

Opinnäytetyö (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikka

Biotekniikka

2011

Jelena Jakovleva

PCR-menetelmän optimointi, standardien kehittäminen sekä potilasnäytteiden analysointi



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

OPINNÄYTETYÖ (AMK) | TIIVISTELMÄ

TURUN AMMATTIKORKEAKOULU

Bio- ja elintarviketekniikka | Biotekniikka

2011 | Sivumäärä 76

FM Kari Haajanen

Dos. Matti Waris ja FT Eeva Broberg

Jelena Jakovleva

PCR-menetelmän optimointi, standardien kehittäminen sekä potilasaineiston analysointi

Tämän työn tarkoituksena oli optimoida reaaliaikainen PCR- reaktiomenetelmä, jolla saataisiin määritettyä potilasnäytteestä samanaikaisesti kolme influenssavirusta ja RS-virus. PCR-reaktiot suoritettiin RotorGene – laitteilla. Reaktioita tarkasteltiin aluksi Boxtoväriä virusten kolmois-, neli- ja yksittäisseoksilla. Lopulliset PCR-reaktiot tehtiin kahden influenssaviruksen ja RS-viruksen kolmoisseoksilla sekä kunkin viruksen yksittäisseoksilla koettimen mukana olleessa.

Lisäksi työssä kehitettiin influenssa A(H1N1)2009 virukselle sekä influenssa A –viruksille sopiva yleispätevä kopiokustandardi. Standardimolekyylejä varten vertailtiin yleisimmin esiintyviä influenssavirusten kantoja. Influenssa A-viruksen standardimolekyylei valmistettiin eristämällä PCR-reaktiossa suunniteltujen alukkeiden avulla 889 bp:n pituinen DNA-jakso viruksen M-geenistä. Pandemisen (H1N1)-viruksen standardimolekyylei eristettiin viruksen H-geeniin alueelta (902 bp:n pituinen DNA-molekyylei) samoja menetelmiä käyttämällä H1N1-virukselle spesifisiä alukkeita käyttäen. Saadut DNA- molekyylit kloonattiin plasmidivektoriin ja monistettiin standardimolekyylivektorit tranformoimalla ne *E.coliin*. Lopuksi monistetut plasmidimolekyylit eristettiin bakteerista ja varmistettiin standardimolekyyliden oikeellisuus ja toimivuus PCR-reaktiossa.

Työssä tarkistettiin influenssa A(H1N1)2009 suhteen laboratorioon tutkittaviksi saapuneita näytteitä. Tarkastettavien näytteiden otos oli 124 näytettä ja tarkastettavana kohteena oli alle 12-vuotiaiden lasten ryhmä. Potilasnäytteitä tutkittiin 12 respiratorisen viruksen kaupallisella multiplex DPO- (Dual Priming Oligonucleotide) alukkeita hyödyntävällä multiplex PCR-menetelmällä ja saatuja viruslöydöksiä arvioitiin suhteessa influenssaepidemiaan.

ASIASANAT: PCR, influenssa A(H1N1)2009 -virus, influenssa A-virus, RS-virus, yhdistelmä-DNA-tekniikka

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Biotechnology and Food Technology| Biotechnology

2011 | Total number of pages 76

Kari Haajanen, M.Sc

Matti Waris, Adj. Prof; Eeva Broberg PhD

Jelena Jakovleva

Optimization of PCR-method, development of standards and analysis of patient samples

The purpose of this thesis was to optimize PCR-method for three influenza viruses and the RS-virus. The PCR reactions were run on RotorGene devices. First the PCR reactions were analysed with dsDNA dye BOXTO in double, triple and fourfold PCR reaction mixes. Finally, reactions with specific probes in different multiplex combinations were compared with separate reactions for each virus.

In this thesis standard molecules of the influenza A/H1N1 viruses and influenza A virus were created. For standards, the most prevalent influenza virus strains were compared. The standard molecule for influenza A was prepared by amplifying a 889 bp sequence of influenza A M gene by PCR.

The standard molecule of the pandemic influenza A/H1N1 virus was isolated from the H gene (902 bp) of the influenza A/H1N1 virus the same way as the M gene standard but using primers specific for H1N1. The DNA molecules were cloned into the plasmid vector and transformed into *E.coli*. Finally, multiplied recombinant DNA plasmids were isolated from bacteria and tested by PCR for their accuracy and functionality.

In this thesis patient samples were examined for influenza A/H1N1. For the examination 124 samples were chosen from children under the age of 12. Patient samples were studied for the presence of 12 respiratory viruses by a commercial multiplex PCR with DPO (Dual Priming Oligonucleotide) primers and the total virus findings were analyzed in relation to the influenza outbreak.

KEYWORDS: PCR, influenza A(H1N1)2009, influenza A, RS virus, recombinant DNA technology

SISÄLTÖ

TEORIAA	5
1.1 Johdanto	5
1.2 PCR-menetelmä	6
1.3 Reaaliaikainen PCR	8
1.4 Dual Priming Oligonucleotide (DPO)	10
1.5 Influenssa A	11
1.6 RS-virus	13
1.7 Yhdistelmä-DNA-molekyylin valmistaminen	14
1.8 Agarosigeelielektroforeesi	15
1.9 Restriktioentsyymianalyysi	15
1.10 α -komplementaatio	16
2 MENETELMÄT	17
2.1 Standardien kehittäminen	17
2.1.1 Alukkeiden suunnittelu	18
2.1.2 Geenien eristäminen ja PCR-tuotteiden analysointi	19
2.1.3 Geenien puhdistaminen ja puhdistustuotteiden analysointi	20
2.1.4 Kloonaminen ja kasvatus	21
2.1.5 Seulonta	22
2.1.6 Plasmidien puhdistaminen ja DNA-määrän määrittäminen sekä yhdistelmä-DNA-plasmidien analysoiminen	22
2.1.7 Valittujen kloonien kasvatus ja monistettujen plasmidien eristäminen	23
2.2 PCR-reaktion optimointi	24
2.2.1 Reaktion toimivuuden testaaminen kolmois- ja neloiseoksilla	24
2.2.2 RSV-koettimen testaus	25
2.2.3 PCR-reaktion toimivuuden testaaminen influenssa A-, pandemisen influenssa A(H1N1)v- ja RS-virusten näytteillä	26
2.3 Potilasnäytteiden analysointi	29
3 TULOKSET	31
3.1 Standardit	31

3.1.1 Alukkeet	31
3.1.2 Reaaliaikaisessa PCR-reaktiossa eristetyt ja monistetut DNA-molekyylit	32
3.1.3 M- ja H-geenien kloonaminen	33
3.1.4 Yhdistelmä-DNA-plasmidit	34
3.2 Influenssavirusten ja RS-viruksen PCR-testi	43
3.2.1 PCR-reaktion tulokset kolmoisseoksessa	43
3.2.2 RSV-koettimen testaus	51
3.2.3 PCR-reaktio pCR 4 TOPO M ₃ - ja pCR 4 TOPO H ₁₇ - plasmideilla ja RS-viruksen rutiinitestien positiivisilla kontrolleilla	55
3.3 Potilasnäytteiden analysointi	65
4 PÄÄTELMÄT	73
LÄHTEET	76

LIITTEET

Liite 1.	Influenssa A-viruksen standardisuunnittelukanta
Liite 2.	Influenssa A/H1N1-viruksen standardisuunnittelukanta
Liite 3.	Aluke-ehdotukset influenssa A M-geelille, halutun tuotteen pituus on 701 bp
Liite 4.	Aluke-ehdotukset influenssa A M-geelille, halutun tuotteen pituus on 889 bp
Liite 5.	Aluke-ehdotukset H1N1-viruksen H-geenille, halutun tuotteen pituus on 902bp
Liite 6.	Aluke-ehdotukset H1N1-viruksen H-geenille, halutun tuotteen pituus on 1634bp
Liite 7.	pCR4 TOPO-plasmidivektori
Liite 8.	Sekvensointireaktion reaktioseokset
Liite 9.	M-geenin sekvenssi pCR4 TOPO vektorissa M13R-alukkeella
Liite 10.	Näyte H ₁₃ . H-geenin sekvenssi M13F-alukkeella
Liite 11.	Näyte H ₁₃ . H-geenin sekvenssi M13R-alukkeella
Liite 12.	Näyte H ₁₇ . H-geenin sekvenssi M13R-alukkeella
Liite 13.	Näyte H ₁₃ . H-geenin sekvenssi M13F-alukkeella
Liite 14.	Restriktioentsyymien katkaisukohdat influenssa A/H1N1-viruksen H-geenissä
Liite 15.	Restriktioentsyymien katkaisukohdat pCR4- TOPO-plasmidissa
Liite 16.	Restriktioentsyymien katkaisukohdat influenssa A-viruksen M-geenin sekvenssissä
Liite 17.	Potilasnäytteiden tiedot

KUVAT

Kuva 1 RSV-epidemioiden esiintyminen Suomessa 1987–2008. Kuva perustuu Turun yliopiston virusopin laitoksessa diagnosoituihin tapauksiin.....	5
Kuva 2 Polymeraasiketjureaktion periaate	7
Kuva 3 Reaaliaikaisen PCR:n monistuskäyrä	9
Kuva 4 PCR-reaktion tuotteiden sulamiskäyrä (Melt-käyrä)	10
Kuva 5 Dual Priming Oligonucleotide – alukkeen rakenne	11
Kuva 6 α-komplementaatioon perustuvan seulonnan periaate.....	17
Kuva 7 Suunnitteluilla alukkeilla PCR-reaktiossa monistetut tuotteet	33

Kuva 8 Alustava restriktioentsyymianalyysi.....	36
Kuva 9 pCR TOPO 4 M- plasmidin ja pCR TOPO 4 H-plasmidin restriktioentsyymianalyysi	39
Kuva 10 pCR 4 TOPO M-plasmidi	41
Kuva 11 pCR 4 TOPO H-plasmidi	42
Kuva 12 Neljän viruksen ja yksittäis-PCR-reaktioseoksen tuotteet 7.10.2009.....	46
Kuva 13 Neljän viruksen ja yksittäis-PCR-reaktioseoksen tuotteet 12.10.2009.....	47
Kuva 14 Neljän viruksen ja yksittäis-PCR-reaktioseoksen tuotteet 12.10.2009.....	47
Kuva 15 7.10.09 PCR-reaktion melt-kuvaajat	48
Kuva 16 12.10.09 PCR:n influenssa A-viruksen melt- kuvaaja	49
Kuva 17 12.10.09 PCR:n influenssa B-viruksen melt- kuvaaja	49
Kuva 18 12.10.09 PCR:n RSV-viruksen melt- kuvaaja	50
Kuva 19 12.10.09 PCR:n RSV-viruksen melt- kuvaaja	50
Kuva 20 RSV-koettimen optimaalisen pitoisuuden valinta	54
Kuva 21 PCR-reaktio RSV-reaktioseoksessa	57
Kuva 22 RS-näytteet kolmoisseoksen reaktioissa	58
Kuva 23 PCR-testi RSV-näytteiden suhteen.....	59
Kuva 24 PCR-testin herkkyys pCR TOPO 4 M-plasmidilla Inf A-seoksessa.....	60
Kuva 25 pCR TOPO4 M-plasmidin reaktio kolmoisseoksessa	61
Kuva 26 pCR-TOPO4 M-plasmidin reaktio Inf A ja RSV:n kaksoisseoksessa	62
Kuva 27 pCR TOPO 4 H-plasmidin reaktio yksöis-PCR-reaktioseoksessa	63
Kuva 28 pCR TOPO 4 H-plasmidin reaktio kaksoisseoksessa	64
Kuva 29 pCR TOPO 4 H-plasmidin reaktio kolmoiseoksessa	65
Kuva 30 Työhön otettujen näytteiden määrä viikkoa kohden	67
Kuva 31 Positiivisten löydösten jakautuminen viikoittain	69
Kuva 32 Positiivisten löydösten jakautuminen viikoittain	70
Kuva 33 Influenssa A-positiiviset näytteet yhteensä. Turun virusopin diagnostiikassa syksyllä 2009 (tulokset Turun virusopin arkistoista).....	71
Kuva 34 Positiivisten löydösten määrä viruksittain	72

TAULUKOT

Taulukko 1 Influenssa A M-geeni ja (H1N1)v:n H-geeni, reaktio ilman Boxtoväriä	19
Taulukko 2 Influenssa A M-geeni ja (H1N1)v:n H-geeni.....	20
Taulukko 3 Influenssa A:n, H1N1v:n ja RSV:n yhdistäminen	27
Taulukko 4 PCR Mastermix A ja B	30
Taulukko 5 PCR-reaktion kulku	30
Taulukko 6 Miniskaalassa puhdistettujen yhdistelmä-DNA-plasmidien DNA-pitoisuus.....	34
Taulukko 7 Restriktioentsyymianalyysissa käytetty reaktioseos.....	35
Taulukko 8 pCR TOPO4 M-plasmidin pilkkoutuminen.....	37
Taulukko 9 pCR TOPO4 H-plasmidin pilkkoutuminen	38
Taulukko 10 Absolut Fast Flu InfA+RSV-ohjelma.....	43
Taulukko 11 Kolmoisseos+Boxto-väri, Threshold 0,00854.....	43
Taulukko 12 Yksittäisseos+Boxto-väri, Threshold 0,00854	44
Taulukko 13 Neljän viruksen alukkeita sisältävien reaktioiden Ct-arvot.....	45
Taulukko 14 RSV-koettimen testaus 26.10.2009.....	52
Taulukko 15 Koettimen testaus 30.10.2009	53
Taulukko 16 RSV- koettimen testaus	54

Taulukko 17 RSV-näytteet RS-yksittäis- ja kolmois-PCR-seosten reaktioissa	56
Taulukko 18 RSV-reaktion tulokset ohjelman muokaamisen jälkeen	59
Taulukko 19 Työhön otettujen näytteiden ikäjakauma	73
Taulukko 20 Follinin tutkimuksessa ilmennetyt viruslöydöt.....	75
Taulukko 21 Tässä työssä tarkastettujen näytteiden Seeplex-testillä ilmentämät virukset	75

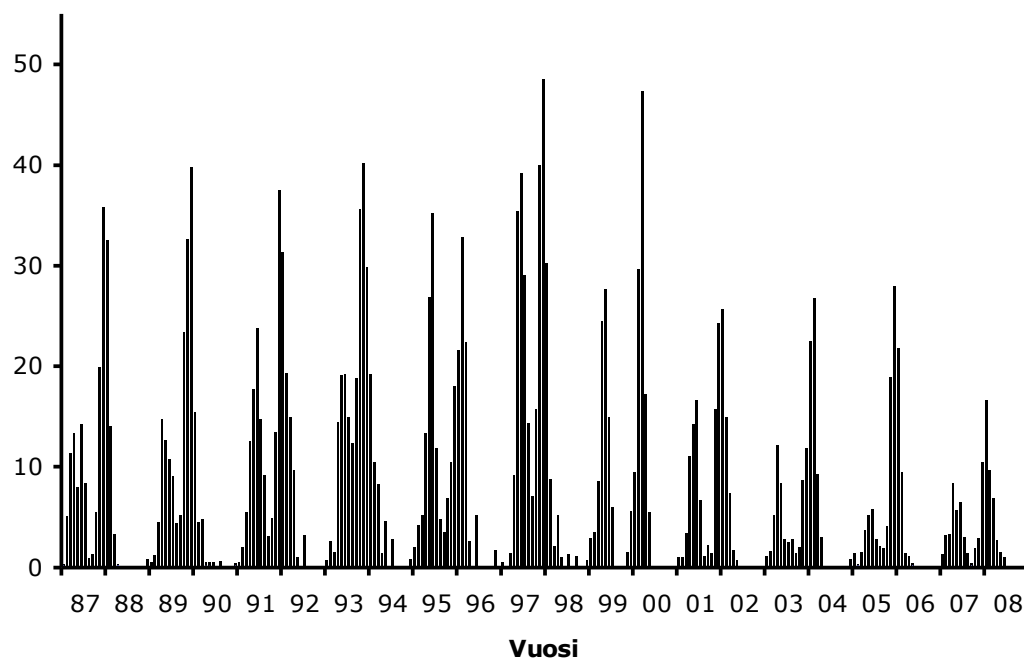
Lyhenneluettelo:

ADV	Adenovirus
Aluke jakso	nukleiinihapposynteesissä aloitusjaksona toimiva DNA-
cDNA	RNA:sta käänteisesti kopioitu DNA
CoV	Coronavirus
HRV	Rhinovirus
Flu A	Influenssa A-virus
Flu B	Influenssa B-virus
MPV	Metapneumovirus
MCS	moniklonauskohta plamidivektorissa
PIV -1, 2 ja 3	Parainfluenssavirukset
RSV	Respiratory Syncytial Virus

Teoriaa

1.1 Johdanto

Tämä työ tehtiin Turun yliopiston virusopin laitokselle tarkoituksena optimoida reaaliaikainen PCR-menetelmä neljälle virukselle ensisijaisesti tutkimuskäyttöön. Testin osoittavat virukset olivat influenssa A, -B ja A(H1N1)pdm ja RS-virus. Näiden virusten esiintyvyys ja Suomessa aiheuttamat epidemiat ajoittuvat yleensä samoihin vuodenaikoihin.



Kuva 1 RSV-epidemioiden esiintyminen Suomessa 1987–2008. Kuva perustuu Turun yliopiston virusopin laitoksessa diagnosoituihin tapauksiin.

Lisäksi yksi syy sisällyttää pandeeminen influenssa A-virus mukaan reaktioon oli se, että syksyllä 2009 sen aiheuttaman pandeemian odotettiin saapuvaan tavalliseen kausi-influenssaan verrattuna aikaisempaan vuodenaikaan syksyllä, kun normaalisti influenssaa ei esiinny, mutta RSV:n esiintyminen lisääntyy (Matti Waris, 8.9.2011).

Työssä kehitettiin myös standardiplasmidit optimoitavaa PCR- testiä varten influenssa A-virukselle ja influenssa A/H1N1-virukselle.

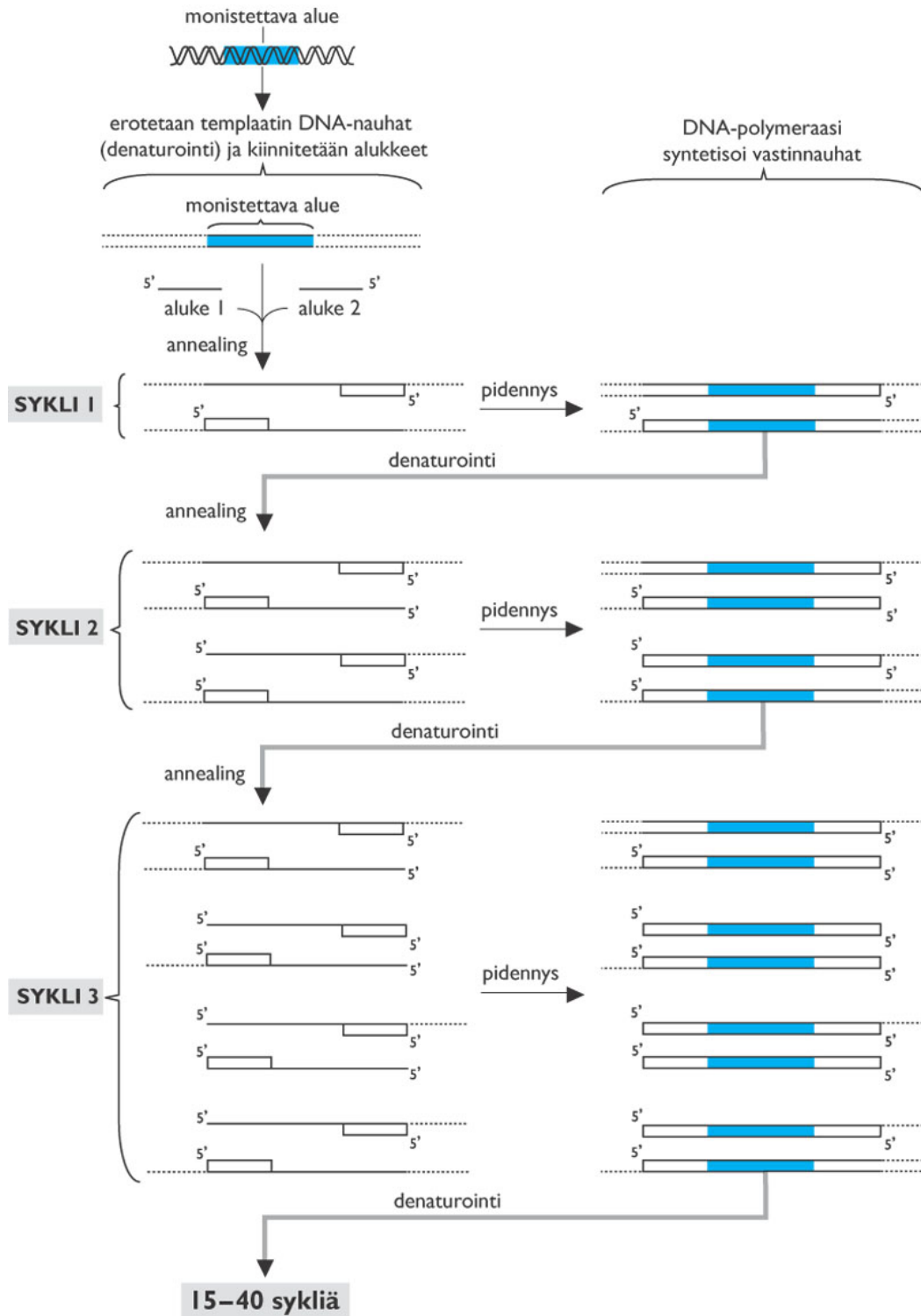
Lisäksi työssä haluttiin selvittää muiden virusten löytymistä influenssatutkimukseen tulleista näytteistä paremman kokonaiskuvan saamiseksi pandemian vaikutuksista. Tätä varten tarkasteltaviksi otettiin laboratorioon influenssa A-viruksen suhteen tutkittaviksi saapuneista potilasnäytteistä tietty määrä näytteitä. Tarkasteltava aikaväli oli 18.8.- 17.12.2009 ja kiinnostuksen kohteena olleena potilasryhmänä olivat pandemian riskiryhmään kuuluvina alle 12-vuotiaat lapset.

1.2 PCR-menetelmä

Polymeraasiketjureaktiossa (PCR) monistetaan kahden nukleotidijärjestykseltään tunnetun DNA-jakson välissä olevia DNA-alueita. Monistettavaa DNA-jaksoa kutsutaan templaatiksi. PCR:ssa käytetään nukleinihappojen synteesiä katalysoivaa entsyymiä, joka on korkeitakin lämpötiloja kestävä. Lisäksi reaktiossa on mukana kaksi tarkalleen tunnettua aluketta, jotka sitoutuvat kaksinauhaisen DNA:n eri juosteiden vastakkaisiin päihin niille komplementaarisiin kohtiin. Reaktioseoksessa on aina mukana myös DNA:n nukleotideja: guaniini, adeniini, sytosiini ja tymiini. Alkuperäisen templaatin pitoisuuteen verrattuna reaktioseoksessa alukkeita ja dNTP:ja on monikertainen määrä.

Polymeraasiketjureaktio aloitetaan kuumennuskäsittelyllä (n. 95 °C:n lämpötila), jolla saadaan aikaan kaksinauhaisen DNA:n denaturoiminen. Kun DNA:n molemmat nauhat ovat erillään toisistaan, lämpötilaa lasketaan alukkeista riippuen 55–60°C:een. Mikäli tehdään kaksivaiheinen monistus, käytetään eksten-siolämpötilana 72 °C:tta (Matti Waris, 8.9.2011). Tässä PCR:n annealing-reaktioksi kutsutussa vaiheessa alukkeet kiinnittyvät templattiin. Alukkeiden annetaan vähän aikaa kiinnittyä, minkä jälkeen lämpötila taas nostetaan. Tässä pidennysreaktiossa DNA-polymeraasi liittyy reaktioseoksessa olevia nukleotideja alukseen 3'-päästä lähtien kohde-DNA:n ohjeen mukaisesti. DNA-nauhan

synteesi on valmis parin minuutin päästä, jonka jälkeen denaturointivaihe käynnistetään uudelleen.



Kuva 2 Polymeraasiketjureaktion periaate

PCR-reaktiossa tapahtuvia denaturointi – annealing - pidennyssyklejä on yleensä noin 40. Ensimmäisen syklin jälkeen muodostuvat tuotteet ovat toisesta päästä monistettavaa aluetta pidempiä, koska DNA-polymeraasin toimintaa jatku seuraavaan denaturointivaiheen alkuun asti. Toisessa syklistä syntyy ensimmäiset tarkalleen monistettavan DNA- jakson pituiset tuotteet, kun templaatteina ovat ensimmäisessä syklistä syntyneet tuotteet. Tämän jälkeen monistettavan DNA-alueen määrää kaksinkertaistuu eli kasvaa eksponentiaalisesti jokaisen syklin jälkeen.

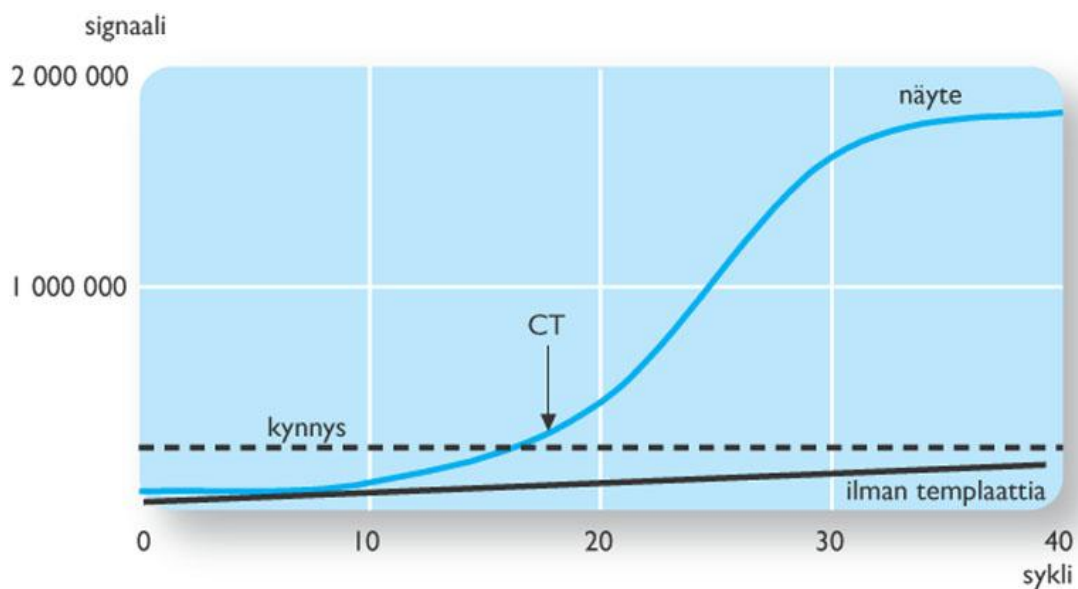
PCR-reaktion onnistumisen kannalta alukkeiden suunnittelulla on suuri rooli. Sen lisäksi, että alukkeiden täytyy olla mahdollisimman komplementaarisia, suunnittelussa täytyy ottaa huomioon muutama muu tärkeä seikka. Alukkeiden sulamislämpötila on tärkeätä selvittää, jotta päästään oikeaan annealing-lämpötilaan vähentämällä sulamislämpötilan arvosta noin 5 °C. Tosin nykyään PCR-reaktioissa voidaan käyttää sellaista reaktioseosta, jolla tietyllä kaavalla laskettu alukkeiden sulamispiste on sama kuin annealing-lämpötila (Matti Waris, 8.9.2011). Kahden alukkeen välinen sulamislämpötilaero ei saa olla 2 °C:tta suurempi. Lisäksi huomioon täytyy myös ottaa alukkeiden sekvenssiin liittyviä ehtoja (ks. menetelmäosio). Hiusneularakenteita mahdollistavia sekvenssejä ja alukkeiden mahdollisuutta sitoutua toinen toisiinsa tulisi välttää.

Sopivia annealing-lämpötiloja määritellään usein kokeellisesti kokeilemalla useita PCR-reaktio-olosuhdevaihtoehtoja. Alukkeiden sekvenssiin liittyviä kohtia on usein vaikea havaita silmämääräisesti. Tämän johdosta alukkeiden suunnittelussa käytetään tietokoneohjelmia, joihin ehdoiksi määritellään mm. alukkeiden arvioitu koko ja sulamislämpötila. (Suominen & Ollikka 1997, 107–111).

1.3 Reaaliaikainen PCR

Reaaliaikaisen PCR-menetelmän avulla muodostuvan tuotteen määrää voidaan seurata jatkuvasti reaktion aikana. Reaktiossa käytetään fluoresoivaa merkkiainetta (esim. SYBR Green, BOXTO), jonka signaali voimistuu aineen sitoutu-

essa kaksinauhaiseen PCR-tuotteeseen. Muodostuva fluoresenssisignaali voidaan ilmoittaa laitekohtaisena fluoresenssiyksikkönä (RFU, engl. relative fluorescence unit). Menetelmän herkkyyttä voidaan tutkia näytteistä tehtyjen laimennossarjojen avulla. Reaaliaikaisen PCR:n monistuskäyrä havainnollistaa kynnyssyklin (Ct-threshold cycle) avulla reaktioputkessa olevan monistettavan näytteen määrää. Ct-arvon lukemiseksi monistusta havainnollistavaan kuvaajaan asetetaan raja-arvosuora (threshold).

