

Opinnäytetyö (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikka

Biotekniikka

2012

Sarianne Lukkaroinen

# COXSACKIEVIRUS A9 - NÄYTTEIDEN VP1- JA 3D- GEENIEN RT-PCR-REAKTIOT JA PCR-TUOTTEIDEN SEKVENSOINTI



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU  
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Sarianne Lukkaroinen

## COXSACKIEVIRUS A9 -NÄYTTEIDEN VP1- JA 3D-GEENIEN RT-PCR-REAKTIOT JA PCR-TUOTTEIDEN SEKVENSOINTI

Työn tarkoituksena oli kehittää menetelmä ja tuottaa CAV9-näytteiden VP1- ja 3Dpol-geenialueista PCR-tuotteet ja määrittää niitä vastaavat sekvenssit. VP1- ja 3D-geenien sekvenssejä vertaillaan silloin, kun halutaan verrata virusten muuntumista. VP1-geeni tuottaa rakenneproteiinia, jonka avulla virus sitoutuu solun pintaan, reseptoriin. 3D-geeni taas tuottaa entsyymiä, joka monistaa genomia. Tässä opinnäytetyössä selvitettiin myös vaikuttaako PCR-tuotteen puhdistustapa sekvensointitulokseen. Lisäksi tutkittiin CAV9-viruksen adaptaatiota keuhkosyöpäsolulinjaan mm. PCR:n ja immunofluoresenssin avulla.

Tässä työssä tutkittavana oleva Coxsackievirus A9 (CAV9) kuuluu ihmisen enterovirus (HEV) B-lajiin. Enterovirukset taas kuuluvat enterovirus-sukuun ja pikornavirus-perheeseen. Pikornavirus-perheeseen kuuluu 12 sukua, joista yleisimpiä ihmisen taudinaiheuttajia ovat entero-, rino-, hepato- ja parechovirukset. Pikornavirukset ovat pieniä pallomaisia ja vaipattomia RNA-virusia. CAV9 on yleinen ihmispatogeeni, joka aiheuttaa hengitystieinfektioita, sydänlihastulehduksia ja keskushermostoinfektioita. CAV9:llä on VP1-proteiinissa arginiini-, glysiini- ja aspartaatti-aminohappojen muodostama RGD-motiivi, jonka avulla se sitoutuu solun pinnan reseptoreihin.

Työn suoritus aloitettiin eristämällä viruksista RNA. RNA:sta tehtiin cDNA RT-reaktiossa antisense-alkukeilla. RT-reaktiosta saatua cDNA:ta käytettiin templaattina PCR:ssä. PCR-tuotteet puhdistettiin, jonka jälkeen ne ajettiin agarosigeelille. Puhdistetut DNA-näytteet lähetettiin sekvensoitavaksi. Sekvenssit analysoitiin silmämääräisesti. Tämän lisäksi tehtiin infektion kuvantaminen pasasointinäytteistä immunofluoresenssimikroskoopilla. Tässä työssä käsiteltiin kahta eri näytesarjaa, rekombinaatio- ja pasasointisarjaa.

Rekombinaatiosarjassa saatiin 56 sekvenssiä. Pasasointisarjassa saatiin yhteensä 66 sekvenssiä. Näytteiden puhdistuksessa ei ollut juuri mitään eroa, joten kaikkia menetelmiä voi käyttää PCR-tuotteen puhdistamiseen. Rekombinaatiosarjassa saatiin tarvittava määrä sekvenssejä, jotta niitä voidaan tulevaisuudessa vertailla. Pasasointisarjassa saatiin reilusti yli puolelle näytteistä kunnollinen sekvenssi. A549-soluja infektoitiin pasasointisarjan viruksilla. Immunofluoresenssimikroskoopin avulla nähtiin, että virukset ovat muuntuneet, mutta ne ovat sopeutuneet uusiin olosuhteisiin.

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Biotechnology and Food Technology | Biotechnology

June 2012 | 44

Instructors: Ilari Suominen (Ph.D.), Petri Susi (Ph.D.) and Eveliina Karelehto (M.Sc.)

Sarianne Lukkaroinen

## RT-PCR REACTIONS OF THE VP1 AND 3D GENES OF COXSACKIEVIRUS A9 SAMPLES AND SEQUENCING OF PCR PRODUCTS

The purpose of the thesis was to develop the method and to produce the PCR products of the VP1 and 3D gene regions of the CAV9 samples and to determine the corresponding sequences. The sequences of the VP1 and 3D genes are compared when a comparison of virus transformation is desired. The VP1 gene produces the structural protein with the help of which the virus binds itself to the cell surface, the receptor. The 3D gene, then produces the enzyme which duplicates the genome. In this thesis it also was clarified if the purification of the PCR product affects the sequencing result. Furthermore, the adaptation of the CAV9 virus to a lung cancer cell line was studied, among other means, with the help of PCR and immunofluorescence.

The coxsackievirus A9 (CAV9) studied in this thesis belongs to the species human enterovirus B, (HEV). Enteroviruses in turn belong to the genus Enterovirus and the family Picornaviridae. The family Picornaviridae includes 12 families, the most common human pathogens being enterovirus, rhinovirus, hepatovirus and parechoviruses. Picornaviruses are small spherical and single stranded RNA viruses. CAV9 is a general pathogen which causes respiratory tract infections, myocarditis and central nervous system infections. CAV9 has in the VP1 protein an RGD motive, formed by the arginyl-glycyl-aspartic acid, with the help of which it binds itself to the receptors on the surface of the cell.

The study was begun by isolating RNA from the viruses. RNA was converted into cDNA in an RT reaction with antisense primers. The cDNA that was obtained from the RT reaction was used as a template in the PCR reaction. The PCR products were purified after which they were driven onto agarose gel. The purified DNA samples were sent to be sequenced. The sequences were analyzed visually. In addition to this, the imaging of the infection performed by immunofluorescence microscopy of passage samples. In this thesis two different sample series were dealt with, a recombination and a passage series.

In the recombination series 56 sequences were obtained. In the passage series altogether 66 sequences were obtained. There was hardly any difference in the purification of the samples so all the methods can be used for the purification of the PCR product. In the recombination series a sufficient number of sequences was obtained so that they can be compared in the future. In the passage series a decent sequence was obtained for well more than half of the samples. The A549 cells were infected with the viruses from the passage series. With the help of immunofluorescence microscopy it was seen that the viruses had transformed but had adapted themselves to the new conditions.

**KEYWORDS:** CAV9, Picornavirus, VP1, 3D, RGD motif, virus evolution,

# SISÄLTÖ

<b>KÄYTETYT LYHENTEET</b>	<b>7</b>
<b>1 JOHDANTO</b>	<b>8</b>
<b>2 PIKORNAVIRUKSET</b>	<b>9</b>
2.1 Coxsackievirus A9	11
2.2 Virusevoluutio	11
<b>3 NÄYTESARJAT</b>	<b>13</b>
<b>4 MENETELMÄT</b>	<b>14</b>
4.1 Virus-RNA:n eristys	14
4.2 RT-PCR	14
4.3 Agarosigeelielektroforeesi	16
4.4 PCR-tuotteen puhdistus	17
4.5 DNA:n konsentraation mittaaminen	19
4.6 Sekvensointi	20
4.7 Sekvenssien analysointi	21
4.8 Immunofluoresenssi	22
<b>5 TYÖN SUORITUS</b>	<b>24</b>
5.1 Virus-RNA:n eristys	24
5.2 RT-PCR	25
5.3 Agarosigeelielektroforeesi	28
5.4 Näytteen käsittely sekvensointia varten	28
5.5 Sekvensointi	29
5.6 Pasasoitujen virusnäytteiden infektion kuvantaminen A549-soluilla	30
<b>6 TULOKSET</b>	<b>32</b>
6.1 TYÖPAKETTI 1	33
6.1.1 RNA:n eristys, RT-PCR ja AGE-analyysi	33
6.1.2 Sekvensointi	34
6.2 TYÖPAKETTI 2	34
6.2.1 RT-PCR ja AGE-analyysi	34
6.2.2 Sekvensointi	35
6.2.3 Näytteen käsittely sekvensointia varten	35

6.2.4 Pasasoitujen virusten kasvattaminen A549- ja RD-soluissa	37
6.2.5 Immunofluoresenssi	38

<b>7 PÄÄTELMÄT</b>	<b>41</b>
--------------------	-----------

<b>LÄHTEET</b>	<b>43</b>
----------------	-----------

## **LIITTEET**

Liite 1. Rekombinaatiosarja.	
Liite 2. Pasasointisarja	
Liite 3. GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder	

## **KUVAT**

Kuva 1. Pikornaviruksen rakenneproteiinien asettuminen. (ViralZone)	10
Kuva 2. Cocksackievirus A9:n genomi. (Muokattu Airaksinen, 2000)	11
Kuva 3. Polymeerasiketjureaktio. (Suominen ym., 2010)	16
Kuva 4. DNA:n sekvensointi kapillaarielektroforeesilla. (Suominen ym., 2010)	21
Kuva 5. a) Suora ja b) epäsuora immunofluoresenssileimaus. (Solunetti, 2006)	22
Kuva 6. CAV9-VP1-PCR-tuotteiden ajo agarosigeelillä. Näytteet ovat puhdistamattomia PCR-tuotteita rekombinaatiosarjasta.	33
Kuva 7. CAV9-VP1-PCR-tuotteiden ajo agarosigeelillä. Näytteet ovat puhdistamattomia PCR-tuotteita pasasointisarjasta.	35
Kuva 8. Kokomarkkerina GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder, 1. 08-ACAV/10 2. 09-ACAV/8 3. 08-ACAV/10 4. 09-ACAV/8 5. 08-ACAV/10 6. 09-ACAV/8.	36
Kuva 9. 09-ACAV/8 GeneJET™ PCR Purification-kitillä puhdistettuna.	37
Kuva 10. 09-ACAV- infektiot eri aikapisteissä.	38
Kuva 11. 09-RCAV-infektiot eri aikapisteissä.	39
Kuva 12. 09-ARGD-infektiot eri aikapisteissä.	39
Kuva 13. 09-RRGD-infektiot eri aikapisteissä.	40

## **KUVIOT**

Kuvio 1. Nukleiinihappojen puhdistus. (Muokattu Biosettia, 2011)	18
Kuvio 2. Työn eteneminen.	24
Kuvio 3. Alukkeiden sijainnit ja suunnat.	25

## TAULUKOT

Taulukko 1. Alukkeiden sekvenssit.	26
Taulukko 2. RT-reaktio.	26
Taulukko 3. PCR-reaktio.	27
Taulukko 4. PCR-ajo-olosuhteet.	28

## KÄYTETYT LYHENTEET

Aluke	DNA-jakso, joka sitoutuu sille komplementaariseen kohtaan DNA:ssa
A549	Ihmisen keuhkocytopäsolulinja
AGE	Agaroosigeelielektroforeesi
CAV9	Coxsackievirus A9
cDNA	Komplementaarinen DNA
DNA	Deoksiribonukleiinihappo
PBS	Fosfaattipuskuroitu suolaliuos
RD	Ihmisen lihassolulinja
RNA	Ribonukleiinihappo
RNAasi	RNA:ta pilkkova entsyymi
RNAasi-inhibiittori	Estää RNAasin toiminnan
RNA-polymeraasi	Entsyymi, joka syntetisoi RNA:ta
RT-PCR	Käänteistranskriptio-polymeraasiketjureaktio

# 1 JOHDANTO

Tässä opinnäytetyössä tutkittavana oleva coxsackievirus A9 (CAV9) kuuluu ihmisen enterovirus B-lajiin (HEV-B). Enterovirukset kuuluvat enterovirus-sukuun (eng. genus *Enterovirus*) ja pikornavirus-perheeseen (eng. family *Picornaviridae*). Pikornavirukset ovat pieniä pallomaisia ja vaipattomia RNA-viruksia. Enterovirukset aiheuttavat mm. aivokalvontulehdusta, sydänlihastulehdusta, ihottumaa ja hengitystieinfektioita.

CAV9 on yleinen ihmispatogeeni, jonka genomi muodostuu neljää rakenneproteiinia (VP1-VP4) sekä niitä seuraavia ei-rakenteellisia proteiineja koodaavista geeneistä (2A-C ja 3A-3D). VP1- ja 3D-geenien sekvenssejä vertaillaan silloin, kun halutaan verrata virusten muuntumista (esim. rekombinaatiota). VP1-geeni tuottaa rakenneproteiinia, jonka avulla virus sitoutuu solun pintaan, reseptoriin. 3D-geeni taas tuottaa entsyymiä, joka monistaa genomia (eng. RNA-dependent RNA polymerase).

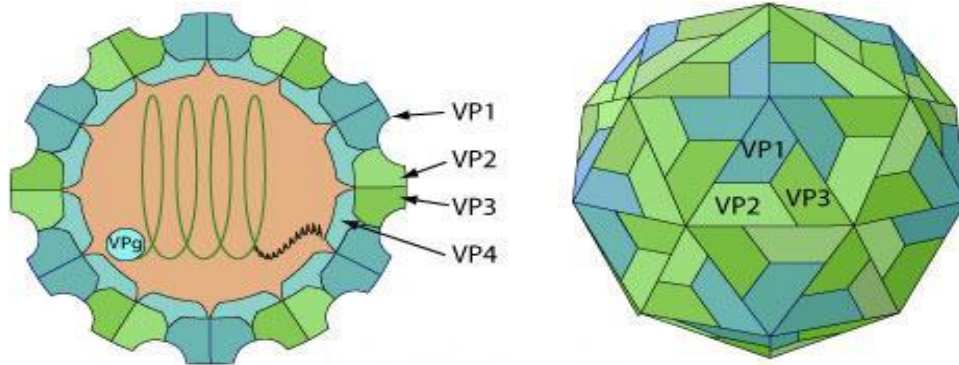
Työ tehtiin Turun yliopistolla, Lääketieteellisessä tiedekunnassa, Virusopilla. Työn tarkoituksena oli kehittää menetelmä ja tuottaa HEV B-lajin CAV9-näytteiden VP1- ja 3Dpol-geenialueista PCR-tuotteet ja määrittää niitä vastaavat sekvenssit. Menetelmää voidaan käyttää tyyppitykseen tai rekombinaatiotutkimuksiin käyttäen myös muita virussekvenssejä. Tässä opinnäytetyössä selvitettiin myös vaikuttaako PCR-tuotteen puhdistustapa sekvensointitulokseen. Lisäksi tutkittiin CAV9-viruksen adaptaatiota keuhkosityöpäsolulinjaan mm. PCR:n ja immunofluoresenssin avulla.



