



Osaamista
ja oivallusta
tulevaisuuden
tekemiseen

Sanna Ervasti

Narkolepsian ja ihmisen mikrobiomin mahdollisen yhteyden selvittäminen NGS-sekvensointikirjaston avulla

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalyttikko (AMK)

Laboratorioanalytiikka

Opinnäytetyö

9.9.2019

Tekijä Otsikko Sivumäärä Aika	Sanna Ervasti Narkolepsian ja ihmisen mikrobiomin mahdollisen yhteyden selvittäminen NGS sekvensointikirjaston avulla 30 sivua + 5 liitettä 9.9.2019
Tutkinto	Laboratorioanalyttikko (AMK)
Tutkinto-ohjelma	Laboratorioanalytiikka
Ammatillinen pääaine	
Ohjaajat	Tutkimusjohtaja Petri Auvinen Laboratorioinsinööri Lars Paulin Tutkija Pedro Pereira Lehtori Tiina Soininen
<p>Opinnäytetyö tehtiin Helsingin yliopiston Biotekniikan instituutissa. Opinnäytetyö suoritettiin helsinkiläisen ja ranskalaisen tutkimusryhmän yhteistyöprojektina, jossa selvitettiin uloste-näytteitä tutkimalla mahdollista yhteyttä narkolepsian ja ihmisen mikrobiomin välillä. Tutkimuksessa oli mukana näytteitä narkolepsiaa sairastavilta henkilöiltä, näytteitä henkilöiltä, joilla oli todettu muunlaista hypersomniaa, ja näytteitä terveiltä henkilöiltä.</p> <p>Biotekniikan instituutissa on aiemmin suoritettu Parkinsonin tautiin liittyvää tutkimusta, jossa on selvitetty Parkinsonin taudin ja ihmisen suoliston mikrobiomin välistä korrelaatiota. Tämän perusteella on todistettu, että ihmisen suoliston mikrobiomista löytyy eroavaisuuksia terveiden ja Parkinsonin tautia sairastavien henkilöiden välillä.</p> <p>Projekti aloitettiin näytteiden lajittelulla ja merkitsemisellä, jonka jälkeen suoritettiin DNA:n eristäminen kaupallisen kitin protokollan mukaan. Eristetyille DNA-näytteille tehtiin kaksivaiheinen PCR, jossa ensimmäisessä vaiheessa rajattiin spesifisillä alukkeilla monistettava osa 16S-geenistä. Toisessa vaiheessa universaalit kaksoisindeksialukkeet tunnistivat ensimmäisen PCR:n sekvensointiadapterit, jolloin muodostui pidempi fragmentti ensimmäisen vaiheen PCR-tuotteesta. Kaksoisindeksialukkeiden avulla näytteet pystyttiin identifioimaan sekvensoinnin jälkeen. 16S NGS-sekvensointikirjasto varten PCR-tuotteet yhdistettiin yhdeksi näytepooliksi. Näytepooli puhdistettiin, minkä jälkeen määritettiin DNA-fragmenttien pituus.</p> <p>Lopuksi näytteistä valmistettiin 16S NGS-sekvensointikirjasto ja näytteiden sisältämät bakteerit pystyttiin tunnistamaan. Sekvensointi suoritettiin Illumina-sekvensointimenetelmällä, jossa halutusta geenialueesta saatiin monistettua tuhansia sekvenssejä myöhempää bioinformatiivista analysointia varten, jossa sekvenssejä verrataan tunnettuun genomiin. Tämän perusteella voidaan tutkia, löytyykö narkolepsiaa sairastavien ja terveiden henkilöiden suoliston mikrobiomien väliltä eroavaisuuksia.</p>	
Avainsanat	DNA-eristys, kaksivaiheinen PCR, NGS-sekvensointikirjasto

Author Title	Sanna Ervasti Exploring the Possible Association between Narcolepsy and the Human Microbiome with the NGS Sequencing Library
Number of Pages Date	30 pages + 5 appendices 9 September 2019
Degree	Bachelor of Laboratory Services
Degree Programme	Laboratory Sciences
Professional Major	
Instructors	Petri Auvinen, Research Director Lars Paulin, Laboratory engineer Pedro Pereira, Researcher Tiina Soininen, Senior Lecturer
<p>The thesis study was made at the Institute of Biotechnology of the University of Helsinki. The study was executed as a collaborative project with research groups in France and Helsinki, to explore the probability of connection between narcolepsy and human microbiome by studying fecal samples. In this study narcoleptic samples, samples with hypersomnia and samples from healthy persons were used.</p> <p>There has been previous research at the Institute of Biotechnology concerning the correlation between Parkinson`s disease and gut microbiota from different bacteria species. By these studies it has been shown that there are differences in gut microbiota between healthy persons and persons that suffer from Parkinson`s disease.</p> <p>The study was started by sorting and labeling samples, followed by DNA extraction according to the commercial kit protocol. The extracted DNA-samples were subjected to two-phase PCR, where in the first phase, part of the 16s-gene were amplified with specific primers. In the second phase, universal dual index-primers adhered to first phase sequence adapters and they formed a longer PCR-fragment from the first phase PCR-product. The samples could be identified after sequencing by dual index primers. The PCR-products were combined into one sample pool for the 16s NGS-sequencing library. Sample pool was purified and the length of DNA-fragments were measured.</p> <p>Finally, the 16s NGS-sequencing library was prepared and the bacteria occurring in the samples could be identified. The sequencing method was performed as Illumina sequencing, where particular gene region can be amplified thousands of reads for later bioinformatic data analysis, where the reads are compared to known genome. Based on this information it can be explored if there are any differences between narcoleptic and healthy persons gut microbiota.</p>	
Keywords	DNA-extraction, Two-step PCR, NGS sequencing library

Sisällys

Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Narkolepsia	2
2.1	Narkolepsian ja hypersomnian oireet	2
2.2	Narkolepsiaan liittyvät aiemmat tutkimukset	3
3	Tutkittava geeni ja tutkimuksen työvaiheet	4
3.1	16S rRNA-geeni	4
3.2	Kaksivaiheinen PCR ja sekvensoitavan DNA-fragmentin rakenne	5
3.3	Sekvensointi	7
3.3.1	Sanger-sekvensointi	7
3.3.2	Uuden sukupolven sekvensointimenetelmät	9
4	Materiaalit ja menetelmät	11
4.1	Tutkimuksessa käytetyt näytteet	11
4.2	Tutkimuksessa käytetyt menetelmät	12
4.2.1	DNA:n eristys	12
4.2.2	PCR-reaktio kaksivaiheisesti	13
4.2.3	Illumina-sekvensointi	20
5	Tuloksien käsittely	21
5.1	DNA-eristyksen tulokset	21
5.2	Kaksivaiheisen PCR:n tulokset	22
5.3	Sekvensoinnin tulokset	25
6	Pohdinta	27
	Lähteet	30

Liitteet

Liite 1. Eristettyjen näytteiden DNA-konsentraatiot, näytetyypit, absorbanssit ja eristyspäivät

Liite 2: II-vaiheen PCR:ssä käytetyt kaksoisindeksialukkeet ja niiden sekvenssit

Liite 3. DNA-fragmenttien agarosigeelielektroforeesi-kuvat

Liite 4. Näytteiden sekvenssien lukumäärät pylväsdiagrammissa

Liite 5. Illumina-sekvensoinnin ajodata

Lyhenteet

AGE	Agaroosigeelielektroforeesi
BMI	Painoindeksi
CFS	Krooninen väsymysoireyhtymä
DIFP	Di-isopropyylifluorofosfaatti
DNA	Deoksiribonukleiinihappo
EDTA	Etyleenidiamiinitetra-asettaatti
PCR	Polymeraasiketjureaktio
PMSF	Fenyylimetaanisulfonyylifluoridi
RNA	Ribonukleiinihappo
Tris-HCl	Tris(hydroksimetyyli)aminometaani

1 Johdanto

Opinnäytetyö tehtiin Helsingin yliopiston Biotekniikan instituutin DNA:n sekvensointi- ja genomiikkalaboratoriossa. Työn tarkoituksena oli selvittää mahdollista yhteyttä narkolepsian ja ihmisen suolistomikrobiomin välillä tutkimalla ulostenäytteitä henkilöiltä, joilla oli joko diagnosoitu narkolepsia tai havaittu muita hypersomnian eli liikaunisuuden oireita. Tutkimuksen verrokinäytteinä käytettiin näytteitä sellaisilta henkilöiltä, joilla ei ollut diagnosoitu narkolepsiaa tai muunlaista liikaunisuutta.

Tutkittavia näytteitä oli yhteensä 113 kappaletta, jotka ranskalainen tutkimusryhmä oli lähettänyt aiemmin keväällä 2019 Biotekniikan instituutille analysoitavaksi. Ranskassa oli kerätty ulostenäytteitä narkolepsiapotilailta, hypersomniasta kärsiviltä ja terveiltä henkilöiltä, eikä tämän tyyppistä näytekokoelmaa ollut Suomessa saatavilla. Kaikki DNA-tutkimuksessa käytetyt näytteet oli jo lähtömaassa laitettu valmiiksi DNA:n tasapainotuspuskuriin, mikä paransi näytteiden säilyvyyttä.

Tutkimuksessa monistetaan 16S-geenin V3- ja V4-alueita, joista voidaan havaita eri bakteerilajit, joita näytteet sisältävät. Näytteistä löytyvien bakteerien perusteella analysoidaan, onko niissä korrelaatioita narkolepsian ja tietyn bakteerilajin välillä. 16S-geenin V3- ja V4-alueet ovat valikoituneet tähän tutkimukseen, koska niiden pituus on optimaalinen ja näiden alueiden perusteella pystytään selkeästi havaitsemaan eroavaisuuksia eri bakteerien välillä.

Narkolepsiaan ei ole pystytty kehittämään parantavaa hoitoa. Vuonna 2009 syntyneen sikainfluenssapandemian myötä monet nuoret henkilöt sairastuivat narkolepsiaan otettuaan sikainfluenssarokotteen. Tällöin nopeasti levinnyttä sairautta vastaan kehitetyn rokotteen mahdollisten haittavaikutusten testaus jäi liian suppeaksi. On tärkeää, että narkolepsiaan liittyviä tutkimuksia jatketaan, jotta ymmärrys sairaudelle altistavista geneettisistä tekijöistä ja sen syntymekanismeista kasvaisi. Samalla narkolepsian diagnosoiminen voisi helpottua ja lääkekehitystä saataisiin tehostettua.

2 Narkolepsia

2.1 Narkolepsian ja hypersomnian oireet

Narkolepsia luokitellaan autoimmuunisairauksiin, jossa elimistön puolustusjärjestelmä hyökkää kehon omia hypotalamuksen oreksiini-hormonia tuottavia hermosoluja vastaan. Oreksiinilla on keskeinen tehtävä ihmisen vireystilan ja ruokahalun säätelyssä. [1.]

Narkolepsian oireisiin kuuluu aaltomaisesti esiintyvä nukahtelutaipumus, yleinen päivä-väsymys, yöunen katkonaisuus ja katapleksia eli lihasten hervottomuus tunnereaktioiden yhteydessä [1]. Muutamalla prosentilla oireet alkavat katapleksialla [2]. Oireet ilmaantuvat yleensä 15–25-vuotiaana vaikuttaen yleensä opiskeluun ja pärjäämiseen työelämässä [3].

Hypersomniaan liittyy voimakas päiväaikainen väsymys, mutta yöuni ei ole katkonaista kuten muissa neurologisissa unihäiriöissä. Hypersomnian diagnosoimista hankaloittaa lukuisat muut mahdolliset syyt, jotka saattavat olla liikaunisuuden taustalla. [3.] Tällaisia voivat olla esimerkiksi erilaiset tulehdus- ja hengityselinten sairaudet, diabetes, kilpirauhasen vajaatoiminta, anemia, keskushermoston sairaudet tai unenaikaisia hengityskatkoksia aiheuttava obstruktiivinen uniapnea [4].

Narkolepsiaa jaetaan tyyppeihin 1 ja 2 sairaudelle ominaisen spesifisen ja sensitiivisen biomarkkerin mukaan. Vuonna 2009 syntyneen sikainfluenssapandemian ja sitä vastaan kehitetyn sikainfluenssarokotteen, influenssa A -viruksen, H1N1-tyyppi sisälsi narkolepsia tyyppin 1 tekijöitä. Rokotteen kehittelyn myötä saatiin selvitettyä hypokreettisten neuronien tuhoutumisen olevan osana narkolepsian kehittymisessä. Narkolepsian hoidossa käytetään, potilaan oireista riippuen, modafiniiliä, armodafiniiliä sekä vahvempana lääkityksenä metyyliifenidaattia tai amfetamiinia. [5.] Sairautta hoidetaan myös päiväaikaisella piristävällä lääkeyksellä modafiniilillä tai metyyliifenidaattiatilla tai yöaikaan käytettävällä natriumoksybaatilla. Katapleksiaa hoidetaan masennuslääkeryhmään kuuluvilla serotoniin ja/tai noradrenaliinin takaisinotonestäjillä ja trisyklisillä lääkeaineilla. [1.]

Suomessa narkolepsiaa sairastaa noin 500–1 000 henkilöä. Narkolepsia ei ole periytyvä sairaus, mutta taudin puhkeamisriskiin on huomattu vaikuttavan perinnöllisen puolustusjärjestelmän ominaisuus alleelissa HLA-DQB1*0602 [1].

2.2 Narkolepsiaan liittyvät aiemmat tutkimukset

Aiemmissa tutkimuksissa on eläinkokeiden avulla havaittu yhteys narkolepsian ja alhaisen hypokretiinin määrässä aivoselkäydinnesteessä sekä aivoissa. Koirilla ja hiirillä hypokretiinin ligandin ja hypokretiinin reseptorin 2 geneettisen mutaation on todettu aiheuttavan narkolepsiaa. Ihmisellä hypokretiini-geenin mutaatiolla ei ole todettu olevan, yksittäisiä tapauksia lukuun ottamatta, suoraa yhteyttä narkolepsiaan sairastumiseen. Aiemmassa tutkimuksessa on löydetty huomattavan alhaisia hypokretiini-transkriptiotekijöiden ja/tai peptidien tasoja kaikkien narkolepsiaa sairastavien henkilöiden aivoista. Hypokretiini 1 ja 2 (oreksiini A ja B) ovat neuropeptidejä, jotka toimivat prekursoreina eli preprohypokretiineinä. Hypokretiinit toimivat unen, endokriinien toiminnan, ruokahalun ja energiatasapainon säätelijöinä. [6.]

Narkolepsiaan sairastuvuus ihmisellä liittyy ylipainoon ja ei-insuliiniriippuvaiseen diabetekseen. Hypokretiinin vähäisyys voi myös liittyä näiden tekijöiden muutoksiin narkolepsiassa. Energiatasapaino edellyttää leptiinien, insuliinin, neuropeptidi Y:n (NPY) ja α -melanosyyttiä stimuloivien hormonien (α -MHS) välisiä signaalireittejä. Näistä tärkeintä leptiniä syntetisoidaan rasvakudoksessa, mikä vähentää voimakkaasti ravinnon imeytymistä. Leptiinin puutos tai leptiini-resistanssi aiheuttaa ylipainoa. Leptiinin vaikutus ravinnon imeytymiseen vaikuttaa osittain neuropeptidi Y:n inhibitioon ja α -melanosyyttiä stimuloivan hormonin aktiivisuuteen. Hypokretiini voi suoraan säädellä energiatasapainoa näiden systeemien kautta. Paastoaminen tai insuliinin annostelu aktivoi hypokretiini-neuroneita ja transkriptiota. Hypokretiinin keskeinen toiminta tehostaa ruoansulatusta, joka estyy neuropeptidi Y-vastavaikuttajien takia. Hypokretiiniä sisältävät neuronit erittävät leptiini-reseptoreita, ja leptiinien pitkäaikainen toiminta vähentää hypokretiinien signaaleja lateraalisessa hypotalamuksessa. [6.]

Tutkimuksessa havaittiin, että narkolepsiapotilaiden ruoasta saatavien kalorien imeytyminen on alentunut. Potilailla, joilla ei ollut havaittu kroonista väsymysoireyhtymää eli CFS:ää (*engl.* chronic fatigue syndrome), oli huomattavasti korkeampi painoindeksi

(BMI-arvo) kuin potilailla, joilla oli havaittavia CFS-hypokretiini-tasoja. Tähän voi olla syynä korkea BMI-arvo, joka voi alentaa energiankulutusta toissijaisesti lisääntyneen unen ja vähentyneen päiväaktiivisuuden vaikutuksesta narkolepsiassa. Narkolepsia ilman hypokretiinin puutosta voidaan yhdistää tutkimusten perusteella energia-aineenvaihdunnan ongelmiin. Kun alentunut hypokretiini-taso voidaan yhdistää unen lisäksi sympaattisen hermoston aktiivisuuteen ja neuroendokriini-systeemin toimintaan, se voi vaikuttaa aineenvaihdunnan nopeuteen näiden systeemien kautta ja johtaa ylipainoisuuteen. [6.]

