



Osaamista
ja oivallusta
tulevaisuuden
tekemiseen

Lauri Kakko

Laadunvalvontamenetelmän pystytys Novodiag-testikasetin primer mix - komponenteille

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalyttikko (AMK)

Laboratorioanalytiikka

Opinnäytetyö

1.12.2019

Tekijä Otsikko Sivumäärä Aika	Lauri Kakko Laadunvalvontamenetelmän pystytys Novodiag-testikasetin primer mix -komponenteille 25 sivua 1.12.2019
Tutkinto	Laboratorioanalytikko (AMK)
Tutkinto-ohjelma	Laboratorioanalytiikka
Ohjaajat	Vanhempi tuotekehityspäällikkö Juha Saharinen Tuotekehitysinsinööri Sanna Uusivirta Lehtori Tiina Soininen
<p>Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli kehittää laadunvalvontamenetelmä Mobidiag Oy:n Novodiag® Bacterial GE+ -testikasetin primer mix -komponenteille (alukesekoitus-komponentit). Novodiag Bacterial GE+ on automatisoitu geenimonistusmenetelmä (PCR) useiden patogeenisten gastroenteriittiä aiheuttavien bakteerien tunnistukseen potilaan uloste-näytteestä. Primer mix sisältää testissä tunnistettavien bakteerien kohdegeenien alukkeet ja kehitetyn menetelmän tarkoitus oli pystyä toteamaan kaikkien tarvittavien primer mix -komponenttien toiminta osana valmistettavan kasetin laadunvalvontaa. Kehitetyn menetelmän oli myös tarkoitus tuottaa kvantitatiivista ja hyvin toistettavissa olevaa tietoa primer mix -komponenttien toiminnasta eri tuotantoerissä.</p> <p>Menetelmässä käytettiin SYBR® Green -pohjaista qPCR-sulamiskäyräanalyysiä. Työssä kehitettiin sopivat pitoisuudet käytetyille synteettisille gBlock®-DNA-templaateille ja toimiva qPCR-ohjelma. Myös alukkeiden valmistajan vaikutusta tutkittiin ja se koettiin vähäiseksi. Toimivien olosuhteiden löydyttyä tehtiin toistoja eri primer mix -erillä ja qPCR-laitteistoilla selvittämään normaalivaihtelun suuruutta, laadunvalvonnassa käytettävien hyväksyntärajojen asettamiseksi.</p> <p>Työssä kehitettyä laadunvalvontamenetelmää suunniteltaessa keskityttiin siihen, että kaikki alukkeet tunnistetaan. Kehitetyllä menetelmällä pystyttiin onnistuneesti erottamaan kaikki Bacterial GE+ -testikasetissa käytössä olevat alukkeet. Kuitenkin qPCR-monistuksessa havaittiin negatiivisten näytteiden epäspesifistä monistumista SYBR Green -detektioilla, joka menetelmänä poikkeaa lopullisen tuotteen spesifisestä koetin-detektiosta. Koska negatiivisten näytteiden monistuminen olisi vaikeuttanut laadunvalvontaa huomattavasti ja niiden erottaminen varsinaisista kontaminaatioista olisi ollut vaikeaa, päätettiin ettei kehitettyä menetelmää lopulta voida käyttää vakituksena laadunvalvontamenetelmänä.</p>	
Avainsanat	qPCR, <i>in vitro</i> -diagnostiikka, gastroenteriitti, aluke

Author Title	Lauri Kakko Development of Quality Control Protocol for Primer Mix Components of Novodiag® Test Cartridge
Number of Pages Date	25 pages 1 December 2019
Degree	Bachelor of Laboratory Services
Degree Programme	Laboratory Sciences
Instructors	Juha Saharinen, Senior R&D Manager Sanna Uusivirta, R&D Manager Tiina Soininen, Senior Lecturer
<p>The aim of this thesis project was to develop a quality control method for the primer mix components of Novodiag® Bacterial GE+ test cartridge. Novodiag Bacterial GE+ is an automated gene amplification method (Polymerase Chain Reaction, PCR) developed and manufactured by a Finnish biotechnology company Mobidiag Ltd. Novodiag is for the detection of various gastroenteritis causing pathogens from the fecal sample of the patient. The primer mix contains the primers of the target genes detected in the test and the aim of the method was to detect the function of all the necessary primer mix components, as a part of the quality control procedure of the produced test cartridges. Additional aim of the method was to develop quantitative and repeatable information about the primer mix components across different production lots.</p> <p>The developed method used a SYBR® Green based qPCR melting curve analysis. During method development, suitable concentrations for the synthetic gBlock® DNA templates used were tested and a suitable qPCR protocol was developed. The effect of the manufacturer of the primers used in the primer mixes was also studied and found minute. Different primer mix production lots and different qPCR equipment were used to gain information about the amount of the normal fluctuation, after functioning test conditions were found to set the parameters for the acceptance limits.</p> <p>The primary aim of the thesis project was to develop a method that was able to detect all the primers used in the test cartridge. All the primers used in Bacterial GE+ test cartridge was successfully detected with the developed method. Some unspecific amplification were detected from the negative control samples during SYBR Green detection, a detection method that differs from the probe-based detection of the final product. The unspecific amplification of the negative control samples would have caused a significant challenge for the quality control because they would have been difficult to separate from actual contaminations. It was decided that the method would not be used as a routine quality control method.</p>	
Keywords	qPCR, In Vitro diagnostics, gastroenteritis, primer mix

Sisällys

Lyhenteet ja käsitteet

1	Johdanto	1
2	Novodiag®	2
2.1	Laitteisto	2
2.2	Testikasetti	3
2.3	Bacterial GE+ -testi	6
3	qPCR	8
3.1	Fluoresoivat väriaineet	8
3.2	Hydrolyysikoettimilla aikaansaatu DNA-monistumisen spesifinen detektio	8
3.3	DNA-monistumisen epäspesifinen detektio	9
3.4	Sulamiskäyräanalyysi	9
3.5	Multiplex qPCR	10
4	Työn toteutus	11
4.1	Työvaiheet	11
4.2	SYBR® Greenin toiminta NVD-alukkeilla	12
4.3	Kaikkien NVD-alukkeiden ja gBlock-templaattien testaus	14
4.4	Oligonukleotidien-valmistajan vaikutus	15
4.5	Templaattien yhdistäminen	15
4.6	Konsentraation vaikutus ja toistojen suoritus	16
5	Tulokset	17
5.1	Menetelmän käyttökelpoisuus	17
5.2	Cq-arvot	19
5.3	Sulamiskäyräanalyysit	22
6	Loppupäätelmät	24
	Lähteet	26

Lyhenteet ja käsitteet

BGE+	Bacterial GE+. Yksi Mobidiag Oy:n Novodiag®-tuoteperheen tuote, joka tunnistaa geenimonistusmenetelmällä ulostenäytteessä olevia patogeenisiä bakteereita.
Kopiota/ μ l	DNA-molekyylien kopioluku mikrolitrassa
Cq-arvo	Quantification cycle. DNA-monistuksen (PCR) monistussyklimäärä, jolla fluoresenssin taso saavuttaa asetetun kynnyssykitason.
dsDNA	Kaksijuosteinen DNA
eNAT®	Guanidiinitiosyanaatti pohjainen molekulaariseen diagnostiikkaan tarkoitettu näytteen keräys- ja säilytyspuskuri. eNAT® on rekisteröity tuotemerkki (COPAN ITALIA spa, Brescia, Italy)
gBlock®	Synteettinen kaksijuosteinen geenifragmentti. gBlock® on rekisteröity tuotemerkki (Integrated DNA Technologies, Inc. (IDT), Coralville, Iowa, USA)
IVD	<i>In vitro</i> -diagnostiikka, tarkoittaa potilaasta tai terveestä henkilöstä otetun näytteen lääketieteellistä tutkimista kehon ulkopuolella.
Melting analysis	DNA:n sulamislämpöanalyysi. DNA:n sulamisella tarkoitetaan kaksijuosteiden erkaantumista toisistaan, jolloin syntyy kaksi komplementaarista, yksijuosteista DNA molekyyliä. dsDNA voidaan sulattaa nostamalla reaktion lämpötilaa ja sulamislämpötilaksi (T_m) kutsutaan sitä lämpötilaa, jossa kaksijuosteinen DNA erkaantuu yksijuosteiseksi. Koska sulamislämpötila riippuu dsDNA:n sekvenssistä, sulamiskäyräanalyysillä voidaan mitata yhtä aikaa monen dsDNA-molekyylijoukon seosta.
Multiplex	DNA-monistusreaktio, joka mahdollistaa usean erillisen DNA-sekvenssin samanaikaisen monistuksen.

NVD	Novodiag®, Mobidiag Oy:n rekisteröity tavaramerkki (Mobidiag Oy, Espoo, Finland)
PCR	Polymerase chain reaction, eli polymeraasiketjureaktio. Molekyylibiologian menetelmä, jolla voidaan eksponentiaalisesti monistaa DNA kohdealue.
Primer mix	Multiplex DNA monistuksessa käytettyjen alukkeiden sekoitus
qPCR	Kvantitatiivinen PCR
SYBR-Green®	SYBR-Green® on merkkiaine, joka sitoutuu kaksijuosteiseen DNA:han (interkaloituu). Sitoutuessaan dsDNA:han, SYBR-Green® tuottaa fluoresenssia, jonka emissioaallonpituus vastaa näkyvää vihreää valoa. Täten SYBR-Green®:iä voidaan käyttää määrittämään näytteessä olevan kokonais dsDNA:n määrää. (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, U.S.)

1 Johdanto

Mikrobilääkkeillä (antimikrobiaineilla) voidaan tappaa mikrobeja tai hidastaa niiden kasvua. Mikrobilääke voi olla joko antibiootti tai kemoterapia-aine. Antibiootilla tarkoitetaan lääkettä, joka toimii tuhoamalla tai estämällä pieneliöiden lisääntymistä toisten pieneliöiden tuottamien lääkeaineiden avulla, toisin kun kemoterapia-aine, joka on teollisesti valmistettu. Antibioottiresistenssi tarkoittaa bakteerin kykyä vastustaa antibioottia. Antibioottiresistentin mikrobin aiheuttamia infektioita ei pystytä siis enää hoitamaan kyseisellä antibiootilla. Osa mikrobeista on luonnostaan resistenssejä antibiooteille, mutta antibioottien käytön määrällä on suora yhteys antibioottiresistenssiin, sillä antibioottien käytön kasvu lisää myös resistenssiä. Mikrobilääkeresistenssin torjunta on maailmanlaajuinen uhka ja se onkin yksi harvoista terveysaiheista, joka on noussut Yhdistyneiden kansakuntien (YK) yleiskokouksen asialistalle. [1.]

