

Opinnäytetyö (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikka

Biotekniikka

2015

Alexi Saariranta

IHMISEN RINOVIRUSTEN VP4/2-GEENIALUEEN MONISTAMINEN RT-qPCR - MENETELMÄLLÄ



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

OPINNÄYTETYÖ (AMK) | TIIVISTELMÄ

TURUN AMMATTIKORKEAKOULU

Bio- ja elintarviketekniikka | Biotekniikka

2015 | 25 sivua

Petri Susi (FT), Jarno Pusa (Biot. Ins.)

Aleksi Saariranta

IHMISEN RINOVIRUSTEN VP4/2- GEENIALUEEN MONISTAMINEN RT- QPCR MENETELMÄLLÄ

Rinovirukset ovat yleisiä RNA-virusia, joiden on todettu aiheuttavan ihmiselle mm. lieviä hengitystieinfektioita, keuhkokuumetta, korvatulehduksia ja astmaa. Viruksia tunnetaan yli 100 tyyppiä. Viruksen genomin 5' UTR-geenialuetta on käytetty yleisesti rinovirusten tunnistamiseen PCR-menetelmällä, mutta se ei sovellu tyypitykseen. Tässä opinnäytetyössä selvitettiin, onnistuuko 650 emäksen pituisen VP4/2-alueen monistaminen RT-qPCR-menetelmällä ja pyrittiin kehittämään optimoitu menetelmä geenituotteen muodostamiseksi. Työssä vertailtiin mm. kaupallisia qPCR-reaktiosarjoja ja RT-entsyymejä. qPCR-reaktiosarjojen välillä oli selkeitä eroja; KAPA SYBR FAST (Kapa Biosystems) ja SensiFAST SYBR No-ROX (Bioline) –qPCR-reaktiosarjat olivat selkeästi herkempiä kuin edullinen MAXIMA SYBR Green (Fermentas) –reaktiosarja. Tulokset osoittivat, että VP4/2-aluetta pystyttiin monistamaan 100 rinovirusgenomia sisältävästä näytteestä. Menetelmä toimi tehokkaasti viljeltyjen rinovirus-RNA-näytteiden VP4/2-alueen monistamiseen. Menetelmän toimivuus pitää testata jatkossa myös kliinisillä näytteillä menetelmän validoimiseksi kliinis-virologiseen käyttöön.

ASIASANAT:

RT-qPCR, rinovirukset, diagnostiikka, PCR-optimointi

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Biotechnology and Food technology | Biotechnology

2015 | 25 pages

Dr. Petri Susi (PhD); Jarno Pusa (Eng. in Biotechnology))

Aleksi Saariranta

TYPING OF HUMAN RHINOVIRUSES BY RT-QPCR USING VP4/2 GENES AS TARGET

Rhinoviruses are common RNA viruses which cause mild respiratory infections, pneumonia, otitis media and asthma. The 5' UTR viral gene region of rhinoviruses has commonly been used to recognize rhinoviruses by PCR. However, the 5'UTR region is not suitable for the serotyping of individual viruses. Therefore, the VP4/2 gene area is commonly used for typing different rhinovirus species. In this Bachelor's thesis it was studied if it is possible to amplify a 650 base-pair-long VP4/2 gene region by RT-qPCR and also to find optimized conditions. The results showed that the VP4/2 gene region could be amplified successfully with reasonable sensitivity. It was possible to obtain PCR-product from a sample containing only 100 copies of viral genome. The optimization of the RT-qPCR method included the comparison of the commercial qPCR kits and RT enzymes. There were clear differences between the qPCR kits - the KAPA SYBR FAST qPCR Kit (Kapa Biosystems) and the SensiFAST SYBR No-ROX Kit (Bioline) showed significantly higher sensitivity than the inexpensive MAXIMA SYBR Green qPCR Kit when amplifying the VP4/2 gene region. All the samples used in this study were cultured rhinovirus samples. Therefore, the functionality of the RT-qPCR method should be tested with clinical virus samples in order to validate the method.

KEYWORDS:

RT-qPCR, rhinoviruses, diagnostics, PCR optimization

SISÄLTÖ

KÄYTETYT LYHENTEET JA SANASTO	6
1 JOHDANTO	7
2 MATERIAALIT JA MENETELMÄT	9
3 TULOKSET	12
3.1 Annealing-lämpötilan optimointi	12
3.2 qPCR-menetelmän herkkyys ja VP4/2-alueen sulamislämpötila	13
3.3 qPCR-reaktiosarjojen vertailu	12
3.4 RT-entsyymien vertailu	15
3.5 RT-entsyymien määrän vaikutus herkkyyteen	16
3.6 ENRI-alueen monistaminen käyttäen VP4/2 HRV/HEV OAS-aluketta	17
3.7 Rinovirustyyppien RNA:sta tehty RT-qPCR	19
4 TULOSTEN TARKASTELU	20
4.1 Annealing-lämpötilan optimointi	20
4.2 qPCR-menetelmän herkkyys ja VP4/2-alueen sulamislämpötila	21
4.3 qPCR-reaktiosarjojen vertailu	20
4.4 RT-entsyymien vertailu	21
4.5 RT-entsyymien määrän vaikutus herkkyyteen	22
4.6 ENRI-alueen monistaminen käyttäen RT-vaiheessa VP4/2 HRV/HEV OAS- aluketta	22
4.7 Rinovirustyyppien RT-qPCR	23
5 LOPPUPÄÄTELMÄT	24
6 LÄHTEET	25

KUVAT

Kuva 1. Rinovirusten genomin rakenne	7
Kuva 2. Pipetointikaavio	11
Kuva 3. Annealing-lämpötila optimoinnin agarosigeelijaot	12
Kuva 4. qPCR-reaktiosarjojen vertailu	13
Kuva 5. qPCR käyttäen HRV-plasmideja näytteinä	14
Kuva 6. Cp-arvot näytteen genomien lukumäärän funktiona	14
Kuva 7. pHRV-C15-plasmidista monistetun VP4/2-alueen sulamiskäyrä	15
Kuva 8. RT-entsyymien vertailu käyttäen HRV-A-1b:ta näytteenä	16
Kuva 9. RT-entsyymien vertailu käyttäen HRV-B14 näytteenä	16
Kuva 10. RT-entsyymien määrän vaikutus herkyyteen	17
Kuva 11. Sulamiskäyräanalyysi	18
Kuva 12. ENRI-alueen monistaminen käyttäen RT-vaiheessa VP4/2 HRV/HEV OAS-aluketta	18
Kuva 13. Rinovirustyyppien qPCR-monistuskäyrät	19
Kuva 14. Rinovirustyyppien qPCR-sulamiskäyräanalyysi	19

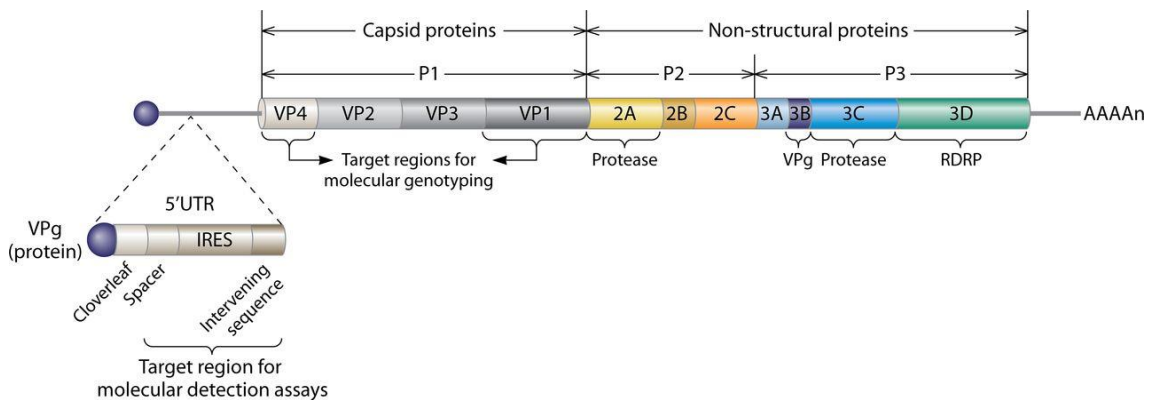
LYHENTEET JA SANASTO

RT-qPCR	Käänteistranskriptiopolymeraasiketjureaktio
RT	Käänteistranskriptio-reaktio, jossa RNA käännetään cDNA-muotoon.
Cp	Kynnyssykli, joka ylittää tietyn kynnyksarvon (engl. Crossing point).
HRV	Ihmisen rinovirus
pHRV	Plasmidi, johon on kloonattu ihmisen rinoviruksen genomi
ENRI	Diagnostinen testi entero- ja rinovirusten tunnistamiseksi