Bioteknikan instituutissa Helsingin yliopistolla on tehty aiempaa tutkimusta Parkinsonin taudin ja ihmisen mikrobiomin välillä, ja tutkimuksessa on todettu Parkinsonin tautia sairastavien suoliston mikrobiomista huomattavasti matalampia *Prevotellaceae*-sukuun kuuluvan bakteerin määriä kuin terveiden henkilöiden näytteistä [7]. Näiden aiempien havaintojen pohjalta Bioteknikan instituutissa on haluttu jatkaa suoliston mikrobiomien tutkimista, jotta voitaisiin havaita, minkälaisia eroja narkolepsiaa sairastavien ja terveiden henkilöiden suolistomikrobiomissa on.

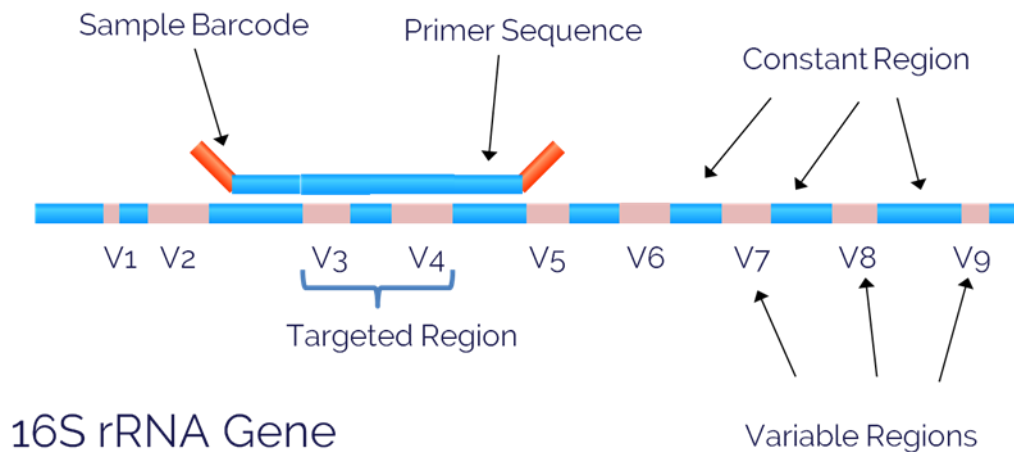
3 Tutkittava geeni ja tutkimuksen työvaiheet

3.1 16S rRNA-geeni

16S RNA on prokaryoottisen ribosomin pieni alayksikkö 30S-komponentissa. Kyseistä geenialuetta käytetään bakteerien ja arkkien luokitteluun ja tunnistamiseen [8]. 16S RNA on funktionaalisesti muuttumaton, mutta sisältää vaihtelevia alueita, joita ilmenee kaikissa organismeissa. Geenin pituuden takia sitä on helppo sekvensoida [9].

Bakteerin 16S RNA-geeni sisältää eri bakteerien lajinkehitykselle ominaisia vaihtelevia alueita, joiden intragenomisen sekvenssin heterogeenisyyttä on arvioitu aiemmin tehdyn tutkimuksen perusteella 55 bakteerigenomissa, jotka ovat edustaneet erilaisia fylogeneettisiä ryhmiä. RNA-operonien kokonaismäärä genomeissa vaihteli 2–13 operonin välillä. Erilaisten geeniparien sisältämien nukleotidien enimmäismäärä 16S rRNA-geenissä vaihteli 0–19 emäksen välillä. Vastaava minimaalinen samankaltaisuus vaihteli välillä

98,7–100 % osoittaen näiden bakteerien genomien 16S rRNA-operonien intragenomisen heterogeenisyyden rajallisuuden. Sen sijaan 16S rRNA-geenien kopioiden joukosta laskettiin 199 mutaatiota siirtymillä, jotka olivat määräävää tyyppiä 16S rRNA-geenin kokonaispituudella. Useimmat heterogeeniset alueet osuivat geenin vaihteleville alueille V1, V2 ja V6. [9.] Kuvassa 1 esitetään 16S rRNA:n rakenne ja tässä tutkimuksessa amplikoidut V3- ja V4-geenialueet.



Kuva 1. 16S rRNA-geenin rakenne [10.]

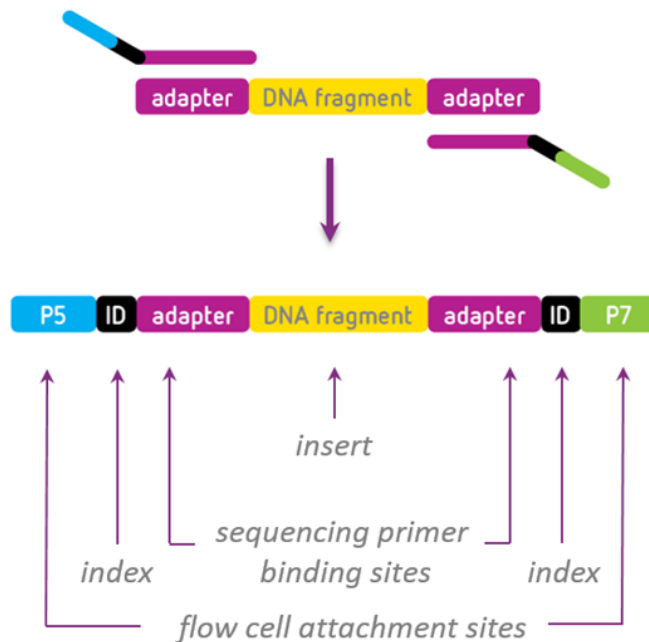
Kuvasta 1 voidaan huomata, että ribosomaalinen 16S-geenialue sisältää runsaasti erilaisia vaihtelevia alueita, joita voidaan hyödyntää tutkimuksessa esimerkiksi, kun halutaan tunnistaa DNA-alueita bakteerilajien välillä.

3.2 Kaksivaiheinen PCR ja sekvensoitavan DNA-fragmentin rakenne

Kaksivaiheisella PCR:llä (*engl.* two-step PCR) pystytään monistamaan tuotetta tarkemmin pienemmällä lähtötuotteen konsentraatiolla. Eristettyä DNA:ta käytetään lähtötuotteena, josta ensimmäisessä PCR-reaktiossa rajataan haluttu DNA-alue spesifisillä alukkeilla, jotka hybridisoituvat rajattavaan DNA-alueeseen ja monistavat tutkittavaa fragmenttia. Adapterit kiinnittyvät sekvensoitavaan fragmenttiin, jolloin muodostuu kohdeamplikonit. Spesifisissä alukkeissa on kiinnittyneinä overhang-tagit, jotka sisältävät adapterin ja muodostuu I-vaiheen PCR-tuote. [11.] Adaptereja käytetään, kun monistetaan ennalta emäsjärjestykseltään tuntematonta DNA-aluetta [12].

PCR-reaktion toisessa vaiheessa adapterin perään kiinnittyy kaksoisindeksialuke ja oligo, jotka sitoutuvat monistettavan DNA-fragmentin päihin. Universaalit kaksoisindeksialukkeet tunnistavat ensimmäisen vaiheen sekvensointiadapterit, ja muodostuu pitempi fragmentti ensimmäisen vaiheen PCR-tuotteesta. Indeksijä käytetään sekvensoitavien näytteiden identifioimiseksi. Kaksivaiheinen PCR on sekä sensitiivinen että spesifinen menetelmä. [11.] Kaksoisindeksialukkeiden käytön etuja ovat myös mahdollisuus tehokkaaseen ja tarkkaan kanavointiin sekä tarkempaan ja luotettavampaan dataan, jolloin pystytään ehkäisemään indeksien väärää tunnistusta. [13.]

Indeksit ovat pituudeltaan noin 6–10 emäksen oligoja, jotka liittyvät monistettavan fragmentin päihin. Molempien indeksien sekvenssit ovat emäsjärjestykseltään erilaiset, mikä mahdollistaa jopa satojen näytteiden samanaikaisen signaalien detektoinnin. Kaksoisindeksialukkeet sisältävät I-vaiheen PCR-tuotteen adapterin tunnistussekvenssin, indeksin ja tässä tutkimuksessa käytetyt polymeeri 5- tai polymeeri 7-oligot (kuva 2). P5- ja P7-oligot ovat kiinnittyneinä sekvensointilaitteessa olevan virtauskammion pintaan, joiden kanssa DNA-fragmentin päihin kiinnittyneet P5- ja P7-oligot hybridisoituvat. Oligot ovat laitteistokohtaisia, ja P5- sekä P7-oligoja käytetään yleisesti Illuminalla. [13.]



Kuva 2. II-vaiheen PCR-tuote (ylh.) ja sekvensointiin valmis DNA-fragmentti (alh.) [13].

Kuvassa 2 oleva alempi fragmentti esittää valmista sekvensoitavaa tuotetta, johon adapterien lisäksi ovat kiinnittyneet kaksoisindeksit sekä P5- ja P7-oligot. Indeksialuke 1 on kiinnittyneenä P7-oligoon ja indeksialuke 2 P5-oligoon.

Sekvensointivaiheessa sekvensointialuke 1 kiinnittyy koodaavan juosteen adapteriin ja DNA-polymeraasi täydentää monistettavan DNA-fragmentin emäsjärjestyksen mukaan, kunnes haluttu sekvenssin pituus on saavutettu. Sekvensoitutuote pestään pois. Kaksoisindeksialuke 1 hybridisoituu templaattiin, jonka jälkeen polymeraasi täydentää fragmenttia komplementaarisesti juosteen emäsjärjestyksen mukaan. Indeksituote pestään pois. Indeksi 2:n mukainen sekvenssin luku alkaa polymeraasin avustuksella, kun templaattijuoste yhdistyy P5-oligon kanssa. Lopulta muodostuu kaksi erillistä juostetta denaturoitunutta juostetta ja jäljelle jää käänteinen juoste. [14.]

Toinen sekvensointikierros alkaa sekvenssialuke 2:n kiinnittymisellä templaattiin, ja kierros etenee samoin kuin sekvenssialuke 1:n mukainen monistuminen. Sekvenssialuke 1:n ja 2:n johdolla tapahtuva monistuminen toistuu useita kertoja, ja lopputuloksena on miljoonia sekvenssejä tutkituista fragmenteista. [14.]

3.3 Sekvensointi

Sekvensoinnilla tarkoitetaan DNA-jakson tai koko genomin emäsjärjestyksen selvittämistä. 1970-luvulla Maxam ja Gilbert kehittivät synteesisekvensointitekniikoihin kuuluvan Sanger-sekvensointimenetelmän, joka perustuu DNA-templaatin ja dideoksinukleotidien käyttöön. Sanger-sekvensointi olikin käytetyin sekvensointimenetelmä kolmen vuosikymmenen ajan. Vuonna 2005 uuden sukupolven DNA-sekvensointivälineiden kaupallinen kehitys mahdollisti uudenlaisien DNA-sekvensointimenetelmien suunnittelun ja kannusti tutkijoita käsittelemään rohkeammin koko genomin laajuisia kokeita. [15.]

3.3.1 Sanger-sekvensointi

Sanger-sekvensointimenetelmä tunnetaan myös nimillä dideoksimenetelmä ja terminaatimenetelmä. Sekvensointi aloitetaan kiinnittämällä sekvensoitavan alueen 3'-päähän

15–25 nukleotidin pituinen synteettinen yksijuosteinen aluke, joka on komplementaarinen templaatin vastaavalle kohdalle. Templaatile syntetisoidaan alukkeesta lähtien komplementaarista vastinjuostetta nukleosiditriposfaateista (dNTP) DNA-polymeraasin avustuksella. Kullekin nukleotidille tehdään oma reaktio, jossa valmistettava DNA-juoste leimautuu nukleotidille ominaisella fluoresoivalla merkkiaineella, kun reaktiokohtaisesti käytetään vain yhtä leimattua deoksinukleotidia. [16, s.177–178.]

Sangerin dideoksimenetelmässä käytetään sekä deoksi- (dNTP) että dideoksinukleotideja (ddNTP). Dideoksinukleotideista puuttuu hydroksyyli-ryhmä 2'-aseman lisäksi 3'-asemasta. DNA-polymeraasin muodostaessa fosfodiesterisidoksen dideoksinukleotidin 5'-fosfaatin ja syntetisoitavan juosteen edellisen nukleotidin 3'-hydroksyyli-ryhmien välille se ei enää pysty lisäämään seuraavaa nukleotidia 3'-hydroksyyli-ryhmän puuttumisen takia, jolloin synteesi päättyy. On sattumanvaraista, liittyykö tiettyyn kohtaan deoksi- vai dideoksinukleotidi, koska reaktioseos sisältää runsaasti templaattia, aluketta ja dNTP:itä, mutta vain vähän ddNTP:itä. Lopputuloksena saadaan erikokoisia terminaatiotuotteita, jotka päättyvät dideoksinukleotidiin, ja tuotepopulaatio sisältää kaikki ne kyseisen nukleotidin kohdat templaattissa. [16, s. 178–179.]

Tämän jälkeen DNA-templaattit denaturoidaan ja sekvensointireaktioiden tuotteet ajetaan samanaikaisesti geelielektroforeesilla. Geelinä elektroforeesissa käytetään polyakryyliamidigeeliä, koska sen erottelukyky on parempi kuin agarosigeelin. Geelillä DNA kulkeutuu positiivista varausta kohti fosfaattiryhmien negatiivisen varauksen seurauksena. Pienemmät DNA-fragmentit kulkeutuvat kauemmas elektroforeesigeelin alaosaan. [17.]

Reaktioseosten DNA:t denaturoidaan sekvensointireaktioiden jälkeen. Sekvensointireaktioiden tuotteet ajetaan samassa kapillaarissa yhtenä näytteenä kapillaarielektroforeesilla. Kaksijuosteista DNA:ta sekvensoitaessa reaktioiden tehokkuus on heikompi kuin yksijuosteisen DNA:n sekvensoinnissa, jolloin yhdellä reaktiolla saadaan yleensä 700–800 nukleotidin pituinen sekvenssi. Kaksijuosteisen DNA:n sekvenssit ovat tyypillisesti alle 500 nukleotidin pituisia, mutta templaattia ei tarvitse kloonata M13-vektoriin. [16, s. 180.]

Sanger-sekvensointia on kehitetty leimaamalla nukleotidit spektrisesti erilaisilla fluore-soivilla väriaineilla, kapillaarielektroforeesin käytön yleistymisellä ja automatisoimalla protokollaa. Näillä toimenpiteillä on parannettu menetelmän rinnakkaisuutta, toistetta-vuutta ja läpäisykykyä. Sanger-sekvensointia käytetään edelleen geneettisten variant-tien validoinnissa ja tarkempien lukemien (readien) saavuttamisessa. Nykyään sekven-sointiteknologian kehityksen jatkuminen on painottunut enemmän uuden sukupolven sekvensointimenetelmiin kuin Sanger-sekvensointimenetelmän kehittymiseen. [15.]

3.3.2 Uuden sukupolven sekvensointimenetelmät

Nykyisin yleisimmin käytetyt sekvensointimenetelmät ovat ns. uuden sukupolven sek-vensointimenetelmiä (NGS, *engl.* next-generation sequencing), jotka ovat mahdollista-neet entistä pidempien, ehjien DNA-fragmenttien sekvensoimisen. Uuden sukupolven sekvensointimenetelmät jaetaan synteisisekvensointitekniikoihin (*engl.* sequencing by synthesis) ja ligaatiosekvensointitekniikoihin (*engl.* sequencing by ligation). Innovatiivi-sissa uusissa sekvensointimenetelmissä käytetään yksittäisiä DNA-molekyylejä ja reaa-liaikaista havaitsemista, jotka täydentävät jo olemassa olevia sekvensointialustoja. Uu-den sukupolven sekvensointialustoissa käytetään myös Sangeriin kuuluvia synteisiin osallistuvia polymeraaseja, muokattuja nukleotideja ja fluoresoivia merkkiaineita, mutta ne myös edellyttävät DNA-kloonausta ennen sekvensointia. [15.]

NGS-kirjastojen tekemisessä olennaista on sekvensointiadapterien ja -indeksien käyttö, jotka mahdollistavat näytteiden identifioinnin, haluttujen fragmenttien monistumisen ja kirjaston kiinnittymisen sekvensointilaitteiston virtauskammioon (*engl.* flow cell) [13].

Illumina-sekvensointi

Tässä tutkimuksessa käytetty Illumina-sekvensointi jaetaan neljään vaiheeseen: näyt-teen valmisteluun, klustereiden tuottamiseen, sekvensointiin ja tulosten käsittelyyn. Näytteen valmisteluvaiheessa lisätään adapteri DNA-fragmenttien päihin, minkä jälkeen sekvensoitavaan sitoutumiskohtaan tulee vielä indeksialuke ja oligo-häntä. P5- ja P7-oligot sitoutuvat komplementaarisesti virtauskammion P5- ja P7-oligomeereihin. [14.]