Mobidiag Oy:n Novodiag® Bacterial GE+ -testikasetti (BGE+) toimii osallaan turhien antibioottien määräämistä vastaan. BGE+ on gastroenteriitin eli maha-suolistotulehdukseen aiheuttamien bakteerien diagnosointiin tarkoitettu automatisoituun *In vitro* -diagnostiikkalaitteistoon perustuvan Novodiag:n testikasetti. Mobidiag Oy on vuonna 2000 perustettu suomalainen molekyyli diagnostiikan yritys. Yritys on ollut Euroopan kliinisen diagnostiikan markkinoilla vuodesta 2008. Vuonna 2013 Mobidiag yhdistyi ranskalaisen Genewaven ja suomalaisen Amplidiagin kanssa yritysliitossa. Tällä hetkellä Mobidiagilla on kaksi tuotepohjettä: Amplidiag® ja Novodiag. Amplidiag on PCR-tekniikkaan perustuva suurille ja keskisuurille laboratorioille tarkoitettu tuotesarja ja Mobidiagin tavoitteisiin kuuluu taistelu antibioottiresistenssiä vastaan. Yksi keinoista on vähentää antibioottien liiallista ja turhaa käyttöä nopean diagnoosin avulla. Tässä opinnäytetyössä kehitettiin Mobidiag Oy:n Novodiag-testikasetin alukeseoskomponenttien, eli primer mix-komponenttien, laadunvalvontamenetelmä kvantitatiivisellä polymeerasiketjureaktio -menetelmällä (qPCR).

Opinnäytetyössä tarkoituksena oli kehittää SYBR® Green sulamiskäyräanalyysiin perustuva laadunvalvontamenetelmä. Menetelmällä tavoiteltiin nopeaa ja yksinkertaista tapaa varmentaa kaikki testikasetissa käytetyt alukkeet testikasetin ulkopuolella, ennen tuotantovaihetta, jossa alukkeet lisätään testikasettiin.

2 Novodiag®

2.1 Laitteisto

Novodiag (NVD) on täysin automatisoitu *In vitro* -diagnostiikka-alusta (IVD), joka on suunniteltu havaitsemaan ja tunnistamaan näytteessä olevat kohdenneet nukleiinihapot. NVD on Mobidiag Oy:n kehittämä ja valmistama diagnostiikkakokonaisuus, joka koostuu NVD-laitteesta, NVD-ohjelmistosta, kosketusnäytöllisestä tietokoneesta, viivakoodinlukijasta ja testikohtaisista NVD-testikaseteista.

NVD:n toiminta perustuu 1) nukleiinihappojen (DNA ja/tai RNA) eristykseen näytteestä, 2) näiden nukleiinihappojen monistukseen multiplex qPCR -tekniikalla (Multiplex-qPCR) ja 3) niiden tunnistukseen DNA-mikrosiru-hybridisaatiolla (microarray-hybridisaatio). [2.]

Yksi NVD-laite pystyy analysoimaan neljä näytettä kerralla ja analyysistä saadaan tulos noin tunnissa. Kapasiteettia pystytään lisäämään asentamalla laitteistoja päällekkäin. Yhdellä ohjauspaneelilla pystytään käyttämään yhdestä neljään päällekkäin asennettua NVD-laitetta. Edellä mainitut asennusvaihtoehdot esiteltynä kuvassa 1.



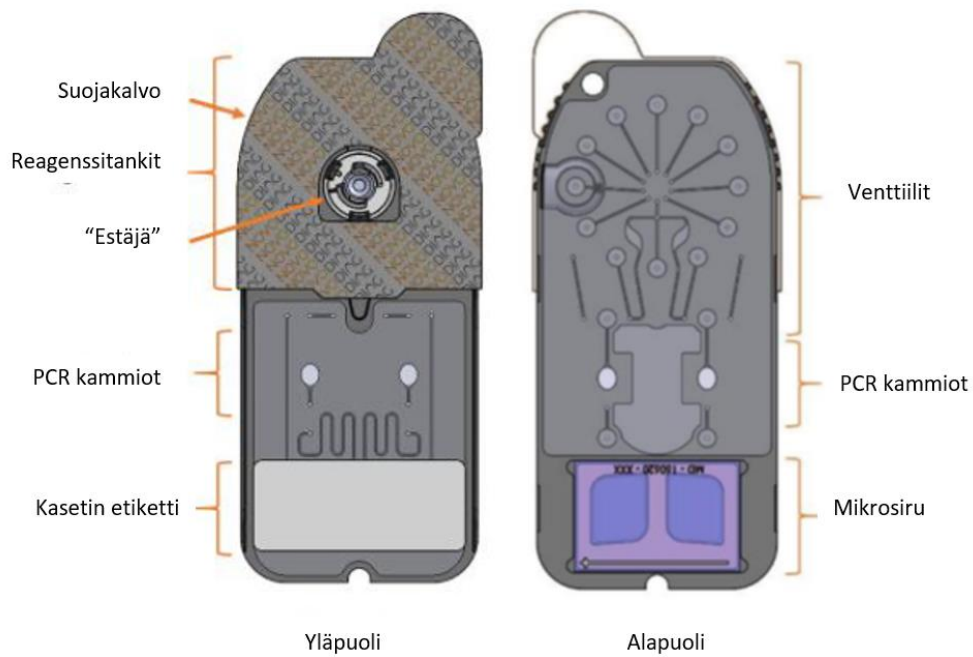
Kuva 1. Novodiag®-laite, kosketusnäytöllinen hallintapaneeli, viivakoodinlukija yksittäisasetteluna (1) ja neljä laitetta asennettu päällekkäin (2) [2.]

NVD:n vahvuuksia ovat sen helppokäyttöisyys ja nopeus. Yhden näytekasetin analysointiaika on testistä riippuen noin 60–90 minuuttia. Tämän vuoksi NVD:llä voidaan saada tulos huomattavasti aikaisemmin, kuin yleisesti käytetyllä bakteeriviljelymentelmällä, joka vie yhden tai useamman vuorokauden ajan.

Tutkitusta näytteestä voidaan analysoida kohdennettuja nukleiinihappoja sisältäviä patogeenejä. Laitteistoa hallitaan NVD-ohjelmistolla, joka on asennettu laitteen mukana tulevaan kosketusnäytölliseen tietokoneeseen. Kosketusnäytöllinen tietokone toimii myös laitteiston hallintapaneelina. Laitteisto ja ohjelmisto ohjaavat toimenpiteitä NVD-kasetissa, johon guadiinisyaanaattipohjaiseen näytteen keräys- ja säilytyspuskuriin (eNAT®) liuotettu näyte on lisätty. Kasettiin valmiiksi lisätyt reagenssit ohjataan näytteen kanssa oikeissa vaiheissa eri kasetin sijainteihin, joissa tarvittavat reaktiot tapahtuvat, esimerkiksi kiinteä-nestefaasi DNA/RNA-eristys ja DNA-monistus. Kasettiin integroitu ruiskumäntä, mäntään kohdistetut positiivinen ja negatiivinen paine sekä kasetin eri säiliöiden integroidut venttiilit mahdollistavat tarkan nesteensiirron kasetin eri kammioiden välillä. Edelleen säiliöiden päällä oleva hydrofobinen, kaasut läpi päästävä kalvo, pitää kasetin suljettuna, mahdollistaen suljetun järjestelmän. [2.]

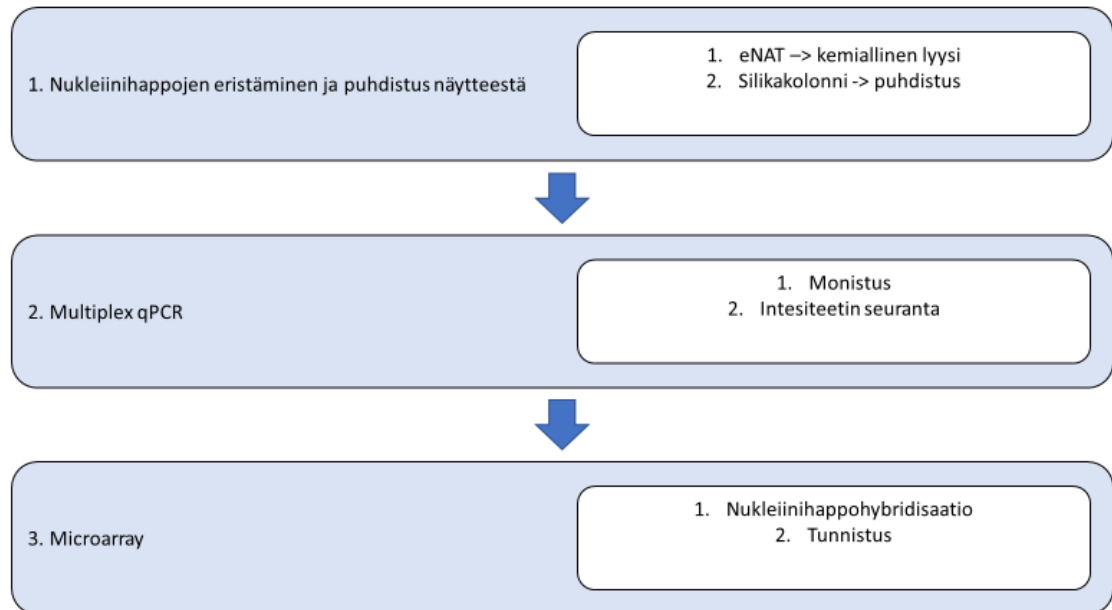
2.2 Testikasetti

NVD-laitteisto käyttää kertakäyttöisiä NVD-kasetteja, jotka sisältävät analyysiin tarvittavat liuokset, alukkeet ja koettimet sekä toiminnalliset mekaaniset osat. NVD-kasetti ja sen osat kuvassa 2.



Kuva 2. Novodiag-kasetti ja sen osat [2.]

NVD-kasetti on jaettu kolmeen osaan. Kasetin yläosassa tapahtuu nukleiinihappojen eristys. Keskiosassa sijaitsevat PCR-kammiot, joissa tapahtuu eristettyjen nukleiinihappojen monistus. Kasetin alaosassa tapahtuu nukleiinihappojen hybridisaatio DNA-mikrosirulla. Diagnoosin prosessi esitettyinä kuvassa 3.



Kuva 3. Novodiag-testin prosessikaavio

Näytteen nukleiinihappojen eristys tapahtuu kasetin reagenssitankkeihin valmiiksi annostettujen liuoksien avulla. NVD BGE+ -näyttekasetin reagensseihin kuuluvat taulukossa 1 esitetyt reagenssit.