1 JOHDANTO

Rinovirukset kuuluvat *Picornaviridae*-heimoon, jotka ovat rakenteeltaan vaipattomia, ikosahedraalisia viruksia, ja joiden genomi koostuu RNA:sta. Tällä hetkellä rinovirusia tunnetaan 153 erilaista serotyyppiä, jotka jaetaan kolmeen lajiin: A ($n=77$), B ($n=25$) ja C ($n=51$)(2). Rinovirukset ovat yleisimpiä lievien hengitystieinfektioiden aiheuttajia, mutta tämän lisäksi niiden on havaittu aiheuttavan vakavampia sairauksia, kuten keuhkokuumetta, korvatulehduksia ja astmaa. Rinovirusten kiertokulusta ja yksittäisten serotyyppien vaikutuksesta ihmiseen tiedetään hyvin vähän.(1,2)

Rinovirusten RNA-genomi on pituudeltaan n. 7200 emästä. Kliinisessä virusdiagnostiikassa on viruksen tunnistamiseen käyttäen 5' UTR-aluetta, joka mahdollistaa myös enterovirusten ja rinovirusten erottamisen toisistaan. Rinovirusten tyyppittämiseen on käytetty viruksen genomien VP4/2-aluetta, joka on pituudeltaan n. 650 emästä. (1,2,3)



Kuva 1. Rinovirusten genomien rakenne (4)

Diagnostiikassa virusten tyyppittämällä on suuri merkitys, kun tutkitaan tunnetun virustyyppin yhteyttä tiettyyn sairauteen (3). Kansanterveydellisestä näkökulmasta tiettyjä virustyyppiejä vastaan voidaan yrittää valmistaa rokote, jos niiden on havaittu aiheuttavan vakavia sairauksia kuten astmaa.

Tässä opinnäytetyössä tutkittiin ihmisen rinovirusten VP4/2-alueen monistamista kvantitatiivisella RT-PCR-menetelmällä (RT-qPCR). Perinteinen PCR-menetelmä on hidas ja epätaloudellinen, varsinkin jos joudutaan tutkimaan monta näytettä samaan aikaan; ensin suoritetaan PCR-ajo, jonka jälkeen jokainen näyte joudutaan analysoimaan erikseen agarosigeelillä. RT-qPCR-menetelmä perustuu fluoresoivan merkkiaineen käyttöön, joka mahdollistaa syntyvän tuotteen reaaliaikaisen seuraamisen. Ajettaessa monta näytettä kerralla, positiiviset näytteet voidaan kerätä sekvensoitavaksi, jonka avulla virus voidaan tyypittää. Tämä säästää aikaa ja resursseja sekä mahdollistaa näytteiden tehokkaan analysoinnin.

Työn tavoite oli testata RT-qPCR-menetelmän toimivuus kahdelle eri rinovirus-RNA-näytteellä (HRV-A-1b, HRV-B14) ja qPCR:n toimivuus kolmella rinovirusplasmidilla (pHRV-A-1b, pHRV-B14 ja pHRV-C15). Kaupalliset qPCR-reaktiosarjavalmistajat suosittelevat suunnittelemaan alukkeet kitistä riippuen n. 80–400 emäsparin pituisille monistettaville cDNA-jaksoille. Työn alussa täytyi testata, pystyttiinkö VP4/2-alueen 650 emäksen pituista palaa ylipäätään monistamaan käytettävillä kaupallisilla kiteillä. Tämän lisäksi menetelmälle määritettiin herkkyys eli miten pientä RNA-määrää pystytään vielä monistamaan luotettavasti. Tuotteen monistuminen määritettiin qPCR-laitteen monistus- ja sulamiskäyriä tarkastelemalla ja ajamalla tuotteet agarosigeelillä.

Yksi työvaiheista oli testata, pystytäänkö 5' UTR-geenialueella sijaitsevaa ns. "ENRI"-aluetta monistamaan RT-vaiheen jälkeen cDNA:sta, joka oli tehty VP4/2-aluetta monistavalla alukkeella. Tavallisesti "ENRI"-aluetta monistettaessa käytetään sille ominaisia alukkeita(2).

Työssä pyrittiin myös optimoimaan parasta menetelmää VP4/2-alueen monistamiseksi testaamalla parasta annealing-lämpötilaa sekä vertailemalla kaupallisia qPCR-reaktiosarjoja ja RT-entsyymejä.

2 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

VP4/2-geenialueen alukkeet valittiin aikaisempien julkaisuiden perusteella, joissa aluetta oli monistettu onnistuneesti perinteisin menetelmin. Eri vaihtoehtoista päädyttiin käyttämään VP4/2 HRV/HEV OS- ja VP4/2 HRV/HEV OAS -alukkeita (1,3). Alukeparit olivat alukesekoituksia (eng. wobble primers), joissa tietyissä kohdissa nukleotidi vaihteli (OS = CCGGCCCTGAATGYGGCTAA ja OAS = CATRTTYTSNCCAAANAYDCCCAT, I = inosiini; Y = T, C; R = G, A; N = A, G, C,T). (3)

Työssä käytettiin kolmea eri kaupallista qPCR-reaktiosarjaa: KAPA SYBR® FAST qPCR Kit (Bio Systems), SensiFAST™ SYBR® No-ROX Kit (Bioline) ja MAXIMA SYBR Green qPCR Kit (Fermentas). qPCR-reaktiosarjojen vertailu suoritettiin käyttäen HRV-A-1b cDNA-näytettä. Ellei kyseessä ollut eri reaktiosarjojen vertailu, työssä käytettiin pääasiassa KAPA SYBR® FAST qPCR-reaktiosarjaa. Valmistajat ovat antaneet suosituksen monistettavan DNA-jakson pituudelle: KAPA; 60–400 emästä, SensiFAST; 80–200 emästä ja MAXIMA; 70–150 emästä.

Annealing-lämpötilan optimointi suoritettiin Bioradin C1000 Thermal Cycler -laitteella, johon ohjelmoitiin annealing-lämpötilagradientti 52–62 °C (52; 52,7; 54; 55,9; 58,4; 60,3; 61,4 ja 62 °C). Annealing-lämpötilatestaus suoritettiin käyttäen kahta eri rinovirusplasmidia, pHRV-A-1b ja pHRV-B14, KAPA ja SensiFASTin qPCR-reaktiosarjoilla. (reaktiotilavuus 20 µl, jossa 1 µl näyte, 1 µl OAS- & OS-alukkeet, 10 µl 2x Master Mix ja 7 µl H₂O). PCR-ajon jälkeen näytteet ajettiin agarosigeelillä ja muodostuneiden bändien intensiteettiä verrattiin toisiinsa.