Klustereiden tuottamisessa fragmenttimolekyyli monistuu isoterminaalisesti virtauskammiossa. Virtauskammiona toimii lasilevy, jossa on uria. Jokaisessa urassa on oligoja, joiden avulla hybridisaatio mahdollistuu ja virtauskammion pinnassa olevalle oligomeerille komplementaarinen DNA-fragmentin adapteri pääsee kiinnittymään. Polymeraasi kiinnittää komplementin hybridisoituneelle fragmentille. Kaksijuosteinen molekyyli denaturoituu ja alkuperäinen templaatti pestään pois. Monistettu juoste on samanlainen kuin alkuperäinen, ja se monistuu uudelleen yhdistymällä P7-oligon kanssa. [14.]

Polymeraasi valmistaa komplementaarisen juosteen, jolloin muodostuu kaksijuosteinen silta. Silta denaturoituu, ja seurauksena on kaksi yksijuosteista molekyylikopiota, jotka molemmat ovat hybridisoituneet virtauskammion pintaan erityyppisen oligon kanssa. Tämän jälkeen prosessi toistuu useita kertoja samanaikaisesti ja muodostuu miljoonia klustereita, jolloin kaikki fragmentit monistuvat klonaalisesti. Käänteiset juosteet pestään pois, ja jäljelle jää koodaavat juosteet kiinnittyneinä virtauskammion P7-oligoon. Templaatin polymeerasihäntien 3'-pää estävät ei-toivotun monistumisen. [14.]

Sekvensointi alkaa ensimmäisen sekvensointialukkeen pidentymisellä. Jokaisella kieroksella fluoresoidut nukleotidit kiinnittyvät kasvavaan juosteeseen yksi kerrallaan templaatin sekvenssin mukaan. Jokaisen nukleotidin kiinnittymisen jälkeen klusteri virittyy valon vaikutuksesta ja nukleotidin värikoodin mukainen fluoresenssisignaali emittoituu. Tätä menetelmää kutsutaan synteetisisekvensoimiseksi. Sykliin määrä vaikuttaa luettavien juosteiden pituuteen. Emissioaallonpituus signaalin intensiteetin kanssa määrittää emästen värin. Kaikki keskenään identtiset juosteet luetaan samanaikaisesti. [14.]

Kun ensimmäinen lukusykli on ohi, luettu tuote pestään pois. Tämän jälkeen kaksoisindeksialuke 1 hybridisoituu templaattiin ja templaatin sekvenssin mukainen juosteen pidentyminen jatkuu. Kun indeksin mukainen sekvenssin luku päättyy, indeksituote pestään pois. Templaatin polymeerasihäntien ei-toivotun monistumisen estävät 3'-pää aktivoituvat ja templaattijuoste muodostaa kaaren ja hybridisoituu virtauskammion pinnassa kiinni olevan P5-oligon kanssa. Tällöin kaksoisindeksi 2:n mukainen templaatin emäspariutuminen jatkuu polymeerasin avustuksella, jolloin muodostuu kaksi vierekkäistä juostetta. [14.]

Tämän jälkeen kaksijuosteinen silta aukeaa ja muodostuu kaksi erillistä juostetta. Temp-laatin polymeraasihäntien 5'-pääät estyvät, jolloin alkuperäinen juoste lohkeaa pois. Jäl-jelle jää käänteinen juoste, joka on kiinnittyneenä virtauskammion pinnassa olevaan P5-oligoon. Luku 2 alkaa, kun sekvensointialuke 2 kiinnittyy templaattiin ja toinen sekven-sointikierros etenee samalla tavalla kuin ensimmäinenkin P7-oligoon kiinnittyneen sek-venssialuke 2:n mukaan, kunnes haluttu juosteen pituus saavutetaan ja lopputuote pes-tään pois. [14.]

Lopulta saadaan miljoonia sekvenssejä, jotka esittävät kaikkia fragmentteja. Sekvenssi-kirjasto luodaan ja näytteen erotellaan valmisteluvaiheessa käytettyjen indeksien mu-kaan. Jokainen näyte ryhmitellään sekvenssissä olevien emästen värien mukaan. Koo-daava ja käänteinen juoste muodostetaan pariaksi, joiden sekvenssejä verrataan tunnet-tuun genomiin tunnistuksen todentamiseksi. [14.]

Latausmäärä vaikuttaa virtauskammioon kiinnittyneiden klustereiden määrään, ja käy-tettävä latausmäärä päätetään amplikonien emäsparien pituuden mukaan. Mitä pidempi tuote, sitä herkemmin se tarttuu klustereihin ja antaa sekvensointisignaalin. Liian suuri lataustilavuus amplikonien pituuksiin nähden vaikeuttaa sekvensointituloksien analy-sointia bioinformatiivisesti. [18.]

4 Materiaalit ja menetelmät

4.1 Tutkimuksessa käytetyt näytteet

Tutkittavia suolistomikrobinäytteitä oli yhteensä 113 kappaletta. Näytteet jaettiin kolmeen kategoriaan potilaan oireiden perusteella:

1. narkolepsian tyyppi 1.
2. muunlainen liikaunisuus (hypersomnia).
3. kontrollinäyte, ei sairautta.

4.2 Tutkimuksessa käytetyt menetelmät

4.2.1 DNA:n eristys

DNA:n eristykseen käytettiin kaupallista PSP[®] Spin Stool Plus -kittiä (Stratec molecular GmbH, tuotenro 1038110300, lot JB180023). Näytteet oli valmiiksi säilötty Ranskassa DNA:n tasapainotusliuokseen, joten näytteitä ei tarvinnut lyysata ennen varsinaista eristystä. Näytteitä säilytettiin -80 asteessa. Aluksi kolmella ensimmäisellä eristyskerralla näytteet sulatettiin kaksivaiheisesti siirtämällä ne ensin -80-asteisesta pakastimesta kylmähuoneeseen +4 asteeseen joko edeltävänä päivänä tai eristyspäivän aamuna. Varsinaisena eristyspäivänä ne otettiin kylmähuoneesta huoneenlämpöön pariaksi tunniksi ennen työskentelyn aloittamista. Myöhemmin näytteet sulatettiin suoraan -80 asteesta, koska huomattiin, että tulosten kannalta ei ollut merkityksellistä, otettiinkö näytteet sulamaan huoneenlämpöön -80 asteesta vai +4 asteesta.

Ensimmäisessä eristyksessä DNA:n tasapainotusliuoksessa oli havaittavissa vaaleita sakkaumia, joiden ilmaantumisen syystä ei ollut tietoa. Jälkeenpäin huomattiin, että sakkaumien häviäminen korreloi lämpötilan nousun kanssa ja tämän takia päätettiin aina jatkossa nostaa näytteet sulamaan huoneenlämpöön paria tuntia ennen työskentelyn aloittamista.

Negatiivisena kontrollina käytettiin eristyskittiin kuulunutta DNA-tasapainotusliuosta. Näytteitä ja nollanäytettä pipetoitiin 1,4 ml 2 ml:n Safe Lock -putkiin. Protokollasta poiketen näytteitä ei sentrifugoitu, vaan ne laitettiin suoraan inkuboitumaan Thermomixeriin 95 asteeseen. Zirconia beads II -helmien lisäämisen ja 2 minuutin vorteksoimisen jälkeen näytteitä sentrifugoitiin kitin protokollasta poiketen kierrosnopeudella 13 000 rpm 1 minuutin ajan.

Näytteissä olevat PCR-inhibiittorit poistettiin siirtämällä supernatantit InviAdsorb-putkiin. Supernatantit (800 µl/näyte) siirrettiin uusiin 1,5 ml:n mikrosentrifugi-putkiin. Proteinaasi K:ta pipetoitiin 25 µl protokollasta poiketen, 2 ml:n receiver-putkiin, joihin jokaiseen tämän jälkeen lisättiin 800 µl supernatanttia.

Näytteitä inkuboitiin huoneenlämmössä eluutiopuskurin lisäämisen jälkeen, protokol-
lasta poiketen, 5 minuuttia jotta varmistuttiin, että eluutiopuskuri ehtii sitoutua kunnolla
DNA:han. Sentrifugoinnin jälkeen pipetoitiin eristetyt DNA-näytteet 0,5 ml:n mikroputkiin
(Sarstedt Ag &Co. KG, tuotenro 72.730.105). DNA:n konsentraation mittaamiseen käy-
tettiin Nanodrop-laitetta. Eristetyt DNA-näytteet laitettiin säilytykseen -20-asteiseen pa-
kastimeen.

4.2.2 PCR-reaktio kaksivaiheisesti

Tässä tutkimuksessa polymeraasiketjureaktio suoritettiin eristetyille DNA-näytteille kak-
sivaiheisesti ja PCR-reaktioiden välissä näytteille tehtiin ExoSAP-puhdistus. Tässä tut-
kimuksessa käytetyssä menetelmässä DNA-fragmentti monistetaan ulospäin, jolloin
saadaan muodostettua pidempi fragmentti PCR-reaktioiden jälkeen.

Näytteet valittiin satunnaisesti eri eristyspäiviltä. Ensimmäisellä eristyskerralla valittiin
myös näytteitä, joiden konsentraatiot vaihtelivat mahdollisimman paljon. Sekä PCR- että
ExoSAP-puhdistusreaktiossa käytettiin Veritin 96 well Thermal Cyclor-PCR -laitetta (Ap-
plied Biosystems).

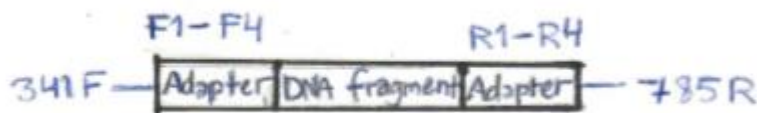
Ensimmäinen PCR-reaktio

Tutkimuksessa käytettiin spesifisiä 20 nukleotidin pituisia, 341F-suoria ja 785R-käänte-
isiä alukkeita (taulukko 1). DNA-polymeraasi monisti spesifisten alukkeiden mukaan 470
emäksen pituisen DNA-jakson tietystä kohdasta 16S rRNA-geeniä. Molemmat alukkeet
sisälsivät 30 nukleotidin pituisen jatkeen, adapterin, joka monistui toisessa PCR-reak-
tiossa tuotteen sisälle. Adaptereista oli valmistettu kaksi neljää erilaista adapteria sisäl-
tävää liuosta, jotka sisälsivät joko 341F- tai 785R-alukkeen.

Taulukko 1. Spesifisten alukkeiden ja adapterien sekvenssit.

341F-aluke		Adapteri	
3'-CCTACGGGNGGCWGCAG- 5'	F1		TCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT
3'-CCTACGGGNGGCWGCAG- 5'	F2		TCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTgt
3'-CCTACGGGNGGCWGCAG- 5'	F3		CTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTagag
3'-CCTACGGGNGGCWGCAG- 5'	F4		TCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTtagtgt
785R-aluke		Adapteri	
5'GACTACHVGGGTATCTAATCC 3'	R1		TGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT
5'GACTACHVGGGTATCTAATCC 3'	R2		GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTa
5'GACTACHVGGGTATCTAATCC 3'	R3		GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTtct,
5'GACTACHVGGGTATCTAATCC 3'	R4		TGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTctgagtg

Adaptoreina on tässä tutkimuksessa käytetty suorissa DNA-juosteissa adapterien F1–F4 seosta spesifisellä 341F-alukkeella ja käänteisissä DNA-juosteissa adapterien R1–R4 seosta spesifisellä 785R-alukkeella. Kuvassa 3 esitetään I-vaiheen PCR-tuote, johon spesifisten alukkeiden perään on kiinnittynyt adapterit.



Kuva 3. Adapterien kiinnittyminen spesifisiin alukkeisiin I-vaiheen PCR-reaktiossa.

Mastermixissä käytettiin 5-kertaista HF-puskuria (Thermo Scientific, tuotenro F-518, lot 00738556) ja DNA-polymeraasientsyymiä (Thermo Scientific, tuotenro F-549L, lot 00738556). Mastermix valmistettiin ja pipetoitiin puhdashuoneessa. Myös alukkeiden pipetoiminen suoritettiin puhdashuoneessa kontaminaatioiden välttämiseksi. Ensimmäisessä PCR-reaktiossa käytetyt reagenssit ja niiden määrät esitetään taulukossa 2.

Taulukko 2. Ensimmäisen PCR-reaktion reagenssit.

1nen PCR-reaktio x2	1 x	Pitoisuus
5x HF-puskuri	5 µl	1x
10 mM dNTP:t	0,5 µl	200 µM
10 µM Illum_341F_1-4 -mix	0,5 µl	0,2 µM
10 µM Illum_785R_1-4 -mix	0,5 µl	0,2 µM
2 U/µL Phusion HS II polymeraasi	0,25 µl	0,5 U
100 % DMSO	0,625 µl	2,50 %
MQ-vesi	16,625 µl	
0,7-760,7 ng/µl templaatti DNA	1 µl	
	25 µl	

Taulukossa 3 esitetään ensimmäisessä PCR-reaktiossa käytetty ajo-ohjelma.

Taulukko 3. Ensimmäisen PCR-reaktion ajo-ohjelma.

1seen PCR-reaktioon käytetty ohjelma		
1.	98 °C	30 s
2.	98 °C	10 s
3.	55 °C	30 s
4.	72 °C	10 s
5.	vaihe 2. 11 kierrosta	
6.	72 °C	5 min
7.	4 °C	∞

Ensimmäisen PCR-reaktion ajon kolmannessa kohdassa käytetyllä 55 asteen lämpötilalla saatiin alukkeet sitoutumaan spesifisesti haluttuun kohtaan DNA-juosteessa. Ajo-ohjelmassa toistettiin 12 sykliä.

PCR-fragmenttien puhdistus ExoSAP-reaktiolla

Entsyyllisessä puhdistusreaktiossa käytettiin eksonukelaasia (ExoI; Thermo Scientific, tuotenro EN0582, lot 00716871) ja alkalista fosfataasi-entsyymiä (FastAP; Thermo Scientific, tuotenro EF0651, lot 00671185). Eksonukleasilla PCR-tuotteet puhdistettiin ylimääräisistä fragmenteista ja fosfataasilla hydrolysoitiin nukleotidit. Taulukossa 4 esitetään ExoSAP-reaktiossa käytetyt reagenssit ja niiden määrät.

Taulukko 4. ExoSAP-puhdistusajon reagenssit.

ExoSAP puhdistus-reaktio 25 µl:n		
näytteelle	1 x	Pitoisuus
20 U/µl Eksonukleaasi I	0,025 µl	0,5 U
1 U/µl Alkaalinen fisfataasi SAP	0,25 µl	0,25 U
MQ-vesi	9,725 µl	
	10 µl	

Taulukossa 5 esitetään ExoSAP-puhdistusreaktiossa käytetty ajo-ohjelma.

Taulukko 5. ExoSAP-reaktion ajo-ohjelma.

Inkubointi-ohjelma		
1.	37 °C	30 min
2.	95 °C	5 min
3.	4 °C	∞ (30-60 min)

ExoSAP-puhdistusreaktiota käytetään yleisesti kaksivaiheisessa PCR:ssä fragmenttien puhdistukseen PCR-reaktioiden välillä.

Toinen PCR-reaktio

PCR-reaktion toisessa vaiheessa käytettiin numeroituja, 8 nukleotidin pituisia kaksoisindeksialukkeita (*engl.* dual index-primer), joiden avulla näytteet pysyttiin myöhemmin identifioimaan sekvensointidataa analysoitaessa. Kaksoisindeksialukkeiden perään kiinnittyi 30 nukleotidin pituiset oligomeerit. Taulukossa 6 esitetään 10 ensimmäisen näytteen kaksoisindeksialukkeet ja niiden emäsjärjestys. Liitteeseen 2 on koottu kaikkien tutkimuksessa käytettyjen kaksoisindeksialukkeiden näytekohtaiset sekvenssit.

Taulukko 6. Näytteille käytettyjä kaksoisindeksialukkeiden sekvenssejä.

Näyte	P7-indeksi		P5-indeksi	
	Indeksi 1	Sekvenssi	Indeksi 2	Sekvenssi
SLEEP_D0001	Ind_8bp_107	GTTAGGAA	Ind_8bp_112	GCATGGCT
SLEEP_D0002	Ind_8bp_028	TATGGTGT	Ind_8bp_115	TAGCGAAG
SLEEP_D0003	Ind_8bp_059	AGGAATGG	Ind_8bp_121	AGACTCAA
SLEEP_D0004	Ind_8bp_002	TATCCAGT	Ind_8bp_122	CGGTCGTA
SLEEP_D0005	Ind_8bp_003	GAGATAAC	Ind_8bp_115	TAGCGAAG
SLEEP_D0006	Ind_8bp_003	GAGATAAC	Ind_8bp_133	TTTGCTGG
SLEEP_D0007	Ind_8bp_021	GCATCACG	Ind_8bp_122	CGGTCGTA
SLEEP_D0008	Ind_8bp_004	ACACAGGC	Ind_8bp_122	CGGTCGTA
SLEEP_D0009	Ind_8bp_021	GCATCACG	Ind_8bp_115	TAGCGAAG
SLEEP_D0010	Ind_8bp_004	ACACAGGC	Ind_8bp_133	TTTGCTGG

Taulukossa 7 esitetään toisessa PCR-reaktiossa käytetyt reagenssit ja niiden lopulliset pitoisuudet mastermixissä. Mastermixin valmistus sekä pipetoiminen ja kaksoisindeksialukkeiden pipetoiminen suoritettiin puhdashuoneessa.

