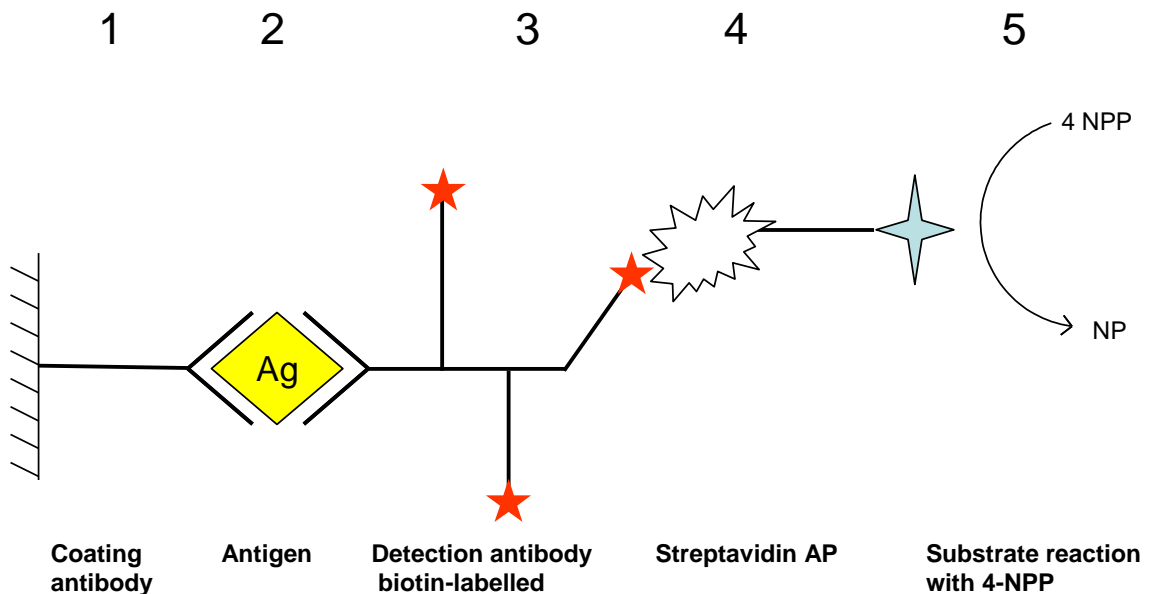
entsyymille sopiva substraatti. Reaktio pysäytetään STOP-liuoksella ja näytteen antigeenipitoisuus mitataan käyttämällä spektrofotometriä sopivalla aallonpituudella (Crowther 2009, 17.)

Sandwich-menetelmän edellytyksenä on, että antigeenilla on vähintään kaksi vasta-ainetta sitovaa kohtaa eli epitooppia. Toisella epitoopilla se tarttuu kuoppalevyille lisättyyn sekundäärivasta-aineeseen ja toisella sidottuun vasta-aineeseen. Tämä rajoittaa menetelmän käyttöä (Crowther 2009, 18.)

Sandwich-menetelmää voidaan soveltaa myös epäsuorana. Tällöin ensimmäiseksi lisätään näytteen inkuboinnin jälkeen leimaamaton sekundäärivasta-aine. Tämän jälkeen lisätään entsyymikonjugoitu anti-vasta-aine, joka tunnistaa leimaamattoman vasta-aineen rakenneosan, jolloin sitä voidaan käyttää laajalle määrälle eri sekundäärivasta-aineita. Kiinteään faasiin sidotun vasta-aineen ja sekundäärivasta-aineen täytyy olla peräisin eri eläinlajista, jotta entsyymikonjugoitu vasta-aine reagoi vain sekundäärivasta-aineen, mutta ei kiinteään faasiin liitetyn vasta-aineen kanssa (Crowther 2009, 19-21.)

Sandwich-menetelmää sovelletaan yleisesti biotiini-avidiiini-kompleksin kanssa. Avidiini on tetrameerinen kananmunasta eristetty proteiini, joka sitoutuu voimakkaasti biotiinimolekyylisiin jokaisella alayksiköllään (Crowther 2009, 547.) Streptavidiiini on *Streptomyces avidiini*-bakteerista eristetty avidiinin analogi, jolla on lähes identtisestä sekundäärirakenteestaan johtuen yhtä suuri affiniteetti biotiinia kohtaan (Argaraña, Kuntz, Birken, Axel & Cantor Argaraña 1986, 1881). Biotiinimolekyylillä voidaan liittää vasta-aineeseen ja streptavidiiini voidaan konjugoitua entsyymiin, jota käytetään. Biotiini-streptavidiiini-ELISA toimii epäsuoran sandwich-ELISA-menetelmän tavoin. Biotiini-konjugoitu sekundäärivasta-aine lisätään levyille näytteen inkuboinnin jälkeen. Tämän jälkeen kuopat pestään ja niihin lisätään streptavidiiinikonjugoitu HRP-entsyymi (horseradish peroxidase). Sitoutuminen on voimakas ja spesifinen, eivätkä sitoutumista häiritse esimerkiksi pH tai suuret suolakonsentraatiot (Crowther 2009, 547.)

Tässä opinnäytetyössä käytetään biotiini-streptavidini-ELISA:an perustuvaa sandwich-menetelmää, jossa substraattina toimii 4-nitrophenylfosfaatti (4-NPP). (Kuva 3.)



Kuva 3. ELISA:n periaate. (Mycoplasma Detection Kit, Roche, Germany)

Kuopan päällystys vasta-aineella. Blokataan kaikki epäspesifinen sitoutuminen pois.

Näytteiden inkubointi → antigeeni sitoutuu vasta-aineeseen.