Taulukko 1. Novodiag BGE+ -testikasetin esiannostellut reagenssit

Esiannosteltu reagenssi	Sijainti
Pesupuskuri 1	reagenssitankki
Pesupuskuri 2	reagenssitankki
Eluointipuskuri	reagenssitankki
PCR master mix	reagenssitankki
Kuivatut oligonukleotidialukkeet	PCR-kammio
Prosessikontrolli	reagenssitankki
Hybridisaatiopuskuri	reagenssitankki
Hybridisaatiokontrolli	reagenssitankki
Hybridisaatiokoettimet	mikrosiru
Mikrosirun asemointikontrollit	mikrosiru

Potilasnäyte lisätään kasettiin eNAT-liuoksessa, johon näyte on sekoitettu näytepuikolla. eNAT aloittaa näytteen kemiallisen hajotuksen. Nukleiinihappojen eristykseen kasetissa

käytetään silikapohjaista neste-kiinteäfaasieristystä. Silikakolonne sijaitsee yhdessä NVD-kasetin reagenssitankissa, johon näyte siirretään NVD-laitteiston ruiskun avulla. NVD-kasetin silikakiinteäfaasikolonne on toimintatavaltaan DNA-eristyskriteissä yleisesti käytetyn spin-kolonnin tapainen, mutta sen käyttöön ei tarvita sentrifugia. Eristys tapahtuu, kun hajotettu näyte tuodaan kolonnein ja reagenssien korkea suolapitoisuus sitoo nukleinihapot kolonnein. Tämän jälkeen kolonnein sidottua kohdetta pestään pesupuskureilla ja lopulta se eluoidaan irti kolonnista. Eluoituskurin pH ja matala suolapitoisuus irrottavat nukleinihapot kolonnista. [3.]

Nukleinihappojen eristyksen ja puhdistuksen jälkeen niitä monistetaan qPCR-tekniikkaa hyväksikäyttäen. Näyteliuos ja PCR-master mix -liuos ohjataan kahteen PCR-kammioon, joissa on valmiiksi kuivatut alukkeet PCR-reaktiolle. Näissä kahdessa PCR-kammiossa on molemmissa omat lämpökierrättäjänsä, joten NVD-laitteisto pystyy tarkkaan lämpötilanhallintaan molemmissa kammioissa erikseen.

Joissakin NVD-tuotteissa diagnosointi perustuu pelkästään qPCR:ään (esim. *C. difficile*), mutta toisissa tuotteissa diagnostiikkaan käytetään hyväksi myös DNA-sirua. DNA-sirulla on sirun tunnettuihin kohtiin kiinnitetyt spesifiset koettimet, joihin amplikonit sitoutuvat hybridisaation avulla. Hybridisaatiossa amplikonit sitoutuvat komplementaarisiin koettimiin ja näin ne voidaan havaita. Analysointi tapahtuu käyttäen kosketusfluoresenssi-kuvausta (Contact fluorescence imaging) ja sirun pinnan läheisyydessä tapahtuvaa ”katoavaa eksitaatiota” (evanescent excitation). [3.]

2.3 Bacterial GE+ -testi

Gastroenteriitin eli mahasuolitulehduksen aiheuttajana voi olla virus, bakteeri, sieni tai parasiitti ja tartunta on yleisimmin peräisin vedestä tai ruuasta. Akuuttia ripulia kutsutaan ruokamyrkytykseksi, jos tartunta on tapahtunut kotimaassa ja turistiripuliksi, jos tartunta on tapahtunut ulkomailla. [4;5.] Turistiripulin taudinaiheuttaja jää usein epäselväksi, mutta tavallisin taudinaiheuttaja on bakteeri-infektio 50–80 %:n osuudella. Virukset aiheuttavat noin 5–25 % ja alkueläimet noin 10 % turistiripulitapauksista.

Yleisin akuutin ripulin aiheuttava bakteeri on enterotoksigeeninen *Escherichia coli* (ETEC) sekä muut kolibakteerit, kuten enteroaggregatiivinen *E. coli* (EAEC), enterohemorraginen *E. coli* (EHEC) ja enteropatogeeninen *E. coli* (EPEC). Myös kampylobakteerit (*C. coli* ja *C. jejuni*), salmonellat, yersiniat ja vibriot ovat usein ripulin taudinaiheuttajina. [5.] Bacterial GE+ (BGE) on Mobidiag Oy:n Novodiag®-tuoteperheen gastroenteriitti-analyysiin tarkoitettu tuote. NVD BGE tarjoaa Multiplex qPCR -tekniikkaan ja microarray-hybridisaatioon perustuvan analyysin perinteisen ulosteviljelyyn perustuvan diagnostiikan rinnalle. BGE:llä pystytään analysoimaan yleisimmät akuutin ripulin aiheuttavat bakteerit ja toksiinit. NVD BGE:n testipaneeli sisältää taulukossa 2 esitetyt bakteerit ja toksiinit. [6.]

Taulukko 2. Novodiag Bacterial GE+ -testikasetin testipaneeli

<i>Campylobacter coli</i>
<i>Campylobacter jejuni</i>
<i>Clostridium difficile</i> toksiini B
Enteroaggregatiivinen <i>Escherichia coli</i> (EAEC)
Enterohemorraginen <i>Escherichia coli</i> (EHEC)
Enteropatogeeninen <i>Escherichia coli</i> (EPEC)
Enterotoksigeeninen <i>Escherichia coli</i> (ETEC)
<i>Salmonella spp.</i>
<i>Shigella spp.</i> / enteroinvasiivinen <i>Escherichia coli</i> (EIEC)
<i>Vibrio cholerae</i>
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
<i>Yersinia enterocolitica</i>
<i>Yersinia pseudotuberculosis/pestis</i>

PCR-kammioihin kuivatut alukkeet ovat jaettu kahteen eri alukeseokseen. Ne ovat nimeltään primer mix 1 ja primer mix 2. Alukeseokset ovat kuivattuina omissa PCR-kammioissaan. BGE+ -testikasetin primer mix -komponenteista haluttiin tuottaa kvantitatiivista ja toistettavissa olevaa tietoa. Tähän menetelmään valittiin SYBR Green -pohjainen qPCR-sulamiskäyräanalyysi tuottamaan haluttua tietoa.

3 qPCR

qPCR, eli kvantitatiivinen polymeerasiketjureaktio, on molekyylibiologian menetelmä, jossa seurataan DNA:n monistumista monistumisen aikana reaktioon lisätyn väriaineen avulla. Tavallisessa PCR:ssä voidaan analysointi tehdä vasta, kun kaikki asetetut syklit ovat päättyneet, mutta qPCR-menetelmän avulla DNA:n monistumista pystytään seuraamaan reaaliaikaisesti. [7.]

3.1 Fluoresoivat väriaineet

qPCR:n monistumisreaktiota seurataan käyttämällä reaktioissa fluoresoivia väriaineita, joista yleisimpiä ovat 5'-nukleaasikoettimet, eli hydrolyysikoettimet, kuten TaqMan® ja DNA:han sitoutuvat väriaineet kuten SYBR Green. [7.] Hydrolyysikoettimia kutsutaan 5'-nukleaasikoettimiksi siksi, polymeerasin 5'-eksonukleaasiaktiivisuus irrottaa ja pilkkoo kyseiset koettimet. [8.] Nämä TaqMan-koettimet ovat sekvenssispesifisiä fluorofori-leimattuja DNA-oligonukleotidejä ja ne ovat yleisimmin käytössä olevia väriaineita. [9.] SYBR Green on epäspesifinen kaikkeen kaksijuosteiseen DNA:han (dsDNA) kiinnittyvä väriaine. [7.] Kummankin väriaineen perustoimintaperiaate on samanlainen: DNA:n monistumisesta seuraa mitattavan fluoresenssin määrän kasvu. [8.]

3.2 Hydrolyysikoettimilla aikaansaatu DNA-monistumisen spesifinen detektio

Yksi yleisimmin käytetyistä DNA-monistumisen detektiomenetelmistä perustuu TaqMan-koettiin. Sen kuten muidenkin hydrolyysikoettinten toiminta perustuu DNA-polymeraasin (Taq-polymeraasin) 5'-eksonukleaasiaktiivisuuteen. TaqMan-koettimessa on sekä fluorofori-tähde että quencher-tähde (vaimentaja tai luovuttaja). Näiden molekyylien toiminta perustuu fluorescence resonance energy transfer (FRET) -ilmiöön. FRET-ilmiössä quencher absorboi fluoroforia eksitoitaessa syntyvän emissioenergian niiden ollessa lähelläkin samassa oligonukleotidissä. [8.] Kun koetin on liittynyt (anneal) oikeaan kohde-molekyyliin, Taq-polymeraasin 5'-nukleaasiaktiivisuus pilkkoo koettimen ja irrottaa fluoroforin ja quencherin toisistaan ympäröivään liuokseen. Tällöin niiden välimatka kasvaa

ja FRET-ilmiö lakkaa toimimasta, eli quencher ei enää pysty absorboimaan fluoroforin eksitaatioissa lähettämää emissioenergiaa. Näin saadaan aikaiseksi fluoresenssi, jota pystytään qPCR-laitteistolla mittaamaan. [9.]

3.3 DNA-monistumisen epäspesifinen detektio

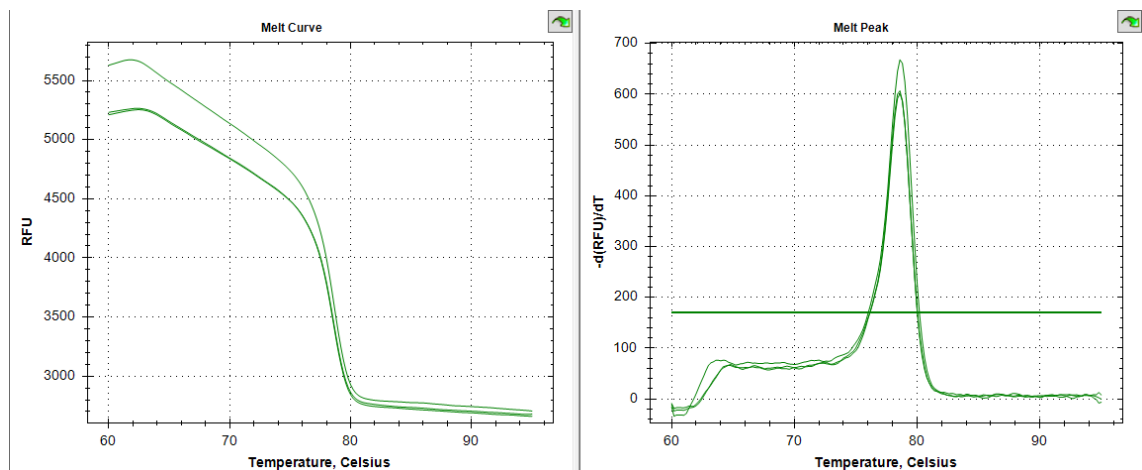
DNA-monistumisen epäspesifinen qPCR-detektio perustuu kaksijuosteiseen DNA:han sitoutuvaan väriaineeseen, kuten SYBR Greeniin. SYBR Green sitoutuu ainostaan kaksijuosteiseen DNA:han, jolloin eksitoitaessa SYBR Green luovuttaa emissioenergiaa. Menetelmä on epäspesifinen, sillä väriaine kiinnittyy kaikkeen kaksijuosteiseen DNA:han riippumatta siitä, onko DNA juuri sitä mitä on yritetty monistaa. Toisin sanoen menetelmä ei kykene erottamaan oikean, tavoitellun DNA-fragmentin monistumista ei-toivotusta, epäspesifisestä monistumisesta. Menetelmä on halvempi ja helpompi kehittää, kuin spesifiseen kemiaan perustuva menetelmä. Helppous tulee siitä, että menetelmää ei tarvitse suurta tietomäärää patogeenivarianttien sekvenssi-heterogenioista. Menetelmää ei tarvitse juurikaan optimoida, eikä menetelmässä tarvita spesifisiin sekvensseihin perustuvia koettimia. Epäspesifiseen kemiaan perustuvien menetelmien PCR-tuotteiden tarkistus voidaan tehdä esimerkiksi PCR-sykliden jälkeen suoritettavalla sulamiskäyrä-analyysillä. [10.]