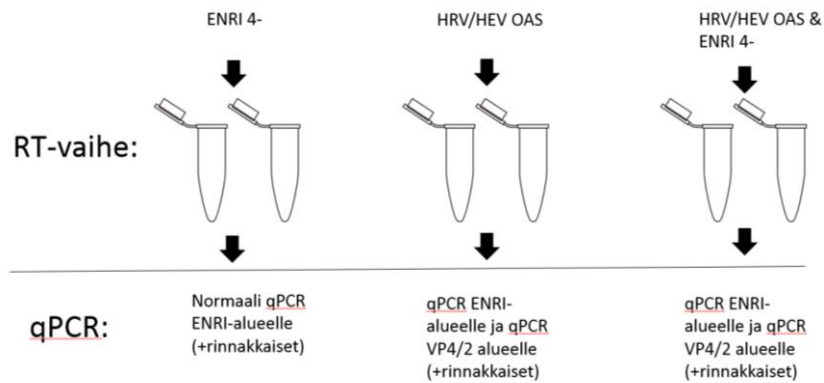
qPCR-ajot suoritettiin Roche Light Cycler® 480 II laitteella, jossa reaktiot on pipetoitu 96-kuoppalevylle. Ajo-ohjelma määritettiin annealing-testin ja reaktiosarjojen suositusten perusteella. Ohjelma sisälsi 3 vaihetta: hold- (95 °C, 3 min), 45 x cycling- (95 °C, 10 s; 54 °C, 30 s; 72 °C, 30 s) ja final extension-vaiheen (72 °C, 5 min). Jokaiseen kuoppalevyn kuoppaan pipetoitiin 10 µl 2 x KAPA SYBR® FAST Master Mix-seosta, 1µl kumpaakin aluketta ja 8 µl milli-Q-vettä. Ajon jälkeen näytteet analysoitiin geelillä tai varastoitiin -20 °C:een.

Työn kaikissa vaiheissa käänteistranskriptio tehtiin käyttäen joko SuperScript III- tai ImProm II- RT-entsyymiä lukuun ottamatta työvaihetta, jossa vertailtiin eri RT-entsyymien tehokkuutta. RT-vaihe suoritettiin pipetoimalla kaikki reagenssit 0,5 ml eppendorf-putkiin, joihin pipetoitiin 2 µl 5 x puskuria, 1 µl magnesiumkloridia (MgCl_2 ; 2,5 mM), 0,5 µl 10 mM dNTP:tä, 0,5 µl RNAasi-inhibiittoria, 0,5 µl RT-entsyymiä, 1 µl OAS-aluketta ja 4,5 µl RNA-näytettä. Näytteet inkuboitiin 42 °C:ssa, 60 min \pm 15 min (poikkeuksena SuperScript IV, jota inkuboitiin 10 min, 50 °C:ssa ja 10 min 80 °C:ssa). RT-vaiheessa käytettiin pääasiassa Promegan 5x buffer-puskuriliuosta ja RNAasi-inhibiittoria.

Työssä käytetyt näytteet olivat joko plasmidinäytteitä tai RNA-näytteitä riippuen työn vaiheista. Annealing-lämpötilan määrittämisessä käytettiin plasmideita pHRV-A-1b ja pHRV-B14. Herkkyyden määrittämisessä käytettiin plasmideita pHRV-A-1b, pHRV-B14 ja pHRV-C15. Plasmidikonsentraatio määritettiin Nano Drop 1000 -laitteella (Thermo Scientific), jonka jälkeen näytteistä tehtiin 10^8 kopiota sisältävät näytteet. Tästä näytteestä tehtiin taas laimennossarja 10^6 :sta 10^{-1} :een. Käytetyt RNA-näytteet olivat HRV-A-1b ja HRV-B14. RT-qPCR-menetelmä testattiin lopuksi käyttäen 18 eri HRV-virustyyppistä eristettyä RNA:ta.

Geelajot suoritettiin valmistamalla 1 % agarosigeeli, johon pipetoitiin 2-3 µl Miodori Green Advange-reagenssia (Nippon Genetics). Näytteitä ajettiin geelillä 40–60 min, 80 V.

Kuvan 2 mukainen pipetointi suoritettiin työvaiheessa, jossa tutkittiin, pystytäänkö ENRI-aluetta monistamaan käyttäen RT-vaiheessa VP4/2 HRV/HEV OAS -alukkeita.



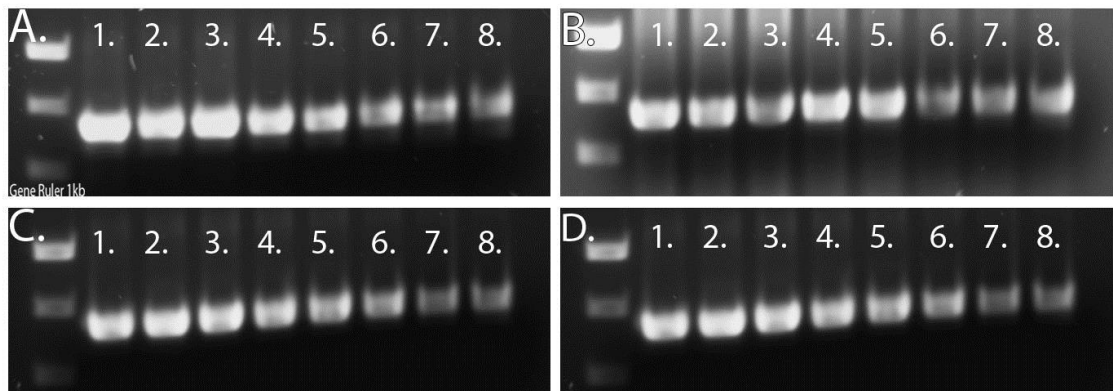
Kuva 2. Pipetointikaavio: ENRI-alueen monistamisen testaus käyttäen eri alukkeita RT-vaiheessa

Ensimmäiseen kahteen putkeen pipetoitiin pelkästään ENRI 4- aluketta. RT-vaiheen jälkeen tehtiin normaali qPCR-ajo käyttäen ENRI 4- ja ENRI 3+ -alukkeita. Keskimmäisiin putkiin pipetoitiin VP4/2 HRV/HEV OAS aluketta RT-vaihetta varten, jonka jälkeen suoritettiin qPCR-ajo sekä ENRI-alueelle että VP4/2-alueelle. Oikeanpuoleisiin putkiin pipetoitiin kumpaakin aluketta ENRI 4- ja VP4/2 HRV/HEV OAS aluketta, tehtiin RT-vaihe, jonka jälkeen suoritettiin qPCR ajo käyttäen sekä ENRI- että VP4/2-alueen alukkeita.

3 TULOKSET

3.1 Annealing-lämpötilan optimointi

Työssä testattiin qPCR-reaktiosarjojen kykyä monistaa rinovirusten VP4/2-geeni-alueita ja samalla määritettiin optimaalinen annealing-lämpötila. VP4/2-geeni-alueita pystyttiin tehokkaasti monistamaan Biorad C1000 Thermal Cycler-laitteella sekä KAPA- että SensiFAST-reaktiosarjalla. Kaikki lämpötilagradientin lämpötilat antoivat geelille näkyvän bändin. Gradientin neljä ensimmäistä lämpötilaa (52 - 55,9 °C) antoivat kuitenkin parhaimman intensiteetin (Kuva 3). Tästä eteenpäin bändit alkoivat selkeästi haalenemaan lähestyttäessä 62 °C:tta. Teoreettisten laskujen ja geelin intensiteettien perusteella päädyttiin jatkossa käyttämään 54 °C:een annealing-lämpötilaa.