Biotiini-leimatun vasta-aineen kiinnittyminen antigeeniin.

Streptavidin-AP-konjugaatin sitoutuminen biotiini-leimattuun vasta-aineeseen.

Visualisointi entsyymireaktiolla käyttäen 4-NPP substraattia.

3 Työn tarkoitus ja tutkimusongelmat

Opinnäytetyön tarkoitus oli selvittää mykoplasmakontaminaatioita tutkimusryhmän käyttämissä solulinjoissa vertaamalla kahta eri menetelmää toisiinsa. Käytössä oli kaksi kaupallista kittiä, joista toinen perustuu PCR- ja

toinen ELISA-määrittelykseen. ELISA-testiä on tutkimusryhmässä käytetty jo kauan, mutta testatut tulokset eivät aina pitännekkään paikkaansa. Negatiivisissa tuloksissa solut voivat kaikesta huolimatta huonosti eivätkä kasvaneet kunnolla. Ajateltiin ottaa käyttöön testattavaksi toinen, eri menetelmään perustuva mykoplasmatesti. Mykoplasmat saastuttavat soluviljelmiä ja niitä on toisinaan vaikea havaita. Tavoitteena on löytää nopea ja luotettava testi. Nopea testi auttaa löytämään kontaminoidut solulinjat aikaisemmin sekä mahdollistaa jatkotutkimusten etenemisen.

3.1 Testien käytettävyys

Käytettävyydellä tarkoitetaan apuvälineen tai muun valmistetun esineen, palvelun tai ympäristön helppokäyttöisyyttä tietyn tavoitteen saavuttamiseksi. Käytettävyydellä voidaan myös viitata helppokäyttöisyyttä mittaaviin menetelmiin sekä oppiin niistä periaatteista joita soveltamalla tuotteesta, palvelusta tai ympäristöstä saadaan helppokäyttöisempi. Sovelluksen käytettävyyttä arvioidessa on sen tarkoituksena yleensä parantaa sovelluksen laatua (Kosonen 2005, 313.)

Molemmat vertailussa käyttämät kitit ovat helppoja käyttää. Kitit sisältävät menetelmissä käytettävät reagenssit. Elisa-menetelmässä kontrollit, sekä muut reagenssit tulevat kuivattuina ja ne on liotettava välttämättä mahdollista kontaminaatiota. Näytteet pipetoidaan kuoppalevyille ja inkuboinnin jälkeen kuoppalevy pestään kitin mukana tulevalla pesuliuksella. Testi on kaksipäiväinen ja tulos luetaan käyttämällä siihen tarkoitettua laitetta.

PCR-menetelmässä käytettävät reagenssit tulevat myös valmiina. Ainoastaan elektroforeesia varten tarvittavat ajogeelit ja liuokset tehdään itse. Testi kestää yhden päivän.

3.2 Tutkimusmenetelmä

Tämän opinnäytetyön tutkimusmenetelmänä on vertaileva tutkimus, jonka mittarina on koe. Vertailevassa tutkimuksessa tutkija etsii ja tarkastelee aineiston tapauksia ja yksilöitä, jotka kuuluvat samaan ryhmään tai lajiin mutta

kuitenkin eroavat toisistaan. Vertailumenetelmä on joustava sillä se sopii niin koko tutkimushankkeen rungoksi kuin myös yksityiskohtien vertailemiseen toisten menetelmien apuna (Routio 2007.)

Menetelmä on kvantitatiivinen, koska täsmällisesti rajattu aineisto on lukuina, kysymyksessä on laboratoriossa suoritettava koe, tutkimus on toistettava sekä se on teoriaa koetteleva. Mittauksen validiteetin ja reliabiliteetin käsitteet liittyvät kvantitatiiviseen tutkimukseen (Uusitalo 1998, 7.)

3.2.1 Mittauksen validointi

Uuden analyysimenetelmän aiottu käyttötarkoitus laboratorioon osoitetaan validoinnilla (Jaarinen & Niiranen 2005, 11). Validoinnin vaatimuksiin vaikuttaa se, onko menetelmä itse kehitetty, kansainvälinen menetelmä, kaupallinen menetelmä vai muualla tuotetun tieteelliseen julkaisuun perustuva menetelmä (Terveyden ja hyvinvoinnin laitos 2005). Tulosten perusteella analyysimenetelmää kehitetään siten, että parametrit jotka halutaan, saavutetaan. Validointi on tärkeä osa uuden analyysimenetelmän kehitystyötä (Lehtonen & Sihvonen 2004, 94.)

Validointi sisältää mittausten suorittamisen, koejärjestelyjen suunnittelun, tilastolliset laskut, tulosten arvioinnin sekä menetelmäohjeen ja menetelmään liittyvän laadunvalvonnan laatimisen. Mitä useampia toistoja kussakin validoinnin vaiheessa tehdään, sitä luotettavampia ovat mittausten luotettavuutta ja tulosten perusteella laskettuja menetelmiä kuvaavat tunnusluvut (Jaarinen & Niiranen 2005, 30-31.)

Kvantitatiivisen tutkimuksen ollessa kysymyksessä on tutkimuksen luotettavuuden tarkastelu keskittynyt käsitteisiin ulkoinen ja sisäinen validius sekä reliaabelius. Sisäisellä validiudella tarkoitetaan, että tutkimuksen tulos on menettelytapojen tai testattavana olevan ohjelman seurausta. Sillä katsotaan tulosten pätevyyttä suhteessa tutkimuskohteeseen. Ulkoisella validiudella tarkoitetaan sitä, missä määrin tutkijan omat oletukset ja käsitteet tai saadut tulokset ovat siirrettävissä toiseen tilanteeseen (Soininen 1995, 120-121).

