

Iiris Nikula

Pesäke-PCR-menetelmän optimointi

Gramnegatiiviset sauvabakteerit

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Bioanalytiikan tutkinto-ohjelma

Bioanalytiikko (AMK)

Opinnäytetyö

17.4.2018

Tekijä Otsikko	liris Nikula Pesäke-PCR-menetelmän optimointi: gramnegatiiviset sauvabakteerit
Sivumäärä Aika	35 + 5 liitettä 17. huhtikuu 2018
Tutkinto	Bioanalyttikko (AMK)
Tutkinto-ohjelma	Bioanalytiikan tutkinto-ohjelma
Suuntautumisvaihtoehto	Bioanalyttikko (AMK)
Ohjaajat	Heidi Malava, lehtori Johannes Cairns, tohtorikoulutettava, projektiohjaaja Jenni Hultman, akatemiatutkija
<p>Opinnäytetyö tehtiin Helsingin yliopiston mikrobiologian osastolla kokeellisen evoluution tutkimusryhmässä. Opinnäytetyön tarkoituksena oli optimoida menetelmä, jossa PCR suoritetaan bakteeripesäkkeille ilman DNA-eristystä (pesäke-PCR). Optimointi suoritettiin selvittämällä soluliuoksen kolmessa lyysauspuskurissa keittämisen, sentrifugoinnin ja kahden polymeraasientsyymin vaikutus PCR:n tilastollisesti mallinnettuun onnistumistodennäköisyyteen.</p> <p>Tutkimuksen näyttemateriaalina oli kahdeksan bakteerikantaa Helsingin yliopiston HAMBI-kantakokoelmasta. Näytteet valittiin kiinnittämällä huomiota bakteerien kliiniseen merkitykseen. Kaikki tutkimukseen valitut kannat ovat gramnegatiivisia, opportunistisia sauvabakteereja.</p> <p>Tutkimuksesta kävi ilmi, että PCR-tulokseen vaikutti voimakkaimmin näytteen esikäsittely: Positiivista PCR-tulosta ennusti parhaiten 20 mM NaOH:n käyttäminen lyysauspuskurina. Näytteen sentrifugoinnilla ei ollut tilastollisesti merkitsevää vaikutusta, mutta sentrifugointi johti suurempaan tuotemäärään. PCR-ohjelma, jossa oli käytössä DreamTaq-polymeraasientsyymi, tuotti Phusion-polymeraasientsyymiin verrattuna enemmän positiivisia PCR-tuloksia, mutta tuotti myös enemmän virheitä.</p>	
Avainsanat	PCR, pesäke-PCR, gramnegatiiviset sauvabakteerit

Author Title	liris Nikula Optimization of colony PCR for gram-negative rods
Number of Pages Date	35 + 5 appendices 17 April 2018
Degree	Bachelor of Health Care
Degree Programme	Biomedical Laboratory Science
Specialisation option	Biomedical Laboratory Science
Instructors	Malava Heidi, Senior lecturer Cairns Johannes, PhD Candidate, Project Manager Hultman Jenni, Academy Research Fellow
<p>This project was performed at the Experimental Evolution group in the Department of Microbiology, University of Helsinki. The purpose of the study was to optimize a method for PCR amplification from bacterial colonies without DNA extraction (colony PCR). This was achieved by comparing the effect of three lysis buffers, centrifugation of boiled cell suspension and two polymerase enzymes on the statistically modelled probability of a positive PCR outcome.</p> <p>The study material consisted of eight bacterial strains from the HAMBI culture collection at the University of Helsinki. The strains were chosen based on clinical relevance. All the strains selected for the study are gram-negative, opportunistic rods.</p> <p>The results of the study showed that sample pre-treatment had the strongest impact on PCR outcome: The best predictor of a positive PCR result was the use of 20 mM NaOH as lysis buffer. Centrifugation did not have a statistically significant effect on PCR success but the use of centrifugation resulted in a higher amount of PCR product. A PCR program using the DreamTaq polymerase enzyme produced a higher number of positive PCR results compared to Phusion, while also producing a higher number of unwanted products.</p>	
Keywords	PCR, colony PCR, gram-negative rod

Sisällysluettelo

1	Johdanto	1
2	DNA:n monistaminen polymeeraasiketjureaktiolla	2
2.1.	Alukkeet	3
2.2.	Polymeraasit	4
2.3.	Pesäke-PCR	5
2.4.	Agaroosigeelielektroforeesi	8
2.5.	Sanger-sekvensointi	9
3	Optimointi	10
4	Regressioanalyysi	10
5	Opinnäytetyön tarkoitus ja tutkimuskysymykset	12
6	Työn toteutus	12
6.1.	Tutkimusnäytteet ja kasvatusolosuhteet	13
6.2.	Esikäsittelyt ja sentrifugointi	14
6.3.	PCR	16
6.3.1.	Alukkeet	16
6.3.2.	PCR-reaktioseos	17
6.4.	PCR-ohjelmat	17
6.5.	Agaroosigeelielektroforeesi	18
6.6.	Sanger-sekvensointi	19
6.7.	PCR-menetelmän optimointi	19
6.8.	Regressioanalyysi	21
7	Tulokset	23
7.1.	PCR-tulokset	23
7.2.	Sanger-sekvensointi	27
7.3.	Regressioanalyysi	27
8	Pohdinta	31
8.1.	Tutkimuksen eettisyys ja luotettavuus	33
	Lähteet	35

Liite 1 Tutkimuksen aineisto

Liite 2 Tietoa tutkimuksessa käytettävistä bakteerikannoista

Liite 3 Menetelmäohjeet

Liite 4 Visuaalinen esitys kerätystä aineistosta

Liite 5 Pesäke-PCR-protokolla

1 Johdanto

Opinnäytetyön aihe syntyi työelämässä tehtyjen havaintojen perusteella syksyllä 2017. Tuolloin Helsingin yliopiston mikrobiologian osastolla tekemieni pesäke-PCR-tutkimusten yhteydessä havaitsin, ettei pesäke-PCR:lle ole yleisesti toimivaa protokollaa. Kyseisessä tutkimuksessa 22:lle kantakokoelman bakteerikannalle tehtiin pesäke-PCR, jotta kantaidentiteetti voitaisiin varmistaa sekvensoimalla. Laboratoriossa käytössä ollut menetelmä ei aina tuottanut toivottavaa monistumista. Jatkotoimenpiteisiin ei ollut saatavilla selkeää suositusta, vaan työtä jatkettiin oman osaamisen mukaisesti tai hakemalla neuvoa muilta osaston asiantuntijoilta. Epäonnistuneen PCR:n jälkeen työ suoritettiin uudestaan muuttamalla parametreja, joiden voitiin katsoa vaikuttaneen bakteerin monistumisen epäonnistumiseen, mutta joiden vaikutuksesta ei ollut varmuutta.

Pesäke-PCR-menetelmää on tyypillisesti käytetty kloonauksen onnistumisen tutkimiseen *Escherichia coli* -bakteerilla. *E. coli* -bakteerille toimivat protokollat eivät kuitenkaan välttämättä tuota samaa PCR:n onnistumistodennäköisyyttä muille gramnegatiivisille bakteerilajeille, joilla on vaihteleva solurakenne ja -fysiologia. Tämä saattaa selittää, miksi laboratoriossa käytössä ollut menetelmä tuotti vaihtelevia tuloksia eri bakteerikannoille. Tässä työssä PCR:n onnistumistodennäköisyyttä tutkittiin PCR-menetelmän optimoinnilla. Optimoinnin tarkoituksena oli tarkastella erilaisten menetelmien toimintavarmuutta sekä etsiä optimaalinen vaihtoehto käytössä olevan menetelmän tilalle. Optimoinnissa keskityttiin lyysauspuskurin, sentrifugoinnin sekä polymeraasientsyymin vaikutukseen.

Menetelmävertailuun otettiin mukaan myös kaksi muuta esikäsitteilymenetelmää. Yksi kokeellinen menetelmä keskittyi jo lyysattujen bakteerisolujen jatkokäsittelyyn suodatinpaperin avulla. Toisessa kokeellisessa menetelmässä soluille ei käytetty erillistä lyysauspuskuria, vaan solut siirrettiin käsittelemättömälle selluloosapohjaiselle suodatinpaperille, joka puhdistettiin pesupuskurilla. Molemmissa menetelmissä suodatinpaperi siirrettiin PCR-reaktioosekseen pesun jälkeen.

Tehty tutkimus antoi selkeän tuloksen, jonka pohjalta opinnäytetyössä tehtiin pesäke-PCR-menetelmälle ohjeistus, joka on toimitettu laboratorion käyttöön. Ohjeistus lisää

työskentelyn toimintavarmuutta, kustannustehokkuutta ja helppoutta, vähentäen turhien uusintatutkimusten määrää.

2 DNA:n monistaminen polymeerasiketjureaktiolla

DNA:ta voidaan monistaa joko liittämällä DNA-jakso elävään soluun (kloonaaminen), joka monistaa sitä solujakautumisen yhteydessä, tai keinotekoisilla (*in vitro*) menetelmillä. Vaikka menetelmät eroavat toisistaan, voidaan molempien avulla monistaa yksittäisiä kiinnostuksen kohteena olevia DNA-jaksoja (yleensä geenejä). (Brown 2016:6–11.)

Polymeerasiketjureaktio (polymerase chain reaction, PCR) on yksinkertainen entsyymaattinen menetelmä, joka mahdollistaa tietyn DNA-jakson monistamisen (Garibyan – Avashia 2014). PCR:ään verrattuna geenien kloonaus on hidasta, sillä laboratorio-oloissa geenien kloonaaminen voi viedä viikkoja tai kuukausia, kun taas PCR monistaa DNA:n muutamassa tunnissa. Geenien kloonaaminen on silti edelleen käytössä, sillä PCR:n toimiminen edellyttää alukkeiden suunnittelemista ja sitoutumista haluttuun paikkaan. Lisäksi PCR edellyttää sekvenssien tuntemusta, sillä mikäli sekvenssiä ei tunneta, ei sopivia alukkeita voida tehdä. Tästä johtuen PCR ei sovellu käytettäväksi sellaisten geenien eristämiseen, joita ei ole tutkittu ennen, jolloin tutkimus on tehtävä kloonaamalla. Lisäksi PCR toimii vain rajallisten pituisten DNA-sekvenssien monistamisessa: PCR:llä voidaan monistaa 5-40 kb:n mittaisia DNA-molekyylejä. (Brown 2016:6–11.)

PCR-menetelmä suoritetaan aina keinotekoisessa ympäristössä käyttäen hyödyksi reagensseja ja lämpötilavaihteluita. Perinteisessä PCR:ssä reaktio käynnistyy, kun reaktioseos kuumennetaan lähelle veden kiehumispistettä (esim. 94 °C). Kuumennus saa kaksijuosteisen DNA:n vetysidokset katkeamaan, jolloin kaksijuosteisesta DNA:sta tulee yksijuosteista (denaturaatio). Denaturaation jälkeen lämpötilaa lasketaan (esim. 50–60 °C), joka mahdollistaa reaktioseoksessa olevien alukkeiden kiinnittymisen yksijuosteiseen DNA:han. Tämä annealing- eli kiinnittymislämpötila riippuu käytetystä polymeerasista sekä alukkeiden pituudesta ja GC-pitoisuudesta. Mikäli reaktioseoksessa ei ole alukkeita tai alukkeet eivät sovi näytemateriaaliin, DNA-juosteet kiinnittyvät jäl-

leen toisiinsa, eikä toivottua monistumista tapahdu. Kiinnittymisvaiheen jälkeen lämpötila nostetaan lämpötilaan (esim. 74 °C DreamTaq-polymeraasientsyymiä käytettäessä), joka mahdollistaa DNA-polymeraasientsyymien toiminnan. Tässä vaiheessa DNA-polymeraasi tuottaa komplementaarista DNA:ta kohde-DNA:han (templaatti) nähden tehden yksijuosteisesta DNA:sta kaksijuosteista: tapahtuu loppupidennys. Loppupidennysvaiheen jälkeen lämpötila nostetaan takaisin 94 °C:seen, jolloin kaksijuosteinen DNA denaturoituu ja monistumissykli alkaa uudelleen. Sykliä toistetaan useita kertoja, jolloin muodostuu runsaasti (esim. 30 sykliä: n. 130 miljoonaa) kaksijuosteisia DNA-molekyylejä, joista jokainen on kopio alkuperäisestä DNA-molekyylistä. (Brown 2016:6–11, 157–159.)

2.1. Alukkeet

Alukkeet ovat avain onnistuneeseen DNA:n monistumiseen. Alukkeet tulee suunnitella oikein, jotta ne sitoutuvat oikeaan kohtaan DNA-jaksossa. Väärin suunnitellut alukkeet voivat aiheuttaa DNA:n monistumisen estymisen siksi, että alukkeet kiinnittyvät väärään DNA-jaksoon, useampaan kuin yhteen jaksoon tai toisiinsa. (Brown 2016:159–160.)

Alukkeiden toimivuuteen vaikuttaa myös PCR-ohjelman kiinnittymislämpötila, sillä DNA-DNA-hybridisaatio on lämpötilariippuvainen menetelmä: jos lämpötila on liian korkea, hybridisaatiota ei tapahdu ja alukkeet sekä templaatti-DNA pysyvät muuttumattomina. Jos taas lämpötila jää liian alhaiseksi, muodostuu vakaita epäsopivia hybridejä. Ihanteellisen kiinnityslämpötilan tulee olla riittävän alhainen DNA-DNA-hybridisaatiolle, mutta tarpeeksi korkea estämään epäsopivien hybridien muodostuminen. (Brown 2016:161.)

Sopivan kiinnityslämpötilan voi laskea huomioimalla alukkeen sulamislämpötilan eli T_m -lämpötilan (T_m = melting temperature) (Brown 2016:163). T_m -lämpötilalla tarkoitetaan lämpötilaa, jossa 50 % alukkeesta pysyy yksijuosteisena ja 50 % kykenee kiinnittymään templaattiin. Lämpötila, joka on 1–2 °C T_m -lämpötilaa alhaisempi, on yleensä riittävän alhainen oikeiden aluke-templaatti-hybridien muodostumiseksi sekä riittävän korkea epäsopivien hybridien muodostumisen estämiseksi (Brown 2016:163).

DNA:n emäksistä guaniini (G) ja sytosiini (C) nostavat T_m -lämpötilaa verrattuna adeniniin (A) ja tyminiiniin (T). T_m -lämpötilan voi yksinkertaisimmillaan laskea kaavalla: T_m

= $(4 \times [G+C]) + (2 \times [A+T])$ °C, jossa [G+C] on G ja C emästen lukumäärä alukkeen sekvenssissä ja [A+T] on A- ja T-emästen lukumäärä alukkeen sekvenssissä (Brown 2016:163–164) tai käyttämällä alukkeita tai reagensseja tuottavien yritysten laskureita, kuten Thermo Fisherin tarjoamaa ilmaista T_m Calculator ohjelmaa. Lisäksi alukkeiden suunnittelussa tulee huomioida, että käytettävien alukkeiden T_m-lämpötilat ovat riittävän lähellä toisiaan, jotta kiinnittymislämpötila ei ole liian korkea tai matala yhdelle alukkeista (Brown 2016:164).

2.2. Polymeraasit

PCR-reaktiossa DNA-polymeraasi toimii kemiallisen reaktion katalysaattorina, ja sen pääasiallinen tehtävä on DNA-synteesin suorittaminen. Polymeraasientsyymi toimii aina sekvenssin uudelleen luomisessa 5'→3'-suunnassa. Useimmat polymeraasientsyymit ovat lämpöstabieleja eli ne pysyvät aktiivisina lämpötiloissa, joissa normaalit entsyymit eivät kykene toimimaan. (Brown 2012:194, 198.)

Kaikki DNA-polymeraasit kykenevät jatkamaan DNA-jakson monistamista alukkeista, jotka ovat kiinnittyneet yksijuosteiseen DNA-jaksoon, mutta kaikki polymeraasit eivät sovellu DNA:n sekvensointiin, sillä useimmat DNA-polymeraasit kykenevät sekä hajotamaan että syntetisoimaan DNA:ta entsyymaattisella aktiivisuudellaan. Hajoamista voi tapahtua sekä 5'→3' että 3'→5' suuntaan, joista jälkimmäinen on erityisen haitallinen ketjuterminatiosekvenssoinnille (Sanger-sekvensointi), sillä 3'→5' -aktiivisuus estää ketjun lopettamisen poistamalla dideoksinukleotidin välittömästi sen jälkeen, kun se on lisätty 3'-päähän. Tyypillisimmin käytössä on Taq-pohjainen DNA polymeraasientsyymi (alun perin *Thermus aquaticus* -bakteerista eristetty lämpöstabili polymeraasi), sillä se ei sisällä eksonukleaasiaktiivisuutta ja mahdollistaa 750 emäsparin mittaisen sekvenssin monistamisen yhdessä kokeessa. (Brown 2016: 178–179.) Eksonukleaasiaktiivisuudella tarkoitetaan polymeraasin kykyä poistaa tuotteeseen virheellisesti lisätty emäs (Khare – Eckert 2002).

Kaikki polymeraasit ovat virhealttiita ja voivat toisinaan lisätä vääriä nukleotidejä kasvavaan DNA-juosteeseen. Useimmat polymeraasit kykenevät kuitenkin korjaamaan nämä virheet syntetisoimalla uudelleen oikean sekvenssin. Tätä ominaisuutta kutsutaan oikolukemistoiminnoksi, ja se on riippuvainen polymeraasin 3'-5'-eksonukleaasiaktiivisuudesta. Taq-polymeraasientsyymillä ei ole oikolukemistoi-

mintoa, jonka vuoksi se ei kykene korjaamaan virheitä. Tästä johtuen Taq-polymeraasientsyymi ei aina kopioi tarkasti templaattimolekyylä. Taq-polymeraasientsyymien kohdalla virhettä voidaan pitää kuitenkin lähes merkityksettömänä, sillä virhetaajuus on yksi 9000 syntetisoitua nukleotidia kohden. Akkumulatiovaikutuksen vuoksi virhe esiintyy PCR-tuotteessa keskimäärin 30 emäsparin välein, kun PCR-ajoa on suoritettu 30 sykliä. (Brown 2016:167.)

