



Jaana Kivilahti

Tamaanien DNA:n eristys ja sekvensoitavan DNA:n tuotto käyttäen PCR-tekniikkaa

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalytiikka (AMK)

Laboratorioanalytiikka

Opinnäytetyö

2.9.2022

Tiivistelmä

Tekijä:	Jaana Kivilahti
Otsikko:	Tamaanien DNA:n eristys ja sekvensoitavan DNA:n tuotto käyttäen PCR-tekniikkaa
Sivumäärä:	44 sivua + 1 liite
Aika:	2.9.2022
Tutkinto:	Laboratorioanalyttikko (AMK)
Tutkinto-ohjelma:	Laboratorioanalytiikka
Ammatillinen pääaine:	
Ohjaajat:	Tutkimusjohtaja Petri Auvinen Laboratorioteknikko Eeva-Kaisa Vesanen Laboratorioteknikko Eeva-Maria Turkki Lehtori Jarmo Palm

Puutamaaneja on vaikea tutkia ja tunnistaa. Vaarana onkin, ettei kaikkia lajeja ehditä tunnistamaan, ennen kuin ne kuolevat sukupuuttoon. Projektin toimeksiantaja on Helsingin yliopiston Biotekniikan instituutti. Projekti tehtiin DNA-sekvensointi- ja genomiikkalaboratoriossa Viikin kampuksella. Työ toteutettiin yhteistyössä väitöskirjatutkija Hanna Rostin kanssa. Rosti toivoi, että projektista saatua tietoa voisi käyttää tamaanien suojelussa. Työn tavoitteena oli tuottaa sekvensoitavaa DNA:ta ja kerätä siitä laadullista tietoa.

Työssä eristettiin DNA:ta tamaanien uloste- ja nahkanäytteistä. DNA:sta monistettiin 16S-rDNA-geenit ja mitokondriaalista DNA:ta uloste- ja nahkanäytteistä spesifisillä alukkeilla käyttäen PCR-tekniikkaa. Työn monissa vaiheissa DNA:sta kerättiin laadullista tietoa konsentraatiosta, puhtaudesta ja fragmenttien koosta. Isäntä-DNA:sta ja nahkanäytteistä monistettiin mitokondriaalista DNA:ta PCR-tekniikalla pitkillä ja lyhyillä alukkeilla. Ulostenäytteistä eristetystä DNA:sta monistettiin 16S-rDNA-geeni kaksivaiheisella PCR-ohjelmalla.

Kokonais-DNA:n eristyksistä saadut DNA-pitoisuudet olivat todella vaihtelevia noin 30 - 3 200 ng/μl. Molempien kokonais-DNA:n eristysten DNA:n puhtaus oli (A260/A280) suhdelukuna 1,8 - 2,0. Isäntä-DNA:n konsentraatiot olivat välillä 1,3 - 3,1 ng/μl. Nahkanäytteistä saatiin eristettyä DNA:ta 0,4 - 50 ng/μl. 16S-rDNA PCR-tuotteiden geelianalyysi onnistui ja tuotteet olivat noin 600 emäsparin kokoisia, eikä geelikuvassa näkynyt kontaminantteja tai alukkeiden jäämiä. Kaikkia sekvensointeja ei ollut ehditty analysoidaan. Yleisesti sekvensointidataa on saatu sekvensointiajoista, mutta analysoiduissa sekvensseissä oli päällekkäisyyksiä ja sekvenssien laatu oli vaihtelevaa. Kaikista näytteistä onnistuttiin eristämään DNA:ta, mutta joistakin näytteistä saatiin selvästi vähemmän DNA:ta kuin toisista. PCR-reaktioiden optimointia tulisi harkita, niin sekvenssien ja fragmenttianalyyysien laatu paranisi.

Avainsanat: tamaanit, tutkimus, 16S-rDNA-geenit, PCR-tekniikka, sekvensointi

Abstract

Author: Jaana Kivilahti
Title: Extracting Hyrax DNA and Producing Sequensable DNA using PCR thecnology
Number of Pages: 44 pages + 1 appendix
Date: 2 September 2022

Degree: Bachelor of Laboratory Services
Degree Programme: Laboratory Sciences
Professional Major:
Supervisors: Petri Auvinen, Research Director
Eeva-Kaisa Vesanen, Laboratory Technician
Eeva-Maria Turkki, Laboratory Technician
Jarmo Palm, Senior Lecturer

The tree hyraxes are difficult to study and it is challenging to identify their species. The danger is that not all species will be identified before they become extinct. This project was commissioned by the Helsinki University Institute of Biotechnology and it was carried out in DNA Sequencing and Genomics laboratory on the Viikki campus. The work was carried out in collaboration with dissertation researcher Hanna Rosti. Rosti hoped that the information obtained from the project could be used for the protection of tree hyraxes. The goal of the project was to produce DNA that could be sequenced and to collect qualitative information from it.

In the project, DNA was isolated from the feces and skin samples of tree hyraxes. 16S-rDNA genes and mitochondrial DNA from stool and skin samples were amplified from extracted DNA with specific primers using PCR technology. In many phases of the work, qualitative information on concentration, purity and fragment size was collected from the DNA. Mitochondrial DNA was amplified from the host DNA and leather samples using the PCR technique with long and short primers. The 16S rRNA gene was amplified from the DNA isolated from the stool samples using a two-step PCR program.

The DNA concentrations obtained from the total DNA isolations were highly variable from about 30 to 3 200 ng/μl. The DNA purity of both total DNA isolates was (A260 /A280) as a ratio of 1,8 to 2,0. The host DNA concentrations were between 1.3 and 3,1 ng/μl. DNA isolated from the skin samples had concentrations 0.4 to 50 ng/μl. The gel analysis of the 16S-rDNA PCR products was successful and the products were approximately 600 base pairs in size, and no contaminants or primer residues were visible in the gel image. Bioinformaticians did not have time to analyze all the sequences obtained. In general, sequencing data has been obtained from all samples sequenced, but there were overlaps in the analyzed sequences and the quality of the sequences was variable. It was possible to isolate DNA from all samples, but some samples yielded clearly less DNA than others. Optimizing PCR reactions should be considered, so the quality of sequences and fragment analyses would improve.

Keywords: Tree hyraxes, research, 16S rRNA genes, PCR technique, sequencing

Sisällys

Lyhenteet

1. Johdanto ja työn tavoite	1
2. Teoria	2
2.1 Puutamaanit (Dendohyrax)	2
2.2 PCR-tekniikka	3
2.3 16S-rRNA-geenit	4
2.4 Kaksivaiheinen PCR-reaktio	6
2.5 Fragment analyzer -laite	7
2.6 DNA:n puhdistus magneettihelmitekniikalla	8
2.7 Next Generation Sequencing -tekniikka	9
2.8 Sanger-sekvensointi	13
3. Tutkimuksen toteutus	14
3.1 Näytteet	14
3.2 DNA:n eristys ulostenäytteistä	15
3.2.1 16S-rDNA-geenien monistus	17
3.2.2 16S-rDNA PCR-tuotteiden geelianalyysi	21
3.2.3 16S-DNA-fragmenttien poolaus ja puhdistus	21
3.3 Isäntä-DNA:n eristys	22
3.4 DNA:n eristys nahkanäytteistä	22
3.5 Mitokondriaalisen DNA:n monistus PCR-tekniikalla	25
3.6 Fragmenttianalyysi	26
3.7 DNA:n puhdistus magneettihelmillä	27
3.8 Sanger- ja Illumina-sekvensoinnit	28
4. Tulokset	28
4.1 DNA:n eristys ulostenäytteistä	28
4.2 Isäntä-DNA:n erottelun tulokset	31

4.3 DNA:n eristys nahkanäytteistä	32
4.4 Geelianalyysi 16S-rDNA-PCR-tuotteille	34
4.5 Fragmenttianalyysi	34
4.6 Sanger- ja NGS-sekvensointi	41
5. Yhteenveto ja pohdintaa	42

Liitteet

Liite 1: Fragmenttianalyysien tuloksia

Liite 2: Kaksoisindeksialukkeiden tiedot ja sekvenssit

Lyhenteet

- AGE:** Agaroosigeelielektroforeesi (agarosegel electrophoresis). DNA-fragmenttien erotteluun ja karakterisointiin käytettävä menetelmä, jossa DNA-fragmentit liikkuvat sähkökentässä ja erottuvat suuruusjärjestykseen.
- CCD-detektori:**
(Charge Coupled Device) on todella herkkä fotonidetektori.
- DNA:** Deoksiribonukleiinihappo sisältää kaikkien elönsolujen geneettisen materiaalin.
- ddNTP:** (Dideoxynucleotides triphosphate) Dideoksinukleotiditriposfaattit ovat Sanger-sekvensoinnissa käytettäviä DNA:n peruskomponentteja.
- dNTP:** Deoksibukleotiditriposfaatit ovat DNA:n peruskomponentteja, jota on neljää emäslajia: A, T, C ja G.
- PCR:** Polymeraasiketjureaktiota (Polymerase chain reaction) käytetään monistamaan DNA-juostetta.
- RNA:** Ribonukleiinihappo (Ribonucleic acid) on nukleotideistä koostuva polymeeri. Se on samankaltainen kuin DNA, mutta deoksiriboosin tilalla on riboosi ja emäs tymiini (T) on vaihtunut urasiiliksi (U).
- rRNA:** Ribosomaalinen RNA (ribosomal RNA) on solun ribosomien rakennusaine.
- SAP:** (Shrimp Alkaline Phosphatase) Alkalinen fosfataasi entsyymi poistaa ylimääräiset dNTP-nukleotidit ja alukkeet PCR-reaktiosta.

1. Johdanto ja työn tavoite

Puutamaanit ovat noin jäniksen kokoisia nisäkkäitä. Koostaan huolimatta puutamaanit ovat norsueläinten lähimpiä eläviä sukulaisia. Puutamaaneja elää muun muassa Taitavuorilla Keniassa. Puutamaanit näyttävät tutkijoille harvoin, tämä vaikeuttaa puutamaanien tutkimista ja tamaanilajien tunnistamista. Vaarana onkin, ettei kaikkia lajeja ehditä tunnistamaan, ennen kuin ne kuolevat sukupuuttoon.

Projektin toimeksiantaja on Helsingin yliopiston Biotekniikan instituutti. Projekti tehtiin DNA-sekvensointi- ja genomiikkalaboratoriossa Viikin kampuksella. Työ toteutettiin yhteistyössä väitöskirjatutkija Hanna Rostin kanssa. Rosti halusi saada geneettisillä analyyseillä selville, onko nykyinen käsitys puutamaanilajeista oikea vai löytyykö lajin sisältä uusia alalajeja. Hän halusi myös ymmärtää tämän lähes tuntemattoman lajin evoluution aikajanaa ja eri tamaanilajien geneettistä yhteyttä keskenään. Rosti toivoi, että projektista saatua tietoa voisi käyttää lajin suojelussa. Työn tavoitteena oli eristää DNA:ta uloste- ja nahkanäytteistä ja tuottaa sekvensoitavaa DNA:ta PCR-tekniikoilla ja hankkia DNA-tuotteista laadullista tietoa.

Projektissa eristettiin DNA:ta museonahka- ja ulostenäytteistä. Ulostenäytteistä eristettiin kokonais-DNA kaksi kertaa. Ensimmäisen eristyksen DNA:ta käytettiin 16S-rDNA:n monistamiseen ja 16S-geenien sekvensoimiseen. 16S-geenejä tutkimalla haluttiin selvittää eläimen suoliston bakteeriyhteisö. Myöhemmin kokonais-DNA eristettiin "isännän" eli alkuperäisen eläimen (Host) DNA:n erottelemiseen bakteerien DNA:sta. Nahkanäytteistä eristettiin kokonais-DNA ja siitä monistettiin mitokondriaalista DNA:ta. DNA:ta monistettiin PCR-tekniikoilla ja sekvensoitiin Sanger- ja Illumina-sekvensoinnilla.

2. Teoria

2.1 Puutamaanit (*Dendohyrax*)

Puutamaanit ovat noin jäniksen kokoisia nisäkkäitä. Pienestä koostaan huolimatta, puutamaanit ovat norsueläinten lähimpiä eläviä sukulaisia. Puutamaanit elävät eristyneinä, mikä johtaa lajien eriytymiseen. Puutamaaneja elää muun muassa Taitavuorilla Keniassa. Puutamaaneista tunnetaan tällä hetkellä vain neljä sukua: idänpuutamaani (*Dendrohyrax Validus*), Beninin puutamaani (*Dendrohyrax Interfluvialis*), etelänpuutamaani (*Dendrohyrax Arboreus*) ja lännenpuutamaani (*Dendrohyrax Dorsalis*). Niiden eristäytyneen elämäntavan ja niiden yöllisen aktiivisuuden vuoksi, puutamaanit näyttävät tutkijoille harvoin, mikä vaikeuttaa puutamaanien tutkimista ja tamaanilajien tunnistamista. Vaarana onkin, ettei kaikkia lajeja ehditä tunnistamaan, ennen kuin ne kuolevat sukupuuttoon. Puutamaanit ovat kasvissyöjiä. Ulkonäöltään ne ovat yleensä harmaita tai ruskeita, vatsa on joillakin lajeilla vaaleampi tai valkoinen. Kuvassa 1 on kuva puutamaanista. [1.]



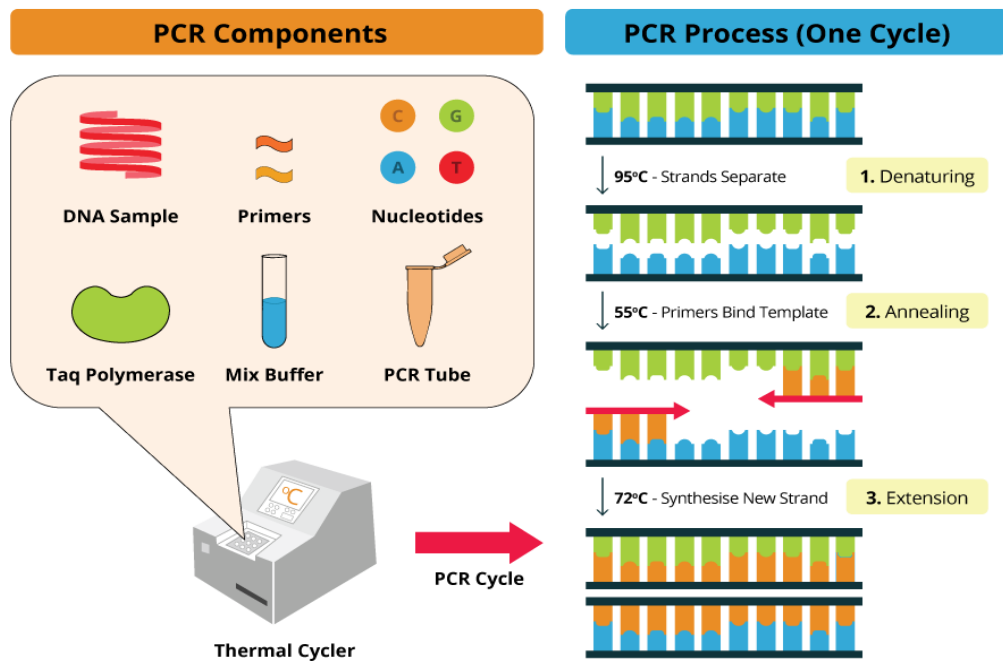
Kuva 1. Puutamaani (*Dendohyrax*) [2].

Puutamaaneilla on jaloissaan vain kolme pientä pyöreää varvasta ja hammasrakenne on samankaltainen kuin sarvikuonolla tai hevosella. Ruoansulatuselimistö on sen ravinnon ravintoköyhyyden takia paljon hitaampi kuin muilla nisäkkäillä, tämän vuoksi puutamaanien aineenvaihdunta ja ruumiinlämpö ovat myös alemmat kuin muilla nisäkkäillä. Alhainen ruumiinlämpö mahdollistaa puutamaaniurosten sisäiset kivekset. Puutamaaneilla on eristyneestä elämäntavasta huolimatta todella äänekäs ja monimuotoinen kommunikaatiojärjestelmä. Tutkija Hanna Rosti on yksi harvoista tamaanien tutkijoista. Hän on käynyt Taitavuorilla tutkimassa muun muassa tamaanien populaatioita niiden ääntelyn perusteella. [1]

2.2 PCR-tekniikka

PCR (Polymeraasiketjureaktio) -tekniikkaa käytetään monistamaan geeniä tai mitä tahansa DNA:n pätkää eksponentiaalisesti. Kuvassa 2 on esitetty PCR-reaktion komponentit ja yksinkertaisen lämpöohjelman vaiheet. PCR-reaktion komponentit ovat alukkeet, polymeraasientsyymi, deoksinukleotidit, puskuriliuos, kationit ja templaatti-DNA. Reaktiota ohjataan PCR-lämpöohjelmalla, jonka voi yleisesti jakaa kolmeen vaiheeseen: [3;4.]

1. Denaturaatiovaiheessa (94–98 °C) kaksijuosteinen DNA denaturoituu eli hajoaa kahdeksi yksisäikeiseksi DNA-juosteeksi. [3]
2. Alukkeiden liittymisvaiheessa (engl. annealing) (45–72 °C) monistettavalle DNA-alueelle spesifiset alukkeet liittyvät emäsjärjestyssäännön mukaan DNA-juosteeseen. Tämän vaiheen lämpötila lasketaan monistettavan DNA- alukkeen nukleotidisekvenssin perusteella. [3]
3. DNA:n pidennys eli ekstensiovaihe (72 °C). DNA-polymeraasientsyymi aloittaa uuden vastinjuosteen kokoamisen yksisäikeiselle DNA:lle. [3]



Kuva 2. PCR-reaktion komponentit ja vaiheet. PCR-reaktion komponentit ovat DNA-näyte (DNA Sample), alukkeet (Primers), nukleotidit (nucleotides), polymeerasientsyymi (Taq Polymerase), puskuriliuos (Mix Buffer) ja PCR-putki. PCR-syklin vaiheet ovat: 1. denaturaatiovaihe (engl. denaturing), 2. alukkeiden kiinnittymisvaihe (engl. annealing) ja 3. DNA-juosteen pidennysvaihe (engl. extension) [5]

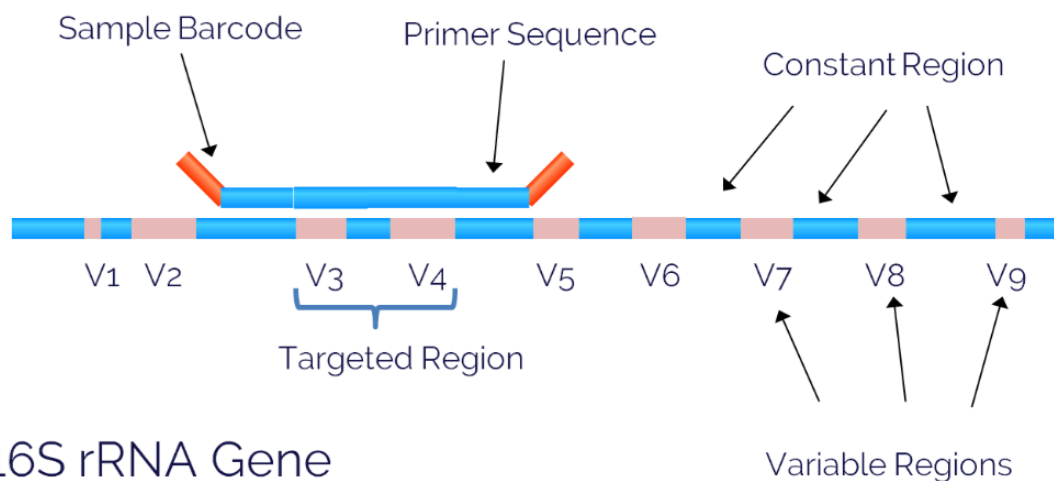
Näitä vaiheita toistetaan kymmeniä kertoja ja tuloksena saadaan miljoonia kopioita halutusta DNA:n alueesta. Teoriassa esimerkiksi 20 syklistä DNA monistuu 2^{20} -kertaiseksi eli DNA:sta on tehty noin 10 485 000 kopiota. [3]

2.3 16S-rRNA-geenit

16S-geenit koodaavat ribosomaalista RNA:ta (16S-rRNA), joka on prokaryoottiribosomin 30S-alayksikön komponentti. Tätä komponenttia koodaavia geenejä kutsutaan 16S-rRNA-geeniksi. Geeniä käytetään bakteerien ja arkeonien tunnistuksessa ja luokittelussa, ja se on läsnä kaikissa bakteereissa. 16S-geenien on osoitettu olevan toiminnallisesti muuttumattomia, mutta geenissä on myös hypervariaabelialueita, joissa on eroja eri bakteeri- ja arkeonilajien välillä. Näitä alueita sekvensoimalla eri lajit voidaan tunnistaa. Kaikkia bakteeri- tai

arkeonilajeja ei pystytä kuitenkaan tunnistamaan 16S-geenien sekvensoinnilla lajien geenien samankaltaisuuden takia. Esimerkiksi *Psychrobacter marincola*- ja *Psychrobacter submarinus* -lajien yhtäläisyys on 99,9 %. [6;7]

16S-rRNA-geeni on yhteensä noin 1 500 emäsparia (bp) pitkä. Geeni sisältää yhdeksän hypervariaabelialuetta (V1 - V9), jotka ovat 30 - 100 bp:n pituisia. Näiden alueiden lyhyt pituus tekee niistä helppoja sekvensoida. [6] Kuvassa 3 on 16S-rRNA-geenin rakenne ja tässä projektissa sekvensoidut geenialueet V3 ja V4. Monistettavan alueen yläpuolella on esitetty rajattu geenialue, johon on liitetty alukkeet ja indeksit.



