

Marjo Voivalin

# T-RFLP-sormenjälkimenetelmän kehittäminen soiden hapettoman turpeen sieniyhteisöjen analysointiin

Metropolia Ammattikorkeakoulu  
Insinööri (AMK)  
Bio- ja elintarviketekniikka  
Insinöörityö  
13.12.2013

Tekijä Otsikko	Marjo Voivalin T-RFLP-sormenjälkimenetelmän kehittäminen soiden hapettoman turpeen sieniyhteisöjen analysointiin
Sivumäärä Aika	36 sivua + 8 liitettä 13.12.2013
Tutkinto	Insinööri (AMK)
Koulutusohjelma	Bio- ja elintarviketekniikan koulutusohjelma
Suuntautumisvaihtoehto	
Ohjaajat	tutkijatohtori, Heli Juottonen koulutusvastaava Carola Fortelius
<p>Insinööriytyössä kehitettiin T-RFLP-sormenjälkimenetelmä, jonka avulla voidaan tunnistaa sieniyhteisöjä hapettomasta turpeesta. T-RFLP:ssä tutkittava näyte PCR-monistetaan käyttäen fluoresoivaa aluketta. Tuotteet pilkotaan restriktioentsyymeillä, jolloin syntyy terminaalisia restriktio fragmentteja (T-RF). Fragmentit tunnistetaan kapillaarielektroforeesilla fluoresoivan leiman avulla.</p> <p>Tavoitteena oli etsiä erilaisia sieniryhmiä soiden hapettomasta turpeesta ja kehittää sormenjälkimenetelmä, jonka avulla pystytään vertailemaan erilaisia yhteisöjä ja tuunistaamaan sieniryhmät. Tutkittavaksi alueeksi valittiin 18S-alue ribosomaalisesta RNA-geenistä, joka oli hyvin konservoitunut. Konservoituneen alueen avulla oletettiin olevan helpompaa tunnistaa hyvin erityyppisiä sieniä, sillä etukäteen ei tiedetty mitä sieniä hapettomassa turpeessa esiintyy.</p> <p>Työssä optimoitiin PCR-menetelmä, jonka avulla turvenäytteiden PCR-monistaminen saatiin toimimaan. Monistetut PCR-tuotteet transformoitiin kompetentteihin bakteerisoluihin ja luotiin näytteistä kloonikirjastot. Kloonikirjastojen näytteiden sekvenssit pilkottiin restriktioentsyymeillä, missä tavoitteena oli löytää mahdollisimman paljon erilaisia sienisekvenssejä. Näytteet lähetettiin sekvensoitaviksi ja sekvenssituloksien perusteella kehitettiin T-RFLP-sormenjälkimenetelmä analysoimaan turvenäytteiden sieniryhmiä ja -yhteisöjä.</p> <p>Hapettomasta turpeesta löydettiin kaikkien neljän pääryhmän sieniä. Sekvenssien perusteella restriktioentsyymien löytäminen oli vaikeaa, koska sekvenssit olivat hyvin konservoituneita. Suonäytteiden T-RFLP-ajon perusteella löydettyjä sieniyhteisöjä vertailtiin keskenään. Näin ollen pystyttiin määrittelemään soiden anaerobisen turpeen erilaisia sieniyhteisöjä. Tulosten perusteella voitiin päätellä, että soiden turvenäytteiden sieniyhteisöt vaihtelevat paljon ja eroavat toisistaan myös rinnakkaisnäytteissä.</p>	
Avainsanat	suo, sieni, 18S, rDNA, PCR, T-RFLP

Author Title	Marjo Voivalin Development of a T-RFLP fingerprinting method for analysis of fungal communities in anoxic peat
Number of Pages Date	36 pages + 8 appendices 13 December 2013
Degree	Bachelor of Engineering
Degree Programme	Biotechnology and Food Engineering
Specialisation option	
Instructors	Heli Juottonen, Post-doctoral Researcher Carola Fortelius, Head of Biotech. and Food Eng. Dept.
<p>The purpose of this study was to develop a T-RFLP-fingerprinting method for the identification of fungal communities in anoxic peat. In T-RFLP, the sample to be analysed, is amplified by PCR using a fluorescent primer. The products are digested with restriction enzymes to produce terminal restriction fragments (T-RF). The fragments were identified by capillary electrophoresis on the basis of the fluorescent label.</p> <p>The aim was to detect a variety of fungal groups in the anoxic peat, and to develop a fingerprinting method that allows to compare fungal communities and identify fungi. Ribosomal RNA gene area (18S) which is highly conserved, was selected for examination. Since it was not known what kind of fungus sequences would be found, the comparison of conserved sequences in a database was easier.</p> <p>PCR optimization method was developed which makes PCR amplification of peat samples successfully. The amplified PCR products were transformed into competent cells, and clone libraries were created for samples. Sample sequences for clone libraries were digested with restriction enzymes whereupon as many different types of fungal sequences as possible were found. The sample was sent to be sequenced. A T-RFLP fingerprint method was developed on the basis of the sequence data. The method was to analyze the peat samples of fungal groups and communities.</p> <p>All four major phyla of fungi were found in anoxic peat. Functional restriction enzymes were difficult to find due to sequence conservation. Fungal communities found in soil samples by the T-RFLP method were compared with each other. Thus, it was possible to determine different types of fungal communities in anaerobic peat. On the basis of the results, it was concluded that fungal communities had a variety of different levels.</p>	
Keywords	soil, fungus, 18S, rDNA, PCR, T-RFLP

## Sisäily

Tiivistelmä

Abstract

Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Suotyytit	1
3	Sienien tunnistus	3
3.1	Sieniryhmät	3
3.2	Ribosomaalinen RNA	4
4	PCR-menetelmän optimointi	6
4.1	PCR-optimoinnin tarkoitus	6
4.2	Parametrien muutokset	6
4.3	Reaktioseoksen muutokset	9
5	Sormenjälkimenetelmät	10
5.1	Yleisimmät yhteisöjen sormenjälkimenetelmät	10
5.2	T-RFLP-menetelmä	10
6	Työn tavoitteet	13
7	Materiaalit ja menetelmät	13
7.1	Näytteet	13
7.2	PCR	14
7.2.1	Perus-PCR	14
7.2.2	PCR optimointi	15
7.3	Näytteiden geelieristys	16
7.4	Kloonikirjaston luominen	18
7.4.1	Kloonikirjastojen suunnittelu	18
7.4.2	Kasvatusalustojen valmistus	19
7.4.3	Ligaatio	19
7.4.4	Transformaatio	20

7.4.5	Kloonipesäkkeiden talteenotto ja säilytys	21
7.5	Restriktio, RFLP	21
7.6	Sekvensointiin valmistelu	23
7.7	Sekvenssien tutkiminen	24
7.8	T-RFLP	25
8	Tulokset	27
8.1	PCR optimointi	27
8.2	RFLP	28
8.3	Sekvenssien analysointi	29
8.3.1	Sekvenssien tunnistus	29
8.3.2	Sekvenssi-rinnastus	29
8.3.3	Fylogeneettinen puu	30
8.4	T-RFLP	32
9	Yhteenveto	34
	Lähteet	36
	Liitteet	
	Liite 1. Kloonikirjaston luominen	
	Liite 2. Ligaatio	
	Liite 3. RFLP	
	Liite 4. Blast tulokset	
	Liite 5. T-RFLP-profiilikuvat	
	Liite 6. T-RFLP piikit	
	Liite 7. T-RFLP piikkien osuudet	
	Liite 8: Materiaalit	

## Lyhenteet

bp	(base pair) emäspari
BSA	(bovine serum albumin) naudan seerumialbumiini
dNTP	(deoxyribonucleotidi triphosphate)
IPTG	(Isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside) isopropyli- $\beta$ -D-thiogalaktopyranosiidiä. Toimii $\beta$ -galaktosidaasin indusorina.
ITS-alue	(internal transcribed spacer)
LSU	(large subunit) ribosomaalisen RNA:n suuri alayksikkö
NMDS	(non-metric multidimensional scaling) monimuuttuja analyysi
rDNA	DNA-alue, joka koodaa ribosomaalista RNA:ta
rRNA	ribosomaalinen RNA
RFLP	(restriction fragment length polymorphism)
SSU	(small subunit) ribosomaalisen RNA:n pieni alayksikkö
TAE	TRIS-asetatti-EDTA. Käytetään puskurina agaroosigeelissä
T-RFLP	(terminal restriction fragment length polymorphism) yhteisövertailumenetelmä
X-Gal	(5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galacto-pyranoside) $\beta$ -galaktosidaasin väriä muodostava substraatti

## 1 Johdanto

Yleisesti sieniyhteisöjä on tutkittu soiden pintakerroksessa olevasta hapellisesta turpeesta. Soiden hapettoman turpeen sieniyhteisöjä ei ole vielä tutkittu juurikaan. Sieniyhteisöjä tiedetään olevan hapettomassa turpeessa, mutta niiden osallistumisesta esimerkiksi orgaaniseen hajotukseen ei ole paljoa tutkimustietoa.

Tässä insinööriössä tutkitaan soiden sieniyhteisöjä ja pyritään kehittämään sormenjälkimenetelmä, jonka avulla voidaan analysoida erilaisten näytteiden sieniyhteisöjä. Tutkimus tehtiin suonäytteistä eristystä DNA:sta. Tämän jälkeen kehitettiin T-RFLP-menetelmä kuvaamaan erilaisia sieniyhteisöjä eri soilla.

Insinööriö tehtiin Helsingin yliopistolla tutkijatohtori Heli Juottosen tutkimushankkeessa. Työ tehtiin osana Soiden metaanituoton puuttuva mikrobiologinen lenkki –fermentoivat bakteerit ja sienet -projektia. T-RFLP-ajo tehtiin Metsäntutkimuslaitoksella (Metla) Vantaalla.

## 2 Suotyypit

Suo määritetään ekosysteemiksi, jonka merkittävimpiä ominaisuuksia ovat korkea vedenpinta ja osittain hajonneen orgaanisen aineksen kerrostuminen turpeeksi (Vasander 1998: 10). Kuollut kasvimateriaali kerrostuu turpeeksi, jonka jälkeen se kokee muutosprosessin, jota kutsutaan hajotukseksi. Akrotelma on suon pintaosa, jossa on vapaata happea. Tästä johtuen hajotus on pintaosassa nopeampaa kuin alaosassa. Hajotukseen vaikuttavat erityisesti kasviaineksen laatu sekä happipitoisuus, happamuus ja ravinteisuus. Merkittävimmät hajottajat ovat aerobisia mikrobeja, jotka tuottavat hajotuskasvina hiilidioksidia ( $\text{CO}_2$ ). Noin 80–90 % tuotetusta kasvimassasta poistuu kaasuna ilmaan. Katotelma on suon vedenpinnan alapuolella sijaitseva hapettoman turpeen osa. Katotelmassa anaerobiset bakteerit hajottavat turpeen hiiliyhdisteitä, jolloin syntyy hiilidioksidia ja metaania ( $\text{CH}_4$ ). Tähän hajotukseen vaikuttaa paikan kosteus, lämpötila ja kasvimateriaalin koostumus. (Vasander 1998: 17.)

Soita luokiteltaessa ne jaetaan kolmeen pääryhmään: korpiin, rämeisiin ja avosoihin. Avosuot ovat yleisesti puuttomia, ja ne jaetaan edelleen lettoihin ja nevoihin (Silvan ym. 2008: 16). Pääryhmätyyppien jaottelua voidaan jatkaa jakamalla ne eri ravinteisuusluokkiin hydrologian ja ravinneolojen perusteella, ombrotrofisiin ja minerotrofisiin soihin. Ombrotrofiset suot eli sadevesisuot saavat vetensä ja ravinteensa sadeveden ja ilmalaskeuman mukana, ja ovat tästä johtuen vähäravinteisia. Nämä suot syntyvät suon kasvillisuuden kasvaessa pois pohjaveden vaikutuksesta. Minerotrofiset suot eli pohjavesisuot saavat ravinteita sadeveden lisäksi myös pohja- ja pintavesien mukana. Ne toimivat pohjaveden vastaanottajina. (Silvan ym. 2008: 17–18.)

Suon ominaisuudet määräytyvät valuma-alueelta tulevan veden laadusta ja määrästä. Minerotrofiset suot jaetaan kolmeen eri ryhmään: oligotrofisiin, mesotrofisiin ja eutrofiisiin. (Vasander 1998: 10). Trofia eli ravinteisuus tarkoittaa turpeen fysikaaliskemiallisten kasvutekijöiden vaihtelua. Se kuvaa turpeen ravinteista typen, fosforin, kalsiumin ja raudan määrää. Trofian määrittäminen käytetään suokasveja ja niiden muodostamia kasviyhteiskuntia, eli jokaiselle ravinteisuustasolle on ominaista tiettyjen kasviyhdyskuntien esiintyminen. Osa lajeista esiintyy usealla ravinteisuustasolla, mutta jokaiselle tasolle voidaan nimetä lajeja, jotka esiintyvät vain tietyllä tasolla. (Silvan ym. 2008: 17–18.)

Ombrotrofisilla soilla pH on yleensä alle 4,0, lisäksi suoveden kalsiumpitoisuus on matala. Näillä sadevesisoilla ravinnesaatavuutensa suhteen ääriolosuhteet. Ombrotrofisilla soilla yleisiä kasveja ovat rahkasammalet. Oligotrofiset suot ovat vähäravinteisia ja niiden pH on alle 4,5. Yleisiä kasveja näillä soilla ovat suursarat. Mesotrofiset ovat keskivälikasveja ja niiden pH on välillä 4,5–5,5. Mesotrofisilla soilla kasvaa suoruojoja, esimerkiksi kurjenjalka. Eutrofisilla soilla eli letoilla pH on korkea (5,5–7,5). Turpeessa on paljon typpeä, mutta kaliumia ja fosforia niukasti. Kalium ja fosfori voivat olla sitoutuneena esimerkiksi rautaan tai ne ovat huuhtoutuneet pois. Eutrofisilla soilla kasvaa ruskosammalia. Minerotrofisten kasvien puuttuminen kertoo suon ombrotrofisuudesta. (Silvan ym. 2008: 18–19; Vasander 1998: 10.) Yleisesti minerotrofiset ekosysteemit ovat sarasoita ja ombrotrofiset rahkasoita (Thorman 2005: 281).

Rahkasuot ovat ombrotrofisia ekosysteemejä, eli ne saavat ravinteensa ja vetensä sadeveden mukana (Thorman 2005: 281). Niille on tunnusomaista huokoiset turvekerrostumat ja hapan vesi. Lisäksi niiden päällyks on peittynyt paksulla rahkasammalmatolla.



Rahkasoiden kasvit tulevat toimeen niukalla ravinnemäärällä, joten olosuhteet lisäävät happaman turvesammaleen muodostumista. Rahkasuot voivat syntyä kahdella eri tavalla. Ne voivat muodostua sammaleen kasvaessa vähitellen vesistön (esimerkiksi lammen) yli täyttäen sen. Rahkasuo voi muodostua myös rahkasammaleen kasvaessa mattona kuivalle maalle, jolloin se estää veden poistumisen pinnalta (Bogs 2013). Sarasuot ovat minerotrofisia ekosysteemejä. Sarasuot voidaan jakaa karuihin ja rikkaisiin sarasoihin. Karuilla sarasoilla on alhaisempi mineraalipitoisuus pintavedessä kuin rikkailla (Thorman 2005: 281). Sarasuot ovat rahkasoihin verrattuna vähemmän happamia ja niissä on enemmän ravinteita. Nämä suot ovat yleensä ruohon, sarojen ja kaislan peittämiä. Sarasoilla turpeen määrä voi ajan kuluessa lisääntyä ja eristää sen pohjavedestä. Tällöin sarasuo menettää ravinteita ja saattaa muuttua rahkasuoksi. (Fens 2013.)

### **3 Sienien tunnistus**

#### **3.1 Sieniryhmät**

Sienillä on useita erilaisia rooleja ekosysteemissä ja yhteiskunnassa. Ne käsittävät suurimman osan mikrobiomassasta maaperässä, hajottavat orgaanista materiaalia, toimittavat kasveille ravinteita ja voivat toimia ekosysteemissä myös indikaattoreina. Maatalouden puolella sienet voivat joko tuhota pelloilta satoa tai ehkäistä hyötykasvien tuhoalaisia. Ihmisille sienet voivat aiheuttaa tauteja, esimerkiksi aivokalvon tulehdusta. Toisaalta, biotekniikassa niitä käytetään tuottamaan useita eri sekundääri aineenvaihduntatuotteita lääkealalle. Sieniä elää useissa elinympäristöissä ja ekologisissa lokeroissa, joista kaikkia ei ole vielä tutkittu. (Borneman & Hartin 2000: 4356.)

Sienten neljä suurinta pääjaksoa ovat kotelosienet (Ascomycota), kantasienet (Basidiomycota), piiskasiimasienet (Chytridiomycota) ja yhtymäsienet (Zycomycota) (Borneman & Hartin 2000: 4356). Sienet kuuluvat eukaryooteihin eli aitotumallisiin. Niiden yleisin elinympäristö on maaperä, mutta niitä tavataan myös muissa elinympäristöissä. Suurin osa sienistä on koenosyytteja eli monitumaisia. (Ojamo 2007). Rakenteeltaan ne voivat olla joko yksi- tai monisoluisia. Monisoluiset sienet ovat rihmamaisia. Rihmat eli hyyfit koostuvat pitkänomaisista soluista. (Sienet 2006.) Hiivat ovat yksisoluisia, jotka kuuluvat pääasiallisesti kotelosieniin. Jotkut voivat olla myös monisoluisia. Hiivat

elävät kosteissa olosuhteissa. (Hiivat 2006). Homeet ovat sieniryhmä, jotka muodostavat homemaista kasvustoa. Ne kasvavat monisoluisina rihmastoina. Kasvaakseen homeet vaativat happea, mutta niukasti vettä. Homeet lisääntyvät suvuttomasti konidioiden välityksellä, mutta jotkin homeet voivat lisääntyä suvullisesti. Tunnetuin homesuku on *Penicillium*. (Homeet 2006.)

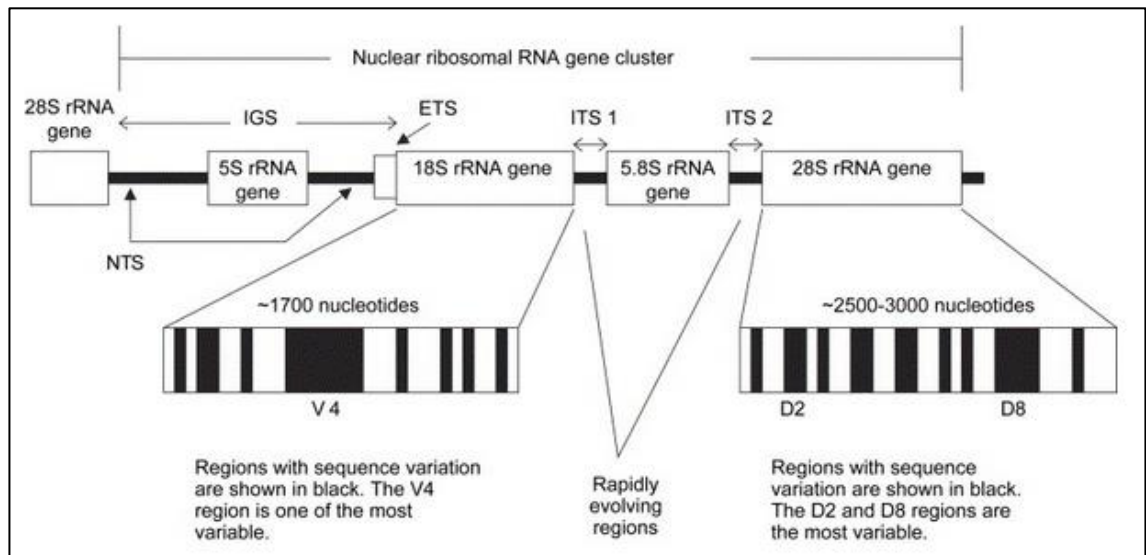
Kotelosienet ovat suurin sienten pääryhmä. Niitä esiintyy käytännöllisesti katsoen kaikissa maa- ja vesiekosysteemeissä. Suurin osa kotelosieniryhmään kuuluvista sienistä toimii biomassan hajottajina tai ne elävät loisina eläimissä ja kasveissa. Niitä on pystytty eristämään ympäristön ääriolosuhteista, esimerkiksi sedimenttikerroksesta ja Antarktiksen jäätyneistä kasveista. Useimmat kotelosienet lisääntyvät suvuttomasti, ja niistä suurin osa on yksisoluisia hiivoja. (Schouch ym. 2009: 225.) Kantasienet ovat toiseksi suurin sieniryhmä. Tunnetuimmat kantasienet ovat syötäviä sieniä (lakkisienet), mutta ryhmään kuuluu myös hiivoja. Niitä löytyy yleensä maalta, mutta myös makeasta vedestä ja meriolosuhteista. Kantasienet voivat olla yksi- tai monisoluisia. Kantasienet lahottavat kuollutta orgaanista ainetta, joten ne osallistuvat hiilen kiertokulkuun, kuten kotelosienetkin. (Basidiomycota 2003.)