Taulukko 7. Toisen PCR-reaktion reagenssit.

2nen PCR reaktio x 1	1 x	Pitoisuus
5x HF-puskuri	10 µl	1x
10 mM dNTP:t	1 µl	200 µM
2 U/µL Phusion HS II polymeraasi	0,5 µl	1 U
100 % DMSO	1,25 µl	2,50 %
MQ	33,25 µl	
2,5 µM dualIndex-alukkeet	3 µl	0,15 µM
Templaatti DNA	1 µl	
	50 µl	

Toisen PCR-reaktion ajon kolmannessa kohdassa käytettiin 65 asteen lämpötilaa, jotta alukkeet saatiin sitoutumaan lopputuotteeseen (taulukko 8). Toisessa PCR-ajossa toistettiin 18 sykliä.

Taulukko 8. Toisen PCR-reaktion ajo-ohjelma.

2seen PCR-reaktioon käytetty ohjelma		
1.	98 °C	30 s
2.	98 °C	10 s
3.	65 °C	30 s
4.	72 °C	10 s
5.	vaihe 2. 17 kierrosta	
6.	72 °C	5 min
7.	4 °C	∞

PCR-reaktioiden jälkeen AGE:lla tarkistettiin PCR-fragmenttien koot vertaamalla PCR-tuotteiden bändejä standardiin. Ajoon käytettiin 1,5 %:n agarosoosigeeliä (Bioline, tuotenro BIO-41025, lot ES520-B043670), johon lisättiin muutama tippa etydiumbromidia (ICN Biomedicals Inc., tuotenro 806812, lot 1946E). Näytteitä pipetoitiin 10 µl ja DNA-väriainetta 2 µl (Thermo Scientific, 6x DNA loading dye, tuotenro R0611 ja lot 00266900) 96-kuoppalevylle. Kuoppalevyltä näytteet pipetoitiin geelille. Standardina käytettiin 1 kb:n Generuler-DNA-ladderia (Thermo Scientific, tuotenro SM0311, lot 00264162), jota pipetoitiin 3,5 µl/kaivo, ja sen konsentraatio oli 0,5 µg/µl. Geeliä ajettiin 50 minuuttia 100 V:n jännitteellä.

DNA-fragmenttien pituuden määrittäminen

DNA-fragmenttien pituuksien määrittämistä varten PCR-tuotteet yhdistettiin yhdeksi kirjastopooliksi. Pooliin pipetoitiin jokaista näytettä 6 µl ja negatiivisia kontroleja 10 µl. Kontroleja pipetoitiin enemmän, koska niiden DNA-konsentraatio oli pääsääntöisesti matalampi (0,2 ng/µl–1,7 ng/µl) kuin varsinaisten näytteiden konsentraatio (0,7 ng/µl–760,7 ng/µl).

Näytteitä D0029 ja D0089 pipetoitiin pooliin enemmän kuin muita näytteitä, koska niiden DNA-konsentraatiot olivat hyvin matalia. Heikoimmin geelissä erottunutta näytettä D0029, jonka DNA-konsentraatio oli vain 0,7 ng/µl, pipetoitiin pooliin 20 µl. Näytettä D0089, jonka konsentraatio oli 1 ng/µl, pipetoitiin 12 µl.

Kaksivaiheisen PCR:n jälkeen näytteet yhdistettiin kirjastopooliksi pipetoimalla kaikki PCR-näytteet ja DNA-eristuksen kontrollinäytteet 1,5 ml:n low-bind-mikrosentrifugiputkeen. Kirjastopoolin DNA-konsentraatio mitattiin Qubit-fluorometrillä. Konsentraation mittaaminen suoritettiin QubitTM dsDNA HS Assay -kitin (Invitrogen Thermo Fisher Scientific, tuotenro Q32864, lot 1987198) protokollan ohjeen mukaan. Poolin DNA-konsentraatio mitattiin Qubit 3 -fluorometrillä (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific).

Magneettipuhdistus

Näytepoolin PCR-fragmentit sidottiin magneettipartikkelien pinnalle, jolloin ylimääräiset nukleotidit, alukkeet, aluke-dimeerit ja muut kontaminantit eroutuivat eluointiliuoksesta. Magneettipuhdistus suoritettiin Magtivio MagSi-NGS^{PREP} Plus-protokollan version 4.1 mukaan (Magtivio, MagSi-NGS^{PREP} Plus, tuotenro MDKT0001, Versio 1.0 | 07/08/2018). Puhdistettavaksi otettiin 100 µl näytepoolia, johon pipetoitiin 0,9-kertainen määrä magneettipartikkeleja. Protokollan ohjeesta poiketen magneettipartikkelien pipetoimisen jälkeen näytteen annettiin inkuboitua 8 minuuttia protokollassa ilmoitetun 5 minuutin sijaan, jotta varmistuttiin partikkelien sitoutumisesta DNA:han.

Seuraavaksi pooli asetettiin magneettierottajaan 2 minuutiksi, jotta fragmentit tarttuivat magneettiin. Protokollan ohjeesta poiketen pesuun käytettävää 70-prosenttista etanolia pipetoitiin 300 µl ohjeessa ilmoitetun 180 µl:n sijaan, jotta varmistuttiin magneettisakan sekoittumisesta etanoliin. Poolin eluointiin käytettiin protokollassa ilmoitetun 40 µl:n sijaan 30 µl:aa eluutiopuskuria. Magneettipuhdistetun poolin DNA-konsentraatio mitattiin Qubit 3 -fluorometrillä.

Näytepoolin puhtaus ja siinä olevien amplikonien pituudet määritettiin Fragment Analyzerilla käyttämällä DNF-474 High Sensitivity NGS fragment Analysis -kittiä (Agilent HS NGS Fragment kit, 1–6000 bp). Kitti soveltuu käytettäväksi 1–6 000 emäsparin pituisille fragmenteille. Protokollasta poiketen 96-kuoppalevyllä pipetoitu 0,25-kertaisen TE-huuhTELUPUSKURIN (Advanced Analytical) määrä oli 200 µl/kaivo, eikä protokollassa ilmoitettu 100 µl/kaivo. 96-kuoppalevyllä pipetoitiin 22 µl standardia (Advanced Analytical, High Sensitivity Diluent NGS Fragment Diluent Marker, 1 bp–6000 bp, tuotenro DNF-373–0003 ja lot 08AIYR19-373-0003) ja 2 µl näytettä tai ladderia. Inlet-puskurin kantaliuokseksi käytettiin kaupallista 5-kertaista 930 dsDNA Inlet -puskuria (Advanced Analytical,

lot 09AEYR07-355-0125). Näytteestä tehtiin 1 ng/μl:ssa -laimennos Fragment Analyzer-ajoa varten. Fragment Analyzerin toiminta perustuu kapillaarielektroforeesiin, ja se on hyvin sensitiivinen laite, jolla amplikonien pituus saadaan määritettyä 3 nukleotidin tarkkuudella [11].

4.2.3 Illumina-sekvensointi

Magneettipuhdistetusta kirjastopoolista tehtiin sekvensointikirjastot Illuminan reagenssi-kitillä käyttämällä MiSeq-sekvensointilaitteistoa. Pooli denaturoitiin ennen sekvensointia. Sekvensoinnissa käytettiin MiSeq-laitteelle tarkoitettua reagenssi-kittä (Illumina Inc., MiSeq Reagent Kit v3 1/2 600 cycles PE, tuotenro 15043895, lot 20291966, RTG RGT21371293) ja ajokittiä (Illumina Inc., MiSeq v2/v3 Reagent Kit, tuotenro 15043894 ja lot 20308515). Kittiin sisältynyt ajokasetti sisälsi komplementaariset sekvensointi-, indeksi 1- ja indeksi 2 -alukkeet valmiille sekvensointituotteelle.

Sekvensointia varten magneettipuhdistettu pooli laimennettiin 1:10 Illuminakitin protokollan mukaan 2 nM DNA-konsentraatiolle (2018 Illumina inc., NextSeq System, Denature and Dilute Libraries Guide, document # 15048776 v09), jossa pipetoitiin 2 μl kirjastopoolia ja 18 μl ultrapuhdasta vettä. Poolilaimennoksen DNA-konsentraatio mitattiin Qubit 3 -fluorometrillä ja konsentraatioksi saatiin 5,46 ng/μl. Konsentraation perusteella kirjastolaskurilla saatiin templaatti-konsentraatioksi 13,8 nM. Laimennettua kirjastonäytettä otettiin sekvensoitavaksi 10 μl, ja siihen pipetoitiin 10 μl 0,2 N NaOH-liuosta. Kirjastopoolia sentrifugoitiin 280 rpm:n kierrosnopeudella 1 minuutin ajan, minkä jälkeen sitä inkuboitiin huoneenlämmössä 5 minuuttia. Näyte-natriumhydroksidiliuokseen lisättiin 10 μl 200 mM Tris-HCl-puskuria. Poolia sentrifugoitiin uudelleen 280 rpm:n kierrosnopeudella 1 minuutti.

Kirjastopoolin lopulliseksi konsentraatioksi haluttu protokollan mukainen 20 pikomoolinen (pM) pooli valmistettiin pipetoimalla 30 μl:aan denaturoitua kirjastopoolia, 970 μl HT1-puskuria, jonka jälkeen sitä sentrifugoitiin 280 rpm:n kierrosnopeudella 1 minuutti. Pooliin yhdistettiin myös toisen työntekijän eristämä bakteeriperäinen genominen näyte ja kontrollinäyte PhiX, johon Biotekniikan instituutissa oli lisätty indeksit ajon laadun tarkkailun spesifisyyden lisäämiseksi sekvensoitavasta geneettisestä materiaalista riippumatta.

MiSeq-ajon latauskonsentraatioksi valittiin 9,5 pM. Narkolepsia-näytteen kirjastopoolin prosentuaalinen osuus 600 µl:n kokonaistilavuudesta oli 89 %, genomisen kirjastopoolin 10 % ja kontrollin 1 %. Tällöin narkolepsia kirjastopoolia pipetoitiin 235,5 µl, genomista poolia 28,5 µl ja kontrollinäytettä 3 µl. Lopuksi pooliin pipetoitiin 315 µl HT1-puskuria, koska MiSeq-ajoon menevän näytteen kokonaistilavuuden tuli olla 600 µl.

5 Tuloksien käsittely

5.1 DNA-eristyksen tulokset

Eristetyistä 113 näytteestä matalin Nanodropilla mitattu DNA-konsentraatio oli 0,7 ng/µl näytteestä D0029 ja korkein 760,7 ng/µl näytteestä D0050. Näytteen D0029 matalan DNA-konsentraation syynä oli näytteen vähäinen määrä alkuperäisessä näyteputkestaan. Kolmea näytettä jouduttiin laimentamaan DNA-tasapainotusliuoksella (D0004, D0014 ja D0115), koska osa näytteitä oli hankala pipetoida sellaisenaan alkuperäisestä näyteputkestaan.

Taulukossa 9 esitetään otanta eristettyjen näytteiden DNA-konsentraatioista ja absorbanseista. Näytetyyppi sarakkeessa olevat numerot 1–3 kuvaavat diagnoosia, niin että numero 1 kuvaa tyypin 1 narkolepsiaa, 2 kuvaa muunlaista hypersomniaa ja 3 kuvaa terveen henkilön näytettä. Taulukkoon 9 on merkitty korostevärillä näyte, jonka DNA-konsentraatio oli tutkittavista näytteistä matalin.

Taulukko 9. Nanodropilla mitatut DNA-konsentraatiot ja absorbanssit valituista näytteistä päiväkohtaisesti näytetyypeittäin.

Näyte	Näytetyyppi	c (ng/μl)	A (260/280)	A (260/230)	Pvm
SLEEP-D0062	1	3,4	1,96	0,12	5.4.2019
SLEEP-D0113	2	107,3	1,93	1,32	8.4.2019
SLEEP-D0087	3	57,2	2,03	0,93	9.4.2019
SLEEP-D0094	1	73,1	2,01	0,42	11.4.2019
SLEEP-D0095	2	12	1,86	0,15	12.4.2019
SLEEP-D0150	3	114,5	1,96	1,04	15.4.2019
SLEEP-D0069	1	28,3	1,91	0,77	16.4.2019
SLEEP-D0050	2	760,7	1,98	1,45	17.4.2019
SLEEP-D0011	2	163,4	2,02	1,22	18.4.2019
SLEEP-D0029	3	0,7	3,98	0,01	23.4.2019
SLEEP-D0134	3	298,1	1,95	0,95	24.4.2019
SLEEP-D0110	1	54,5	1,96	1,12	25.4.2019
SLEEP-D0080	1	562,3	1,96	1,66	26.4.2019
SLEEP-D0070	2	147,5	1,97	1,42	29.4.2019
SLEEP-D0014	3	420,8	1,99	1,59	3.5.2019

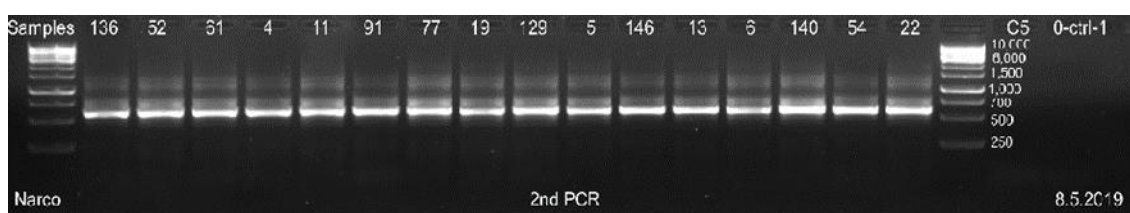
Taulukosta 9 voidaan huomata, että eristettyjen näytteiden DNA-konsentraatiot vaihtelivat huomattavasti, mutta konsentraation suuruudella ei välttämättä ollut vaikutusta DNA:n puhtauteen. On myös huomioitava, että ulostenäytteet itsessään sisältävät runsaasti inhibiittoreita, jotka voivat vaikuttaa eristetyn DNA:n puhtauteen. Liitteessä 1 esitetään kaikkien eristettyjen näytteiden näytetyypit, absorbanssit ja eristyspäivä. Jos näytteistä on suoritettu useampi mittaus, toisen mittauksen tulokset on merkitty sulkeisiin.

5.2 Kaksivaiheisen PCR:n tulokset

PCR-ajossa käytetyn templaatin määrä vaihteli lähtötuotteen DNA-konsentraation mukaan 0,5–1 μl:n välillä. Näytteet, joiden DNA-konsentraatiot ylittivät 150 ng/μl:ssa, laimennettiin ensimmäiseen PCR-reaktioon pipetoimalla 0,5 μl nukleaasi-vapaata vettä. Jos näytteiden konsentraatio oli ≤ 150 ng/μl:ssa, templaattimääränä käytettiin molemmissa PCR-reaktioissa 1 μl:aa. Kolme DNA-konsentraatioltaan vahvinta näytettä, joiden konsentraatiot olivat 760,4 ng/μl (näyte D0050), 663,5 ng/μl (näyte D0052), 754,4 ng/μl (näyte D0077), laimennettiin myös toiseen PCR-reaktioon samalla tavalla kuin I-vaiheen PCR:ssä oli tehty.

Näytettä D0029 ei saatu erottumaan selkeänä bändinä geelياجossa sen matalan DNA-konsentraation takia. Kaikista näytteistä saatiin geelياجossa tasaiset samaa koko luokkaa olevat fragmentit, joiden pituudeksi voitiin arvioida noin 520 emäsparia, kun niitä verrattiin standardiin. Kaikkien näytteiden geelikuvat on esitetty liitteessä 3.

Liitteen 3 osassa 2 (3) 16.5. ajetuista II-vaiheen PCR-näytteistä, näyte WB1 on DNA-eristyksessä käytetty pesupuskurinäyte, joka tarkistettiin mahdollisen kontaminaation varalta. Liitteen 3 osassa 3 (3) esitetystä 17.5. ajetusta agarosigeelin uusinta-ajosta, heikoimmin erottautuneille näytteille, otettiin kirjastopooliin yhdistettäväksi kaikki muut näytteet paitsi D0089 ja 21.5. suoritetusta toisesta uusinta-ajosta yhdistettiin kirjastopooliin vain näyte D0089, koska muille näytteille kyseisenä päivänä suoritettu uusinta-ajo osoitautui tarpeettomaksi. Kuvasta 4 nähdään 16 näytteen PCR-fragmenttien koot ja siihen on myös merkitty standardin molekyylipainot. Kuvan 4 oikeaan laitaan on merkitty negatiivinen PCR-kontrollinäyte.