16S rRNA Gene

Kuva 3. 16S rRNA-geenin rakenne. Näyte tunniste (engl. Sample Barcode) eli indeksi on DNA-jakso, jota käytetään näytteen yksilöintiin. Aluke sekvenssit (engl. Primer Sequence) rajaavat monistettavan alueen. 16S-rDNA-geenissä on muuttumattomia alueita (engl. Constant Region) ja yhdeksän (V1 - V9) hypervariaabelialuetta (engl. Variable Regions). [8]

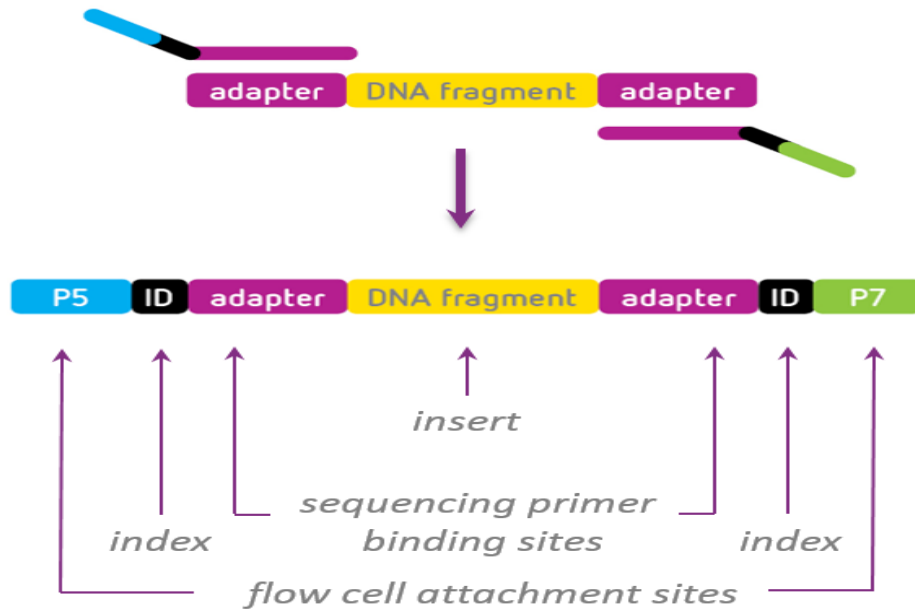
Geenin lähes muuttumattomille alueille on valmistettu spesifisiä alukkeita, joiden avulla voidaan monistaa ja sekvensoida tiettyjä sekvenssejä. Spesifiset alukkeet valitaan tutkittavan alueen molemmin puolin, muodostaen pienen monistettavan geenialueen.

2.4 Kaksivaiheinen PCR-reaktio

Kaksivaiheisella PCR-reaktiolla pystytään monistamaan haluttua fragmenttia tarkemmin ja pienemmällä lähtökonsentraatiolla. Ensimmäisessä PCR-reaktiossa eristetystä DNA:sta rajataan haluttu alue spesifisillä alukkeilla, jotka hybridisoituvat DNA-templaattiin ja mahdollistavat halutun alueen monistamisen. Ensimmäisessä reaktiossa käytettävissä alukkeissa on kiinnittyneinä "overhang-tagit", jotka sisältävät adapterialueen sekvenssin. Tästä muodostuu ensimmäisen PCR-reaktion tuote. [10]

Puhdistusvaiheessa eksonukleaasi I ja alkalinen fosfataasi (SAP, engl. Shrimp Alkaline Phosphatase) -entsyymit poistavat ylimääräiset dNTP-nukleotidit ja alukkeet häiritsemästä toista PCR-reaktiota.[11]

Kuvassa 4 alimpana on yksinkertaistettu kuva sekvensoitavasta tuotteesta. Tuotteessa on siis kaikkiaan haluttu DNA-alue, adapterit, kaksoisindeksit ja oligot P5 ja P7. Oligot mahdollistavat tuotteen kiinnittymisen Illuminan virtauskammion pintaan, josta kerrotaan enemmän luvussa 2.7.

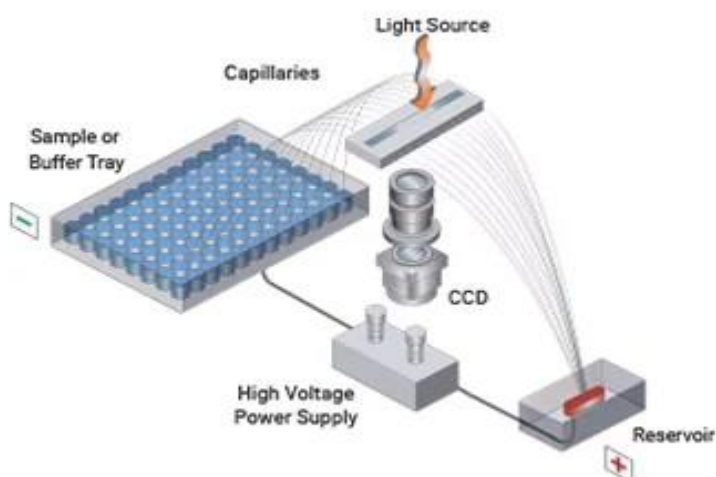


Kuva 4. Kaksivaiheisen PCR-reaktion tuote ja sekvensointivalmis fragmentti. Alimpana näkyy sekvensointivalmis PCR-tuote, jossa on virtauskammioon kiinnittyvät oligot P5 ja P7, tunnistusindeksit, adapterit ja tutkittava DNA-alue. [9]

Toisessa PCR-reaktiossa adapterien päihin kiinnittyy kaksoisindeksialuke ja oligo. Kaksoisindeksialukkeet mahdollistavat näytteiden tarkemman yksilöinnin ja sekvensoinnin multipleksauksen. Toisen vaiheen jälkeen tuote on valmis sekvensointiin. [10]

2.5 Fragment analyzer -laite

Fragment Analyzer -laitteen toiminta perustuu fluoresenssiin ja rinnakkaiseen kapillaarielektroforeesiin. Näytettä tarvitaan vain noin kaksi mikrolitraa analyysin suorittamiseen. Näytteet ja kokostandardi injektoidaan elektrokineettisellä injektioilla kukin omaan kapillaariinsa. Näytteet kulkevat erotusgeelimatriisissa, johon on integroitu fluoresoivaa väriainetta. Näytteet erottuvat erikokoisiksi fragmenteiksi kulkiessaan kapillaarissa ja keräävät fluoresoivaa väriä mukaansa. Näytteiden ohittaessa detektori-ikkunan fluoresoiva väriaine viritetään jatkuvalla valonlähteellä ja valon emissiota detektoidaan herkällä CCD (eng. Charge Coupled Device) -detektorilla. Kuvassa 5 on esitetty Fragment Analyzer -laitteen sisäinen rakenne. [12]



Kuva 5. Fragment Analyzer -laitteen sisäinen rakenne. [13]

Detektori-ikkunan läpikulkuun kulunut aika antaa dataa fragmentin koosta ja emission määrä konsentraatiosta verrattuna kalibroituun kokostandardiin.

Tietokone analysoi datan ja antaa tulokset jokaiselle mitatulle näytteelle. [12]

2.6 DNA:n puhdistus magneettihelmitekniikalla

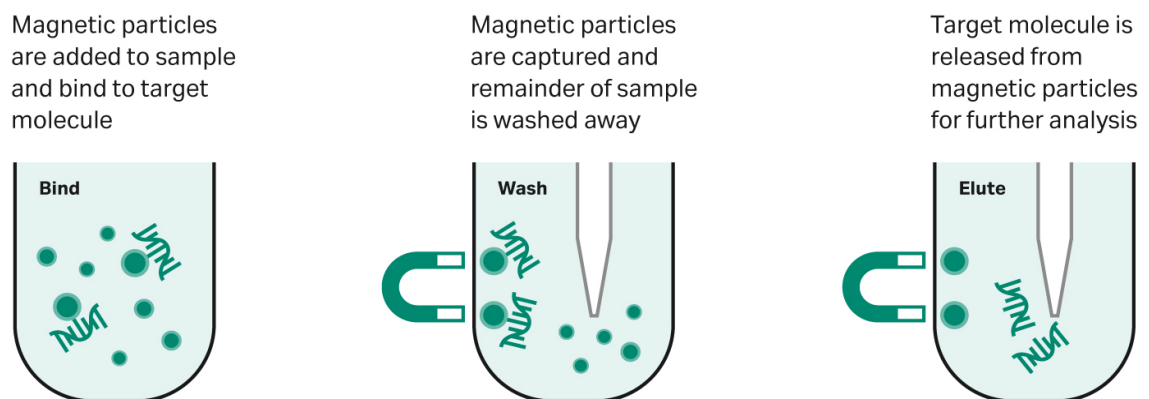
Tässä projektissa DNA:n puhdistukseen käytettiin magneettihelmiä.

Magneettihelmet ovat useimmiten magnetiitista (Fe_3O_4) tehtyjä magneettisia partikkeleita, jotka on päällystetty DNA:ta sitovalla pinnoitteella. Pinnoitteena voidaan käyttää esimerkiksi lasia, silikaa ja karboksylaattia. Magneettihelmet ovat superparamagneettisia eli ne käyttäytyvät magneettisesti vain magneetin läsnäollessa. Magneettihelmet ovat halkaisijaltaan 20 - 30 nm. Pinnoitteen koostumuksella voidaan valikoida DNA:n sitoutumista esimerkiksi DNA:n koon mukaan, tiettyyn sekvenssiin tai tunniste proteiineihin (engl. protein tag). DNA:n sitoutuminen on palautuvaa, ja DNA voidaan irrottaa helmistä muuttamalla puskuriolosuhteita. [14]

Magneettihelmpuhdistuksen prosessin voi selittää seuraavasti. DNA sitoutuu selektiivisesti magneettihelmien pintaan. Ulkoinen magneetti vetää helmiä ja

niihin sitoutunutta DNA:ta puoleensa ja immobilisoi ne putken sisäpintaan. DNA pysyy sitoutuneena helmiin pesuvaiheiden aikana. Eluutiopuskurin lisääminen ja ulkoisen magneetin poistaminen irrottaa DNA:n helmien pinnoitteesta. Magneettihelmet kerätään eluutiovaiheessa putken seinämään ja puhdistettu DNA puskuriliuoksessa kerätään talteen. Tätä DNA:ta voi käyttää suoraan molekyylibiologian sovelluksissa. Kuvassa 6 puhdistusprosessi on esitetty kuvitettuna.

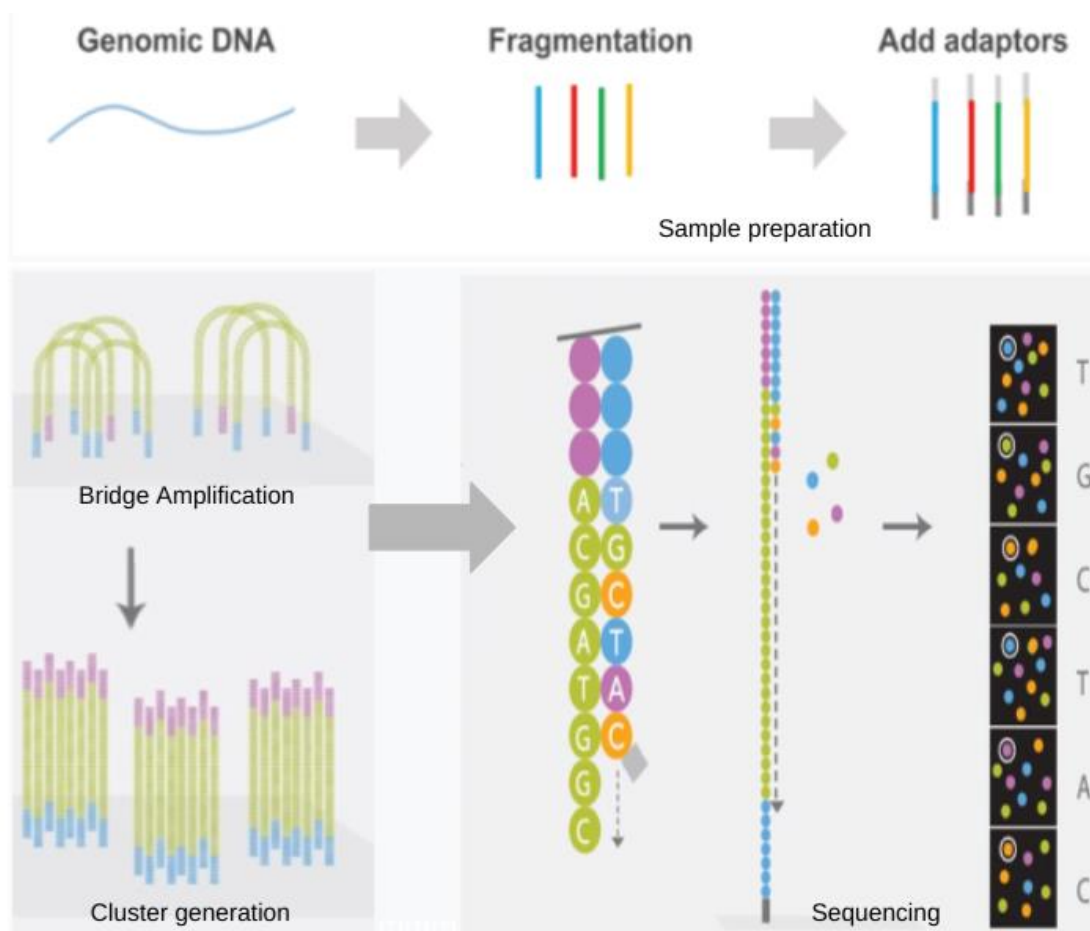
[14]



Kuva 6. Yksinkertaistettu DNA:n magneettinen puhdistusprosessi. DNA kiinnittyy magneettihelmien pintaan. Pesuvaiheessa ulkoinen magneetti vetää helmiä ja niihin sitoutunutta DNA:ta puoleensa ja immobilisoi ne putken sisäpintaan ja helmiä pestään etanoliliuoksella. Eluutiovaiheessa eluutiopuskuri lisätään, ulkoinen magneetti poistetaan ja DNA irtoaa helmien pinnoitteesta. [14]

2.7 Next Generation Sequencing -tekniikka

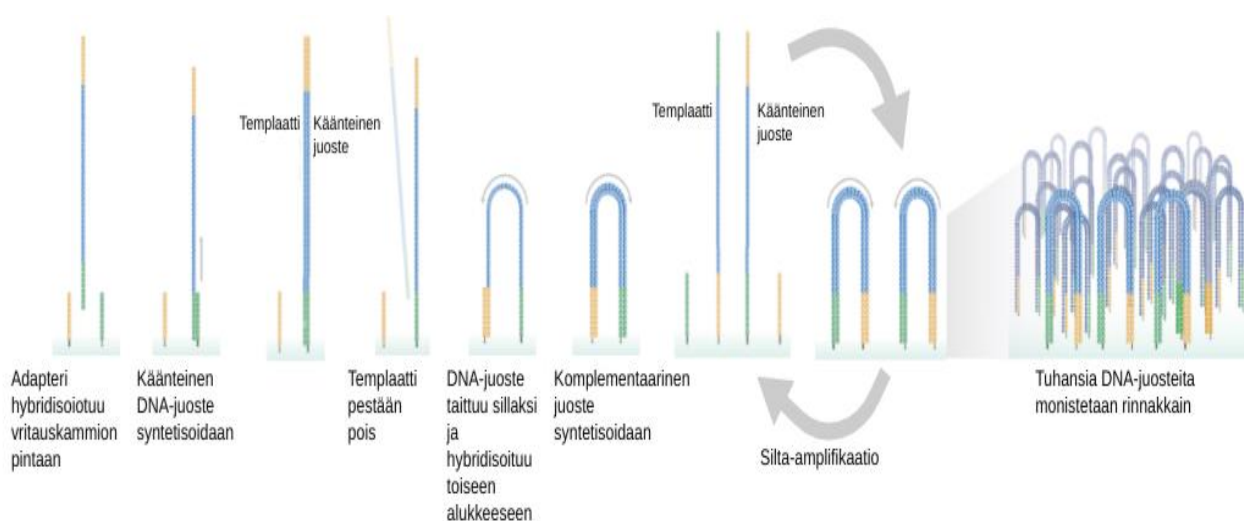
Next Generation Sequencing (NGS) -tekniikka tarkoittaa uuden sukupolven sekvensointimenetelmää. NGS-menetelmiä kehitettiin sekvensoinnin kustannusten pienentämiseksi, nopeuttamiseksi, ja se parantaa laboratoriodien kykyä suurempien näytemäärien sekvensoimiseen kerralla. NGS-sekvensointimenetelmiä ovat pyrosekvensointi (engl. pyrosequencing), sekvensointi peruutettavan terminaattorin avulla (engl. sequencing by reversible terminator chemistry), ligaatiosekvensointi (engl. sequencing-by-ligation) ja reaaliaikainen sekvensointi (engl. real-time sequencing). [15]



Kuva 7. Yksinkertaistettu Illumina-sekvensointi prosessin kuvituskuva. Näytteen valmistelu (engl. Sample Preparation) alkaa genomisesta DNA:sta, josta rajataan monistettava alue ja alueen päihin lisätään adapterit PCR-reaktioilla. PCR-tuotetta monistetaan silta-amplifikaatiolla (engl. Bridge Amplification), josta syntyy DNA-juoste-klustereita. Klusterit (engl. cluster) sekvensoidaan syntetisoimalla jokaiselle DNA-juosteelle komplementaarinen juoste fluoresoivilla emäksillä. Emästen emissio kuvataan kuten kuvan oikeassa alalaidassa.

Tässä projektissa käytettiin Illumina-sekvensointia, jossa käytetään sekvensointi-synteesimenetelmää (engl. sequencing by synthesis, SBS). Illumina-sekvensoinnissa on neljä vaihetta (kuva 7): näytteen valmistelu, DNA:n monistaminen ja klustereiden tuotto, sekvensointi ja tulostanalyysi. Näytteen valmistelussa DNA-fragmenttien päihin lisätään adapterit, indeksialukkeet ja oligo-häntä. Oligo-hännät pystyvät sitoutumaan komplementtaarisesti virtauskammion (engl. flow cell) oligomeereihin ja mahdollistavat näytteen sekvensoinnin. [16]

Klusteroinnissa DNA-fragmentteja monistetaan isotermisesti virtauskammiossa. Virtauskammio on lasilevy, jossa on uria. Urat ovat kanavia, joiden pinnalla on "oligonukleotidi nurmi", joka koostuu kahden tyyppisestä P5- ja P7-oligonukleotideistä. Kahden tyyppisiä oligonukleotidejä käytetään, jotta DNA-juostetta voidaan lukea etuperin ja takaperin. Oligot ovat komplementaarisia DNA-fragmentteihin lisättyjen adapterien kanssa ja mahdollistavat fragmentin hybridisoitumisen virtauskammion pintaan. Polymeraasientsyymi kokoaa hybridisoituneelle fragmentille komplementaarisen vastinjuosteen. Kaksijuosteinen DNA-fragmentti denaturoidaan ja alkuperäinen templaatti pestään pois. Jäljelle jäävä DNA on täydellinen kopio templaattista, ja sitä monistetaan klonaalisesti silta-amplifikaatiolla (engl. bridge amplification). Kuvassa 8 on esitetty silta-amplifikaation monistusprosessi.[16]



Kuva 8. Silta-amplifikaation monistus prosessi kuvitettuna. [17]

Silta-amplifikaatiossa DNA taittuu takaisin oligonukleotidejä kohti ja tekee fragmentin sillan muotoiseksi kaareksi, jonka molemmat päät ovat yhdistyneet virtauskammion oligoihin, kumpikin pää erityyppisiin komplementaarisiiin oligoihin. Polymeraasientsyymi tuottaa fragmentille komplementaarisen juosteen ja syntyy kaksijuosteinen silta. DNA-silta denaturoidaan ja saadaan kaksi yksijuosteista DNA-molekyyliä. Tämä prosessi toistetaan monia kertoja samanaikaisesti, minkä tuloksena saadaan miljoonia klustereita. Kun kaikki

fragmentit ovat monistuneet, käänteiset juosteet pestään pois. Fragmenttien 3'-päiden ei-toivottu monistuminen estetään. [16]

Sekvensointi aloitetaan 5'-pästä (etuperin luenta) ja sekvensointi toistetaan myöhemmin niin, että sekvensointi aloitetaan 3'-pästä (takaperin luenta). Sekvensointi alkaa sekvensointialukkeiden ekstensiolla. Jokaisella kierroksella juosteeseen lisätään yksi emäs templaatin määräämään järjestykseen emäs-säännön mukaisesti. Reaktiossa käytettävät emäkset ovat muunneltuja. Eri-tyyppisiin emäksiin on laitettu oma fluoresoiva merkkiaine ja peruutettava terminaattori, joka estää useiden emästen lisäämisen DNA-juosteeseen yhtä-aikaisesti. Jokaisen kierroksen jälkeen klusterit viritetään laserilla ja fluoresoivien merkkiaineiden emissio mitataan. Eri emäkset emittoivat valoa eri aallonpituuksilla ja emäkset voidaan erottaa toisistaan. Tätä kutsutaan sekvensointi-synteesillä prosessiksi. Sykliin lukumäärä määrää luetun sekvenssin pituuden. Emission aallonpituus ja signaalin intensiteetti määrää emäksen identifioinnin. Kaikki identtiset sekvenssit luetaan samanaikaisesti. [16]

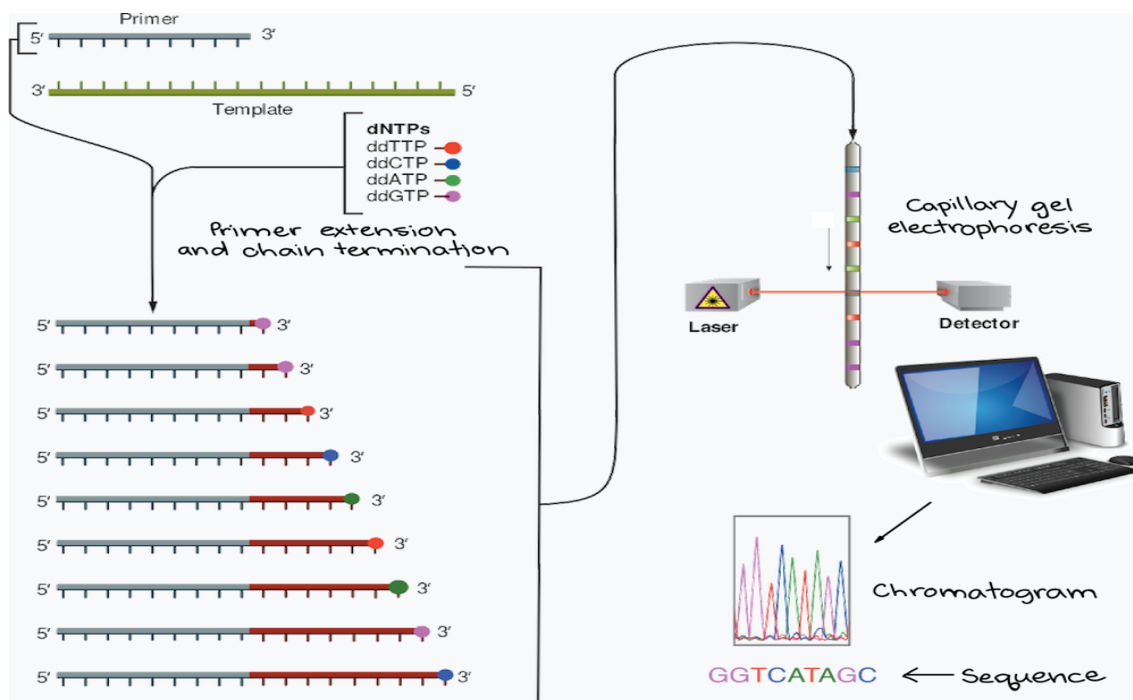
Kun kaikki syklit on käyty läpi ja templaatti on sekvensoitu, sekvensointituote pestään pois. DNA-templaattiin hybridisoituu indeksialuke 1 ja se luetaan samaan tapaan kuin edellisissä vaiheissa. Indeksin sekvensointituote pestään pois ja 3'-pää vapautetaan. DNA-juoste taittuu taas sillan muotoiseksi kaareksi ja 3'-pää hybridisoituu oligonukleotidiin. Indeksii 2 luetaan samaan tapaan kuin indeksii 1. Polymeraasientsyymi kokoaa templaatile vastinjuosteen ja muodostuu kaksijuosteinen silta. DNA-juosteet linearisoidaan ja juosteen 3'-päiden ei-toivottu monistuminen estetään. Etuperin luetut juosteet pestään pois, että jäljelle jää vain takaperin luettavat fragmentit. Sekvensointiprosessi etenee samoin kuin eteenpäin luetussa reaktiossa ja sekvensointituotteet pestään pois. [16]

