

Karoliina Liikonen

Uuden nukleiinihappoeristykseen pohjautuvan näytteenkäsittelymenetelmän kehittäminen rotavirukselle

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Insinööri (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikka

Insinöörityö

14.4.2015

Tekijä Otsikko Sivumäärä Aika	Karoliina Liikonen Uuden nukleiinihappoeristykseen pohjautuvan näytteenkäsittelymenetelmän kehittäminen rotavirukselle 36 sivua + 4 liitettä 14.4.2015
Tutkinto	insinööri (AMK)
Koulutusohjelma	Bio- ja elintarviketekniikka
Suuntautumisvaihtoehto	Biolääketiede
Ohjaajat	Lehtori Juha E. A. Knuutila Tuotekehitysasiantuntija Solveig Sjöblom Laboratorioasiantuntija Jenna Flinck
<p>Rotavirus on kaksijuosteinen RNA-virus, joka aiheuttaa korkeakuumeisen suolistoinfektion. Taudinkuvaan liittyy myös voimakasta oksentelua ja vesiripulia. Rotavirusinfektiot ovat tyypillisiä pienillä lapsilla, yleisimmillään ne ovat 6-24 kuukauden ikäisillä. Rotaviruksesta tunnetaan useita eri serotyyppejä, jotka luokitellaan A-G luokkiin. Näistä A, B ja C voivat aiheuttaa taudin ihmisessä.</p> <p>Tämän opinnäytetyön tavoitteena oli kehittää Orion Diagnostican uutta nukleiinihappoeristykseen perustuvaa näytteenkäsittelymenetelmää rotavirukselle. Menetelmä perustuu magneettisten silikananopartikkelien käyttöön ja siinä on neljä eri vaihetta: lyysaus, kaksi pesuvaihetta ja eristetyin nukleiinihapon eluointi.</p> <p>Rotaviruksen diagnosointiin ulosteesta käytetään nykyisin esimerkiksi antigeenipohjaisia pikatestejä ja PCR-menetelmää. Kehitettävän menetelmän tarkoitus on helpottaa RNA-eristystä. Tutkittavan menetelmän avulla suoritettua nukleiinihapon eristystä todennetaan käyttämällä RT-qPCR-menetelmää sekä vertaamalla saatuja tuloksia kaupalliseen magneettipartikkelipohjaiseen eristysmenetelmään.</p> <p>Työn aikana suoritettujen tutkimusten pohjalta eristysmenetelmän lyysausvaihetta optimoitiin tehoamaan rotaviruksen kolmikerroksiseen kapsidiin. Tätä varten kehitettiin uusi pus-kuri ja sen toimintaa tehostettiin vielä inkuboimalla näytettä korkeassa lämpötilassa. Tämän avulla RNA saatiin vapautumaan lyysausliuokseen tehokkaammin.</p> <p>Saatujen tulosten perusteella voidaan todeta, että kehitettävällä menetelmällä päästään samoihin ellei suurempiin RNA-saantoihin, kuin kaupallisella vertailumenetelmällä näytteen sisältäessä vain rotaviruspartikkeleja. Toisaalta tutkimuksissa todettiin ulostenäyttemateriaalin häiritsevän RNA-eristystä merkittävästi.</p> <p>Tulosten perusteella menetelmä tarvitsee vielä jatkotutkimuksia niin lyysauksen tehostamisen, kuin ulosteen RNA-eristykseen aiheuttaman inhibition vuoksi. Myös magneettisten silikananopartikkelien RNA:n sitomiskykyyn tulisi perehtyä tarkemmin.</p>	
Avainsanat	Rotavirus, PCR, RNA-eristys, magneettiset nanopartikkelit

Author	Karoliina Liikonen
Title	Development of the new nucleic acid isolation based sample preparation method for rotavirus
Number of Pages	36 pages + 4 appendices
Date	14 April 2015
Degree	Bachelor of Engineering
Degree Programme	Biotechnology and Food Engineering
Specialisation option	Biomedicine
Instructors	Juha E. A. Knuuttila, Lecturer Solveig Sjöblom, R&D Specialist Jenna Flinck, Laboratory Specialist
<p>Rotavirus is a double stranded RNA virus, which causes gastroenteritis with high fever. Symptoms include severe vomiting and diarrhea. Rotavirus infections are typical in young children; most frequent they are with children aged between 6-24 months. Rotaviruses can be classified for several serotypes, namely from A to G. Serotypes A, B and C can infect humans.</p> <p>The aim of this thesis was to develop a new nucleic acid isolation based sample preparation method for rotavirus. The thesis was conducted at Orion Diagnostica. The method is based on the use of magnetic silica nanoparticles, and it includes four steps: lysis, two washing steps and elution of isolated nucleic acid. In order to diagnose rotavirus in stool, antigen-based rapid tests and RT methods are currently used.</p> <p>The new method was developed to facilitate the RNA isolation. The new RNA extraction method was verified with RT-qPCR-method and the results were compared with a commercial extraction method, based on magnetic particles.</p> <p>During the thesis project, the lysis step of the extraction method was optimized to be more effective for the three-layered capsid of rotavirus. For this purpose, a new buffer was developed and the activity was enhanced by incubating the sample at high temperature. This lead to a more efficient lysis and a better RNA extraction result.</p> <p>On the basis of the results, it can be concluded that with by new method, similar RNA yields could be achieved as by the commercial reference method when the sample contains suspended rotavirus particles. However, the fecal sample material significantly inhibited the RNA extraction.</p> <p>According to the results, the method needs further investigation regarding lysis efficiency and the effect of fecal material on the RNA extraction method. Also the RNA binding capacity of magnetic nanoparticles should be studied more.</p>	
Keywords	rotavirus, PCR, RNA extraction, magnetic nanoparticles

Kiitokset

Tämä opinnäyte työ tehtiin yhteistyössä Orion Diagnostica Oy:n tuotekehityksen kanssa. Kiitän ohjaajiani tuotekehitysasiantuntija Solveig Sjöblomia ja laboratorioasiantuntija Jenna Flinckiä asiantuntevuudesta, tuesta ja kannustuksesta. Suuret kiitokset myös ohjelmapäällikkö Minna Mäelle neuvoista ja kannustuksesta.

Metropolia Ammattikorkeakoulusta opinnäytetyön ohjaajana toimi lehtori Juha E. A. Knuutila. Haluan kiittää häntä kannustuksesta sekä opintojen, että insinööriyön aikana.

Kiitän myös Pauliina Auvista ja Sonja Elfiä yhteistyöstä insinööriyön parissa.

Lisäksi haluan kiittää terveyden ja hyvinvoinnin strategisen huippuosaamisen keskittymään (SHOK) SalWe Oy:n Get It Done-ohjelmaa, joka on mahdollistanut tämän opinnäytetyön suorituksen.

Hyvinkäällä 14.4.2015

Karoliina Liikonen

Sisällys

Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Rotavirus	2
2.1	Rotaviruksen rakenne	2
2.2	Rotaviruksen oireet ja hoito	5
2.3	Rotaviruksen esiintyvyys	6
3	Rotaviruksen diagnosointi	8
3.1	Nykyiset diagnostiikkaratkaisut	8
3.2	Diagnostiset haasteet	11
3.3	Esimerkkejä rotaviruksen kaupallisista diagnostiikkaratkaisuista	11
4	Ulosteen näytteenkäsittelymenetelmät	12
5	RT-qPCR menetelmä	13
6	Nukleiinihappojen eristys	16
6.1	Perinteiset nukleiinihappojen eristysmenetelmät	16
6.2	Magneettipartikkeleihin pohjautuvat eristysmenetelmät	17
7	Työn tarkoitus	19
8	Materiaalit ja menetelmät	19
8.1	Rotavirusnäytteet	19
8.2	PCR-alukset ja RT-PCR -protokolla	20
8.3	Nukleiinihappopitoisuuden mittaaminen Qubit Fluorometer -laitteella	21
8.4	Vertailumenetelmä	22
8.5	Kehitettävä menetelmä	23
9	Tulokset ja tulosten tulkinta	24
9.1	PCR	24
9.2	Näytteenkäsittelymenetelmän puskurien kehittäminen	24
9.3	Lyysausvaiheen tehostaminen	27
9.3.1	Kuumennuksen vaikutus lyysautumiseen	29
9.3.2	Lyysautumisen tehostaminen TritonX-detergentillä	29

9.4	RNA:n sitoutuminen magneettipartikkeleihin	30
9.5	Näyttemateriaalin aiheuttama inhibitio	31
9.6	Näytteenkäsittelymenetelmä verrattuna EZ1-eristysrobotin DSP Virus Kit menetelmään	33
10	Pohdinta	35
	Lähteet	37
	Liitteet	
	Liite 1. American Type Culture Collectionin todistus rotavirus kannasta	
	Liite 2. Rotaviruksen analysointi	
	Liite 3. Rotaviruksen <i>virusproteiini 7</i> sekvenssi	
	Liite 4. PCR –reagenssit ja -ohjeet	

Lyhenteet

cDNA	Komplementaarinen DNA
CT-arvo	Kynnyssyklarivo, sykli jossa fluoresenssi ylittää asetetun kynnyksarvon.
EIA	Entsyymi-immunologinen menetelmä
NSP	Ei-rakenne proteiini (Non Structural Protein)
PBS	Fosfaattipuskuroitu suolaliuos (Phosphate-buffered saline)
PCR	Polymeraasiketjureaktio
qPCR	Kvantitatiivinen PCR
RT	Käänteiskopiointi (Reverse Transcription)
RT-qPCR	Käänteiskopiointi polymeraasiketjureaktio (reverse transcription polymerase chain reaction).
SIBA	Kaksioisjuosteen invaasioon perustuva monistus (Strand Invasion Based Amplification)
WHO	Maailman terveysjärjestö (Worlds Health Organization)
VP	Virusproteiini

1 Johdanto

Insinööri työ suoritettiin yhteistyössä Orion Diagnostica Oy:n tuotekehityksen kanssa. Tarkoituksena oli kehittää uutta näytteenkäsittelymenetelmää rotavirukselle. Rotavirus on kaksijuosteinen RNA-virus, joka aiheuttaa varsinkin pienillä lapsilla suolistoinfektioita, joihin liittyy voimakasta ripulointia sekä oksentelua. Tauti aiheuttaa tyypillisesti elimistön kuivumista, mikä on riski potilaalle.

Rotaviruksen nykyinen diagnosointi perustuu pitkälti antigeenipohjaisiin pikatesteihin. Näitä on kritisoitu niiden epäherkkyyden takia. PCR-menetelmä on antigeenitestiin verrattuna herkempi, mutta sen käyttö ei ole vielä saavuttanut samankaltaista suosiota kuin nykyiset pikatestit.

Nyt kehitettävä näytteenkäsittelymenetelmä perustuu magneettisten silikananopartikkelien käyttöön ja tavoitteena oli selvittää kuinka tämä menetelmä soveltuu RNA-virusten nukleinihappojen eristykseen. Lisäksi mielenkiinnon kohteena oli tutkia myös kuinka näytteenkäsittely toimii yhdessä ulostenäytteen kanssa.

Kehitettäessä näytteenkäsittelymenetelmää ja tutkittaessa RNA-eristyksen tehokkuutta eri koejärjestelyillä työkaluna käytettiin PCR-menetelmää. Koska rotaviruksen genomi on RNA:ta, on ennen PCR:ää suoritettava käänteiskopiointireaktio RNA:sta komplementaariseksi DNA:ksi (cDNA).

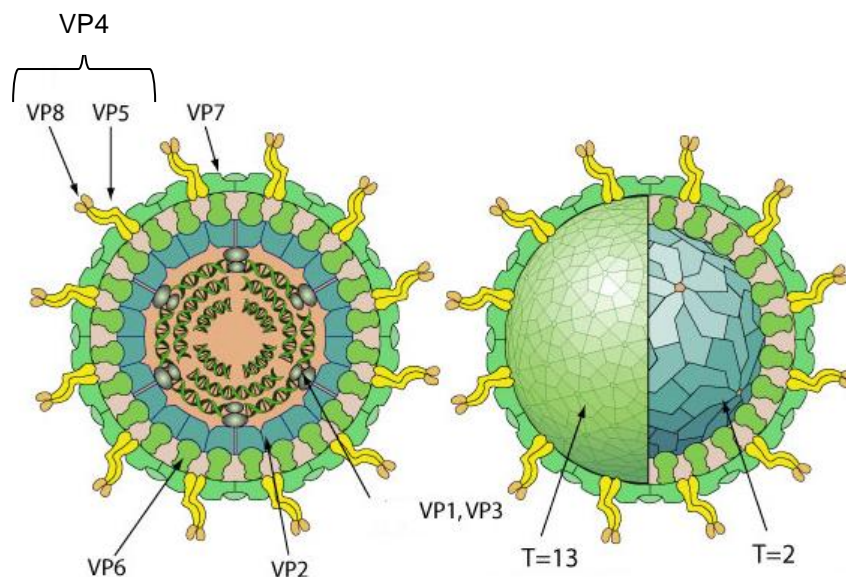
Rotaviruksen alukkeina PCR:ssä käytetään yleisesti useita eri proteiineja koodaavia jaksoja. Yleisiä sekvenssialueita on muun muassa VP4, VP6, ja tässä työssä käytetty VP7. Lisäksi joissakin tutkimuksissa on käytetty ei-rakenneproteiineja (NSP – non structural protein) koodaaviin jaksoihin sitoutuvia alukkeita.

2 Rotavirus

Rotavirusta esiintyy kaikkialla maailmassa sekä maaperässä että vesistöissä. Se kuuluu *Reoviridae*-heimoon ja on kaksijuosteinen RNA-virus. Rotavirus löydettiin vuonna 1974 tarkasteltaessa ripulipotilaiden ulostetta elektronimikroskoopilla. Pian tämän jälkeen todettiin, että rotavirukset ovat yleisimpiä lasten gastroenteriitin aiheuttajia kehittyneissä maissa. (Hedman ym. 2011. s. 491. Hedman ym. 2010. s.592 - 595.)

2.1 Rotaviruksen rakenne

Rotavirus muodostuu kolmesta eri kerroksesta (kuva 1). Uloimman kuoren muodostaa *virusproteiinin 7 (VP7)* glykoproteiini. Rotaviruksen kuorirakenne ei ole täysin tiivis, vaan siinä on 132 sisäkuoreen saakka ulottuvaa kanavaa. Lisäksi ulokuoren läpäisee *virusproteiinista 4 (VP4)* muodostuvat piikkimäiset ulokkeet. Sisimmän kuoren muodostaa *virusproteiini 6 (VP6)* ja sen sisäpuolella on *virusproteiinista 2 (VP2)* rakentuva sisimmäinen kuori. Näiden kolmen kuorikerroksen sisällä sijaitsee viruksen 11 osaan segmentoitunut, kaksijuosteisesta RNA:sta muodostuva genomi. (Hedman ym. 2010. s. 592 - 595.)



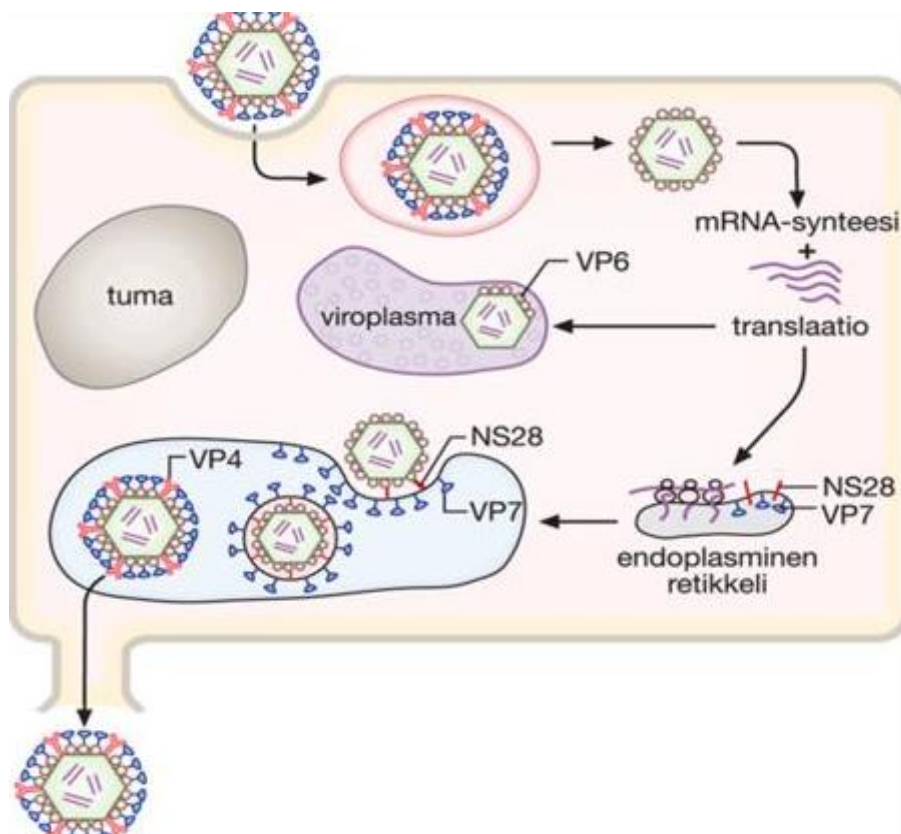
Kuva 1. Rotaviruksen rakenne kaavakuvana. (Muokattu lähteestä ViralZone)

Rotaviruksen genomi on kooltaan 18 500 emäsparia. Jokainen rotaviruksen genomin segmentti koodaa yhtä proteiinia, paitsi jaoke 11 koodaa kahta (NSP5 ja NSP6). VP1-4 sekä VP6-7 koodaavat viruksen rakenneproteiineja ja NSP1-6 koodaavat ei-rakenneproteiineja. Näitä NS-proteiineja tarvitaan rotaviruksen monistumiseen ja niitä tuotetaan infektoituneissa soluissa. Taulukossa 1 on esitetty rotavirusgenomin jaokkeet ja niiden toiminnot. (Desselberger, Ulrich. s. 78.)