Piiskasiimasienet elävät vesistöissä ja kosteissa olosuhteissa, sekä maalla. Yleisesti ne elävät loisina. Rakenteeltaan piiskasiimasienet ovat yksisoluisia tai rihmamaisia. Ne tuottavat värekarvojen avulla liikkuvia itiöitä. (James 2006: 860). Yhtymäsienet jaetaan kahteen ryhmään, *Zygomycetes* ja *Trichomycetes*. Ne ovat pienin pääryhmä. Suurin osa yhtymäsienilajeista on loisia, mutta jotkut voivat toimia patogeeneinä kasveille, eläimille ja muille sienille. Osa ryhmään kuuluvista sienistä on symbiootteja, ja osa on nopeasti kasvavia homeita. Nämä homeet ovat yleisiä mansikoissa ja leivissä. Yhtymäsieniä on tavattu sekä maalla että vedessä. (White 2006: 872.)

### 3.2 Ribosomaalinen RNA

Ribosomit muodostuvat suuresta ja pienestä alayksiköstä. Niiden entsymaattisena osana toimii ribosomaalinen RNA (rRNA). Eukaryoottien ribosomien koko on 80S, ja se jaetaan suureen alayksikköön (LSU) sekä pieneen alayksikköön (SSU). Suureen alayksikköön (60S) kuuluu 5S, 5,8S ja 28S ribosomaaliset RNA-molekyylit. Pieneen alayksik-

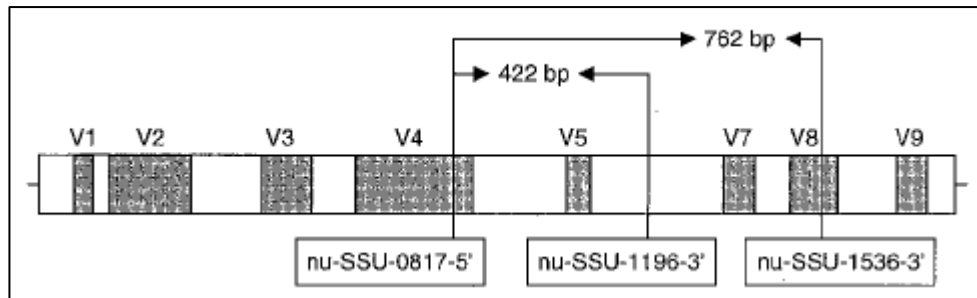
köön (40S) kuuluu 18S ribosomaalinen RNA-molekyyli. Kuvassa 1 on esitettynä rRNA geeni. (Ribosomaalinen RNA 2006).



Kuva 1: Eukaryootin rRNA geeni. (Mitchell & Zuccaro 2005: 65)

Sienten tunnistukseen ja analysointiin käytetään rRNA:ta. Eukaryoottien ribosomaalisen RNA:n pienen alayksikön geeni on hyvin konservoitunut. Fylogeneettisten eroavaisuuksien erottaminen saattaa olla ongelmallista. Geenialue on hyvin konservoitunut, joten se soveltuu tutkimuksiin, joissa tarvitaan heimotason tunnistusta. Suuren alayksikön rDNA on huomattavasti vaihtelevampaa, joten tunnistus voidaan tehdä sukutasolle asti. Eniten vaihtelua on ITS-alueilla (internal transcribed spacer). Näiden alueiden avulla pystytään tunnistamaan lajeja ja kantoja. Kuvasta 1 huomataan, että ITS-alueet sijaitsevat päägeenien välissä. (Mitchell & Zuccaro 2005: 63). Toisaalta nämä alueet saattavat erota toisistaan myös saman lajin ja jopa yksilön sisällä, jolloin myös lajin tunnistaminen voi osoittautua hankalaksi (Rajala 2009: 151).

Useita PCR-alukkeita on kehitetty sienten ribosomaalisen RNA-geenin tutkimiseen, mutta vain osa niistä toimii ympäristönäytteiden analysoinnissa. 18S alueen tutkimiseen nimenomaan ympäristönäytteissä on kehitetty kolme aluketta, jotka on suunniteltu ilmentämään rDNA:ta neljältä suurimmalta sieni pääryhmältä. Alukkeista saadaan kaksi paria (Kuva 2). Niillä on vahva spesifisyys sienten ribosomaaliseen DNA sekvenssiin. (Borneman & Hartin 2000: 4357).



Kuva 2: Eukaryootin pienen alayksikön rDNA. Kuvassa kolme aluketta, joiden avulla saadaan monistettua ribosomaalisen RNA:n geeniä. (Borneman & Hartin 2000: 4357).

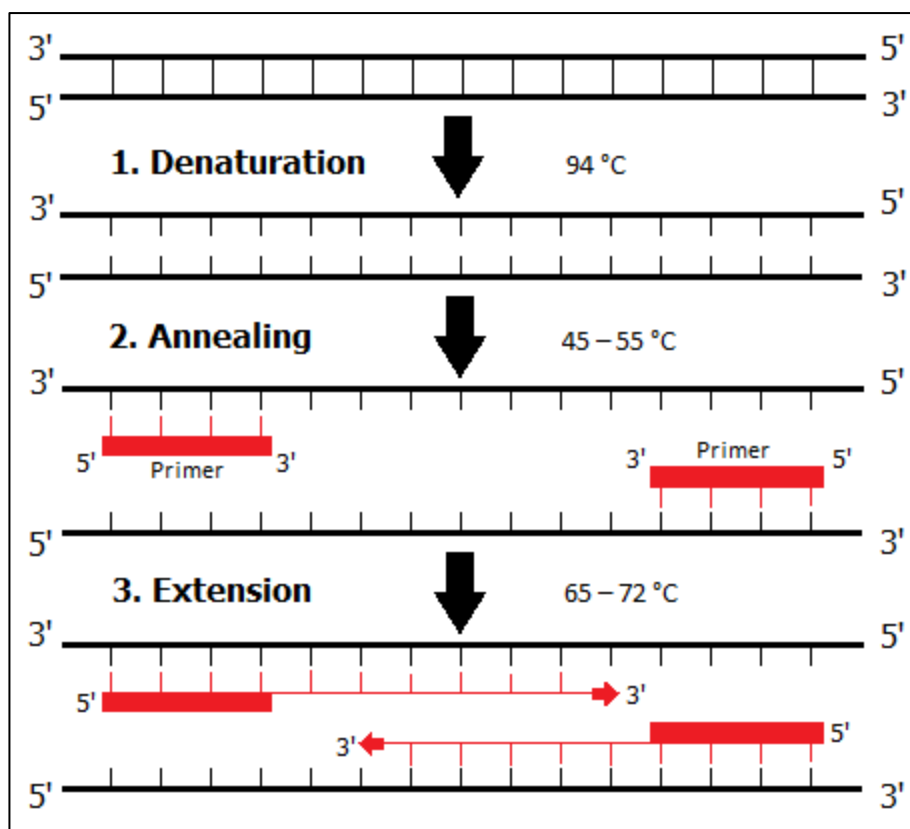
## 4 PCR-menetelmän optimointi

### 4.1 PCR-optimoinnin tarkoitus

PCR-menetelmän avulla saadaan monistettua DNA- tai RNA-näytteestä haluttua tuotetta. Menetelmän epäonnistuessa saattaa syntyä epäspesifisiä tuotteita, tai tuotetta ei monistu ollenkaan. Optimoinnin tarkoitus on saada aikaan tehokas tutkittavan geenialueen spesifinen monistuminen. Tärkeimmät asiat optimoinnissa ovat annealing-vaiheen eli hybridisaation lämpötila, magnesiumin konsentraatio, puskurin pH ja syklien olosuhteet. (Roux 2003.)

### 4.2 Parametrien muutokset

Parametrien muutoksilla tarkoitetaan PCR-ohjelman lämpötilojen ja niiden aikojen muutoksia. PCR on herkkä menetelmä, joten pienetkin muutokset saattavat vaikuttaa onnistumiseen. Muutosten tekeminen aloitetaan perusohjelmien pohjalta. Kuvassa 3 on esitetty PCR-menetelmän yhden syklin vaiheet ja yleisesti käytetyt lämpötilavaihtelut. PCR-ohjelman alussa tehdään alkudenaturaatio. Tämän jälkeen toistetaan haluttu määrä syklejä, joihin sisältyy denaturaatio-, hybridisaatio- ja ekstensiovaihe. Sykliä jälkeen tehdään loppuekstensio.

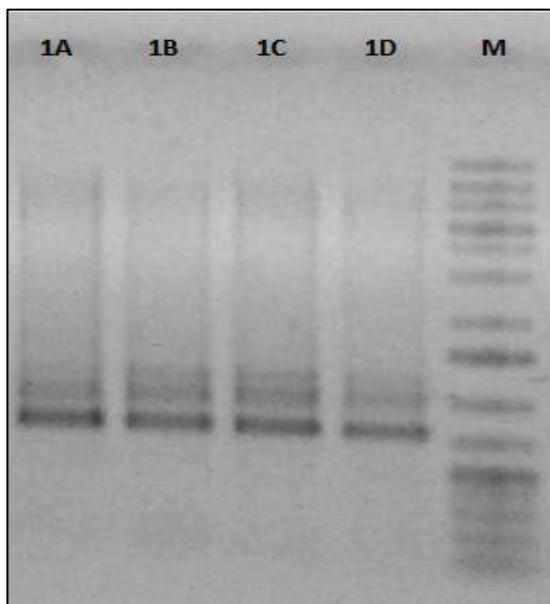


Kuva 3. PCR syklin vaiheet. Kuvassa nuolen oikealle puolelle merkitty optimoinnissa yleisesti käytettävät lämpötilan muutokset.

Yleisesti käytetty denaturaatiolämpötila on 94 °C, tällöin emäsparit irtoavat toisistaan ja syntyy yksijuosteista DNA:ta (Brown 2006: 186). Alkudenaturaatio toimii parhaiten, jos sen kestona pidetään 2–5 minuuttia. Denaturaatioaikana pidetään usein 30–60 sekuntia, koska Taq polymeraasi -entsyymiä ei suositella pidettäväksi pitkiä aikoja korkeassa lämpötilassa. Denaturaatioaikaa voidaan vähentää myös alle 30 sekuntiin. (PCR and Multiplex PCR guide 1997). Annealing-vaiheessa alukkeet kiinnittyvät templaattiin (Brown 2006: 186). Annealing-vaiheen lämpötila saadaan laskettua alukkeiden sulamislämpötilan avulla ( $T_m$ ). (PCR and multiplex PCR guide 1997.)

Alukkeiden sulamislämpötila vaihtelee useimmiten 45–55 °C:een välillä. Kuvassa 4 on geelikuva annealing-vaiheen lämpötilaan tehtyjen muutosten vaikutuksia. Lämpötilan muutoksilla voi olla vaikutusta spesifisyyteen ja tuotteen vahvuuteen. Annealing-vaiheen kesto pidetään 30–60 sekunnin välillä. Toistaiseksi ei ole todettu olevan hyötyä pidemmästä ajasta. Ekstensioaika on usein 1–2 minuuttia, jos käytetään pidempää aikaa saattaa syntyä epäspesifisyyttä. Ekstensiolämpötilana pidetään 65–72 °C:tta. Matalassa lämpötilassa on todettu syntyvän vähemmän epäspesifisyyttä. Taq-

polymeraasin optimi lämpötila on 72–78 °C, joten on pysyttävä lähellä kyseistä lämpötilaa. Loppuekstension kesto on 5–10 minuuttia. Tällöin saadaan viimeisteltä viimeisen syklin aikana alkaneiden tuotteiden valmistus. Sykliä määrätään yleensä 30–40 välillä. (PCR and multiplex PCR guide 1997.) Sykliä lisääminen saattaa vahvistaa monistumista, mutta se voi myös saada aikaan epäspesifisyyttä (Roux 2003).



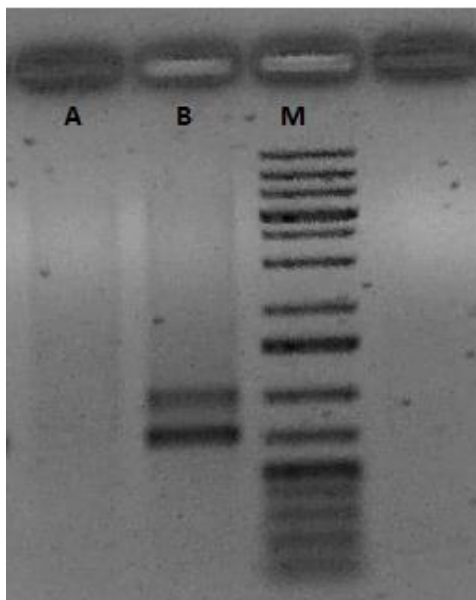
Kuva 4. Annealing-vaiheen lämpötilan muutokset. 1A on 48 °C, 1B 51 °C, 1C 53 °C ja 1D 55 °C.

PCR-ohjelmaan voidaan tehdä myös muita lisäyksiä ja muutoksia. Hot Start -menetelmän tarkoitus on poistaa epäspesifisyyttä (Hot Start PCR 2013). Koska lyhyetkin inkubaatioajat voivat aiheuttaa alukkeiden epäspesifistä sitoutumista, aluksi reaktioseoksen lämpötila nostetaan yli annealing-vaiheen lämpötilan ilman Taq polymeraasi-entsyymiä. Tämän jälkeen seokseen lisätään entsyymi, joten epäspesifisiä sitoutumisia ei tapahdu reaktioseoksen alkulämmitys vaiheessa. Seuraavaksi PCR-ohjelmaa jatketaan normaalisti. (Roux 2003.)

Myös touchdown-PCR -menetelmä lisää reaktion spesifisyyttä. Siinä annealing-vaiheen peräkkäiset syklit ajetaan vähitellen laskevassa lämpötilassa. Tällaisia syklejä ajetaan ohjelman alussa 5–6 kertaa, jonka jälkeen ohjelmaa jatketaan normaaliin tapaan. Tämän ohjelman lisäyksen avulla varmistetaan, että ensimmäisen aluke-templaatti hybridisaation osallisina on vain ne alukkeet ja templaatti-DNA joilla on suurin yhteneväisyys. Yleistä on tehdä Hot Start ennen Touchdown-vaihetta. (Roux 2003.)

### 4.3 Reaktioseoksen muutokset

Puskuri sisältää kaliumkloridia (KCl) ja magnesiumkloridia ( $\text{MgCl}_2$ ), joten se määrää reaktioseoksen suolakonsentraation. Puskurin tehtävänä on tukea polymeraasin toimintaa. Suolakonsentraatio tulisi suhteuttaa nukleotidien määrään. Spesifisyyden lisäämiseksi voidaan kokeilla dNTP konsentraation lisäämistä. Polymeraasientsyymi vaatii toimiakseen magnesiumia, jota on puskurissa tai sitä voidaan lisätä reaktioseokseen. Magnesiumkloridi ( $\text{MgCl}_2$ ) vaikuttaa tuotteen spesifisyyteen. Pitoisuus reaktioliuoksessa voi olla väliltä 1–10 mM. Liian suurista määristä ei ole hyötyä. Kuvassa 5 olevissa näytteissä templaatit ovat samat, mutta reaktioseokset ovat erilaiset. Näytteen A reaktioseokseen ei ole lisätty magnesiumkloridia, kun taas näytteen B reaktioseokseen on. Alukkeita voidaan käyttää PCR-menetelmässä usealla eri konsentraatiolla. Alukkeiden konsentraatio on yleensä 10–25  $\mu\text{M}$ . Tällöin niiden määräksi riittää 0,5–1,0  $\mu\text{l}$ , jos kyseessä on 25–100  $\mu\text{l}$ :n PCR-reaktio. Taq-polymeraasin korkea konsentraatio voi johtaa epäspesifisyyteen, joten sen konsentraatiota liuoksessa ei kannata nostaa liian suureksi. Templaatin määrä vaikuttaa PCR-monistumiseen. Jos templaattia on vähän, PCR-olosuhteet on muutettava mahdollisimman tehokkaaksi. (PCR and multiplex PCR guide 1997.)



Kuva 5: Magnesiumin lisääminen reaktioseokseen. A näyte ilman magnesiumia ja B näytteeseen lisätty magnesiumia. M on kokomarkkeri.

DNA-eristämisen jälkeen näytteisiin voi jäädä inhibiittoreita, jotka häiritsevät PCR-menetelmän toimintaa. BSA (bovine serum album) on adjuvantti eli tehostava aine.

Sitä käytetään usein monistettaessa ympäristönäytteiden DNA:ta, joissa on usein inhibioivia aineita. Näitä ovat esimerkiksi humushapot. Lisäämällä BSA:ta reaktioseokseen saadaan tehostettua inhibiittoreita sisältävän templaatin monistuvuutta (Kreader 1996). BSA:n loppukonsentraatioksi suositellaan 0,1–0,8 µg/µl (PCR and multiplex PCR guide 1997.)

## 5 Sormenjälkimenetelmät

### 5.1 Yleisimmät yhteisöjen sormenjälkimenetelmät

Yhteisöjen sormenjälkimenetelmiä on käytetty tutkittaessa bakteerien ekologiaa, mutta nykyisin niitä käytetään myös tutkittaessa soiden sieniyhteisöjä. Tällaisia tekniikoita ovat DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis), TGGE (temperature gradient gel electrophoresis), SSCP (single-strand conformation polymorphism), T-RFLP (terminal restriction length polymorphism), ARDRA (amplified rDNA restriction analysis), ARISA (amplified ribosomal intergenic spacer analysis) ja kloonikirjastojen analysointi. Tekniikoiden lähestymistavat ovat erilaisia, mutta tekniikat perustuvat DNA:n erotteluun sekvenssierojen perusteella. (Anderson & Cairney 2004: 772).

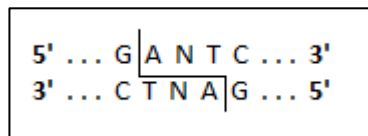
### 5.2 T-RFLP-menetelmä

T-RFLP-menetelmää käytetään analysoitaessa ympäristöstä erilaisia mikrobiyhteisöjä. Menetelmää käytetään monenlaisessa ekologisessa tutkimuksessa: mikrobiologisessa, ekosysteemin toiminnan ja mikrobiyhteisöjen välisessä tutkimuksessa. T-RFLP-menetelmä on hyödyllinen tutkittaessa lajirikkaita ympäristöjä (Mitchell & Zuccaro 2005: 67). T-RFLP -menetelmää on käytetty eniten analysoitaessa bakteereja 16S rRNA geenin perusteella, mutta sitä voidaan käyttää myös arvioidessa sieniyhteisöjen erilaisuutta 18S rDNA:n perusteella. (Thies 2007: 579–582.)

