

Opinnäytetyö (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikan koulutusohjelma

Biotekniikka

2012

Minna Pirttinen

Yksivaiheisen RT-qPCR -testin optimointi enterovirusten tyypit- tämiseksi



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

OPINNÄYTETYÖ (AMK) | TIIVISTELMÄ

TURUN AMMATTIKORKEAKOULU

Bio- ja elintarviketekniikan koulutusohjelma | Biotekniikka

Marraskuu 2012 | Sivumäärä 42 + 6 liitettä

Ohjaajat: Kari Haajanen (FM), Petri Susi (Dosentti, FT) ja Riikka Österback (FM)

Minna Pirttinen

Yksivaiheisen RT-qPCR -testin optimointi enterovirusten tyypittämiseksi

Työn tarkoituksena oli optimoida yksivaiheinen, kvantitatiivinen käänteistranskriptio-polymeraasiketjureaktio (engl. one-step RT-qPCR) enterovirusten tyypittämiseksi ja verrata sen herkkyyttä kaksivaiheiseen RT-qPCR -menetelmään. Työssä monistettiin enterovirusgenomin VP1-aluetta ja siinä käytettiin templaatteina enterovirusgenomin sisältäviä geenivektoreita, virus-RNA-transkriptteja ja virusviljelyssä kasvatettuja viruksia, joista oli eristetty RNA. Työssä oli tarkoitus testata myös fluoresoivien alukkeiden ja uusien fluorokromien toimivuutta, kun erilaisia kaupallisia entsyymiseoksia käytetään qPCR:ssä.

RT-qPCR -reaktion optimoinnissa testattiin kaupallista yksivaiheista (engl. one-step) menetelmää sekä omaa ns. in-house one-step -menetelmää. Työn alkuvaiheessa tehdyissä kokeissa osoitettiin, että kaupallinen menetelmä toimi huonosti, ja tämän takia työn seuraavissa vaiheissa keskityttiin ainoastaan yksivaiheisen in-house -menetelmän optimointiin. Optimoinnissa keskityttiin erityisesti RT-qPCR -reaktion reagenssipitoisuuksiin, joista $MgCl_2$ -pitoisuutta optimoitiin eniten. Cy5-leimatun alukkeen toimivuutta verrattiin leimaamattomaan alukkeeseen qPCR-ajoissa. SYTO9- ja SYTO82 -fluorokromeja verrattiin SYBR Green I -fluorokromin toimivuuteen Rotor Gene -laitteistossa.

Yksivaiheisen RT-qPCR -menetelmän toimivuutta saatiin merkittävästi testattua ja optimoitua, mutta menetelmällä ei saavutettu kaksivaiheisen menetelmän herkkyyttä. qPCR:ssä ei havaittu merkittäviä eroja, jos käytettiin joko Cy5-leimattuja tai leimaamattomia alukkeita. SYBR Green I toimi fluorokromina paremmin kuin SYTO 9- ja SYTO 82 -fluorokromit, mutta työ vaatii jatkotutkimuksia.

ASIASANAT: enterovirus, käänteistranskriptaasireaktio, PCR, polymeraasiketjureaktio, VP1-geeni, virustyyppitys

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Biotechnology and Food Technology | Biotechnology

November 2012 | Total number of pages 42 + 6 appendices

Instructors: Kari Haajanen (M.Sc.), Petri Susi (Docent, PhD) and Riikka Österback (M.Sc.)

Minna Pirttinen

Optimization of One-step RT-qPCR method for enterovirus typing

The purpose of this thesis was to optimize the one-step real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR) method for enterovirus typing and to compare its sensitivity with the two-step method. The target gene to be amplified was the enteroviral VP1 gene, and the templates included enteroviral cDNA clones, viral RNA transcripts, and viral RNA isolated from virus particles. The functionality of new fluorescent primers and fluorochromes in commercial RT-qPCR assays was also tested.

In the early stage of the study, a commercial one-step method was compared with the in-house one-step method and found to be less sensitive. The commercial method was therefore rejected, and the rest of the working time was used to optimize the in-house method. The main focus was on the reaction components, particularly the concentration of MgCl₂. The effect of a Cy5-labelled primer on the sensitivity of qPCR was compared with an unlabelled primer. The fluorescence properties of SYTO9 and SYTO82 fluorochromes were compared SYBR with Green I in Rotor Gene apparatus.

Even though the one-step method was significantly optimized and sensitized, its sensitivity was not comparable with that of the two-step method. The Cy5-labelled primer did not lower the sensitivity of the RT-qPCR method. In a few assays carried out with fluorochromes it was evident that SYBR Green I was a better fluorochrome than SYTO 9- or SYTO 82, but more experimentation is needed to demonstrate the apparent differences which they have in functionality.

KEYWORDS: enterovirus, polymerase chain reaction, PCR, reverse transcription, VP1, virus typing

SISÄLTÖ

TIIVISTELMÄ

ABSTRACT

LYHENNELUETTELO

1 JOHDANTO	8
2 IHMISEN ENTEROVIRUKSET	9
2.1 Enterovirusten rakenne ja genomin järjestyminen	9
2.2 Enterovirusten lisääntyminen	11
2.3 Diagnostiikka	13
3 TUTKIMUSMENETELMÄT	14
3.1 RT-qPCR	14
3.2 Kaksivaiheinen RT-qPCR -menetelmä	14
3.3 Yksivaiheinen RT-qPCR	16
3.4 Reaaliaikainen PCR	17
3.5 Agaroosigeelielektroforeesi (AGE)	18
3.6 Rotor Gene 6000	20
4 REAGENSIT	23
4.1 Alukkeet	23
4.2 Entsyymit	23
4.2.1 RT-entsyymit	24
4.3 PCR-entsyymit	24
4.4 Fluorokromit	25
4.4.1 SYBR® Green I	26
4.4.2 Cy5-leima	26
4.4.3 SYTO 9 ja SYTO 82	26
4.5 Virusnäytteet	26
5 TYÖN SUORITUS JA TULOKSET	28
5.1 Yksivaiheisen RT-qPCR -menetelmän optimointi	28
5.2 Cy5-testaus	32
5.3 Fluorokromitestaus	35
6 LOPPUPÄÄTELMÄT	38
LÄHTEET	40

LIITTEET

- Liite 1 Ihmisen enterovirusten serotyypit
- Liite 2 Agaroosigeelielektroforeesi
- Liite 3 Yksivaiheinen RT-qPCR -menetelmän optimointi: In-house -työohjeet
- Liite 4 Yksivaiheinen RT-qPCR -menetelmän optimointi: Ympyviruset
- Liite 5 RT-qPCR -yleisohje
- Liite 6 SYTO 9- ja 82 -työohjeet

KUVAT

Kuva 1 Enteroviruksen rakenne.	10
Kuva 2 Enteroviruksen genomi.	11
Kuva 3 Enteroviruksen lisääntyminen.	12
Kuva 4 Kaksivaiheinen RT-PCR.	15
Kuva 5 Polymeraasiketjureaktion periaate.	16
Kuva 6 RT-qPCR:n logaritmikäyrä.	18
Kuva 7 RT-qPCR:n sulamispistekäyrä.	18
Kuva 8 pUC 19 –kokostandardi.	19
Kuva 9 Rotor Gene 6000 PCR-laite.	20
Kuva 10 Rotor Gene 6000 PCR-laitteen toimintaperiaate.	21
Kuva 11 SensiFAST No-Rox -tulokset.	36
Kuva 12 Syto82:n geelikuva.	37

TAULUKOT

Taulukko 1 Rotor Gene 6000 PCR-laitteen fluorokromi-mittausalueet.	22
Taulukko 2 PCR-entsyymiseokset.	25
Taulukko 3 Kaupallinen one-step qPCR-reaktioseos.	29
Taulukko 4 Kaupallinen One-step-ajo transkripteillä.	29
Taulukko 5 RT-vaiheen magnesium-konsentraation vaikutus yksivaiheisen RT-qPCR:n toimivuuteen.	30
Taulukko 6 MgCl ₂ -pitoisuudet ja ajotulokset omasta yksivaiheisesta RT-qPCR:stä verrattuna kaksivaiheiseen menetelmään.	31
Taulukko 7 RT-reaktion reagenssit.	32
Taulukko 8 AN88/ AN88 Cy5-testaus -tulokset.	34
Taulukko 9 Syto 9 -fluorokromivärijäys, tulokset; (x)=näkyvä Ct- ja Melt -käyrillä tai geelillä.	35
Taulukko 10 Syto 82 -fluorokromivärijäys, tulokset. (x)=näkyvä Ct- ja Melt -käyrillä tai geelillä.	37

LYHENNELUETTELO

Aluke	polymeraasiketjureaktiossa käytettävä synteettinen oligonukleotidi, joka sitoutuu komplementaariseen DNA:han
bp	emäspari (engl. base pair)
cDNA	komplementaarinen DNA
Ct-arvo	sykli, jonka aikana näytteen fluoresenssi ylittää asetettun kynnyksarvon (engl. cycle threshold)
DNA	deoksiribonukleiinihappo
dsDNA	kaksinauhainen DNA (engl. double-stranded DNA)
HEV A-D	ihmisen enteroviruslajit A-D
Melt	lämpötila, jossa PCR-tuotteen nauhat eroavat (sulavat) toisistaan
MgCl ₂	magnesiumkloridi
M-MLV	moloney murine leukemia -viruksesta eristetty käänteiskopioijaentsyymi, jota käytetään RT-reaktiossa
mRNA	lähetti-RNA (engl. messenger RNA)
NCR-alue	proteiinia koodaamaton alue genomissa (engl. non-coding-region)
PCR	polymeraasiketjureaktio
PMT-tunnistin	valokenno-tunnistin (engl. photo-multiplier tube)
RNA	ribonukleiinihappo
RT	käänteiskopioijaentsyymi, käänteiskopionti
RT-qPCR	kvantitatiivinen reaaliaikainen käänteistranskriptio-polymeraasiketjureaktio

RT-reaktio	käänteistranskriptioreaktio
SYBR Green I	Fluorokromi-väriaine, sitoutuu dsDNA:han
VP1-4	viruksen kuoriproteiinit 1-4

1 Johdanto

Opinnäytetyö tehtiin Turun yliopiston, Biolääketieteen laitoksen Virusopin oppiaineessa. Työn tavoitteena oli jatkaa osastolla tehtyä RT-qPCR menetelmän optimointia enterovirusten tyypittämiseksi käyttäen kohteena VP1-geenialuetta. Työn aiemmissa vaiheissa oli vertailtu eri alukkeiden kykyä sitoutua eri enterovirustyyppikantojen VP1-alueeseen ja käytetty erilaisia kaupallisia reaktioseoksia VP1-alueen monistamiseksi. Näissä töissä oli määritelty ne reaktioseokset ja alukkeet, joiden avulla enterovirus-PCR -tuote saadaan muodostumaan suurella herkkyydellä kaksivaiheisessa RT-qPCR -reaktiossa.

Tämän opinnäytetyön tarkoitus on optimoida yksivaiheinen RT-qPCR-menetelmä ja verrata sen herkkyyttä kaksivaiheeseen menetelmään. Yksivaiheisessa RT-qPCR -menetelmässä RT- ja qPCR-reaktiot tapahtuvat samassa putkessa peräkkäisinä reaktiosarjoina.

Työssä on tarkoitus verrata myös Cy5-fluorokromilla leimatun ja leimaamattoman alukkeen toimivuutta RT-qPCR -reaktiossa ja testata erilaisia kaupallisia entsyymiseoksia, joissa on käytetty eri fluorokromivärejä tuotteen tunnistamiseksi.

Työn tavoitteena on optimoida mahdollisimman suoraviivainen ja herkkä enterovirus-RT-qPCR -menetelmä, jota voidaan käyttää epidemiologisiin ja kliinisiin virologisiin tutkimuksiin. Virustyyppien suuren lukumäärän ja sekvenssierojen takia niille ei ole onnistuttu kehittää laaja-alaisia, spesifisiä vasta-aineita diagnostiikan tarpeisiin. Tarkoituksena on monistaa enterovirusten VP1-aluetta sekvensointia varten. Leimattuja PCR-tuotteita aiotaan myöhemmin hyödyntää virustyyppien tunnistuksessa mikrosiru-menetelmää käyttäen.