## 2 PIKORNAVIRUKSET

Pikornavirus-perheeseen kuuluu 12 sukua, joista yleisimpiä ihmisen taudinaiheuttajia ovat entero-, rino-, hepato- ja parechovirukset. Pikornaviruksia tunnetaan yli 250 serotyyppiä. Enterovirus-sukuun kuuluu 10 lajia, joista osa käsittää merkittäviä ihmispatoogeneja. Näitä ovat ihmisen enterovirus A-D-lajit (HEV A-D) ja ihmisen rinovirus A-C (HRV A-C). Nykyisen jaottelun mukaan rinoviruksetkin siis kuuluvat enterovirusten sukuun. Rinovirukset jaetaan kolmeen lajiin A-C. Enterovirukset aiheuttavat mm. aivokalvontulehduksia, sydänlihastulehduksia, ihottumaa ja hengitystieinfektioita, niillä epäillään olevan osuutta myös nuoruustypin diabeteksen ja sepelvaltimotaudin syntyyn. Rinovirukset aiheuttavat eniten tavallista flunssaa. Osassa kehitysmaissa esiintyy edelleen poliovirusta, joka aiheuttaa halvauksia. Hepatovirus-suvun ainoa laji hepatiitti A aiheuttaa maksatulehdusta. Sorkkaeläimillä esiintyvä suu- ja sorkkatautivirus kuuluu myös pikornaviruksiin (Ehrenfeld ym., 2010; [www.picornaviridae.com](http://www.picornaviridae.com), [www.picornastudygroup.com](http://www.picornastudygroup.com)).

Pikornavirukset ovat pieniä pallomaisia ja vaipattomia RNA-viruksia. Ne ovat läpimitaltaan noin 28 nm. Pikornavirusten genomi koostuu positiivissäikeisestä, yksinauhaisesta RNA:sta, joka toimii samaan tapaan kuin solujen lähetti-RNA (mRNA). Genomi on keskimäärin 7100 - 8900 emäksen mittainen. Kuori, joka ympäröi RNA-genomia, koostuu 60 samanlaisesta rakenneyksiköstä. Näistä jokainen sisältää neljä rakenneproteiinia VP1, VP2, VP3 ja VP4. VP1-VP3 muodostavat kuoren ulkopinnan ja VP4 sijaitsee kuoren sisäpuolella. Rakenneproteiinien asettuminen on esitetty kuviossa 1. Pikornaviruksilla on myös ei-rakenteellisia proteiineja, 2A-C ja 3A-3D. (Ehrenfeld ym., 2010; ViralZone)



Kuva 1. Pikornaviruksen rakenneproteiinien asettuminen. (ViralZone)

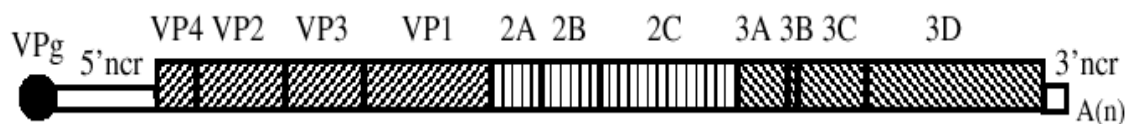
Koska pikornaviruspartikkelit eivät koostu membraanipinnasta, niiden proteiini-kuoressa on alueita, joiden avulla virukset tarttuvat solupinnan reseptoreihin päästäkseen solun sisään ja aloittaakseen replikaatiosyklin. Pikornavirusreseptoreja tunnetaan yli kymmenen, ja tällä hetkellä ei tunneta tarkkaan, millä mekanismeilla eri virustyytit vuorovaikuttavat eri reseptorien kanssa. Varsin yleinen piirre tälle on kuitenkin se, että reseptorit esiintyvät varsin yleisesti eri solujen pinnalla, ja tämän takia pikornavirustyypeillä on varsin laaja-alainen ja samanlainen infektioprofiili riippumatta niiden eroavaisuuksista. Solun sisällä virus kulkeutuu solun omien endosytoottisten vesikkelien avulla replikaatiopaikkaan, jossa genomi vapautuu sytoplasmaan. Pikornavirus-RNA toimii suoraan lähetti-RNA:na päästyään solun sisään. Lähetti-RNA tuottaa suuren polyproteiinin, joka pilkkoutuu yksittäisiksi proteiineiksi, joita tarvitaan viruksen lisääntymisessä. Virus myös häiritsee solun RNA-synteesiä sekä muuta aineenvaihduntaa, jolloin se saa solun omaan käyttöönsä. (Rossmann ym. 2002)

Enterovirusten tunnistamiseen potilasnäytteistä käytetään polymeraasiketjureaktiota (RT-PCR), joka tunnistaa viruksen RNA-genomin. RT-reaktiolla tuotetaan RNA:sta cDNA-kopio, jota käyttäen DNA-jakso monistetaan siihen tarttuvien alukkeiden avulla. Potilasnäytteestä löydetty virus voidaan tyypittää VP1-proteiinin nukleotidisekvenssin avulla, koska se korreloi hyvin tunnettujen serotyyppien kanssa. Tyypitysmenetelmää on kehitetty viime vuosien aikana, ja siitä on olemassa ns. partial-VP1-menetelmä ja täyspitkää VP1-geeniä monistava

menetelmä. (Lönnrot ym., 1999; McWilliam Leitch ym., 2009; Nix ym., 2006; Oberste ym., 1999; Peltola ym., 2008)

## 2.1 Coxsackievirus A9

Coxsackievirus A9 (CAV9) on yleinen ihmispatogeeni, joka aiheuttaa hengitystieinfektioita, sydänlihastulehduksia ja keskushermostoinfektioita. Coxsackievirus A9 on yksi kuudestakymmenestä ihmisen enterovirus B-lajin (HEV B) serotyypistä. CAV9:n genomi on noin 7500 emäksen mittainen, genomi on esitetty kuvassa 2. CAV9:llä on VP1-proteiinin C-terminaalissa arginiini-, glysiini- ja aspartaatti-aminohappojen muodostama RGD-motiivi, jonka avulla virus sitoutuu solun pinnan reseptoreihin. CAV9:n primäärisinä reseptoreina toimivat  $\alpha\beta 3$ - ja  $\alpha\beta 6$ -integroiniit. Vaikka RGD-motiivi puuttuisi, CAV9:n on todettu silti infektoivan mm. RD-soluja (ihmisen rabdomyosarkooma). Reseptoreina voivat toimia myös GRP78-proteiini ja  $\beta_2$ -mikroglobuliini. (Cui ym., 2010; Heikkilä ym., 2009; Heikkilä ym. julkaisematon)



Kuva 2. Coxsackievirus A9:n genomi. (Muokattu Airaksinen, 2000)

## 2.2 Virusevoluutio

Virusgenomit ovat hyvin monimuotoisia käsittäen joko DNA:ta tai RNA:ta. RNA-virukset monistavat genomiaan normaalisti sytoplasmassa ja voivat olla yksi- tai kaksisäikeisiä ja positiivi- tai negatiivisäikeisiä. RNA-viruksille on ominaista, että ne muuntuvat koko ajan ja paljon nopeammin kuin DNA-virukset. Hämmästyttävää kyllä, tämä on myös etu virusten selviämiselle. Muuntuneet virukset voivat olla patogeenejä ihmisille, kasveille tai eläimille, jolloin niillä voi olla kohtalokkaita vaikutuksia. Virusten evoluutio on nopeaa, mikä tekee niistä vieläkin vaarallisempia. Viruspopulaation jatkuva muutos selektiivisten paineiden edessä on

virusevoluution määritelmä. Virusten evoluutiomekanismeja ovat mm. mutaatio, rekombinaatio ja valinta. (Flint ym., 2009; Simmonds & Welch 2006)

Viruksen koodaama RNA-polymeraasi, joka sijaitsee 3D-alueella (genomin 3'-päässä), monistaa genomia, mutta se tekee virheitä, jolloin kaikki uudet virusgenomit poikkeavat toisistaan. Jokainen virusgenomi poikkeaa noin yhden nukleotidin verran mallistaan. Tätä viruksen "tapaa" esiintyä sekvensseiltään erilaisena viruspopulaationa kutsutaan "quasispecies"-nimellä, ja se mahdollistaa viruksen selviämisen muuttuvissa olosuhteissa. (Vignuzzi ym., 2006)

Monilta RNA-polymeraaseilta puuttuu korjausaktiivisuus, kun taas DNA-polymeraaseilta se löytyy, minkä takia ne tekevät paljon vähemmän virheitä kuin RNA-virukset. Virukset voivat muuttua myös rekombinaation kautta, jolloin kahden viruksen genomin osat voivat liittyä toisiinsa. Osittain tämä selittyy sillä, että replikaation aikana polymeraasi siirtyy templaatilta toiselle. Viruksissa tapahtuu myös luonnollista valintaa. (Simmonds & Welch 2006)

### 3 NÄYTESARJAT

Opinnäytetyössä tarkasteltiin kahta eri näytesarjaa, joista molemmista tutkittiin CAV9-virusta. Näytesarjoja kutsuttiin nimillä; rekombinaatio- ja pasasointisarja. Rekombinaatiosarja (Liite 1) käsitti potilasnäytteistä eristettyjä virusisolaatteja viidenkymmenen vuoden ajalta. Näytteet oli kerätty eri puolilta maailmaa. Näitä näytteitä oli tutkittu aiemmin, ja niistä oli valmiina puhdistettuja VP1- ja 3Dpol-PCR-tuotteita, sekä virus-cDNA:ta että -RNA:ta. Näytteiden tutkiminen aloitettiin valmiista näytteistä, jotka sekvensoitiin ja analysoitiin, muiden näytteiden kohdalla tehtiin PCR (cDNA) tai RT-PCR (RNA). Pasasointisarja (Liite 2) käsitti erilaisissa soluviljelmissä useaan kertaan kierrätettyjä (pasasoituja) viruskantoja, joiden lähtövirus oli sama. Pasasointisarjassa oli kahtena eri vuonna (2008/2009) kerätyt pasasointisarjat. Pasasointisarjassa suurin osa näytteistä oli valmiina puhdistettuina VP1- ja 3Dpol-PCR-tuotteina. Rekombinaatiosarjassa oli yhteensä 91 näytettä, joista haluttiin sekvenssi sekä 3D- että VP1-alueelle. Työssä oli jäljellä 71 sekvensoimatonta aluetta, kun työ aloitettiin. Pasasointinäytteitä oli 64 ja niille haluttiin sekvenssi VP1-alueelle.

## 4 MENETELMÄT

### 4.1 Virus-RNA:n eristys

Solujen hajotus on ensimmäinen vaihe RNA:n eristyksessä. Solujen hajotus tapahtuu yleensä mekaanisella, kemiallisella ja entsyymaattisella menetelmällä. Laadukkaan RNA:n eristämiseksi on tärkeää, että nukleiinihappoja hajottavat ribonukleaasit inaktivoidaan käyttämällä RNAasi-inhibiittoreita. Soluhajotuksen jälkeen RNA eristetään saostamalla tai suodattamalla. (Solunetti, 2006)

Tässä työssä RNA:n eristämiseen käytettiin E.Z.N.A<sup>TM</sup> Viral RNA kittiä (Omega bio-tek, 2007). Se on suunniteltu virus-RNA:n eristämiseen soluvapaista nesteistä, kuten plasmasta, seerumista ja virtsasta. Menetelmä poistaa täydellisesti epäpuhtaudet ja RNAasi-inhibiittorit. E.Z.N.A<sup>TM</sup> Viral RNA kitillä puhdistettu RNA on valmis käytettäväksi RT-PCR-menetelmässä.

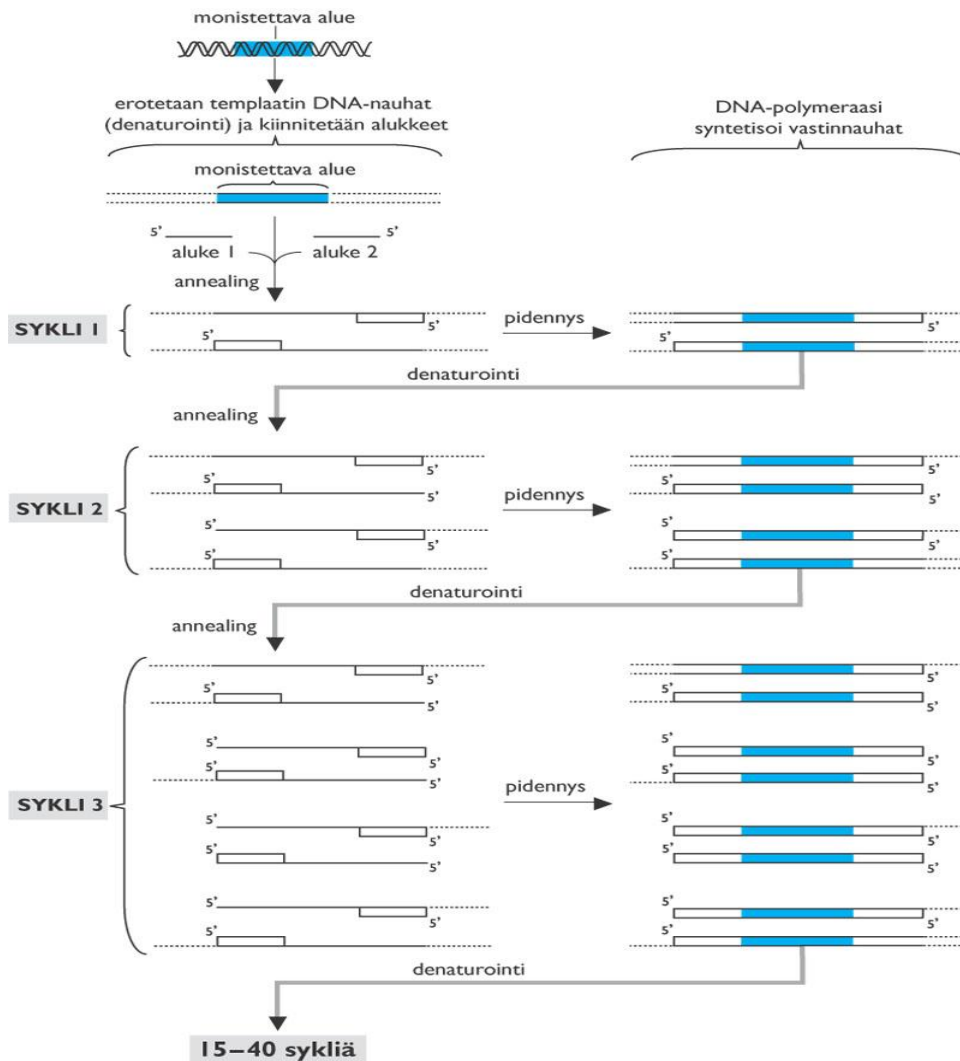
E.Z.N.A<sup>TM</sup> Viral RNA kitti perustuu HiBind® silikamatriksin sitoutumisominaisuuksiin. Solunäyte sekoitetaan ensin erittäin denaturoivaan puskuriin, jolloin solut hajoavat ja RNAasit inaktivoituvat suojaten virus-RNA:ta hajoamiselta. Puskurin säätämisen jälkeen näytteet pipetoidaan HiBind® RNA-kolonneihin. Sentrifugoinnissa näyte kulkee kolonnin läpi ja virus-RNA sitoutuu HiBind® matriksiin. Puhdistettu virus-RNA eluoidaan RNAasi-vapaaseen veteen kahden pesuvaiheen jälkeen.