Useimmissa sovellutuksissa Taq-polymeraasientsyymien korkea virhetaajuus ei ole ongelma, vaan oikea sekvenssi saadaan luotua kopiointivirheistä huolimatta. Tämä johtuu siitä, että Taq-polymeraasientsyymien tekemät virheet ovat satunnaisia ja satunnaisvirheiden ympärillä on oikein muodostunutta juostetta. Polymeerasin aiheuttamat virheet ovat merkittäviä erityisesti silloin, jos virhe on tullut monistuksen alkuvaiheessa. (Brown 2016:168.)

Taq-polymeraasientsyymien lisäksi PCR-menetelmässä on yleisesti käytössä Phusion-polymeraasientsyymi, joka on 52 kertaa Taq-polymeraasientsyymiä tarkempi. Phusion-polymeraasientsyymien kestävyyttä on parannettu niin, että reaktiohäiriöt ovat vähäisiä ja optimointi minimaalista. Phusion-polymeraasientsyymissä on otettu huomioon alukkeiden hajoaminen ja epäspesifisten hybridien muodostuminen kehittämällä tuotteeseen ainutlaatuinen kuumakäynnistysteknologia. Phusion-polymeraasientsyymillä on lisäksi erittäin alhainen virhetaajuus, ja se kykenee säilyttämään tarkan DNA-sekvenssin Taq-polymeraasientsyymiä paremmin. (Phusion DNA Polymerases. 2017.)

2.3. Pesäke-PCR

Pesäke-PCR:ssä monistuva DNA tulee vapauttaa pesäkkeessä olevista soluista ennen PCR-reaktion suorittamista. Bakterisolun lyysauksessa on oleellista huomioida, että bakteerin soluelimiä suojaa aina sytoplasminen membraani eli solukalvo. Soluseinän pääkomponenttina on peptidoglykaani, joka vaikuttaa bakteerin muotoon ja antaa bakteerille mekaanisen resistenssin osmoottiselle paineelle estäen solujen tuhoutumisen. Soluseinä koostuu hydrofobisesta fosfolipidikaksoiskerroksesta, johon on kiinnittyneenä proteiineja. Tämä rakenne toimii puoliläpäisevänä kalvona, joka estää hydrofiilisten aineiden vuotamisen sytoplasmasta, suojaten solua ulkopuolisilta tekijöiltä. (Catalão ym. 2013.)

Useimmilla bakteereilla on myös solua jäykistävä soluseinä ja joillakin kapselirakenne. Lisäksi useilla bakteereilla on solujen pintaan tarttumisen mahdollistavia elimiä, fimbrioita eli tarttumakarvoja, jotka ovat vahvasti yhteydessä bakteerin taudinaiheuttamisominaisuuteen. Bakteerit liikkuvat ympäristössään usein liikkumasiiman eli flagellan avulla, joka on korkkiruuvimuotoinen rakenne, jonka pyörimisliikkeen avulla bakteerisolu liikkuu pois epäedullisista oloista kohti parempia kasvuolosuhteita. Flagellattomat bakteerit liikkuvat liukumalla. Bakteerisolu sisältää DNA:ta, RNA:ta, proteiineja, lipidejä ja hiilihydraatteja sekä ribosomeja, jotka vastaavat solun toiminnasta. (Vaara – Skurnik – Sarvas 2010.)

Solurakenteiden rikkomiseksi ja DNA:n vapauttamiseksi voidaan käyttää useita menetelmiä riippuen siitä, onko kyseessä gramnegatiivinen vai grampositiivinen bakteeri (Jordens 1998). Grampositiivisten bakteereiden soluseinä on paksumpi kuin gramnegatiivisten bakteerien soluseinä. Lisäksi grampositiivisilla bakteereilla peptidoglykaanikerros sisältää pitkiä anionisia polymeerejä ja teikohappoja, jotka osallistuvat solun toimintaan. Gramnegatiivisilla bakteereilla on ohuempi peptidoglykaanikerros, joka on kovalenttisesti sitoutuneena ulompaan kahdesta solukalvosta. Gramnegatiivisten bakteerien ulompi solukalvo on epäsymmetrinen lipidikerros, joka sisältää fosfolipidejä ja lipopolysakkarideja. Tämä ulkoinen solukalvo toimii gramnegatiivisten bakteerien suojaiteena, säädellessä liukoisten aineiden virtausta. (Catalão ym. 2013.)

Bakteerin soluseinän tuhoaminen ja solunsisäisten komponenttien vapauttaminen vaativat soluseinän lujuutta tuottavien komponenttien tuhoamisen. Gramnegatiivisten bakteerien kohdalla lyysaus vaatii peptidoglykaanin hajottamisen. Soluseinän tuhoaminen voidaan tehdä joko mekaanisilla keinoilla tai ei-mekaanisilla keinoilla (fysikaaliset, kemialliset ja entsyymaattiset), mitkä ovat tarkempia ja lempeämpiä. Mekaanisissa menetelmissä solut altistetaan solustressille, kuten korkealle paineelle, hankaukselle tai ulträänelle. (Geciova et al. 2002.)

Fysikaalisia menetelmiä ovat esimerkiksi dekompressio, jossa solujen hajotus tapahtuu johtamalla solun sisään kyllästetty kaasua, osmoottinen shokki, jossa suspensio on laimentamisen jälkeen altistettu korkealle osmoottiselle paineelle, ja lämpökäsittely. Menetelmät ovat herkkiä ja mahdollistavat mm. proteiinien ja entsyymien erottelun. (Geciova et al. 2002:546–547.) Pesäke-PCR-menetelmässä solut lyysataan tyypillisesti lämpökäsittelyllä. Lisäksi fysikaalisen menetelmän tueksi voidaan lisätä kemiallisia komponentteja soluseinämän tuhoamiseksi.

Kemiallisissa menetelmissä ulompi solukalvo hajotetaan käyttämällä bakteerilajille sopivaa hajotusmenetelmää. Kemiallinen hajotus voidaan tehdä käyttämällä esimerkiksi antibiootteja, kelatoivia aineita (EDTA), kaotrooppeja, detergentejä, liuottimia, hydroksideja ja hypokloriitteja. Kemiallinen hajottaminen liuottimilla ja detergenteillä ei kuitenkaan johda solun sisäisten entsyymien vapautumiseen. (Geicova et al. 2002:547.)

Esimerkiksi Nybo (2012:345–347) esittelee kemiallisena menetelmänä NaOH-protokollan, jossa pesäke-PCR-menetelmässä bakteerisolujen lyysaus tehdään 20 mM NaOH-liuoksella. Menetelmä onnistuu hänen tutkimustensa mukaan esimerkiksi *Saccharomyces cerevisiae* -hiivalla. Lisäksi Jordens (1998) ja Nybo (2012) esittelevät artikkeleissaan gramnegatiivisten bakteerien hajottamista TE-puskurilla. TE-puskuri on kemiallinen puskuri, jossa EDTA toimii Mg^{2+} ja Ca^{2+} -ioneja sitovana partikkelina, mikä johtaa lipopolysakkaridimolekyylien vapautumiseen aiheuttaen peptidoglykaanikerroksen altistumisen lyysaukselle (Geicova et al. 2002:547). TE-puskuri sisältää EDTA:n lisäksi Tris-HCL-liuosta (0,1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH 8,0)) (TE Buffer 2018).

Entsyyttisessä hajotuksessa solut on mahdollista lysata hyödyntämällä autolyysia tai käyttämällä solunulkoista entsyymiä. Autolyysi on mahdollista esimerkiksi *Escherichia coli* -bakteerikannalle. *E. coli* -bakteerikannan autolyysiä on tutkittu antibiootin avulla. Antibiootti häiritsee solun peptidoglykaanisynteesiä ja peptidoglykaanikerroksen hajotessa bakteerin soluseinämän huokoisuus lisääntyy, mikä voi aiheuttaa solun hajoamisen. Ulkoisena entsyyminä käytetään usein proteaasia ja glukanaasia, jotka hajottavat soluvälin mannoproteiinikompleksin tuhoten solurakenteen. Lysotsyymejä voidaan käyttää grampositiivisten bakteerien hajottamisessa, sillä lysotsyymit katalysoivat b-1,4-glykosidisen hydrolyysia, tuhoten peptidoglykaania. Gramnegatiiviset bakteerit ovat vähemmän alttiita lysotsyymeille, sillä gramnegatiivisten bakteerien ulkoinen polysakkaridikerros suojaa bakteerin peptidoglykaania entsyymiltä. (Geicova et al. 2002:547–548.)

Lyysauksen lisäksi pesäke-PCR-menetelmässä hyödynnetään usein sentrifugointia. Sentrifugoinnissa keskipakovoiman avulla erotellaan suspensiossa olevat eripainoiset komponentit toisistaan. Sentrifugoinnilla pyritään poistamaan näytesuspensiosta PCR-reaktiota inhiboivia tekijöitä, kuten proteiineja, proteinaaseja ja polysakkarideja (Schraeder – Schielke – Ellerbroek – Johne 2012). Esimerkiksi sekä Jordens että Nybo mainitsevat kemiallisen lyysauksen lisäksi sentrifugoinnin osana bakteeri-DNA:n käsittelyä.

Kirjallisuudessa esiintyy myös menetelmiä, joissa pesäke käsitellään ainoastaan mekaanisella menetelmällä. Kyseisissä menetelmissä pesäke siirrostetaan suoraan PCR-reaktioseokseen hieromalla siirrostussilmukkaa PCR-putken laitaan. Esimerkiksi *E. coli* -bakteerin ja joidenkin hiivojen kohdalla erillinen lyysaus ei välttämättä ole tarpeen, vaan pieni määrä pesäkettä voidaan siirrostaa suoraan reaktioseokseen esimerkiksi pipetin kärjellä (Gutherie – Bergkessel 2013:299–309).

Lisäksi uusi tutkimus esittelee menetelmää, jossa kasvien, eläinten ja mikrobien nukleinihappopuhdistus voidaan suorittaa nopeasti hyödyntämällä suodatinpaperia ja pesupuskuria. Menetelmässä bakteerit lyysataan uuttopuskurilla käsittelemättömän selluloosapohjaisen suodatinpaperin läpi ja huuhdellaan pesupuskurilla ennen suodatinpaperin siirtämistä PCR-reaktioseokseen. (Zou et al. 2017.)

Yleensä PCR-menetelmässä käytetään puhdasta eristettyä DNA:ta. DNA:n eristys voidaan tehdä erilaisilla menetelmillä, kuten fenolikloroformiuutolla tai eristämällä DNA kaupallisella kitillä. Kun DNA:n eristäminen suoritetaan esimerkiksi DNA:n eristyskitteillä, voidaan DNA-pitoisuus määrittää, jolloin PCR-reaktioseokseen lisättävä näytemäärä voidaan optimoida näytteen DNA-pitoisuuden mukaan. Pesäke-PCR-menetelmässä DNA:n eristämistä ei tehdä, vaan menetelmässä DNA vapautetaan reaktioseoksen käyttöön muutamalla lyhytkestoisella käsittelyllä, kuten keittämällä bakteerisoluja soluja vedessä tai puskuriliuoksessa. Pesäke-PCR-menetelmä käyttää puhdistetun DNA:n sijasta puhdistamatonta lysaattia, joka sisältää templaatti-DNA:ta.

2.4. Agarosigeelielektroforeesi

DNA:n monistumisen onnistumisen tarkastamiseen voidaan käyttää esimerkiksi agarosigeelielektroforeesia, jossa agarosigeelille pipetoidaan PCR-tuotetta. Geelillä näkyvä vyöhyke kertoo monistuneesta DNA:sta. Mikäli odotettua vyöhykettä ei muodostu tai jos geelillä näkyy lisäksi muita vyöhykkeitä, PCR on epäonnistunut ja se tulee uusiksi. Agarosigeeliä ei käytetä ainoastaan todentamaan PCR:n onnistumista, vaan sen avulla voidaan myös arvioida PCR-tuotteen koko ja DNA-pitoisuus. (Brown 2016:164.) Jotta PCR-tuotteen kokoa ja DNA-pitoisuutta on mahdollista arvioida agarosigeeliltä, tulee geelille pipetoida näytteiden lisäksi positiivinen kontrolli ja DNA-kokostandardi.

Agaroosigeelielektroforeesin toiminta perustuu nukleiinihappojen koon vaihteluihin ja niiden negatiiviseen varaukseen. Negatiivisesti varautuneet nukleiinihappokompleksit liikkuvat pituutensa mukaan agarosigeelillä negatiivisesta varauksesta kohti positiivista varausta. Pienet nukleiinihapot kulkevat geelillä nopeammin kuin pitkät, mistä johtuen nukleiinihapot erottuvat geelillä ajon myötä koon mukaan. Jos näytteiden väriaine on fluoresoiva (esim. etidiumbromidi), tulee geeliä tarkastella UV-valon avulla. (Koontz 2013:35–45.)

2.5. Sanger-sekvensointi

Onnistuneen PCR-monistuksen jälkeen PCR-tuote voidaan sekvensoida bakteerin taksonomista tunnistusta varten. Yleensä PCR-tuotteiden sekvensoinnissa käytetään Sanger-sekvensointimenetelmää.

Sanger-sekvensointi on Fred Sangerin 1970-luvulla kehittämä ketjuterminaatiomenetelmä, joka edellyttää DNA:n monistamista polymeerasireaktion avulla. Jotta sekvensointi olisi mahdollista, tulee lyhyitä oligonukleotidiketjuja olla kiinnittyneinä templaatti-DNA:han. Nämä templaatti-DNA:han kiinnittyneet oligonukleotidiketjut toimivat myöhemmin synteessissä alukkeina, joiden tehtävänä on muodostaa uutta DNA-juostetta, joka on vastakkainen templaattiin nähden. Nykyisin käytettävässä ketjuterminaatiomenetelmän versiossa pieni määrä neljää dideoksynukleotidiä (ddNTP: ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) on lisätty reaktioseokseen, ja ne on jokainen merkitty erivärisellä fluoresoivalla markkerilla. (Brown 2012:175–177.)

Reaktiossa oleva polymeerasientsyymi ei kykene erottelemaan deoksi- ja dideoksinukleotideja. Deoksi- ja dideoksinukleotideilla on omat tehtävänsä polymeerasireaktiossa sekvensoinnin näkökulmasta: DNA-ketjun synteesi jatkuu niin kauan, kun nukleotidien välille sitoutuu deoksinukleotidi. Kun yksijuosteiseen DNA-ketjuun on liitetty pidennysvaiheessa dideoksinukleotidi, sillä ei ole enää 3'-hydroksyyliiryhmää, eikä se täten kykene enää muodostamaan yhteyttä seuraavaan nukleotidiin, jolloin reaktioseokseen muodostuu joukko eripituisia DNA-jaksoja. Jokainen DNA molekyyli loppuu templaatti-DNA:n mukaiseen emäkseen: A, C, G tai T. (Brown 2016:177.)

Molekyylit ajetaan nykyään yleensä kapillaarin läpi, missä jokaisen ketjun viimeinen nukleotidi (A, C, G, T) tunnistetaan emäskohtaisen fluoresenssisignaalin perusteella. Tämä tuottaa kromatogrammin, missä on emäskohtaisia piikkejä emäsjärjestyksen

mukaisesti, mistä voidaan päätellä templaatin emäsjärjestys suurella tarkkuudella. (Brown 2016:177.)

Kun tuntemattoman bakteerikannan 16S rRNA -geeni on sekvensoitu, saatua geenisekvenssiä verrataan yleiseen tietokantaan, joka sisältää tiedon kaikista tunnetuista 16S rRNA -geenisekvensseistä. Geenisekvenssin vertailu mahdollistaa myös bakteerin sijoittamisen fylogeneettiseen puuhun. Lajipuusto auttaa myös sellaisten bakteerien tunnistamisessa, joiden DNA:ta esiintyy ympäristössä, mutta joita ei pystytä viljelemään ja joiden fysiologiasta ei ole vielä tarkkaa tietoa. (Lindholm – Eerola 2010.) Saman bakteerisuvun jäsenillä 16S rRNA -geenisekvenssi on yleensä yli 95 % samanlainen ja saman lajin jäsenillä yli 99 % samanlainen. Sekvensointi ei kuitenkaan ole täysin varma menetelmä, ja tiettyjen lajien kohdalla homologisten geenien sekvenssissä on merkittäviä eroja. (Rossi-Tamisier – Benamar – Raoult – Fournier 2015.)

3 Optimointi

Optimoinnilla tarkoitetaan prosessia, jossa toimintaa pyritään kehittämään jatkuvasti työnkulkua pysäyttämättä. Optimointi on toiminnan tehostamisen työkalu, jonka avulla arvioidaan eri ratkaisuvaihtoehtoja. Optimoinnin tavoitteena voi olla esimerkiksi kulujen pienentäminen tai maksimaalisen tehon/vaikutuksen saavuttaminen. Optimoinnin tukena käytetään erilaisia työkaluja riippuen optimoinnin kohteesta. Optimoinnin työkalujen tavoitteena on auttaa määrittämään optimoinnin kohdetta sekä ohjata optimoinnissa. Tällaisia työkaluja ovat esimerkiksi miellekartat, asioiden listaaminen, asioiden välisten suhteiden tarkastelu suhdelukujen avulla sekä erilaisten toiminta- ja havainnekaavioiden rakentaminen. (Process optimization methods. 2015.)

4 Regressioanalyysi

Regressioanalyysissä tutkitaan yhden tai useamman selittävän muuttujan eli selittäjän vaikutusta selitettävään muuttujaan eli vastemuuttujaan. Regressioanalyysin hyvänä puolena on, että sillä voidaan tutkia yhtä aikaa monen selittäjän vaikutusta vastemuuttujaan. Menetelmää on käytetty perinteisesti tilanteissa, joissa vastemuuttujan arvoja ei

ole rajattu millekään ennalta määrätylle välillä, vaan muuttuja voi saada arvoja pienestä äärettömästä suureen äärettömään. Perinteisestä regressioanalyysistä on johdettu myös yleistettyjä lineaarisia malleja (generalized linear model, GLM), joita voidaan soveltaa tyypiltään ja jakaumaltaan poikkeaviin vastemuuttujiin. (KvantiMOTV 2018a.)

