



**PCR-MENETELMÄN OPTIMOINTI**  
***nifH*-TYPENSITOJAGEENIN**  
**MONISTAMISEKSI TURVENÄYTTEISTÄ**

Hanna Kangas

Kehittämistehtävä  
Toukokuu 2010  
Solu- ja molekyylibiologian erikoistumisopinnot  
Tampereen ammattikorkeakoulu

TAMPEREEN AMMATTIKORKEAKOULU  
Tampere University of Applied Sciences

## TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu  
Solu- ja molekyylibiologian erikoistumisopinnot

KANGAS, HANNA:

PCR-menetelmän optimointi *nifH*-typensitojageenin monistamiseksi turvenäytteistä.

Kehittämistehtävä 34 s., liitteet 4 s.  
Toukokuu 2010

---

Polymeraasiketjureaktio eli PCR (Polymerase Chain Reaction) perustuu yksinkertaiseen tekniikkaan, jolla DNA:ta saadaan monistettua nopeasti tuhansiksi kopioiksi. PCR-menetelmä on optimoitava kullekin templaatti-alue-parille erikseen. Optimoinnissa on otettava huomioon reagenssimäärät ja lämpötilaohjelma. PCR-menetelmän eräs sovellys, nested-PCR, on tehokas tapa monistettaessa pientä DNA-määrää. Menetelmä koostuu kahdesta peräkkäisestä PCR-reaktiosta, joissa käytetään eri alukepareja. Kehittämistehtävän tarkoituksena oli optimoida PCR-menetelmä *nifH*-typensitojageenin monistamiseksi turvenäytteistä. Lisäksi työhön sisältyi DNA:n eristys turvenäytteistä.

Menetelmän optimoinnissa alukkeina käytettiin yksivaiheisessa PCR-reaktiossa PolF- ja PolR-alukkeita sekä nested-PCR-menetelmässä FGPH19–PolR- ja PolF–GC–AQER-alukepareja. Työssä optimoitiin reagenssimäärät ja lämpötilaohjelma. Näytteinä menetelmän optimoinnissa käytettiin kahden typensitobakteerin DNA:ta ja kahta pintaturvenäytesarjaa, joista toisesta eristettiin DNA kaupallisen kitin avulla. Toisen sarjan DNA oli eristetty jo aikaisemmin.

Käytettäessä nested-PCR-menetelmää saatiin monistettua haluttua geeniä. Nested-PCR-menetelmän suuresta herkkyystä johtuen reaktiossa monistui myös kaksi muuta tuotetta. Nostettaessa jälkimmäisen PCR-reaktion annealing-lämpötilaa saatiin ylimääräisten tuotteiden monistuminen heikkenemään. PolF–PolR-alueparilla ei saatu monistettua haluttua geeniä, vaan alukkeet muodostivat joko alukedimeerejä tai sekundäärirakenteita. Optimoinnin tuloksena *nifH*-geenin monistuksessa päädyttiin käyttämään nested-PCR-menetelmää, jossa alukkeina käytetään FGPH19–PolR- ja PolF–GC–AQER-alukepareja. PCR-reaktioissa käytetään eri annealing-lämpötiloja.

Näytteille voidaan tehdä jatkotoimenpiteinä denaturoivan gradientin geelielektroforeesi (DGGE) ja sekvensointi, jolloin saadaan selville, onko PCR-reaktiossa monistunut tuote *nifH*-geeni. Lisäksi PCR-reaktiossa monistunut tuote voidaan puhdistaa ennen sekvensointia kaupallisella kitillä, jossa halutut vyöhykkeet leikataan agarosigeelistä ja puhdistetaan.

## SISÄLLYSLUETTELO

1 JOHDANTO .....	4
2 PCR-MENETELMÄ.....	5
2.1 Periaate.....	5
2.2 Reagenssit .....	6
2.2.1 Templaatti .....	7
2.2.2 Alukkeet .....	7
2.2.3 Polymeraasi .....	9
2.2.4 Kationit.....	9
2.2.5 Nukleotidit .....	10
2.2.6 Tehostajareagenssit .....	11
2.3 Kontaminaatiot.....	11
2.4 PCR-sovelluksia.....	13
2.5 Agaroosigeelielektroforeesi .....	14
3 TYPENSIDONTA .....	15
3.1 Typensitobakteerit.....	16
3.2 <i>nifH</i> -typensitogeeni .....	16
4 TYÖN TARKOITUS JA TAVOITE .....	18
5 KOKEELLINEN OSA.....	19
5.1 Näytämateriaalit ja laitteet .....	19
5.2 Menetelmän optimointi .....	19
5.3 DNA-eristys .....	23
6 TULOKSET JA TULOSTEN TARKASTELU .....	24
7 PÄÄTÄNTÄ .....	27
LÄHTEET.....	29
LIITTEET	

## 1 JOHDANTO

PCR-menetelmällä saadaan tehokkaasti monistettua pienestäkin määrästä DNA:ta useita tuhansia kopioita. Kolmivaiheisessa PCR-reaktiossa templaatti-DNA:n juosteet irtoavat toisistaan, jotta alukkeet voivat kiinnittyä niille komplementaarisiin kohtiin. Polymeraasin avulla nukleotideistä muodostuu uusi vastinjuoste templaatile alukkeista alkaen. Jokaiselle templaatti-aluke-parille on suunniteltava optimaaliset reaktio-olosuhteet. Koska PCR-menetelmä on herkkä kontaminaatioille, on työskenneltäessä oltava erityisen tarkkaavainen reagenssien, välineiden ja työtilojen puhtauden suhteen. PCR-menetelmästä on olemassa erilaisia sovelluksia. Nested-PCR-menetelmällä saadaan tehokkaasti monistettua pienestä DNA-määrästä useita tuhansia kopioita. Menetelmä koostuu kahdesta peräkkäisestä PCR-reaktiosta, joista jälkimmäisessä käytetään templaattina ensimmäisen reaktion tuotetta. Reaktioissa käytetään eri alukepareja. Toisen reaktion alukkeet ovat komplementaarisia ensimmäisen reaktion tuotteelle. Reaktioissa voidaan käyttää samanlaista tai erilaista lämpötilaohjelmaa.

Kehittämistehtävä tehtiin Metsäntutkimuslaitoksen (Metla) Länsi-Suomen alueyksikön kuuluvassa Parkanon yksikössä. Metla on maa- ja metsätalousministeriön alaisuudessa toimiva tutkimuslaitos, jonka tehtävänä on edistää tutkimuksen keinoin metsien taloudellisesti, ekologisesti ja sosiaalisesti kestävää hoitoa ja käyttöä. Parkanon yksikkö keskittyy turvemaiden metsien kasvatukseen ja käyttöön, puunhankintalogistiikkaan ja -teknologiaan, ympäristökysymyksiin sekä metsäyrittäjyyteen. Parkanon yksikkö on perustettu vuonna 1961. (Metsäntutkimuslaitos 2010a.)

Kehittämistehtävän tarkoituksena oli optimoida PCR-menetelmä *nifH*-typensitojageenin monistamiseksi turvenäytteistä. *nifH*-geeniä ei ole aikaisemmin monistettu PCR-menetelmällä Metlan Parkanon yksikössä. Optimoinnissa käytettiin kahta positiivista kontrollinäytettä ja valmista pintaturvenäytteiden DNA-näytesarjaa. Lisäksi toisesta pintaturvenäytesarjasta eristettiin DNA. Optimoinnissa pyrittiin löytämään optimaaliset reagenssimäärät ja oikea lämpötilaohjelma. Tavoitteena oli, että menetelmää voitaisiin myöhemmin hyödyntää Metlan tutkimushankkeissa, esimerkiksi selvittäessä typensitojayhteisöjen rakennetta tutkittaessa typen transformaatioprosesseja maaekosysteemeissä.

## 2 PCR-MENETELMÄ

### 2.1 Periaate

Polymeraasiketjureaktio eli PCR (Polymerase Chain Reaction) perustuu yksinkertaiseen tekniikkaan, jolla DNA:ta saadaan monistettua nopeasti tuhansiksi kopioiksi. Menetelmää käytetään perustutkimuksessa tutkimuslaboratorioissa sekä geneettisessä tunnistuksessa, oikeuslääketieteessä, teollisuudessa laaduntarkkailussa ja *in vitro* diagnostiikassa. (Doyle 1996, 193.) PCR-menetelmä perustuu lämpöä kestäväen eli termostabiilin DNA-polymeraasin käyttöön. Polymeraasi ei inaktivoidu korkeissakaan lämpötiloissa (lähes 100 °C). Termostabiilien polymeraasien löytäminen mahdollisti PCR-menetelmän kehittämisen. Yleisin, parhaiten tunnettu ja ensimmäisenä eristetty polymeraasi on *Thermus aquaticus* -bakteerista eristetty *Taq*-polymeraasi. (Sambrook & Russell 2001, 8.8.) Polymeraasin lisäksi PCR-menetelmässä tarvitaan kaksi erilaista tarkalleen tunnettua aluketta, jotka sitoutuvat kaksijuosteisen DNA:n eri juosteisiin mutta eivät samaan kohtaan. Alukkeiden väliin jää monistettava DNA-sekvenssi. (Suominen & Ollikka 2003, 107.)

PCR-menetelmä koostuu kolmesta eri vaiheesta, jotka ovat denaturaatio, annealing ja ekstensio. Denaturaatiossa kaksijuosteisen DNA:n juosteet denaturoituvat korkean lämpötilan vaikutuksesta (noin 94–95 °C). Annealing-vaihetta varten lämpötilaa lasketaan hetkellisesti, jolloin alukkeet kiinnittyvät templaattijuosteisiin. Aika on niin lyhyt, että templaatti ei ehdi renaturoitua. Alukkeiden pienestä koosta johtuen ne ehtivät kiinnittymään niille komplementaarisiin kohtiin. Seuraavaksi lämpötilaa nostetaan polymeraasin aktivaatiolämpötilaan, noin 72 °C:een, jolloin polymeraasi alkaa liittää reaktioseoksessa olevia nukleotidejä alukkeiden 3'-päistä lähtien templaatin mallin mukaan. Templaatin kummallekin juosteelle syntyy vastinnauha. Seuraavaksi lämpötila nostetaan taas denaturaatiolämpötilaan ja kolmivaiheinen sykli alkaa alusta. Ensimmäisen syklin aikana kahdesta DNA-juosteesta syntyy neljä juostetta, toisen syklin aikana neljästä juosteesta syntyy kahdeksan juostetta eli jokaisen syklin aikana määrä kaksinkertaistuu. Syklejä toistetaan yleensä 15–40 kertaa, joten alun perin hyvin pienestäkin määrästä DNA:ta saadaan monistettua suuri määrä tarkalleen määrätyn pituista DNA-jaksoa. PCR-reaktio toteutetaan erityisessä laitteessa, johon voidaan ohjelmoida nopeat lämpötilan vaihtelut

halutun syklin mukaisesti. (Campbell & Farrell 2006, 352–353; Suominen & Ollikka 2003, 107–108.)