Taulukko 1. Rotaviruksen jaokkeiden toiminnot. (Muokaten Desselberger, Ulrich)

Jaoke	Koodattu proteiini	Sijainti	Tehtävä
1	VP1	Sisin kuori	RNA polymeeraasikompleksi yhdessä VP3 kanssa
2	VP2	Sisin kuori	Aktivoi RNA-synteesin
3	VP3	Sisin kuori	RNA-synteesi yhdessä VP1 kanssa
4	VP4 (VP5 ja VP8)	Ulompi kuori	Solukiinnittyminen (VP5) piikkimäiset ulokkeet (VP8)
5	NSP1	Ei-rakenneproteiini	Interferonien vastustaja
6	VP6	Sisempi kuori	Vaaditaan transkriptin toimintaan
7	NSP3	Ei-rakenneproteiini	Estää isäntäsolun proteiinin valmistuksen
8	NSP2	Ei-rakenneproteiini	Osallistuu genomireplikaatioon
9	VP7	Ulompi kuori	Glykoproteiini, uloimman kuoren muodostus
10	NSP4	Ei-rakenneproteiini	Glykoproteiini
11	NSP5/NSP6	Ei-rakenneproteiini	Viruksen kokoaminen

Kuvassa 2 on esitetty viruksen lisääntyminen kaavakuvana. Viruksen lisääntyessä vain ulommainen proteiiniuori (VP7) irtoaa ja RNA-synteesi tapahtuu kapsidin sisällä. Viruksella on oma RNA-polymeraasi, jonka avulla se saa muodostettua lähetti-RNA:ta. Nukleokapsidi ankkuroituu karkealle endoplasmakalvostolle. Siellä lipidit poistuvat ja VP7 sekä VP4 muodostavat viruksen ulkokuoren. Nukleokapsidi kootaan sytoplasmassa puolella, sinne muodostuvissa synteesikeskuksissa. Viruksen vapautuminen solusta tapahtuu joko solun hajotessa tai karkean endoplasmakalvoston yhtyessä solukalvoon. (Hedman ym. 2010. s. 592 - 595.)



Kuva 2. Rotaviruksen lisääntyminen

Rotavirus luokitellaan ryhmiin A-G. Serotyyppeihin rotavirukset luokitellaan rakenneproteiinien mukaan, VP6- pintaproteiinin perusteella rotavirukset on jaoteltu ryhmiin A, B ja C, joista kaikki ovat ihmisille infektiivisiä. Rotavirusten tarkempi serotyypitys tehdään proteiinien VP7 ja VP4 perusteella. Näiden pintaproteiinien perusteella tehty tyypitys vastaa hyvin molekyylogeneettisesti määritettyjä G- ja P-genotyyppejä. Tällä hetkellä tunnetaan 15 G-tyyppiä ja 20 P-tyyppiä ihmisen rotavirukselta. Rotaviruksen tyyppi ilmoitetaan käyttämällä G- ja P-tyypin yhdistelmällä, esimerkiksi G1P[8]. Eri serotyypin aiheuttamat taudinkuvat ovat hyvin samankaltaisia keskenään. (Al-Hello ym. 2014.

s. 6. Kansanterveyslaitoksen asettaman lasten rotavirusrokotustyöryhmän selvitys. 2007. s.10.)

Koska rotaviruksen genomi on jakautunut, voi kahden rotaviruksen infektoidessa saman isäntäsolun tapahtua perintöaineksen vaihtumista. Tällöin voi muodistua reassortanttiviruksia, joiden perimä koostuu kahden viruksen genomista. On myös havaittu, että ihmisten rotavirukset voivat sekoittua eläinten rotaviruksiin. Näiden seurauksena voi syntyä taudinaiheuttamiskyvyltään ja lajispesifisyydeltään muuntuneita rotaviruksia. (AI-Hello ym. 2014. s. 6 - 7.)

2.2 Rotaviruksen oireet ja hoito

Rotavirus aiheuttaa varsinkin pienillä lapsilla rajun, korkeakuumeisen suolistoinfektion johon liittyy oksentelua ja vesiripulia. Rotaviruksen ilmentymishuippu on 6 – 24 kuukauden ikäisillä lapsilla. Primääri-infektio on usein voimakasoireinen, mutta uusiutuvat infektiot ovat yleensä lievempiä. Sairastettu infektio antaa ainakin osittaisen immuniteetin myös muiden serotyypin rotaviruksille. Lähes kaikki lapset sairastavat rotaviruksen ja vaikka tauti on harvinainen aikuisilla, on varuskunta- ja vanhainkotiepidemioita havaittu. (Hedman ym. 2011. s. 491 - 493. Hedman ym. 2010. s. 596.)

Rotaviruksen aiheuttaman taudin itämisaika on lyhyt, noin 1-2 vuorokautta. Useimmiten tauti alkaa korkealla kuumeella, johon liittyy voimakasta oksentelua ja vetistä ripulia noin 24-48 tuntia oireiden alkamisesta. Ripulin kesto on lapsilla 3-8 vuorokautta. Aikuisen tauti on lievempi ja se voidaan sairastaa myös oireettomana. Usein siihen liittyy kuumetta, oksentelua, ripulia, päänsärkyä ja väsymystä sekä kouristavia vatsakipuja. Oireiden kesto on lyhyempi vain 1-2 vuorokautta. (Kansanterveyslaitoksen asettaman lasten rotavirusrokotustyöryhmän selvitys. 2007. s.11 - 14.)

Rotavirus on kestävä virus, joka selviytyy pitkään elimistön ulkopuolella. Infektiivinen annos on vain 1 – 100 partikkelia. Täten rotavirus on hyvin tarttuva, sillä ripulin aikana ulosteeseen erittyy suuri määrä virusta. Itämisaika taudille on noin kaksi vuorokautta. Rotavirus tarttuu käsien välityksellä, mutta sen voi saada myös saastuneiden elintarvikkeiden, kuten myös hengitysteiden välityksellä. (Hedman ym. 2011. s. 492.)

Rotavirus pyrkii ohutsuoleen, jossa sen lisääntyminen tapahtuu. Infektoituneet solut rikkoutuvat ja täten ravinnosta saatavat sokerit eivät imeydy normaalisti. Tämä johtaa niin sanottuun osmoottiseen ripuliin, jossa uloste muuttuu vetiseksi. (Hedman, Klaus ym. 2011. s. 492)

Rotaviruksen aiheuttama suolistoinfektio on itsessään paraneva tauti. Suurin uhka on kuumeen, oksentelun ja ripulin aiheuttama nestehukka. Vaikeimmissa tapauksissa voidaan vaatia nesteytystä nenä-mahaletkulla tai suonensisäisesti. (Kansanterveyslaitoksen asettaman lasten rotavirusrokotustyöryhmän selvitys. 2007. s.12 - 13.)

2.3 Rotaviruksen esiintyvyys

Rotavirusta on esiintynyt Suomessa vuosien 1995–2009 aikana keskimäärin 1400 ilmoitettua tapausta vuodessa. Erikoinen yksityiskohta on, että kaikkina seurantajakson vuosina ilmaantuvuus on ollut pojilla hieman suurempi, noin 55 % kaikista tapauksista. Taulukossa 2 on esitettyä arvio rotavirus tapauksista vuosina 1995–2014. (Ruutu ym. 2010. s.24.)

Seurantajakson (1995–2009) aikana todettiin rotavirustapauksien huippuajankohdan olleen Suomessa helmikuusta huhtikuuhun. Elokuun ja marraskuun välille sijoittuvana aikana tapauksia esiintyi vain yksittäisesti. Eteläisimmissä maissa rotaviruksen esiintymishuippu on aiemmin, sijoittuen jo talvikuukausille. (Ruutu ym. 2010. s.24.)

Taulukko 2. Rotavirustapaukset Suomessa vuosina 1995-2014 (Tartuntautirekisteri.)

Tapauksia arvoina	
1995	1 652
1996	1 507
1997	1 194
1998	1 458
1999	1 028
2000	1 437
2001	1 395
2002	1 550
2003	2 185
2004	1 323
2005	1 439
2006	2 190
2007	973
2008	1 337
2009	1 092
2010	426
2011	292
2012	209
2013	282
2014	272
Aika	23 241

Vuonna 2006 on alkanut lasten rokottaminen rotavirusta vastaan. Syyskuussa 2009 rokote tuli kansalliseen rokotusohjelmaan, mutta jo vuonna 2008 oli joka kolmas lapsi saanut rokotteen vanhempien kustantamana. Taudin esiintyvyys oli pudonnut selkeästi rokotusohjelman käynnistyttyä, kuten kuvasta taulukosta 1 voidaan havaita. (Salminen ym. 2014. s. 20 - 21.)

Rokotusohjelman myötä kiinnostusta on herättänyt korvautuvatko jo nyt vähentyneet rotaviruskannat uusilla viruskannoilla. Tästä johtuen kaikki pikatesteissä positiivisiksi todetut ulosteet on lähetettävä Terveyden ja hyvinvoinnin laitokselle molekyylogeneettistä tyyppitystä varten. Vuonna 2013 tautitapauksia aiheuttaneet rotavirustyyppit olivat: G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8], G9P[8] ja G12P[8]. (Salminen ym.2014.s. 20 - 21.)

3 Rotaviruksen diagnosointi

Ripulitaudit paranevat useimmiten nopeasti itsestään, joten harvoissa tapauksissa ulostenäytteen ottaminen on tarpeellista. Näytteenottoa harkitaan yksilöllisesti, ottaen huomioon muun muassa taudin keston, oireet ja mahdolliset komplikaatiot. Erityisesti jos kyseessä on epäily tartuntavaaralliseksi luokitelluista tapauksesta, on tapauskoh-tainen harkinta aiheellista. (Hedman ym. s. 494 - 497.)

Aikuisten yksittäisissä ripulitapauksissa virustutkimukset eivät ole tarpeen. Kun kyse on lapsipotilaiden pitkittyvistä oireista ja ripuliepidemioiden selvittämisessä, on diagnostiikka oleellisessa roolissa. (Hedman ym. s 494 - 497.)

3.1 Nykyiset diagnostiikkaratkaisut

Rotavirusta erittyy taudin aikana paljon ulosteeseen, joten diagnosointi on suhteellisen vaivatonta. Määrät vaihtelevat jopa 10^8 :sta 10^{11} viruspartikkeliin millilitrassa ulostetta sairastuneilla potilailla. (Ward ym. 2013, s. 1436.)

Rotaviruksen diagnosoimiseksi paras ajankohta on 3-5 vuorokautta oireiden alkamisesta. Rotaviruksen diagnosointi perustuu pääasiallisesti antigeenien osoitukseen ulosteesta pikatesteillä. Elektronimikroskopiaan verrattuna antigeenitestien herkkyys on 92 % ja tarkkuus 99 %. Aiemmin elektronimikroskopia oli tärkeä diagnostiikkamenetelmä. Rotaviruksen viljely on keskittynyt tutkimuskäyttöön ja sen käyttö ei diagnostiikassa ole tarpeellista. (Hedman ym. s.492.)

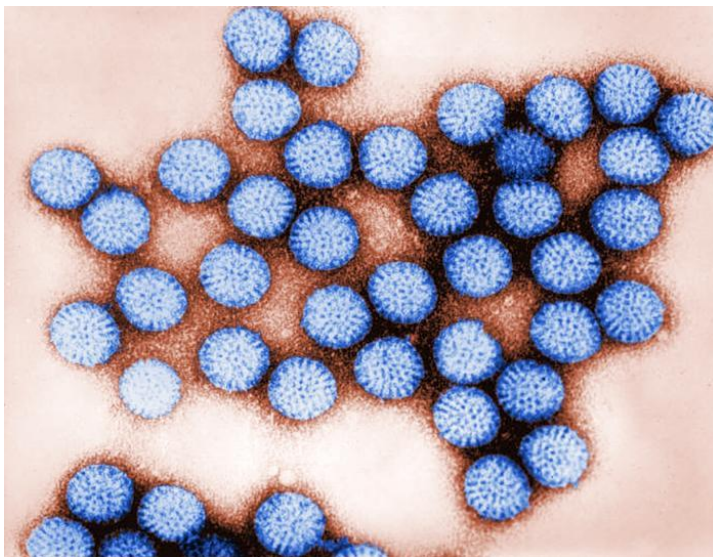
Taulukossa 3 on esitelty Suomen sairaanhoitopiireissä käytettyjä rotaviruksen diagnosointiin käytettyjä testejä. Selkeästi yleisin Suomessa käytetty menetelmä on immunokromatografinen testi

Taulukko 3. . Rotaviruksen diagnosointi Suomen sairaanhoitopiireissä

	Tutkimus	Menetelmä	Näytematriisi	Kesto
Huslab (Tutkimusohjekirja (a).)	F -VirAg	Immunokromatografia	Ulostenäyte (1 ml)	1-2 työpäivää
Huslab (Tutkimusohjekirja (a).)	F -VirEpid	Immunokromatografia, RT-PCR	Ulostenäyte	2-7 työpäivää
Huslab (Tutkimusohjekirja (a).)	S-RotaCF	Komplementin sitoutuminen (CF)	seerumi 1ml	3-5 työpäivää
Tykslab (Ohjekirja (b).)	F-VirEpid	RT-PCR, Elektronimikroskopia, tai immunokromatografia	ulostenäyte	noin viikon kuluessa
Tykslab (Ohjekirja (b).)	AdeRotaAg	EIA	ulostenäyte 1-2 ml	
Fimlab (Ohjekirja (a).)	F -RotaAg	Entsyymi-immunologinen määrittäminen.	puoli purkillista ulostenäytettä	vuorokauden kuluessa
Satadiag (Tutkimusohjekirja (b).)	S-RotaCF			
Islab (Web-ohjekirja.)	F -RotaAg	Immunokromatografinen	Ulostenäyte	1-2 työpäivää
Nordlab (Tutkimusvalikoima.)	S -RotaCF	Komplementin sitoutuminen (CF)	seerumi 1ml	3-5 työpäivää
Nordlab (Tutkimusvalikoima.)	F -AdRoAg	Entsyymi-immunologinen antigenimääritys.	ulostenäyte 2 ml	työpäivän kuluessa
phsotey (Laboratoriotutkimukset - mikrobiologia.)	F -RotAdAg	Immunokromatografia	puoli purkillista ulostenäytettä	
medix (Laboratoriokäsikirja.)	F -RotaAg	Entsyymi-immunologinen	Tuoretta ulostetta puoli purkkia	6 arkipäivää
Vshp (Laboratorio-ohjekirja.)	F-RotaAg	Immunokromatografinen	Tuoretta ulostetta	Työpäivän aikana
EpsHP (Kliinisen mikrobiologian ohjekirja.)	F- RotaAg	Immunokromatografinen	Tuoretta ulostetta	Yleensä samana päivänä
Utulab (Ohjekirja (c).)	F-RotaAg	Entsyymi-immunologinen (EIA)	Ulostetta 1-2 g (1-2 ml)	Normaalisti testin suorituspäivänä

Rotaviruksen diagnosointiin on erilaisia vaihtoehtoja. Yleisesti on käytössä jo aiemmin mainittu immunokromatografinen menetelmä (EIA), joka soveltuu hyvin pikadiagnostiikkaan. EIA:n kaltainen, mutta ei yhtä spesifinen, menetelmä on lateksiagglutinaatiomenetelmä. Tässä menetelmässä rotaviruksen antiseerumi sitoutuu lateksipartikkeliin, joka on biologisesti inertti, sekä näytteessä olevaan rotavirukseen muodostaen silmin havaittavan saostuman eli agglutinaation. (Hedman ym. 2011. s. 597. CRP eli C-reaktiivinen proteiini. 2008.)