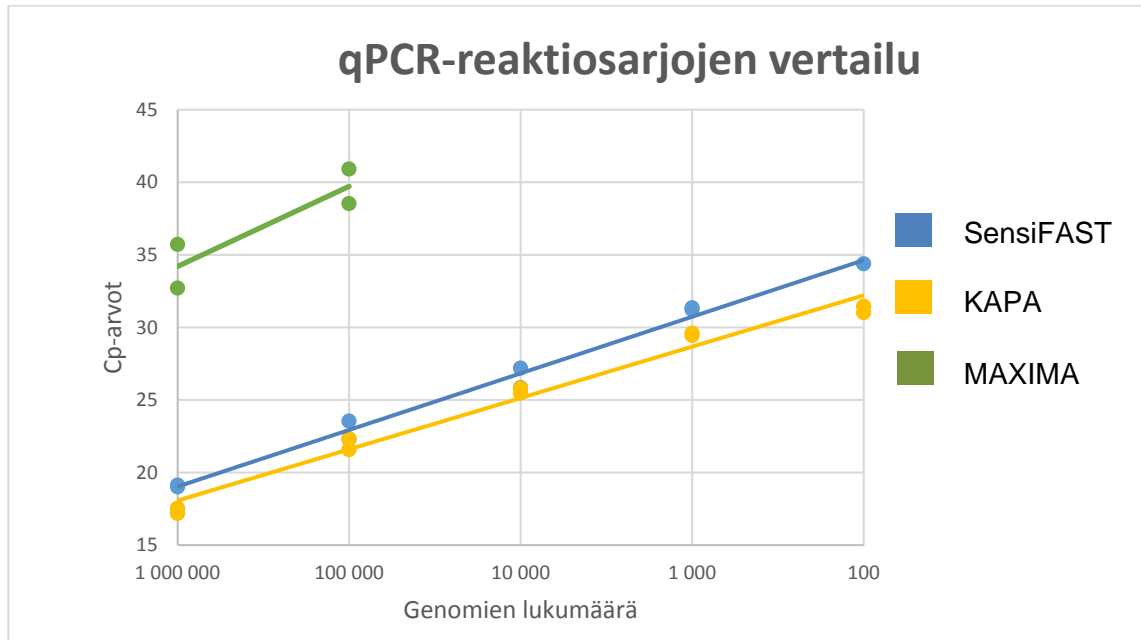


Kuva 3. Annealing-lämpötila optimoinnin agarosigeeliatjot. A. pHRV-A-1b, KAPA; B. pHRV-A-1b, SensiFAST; C. pHRV-B14, KAPA; D. pHRV-B14, SensiFAST. Lämpötilagradientti: 1. 52,0 °C, 2. 52,7 °C, 3. 54,0 °C, 4. 55,9 °C, 5. 58,4 °C, 6. 60,3 °C, 7. 61,4 °C ja 8. 62,0 °C.

3.2 qPCR-reaktiosarjojen vertailu

Työssä vertailtiin KAPA-, SensiFAST- ja MAXIMA-qPCR-reaktiosarjojen kykyä monistaa rinoviruksen VP4/2-alueita käyttäen pHRV-A-1b-plasmidia. Herkimmäksi qPCR-reaktiosarjaksi osoittautui KAPA SYBR® FAST qPCR-reaktiosarja Cp-arvoina mitattuna. SensiFAST-qPCR reaktiosarjalla päästiin hyvin lähelle

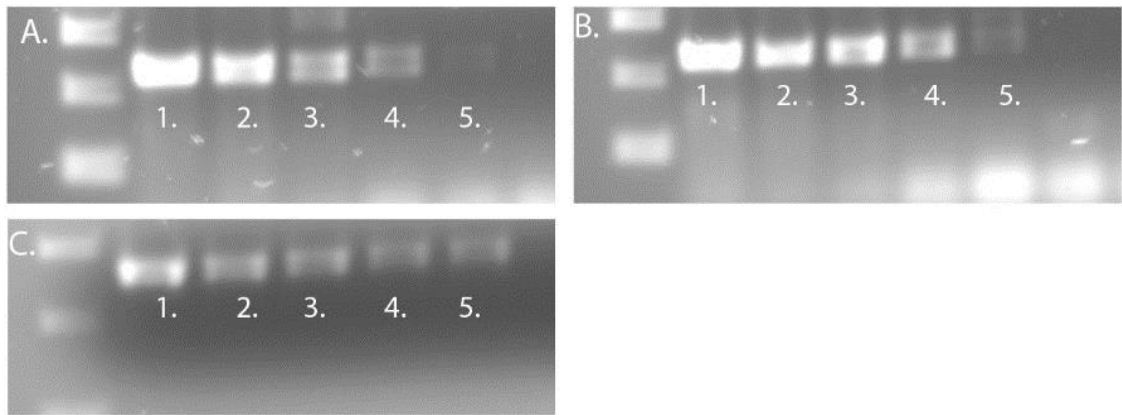
KAPA:n arvoja kun taas MAXIMA qPCR-reaktiosarja jäi selvästi jälkeen muista. KAPA- ja SensiFAST-reaktiosarjalla pystyttiin kummallakin monistamaan näytteitä, joiden sisältämä genomien lukumäärä oli 10^2 kpl kun taas MAXIMA-reaktiosarjalla luku jäi 10^5 :een (kuva 4).



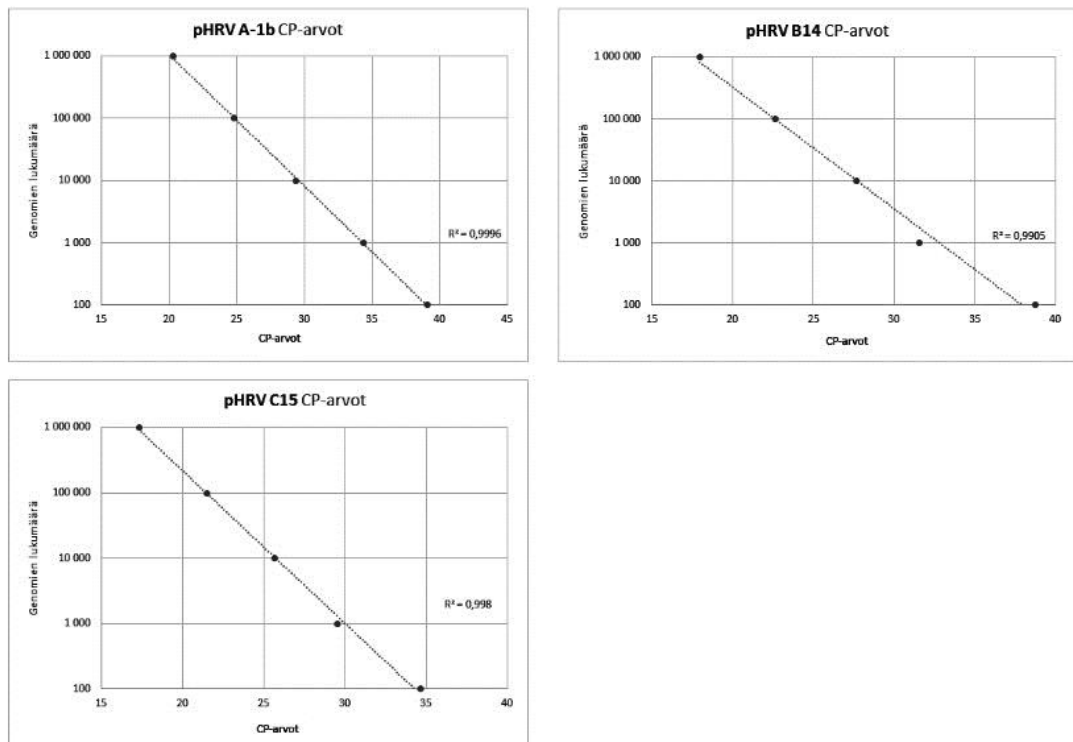
Kuva 4. qPCR-reaktiosarjojen vertailu. Suoran pituus ja sijoittuminen kuvaajassa kertoo reaktiosarjan herkkydestä; mitä pidempi suora ja mitä alemmas suora sijoittuu, sitä herkempi qPCR-reaktiosarja on kyseessä.