Optimaalisten olosuhteiden vallitessa PCR-menetelmä on erittäin tehokas. Hyvät alukkeet eivät sitoudu toisiinsa 3'-päistä ja ovat spesifisiä vain yhdelle sekvenssille kohde-DNA:ssa. Jos annealing-lämpötila on liian alhainen, monistuu epäspesifisiä DNA-fragmentteja aiheuttaen useita vyöhykkeitä agarosigeelissä. Jos lämpötila on liian korkea, halutun sekvenssin tuotto on alhainen ja joskus puhtaus laskee alukkeiden huonon sitoutumisen vuoksi. (Rychlik, Spencer & Rhoads 1990, 6409.)

Jokainen syklin vaihe vaatii minimiajan ollakseen tehokas, kun taas liian pitkä aika voi olla sekä tuhlaava että vahingollinen DNA-polymeraasille. Parhaan mahdollisen tuloksen saamiseksi eri vaiheissa olisi käytettävä lyhintä mahdollista aikaa. Denaturaatiossa on tärkeää, että juosteiden täydellinen eroaminen tapahtuu. Ohjelman alussa voi olla yksi pitempi denaturaatiojakso, joka varmistaa DNA:n juosteiden irtoamisen toisistaan. Denaturaatio on hyvin nopea vaihe. Annealing-vaiheessa on tärkeää, että alukkeet kiinnittyvät stabiilisti templaattiin. Alhaisen GC-pitoisuuden omaavat alukkeet voivat vaatia alle 55 °C annealing-lämpötilan, kun taas korkeamman GC-pitoisuuden omaavat alukkeet vaativat korkeamman annealing-lämpötilan. Myös annealing-vaihe tapahtuu hyvin nopeasti. Ekstensiovaiheessa lämpötila nostetaan lähelle polymeraasin toimintalämpötilaa, yleensä 72 °C:een. Ekstensiovaiheen pituus riippuu pääasiassa monistettavan sekvenssin pituudesta. PCR-reaktion lopussa käytetään yleensä yhtä pitempää loppuekstensiojaksoa, jonka tarkoituksena on varmistaa, että polymeraasientsyymi rakentaa kaikki aloitetut DNA-kopiot loppuun asti. Jotta reaktiossa saataisiin monistettua haluttua tuotetta mahdollisimman tehokkaasti, siirtymäaika lämpötilasta toiseen on minimoitava. (Kramer & Coen 2001, 15.1.12–15.1.13.)

## 2.2 Reagenssit

Termostabiilin polymeraasin ja alukkeiden lisäksi PCR-reaktiossa tarvitaan puskuriliuos, kationit ja nukleotidit. Reaktiossa voidaan myös käyttää tehostajareagensseja esimerkiksi paremman saannon saavuttamiseksi. Reaktioseos täytetään lopputilavuuteensa steriilillä vedellä. (Sambrook & Russell 2001, 8.4.)

### 2.2.1 Templaatti

Kohdesekvenssin sisältävä DNA-juoste eli templaatti voi olla reaktiossa yksi- tai kaksi-juosteisena. Suljettu sirkulaarinen DNA monistuu jossain määrin tehottomammin kuin lineaarinen DNA. Parhaimmillaan PCR-reaktion alussa tarvitaan vain yksi kopio kohdesekvenssistä mutta yleensä käytetään useita tuhansia kopioita. (Sambrook & Russell 2001, 8.6.) Kiinnostuksen kohteena olevan alueen monistumisen onnistuminen riippuu templaatti-DNA:n laadusta (Doyle 1996, 199).

Kaksi tärkeintä ominaisuutta templaatissa on puhtaus ja määrä. Useat kontaminaatiot DNA-preparaatissa voivat laskea PCR-reaktion tehokkuutta. Templaatin liian suuri määrä optimoitaessa magnesiumkonsentraatiota tai muita parametreja ei ole järkevää, koska se voi peittää erot monistustehokkuudessa. Lisäksi liian suuri määrä templaattia voi laskea tehokkuutta DNA:n sisältämien kontaminaatioiden määrän kasvaessa samalla. (Kramer & Coen 2001, 15.1.9.)

### 2.2.2 Alukkeet

Alukkeiden huolellinen suunnittelu on PCR-menetelmän tärkein osa (Campbell & Farrell 2006, 354). Siten saavutetaan suuri tuotto haluttua tuotetta ja minimoidaan ei-toivottujen sekvenssien muodostuminen. Liian suuri alukemäärä johtaa väärinsitoutumiseen, joka voi johtaa ei-spesifiseen monistumiseen. Yleensä käytetään pitoisuutta 0,1–0,5  $\mu\text{M}$ . (Sambrook & Russell 2001.) Alukkeiden pitäisi olla kooltaan samankokoisia, keskimäärin noin 15–30 emästä (Roux 1995, 186; Doyle 1996, 199; Kramer & Coen 2001, 15.1.9). Alukkeiden sopiva GC-pitoisuus, noin 40–60 %, takaa niiden kiinnittymisen templaattiin ennen kuin DNA renaturoituu. Alukeparilla olisi hyvä olla samanlainen GC-pitoisuus, jolloin niillä on samanlainen sulamispiste. (Doyle 1996, 199; Campbell & Farrell 2006, 354.)

Monissa sovelluksissa alukkeet on suunniteltu täysin komplementaariseksi templaatille (Kramer & Coen 2001, 15.1.17). Alukkeiden on oltava tarpeeksi pitkiä, jotta ne olisivat spesifisiä kohteena olevalle DNA-sekvenssille. Liian pitkien alukkeiden kohdalla hinta nousee kuitenkin liian korkeaksi. (Campbell & Farrell 2006, 354.) Alukkeiden suunnit-

teluun on nykyään useita tietokoneohjelmia (Roux 1995, 186; Kramer & Coen 2001, 15.1.7).

Alukkeissa on vältettävä sekvenssejä, jotka voivat muodostaa sisäisiä sekundäärirakenteita, kuten hiuspinni-rakenteita. Tällöin alukkeet eivät sitoudu templaattiin. Alukkeiden 3'-päät eivät saa olla keskenään komplementaariset, jotta vältetään alukedimeerien syntyminen. (Doyle 1996, 199; Campbell & Farrell 2006, 354.) Alukedimeerejä on yleisimmin havainnoitu, kun pieni määrä templaattia kulkee useamman monistussyklin läpi. Alukkeiden sitouduttua toisiinsa 3'-päistä polymeraasi aloittaa juosteen muodostuksen alukkeiden mallin mukaan. Lopputuloksena oleva tuote voi kilpailla erittäin tehokkaasti haluttua tuotetta vastaan. Alukedimeerit pystyy parhaiten estämään välttämällä komplementaarisuutta alukkeiden sekvensseissä, erityisesti 3'-päissä. Jos niitä kuitenkin esiintyy, optimoimalla magnesiumipitoisuuden voi minimoida niiden määrän suhteessa kiinnostuksen kohteena olevaan tuotteeseen. (Kramer & Coen 2001, 15.1.9.) Molempien alukkeiden pitäisi kiinnittyä templaattiin samassa lämpötilassa. Käytettävä lämpötila kuitenkin riippuu sen alukkeen sulamislämpötilasta, jonka sulamislämpötila on alhaisin. (Doyle 1996, 199.)

Haluttaessa monistaa DNA-jaksoja, joiden nukleotidisekvenssiä ei tarkkaan tunneta, voidaan käyttää degeneroituja alukkeita (Suominen & Ollikka). Niiden käyttö on joissain tapauksissa toiminut mutta myös epäonnistunut useita kertoja eikä kaikkia ole raportoitu (Kramer & Coen 2001, 15.1.7). Degeneroitu aluke on sekoitus erilaisista sekvensseistä, joissa on eri emäs samassa kohtaa sekvenssiä (Löffert, Seip, Karger, & Kang 1998). Tämä johtuu siitä, että yhtä aminohappoa voi koodittaa jopa kuusi erilaista koodonia (Suominen & Ollikka). Koska degeneroiduissa alukkeissa vain pieni osa alukesekvenssistä on komplementaarinen templaatile, saattaa PCR-reaktion tehokkuus laskea. Alukemäärän kasvattaminen voi tehostaa reaktiota mutta samalla kasvaa myös mahdollisuus epäspesifisten tuotteiden monistumiselle. (Löffert ym. 1998.) Suositeltavaa olisi käyttää alukkeita, joiden degeneroitumisaste on mahdollisimman alhainen (Kramer & Coen 2001, 15.1.7).



### 2.2.3 Polymeraasi

Nykyään on saatavilla laaja valikoima eri valmistajien entsyymejä, jotka vaihtelevat tarkkuudeltaan, tehokkuudeltaan ja kyvyltään syntetisoida isojakin DNA-molekyylejä. (Sambrook & Russell 2001, 8.6). Polymeraasin ylimäärä ei tehosta reaktiota merkittävästi. Entsyymien määrän kasvattaminen ja kohtuuttoman pitkä ekstensioaika lisäävät todennäköisyyttä artefaktien lisääntymiselle. Pipetointivirheet ovat yleisin syy liian suurille entsyymimäärille. Polymeraasiliuoksen, kuten muidenkin reagenssien, oikean määrän virheetön pipetoiminen yksittäisiin näyteputkiin on vaikeaa. Suositeltavampi tapa on käyttää reaktioseoksia eli niin sanottuja master mixejä, jolloin pipetointimäärät kasvavat ja pipetointivirheiden määrä pienenee. (Doyle 1996, 199.)

Vaikka polymeraasit ovat termostabiileja, ne eivät kuitenkaan kestä loputtomasti korkeita lämpötiloja. Jotta saataisiin paras tehokkuus, entsyymien ei pitäisi läpikäydä tarpeettomia denaturaatiovaiheita. Esimerkiksi hot start -menetelmässä entsyymi lisätään vasta ensimmäisen denaturaatiovaiheen jälkeen. Entsyymien määrän kasvattaminen voi jossain määrin lisätä PCR-reaktion tehokkuutta mutta vain tiettyyn rajaan asti. Entsyymien ylimäärä voi lisätä epäspesifisten tuotteiden määrää kiinnostuksen kohteena olevan tuotteen kustannuksella. Jotkin reaktiot voivat toimia paremmin jollain toisella termostabiililla polymeraasilla. (Kramer & Coen 2001, 15.1.9–15.1.10.) Polymeraasin mukana tulee yleensä puskuriliuos erillisessä putkessa, jonka käyttäminen auttaa optimoimaan polymeraasin toiminnan. Puskuri ylläpitää oikeaa pH-arvoa reaktioseoksessa. (Sambrook & Russell 2001, 8.6.)