Regressioanalyysin tulokset kertovat, mikä on yksittäisen selittäjän vaikutus vastemuuttajaan silloin, kun muiden selittäjien vaikutus on otettu huomioon. Tuloksena saadaan kuvio, johon on piirretty ns. regressiokäyrä, josta tulkitaan muuttujien välisten yhteyksien voimakkuutta: Kun selittäjän ja vastemuuttujan suhde on lineaarinen, mikäli regressiosuora on alaspäin viettävä (negatiivinen kulma- eli regressiokerroin), on muuttujilla negatiivinen yhteys. Jos käyrä taas nousee ylöspäin (positiivinen regressiokerroin), on niillä positiivinen yhteys, ja mitä lähempänä vaakatasoa regressiosuora kulkee, sitä vähemmän selittäjä vaikuttaa vastemuuttajaan. (KvantiMOTV 2018a.)

Logistinen regressio on GLM-tyyppi, jota käytetään silloin, kun vastemuuttuja voi saada vain kaksi arvoa, 0 tai 1, jolloin se noudattaa Bernoulli-jakaumaa. Analyysi perustuu riskien (odds) määrittämiseen. Riski saadaan, kun suhteutetaan tapahtuman todennäköisyys siihen todennäköisyyteen, että se ei tapahdu. Riskiluvut voivat saada arvoja nollan ja äärettömän väliltä, jonka vuoksi riskistä otetaan luonnollinen logaritmi regressioanalyysia varten. Luonnollisella logaritmillä varmistetaan, että saatu lukuarvo vaihtelee äärettömän pienten ja äärettömän suurten lukujen välillä. Logistisessa regressiomallissa vastemuuttujana on täten tutkittavan tapahtuman riskin logaritmi. (KvantiMOTV 2018b.)

Logistisessa regressiomallissa regressiokerroin määrittää selittäjän ja vastemuuttujan suhdetta niin, että malli ei ennusta määrää, vaan todennäköisyyttä: millä todennäköisyydellä tarkasteltuna oleva asia tapahtuu tai pätee eli vaikuttaako selittäjä tapahtuman todennäköisyyteen ja millä voimakkuudella. Toisin kuin perinteisessä regressioanalyysissä, logistisessa regressiomallissa jatkuvan selittäjän ja vastemuuttujan suhde on s-käyrän muotoinen. Samoin kuin perinteisessä regressioanalyysissä, mitä lähempänä regressiokerroin on arvoa 0, sitä pienempi vaikutus selittäjällä on vastemuuttajaan. (KvantiMOTV 2018b.)

5 Opinnäytetyön tarkoitus ja tutkimuskysymykset

Opinnäytetyössä tutkimuksen tavoite määritti tutkimuskysymykset ja niiden muodon: Opinnäytetyön tavoitteena oli luoda protokolla pesäke-PCR-menetelmälle. Protokollan luomiseksi opinnäytetyössä perehdyttiin PCR-menetelmään ja sen käyttökohteisiin bakteeritunnistuksen apuvälineenä. Tarkoituksena oli luoda kustannustehokas ja toimintavarma protokolla, jolla tutkimusryhmässä käytettävien bakteerien monistaminen onnistuu helposti.

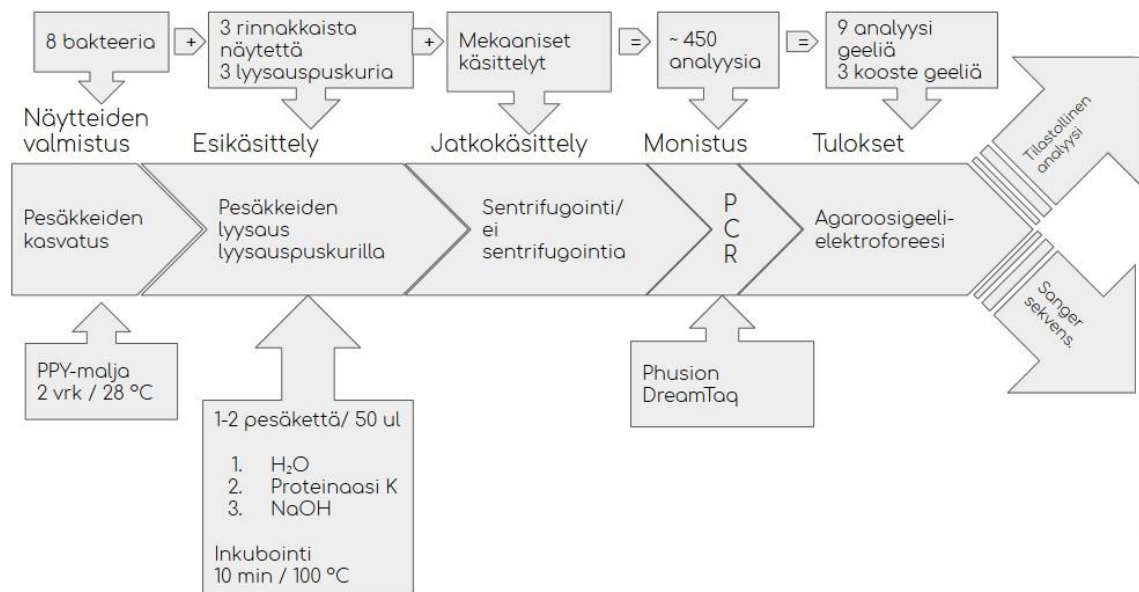
Opinnäytetyön tutkimusasetelmana oli tutkia bakteeri-DNA:n monistumista eri olosuhteissa. Tutkimusasetelma muodostettiin kolmen lyysauspuskurin, sentrifugoinnin ja kahden polymeraasientsyymin ympärille tarkoituksena selvittää, millä muuttujien yhdistelmällä saadaan optimaalinen tulos pesäke-PCR:ssä.

Tilastollisen analyysin näkökulmasta opinnäytetyön tavoitteena oli selvittää, selittävätkö nämä kolme tekijää pesäke-PCR:n onnistumistodennäköisyyttä ja miten voimakkaasti.

6 Työn toteutus

Opinnäytetyön käytännön suoritus aloitettiin bakteerikantojen viljelyllä. Bakteerikantojen viljelyn ja kasvatuksen jälkeen bakteerit esikäsiteltiin esikäsitelyprotokollan mukaisesti, siirrostamalla bakteerit lyysauspuskuriin ja keittämällä niitä PCR-laitteessa 10 minuutin ajan 100 °C lämpötilassa. Keiton jälkeen näytteet vorteksoitiin ja sentrifugoitiiin protokollien mukaisesti. Tämän jälkeen näytteet lisättiin PCR-reaktioseokseen. PCR suoritettiin huomioimalla polymeraasientsyymin ja alukkeiden vaatimat lämpötilat. PCR:n jälkeen näytteet pakastettiin (-20 °C), ja myöhemmin tulokset visualisoitiin hyödyntämällä agarosigeelielektroforeesia. Visuaaliset havainnot kirjattiin taulukkoon, jotta niille oli mahdollista suorittaa tilastollinen analyysi. Tilastollisessa analyysissä (logistinen regressio) tarkasteltiin muodostuneita vyöhykkeitä ja niiden sijaintia, vyöhykkeiden lukumäärää sekä puuttumista. Binäärisiä (0/1) vastemuuttujia olivat PCR:n onnistuminen sekä väärän kokoisen tuotteen esiintyminen geelillä. Logistisen regressioon tarkoituksena oli määrittää selittäjien (puskuri, sentrifugointi ja polymeraasientsyymin) vaikutus todennäköisyyteen, että PCR onnistuu tai johtaa vääränkokoisiin tuotteisiin, ja

tällä tavoin määrittää optimaalinen selittäjäyhdistelmä eli protokolla pesäke-PCR:lle. Kuvio 1 havainnollistaa opinnäytetyön käytännön osuuden.



Kuvio 1. Pesäke-PCR-menetelmän käytännön toteutus

6.1. Tutkimusnäytteet ja kasvatusolosuhteet

Opinnäytetyön aineistona oli Helsingin yliopiston mikrobiologian osaston HAMBI-kantakokoelma. Tutkimuksessa käytetyt bakteerit valittiin syksyllä 2017 tehdyn tutkimuksen perusteella (Liite 1). Valinnassa ohjaavina tekijöinä olivat bakteereille suoritettujen tutkimusprotokollin määrä, niiden kliininen merkitys ja gramvärjäykseen perustuva luokitus (gramnegatiiviset sauvabakteerit). Työhön valitut kahdeksan bakteerikantaa olivat:

- 1) *Elizabethkingia meningoseptica* HAMBI 1875
- 2) *Chitinophaga sancti* HAMBI 1966
- 3) *Comamonas testosteroni* HAMBI 403
- 4) *Microvirga lotonindis* HAMBI 3237
- 5) *Morganella morganii* HAMBI 1292
- 6) *Myroides odoratus* HAMBI 1923
- 7) *Sphinobacterium multivorum* HAMBI 1874
- 8) *Stenotrophomonas maltophilia* HAMBI 2659

Tutkimuksessa käytettävät bakteerikannat olivat kaikki maljakasvatuksia, jotka siirrotettiin 100 % PPY-maljoille hajotusviljelminä. Hajotusviljelmien tarkoituksena oli varmistaa kasvatusten puhtaus sekä luoda pesäkkeiden esikäsittelyä varten erillispesäkkeitä, joille PCR suoritettiin. Siirrostus tehtiin laminaarikaapissa kontaminaatioiden ehkäisemiseksi. Siirrostuksen jälkeen bakteereja kasvatettiin 28 °C / 2 vuorokautta.

6.2. Esikäsittelyt ja sentrifugointi

Bakteerien esikäsittely (liite 3) sisälsi bakteeripesäkkeiden siirrostuksen hajotusviljelystä lyysauspuskuriin. Siirrostus suoritettiin laminaarikaapissa kontaminaation estämiseksi. Pesäkkeet siirrotettiin maljalta näyteputkeen käyttäen viljelysilmukkaa. Pesäkkeen koosta riippuen lyysauspuskuriin (24 µl) siirrotettiin 1–3 pesäkettä (Ø 2 mm), minkä jälkeen näytettä keitettiin PCR-laitteessa 100 °C / 10 minuuttia tarkoituksena hajottaa bakteerin ulkoinen solurakenne.

Opinnäytetyössä käytettiin esikäsittelymenetelmänä Nybon (2012:345–347) esittelemää protokollaa. Lyysauspuskurina tutkimuksessa käytettiin 20 mM NaOH liuosta, proteinaasi-K:ta (Proteinase K from *Tritirachium album*, Sigma-Aldrich, Helsinki, Suomi) tai vettä. Kaikkien lyysauspuskurien kohdalla noudatettiin samaa protokollaa, mutta proteinaasi-K:n kohdalla tehtiin erillinen alkuinkubaatio, sillä optimaalisen tuloksen saamiseksi proteinaasi-K tulee aktivoida ennen käyttöä lämpökäsittelyllä (Proteinase K from *Tritirachium album*. 2018).

Tutkimuksessa vertailevana lyysauspuskurina käytettiin pelkkää vettä, mitä on aiemmin käytetty tutkimusryhmässä puskurina. Tällöin ainoastaan lämpökäsittely vapauttaa DNA:ta. Lyysauspuskureista NaOH-liuos ja proteinaasi-K -liuos vapauttavat DNA:ta myös ilman lämpökäsittelyä. Voidaan olettaa, että NaOH-käsittelyn aiheuttama pH-muutos vaikuttaa bakteerin solukalvoon tuhoavasti. Oletettavasti myös proteinaasi-K:n proteolyttinen vaikutus tuhoaa solurakenteen hajottaessaan solun valkuaisaineita. Lisäksi työssä tarkasteltiin sentrifugoinnin merkitystä PCR:n toimivuuteen.

Esikäsittelyjen tarkoituksena oli selvittää muuttujien vaikutus pesäke-PCR-menetelmän toimivuuteen. Tämän oletetaan liittyvän puskurin tapauksessa parempaan solujen lyysautumiseen ja sentrifugoinnin tapauksessa epäpuhtauksien laskeutumiseen näyteputken pohjalle.

Opinnäytetyössä näytteiden esikäsittelyt tehtiin ohessa olevan taulukon mukaisesti molemmille polymeraasientsyymeille (Taq- ja Phusion-polymeraasientsyymi). Tutkimusasetelmat toteutettiin 8 eri bakteerikannalle, joista jokaiselle suoritettiin kolme biologista rinnakkaista analyysia (kolme eri pesäkettä) kantojen tilastollisen vertailun mahdollistamiseksi (taulukko 1).

Taulukko 1. Näytteille suoritettavat esikäsittelyt. Luku edustaa rinnakkaisten pesäkkeiden määrää bakteerikantaa kohti.

	Lyysaus: steriili vesi	Lyysaus: proteinaasi-K	Lyysaus: NaOH
Sentrifugointi	3	3	3
Ei sentrifugointia	3	3	3

Perinteisen pesäke-PCR-menetelmän lisäksi tutkimukseen otettiin vertailevaksi menetelmäksi Zou ym. (2017) tutkimuksen suodatinpaperimenetelmä, jossa näytteet käsitellään suodattamalla ne käsittelemättömän selluloosapohjaisen suodatinpaperin läpi. Menetelmä kuvaillaan nopeammaksi aiempiin DNA:n eristysmenetelmiin verrattuna. Opinnäytetyössä Zou ym. tutkimuksessa esitellystä menetelmästä tehtiin kaksi sovellutusta, joiden lähtökohtana oli yhtä suuri helppous ja nopeus kuin muissa käytetyissä menetelmissä (Liite 3). Ilman näiden vaatimusten täyttämistä ei menetelmä olisi tutkimusryhmässä hyödyllinen vaihtoehto perinteiselle pesäke-PCR-menetelmälle.

Ensimmäisessä suodatinpaperimenetelmässä suodatinpaperia (nitroselluloosa, \varnothing 3 mm) pidettiin minuutin verran esikäsittelyprotokollan läpikäyneessä vorteksoidussa näytesuspensiossa. Tämän jälkeen suodatinpaperi siirrostettiin pesupuskuriin (0.1 % Tween, 10 mM Tris-buffer), jossa sitä pidettiin minuutin verran. Pesupuskurista suodatinpaperi siirrostettiin suoraan PCR-reaktioseokseen (20 μ l).

Toisessa suodatinpaperimenetelmässä maljalta siirrostettiin pesäkettä suoraan suodatinpaperille (nitroselluloosa, \varnothing 3 mm). Pesäke hierottiin mekaanisesti suodatinpaperiin ennen suodatinpaperin siirrostamista pesupuskuriin. Suodatinpaperia pidettiin pesupuskurissa minuutin ajan ennen siirrostamista PCR-reaktioseokseen (20 μ l).

6.3. PCR

Opinnäytetyössä hyödynnettiin klassista PCR-menetelmää. PCR suoritetaan yleensä puhtaalle eristetylle DNA:lle. PCR-menetelmää voidaan kuitenkin käyttää myös mille tahansa näytteelle, jossa on riittävästi templaatti-DNA:ta ja riittävän vähän PCR-reaktiota häiritseviä epäpuhtauksia. Pesäke-PCR:ssä näytteen esikäsittelyn tarkoituksena on vapauttaa bakteerisolun sisällä oleva DNA lyysauspuskuriin, jotta polymeraasiketjureaktiolle on reaktioseoksessa templaatti-DNA:ta. Pesäke-PCR:n tavoitteena on oikoa työläs ja kallis DNA-eristysprosessi.

6.3.1. Alukkeet

Opinnäytetyössä DNA:n monistus kohdistui bakteerissa olevaan 16S rRNA -geeniin. Monistuksessa käytettävät alukkeet on luotu niin, että ne sijaitsevat geenin lähes muuttumattomana pysyvällä (konservoituneella) alueella, tunnistaen ja monistaen 16S rRNA -geenin kaikista bakteerilajeista. 16S rRNA -geeni on tunnetuin ja eniten käytetty merkkimolekyylillä bakteerien tunnistamisessa. Se on noin 1 500 nukleotidin pituinen, bakteeriribosomin 30S-alayksikön rakenneosaa (ribosomaalinen RNA, rRNA) koodaava geeni, joka sisältää 974 vaihtelevaa emästä. Koska koko 16S rRNA -geeni on verrattain hyvin konservoitunut bakteerien keskuudessa keskeisen solutoimintoroolinsa vuoksi, geenisekvenssiä käytetään bakteerien välisten fylogeneettisten suhteiden määrittämiseen. (Lindholm – Eerola 2010.)

Opinnäytetyöhön valittiin tutkimusryhmässä käytössä oleva alukepari, pA ja pH' (Edwards et al. 1989:7488-7845), 16S rRNA -geenin monistukseen. Lisäksi tutkimuksen edistymisen myötä käyttöön otettiin erillisiä alukkeita *Elizabethkingia meningoseptica* HAMBI 1875 -bakteerikannalle, sillä tutkimuksessa käytetyt alukkeet eivät vaikuttaneet kykenevän monistamaan bakteerikannan 16S rRNA -geeniä, mikä johti epäonnistuneisiin sekvensointeihin. *Elizabethkingia meningoseptica* -bakteerikannan osalta tarkastusmonistuksessa ja sekvensoinnissa käytettiin alukkeita 8f, 534f ja 1512r (Jiun-Nong ym. 2017). Opinnäytetyön suorituksessa käytettiin kuitenkin myös *Elizabethkingia meningoseptica* -bakteerin kohdalla samoja alukkeita kuin muille, jotta tulosta voitaisiin pitää vertailukelpoisena.

Opinnäytetyöprosessissa käytettyjen alukkeiden nukleotidijärjestys oli: AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG (pA) ja AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA (pH').

Valmistajan (Metabion, Saksa) antamat T_m -lämpötilat alukkeille olivat: 58 °C (pA) ja 63 °C (pH'). Koska kiinnittymislämpötila tulee asettaa PCR-ohjelmassa 1–2 °C T_m -lämpötilan alapuolelle, määritettiin kiinnittymislämpötilaksi ohjelmaan 55 °C, kun käytettiin Phusion-polymeraasientsyymiä (ThermoFisher Scientific, Espoo, Suomi), ja 57 °C, kun käytettiin DreamTaq-polymeraasientsyymiä (ThermoFisher Scientific, Espoo, Suomi). Phusion-polymeraasientsyymien kohdalla valittu kiinnittymislämpötila oli lisäksi tutkimusryhmän käytössä olevan ohjeistuksen mukainen, sillä opinnäytetyössä ei haluttu optimoida PCR-ohjelmaa, vaan huomio kiinnitettiin ainoastaan pesäkkeen esikäsitteilyä koskeviin muuttujiin.