3.3 qPCR-menetelmän herkkyys ja VP4/2-alueen sulamislämpötila

qPCR-menetelmän herkkyys testattiin käyttäen kolmea HRV-plasmidia: pHRV A-1b, pHRV-B14 ja pHRV-C15. Plasmideista tehtiin laimennossarja (10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 , 10^0 ja 10^{-1} genomia / μ l), joilla suoritettiin qPCR-ajo. Kaikkia plasmideja pystyttiin monistamaan Roche Light Cycler 480 II -qPCR-laitteella käyttäen KAPA SYBR® FAST qPCR-reaktiosarjaa. Geelijaon perusteella menetelmällä pystyttiin monistamaan VP4/2-geenialuetta vielä 10^2 genomia / μ l -laimennoksesta (kuva 5), kaikilla plasmideilla.

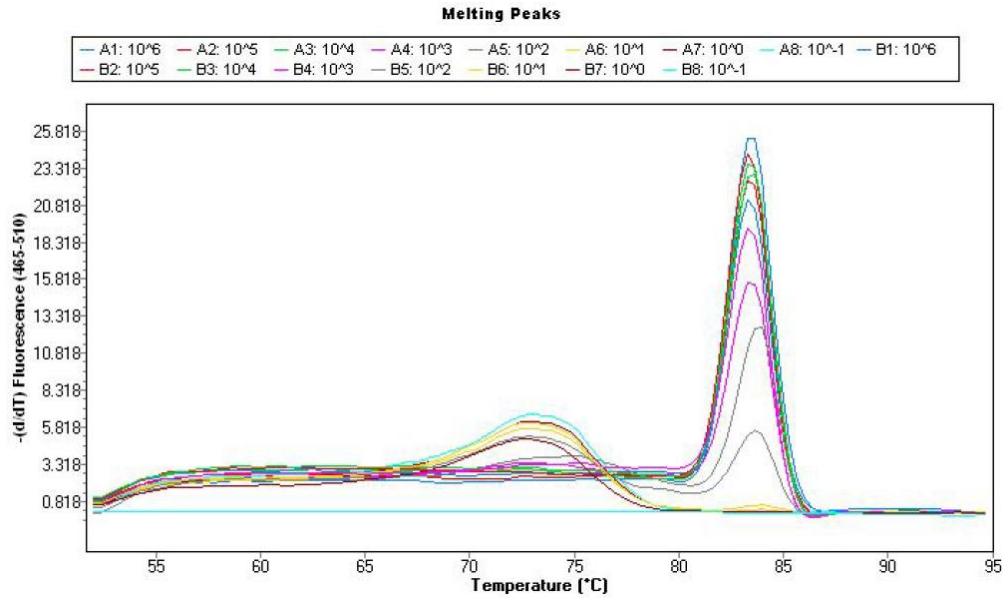


Kuva 5. qPCR käyttäen HRV-plasmideja näytteinä. A) pHRV-A-1b, B) pHRV-B14 ja C) pHRV-C15. Laimennokset: 1. 10^6 , 2. 10^5 , 3. 10^4 , 4. 10^3 , 5. 10^2



Kuva 6. Cp-arvot näytteen genomien lukumäärän funktiona.

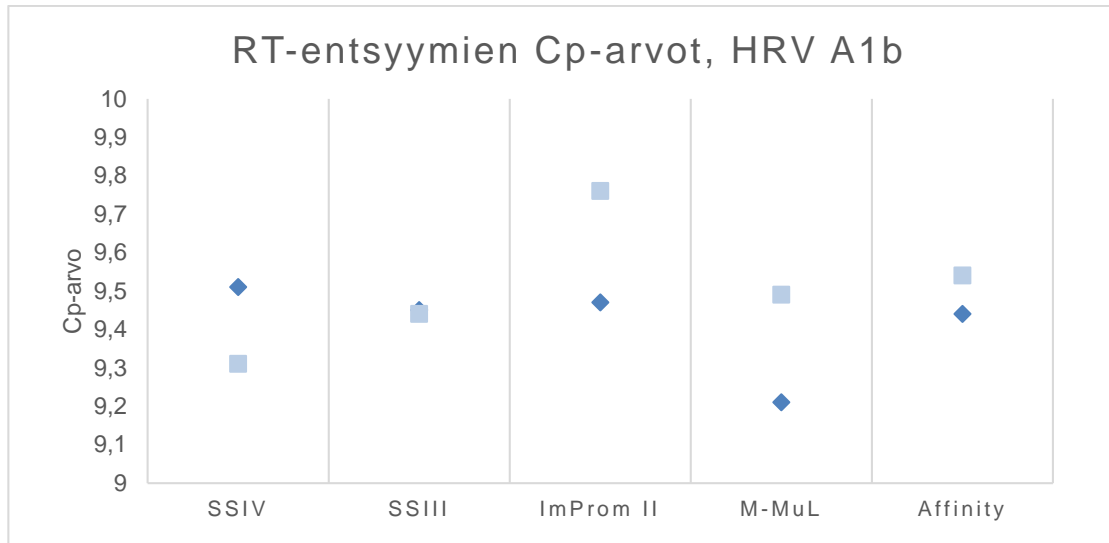
10^2 laimennoksen intensiteetti jäi geelikuvissa hyvin pieneksi. Sulamiskäyrästä pystyttiin kuitenkin vahvistamaan tuotteen monistuminen. VP4/2 alueelle pystyttiin määrittämään tarkka sulamislämpötila "Tm-calling"-analyysillä, jolloin sulamislämpötilaksi saatiin n. 83,5 °C (kuva 4).



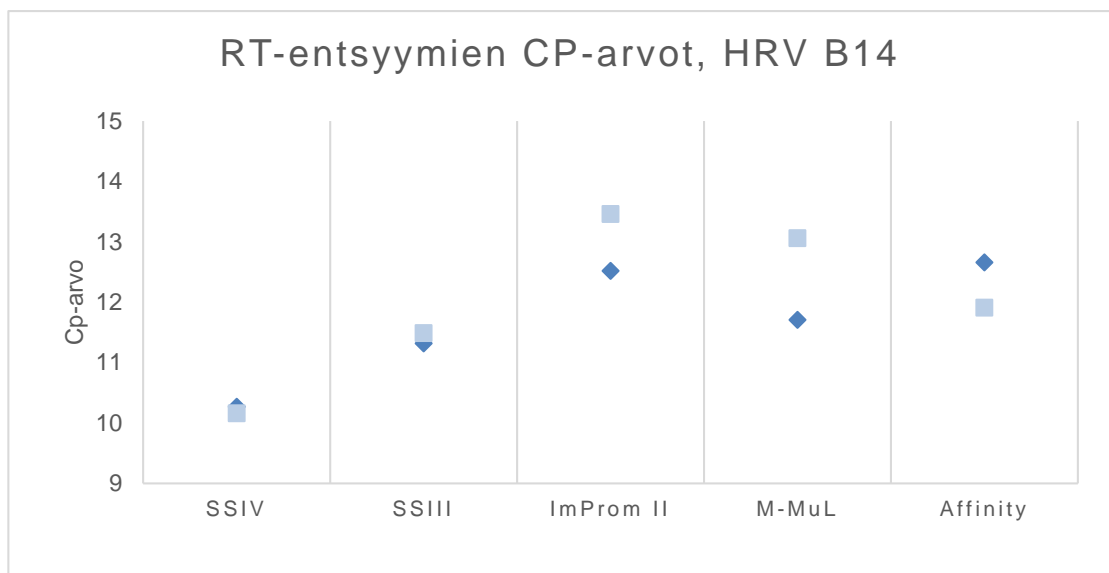
Kuva 7. pHRV-C15-plasmidista monistetun VP4/2 alueen sulamiskäyrä.

3.4 RT-entsyymien vertailu

Työssä vertailtiin viittä erilaista RT-entsyymiä keskenään: SuperScript IV (SSIV, Invitrogen), SuperScript III (SSIII, Invitrogen), ImProm-II (Promega), RevertedAid Reverse Transcriptase (M-MuL, Fermentas) ja AffinityScript (Agilent). Vertailu tehtiin kummallekin RNA-näytteelle, HRV A-1b:lle ja HRV B14:sta. Kaikilla entsyymeillä transkriptio toimi hyvin; HRV A-1b RNA-näytteellä testattuna RT-entsyymien välillä ei ollut Cp-arvoissa mitattuna suuria eroja (kuva 8). HRV B14 RNA-näytteellä testattuna RT-entsyymien välille tuli vain pieniä eroja Cp-arvoihin (kuva 9).



