

Marko Salmikangas

Menetelmä gastrointestinaalien strooma-
kasvaimien mutaatioiden tutkimiseksi Roche®
GS junior™ :lla

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Terveys- ja hoitoala

Bioanalytiikan koulutusohjelma

Opinnäytetyö

20.4.2013

| | |
|---|--|
| Tekijä(t) Otsikko Sivumäärä Aika | Marko Salmikangas Menetelmä gastrointestinaalien stroomakasvaimien mutaatioiden tutkimiseksi Roche® GS junior™:lla 29 sivua + 8 liitettä 20.04.2014 |
| Tutkinto | Ammattikorkeakoulu |
| Koulutusohjelma | Bioanalytiikan koulutusohjelma |
| Suuntautumisvaihtoehto | Bioanalytiikka |
| Ohjaaja(t) | Hannele Pihlaja, Lehtori, Metropolia AMK Harri Sihto, Tutkija FT, Helsingin Yliopisto |
| <p>Uuden sukupolven sekvensointitekniikat ovat olleet käytössä jo vuosituhannen alkupuolelta suurissa kansainvälisissä tutkimusryhmissä, mutta suuren kokonsa ja korkean hintansa vuoksi näitä NGS (next-generation sequencing) -laitteita ei ole ollut mahdollista hyödyntää diagnostisessa laboratoriotyössä. Tekniikan kehittyessä laitteiden koko ja kustannukset ovat laskeneet tasolle, jossa myös pienemmillä laboratorioilla on mahdollisuus hankkia itselleen näitä laitteita diagnostiseen työhön tutkimustyön lisäksi.</p> <p>Työn tarkoituksena on luoda kustannustehokas menetelmä, jolla voidaan tutkia usean potilaan näytteet samanaikaisesti ja luotettavasti. Menetelmän avulla pystytään GIST (Gastro Intestinal Stromal Tumors) -diagnostiikan lisäksi arvioimaan taudissa käytettävän lääkityksen esim. imatinib[®] annostus. Tämä on merkittävä osa taudin hoitoa, sillä osa KIT:n mutaatioista on imatinib[®] hoidolle resistenttejä toisten vaatiessa hyvinkin pieniä annoksia.</p> <p>Koska Roche[®] GS junior™:lla on mahdollista tutkia useita eri asioita, mukaan lukien virusintegraatio alueita ja fuusiogeneenejä, ja menetelmää halutaan hyödyntää koko laitteen toimintakapasiteetin alueelta, on tarkoituksena luoda menetelmästä universaalisti sovellettava muillekin taudeille, esim. MCPyV:n (Merkel Cell Polyoma Virus) havaitsemiseksi ja integraation tunnistamiseksi. Menetelmä pystytetään muistuttamaan Duncavage ym. artikkelissa esittelemää Washington University Capture menetelmää, mukailien myös Roche[®]:n työ- ja käyttöohjeita.</p> <p>Projektin tavoitteena oli menetelmän pystytys ja kustannustehokkuuden arviointi; tässä onnistuttiin vain osittain, sillä näytteiden sekvensointi ei onnistunut. qPCR:n perusteella pystytään kuitenkin osoittamaan itse valmistettujen koettimien toiminta, sekä menetelmän toimivuus aina sekvensointivalmisteluihin asti. Valitettavasti materiaalien loppuminen, sekä ongelmat sekvensoinnissa annetulla aikavälillä vaikuttivat huonoihin sekvensointituloksiin, minkä takia emme pysty varmasti osoittamaan menetelmän spesifisyyttä ja toiminnan puhautta.</p> | |
| Avainsanat | NGS, GIST, KIT, Roche [®] GS junior™, pyrosekvensointi |

| | |
|---|--|
| Author(s) Title Number of Pages Date | Marko Salmikangas A protocol for the investigation of gastrointestinal stromal tumors with Roche® GS junior™ 29 pages + 8 appendices 20.04.2014 |
| Degree | Bachelor of Health Care |
| Degree Programme | Biomedical Laboratory Science |
| Specialisation option | Biomedical Laboratory Science |
| Instructor(s) | Hannele Pihlaja, Senior Lecturer, Metropolia UAS Harri Sihto, Researcher D.Sc., University of Helsinki |
| <p>The next generation sequencing technologies have been around from the beginning of the century in international academic groups and large research laboratories, but due to their high pricing and large size these NGS –technologies haven't been usable in every day laboratory use. The technology has advanced however, causing the prices and sizes of these machines to lower to a rate at which they are acquirable for diagnostic laboratories and smaller research laboratories also.</p> <p>The main focus of this work is to create a low-priced protocol that one can use to analyze multiple patient samples simultaneously still keeping the results as reliable as possible. The protocol is meant for the research of GIST (Gastro Intestinal Stromal Tumor) and for the estimation of treatment and dosing of Imatinib®. This is a crucial part of GISTs treatment, for some KIT –mutations have really high resistance to Imatinib®, whereas others need really small amounts of the drug.</p> <p>Because it is possible to study different things with Roche® GS junior™, including viral integration sites and transfusion genes, the protocol that the work aims, is meant to be universally adaptable for other diseases also, including MCPyV (Merkel Cell Polyoma Virus) and its recognition and observation of integration. The protocol aims to resemble Washington University Capture described by Duncavage et al in their review, including some parts and adjustments from the original manuals of Roche®.</p> <p>The target of this project was to create a protocol and to estimate and compare its expenses to commercially available versions. This succeeded only partly, for the sequencing didn't yield any results. However qPCR proofed that the self-made probes worked, and the protocol worked until the emulsion enrichment and sequencing. Unfortunately the lack of materials and problems in sequencing at the given time resulted in the poor yield in sequencing and thus we were unable to attest the full extent of our protocol and the purity of our DNA extraction.</p> | |
| Keywords | NGS, GIST, KIT, Roche® GS junior™, pyrosequencing |

Sisällys

| | | |
|-------|--|----|
| 1 | Johdanto | 1 |
| 2 | GIST –kasvaimet ja KIT –valkuaisaineet | 2 |
| 2.1 | GIST | 2 |
| 2.2 | KIT –geeni ja CD117 –proteiini | 3 |
| 3 | Uuden sukupolven sekvensointi | 4 |
| 3.1 | Pyrosekvensointi | 5 |
| 3.2 | Roche® GS junior™ | 6 |
| 4 | Työn tarkoitus | 8 |
| 4.1 | Tutkimusongelmat | 8 |
| 5 | Toteutus | 8 |
| 5.1 | Projektiorganisaatio | 9 |
| 5.2 | Näyttemateriaali | 9 |
| 5.3 | Menetelmät | 10 |
| 5.3.1 | PCR:n variaatiot | 10 |
| 5.3.2 | DNA:n puhdistustekniikat | 12 |
| 5.4 | Projektin vaiheet | 13 |
| 5.5 | Biotinyloitujen koettimien valmistus | 16 |
| 5.6 | Näytteiden esikäsittely | 17 |
| 5.7 | Kapturointi | 18 |
| 5.8 | Emulsiorikastaminen | 20 |
| 5.9 | Sekvensointi | 21 |
| 6 | Tulokset | 21 |
| 6.1 | Kustannustehokkuus | 23 |
| 6.2 | Protokollan optimointi | 25 |
| 6.2.1 | Q5® entsyymien optimointi | 25 |
| 6.2.2 | Optimoidun protokollan testaaminen | 26 |
| 7 | Pohdinta | 26 |
| 7.1 | Protokollan ja tulosten tarkastelu | 26 |

| | |
|--|----|
| 7.2 Tulevaisuus | 27 |
| Lähteet | 29 |
| Liite 1. Projektin kulku | |
| Liite 2. Biotinyloitujen koettimien valmistus | |
| Liite 3. Näytteiden esikäsittely | |
| Liite 4. Kapturointi, DNA:n monistaminen ja kerääminen | |
| Liite 5. Emulsiorikastus | |
| Liite 6. Alukkeet ja koettimet | |
| Liite 8. qPCR tulokset | |
| Liite 9. Tutkimussuunnitelma | |

1 Johdanto

Uuden sukupolven sekvensointitekniikat ovat olleet käytössä jo vuosituhanneen alkupuolelta suurissa kansainvälisissä tutkimusryhmissä, mutta suuren kokonsa ja korkean hintansa vuoksi näitä NGS (next-generation sequencing) -laitteita ei ole ollut mahdollista hyödyntää diagnostisessa laboratoriotyössä. Tekniikan kehittyessä laitteiden koko ja kustannukset ovat laskeneet tasolle, jossa myös pienemmillä laboratorioilla on mahdollisuus hankkia itselleen näitä laitteita diagnostiseen työhön tutkimustyön lisäksi.

Heikki Joensuun tutkimusryhmä on yksi Suomen tunnetuimmista ja arvostetuimmista tutkimusryhmistä syöpätutkimusten alueella. Ryhmällä on tälläkin hetkellä useita eri tutkimuksia käynnissä, ja näiden tutkimusten edistämiseksi he ovat hankkineet Roche® GS junior™ sekvensaattorin. Opinnäytetyön tarkoituksena on kyseiseen laitteeseen tutustuminen ja kustannustehokkaan menetelmän kehittäminen ruoansulatuskanavaperäisten stroomakasvainten (GIST) CD117 proteiinia koodittavan geenin (v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog eli KIT) mutaatioiden tunnistamiseksi potilasnäytteistä.

Menetelmän kehittämisessä tullaan käyttämään Roche®:n valmiita protokollia, joita muokkaamalla ja itse valmistettuja koettimia hyväksi käyttäen pyritään valmistamaan KIT –mutaatioille tyypilliset geenialueet valikoiva menetelmä. Menetelmän avulla pystytään GIST (Gastro Intestinal Stromal Tumors) diagnostiikan lisäksi arvioimaan taudissa käytettävän lääkityksen esim. imatinib® annostus. Tämä on merkittävä osa taudin hoitoa, sillä osa KIT –mutaatioista on imatinib® hoidolle resistenttejä toisten vaatiessa hyvinkin pieniä annoksia. Koska Roche® GS junior™:lla on mahdollista tutkia useita eri asioita, mukaan lukien virusintegraatioalueita ja fuusiogeenejä, ja menetelmää halutaan hyödyntää koko laitteen toimintakapasiteetin alueelta, on tarkoituksena luoda menetelmästä universaalisti sovellettava muillekin taudeille, esim. MCPyV:n (Merkel Cell Polyoma Virus) havaitsemiseksi ja integraation tunnistamiseksi.

2 GIST –kasvaimet ja KIT –valkuaisaineet

2.1 GIST

Gastrointestinaali strooma tuumorit, eli ruoansulatuskanavan stroomakasvaimet ovat ryhmä harvinaisia ruoansulatuskanavan ja vatsan alueen kasvaimia, jotka on havaittu valomikroskopian kehittämisen yhteydessä jo 1930 - 1950, mutta joiden tunnustaminen omaksi kasvaintyyppikseen tapahtui vasta 1990 –luvulla. Alkuvaiheessa GIST:ien luultiin kuuluvan sileälihaskudosten syöpiin, ja se usein sekoitettiin leiomyoomaan, leiomyosarkoomaan ja –blastoomaan sileälihasneoplasian perusteella. (Corless - Fletcher - Heinrich 2004.)

Immunohistokemian ja kudsvärjäysten kehittyessä huomattiin kuitenkin eroavaisuuksia tyyppillisten sileälihaskudosneoplasian ja GIST:ien välillä. Vuonna 1983 Mazur ja Clark julkaisivat tutkimusartikkelin, jossa he esittelivät vatsan strooma kasvaimia. Mazur ja Clark olivat uudelleen arvioineet 28 leiomyoomaksi tai leiomyosarkoomaksi luokiteltua kasvainta S-100 proteiinivärjäyksellä. Normaalisti S-100 yhdistetään neuraalisen, eli hermostollisen sarjan soluihin, kuten Schwannin solut, gliasolut ja melanosyytit, mutta joita Mazurin ja Clarkin tutkimuksessa löytyi 8:sta kasvaimesta, mikä poikkesi täysin aikaisemmasta leiomyooma tai leiomyosarkooma diagnoosista. (Mazur - Clark 1983.)

Tämän hermostollisen yhteyden ja sileälihasneoplasian yhdistelmän todettiin olevan omanlaisensa kasvaintyyppi, ja 1990 –luvulla tälle saatiin täysi varmistus kun ensimmäiseksi todelliseksi GIST:ien tunnusmerkiksi löydettiin CD34 proteiini. Nykyään CD34 proteiinin käyttämisestä tunnusmerkkinä on luovuttu ja sen tilalle on löydetty tarkempi vaihtoehto, CD117 proteiini, ja tarkemmin tätä koodaava KIT -geeni, joka esiintyy mutaationa 95% GIST:eistä. (Corless - Fletcher - Heinrich 2004.) Tämän korkean KIT –geenin mutaatioiden esiintymisen johdosta nykyään määritelläänkin GIST:n olevan ”KIT –positiivinen GI –kanavan ja vatsan mesenkymaalinen neoplasia” (Miettinen M. - Lasota J. 2003.)”. Loput 5%:a, jotka ovat KIT –negatiivisia, kuuluvat ns. villin tyyppin GIST:eihin, joista suurin osa on PDGFRA –geenin mutaation omaavia GIST:ejä. GIST:ien maligniteetin määrittää yleisesti mutaation sijainti KIT –geenissä, sekä tietysti kasvaimen koko ja sijainti, jotka ovat molemmat riippuvaisia löydöksen ajankohdasta (Corless - Fletcher - Heinrich 2004). Lisäksi nykyään GIST:n maligniteettia arvioitaessa huomioidaan uudelleen esiintymisen riskiä, jonka perustana ovat kasvaimen sijainti,

koko, kasvaimen yleisilme ("puhdas" vai "repeytynyt") ja invasiivisuus. Alle 1cm halkaisijaltaan olevat kasvaimet (ns. mikro-GIST:t, yleisiä vanhusten keskuudessa) ovat riskiltään erittäin pieniä ja usein täysin benigniä kasvaimia, joiden hoitona käytetään endoskooppista seuranta 6-12 kk välein. Yli 2cm halkaisijaltaan olevat GIST:t ovat puolestaan usein maligneja ja metastasoivat lähes 40% potilaista löytymishetkellä. Näiden hoitona suositellaan välitöntä leikkausta, 1-2cm marginaaleilla invasiivisuuden toteamiseksi ja metastasoinnin sekä uudelleen esiintymisen riskin arvioimiseksi. (Joensuu - Hohenberger - Corless 2013.)

2.2 KIT –geeni ja CD117 –proteiini

KIT-geeni on 4q12 alueella sijaitseva proto-onkogeeni, joka koodaa CD117 proteiinin valmistusta. CD117 on 145-160 kDa kokoinen proteiini ja sitä esiintyy pääasiassa hermostollista yhteyttä sisältävissä soluissa, joissa se toimii tyrosiinikinaasireseptorina. CD117 toimii SCF:n (stem-cell factor, eli kantasolutekijä) reseptorina ja vaikuttaa solun jakautumiseen ja kasvuun. Mutaatiot KIT-geenissä aiheuttavat useita syöpiä, mukaan lukien myeloomia ja suolistosyöpiä. GIST:n kannalta tärkeää on CD117 proteiinin esiintyminen ICC (Intestinal Cells of Cajal, eli Cajalin solut) soluissa, jotka toimivat suoliston sähköisen toiminnan tahdistajina. (Corless - Fletcher - Heinrich 2004). Näiden CD117 proteiinien mutaatiot johtavat usein solun hallitsemattomaan jakautumiseen, joka puolestaan tarkoittaa syövän kehittymistä.

GIST:n kannalta tärkeimpiä mutaatioita ovat eksoneissa 9,11,13 ja 17 tapahtuvat mutaatiot. Yleisin näistä on eksonissa 11 eli proteiinin jukstamembraanissa esiintyvä pistemutaatio. Näitä mutaatioita on löydetty lähteestä riippuen 60-80% kaikista GIST tapauksista. (Corless – Fletcher - Heinrich 2004.) KIT 11 eksonin jukstamembraanin tarkoituksena on säädellä proteiinin dimerisaatiota, ja mutaatiot tällä alueella häiritsevät tätä funktiota, johtaen onkogeeneeseen singalointiin. (Joensuu - Hohenberger - Corless 2013.) Toiseksi yleisin mutaatio on noin 10% GIST:stä löytyvä proteiinin ekstrasellulaarisen osan eli eksonin 9 mutaatio. Mutaatiot ovat 6 nukleotidin mittaiset (GCC⁵⁰² ja TAT⁵⁰³ -> ALA⁵⁰² ja TYR⁵⁰³) ja niitä on löydetty vain vatsalaukun GIST:ien yhteydessä. Nämä GIST tapaukset ovat olleet erittäin maligneja ja huonosti Imatinib[®] hoidolle vastavia, vaati jopa kaksinkertaisen annostuksen. (Corless - Fletcher - Heinrich 2004.)

Harvinaisempia KIT mutaatioita ovat eksoneiden 13 ja 17 mutaatiot. Nämä muodostavat yhdessä noin 2%:a kaikista mutaatioista. Eksoni 13 on proteiinin ATP:tä sitovan osuuden, tyrosiinikinaasi 1. domaanin, koodittava alue ja eksoni 17 tyrosiinikinaasi 2. domaanin koodittava alue. Eksonin 13 mutaatiot ovat olleet maligneja syöpiä, mutta Imatinib[®] herkkiä, kun taas eksonin 17 ovat olleet maligneja, mutta Imatinib[®] resistenttejä. (Rink, Lori ym. 2009.)

Vaikka KIT-geenin mutaatiot ovat näinkin tarkkaan selvillä, on niiden hoito silti vaikeaa. Varsinaista geenihoidoa ei ole KIT -mutaatioille olemassa, mutta Imatinib[®] -hoidolla pystytään hillitsemään CD117 proteiinin toimintaa, ehkäisten näin hyperplasiasta aiheutuvaa syöpää. (Miettinen - Lasota 2003.) Hoidon vaikeuden ja lääkeresistenttien tapauksien vuoksi geenisekvensointi on nykyään paras mahdollinen keino selvittää GIST epäilyjen potilaiden syöpästatus. Opinnäytetyön tavoitteena onkin tarjota entistä parempi keino GIST:ien tutkimiseksi, joka mahdollistaisi syövän toteamisen lisäksi myös lääkeaineresistenttien GIST:ien seulomisen.