T-RFLP-menetelmä on muunnelma perinteisestä RFLP-menetelmästä (Anderson & Cairney 2004: 773). RFLP-menetelmän avulla voidaan erottaa emäsjärjestykseltään eroavia DNA-juosteita toisistaan. Siinä DNA pilkotaan erikokoisiksi fragmenteiksi käyttämällä yhtä tai useampaa restriktioentsyymiä. Restriktioentsyymit tunnistavat yleensä noin 4–6 emäsparia pitkiä spesifisiä kohtia sekvenssistä. Kuvassa 6 on esimerkki *Hinf*I

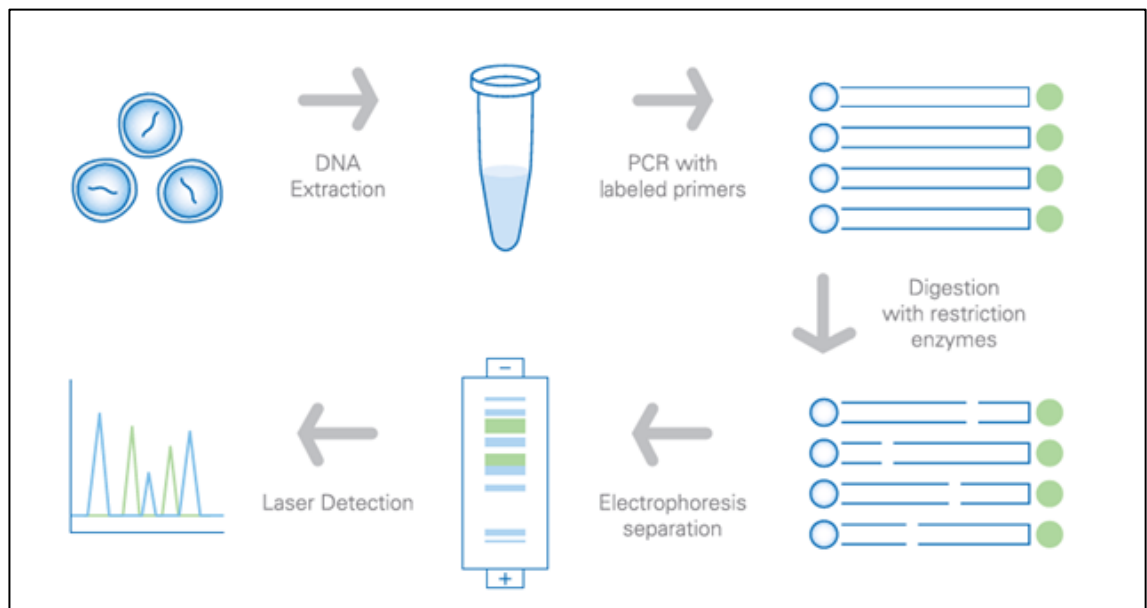


restriktioentsyymin tunnistus- ja katkaisukohtasta. (Restriction fragment Length Polymorphism).



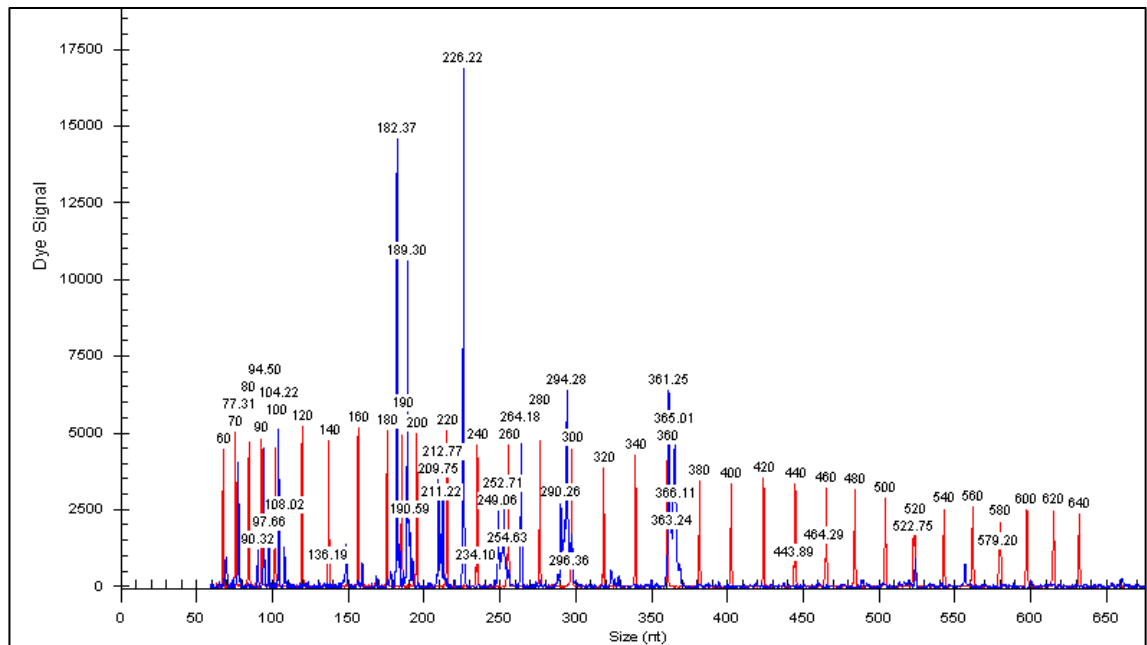
Kuva 6: *HinfI* restriktioentsyymin tunnistus- ja katkaisukohta. (HinfI 2005).

T-RFLP-analysointi aloitetaan eristämällä näytteestä DNA/RNA. Seuraavassa vaiheessa tehdään PCR-monistaminen, jossa alukkeeseen on lisätty fluoresoiva leima. Fluoresoivaa leimaa voidaan käyttää joko 3'- tai 5'-päässä tai molemmissa. Monistettu tuote puhdistetaan, jotta esimerkiksi ylimääräiset suolat ja nukleotidit eivät häiritsisi tuotteen jatkokäsittelyä. Seuraavaksi puhdistettu tuote pilkotaan fragmenteiksi restriktioentsyymillä. On mahdollista käyttää yhtä tai useampaa entsyymiä, mutta yleistä on käyttää yhtä tai kahta. Restriktion avulla saadaan terminaalisia restriktiofragmentteja (T-RF). Näiden fragmenttien toisessa päässä on fluoresoiva leima. Fragmenttien pituudet määräytyvät sekvenssin emäsjärjestyksen perusteella, johon vaikuttaa restriktioentsyymin katkaisukohdan sijainti. Terminaaliset restriktiofragmentit analysoidaan kapillaarielektroforeesilla, jossa ne erotellaan ja tunnistetaan koon perusteella automaattisesti. Kuvasssa 7 on esitettyä T-RFLP -menetelmän eri vaiheet. (Thies 2007: 579–580.)



Kuva 7: T-RFLP-menetelmän vaiheet. 1) DNA eristäminen, 2) PCR fluoresoivalla leimalla 3) tuotteen pilkkominen restriktioentsyymeillä 4) TRF:t erotellaan kapillaarielektroforeesilla ja 5) fluoresoivan leiman havaitseminen. (Terminal Fragment Length Polymorphism).

T-RFLP -menetelmän avulla saadaan analysoitua tutkittavan näytteen profiili eli sormenjälki. T-RFLP -ajon jälkeen saadaan tutkittavasta näytteestä sen terminaalisten restriktiofragmenttien piikit. Kuvassa 8 on esimerkki näytteen T-RFLP -profiilista. Punaisella värillä näkyvät standardipiikit ja sinisellä näytteen piikit. Pystyakselilla kuvataan fluoresenssia ja vaaka-akselilla fragmentin kokoa emäspareina (bp). Tuloksia analysoitaessa on huomioitava käytettävän kapillaarielektroforeesilaitteen havaitsemiskyky, sillä se voi olla rajoitettu ja riippuu käytetystä DNA-määrästä. Tällöin piikkien puuttuminen ei välttämättä tarkoita lajin puuttumista. (Anderson & Cairney 2004: 774).



Kuva 8: T-RFLP-piikit. Punaisella värillä näkyy standardipiikit ja sinisellä värillä näytepiikit. Pystyakselilla on piikin korkeus ja vaaka-akselilla piikin koko.

T-RFLP -menetelmä on tehokas menetelmä yhteisöjen vertailuun. Silti siinä on useita huomioitavia asioita, jotka saattavat vaikuttaa lopputuloksiin. Näytteen eristämisessä, ja työn eri vaiheissa tapahtuvat mahdolliset kontaminaatiot saattavat vaikuttaa loppuanalysointiin. Lisäksi PCR-monistamisen optimointi on tärkeää, jotta aluke-templaatti hybridisaatio onnistuisi mahdollisimman hyvin, jotta monistuminen olisi spesifistä tutkitavalle geenialueelle ja eliöryhmälle. Tällöin PCR-monistuksessa saadaan monistettua ainoastaan tutkittavaa kohtaa sekvenssistä. Restriktioentsyymit on valittava huolellisesti, koska kahdella eri lajilla saattaa olla sama T-RF. Ensyymit on valittava niin, että tutkittavat mikrobit pystytään erottelamaan halutulla taksonomisella tasolla. (Anderson & Cairney 2004: 774). On mahdollista, että terminaalisen restriktiofragmentin pituuden avulla voidaan tunnistaa näytteessä esiintyvä mikrobiryhmä.

## 6 Työn tavoitteet

Työssä tutkitaan turvenäytteistä eristettyä DNA:ta, josta tutkitaan sienten ribosomaalisen RNA:n geeniä. Tutkittava sekvenssi sijaitsee rDNA:n pienessä alayksikössä (18S), ja se on pituudeltaan 760 bp. Aluksi suunniteltiin PCR-optimointi -menetelmä, jonka avulla kaikki näytteet saatiin toimimaan. Seuraavaksi näytteistä tehtiin kloonikirjastot, joita analysoitiin käyttäen RFLP:tä. RFLP:n perusteella näytteitä valitaan sekvensoitavaksi, ja sekvenssit analysoitiin käyttämällä erilaisia tietokoneohjelmia. Sekvenssianalyysin perusteella tuotteille tehdään fylotypitys. Lopuksi sekvenssianalyysien pohjalta suunnitellaan ja toteutetaan T-RFLP -ajo. Taulukossa 1 on esitetty työvaiheiden järjestys.

Taulukko 1: Työvaiheet.

DNA eristys	→	PCR	→	Klooni- kirjasto	→	RFLP	→	Sekvenssit	→	Fylo- tyypitys	→	T-RFLP
----------------	---	-----	---	---------------------	---	------	---	------------	---	-------------------	---	--------

## 7 Materiaalit ja menetelmät

### 7.1 Näytteet

Työssä tutkittiin turvenäytteitä, jotka oli kerätty 20–30 cm turpeenpinnan alapuolella olevasta hapettomasta turpeesta. Näytteet oli otettu vedenpinnan alapuolelta. Ne oli kerätty elokuussa 2011. Näytteitä oli kerätty kolmelta eri suolta: kahdelta eri suolta Orivedeltä ja yhdeltä suolta Siikajoelta. Jokaisesta näytteenottopaikasta on kolme rinnakkaisnäytettä. Taulukossa 2 on esitettyinä perustiedot kyseisistä soista.

Taulukko 2: Tiedot näytteidenottopaikoista.

<b>Paikka</b>	<b>Lyhenne</b>	<b>Suotyyppi</b>	<b>Ravinteisuusluokka</b>	<b>pH</b>
Lakkasuo (Orivesi)	MES	Rikkaampi sarasuo	Mesotrofinen	5,1
	OLI	Karu sarasuo	Oligotrofinen	4,7
	OMB	Rahkasuo	Ombrotrofinen	4,0
Siikaneva (Orivesi)	SNB	Rahkasuo	Ombrotrofinen	3,9
	SNF	Karu sarasuo	Oligotrofinen	4,2
Siikajoki	SJ4	Sarasuo	Mesotrofinen	5,2
	SJ5	Sarasuo -> rahkasuo	Oligotrofinen	4,4
	SJ6	Rahkasuo	Ombrotrofinen	4,2

Turvenäytteistä oli eristetty DNA käyttäen Genomic DNA from Soil -kittiä (NucleoSpin Soil). Eristämisessä oli noudatettu kitin ohjeita, mutta siihen oli tehty muutamia vaihtoehtoisia muutoksia. Jokaista turvenäytettä punnittiin 250 mg. Puskurina käytettiin SL2:sta, koska sen oli todettu toimivan paremmin kuin puskuri SL1:n. Vahvennetta SX lisättiin näytteisiin ainoastaan 10 µl. Vahvenne SX mahdollistaa korkean DNA-saannon suurimmasta osasta erilaisia näytteitä. On mahdollista, että vahvenne SX pienentää DNA:n puhtautta joissain näytteissä vahvistamalla humushappojen vapautumista solun hajoamisen eli lyysin aikana. Lisäksi puskuri SE:tä lisättiin DNA:n elutoinnissa 50 µl.

## 7.2 PCR

### 7.2.1 Perus-PCR

Monistettavaksi alueeksi valittiin kohta ribosomaalisesta RNA-geenistä. Valittu kohta oli osa ribosomaalisen RNA:n pienen alayksikön alueelta. Alukkeina käytettiin nu-SSU-0817-5' (TTAGCATGGAATAATRRRAATAGGA) ja nu-SSU-1536-3' (ATTGCAATGCYC-TATCCCCA), jolloin monistettavan sekvenssin pituus oli 760 bp (Borneman & Hartin 2000: 4356). Aluksi etsittiin sellaiset olosuhteet ja reaktioseos, että monistus saataisiin onnistumaan. Positiivisena näytteenä käytettiin vahvaa sieni DNA:ta ja negatiivisena näytteenä Milli Q -vettä. Restriktioentsyyminä käytettiin DreamTaq DNA polymeraasia (Thermo Scientific).

## Reaktioseos:

10x DreamTaq -puskuri	2,5 µl
dNTP (10 mM)	0,5 µl
aluke nu-SSU-0817 (10 µM)	1,0 µl
aluke nu-SSU-1536 (10 µM)	1,0 µl
vesi	18,9 µl
DreamTaq DNA polymeraasi (5U/µl)	0,1 µl
Templaatti	1,0 µl
Yhteensä	25 µl

## PCR-ohjelma:

<u>94 °C</u>	<u>3 min</u>	
94 °C	30 s	
52 °C	1 min	40 sykliä
<u>72 °C</u>	<u>1 min</u>	
72 °C	5 min	

PCR-monistumisen onnistuminen tarkistettiin geielektroforeesijolla, käyttämällä 1-prosenttista agarosigeeliä 1 x TAE-puskurissa (TRIS-asetatti-EDTA -puskuri). Turvenäytteiden PCR-monistaminen osoittautui haastavaksi. Lisäksi osa näytteistä monistui helpommin kuin toiset.

## 7.2.2 PCR optimointi

PCR-menetelmää alettiin optimoida, jotta kaikkien näytteiden monistuminen saataisiin onnistumaan samanlaisella ohjelmalla. Tarkoituksena oli myös vähentää epäspesifistä monistumista ja saada tuotteet vahvemmiksi. Jotta PCR saataisiin mahdollisimman hyvin toimimaan ja spesifiseksi, aloitettiin ohjelman parametreja ja reaktioseosta muuttamaan.

PCR-ohjelman parametreja muutettiin usealla eri tavalla. Alkudenaturaatiossa lämpötila pidettiin kokoajan 94 °C:ssa, ja aikana pidettiin 3 minuuttia. Perusparametrit valittiin

Borneman & Hartin (2000: 4356) artikkelin perusteella. Kyseisessä PCR-ohjelmassa denaturaatioaikana oli nolla sekuntia. Oletettavasti tämä tarkoitti, että lämpötila nostettiin 94 °C:seen vain hetkeksi. Tästä johtuen ohjelmassa lyhennettiin denaturaatioaikaa 30 sekunnista viiteen sekuntiin. Seuraavaksi muutettiin muita lämpötiloja. Tehtiin lämpötilagradientti sekä annealing-vaiheen lämpötilaan että ekstensiolämpötilaan. Annealing-vaiheen lämpötilaa kokeiltiin neljällä eri lämpötilalla. Ekstensiovaiheen lämpötilaksi kokeiltiin kahta eri lämpötilaa. Ohjelman syklien määränä pidettiin kokoajan 40, jotta monistuvuus saataisiin paremmaksi. Lisäksi kokeiltiin erilaisia PCR-ohjelman vaihteita, kuten touchdown- ja hotstart-vaihetta.

Reaktioseoksen muutoksiin kokeiltiin useita eri vaihtoehtoja. Templaatin määrää muutettiin, jotta monistuminen saataisiin onnistumaan. Templaatin määrää muutettiin lisäämällä sitä, ja laimentamalla näytettä. Reaktioseosta käytettiin templaattia joko 1 tai 2 mikrolitraa. Kokeiltiin myös laimentaa näytettä 1:10, jolloin laimennettua templaattia käytettiin 1 µl. Lisäksi reaktioseoksessa muutettiin alukkeiden, Taq-polymeraasin ja dNTP:n pitoisuutta. Alukkeiden määränä käytettiin joko 1,0 µl tai 1,5 µl. DNA polymeraasin määränä kokeiltiin 0,1 µl ja 0,2 µl ja dNTP:n määränä käytettiin joko 0,5 µl tai 0,75 µl. Reaktioseokseen lisättiin myös eri pitoisuuksia MgCl<sub>2</sub>:a ja BSA:ta. PCR-monistamista kokeiltiin lisäämällä reaktioseokseen 1,5 µl BSA:ta. Lisäksi reaktioon lisättiin MgCl<sub>2</sub>:a joko 1,0 µl tai 2,0 µl. BSA:n konsentraatio oli 10 µg/µl ja MgCl<sub>2</sub>:n 25 mM:a.

### 7.3 Näytteiden geelieristys

PCR-menetelmän optimoinnin jälkeen osassa tuotteita oli mukana epäspesifisyyttä. Jotta epäspesifisyydestä päästäisiin eroon, kaikille tuotteille tehtiin geelieristys. Aloitettiin tekemällä PCR-monistaminen optimoinnin perusteella, ja tuotteet ajettiin geelielektroforeesijolla 1-prosenttiseen agarosigeeliin. Geeliltä leikattiin talteen tutkittavat sekvenssit, jotka puhdistettiin.

Monistaminen tehtiin kaikille alkuperäisille turpeesta eristetyillä DNA-näytteille. Näytteenottopaikkoja oli yhteensä kahdeksan kappaletta ja jokaisesta paikasta oli kolme rinnakkaisnäytettä. Yhteensä PCR-tuotteita, eli geelieristettäviä tuotteita, oli 24. PCR-ohjelmana käytettiin seuraavanlaista ohjelmaa.

## Reaktioseos:

10x DreamTaq -puskuri	2,3 µl
BSA (10 µg/µl)	1,5 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1,0 µl
dNTP (10 mM)	0,5 µl
aluke nu-SSU-0817 (10 µM)	1,0 µl
aluke nu-SSU-1536 (10 µM)	1,0 µl
Milli Q -vesi	14,7 µl
DreamTaq DNA polymeraasi (5U/µl)	- µl
templaatti	1,0 µl

## Hot Start:

1x DreamTaq -puskuri	1,9 µl
DreamTaq polymeraasi (5U/µl)	0,1 µl

Yhteensä	25 µl
----------	-------

## PCR-ohjelma:

<u>70 °C</u>	<u>3 min</u>	Hot Start
<u>94 °C</u>	<u>30 s</u>	
94 °C	5 s	
52 °C	30 s	40 sykliä
<u>68 °C</u>	<u>1 min</u>	
68 °C	7 min	

Kun kaikkien näytteiden PCR-monistaminen saatiin toimimaan, rinnakkaisnäytteet yhdistettiin keskenään. Jokaista rinnakkaisnäytettä otettiin 10 µl. Tällöin jokaisen näyteseoksen kokonaismääräksi tuli 30 µl:aa. Näyteseoksiin lisättiin 1,5 µl näytepuskuria (6x Loading dye), ja ne pipetoitiin 1-prosenttiseen agarosigeeliin. Seuraavaksi ajettiin geelielektroforeesiajo. Näytteitä ajettiin 45 minuuttia 120 V:n jännitteellä. Ajon jälkeen geeli laitettiin värjäytymään etidumbromidi-liuokseen, jossa geeliä liotettiin 30 minuuttia. DNA saadaan näkyviin geelistä käyttämällä etidumbromidia. Etidumbromidi kiinnittyy DNA:n emäsparien väliin ja fluoresoi UV-valon avulla.