### 4.2 RT-PCR

Polymeraasiketjureaktiossa eli PCR:ssä DNA toimii templaattina. PCR perustuu korkeaa lämpöä kestävä DNA-polymeraasin toimintaan. PCR-reaktiossa käytetään kahta sekvenssi-spesifistä aluketta, jotka kiinnittyvät DNA:n eri juosteisiin, toinen alkupäähän ja toinen loppupäähän. Kun templaattina käytetään RNA:ta, RNA täytyy ensin kääntää cDNA:ksi käänteistranskriptaasi-entsyymillä eli ns. RT-reaktiossa. RT-reaktiossa loppupään aluke sitoutuu RNA:han, ja RT-

entsyymi muodostaa cDNA:n, jota käytetään PCR:ssä. RT- ja PCR-reaktiot voidaan toteuttaa yhdessä tai erikseen. Yhdessä suoritettussa RT-PCR-reaktiossa RT- ja PCR-entsyymit laitetaan samaan putkeen; cDNA:n valmistuksessa käytetään ensin lämpötilaa, jossa käänteistranskriptaasi toimii tehokkaasti, jonka jälkeen jatketaan suoraan PCR-reaktiosykliin. Kaksivaiheisessa RT-PCR-reaktiossa RT-vaihe tehdään ensin lämpöhauteella, ja siitä saatu cDNA-tuote otetaan erilliseen putkeen, jossa PCR-reaktio tapahtuu. (Roche; Suominen ym., 2010)

PCR-reaktio tapahtuu kolmessa vaiheessa, millä tarkoitetaan sitä, että reaktiossa vuorottelevat denaturointi-, annealing- ja pidennysvaiheet. PCR-reaktio alkaa DNA:n denaturoimisella korkeassa lämpötilassa (94 °C - 96°C). Seuraavaksi lämpötilaa lasketaan siten, että alukkeet voivat sitoutua denaturoituun, yksinauhaiseen DNA-templaattiin. Annealing-lämpötila (40 °C – 65 °C) on sekvenssistä riippuvaista. DNA-ketjun muodostuminen tapahtuu pidennysvaiheessa (72 °C), jolloin DNA-polymeraasi liittyy uuteen nauhaan vapaita nukleotideja templaatin mallin mukaan. Syklejä on yleensä 25-40 kpl ja PCR-ajo kestää 1-3 tuntia. Kuvassa 3 on esitetty PCR-reaktion vaiheet. (Roche; Suominen ym., 2010)



Kuva 3. Polymeraasiketjureaktio. (Suominen ym., 2010)

#### 4.3 Agarosigeelielektroforeesi

Agarosigeelielektroforeesilla analysoidaan nukleiinihappoja, joiden koko on noin 0,1 - 50 kb. Agarosi on merilevästä eristetty polysakkaridi, joka liukenee veteen kuumennettaessa, ja jäähtyessään se muodostaa hyytelömäisen geelin. Agarosigeelielektroforeesissa käytetään hyväksi sähkökenttää. DNA ja RNA ovat negatiivisesti varautuneita, jolloin ne kulkeutuvat sähkökentässä kohti positiivista napaa eli anodia. DNA:n koko ja muoto vaikuttavat niiden kulkeutumiseen geelillä, geelin verkkomainen rakenne hidastaa eniten suurten DNA-molekyylien vauhtia ja pienempikokoiset molekyylit kulkeutuvat pidemmälle,



jolloin ajon aikana erikokoiset DNA-molekyylit ajautuvat niille ominaisissa vyöhykkeissä. (Suominen ym., 2010)

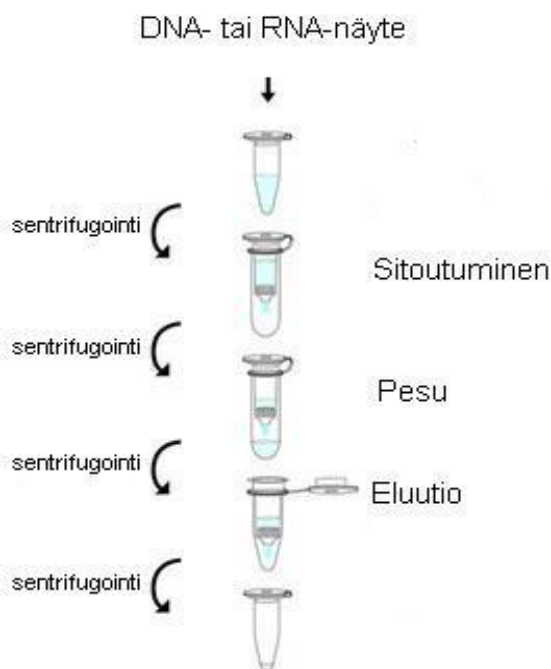
DNA ja RNA tarvitsevat värin näkyäkseen geelillä. Etidiumbromidi on käytetyin väriaine. Se lisätään geelin joukkoon, josta se tunkeutuu nukleiinihappojen emästen väliin, DNA:n kulkeutuessa geelillä. Valaistaessa geeliä UV-valolla, etidiumbromidi fluoresoi oranssinpunaisena. Agarosigeeli valetaan geelialustalle samaan puskuriin, joka toimii myös ajopuskurina. Kampa asetetaan tarjotimelle, ja poistetaan geelin jäähmetyttyä. Geeli asetetaan ajolaitteeseen, jossa on ajopuskuria siten, että se peittää geelin ja täyttää näytekolot. Näytteiden lisäämisen jälkeen turvakansi asetetaan ajoaltaan päälle ja kytketään virtalähde päälle. Jännite välillä 20 - 200 V. Geeli kuvataan ajon jälkeen UV-valon avulla, jonka jälkeen tuloksia analysoidaan tietokoneen avulla tai silmämääräisesti. (Suominen ym., 2010)

Ennen näytteiden pipetoimista näytekaivoihin, niihin pitää lisätä näytepuskuria, joka on ajopuskuria raskaampaa. Näytepuskurin väriaineita voidaan käyttää ajon seuraamiseen ilman, että ajo täytyy keskeyttää. Näytepuskuri auttaa näytteen pipetoimisessa näytekaivon pohjalle. Jotta saadaan selville näytteiden koko, käytetään kokostandardia. Kokostandardi on usein DNA, joka on pilkottu jollakin restriktioentsyymillä, jolloin fragmenttien koot tunnetaan ja niitä voidaan vertailla näytteiden kokoon. (Suominen ym., 2010)

#### 4.4 PCR-tuotteen puhdistus

PCR-reaktion jälkeen näytteet pitää puhdistaa sekvensointia varten. Puhdistukseen käytetään monenlaisia menetelmiä kuten uuttamista ja saostamista, sentrifugointia ja elektroforeesia, mutta nykyään käytetään eniten DNA:n puhdistuskittejä, jotka perustuvat silikamenetelmiin. Tässä opinnäytetyössä käytettiin GeneJET™ Gel Extraction-kittiä, GeneJET™ PCR Purification-kittiä ja ExoSAP-protokollan mukaista PCR-tuotteen puhdistusta. (Solunetti, 2006; Suominen ym., 2010)

GeneJET™ Gel Extraction-kitti on suunniteltu DNA-fragmenttien puhdistukseen agarosigeeliltä, joka on tehty joko TAE (Tris-asetatti-EDTA) -puskuri tai TBE (Tris-boraatti-EDTA) -puskuriin. Menetelmä perustuu spin-kolonneihin, jonka sisällä on silikapohjainen kalvo. Käytettäessä GeneJET™ Gel Extraction-kittiä, haluttu kokoinen DNA-fragmentti leikataan agarosigeeliltä. Geelipala liuotetaan sitomispuskuriin, jossa oleva kaotrooppi liottaa agarosin, denaturoi proteiinit ja edistää DNA:n sitoutumista kolonnissa olevaan silikamatriksiin. Liuottamisen jälkeen, se siirretään kolonneihin. Sitomispuskuriin lisätyn väri-indikaattorin ansiosta nähdään onko liuoksen pH sopiva DNA:n sitoutumiseen. Epäpuhtaudet poistetaan pesupuskurilla, jonka jälkeen puhdistettu DNA irrotetaan silikamatriksista eluutiopuskurilla. Menetelmän periaate on esitetty kuviossa 1. (Fermentas, 2011)



Kuvio 1. Nukleinihappojen puhdistus. (Muokattu Biosettia, 2011)

GeneJET™ PCR Purification-kitti on suunniteltu DNA:n puhdistamiseen PCR-reaktiosta syntyneistä tuotteista sekä muista entsyymaattisista reaktioseoksista. Myös tämä menetelmä perustuu spin-kolonneihin, jonka sisällä on silikapohjainen kalvo. GeneJET™ PCR Purification-kitti poistaa tehokkaasti alukkeet, dNTP:t eli

nukleotidit, entsyymit ja suolat PCR-tuotteesta. GeneJET™ PCR Purification-kitin periaate on muuten täysin sama kuin GeneJET™ Gel Extraction-kitin, mutta lähtöaineena on suoraan PCR-reaktiosta saatu reaktioseos ilman geelieristystä. (Fermentas)

ExoSAP-protokolla on yksinkertainen tapa ”puhdistaa” PCR-tuotteet ennen sekvensointia. Eksonukleaasi I poistaa jäljelle jääneet alukkeet ja SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase) poistaa dNTP:t. ExoSAP-menetelmä perustuu siis alukkeiden ja dNTP:n entsyymaattiseen hajotukseen. (Nucleics, 2010)

ExoSAP-protokollaa käytettäessä reaktion lopullinen tilavuus on 32 µl, josta 22 µl on PCR-tuotetta ja 10 µl ExoSAP-sekoitusta. Jos PCR-tuotetta ei ole tarvittua määrää, voidaan ExoSAP-sekoitukseen lisätä milli-Q-vettä. ExoSAP-sekoitukseen (1x) käytetään 0,025 µl eksonukleaasi I:a, 0,250 µl SAP:ia sekä 9,725 µl milli-Q-vettä. Jokaiseen PCR-näytteeseen lisätään 10 µl 1x ExoSAP-sekoitusta, jonka jälkeen sitä inkuboidaan lämpöhauteessa 30 minuuttia 37 °C:ssa ja sen jälkeen 5 minuuttia 95 °C:ssa. Näytteitä säilytetään 4 °C:ssa tai -20 °C:ssa. SAP kannattaa jakaa pieniin osiin (20 µl) ja säilyttää -70 °C:ssa, koska se on taipuvainen inaktivoitumaan muutaman kuukauden säilytyksen jälkeen -20 °C:ssa. (Nucleics, 2010)

#### 4.5 DNA:n konsentraation mittaaminen

DNA:n konsentraatio voidaan määrittää ajamalla näyte ja standardi rinnakkain agarosigeelillä. Vertaamalla niiden vyöhykkeitä saadaan arvio DNA:n konsentraatiosta. Tarkempi tulos saadaan mittaamalla DNA:n absorptio 260 nm:ssa ja samalla saadaan arvio DNA:n puhtaudesta. Mittaus tehdään UV-valoa läpäisevissä kyveteissä. Pienoisspektrofotometrillä kuten NanoDrop-laitteella näytettä tarvitaan vain 0,5 µl – 2,0 µl. NanoDrop on helppo ja nopea tapa selvittää DNA:n, RNA:n tai proteiinin konsentraatio sekä puhtaus. (NanoDrop, 2009; Suominen ym., 2010)

DNA:n konsentraation mittaamiseen käytettiin NanoDrop 2000 C- laitetta (Thermo Scientific). Nanodropilla mitattaessa jalustalle pipetoidaan suoraan 0,5

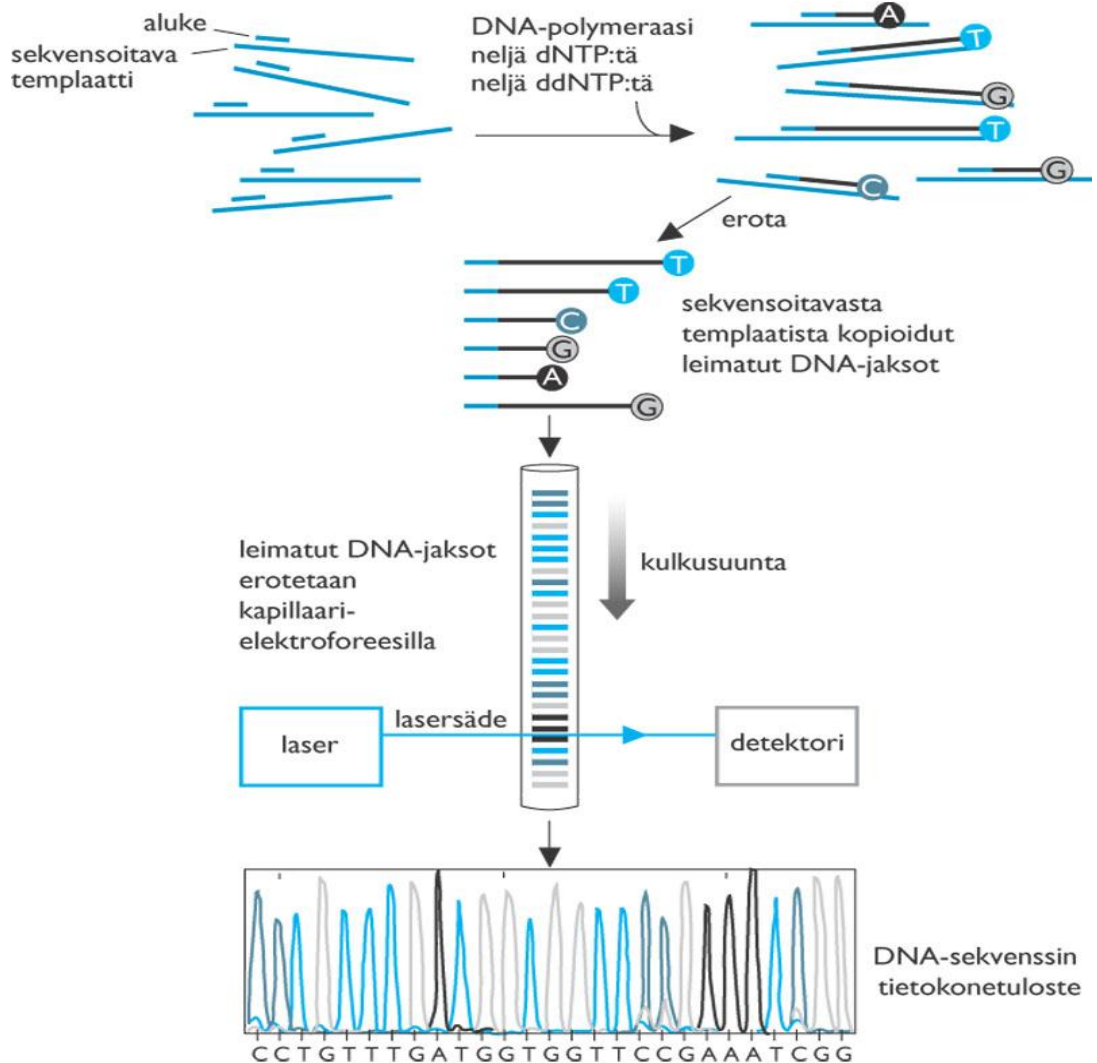
$\mu\text{l} - 2,0 \mu\text{l}$  näytettä. Kannen laskemisen jälkeen muodostuu näytepilari. Tämän jälkeen jalusta liikkuu muodostaen optimaalisen välimatkan (0,05mm – 1 mm). Tulos tulee näkyviin tietokoneelle. Kun mittaus on suoritettu, pinnat pyyhitään nukkaamattomalla liinalla, jonka jälkeen voidaan mitata seuraava näyte. (NanoDrop, 2009)

#### 4.6 Sekvensointi

Sekvensoinnin avulla saadaan selville DNA:n nukleotidijärjestys. DNA:n sekvensointiin on monia menetelmiä, mutta Sangerin dideoksimenetelmä on eniten käytetty suorasekvensointimenetelmä. Sekvensointireaktiot tehdään usein käyttäen kaupallisia operaattoreita. Näyte lähetetään operaattorille ja tulokset saadaan takaisin muutamassa päivässä digitaalisessa muodossa, nukleotidisekvenssinä sekä graafisena kuvana. Erilaisilla tietokoneohjelmilla voidaan analysoida sekvenssidataa kuten tehdä vertailuja geenipankin sekvenssejä vastaan ja tunnistaa sekvenssissä oleva geeni tai säätelyalue. (Aittomäki ym., 2002; Solunetti, 2006)

DNA toimii templaattina sekvensointireaktiossa. Sekvensointireaktio alkaa alukkeen kiinnittymisellä yksijuosteiseen DNA:han. Sekvensointialuke on normaalisti 15-25 nukleotidin mittainen. DNA-polymeraasin avulla syntetisoidaan sekvensoitavalle DNA:lle vastinjuostetta nukleosiditriposfaateista (dNTP). DNA erotellaan ja analysoidaan automatisoidulla kapillaarielektroforeesilla, jossa tunnistus perustuu eri väreillä fluoresoiviin nukleotideihin (Kuva 4). (Aittomäki ym., 2002; Suominen ym., 2010)

Sekvensoitavaksi lähetetyt näytteet pipetoitiin yleensä 96-kuoppalevyille, mutta jos näytteitä oli alle viisi, ne pipetoitiin eppendorf-putkiin. PCR-tuotetta pipetoitiin 5  $\mu\text{l}$ , konsentraatio vaihteli yleensä välillä 2 ng/ $\mu\text{l}$  – 25 ng/ $\mu\text{l}$  ja 1  $\mu\text{l}$  aluketta, jonka konsentraatio oli 10  $\mu\text{M}$ , samaan kuoppaan 96-kuoppalevyille. Kuoppalevy, jolla oli näytteet, toimitettiin sekvensoitavaksi kaupalliselle operaattorille.