Tässä työssä validiteettina toimivat PCR- ja ELISA-kitin kontrollit. Sekä positiivista että negatiivista kontrollia käytettiin joka mittauksessa. Jokaisella mittauksella molemmat näkyivät, joten silloin ne mittasivat kysyttä asiaa eli tässä tapauksessa mykoplasmaa.

3.2.2 Mittauksen reliabiliteetti

Mittauksen reliabiliteetti liittyy siihen, että tutkimusten tulokset pysyvät samanlaisina tutkimusta toistettaessa vastaavalle koeryhmälle vastaavassa tilanteessa (Soininen 1995, 122). Reliabiliteettiin vaikuttavat esimerkiksi pipettien ja laitteiden tarkkuus sekä kuinka tarkasti määrittäminen tehdään. Tässä työssä reliabiliteettia ovat rinnakkaisnäytteet. Jokainen näyte ajettiin kahteen kertaan ja niiden tuloksia verrattiin toisiinsa. Näin pystyttiin arvioimaan menetelmän toistettavuutta sekä pohtia mahdollisten satunnaisvirheiden ilmenemistä. Mittaus tehtiin samoilla laitteilla, samoissa olosuhteissa ja aina saman mittajan toimesta.

3.3 Tutkimuksen eettisyys ja luotettavuus

Tutkimuksen tekemiseen liittyy paljon eettisiä asioita, joita tutkijan täytyy huomioida tutkimusta aloittaessaan. Tutkimuksen teossa täytyy noudattaa hyvää tieteellistä käytäntöä, johon kuuluvat tiedeyhteisön toimintatapojen noudattaminen, rehellisyys sekä huolellisuus tutkimustyössä. Tutkijan täytyy ottaa huomioon muiden tutkijoiden saavutukset sekä antaa niille kuuluva merkitys omassa tutkimuksessaan (Hirsjärvi, Remes & Sajavaara 2007, 23 – 27.)

”Tutkimuslaki sisältää eettiset perusteet sille, että ihmiselle voidaan suorittaa lääketieteellisiä tutkimuksia. Lääketieteellisellä tutkimuksella tarkoitetaan tutkimusta, jossa puututaan ihmisen sikiön tai alkion koskemattomuuteen ja jonka tarkoituksena on saada enemmän tietoa sairauksista, niiden oireista ja hoidoista sekä ehkäisystä.” (Laki lääketieteellisestä tutkimuksesta 9.4.1999/488.)

”Lupa potilasasiakirjoihin tutustumiseen voidaan antaa potilaislain nojalla. Tällöin täytyy olla varma ettei tiedon antaminen loukkaa sellaisia etuja, joiden vuoksi salassapitovelvollisuus on säädetty. Harkitessa lupaa on huolehdittava, että tieteellisen tutkimuksen vapaus turvataan.” (Laki lääketieteellisestä tutkimuksesta 9.4.1999/488.)

”Veri-, plasma- tai veren ainesosista tai soluista valmistetut näytteet, kudokset, solu ja elinnäytteet tai DNA:ta sisältävät näytteet eivät ole potilasasiakirjoja vaan muuta materiaalia, jotka liittyvät hoitoon. Tähän materiaaliin ei voida soveltaa potilaslain säännöksiä tietojen luovuttamisesta tieteelliseen tutkimukseen. toisaalta näytteistä analysoituja tietoja, jotka ovat hoidon kannalta tarpeellisia siirretään potilasasiakirjoihin ja ne ovat sieltä tarvittaessa käytössä.” (Laki lääketieteellisestä tutkimuksesta 9.4.1999/488.)

Hyvään tieteelliseen tapaan kuuluu myös ulkopuolisten lähteiden asiallinen käyttö (Vilkkä 2007, 165).

Opinnäytetyössä käytetyt näytteet ovat tulleet tutkimusryhmälle vuosia sitten. Niissä ei ole merkintää kenen näytteitä ne ovat eli henkilötiedot puuttuvat kokonaan eikä niistä ole tietoa. Työssä ei testattu itse soluja vaan kasvatusliuosta, josta solut saavat ravintonsa.

Testeistä saadut tulokset merkitään ylös sellaisinaan eikä niitä muuteta. Molemmissa käytettävissä kiteissä on mukana positiivinen ja negatiivinen kontrolli, johon näytteestä saatua tulosta verrataan.

3.4 Tutkimusongelmat

Tässä opinnäytetyössä pyrittiin selvittämään ja vertailemaan

1. Kahden eri testin (PCR; ELISA) herkkyyttä mykoplasmojen tunnistamiseksi.

2. Kumpi edellä olevista menetelmistä soveltuu parhaiten työyhteisöimme tarpeisiin.

4 Tutkimuksen toteutus

4.1 Tutkimusaineiston keruu ja analysointi

Tutkittava aineisto perustuu solujen kasvatusmediaan, jotka ovat kaupallisia. Kasvatusmediasta eli ravintoliuoksesta solut saavat ravintonsa. eivätkä pysty elämään ilman sitä. ELISA-menetelmässä tulosten analysointi tapahtuu absorbanssimittauksella 405 nm :n aallonpituudella. PCR-näytteet analysoidaan käyttämällä eri mykoplasman tunnistavia alukkeita PCR-reaktiossa ja todentamalla ne UV-valossa agarosigeeliltä.

4.1.1 Solulinjat

Tässä työssä ei testata kuvailtuja solulinjoja, vaan ainoastaan niiden käyttämää ravinto- eli kasvatusliuosta, joka sisältää solujen kasvuille tärkeitä aineita.