Agaroosigeeli asetettiin UV-valon päälle ja jokaisesta näytteestä leikattiin tutkittava sekvenssikohta talteen. Koska näytteissä oli epäspesifisyyttä, oikean kohdan löytämiseksi apuna käytettiin agaroosigeeliin ajettua kokomarkkeria. Näytteitä pyrittiin pitämään mahdollisimman vähän UV-valossa, jotta UV-valo ei vaurioittaisi DNA:ta. Geelipalat punnittiin, jonka jälkeen ne puhdistettiin käyttämällä Wizart SV Gel and PCR Clean Up System -kittiä (Promega). Näytteiden puhdistus tehtiin kitin ohjeiden mukaan, ja eluointiin käytettiin 20 µl nukleaasivapaata vettä (Nuclease-Free Water). Eluointimäärää pienennettiin, jottei näytteiden konsentraatio laskisi liian alhaiseksi. Tuotteiden konsentraatio mitattiin UV/vis-spektrofotometrillä (NanoDrop2000). Tuotteiden konsentraatiot on esitetty taulukossa 3.

Taulukko 3: Geelieristettyjen tuotteiden konsentraatiot.

	Konsentraatio (ng/µl)	Abs. 260/280	Abs. 260/230
<b>MES</b>	17,20	1,66	0,57
<b>OLI</b>	28,80	1,90	0,68
<b>OMB</b>	23,00	1,88	0,57
<b>SNB</b>	19,30	1,90	0,47
<b>SNF</b>	26,90	1,92	0,61
<b>SJ4</b>	23,90	1,89	0,66
<b>SJ5</b>	27,20	1,80	0,73
<b>SJ6</b>	15,30	1,85	0,55

Absorbanssisuhteen 260/280 nm avulla voidaan arvioida DNA-liuoksen puhtautta ja pitoisuutta. Suhdeluvun ( $A_{260}/A_{280}$ ) ollessa 1,8 kyseessä on puhdas DNA. Absorbanssisuhteen 260/230 nm pitäisi olla suurempi kuin 260/280 suhteen. Jos suhde on pienempi, saattaa näytteessä olla ainesosien jäämiä, jotka häiritsevät mittausta.

## 7.4 Kloonikirjaston luominen

### 7.4.1 Kloonikirjastojen suunnittelu

Näytteet jaoteltiin neljäksi eri kirjastoiksi suotyypin sekä suon sijainnin mukaan (Taulukko 4). Jokaista suota ei laitettu omaksi kirjastokseen, koska se olisi tehnyt näytteiden käsiteltävyydestä haastavampaa. Siikajoella eli pohjoisemmassa sijaitsevat suot SJ4, SJ5 ja SJ6 yhdistettiin yhdeksi kirjastoksi. Toiseen kirjastoon yhdistettiin karut sarasuot eli OLI ja SNF. Kolmanteen yhdistettiin rahkasuot OMB ja SNB. Neljanteen



kirjastoon laitettiin ainoastaan rikkaampi sarasuo MES, koska se oli huomattavasti erilaisempi muihin verrattuna.

Taulukko 4: Näytteiden jaottelu kloonikirjastoiksi.

	<b>Luokittelu peruste</b>
SJ:t	Pohjoisessa sijaitsevat suot
OLI+SNF	Karut sarasuo
OMB+SNB	Rahkasuot
MES	Rikkaampi sarasuo

#### 7.4.2 Kasvatusalustojen valmistus

Maljojen valmistukseen käytettiin valmista Luria Bertani agaria. Aluksi kiinteä agar lämmitettiin mikroaaltouunissa tasaiseksi nesteeksi. Agarin annettiin jäähtyä noin 50 °C:seen, jonka jälkeen siihen lisättiin ampisilliini. Ampisilliinin konsentraatio oli 100 mg/ml. Luria Bertani agaria otettiin 200 ml ja siihen lisättiin 200 µl ampisilliinia, jotta agarin lopulliseksi ampisilliini-pitoisuudeksi saataisiin 100 µg/ml. Agar valettiin petrimaljoille ja niiden annettiin kuivua laminaarissa.

Maljojen kuivuttua jokaiseen lisättiin 40 µl isopropyli-β-D-thiogalaktopyranosiidiä (IPTG), jonka konsentraatio oli 100 mM ja 30 µl X-gal-liuosta (20 mg/ml) sekä 30 µl Milli Q -vettä. Lisätyt aineet levitettiin tasaisesti maljoille lasisauvalla. Maljat laitettiin kuivumaan +37 °C:seen 30 minuutiksi.

#### 7.4.3 Ligaatio

Ligaation avulla DNA-jakso saadaan liitettyä vektoriin. Ligaasientsyymi muodostaa DNA-palojen välille kovalenttisen sidoksen, jonka avulla palat kiinnittyvät toisiinsa. Yleisesti käytetään T4-bakteriofaagista saatua ligaasia. (Ligaatio 2006.)

Koska kloonikirjastoja varten eri soiden näytteitä yhdistettiin keskenään, laskettiin niiden konsentraation perusteella näyteseoksiin tarvittavien näytteiden määrä. Tämä tehtiin siksi, että haluttiin jokaista näytettä saman verran jokaiseen kirjastoon. Näyteseoksia valmistaessa periaatteena oli, että jokaista näytettä otettaisiin vähintään 3 µl:a. Laskut ovat esitettyinä liitteessä 1.

Ligaatioon käytettiin pGEM® Vector Systems -kittiä (Promega). Laskettiin kitin ohjeen mukaan tarvittava PCR-tuotteen määrä. Tuote määrä puolitettiin, koska ohjeessa olle 10 µl sijaa tehtiin 5 µl seos. Laskut ovat esitettynä liitteessä 2. Taulukossa 5 on esitettynä ligaatioseokset. Seoksia inkuboitii +4 °C:ssa yön yli.

Taulukko 5: Ligaatioseosten reagenssimäärät (µl).

	<b>SJ:t</b>	<b>MES</b>	<b>OLI + SNF</b>	<b>OMB + SNB</b>
2x Puskuri	2,5	2,5	2,5	2,5
Vektori	0,5	0,5	0,5	0,5
PCR tuote	0,9	1,1	0,7	0,9
T4 DNA Ligase	0,5	0,5	0,5	0,5
Milli Q -vesi	0,6	0,4	0,8	0,6
yht.	5,0	5,0	5,0	5,0

#### 7.4.4 Transformaatio

Transformaatiossa geneettinen materiaali siirtyy DNA-molekyylien välityksellä solusta toiseen. Solun on oltava kompetentti, jotta se pystyy vastaanottamaan esimerkiksi plasmidin. Vaikka jotkut bakteerit ovat kompetentteja luontaisesti, kompetenssi voidaan saada aikaan käsiteltäessä soluja laboratorio-olosuhteissa. *Escherichia coli* solut voidaan muuttaa kompetenteiksi käsittelemällä ne kalsiumkloridi-liuoksella. Menetelmässä soluja liuotetaan yleensä 50 millimolaarisessa (mM) CaCl<sub>2</sub>-liuoksessa. Todennäköisesti tämä tekee muutoksia soluseinämässä, jolloin plasmidin vastaanotto mahdollistuu. (Brown 2006: 90–91).

Otettiin jokaista näytettä varten kompetentteja soluja. Kompetentteja soluja säilytetään -70 °C:ssa, joten aluksi niitä sulatettiin jäällä kymmenen minuuttia. Jokaiseen ligaatioseokseen lisättiin 100 µl kompetentteja soluja. Seokset laitettiin jäälle 20 minuutiksi. Jäällä olon jälkeen seokset siirrettiin 42 °C:seen lämpöblokkiin 45 sekunniksi, ja heti tämän jälkeen takaisin jäälle kahdeksi minuutiksi. Seuraavaksi valmistettiin SOC-liuos. Otettiin 10 ml:an SOC-lientä ja siihen lisättiin 10 µl Mg<sup>2+</sup> (1M, MgCl<sub>2</sub> x 6H<sub>2</sub>O + MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O) ja 100 µl glukoosia (2M C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>). Näytteseoksiin lisättiin SOC-liuosta 800 µl:a.

Soluja kasvatettiin + 37 °C:ssa 90 minuuttia ja kierrosnopeudeksi asetettiin 150 rpm. Ravistelun jälkeen näytteet maljattiin. Jokaista näytettä varten otettiin kaksi maljaa.

Toiseen näytettä laitettiin 50 µl ja toiseen 100 µl. Soluja eli transformantteja kasvatettiin 37 °C:ssa yön yli.

#### 7.4.5 Kloonipesäkkeiden talteenotto ja säilytys

Aluksi valmistettiin Luria + ampisilliini -liuos. Luria-lientä mitattiin 50 ml ja siihen lisättiin 50 µl:a ampisilliinia (100 mg/ml). Jokaista näytettä varten otettiin yksi 96-kuoppalevy. Kuoppalevyn kuoppiin laitettiin 150 µl Luria-liuosta, joka sisälsi ampisilliinin. Tehtiin sinivalkoseulonta, eli maljoilta siirrettiin puutikuilla talteen valkoisia pesäkkeitä 96-kuoppalevylle Luria-liemeen kasvatusta varten. Levyjen päälle laitettiin muovi, ja soluja kasvatettiin ravistelussa +37 °C:ssa yön yli.

Kloonipesäkkeiden analysointia varten jokaisesta 96-kuoppalevystä nesteviljelmänä kasvatetuista pesäkkeistä valmistettiin laimennokset veteen. Uudelle 96-kuoppalevylle laitettiin 45 µl Milli Q -vettä, ja jokaiseen kuoppaan lisättiin 5 µl kasvatusta. Laimennettuja näytteitä säilytettiin jääkaapissa +4 °C:ssa. Loput kasvatuksista pakastettiin. Pakastusta varten alkuperäisten kuoppalevyjen kuoppiin lisättiin 90 ml 50-prosenttista glyserolia, ja ne sekoitettiin varovasti pipetoimalla. Kuoppalevyt laitettiin -70 °C:een.

#### 7.5 Restriktio, RFLP

Restriktiota varten tehtiin aluksi kokeilu kahdella eri restriktioentsyymillä. Se entsyymi, jonka avulla saadaan enemmän erilaisuuksia geelikuvissa, valitaan käytettäväksi entsyymiksi. Aluksi otettiin jokaiselta kuoppalevyeltä kaksi kloonia. Tehtiin PCR-monistus, jonka avulla varmistettiin näytteiden toimivuus että kloonit sisältävät oikean insertin.

## Reaktioseos:

10x DreamTaq -puskuri	2,5 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1,0 µl
dNTP (10 mM)	0,5 µl
aluke nu-SSU-0817 (10 µM)	1,0 µl
aluke nu-SSU-1536 (10 µM)	1,0 µl
vesi	17,9 µl
DreamTaq DNA polymeraasi (5U/µl)	0,1µl
templaatti	1,0 µl
Yhteensä	25 µl

## PCR-ohjelma:

94 °C	30 s	
94 °C	5 s	
52 °C	1 min	30 sykliä
68 °C	1 min	
68 °C	7 min	

Kokeilussa käytettiin seuraavia restriktioentsyymejä: *Msp*I (10 U/µl) ja *Hinf*I (10 U/µl). Restriktioentsyymi *Msp*I:n kanssa käytettävä puskuri oli BufferTango (Fermentas) ja *Hinf*I:n kanssa käytettävä BufferB (Promega). Seokset laitettiin inkuboitumaan kolmeksi tunniksi +37 °C:seen.

## Restriktioentsyymien reaktioseos:

10x puskuri	1,5 µl
Entsyymi	0,3 µl
Milli Q -vesi	11,2 µl
PCR-tuote	7,0 µl
Yhteensä	20 µl

Jokaisesta kloonikirjastosta tehtiin PCR-monistus useille klooneille, jotta oikean insertin sisältäviä klooneja löydettäisiin tarpeeksi. Koska MES kloonikirjasto koski vain yhtä suota, siitä etsittiin 20 toimivaa näytettä. Kirjastosta SJ4, SJ5 ja SJ6 etsittiin 50 toimivaa näytettä. Kahdesta muusta kirjastosta etsittiin 40 toimivaa näytettä. Toimiville PCR-tuotteille tehtiin restriktio. Tämän jälkeen niille tehtiin geelielektroforeesiajo, jolloin geelinä käytettiin 3 %:sta synergeeliä (Diversified Biotech). Synergeeli on tiheämpää kuin 1-prosenttinen agaroosigeeli, joten fragmenttikirjot erottuvat siinä paremmin. Synergeelin tilalla voitaisiin käyttää 2-prosenttista agaroosigeeliä, mutta agaroosigeeli rikkoutuu helpommin käsiteltäessä.

## 7.6 Sekvensointiin valmistelu

RFLP:n perusteella valittiin 50 kloonia, jotka lähetettiin sekvensoitavaksi. Valituille näytteille tehtiin PCR-monistus, jossa monistetaan myös osa vektoria. Tällöin tutkittava DNA löytyy vektorin välistä.

Reaktioseos:

10x DreamTaq –puskuri	2,5 µl
dNTP (10 mM)	0,5 µl
aluke M13 RP (10 µM)	1,0 µl
aluke M13 FP (10 µM)	1,0 µl
Milli Q -vesi	18,9 µl
DreamTaq DNA polymeraasi (5U/µl)	0,1µl
templaatti	1,0 µl
Yhteensä	25 µl

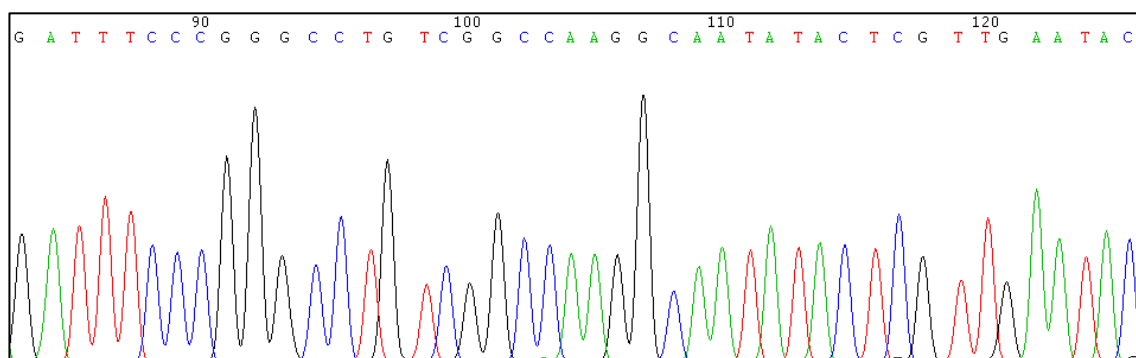
PCR-ohjelma:

<u>94 °C</u>	<u>3 min</u>	
94 °C	15 s	
52 °C	1 min	40 sykliä
<u>72 °C</u>	<u>1 min</u>	
72 °C	7 min	

Tuotteiden puhdistukseen käytettiin ExoSAP:ia (Affymetrix). ExoSAP:in tehtävä on poistaa PCR- näytteestä yksijuosteiset alukkeet ja ylimääräiset yksijuosteiset DNA-tuotteet. Lisäksi se poistaa ylimääräiset nukleotidit. ExoSAP laimennettiin 1:5. PCR-tuotetta otettiin 6 µl, ja lisättiin 2,4 µl:a laimennettua ExoSAP:ia. Aluksi seosta inkuboitiin 30 minuuttia 37 °C:ssa, jonka jälkeen sitä pidettiin vielä 15 minuuttia 80 °C:ssa. Loppukuumennuksen tarkoituksena on saada ExoSAP inaktivoitumaan. (ExoSAP-IT). Ennen kuin tuotteet lähetettiin sekvensoitaviksi, tarkistettiin geeliajon perusteella tuotteen konsentraatio. Sekvensointiin lähetettiin 5 µl puhdistettua PCR-tuotetta, johon lisättiin 5 µl T7-aluketta (5 mM). Sekvenssoinnin teki GATC Biotech -yritys. T7-alukkeen avulla tunnistetaan vektori ja löydetään halutun sekvenssin aloituskohta.

## 7.7 Sekvenssien tutkiminen

Sekvensointitulokset tulivat kromatogrammeina, joista Chromas Lite –ohjelman avulla saatiin FASTA-muotoiset sekvenssit (kuva 9). Sekvenssirinnastukset tehtiin CLUSTALW-ohjelmalla, jonka avulla voidaan rinnastaa useita sekvenssejä samanaikaisesti. Rinnastusten välissä sekvenssejä muokattiin käyttämällä GeneDoc-ohjelmaa. Sekvenssejä käännettiin toisinpäin, jotta kaikki olisivat samoin päin. Kääntämistä jouduttiin tekemään, koska tutkittava sekvenssi saattaa kiinnittyä vektoriin kumminpäin vain.



Kuva 9: Sekvensointituloksesta kromatogrammina.

Sekvenssirinnastuksen avulla saatiin sekvensseistä muodostettua fylogeneettinen puu. Puutyypinä käytettiin fenogrammia. Fenogrammissa puun oksien pituudella on merkitys. Oksan pituudella kuvataan tapahtuneen evoluution määrää eli se kuvaa myös nukleotidimuutosten määrää. (Tuimala 2003: 352.) Fylogeneettisessä puussa sekvenssit rinnastettiin aluksi CLUSTALW-ohjelmalla. Puun teossa käytettiin neighbour-joining-menetelmää. Tämän pohjalta muodostettiin puu käyttämällä ilmaisohjelmaa Mega5.

Sekvensseille etsittiin vastaavuuksia BLAST (basic local alignment search tool) -haulla. Käytettiin BLASTN -ohjelmaa. Se on hakutyökalu, jonka avulla voidaan etsiä sekvenssi-tietokannoista (GeneBank) samankaltaisia sekvenssejä. Haun perusteella etsittiin vastaavuuksia sekvensseille, jotta voitiin päätellä onko kyse sienistä, vai jostain muista eliöistä. Sekvenssejä verrattiin tunnettujen sienilajien sekvensseihin. Pyrittiin tunnistamaan mitä sienten pääryhmää sekvenssit edustavat ja kuinka samankaltaisia sekvenssit olivat tietokantasekvensseihin verrattuna.

## 7.8 T-RFLP

Aluksi valittiin sekvenssirinnastuksen avulla sellaiset restriktioentsyymit T-RFLP:tä varten, joiden avulla eri sieniryhmien tunnistus olisi mahdollista. Lisäksi huomioitiin kumpi terminaalifragmentti (3'- vai 5'-pään) erottelee sieniryhmiä paremmin. Tämän perusteella valittiin kumpaan alukkeeseen fluoresoiva leima tulee, Valinnan apuna käytetään tietokoneohjelmia, ja näistä GeneDoc-ohjelma todettiin parhaimmaksi.

Aluksi tehtiin PCR-monistus kaikista alkuperäisistä suonäytteistä (24 kpl). PCR-ohjelmanä käytettiin optimoinnin avulla parhaiten toimivaa. Fluoresoivaa D4-leimaa (Sigma) käytettiin 3'-pään alukkeessa. Kun todettiin näytteiden PCR-monistumisen onnistuneen, tuotteet geelieristettiin. Geelieristettyjen tuotteiden puhdistus tehtiin Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System:illä. Puhdistettujen näytteiden konsentraatiota ei pystytty mittaamaan NanoDrop:illa fluoresoivan leiman takia, joten arviointiin käytettiin geelielektroforeesia. Tämän perusteella näytteet jaettiin heikkoihin ja vahvoihin jatkokäsittelyä varten.