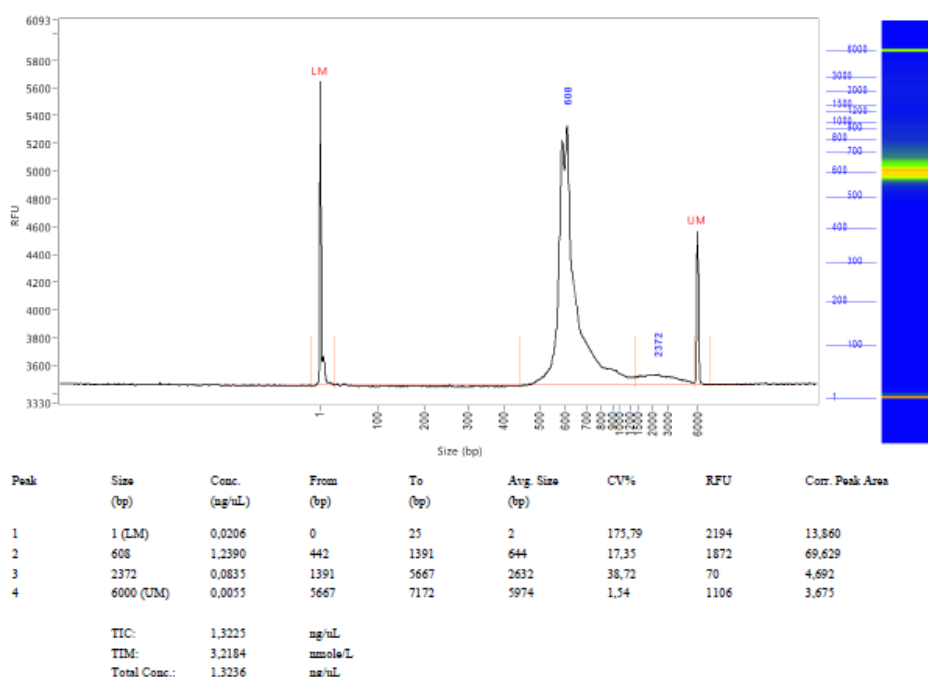
Kuva 4. AGE:lla 8.5. ajetut II-vaiheen PCR-näytteet.

Koska näytteiden fragmenttien pituudet olivat lähes saman kokoisia, pystyttiin PCR-tuotteet yhdistämään suoraan samaksi pooliksi ja mittaamaan poolin DNA-konsentraatio. Sen sijaan, jos fragmenttien pituudet olisivat poikenneet huomattavasti toisistaan, näytteet olisi pitänyt konsentroida ensin omiksi näytepooleikseen kaupallisen kitin ohjeen mukaan ja niiden konsentraatiot olisi mitattu Qubit 3 -fluorometrillä. Vasta tämän jälkeen näytteet olisi pystytty yhdistämään samaan kirjastopooliin niiden DNA-konsentraatioiden mukaan.

PCR-tuotteiden konsentraatioiden mittaaminen ja koon määrittäminen

PCR-poolin DNA-konsentraatioksi saatiin 25,4 ng/μl. Mittaamiseen käytettiin Qubit 3-fluorometrin dsDNA high sensitivity-asetusta, joka soveltuu DNA-konsentraatiolle, jotka ovat alle 100 ng/μl.

Magneettipuhdistetun poolinäytteen DNA-konsentraatioksi mitattiin 47,2 ng/μl. Fragmenttiajosta varten tästä tehtiin laimennos, jonka konsentraatio oli 1 ng/μl. Fragment Analyzerilla määritettiin poolin kokojakauma ja puhtaus. Fragmenttien emäsparien pituudeksi saatiin noin 600 emäsparia (kuva 5). Kuvassa 5 oikealla puolella sinisellä pohjalla oleva paksu viiva kuvaa fragmentin pituutta ja sen vasemmalla puolella on esitetty standardien pituudet.



Kuva 5. Fragment Analyzerilla määritetty DNA-poolinäytteen fragmenttien pituus.

Kuvassa 5 olevat suorat piikit LM ja UM kuvaavat mittausaluetta, joka muodostuu jokaiseen näytteeseen pipetoidun laimennospuskurin mukaan. Kuvan 5 keskimmaisesta näytteen piikistä voidaan havaita, että PCR-fragmentit ovat puhdistuneet hyvin, koska

saatiin selkeä yksi piikki eikä piikkiä ennen ole näkyvissä ylimääräisiä piikkejä fragmentteihin sitoutumattomista PCR:n sivutuotteista (*engl.* primer-dimer). Isomman piikin jälkeen muodostunut pienempi piikki muodostui alukkeiden loppumisesta PCR-reaktiossa, eikä siinä ole poikkeavuuksia verrattuna odotettuun tulokseen. Alukkeiden loppuminen on johtanut fragmenttien fuusioitumiseen, jolloin on muodostunut pidempiä fragmentteja 16S-geenistä.

5.3 Sekvensoinnin tulokset

Sekvensoinnista saadut tulokset olivat onnistuneet kaikkien muiden näytteiden osalta paitsi näytteen D0029. Taulukossa 10 esitetään sekvenssien näytekohtaiset määrät.

Taulukko 10. Näytteistä MiSeq-ajossa saadut sekvenssien lukumäärät.

Näyte	Readien lkm	Näyte	Readien lkm	Näyte	Readien lkm	Näyte	Readien lkm
SLEEP-0001	131853	SLEEP-0032	116107	SLEEP-0071	90503	SLEEP-0105	72846
SLEEP-0002	93815	SLEEP-0034	113705	SLEEP-0072	88919	SLEEP-0106	110018
SLEEP-0003	126782	SLEEP-0035	54489	SLEEP-0074	98888	SLEEP-0108	109528
SLEEP-0004	130178	SLEEP-0036	103788	SLEEP-0075	106560	SLEEP-0110	112970
SLEEP-0005	116291	SLEEP-0038	97065	SLEEP-0076	112505	SLEEP-0112	70844
SLEEP-0006	127424	SLEEP-0039	112371	SLEEP-0077	131747	SLEEP-0113	107244
SLEEP-0007	109987	SLEEP-0040	104757	SLEEP-0080	130145	SLEEP-0115	90152
SLEEP-0008	122881	SLEEP-0041	105833	SLEEP-0082	36514	SLEEP-0116	74972
SLEEP-0009	111146	SLEEP-0045	119986	SLEEP-0083	97133	SLEEP-0128	117833
SLEEP-0010	111812	SLEEP-0046	74886	SLEEP-0084	100285	SLEEP-0129	93744
SLEEP-0011	157564	SLEEP-0047	140175	SLEEP-0085	61169	SLEEP-0131	118943
SLEEP-0012	109297	SLEEP-0048	125303	SLEEP-0086	93725	SLEEP-0132	110026
SLEEP-0013	111894	SLEEP-0049	126494	SLEEP-0087	117585	SLEEP-0133	119671
SLEEP-0014	122616	SLEEP-0050	98915	SLEEP-0088	148295	SLEEP-0134	103878
SLEEP-0015	149452	SLEEP-0051	89133	SLEEP-0089	18019	SLEEP-0135	121885
SLEEP-0016	118199	SLEEP-0052	148634	SLEEP-0091	110564	SLEEP-0136	150991
SLEEP-0018	141058	SLEEP-0054	104716	SLEEP-0092	61879	SLEEP-0137	125512
SLEEP-0019	159198	SLEEP-0055	111916	SLEEP-0093	107826	SLEEP-0138	111149
SLEEP-0020	119411	SLEEP-0056	109372	SLEEP-0094	130971	SLEEP-0140	130805
SLEEP-0022	132615	SLEEP-0057	124787	SLEEP-0095	116937	SLEEP-0142	147969
SLEEP-0023	114995	SLEEP-0058	113171	SLEEP-0096	107790	SLEEP-0143	100690
SLEEP-0024	124038	SLEEP-0059	114906	SLEEP-0097	129469	SLEEP-0145	123320
SLEEP-0025	115106	SLEEP-0060	103568	SLEEP-0098	109080	SLEEP-0146	82732
SLEEP-0026	100210	SLEEP-0061	171858	SLEEP-0099	100644	SLEEP-0148	57204
SLEEP-0027	133771	SLEEP-0062	44780	SLEEP-0100	107130	SLEEP-0149	119932
SLEEP-0028	136214	SLEEP-0065	98766	SLEEP-0101	118181	SLEEP-0150	101931
SLEEP-0029	156	SLEEP-0068	45530	SLEEP-0102	101330		
SLEEP-0030	125985	SLEEP-0069	114409	SLEEP-0103	124639		
SLEEP-0031	100758	SLEEP-0070	124069	SLEEP-0104	115211		

Taulukkoon 11 on koottu negatiivisten DNA-eristyskontrollien ja PCR-kontrollien sekvensoidut määrät.

Taulukko 11. Negatiivisten kontrollinäytteiden sekvenssien lukumäärät.

Näyte	Readien lkm
C1	10
C2	95
C3	5
C4	121
C4	20
C5	120
C6	79
C7	138
C8	5
C9	72
C10	187
C11	5
C12	3
C13	73
C14	8
C15	99
PCR-ctrl-1	135
PCR-ctrl-2	115
PCR-ctrl-3	119
PCR-ctrl-4	119
PCR-ctrl-5	161
PCR-ctrl-6	7
PCR-ctrl-7	8
PCR-ctrl-8	5
PCR-ctrl-9	9

Taulukon 10 tulokset on visualisoitu myös pylväsdiagrammilla liitteessä 4 ja niistä voidaan havaita, että suurin saavutettu sekvenssifragmenttien määrä oli 171 858 kappaletta, joka saatiin näytteestä D0061 ja pienin fragmenttimäärä oli 18 019 kappaletta näytteestä D0089. Tutkimuksen ulkopuolelle jääneen näytteen D0029 sekvenssifragmenttien määrä oli 156 kappaletta. Readien lukumäärä kuvaa onnistuneita sekvenssejä bakteeripopulaatiosta/näyte. Jatkoanalysoitaessa näytteiden sekvenssejä voidaan huomata, mitä bakteereja ja minkälaisia määriä erilaisia bakteerilajeja näytteet sisältävät.

Liitteessä 5 MiSeqilla saadun sekvensointidatan perusteella nähdään, että ajon keskiarvo on 74,3 %, mikä osoittaa ajon onnistuneen. Sekvensointiajoa voidaan pitää onnistuneena, jos laatuanalyysin tulos ylittää 70 %. Tämä on laitevalmistajan määrittämä raja hyväksytysti sujuneelle ajolle.

6 Pohdinta

Työskentelyssä oli kiinnitettävä erityistä huomiota puhtauteen, koska PCR-näytteiden kontaminoitumisriski on korkea. On myös huomioitava, että kontaminaatiolähteitä on myös ilmassa, jolloin reaktiotuotteisiin tulee aina hieman ulkopuolelta ylimääräistä kontaminaatiota. Tätä niin kutsuttua carry-over–vaikutusta yritetään minimoida työskentelemällä erillisissä puhdastiloissa ja laminaarikaapissa. Tässä tutkimuksessa kontaminaatioiden ehkäisemiseksi kaikki PCR-reaktioon käytetyt reagenssit pipetoitiin erillisen puhdashuoneen laminaarikaapissa. Templaatti lisättiin puhdashuoneen ulkopuolella varsinaisen laboratorihuoneen laminaarissa, joka oli tarkoitettu amplikonien II-vaiheen käsittelyyn. DNA-eristykseen liittyvät pipetoinnit suoritettiin varsinaisen laboratoriotilan laminaarissa, joka oli tarkoitettu DNA:n eristykseen tai muunlaiseen näytteiden esikäsittelyyn, jolloin myös niiden kontaminaatoriski on pienempi.

Sekvensointiin käytetyn MiSeq-laitteen huollossa käytettiin kolmea erilaista pesuohjelmaa: post-run-, stanby- ja maintenance-pesuohjelmia. Post-run-pesu suoritetaan MiSeq:lle jokaista sekvensointia ennen ja sekvensoinnin jälkeen. Stanby-pesu tehdään, jos laitetta ei ole tarkoitus käyttää vähintään seuraavaan seitsemään vuorokauteen. Kerran kuukaudessa laitteelle suoritetaan käytöstä riippumaton maintenance-pesu. Pesujen avulla vähennetään kontaminaatiota näytteiden välillä sekvensointiajon aikana. On kuitenkin havaittu, että tavallisten ja kaksoisindeksialukkeiden välillä tapahtuu, säännöllisistä pesuista huolimatta, carry-over–vaikutusta, jolloin tavallisia alukkeita kulkeutuu kaksoisindeksialukkeiden mukaan.

Sekvensoinnissa käytettiin kaksoisindeksialukkeita, jotka mahdollistivat tarkan samanlaisen näytteiden signaalien detektoinnin, jolloin harvinaisemmat variantit havaitaan paremmin. Kaksoisindeksialukkeiden käytöllä voidaan vähentää näytteiden välistä ristikontaminaatiota ja riskiä sekvenssidatan yhdistämisestä väärään näytteeseen.

Saatujen tulosten perusteella voidaan todeta, että myös ulostenäytteiden vaihteleva laatu vaikutti näytteiden DNA-konsentraatioon. Tämä johtui siitä, että potilaat olivat itse annostelleet näytteen näyteputkeen ja annosteluohjeiden tulkitsemisessa on ollut yksilökohtaisia eroja.

Geelajossa havaittiin näytteiden fragmenttien pituuksien olevan tasaisia, eikä näytettä tarvinnut konsentroida ennen poolin valmistusta. Myös Fragment Analyzerilla tehdystä ajosta voitiin huomata näytepoolin amplikonien olevan pituudeltaan yhteneväisiä.

Sekvensointikirjastosta saadut tulokset antoivat vaihtelevia sekvensointimääriä, koska näytteiden tarttuminen klustereihin vaihteli. Tähän voivat olla syynä kaksoisindeksialukkeiden vaihteleva sitoutuminen DNA-juosteeseen kaksivaiheisen PCR:n aikana. Sekvensoituun määrään on myös saattanut vaikuttaa samassa ajossa mukana ollut genomista alkuperää oleva lyhyempi näyte, jonka emäsparien pituus on ollut 400 bp, kun taas analysoidun amplikonisen näytteen pituus on ollut 600 bp.

Ainoastaan näyte D0029 ei ollut jatkoanalysointikelpoinen, koska sen alkuperäinen DNA-konsentraatio ei ollut riittävä ja näytteestä saatu pieni sekvenssifragmenttien (reaktien) lukumäärä johtui todennäköisesti carry over-vaikutuksesta. Sekvensointidataa tulkitsemalla negatiivisten kontrolli- ja 0-näytteiden keskiarvo oli noin 70 ja varsinaisten näytteiden 109 000, jotka vastaavat tavanomaisia lukemia. Sen perusteella voidaan päätellä sekvensoinnin onnistuneen, eikä ajon aikana ole ilmennyt laitteesta johtuvia häiriöitä. Sekvensoinnissa kontrollinäytteistäkin tulee jonkin verran readeja carry-over-vaikutuksen myötä, jonka tiedostaminen sekvensointidatan tulkitsemisen kannalta on olennaista.

Kaiken kaikkiaan sekvensointikirjaston tekeminen onnistui odotusten mukaisesti, koska sekvensointitulokset olivat analysointikelpoisia bioinformatiiviseen jatkokäsittelyyn. Laajempi bioinformatiivinen tulosten käsittely ei kuitenkaan enää kuulu tämän tutkimuksen aihepiiriin.

Narkolepsiaan liittyvää tutkimusta tulee yleisellä tasolla jatkaa, ja tässä opinnäytetyössä tehty tutkimus on vielä vasta alkumetreillä. Tutkimuksesta saatuja näytekohtaisia sekvensointituloksia tullaan vertaamaan bioinformatiivisessa jatkokäsittelyssä Ranskasta myöhemmin saatavaan metadataan. Metadatan perusteella voidaan tehdä johtopäätöksiä mahdollisista yhtäläisyyksistä tiettyjen bakteerien esiintyvyydessä narkolepsiaa sairastavilla henkilöillä ja analysoida indikoivatko jotkin bakteerit narkolepsiaan sairastumisen riskiä. Tähän mennessä on tunnistettu vasta muutamia bakteereja sekvensoiduista

näytteistä, joiden yhteyttä narkolepsiaan ei vielä voida tässä vaiheessa tutkimusta vahvistaa.