2 Ihmisen enterovirukset

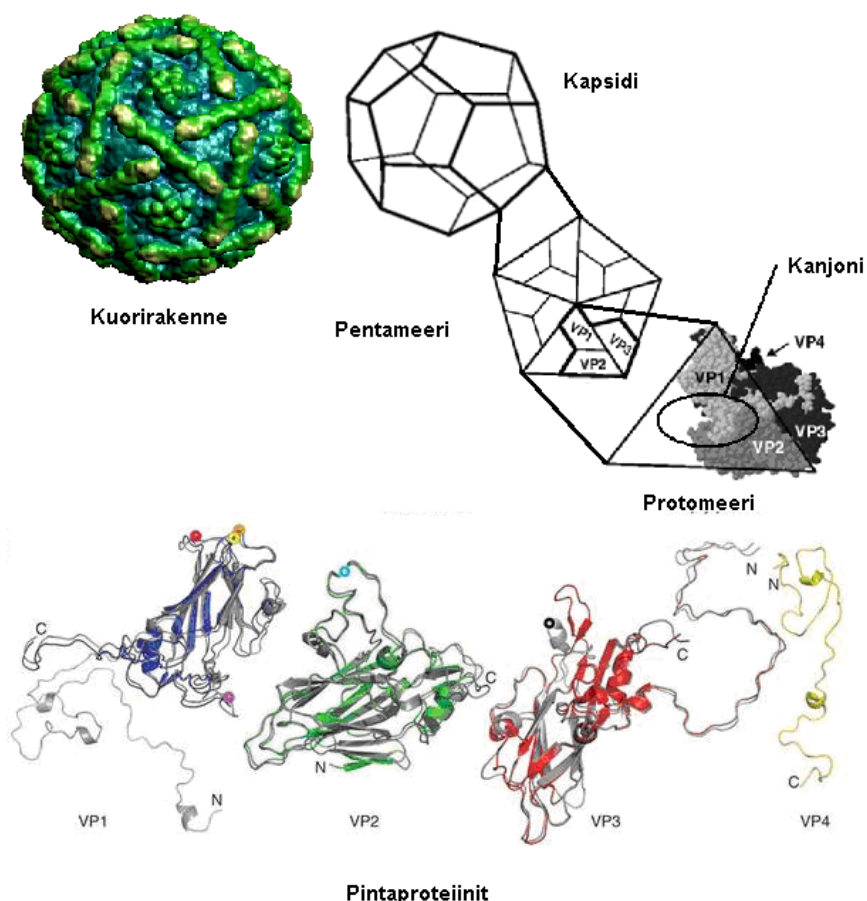
Pikornavirukset (*Picornaviridae*-heimo) muodostavat virusryhmän, johon kuuluu 12 virussukua: *Aphthovirus*, *Avihepatovirus*, *Cardiovirus*, *Enterovirus*, *Erbovirus*, *Hepatovirus*, *Kobuvirus*, *Parechovirus*, *Sapelovirus*, *Senecavirus*, *Teschovirus* ja *Tremovirus*. Pikornavirustyyppäjä on yli 300 ja uusia löydetään jatkuvasti. Niistä tunnetuimmat ovat poliovirukset, hepatiitti A-virus, rinovirus ja coxsackievirukset. Ihmisen enterovirukset kuuluvat *Picornaviridae*-heimon *Enterovirus*-sukuun, jotka jakautuvat 12 ala-lajiin. Ala-lajeihin kuuluu sekä ihmisen ja eläinten virustyyppäjä: *ihmisen enterovirukset A-D*, *Simian enterovirus A*, *Bovine enterovirus B*, *Ihmisen rinovirukset A-C*, *Borcine enterovirus B*, *Enterovirus F* ja *Enterovirus J*. (Picornaviridae.com.2012). Ihmisten enterovirukset on listattu liitteessä 1.

Enterovirusia esiintyy maailmanlaajuisesti. Ne ovat yleisimpiä ihmisiä infektoivia viruksia ja muodostavat taloudellisesti ja kansanterveydellisesti tärkeimmän virusryhmän. Enterovirukset aiheuttavat vuosittain flunssa- ja aivokalvontulehdus-epidemiaita eri puolilla maailmaa. Ne liittyvät myös erilaisten kroonisten tautien syntyyn, joista merkittävimmät ovat lapsuusiän diabetes, astma sekä toistuvat korvatulehdukset (Hyypiä ym. 2010).

2.1 Enterovirusten rakenne ja genomien järjestyminen

Ihmisen enterovirukset ovat läpimitaltaan 22–28 nm:n kokoisia, vaipattomia viruksia. Niiden yksijuosteinen, positiivissäikeinen RNA-genomi on n. 7000–7500 nukleotidia pitkä. Viruksen rakenne on muotoutunut tarkoituksenmukaisesti niin, että virus kykenee tunkeutumaan isäntäsoluun ja kestää isäntäsolun olosuhteita. Enteroviruksilla on kestävä rakenne, joka kestää matalaa pH:ta. Tämän takia virus kykenee selviytymään ihmisen ruoansulatuskanavan olosuhteita ja leviämään suun ja nenän kautta muualle kehoon. Viruksen RNA:n ympärillä on ikosahedraalinen (kaksikymmentähokas) proteiiniukuori. Virus koostuu 60 identtistä protomeeriyksiköstä, jotka muodostuvat 12 pentameeri-yksiköstä. Protoomerissa on neljä erilaista rakenneproteiinia: VP1, VP2, VP3 ja VP4. VP1-3

muodostavat proteiinkuoren ulkopinnan ja VP4 kuoren sisäpinnan yhdessä yksinauhaisen RNA-genomin kanssa. VP1-proteiini, ja sitä koodaava geeni, on erilainen eri virustyypeillä ja siksi sitä käytetään enterovirusten tyyppittämiseen. (Hyypiä ym. 2010). Enteroviruksen rakenne ja pintaproteiinit on esitetty kuvassa 1.



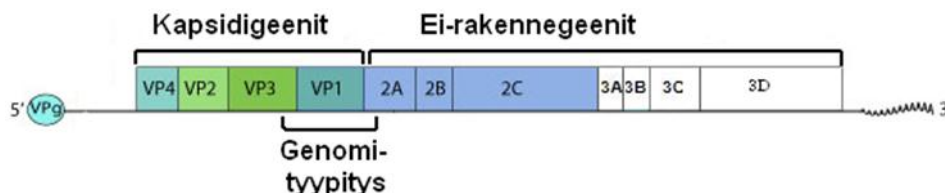
Kuva 1 Enteroviruksen rakenne. (lähteet:

<http://www.picornaviridae.com/structures/enterovirus.htm>

http://www.nature.com/nsmb/journal/v19/n4/full/nsmb.2255.html?WT.ec_id=NSMB-201204)

Enteroviruksen RNA-genomi on pieni, keskimäärin 7,0–7,5 kiloemästä pitkä. Genomin 5'- ja 3' -päissä sijaitsevat proteiinia koodaamattomat alueet. VP1-4 -kuoriproteiineja koodaavat alueet sijaitsevat genomin 5'-päissä, NCR-alueen jälkeen. Muut genomin koodaamat ei-rakenteelliset proteiinit osallistuvat viruk-

sen elinkierto. VP1-geeniä käytetään virusten tyypitykseen (Ylä-Pelto & Susi, 2010). Enteroviruksen genomi on esitetty kuvassa 2.



Kuva 2 Enteroviruksen genomi.

2.2 Enterovirusten lisääntyminen

Virukset ovat solun ulkopuolella täysin elottomia olentoja, joten lisääntyäkseen niiden on päästävä isäntäsolun sisään. "Entero" on kreikkaa, joka tarkoittaa suolta. Tämä tarkoittaa sitä, että enterovirukset lisääntyvät tyypillisesti suolen seinämässä. Virukset ovat lisääntyessään riippuvaisia solujen tuottamasta energiasta ja tarvitsevat siten solun proteiinisynteesikoneistoa viruksen omien proteiinien tuottamiseen ("Enterovirukset ja pikornavirukset", 2012).

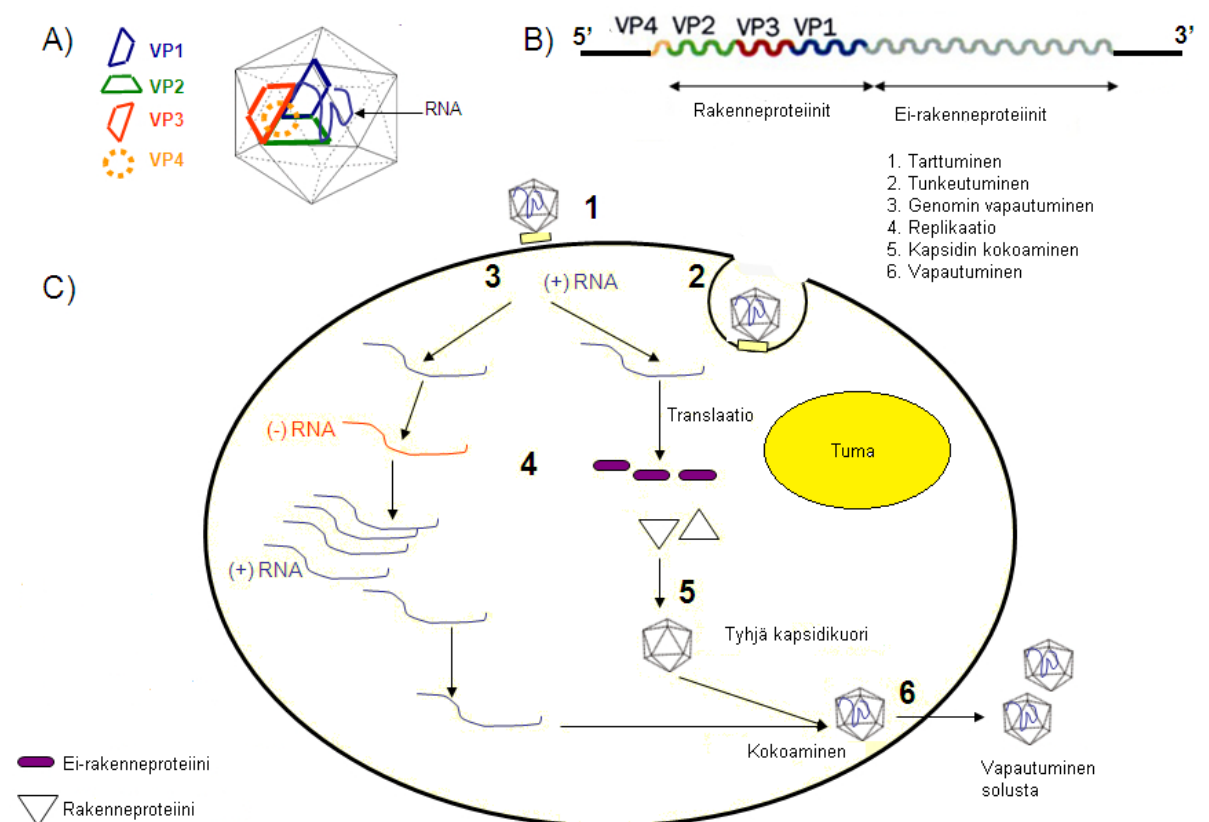
Virusten lisääntymiskierto jaetaan kahdeksaan päävaiheeseen: tarttuminen isäntäsolun pinnalle (attachment), tunkeutuminen isäntäsoluun (penetration), genomien vapautuminen (uncoating), replikaatio (replication), geenien ilmentyminen (gene expression), virusproteiinien synteesi (translation), uusien virusten kokoaminen (assembly), kypsyminen (maturation) ja vapautuminen solusta (release) ("Viral Life Cycles in Cells", 2012).

Virukset tunnistavat yleensä solun pinnalla olevan proteiinimolekyylin eli reseptorin päästäkseen solun sisään. Virusreseptori määrittelee usein ns. endosytoottisen tavan, jolla virus kulkeutuu solun sisällä lisääntymispaikkaansa. Sitoutuminen solupinnan reseptoriin saattaa muuttaa viruksen rakennetta siten, että virus-RNA vapautuu solun sisään. Vaihtoehtoisesti virus kulkeutuu solun sisällä

tiettyyn paikkaan, jossa pH-muutos johtaa genomien vapautumiseen. (Susi, Pirkornavirukset, 2012).

Tunkeuduttuaan solun sisään, virus kulkeutuu solun sisällä samoja reittejä käyttäen, mitä solukin käyttää eri molekyylien kuljetukseen (Ahola ym. 2010, s. 460–466). Enterovirusten RNA-genomi toimii solun sisällä mRNA:na eli lähetti-RNA:na. Genomin translaatiossa muodostuu sekä replikaasi- että rakenneproteiinit. Tärkein replikaasi- ja rakenneproteiini on RNA-polymeraasi. RNA-polymeraasi kopioi viruksen genomille komplementaarisen RNA-vastinsäikeen, joka on edelleen mallina positiivissäikeisen RNA:n muodostuksessa (Ahola ym. 2010, s. 460–466).