Tuotteet pilkottiin restriktioentsyymeillä *BfaI* (5 000 U/ml, valmistaja New England Biolabs) ja *HinfI* (10 000 U/ml, valmistaja New England Biolabs). Vahvoja tuotteita laitettiin seokseen 4 µl ja heikkoja 6 µl. PCR-tuotteiden joukkoon lisättiin restriktioentsyymit, puskuri ja Milli Q -vesi. Lopputilavuudeksi tuli 20 µl. Restriktioliuokset ovat esitettyinä Taulukossa 6. Seosten annettiin inkuboitua kolme tunti 37 °C:ssa.

Taulukko 6: Tuotteiden pilkkominen restriktioentsyymeillä.

Heikot	µl	Vahvat	µl
PCR-tuote	6,0	PCR-tuote	4,0
Bfal	0,6	Bfal	0,6
Hinfl	0,3	Hinfl	0,3
Buffer 4	2	Buffer 4	2
Milli Q -vesi	11,1	Milli Q -vesi	13,1

Tämän jälkeen tehtiin etanolisaostus. Lisättiin restriktioseokseen 2 µl natriumasetaattia (3M), jonka pH oli 5,2; ja 50 µl etanolia (100-prosenttinen). Etanolin lämpötila oli -20 °C:tta. Näytteet sekoitettiin koeputkisekoittajalla ja laitettiin 20 minuutiksi pakastimeen (-20 °C). Loppuvaihe etanolisaostuksesta tehtiin 4 °C:ssa kylmähuoneessa. Näytteet sentrifugoitiin 30 minuuttia kierrosnopeudella 13 000 rpm. Poistettiin supernantti varoen koskemasta pellettiä. Lisättiin 500 µl 70-prosenttista etanolia (-20 °C) ja sekoitettiin. Tämän jälkeen putket asetettiin uudelleen sentrifuugiin. Kierrosnopeus pidettiin samana (13 000 rpm), mutta aika muutettiin 15 minuutiksi. Lopuksi poistettiin varovasti supernantti. Näyte haihdutettiin kuivaksi huoneenlämmössä valolta suojattuna. Etanolisaostuksella saadaan nukleiinihapot puhdistettua ja konsentroitua. Liuokseen, joka sisältää DNA:ta, lisätään suolaa ja etanolia. Suola ja etanoli saostavat DNA:n, jolloin se saadaan pellettinä talteen. T-RFLP:tä varten suolasaostuksen tarkoituksena on poistaa näytteestä ylimääräinen leimattu aluke ja suolat. Suolat häiritsevät kapillaarielektroforeesia. (Zumbo 2013).

Ennen kuin kaikki näytteet ajettiin T-RFLP laitteessa eli kapillaarisekvensaattorissa (CEO 8000 Genetic Analysis System, Beckman), tehtiin kokeilu kahdella vahvalla ja kahdella heikolla näytteellä. Etanolisaostuksesta saatu pelletti liuotettiin 20 µl Hi-Di formamidia. T-RFLP koeajo tehtiin kaikilla neljällä näytteellä kahdessa eri näytepitoisuudessa. Näytteitä laitettiin 3 ja 5 µl. Jokaiseen näytteeseen lisättiin 0,2 µl standardiliuosta (GenomeLab DNA size Standard Kit 600 D1, Beckman Coulter) ja loput SLS-liuosta (Sample Loading Solution, Beckman Coulter), jotta lopputilavuudeksi saataisiin 30 µl. Näytteet pipetoitiin kuoppalevyille. Pipetoinnin aikana mahdollisesti syntyneet ilmakuplat poistettiin, jotteivät ne häiritse ajoa. Näytteiden pinnalle laitettiin pisara mineraaliöljyä. Toiselle kuoppalevyille laitettiin puskuria (GenomeLab, Beckman Coulter) ja kuoppalevyt asetettiin T-RFLP laitteeseen. Näytteet ajettiin T-RFLP ohjelman mukaan, ja taulukossa 7 on ajoparametrit.



Taulukko 7: T-RFLP –ajon ajoparametrit.

Capillary temperature	50 °C
Wait for temperature	yes
Denature	90 °C, 120 s
Inject	2,0 kV; 10 s
Separate	4,8 kV; 90 min

Koeajon perusteella päätettiin loput näytteistä liuottaa 15 µl:an Hi-Di formamidia. Näytteitä laitettiin 5 µl. Neljä näytettä jouduttiin niiden heikkouden takia ajamaan suuremmalla määrällä. Ajossa käytettiin näytteitä 3–10 µl PCR-tuotteen konsentraation perusteella. Muuten toimittiin samalla tavalla kuin koeajossa.

T-RFLP-ajon perusteella saatiin jokaisesta näytteestä terminaalisten fragmenttien piikkien koot (bp) ja niiden pinta-alat. Laskettiin piikkien osuudet ja tulokset taulukoitiin. Pystyriiville merkattiin fragmenttien koot ja vaakariville näytteet. Tuloksien analysointiin monimuuttujamenetelmällä käytettiin Past-ohjelmaa (PAleontological STatistics, ilmais-ohjelma). Aluksi taulukon tiedot syötettiin ohjelmaan. Käytettäväksi analysointi menetelmäksi valittiin non-metric MDS ja etäisyysmitaksi Bray-Curtis. Yhteisöjä verrataan NMDS-oordinaatiolla (non-metric multidimensional scaling).

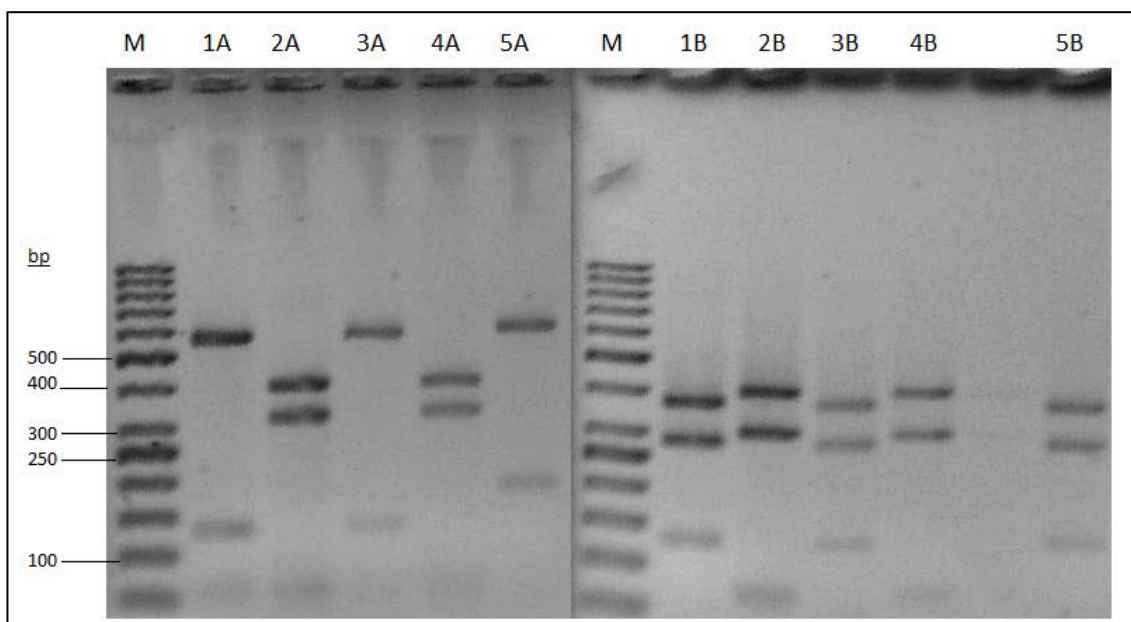
## 8 Tulokset

### 8.1 PCR optimointi

Optimoinnin perusteella huomattiin, että PCR-ohjelmaan tarvitaan Hot Start -vaihe ja reaktioseokseen on lisättävä sekä BSA:ta että magnesiumkloridia. Polymeraasin puskuri sisältää valmiiksi  $MgCl_2$ :a, mutta tässä tapauksessa sitä oli vielä lisättävä enemmän. Näiden avulla kaikki näytteet saatiin monistumaan. PCR-ohjelmassa denaturaatioaikaa lyhennettiin viiteen sekuntiin. Lisäksi annealing-vaiheen lämpötila pidettiin 52 °C:ssa ja ekstensiovaiheen lämpötila laskettiin 68 °C:seen. Sykliä määrää pidettiin neljässä kymmenessä.

## 8.2 RFLP

Restriktion avulla haluttiin löytää kirjastoista mahdollisimman paljon erilaisia sieniä ja sieniryhmiä. Restriktioentsyymiksi valittiin sellainen, joka erottelee sieniryhmät mahdollisimman hyvin. Todettiin, että restriktioentsyymi *MspI* saa aikaiseksi enemmän eroavaisuuksia kuin restriktioentsyymillä *HinfI*. *MspI* entsyymin avulla fragmenttiryhmien erot näkyivät selkeämmin, ja niiden jaottelu oli helpompaa. Kuvassa 10 on esitettyinä, millä tavalla samat kloonit restriktoituina kahdella eri entsyymillä eroavat toisistaan.



Kuva 10: RFLP. M kuvaa markkeria, A näytteisiin on käytetty *MspI* ja B näytteisiin *HinfI*. Huomataan, että näytteissä 1A ja 2A eroavaisuudet ovat selkeämmät kuin näytteissä 1B ja 2B.

RFLP:n perusteella erilaiset fragmenttiryhmät taulukoitiin, jotta nähtäisiin erilaisten fragmenttiryhmien esiintymismäärä kloonikirjastoissa. Liitteessä 3 olevassa Taulukossa 1 on esitettyinä kloonikirjastot ja fragmenttiryhmät. Lisäksi siinä näkyy erilaisten fragmenttiryhmien määrät. Koska tutkittavan sekvenssin pituus oli noin 760 bp, hylättiin yli 800 bp pitkät fragmentit ja ne fragmenttiryhmät, joiden yhteispituus oli yli 800 bp. Kyseiset sekvenssit on merkitty taulukossa harmaalla. Tämän taulukon perusteella valittiin sekvensointiin lähetettävät kloonit. Suurista ryhmistä sekvensointiin lähetettiin useita näytteitä. Sekvensointiin lähetettäviä näytteitä valittiin 48. Yleisimmät fragmenttiryhmät ovat (600 + 200) bp, (600 + 150) bp ja (400 + 350) bp. Näitä fragmenttiryhmiä löytyi jokaisesta kloonikirjastosta. Liitteessä 3 kuvassa 1 on kaaviomuodossa esitettyinä erilaisten fragmenttien prosenttiosuudet. Siitä huomataan, kuinka erilaisia kaikki kloonikirjastot ovat keskenään.

### 8.3 Sekvenssien analysointi

#### 8.3.1 Sekvenssien tunnistus

Aluksi sekvenssitiedot muutettiin FASTA-muotoon. Sekvenssien tunnistukseen käytettiin BLAST-ohjelmistoa. Liitteessä 4 olevassa Taulukossa 1 on esitettyinä näytteet ja yleisty sekvenssien vastaavuudesta. Kaksi näytettä eivät onnistuneet sekvensoinnissa, ja ne on taulukossa merkitty harmaalla. Lisäksi sekvensseistä neljä oli selkeästi jäänyt alle 500 bp:n ja yksi oli yli 800 bp, joten myös ne on merkattu harmaiksi. Näitä sekvenssejä ei otettu mukaan analysointiin, koska ne olisivat voineet vääristää tuloksia.

Sekvenssien joukosta löytyi myös muita eukaryooteja kuin sieniiä. Huomataan, että käytetyillä alukkeilla monistuu muitakin eukaryootteja. Nematodat eli sukkulamadot ovat monimuotoinen ryhmä parasiittejä ja maaperäeliöitä, ja *Katableharidophyta* on yksisolainen eukaryootti. Kaikille sekvensseille ei löytynyt tarkkoja vastaavuuksia, joten ne merkattiin vain yleistäen sieniksi (Fungi).

#### 8.3.2 Sekvenssi-rinnastus

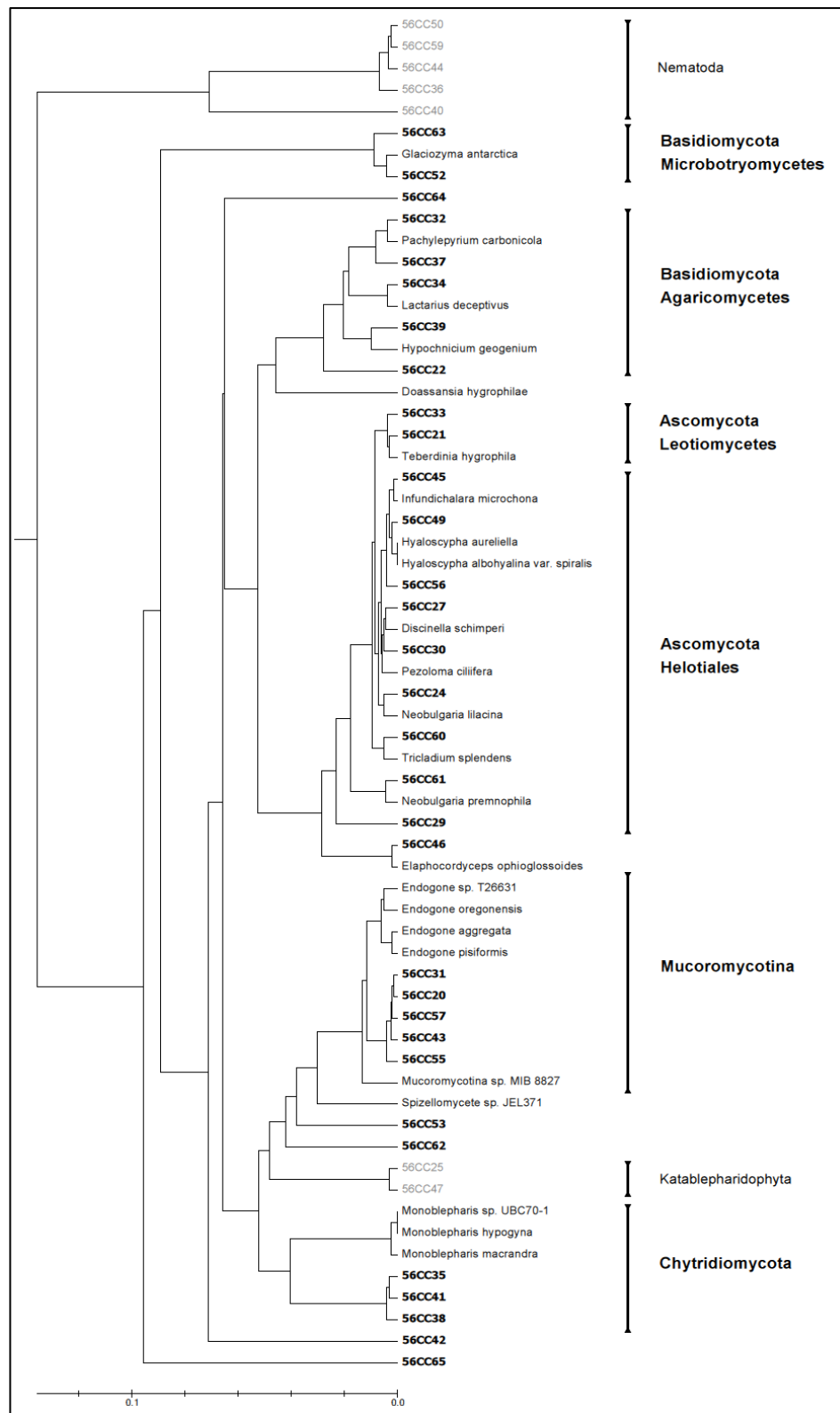
Sekvenssien rinnastukseen ja muokkaamiseen käytettiin CLUSTALW- ja GeneDoc-ohjelmaa. CLUSTALW-ohjelma rinnastaa useita sekvenssejä samanaikaisesti, ja GeneDoc-ohjelmalla sekvenssejä pystyttiin tarkastelemaan ja muokkaamaan. Sekvenssejä käännettiin toisinpäin, jotta ne kaikki alkaisivat samasta päästä (3'- tai 5'-pää). Kuvassa 11 on nähtävillä GeneDoc-ohjelmalla tehty sekvenssien tarkastelu. Kuvassa on yksi kohta sekvenssirinnastuksen perusteella saaduista tuloksesta. Kuva on keskeltä sekvenssejä, ja siitä näkyy kaksi hyvin konservoitunutta aluetta.

	*	160	*	180	*	200
56CC50 :	CAGACCTGTTATTGCTC	--AATCTCGTGCAGCT	--AGACGCTGCTTGTCCCTCTAAGAAGTA	--CAG-		
56CC59 :	CAGACCTGTTATTGCTC	--AATCTCGTGCAGCT	--AGACGCTGCTTGTCCCTCTAAGAAGTA	--CAG-		
56CC36 :	CAGACCTGTTATTGCTC	--AATCTCGTGCAGCT	--AGACGCTGCTTGTCCCTCTAAGAAGTA	--CAG-		
56CC44 :	CAGACCTGTTATTGCTC	--AATCTCGTGCAGCT	--AGACGCTGCTTGTCCCTCTAAGAAGTA	--CAG-		
56CC54 :	CAGACCTGTTATTGCTCAAACTTC	CGTCGGTT	--AAACACCGACAGTCCCTCTAAGAAGTTGCGCC			
56CC53 :	CAGACCTGTTATTGCTCAAACTTC	CGTGGACT	TGAAAGTACCACAGTCCCTCTAAGAAGCTTACCC			
56CC43 :	CAGACCTGTTATTGCTCAAACTTC	CATTGACT	--AAACGTCAATAGTCCCTCTAAGAAGT-TGACG			
56CC55 :	CAGACCTGTTATTGCTCAAACTTC	CATTGACT	--AAACGTCAATAGTCCCTCTAAGAAGT-TGACG			
56CC31 :	CAGACCTGTTATTGCTCAAACTTC	CATTGACT	--AAACGTCAATAGTCCCTCTAAGAAGTATGACG			
56CC57 :	CAGACCTGTTATTGCTCAAACTTC	CATTGACT	--AAACGTCAATAGTCCCTCTAAGAAGTATGACG			
56CC20 :	CAGACCTGTTATTGCTCAAACTTC	CATTGACT	--AAACGTCAATAGTCCCTCTAAGAAGTATGACG			
56CC25 :	CAGACCTGTTATTGCTCAAACTTC	CATTGCT	--AAACAGCAATAGTCCCTCTAAGAAGTTGGCGA			
56CC65 :	CAGACCTGTTATTGCTCGA	ACTTCCTTTGGCT	--ACTCACCAAAAGTCCCTCTAAGAAGTTGATCC			
56CC35 :	CAGACCTGTTATTGCTCAAACTTC	CGCGAGCT	--AAACGCCCGCAGTCCCTCTAAGAAGTAAACCC			
56CC41 :	CAGACCTGTTATTGCTCAAACTTC	CGCGAGCT	--AAACGCCCGCAGTCCCTCTAAGAAGTAAACCC			
56CC38 :	CAGACCTGTTATTGCTCAAACTTC	CGCGAGCT	--AAACGCCCGCAGTCCCTCTAAGAAGTAAACCC			
56CC62 :	CAGACCTGTTATTGCTCAAACTTC	CATCGGTT	--AAACACCGAGAGTCCCTCTAAGAAGTCGACC			
56CC42 :	CAGACCTGTTATTGCTCAAACTTC	CATGCCACT	--AGTCGTGGCAAGTCCCTCTAAGAAGCAGCCGC			
56CC64 :	CAGACCTGTTATTGCTCAAACTTC	CATCAGCT	--AAACGCTGATAGCCCTCTAAGAAGCAGCAG			
56CC24 :	CAGACCTGTTATTGCTCAAACTTC	CATCGGCT	--TGA-GCCGATAGTCCCTCTAAGAAGCCGGCGA			
56CC60 :	CAGACCTGTTATTGCTCAAACTTC	CATCGGCT	--TGA-GCCGATAGTCCCTCTAAGAAGCCGGCGA			
56CC27 :	CAGACCTGTTATTGCTCAAACTTC	CATCGGCT	--TGA-GCCGATAGTCCCTCTAAGAAGCCAGCGA			
56CC30 :	CAGACCTGTTATTGCTCAAACTTC	CATCGGCT	--TGA-GCCGATAGTCCCTCTAAGAAGCCAGCGA			
56CC49 :	CAGACCTGTTATTGCTCAAACTTC	CACCGGCT	--TGA-GCCGATAGTCCCTCTAAGAAGCCGGCGA			
56CC45 :	CAGACCTGTTATTGCTCAAACTTC	CATCGGCT	--TGA-GCCGATAGTCCCTCTAAGAAGCCGGCGA			
56CC56 :	CAGACCTGTTATTGCTCAAACTTC	CATCGGCT	--TGA-GCCGATAGTCCCTCTAAGAAGCCGGCGA			
56CC21 :	CAGACCTGTTATTGCTCAAACTTC	CATCGGCT	--TGA-GCCGATAGTCCCTCTAAGAAGCCAGCGA			

Kuva 11: Sekvenssirinnastuksen tarkastelu Genedoc-ohjelmalla.