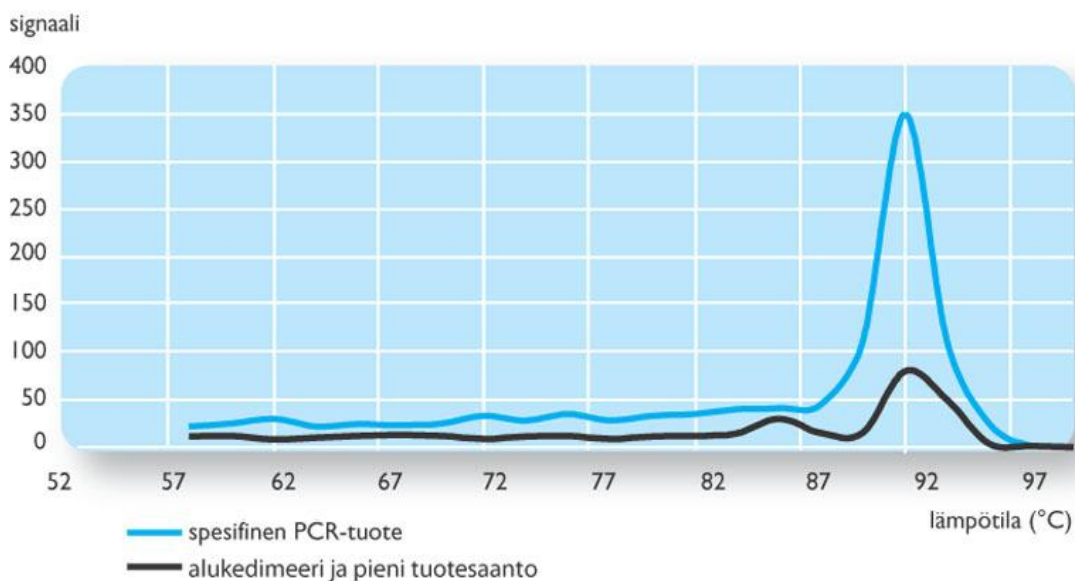


Kuva 3 Reaaliaikaisen PCR:n monistuskäyrä

Fluoresoiva signaali voidaan saada reaaliaikaisessa PCR-menetelmässä mm. fluoresoivan koettimen avulla. Koettimet ovat pieniä leimattuja kopioitavalle DNA:lle komplementaarisia DNA-pätkiä, joiden fluoresoiva signaali virittyy koettimen sitoutuessa kohde-DNA:han. Tässä työssä käytettiin ns. kaksoisleimattuja hydrolyysi-koettimia. Taq-polymeraasi pilkkoo koettimen, mikäli se on sitoutunut monistettavaan templaattiin. Pilkkoutuminen vapauttaa fluoresoivan molekyylin sammuttajasta, jolloin reaktioliuoksen fluoresenssi lisääntyy (Matti Waris, 8.9.2011).

Kaksinauhaisen DNA:n nauhojen erkaantuessa toisistaan sekvenssille ominaisessa lämpötilassa yksinauhainen DNA absorboi kaksinauhaista DNA:ta

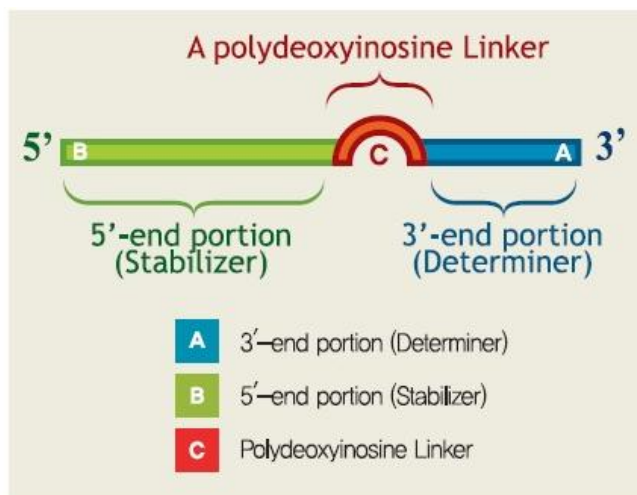
enemmän UV-valoa. PCR-tuotteen sulamislämpöä mittaamalla ja vertaamalla sitä kontrollitemplaatin arvoihin voidaan varmistua tuotteen oikeellisuudesta ja puhtaudesta (Suominen ym. 2010, 166-169).



Kuva 4 PCR-reaktion tuotteiden sulamiskäyrä (Melt-käyrä)

1.4 Dual Priming Oligonucleotide (DPO)

Dual Priming Oligonucleotide on PCR-menetelmä, joka oikeissa reaktioolosuhteissa mahdollistaa templaatti-DNA:han epäspesifisesti liittyneiden alukkeiden pidennysreaktion estämisen (Seegene 2011).



Kuva 5 Dual Priming Oligonucleotide – alukkeen rakenne

DPOTM-aluke muodostuu kahdesta osasta, jotka on yhdistetty toisiinsa polydeoksiinosiini-osalla.

Deoksiinosiinin matalan sulamislämpötilan ansiosta alukkeen C-osa muodostaa PCR-reaktiossa ns. kuplarakenteen ja näin jakaa alukkeen kahdeksi toiminnalliseksi osaksi.

Alukkeen pidempi 5'-pää-alue liittyy ensimmäiseksi templatti-DNA:han ja aloittaa annealing-reaktion. Alukkeen 5'-pää-alueen tehtävä on tunnistaa monistettava jakso DNA:ssa ja tuoda monistettavalle alueelle sille täysin komplementaarinen alukkeen 3'-pää-alue. Alukkeen 5'-pää-alueella ei tarvitse olla täysin komplementaarinen kohde – DNA:n kanssa. Alukkeen yhdistävä C-osa mahdollistaa 3'-pää-alueen kiinnittymisen täsmälleen sille komplementaariseen kohtaan DNA:ssa, sillä C-osa toimii vain yhdistävänä linkkinä alukkeen kahden osan välillä (Seegene 2011).

1.5 Influenssa A

Influenssavirukset (*Orthomyxoviridae*) ovat yksisäikeisiä RNA-virusia, joiden genomirakenteen ansiosta viruksilla on merkittävä muuntelupotentiaali. Influenssavirukset jaetaan kolmeen ryhmään A, B ja C. Influenssa B- ja C-virukset esiintyvät muutamaa poikkeusta lukuun ottamatta yksinomaan ihmisissä, kun taas influenssa A-virukset lisääntyvät ensisijaisesti vesilinnuissa.

Influenssa A-alatyypin vaihtumisen aiheuttaa viruksen jyrkkä antigeenimuutos. Immuunisuojan puuttuminen miltei koko väestöstä johtaa voimakkaaseen, pandemiaksi kutsuttuun epidemiaan. Pandemian välivuosina viruksen antigeeniset muutokset ovat pienempiä. Pandemian aiheuttaman viruksen hemagglutiniini (HA) ja neuraminidaasi(NA) sekä eräät muut osat ovat erilaisia kuin viruksen edeltäjillä. Usein uusi geeni aines on peräisin eläinten influenssa A- viruksilta. Uusi geeniyhdistelmä syntyy kun kaksi erilaista influenssa A-virusta infektoi saman solun. Tällöin uusi virus voi sisältää kummankin viruksen RNA- jaokkeita. Sekä lintujen että ihmisen influenssavirukset kykenevät lisääntymään hyvin siassa. Syynä tähän on, että sian hengitysteissä on molempien virusten käyttämät reseptorit. Potentiaalisimpia geenilähteitä tällaisille ns. yhdistelmäviruksille ovat aasialaisten vesilintujen ja siipikarjan virukset.

Geenien uudelleen järjestäytymisen lisäksi pandemiaa aiheuttava virus voi syntyä lintujen influenssaviruksen mutaation kautta. Myös vuosikymmeniä kadoksissa ollut ihmisen influenssa virus voi ilmaantua uudelleen (Huovinen ym. 418–419).

Negatiivisäikeinen jaokkeinen RNA muodostaa influenssavirusten genomien. Jaokkeisuus on muuntelupotentiaaliltaan kannalta tärkeä strateginen ominaisuus. Influenssavirus rakentuu polymeraasikomplekseista, joita ympäröi nukleokapsidi. Nukleokapsidin pinnalla on M1-proteiineja. Tätä peittää rasvavaippa, jonka pinnalla on ionikanavana toimiva M2-proteiini. Rasvavaipan pinnalla on glykoproteiineja. Influenssa A- ja B-viruksilla ne ovat hemagglutiniini (HA) ja neuraminidaasi (NA). Influenssa C-viruksilla on taas vain yksi glykoproteiini (HEF). Hemagglutiinin avulla virus kiinnittyy isäntäsolun pintareseptoreihin ja soluun päästyä vapautuu nukleokapsidin pintarakenteista. Neuraminidaasi taas edesauttaa jälkeläisviruksia vapautumaan isäntäsoluista. Infektion alussa neuraminidaasi auttaa virusta kiinnittymään hengitysteiden pinnoille. (Huovinen ym. 416).

Influenssa A-virukset jaetaan 16 H- (H1-H16) ja 9 N- (N1-N9) ryhmään, jotka tekevät yhteensä 16X9 eri serotyyppiä. Tosin vain muutama alatyyppejä (H3N8,

H1N8, H1N1, H2N2, H3N2 ja H5N1) on aiheuttanut ihmisillä epidemioita. (Michaelis ym. 2009 ja Eeva Broberg, 8.9.2011)

Influenssa A- ja B virusten aiheuttamat epidemiat ajoittuvat pohjoisella pallonpuoliskolla talveen ja kevääseen. Influenssavirukset leviävät pisaratartuntana sekä limakalvojen kosketuksen kautta. Antigenevoluution ansiosta virus väistää taitavasti immuunisuojan, mikä aiheuttaa toistumiseen epidemioita.

Influenssavirusten infektion oireita ovat kuumetilat, kipeä kurkku, yskä, lihaskipu, päänsärky sekä yleinen pahoinvointi. Harvinaisimpia komplikaatioita influenssavirusten infektio tapauksissa ovat keuhkokuume, akuutti keuhkoputken tulehdus, sivuontelo- ja lihastulehdukset. Influenssa A -potilaat tarvitsevat yleensä neljä kertaa useammin sairaalahoitoa kuin influenssa B-viruksen infektioimat potilaat. (Huovinen ym. 422, 425).

Influenssa A(H1N1)2009 – virus on kolmen influenssavirustyyppin yhdistelmä, joka on muodostunut geenisegmenttien vaihduttua isäntäsolun infektoitua samanaikaisesti kahdella erilaisella viruksella. Vuonna 2009 pandeemisesti levinnyt virus sisältääkin Pohjois-Amerikan lintuinfluenssaviruksen, sikojen influenssa A-viruksen ja ihmisen kausi-influenssa (H3N2)-viruksen geenejä. (Garten 2009)

Influenssa A(H1N1)2009 -virus infektoi herkemmin nuoria ihmisiä sekä muita riskiryhmään kuuluvia henkilöitä. Vuoden 2010 tammikuuhun mennessä oli rekisteröity laboratoriotuloksien todistettuina 16 000 kuolemantapausta. (Moser Woo 2010).

1.6 RS-virus

RS- (respiratory syncytial) virus kuuluu Paramykovirusten ryhmän (*Paramyxoviridae*). Paramykovirukset ovat vaipallisia RNA-virusia, joilla on yksisäikeinen genomi. Paramykovirukset jaetaan varsinaisiin paramykovirusiin, rubulavirusiin, morbillivirusiin ja pneumovirusiin. RS-virukset kuuluvat pneumovirusten alaluokkaan.

Rakenteeltaan RS-virus jaetaan antigeenisesti kahteen tyyppiin (A ja B). RS-virus aiheuttaa alempien hengitysteiden infektoita erityisesti pienillä lapsilla, mutta myös vanhuksilla. Alle yksivuotiailla lapsilla tauti johtaa usein keuhkoinfektioon ja vaatii sairaalahoitoa. Myös vanhuksilla taudin kulku on vakava. Aikuisilla ja isommilla lapsilla RS-viruksen infektio näkyy ylempien hengitysteiden oireina.

RS-virus leviää pisaratartuntana ja esiintyy lapsilla noin viikon ajan sairauden alettua. Virus etenee hengitysteiden epiteeliä pitkin keuhkoja kohti. Infektio rajoittuu kuitenkin vain keuhkokudokseen.

RS-viruksen aiheuttamia epidemioita esiintyy maailmanlaajuisesti. Suomessa epidemioiden huippu on yleensä talvikausina. Lisäksi viruksen molemmat alatyypit vuorottelevat kahden vuoden välein, mihin voi olla selityksenä se, että ihmisen immunitetti viruksen yhtä tyyppiä vastaan ei ole riittävää estämään toisen tyyppin esiintymistä. (Huovinen ym. 429, 441-442).

1.7 Yhdistelmä-DNA-molekyylin valmistaminen

Plasmidin ja kloonattavan DNA-jakson yhdistäminen yhdeksi yhdistelmä-DNA-molekyyliksi tapahtuu lugaatioentsyymien avulla entsyymien toiminnan kannalta otollisissa olosuhteissa. Entsyymi muodostaa DNA-molekyylien päiden välille fosforidiesterisidokset, joiden välityksellä insertti ja plasmidi ovat kiinni toisiinsa ja muodostavat yhdistelmä-DNA-molekyylin.

Kun yhdistelmä-DNA-plasmidi on valmis, se transformoidaan isäntäsoluun ja transformoidut organismit kasvatetaan. Usein isäntäorganismina toimii *E.coli*-bakteeri.

Solujen jakautuessa myös sen sisältämät plasmidimolekyylit monistuvat. Lugaatioissa muodostuneiden molekyylien joukossa voi olla monenlaisella tavalla toisiinsa liittyneitä DNA-jaksoja, minkä takia transfektoidut solut seulotaan tarkoi-

tuksena erottaa yhdistelmä-DNA-vektoreita sisältäviä organismeja. Oikeanlaisen yhdistelmä-DNA-plasmidin saaneiden solujen löydyttyä ne voidaan kasvat-
taa tarkoituksena monistaa myös niiden sisältämät plasmidi-DNA-molekyylit.
(Suominen & Ollikka 1997, 46-49).

1.8 Agarosigeelielektroforeesi

Agarosigeeli on merilevästä eristettävästä polysakkaridista kiehauttamisen
kautta valmistettava geeli. Agarosigeelielektroforeesin periaate perustuu säh-
köisesti negatiivisesti varautuneiden partikkeleiden kulkeutumiseen positiivista
napaa kohti sähkökentässä. Nukleiinihappojen fosfaattiryhmät ovat negatiivises-
ti varautuneita ja kulkevat AGE:ssa anodia kohti. Geelin verkkorakenne vaikut-
taa nukleiinihappomokelylien kulkeutumiseen niin, että pidemmät molekyylit
etenevät hitaammin kuin lyhyet. Tällä tavalla erikokoiset molekyylit ajautuvat
omiksi vyöhykkeikseen.

Nukleiinihapot eivät sellaisenaan näy agarosigeelillä. Tämän johdosta aga-
rosigeelin valmistusvaiheessa siihen lisätään etidiumbromidia (EtBr), joka si-
toutuu nukleiinihappojen emästen väliin. Ultraviolettivalossa emäkset absorboi-
tuvat UV-valoa ja lähettävät valosta saamansa energian EtBr:lle. Etidiumbromidi
puolestaan fluoresoi oranssipunaisena näkyvänä valona (Suominen ym. 2010,
122-125).

1.9 Restriktioentsyymianalyysi

Restriktioentsyymi tai toiselta nimeltä restriktioendonukleaasi on entsyymi, joka
tunnistaa emäsjärjestyksen perusteella tiettyjä alueita DNA:ssa ja katkaisee
kaksinauhaisen DNA:n spesifisistä kohdista (Suominen & Ollikka 1997, 128).
Restriktioanalyysin avulla voidaan selvittää onko DNA-jakson kloonauksella plasmidiin
onnistunut. Plasmidille ja insertille spesifisten restriktioentsyymien leikkaus-
kohtien perusteella tehdään restriktioanalyysikartta ja restriktioreaktiosta saatuja

tuotteita analysoidaan agarosigeelielektroforeesin avulla. Kokostandardien avulla määritellään restriktioreaktion tuloksena muodostuneiden DNA-jaksojen koot.

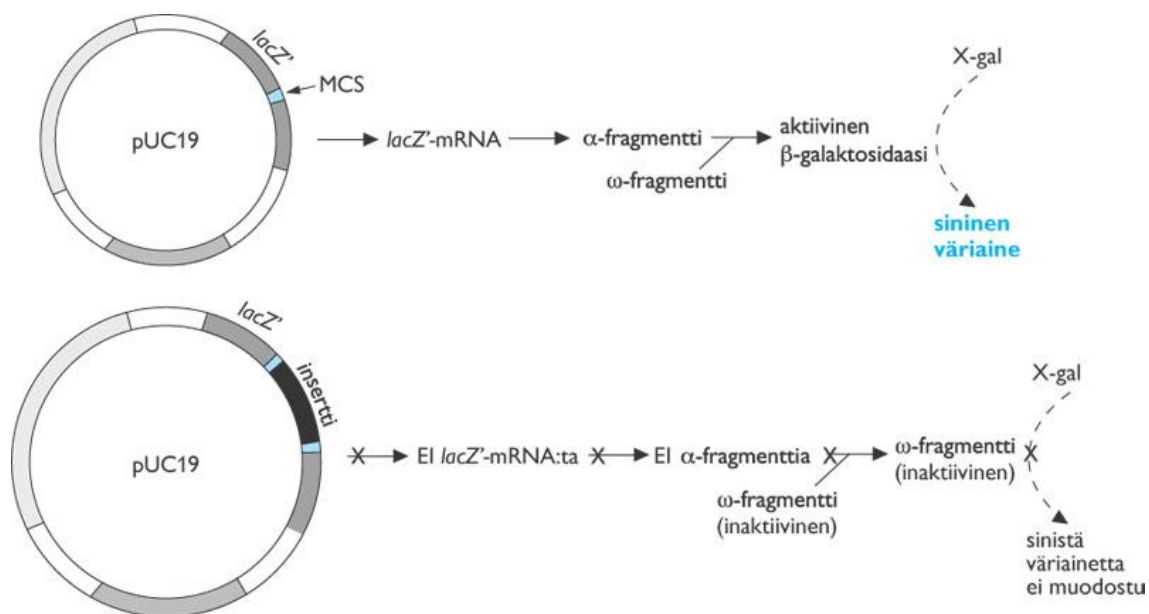
1.10 α -komplementaatio

α -komplementaatio on β -galaktosidaasiin pohjautuva ensivaiheen sini/valko-seulontamenetelmä, jonka avulla on mahdollista erottaa yhdistelmä-DNA-plasmidin ja pelkän vektoriplasmidin saaneet transformanttisolut toisistaan värireaktion perusteella.

Monissa vektoreissa on β -galaktosidaasientsyymin α -fragmenttia koodaava geenijakso *lacZ'*. *lacZ'*-geeni ei ole kuitenkaan plasmidissa kokonaisena. *E.coli*-bakteereissa, joita yleensä käytetään kloonauksvektoreiden isäntänä, on ns. F'-tekijä eli fertiilitetekijä. Se on kromosomista erillään oleva rengasmaisen DNA-molekyylin, jossa on *lacZ*-geenin loppuosa *lacZ* Δ M15. *lacZ* Δ M15 puolestaan koodaa β -galaktosidaasin loppuosan, ω -fragmentin muodostumista. Kun solussa on sekä ω - että β -fragmentin koodaavat osat niiden välityksellä syntyvät entsyymiosat yhdistyvät ja muodostuvat β -galaktosidaasin.

β -galaktosidaasi pystyy hajottamaan ainetta systemaattiselta nimeltään 5-bromi-4-kloori-3-indolyyli-D-galaktopyranosidi, joka on laktoositapainen synteettinen yhdiste (X-gal). Yhdisteen hajoamistuotteen väri on sininen. α -komplementaatio-menetelmässä X-galia sisältävällä elatusmaljalla kasvatettavat transformoidut solujen pesäkkeet värjäytyvät sinisiksi.

Vektoreissa *lacZ'*-alue sijoittuu MCS-alueelle, jolle yleensä liitetään vierasta DNA:ta. Silloin *lacZ'*-geenin sekvenssi hajautuu eikä se enää kykene tuottamaan toimivaa β -galaktosidaasin α -fragmenttia. Bakteerisolussa olevan F'-tekijän aikaansaama ω -fragmentti ei ole entsyymaattisesti aktiivinen ja täten ei tuota väriä akronyymi X-galin hajottamisreaktiossa. Tällaiset yhdistelmä-DNA-plasmidia sisältävät pesäkkeet jäävät maljalla valkoisiksi ja ovat eroteltavissa muiden kloonien joukosta (Suominen ym. 2010, 79-82).



Kuva 6 α -komplementaatioon perustuvan seulonnan periaate

2 Menetelmät

2.1 Standardien kehittäminen

Optimoitavan PCR-testin influenssavirusten standardien kehittäminen aloitettiin kyseessä olevia geenejä tunnistavien alukkeiden suunnittelulla. Standardeja varten tarvittavat geenit eristettiin suunniteltujen alukkeiden avulla PCR-reaktiossa. PCR-reaktion tuotteet puhdistettiin ja analysoitiin agarosigeelillä ennen geenien kloonamista plasmidi-*E.coliin*. Kasvatuksen jälkeen seulottiin plasmidin saaneita klooneja. Kasvatuksen avulla monistetut plasmidit eristettiin bakteereista ja testattiin niiden toimivuus PCR-reaktiossa influenssa A, -B sekä RS- viruksen alukkeiden kolmoisseoksilla. Saaduista plasmideista tehtiin restriktioentsyymianalyysi. Restriktioentsyymianalyysin perusteella valittiin sekvensoitavaksi selkeimmät tulokset antaneet ehdokkaat. Sekvensointitulosten varmennettuina kyseisiä klooneja kasvatettiin. Lopullisten standardien toimivuus testattiin PCR-reaktiossa influenssa A-viruksen, influenssa A(H1N1)2009 ja RS- viruksen alukkeiden yksittäis- ja kolmoisseoksilla.

2.1.1 Alukkeiden suunnittelu

Alukkeiden suunnittelua varten vertailtiin keskenään yleisimpiä influenssa A ja influenssa A(H1N1)-viruskantoja. Tarkoituksena oli sulkea pois sellaiset kannat, joiden sekvensseissä esiintyy eniten eroavuuksia muihin kantoihin verrattuna. Tämän avulla haluttiin seuloa alukkeiden suunnittelukantojen ehdokkaista pois sellaiset kannat, jotka aiheuttaisivat alukkeissa eniten mismatcheja näyteviruskantojen DNA:n kanssa. ”Mismatch on pariutuneiden DNA-juosteiden kohta yksi nukleotidipari ei muodostaa vetysidoksia keskenään” (Suominen ym. 2010, 161). Alukkeiden suunnittelu aloitettiin vertaamalla laboratoriossa kontrolleina käytössä olleita kantoja muihin H3N2- ja H1N1v-kantoihin. Ennen alukkeiden varsinaista suunnittelua oli valittava kanta, jonka sekvenssin pohjalta lähdettäisiin suunnittelemaan alukkeita standardeja varten. Sopivaksi standardien kannaksi (influenssa A-virukselle ja A(H1N1)2009-virukselle omat kannat) oli valittava kanta, jonka sekvenssi poikkeaisi mahdollisimman vähän kyseisten virus-ten yleisimmin esiintyvistä kannoista. Monistettavaksi alueeksi haluttiin saada kaksi eripituista jaksoa kummastakin geenistä.

Sopivia alukkeita valittiin Primer3-tietokoneohjelman avulla. Geenisekvenssin, halutun tuotteen pituuden sekä aluke-ehdojen perusteella saatiin ohjelman tarjoamat aluke-ehdotukset. Saaduista vaihtoehdoista parhaat alukeparit valittiin seuraavien ehtojen mukaisesti: alukkeeseen 3'pään viimeinen nukleotidi ei saa olla tymiini, 5'viimeisen nukleotidin joukossa voi olla korkeintaan 2 sytosiini- tai guaniin nukleotidia sekä alukkeiden 3'päässä ei saisi olla komplementarisuutta. Lisäksi alukkeeseen 5'pään viimeisen nukleotidin on hyvä olla adeniini tai tymiini. The Basic Local Alignment Search Tool (*BLAST*) -nimisen geenitietopankin kautta tarkistettiin valittujen alukeparien antamat tuotteet. Alukkeiden tunnistamien sekvenssien joukossa ei saanut olla muiden kuin influenssa A:n H1N1-virusten kyseessä olevien geenien sekvenssejä.

Valitut aluke-ehdotukset tilattiin synteettisiä nukleiiinihappomolekyyleja valmistavalta yritykseltä (Oligomer).

2.1.2 Geenien eristäminen ja PCR-tuotteiden analysointi

Standardimolekyyleiksi suunnitellut influenssa A-kannan M-geeni ja H1N1v-kannan H-geeni eristettiin ja monistettiin PCR- reaktiossa suunniteltujen alukeiden avulla. M-geenistä monistettiin 889 ja 701 bp:n pituiset alueet alukepareilla InfA_M_R900 ja InfA_M_F900 ja InfA_M_F700 ja InfA_M_F900. n H-geenistä oli tarkoitus monistaa 902 ja 1634bp:n pituiset nukleotidisekvenssit alukepareilla H1N1_H_R ja H1N1_H_F ja H1N1_H_R1634 ja H1N1_H_F. Kannat joista, M- ja H-geenit eristettiin olivat laboratoriossa käytetyt influenssa A-viruksen kontrollikantoja (reassortantti A/New Caledonia/20/99 x A/Panama/2007/99) sekä kliinisistä näytteistä peräisin oleva H1N1-viruksen 2009 (H1N1)v-kanta (Saatu T. Ziegleriltä, THL, Helsinki).

M-geenin PCR-reaktiota varten tehtiin seuraavat PCR-reaktioseokset:

Taulukko 1 Influenssa A M-geeni ja (H1N1)v:n H-geeni, reaktio ilman Boxtoväriä

	1-kertainen tilavuus (μ l)
Vesi	34,75
10 x F-511	
Buffer	5
dNTPmix	
10mM	1
F-aluke 10 μ M	2
R-aluke 10 μ M	2
Dyna HI 20/ μ l	0,25
<hr/>	
Reaktioputkessa:	
cDNA- näyte	5

Taulukko 2 Influenssa A M-geeni ja (H1N1)v:n H-geeni

	1-kertainen tilavuus (μl)
Vesi	32,6
10 x F-511 Buffer	5
dNTPmix 10mM	1
F-aluke 10 μM	2
R-aluke 10 μM	2
Boxto 10 μM	2,2
DreamTaq	0,25
Reaktioputkessa:	
cDNA- näyte	5

Alukkeiden avulla saadut PCR-reaktion tuotteiden monistumista seurattiin reaaliaikaisella PCR:lla (vain ne, joissa BOXTO-väri oli mukana). Näytteistä tehtiin agarosigeelielektroforeesianalyysi.

2.1.3 Geenien puhdistaminen ja puhdistustuotteiden analysointi

PCR-reaktiossa monistettuja M- ja H-geenikohteita (influenssa A:n M-geeni RF900 ja influenssa A:n M-geeni RF900+Boxto sekä H1N1-viruksen H-geeni RF ja H1N1-viruksen RF-geeni+ Boxto) puhdistettiin reaktioputkissa olevista seoksista DNA-puhdistuskitin (Qiagen) ohjeiden mukaan. Puhdistus aloitettiin sekoittamalla näyte ja NT-puskuri suhteessa 1:2. Saatu seos sentrifugoitiin 1 min ajan 11000 x g. Sentrifugoinnin yhteydessä muodostunut alafaasi poistettiin ja suodattimella varustettuun koeputkeen lisättiin 600 μl NT3-puskuria. Putki sentrifugoitiin uudelleen samoilla asetuksilla ja poistettiin alafaasi. Sentrifugointi toistettiin 2 min ajan samalla nopeudella, jotta NT3-puskuri saatiin poistettua seoksesta. Tämän jälkeen suodattimella varustettu pylväs siirrettiin uuteen eppendorf-putkeen ja lisättiin siihen 30 μl eluutiopuskuria NE:ta, minkä jälkeen seos inkuboitiin huoneen lämmössä 1 minuutti. Tämän jälkeen sentrifugoitiin puhdas DNA uuteen eppendorf-putkeen.

Puhdistetuista M- ja H-geenikohteista tehtiin agarosigeelianalyysi, joka todisti että joukossa oli myös epäpuhtauksia (mahdollisesti alukedimeerejä). Joten

seuraavaksi puhdistettiin kyseisten geenien DNA agarosigeeliltä DNA-puhdistuskitin ohjeiden mukaisesti.

Tämän jälkeen mitattiin puhdistettujen influenssa A:n M-geeni RF900:n sekä H1N1-viruksen H-geeni RF:n DNA:n pitoisuudet Nanodrop-spektrofotometrillä (malli 2000c, Thermo Scientific).

PCR-tuotteiden konsentraatioiden perusteella M- ja H-geenien DNA:sta (influenssa A:n M-geeni RF900- (889 bp) ja H1N1-viruksen H-geeni RF- (902 bp) näytteet) valmistettiin laimennussarjat 10^9 - 10^0 /μl. Laimennettujen näytteiden avulla testattiin PCR-reaktion toimivuutta kyseisillä näytteillä kummankin viruksen yksittäisseoksilla. M- ja H-geenikohteet monistivat PCR-reaktiossa konsentraation mukaisesti.

2.1.4 Kloonaaminen ja kasvatus

Agarosigeelianalyysin ja PCR-reaktiossa toimivuuden testaamisen jälkeen influenssa A-viruksen M-geeni ja H1N1-viruksen H-geeni kloonattiin pCR4-TOPO-vektoriin ja saatu kloonaustuote transformoitiin *E.coli* Mach1TM-T1^R kemiallisesti kompetentteihin soluihin. Kloonaaminen ja transformaatio tehtiin Invitrogenin TOPO TA Cloning- kitin ohjeilla ja reagensseilla (Invitrogen TOPO TA Cloning Kit for Sequencing, Catalog nos. K 4530-20, Version O 10 April 2006 25-0276).