### 2.2.4 Kationit

Kaikki termostabiilit DNA-polymeraasit vaativat toimiakseen vapaita kahdenarvoisia kationeja. Lisäksi kationit vaikuttavat alukkeiden kiinnittymiseen, DNA-nauhojen eroamislämpötilaan, tuotteen spesifisyyteen sekä entsyymien aktiivisuuteen ja tarkkuuteen. Yleensä käytetään magnesiumioneja  $Mg^{2+}$ . Magnesiumionit voidaan lisätä reaktioseokseen erikseen tai puskuriliuos voi valmiiksi sisältää magnesiumia. Tällöin polymeraasin toiminta voi olla vähemmän tehokasta kuin lisättäessä magnesium erikseen. Kalsiumionit ovat melko tehottomia vaikutukseltaan. Koska dNTP:t ja oligonukleotidit sitovat magnesiumioneja, magnesiumin molaarisen konsentraation on oltava suurempi

kuin dNTP:n ja alukkeiden yhteisen fosfaattipitoisuuden. Siten on mahdotonta antaa yhtä yleispätevää määrää magnesiumioneille. Yleensä käytetään kuitenkin pitoisuutta 1,5 mM mutta optimaalinen konsentraatio on määritettävä empiirisesti jokaiselle aluke-templaatti -yhdistelmälle erikseen. Templaatti-DNA:n näytteenkäsittely ei saisi sisältää merkittäviä määriä kelatoivia tekijöitä kuten EDTA (etyleenidiamiinitetraetikkahappo) tai negatiivisesti varattuja ioneja, jotka voivat syrjäyttää magnesiumionit. (Sambrook & Russell 2001, 8.5–8.6.)

Jos magnesiumia ei ole riittävästi, polymeerasi on inaktiivinen. Sitä vastoin magnesiumin ylimäärä pienentää entsyymien tarkkuutta ja täsmällisyyttä ja voi kasvattaa epäspesifistä monistumista. (Doyle 1996, 198.) Magnesiumkloridikonsentraatio voi vaihdella eri alukkeilla, vaikka monistettava sekvenssi olisi samalla alueella.  $MgCl_2$ -konsentraatiolla voi olla suuri vaikutus PCR-reaktion onnistumiseen. Tyypillisesti  $MgCl_2$ -liuos tulee erillisessä putkessa puskuriliuoksen ja polymeerasin mukana, joten käyttäjä voi helposti määrittellä sopivan pitoisuuden. (Kramer & Coen 2001, 15.1.7.) Yhdenarvoisista katiooneista kalium edistää monistumista. Kaliumin määrän kasvattaminen edesauttaa lyhyempien DNA-segmenttien tuottoa. Puskuriliuos sisältää yleensä kaliumkloridia. (Sambrook & Russell 2001, 8.5–8.6)

### 2.2.5 Nukleotidit

dNTP-seos koostuu neljästä deoksinukleotiditriposfaatista, jotka ovat dATP, dTTP, dCTP ja dGTP. Normaalisti PCR-reaktio sisältää saman määrän jokaista nukleotidiä. (Sambrook & Russell 2001, 8.5.) dNTP-seoksen yleisin pitoisuus PCR-reaktiossa on 20–200  $\mu M$ . Suositeltavaa on käyttää pienintä käyttökelpoista pitoisuutta, koska nukleotidien alhainen määrä vähentää alukkeiden kiinnittymistä väärin kohtiin, ja PCR-reaktion spesifisyys paranee. Pieni pitoisuus vähentää myös todennäköisyyttä, että väärä nukleotidi kiinnittyisi syntyvään DNA-nauhaan. Liian korkea dNTP-pitoisuus toimii inhibiittorina polymeerasille. (Sambrook & Russell 2001, 8.5.) Jo millimolaariset (mM) konsentraatiot inhiboivat polymeerasia. Lisäksi dNTP-seoksen liian suuri määrä kasvattaa polymeerasin virheellistä toimintaa. Yritettäessä kasvattaa PCR-reaktion tehokkuutta saattaa olla houkuttelevaa lisätä dNTP-seoksen määrää. Sitä ei kuitenkaan pitäisi tehdä, koska dNTP kelatoi magnesiumia ja muuttaa optimaalisen  $MgCl_2$ :n konsentraatiota. (Kramer & Coen 2001, 15.1.110–15.1.11.)

dNTP-seoksen varastoliuos pitää säilyttää -20 asteessa ja se pitäisi jakaa pienempiin alieriin, jotka hävitetään toisen pakastus-sulatuskerran jälkeen. Pitkän säilytyksen aikana haihtuu pieniä määriä vettä ja jäätyy putken seinämiin. Konsentraatiomuutosten minimoimiseksi dNTP-seosta pitäisi sentrifugoida lyhyesti sulatuksen jälkeen. (Sambrook & Russell 2001, 8.5.)

### 2.2.6 Tehostajareagenssit

Tehostajareagensseja käytetään kasvattamaan saantoa ja spesifisyyttä. Ongelmia saattaa olla myös esimerkiksi templaatin suuren GC-pitoisuuden tai pitkän templaatin vuoksi. Ionittomat detergentit, kuten Triton X-100, Tween 20 tai Nonidet P-40, neutraloivat ionisten detergenttien varaukset templaatin käsittelyssä. Ionittomien detergenttien käyttö on suositeltavampaa kuin tehostajareagenssien käyttäminen. (Kramer & Coen 2001, 15.1.11–15.1.12.)

Halutun sekvenssin mahdollisimman suuri tuotto voidaan aikaansaada stabiloimalla tai tehostamalla polymeraasin aktiivisuutta esimerkiksi entsyymejä stabiloivilla proteiineilla kuten BSA (Bovine Serum Albumin, naudan seerumin albumiini) ja gelatiini, entsyymejä stabiloivilla liuenneilla aineilla kuten betaiini ja betaiini-HCl tai liukoisuutta tehostavilla liuottimilla kuten DMSO (dimethyl sulfoxide, dimetyylisulfoksidi) ja asetamidi. (Kramer & Coen 2001, 15.1.11–15.1.12.)

### 2.3 Kontaminaatiot

Kontaminaatiolla tarkoitetaan pientä määrää vierasta DNA:ta, joka ei ole peräisin monistettavasta näytteestä. Edellisestä PCR-reaktiosta peräisin olevaa tuotetta saattaa leijaila tilassa, jossa seuraavan reaktion reagensseja pipetoidaan. Tilanne on ongelmallinen varsinkin tehtäessä samanlaisia PCR-reaktioita toistuvasti. Todennäköisin kontaminaation lähde syntyy avattaessa ja suljettaessa putkia, jolloin muodostuu aerosoleja. Erityisesti ongelma tulee esiin käytettäessä kaksivaiheista PCR-menetelmää, kuten nested-PCR. (Suominen & Ollikka 2003, 111–112; Roux 1995, 188–189.) PCR-reaktion jälkeen näyteputkia ei saisi avata samassa tilassa, jossa reaktiot pipetoidaan. Lisäksi

putket on sentrifugoitava lyhyesti ennen avaamista. Sentrifugoinnilla varmistetaan, että putken reunoille ja korkkiin tiivistynyt neste on putken pohjalla, ja aerosolien muodostuminen on minimoitu. (Suominen & Ollikka 2003, 111–112.)

PCR-reaktiot olisi tehtävä erillisessä laboratoriossa, jossa on omat välineet työskentelyyn ja pakastin reagenssien säilyttämiseksi. Reaktioiden valmisteluun käytetyn puhdas-tilan pitäisi olla eristettynä mahdollisimman hyvin muusta laboratoriosta ja PCR-laitteesta. Reaktioseosten valmistus pitäisi tehdä laminaarikaapissa, joka on varustettu UV-valolla, jota voidaan pitää päällä silloin, kun kaapissa ei työskennellä. (Suominen & Ollikka 2003, 111–112; Sambrook & Russell 2001, 8.16–8.17.) Jos mahdollista, PCR-reaktion valmisteluun käytettävä työskentelyalue, mukaan lukien pipetit, telineet ja reagenssit olisi pidettävä fyysisesti erillään niistä, joita käytetään reaktiotuotteiden analysointiin (Roux 1995, 188–189). Työntekijöiden kulkua tulisi rajoittaa siten, että PCR-tuotteiden käsittelytilasta ei saisi saman päivän aikana tulla PCR-reaktion valmistustilaan ilman perusteellista puhdistautumista. (Suominen & Ollikka 2003, 111–112.) Varsinkin pipetointien aikana PCR-tilaan/tilasta on minimoitava liikenne (Sambrook & Russell 2001, 8.16). On kuitenkin huomioitava, että useimmat PCR-tekniikat eivät vaadi näin tarkkoja varotoimia (Suominen & Ollikka 2003, 111–112). Käytännöllisempi vaihtoehto on yleensä rajata tietty osa laboratoriosta PCR-työskentelylle (Sambrook & Russell 2001, 8.16).

Yksi yleisimmistä kontaminaatiolähteistä PCR-työskentelyssä ovat mikropipetit. Pipetoinnin yhteydessä syntyvät aerosolit kulkeutuvat pipetin sisään ja siten seuraavan pipetoinnin yhteydessä näyteputkeen. Siksi pitäisi käyttää positiivikorvauspipettejä tai kertakäyttöisiä steriilejä, suodattimellisia pipetinkärkiä, jolloin suodatin estää aerosolien kulkeutumisen pipetin sisään. PCR-työskentelyssä olisi hyvä olla omat pipetit, joita ei käytetä muuhun työskentelyyn. (Suominen & Ollikka 2003, 111–112.) Pipetoinnin pitää olla rauhallista ja kiireetöntä. Tällä tavoin minimoidaan aerosolien tuotto. Pipetointivaihtelut voidaan minimoida valmistamalla reaktioseos polymeraasia lukuun ottamatta valmiiksi etukäteen. Reaktioseos säilyy +4 °C:ssa useita päiviä. Mikropipetit, säilytys-rasiat ja telineet pitäisi pystyä steriloimaan autoklaavissa. (Roux 1995, 189.) Työskentellessä on käytettävä kertakäyttöisiä käsineitä ja ne on vaihdettava riittävän usein, varsinkin tullessa muualta laboratoriosta PCR-tilaan (Suominen & Ollikka 2003, 111–112; Sambrook & Russell 2001, 8.16). Liian isot tai huonosti sopivat käsineet luovat riskin esimerkiksi kontaktille näyteputken kannen sisäpuoleen (Roux 1995, 189).