3 Uuden sukupolven sekvensointi

Uuden sukupolven geeni- ja genomisekvensointilaitteet ovat olleet jo hetken markkinoilla, ja ne alkavatkin yleistymään patologian ja genetiikan laboratorioissa tutkimuskäytön lisäksi myös diagnostisissa laboratorioissa. Nämä NGS -laitteet eroavat perinteisistä sekvensointiin kykenevistä laitteista ajankäytön ja teknologian lisäksi myös toimintaperiaatteeltaan. Perinteisestä Sangerin sekvensoinnista, joka perustuu radioaktiivisesti leimattuihin nukleotideihin tai vaihtoehtoisesti fluoresoiviin nukleotideihin ja geeli-/kapillaarielektroforeesiin, on luovutta ja siirrytty ns. pyrosekvensointiin.

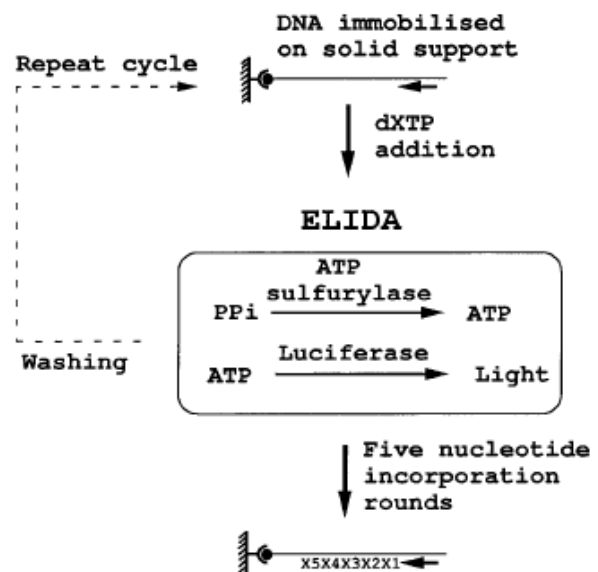
Pyrosekvensointi on alkuaan Tukholmasta, Royal Institute of Technology:sta ja on Mostafa Ronaghin ja Pål Nyrénin käsialaa. Vuonna 1985 Nyrén julkaisi artikkelin, jossa kuvattiin sekvensointia luminesenssin avulla cDNA:n muodostuksen yhteydessä. Vuonna 1996 Nyrén, Ronaghi ja Uhlén julkaisivat laajan tutkimusartikkelin "Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release". Tässä kohtaa pyrosekvensoinnin periaate ja teknologia pyrosekvensoinnin takana oli niin pitkällä, että se mahdollisti menetelmän kaupallistamisen. Vuonna 1999 Tukholman pörssiin listautunut Pyrosequencing AB alkoi valmistaa laitteistoa ja reagensseja kokeelliseen pyrosekvensointiin. (Nyrén Pål 2007.) Pyrosekvensointi lisensoitiin myöhemmin Qiagen[®]:lle ja edelleen 454 Life Sciences[®]:lle, jonka nykyään omistaa Roche Diagnostics[®]. Teknolo-

gian ja tekniikoiden kehityksen myötä alkujaan lyhyille DNA pätkille ja sekvensoinnille tarkoitettu menetelmä, on nykyään markkinoiden tehokkaimpia sekvensointimenetelmiä. Roche® GS FLX+™ välineistöllä pystytään teoreettisesti lukemaan jopa 1000bp pätkiä ja jopa 40 Mbp 10 tunnin ajossa yhdellä analysaattorilla. Nykyään markkinoilla on useita muitakin pyrosekvensoinnin laitevalmistajia, ja vaikuttaakin siltä, että pyrosekvensaatio on valtaamassa markkinat Sangerin sekvensoinnilta. (Ahmadian, Afshin ym. 2006.)

3.1 Pyrosekvensointi

Pyrosekvensointi perustuu pyrofosfaatin (PPi) havaitsemiseen kemiluminesenssin avulla. Aikaisempiin sekvensointimenetelmiin, esim. Sangerin sekvensointiin, verrattuna menetelmä on huomattavasti nopeampi, sillä sekvensointi tapahtuu näytteen DNA:n kopioiden aikana. Sangerin sekvensoinnissa näytteen DNA tulee ensin kopioida PCR:llä käyttäen hyväksi leimattuja merkkiaineita, ja tämän jälkeen ajaa geeli- tai kapillaarielektroforeesin läpi, jolloin tulokset vasta havaitaan. Molemmat menetelmät ovat erittäin tarkkoja, pyrosekvensoinnin tavoittaessa jopa 99% tarkkuus, ainoan virhelähteen ollessa DNA-polymeraasin lukuvirheet. (Roche Diagnostics Corp. 2011.)

Pyrosekvensointi perustuu neljän entsyymin ja nukleotidien vuorotellen tapahtuviin reaktioihin. Nämä entsyymit ovat DNA-polymeraasi 1, ATP sulfurylaasi, luciferaasi ja apyraasi. Näytteen sekvensointi alkaa kaksijuosteisen DNA:n avaamisella yksijuosteiseksi, ja tämän ssDNA:n (single stranded DNA) kiinnittämällä kiinteään faasiin. Kiinnitettyyn ssDNA:han kiinnitetään sekvensointialue joka kiinnittyy sekvensoitavaan DNA:han ja toimii alkukohtana sekvensoinnille. Tämän jälkeen lisätään sekoitusta, joka sisältää DNA polymeraasi 1:tä, sulfurylaasia, luciferaasia, luciferiiniä ja adenosiiini-5'-fosfosulfaattia (dATP α S), joka korvaa dATP:n neljäntenä nukleotidina. Tämä perustuu luciferaasin ja ATP:n reaktioon joka käsitellään myöhemmin. DNA-polymeraasi 1 kiinnittää dATP α S:n ensimmäiseksi nuk-



Kuva 1. Pyrosekvensointi (Nyrén, Pål ym. 1996).

leotidiksi DNA:n vastinjuosteeksi, mikäli emäspariutuminen sen sallii. DNA-polymeraasin kiinnittäessä dATP α S, irtoaa reaktiotuotteena pyrofosfaatti PPI. ATP sulfonylaasi muodostaa PPI:stä ATP:tä, joka toimii luciferaasi - luciferiini kompleksin voimanlähteenä valon tuottamisessa. Halutun inkubaatioajan jälkeen näytteeseen lisätään apyraasia, joka degeneroi ylimääräiset nukleotidit ja ATP:t monofosfaateikseen. Tämä on tärkeä vaihe nukleotidispesifisen valontuottamisen kannalta, sillä AMP ja dNMP:t eivät toimi luciferaasi - luciferiini kompleksin voimanlähteenä, jolloin vain juuri lisätty dNTP voi kiinnittyä templaatti DNA:han ja aiheuttaa näin valoreaktion. Kun on palattu ns. alkutilaan, lisätään toista dNTP:tä, jolloin sykli käynnistyy uudestaan. Tätä sykliä toistetaan kunnes päästään templaattina toimineen DNA:n loppuun ja sekvensointi on valmis (kts. kuva 1). (Nyrén, Pål ym. 1996.)

Reaktiot tapahtuvat 1:1 periaatteella, jolloin yhden emäksen kiinnittyminen ja täten yhden PPI:n irtoaminen havaitaan XmV:n valonvälähdyksenä luciferaasilta (0,1 μ M puhdas ATP aiheuttaa luciferaasi-luciferiini kompleksilla 200mV:n vasteen). Mikäli templaatti-DNA:ssa on peräkkäin useampia samoja nukleotidejä, havaitaan valoa suhteessa yhtä paljon kuin kiinnitettyjä nukleotidejä on. Esim. mikäli templaatti-DNA:ssa on 3 C:tä peräkkäin, kiinnitetään näytteeseen 3 dGTP:tä, mikä johtaa kolmen ATP:n ja edelleen kolmen PPI:n muodostumiseen, ja aiheutuva valonvälähdys on näin 3XmV suuruinen. Valoa havaitaan sekvensaattoriin rakennetuilla detektoreilla, josta tiedot yhtenevät ajo-ohjelman tietojen kanssa ja tuloksena on valmis ssDNA sekvenssi koodaavasta juosteesta. (Nyrén, Pål ym. 1996.)

3.2 Roche® GS junior™

Roche® GS junior™ on Roche Diagnostics®:n valmistama sekvensaattori, joka on tarkoitettu pienten geenimäärien ja mutaatioiden tutkimiseen, keskimääräisen geenin lukupituuden ollessa noin 400 bp. Analysoinnissa käytetään erityistä Pico Titer Plate™ -levyä, joka sisältää yli 300 000 kaivoa johon DNA:ta sisältävät helmet kiinnitetään. Yhden analysointikierron kestäessä noin 10 h saadaan teoreettisesti noin 35Mbp DNA sekvenssiä tutkittua kerralla. (Roche Diagnostics Corp. 2011.)

Toimintaperiaatteeltaan Roche® GS junior™ perustuu kiinteän faasin pyrosekvenssaatioon. Tämä tarkoittaa sitä, että edellä kuvattu pyrosekvensointi tapahtuu ssDNA:n ollessa kiinnitettynä kiinteään faasiin. Roche® GS junior™:ssa tämä kiinteä faasi on streptavidin päällystetyt helmet. Nämä streptavidin päällystetyt helmet ovat halkaisijaltaan

noin 3 μm ja ovat valmistettu superparamagneettisesta materiaalista, joka mahdollistaa niiden sitomisen kiinteään faasiin. (Life Technologies Corp. 2013.) Käytännössä tämä tarkoittaa siis seuraavaa: helmien joutuessa ulkoiseen magneettikenttään, muuttuvat ne magneettisiksi, ja tarrautuvat kiinni Roche® GS junior™:in kaivoihin.

Mutta pelkkä helmien kiinnittäminen kaivoihin ei riitä, vaan helmiin on saatava tätä ennen kiinnitettyä myös tutkittava DNA. Tätä varten nämä helmet on päällystetty streptavidinillä, joka muodostaa biotiinin kanssa vahvan sidoksen ($K_d=10^{-15}$). Tällöin DNA-juoste, joka on leimattu biotiinillä, saadaan kiinnitettyä näihin helmiin, ja edelleen sekvensaattorin kaivoihin sekvensointia varten. (Life Technologies Corp. 2013.)

4 Työn tarkoitus

Kuten johdannosta käy ilmi, työn tarkoituksena on menetelmän (myöhemmin protokolla) kehittäminen ja tämän menetelmän kustannustehokkuuden arviointi. Menetelmän tarkoituksena on GIST:ien KIT –geenin eksoneiden 9,11,13 ja 17 eristäminen potilasnäytteistä ja näiden eksoneiden sekvensointi Roche® GS Junior™:lla. Eristäminen tapahtuu itse valmistettujen biotinyloitujen koettimien avulla, joiden valmistamiseen käytetyn menetelmän luominen on osa opinnäytetyötä. Eksoneiden eristämisestä ja koettimien valmistamisesta tehdään kapturointi protokolla, josta työohjeet on esitelty liitteissä 1-5. Lisäksi opinnäytetyön tarkoituksena on verrata oman protokollan ja Roche®:n kaupallisen protokollan kustannustehokkuutta.

4.1 Tutkimusongelmat

Varsinaisia tutkimusongelmia opinnäytetyöllä on kolme:

1. Kuinka protokollan vaatimat koettimet valmistetaan?
2. Saadaanko protokollasta toimiva määräajassa?
3. Onko protokolla itse valmistetuilla koettimilla kustannustehokkaampi kuin kaupallisilla koettimilla?

5 Toteutus

Projekti toteutettiin helmi-maaliskuussa 2014. Projektin loppuun saakka viemiseen kului 9 viikkoa, ja lopullisia tuloksia projektille ei tässä ajassa saatu. qPCR:n (kvantitatiivinen PCR) avulla voidaan osoittaa että itse tehdyt koettimet toimivat, samoin kuin protokolla yleisesti ottaen. Varsinaisia sekvenssejä ei kuitenkaan ajan ja materiaalien loppumisen vuoksi saatu. Sekvenssien puutteen vuoksi ei voida varmuudella sanoa protokollan eristävän pelkästään haluttua materiaalia optimaalisesti. Näin ollen projektista saadut tulokset eivät täytä kaikkia haluttuja kriteereitä, mutta ovat kuitenkin hyvä pohja kapturointimenetelmän kehittämisessä.

5.1 Projektioorganisaatio

Projektin toteuttamisesta (sekä työstämisestä, että kirjallisesta osuudesta) vastasi Marko Salmikangas. Ohjeistusta työstämisvaiheessa antoi Harri Sihto, työn tilaaja ja biokemisti Heikki Joensuun tutkimusryhmästä. Kirjallisessa vaiheessa palautteen kautta työtä edistivät ohjaava opettaja Hannele Pihlaja, sekä opponentit Mikael Järvinen ja Kalle Lehto.

Taulukko 1. Projektioorganisaatio.

| | | |
|-------------------|--------------------------|---------------------|
| Marko Salmikangas | Opiskelija | Metropolia AMK |
| Hannele Pihlaja | Ohjaava opettaja/Lehtori | Metropolia AMK |
| Harri Sihto | Yhdyshenkilö/Biokemisti | Helsingin Yliopisto |
| Mikael Järvinen | Opponentti | Metropolia AMK |
| Kalle Lehto | Opponentti | Metropolia AMK |

5.2 Näytemateriaali

Näytteinä käytettiin neljää (4) GIST –potilaan kudospäytettä, joista oli eristetty DNA ennen projektin alkua. Näytteiksi valittiin erilaisia mutaatioita sisältäviä näytteitä mahdollisuuksien mukaan. Kaiken kaikkiaan joukossa oli 1 eksoni 11 deleetio ja 1 pistemutaatio sekä 2 useamman emäksen mutaatiota, jotka esiintyivät eksonissa 9. Lisäksi työssä käytettiin neljää (4) Merkelinsolukarsinoma (MCC) –potilaan kudospäytettä kontrollina, joista oli yhtäläillä eristetty DNA ennen projektin alkua. Tavoitteena oli seurata Duncavage ym. julkaisemaa artikkelia, jolloin MCC -potilaiden näytteistä olisi pitänyt saada sekvensoitua MCPyV:n integraatiokohta potilaan DNA:sta.

Taulukko 2. Potilasnäytteet.

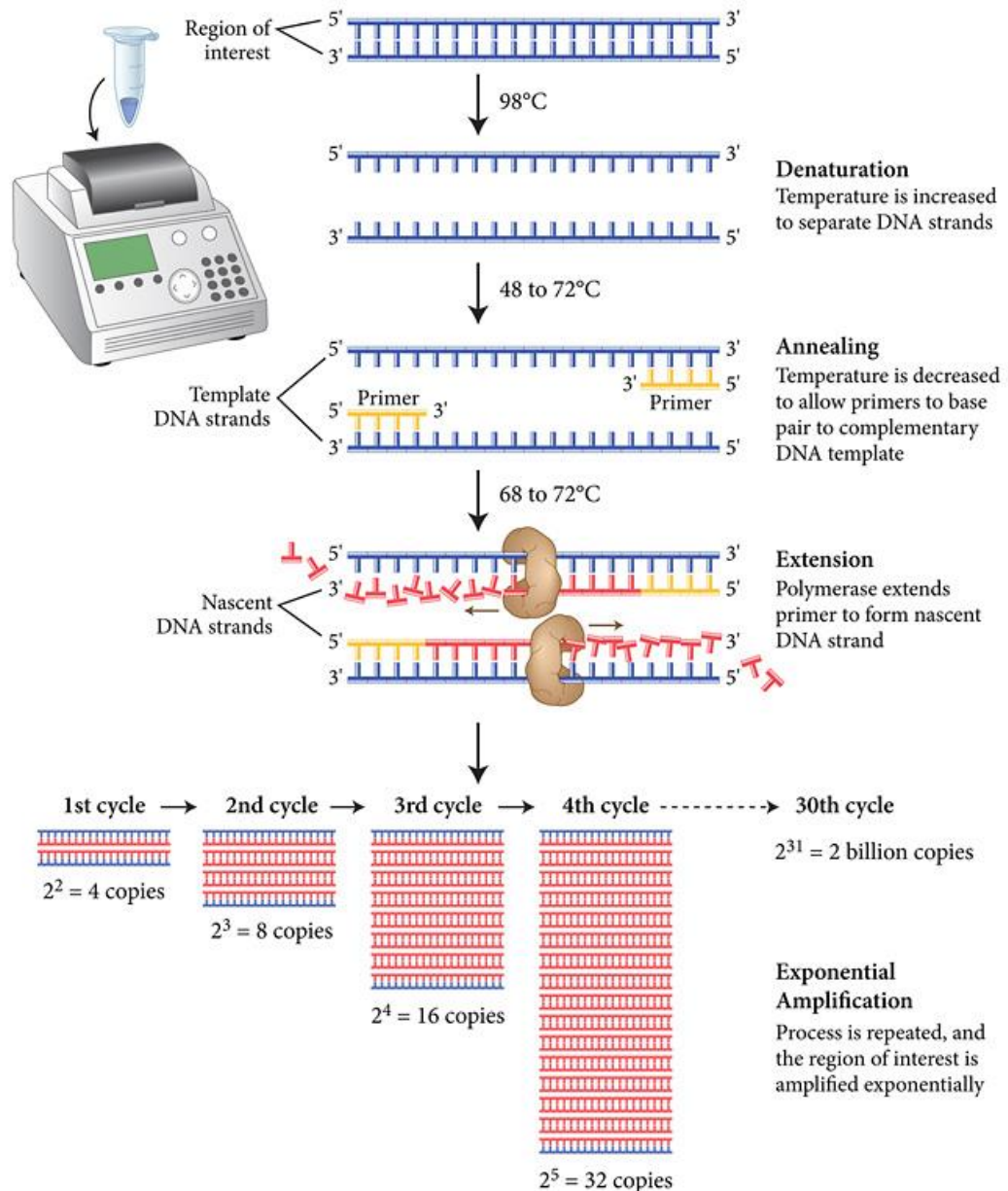
| Näyte nro. | Syöpä | Näytepitoisuus ng/ μ L | Tunniste |
|--------------|-------|----------------------------|----------|
| 1699-101E3A | MCC | 81 | 2 |
| 6650/03 | MCC | 81 | 11 |
| P00-14332A | MCC | 118 | 19 |
| B98-12950 | MCC | 127 | 20 |
| 11254-07C | GIST | 245 | C |
| JK04-40444 | GIST | 51 | 4 |
| PK03-57792 | GIST | 150 | 2 |
| OK06-1991203 | GIST | 220 | 203 |

5.3 Menetelmät

Projektissa käytettiin useita yleisesti käytössä olevia molekyyli­genetiikan ja biokemian menetelmiä, mukaanlukien erilaiset PCR –menetelmät, DNA:n puhdistaminen kolumnilla, geelillä, paramagneettisilla helmillä ja etanolipresipitaatiolla jne. Nämä kaikki on esitelty seuraavaksi vain lyhyesti, sillä nämä menetelmät ovat, kuten mainittu edellä, yleisesti käytössä, ja täten yleisessä tiedossa ainakin jollain tasolla.