Ensin valmistettiin kummallekin geenille TOPO-kloonausreaktiosekset seuraavasti:

PCR-tuote	2 μl
Suolaliuos	1 μl
Vesi	2 μl
<u>TOPO-vektori</u>	<u>1 μl</u>
Yhteensä	6 μl

Reaktioseos sekoitettiin varovasti ja inkuboitiin huoneen lämpötilassa 5 minuuttia. Sen jälkeen reaktioputket siirrettiin jäähauteelle.

Kummallekin geenille tehtiin erikseen oma transformaatioreaktio sekä lisäksi valmistettiin kontrollireaktio pUC19-vektorilla. Transformaatioreaktiossa lisättiin 2 µl TOPO-kloonauksreaktioseosta jäällä sulatettujen transformoitavien solujen joukkoon. Seos inkuboitii + 4 °C:n lämpötilassa, minkä jälkeen solut altistettiin lämpöshokille +42 °C:n lämpötilassa. Sen jälkeen solut siirrettiin välittömästi jäälle ja lisättiin seokseen huoneenlämpöistä S.O.C.-mediumia. Solususpensio asetettiin +37 C-asteeseen 1 h:ksi, minkä jälkeen solut kasvatettiin ampicilliinia sisältävillä ravintoalustoilla yön yli. Kummastakin geenistä sekä kontrollireaktion solusta tehtiin 10 µl:n ja 50 µl:n ympin tilavuuden kasvatukset petrimaljoilla.

Saaduista klooneista tehtiin myös niin sanottu master plate - malja, joilla kasvatettiin useita kasvatusaljoilta poimittuja pesäkkeitä.

2.1.5 Seulonta

Oikein kloonatun plasmidin saaneet solut ilmennettiin kaikkien kloonien joukosta kasvatusaljoille lisätyn x-gal/IPTG-indikaattorivärin avulla. Kasvatuksen aikana nämä kloonit eivät tuottaneet värireaktiota ja jäivät vaaleanvärisiksi. Sen sijaan ne bakteeripesäkkeet, joiden plasmideihin monistetut M- ja H-geenit eivät menneet, kykenivät tuottamaan sinistä väriä ja sen johdosta erottuivat selvästi maljalla.

2.1.6 Plasmidien puhdistaminen ja DNA-määrän määrittäminen sekä yhdistelmä-DNA-plasmidien analysoiminen

Seuraavaksi seulottuja klooneja kasvatettiin 10 ml:n tilavuudessa. Sen jälkeen kasvatetuista klooneista eristettiin monistettu yhdistelmävektori DNA-eristyskitin (Macherey-Nagel, March 2006/Rev.01, Plasmid DNA purification) avulla mini-prep-protokollaa noudattaen. Näin saatujen yhdistelmäplasmidien DNA-konsentraatio mitattiin Nanodrop- laitteella (Thermo Scientific Turun yliopisto75 30931, NANODROP 2000 c Spectrophotometr).

Yhdistelmä-DNA-vektoreiden analysointi aloitettiin tarkistamalla ne alustavan agarosigeelianalyysin avulla. Restriktioentsyyminä käytettiin EcoRI, joka leik-

kaa plasmidia kahdesta kohdasta insertin molemmista päistä: pCR 4 M-plasmidissa 283bp ja 1190bp kohdalla ja pCR 4 H-plasmidissa 283 bp:n ja 1203bp kohdalla. Tämän vaiheen tarkoituksena oli varmistaa, että insertin kloonaminen plasmidivektoriin oli onnistunut (ks. liite 16 ja kuva 9).

Tämän jälkeen tehtiin varsinainen restriktioentsyymianalyysi. Restriktioentsyymien valinnan ehtoina oli leikkauskohtien olemassaolo sekä insertin että pCR 4 TOPO-vektorin sekvensseissä. Lisäksi oli tärkeää valita sellaiset entsyymit, jotka eivät pilkkoisi plasmidivektoria liian monesta kohdasta. Intenet tietopankista (www.lablife.org) haettuun tietoon nojaten (ks. liite 16 Restriktioentsyymien katkaisukohtat influenssa A-viruksen M-geenin sekvenssissä) analyysia varten valittiin pCR 4 TOPO M-plasmidille PstI-entsyymi ja pCR 4 TOPO H-plasmidille DraI-entsyymi (ks. liite 14 Restriktioentsyymien katkaisukohtat influenssa A/H1N1-viruksen H-geenissä). Restriktioentsyymireaktiota varten valmistettiin tarvittavat reaktioseokset ja lopuksi näytteet tutkittiin agarosigeelielektroforeesilla. Kloonauksen tuloksia tulkittiin vertaamalla geelikuvalla erottuvien bändien pituudet restriktioentsyymikarttojen antamaan tietoon.

Varmistaakseen, että saaduista yhdistelmä-DNA-vektoreista tulisivat halutunlaiset molekyylit, agarosigeelikuvien perusteella valittiin kummankin yhdistelmä-DNA-plasmidin kaksi ehdokasta sekvensoitavaksi. Tätä varten käytettiin Turun Biotekniikan keskuksen sekvensointipalvelua. Sekvensointipalvelun antamia ohjeita soveltaen valmistettiin reaktioseokset, joihin kuuluivat yhdistelmä-DNA-plasmidinäyte, 5'pää-alue tai 3'pää-alue ja vesi (ks.liite 8 Sekvensointireaktion reaktioseokset). Sekvensointireaktiot tehtiin sekä kloonauksittain alukkeilla että itse suunnitelluilla alukkeilla. Yhdistelmä-DNA-vektoreiden sekvenssien ja restriktioentsyymianalyysin antamien tulosten perusteella standardeiksi kehitetyistä molekyyleistä piirrettiin plasmidikartat.

2.1.7 Valittujen kloonien kasvatus ja monistettujen plasmidien eristäminen

Sekvensoituja yhdistelmä-DNA-plasmideja vastaavista bakteeripesäkkeistä tehtiin uudet kasvatukset suuremmassa mittakaavassa (150 ml) ampisilliinia sisältävässä LB-mediumissa. Tämän jälkeen kasvatetuista bakteereista eristettiin

DNA DNA-eristyskitin ohjeiden mukaisesti. Saatujen DNA-molekyylien pitoisuudet mitattiin Nanodropilla. Uudelleen monistettujen standardien toimivuus PCR-reaktiossa tarkistettiin näytteen kolmella eri konsentraatiolla influenssa A – yksittäiseoksissa ja H1N1-yksittäiseoksissa.

2.2 PCR-reaktion optimointi

PCR-reaktion optimointi influenssa A-, influenssa B-, pandeemisen influenssa A(H1N1)2009v- sekä RS- virusten samanaikaista osoittamista varten aloitettiin testaamalla laboratoriossa aiemmin käytössä ollutta PCR- ohjelmaa aluksi kolmen viruksen alukkeilla ja fluoresenssia muodostavalla värillä. Tämän jälkeen reaktioputkeen neljännen viruksen tunnistamiseksi lisättiin alukkeet pandemista influenssa A(H1N1)v-virusta tunnistamista varten. Näytteinä käytettiin laboratorion rutiinin sarjoissa käytettäviä positiivisia c-DNA-kontrolleja. PCR-reaktioiden tulokset analysoitiin kopioluvun ja agarosigeelianalyysin perustella. Näin saatiin alustavaa näyttöä 4-plex-reaktion toimivuudesta.

Testin optimointi jatkettiin testaamalla uusien RS-viruksen koettimien toimivuutta ja valitsemalla niiden optimaalinen konsentraatio.

Lopuksi PCR-reaktion toimivuus testattiin valmistetuilla influenssa A-viruksen M-geeni- ja influenssa A(H1N1)2009-virusten H-geeni-standardimolekyyyleillä.

2.2.1 Reaktion toimivuuden testaaminen kolmois- ja neloiseoksilla

Kolmen viruksen samanaikaisen osoittamisen mahdollistavan PCR-testin optimointia varten valmistettiin kyseessä olevien virusten alukkeet sisältävä PCR-reaktioseos laboratorion Pan-influenssavirus-RT-q PCR-protokollan pohjalta. Koettimien sijasta reaktiota lähdettiin testaamaan aluksi fluoresenssia muodostavaa väriä käyttäen (SYBR Green). Reaktiossa käytettiin samoja alukkeita, jotka olivat käytössä laboratorion influenssa A:n, influenssa B:n rutiinitesteissä. Tässä testissä RSV-alukkeina käytettiin tutkimustesteistä saatuja alukkeita.

Näytteinä käytettiin virusopin diagnostiikkapalvelun positiivisia c-DNA-kontrolleja. Testin toimivuus tarkistettiin seitsemällä eri näytevaihtoehdoilla. Näin haluttiin saada näyttöä mahdollisista tuloksista kaksois- tai kolmoisinfektion tapauksessa.

Tämän jälkeen kolmoisseoksen reaktiota fluoresoivalla värillä (tästä eteenpäin PCR-reaktioseoksissa käytettiin Boxtoväriä koska Absolut Fast -entsyymireaktioseos on tarkoitettu koettimille ja myöhemmin oli tarkoitus ottaa myös koettimet käyttöön) testattiin vielä kolmeen otteeseen Absolut Fast Flu InfA+RSV-ohjelmalla. Tämä ohjelma luotiin laboratorion rutiinikäytössä olleen ohjelman pohjalta. Vertailua varten jokaisen kolmoisseoksen reaktion yhteydessä jokaiselle virukselle tehtiin PCR-reaktio myös yksittäisseoksella. PCR-reaktioiden tulokset tutkittiin sulamispistekäyrän ja kopiolumunperusteella.

Neljän viruksen samanaikaista osoittamista varten kolmoisseokseen lisättiin pandeemisen influenssa A(H1N1)v-viruksen alukkeet. Reaktiota testattiin 12 eri näyteyhdistelmällä. Näytteiden monistumista reaktiossa tutkittiin sulamispistekäyrän ja kopiolumunperusteella sekä lisäksi PCR-tuotteista tehtiin agarosigeelianalyysi. Näytteen konsentraation vaikutuksen PCR-tuotteiden muodostumiseen neloisreaktiossa selvittämiseksi yksittäis- ja neloiseoksen reaktio toistettiin näytteiden 4:llä eri konsentraatiolla. Neliseoksen reaktio testattiin influenssa A-, influenssa B-, pandeemisen influenssa A(H1N1)v- sekä RS-viruksen suhteen. Näytteinä käytettiin virusopin laboratoriossa käytettyjä viljellyistä viruksista tuotettuja positiivisia c-DNA-kontrolleja. Polymeerasiketjureaktion tulokset tutkittiin Absolut Fast Flu InfA+RSV-ohjelmalla ja agarosigeelianalyysin avulla. Ajo tehtiin Absolut Fast Flu InfA+RSV-ohjelmalla.

2.2.2 RSV-koettimen testaus

PCR-testin RS-virusten tunnistusta varten tarvittiin uusi RSV-koetin. Uuden koettimen toimivuus tarkistettiin 3:lla eri koettimen konsentraatiolla, jotka olivat koettimen 50, 100 ja 200 nM liuokset. Lisäksi vertailun vuoksi tehtiin yksi reak-

tioseos ilman RSV-koetinta. Samanaikaisesti koettimen kanssa reaktiossa käytettiin fluoresoivaa Boxtto-väriä. Näytteinä käytettiin RSVA ja RSVB c-DNA:ta sekä vettä. Reaktion toimivuus testattiin kolmella rinnakkaisella näytteellä. PCR-reaktio ajettiin Absolut Fast Flu InfA+RSVprobe+melt-ohjelmalla Rotorgene 6000-laitteella. Reaktion tuloksia tutkittiin Absolut Fast Flu InfA+RSVprobe+melt-ohjelman ja geelianalyysin avulla. Tulosten perusteella koettimen oikean konsentraation valintaa jatkettiin vielä testaamalla koetin uudelleen 25, 50 ja 100nM liuoksilla. PCR-reaktio tehtiin samoilla parametreilla, kuin sitä edeltävässä reaktiossa oli käytetty.

2.2.3 PCR-reaktion toimivuuden testaaminen influenssa A-, pandemisen influenssa A(H1N1)v- ja RS-virusten näytteillä

Kolmea virusta tunnistavan reaktion tehokkuus lähdettiin testaamaan valmisteilla pCR 4 TOPO M₃ - ja pCR 4 TOPO H₁₇ - plasmideilla ja RS-viruksen ruutiinestien positiivisilla kontrolleilla. Reaktio ajettiin Rotor Gene 6000-laitteella ohjelmalla Absolut Fast Flu+RSVprobe. Näytteistä tehtiin laimennossarjat 10⁸ - 1 kopioita/μl. Selvemmän näytön saamiseksi näytegeenien monistumisesta ja monistumisen tehokkuudesta reaktiot tehtiin yksittäis-, (influenssa A- ja pandemisen influenssa A(H1N1)v-virukset) kaksois- (influenssa A-virus ja RS-virus sekä pandemisen influenssa A(H1N1)v-virus ja RS-virukset) ja kolmoisseoksissa (influenssa A-viruksen, pandemisen influenssa A(H1N1)v-viruksen ja RS-virusten alukkeet). Reaktio toistettiin vielä samoilla molekyylinäytteillä laimennoksilla 10⁸ - 1 kopiota/μl yksittäis- ja kolmoisseoksissa. Ajo tehtiin Rotor Gene 6000-laitteella Absolut Fast Flu+RSVtemp - ohjelmalla. Sama reaktio toistettiin vielä neljällä identtisellä ajolla ja reaktioparametreilla. Lopuksi määritettiin PCR-reaktiossa monistuneiden tuotteiden kopioluku. PCR-reaktioden tuotteiden määrää tutkittiin analysoimalla sulamispisteitä ja monistettujen molekyylien kopiolukua. Reaktion tehokkuus arvioitiin vertaamalla tulokset keskenään graafisesti sekä taulukoiden avulla.

RS-virusten suhteen kolmoisreaktioiden testaaminen päätettiin tehdä toisella PCR-laitteella, jolla RSV-koettimen mittaamisen todettiin toimivan paremmin (Rotor Gene 3000) ja tuoreilla c-DNA-näytteillä. Näytteinä käytettiin RS-virusten rutiinitesteissä positiiviseksi todettun c-DNA:n seitsemää eri konsentraatiota. PCR-reaktio suoritettiin RS-yksittäisreaktioseoksella ja kolmoisreaktioseoksella, jossa mukana olivat influenssa A:n, pandemisen influenssa A(H1N1)v-viruksen ja RS-virusten alukkeet ja koettimet. Reaktio ajettiin Rotor Gene 3000-laitteella ja Absolut Fast Flu+RSV-ohjelmalla. Seuraavaa PCR-reaktiota varten tehtiin uudet 100 µM:sta 10 µM RSV-aluke- ja koetinlaimennokset. c-DNA-näytteinä käytettiin rutiinin RS-testien positiivisia c-DNA-kontrolleja. Reaktiot ajettiin 7:llä eri näytteiden laimennoksilla, Rotor Gene 3000-laitteella ja samalla ohjelmalla kuin Absolut Fast Flu+RSVtemp. Seuraavaksi ajo-ohjelman mittauspiste siirrettiin sykleissä 72 °C:n jälkeen. Reaktio ajettiin RSV-yksittäisseoksella. Näytteinä reaktiossa käytettiin 4:ä eri laimennosta c-DNA:n positiivisista kontrolleista ja 30 virusopin diagnostiikkapalvelun influenssatestien c-DNA-näytettä. Lopuksi PCR-reaktion toimivuus kolmoisseoksessa RSV-näytteiden suhteen testattiin positiivisen c-DNA:n kontrollin laimennoksilla ja rutiinin RSV-PCR-testeissä positiivisiksi todetuilla näytteillä. Ajo tehtiin Rotor Gene 3000 koneella ja muunnellulla Absolut Fast Flu+RSVtemp-ohjelman versiolla.

Taulukko 3 Influenssa A:n, H1N1v:n ja RSV:n yhdistäminen

Inf A/ H1N1	
	1 (µl)
Aqua	5,4
2xAbsolutFastFlu	10
10µM AM1s/H1swF	1,2
10µM AM1a/H1swR	1,2
10µM AM-P/H1sw-P	0,2
Total	18

RSV	1 (μ l)
Aqua	5,8
2*AbsolutFastFlu	10
10 μ M RSV-R	1
10 μ M RSV-F	1
10 μ M RSV-p	0,2
Total	18

InfA+RSV	
	1 (μ l)
Aqua	3,2
2xAbsolutFastFlu	10
10 μ M AM1s	1,2
10 μ M AM1a	1,2
10 μ M RSV-F	1
10 μ M RSV-R	1
10 μ M RSV-p	0,2
10 μ M AM-P	0,2
Total	18

H1N1+RSV	
	1 (μ l)
Aqua	3,2
2xAbsolutFastFlu	10
10 μ M Hsw-R	1,2
10 μ M Hsw-F	1,2
10 μ M RSV-F	1
10 μ M RSV-R	1
10 μ M RSV-p	0,2
10 μ M Hsw-P	0,2
Total	18

Inf A+H1N1+RSV	
	1 (µl)
Aqua	0,6
2xAbsolutFastFlu	10
10µM AM1s	1,2
10µM AM1a	1,2
10µM Hsw-R	1,2
10µM Hsw-F	1,2
10µM RSV-F	1
10µM RSV-R	1
10µM RSV-p	0,2
10µM AM-p	0,2
10µM Hsw-P	0,2
Total	18

2.3 Potilasnäytteiden analysointi

Influenssa A(H1N1)2009v- ja influenssa A-viruksen suhteen tarkistettaviksi saapuneita näytteitä haluttiin tutkia tarkemmin ja seurata tilastollisten muuttujien avulla kehitystä epidemian edetessä. Tätä varten kaikista saapuneista näytteistä selkeämmän näytön takia sekä merkityksellisyyden vuoksi otosryhmäksi valittiin alle 12-vuotiaiden lasten ryhmän. Tarkastushetken lähtökohdaksi valittiin koulun alkamisajankohdan eli 18.8.2009 perusteluna lasten kanssakäymisen lisääntyminen ja infektion leviämisen nousu.

Tutkittaviksi näytteiksi kohderyhmästä valittiin aikavälillä 18.8.09–17.12.09 124 potilasnäytettä. Tutkittaviksi näytteitä valittiin pitkin syksyä, joten näytteiden valinta tapahtui pienistä otosryhmistä näytteiden saapumismäärän mukaan. Otosryhmän sisällä näytteitä valittiin niin, että valituksi tulisi esimerkiksi joka neljäs näyte. Kuitenkin koko tarkistettavaa ryhmää huomioon ottaen otosryhmien koon vaihtuessaan voidaan todeta, että 124 tarkistettua näytettä valittiin tutkimukseen satunnaisesti.

Valittuja potilasnäytteitä tutkittiin SeeplesRV12 ACE Detection-kitin testin avulla PCR-reaktiossa 12 respiratorisen viruksen suhteen. Testiä varten valittujen potilasnäytteiden c-DNA:t haettiin erillisiin eppendorf-putkiin. Reaktiota varten valmistettiin kaksi PCR-reaktioseosta kitin reagensseilla ohjeiden mukaisesti.

Taulukko 4 PCR Mastermix A ja B

	μl
RV 12 ACE PM(A/B)	4
aqua	3
2 x MultiplexMasterMix	10
Total	17

cDNA	3
------	---

Jokainen reaktioseos pipetoitiin omiin PCR-putkiin 17 μl/putki. Käsittelyn aikana reaktioseokset pidettiin jäällä ja PCR-putket pidettiin kylminä kylmäblokeilla. Tämän jälkeen pipetoitiin 3μl jokaista c-DNA-näytettä kumpaakin PCR-reaktioseosta sisältäviin putkiin. Reaktioputket siirrettiin esikuumennettuun (94 °C) PCR-laitteen kammioon. PCR-reaktiossa käytettiin myös esikuumennettua reaktiokammion kantta. Ajettiin seuraava PCR-reaktio:

Taulukko 5 PCR-reaktion kulku

Vaihe	Sykliden määrä	Lämpötila (°C)	Käsittelyaika (min)
1	1	94	15
2	40	94	0,5
		60	1,5
		72	1,5
3	1	72	10

Reaktion päätyttyä näytteet joko siirrettiin +4 °C asteeseen tai tutkittiin PCR-reaktion tuotteet heti reaktion jälkeen Seeples-kitin geelillä.

Geeliansyysiä varten pipetoitiin eppendorf-putkiin 6 µl puskuria ja 2 µl PCR-reaktiotuotenyötettä. Putket asetettiin geelilaitteeseen (Gene Tools Tape Station™ Controller Software Lab 901 icon). Ensimmäiseksi geelille pipetoitavaksi asetettiin kokostandardia sisältävää näyte. Saadut tulokset taulukoitiin ja tutkittiin kuvaajien avulla.

3 Tulokset

3.1 Standardit

3.1.1 Alukkeet

Influenssa A-viruksen standardisuunnittelukannaksi valittiin A/Tennessee/02/2008(H3N2)-kanta (ks. liite 1 Influenssa A-viruksen standardisuunnittelukanta). Tämän kannan M-geenin sekvenssin pohjalta Primer3-ohjelman avulla saatiin mahdollisten alukkeiden eri vaihtoehtoja (ks. liite 3 Aluke-ehdotukset influenssa A M-geelille, halutun tuotteen pituus on 701 bp ja liite 4 Aluke-ehdotukset influenssa A M-geelille, halutun tuotteen pituus on 889 bp).

Aluke-ehdokkaista influenssa A-viruksen M-geenille valittiin seuraavat alukeparit kahta eripituista PCR-tuotetta varten:

Inf A M, 889 bp		'3	'5
LeftPrimer	GAGATCGCGCAGAGACTTG		
RightPrimer	ACTGTCGTCAGCATCCACAG		
Inf A M, 701 bp			
LeftPrimer	GATCGCGCAGAGACTTGAAG		
RightPrimer	ACTGTCGTCAGCATCCACAG		

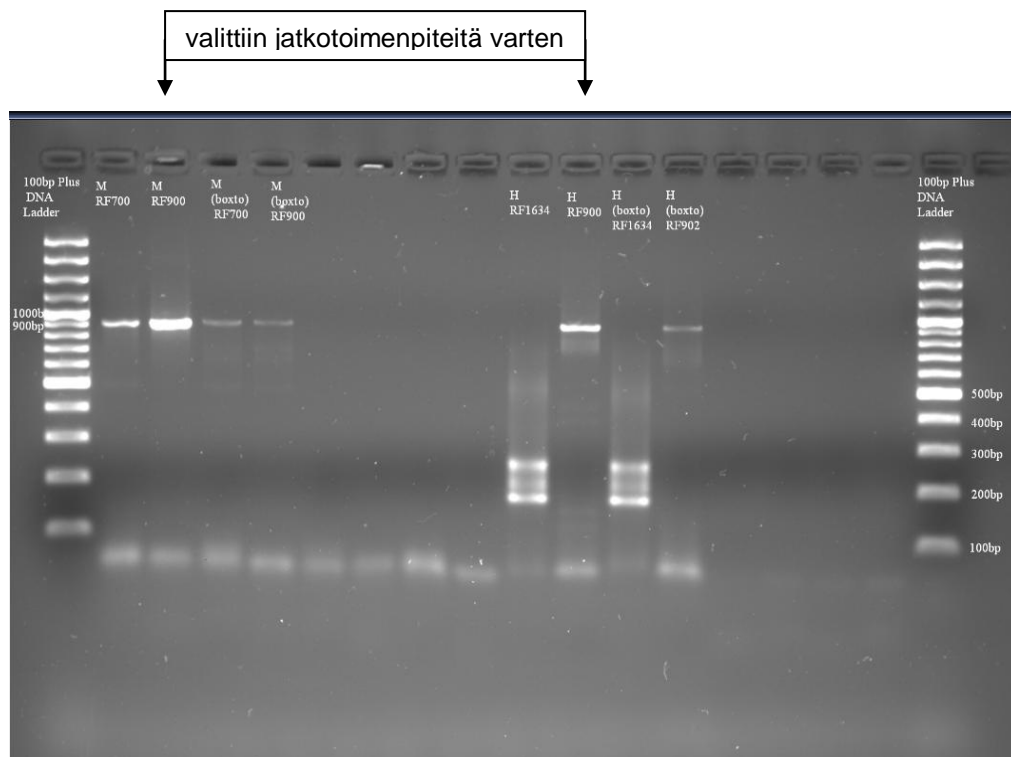
Influenssa A/H1N1 standardikanta oli Influenza A virus (A/Sao Paulo/57831/2009(H1N1)) (ks. liite 2 Influenssa A/H1N1-viruksen standardisuunnittelukanta sekä liite 4 aluke-ehdotukset H1N1-viruksen H-geenille, halutun tuotteen pituus on 902bp ja liite 5 aluke-ehdotukset H1N1-viruksen H-geenille, halutun tuotteen pituus on 1634bp).

H1N1-viruksen H-geeniä varten valitut alukeparit olivat:

(H1N1)v H, 1634 bp	
	'3 '5
LeftPrimer	GAGATCGCGCAGAGACTTG
RightPrimer	ACTGTCGTCAGCATCCACAG
(H1N1)v H, 902 bp	
LeftPrimer	GATCGCGCAGAGACTTGAAG
RightPrimer	ACTGTCGTCAGCATCCACAG

3.1.2 Reaaliaikaisessa PCR-reaktiossa eristetyt ja monistetut DNA-molekyylit

Uusilla alukkeilla PCR-reaktioissa saatiin seuraavanlaiset tulokset M- ja H-geenien monistumisesta:



Kuva 7 Suunnitelluilla alukkeilla RCR-reaktiossa monistetut tuotteet

Agaroosigeelielektroforeesi osoitti, että H1N1-viruksen H-geenistä 1634 bp:n tuotteen kohdalla PCR-reaktio ei antanut haluttua tulosta. Agaroosigeelikuvan perusteella, influenssa A-viruksen M-geenistä saatiin monistettua 889bp:n pituinen DNA-jakso. Boxto-värin vaikutus reaktioon on ollut huomattava (PCR-reaktion tuotteet näkyvät geelillä huomattavasti haaleimpana). Tämä tapahtui siksi, että ”BOXTO on joko estänyt PCR-reaktiota tai estänyt etidium bromidin tarttumista kaksoisnauhaan” (Matti Waris, 8.9.2011).

3.1.3 M- ja H-geenien kloonaminen

Transformoitujen bakteerien kummankin tilaavuuden kasvatuksissa mikroorganismit kasvoivat seuraavasti:

Transformantti	Pesäkkeiden määrä
<i>E.coli</i> pCR4 TOPO M 10µl	30
<i>E.coli</i> pCR4 TOPO M 50µl	100
<i>E.coli</i> pCR4 TOPO H 10µl	20
<i>E.coli</i> pCR4 TOPO H 50µl	50
<i>E.coli</i> pCR4 TOPO pUC 19 10µl	300
<i>E.coli</i> pCR4 TOPO pUC 19 50µl	1000

Master plate-maljalla kasvaneita ja X-gal/IPTG-seulonnan avulla oikeiksi klooniksi varmistettuja klooneja olivat:

Transformantti	Seulottavat pesäkkeet (kpl)	Seulonnan läpäiset pesäkkeet (kpl)
<i>E.coli</i> pCR4 TOPO M	10	10
<i>E.coli</i> pCR4 TOPO H	10	8
<i>E.coli</i> pCR4 TOPO pUC 19	9	

E.coli pCR4 TOPO H-transformanteista oikeanlaisiksi klooneiksi varmistettuja olivat kloonit nro 11,13–18 ja 20. *E.coli* pCR4 TOPO pUC 19-selulottujen transformanttien joukosta restriktioentsyymianalyysia varten valittiin vain ehdokas 23.

3.1.4 Yhdistelmä-DNA-plasmit

Puhdistettujen yhdistelmä-DNA-molekyylien DNA-pitoisuus mitattiin ja sen perusteella valmistettiin restriktioentsyymianalyysin reaktioseokset. Kaikkien näytteiden kohdalla DNA:n pitoisuus restriktioentsyymireaktiossa oli noin 100 ng/μl.

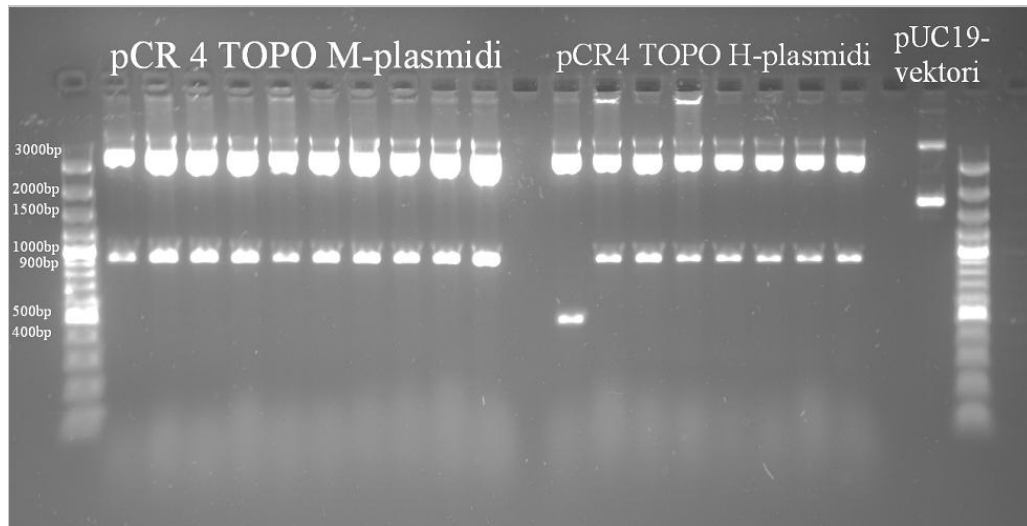
Taulukko 6 Miniskaalassa puhdistettujen yhdistelmä-DNA-plasmidien DNA-pitoisuus.