3.4 Sulamiskäyräanalyysi

Sulamiskäyräanalyysiä voidaan käyttää epäspesifiseen kemiaan perustuvassa qPCR-menetelmässä. SYBR Green sitoutuu kaikkeen kaksijuosteiseen DNA:han (dsDNA), joten on tärkeää varmistua siitä, mitä tuotetta PCR:ssä monistetaan. Sulamiskäyrä on käytännössä qPCR-laitteiston havaitseman fluoresenssin muutos, kun reaktioseoksen lämpötilaa nostetaan itse DNA-monistussykliden jälkeen. Lämpötilan nostaminen johtaa siihen, että kaksijuosteisen dsDNA:n juosteet erkanevat ("sulavat") yksijuosteisiksi DNA:ksi (ssDNA) ja näin SYBR Green-väri ei pysty sitoudu amplikoniin. Täten fluoresenssissä havaitaan selvä lasku, kun sulamislämpötila T_m on saavutettu. Eri nukleinihapoilla on erilaiset sulamislämpötilat, johtuen niiden pituudesta ja nukleotidi-kompositiosta. Monistuksesta voidaan samanaikaisesti mitata eri monistustuotteiden ominaiset sulamislämpötilat. Tällöin mitattujen sulamislämpötilojen perusteella voidaan määrittää, onko

reaktiossa epäspesifisiä tuotteita, esim ”primer dimereita”, ja onko reaktiossa tuotettu haluttua amplikonia. Primer dimereita voi syntyä, kun kaksi PCR-aluketta kiinnittyy toisiinsa, eikä haluttuun kohdenukleotidiin. Primer dimereiden sulamislämpötila on yleensä matalampi, kuin amplikonien ja tämän avulla ne on mahdollista tunnistaa. Yleisin tilanne primer dimereiden syntymiselle on negatiivisissa kontroleissa, joissa ei ole templaattia (NTC, no-template control), koska näissä kontroleissa ei nimensä mukaisesti ole templaattia ja alukkeita on ylimäärin. Primer dimereiden lisäksi PCR-reaktiossa voi syntyä myös muita epäspesifisiä monistumistuotteita, jotka voidaan myös havaita sulamiskäyrä-analyysillä. [9.]

Sulamiskäyrä on itsessään vaikea tulkita ja siksi usein muodostetaan kuvaaja, jossa tutkitaan lämpötilan ja fluoresenssin toisen kertaluvun derivaattojen muutosta lämpötilaan verrattuna. Tällöin saadaan muodostettua piikkejä, joita on huomattavasti helpompi analysoida. Nämä kuvaajat esiteltynä kuvassa 4. qPCR-laitteistojen ohjelmistot muodostavat usein nämä kuvaajat automaattisesti.



Kuva 4. Vasemmalla sulamiskäyrä ja oikealla sulamispistekäyrä (fluoresenssin muutos jaettuna lämpötilanmuutoksella)

3.5 Multiplex qPCR

Multiplex qPCR:llä tarkoitetaan kahden tai useamman sekvenssin samanaikaista monistamista ja tunnistamista samassa PCR-reaktiossa. Tämä saavutetaan lisäämällä use-

ampia alukkeita ja koettimia yhteen reaktioon. Huonon spesifisyyden ja herkkyuden ehkäisemiseksi alukkeiden suunnittelussa pitää olla huolellinen, sillä tuotteiden monistuslämpötilat tulee olla samankaltaiset, jotta kaikki toivotut tuotteet monistuvat. Huonolla alukesuunnittelulla voi muodostua myös primer dimereita tai muita epäspesifisiä monistustuotteita. [10.]

Hyvin suunnitellulla multiplex qPCR-menetelmällä pystytään säästämään aikaa ja se tulee myös todennäköisesti edullisemmaksi kuin reaktioiden tekeminen yksittäin. Myös pienet näytemäärät voivat rajoittaa qPCR-analyysien suorittamista. Multiplex qPCR -menetelmällä voidaan joissain tapauksissa suorittaa enemmän analyysijä yksittäisiin qPCR-ajoihin verrattuna pienemmän näytemäärä vaatimuksen vuoksi. [11.]

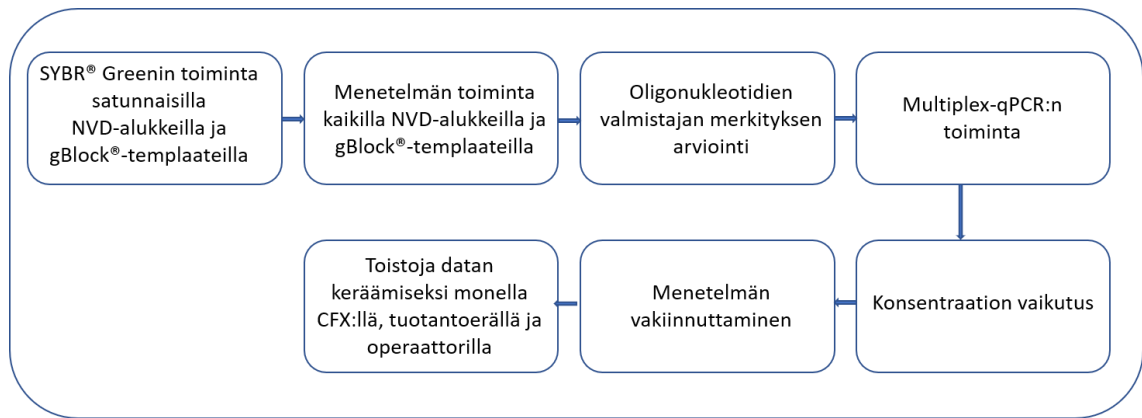
Multiplex qPCR:ää käytetään myös siten, että käytössä on vain yksi monistuskohde, mutta koe (assay) sisältää sisäisen positiivisen kontrollin. Tämänlainen koejärjestely nostaa kokeen suoritusvarmuutta. Lisäksi pipetoinnin tarkkuudesta johtuvat virheet minimoituvat, sillä näiden virheiden tulisi vaikuttaa näytteeseen ja kontrolliin samalla tavalla. [9.]

Suurin osa multiplex qPCR-analyyseistä tehdään korkeiden spesifisyyksien väriaineke-mioilla, kuten TaqMan-pohjaisilla väriaineilla, mutta multiplex qPCR -analyysijä voidaan suorittaa myös muilla merkkiaineilla, kuten SYBR Greenillä, yhdistettynä sulamiskäyrä-analyysiin. [12.]

4 Työn toteutus

4.1 Työvaiheet

Työn suoritus alkoi selvittämällä PowerUp[™] SYBR Green Master Mixin toimintaa ja työssä edettiin kohti vakiintunutta koejärjestelyä kuvan 5 mukaan.



Kuva 5. Opinnäytetyön laboratorio-osuuden suoritusjärjestys

4.2 SYBR® Greenin toiminta NVD-alukkeilla

Työn ensimmäinen vaihe oli selvittää SYBR Green Master Mix toiminta NVD:ssä käytetyillä alukkeilla ja gBlock-templaateilla, joita menetelmään oli suunniteltu käytettävän. Menetelmässä käytetyn Applied Biosystems PowerUp™ SYBR® Green Master Mix:in toimintaa testattiin yksittäisillä alukkeilla ja aiemmin valmistetulla primer mixillä. Testaukseen käytettiin Mobidiagin Amplidiag Bacterial GE CS-kalibroitisarjaa. CS-kalibroitisarja on Amplidiag tuoteperheessä käytetty ulkoinen kalibroitisarja. NVD:n alukkeista testiin valittiin satunnaisesti campC, campJ, est1ab ja elt. Reaktiivilavuutena oli 20 µl. Forward- ja reverse-alukkeet ja SYBR Green Master Mix laimennettiin Milli-Q vedellä vastaamaan NVD BGE+:ssä olevien alukkeiden pitoisuuksia ja PowerUp™ SYBR Green Master Mix -käyttöohjeen suosituksia. Yksittäisten forward- ja reversealukkeiden konsentraatio oli valmiiksi laimennettu 100 µM muiden alukkeiden osalta, mutta R_elt-aluke laimennettiin samaan pitoisuuteen 500 µM:sta laimentamalla se TE-puskuriin vastaamaan muiden pitoisuutta. Yksittäisiä alukkeita F_campc_06, R_campc_06, F_est1ab_004, R_est1ab_004, F_campj_04, R_campj_04, F_elt_001 ja R_elt_001 pipetoitiin jokaista mikrosentrifugiputkeen 0,08 µl:aa reaktiota kohden. Reaktioita oli yhteensä 18. Jokaista aluketta pipetoitiin 1,8 µl, joka vastaa 22:ta reaktiota. qPCR-reaktioseoksen muut komponentit näkyvät taulukossa 3. Alkuteistauksessa BGE+ primer mix:n tilalle pipetoitiin yksittäisten alukkeiden seosta osaan kuoppalevystä, mutta koska tämän liuoksen konsentraatio oli asetettu vastaamaan BGE+ primer mix -konsentraatioita tilavuus pysyi samana. BGE+:ssa käytetyistä alukkeista osa on primer mix 1:ssä ja osa primer mix 2:ssa.