5.3.1 PCR:n variaatiot

PCR eli polymeerasiketjureaktio (Polymerase Chain Reaction) on Kary Mullis:n 1980 –luvulla kehittämä menetelmä, jossa DNA –polymeraasin avulla valmistetaan templaatti –DNA:sta uusia kopioita lämpötilaa, DNA –alukkeita ja nukleotidejä hyväksikäyttäen.



Kuva 2. PCR –reaktio (New England BioLabs 2014).

Projektissa käytettiin tavallisen PCR –monistuksen lisäksi myös kvantitatiivista PCR:ää, eli qPCR:ää. Tämä on PCR:n variaatio, jossa fluoresenssileimattujen koettimien avulla saadaan aikaan valoreaktio kiinnittymisvaiheessa. Mitä suurempi pitoisuus haluttua koetinta kiinnittyy, sitä suurempi valoreaktio on. Tätä voidaan käyttää hyväksi joko monistumisen ja rikastumisen todistamisessa tai yhdistettynä standardinäytteisiin, jolloin saadaan mitattua näytteen tarkka pitoisuus. (Life Technologies Corp. 2014.)

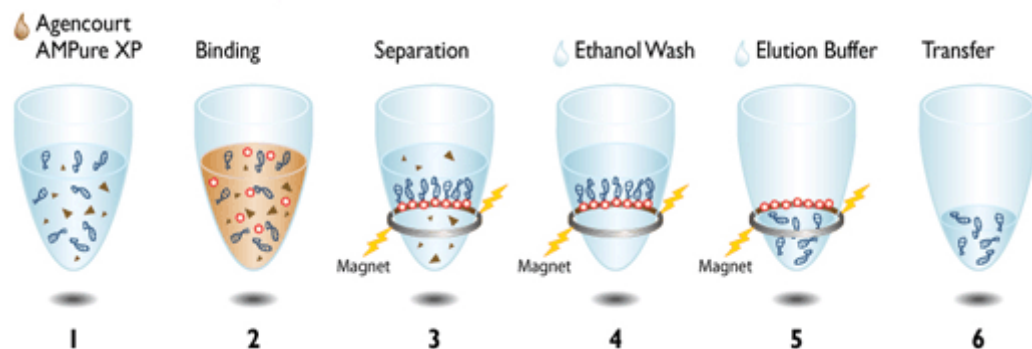
5.3.2 DNA:n puhdistustekniikat

Projektin aikana käytettiin useita erilaisia DNA:n puhdistustekniikoita. Näistä tärkeimmät ja varsinaisiin työohjeisiin päätyvät tekniikat ovat ns. kolumnipuhdistus ja helmi-puhdistus eli ampure -puhdistus. Lisäksi työn aikana testattiin etanolipresipitaation toimivuutta puhdistuksessa, mutta tämä todettiin epäkäytännölliseksi ja jätettiin siksi pois lopullisista työsuunnitelmista. Ylimääräisenä työvaiheena tehtiin myös geelipuhdistus koettimien valmistuksen aikana. Tämä geelipuhdistus on idealtaan ja toimintaperiaatteeltaan sama kuin kolumnipuhdistus, mutta näytemateriaalina toimii agarosigeeli, joka sulatetaan ennen kolumneille siirtämistä.

Kolumnipuhdistus on jäljelle jääneistä menetelmistä vanhempi ja yleisesti käytössä. Kolumnipuhdistuksen tarkoituksena on puhdistaa näytemateriaali ylimääräisistä epäpuhtauksista, kuten suoloista. Lisäksi kolumnipuhdistus tarjoaa jonkinasteista koselektiota, poistaen yli 10000bp ja alle 100bp DNA pätkät, mukaan lukien genomisen DNA:n. (Qiagen 2008.) Kolumnipuhdistus perustuu DNA:n sitomiseen silikakolumniin. Tämä tapahtuu puskuroimalla DNA:ta korkeaan suolapitoisuuteen, jolloin DNA ei läpäise kolumnissa olevaa silikakalvoa sentrifugoitaessa. Kalvoon jäänyt DNA saadaan tämän jälkeen puhdistettua suoloista ja ylimääräisistä PCR jäämistä (alukkeet, nukleotidit, etsyymit) alkoholipitoisilla, DNA:ta saostavilla pesuliuksilla. Tämän jälkeen puhdas DNA voidaan eluoida kalvolta matalasuolaisilla alkoholittomilla puskureilla, tai PCR – tason vedellä.

Ampure –puhdistus, nimi tulee AMPure XP™ helmistä, perustuu DNA:n sitomiseen paramagneettisiin helmiin (kuva 3). DNA sidotaan helmien pinnalla olevaan karboksyloituun polymeeripinnoitteeseen polyetyleeniglykolin (PEG) avulla. PEG aiheuttaa negatiivisesti varautuneiden DNA –juosteiden hakeutumisen ja kiinnittymisen paramagneettisten helmien karboksyyliiryhmiin. Kiinnittymisen jälkeen helmet asetetaan magneetikenttään, jolloin ne kasaantuvat magneetin lähelle ja alkuperäinen neste (joka sisältää PCR –reaktion ylijäämät, suolaa, nukleotidejä jne.) voidaan poistaa. Tämän jälkeen helmistä voidaan epäspesifi sitoutuminen ja jäljelle jääneet suolat poistaa huuhtelemalla helmiä 70% etanolilla (alkoholi ei riko DNA:n ja karboksyylien välistä sidettä). Puhdistettu DNA voidaan tämän jälkeen irroittaa helmistä neutraalilla liuoksella, kuten PCR –tason vedellä, ja voimakkaalla vorteksoinnilla. Ylimääräiset helmet saadaan tämän jälkeen poistettua asettamalla liuos magneetille, ja siirtämällä supernatantti uuteen putkeen (sisältää nyt DNA:n). Menetelmän avulla pystytään poistamaan näytteestä epä-

puhtaudet, esim. suolat, sekä kokoselekoimaan vain halutusta DNA:n pituudesta ylös-päin olevat DNA –pätkät käyttämällä erilaisia näyte/helmi pitoisuuksia. (Beckman Coulter 2012.)



Kuva 3. Puhdistusprosessi (Beckman Coulter 2012).

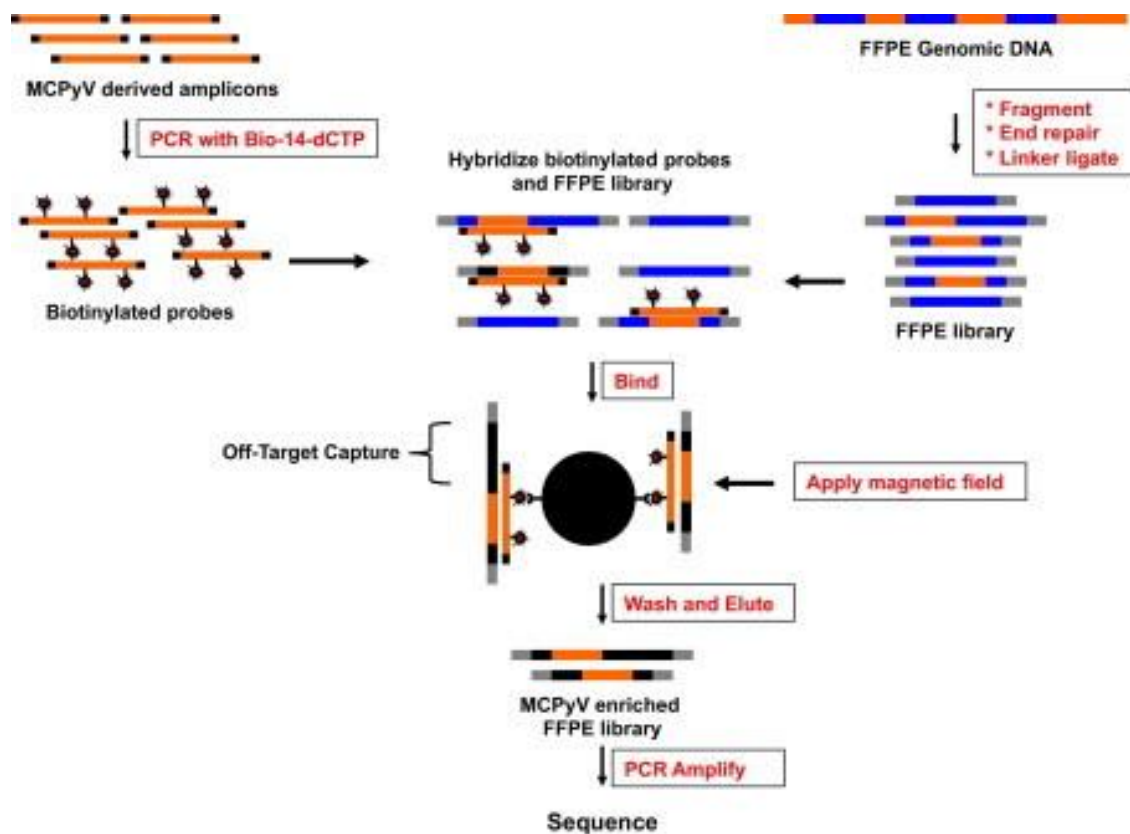
5.4 Projektin vaiheet

Protokollan ensimmäinen vaihe oli koettimien valmistus. Tämä on protokollan tärkein vaihe, sillä koettimien epäonnistuminen johtaa joko epäspesifiin sitoutumiseen ja täten vääriin tuloksiin tai epäonnistuneeseen hybridisaatioon, joka johtaa täysin olemattomiin tuloksiin. Koettimien valmistukseen käytettiin Invitrogen[®]:n biotinyloitua dCTP:tä, joka liitettiin koettiin PCR:n avulla. Tavalliseen PCR reaktioon (työohje liitteessä 2) lisättiin biotinyloitua dCTP:tä yhdessä tavallisen nukleotidiseoksen kanssa, jolloin biotinyloitu dCTP liittyy satunnaisesti tavallisen sijaan valmistuvaan juosteeseen guaniinin pariaksi. Valmistuneet PCR –tuotteet ovat täten osittain biotinyloituneet, minkä pitäisi riittää DNA –juosteen sitomiseen streptavidin päällystettyihin helmiin.

Koettimien valmistusta seurasi näytteiden esikäsitely. Tämä sisältää DNA –juosteiden päiden korjaamisen, sekä 454 MID –adapterien liittämisen näytteisiin. Adapterien liittäminen on myös yksi projektin tärkeimmistä vaiheista, sillä näitä adaptereita tullaan käyttämään myöhemmin monistamisessa alukkeiden kiinnittymiskohtana. Lisäksi näiden adapterien avulla näytteiden tunnistaminen sekvensoinnissa ja näin ollen näytteiden ”poolaaminen”, eli näytteiden yhdistäminen yhdeksi näytteeksi, mahdollistetaan. Projektin aikana tätä näytteiden poolaamista ei kuitenkaan tehty ennen sekvensointia näytteiden seurannan helpottamiseksi sekä laaduntarkkailullisista syistä.

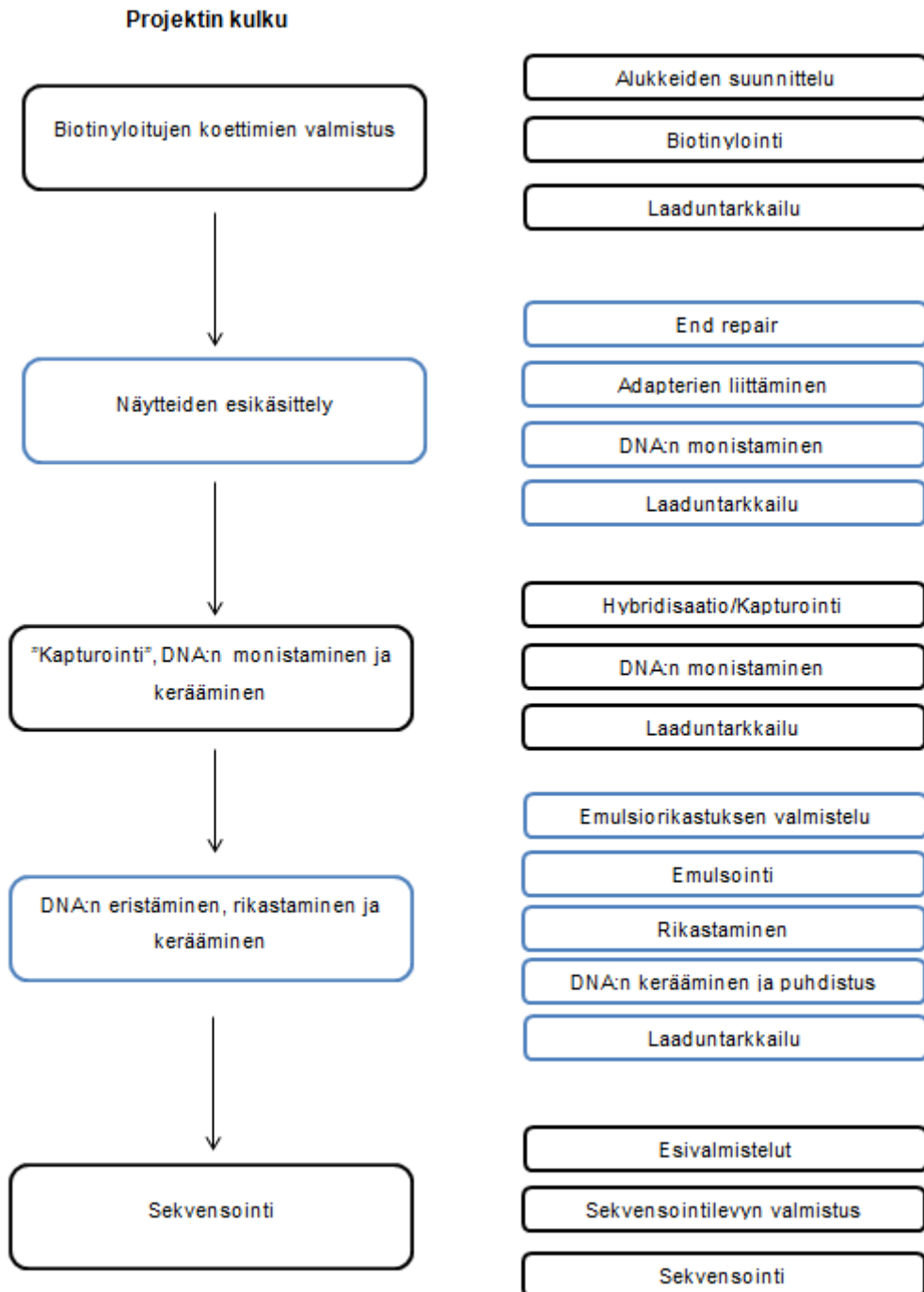
Kun näytteet oli esikäsitelty ja monistettu ensimmäisen kerran siirryttiin varsinaiseen kapturointiin. Tämä tarkoittaa näytteiden ja biotinyloitujen koettimien hybridisoimista,

jolloin näytteiden DNA:n sitominen kiinteään faasiin mahdollistuu. DNA:n sitomisessa käytetään hyväksi koettimien biotiiniä, joka muodostaa streptavidinin kanssa kovalenttisen sidoksen. Kun puolestaan tämä streptavidin on sidottu paramagneettisiin helmiin, kuten Invitrogen[®]:n M-280 streptavidin beads, voidaan koko kompleksi kerätä talteen käyttäen hyväksi magneettia. Tämän jälkeen näytteiden DNA:ta voidaan vielä monistaa halutun tuloksen saavuttamiseksi, mutta varsinainen kapturointiprotokolla muilta osin on valmis. Menetelmän toimivuuden osoittamiseksi näytteet kuitenkin haluttiin sekvensoida. Tästä on kerrottu lisää kappaleessa 5.9.



Kuva 4. Washington University capture (Ducavage, Eric ym. 2011.)

Projektin kulku suunniteltiin muistuttamaan Duncavage ym. artikkelissa esittelemää Washington University capture (Wucap) –protokollaa (kuva 4). Vaikka edellisellä sivulla esitetty kuva onkin erittäin pelkistetty, kuvaa se silti hyvin projektin eri vaiheiden linkitymistä toisiinsa. Kuva 5 puolestaan esittelee opinnäytetyössä valmistuneen protokollan eri vaiheet ja projektin etenemisen vaihe vaiheelta.

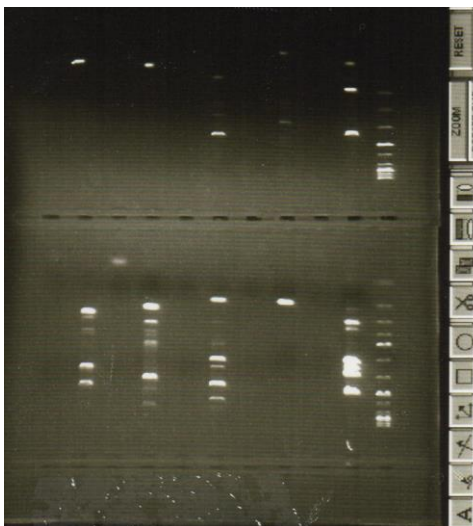


Kuva 5. Projektin kulku.