Näyte	ng/μl
M 1	83,11
M 2	131,54
M 3	126,21
M 4	112,55
M 5	96,92
M 6	98,77
M 7	96,52
M 8	93,47
M 9	110,95
M 10	150,86
H 11	87,34
H 18	62,23
H 20	67,52
pUC19-mini23	40,98

Taulukko 7 Restriktioentsyymianalyysissa käytetty reaktioseos.

Seoskomponentti	%
EcoRI-puskuri	0,1
EcoRI-entsyymi	0,1
DNA-näyte	0,6
Vesi	0,2
Yhteensä	100

Yhdistelmä-DNA-vektoreille EcoRI-entsyymillä tehty ns. alustava restriktioentsyymianalyysi osoitti plasmidin katkaisemisen tuloksena muodostuneen kaksi eripituista nukleiinihappojaksoa. EcoRI-entsyymillä leikkauskohdat pCR4–TOPO–plasmidissa olivat 283 ja 301 (ks. liite Restriktioentsyymien katkaisukohdat pCR4–TOPO-plasmidissa). Alukkeiden avulla PCR-reaktion tuloksena saadun influenssa A-viruksen (A/Tennessee/02/2008(H3N2)-kanta) M-geenin pituus oli 889 emäsparia. H1N1-viruksen (A/Sao Paulo/57831/2009(H1N1)) PCR-reaktiossa saatu H-geeni oli pituudelta 901bp. Agarosigeelikuva osoittaa, että pCR4–TOPO M-plasmidi on leikkautunut 3938 bp:n ja 907 bp:n pituisiksi jaksoiksi. pCR4–TOPO H- plasmidista on puolestaan muodostunut 3938 bp:n ja 919 bp:n mittaiset DNA-molekyylit. Alustavan restriktioentsyymianalyysin perusteella voidaan todeta, että kummastakin geenistä onnistuttiin kloonauksen tuloksena saamaan halutut yhdistelmä-DNA-molekyylit. Tosin yhden pCR4–TOPO H- plasmidinäytteen kohdalla pienempi bändi on kulkeutunut noin 500 emäsparin kohdalle. Selityksenä asialle voi olla se, että EcoRI-entsyymillä joutuessa saattanut olla epäpuhtautena EcoP15I-entsyymiä, joka leikkaa H-geeniä kohdista 481 ja 483.



Kuva 8 Alustava restriktioentsyymianalyysi

Tämän jälkeen varsinainen restriktioentsyymianalyysi antoi tarkemmat tulokset kloonauustuotteista. Laskemalla mahdollisten leikkaustuotteiden pituudet ja vertaamalla niitä geelillä näkyviin DNA-jaksoihin saatiin tietoa siitä, miten päin lukukehykseen nähden geeni on liittynyt plasmidiin.

PstI-entsyymin toiminnan tuloksena pCR4 TOPO M-plasmidista mahdollisesti muodostuneiden bändien koot:

Taulukko 8 pCR TOPO4 M-plasmidin pilkkoutuminen

$3965+889=4845$ bp pCR4 TOPO M plasmidi

Insertin aloituskohta plsmidissa: 294

Alue	Pituus (bp)
Geeni "oikeinpäin"	
Plasmidissa olevan leikkauskohdan ja insertin välinen etäisyys	$294-273=21$
Geenin ensimmäisen osan ja 21bp:n alueen muodostama bändi	$220+21=241$
Jäljellä olevan insertin ja plasmidin muodostama bändi	$4845-241=4601$
Geeni "väärinpäin"	
Insetin pidempi jakso leikkauskohdan jälkeen	$889-224=665$
Insetrin ja 21bp:n jakson muodostama bändi	$665+21=686$
Insertin lyhyempi jakso	$889-686= 203$
Plasmidin ja insertin lyhyemmän jakson muodostama bändi	$4845-686= 4159$
Jäljellä olevan insertin ja plasmidin muodostama bändi	$4845-241=4601$

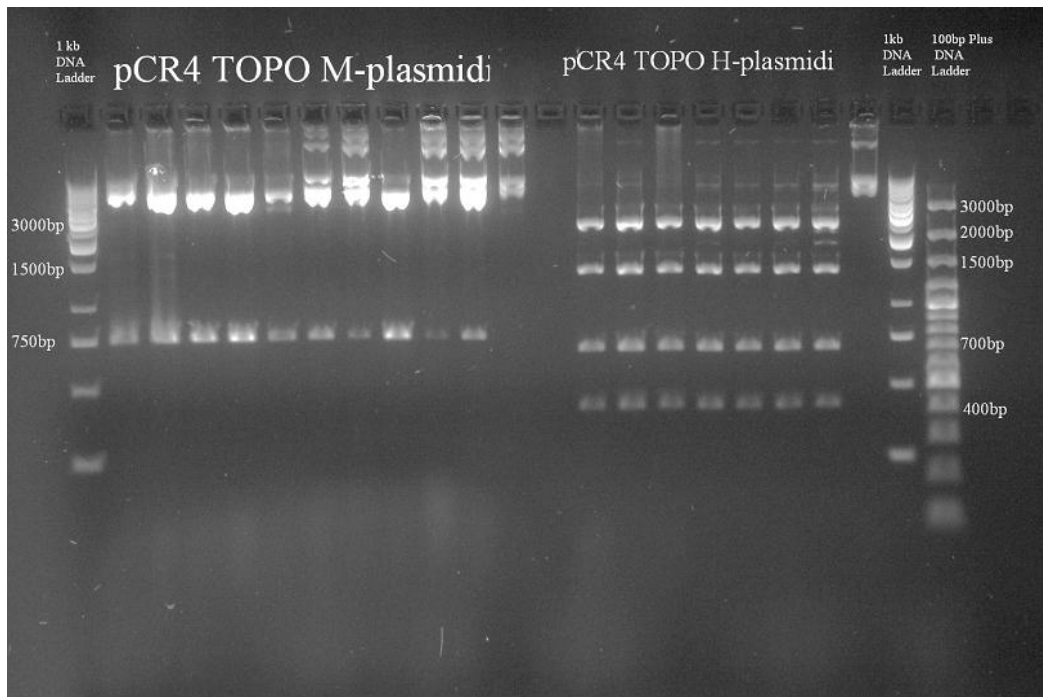
Taulukko 9 pCR TOPO4 H-plasmidin pilkkoutuminen

$3965+902=4858\text{bp}$ pCR4 TOPO H plasmidi

$294-278=16\text{ bp}$ Plasmidissa olevan leikkauskohdan ja insertin välinen etäisyys

$294+902=1196\text{bp}$ Kohta pCR4 TOPO H plasmidissa, jossa insertin sekvenssi päättyy

Alue	Pituus (bp)
Geeni "oikeinpäin"	
Geenin ensimmäisen osan ja 16 bp:n alueen muodostama bändi	$499+16=515$
Jäljellä olevan insertin ja 2141 bp:n välisen alueen muodostama bändi	$403+(2142-294)=2251$
2161 bp:n ja 2142 bp:n väliin jäävän jakson muodostama bändi	$2161-2142=19$
2853 bp:n ja 2161 bp:n väliin jäävän jakson muodostama bändi	$2853-2161=692$
2853 bp:n ja 278 bp:n väliin jäävän jakson muodostama bändi	$(3956-2853)+278=1381$
Geeni "väärinpäin"	
Geenin ensimmäisen osan ja 16 bpn:n alueen muodostama bändi	$403+16=419$
Jäljellä olevan insertin ja 2142 bp:n välisen alueen muodostama bändi	$499+(2142-294)=2347$
2161 bp:n ja 2142 bp:n väliin jäävän jakson muodostama bändi	$2161-2142=19$
2853 bp:n ja 2161 bp:n väliin jäävän jakson muodostama bändi	$2853-2161=692$
2853 bp:n ja 278 bp:n väliin jäävän jakson muodostama bändi	$(3956-2853)+278=1381$

M₁ M₂ M₃ M₄ M₅ M₆ M₇ M₈ M₉ M₁₀H₁₁ H₁₃ H₁₄ H₁₅ H₁₆ H₁₇ H₁₈ pUC19

Kuva 9 pCR TOPO 4 M- plasmidin ja pCR TOPO 4 H-plasmidin restriktioentsyymianalyysi

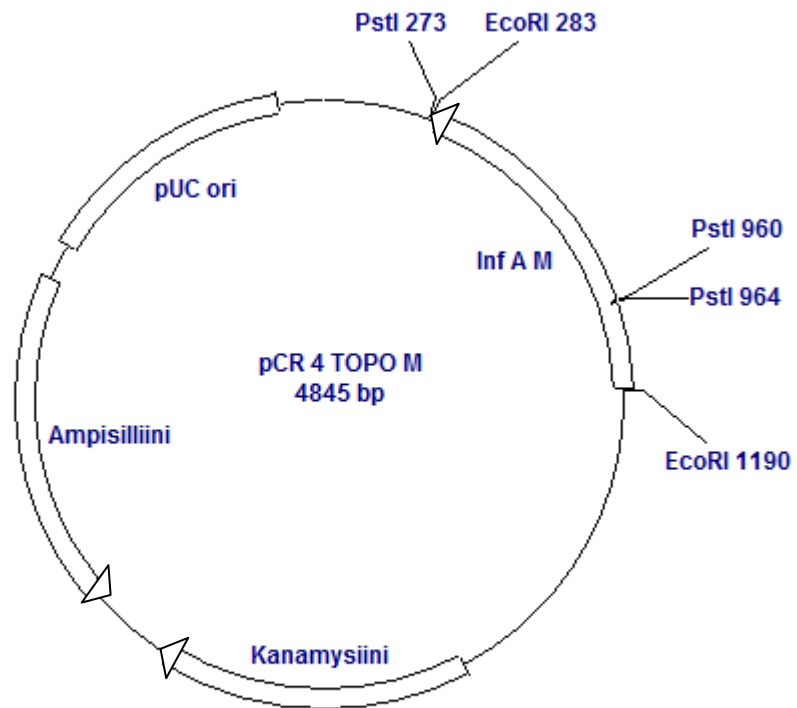
pCR4–TOPO M-plasmidin restriktioreaktiossa muodostuneet bändit asettuivat 1,5 % agarosigeelillä n. 700 bp ja 4000bp kohdille. 200 bp:n kohdalle ei ole kulkeutunut bändejä yhdenkään näytteen osalta. Tämän perusteella voidaan päätellä, että pCR4 TOPO M-plasmidinäytteiden kohdalla olevat alimmaisat bändit ovat 686 bp:n pituiset. Tämä puolestaan kertoo siitä, että geeni on asetunut plasmidiin niin, että insertin liittymiskohdasta lähtien geenin sekvenssi alkaa 3´-päästä lukien.

pCR4–TOPO H-plasmidin näytteistä muodostuneet bändit ovat kulkeutuneet geelillä noin 400, 700, 1500 ja 2500 bp:n kohdille. Lyhyin 19 bp:n bändi voi olla kulkeutunut geelin alaosaan eikä näy kuvissa pienen kokonsa takia. Lisäksi 515 bp:n kohdalla geelillä ei ole merkkiä bändeistä. Tämä voidaan pitää osoituksena siitä, että myös H-geeni kloonautui plasmidiin niin, että sen sekvenssin lu-

kusuunta plasmidiin nähden on päinvastainen eli geenin sekvenssi alkaa 3'-päästä eikä 5'-päästä.

Standardien kehittämisessä geenin asettumisella plasmidiin ei ole merkitystä PCR-testin toimivuuden tai tehokkuuden kannalta, koska PCR-testin tarkoituksena on tunnistaa ja monistaa tietty geenijakso, mikäli sellainen on näytteessä.

Lopulliset ja varmimmat tulokset geenien kloonauksesta plasmidiin saatiin näytteiden sekvensoinnin kautta. Varsinaisen restriktioanalyysin perusteella sekvensoitavaksi valittiin M₂- ja M₃-näytteet ja H₁₃- ja H₁₇- näytteet. Onnistuneet sekvenssit saatiin näytteistä M₃ M13R-alukkeella, H₁₃ M13R- ja M13F-alukkeilla ja H₁₇ M13R- ja M13F-alukkeilla (ks. liitteet: M-geenin sekvenssi pCR4 TOPO vektorissa M13R-alukkeella, Näyte H₁₃, H-geenin sekvenssi M13F-alukeella, Näyte H₁₃, H-geenin sekvenssi M13R-alukkeella, Näyte H₁₇, H-geenin sekvenssi M13R-alukkeella, Näyte H₁₃ ja H-geenin sekvenssi M13F-alukeella). Sekvenssien perusteella PCR-testin standardeiksi kehitetyistä plasmideista piirrettiin plasmidikartat.



M13 Reverse priming site: 205-221

M13 Forward (-20) priming site: 1244-1259

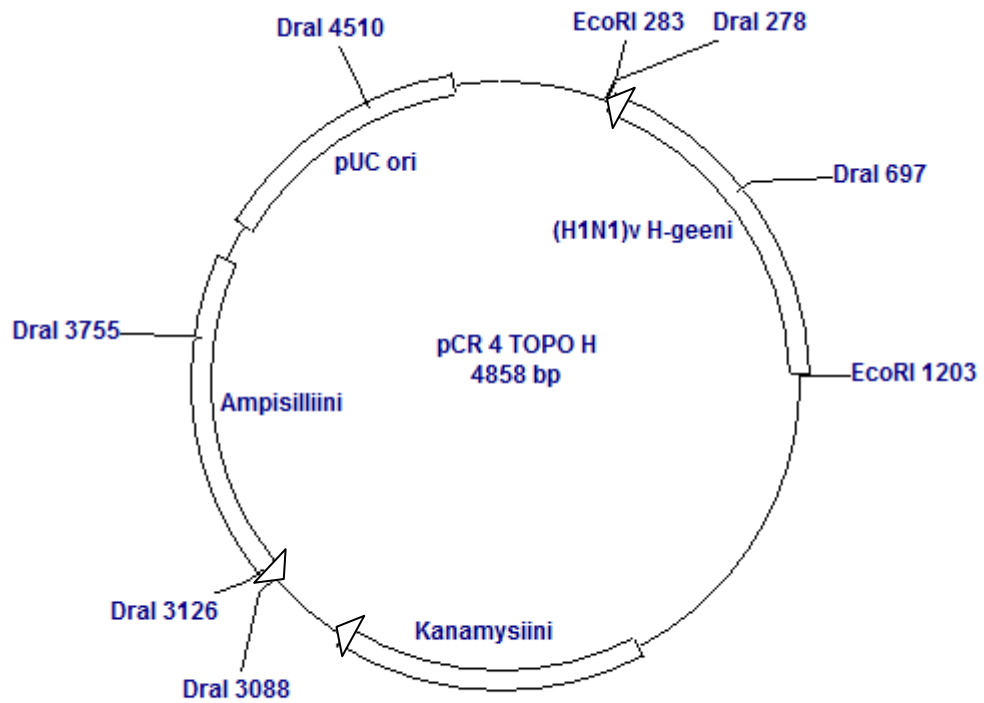
Influenssa A-viruksen M geeni (889bp): 295–1184

Kanamysiiniresistenssigeeni: 2048–2842

Ampisilliiniresistenssigeeni: 3092–3952

pUCori:4050–4723

Kuva 10 pCR 4 TOPO M-plasmidi



M13 Reverse priming site: 205-221

M13 Forward (-20) priming site: 1256-1271

H1N1-viruksen H-geeni (902bp): 295–1196

Kanamysiiniresistenssigeeni: 2061–2855

Ampisilliiniresistenssigeeni: 3105–3965

pUCori:4063–4736

Kuva 11 pCR 4 TOPO H-plasmidi

3.2 Influenssavirusten ja RS-viruksen PCR-testi

3.2.1 PCR-reaktion tulokset kolmoisseoksessa

Alustava näyttö testin toimivuudesta saatiin yhdistämällä samaan reaktioputkeen kolmen viruksen alukkeet. Koettimien sijasta tässä vaiheessa reaktio tehtiin Boxtto-väriä käyttäen. Reaktio ajettiin Absolut Fast Flu InfA+RSV-ohjelmalla (Taulukko 10).

Taulukko 10 Absolut Fast Flu InfA+RSV-ohjelma.

Vaihe	Syklien määrä	Lämpötila (°C)	Käsittelyaika (s)
1	1	95	15x 60
2	42	95	1
		55	20
		72	10

Rinnakkaisten ajojen rinnakkaisten näytteiden tulokset olivat seuraavat:

Taulukko 11 Kolmoisseos+Boxto-väri, Threshold 0,00854

Näytteet	25.9.2009 1.10.2009 2.10.2009 6.10.2009			
	Ct	Ct	Ct	Ct
A	20,3	22,6	23,03	22,25
B	19,23	21,04	21,99	21,14
RSV	19,17	19,88	33,04	21,43
A+B	19,77	21,79	22,13	21,81
A+RSV	20,3	22,01	23,02	21,02
B+RSV	19,28	20,31	22,28	20,23
A+B+RSV	19,06	22,07	22,39	21,5
aq	36,88	29,54	30,64	31,67

Rinnakkaisten ajojen tulokset yksittäisillä PCR-reaktioseoksilla olivat seuraavanlaiset:

Taulukko 12 Yksittäisseos+Boxto-väri, Threshold 0,00854

	25.9.2009	1.10.2009	2.10.2009	6.10.2009	7.10.2009	12.10.2009
PCRmix	Ct	Ct	Ct	Ct	Ct	Ct
A			22,86	22	22,63	26,88
B			20,48	20,65	22,23	24,69
RSV			25,03	18,85	20	19,84

Ct-arvoista nähdään, että jokaisessa kolmoisseoksen reaktiossa on tapahtunut DNA:n monistumista suhteellisen alhaisten Ct-lukemien kohdalla. Tosin 2.10.2009 tehdyssä reaktiossa RS-viruksen Ct-arvo on korkea, mikä voi johtua satunnaisesta pipetointivirheestä. Myös näytesyhdistelmällä tehtyjen reaktioiden Ct-arvot viittaavat onnistuneeseen PCR-reaktioon, tosin ilman agarosigeeli-analyysin tuloksia reaktiota ei voitu todistaa yhtä tehokkaaksi kaikkien tutkittavien virusten suhteen.

Verrattaessa yksittäisseosten ja kolmoisseosten tuloksia nähdään, että influenssa A- ja B-viruksten suhteen Ct-arvot ovat samaa tasoa läpi ajojen. RS-virusten suhteen yksittäisseoksen reaktioissa on enemmän vaihtelua tuloksissa mikä voi selittyä eri ajojen välisillä eroilla ja erot noudattavat tiettyjen päivien ”yleistä trendiä”, esimerkiksi 12.10.2009 yksittäisseoksella tehdyssä reaktiossa ja 2.10.2009 tehdyssä reaktiossa Ct-arvot ovat yleisesti korkeampia.

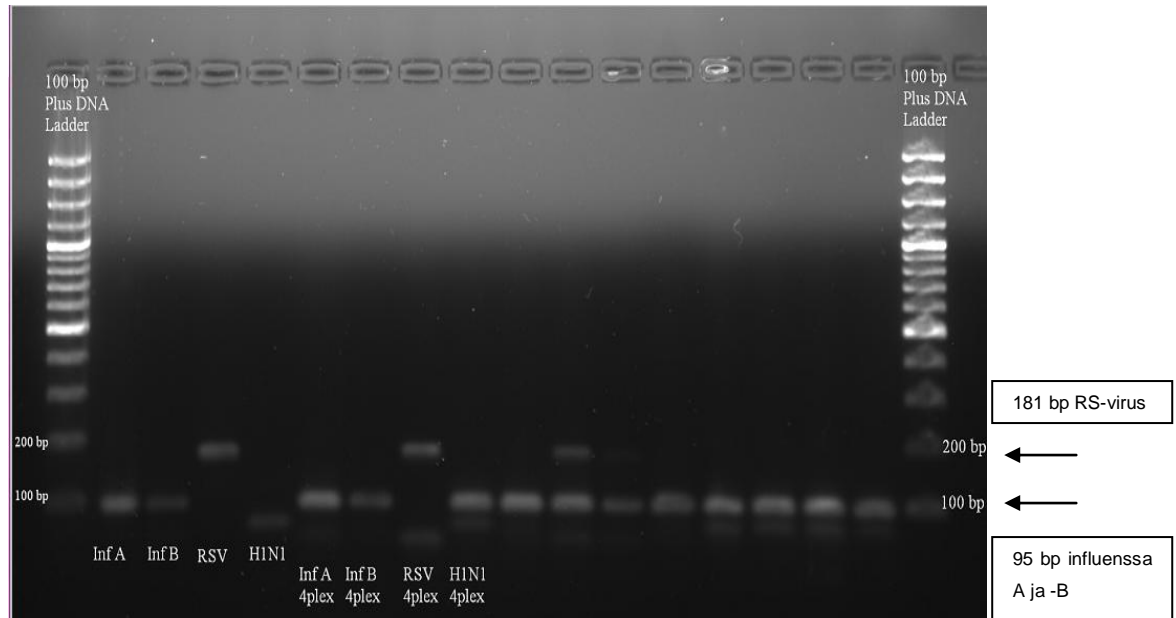
Tämän jälkeen tehtiin vastaavanlaiset reaktiot neljän viruksen PCR-reaktioseoksilla käyttäen Boxto-väriä. Näissäkin reaktioissa mukana olivat tutkittavien virusten näytesyhdistelmät.

Taulukko 13 Neljän viruksen alukkeita sisältävien reaktioiden Ct-arvot

Näytteet	7.10.2009	12.10.2009
	Ct	Ct
A	22,98	25,28
B	21,05	23,93
RSV	20,5	20,6
SW	17,4	19,56
AB	21,77	
ARSV	21,64	
BRSV	21,23	
ABRSV	21,63	
Asw	18,13	
Bsw	18,03	
RSVsw	18,03	
ABRSVsw	19,43	
aq		

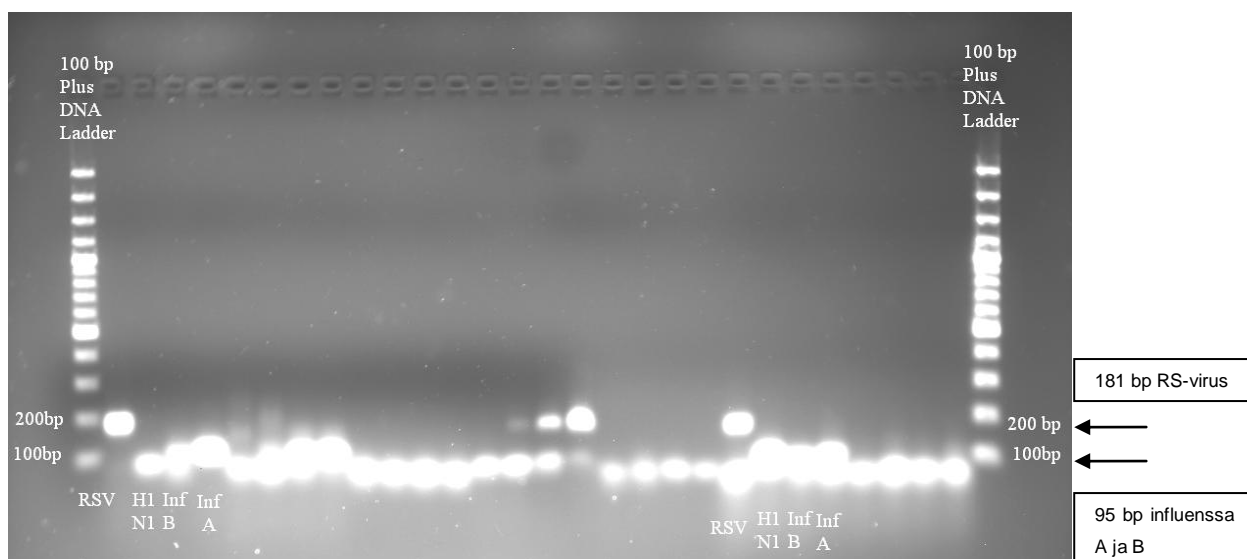
A= influenssa A, B= influenssa B, sw= influenssa A(H1N1)2009v, RSV= RS-virus

Ct-arvoista nähdään, että myös neljän viruksen alukkeita sisältävässä reaktiossa oli tapahtunut DNA:n monistumista suhteellisen alhaisilla Ct-arvoilla, mitä voidaan pitää viittauksena reaktion toimivuudesta. Reaktiossa oli tosin käytetty Boxtoväriä ja signaalia mitattiin vain yhdellä kanavalla. Tämän takia Ct-arvojen perusteella ei voitu vielä sanoa mikä viruksista näytesyhdistelmien tapauksessa oli monistunut reaktiossa. Haluttujen virusten DNA:n monistumisen tarkistamiseksi, PCR-tuotteista tehtiin agarosigeelianalyysi.

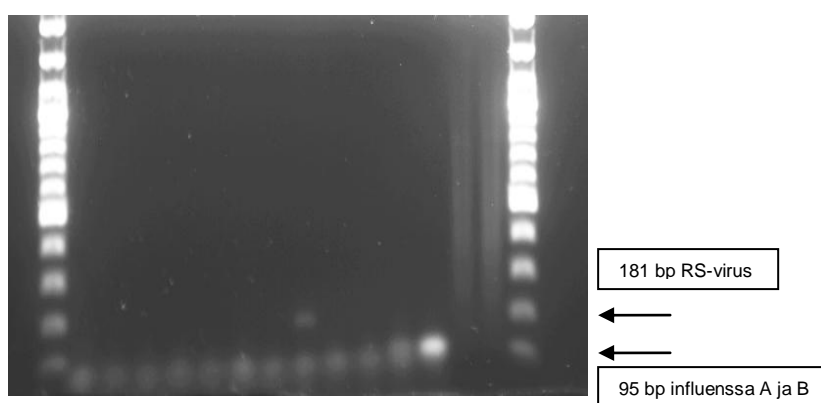


Kuva 12 Neljän viruksen ja yksittäis-PCR-reaktioseoksen tuotteet 7.10.2009

Agarosegeelianalyysin perusteella nähdään, että DNA:n monistumista on tapahtunut jokaisessa reaktiossa ja PCR-reaktio on toiminut. Influenssa B:n ja pandeemisen (H1N1)v-viruksten kohdilla DNA-jaksot näkyvät geelillä himmeinä, viitaten molekyylien pienempään määrään, mikä puolestaan on osoituksena PCR-reaktion heikommasta tehosta näiden virusten suhteen. Lisäksi huomattiin, että neljän viruksen alukkeita sisältävässä PCR-reaktioseoksessa pandeemisen (H1N1)v-kohdalla näkyy vahva merkintä 100 emäsparin kohdalla. Näyteyhdistelmien tapauksessa influenssa B ja RS-virusten DNA:ta sisältävässä reaktiossa RS-virusten DNA:n monistus on ollut heikkoa päätellen himmeästä DNA-jaksosta RS-viruksille odotetun DNA-jakson pituuden kohdalla. Influenssa A-, B- ja RS-virusten sekä influenssa A-, B-, pandeemisen (H1N1)v- ja RS-virusten reaktiossa monistumista ei agarosegeelianalyysin perusteella ole tapahtunut.



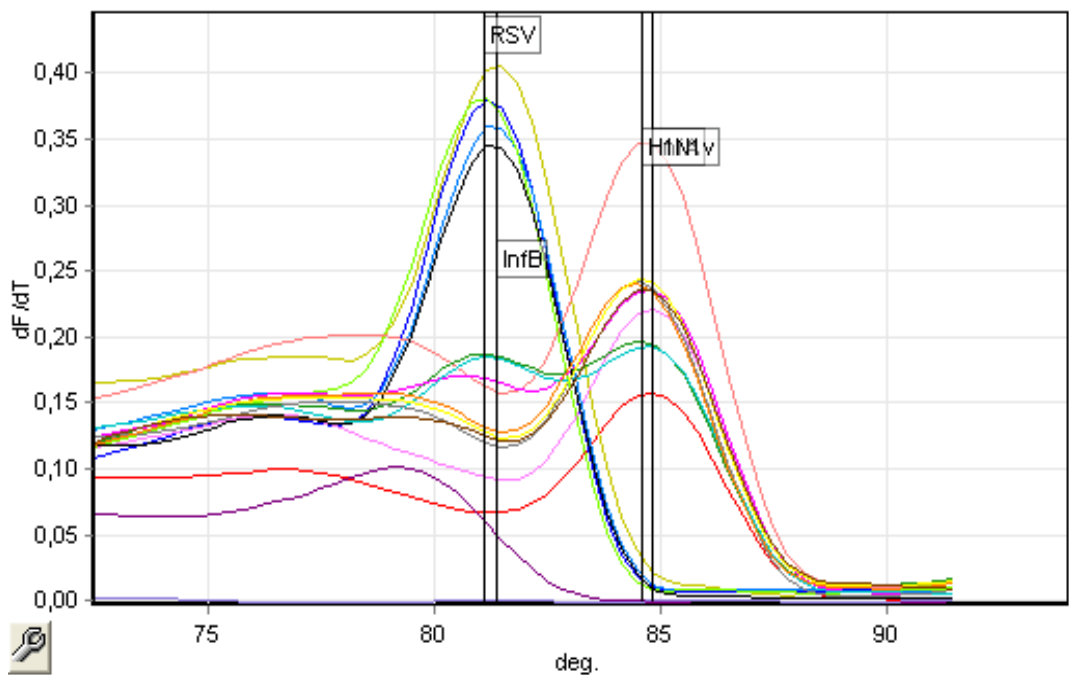
Kuva 13 Neljän viruksen ja yksittäis-PCR-reaktioseoksen tuotteet 12.10.2009



Kuva 14 Neljän viruksen ja yksittäis-PCR-reaktioseoksen tuotteet 12.10.2009

12.10.2009 PCR-reaktion tuotteista nähdään, että vain yhtä näytelajia sisältävissä reaktioissa DNA-jaksot monistuvat odotusten mukaisesti ja muodostavat selkeän tuloksen sekä yksittäis- että neljän viruksen alukkeita sisältävässä reaktioseoksissa (Kuva 13 ja 14). Näytelaimennokset taas osoittavat, että pandeeminen (H1N1)viruksen ja RSV-viruksen DNA monistuu neljän viruksen alukkeita sisältävässä reaktiossa 0,1 vahvuisten näytekonsentraatioiden tapauksessa. Osaltaan Influenssa A- ja B-viruksen tapauksessa neliseoksen PCR-reaktioissa DNA:n monistuminen ei agarosigeelianalyysin perusteella onnistunut.