Kuva 4. DNA:n sekvensointi kapillaarielektroforeesilla. (Suominen ym., 2010)

#### 4.7 Sekvenssien analysointi

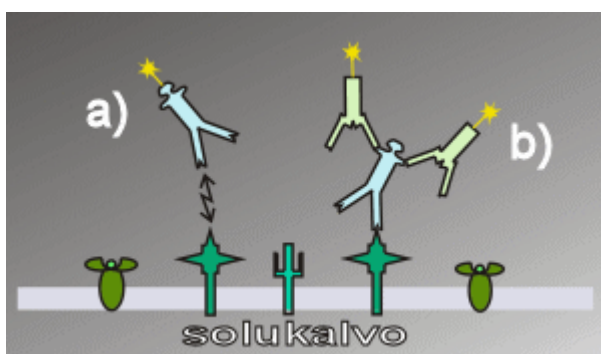
Sekvenssitiedostoja oli kolme aina yhtä sekvenssiä kohden: teksti-, ab1- ja pdf-tiedostot. Tekstitiedosto oli FASTA-muodossa ja pdf-tiedostossa oli kromatogrammikuva. ab1-tiedostossa oli myös kromatogrammikuva, mutta tätä tiedostoa pystyi muokkaamaan siten, että pienimmätkin yksityiskohdat saatiin näkyviin. Kromatogrammikuvasta näki parhaiten oliko sekvensointi onnistunut eli oliko jokaisen nukleotidin kohdalla selkeä yksivärinen piikki. Onnistuneessakaan sekvenssitiedostossa alku ei aina ollut kovin selkeä. Sekvenssin ollessa liian

lyhyt tai epäselvä, kyseinen alue sekvensoitiin uudelleen. Jos sekvensoinnissa nukleotidiksi tuli esim. W, etsittiin kromatogrammikuvasta kohta, joka oli antanut tulokseksi W:n ja vaihdettiin se oikeaksi nukleotidiksi tekstitiedostoon, jos siinä kohdalla oli selkeä yksivärinen piikki.

Sekvenssilistat muodostettiin käytetyn alukkeen ja näytteen mukaan. Rekombinaatiosarjassa 3D-geenit sekvensoitiin käyttäen 3D-IS-aluketta ja VP1-geenit VP1-AS-alukkeella, jonka alueella tutkittava alue on. Aikaisemmissa tutkimuksissa VP1-alueen geenejä oli sekvensoitu VP1-IS- ja VP1-IAS-alukkeilla, näillä kahdella alukkeella saatiin lähes koko geeni sekvensoitua. Pasasointisarjassa tutkittiin RGD-aluetta, joka saatiin selville VP1-IAS-alukkeella. A549-soluilla kasvatettuja näytteitä sekvensoitiin myös VP1-AS-alukkeella.

#### 4.8 Immunofluoresenssi

Immunofluoresenssin (IF) avulla voidaan tutkia erilaisia biologisia näytteitä, esimerkiksi soluja. IF perustuu vasta-aineiden käyttöön ja fluoresenssi-ilmiöön. IF tekniikoissa käytettäviin vasta-aineisiin on liitetty fluorokromeiksi kutsuttuja kemiallisia yhdisteitä. Leimatut vasta-aineet sitoutuvat suorasti tai epäsuorasti haluttuun kohteeseen ja fluorokromin avulla kohde voidaan paikantaa. (Dako)



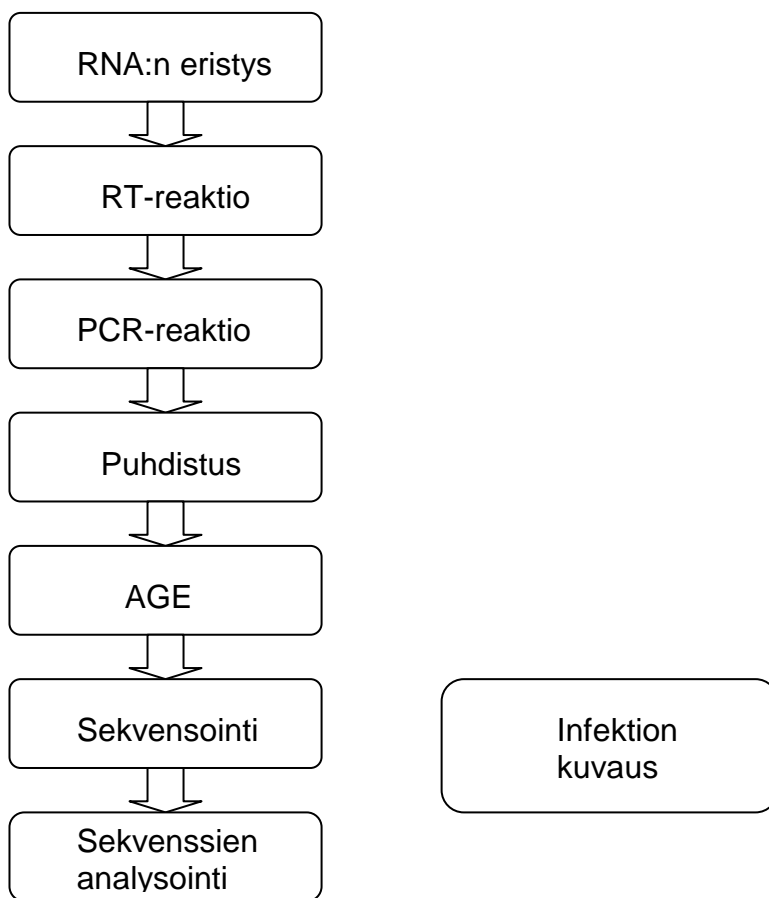
Kuva 5. a) Suora ja b) epäsuora immunofluoresenssileimaus. (Solunetti, 2006)

Immunofluoresenssimenetelmät voidaan jakaa suoraan ja epäsuoraan. Näistä suora on vähemmän käytetty. Siinä fluorokromi on liitetty kohdemolekyyliä sitovaan primaarivasta-aineeseen. Epäsuorassa immunofluoresenssiväryksessä

leimaamaton primaarivasta-aine tunnistetaan fluorokromileimatulla sekundaarivasta-aineella. Immunofluoresenssileimaukset ovat esitetty kuvassa 5. (Dako)

## 5 TYÖN SUORITUS

Virusista eristettiin RNA. RNA:sta tehtiin cDNA RT-reaktiossa antisense-  
alukkeilla. RT-reaktiosta saatua cDNA:ta käytettiin templaattina PCR:ssä. PCR-  
tuotteet puhdistettiin. Puhdistetut PCR-tuotteet ajettiin agarosigeelille. Puhdis-  
tetut DNA-näytteet lähetettiin sekvensoitavaksi. Sekvenssit analysoitiin silmä-  
määräisesti. Tämän lisäksi tehtiin infektion kuvantaminen pasasointinäytteistä  
immunofluoresenssimikroskoopilla. Työjärjestys esitetty kuviossa 2.



Kuvio 2. Työn eteneminen.

### 5.1 Virus-RNA:n eristys

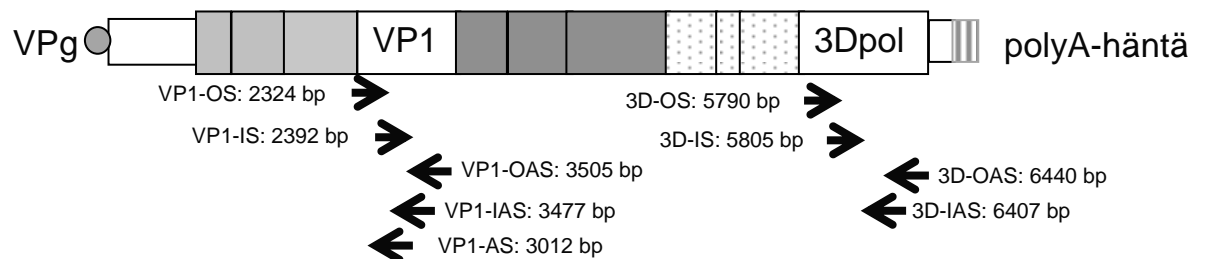
Kliinisistä näytteistä RNA eristettiin E.Z.N.A™ -kitillä (Omega bio-tek) ohjeen mukaan. 150 µl virusnäytettä ja 500 µl QVL-carrier RNA-liuosta sekoitettiin vor-



teksoimalla 30 sekuntia. Kymmenen minuutin inkuboinnin jälkeen seokseen lisättiin 350 µl absoluuttista etanolia ja seosta vorteksoitiin 30 sekuntia. Seos siirrettiin HiBind® RNA -kolonniin, jota sentrifugoitiin 15 sekuntia. Kolonni pestiin absoluuttisella etanolilla laimennetulla RWB-puskurilla. RWB-puskuria pipetoiitiin 750 µl kolonniin, jota sentrifugoitiin, kunnes se oli kuiva. RNA eluoiitiin lisäämällä kolonniin 50 µl DEPC-käsiteltyä vettä ja sentrifugoimalla minuutin ajan. RNA-näytteitä säilytettiin -70 °C:ssä.

## 5.2 RT-PCR

Virus-RNA:sta tuotettiin sekä VP1- että 3Dpol-alueet käyttäen samaa RT-PCR-reaktiosarjaa. RT-PCR:ssä käytetyt alukkeet on kuvattu taulukossa 1 ja niiden sijainti CAV9-viruksen genomissa on kuvattu kuviossa 3.



Kuvio 3. Alukkeiden sijainnit ja suunnat.

Viruksesta eristetty RNA muunnettiin RT-reaktiolla cDNA:ksi. Reaktioseoksen komponentit sekoitettiin keskenään, jonka jälkeen seos laitettiin lämpöblokkiin tunniksi 42 °C:seen. Jos RT-vaiheesta ei jatkettu suoraan PCR:ään, RT-reaktioseos inaktivoitiin pitämällä sitä lämpöblokkissa 5 min, 70 °C:ssä. Näytteet säilytettiin pakastuksessa (-20 °C). Taulukossa 2 on esitetty RT-reaktion pipetointivaiheet.

Taulukko 1. Alukkeiden sekvenssit.

VP1-OS	GGYTAYATNACNTGYTGGTAYCARAC
VP1-OAS	GGTGCTCACTAGGAGGTCYCTRTRTARTCYTCCCA
VP1-IS	CTTGTGCTTTGTGTGCGGCRGTGYAAYGAYTTYTCWG
VP1-IAS	TCYTCCCACACRCAVTTYTGCCARTC
VP1-AS	GGRTTNGTNGAIGTYTGCCA
3D-OS	GGYGGYACHCCCCANAARAGAATGCT
3D-OAS	TCRTCYTTBACRTADGTYACCATTGG
3D-IS	AARAGAATGCTYATGTAYAAYTTYCC
3D-IAS	ARDCCRTAYTTRTCCATRCAYTCYTT

Taulukossa 1 olevissa alukkeissa on kirjaimia, joita vastaa useampi nukleotidi. Kirjaimet ja niitä vastaavat nukleotidit R (A ja G), Y (C ja T), W (A ja T), H (A, C ja T), B (G, T ja C), V (G, C ja A), D (G, T ja A), N (G, A, T ja C).

Taulukko 2. RT-reaktio.

RT	
Reagenssi	Määrä µl (lopullinen konsentraatio)
5 x ImProm II-puskuri	2 (1x)
25 mM MgCl <sub>2</sub>	1 (2,5 mM)
10 mM dNTP	0,5 (0,5 mM)
RNAasi-inhibiittori	0,5
RT-entsyymi: ImProm II	0,5
10 µM OAS-aluke	1 (1 µM)
RNA	4,5
Yhteensä	10

RT-reaktiosta saatua cDNA:ta käytettiin templaattina PCR:ssä. Näytteille, jotka olivat valmiina puhdistettuina VP1- ja 3Dpol-PCR-tuotteina, käytettiin PCR-reaktiossa 3D-IS- ja 3D-IAS-alukkeita sekä VP1-IS- ja VP1-IAS-alukkeita. Eristettäessä näytteet itse, käytettiin 3D-alueelle 3D-OS- ja 3D-OAS-alukkeita ja VP1-alueelle VP1-OS- ja VP1-OAS-alukkeita. Alukkeiden sekvenssit ovat esitetty taulukossa 1. PCR-ajossa oli aina mukana myös negatiivinen kontrolli. PCR-ajossa suoritettiin ns. hot start, eli PCR-laite lämmitettiin 95 °C ennen kuin PCR-putket asetettiin laitteeseen. Taulukossa 3 on kuvattu PCR-reaktion pipetointivaiheet ja PCR-ajo-olosuhteet on esitetty taulukossa 4.

Taulukko 3. PCR-reaktio.

Reagenssi	Määrä µl
cDNA (RT-reaktiosta)	5
ddH <sub>2</sub> O	11,75
10 x puskuri	2,5
10 mM dNTP	0,5
10 µM 5'-aluke	2,5
10 µM 3'-aluke	2,5
Dynazyme	0,25
Yhteensä	25

Taulukko 4. PCR-ajo-olosuhteet.