Squamous cell carcinomas eli SCC-solulinjat ovat peräisin korvapoliklinikalla leikatuista ihmisen pään ja kaulan alueen levyepiteelikarsinoomista.

Normal human epidermal keratinocytes eli NHEK-solulinjat (keratinosyytit) ovat peräisin myöskin ihotautiklinikalla leikatuista terveistä ihonäytteistä. Ainoastaan yksi linja on kaupallinen.

Melanomasolulinjat A2058, SK-Mel-5 ja WM-266-4 ovat kaupallisia. Ne ovat peräisin ATCC:ltä eli American Type Culture Collectionilta

4.1.2 Näytteenotto

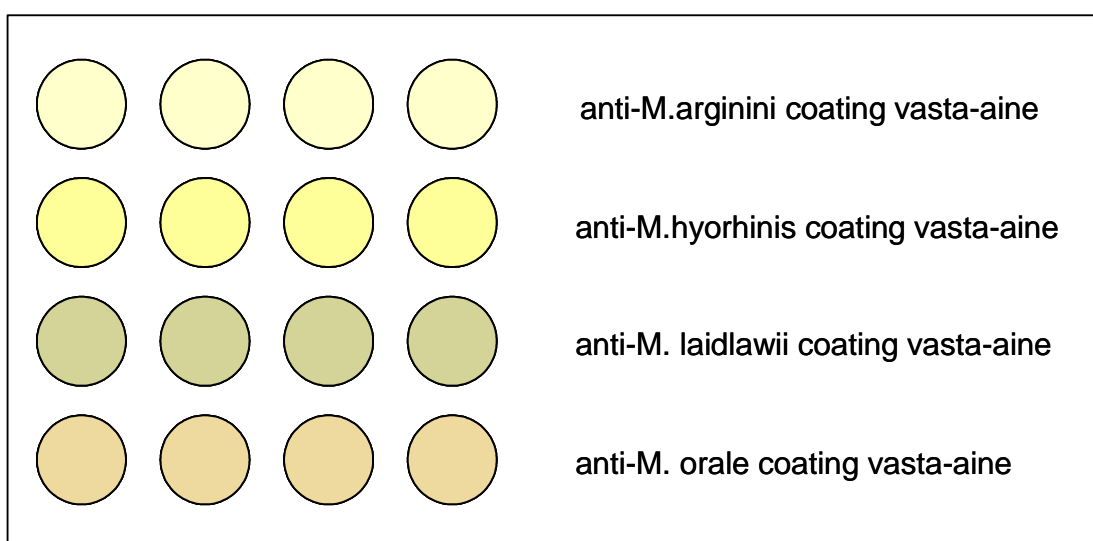
Soluja kasvatettiin muovisissa 250 ml:n soluviljelypulloissa, olosuhteissa 37 °C; 95 % ilma ja 5 % CO₂ 3-4 vuorokautta. Niissä oleva ravintoaine eli medium otettiin talteen ja kaadettiin 15 ml:n putkeen. Elatusaineena oli DMEM

(Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Euroclone; ECB7501L), joka sisälsi 10 % naudan sikiön seerumia (Fetal Bovine serum, FBS, Euroclone; ECS0180L), 1 % Penisilliini/Streptomysiiniä (P/S, Euroclone; ECB3001D), 1 % L-glutamaattia (Euroclone; ECB3000D), 1 % ei välttämättömiä aminohappoja (Non-Essential Amino Acids, NEAA, Invitrogen; 11140-035) ja 0,2 % Amfoterisiini B:tä (Sigma; AZ942). Näytteitä oli 50 kpl ja ne laitettiin -20°C pakastimeen odottamaan testien tekoa.

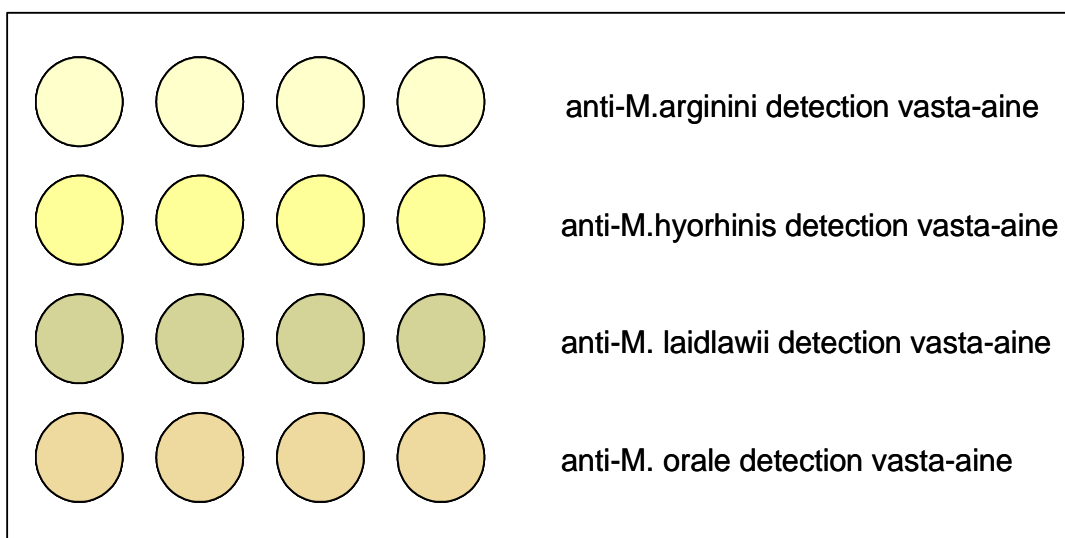
4.2 ELISA:n työvaiheet

Kaikki liuokset, näytteitä lukuunottamatta, ovat testin valmistajan ja kuuluvat käytettävään ELISA-kittiin (Mycoplasma Detection-kit, Roche, Germany).

