

Opinnäytetyö (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikan koulutusohjelma

Biotekniikka

2011

Maija Liimatainen

# Kvantitatiiviseen qRT-PCR:ään perustuva menetelmä enterovirusten tyypittämiseksi



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU  
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

OPINNÄYTETYÖ (AMK) | TIIVISTELMÄ

TURUN AMMATTIKORKEAKOULU

Bio- ja elintarviketekniikan koulutusohjelma | Biotekniikka

Kesäkuu 2011 | Sivumäärä 47+ 5 liitettä

Ohjaajat: Ilari Suominen (FT), Petri Susi (Dosentti, FT) ja Riikka Österback (FM)

Maija Liimatainen

## Kvantitatiiviseen qRT-PCR:ään perustuva menetelmä enterovirusten tyypittämiseksi

Opinnäytetyön tavoitteena oli kehittää herkkä menetelmä, jolla tuotetaan spesifinen DNA-pala suoraan virus-RNA:sta käyttäen kvantitatiivista, reaaliaikaista käänteistranskriptio-polymeraasiketjureaktiota (qRT-PCR). Optimoinnissa keskityttiin enterovirusten VP1-alueen monistamiseen. Menetelmän optimointi tehtiin vaiheittain käyttäen ensin plasmidimuotoon kloonattuja virusgenomeja (PCR-vaihe) ja sitten virus-RNA:ta, joka on eristetty tunnetuista virustyypeistä sekä ns. RNA-transkripteja, joiden kopioluku on tunnettu. Lopuksi tutkittiin klinisiä virusnäytteitä, jotka edustavat todellista tunnistustilannetta, johon kehitettävää menetelmää aiotaan käyttää.

Työssä testattiin erilaisia kaupallisia tuotteita, joita käytetään qRT-PCR:n eri vaiheissa. Tällaisia tuotteita ovat mm. kaupalliset käänteistranskriptioentsyymit (RT-vaihe), polymeraasiketjureaktiossa käytettävät entsyymit (PCR-vaihe) ja VP1-geenin eri kohtiin sitoutuvat alukkeet. Työssä tutkittiin myös PCR-syklin eri vaiheiden pituuksien ja lämpötilojen vaikutuksia PCR-tuotteen muodostumiseen. Ajo-olosuhteita vertailtiin toisiinsa ajojen Ct-arvoja ja PCR-tuotteiden sulamiskäyriä tarkastelemalla. Kehitettävän VP1-menetelmän herkkyyttä verrattiin diagnostiikassa käytettävään, ns. ENRI RT-menetelmään. Tuotteen laatu tarkistettiin agarosigeelielektroforeesilla.

Työssä havaittiin merkittäviä eroja erilaisten kaupallisten tuotteiden välillä ja löydettiin VP1-geenin amplifointiin sopivat olosuhteet. Kehitetyllä menetelmällä saavutettiin parhaimmillaan 100 kopion herkkyys PCR-vaiheessa, kun standardina käytetyllä ENRI RT-menetelmällä herkkyys oli 10 kopiota. Kvantitatiivinen RT-PCR -menetelmä testattiin kokonaisuudessaan eri virustyypeillä. Työssä analysoitiin 24 tunnettua virustyyppiä, joista neljälle ei saatu sulamislämpötilaa, mikä saattoi osin johtua myös koettimien epäsovivuudesta. Lopputuloksena työssä kehitettiin herkkä qRT-PCR-menetelmä VP1-geeniin tuottamiseksi ja kvantitoimiseksi, mikä mahdollistaa isojen näytemäärien nopean käsittelyn ja hallinnan esimerkiksi epidemioiden aikana. Jatkotutkimuksissa tulee testata ja määrittää menetelmän toimivuus tekemällä qRT-PCR-ajoja potilasnäytteistä.

ASIASANAT: enterovirus, VP1, käänteistranskriptio, polymeraasiketjureaktio

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Bio technology and Food Technology | Bio technology

June 2011 | Total number of pages 47 + 5 appendices

Instructors: Ilari Suominen (PhD), Petri Susi (Dosentti, PhD) ja Riikka Österback (MSc)

Maija Liimatainen

## Quantitative qRT-PCR method for typing enterovirus

The goal of the thesis was to develop a sensitive method for enterovirus typing using a quantitative real-time polymerase chain reaction method. The qRT-PCR was targeted at the VP1 region of the enterovirus genome using both enteroviral cDNA clones, RNA transcripts and viral RNA isolated from clinical specimens.

Different commercially available reagents were tested during the study. These included reverse transcriptases (RT step), DNA polymerases (PCR step), and primer sets. The effect of temperature and time during PCR cycling was also analyzed. Individual runs were compared by Ct-values and melting curve analyses. The sensitivity of the method was compared with the ENRI RT method that is used in routine diagnostics. The quality of the PCR product was evaluated by agarose gel electrophoresis.

There were significant differences in the performance of the commercial reagents with respect to the amplification of the VP1 gene. The sensitivity of the optimized PCR method reached 100 copies which is close to the sensitivity of the ENRI RT method (10 copies). The enterovirus qRT-PCR method was tested with 24 different enterovirus types of which only four remained unamplified. However, this may be due to primer incompatibility. In the future, the method may prove to be useful in the analysis of epidemiological sample sets as well as in rapid screening of positive samples during outbreaks. The performance of the developed assay will be further evaluated using clinical specimens.

KEYWORDS: enterovirus, VP1, reverse transcription, polymerase chain reaction

# SISÄLTÖ

TIIVISTELMÄ

ABSTRACT

LYHENNELUETTELO

<b>1 JOHDANTO</b>	<b>5</b>
<b>2 IHMISEN ENTEROVIRUKSET</b>	<b>6</b>
2.1 Yleistä	6
2.2 Ihmisen enterovirusinfektiot	8
2.3 Diagnostiikka	10
<b>3 MENETELMÄT</b>	<b>13</b>
3.1 qRT-PCR	13
3.1.1 Käänteiskopiointireaktio (RT-reaktio)	13
3.1.2 Kvantitatiivinen polymeerasiketjureaktio (qPCR)	14
3.2 Entsyymit	17
3.3 Alukkeet	19
3.4 Agaroosigeelielektroforeesi	23
3.5 Näytteet	25
<b>4 TYÖN SUORITUS JA TULOKSET</b>	<b>26</b>
4.1 qPCR:n optimointi	26
4.2 RT-reaktio	33
4.3 qRT-PCR:n testaus tyypikannoilla	38
<b>5 TARKASTELU</b>	<b>43</b>
<b>6 PÄÄTELMÄT</b>	<b>44</b>
<b>LÄHTEET</b>	<b>46</b>

## LIITTEET

- Liite 1 Ihmisen enteroviruslajit ja niihin kuuluvat serotyypit
- Liite 2 qPCR-entsyymien työskentely: ohjeet ja ajo-olosuhteet
- Liite 3 Agaroosigeelielektroforeesi
- Liite 4 ENRI RT-PCR:n työohje
- Liite 5 RT-reaktion työohje

## KUVAT

Kuva 1 Pikonaviruksen rakenneproteiinit (Bamford ym., 2010, 451)	7
Kuva 2 Pikonavirusten lisääntymiskierto (Hyypiä ym., 2010)	8
Kuva 3 Pikonavirusgenomin rakenne (Ylä-Pelto & Susi, 2010)	11
Kuva 4 ENRI RT-PCR:n kuva ajosta (Susi, 2011)	11
Kuva 5 Sulamislämpötilat (Susi, 2011)	12
Kuva 6 Käänteistranskriptio (kuva muokattu: Solunetti, 2006)	14
Kuva 7 Polymeerasiketjureaktion periaate (Suominen ym., 2010, 157)	15
Kuva 8 Reaaliaikaisen PCR:n monistuskäyrä (Suominen ym., 2010, 167)	16
Kuva 9 PCR-tuotteen sulamiskäyrä (Suominen ym., 2010, 169)	17
Kuva 10 Partial-alukkeiden sijoittuminen cDNA synteesissä ja PCR:ssä (muokattu Nix ym., 2006)	20
Kuva 11 Simmonds-alukkeiden suunnat ja aloituskohdat	21
Kuva 12 Agaroosigeelielektroforeesi (Suominen ym., 2010, 127)	24
Kuva 13 Agaroosigeelielektroforeesi plasmidi-CAV9, Partial vs. Simmonds	31
Kuva 14 Agaroosigeelielektroforeesi A-, C- ja D-lajin PCR-tuoteista	40
Kuva 15 Agaroosigeelielektroforeesi B-lajin PCR-tuoteista (AN89f-88r)	41
Kuva 16 Agaroosigeelielektroforeesi B-lajin PCR1-tuoteista (EvB OS+OAS)	42
Kuva 17 Agaroosigeelielektroforeesi B-lajin PCR2-tuoteista (EvB IS+IAS)	42

## TAULUKOT

Taulukko 1 PCR-optimoinnin entsyymiseokset	18
Taulukko 2 RT-optimoinnin entsyymit	19
Taulukko 3 Optimoinnissa käytetyt alukkeet	22
Taulukko 4 Entsyymiseoksien herkkyiden vertailu	27
Taulukko 5 GoTaq <sup>®</sup> - ja KAPA <sup>™</sup> -seoksien herkkyys muilla enterovirusplasmideilla	28
Taulukko 6 Simmonds A-lajin alukkeiden testaus GoTaq <sup>®</sup> -seoksella	29
Taulukko 7 Simmonds B-lajin alukkeiden testaus KAPA <sup>™</sup> -seoksella	30
Taulukko 8 AN89f-88r ja B-lajin OS+OAS -alukkeiden vertailu ENRI RT-PCR:ään	32
Taulukko 9 RT-entsyymien vertailu	33
Taulukko 10 Alukkeiden vertailu	35
Taulukko 11 Transkriptit	36
Taulukko 12 Transkriptit	37
Taulukko 13 A-, C- ja D-lajeihin kuuluvien enterovirustyyppien qRT-PCR tulokset	38
Taulukko 14 B-lajin qRT-PCR:n tulokset	39

## Lyhenneluettelo:

Aluke	Lyhyt DNA-pala, joka sitoutuu komplementaariseen kohtaan DNA:ssa (tai RNA:han RT-reaktiossa)
cDNA	DNA:RNA-hybridi (engl. complementary DNA)
Ct-arvo	kynnysarvo; sykli, jossa PCR-tuotetta alkaa muodostua
DNA	deoksiribonukleiinihappo
HEV A-D	enterovirusten lajit A-D
Melt	sulamislämpötila PCR-tuotteelle
PCR-entsyymi	PCR-reaktiossa käytettävä entsyymi
qRT-PCR	kvantitatiivinen, reaaliaikainen käänteistranskriptio-polymeraasiketjureaktio (engl. real-time quantitative reverse transcriptase - polymerase chain reaction)
RNA	ribonukleiinihappo VP1-4 viruksen rakenneproteiineja
RT-entsyymi	RT-reaktiossa käytettävä entsyymi
ssRNA -genomi	single-stranded RNA, yksijuosteinen RNA -genomi
Tyyppi	serotyyppi; lajin jälkeen seuraava pienempi yksikkö
3' -pää	sekvenssin loppupää
5' -pää	sekvenssin alkupää

# 1 Johdanto

Opinnäytetyö tehtiin Turun yliopiston, Lääketieteellisen tiedekunnan Virusopin oppiaineessa. Opinnäytetyö on osa tutkimushanketta, jossa tutkitaan ihmisen pikornaviruksia, joihin myös enterovirukset kuuluvat. Työn tavoitteena oli optimoida enterovirusten qRT-PCR-menetelmä; virustyyppi voidaan tunnistaa eli tyypittää joko sekvensoimalla menetelmällä tuotettava PCR-tuote tai käyttämällä mikrosirumenetelmää PCR-tuotteen tunnistamiseen (Susi ym., 2009). Tyypityksessä virussekvenssiä (VP1-alue) verrattiin muihin pikornavirustyyppihin bioinformatiikan keinoin.

qRT-PCR:n optimoinnissa testattiin erilaisia kaupallisia valmiiksisekoitettuja reaktioseoksia sekä alukkeita, jotka sitoutuvat VP1-geenin eri kohtiin. PCR-vaihetta testattiin myös muuntelemalla syklausen eri vaiheiden lämpötiloja ja reaktioaikoja. Ajo-olosuhteita verrattiin toisiinsa Ct-arvojen ja PCR-tuotteiden sulamiskäyrien perusteella. Herkkyyttä verrattiin enterovirusdiagnoosissa käytettävään, ns. ENRI RT-menetelmään.

ENRI RT-menetelmässä alukkeet sitoutuvat virusgenomin 5'-päähän konservoituneeseen alueeseen, jolloin saadaan tuotettua 120 emäsparin (bp) PCR-tuote. Menetelmällä saavutetaan 10 kopion herkkyys ja sillä saadaan erotettua entero- ja rinovirukset toisistaan, mutta tyypityskäyttöön sekvenssierot ovat riittämättömiä.

qRT-PCR:n toimivuutta testattiin erilaisilla virusnäytteillä: virus-cDNA-klooneilla (virusgenomi DNA-muodossa), puhdistetuista viruksista eristetyillä virus-RNA:lla, *in vitro* RNA-transkripteilla ja soluviljelmissä kasvatetuista, tyypiviruksista eristetyillä RNA:illa. Lopputuotteiden laatu varmistettiin agarosigeelielektroforeesilla.

## 2 Ihmisen enterovirukset

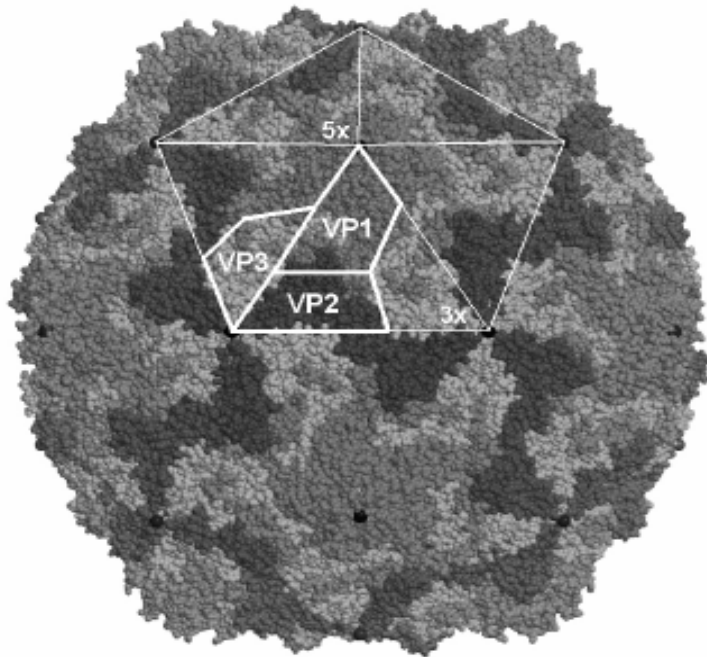
### 2.1 Yleistä

Ihmisen enterovirukset (HEVs=human enteroviruses) kuuluvat *Picornaviridae*-heimoon ja *Picornavirinae*-alaheimoon (Pikornavirukset). Pikornaviruksiin kuuluu 12 virussukua: *Enterovirus*, *Cardiovirus*, *Aphthovirus*, *Hepatovirus*, *Parechovirus*, *Erbovirus*, *Kobuvirus*, *Teschovirus*, *Sapelovirus*, *Senecavirus*, *Tremovirus* ja *Avihepatovirus*. Pikornaviruksia tunnetaan yli 300 tyyppiä ja uusia löydetään jatkuvasti. (Ylä-Pelto & Susi, 2010.)

Enteroviruksiin kuuluu 10 lajia: *Ihmisen enterovirus A* (HEV A -laji), *Ihmisen enterovirus B* (HEV B -laji), *Ihmisen enterovirus C* (HEV C -laji), *Ihmisen enterovirus D* (HEV D -laji), *Simian enterovirus A*, *Bovine enterovirus*, *Porcine enterovirus B*, *Ihmisen rhinovirus A*, *Ihmisen rhinovirus B* ja *Ihmisen rhinovirus C* (Picornaviridae.com. 2011). Liitteessä 1 on esitetty ihmisen enteroviruslajit ja niihin kuuluvat serotyypit.

Pikornavirukset ovat pieniä (läpimitaltaan 30 nm), vaipattomia RNA-viruksia, joiden ssRNA-genomin pituus on noin 7 500 emäksen mittainen. Viruksen RNA-genomia ympäröi kuori, joka koostuu 60 samanlaisesta rakenneyksiköstä. Näissä on kussakin yksi kappale neljää erilaista rakenneproteiinia. Kuvassa 1 on kuvattu kuinka VP1, VP2 ja VP3 muodostavat kuoren ulkopinnan. VP4 sijaitsee kuoren sisäpinnalla. (Hyypiä ym., 2010.)