Sekvensointiprosessista saadaan miljoonia sekvenssejä, jotka yhdessä kuvaavat koko näytteen fragmentteja. Näytteet erotellaan toisistaan niiden uniikkien indeksien avulla. Sekvenssit ryhmitellään niiden emäsjärjestyksen

mukaan samankaltaisuuden perusteella. Etu- ja takaperin luetut sekvenssit muodostetaan pariiksi. Näitä sekvenssejä verrataan tunnettuun sekvenssiin varianttien identifioimiseksi. [16]

2.8 Sanger-sekvensointi

Sanger-menetelmä on DNA:n sekvensointimenetelmä. Tällä menetelmällä lukupituus on suurimmillaan noin 900 emäsparia. Sanger-sekvensointiin tarvitaan samoja reagensseja kuin PCR-reaktioissa. Sanger-sekvensoinnin lähtöaineita ovat DNA-polymeraasientsyymi, alukkeet, templaatti, normaalit deoksinukleotiditriposfaatit (dNTPs) ja muunnellut dideoksinukleotiditriposfaatit (ddNTPs). Muunneltuja emäksiä tulee olla paljon vähemmän kuin normaaleja emäksiä, niin saadaan myös pitkiä DNA-fragmentteja. Muunnelluissa emäksissä on jokaisella erivärinen fluoresoiva osa, eli ne emittoivat valoa eri aallonpituuksilla. Nämä muunnellut emäkset myös lopettavat DNA:n replikaation. Muunnellut emäkset lisätään tuotettuun DNA:han satunnaisesti ja tuloksena on monia eri pituisia DNA-fragmentteja, joiden päässä on fluoresoiva emäs. Sanger-sekvensoinnissa DNA-fragmentit kootaan samaan tapaan kuin PCR-reaktiossa. Ensimmäisessä vaiheessa DNA denaturoidaan, toisessa alukkeet liittyvät yksijuosteiseen DNA:han ja kolmannessa DNA-polymeraasientsyymi rakentaa yksijuosteiselle DNA:lle vastinjuostetta, kunnes muunneltu emäs lisätään juosteeseen, jolloin ekstensio loppuu. Tätä sykliä toistetaan monia kertoja. Sykliä päättyessä voidaan sanoa varmuudella, että muunneltu emäs on liitetty jokaiseen DNA:n positioon ainakin kerran. Kuvassa 9 näkyy Sanger-sekvensointi kuvitettuna. [18;19]



Kuva 9. Yksinkertaistettu kuva Sanger-sekvensointimenetelmästä. Kuvassa ylimpänä on esitetty aluke (engl. primer) ja templaatti (engl. template). Deoksinukleotiditriposfaatit (dNTPs) ovat DNA-juosteen rakennusaineita. Dideoksinukleotiditriposfaatit (ddNTPs) ovat fluoresoivasti leimattuja DNA:n rakennusaineita ja ne myös lopettavat DNA-juosteen replikaation. DNA-juosteisiin liitetään muunneltu emäs jokaiseen DNA:n position ainakin kerran. Juosteet erotellaan kapillaarielektroforeesilla pituuden mukaan ja juosteiden päissä olevat fluoresoivat leimat luetaan. Luetuista leimoista tehdään kromatogrammi, josta saadaan DNA:n sekvenssi. [18]

3. Tutkimuksen toteutus

3.1 Näytteet

Näytteinä oli tamaanien uloste- ja museonahkanäytteitä. Ulostenäytteitä oli kerätty Afrikan sademetsistä, luolista ja tšekkiläisistä eläintarhoista Ostrava zoo ja Plzen zoo. Museonahkanäytteet saatiin Tukholman luonnontieteellisestä museosta. Ulostenäytteet oli säilytetty DNA:n stabilisointiliuokseen. Nahkanäytteet olivat kuivia, eikä niitä ollut säilytetty pakastamisen lisäksi. Näytteitä säilytettiin -80°C :ssa. Taulukossa 1 on esitetty ulostenäytteiden eristyksien erät, näyttenumerot, ottopäivä ja -paikka.

Taulukko 1. Näytteiden eristyserät, näytteiden numerot, näytteiden ottopäivä ja -paikka.

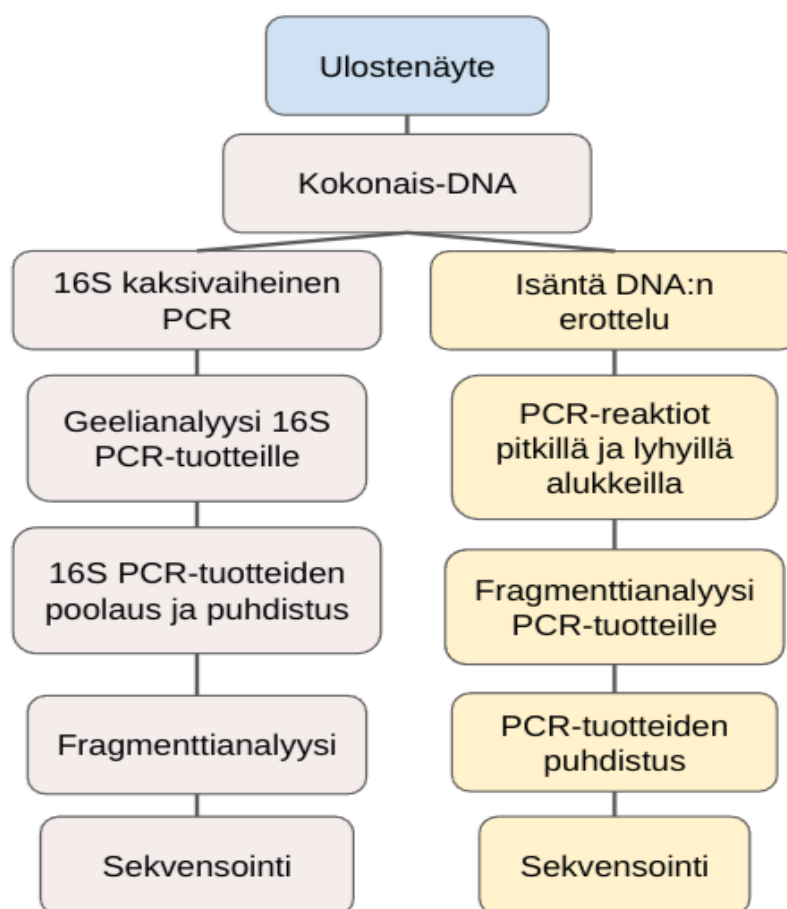
Eristyserä	Näyte-numero	Otto päivä	Paikka
1	1	30.1.22	Chasimba, Kilifi
1	2	27.10.21	Ostrava
1	3	28.1.22	Shimba hills
2	4	15.9.21	Rat village
2	5	15.9.21	Ngangao
2	6	27.10.21	Ostrava
2	7	(28.10.21)	Ostrava
2	8	(2021)	Plezen
3	9	28.10.21	Ostrava
3	10	30.1.22	Kinoni, Vipingo
3	11	10.9.21	Mbololo
3	12	17.9	Rat village
3	13	10.9.21	Mbololo
4	14	(28.10.21)	Ostrava
4	15	(2021)	Plezen
4	16	(2021)	Plezen
4	17	15.9.21	Rat village
4	18	14.9	Ngangao
4	19	12.2.22	Nanguki
4	20	28.10.21	Ostrava

Näytteiden DNA-eristykset tehtiin erissä satunnaisella valinnalla ja näytteet merkittiin juoksevalla numerolla näytteiden merkitsemisen helpottamiseksi.

3.2 DNA:n eristys ulostenäytteistä

Ulostenäytteistä eristettiin kokonais-DNA kaksi kertaa. Ensimmäisen eristyksen DNA:ta käytettiin 16S-rDNA:n monistamiseen ja 16S-geenien sekvensoimiseen. 16S-geenejä tutkimalla haluttiin selvittää eläimen suoliston bakteeriyhteisö. Myöhemmin kokonais-DNA eristettiin "isännän" eli alkuperäisen eläimen (Host) DNA:n erottelukseen bakteerien DNA:sta. Molemmat eristykset tehtiin samalla kitillä, mutta isäntä-DNA:n tutkimista varten tehty eristys tehtiin ilman mikrobi-

DNA:n rikastusvaihetta. Isäntä-DNA:n eristysprotokolla ja siihen tehdyt muutokset ovat samat kuin bakteeri-DNA:n eristyksissä. Eristykset tehtiin erissä, ja näytteet valittiin satunnaisesti. Kokonais-DNA:n eristyksissä näytteet valittiin uudelleen satunnaisesti. Näytteet eristettiin PSP® Spin Stool DNA -kitillä (INVITEK Molecular, tuotenumero: 1038120300). Eristyksissä kontrolleina käytettiin eristyskitin Stool Stabilizer -liuosta ja niitä käsiteltiin samoin kuin ulostenäytteitä. Eristetyn DNA:n konsentraatio mitattiin Nanodrop-laitteella. Kuvassa 10 on esitetty ulostenäytteille tehdyt työvaiheet.



Kuva 10. Kuva ulostenäytteiden työvaiheista. Ensin ulostenäytteistä eristettiin kokonais-DNA, josta osa meni ulostenäytteen bakteerien 16S-rDNA-geenien monistamiseen ja osa isäntä-DNA:n erottelukseen ja monistamiseen. Myöhemmin molemmille 16S-PCR-tuotteille ja isäntä-DNA:lle tehtiin magneettipuhdistus, fragmenttianalyysi ja sekvensointi.

Kokonais-DNA:n eristyksiä tehtäessä useisiin näytteisiin jouduttiin lisäämään Stool Stabilizer -liuosta, koska näyteputket olivat liian täynnä ulostetta ja

nestettä ei ollut enää tarpeeksi. Liuoksen lisäämisen jälkeen putkia vorteksoitiin, että näyte ei laimenisi ja DNA:ta saataisiin näytteestä riittävästi.

PCR-inhibiittorit poistettiin pipetoimalla supernatantti InviAdsorb-putkiin. Näyte puhdistettiin uudelleen sentrifugoimalla 1,5 ml mikrosentrifugi-putkissa. Protokollasta poiketen 25 µl proteinaasi K:ta pipetoitiin 2,0 ml safe-lock-putkiin, joihin jokaiseen pipetoitiin 800 µl supernatanttia.

DNA:n eluutiovaiheessa esilämmitetyn (70 °C) eluointipuskurin inkubointiaikana käytettiin ohjeesta poiketen kolmea minuuttia protokollan kahden minuutin sijasta. Myös loppusentrifugoinnin aikaa pidennettiin yhdestä minuutista kahteen minuuttiin. Näytteet eluointiin 100 µl:aan kitin eluointipuskuria.

Eristysprotokollassa oli monia sentrifugauksia ja näytteet olivat kaikki erilaisia. Joissakin näytteissä oli enemmän kiinteää ainesta kuin toisissa, mikä johti suodatinkalvon tukkeutumiseen. Käytännössä joitakin näytteistä täytyi fuugata useasti, että koko näyteliuos saatiin suodatinkalvosta läpi. Kierrosnopeutta ja aikaa muutettiin tarvittaessa, niin ettei työvaiheeseen menisi kohtuuttomasti aikaa.

3.2.1 16S-rDNA-geenien monistus

Ulostenäytteistä eristetystä DNA:sta monistettiin 16S-rDNA-geeni kaksivaiheisella PCR-ohjelmalla laboratorioteknikko Eeva-Kaisa Vesasen avustuksella. Ensimmäisen ja toisen PCR-reaktion välissä tehtiin ExoSAP-puhdistus. PCR-reaktioissa ja ExoSAP-puhdistuksessa käytettiin Veritin 96 well Thermal Cycler-PCR -laitetta (Applied Biosystems). Nämä reaktiot tehtiin kaikille näytteille kerralla, koska näytteitä oli sopiva määrä ja näytteet mahtuivat kontrolleineen kolmelle kahdeksan PCR-putken liuskalle. Reaktiot jaettiin kuitenkin kahdelle päivälle. Ensimmäisenä päivänä tehtiin ensimmäinen PCR-reaktio ja ExoSAP-puhdistus. Toisena päivänä tehtiin viimeinen PCR-reaktio ja geelijaio. Näytteiden 15 ja 16 eristetyn DNA:n konsentraatiot olivat todella suuret

verrattuna muihin näytteisiin ja kyseiset näytteet laimennettiin 1:10 ennen ensimmäistä PCR-reaktiota.

Ensimmäinen reaktio tehtiin kahtena rinnakkaisena reaktiona. Reaktioiden tilavuus oli 25 µl, joissa oli monistettavaa templaatti-DNA:ta 1 µl. Mastermix pipetoitiin PCR-huoneen laminaarikaapissa kontaminaatioiden estämiseksi. PCR-ajossa monistussykliä toistettiin 15 kertaa. Taulukossa 2 on esitetty ensimmäisen PCR-reaktion reaktioseos ja PCR-lämpöohjelma.

Taulukko 2. Ensimmäisen PCR-reaktion reaktioseoksen koostumus ja PCR-ohjelma.

	1x	54x	PCR-ohjelma		
5x HF Buffer	5 µl	270µl	1	98 °C	30 s
dNTPs 10mM	0,5 µl	27µl	2	98 °C	10 s
Illum_341F_1-4 -mix 10µM	0,5 µl	27µl	3	55 °C	30 s
Illum_785R_1-4 -mix 10µM	0,5 µl	27µl	4	72 °C	10 s
Phusion HS II polym. 2U/µl	0,25 µl	13,5µl	5	palaa 2.	14 kertaa
DMSO 100%	0,625 µl	33,75µl	6	72 °C	5 min
MQ	16,625 µl	897,75µl	7	4 °C	∞
		24 µl			
Templaatti DNA	1µl				
	25µl				

Reaktiossa käytettiin Illuminan 341F-suoria ja 785R-käänteisiä alukkeita.

Alukkeiden ja adapterien sekvenssit löytyvät taulukosta 3.

Taulukko 3. Ensimmäisessä PCR-reaktiossa käytettyjen alukkeiden ja adapterien sekvenssit.

341F aluke		Adapteri	
5`-GACGWCGGNGGGCATCC- 3`	F1	TCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT	
5`-GACGWCGGNGGGCATCC- 3`	F2	TCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTgt	
5`-GACGWCGGNGGGCATCC- 3`	F3	CTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTagag	
5`-GACGWCGGNGGGCATCC- 3`	F4	TCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTtagtgt	
785R aluke		Adapteri	
5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC- 3'	R1	TGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT	
5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC- 3'	R2	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTa	
5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC- 3'	R3	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTtct	
5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC- 3'	R4	TGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTctgagtg	

Kuten taulukosta 3 voi nähdä, alukkeet 341F ja 785R ovat yhdistettynä yhteen neljästä erilaisesta adapterista. Eli reaktioon käytetyt alukkeet olivat yhden alukkeen ja neljän adapterin seoksia. Mastermix ja alukkeet pipetoitiin PCR-putkiin puhdashuoneessa. Kuvassa 11 on ensimmäisen PCR-reaktion tuotteen koostumus, jossa DNA-fragmenttiin on liitetty sekvensointialukkeet ja adapterit.

Adapteri F1-4	341F	DNA fragmentti	785R	Adapteri R1-4
---------------	------	----------------	------	---------------

Kuva 11. Ensimmäisen PCR-reaktion tuote. DNA-fragmentti, jonka molempiin päihin on liitetty alukkeet ja adapterit.

Ensimmäiset reaktiot yhdistettiin ja saadusta 50 µl:sta otettiin 25 µl ExoSAP-puhdistusreaktioon ja puhdistusseosta laitettiin 10 µl. Näin ExoSAP-reaktiotilavuus on 35 µl. Tässä reaktiossa ylimääräiset dNTP-nukleotidit ja alukkeet poistetaan. Taulukossa 4 on ExoSAP-puhdistusreaktion lähtöaineet ja PCR-ohjelma.

Taulukko 4. ExoSAP-puhdistusreaktio ja PCR-ohjelma.

ExoSAP puhdistus mix 25µl reaktiolle			PCR-ohjelma		
	1x	26x			
Eksonukleaasi	0,025 µl	0,65 µl	1	37°C	30 min
SAP	0,25 µl	6,5 µl	2	95°C	5 min
MQ	9,725 µl	252,82 µl	3	4°C	∞ (30-60 min)
	10 µl	260 µl			

Toiseen ja viimeiseen PCR-reaktioon pipetoitiin 3 µl:aa kaksoisindeksialuketta (Dlnd primer), 46 µl mastermixiä ja 1 µl templaattia, joka on käynyt läpi ExoSAP-puhdistusvaiheen. Taulukossa 5 on esitetty toisen PCR-reaktion lähtöaineet ja reaktion PCR-ohjelma. Toisen PCR-reaktion tuote on valmis geelianalyysiin.

Taulukko 5. Toisen PCR-reaktion reaktioseos ja lämpöohjelma.

2. PCR-reaktio	1x	27x	Ohjelma		
5x HF Buffer	10 µl	270 µl	1	98°C	30 s
dNTPs 10mM	1 µl	27 µl	2	98°C	10 s
Phusion HS II polym. 2U/µl	0,5 µl	13,5 µl	3	65°C	30 s
DMSO 100%	1,25µl	33,75 µl	4	72°C	10 s
MQ	33,25 µl	897,75 µl	5	go to 2.	17 times
Dlnd primer 2,5 µM	3 µl	46 µl	6	72°C	5 min
			7	4°C	∞
Templaatti DNA	1µl				
	50µl				

Mastermix ja kaksoisindeksialukkeet pipetoitiin puhdashuoneessa kontaminaatioiden estämiseksi. Toisessa PCR-reaktiossa sykliä toistettiin 18 kertaa. Toisen PCR-reaktion tuotteet ovat valmiit geelianalyysiin.

3.2.2 16S-rDNA PCR-tuotteiden geeliansalyysi

PCR-reaktioiden jälkeen näytteiden fragmenttien koot tarkistettiin agarosigeelielektroforeesilla (AGE) vertaamalla fragmentteja kokostandardiin. Ajossa käytettiin 1,5 %:n agarosigeeliä (Bioline, Agarose Molecular Grade, tuotenumero: BIO-41025), johon lisättiin pari tippaa etidiumbromidia (0,5 mg/ml). Näytteitä pipetoitiin 10 µl ja DNA-väriä 2 µl (Thermo Fisher, 6x DNA loading Dye) kuoppalevylle, josta näytteet pipetoitiin geelille. Kokostandardina käytettiin (Thermo Fisher, Generuler 1 Kb DNA ladder), jota pipetoitiin 3,5 µl geelin molempiin reunakaivoihin. Geelin valmistukseen ja ajoon käytettiin 1x boraatipuskuria. Etidiumbromidia laitettiin geeliin ja puskuriin. Geeliä ajettiin noin 50 minuuttia 100 voltin jännitteellä.

3.2.3 16S-DNA-fragmenttien poolaus ja puhdistus

Kaksivaiheisen-PCR-reaktion ja geelijaon jälkeen näytteistä tehtiin pooli. Näytettä 11 otettiin 10 µl samoin kaikkia kontroleja, koska niiden konsentraatiot olivat pieniä. Kaikkien muiden näytteiden konsentraatiot olivat korkeammat, joista otettiin pooliin 5 µl. Kaikkien näytteiden näytenuumerot, indeksit ja niiden tiedot löytyvät liitteestä 2.

Valmiista poolista otettiin 100 µl puhdistukseen sekvensointia varten. Puhdistus tehtiin magneettihelmipuhdistuksella. Puhdistuksessa käytettiin MagSi-NGS^{PREP} Plus magneettihelmiä (tuotenumero: MDKT00010075). Puhdistus tehtiin protokollan ohjeen 4.1 "Clean-up for enzymatic reactions" [21, s.7] mukaan.

Magneettihelmiä käytettiin kertoimella 0,9 eli 100 µl:n pooliin laitettiin 90 µl magneettihelmiä. Pesuvaiheissa pipetoitiin 200 µl 70-prosenttista etanolia, ohjeen 180 µl:n sijasta. Eluointivaiheessa inkubointivaihe pidennettiin kahdesta minuutista viiteen minuuttiin DNA:n irtoamisen varmistamiseksi. Eluointi tehtiin 40 µl:aan steriilisuodatettua 10 mM Tris-HCl-puskuria.

3.3 Isäntä-DNA:n eristys

Ulostenäytteistä eristetyistä kokonais-DNA:sta eroteltiin bakteerien DNA tamaa-
nin DNA:sta NEBNext Microbiome DNA Enrichment -kitillä (Tuotenumero:
E2612-3). Kyseinen kitti on suunniteltu bakteerien DNA:n rikastamiseen isäntä-
DNA:sta, mutta tässä työssä sitä käytettiin "väärinpäin" isännän DNA:n
rikastamiseen. Protokollaa ei tarvinnut muuttaa halutun lopputuloksen saavut-
tamiseksi ja eristys tehtiin protokollan mukaisesti. Ensimmäisen erän eristy-
ksissä käytettiin valmistajan tarjoamaa kuuden reaktion testikittiä (Tuotenumero:
E2612-1), jolla testattiin menetelmän toimivuus näytteille. Erottelu suoritettiin
laboratorion pöydällä.