Kun viruksen genomi on monistettu, vuorossa on uuden viruksen kokoaminen. Tämä prosessi tunnetaan huonosti. Virus vapautuu solusta, kun solumembraani hajoaa, ja samalla solu kuolee (Ahola ym. 2010, s. 460–466). Viruksen lisääntyminen on esitetty kuvassa 3.



Kuva 3 Enteroviruksen lisääntyminen.

Yksi infektoitunut isäntäsolu tuottaa tuhansia uusia viruspartikkeleita. Lisääntymisen aikana virusgenomiin tulee virheitä, jotka johtuvat RNA-polymeraasientsyymin toiminnasta, koska sillä ei ole DNA-polymeraaseille ominaista tarkistus- ja korjausaktiivisuutta. Virheiden takia RNA-virusten evoluutio on nopeaa (Ahola ym. 2010, s. 460–466) ja oletettavasti eri enterovirustyyppit ovat saaneet alkunsa näiden virheiden seurauksena.

2.3 Diagnostiikka

Enterovirusia on perinteisesti tunnistettu virusviljelyn avulla. Virusviljelymenetelmässä kasvatetaan näytteessä olevia infektiokykyisiä viruksia soluviljelmissä. Vaikka suurin osa enterovirustyyppikannoista kasvaa soluviljelmissä, niiden viljely kliinisestä näytteestä saattaa olla haastavaa. Virusviljelyssä enterovirusia tunnistavien antiseerumien annetaan reagoida viljellyn viruksen kanssa, kun tunnettu antiseerumi estää viruksen lisääntymiskyvyn eli neutraloi viruksen. Tällöin saadaan tietoon virusserotyyppi, millä on erityisesti epidemiologista merkitystä. Neutralisaatiotuloksen saaminen tosin kestää viikkoja, joten se ei ehdi vaikuttaa hoitopäätöksen tekoon (Hyypiä ym. 2010, s. 520). Enterovirusten aiheuttamia infektiota määritellään myös serologisesti eli seerumista mitataan enterovirusten vasta-aineita (Tutkimusmenetelmät, 2009). Tällöin voidaan tunnistaa sairastettu infektio jälkikäteen.

Enterovirusten suoraan osoittamiseen potilasnäytteistä käytetään viruksen RNA-genomin tunnistavaa RT-qPCR -menetelmää. RT-qPCR:n avulla voidaan todeta pienikin virusmäärä. Virus voidaan myös tyypittää kapsidiproteiini VP1:n nukleotidisekvenssin avulla. Menetelmän avulla viruksen tunnistamiseen kuluva aika lyhenee merkittävästi perinteiseen virusviljelyyn verrattuna ja vastaus saadaan parhaimmillaan jo muutaman päivän kuluttua näytteen ottamisesta. Pikkoronavirusdiagnostiikassa RT-qPCR on ensisijainen menetelmä, jos epäillään enterovirusten aiheuttamaa keskushermostoinfektiota (Hyypiä ym. 2010, s. 520).

3 Tutkimusmenetelmät

3.1 RT-qPCR

RT-qPCR -menetelmää käytetään virusdiagnoosissa RNA-virusten tunnistamiseen. Menetelmässä on kaksi pääreaktiota, RT- ja PCR -reaktio. RT-reaktio on käänteiskopiointi-reaktio, jossa RNA:sta muodostetaan cDNA-kopio. PCR-reaktiossa cDNA-kopiota ja siihen spesifisesti sitoutuvia alukkeita käytetään näytteen monistamiseen, mikä mahdollistaa sen tunnistamisen. Perinteisesti PCR-tuote on ajettu agarosigeelillä, mutta nykyaikainen tapa on tehdä tunnistus reaaliaikaisesti fluoresoivan merkkiaineen avulla (Suominen ym. 2010, s. 170). RT-qPCR -menetelmän RT- ja PCR -reaktiot voidaan tehdä joko erikseen kaksivaiheisena tai samassa reaktiossa yksivaiheisena.

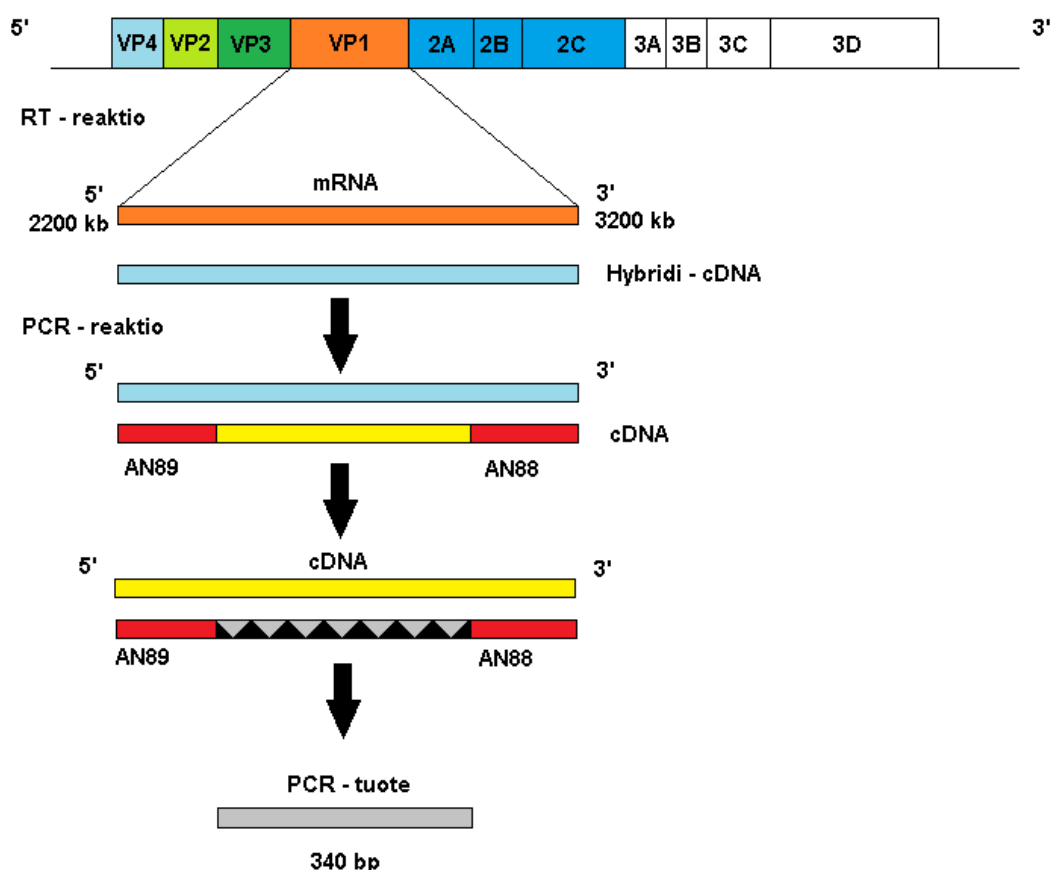
3.2 Kaksivaiheinen RT-qPCR -menetelmä

Kaksivaiheisessa RT-qPCR -menetelmässä RT- ja PCR -reaktiot tehdään eri reaktioissa ja eri putkissa. Perinteisesti nämä reaktiot tehdään erikseen paremman menetelmäherkkyyden saavuttamiseksi.

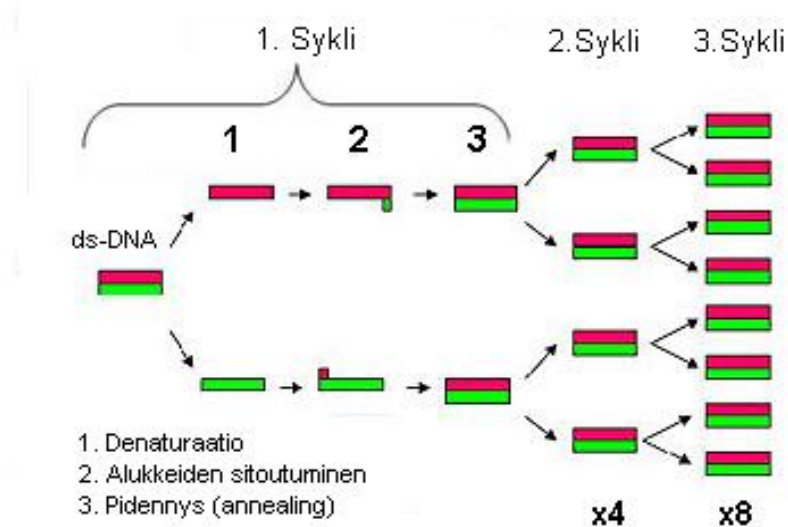
Kaksivaiheisessa RT-qPCR:ssä viruksen yksijuosteinen mRNA muutetaan ensin RT-reaktion käänteiskopioijaentsyymien avulla kaksijuosteiseksi RNA:DNA-hybridiksi eli cDNA:ksi. cDNA toimii PCR-reaktiossa templaattina. DNA-virusta monistaessa RT-reaktiota ei tarvita.

PCR-reaktion alussa RT-reaktiossa muodostettu cDNA:n vastinnauhat erotetaan toisistaan lämpökäsittelyn avulla, yleensä 95 °C:ssa. Tämän jälkeen lämpötilaa lasketaan alukkeiden sitoutumistilaan yleensä 65–56 °C, jolloin alukkeet (enterovirustyyppityksessä alukkeet ovat AN88 ja AN89) tarttuvat erotettujen vastinnauhojen vastakkaisiin päihin. Alukkeiden kiinnittymisen jälkeen lämpötilaa nostetaan jälleen yleensä 72 °C:seen, jolloin lämpöä kestävä polymeerasientsyymi alkaa muodostaa alukkeiden avulla uutta vastinnauhaa eli kaksinauhaista dsDNA:ta (Suominen ym, 2010, s. 170). Tätä vaihetta kutsutaan annealing eli

pidennys-vaiheeksi. Yhdessä nämä kolme vaihetta: denaturaatio, alukkeiden sitoutuminen ja annealing, muodostavat syklin, joita yhden PCR-ajon aikana voi olla 25–45 kpl. Kaksivaiheinen RT-PCR on kuvattu genomitasolla kuvassa 4. Polymeraasiketjureaktion periaate on esitetty kuvassa 5.



Kuva 4 Kaksivaiheinen RT-PCR.



Kuva 5 Polymeraasiketjureaktion periaate.

3.3 Yksivaiheinen RT-qPCR

Yksivaiheisessa RT-qPCR -reaktiossa RT- ja PCR -reaktioiden entsyymiseokset ja muut komponentit on samassa putkessa. Näyte sekoitetaan reaktioseokseen, jossa ovat alukkeet, käänteiskopioijaentsyymi (RT), RT-puskuri, RNAasi-inhibiittori, nukleotideja, DNA-polymeraasientsyymi ja SYBR Green I.

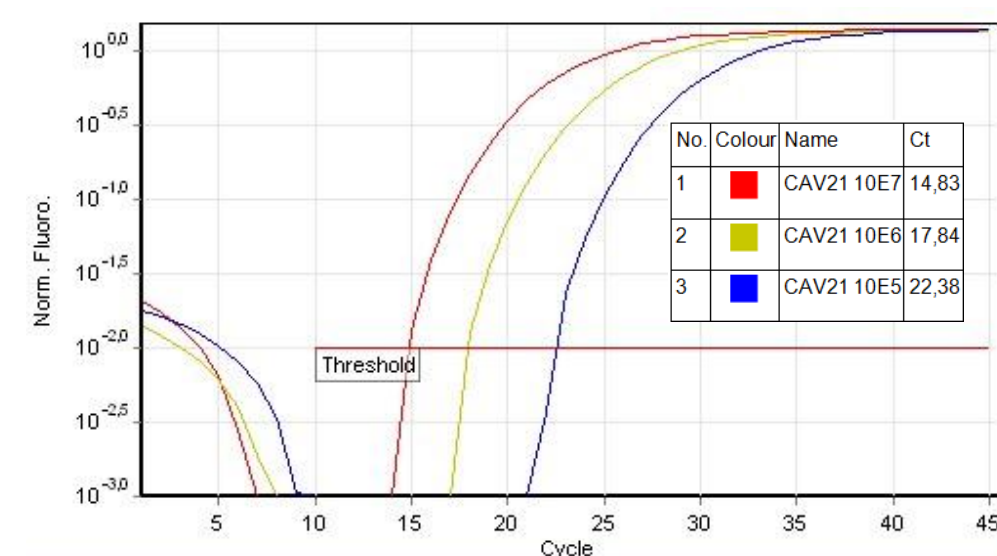
Yksivaiheisessa RT-qPCR:ssä tehdään ensin "RT-inkubaatio" stabiilissa lämpötilassa (yleensä 37–42 °C) ja sen jälkeen ajetaan normaali PCR-sykli. RT-lämpötilassa PCR-polymeraasi on inaktiivinen. RT-reaktion jälkeen siirytään PCR-sykliin, jossa lämpötila nostetaan 95 °C:seen kahdeksi minuutiksi. Tässä lämpötilassa RT-entsyymi inaktivoituu ja PCR-polymeraasi aktivoituu. Tämän aikana myös nukleiinihaponauhat irtoavat toisistaan. Koska komponentteja ei poisteta näyteputkista PCR-sykliden välillä, menetelmä on käytännössä nopeampi kuin kaksivaiheinen RT-qPCR.