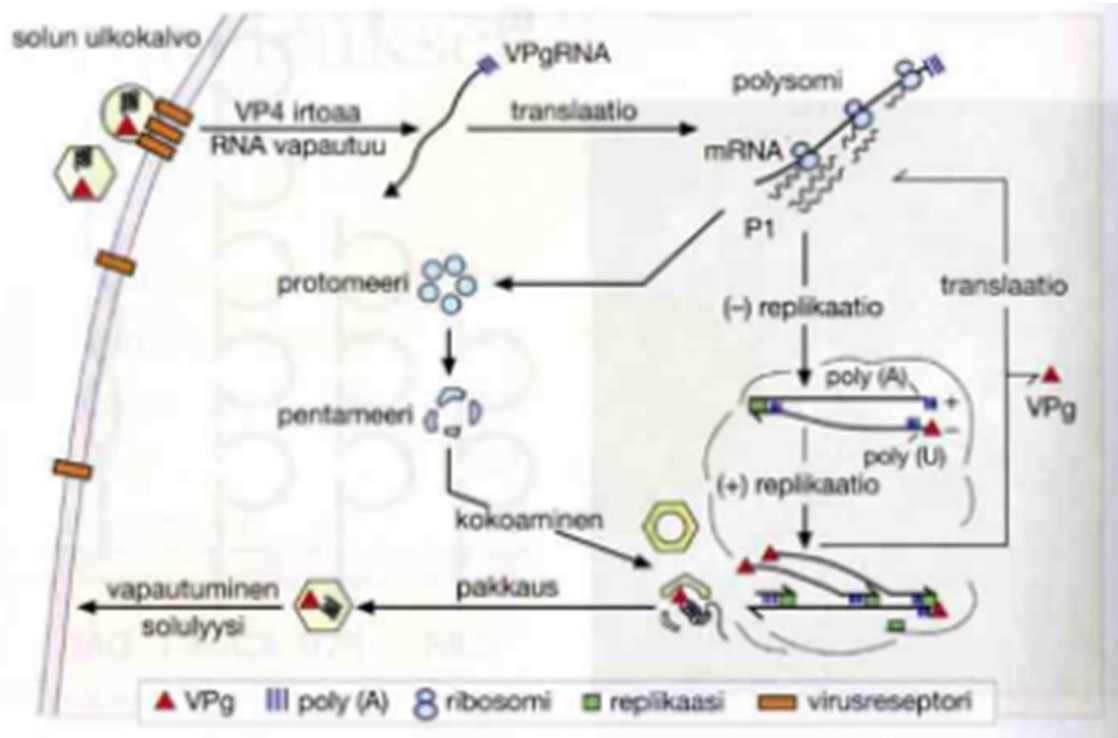


Kuva 1 Pikornaviruksen rakenneproteiinit (Bamford ym., 2010, 451)

Pikornaviruksen RNA on positiivissäikeinen, joten sen RNA pystyy suoraan toimimaan lähetti-RNA:na (m-RNA) proteiinisynteesissä (Ahola ym., 2010, 463). Kuvassa 2 on kuvattu, kuinka virus tarttuu solun pinnalle ja lisääntyy solussa. Virus tarttuu solun pinnalla olevaan reseptoriin ja pääsee sen avulla solun sisälle. Lähetti-RNA:n koodittamana syntyy suuri polyproteiini. Viruksen proteiinit pilkkoutuvat viruksen omien proteaasi-entsyymien avulla. Enterovirusten 2A-proteaasi pysäyttää välillisesti isäntäsolun oman proteiinisynteesin. Virus myös häiritsee solun RNA-synteesiä ja muuta aineenvaihduntaa. Näin virus valjastaa nopeasti isäntäsolun makromolekyylisynteesin omaan käyttöönsä. (Hyypiä ym., 2010.)

Virusgenomin monistamiseen osallistuu viruksen koodittama RNA:sta riippuvainen RNA-polymeraasi sekä muita viruksen ja solun proteiineja. Komplementaarista RNA:ta käyttäen RNA-polymeraasi tuottaa suuren joukon genomin kopioita. Osa genomin kopiosta käytetään lähetti-RNA:na rakenneproteiinien tuotannossa ja lisääntymiskierrossa. Osa genomin kopioista pakkautuu genomiksi solulimassa kypsyviin tytärviruksiin. RNA-polymeraasi tekee toimiessaan virheitä, jonka takia tytärvirukset poikkeavat toisistaan noin

yhden nukleotidin verran. Tytävirusista muodostuu virusparvi, josta valikoituu parhaiten lisääntyvät tai esimerkiksi hoidolle resistentit virukset. Valikoituneet tytäviruset vapautuvat infektoimaan uusia soluja. (Hyypiä ym., 2010.)



Kuva 2 Pikornavirusten lisääntymiskierto (Hyypiä ym., 2010)

## 2.2 Ihmisen enterovirusinfektiot

Enterovirustartunta saadaan yleensä hengitysteiden limakalvon tai ruoansulatuskanavan kautta kontaminoituneesta ruoasta. Kontaminoituneen ravinnon mukana enterovirukset pääsevät suoliston limakalvoille, sillä ne kestävät hyvin mahalaukun matalaa pH-arvoa. Itämissaika tartunnasta oireiden alkamiseen vaihtelee yhdestä vuorokaudesta pariin viikkoon. Akuutin vaiheen jälkeen ja taudin oireista riippumatta viruksen lisääntyminen voi jatkua suoliston limakalvon alaisessa imukudoksessa ja virusta voi erittyä ulosteeseen useita viikkoja, jopa kuukausia. Enterovirusinfektio voi kroonistua henkilöillä, joilla on vasta-ainevälitteisen immuunipuolustuksen toimintavajaus. (Hyypiä ym., 2010.)

HEV A -lajin tyypillisin virusten aiheuttama tauti on enterorokko, jonka oireita ovat kuumeilu ja rakkulainen ihottuma käsissä, jaloissa, pakaroissa ja suun limakalvoilla. Enterorokkoa aiheuttaa yleensä virustyyppit coxsackie A16 (CAV16) tai enterovirus 71 (EV71). Tautia esiintyy pieninä epidemioina syksyisin erityisesti lapsilla. Enterorokko luultavasti tartuttaa niin kauan kuin uusia rakkuloita syntyy. Rakkulat kuivuvat ja häviävät yleensä 5-7 vrk:n kuluessa. HEV A -lajin virukset aiheuttavat myös rakkulaista nielutulehdusta, johon liittyy kuumeilua. Coxsackie A7 -virustyyppi (CAV7) aiheuttaa aivokalvontulehdusta ja halvauksia. (Hyypiä ym., 2010.)

HEV B -lajin virukset aiheuttavat aivokalvon ja aivojen tulehdusta, joiden epidemioihin on liittynyt myös halvauksia. HEV B -virukset aiheuttavat vakavia vastasyntyneiden yleisinfektioita, jotka voivat levitä synnytysosastoilla. Oireyhtymään liittyy usein keskushermostoinfektio ja sydäntulehdus, jolloin taudinkulku on kohtalokasta. HEV B -genomia on löydetty kroonista sydänlihastulehdusta sairastavien potilaiden sydänlihaksesta. Harvinainen kylkiluuvälilihasten tulehdus on HEV B -lajin virusten aiheuttama. HEV B -lajin virukset aiheuttavat myös ihottumia ja hengitystieinfektioita. (Hyypiä ym., 2010.)

HEV C -lajiin kuuluva polioviruksen infektio voi ilmetä halvauksina ja muina keskushermostokomplikaatioina. Maailman terveysjärjestön tavoitteena on hävittää tauti ja poliovirus kokonaan maapallolta rokotusohjelmien avulla. Muut HEV C-lajin virukset aiheuttavat oireeltaan lievää flunssaa, joka paranee parissa viikossa. Lapsilla kuitenkin lisätautina esiintyy välikorvatulehdusta, nenän sivuonteloiden tulehdusta, astman vaikeutumista ja keuhkokuumetta. (Hyypiä ym., 2010.)

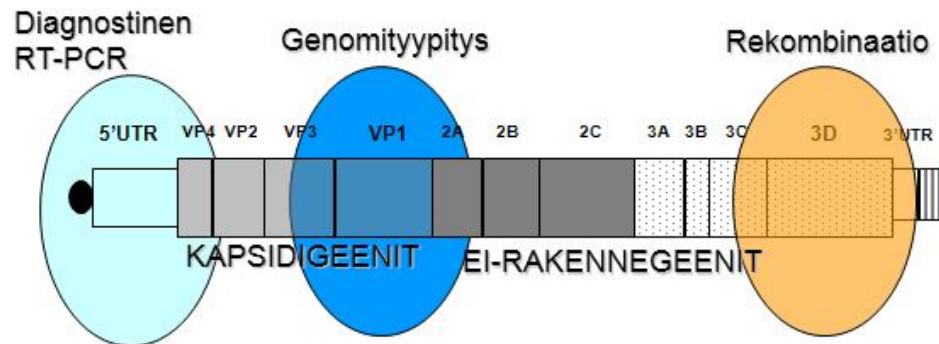
HEV D-lajin virukset (E68 ja E70) aiheuttavat ylähengitystieinfektioita, joiden jälkioireena voi esiintyä akuuttia sidekalvotulehdusta (Oberste ym., 2004). HEV D-lajin EV 94 enterovirusta esiintyy Egyptin jätevesissä ja sama virustyyppi on löydetty halvausoireisilta kongolaiselta lapselta (Smura ym., 2007). Suomalaisnaisten seeruminäytteistä on löydetty vasta-aineita EV 94 enterovirukselle (Smura ym., 2007).

Nuoruustyypin diabetes on autoimmuunitauti, jossa asteittain tuhoutuu insuliinia tuottavat haiman beetasolut. Perinnöllisen taipumuksen lisäksi on löydetty viitteitä siitä, että erityisesti enterovirusinfektiot vauhdittavat taudin puhkeamista. Diabeetikkojen haimasta ja siellä spesifisesti insuliinia-tuottavia soluja sisältävistä Langerhansin saarekkeista on löydetty enterovirusgenomia. Jos tulevaisuudessa saadan varmistettua syy-seuraussuhde, voidaan diabetesta mahdollisesti ehkäistä enterovirusrokotteella. (Hyypiä ym., 2010.)

### 2.3 Diagnostiikka

Enterovirusinfektioiden diagnostikka on perinteisesti perustunut soluissa tapahtuvaan virus-viljelytekniikkaan, joka kestää 1-4 viikkoa ja jonka tulos voidaan varmistaa neutralisaatiotestin avulla. Virusviljelyn hitauden takia virusviljelyn tulokset eivät ehdi vaikuttaa hoitopäätökseen. Tällä tavalla tunnistettavia viruksia kutsuttiin aiemmin serotyypeiksi, mutta nykyään (ja myös tässä työssä) käytetään tyyppi-nimitystä kaikista enterovirusista. Tyyppi viittaa siis enterovirukseen, joka tunnistetaan sekvenssin perusteella. Suuri joukko enterovirusten tyyppikannoista kasvaa yleisesti käytössä olevassa soluviljelmässä, mutta jotkut kliiniset näytteet saattavat sisältää viruksia, joiden viljely on vaikeaa. Tästä johtuen on kehitetty RT-PCR -menetelmä, jossa näytteessä olevan viruksen RNA-genomi muutetaan cDNA:ksi, josta monistetaan haluttu DNA-jakso PCR-menetelmällä. RT-PCR:n avulla voidaan todeta erittäin pieniä määriä virusgenomia, ja sillä voidaan tunnistaa myös sellaiset tyypit, jotka eivät lisäänty virusviljelyssä. (Hyypiä ym., 2010.)

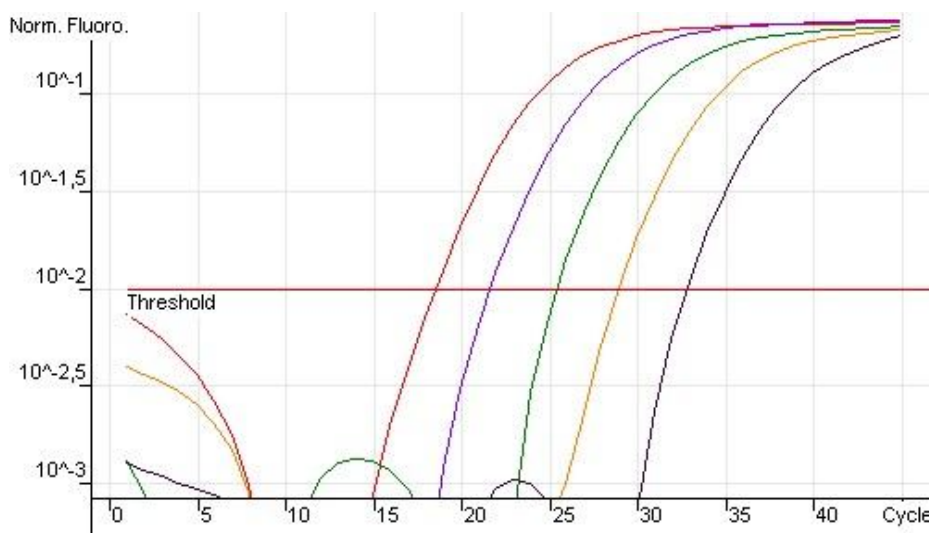
Diagnosointia nopeuttaakseen on kehitetty ENRI RT-PCR, jolla voidaan erottaa enterovirukset ja rhinovirukset toisistaan. ENRI RT-PCR on reaaliaikainen RT-PCR, jossa käytetään 5'-päähän sitoutuvia konservoituja alukkeita, joiden avulla voidaan tunnistaa kaikki tunnetut enterovirustyyppit (Kuva 3). ENRI RT-PCR:ssä monistetaan 120 bp:n pituista pätkää ja virukset saadaan erotettua toisistaan PCR-tuotteen sulamislämpötilan avulla. ENRI RT-PCR:n herkkyys on 10 kopiota. (Peltola ym., 2008.)



Kuva 3 Pikornavirusgenomin rakenne (Ylä-Pelto & Susi, 2010)

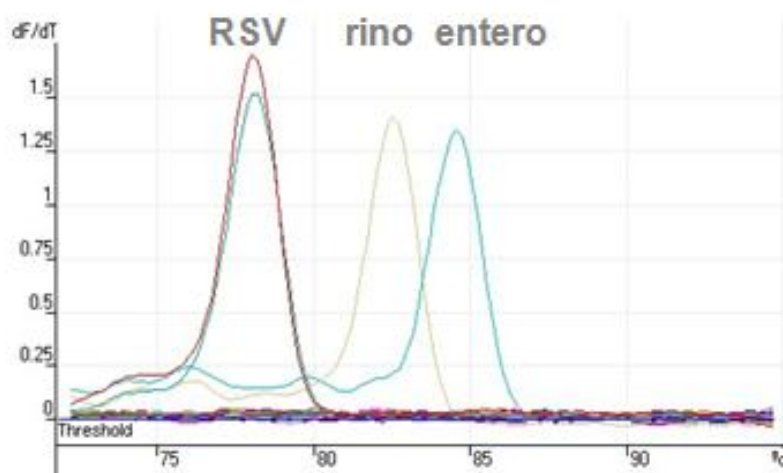
Virusen rakennegeenit (VP 1-4) ovat genomin 5'-päässä ja ei-rakenteellisia proteiineja koodaavat geenit on genomin 3'-päässä. VP1-geeniä käytetään tyyppityksessä. (Ylä-Pelto & Susi, 2010.)

Reaaliaikaisessa RT-PCR:ssä (Kuva 4) ajon etenemistä voidaan seurata reaaliajassa näytöltä. Treshold tarkoittaa asetettua kynnysarvoa, jonka tulee olla kaikissa ENRI RT-ajoissa sama, jotta voidaan verrata PCR-tuotteen syntyä. Ct-arvo kertoo missä vaiheessa ajoa (missä syklissä) lopputuotetta alkaa syntyä.



Kuva 4 ENRI RT-PCR:n kuva ajosta (Susi, 2011)

Kun tehdään RT-PCR:ää usean viruksen toteamiseksi samasta näytteestä, seoksessa käytetään useita alukepareja ja lopputuloksena syntyvät tuotteet voidaan luokitella niiden sulamislämpötilojen (Kuva 5) avulla. ENRI-RT-menetelmällä tuotetusta PCR-tuotteesta ei voida sekvenssoinnin avulla määrittää virustyyppiä, koska sekvenssierot ovat riittämättömiä (Susi, 2011).



Kuva 5 Sulamislämpötilat (Susi, 2011)

Genomityypityksessä monistetaan virusgenomin VP1-aluetta (tai sen osaa) (Kuva 3), ja sekvenssoinnin avulla siitä voidaan määrittää virustyyppi. VP1-alueen sekvenssillä tulee olla vähintään 75 % identtisyys ja yli 85 % amonihappoidenttisyys tunnettuun prototyyppiin, jotta voidaan sanoa, että kyseessä on sama virustyyppi (Oberste ym., 1999). VP1-alue on sopiva genomityypitykseen, koska VP1-alueella on sekvenssieroja virustyyppien välillä (Susi, 2011). Virustyyppityksen avulla voidaan nopeasti selvittää epidemioiden lähde, osoittaa tautiassosiaatio ja antaa niiden avulla tietoa tulevaisuuden lääke- ja rokotuskehitykseen.

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena on kehittää kvantitatiivinen RT-PCR-menetelmä VP1-alueen monistamiseksi.