96-kuoppalevyille pipetoitiin 250 µl anti-coating vasta-ainetta. (Kuva 4.) Kuoppalevy laitettiin +37°C kahdeksi tunniksi. Inkuboinnin aikana vasta-aine kiinnittyy kuopan pohjalle. Tämän jälkeen kuopat pestiin pesuliuoksella, jonka jälkeen ne tyhjennettiin ja kuivattiin napakasti selluloosaa vasten. Tämän jälkeen kuoppiin pipetoitiin 250 µl blokkauksuskuria ja laitettiin +37°C:een 30 minuutiksi. Inkuboinnissa blokkauksuskuri lopettaa anti-coating vasta-aineen kiinnittymisen kuopan pohjalle. Inkubointivaiheen jälkeen kuopat kuivattiin hyvin ja lisättiin näytettä 200 µl/kuoppa. Levy suojattiin hyvin kuivumiselta ja laitettiin +4°C:een yöksi.



Kuva 4. Anti-coating vasta-aineen pipetointi levyille.



Kuva 5. Anti-detection vasta-aineen pipetointi levyille.

Seuraavana päivänä kuopat pestiin 3 x pesuliuksella ja pipetoitiin 200 µl entsyymileimattua kaksoisvasta-ainetta kuoppiin. (Kuva 5.) Kuoppalevy laitettiin 37°C:een kahdeksi tunniksi. Tämän jälkeen kuopat pestiin pesuliuksella, jonka jälkeen pipetoitiin 200 µl Streptavidin-AP/kuoppa, inkuboitiin yksi tunti 37°C:ssa. Streptavidin sitoutuu leimattuun vasta-aineeseen. Inkuboinnin jälkeen kuopat pestiin ja kuivatettiin, jonka jälkeen lisättiin substraattia 200 µl/kuoppa. Substraatti sitoutuu inkuboinnin aikana entsyymiin, joka katalysoi substraatin muuttumista reaktiotuotteeksi. Mikäli levyllä on positiivisia näytteitä väri näkyy keltaisena. Levy luettiin erillisellä levynlukijalla mitaten absorbanssi 405 nm:n aallonpituudella.

Pipetontivirheet aiheuttavat hajontaa tuloksiin. Tämän vuoksi pipetit tulisi kalibroida säännöllisin väliajoin. Kuoppalevyjen pohjat on pidettävä puhtaina etteivät epäpuhtaudet vaikuttaisi mittauksessa valon absorptioon. Reagenssien lisäykset kuoppalevyille sekä entsyymi-substraattireaktion pysäyttäminen oikeaan aikaan on tärkeää, jotta reaktioiden lyhentymisen tai pidentymisen ei vaikuta näytteiden värin intensiteettiin.

Pesuvaiheet ovat ELISA:ssa tärkeitä, jotta kiinnittymättömät, ylimääräiset vasta-aineet eivät häiritse näytteeseen sitoutuneiden vasta-aineiden kiinnittymistä.

4.3 PCR:n työvaiheet

Kaikki liuokset näytteitä lukuunottamatta kuuluvat käytettävään PCR-kittiin (Venor®GeM Advance, Minerva biolabs, Germany).

PCR: 100 µl kasvatusmediaa pipetoitiin reaktioputkiin ja inkuboitiin + 95 °C:ssa 10 minuuttia. Putkia sentrifugoitiin hetki, jolloin kasvatusmediaan päässeet solut jäivät putken pohjalle. Supernatantti käytettiin PCR-reaktioon.

Jokaiseen putkeen pipetoitiin 22,8 µl rehydraatiopuskuria sekä 0,2 µl polymeraasia (5 U/µl). Seos sekoitettiin hyvin ja pipetoitiin PCR-putkiin, johon lisättiin 0,2 µl näytettä. Putket pidettiin jäällä pipetoinnin aikana. Näytteet ajettiin taulukon 2 mukaisella ohjelmalla. (Taulukko 2.)

Taulukko 2. PCR-ajo-ohjelma

94 °C 2 min	denaturointi	1 sykli
94 °C 2 min	denaturointi	39 sykliä
55 °C 30 sek	alukkeiden kiinnittyminen	
72 °C 30 sek	DNA-synteesi	
jäähdytä +4°C.	lopetus	

Joka syklillä DNA molekyylien määrä kaksinkertaistuu, jos alussa on yksi DNA molekyyli, niin 45 syklin jälkeen molekyyliä on $1 * 2^{45} = 3,5 * 10^{13}$ (ks. 2.3.2, s. 8).

Tämän jälkeen tehtiin 1,5 % agarosigeeli. Agarosi on polysakkaridi, joka liukenee veteen kiehautettaessa jäähdyttyään se muodostaa hyytelömäisen

geelin. Geelin verkkorakenne hidastaa kulkeutumista sitä enemmän mitä suurempikokoista DNA on (Suominen & Ollikka 1997, 72.)

Näytteet pipetoitiin geelille ja ajettiin elektroforeesilla. UV-valossa todennettiin olivatko näytteet positiivisia vai negatiivisia. Näytteitä ajettiin noin 20 minuuttia 100 V elektroforeesilaitteella, kunnes näytteet erottuivat.

Elektroforeesissa negatiivisesti varautuneet DNA-palat kulkeutuvat geelissä kohti positiivista napaa. Pienimmät palat kulkeutuvat pidemmälle (Turpeenoja 2005, 179.) Tulos katsottiin UV-kameralla ja näytteitä verrattiin positiivisiin ja negatiivisiin kontrolleihin.