### 8.3.3 Fylogeneettinen puu

Sekvenssirinnastuksen perusteella tehtiin fylogeneettinen puu, jonka avulla nähdään kuinka samankaltaisia sekvenssit ovat keskenään. Puutyyppiksi valittiin fenogrammi, jossa oksien pituudet kuvaavat erilaisuutta. Kuvassa 12 (s. 31) on fylogeneettinen puu, jossa mukana BLAST vastaavuudet. Fylogeneettisessa puussa on mukana myös ne sekvenssit, jotka eivät BLAST-haun perusteella olleet sieniä. Lisäksi sinne on lisätty jo tunnettuja sienisekvenssejä.



Kuva 12: Sienisekvenssien fylogeneettinen puu.

Kuvasta 12 huomataan, että ylimpänä ryhmänä ovat sukkulamadot (Nematoda), jotka eivät ole sieniä, mutta niitä monistuu sienialukkeilla. Lisäksi fylopuussa on myös Katab-

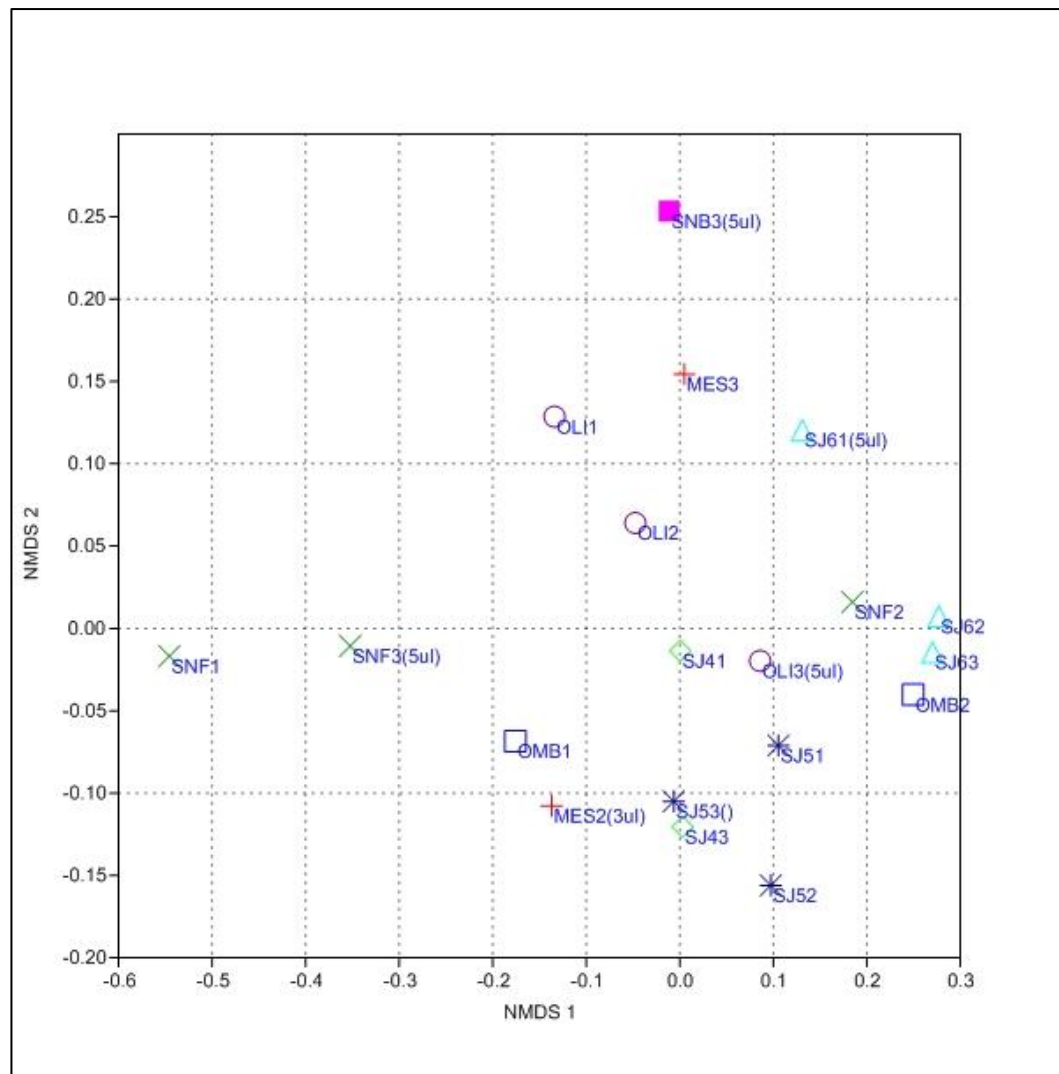
leharidophyta, joita myös monistuu sienialukkeilla. Seuraavana ovat kantasienet (Basidiomycota). Ne ovat jakautuneet kahteen ryhmään: *Microbotrymycetes* ja *Agaricomycetes*. Tämän jälkeen on kotelosienet (Ascomycota). Ensimmäisenä ovat luokaltaan *Leotiomycetes*. Seuraavat kotelosienet on merkitty lahkon mukaan eli *Helotiales*. Seuraavaksi ryhmä on *Mucoromycotina*, jotka kuuluvat yhtymäsieniryhmään (Zygomycota). Näiden jälkeen piiskasiimasienet (Chytridiomycota).

Fylogeneettiseen puuhun on lisätty myös tunnettuja sienisekvenssejä, jotka ovat lähellä näytesekvenssejä. Fylogeneettisen puun perusteella voidaan päätellä, että kaikki sekvenssit ovat hyvin samankaltaisia ja eroavaisuudet ovat pieniä.

#### 8.4 T-RFLP

T-RFLP-menetelmän onnistumisen edellytys on, että pystytään löytämään restriktioentsyymit, joiden avulla sekvensseistä voidaan erotella terminaalinen restriktiofragmentti. T-RFLP-menetelmää varten löydettiin kaksi entsyymiä, joilla pilkkomalla sekvensseistä voidaan tunnistaa hapettoman turpeen sieniryhmiä. Fluoresoivaksi alukkeeksi valittiin 3'-pään alue. Restriktioentsyymeiksi valittiin *BfaI* ja *HinfI*.

T-RFLP-ajon perusteella saatiin näytteiden sieni-yhteisöjen T-RFLP-profiilikuvat, ja fragmenttipiikkien koot emäspareina (bp) sekä niiden pinta-alat. Näiden tulosten perusteella laskettiin jokaisen näytteen terminaalisten restriktiofragmenttien (T-RF) prosentuaaliset osuudet. Lähellä toisiaan olevat piikit yhdistettiin. T-RFLP-ajossa saattaa olla sen verran vaihtelua, että yhden emäsparin erot eivät välttämättä ole luotettavia. Kuitenkin joissain näytteissä oli selvästi havaittavissa kaksi eri piikkiä, joten ne jätettiin erilleen. Näytteiden terminaalisten restriktiofragmenttien kuvat ovat liitteessä 5. Kuvat eivät olleet kovin tarkkoja, jollei ollut aihetta yhdistää, piikkejä ne jätettiin erilleen. Tulosten käsittelystä hylättiin piikit, joiden pinta-alan prosentuaalinen osuus oli alle 2 prosenttia. Lisäksi hylättiin piikit, joiden pituus oli yli 600 bp. Niitä ei pystytty määrittämään luotettavasti, koska suurin standardipiikki oli 600 bp. Näytteiden perustiedot ovat Liitteessä 6. Siinä on taulukot jokaisesta tuloksissa käytetystä näytteestä. Lisäksi Liitteessä 7 on Past-ohjelmaan syötetty Taulukko 1, jonka perusteella saatiin NMDS-oordinaatio.



Kuva 12: NMDS-oordinaatio soiden sieniyhteisöjen T-RFLP-tuloksista.

Periaatteena kuvan (Kuva 12) tulkinnessa on, että lähekkäin toisiaan olevat näytteet ovat keskenään samanlaisia. Aluksi katsottiin ovatko saman suon näytteet lähellä toisiinsa. Maaperässä olevilla mikrobiyhteisöillä saattaa olla suurta vaihtelua, joten myös rinnakkaisnäytteet saattavat erota keskenään toisistaan. Lisäksi katsottiin että eroavat erilaisten soiden sieniyhteisöt toisistaan.

Samojen soiden rinnakkaisnäytteiden oletetaan olevan lähekkäin. Kuvassa näytteiden OLI, SJ5 ja SJ6 rinnakkaisnäytteet ovat suhteellisen lähellä toisiaan. Lisäksi näytteen SJ4 kaksi rinnakkaisnäytettä ovat lähellä toisiaan. Voidaan päätellä, että näiden soiden rinnakkaisnäytteissä ei ole suurta eroa. Toisaalta näytteiden SNF yksi rinnakkaisnäyte eroaa muista. Tästä voidaan päätellä, että kyseisessä näytteessä on jotain erilaista. Näytteiden MES ja OMB rinnakkaisnäytteet ovat kaukana toisistaan, joten myös niissä

voidaan päätellä olevan eroavaisuuksia. Lisäksi näytteestä SNB onnistui vain yksi rinnakkaisnäyte, joten sen perusteella on vaikeaa päätellä mitään.

Kuvan perusteella voidaan analysoida, onko erilaisten soiden välillä eroja. Tutkitaan, onko pohjoisten ja eteläisten soiden välillä suuria eroja, ja ovatko suotyyppiltään samantlaiset suot lähekkäin. Huomataan, että näiden välillä ei ole selkeitä eroavaisuuksia. Kuvan perusteella voidaan päätellä, että jokaisella suolla on omanlaisensa sieniyhteisö.

## 9 Yhteenveto

Työssä kehitettiin T-RFLP-sormenjälkimenetelmä, jonka avulla voidaan vertailla erilaisia sieniyhteisöjä ja niiden eroja soiden turvenäytteistä. Tutkittava sienisekvenssi oli alue ribosomaalisen RNA-geenin 18S alueelta. Alue on hyvin konservoitunut, joten sekvensseissä olleet erot olivat vähäisiä. Tämä alue valittiin, koska etukäteen ei tiedetty millaisia sieniä näytteistä löytyisi. Konservoituneen alueen perusteella on helpompi tunnistaa tietokantasekvensseistä poikkeavia sekvenssejä.

PCR-menetelmän optimointi oli tärkeää, jotta kaikki näytteet saataisiin monistumaan samalla ohjelmalla eikä syntyisi epäspesifistä monistumista. Näytteissä ohi hieman epäspesifisyyttä, joten PCR-monistuksesta saadut tuotteet oli eristettävä geelistä. T-RFLP-menetelmässä on tulosten kannalta tärkeää, että näyte sisältää ainoastaan tutkittavaa geeni-aluetta.

T-RFLP-menetelmää varten löydettiin sellaiset restriktioentsyymit, joiden avulla voidaan erotella hapettoman turpeen sieniä. Tuloksien perusteella turvenäytteistä löytyi kaikkien neljän sienipääryhmän sieniä. Tuloksista voidaan päätellä, että sieniyhteisöt eri soilla olivat keskenään erilaisia. Tämän perusteella ei löydetty selkeää eroa erityyppisten soiden välillä. Myös soiden rinnakkaisnäytteiden välillä oli eroja.



T-RFLP-sormenjälkimenetelmää voitaisiin kehittää tehokkaammaksi etsimällä muita restriktioentsyymejä, joiden avulla eri sieniryhmien tunnistaminen olisi tarkempaa. Tällöin T-RFLP-ajon perusteella saadut piikit saataisiin tarkemmin eroteltua soilla esiintyvien sieniryhmien omiksi piikeiksi. Kun tiedetään mitä sieniryhmiä soilla esiintyy, voitaisiin valita myös vaihtelevampi geenialue. Tällöin voitaisiin erotella sieniryhmiä paremmin.

## Lähteet

Anderson, I.C. & Cairney J. 2004. Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques. *Environmental Microbiology*. s. 769–779.

Basidiomycota. 2003. Verkkodokumentti. Tree of Life web project.  
<<http://tolweb.org/Basidiomycota>>. Luettu 30.5.2013.

Bogs. 2013. Verkkodokumentti. United States Environmental Protection Agency.  
<<http://water.epa.gov/type/wetlands/bog.cfm>>. Luettu 5.10.2013.

Borneman, J. Hartin, R.J. 2000. PCR Primers That Amplify Fungal rRNA Genes from Environmental Samples. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 66, No 10. s. 4356–4360.

Brown, T.A. 2006. Gene cloning & DNA analysis. Singapore. Markono Print Media Pte Ltd.

ExoSAP-IT. 2013. Verkkodokumentti.  
<[http://www.affymetrix.com/estore/browse/brand/usb/product.jsp?productId=131310#1\\_1](http://www.affymetrix.com/estore/browse/brand/usb/product.jsp?productId=131310#1_1)>. Luettu 20.5.2013.

Fens. 2013. Verkkodokumentti. United States Environmental Protection Agency.  
<<http://water.epa.gov/type/wetlands/fen.cfm>>. Luettu 5.10.2013.

Hiivat. 2006. Verkkodokumentti. Solunetti.  
<<http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/hiivat/2/>>. Luettu 14.4.2013.

HinfI. 2005. Verkkodokumentti. theLabRat.com.  
<<http://www.thelabrat.com/restriction/HinfI.shtml>>. Luettu 5.10.2013.

Homeet. 2006. Verkkodokumentti. Solunetti.  
<<http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/homeet/2/>>. Luettu 14.4.2013.

Hot Start PCR. 2013. Verkkodokumentti. BioLabs Inc.  
<<https://www.neb.com/applications/dna-amplification-and-pcr/pcr/hot-start-pcr>>. Luettu 20.5.2013.

James, Timothy Y ym 2006. A molecular phylogeny of the flagellated fungi (Chytridiomycota) and description of a new phylum (Blastocladiomycota). *Mycologia* 98(6). s.860–871.

Kreader, Carol A. 1996. Relief of Amplification Inhibition in PCR with Bovine Serum Albumin or T4 Gene 32 Protein. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol 63, No 3. 6.12.1995. s.1102–1106.

Ligaatio. 2006. Verkkodokumentti. solunetti.  
<<http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/ligaatio/2/>>. Luettu 16.5.2013

Mitchell, J.I. Zuccaro, A. 2005. Sequences, the environment fungi. *Mycologist* 20. 2006. s. 62–74.

Ojamo, Heikki. 2007. Mikrobiologia. Luentomoniste. Metropolia Ammattikorkeakoulu.

PCR and multiplex PCR guide. 1997. Verkkodokumentti.  
<<http://medicine.yale.edu/labs/henegariu/www/tavi/Guide.html>>. Luettu 20.4.2013.

Rajala Tiina. 2009. Selittävätkö mykorritsojen lajit ja lajilukumäärät puiden kasvueroja? Verkkodokumentti. <<http://www.metla.fi/aikakauskirja/full/ff09/ff092150.pdf>>. Luettu 14.4.2013.

Restriction fragment Length Polymorphism (RFLP). Verkkodokumentti. NCBI.  
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/probe/doc/TechRFLP.shtml>>. Luettu 4.20.2013.

Ribosomaalinen RNA. 2006. Verkkodokumentti. Solunetti.  
<<http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/rna/2/>>. Luettu 14.4.2013.

Roux, Kenneth. H. 2003. Optimization and Troubleshooting in PCR. CSHL Press, Cold Spring Harbor 2003.

Schoch, Conrad L ym. 2009. The Ascomycota Tree of Life: A Phylum-wide Phylogeny Clarifies the Origin and Evolution of Fundamental Reproductive and Ecological Traits. *Society of Systematic Biologists*, vol 58, no 2. s. 224–239.

Sienet. 2006. Verkkodokumentti. Solunetti.  
<<http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/sienet/>>. Luettu 14.4.2013.

Silvan, N. Saarinen, M. Sarkola, S. Päivänen, J. Vasander, H. 2008. Siikaneva – Pirkanmaan laajin suoerämaa. Vammalan kirjapaino Oy.

Terminal Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) Analysis on Applient Biosystems Capillary Electrophoresis. 2005. Verkkodokumentti. Applied Biosystems.  
<[http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb\\_marketing/documents/general/documents/cms\\_042272.pdf](http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_marketing/documents/general/documents/cms_042272.pdf)> Luettu 5.10.2013

Thies, Janice E. 2007. Soil microbial community analysis using terminal restriction fragment length polymorphisms. *SSSAJ*, vol 71. s. 579–591.

Thorman, Markus N. 2005. Diversity and function of fungi in peatlands: A carbon cycling perspective. *Canadian Journal of Soil Science*. s. 281–293 .

Tuimala, Jarno. 2003. Bioinformatiikan perusteet. Verkkodokumentti.  
<<http://koti.mbnet.fi/tuimala/oppaat/bioinfo-laaja.pdf>> . Luettu 30.8.2013.

Vasander, Harri (toim.). 1998. Suomen suot. Helsinki: Gummerlus Kirjapaino Oy.

White, Merlin M ym. 2006. Phylogeny of the Zygomycota based on nuclear ribosomal sequence data. *Mycologia*, vol 98, no 6. s. 872–884.

Zumbo, Paul. 2013. Ethanol precipitation. Verkkodokumentti.  
<[http://physiology.med.cornell.edu/faculty/mason/lab/zumbo/files/ETHANOL\\_PRECIPITATION.pdf](http://physiology.med.cornell.edu/faculty/mason/lab/zumbo/files/ETHANOL_PRECIPITATION.pdf)> . Luettu 30.8.2013.