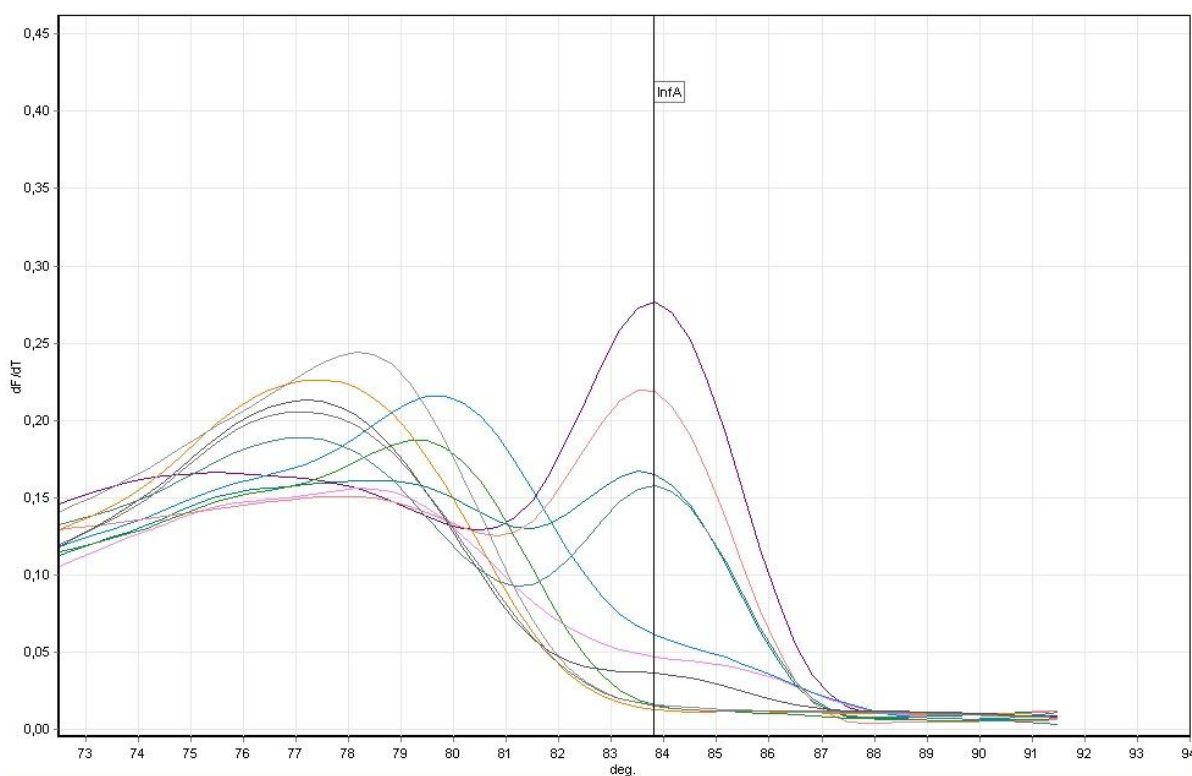
Yksittäisseoksen PCR-reaktioissa tulokset saatiin kaikista viruksista paitsi influenssa B-viruksesta ainakin 0,1 vahvuisten näytekonsentraatioiden tapauksessa.



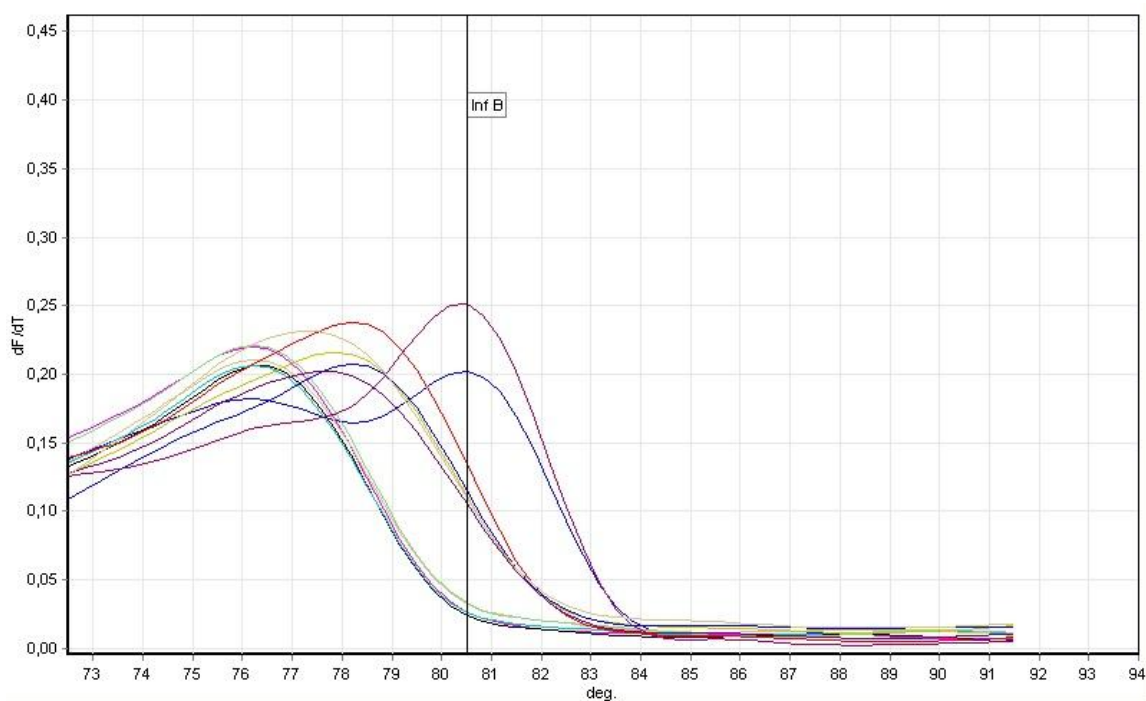
No.	C	Name	Peak 1	Peak 2
1	Red	Aprimers	76,7	84,8 (InfA)
2	Yellow	Bprimers	77,0	81,5 (InfB)
3	Blue	RSVprimers	76,0	81,2 (RSV)
4	Purple	SWprimers	79,2 (RSV)	87,8
5	Pink	A	76,5	84,8 (InfA)
6	Light Blue	B	76,5	81,3 (InfB)
7	Light Green	RSV	81,0 (RSV)	85,8 (InfA)
8	Light Red	SW	78,3	84,7 (H1N1v)
9	Dark Green	AB	76,0	81,0 (RSV)
10	Magenta	ARSV	76,8	80,5 (RSV)
11	Black	BRSV	76,5	81,3 (InfB)
12	Cyan	ABRSV	76,0	81,2 (RSV)
13	Grey	A _{sw}	77,8	84,5 (H1N1v)
14	Orange	B _{sw}	79,0	84,5 (H1N1v)
15	Yellow	RSV _{sw}	77,5	84,5 (H1N1v)
16	Brown	ABRSV _{sw}	75,5	79,3 (RSV)
17	Purple	aq	73,3	76,5

Kuva 15 7.10.09 PCR-reaktion melt-kuvaajat

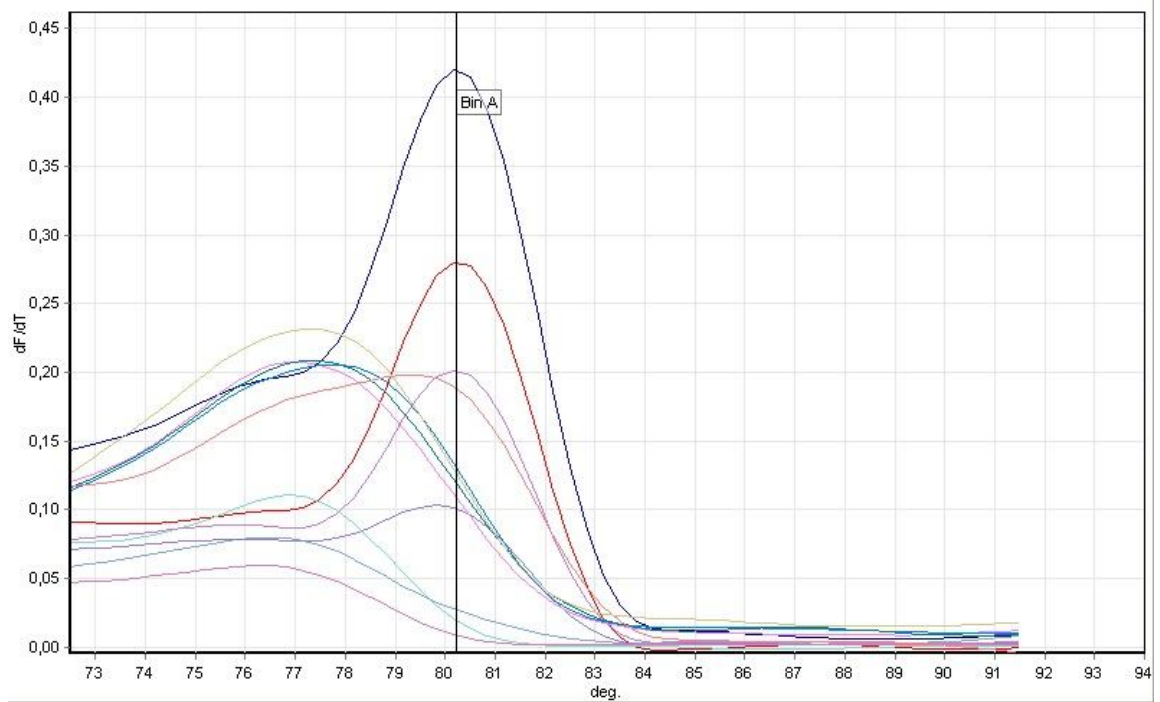
Myös melt-kuvajista nähdään, että RSV-virusken ja influenssa B-virusken piikit osuvat lähes samalle kohdalle. Näyteyhdistelmien tapauksissa värillä tehdyissä PCR-reaktioissa reaktion herkkyys laskee huomattavasti.



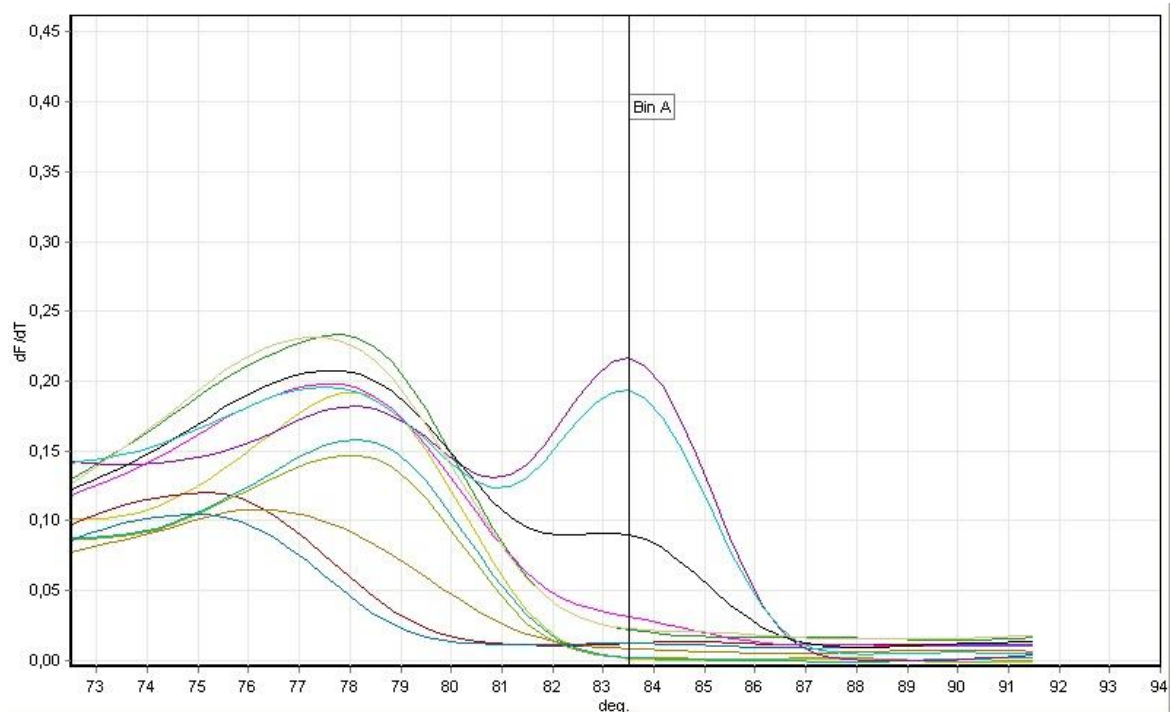
Kuva 16 12.10.09 PCR:n influenssa A-viruksen melt- kuvaaja



Kuva 17 12.10.09 PCR:n influenssa B-viruksen melt- kuvaaja



Kuva 18 12.10.09 PCR:n RSV-viruksen melt- kuvaaja



Kuva 19 12.10.09 PCR:n RSV-viruksen melt- kuvaaja

Melt-kuvaajista voidaan nähdä, että tässäkin tapauksessa reaktioiden tehokkuus hieman laskee, kun näytteinä on samanaikaisesti useamman viruksen DNA:ta.

Näiden alustavien reaktioiden tulokset osoittivat, että PCR-reaktio oli selvästi heikkotehoisempi influenssa B-viruksen suhteen. Influenssa B-viruksen harvinaisuuden ja lopputuloksena herkemmän PCR-reaktion saamiseksi, optimointia jatkettiin vain kolmea virusta tunnistavalle reaktiolle.

3.2.2 RSV-koettimen testaus

Uusi RS-virusten koetin testattiin RSA- ja RSB-viruksen positiivisten näytteiden eri konsentraatioilla. Ensimmäisen testin tulokset näyttävät, että reaktio oli onnistunut vain 50 nM koettimen konsentraatiolla.

Taulukko 14 RSV-koettimen testaus 26.10.2009

Treshold 0,00854		Yellow kanava Melt	
Näyte		Näyte	Piikki 1
RSV A 0	25,53	RSV A 0	81,0 (RSV)
RSV A 0	26,75	RSV A 0	81,0 (RSV)
RSV A 0	25,27	RSV A 0	81,0 (RSV)
RSV B 0	24,04	RSV B 0	81,2 (RSV)
RSV B 0	23,96	RSV B 0	81,0 (RSV)
RSV B 0	23,72	RSV B 0	81,2 (RSV)
aq0	34,08	aq0	
aq0	32,55	aq0	
aq0	34,69	aq0	
RSVA 50	23,37	RSVA 50	81,0 (RSV)
RSVA 50	23,35	RSVA 50	81,0 (RSV)
RSVA 50	23,78	RSVA 50	81,0 (RSV)
RSVB 50	24,24	RSVB 50	81,0 (RSV)
RSVB 50	24,2	RSVB 50	81,0 (RSV)
RSVB 50	24,42	RSVB 50	81,0 (RSV)
aq50	33,68	aq50	
aq50	33,6	aq50	
aq50	40,6	aq50	
RSVA 100	40,7	RSVA 100	
RSVA 100	35,76	RSVA 100	
RSVA 100	35,12	RSVA 100	
RSVB 100	34,32	RSVB 100	
RSVB 100	40,64	RSVB 100	
RSVB 100		RSVB 100	
aq100	37,66	aq100	
aq100	41,04	aq100	
aq100		aq100	
RSVA 200	35,86	RSVA 200	
RSVA 200	34,85	RSVA 200	
RSVA 200	36,87	RSVA 200	
RSVB 200	35,05	RSVB 200	
RSVB 200	36,03	RSVB 200	
RSVB 200	38,14	RSVB 200	
aq200		aq200	
aq200	37,65	aq200	
aq200		aq200	

Koetin testattiin reaaliaikaisessa PCR-reaktiossa uudestaan. PCR- reaktiotuotteiden Ct-arvojen perusteella nähdään, että 25 nM:na koetin antaa korkeahkot Ct-arvot kun taas 100 nM:na Ct-arvot ovat turhan matalia.

Taulukko 15 Koettimen testaus 30.10.2009

30.10.2009

Threshold 0,00854

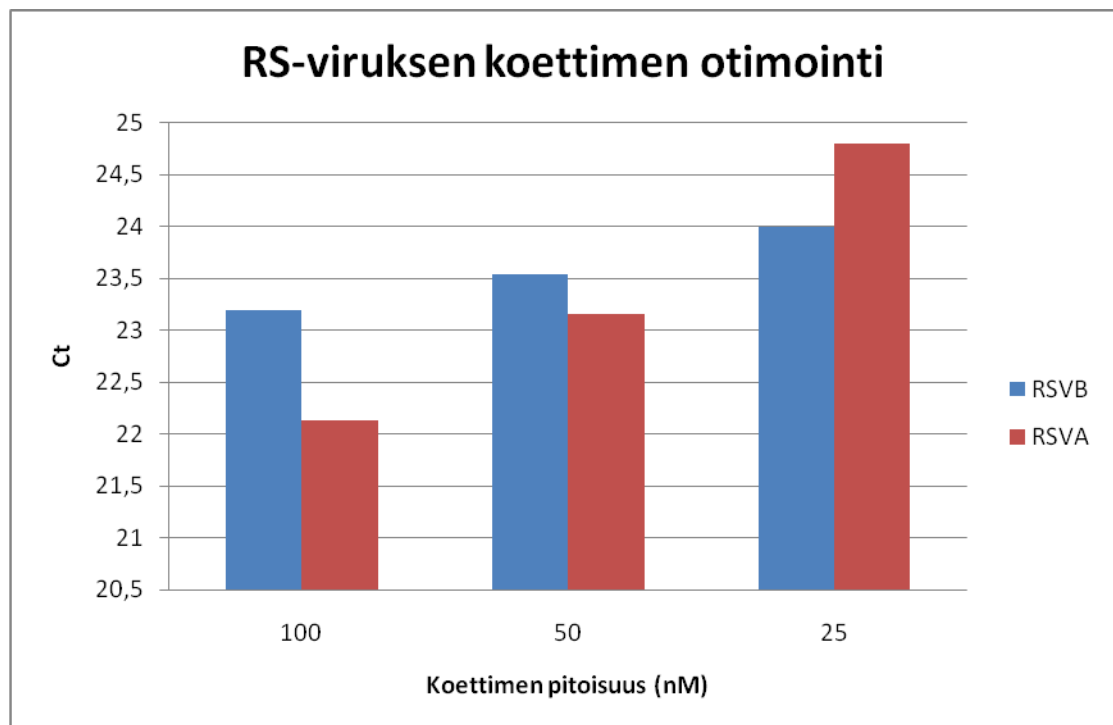
Yellow kanava

Melt

Näyte	Ct	Piikki 1	Piikki 2
a0	31,15	77,3	
a0	30,98	81,0 (RSV A)	
a0	30,76	81,0 (RSV A)	
b0	25,43	77,3	81,2 (RSV B)
b0	24,93	77,2	81,2 (RSV B)
b0	25,25	77	81,0 (RSV A)
aq0	35,99	76,5	
aq0	35	75,8	
aq0	35,07	76,5	
a25	25,37	81,0 (RSV A)	
a25	23,78	81,0 (RSV A)	
a25	25,25	81,0 (RSV A)	
b25	24,17	76,8	81,2 (RSV B)
b25	23,87	76,3	81,0 (RSV A)
b25	23,95	81,0 (RSV A)	
aq25	38,71		
aq25	33,32	76,5	
aq25	32,86	77,5	
a50	22,94	76,3	81,0 (RSV A)
a50	23,43	81,0 (RSV A)	
a50	23,11	81,0 (RSV A)	
b50	23,86	77,2	81,0 (RSV A)
b50	23,62	81,0 (RSV A)	
b50	23,15	77,2	81,0 (RSV A)
aq50	36,34	76,5	
aq50	38,96		
aq50	33,84	75,3	
a100	22,16	76	81,0 (RSV A)
a100	21,96	81,0 (RSV A)	
a100	22,29	81,0 (RSV A)	
b100	23,24	81,0 (RSV A)	
b100	23,12	81,0 (RSV A)	
b100	23,21	76,5	81,0 (RSV A)
aq100	43,29		
aq100	42,8		
aq100	38,72		

Taulukko 16 RSV- koettimen testaus

Koettimen pitoisuus (nM)	RSV A	RSV B
100	22,16	23,24
100	21,96	23,12
100	22,29	23,21
50	22,94	23,86
50	23,43	23,62
50	23,11	23,15
25	25,37	24,17
25	23,78	23,87
25	25,25	23,95



Kuva 20 RSV-koettimen optimaalisen pitoisuuden valinta

Kuvaajasta nähdään, että koettimen pitoisuuden ollessa 50 nM RSVA- ja RSVB-virusten keskinäisiä tuloksia verratessa hajonta on pienintä.

Koettimen 50 nM pitoisuus on ollut toimiva molemmissa kokeissa, joskin jälkimmäisessä tulokset olivat paremmat. Lisäksi RSA- ja RSVB-virusten suhteen

tuloksissa on ollut vähemmän hajontaa 50 nM pitoisuutta käyttäen. Tämän perusteella kolmen viruksen PCR-reaktiossa käytettiin tästä eteenpäin RSV-koettimen 50 nM:sta pitoisuutta.

3.2.3 PCR-reaktio pCR 4 TOPO M₃ - ja pCR 4 TOPO H₁₇ – plasmideilla ja RS-viruksen rutiinitestien positiivisilla kontrolleilla

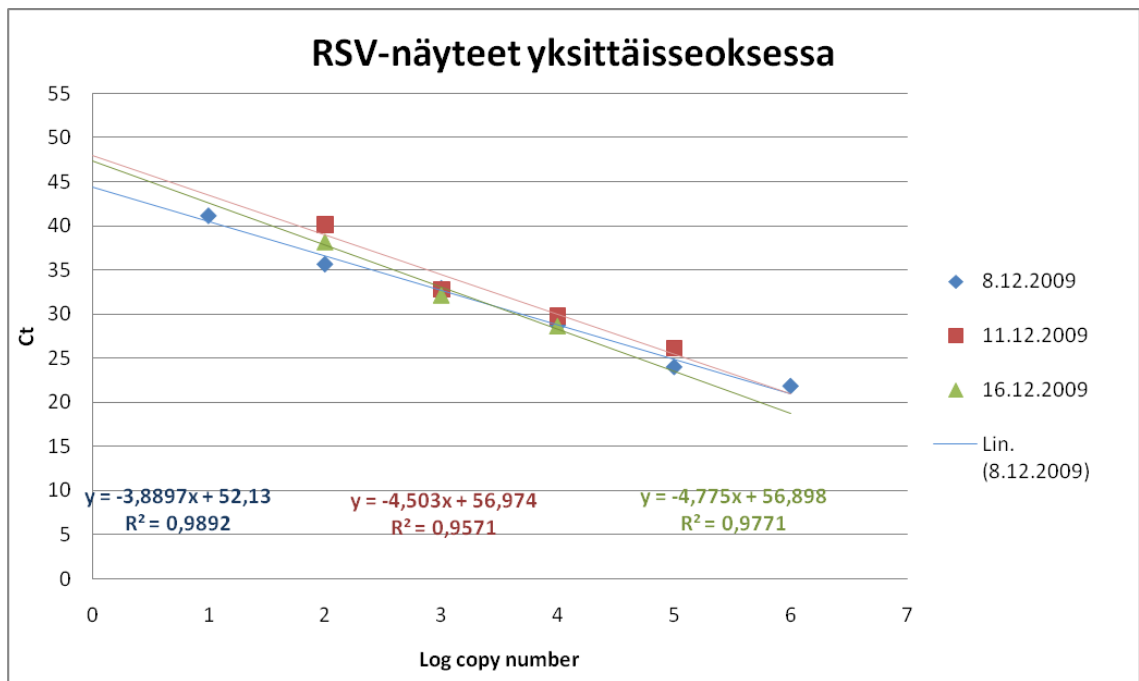
Tulosten tulkinnan selkeyttämiseksi oletettiin, että laimentamattoman RSV-rutiininäytteen konsentraatio on 10⁶-kopiota 2 µl:a kohden.

RS-virusten suhteen ensimmäinen reaktio rutiininäytteiden laimennoksilla RS-PCR-yksittäis- ja kolmoisseoksessa onnistui heikosti. Yksittäisseoksen reaktiossa tuloksia saatiin 10⁵-10³-näytepitoisuuksilla. Vähemmässä määrin DNA:ta sisältävissä näytteissä reaktio ei tuottanut tuloksia. Kolmoisseoksen reaktioissa monistumista oli tapahtunut 10⁵-10⁴-näytelaimennoksissa. 10⁶ kopiota sisältävien näytteiden kohdalla PCR-reaktio ei onnistunut.

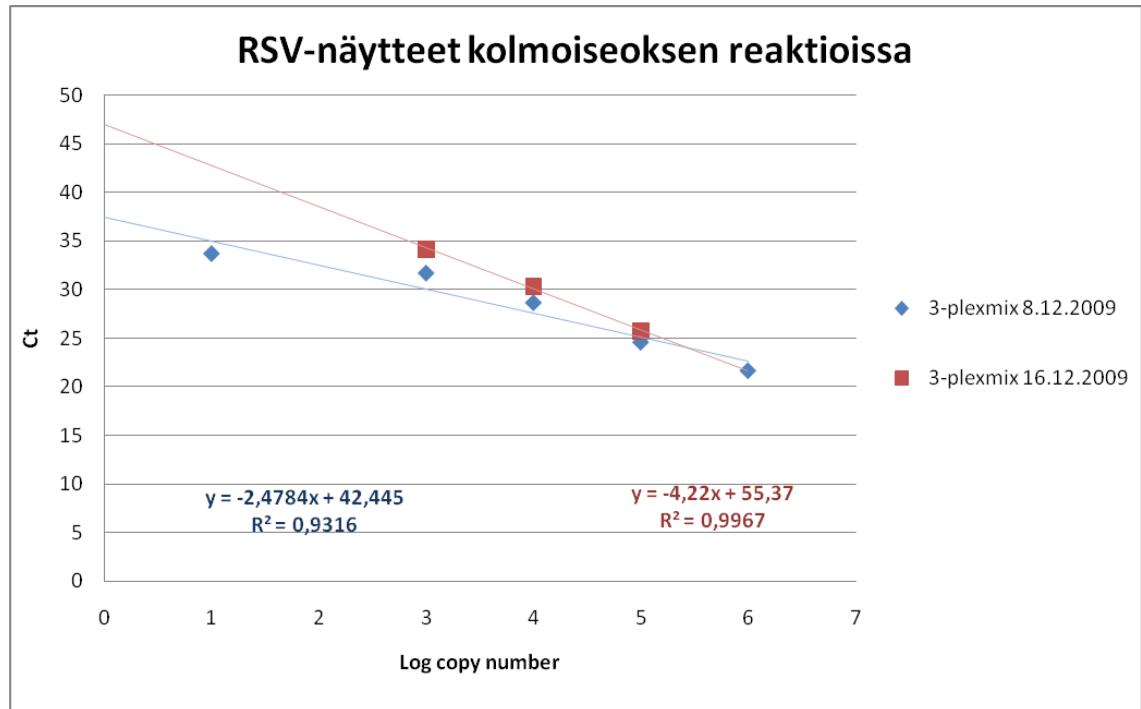
Taulukko 17 RSV-näytteet RS-yksittäis- ja kolmois-PCR-seosten reaktioissa

Näytteet	20.11.2009	20.11.2009	Näytteet (kon- sentraatiot)
	RSV- PCRmix	3plex- PCRmix	
10 ⁵	23,45	23,54	10 %
10 ⁵	23,74	23,89	10 %
10 ⁵	23,89	23,91	10 %
10 ⁵	23,64	23,98	10 %
10 ⁴	27,3	27,15	1 %
10 ⁴	27,25	27,56	1 %
10 ⁴	27,47	27,45	1 %
10 ⁴	27,42		1 %
10 ³	30,38		0,10 %
10 ³	31,64		0,10 %
10 ³	31,18		0,10 %
10 ³	31,81		0,10 %
10 ²			0,0100 %
10 ²			0,0100 %
10 ²			0,0100 %
10 ²	38,38		0,0100 %
10 ¹			0,0010 %
10 ¹			0,0010 %
10 ¹			0,0010 %
10 ¹			0,0010 %
10 ¹			0,0001 %
10 ¹			0,0001 %
10 ¹			0,0001 %
10 ¹			0,0001 %
10 ⁶			100 %
10 ⁶			100 %
10 ⁶			100 %
10 ⁶			100 %

Ohjelman muokkaamisen jälkeen PCR-reaktio saatiin toimimaan RS-yksittäis- sekä kolmoisseoksissa. Mittauspisteen lisäys 72 °C:n jälkeen paransi reaktioiden tuloksia niin, että kaikissa näytteissä oli tapahtunut DNA:n monistumista. Ct-arvot noudattivat noin 2-4 arvon nousua näytelaimennoksen pienentyessä. Kaikissa yksittäisseoksen PCR-reaktioissa tuloksia saatiin näytteiden 10²-laimennoksista. 8.12.09 yksittäisseoksen reaktiossa myös 10¹-näytelaimennos on tullut ilmi.