Lähteet

- 1 Narkolepsia-katapleksia ja ei-kataplektinen narkolepsia. Verkkoaineisto. Terveyskylä.fi. < <https://www.terveyskyla.fi/harvinaissairaudet/tietoa/tauti-ryhm%C3%A4t/neurologiset-sairaudet/sairaudet/narkolepsia-katapleksia-ja-ei-kataplektinen-narkolepsia>>. Luettu 3.4.2019.
- 2 Mitä on narkolepsia? 2019. Verkkoaineisto. Suomen narkolepsiaiyhdistys ry. <<https://www.narkolepsia.fi/mita-on-narkolepsia/>>. Luettu 4.4.2019.
- 3 Hypersomnia (liikaunisuus). Verkkoaineisto. Vitalmed Helsingin Uniklinikka. <<https://www.uniklinikka.fi/unihairiot/hypersomnia>>. Luettu 4.4.2019.
- 4 Liikaunisuus. 2019. Verkkoaineisto. Duodecim Terveyskirjasto. < https://www.terveysportti.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk00385&p_haku=Liikaunisuus>. Luettu 4.4.2019.
- 5 Narcolepsy and other central hypersomnias. 23.8.2017. Verkkoaineisto. Pub-Med.gov. US National Library of Medicine National Institutes of Health. <<https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwjNnZLDssLhAhWhIYsKHZAIDr0QFjAAegQIAxAB&url=https%3A%2F%2Fwww.ncbi.nlm.nih.gov%2Fpub-med%2F28777172&usg=AOvVaw0BwwDwKgG9Pris9FeIN8Bs>>. Luettu 4.4.2019.
- 6 Brooks, Stephen MD; Lammers, Gert Jan MD; Mignot, Emmanuel MD; Nevsimailova, Sona MD; Nishino, Seiji MD; Okun, Michele MA; Overeem, Sebastiaan MSc; Ripley, Beth BS; Rogers, William BS & Vankova, Jitka MD. 6.8.2001. Low cerebrospinal fluid hypocretin (orexin) and altered energy homeostasis in human narcolepsy. Verkkoaineisto. Wiley Online Library. Helsingin yliopiston kirjasto. < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ana.1130?sid=nlm:pubmed>>. Luettu 6.5.2019.
- 7 Aho, Velma; Auvinen, Petri; Eerola-Rautio, Johanna; Haapaniemi, Elena; Kaakkola, Seppo; Kinnunen, Esko; Koskinen, Kaisa; Murros, Paulin; Lars; Kari; Pekkonen, Eero; Pereira, Pedro; Pohja, Marjatta & Scheperjans, Filip. Gut microbiota are related to Parkinson's disease and clinical phenotype. Verkkoaineisto. <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/mds.26069>>. Luettu 27.8.2019.
- 8 16S Ribosomal RNA. 2019. Verkkoaineisto. Science Direct. < <https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/16s-ribosomal-rna>>. Luettu 10.4.2019.
- 9 Intragenomic heterogeneity between multiple 16S ribosomal RNA operons in sequenced bacterial genomes. 1.11.2003. Verkkoaineisto. Fems microbiology letters. Oxford Academic. < <https://academic.oup.com/femsle/article/228/1/45/571392>>. Luettu 10.4.2019.

- 10 16s-Gene. 2018. Verkkoaineisto. LC Sciences. <<https://www.lcsciences.com/discovery/applications/genomics/16s-rrna-gene-sequencing-landing/16s-gene/>>. Luettu 7.6.2019.
- 11 Auvinen, Petri. Tutkimusjohtaja. Paulin, Lars. Laboratoriainsinööri. 2019. Biotekniikan Instituutti, Helsingin yliopisto. Keskustelu 27.8.2019.
- 12 What is difference between sequence adapter and PCR primer? Verkkoaineisto. Biostars Bioinformatics Explained. <<https://www.biostars.org/p/145032/>>. Luettu 28.8.2019.
- 13 Blogikirjoitussarja: NGS-perusteet, osa 4. 22.10.2018. Verkkoaineisto. Immunodiagnostic Oy. <<https://www.immunodiagnostic.fi/blogikirjoitussarja-ngs-perusteet-osa-4/>>. Luettu 2.6.2019.
- 14 SBS Chemistry. 2019. Verkkoaineisto. Explore Illumina sequencing technology. Massively parallel sequencing with optimized SBS chemistry. Illumina. <<https://emea.illumina.com/science/technology/next-generation-sequencing/sequencing-technology.html?langsel=/fi/>>. Luettu 10.6.2019.
- 15 Stranneheim, Henrik & Lundeberg, Joakim. 8.8.2012. Stepping stones in DNA sequencing. Biotechnology Journal. Vol. 7, s. 1063–1073.
- 16 Suominen, Ilari; Pärssinen, Raimo; Haajanen, Kari & Pelkonen, Jani. 2010. Geenitekniikka. Turku: Turun ammattikorkeakoulun oppimateriaaleja 52.
- 17 The Sanger Method of DNA sequencing. Verkkoaineisto. <<https://www.youtube.com/watch?v=FvHRio1yyhQ>>. Luettu 3.6.2019.
- 18 Mustanoja, Ella. 2019. Bioinformaatikko. Biotekniikan Instituutti, Helsingin yliopisto. Keskustelu 7.6.2019.

Eristettyjen näytteiden DNA-konsentraatiot, näytetyypit, absorbanssit ja eristyspäivät

Näyte	Näytetyyppi	c (ng/μl)	A (260/280)	A (260/230)	Pvm
SLEEP-D0001	1	316,1	1,97	1,32	12.4.2019
SLEEP-D0002	1	642,7	1,99	1,92	15.4.2019
SLEEP-D0003	3	36,1	2,07	0,61	25.4.2019
SLEEP-D0004	1	231,8	2,12	1,37	3.5.2019
SLEEP-D0005	1	192,8	1,9	0,79	15.4.2019
SLEEP-D0006	2	327,6	1,96	1,57	24.4.2019
SLEEP-D0007	2	22,4	1,88	0,49	25.4.2019
SLEEP-D0008	1	571,3	1,96	1,15	23.4.2019
SLEEP-D0009	2	54,5	1,97	0,68	24.4.2019
SLEEP-D0010	3	253,4	1,96	1,03	26.4.2019
SLEEP-D0011	2	163,4	2,02	1,22	18.4.2019
SLEEP-D0012	1	418,7	1,98	0,98	17.4.2019
SLEEP-D0013	1	39,2	2,3	0,79	17.4.2019
SLEEP-D0014	3	420,8	1,99	1,59	3.5.2019
SLEEP-D0015	1	415,6	2,03	1,39	17.4.2019
SLEEP-D0016	1	100	1,92	1,23	18.4.2019
SLEEP-D0018	1	191,2	1,99	1,55	15.4.2019
SLEEP-D0019	2	54,2	1,91	0,63	16.4.2019
SLEEP-D0020	2	31,6	2,01	0,65	23.4.2019
SLEEP-D0022	2	103,6	1,96	0,94	25.4.2019
SLEEP-D0023	2	111,1	1,98	1,27	18.4.2019
SLEEP-D0024	1	223,1	1,98	1,77	25.4.2019
SLEEP-D0025	1	110,8	1,98	1,71	26.4.2019
SLEEP-D0026	1	29,6	2,17	0,5	18.4.2019
SLEEP-D0027	2	31,6	1,98	0,72	18.4.2019
SLEEP-D0028	2	247,7	1,98	1,74	26.4.2019
SLEEP-D0029	3	0,7	3,98 (-1,18)	0,01	23.4.2019
SLEEP-D0030	3	180,7	1,98	1,59	29.4.2019
SLEEP-D0031	2	685,2	1,99	1,83	9.4.2019
SLEEP-D0032	1	446,4	2,01	1,92	9.4.2019
SLEEP-D0034	1	149,4	2,05	1,65	9.4.2019
SLEEP-D0035	3	2,5 (2,8)	2,60 (2,59)	0,07	11.4.2019

Näyte	Näytetyyppi	c (ng/μl)	A (260/280)	A (260/230)	Pvm
SLEEP-D0036	2	38,8	1,99	0,58	11.4.2019
SLEEP-D0038	3	40,6	2,04	0,78	11.4.2019
SLEEP-D0039	1	16	2,07	0,25	11.4.2019
SLEEP-D0040	3	26,7	1,89	0,46	11.4.2019
SLEEP-D0041	3	20	2,06	0,45	16.4.2019
SLEEP-D0045	2	284,9	1,97	1,74	26.4.2019
SLEEP-D0046	3	2,0 (2,1)	1,32 (1,22)	0,15 (0,16)	16.4.2019
SLEEP-D0047	3	178,8	1,95	1,41	17.4.2019
SLEEP-D0048	2	82,3	1,97	1,31	17.4.2019
SLEEP-D0049	2	408,1	2,01	0,97	11.4.2019
SLEEP-D0050	2	760,7	1,98	1,45	17.4.2019
SLEEP-D0051	3	76,7	1,96	1,37	16.4.2019
SLEEP-D0052	2	633,5	1,97	1,53	23.4.2019
SLEEP-D0054	1	11,1	2,03	0,13	11.4.2019
SLEEP-D0055	1	46,7	2	0,69	18.4.2019
SLEEP-D0056	3	28,7	1,94	0,54	29.4.2019
SLEEP-D0057	2	470,4	1,94	1,68	24.4.2019
SLEEP-D0058	3	252,1	1,97	1,86	25.4.2019
SLEEP-D0059	2	70,3	1,97	1,21	26.4.2019
SLEEP-D0060	3	100,9	1,96	1,65	29.4.2019
SLEEP-D0061	1	41,6 (41,0)	1,97 (1,95)	1,02 (1,03)	5.4.2019
SLEEP-D0062	1	3,4 (2,6)	1,96 (2,66)	0,12 (0,1)	5.4.2019
SLEEP-D0065	2	22,9	1,91	0,39	11.4.2019
SLEEP-D0068	2	3,3 (3,5)	1,63 (1,90)	0,05	17.4.2019
SLEEP-D0069	1	28,3	1,91	0,77	16.4.2019
SLEEP-D0070	2	147,5	1,97	1,42	29.4.2019
SLEEP-D0071	1	17	1,79	0,34	26.4.2019
SLEEP-D0072	3	35	1,98	0,42	17.4.2019
SLEEP-D0074	1	29,6	1,96	0,68	16.4.2019
SLEEP-D0075	1	142,3	1,98	1,33	23.4.2019
SLEEP-D0076	1	69,9	1,91	0,86	16.4.2019
SLEEP-D0077	3	754,4	1,98	1,81	29.4.2019

Näyte	Näytetyyppi	c (ng/μl)	A (260/280)	A (260/230)	Pvm
SLEEP-D0080	1	562,3	1,96	1,66	26.4.2019
SLEEP-D0082	3	1,2	-37,17 (1,08)	0,02	5.4.2019
SLEEP-D0083	3	13,2 (13,7)	2,07 (1,81)	0,37 (0,39)	5.4.2019
SLEEP-D0084	3	44	2,01	0,45	8.4.2019
SLEEP-D0085	2	3,1 (2,4)	1,77 (1,53)	0,04	5.4.2019
SLEEP-D0086	1	3,7	1,78	0,06	9.4.2019
SLEEP-D0087	3	57,2	2,03	0,93	9.4.2019
SLEEP-D0088	1	179,6	1,97	1,03	8.4.2019
SLEEP-D0089	2	1	2,32	0,01	9.4.2019
SLEEP-D0091	2	4,9	2,36 (2,13)	0,12	12.4.2019
SLEEP-D0092	3	3,2 (3,6)	2,63 (2,56)	0,12 (0,13)	23.4.2019
SLEEP-D0093	2	19,3	1,8	0,41	12.4.2019
SLEEP-D0094	1	73,1	2,01	0,42	11.4.2019
SLEEP-D0095	2	12	1,86	0,15	12.4.2019
SLEEP-D0096	1	34,1	2,03	0,49	23.4.2019
SLEEP-D0097	2	64,7	1,93	0,86	15.4.2019
SLEEP-D0098	2	18,7	1,75	0,31	15.4.2019
SLEEP-D0099	2	85,2	1,92	1,23	15.4.2019
SLEEP-D0100	3	22,3	2,05	0,12	23.4.2019
SLEEP-D0101	1	28,8	1,9	0,97	16.4.2019
SLEEP-D0102	2	1,5 (1,9)	3,84 (1,73)	0,03 (0,04)	16.4.2019
SLEEP-D0103	1	21,2	1,93	0,24	24.4.2019
SLEEP-D0104	3	72,9	1,95	0,92	17.4.2019
SLEEP-D0105	1	13,9	1,96	0,31	12.4.2019
SLEEP-D0106	1	66,2	2,05	0,78	24.4.2019
SLEEP-D0108	1	442	1,94	1,44	24.4.2019
SLEEP-D0110	1	54,5	1,96	1,12	25.4.2019
SLEEP-D0112	1	9,8	2,18	0,16	9.4.2019
SLEEP-D0113	2	107,3	1,93	1,32	8.4.2019
SLEEP-D0115	3	101,6	2,05	1,18	3.5.2019
SLEEP-D0116	2	53	1,94	0,73	8.4.2019
SLEEP-D0128	3	39,3	2,08	0,37	9.4.2019

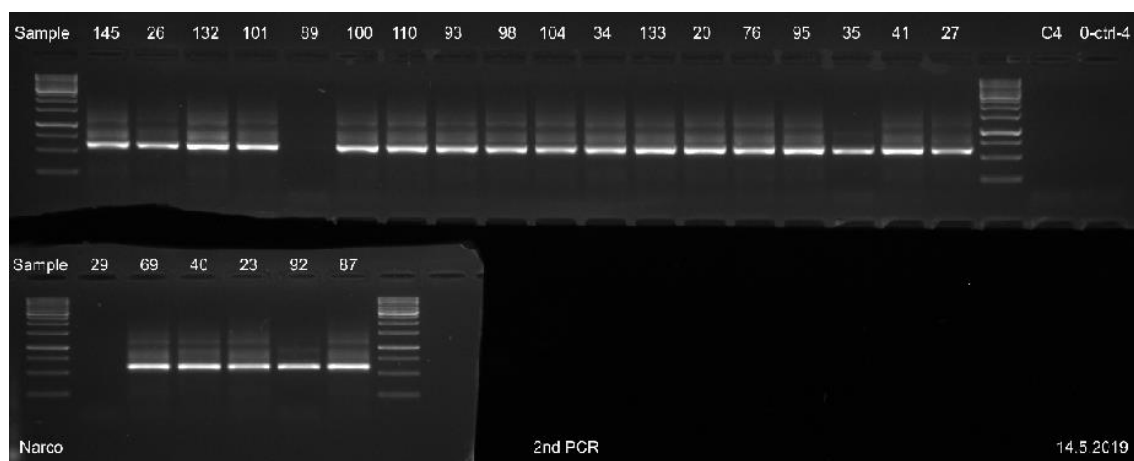
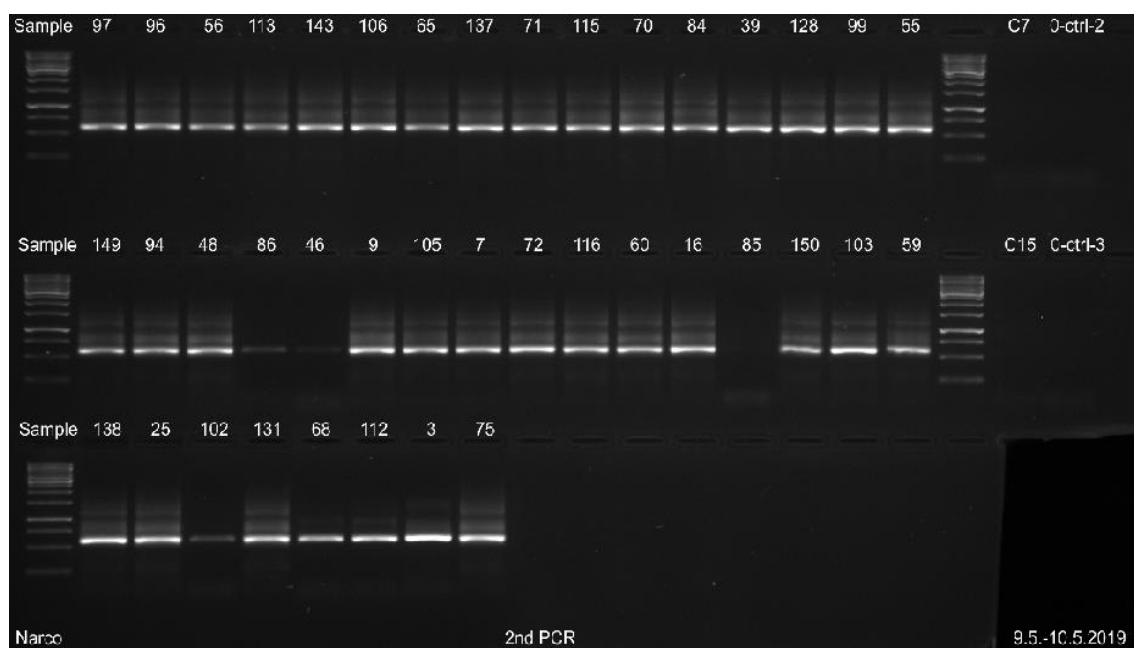
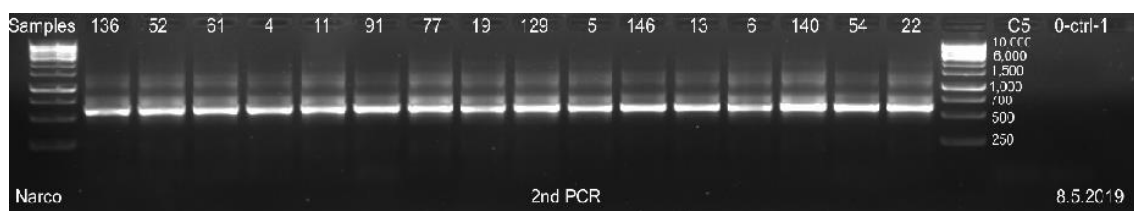
Näyte	Näytetyyppi	c (ng/μl)	A (260/280)	A (260/230)	Pvm
SLEEP-D0129	3	144,7	1,91	0,55	8.4.2019
SLEEP-D0131	3	141,2	1,98	1,04	24.4.2019
SLEEP-D0132	3	135,2	1,96	1,61	26.4.2019
SLEEP-D0133	3	13,8	2,1	0,19	18.4.2019
SLEEP-D0134	3	298,1	1,95	0,95	24.4.2019
SLEEP-D0135	3	331,6	1,97	1,18	24.4.2019
SLEEP-D0136	3	15	2,04	0,17	18.4.2019
SLEEP-D0137	3	44,9	2,07	0,76	25.4.2019
SLEEP-D0138	3	21,5	1,99	0,34	18.4.2019
SLEEP-D0140	3	86,4	1,98	1,21	26.4.2019
SLEEP-D0142	3	267,6	1,99	1,45	12.4.2019
SLEEP-D0143	3	58,8	2,02	0,78	12.4.2019
SLEEP-D0145	3	141,8	1,98	1,36	12.4.2019
SLEEP-D0146	3	24,3	2,13	0,21	12.4.2019
SLEEP-D0148	3	4,4 (4,2)	1,38 (1,55)	0,08 (0,07)	15.4.2019
SLEEP-D0149	3	32,5	1,87	0,56	15.4.2019
SLEEP-D0150	3	114,5	1,96	1,04	15.4.2019
C1		0,6	1,19 (-1,57)	0,03 (0,01)	5.4.2019
C2		1,7	1,37	0,02	8.4.2019
C3		1,7	2,67	0,04	9.4.2019
C4		1	4,51	0,02	11.4.2019
C5		0,2	1,27	0,01	12.4.2019
C6		1	0,72	0,02	15.4.2019
C7		0,5	0,73	0,03	16.4.2019
C8		0,6	0,69	0,02	17.4.2019
C9		0,5	1,2	0,01	18.4.2019
C10		0,3	-0,7	0,01	23.4.2019
C11		1,1	1,18	0,01	24.4.2019
C12		1,3	1,3	0,01	25.4.2019
C13		0,3	-4,11	0,01	26.4.2019
C14		-0,2	3,84	-0,01	29.4.2019
C15		1	2,95	0,01	3.5.2019