Paras tapa ehkäistä kontaminaatioita on ottaa varotoimenpiteet käyttöön jo ennen kuin kontaminaatioita on tapahtunut. Huolimatta siitä, kuinka huolellinen on, kontaminaatio tapahtuu silloin tällöin. (Roux 1995, 189.) Reagenssien puhtaus on tärkein parametri ja jokainen työvaihe on kriittinen kontaminaation välttämiseksi. Reagenssien viilentäminen noltaan asteeseen ennen sekoittamista on halvin mutta myös vähiten luotettava tapa kontaminaatioiden estämiseksi ja vähentämiseksi. Korkealaatuisten reagenssien käyttäminen ja säilyttäminen alierissä edistää niiden puhtaana säilymistä. (Kramer & Coen 2001, 15.1.7.)

## 2.4 PCR-sovelluksia

Nested-PCR-menetelmä koostuu kahdesta peräkkäisestä PCR-reaktiosta, joista jälkimmäisessä käytetään templaattina ensimmäisen reaktion tuotetta. Nested-PCR on melko tehokas menetelmä haluttaessa vähentää tai eliminoida ei-haluttuja tuotteita. Lisäksi menetelmän herkkyys kasvaa huomattavasti. Vääriä tuotteita monistuu yleisesti joko toisen tai molempien alukkeiden ansiosta ja ne sisältävät asiaan kuulumattomia sekvenssejä sisällään. Toisen kierroksen PCR-reaktiossa alukkeet ovat komplementaarisia ensimmäisen kierroksen tuotteelle. Siten vain oikeaa tuotetta pitäisi monistua toisella kierroksella. Nested-PCR on usein tehokas menetelmä, vaikka alun perin halutun tuotteen määrä olisi alhaisempi kuin mihin etidiumbromidi kykenee sitoutumaan tai alhaisempi kuin ei-haluttujen tuotteiden määrä. Käytettäessä nested-PCR-menetelmää saadaan parempia tuloksia syklimäärällä noin 20 tavallisen 30–35 syklin sijaan. Tämä minimoi mahdollisuuden suurten molekyyliainesten vyöhykkeiden muodostumiselle. Nested-PCR on äärimmäisen herkkä menetelmä. (Roux 1995, 187–188.)

Hot start -menetelmässä vähintään yksi reagenssi lisätään reaktioputkiin vasta, kun lämpötila on noussut korkeammaksi kuin reagenssien sulamislämpötilat (Roux 1995, 188). Templaatin denaturaatio ennen polymeraasin tai magnesiumin lisäämistä parantaa huomattavasti spesifisyyttä ja herkkyyttä monissa tapauksissa. Tämän menetelmän suurin haittapuoli on se, että putket joudutaan avaamaan kesken reaktion reagenssien lisäämiseksi. Tästä aiheutuu vaivaa sekä kontaminaatoriski. (Kramer & Coen 2001, 15.1.1.) Putkien avaamisen sijaan voidaan myös käyttää vahakerrosta, joka jakaa näyteputkessa olevat reagenssit kahteen osaan. Ylemmässä kerroksessa on reagenssi tai reagenssit,

joiden ei haluta sekoittuvan muihin reagensseihin ja reagoivan ennen tietyn lämpötilan saavuttamista. Vahan sulaessa korkeassa lämpötilassa kaksi eri faasia sekoittuu. (Chou, Russell, Birch, Raymond & Bloch 1992, 1717.)

## 2.5 Agarosigeelielektroforeesi

Agarosigeelielektroforeesi (AGE, Agarose Gel Electrophoresis) on yksi molekyylibiologian perusmenetelmistä, jota käytetään DNA:n analysoimiseen. PCR-työskentelyssä agarosigeelielektroforeesia käytetään PCR-monistuksen onnistumisen todentamiseen sekä mahdollisten kontaminaatioiden havaitsemiseen. Negatiivisesti varautuneet nukleiinihapot kulkeutuvat sähkökentässä kohti positiivista napaa. Geelin verkkorakenne hidastaa DNA:n kulkeutumista, joten lyhyemmät DNA-molekyylit kulkeutuvat pidemmälle. Kulkeutumiseen vaikuttaa myös geelin agarosipitoisuus. Yleensä käytetään pitoisuutta 0,4–2 %. (Suominen & Ollikka 2003, 72, 75.)

Koska DNA ei sellaisenaan näy agarosigeelissä, on geeli värjättävä ennen tai jälkeen geeliajon. Yleensä käytetään etidiumbromidia, jonka etidiumioni tunkeutuu nukleiinihappojen emästen väliin. Säteilytettäessä DNA-etidiumkompleksia UV-valolla emäkset absorboivat UV-säteitä ja luovuttavat saamansa energian etidiumille, joka fluoresoi oranssinpunaisena. (Suominen & Ollikka 2003, 75.)

### 3 TYPENSIDONTA

Biologisesti käytettävissä oleva typpi on välttämätön elämälle ja monissa maaekosysteemeissä eniten kasvua rajoittava tekijä. Kaikki tunnetut typpeä sitovat organismit eli diatsotrofit ovat prokaryootteja, ja kyky sitoa typpeä on laajasti levinnyt sekä bakteerietä arkkikuntiin. Typensidontakyvyn kapasiteetti näissä organismeissa on riippuvainen ainoastaan nitrogenaasientsyymisysteemistä. Biologisesti sidotun typen määrä on noin  $2 \cdot 10^{13}$  g/vuosi (1997). (Raymond, Siefert, Staples & Blankenship 2004, 541.) Typensidonta on olennaisen tärkeää, koska sen ansiosta ilmakehän dityppi ( $N_2$ ) on käytettävissä ekosysteemin typpivarantojen ylläpitoon (Zehr, Jenkins, Short & Steward 2003a, 539).

Typensidontaprosessissa nitrogenaasi pelkistää ilmakehän typen  $N_2$  ammoniumiksi  $NH_4^+$ . Luontaisen typensidonnan osuus vuosittaisesta sidonnasta on noin 65 %. (Poly, Monrozier & Bally 2001a, 95.) Typpeä sitovien mikro-organismien levinneisyys ei ole määrätynyt pelkästään typen saatavuuden mukaan mutta sitä voidaan kuitenkin ennustaa tiettyjen elinympäristön ominaispiirteiden perusteella. Biologinen typensidonta, joka katalysoi ilmakehän typpikaasun pelkistystä biologisesti käytettäväksi ammoniumiksi, on ekologisesti tärkeä typen lähde monissa maa- ja vesiympäristöissä. (Zehr ym. 2003a, 539.) Typensidontaa tapahtuu sekä aerobisissa että anaerobisissa ympäristöissä (Raymond ym. 2004, 541).

Mikro-organismit katalysoivat typensidontaa nitrogenaasientsyymillä, joka on säilynyt hyvin konservoituneena evoluution aikana. Nitrogenaasi koostuu kahdesta proteiinista, jotka ovat dinitrogenaasi  $\alpha_2\beta_2$  heterotetrameeri, jossa  $\alpha$  vastaa NifD-proteiinia ja  $\beta$  vastaa NifK-proteiinia sekä dinitrogenaasi reduktiaasi  $\gamma_2$  homodimeeri eli NifH-proteiini. (Raymond ym. 2004, 541.) *nifH*-geenin kloonaukset ja sekvensointi on tarjonnut laajan ja nopeasti kasvavan tietokannan monipuolisista maa- ja vesiympäristöistä. Nitrogenaasi-reaktio on energisesti kallis, koska yhtä molekyyliä kohden pelkistyy 16 ATP:tä (adenosiinitrifosfaatti) ja kahdeksan elektronia. Nitrogenaasigeenin ekspressio on hyvin säädeltyä. (Zehr ym. 2003a, 540.)

### 3.1 Typensitobakteerit

Kyky hyödyntää ditypeä ( $N_2$ ) typenlähteenä on tärkeä fenotyypinen piirre useimmille nykyään tunnetuille metanotrofeille, syanobakteereille ja symbionttisille typensitojille (Dedysh, Ricke & Liesack 2004, 1301; Prescott, Harley & Klein 2005, 459, 464). Asidofiiliset metanotrofiset bakteerit ovat fylogeneettisesti läheisimmin sukua heterotrofisille typpeä sitoville *Beijerinckia*-suvun bakteereille. Nykyiset tunnistetut asidofiiliset metanotrofit edustavat kahta sukua, *Methylocella* ja *Methylocapsa*, jotka kuuluvat *Alphaproteobacteria*-luokkaan. *Methylocella* ja *Methylocapsa* ovat evolutionaarisesti lähempänä *Beijerinckia*-sukua kuin *Methylosinus* ja *Methylocystis*-sukuja, jotka kuuluvat myös *Alphaproteobacteria*-luokkaan. Asidofiilisiä metanotrofeja esiintyy monipuolisissa happamissa ympäristöissä, kuten pohjoisen vyöhykkeen ja tundran kosteikoissa ja ylängöillä. Kyky hyödyntää ditypeä typen lähteenä on välttämätön fenotyypinen ominaisuus näissä ekosysteemeissä esiintyville mikrobeille. (Dedysh ym. 2004, 1301–1302.) Typpeä sitovia syanobakteereja ovat esimerkiksi *Anabaena* ja *Oscillatoria*. Symbionttisia typensitojia ovat esimerkiksi palkokasveissa *Rhizobium* ja *Bradyrhizobium* sekä lepän *Frankia*. (Prescott, Harley & Klein 2005, 598.)

### 3.2 *nifH*-typensitojageeni

Kaikki typensitojat kantavat *nifH*-geeniä, joka koodaa nitrogenaasientsyymikompleksin pääkomponentteja dinitrogenaasireduktaasia eli Fe-proteiinialayksikköä ja dinitrogenaasin  $\alpha$ -alayksikköä (Poly, Ranjard, Nazaret, Gourbrière & Monrozier 2001b, 2255; Dedysh ym. 2004, 1301). Nitrogenaasin proteiinisekvenssin samankaltaisuuden korkea aste mikro-organismien kesken viittaa aikaiseen syntyyn tai lateraaliseen geenin transformointiin prokaryoottien sukujuurten kesken (Zehr ym. 2003a, 540).

PCR-menetelmän suuren herkkyuden vuoksi väärät positiiviset tulokset ovat aiheuttaneet isoja ongelmia monistettaessa pieniä määriä DNA:ta. Goto, Ando, Hachisuka ja Yoneyama (2005, 33) ovat tutkimuksissaan selvittäneet, että reagenssit saattavat olla kontaminoituneita *nifH*-geenillä tai *nifH*-geenin kaltaisella DNA:lla. Kontaminaatiot aiheuttivat väärää positiivisia tuloksia tutkittaessa *nifH*-geenin esiintymistä ympäristönäytteissä (Goto, Ando, Hachisuka & Yoneyama 2005, 33).