Ulostetta on myös mahdollista tarkastella elektronimikroskopiolla (kuva 3.). Mikrokooppisen tarkastelun etuna on, että samalla voidaan havaita muita mikrobeja samasta ulostenäytteestä. Tämä menetelmä on ainakin Suomessa verrattain vähäisessä käytössä. Vain Tykslabin ohjekirjassa on maininta elektronimikroskopiasta. Suoraan ulostenäytteestä voidaan myös osoittaa RNA-segmenttejä polyakryyliamidielektroforeesin avulla. (Hedman ym. 2011. s. 597. Ohjekirja (b).)



Kuva 3. Elektronimikroskooppikuva rotaviruksesta (Public Health Image Library)

Serologisesti rotavirusinfektio voidaan todentaa myös pariseeruminnäytteistä. Tässä käytettävä menetelmä on komplementinsitoutuminen. Menetelmä perustuu komplementtiin, joka on yli 20 proteiinin muodostama immuunipuolustuksen järjestelmän osa. (Hedman ym. 2011. s. 597. The Complement Fixation Test. 2010.)

3.2 Diagnostiset haasteet

Vaikkakin rotavirusta erittyä ulosteeseen paljon taudin aikana, on sen diagnosoinnissa haasteita. Rotaviruksen viljely suoraan ulostenäytteestä on hankalaa, joten rotavirus osoitetaan usein ulostenäytteestä nopealla antigeenitestillä. (Wilde, James ym. 1990. s. 1300.)

Vaikka antigeenipohjaiset EIA-testit ovatkin yleisessä käytössä, on niitä kritisoitu niiden herkkyuden ja spesifisyyden vaihtelun takia. PCR-menetelmää käytettäessä, rotaviruksen todentaminen kasvoi 15 - 27 % verrattuna EIA menetelmiin. (Mijatovic-Rustempasic, Slavica ym. 2013. s. 3047.)

3.3 Esimerkkejä rotaviruksen kaupallisista diagnostiikkaratkaisuksista

Markkinoilla on useampia pikatestejä. Thermo Scientificin XPECT Rotavirus Test on nopea, antigeenipohjainen testi, joka perustuu immunokromatografiaan. Ennen varsinaisen testin suorittamista, ulostenäyte on suspensoitava kitin mukana tulevaan eristysliuokseen ja vorteksoitava. Varsinaiseen testikasettiin tiputetaan neljä pisaraa ulostesuspensiota. Tulos tulkitaan värireaktion mukaan, negatiivisessa testissä on vain yksi värillinen viiva kontrolli alueella, kun taas positiivisessa tuloksessa viivoja on kaksi. Jos kontrollialueella ei ole lainkaan viivoja, on testi tehty virheellisesti. (XPECT Rotavirus Test.)

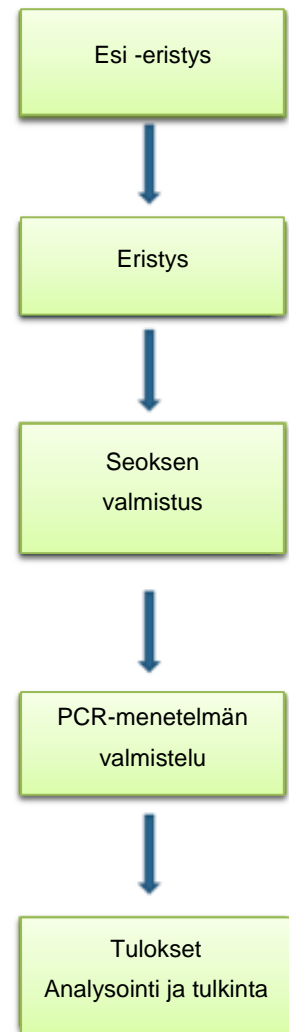
Toinen pikatesti tyyppi on entsyymi-immunomääritys. Tästä esimerkkinä on The Prospect Rotavirus Test niin ikään Thermo Scientificin valmistamana. Tässä testissä polyklonaalinen vasta-aine on sidottu kuoppalevyn pohjalle. Näytteessä mukana oleva rotavirusantigeeni sitoutuu kuopan pohjalla olevaan vasta-aineeseen. Tulos on luettavissa spektrofotometrisesti (450 nm) tai visuaalisesti. (Rotavirus Test.)

XPECT Rotavirus Testiin kuuluva työskentelyaika valmistajan ilmoituksen mukaan alle minuutin ja tuloksen saamiseen kuuluva aika noin 15 minuuttia. The Prospect Rotavirus Testiin tuloksen saamiseen kuluu kaksi tuntia, johtuen kahdesta huoneenlämmössä suoritettavasta inkuboinnista. (XPECT Rotavirus Test. Rotavirus Test.)

Erilaisia PCR kittejä on myös markkinoilla, mutta ilmeisesti ainakin Suomessa antigeenipohjaiset pikatestit ovat käytetympiä. On myös huomioitava, että PCR-menetelmiä käytettäessä rotaviruksen RNA on eristettävä näytteestä ennen varsinaista diagnosointia. (Tutkimusohjekirja (a). Suominen ym. 2010, s. 105 - 110.)

Diagenode Diagnostics yhtiöllä on tarjolla gastroenteriittidiagnostiikkapaketti, G-DiaNota, jolla voidaan diagnosoida Norovirus I/II ja rotavirus. Tätä PCR-menetelmää käytettäessä valmistaja ohjeistaa eristämään näytteestä RNA:n Roche MagNA pure 96 – eristysrobotilla. Kuten kuvasta 4 voidaan todeta, on menetelmässä useita erivaiheita ennen varsinaista PCR:ää. G-DiaNotan herkkyys on valmistajan mukaan erittäin hyvä, jopa 1 kopio/ml riittää viruksen tunnistamiseen. (G-DiaNota. 2015.)

Muita PCR-kittejä ovat muun muassa AmpliSensen AmpliSens All-screen-FRTPCR kit, Ingenetixin ViroReal® Rotavirus (A-G) – Kitversion.



Kuva 4. G-DiaNoTa menetelmän protokolla (G-DiaNota. 2015.)

4 Ulosteen näytteenkäsittelymenetelmät

Ulostenäyte voi olla ulkomuodoltaan hyvin vaihtelevaa. Lisäksi ulosteeseen erittyy ihmisen elimistöstä useita erilaisia PCR:ää inhiboivia tekijöitä. Esimerkiksi erilaiset sokearit ja sappisuolat vaikuttavat PCR-menetelmään huonontavasti. Jotta PCR-menetelmä toimisi halutusti, on ulostenäytettä esikäsiteltävä. Useat näistä menetelmistä on aikaa-vieviä ja työläitä. (Rådström, Peter ym. 2004. s. 33 - 34.)

Useissa eri tieteellisissä artikkeleissa esitetyissä tutkimuksissa, uloste saadaan liukoiseen muotoon liuottamalla se PBS-puskuriin (Phosphate-buffered saline) eli fosfaatti-

puskuroituun suolaliuokseen. Liuotus voidaan tarpeen mukaan tehdä eri suhteissa, mutta yleisesti on käytössä suhde 1:1. (Wilde, James ym. 1990.)

Useissa menetelmissä käytetään lisäksi inkubointia sekä voimakasta sekoitusta. Esimerkiksi Qiuyan, Loun ym julkaisemassa artikkelissa, noin 100 mg kiinteätä tai 200 µl nestemäistä ulostetta sekoitettiin 1 ml vettä. Tämän jälkeen näyteteitä sentrifugoitii 2800 g:n voimalla kaksi minuuttia ja lisäksi supernatanttia kuumennettiin 10 minuuttia. Tämän jälkeen liuoksesta eristettiin RNA-pylväskromatografiaan perustuen. (Lou Qinyua ym. 1997. s. 281 - 282.)

Kaupallisia näytteenkäsittelymenetelmiä on myös saatavilla. Useiden eri nukleiinihappoeristyskittien mukana on valmiiksi suunniteltuna esikäsittely. Esimerkiksi tässä työssä vertailumenetelmänä käytettävässä Qiagenin DSP-Virus tarvikepakauksessa on useammalle näytemateriaalille oma esikäsittelyprotokollansa. Ennen eristysprotokollan aloittamista, ulostenäyte tulee käsitellä ASL-reagenssilla. 100 mg ulostenäytettä liuotetaan 900 µl:aan ASL-reagenssia, jonka jälkeen seosta sekoitetaan voimakkaasti, kunnes näyte on homogeeninen. Liuosta tulee inkuboida 10 minuuttia huoneenlämmössä, jotta suurimmat partikkelit laskeutuvat näyteastian pohjalle. Tämän jälkeen vähintään 400 µl liuosta siirretään puhtaaseen näyteastiaan ja suoritetaan 10 minuutin inkubointi 70 °C:ssa. Tämän esikäsittelyn jälkeen näyte on valmis eristettäväksi EZ1:n eristysprotokollan mukaan. (EZ1 DSP Virus Kit Handbook, s. 25.)

5 RT-qPCR menetelmä

Polymeraasiketjureaktio (PCR) on Kary Mullisin kehittämä nukleiinihappojen monistusmenetelmä. PCR-menetelmää voidaan käyttää muun muassa nukleiinihappojen sekvensointiin, kloonaukseen ja eristämiseen. (Mullis ym. 1986.)

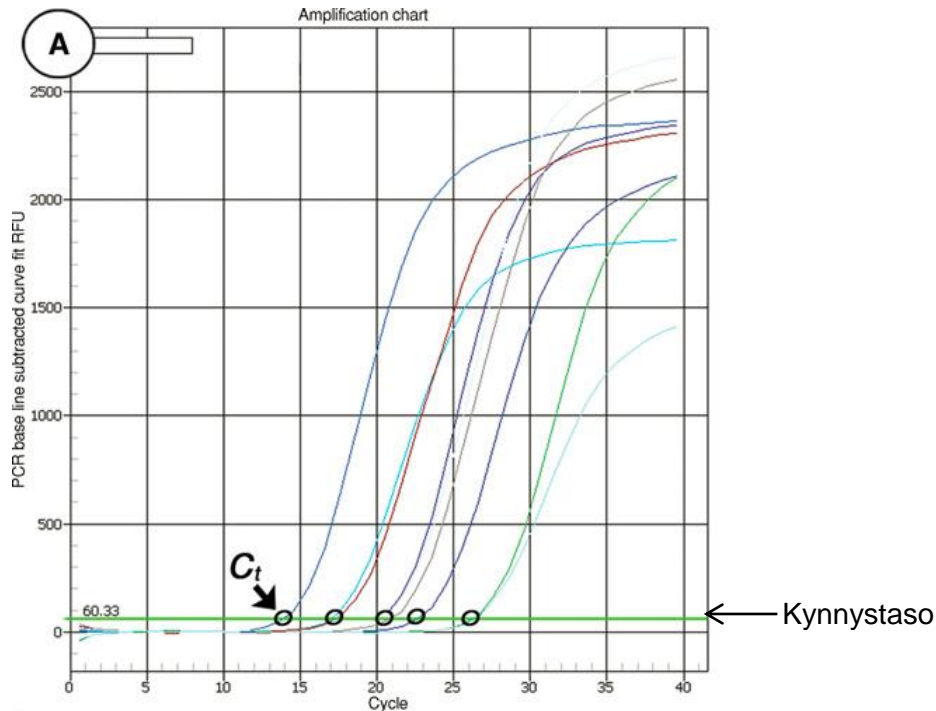
PCR:n avulla voidaan monistaa tiettyä nukleiinihapposekvenssiä, joka sijaitsee tunnettujen nukleiinihappojaksojen välissä. Näitä tunnettuja jaksoja kutsutaan alukkeiksi tai primereiksi. PCR perustuu nukleotidien pariutumiseen emäspari periaatteen mukaisesti. (Suominen ym. 2010, s. 153 - 155.)

PCR:ssä on yksinkertaisimmillaan vain kolme vaihetta: denaturaatio, annealing eli alukkeiden liittymisvaihe ja elongaatio eli pidentymisvaihe. Denaturaatio tapahtuu huo-

mattavan korkeassa lämpötilassa (94 - 98 °C), jolloin nukleiinihappojuosteet eroavat toisistaan. Annealing-vaiheessa PCR:ään tarvittavat alukkeet kiinnittyvät juosteisiin ja tämän jälkeen reaktiossa tarvittava polymeraasientsyymi aloittaa elongaatiovaiheen liittämällä nukleotidejä templaattijuosteen nukleotidien mukaisesti. Näin nukleiinihappo- ketju monistuu ja sen määrä kaksinkertaistuu jokaisen toistettavan syklin aikana. (Suominen ym. 2010, s. 153 - 155.)

Kvantitatiivinen PCR eli qPCR on eräs PCR-menetelmän sovellus. Sen avulla voidaan reaaliaikaisesti seurata reaktiossa syntyneen tuotteen määrää. Reaaliaikaisessa PCR:ssä reaktioseokseen lisätään fluoresoivaa merkkiainetta, joka sitoutuu kaksijuosteiseen DNA:han. Fluoroforeja on erilaisia, toiset lähettävät signaalin sitoutuessaan nukleiinihappojuosteeseen, kun taas toiset merkkiaineet taas lähettävät signaalin kun vapautuvat syntetisoitavasta juosteesta. Tapahtuipa signaalin lähetys kummalla tavalla tahansa, on fluoresenssin voimakkuus verrannollinen syntyneen tuotteen määrään. (Suominen ym. 2010. s.166 - 169.)

qPCR-ohjelmaan voidaan asettaa kynnystaso. Kun tuotteen aiheuttama signaali ylittää asetetun kynnystason, monistustuotteen aikaansaama signaali kohoaa taustafluoresenssin yläpuolelle. Kynnyssykli (C_T) on se sykli, jolla monistuskäyrä saavuttaa asetetun kynnystason. Mitä enemmän nukleiinihappoja on näytteessä, sen aiemmin C_T -arvo näytteen monistuessa ylittyy ja täten, sitä pienempi C_T -arvo on. C_T -arvojen avulla voidaan tulkita eri näytteiden sisältämää templaatin määrää. Kuvassa 5 on esitetty vihreällä asetettu kynnyssykliarvo ja monistuskäyrissä olevat ympyrät kuvaavat pistettä, jossa asetettu arvo ylittyy. (Fraga ym. 2008. s. 10.3.15 - 10.3.17.)



Kuva 5. C_T -arvot verrattuna asetettuun kynnysyksiin. (Kuva mukailen Fraga ym. 2008. s. 10.3.17.)

PCR-tuotteen sulamiskäyräanalyysin avulla voidaan tarkastella monistuneen tuotteen spesifisyyttä. Analyysissä saatua arvoa verrataan teoreettiseen. Sulamispisteanalyysin perusteella voidaan havaita myös ongelmakohtia, esimerkiksi epäspesifisen tuotteen monistumista. (Suominen ym. 2010. s. 168 - 169.)

Jos PCR:n lähtömateriaalina on RNA, on valmistettava ensin yksijuosteinen komplementaarinen DNA-juoste (cDNA). cDNA:n valmistukseen käytetään käänteiskopioijaentsyymiä, jonka jälkeen tehdään varsinaiset monistusreaktiot. Sovelluksesta käytetään nimitystä käänteiskopiointi-PCR (reverse transcription PCR). (Suominen ym. 2010. s. 153 - 155, s. 170 - 171.)

RT-PCR:n voi suorittaa kahdella eri tavalla: niin kutsutulla yksivaiheisella (one-step) periaatteella, jossa sekä käänteisreaktio että PCR-reaktio tapahtuvat samassa reaktio-astiassa. Kvantitatiivisesta one-step-periaatteesta käytetään nimitystä RT-qPCR. Toinen vaihtoehto on suorittaa ensin RNA:n kääntäminen cDNA:ksi ja tämän jälkeen vasta suorittaa PCR (two-step). One-step -menetelmä on nopeampi ja vaivattomampi käyttää ja siinä pipetointivirheiden määrä on pienempi verrattuna two-step-menetelmään. (Wacker, Michael J. Godard, Michael P. 2005. s. 266.)

On huomattava, että usein DNA tai RNA on eristettävä näytteestä ja puhdistettava ennen PCR-menetelmää häiritsevista tekijöistä. Perinteisesti DNA on puhdistettu fenoli tai fenoli-kloroformiuutolla. Tämä menetelmän käyttö on kuitenkin vähentynyt huomattavasti silikamenetelmien kehityttyä. RNA-eristyksessä pyritään hajottamaan solut nopeasti kaotrooppisissa olosuhteissa. Tämä estää RNAasien toiminnan ja täten ehkäisee RNA:n hajoamista. Markkinoilla on useita eri kittejä DNA:n ja RNA:n eristykseen ja puhdistukseen näytteestä, osa näistä on myös automatisoituja. (Suominen ym. 2010, s. 105 - 110.)

6 Nukleiinihappojen eristys

Yleisesti ottaen nukleiinihappojen eristyksessä on useita eri vaiheita: tehokas solujen hajotus, RNAasien tai DNAasien toiminnan inhiboiminen ja puhdistus muista soluissa esiintyvistä molekyyleistä, esimerkiksi proteiineista, lipideistä ja muista nukleiinihapoista. Eristettäessä RNA:ta on huomioitava vielä erityisesti RNA:n herkkä hajoaminen. RNAasit saavat RNA:n hajoamaan ja vaikeutena on se, että niitä esiintyy kaikkialla ympäristössä. (Tan, Siun Chee. Yip, Beow Chin. 2009.)