DNA ei sellaisenaan näy agarosigeelissä vaan yleisimmin havainnoimiseen käytetään etidiumbromidiväryästä. Emäkset absorboivat UV-säteitä ja luovuttavat näin saamansa energian etidiumille, joka fluoresoi oranssinpunaisena (Suominen & Ollikka 1997, 72.)

4.4 Menetelmien vertailu

Menetelmien vertailussa otettiin huomioon käytettävyys, nopeus, saatavuus sekä spesifisyys. Nämä seikat ovat osoittautuneet tärkeiksi tutkimusyhteisössä sekä niitä mietittiin yhdessä ryhmämme kanssa.

-Käytettävyydellä tarkoitetaan, onko kittejä helppo ja yksinkertainen käyttää sekä millaisia työvaiheita siinä on. Kitillä tarkoitetaan pakkausta, joka sisältää testiin tarvittavat reagenssit.

-Nopeudella tarkoitetaan, kauanko testien tekoon menee aikaa, kuinka nopeasti tulokset saadaan ja millainen työmäärä on nopeuteen verrattuna.

-Saatavuudella tarkoitetaan kuinka kauan kestää saada uusi kitti loppuneen tilalle sekä miten saatavuuteen vaikuttavat kuljetusongelmat yms.

-Spesifisyydellä tarkoitetaan miten testit pystyvät havaitsemaan mykoplasman käyttämissämme solulinjoissa ja onko toinen kiteistä spesifisempi kuin toinen.

5 Tulokset

Testattavia näytteitä oli 50 kappaletta. Näytteet otettiin ennen solujen jakamista, uutta soluampullia sulatettaessa sekä ennen solujen pakastusta. Tämä mahdollisti sen, että mykoplasma kontaminaatio huomattiin aikaisemmin.

Näytteet numeroitiin 1-50 niiden erottamiseksi toisistaan. (+)-merkki tarkoitti mykoplasma positiivista ja (-)-merkki mykoplasma negatiivista. Näytteiden aloitettiin molemmilla kiteillä samana päivänä ja tulokset kirjattiin ylös seuraavana päivänä ELISA:n tulosten valmistumisen jälkeen. Samoista näytteistä 26 kpl (52 %) oli positiivisia ELISA-menetelmällä ja 38 kpl (76 %) PCR-menetelmällä. PCR-menetelmä tunnisti positiiviseksi 12 kpl sellaisia näytteitä, jotka ELISA-testillä olivat negatiivisia. (LIITE).

ELISA-kitti (Mycoplasma detection kit, Roche, Germany) tunnisti vain neljää mykoplasma-lajia *M. orale*, *M. hyorhinae*, *M. arginini*, ja *A. laidlawii*. Näistä lajeista *M. Orale* on ihmisperäinen ja *M. arginini*, *M. hyorhinae* ja *A. laidlawii* ovat eläinperäisiä. Tulos oli positiivinen, jos mittausarvo eli OD (optical density) oli suurempi kuin 0,2. ELISA-kitillä tehdyistä näytteistä 9 kpl (35 %) oli positiivisia *M. hyorhinae*- 7 kpl (27 %) *M. laidlawiin*-, 6 kpl (23 %) *M. oraleen*- ja 4 kpl (15 %) *M. arginin*-lajin osalta. (Taulukko 3.)

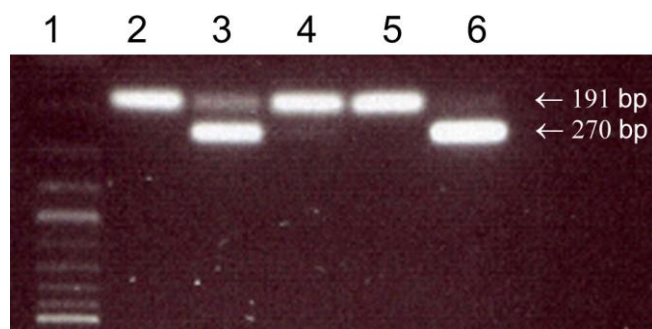
Taulukko 3. ELISA-testillä löytyneet positiiviset mykoplasmaalajit näytteissä

Mykoplasma-laji	Positiivisia näytteessä/kpl
<i>M. hyorhinae</i>	9
<i>M. laidlawiin</i>	7
<i>M. oraleen</i>	6
<i>M. arginin</i>	4

PCR-kitti (Venor®GeM Advance, Minerva biolabs, Germany) tunnisti näiden neljän mykoplasman lisäksi *M. fermentans*, *M. salivarium*, *M. pneumoniae*, *M. synoviae* ja *Ureaplasma*-lajeja.

ELISA-menetelmän positiivisuus näkyi värireaktiona ja sitä verrattiin positiiviseen kontrolliin. Näytteet luettiin 405 nm:n aallonpituudella.

PCR-menetelmän tulokset analysoitiin elektroforeesilla, jossa näytteiden tuloksia verrattiin positiiviseen ja negatiiviseen kontrolliin. Positiivisen näytteen tulos oli geelillä 270 bp, negatiivisen näytteen tulos oli 191 bp ja näytteet joissa näkyi sekä 191 bp että 270 bp kokoinen PCR-tuote, olivat heikosti positiivisia. (Kuva 6.)



Kuva 6. PCR-tulokset agarosigeelillä 1. 100 bp ladder 2. negatiivinen näyte 3. positiivinen näyte 4. heikko positiivinen näyte 5. negatiivinen kontrolli 6. positiivinen kontrolli

Taulukko 4. Testien kriteerit

	ELISA	PCR
Saatavuus	+++	++
Käytettävyys	++	++
Nopeus	+	+++
Spesifisyys	+++	+++

Kriteereiden pisteytys määriteltiin siten, että (+++) = erinomainen, (++) = hyvä, (+) = tyydyttävä.