6.3.2. PCR-reaktioseos

Opinnäytetyön käytännön suorituksessa PCR-reaktioseos valmistettiin UV-kierröllisessä kaapissa reagenssien kontaminoitumisen estämiseksi. Reaktioseoksen tekemisessä huomioitiin polymeraasientsyymien aktivoituminen lämmitessään, joten polymeraasientsyymiä pidettiin pakastimessa lisäykseen asti ja lisäys suoritettiin pitämällä entsyymi koko ajan kylmäblokkissa.

Jokainen reaktioseos (25 µl) sisälsi 1 µl templaatti-DNA:ta, 0,5 µM molempia alukkeita (pA, pH'), 0,5 µl 10 mM dNTP-liuosta, 1,25 U Taq-polymeraasientsyymiä tai 0,02 U Phusion-polymeraasientsyymiä ja 1 x polymeraasientsyymikohtaista reaktiopuskuria (2,5 µl 10X Taq reaction buffer tai 5 µl 5X Phusion GC buffer), laimennosliuoksena vesi (Taq: 18,25 µl; Phusion 15,75 µl). Käytetyt reagenssit olivat kaikki ThermoFisherin valmistamia.

6.4. PCR-ohjelmat

PCR suoritettiin BIO-RAD C1000 Touch™ Thermal Cycler -laitteella, johon oli luotu erilliset ohjelmat Taq- ja Phusion-polymeraasientsyymiä sisältäville reaktioseoksille. Luodut PCR-ohjelmat huomioivat polymeraasientsyymien ominaisuuksien lisäksi alukkeiden valmistajan mukaiset T_m -lämpötilat.

Phusion-polymeraasientsyymien kohdalla noudatettiin ohjelmaa: 1x lisäkeitto 98 °C / 5 min, 1x alkudenaturaatio 98 °C / 3 min, 30-kertainen sykli: denaturaatio 98 °C / 30 s.

Kiinnittyminen 55 °C / 30 s., loppupidennys 72 °C / 30 min, 1x viimeinen loppupidennys 72 °C / 5 min, säilytyslämpötila 4°C.

Taq-polymeraasientsyymille käytettiin ohjelmaa: 1x alkudenaturaatio 95 °C / 3 min, 30-kertainen sykli: denaturaatio 95 °C / 30 s., kiinnittyminen 57 °C / 30 s., loppupidennys 72 °C / 1 min, 1x viimeinen loppupidennys 72 °C / 5min, säilytyslämpötila 4°C.

Ohjelmaan asetetun 4 °C säilytyslämpötilan tarkoituksena on suojata PCR-tuotetta monistuksen jälkeen lämpötilan vaikutuksilta.

6.5. Agarosigeelielektroforeesi

Agarosigeelielektroforeesia käytettiin opinnäytetyössä DNA:n monistumisen todentamismenetelmänä. Käytettävä geeli oli 2 % agarosigeeli (2,6 g agar, 130 ml 1xTAE, 0,625 mg/ml etidiumbromidi), jolle pipetoitiin näytteiden lisäksi tunnettu positiivinen kontrolli (*E. coli* K-12 JE2571(RP)), minkä tarkoituksena oli varmistaa, että käytetty PCR-reaktioseos toimii toivotulla tavalla. Positiivisen kontrollin tarkoituksena oli varmistaa, että menetelmä mahdollistaa DNA:n monistumisen, eikä menetelmässä ole inhiboivia tekijöitä. Tunnetun positiivisen kontrollin ja DNA-kokostandardin avulla opinnäytetyössä voitiin visuaalisesti todentaa oikeat positiiviset tulokset sekä sulkea pois virheelliset positiiviset tulokset. Opinnäytetyössä DNA-kokostandardina käytettiin GeneRuler 1 kb DNA ladder -reagenssia (Thermo Scientific), ja näytteiden visualisoimiseksi näytteet värjättiin 6X DNA Loading Dye -reagenssilla (Thermo Scientific).

Geelille pipetoitiin myös menetelmästä riippuen yksi tai kaksi negatiivista kontrollia. Jokaisessa menetelmässä negatiivisena kontrollina oli PCR-reaktioseoksessa käytetty vesi. Negatiivisen kontrollin tarkoituksena on varmistaa, että reaktioseos toimii halutulla tavalla, eikä reaktioseoksessa ole kontaminanteja. Negatiivinen kontrolli myös varmistaa, että tutkimuksessa käytettävät alukkeet toimivat oikein, eivätkä sitoudu toisiinsa.

Toisena negatiivisena kontrollina oli menetelmänegatiivinen kontrolli, joka oli tutkimusprotokollan läpikäynyt pesäkkeetön lyysauspuskuri. Menetelmänegatiivisen näytteen tarkoituksena oli osoittaa, ettei menetelmässä käytettävä lyysauspuskuri tai esikäsitelymenetelmä aiheuta DNA:n monistumista.

Opinnäytetyössä kaikki PCR-tuotteet ajettiin agarosigeelille. PCR-tuotteista tehtiin lisäksi koosteajot, jotka mahdollistivat tulosten silmämääräisen arvioinnin.

6.6. Sanger-sekvensointi

Opinnäytetyössä Sanger-sekvensointia käytettiin todentamaan, että pesäke-PCR:ssä käytetyt bakteerikannat vastasivat oletusta. Rinnakkaisista näytteistä ja useammasta näyteajosta huolimatta sekvensointi suoritettiin ainoastaan kerran jokaiselle näytteelle. Bakteerikannoista oli koostettu jo aiemmin laadukkaat 16S rRNA -sekvenssit, joista oli muodostettu vertailutietokanta (Edwards et al. 1898), minkä perusteella kantaidentiteetti varmistettiin. Koska bakteerien 16S rRNA -geenisekvenssi vaihtelee, todennäköisyys virheellisesti saatavalle sekvenssille, joka on identtinen pienessä tietokannassa olevan odotetun sekvenssin kanssa, katsottiin käytännössä olemattomaksi.

Poikkeuksena opinnäytetyössä suoritettiin useampi sekvensointi näytteelle 1 (*Elizabethkingia meningoseptica* HAMBI 1875), sillä ensimmäiset kaksi sekvensointia epäonnistuivat positiivisesta monistustuotteesta huolimatta. Ensimmäinen sekvensointi tehtiin opinnäytetyön testiprotokollan kautta saadulle positiiviselle monistustuotteelle. Epäonnistuneen sekvensointituloksen vuoksi näyte päätettiin käsitellä opinnäytetyön testiprotokollasta poikkeavalla tavalla, jotta kanta saataisiin varmistettua. Sekvensointiin lähetettiin tällöin positiivinen PCR-tuote, jonka templaatti-DNA:na oli DNA:n eristyskitillä nesteviljelmästä eristetty DNA. Lisäksi sekvensointi suoritettiin käyttämällä muista poikkeavia alukkeita (1512r, 534f), jotka ovat lajille spesifiset (Jiun-Nong ym. 2017).

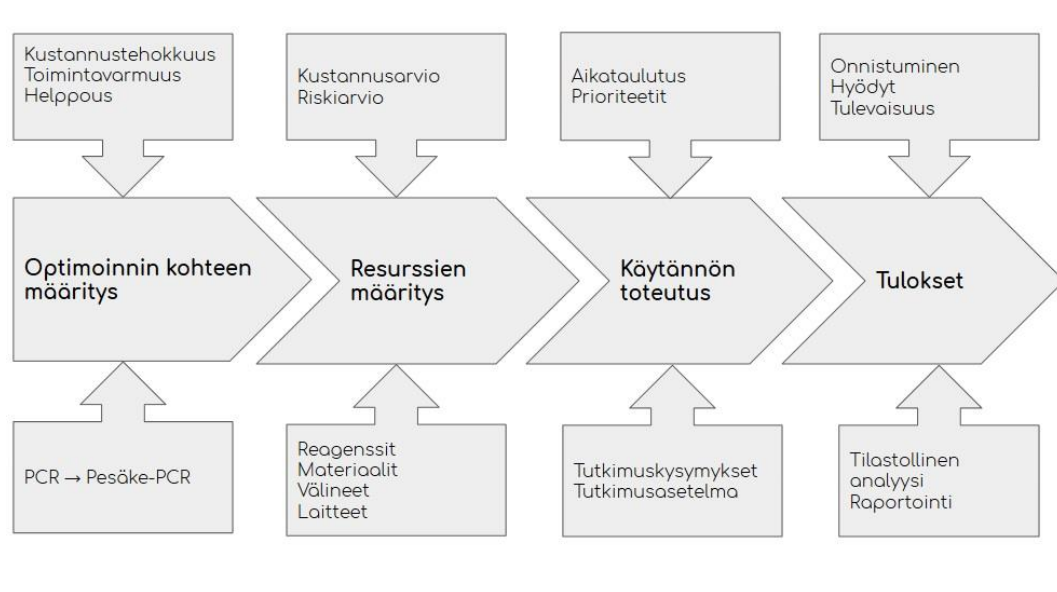
Sanger sekvensoinnista saatava data käsiteltiin käyttämällä Staden Package, Pregap4 ja Gap4 -ohjelmia (Staden – Beal – Bonfield 1998) sekä Clustal Omega (Sievers ym. 2011) ja BLAST (Altschul – Gish – Miller – Myers – Lipman 1990) -palveluja. Sekvensoinnin perusteella tutkituille bakteereille muodostui lajipuusto.

6.7. PCR-menetelmän optimointi

Opinnäytetyössä optimoinnin tarkoituksena oli löytää optimaalinen esikäsitelymenetelmä PCR-menetelmää varten sekä optimoida menetelmälle sopiva polymeraasientsyymi. Optimoinnin kohteena olivat esikäsitelymenetelmä sekä polymeraasientsyymi. Optimoinnin tarkoitus oli hyödyntää käytössä olevia resursseja, luoden kustannusteho-

kas, toimintavarma ja helppo menetelmä, joka vähentää turhien uusinta-analysien suorittamista.

Opinnäytetyön prosessikaavion (kuvio 2) tarkoituksena on selventää optimoinnin kohdetta sekä optimoinnin sisältämiä toimenpiteitä ja vaatimuksia. Optimoinnin prosessikaavio toimi työn suunnittelun pohjana, auttaen huomioimaan optimointiin liittyviä ongelmakohtia ja prosessin taitekohtia.



Kuvio 2. Optimoinnin prosessikaavio

Opinnäytetyössä optimoinnissa huomioitiin olosuhteiden vakiointi. Olosuhteiden vakioinnin tarkoituksena oli varmistaa laboratorio-olosuhteissa tehtävän analyysin toimintavarmuus sekä mahdollistaa stabiilin toimintamenetelmän luominen. Olosuhteiden vakioinnilla poistettiin toiminnasta johtuvia virheitä ja pienennettiin satunnaismuuttujien läsnäoloa.

Opinnäytetyössä olosuhteiden vakioinnista huolehdittiin kasvattamalla kaikkia näytteinä käytettäviä bakteerikantoja samalla maljatyypillä (100 % PPY-malja) saman aikaa (2 vrk) samassa lämpötilassa (28 °C). Kasvatusolosuhteiden vakioinnin tarkoituksena oli taata, että jokaisessa näytteessä on riittävän paljon elinvoimaisia bakteerisoluja, joiden llyksauksella on mahdollista vapauttaa riittävä määrä bakteeri-DNA:ta polymeraasiketju-reaktion käyttöön.

Lisäksi kaikki näytteet käsiteltiin samalla esikäsitelyprotokollalla. Näin varmistettiin, että esikäsitelyssä esiintyvä vaihtelu ei vaikuta koetuloksiin. Ainoastaan proteinaasi-K:n kohdalla protokollasta poikettiin, sillä aktivoitua proteinaasi-K tarvitsee yli 37 °C lämpötilan. Lisäksi huomioon oli otettava, että proteinaasi-K inaktivoituu 98 °C:ssa. Tämä edellytti, että proteinaasi-K:n kohdalla bakteerikantoja inkuboitiin proteinaasi-K -liuoksessa 50 minuuttia ennen keittoa, jotta reagenssi ehti vaikuttaa näytteen esikäsitelyyn liittyvän keiton (100 °C / 10 min) alkaessa.

Olosuhteiden vakiointi huomioitiin myös käyttämällä koko prosessissa samaa PCR-laitetta. Näyteajot suoritettiin BIO-RAD C1000 Touch™ Thermal Cycler -laitteella.

Lisäksi olosuhteiden vakioimiseksi näytteet pakastettiin PCR-ajon jälkeen (-20 °C). Pakastuksen tarkoituksena oli monistustuotteiden säilyttäminen stabiilissa tilassa tulosten lukemiseen asti. Näin mahdollistettiin lisäksi näytteiden haluttu organisointi agarosigeelille.

6.8. Regressioanalyysi

Opinnäytetyössä saadut tiedot taulukoitiin. Taulukoinnissa huomioitiin agarosigeelille muodostuneen vyöhykkeen sijainti ja oikeellisuus. Tilastollisella tarkastelulla (logistinen regressio) selvitettiin parhaimman käsittelyn vaikutus onnistumistodennäköisyyteen. Tilastollinen tarkastelu tehtiin R-ohjelmistolla (RStudio, R-versio 3.4.3 2017) (R Foundation).

Suodatinpaperimenetelmän epäonnistumisen vuoksi lopullisessa tilastollisessa analyysissä ei huomioitu kyseistä selittäjää. Tilastollisesti analysoitavia havaintoarvoja oli tämän vuoksi kaikkiaan 228 kappaletta (taulukko 2).

Taulukko 2. Havaintojen määrä eri koekäsittelyissä

Bakteerikanta polymeraasi	Sentrifugaatio						Yhteensä
	Ei			Kyllä			
	NaOH	prot-K	vesi	NaOH	prot-K	vesi	
HAMBI 403							
Phusion	3	3	3	3	3	3	18
DreamTaq	3	3	3	3	3	3	18
HAMBI 1292							
Phusion	3	3	3	3	3	3	18
DreamTaq	3	3	3	3	3	3	18
HAMBI 1874							
Phusion	3	3	3	3	3	3	18
DreamTaq	3	3	3	3	3	3	18
HAMBI 1875							
Phusion	3	3	3	3	3	3	18
DreamTaq	3	3	3	3	3	3	18
HAMBI 1923							
Phusion	3	3	3	3	3	3	18
DreamTaq	3	3	3	3	3	3	18
HAMBI 1966							
Phusion	3	3	3	3	3	3	18
DreamTaq	3	3	3	3	3	3	18
HAMBI 2659							
Phusion	3	3	3	3	3	3	18
DreamTaq	3	3	3	3	3	3	18
HAMBI 3237							
Phusion	3	3	3	3	3	3	18
DreamTaq	3	3	3	3	3	3	18
Yhteensä	48	48	48	48	48	48	
	144			144			288

Opinnäytetyössä kerättyä aineistoa tarkasteltiin logistisen regression kautta, sillä malli soveltuu binääriseen vastemuuttujan sisältävän aineiston analysointiin ja sen avulla on mahdollista luoda onnistumistodennäköisyyttä kuvaava ennuste.

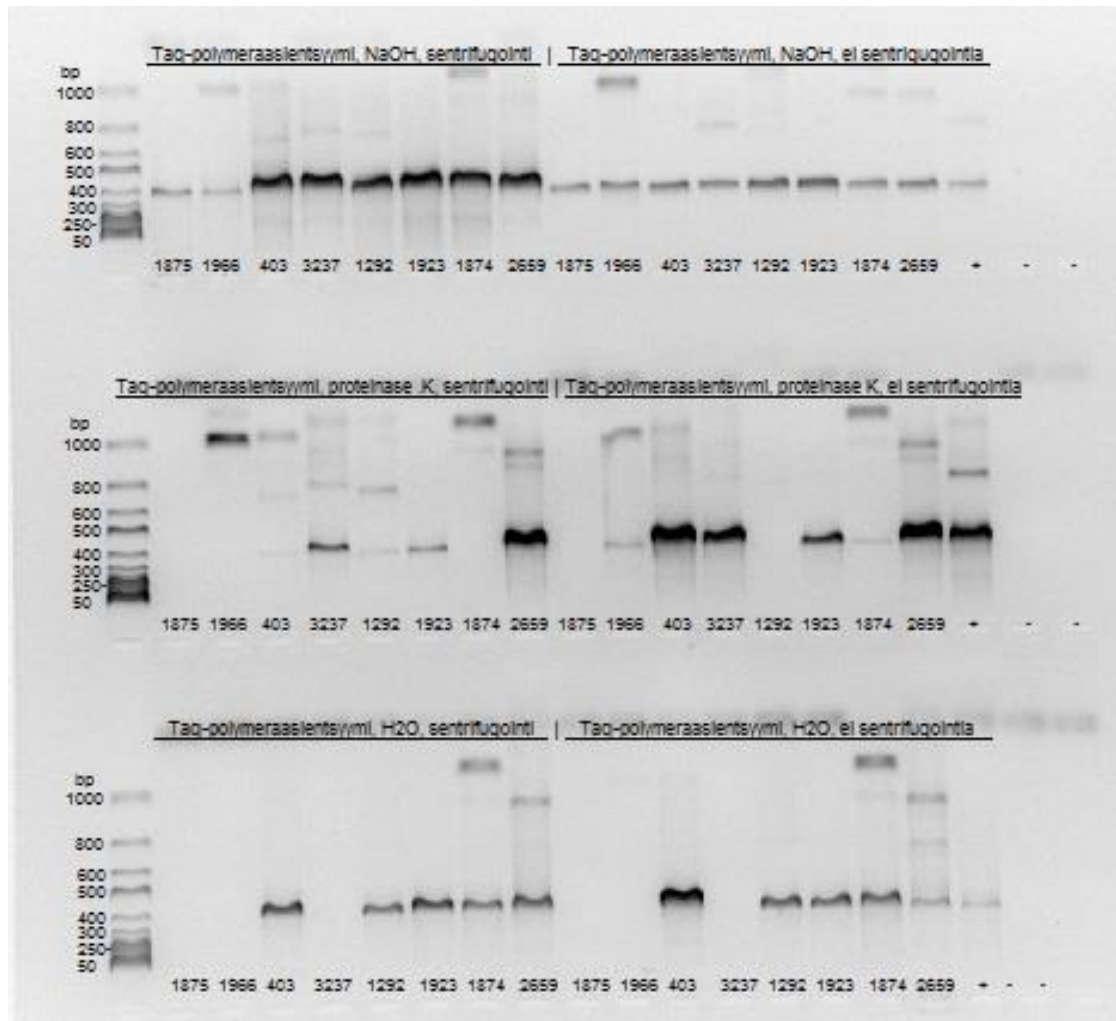
7 Tulokset

Opinnäytetyön tavoitteena oli optimoida PCR-menetelmä pesäke-PCR-menetelmäksi. Tulokset luotiin käyttämällä PCR-menetelmää, Sanger-sekvensointia ja tilastollista analyysiä (regressio analyysi).