3.4 Reaaliaikainen PCR

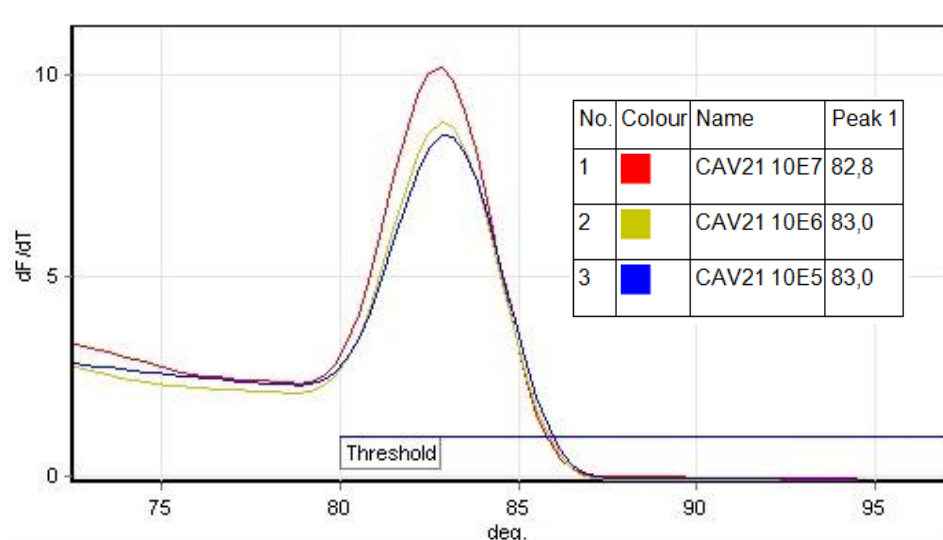
Reaaliaikaisessa PCR:ssä polymeerasietyymin muodostaessa uutta vastin nauhaa, fluoresoiva väri (SYBR Green I tai jokin muu fluorokromi) tarttuu muodostuvaan kaksinauhaiseen dsDNA:han muodostaen fluoresoivaa valoa. PCR-reaktion edetessä fluoresenssia muodostuu lisää ja sitä voidaan seurata reaaliaikaisesti PCR-koneen näytöltä. Fluoresenssin määrä on suhteessa muodostuvan kaksinauhaisen DNA-tuotteen määrään.

Lopputuotteen muodostuminen havainnoidaan tietokoneen ruudulle muodostuvana Ct-käyränä ja sulamispisteanalyysillä. Ct-käyrälle asetetaan kynnystaso (threshold line) monistuskäyrän kasvun alueelle, josta määritetään ns. kynnysyksi. Tässä työssä kynnystaso asetettiin aina fluoresenssin arvolle 10^{-2} , jotta eri PCR-ajoista saatuja arvoja voidaan verrata keskenään toisiinsa. Ct-arvo osoittaa, milloin tuotteen määrä ylittää ennalta asetetun rajan merkinä tuotteen muodostumiselle. Mitä matalampi Ct-arvo on, sitä aiemmassa syklistä tuotetta muodostuu ja sitä enemmän tuotetta on reaktion lopussa. (Suominen ym. 2010, s.166–168).

Sulamispisteanalyysillä nähdään PCR-reaktiossa muodostuneen tuotteen ”laatu”. PCR-tuotetta kuumennetaan vähitellen 72–95 °C:seen, jolloin kaksinauhaiset DNA:t denaturoituvat ja DNA-juosteet eroavat toisistaan. Tällöin SYBR Green -väri irtoaa nauhasta, mikä johtaa fluoresenssin heikkenemiseen. Tuotteen denaturoituminen näkyy laskevana fluoresenssipiikkinä eli tuotteen sulamispisteenä koneen näytöllä. Reaaliaikaisen PCR:n Ct-monistuskäyrä on kuvattu kuvassa 6. Kuvassa on esitetty coxsackievirus A21:n laimennossarja, mikä näkyy kolmena Ct-käyränä mitaten virus-RNA:n monistumista. Kuvassa 7 on PCR-tuotteille tehty sulamispisteanalyysi, jonka perusteella CAV21-virustyyppille on voitu määrittää sille (VP1-geenille) ominainen sulamislämpötila.



Kuva 6 RT-qPCR:n logaritmikäyrä.



Kuva 7 RT-qPCR:n sulamispistekäyrä.

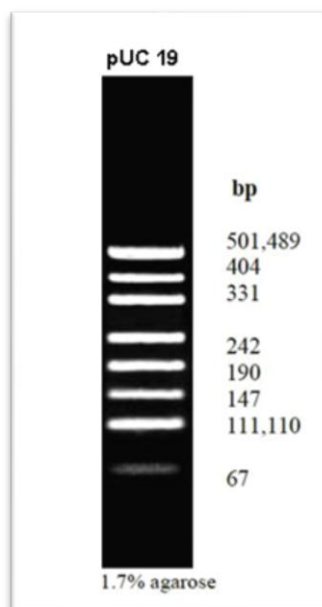
3.5 Agarosigeelielektroforeesi (AGE)

Agarosigeelielektroforeesi on menetelmä, jolla erotetaan ja tunnistetaan PCR-laitteella tuotetun sekvenssin emäspituus. Menetelmä perustuu elektroforeesissa negatiivisesti varautuneiden molekyylien liikkumiseen sähkökentässä kohti positiivisesti varautunutta elektroodia. Elektroforeesilla voidaan ajaa yleensä 0,1-50 kb pituisia fragmentteja.

Nukleiinihappojen elektroforeesi tapahtuu agarosigeelissä. Agarosi on puna-levistä eristetty polysakkaridi, joka liukenee kuumaan veteen ja jäähtyessä (n. 45-asteiseksi) muodostaa hyytelömäisen geelin. Geelin rakenne on verkkomainen, joka vaikuttaa geelissä liikkuvien erikokoisten molekyylien nopeuteen. Pienet molekyylit kulkeutuvat geelissä nopeammin ja pidemmälle, kun taas isojen molekyylien liike hidastuu. Molekyylien liikkuminen geelissä perustuu niiden negatiiviseen varaukseen, joka on peräisin happamista fosfaattiryhmistä. (Suominen ja Ollikka 1999, s. 72).

UV-valossa fluoresoivaa etidiumbromidia käytetään DNA:n paikantamiseen geeliltä. Etidiumbromidi sitoutuu kaksijuosteisen DNA-molekyylin sisään, jonka ansiosta jopa 0,05 mikrogrammaa DNA:ta voidaan havaita geeliltä. Kun geeliä valaistetaan UV-valolla, etidiumbromidi fluoresoi oranssinpunaisena ("Geelielektroforeesi", 2012). Agarosigeelielektroforeesin työohje on liitteessä 2.

Sekvenssin emäspituus selvitetään ajamalla näytteiden rinnalla kokostandardi, joka koostuu tunnetun pituisista DNA-juosteista. Näyte on positiivinen, jos geelissä havaitaan standardin perusteella oletetun kokoinen monistustuote. Työssä ajettuja näytteitä verrattiin pUC 19-kokostandardiin (kuva 8).



Kuva 8 pUC 19 -kokostandardi. (Lähde: <http://www.taq-dna.com/puc19-dna-2fbsis-i--28hpa-ii-29-digest--147.html>)

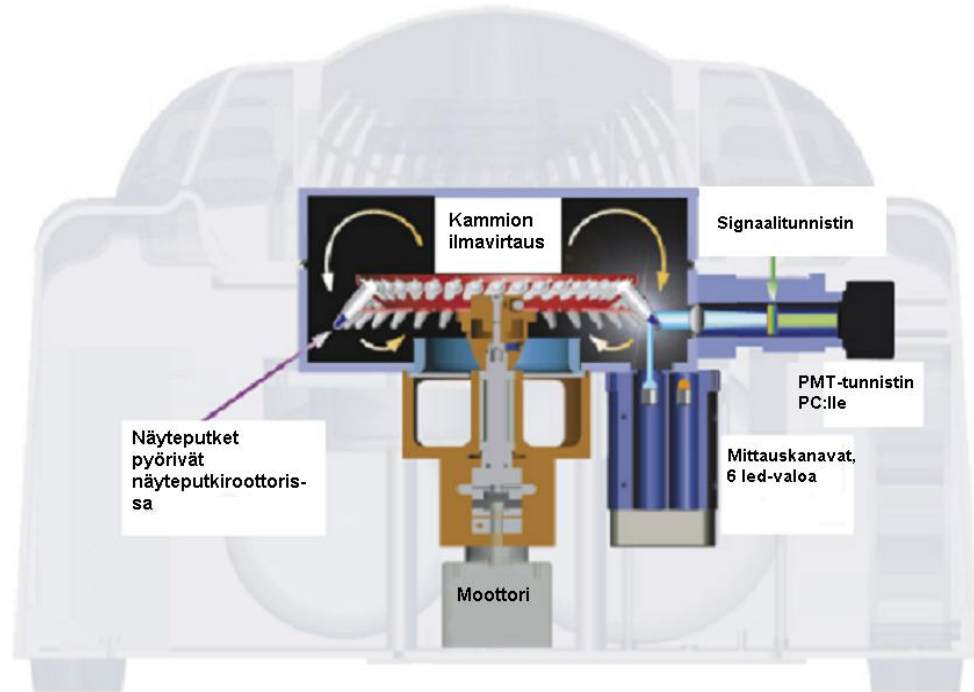
3.6 Rotor Gene 6000

Reaaliaikainen Rotor Gene 6000 PCR-laite (kuva 9) on käytössä tutkimussovel-
luksissa kuten lääketieteessä, maataloudessa, oikeustieteessä ja biotieteessä.
Laitteella saadaan muodostumaan nopeasti ja suurella herkkyydellä PCR-
tuotetta. Koneen avulla saadaan PCR-menetelmää haittaavat kontaminaatoris-
kit pienemmiksi.



Kuva 9 Rotor Gene 6000 PCR-laite.

Koneen toimintaperiaate perustuu kammiossa 400 rpm pyörivään roottoriin, josta kiertävän ilman lämpötila muuttuu PCR-sykliden eri vaiheissa. Roottorissa ovat kuusi optista valonlähdettä osoitetaan putkissa oleviin näyteliuoksiin, josta lähtevä valoärsyke heijastuu koneen signaalitunnistimeen. Tunnistin muuttaa signaalin PMT-tunnistimella koneen näytölle nousevaksi käyräksi. Laite lähettää reaaliaikaista PCR-dataa koneen näytölle koko ajon ajan. Laitteen piirtämä data voi olla logaritmista, lineaarista tai suoraviivaista. Laitteessa olevaa PCR-ohjelmaa ja sen kestoa voi muuttaa halutunlaiseksi. Rotor Gene 6000 PCR-laitteen toimintaperiaate on esitetty kuvassa 10.



Kuva 10 Rotor Gene 6000 PCR-laitteen toimintaperiaate.

Rotor Gene 6000-laitteessa on kuusi eri mittauskanavaa: sininen, vihreä, keltainen, oranssi, punainen, purppura ja HRM (high resolution melting). Työssä käytettiin kanavia green, yellow, red ja HRM. Green-kanava mittaa SYBR Green I -leimaa, punainen kanava Cy5-leimaa ja HRM Syto9- ja Syto82 -leimoja. (Rotor Gene 6000-fluoresenssikanavat, 2012). Kanavien eri fluorokromi-mittausalueet on esitetty taulukossa 1.

Taulukko 1 Rotor Gene 6000 PCR-laitteen fluorokromi-mittausalueet.