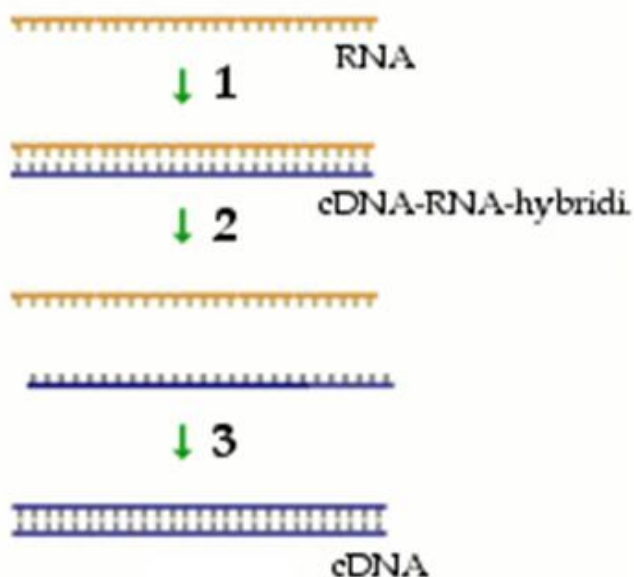
## 3 Menetelmät

### 3.1 qRT-PCR

qRT-PCR tarkoittaa kvantitatiivista reaaliaikaista käänteistranskriptio polymeraasiketjureaktiota (engl. Real-Time quantitative reverse transcriptase - polymerase chain reaction). (Suominen ym., 2010, 153-170.) Siinä on kaksi vaihetta: RT- eli käänteistranskriptio- ja PCR- eli polymeraasiketjureaktio, jotka voidaan tehdä perättäisissä reaktiosarjoissa eli kaksi-vaiheisena tai ns. yksiputkimenetelmänä, missä RT- ja PCR-vaiheissa tarvittavat komponentit on laitettu samaan putkeen ja syklaus tehdään samassa ajossa ilman, että putkia poistetaan PCR-laitteesta. Kvantitatiivisella ajolla tarkoitetaan mahdollisuutta kvantitoida tuntemattoman lähtömateriaalin määrää käyttäen hyväksi standardeja, joilla on tunnettu pitoisuus.

#### 3.1.1 Käänteiskopiointireaktio (RT-reaktio)

RT-reaktiossa yksijuosteinen RNA muutetaan kaksijuosteiseksi cDNA-RNA-hybridiksi (Solunetti, 2006). Hybridiä käytetään polymeraasiketjureaktiossa templaattina eli mallina (Solunetti 2006). RNA:n 3'-päähän liitetään spesifisesti sitoutuva aluke ja käänteiskopioijaentsyymien avulla syntetisoidaan yksijuosteinen RNA kaksijuosteiseksi cDNA-RNA-hybridiksi:ksi (engl. complementary DNA) (Suominen ym., 2010, 153-170) (kuva 6). Enterovirus-RNA käyttäytyy kuten mRNA (lähetti-RNA) ja siksi cDNA:ssa aluke sitoutuu nimenomaan RNA:n 3'-päähän (koska mRNA vastaa koodaavaa DNA:ta). cDNA toimii PCR:ssä templaattina ja RNA-juoste hajoaa PCR:n aikana.



Kuva 6 Käänteistranskriptio (kuva muokattu: Solunetti, 2006)

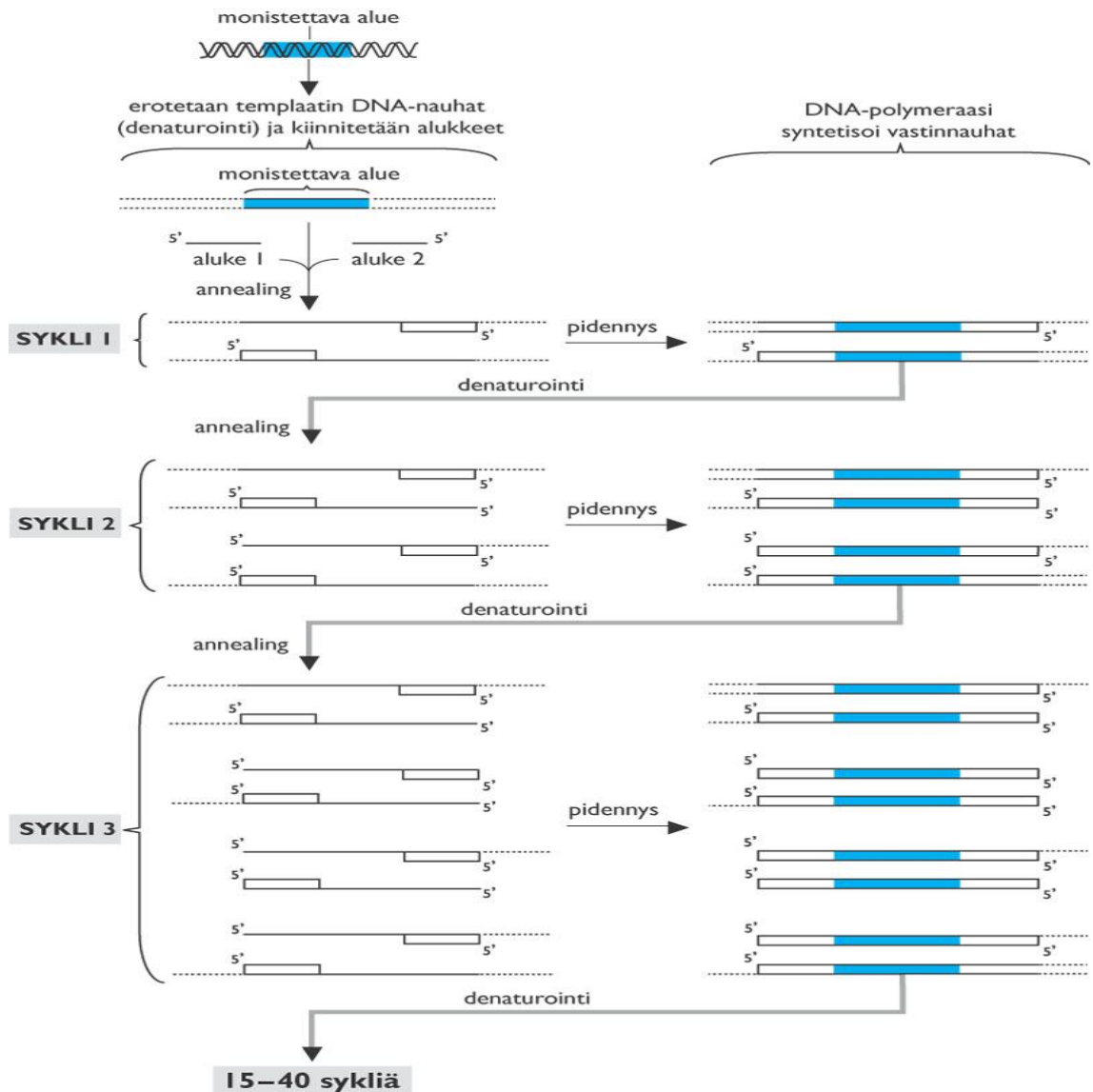
### 3.1.2 Kvantitatiivinen polymeraasiketjureaktio (qPCR)

qPCR:llä eli kvantitatiivisessa reaaliaikaisessa polymeraasiketjureaktiossa RT-reaktiossa tehdystä cDNA:sta monistetaan DNA-jakso, PCR-alukkeita käyttäen. Näistä toinen voi olla RT-reaktiossa käytetty 3'-pään aluke tai siitä cDNA:n alavirtaan sitoutuva aluke. PCR:ssä käytetään termostabiilia DNA-polymeraasia, joka ei inaktivoitu korkeissa lämpötiloissa (< 100 °C), ja siten mahdollistaa perättäisten PCR-syklauksten tekemisen ilman, että putkeen tarvitsee lisätä uutta entsyymiä. DNA-polymeraasin lisäksi käytetään kahta erilaista tunnettua aluketta, jotka kiinnittyvät kaksinauhaisen DNA:n vastinnauhoihin monistettavan DNA-nauhan vastakkaisiin päihin. Alukkeiden väliin jäävää aluetta monistetaan PCR:llä. (Suominen ym., 2010, 153-154.)

PCR:n syklit jakautuvat yleensä kolmeen vaiheeseen, joista ensimmäinen on denaturaatio, jossa lämpötila nostetaan +95 °C:seen, jonka vaikutuksesta templaattina käytetty cDNA-RNA-hybridin nauhat irtoavat toisistaan. Tämän jälkeen lämpötilaa lasketaan (+68 °C), jolloin alukkeet voivat kiinnittyä templaattiin niille komplementaarisiin kohtiin (=alukkeiden kiinnitys, annealing).



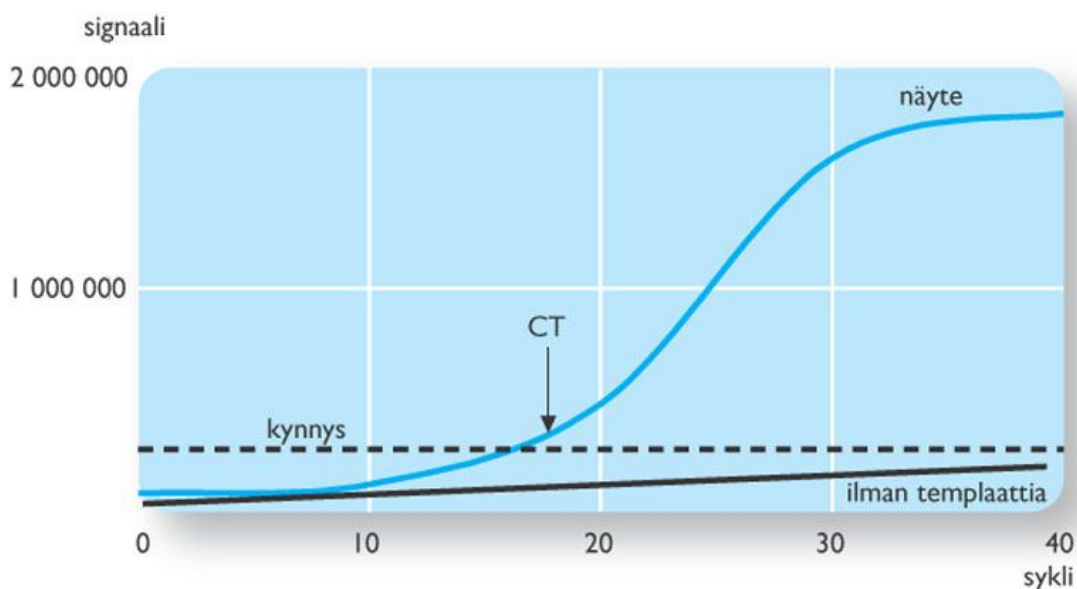
Lopuksi lämpötila nostetaan (+72 °C), jolloin DNA-polymeraasientsyymi alkaa liittää reaktioseoksessa olevia nukleotideja alukseen 3'-päästä lähtien templaatin mallin mukaisesti (=pidennysreaktio). Yhden syklin tuloksena syntyy kahdesta DNA-nauhasta neljä DNA-nauhaa. Eli monistettava alue monistuu eksponentiaalisesti eli sykli sykliltä sen määrä kaksinkertaistuu. Kuvassa 7 on esitetty PCR:n vaiheet. (Suominen ym., 2010, 154-155.)



Kuva 7 Polymeraasiketjureaktion periaate (Suominen ym., 2010, 157)

Reaaliaikaisessa PCR:ssä syntyvän tuotteen määrää voidaan seurata tietokoneen näytöltä. Seuranta perustuu fluoresoivan merkkiaineen (SyBR-väri) käyttöön, jonka fluoresenssisignaali moninkertaistuu värin sitoutuessa

valmistuvaan kaksinauhaiseen PCR-tuotteeseen. (On myös muita tapoja havaita lopputuote, mutta tässä työssä käytettiin ainoastaan SyBR-väriä). Fluoresenssisignaali ilmoitetaan laitekohtaisena fluoresenssiyksikkönä (RFU, engl. relative fluorescence unit). Fluoresenssisignaalin määrä korreloi DNA:n määrää. (Suominen ym., 2010, 166-167.)

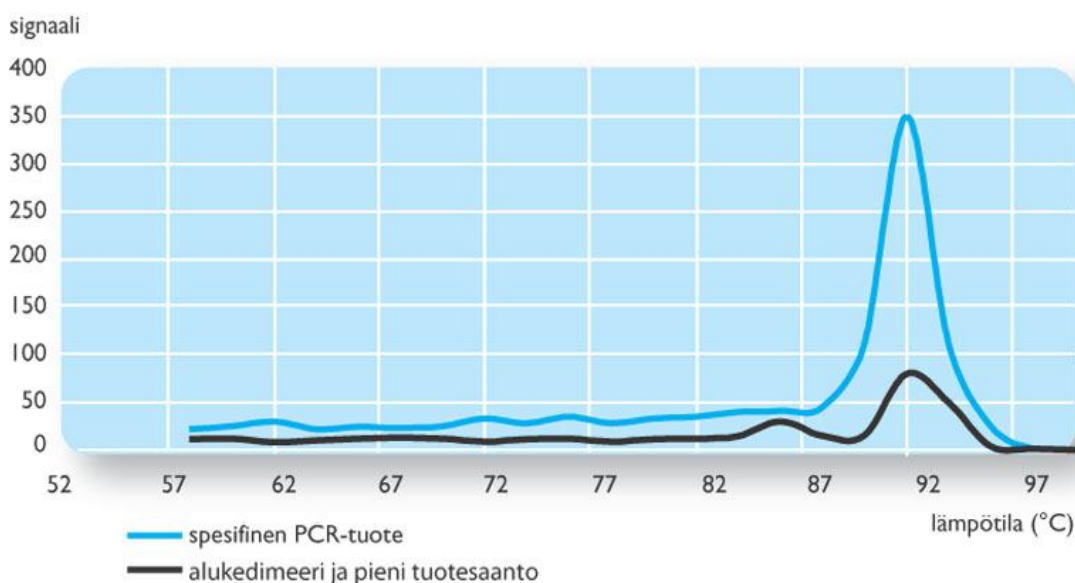


Kuva 8 Reaaliaikaisen PCR:n monistuskäyrä (Suominen ym., 2010, 167)

Ct-arvo eli kynnysyksi (threshold cycle) asetetaan manuaalisesti haluttuun kohtaan (kuva 8). Kynnysyksiin signaali ylittää tietyn kynnysarvon. Tässä työssä kynnysyksi asetetaan aina samaan kohtaan (Norm. Fluoro. arvolle  $10^{-2}$ ), jotta Ct-arvoja voidaan keskenään verrata toisiinsa. Mitä pienempi Ct-arvo, sitä aikaisemmin PCR-monistus on lähtenyt liikkeelle. Mitä alempi Ct-arvo on, sitä enemmän lähtömateriaalissa on tunnistettavaa tuotetta. Ct-arvo ja kopioluku suhteutuvat toisiinsa siten, että yksi kertaluokka eli 10-kertainen muutos herkkydessä vastaa 3,3-yksikön muutosta Ct-arvossa.

PCR-tuotteen oikeellisuus ja puhtaus todetaan sulamislämpötilakäyrän avulla. Lämmitettäessä kaksinauhaisen DNA:n nauhat erkanevat toisistaan sekvenssille ominaisessa lämpötilassa, jolloin kaksinauhaiseen DNA:han

sitoutunut merkkiaine (SYBR green) vapautuu, muodostaen fluoresenssisignaaliin. (Suominen ym., 2010, 168-169.)



Kuva 9 PCR-tuotteen sulamiskäyrä (Suominen ym., 2010, 169)

Kuvassa 9 on kuvattu sinisellä viivalla spesifinen PCR-tuote ja mustalla viivalla alukedimeeri ja pieni tuotesaanto (Suominen ym., 2010, 169). Alukedimeeri tarkoittaa sitä, että alukkeet sitoutuvat toisiinsa, jolloin niitä ei ole saatavilla riittävästi spesifisen tuotteen valmistamiseksi ja näin ollen saanto heikkenee (Suominen ym., 2010, 160).

### 3.2 Entsyymit

PCR:ssä käytetyt entsyymit ovat valmiita seoksia (engl. mastermix), jotka sisältävät kaiken muun paitsi alukkeet ja monistettavan templaatin. Valmistajat takaavat ja ilmoittavat entsyymien seoksien komponentit ja niiden määrät. Seokset sisältävät optimoidun PCR-puskurin, magnesiumkloridia, fluoresoivan merkkiaineen, dNTP+ dUTP ja PCR-entsyymin. Taulukossa 1 on esitetty työssä käytettyjen PCR-entsyymien tuotenumero, kaupalliset nimet, niissä käytetty polymeraasientsyymi ja valmistajan antama arvioitu kopiointipituus qPCR:ssä.