6.1 Perinteiset nukleiinihappojen eristysmenetelmät

Ensimmäisen DNA eristyksen suoritti Friedrich Miescher vuonna 1869. Tämän jälkeen on nukleiinihappojen eristykseen käytetty useita erilaisia menetelmiä. Fenoli-kloroformi eristys yhdistettynä guanidiinitiosyanaattiin on yksi perinteisimmistä menetelmistä. Tämän menetelmän haittapuolena on kuitenkin fenolin myrkyllisyys, tulenarkuus ja että se ei täysin poista RNAasien toimintaa. RNAasien ja DNAasien toiminnan inhiboiminen on kuitenkin hyvin merkittävä osa nukleiinihappojen eristystä. (Tan, Siun Chee. Yip, Beow Chin. 2009.)

Guadiinitiosyanaatin käytöstä RNA:n eristämässä on ensimmäinen maininta vuodelta 1977. Tämä menetelmä oli työläs ja siksi siitä siirryttiin guadiiniini-fenoli-kloroformieristykseen. Tässä menetelmässä RNA jää ylempään vesifaasiin proteiinien ja DNA:n jäädessä alempiin faaseihin. (Tan, Siun Chee. Yip, Beow Chin. 2009.)

Muita eristysmenetelmiä ovat muun muassa alkalinen eristysmenetelmä, jota on käytetty plasmidi DNA:n eristämiseen bakteeriviljelmistä. Menetelmä perustuu selektiiviseen alkaliiseen denaturaatioon. Toinen menetelmä on etidiumbromidi-cesiumkloridi gradienttisentrifugointi. Tämä on hyvin monimutkainen, kallis ja aikaavievä menetelmä verrattuna muihin eristysmenetelmiin, joten sitä käytetään suuriin bakteeriviljelmiin. (Tan, Siun Chee. Yip, Beow Chin. 2009.)

Lisäksi käytössä on useita kiinteään materiaaliin perustuvia nukleiinihappojen eristysmenetelmiä. Esimerkiksi pylväskromatogarifa on yksi hyvin yleisesti käytetty menetelmä. Pylväskromatografia voi perustua esimerkiksi ioninvaihtoon tai affiniteettiin. Maanuaalisesti suoritettavista kromatografisista menetelmistä yleisesti käytetty on spin-kolonnimenetelmä. Siinä näyte lisätään kolonnipylväeseen, jossa on kaotrooppinen liuos. Pylväs sentrifugoidaan, jolloin DNA sitoutuu silikamembraaniin. Epäpuhtaudet pestään pesuliuksilla ja liuokset sentrifugoidaan pois. Nukleiinihappo eluoidaan eluutiopuskuriin sentrifugoimalla näyte silikakalvon läpi puhtaaseen vastaanottoputkeen. (Tan, Siun Chee. Yip, Beow Chin. 2009. Suominen ym. 2013. s. 106.)

6.2 Magneettipartikkeleihin pohjautuvat eristysmenetelmät

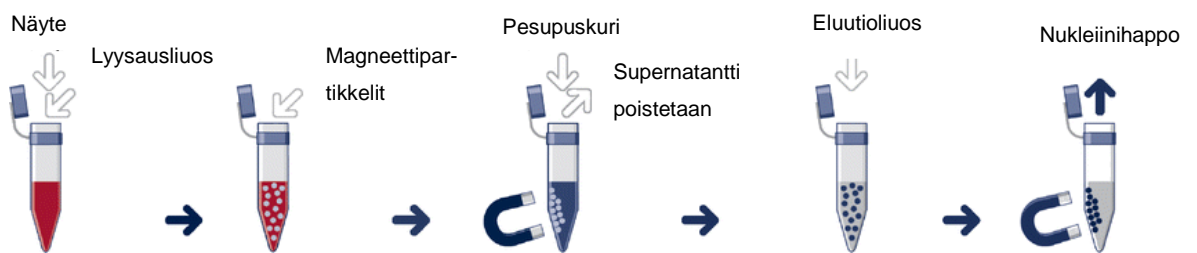
Magneettierotus perustuu para- ja ferromagneettisiin partikkeleihin, jotka on voitu päällystää erilaisilla apuaineilla, joista yksi on silika. Nykyisin on saatavilla useita erilaisia kaupallisia eristyskittejä, joiden toiminta perustuu magneettipartikkeleihin. (Berensmeier 2006. S. 495. Tan, Siun Chee. Yip, Beow Chin. 2009.)

Boom ym. ovat kehittäneet, nykyisin yhden kaikkein käytetyimmän nukleiinihappojen eristysmenetelmän. Metodi perustuu lyysauksen ja nukleaasien inaktivoimiseen kaotrooppisessa ympäristössä. Tässä menetelmässä nukleiinihapot sitoutuvat silikapartikkeleihin. Lyysaus-liuoksessa on käytetty guanidiinitiosyanaattia, joka inaktivoi tehokkaasti nukleaasien toimintaa ja puhdistaa nukleiinihappoja. (Boom ym. 1991. Dao ym. 2013. s. 1.)

Magneettipartikkeleilla on useita etuja verrattuna perinteisiin eristysmenetelmiin. Nukleiinihapon saa magneettisten partikkeleiden avulla eristettyä usein suoraan näytteestä, esimerkiksi verestä ja kasvatusalustasta. Lisäksi menetelmä on nopeampi verrattuna perinteisiin menetelmiin. Magneettipartikkelieristystä voi käyttää pienen mittakaavan

toimintaan, mutta se antaa mahdollisuudet myös suuremman mittakaavan, automatisoiduille puhdistuksille. (Berensmeier 2006. s. 495 - 496.)

Kuvassa 6 on esitelty magneettieristyksen vaiheet kaavakuvana. Eristys sisältää näytteen lyysausvaiheen, magneettipartikkeleiden lisäyksen, pesuvaiheet ja eluutiovaiheen. Magneettipartikkelimenetelmässä käytetään apuna magneettista työkalua, jolla magneettipartikkelit ja niihin assosioituneet nukleiinihapot saadaan eroteltua muusta näytteestä. Eluutioliuksen olosuhteet saavat nukleiinihapot huuhtoutumaan magneettipartikkeleiden pinnalta. (Berensmeier 2006. s. 497. Tan, Siun Chee. Yip, Beow Chin. 2009.)



Kuva 6. Kaavakuva nukleiinihappojen magneettipartikkelieristyksestä (Mukaihen Berensmeier 2006. s. 497.)

Magneettipartikkeleiden halkaisijat vaihtelevat 0,5 ja 10 μm välillä. Mitä suurempi pinta-ala partikkeleilla on, sitä enemmän ne pystyvät sitomaan nukleiinihappoja itseensä. Magneettipartikkeleita on mahdollista päällystää usealla eri tavalla ja eri yhdisteillä. (Berensmeier 2006. s. 497.)

Nukleiinihapon sitominen magneettipartikkeleihin on eristyksessä kriittinen vaihe. Vaikka sekä nukleiinihapot että magneettipartikkelit ovat molemmat negatiivisesti varautuneita, saadaan liuoksen kaotrooppisilla olosuhteilla ne vetämään toisiaan puoleensa. (Smerkova ym. 2013. s.68. Berensmeier 2006. s. 498 - 499.)

Eluutiovaiheessa nukleiinihapot irrotetaan magneettipartikkelien pinnalta ja näin puhdistettu nukleiinihappo saadaan liuokseen jatkokäsittelyä varten. Eluutioliuksen reagensseilla sekä muilla olosuhteilla on merkitystä saantoon. On tutkittu, että Tris-EDTA-puskurilla, jonka pH on 9, on DNA-pitoisuus korkein. (Smerkova ym. 2013. s. 69.)

7 Työn tarkoitus

Insinööriyössä tutkitaan Juha Saharisen Orion Diagnostica Oy:lle jatkokehittämää nukleiinihappoeristysmenetelmää, joka pohjautuu Boomin menetelmään. Koska menetelmä on vasta tuotekehitysvaiheessa, ei sen toimintaperiaatetta voida tarkemmin esitellä. (Boom ym. 1991. Flinck. 2015.)

Tavoitteena oli optimoida menetelmä sopimaan rotavirukselle ja mahdollistaa menetelmän käyttö myös muille RNA-viruksille. DNA:n eristykseen menetelmää oli jo aiemmin käytetty onnistuneesti, mutta sitä ei ollut käytetty RNA-viruksille. Lisäksi haluttiin myös kehittää eri vaiheissa käytettäviä puskureita Orion Diagnostican vaatimusten perusteelta.

Työn lähtökohtana oli saada eristettyä mahdollisimman paljon RNA:ta näytteestä. Menetelmän kehittämisen perusajatuksena oli saada eristyksestä mahdollisimman suuri saanto RNA:ta. Orion Diagnostican tavoite on saada näytteenkäsittelymenetelmä käyttöön yhdessä SIBA-tekniikan (Strand Invasion Based Amplification) kanssa ja tämä menetelmä vaatii suuremman templaattimäärän käytettäessä GenRead -laitetta ja siihen kuuluvia kylmäkuivattuja reagensseja. SIBA-menetelmä perustuu isotermiseen nukleiinihappojen monistumiseen. (Proudly presenting SIBA.)

8 Materiaalit ja menetelmät

Insinööriyön kokeellinen osuus kesti yhdeksän viikkoa. Tämän aikana suoritettiin PCR:n pystytys ja kehitettiin näytteenkäsittelymenetelmän.

8.1 Rotavirusnäytteet

Insinööriyön aikana varsinaisia kliinisiä näytteitä ei ollut saatavilla. Kliinistä näytettä mallinnettiin siirrostamalla viljeltyä rotaviruskantaa ulosteeseen. Koska ulosteeseen taudin aikana erittyvän rotaviruksen määrä on tiedossa, käytettiin näytteissä tätä määrää.

Työssä käytetty rotaviruskanta on Wa-kanta (ATCC No. VR-2018) Kannan alkuperäinen lähde on ripuliuloste rotaviruspositiiviselta potilaalta. Liitteessä 1 on esitetty American Type Culture Collectionin todistus rotaviruskannasta. (ATCC.)

Käytettävä rotavirus kanta on analysoitu Helsingin Yliopiston toimesta (Liite 2). Analysoinnin mukaan rotavirusta on suspensiossa $1,43 \cdot 10^{12}$ PCR-yksikköä/ml. PCR-yksikkö on testikohtainen suure, joka on määritelty standardisuoraan käytetyn virusgenomin laimennussarjan avulla. Se ei suoranaisesti korreloi virusgenomin määrää, mutta on riittävä tarkkuus tässä vaiheessa tuotekehitystä. (Liite 2.)

Käytetty rotavirussuspensio on puhdistettu Orion Diagnostican sisäisten protokollien mukaisesti ja saattaa sisältää isäntäsolun soluja sekä elatusainetta.

8.2 PCR-alukset ja RT-PCR -protokolla

PCR-menetelmää varten etsittiin tieteellisistä julkaisuista sopivia alukkeita rotaviruksen osoittamiseksi näytteistä. Käytettäviksi alukkeiksi valikoituivat taulukossa 3 esitetyt alukkeet.

Taulukko 3. Rotavirus alukkeet

RW: Rota VP7-R(Wa)	5'- TACTTGCCACCACTTTTTCC
FW: Rota VP7-F2	5'-GCTCYTTTTRATGTATGGTATTGAATATACCAC

Alukkeiden kohdesekvenssinä on rotaviruksen *virusproteiini 7 (vp7)*, joka koodaa rotaviruksen uloimmaisen kuoren glykoproteiinia. Liitteessä kolme on esitetty *vp7* sekvenssi. Reverse-aluketta (Rota VP7-R(Wa)) on muokattu kannan mukaiseksi vaihtamalla kaksi nukleotidiä toiseksi. Taulukossa 4 on esitetty muokattu aluke verrattuna artikkelissa esiintyvään alkuperäiseen alukkeeseen.

Taulukko 4. Muokattu reverse-alue

RW:Rota VP7-R(Wa)	5'- TACTTGCCACCACTTTTTCC
RW:Rota VP7-R	5'- AACTTGCCACCATTTTTCC

Rotaviruksen sekä one-step että two-step PCR-menetelmien käytettävät protokollat ja vaadittavat reagenssit on esitetty liitteessä neljä. Two-step-menetelmän reagenssien

lähteenä on ollut Lönnrotin ym. entero- ja rinovirusia käsittelevästä artikkelista. One-step PCR-menetelmän lähteenä on ollut DiStefanon ym. kirjoittama tieteellinen artikkeli. (Lönnrot ym. DiStefano ym.)

8.3 Nukleiinihappopitoisuuden mittaaminen Qubit Fluorometer -laitteella

Qubit Fluorometer 2.0 -laitteella (kuva 7) on mahdollista mitata näytteessä olevien nukleiinihappojen ja proteiinien pitoisuus. Perinteisesti nukleiinihappopitoisuudet on todettu mittaamalla näytteen absorbanssi aallonpituudella 260 nm. Tällä ei voida kuitenkaan erotella näytteessä olevia proteiineja ja nukleiinihappoja toisistaan. Absorbanssi -arvo on myös hyvin herkkä muille kontaminaatioille, kuten esimerkiksi suoloille ja orgaanisille yhdisteille. (Qubit.)

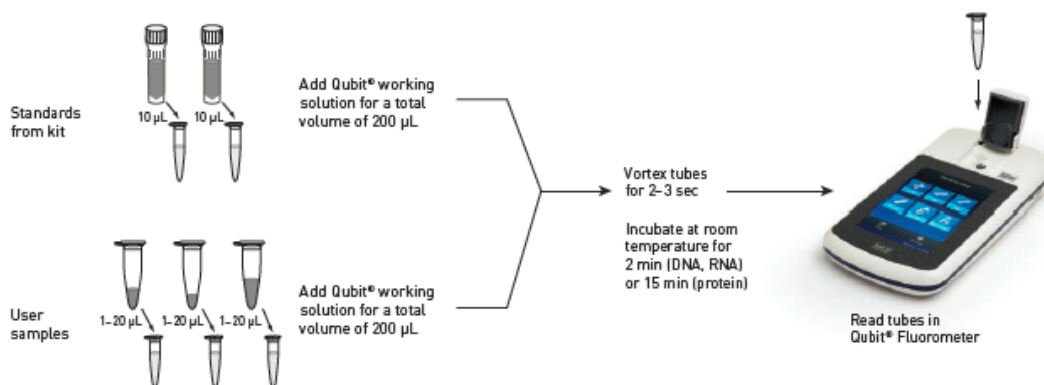


Kuva 7. Qubit Fluorometer 2.0 (Qubit® 2.0 Fluorometer)

Qubitia valmistava Life Technologies lupaa, että Qubitin-metodi on selektiivisempi ja herkempi kuin muut markkinoilla olevat menetelmät. Vain 1-20 µl näytettä on riittävä määrä mittausta varten. Kuvassa 8 on esitettyä kaavakuvana laitteen toiminta. Laitteelle tulee jokaisen käyttökerran aluksi kalibroida standardiliuoksilla. Näiden avulla muodostetaan standardisuora, johon näytteitä verrataan. Varsinainen näyte on sekoitettava työskentelyliuokseen ja inkuboitava huoneenlämmössä mitattavasta kohteesta riippuen 2 tai 15 minuuttia. Laitteen antama tulos on laskettava auki kaavalla:

$$\text{Näytteen konsentraatio} = QF - arvo \times \frac{200}{x}$$

jossa QF on laitteen antama arvo ja x mittaukseen laitetun näytteen tilavuus. (Qubit. Qubit® RNA HS Assay Kits.)



Kuva 8. Qubit-laitteen toimintaperuste. (Qubit.)

Tässä työssä käytettiin RNA-pitoisuuden mittaukseen Qubit® RNA HS Assay Kittä. Kyseinen kitti voi mitata RNA pitoisuuden välillä 5 ng/ml – 1000 ng/ml. (Qubit® RNA HS Assay Kits.)