Taulukko 3. Menetelmässä käytetyn qPCR-reaktioseoksen tilavuudet

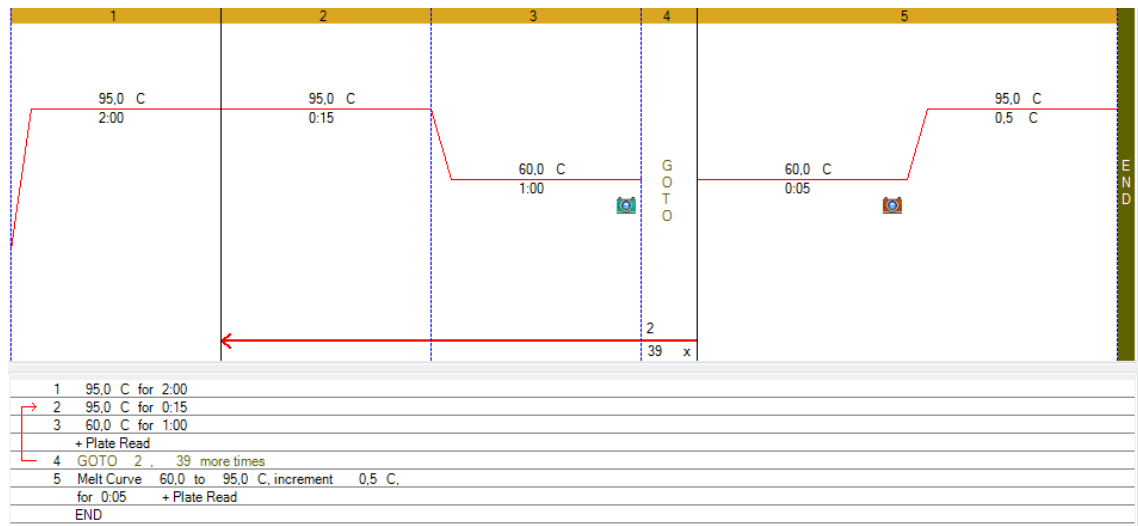
Komponentti	Tilavuus (μl)
PowerUp™ SYBR® Green Master Mix	10
Bacterial GE+ primer mix 1 tai 2	0,31
gBlock templaatti	5
Milli-Q vesi	4,69

qPCR-ajoa varten SYBR Green Master Mixistä, neljän alukkeen sekoituksesta, tai NVD BGE+ primer mix 1 ja 2 laimennettiin Milli-Q vedellä sekoitukset, joita kaikkia pipetoitiin 18 kaivoon 15 μl. Näin saatiin kolme rinnakkaista tulosta kaikista neljästä CS-sarjan pitoisuudesta ja kuusi Milli-Q-vettä templaattina käyttävää NTC-näytettä. 96-kuoppalevykaavio näkyvillä kuvassa 6.

	Yksittäiset alukkeet			NVD-BGE mix 1			NVD-BGE mix 2					
	Mix 1			Mix 2			Mix 3					
CS1												
CS2												
CS3												
CS4												
NTC												
NTC												

Kuva 6. 96 kuoppalevyn pipetointisuunnitelma kokeiluaajolle

qPCR-laitteistona työssä oli Bio-Radin CFX96™ Real-Time PCR Detection System ja qPCR protokolla muodostettiin lähes suoraan SYBR Green Master Mix -käyttöohjeen mukaisesti. Työssä käytetty kaksivaiheinen qPCR- ja sulamikäyräanalyysi -protokolla on esitettyä kuvassa 7. Käyttöohjeesta poiketen työssä ei tehty UDG-aktivointia ja sulamiskäyräprotokollan lämmönousua muutettiin siten, että lämpö nousi 0,1 °C sekunnissa.



Kuva 7. qPCR-ohjelma ja sulatusvaihe

4.3 Kaikkien NVD-alukkeiden ja gBlock-templaattien testaus

Työssä käytettiin synteettisiä IDT:n valmistamia kaksijuosteisia gBlock® DNA-fragmentteja DNA-templaatteina. Näiden yhteensopivuutta menetelmään kokeiltiin käyttämällä kohdassa 4.2 taulukko 3 kuvailtuja pitoisuuksia NVD BGE+ primer mix 1 ja 2 osalta ja templaatiksi vaihtui gBlockit, jotka laimennettiin TE-puskurilla pitoisuuteen 20 000 kopiota mikrolitrassa (kopiota/μl). Taulukossa 4 on esitettyä työssä käytettyjen alukkeiden ja templaattien tiedot. Templaateissa 2 (rumB), 16 (stx1) ja 17 (stx2) käytettiin kahta tai kolmea templaattia yhdistettynä.

Taulukko 4. Työssä käytetyt templaatit ja kohdegeenit

Templaatin numero	gBlock®-templaatti	Bakteeri - Geeni
1	gBlock_invA_02_1	<i>Salmonella- invA</i>
2	T_rumB_01	<i>Yersinia pseudotuberculosis - rumB</i>
	New_rumB_gBlock	
3	T_virF_01	<i>Yersinia enterocolitica</i>
4	C.dif_tcdB_short	<i>Clostridium difficile- toxB</i>
5	GB_Vpar_toxR	<i>Vibro parahaemolyticus- toxR</i>
6	T_ctx_02	<i>Vibrio cholerae - ctx</i>
7	T_ipaH_01	<i>Shigella/EIEC - ipaH</i>
8	T_invE_01	<i>Shigella/EIEC - invE</i>

9	T_campJ_01	<i>Campylobacter jejuni</i>
10	T_campC_01	<i>Campylobacter coli</i>
11	T_eae_04b	EPEC-eae
12	T_aggR_02	EAEC-aggR
13	T_est_03	EPEC-est
14	T_estA2_01	EPEC-est1ab
15	T_elt04	EPEC-elt
16	T06_stx1_A	EHEC-stx1
	T08_stx1d	
	T09_stx1_GG	
17	T_01_stx2_ABCD	EHEC-stx2
	T_02_stx2_E	
	T_03_stx2_F	

Tässä vaiheessa menetelmän kehitystä muokattiin myös PCR-ohjelmaa. Ohjelman lämmön nostamista sulamiskäyrää varten muutettiin siten, että lämpö nousi 0,1 °C/s ja fluoresenssia mitattiin 2 sekunnin välein. Muutos tehtiin, jotta sulamiskäyrään saataisiin useampi mittauspiste ja näin tarkempi kuvaaja. Tämä 0,2 °C lämmönosto vakiintui käytettäväksi työn loppuvaiheisiin. Muuten analyysi toteutettiin samalla kappaletta 4.2 vastaavalla tavalla.

4.4 Oligonukleotidien-valmistajan vaikutus

Työssä selvitettiin oligonukleotidien valmistajan vaikutusta käyttämällä kahden eri valmistajan oligonukleotideistä valmistettuja NVD BGE+ primer mix 2 -seoksia. Nämä nukleotidivalmistajat olivat Biomers ja LGC. Molemmista primer mixeistä valmistettiin PCR-sekoitukset (SYBR® Green master mix, BGE+ primer mix ja Milli-Q -vesi) kuten kappaleessa 4.2 on kuvattu.

4.5 Templaattien yhdistäminen

gBlock-templaateista valmistettiin suuremman konsentraation laimennokset, jotka mahdollistivat saman kopioluvun reaktiossa pienemmällä templaattilavuudella. Tämä muutos tehtiin, jotta templaatteja voisi yhdistää kaksi tai kolme yhteen kuoppalevyn kuop-

paan. Yhdistetyt templaatit valittiin siten, että samaan kuoppalevyn kuoppaan annostelujen amplikonien sulamislämpötilat olisivat mahdollisimman erillään toisistaan. Yhdistetyt templaatit näkyvät taulukossa 5.

Taulukko 5. Multiplex-qPCR -analyysiä varten yhdistetyt gBlock-templaatit

Multiplex-seos	gBlock-templaatit	Primer mix
1	toxB & ctx	1
2	aggR & rumB	1
3	eae & invA	1
4	toxR & ipaH	1
5	est & invE & stx2	2
6	estA2 & stx1	2
7	campJ & virF	2
8	campC & elt	2

Templaattien konsentraatiot olivat muiden osalta 40000 ja 4000 kopiota/ μ l, mutta multiplex-seos 5:n templaateilla 60 000 ja 6000 kopiota/ μ l, koska siinä yhdistettiin kolme templaattia, kun muissa seoksissa oli vain kaksi templaattia yhdistettynä. Templaattien kokonaistilavuus oli 5 μ l ja se jaettiin tasan templaattien kesken.

4.6 Konsentraation vaikutus ja toistojen suoritus

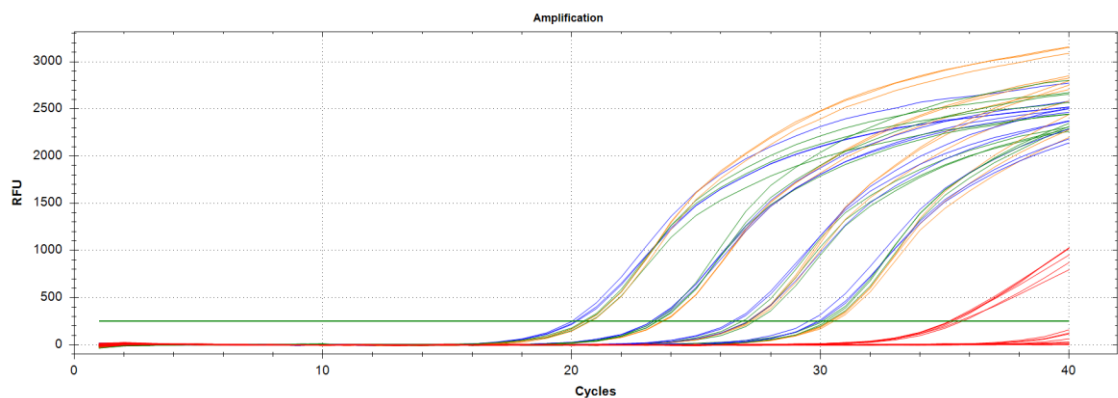
Konsentraation vaikutuksen testaamista varten templaateista valmistettiin laimennokset konsentraatioilla 20000 kopiota/ μ l ja 200 kopiota/ μ l. Rinnakkaisia näytteitä kummastakin konsentraatiosta pipetoitiin kuoppalevylle kaksi. Muut koejärjestelyt olivat saman kuin aikaisemmissa työn vaiheissa.

Tässä vaiheessa menetelmä vakiinutettiin pitoisuuteen 20000 kopiota/ μ l ja työssä alettiin tarkastelemaan CFX 96-laitteiston ja tuote-erän vaikutusta menetelmään. Käytössä oli neljä eri CFX 96-laitteistoa (Bio-Rad) ja viisi eri primer mix -tuote-erää.