7.1. PCR-tulokset

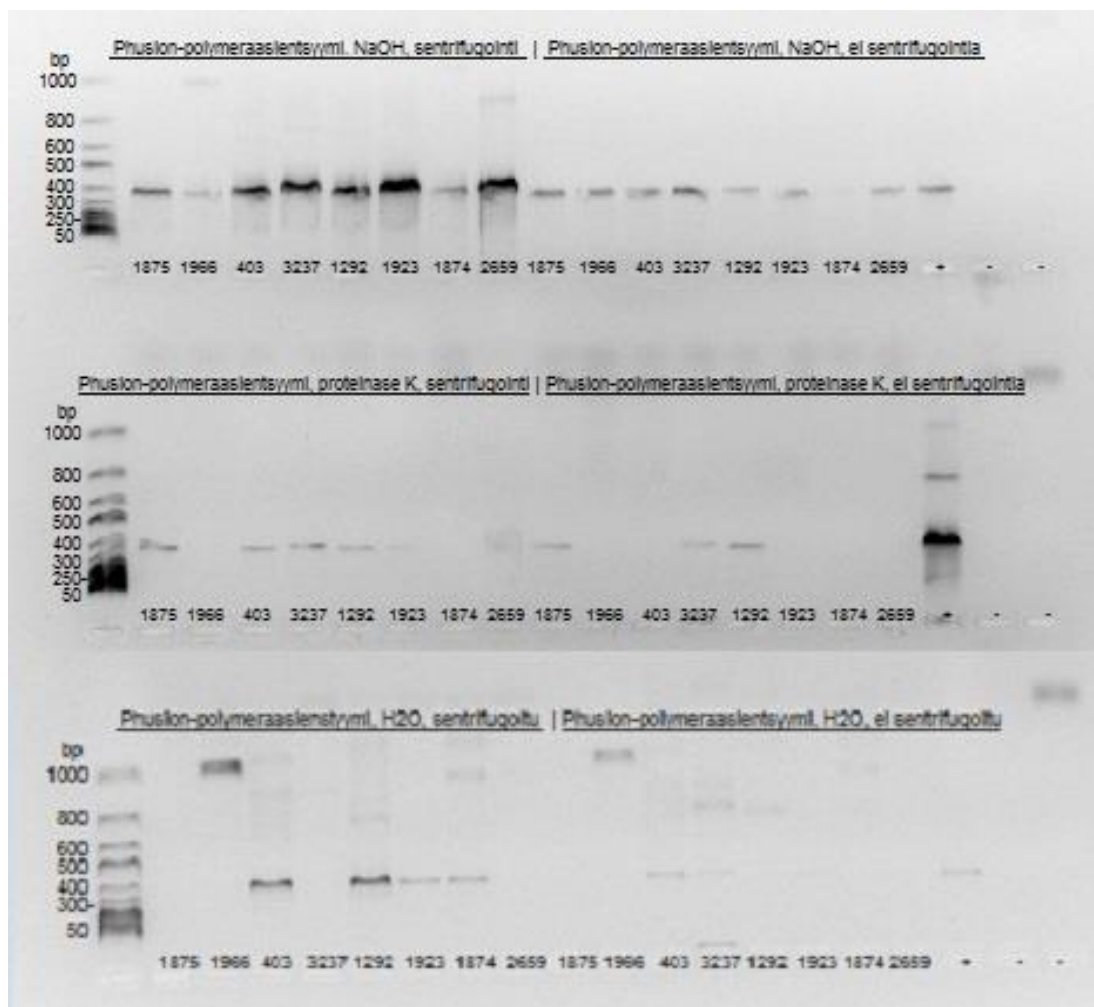
Agaroosigeelille ajettavia PCR-tuotteita oli yhteensä 384. Luku sisältää kaikki näytteitä koskevat PCR-tulokset: 151 PCR-tuotetta ei tuottanut agaroosigeelille lainkaan vyöhykettä ja 23 tuotti ainoastaan väärän vyöhykkeen. Oikean positiivisen monistustuotteen tuotti 130 näytettä, ja 80 näytettä tuotti oikean monistustuotteen lisäksi virheellisiä monistustuotteita.

Kuviossa 2 on Taq-polymeraasientsyymille suoritettujen menetelmien tulokset. Taq-polymeraasientsyymien optimaalinen tulos saavutettiin, kun käytettiin lyysauspuskurina NaOH-liuosta. NaOH-liuoksen kohdalla sentrifugointi näyttää vaikuttaneen DNA-pitoisuuteen suurimmassa osassa näytteitä.



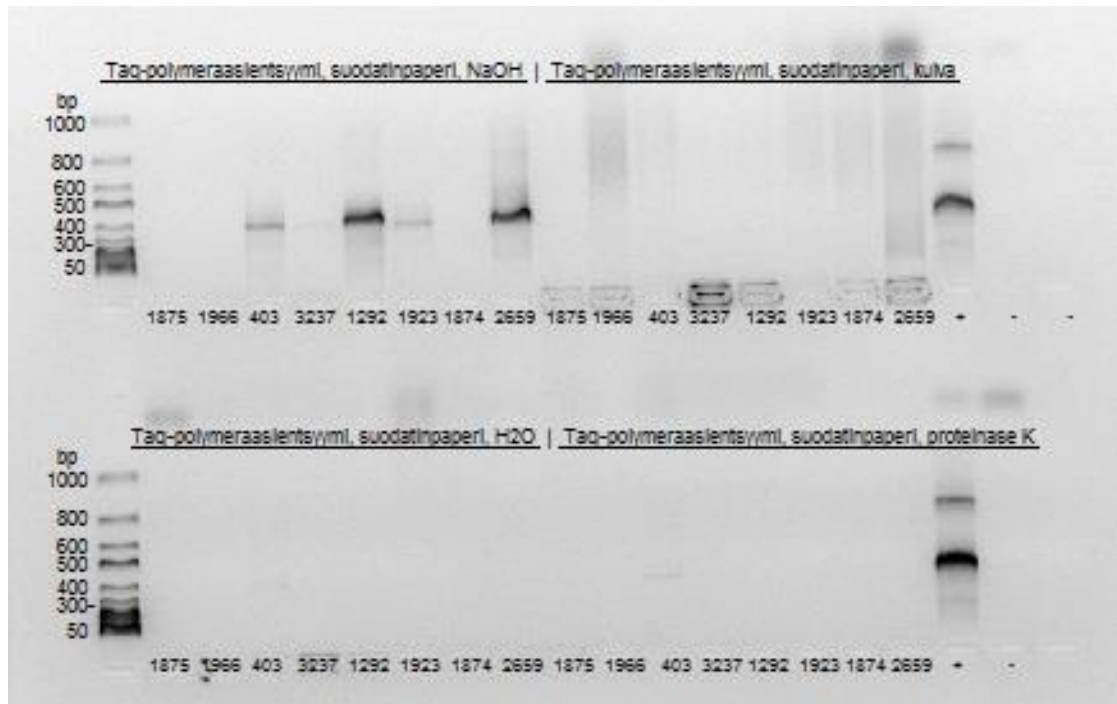
Kuvio 2. Taq-polymeraasientsyymän vaikutus pesäke-PCR-menetelmän toimivuuteen, kun lyysauspuskurina oli NaOH (yläriivi), proteinaasi-K (keskimmäinen rivi) tai vesi (alarivi). Geeliku-
van alla oleva numero ilmaisee bakteerikannan HAMBI-koodin.

Kuviossa 3 kuvataan Phusion-polymeraasientsyymän vaikutus DNA:n monistumiseen. Myös Phusion-polymeraasientsyymän optimaalinen tulos saavutettiin, kun lyysauksessa käytettiin NaOH-liuosta. Sentrifugointi vaikuttaa vahvistavan jonkin verran monistuneiden kantojen DNA-pitoisuutta.



Kuvio 3. Phusion polymeraasientsyymien toiminta pesäke-PCR-menetelmässä, kun lyysauspuskurina on NaOH (ylärivi), proteinaasi-K (keskirivi) tai vesi (alarivi). Geelikuvan alla oleva numero ilmaisee bakteerikannan HAMBI-koodin.

Kuviossa 4 esitetään suodatinpaperimenetelmien toimintaa pesäke-PCR-menetelmässä. Menetelmä ei onnistunut toimitulla tavalla, sillä käsittelystä riippumatta valtaosa PCR-tuotteista oli negatiivisia. Ainoastaan NaOH-lyysauspuskurissa pidetyn suodatinpaperin kohdalla monistumista on tapahtunut neljässä kannassa kahdeksasta. Monistuneissa kannoissa ei esiintynyt suodatinpaperimenetelmässä niin paljoa virheellistä monistumista kuin ilman suodatinpaperia tapahtuvassa monistuksessa. Tulos ei kuitenkaan ole luotettava liian vähäisen tutkimustiedon vuoksi, joten tuloksesta ei voida vetää johtopäätöksiä suodatinpaperin vaikutuksesta PCR-tuotteen monistumiseen tai puhtauteen.

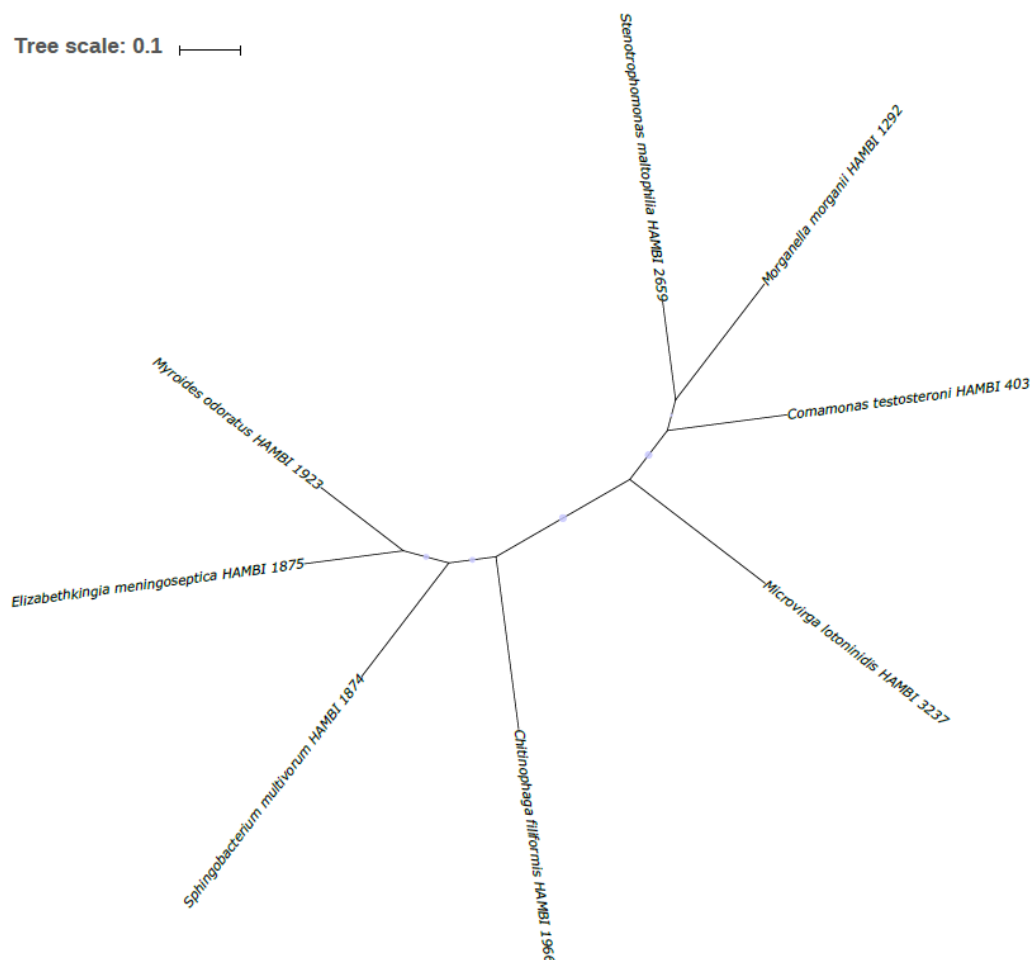


Kuvio 4. Suodatinpaperimenetelmien toiminta pesäke-PCR-menetelmässä. Ylärivissä vasemmalla olevat näytteet on liysattu NaOH-liuoksella ja oikean puoleiset näytteet on käsitelty siirrostamalla pesäkettä suoraan suodatinpaperille. Alarivissä olevat näytteet on liysattu vedellä (vasen) ja proteinaasi-K:lla (oikea) ja käsitelty suodatinpaperilla ja pesupuskurilla. Polymeeraasientsyyminä näytteissä oli Taq-polymeraasi. Geelikuvan alla oleva numero ilmaisee bakteerikannan HAMBI-koodin.

Agaroosigeelien perusteella optimaalisin yhdistelmä pesäke-PCR-menetelmälle saadaan, kun käytetään NaOH-liuosta lyysauspuskurina (kuvio 5). Sentrifugoinnilla on mahdollista lisätä monistustuotteen pitoisuutta. PCR-ohjelma, jossa on käytössä käytössä Taq-polymeraasi vaikuttaa tekevän Phusion polymeraasia enemmän virheitä.

7.2. Sanger-sekvensointi

Sekvensoinnin perusteella voidaan todeta, että tutkimuksessa mukana olleet näytekannat vastasivat oletusta. Sekvenssien perusteella tehty lajipuusto esitetään kuviossa 5.



Kuvio 5. Opinnäytetyössä käytettyjen bakteerikantojen lajipuusto (Cairns 2018).

7.3. Regressioanalyysi

Tilastollisesti analysoitavat tutkimustulokset koostuvat 288 PCR-tuloksesta, joista 194 oli positiivista ja 94 negatiivista tulosta. Kaikissa koekäsittelyissä esiintyi sekä positiivisia että negatiivisia tuloksia. Tutkimuksen tulokset eri koekäsittelyistä on esitetty taulukossa 3, josta käy ilmi muuttujan vaikutus PCR:n onnistumistodennäköisyyteen.

Taulukko 3. PCR-tulokset eri koekäsittelyissä.

Onnistuiko PCR?	B1	B2	B3	C1	C2	P1	P2	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8
Kyllä	48	51	95	92	102	106	88	30	31	20	18	28	16	23	28
Ei	48	45	1	52	42	38	56	6	5	16	18	8	20	13	8
Yht.	96	96	96	144	144	144	144	36	36	36	36	36	36	36	36
Kyllä%	50	53	99	64	71	74	61	83	86	56	50	78	44	64	78

B = puskuri; C = sentrifugaatio; P = polymeraasi; S = bakteerikanta

B1 = vesi P1 = DreamTaq S4 = HAMB1 1875

B2 = proteinaasi-K P2 = Phusion S5 = HAMB1 1923

B3 = NaOH S1 = HAMB1 403 S6 = HAMB1 1966

C1 = ei S2 = HAMB1 1292 S7 = HAMB1 2659

C2 = kyllä S3 = HAMB1 1874 S8 = HAMB1 3237

Regressioanalyysin perusteella tarkasteltiin optimaalisinta muuttujien yhdistelmää. Paras tilastollinen malli aineistolle käsitti selittäjät kanta, puskuri ja polymeraasi. Taulukossa 4 esitetään selittäjien tilastolliset merkitykset PCR-menetelmän onnistumistodennäköisyydelle.

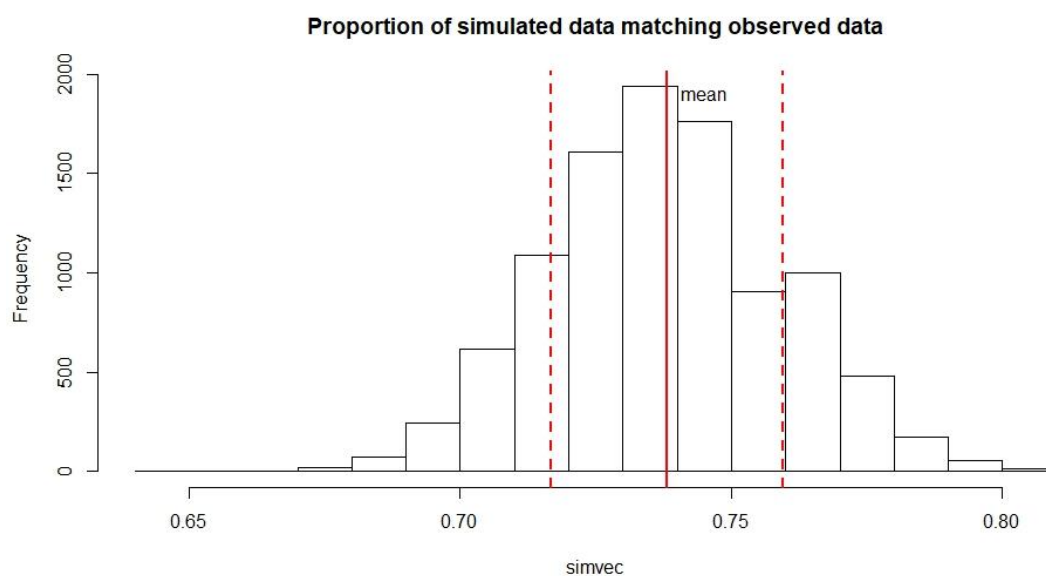
Taulukko 4. Logistinen regressiomalli: PCR-tulos ~ kanta + puskuri + polymeraasi

	Estimate	Std.	z value	Pr(> z)
(Intercept)	6.9676		5.644	1.66e-08
HAMB1 1874	-2.1053		-3.139	0.00169
HAMB1 1875	-2.5062		-3.624	0.00029
HAMB1 1923	-0.6671		-0.993	0.32052
HAMB1 1966	-2.9769		-4.079	4.52e-5
HAMB1 2659	-1.5657		-2.385	0.01720
HAMB1 3237	-0.6671		-0.987	0.32386
HAMB1 403	-0.2448		-0.349	0.726988
Phusion polymeraasi	-0.9364		-2.821	0.004787
Proteinaasi K	-5.0123		-4.739	2.15e-6
Vesi	-5.1747		-4.884	1.04e-7

Null deviance: 363.80 on 287 degrees of freedom, Residual deviance: 228.38 on 277 degrees of freedom, AIC: 250.38

Parhaimman mallin suorituskykyä arvioitiin tarkastelemalla väärin ennusteiden osuutta ennusteista ja herkkyys-spesifisyyskäyrän alaista pinta-alaa. Väärin ennusteiden osuus ennusteista oli noin 17 % ja herkkyys-spesifisyyskäyrän alainen pinta-ala noin 87 %. Saatujen tulosten pohjalta voidaan sanoa mallin suorituskyvyn olevan hyvä. Lisäksi tarkasteltiin mallin selittämää devianssia. Mallin selittämä devianssi kertoo siitä, miten hyvin valitut selittäjät selittävät vastemuuttujaa. Valittu malli pystyy selittämään noin 37 % $[100 * (\text{Null deviance} - \text{Residual deviance} / \text{Null deviance})]$ PCR:n onnistumistodennäköisyydestä.