Kanavan nimi	Viritys/ Excitation (nm)	Havaitseminen/ Detection (nm)	Fluorokromi
Sininen/Blue	365 nm	460 nm	Marina Blue
Vihreä/Green	470 nm	510 nm	SYBR Green
Keltainen/yellow	530 nm	557 nm	JOE, VIC, HEX
Oranssi/Orange	585 nm	610 nm	ROX, Cy 3.5
Punainen/Red	625 nm	660 nm	Cy5
Purppura/Crimson	680 nm	712 nm	Quasar 705
HRM	460 nm	510 nm	Syto9/Syto82

4 Reagenssit

4.1 Alukkeet

PCR:ssä tarvitaan monistettavalle DNA-pätkälle sopivat alukkeet. Alukkeet ovat pieniä nukleotidipätkiä, jotka tunnistavat monistettavan DNA-alueen aloitus- ja lopetuspäät. Työssä on aikaisemmin osoitettu, että enterovirusia voidaan parhaiten monistaa käyttämällä AN88- ja AN89-alukkeita (Liimatainen, M., 2011). Nämä alukkeet koodaavat noin 340 emäsparin pituista aluetta ja ovat suunniteltu sitoutumaan enterovirusten VP1-alueen 5'- ja 3'-päihin. AN88-alue on 3'-pään alue ja AN89 5'-pään alue.

Työssä verrattiin Cy5-leimatun AN88-alukkeen toimivuutta leimaamattomaan AN88-alukkeeseen. Cy5 on fluoresoiva väriaine, jonka absorbanssiväli on 649–670 nm. PCR-reaktiossa Cy5-leimattuja AN88-alukkeita mitattiin PCR-laitteen Red-kanavalla (625–660 nm).

Random Hexamer on kuuden satunnaisessa järjestyksessä olevan nukleotidin seos, jota käytetään RT-reaktiossa. Random Hexamer -alukkeet sitoutuvat niille komplementaarisiin templaattissa oleviin kohtiin RT-reaktiossa.

4.2 Entsyymit

Mastermix-entsyymiseokset ovat valmiita seoksia, jotka sisältävät kaikki muut komponentit paitsi alukkeet ja monistettavan DNA/RNA-templaatin. Seokset sisältävät PCR-puskurin, magnesiumkloridia, fluoresoivan merkkiaineen, vapaat nukleotidit ja PCR-entsyymin. Näiden reaktion välttämättömien osasten lisäksi PCR-reaktiossa käytetään usein myös muita aineita, joiden tarkoituksena on muuttaa reaktio-olosuhteita suotuisiksi. Aiemmin on todettu, että KAPA SYBR Green-entsyymiseoksella saadaan paras menetelmäherkkyys RT-qPCR:ssä (Liimatainen, M., 2011).

4.2.1 RT-entsyymit

Improm II™ -entsyymi on käänteiskopioijaentsyymi, joka muuttaa RNA-molekyylin komplementaariseksi DNA:ksi RT-reaktiossa. Improm II on aktiivisimmillaan 37–55 °C:ssa. Improm II™ -entsyymiä käytettiin työssä kaksivaiheisessa qPCR:ssä ja yksivaiheisessa RT-qPCR:ssä käänteiskopioijaentsyyminä (Improm II™ Reverse Transcription System II, 2012).

M-MuLV tai toisin sanoen M-MLV -entsyymi on käänteiskopioijaentsyymi, joka tuottaa yksivaiheisessa RT-PCR:ssä komplementaarisen DNA:n RNA:sta. Optimaalinen reaktiolämpötila tällä entsyymillä on + 37 °C (Das ym., 2004). Työssä käytetty kaupallinen KAPA One-step PCR -reaktiosarja sisälsi M-MLV -käänteiskopioijaentsyymien.

4.3 PCR-entsyymit

PCR-reaktiossa yleisimmin käytetty polymeraasientsyymi on Taq-polymeraasientsyymi. Taq-polymeraasientsyymi on eristetty korkeaa lämpötilaa kestävän *Thermus aquaticus*-bakteerista ja sen molekyylipaino on noin 94 kDa (Taq-DNA-polymeraasi, VWR, 2012).

Työn fluorokromitestissä testattiin eri entsyymiseosten toimintaa PCR-reaktioissa, joihin lisättiin SYTO 9- ja SYTO 82 -fluorokromivärejä. Testatut entsyymiseokset olivat kaupallisia entsyymiseoksia: Kapa Hifi qPCR, Kapa Hifi HOTSTART, Sensifast Probe NO-ROX, Maxima Probe ja Kapa Maxima Probe. Työssä käytetyt PCR -entsyymien tiedot on listattu taulukossa 2.

Taulukko 2 PCR-entsyymiseokset.

Tuote-numero	Entsyymiseos	Valmistaja	PCR-entsyymi	Käyttötarkoitus	Ajokanava PCR
KK4600	KAPA™ SYBR® FAST qPCR Universal	KapaBiosystems	Taq-polymeraasi	Two-step/one-step	Vihreä
KK4701	KAPA™ Probe qPCR	KapaBiosystems	Taq-polymeraasi	Syto 9/ Syto 82	Oranssi ja keltainen
KE2005	KAPA HiFi™ Probe	KapaBiosystems	B-ryhmän polymeraasi	Syto9	Vihreä/HRM
KK2501	KAPA HiFi™ HOTSTART	KapaBiosystems	B-ryhmän polymeraasi	Syto9	Vihreä/HRM
SFPNS-111C	SensiFAST™ Probe NO-Rox	Bioline	Hot Start	Syto9	Vihreä/HRM
00031493	Maxima Probe qPCR Mastermix	Fermentas	Taq-polymeraasi	Syto82	Oranssi ja keltainen

4.4 Fluorokromit

PCR-ajoa voidaan seurata reaaliaikaisesti fluorokromien avulla. Fluorokromit ovat kemiallisia yhdisteitä ja ei-spesifisesti kiinnittyviä leimoja. Fluorokromit absorboivat näkymätöntä ultraviolettisäteilyä, ja vapauttavat osan energiasta pidempinä, näkyvinä valon aallonpituuksina eli fluoresenssina. Tämä lähestymistapa vaatii vähemmän optimointia kuin muut PCR:ssä käytetyt tunnistusmenetelmät, eikä se tarvitse tarkkaa tietoa kohdesekvenssistä. Eniten käytetty ei-spesifisesti kiinnittyvä leima on SYBR® Green I (Fluoresenssimikroskopia, 2012). Fluoresenssisignaali on verrannollinen tuotteen määrään, eli mitä enemmän tuotetta muodostuu, sitä enemmän tuote fluoresoi (Suominen ym. 2010, s. 167).

4.4.1 SYBR® Green I

SYBR Green I on syaaniväriaine, joka auttaa tunnistamaan muodostuvan DNA:n PCR-syklien aikana. SYBR Green I tarttuu PCR-reaktiossa muodostuvaan kaksinauhaiseen DNA:han, jonka seurauksena muodostuva DNA-väriainekompleksi absorboi fluoresoivaa vihreää väriä. Värin tunnistava PCR-laitte muodostaa lineaarisen Ct-kynnysarvokäyrän laitteen näytölle. Ongelmana tuotteen muodostumisessa on SYBR Green I -värin epäspesifisyys eli väriaine tarttuu jokaiseen PCR:ssä muodostuvaan kaksijuosteiseen DNA-nauhaan esim. ”silmukoituneeseen DNA:han”, eikä vain haluttuun kohde-DNA:han (Suominen ym., 2010, s. 167).

4.4.2 Cy5-leima

Cy5 on kellanvihreänä fluoresoiva syaaniväriaine, joka on kiinnitetty koettimeen, tässä työssä enteroviruksen VP1-alueen AN88-alukkeeseen. Työssä Cy5-leimattuja AN88-alukkeita mitattiin PCR-laitteen Red-kanavalla (625–660 nm). Cy5-leimaa käytetään yleensä mikrosirutekniikassa.

4.4.3 SYTO 9 ja SYTO 82

Reaaliaikaisen PCR:n seurantaan on kehitetty muitakin fluoresoivia väriaineita, esim. SYTO 9 ja SYTO 82. Aikaisemmissa tutkimuksissa on osoitettu, että Syto82-väri sitoutuu herkemmin kaksinauhaiseen kohde-DNA:han kuin SYBR Green I ja muodostaa siten paremman signaalin (Monis ym. 2005).

4.5 Virusnäytteet

Työssä käytettiin virusnäytteitä, jotka olivat enteroviruksen RNA-transkripteja, plasmidivektoreita ja tyyppiviruksia. Transkriptit on tuotettu in vitro-transkriptioreaktiolla plasmidivektoreista, joissa RNA-virusten genomi on kloonattu DNA-muotoon. Transkriptien kopioluku on tunnettu (McLeish ym, 2012). Työssä käytettiin kahden enteroviruksen RNA-transkripteja, E30 ja E7.

Työssä käytettyjä plasmidivektoreita ovat pCAV9 (HEV-B-laji), pCAV16 (HEV-A-laji), pCAV21 (HEV-C-laji) ja pEV11 (HEV-D-laji). Plasmidikannat on tuotettu plasmidivektoreista, joissa RNA-virusten genomi on kloonattu DNA-muotoon. Plasmidien konsentraation avulla voidaan laskea virusgenomin määrä PCR-reaktiossa.

Tutkitut tyypvirukset ovat soluviljelmissä kasvatettuja enterovirus-tyyppikantoja CBV4, Echo 11 ja CAV9 (HEV-B-laji). Tyypviruksien kopiolukua ei tunneta. Plasmidikannat sekä enterovirustyyppikannat ovat peräisin Virusopin kantakokoelmasta.

5 Työn suoritus ja tulokset

5.1 Yksivaiheisen RT-qPCR -menetelmän optimointi

Työn tarkoituksena oli optimoida yksivaiheinen RT-qPCR -menetelmä enterovirusten tyypittämiseksi. Optimoinnin tarkoituksena oli löytää reaktiokomponenttien pitoisuuksia ja ajo-olosuhteita muuntelemalla olosuhteet, joilla päästään mahdollisimman lähelle kaksivaiheisessa menetelmässä saavutettavaa monistusherkkyyttä.

Lähtökohtana oli kolme erilaista yksivaiheista PCR-ohjetta, joita pyrittiin muuntamaan sellaisiksi, joissa on kaksivaiheista vastaava PCR-monistusherkkyyys. Ohjeista kaksi olivat itse tehtyjä ns. in-house -ohjeita ja yksi kaupallinen kitti-ohje (KAPA SYBR FAST One-Step qRT-PCR-Kit). Käänteiskopioijaentsyyminä kaupallisessa kitissä oli M-MLV -entsyymi ja omassa ohjeessa Improm II™ -entsyymi. Kaupallisella yksivaiheisella menetelmällä analysoitiin enteroviruksen RNA-transkriptejä (E7, E30) ja omilla yksi- ja kaksivaiheisilla ohjeilla enteroviruksen tyypiviruksia (CAV9, ECHO11 ja CBV4). Optimoinnissa käytettiin laimennoksia 10^4 – 10^{-4} . Laimennos tarkoittaa sitä, kuinka monta enteroviruskopiota on mikrolitrassa. 10^4 -laimennoksessa on siten 10 000 viruskopiota/ μ l. Kun tiedetään laimennoksissa käytettävät viruskopioiden määrät, saadaan selville, kuinka monta virusgenomia PCR-reaktioseoksen komponentit pystyvät monistamaan PCR:ssä. Kaupallinen one-step -reaktioseos on esitetty taulukossa 3.

Taulukko 3 Kaupallinen one-step qPCR-reaktioseos.

Reagenssi	Määrä µl (lopullinen konsentraatio)
KAPA qPCR Sybr Fast Universal	10
KAPA RT mix (50x)	0,4
AN88-aluke	1
AN89-aluke	1
AQUA	5,6
Kokonaistilavuus	20

Taulukosta 4 nähdään kaupallisen yksivaiheisen RT-qPCR -reaktion tulos verrattuna omaan kaksivaiheiseen menetelmään. Tuloksista ilmenee, että kaupallinen menetelmä ei toiminut yhtä hyvin. Menetelmällä saatiin näkymään vain E7-virus-RNA:n vahvin pitoisuus (10^4), koska tuotteelle saatiin mitattua sulamispiste. E30-RNA -näyte ei toiminut tällä menetelmällä ollenkaan. Kaksivaiheisessa menetelmässä sen sijaan saatiin tulos 10^4 - ja 10^3 -laimennoksilla.

Taulukko 4 Kaupallinen One-step-ajo transkripteillä.