## Kloonikirjaston luominen

Lasketaan jokaista näytettä tarvittava määrä näyteseokseen, sekä jokaisen näyteseoksen lop-  
pukonsentraatio.

$$c = \frac{m}{V} \quad (1)$$

jossa c on konsentraatio, m on massa ja V on tilavuus

Kloonikirjasto SJ:t

$$\text{SJ6: } 15,3 \frac{\text{ng}}{\mu\text{l}} \times 5,5 \mu\text{l} = 84,15 \text{ ng}$$

$$\text{SJ5: } 27,2 \frac{\text{ng}}{\mu\text{l}} \times a = 84,15 \text{ ng} \Rightarrow a = 3,09 \mu\text{l}$$

$$\text{SJ4: } 23,9 \frac{\text{ng}}{\mu\text{l}} \times b = 84,15 \text{ ng} \Rightarrow b = 3,52 \mu\text{l}$$

$$c_{\text{kok}} = \frac{3 \times 84,15 \text{ ng}}{(5,5+3,09+3,52)\mu\text{l}} = 20,86 \frac{\text{ng}}{\mu\text{l}}$$

Kloonikirjasto OLI + SNF

$$\text{OLI: } 28,8 \frac{\text{ng}}{\mu\text{l}} \times 3,0 \mu\text{l} = 86,4 \text{ ng}$$

$$\text{SNF: } 26,90 \frac{\text{ng}}{\mu\text{l}} \times d = 86,4 \text{ ng} \Rightarrow d = 3,2 \mu\text{l}$$

$$c_{\text{kok}} = \frac{2 \times 86,4 \text{ ng}}{(3,0+3,2)\mu\text{l}} = 27,8 \frac{\text{ng}}{\mu\text{l}}$$

Kloonikirjasto OMB +SNB

$$\text{OMB: } 23,0 \frac{\text{ng}}{\mu\text{l}} \times 3,0 \mu\text{l} = 69,0 \text{ ng}$$

$$\text{SNB: } 19,3 \frac{\text{ng}}{\mu\text{l}} \times f = 69,0 \text{ ng} \Rightarrow f = 3,6 \mu\text{l}$$

$$c_{\text{kok}} = \frac{2 \times 69,0 \text{ ng}}{(3,0+3,6)\mu\text{l}} = 20,9 \frac{\text{ng}}{\mu\text{l}}$$

Kloonikirjasto MES

$$c_{\text{kok}} = 17,2 \frac{\text{ng}}{\mu\text{l}}$$

**LIGAATIO**

Lasketaan ligaatiota varten tarvittavan tuotteen määrä Kaavan 2 perusteella.

$$\frac{ng\ of\ vector \times kb\ size\ of\ insert}{kb\ size\ of\ vector} \times insert: vector\ molar\ ratio = ng\ of\ insert \quad (2)$$

jossa ng of vector on 50, kb size of insert on 0,76, kb size of vector on 3,0 ja vector molar ratio on 3/1

$$ng\ of\ insert = \frac{50\ ng\ vector \times 0,76\ kb\ insert}{3,0\ kb\ vector} \times \frac{3}{1} = 38,0\ ng$$

$$SJ:t \quad \frac{38\ mg}{20,86\ \frac{ng}{\mu l}} = 1,82\ \mu l$$

$$OLI + SNF \quad \frac{38\ mg}{27,8\ \frac{ng}{\mu l}} = 1,37\ \mu l$$

$$OMB + SNB \quad \frac{38\ mg}{20,9\ \frac{ng}{\mu l}} = 1,82\ \mu l$$

$$MES: \quad \frac{38\ mg}{17,2\ \frac{ng}{\mu l}} = 2,21\ \mu l$$

Tuotemäärät puolitetaan, koska ligaatioseosta valmistetaan puolikas määrä.

$$SJ:t \quad 0,9\ \mu l$$

$$OLI + SNF \quad 0,7\ \mu l$$

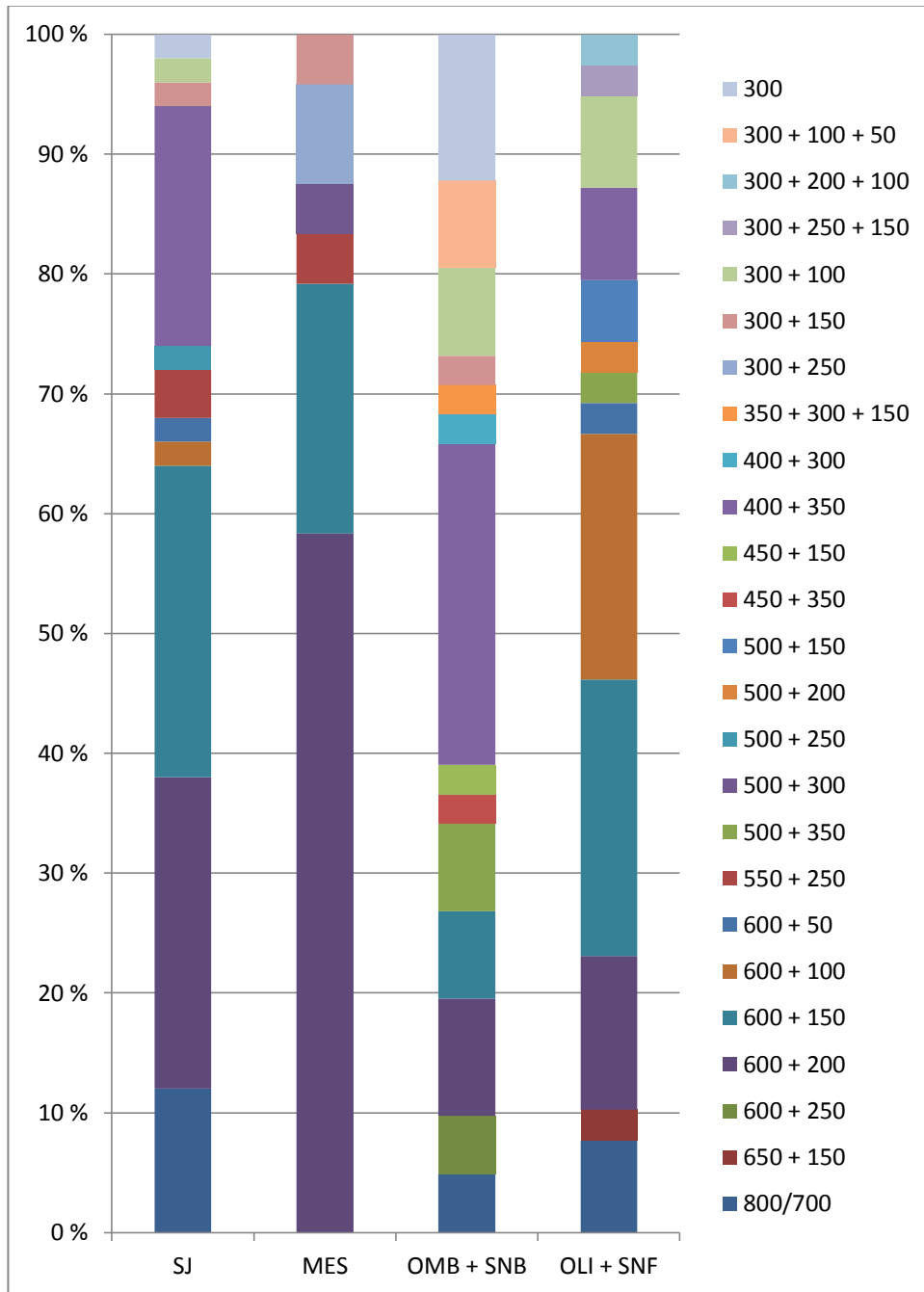
$$OMB + SNB \quad 0,9\ \mu l$$

$$MES \quad 1,1\ \mu l$$

**RFLP**

Taulukko 1: Restriktiofragmentit. harmaalle merkityt fragmentit on hylätty tuloksista, koska niiden pituus on yli 800 bp.

Fragmenttien pituus (bp)	SJ	MES	OMB + SNB	OLI + SNF	yht.
800+	2		1	1	4
800/700	6		2	3	11
650 + 150				1	1
600 + 500 + 400 + 150				1	1
600 + 250			2		2
600 + 200	13	14	4	5	36
600 + 150	13	5	3	9	30
600 + 100	1			8	9
600 + 50	1			1	2
550 + 250	2	1			3
500 + 350			3	1	4
500 + 300		1			1
500 + 250	1				1
500 + 200				1	1
500 + 150				2	2
450 + 350			1		1
450 + 150			1		1
400 + 350	10		11	3	24
400 + 300			1		1
350 + 300 + 200				1	1
350 + 300 + 150			1		1
300 + 250		2			2
300 + 150	1	1	1		3
300 + 100	1		3	3	7
300 + 250 + 150				1	1
300 + 200 + 100				1	1
300 + 100 + 50			3		3
300	1		5		6
yhteensä	50	24	41	40	



Kuva 1: Fragmenttityhmien prosentuaaliset-osuudet Kloonikirjastoissa.



## BLAST tulokset

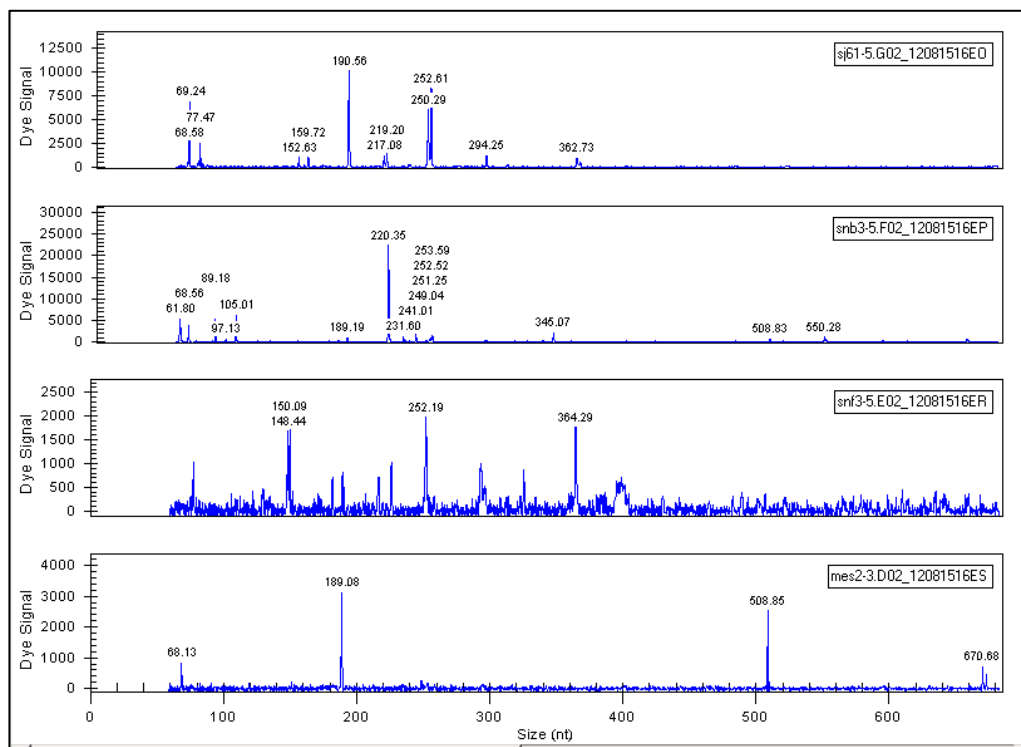
Taulukko 1: Sekvensoitujen näytteiden tiedot ja Blast-vastaavuudet.

Suo	Fragmentit (bp)	koodi	bp	Blast tulos
SJ	400 + 350	56CC20	767	Mucoromycotina
SJ	600 + 200	56CC21	748	Ascomycetes Helotiales
SJ	600 + 150	56CC22	767	Basidiomycetes Agaricomycota
MES	550 + 250	56CC23	-	-
MES	600 + 200	56CC24	767	Ascomycetes Helotiales
OMB+SNB	450 + 350	56CC25	764	Katablepharidophyta
OMB+SNB	300	56CC26	370	Chytridiomycota
OLI+SNF	800	56CC27	766	Ascomycetes Helotiales
OLI+SNF	650 + 150	56CC28	387	Ascomycetes Helotiales
OLI+SNF	350 + 300 + 200	56CC29	536	Ascomycetes Helotiales
SJ	800 / 700	56CC30	766	Ascomycota helotiales
SJ	400 + 350	56CC31	768	Mucoromycotina
SJ	600 + 100	56CC32	769	Basidiomycetes Agaricomycota
SJ	600 + 200	56CC33	768	Ascomycetes Helotiales
SJ	600 + 150	56CC34	768	Basidiomycetes Agaricomycota
SJ	550 + 250	56CC35	746	Chytridiomycota
SJ	300 + 100	56CC36	761	Nematoda
SJ	300	56CC37	521	Basidiomycetes Agaricomycota
SJ	500 + 250	56CC38	771	Chytridiomycota
MES	600 + 150	56CC39	768	Basidiomycetes Agaricomycota
MES	300 + 250	56CC40	481	Nematoda
MES	500 + 300	56CC41	768	Chytridiomycota
MES	300 + 150	56CC42	760	Fungi
OMB+SNB	400 + 350	56CC43	769	Mucoromycotina
OMB+SNB	300 + 150	56CC44	761	Nematoda
OMB+SNB	600 + 200	56CC45	768	Ascomycetes Helotiales
OMB+SNB	800	56CC46	764	Ascomycota
OMB+SNB	500 + 350	56CC47	524	Katablepharidophyta
OMB+SNB	600 + 250	56CC48	299	Chytridiomycetes
OMB+SNB	600 + 150	56CC49	765	Ascomycetes Helotiales
OMB+SNB	300 + 100	56CC50	760	Nematoda
OMB+SNB	300 + 100 + 50	56CC51	462	Nematoda
OMB+SNB	450 + 150	56CC52	552	Basidiomycota Microbotryomycetes
OMB+SNB	400 + 300	56CC53	766	Chytridiomycota
OMB+SNB	350 + 300 + 150	56CC54	841	Chytridiomycota
OMB+SNB	400 + 350	56CC55	765	Mucoromycotina
OLI+SNF	600 + 200	56CC56	766	Ascomycetes Helotiales

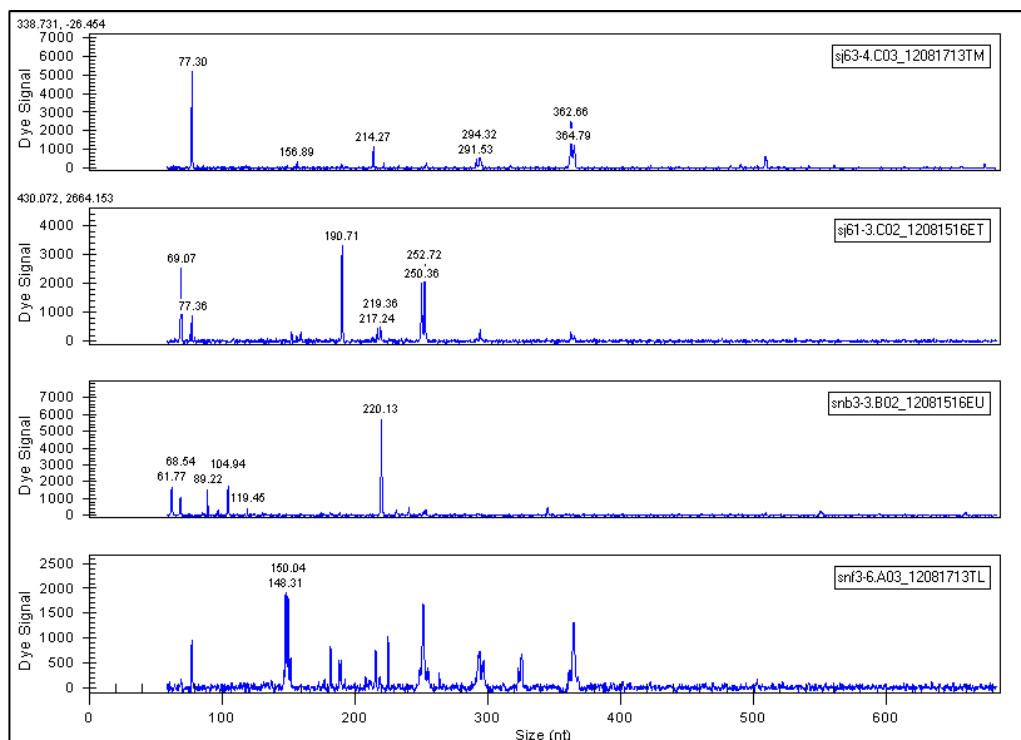
Taulukko 2: Sekvenssoitujen näytteiden tiedot ja Blast-vastaavuudet.

Suo	Fragmentit (bp)	koodi	bp	Blast tulos
OLI+SNF	400 + 350	56CC57	767	Mucoromycotina
OLI+SNF	500 + 150	56CC58	-	-
OLI+SNF	300 + 100	56CC59	760	Nematoda
OLI+SNF	600 + 100	56CC60	766	Ascomycetes Helotiales
OLI+SNF	600 + 150	56CC61	766	Ascomycetes Helotiales
OLI+SNF	500 + 350	56CC62	768	Mucoromycotina
OLI+SNF	500 + 200	56CC63	763	Basidiomycota Microbotryomycetes
OLI+SNF	300 + 250 + 150	56CC64	763	Basidiomycota
OLI+SNF	300 + 200 + 100	56CC65	768	Fungi

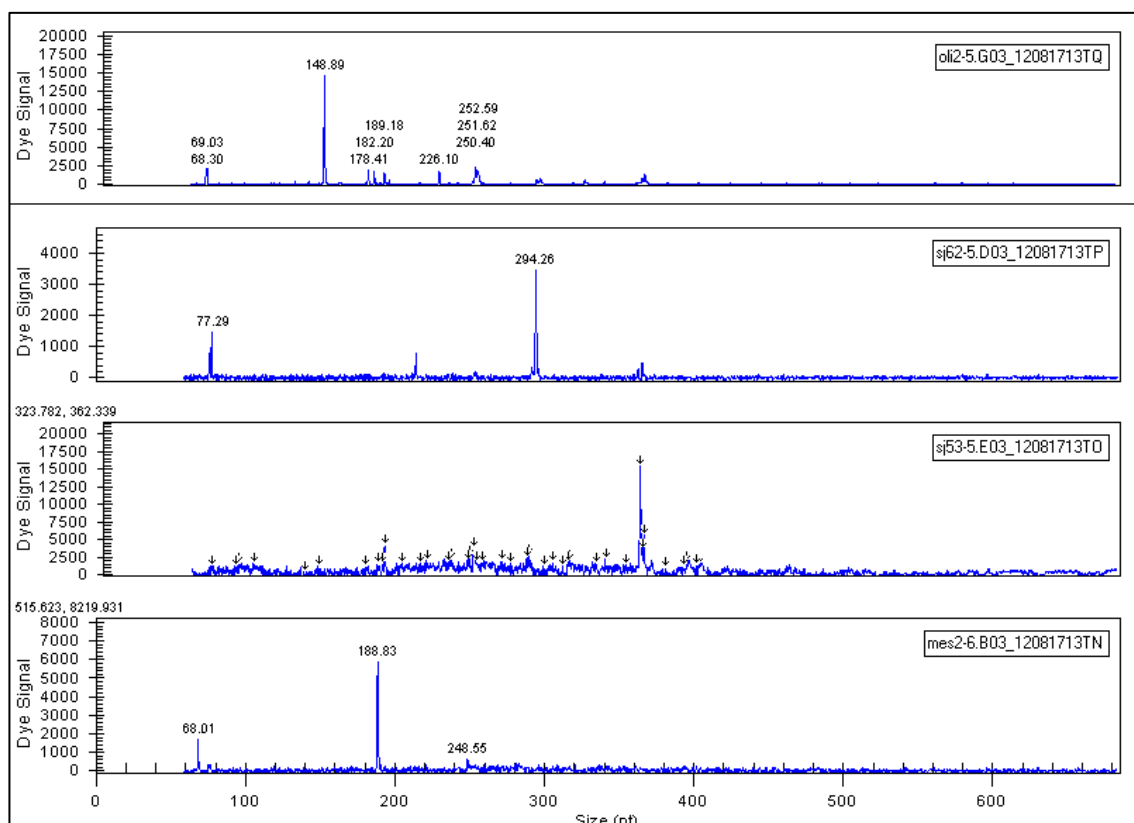
## T-RFLP -profiilikuvat



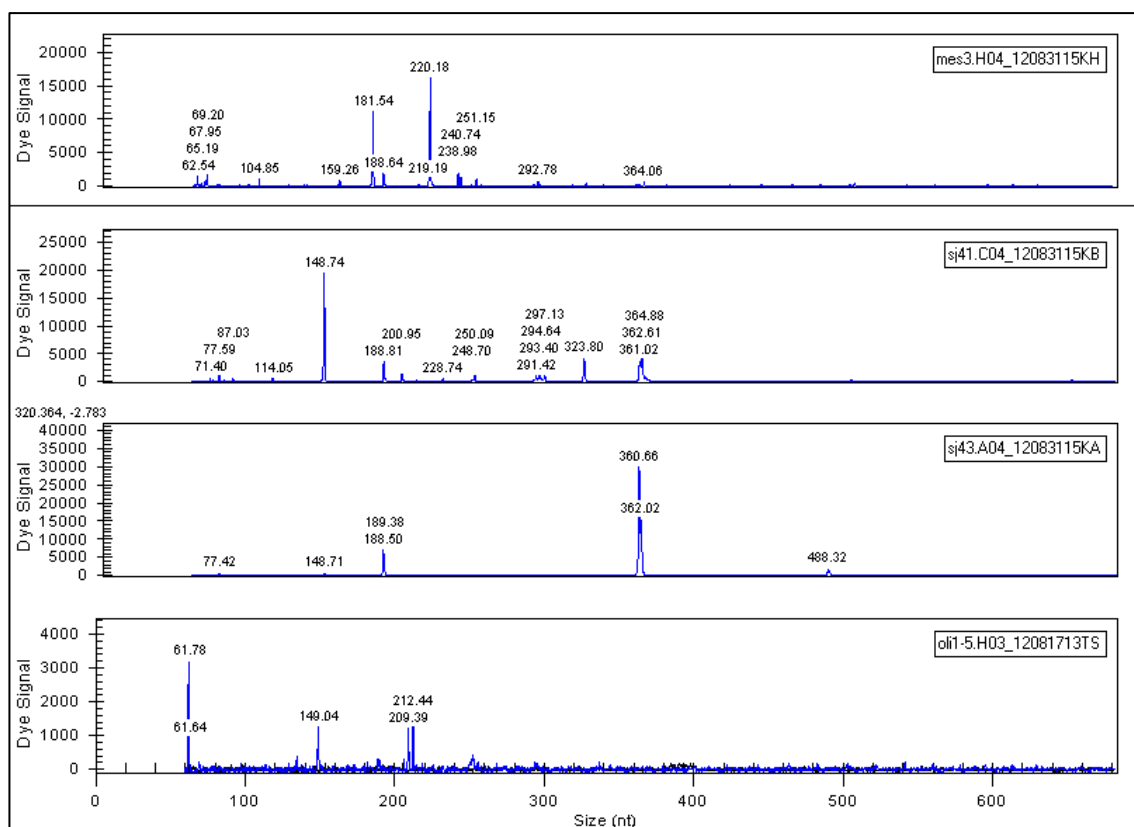
Kuva 1: Näytteiden SJ61, SNB3-5, SNF3-5 ja MES2-3 T-RFLP -profiilit.