PCR-ajo-olosuhteet		
Lämpötila	Aika	
95 °C	3 min	
95 °C	30 s	x 40
50 °C	1 min	
72 °C	2 min	
72 °C	5 min	
4 °C	∞	

### 5.3 Agarosigeelielektroforeesi

PCR-tuotteet ajettiin 1 % agarosigeelillä. Geeli valmistettiin sekoittamalla 1,0 g agarosia 100 ml:aan 0,5 x TBE-puskuria. Seosta kuumennettiin mikroaaltouunissa välillä sekoittaen, kunnes se oli täysin kirkasta ja agarosi oli täysin sulanut. Seoksen jäähtyttyä noin 50 °C:seen, siihen lisättiin 5 µl etidiumbromidia vetokaapissa. Seos kaadettiin erilliselle tarjottimelle, jossa oli kampa, ja sen annettiin jähmettyä 30 minuuttia.

Geelijaon varten 5µl:aan PCR-näytteitä lisättiin 1 µl 6 x näytepuskuria, jonka jälkeen ne pipetoitiin geelille. Kokomarkkerina käytettiin GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladderia (Liite 3). Geeliä ajettiin jännitteellä 120 V tunnin ajan, jonka jälkeen se kuvattiin UV-valossa.

### 5.4 Näytteen käsittely sekvensointia varten

Suurin osa PCR-tuotteista puhdistettiin agarosigeelipaloista GeneJET™ Gel Extraction-kitillä (Fermentas), mutta työn aikana testattiin myös GeneJET™ PCR Purification-kittiä (Fermentas) PCR-tuotteen puhdistamiseen sekä ExoSAP-protokollan mukaista PCR-tuotteen käsittelyä. Puhdistus aloitettiin

leikkaamalla agarosigeeliltä skalpellilla UV-valossa oikeankokoiset palat komarkkerin mukaan. Geeliltä leikattu pala sulatettiin lämpöhauteessa samaan määrään sitomispuskuria, ja näyte siirrettiin kolonniin. Sentrifugoinnin jälkeen kolonniin lisättiin 100 µl sitomispuskuria, jonka jälkeen kolonni pestiin 700 µl:lla pesupuskuria. Kolonni sentrifugoitiin kuivaksi ja DNA eluoiitiin 40 µl:aan eluutiopuskuria. GeneJET™ PCR Purification-kitillä puhdistettaessa näytettä ja sitomispuskuria lisättiin samassa suhteessa (1:1), jonka jälkeen näyte siirrettiin kolonniin. Kolonni pestiin lisäämällä sinne 700 µl pesupuskuria. DNA eluoiitiin 40 µl:lla eluutiopuskuria. Jokaisen kolonniin lisäyksen jälkeen, kolonnia sentrifugoitiin 30 sekuntia. ExoSAP-protokollan mukaisesti puhdistettua näytettä piti olla 22 µl, jos näytettä kuitenkin oli vähemmän, lopputilavuus korvattiin milli-Q-vedellä. Näytteen joukkoon lisättiin 10 µl ExoSAP-sekoitusta (Exonuclease I 0,025 µl, SAP 0,250 µl ja milli-Q-vesi 9,725 µl). Näytettä inkuboitiin 30 minuuttia 37 °C:eessa ja 5 minuuttia 95 °C:eessa. Kaikki puhdistetut PCR-tuotteet tarkastettiin ajamalla 5 µl agarosigeelille.

## 5.5 Sekvensointi

Sekvensointia varten näytteiden konsentraatiot mitattiin NanoDrop-laitteella. Sekvensoinnin tehtiin käyttäen kaupallisia operaattoreita, ja PCR-tuotteet valmisteltiin sekvensointia varten operaattorien antamien ohjeiden mukaisesti. Turun yliopiston Biotekniikan keskuksen (BTK) sekvensointipalvelun ohjeistus oli seuraava: BTK:n omaan Excel-taulukkoon syötettiin PCR-tuotteen konsentraatio ja pituus, jolloin taulukko kertoi, kuinka paljon näytettä ja aluketta piti laittaa yhteen ja samaan reaktioon. Kokonaistilavuus oli 6 µl. Näytteiden konsentraatioiden vaihdellessa melko paljon, päätettiin sekvensointiin meneviä näytteitä laittaa maksimimäärä eli 5 µl näytettä ja 1 µl aluketta (10 µM).

Rekombinaatiosarjassa 3D-alueelle käytettiin 3D-IS-aluketta ja VP1-alueelle käytettiin pääsääntöisesti VP1-AS-aluketta. Pasasointisarjassa käytettiin VP1-IAS- ja VP1-AS-alukkeita. Näytteet pipetoitiin 96-kuoppalevyille Excel-taulukon mukaan ja kuoppalevy vietiin BTK:n pakastimeen. BTK:lta saatiin takaisin tie-

dosto, jossa oli sekvenssaattorin muodostama emäsjärjestys sekä kuva (kromatogrammi), josta nähtiin nukleotidien antamat fluoresenssipiikit. Jos kone antoi tuntemattoman nukleotidin, saatettiin kuvan avulla pystyä tulkitsemaan oikea nukleotidi ja muuttaa se sekvenssiedostoon oikeaksi. Kaikki PCR-tuotteiden sekvenssit kerättiin niille ominaiseen tiedostoon eli jokaisesta eri alukkeella sekvensoiduista näytesarjoista tehtiin omat tiedostonsa, jotta niiden vertailu olisi helpompaa. Työn aikana testattiin myös muita sekvensointipaikkoja (Gatc ja MacroGen), mutta niiden käytäntöjä ei raportoida tässä kirjoituksessa, koska ne olivat pääosin samanlaiset kuin BTK:n käytänteet.

## 5.6 Pasasoitujen virusnäytteiden infektion kuvantaminen A549-soluilla

A549-solut jaettiin lasipohjaiselle 96-kuoppalevyille ja soluja kasvatettiin kolme päivää, jolloin saavutettiin haluttu 50–80 % solutiheys eli konfluenssi. Pasasoitujen virusnäytteet laimennettiin HAM + 1 % FCS + gentamisiini-infektiomediumilla suhteessa 1:10. Soluilta poistettiin mediumi ja kuopille pipetoitiin 100 µl viruslaimennosta kahteen rinnakkaiseen kuoppaan. Osa kuopista jätettiin kontrolleiksi, joten ne jätettiin infektoimatta. Virukset sitoutettiin soluille tunnin ajan huoneenlämmössä. Viruslaimennokset poistettiin soluilta, kuopat pestiin infektiomediumilla ja kuopille lisättiin 100 µl infektiomediumia. Soluja inkuboitiin 37 °C lämpökaapissa kuusi tuntia.

Kussakin aikapisteessä kaksi rinnakkaista kuoppaa pestiin kaksi kertaa PBS-puskurilla ja solut fiksattiin pipetoimalla kuoppiin 4 % formaldehydi-PBS-liuosta ja inkuboimalla levyä 15 minuuttia huoneenlämmössä. Fiksattuihin kuoppiin jätettiin PBS-puskuria ja muiden aikapisteiden inkubaatiota jatkettiin 37 °C:ssa. Aikapisteet olivat 6 h, 24 h, 48 h, 72 h ja 96 h. Kontrollikuopat pestiin ja fiksattiin myös aikapisteessä 96 h. Solut permeabilisoitiin pipetoimalla kuoppiin 0,3 % Triton-X 100-PBS-liuosta ja inkuboimalla levyä 10 minuuttia.

Polyklonaalista CAV9:n tunnistavaa kanin vasta-ainetta (K8867 CAV9 purif. rabbit NaN<sub>3</sub>) käytettiin primaarivasta-aineena laimennettuna suhteessa 1:500. Primaarivasta-aineen lisäämisen jälkeen soluja inkuboitiin 1 tunti. Sekundaari-

vasta-aineena käytettiin primaarin kanin vasta-aineen tunnistavaa Alexa Fluor 488-leimattua vasta-ainetta (Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit 2 mg/ml) laimennettuna suhteessa 1:200. Soluja inkuboitiin 1 tunti valolta suojattuna sekundaarivasta-aineen lisäämisen jälkeen. Solujen tumat värjättiin Hoechst-tumavärillä (1 mg/ml), joka laimennettiin 1:1000. Tumaväriin lisäämisen jälkeen soluja inkuboitiin 15 minuuttia valolta suojattuna. Tumaväri ja vasta-aineet laimennettiin steriilisuodatetulla 1 % BSA-PBS-liuoksella. Kaikki inkubaatiot tehtiin huoneenlämmössä ja jokaisen käsittelyn välissä kuopat pestiin kaksi kertaa PBS-puskurilla. Kuoppiin jätettiin lopuksi PBS-puskuria. Solut kuvannettiin fluoressimmikroskoopilla (Zeiss AxioVert 200M mikroskooppi, Plan-Apochromat 10x/0.25 objektiivi ja Axiovision 4.8 ohjelmisto).

## 6 TULOKSET

Tässä opinnäytetyössä työstettiin kahta työpakettia, joissa molemmissa lisättiin ihmisen enterovirusiin kuuluvan coxsackievirus A9:n RNA-genomista VP1- ja 3D-geenit RT-PCR-menetelmällä. PCR-tuotteet sekvensoitiin jatkoanalyysijä varten. VP1-geeni tuottaa proteiinia, jonka avulla se sitoutuu solun pintaan ja siten mahdollistaa viruksen tunkeutumisen soluun. 3D-geeni taas tuottaa RNA-polymeraasientsyymiä, joka monistaa virusgenomia. RNA-polymeraasin toiminta vaikuttaa viruksen elinkykyyn ns. quasispecies-käsitteen kautta. Tämä tarkoittaa sitä, että viruksen lisääntyessä muodostuu joukko sekvenssiltään erilaisia viruksia, mikä mahdollistaa virusinfektion erilaisiin soluihin ja kudoksiin sekä viruksen elinkyvyn muuntuneissa olosuhteissa.

Ensimmäisessä työpaketissa VP1- ja 3D-geenit lisättiin kliinisistä CAV9-näytteistä (Liite 1). Työn tarkoitus oli tarkastella toisistaan kaukana olevia sekvenssialueita, jolloin on mahdollista todeta virusten ajallista muuntumista mutaatioiden ja rekombinaatio-tapahtumien kautta. VP1- ja 3D-alueet sijaitsevat toisistaan noin 3000 emäsparin päässä, mikä on lähes puolet viruksen genomista. Työ aloitettiin analysoimalla valmiita rekombinaatiosarjan sekvenssejä, minkä perusteella saatiin selville mistä näytteistä vielä puuttui sekvenssi. Näytelistaa päivitettiin (Liite 1) työn edetessä.

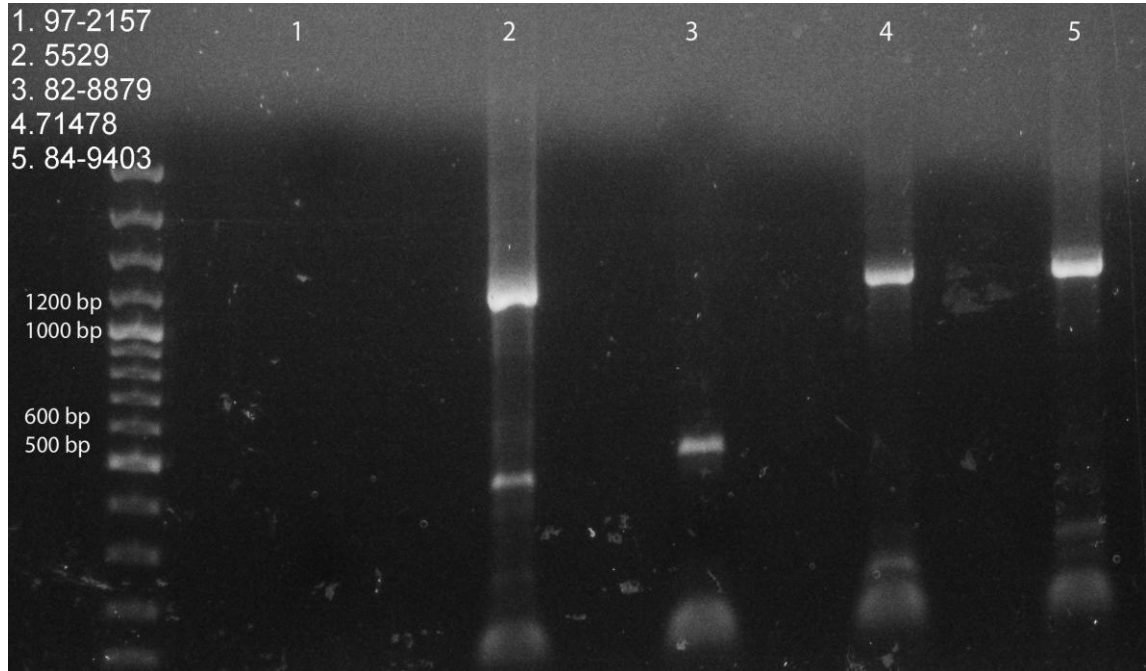
Toisessa työsarjassa käytettiin CAV9-näytteitä, joita oli kasvatettu peräjälkeen A549- ja RD-soluissa. Tällainen pasasointisarja johti viruksen nopeutuneeseen kasvuun myös tilanteessa, jossa virus ei kyennyt tunnistamaan alkuperäistä reseptoriaan. Työn tarkoitus oli havainnollistaa tätä nopeutunutta kasvua, sekä tuottaa PCR-tuotteista sekvenssit jatkoanalyysijä varten. Pasasointisarjaa ei ollut aikaisemmin sekvensoitu ja nämä sekvenssit tuotettiin työn aikana (Liite 2). Työsarjassa tehtiin myös immunofluoresenssianalyysijä.



## 6.1 TYÖPAKETTI 1

### 6.1.1 RNA:n eristys, RT-PCR ja AGE-analyysi

Viruksista eristettiin RNA. Virusnäytteitä eristettiin rekombinaatiosarjassa seitsemän kappaletta. RNA:sta tehtiin cDNA RT-reaktiossa antisense-alukkeilla (AS). RT-reaktiosta saatua cDNA:ta käytettiin templaattina PCR-reaktiossa. PCR:ssä käytettiin tarkasteltavaa aluetta vastaavaa aluketta sense (OS/IS) ja antisense (OAS/IAS) suuntaan. PCR-tuote analysoitiin agarosigeelillä, jolta nähtiin oliko se oikeankokoinen. Agarosigeelillä analysoitiin työn aikana yhteensä 114 PCR-tuotetta. Agarosigeeli kuvattiin UV-valossa. Kuvassa 6 on esitetty muutama 3D- ja VP1-PCR-tuote agarosigeelielektroforeesijossa. Näytteiden vasemmalla puolella on GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder, jonka avulla voitiin arvioida näytteen koko.



Kuva 6. CAV9-VP1-PCR-tuotteiden ajo agarosigeelillä. Näytteet ovat puhdistamattomia PCR-tuotteita rekombinaatiosarjasta.

Kuvassa 6 on puhdistamattomia PCR-tuotteita ajettuna agarosigeelille. Näyte 1 on epäonnistunut. Näytteet 2, 4 ja 5 ovat VP1-geenejä (1200 bp) ja näyte 3 on 3D-geenituote (600 bp). Näytteen 2 alaosassa on 400 bp epäspesifinen tuote.