Näytteiden DNA-pitoisuudet olivat kaikki erilaisia. Erottelua varten DNA:ta
pipetoitiin niin, että DNA:ta tuli 1 µg jokaiseen 1,5 ml low-bind -mikrosen-
trifugiputkeen, että protokollaa voitiin käyttää suoraan tekemättä joitakin
laskutoimituksia.

DNA:n puhdistusvaiheessa käytettiin MagSi NGS Plus^{PREP} magneettihelmiä
ohjeessa esitettyjen AMPure- tai SPRIselect-helmien sijaan. Valmiin DNA:n
konsentraatio mitattiin Qubit 3 -fluorometrillä Qubit dsDNA HS Assay -kitin
(Invitrogen Thermo Fisher Scientific) protokollan mukaisesti.

3.4 DNA:n eristys nahkanäytteistä

Eristys tehtiin MACHERY-NAGEL, NucleoMag® Tissue kitillä (Tuotenro:
7443004) laboratorioteknikko Eeva-Maria Turkin avustuksella. Nahkanäytteiden
DNA:n eristys oli kaksivaiheinen prosessi. Nahkanäytteistä leikattiin pieni noin
10 mg:n pala ja ne hajotettiin pitämällä näytteitä yön yli 56 °C:n lämpötilassa
proteaasi-K-liuoksessa. Näytteen hajottua lyaatti käsiteltiin RNAasi A:lla RNA:n
poistamiseksi. Sitten näytteistä eristettiin kokonais-DNA.

Eristys tehtiin protokollan mukaan eluutiota lukuun ottamatta, koska kitin
yksinkertaistettu ohje jätti viimeisen 56 °C:n inkubaatiovaiheen pois. Virhe

huomattiin, mutta vasta viimeisen näyte-erän eristyksissä. Eristyserien välillä ei kuitenkaan huomattu merkittävää eroa saaduissa konsentraatioissa ennen ja jälkeen PCR-monistuksen. Näytteet eluoiitiin 50 µl:lla MB6-puskuria.

Eristetystä DNA:sta mitattiin konsentraatio Qubit 3 fluorometrillä Qubit dsDNA HS Assay -kitin (Invitrogen Thermo Fisher Scientific) protokollan mukaisesti ja tehtiin fragmenttianalyysi luvun 3.6 kuvauksen mukaisesti. Sama toistettiin jokaiselle näyte-erälle. Fragmenttianalyysin jälkeen näytteille tehtiin PCR-monistus, joka on kuvattu luvussa 3.5. PCR-tuotteille tehtiin myös konsentraatiomittaus ja fragmenttianalyysi. Näytteen DNA:ta käytettiin mitokondriaalisen ja yksilön DNA:n monistamiseen ja sekvensointiin. Taulukossa 6 on esitetty nahkanäytteiden näytelistä, eristysnumerot, eristyspäivät ja näytteiden lajitiedot.

Taulukko 6. Nahkanäytteiden näytelistä, eristysnumerot, eristyspäivä ja näytteiden lajitiedot.

Näytenumero	Eristysnumero	Eristys päivä	Genus	Species
erä1				
593117	1	25.4.2022	Dendrohyrax	arboreus
581269	2	25.4.2022	Dendrohyrax	arboreus
erä2				
582273	1	5.5.2022	Dendrohyrax	arboreus
583216	2	5.5.2022	Dendrohyrax	arboreus
645303	3	5.5.2022	Dendrohyrax	arboreus
581269	4	5.5.2022	Dendrohyrax	arboreus
593117	5	5.5.2022	Dendrohyrax	arboreus
590126	6	5.5.2022	Dendrohyrax	arboreus
583279	7	5.5.2022	Dendrohyrax	arboreus
602434	8	5.5.2022	Dendrohyrax	arboreus
erä3				
580258	1	10.5.2022	Dendrohyrax	arboreus
602435	2	10.5.2022	Dendrohyrax	arboreus
590124	3	10.5.2022	Dendrohyrax	arboreus
581158	4	10.5.2022	Dendrohyrax	arboreus
583268	5	10.5.2022	Dendrohyrax	arboreus
590276	6	10.5.2022	Dendrohyrax	arboreus
645301	7	10.5.2022	Dendrohyrax	arboreus
582144	8	10.5.2022	Dendrohyrax	arboreus
erä4				
590235	1	12.5.2022	Dendrohyrax	arboreus
582116	2	12.5.2022	Dendrohyrax	arboreus
603423	3	12.5.2022	Dendrohyrax	sp.
582155	4	12.5.2022	Dendrohyrax	arboreus
581037	5	12.5.2022	Dendrohyrax	dorsalis

Näytteet eristettiin erissä satunnaisella valinnalla ja ne merkittiin erittäin juoksevalla numerolla. Ensimmäinen erä oli eristyksen testierä, ja erän näytteet eristettiin epähuomiossa uudelleen seuraavassa erässä. Ensimmäistä erää ei käytetty jatkoprosesseissa, koska oli helpompaa käyttää toista erää kokonaisuudessaan.

3.5 Mitokondriaalisen DNA:n monistus PCR-tekniikalla

Nahkanäytteistä monistettiin mitokondriaalista DNA:ta Mito-F2 ja Mito-R2- alukkeilla (Valmistaja: IDT) ja erillisellä PCR-ohjelmalla. Ulostenäytteistä eristetystä isäntä DNA:sta monistettiin myös mitokondriaalista DNA:ta samalla PCR-ohjelmalla, joka on esitetty taulukossa 8. Isäntä-DNA:lle ja nahkanäytteille tehtiin PCR-reaktiot pitkillä ja lyhyillä alukkeilla. Nahkanäytteet olivat peräisin vanhoista ja kuivista museonahoista, joten niiden DNA oli ehtinyt hajota lyhyiksi jaksoiksi. Alukkeet nimettiin pitkiksi ja lyhyiksi alukkeiksi niiden ideaaliolosuhteissa tuottaman fragmenttikoon perusteella. Pitkät alukkeet tuottavat noin 1 000 emäsparin pituisia DNA-fragmentteja ja lyhyet noin 200 emäsparin pituisia fragmentteja. Taulukossa 7 on esitetty monistuksessa käytettyjen pitkien ja lyhyiden alukkeiden nimet ja sekvenssit.

Taulukko 7. Mitokondriaalisen DNA:n monistuksessa käytettyjen pitkien ja lyhyiden alukkeiden nimet ja sekvenssit.

Pitkät alukkeet	
Mito-F2	5' TCT GRC ATC TGG TTC TTA CTT CAG '3
Mito-R2	5' TTT ATT ACT GCT GTY TCC CGTG '3
Lyhyet alukkeet	
II-Mito-12S-F	5' ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT ACT GGG ATT AGA TAC CCC '3
II-Mito-12S-R	5' GTG ACT GGA GTT CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATC TAT DGR ACA GGC TCC TCT AG '3

Mito-F2- ja Mito-R2-alukkeet eivät olleet toimivia hajonneille DNA-jaksoille, joten näytteille hankittiin uudet alukkeet II-Mito-12S-R ja II-Mito-12S-F (IDT). PCR-reaktiot tehtiin Veritin 96 well Thermal Cycler-PCR -laitteella (Applied Biosystems). Lyhyitä ja pitkiä alukkeita pipetoitiin reaktioon sama määrä ja ne oli laimennettu 100 µM:sta 10 µM:iin.

Taulukko 8. Mitokondriaalisen DNA:n monistamisen PCR-ohjelma.

PCR-reaktion lähtöaineet	1	x	9	x	PCR-ohjelma		
5x HF Buffer	10	μl	90	μl	1	98 °C	30 s
dNTPs 10 mM	1	μl	9	μl	2	98 °C	10 s
Mito-F2 10 μM	1	μl	9	μl	3	55 °C	30 s
Mito-R2 10 μM	1	μl	9	μl	4	72 °C	1 min 15 s
Phusion HS II polym. 2 U/μL	0,5	μl	4,5	μl	5	go to 2.	34 times
MQ	26,5	μl	238,5	μl	6	72 °C	5 min
			40	μl	7	4 °C	∞
Templaatti-DNA	10	μl					
	50	μl					

PCR-reaktion mastermix valmistettiin PCR-huoneessa laminaarissa ja templaattit lisättiin toisessa laminaarissa muualla laboratoriossa kontaminaatioiden välttämiseksi. Tällä ohjelmalla tehtiin reaktioihin käytettiin 10 μl templaatti-DNA:ta ja reaktion vesimäärää pienennettiin, ettei reaktio laimenisi liikaa. PCR-putket pidettiin jäissä mastermixin lisäämisen jälkeen, entsyymien toimivuuden säilyttämiseksi ja PCR-reaktion jälkeen DNA:n hajoamisen estämiseksi. PCR-tuotteista mitattiin DNA:n konsentraatio Qubit 3 -fluorometrillä Qubit dsDNA HS Assay -kitin (Invitrogen Thermo Fisher Scientific) protokollan mukaisesti.

3.6 Fragmenttianalyysi

Fragmenttien kokoanalyysiä tehtiin nahkanäytteille ja niiden PCR-reaktiotuotteille, 16S-poolille ja isäntä-DNA:n PCR-tuotteista. Nahkanäytteistä eristetyille DNA:lle tehdyt fragmenttianalyysit tehtiin 50K Large fragment diluent marker (Agilent, Tuotenumero: DNF-373-0003) ajoliuoksella ja kokostandardilla NGS HS ladder 1-6000 bp (Agilent, Tuotenro: DNF-396-U100, lot: 0006611280). HS "High Sensitivity" fragmenttianalyysi tehtiin ainoastaan PCR-

tuotteille ja 16S-poolille, joihin käytettiin seuraavaa kittiä: Agilent HS NGS Fragment kit, 1–6000 bp. Kaikissa fragmenttianalyseissa käytettiin samaa kokostandardia.

Fragmenttianalyysit suoritettiin laitteen pikaohjeen [20, s.5] mukaan, Fragment Analyzer -laitteella (Advanced Analytical). Näytteet laimennettiin siten, että niistä pystyy helposti pipetoimaan laitteelle noin 2 ng DNA:ta, kun näytemäärä on 0,5 - 3 µl per kuoppa. 16S-poolista tehtiin ensin 1:10-laimennos ja siitä pipetoitiin 1,5 µl fragmentille paikkaan A1 ja 2,0 µl paikkaan A2. Fragmenttianalyysin tehtävänä oli varmistaa, että DNA-fragmentit ovat halutun pituisia eli menetelmää käytettiin kvalitatiivisesti, joten näytemäärissä ei noudatettu suurempaa tarkkuutta.

3.7 DNA:n puhdistus magneettihelmillä

Isäntä-DNA:lle ja nahkanäytteiden PCR-reaktioista saatua DNA:ta puhdistettiin Sanger-sekvensointia varten. Myös 16S-rDNA-pooli puhdistettiin tällä menetelmällä, joka on esitetty luvussa "16S-DNA-fragmenttien poolaus ja puhdistus". Puhdistus tehtiin Magtivation protokollan ohjeen 4.1 "Clean-up for enzymatic reactions" [21, s.7] mukaan.

Puhdistukseen käytettävän näytteen määrä valittiin näytteen konsentraation perusteella niin, että näytteiden DNA saadaan sitoutumaan helmiin optimaaliseksi. Heikkojen näytteiden PCR-tuote käytettiin kokonaan puhdistukseen ja vahvoista näytteistä pipetoitiin 15 µl PCR-tuotetta puhdistukseen. Magneettihelmiä käytettiin kertoimella 0,7.

Eluointi tehtiin kaikille näytteille 15 µl:aan steriilisuodatettua 10 mM Tris-HCl puskuria. Eluointiaikaa pidennettiin kahdesta minuutista viiteen minuuttiin. Valmiin DNA:n konsentraatio mitattiin Qubit 3 -fluorometrillä Qubit dsDNA HS Assay -kitin (Invitrogen Thermo Fisher Scientific) protokollan mukaisesti.

3.8 Sanger- ja Illumina-sekvensoinnit

Laboratorion henkilökunta suoritti projektin kaikki Sanger- ja Illumina-sekvensoinnit, koska he tekivät muita sekvensointeja molemmilla tekniikoilla asiakkaille rutiininomaisesti. Lisäksi projekti oli muutenkin laajasisältöinen ja sekvensoinnin valmistuneet tulokset ovat kaikesta huolimatta käytettävissä. Sekvensoinnit suorittivat laboratorioteknikot Kirsi Lipponen ja Hanna Roos. Sekvensoinnit tehtiin (Applied Biosystems) 3500 XL Genetic Analyzer-laitteella (Sanger-sekvensointi) ja (Illumina) MiSeq-laitteella (NGS).

4. Tulokset

4.1 DNA:n eristys ulostenäytteistä

Ulostenäytteistä eristettiin kokonais-DNA, josta rajattiin 16S-rDNA-sekvenssi spesifisillä alukkeilla, monistettiin PCR-reaktiolla ja lopuksi sekvensoitiin. Myöhemmin kokonais-DNA:sta eroteltiin isännän (tamaanin) DNA, josta rajattiin mitokondriaalista DNA:ta spesifisillä alukkeilla, monistettiin ja sekvensoitiin. 16S-eristyksistä saadut DNA-pitoisuudet olivat todella vaihtelevia noin 45 - 300 ng/µl. Taulukossa 9 on esitetty 16S-rDNA-eristysten konsentraatiot ja puhtaus.

Taulukko 9. 16S-rDNA eristykset, eristyspäivä, konsentraatio ja puhtaus.

	16S-rDNA	Nanodrop eristysten	Puhtaus
Näyttenumero	eristyspäivä	konsentraatio. (ng/μl) V=100 μl	260/280A
1	5.4.2022	66,26	1,92
2	5.4.2022	71,01	1,94
3	5.4.2022	37,85	1,96
4	6.4.2022	338,87	1,98
5	6.4.2022	141,1	1,78
6	6.4.2022	447,15	1,99
7	6.4.2022	459,05	2,01
8	6.4.2022	651,11	2,03
9	7.4.2022	291,22	2
10	7.4.2022	86,43	2,04
11	7.4.2022	435,9	1,91
12	7.4.2022	467,86	1,92
13	7.4.2022	409,53	1,95
14	8.4.2022	227,22	1,99
15	8.4.2022	3277,18	1,98
16	8.4.2022	2038,37	1,93
17	8.4.2022	333,3	1,95
18	8.4.2022	357,37	1,92
19	8.4.2022	99,67	1,94
20	8.4.2022	45,62	1,97

Isäntä-DNA:n erottelua varten tehdyissä kokonais-DNA:n eristyksissä alin konsentraatio oli 10. näytteellä (30 ng/μl) ja ylin oli 15. näytteellä (1 855 ng/μl).

Taulukossa 10 on esitetty isäntä-DNA:n erottelua varten eristettyjen näytteiden näyttenumerot, eristyspäivä, konsentraatio ja puhtaus. Keltaisella värillä korostettuihin näytteisiin jouduttiin lisäämään DNA-tasapainotusliuosta, että niistä saatiin otettua näyte. Näytteissä on vähemmän isännän DNA:ta kuin bakteeri-DNA:ta, ja tämä näkyy selvästi saaduissa konsentraatioissa. DNA-tasapainotusliuoksen lisääminen laimensi todennäköisesti näytteitä hieman, mutta kaikista näytteistä saatiin DNA:ta jatkoanalyysiin. Näyte 13 oli viety virologian osastolle analyysiin, joten se ei ollut käytettävissä isäntä-DNA:n eristyksissä.

Taulukko 10. Toisen kokonais-DNA:n eristyksen, näyttenumerot, eristyspäivä, konsentraatio ja puhtaus.

Näyte	Kokonais-DNA	Kokonais-DNA Nanodrop	Puhtaus
Numero	eristyspäivä	Kons. (ng/μl), V= 100 μl	260/280A
1	20.5.2022	33,6	1,87
2	18.5.2022	287,8	1,95
3	19.5.2022	43,3	1,94
4	18.5.2022	169	1,92
5	20.5.2022	104,9	1,81
6	18.5.2022	161,2	1,92
7	17.5.2022	1386,5	1,92
8	18.5.2022	263,5	1,96
9	19.5.2022	309,6	1,9
10	20.5.2022	30	1,88
11	17.5.2022	91,43	1,86
12	18.5.2022	343,1	1,88
13	-	-	-
14	18.5.2022	357,2	1,89
15	19.5.2022	1855,7	1,92
16	19.5.2022	575,6	1,86
17	20.5.2022	326,1	1,9
18	19.5.2022	97,6	1,86
19	18.5.2022	146,2	1,92
20	20.5.2022	305,1	1,96

Näytteet oli kerätty eri tamaaniyksilöiltä eläintarhoista ja niiden luonnollisista elinympäristöistä. On vaikea sanoa, miten tamaanien elinympäristö ja niille tarjottu ravinto vaikuttaa niiden suolistoon tai siihen, miten paljon DNA:ta ulostenäytteistä saadaan.

Näyteputkien näytemäärä ei ollut myöskään sama. Tästä koitui itse asiassa hieman haittaa toisessa kokonais-DNA:n eristyksessä, koska putkissa ollut uloste sitoi suuren määrän nesteestä, minkä vuoksi näytteet olivat usein kuivia toisella eristyskerralla ja niihin jouduttiin lisäämään DNA:n tasapainotusliuosta. Tärkein tavoite oli saada näytteestä tarpeeksi DNA:ta jatkoanalyysijä varten,

joten näytetilavuuden muuttamisessa ei nähty ongelmaa, kunhan niistä saataisiin DNA:ta.

4.2 Isäntä-DNA:n erottelun tulokset

Isäntä-DNA:n konsentraatiot olivat pieniä vain 1,3 - 3.1 ng/μl. Isäntä-DNA eroteltiin bakteerien DNA:sta laboratorion pöydällä, mikä on voinut altistaa näytteet kontaminaatioille. Taulukossa 11 on esitetty erotteluun käytetyn ulostenäytteen numero, isäntä-DNA:n erottelun päivämäärät ja valmiin isäntä-DNA:n konsentraatio ja puhtaus.

Taulukko 11. Ulostenäytteen numero, isäntä-DNA:n erottelupäivät, valmiin isäntä-DNA:n konsentraatio ja puhtaus.

Näyte numero	Isäntä-DNA:n erottelu	Host erottelu ng/μl	Puhtaus
	Päivämäärä	Puhd. Kons. Nanodrop	(260A/280A)
1	25.5.2022	2,1	1,7
2	14.6.2022	2,6	1,05
3	25.5.2022	1,6	5,2
4	14.6.2022	3,1	1,72
5	25.5.2022	2,2	1,82
6	14.6.2022	1,9	0,88
7	14.6.2022	3,9	0,98
8	16.6.2022	2,1	1,15
9	16.6.2022	2	1,34
10	16.6.2022	2,2	1,29
11	14.6.2022	2,4	1,11
12	16.6.2022	1,9	1,09
13	-	-	-
14	14.6.2022	2,4	0,89
15	25.5.2022	2,5	1,19
16	25.5.2022	2,6	1,36
17	14.6.2022	2,4	1,42
18	16.6.2022	2,3	1,18
19	16.6.2022	1,3	1,19
20	25.5.2022	1,8	6,5

Isäntä-DNA eroteltiin erissä satunnaisesti valituista näytteistä. Isäntä-DNA:n erottelu protokollassa oli monia vaiheita, joista viimeisin oli magneettinen puhdistusvaihe. Puhdistusvaihe alensi todennäköisesti DNA:n konsentraatiota. Puhtaus suhdeluvut vaihtelevat suuresti, mikä voi johtua DNA:n pienestä konsentraatiosta.

4.3 DNA:n eristys nahkanäytteistä

Nahkanäytteistä saatiin eristettyä DNA:ta 0,4 - 50 ng/μl. Näytteet olivat kaikki erilaisia. Osassa näytteistä oli paljon karvaa, joka ei liuennut ollenkaan lyysauksen aikana ja osassa oli niin pieni pala nahkaa, että se jouduttiin käyttämään kokonaan. Näytteistä saatujen DNA-konsentraatioiden vaihtelu voi johtua esimerkiksi tamaanin nahan iästä, säilytyksestä ja nahan esikäsittelytavoista. Taulukossa 12 on esitetty näyttenumerot, eristyspäivät ja eristetyn DNA:n konsentraatio.

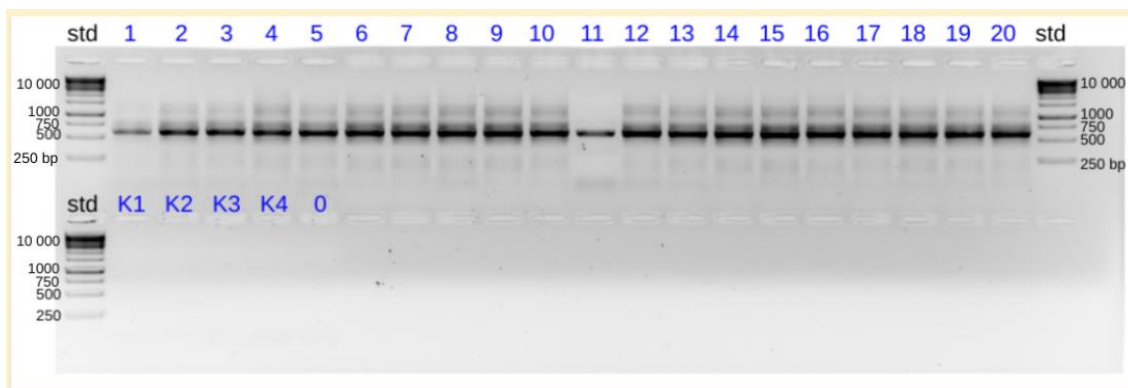
Taulukko 12. Nahkanäytteiden näytenuumerot, eristysnumerot, eristyspäivä ja konsentraatiot.

Eristysnumero	Näytenuumero	Eristyspäivä	Erist. DNA kons. Qubit
			Tilavuus 50µl (ng/µl)
1	593117	25.4.2022	0,44
2	581269	25.4.2022	3,30
1	582273	5.5.2022	0,93
2	583216	5.5.2022	1,82
3	645303	5.5.2022	24,60
4	581269	5.5.2022	0,45
5	593117	5.5.2022	0,49
6	590126	5.5.2022	0,60
7	583279	5.5.2022	5,06
8	602434	5.5.2022	12,00
1	580258	10.5.2022	0,60
2	602435	10.5.2022	23,20
3	590124	10.5.2022	0,59
4	581158	10.5.2022	0,65
5	583268	10.5.2022	6,34
6	590276	10.5.2022	25,40
7	645301	10.5.2022	31,80
8	582144	10.5.2022	3,96
1	590235	12.5.2022	50,20
2	582116	12.5.2022	0,64
3	603423	12.5.2022	39,20
4	582155	12.5.2022	1,75
5	581037	12.5.2022	23,40

Nahkanäytteet olivat myös noin sata vuotta vanhoja ja kuivattuja. DNA ei usein säily hyvin kuivassa, ja nahkanäytteiden DNA oli fragmentoitunutta ja niiden PCR-reaktioihin tarvittiin lyhyemmät alukkeet kuin muihin näytteisiin.