Goto ym. (2005, 34) yrittivät tutkimuksissaan päästä eroon kontaminaatiosta käyttämällä eri valmistajien reagensseja sekä tilaamalla uudet reagenssit ja käyttämällä eri valmistuseriä. Lisäksi reaktioseokset valmistettiin eri huoneessa kuin missä PCR-laite sijaitsi, mutta kontaminaatio toistui edelleen PCR-reaktioissa. He havaitsivat myös, että käytettäessä tiettyjen valmistajien alukkeita kontaminaatio toistui useissa PCR-reaktioissa. Tutkimusryhmä päätyi tulokseen, jonka mukaan alukkeet olisivat olleet ensisijainen lähde *nifH*-geeni- ja *nifH*-geenin kaltaisille kontaminaatioille. He eivät kuitenkaan pystyneet todistamaan, että alukkeet olisivat ainoa kontaminaation lähde. Alukkeiden kontaminaation syynä saattaa olla ultrapuhtaan veden käyttö. Uusi aluke-erä pitäisi aina testata, vaikka samalta reagenssivalmistajalta olisi aikaisemmin tullut puhtaita alukkeita. Myös kaupalliset polymeraasit saattavat olla kontaminoituneita *Escherichia coli*- tai *Thermus aquaticus*- bakteereilla mutta nämä eivät omaa *nifH*-geeniä tai *nifH*-geenin kaltaista DNA:ta. (Goto ym. 2005, 34–37.)

Myös Zehr, Crumbliss, Chiruch, Omoregie ja Jenkins (2003b, 996–997) ovat päätyneet tutkimuksissaan samankaltaisiin tuloksiin. Kohdegeenien, jotka eivät ole yleisesti levinneet mikro-organismien joukossa, kuten nitrogeenin, voidaan olettaa olevan vähemmän alttiita laboratoriosta tai reagensseista peräisin olevalle kontaminaatiolle, koska nämä geenit eivät esiinny monissa laboratoriossa usein käytetyissä reagensseissa. Kaupalliset reagenssit voivat kuitenkin olla rutiininomaisesti kontaminoituneita nitrogeenigeeneillä. Havaitut pitoisuudet ovat yleensä alhaisia. (Zehr, Crumbliss, Chiruch, Omoregie & Jenkins 2003b, 996–997.)

#### 4 TYÖN TARKOITUS JA TAVOITE

Kehittämistehtävän tarkoituksena oli optimoida PCR-menetelmä *nifH*-typensitojageenin monistamiseksi turvenäytteistä. Metlan Parkanon yksikössä ei ole aikaisemmin monistettu *nifH*-geeniä PCR-menetelmällä. Optimoinnissa käytettiin kahta positiivista kontrollinäytettä sekä kahta pintaturvenäytesarjaa, joista toiselle oli tehty aikaisemmin DNA-eristys kaupallisella kitillä. Toisen sarjan DNA-eristys sisältyi kehittämistehtävän kokeelliseen osuuteen. Tavoitteena oli, että menetelmää voidaan tulevaisuudessa hyödyntää Metlan Parkanon yksikön hankkeissa, esimerkiksi selvitettäessä typensitojajayhteisöjen rakennetta tutkittaessa typen transformaatioprosesseja maaekosysteemeissä.

## 5 KOKEELLINEN OSA

### 5.1 Näyttemateriaalit ja laitteet

Kehittämistehtävän näytteet koostuivat kahdesta eri pintaturvenäytesarjasta. Sarja I edusti eri-ikäisiä, syntyvaltaan samanlaisia, luonnontilaisia suoekosysteemejä, joista nuorimmat ovat juuri soistumiskehityksen alussa ja vanhimmat ovat jo kehittyneet aap-pasoiksi (Metsäntutkimuslaitos 2010b). Parkanon yksikön laboratorion työntekijät ovat tehneet näytteille DNA-eristyksen vuonna 2008. Sarjan II näytteet olivat pintaturvenäyt-teitä neljältä eri koelalta, jotka edustavat maantieteellistä gradienttia pohjois-eteläsuunnassa. Näytteiden DNA-eristys kuului kehittämistehtävään. Lisäksi PCR-reaktioissa käytettiin kahta positiivista DNA-kontrollinäytettä, jotka olivat typensitoja-bakteerit *Beijerinckia indica* (I) ja *Methylocapsa acidiphila* (II). Negatiivisena kontrol-linäytteenä optimoinnissa käytettiin autoklavoitua vettä.

Menetelmän optimoinnissa käytetyt alukkeet on koottu taulukkoon 5 ja reagenssit tau-lukkoon 6 (liite 1). PCR-laitteena käytettiin MJ Researchin PTC-200 DNA Engine Cy-cler-laitetta. Agarosigeeliatot tehtiin BIO-RADin SUB-CELL<sup>®</sup>GT-ajaltaassa, jonka virtalähteenä oli BIO-RADin PowerPac 3000. Geelit kuvattiin Syngenen Bio Imaging System GeneGenius-geelikuvauslaitteella. DNA-eristyksessä käytettiin MO BION Po-weiSoil DNA Isolation -kittiä. DNA-eristyksessä näytteiden mekaaniseen hajotukseen käytettiin Thermo Electron Corporationin FastPrep<sup>™</sup> FP 120 BIO 101-kuulamylyä.

### 5.2 Menetelmän optimointi

Menetelmän optimoinnin lähtökohtana käytettiin kolmea eri reagenssiohjetta (A, B ja C), joita on käytetty *nifH*-geenin monistamiseen (Poly ym. 2001a, 96; Diallo, Willems, Vloemans, Cousin, Vandekerckhove, de Lajudie, Neyra, Vyverman, Gillis & Van der Gucht 2004, 412). Ohjeet on koottu taulukkoon 1. Ohjeessa A oli yksi PCR-reaktio, ja ohjeissa B ja C käytettiin nested-PCR-menetelmää. Ohjeissa käytetyt reagenssit olivat samoja lukuun ottamatta alukkeita ja tehostajareagensseja. Ohjeessa A käytettiin aluke-parina PolF- ja PolR-alukkeita ja tehostajareagenssina dimetyylisulfoksidia. Ohjeissa B ja C käytettiin FGPH19-PolR- ja PolF-GC-AQER-alukepareja ja tehostajareagenssina

BSA:a. Reagenssiohjeisiin liittyvät lämpötilaohjelmat on merkitty vastaavin merkinnöin (taulukko 2). Jokaisen PCR-reaktion jälkeen näytteet ajettiin etidiumbromidilla värjättyyn 1 % agarosigeeliin (120 V, 1 h 15 min).

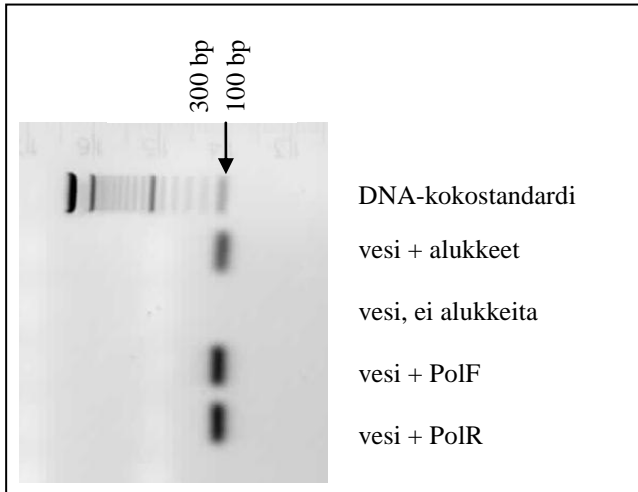
TAULUKKO 1. Optimoinnissa käytetyt reagenssiohjeet.

50 µl reaktiutilavuus	A (Poly ym. 2001a, 96)		B (Diallo ym. 2004, 412)			C (mukaillen Diallo ym. 2004, 412)		
Alukkeet / µM	PolF	0,6	PCR 1	FGPH19	0,5	PCR 1	FGPH19	0,3
				PolR	0,5		PolR	0,3
	PolR	0,6	PCR 2	PolF-GC	0,5	PCR 2	PolF-GC	0,3
				AQER	0,5		AQER	0,3
Puskuriliuos	< 1x		< 1x			~2,5x		
MgCl <sub>2</sub> / mM	0,75		1,5			5		
dNTP / µM	10		200			200		
DMSO / mM	0,05		-			-		
BSA	-		400 ng/ml			1 mg/ml		
Polymeraasi / U	2,5		2,5			1		

TAULUKKO 2. Optimoinnissa käytetyt lämpötilaohjelmat.

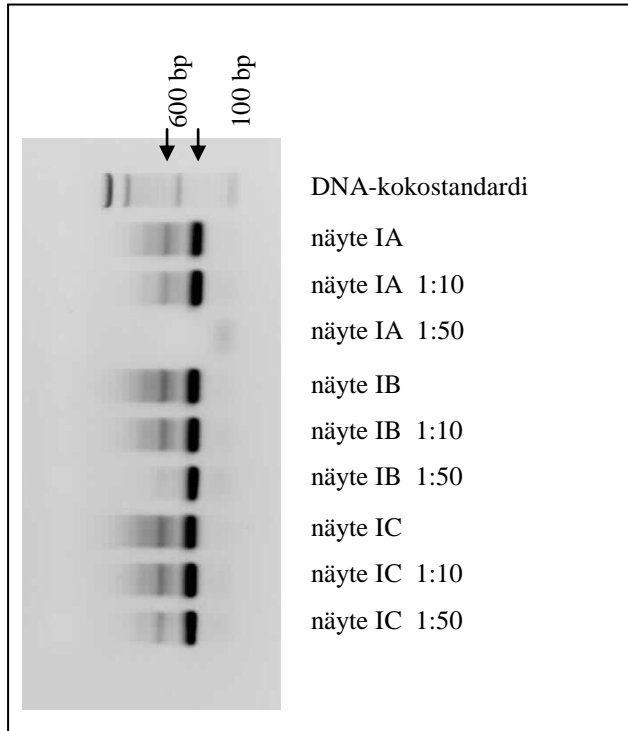
	A			B				C		
	°C	aika		PCR 1	PCR 2			PCR 1 & PCR 2		
vaihe	°C	aika		°C	°C	aika		°C	aika	
alkudenaturaatio	95	5 min		-				95	5 min	
denaturaatio	94	1 min	33x	94	94	1 min	30x	94	30 s	30x
annealing	57	1 min		55	48	1 min		53	1 min	
ekstensio	72	2 min		72	72	2 min		72	3 min	
loppuekstensio	72	10 min		72	72	5 min				

Reagenssi- ja lämpötilaohjeella A ei saatu monistettua haluttua tuotetta, joka on pituudeltaan 360 bp (base pair, emäspari) (Poly ym. 2001a, 96). Sen sijaan PCR-reaktiossa monistui noin 100 bp tuote, joka monistui myös negatiivisella kontrollinäytteellä. Kyseinen tuote monistui myös käytettäessä negatiivisella kontrollinäytteellä vain jompaa-kumpaa aluketta (kuvio 1). Alukkeista ja dNTP-seoksesta valmistettiin uudet käyttö-laimennokset kontaminaation poissulkemiseksi mutta tuote monistui edelleen. Alukkeet myös tilattiin uudestaan mutta 100 bp tuotteesta ei päästy eroon. Ohjeessa A puskuriliuoksen, magnesiumin ja dNTP-seoksen määrät olivat alhaisemmat kuin reagenssivalmistajien ilmoittamat optimaaliset määrät. Kasvatettaessa reagenssimääriä ohjeen A2 (liite 1, taulukko 7) mukaisiksi saatiin positiivinen kontrollinäyte I monistumaan.