	Kaupallinen One-step				Kaksivaiheinen			
	E30	E7	E30	E7	E30	E7	E30	E7
Kopioluku	Ct		Melt		Ct		Melt	
10^4	26,32	25,1		82,3	24,94	23,22	85	84
10^3	26,19	26,33			28,36	27,37	85,2	84
10^2	26,28	26,35			29,05	30,39		
10^1	26,15	26,36			29,79	30,33		
Threshold	0,01	1	0,01				0,5	
Tulos				1			2	2

Menetelmäoptimoinnissa pyrittiin muuttamaan reagenssipitoisuuksia, jotka vaikuttavat menetelmän herkkyyteen. Reagensseista muutettiin neljää reagenssipitoisuutta: magnesiumkloridi, alukkeet, nukleotidit ja veden määrä. Näytteinä

käytettiin Cav9, Echo11 ja CBV4 -ymppiviruksia ja niiden laimennoksia 10^{-2} - 10^{-4} . Lähtökohtana oli kaksi omaa in-house -ohjetta, joista toisesta puuttui $MgCl_2$ -reagenssi (Mastermix 2.) Alkuperäiset in-house -työohjeet ja ajo-olosuhteet ovat liitteessä 3. Taulukosta 5 nähdään, että 2. Mastermix -ohjeen PCR-ajot tyyppiviruksilla onnistuivat 55,5 %:n herkkyydellä. Tästä voitiin myös päätellä, että $MgCl_2$ -pitoisuus vaikuttaa PCR-menetelmäherkkyteen. Mitä vähemmän $MgCl_2$ on seoksessa, sitä paremmin tuotetta muodostui.

Taulukko 5 RT-vaiheen magnesium-konsentraation vaikutus yksivaiheisen RT-qPCR:n toimivuuteen.

One step	1.Mastermix		2.Mastermix	
	Ct	Melt	Ct	Melt
Kopioluku				
Cav9				
10^{-2}	21,47	83,5	23,53	83,5
10^{-3}	22,16		31,38	
10^{-4}	23,36		29,79	
Echo11				
10^{-2}	21,15	83,5	24,14	83,8
10^{-3}	21,46		28,36	84
10^{-4}	21,74		29,45	84
CBV4				
10^{-2}	21,64		26,79	83
10^{-3}	21,61		29,19	
10^{-4}	21,49		29,54	
Threshold	0,1	0,5	0,1	0,5
Tulos		2		5
%		22,20		55,50

Taulukosta 6 nähdään, että $MgCl_2$ -pitoisuus vaikuttaa tuotteen muodostukseen PCR:ssä. Paras $MgCl_2$ -pitoisuus on tuloksien mukaan 0,25 μ l, jonka avulla saatiin ymppiviruksia monistumaan 55,5 %:n herkkyydellä. Ymppivirusten työohjeet ja ajo-olosuhteet tälle 0,25 μ l $MgCl_2$ -pitoisuudelle on esitetty liitteessä 4.

Taulukko 6 MgCl₂-pitoisuudet ja ajotulokset omasta yksivaiheisesta RT-qPCR:stä verrattuna kaksivaiheiseen menetelmään.

MgCl ₂ /μl	0		0,25		0,5		0,75		Kaksivaiheinen	
Kopioluku	Ct	Melt	Ct	Melt	Ct	Melt	Ct	Melt	Ct	Melt
Cav9										
10 ⁻²	19,58	83,5	17,85	83,7	16,99	83,7	16,97	83,5	17,87	84,3
10 ⁻³	21,73	83,8	20,83	84	18,14		17,22		20,67	84,3
10 ⁻⁴	22		21,04		18,15		17,49		24,65	84,2
Echo11										
10 ⁻²	19,66	83,8	18,85	83,8	17,85	83,7	17		16,96	84,5
10 ⁻³	21,72	83,8	20,8	83,8	18,16		17,75		19,87	84,5
10 ⁻⁴	21,97		21,01		18,12		17,38		24,59	84,5
CBV4										
10 ⁻²	20,83	82,7	19,89	83	18,06		17,3		19,88	83,5
10 ⁻³	22,06		21,42		18,36		17,28		23,43	83,5
10 ⁻⁴	22,44		21,29		18,55		17,02		27,69	83,5
Threshold	0,01	1	0,01	1	0,01	1	0,01	1	0,01	1
TULOS		5		5		2		1		9
%		55,5		55,5		22,2		11,1		100

Reaktiossa tarvittavan MgCl₂-pitoisuuden voi selvittää laskennallisesti kaksivaiheisesta PCR-menetelmän reagenssipitoisuuksien avulla. RT-reaktiossa käytetään suurin osa niistä reagensseista, mitä yksivaiheisessa menetelmässä edellytetään. Kaksivaiheisen RT-reaktion reagenssipitoisuudet on listattu taulukossa 7.

Taulukko 7 RT-reaktion reagenssit.

Reagenssi	Määrä μl (lopullinen konsentraatio)
5x Improm II-puskuri	2 (1x)
25 mM MgCl_2	1 (2,5 mM)
*10 mM dNTP	0,5 (0,5 mM)
RNAasi-inhibiittori	0,5
Improm II-entsyymi	0,5
Random Hexamer-primer	1 (1 μM)
RNA	4,5
Kokonaistilavuus	10

Ohjeen mukaan RT-reaktioseoksesta siirretään 2 μl PCR-reaktioseokseen. Reaktioseoksesta otetaan siten viidesosa koko seoksen kokonaistilavuudesta. Tästä saadaan PCR-reaktiossa vaikuttavat RT-reagenssipitoisuudet, joista nähdään, että MgCl_2 :ia on PCR-ajossa 0,2 μl , joka vastaa työn ajoissa saatuun MgCl_2 -määrään.

RT-reagenssien määrät PCR-reaktiossa ovat seuraavat:

2 μl = 0,4 μl RT-puskuri
 0,2 μl MgCl_2
 0,1 μl dNTP
 0,1 μl RNAasi
 0,1 μl RT-entsyymi
 0,2 μl Random Hexamer
 0,9 μl RNA Näyte

5.2 Cy5-testaus

Cy5-testauksessa oli tarkoitus verrata leimaamattoman ja Cy5-fluorokromilla leimatun alukkeen toimivuutta qPCR-reaktioissa. Jos Cy5-leimattu aluke toimii, voidaan jatkotutkimuksissa käyttää leimattua PCR-tuotetta sekvenssoinnin sijaan mikrosiruilla, joilla tuote voidaan ”tyypittää”. Cy5-fluorokromilla leimattu aluke oli enterovirusten VP1- alueen 3’-pään AN88-alue. Työssä käytettiin enterovirusten plasmidivektoreita CAV9, CAV16, CAV21 ja EV11 ja niiden laimennoksia 10^7 – 10^{-1} . Koska käytettiin plasmidivektoreita, RT-reaktiota ei tarvittu,

ja PCR-reaktioajo voitiin ajaa suoraan näytteistä. Työ tehtiin noudattamalla PCR:n yleisohjetta (liite 5), jossa Cy5-ajoissa tavallinen AN88-aluke korvattiin Cy5-leimatulla AN88-alukkeella. PCR-ajo -olosuhteet olivat samat kaikissa ajoissa (liite 5). Ajon tulokset näkyvät taulukossa 8.

Vertailukohteena tulosten analyysissä olivat Ct- ja Melt -arvot. Tuloksista nähdään, että Ct- ja Melt -arvoilla ei ole suurta eroa leimaamattoman ja leimatun alukkeen välillä.

Taulukko 8 AN88/ AN88 Cy5-testaus -tulokset.

AN88 (ylempi lukema)								
Cy5 AN88 (alempi lukema)								
	CAV9		CAV16		CAV21		EV11	
Kopioluku	Ct	Melt	Ct	Melt	Ct	Melt	Ct	Melt
10 ⁷	11,83	84	25,88	84	14,83	82,8	8,27	83,5
	12,1	84	27,77	84	14,91	83	9,05	84,7
10 ⁶	14,66	83,8	29,06	84	17,84	83	11,97	83,5
	14,9	84	31,1	84,2	18,55	83	12,9	84,8
10 ⁵	17,57	84	32,78	84	22,38	83	15,82	83,5
	18,55	84	33,74		23,29	83	16,49	84,7
10 ⁴	21,44	84	37,58		26,19	82,7	19,68	83,5
	22,47	84	35,82		26,32	83	20,62	84,8
10 ³	24,4	84	37,67		28,21	82,5	23,5	83,7
	26,36	84	37,06		30,2	83,2	24,5	84,7
10 ²	26,52	84	37,27		30,03		26,64	83,7
	29,51	84	39,48		30,75	83,2	27,5	84,7
10 ¹	26,73		37,72		30,19		29,71	83,8
	26,36	84	35,71		32,88		29,64	84,7
10 ⁰	25,93		40,3		30,92		30,88	83,5
	31,48		36,85		21,42		30,84	
10 ⁻¹	26,59		35,1		31,98		30,94	83,5
	0		40,89		32,9		31,66	

5.3 Fluorokromitestaus

Työn tarkoitus oli testata qPCR:ssä erilaisia kaupallisia entsyymiseoksia, joihin lisättiin fluoresoiva väri SYTO 9 tai SYTO 82. Työn entsyymiseokset, käyttötarvikkeet ja polymeerasientsyymit on listattu taulukossa 2. Työssä käytettiin plasmidivektoria pCAV9 ja sen laimennoksia 10^7 – 10^{-1} .

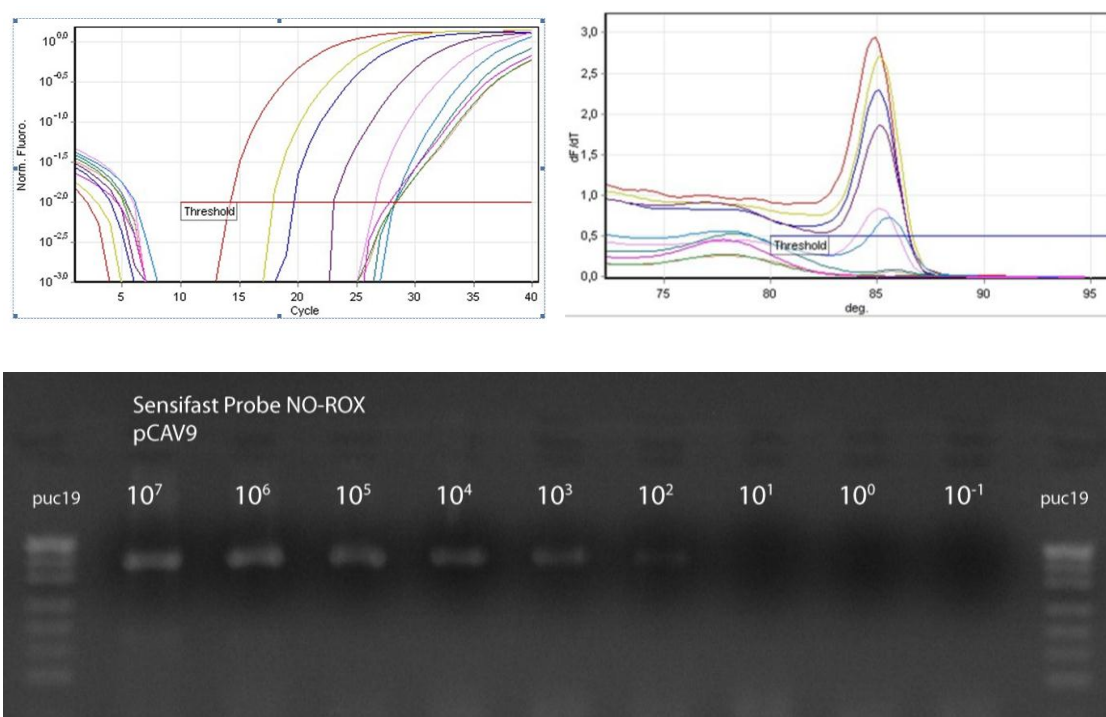
Entsyymiseoksista valmistettiin ensin käyttöliuos, joka sisälsi tietyn fluorokromin. Tämän jälkeen käyttöliuokseen lisättiin muut PCR-reaktioon tarvittavat komponentit ja ajettiin PCR. Työn ohjeet on listattu liitteessä 6. PCR -ajokanavana käytettiin HRM -kanavaa. Mahdollisten PCR-tuotteiden muodostuminen saatiin selville ajamalla PCR -tuotteista agarosigeeli. Työn tulokset on kuvattu taulukossa 9.