4.4 Geelianaalyysi 16S-rDNA-PCR-tuotteille

Kaksivaiheisen PCR-reaktion jälkeen PCR-tuotteet ajettiin geelille. Kuvasta 11 näkyy, että näytteiden 1 ja 11 bändit olivat heikommat kuin muiden näytteiden, mutta kaikkien näytteiden fragmenttivyöhykkeet olivat samankokoisia noin 600 bp. Negatiiviset kontrollinäytteet olivat täysin tyhjiä, eli kontaminaatioita ei ole tullut DNA:n eristysvaiheessa. Geelijaosta otettu geelikuva on esitetty kuvassa 12.

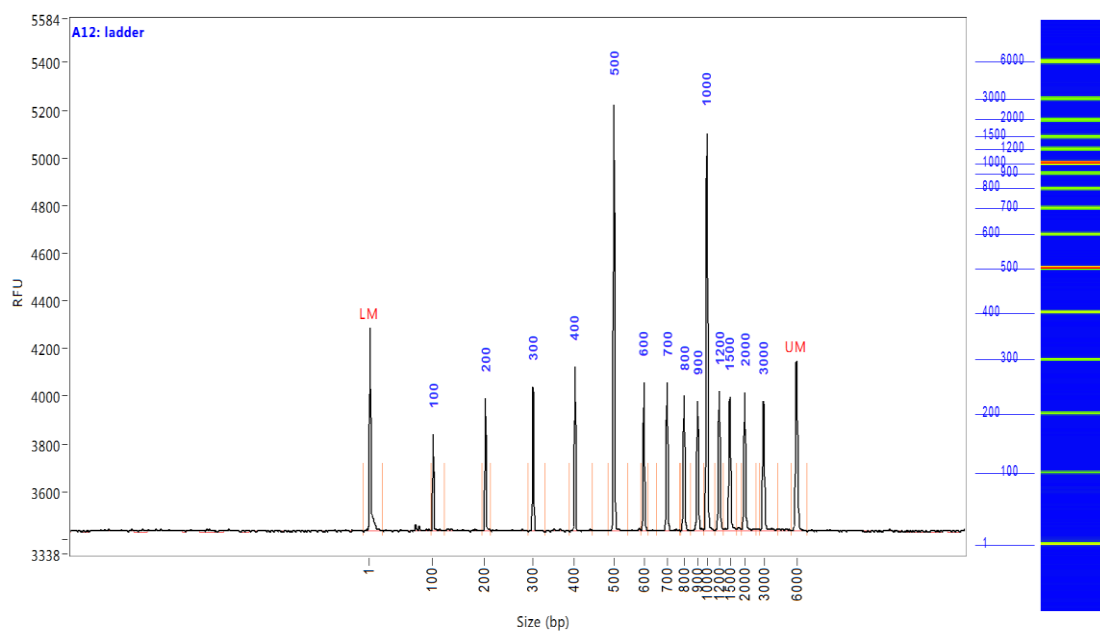


Kuva 12. 16S-rDNA PCR-tuotteiden, kontrollien ja molemmissa päissä olevien kokostandardien (std) geelikuva. Näytteiden PCR-tuotteet on numeroitu 1-20 ja kontrollit ovat kaikki alimmalla rivillä.

Näytteissä ei näy ylimääräisiä bändejä eikä kovin paljoa alukkeiden jäänteitä. Näytteiden todettiin olevan tarpeeksi puhtaat ja yhtenäisen kokoiset, että ne olivat valmiit poolattaviksi.

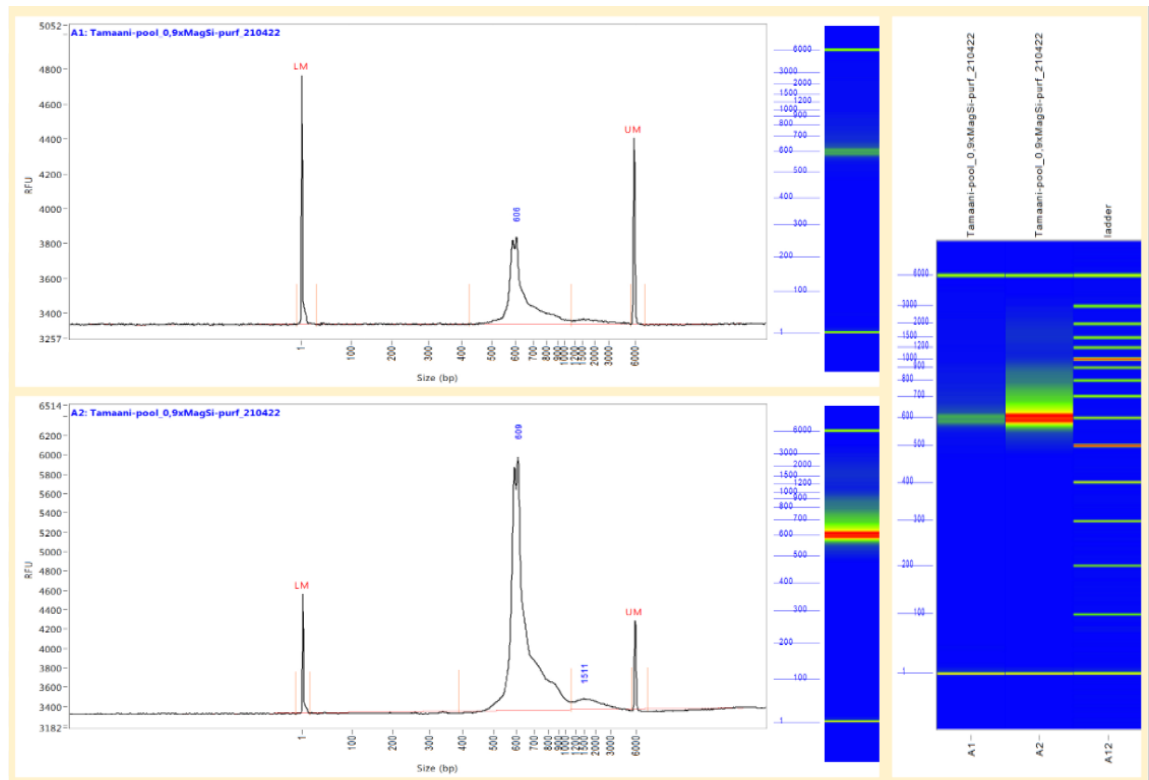
4.5 Fragmenttianaalyysi

Fragmenttianaalysien tulokset esitetään koottuina esimerkkeinä eri alukkeilla ja näytematriiseilla tehdyistä fragmenttianaalysista. Kaikki muut fragmenttianaalysit esitetään geelikuvina, jotka löytyvät liitteestä 1. Kuvassa 13 on esitetty fragmenttianaalysissa käytetyn kokostandardin analyyysin tulokset.



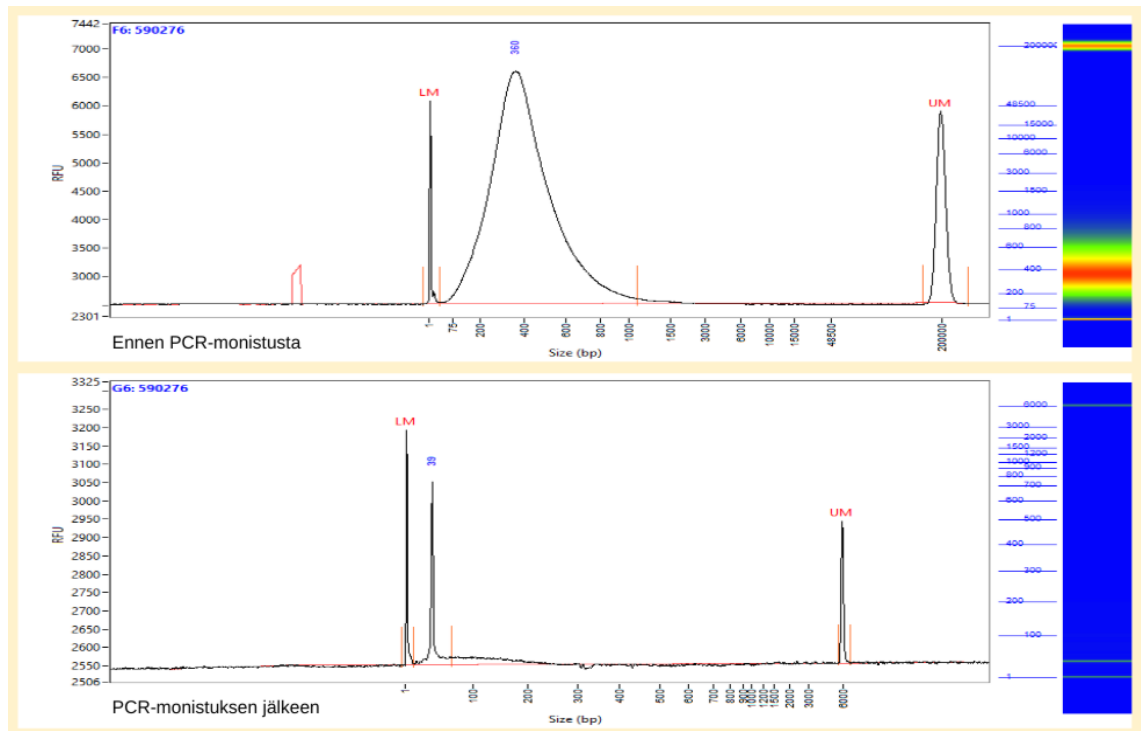
Kuva 13. Fragmenttianalyseissä käytetyn kokostandardin tulokset.

Puhdistetulle poolille tehtiin fragmenttianalyysi kahdella eri konsentraatiolla. Paikkaan A1 pipetoitiin 1,5 μ l ja paikkaan A2 pipetoitiin 2,0 μ l puhdistettua poolia. Fragmenttikoko oli sama kuin geelijossa noin 600 emäsparia. Analyysistä saadun elektroferogrammin piikit ovat siistejä. Elektroferogrammin suurin piikki kuvaa poolin fragmentteja. Ennen poolin piikkiä ei näy alukkeiden jäänteitä. Kuvassa 14 on esitetty 16S-rDNA näytepoolin fragmenttianalyysin tulokset, poolin elektroferogrammit ja geelikuvat. Kuvassa LM (lower limit) ja UM (upper limit) kuvaavat mittausaluetta.



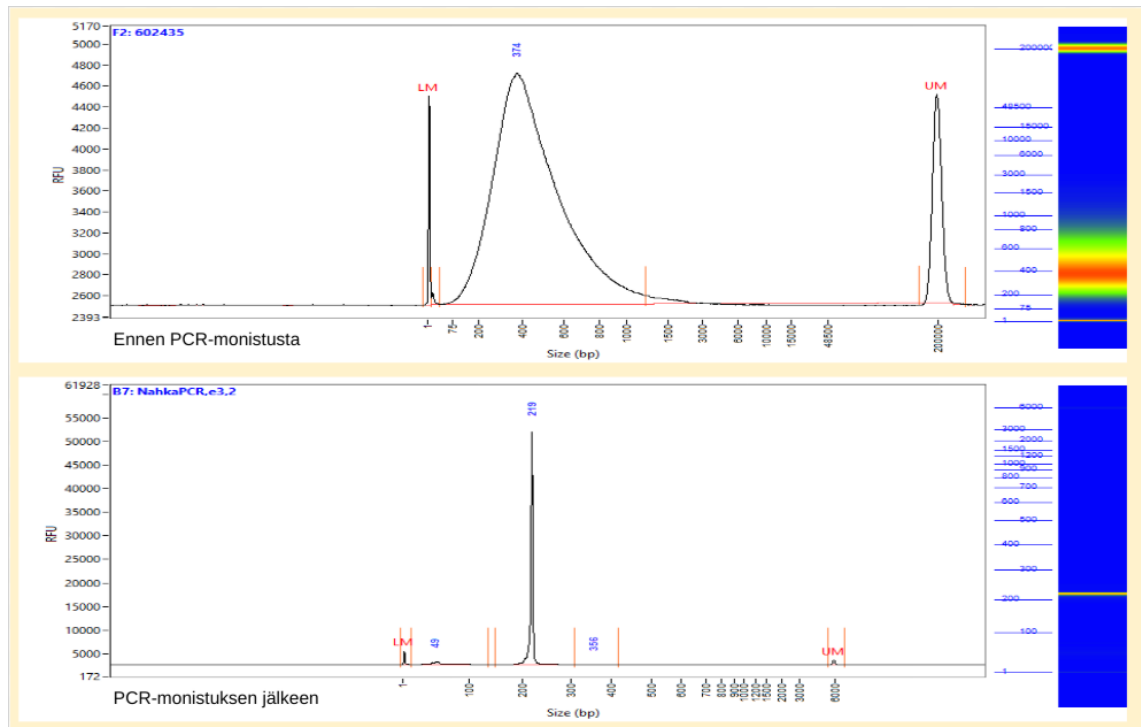
Kuva 14. 16S-rDNA näytepoolin elektroferogrammit ja geelikuvat. Poolin fragmenttianalyysi tehtiin kahdella näytemäärällä 1,5 μ l ylimmässä ja 2,0 μ l alimmassa elektroferogrammissa.

Kuvassa 15 on esitetty nahkänäytteen 590276 fragmenttianalyysin tulokset ennen ja jälkeen PCR-monistuksen pitkillä alukkeilla Mito-F2 ja Mito-R2. Kuvassa yllimpänä on ennen PCR-monistusta tehdyn fragmenttianalyysin elektroferogrammi ja geelikuva. Ennen PCR-monistusta tehdyn fragmenttianalyysin suurimman piikin fragmenttikoko on noin 360 bp ja PCR-monistuksen jälkeen noin 40 emäsparia. Pitkillä alukkeilla tehdyt PCR-monistukset eivät tuottaneet suuria konsentraatioita DNA:ta, vain noin 1 ng/ μ l, ja sen voi huomata myös fragmenttianalyysin geelikuvien heikoista fragmentti vyöhykkeistä. Heikkojen PCR-monistuksen takia nahkänäytteiden pitkillä alukkeilla tehtyjä PCR-tuotteita ei sekvensoitu. Ylimmän elektroferogrammin piikki on leveämpi kuin alimmassa elektroferogrammissa, koska ennen PCR-monistusta DNA-fragmenttien koot vaihtelevat. Alimmassa elektroferogrammissa on pienempi ja terävämpi piikki, koska PCR-monistuksessa DNA-fragmenttien koot ovat rajatut ja tarkat.



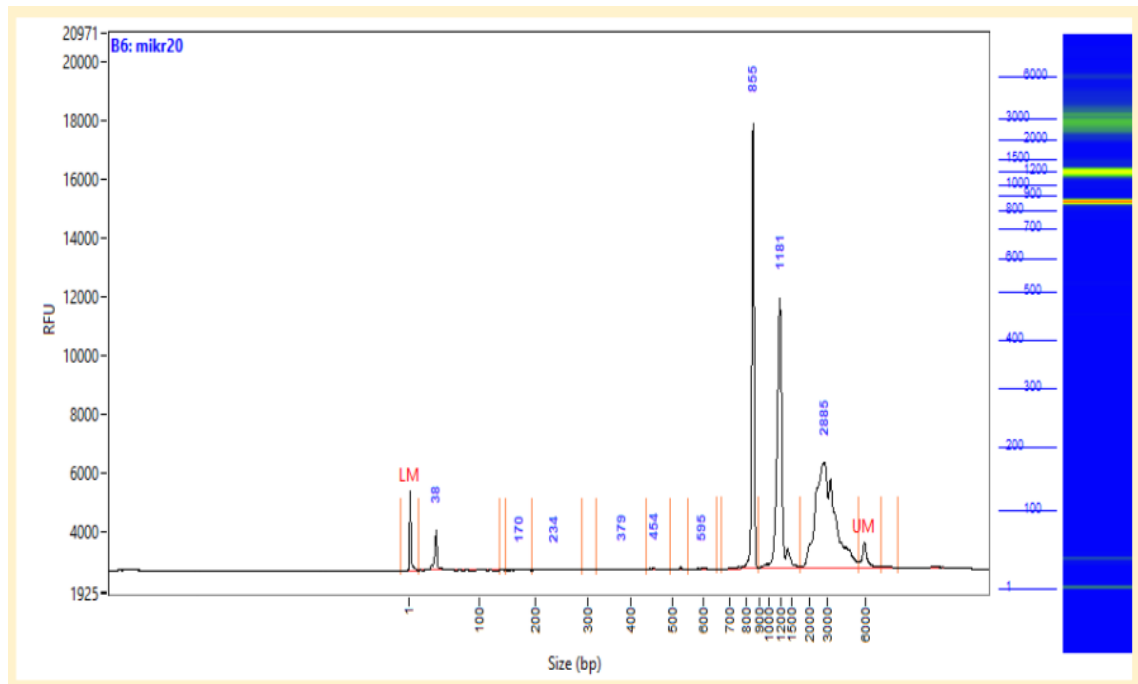
Kuva 15. Nahkanäytteen 590276 fragmenttianalyysin tulokset ennen ja jälkeen PCR-monistuksen.

Kuvassa 16 on esitetty nahkanäytteelle 602435 tehdyn fragmenttianalyysin tulokset ennen ja jälkeen PCR-monistuksen lyhyillä alukkeilla II-Mito-12S-F ja II-Mito-12S-R. Samoin kuin edellisessä esimerkissä ennen PCR-monistusta saatu elektroferogrammin piikki on leveämpi kuin PCR-monistuksen jälkeen saatu piikki. Ennen PCR-monistusta tehdyn fragmenttianalyysin fragmentti on noin 400 bp:n ja PCR-monistuksen jälkeen saatiin noin 200 bp:n kokoinen fragmentti. Lyhyillä alukkeilla tehdyistä PCR-reaktioista saatiin pidempiä fragmentteja kuin pitkillä alukkeilla tehdyillä PCR-reaktioilla, vaikka pitkien alukkeiden pitäisi tuottaa pitkiä fragmentteja. Nahkanäytteiden DNA oli vanhaa ja osaksi hajonnutta. Pitkille alukkeille ei todennäköisesti löytynyt tarpeeksi pitkää templaatti-DNA:n fragmenttia monistettavaksi. Tähän PCR-reaktioon olisi jatkossa suositeltavaa tehdä alukkeiden optimointia.



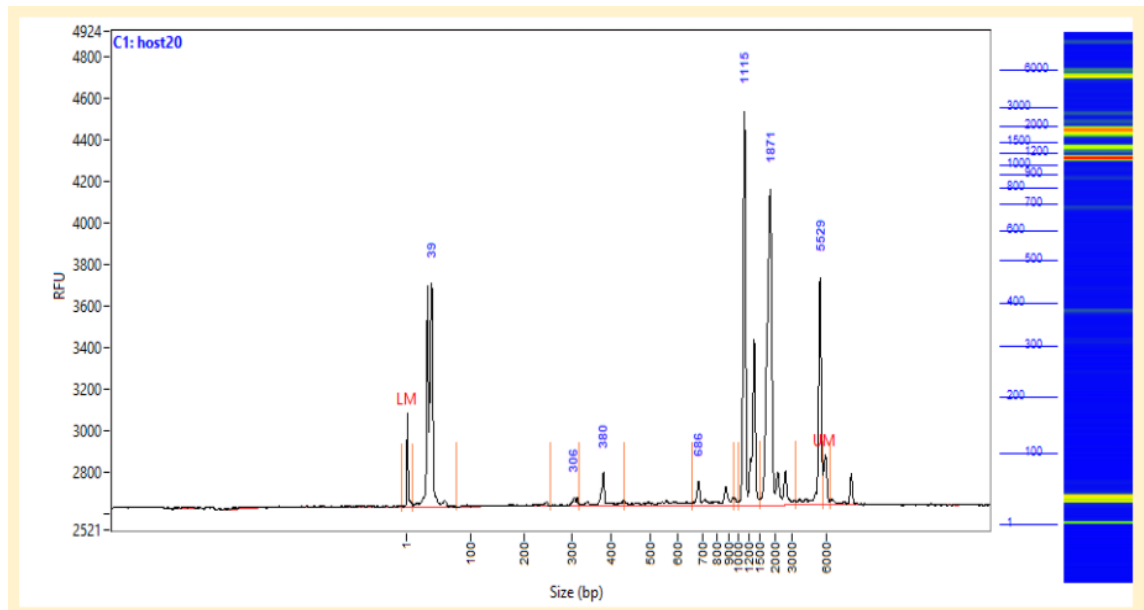
Kuva 16. Nahkänäytteelle 602435 tehdyn fragmenttianalyysin tulokset ennen ja jälkeen PCR-monistuksen lyhyillä alukkeilla.

Kuvassa 17 on esitetty ulostenäytteestä 20 eristetyn isäntä-DNA:n PCR-tuotteen fragmenttianalyysi. Tälle näytteelle tehtiin PCR-monistus pitkillä alukkeilla. Näyte oli nimetty väärin mikrobi-DNA:ksi, koska putket oli merkitty väärin eristysvaiheessa. Näytteessä on monia fragmentteja, mikä saattaa johtua mikrobi-DNA:n jäämistä. Isäntä DNA:lle ei tehty fragmenttianalyysiä ennen PCR-monistusta.