Taulukko 1 PCR-optimoinnin entsyymiseokset

Tuotenumero	qPCR-seoksen kauppanimi	PCR-entsyymi	Luvattu kopiointipituus
F-430L	<b>DyNAmo™ SYBR® Green 2-Step qRT-PCR Kit (Finnzymes)<sup>1</sup></b>	Muunnettu <i>Thermus brockianus</i> (Tbr) DNA polymeraasi (Hot Start)	50-250 bp
F-501S	<b>DyNAzyme™ II DNA Polymerase (Finnzymes)<sup>2</sup></b>	<i>Thermus brockianus</i> (Tbr) DNA polymeraasi (Lämpöä kestävä)	500 bp (lambda DNA) ja 6 kb (M13 DNA)
A6001	<b>GoTaq® qPCR Master Mix (Promega)<sup>3</sup></b>	Täyspitkä Taq DNA polymeraasi (Hot Start)	Ei mainintaa
KK4600	<b>KAPA™ SYBR® FAST qPCR Kits (KapaBiosystemens)<sup>4</sup></b>	Taq DNA polymeraasi	Paras tehokkuus 86-249 bp
L6544	<b>LuminoCt® SYBR® Green qPCR ReadyMix™ (Sigma)<sup>5</sup></b>	Taq DNA polymeraasi (JumpStart)	< 200 bp
#K0241	<b>Maxima® SYBR® Green/Fluorescein qPCR Master Mix (2X) (Fermantas)<sup>6</sup></b>	Kemiallisesti muunnettu Taq DNA polymeraasi (Hot Start)	70-150 bp

1 DyNAmo™ SYBR® Green 2-Step qRT-PCR Kit. 2010

2 DyNAzyme™ II DNA Polymerase. 2010

3 GoTaq® qPCR Master Mix. 2010

4 KAPA™ SYBR® FAST qPCR Kits. 2010

5 LuminoCt® SYBR® Green qPCR ReadyMix™. 2010

6 Maxima® SYBR® Green/Fluorescein qPCR Master Mix (2X). 2009

Käänteistranskriptiossa käytettiin kolmea kaupallista RT-entsyymiä. Tyypillisessä reaktioseoksessa on reaktiopuskuri, RNAasi-inhibiittori, dNTP-seos, alukkeet ja entsyymi. Taulukossa 2 on esitetty käänteistranskriptiossa käytetyt entsyymit: tuotenumero, kaupallinen nimi, ja RT-entsyymi. Valmistajien kuvauksissa ei kerrota lähdeä ImProm II -entsyymille.

Taulukko 2 RT-optimoinnin entsyymit

Tuotenumero	RT-seoksen kaupan nimi	RT-entsyymi
A3800	<b>Improm II™ Reverse Transcription System (Promega)<sup>1</sup></b>	ei ilmoitettu
#EP0351	<b>M-MuLV Reverse Transcriptase (Fermentas)<sup>2</sup></b>	Moloney Murine Leukemia -viruksesta eristetty käänteistranskriptaasi
18080-093	<b>SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen)<sup>3</sup></b>	Muunneltu Moloney Murine Leukemia -viruksesta eristetty käänteistranskriptaasi

1 Improm II™ Reverse Transcription System. 2010

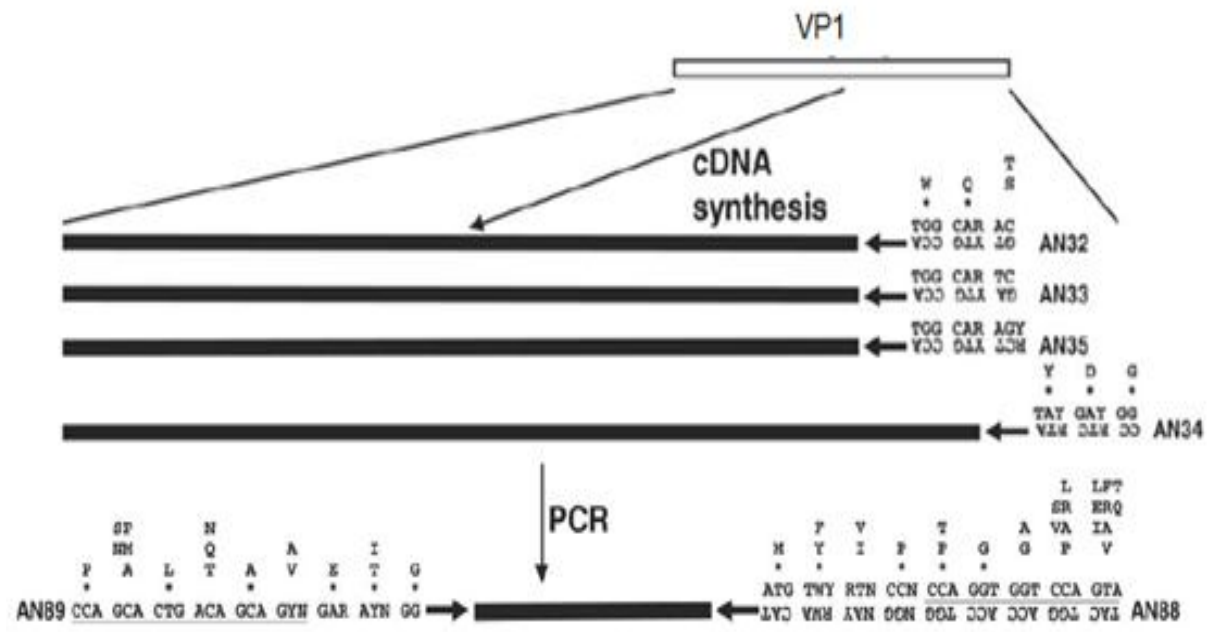
2 M-MuLV Reverse Transcriptase. 2010

3 SuperScript™ III Reverse Transcriptase. 2010

### 3.3 Alukkeet

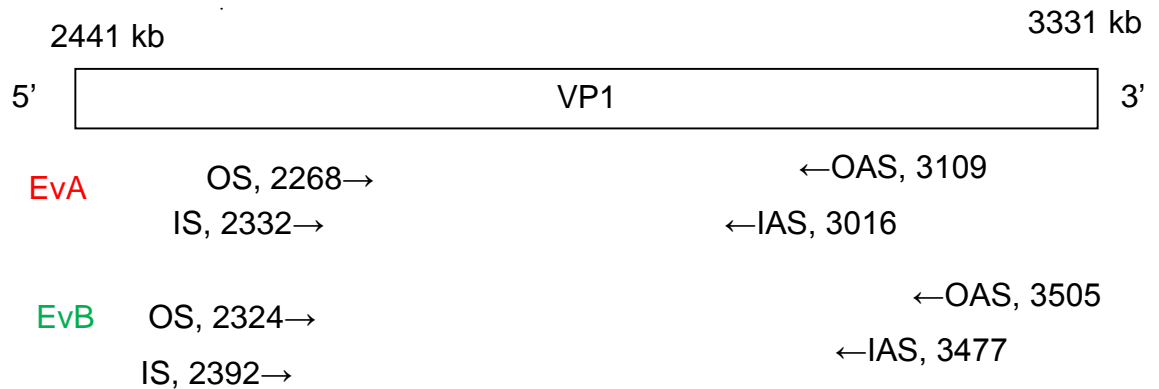
Tässä työssä tutkitaan ja verrataan VP1 osasekvenssialukkeita (Partial) ja koko vp1 sekvenssin alukkeita (Simmonds) toisiinsa. Kyseiset alukkeet on aiemmin kuvailtu (Nix ym. 2006 ja McWilliam Leitch 2009) ja ne tuottavat osan enterovirus-VP1-geenistä. Partial-alukkeet monistavat tuotetta, joka sijaitsee Simmonds-alukkeiden sisällä. Partial-alukkeisiin kuuluvat AN32r, AN33r, AN34r, AN35r (RT-reaktio) ja AN89f ja AN88r alukkeet (PCR-reaktio) (taulukko 3).

Kuvassa 10 on havainnollistettu alukkeiden sijoittuminen VP1-alueeseen sekä niiden kopiointisuunta. (Nix ym., 2006.)



Kuva 10 Partial-alukkeiden sijoittuminen cDNA synteessä ja PCR:ssä (muokattu Nix ym., 2006)

Simmondsin alukkeisiin kuuluvat enterovirus A- ja B-lajin (EvA/ EvB) OS (engl. outer sense), OAS (engl. outer antisense), IS (engl. inner sense) ja IAS (engl. inner antisense) alukkeet (taulukko 3, kuva 11). Alkuperäinen menetelmä on siis kaksivaiheinen eli ns. seminested PCR-menetelmä. OS- ja OAS-alukkeilla saadaan 841 kb (EvA) tai 1181 kb (EvB) pituiset sekvenssit (PCR1). IS- ja IAS-alukkeilla saadaan 684 kb (EvA) tai 1085 kb (EvB) pituiset sekvenssit (PCR2 eli nested-PCR:ä). Eli Simmonds-alukkeilla on tarkoituksena tehdä kaksi PCR-ajoa. Tällä tavoin saadaan herkkyyttä parannettua. (Mc William ym., 2008.)



Kuva 11 Simmonds-alukkeiden suunnat ja aloituskohdat

Partial- ja Simmonds-alukkeiden lisäksi testataan Random Hexamer Primer-aluketta käänteistranskriptiossa ja verrataan siitä johtuvaa herkkyyttä em. alukkeisiin. Random Hexamer Primer on kuuden emäksen aluke, jossa esiintyy G, A, T ja C nukleiinihappoja. Nukleiinihapot voivat olla missä vain järjestyksessä. Tämä tarkoittaa sitä, että aluke voi kiinnittyä kohdesekvenssin eri kohtiin.

Molemmilla RT-PCR-menetelmillä on väitetty kyettävän tunnistamaan kaikki tunnetut enterovirustyyppit. Työ ei siis ota kantaa alukeparien käytettävyyteen tunnistettaessa uusia enterovirustyyppijä vaan lähtöoletuksena on, että kumpi tahansa menetelmä on toimiva laaja-alaiseen enterovirustyyppitykseen.

Taulukko 3 Optimoinnissa käytetyt alukkeet

Eränumero	RT-alukkeen kauppanimi	Sekvenssi 5'-3'	Sijainti
HA01922952	EvA OS	CCN TGG ATH AGY AAC CAN CAY T <sup>a</sup>	2268
HA01922953	EvA OAS	GGR TAN CCR TCR TAR AAC CAY TG <sup>a</sup>	3109
HA01922954	EvA IS	TNA SNA TYT GGT AYC ARA CAN AYT <sup>a</sup>	2332
HA01922955	EvA IAS	GAN GGR TTN GTN GKN GTY TGC CA <sup>a</sup>	3016
HA01922956	EvB OS	GGY TAY ATN CAN TGY TGG TAY CAR AC <sup>a</sup>	2324
HA01922957	EvB OAS	GGT GCT CAC TAG GAG GTC YCT RTT RTA RTC <sup>a</sup>	3505
HA01922958	EvB IS	CTT GTG CTT TGT GTC GGC RTG YAA YGA YTT YTC WG <sup>a</sup>	2392
HA01922959	EvB IAS	TCY TCC CAC ACR CAV TTY TGC CAR TC <sup>a</sup>	3477
HA01922960	AN32r	GYTGCCA <sup>a</sup>	3009-3002
HA01922961	AN33r	GAYTGCCA <sup>a</sup>	3009-3002
HA01922962	AN34r	CCRTCRTA <sup>a</sup>	3111-3104
HA01922963	AN35r	RCTYTGCCA <sup>a</sup>	3009-3002
HA01922964	AN89f	CCAGCACTGACAGCAGYNGARAYNGG <sup>a</sup>	2602-2627 <sup>b</sup>
HA01922965	AN88r	TACTGGACCACCTGGNGGNAYRWACAT <sup>a</sup>	2977-2951 <sup>b</sup>
#S0142	Random Hexamer Primer	d(NNNNNN) <sup>c</sup>	

a Sigma. 2010. (R=A+G, Y=C+T, M=A+C, K=G+T, S=G+C, W=A+T, H=A+T+C, B=G+T+C, D=G+A+T, N=A+C+G+T, V=G+A+C)

b Sijainti määritetty PV1 Mahoney genomilla (GenBank tuotenumero J02281)

c Fermentas. 2010. (N= G, A, T tai C)



### 3.4 Agaroosigeelielektroforeesi

Agaroosigeelielektroforeesilla analysoidaan nukleiinihappoja (PCR:n tuotteita), joiden koko on noin 0,1 – 50 kb. Agaroosi on merilevästä eristetty polysakkaridi, joka kiehautettaessa liukenee geelipuskuriin. Jäähtyessään se muodostaa hyytelömäisen geelin. Nukleiinihappojen kulkeutuminen geelillä perustuu siihen, että ne ovat fosfaattiryhmiensä ansiosta happamia ja näin ollen negatiivisesti varautuneita. Kun PCR-tuotteen DNA joutuu sähkökenttään, se kulkeutuu kohti positiivista napaa. Agaroosigeelin verkkorakenne hidastaa suurempikokoisten fragmenttien kulkua ja pienempikokoiset fragmentit liikkuvat pidemmälle, jolloin saadaan erotettua erikokoiset fragmentit toisistaan omiksi vyöhykkeiksi. Vyöhykkeet kulkeutuvat niiden pituudelle ominaisella nopeudella. (Suominen ym., 2010, 122-123.)

Jotta vyöhykkeet saadaan näkyviin, ennen agaroosigeelin jähmettymistä siihen tulee lisätä etidiumbromidia (EtBr), joka tunkeutuu nukleiinihappojen emästen väliin. Kun DNA-etidiumkompleksia valaistaan ultraviolettivalolla, emäkset absorboivat UV-säteitä ja luovuttavat saamansa energian etidiumille, joka fluoresoi oranssinpunaisena värinä. (Suominen ym., 2010, 123.)

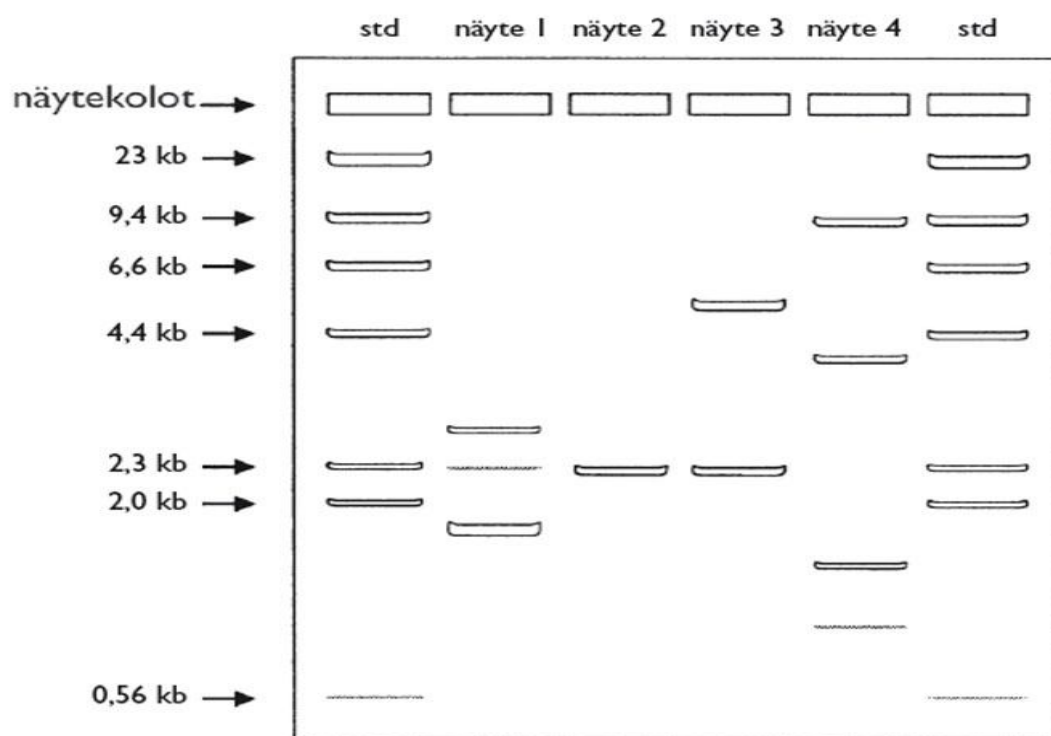
Geeli valmistetaan tarjottimelle, johon on liitetty näytekampa. Geelin jähmettyä näytekampa poistetaan, jolloin geeliin jää näytteille kolot. Valmistettu geeli upotetaan tarjottimessa ajoaltaaseen, jossa on ajopuskuria niin paljon, että geeli ja sen näytekolot peittyvät. Ajoaltaan päissä on elektrodit, joiden avulla sähkövirta saadaan kulkemaan ajopuskurin avulla geelin läpi. Ajopuskuri on samaa kuin geelipuskuri. (Suominen ym., 2010, 124.)

Näytteiden on oltava raskaampaa kuin ajopuskuri, sillä muuten ne eivät uppoa tasaisesti näytekoloihin vaan sekoittuisivat ajopuskuriin. Näytteisiin lisätään näytepuskuria. Näytepuskuri lisää PCR-tuotteen tiheyttä ja värjää sen näkyväksi, joillon se on helpompi pipetoida näytekoloon. (Suominen ym., 2010, 124.)

Jotta näytteiden fragmenttien koko saataisiin selville, on käytettävä kokostandardia. Kokostandardi on pilkottu tunnetun kokoisiksi fragmenteiksi.

Ajon aikana fragmentit kulkevat niille ominaisen matkan ja standardikartan avulla voidaan määrittää vyöhykkeiden koot (kb). (Suominen ym., 2010, 125.)

Ajo käynnistetään asettamalla turvakansi kiinni ja kytkemällä virtalähde päälle. Virran tulee kulkea siten, että DNA kulkee kohti +-napaa. Jännite on 20-200 V ja ajoaika 1-2 h. Ajon jälkeen geeli kuvataan UV-valon avulla ja tuloksia analysoidaan tietokoneohjelmalla tai manuaalisesti. (Suominen ym., 2010, 125.)