Taulukko 9 Syto 9 -fluorokromivärjäys, tulokset; (x)=näkyvä Ct- ja Melt -käyrillä tai geelillä.

Entsyymiseos	Ct	Melt	AGE
KAPA™ Probe		x	
KAPA HiFi™ Probe	x		x
KAPA HiFi™ HOTSTART	x		
SensiFAST™ Probe NO-Rox	x	x	x

Taulukosta 9 nähdään, että Syto9 ei toiminut odotetusti kaikilla entsyymiseoksilla. KAPA Probe ja KAPA Hifi Hotstart:illa ei saavutettu molempia Ct- tai Melt -fluoresenssiarvoja. KAPA Hifi Probe:lla saatiin Ct-fluoresenssiarvot, mutta ei Melt-arvoja. Kuitenkin tuotteet näkyivät agarosigeelillä, mikä viittaa reaktion

onnistumiseen, mutta PCR-laitteeseen viittaavaan ongelmaan tai reaktioseoksessa tapahtuneeseen inhibitioon. Ainoastaan SensiFAST™ Probe NO-ROX näkyy kaikilla käyrillä ja agarosigeelillä (kuva 11).

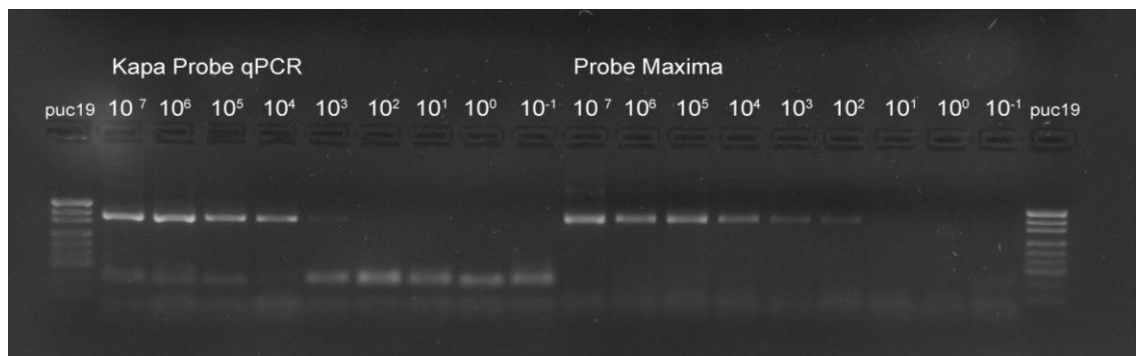


Kuva 11 SensiFAST No-Rox -tulokset.

Syto 82 -fluorokromin testauksessa käytettiin kahta entsyymiseosta: KAPA™ Probe qPCR- ja Maxima Probe qPCR -mastermix. Entsyymiseoksien käyttö-
laimennokset, johon oli lisätty Syto 82 -fluorokromia, valmistettiin erikseen ennen muiden reagenssien lisäämistä. Käyttö-
laimennokset ja Syto 82 -työohjeet ovat liitteessä 4. PCR-ajon jälkeen tuotteista ajettiin agarosigeeli. Syto 82 PCR-ajotulokset on esitetty taulukossa 10 ja AGE on esitetty kuvassa 12. Työssä käytetyt PCR-ajokanavat ovat keltainen, oranssi ja vihreä.

Taulukko 10 Syto 82 -fluorokromivärjäys, tulokset. (x)=näkyvät Ct- ja Melt -käyrillä tai geelillä.

Entsyymiseos	Ct		Melt	AGE
KAPA™ Probe qPCR		x		x
Maxima Probe qPCR				x
PCR-ajokanava	Oranssi	Keltainen	Vihreä	



Kuva 12 Syto82:n geelikuva.

Taulukosta 10 nähdään, että KAPA™ Probe qPCR näkyy Ct-käyrällä vain keltaisella ajokanavalla. Maxima Probe qPCR:lle ei saatu PCR-tuloksia. AGE-kuvasta kuitenkin nähdään, että tuotetta muodostui PCR-ajossa eli ajo onnistui.

6 Loppupäätelmät

Työn tarkoituksena oli optimoida yksivaiheinen RT-qPCR -menetelmä yhtä herkäksi kuin kaksivaiheinen RT-qPCR-menetelmä. Menetelmää käytetään enterovirusten tunnistamiseen. Työn tarkoituksena oli myös testata, haittaako Cy5-fluorokromileima PCR-laitteen SYBR Green I -kanavan toimintaa PCR-ajossa ja testata SYTO 9- ja SYTO 82 -fluorokromien toimivuutta eri kaupallisilla entsyymiseoksilla. Menetelmän spesifisyys testattiin enterovirus-cDNA:ta sisältävillä geenivektoreilla, virus-RNA-transkripteilla ja tyyppiviruskannoilla.

Työn merkittävin tulos oli, että kaupallinen yksivaiheinen RT-qPCR -menetelmä ei toiminut yhtä herkästi kuin omaan optimoituun menetelmään perustuva yksivaiheinen RT-qPCR, jolla päästiin lähes samaan herkkyteen kuin kaksivaiheinen menetelmä. Optimoinnin tuloksena löydettiin siten olosuhteet, joissa yksivaiheisen RT-qPCR-menetelmän herkkyys saatiin lähelle kaksivaiheista RT-qPCR-menetelmää. Optimoinnissa huomattiin, että magnesiumkloridin määrä vaikutti merkittävästi tuloksiin. Tämä todistettiin myös laskennallisesti, koska sekä kaksivaiheisessa että omassa yksivaiheisessa menetelmässä on melkein samat reagenssipitoisuudet. Tuloksena saatiin kehitettyä alustavat puitteet RT-qPCR -menetelmän jatkokehitykselle. Yksivaiheisen RT-qPCR:n jatkooptimoinnille olisi vielä tarvetta, jos halutaan päästä samoihin herkkyysiin kuin kaksivaiheisessa mallissa.

Vertailtaessa Cy5-leimattujen enterovirus-VP1 -alukkeiden eroa ei leimattuihin primereihin, ei huomattu mitään haittavaikutuksia fluoresenssin mittauksessa. Koska Cy5-leimattu ja ei-leimattu olivat yhtä hyvät, enterovirus-VP1-tyypityksessä tullaan jatkossa käyttämään Cy5-leimattua primeria PCR:ssä.

Kirjallisuuden perusteella Syto9- ja Syto82 -fluorokromin pitäisi toimia paremmin kuin SYBR Green I. Työn tuloksista kuitenkin nähdään, että Syto9 ja Syto82 eivät toimi paremmin kuin SYBR Green I.

PCR:ssä on useita reaktiokomponentteja, joita työn aikana ei ehditty optimoimaan. Reaktion herkkyyttä pitää pystyä parantamaan, mikäli tavoitteena on tuottaa VP1-tuote suoraan kliinisistä virusnäytteistä, joissa virus-RNA:ta on vä-

hän. Herkkyyttä voidaan parantaa muokkaamalla PCR-ajo -olosuhteita ja reagenssi-pitoisuuksia. Tärkeässä osassa ovat reagenssien ja eritoten näytteiden laatu. Yksivaiheisessa on vähemmän kontaminaatioriskejä kuin kaksivaiheisessa menetelmässä, koska kaksivaiheisessa on enemmän pipetointivaiheita. Yksivaiheisessa nähdään myös koko reaktio, koska nähdään reaktio reaaliaikaisesti PCR:n näytöltä.

RT-qPCR -menetelmän yksi etu on sen nopeus. RT-reaktio voidaan tehdä tunnissa ja PCR-reaktio kahdessa tunnissa. Jatkotutkimusten jälkeen menetelmää voidaan käyttää epidemioiden nopeaan selvittämiseen, virusmäärien tunnistamiseen ja virustyyppien ja muiden taudinaiheuttajien erottamiseen.

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 yms. Jyväskylä: Ws Bookwell Oy.

Bennett, S., Harvala H., Witteweldt J., McWilliam Leitch E.C., etc.... 2011. Rapid Simultaneous Detection of Enterovirus and Parechovirus RNAs in Clinical Samples by One-Step Real-Time Reverse Transcription-PCR Assay. Journal of Clinical Microbiology Vol.49; No.7.

Bustin S. A., Benes V., Garson J.A., Hellems J., Huggett J., Kubista M., Mueller H., Nolan T., Shipley G.L., Vandesompele J. ja Wittwer C.T. 2009. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. The American Association for Clinical Chemistry. Analytical Biochemistry.

Das, Debanu - Georgiadis, Millie. The Crystal Structure of the Monomeric Reverse Transcriptase from Moloney Murine Leukemia Virus. Department of Biochemistry and Molecular Biology Indiana University School of Medicine. Elsevier Science Ltd., 2004, Structure, Vol. 12, 819 - 829. (8)

Ehrenfeld E., Domingo E. ja Roos R.P. 2010. The Picornaviruses. Washington, DC.

Enteroviruksen kuorikerros. Saatavilla <http://www.picornaviridae.com/structures/enterovirus.htm> 13.9.2012

Enteroviruksen kuoriproteiinit; 3D. Saatavilla http://www.nature.com/nsmb/journal/v19/n4/full/nsmb.2255.html?WT.ec_id=NSMB-201204 13.9.2012

Enterovirukset ja pikornavirukset. Saatavilla <http://www.ktl.fi/attachments/vimo/tammikuu10.pdf>, 14.4.2012.

Fluoresenssimikroskopia. Saatavilla <http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/fluoresenssimikroskopia/2/> 13.7.2012

Geelielektroforeesi. Saatavilla http://opinnot.internetix.fi/fi/muikku2materiaalit/lukio/bi/bi5/4_geeni-_ja_biotekniikkaa_kaytannossa/4.3_geenitekniikan_perusmenetelmia/4.3.3_geelielektroforeesi?C:D=hNcl.gWxJ&m:selres=hNcl.gWxJ 13.4.2012

Hyypiä, T.; Roivanen, M. & Ruuskanen, O. 2010. Pikornavirukset. Teoksessa Mikrobiologia, Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet. 1. painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.

Improm-II™ Reverse Transcription System. 2012. Ohjekirja. Versio #TM236. Promega.

McLeish NJ, Witteveldt J, Clasper L, McIntyre C, McWilliam Leitch EC, Hardie A, Bennett S, Gunson R, Carman WF, Feeney SA, Coyle PV, Vipond B, Muir P, Benschop K, Wolthers K, Waris M, Osterback R, Johannessen I, Templeton K, Harvala H, Simmonds P. 2012. Development and assay of RNA transcripts of enterovirus species a to d, rhinovirus species a to C, and human parechovirus: assessment of assay sensitivity and specificity of real-time screening and typing methods. Clin. Microbiological; 2910-7.

KAPA HiFi™ HOTSTART. 2012. Ohjekirja. Versio 4.10. KapaBiosystems.

KAPA HiFi™ PCR-Kit. 2012. Ohjekirja. Versio 6.10. KapaBiosystems.

KAPA SYBR® FAST One-step qRT-PCR Kit. 2012. Ohjekirja. Versio 1.10. KapaBiosystems.

KAPA™ SYBR® FAST qPCR Kit. 2012. Ohjekirja. Versio 4.10.KapaBiosystems.

Liimatainen, M. 2011. Opinnäytetyö. Kvantitatiiviseen qRT-PCR:ään perustuva menetelmä enterovirusten tyypittämiseen.

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.

Monis P.T., Giglio S. ja Saint C.P.2005. Comparison of SYTO9 and SYBR Green I for real-time polymerase chain reaction and investigation of the effect of dye concentration on amplification and DNA melting curve analysis.

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.

Nuoruustyypin diabetes. http://www.ktl.fi/portal/suomi/osastot/vimo/tutkimus-_ja_seurantakohteet/enterovirukset/enterovirukset_ja_nuoruustyypin_diabetes, 14.4.2012 diabetesjuttu!

Picornaviridae.com. 2011. Pikornavirusten kotisivu. Saatavilla <http://www.picornaviridae.com> 7.3.2012

pUC 19-kokostandardi, Saatavilla http://www.taq-dna.com/puc19-dna-2fbsis-i--28hpa-ii-29-digest--_147.html 21.11.2012

Rotor Gene 6000 – fluoresenssikanavat. Saatavilla <http://www.qiagen.com/products/rotor-geneq.aspx#Tabs=t1> 7.6.2012

SensiFAST™ Probe NO-ROX Kit.2012. Ohjekirja. Versio SPN11.06a. Biorline.

Solunetti, Suomen virtuaaliyliopisto. 2006. Solubiologia. Saatavilla <http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/etusivu/> 7.3.2012

Suomen Solubiologit ry. Saatavilla www.suomensolubiologit.fi 20.3.2012.