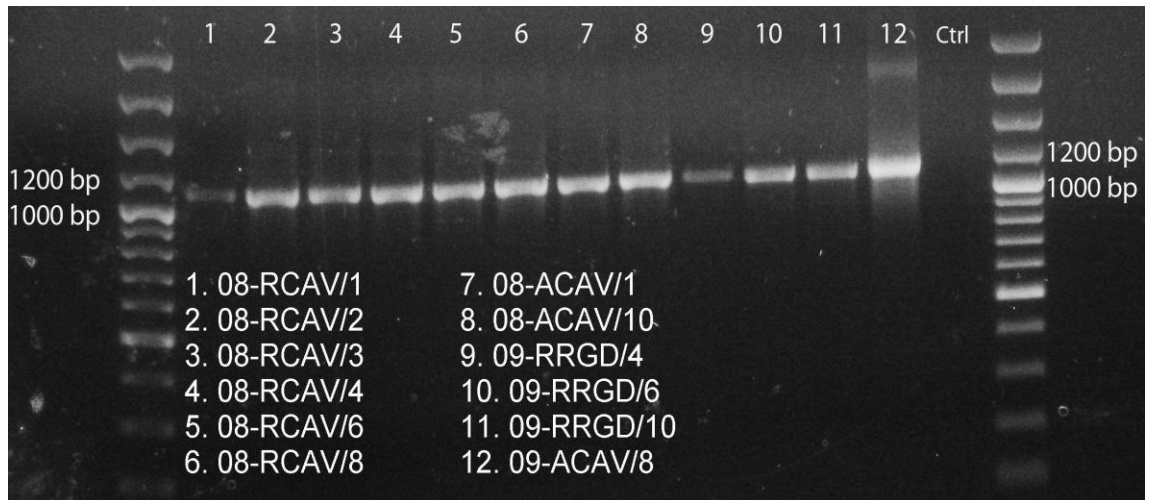
### 6.1.2 Sekvensointi

Rekombinaatiosarjassa 3D-geenit sekvensoitiin 3D-IS-alukkeella ja VP1-geenit VP1-AS-alukkeella. Aikaisemmissa töissä VP1-geeniä oli sekvensoitu VP1-IS- ja VP1-IAS-alukkeilla, jolloin saatiin koko VP1-geenialue (1200 bp) sekvensoitua. Tässä työssä käytettiin VP1-AS-aluketta, koska sillä saatiin sekvensoitua kokonaan alue, jota haluttiin tutkia (500 bp). Sekvensoitavaksi lähetettiin 71 näytettä, ja niistä saatiin 56 kunnollista sekvenssiä jatkoanalyysiin (Liite 1).

## 6.2 TYÖPAKETTI 2

### 6.2.1 RT-PCR ja AGE-analyysi

Pasasointisarjan näytteille tehtiin RT-PCR ja AGE-analyysi samalla tavalla kuin rekombinaatiosarjan näytteille. Tämän sarja PCR-tuotteita ajettiin agarosigeelille 164 kappaletta. Kuvassa 7 kaikki näytteet ovat monistuneet PCR-reaktiossa ja ovat oikean kokoisia.



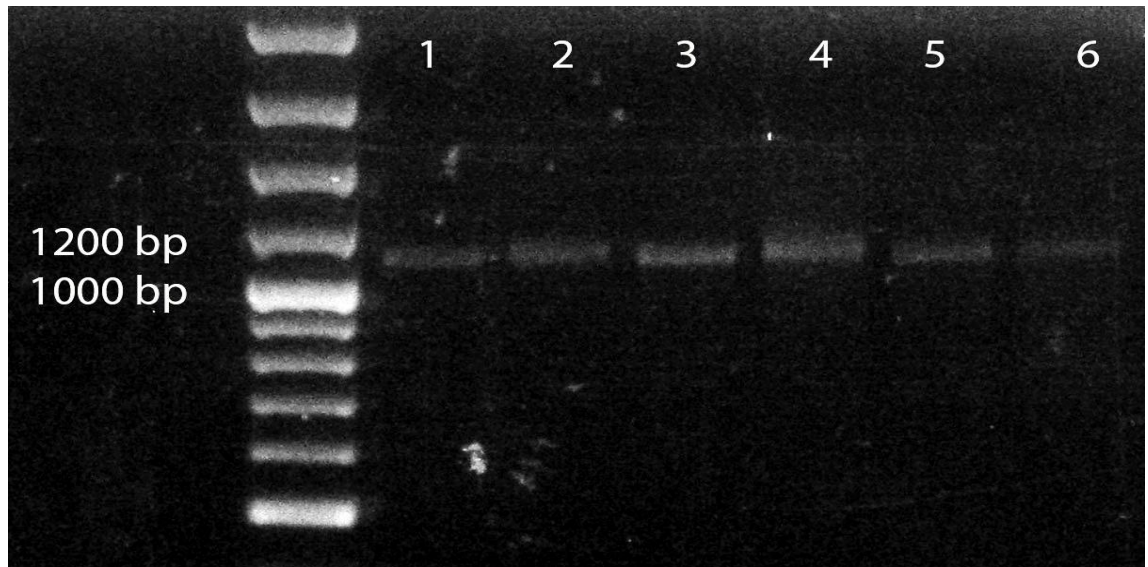
Kuva 7. CAV9-VP1-PCR-tuotteiden ajo agarosigeelillä. Näytteet ovat puhdistamattomia PCR-tuotteita pasasointisarjasta.

### 6.2.2 Sekvensointi

Pasasointisarjassa sekvensoitiin ainoastaan VP1-geeniä. Kaikki näytteet sekvensoitiin VP1-IAS-alukkeella, lisäksi A549-soluilla kasvatettuja näytteitä sekvensoitiin myös VP1-AS-alukkeella. Sekvensointiin lähetettiin 98 näytettä, jonka tuloksena saatiin yhteensä 66 kunnollista sekvenssiä jatkoanalyysiin (Liite 2).

### 6.2.3 Näytteen käsittely sekvensointia varten

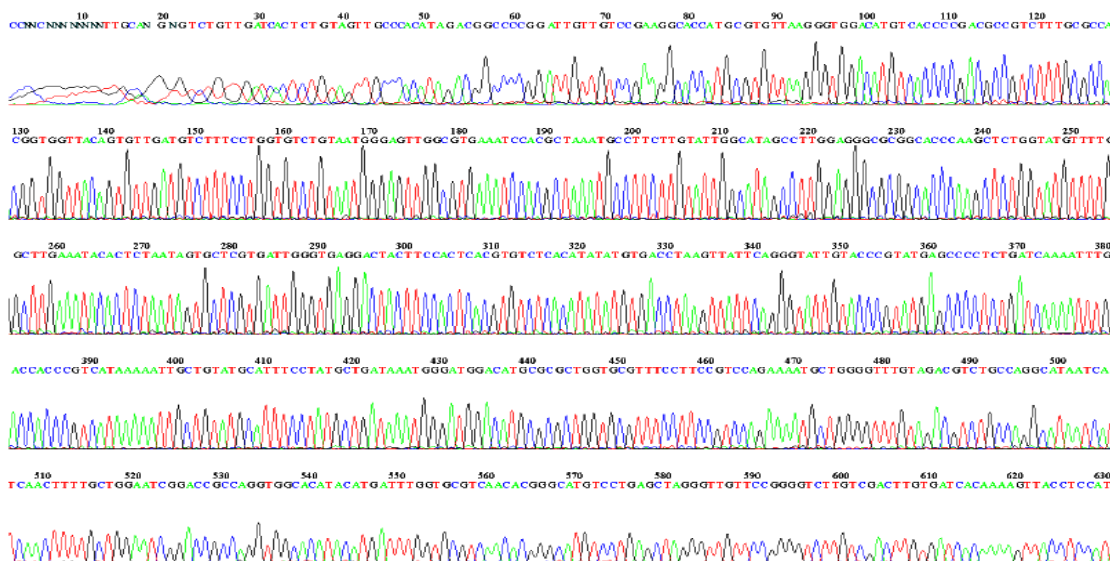
PCR-tuotteen optimointiin valittiin kaksi näytettä, jotka puhdistettiin kolmella eri tavalla. Näytteet puhdistettiin GeneJET™ Gel Extraction-kitillä, GeneJET™ PCR Purification-kitillä ja ExoSAP-protokollan mukaisesti, jolloin saatiin kuusi näytettä kolmella eri tavalla puhdistettuna. Puhdistetut tuotteet sekvensoitiin ja saatuja sekvenssejä verrattiin keskenään. Näytteet valittiin geeliajon perusteella (Kuva 7). Näyte koodilla 08-ACAV/10 oli lähes puhdas, kun taas 09-ACAV/8:ssa näkyi selkeästi myös toinen bändi.



Kuva 8. Kokomarkkerina GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder, 1. 08-ACAV/10 2. 09-ACAV/8 3. 08-ACAV/10 4. 09-ACAV/8 5. 08-ACAV/10 6. 09-ACAV/8.

Puhdistetut näytteet ajettiin agarosigeelille, jotta nähtiin olivatko ne puhdistuneet. Puhdistetut näytteet ovat esitetty kuvassa 8. Näytteet 1 ja 2 on puhdistettu GeneJET™ Gel Extraction-kitillä, näytteet 3 ja 4 on puhdistettu GeneJET™ PCR Purification-kitillä ja näytteet 5 ja 6 on puhdistettu ExoSAP-protokollan mukaisesti. AGE-ajon perusteella kaikki näytteet ovat puhdistuneet hyvin.

File: T1289ZD023.ab1 Run Ended: 2011/11/24 20:29:35 Signal G:366 A:286 C:252 T:312  
 Sample: T1289Z.023\_premix Lane: 2 Base spacing: 15.121456 1050 bases in 12516 scans Page 1 of 2



Kuva 9. 09-ACAV/8 GeneJET™ PCR Purification-kitillä puhdistettuna.

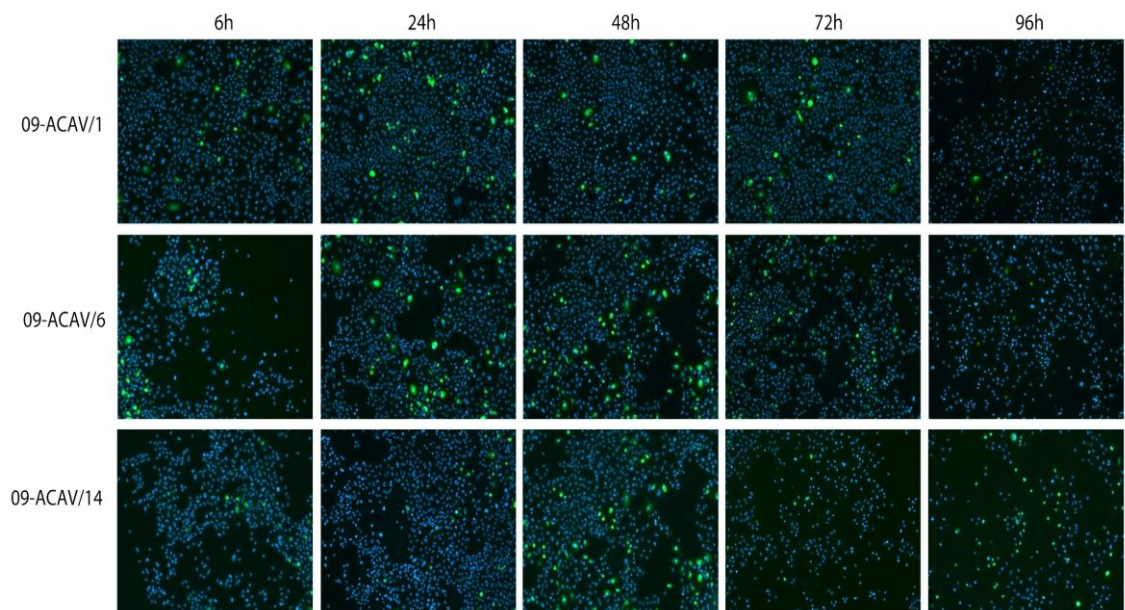
Sekvenssien puhtautta verrattiin myös tarkastelemalla niiden sekvenssejä. Ku-  
 vassa 9 on kromatogrammikuva onnistuneesta sekvenssoinnista.

#### 6.2.4 Pasasoitujen virusten kasvattaminen A549- ja RD-soluissa

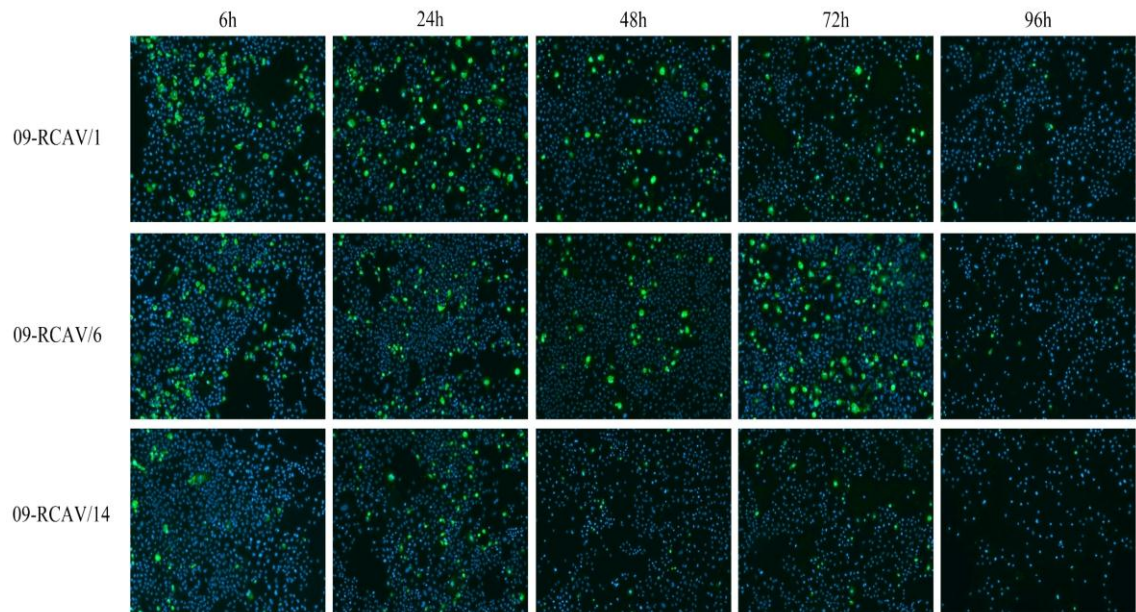
Pasasointisarja tarkoitti CAV9-virusia, joita oli kasvatettu A549- (A) tai RD-  
 soluilla (R). Mukana oli sellaisia virusia, joista oli poistettu RGD-alue, jonka  
 avulla virus sitoutuu solun pinnan integriini-reseptoreihin; näitä virusia kasva-  
 tettiin myös A549- (ARGD) tai RD-soluissa (RRGD). Työssä oli aiemmin todet-  
 tu, että vaikka CAV9-viruksesta oli poistettu RGD-alue, niin virus kasvaa hyvin  
 RD-soluissa. Sen sijaan A549-soluissa kasvua ei tapahdu eli virus ei kykene  
 infektoimaan tällaisia soluja ilman integriini-välitteistä vuorovaikutusta. Pa-  
 sasointisarjat (2008 ja 2009) oli kerätty ennen työn aloittamista ja tällöin oli ha-  
 vaittu, että jos CAV9-ARGD-viruksen annetaan reagoida A549-solujen kanssa  
 pitkään, virus kykenee infektoimaan solut ja jos tällaisista infektoiduista soluista  
 eristetään virus, niin se kykenee edelleen infektoimaan A549-solut yhä nope-  
 ammin. Tämä viittaa viruksen nopeaan adaptaatioon tilanteessa, missä sillä on  
 epäsuotuisa viruksen pinta – solun pinnan reseptorivuorovaikutus.