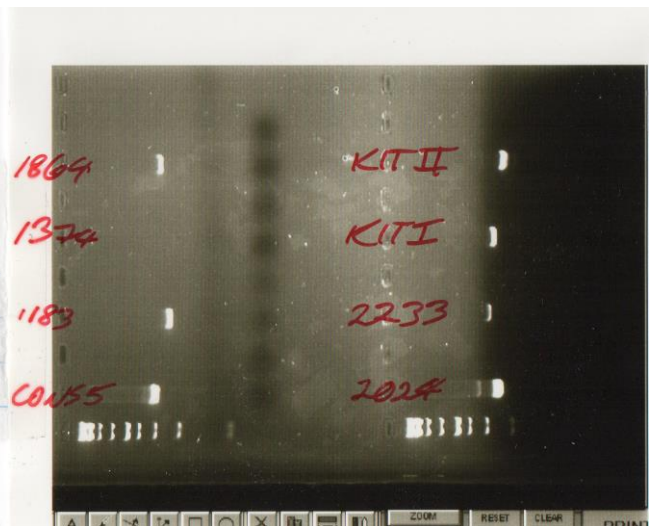
5.4.1 Biotinyloitujen koettimien valmistus

Biotinyloidut koettimet valmistettiin itse biotinyloidun dCTP:n lisäämisellä tavalliseen PCR –reaktioon. PCR:ää varten Harri Sihto suunnitteli alukkeet käyttäen hyväksi primer3 –ohjelmaa (saatavilla ilmaiseksi osoitteessa <http://primer3.ut.ee/>). Tarkat alukekvenssit ja koettimien tiedot löytyvät liitteestä 6. ja työohjeet biotinyloitujen koettimien valmistukselle löytyvät liitteestä 2. Tähän suhteellisen yksinkertaisen toimenpiteen toimintakuntoon saattamiseen kului 3 viikkoa, joka kului pääosin PCR:n aikana tapahtuvien ongelmien, kuten reaktiopuskurin kontaminaation selvittelyihin. Koska virusgenomin kanssa työskentelyssä on usein omat ongelmansa liiallisen replikoitumisen ja ylimääräisten tuotteiden muodostumisen kanssa, päätettiin koettimien valmistuksessa käyttää ylimääräistä valmistelua templaattina toimineen näytteen kanssa (ei potilasnäyte, julkaisematonta materiaalia).

Templaattina toiminutta näytettä monistettiin PCR:n avulla käyttäen hyväksi ennalta suunniteltuja alukkeita. Näistä tuotteista tehtiin agarosigeeli kuvantamista varten, ja halutut tuotteet puhdistettiin geeliltä Qiagen[®]:n QIAquick Gel extraction –pakkauksella valmistajan ohjeiden mukaan. Valmiit tuotteet toimivat tästä eteenpäin koettimien PCR –reaktiossa templaatteina, jokainen omaa alukepariaan vastaten, jolloin valmiit koettimet sisälsivät vain haluttua DNA aluetta.



Kuva 7. Puhdistamaton PCR.



Kuva 6. Valmiit koettimet.

Seuraavan PCR reaktion yhteyteen lisättiin Invitrogen[®]:n 14-biotin-dCTP:tä, jolla koettimet biotinyloitiin. Koettimien toimintaa testattiin sitomalla koettimet streptavidin pääl-

lystettyihin helmiin, jota seurasi kaksi pesua Tris-HCl/NaCl/EDTA liuoksella, jonka jälkeen koettimet irroitettiin streptavidinistä keittämällä helmiä 0,1% SDS –liuoksessa 10 min. Tulokset näistä testeistä jäivät pelkän todistuksen tasolle, sillä SDS –liuos ja biotiini häiritsivät testaamisessa käytettyä Agilent®:n BioAnalyzer™:a siinä määrin ettei järkevää tulosta saatu aikaiseksi. NanoDrop™ laitteistolla pystyimme kuitenkin havaitsemaan DNA:ta eluaattiliuoksissa mitattavia pitoisuuksia, joten uskoimme koettimien toimintaan näillä perusteilla. Pohdinta osiossa on esitelty koettimien valmistuksesta sekä siihen liittyvistä ongelmista parannusehdotuksia.

5.4.2 Näytteiden esikäsittely

Näytteiden esikäsittelyssä noudatettiin suoraan Roche®:n ohjetta ”Rapid Library Preparation Method Manual”. Näytteitä oli yhteensä 8 kappaletta, 4 GIST ja 4 MCC näytettä. Molemmista näytetyypeistä käytettiin jo aikaisemmin parafiinista eristettyä DNA:ta (kts. taulukko 1. Potilasnäytteet). Näytteiden esikäsittelyssä näytteiden päihin lisätään väli-vaiheiden avulla 454 MID –adapterit, jotka ovat näytteiden monistukseen ja tunnistukseen tarkoitetut DNA –”alukkeet”. Näiden kiinnittämiseen ja näytteiden esikäsittelyyn tarkoitetut työohjeet löytyvät liitteestä 3. Adapterien liittämisen jälkeen näytteiden pitoisuudet mitattiin varmuuden vuoksi, ja näytteet puhdistettiin Ampure XP –helmillä.

Puhdistetut näytteet siirtyivät tämän jälkeen ensimmäiseen monistusvaiheeseen, jonka tarkoituksena on lisätä DNA:n määrää ennen hybridisaatiota. Sekvensointiin päätyneet näytteet monistettiin käyttäen Roche®:n ohjetta ”NimbleGen SeqCap EZ Library LR User’s Guide”. Työohjeissa (liite 4) on kuitenkin esitelty eri entsyymille (Q5® Hot Start enzyme, New England Biolabs®) käytettävä protokolla, koska opinnäytetyön aikana Roche®:n ohjeissa käytetty entsyymi (FastStart® Taq, Roche®) loppui, ja protokollaa aloitettiin optimoimaan Q5® –entsyymille. Tästä lisää kappaleessa 4.10. ”Protokollan optimointi”. Monistetut näytteet puhdistettiin Roche®:n ohjeiden mukaisesti Qiagen®:n kolumneilla ja näytteistä tehtiin agarosigeeli kuvantamista varten, sekä näytteiden pitoisuudet mitattiin käyttäen NanoDrop™ laitteistoa.

5.4.3 Kapturointi

Kapturointivaiheen tarkoituksena oli näytteiden hybridisoiminen itse valmistettujen biotinyloitujen koettimien kanssa, ja tämän jälkeen hybridisoituneiden DNA –juosteiden erottaminen ylimääräisestä DNA:sta magneetin avulla. Hybridisaatiossa seurattiin Roche[®]:n em. ohjetta, sillä poikkeuksella että valmiiden koettimien sijalla käytettiin omia koettimia (määrä molemmissa noin 200 ng). Lisäksi liitteenä 4. olevissa työohjeissa on muutettu koettimien pipetoinnin ja näytteen denaturoinnin paikat keskenään, sillä optimointivaiheessa huomattiin tarve myös koettimien denaturoimiseen. Kaupallisten koettimien ollessa yksijuosteista DNA:ta koettimien denaturoimisesta ei ole hyötyä, toisin kuin itse valmistettujen kaksijuosteisten DNA koettimien, joiden sitoutuminen templaatti-DNA:han vaatii koettimien avaamisen yksijuosteiseksi. Itse hybridisaatio tapahtui lisäämällä näytteille hybridisaatioalukkeita ja kuivaamalla tämä seos +60°C. Tämän jälkeen kuivatuille näytteille/alukkeille lisättiin hybridisaatiopuskurit ja biotinyloidut koettimet, minkä jälkeen seos denaturoitiin +95°C 10 min ja jätettiin hybridisoitumaan 48h (viikonlopun yli hybridisaatio).

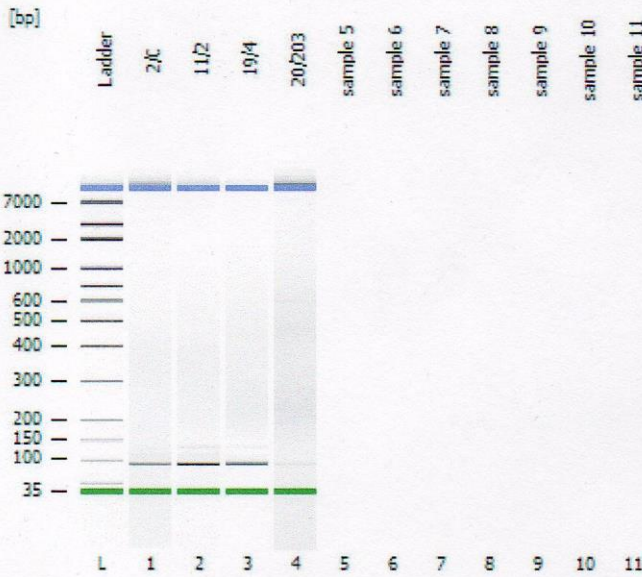
Hybridisoituneet näytteet puhdistettiin tämän jälkeen ylimääräisestä DNA:sta sekä hybridisaatiopuskureista ja –alukkeista streptavidin M-280™ (Invitrogen[®]) –helmillä, seuraten Roche[®]:n ”NimbleGen ...” –ohjetta. Tämän jälkeen kaikista näytteistä tehtiin toinen PCR –monistus Roche[®]:n ohjeiden mukaisesti, Q5[®] entsyymille muokatut työohjeet liitteessä 4. Näytteitä ei monistamista varten irroitettu helmiltä, vaan koko helmi/DNA kompleksi toimi monistuksessa templaattina. Ylimääräiset helmet ja epäpuhtaudet puhdistettiin monistuksen jälkeen Qiagen[®]:n kolumneilla. Puhdistetut näytteet lähetettiin tämän jälkeen analysoitavaksi BioAnalyzer™:lle (kuva 6), ja pitoisuudet tarkistettiin vielä itse tekemällä näytteistä qPCR:t. Koska näytteissä ilmeni jonkin asteista epäpuhtautta puhdistettiin näytteet vielä kahteen kertaan Ampure XP –helmillä, joilla päästiin ylimääräisistä alukkeista geelikuvantamisen mukaan tehokkaasti eroon, samalla konsentroiden näytteitä.

Opinnäytetyön aikana FastStart[®] reaktiopakkaus loppui kesken, joten protokollaa ei alkuperäisillä ohjeilla päästy tekemään tähän saakka kuin kerran. Tästä johtuen tulokset eivät olleet kovinkaan edustavat kuten kuvasta 5 voi päätellä. Koska muutakaan mahdollisuutta ei projektia työstettäessä ollut, lähdettiin näitä näytteitä pienistä pitoisuuksistaan huolimatta jatkamaan emulsiorikastukseen ja edelleen sekvensointiin.

Assay Class: High Sensitivity DNA Assay
 Data Path: C:\...gh Sensitivity DNA Assay_DE13701091_2014-03-18_15-53-55.xad

Created: 18.3.2014 15:53:55
 Modified: 18.3.2014 16:29:57

Electrophoresis File Run Summary



Instrument Information:

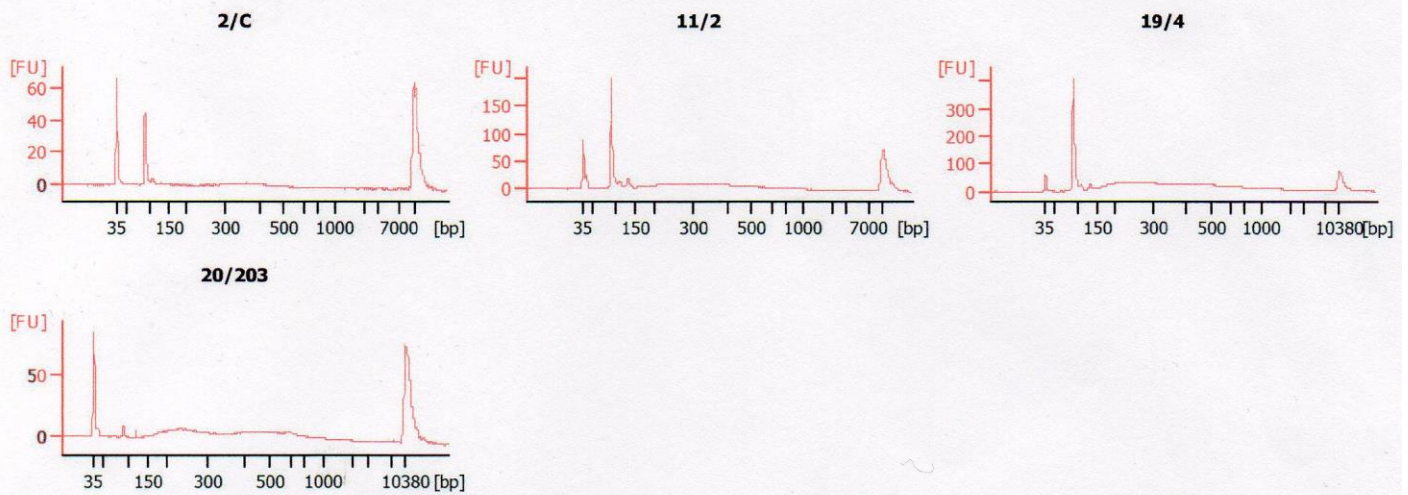
Instrument Name: DE13701065 Firmware: C.01.069
 Serial#: DE13701091 Type: G2938B

Assay Information:

Assay Origin Path: C:\Program Files (x86)\Agilent\2100 bioanalyzer\2100 expert\assays\dsDNA\High Sensitivity DNA.xsy
 Assay Class: High Sensitivity DNA Assay
 Version: 1.03
 Assay Comments: Copyright © 2003-2010 Agilent Technologies

Chip Information:

Chip Lot #:
 Reagent Kit Lot #:
 Chip Comments:



5.4.4 Emulsiorikastaminen

Emulsiorikastaminen tapahtui Roche[®]:n ”emPCR Rapid Library Preparation Lib-L” –ohjeen mukaisesti, työohjeet liitteessä 6. Emulsiorikastamisen tarkoituksena on kiinnittää edellisessä vaiheessa monistettu DNA sekvensointia varten Roche[®]:n helmiin. Kiinnittäminen tapahtuu helmiin kiinnitettyjen alukkeiden kiinnittämällä näytteisiin ligatoiduilla MID –alukkeilla. Tämä vaatii toimiakseen näytteiden ja helmien emulsoimisen Roche[®]:n kaupalliseen öljysuspensioon, johon lisätään PCR –reagensseja ja alukkeita. Tämän jälkeen suspensiolla tehdään PCR –monistus, jonka aikana sekvensoitavaa materiaalia monistetaan, ja varsinainen kiinnittyminen helmille tapahtuu.

Monistuksen jälkeen emulsio ja sen sisältämä DNA puhdistettiin ja aloitettiin rikastaminen. Opinnäytetyön aikana puhdistus ja rikastamisvaihetta testattiin kahdella tavalla: manuaalisesti sekä pipetointirobotin avulla (Biomek 4000[™]). Näiden kahden välillä ei huomattu merkittävää eroa, joskin ensimmäinen yritys, pipetointirobotilla tehty, epäonnistui väärinarvioidun näytemäärän vuoksi. Jälkimmäinen, manuaalinen, puhdistus ja rikastus onnistui paremmin.

Puhdistus tapahtuu helmille kiinnitetyn DNA:n huuhtelemisella alkoholiliuoksilla (etanoli ja isopropanoli), jolloin myös emulsioPCR:n öljyt poistetaan näytteistä. Tämän jälkeen DNA:ta rikastetaan poistamalla epäspesifisti sitoutuneet DNA pätkät ja helmet joihin ei ole sitoutunut lainkaan DNA:ta. Tämä tapahtuu kiinnittämällä sekvensointihelmiin sitoutunut DNA toisiin, Roche[®]:n valmistamiin paramagneettisiin helmiin, joiden toiminta muistuttaa aiemmin kuvattujen Ampure XP –helmien toimintaa. Tässä vaiheessa näyte –DNA on sidottu siis kaksiin helmiin. Nämä paramagneettiset helmet kerätään magneetin avulla, jolloin suurin osa sitoutumattomasta DNA:sta ja DNA:ta sisältämättömistä helmistä voidaan poistaa supernatantin mukana. Tämän jälkeen helmet resuspensoidaan alkoholiin (alkoholit eivät eluoi DNA:ta irti paramagneettisilta helmiltä), ja asetetaan uudelleen magneetille helmien keräämiseksi. Näitä pesuja toistetaan niin kauan, ettei supernatanttiin enää irtoa sekvensointihelmiä. Tämän jälkeen ylimääräinen alkoholi kuivataan pois helmiltä, ja näyte –DNA ja siihen kiinnittyneet sekvensointihelmet irrotetaan paramagneettisilta helmiltä veteen eluoimalla. Valmis emulsiorikastettu tuote sisältää täten vain sekvensointihelmiä, joihin on kiinnittynyt MID –alukkeita sisältävää DNA:ta.

Emulsiorikastamisessa emme poikenneet Roche[®]:n valmiista protokollasta, eikä tähän vaiheeseen kiinnitetty erityishuomiota optimoinninkaan aikana, sillä varsinaiseen kapturoidintimenetelmään emulsiorikastaminen ei kuulu. Lisäksi tämä on yksi protokollan kalteimmista vaiheista, ja protokollan muuttaminen vaikuttaa olennaisesti sekvensointituloksiin. Voidaankin vetää siis johtopäätös, ettei tämän vaiheen muokkaaminen ole hyvä idea. Emulsiorikastamista koitettiin opinnäytetyön aikana kaksi kertaa, ensimmäisen epäonnistuttua liiallisen lopputuotteen vuoksi (Roche[®]:n ohjeiden mukaan tämä johtuu emulsiovalmisteluiden epäonnistumisesta).

5.4.5 Sekvensointi

Itse sekvensointi on täysin automatisoitu, mutta ennen sekvensointia sekvensointihelmit ja niihin sitoutunut näyte –DNA siirretään Roche[®]:n PicoTiterPlate[™]:lle, joka toimii kuvausalustana. Tämä PTP –levy sisältää yli 300 000 kuoppaa, joihin sekvensointihelmit upotetaan sentrifugoimalla. Sekvensointihelmien lisäksi kuoppiin upotetaan entsyymeitä ja kiinnittymistä helpottavia aineita sisältäviä helmiä. Tämä PTP –levy laitetaan valmistelujen jälkeen Roche[®] GS Junior[™]:lle sekvensointireagensseja sisältävän kasetin kanssa. Sekvensoinnin ja myös Roche[®] GS Junior[™]:n periaate on kuvattu kappaleessa 3.1.