5 Tulokset

5.1 Menetelmän käyttökelpoisuus

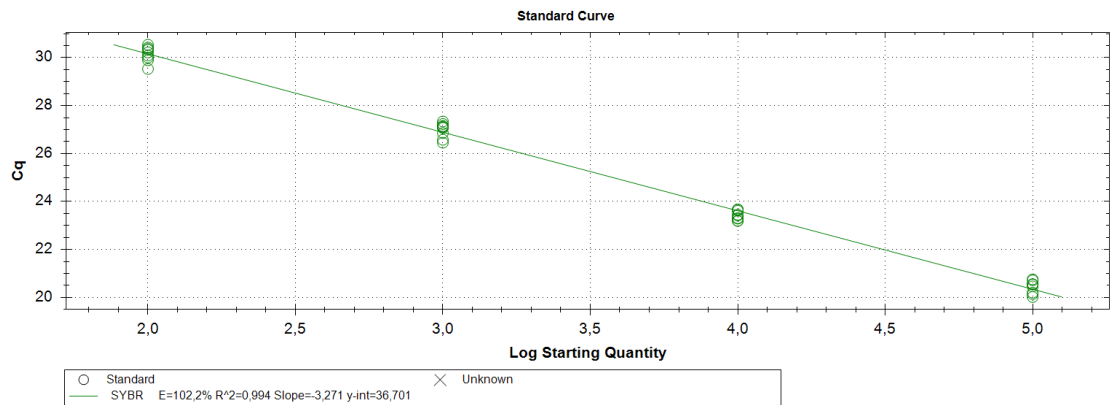
Kalibroitisarjan monistuksella varmistettiin työssä käytettyjen templaattien konsentraation olevan lineaarisella alueella. Yksittäisistä alukkeista (campC, campJ, est1 ab ja elt) valmistetun alukeseoksen sekä primer mix 1 ja 2 kalibroitisarjojen monistuskäyrät näkyvät kuvassa 8.



Kuva 8. Kalibroitisarjan monistuksen kuvaaja. Kuvaajassa on näkyvillä oranssilla yksittäisten alukkeiden (CampC, CampJ, est1 ab ja elt) monistuskäyrät. Primer mix 1 näkyy kuvaajassa vihreällä ja primer mix 2 sinisellä. Negatiivinen kontrolli on esitettyä punaisena.

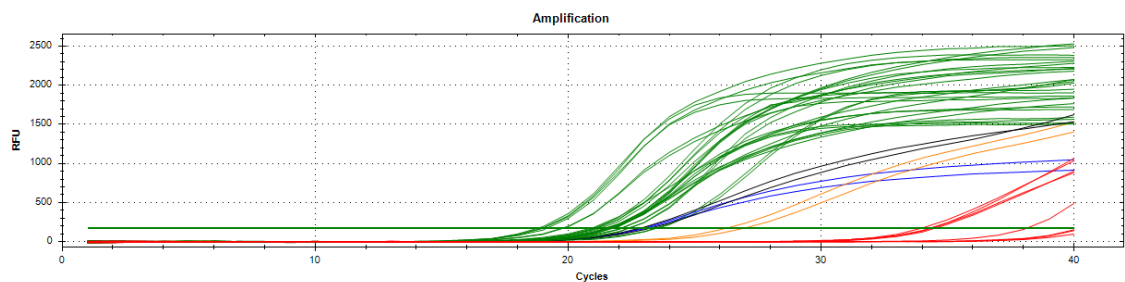
Kalibroitisarjassa käytetyn neljän pitoisuuden tuottamien monistuskäyräryppään lisäksi kuvaajassa voidaan havaita ylimääräisiä monistumisia negatiivisista kontrollinäytteistä. Näiden tulkittiin olevan primer dimereita. Ei-toivotut tuotteet monistuivat toivottujen kalibraatiosarjan monistumisten jälkeen. Näiden primer dimerien Cq-arvot, eli Syklimäärät, jolla fluoresenssin taso saavuttaa asetetun kynnyssyklimäärän, olivat noin 35,2–35,7. Suurin Cq-arvo toivottujen tuotteiden kohdalla oli 30,5. Tässä vaiheessa tulkittiin primer dimerien vaikutuksen olevan niin vähäinen, että työtä jatkettiin sellaisenaan. Myöhemmin negatiivisten kontrollien monistuminen koettiin suureksi epävarmuustekijäksi menetelmässä.

Kuvassa 9 on esitettyä kalibraatiosarjan standardisuora. Standardisuoran Y-akselin leikkauskohta oli 36,701. Standardisuoran korrelaatiokertoimen neliö oli $>0,990$ (0,994), kulmakerroin oli -3,271 ja E-luku, eli reaktion tehokkuus, oli 102,2 %.



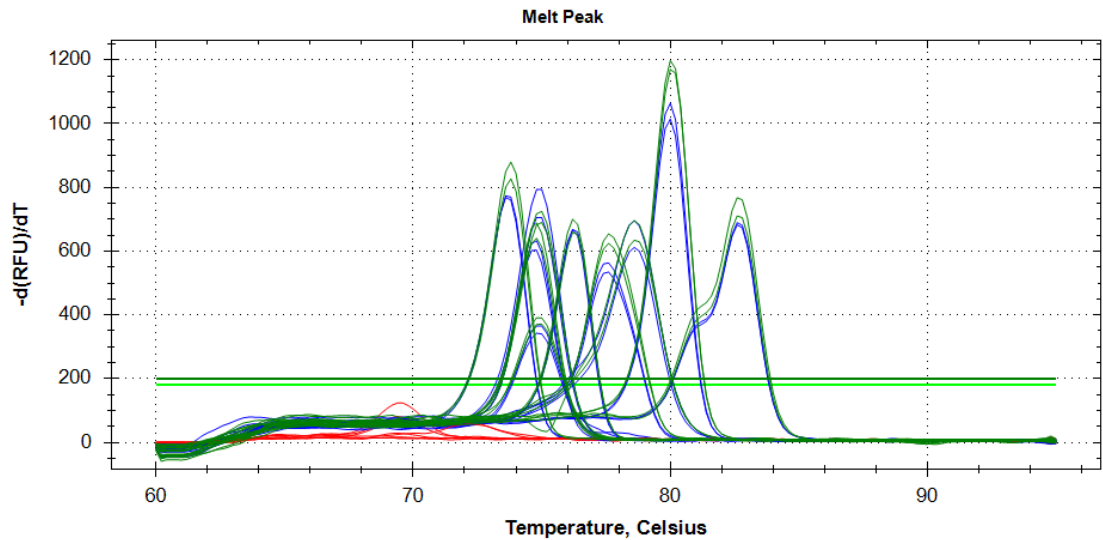
Kuva 9. Kalibraatiosarjan standardisuora

Kaikki Bacteria GE+ -testissä käytetyt alukkeet ja templaatit monistuivat hyväksyttävällä tasolla. Tämä havaittavissa kuvassa 10. Heikointa monistuminen oli templaatteja *toxB* (oranssi), *toxR* (musta) ja *est1ab* (sininen) monistettaessa. Myös negatiiviset kontrollinäytteet (punainen) monistuivat, joskin myöhemmin kuin testiamplikonit. Varsinkin primer mix 1 negatiiviset kontrollit voivat aiheuttaa kontaminaatioepäilyksiä.



Kuva 10. Bacterial GE+ alukkeiden monistus. Negatiiviset kontrollinäytteet korostettu punaisella, *toxB* oranssilla, *toxR* mustalla ja *est1ab* sinisellä värillä. Loput näytteistä näkyvät vihreällä värillä. Niiden monistumisessa ei ollut erityistä huomioitavaa.

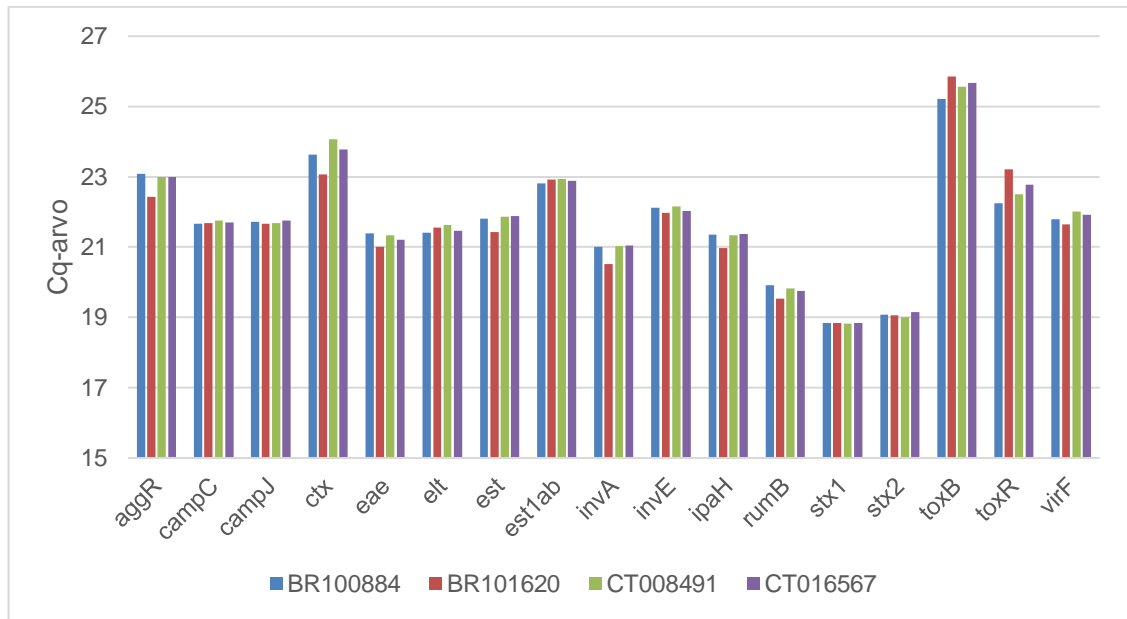
Oligonukleotidien valmistajalla ei huomattu olevan merkitystä. Kuvassa 11 on esitettyä kaksi rinnakkaista sulamispistekäyrää Biomersin (vihreät käyrät) ja LGC:n (siniset käyrät) alukkeista valmistettuja primer mixejä käyttäen. Sulamiskäyräanalyysin sulamispiekit ovat samanlaisia molempien valmistajien alukkeilla.



Kuva 11. Kahden eri valmistajan alukkeiden sulamispistekäyräanalyysi. Vihreällä merkatut käyrät ovat Biomersin alukkeista valmistettuja primer mixejä käyttäen. Siniset käyrät ovat LGC:n vastaavat kuvaajat. Negatiivinen kontrolli näkyy kuvassa punaisella.