Kuva 8. RT-entsyymien vertailu käyttäen HRV-A-1b:ta näytteenä.

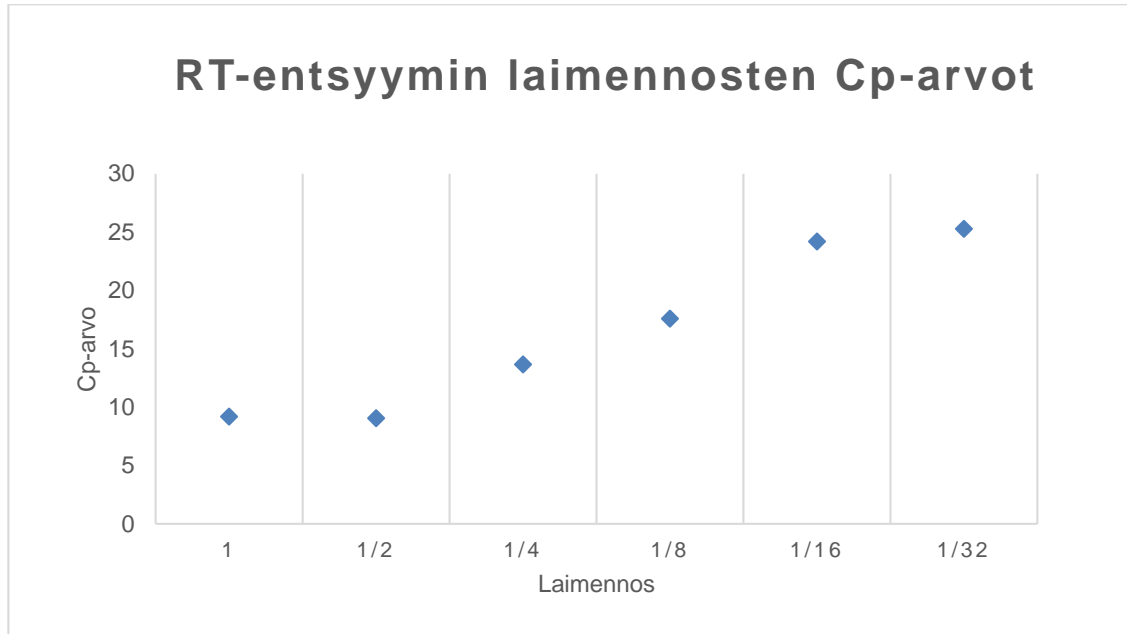


Kuva 9. RT-entsyymien vertailu käyttäen HRV-B14:ta näytteenä.

3.5 RT-entsyymien määrän vaikutus herkyyteen

ImProm-II -RT-entsyymistä tehtiin laimennossarja, jossa entsyymiä laimennettiin aina puolella. Laimennokset olivat 1/1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 ja 1/32. Tulokset osoittivat, että 1/2-laimennosta voitiin vielä käyttää sen vaikuttamatta menetelmän

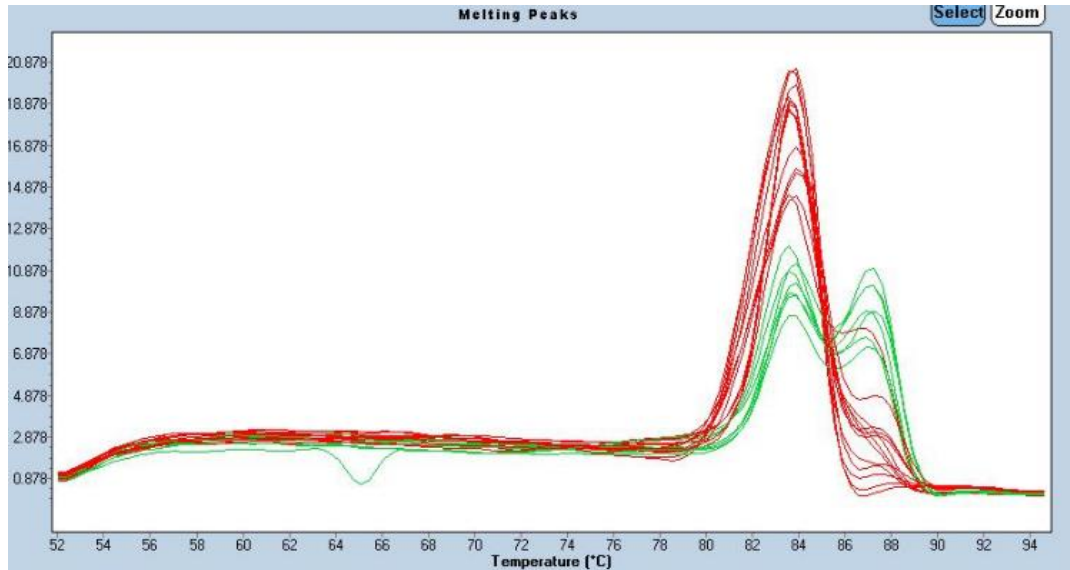
herkkyyteen. 1/4-laimennoksesta eteenpäin menetelmän herkkyys heikkeni huomattavasti (kuva 10). Sulamiskäyräanalyysit osoittivat, että 1/16- ja 1/32-laimennokset eivät tuottaneet lainkaan haluttua geenialuetta.



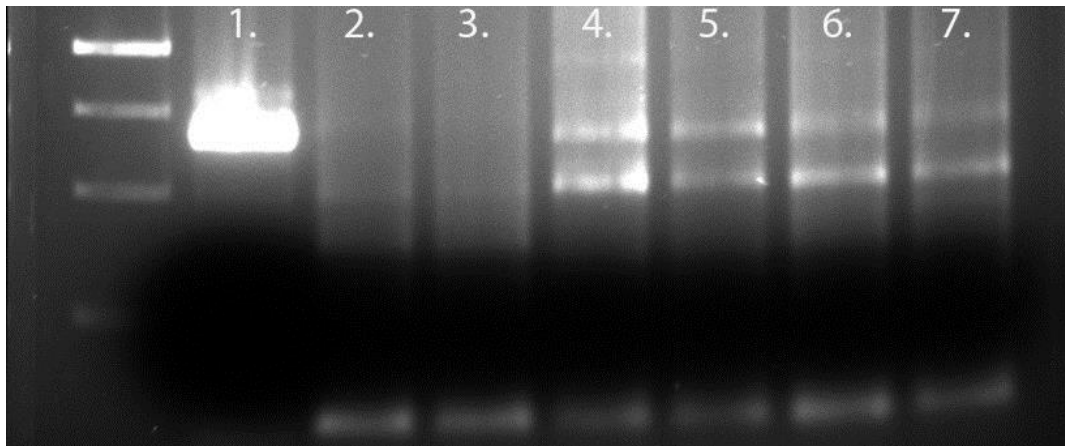
Kuva 10. RT-entsyymin määrän vaikutus herkkyyteen

3.6 ENRI-alueen monistaminen käyttäen VP4/2 HRV/HEV OAS-aluketta

Sulamiskäyräanalyysi ja näytteiden ajo agarosigeelillä osoittivat, että cDNA:ta, joka oli tehty VP4/2 HRV/HEV OAS-alukkeella, ei pystytty qPCR-vaiheessa monistamaan tehokkaasti käyttäen ENRI-alukkeita. Sulamiskäyräanalyysin ja geelilajojen perusteella näytteeseen monistui myös jotain muuta tuotetta. ENRI-alueen monistus qPCR:llä, jonka RT-vaihe oli tehty VP4/2 HRV/HEV OAS-alukkeella, antoi sulamiskäyräanalyysissä kaksi selkeää piikkiä (kuva 12, vihreät käyrät). Geelillä vastaavat näytteet näkyivät ns. ylimääräisinä bändeinä (kuva 13, 4. ja 5.). Samat tulokset toistuivat, kun RT-vaihe tehtiin kummallakin alukkeella, ENRI 4- ja VP4/2 HRV/HEV OAS-alukkeilla samassa putkessa (kuva 13, 6. ja 7.)