Kuva 21 PCR-reaktio RSV-reaktioseoksessa

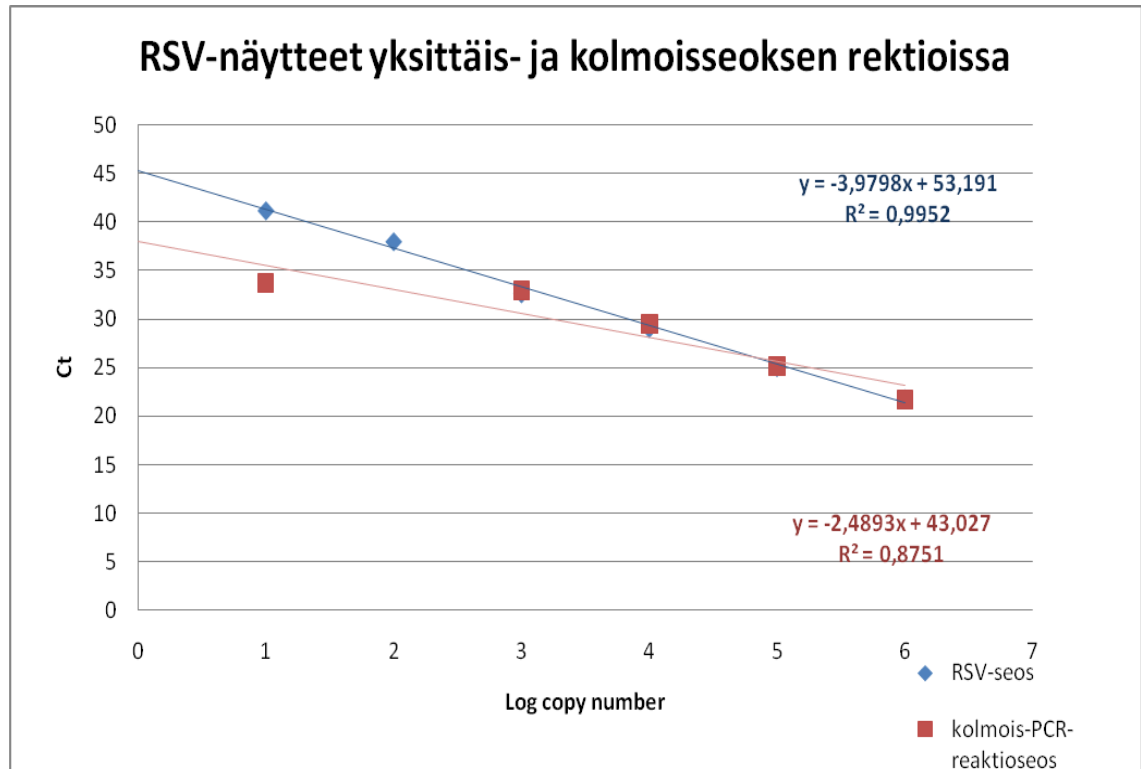


Kuva 22 RS-näytteet kolmoiseoksen reaktioissa

Kolmoiseoksen reaktiot analysoitiin 10^6 - 10^0 -näytelaimennoksilla. 8.12.09 PCR-reaktiossa (Kuva 22) 10^2 -näytteen kohdalla ei saatu tuloksia PCR-reaktiosta, mikä voi selittyä sillä, että näytelaimennokset testiä varten tehtiin 7.12.09 ja säilytettiin yön yli jääkaapissa. Asialla voi olla vähentävää tai hajottavaa vaikutusta laimeampien näytteiden DNA-määrään. 16.12.09 PCR-reaktiossa (Kuva 22) 10^1 -laimennoksessa 33 Ct-arvon kohdalla havaittiin PCR-reaktion tulos. 16.12.09 reaktiossa ainoastaan 10^2 -näyte ei tullut ilmi PCR-reaktiossa.

Tulosten perusteella voidaan todeta, että kolmoiseoksen reaktio ei ole tarpeeksi herkkä tunnistamaan positiiviseksi alle 100 kopion näytteitä. Kaikissa näissä testeissä käytetyt RSV-näytteet olivat kuitenkin virusopin diagnostiikkapalvelun testien positiivisten kontrollien laimennoksia. Vahvemmissa laimennoksista oli saatu tuloksia kaikissa reaktiossa. 10.12.09 testissä oli testattu influenssa A-jonon 30 näytettä, mitkä osoittautuivat tämän testin mukaan RSV-negatiivisiksi, niin kuin pitikin. 16.12.09-yksittäis ja kolmoiseoksen reaktioissa olivat mukana rutiinin positiiviset RSV-näytteet. Yksittäisseoksen reaktioissa

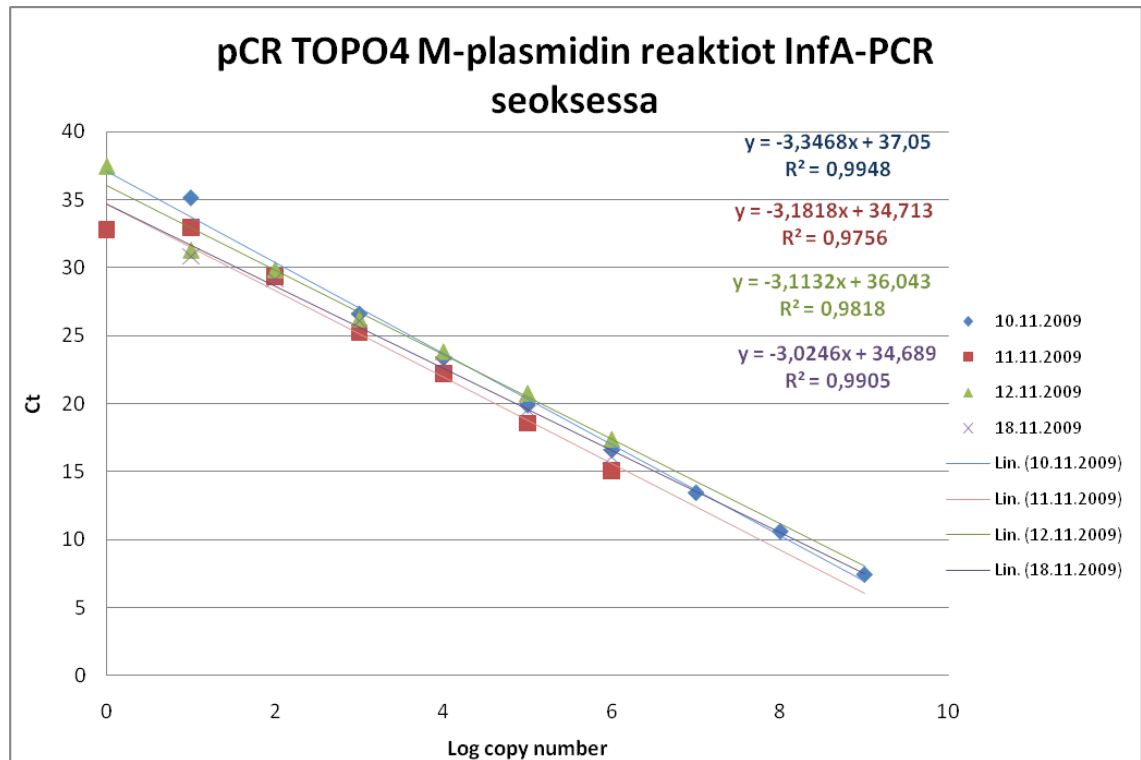
seitsemän kymmenestä todettiin positiiviseksi ja kolmoisseoksen reaktioissa 5 10:sta antoi positiivisen tuloksen.



Kuva 23 PCR-testi RSV-näytteiden suhteen

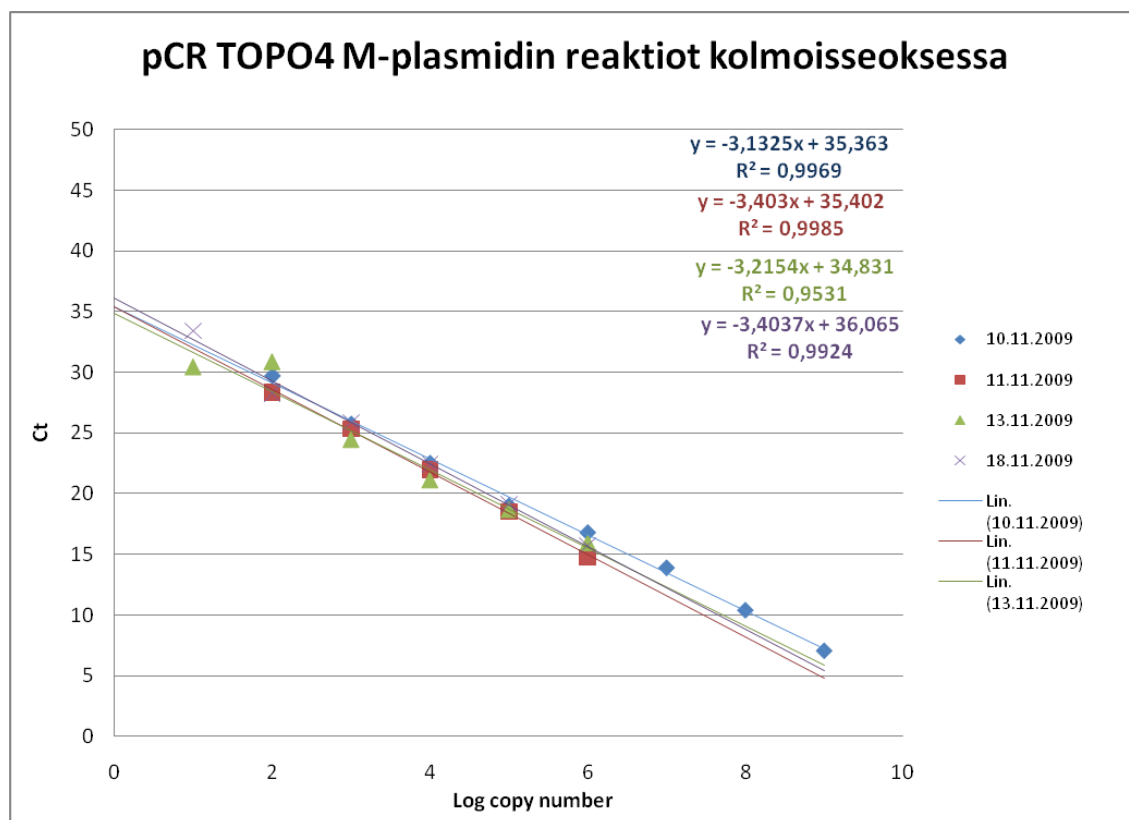
Taulukko 18 RSV-reaktion tulokset ohjelman muokaamisen jälkeen

Näytteet	4.12.2009	4.12.2009	8.12.2009	8.12.2009	11.12.2009	16.12.2009	16.12.2009
	RSV-PCRmix	3plex-PCRmix	RSV-PCRmix	3plex-PCRmix	RSV-PCRmix	RSV-PCRmix	3plex-PCRmix
	Ct		Ct	Ct		Ct	Ct
100,0000 %			21,83	21,7			
10,0000 %	25,53		24	24,61	26,11	2,29	25,69
1,0000 %	32,56		28,74	28,66	29,8	28,67	30,33
0,1000 %			32,96	31,69	32,8	32,18	34,13
0,0100 %			35,69		40,12	38,22	
0,0010 %	25,7		41,2	33,69			
0,0001 %	42,6						



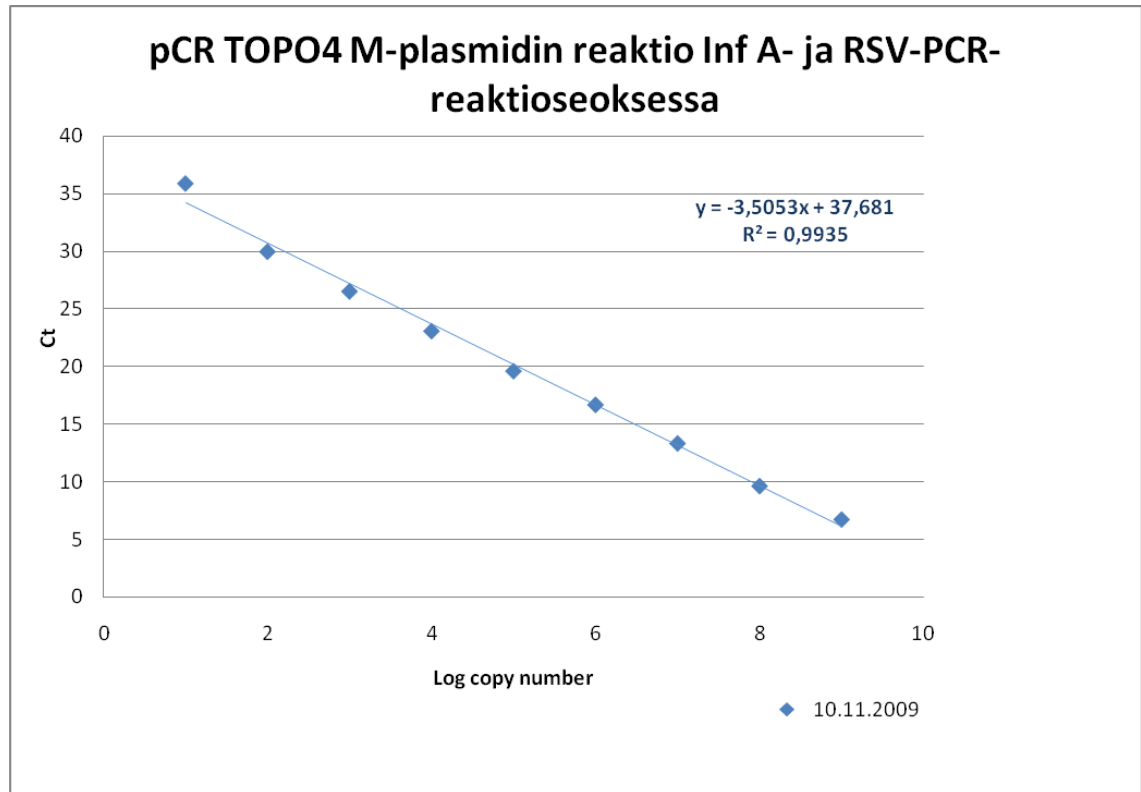
Kuva 24 PCR-testin herkkyys pCR TOPO 4 M-plasmidilla Inf A-seoksessa

Kahdessa reaktiossa kolmesta pCR TOPO 4 M-plasmidin tunnistus näytteestä yksittäisseoksessa oli onnistunut 1 kopio/ 2µl näytekonsentraatiolla. Kahdessa muussa tapauksessa viimeinen testin detektoima näytekonsentraatio oli 10 kopiota/2 µl. 11.11.09 PCR-reaktion kuvaajan R²-arvo on jäänyt vain 0,9756, mihin vaikutti 1 kopio/ 2µl – näytteen Ct-arvon pysähtyminen samalle tasolle kuin 10 kopio/ 2µl laimennoksen tapauksessa.



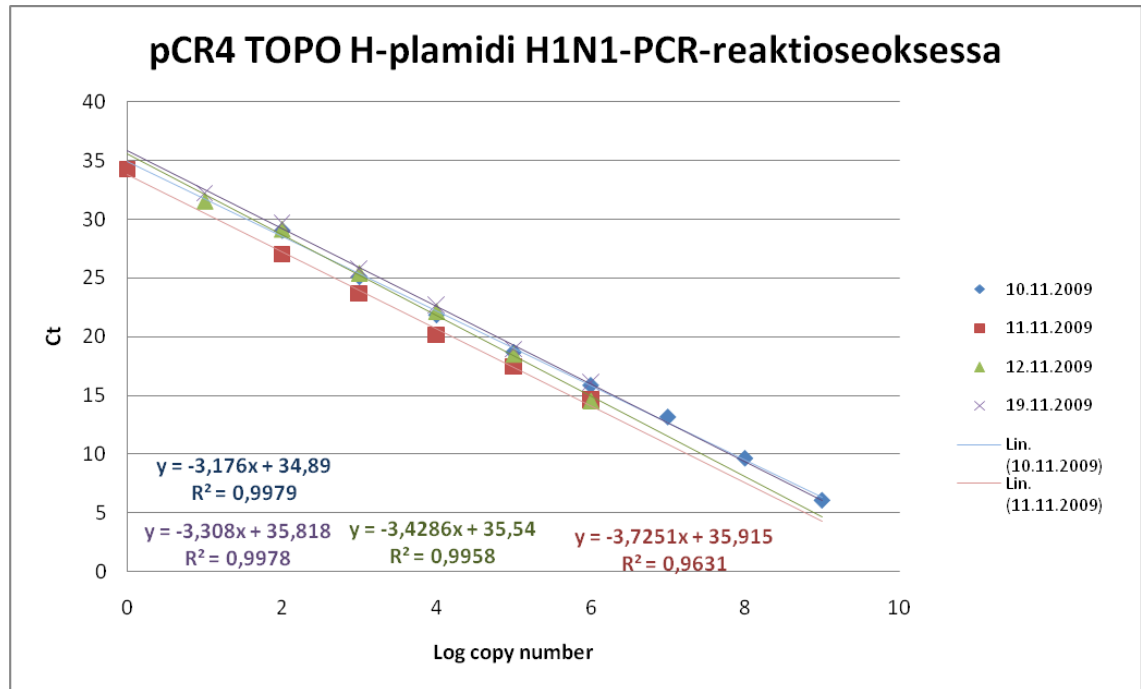
Kuva 25 pCR TOPO4 M-plasmidin reaktio kolmoisseoksessa

Kahdessa neljästä kolmoisseoksen reaktiossa pCR TOPO4 M-plasmidin tunnistus näytteestä on onnistunut 10 kopio/2 μ l- näyttekonsentraatiolla. 13.11.09 reaktiossa näytteinä olivat molemmat plasmidit, joten laimeammassa konsentraatiossa pCR TOPO 4 M-plasmidin pitoisuus oli teoreettisesti 0,5 kopiota/2 μ l. Näytepisteiden sijoittuminen standardisuoralle 10²- ja 10¹-näytteiden tapauksissa vaikuttaa alhaiseen R²-arvoon, mihin selityksenä voi olla molempien plasmidien läsnäolo reaktiossa ja tästä johtuva puolet pienempi pCR TOPO 4 M-plasmidin pitoisuus reaktioseoksessa. 11.11.09 10¹-näyttekonsentraation tulosta ei voida pitää paikkansa pitävänä. Tosin 11.11.09 reaktiossa 1 kopio/2 μ l-näytepitoisuudella PCR-reaktio näyttää toimineen.



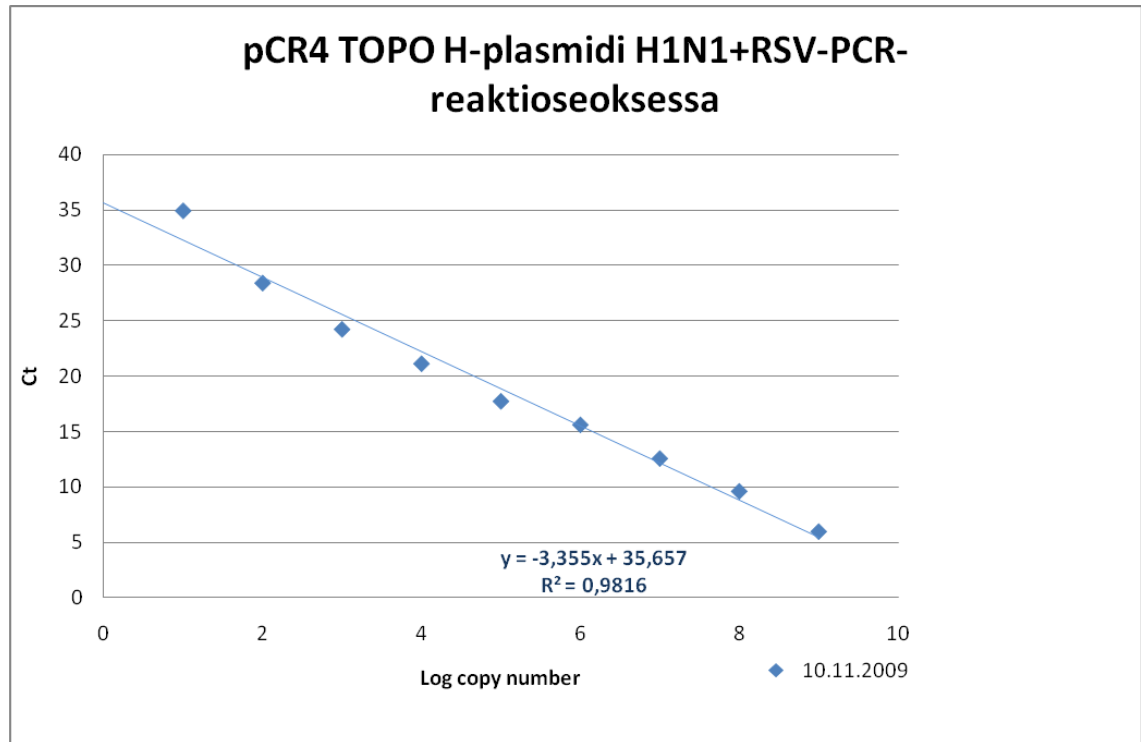
Kuva 26 pCR-TOPO4 M-plasmidin reaktio Inf A ja RSV:n kaksoisseoksessa

PCR-reaktio pCR TOPO 4M-plsmidilla testattiin myös Influenssa A ja RS-virusten kaksoisseoksessa. Reaktiossa tapahtuneen DNA:n monistumisen arvot sijoittuvat suoralle ja antavat hyvän R^2 -arvon vaikka 1 kopian näytteessä monistumista ei tapahtunut.



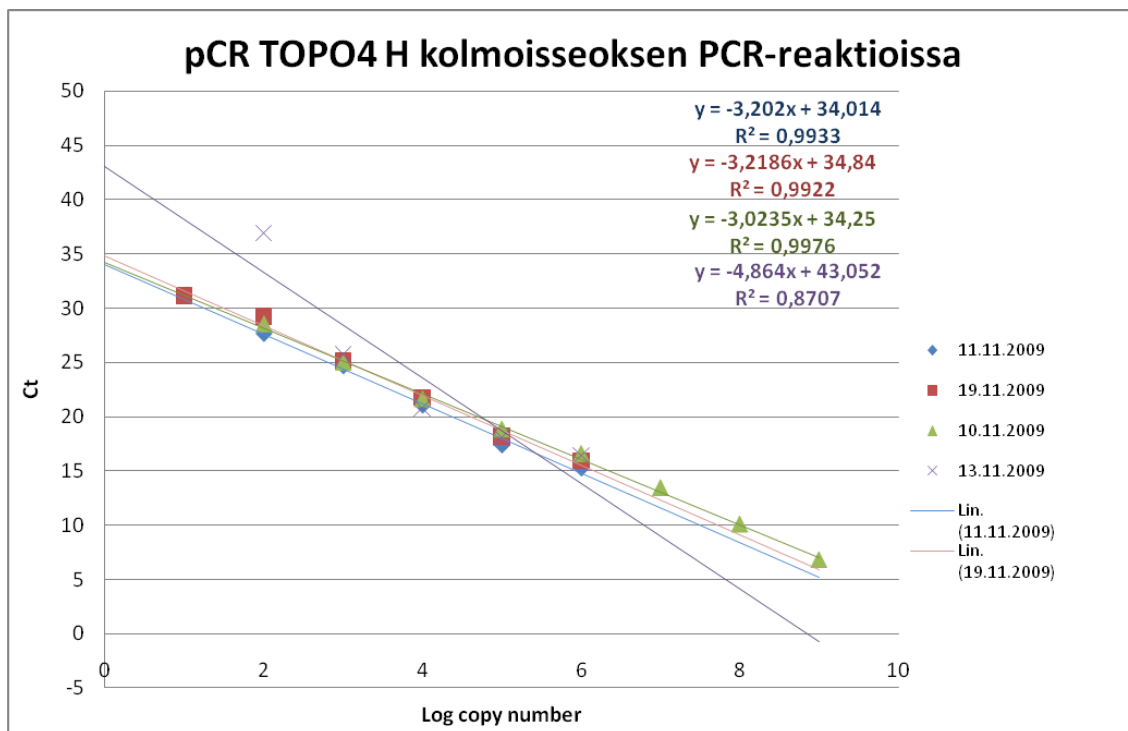
Kuva 27 pCR TOPO 4 H-plasmidin reaktio yksöis-PCR-reaktioseoksessa

pCR TOPO 4 H-plasmidin reaktion tulokset H1N1-PCR-reaktioseoksessa sijoittuvat standardisuorille. Kahdessa reaktiossa saadaan tulokset 10 kopion näytekonsentraatiolla. Yksi reaktio antaa standardisuoralle sijoittuvan Ct-arvon myös 1 kopion/ 2 μ l konsentratossa.



Kuva 28 pCR TOPO 4 H-plasmidin reaktio kaksoisseoksessa

Kaksoisseoksen reaktio myöskin näyttää toimineen hyvin, tosiaan 1 kopion näytekonsentraation tulos jää puuttumaan.



Kuva 29 pCR TOPO 4 H-plasmidin reaktio kolmoiseoksessa

pCR TOPO 4H-plasmidin reaktioherkkyys kolmoiseoksessa pysähtyy 10^1 -näytekonsentraation. 13.12.09 reaktiossa 10^2 -näytekonsentraation poikkeava tulos voi olla seuraksena siitä, että reaktiossa oli mukana sekä pCR TOPO 4 H-että M-plasmidi pitoisuudella 1 kopio/ $1\mu\text{l}$. Tämän reaktion 10^2 -näytteissä Ct-arvot ovat huomattavasti korkeampia kuin muissa rinnakkaisissa reaktioissa, mille mahdollisena selityksenä voi olla pCR TOPO 4 H-plasmidin puolet pienempi konsentraatioissa näissä tapauksissa. Tätä poikkeavuutta lukuun ottamatta kolmoiseoksen rinnakkaiset reaktiot antavat hyvin yhteneväiset tulokset näytekonsentraatioilla 10^9 - 10^1 .

3.3 Potilasnäytteiden analysointi

Työssä seulottiin 124 kappaletta rutiinin influenssatutkimukseen saapunutta näytettä. 12 viruksen testillä positiivisia tuloksia tuli 82 kappaletta, joista 17 osoittautui rinnakkaisinfektioiksi. Positiivisten näytteiden joukossa kolmesta näytteestä tuli positiiviset tulokset samanaikaisesti kolmen eri viruksen kohdalla.

Rinnakkaisinfektioiksi todetuista näytteistä kahdeksan kappaletta oli influenssa A-negatiivisia kaksoisinfektioita ja 3 kolmoisinfektioita. 6 kappaletta kaksoisinfektioiksi todettua näytettä oli Seeplex-testin mukaan influenssa A-positiivisia.

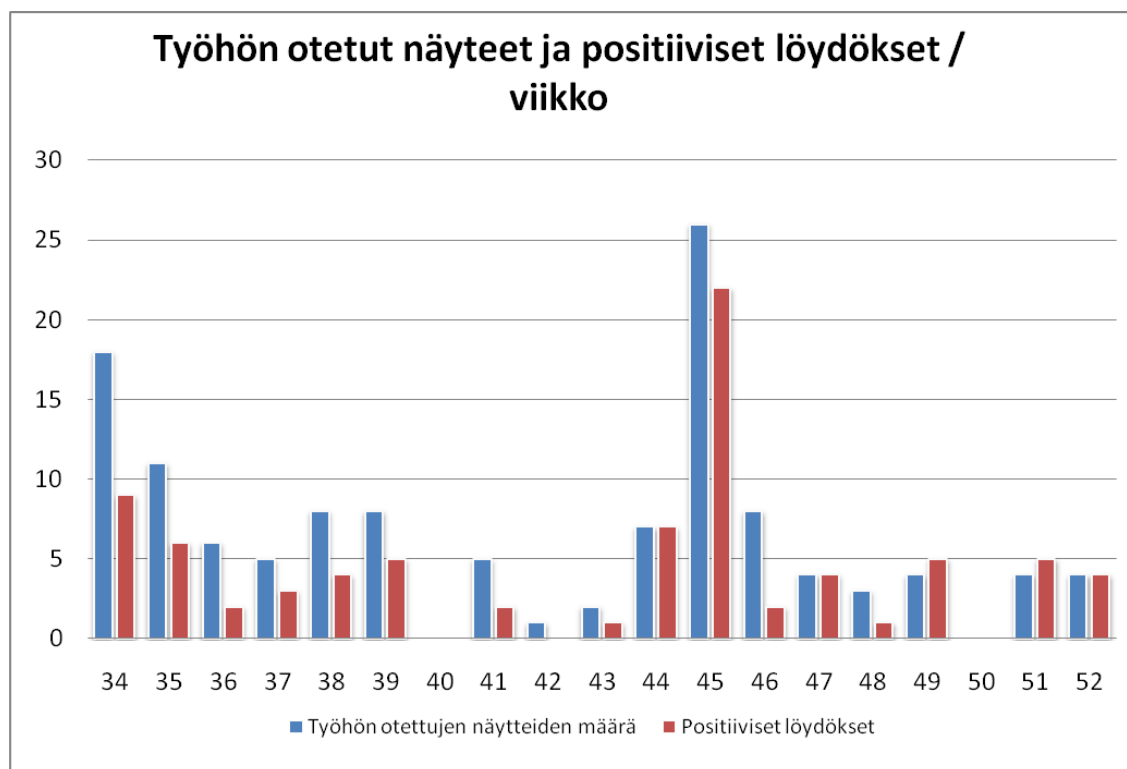
Rinnakkaisinfektioposiitivisten näytteiden tuloksia tarkastellessa huomattiin, että 11 näytteen kohdalla näyte osoittautui toisen viruksen suhteen vain heikosti positiiviseksi. Turun virusopin diagnostiikkapalvelussa näytteitä tarkastellessa Seeplex – testillä positiivisen tuloksen rajana pidetään 4:n lukemaa. Tämän perusteella voidaan sanoa alle 10 lukemalla kaksoisinfektioiksi todettujen näytteiden olevan heikkoja positiivisia alhaisen lukeman antaneiden virusten suhteen.