8.4 Vertailumenetelmä

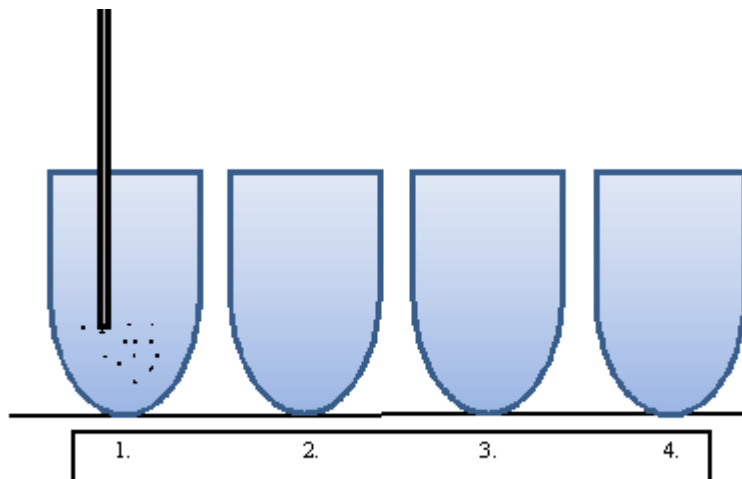
Tutkittavan menetelmän vertailumenetelmänä käytetään Qiagen EZ1-eristysmenetelmää, joka perustuu magneettisiin silikananopartikkelihin. Käytettävä menetelmä sopii useille näytemateriaalille kuten virtsalle, seerumille, ulosteelle ja eri organismeille. Eri näytemateriaalit vaativat erilaisen käsittelyn ennen eristyksen aloittamista. EZ1 eristysmenetelmässä on neljä vaihetta: lyysaus, nukleiinihappomolekyylien sitominen magneettipartikkeleihin, pesu ja eluointi. (EZ1 DSP Virus Kit Handbook, s.5-7)

Eristyksen ensimmäinen vaihe, proteolyysi, suoritetaan korkeassa lämpötilassa, olosuhteiden ollessa hyvin denaturoivat. Lyysauksessa on mukana proteiinikinaasi-K ja lyysauspuskuri, jotka yhdessä saavat virionin kapsidit hajoamaan ja nukleaasit inaktivoitumaan. Seuraavassa vaiheessa lyysattu näyte sekoitetaan magneettisten partikkeleiden joukkoon, jotta nukleiinihapot voivat sitoutua. Olosuhteet on säädetty suolapitoisuuden ja pH:n avulla optimaaliseksi magneettisten partikkeleiden ja nukleiinihapon

sitoutumiselle. Kun nukleiinihappo on saatu sidottua magneettipartikkeleihin, suoritetaan pesu, kahdella eri puskurilla. Lopuksi eristetty nukleiinihappo eluoidaan eluutiopuskuriin (AVE). Tarvittaessa eristetyn näytteen voi säilyttää myöhempää käyttöä varten. (EZ1 DSP Virus Kit Handbook, s.6 - 7)

8.5 Kehitettävä menetelmä

Kehitettävä menetelmä sisältää neljä eri vaihetta, jotka on esitetty kuvassa 9. Ensimmäisessä vaiheessa suoritetaan solukalvojen hajotus ja nukleiinihapon sitominen magneettisiin partikkeleihin. Lyysaus suoritetaan guanidiinitiosyanaatin läsnä ollessa. Magneettisiin partikkeleihin sitoutuneet nukleiinihapot siirretään pesuvaiheisiin magneettivarren avulla. Pesuliukokset sisältävät natriumkloridia ja etanolia. Neljännessä vaiheessa nukleiinihappo eluoidaan eluointiliuokseen.



Kuva 9. Kehitettävän näytteenkäsittelymenetelmän työvaiheet kaavakuvana.

9 Tulokset ja tulosten tulkinta

9.1 PCR

Työssä kokeiltiin sekä two-step- että one-step-menetelmää. One-step-menetelmää käytettiin pääasiallisesti kahdesta syystä: sen suorittaminen on yksinkertaisempaa, koska erillinen RT-reaktio jää välistä, jolloin myös pipetointi, sekä muiden mahdollisten virhelähteiden määrä vähenee. Taulukossa 5 on vertailtu näiden menetelmien C_T -aikoja, joista voidaan havaita one-stepin olevan hieman nopeampi.

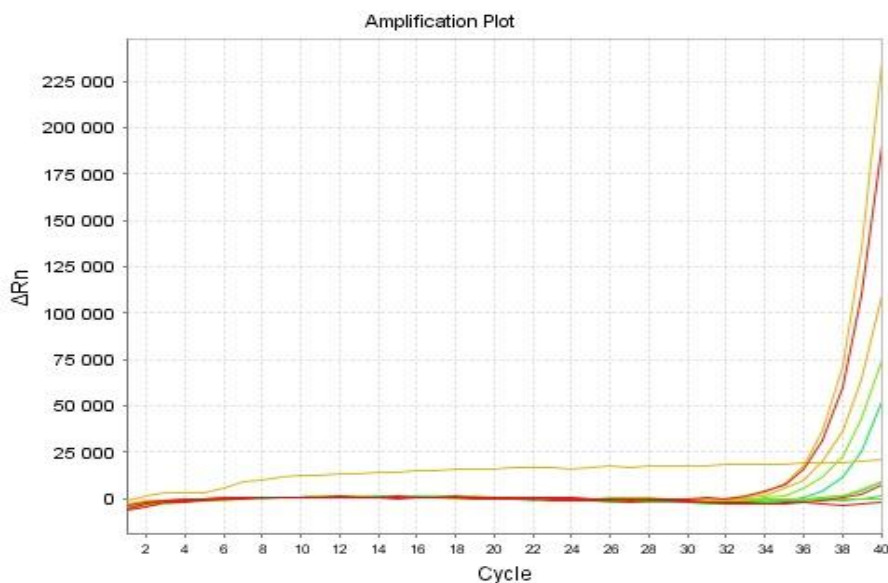
PCR-menetelmien pystyttämisessä näytteenä käytettiin EZ1-eristysrobotilla eristettyä rotavirus RNA:ta. Tämä laimennettiin kahteen eri pitoisuuteen (1:10 ja 1:100). One-step kokeessa 1:1 pitoisuus ei monistunut.

Taulukko 5. Rotaviruksen RT-PCR menetelmien vertailu C_T -aikojen perusteella

	Two-step	One-step
	C_T	C_T
1:1	22,1	-
1:1	22,1	-
1:10	24,2	14,0
1:10	23,8	15,0
1:100	27,5	15,3
1:100	27,4	17,6

9.2 Näytteenkäsittelymenetelmän puskurien kehittäminen

Näytteenkäsittelymenetelmän kehittäminen aloitettiin lyysauspuskurin kehittämisellä. Lähtökohdaksi otettiin lyysauspuskuri, jota tästä eteenpäin nimellä LBB1 (lyysis binding buffer 1). Se on kehitetty alun perin Boomin menetelmän (Boom ym.) perusteella, sisältäen guanidiinitiosyanaattia. Kuvassa 10 näkyy LBB1:llä tehty eristyminen. Monistumista tapahtuu, mutta RNA:ta eristyi ilmeisesti hyvin vähäisiä määriä.

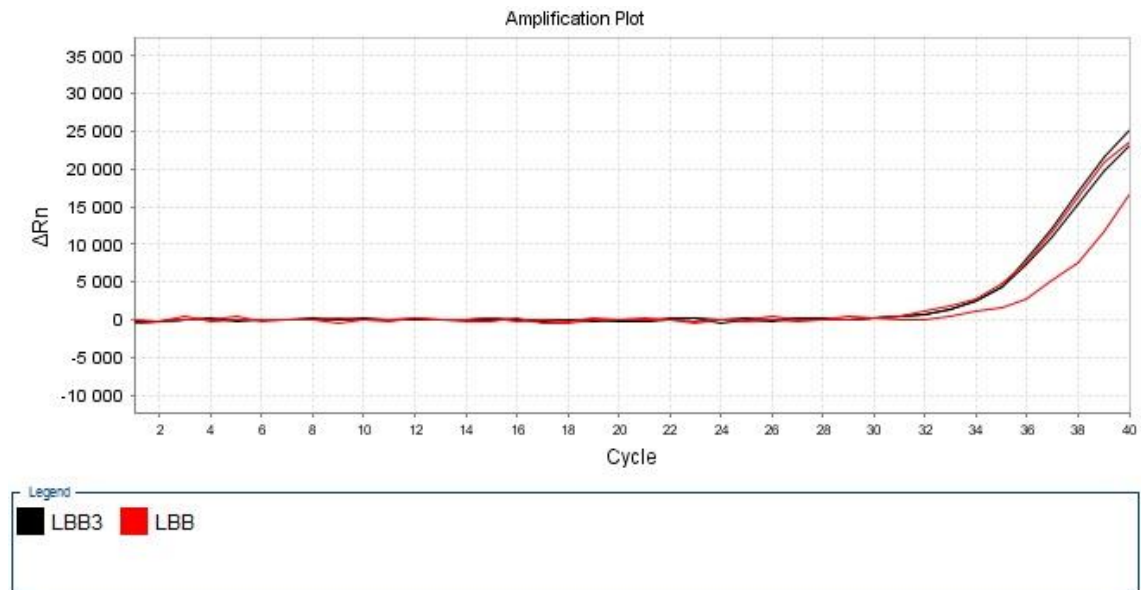


Kuva 10. LBB1:llä tehdyt eristykset.

Eristymisen tehokkuutta pyrittiin kehittämään uusilla puskureilla, joista tässä tapauksessa tehokkaammaksi valikoitui puskuri LBB3. Se sisältää guanidiiniatiosyanaattia matalamassa konsentraatiossa verrattuna aiemmin kehitettyyn puskuriin ja lisäksi litiumkloridia. Samassa kokeessa kokeiltiin useampaa variaatiota guanidiiniatiosyanaatin ja litiumkloridin suhteen.

Litiumkloridi auttaa nukleiinihappoja sitoutumaan magneettisiin partikkeleihin. Alkalimetallien ja kloridin muodostamat yhdisteet saavat aikaan nukleiinihappojen ja magneettisten partikkelien sitoutumisen tiukemmin toisiinsa. (Himmelreih ym. Smerkova ym. . 68 - 69)

Kuvassa 11 on esitettyä uudella puskurilla (LBB3) suoritettu eristyminen verrattuna aiemmin käytettyyn. Ero ei ole suuri verrattuna aikaisempaan, varsinkaan graafisesti tulkittuna mutta tutkimuksia haluttiin kuitenkin jatkaa kyseisellä puskurilla, tiedostaen että litiumkloridia käytetään esimerkiksi EZ1- eristysrobotin reagensseissa. (Himmelreich Ralf. Werner Sabine. 2009. s. 7.)



Kuva 11. LBB3 verrattuna LBB1. Graafisesti ero kahden puskurin välillä ei ole selkeä, mutta Qubit-mittaus tuki valintaa.

Eristymistä tutkittiin myös mittaamalla eristetyn RNA:n pitoisuus Qubitin RNA HS Kitillä. Tämä kitti ei pysty määrittämään näytteiden RNA-pitoisuutta, jos saanto jää alle 0,5 µg/ml. Taulukossa 6 on esitetty Qubit-mittauksen tulokset. Taulukossa on vertailtu eri lyysauspuskureita (LBB1, LBB3, LBB4), joista jokaisessa on guaniniinitiosyanaattia ja litiumkloridia eri pitoisuuksissa. Qubit-mittaus tuki ajatusta siirtyä käyttämään lyysauspuskuria numero kolme. Tosin mittaustulokset ovat lähellä herkkyysrajaa, joten tulokset eivät ole täysin luotettavia.

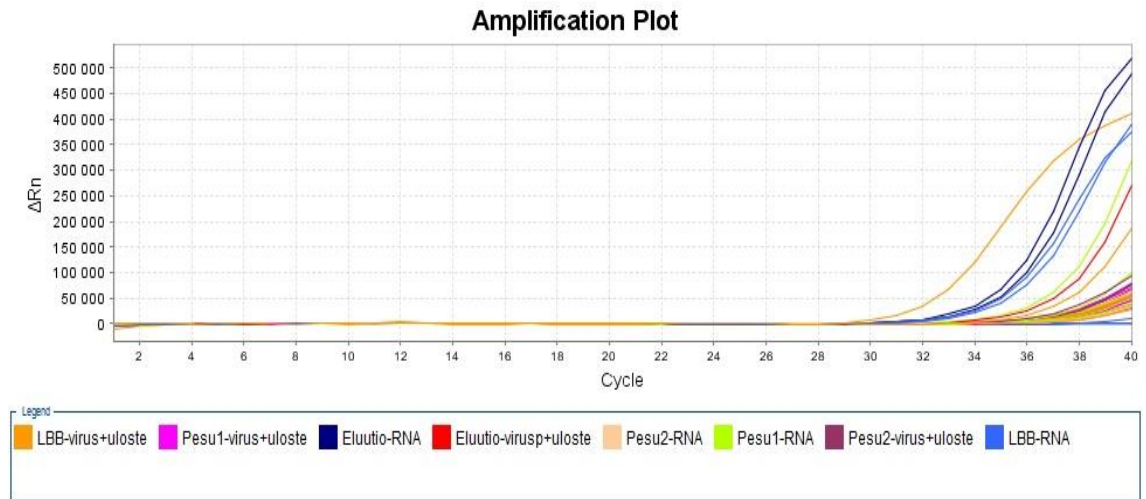
Taulukko 6. RNA-pitoisuudet mitattuna Qubitilla

	Viruspartikkelia/ml	Näyte	LBB	RNA $\mu\text{g/ml}$
1	10^{10}	uloste+viruspartikkelit	1	1,89
2	10^{10}	uloste+viruspartikkelit	1	1,97
3	10^{10}	viruspartikkelit	1	<0,5
4	10^{10}	viruspartikkelit	1	<0,5
5	10^{10}	uloste	1	2,76
6	10^{10}	uloste+viruspartikkelit	3	3,62
7	10^{10}	uloste+viruspartikkelit	3	4,16
8	10^{10}	viruspartikkelit	3	<0,5
9	10^{10}	viruspartikkelit	3	<0,5
10	10^{10}	uloste	3	6,49
11	10^{10}	uloste+viruspartikkelit	4	2,68
12	10^{10}	uloste+viruspartikkelit	4	3,58
13	10^{10}	viruspartikkelit	4	<0,5
14	10^{10}	viruspartikkelit	4	<0,5
15	10^{10}	uloste	4	3,36

9.3 Lyysausvaiheen tehostaminen

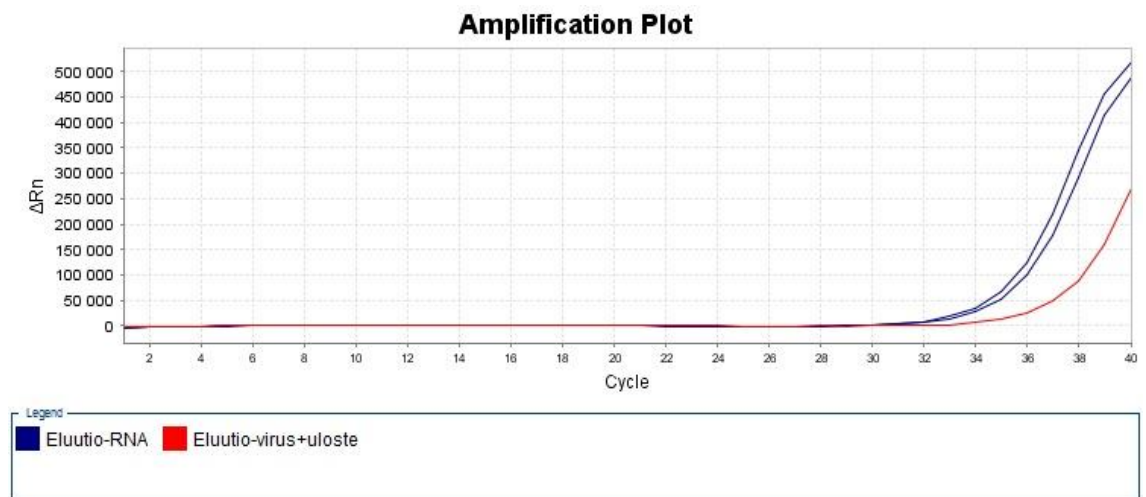
Menetelmän ongelmakohtia lähdettiin etsimään tutkimalla näytteenkäsittelymenetelmän eri vaiheisiin jäävää RNA:ta. Jokaisesta näytteenkäsittelyyn kuuluvasta vaiheesta otettiin näyte, jota laimennettiin PCR:ää varten. Menetelmissä käytettävät puskurit itsessään saattavat inhiboida PCR-reaktiota, jonka takia laimennus on tehtävä. Kokeilemalla löydettiin, että 1:50 laimennus on paras vaihtoehto niin RNA:n kuin PCR:n kannalta. Tässä laimennoksessa PCR:ää inhiboivat tekijät eivät vaikuttaneet PCR-menetelmän toimintaan merkittävästi, eikä RNA:n konsentraatio pudonnut liian alhaiseksi.

Haluttiin kuitenkin tutkia, mihin näytteenkäsittelymenetelmän vaiheeseen RNA:ta jää, eli mikä menetelmän vaihe kriittinen vaihe. Monistuskäyrä on esitettyä kuvassa 12. Eluutioliuosta ei ole laimennettu, joten sen RNA-pitoisuus näyttäytyy korkeampana.



Kuva 12. Eri eristysvaiheista otettujen näytteiden monistuskäyrät. Lyysauspuskurista monistuu huomattavan vähän RNA:ta, vaikka oletuksena siinä puskurissa sitä tulisi olla määrällisesti eniten.