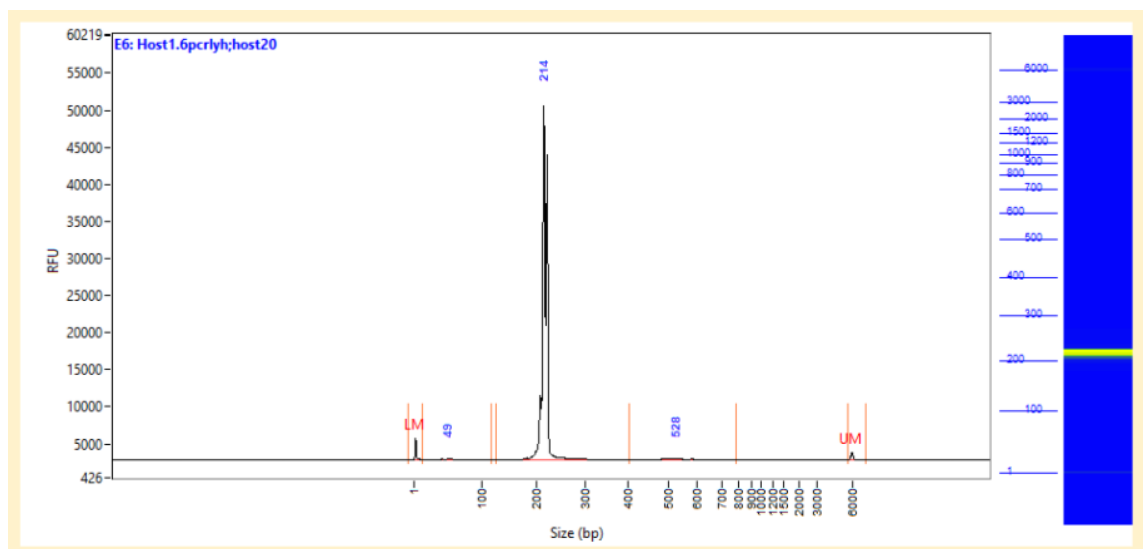
Kuva 17. Kuvassa on esimerkki isäntä-DNA:n PCR-tuotteen fragmenttianalyysin tuloksista. Näyte oli nimetty väärin mikrobi-DNA:ksi, koska putket oli merkitty väärin eristysvaiheessa.

Kuvassa 18 on esitetty esimerkki isäntä DNA:sta erotellun mikrobi-DNA:n PCR-tuotteen fragmenttianalyysistä. Näytteessä on monia fragmentteja, koska näytteessä on pääasiassa mikrobi-DNA:ta ja todennäköisesti hieman isäntä-DNA:ta. Suurin osa fragmenteista on noin 1000 bp:n kokoisia, joka vastaa pitkien alukkeiden ideaaliolosuhteissa tuottamaa fragmenttikokoa.



Kuva 18. Kuvassa on esimerkki isäntä DNA:sta erotellun mikrobi DNA:n PCR-tuotteen fragmenttianalysistä. Näyte oli nimetty väärin isäntä (host)-DNA:ksi, koska putket oli merkitty väärin eristysvaiheessa.

Kuvassa 19 on esitetty esimerkki ulostenäytteestä 20 eristetyn isäntä-DNA:n lyhyillä alukkeilla monistetusta PCR-tuotteesta. Fragmentteja on vain yksi, joka on noin 200 bp:n kokoinen. Joissakin samoilla alukkeilla monistetuissa näytteissä näkyy muitakin fragmentteja, mutta kaikista vahvin fragmentti on noin 200 bp:n kokoinen.

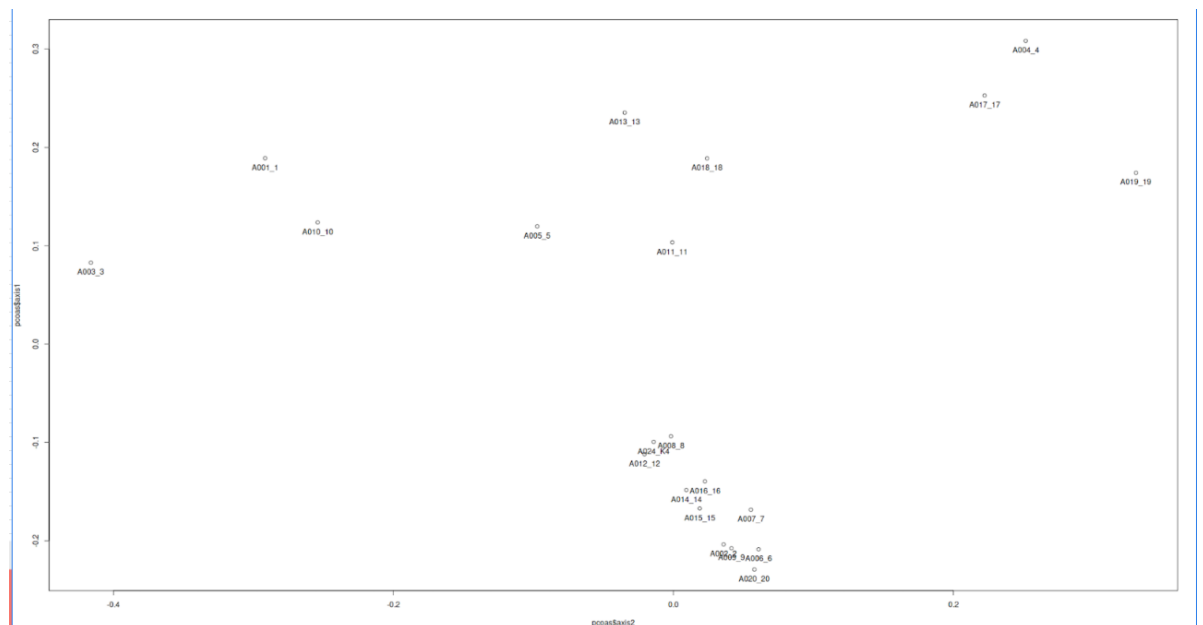


Kuva 19. Esimerkki ulostenäytteestä 20 eristetyn isäntä-DNA:n lyhyillä alukkeilla monistetusta PCR-tuotteesta.

Osa fragmenttianalyyseistä ei tuottanut tulosta, mikä joutuu todennäköisesti PCR-monistuksen epäonnistumisesta, mikä taas johtuu eristetyn DNA:n huonosta laadusta. Useissa näytteissä näkyy useita eri fragmenttikokoja, mikä todennäköisesti johtuu kontaminaatiosta tai epätarkasta PCR-monistamisesta.

4.6 Sanger- ja NGS-sekvensointi

Nahkänäytteiden ja isäntä-DNA:n PCR-monistus tuotteet sekvensoitiin Sanger-sekvensoinnilla. 16S-rDNA-PCR-tuotteet sekvensoitiin näytepoolina MiSeq-laitteella. Monia sekvensointeja ei ole ehditty analysoidaan. Yleisesti sekvensointidataa on saatu kaikista sekvensointiajoista, mutta sekvensseissä oli päällekkäisyyksiä ja sekvenssien laatu oli vaihtelevaa. Näytteissä oli myös kontaminaatioita. Ainakin yksi näyte tunnistettiin ihmisen DNA:ksi. Näytteistä tunnistettiin myös tamaanilajeja: puutamaanilajit *Dendrohyrax dorsalis* ja *Dendrohyrax interfluvialis* ja kalliotamaani *Procavia capensis*. Osa 16S-rDNA sekvensoinnin tuloksista on esitetty kuvassa 20. Tulosanalyysin suorittivat bioinformaatikot Xueyun Feng ja Pia Laine.



Kuva 20. Kuvassa on esitetty 16S-rDNA-geenien sekvensoinnilla määritetyn mikrobikannan samankaltaisuutta kuvaava kuvaaja.

Kuvassa 20 on esitetty 16S-rDNA-geenien sekvensoinnilla määritetyn mikrobikannan samankaltaisuutta kuvaava kuvaaja. Näytteet oli nimetty uudelleen sekvenssianalyysijä varten. Kuvaajan alareunassa olevat näytteet ovat tulleet eläintarhoista. Eläintarhoissa eläimille annetaan tietynlaista ruokaa ja usein samanlaista ruokaa tietyille eläinlajeille. Kuvaajasta näkee selvästi, että samanlainen ravinto eri yksilöillä ylläpitää samankaltaista suoliston mikrobiomia. Yläreunassa olevat hajaantuneet näytteet ovat suurelta osin Taitan sademetsistä haettuja näytteitä.

5. Yhteenveto ja pohdintaa

Projektissa eristettiin DNA:ta tamaanien uloste- ja nahkanäytteistä. DNA:sta monistettiin 16S-rDNA-geenit ja mitokondriaalista DNA:ta spesifisillä alukkeilla käyttäen PCR-tekniikkaa. DNA:sta kerättiin laadullista tietoa konsentraatiosta, puhtaudesta ja fragmenttien koosta työn monissa vaiheissa. Työn tavoitteena oli tuottaa sekvensoitavaa DNA:ta ja kerätä siitä laadullista tietoa.

Ulostenäytteistä eristettiin kokonais-DNA kaksi kertaa PSP® Spin Stool DNA-kitillä. Ensimmäisen eristyksen DNA:ta käytettiin 16S-rDNA:n monistamiseen ja 16S-rDNA-geenien sekvensoimiseen. Myöhemmin kokonais-DNA eristettiin "isännän" eli alkuperäisen eläimen (Host) DNA:n erottelukseen bakteerien DNA:sta. Ulostenäytteistä eristetystä DNA:sta monistettiin 16S-rDNA-geeni kaksivaiheisella PCR-ohjelmalla. Ensimmäisen ja toisen PCR-reaktion välissä tehtiin ExoSAP-puhdistus. 16S-rDNA-PCR-reaktiotuotteet sekvensoitiin Illuminan MiSeq -laitteella. Isäntä-DNA ja nahkanäytteiden PCR-tuotteet sekvensoitiin Sanger-sekvensoinnilla.

Ulostenäytteistä eritetystä kokonais-DNA:sta erotettiin bakteerien DNA tamaanin DNA:sta NEBNext Microbiome DNA Enrichment -kitillä. Kyseinen kitti on suunniteltu bakteerien DNA:n rikastamiseen isäntä-DNA:sta, mutta tässä työssä sitä käytettiin "väärinpäin" isännän DNA:n rikastamiseen. Isäntä-DNA:sta monistettiin mitokondriaalista DNA:ta PCR-tekniikalla pitkällä ja lyhyillä alukkeilla. PCR-tuotteet sekvensoitiin sanger-sekvensoinnilla. Isäntä-DNA:ta

monistettiin lyhyillä alukkeilla, että sekvensoinnista saataisiin nahkanäytteiden kanssa vertailtavia sekvenssejä. Nahkanäytteistä eristettiin DNA NucleoMag® Tissue -kitillä. Eristetystä DNA:sta monistettiin mitokondriaalista DNA:ta PCR-tekniikalla.

Kaikista ulostenäytteistä onnistuttiin eristämään DNA:ta, mutta joistakin näytteistä saatiin selvästi vähemmän DNA:ta kuin toisista. Näytteet oli kerätty eri tamaaniyksilöiltä eläintarhoista ja niiden luonnollisista elinympäristöistä, mikä vaikuttaa tamaanien suolistobiomiin ja suoliston terveydentilaan. Suoliston terveys voi siis vaikuttaa näytteistä saatavan DNA:n määrään ja laatuun. Kokonais-DNA:n eristyksistä saadut DNA-pitoisuudet olivat todella vaihtelevia noin 30 - 3200 ng/μl. Molempien kokonais-DNA:n eristyksien DNA:n puhtaus oli (260A/280A) suhdelukuna 1,8 - 2,0. Isäntä-DNA:n erotellun DNA:n konsentraatiot olivat 1,3 - 3,1 ng/μl. Isäntä-DNA:ta varten tehdyissä kokonais-DNA:n eristyksissä näytteisiin jouduttiin lisäämään DNA-tasapainotusliuosta, että ulosteesta saataisiin näyte. DNA-tasapainotusliuoksen lisääminen laimensi todennäköisesti näytteitä hieman, mutta kaikista näytteistä saatiin DNA:ta jatkoanalyysiin. Isäntä-DNA:n erotteluprotokollassa oli monia vaiheita, joista viimeisin oli magneettinen puhdistusvaihe. Puhdistusvaihe alensi todennäköisesti DNA:n konsentraatiota. Isäntä-DNA eroteltiin bakteerien DNA:sta laboratorion pöydällä, mikä on todennäköisesti altistanut näytteet kontaminaatioille. Ainakin yksi näyte tunnistettiin sekvensoinnissa ihmisen DNA:ksi. Kontaminaatio tapahtui todennäköisesti isäntä-DNA:n erotteluvaiheessa, koska se suoritettiin laboratorion pöydällä ilman suojausta kuten laminaarikaappia.

16S-rDNA-PCR-tuotteiden geelianalyysi onnistui, ja tuotteet olivat noin 600 emäs- parin kokoisia, eikä geelikuvassa näkynyt kontaminantteja tai alukkeiden jäämiä. Fragmenttianalyysit onnistuivat vaihtelevasti, koska PCR-monistuksista ei saatu oikeita tuotteita tai monistus ei ollut muuten onnistunut.

Fragmenttianalyysin suurimmat ongelmat olivat pitkällä alukkeilla tehdyt nahkanäytteet, niiden PCR-reaktiotuotteet ja isäntä-DNA:n PCR-reaktiotuotteet.

Lyhyillä alukkeilla fragmenttianalyysistä saatiin aina näkyviin yksi tai useampi DNA-fragmentti.

Nahkanäytteistä saatiin eristettyä DNA:ta 0,4 - 50 ng/μl. Osassa nahkanäytteistä oli paljon karvaa, joka ei liuennut ollenkaan näytteen hajotuksen aikana ja osassa oli niin pieni pala nahkaa, että se jouduttiin käyttämään kokonaan. Nahkanäytteet olivat noin sata vuotta vanhoja ja kuivattuja. DNA ei usein säily hyvin kuivassa. Nahkanäytteiden DNA oli kuivumisen ja DNA:n vanhuuden takia fragmentoitunutta, ja niiden PCR-reaktioihin tarvittiin lyhyemmät alukkeet kuin muihin näytteisiin. Pitkille alukkeille ei todennäköisesti löytynyt tarpeeksi pitkää templaatti-DNA:n fragmenttia monistettavaksi. Heikkojen PCR-monistuksen takia nahkanäytteiden pitkillä alukkeilla tehtyjä PCR-tuotteita ei sekvensoitu. Tähän PCR-reaktioon olisi jatkossa suositeltavaa tehdä alukkeiden optimointia.

Nahkanäytteiden ja isäntä-DNA:n PCR-monistustuotteet sekvensoitiin Sanger-sekvensoinnilla. 16S-rDNA PCR-tuotteet sekvensoitiin näytepoolina MiSeq-laitteella. Monia sekvensointeja ei ole ehditty analysoimaan. Yleisesti sekvensointidataa on saatu kaikista sekvensointiajoista, mutta sekvensseissä oli päällekkäisyyksiä ja sekvenssien laatu oli vaihtelevaa. 16S-rDNA-geenien sekvenointi oli ehditty analysoimaan, ja tällöin voitiin nähdä tamaanien ravinnon samankaltaisuuden ylläpitävän samankaltaista suolistobiomia.

Työssä onnistuttiin tuottamaan sekvensoitavaa DNA:ta ja siitä kerättiin laadullista tietoa. Työstä kerättyä tietoa käytetään tieteellisen artikkelin kirjoittamiseen. Sekvenssianalyysien valmistuttua tietoa toivotaan pystyttävän käyttämään tamaanilajien erottelussa ja suojelutyössä.

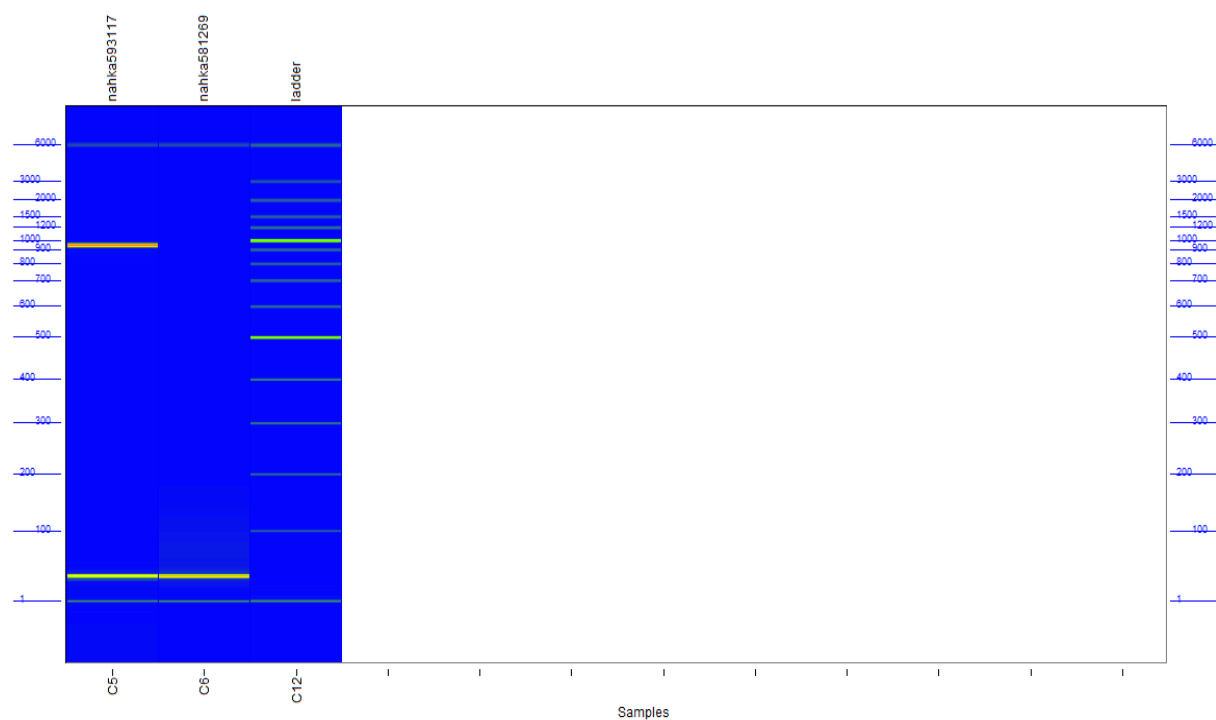
Lähteet

1. Rosti, Hanna. 4.4.2022. Hyrax species. Verkkoaineisto.
<<https://animalstaita.com/category/tree-hyrax/>> Luettu 14.6.2022
2. Rosti, Hanna. 16.4.2022. Habitat preferences, estimated abundance and behavior of tree hyrax (*Dendrohyrax* sp.) in fragmented montane forests of Taita Hills, Kenya. Verkkoaineisto.
<<https://animalstaita.com/2022/04/16/habitat-preferences-estimated-abundance-and-behavior-of-tree-hyrax-dendrohyrax-sp-in-fragmented-montane-forests-of-taita-hills-kenya/>> Luettu 14.6.2022
3. Solunetti. Nukleiinihappojen monistaminen. 2006. Verkkoaineisto.
<https://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/nukleiinihappojen_monistaminen/2/> Luettu 20.6.2022
4. Aryal, Sagar. 10.8.2022. Polymerase Chain Reaction (PCR)- Principle, Procedure, Types, Applications and Animation. Verkkoaineisto. Mikrobiologyinfo. <<https://microbiologyinfo.com/polymerase-chain-reaction-pcr-principle-procedure-types-applications-and-animation/>> Luettu 20.6.2022
5. Bosterbio. PCR Principle. Verkkoaineisto.
<<https://www.bosterbio.com/protocol-and-troubleshooting/pcr-principle>> Luettu 20.6.2022
6. cdadmin. 17.10.2018. 16S rRNA, One of the Most Important rRNAs. Verkkoaineisto. CD-Genomics. <<https://www.cd-genomics.com/blog/16S-rDNA-one-of-the-most-important-rnas/>> Luettu 14.7.2022

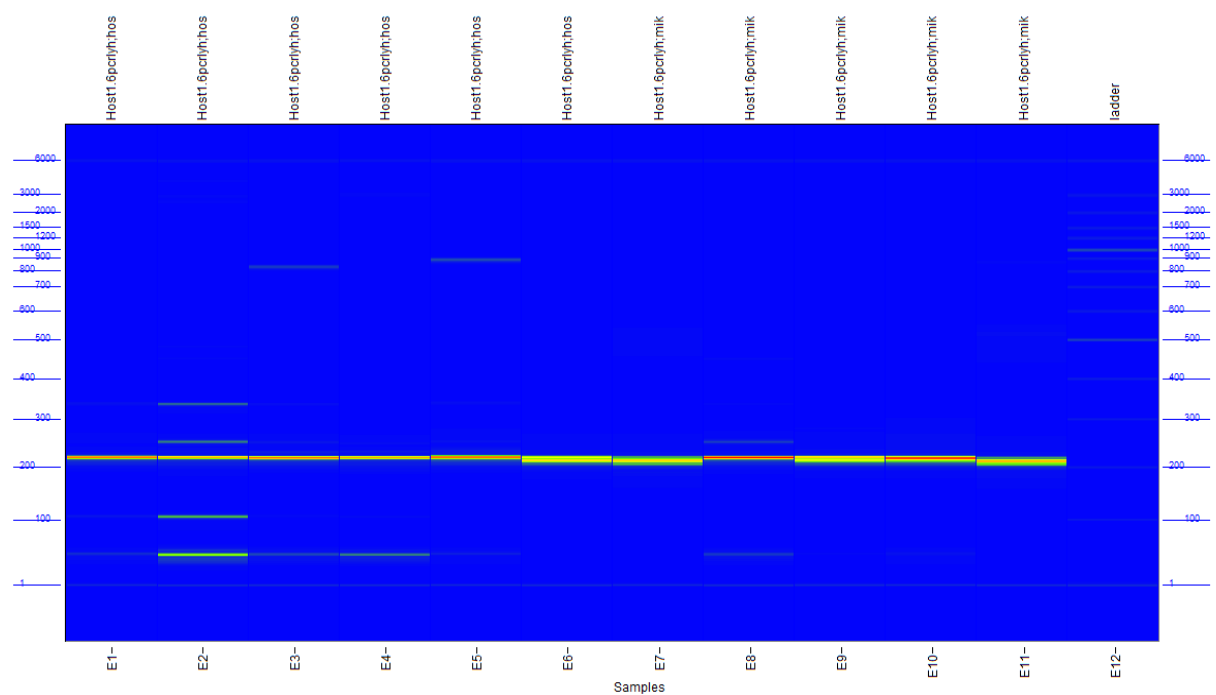
7. García-López, M-L. & Rodríguez-Calleja, J.M. 2014. Psychroobakter. Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition).
<<https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/16s-ribosomal-rna>>
Luettu 14.7.2022
8. LC Sciences. Microbiome Analysis. Verkkoaineisto.
<<https://lcsciences.com/services/dna-sequencing/16S-rDNA-gene-sequencing/microbiome-analysis/>> Luettu 15.7.2022
9. Siltanen, Sanna. 22.10.2018. Blogikirjoitussarja: NGS-perusteet, osa 4. Verkkoaineisto. Immunodiagnostic.
<<https://www.immunodiagnostic.fi/blogikirjoitussarja-ngs-perusteet-osa-4/>> Luettu 1.8.2022
10. Ervasti Sanna. 9.9.2019. Opinnäytetyö. Verkkoaineisto. Theseus.
<<https://urn.fi/URN:NBN:fi:amk-2019091018331>> Luettu 1.8.2022
11. Fimm. ExoSAP-IT. Verkkoaineisto.
<https://www.fimm.fi/sites/default/files/SeqLab_Exosap_USB.pdf> Luettu 22.7.2022
12. Agilent. 5.11.2018. Fragment Analyzer. Verkkoaineisto. Genlabperu.
<<https://genlabperu.com/wp-content/uploads/2019/03/fragment-analyzer-brochure.pdf>> Luettu 15.7.2022
13. Agilent. Fragment Analyzer Systems Capillary Arrays. Verkkoaineisto. Agilent. <<https://www.agilent.com/en/product/automated-electrophoresis/fragment-analyzer-systems>> Luettu 15.7.2022
14. Gane, Andrew. 29.5.2019. Magbeads 101: A guide to choosing and using magnetic beads. Verkkoaineisto. Cytiva.
<<https://www.cytivalifesciences.com/en/us/news-center/magnetic-beads-a-simple-guide-10001>> Luettu 10.7.2022