5.2 Cq-arvot

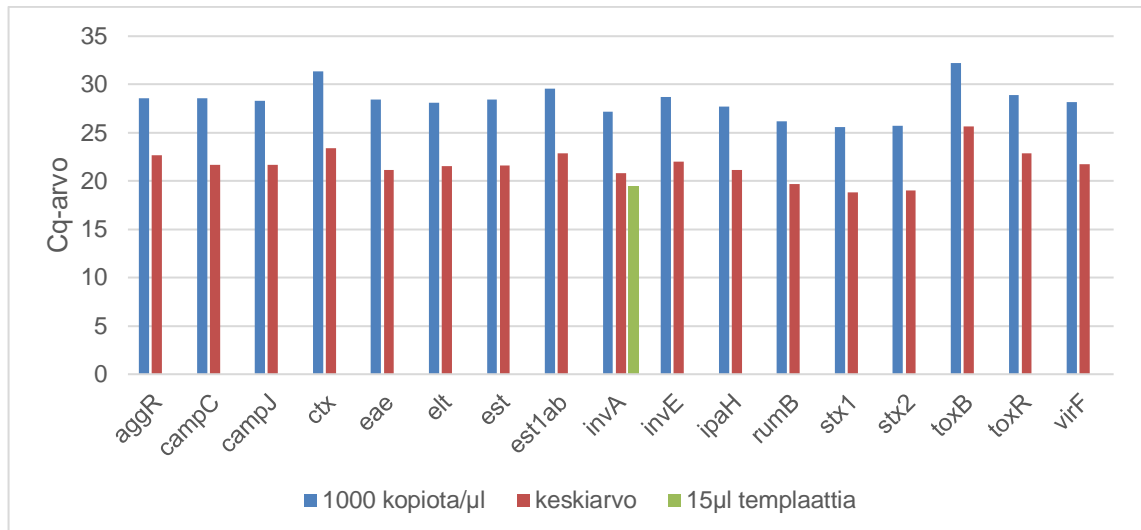
Cq-arvojen analysointi aloitettiin asettamalla Cq-kynnysraja-arvo kaikille qPCR-ajoille. Cq-kynnysraja-arvoksi asetettiin 10 % RFU keskiarvosta (Relative Fluorescence Units). Kuvassa 12 esiteltynä tulokset sellaisista olosuhteista, missä työtä oli tarkoitus suorittaa laadunvarmistuksessa.



Kuva 12. Amplikonien Cq-arvot eri CFX-laitteilla. Eri värit kuvaavat eri CFX-laitteistoja.

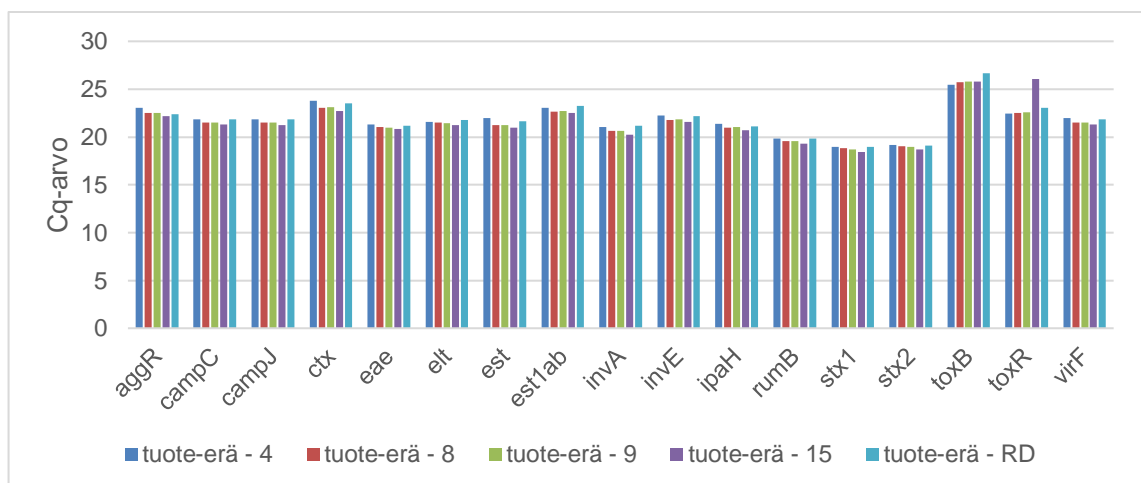
Suurin osa testiajoista suoritettiin laitteella BR101620. Tämä johtui siitä, että työtä tehdessä muut laitteet olivat usein varattuina. Työssä pyrittiin käyttämään useita CFX-laitteita ja kaikilla laitteilla saatiinkin suoritettua ainakin yksi monistus. BR101620-laitetta käytettäessä Cq-arvot olivat templaattien aggR, ctx, eae, est, invA, ipaH ja virF monistusten kohdalla pienemmät kuin muilla qPCR-laitteilla. Amplikonien toxB ja toxR kohdalla Cq-arvot olivat kuitenkin korkeampia kuin muilla laitteilla. Vaihtelu oli kuitenkin niin vähäistä, että sillä ei katsottu olevan merkitystä työn suoritukselle, sillä Cq-arvolle oli tarkoitus määrittää raja-arvot, joiden sisälle tämä vaihtelu olisi osunut.

Työssä käytettyjen gBlock-templaattien kopiota/ μ l -pitoisuuksien vaikutus on nähtävissä kuvassa 13. Siitä voidaan nähdä, että kun gBlockien pitoisuus oli 200 kopiota/ μ l, olivat Cq-arvot odotetusti huomattavasti korkeammat kuin pitoisuudessa 20000 kopiota/ μ l. Pitoisuudella 200 kopiota/ μ l Cq-arvot olivat niin korkeat, ettei toivottuja monistustuotteita olisi voitu erottaa primer dimereista, joten pitoisuus 200 kopiota/ μ l koettiin liian matalaksi konsentraatioksi tälle menetelmälle. Yhdessä ajossa invA-näytettä pipetoitiin vahingossa kuoppalevyille 10 μ l liikaa. Suunnitellussa pitoisuudessa invA-näytteiden Cq-arvo vaihteli välillä 21,46-20,13. invA-näytteen Cq-arvot olivat 19,54 ja 19,38, kun templaattia oli 15 μ l suunnitellun 5 μ l:n sijaan.



Kuva 13. Kuvassa sinisellä 1000 kopiota/μl -pitoisuuden Cq-arvo.

Kuvassa 14 näkyy viiden eri primer mixien Cq- arvot, jotka olivat tuotantoerien välillä pääosin yhdenmukaisia. Erän 15 toxR-templaatin Cq-arvo on huomattavasti korkeampi kuin muilla erillä. Tämä huomattiin vasta tuloksien kokoamisen yhteydessä, eikä tuote-erästä tehty kuin yksi ajo. Syy korkealle Cq-arvolle ei ole selvillä.

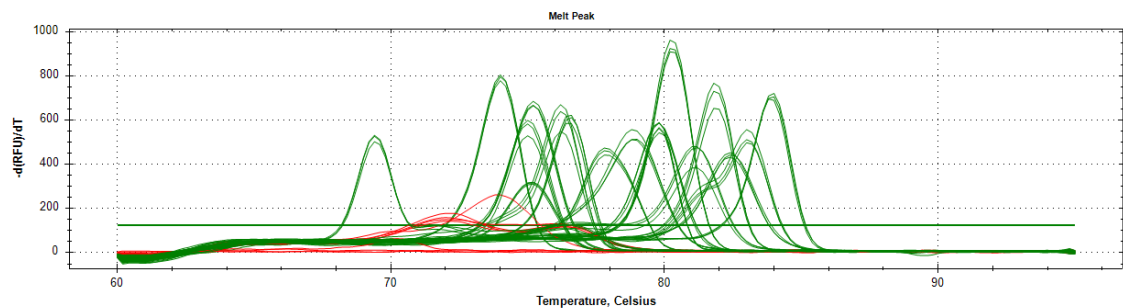


Kuva 14. Pylväsdiagrammissa kuvattuna eri tuote-erät eri väreillä.

5.3 Sulamiskäyräanalyysit

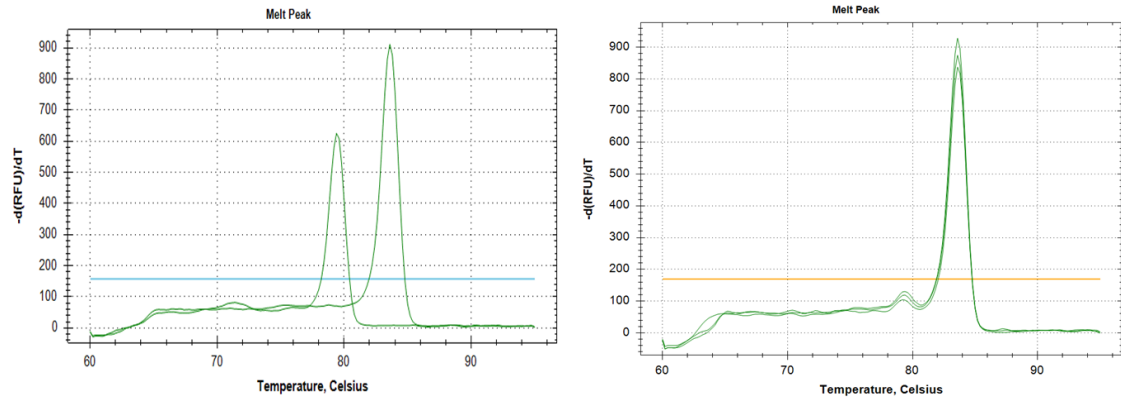
Sulamiskäyräanalyysillä tutkittiin sulamislämpötilojen vaihtelua tuote-erien välillä. Sulamiskäyräanalyysin oli tarkoitus olla suurin tekijä primer mix komponenttien laadunvalvonnassa, sillä juuri sulamiskäyrien perusteella komponenttien tunnistus olisi tapahtunut. Sulamislämpötilat olivat selkeästi erotettavissa ja tunnistaminen voitiin toteuttaa.

Sulamispistekuvaajan perusteella pystyttiin erottamaan selvät erot eri tuotteille. Kuvassa 15 näkyvissä myös negatiivisten kontrollinäytteiden käyriä esimerkiksi noin 72 C°:n kohdalla. Negatiivisten näytteiden monistuminen muodosti suuren epävarmuuden menetelmän käyttöönottoa ajatellen.



Kuva 15. Sulamispistekuvaajassa näkyy toivotut tuotteet vihreällä ja negatiiviset kontrollinäytteet punaisella.