ELISA-kitin saatavuus oli parempi kuin PCR-kitin, koska kitti oli saatavilla samassa rakennuksessa toimivalla jälleenmyyjällä. PCR-kitti piti tilata jälleenmyyjältä ja sen toimitusaika vaihteli viikosta kahteen viikkoon. (Taulukko 4.)

Näytteiden käsittely ELISA-testissä oli helpompaa PCR-testiin verrattuna, koska näytteiden pipetointi pieniin PCR-testiputkiin vaati erityistä huolellisuutta ja tarkkuutta. PCR-testissä reagenssit olivat kuitenkin valmiina mikä nopeutti testin suorittamista ja vähensi liuottamisvaiheessa syntyvää kontaminaatiovaaraa. (Taulukko 4.)

Nopeudessa PCR oli selvästi nopeampi. Testin teki yhden työpäivän aikana, kun ELISA-testi vaati kaksi työpäivää. Testit menestyivät lähes samoin annetuilla kriteereillä. Ainoastaan nopeudessa PCR sai paremmat pisteet kuin ELISA mutta ELISA-kitin saatavuus oli parempi kuin PCR-kitin. (Taulukko 4.)

Vaikka PCR olikin laajakirjoisempi mykoplasmojen suhteen olivat molemmat testit spesifisia juuri niille mykoplasmoille kuin ne lupasivatkin.

6 Pohdinta

Aikaisemmat tutkimukset ovat osoittaneet, että mykoplasman selvittämiseen soluviljelmistä on monta erilaista tapaa. PCR:n on näytetty olevan herkkä ja nopea tapa löytää mykoplasma ajoissa. Testi pystyy tunnistamaan spesifisillä reagensseilla yksittäisenkin mykoplasma-lajin (Hyeran, Seung, Yoon, Jin, Youn, Chonh-Kil & Skuglil 2006, 42.)

Arora ym. (2006, 177) ovat tutkimuksessaan verranneet ELISA-testiä ja PCR-testiä toisiinsa bakteerin tunnistamiseksi ruoasta. Tutkimuksessa selvisi, että PCR-testi oli herkempi ja näytti enemmän positiivisia tuloksia kuin ELISA-testi.

Vertailevaa tutkimusta käyttämistäni testeistä ja kiteistä ei löytynyt. Valitsin opinnäytetyön aiheen tutkimusryhmän tarpeesta. Soluviljelyssämme on ajoittain esiintynyt mykoplasmaa ja vaikka käytössämme ollut ELISA- testi on näyttänyt mykoplasmanegatiivista, solut ovat voineet huonosti. Näin päädyimme vertailemaan kahta erilaista menetelmää mykoplasman tunnistamiseksi. ELISA-testi tunnsti vähemmän mykoplasmoja kuin PCR-testi, mutta oli kuitenkin spesifinen niille neljälle lajille kuin testi lupasikin. PCR-testi antoi positiivisiksi sellaisia näytteitä, joita ELISA antoi negatiivisiksi. Todennäköistä siis on, että näytteissä oli jokin muu mykoplasma kuin ne neljä, joita ELISA-testi tunnsti. Osa näytteistä oli ELISA-testillä positiivisia sellaisen mykoplasman osalta, joka leviää soluviljelyyn ihmisen kautta. Tämä on selvästi ongelma sillä soluviljelylaboratoriossa työskentelevien tutkijoiden määrä on suuri. Ainoastaan järkevällä ja varovaisella menettelyllä voidaan eliminoida tällaiset mykoplasmat pois.

Tarkat ohjeet siitä, miten soluviljelyssä käyttäydytään ja huolellinen opastus auttavat mutta huolimattomuus ja välinpitämättömyys ovat todellisia ongelmia. Vaikka PCR-testi onkin spesifinen monelle mykoplasmalajille niin se ei kuitenkaan pysty erottelemaan mistä mykoplasmalajista on kysymys. Tämän vuoksi molemmat testit ovat hyödyllisiä tutkimusryhmämme tarpeisiin. PCR-testiä käytettäisiin rutiininomaisesti testattaviin näytteisiin ja ELISA-testiä käytettäisiin silloin, kun halutaan varmistaa onko soluviljelyssä oleva ongelma

ihmisestä lähtöisin. Tämä pakottaa kiinnittämään enemmän huomiota steriiliin työskentelyyn soluviljelylaboratoriossa.

Miten steriili työskentely vaikuttaa mykoplasman häviämiseen soluviljelystä olisi hyvä jatkotutkimusaihe. Miten aseptiikkaa voisi parantaa ja mitkä tekijät vaikuttavat eniten siihen, että tartuntoja tapahtuu. Tämä toisi tärkeää tietoa tutkimusyhteisölle ja saattaisi parantaa ratkaisevasti työskentelyrutiineja soluviljelylaboratoriossa.

LÄHTEET

Argaraña, C., Kuntz, I. Birken, S., Axel, R. & Cantor, C. 1986. Molecular cloning and nucleotide sequence of the streptavidin gene. *Nucleic acids research* 14 (4) 1871-1882.

Arora, S; Agarwall, R. & Bist, B. 2006. Comparison of ELISA and PCR vis-à-vis cultural methods for detecting *Aeromonas* spp. in foods of animal origin. *International Journal of Food Microbiology* 106: 177-183.

Bionique® Testing Laboratories 2010. Viitattu 4.7.2010.<http://www.bionique.com>.