### 6.2.5 Immunofluoresenssi

Pasasointisarjasta valittiin vuoden 2009 sarjat, joista jokaisesta valittiin yksi näyte alusta, keskeltä ja lopusta. Yhteensä näytteitä valittiin 12. Lasipohjaiselle 96-kuoppalevyllä oli kasvatettu A549-soluja, jotka infektoitiin pasasointinäytteillä. Infektion kulkua seurattiin viidessä eri aikapisteessä (6 h, 24 h, 48 h, 72 h ja 96 h). Infektiot kuvattiin immunofluoresenssimikroskoopilla.

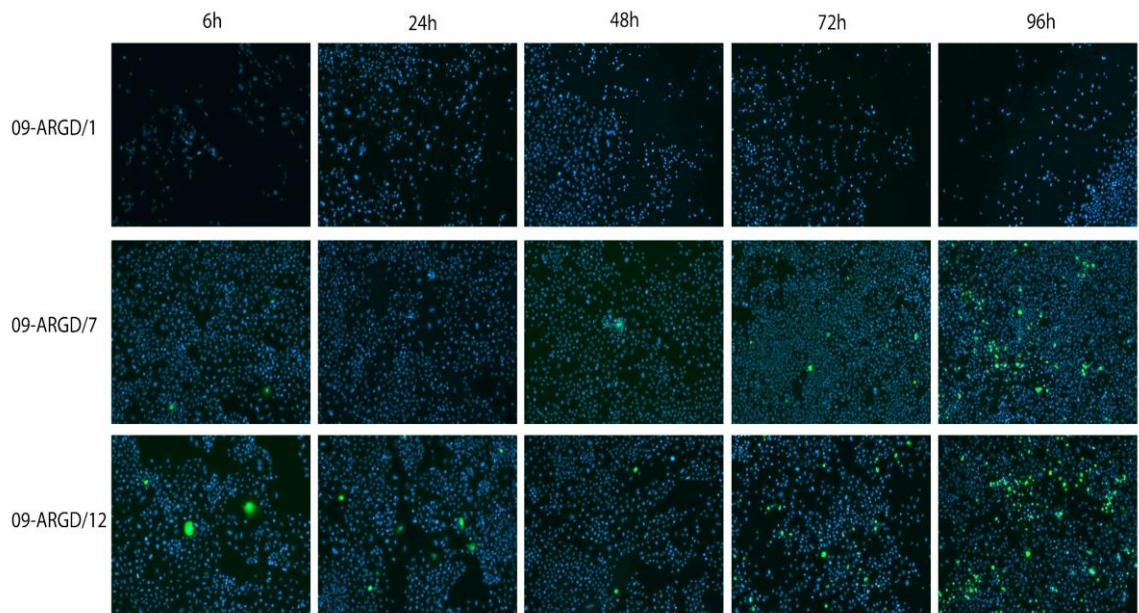


Kuva 10. 09-ACAV- infektiot eri aikapisteissä.

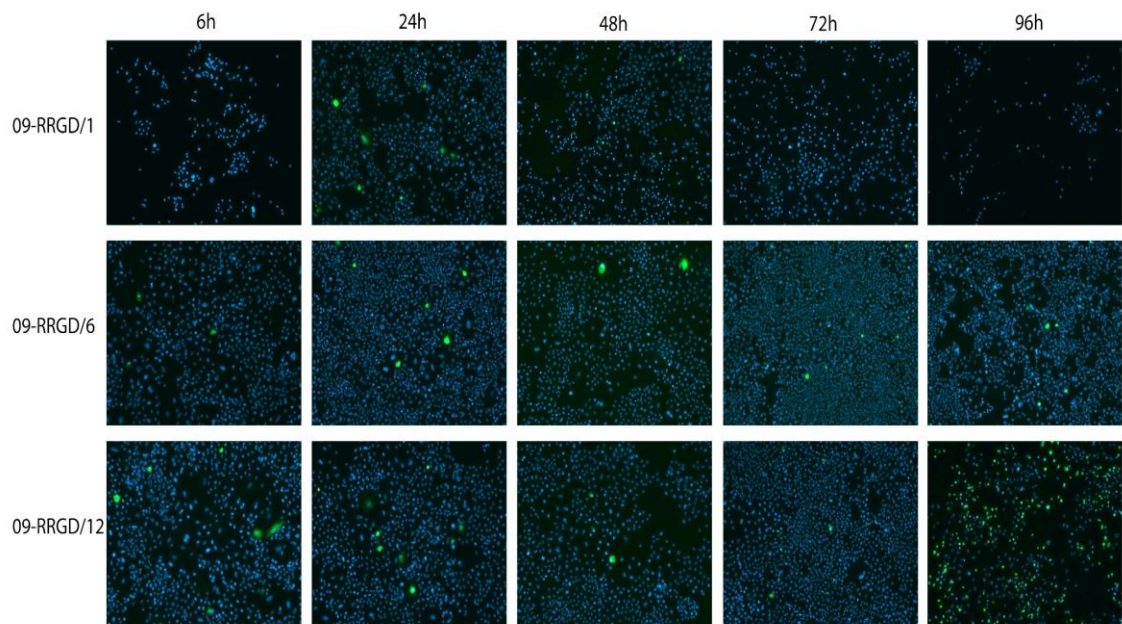


Kuva 11. 09-RCAV-infektiot eri aikapisteissä.

A549 (Kuva 10) - ja RD-soluissa (Kuva 11) pasasoitujen mutatoimattomien CAV9-virusten kaikki pasaasit infektoivat A549-solut melko samalla tavalla. Tumat näkyvät sinisinä (Hoechst-tumaväri) ja infektoituneet solut näkyvät vihreinä AlexaFluor488-värjäyksessä.



Kuva 12. 09-ARGD-infektiot eri aikapisteissä.



Kuva 13. 09-RRGD-infektiot eri aikapisteissä.

RGD-del-CAV9-virusten (riippumatta onko pasasoitu A549 vai RD-soluissa) kaikkien pasaasien ajatellaan edelleen infektoivan RD-solut yhtä hyvin. A549-soluissa pasasoitujen RGD-del-CAV9-virusten alkupään pasaasien ei pitäisi infektoida A549-soluja, mutta myöhempien pasaasien pitäisi infektoida A549-soluja. Kuvassa 12 nähdäänkin, että 1-pasaasi ei infektoi, 7-pasaasi infektoi vähän ja 12-pasaasi eniten. Eli virus on adaptoitunut. Mielenkiintoisesti on, että koostekuvista katsottuna näyttää, että muut sarjat (ACAV, RCAV, RRGD) pasasista riippumatta infektoivat solut nopeammin ja ARGD-sarja vasta 72h (tai oikeastaan 96h) aikapisteessä.



## 7 PÄÄTELMÄT

Työn aikana tehtiin rinnakkain kahta työpakettia, joissa molemmissa käytettiin samaa RT-PCR-menetelmää. Kaiken kaikkiaan RT-PCR-menetelmä toimi hyvin, koska 98 näytteestä saatiin 69 PCR-tuotetta. Kaikki PCR-tuotteet analysoitiin agarosigeelillä ja näistä havaittiin, että menetelmä toimi hyvin spesifisesti, koska yleensä vain oikeankokoinen tuote oli nähtävillä. PCR-reaktio oli onnistunut, jos agarosigeelillä 3D-alueen koko oli noin 600 emäsparia ja VP1-alueen koko oli noin 1200 emäsparia. Syyt epäonnistumisiin voivat olla moninaiset, RT-PCR-reaktiossa on voinut tapahtua pipetointivirhe, jos näyte ei näy agarosigeelillä. Templaattina PCR-reaktiossa toiminut cDNA on saattanut esimerkiksi kuivua pakkasessa, jolloin se ei monistu PCR:ssä. Myös PCR-materiaalit saattavat olla epäkunnossa, PCR-reaktiossa tehtiin kuitenkin aina kontrolli, josta nähtiin, että master mix ei ollut kontaminoitunut. Todennäköisempi syy epäonnistumisiin PCR:ssä oli alkuperäisen näytteen laatu. Tämä oli selvää työpaketissa 1 käytettyjen näytteiden osalta, koska niiden kohdalla epäonnistumisia tuli enemmän. Koska pasasointisarja oli tehty käyttäen samaa lähtövirusta, samoja soluja ja samaan aikaan, niistä saatiin myös hyvin samanlaiset PCR-tulokset. Kliiniset näytteet ovat alkuperältään erilaisia, ja on mahdollista, että käytetyt alukkeet eivät tarttuneet näytteisiin samalla spesifisyydellä.

Näytteiden puhdistuksessa ei ollut juuri mitään eroa, joten kaikkia menetelmiä voi käyttää PCR-tuotteen puhdistamiseen. Kaikilla kolmella menetelmällä, GeneJET™ Gel Extraction-kitillä, GeneJET™ PCR Purification-kitillä ja ExoSAP:lla saatiin todella puhdas sekvenssi. ExoSAP-menetelmän etuna on sen käytön helppous ja nopeus. Menetelmä toimii todennäköisesti parhaiten näytteistä, jotka ovat puhtaita eli niissä ei ole epäspesifisiä PCR-tuotteita. Työn aikana ei ollut aikaa tehdä kokeita tällaisilla näytteillä. Tämä oli kuitenkin ensimmäinen kerta, kun Virusopilla käytettiin ExoSAP-menetelmää, ja menetelmää voi jatkossa suositella käytettäväksi myös muissa projekteissa PCR-tuotteiden puhdistamiseen. Menetelmä on myös erittäin halpa verrattuna puhdistuspylväisiin.

PCR-tuote oli myös laadullisesti hyvä, koska useimmista sekvensointiin lähetetyistä näytteistä saatiin kunnollinen sekvenssi. Sekvensoinnissa on voinut tapahtua virhe pipetointivaiheessa, koska määrät ovat todella pieniä. Pipetointivaiheessa on saattanut mennä epähuomiossa samaan kuoppaan kahta eri näytettä, koska näytteitä pipetoitiin usein paljon kerralla. 96-kuoppalevyille pipetoidut näytteet ovat voineet ajautua kuopan seinämille, koska kuoppalevyt vietiin kävellen BTK:lle. Se, miten levyä käsiteltiin BTK:lla, ei ole tiedossa. Myös BTK:lla on voinut tapahtua virhe, jolloin sekvensointi on epäonnistunut. Rekombinaatiosarjassa saatiin kuitenkin tarvittava määrä sekvenssejä, jotta niitä voidaan tulevaisuudessa vertailla. Pasasointisarjassa saatiin reilusti yli puolelle näytteistä kunnollinen sekvenssi. Ongelmat sekvensoinneissa johtuivat todennäköisesti heterogeenisistä alukkeista, koska puhdistus tehtiin samannäköisistä geelituotteista samoilla reagensseilla samaan aikaan. Tällöin on oletettavaa, että puhdistusmateriaaleissa ei sinänsä ollut ongelmia. Jatkossa VP1- ja 3D-geenien sekvenssejä vertaillaan, kun selvitetään virusten muuntumista.

Pasasoitujen virusnäytteiden infektion kuvantamisessa A549-soluilla tehtiin vain kaksi rinnakkaista kolmen sijaan, koska näytteitä oli niin paljon. Tällä tavoin ne saatiin mahtumaan kahdelle 96-kuoppalevyille. Työssä ehdittiin tehdä alustavia tarkasteluja virusten infektiivisyydestä. Solujen kasvatuksessa oli ongelmia, ja se näkyi myös ongelmina virusinfektiossa ja virusvärjäyksessä. Liian rajun pipetoinnin takia osa soluista on voinut lähteä irti pohjasta ja huuhtoutua pesujen mukana pois, jolloin infektoitavia soluja ei välttämättä ollut paljoa jäljellä. Eittä-mättä soluviljelyä pitää harjoitella enemmän ja solujen käsittelyyn pitää harjaantua, jotta voi saada onnistumisia. Soluja pitää vielä uudelleen infektoida viruksilla, mutta alustavien tulosten mukaan infektiotitrauksesta aiemmin saadut tulokset voidaan todentaa värjäämällä virusinfektoituja soluja vasta-aineilla ja laske-malla infektoitujen solujen määrä.

## LÄHTEET

Aittomäki E., Eerikäinen T., Leisola M., Ojamo H., Suominen I. ja von Weymarn N. 2002. Bio-prosessitekniikka. WSOY. Porvoo

Biosettia. 2011. Saatavilla <http://biosettia.com/04-nucleic-acid-purification/miniprep-kit>. Viitattu 7.3.2012.

Cui A., Yu D, Zhu Z, Meng L, Li H, Liu J, Liu G, Mao N, Xu W. 2010. An outbreak of aseptic meningitis caused by coxsackievirus A9 in Gansu, the People's Republic of China. *Virology Journal* 7:72

Dako. Saatavilla: [http://www.dako.com/08002\\_03aug09\\_ihc\\_guidebook\\_5th\\_edition\\_chapter\\_10.pdf](http://www.dako.com/08002_03aug09_ihc_guidebook_5th_edition_chapter_10.pdf). Viitattu 23.4.2012.

Ehrenfeld, E., Domingo, E. & Roos, R.P. 2010. The picornaviruses. 1. painos. Washington DC: ASM Press.

Fermentas. 2011. GeneJET™ Gel Extraction Kit Manual

Fermentas. GeneJET™ PCR Purification Kit Manual

Flint S.J., Enquist L.W., Racaniello V.R., Skalka A.M. 2009. Principles of Virology, Volume II: Pathogenesis and Control. 3. painos. Washington DC: ASM Press.

Heikkilä O., Susi P., Stanway G. & Hyypiä T. 2009. Integrin  $\alpha$ V $\beta$ 6 is a high-affinity receptor for coxsackievirus A9. *Journal of General Virology* 90, 197-204.

Lönnrot M., Sjöroos M., Salminen K., Maaronen M., Hyypiä T., and Hyöty H. 1999 Diagnosis of Enterovirus and Rhinovirus Infections by RT-PCR and Time-Resolved Fluorometry With Lanthanide Chelate Labeled Probes. *Journal of Medical Virology* 59, 378–384.

Mane. 2012. Saatavilla: [http://cse.lmu.edu/resources/MANE\\_Labs/Instruments/Epi-fluorescence\\_Microscope\\_\\_EFM\\_.htm](http://cse.lmu.edu/resources/MANE_Labs/Instruments/Epi-fluorescence_Microscope__EFM_.htm). Viitattu 23.4.2012.

McWilliam Leitch, E.C., Harvala H., Robertson I., Ubillos I., Templeton K. & Simmonds P. 2009. Direct identification of human enterovirus serotypes in cerebrospinal fluid by amplification and sequencing of the VP1 region. *Journal of Clinical Virology* 44, 119-124.

NanoDrop. 2009. Saatavilla: <http://www.nanodrop.com/Absorbance.aspx>. Viitattu 1.3.2012.

Nix W. A., Oberste M. S., Pallansch M. A. 2006. Sensitive, seminested PCR amplification of VP1 sequences for direct identification of all enterovirus serotypes from original clinical specimens. *The Journal of Clinical Microbiology* Vol. 44 No. 8, 2698-2704.