Vahvan positiivisen ja heikon positiivisen tuloksen antanut PCR-reaktiossa monistettu DNA sijoittuu geelillä suunnilleen samalle korkeudelle. Koska rinnakkaisinfektioissa yksi positiivisesta vastauksesta on selvästi heikompi, ilmiölle voi olla selityksenä se, että toisen viruksen suurella DNA-määrällä on mahdollinen vaikutus geelillä kulkeutumiselle, mikä näkyy ”jälkenä” toisen lähellä olevan tai toisella geelillä samoille lukemille jäävänä heikkona tuloksena.

Tosin rinnakkaisinfektioiksi osoittautuneista näytteistä kolmesta on tullut selkeästi kaksoisinfektiotapaukset kummankin viruksen vahvasta tuloksesta päätellen.

Yhdessä kaksoisinfektiotapauksessa kummankin viruksen kohdalla tulos jäi heikoksi. Siitä huolimatta tapaus voidaan silti pitää kummankin viruksen suhteen positiivisena.

Viidestä rinnakkaiseksi infektioksi osoittautuneista näytteistä tehtiin Seeplex-kitin PCR-reaktio uudestaan. Tässä varmistukseksi tehdyssä reaktiossa näytteet osoittautuivat lähes samoilla lukemilla kaksoisinfektioiksi. Joten voidaan sanoa, että rinnakkaisinfektiotulokset ovat paikkaansa pitäviä ja mikäli toinen heikompi positiivinen tulos on vahvemaksi lukemaksi muodostuvan viruksen vaikutusta, niin ilmiö on myös paikkansapitävä ja toistuu rinnakkaisessa reaktiossa.

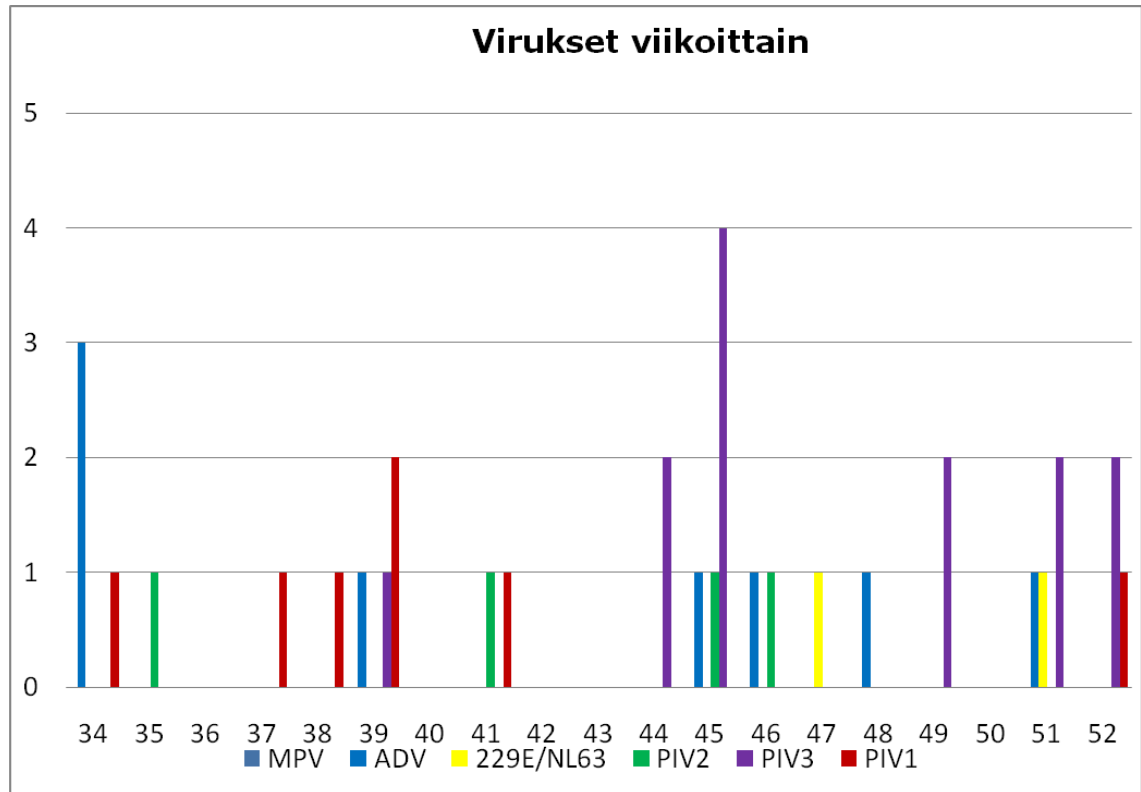


Kuva 30 Työhön otettujen näytteiden määrä viikkoa kohden

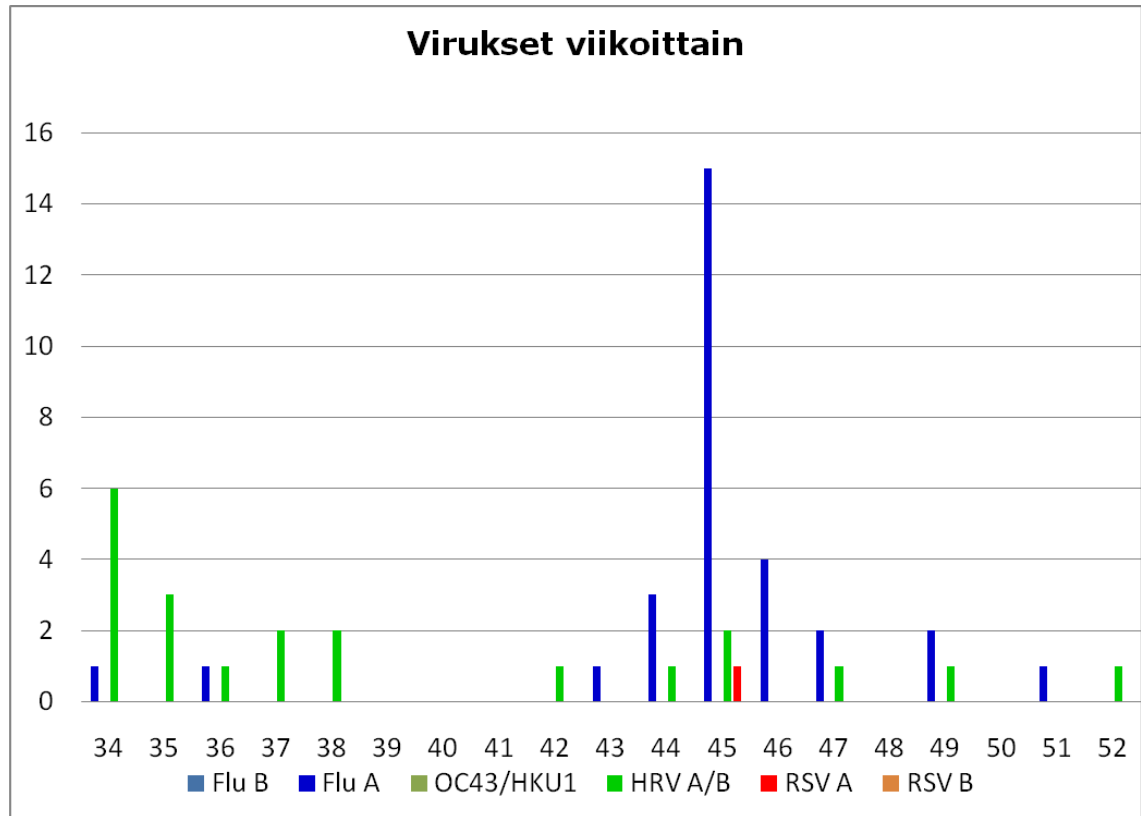
Tulokset ja näytemäärän jakaumia eri asioiden suhteen tarkastettiin myös graafisessa muodossa (Kuva 30). Työhön otettujen näytteiden määrässä heijastuu myös influenssa-tutkimukseen saapuvien näytteiden suuruusluokkien kehitys 16.8.09 - 31.12.09. Tarkistettuun näytemäärään nojaten voidaan sanoa, että epidemian piikki ajoittui viikolle 45, jolloin myös positiivisten löydösten määrä oli suurimmillaan. Viikolla 45 positiivisiksi todettujen näytteiden osuus työhön otettujen näytteiden koko määrästä on 26,8 %. Myös epidemian alkuvaiheessa näkyy selvää yhdenmukaisuutta näytemäärän ja positiivisten löydösten välillä. Viikoilla 38 ja 39 huomataan olleen pieni piikki näytemäärissä. Samanaikaisesti testissä positiivisiksi todettujen näytteiden lukumäärä on muodostunut kahta edeltävää ja neljää seuraavaa viikkoa korkeammaksi. Viikoilla 44, 47 ja 52 tarkistettujen näytteiden määrä sekä positiivisten löydösten määrä ovat lähes samoja.

Kun satunnaisesti otettujen näytteiden joukosta kaikki näytteet osoittautuvat jonkun viruksen suhteen positiivisiksi voidaan todeta, että epidemian vaikutus näkyy silloin selvimmin. Vaikka kylmänä vuodeaika virusinfektioita esiintyy enemmän, tieteellisesti kylmän ei ole todistettu altistavan infektiolle. Rinnakkaisinfektioiden esiintymiselle selityksenä voi olla se, että väestössä oli jo ennestään runsaasti muita viruksia ennen influenssaepidemian puhkeamista.

Tarkastettuna aikavälinä tilastollisesti RS-virusta olisi pitänyt esiintyä enemmän. Vaikuttaa siltä, että influenssan esiintyminen siirsi RSV:n leviämistä ajallisesti eteenpäin. Tämä johtui mahdollisesti interferenssi-ilmiöstä. Muutoin terveillä ihmisillä virusinfektio laukaisee interferonivasteen, jonka aikana uuden virusinfektion saaminen saattaa estyä. Tämä on osittain ristiriidassa kaksoisinfektioiden esiintymisen kanssa. Tosin herkillä PCR-menetelmillä kaksos- tai moni-infektioita löytyy paljon aiempaa enemmän ja ilmiötä tutkitaan nyt runsaasti (Matti Waris, 8.9.2011).

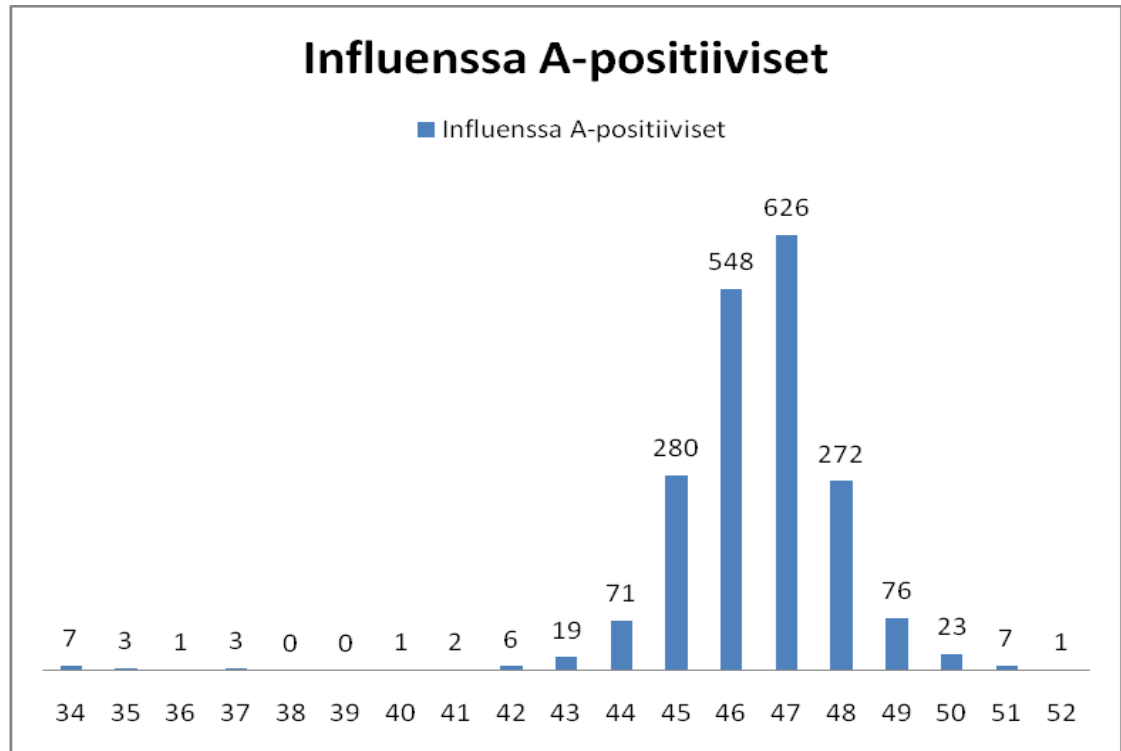


Kuva 31 Positiivisten löydösten jakautuminen viikoittain



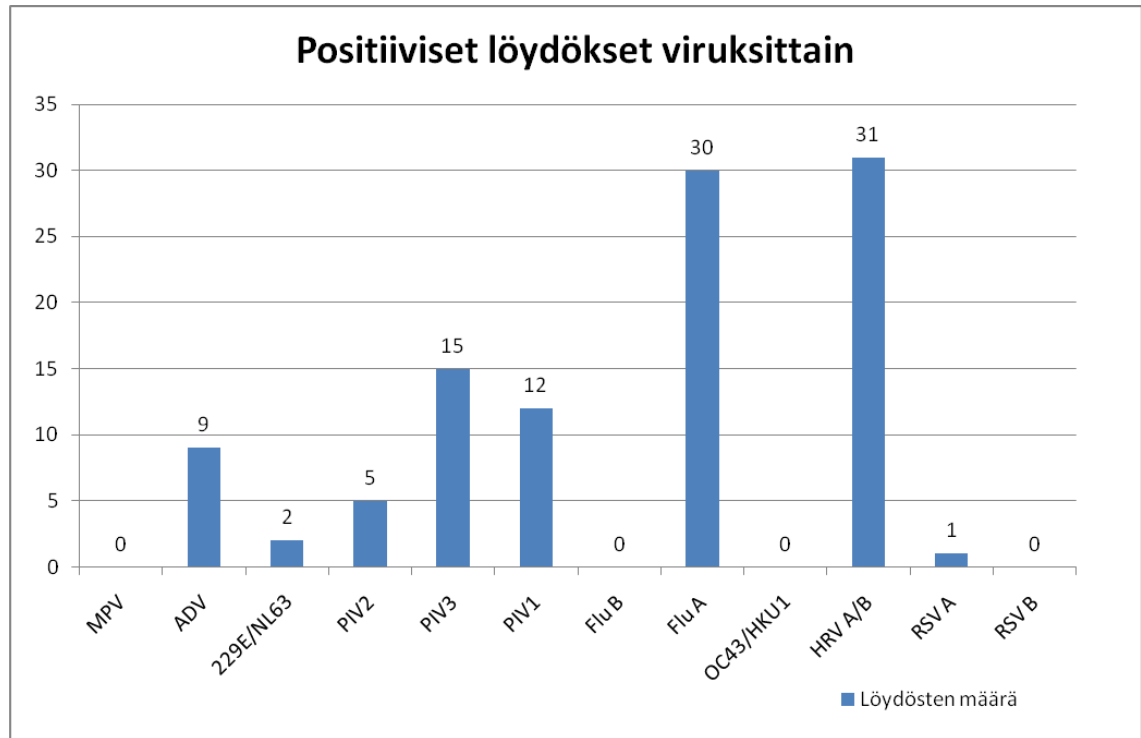
Kuva 32 Positiivisten löydösten jakautuminen viikoittain

Epidemian kehityksessä näkyy, että Influenssa A ja pandeemisen H1N1-viruksen lisäksi samanaikaisesti aktiivisesti leviäviä vuonna 2009 Turun seudulla alle 12-vuotiaiden keskuudessa olivat parainfluenssaviruksen tyypit 1, 2 ja 3 (PIV) sekä rinovirukset (HRV A/B). Myös adenovirus (ADV) on epidemiaa aiheuttavien influenssavirusten kanssa samanaikaisesti liikkeellä olevien virusten joukossa pitkin tarkisteluajaksoa. Tosin syksyn alkuvaiheessa positiivisten löydösten piikin muodostavat lähes yksinomaan adeno- ja rinovirukset.



Kuva 33 Influenssa A-positiiviset näytteet yhteensä. Turun virusopin diagnostiikassa syksyllä 2009 (tulokset Turun virusopin arkistoista).

Virusopin laboratoriossa todettujen influenssa A-viruspositiivisten näytteiden kokonaismääriä tarkasteltaessa huomataan, että koko väestöä koskeva epidemian piikki ajoittuu viikoille 46 ja 47 toisin, kuin työssä tarkasteltujen alle 12 vuotiaiden lasten kohdalla. Selityksenä asialle voi olla rokotusten aloittaminen, joita annettiin ensiksi riskiryhmille, joihin lapset luetaan mukaan.



Kuva 34 Positiivisten löydösten määrä viruksittain

Työssä tarkiastettujen näytteiden positiivisten löydösten joukossa influenssa A-viruksen rinnalle nousee rinovirus (HRV A/B). Tosin näiden virusten ajallisessa jakutumisessa tarkisteluajakson aikana on eroja. Rinovirusten piikki sijoittuu loppukesään ja alkusyksyyn, vaikka positiivisia rinoviruslöytöjä oli ollut pitkin syksyä alkutalveen asti näytemääriä seuraten.

Influenssa A-positiivisiksi todettujen näytteiden piikki sijoittuu viikolle 45 ja muodostaa 73,3 % työhön otettujen näytteiden influenssa A-positiivisiksi todettujen määrästä.

Taulukko 19 Työhön otettujen näytteiden ikäjakauma.

Syntymävuosi	Määrä (kpl)
1997	12
1998	6
1999	6
2000	5
2001	6
2002	12
2003	11
2004	6
2005	5
2006	7
2007	17
2008	20
2009	3

Tarkastelujoukon suurimmiksi ryhmiksi muodostuvat 1-, 2-, 7-, 12- ja 6-vuotiaat. Kun suurimmiksi muodostuvia ikäryhmiä tarkistellaan, huomataan, että eniten respiratorisille infektioille altistuvat ryhmät muodostavat pienet lapset (alle 2 vuotiaat), juuri koulun tai esikoulun aloittavat lapset sekä murrosikään siirtyvät lapset. Kaikkien kolmen ryhmän voidaan ajatella kuuluvan erityiseen riskiryhmään. Alle 2 vuotiaat ovat vielä heikon immunitetin takia altistuneita taudeille. Koulun aloittavat altistuvat infektioitaudeille lisääntyneen sosiaalisen kanssa käymisen myötä. Murrosikäisten lasten elimistö voi olla alttiimpi infektioille elimistössä tapahtuvien muutosten takia.

4 Päätelmät

Tässä työssä onnistuttiin optimoimaan reaaliaikainen PCR-menetelmä influenssa A-, influenssa A/H1N1- ja RS-viruksille. Influenssa B-viruksen sisällyttäminen reaktioon jouduttiin jättämään pois reaktiotehokkuuden laskemisen takia.

Lisäksi työssä onnistuttiin kehittämään optimoitua PCR-menetelmää varten standardimolekyylit influenssa (H3N2)A-virukselle ja influenssa A /H1N1-virukselle. Influenssa A- viruksen M-geeni ja influenssa A/H1N1-viruksen H-geeni eristettiin itse suunniteltujen alukkeiden avulla PCR-reaktiossa ja kloonattiin ne pCR TOPO 4-plasmidiin. Standardimolekyylien oikeellisuuden ja puhtauden varmistamiseksi yhdistelmä-DNA-plasmidit kasvatettiin *E.colissa* . Oikeanlaiset kloonit seulottiin x-gal/IPTG-menetelmällä ja monistettujen plasmidien sekvensoitiin ja testattiin niiden toimivuus PCR-reaktiossa.

Työssä analysoitiin myös influenssa A/H1N1-kannalta riskiryhmään kuuluvien potilaiden näytteitä 12 muun respiratorisen viruksen suhteen tarkoituksena ilmentää mahdolliset muut infektiota aiheuttaneet taudinaiheuttajat. Tämän lisäksi haluttiin seurata influenssa A/H1N1-epidemian kulkua ja arvioida saatuja viruslöydöksiä suhteessa influenssaepidemiaan.

Vertaillessa saadut tulokset vastaavanlaisen tutkimuksen (Eurosurveilanse 2009) tuloksiin influenssa A(H1N1)2009v-epidemian ajoilta, huomataan, että tietyiltä osin tuloksissa näkyy sama trendi. Kyseisessä tutkimuksessa oli tutkittu 79 potilasnäytettä, näyteotoksen ikäjakauma oli 1-75 vuotta. Näytteet oli otettu aikavälillä 24.4.–10.6.2009 Länsi-Götanmaan läänin alueelta Ruotsissa. Tutkimukseen valittiin hengitystieinfektion oireita potevia potilaita. Yllä mainitussa tutkimuksessa ylivoimaisesti suurin positiivisten viruslöydösten ryhmä on rhinoviruslöydöt. Tutkimuksessa tarkastettujen näytteiden joukossa (ks. Taulukko 20) tilanne RS-viruksen suhteen on lähes samanlainen kuin tämänkin työn tuloksista käy ilmi. Tämä voi olla todisteena olettamukselle interferenssi-ilmiöstä. Lisäksi selvä on, että ennen influenssa A(H1N1)2009v-epidemian puhkeamista muiden hengitystieinfektioita aiheuttavien virusten määrä väestössä oli runsas myös Eurooppa-laajuisesti tarkastettuna.

Taudinaiheuttaja	Kappalemäärä	Prosentteina
Rhinovirus	28*	34
Coronavirus	8	10
Influenssa B	3	4
Parainfluenssavirukset (1-3)	3	4
Adenovirus	2*	2
Influenssa A(H1N1)v	4	5
Metapneumovirus	1*	1
Enterovirus	1*	1
Respiratory syncytial virus (RSV)	0	0
Mycoplasma pneumoniae, Chlamydia pneumoniae	0	0
Negatiiviset	32	39
Yhteensä	82*	100

Taulukko 20 Follinin tutkimuksessa ilmennetyt viruslöydöt

Taudinaiheuttaja	Kappalemäärä
Metapneumovirus	0
Adenovirus	9
229E/NL63	2
PIV2	5
PIV3	15
PIV1	12
Influenssa B	0
Influenssa A	30
OC43/HKU1	0
Rhinovirus	31
Respiratory syncytial virus (RSV)	1
Negatiiviset	19
Yhteensä	124

Taulukko 21 Tässä työssä tarkastettujen näytteiden Seeplex-testillä ilmentämät virukset

LÄHTEET

Huovinen, P.; Meeri, S. & Peltola, H. 2003. Mikrobiologia ja infektioaudit. 1., Helsinki: Duodecim.

Follin, P., Lindqvist, A., Nyström, K., Lindh, M. 2009. A variety of respiratory viruses found in symptomatic travelers returning from countries with ongoing spread of the new influenza A(H1N1)v virus strain. Eurosurveillance 1- 2.

Invitrogen 2011. TOPO TA Cloning. Viitattu 17.09.2011
http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/topotaseq_man.pdf

Garten, R.J., Davis, C.T., Russell, C.A., Shu, B., Lindstrom, S., Balish, A., Sessions, W.M., Xu, X., Skepner, E., Deyde, V. 2009. Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. Science 325, 197-201.

Michaelis, M.; Doerr, H.-W. & Cinatl, J.-Jr. 2009. Novel swine-origin influenza A virus in humans: another pandemic knocking at the door. Med Microbiol Immunol (2009) 198; 175-183.

Mooser Woo, T. 2010. 2009 H1N1 Influenza Pandemic. Journal of Pediatric Health Care Vol. 24 No.4, 258-266.

Plasmid Proessor. 1996. T. Kivirauma, P.Oikari, J. Saarela. Department of Biotechnology, University of Kuopio, Finland.

Seegene 2011. DPO™ Tehnology. Viitattu 8.4.2011
http://www.seegene.com/en/research/core_020.php

Suominen, I.; Ollikka, P. 1997. Yhdistelmä-DNA-tekniikan perusteet. Helsinki: opetushallitus

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

Influenssa A-viruksen standardisuunnittelukanta

GenBank: GQ369932.1

Influenza A virus (A/Tennessee/02/2008(H3N2)) segment 7 matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds

>gi|253740870|gb|GQ369932.1| Influenza A virus (A/Tennessee/02/2008(H3N2)) segment 7 matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes, complete cds

```
ATGAGCCTTCTAACCAGAGGTCGAAAACGTATGTTCTCTCTATCGTTCCATCAGGCCCCCTCAAAGCCGAGA
TCGCGCAGAGACTTGAAGATGTCTTTGCTGGGAAAAACACAGATCTTGAGGCTCTCATGGAATGGCTAAA
GACAAGACCAATTCTGTCACCTCTGACTAAGGGGATTTTGGGGTTTGTGTTACGCTCACCGTGCCAGT
GAGCGAGGACTGCAGCGTAGACGCTTTGTCCAAAATGCCCTCAATGGGAATGGAGACCCAAATAACATGG
ACAAAGCAGTTAACTGTATAGGAACTTAAGAGGGAGATAACGTTCCATGGGGCCAAAGAAATAGCTCT
CAGTTATTCTGCTGGTGCACCTTGCCAGTTGCATGGGCCTCATATACAATAGGATGGGGGCTGTAACCACT
GAAGTGGCATTGGCCTGGTATGTGCAACATGTGAGCAGATTGCTGACTCCCAGCACAGGTCTCATAGGC
AGATGGTGGCAACAACCAATCCATTAATAAAAACATGAGAACAGAATGGTTTTGGCCAGCACTACAGCTAA
GGCTATGGAGCAAATGGCTGGATCAAGTGAACAGGCAGCGGAGGCCATGGAGATTGCTAGTCAAGCCAGG
CAGATGGTGCAGGCAATGAGAGCCATTGGGACTCATCCTAGTTCCAGTACTGGTCTAAGAGATGATCTTC
TTGAAAATTTGCAGACCTATCAGAAACGAATGGGGGTGCAGATGCAACGATTCAAGTGACCCGCTTGTG
TTGCCGCGAATATCATTGGGATCTTGCACTTGATATTGTGGATTCTTGATCGTCTTTTTTCAAATGCGT
CTATCGACTCTTCAAACACGGCCTTAAAAGAGGCCCTTCTACGGAAGGAGTACCTGAGTCTATGAGGGAA
GAATATCGAAAGGAACAGCAGAATGCTGTGGATGCTGACGACAGTCATTTTGTGAGCATAGAGTTGGAGT
```

Influenza A/H1N1-viruksen standardisuunnittelukanta

Influenza A virus (A/Sao Paulo/57831/2009(H1N1)) segment 4 hemagglutinin (HA) gene, complete cds

>gi|258599148|gb|GQ915025.1| Influenza A virus (A/Sao Paulo/57831/2009(H1N1)) segment 4 hemagglutinin (HA) gene, complete cds

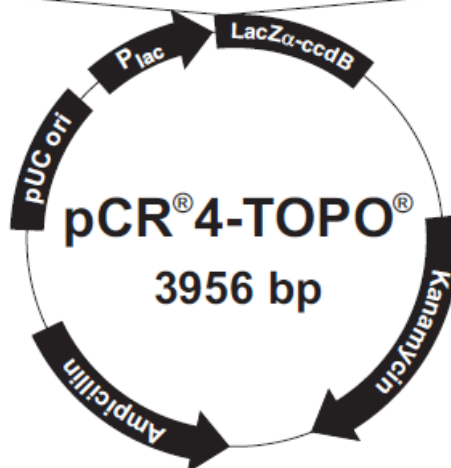
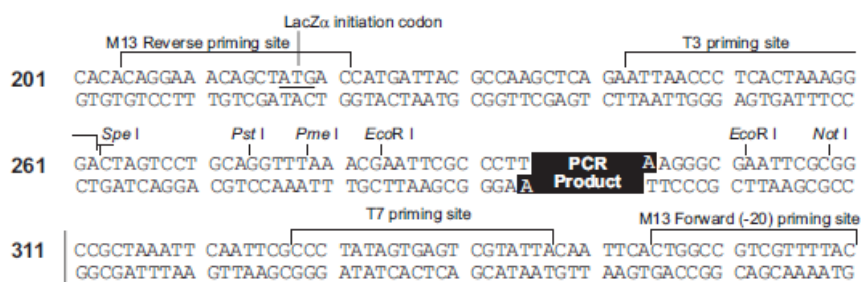
```
ATGGAGGCAACTACTAGTAGTTCTGCTATATACATTTGCAACCGCAAATGCAGACACATTATGTATAGGTT
ATCATGCGAACCAATTC AACAGACACTGTAGACACAGTACTAGAAAAGAATGTAACAGTAACACACTCTGT
TAACCTTCTAGAAGACAAGCATAACGGGAACTATGCAAATAAGAGGGGTAGCCCCATTGCATTTGGGT
AAATGTAACATTGCTGGCTGGATCCTGGGAAATCCAGAGTGTGAATCACTCTCCACAGCAAGCTCATGGT
CCTACATTGTGGAACATCTAGTTCAGACAATGGAACGTGTTACCCAGGAGATTTTCATCGATTATGAGGA
GCTAAGAGAGCAATTGAGCTCAGTGTATCATTTGAAAGGTTTGAGATATCCCAAGACAAGTTCATGG
CCCAATCATGACTCGAACAAAGGTGAACGGCAGCATGTCCTCATGCTGGAGCAAAAAGCTTCTACAAAA
ATTTAATATGGCTAGTAAAAAAGGAAATTCATACCCAAAGCTCAGCAAATCCTACATTAATGATAAAGG
GAAAGAAGTCCCTCGTGTATGGGGCATTACCATCCATCTACTAGTGTGACCAACAAGTCTCTATCAG
AATGCAGATGCATATGTTTTGTGGGGTCATCAAGATACAGCAAGAAGTTCAAGCCGGAATAGCAATAA
GACCCAAAGTGAGGGATCAAGAAGGGAGAATGAACTATTACTGGACACTAGTAGAGCCGGGAGACAAAAT
AACATTCGAAGCAACTGGAAATCTAGTGGTACCCGAGATATGCATTCGCAATGGAAAGAAATGCTGGATCT
GGTATTATCATTTTCAGATACACCAAGTCCACGATTGCAATACAACCTGTCAGACACCCAAAGGGTGTATAA
ACACCAGCCTCCCATTTTCATAATATACATCCGATCACAATTGGAAAATGTCCAAAATATGTA AAAAGCAC
AAAATTGAGACTGGCCACAGGATTGAGGAATGTCCCGTCTATTCAATCTAGAGGCCTATTTGGGGCCATT
GCCGGTTTCATTGAAGGGGGGTGGACAGGGATGGTAGATGGATGGTACGGTTATCACCATCAAATGAGC
AGGGGTGAGGATATGCAGCCGACCTGAAGAGCACACAGAATGCCATTGACGAGATTACTAACAAAAGTAA
TTCTGTTATTGAAAAGATGAATACACAGTTCACAGCAGTAGGTAAGAGTTCAACCACTGGAAAAAAGA
ATAGAGAATTTAAATAAAAAAGTTGATGATGGTTTCTGGACATTTGGACTTACAATGCCGAACTGTTGG
TTCTATTGAAAATGAAAGAATTTGGACTACCAGATTCAAATGTGAAGAATTATGAAAAGGTAAG
AAGCCAGTTAAAAACAATGCCAAGGAAATGGAAACGGCTGCTTTGAATTTTACCACAAATGCGATAAC
ACGTGCATGGAAAGTGTCAAAAATGGGACTTATGACTACCCAAAATACTCAGAGGAAGCAAAAATTAACA
GAGAAGAAATAGATGGGGTAAAGCTGGAATCAACAAGGATTTACCAGATTTTGGCGATCTATTCAACTGT
CGCCAGTTCATTGGTACTGGTAGTCTCCCTGGGGCAATCAGTTTCTGGATGTGCTCTAATGGGTCTCTA
CAGTGTAGAATATGTATTTAA
```

GGCGATCTATTCAACTGTGCCAG

pCR4 TOPO-plasmidivektori

Map of pCR[®]4-TOPO[®]

pCR[®]4-TOPO[®] Map The map below shows the features of pCR[®]4-TOPO[®] and the sequence surrounding the TOPO[®] Cloning site. Restriction sites are labeled to indicate the actual cleavage site. The complete sequence of pCR[®]4-TOPO[®] is available for downloading from our Web site (www.invitrogen.com) or by contacting Technical Service (page 27).