Crowther, J. 2009. *Methods in Molecular Biology. The ELISA guidebook*. 2 painos. New York:Humana Press.

Crueger, W. 1990. *Sterile Techniques in Biotechnology. In Biotechnology Focus 2*, (Hanser Publishers, Munich,) p. 393.

Davies, C. 2005. *Introduction to Immunoassay. In The Immunoassay Handbook*. 3. painos. Oxford: Elsevier Ltd.

Drexler, H.& Uphoff, C. 2002. Mycoplasma contamination of cell cultures: Incidence, sources, effects, detection, elimination, prevention. *Cytotechnology* 39: 75-90.

Gopalkrishna, V.; Verma. H.; Kumbhar, N.; Tomar, R. & Patil, P. 2007. Detection of *Mycoplasma* species in cell culture by PCR and RFLP based method: Effect of BM-cyclin to cure infections. 25: 364-368.

Hirsjärvi. T.; Remes, P. & Sajavaara, P. 2007. *Tutki ja kirjoita*. Helsinki. Tammi.

Hyeran, S.; Seung, S.; Yoon, J.; Jin, T.; Youn, B.; Chonh-Kil, L & Skuglil, S. 2006. PCR-Based Detection of Mycoplasma Species. *The Journal of Microbiology* 44: 42- 49.

Jaarinen, S. & Niiranen, J. 2005. *Laboratorion analyysitekniikka*. 5. painos. Helsinki: Edita Publishing Oy.

Kong, F.; James, G.; Gordon, S.; Zelynski, A. & Gilbert, G. 2001. Species-Specific PCR for Identification of Common Contaminant Mollicutes in Cell Culture. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 3195-3200.

Kosonen, K. 2005. Käytettävyytutkimuksen menetelmien vertailu. *Käytettävyytutkimuksen menetelmät*, 313 – 330. Tampereen yliopisto.

Laki lääketieteellisestä tutkimuksesta 9.4.1999/488.

Lehtonen, P. & Sihvonen, M.-L. 2004. *Laboratorioalan analyttinen kemia*. Helsinki: opetushallitus.

Mirjalili, A.; Parmoor, E., Moradi Bidhendi, S. & Sarkari, B. 2005. Microbial contamination of cell cultures: a 2 years study. *Biologicals* 33. 81-85.

Molecular Station 2009. Viitattu 22.11.2009. <http://www.molecularstation.com>.

Niemi, M; Korhonen, K. & Virtanen, I.1992. *Solu- ja molekyylibiologia*.3. painos.

- Razin, S; Yogev, D; & Naot, Y. 1998. Molecular Biology and Pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiology and molecular Biology Reviews*. 1094-1156.
- Rottem, S. & Barile, M. 1993. Beware of mycoplasmas. *Trends in Biotechnology* 11:143 – 151.
- Routio, P. 2007. Tutkimuksen ja kehittämisen metodiikka: Vertaileva metodi. Viitattu 4.3.2010. www2.uiah.fi/projekti/metodi
- Schmitt M. & Pawlita, M. 2009. High-throughput detection and multiplex identification of cell contaminations. *Nucleic Acids Reseach* 37:18.
- Soininen, M. 1995. Tieteellisen tutkimuksen perusteet. Turun yliopiston täydennyskoulutuskeskuksen julkaisuja A:43. Painosalama Oy, Turku.
- Solunetti 2010. Viitattu 4.3.2010. www.solunetti.fi
- Sung, H.; Kang, S.; Bae, Y.; Hong, J.; Chung, Y.; Chong-Kil, L. & Sukqil, S. 2006. PCR-based detection of *Mycoplasma* species. *Journal of microbiology* 44: 42-49.
- Suominen, I.; Ollikka, P. 1997, Yhdistelmä DNA-tekniikan perusteet. 2. painos. Opetushallitus.
- Terveiden ja hyvinvoinnin laitos. 2005. 14.3.4 Menetelmät, menetelmien validointi ja mittausten jäljitettävyyys. Kansanterveyslaitoksen julkaisuja B. Viitattu 4.1.2010. <http://www.ktl.fi/portal/suomi/julkaisut/julkaisusarjat>
- Turpeenoja L. 2005. Biokemiaa.4-2. painos. Opetushallitus.
- Uusitalo H. 2010. Tiede, tutkimus, tutkielma. Johdanto tutkielman maailmaan. Porvoo: WSOY.
- Vilka, H. 2007. Tutki ja kehitä. 1.-2. painos. Tammi
- Virtanen, I. 2008. Soluviljely. Viitattu 22.11.2009. www.ept.tkk.fi
- Volokhov , D. ; Kong , H. ; George, J.; Anderson, C. & Chizhikov, V. 2008. Biological enrichment of Mycoplasma agents by cocultivation with permissive cell cultures.. 17: 5383-5391.

LIITE: ELISA- ja PCR-näytteiden tulokset

Näyte	PCR	ELISA	Näyte	PCR	ELISA
1	+	+	26	+	+
2	+	+	27	+	-
3	+	+	28	+	+
4	+	+	29	+	-
5	+	+	30	+	+
6	-	-	31	-	-
7	+	-	32	+	+
8	+	+	33	-	-
9	+	-	34	+	-
10	-	-	35	-	-
11	-	-	36	+	+
12	+	+	37	+	+
13	+	+	38	-	-
14	+	+	39	-	-
15	+	+	40	+	+
16	+	+	41	+	+
17	+	+	42	+	+
18	+	+	43	+	+
19	-	-	44	+	+
20	-	-	45	+	-
21	+	-	46	+	-
22	-	-	47	+	-
23	-	-	48	+	-
24	+	+	49	+	-
25	+	+	50	+	-