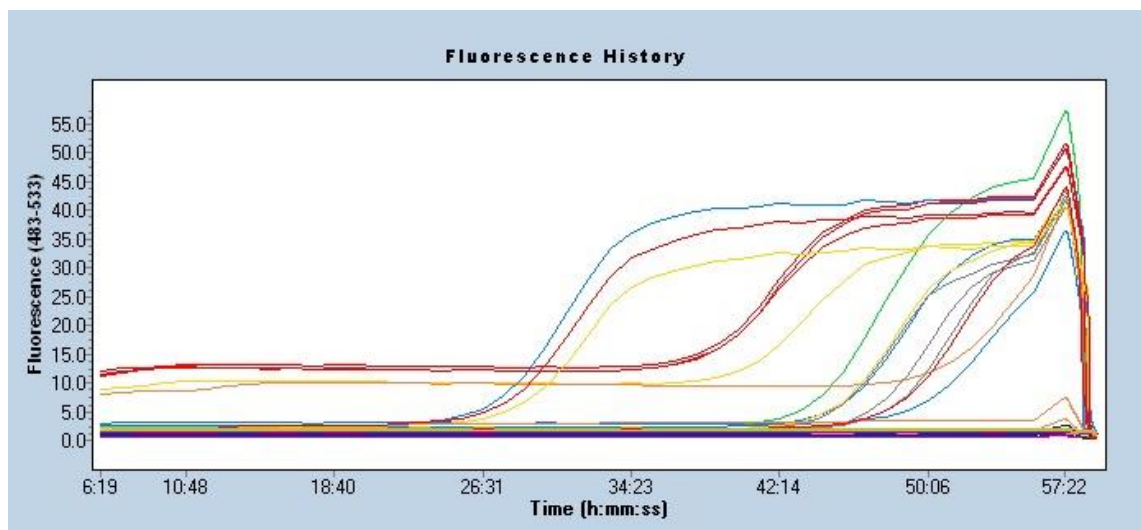
Opinnäytetyön aikana sekvensoitiin käytettävien materiaalien loppumisen ja kustannusten vuoksi vain yksi näytepooli. Sekvensointivalmistelut ja sekvensointi tapahtuivat Roche[®]:n ”Sequencing Method Manual” –ohjeen mukaisesti. Sekvensoinnin tuloksia on kuvattu seuraavassa kappaleessa

6 Tulokset

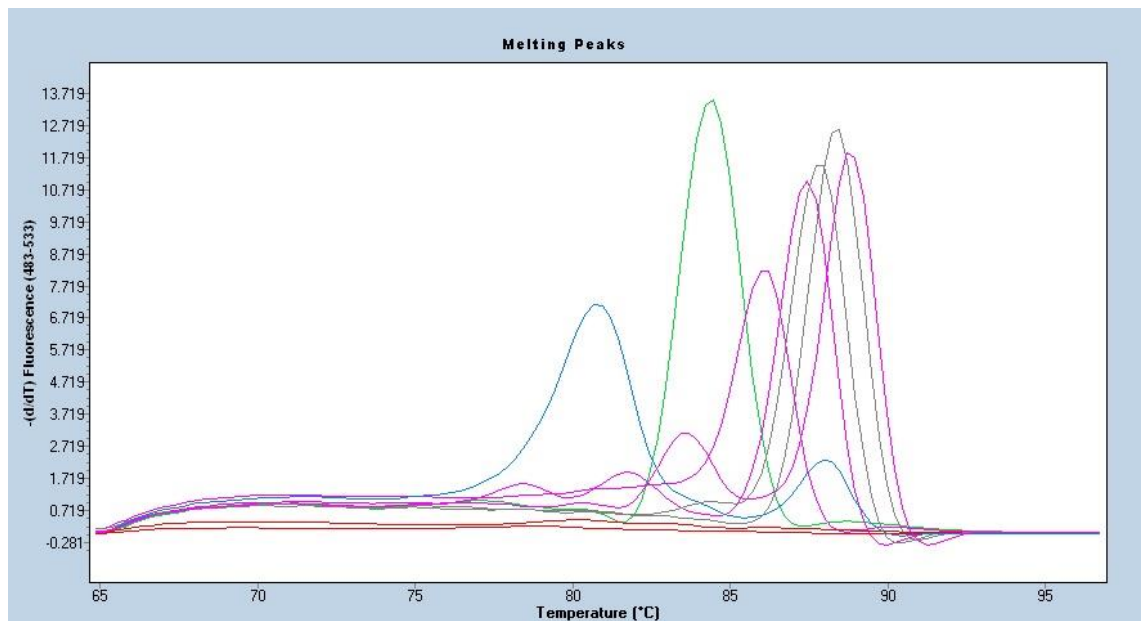
Opinnäytetyön näytteiden sekvensointi ei onnistunut halutusti, 300 000 kaivosta vain noin 0,05% antoi MID –alukkeellisen sekvenssin. Tähän saattoi kuitenkin olla myös opinnäytetyöstä riippumattomia tekijöitä, sillä tutkimusryhmän muut tuohon aikaan tehdyt sekvensoinnit epäonnistuivat kaikki. Tästä johtuen opinnäytetyössä jouduttiin tyytymään qPCR:n tarjoamiin tuloksiin.

Kuvassa 7 jokaisesta näytteestä on tehty qPCR reaktio alkuperäisillä näytteillä, ensimmäisen monistuksen jälkeisillä näytteillä ja toisen monistuksen jälkeisillä näytteillä

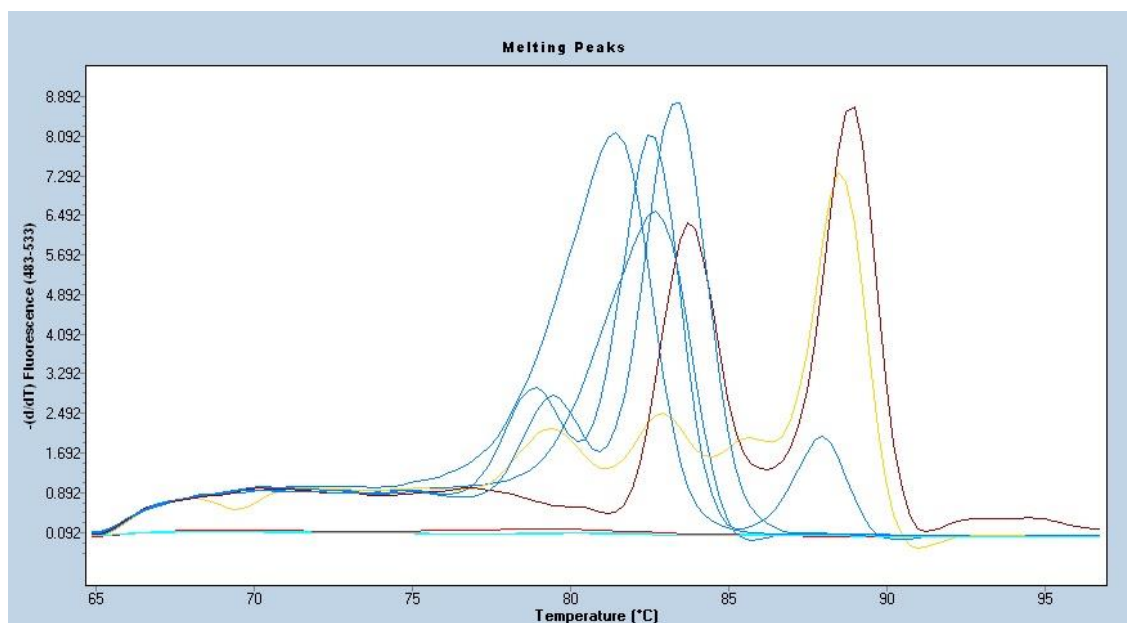
(kapturoinnin jälkeen). Näytteiden testaamisessa käytettiin kahta KIT –alukeparia, kahta MCC –alukeparia ja SEDT2 alukeparia, joka toimi negatiivisena kontrollina rikastuksen suhteen. Saman näytteen eri vaiheen versiot on merkitty kuvassa 7. samalla värillä, minkä lisäksi jokaisesta näytteestä on erikseen tarkemmat kuvat liitteessä 7. qPCR:ssä havaittiin monistumisen noudattavan kronologisesti käänteistä järjestystä protokollan etenemiseen verrattuna. Suomeksi, alkuperäiset näytteet alkoivat monistumaan viimeisenä ja protokollan viimeiset (ennen emulsiorikastusta) näytteet alkoivat monistumaan ensimmäisenä. Sulamiskäyristä (kuvat 7 ja 8) puolestaan huomataan, että kyseessä on todellakin DNA:ta, ja joitakin poikkeuksia lukuun ottamatta puhdasta DNA:ta, joka esiintyy vain yhtenä piikkinä sulamiskäyrässä.



Kuva 9. qPCR tulokset.



Kuva 10. GIST, sulamiskäyrä



Kuva 11. MCPyV sulamiskäyrä

Tämä tarkoittaa sitä, että protokollan avulla on onnistuttu monistamaan haluttuja eksoneita. BioAnalyzer[™]:n tuloksien osoittaessa näytemäärän vähentyneen koko ajan protokollan edetessä, tarkoittaa tämä monistuminen myös suoraan näytteen rikastumista haluttujen eksoneiden suhteen. Opinnäytetyön tavoitteeksi asetettu menetelmän pysyttäminen voidaan todeta näin täytyneeksi, joskin pienellä varauksella, sillä eristyksen puhtautta ei pystytä täysin todistamaan ilman kunnollisia sekvensointituloksia.

6.1 Kustannustehokkuus

Invitrogen[®]:n mukaan yhdellä pakkauksella biotinyloitua dCTP:tä voi leimata jopa 50 µg DNA:ta täydellisesti. Kun protokollaan käytetään noin 200 ng koettimia, voi yhdellä pakkauksella valmistaa koettimia jopa 250 protokollaa varten. Verrattaessa Roche[®]:n kaupallisiin koettimiin, joita riittää 48 protokollaan, voidaan todeta itse valmistettaessa koettimia riittävän jopa 5 kertaa kauemmin kuin kaupallisia koettimia käytettäessä.

Kaupalliset Roche[®]:n koettimet maksavat 9600€/48 reaktiota, eli 200€/reaktio. Itse valmistettaessa koettimien hintaan sisältyvät PCR –reaktiossa käytettävät entsyymit, nukleotidit, biotinyloitu dCTP ja käytettävät alukkeet. Entsyymit, nukleotidit ja käytettävät puskurit maksavat yhdessä noin 100€ ja biotinyloitu dCTP 178€. Tämän lisäksi yksi alukepari maksaa 20€, jolloin esim. KIT –eksoneita tutkittaessa alukkeille tulee hintaa

100€/5 alukeparia. Näin ollen esimerkiksi KIT mutaatioita sekvensoitaessa hintaa tulee 378€/50 reaktiota, eli 7,56€/reaktio. Koska yhteen reaktioon voidaan käyttää jopa 12 näytettä (6-8 kuitenkin suositeltu), voi yhdelle hybridisaatiolle hintaa tulla vain 0,63€ itse valmistetuilla koettimilla ja 16,7€/näyte kaupallisilla koettimilla. Tulee kuitenkin huomioida, että nyt lasketut hinnat ovat vain hybridisaatiossa käytettävien koettimien hintoja. Loppuun ajatun protokollan hinta on tästä huomattavasti korkeampi, mutta loppupuolen kustannukset ovat opinnäytetyöstä riippumattomat, eli näiden vertailussa ei ole varsinaista hyötyä.

Koska ainoa varsinainen ero protokollien välillä on nämä itse valmistetut koettimet, voidaan näitä kustannuksia arvioitaessa sanoa varmasti itse valmistettujen koettimien olevan huomattavasti edullisempi ratkaisu kaupallisiin verrattuna. Lisäksi projektin aikana tehty entsyymin vaihto ja sen optimointi pudottaa reagenssien hinnat 650 eurosta 80 euroon per 500 reaktiota. Tulee myös huomioida, ettei kaupallinen koetin pysty valikoimaan haluttuja alueita toisin kuin itse valmistettu koetin. Näin ollen (ainakin teorias- sa) itse valmistettu koetin on huomattavasti tarkempi ja halvempi kuin kaupallisesti saatavilla olevat koettimet.

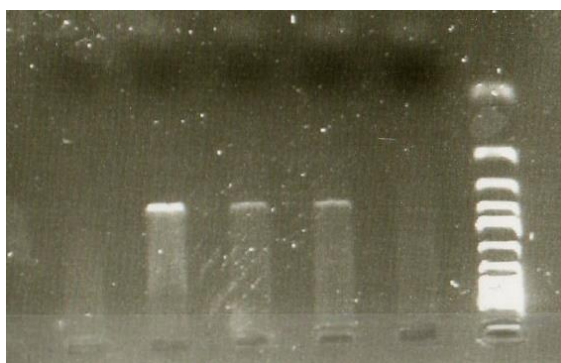
6.2 Protokollan optimointi

Koska Roche[®]:n FastStart[®] entsyymi loppui projektin aikana, päätettiin protokollaa optimoida tulevaisuutta varten. Optimointi oli kaksivaiheinen, ensin muunnettiin protokolla Q5[®] entsyymille sopivaksi ja tämän jälkeen protokolla tehtiin emulsiorikastamiseen saakka, ja tuloksia verrattiin aikaisempiin tuloksiin. Optimoinnin tavoitteena oli päästä eroon kahden erillisen entsyymin käytöstä kapturointiprotokollassa, ja säästää kustannuksissa. Roche[®]:n entsyymin maksaessa puskureineen noin 650 euroa ja Q5[®] entsyymin maksaessa 80 euroa (hinnat 500 reaktion pakkauksille) on kustannuksissa pitkällä aikavälillä huomattavat erot.

6.2.1 Q5[®] entsyymin optimointi

Ensimmäiseksi protokollan monistusvaiheita testattiin suoraan vaihtamalla vain reaktiossa käytettävä entsyymi ja entsyymin reaktiopuskurit. Kun tämä ei toiminut, eikä varsinaista reaktiotuotetta saatu geelikuvantamisella näkyviin, testattiin monistamista Q5[®] entsyymin perusprotokollalla käyttäen tavallisten alukkeiden tilalla Roche[®]:n 454 –rapid A ja B alukkeita. Lisäksi samalla testattiin sopivaa alukkeiden kiinnittymislämpötilaa ns. gradient –PCR:n avulla (monistuksen kiinnittymisvaiheessa lämpötila vaihtelee eri osissa lämpölevyä). Geelikuvantamisella huomattiin monistuksen toimineen lähes erin-

omaisesti, optimaalisen kiinnittymislämpötilan ollessa 60-62°C (kuva 10).



Kuva 12. Q5[®] Optimointi. 64-56°C

Q5[®] entsyymin optimoinnin onnistuminen oli erinomainen tulos opinnäytetyön osalta, sekä erittäin hyvä myös työryhmälle, sillä käyttämällä Q5[®] entsyymiä protokollassa työryhmä pystyy siirtymään pois kahden entsyymin käyttämisestä. Lisäksi

tutkimusryhmän omissa selvityksissä Q5[®] entsyymi on todettu FastStart[®] Taq:a tarkemmaksi ja halvemmaksi entsyymiksi.

6.2.2 Optimoidun protokollan testaaminen

Kuten mainittu opinnäytetyön protokollaa työstettiin Q5[®] entsyymille muokatulla protokollalla aina emulsiorikastukseen saakka, eli varsinainen opinnäytetyöosuus tehtiin kerran kokonaisuudessaan Q5[®] entsyymillä. Näyttemateriaalina käytettiin kahta alkuperäisissä töissä käytettyä näytettä, MCC 2 ja GIST C. Alkuperäisissä testeissä nämä näytteet yhdistettiin keskenään, mutta kokeilumielessä nämä pidettiin erillään Q5[®] testeissä.

Protokolla ajettiin loppuun saakka onnistuneesti, ja toisin kuin alkuperäisissä testeissä, lopputuotteiden pitoisuudet olivat mitattavissa ja täysin havaittavissa geelikuvantamisen avulla. Pitoisuudet NanoDrop[™] -laitteistolla mitattuna olivat kolminkertaiset alkuperäiseen protokollaan verrattuna, ja qPCR:n mukaan näyttemateriaali sisälsi yhtälailla rikastettua KIT ja MCPyV geenialuetta kuin alkuperäinen protokolla. Täten voidaan sanoa optimoinnin onnistuneen erittäin hyvin opinnäytetyön osana. Tietysti optimointia voi ja tulee edelleen jatkaa, sillä opinnäytetyön aikana tehty optimointi oli vain pieni osa koko protokollasta ja siihen vaadittavasta optimoinnista.

7 Pohdinta

Projektiin kului 9 viikkoa, joka on huomattavasti enemmän kuin opinnäytetyölle asetettu 3 viikon aikaraja. Tämä ei kuitenkaan vaikuttanut itse työskentelyyn. Opinnäytetyön rajaaminen pienemmäksi olisi varmasti pienentänyt opinnäytetyöhön tarvittun työn määrää, mutta toisaalta tällöin opinnäytetyöstä ei olisi tullut yhtä kattava. Opinnäytetyön kuuluu myös olla vaatimustasoltaan suhteutettu opiskelijan omiin kykyihin sekä ammatikorkeakoulun vaatimuksiin, joten opinnäytetyö tällaisena kokonaisuutena oli tällä kertaa toimivin ratkaisu.

7.1 Protokollan ja tulosten tarkastelu

Itse valmistettujen koettimien valmistaminen oli projektin tärkein osuus. Näiden koettimien valmistaminen onnistui opinnäytetyön aikana halutusti, mutta laaduntarkkailussa esiintyi ongelmia. Opinnäytetyössä koettimet valmistettiin ns. satunnaissitoutumisen perusteella, jolloin biotinyloitu dCTP kilpailee tavallisen dCTP:n kanssa sitoutumispaikoista. Laadullisesti parempia koettimia voi varmasti valmistaa esim. käyttämällä pel-

kästäään biotinyloitua dCTP:tä ja tavallisia muita nukleotidejä (dATP, dGTP ja dTTP), jolloin jokainen sitoutunut dCTP on biotinyloitu. Tällöin jokainen onnistunut reaktio on varmasti biotinyloitu ja toimiva, mutta protokolla kuluttaa huomattavasti enemmän biotinyloitua dCTP:tä. Lisäksi, täysin biotinyloidun DNA –juosteen ja osittain biotinyloidun DNA –juosteen sitoutumisessa ei ole tutkimuskäytössä todennäköisesti merkittävää eroa, mikäli näyte on hyvälaatuista ja koettimien valmistaminen on onnistunut oikein.