Aineistolle suoritettiin myös simulaatiotutkimus, jonka tarkoituksena oli simuloida tulokset käytetylle aineistolle mallin perusteella ja tarkastella, kuinka suuri osuus simuloidusta aineistosta on samanlaista havaitun aineiston kanssa. Simuloinnin (kuvio 6) mukaan mallin avulla simuloitu aineisto on noin $74 \pm 2\%$ (keskiarvo \pm keskihajonta) samanlaista kuin todellinen aineisto.



Kuvio 6. Simulaatiotutkimuksen tulokset käytetylle aineistolle

Simulaatiotutkimuksen lisäksi aineistolle suoritettiin myös Post hoc-testi (Tuckey HSD), sillä puskureita ja kantoja oli tarkastelussa enemmän kuin kaksi. Post hoc -testin tarkoituksena oli selvittää aineiston sisäisiä eroja. Lyysauspuskurien osalta post hoc -tulokset vahvistivat visuaaliset havainnot agarosigeelillä: NaOH oli muita lyysauspuskureita huomattavasti parempi (korkea positiivinen vaikutus regressiokertoimeen: taulukko 5).

Taulukko 5. Lyysauspuskurien vaikutus PCR-tuotteen monistumistodennäköisyyteen.

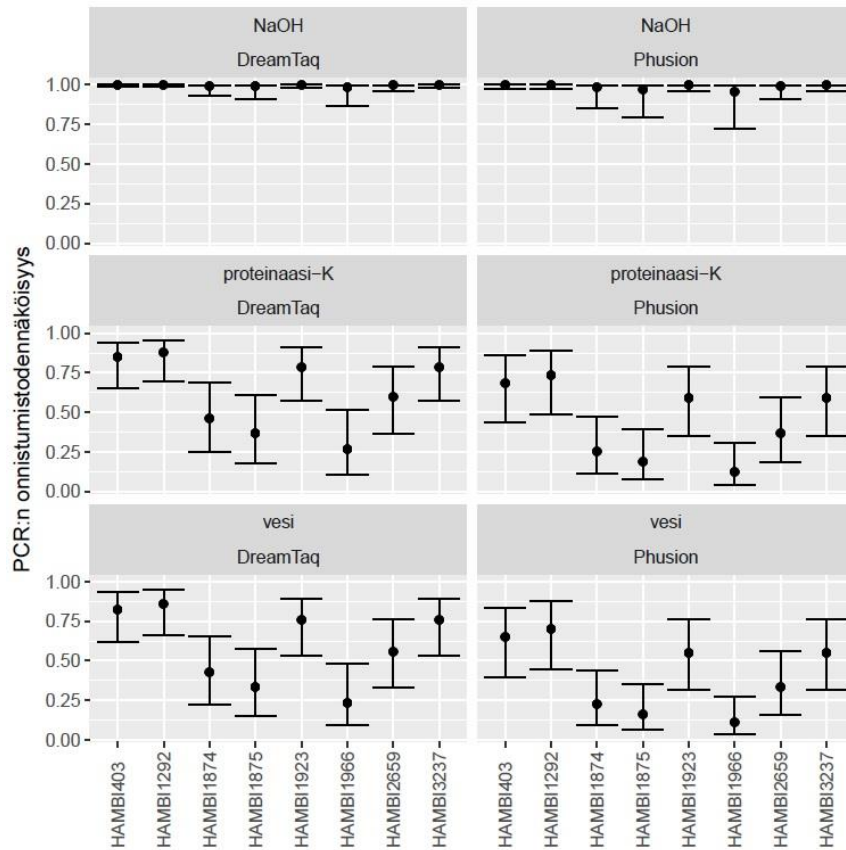
	Estimate	std.	z value	Pr (> z)
no – NaOH == 0	-17.7552		-0.024	1.00
Proteinaasi-K – NaOH == 0	-2.3192		-5.746	<1e-5
Vesi – NaOH == 0	-3.0115		-7.163	<1e-5
Proteinaasi-K – No == 0	15.4360		0.021	1.00
Vesi – no == 0	14.7437		0.020	1.00
Vesi – Proteinaasi-K	-0.6923		-2.173	0.102

Post hoc -tulosten mukaan myös kantojen välillä oli huomattavia eroja suhteessa PCR:n onnistumistodennäköisyyteen, eli jollain kannoilla PCR onnistui tilastollisesti merkitsevästi ja huomattavasti (vaikutus regressiokertoimeen) paremmin kuin toisilla (taulukko 6).

Taulukko 6. Post hoc -testi, kantojen merkitsevyys

Linear hypotheses	Estimate Std.	z value	p(< z)
HAMBI1874 - HAMBI1292 == 0	-2.105e+00	-3.118	0.03845
HAMBI1875 - HAMBI1292 == 0	-2.506e+00	-3.600	0.00756
HAMBI1923 - HAMBI1292 == 0	-6.671e-01	-0.987	0.97629
HAMBI1966 - HAMBI1292 == 0	-2.977e+00	-4.053	0.00127
HAMBI2659 - HAMBI1292 == 0	-1.566e+00	-2.365	0.25745
HAMBI3237 - HAMBI1292 == 0	-6.671e-01	-0.987	0.97632
HAMBI403 - HAMBI1292 == 0	-2.448e-01	-0.349	0.99997
HAMBI1875 - HAMBI1874 == 0	-4.009e-01	-0.631	0.99845
HAMBI1923 - HAMBI1874 == 0	6.231e-01	2.308	0.28801
HAMBI1966 - HAMBI1874 == 0	-8.717e-01	-1.292	0.90162
HAMBI2659 - HAMBI1874 == 0	5.396e-01	0.894	0.98655
HAMBI3237 - HAMBI1874 == 0	1.438e+00	2.308	0.28799
HAMBI403 - HAMBI1874 == 0	1.860e+00	2.855	0.08159
HAMBI1923 - HAMBI1875 == 0	1.839e+00	2.850	0.08259
HAMBI1966 - HAMBI1875 == 0	-4.707e-01	-0.681	0.99747
HAMBI2659 - HAMBI1875 == 0	9.405e-01	1.504	0.80455
HAMBI3237 - HAMBI1875 == 0	1.839e+00	2.850	0.08286
HAMBI403 - HAMBI1875 == 0	2.261e+00	3.359	0.01776
HAMBI1966 - HAMBI1923 == 0	-2.310e+00	-3.367	0.01700
HAMBI2659 - HAMBI1923 == 0	-8.985e-01	-1.475	0.82029
HAMBI3237 - HAMBI1923 == 0	2.887e-15	0.000	1.00000
HAMBI403 - HAMBI1923 == 0	4.223e-01	0.646	0.99819
HAMBI2659 - HAMBI1966 == 0	1.411e+00	2.119	0.40138
HAMBI3237 - HAMBI1966 == 0	2.310e+00	3.367	0.01715
HAMBI403 - HAMBI1966 == 0	2.732e+00	3.834	0.00324
HAMBI3237 - HAMBI2659 == 0	8.985e-01	1.475	0.82042
HAMBI403 - HAMBI2659 == 0	1.321e+00	2.070	0.43320
HAMBI403 - HAMBI3237 == 0	4.223e-01	0.646	0.99819

Tutkimuksesta kävi ilmi, että PCR-tulokseen vaikutti voimakkaimmin näytteen esikäsitely (kuvio 7): Positiivista PCR-tulosta ennusti parhaiten 20 mM NaOH:n käyttäminen lyysauspuskurina. Taq-polymeraasientsyymi tuotti Phusion-polymeraasientsyymiin verrattuna enemmän positiivisia PCR-tuloksia, mutta tuotti myös enemmän virheitä (selittäjien vaikutus virheisiin mallinnettiin erikseen). Näytteen sentrifugoinnilla ei ollut tilastollisesti merkitsevää vaikutusta, mutta onnistumistodennäköisyyden keskiarvo oli korkeampi kuin ilman sentrifugointia. Huonoin mahdollinen tulos saatiin, kun käytettiin tutkimusryhmässä käytössä ollutta protokollaa: lyysauspuskurina vesi, ilman sentrifugointia ja Phusion-polymeraasientsyymiä sisältävä PCR-ohjelma.



Kuvio 7. Tilastollisen mallin ennuste PCR:n onnistumistodennäköisyydelle riippuen puskurista, polymeerasientsyymistä ja bakteerikannasta (keskiarvo \pm 95 % luottamusväli). Kuvasta käy ilmi, että parhaiten PCR:n onnistumista ennustaa NaOH:n käyttäminen puskurina.

8 Pohdinta

Yhteenvedona voidaan todeta, että tutkitut muuttujat (lyysauspuskuri, PCR-ohjelma/polymeerasi) vaikuttavat PCR-menetelmän toimivuuteen merkittävästi. Parhaiten onnistunutta monistumista ennusti 20 mM NaOH-liuosken käyttäminen lyysauspuskurina, mikä johti lähes 100 %:n PCR-onnistumistodennäköisyyteen riippumatta muista tekijöistä. Muiden puskurien kohdalla tuloksiin tuottivat vaihtelua myös eri polymeerasientsyymien sisältävä PCR-ohjelma sekä bakteerikanta (toiset monistivat paremmin ja toiset huonommin).

Tutkimuksessa havaittiin, että NaOH-liuos oli parempi lyysauspuskuri kuin proteinaasi-K ja vesi. Tämän voidaan olettaa johtuvan siitä, että natriumhydroksidi liuottaa solu-

seinässä olevat lipidit, mikä aiheuttaa bakteerisolun hajoamisen (Geicova et al. 2002:547). Täten voidaan arvella, että neutraali vesi, jossa bakteerisolun hajoaminen perustuu lämpökäsittelyyn, toimii huonommin siksi, että keitto hajottaa bakteerin soluseinämää selkeästi heikommin yksin kuin yhdistettynä kemialliseen komponenttiin.

Proteinaasi-K:n ja veden välillä ei ollut tilastollisesti merkitsevää eroa ($p = 0.102$) pesäke-PCR-menetelmän toimivuudessa. Tämä johtuu mahdollisesti siitä, että proteinaasi-K:n vaikutus perustuu lyysauksessa sen entsyymaattiseen tehoon. Entsyymaattisessa hajottamisessa hajotus kohdistuu bakteerin peptidoglykaanikerrokseen. Gramnegatiivisilla bakteereilla peptidoglykaanikerroksessa on ulospäin suuntautuva polysakkaridikerros, joka estää proteinaasi-K:n solukalvoa tuhoavan entsyymaattisen vaikutuksen. Grampositiivisilla bakteereilla ei ole soluseinää suojaavaa polysakkaridikerrosta, joten grampositiivisten bakteerien ja hiivojen lyysaus proteinaasi-K:lla on mahdollista. (Geicova et al. 2002:547–548.)

Tutkimuksessa todettiin myös, että sentrifugointi ei vaikuttanut merkitsevästi pesäke-PCR-menetelmän onnistumistodennäköisyyteen. Tämän voidaan olettaa johtuvan siitä, että sentrifugoinnin teho perustuu lähinnä epäpuhtauksien laskeutumiseen näyteputken pohjalle. Menetelmä ei itsessään vapauta tai denaturoi DNA:ta. Tilastollisessa analyysissä ei kuitenkaan huomioitu vyöhykkeiden vahvuuksia, jotka vaikuttivat visuaalisen tarkastelun perusteella eroavan sentrifugoitujen ja sentrifugoimattomien näytteiden välillä. Johtopäätöksenä voidaan todeta, että sentrifugoinnilla vaikuttaa olevan vähäinen vaikutus pesäke-PCR:n onnistumiseen, mutta selkeä vaikutus PCR-tuotteen määrään, mikä puoltaa sentrifugaation käyttöä osana protokollaa.

Tutkimuksessa todettiin Taq-polymeraasin sisältävän PCR-ohjelman tuottavan Phusion-polymeraasientsyymiä enemmän virheitä DNA:n monistuksessa. Virheet johtuvat mahdollisesti PCR-ohjelmaa koskevista virheistä, sillä molemmissa ohjelmissa käytettävien reaktioseosten komponenttien pitoisuudet olivat samat. Tämä poistaa osa reaktioseoksesta johtuvista selittävästä virheistä (kontaminoituneet tai toimimattomat alukkeet, alukkeiden konsentraatio liian suuri/pieni, liian korkea Mg^{2+} -pitoisuus, kontaminoituneen dNTP:n tai veden käyttö). Tehty tutkimus ei kuitenkaan mahdollista PCR-ohjelman ja polymeraasin vaikutusten erottamista. Virheellisten vyöhykkeiden oikean ilmenemissyyden selvittäminen vaatisikin PCR-menetelmän optimointia. Virheelliset vyöhykkeet voivat johtua esimerkiksi PCR-ohjelman liian korkeasta monistussyklien määrästä, liian pitkästä pidennys- tai kiinnittymisajasta, liian matalasta kiinnittymislämpöti-

lasta, liian hitaasta lämpökierron nopeudesta tai väärin lasketuista T_m -lämpötilasta. (PCR Troubleshooting. 2018.)

Lisäksi opinnäytetyössä tutkittu suodatinpaperimenetelmä ei toiminut toivotulla tavalla, eikä monistumista tapahtunut. Tämän voidaan katsoa johtuvan suodatinpaperin liian isosta koosta reaktiivilavuuteen nähden. PCR-reaktioksessa ei täten ollut riittävästi templaatti-DNA:ta monistumisen onnistumiseen. Suodatinpaperimenetelmän kehittäminen toimivaksi vaatiikin suodatinpaperin koon suhteuttamista reaktioseoksen määrään, jotta suodatinpaperissa oleva templaatti-DNA saadaan reaktioseoksen käyttöön.

Opinnäytetyössä saatua tulosta voidaan hyödyntää tulevaisuudessa pesäke-PCR-menetelmän jatko-optimoinnissa. Pesäke-PCR-menetelmän optimointia voidaan jatkaa keskittymällä optimoimaan PCR-ohjelmaa. Näin voidaan poistaa tutkimuksessa havaitun optimiolosuhteissa suoritettun PCR:n virheellistä monistumista. PCR-ohjelman optimoimisella voidaan saatujen tulosten luotettavuutta ja varmuutta parantaa entisestään.

8.1. Tutkimuksen eettisyys ja luotettavuus

Eettisyydellä tarkoitetaan normitietoisuutta, kykyä erottaa hyväksyttävä ja hyväksymätön toisistaan. Eettisyys on vahvasti yhteydessä yksilöön itseensä sekä hänen sosiaaliseen normistoonsa. Yksilölliseen eettisyyden käsitteeseen vaikuttavat yksilön ja yhteisön moraalikäsitteet, joita säätelevät lait ja säädökset. Eettisyyttä voidaan tarkastella myös tieteenalojen näkökulmasta, jolloin eettisyys voidaan tulkita menetelmäksi, menettelytavoitteeksi tai perspektiiviksi, jota hyödynnetään toiminnan ja ongelmien analysoinnissa. (Resnik 2015.)

Tieteellisen tutkimuksen kohdalla eettisyys sisällytetään tutkimusetiikan yläkäsitteeseen, joka sisältää kaikki tutkimukseen ja tieteeseen liittyvät eettiset näkökulmat ja arvioinnit. Eettisesti hyväksyttävän tutkimuksen tulee noudattaa hyvää tieteellistä käytäntöä, mikä on luotu lainsäädännön määrittelemissä rajoissa. Tutkimusetiikassa korostuvat rehellisyys, huolellisuus ja tarkkuus, eettisesti kestävä tiedonhankinta-, tutkimus- ja arviointimenetelmät sekä vastuullisuus. (Tutkimustieteellinen neuvottelukunta 2012.)

Opinnäytetyössä eettisyys on otettu huomioon tutkimuslupahakemuksella ja tieteelliseen tutkimukseen sitoutumisella. Opinnäytetyötä varten laadittiin sopimus, jossa mää-

ritettiin opiskelijan, oppilaitoksen ja työelämätahon vastuut ja velvollisuudet. Sopimus allekirjoitettiin kaikkien opinnäytetyöhön osallistuvien tahojen osalta tammikuussa 2018. Sopimuksesta käy ilmi tutkimuksen aikataulu, aineiston hankinta ja tutkimusmenetelmät, joiden mukaisesti tutkimus suoritettiin luotettavasti ja objektiivisesti.

Tutkimus suoritettiin avoimesti tutkimusaineistoa ja -materiaalia kunnioittaen. Ennen tutkimuksen aloittamista opinnäytetyössä selvitettiin, millä tavalla tutkimus voidaan suorittaa niin, että tutkimuksesta saatava hyöty on suurempi kuin tutkimukseen liittyvät riskit ja kulut. Tutkimuksen näkökulmasta tämä tarkoitti aiheeseen liittyviin tutkimuksiin perehtymistä sekä tutkimusasetelman tarkastelua kriittisesti lähdekirjallisuuden valossa. Tutkimusasetelma luotiin vastamaan tutkimuskysymyksiin, jotka ohjasivat tutkimusta. Tutkimuskysymykset asetettiin niin, ettei kysymysten perusteella ollut mahdollista luoda tutkimustulokseen vaikuttavia ennakkokäsityksiä.