Nucleics. 2010. Saatavilla [http://www.nucleics.com/DNA\\_sequencing\\_support/exonuclease-SAP-PCR-protocol.html](http://www.nucleics.com/DNA_sequencing_support/exonuclease-SAP-PCR-protocol.html). Viitattu 7.3.2012.

Oberste M. S., Maher K., Kilpatrick D. R., ja Pallansch M. A. 1999. Molecular Evolution of the Human Enteroviruses: Correlation of Serotype with VP1 Sequence and Application to Picornavirus Classification. *Journal of Virology*, 1941–1948.

Omega bio-tek. 2007. E.Z.N.A™ Viral RNA Kit Manual

Peltola, V. Waris, M. Österback, R. Susi, P. Ruuskanen, O. Hyypiä, T. 2008. Rhinovirus transmission within families with children: incidence of symptomatic and asymptomatic infections. *Journal of Infection Disease* Vol. 197 No. 3, 382-389.

Picornaviridae Study Group. Saatavissa: [www.picornastudygroup.com](http://www.picornastudygroup.com). Viitattu 26.3.2012.

Picornavirus Home. Saatavissa: <http://www.picornaviridae.com/>. Viitattu 26.3.2012.

Roche. PCR Application Manual

Rossmann M. G., He Y., and Kuhn R. J. 2002. Picornavirus–receptor interactions. *Trends in Microbiology* Vol.10 No.7, 324-331.

Simmonds P. ja Welch J. 2006. Frequency and Dynamics of Recombination within Different Species of Human Enteroviruses. *Journal of Virology*, 483–493

Solunetti. 2006. Saatavilla: <http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia>. Viitattu 29.2.2012.

Suominen I., Pärssinen R., Haajanen K. & Pelkonen J. 2010. Geenitekniikka. Turun ammatti-korkeakoulu. Saarijärvi

Vignuzzi M., Stone J. K., Arnold J. J., Cameron G. E., and Andino R. 2006. Quasispecies diversity determines pathogenesis through cooperative interactions within a viral population. *Nature*. 19; 439, 344–348.

Viral zone. Saatavissa: [http://viralzone.expasy.org/all\\_by\\_species/33.html](http://viralzone.expasy.org/all_by_species/33.html). Viitattu 27.3.2012.

## Rekombinaatiosarja

Sample ID	3DPol	VP1-IS	VP1-IAS	VP1-AS	Month/Year	Country	Age	Gender
59-3192	ok	ok		ok	18.8.1959	The Netherlands	6	M
59-3711	ok	ok	ok		28.9.1959	The Netherlands	1	M
60-4223	ok	ok	ok		21.9.1960	The Netherlands	8	F
61-1015	ok	ok		ok	11.3.1961	The Netherlands	8	F
61-2740	ok	ok	ok		23.6.1961	The Netherlands	8	F
62-3583	ok	ok	ok		10.8.1962	The Netherlands	4	F
63-7506	ok	ok	ok		15.10.1963	The Netherlands	4	F
64-3668	ok	ok	ok		15.5.1964	The Netherlands	4	F
64-3694	ok	ok		ok	19.5.1964	The Netherlands	4	F
65-4496	ok	ok		ok	31.5.1964	The Netherlands	16	M
66-9624	ok	ok	ok		31.8.1966	The Netherlands	4	M
67-10062	ok	ok	ok		18.8.1967	The Netherlands	9	M
68-6264	ok	ok	ok		29.5.1968	The Netherlands	1	M
68-10104	ok	ok		ok	16.8.1968	The Netherlands	6	M
69-1815	ok	ok		ok	28.1.1969	The Netherlands	1	F
69-7587	ok	ok	ok		2.6.1969	The Netherlands	17	F
70-11746	ok		ok	ok	18.8.1970	The Netherlands	4	M
70-15888	ok	ok		ok	28.10.1970	The Netherlands	3	M
70-17579	ok	ok	ok		23.11.1970	The Netherlands		
71-12127	ok	ok		ok	16.7.1971	The Netherlands	6	M
71-13477	ok	ok		ok	10.8.1971	The Netherlands	3	F
72-17744	ok	ok	ok		26.9.1972	The Netherlands	5	F
72-23225	ok	ok	ok		20.12.1972	The Netherlands	2	F
73-9361	ok	ok		ok	15.5.1973	The Netherlands	5	M
73-15993	ok	ok	ok		26.10.1973	The Netherlands		
76-9953	ok	ok	ok		10.6.1976	The Netherlands	8	F
76-12146	ok	ok		ok	19.7.1976	The Netherlands	3	F
77-1695	ok	ok	ok		28.1.1977	The Netherlands	3	F
78-13264	ok	ok		ok	21.6.1978	The Netherlands	31	F
79-17755	ok	ok	ok		17.8.1979	The Netherlands	17	M
79-20173	ok	ok	ok		25.9.1979	The Netherlands	1	M
80-11212	ok	ok	ok		5.7.1980	The Netherlands	4	F
80-13682	ok			ok	19.8.1980	The Netherlands	1	M
81-12898	ok	ok	ok		20.8.1981	The Netherlands	2	M
82-1036	ok	ok	ok		26.11.1982	The Netherlands	2	M
82-8879	ok				14.5.1982		3 m	F
83-584	ok	ok		ok	7.1.1983	The Netherlands	8	M
83-16151	ok	ok	ok		21.9.1983	The Netherlands	5	F
84-8962	ok	ok	ok		19.6.1984	The Netherlands	1	M
84-9403	ok	ok	ok		26.6.1984	The Netherlands	5 m	M
93-52440	ok					Santti		
93-54523	ok					Santti		
93-55690	ok			ok		Santti		
93-56297	ok			ok		Santti		
93-58005	ok	ok	ok			Santti	6	
97-3157	ok	ok	lyhyt sekv	ok				

97-3526	ok	ok	ok				
97-64104	ok		ok	ok	18.11.1997	Santti	6
97-64160	ok		ok	ok	19.11.1993	Santti	
97-64166	ok			ok	19.11.1993	Santti	6
98-2685	ok	ok	ok				
99-50551	ok	ok		ok			
99-50646	ok	lyhyt sekv.	ok				
00-60511	ok	ok		ok			
00-60791	ok	ok	ok				
01-70671	ok	lyhyt sekv		ok			
02-80696	ok	ok					
03-90155	ok	ok	ok				
03-90343	ok	ok	ok				
07-2163	ok	ok					
08-00064	ok	lyhyt sekv.	ok				
08-00067	ok	ok		ok			
08-00069	ok	ok		ok			
08-00074	ok	ok					
374€5	ok	ok	ok			USA	
4394	ok	ok	ok			USA	
5529	ok	ok		ok		USA	
6326	ok	ok	ok			USA	
6397	ok	ok		ok		USA	
7147	ok	lyhyt sekv.	ok			USA	
8216	ok	ok		ok		USA	
8693	ok		ok	ok		USA	
9194	ok					Santti	
10043	ok	ok	ok			USA	
11299	ok			ok		Santti	
38050(12)	ok	ok	ok			Santti	
41353(14)		ok		ok		Santti	
45072(15)	ok		ok	ok		Santti	
67603(8)	ok	ok	ok			Santti	
71478(17)	ok	ok	lyhyt sekv.	ok		Santti	
84562(16)	ok			ok		Santti	
88794(13)	ok	ok		ok		Santti	
89914(10)	ok			ok		Santti	
90935(9)	ok		ok	ok		Santti	
106464(11)	ok			ok		Santti	
1/15547	ok						
2/15551	ok						
3/08VI669	ok						
4/07VI1504	ok			ok			
5/06VI1109				ok			
6/04VV892	ok			ok			

## Pasasointisarja

<u>PLACE</u>	<u>VIRUS</u>	<u>VP1-IAS</u>	<u>VP1-AS</u>	<u>PLACE</u>	<u>VIRUS</u>	<u>VP1-IAS</u>	<u>VP1-AS</u>
A1	08-RCAV/1	ok		E1	(08)09-RRGD/1	ok	
A2	08-RCAV/2	ok		E2	(08)09-RRGD/2	ok	
A3	08-RCAV/3	ok		E3	09-RRGD/3	ok	
A4	08-RCAV/4	ok		E4	09-RRGD/4	ok	
A5	08-RCAV/6	päällekk.		E5	09-RRGD/6	ok	
A6	08-RCAV/8	ok		E6	09-RRGD/8	ok	
A7	08-RCAV/10	päällekk.		E7	09-RRGD/10	ok	
A8	08-RCAV/12	ok		E8	09-RRGD/12	päällekk.	
B1	08-ACAV/1	ok	ok	F1	09-ARGD/1	-	-
B2	08-ACAV/2	päällekk.	-	F2	09-ARGD/2	ok	-
B3	08-ACAV/3	päällekk.	ok	F3	09-ARGD/3	ok	-
B4	08-ACAV/4	ok	ok	F4	09-ARGD/5	ok	-
B5	08-ACAV/6	ok	ok	F5	09-ARGD/6	ok	ok
B6	08-ACAV/8	ok	ok	F6	09-ARGD/8	päällekk.	päällekk.
B7	08-ACAV/10	päällekk.	ok	F7	09-ARGD/10	päällekk.	päällekk.
B8	08-ACAV/12	ok	ok	F8	09-ARGD/12	ok	ok
C1	08-RRGD/1	ok		G1	(08)09-RCAV/1	ok	
C2	08-RRGD/2	ok		G2	(08)09-RCAV/2	ok	
C3	08-RRGD/3	ok		G3	09-RCAV/3	ok	
C4	08-RRGD/4	ok		G4	09-RCAV/4	ok	
C5	08-RRGD/6	ok		G5	09-RCAV/6	ok	
C6	08-RRGD/8	ok		G6	09-RCAV/8	päällekk.	
C7	08-RRGD/10	-		G7	09-RCAV/10	ok	
C8	08-RRGD/12	-		G8	09-RCAV/12	ok	
D1	08-ARGD/1	ok	ok	H1	(08)09-ACAV/1	-	-
D2	08-ARGD/2	ok	ok	H2	(08)09-ACAV/2	ok	ok
D3	08-ARGD/3	ok	päällekk.	H3	09-ACAV/3	ok	ok
D4	08-ARGD/4	päällekk.	päällekk.	H4	09-ACAV/4	ok	ok
D5	08-ARGD/6	ok	ok	H5	09-ACAV/6	ok	-
D6	08-ARGD/8	ok	ok	H6	09-ACAV/8	-	ok
D7	08-ARGD/10	ok	alku ok	H7	09-ACAV/10	ok	-
D8	08-ARGD/12	alku huono	-	H8	09-ACAV/12	ok	ok

**RCAV=CAV9 in RD**

**ACAV=CAV9 in A549**

**RRGD=CAV9-RGDdel in RD**

**ARGD=CAV9-RGDdel in A549**

# GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder

**Thermo**  
SCIENTIFIC

## PRODUCT INFORMATION

### Thermo Scientific GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder

#SM0321 50 µg  
(for 100 applications)

#### Lot:

Concentration: 0.5 µg/µl  
Supplied with: 1 ml 6X DNA Loading Dye

Store at -20°C

In total 2 vials.

[www.thermoscientific.com/fermentas](http://www.thermoscientific.com/fermentas)

#### Protocol for Loading

Loading mixture for the 5 mm gel lane\*:

Components	Gels	
	Agarose	Polyacrylamide
DNA ladder (0.5-1 µg)	1-2 µl	1-2 µl
6X DNA Loading Dye	1 µl	0.5 µl
Deionized water	4-3 µl	1.5-0.5 µl
	6 µl	3 µl

**Step 1:** Mix gently

**Step 2:** Load on the gel

\*For gels with other lane widths, the components of the mixture should be scaled either up or down. Use 0.2-0.4 µl (0.1-0.2 µg) of DNA ladder per 1 mm of lane.

#### Recommendations

- Do not heat before loading.
- Dilute your DNA sample with the 6X DNA Loading Dye (#R0611, supplied with the ladder): mix 1 volume of the dye solution with 5 volumes of the DNA sample;
- Load the same volumes of the DNA sample and the DNA ladder;
- For quantification, adjust the concentration of the sample to equalize it approximately with the amount of DNA in the nearest band of the ladder.
- For DNA band visualization with SYBR® Green, GelRed and other intercalating dyes, do not add the dyes into the sample, use gel staining after electrophoresis or include dyes into agarose gel to avoid aberrant DNA migration.

#### PRODUCT USE LIMITATION

This product is developed, designed and sold exclusively for research purposes and *in vitro* use only. The product was not tested for use in diagnostics or for drug development, nor is it suitable for administration to humans or animals. Please refer to [www.thermoscientific.com/fermentas](http://www.thermoscientific.com/fermentas) for Material Safety Data Sheet of the product.

© 2011 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved. SYBR is a registered trademark of Molecular Probes, Inc. All other trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific Inc. and its subsidiaries.

#### Description

Thermo Scientific GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder is designed for sizing and approximate quantification of wide range double-stranded DNA on agarose and polyacrylamide gels. The ladder is composed of fourteen chromatography-purified individual DNA fragments (in base pairs): 3000, 2000, 1500, 1200, **1000**, 900, 800, 700, 600, **500**, 400, 300, 200, 100. It contains two reference bands (1000 and 500 bp) for easy orientation. The ladder is dissolved in TE buffer.

#### Storage Buffer

10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 1 mM EDTA.

#### 6X DNA Loading Dye

10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 0.03% bromophenol blue, 0.03% xylene cyanol FF, 60% glycerol and 60 mM EDTA.

#### CERTIFICATE OF ANALYSIS

Well-defined bands are formed during agarose gel electrophoresis.

The DNA concentration is determined spectrophotometrically.

The absence of nucleases is confirmed by a direct nuclease activity assay.

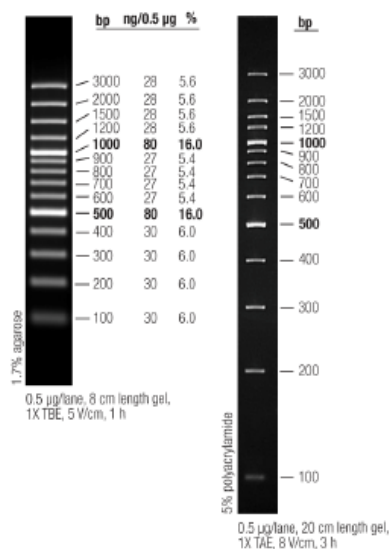
Quality authorized by:



Jurgita Zilinskiene

Rev.6

#### GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder



#### NOTICE TO PURCHASER: LIMITED LICENSE

This product or its use is covered by at least one claim of U.S. Patent Nos. 5,834,201, 6,680,378, and/or 7,132,520 owned by Invitrogen Corporation. The purchase of this product conveys to the buyer the non-transferable right to use the purchased amount of the product in internal research conducted by the buyer. The buyer cannot use this product or materials made by the employment of this product for commercial purposes. Commercial purposes means any activity for consideration and may include, but is not limited to: (1) use of the product in manufacturing, (2) use of the product to provide a service, information, or data, (3) use of the product for therapeutic, diagnostic or prophylactic purposes, or (4) resale of the product, whether or not the product is resold for use in research. Further information on purchasing licenses under the above patents may be obtained by contacting the Business Development Department, Invitrogen Corporation, 5791 Van Allen Way, Carlsbad, CA 92008. Email: [qulicensing@invitrogen.com](mailto:qulicensing@invitrogen.com)