Kuva 12 Agarosigeelielektroforeesi (Suominen ym., 2010, 127)

Kuvassa 12 on kuvattu esimerkki geelijaosta. Oikeassa ja vasemmassa reunassa on sama tunnettu kokostandardi ja keskellä neljä eri näytettä. Kokostandardien avulla näytteiden fragmenttivyöhykkeiden koko voidaan määrittää. (Suominen ym., 2010, 127.)

Menetelmällä tarkistettiin qRT-PCR-tulokset. Tuotteen tunnistus perustuu värin intensiteettiin. RT-PCR:ssä ns. väärät positiiviset voivat saada sopivan Ct-

arvon, joten agarosigeelielektroforeesin avulla saadan varmistus tuotteen olemassa oloon.

### 3.5 Näytteet

Testattavat näytteet ovat plasmidivektorit, puhdistetut virus-RNA:t, RNA-transkriptit ja virustyyppikannat. Plasmidit ovat laboratoriokokeesta, virus-RNA:t on eristetty virustyyppikannoista, jotka ovat pääosin peräisin ATCC:ltä (American Type Culture Collection) tai muilta tutkijoilta. Potilasnäytteet on diagnosoitu ENRI RT-menetelmällä ja tunnistettu sekvensoimalla.

Tutkitut plasmidivektorit ovat pCAV16 (HEV A-laji), pCAV9 (HEV B-laji), pEV11 (HEV D-laji) ja pCAV21 (HEV C-laji). Plasmidivektoreissa enteroviruksen genomi on kloonattu DNA-muotoon tavalliseen plasmidivektoriin.

Tutkitut virus-RNA:t ovat CAV9, CBV4, ECHO11 ja ECHO30 (kaikki kuuluvat HEV B-lajiin). Niiden kopiolukua ei tunneta.

Transkriptit ovat CAV16 (HEV A-laji), E7 (HEV B-laji), E30 (HEV B-laji), CAV21 (HEV C-laji) ja EV70 (HEV D-laji). Transkriptit on tuotettu plasmidivektoreista, joissa RNA-viruksen virusgenomi on kloonattu DNA-muodossa T7-promootterin taakse ja josta on tuotettu virus-RNA T7-RNA-polymeraasilla in vitro transkriptioreaktiossa. Transkriptien kopioluku on tarkasti tunnettu.

Tutkitut tyyppikannat ovat:

- HEV A-laji: CAV2, CAV3, CAV6, CAV7, CAV10, CAV16 ja E71
- HEV B-laji: CAV9, CBV1, CBV4, ECHO1, ECHO7, ECHO9, ECHO11, ECHO17, ECHO18, ECHO30, ECHO31 ja ECHO6
- HEV C-laji: CAV1, CAV13, CAV15 ja CAV21
- HEV D-laji: E70

Tyypikannat ovat laboratoriokokeista (alunperin ATCC:ltä) ja tunnistettu neutralisoimalla. Potilasnäytteiden viruksen määrää on lisätty soluviljelmissä ja niistä on eristetty viruksien RNA.

## 4 Työn suoritus ja tulokset

### 4.1 qPCR:n optimointi

Työssä optimoidaan kvantitatiivinen reaaliaikainen polymeerasiketjureaktio vertailemalla kuuden (6) kaupallisen valmiiksi sekoitettujen (engl. mastermix) entsyymiseoksien toimivuutta ja herkkyyttä ja käyttäen kahdessa aiemmassa työssä kehitettyjä alukekokonaisuuksia. Näiden erona on se, että ns. Partial VP1-menetelmässä tuotetaan 340 bp lopputuotetta, kun taas Simmondsin alukkeiden tuote on 1000 bp. Koska qRT-PCR-seokset on pääosin kehitetty lyhyiden PCR-tuotteiden monistamiseen, tutkimuksen mielenkiinto oli todentaa, kuinka em. käytössä olevat tyypitysmenetelmät soveltuvat kvantitointiin. Käytetyt entsyymit on esitetty taulukossa 1. Herkkyyttä mitataan templaattina käytetyn HEV B-lajin plasmidi-CAV9 -enteroviruksen laimennoksilla  $10^7$ - $10^{-1}$ . Laimennos  $10^7$  tarkoittaa, että plasmidi-CAV9 -enterovirusta on 10 000 000 plasmidikopiota/ $\mu$ l. Pienimmässä laimennoksessa eli  $10^{-1}$  on 0,1 kopiota/ $\mu$ l. Käytännössä plasmidikopio vastaa viruskopion määrää ja siten menetelmällä voidaan osoittaa, kuinka monta virusgenomia käytettävät alukkeet ja reaktioseokset kykenevät tunnistamaan kvantitatiivisessa ajossa.

qPCR-ajossa käytettiin Partial VP1-alukkeita AN89f-88r, jotka kopioivat 349 bp pituista DNA-aluetta. Entsyymejä testattiin yksitellen niiden ohjeissa mainittujen ajo-olosuhteiden mukaan. Liitteessä 2 on kerrottu jokaisen qPCR-entsyymin työskentely ohjeet ja ajo-olosuhteet sekä toimivimmat ajo-olosuhteet. Tämän jälkeen testattiin entsyymien toimivuutta matalammassa annealing-lämpötilassa. Annealing-lämpötilan alentamisen johdosta qPCR:n Ct- ja sulamislämpötilakäyrän arvot paranivat huomattavasti. Sulamislämpötilakäyrä

kertoo tuotteen syntyisestä; korkea käyrä kertoo suuresta tuotesaannosta ja matala käyrä kertoo pienestä lopputuotteen määrästä.

Taulukossa 4 on esitetty entsyymiseokset ja niiden antamat parhaimmat Ct- ja sulamislämpökäyrän arvot eri plasmidi-CAV9 laimennoksille. Taulukosta havaitaan, että GoTaq® ja KAPA™ ovat parhaimmat, sillä niiden Ct-arvot ovat kaikista pienimmät. Tämä tarkoittaa sitä, että PCR-tuotetta alkaa syntyä kaikista aikaisemmin. Näiden entsyymien herkkyys on siten paras. Molemmilla entsyymeillä päästään  $10^2$  laimennokseen eli 100 kopiota/ $\mu$ l. DyNAmo™:lla ja Maxima®:lla päästään  $10^4$  eli 10 000 kopiota/ $\mu$ l herkkyuteen. DyNAzyme™:lla päästään  $10^5$  eli 100 000 kopiota/ $\mu$ l herkkyuteen ja LuminoCt®:lla vain  $10^6$  eli 1 000 000 kopiota/ $\mu$ l herkkyuteen.

Taulukko 4 Entsyymiseoksien herkkyiden vertailu

Seos *	DyNAmo™		DyNAzyme™		GoTaq®		KAPA™		LuminoCt®		Maxima®	
	Ct	Melt	Ct	Melt	Ct	Melt	Ct	Melt	Ct	Melt	Ct	Melt
pCAV9												
$10^7$	21,08	83,5	20,16	83,3	<b>16,45</b>	<b>85,5</b>	<b>10,69</b>	<b>84,7</b>	24,76	85,8	25,68	83,0
$10^6$	24,94	83,5	23,33	83,0	<b>21,27</b>	<b>85,7</b>	<b>14,69</b>	<b>84,8</b>	28,74	86,0	28,55	82,8
$10^5$	29,63	83,5	26,54	82,8	<b>25,99</b>	<b>86,0</b>	<b>18,55</b>	<b>84,8</b>	32,12	-	33,55	83,0
$10^4$	33,65	83,7	26,99	-	<b>30,10</b>	<b>86,0</b>	<b>22,20</b>	<b>84,8</b>	34,09	-	38,26	83,3
$10^3$	36,53	-	27,19	-	<b>33,48</b>	<b>86,5</b>	<b>25,92</b>	<b>85,0</b>	33,33	-	-	-
$10^2$	37,78	-	27,08	-	<b>35,60</b>	<b>86,3</b>	<b>28,50</b>	<b>85,2</b>	35,77	-	-	-
$10^1$	38,02	-	27,07	-	<b>40,04</b>	-	<b>30,19</b>	-	34,11	-	-	-
$10^0$	37,81	-	27,88	-	<b>40,00</b>	-	<b>30,25</b>	-	34,38	-	-	-
$10^{-1}$	37,32	-	26,90	-	<b>41,08</b>	-	<b>30,85</b>	-	33,96	-	-	-

\* DyNAzyme™:lla ja Maxima®:lla annealing-lämpötila on + 55 °C. Muilla seoksilla annealing-lämpötila on + 50 °C.

pCAV9:llä tehdyn analyysin perusteella jatkoanalyseissa päätettiin käyttää kahta parhaiten toiminutta qRT-PCR-seosta eli testattiin GoTaq<sup>®</sup>:n ja KAPA<sup>™</sup>:n herkkyyttä muilla enterovirusplasmideilla käyttämällä samoja AN89f-88r alukkeita kuin entsyymiseoksien vertailussa. Taulukossa 5 on kuvattu seoksien herkkyys plasmidi-CAV16 (HEV A-laji), -EV11 (HEV B-laji), ja -CAV21 (HEV C-laji). GoTaq<sup>®</sup>- ja KAPA<sup>™</sup>-seoksilla on sama herkkyys eri HEV-lajeilla. KAPA<sup>™</sup>-seoksella on kuitenkin selkeästi alemmat Ct-arvot eli sillä saadaan tuotetta syntymään hieman aikaisemmin kuin GoTaq<sup>®</sup>-seoksella.

Taulukko 5 GoTaq<sup>®</sup>- ja KAPA<sup>™</sup>-seoksien herkkyys muilla enterovirusplasmideilla

Seos	GoTaq <sup>®</sup>		KAPA <sup>™</sup>		GoTaq <sup>®</sup>		KAPA <sup>™</sup>		GoTaq <sup>®</sup>		KAPA <sup>™</sup>	
	pCAV16				pEV11				pCAV21			
Kopio-numero	Ct	Melt	Ct	Melt	Ct	Melt	Ct	Melt	Ct	Melt	Ct	Melt
10 <sup>7</sup>	27,47	85,3	<b>21,39</b>	<b>84,0</b>	12,80	86,0	<b>8,5</b>	<b>84,7</b>	18,56	84,3	<b>13,72</b>	<b>83,8</b>
10 <sup>6</sup>	30,61	85,5	<b>24,95</b>	<b>84,0</b>	16,52	86,2	<b>11,52</b>	<b>84,8</b>	22,10	84,5	<b>17,11</b>	<b>83,8</b>
10 <sup>5</sup>	33,38	86,0	<b>28,17</b>	<b>84,2</b>	20,43	86,2	<b>14,73</b>	<b>84,8</b>	27,02	84,7	<b>20,59</b>	<b>83,8</b>
10 <sup>4</sup>	41,42	-	<b>30,87</b>	-	25,07	86,3	<b>18,64</b>	<b>84,7</b>	31,23	84,8	<b>24,38</b>	<b>83,5</b>
10 <sup>3</sup>	37,93	-	<b>31,84</b>	-	29,04	86,5	<b>22,39</b>	<b>85,0</b>	34,04	85,2	<b>28,22</b>	<b>84,0</b>
10 <sup>2</sup>	Negt.	-	<b>31,87</b>	-	31,50	86,5	<b>25,55</b>	<b>85,0</b>	39,03	-	<b>30,95</b>	-
10 <sup>1</sup>	39,12	-	<b>32,44</b>	-	37,29	-	<b>30,26</b>	<b>85,2</b>	38,14	-	<b>32,17</b>	-
10 <sup>0</sup>	40,90	-	<b>31,68</b>	-	37,06	-	<b>31,60</b>	-	40,05	-	<b>31,70</b>	-
10 <sup>-1</sup>	Negt.	-	<b>32,77</b>	-	39,82	-	<b>32,64</b>	-	39,34	-	<b>32,22</b>	-

Tämän jälkeen testattiin Simmonds:n A- ja B-lajin alukkeiden toimivuus vastaavalla tavalla. HEV-A -laji testattiin plasmidi-CAV16:sta ja GoTaq<sup>®</sup>-seoksella. HEV-B -laji testattiin plasmidi-CAV9 ja KAPA<sup>™</sup>-seoksella. Taulukossa 6 on esitetty HEV-A -lajin alukeparit ja niistä tehdyn qPCR:n tulokset. Taulukosta huomataan, että alukepari OS+OAS toimii parhaiten, sillä herkkyys ylittää  $10^3$  kopiaan/ $\mu$ l.

Taulukko 6 Simmonds A-lajin alukkeiden testaus GoTaq<sup>®</sup>-seoksella

Alukeparit	OS+OAS		IS+IAS		OS+IAS		IS+OAS	
	Ct	Melt	Ct	Melt	Ct	Melt	Ct	Melt
$10^7$	17,32	86,5	23,78	86,5	14,47	85,7	23,39	87,3
$10^6$	23,84	86,2	27,03	86,5	20,21	85,5	29,27	87,5
$10^5$	29,29	86,2	25,01	-	22,52	85,7	32,99	-
$10^4$	31,51	86,2	26,12	-	21,38	86,0	36,43	-
$10^3$	34,20	86,5	23,21	-	22,02	-	35,33	-
$10^2$	-	-	11,00	-	21,86	-	42,23	-
$10^1$	44,42	-	19,93	-	22,74	-	25,94	-
$10^0$	-	-	9,02	-	22,33	-	37,91	-
$10^{-1}$	-	-	25,59	-	21,97	-	33,51	-

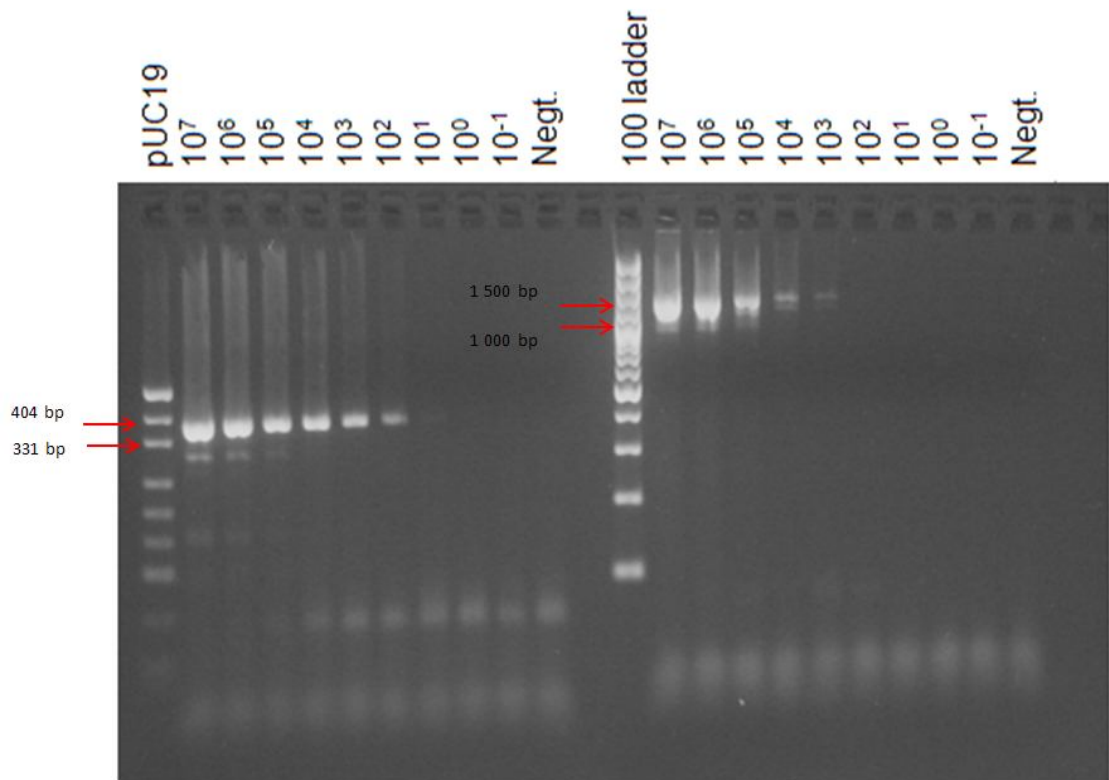
Taulukossa 7 on esitetty HEV-B -lajin alukeparit ja niistä tehdyn qPCR:n tulokset. Taulukosta huomataan, että kaikki muut paitsi alukepari IS+OAS ylittävät herkkyteen  $10^3$  kopiota/ $\mu$ l. Paras alukepari on kuitenkin OS+IAS, sillä niillä päästään parhaimpiin Ct-arvoihin.