Kun tutkittiin mihin vaiheeseen eristyksen aikana RNA:ta jää, todettiin että lyysauspuskurista otetusta näytteestä monistuu huomattavan vähän RNA:ta verrattuna eluutiopuskuriin. Tosiasiassa lyysauspuskurissa tulisi olla RNA:ta olla enemmän verrattuna eluutiopuskuriin. Kun siirrostetaan näytteeseen jo aiemmin eristettyä RNA:ta, sen eristyminen onnistuu hyvin. Viruspartikkelien sisällä olevaa RNA:ta on kehitettävällä menetelmällä vaikea saada eristymään. Kuvassa 13 voidaan havaita useiden syklien ero monistumisen alkamisessa.

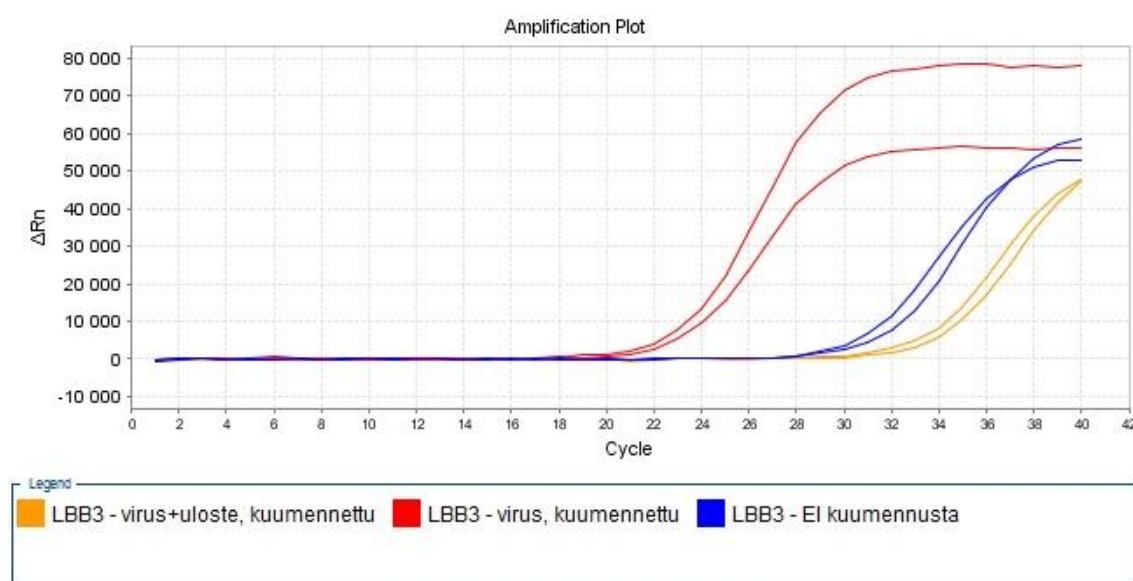


Kuva 7. Eluutiopuskurien monistuskäyrät. Uloste inhiboi RNA:n eristymistä näytteestä.

9.3.1 Kuumennuksen vaikutus lyysautumiseen

Rotaviruspartikkelien lyysautumista pyrittiin tehostamaan kuumentamalla näytettä korkeassa lämpötilassa useita minuutteja. Bakteerisolujen soluseinien ja –kalvojen hajottamiseen kuumennusta käytetään yleisesti. (Kado, C.I. ja Liu, S.T. 1981. s. 1366.)

Kuumennuksen vaikutusta tutkittiin vertaamalla kuumennuksen avulla lyysattuja näytteitä kuumentamattomiin. Kuumennus vaikuttaa selvästi menetelmän tehokkuuteen, kuten kuvasta 14 voidaan havaita. Solunäytteessä kuumennuksen vaikutus on merkittävä.



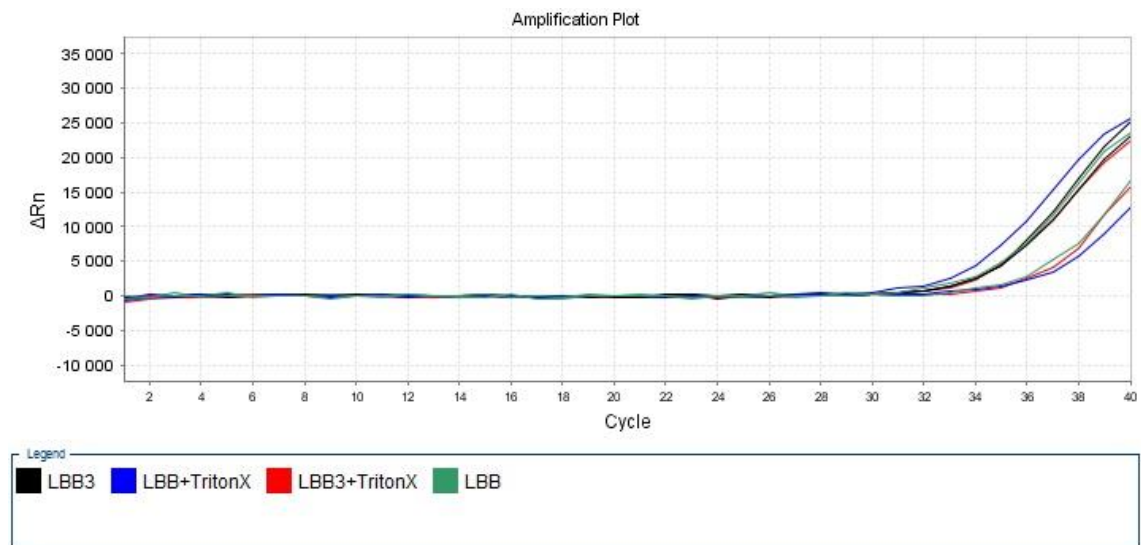
Kuva 14. Kuumennuksen vaikutus lyysautumiseen. Kuumennus tehostaa viruspartikkelin lyysautumista. Ulostenäytteen kanssa kuumennuksen vaikutus ei ole yhtä suuri kuin pelkillä viruspartikkeleilla.

Tällä tuloksella voidaan todeta, että ongelmakohta on todella viruspartikkelien lyysautuminen siihen tarkoitetussa LBB liuoksessa.

9.3.2 Lyysautumisen tehostaminen TritonX-detergentillä

World Health Organizationin (WHO) Manual of rotavirus detection and characterization methods –ohjeessa mainitaan, että rotaviruksen eristämässä käytetään TritonX-detergenttiä. Usein detergenttejä käytetään lyysauksen yhteydessä, auttamaan solukalvojen hajoamista. Artikkelin pohjalta suoritettiin koe, jossa lyysausliuoksen joukkoon lisättiin TritonX-reagenssia. Koe suoritettiin sekä LBB1:llä että LBB3:lla. Kuvasta 15

voidaan todeta, ettei tällä lisäyksellä ollut suurta vaikutusta lyysautumistehokkuuteen. (WHO, s. 55.)



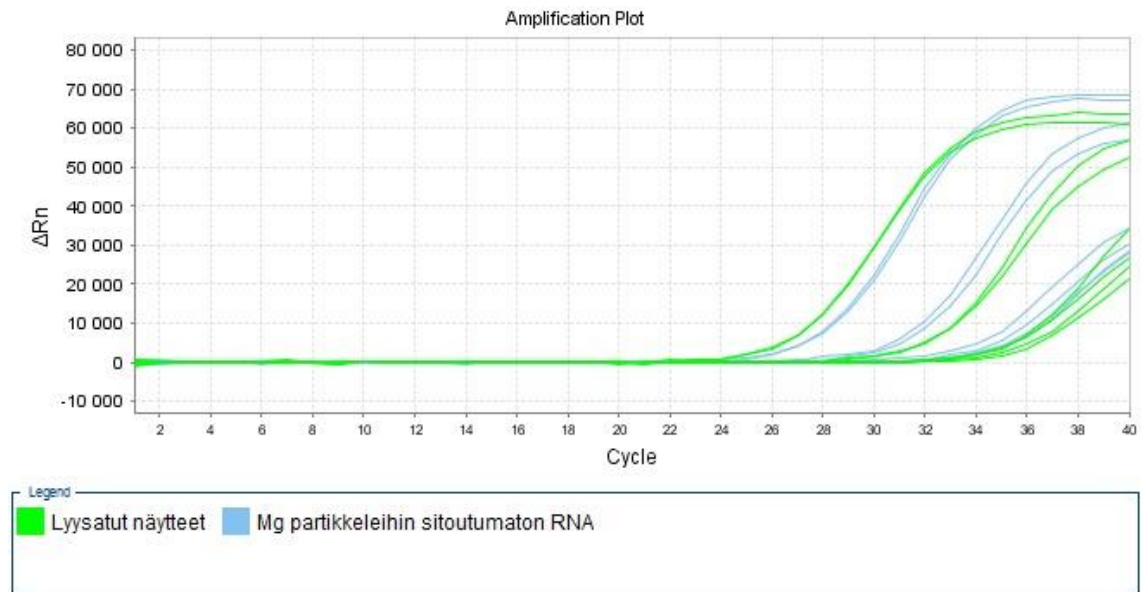
Kuva 85. TritonX vaikutus lyysautumiseen. TritonX:n lisäys ei vaikuta lyysautumistehokkuuteen.

Toisaalta, tässä kokeessa TritonX:n pitoisuus oli hyvin matala. Jos TritonX:n koettaisiin olevan ratkaisu ongelmaan, tulisi koe toistaa useammalla eri pitoisuudella. Tähän ei kuitenkaan ryhdytty, koska kuumennuksen vaikutus lyysautumiseen oli selvästi suurempi.

9.4 RNA:n sitoutuminen magneettipartikkeleihin

Näytteenkäsittelymenetelmään valitut magneettiset partikkelit ovat alun perin valittu DNA-eristystä varten. RNA:n eristyksestä ei näillä magneettipartikkeleilla ollut aikaisempaa kokemusta Orion Diagnostican tuotekehityksessä. Tämän vuoksi oltiin kiinnostuneita, kuinka hyvin magneettipartikkelit sitovat itseensä RNA:ta.

Kuvassa 16 on esitettyä rinnakkain rotavirus-RT-qPCR:n monistuskäyrät samoista eristyksistä, vihreällä värillä on kuvattuna monistuminen LBB3-liuoksesta otetusta näytteestä lyysauksen jälkeen. Kokeessa on käytetty kuumennusta yhdessä LBB3:n kanssa. Sininen väri kuvaa magneettipartikkeleihin sitoutumatonta RNA:ta, joka on jäänyt lyysauspuskuriin magneettipartikkelien keräämisen jälkeen.



Kuva 16. Magneettipartikkeleihin sitoutumaton RNA. Näyte PCR-reaktiota varten on otettu magneettipartikkeleiden keräyksen jälkeen, jolloin on selkeästi havaittavissa, että lyysauspuskuriin jää jäljelle paljon RNA:ta.

Taulukossa 7 on esitetty kahden rinnakkaisen näytteen rotavirus-RT-PCR:n C_T -aikojen keskiarvot. Toisessa sarakkeessa on lyysatusta näytteestä vähennetty magneettipartikkeleiden keräämisen jälkeen otetun näytteen C_T -aika. Tästä voidaan havaita, että magneettipartikkelit eivät sido RNA:ta tarpeeksi.

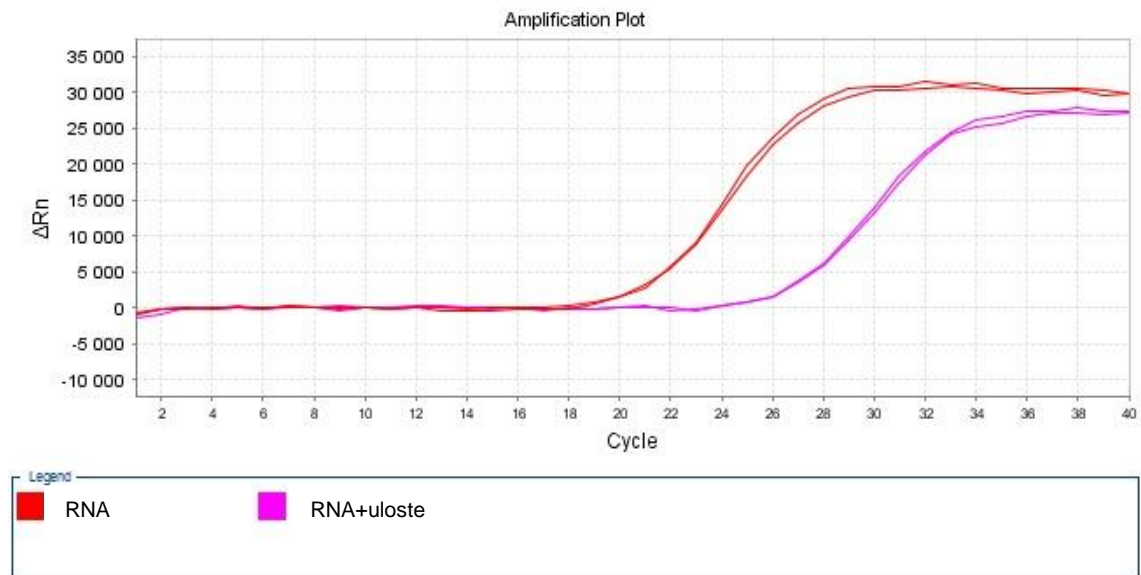
Taulukko 7. C_T -aikojen ero ennen magneettipartikkeleita ja niiden pois keräämisen jälkeen.

	C_T aikojen keskiarvo	Erotus
Lyysatut näytteet	31,50	1,19
Mg partikkeleihin sitoutumaton RNA	30,31	
Lyysatut näytteet	25,96	-0,86
Mg partikkeleihin sitoutumaton RNA	26,82	
Lyysatut näytteet	35,29	1,10
Mg partikkeleihin sitoutumaton RNA	34,19	
Lyysatut näytteet	35,45	0,97
Mg partikkeleihin sitoutumaton RNA	34,48	

9.5 Näytemateriaalin aiheuttama inhibitio

Uloste on näytemateriaalina hyvin vaikea. Ulosteen mukana elimistöstä erittyä pois paljon erilaisia mikrobeja, sekä aineita joita elimistö ei pysty käyttämään hyväkseen. Yhtenä haasteena nähtiin RNA:n eristäminen ulosteesta.

Ulosteen vaikutus RNA-eristykseen tutkittiin koejärjestelyllä, jossa ulosteeseen siirrotettiin jo aiemmin eristettyä RNA:ta. Tätä verrattiin näytteeseen, jossa oli vain RNA:ta, ei ollenkaan näytematriisia. Kuvassa 17 nähdään, kuinka pelkkää jo aiemmin eristettyä RNA:ta eristettäessä uloste inhiboi eristystä huomattavasti. Eristettäessä rotaviruspartikkeleita soluista, näytemateriaalin aiheuttama inhibitio on vielä huomattavampi. Taulukossa 8 on C_T -aikojen vertailu.