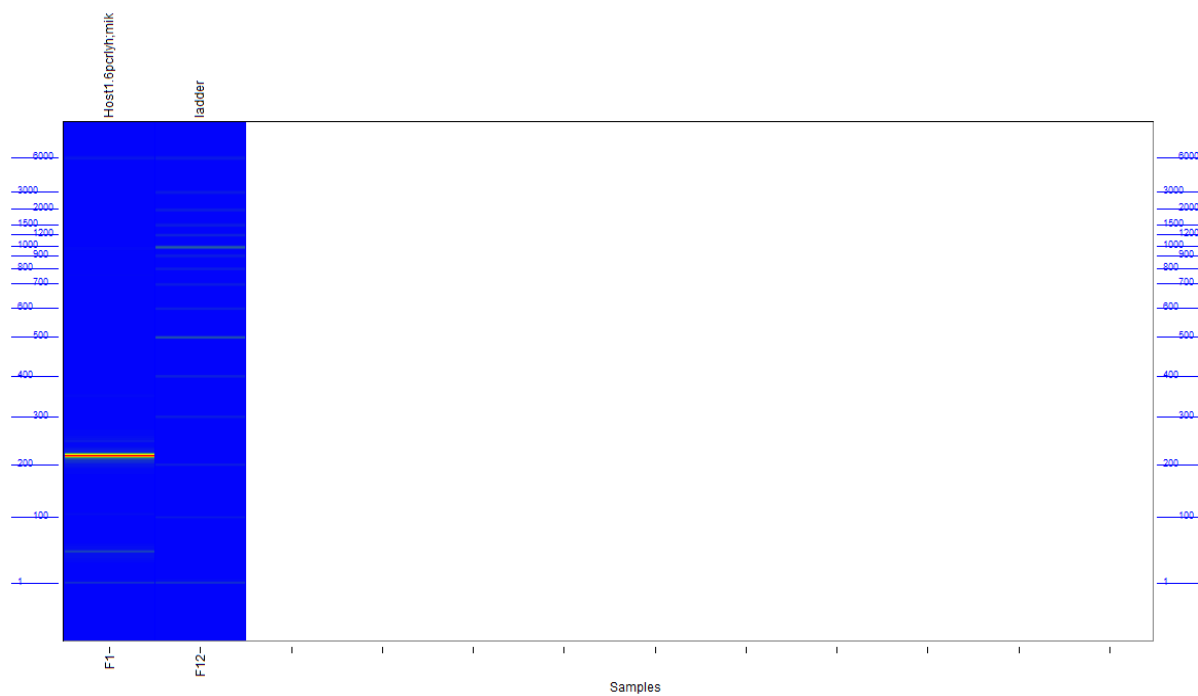
15. Gkazi, Athina. 17.3.2021. An Overview of Next-Generation Sequencing. Verkkoaineisto. Technology Networks.
<<https://www.technologynetworks.com/genomics/articles/an-overview-of-next-generation-sequencing-346532>> Päivitetty 4.5.2022. Luettu 3.7.2022
16. Illumina. 6.10.2016. Illumina Sequencing by Synthesis. Verkkoaineisto. Youtube. <<https://www.youtube.com/watch?v=fCd6B5HRaZ8>> Luettu 3.7.2022
17. FitzGerald, Peter ja Tillo, Desiree. 2020. Sequencing instruments. Verkkoaineisto. <https://btep.ccr.cancer.gov/wp-content/uploads/BIOSTAR_SequencingInstruments_2020-DT.pdf> Luettu 11.8.2022.
18. Khan Academy. DNA sequencing. Verkkoaineisto.
<<https://www.khanacademy.org/science/ap-biology/gene-expression-and-regulation/biotechnology/a/dna-sequencing>> Luettu 29.6.2022
19. Thermo Fisher. What is Sanger sequencing? Verkkoaineisto.
<<https://www.thermofisher.com/fi/en/home/life-science/sequencing/sequencing-learning-center/capillary-electrophoresis-information/what-is-sanger-sequencing.html>> Luettu 29.6.2022
20. Kylätie, Riina & Kallio, Heini. 15.3.2016. Fragment Analyzer User Protocol. Verkkoaineisto. <<https://manualzz.com/doc/7492238/fragment-analyzer-user-protocol>> Luettu 13.8.2022
21. Magtivio. 24.1.2020. MagSi-NGS^{PREP} Plus (versio 2.0). Verkkoaineisto.
<https://www.magtivio.com/wp-content/uploads/2021/06/PM0006-002_MagSi-NGS-PREP_Plus.pdf> Luettu 21.7.2022

Fragmenttiansalysien tuloksia

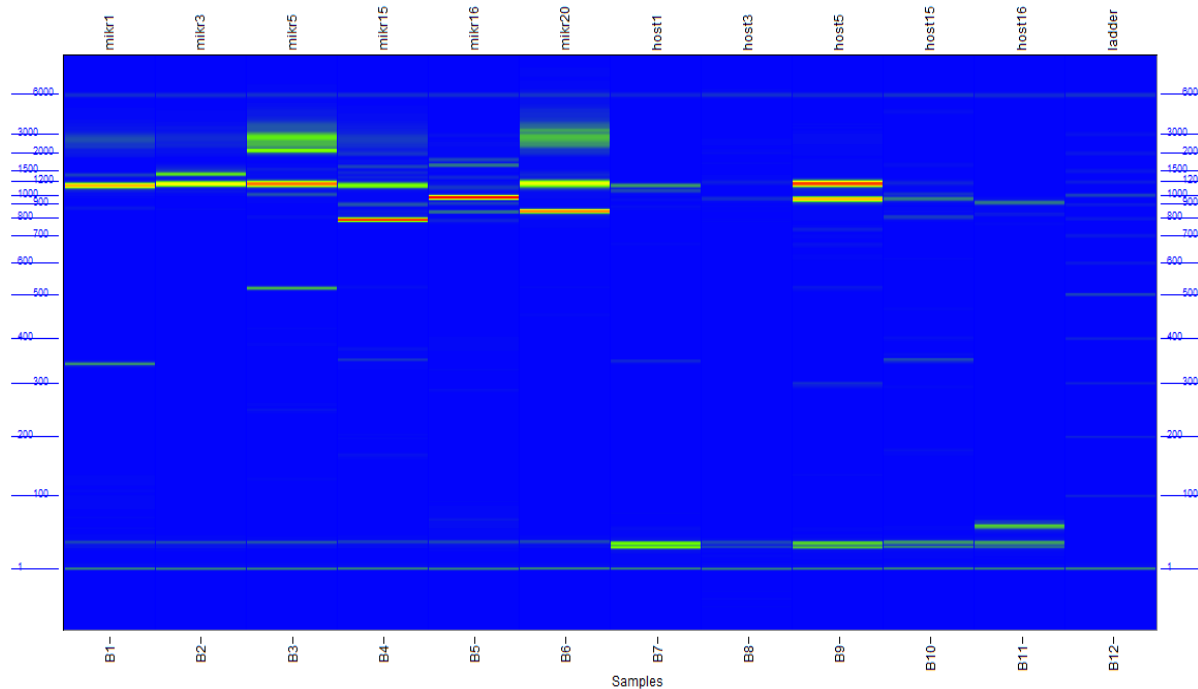


Yllä nahoista 593117 ja 581269 pitkällä alukkeilla tehtyjen PCR-tuotteiden fragmenttiansalysin geelikuva.

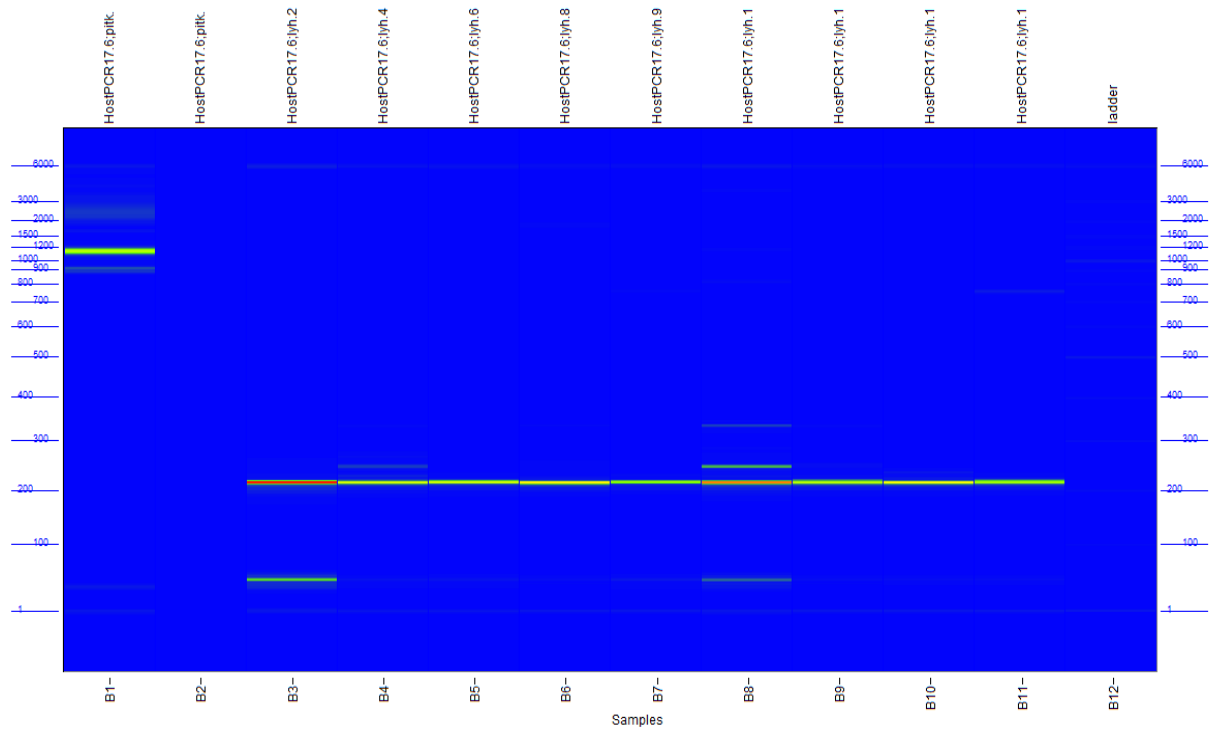
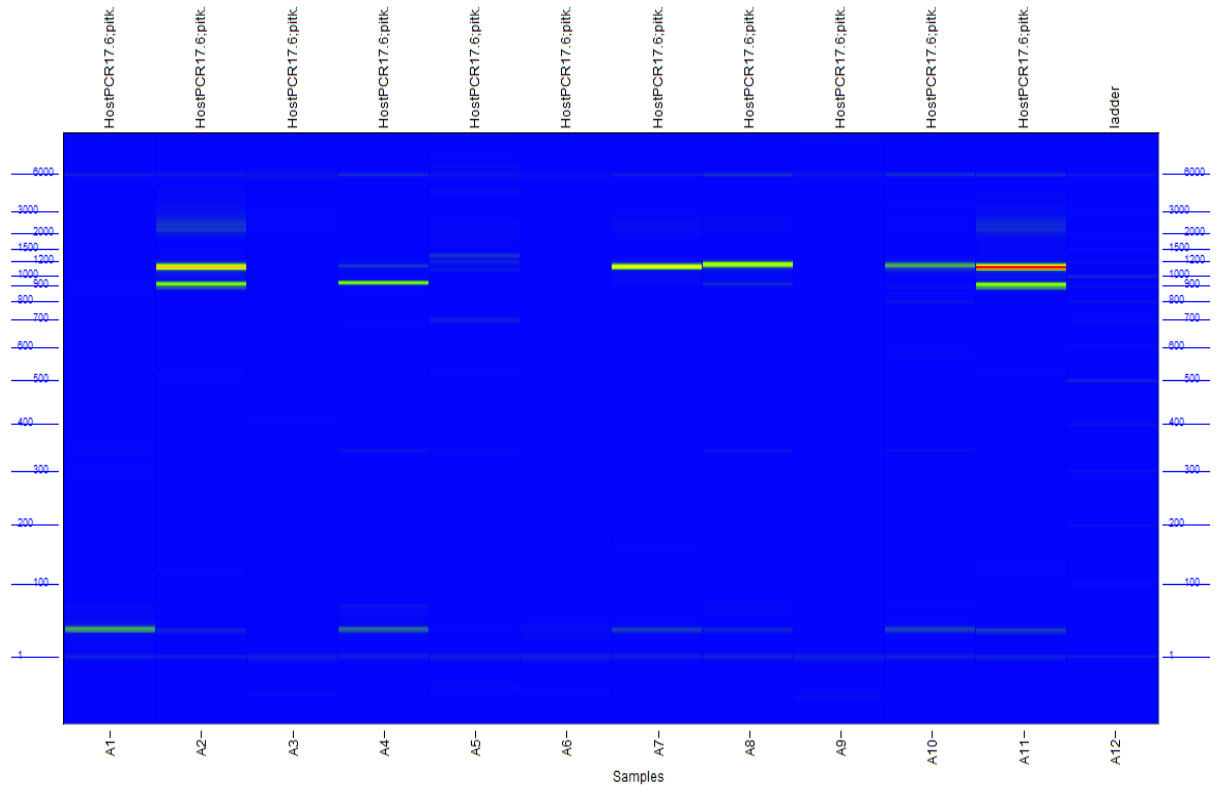


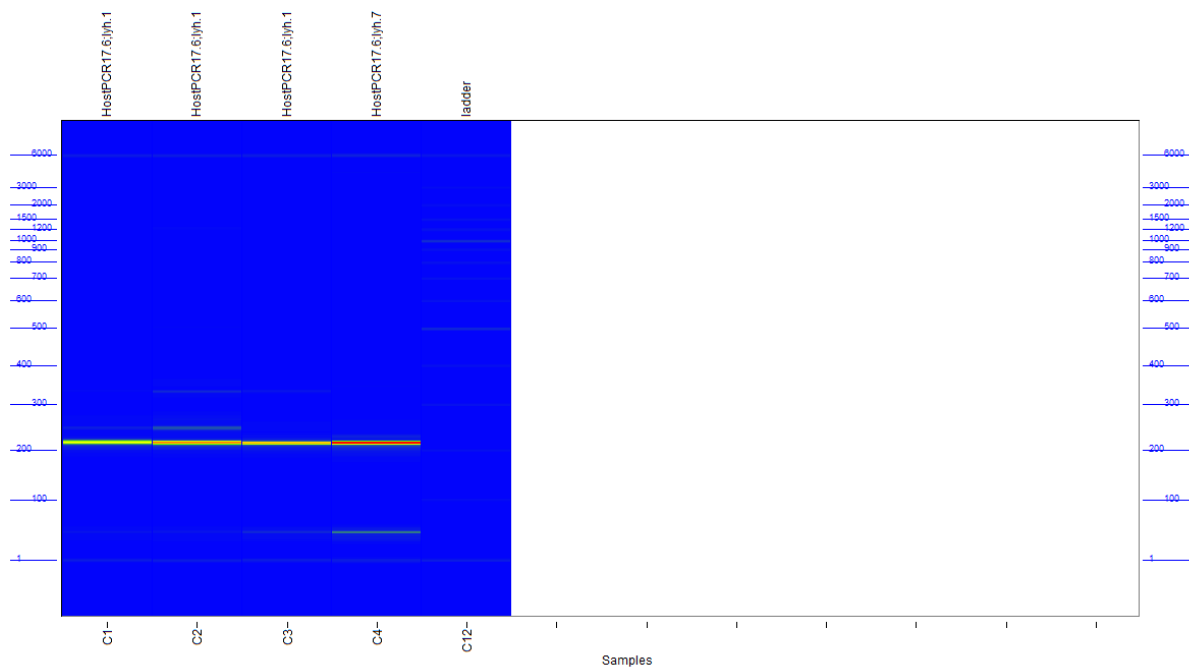


Yllä ulostenäytteistä 1, 3, 5, 15, 16 ja 20 erotellun isäntä-DNA:n (host) ja mikrobien (mik) lyhyillä alukkeilla tehtyjen PCR-tuotteiden fragmenttianalysien geelikuvat.

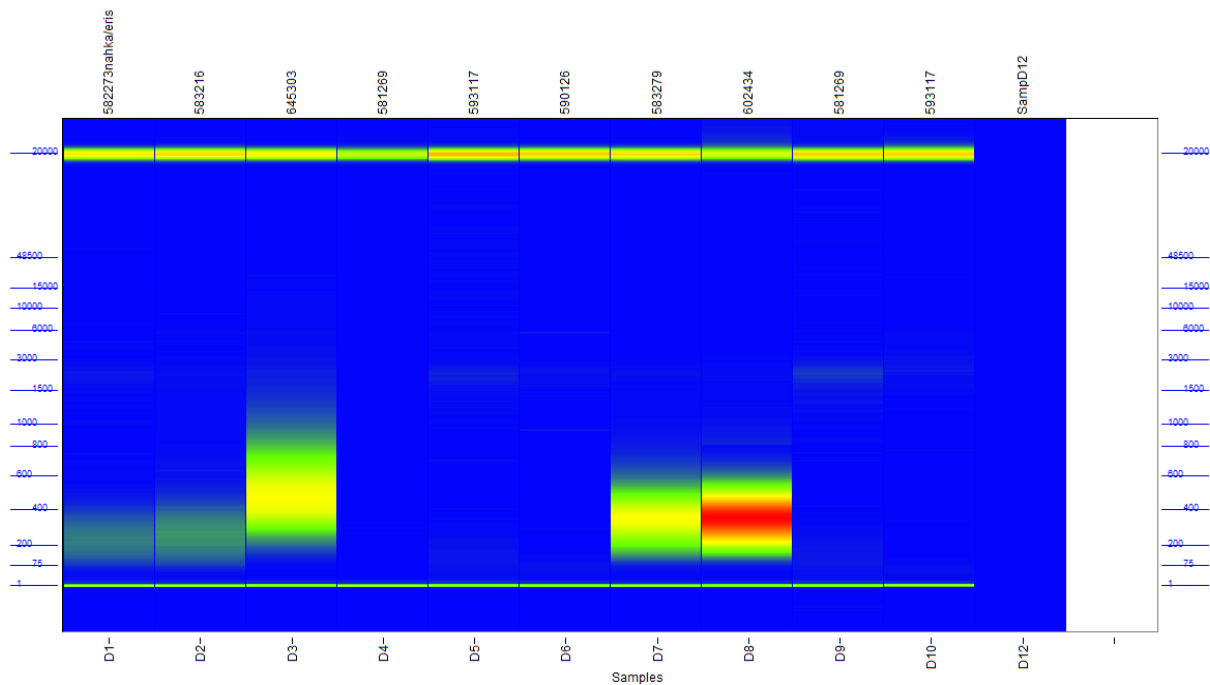


Yllä ulostenäytteiden 1, 3, 5, 15, 16 ja 20 erotellun isäntä-DNA:n (host) ja mikrobien (mik) pitkällä alukkeilla tehtyjen PCR-tuotteiden fragmenttianalysin geelikuva.