Taulukko 7 Simmonds B-lajin alukkeiden testaus KAPA™-seoksella

Alukeparit	OS+OAS		IS+IAS		OS+IAS		IS+OAS	
	Ct	Melt	Ct	Melt	Ct	Melt	Ct	Melt
$10^7$	11,03	86,3	7,25	86,7	<b>6,73</b>	<b>86,5</b>	7,86	86,5
$10^6$	16,03	86,5	11,80	86,7	<b>11,76</b>	<b>86,7</b>	13,96	86,3
$10^5$	22,60	86,3	16,66	86,8	<b>16,78</b>	<b>86,5</b>	21,49	86,2
$10^4$	29,09	86,0	21,70	86,7	<b>21,23</b>	<b>86,5</b>	26,85	86,0
$10^3$	32,84	86,3	26,72	86,7	<b>24,68</b>	<b>86,5</b>	31,08	-
$10^2$	36,81	-	28,81	-	<b>28,63</b>	-	-	-
$10^1$	-	-	29,96	-	<b>30,12</b>	-	-	-
$10^0$	-	-	19,90	-	<b>29,97</b>	-	-	-
$10^{-1}$	-	-	34,16	-	<b>30,12</b>	-	-	-

Agaroosigeelielektroforeesilla todetaan, että PCR-tuote on todellinen ja oikeankokoinen. Liitteessä 3 on agaroosigeelielektroforeesin valmistus ja ajo-ohjeet. Kuvassa 13 plasmidi-CAV9 on vasemmalta lukien pUC19 kokomarkkeri, AN89f-88r -alukkeilla tehdyt PCR-ajon tuotteet laimennoksesta  $10^7$  laimennokseen  $10^{-1}$  ja PCR-ajon negatiivinen kontrolli sekä B-lajin alukkeilla OS+OAS tehdyt PCR-ajon tuotteet laimennoksesta  $10^7$  laimennokseen  $10^{-1}$  ja ajon negatiivinen kontrolli. Agaroosigeelielektroforeesi todentaa sen, että AN89f-88r -alukkeilla saavutetaan  $10^1$  herkkyys. PCR-tuote laimennoksella  $10^1$  näkyy erittäin heikosti, joten tuotetta on olemassa, mutta todella vähän. OS+OAS -alukkeilla saavutetaan  $10^3$  herkkyys.





Kuva 13 Agarosigeelielektroforeesi plasmidi-CAV9, Partial vs. Simmonds

Tyypitys-PCR-ajoja verrataan ENRI RT-PCR:ään käyttäen plasmidi-CAV9:llä tehtyjä PCR-ajoja (AN89f-88r - ja B-lajin OS+OAS -alukeparia). Liitteessä 4 on esitetty ENRI RT-PCR:n työhöje. Taulukossa 8 on esitetty näiden kolmen ajon PCR-tulokset. Siitä nähdään, että ENRI-RT-PCR:n herkkyys on 1 kopio/ $\mu$ l eli se havaitsee yhden (1) plasmidi-CAV9:n/ $\mu$ l. Taulukosta havaitaan myös se, että AN89f-88r alukepari on herkin käytetyistä alukepareista.

Taulukko 8 AN89f-88r ja B-lajin OS+OAS -alukkeiden vertailu ENRI RT-PCR:ään

Alukepari	AN89f-88r		OS+OAS		ENRI RT	
	KAPA™		KAPA™			
pCAV9	Ct	Melt	Ct	Melt	Ct	Melt
10 <sup>7</sup>	10,69	84,7	11,03	86,3	7,03	85,8
10 <sup>6</sup>	14,69	84,8	16,03	86,5	10,30	85,9
10 <sup>5</sup>	18,55	84,8	22,60	86,3	13,52	85,8
10 <sup>4</sup>	22,20	84,8	29,09	86,0	16,79	85,8
10 <sup>3</sup>	25,92	85,0	32,84	86,3	20,28	86,7
10 <sup>2</sup>	28,50	85,2	36,81	-	23,56	85,9
10 <sup>1</sup>	30,19	-	-	-	26,53	85,8
10 <sup>0</sup>	30,25	-	-	-	30,12	85,8
10 <sup>-1</sup>	30,85	-	-	-	-	-

Yhteenvetona PCR-optimointiajojen perusteella KAPA™-seoksella ja AN89f-88r -alukkeilla saadaan paras herkkyys. Toiseksi paras entsyymiseos on GoTaq®-seos. Työn seuraavassa vaiheessa käytettiin KAPA™- ja GoTaq®-seoksia saatavuuden mukaan ja osittain myös rinnakkaisissa ajoissa.

## 4.2 RT-reaktio

Käänteistranskriptioreaktion optimoinnissa verrataan kolmea kaupallista RT-entsyymiä sekä erilaisia alukkeita. Luvussa 3.2 on esitetty käytetyt entsyymit (taulukko 2) ja luvussa 3.3 on esitetty käytetyt alukkeet (taulukko 3). Taulukossa 9 on esitetty CAV9- ja Echo1-RNA:sta tuotettujen RCP-tuotteiden Ct-arvot käyttäen kolmea RT-entsyymiä. cDNA on tuotettu joko AN32-35- tai AN88r-alukkeilla. Enterovirustyyppien laimennoksien tarkkoja kopiointilukuja ei ole tiedossa. Liitteessä 5 on kuvattu RT-reaktion työohjeet.

Taulukko 9 RT-entsyymien vertailu

Entsyymi	Improm II™ Reverse Transcription System				M-MuLV Reverse Transcriptase				SuperScript™ III Reverse Transcriptase			
	AN32-35		AN88r		AN32-35		AN88r		AN32-35		AN88r	
Laimennos	Ct	Melt	Ct	Melt	Ct	Melt	Ct	Melt	Ct	Melt	Ct	Melt
CAV9 10 <sup>-2</sup>	16,86	84,7	12,03	84,7	18,37	84,7	9,06	-	18,86	84,5	18,63	84,5
CAV9 10 <sup>-3</sup>	21,80	85,0	18,42	84,7	23,66	84,8	5,70	-	23,23	84,7	17,71	84,5
CAV9 10 <sup>-4</sup>	26,25	85,0	16,17	-	26,21	84,7	9,56	-	26,11	84,8	22,63	-
ECHO11 10 <sup>-2</sup>	15,28	85,0	13,50	84,7	15,29	85,0	8,97	84,5	14,53	84,8	12,90	84,7
ECHO11 10 <sup>-3</sup>	19,81	85,0	15,62	85,0	19,88	84,8	10,54	84,5	19,15	84,7	15,49	84,8
ECHO11 10 <sup>-4</sup>	24,11	85,2	17,41	84,8	24,7	84,8	9,94	-	24,2	85,0	15,11	84,8

Taulukosta 9 havaitaan, että M-MuLV Reverse Transcriptase -entsyymi on heikoin, sillä sen avulla ei saada ollenkaan tuloksia AN88r-alukkeella ja CAV9:llä. M-MuLV Reverse Transcriptase -entsyymillä ja AN88r-alukkeella ei saada CAV9:lle sulamislämpötiloja ja ECHO11:sta ei saada sulamislämpötilaa viimeiselle laimennokselle. ECHO11:sta herkkyys ei yllä Improm II™ Reverse Transcription System - ja SuperScript™ III Reverse Transcriptase -entsyymien

tasolle. Improm II™ Reverse Transcription System -entsyymi on paras, koska sillä päästään alhaisimpiin Ct-arvoihin kuin SuperScript™ III -entsyymillä.

Tämän jälkeen jatkettiin RT-alukkeiden testausta siten, että RT-reaktio tehtiin CAV9, ECHO11, CBV4 ja ECHO30 -virustyypeille Hexamer Primer -, EvB OAS - tai EvB IAS -alukkeilla. cDNA-tuotteiden toimivuutta testattiin ajamalla PCR-ajo KAPA™-seoksella ja eri alukepareilla. Alukepareina olivat AN89f-88r, EvB IS+EvB IAS sekä EvB OS+EvB OAS. Parhaimmat tulokset saatiin alukeparilla AN89f-88r. Taulukossa 10 on esitetty cDNA-tuotteiden PCR-ajojen tulokset, kun PCR-ajossa on käytetty KAPA™-seosta ja AN89f-88r -alukeparia. (Testauksissa on käytetty useammin SuperScript™ III -entsyymiä, koska ImProm II -entsyymiä ei ole saatavilla toimitusvaikeuksien takia.)

Taulukko 10 Alukkeiden vertailu

Entsyymi	Improm II™ Reverse Transcription System		SuperScript™ III Reverse Transcriptase			
	Random Hexamer Primer		EvB OAS		EvB IAS	
Laimennos	Ct	Melt	Ct	Melt	Ct	Melt
CAV9 10 <sup>-2</sup>	22,22	84,8	9,48	84,5	10,19	84,5
CAV9 10 <sup>-3</sup>	27,31	84,8	7,68	84,5	11,14	-
CAV9 10 <sup>-4</sup>	30,88	85,2	10,70	-	5,24	-
ECHO11 10 <sup>-2</sup>	18,83	84,8	5,87	84,8	10,70	84,7
ECHO11 10 <sup>-3</sup>	23,82	85,0	6,05	85,0	11,97	84,5
ECHO11 10 <sup>-4</sup>	28,93	85,2	9,92	85,2	10,99	-
CBV4 10 <sup>-2</sup>	20,01	84,0	11,71	84,0	11,85	83,5
CBV4 10 <sup>-3</sup>	24,80	84,0	8,10	83,7	12,03	-
CBV4 10 <sup>-4</sup>	29,76	84,2	6,18	-	4,92	-
ECHO30 10 <sup>-2</sup>	16,18	84,0	15,35	84,0	13,79	84,0
ECHO30 10 <sup>-3</sup>	21,73	84,0	7,28	84,0	12,24	83,5
ECHO30 10 <sup>-4</sup>	25,86	84,2	17,72	84,2	11,92	-

Taulukosta 9 ja 10 havaitaan, että Improm II™ -entsyymillä ja AN32-35 -alukkeella sekä Random Hexamer Primer -alukkeella saadaan kaikista parhaimmat herkkyudet. Näiden tietojen pohjalta verrataan AN32-35 alukeita Random Hexamer Primer -alukkeeseen kolmessa eri PCR-ajossa: KAPA™-seos + AN89f-88r -alukepari, KAPA™-seos + EvB OS+OAS -alukepari ja ENRI RT-PCR. Taulukossa 11 ja 12 on esitetty ajojen tulokset.

Taulukko 11 Transkriptit

RT-alue	AN32-35						Random Hexamer Primer					
PCR- alukepari	AN89f-88r		EvB OS+OAS		ENRI 5'		AN89f-88r		EvB OS+OAS		ENRI RT	
Laimennos	Ct	Melt	Ct	Melt	Ct	Melt	Ct	Melt	Ct	Melt	Ct	Melt
CAV16 10 <sup>4</sup>	33,12	-	32,92	-	23,84	84,8	32,02	-	36,06	-	22,96	<b>85,0</b>
CAV16 10 <sup>3</sup>	31,15	-	31,84	-	27,24	84,7	31,79	-	37,18	-	27,07	<b>84,8</b>
CAV16 10 <sup>2</sup>	33,10	-	31,74	-	33,21	84,8	31,96	-	-	-	29,94	<b>85,0</b>
CAV16 10 <sup>1</sup>	34,41	-	30,10	-	-	-	32,36	-	-	-	31,48	<b>84,8</b>
CAV16 10 <sup>0</sup>	33,49	-	32,00	-	-	-	31,91	-	-	-	-	-
ECHO7 10 <sup>4</sup>	21,26	83,5	34,09	-	23,85	82,8	22,77	<b>83,5</b>	32,58	86,0	21,34	<b>82,8</b>
ECHO7 10 <sup>3</sup>	24,89	83,7	33,89	-	27,01	82,5	26,38	<b>84,0</b>	34,89	-	24,81	<b>82,7</b>
ECHO7 10 <sup>2</sup>	29,68	84,2	29,44	-	30,76	82,7	30,73	<b>84,2</b>	35,99	-	28,56	<b>82,8</b>
ECHO7 10 <sup>1</sup>	31,66	-	31,00	-	-	-	32,38	-	37,08	-	31,39	<b>82,8</b>
ECHO7 10 <sup>0</sup>	33,78	-	31,93	-	-	-	31,27	-	34,58	-	-	-
ECHO30 10 <sup>4</sup>	24,06	84,7	32,20	-	23,36	85,0	24,68	<b>84,8</b>	34,21	-	22,32	<b>84,8</b>
ECHO30 10 <sup>3</sup>	27,79	84,8	32,96	-	26,61	85,0	28,16	<b>85,0</b>	38,40	-	25,28	<b>84,7</b>
ECHO30 10 <sup>2</sup>	33,18	-	32,58	-	30,21	84,8	31,34	-	-	-	29,39	<b>84,7</b>
ECHO30 10 <sup>1</sup>	32,65	-	32,36	-	-	-	32,47	-	35,20	-	33,09	<b>84,5</b>
ECHO30 10 <sup>0</sup>	34,49	-	31,16	-	-	-	31,76	-	36,52	-	-	-

Taulukko 12 Transkriptit

RT-alue	AN32-35						Random Hexamer Primer					
	AN89f-88r		EvB OS+OAS		ENRI RT		AN89f-88r		EvB OS+OAS		ENRI RT	
PCR- alukepari	Ct	Melt	Ct	Melt	Ct	Melt	Ct	Melt	Ct	Melt	Ct	Melt
Laimennos												
CAV21 10 <sup>4</sup>	31,09	-	32,85	-	25,30	83,2	30,24	<b>84,2</b>	34,57	-	25,07	<b>83,2</b>
CAV21 10 <sup>3</sup>	32,99	-	31,57	-	29,20	83,2	31,07	-	36,54	-	28,23	<b>83,0</b>
CAV21 10 <sup>2</sup>	31,41	-	34,25	-	33,20	83,2	32,64	-	-	-	30,76	<b>83,2</b>
CAV21 10 <sup>1</sup>	32,02	-	33,89	-	-	-	32,17	-	-	-	-	-
CAV21 10 <sup>0</sup>	31,51	-	12,43	-	-	-	32,44	-	-	-	-	-
EV70 10 <sup>4</sup>	33,55	-	29,45	-	23,06	83,3	31,70	-	36,18	-	21,93	<b>83,5</b>
EV70 10 <sup>3</sup>	34,16	-	33,84	-	26,94	83,3	32,01	-	-	-	26,02	<b>83,3</b>
EV70 10 <sup>2</sup>	33,93	-	33,04	-	30,15	83,0	31,73	-	37,71	-	30,55	<b>83,0</b>
EV70 10 <sup>1</sup>	33,18	-	32,31	-	-	-	31,88	-	37,51	-	32,35	<b>83,0</b>
EV70 10 <sup>0</sup>	34,66	-	-	-	-	-	32,38	-	-	-	-	-

Taulukkoihin 11 ja 12 on tummennettu ne kohdat, jotka vaikuttavat siihen, että Random Hexamer Primer on alukkeena parempi kuin AN32-35 alue. Ainoastaan CAV21 AN32-35 alukkeella päästään samaan herkkyteen ENRI RT-PCR:ssä kuin Random Hexamer Primer -alukkeella. Muilla enterovirustyypeillä Random Hexamer Primer:n herkkyys on aina yhtä parempi kuin AN32-35 -alukkeilla. On huomioitava, että EvB OS+OAS -alukkeet ei tietenkään toimi A, C ja D -lajin tyypeillä.

RT-optimoinnissa paras RT-entsyymi on Improm II™ -entsyymi ja paras alue cDNA:n muodostamiseen on Random Hexamer -alue.

### 4.3 qRT-PCR:n testaus tyyppikannoilla

Tyyppikannat testataan optimoidulla qRT-PCR:llä. RT-reaktiossa käytetään Improm II™ -entsyymiä ja Random Hexamer -aluketta. qPCR suoritetaan GoTaq®-seoksella ja AN89f-88r -alukkeilla. B-lajin virukset testataan myös EvB alukkeilla (PCR1 OS+OAS ja PCR2 IS+IAS). Taulukossa 13 on esitetty A-, C- ja D-lajiin kuuluvien näytteiden qRT-PCR:n tulokset ja taulukossa 14 on taulukoitu B-lajin AN89f-88r -, OS+OAS - ja IS+IAS -alukkeilla saadut tulokset.