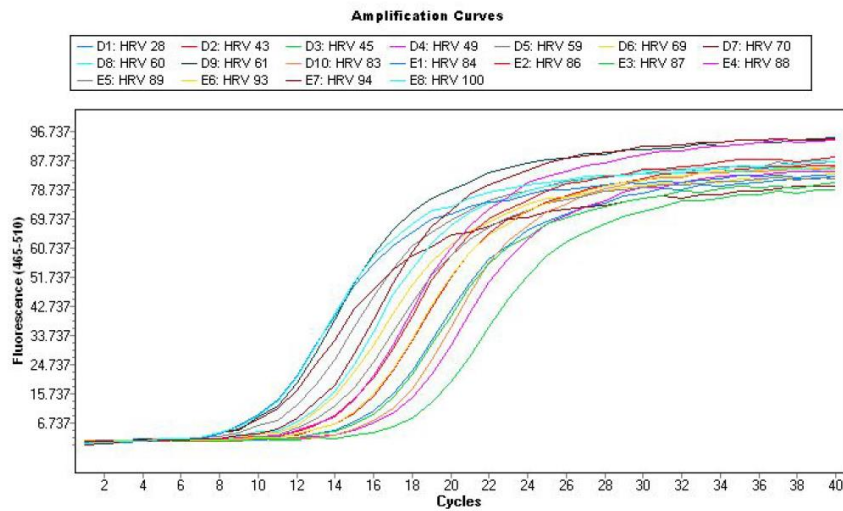
Kuva 11. Sulamiskäyräanalyysi: ENRI alueen monistaminen käyttäen VP4/2 HRV/HEV OAS-aluketta. Vihreät käyrät: RT-vaihe VP4/2 HRV/HEV OAS alukkeilla tai VP4/2 HRV/HEV OAS ja ENRI 4- alukkeilla; qPCR ENRI-alueelle. Punaiset käyrät: RT-vaihe ENRI 4- alukkeilla; qPCR ENRI-alueelle.



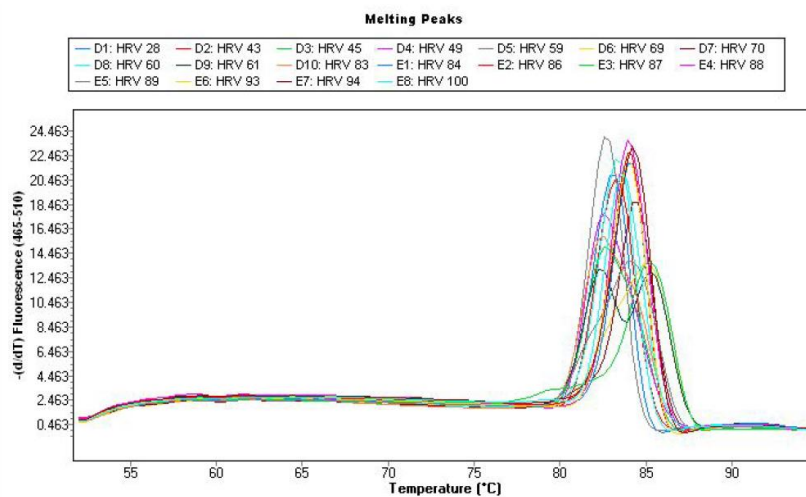
Kuva 12. ENRI-alueen monistaminen käyttäen RT-vaiheessa VP4/2 HRV/HEV OAS -aluketta. 1. RT: HRV/HEV OAS, qPCR: VP4/2; 2. ja 3. RT: ENRI 4-, qPCR: ENRI; 4. ja 5. RT: HRV/HEV OAS, qPCR: ENRI; 6. ja 7. RT: HRV/HEV OAS ja ENRI 4-; qPCR: ENRI

3.7 Rinovirustyyppien RNA:sta tehty RT-qPCR

Työn lopussa testattiin optimoitua RT-qPCR-menetelmää 18:lle rinovirustypille. Kaikki 18 rinovirustyyppiä antoivat positiivisen tuloksen, kun niitä testattiin optimoidulla menetelmällä. (kuva 14 ja 15). Sulamislämpötila kaikilla näytteillä oli n. 83-84 °C.



Kuva 13. Rinovirustyyppien qPCR-monistuskäyrät.



Kuva 14. Rinovirustyyppien qPCR-sulamiskäyräanalyysi.

4 TULOSTEN TARKASTELU

4.1 Annealing-lämpötilan optimointi

VP4/2 HRV/HEV OAS- ja OS -alukkeiden optimaalinen kiinnittymislämpötila oli tulosten perusteella n. 52 - 55,9 °C kummallakin testatulla qPCR-reaktiosarjalla. Näin ollen ks. alukkeille voidaan käyttää mitä vain annealing-lämpötilaa 52 - 55,9 °C väliltä riippuen esimerkiksi ajetaanko samassa qPCR-ajossa jotain muita näytteitä eri alukkeilla, joiden kiinnittymislämpötila on lähellä VP4/2 HRV/HEV OAS ja OS alukkeita. Käytettäessä yli 58,4 °C:een annealing-lämpötilaa, menetelmän herkkyys alkoi jo selkeästi huonontua. Tulokset osoittivat myös, että n. 650 emäksen pituista VP4/2-aluetta pystyttiin monistamaan käytetyillä qPCR-reaktiosarjoilla, vaikka valmistajat suosittelivat reaktiosarjoja korkeintaan 80–400 emäksen pituisille cDNA-jaksoille.

4.2 qPCR-reaktiosarjojen vertailu

qPCR-reaktiosarjan valinta voi olla iso kustannustekijä tutkimuksessa, joten on tärkeää tietää, mikä reaktiosarja toimii tehokkaimmin suhteessa sen hintaan. Kolmesta qPCR-reaktiosarjasta KAPA SYBR® FAST osoittautui kaikista tehokkaimmaksi – tosin SensiFAST-qPCR-reaktiosarja ei jäänyt kauaksi KAPA:n tasosta (kuva 7). Kummallakin reaktiosarjalla saavutettiin sama herkkyys, eli pystyttiin monistamaan vielä 100 genomia sisältävää näytettä. Ero SensiFAST:n ja KAPA:n välillä oli lähinnä Cp-arvoissa. MAXIMA qPCR-reaktiosarja oli selvästi huonoin - reaktiosarjalla pystyttiin monistamaan ainoastaan suuria määriä genomia sisältäviä näytteitä (10^6 ja 10^5 genomia/näyte). Tässä työssä reaktiosarjoja vertailtiin ainoastaan pHRV-A-1b -näytteellä, joten jatkossa olisi vielä hyödyllistä testata, että pystytäänkö testin tulos toistamaan muilla näytteillä esim. HRV B14- ja HRV C15-plasmideilla.

Kaupallisia reaktiosarjoja on tarjolla useita erilaisia, joita kannattaisi vielä vertailla keskenään käyttäen eri näytteitä.