Opinnäytetyön protokolla onnistuttiin ajamaan 2 kertaa emulsiorikastamiseen asti (kerran FastStart[®] entsyymillä ja kerran Q5[®] entsyymillä), johon voi ajatella opinnäytetyön osuuden päättyvän. Valitettavasti sekvensointiin saakka päätyi vain ensimmäisen yrityksen näytteitä, jotka eivät olleet kovinkaan edustavia ja sekvensointitulos oli sen mukainen. Sekvensoinnin epäonnistuminen oli opinnäytetyön suurin menetys. Kapturoitujen näytteiden sekvenssejä tutkimalla olisi saatu täysi varmuus protokollan toimivuudelle. Koska tässä ei kuitenkaan erinäisistä syistä onnistuttu, on opinnäytetyön osalta tyydyttävä qPCR:n ja BioAnalyzer[™]:n tuloksiin. Nämä puolestaan puhuvat protokollan puolesta. Opinnäytetyössä valmistunut protokolla vaatii kuitenkin yhä lähempää tarkastelua ja toistoja sen toimivuuden varmistamiseksi. Protokollan työohjeet antavat kuitenkin hyvän pohjan ja valmiudet menetelmän työstämiseen ja testaamiseen.

Kokonaisuutena opinnäytetyö on kuitenkin onnistunut. Vaikkei opinnäytetyöstä saatuakaan täysin haluttuja tuloksia, saatiin menetelmän toimivuus osoitettua ja vieläpä osittain optimoitua toiselle entsyymille. Lisäksi kappaleessa 6.1 esitelty suppea kustannuslaskelma osoittaa opinnäytetyönä valmistuneen protokollan olevan huomattavasti halvempi kuin kaupallinen protokolla. Kun vielä lisätään yhtälöön itse valmistettujen koettimien kyky valikoida vain halutut geenialueet sekvensoitavaksi, on valmistunut protokolla kaupallista versiota myös huomattavasti tehokkaampi. Näin ollen kappaleessa 4 esitellyt opinnäytetyön primääriset tavoitteet saavutettiin.

7.2 Tulevaisuus

Opinnäytetyönä valmistunut protokolla ei ole vielä täysin käyttövalmis sekvensointilosten puuttuessa. Näin ollen on oletettavaa, että opinnäytetyön protokollaa seuraten tullaan työstämään testinäytteitä ja mikäli näistä saadut sekvensointitulokset ovat halutut, otetaan protokolla käyttöön tutkimusryhmässä.

Opinnäytetyön pohjalta ei tulla kirjoittamaan opinnäytetyön raportin lisäksi muita virallisia artikkeleita. Opinnäytetyö tullaan julkaisemaan 24.04.2014 Metropolian Vanhan Viertotien toimipisteessä osana perimän tutkimusten opetusta. Julkaisu tulee kohdentumaan pyrosekvensointiin ja käytännön työskentelyyn genetiikan laboratoriossa. Mikäli työn tilaaja niin haluaa, tullaan opinnäytetyö julkaisemaan myös tutkimusryhmän sisäisessä palaverissa toistaiseksi määrittelemättömänä ajankohtana.

Lähteet

Ahmadian, Afshin – Ehn, Maria – Hober, Sophia 2006. Pyrosequencing: History, biochemistry and future. *Clinica Chimica Acta*. Vol. 363, 83-94.

Beckman Coulter 2012. Agencourt AMPure XP – PCR Purification. Verkkodokumentti. <<https://www.beckmancoulter.com/wsrportal/wsr/research-and-discovery/products-and-services/nucleic-acid-sample-preparation/agencourt-ampure-xp-pcr-purification/index.htm>>. Luettu 07.04.2014.

Corless, Cristopher. – Fletcher, Jonathan. – Heinrich, Michael. 2004. Biology of gastrointestinal stromal tumors. *Journal of Clinical Oncology*. Vol. 22, 3813-3825.

Duncavage, Eric. ym. 2011. Hybrid capture and next-generation sequencing identify viral integration sites from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *Journal of Molecular Diagnostics*. Vol. 13, 325-333.

Joensuu, Heikki 2012. Adjuvant treatment of GIST: patient selection and treatment strategies. *Nature Reviews Clinical Oncology*. Vol. 9, 351-358.

Joensuu, Heikki – Hohenberger, Peter – Corless, Cristopher 2013. Gastrointestinal stromal tumour. *Lancet*. Vol. 382, 973-983.

Life Technologies Corp. 2013. Dynabeads® M-270 Streptavidin. Verkkodokumentti. <<http://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/65305#>>. Luettu 13.12.2013.

Life Technologies Corp. 2014. Real-Time Polymerase Chain Reaction. Opetusvideo. <<http://media.invitrogen.com.edgesuite.net/ab/applications-technologies/real-time-pcr/real-time-polymerase-chain-reaction/index.html>>. Katsottu 04.04.2013.

Mazur, M. – Clark, H. 1983. Gastric stromal tumors. Reappraisal of histogenesis. *The American Journal of Surgical Pathology*. Vol. 7, 507-519.

Metz, Claudia. – Scheulen, Max. – Bornfeld, Norbert. – Lohmann, Dietmar. – Zesch-nigk, Michael. 2013. Ultradeep sequencing detects GNAQ and GNA11 mutations in cell-free DNA from plasma of patients with uveal melanoma. *Cancer Medicine*. Vol. 2, 208-215.

Miettinen, Markku. Lasota, Jerzy. 2003. Gastrointestinal Stromal Tumors (GISTs): Definition, Occurrence, Pathology, Differential Diagnosis and Molecular Genetics. *Polish Journal of Pathology*. Vol. 54, 3-24.

New England BioLabs 2014. DNA Amplification & PCR, application overview. Verkkodokumentti. <<https://www.neb.com/applications/dna-amplification-and-pcr>> Luettu 2.4.2014.

Nyrén, Pål ym. 1996. Real-Time DNA Sequencing Using Detection of Pyrophosphate Release. *Analytical Biochemistry* 1996. Vol. 242, 84-89.

Nyrén, Pål 2007. The History of Pyrosequencing. *Methods in Molecular Biology* 2007. Vol. 373, 1-13.

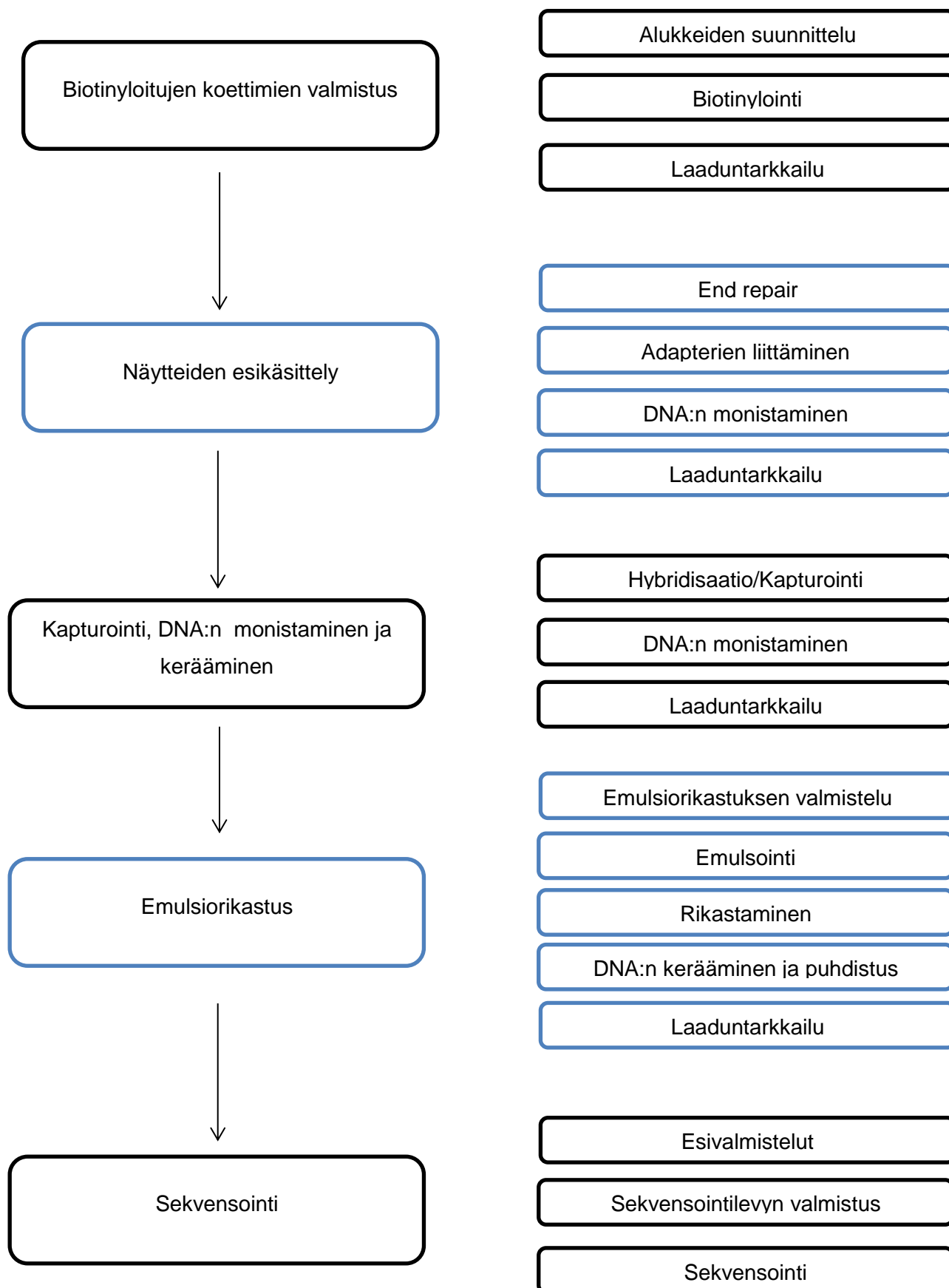
Rink, Lori ym. 2009. Gene Expression Signatures and Response to Imatinib Mesylate in Gastrointestinal Stromal Tumors. *Molecular Cancer Therapeutics* 2009.

Roche Diagnostics Corp. 2011. GS Junior System. <<http://454.com/products/gs-junior-system/index.asp>>. Verkkodokumentti. Luettu 07.11.2013.

Syöpäinfo 2010. GIST (gastrointestinaalinen stroomatumori). Verkkootikkeli. <<http://www.syopainfo.fi/eri-syopamuodot/harvinaisia-syopia/gist.html>>. Luettu 13.12.2013.

Qiagen 2008. QIAquick Spin Handbook. Käyttöohje/verkojulkaisu. <<http://www.qiagen.com/knowledge-and-support/resource-center/resource-download.aspx?id=05356d52-ff29-4ac2-be49-48cba2381cfa&lang=en>>. Luettu 04.04.2014

Projektin kulku



Biotinyloitujen koettimien valmistus

1. Alukkeiden suunnittelu

Alukkeiden suunnitteluun käytettiin primer3 -ohjelmaa, joka on vapaasti saatavilla ja käytettävissä. Alukkeiden suunnittelussa tulee huomioida halutun tuotteen pituus (bp), sulamislämpötila (GC rikkaus) ja tuotteiden päällekkäisyys, jotta kapturointi kattaa koko halutun alueen.

2. Biotinylointi

Biotinylointi tapahtuu edellisessä kohdassa suunniteltujen alukkeiden monistamisella biotinyloidun dCTP:n läsnäollessa. Monistamiseen kannattaa käyttää oikolukevaa ja hyväksi todettua entsyymiä (DNA polymeraasia), kuten esimerkiksi Q5[®] Hot Start DNA Polymerase.

Q5[®] PCR resepti

| | |
|----------|-------------------------------|
| 5 µL | Q5 [®] Enzyme Buffer |
| 15,75 µL | PCR Grade Water |
| 1 µL | Forward Primer |
| 1 µL | Reverse Primer |
| 0,5 µL | dNTP |
| 0,5 µL | Biotin-dCTP |
| 1 µL | Template DNA |
| 0,25 µL | Q5 [®] Enzyme |

Total volume: 25 µL

PCR ohjelma

| | |
|---------------------------|--------------------|
| 98°C, 35 s | First denaturation |
| 98°C, 10 s | Denaturation |
| 60°C, 15 s | Annealing |
| 72°C, 20 s | Extension |
| Loop from step 2 34 times | |
| 72°C, 2 min | Final extension |
| 4°C | End |

Store at -20°C

3. Laaduntarkkailu

Laaduntarkkailussa kannattaa käyttää geelielektroforeesia spesifin monistamisen tarkistamiseksi. Monistuksessa tulee syntyä vain yhden kokoista tuotetta. Monistustuotteita voi tarvittaessa puhdistaa esim. geeliltä eristämällä.

Näytteiden esikäsittely

1. End repair

End repair ohjelma löytyy Taija –kansioista nimellä ENDREPR.

End repair resepti

| | |
|--------|----------------|
| 2,5 µL | RL 10x Buffer |
| 2,5 µL | RL ATP |
| 1 µL | RL dNTP |
| 1 µL | RL T4 Enzyme |
| 1 µL | RL PNK |
| 1 µL | Taq Polymerase |

Add 500ng template DNA in 16 µL
H₂O

Total 25 µL

End repair ohjelma

| | |
|------|---------|
| 25°C | 20 min |
| 72°C | 20 min |
| 4°C | Forever |

2. Adapterien liittäminen

MID –adapterien liittäminen

| | |
|------|---------------|
| 1 µL | RL MID Primer |
| 1 µL | RL Ligase |

Incubate 10 min at 25°C

Adapterien liittämisen jälkeen näytteet kannattaa puhdistaa ylimääräisistä alukkeista, entsyymeistä, suoloista ja proteiineista. Roche:n protokolla suosittelee tässä kohtaa Ampure –puhdistusta.

3. DNA:n monistaminen

DNA:n monistaminen LM-PCR protokollan mukaan Q5[®] entsyymillä. Protokolla testattiin toimivaksi myös Roche[®]:n alkuperäisten ohjeiden mukaan FastStart[®] –entsyymillä, tarkista Roche[®]:n NimbleGen SaqCap EZ Library User's Guide –ohje ko. protokollalle.

LM-PCR resepti

| | |
|-------|----------------------------|
| 20 µL | Q5 [®] Buffer |
| 29 µL | PCR Grade H ₂ O |
| 2 µL | dNTP |
| 4 µL | 454 Rapid-A-Oligo |
| 4 µL | 454 Rapid-B-Oligo |
| 1 µL | Q5 [®] Enzyme |
| 40 µL | Template DNA |

Total 100 µL

LM-PCR ohjelma

| | |
|------------------------------|--------------------|
| 98°C, 35 s | First denaturation |
| 98°C, 10 s | Denaturation |
| 60°C, 15 s | Annealing |
| 72°C, 20 s | Extension |
| Loop from step 2 17-24 times | |
| 72°C, 2 min | Final extension |
| 4°C | End |

Store at -20°C

Alkuperäisen ohjeistuksen mukaan lopputuotetta tulee olla 100 µL. Omissa testeissä havaittiin kuitenkin jopa 25 µL riittävän. Tämä vaihe vaatii vielä hieman optimointia. Monistuksen jälkeen näyte kannattaa puhdistaa ylimääräisistä entsyymeistä ja alukkeista hybridisaatiota varten. Roche[®] suosittelee Qiagen[®]:in kolumneja tähän puhdistukseen.

4. Laaduntarkkailu

Laaduntarkkailuun kannattaa tässä vaiheessa käyttää geelielektroforeesia ja pitoisuusmittausta esim. NanoDrop[®] -laitteistolla PCR:n toimivuuden varmistamiseksi, sekä ylimääräisten alukkeiden ja proteiinien poistumisen varmistamiseksi.

Kapturointi, DNA:n monistaminen ja kerääminen

1. Hybridisaatio/Kapturointi

Hybridisaatiossa aiemmin valmistetut koettimet ja esivalmisteltu DNA kiinnitetään toisiinsa, jolloin haluttujen DNA pätkien kerääminen on mahdollista koettimien biotiinin kiinnittymisellä streptavidin päällystettyihin helmiin.

Hybridisaatio

1. Laita 1,5 mL eppendorfiin 5 μ L 1mg/mL COT-1-Human-DNA:ta
2. Lisää 1 μ g templaatti-DNA:ta
3. Lisää 1 μ L näytteen MID-alukkeiden mukaisia Rapid-HE-Oligoja, sekä reverse että forward.
4. Kuivaa näyte +60°C vakuumifuugilla (eppendorfin korkki auki!)
5. Lisää kuivatulle näytteelle 7,5 μ L Hybridization Buffer:a ja 3 μ L Hybridization Component A:ta
6. Lisää näytteelle aikaisemmin valmistettua koetinta (tai koetinpoolia) 200 ng. (Koetinpoolin sopiva pitoisuus esim 20ng/ μ L)
7. Vorteksoi huolellisesti (10 s maksiminopeus) ja sentrifugoi pöytäfuugilla 10 s.
8. Siirrä näyte 0,2 mL eppendorfiin tai 96 -kuoppalevylle ja sentrifugoi lyhyesti.
9. Denaturoi näyte thermocyclerillä +95°C, 10 min.
10. Sentrifugoi lyhyesti
11. Inkuboi näytettä +47°C, 48-72h.

HUOM! Roche:n protokollassa denaturaatio tapahtuu ennen koettimien lisäämistä. Tämä johtuu mahdollisesti siitä, että Roche:n kaupalliset koettimet ovat yksijuosteisia eivätkä vaadi denaturointia.

Hybridisaation jälkeen halutut DNA alueet voidaan kiinnittää streptavidin päällystettyihin helmiin. Kiinnittämisen jälkeen ylimääräinen DNA huuhdellaan pois, jolloin jäljelle jää vain haluttua DNA -aluetta.

Kapturointi, Vaihe 1.