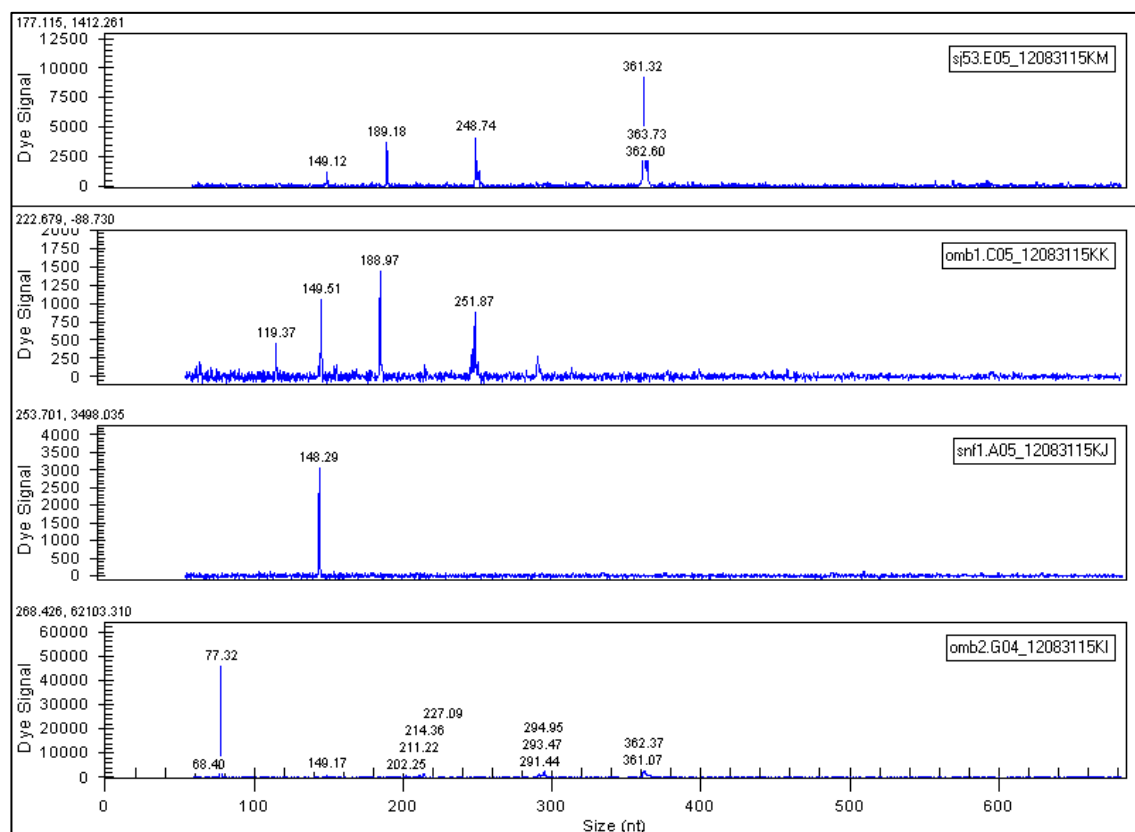
Kuva 2: Näytteiden SJ63, SJ61, SNB3-3 ja SNF3-6 T-RFLP -profiilit.



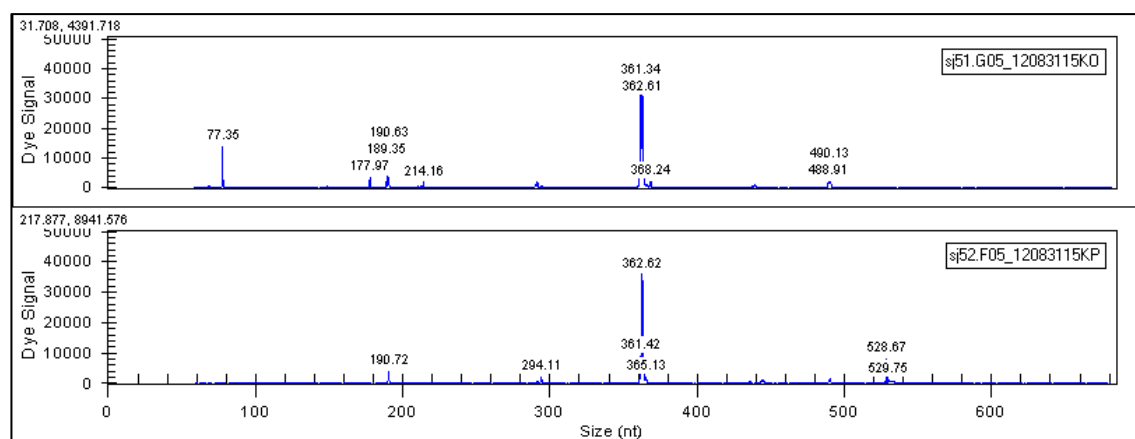
Kuva 3: Näytteiden OLI2-5, SJ62, SJ53-5 JA MES 2.6 T-RFLP -profiilit.



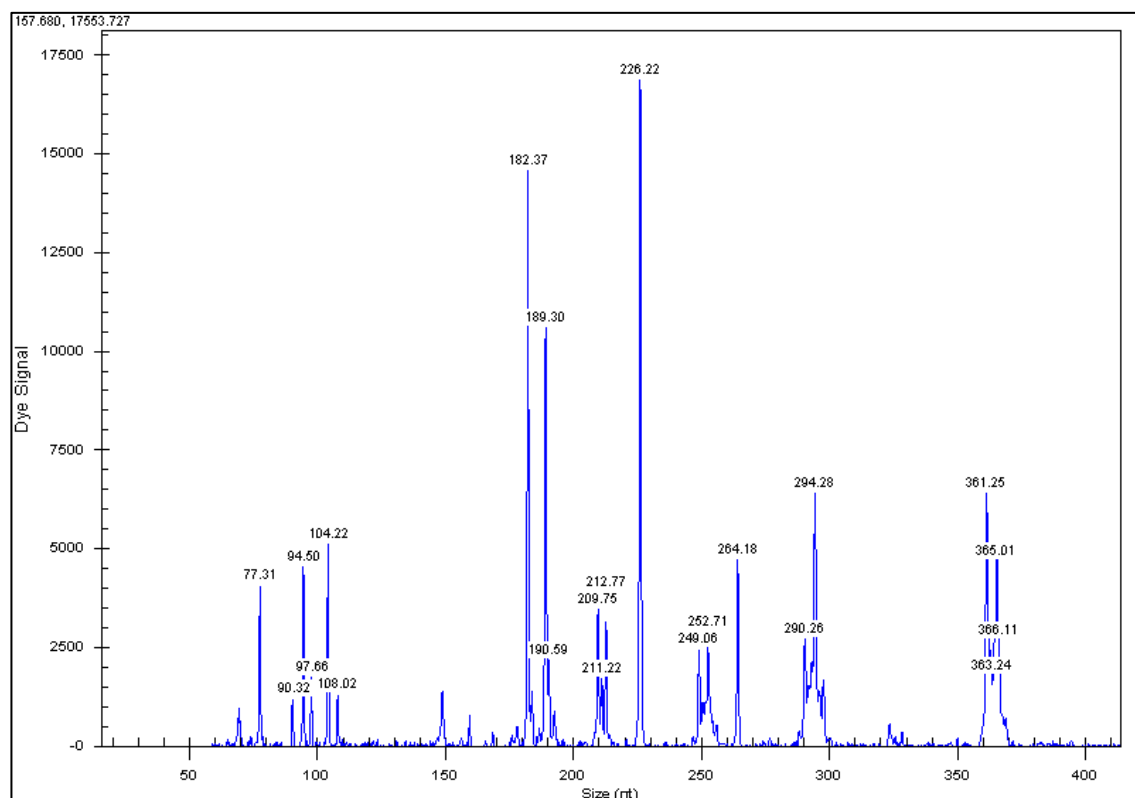
Kuva 4: Näytteiden MES3, SJ41, SJ43 JA OLI1-5 T-RFLP -profiilit.



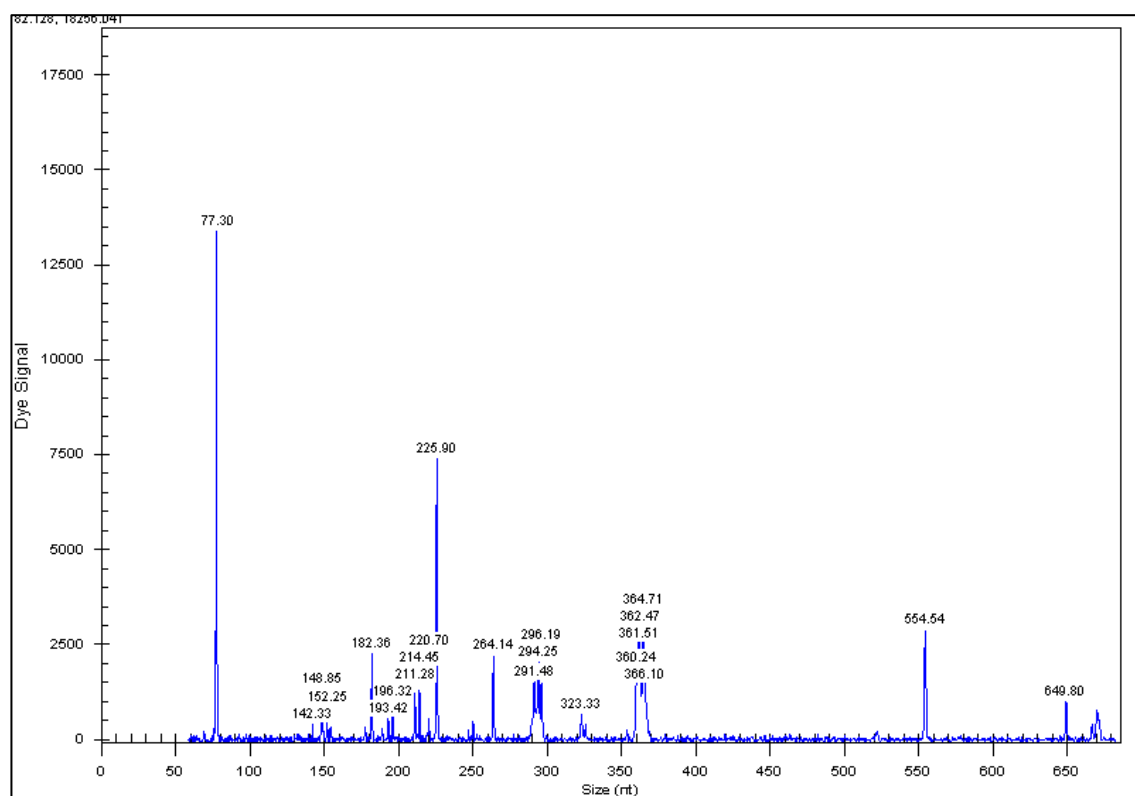
Kuva 5: Näytteiden SJ53, OMB1, SNF1 JA OMB2 T-RFLP -profiilit.



Kuva 6: Näytteiden SJ51 ja SJ52 T-RFLP -profiilit.



Kuva 7: Näytteen OLI 3 T-RFLP -profiili.



Kuva 8: Näytteen SNF2 T-RFLP -profiili.

**T-RFLP -piikit**

Taulukko 1: T-RFLP-piikkien tiedot näytteistä MES2, MES3, OMB1, OMB2, SNB3 ja SNF1.

Näyte	Fragmentti (bp)	Piikin ala	Osuus
MES2-3	68	745	0,2281
	189	1654	0,5064
	509	723	0,2214
	671	144	0,0441
MES3	63	1190	0,0514
	69	2241	0,0968
	105	574	0,0248
	159	463	0,0200
	182	5855	0,2529
	189	1050	0,0454
	220	8618	0,3723
	239	919	0,0397
	241	703	0,0304
	251	554	0,0239
OMB1	119	300	0,1315
	150	612	0,2683
	189	823	0,3608
	252	546	0,2394
OMB2	77	31330	0,7247
	214	2287	0,0529
	291	1270	0,0294
	293	924	0,0214
	295	2198	0,0508
	361	1466	0,0339
	362	1526	0,0353
SNB3-5	62	5407	0,1585
	69	2819	0,0826
	89	3496	0,1025
	105	3994	0,1171
	220	11541	0,3382
	232	686	0,0201
	241	1136	0,0333
	254	1425	0,0418
	345	1046	0,0307
SNF1	148	1808	1,0000

Taulukko 2: T-RFLP-piikkien tiedot näytteistä SNF2, SNF3, OLI1 ja OLI2.

Näyte	Fragmentti (bp)	Piikin ala	Osuus
SNF2	77	8829	0,2560
	149	1226	0,0355
	182	1249	0,0362
	211	727	0,0211
	214	742	0,0215
	226	4174	0,1210
	264	1197	0,0347
	291	1383	0,0401
	294	1685	0,0489
	296	1054	0,0306
	360	1448	0,0420
	362	3256	0,0944
	365	3456	0,1002
	555	1592	0,0462
SNF3-5	148	1126	0,2125
	150	1063	0,2006
	252	1810	0,3416
	364	1299	0,2452
OLI1-5	62	2833	0,5632
	149	885	0,1759
	209	640	0,1272
	212	672	0,1336
OLI2-5	68	1238	0,0612
	69	2926	0,1447
	149	8895	0,4400
	178	1058	0,0523
	182	918	0,0454
	189	843	0,0417
	226	862	0,0426
	250	1488	0,0736
	252	1235	0,0611
	253	753	0,0372



Taulukko 3: T-RFLP-piikkien tiedot näytteistä OLI3, SJ41, SJ43 ja SJ51.

Näyte	Fragmentti (bp)	Piikin ala	Osuus
OLI3-5	77	8476	0,0797
	95	3070	0,0289
	104	4845	0,0456
	108	2217	0,0209
	182	8618	0,0811
	189	7032	0,0662
	210	2319	0,0218
	213	2858	0,0269
	226	13890	0,1307
	264	4713	0,0443
	290	2946	0,0277
	293	2131	0,0200
	294	6350	0,0597
	361	7892	0,0742
	363	3068	0,0289
	364	2675	0,0252
	365	4208	0,0396
SJ41	78	1868	0,0552
	149	13098	0,3871
	189	2363	0,0698
	201	737	0,0218
	250	697	0,0206
	291	716	0,0212
	293	963	0,0285
	297	736	0,0218
	324	2741	0,0810
	361	2680	0,0792
	363	4468	0,1320
	365	681	0,0201
SJ43	189	6077	0,1692
	361	18144	0,5053
	362	9455	0,2633
	488	1277	0,0356
SJ51	77	9081	0,1739
	178	1912	0,0366
	189	2096	0,0401
	191	1841	0,0353
	361	18007	0,3448
	363	15412	0,2951
	489	2293	0,0439

Taulukko 4. T-RFLP-piikkien tiedot näytteistä SJ52, SJ53, SJ61, SJ62 ja SJ63.

Näyte	Fragmentti (bp)	Piikin ala	Osuus
SJ52	191	1997	0,0654
	294	1267	0,0415
	361	4478	0,1465
	363	19138	0,6263
	365	1172	0,0384
	529	2506	0,0820
SJ53	149	647	0,0493
	189	2105	0,1605
	249	2329	0,1775
	361	5182	0,3950
	363	1103	0,0841
	364	1753	0,1336
SJ61_5	69	6062	0,2231
	77	1649	0,0607
	153	572	0,0211
	191	6491	0,2389
	217	713	0,0262
	219	935	0,0344
	250	3751	0,1381
	253	5137	0,1891
	294	724	0,0266
	363	600	0,0221
SJ62-5	77	795	0,3116
	294	1756	0,6884
SJ63-4	77	3678	0,4373
	214	676	0,0804
	292	308	0,0366
	294	741	0,0881
	363	1703	0,2025
	365	1147	0,1364

## T-RFLP piikkien osuudet

Taulukko 1: T-RFLP -piikkien prosentuaaliset osuudet. Pystyrivillä fragmenttien pituudet (bp), vaakarivillä näytteet.

[illegible]

## Materiaalit

Taulukko 1: 50x TAE-puskuri.

121 g	Tris
286 ml	Glacial Asetic Adic
50 ml	EDTA (0,5 M)
Lisätään vettä (lopputilavuus 0,5 l).	

Taulukko 2: 1-prosenttinen agarosigeeli

Agaroosi	1,0 g
1x TAE	100 ml

Taulukko 3: 3-prosenttinen synergel.

1,15 g	Synergel
0,7 g	Agaroosi
Lisätään 96-prosenttista etanolia, että aineet liukenevat.	
Lisätään TAE-puskuri.	
Lopputilavuus 100 ml	

Taulukko 4: LB (Luria Bertani) agar.

Tryptoni	10 g
Hiivauute	5 g
NaCl	10 g
Agar	15 g
Lisätään vettä (lopputilavuus 1l).	

Taulukko 5: RFLP:ssä käytetyt restriktioentsyymit.

Entsyymi	Puskuri	Valmistaja
Hinfl	BufferB	Promega
MSpl	BufferTango	Fermentas

Taulukko 5: T-RFLP:ssä käytetyt restriktioentsyymit.

Entsyymi	Puskuri	Valmistaja
Bfal	Buffer4	New England Biolabs
Hinfl	Buffer4	New England Biolabs