KUVIO 1. PCR-reaktiossa monistunut noin 100 bp tuote.

Koska ohjeella A2 saatiin monistumaan vain positiivinen kontrollinäyte I, päätettiin kokeilla nested-PCR-menetelmää sekä reagenssi- ja lämpötilaohjetta B. Menetelmällä saatiin jälkimmäisen PCR-reaktion jälkeen monistumaan myös kontrollinäyte II. Ensimmäisen reaktion jälkeen monistuva tuote on kooltaan 429 bp ja toisen reaktion jälkeen monistuva tuote noin 320 bp (Diallo ym. 2004, 412). Ensimmäisessä reaktiossa monistui edelleen noin 100 bp tuote. Liitteessä 2 olevasta kuvista 6 nähdään, että mitä enemmän haluttua tuotetta muodostui ensimmäisessä reaktiossa, sitä vähemmän muodostui 100 bp tuotetta. Kuviossa 7 olevasta PCR-reaktion geelikuvasta havaitaan, että jälkimmäisessä PCR-reaktiossa monistui haluttua tuotetta mutta ei enää 100 bp tuotetta (liite 2). Ohjetta B kokeiltiin myös osalle sarjan I näytteistä ja niiden laimennoksille. Jälkimmäisessä PCR-reaktiossa monistui halutun tuotteen lisäksi noin 800 bp tuote (kuvio 2). Positiivisilla kontrollinäytteillä tätä tuotetta ei muodostunut.

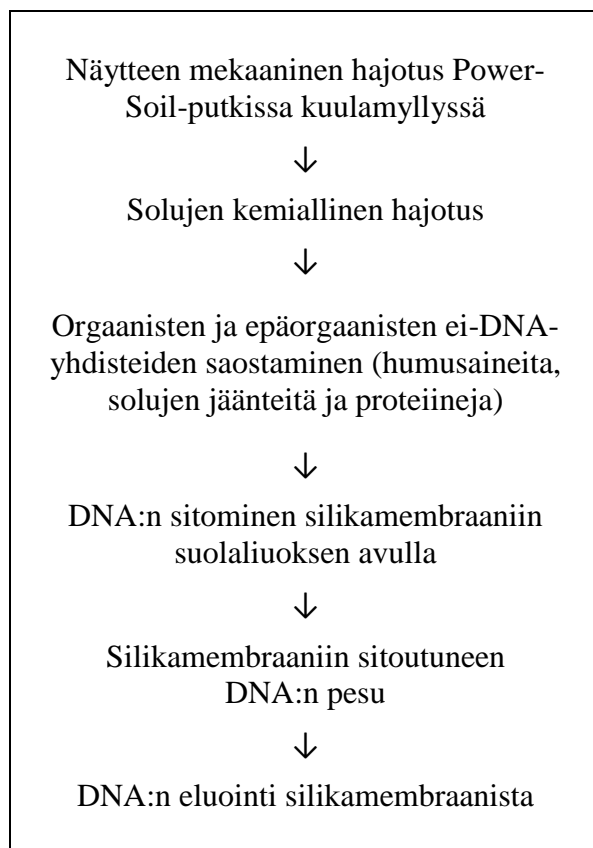


KUVIO 2. Nested-PCR-menetelmällä monistunut haluttu tuote, noin 320 bp sekä ylimääräinen noin 800 bp tuote.

Verrattuna reagenssiohjeeseen B ohjeessa C alukkeiden ja polymeraasin määrät olivat alhaisemmat, mutta silti polymeraasin määrä oli valmistajan antamissa rajoissa. Ohjetta C ei kokeiltu sellaisenaan, koska BSA:n pitoisuus ohjeessa oli moninkertainen verrattuna ohjeeseen B. Sen sijaan ohjeet B ja C yhdistettiin ja saatua ohjetta BC (liite 1, taulukko 7) kokeiltiin kontrollinäytteiden lisäksi molempiin näytesarjoihin. Lämpötilaohjelmanä käytettiin ohjelmaa C. Ohjeella BC monistui jälkimmäisessä reaktiossa molempien sarjojen näytteillä halutun tuotteen lisäksi kaksi pidempää tuotetta (liite 3, kuvat 8 ja 9). Positiivisilla kontrollinäytteillä kyseisiä tuotteita ei monistunut. Näistä tuotteista eroon pääsemiseksi jälkimmäisessä reaktiossa kokeiltiin useita eri annealing-lämpötiloja väleillä 53–58 °C ja 58–64 °C. PCR-laitteeseen ohjelmoitiin minimi- ja maksimi-annealing-lämpötilat ja laite määrittä itse muut lämpötilat kyseisellä välillä. Ensimmäisessä reaktiossa käytettiin edelleen lämpötilaohjelmaa C.

### 5.3 DNA-eristys

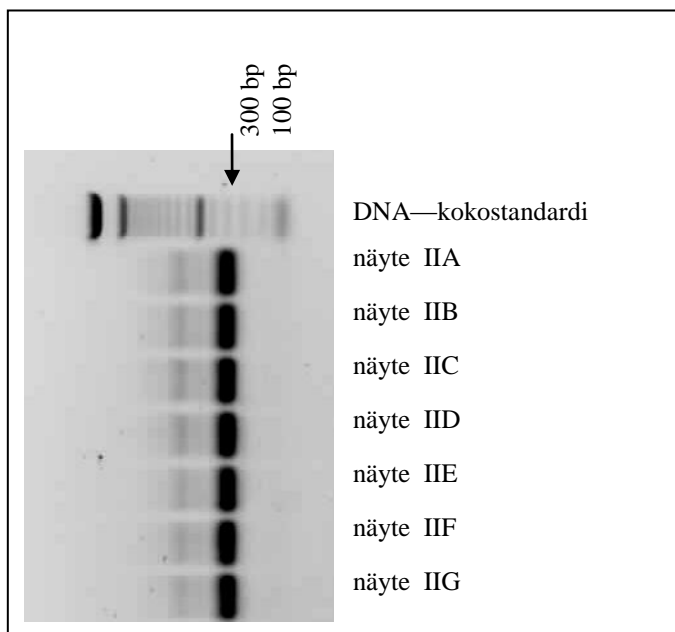
Sarjan II näytteistä eristettiin DNA kaupallisen kitin avulla (MO BIO PowerSoil® DNA Isolation Kit). Käytetty kitti perustui spin column -tekniikkaan, jossa DNA sidotaan silikamembraaniin, pestään ja eluoidaan. DNA-eristyksen vaiheet on selvitetty kuviossa 3. Kitin avulla eristetyille näytteille tehtiin PCR-reaktio nested-PCR-menetelmällä käyttäen reagenssiohjetta BC ja lämpötilaohjelmaa C. Osaa näytteitä käytettiin myös annealing-lämpötilan optimointiin.



KUVIO 3. DNA-eristyskitin periaate (mukaillen Mo Bio 2009, 7–9).

## 6 TULOKSET JA TULOSTEN TARKASTELO

Kehittämistehtävän aikana optimoitiin reagenssien pitoisuudet ja kokeiltiin eri annealing-lämpötiloja sekä eristettiin pintaturvenäytteiden DNA kaupallisen kitin avulla. Sarjan II pintaturvenäytteiden DNA-eristys sujui ongelmitta. Kaikki eristetyt DNA-näytteet monistuivat nested-PCR-menetelmällä käytettäessä reagenssiohjetta BC ja lämpötilaohjelmaa C. Agarosigeelillä näkyvät vyöhykkeet olivat erittäin vahvoja (kuvio 4).



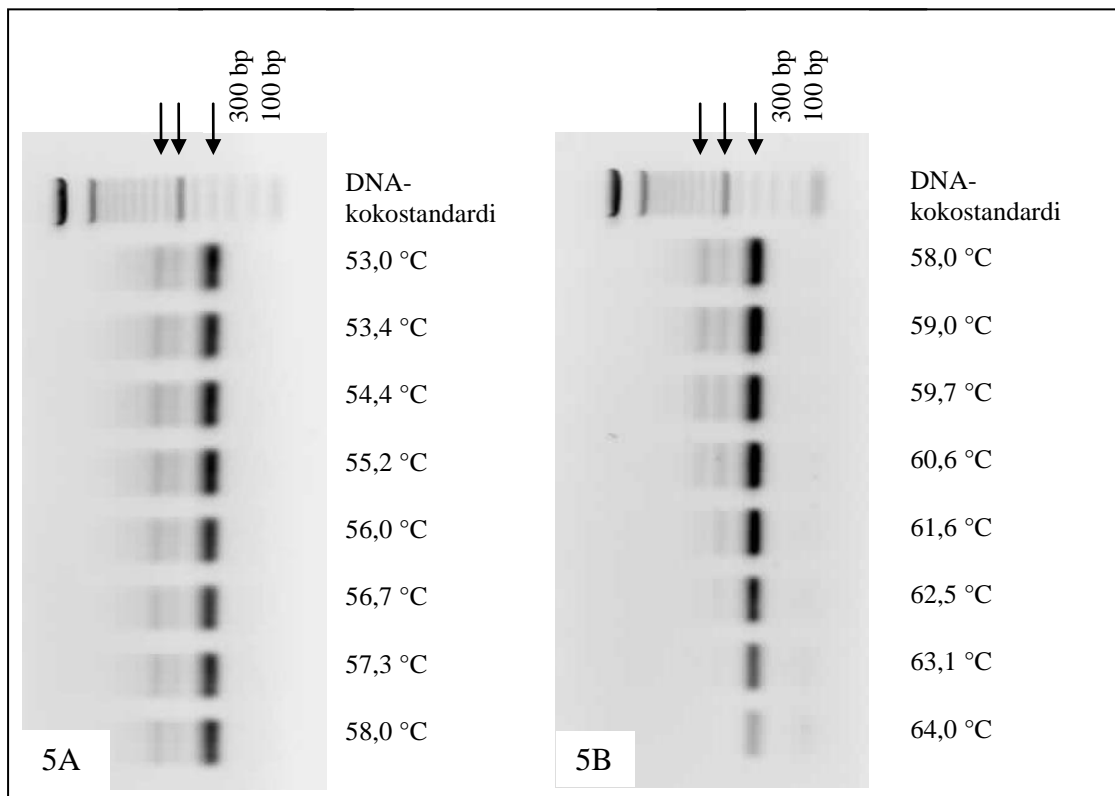
KUVIO 4. Näytteistä nested-PCR-menetelmällä monistunut haluttu tuote, noin 320 bp.