1. Ota streptavidin helmet huoneenlämpöön 30 min ennen käyttöä
2. Sekoita helmet vorteksoimalla 1 min täydellä teholla
3. Lisää 1,5 mL eppendorfiin 100 μ L helmiä per kapturointi. Esim. 4 kapturoitavaa tuotetta = 400 μ L helmiä. Mikäli näytteistä on tehty aiemmin pooli, voi helmiä käyttää hyväksi kokemansa määrän, 100 μ L helmiä pystyy sitomaan noin 1 μ g DNA:ta.
4. Aseta putki Magnetic Particle Concentrator:lle (MPC) ja anna seistä ~5 min.
5. Poista supernatantti ja tämän jälkeen poista putki MPC:ltä.
6. Lisää 1x Bead Wash Bufferia 2 kertaa alkuperäinen helmien tilavuus (eli 100 μ L helmiä -> 200 μ L BWB:tä)
7. Vorteksoi tasaiseksi suspensioksi.
8. Aseta putki MPC:lle. Poista supernatantti kun neste kirkastunut.
9. Lisää alkuperäinen tilavuus 1x Bead Wash Bufferia ja vorteksoi tasaiseksi suspensioksi.
10. Jaa 100 μ L osiin puhtaisiin 1,5 mL eppendorfeihin
11. Aseta putki/putket MPC:lle. Poista supernatantti kun neste kirkastunut.
12. Lisää helmille hybridisoitu näyte.
13. Sekoita tasaiseksi pipetoimalla. Älä vorteksoi!
14. Laita putki/putket thermocycleriin +47°C, 45 min. Vorteksoi näytteitä 10-15 min välein helmien uudelleensuspensioimiseksi ja kiinnittymisen mahdollistamiseksi.
15. Esilämmitä inkubaation aikana 1x Wash Buffer I ja 1x Stringent Wash Buffer +47°C.

Kapturointi, Vaihe 2.

1. Lisää helmi/näyte sekoitukselle 100 µL 1x Wash Buffer I:tä
2. Vorteksoi ~10 s.
3. Siirrä näyte puhtaaseen 1,5 mL eppendorfiin.
4. Aseta putki MPC:lle. Poista supernatantti kun neste kirkastunut.
5. Ota putki pois MPC:ltä. Lisää 200 µL 1x Stringent Wash Buffer:ia.
6. Inkuboi näytettä +47°C, 5 min.
7. Toista kohdat 4-6
8. Aseta putki MPC:lle. Poista supernatantti kun neste kirkastunut.
9. Lisää 200 µL 1x Wash Buffer I:tä. Vorteksoi huolellisesti, 2 min täydellä teholla.
10. Aseta putki MPC:lle. Poista supernatantti kun neste kirkastunut.
11. Lisää 200 µL 1x Wash Buffer II:tä. Vorteksoi 1 min täydellä teholla.
12. Aseta putki MPC:lle. Poista supernatantti kun neste kirkastunut.
13. Lisää 200 µL 1x Wash Buffer III:tä. Vorteksoi 30 s täydellä teholla.
14. Aseta putki MPC:lle. Poista supernatantti kun neste kirkastunut.
15. Eluoi 50 µL PCR Grade H₂O. Näytteiden pitkäaikainen säilytys -20°C, alle viikon säilytys +4°C.

HUOM! Streptavidin helmiä ei tarvitse eikä kuulu poistaa kapturoinnin aikana. Helmet ja niihin sitoutunut DNA tulevat toimimaan templaattina seuraavassa monistusvaiheessa. Helmet eivät vaikuta PCR –reaktioon!

2. DNA:n monistaminen

Kapturoitua DNA:ta monistettaessa tulee huomioida että lähtömateriaalia on todella vähän. DNA:n sitoutuminen streptavidin helmiin ei pitäisi vaikuttaa PCR –reaktioon.

LM-PCR resepti

| | |
|-------|----------------------------|
| 40 µL | Q5 [®] Buffer |
| 98 µL | PCR Grade H ₂ O |
| 4 µL | dNTP |
| 8 µL | 454 Rapid-A-Oligo |
| 8 µL | 454 Rapid-B-Oligo |
| 2 µL | Q5 [®] Enzyme |
| 40 µL | Template DNA |

Total 200 µL

LM-PCR ohjelma

| | |
|------------------------------|--------------------|
| 98°C, 35 s | First denaturation |
| 98°C, 10 s | Denaturation |
| 60°C, 15 s | Annealing |
| 72°C, 20 s | Extension |
| Loop from step 2 17-24 times | |
| 72°C, 2 min | Final extension |
| 4°C | End |

Store at -20°C

HUOM! Jaa näyte 4 kuopalle 96 –kuoppalevyille, tai 4x 0,2 eppendorfiin. Jako ehkäisee helmien painautumista putken pohjalle, mikä puolestaan estää tehokkaan PCR:n toimintaa!

Alkuperäisen ohjeistuksen mukaan lopputuotetta tulee olla 200 µL. Omissa testeissä havaittiin kuitenkin jopa 50 µL riittävän. Tämä vaihe vaatii vielä hieman optimointia.

Monistuksen jälkeen näyte kannattaa puhdistaa ylimääräisistä entsyymeistä ja alukkeista hybridisaatiota varten. Roche[®] suosittelee Qiagen[®]:in kolumneja tähän puhdistukseen.

3. Laaduntarkkailu

Vaikka näytettä on monistettu hybridisaation jälkeen, on näytteen DNA pitoisuus silti oletusarvoltaan matala. Laaduntarkkailuun kannattaa käyttää sekä DNA:n jakautumista, pitoisuutta, että rikastumista mittaavia testejä. Jakaumaa ja pitoisuutta voi mitata esim. Bioanalyzer[®] -analysointilaitteella. Toisaalta myös geelielektroforeesin ja NanoDrop[®] -laitteiston avulla em. tulokset saadaan mitattua, joskaan ei yhtä tarkasti. Näytteiden rikastumista voidaan tutkia esim. SybrGreen, tai qPCR menetelmillä. Näytteiden pitoisuudet voivat olla todella alhaisia, joten rikastumista todentavat testit ovat huomattavasti tärkeämpiä tässä vaiheessa. Lisäksi näytteiden puhtaus tulee olla hyvä, ettei seuraavassa vaiheessa tapahtuvassa monistuksessa tule ylimääräistä, sekvensointia häiritsevää materiaalia, rikastettua.

Emulsiorikastus

1. Emulsiorikastuksen valmistelu

emPCR valmistelu, vaihe 1.

1. Sulata reagenssit huoneenlämmössä, poikkeuksena Enzyme Mix ja Ppiase, jotka tulee säilyttää -20°C .
2. Lämmitä Additive $+55^{\circ}\text{C}$, noin 5 min. Tämä helpottaa kiinteän aineen liuottamista.
3. Vorteksoi kaikki putket huolellisesti, mukaanlukien Enzyme Mix ja Ppiase. Sentrifugoi kaikki putket pöytäfuugilla lyhyesti. Palauta em. kaksikko tämän jälkeen -20°C .

HUOM! Mikäli Additive ei liukene täydellisesti lämmittämisestä ja voimakkaasta vorteksoinnista huolimatta, voi liukeamattoman aineksen sentrifugoida putken pohjalle ja käyttää supernatanttia.

emPCR valmistelu, vaihe 2.

1. Vorteksoi öljy huolellisesti ja kaada koko putken sisältö Turrax Stirring putkeen.
2. Valmista 1x Mock Mix: Lisää 5 mL eppendorfiin 430 μL Mock Mix:iä ja 1,72 mL PCR Grade H_2O .
3. Lisää 2 mL 1x Mock Mix:iä Turrax Stirring -putkeen.
4. Laita Turrax Stirring -putki UTTD -laitteeseen. Aseta UTTD -laitteeseen seuraavat asetukset: 4000 rpm, 5min. Käynnistä laite.

emPCR, emulsointi

1. Valmista Live Amp Mix:

| | |
|--------|----------------------------|
| 410 µL | PCR Grade H ₂ O |
| 515 µL | Additive |
| 270 µL | Amp Mix |
| 80 µL | Amp Primer |
| 70 µL | Enzyme Mix |
| 2 µL | Ppiase |

Total: 1347 µL

2. Lisää 5 mL eppendorfiin 4,5 mL PCR Grade H₂O ja 0,5 mL Wash Buffer
3. Vorteksoi Capture Bead –putki
4. Sentrifugoi Capture Bead –putki siten, että putken helmet kerääntyvät pohjalle. Sentrifugoi pöytäfuugilla putkea, käännä putki 180° ja sentrifugoi uudelleen, jotta saat pinnan tasaiseksi.
5. Poista supernatantti varovasti, älä häiritse pohjalle kerättyjä helmiä.
6. Pese helmet 2 kertaa 1x Wash Bufferilla. Poista välissä supernatantti edellä kuvailulla Spin-Rotate-Spin menetelmällä.
7. Denaturoi näytteenä käytettävä DNA +95°C, 2 min. Laske haluttu DNA määrä ja lisää se puhdistetuille helmille. Laskukaavat erillisellä excel –taulukolla.
8. Vorteksoi tasaiseksi suspensioksi.
9. Lisää 1,2 mL Live Amp Mix:ä helmille.
10. Vorteksoi tasaiseksi suspensioksi ja siirrä koko putken sisältö Turrax Stirring –putkeen.
11. Aseta UTDD –laitteeseen seuraavat asetukset: 2000 rpm, 5min. Käynnistä laite.
12. Kun sekoitus on päättynyt, poista Turrax Stirring –putki UTDD –laitteelta nopeasti, ettei putki ala vuotamaan.

emPCR, rikastaminen

1. Siirrä valmis emulsio 96 –kuoppalevyille, 100 µL/kuoppa noin 70 kuoppaa
2. Sulje kansi huolellisesti. Sentrifugoi lyhyesti.
3. Aseta kuoppalevy thermocyclerille, monistusohjelma:

| | |
|---------------------------|------------------|
| 94 °C, 4 min | First denaturing |
| 94 °C, 30 s | Denaturing |
| 58 °C, 4 min 30 s | Annealing |
| 68 °C, 30 s | Extension |
| Loop 49 times from step 2 | |
| 4-10 °C | End |

Loput emulsiorikastuksen vaiheet tapahtuvat pipetointirobotilla tämän ollessa käytössä. Pipetointirobotin käyttöohjeet löytyvät laitteen omasta kansiosta. Protokollien periaate manuaalisessa työskentelyssä ja pipetointirobotin käytössä on täysin sama.

Alukkeet ja koettimet

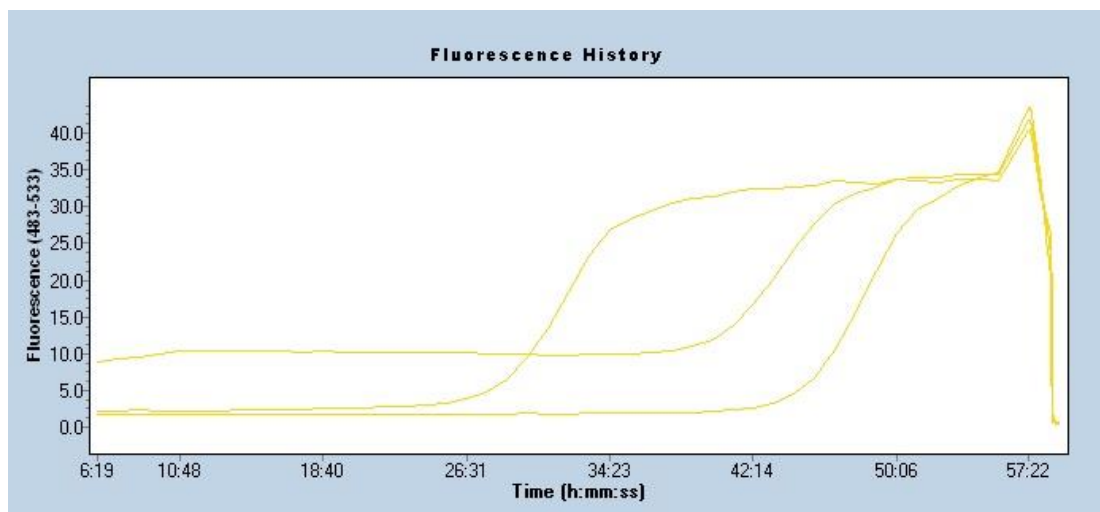
Taulukko 3. KIT ja MCPyV alukkeet.

| Oligon nimi | Emäsjärjestys 5´ - 3´ |
|-----------------------|---|
| KITex9_for2_M13 | GTAAAACGACGGCCAGTAGCCAGGGCTTTTGTCTTCT |
| KITex9_rev2_M13 | CAGGAAACAGCTATGACCAGAGCCTAAACATCCCCTTA |
| KITex11capture_1_for | CGTAATCGTAGCTGGCATGA |
| KITex11capture_1_rev | TTCTGGGAAACTCCCATTG |
| KITex11capture_2_for | TTTCCCTTTCTCCCCACA |
| KITex11capture_2_rev | AAACAAAGGAAGCCACTGGA |
| KITex13_for_M13 | GTAAAACGACGGCCAGTTACTGCATGCGCTTGACATC |
| KITex13_rev_M13 | CAGGAAACAGCTATGACCATGTTTTGATAACCTGACAGACA |
| KITex17_for_M13 | GTAAAACGACGGCCAGTTGGTTTTCTTTCTCCTCCAA |
| KITex17_rev_M13 | CAGGAAACAGCTATGACTCACAGGAAACAATTTTTATCGAA |
| MCPyV - Gen - for | GGGGCTCCTAGCCTCCGAGGCCT |
| MCVcons2rev | GGTGCAGATGCATGAAGCAG |
| MCV - SG - for | GCAAACCTCCTTCTGCATATAGAC |
| MCV-354-373_rev | TCCAAAGGGTGTTCAATTCC |
| MCV - 321 772 - for | CCCTGATAAAGGGGGAAATC |
| MCV-512-531_rev | CTTAAGCATGCACCCAGGAC |
| MCV-507-204_for | CAGAGGTCCTGGGTGCAT |
| MCV- 321 772- rev | GGAAGGAAGTAGGAGTCTAGAAAAGG |
| MCVcons3 | TTGGGAAAGTTTTGACTGGTG |
| MCVcons4 | ATTGGAGGAAGGCTTTCTGG |
| MCVcons5 | CAGAAAGCCTTCCTCCAATG |
| MCV-1248-1267_rev | CAGAAGAGATCCTCCCAGGT |
| MCV-1183-1202_for | CAGGAAGAGAATCCAGCACA |
| MCVcons6 | TGGTGAAGGAGGAGGATCTG |
| MCV - 1374 1938 - for | GAGGCCTCGTCATCTCAGTT |
| MCV-1583-1605_rev | CAGCATGGCTAAGATAATCAGAA |
| MCV-1550-1573_for | AACTCCTGTTCTACTGATTTTCC |
| MCV-1813-1832_rev | TGTAAGGGGGCTTGCAAAA |
| MCV - 1864 2438 - for | GCAAGCCCCCTTACAAATTA |
| MCV-2039-2438_rev | GCTTGTTGGCAAATGGTTTT |
| MCV-2024-2043_for | CTCAAACCTCACAAGGCTCA |
| MCV-2247-2265_rev | CAGTACCAGGCCACACCAC |
| MCV-2233-2255_for | ACTGTATTATATGGGTGGTGTGG |
| MCV-2494-2513_rev | GCCCTTTCACATCCTCAAAA |

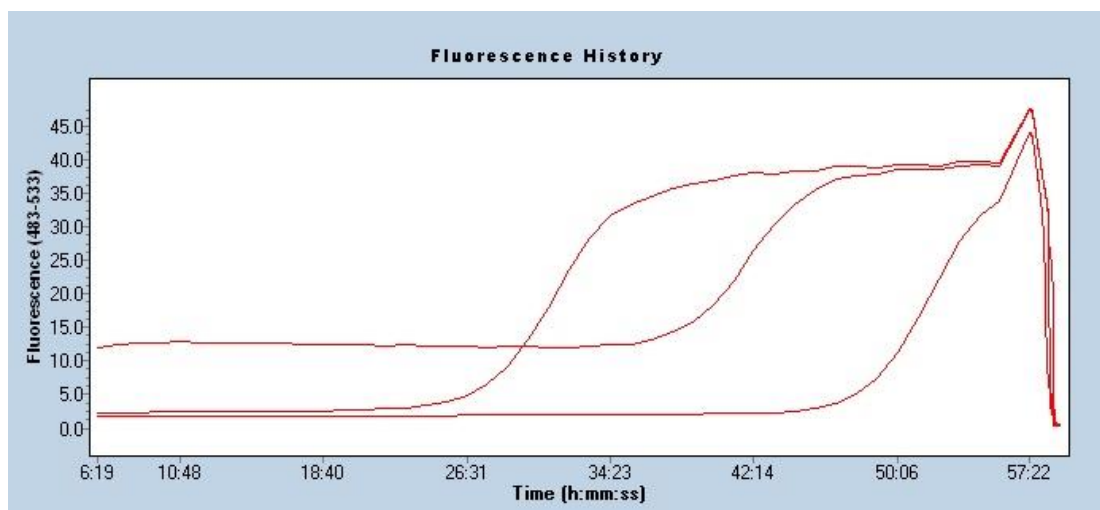
Taulukko 4. KIT ja MCPyV koettimet.

| Koettimen nimi/alueet | GC rikkaus, % | Sulamislämpötila °C | Koettimen pituus, bp |
|-----------------------------|---------------|---------------------|----------------------|
| KIT ex 9 for&rev | 42,9 | 79,4 | 267 |
| KIT ex 11 cap 1 for&rev | 37 | 77,6 | 264 |
| KIT ex 11 cap 2 for&rev | 41 | 79 | 232 |
| KIT ex 13 for&rev | 43 | 79,8 | 230 |
| KIT ex 17 for&rev | 38 | 77,7 | 229 |
| MCPyVgen_for & MC-Vcons2 | 46 | 79,1 | 148 |
| MCV_SG_for & MCV_354_373rev | 47 | 81,3 | 203 |
| MCV234-772for & MCV512-531 | 39 | 77,8 | 210 |
| MCV507-524 & MCV234-772rev | 41 | 79,1 | 266 |
| MCVcons3 & MC-Vcons4 | 42 | 78,8 | 317 |
| MCVcons5 & MCV1284-1267 | 56 | 85,5 | 288 |
| MCV1183-1202 & MC-Vcons6 | 57 | 85,5 | 246 |
| MCV1374-1938 & MCV1583-1605 | 47 | 81,1 | 231 |
| MCV1550-1573 & MCV1813-1832 | 30 | 75 | 282 |
| MCV1864-2438 & MCV2039-2112 | 38 | 78,2 | 295 |
| MCV2024-2043 & MCV2247-2265 | 30 | 75 | 282 |
| MCV2233-2255 & MCV2494-2513 | 37 | 77,5 | 281 |