Kuva 17. Näytemateriaalin aiheuttama inhibitio eristymisessä. Kokeessa on siirrostettu ulostenäytteen jo aiemmin eristettyä RNA:ta ja toinen näyte sisältää vain aiemmin eristettyä RNA:ta

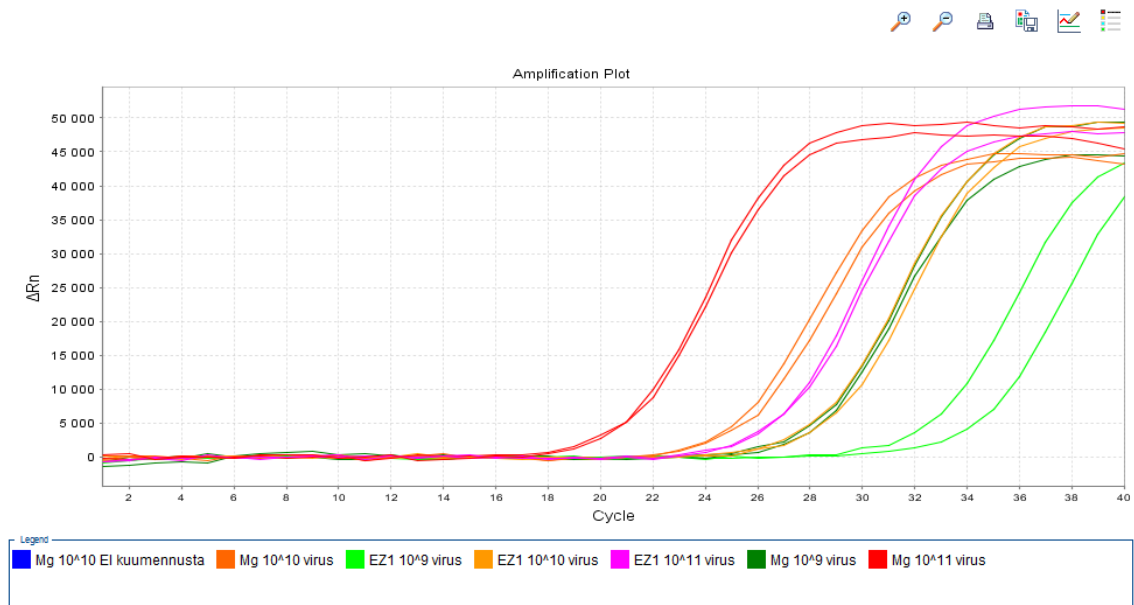
Taulukko 8. Näytemateriaalin aiheuttama inhibitio

	C_T-aikojen keskiarvot	Ero
RNA	17,92	6,22
RNA+uloste	24,14	
Solut	19,94	9,84
Viruspartikkelit+uloste	29,78	

9.6 Näytteenkäsittelymenetelmä verrattuna EZ1-eristysrobotin DSP Virus Kit menetelmään

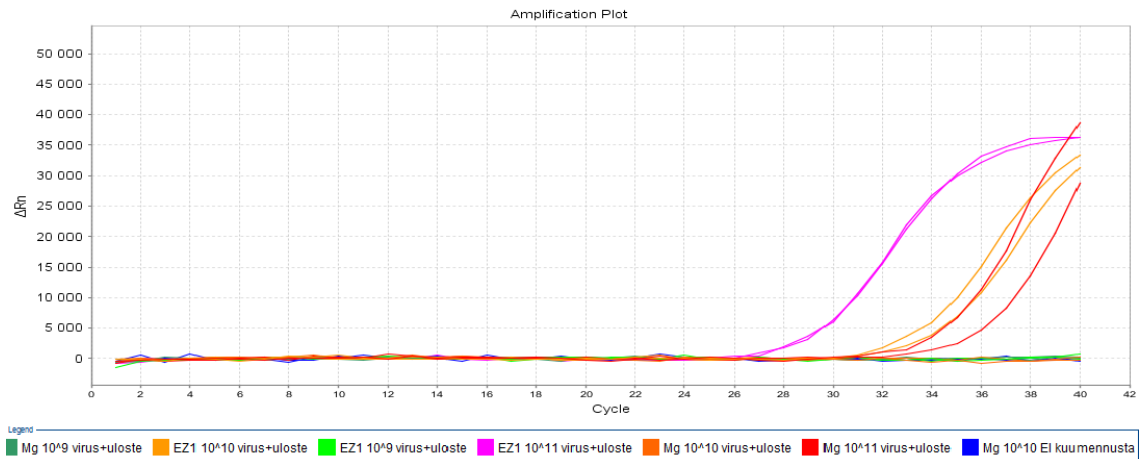
Insinööriyön aikana pyrittiin kehittämään ja optimoimaan näytteenkäsittelymenetelmää rotavirukselle. Lopuksi haluttiin verrata menetelmää kehiteltyjen asioiden kanssa jo markkinoilla olevaan menetelmään. Tuloksia verrataan C_T -aikojen perusteella.

Kuvassa 18 on esiteltyinä monistuskäyrät kokeesta, jossa verrataan toisiinsa EZ1-eristysrobotin DSP Virus Kittä kehitettävään näytteenkäsittelymenetelmään virusnäytteellä. Kokeesta selvisi, että insinööriyön aikana kehitetyn puskurin ja kuumennuksen avulla RNA:n saanto, C_T -aikojen perusteella tulkittuna, on merkittävästi parempi. Kehitettävällä menetelmällä saadaan eristettyä jopa enemmän RNA:ta näytteistä, joissa on vain rotaviruspartikkeleja, kuin EZ1:n menetelmällä.



Kuva 18. Kehitettävän menetelmän vertailu EZ1-eristysrobotin DSP Virus Kittiin. Kyseessä viruspartikkeleja sisältävät näytteet.

Kuvassa 19 on esitettyinä saman kokeen näytteet, joissa rotaviruspartikkelit on siirretty ulostenäytteeseen. Näin verrattuna kaupallinen menetelmä on tehokkaampi. EZ1-robotilla eristetty, korkeimman viruspitoisuuden sisältävän näytteen, C_T -aika on selvästi pienin. Tästä voidaan päätellä sen sisältävän eniten rotaviruksen RNA:ta.



Kuva 19. Kehitettävän menetelmän vertailu EZ1-eristysrobotin DSP Virus Kittiin. Kuvassa esitettynä ulosteeseen siirrostetut viruspartikkeleja sisältävät näytteet.

Taulukossa 9 on esitettynä näytteiden C_T -ajat. Arvot ovat laskettu kahden rinnakkaisen näytteen keskiarvoista. Tästäkin taulukosta on selkeästi havaittavissa, että näytematriisi häiritsee näytteenkäsittelymenetelmällä eristettäessä RNA:n eristymistä huomattavasti. Taulukossa on myös verrattu LBB1 ja LBB3 toisiinsa. Eri lyysauspuskureiden välinen ero on merkittävä.

Taulukko 9. C_T -aikojen vertailu EZ1 ja kehitettävän näytteenkäsittelymenetelmän välillä

Näyte	C_T keskiarvo	Näyte	C_T keskiarvo
MG 10 ¹¹ viruspartikkelit	17,13	EZ1 10 ¹¹ viruspartikkelit	22,70
MG 10 ¹⁰ viruspartikkelit	21,71	EZ1 10 ¹⁰ viruspartikkelit	23,26
MG 10 ⁹ viruspartikkelit	23,81	EZ1 10 ⁹ viruspartikkelit	28,32
Mg 10 ¹⁰ viruspartikkelit, ei kuumennusta	29,64		
MG 10 ¹¹ viruspartikkelit +uloste	30,34	EZ1 10 ¹¹ solut+uloste	25,99
MG 10 ¹⁰ viruspartikkelit +uloste	-	EZ1 10 ¹⁰ solut+uloste	30,26
MG 10 ⁹ viruspartikkelit +uloste	-	EZ1 10 ⁹ viruspartikkelit +uloste	38,25
MG 10 ¹⁰ viruspartikkelit +uloste, ei kuumennusta	-		
MG 10 ¹¹ viruspartikkelit +ulosteLBB1	37,43		
MG 10 ¹⁰ viruspartikkelit +ulosteLBB1	36,22		

10 Pohdinta

Insinööriyön tarkoituksena oli kehittää rotavirukselle uutta silikamagneettipartikkeleihin perustuvaa näytteenkäsittelymenetelmää. Menetelmää ei ollut aiemmin käytetty RNA-viruksille Orion Diagnosticalla ja tämän työn aikana saatiin arvokkaita tuloksia, joiden pohjalta näytteenkäsittelymenetelmän kehittämistä voidaan jatkaa.

Kehitystyössä havaittiin seuraavat haasteet: rotaviruspartikkeleiden hajoaminen ei onnistunut toivotulla tavalla, näytteenkäsittelymenetelmässä olleet magneettipartikkelit eivät sitoneet RNA:ta yhtä hyvin kuin DNA:ta vastaavanlaisessa käsittelyssä ja näytematriisina toimiva uloste inhiboi RNA:n eristymistä huomattavasti. Näiden ongelmien selvittämiseen tarvitaan jatkotutkimuksia. Itse näytteenkäsittelyprotokolla on hyvä ja helppo suorittaa, mutta jotta ongelmat saataisiin ratkaistua, on käytettäviä puskureita kehitettävä vielä lisää. Verrattuna kaupalliseen eristysmenetelmään, kehitettävä näytteenkäsittelymenetelmä toimii virusnäytteellä tehokkaammin.

Tutkimuksia tulisi jatkaa varsinkin lyysauspuskurin kanssa. Mahdollisesti erilaisten reagenssien lisääminen lyysauspuskuriin voisi parantaa lyysaustehokkuutta ja myös vähentää ulosteen häiritsevyyttä eristysmenetelmässä. Seuraavissa koejärjestelyissä voitaisiin tutkia kuumennusajan lyhentämistä.

Lisäksi olisi tärkeää vertailla eri valmistajien silikamagneettipartikkeleita, jotta nimenomaan RNA-eristystä varten löytyisivät parhaat mahdolliset partikkelit. Nyt käytössä olleet partikkelit soveltuvat aikaisempien tulosten mukaan hyvin DNA:lle, mutta RNA:n sitoutumisen tutkiminen olisi tärkeää.

Taulukkoon 10 on koottu työn aikana suoritettut kokeet ja niistä seuranneet päätelmät. Lisäksi taulukossa on pohdittu tarvittavia jatkotutkimuksia.

Taulukko 10. Insinööriyössä suoritettujen tutkimusten koonti: tulokset ja jatkotutkimusehdotukset

Koe	Tulokset	Jatkotutkimukset
PCR: one-step vs. two-step	One-step on herkempi ja sen käyttöön päädyttiin	One-step-menetelmän optimointi
Puskurien kehittäminen	LiCl:n lisäys lyysauspuskuriin Uusi guanidiinitiosyanaatti pitoisuus	Lyysipuskuri vaatii edelleen kehittystä, myös pesupuskureiden kehitys on tarpeellista
Eri vaiheisiin jäävä RNA	RNA:ta jää huomattava määrä lyysausliuokseen	Tarkemmat tutkimukset koskien muita eristyksen vaiheita
Lyysautumisen tehostaminen	a) Kuumennus - huomattava vaikutus virionien lyysautumiseen b) TritonX -tutkitulla matalalla pitoisuudella ei vaikutusta lyysautumiseen	a) - Kuumennusajan lyhentäminen - Eri reagenssikäsittelyt, esimerkiksi proteinaasi K b) - mahdollinen uusintakoe korkeammalla pitoisuudella
RNA:n sitoutuminen mageettipartikkeleihin	Sitoutuminen ei ole toivotua, RNA:ta jää paljon keräämättä	- Magneettipartikkelien määrän lisäys -Magneettipartikkelien eri valmistajien vertailu
Ulostenäyttemateriaalin aiheuttama inhibiitio	Uloste aiheuttaa nukleiinihapon eristymiseen merkittävää inhibiitiota	Inhibition vähentäminen esimerkiksi eri reagenssikäsittelyillä
EZ1 vs. kehitettävä menetelmä	Kehitettävä menetelmä eristää pelkistä rotaviruspartikkeleista enemmän RNA:ta kuin vertailumenetelmät. Toisaalta näyttemateriaalin kanssa EZ1 on tehokkaampi.	Suoritettava uudelleen kun menetelmää on kehitetty edelleen.

Samanaikaisesti tämän insinööriyön kanssa Orion Diagnostica Oy:n tuotekehityksessä tehtiin kaksi muutakin insinööriyötä kehitettävän näytteenkäsittelymenetelmän parissa: ”Uuden nukleiinihappoeristykseen pohjautuvan näytteenkäsittelymenetelmän kehittäminen rinovirukselle” (Elf 2015) ja ”Uuden nukleiinihappoeristykseen pohjautuvan näytteenkäsittelymenetelmän kehittäminen B. pertussikselle” (Auvinen 2015). Jokainen työ oli itsenäinen kokonaisuutensa, vaikkakin käytetyt menetelmät olivat pääosin samoja. Insinööritöiden aikana tehtyjen kokeiden tulokset tukivat toisiaan.

Lähteet

Al-Hello, Haider. Roivanen, Merja. Leino, Tuija. Elonsalo, Ulpu. Pirhonen, Jaana. Rotavirusinfektioiden seurantakäsikirja. 2014. Terveystieteiden tutkimuskeskus. Verkkopublication. Available at <http://urn.fi/URN:ISBN:978-952-302-317-8>

Auvinen, Pauliina. Uuden nukleiinihappoeristykseen pohjautuvan näytteenkäsittelymenetelmän kehittäminen *Bordetella pertussikselle*. 2015. Insinööri.

Berensmeier, Sonja. Magnetic particles for the separation and purification of nucleic acids. 2006. Appl Microbiol Biotechnol (2006) 73.

Boom, R. Sol, C. J. A. Salimans, M. M. M. Jansen, C. L. Wertheim-van Dillen, P. M. E. van der Noordaa, J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. 1990. Journal of Clinical Microbiology.

Boom, Willem R. Adriaanse, Henriette M. A. Kievits, Tim. Lens, Peter F. Process for isolating nucleic acid. 1991. Patentti. Available at <http://www.google.com/patents/US5234809>

CRP eli C-reaktiivinen proteiini. 2008. Verkkodokumentti. http://www.ekoweb.fi/images/pdf/CRP_Latexi.pdf Luettu 26.2.15

Dao, Van Quy . Nguyen, Minh Hieu. Pham, Thi Tra. Nguyen, Hoang Nam. Nguyen, Hoang Hai. Nguyen, Thai Son. Phan, Tuan Nghia. Ngyen, Thi Van Anh. Tran, Thi Hong. Nguyen, Hoang Luong. Synthesis of silica-coated magnetic nanoparticles and application in the detection of pathogenic viruses. 2013. Journal of Nanomaterials.

Desselberger, Ulrich. Rotaviruses. Virus Research. 2014.

DiStefano, Daniel J. Kraiouchkine, Nikolai. Mallette, Laura. Maliga, Marianne. Kulnis, Gregory. Keller, Paul M. Clark, H. Fred. Shaw, Alan. R. Novel Rotavirus

VP7 Typing Assay Using a One-Step Reverse Transcriptase PCR Protocol and Product Sequencing and Utility of the Assay for Epidemiological Studies and Strain Characterization, Including Serotype Subgroup Analysis. 2005. Journal of Clinical Microbiology.

Elf, Sonja. Uuden nukleinihappoeristykseen pohjautuvan näytteenkäsittelymenetelmän kehittäminen rinovirukselle. 2015. Insinööriö.

EZ1 DSP Virus Kit Handbook. 2010. Qiagen. Ohjekirja. Ladattavissa osoitteesta <<http://www.qiagen.com/fi/resources/resourcedetail?id=6185be15-b095-4c9c-b1ce-9915300b89bf&lang=en>>

Flink, Jenna. 2015. Suullinen tiedoksianto. 12.1.2015

Fraga, Dean. Tea Meulia. Steven Fenster. Current Protocols Essential Laboratory Techniques. 2008. John Wiley and Sons, Inc.

G-DiaNota. Real-Time PCR detection of Norovirus I/II and Rotavirus. 20.02.2015. Käyttöohje.

Hedman, Klaus. Heikkinen, Terho. Huovinen, Pentti. Järvinen, Asko. Meri, Seppo, Vaara, Martti. Infektiosairaudet. Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet 3. 2011. Duodecim. Helsinki.

Hedman, Klaus. Heikkinen, Terho. Huovinen, Pentti. Järvinen, Asko. Meri, Seppo, Vaara, Martti. Mikrobiologia. Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet 1. 2010. Duodecim. Helsinki.

Himmelreich Ralf. Werner Sabine. Method F method For isolating And Purifying Nucleic Acids. 2009. United States Patent Application Publication.

Human Wa rotavirus gene 9 for serotype-specific antigen VP7. NCBI. Verkkodokumentti. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/333800?report=fasta>> Luettu 3.4.2015.

Kado, C.I. ja Liu, S.T. Rapid Procedure for Detection and Isolation of Large and Small Plasmids. 1981. Journal of bacteriology. 1981, p. 1365-1373

Kansanterveyslaitoksen asettaman lasten rotavirusrokotustyöryhmän selvitys. 2007. Kansanterveyslaitos.

Kliinisen mikrobiologian ohjekirja. Verkkodokumentti. Etelä-Pohjanmaan sairaanhoito-piiri.

<http://www.epshp.fi/1/yksikoiden_sivut/sairaanhoidolliset_palvelut/kliininen_mikrobiologia/ohjekirja/tutkimuskohtaiset_ohjeet>. Luettu 6.1.2015.

Laboratoriokäsikirja. Verkkodokumentti. Yhtyneet Medix laboratoriot. <http://www.medix.fi/tuotekuvaus_show.php>. Luettu 6.1.2015.

Laboratorio-ohjekirja. Verkkodokumentti. Vaasan keskussairaala. <<http://www.vshp.fi/medserv/klkemi/fi/AAKKOSLISTA.HTM>>. Luettu 6.1.2015.

Laboratoriotutkimukset - mikrobiologia. Verkkodokumentti. Päijät-Hämeen sosiaali- ja terveystyöntekijä. <<http://www.phsotey.fi/sivut/sivu.php?id=3146&vy=4010&ryhma=444>>. Luettu 6.1.2015

Lönnrot, M. Sjöroos, M. Salminen, K. Maaronen, M. Hyypiä, T. Hyöty, H. Diagnosis of enterovirus and rhinovirus infections by RT-PCR and time-resolved fluorometry with lanthanide chelate labeled probes. 1999. Journal of Medical Virology.

Maunula, Leena. Virusstokkien pitoisuuden määrittäminen genomitestillä. 2014. Helsingin yliopisto. Elintarvikehygienian ja ympäristöterveyden osasto. Tutkimustodistus.