PolF- ja PolR-alukkeiden käytössä ilmeni ongelmia. Alukkeilla saatiin monistumaan vain positiivinen kontrollinäyte I sekä ylimääräinen noin 100 bp tuote, jota epäiltiin kontaminaatioksi. Alukkeista ja dNTP-seoksesta valmistettiin uudet käyttölaimennokset ja alukkeet tilattiin uudestaan kontaminaation poissulkemiseksi. Koska 100 bp tuote kuitenkin monistui edelleen, todettiin alukkeiden muodostavan todennäköisesti aluke-dimeerejä ja/tai sekundäärirakenteita. Reagensseissa päädyttiin polymeraasin, dNTP-seoksen, puskuriliuoksen ja magnesiumin osalta reagenssivalmistajien suosittelemiin pitoisuuksiin. Alukkeiden sopiva pitoisuus löydettiin kokeilemalla. Tehostajareagensseille DMSO ja BSA ei kokeiltu eri pitoisuuksia. PCR-reaktioita olisi kuitenkin voinut kokeilla eri pitoisuuksilla sekä jättämällä tehostajareagenssit kokonaan pois. Nested-



PCR-menetelmässä käytetyillä alukepareilla FGPH19–PolR ja PolF–GC–AQER saatiin monistettua haluttua tuotetta.

Käytettäessä molemmissa nested-PCR-reaktioissa samaa lämpötilaohjelmaa (ohjelma C) havaittiin halutun tuotteen lisäksi monistuvan kaksi pidempää tuotetta, noin 600 bp ja noin 800 bp. Tuotteista pyrittiin eroon nostamalla jälkimmäisen reaktion annealing-lämpötilaa. Nostettaessa annealing-lämpötilaa kyseisten tuotteiden vyöhykkeet agarosigeelillä heikentyivät (kuvio 5). Nostettaessa lämpötilaa 63 °C:een tai yli havaittiin myös halutun tuotteen monistumisen heikkenevän huomattavasti. Osalla näytteistä haluttua tuotetta ei monistunut enää ollenkaan tässä lämpötilassa. Optimoinnin tuloksena päädyttiin käyttämään jälkimmäisessä reaktiossa annealing-lämpötilaa 61 °C. Tässä lämpötilassa ylimääräisten tuotteiden vyöhykkeet agarosigeelissä olivat huomattavasti heikentyneet tai osalla testinäytteistä jopa hävinneet kokonaan. Taulukoihin 3 ja 4 on koottu *nifH*-typensitojageenin monistuksessa käytettävät reagenssit ja lämpötilaohjelmat.



KUVIO 5. Nostettaessa annealing-lämpötilaa sekä halutun tuotteen (noin 320 bp) että ylimääräisten tuotteiden (noin 600 bp ja noin 800 bp) vyöhykkeiden monistuminen heikkeni. Kuviossa 5A annealing-lämpötila välillä 53,0-58,0 °C ja kuviossa 5B 58,0-64,0 °C. Molemmissa kuvioissa on sama näyte.

TAULUKKO 3. *nifH*-geenin monistuksessa käytettävät reagenssipitoisuudet.

Reagenssi / reaktiutilavuus			50 µl	25 µl
PCR 1	Aluke 1	FGPH19	0,3 µM	0,3 µM
	Aluke 2	PolR	0,3 µM	0,3 µM
PCR 2	Aluke 1	PolF-GC	0,3 µM	0,3 µM
	Aluke 2	AQER	0,3 µM	0,3 µM
dNTP-seos			200 µM	200 µM
10x puskuriliuos (sis. 20 mM MgCl <sub>2</sub> )			1x	1x
MgCl <sub>2</sub>			2 mM	2 mM
BSA			400 ng/ml	400 ng/ml
Polymeraasi			1 U	0,5 U
Templaatti			1 µl	0,5 µl

TAULUKKO 4. *nifH*-geenin monistamiseen käytettävät lämpötilaohjelmat.

PCR 1			PCR 2		
°C	aika	syklit	°C	aika	syklit
95	5 min	1x	95	5 min	1x
94	30 s	30x	94	30 s	30x
53	1 min		61	1 min	
72	3 min		72	3 min	

## 7 PÄÄTÄNTÄ

Kehittämistehtävän kokeellisessa osuudessa optimoitiin PCR-menetelmä *nifH*-typensitojageenin monistamiseksi turvenäytteistä Metlan Parkanon yksikön käyttöön. Optimoinnin lähtökohtana käytettiin kolmea valmista ohjetta, joilla on aikaisemmin saatu monistettua *nifH*-geeniä. Optimoinnissa käytettiin kahta positiivista kontrollinäytettä ja pintaturvenäytteitä, joiden DNA oli eristetty jo aikaisemmin. Lisäksi työhön sisältyi DNA-eristys toisesta pintaturvenäytesarjasta kaupallisen kitin avulla. Kokeellisen osuuden aikana saatiin optimoitua reagenssimäärät ja lämpötilaohjelma kokeilemalla eri ohjeita ja lämpötiloja.

Optimoinnin alussa käytettiin yksivaiheista PCR-menetelmää ja PolF-PolR-aluekparia, jonka todettiin muodostavan alukedimeerejä ja sekundäärirakenteita. Alukkeilla saatiin monistumaan vain positiivinen kontrollinäyte I. Optimoinnissa päädyttiin käyttämään nested-PCR-menetelmää, joka koostuu kahdesta peräkkäisestä PCR-reaktiosta. Reaktioissa käytetään eri alukepareja ja eri annealing-lämpötilaa. *nifH*-typensitojageenin monistamisessa käytetään FGPH19-PolR- ja PolF-GC-AQER-aluekpareja. Jälkimmäisen reaktion korkeampi annealing-lämpötila johtuu PolF-GC-alukkeen korkeasta GC-pitoisuudesta. Käytössä olleiden kahden näytesarjan jokainen näyte saatiin monistumaan nested-PCR-menetelmällä. Agarosigeelillä näkyvät vyöhykkeet olivat erittäin vahvoja.

PCR-menetelmän optimoinnissa voitaisiin myös määrittää DNA-näytteiden puhtauden ja eristyksen saannot spektrofotometrisellä mittauksella. Tällöin saataisiin myös templaatin määrä optimoitua. Positiivisista kontrollinäytteistä kokeiltiin määrittää DNA:n puhtautta ja määrää spektrofotometrillä, mutta koska saadut tulokset erosivat paljon toisistaan, päätettiin mittaus jättää pois tästä kehittämistehtävästä. Tulosten hajanaisuuteen vaikutti ainakin osittain todennäköisesti se, että mittauksessa käytettiin kvartsikyvetten sijaan kertakäyttökyvettejä, koska kvartsikyvettejä ei ollut saatavilla.

Koska nested-PCR osoittautui tehokkaaksi menetelmäksi *nifH*-typensitojageenin monistamisessa, voitaisiin näytesarjoille tehdä denaturoivan gradientin geielektroforeesi ja sekvensoida näytteet. Vertaamalla saatuja sekvenssejä kirjastosekvensseihin voitaisiin selvittää samankaltaisuutta aiemmin eristettyjen *nifH*-geenisekvenssien kanssa. Siten

saataisiin selville, onko PCR-reaktioissa monistunut tuote todella *nifH*-geeni. Ennen sekvensointia PCR-tuote voidaan myös puhdistaa käyttäen kaupallista kittiä, jossa haluttu vyöhyke leikataan agarosigeelistä ja puhdistetaan kitin avulla.

## LÄHTEET

Campbell, M.K. & Farrell, S.O. 2006. Biochemistry. Viides painos. USA: Thomson Brooks/Cole.

Chou, Q., Russell, M., Birch, D. E., Raymond, J. & Bloch W. 1992. Prevention of pre-PCR mis-priming and primer dimerization improves low-copy-number amplifications. *Nucleic Acids Research*, Vol. 20, No. 7 1717-1723.

Dedysh, S.N., Ricke, P. & Liesack, W. 2004. NifH and NifD phylogenies: an evolutionary basis for understanding nitrogen fixation capabilities of methanotrophic bacteria. *Microbiology* 150.

Diallo, M.D., Willems, A., Vloemans, N., Cousin, S., Vandekerckhove, T.T., de Lajudie, P., Neyra, M., Vyverman, W., Gillis, M. & Van der Gucht, K. 2004. Polymerase chain reaction denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the N<sub>2</sub>-fixing bacterial diversity in soil under *Acacia tortilis* ssp. *raddiana* and *Balanites aegyptiaca* in the dryland part of Senegal. *Environmental Microbiology* 6(4).

Doyle, K. (toim.) 1996. Protocols and applications guide. Kolmas painos. USA: Promega Corporation.

Goto, M., Ando, S., Hachisuka, Y. & Yoneyama, T. 2005. Contamination on diverse *nifH* and *nifH*-like DNA into commercial PCR primers. *FEMS Microbiology Letters* 246.

Kramer, M.F. & Coen, D.M. 2001. The Polymerase chain reaction. Teoksessa Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. & Struhl, K. (toim.) *Current protocols in molecular biology*. USA: John Wiley & Sons, Inc.

Leppänen, S., Rissanen, A. & Tiirola, M. Experimental comparison of nitrogen fixation and methane oxidation rates between boreal *Sphagnum* species and habitats.