Tutkimuksessa eettisyys ja luotettavuus huomioitiin myös olosuhteiden vakioinnilla. Opinnäytetyössä satunnaismuuttujien määrää hallittiin tarkasti määritetyllä tutkimusasetelmalla, mikä mahdollistaa koeasetelman toistamisen ja tulosten luotettavan analysoinnin. Lisäksi tutkimustulokset dokumentoitiin ja raportoitiin asianmukaisesti, ottaen huomioon kaikki tutkimusasetelmassa esitetyt muuttujat. Tutkimuksessa myös pohdittiin satunnaismuuttujien vaikutusta tulokseen sekä arvioitiin tuloksia tilastollisella analyysillä. Tulosten analysoimisessa hyödynnettiin tunnettuja analysointimenetelmiä ja -ohjelmia, ja poikkeamat raportoitiin asianmukaisella tavalla.

Lähteet

Altschul, SF. – Gish, W. – Miller, W. – Myers, EW. – Lipman, DJ. 1990. Basic local alignment search tool J Mol Biol. 1990. 215(3):403-10.

Brown, Terrance A. 2016. Gene Cloning and DNA analysis an Introduction. Seventh edition. New Delhi, India: Asbon by Aptara Inc.

Brown, Terry 2012. Introduction to genetics a molecular approach. USA: Garland Science.

Catalão, Maria João – Gil, Filipa – Moniz-Pereira, José – Pimentel, Madelena 2013. Diversity in bacterial lysis systems: bacteriophages show the way. FEMS Microbiology Reviews. 37(1):554–571. Verkkodokumentti.
<<https://doi.org/10.1111/1574-6976.12006>>. Luettu 28.3.2018.

Cairns, Johannes 2018. Kuvio 8. Opinnäytetyössä käytettyjen bakteerikantojen lajipuusto.

Edwards, Ulrike – Rogall, Till – Blöcker, Helmut – Emde, Monica – Böttger, Erik C. 1989. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. Nucleic Acids Research 17 (19):7844-7845. Verkkodokumentti.
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC334891/pdf/nar00136-0271.pdf>>. Luettu 16.4.2018.

Garibyan, Lilit – Avashia, Nidhi 2014. Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR). J Invest Dermatol 133(3):e6. Verkkodokumentti.
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4102308/>>. Luettu 24.3.2018.

Geicova, Jana – Bury, Dean – Jelen, Paul 2002. Methods for disruption of microbial cells for potential use in the dairy industry - a review. International Dairy Journal 12:541–553.

Gutherie, Christine – Bergkessel, Megan. Chapter Twenty Five - Colony PCR. 2013. Teoksessa Methods in Enzymology. Lorsch, Jon (toim.). 529: 299-309. Verkkodokumentti.
<<http://www.sciencedirect.com.libproxy.helsinki.fi/science/article/pii/B9780124186873000252?via%3Dihub>>. Luettu 30.12.2017.

Jorden, J. Zoe 1998. Genomic DNA Digestion and ribotyping. Teoksessa Molecular Bacteriology: Protocols and Clinical Applications. Teoksessa Woodford, Neil – Johnson, Alan P (toim.). Methods in molecular medicine.15. New Jersey: Humana Press.

Jiun-Nong, Lin – Chuang-Shu, Lai – Chih-Hui, Yang – Yi-Han, Huang – Hsiu-Fang, Lin – His-Hsun, Li 2017. Comparison of for automated microbiology system with 16S rRNA gene sequencing for identification of *Chryseobacterium* and *Elizabethkingia* species. Scientific Reports 2017. Verkkodokumentti.
<<https://www.nature.com/articles/s41598-017-14244-9>>. Luettu 25.2.2018.

Khare, Vineeta – Eckert, Kristin A. 2002. The proofreading 5'→3' exonuclease activity of DNA polymerases: a kinetic barrier to translesion DNA synthesis. *Science Direct: Mutation Research* 510 (2002). Verkkodokumentti. <https://ac.els-cdn.com/S0027510702002518/1-s2.0-S0027510702002518-Zmain.pdf?_tid=da8fba7d-476b-4deb-b286-22027a80d928&acdnat=1523624968_30530777b29a7887e91669c15ece1c12>. Luettu 13.4.2018.

Koonz, Laura 2013. Chapter Four - Agarose Gel Electrophoresis. Teoksessa *Methods in Enzymology*. Lorsch, Jon (toim.). 529: 35-45. Verkkodokumentti: <<https://www.sciencedirect.com.libproxy.helsinki.fi/science/article/pii/B9780124186873000045>>. Luettu 30.11.2017.

KvantiMOTV 2018a. Regressioanalyysi. Verkkodokumentti. <<http://www.fsd.uta.fi/menetelmaopetus/regressio/analyysi.html>>. Luettu 31.3.2018.

KvantiMOTV 2018b. Logistinen regressio. Verkkodokumentti. <<http://www.fsd.uta.fi/menetelmaopetus/logregressio/logistinen.html>>. Luettu 31.3.2018.

Lindholm, Laura – Eerola, Erkki. 2010. Bakteerien luokittelu ja tyypittäminen. Teoksessa *Mikrobiologai. Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet*. Vaara, Martti (toim.). Duodecim.

Nybo, Kristie 2012. Colony PCR. *BioTechniques* 53. (6): 345-347. Verkkodokumentti. <<https://www.future-science.com/doi/pdf/10.2144/000113961>>. Luettu 30.12.2017.

PCR Troubleshooting. BIO-RAD. Verkkodokumentti. <<http://www.bio-rad.com/en-fi/applications-technologies/pcr-troubleshooting?ID=LUSO3HC4S>>. Luettu 15.4.2018.

Phusion DNA Polymerases. 2017. ThermoScientific. Verkkoartikkeli. <<https://www.thermofisher.com/fi/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/thermo-scientific-molecular-biology-products/phusion.html>>. Luettu 4.2.2018.

Process optimization methods. 2015. COSIMA. Verkkodokumentti. <http://web.spi.pt/cosima/sites/all/downloads/R2_EN_COSIMA_Process_Optimization_methods.pdf>. Luettu 5.4.2018.

Product information: Thermo Scientific DreamTaq Polymerase. 2015. Thermo Scientific. Saatavilla verkkodokumenttina. <http://hpc.ilri.cgiar.org/beca/training/IMBB_2015/course/Catalogue/Catalogue_ep0702-dreamtaq-dna-polymerase.pdf>. Luettu 3.1.2018.

Proteinase K from *Tritirachium album*. 2018. Sigma-Aldrich. Verkkodokumentti. <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/p2308?lang=fi®ion=FI&gclid=CjwKCAjw-bLVBRBMEiwAmKSb880oKABSHOBqq9IOgusnqDOF8wToYCrWjdK2kJ6VREZL7qt_EJ0ppBoCSyoQAvD_BwE>. Luettu 28.3.2018.

Resnik, David B. 2015. What is Ethics in Research & Why is it Important? National Institute Environmental Health Sciences. Verkkodokumentti. <<https://www.niehs.nih.gov/research/resources/bioethics/whatis/index.cfm>>. Luettu 28.3.2018.

R Foundation 2018. What is R? <<https://www.r-project.org/about.html>>. Luettu 24.3.2018.

Rossi-Tamisier, Morgane – Benamar, Samia – Raoult, Dider – Fournier, Pierre-Edouard 2015. Cautionary tale of using 16S rRNA gene sequence similarity values in identification of human-associated bacterial species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 65 (6). Verkkootikkeli. <http://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijms.0.000161;jsessionid=Nv6iNo-_Y2RQGFYFp8SfF3HA.x-sgm-live-02#tab2>. Luettu 24.3.2018.

Scheader, C. – Schielke, A. – Ellerbroek, L. – Johne, R. 2012. RCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *Journal of Applied Microbiology*. 113(5). Verkkodokumentti. <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x>>. Luettu 16.4.2018.

Sievers, F. – Wilm, A. – Dineen, D. – Gibson, TJ. – Karplus, K. – Li, W. – Lopez, R. – McWilliam, H. – Remmert, M. – Söding, J. – Thompson, JD, – Higgins DG 2011. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol*. 2011. 7:539.

Staden, R. – Beal, KF – Bonfield, JK. 2000. The Staden package, 1998. *Methods Mol Biol*. 2000 (132):155-30. MRC Laboratory of Molecular Biology. Cambridge, UK.

TE buffer.2018. Tuoteseloste. ThermoScientific. <<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/12090015>>. Luettu 16.4.2018.

Tm Calculator. 2018. ThermoScientific. <<https://www.thermofisher.com/fi/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/tm-calculator.html#>>. Luettu 4.2.2018.

Tutkimuseettinen neuvottelukunta 2012. Hyvä tieteellinen käytäntö ja sen loukausepäilyjen käsitteleminen Suomessa. Tutkimuseettisen neuvottelukunnan ohje 2012. Verkkodokumentti. <http://www.tenk.fi/sites/tenk.fi/files/HTK_ohje_2012.pdf>. Luettu 23.8.2018.

Vaara, Martti – Skurnik, Mikael – Sarvas, Matti. 2010a. Bakteerien evoluutio ja fylogenia. Teoksessa *Mikrobiologia. Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet*. Vaara, Martti (toim.). Duodecim.

Vaara, Martti – Skurnik, Mikael – Sarvas, Matti. 2010b. Eubakteerit ja arkkibakteerit: prokaryoottinen kehityslinja. Teoksessa *Mikrobiologia. Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet*. Vaara, Martti (toim.). Duodecim.

Zou, Yiping - Manson, Michael G. - Wang, Yuling - Wee, Eugene - Turni, Conny - Blackall, Patrick J. - Trau, Matt - Botella, Jose R 2017. Nucleic acid purification from plants, animals and microbes in under 30 seconds. PLOS Biology 2017. Verkkoartikkeli.
<<http://journals.plos.org/plosbiology/article?id=10.1371/journal.pbio.2003916>>. Luettu 5.12.2017.

TUTKIMUKSEN AINEISTO

Näytetyyppi	Jaksottainen/ yhtäjaksoinen	Esikäsittely	Fuugaus	Tulos	HUOM!
1.1) <i>Pakastepelletti</i> (216, 1279, 1292, 1874, 1875, 1896, 1842, 1923, 1966, 1988, 2164, 2470, 2443, 2659, 3237, <i>E.</i> <i>coli</i> JE2571RP)	Jaksottainen (PCR tehty 24.10.2017, ajettu geelille 25.10.2017)	Pelletin päällä oleva säilytysneste pois, +50 µl steriili H ₂ O → vortex → Vesihaudekeitto n. 100 °C/ 5 min. Toisto 3 x.	-	Kaikki näytteet uusittava	-
2.1) <i>Pakastepelletti</i> (216, 1875, 1966)	Jaksottainen (Esikäsittely 27.10.2017, PCR + geeli 30.10.2017)	Edellisen vaiheen näytesuspensio keitetty uudelleen; Vesihaudekeitto n. 100 °C/ 5 min.	13 000 rcf/ 5 min/ 4 °C	216: OK! Näytteet 1875 ja 1966 uusittava	PCR ohjelmaa muokattu: Lid 105 °C asetettu!
2.1.2) <i>Pakastepelletti</i> (1279, 1292, 1874, 1875, 1896, 1842, 1923, 1966, 1988, 2164, 2470, 2443, 2659, 3237, <i>E.coli</i> JE2571RP)	Yhtäjaksoinen (Esikäsittely + PCR + geeli 30.10.2017)	Edellisen vaiheen näytesuspensio keitetty uudelleen; Vesihaudekeitto n. 100 °C/ 5 min.	13 000 rcf/ 5 min/ 4 °C	Näyte 1279: OK! Näytteet 1292, 1874, 1875, 1896, 1842, 1923, 1966, 1988, 2164, 2470, 2443, 2659, 3237, <i>E.coli</i> JE2571RP uusittava	-

1.2) <i>Maljaviljely, vanha</i> (Sc2 w/o p 1.9.17 VP/EVO; valkoinen pesäke, keltainen pesäke)	Jaksottainen (PCR tehty 24.10.2017, ajettu geelille 25.10.2017)	Bakteeria siirrostettu maljalta 50 µl steriiliä H ₂ O → vortex → Vesihaudekeitto n. 100 °C/ 5 min. Toisto 3 x.	-	Kaikki näytteet uusittava	-
2.2) <i>Maljaviljely, vanha</i> (Sc2 w/o p 1.9.17 VP/EVO; valkoinen pesäke, keltainen pesäke)	Jaksottainen (Esikäsitteily 27.10.2017, PCR + geeli 30.10.2017)	Edellisen vaiheen näytesuspensio keitetty uudelleen; Vesihaudekeitto n. 100 °C/ 5 min.	13 000 rcf/ 5 min/ 4 °C	Sc2 w/o p 1.9.17 VP/EVO valkoinen pesäke: OK! Sc2 w/o p 1.9.17 VP/EVO keltainen pesäke: OK!	PCR ohjelmaa muokattu: Lid 105 °C asetettu!
3) <i>Maljaviljely, tuore</i> (403, 1292, 1299, 1874, 1875, 1896, 1842, 1923, 1966, 1988, 2164, 2470, 2443, 2659, 3237, <i>E.coli</i> JE2571RP)	Jaksottainen (Esikäsitteily 31.10.2017, PCR + geeli 1.11.2017)	Maljalta pesäkettä eppendorf putkeen, jossa 50 µl steriiliä H ₂ O → vortex → Vesihaudekeitto n. 100 °C/ 5 min vortex → fuugaus	13 000 rcf/ 5 min/ 4 °C	Näytteet 403, 1299, 1842, 1875, 1896, 1923, 1988, 2164, 2470, JE2571RP: OK! Näytteet 1292, 1874, 1966, 2659, 3237, 3443 uusittava	-
4) <i>Maljaviljely, tuore</i> (1292, 1874, 1875, 1966, 2659, 3237, 3443)	Jaksottainen (Esikäsitteily + PCR + geeli 6.11.2017)	Ei erillistä näytteen esikäsitteilyä. Näytteiden käsittelyä jatkettu kohdan 3 näytesuspensioilla	-	Näyte 1292: OK! Muut näytteet (1874, 1875, 1966, 2659, 3237) uusittava	2,5 % DSMO → MasterMix 30.25 µl H ₂ O 10 µl Phusion GC

Reaction Buffer 5x

2.5 µl pA Primer

2.5 µl pH Primer

1 µl dNTPs 10 nM

0.5 µl DyNAzyme
polym.

1.25 µl DMSO

→ Annealing tem-
perature 55 °C →
53.5 °C

5) <i>Maljaviljely, tuore</i> (1874, 1875, 1966, 2659, 3237)	Yhtäjaksoinen (Esikäsitely + PCR + geeli 6.11.2017)	Näytettä maljalta (viljelty 1.11.) microeppendorf-putkeen, jossa 20 µl steriiliä H ₂ O, varovaisesti pipe- tinkärjellä → iCycler 95 °C/ 6 min, 55 °C/ 30sek, HotStart → Vortex → fuugaus	13 000 rcf/ 5 min/ 4 °C	Kaikki näytteet uusittava	Keitto tehty iCycler PCR-laitteella
6) <i>Maljaviljely</i> (1874, 1875, 1966, 2659, 3237)	Yhtäjaksoinen (Esikäsitely + PCR + geeli 6.11.2017)	Näytettä maljalta (viljelty 1.11.) microeppendorf-putkeen, jossa 20 µl steriiliä H ₂ O. Alkuspension vahvuus 3-5 McFarland. Vortex → Vesihaudekeitto n. 94 °C/ 8 min, →	13 000 rcf/ 5 min/ 4 °C	Kaikki näytteet uusittava	-

Vortex → fuugaus

7) <i>Maljaviljely</i> (1874, 1875, 1966, 2659, 3237)	Yhtäjaksoinen (Esikäsittely + PCR + geeli 8.11.2017)	Näytteille ei erillistä esikäsittelyä, käytössä kohdan 6) näytesuspensi- sioit, joita laimennettu 1:10 (vortex + fuugaus)	13 000 rcf/ 5 min/ 4 °C	Näytteet 1874, 1875, 1966, 2443 ja 3237 OK! Näyte 2659 uusittava	-
8) <i>Maljaviljely</i> (2659)	Yhtäjaksoinen (Esikäsittely + PCR + geeli 10.11.2017)	Näytteille ei erillistä esikäsittelyä, käytössä kohdan 6) näytesuspensi- sioit, joita laimennettu 1:5, 1:10 ja 1:100	13 000 rcf/ 5 min/ 4 °C	Näytteet 2659 1:10 ja 2569: 1:100 OK!	Laimennokset 1:5 = 10 µl alkupe- räistä suspensiota / 50 µl H ₂ O 1:10 = 50 µl 1:5 suspensiota / 100 µl H ₂ O 1:100 = 10 µl 1:10 suspensiota / 100 µl H ₂ O

TIETOA TUTKIMUKSESSA KÄYTETTÄVISTÄ BAKTEERIKANNOISTA

Strain list	Genome sequence information/ Gen-Ban assembly accession	RefSeq assembly accession	Additional genome information	ATCC
HMC34.1 composition				
<i>Azorhizobium caulinodans</i> <i>HAMBI 216</i>	GCA_000010525.1	GCF_000010525.1	Complete reference genome	NA
<i>Chitinophaga filiformis</i> <i>HAMBI 1966</i>	GCA_900102545.1	NA	Draft genome	NA
<i>Chitinophaga sancti</i> <i>HAMBI 1988</i>	GCA_900119105.1	GCF_900119105.1	Full scaffold level reference genome	NA
<i>Comamonas testosteroni</i> <i>HAMBI 403</i>	GCA_000241525.2	GCF_000241525.1	Full scaffold level reference genome	ATCC 11996
<i>Cupriavidus necator</i> <i>HAMBI 2164</i>	GCA_001592245.1	GCF_001592245.1	Full scaffold level reference genome	ATCC 11883

<i>Elizabethkingia meningoseptica</i> HAMBI 1875	GCA_000367325.1	GCF_000367325.1	Full scaffold level reference genome	ATCC 13253
<i>Enterobacter intermedius</i> HAMBI 1299	GCA_00159315.1	GCF_001598315.1	Full scaffold level reference genome	ATCC 33110
<i>Escherichia coli</i> K-12 substr. JE2571 (RP4)	GCA_000005854.2	GCF_000005845.2	RefSeq is the <i>E.coli</i> K-12 reference genome that has previously been used as JE2571 reference (Poranen et al. 2006 J Virol)	NA
<i>Hafnia alvei</i> HAMBI 1279	GCA_000735375.1	GCF_000735375.1	Full contig level reference genome	ATCC 13337
<i>Mirgrovirgia lotoninidis</i> HAMBI 3237	GCA_000262405.1	GCF_000262405.1	Full scaffold level reference genome	NA
<i>Morganella morganii</i> HAMBI 1292	GCA_001598895.1	GCF_001598895.1	Full contig level reference genome Complete reference genome	ATCC 25830
<i>Myroides odoratus</i> HAMBI 1923	GCA_000243275.1	GFC_000243275.1	Full scaffold level reference genome	NA

<i>Paracoccus defnitrificans</i> HAMBI 2443	GCA_900100045.1	GCF_900100045.1	Full scaffold level reference genome	NA
<i>Roseomonas gilardii</i> HAMBI 2470	N	N	Incomplete draft genome	ATCC 49956
<i>Sphingobacterium multivorum</i> HAMBI 1874	N	N	Draft genome	NA
<i>Sphingobacterium spiritivorum</i> HAMBI 1896	GCA_000143765.1	GCF_000143765.1	Full scaffold level reference genome	ATCC 33861
<i>Sphingomonas yanoikuyae</i> HAMBI 1842	GCA_000315525.1	GCF_000315525.1	Full scaffold level reference genome	ATCC 512030
<i>Stenotrophomas maltophilia</i> HAMBI 2659	GCA_000742995.1	GCF_000742995.1	Complete reference genome	ATCC 13637

ESIKÄSITTELYT

Ennen esikäsitteilyn aloittamista, viljele näytteet PPY-maljalle 2 vrk ennen PCR analyysia. Viljelyn tulee olla sekä puhdasviljelmä että hajotusviljelmä, että pesäke-PCR voidaan suorittaa halutulle bakteerille luotettavasti ilman ristikontaminaatio riskiä.