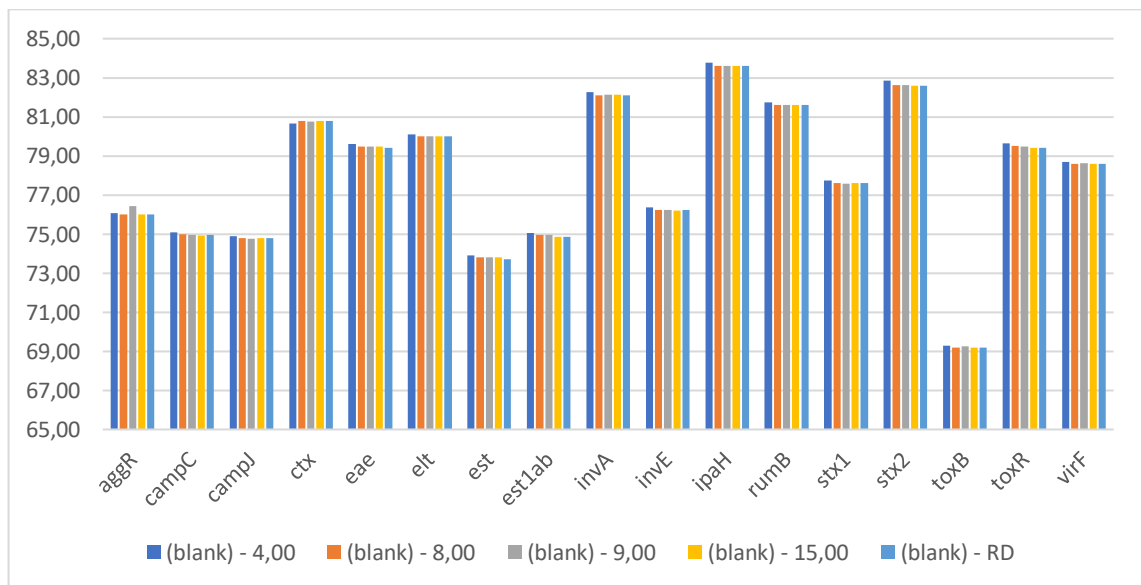
Multiplex qPCR -menetelmän sulamispistekuvaajat eivät tuottaneet selkeään tunnistukseen mahdollistavia tuloksia pitoisuudella 40000 kopiota/ μ l (60000 kopiota/ μ l multiplex-seoksessa 5), joten konsentraatiota pudotettiin pitoisuuteen 4000 kopiota/ μ l (6000 kopiota/ μ l multiplex-seos 5:ssä). Sulamiskäyräanalyysit ovat esitettynä kuvassa 16



Kuva 16. Vasemmalla toxR ja ipaH erillisten amplikonien sulamispistekäyräanalyytit ja oikealla samojen amplikonien sulamispistekäyräanalyytit multiplexissä

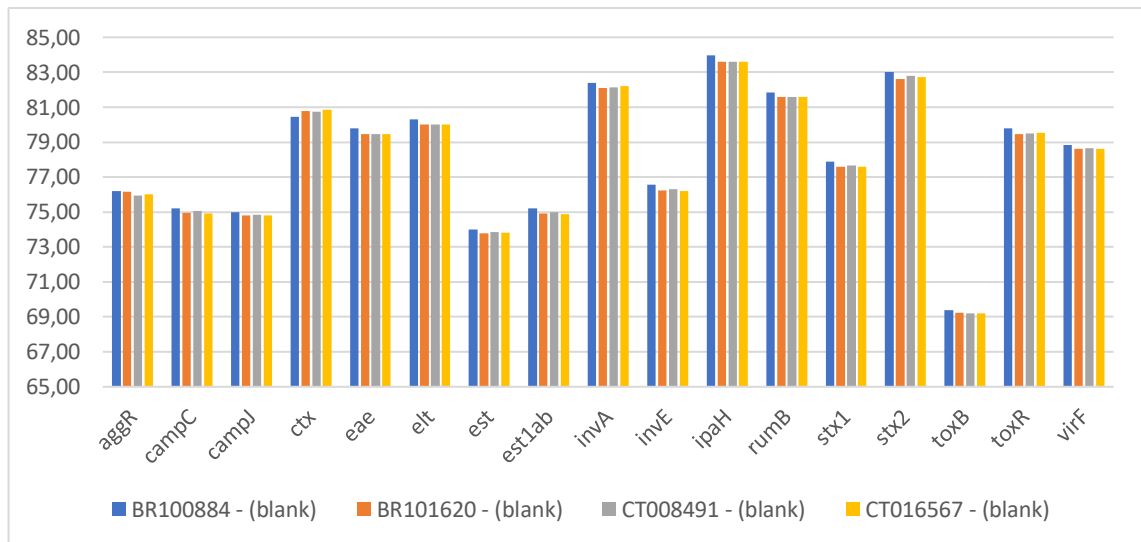
Esimerkkinä huonoista monistumisista on multiplex-seos 2, jossa pelkkä ipaH monistui ja toxR ei. Kaikista kahdeksasta eri multiplex-seoksesta vain kahdesta saatiin tunnistettavat piikit molempien amplikonien sulamisesta. Nämä olivat multiplex-seoksen 2 aggR ja ctx, sekä eae ja invA multiplex-seoksessa 3.

Työssä tehtiin toistoja eri tuote-erillä ja CFX-laitteistolla, jotta saataisiin dataa näiden muuttujien vaikutuksesta tuloksiin. Kuvassa 17 esitettynä eri tuote-erien sulamislämpötilojen keskiarvoja. Tuote-erällä ei ollut vaikutusta amplikonin sulamislämpötilaan.



Kuva 17. Sulamislämpötilat eri tuote-erien välillä. Eri tuote-erät ovat korostettu eri väreillä.

Kuvassa 18 eri CFX-laitteilla suoritettujen analyysien sulamislämpötilojen keskiarvoja. Pylväsdiagrammeista voidaan päätellä, että eri tuote-erien välillä sulamislämpötilat ovat samankaltaisia, eikä CFX-laitteella ole suurta vaikutusta sulamislämpötilaan.



Kuva 18. Sulamislämpötilat eri CFX-laitteilla. Värit kertovat käytetyn CFX-laitteiston nimen.

6 Loppupäätelmät

Työssä oli tarkoitus kehittää laadunvalvontamenetelmä, jolla pystyttäisiin varmistamaan qPCR-menetelmällä kaikkien NVD Bacterial GE+ -testikasetissa olevien alukkeiden todella olevan primer mixeissä. Laadunvarmistus oli tarkoitus toteuttaa SYBR Green Master Mixin mahdollistamaa sulamiskäyräanalyysiä käyttäen. Menetelmällä saatiin tunnistettua kaikki käytössä olleet alukkeet ja pystyttiin todentamaan, että kaikki tarvittavat alukkeet olivat primer mixissä. Laadunvalvontamentelmän oli myös tarkoitus olla nopea ja yksinkertainen varsinaisessa laadunvalvontatilanteessa. Kehitetyllä menetelmällä pystyttiin täyttämään nämä edellä mainitut tavoitteet, mutta menetelmää ei toistaiseksi tulla ottamaan sellaisenaan käyttöön mahdollisten kontaminaatioiden tunnistamiseen liittyvien riskien vuoksi.

Työssä keskityttiin aluksi sopivien olosuhteiden kehittämiseen. gBlock-templaattit toimivat toivotusti SYBR Green Master Mixin kanssa ja sopivat koeolosuhteet löydettiin nopeasti käyttämällä lähes suoraan SYBR Green Master Mixin käyttöohjeen suosituksia. Käytössä oli kahden eri oligonukleotidivalmistajan alukkeita, eikä niiden toiminnassa huomattu merkittäviä eroja. Menetelmän käyttökustannuksia pienentävä Multiplex qPCR-menetelmä ei toiminut. Kaksi templaattia, joiden sulamislämpötilaerot olivat mahdollisimman suuria, lisättiin samaan kaivoon. Sulamiskäyräanalyysillä havaittiin, että suurimmassa osassa vain toinen näistä monistui vaadittavalla tavalla. Sopivaa templaattikon-sentraatiota etsittäessä huomattiin, että 200 kopiota/ μl on liian matala konsentraatio. Menetelmä toimi pitoisuudella 20000 kopiota/ μl , mutta konsentraatiota voidaan optimoida edelleen. Toistoja tehtiin käyttäen eri tuote-eriä ja eri CFX-laitteistoja. Merkittävää variaatiota tuote-erien tai CFX-laitteistojen välillä ei havaittu.

Ongelmia menetelmässä tuotti NTC-näytteiden monistuminen. Työn suunnitteluvaiheessa keskityttiin siihen, että kaikki alukkeet pystyttäisiin erottamaan, mutta NTC-näytteiden monistuminen aiheutti huomattavan epävarmuustekijän menetelmän käytettävyydelle. Menetelmän käyttöönottoa arvioitaessa todettiin, että NTC-näytteiden primer dimereita olisi vaikea erottaa mahdollisista kontaminaatioista ja tämän vuoksi menetelmää ei tulla ottamaan käyttöön laadunvalvonnassa, ainakaan ilman lisäoptimointeja ja kontaminaatioihin liittyvien riskien eliminoimista.

Lähteet

- 1 Hakanen, Antti; Jalava, Jari & Kaartinen, Liisa. 2017. Mikrobilääkeresistenssin torjunnan kansallinen toimintaohjelma 2017–202. Helsinki Sosiaali- ja Terveysministeriö
- 2 Novodiag User Manual. 2018. Käyttöohje. Mobidiag Oy.
- 3 Tan, Siun Chee & Yiap, Beow Chin. 2009. DNA, RNA, and Protein Extraction: The Past and The Present. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. Vol 2009.
- 4 Vuoristo, Perttu & Arkkila, Perttu. 2016. Geriatria. E-kirja. Helsinki kustannus Oy Duodecim.
- 5 Arkkila, Perttu. 2016. Gastroenterologia ja hepatologia. E-kirja. Helsinki Kustannus Oy Duodecim.
- 6 Instructions for Use. 2018. Käyttöohje. Mobidiag Oy
- 7 Finnzymes. Principles of qPCR. 2009. Principles of qPCR. Käsikirja. Edita
- 8 Kagkli DM, Folloni S, Barbau-Piednoir E, Van den Eede G & Van den Bulcke M. 2012. Towards a pathogenic *Escherichia coli* detection platform using multiplex SYBR®Green Real-time PCR methods and high resolution melting analysis. *PLoS One*. 2012; 7(6)
- 9 Life Technologies. 2014. Real-time PCR handbook. Verkkoaineisto. Thermo Fisher Scientific <<https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/global/Forms/PDF/real-time-pcr-handbook.pdf>>. Luettu 28.11.2019.
- 10 Tajadini M, Panjehpour M & Javanmard S H. 2014. Comparison of SYBR Green and TaqMan methods in quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of four adenosine receptor subtypes. *Adv Biomed Res*. 2014; 3: 85.
- 11 Elfath M. Elnifro, Ahmed M. Ashshi, Robert J. Cooper & Paul E. Klapper. 2000. Multiplex PCR: Optimization and Application in Diagnostic Virology. *Clin Microbiol Rev*. 2000 Oct; 13(4): 559–570.
- 12 TaqMan multiplex real-time PCR product bulletin. Verkkoaineisto. Thermo Fisher Scientific. <<https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/Documents/PDFs/PG1600-PJT1731-COL12035-TaqManMultiplex-qPCR-ProdBulletin-Global-FHR.pdf>> Luettu 28.11.2019.

- 13 Mark A. Valasek & Joyce J. Repa. 2005. The power of real-time PCR. *Adv Physiol Educ* 29: 151–159, 2005;