Taulukko 13 A-, C- ja D-lajeihin kuuluvien enterovirustyyppien qRT-PCR tulokset

Laji	Virustyyppi	Ct	Melt
A-laji	CAV2	17,30	84,2
A-laji	CAV3	22,51	86,0
A-laji	CAV6	18,53	86,5
A-laji	CAV7	20,22	-
A-laji	CAV10	17,73	85,5
A-laji	CAV16	21,66	85,2
A-laji	E71	16,63	-
C-laji	CAV1	17,35	82,7
C-laji	CAV13	22,69	84,5
C-laji	CAV15	12,21	85,2
C-laji	CAV21	18,00	-
D-laji	E70	20,47	83,8

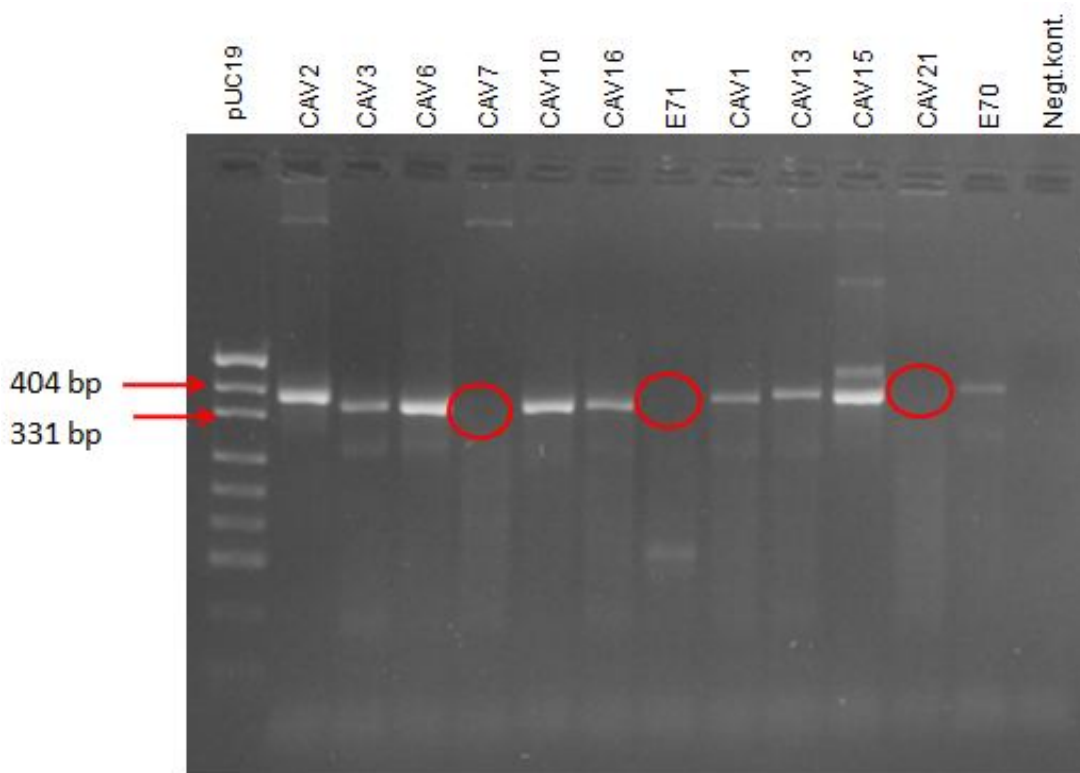


Taulukko 14 B-lajin qRT-PCR:n tulokset

Virustyyppi	AN89f-88r		PCR1: OS+OAS		PCR2: IS+IAS	
	Ct	Melt	Ct	Melt	Ct	Melt
CAV9	14,18	87,2	20,52	86,3	8,17	84,8
CBV1A	18,24	85,5	22,43	-	2,83	83,0
CBV4	18,81	85,0	31,09	84,3	12,31	81,7
ECHO1	15,36	84,0	26,31	84,7	2,28	83,0
ECHO7	12,53	84,3	30,56	85,5	2,42	83,5
ECHO9	14,33	87	24,69	85,5	1,59	81,8
ECHO9	19,99	86,7	31,08	85,5	2,93	82,7
ECHO11	10,53	86,2	21,77	85,5	2,26	83,8
ECHO11	11,46	86,2	22,18	85,3	2,26	83,3
ECHO17	17,27	84,5	28,99	-	2,86	85,7
ECHO18	15,86	83,5	31,87	-	15,15	80
ECHO30	7,37	85,3	21,06	83	12,42	80,7
ECHO30	7,47	85,3	20,72	82,8	2,27	81,3
ECHO31	22,86	-	30,26	81,5	13,37	80,5
ECHO6	12,07	85,3	29,37	85	2,34	86,2

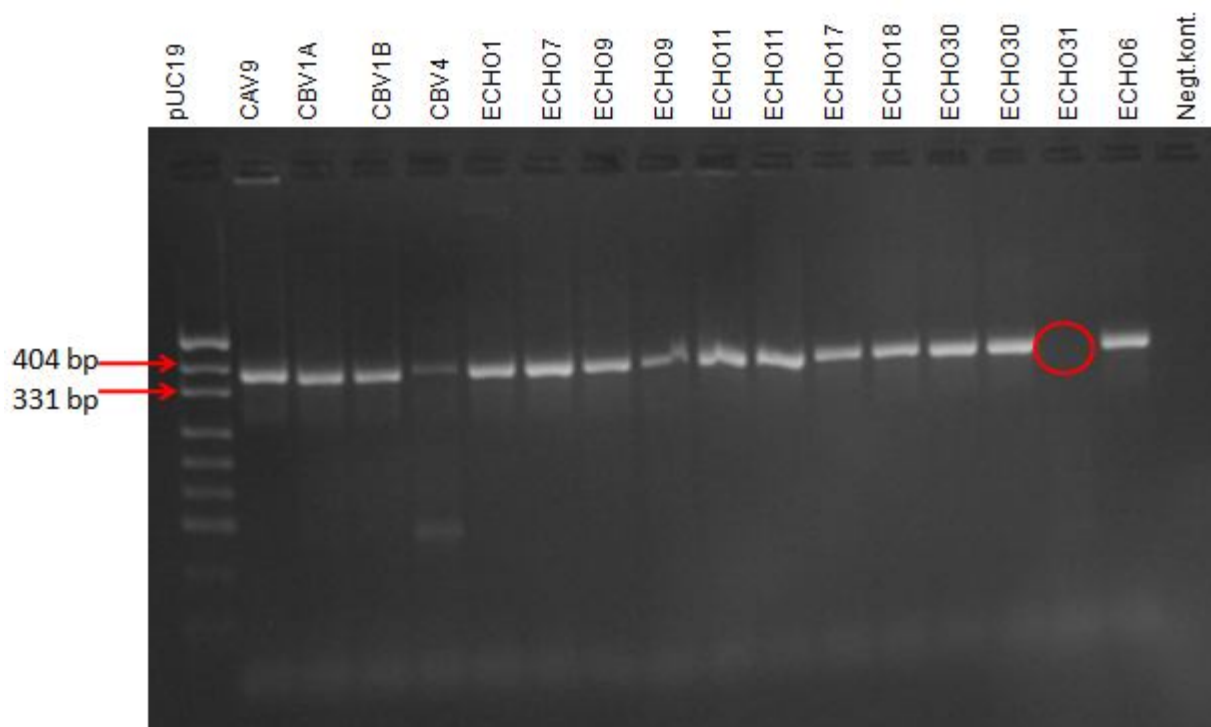
Taulukoista 13 ja 14 havaitaan, että AN89f-88r -alukkeilla tehdyistä qPCR-ajoista neljälle (4) tyyppikannan virusnäytteistä ei saatu sulamislämpötilaa. PCR2-tuotteiden Ct-arvot ovat alhaisia, koska PCR1-ajon aikana kehittyi lisää SyBR-väriä, joka puolestaan PCR1-ajon tuotteiden välityksellä siirtyi PCR2-ajon putkiin. Eli PCR2-ajossa on enemmän SyBR-väriä, joka antaa alhaisempia Ct-arvoja.

PCR-tuotteiden laatu tarkistettiin vielä agarosigeelielektroforeesilla. Kuvassa 14 on esitetty A-, C- ja D-lajin PCR-tuotteista tehty geelija. Kuvasta havaitaan, että CAV7:lla, E71:lla ja CAV21:lla ei ole PCR-tuotetta. Muista tyyppikannoista saadaan PCR-tuotetta, mutta niiden laatu ja määrä vaihtelee. Esimerkiksi CAV2 ja CAV15 saanto on suuri, sillä niiden fragmenttivyöhykkeet ovat suurimmat.



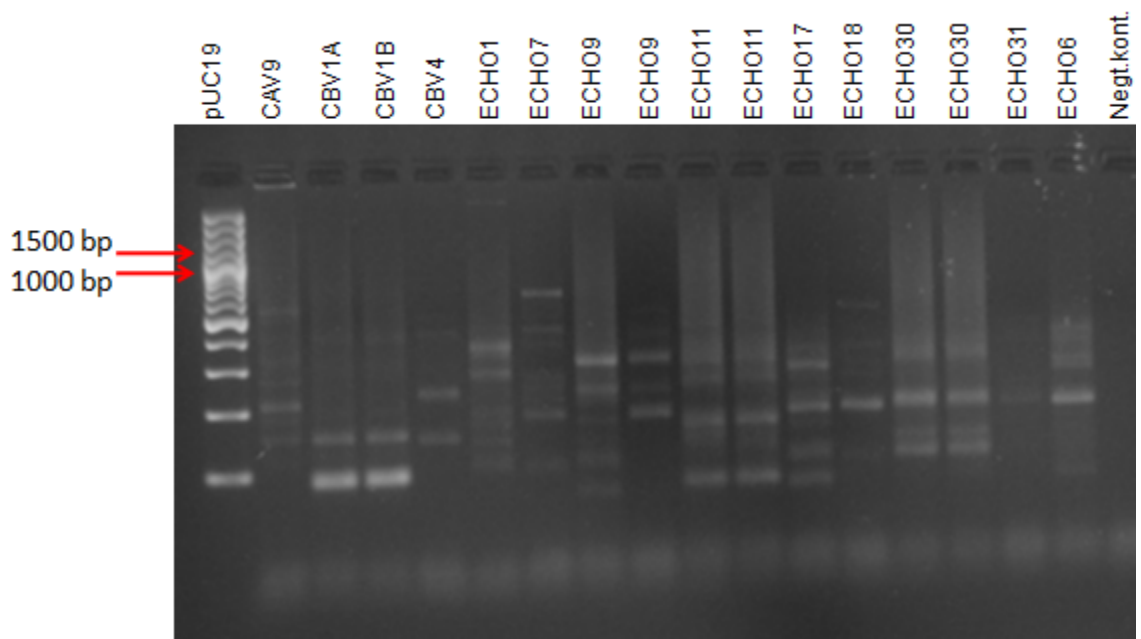
Kuva 14 Agarosigeelielektroforeesi A-, C- ja D-lajin PCR-tuoteista

Kuvassa 15 on kuvattu B-lajin PCR-tuotteet. Kuvasta havaitaan, että ECHO31 monistaminen ei onnistunut. ECHO9, ECHO 11 ja ECHO11 fragmenttivyöhykkeissä ovat röpelöisiä. Tämä oletettavasti johtuu siitä, että näytekolot hieman vaurioituivat, kun kampa otettiin irti geelistä.

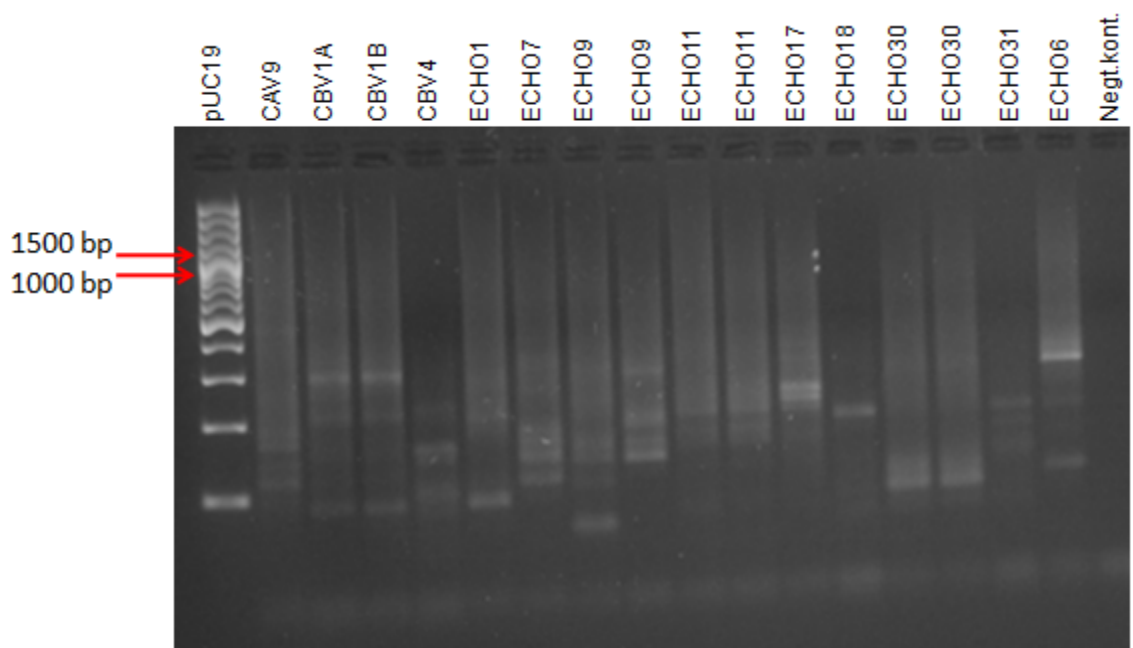


Kuva 15 Agarosigeelielektroforeesi B-lajin PCR-tuoteista (AN89f-88r)

Kuvissa 16 ja 17 on esitetty B-lajin PCR-tuotteiden agarosigeelielektroforeesijot, kun PCR1-ajossa on käytetty EvB:n OS+OAS -alukkeita ja PCR2-ajossa EvB:n IS+IAS -alukkeita. Agarosielektroforeesijojen perusteella B-lajin viruksista ei saada ollenkaan PCR-tuotetta alukkeilla OS+OAS (PCR1) ja IS+IAS (PCR2), vaikka sulamislämpötila antaa PCR2 kaikille viruksille arvot. Tämä ero saattaa johtua siitä, että PCR-tuotetta on todella vähän, jolloin käytetty detektointi ei ole ollut riittävän herkkä tai on muodostunut epäspesifistä tuotetta. Lisäksi Ct-arvot PCR2-ajossa viittavat siihen että PCR1- tuotteen mukana siirtynyt Syber green antaa flueresoivaa taustaa. Tästä johtuen voidaan sanoa että qPCR PCR1:senä ei sovellu nested-muotoiseen PCR:ään.



Kuva 16 Agarosigeelielektroforeesi B-lajin PCR1-tuoteista (EvB OS+OAS)



Kuva 17 Agarosigeelielektroforeesi B-lajin PCR2-tuoteista (EvB IS+IAS)

## 5 Tarkastelu

Opinnäytetön tavoitteena oli optimoida enteroviruksille herkkä qRT-PCR -menetelmä, jolla voidaan monistaa enterovirusten VP1-aluetta tai sen osaa. Virustyyppi määritetään PCR-tuoteesta sekvensoinnilla tai mikrosirutekniikalla. Optimoinnissa verrattiin kaupallisia PCR-reaktioseoksia, alukkeita ja RT-reaktioon tarkoitettuja entsyymejä keskenään. Menetelmän herkkyyttä verrattiin ENRI RT-menetelmään.

Työn tuloksena kehitettiin enterovirusten qRT-PCR -menetelmä, jossa qPCR:n paras polymeerasientsyymi on KAPA™-seos ja toiseksi paras on GoTaq®-seos sekä paras alukepari on AN89f-88r. RT-reaktion paras entsyymi on Improm II™ ja paras aluke on Random Hexamer -aluke.

Käytettäessä RNA-transkripteja qRT-PCR:llä tunnistettiin parhaimmillaan 100 kopiota (ECHO7) ja muutamia enterovirusia ei näillä alukkeilla kyetä tunnistamaan ollenkaan. ENRI RT-menetelmällä (Peltola ym., 2008) huonoin herkkyys on 100 kopiota (CAV21) ja paras herkkyys on 10 kopiota (CAV16, ECHO 7, ECHO 30 ja EV7). Tämä tarkoittaa sitä, että qRT-PCR -menetelmän herkkyys ylittää parhaillaan 100 kopioon vain tietyillä enterovirustyypeillä. Tämä on ensimmäinen kerta kun tyyppitys-alukkeita on testattu kvantitatiivisessa muodossa ja tulosten mukaan Partial VP1-alukkeilla ja KAPA:lla voidaan saada herkkä tunnistus enteroviruksista.

qRT-PCR -menetelmää testattiin myös tyyppikannoilla, joilla on kaikille saatu positiivinen tulos ENRI RT-menetelmällä. Pienen testiryhmän tuloksena saatiin, että qRT-PCR:ssä 24 näytteestä vain neljälle ei saatu sulamislämpötilaa. Tämä tarkoittaa sitä, että qRT-PCR -menetelmä toimii, mutta sen luotettavuutta, toistettavuutta ja herkkyyttä on syytä kehittää.

## 6 Päätelmät

Työssä onnistuttiin optimoimaan herkkä qRT-PCR-menetelmä enterovirusten tyypitykseen. Menetelmän avulla voidaan monistaa enterovirusten VP1-aluetta ja täten saada tyypitettyä enterovirustyyppit nopeasti. Tulevaisuudessa qRT-PCR-menetelmällä voidaan ajaa suuri joukko potilasnäytteitä helposti ja tehokkaasti.

Optimoinnissa testattiin joukko PCR-entsyymiseoksia, RT-entsyymejä sekä alukkeita. Optimoinnin aikana ei saanut unohtaa, että kaupallisia entsyymejä ja alukkeita tulee koko ajan lisää tarjolle. Tutkimuksen aikana saimme testattavaksi lisää uusia entsyymejä, jotka osoittautuvat paremmaksi kuin alkuperäiset tutkimuskohteet. Tämä on tärkeä seikka tuloksien kannalta. On aina muistettava, että tieto ja työskentelyvälineet voivat muuttua ja kehittyä nopeasti, jolloin on oltava valmis kokeilemaan uusia asioita.

Jatkotutkimuksissa tulee keskittyä potilasnäytteiden testaamiseen, jotta saadaan määritettyä qRT-PCR -menetelmän toistettavuus ja luotettavuus. Menetelmän herkkyyttä voidaan yrittää parantaa ajo-olosuhteiden muokkauksella ja esimerkiksi syklien määrän vähentämisellä sekä suunnittelemalla täsmällisemmät alukkeet eri enteroviruskannoille. Potilasnäytteiden ajossa on huomioitava näytteiden laatu; selkäydinneste on herkkä kontaminaatiolle, enteroviruksen aiheuttama rakkulaneste sisältää runsaasti virusta, nielu- ja ulostenäytteissä voi esiintyä bakteeria/muita viruksia, jotka voivat olla haitaksi virus-RNA:n eristyksessä.

qPCR-ajoon käytettävät laitteet voivat vaikuttaa menetelmän herkkyyteen. Vaikka laitteen valmistaja vakuuttaa, että laite toimii luotettavasti, esimerkiksi lämpötilat voivat hieman poiketa verraten toiseen laitteeseen.