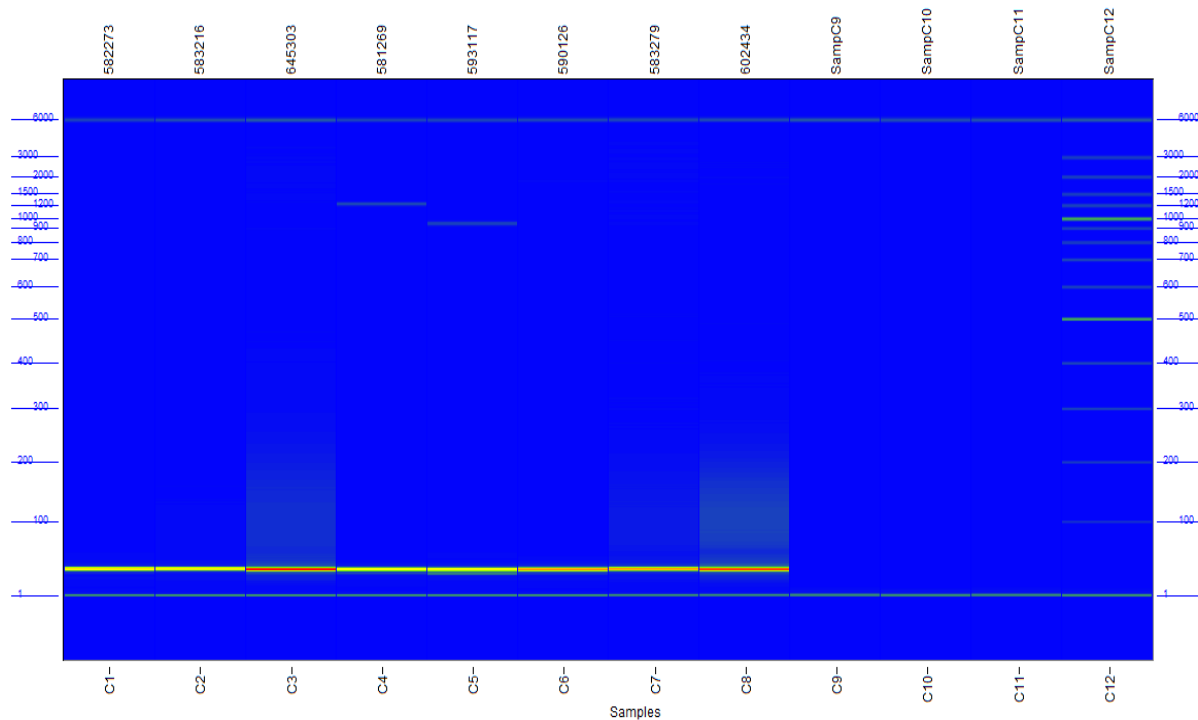




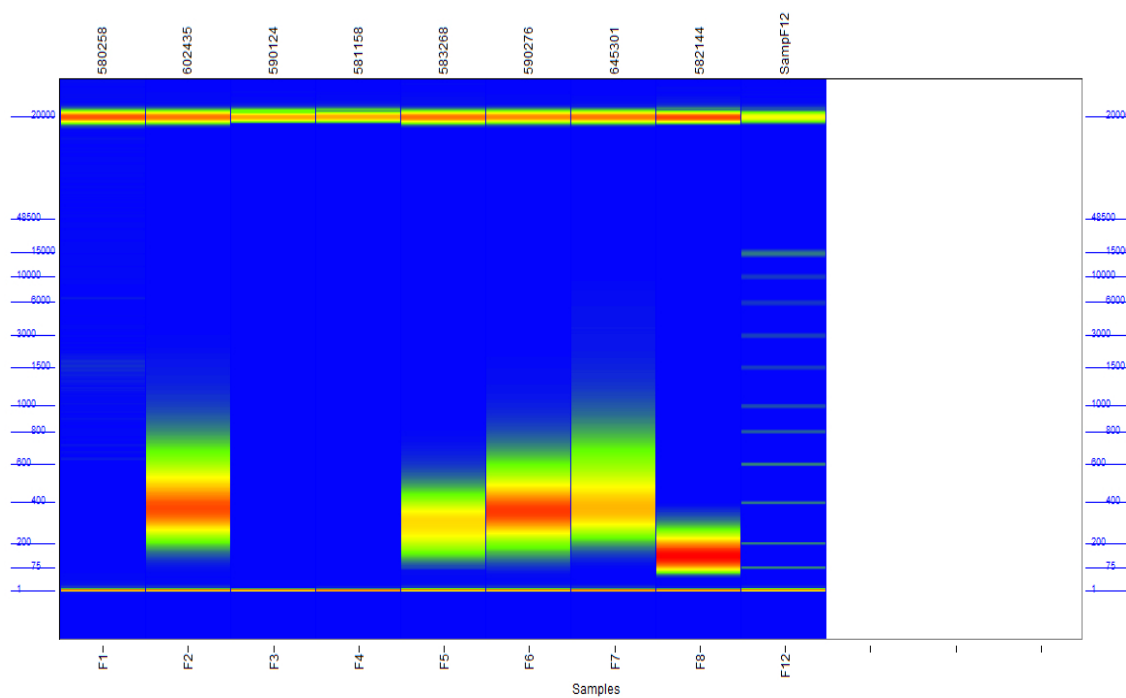
Yllä on ulostenäytteiden 2, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 17, 18 ja 19 erotellun isäntä-DNA:n pitkillä ja lyhyillä alukkeilla tehtyjen PCR-reaktiotuotteiden fragmenttianalyysit. Ensimmäisessä kuvassa on vain pitkillä alukkeilla tehtyjen PCR:ien analyysi, toisessa kuvassa alkaa lyhyiden alukkeiden PCR-tuotteet.



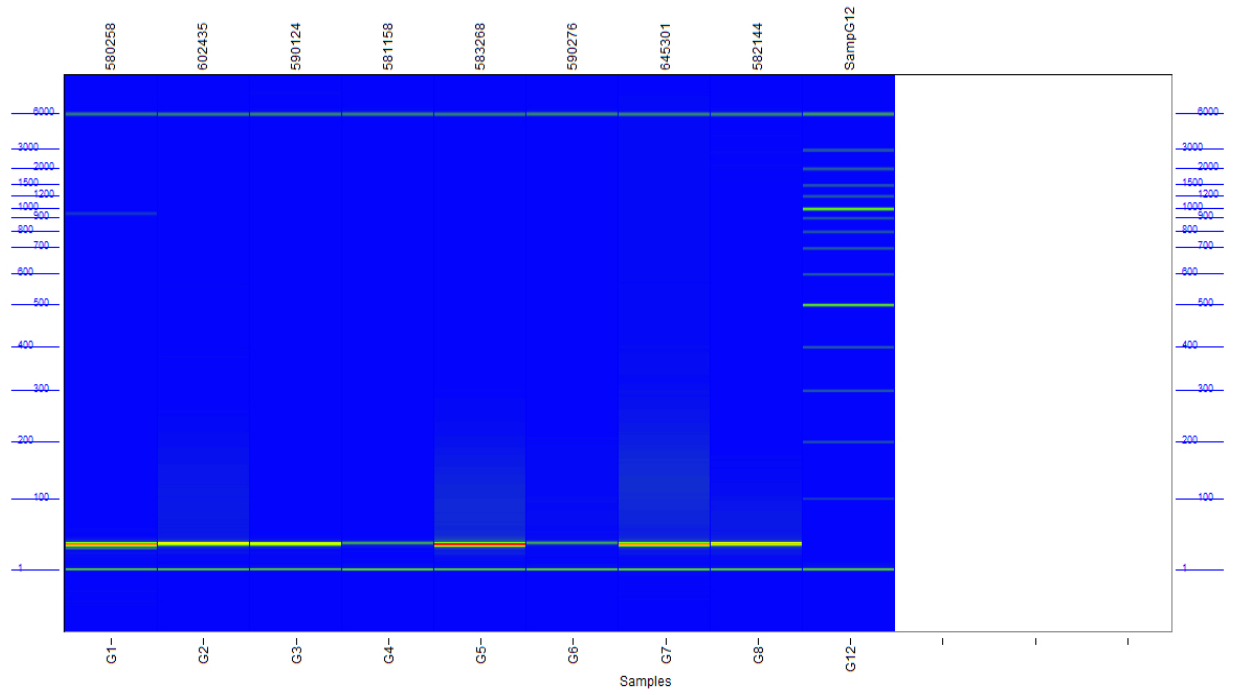
Yllä toisen erän nahkanäytteiden ja 1. erän nahkanäytteiden eristysien fragmenttianalyysien geelikuva.



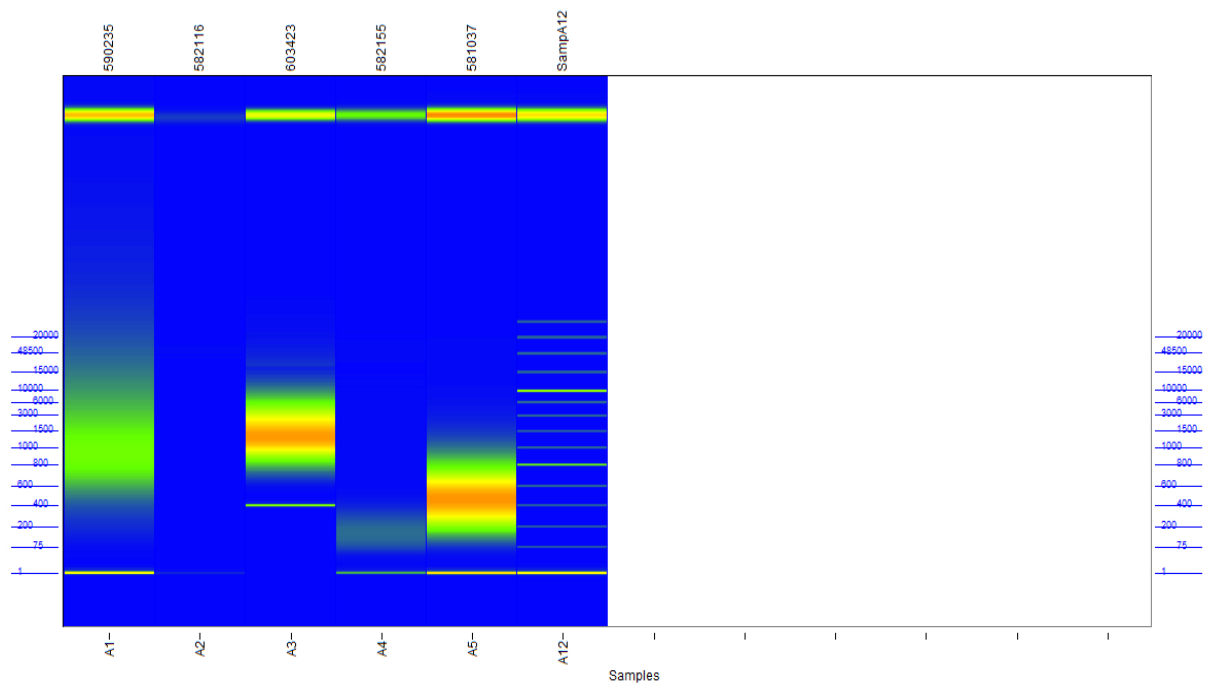
Yllä toisen erän pitkillä alukkeilla tehtyjen PCR-reaktiotuotteiden fragmenttianalyysin geelikuva.



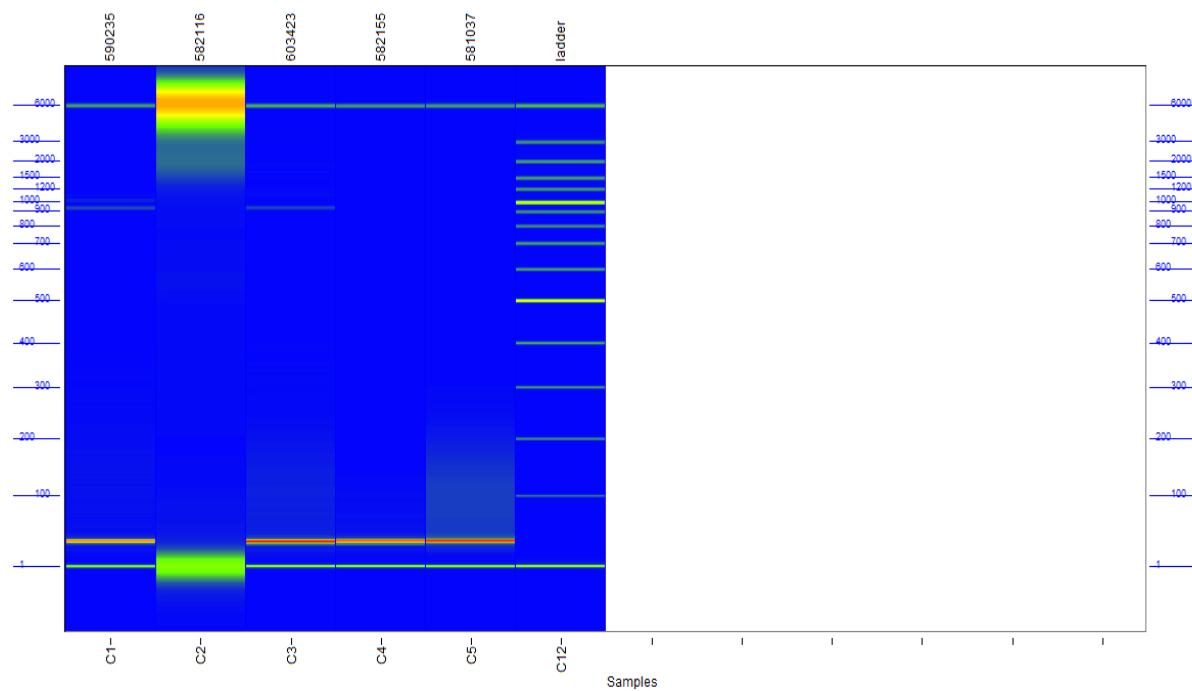
Yllä kolmannen erän nahkanäytteiden eristyksien fragmenttianalyysin geelikuva.



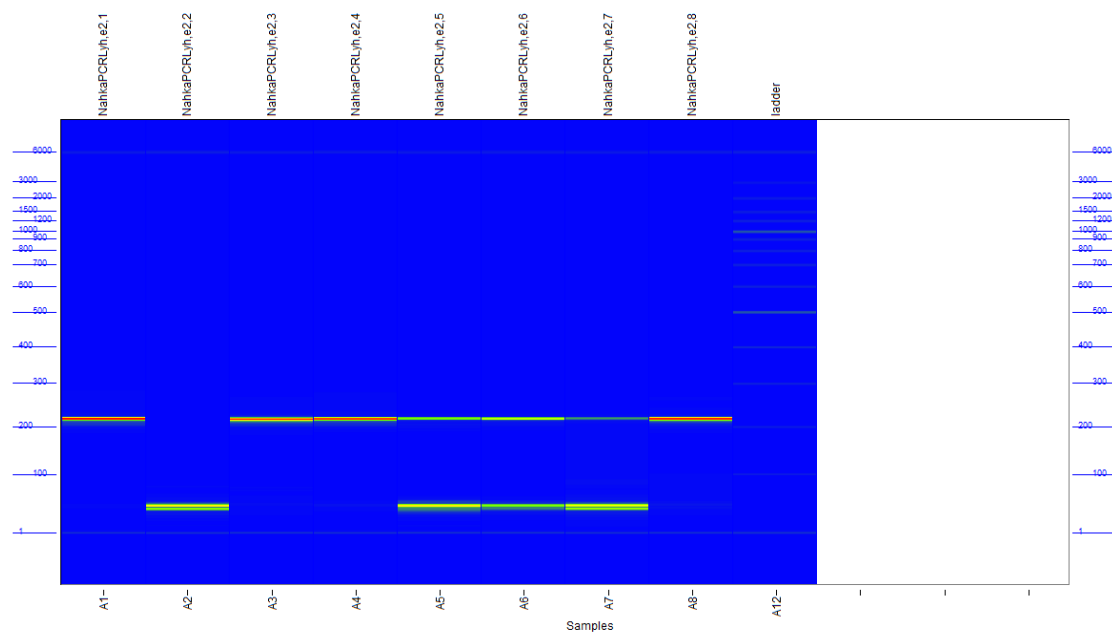
Yllä kolmannen erän nahkänäytteiden pitkillä alukkeilla tehtyjen PCR-reaktiotuotteiden fragmenttianalyysin geelikuva.



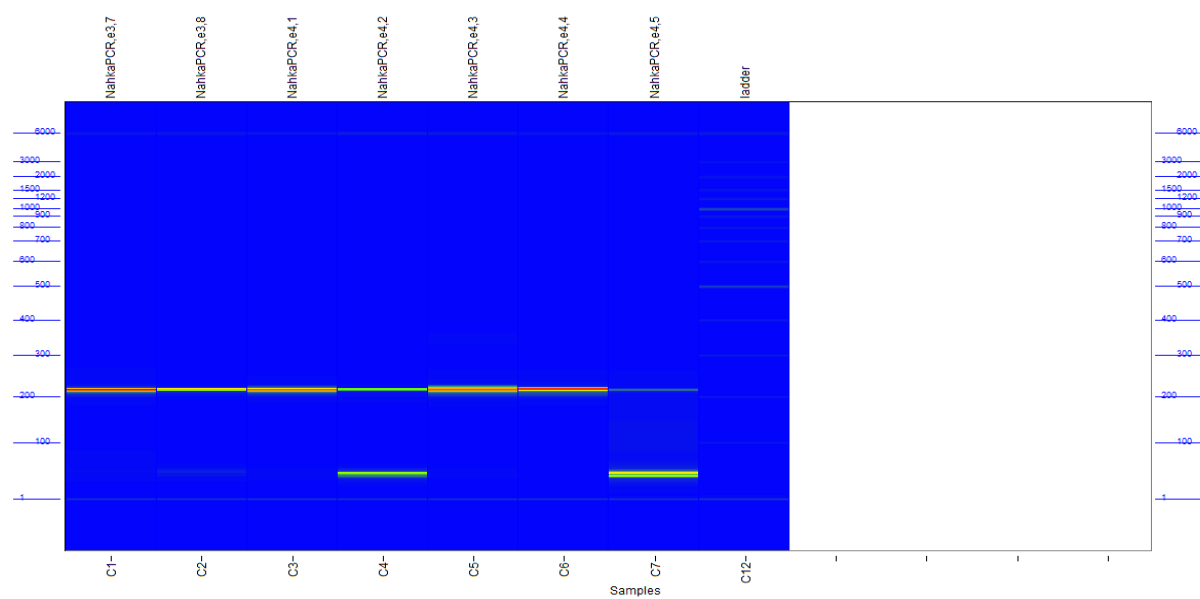
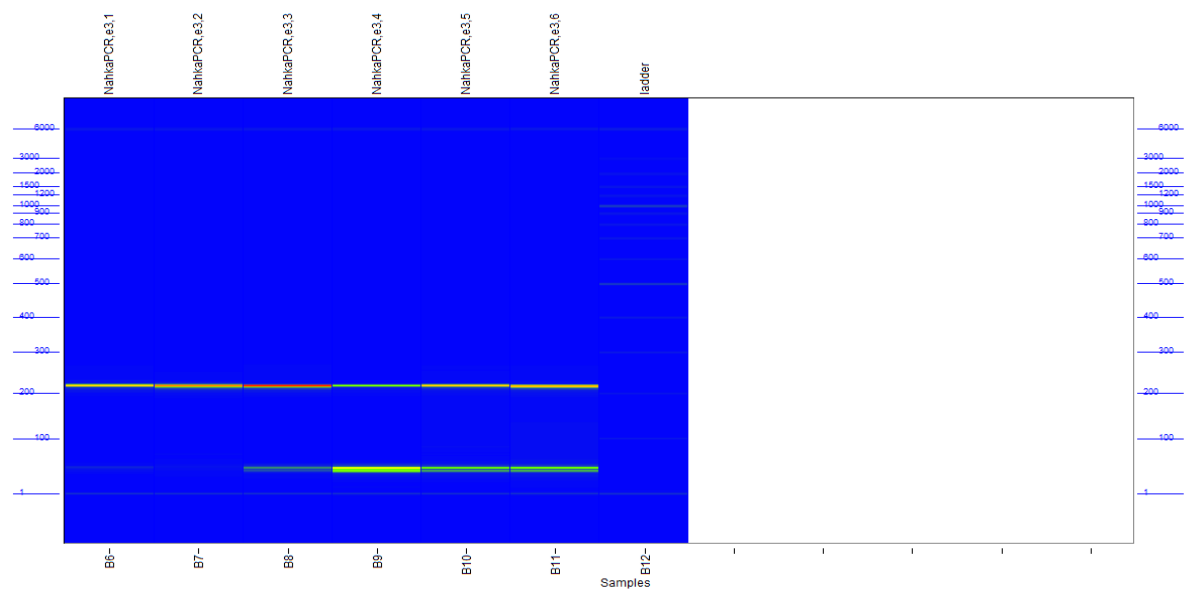
Yllä neljännen erän nahkänäytteiden eristysten fragmenttianalyysin geelikuva.



Yllä neljännen erän nahkanäytteiden pitkällä alukkeilla tehtyjen PCR-reaktiotuotteiden fragmenttianalyysin geelikuva.



Yllä toisen erän 1–8 nahkanäytteiden lyhyillä alukkeilla tehtyjen PCR-reaktiotuotteiden fragmenttianalyysin geelikuva.



Yllä kolmannen erän 1–8 ja neljännen erän 1–5 nahkanäytteiden lyhyillä alukkeilla tehtyjen PCR-reaktiotuotteiden fragmenttianalyysointien geelikuvat.

Kaksoisindeksialukkeiden tiedot ja sekvenssit

Sample	Label	Tube Name	P7 Index		P5 Index		Pooling µl
			Index	Sequence	Index	Sequence Mismatch	
1	2-Dec	DI-12_B01	Ind_8bp_010	GCTGAAGA	Ind_8bp_120	TGAGAGAA	5
2	4-Dec	DI-12_D01	Ind_8bp_010	GCTGAAGA	Ind_8bp_143	CTTGGTTA	5
3	11-Dec	DI-12_C02	Ind_8bp_015	TACTGCAG	Ind_8bp_131	GCACTCTG	5
4	13-Dec	DI-12_E02	Ind_8bp_015	TACTGCAG	Ind_8bp_169	CGTACACA	5
5	20-Dec	DI-12_D03	Ind_8bp_026	ACCTTGAA	Ind_8bp_143	CTTGGTTA	5
6	22-Dec	DI-12_F03	Ind_8bp_026	ACCTTGAA	Ind_8bp_171	TAGACGAC	5
7	29-Dec	DI-12_E04	Ind_8bp_027	GTGGTTCC	Ind_8bp_169	CGTACACA	5
8	31-Dec	DI-12_G04	Ind_8bp_027	GTGGTTCC	Ind_8bp_184	GTGTTCCG	5
9	Dec-38	DI-12_F05	Ind_8bp_029	CGACTGCT	Ind_8bp_171	TAGACGAC	5
10	Dec-40	DI-12_H05	Ind_8bp_029	CGACTGCT	Ind_8bp_192	ATCCCTGG	5
11	Dec-41	DI-12_A06	Ind_8bp_043	AGTAGAGG	Ind_8bp_111	AACTGACT	10
12	Dec-47	DI-12_G06	Ind_8bp_043	AGTAGAGG	Ind_8bp_184	GTGTTCCG	5
13	Dec-50	DI-12_B07	Ind_8bp_045	ATTACCGA	Ind_8bp_120	TGAGAGAA	5
14	Dec-56	DI-12_H07	Ind_8bp_045	ATTACCGA	Ind_8bp_192	ATCCCTGG	5
15	Dec-57	DI-12_A08	Ind_8bp_051	CTAGGATT	Ind_8bp_111	AACTGACT	5
16	Dec-59	DI-12_C08	Ind_8bp_051	CTAGGATT	Ind_8bp_131	GCACTCTG	5
17	Dec-66	DI-12_B09	Ind_8bp_061	TTGCATGT	Ind_8bp_120	TGAGAGAA	5
18	Dec-68	DI-12_D09	Ind_8bp_061	TTGCATGT	Ind_8bp_143	CTTGGTTA	5
19	Dec-75	DI-12_C10	Ind_8bp_066	CACTCTCC	Ind_8bp_131	GCACTCTG	5
20	Dec-77	DI-12_E10	Ind_8bp_066	CACTCTCC	Ind_8bp_169	CGTACACA	5
K1	Dec-84	DI-12_D11	Ind_8bp_073	GGTGTCTT	Ind_8bp_143	CTTGGTTA	10
K2	Dec-86	DI-12_F11	Ind_8bp_073	GGTGTCTT	Ind_8bp_171	TAGACGAC	10
K3	Dec-93	DI-12_E12	Ind_8bp_084	TCCGATGG	Ind_8bp_169	CGTACACA	10
K4	Dec-95	DI-12_G12	Ind_8bp_084	TCCGATGG	Ind_8bp_184	GTGTTCCG	10
0-ctrl	8-Dec	DI-12_H01	Ind_8bp_010	GCTGAAGA	Ind_8bp_192	ATCCCTGG	10