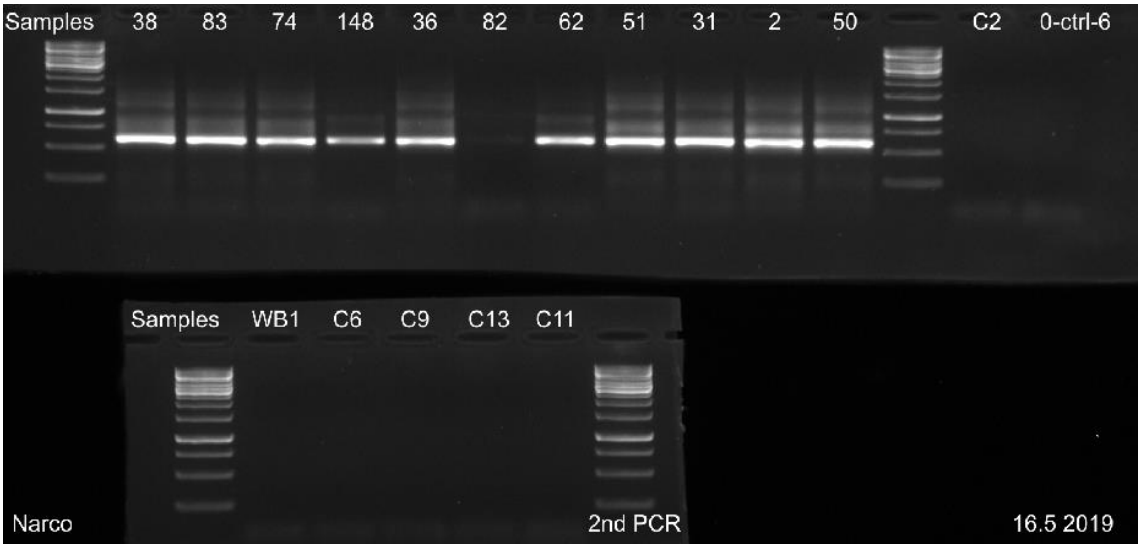
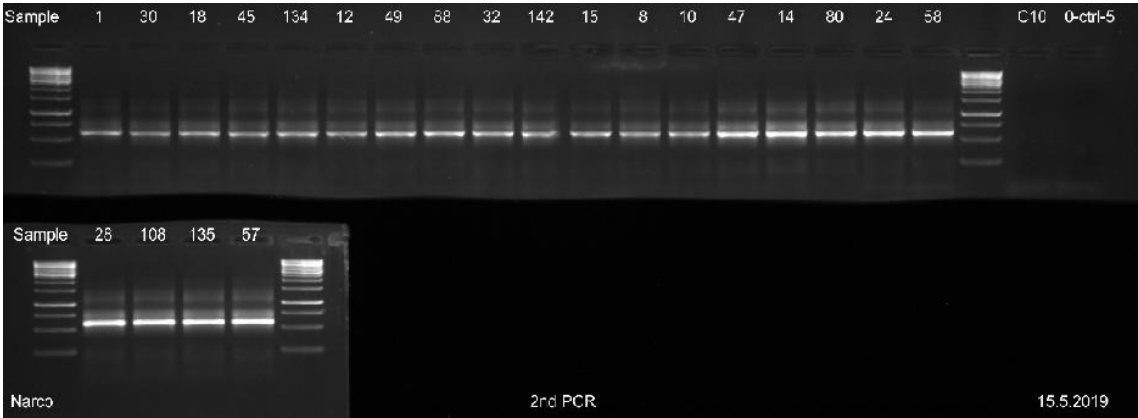
II-vaiheen PCR:ssä käytetyt kaksoisindeksialukkeet ja niiden sekvenssit

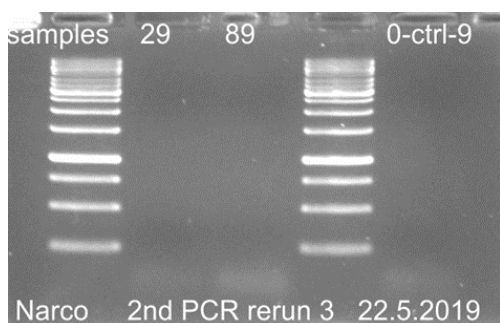
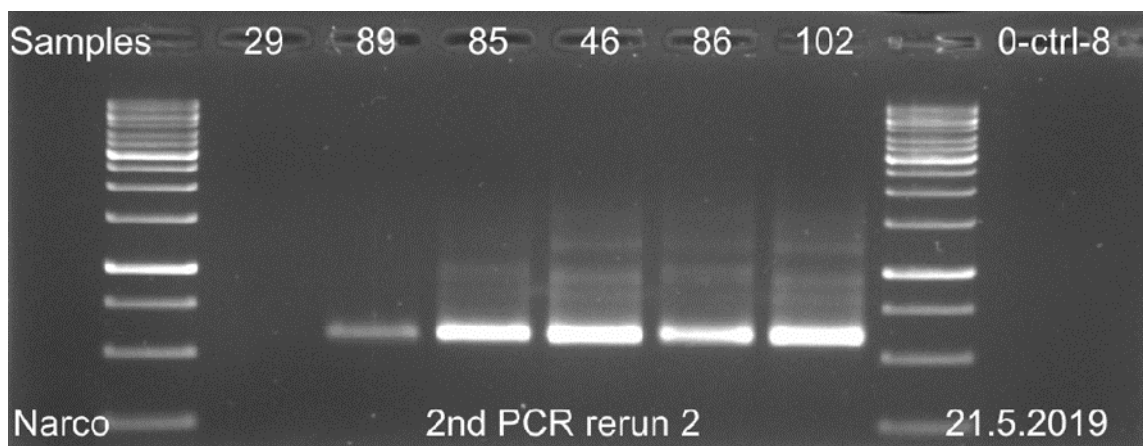
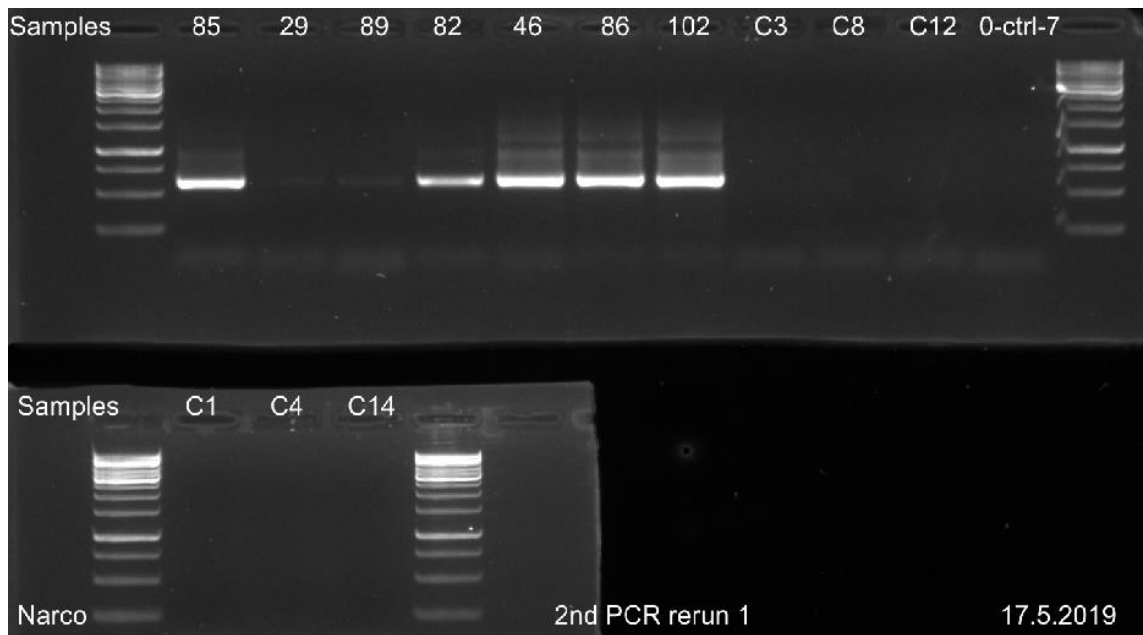
Näyte	P7-indeksi		P5-indeksi		Näyte	P7-indeksi		P5-indeksi	
	Indeksi 1	Sekvenssi	Indeksi 2	Sekvenssi		Indeksi 1	Sekvenssi	Indeksi 2	Sekvenssi
SLEEP_D0001	Ind_8bp_107	GTTAGGAA	Ind_8bp_112	GCATGGCT	SLEEP_D0070	Ind_8bp_018	TAACCTCA	Ind_8bp_133	TTTGCTGG
SLEEP_D0002	Ind_8bp_028	TATGGTGT	Ind_8bp_115	TAGCGAAG	SLEEP_D0071	Ind_8bp_018	TAACCTCA	Ind_8bp_121	AGACTCAA
SLEEP_D0003	Ind_8bp_059	AGGAATGG	Ind_8bp_121	AGACTCAA	SLEEP_D0072	Ind_8bp_021	GCATCACG	Ind_8bp_133	TTTGCTGG
SLEEP_D0004	Ind_8bp_002	TATCCAGT	Ind_8bp_122	CGGTCGTA	SLEEP_D0074	Ind_8bp_025	TGTCACCG	Ind_8bp_121	AGACTCAA
SLEEP_D0005	Ind_8bp_003	GAGATAAC	Ind_8bp_115	TAGCGAAG	SLEEP_D0075	Ind_8bp_059	AGGAATGG	Ind_8bp_122	CGGTCGTA
SLEEP_D0006	Ind_8bp_003	GAGATAAC	Ind_8bp_133	TTTGCTGG	SLEEP_D0076	Ind_8bp_093	CTGGACAA	Ind_8bp_122	CGGTCGTA
SLEEP_D0007	Ind_8bp_021	GCATCACG	Ind_8bp_122	CGGTCGTA	SLEEP_D0077	Ind_8bp_002	TATCCAGT	Ind_8bp_172	ACGTTCTT
SLEEP_D0008	Ind_8bp_004	ACACAGGC	Ind_8bp_122	CGGTCGTA	SLEEP_D0080	Ind_8bp_004	ACACAGGC	Ind_8bp_187	GTCAAAGC
SLEEP_D0009	Ind_8bp_021	GCATCACG	Ind_8bp_115	TAGCGAAG	SLEEP_D0082	Ind_8bp_025	TGTCACCG	Ind_8bp_136	CACACTGC
SLEEP_D0010	Ind_8bp_004	ACACAGGC	Ind_8bp_133	TTTGCTGG	SLEEP_D0083	Ind_8bp_025	TGTCACCG	Ind_8bp_115	TAGCGAAG
SLEEP_D0011	Ind_8bp_002	TATCCAGT	Ind_8bp_133	TTTGCTGG	SLEEP_D0084	Ind_8bp_018	TAACCTCA	Ind_8bp_136	CACACTGC
SLEEP_D0012	Ind_8bp_107	GTTAGGAA	Ind_8bp_136	CACACTGC	SLEEP_D0085	Ind_8bp_049	ATTGGCAA	Ind_8bp_112	GCATGGCT
SLEEP_D0013	Ind_8bp_003	GAGATAAC	Ind_8bp_122	CGGTCGTA	SLEEP_D0086	Ind_8bp_020	TCACGCTC	Ind_8bp_187	GTCAAAGC
SLEEP_D0014	Ind_8bp_004	ACACAGGC	Ind_8bp_172	ACGTTCTT	SLEEP_D0087	Ind_8bp_100	TCGCCAGA	Ind_8bp_136	CACACTGC
SLEEP_D0015	Ind_8bp_004	ACACAGGC	Ind_8bp_121	AGACTCAA	SLEEP_D0088	Ind_8bp_107	GTTAGGAA	Ind_8bp_187	GTCAAAGC
SLEEP_D0016	Ind_8bp_021	GCATCACG	Ind_8bp_187	GTCAAAGC	SLEEP_D0089	Ind_8bp_078	GCAAGAAG	Ind_8bp_121	AGACTCAA
SLEEP_D0018	Ind_8bp_107	GTTAGGAA	Ind_8bp_121	AGACTCAA	SLEEP_D0091	Ind_8bp_002	TATCCAGT	Ind_8bp_136	CACACTGC
SLEEP_D0019	Ind_8bp_002	TATCCAGT	Ind_8bp_187	GTCAAAGC	SLEEP_D0092	Ind_8bp_100	TCGCCAGA	Ind_8bp_133	TTTGCTGG
SLEEP_D0020	Ind_8bp_093	CTGGACAA	Ind_8bp_121	AGACTCAA	SLEEP_D0093	Ind_8bp_078	GCAAGAAG	Ind_8bp_136	CACACTGC
SLEEP_D0022	Ind_8bp_003	GAGATAAC	Ind_8bp_187	GTCAAAGC	SLEEP_D0094	Ind_8bp_020	TCACGCTC	Ind_8bp_136	CACACTGC
SLEEP_D0023	Ind_8bp_100	TCGCCAGA	Ind_8bp_122	CGGTCGTA	SLEEP_D0095	Ind_8bp_093	CTGGACAA	Ind_8bp_133	TTTGCTGG
SLEEP_D0024	Ind_8bp_007	CATGGAAT	Ind_8bp_112	GCATGGCT	SLEEP_D0096	Ind_8bp_012	CGCAAGCT	Ind_8bp_122	CGGTCGTA
SLEEP_D0025	Ind_8bp_049	ATTGGCAA	Ind_8bp_136	CACACTGC	SLEEP_D0097	Ind_8bp_012	CGCAAGCT	Ind_8bp_121	AGACTCAA
SLEEP_D0026	Ind_8bp_059	AGGAATGG	Ind_8bp_187	GTCAAAGC	SLEEP_D0098	Ind_8bp_078	GCAAGAAG	Ind_8bp_172	ACGTTCTT
SLEEP_D0027	Ind_8bp_093	CTGGACAA	Ind_8bp_187	GTCAAAGC	SLEEP_D0099	Ind_8bp_020	TCACGCTC	Ind_8bp_112	GCATGGCT
SLEEP_D0028	Ind_8bp_007	CATGGAAT	Ind_8bp_121	AGACTCAA	SLEEP_D0100	Ind_8bp_078	GCAAGAAG	Ind_8bp_122	CGGTCGTA
SLEEP_D0029	Ind_8bp_100	TCGCCAGA	Ind_8bp_112	GCATGGCT	SLEEP_D0101	Ind_8bp_078	GCAAGAAG	Ind_8bp_115	TAGCGAAG
SLEEP_D0030	Ind_8bp_107	GTTAGGAA	Ind_8bp_115	TAGCGAAG	SLEEP_D0102	Ind_8bp_049	ATTGGCAA	Ind_8bp_172	ACGTTCTT
SLEEP_D0031	Ind_8bp_028	TATGGTGT	Ind_8bp_112	GCATGGCT	SLEEP_D0103	Ind_8bp_049	ATTGGCAA	Ind_8bp_121	AGACTCAA
SLEEP_D0032	Ind_8bp_004	ACACAGGC	Ind_8bp_112	GCATGGCT	SLEEP_D0104	Ind_8bp_078	GCAAGAAG	Ind_8bp_187	GTCAAAGC
SLEEP_D0034	Ind_8bp_093	CTGGACAA	Ind_8bp_112	GCATGGCT	SLEEP_D0105	Ind_8bp_021	GCATCACG	Ind_8bp_121	AGACTCAA
SLEEP_D0035	Ind_8bp_093	CTGGACAA	Ind_8bp_136	CACACTGC	SLEEP_D0106	Ind_8bp_012	CGCAAGCT	Ind_8bp_187	GTCAAAGC
SLEEP_D0036	Ind_8bp_025	TGTCACCG	Ind_8bp_133	TTTGCTGG	SLEEP_D0108	Ind_8bp_007	CATGGAAT	Ind_8bp_122	CGGTCGTA
SLEEP_D0038	Ind_8bp_025	TGTCACCG	Ind_8bp_112	GCATGGCT	SLEEP_D0110	Ind_8bp_078	GCAAGAAG	Ind_8bp_133	TTTGCTGG
SLEEP_D0039	Ind_8bp_018	TAACCTCA	Ind_8bp_172	ACGTTCTT	SLEEP_D0112	Ind_8bp_059	AGGAATGG	Ind_8bp_115	TAGCGAAG
SLEEP_D0040	Ind_8bp_100	TCGCCAGA	Ind_8bp_121	AGACTCAA	SLEEP_D0113	Ind_8bp_012	CGCAAGCT	Ind_8bp_136	CACACTGC
SLEEP_D0041	Ind_8bp_093	CTGGACAA	Ind_8bp_172	ACGTTCTT	SLEEP_D0115	Ind_8bp_018	TAACCTCA	Ind_8bp_122	CGGTCGTA
SLEEP_D0045	Ind_8bp_107	GTTAGGAA	Ind_8bp_122	CGGTCGTA	SLEEP_D0116	Ind_8bp_021	GCATCACG	Ind_8bp_136	CACACTGC
SLEEP_D0046	Ind_8bp_021	GCATCACG	Ind_8bp_112	GCATGGCT	SLEEP_D0128	Ind_8bp_018	TAACCTCA	Ind_8bp_187	GTCAAAGC
SLEEP_D0047	Ind_8bp_004	ACACAGGC	Ind_8bp_136	CACACTGC	SLEEP_D0129	Ind_8bp_003	GAGATAAC	Ind_8bp_112	GCATGGCT
SLEEP_D0048	Ind_8bp_020	TCACGCTC	Ind_8bp_172	ACGTTCTT	SLEEP_D0131	Ind_8bp_049	ATTGGCAA	Ind_8bp_187	GTCAAAGC
SLEEP_D0049	Ind_8bp_107	GTTAGGAA	Ind_8bp_172	ACGTTCTT	SLEEP_D0132	Ind_8bp_078	GCAAGAAG	Ind_8bp_112	GCATGGCT
SLEEP_D0050	Ind_8bp_028	TATGGTGT	Ind_8bp_121	AGACTCAA	SLEEP_D0133	Ind_8bp_093	CTGGACAA	Ind_8bp_115	TAGCGAAG
SLEEP_D0051	Ind_8bp_025	TGTCACCG	Ind_8bp_187	GTCAAAGC	SLEEP_D0134	Ind_8bp_107	GTTAGGAA	Ind_8bp_133	TTTGCTGG
SLEEP_D0052	Ind_8bp_002	TATCCAGT	Ind_8bp_115	TAGCGAAG	SLEEP_D0135	Ind_8bp_007	CATGGAAT	Ind_8bp_133	TTTGCTGG
SLEEP_D0054	Ind_8bp_003	GAGATAAC	Ind_8bp_172	ACGTTCTT	SLEEP_D0136	Ind_8bp_002	TATCCAGT	Ind_8bp_112	GCATGGCT
SLEEP_D0055	Ind_8bp_020	TCACGCTC	Ind_8bp_115	TAGCGAAG	SLEEP_D0137	Ind_8bp_018	TAACCTCA	Ind_8bp_115	TAGCGAAG
SLEEP_D0056	Ind_8bp_012	CGCAAGCT	Ind_8bp_133	TTTGCTGG	SLEEP_D0138	Ind_8bp_049	ATTGGCAA	Ind_8bp_133	TTTGCTGG
SLEEP_D0057	Ind_8bp_007	CATGGAAT	Ind_8bp_136	CACACTGC	SLEEP_D0140	Ind_8bp_003	GAGATAAC	Ind_8bp_136	CACACTGC
SLEEP_D0058	Ind_8bp_007	CATGGAAT	Ind_8bp_115	TAGCGAAG	SLEEP_D0142	Ind_8bp_004	ACACAGGC	Ind_8bp_115	TAGCGAAG
SLEEP_D0059	Ind_8bp_049	ATTGGCAA	Ind_8bp_122	CGGTCGTA	SLEEP_D0143	Ind_8bp_012	CGCAAGCT	Ind_8bp_172	ACGTTCTT
SLEEP_D0060	Ind_8bp_021	GCATCACG	Ind_8bp_172	ACGTTCTT	SLEEP_D0145	Ind_8bp_059	AGGAATGG	Ind_8bp_122	CGGTCGTA
SLEEP_D0061	Ind_8bp_002	TATCCAGT	Ind_8bp_121	AGACTCAA	SLEEP_D0146	Ind_8bp_003	GAGATAAC	Ind_8bp_121	AGACTCAA
SLEEP_D0062	Ind_8bp_025	TGTCACCG	Ind_8bp_172	ACGTTCTT	SLEEP_D0148	Ind_8bp_025	TGTCACCG	Ind_8bp_122	CGGTCGTA
SLEEP_D0065	Ind_8bp_018	TAACCTCA	Ind_8bp_112	GCATGGCT	SLEEP_D0149	Ind_8bp_020	TCACGCTC	Ind_8bp_133	TTTGCTGG
SLEEP_D0068	Ind_8bp_059	AGGAATGG	Ind_8bp_112	GCATGGCT	SLEEP_D0150	Ind_8bp_049	ATTGGCAA	Ind_8bp_115	TAGCGAAG
SLEEP_D0069	Ind_8bp_100	TCGCCAGA	Ind_8bp_115	TAGCGAAG					