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

Suominen, I. ja Ollikka P. 1999. 3. Painos. *Yhdistelmä-DNA-tekniikan perusteet*. Helsinki.

SYTO® Green - Fluorescent Nuclein Acid Stains. Saatavilla <http://www.gene-quantification.de/syto-dyes.pdf> 20.3.2012

Taq-polymeraasi. VWR – internetsivut. Saatavilla https://fi.vwr.com/app/catalog/Product;jsessionid=Ax-Q6EYiGI0kD7kBfmjulg**.node3?article_number=733-1834 10.9.2012

Venäläinen, R. 2012. *Internetix opinnot*. Bioteknologia. *Geenitekniikan perusmenetelmät: Agarosigeelielektroforeesi*. Saatavilla <http://opinnot.internetix.fi/fi/muikku2materiaalit/lukio/bi/bi5/index> 13.4.2012

Viral Life Cycles in Cells. Saatavilla <https://www.msu.edu/course/mmg/569/lifecycles.htm>
13.9.2012

Virusten tutkimusmenetelmät. Saatavilla
<http://www.med.utu.fi/ylib/ohjeita/tutkimusmenetelmat/Tutkimusmenetelmat.pdf> 14.4.2012

Ylä-Pelto, J. & Susi, P. 2010. Pikornavirusten käyttö geenivektoreina ja syöpäterapiassa.

Ihmisen enterovirusten serotyypit

Human enterovirus A (22 tyypikantaa):

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 A71 (EV-A71), EV-A76, EV-A89, EV-A90, EV-A91, EV-A114, EV-A119, EV-A92, simian enterovirus 19 (SV19), SV43, SV46 ja baboon enterovirus A13 (BA13)

Human enterovirus B (60 tyyppeä):

Coxsackievirus B1 (CV-B1), CV-B2, CV-B3, CV-B4, CV-B5, CVB6, CV-A9, echovirus 1 (E-1), E-2, E-3, E-4, E-5, E-6, E-7, E-9, 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 B69 (EV-B69), EV-B73, EV-B74, EV-B75, EV-B77, EV-B78, EV-B79, EV-B80, EV-B81, EV-B82, EV-B83, EV-B84, EV-B85, EV-B86, EV-B87, EV-B88, EV-B93, EV-B97, EV-B98, EV-B100, EV-B101, EV-B106, EV-B107, EV-B110 ja simian enterovirus SA5

Human enterovirus C (23 tyyppeä):

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-C95, EV-C96, EV-C99, EV-C102, EV-C104, EV-C105, EV-C109, EV-C113, EV-C116, EV-C116, EV-C117 ja EV-C118

Human enterovirus D (neljä tyyppeä):

EV-D68, EV-D70, EV-D94 ja EV-D111

Agaroosigeelielektroforeesi

Reagenssit

- Agaroosi (SeaKem Le Agarose, valm. Lonza, tuotenumero 5005)
- Elektroforeesiajopuskuri; 0,5 x TBE
- Load – väri; 10 x näytekupuri (10 x XCOG, Xylene cyanol orange G, blue)
- Etidiumbromidi, EtBr (Valm. Sigma, tuotenumero 806808)
- pUC 19 100 ng/μl molekyylipainomarkeri (valm. OZ Biosciences, tuotenumero PF00700)

Agaroosigeelin valmistus

Valmistetaan 2 % agaroosigeeli. Punnitaan 3 g agaroosia ja 150 ml 0,5 x TBE-puskuria. Kiehautetaan liuos mikrossa täydellä teholla 3 x 2 min, välillä sekoitetaan ja varmistetaan, että agaroosi on täysin liuennut puskuuriin. Lisätään liuokseen 7,5 μl etidiumbromidia ja sekoitetaan. Kaadetaan liuos sopivan kokoiseen kelkkaan, jonka päädyt on teipattu ja toiseen pätyyn on kiinnitetty sopivan kokoinen näytekampa. Annetaan liuoksen jähmettyä kelkassa n. 30 min vetokappissa, jonka jälkeen kampa irrotetaan.

Standardin valmistus

Pipetoidaan 13 μl Aqua, 5 μl pUC 19 100 ng/μ ja 2 μl 10 x näytekupuria (load-väri) 1,5 ml:n eppendorffputkeen.

Näytteiden valmistus

Pipetoidaan 20 μl PCR-tuotetta ja 2,5 μl 10 x näytekupuria (load-väri) 1,5 ml:n eppendorffputkiin.

Geelijaio

Asetetaan geelikelkka elektroforeesialtaaseen ja peitetään kelkka 0,5 x TBE-puskurilla. Geelille pipetoidaan standardi ja jokaista näytettä 10 µ/kolo. Näytteet ajetaan negatiivisesta positiiviseen napaan 120V/1h. Ajon jälkeen geeli valaistaan UV-valolla ja kuvataan kameralla. Kuvaan merkitään ajon näytejärjestys.

Yksivaiheinen RT-qPCR -optimointi: In-house työohjeet

1. Mastermix

ImProm + KAPA universal onestep

Reagenssi	Määrä µl (lopullinen konsentraatio)
Aqua	3
Random Hexamer	1
25 mM MgCl ₂	1
*10 mM dNTP	0,5 (0,5 mM)
ImProm RT-entsyymi	0,5
*AN88-primer (Eurogentec)	1 (0,5 mM)
*AN89-primer (Eurogentec)	1 (0,5 mM)
KAPA qPCR mastermix, 2x	10
cDNA/ Templaatti	2
Kokonaistilavuus	20

*Katso PCR-yleisohje (liite 5).

2. Mastermix

ImProm + KAPA universal one-step

Reagenssi	Määrä µl (lopullinen konsentraatio)
Aqua	4
Random Hexamer	1
25 mM MgCl ₂	jätetään pois
*10 mM dNTP	0,5 (0,5 mM)
ImProm RT-entsyymi	0,5
*AN88-primer (Eurogentec)	1 (0,5 mM)
*AN89-primer (Eurogentec)	1 (0,5 mM)
KAPA qPCR mastermix, 2x	10
cDNA/ Templaatti	2
Kokonaistilavuus	20

*Katso PCR-yleisohje (liite 5).

PCR ajo-olosuhteet:

Vaihe	Lämpötila	Aika	Syklien määrä
Hold (RT)	42 °C	45 min	
Inactive RT	95 °C	5 min	
Cycling	95 °C	10 s	x 40
	50 °C	30 s (20 s)	
	72 °C	10 s (1 s)	
Melt	72 °C → 95 °C	1 °C/ steppi	

Yksivaiheisen RT-qPCR -menetelmän optimointi: Ympypivirukset

Ohjeet ja ajo-olosuhteet (paras versio; lähimpänä kaksivaiheista menetelmää)

-Ajo 0,2 ml Rotor Gene -putkissa

Reagenssit	Määrä μ l
AQUA	3,75
Random Hexamer	1
MgCl ₂	0,25
*10 mM dNTP	0,5
Improm II RT-entsyymi	0,5
*AN88-primer (Eurogentec)	1
*AN89-primer (Eurogentec)	1
KAPA qPCR master mix 2x	10
RNA	2
Kokonaistilavuus	20

*PCR-yleisohje (liite 5).

Ajo-olosuhteet

Vaihe	Lämpötila	Aika	Syklien määrä
Hold (RT)	42 °C	45 min	
Inactive RT	95 °C	5 min	
Cycling	95 °C	10 s	x 40
	50 °C	30 s (20 s)	
	72 °C	10 s (1 s)	
Melt	72 °C → 95 °C	1 °C/ steppi	

RT-qPCR -yleisohje

Enterovirusten kvantitatiivinen RT-PCR -menetelmä

cDNA reaktio:

- 0,5 ml:n putkiin
- Reagenssit pidetään kylmäblokissa työskentelyn ajan, paitsi RNAasi-inhibiittori ja Improm-entsyymi, joita säilytetään pakastimessa pipetointihetkeen saakka. Improm-entsyymi tulee olla valolta suojattuna, esim. foliossa.

Työskentelyohje/putki

Reagenssi	Määrä μ l (lopullinen konsentraatio)
5x Improm II -puskuri (Promega)	2 (1x)
25 mM MgCl ₂ (Promega)	1 (2,5 mM)
*10 mM dNTP	0,5 (0,5 mM)
RNAasi-inhibiittori (Promega)	0,5
Improm II -entsyymi (Promega)	0,5
Random Hexamer -primer (Fermentas)	1 (1 μ M)
RNA	4,5
Kokonaistilavuus	10

*dNTP: (stokki 100 mM)

-Tehdään 10 mM seos:

10 μ l stokki +10 μ l stokki +10 μ l stokki+ 10 c stokki +60 μ l AQUA = 100 μ 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

PCR (yleisohje):

-Ajo 0,2 ml Rotor Gene -putkissa

Työskentelyohje/putki:

Reagenssi	Määrä µl (lopullinen konsentraatio)
Aqua	6
*AN88-primer (Eurogentec)	1 (0,5 mM)
*AN89-primer (Eurogentec)	1 (0,5 mM)
KAPA qPCR master mix, 2x	10
cDNA/Templaatti	2
Kokonaistilavuus	20

*AN88-primer: (stokki 100 mM)

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

*AN89-primer: (stokki 100 mM)

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

PCR-Ajo -olosuhteet: KAPA

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

SYTO 9- ja 82 -työohjeet

1. SYTO 9

pCAV9-laimennossarjalla.

1.1 PCR KAPA HiFi + SYTO9

SYTO9-käyttölaimennos: 1 µl SYTO 9 + 95 µl AQUA = 100 µl (50µM).

PCR-ohje/ putki: 0,2 ml Rotor Gene -putkiin.

Reagenssit	Määrä µl
AQUA	10,75
5x KAPA HiFi Fidelity -puskuri	5
KAPA dNTP	0,75
AN88-primer	1
AN89-primer	1
SYTO9 (50µM)	1
KAPA HiFi	0,5
cDNA	5
Kokonaistilavuus	25

1.2 Probe qPCR Mastermix 2x

SYTO 9-käyttöliuos:

Lisätään 1 µl SYTO9-stokkia 1,25 ml:aan Probe qPCR Mastermixiä.

PCR-ohje/ putki: 0,2 ml Rotor Gene -putkiin.

Reagenssit	Määrä µl
AQUA	6
AN88-primer	1
AN89-primer	1
Probe maxima qPCR mastermix 2x-käyttöliuos	10
cDNA	2
Kokonaistilavuus	20

Ajo HRM -kanavalla.

1.3 KAPA HiFi HOTSTART

PCR - ohje/ putki: 0,2 ml Rotor Gene -putkiin.

Reagenssit	Määrä µl
AQUA	10,75
5x KAPA HiFi Fidelity Buffer	5
KAPA dNTP Mix	0,75
AN88-primer	1
AN89-primer	1
SYTO 9 -käyttölaimennos (50µM)*	1
KAPA HiFi Hotstart DNA Polymerase	0,5
cDNA	5
Kokonaistilavuus	25

Ajo HRM -kanavalla.

1.4 SensiFAST Probe NO-ROX Kit + SYTO 9

SYTO9-käyttöliuos:

0,200 ml Sensifast Probe NO-ROX + 0,016ml SYTO9

PCR - ohje/ putki: 0,2 ml Rotor Gene -putkiin.

Reagenssit	Määrä µl
AQUA	4
AN88-primer	1
AN89-primer	1
2x SensiFAST Probe No-ROX Mix +SYTO 9 -käyttöliuos	10
cDNA	4
Kokonaistilavuus	20

1.5 PCR-ajo:

Vaihe	Lämpötila	Aika	Syklien määrä
HOLD	95	5 min	
Cycling	95	10 s	x 40
	50	30 s	
	72	10 s	
Melt	72 °C → 95 °C	1°C /steppi	

2. SYTO 82

2.1 KAPA Probe qPCR + SYTO 82

KAPA Probe qPCR +SYTO 82 -käyttölaimennos:

- 0,625 ml KAPA Probe qPCR -entsyymiseosta + 0,5 ml SYTO 82

2.2 KAPA Maxima Probe + SYTO 82

KAPA Maxima Probe + SYTO 82 -käyttölaimennos:

- 1,25 ml KAPA Maxima Probe -entsyymiseosta + 1 ml SYTO 82

2.3 PCR-ajo

PCR-ohje/ putki: 0,2 ml Rotor Gene -putkiin

PCR-ohje ja PCR-ajo -olosuhteet samat kuin RT-qPCR -yleisohjeessa (liite 5).