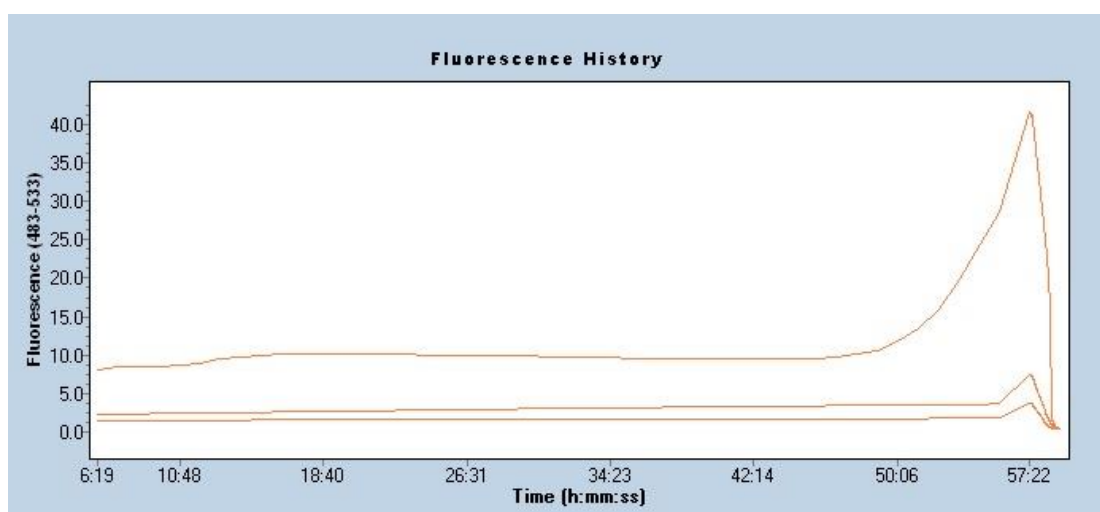
qPCR tulokset



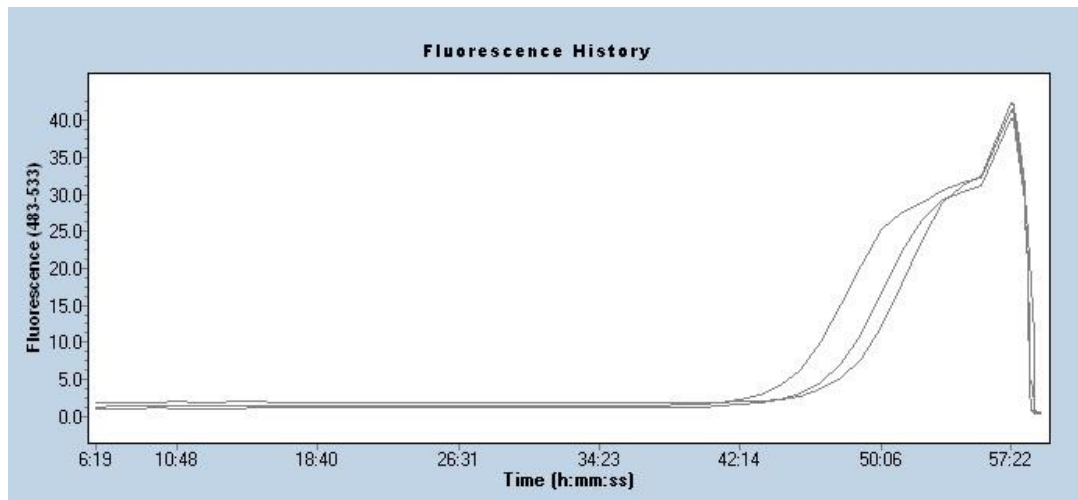
Kuva 13. Gist näyte, MCC alukkeet



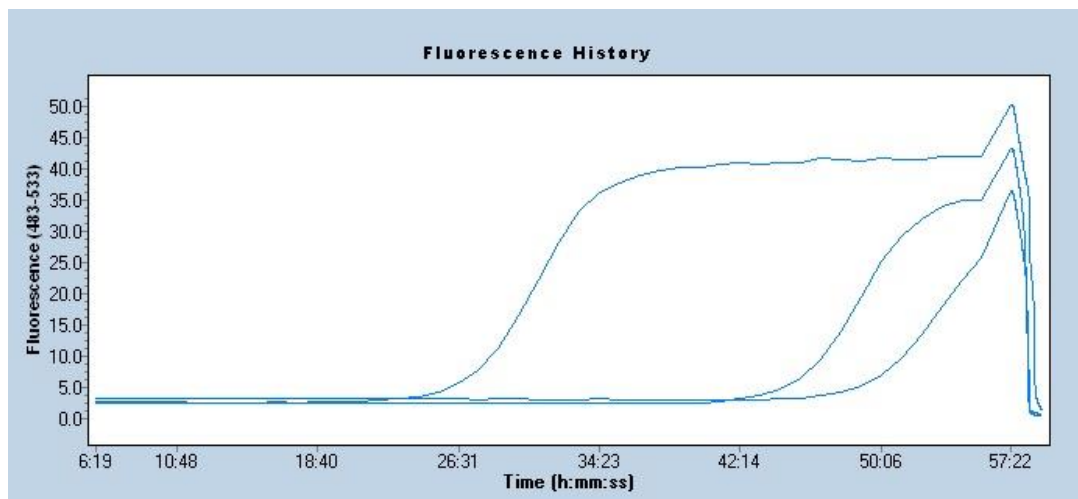
Kuva 14. GIST näyte, KIT alukkeet



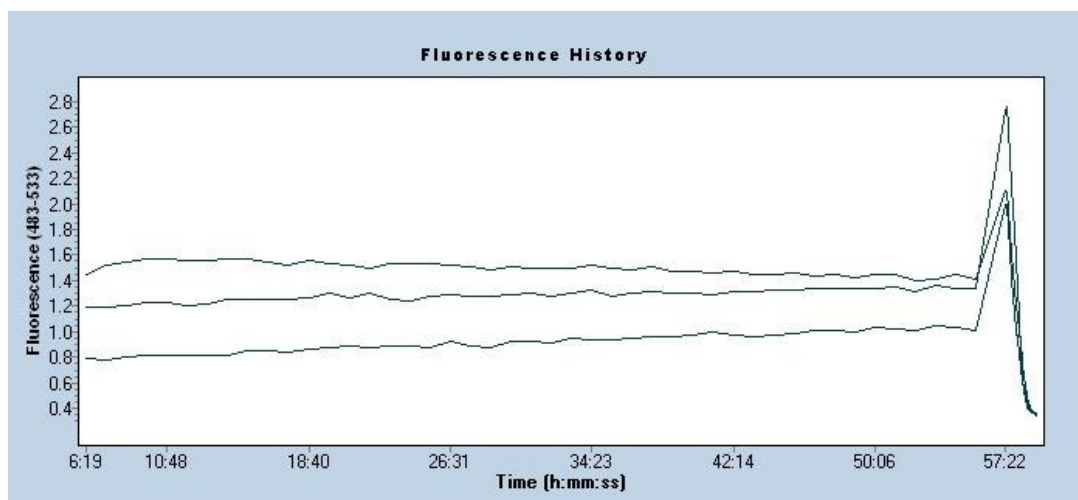
Kuva 15. GIST näyte, SEDT2 alukkeet



Kuva 16. MCPyV, KIT alukkeet



Kuva 17. MCPyV, MCC alukkeet



Kuva 18. MCPyV, SEDT2 alukkeet

Tutkimussuunnitelma

Tutkimuskohde

Tutkimuksen kohteena on Roche® GS junior™, uuden sukupolven geenisekvensaattori, ja sen käyttö KIT-geenin mutaatiot GIST potilaiden näytteistä. Tutkimuksen tarkoituksena on ottaa käyttöön Roche® GS junior™ Heikki Joensuun tutkimusryhmässä, ja tuottaa kustannustehokas menetelmä ko. laitteelle. Tutkimuksen tulokset tullaan raportoimaan opinnäytetyön raportissa ja tutkimustuloksien julkistamisesta sovitaan tutkimusryhmän kanssa erikseen.

Työssä tullaan käyttämään hyväksi GIST –potilaiden näytteitä joihin tutkimusryhmä on pyytänyt tutkimusluvat potilailta, HUS:n eettiseltä toimikunnalta sekä Valviralta. Lisäksi tutkimuksessa käytetään virusintegraatiokontrollina ma -potilasnäytettä menetelmän kontrolloimiseen sekä käyttökelpoisuuden arviointiin.

Tutkimuksessa käytettävät materiaalit

Tutkimusta varten tarvitaan Roche® GS junior™:n käyttöön tarvittavat reagenssit, alukkeet ja näytteet. Reagensseja tulee olemaan työssä paljon, kaikki kaupallisesti hankittavia. Käytettävät reagenssit löytyvät tarkemmin Rochen 454-manuaaleista. Käytettävät alukkeet ovat tutkimusryhmän suunnittelemat ja ne myös ovat kaupallisesti hankittuja. Näitä alukkeita tullaan käyttämään biotinyloitujen koettimien valmistuksessa, joista kerrotaan kappaleessa 4.3.2. Näytteet ovat tutkimusryhmän käytössä olevia potilasnäytteitä, joiden tutkimuskäyttöön on pyydetty lupa potilailta, HUS:n eettiseltä toimikunnalta sekä Valviralta.

Työsuunnitelma

Seuraavaksi esittelen työn eri osiot siinä järjestyksessä, missä ne tulevat näytteen käsittelyn ja sekvensoinnin aikana tapahtumaan. Suunnitelma perustuu Duncavage ym. julkaisemaan artikkeliin, jossa he esittelivät ns. Washington University re -menetelmää, eli WUcap:ia.

Streptavidin helmien valmistus

Streptavidin päällystetyt helmet tullaan hankkimaan kaupallisena valmisteena esim. Invitrogeniltä. Näiden helmien tarkoituksena on kiinnittyä Roche® GS junior™:ssa oleviin kuoppiin sekvensoinnin aikana ja kiinnittää täten streptavidiin kiinnitetty DNA juoste kiinteään faasiin.

Biotinyloidut koettimet

Biotinyloituja koettimia on saatavilla kaupallisesti, mutta ne on myös mahdollista valmistaa itse. Opinnäytetyössä on tarkoitus valmistaa nämä koettimet PCR:llä käyttämällä tunnistettuja alukkeita/DNA pätkiä ja leimaamalla nämä biotiinileimatulla nukleotidilla. Yksi tapa valmistaa nämä koettimet on esitelty Duncavage ym. artikkelissa. Etsitään ehjä kopio halutusta DNA:sta (esim. eksoni 11) ja suoritetaan PCR normaalisti, lisäten sekaan biotinyloitua dCTP:tä suhteessa 1:5 tavalliseen nukleotidiin. Halutun pituiset pätkät voidaan tämän jälkeen eristää geelielektroforeesilla.

Potilasnäyte

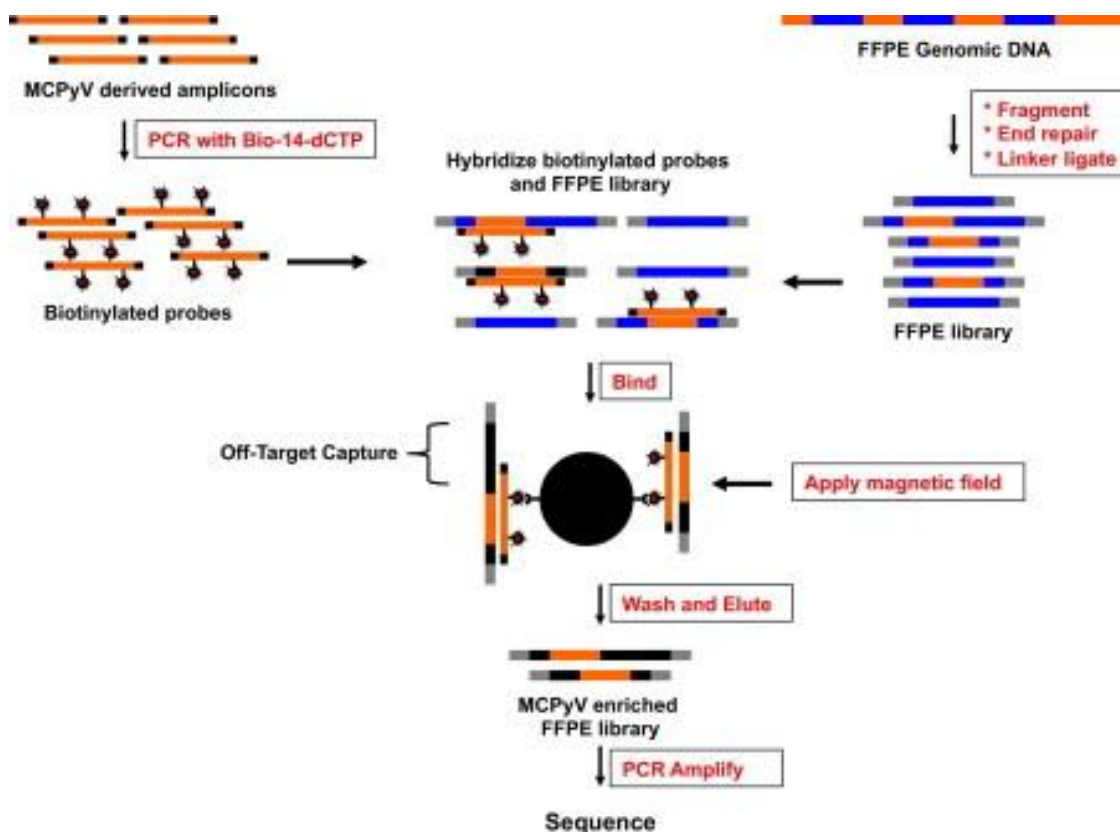
Potilasnäytteenä käytetään parafinisoituja näytteitä, ehkä jopa värjättyjä näytelaseja. Näistä näytteistä poistetaan tarvittaessa parafiini, ja niiden DNA kerätään talteen kaupallisesti saatavilla olevilla kiteillä. Näytteestä muodostetaan tämän jälkeen ns. shotgun library, eli näytteen DNA pilkotaan halutun pituisiksi pätkiksi (esim. 300 bp) ja näiden pätkien päät korjataan entsyymaattisesti. FFPE-näytteissä DNA on usein jo sopivan pituista, joten tämä vaihe voidaan jättää väliin. Valmis geenikirjasto tarkistetaan esim. agarosigeelillä ja tarvittaessa puhdistetaan sopivan kokoiset DNA pätkät. Potilasnäytteet leimataan 454adaptoreilla (DNA sekvenssi, joka kiinnitetään näytteen alkuun), jotka mahdollistavat potilaiden tunnistuksen ja adaptorispesifien alukkeiden käytön PCR monistuksessa. Valmiista geenikirjastosta voidaan tämän jälkeen tutkia haluttuja eksoneita Roche® GS junior™:lla.

Hybridisaatio/kaappaus

Hybridisaatio/kaappaus vaiheessa äsken valmistetusta geenikirjastosta valikoidaan vain halutut alueet, eli KIT-geenin eksonit 11,13,17 ja 9. Tämä tapahtuu avaamalla näyte-DNA yksijuosteiseksi ssDNA:ksi ja hybridisoimalla sitä biotinyloitujen alukkeiden kanssa. Tämän jälkeen kiinnitetään biotiini streptavidiniin, eli näyte-DNA kiinnitetään streptavidin helmiin. Kiinnityksen jälkeen näytteestä voidaan pestä kaikki ylimääräinen DNA ja muu materia pois jolloin jäljelle jää vain ”kaapatut” eksonit. Tämä mahdollistaa näytemäärän vähentämisen Roche® GS junior™:lle sopivaksi ja ajoaikojen lyhentämisen. Tämän ansiosta sekä kappaleessa 2.1. esiteltyjen pyrosekvensointiin liittyvien pesujen vuoksi näytteen sekvensointi on erittäin puhdasta ja tarkkuus näillä NGS laitteilla hyvin korkea.

Pyrosekvensointi

Pyrosekvensointi tapahtuu täysin automatisoidusti Roche® GS junior™:lla. Pyrosekvensoinnin periaate on esitelty kappaleessa 2.1. Sekvensoinnin avulla saadaan selvitettyä DNA:n emäsjärjestys, jota voidaan verrata terveeseen DNA:han. Näin saadaan tunnistettua yleisimmät KIT-mutaatiot, ja mahdollisesti myös sattumalöydökset kyseisistä eksoneista.



Kuva 19. WUcap (Ducavage ym. 2011).

Tulokset

Opinnäytetyöni tavoitteena on saada aikaiseksi kustannustehokas menetelmä Roche® GS junior™:lle GIST potilaiden näytteiden analysoimiseksi, sekä alukkeita muokkaamalla myös muille geenimutaatioille ja esim. virusintegraatio –alueille. Näin ollen tuloksia arvioitaessa tulee miettiä toimiko menetelmä, ja saavutettiin sille asetetut tavoitteet. Mikäli menetelmä toimii ja on todellakin kustannustehokas, on sen avulla mahdollista muodostaa laajempia paneeleja, joilla voidaan tutkia useamman potilaan näytteet samanaikaisesti, mahdollisesti jopa eri sairauden aiheuttamia mutaatioita voidaan tutkia samassa paneelissa.

Projektiorganisaatio

Opinnäytetyöni projektiryhmään tulee kuulumaan itseni lisäksi työn tilaaja, ohjaajani koulun puolelta, ohjaajani/yhteyshenkilöni työelämästä, sekä tietysti opponijani. Opinnäytetyön tulen suorittamaan yksin, joskin laitteenkäsitelyssä ja menetelmän kehittämisessä tulen hyödyntämään sekä ohjaajaani, että muuta tutkimusryhmää ja heidän