	P7-indeksi		P5-indeksi	
Näyte	Indeksi 1	Sekvenssi	Indeksi 2	Sekvenssi
C1	Ind_8bp_032	GGCTCTTG	Ind_8bp_136	CACACTGC
C2	Ind_8bp_028	TATGGTGT	Ind_8bp_133	TTTGCTGG
C3	Ind_8bp_032	GGCTCTTG	Ind_8bp_121	AGACTCAA
C4	Ind_8bp_100	TCGCCAGA	Ind_8bp_172	ACGTTCTT
C5	Ind_8bp_012	CGCAAGCT	Ind_8bp_112	GCATGGCT
C6	Ind_8bp_028	TATGGTGT	Ind_8bp_136	CACACTGC
C7	Ind_8bp_020	TCACGCTC	Ind_8bp_121	AGACTCAA
C8	Ind_8bp_032	GGCTCTTG	Ind_8bp_122	CGGTCGTA
C9	Ind_8bp_028	TATGGTGT	Ind_8bp_172	ACGTTCTT
C10	Ind_8bp_007	CATGGAAT	Ind_8bp_172	ACGTTCTT
C11	Ind_8bp_032	GGCTCTTG	Ind_8bp_112	GCATGGCT
C12	Ind_8bp_032	GGCTCTTG	Ind_8bp_133	TTTGCTGG
C13	Ind_8bp_028	TATGGTGT	Ind_8bp_187	GTCAAAGC
C14	Ind_8bp_032	GGCTCTTG	Ind_8bp_187	GTCAAAGC
C15	Ind_8bp_059	AGGAATGG	Ind_8bp_133	TTTGCTGG
BI_PCR_0_ctrl1	Ind_8bp_012	CGCAAGCT	Ind_8bp_115	TAGCGAAG
BI_PCR_0_ctrl2	Ind_8bp_020	TCACGCTC	Ind_8bp_122	CGGTCGTA
BI_PCR_0_ctrl3	Ind_8bp_059	AGGAATGG	Ind_8bp_136	CACACTGC
BI_PCR_0_ctrl4	Ind_8bp_100	TCGCCAGA	Ind_8bp_187	GTCAAAGC
BI_PCR_0_ctrl5	Ind_8bp_007	CATGGAAT	Ind_8bp_187	GTCAAAGC
BI_PCR_0_ctrl6	Ind_8bp_032	GGCTCTTG	Ind_8bp_115	TAGCGAAG
BI_PCR_0_ctrl7	Ind_8bp_058	AGGATGCC	Ind_8bp_112	GCATGGCT
BI_PCR_0_ctrl8	Ind_8bp_058	AGGATGCC	Ind_8bp_115	TAGCGAAG
BI_PCR_0_ctrl9	Ind_8bp_058	AGGATGCC	Ind_8bp_121	AGACTCAA

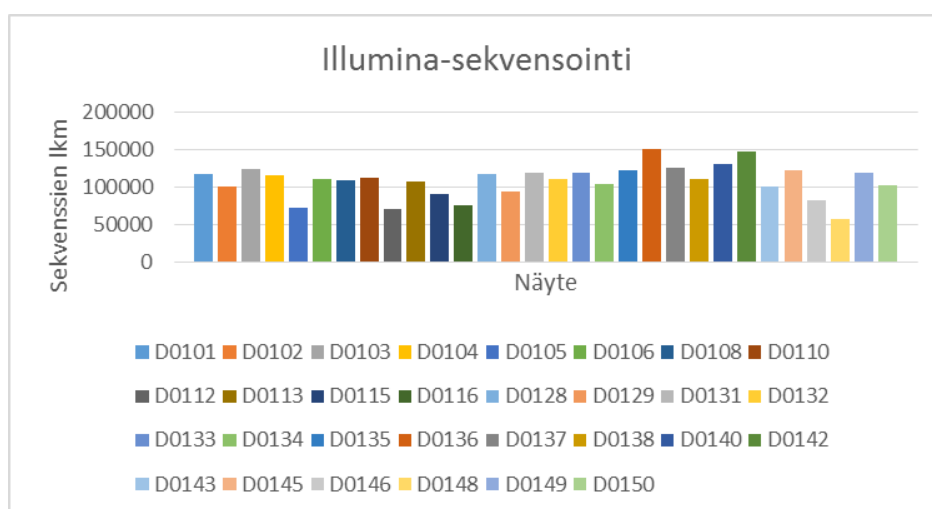
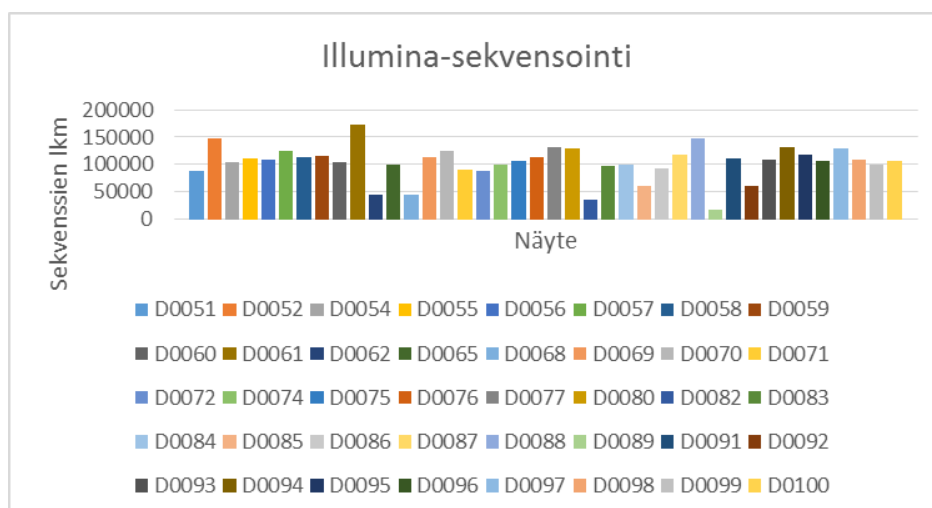
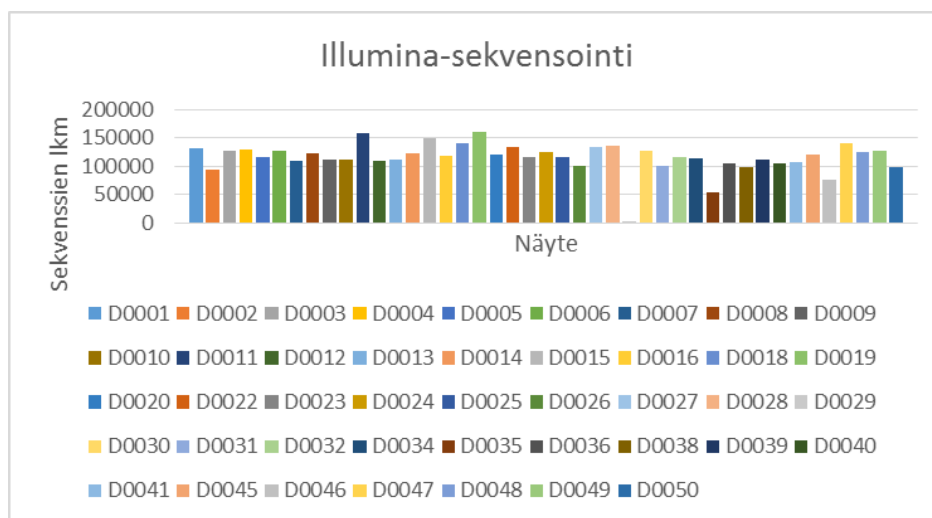
DNA-fragmenttien agarosigeelielektroforeesi-kuvat

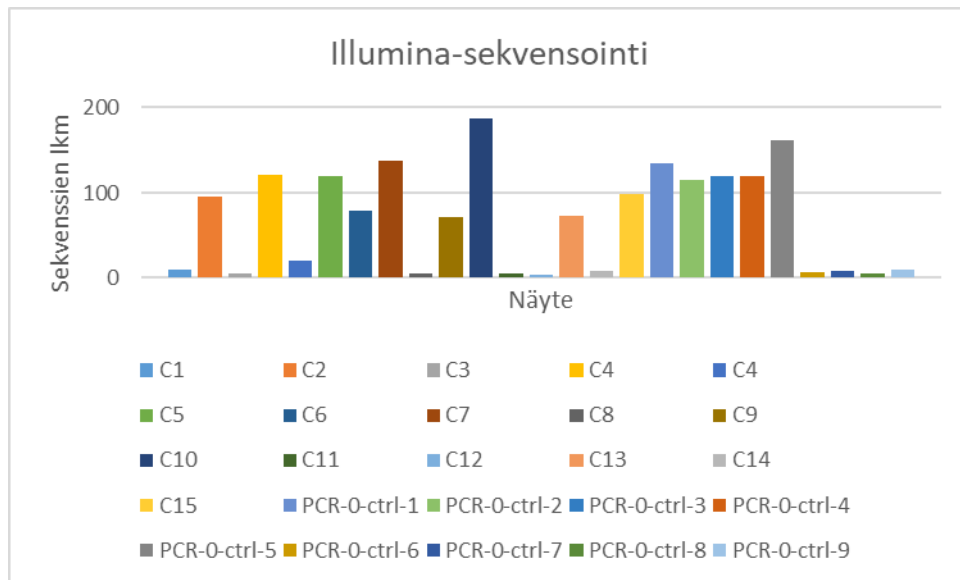






Näytteiden sekvenssien lukumäärät pylväsdiagrammissa





Illumina-sekvensoinnin ajodata

Instrument #	Robin		
Run #	322		
Date	20190528		
Description	Narco_16S/Sergei_Nextera		
pM	9,5		
Libraries	139+19(N)+1		
Template	AMP+DNA		
Operator	EV		
Workflow	FastQ		
Cycles	326-8-8-278		
Lot	20291966		
Lot	20308515		
K/mm2	956		
Clusters Passing Filter	85,61		
Comments			
phiX	V3 kitti, 1%oma Phix newA+T		
Type			
Estimated Yield / >=Q30 Yield & %	12,1 / 9,0 - 74,3%		
% phiX aligned (R1, R4, total)	0,40 / 0,41 / 0,41		
phiX error rate% (R1, R4, total)	20,68 / 17,26 / 18,95		
total)	206 / 535 / 415 / 205 / 340		
Q30 (R1, R2, R3, R4, total)	77,1 / 94,1 / 91,8 / 69,9 / 74,3		
Sample	Sample count	IN	
Narco 16S	139	89,00 %	63,00 %
Sergei test-pool, Nextera	19	10,00 %	32,30 %
PhiX oma new (Nextera)	1	1,00 %	0,40 %
Undetermined			4,30 %