Löffert, D., Seip, N., Karger, S. & Kang, J. Qiagen news. PCR optimization: degenerate primers. 1998:2. Hilden, Saksa: Qiagen GmbH. Luettu 30.4.2010.  
<http://www1.qiagen.com/literature/qiagennews/0298/982pcrop.pdf>

Metsäntutkimuslaitos. Päivitetty 4.2.2010a. Metla Parkano. Luettu 12.4.2010.  
<http://www.metla.fi/pa/>

Metsäntutkimuslaitos. Päivitetty 16.4.2010b. Tutkimustoiminta. Luettu 17.4.2010.  
<http://www.metla.fi/hanke/3470/index.htm>

Mo Bio. 2009. PowerSoil<sup>®</sup> DNA Isolation Kit. Instruction Manual. Mo Bio Laboratories, Inc.

- Poly, F., Monrozier, L.J. & Bally, R. 2001a. Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of *nifH* genes in communities of nitrogen fixers in soil. *Research in Microbiology* 152.
- Poly, F., Ranjard, L., Nazaret, S., Goubrière, F. & Monrozier, L.J. 2001b. Comparison of *nifH* gene pools in soils and soil microenvironments with contrasting properties. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 67, No.5. American Society for microbiology.
- Prescott, L.M., Harley, J.P. & Klein, D.A. 2005. *Microbiology*. Kuudes painos. New York: McGraw-Hill.
- Raymond, J., Siefert, J.L., Staples, C.R. & Blankenship, R.E. 2004. The natural history of nitrogen fixation. *Molecular Biology and Evolution* 21(3).
- Roux, K.H. 1995. *Optimization and troubleshooting in PCR*. Genome Research. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Rychlik, W., Spencer, W.J. & Rhoads, R.E. 1990. Optimization of the annealing temperature for DNA amplification *in vitro*. *Nucleic Acids Research*, Vol. 18, No. 21. Oxford University Press.
- Sambrook, J. & Russell, D.W. 2001. *Molecular cloning. A laboratory manual*. Kolmas painos. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Suominen, I. & Ollikka, P. 2003. *Yhdistelmä-DNA-tekniikan perusteet*. 3-1. painos. Opetushallitus.
- Suominen, I. & Ollikka, P. *Yhdistelmä-DNA-tekniikan perusteet –oppikirjan verkkosio*. Tulostettu 9.2.2010. <http://www.edu.fi/oph/abc/dna/pcr1.html>.
- Zehr, J.P., Crumbliss, L.L., Church, M.J., Omoregie, E.O. & Jenkins, B.D. 2003a. Nitrogenase genes in PCR and RT-PCR reagents: implications for studies of diversity of functional genes. *BioTechniques* 35.
- Zehr, J.P., Jenkins, B.D., Short, S.M. & Steward, G.F. 2003b. Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. *Environmental Microbiology* 5(7).

Optimoinnissa käytetyt alukkeet (taulukko 5), reagenssit ja valmistajat (taulukko 6) sekä muokatut reagenssiohjeet (taulukko 7)

TAULUKKO 5. Optimoinnissa käytetyt Oligomer Oy:n alukkeet.

Aluke	Sekvenssi	Sulamis- lämpötila / °C
PolF (forward)	5'- TGC GAY CCS AAR GCB GAC TC -3'	62,8
PolR (reverse)	5'- ATS GCC ATC ATY TCR CCG GA -3'	59,4
FGPH19 (forward)	5'- TAC GGC AAR GGT GGN ATH G -3'	57,4
PolF-GC (forward)	5'- CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GGC CCG CCG CCC CCG TGC GAY CCS AAR GCB GAC TC -3'	93,3
AQER (reverse)	5'- GAC GAT GTA GAT YTC CTG -3'	52,5
	sekvensseissä Y = C, T / S = G, C / R = G, A / B = C, G, T / N = A, C, G, T / H = A, C, T	

TAULUKKO 6. PCR-menetelmän optimoinnissa käytetyt reagenssit ja valmistajat.

Reagenssi		Valmistaja
dNTP-seos	dNTP Mix, a mixture of dATP, dGTP, dCTP and dTTP	Finnzymes Oy
Polymeraasi	Biotools DNA Polymerase 5 U/μl	Biotools B&M Labs S.A. Spain
Puskuriliuos, MgCl <sub>2</sub>	10x Standard Reaction Buffer with MgCl <sub>2</sub>	
BSA	Bovine Serum Albumin (BSA), naudan seerumin albumiini	Fermentas
DMSO	Dimethylsulfoxide C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> OS, di- metyylisulfoksidi 99,9 %	Sigma

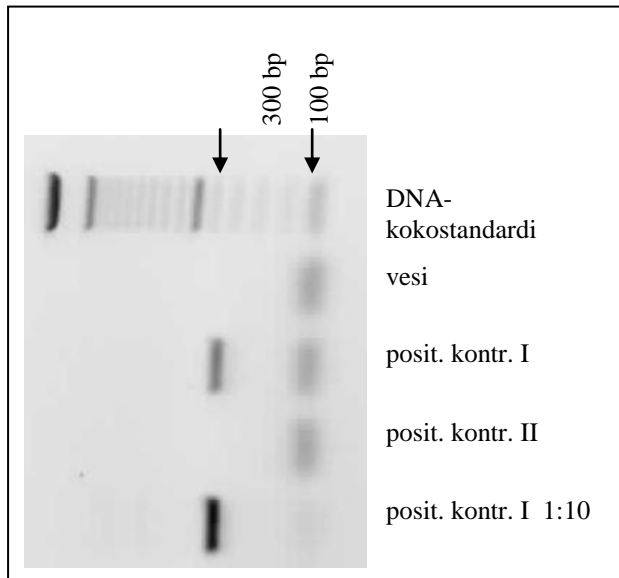
(jatkuu)

TAULUKKO 6. Muokatut reagenssiohjeet.

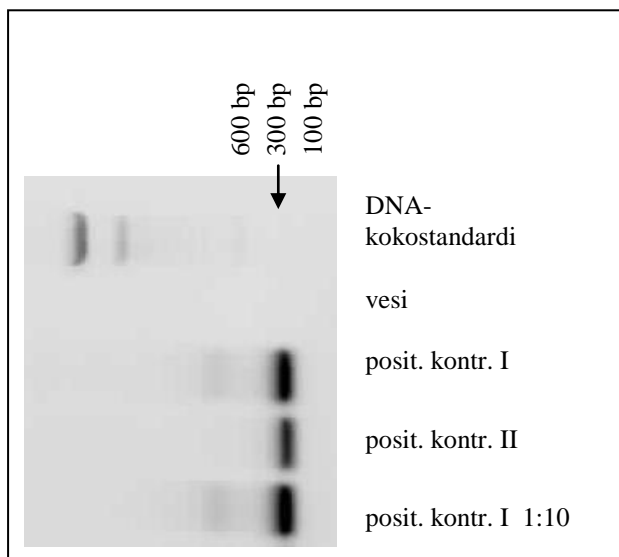
50 µl reaktiivilavuus	A2		BC		
Alukkeet / µM	PolF	0,6	PCR 1	FGPH19	0,3
				PolR	0,3
	PolR	0,6	PCR 2	PolF-GC	0,3
				AQER	0,3
Puskuriliuos	1x		1		
MgCl <sub>2</sub> / mM	2		2		
dNTP / µM	200		200		
DMSO / mM	5 %		-		
BSA	-		400 ng/ml		
Polymeraasi / U	2,5		1		



Agaroosigeelikuvat ensimmäisen (kuvio 6) ja jälkimmäisen (kuvio 7) PCR-reaktion jälkeen

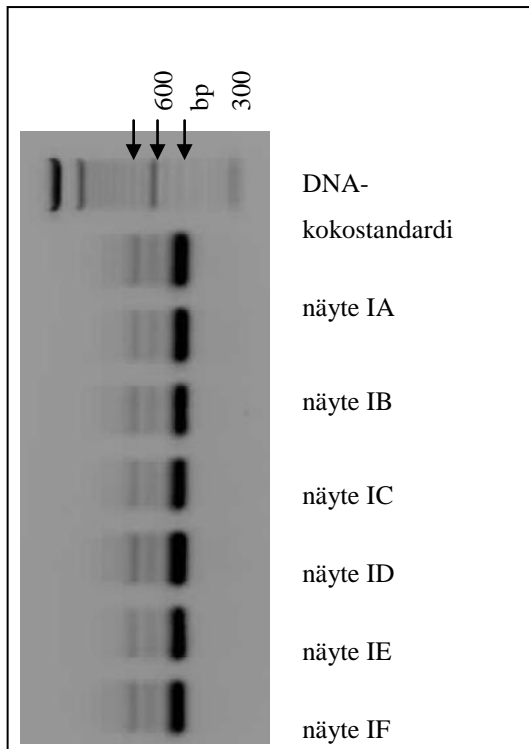


KUVIO 6. Ensimmäisessä PCR-reaktiossa monistunut haluttu tuote, noin 430 bp sekä noin 100 bp tuote.

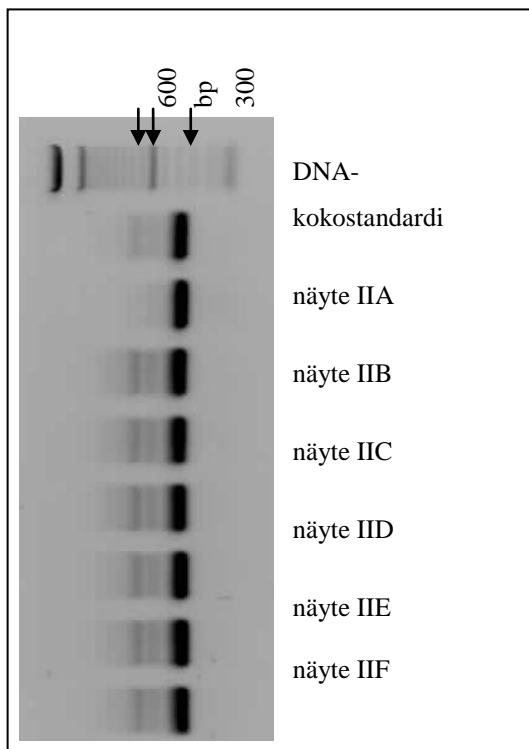


KUVIO 7. Jälkimmäisessä PCR-reaktiossa monistunut haluttu tuote, noin 320 bp.

Näytesarjojen I ja II agarosigeelikuvat jälkimmäisen PCR-reaktion jälkeen



KUVIO 8. Jälkimmäisessä PCR-reaktiossa monistuneet tuotteet, haluttu tuote noin 320 bp sekä ylimääräiset tuotteet, noin 600 bp ja noin 800 bp, sarjan I näytteitä.



KUVIO 9. Jälkimmäisessä PCR-reaktiossa monistuneet tuotteet, haluttu tuote noin 320 bp sekä ylimääräiset tuotteet, noin 600 bp ja noin 800 bp, sarjan II näytteitä.