4.3 qPCR-menetelmän herkkyys ja VP4/2-alueen sulamislämpötila

qPCR osoittautui melko herkäksi menetelmäksi monistettaessa VP4/2-aluetta HRV-plasmideilla. Menetelmällä pystyttiin vielä monistamaan luotettavasti kaikkia HRV-plasmidinäytteitä (pHRV-A-1b, pHRV-B14 ja pHRV-C15), jotka sisälsivät n. 100 genomia. Teoriassa tämä tarkoittaa, että kliinisestä näytteestä, jossa on ainoastaan 100 virusta/viruksen genomia, pystytään saamaan positiivinen tulos qPCR-menetelmällä. Täytyy kuitenkin huomioida, että plasmidinäytteet ovat usein hyvin puhtaita näytteitä, kun taas kliiniset näytteet voivat sisältää paljon muuta DNA:ta. Nano Drop 1000 -laitteella mitattu konsentraatio ei myöskään ole kovin tarkka mittaamaan DNA:ta, joten tulokset ovat vähintäänkin vain suuntaa antavia. Merkittävää oli kuitenkin todeta, että menetelmä toimi lähes samalla tavalla kaikille plasmidinäytteille.

VP4/2-alueelle saatiin myös määritettyä sulamislämpötila, joka oli n. 83,5 °C. Sulamislämpötilan määrittäminen säästää aikaa lopputuloksen laadullisessa analysoinnissa, sillä näytteitä ei välttämättä tarvitse ajaa enää agarosigeelille, jos sulamislämpötila vastaa näytteen odotettua lämpötilaa. Agarosigeelijajo ei myöskään diagnostiikassa ole suositeltava tapa, koska tällöin lopputuote pitää ottaa pois putkessa, mikä altistaa prosessin DNA-kontaminaatioille. Menetelmän validointivaiheessa on kuitenkin suositeltavaa ajaa näytteet myös geelillä, jos halutaan olla täysin varmoja positiivisista tuloksista. Tulosten perusteella laimein näyte näkyi geelillä vaikka sen muodostama monistuskäyrä oli matala ja Cp-arvo korkea. Tällaisen näytteen positiivisuuden tulkinta on vaikeaa pelkästään qPCR-laitteen mittausta käyttäen.

4.4 RT-entsyymien vertailu

Tulokset osoittivat, että kaikki testattavat RT-entsyymit toimivat hyvin, eikä niiden välillä ollut suuria eroja (kuva 9 ja 10). Erityisesti HRV-A-1b-näytteellä suoritettu testi antoi kaikilla RT-entsyymeillä lähes samat Cp-arvot. Suuremmat erot saattaisivat ilmetä jos RNA-näytteistä tehtäisiin laimennossarja. SuperScript IV-RT-

entsyymillä suoritettu RT-vaihe on kuitenkin kaikista nopein. Muilla RT-entsyymeillä RT-vaihe kestää n. 45–75 min kun taas SuperScript IV-RT-entsyymiä käyttäen aikaa kuluu vain n. 20 min, mikä saattaa osoittautua kustannustehokkaaksi tekijäksi tutkittaessa suuria määriä näytteitä.

4.5 RT-entsyymien määrän vaikutus herkkyyteen

RT-entsyymien määrä, jolla voidaan vielä saavuttaa hyvät ja luotettavat tulokset, on merkittävä kun halutaan optimoida mahdollisimman kustannustehokasta menetelmää. RT-entsyymi on yksittäisistä reagensseista suurin kustannustekijä, joten sitä ei haluta tuhata suuria määriä. Tulokset osoittivat, että 0,25 µl:n määrä (1/2 normaalista määrästä) RT-entsyymiä käytettynä 10 µl:n reaktiotilavuudessa ei vaikuttanut menetelmän herkkyyteen. Tällä voidaan tehdä jo merkittäviä säästöjä tutkimuksen kustannuksissa. RT-entsyymien määrän vaikutusta herkkyyteen testattiin käyttäen ainoastaan yhtä entsyymiä, ImProm II:sta, joten muidenkin entsyymien testaus voisi olla seuraava mahdollinen työvaihe.

4.6 ENRI-alueen monistaminen käyttäen RT-vaiheessa VP4/2 HRV/HEV OAS-aluketta

Tulokset osoittivat, että RT-vaihe kannattaa aina tehdä halutun qPCR-tuotteen omilla alukkeilla. Käytettäessä VP4/2 HRV/HEV OAS -aluketta RT-vaiheessa tai ENRI- ja VP4/2-alueen HRV/HEV OAS -alukkeita sekaisin, qPCR-vaiheessa syntyi myös sivutuotteita monistettaessa ENRI-aluetta. Sivutuotteet ilmenivät sulamiskäyräanalyyseissä, jossa näkyi selkeästi kaksi erillistä piikkiä (kuva 12). Yleisesti tiedetään, että ENRI-alueen monistaminen RT-qPCR:llä on hyvin herkkä menetelmä. Seuraava työvaihe olisi ollut monistaa rinnakkain ENRI- ja VP4/2 aluetta ja tutkia kummankin suhteellista herkkyyttä.

4.7 Rinovirustyyppien RT-qPCR

Työn lopuksi testattiin optimoitua RT-qPCR menetelmää käyttäen erilaisista rinovirustyyppikannoista eristettyjä RNA-paloja näytteinä. Kaikki 18 rinovirustyyppiä antoivat positiivisen tuloksen, joten työssä optimoidun RT-qPCR-menetelmän toimivuus pystyttiin vahvistamaan.

5 LOPPUPÄÄTELMÄT

Työssä saavutettiin tärkein tavoite, joka oli monistaa rinovirusten VP4/2-alueita RT-qPCR-menetelmällä. Samalla määritettiin menetelmän herkkyys. VP4/2-alueen pituuteen nähden menetelmä osoittautui melko herkäksi monistettaessa plasmidinäytteitä käytetyillä qPCR-reaktiosarjoilla. Työssä käytetty menetelmä oli loppujen lopuksi melko hyvin toimiva eri olosuhteissa; testien suorituksissa saatiin käyttää mm. eri puskuriliuoksia ja RNA-inhibiittoreita ja silti saatiin luotettavia tuloksia.

Työssä suoritettu RT-qPCR:n optimointi voisi olla esim. esityötä lopulliselle validoinnille. Seuraavaksi olisi loogista testata työvaiheiden toistettavuutta; samat tulokset tulisi saada riippumatta työn suorittajasta. Eri ihmisillä saattaa silti olla erilainen pipetointitarkkuus, mikä luo oman haasteen testien toistettavuudelle. Tärkeintä olisi ainakin itse saada samat tulokset jos olosuhteet ja reagenssit pysyvät samoina.

Toinen mahdollinen työvaihe olisi testata kliinisiä näytteitä, jotka on otettu suoraan potilaasta. Kliiniset näytteet saattavat sisältää suuria määriä muuta kuin halutun kohteen genomia, jotka saattavat vaikuttaa menetelmän herkkyyteen negatiivisesti. Tämän vuoksi olisi erityisen tärkeää testata pystytäänkö optimoitua RT-qPCR-menetelmää käyttää diagnostisten näytteiden analysointiin.

6 LÄHTEET

- 1 C. Savolainen, S. Blomqvist, Mick N. Mulders. and T. Hovi, (2002) Journal of General Virology: Genetic clustering of all 102 human rhinovirus prototype strains: serotype 87 is close to human enterovirus 70
- 2 R. Österback,a T. Tevaluoto,a T. Ylinen,a V. Peltola,b P. Susi,a,c T. Hyypiä,a M. Warisa (2013), Journal of Clinical Microbiology: Simultaneous Detection and Differentiation of Human Rhino- and Enteroviruses in Clinical Specimens by Real-Time PCR with Locked Nucleic Acid Probes
- 3 A. Wisdom, E. C. McWilliam Leitch, E. Gaunt, H. Harvala, and P. Simmonds (2009), Journal of Clinical Microbiology, Screening Respiratory Samples for Detection of Human Rhinoviruses (HRVs) and Enteroviruses: Comprehensive VP4-VP2 Typing Reveals High Incidence and Genetic Diversity of HRV Species C
- 4 S. Jacobs, D. Lamson, K. St. George and T. Walsh (2013) Human Rhinoviruses. Clin. Microbiol. Rev. January 2013 vol. 26 no. 1 135–16