Tuloksien ja varsinkin jatkotutkimuksien jälkeen qRT-PCR -menetelmää voidaan käyttää hyödyksi epidemioiden nopeaan selvittämiseen; virustyyppin selvittämiseen ja mahdollisen taudinaiheuttajan löytämiseen. Menetelmän avulla saadan nopeasti tietää (tulokset jopa 2-3 päivässä), mikä enterovirustyyppi on kyseessä. Nopean diagnoosin avulla lääkärit osaavat hoitaa potilaita oikeilla ja tehokkailla lääkkeillä. Tämä on erityisen tärkeää

nopeasti etenevissä ja vaikeissa tautitilanteissa. Tulevaisuudessa on mahdollista kehittää parempia lääkkeitä ja jopa rokotteita, kun tiedetään mikä tai mitkä enterovirustyytit aiheuttavat eniten epidemioita.

## LÄHTEET

Ahola, T. Hyypiä, T. ja Söderlund-Venermo, M. 2010. Virusten lisääntyminen. Teoksessa Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet. 1. painos. Hedman, Klaus; Heikkinen, Terho; Huovinen, Pentti ym. Jyväskylä: WS Bookwell Oy.

Bamford, D. Hyypiä, T. ja Saksela, K. 2010. Virusten yleiset ominaisuudet, rakenne ja luokittelu. Teoksessa Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet. 1. painos. Hedman, Klaus; Heikkinen, Terho; Huovinen, Pentti ym. Jyväskylä: WS Bookwell Oy.

DyNAmo™ SYBR® Green 2-Step qRT-PCR Kit. 2010. Ohjekirja. Versio 2.1. Finnzymes

DyNAzyme™ II DNA Polymerase. 2010. Ohjekirja. Versio 2.1. Finnzymes

GoTaq® qPCR Master Mix. 2010. Ohjekirja. Versio 11/10. Promega

Hyypiä, T. Roivainen, M. ja Ruuskanen, O. 2010. Pikornavirukset. Teoksessa Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet. 1. painos. Hedman, Klaus; Heikkinen, Terho; Huovinen, Pentti ym. Jyväskylä: WS Bookwell Oy.

Improm-II™ Reverse Transcription System. 2010. Ohjekirja. Versio #TM236. Promega

KAPA™ SYBR® FAST qPCR Kits. 2010. Ohjekirja. Versio 2.09. KapaBiosystems

LuminoCt® SYBR® Green qPCR ReadyMix™. 2010. Ohjekirja. Versio 03/10-1. Sigma

Maxima® SYBR® Green/Fluorescein qPCR Master Mix (2X). 2009. Ohjekirja. Fermentas

McWilliam Leitch, E.C., Harvala, H., Ubillos, I., Templeton, K., Simmonds, P. 2008. Direct identification of human enterovirus serotypes in cerebrospinal fluid by amplification and sequencing of the VP1 region. *The Journal of Clinical Virology* Vol. 44 No. 2, 119-124.

M-MuLV Reverse Transcriptase. 2010. Ohjekirja. Fermentas

Nix W. A., Oberste M. S., Pallansch M. A. 2006. Sensitive, seminested PCR amplification of VP1 sequences for direct identification of all enterovirus serotypes from original clinical specimens. *The Journal of Clinical Microbiology* Vol. 44 No. 8, 2698-2704.

Oberste, M. S. Maher, K. Kilpatrick, D. R. Flemister, M. R. Brown, B. A. ja Pallansch, M. A. 1999. Typing of Human Enteroviruses by Partial Sequencing of VP1. *Journal of Clinical Microbiology* Vol. 37 No. 5, 1288-1293.

Oberste, M. S. Maher, K. Schnurr, D. Flemister, M. R. Lovchik, J. C. Peters, H. Sessions, W. Kirk, C. Chatterjee, N. Fuller, S. Hanauer, J. Pallansch, M. A. 2004. Enterovirus 68 is associated with respiratory illness and shares biological features with both the enteroviruses and the rhinoviruses. *Journal of General Virology* Vol. 85 No. 9, 2577-2584.

Oligos. 2011. Ohjekirja. SIGMA

Peltola, V. Waris, M. Österback, R. Susi, P. Ruuskanen, O. Hyypiä, T. 2008. Rhinovirus transmission within families with children: incidence of symptomatic and asymptomatic infections. *Journal of Infection Disease* Vol. 197 No. 3, 382-389.

Picornaviridae.com. 2011. (Pikornaviruksien kotisivu). Enterovirus. Saatavilla <http://www.picornaviridae.com/enterovirus/enterovirus.htm> (29.4.2011)

Random Hexamer Primer. 2011. Ohjekirja. Fermentas



Smura, T. P. Nina Junntila, N. Blomqvist, S. Norder, H. Kajjalainen, S. Paananen, A. Magnus, L. O. Tapani Hovi, T. Roivainen, M. 2007. Enterovirus 94, a proposed new serotype in human enterovirus species D. *Journal of General Virology* Vol. 33 No. 3, 849-858.

Solunetti, Suomen virtuaaliyliopisto. 2006. Solubiologia. Saatavilla <http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/etusivu/> (25.3.2011)

Suominen, I. Pärssinen, R. Haajanen, K. ja Pelkonen, J. 2010. *Geenitekniikka*. 1. painos. Turku: Turun ammattikorkeakoulu.

SuperScript™ III Reverse Transcriptase. 2010. Ohjekirja. Invitrogen

Susi, P. 2011. Kokoelman pikornatunnistuksesta. Luentomateriaali. Turun Yliopisto.

Susi, P. Hattara, L. Waris, M. Luoma-aho, T. Siitari, H. Hyypiä, T. ja Saviranta, P. 2009. Typing of Enteroviruses by Use of Microwell Oligonucleotide Arrays. *Journal of Clinical Microbiology* Vol. 47 No. 6, 1863-1870.

Ylä-Pelto, J. ja Susi, P. 2010. Pikornavirusten käyttö geenivektoreina ja syöpäterapiassa. Suomen Solubiologit ry.

## Ihmisen enterovirus lajit ja niiden serotyypit

### HEV-A

17 serotyyppiä: coxsackievirus A2 (CV-A2), CV-A3, CV-A4, CV-A5, CV-A6, CV-A7, CV-A8, CV-A10, CV-A12, CV-A14, CV-A16, enterovirus 71 (EV-71), EV-76, EV-89, EV-90, EV-91

### HEV-B

56 serotyyppiä: coxsackievirus B1 (CV-B1), CV-B2, CV-B3, CV-B4, CV-B5, CV-B6, CV-A9, echovirus 1 (E-1), E-2, E-3, E-4, E-5, E-6, E-7, E-9 (sis. CV-A23), E-11, E-12, E-13, E-14, E-15, E-16, E-17, E-18, E-19, E-20, E-21, E-24, E-25, E-26, E-27, E-29, E-30, E-31, E-32, E-33, enterovirus 69 (EV-69), EV-73, EV-74, EV-75, EV-77, EV-78, EV-79, EV-80, EV-81, EV-82, EV-83, EV-84, EV-85, EV-86, EV-87, EV-88, EV-93, EV-97, EV-98, EV-100 & EV-101

### HEV-C

18 serotyyppiä: Poliovirus-1 (PV-1), PV-2, PV-3, coxsackievirus A1 (CV-A1), CV-A11, CV-A13, CV-A17, CV-A19, CV-A20, CV-A21, CV-A22 and CV-A24, EV-95, EV-96, EV-99, EV-102, EV-104 & EV-105.

### HEV-D

kolme serotyyppiä, EV-68, EV-70 & EV-94

(Pikornaviridae.com. 2011.)

## qPCR-entsyymien työskentely: ohjeet ja ajo-olosuhteet

- Ajo 0,2 ml Rotor Gene -putkissa
- Työskentelyohje/putki

### DyNAmo™

Reagenssit	Määrä µl (lopullinen konsentraatio)
Steriili vesi	6
*Aluke	1 (0,5 mM)
*Aluke	1 (0,5 mM)
DyNAmo™	10
cDNA/ Templaatti	2
<b>Kokonaistilavuus</b>	<b>20</b>

\* Aluke: (stokki 100 mM)

- Käytetään 10 mM (20µl stokki+ 180 µl Aqua= 200 µl)

### **Ajo-olosuhteet (suluissa paras versio)**

Vaihe	Lämpötila	Aika	Syklien määrä
Alkulämmitys	95 °C	15 min	
Denaturaatio	94 °C	10 s	x 45
Liittyminen	60 °C (50 °C)	30 s	
Pidennys	72 °C	30 s	
Sulamispistetesti	72 °C → 95 °C	1 °C/steppi	

### DyNAzyme™

Reagenssit	Määrä µl (lopullinen konsentraatio)
Steriili vesi	5,8
Syber Green	10
*Aluke	1 (0,5 mM)
*Aluke	1 (0,5 mM)
DyNAzyme™	0,2
cDNA/ Templaatti	2
<b>Kokonaistilavuus</b>	<b>20</b>

\* Aluke: (stokki 100 mM)

- Käytetään 10 mM (20µl stokki+ 180 µl Aqua= 200 µl)

**Ajo-olosuhteet (suluissa paras versio)**

Vaihe	Lämpötila	Aika	Syklien määrä
Alkulämmitys	94 °C	2 min (5 min)	x 25-35 (45)
Denaturaatio	94 °C	15 s- 1 min (30 s)	
Liittyminen	55 °C	10-30 s (30 s)	
Pidennys	72 °C	40 s (45 s)	
Sulamispistetesti	72 °C → 95 °C	1 °C/steppi	

**GoTaq®****Reagenssit****Määrä µl (lopullinen konsentraatio)**

Steriili vesi	6
*Aluke	1 (0,5 mM)
*Aluke	1 (0,5 mM)
GoTaq®	10
cDNA/ Templaatti	2
<b>Kokonaistilavuus</b>	<b>20</b>

\* Aluke: (stokki 100 mM)

- Käytetään 10 mM (20µl stokki+ 180 µl Aqua= 200 µl)

**Ajo-olosuhteet (suluissa paras versio)**

Vaihe	Lämpötila	Aika	Syklien määrä
Alkulämmitys	95 °C	2 min	x 40 (45)
Denaturaatio	95 °C	3 s (15 s)	
Liittyminen	60 °C (50 °C)	30 s	
Pidennys	60 °C (72 °C)	60 s (30 s)	
Sulamispistetesti	72 °C → 95 °C	1 °C/steppi	

KAPA™

<b>Reagenssit</b>	<b>Määrä µl (lopullinen konsentraatio)</b>
Steriili vesi	6
*Auke	1 (0,5 mM)
*Auke	1 (0,5 mM)
KAPA™	10
cDNA/ Templaatti	2
<b>Kokonaistilavuus</b>	<b>20</b>

\* Auke: (stokki 100 mM)

- Käytetään 10 mM (20µl stokki+ 180 µl Aqua= 200 µl)

**Ajo-olosuhteet (suluissa paras versio)**

Vaihe	Lämpötila	Aika	Sykliden määrä
Alkulämmitys	95 °C	3 min (5 min)	x 40
Denaturaatio	95 °C	10 s	
Liittyminen	55 °C (50 °C)	30 s	
Pidennys	72 °C	1 s (10 s)	
Sulamispistetesti	72 °C → 95 °C	1 °C/steppi	

LuminoCt®

<b>Reagenssit</b>	<b>Määrä µl (lopullinen konsentraatio)</b>
Steriili vesi	6
*Auke	1 (0,5 mM)
*Auke	1 (0,5 mM)
LuminoCt®	10
cDNA/ Templaatti	2
<b>Kokonaistilavuus</b>	<b>20</b>

\* Auke: (stokki 100 mM)

- Käytetään 10 mM (20µl stokki+ 180 µl Aqua= 200 µl)

**Ajo-olosuhteet (suluissa paras versio)**

Vaihe	Lämpötila	Aika	Syklien määrä
Alkulämmitys	95 °C	20 s (2 min)	
Denaturaatio	95 °C	3 s	
Liittyminen	60 °C (50 °C)	15-30 s (30 s)	x 40
Pidennys	60 °C (72 °C)	15-30 s (10 s)	
Sulamispistetesti	72 °C → 95 °C	1 °C/steppi	

**Maxima®**

Reagenssit	Määrä µl (lopullinen konsentraatio)
Steriili vesi	5,5
*Aluke	1 (0,5 mM)
*Aluke	1 (0,5 mM)
Maxima®	12,5
cDNA/ Templaatti	5
<b>Kokonaistilavuus</b>	<b>25</b>

\* Aluke: (stokki 100 mM)

- Käytetään 10 mM (20µl stokki+ 180 µl Aqua= 200 µl)

**Ajo-olosuhteet (suluissa paras versio)**

Vaihe	Lämpötila	Aika	Syklien määrä
Alkulämmitys	95 °C	10 min	
Denaturaatio	95 °C	15 s (30 s)	
Liittyminen	60 °C (55 °C)	30 s (20 s)	x 40 (45)
Pidennys	72 °C	30 s (15 s)	
Sulamispistetesti	72 °C → 95 °C	1 °C/steppi	

## Agaroosigeelielektroforeesi

Agaroosi, SeaKem Le Agarose, valm. Lonza, tuotenumero 5005

10xTBE, valm. Medicargo, tuotenumero 12-9112-10

- tehdään laimmennus 1:20

Load-väri, 10x XCOG (xylene cyanol orange G)

- 1:1 10xTBE + 0,5 % Orange G + 0,01 % xylene cyanoli

Etidiumbromidi, valm. Sigma, tuotenumero 806808

### Geelin valmistus

Punnitaan 3 g agaroosia ja liuotetaan se 150 ml:aan 0,5xTBE:hen mikrossa täydellä teholla 3x 2min (sekoitetaan välillä). Lisätään 7,5  $\mu$ l etidiumbromidia ja sekoitetaan. Kaadetaan seos kelkkaan, jossa kampa kiinni. Annetaan jähmettyä noin 30 min ja irrotetaan kampa.

### Standardien valmistus

pUC19, valm. OZ Biosciences, tuotenumero PF00700

100 bp DNA Ladder, valm. Invitrogen, tuotenumero 15628-019

13  $\mu$ l vettä + 5  $\mu$ l standardia + 2  $\mu$ l load-väriä, sekoitetaan pipetin avulla

### Näytteiden valmistus

PCR-tuotetta 20  $\mu$ l/putki

Lisätään load-väriä 2,5  $\mu$ l/putki, sekoitetaan pipetin avulla

### Ajo

Laitetaan geeli ajolaitteeseen ja peitetään se 0,5xTBE:hen. Pipetoidaan standardia ja näytteitä 10  $\mu$ l/kolo. Ajetaan näytteet negatiivisesta positiiviseen napaan noin 150 V/1 h. Ajon jälkeen siirretään geeli UV-valon alle ja kuvataan geeli kameralla.

## ENRI RT-PCR:n työohje

<b>Reagenssit</b>	<b>Määrä µl (lopullinen konsentraatio)</b>
ENRI RT-PCR -mix	20
cDNA/ Templaatti	5
<b>Kokonaistilavuus</b>	<b>25</b>

### **Ajo-olosuhteet (suluissa paras versio)**

Vaihe	Lämpötila	Aika	Syklien määrä
Alkulämmitys	95 °C	10 min	
Denaturaatio	95 °C	15 s	
Liittyminen	65 °C	30 s	x 45
Pidennys	72 °C	40 s	
Sulamispistetesti	72 °C → 95 °C	1 °C/steppi	



## RT-reaktion työohje

- 0,5 ml:n putkiin

- Reagenssit pidetään kylmäblokissa työskentelyn ajan, paitsi RNAasi-inhibiittori ja RT-entsyymi, joita säilytetään pakastimessa pipetointihetken saakka. RT-entsyymi tulee olla valolta suojattuna, esim. folion suojassa.

Työskentelyohje/putki

Reagenssi	Määrä $\mu$ l (lopullinen konsentraatio)
<sup>1</sup> 5x puskuri	2 (1x)
<sup>1</sup> 25 mM MgCl <sub>2</sub>	1 (2,5 mM)
<sup>2</sup> 10 mM dNTP	0,5 (0,5 mM)
<sup>1</sup> RNAasi-inhibiittori	0,5
<sup>1</sup> RT-entsyymi	0,5
Aluke	1 (1 $\mu$ M)
RNA	4,5
<b>Kokonaistilavuus</b>	<b>10</b>

<sup>1</sup>Käytetään RT-entsyymin kitissä olevia reagensseja

<sup>2</sup>dNTP: (stokki 100 mM)

- Tehdään 10 mM seos

(10  $\mu$ l stokki+10  $\mu$ l stokki+10  $\mu$ l stokki+10  $\mu$ l stokki+60  $\mu$ l aqua=100  $\mu$ l)

RT-ohjelma: +42 °C/ 60 min  $\pm$  15 min

- Jos jatkat suoraan PCR:ään, jäädytä kunnolla jäähauteessa.

- Jos et jatka suoraan PCR:ään, säilytetään pakastimessa -20 °C