Mijatovic-Rustempasic, Slavica. Tam, Ka Ian. Kerin, Tara K. Lewis, Jamie M. Gautam, Rashi. Quaye, Osbourne. Gentsch, Jon R. Bowen, Michael D. Sensitive and Specific Quantitative Detection of Rotavirus A by One-Step Real-Time Reverse Transcription-PCR Assay without Antecedent Double-Stranded-RNA Denaturation. 2013 journal of Clinical Microbiology.

Mullis, Kary . Erlich, Henry. Arnheim, Norman. Horn, Glenn. Saiki, Randall. Scharf, Stephen. One of the first Polymerase Chain Reaction (PCR) patents. 1986. Patenttijulkaisu 28.7.1987. Patentihakemuksen numero US 06/828,144. Verkkodokumentti. <<http://google.com/patents/US4683195>>. Luettu 5.2.2015.

Ohjekirja (a). Verkkodokumentti. Fimlab laboratoriot Oy. <http://www.fimlab.fi/lake/ohje-kirja/index.tpl?sivu_id=194>. Luettu 6.1.2015

Ohjekirja (b). Verkkodokumentti. Tykslab. <<http://webohjekirja.mylabservices.fi/TYKS/>>. Luettu 6.1.2015.

Ohjekirja (c). Verkkodokumentti. Utulab. <<http://www.utu.fi/fi/yksikot/med/yksikot/utulab/ohjekirja/Sivut/home.aspx#R>> Luettu 6.1.2015

Proudly presenting SIBA – a novel and highly specific isothermal DNA amplification technology. Orion Diagnostica. Verkkodokumentti. <<http://www.oriondiagnostica.com/News-and-events/Proudly-presenting-SIBA--a-novel-and-highly-specific-isothermal-DNA-amplification-technology1/#.VRa94qPUjBk>> Luettu 28.3.15

Public Health Image Library. Verkkodokumentti. <<http://phil.cdc.gov/phil/home.asp>> Luettu 2.2.15

Qiuyan, Lou. Chong, Sonny K.F. Fitzgerald, Jean. A: Siders, Stephen D. Allen. Lee, Chao-Hung. Rapid and Effective Method for Preparation of Fecal Specimens for PCR Assays. 1997. Journal of clinical microbiology.

Qubit. Comparison of fluorescence-based quantitation with UV absorbance measurements. Tekninen muistio. Ladattavissa osoitteesta <<https://www.lifetechnologies.com/content/dam/LifeTech/global/life-sciences/Laboratory%20Instruments/Files/1014/Qubit-fluorometric-quantitation-vs-spectrophotometer-measurements.pdf>>

Qubit® 2.0 Fluorometer. 2010. Käyttöohje. Ladattavissa osoitteesta <<https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/mp32866.pdf>>

Qubit® RNA HS Assay Kits. Ohjekirja. Ladattavissa osoitteesta:
<<https://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/Q32852>>

Rotateq. Lääkeinfo. Verkkodokumentti.
<http://www.laakeinfo.fi/Medicine.aspx?m=15090&i=SANOFI+PASTEUR+MSD_R OTATEQ> Luettu 22.2.15

Rotavirus Test. Verkkodokumentti. <
http://www.oxid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=R240396>

Rotavirus, vasta-aineet. 2015. Huslab.< <http://huslab.fi/ohjekirja/55.html>> luettu
26.2.15

Rotavirustokote. 2013. Terveiden ja hyvinvoinnin laitos. Verkkodokumentti
<<http://www.thl.fi/fi/web/rokottaminen/rokotteet/rotavirusrokote>> Luettu 22.2.15.

Ruutu, Petri. Hulkko, Terhi. Lyytikäinen, Outi. Kuusi, Markku. Seppälä, Säde. Tar-
tuntataudit Suomessa 1995-2009. 2010. Terveiden ja hyvinvoinnin laitos. Raportti.
Ladattavissa osoitteesta
<<https://www.thl.fi/documents/10531/99473/Raportti%202010%2017.pdf>>

Rådström, Peter. Knutssin, Rickard. Wolffs, Petra. Lövenklev, Maria. Löfström,
Charlotta. Pre-PCR processing. 2004. Molecular Biotechnology.

Salminen, Mika. Jaakkola, Sari. Lyytikäinen, Outi. Rimhanen-Finne, Ruska. Sal-
menlinna, Saara. Savolainen-Kopra, Carita. Pirhonen, Jaana. Vuopio, Jaana. Jala-
va, Jari. Toropainen, Maija. Nohynek, Hanna. Toikkanen, Salla. Löflund, Jan-Erik.
Kuusi, Markku. Tartuntaudit Suomessa 2013. 2014. Terveiden ja hyvinvoinnin lai-
tos. Raportti. Ladattavissa osoitteesta <<http://urn.fi/URN:ISBN:978-952-302-190-7>>

Smerkova, Kristyna. Dostalova, Simona. Vaculovicova, Marketa. Kynicky, Jindrich.
Trnkova, Libuse. Kralik, Miroslav. Adam, Vojtech. Hubalek, Jaromir. Provaznik, Ivo.
Kizek, Rene. Investigation of interaction between magnetic silica particles and
lambda phage DNA fragment. 2013. Journal of Pharmaceutical and Biomedical
Analysis.

Suominen, Ilari. Pärssinen, Raimo. Haajanen, Kari. Pelkonen, Jani. Geenitekniikka. 2013. Turun ammattikorkeakoulu. Turku.

Tan, Siun Chee. Yip, Beow Chin. DNA, RNA, and Protein Extraction: The Past and The Present. 2009. Journal of Biomedicine and Biotechnology.

Tartuntautirekisteri. Verkkodokumentti. <<http://www.thl.fi/ttr/gen/rpt/tilastot.html>> Luettu 2.3.2015

The Complement Fixation Test. 2010. Texas Department of State Health Services. Verkkodokumentti.< http://www.dshs.state.tx.us/LAB/serology_cf.shtm> Luettu 12.2.2015.

Tutkimusohjekirja (a). Verkkodokumentti. Helsingin ja uudenmaan sairaanhoitopiiri. <<http://huslab.fi/ohjekirja/>>. Luettu 6.1.2015

Tutkimusohjekirja (b). Verkkodokumentti. Satakunnan sairaanhoitopiiri. <ohjekirja.satadiag.fi/>. Luettu 6.1.2015.

Tutkimusvalikoima. Verkkodokumentti. Nordlab Oulu. <<http://www.oyslab.fi/>>. Luettu 6.1.2015.

Wacker, Michael J. Godard, Michael P. 2005 Journal of biomolecular techniques. VOLUME 16, ISSUE 3, SEPTEMBER 2005

Ward P., Poitras E., Leblanc D., Gagnon C.A., Brassard J., Houde A., Comparison of different RT-qPCR assays for the detection of human and bovine group A rotaviruses and characterization by sequences analysis of genes encoding VP4 and VP7 capsid proteins. 2013. Journal of Applied Microbiology.

Web-ohjekirja. Verkkodokumentti. Itäsuomen laboratorokeskus. <<https://ekstra1.kuh.fi/csp/islabohje/labohje.csp>>. Luettu 6.1.2015.

WHO. Manual of rotavirus detection and characterization methods. 2009. Ladattavissa osoitteesta < http://whqlibdoc.who.int/hq/2008/who_ivb_08.17_eng.pdf>

Wilde, James. Eiden, Joseph. Yolken, Robert. 1990. Journal of Clinical Mikrobiology.

Wilde, James. Eiden, Joseph. Yolken, Robert. Removal of Inhibitory Substances from Human Fecal Specimens for Detection of Group A Rotaviruses by Reverse Transcriptase and Polymerase Chain Reactions. 1990. Journal of clinical microbiology.

ViralZone. Swiss Institute of Bioinformatics. Verkkodokumentti. <http://viralzone.expasy.org/all_by_species/107.html> Luettu 2.4.2015.

XPECT Rotavirus Test. Verkkodokumentti. <http://www.oxid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=R24655&c=UK&lang=EN> Luettu 1.3.15

American Type Culture Collectionin todistus rotaviruskannasta



AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION
12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852

COLLECTION OF ANIMAL VIRUSES, CHLAMYDIAE & RICKETTSIAE

ATCC NO: VR-2018

Permit: None

Classification: Rotavirus

Agent: Human rotavirus (Patent strain)

Strain: Wa (TC adapted)

Original Source: Diarrhea stool from patient positive for rotavirus

Reference: Wyatt, R. G. et al., Science (Washington, DC) 207:189-191, 1980,
U. S. Patent 4,341,870.

Host of Choice: Pr AGMKK

Incubation: 5-7 days, 37°C

Effect: CPE variable, plaques under agar, indirect immunofluorescent

Host Range: MA 104, CV-1 cells

Storage Temperature: -70°C

Vol./Ampule: 1.0 ml

FREEZE-DRIED Virus Lot 2D

Passage History: Gnotobiotic piglets/11; CV-1/2; MA104/2

Medium: Eagle's MEM + 20 ug/ml trypsin [NO FBS]

Antibiotics: None

Tested: 1/92

Titer: Positive by ELISA at 1:25 dilution

Preparation Prepared By: ATCC

Preparation Contributed By: NIAID, R.G. Wyatt

REMARKS: Also see Wyatt, R. G., & W. D. James. 1982. In vivo and in vitro
methods of culture. In: Virus Infections of the Gastrointestinal Tract. H.C.
Neu et al., editors. Marcel Dekker Inc.

Reconstitute to original volume with distilled water.

Note: This material is cited in a U.S. and/or other Patent and may
not be used to infringe the patent claims.

Rotaviruksen analysointi



Elintarvikehygienian ja ympäristöterveyden osasto
Agnes Sjöberginkatu 2
PL 66
00014 HELSINGIN YLIOPISTO

TUTKIMUSTODISTUS

Virusstokkien pitoisuuden määrittäminen genomitestillä

Aika: Lokakuu 2014

Tilaaaja: Orion Diagnostica Oy
Minna Mäki
PL 83, 02101 Espoo
puh. +358 50 966 5837
minna.maki@oriondiagnostica.fi

Laskutus: Orion Diagnostica Oy
OVT 003718552161
Viite: Minna Mäki

Tulokset:

	Adenovirusgenomi	Rotavirusgenomi
	Pcr yks/ml	Pcr yks/ml
Adenolex stock (type 3), erä 539901, 26.9.2003	8.90E+05	
Rota stock Wa strain erä 1514124, 28.2.2013, exp 2023-02-28		1.43E+12

*pcr-yksikkö on testikohtainen suure ja määriteltä siten, että standardisuoraan käytetyn virusgenomin laimennossarjassa laimein positiivinen laimennos on saanut arvon 1, toiseksi laimein arvon 10 jne. PCR:n tehokkuuden ollessa 100%, pcr-yksikkö vastaa genomikopiota.

Lausunto tuloksista:

Virusstokit analysoitiin reaaliaikaisella PCR- tai käänteiskopiointi-PCR- menetelmällä. Kvalitatiivisessa geenimonistuksessa laimentamaton adenovirus antoi ct-arvon 32 ja rotavirus, laimennettuna 1:10 ennen RNA-eristystä, antoi ct-arvon 9.5.

Virusgenomin pitoisuus määritettiin sekä standardisuoran (taulukko) ja että laimennossarjan avulla. Laimennettaessa adenoviruksen DNA:ta voitiin laimentaa laimennokseen 10^3 saakka (viimeinen positiivisen tuloksen antanut laimennos PCR-testissä). Rotavirus laimennettiin jo ennen RNA-eristystä 1:100 ja siitä eristetty RNA antoi signaalin vielä laimennoksessa 10^8 .

Virusgenomin määrä ei välttämättä korreloi viruspartikkelien määrään, etenkin, jos virusta on kasvatettu soluviljelmässä ja soluista vapautunutta viruksen genomimateriaalia on näytteessä mukana.

Helsingissä

Allekirjoitus

Pvm 06. 10. 2014

Leena Maunula

Leena Maunula, FT, dos.
mikrobiologi,
puh. 02941 57143 tai 040 838 4007
etunimi.sukunimi@helsinki.fi

Rotaviruksen *virusproteiini 7* sekvenssi

>gi|333800|gb|K02033.1|R029 Human Wa rotavirus gene 9 for serotype-specific antigen VP7

```
GGCTTTAAAAGAGAGAATTTCCGTCTGGCTAACGGTTAGCTCCTTTTAAATGTATGGTATTGAATATACCA
CAATTCTAATCTTTTTGATATCAATCATTCTACTCAACTATATATTTAAAATCAGTGACTCGAATAATGGA
CTACATTATATATAGATTTTTGTTGATTACTGTAGCATTATTTGCTTTGACAAGAGCTCAGAATTATGGA
CTTAACTTACCAATAACAGGATCAATGGACGCTGTATATACTAACTCTACTCAAGAAGAAGTGTTTCTAA
CTTCTACGTTATGTCTGTATTATCCAAGCAAGTACTCAAATCAATGATGGTGACTGGAAAGACTC
ATTGTCGCAAATGTTTCTTACAAAGGGTTGGCCAACAGGATCTGTTTACTTTAAAGAGTACTCAAATATT
GTTGATTTTTCTGTTGACCCACAGCTGTATTGTGACTATAATTTAGTACTTATGAAATATGACCAAAGTC
TTGAATTAGATATGTCAGAGTTAGCTGATTTAATATTGAATGAATGGTTATGTAACCCAATGGATGTAAC
ATTATACTATTATCAACAATCGGGAGAATCAAATAAGTGGATATCGATGGGATCATCATGTACCGTGAAA
GTGTGTCCGCTAAATACACAAACGTTAGGGATAGGTTGTCAAACAACAACGTTAGACTCATTGAAATGA
TTGCTGAGAATGAGAAATTAGCTATAGTGGATGTCGTTGATGGGATAAATCATAAAATAAATTTAACCAAC
TACGACATGTACTATTCGAAATTGTAAGAAATTAGGTCCAAGAGAAAAATGTAGCTGTAATACAAGTTGGT
GGTTCTAATGTGTTAGACATAACAGCAGATCCAACAATAATCCACAAACTGAGAGAATGATGAGAGTGA
ATTGGAAAAAGTGGTGGCAAGTATTTTATACTATAGTAGATTATATTAATCAAATGTACAGGTAATGTC
CAAAAGATCAAGATCATTAAATTCTGCAGCTTTTTATTATAGAGTATAGATATATCTTAGATTAGAATTG
TTCGATGTGACC
```

(Human Wa rotavirus gene 9 for serotype-specific antigen VP7.)

PCR -reagenssit ja -ohjeet**RT-PCR mix: One-Step**Lopputilavuus (μl) **50**

reagenssi	yksikkö	Alku konsentraatio	Loppu konsentraatio	1 reaktio μl
NFW				25,18
5* OneStep bufferi				10
SYBER GREEN		100	0,1	0,05
dNTP-seos				2
VP7-R(Wa)	pmol/ μl	100	0,6	0,3
VP7-F2	pmol/ μl	100	0,6	0,3
OneStep entsyymiseos				2
Rnaasi inhibiittori	U	40	0,14	0,2
Rotavirus	μl			10
			40	50

One-step Protokolla:

Käänteiskopiointi	50 °C	30 min	
PCR-entsyymien aktivointi	95 °C	15 min	
Denaturaatio	94 °C	45 s	40x
Annealing	54 °C	45 s	
Elongaatio	72 °C	1 min	
Elongaatio	72 °C	10 min	
Sulamispisteanalyysi	72-95 0,5 C incr., 1°C/5 s		

RT-PCR: Two-Step

cDNA mix denaturaatiota varten:

Lopputilavuus (µl)	40
--------------------	----

reagenssi	yksikkö	Alku konsentraatio	Loppu konsentraatio	1 reaktion µl
VP7-R-Wa	pmol/µl	100	1,25	0,5
Rotavirus RNA	µl			10

10,5

RNA denaturaatio 70 °C 10 min yhdessä reverse-alukkeen kanssa.

cDNA master mix

reagenssi	yksikkö	Alku konsentraatio	Loppu konsentraatio	1 reaktion µl
NFW				19,3
5* bufferi				8
dNTP	mM	10	0,5	2
Rnaasi inhibiittori	U	40	0,1	0,1
RT-entsyymi	U	200	0,5	0,1

Pipetoi 29,5 µl cDNA master mixiä jokaiseen näyteputkeen ja inkuboi 37-42 °C. Inkuboinin jälkeen siirrä kylmäblokkiin.

Reaktiitolavuus 25 μ l**PCR mix:**

reagenssi	yksikkö	Alku konsentraatio	Loppu konsentraatio	1 x (μ l)
NFW				7,2
VP7-VP7 F2	pmol/ μ l	100	0,6	0,15
VP7-R-Wa	pmol/ μ l	100	0,6	0,15
SyBR Green SuperMix (2X)				12,5
Pipetoi kaivoihin:			välisumma	20
Lisää cDNA templaattia:				5
			yhteensä	25

Two-step Protocol:

	95	15 min		
Denaturaatio	94	45 s		40x
Annealing	54	45 s		
Elongaatio	72	1 min		
Elongaatio	72	10 min		
Sulamispisteanalyysi	72-95 0,5 C incr., 1°C/5 s			