Ennen esikäsitteilyn aloittamista valmista myös tarvittavat liuokset:

Pesupuskuri (25 ml)
10 mM Tris (pH 8) (=25 ml)
0.1 % Tween-20 (=25 µl)

Proteinaasi-K (20 mg/ml)
20 µl proteinaasi-K/ 1000 µl steriili vesi

20 mM NaOH-liuos
40 mg NaOH/ 50 ml steriiliä vettä

Näytteiden esikäsitteily suoritetaan siirrostamalla pesäkkeitä lyysauspuskuriin alla olevan ohjeistuksen mukaisesti.

Nestemäiset lyysauspuskurit: steriili vesi, 20 mM NaOH-liuos

- 1 Siirrosta silmukalla 2-3 pesäkettä (ø 2 mm) / 50 µl lyysauspuskuria
- 2 Inkuboi 100 °C / 10 min PCR laitteessa. HUOM! Heated lid (105 °C)
- 3 Sentrifugoi näyte pohjaan
- 4 Vorteksoi 15 sekuntia
- 5 Sentrifugoi 30 sekuntia.

Mikäli suoritat protokolla ilman sentrifugointia, noudata yllä olevaa ohjeistusta ilman viimeistä 30 sekunnin sentrifugointia.

Nestemäiset lyysauspuskurit: Proteinaasi K 20 mg/ml

1. Siirrosta silmukalla 2-3 pesäkettä (ø 2 mm) / 50 µl lyysauspuskuria
2. Inkuboi 55 °C/ 60 min
3. Inkuboi 100 °C/ 10 min PCR laitteessa. HUOM! Heated lid (105 °C)
4. Sentrifugoi näyte pohjaan
5. Vorteksoi 15 sekuntia
6. Sentrifugoi 30 sekuntia.

Mikäli suoritat protokolla ilman fuugausta, noudata yllä olevaa ohjeistusta ilman viimeistä 30 sekunnin fuugausta.

Suodatinpaperimenetelmät, nestemäiset lyysauspuskurit

1. Lyysaa solut Nestemäiset lyysauspuskurit -ohjeella jättäen viimeinen sentrifugointi pois
2. Lisää suspensioon suodatinpaperikiekko (nirtoselluloosa ø 3 mm) 1 min ajaksi
3. Siirrä suodatinpaperikiekko eppendorf-putkeen, jossa on 200 µl pesupuskuria 1 min ajaksi
4. Siirrä suodatinpaperi suoraan PCR-reaktioseokseen (à 20 µl)

Suodatinpaperimenetelmät, kuiva

1. Siirrosta maljalta suoraan pesäkettä suodatinpaperikiekolle (nitroselluloosa \varnothing 3 mm)
2. Siirrosta suodatinpaperikiekko eppendorf-putkeen, jossa on 200 μ l pesupuskuria 1 min ajaksi
3. Siirrä suodatinpaperi suoraan PCR-reaktioseokseen (à 20 μ l)

PCR**PCR-reaktioseos, Phusion**

Ohjeessa olevat lukemat ovat yhden näytteen PCR-reaktioon tarvittavat reagenssimäärät, kun lopullinen näytetilavuus on 25 μ l.

15,75 μ l H₂O
5 μ l 5x Phusion GC Reaction Buffer
1,25 μ l pA' Primer (445)
1,25 μ l pH' Primer (869)
0,5 μ l dNTPs 10 nM
0,25 μ l Phusion DNA Polymerase

PCR-reaktioseos, DreamTaq (Product information: Thermo Scientific DreamTaq Polymerase. 2015.)

Ohjeessa olevat lukemat ovat yhden näytteen PCR-reaktioon tarvittavat reagenssimäärät, kun lopullinen näytetilavuus on 25 μ l.

18,25 μ l H₂O
2,5 μ l 10x DreamTaq Buffer (includes 20 mM MgCl₂)
1,25 μ l pA' Primer (445)
1,25 μ l pH' Primer (869)
0,5 μ l dNTPs 10 nM
0,25 μ l DreamTaq DNA Polymerase

Valmista PCR-reaktioseos UV-kierrollisessa suojakaapissa kontaminaation pienentämiseksi, mikäli mahdollista.

Lisää näyte (1 μ l) PCR-reaktioseokseen UV-kaapin ulkopuolella.

HUOM! Pipetointivirheen vähentämiseksi, tee PCR-reaktioseosta aina useammalle näytteelle kerrallaan, mikäli mahdollista.

HUOM! Muista laskea tarvittavaan tilavuuteen myös positiivinen ja negatiivinen kontrolli sekä mahdolliset menetelmäkontrollit.

PCR-ohjelma, Phusion polymeerasientstyymi

Partial cell lysis 98 °C/ 5min x1
Initial denaturation 98 °C/ 30 sec x1
Denaturation 98 °C/ 10 sec
Annealing 55 °C/ 30 sec x25
Extension 72 °C/ 30 sec
Final extension 72 °C/ 5 min x1
Storing temperature 4 °C

PCR-ohjelma, DreamTaq polymeerasientsyymi (Phusion DNA Polymerases)

Initial denaturation 95 °C / 3 Min x1
Denaturation 95 °C/ 30 sec
Annealing 57 °C / 30 sec x 30
Extension 72 °C / 1 min
Final extension 72 °C / 5 min x1
Storing temperature 4 °C

HUOM! Säilytyslämpötilan tarkoituksena on suojata näytteitä niin kauan, että näytteet analysoidaan agarosigeelielektroforeesilla tai kunnes ne siirretään pakastimeen odotta-
maan jatkokäsittelyjä. Mikäli agarosigeelielektroforeesia ei ehditä tehdä heti, mutta näyt-
teet aiotaan jatkokäsitellä saman vuorokauden aikana, näytteitä voi säilyttää jääkaapissa.
Mikäli näytteitä ei ehditä analysoidaan saman päivän aikana, säilytetään näytteet -25 °C
pakastimessa.

AGAROOSIGEELIELEKTROFOREESI

Geelin valmistus

2,6 g Agar
130 ml 1xTAE

Keitä mikroaaltouunissa, kunnes kiehahtaa.
Jäähdytä noin +65 °C.
Lisää 1 tippa etidiumbromidia (0,625 mg/ml)

Kaada teipattuun geelikelkkaan, johon on asetettu näytekanavakammat alussa ja puoles-
sa välissä.

Anna jähmettyä noin 20 minuuttia.

Siirrä geeli elektroforeesikammioon, jossa on 1xTAE -liuosta niin, että se peittää geelin
kokonaan.

Näytteiden lataus agarosigeelille

Pipetoi 5 µl näytettä parafilmin päälle.

Lisää 1 µl 6xLD reagenssia.

Sekoita ja pipetoi geelille.

HUOM! Pipetoi vähintään yhteen kanavaan kontrollinäyte (Ladder Gene Ruler 1 kb 0,1
µg/ml). Ladder Gene Ruler toimii DNA:n kokostandardina.

Aja geeliä geelielektroforeesi laitteessa 100V/ 45 minuuttia.

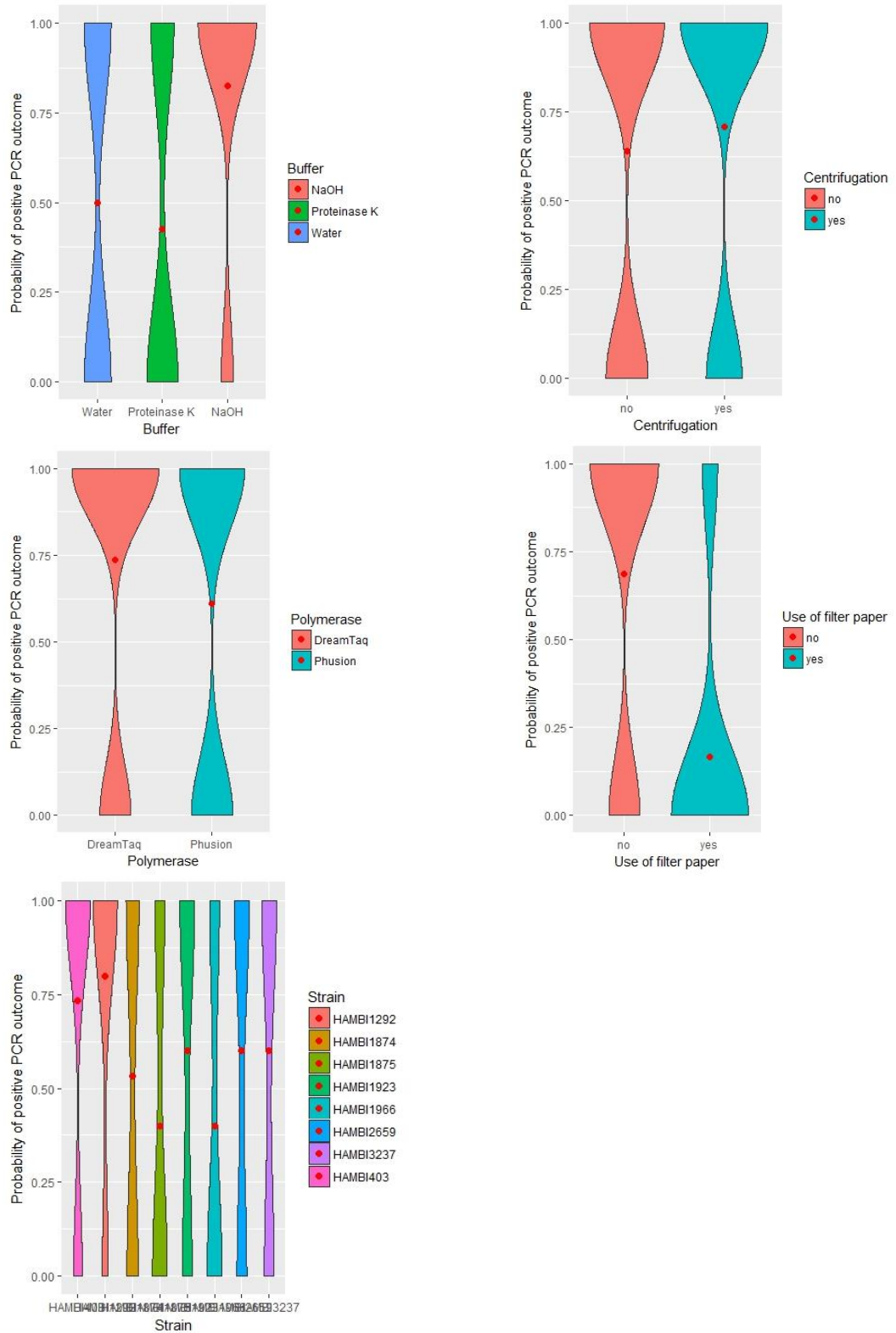
Kuvanna geeli UV-valoa apuna käyttäen.

1xTAE valmistus

Laimenna 50xTAE-puskuri (242 g TRIS-Base, 57 ml etikkahappo (17.4 M), 18,5 g EDTA,
1 l H₂O) Milli-Q-veteen: 20 ml 50xTAE / 980 ml Milli-Q-H₂O

Visuaalinen esitys kerätystä aineistosta

Kuviossa punainen piste kuvantaa onnistumistodennäköisyyttä empiirisessä aineistossa ja sen ympärillä oleva muoto sitä, kuinka suuri osa aineistosta sijoittuu lähelle arvoa 1 (onnistunut PCR) tai 0 (epäonnistunut PCR) riippuen koekäsittelystä.



Pesäke-PCR-menetelmä: gram-negatiiviset sauvabakteerit

Versio 1.0: 25.2.2018/ liris Nikula

Tarkastaja:

Hyväksyjä:

Näyte

Menetelmän soveltuu tutkimusryhmässä käytössä olevien gram-negatiivisten sauvabakteerien polymeraasiketjureaktiota hyödyntävään DNA:n monistukseen.

Näytteenä käytetään korkeintaan 2 vrk vanhoja bakteeriviljelyitä. Viljelyn tulee olla sekä puhdas- että hajotusviljelmä, jotta pesäke-PCR voidaan suorittaa halutulle bakteerille luotettavasti ilman ristikontaminaatio riskiä. Kasvata bakteereja 2 vrk / 28 °C.

Ennen esikäsitteilyn aloittamista valmista myös tarvittava lyysauspuskuri:

20 mM NaOH-liuos

40 mg NaOH / 50 ml steriiliä vettä

Esikäsitteily

Näytteiden esikäsitteily suoritetaan siirrostamalla pesäkkeitä lyysauspuskuriin alla olevan ohjeistuksen mukaisesti.

- 1 Siirrosta silmukalla 2-3 pesäkettä (ø 2 mm) / 50 µl lyysauspuskuriä
- 2 Inkuboi 100 °C / 10 min PCR laitteessa. HUOM! Heated lid (105 °C)
- 3 Sentrifugoi näyte pohjaan
- 4 Vorteksoi 15 sekuntia
- 5 Sentrifugoi 30 sekuntia.

Kontrollit

Positiivinen kontrolli: JE2571 (RP4) EC

Negatiivinen kontrolli: steriili/PCR vesi

Menetelmäkontrolli: 20 mM NaOH

PCR- reaktioseos, DreamTaq

Ohjeessa olevat lukemat ovat yhden näytteen PCR-reaktioon tarvittavat reagenssimäärät, kun lopullinen näytetilavuus on 50 µl.

36,5 µl H₂O

5 µl 10x DreamTaq Buffer (includes 20 mM MgCl₂)

2,5 µl pA' Primer (445)

2,5 µl pH' Primer (869)

1 µl dNTPs 10 nM

0,5 µl DreamTaq DNA Polymerase

1. Valmista PCR-reaktioseos koko näytemäärälle kerrallaan. Laske näytemäärän myös kontrollit sekä pipetointivara (+1).
2. Valmista PCR-reaktioseos UV-kierroksissa laminaarikaapissa välttääksesi reagenssien kontaminoitumisen.

HUOM! Polymeraasientsyymiä ei saa pitää huoneenlämmössä. Hae polymeraasientsyymi pakastimesta kylmäblokkissa vasta, kun olet lisännyt muut reagenssit PCR-reaktioseokseen!

3. Jaa PCR-reaktioseos PCR-putkiin à 48 µl.
4. Lisää 2 µl näytettä reaktioseokseen

HUOM! Lisää näyte pöydällä, älä UV-kierröllisessä kaapissa.

PCR ohjelma

PCR-ohjelma on asennettu kolmannen kerroksen PCR laitteeseen tiedostonimellä DreamTaq. Mikäli käytät laitetta, jossa ohjelmaa ei ole valmiina, aseta ohjelmalle ohessa olevat parametrit.

Initial denaturation 95 °C / 3 Min x1
Denaturation 95 °C / 30 sec
Annealing 57 °C / 30 sec x 30
Extension 72 °C / 1 min
Final extension 72 °C / 5 min x1
Storing temperature 4 °C

HUOM! Säilytyslämpötilan tarkoituksena on suojata näytteitä niin kauan, että näytteet analysoidaan agarosigeelielektroforeesilla tai kunnes ne siirretään pakastimeen odottamaan jatkokäsittelyä. Mikäli agarosigeelielektroforeesia ei ehditä tehdä heti, mutta näytteet aiotaan jatkokäsitellä saman vuorokauden aikana, näytteitä voi säilyttää jääkaapissa. Mikäli näytteitä ei ehditä analysoidaan saman päivän aikana, säilytetään näytteet pakastimessa (-20– -25 °C).

Agarosigeelielektroforeesi

Agarosigeeli

2,6 g Agar
130 ml 1xTAE

1. Keitä mikroaaltouunissa, kunnes kiehahtaa.
2. Jäähdytä noin +65 °C.
3. Lisää 1 tippa Eidiumbromidia (0,625 mg/ml).
4. Kaada teipattuun geelikelkkaan, jossa on näytekanavakammat alussa ja puolessa välissä.
5. Anna jähmettyä noin 20 minuuttia.
6. Siirrä geeli elektroforeesikammioon, jossa on 1xTAE –liuosta niin, että se peittää geelin kokonaan.

Näytteiden lataus agarosigeelille

1. Pipetoi 5 µl näytettä parafilmin päälle.
2. Lisää 1 µl 6xLD reagenssia.
3. Sekoita ja pipetoi geelille.

HUOM! Pipetoi vähintään yhteen kanavaan kontrollinäyte (Ladder Gene Ruler 1 kb 0,1 µg/ml), joka mahdollistaa tulosten tulkinnan. Ladderia pipetoidaan kanavaan 2 µl. Ladder toimii geelillä DNA:n kokostandardina.

4. Aja geeliä geelielektroforeesi laitteessa 100V/ 45 minuuttia.
5. Kuvanna geeli UV-valoa apuna käyttäen.