Comments for pCR[®]4-TOPO[®]
3956 nucleotides

lac promoter region: bases 2-216
CAP binding site: bases 95-132
RNA polymerase binding site: bases 133-178

Lac repressor binding site: bases 179-199
Start of transcription: base 179
M13 Reverse priming site: bases 205-221
LacZα-*ccdB* gene fusion: bases 217-810
LacZα portion of fusion: bases 217-497
ccdB portion of fusion: bases 508-810
T3 priming site: bases 243-262
TOPO[®] Cloning site: bases 294-295
T7 priming site: bases 328-347
M13 Forward (-20) priming site: bases 355-370
Kanamycin promoter: bases 1021-1070
Kanamycin resistance gene: bases 1159-1953
Ampicillin (*bla*) resistance gene: bases 2203-3063 (c)
Ampicillin (*bla*) promoter: bases 3064-3160 (c)
pUC origin: bases 3161-3834
(c) = complementary strand

(Invitrogene 2011)

Sekvensointireaktion reaktioseokset

Näyte	Määrä(μl)	Aluke μl	Määrä(μl)	Vesi (μl)
M2	2,3	M 13 R	3,7	
M2	2,3	M13 F	3,7	
M2	2,3	F900	1	2,7
M3	2,4	M 13 R	3,6	
M3	2,4	M13 F	3,6	
M3	2,4	F900	1	2,6
H13	3,8	M 13 R	2,2	
H13	3,8	M13 F	2,2	
H13	3,8	HF	1	1,2
H17	4,5	M 13 R	1,5	
H17	4,5	M13 F	1,5	
H17	4,5	HF	1	0,5

Jokaisen reaktion lopullinen tilavuus oli 6μl.

M-geenin sekvenssi pCR4 TOPO vektorissa M13R-alukkeella

>BTK06340004(c)EBR(t)M3(p)M13R(s)091104ORSEQ1.026.ab1

TWTCYWGATTACCTCACTAAAGGGACTAGTCCTGCAGGTTTAAAC-
G**AATTCGCCCTT****ACTGTCGTCAGCATCCACAG**CAC

TCTGCTGTTCCCTTTTCGATATTCTTCCCTCATAGACTTTGGCACTCCTTCCGTA-
GAAGGCCCTCCTTTCAGTCCGTATTTA

AAGCGACGGTAAATGCATTTGAAAAAAGACGATCAAGAATCCACAATGTCAAGTGCAA-
GATCCCAATGATATTTGCGGC

AATAGTGAGAGGATCACTTGAACCGTTGCATCTGCACCCCCATTGTTTCTGA-
TAGGCCTGCAAATTTTCAAGAAGATCA

TTTTTCAGACCAGCACTGGAGCTAGGATGAGTCCCAATGGTTCTCATCGCTTGAC-
CATTGTCTAGCCTGACTAGCAAC

CTCCATGGCCTCTGCTGCTTGCTCACTTGATCCAGCCATTTGCTCCA-
TAGCCTTAGCTGTAGTGCTGGCTAAAACCATTC

TGTTCTCATGTCTGATTAGTGGATTGGTTGTTGTCAACATTTGCCTATGAGACC-
GATGCTGGGAGTCAGCAATCTGTTCA

CAGGTTGCACATACCAGGCCAAATGCCACTTCAGTGGTCACAGCCCCATCCTGTTGTA-
TATGAGGCCCATACAACCTGGC

AAGTGCACCAGCAGAATAACTGAGTGAGATTTCTTTGGCCCCATG-
GAATGTTATCTCCCTCTTGAGCTTCCTATACAGTT

TAAGTCTTTGTCCATGTTATTTGGATCCCCGTTCCCATTAAGGGCATTTTGA-
CAAAGCGTCTACGCTGCAGTCCTCGC

TCACTGGGCACGGTGAGCGTGAACACAAATCCTAAAATCCCCTTAGTCAGAGGTGACAG-
GATTGGTCTTGTCTTTAGCCA

TTCCATGAGAACCTCAAGATCGGTGTTCTTCCCTGCAAAGA-
CATCTT**CAAGTCTCTGCGCGATCTC****AAGGGCG**AATTCGC

GGGCGCTAAATTC AATTTCGCCTAWAGTGAGTCGTAWTAMAATTC ACTGGGCGTCGTTA-
CAACGTCGTGACTGGGAAAACC

CTGGCGTTACAATAATCGCTTGSAGAMATTCTCCTTCGCCAGCTKGCGTAWARCGA-
GAAGGGCCGCACCGATTGCTTCA

CAGTTGGCAGCTAYGGTACGCAGTTAAGGTTACACTAAAA-
GATGCTWCCGTTGAGTTCACGTATAATG

AATTCGCCCTT Alue Eco R I-leikkauskohdasta inserttiin

5'-**ACTGTCGTCAGCATCCACAG**-3' Inf A M R 889-alukkeen sekvenssi

5'-**CAAGTCTCTGCGCGATCTC**-3' Inf A M F889-alukkeen käänteinen sekvenssi

Näyte H13. H-geenin sekvenssi M13F-alukeella

>BTK06340014(c)EBR(t)H13(p)M13F(s)091104ORSEQ1.031.ab1

TAWAGTWWGGGCGATTGATTTAGCGGCCGCGAATTCGCCCTT CATT CGAAG-
CAACTGGAAATCTAGTGGTACCGAGATAT

GCATT CGCAATGGAAAGAAATGCTGGATCTGGTATTATCATTTCAGATACACCAGTCCAC-
GATTGCAATACAACCTTGCA

GACACCCAAGGGTGCTATAAACACCAGCCTCCCATTT CAGAATATACATCCGATCA-
CAATTGGAAAATGTCCAAAATATG

TAAAAAGCACAAAATTGAGACTGGCCACAGGATTGAGGAATGTCCCGTCTATTCAATCTA-
GAGGCCATTTGGGGCCATT

GCCGGTTTCATTGAAGGGGGGTGGACAGGGATGGTAGATGGATGGTACGGTTATCAC-
CATCAAATGAGCAGGGGTCAGG

ATATGCAGCCGACCTGAAGAGCACACAGAATGCCATTGACGAGATTACTAACAAAG-
TAAATTCTGTTATTGAAAAGATGA

ATACACAGTTCACAGCAGTAGGTAAAGAGTTCAACCACCTGGAAAAAGAATAGAGAATT-
TAAATAAAAAAGTTGGTGAT

GGTTTCCTGGACATTTGGACTTACAATGCCGAAGTGTGGTTCTATTGGAAAATGAAA-
GAACTTTGGACTACCACGATTC

AAATGTGAAGAACTTATATGAAAAGGTAAGAAACCAGTTAAAAACAATGCCAAG-
GAAATTGGAAACGGCTGCTTTGAAT

TTTACCACAAATGCGATAACACGTGCATGGAAAGTGTCAAAAATGGGACTTATGACTACC-
CAAAATACTCAGAGGAAGCA

AAATTAACAGAGAAGAAATAGATGGGGTAAAGCTGGAATCAACAAGGATTTACCA-
GATTTTGGCGATCTATTCAACTGT

CGCCAGTTCATTGGTACTGGTAGTCTCCCTGGGGGCAAT-
CAGTTCTGGATGTGCTCTAATGGGAAGGGCGAATTCGTTAA

ACCTGCAGACTAGTCCCTTAGTGRAGGGTAATTCTGAGCTGGCGTAWCATGGTCA-
WAGCTGTTTCCTGKGTGAATGKTAT

CCGCTCACATTCCMMMCAAMATACGAGTCGGAAGMATAAG-
TAAGCCTGGGGTGCCTAWRGTGAGCTAYCCATAATGSGTT

GCTMTGCGCGTCATCGGAACCCTTGCATGCTATGAATGCACMCGGAGC

AATTCGCCCTT 1196 bp:n emäksestä lähtevä alue H-geeni-insertin jälkeen

5'-CATT CGAAGCAACTGGAAATC -3' H1N1 H F-aluke

3'- TTCTGGATGTGCTCTAATGGG -5' H1N1 H R-alukkeeseen käänteinen sekvenssi

AAGGGCG 287-294 bp:n alue yhdistelmä-DNA-plasmidissa

Näyte H₁₃. H-geenin sekvenssi M13R-alukkeella (jatkuu)

>BTK06340006(c)EBR(t)H13(p)M13R(s)091104ORSEQ1.027.ab1

CYCCAGATTACCCTCACTAAAGGGACTAGTCCTGCAGGTTAAAC-
GAATTCGCCCTTCCCATTAGAGCACATCCAGAAACTGATTGCCCCCAGGGAGACTACCAGTACCAATGAACTGGCGACAGTTGAATA-
GATCGCCAAAATCTGGTAAATCCTTGTTGATTCCAGCTTTACCCCATCTATTTCTTCTCTGTTTAATTTTGCTTCCTCTGAG-
TATTTTGGGTAGTCATAAGTCCCATTTTTGACACTTTCCATGCACGTGTTATCGCATTGTGGTAAAATTCAAAG-
CAGCCGTTCCAATTTCTTGGCATTGTTTTTTAACTGGTTTCTTACCTTTTCATATAAGTTCTTCA-
CATTTGAATCGTGGTAGTCCAAAGTTCTTTCATTTTCCAATAGAACCAACAGTTCGGCATTGTAAGTCCAAATGTCCAGGAAACCATCACCAACTTTTTTATT-
TAAATTCTCTATTCTTTTTTCCAGGTGGTTGAACTCTTACCTACTGCTGTGAACTGTGTATTCATCTTTTCAATAACA-
GAATTTACTTTGTTAGTAATCTCGTCAATGGCATTCTGTGTGCTCTTCAGGTCGGCTGCA-
TATCCTGACCCCTGSTCATTGATGGTGATAACCGTACCATCCATCTACCATCCCTGTCCACCCCCCTTCAATGAAACCGGSAATGGCCCCAAA-
TAGGCCTCTAGATTGAATAGACGGGACATTCCTCAATCCTGTGGCCAGTCTCAATTTTGTGCTTTTTACATATTTTGA-
CATTTTCCAATTGTGATCGGATGTATATTCTGAAATGGGAGGCTGGTGTATATAGCACCCCTGGGTGTCTGA-
CAAGTTGTATTGCAATCGTGGACTGGTGTATCTGAAATGATAATACCAGATCCAGCATTCTTTCCATTGCGAATGCATATCTCGGTACCACTA-
GATTCCAGTTGCTTCAATGAAGGGCGAATTTCGCGGCCGCTAAATTCAATTCGCCCTWWAGT-
GAGTCGTATTWMMATTCMCTGGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCCTGGCGTTWCCCMACCTAWTCGCCTTGSAGCACA-
TYCCCTTCKTCAGCTGSGTAWTAGCGAGAGGACCGCACCGATYGCCCTTYCAACAGTGSKCAGCTTATACGTACGGCAGTTAAGTTA-
CACTATAAAGAGAGAGAGCC

GTWTCGCTYCKCTGATA

AATTCGCCCTT alue Eco R I:n leikkauskohdasta inserttiin

5'- CCCATTAGAGCACATCCAGAA-3' H1N1 H R-alue

Näyte H₁₃. H-geenin sekvenssi M13R-alukkeella (jatkuu)

3'-GATTCCAGTTGCTTCGAATG-5' H1N1 H F-alukkeen käänteinen sekvenssi
AAGGGCG plasmidin alue insertista Eco R I:in

Näyte H₁₇. H-geenin sekvenssi M13R-alukkeella (jatkuu)

>BTK06340008(c)EBR(t)H17(p)M13R(s)091104ORSEQ1.028.ab1

CYRCATTACCTCACTAAAGGGACTAGTCCTGCAGGTTTAAACG**AATTCGCCCTT****CCCAT-**
TAGAGCACMTYCAGAAACTGA

TTGCCCCCAGGGAGACTACCAAGTACCAATGAACTGGCGACAGTTGAATA-
GATCGCCAAAATCTGGTAAATCCTTGTTGAT

TCCAGCTTTACCCCATCTATTTCTTCTCTGTTTAAATTTGCTTCCTCTGAG-
TATTTTGGGTAGTCATAAGTCCCATTTTT

GACACTTTCCATGCACGCGTTATCGCATTGTGGTAAAATTCAAAG-
CAGCCGTTTCCAATTTCTTGGCATTGTTTTTTA

ACTGGTTTCTTACCTTTTTCATATAAGTTCTTCA-
CATTTGAATCGTGGTAGTCCAAAGTTCTTTCATTTTCCAATAGAACC

AACAGTTCGGCATTGTAAGTCCAAATGTCCAGGAAACCATCATCAACTTTTTTATT-
TAAATTCTCTATTCTTTTTTCCAG

GTGGTTGAACTCTTACCTACTGCTGTGAACTGTGTATTCATCTTTTCAATAACAGAATT-
TACTTTGTTAGTAATCTCGT

CAATGGCATTCTGTGTGCTCTTCAGGTCGGCTGCA-
TATCCTGACCCCTGCTCATTTTGTGGTATAACCGTACCATCCA

TCTACCATCCCTGTCCACCCCTTCAATGAAACCGGCAATGGCCCCAAATAGGCCTCTA-
GATTGAATAGACGGGACATT

CCTCAATCCTGTGGCCAGTCTCAATTTTGTGCTTTTTACATATTTTGG-
CATTTTCCAATTGTGATCGGATGTATATTCT

GAAATGGGAGGCTGGTGTATATAGCACCTTGGGTGTCTGA-
CAAGTTGTATTGCAATCGTGGACTGGTGTATCTGAAATG

ATAATACCAGATCCAGCATTTCTTTCCATTGCGAATGCATATCTCGGTACCACTA-
GATTCCAGTTGCTTCAATG**AAGG**

GCGAATTCGCGGGCGCTAAATTCAATTCGCCCTAWTAGTGAGTCGTATTACAATT-
CACTGGGCCGTCGTTTTACAACGTC

GTGACTGGGAAAACCCTGCGTTACCMACCTTAATCGCCTTGCAGACATCCCCTTYGY-
CAGCTGCGTAATAGCGAAGCCGCA

CCGATCGCCCTTCCAMCAGTTGSCAGCTATMSGTACGCSAGGTTAGGATARCCTTA-
CAAAGAARTGCGSWATCCGTTG

GAGTACAGTGAATTGGAAAKC

AATTCGCCCTT alue Eco R I:n leikkauskohdasta inserttiin

5'-**CCCATTAGAGCACATCCAGAA**-3' H1N1 H R-aluke

3'-**GATTTCAGTTGCTTCAATG** -5' H1N1 H F-alukkeen käänteinen sekvenssi

Näyte H₁₇. H-geenin sekvenssi M13R-alukkeella (jatkuu)

AAGGCG plasmidin alue insertista Eco R I:in

Näyte H₁₃. H-geenin sekvenssi M13F-alukeella (jatkuu)

>BTK06340016(c)EBR(t)H17(p)M13F(s)091104ORSEQ1.032.ab1

TWCAWTGGGGCGATTGATTTAGCGGCCGCG **AATTCGCCCTT** **CATTCGAAG-CAACTGGAAATC** TAGTGGTWCCGAGATATG

CATTCGCAATGGAAAGAAATGCTGGATCTGGTATTATCATTTCAGATACACCAGTCCAC-
GATTGCAATACAACCTTGTCTAG

ACACCCAAGGGTGCTATAAACACCAGCCTCCCATTTCAGAATATACATCCGATCA-
CAATTGGAAAATGTCCAAAATATGT

AAAAAGCACAAAATTGAGACTGGCCACAGGATTGAGGAATGTCCCGTCTATTCAATCTA-
GAGGCCATTTGGGGCCATTG

CCGGTTTCATTGAAGGGGGGTGGACAGGGATGGTAGATGGATGGTACGGTTATCACCAT-
CAAAATGAGCAGGGGTCAGGA

TATGCAGCCGACCTGAAGAGCACACAGAATGCCATTGACGAGATTACTAACAAAG-
TAAATTCTGTTATTGAAAAGATGAA

TACACAGTTCACAGCAGTAGGTAAAGAGTTCAACCACCTGGAAAAAAGAATAGAGAATT-
TAAATAAAAAAGTTGATGATG

GTTTCCTGGACATTTGGACTTACAATGCCGAACCTGTTGGTTCTATTGGAAAATGAAA-
GAACTTTGGACTACCACGATTCA

AATGTGAAGAACTTATATGAAAAGGTAAGAAACCAGTTAAAAACAATGCCAAG-
GAAATTGGAAACGGCTGCTTTGAATT

TTACCACAAATGCGATAACCGCGTGCATGGAAAGTGTCAAAAATGGGACTTATGACTACC-
CAAAATACTCAGAGGAAGCAA

AATTAACAGAGAAGAAATAGATGGGGTAAAGCTGGAATCAACAAGGATTTACCA-
GATTTTGGCGATCTATTCAACTGTC

GCCAGTTCATTGGTACTGGTAGTCTCCCTGGGGGCAAT-
CAGT **TTCTGGATGTGCTCTAATGGG** **AAGGGCG** AATTTCGTTA

AACCTGCAGGACTAGTCCCTTTAGTGAGGGTAAATTCTGAGCTTGGCGTAATCATGGTCA-
TAGCTGTTTCCTGKKGTGAA

TTGTTATCCGSYCCACAATTCMMMMCMAMMATACGAGCGAGCATAATG-
TAAGCCTGGGGTGCTATGRTGAGCTACTCACA

TAATTGCGTTGGCTMTGGCCGSCTTYWRTCCGGAACGTCTGCACTGCATATGTAATCAG-
CAACRCACGAGGA

AATTCGCCCTT 1196 bp:n emäksestä lähtevä alue H-geeni-insertin jälkeen

5'-**CATTCGAAGCAACTGGAAATC**-3' H1N1 H F-aluke

3'- **TTCTGGATGTGCTCTAATGGG**-5' H1N1 H R-alukkeen käänteinen sekvenssi

Näyte H₁₃. H-geenin sekvenssi M13F-alukeella (jatkuu)

AAGGGCG 287-294 bp:n alue yhdistelmä-DNA-plasmidissa

Restriktioentsyymien katkaisukohdat influenssa A/H1N1-viruksen H-geenissä



Single cutters

[Help](#) [Comments](#)
[\[Back to main display\]](#)

H1N1 Hgene 902bp

Number of cuts = Sort order:

#	Enzyme	Specificity	Sites & flanks	Cut positions (blunt - 5' ext. - 3' ext.)
1	Acc65I	G [^] GTAC _^ C	list	*26/30
2	AcuI	CTGAAG (N) 14 _^ NN [^]	list	393/391
3	AflIII	A [^] CRYG _^ T	list	697/701
4	AluI	AG _^ CT	list	791
5	AlwI	GGATCNNNN [^] N _^	list	#71/72
6	AlwNI	CAG _^ NNN [^] CTG	list	883/880
7	BaeI	_^ (N) 5 [^] (N) 10ACNNNNGTAYC (N) 7 _^ (N) 5 [^]	list	76/71+109/104
8	BanI	G [^] GYRC _^ C	list	*26/30
9	BceAI	ACGGC (N) 12 [^] NN _^	list	*680/682
10	BsaAI	YAC _^ GTR	list	*700
11	BspCNI	CTCAG (N) 7 _^ NN [^]	list	759/757
12	BspQI	GCTCTTCN [^] NNN _^	list	369/372
13	BsrFI	R [^] CCGG _^ Y	list	*279/283
14	BstBI	TT [^] CG _^ AA	list	*4/6
15	BstXI	CCAN _^ NNNN [^] NTGG	list	848/844
16	BstYI	R [^] GATC _^ Y	list	63/67
17	CviAII	C [^] AT _^ G	list	704/706
18	DdeI	C [^] TNA _^ G	list	746/749
19	DraI	TTT _^ AAA	list	499
20	EaeI	Y [^] GGCC _^ R	list	220/224
21	EarI	CTCTTCN [^] NNN _^	list	369/372
22	EcoP15I	CAGCAG (N) 25 [^] NN _^	list	481/483
23	FatI	[^] CATG _^	list	703/707
24	HpaII	C [^] CG _^ G	list	*280/282
25	HphI	GGTGA (N) 7 _^ N [^]	list	324/323
26	HpyAV	CCTTC (N) 5 _^ N [^]	list	285/284
27	HpyCH4IV	A [^] CG _^ T	list	*699/701
28	KpnI	G _^ GTAC [^] C	list	30/26
29	MfeI	C [^] AATT _^ G	list	175/179
30	MscI	TGG _^ CCA	list	222
31	MspI	C [^] CG _^ G	list	280/282
32	NlaIII	_^ CATG [^]	list	707/703
33	NsiI	A _^ TGCA [^] T	list	41/37
34	PflMI	CCAN _^ NNN [^] NTGG	list	818/815

Restriktioentsyymien katkaisukohtat influenssa A/H1N1-viruksen H-geenissä (jatkuu)


<http://tools.neb.com/NEBcutter2/listbycuts.php?nam>

35	PmlI	CAC [^] GTG	<u>list</u>	*700
36	SapI	GCTCTTCN [^] NNN _^	<u>list</u>	369/372
37	Sau96I	G [^] GNC _^ C	<u>list</u>	271/274
38	StuI	AGG [^] CCT	<u>list</u>	262
39	SwaI	ATTT [^] AAAT	<u>list</u>	499
40	TaqI	T [^] CG _^ A	<u>list</u>	4/6
41	XbaI	T [^] CTAG _^ A	<u>list</u>	255/259

Restriktioentsyymien katkaisukohdat pCR4- TOPO-plasmidissa

LabLife - Vector Database Sequence - pCR4-TOPO <https://www.lablife.org/ct/a=viewvecseq&soId=6007/&view=>

Vector Database
Vector Database > pCR4-TOPO > Sequence

 pCR4-TOPO

Sequence | Map and Features | BLAST | Align | Digest | Translate

Last modified: 04/15/2008 08:43 EDT

Restriction Digest

See [list of enzymes](#) used for this page.

[All Cutters](#) | [Unique Cutters](#) | [Non-Cutters](#) | [Circular Digest \(all enzymes\)](#) | [Linear Digest \(all enzymes\)](#)

All cutters:

AccI	Cuts after 2502, 2875
AflII	Cuts after 292
ApaLI	Cuts after 617, 2943, 3517
ApoI	Cuts after 283, 301, 316, 321
Asel	Cuts after 47, 106, 2448
BclI	Cuts after 1128
Bme1580I	Cuts after 621, 1230, 1233, 1323, 1326, 2947, 3521
BsaHI	Cuts after 1039, 1287, 2813, 2816
BsiEI	Cuts after 311, 471, 1196, 2646, 2794, 2795, 3496, 3497, 3920, 3921
BsiWI	Cuts after 501
BspHI	Cuts after 2103, 3111
BsrGI	Cuts after 561
BtgI	Cuts after 1719
DraI	Cuts after 278, 2142, 2161, 2853
EaeI	Cuts after 36, 41, 308, 356, 361, 611, 707, 1183, 1367, 1758, 1763, 1785, 1790, 2664, 2669
EagI	Cuts after 308, 1193
EcoRI	Cuts after 283, 301
FspI	Cuts after 490, 1389, 2498
HaeIII	Cuts after 5, 1042, 1290, 3588, 3591
KasI	Cuts after 1038, 1286
MscI	Cuts after 613, 709, 1369
MspA1I	Cuts after 55, 440, 1033, 1393, 2911, 2912, 3248, 3249, 3493, 3494
NotI	Cuts after 1789
NarI	Cuts after 1039, 1287
NcoI	Cuts after 1719
NgoMIV	Cuts after 1787
NotI	Cuts after 308
NspI	Cuts after 1692, 3835
PciI	Cuts after 3831
PmeI	Cuts after 278
PstI	Cuts after 273
PvuI	Cuts after 471, 2646
PvuII	Cuts after 55, 440, 1033, 1393
SbfI	Cuts after 273
Scal	Cuts after 2756
SfcI	Cuts after 269, 330, 2517, 2522, 3375, 3380, 3566, 3571
SfoI	Cuts after 1040, 1288
SmlI	Cuts after 292, 1678, 1683, 2896, 2901, 3186, 3191, 3463, 3468, 3725, 3730
SnaBI	Cuts after 501
SpeI	Cuts after 282
SphI	Cuts after 1692
SspI	Cuts after 3080

For enzymes that cut at the circular sequence boundary, see [Circular Digest](#).

Restriktioentsyymien katkaisukohtat influenssa A-viruksen M-geenin sekvenssissä (jatkuu)

utter

<http://tools.neb.com/NEBcutter2/listbycuts.php?name=90fe02>

[\[Back to main display\]](#)

 Number of cuts =

Single cutters

unnamed sequence

InflA M-geeni

Sort order:

#	Enzyme	Specificity	Sites & flanks	Cut positions (blunt - 5' ext. - 3' ext.)
1	AccI	GT MK ₂ AC	list	*228/230
2	AclI	AA CG ₂ TT	list	*322/324
3	AcuI	CTGAAG(N) ₁₄ △NN	list	440/438
4	AflII	C TTAA ₂ G	list	307/311
5	AflIII	A CRYG ₂ T	list	448/452
6	AhdI	GACNN ₂ N NNGTC	list	235/234
7	AleI	CACNN ₂ NNGTG	list	421
8	ApaLI	G TGCA ₂ C	list	365/369
9	ApoI	R AATT ₂ Y	list	705/709
10	AseI	AT TA ₂ AT	list	514/516
11	BceAI	ACGGC(N) ₁₂ NN ₂	list	*874/876
12	BglII	A GATC ₂ T	list	111/115
13	BmrI	ACTGGGNNNN ₂ N	list	200/199
14	Bpu10I	CC TNA ₂ GC	list	557/560
15	BpuEI	CTTGAG(N) ₁₄ △NN	list	136/134
16	BsaXI	△NNN(N) ₉ AC(N) ₅ CTCC(N) ₇ △NNN	list	307/304+337/334
17	BsiHKA I	G ₂ WGCW ₂ C	list	#369/365
18	BsmFI	GGGAC(N) ₁₀ NNNN ₂	list	672/676
19	BsmI	GAATG ₂ CN	list	937/935
20	BsrDI	GCAATG ₂ NN	list	650/648
21	BstAPI	GCAN ₂ NNN NTGC	list	636/633
22	EaeI	Y GGCC ₂ R	list	542/546
23	EarI	CTCTCN ₂ NNN	list	854/857
24	FauI	CCCGNNNN ₂ NN	list	*768/770
25	HhaI	G ₂ CG ₂ C	list	*75/73
26	HinPII	G ₂ CG ₂ C	list	*73/75
27	MmeI	TCCRAC(N) ₁₈ △NN	list	954/952
28	MseI	TGG ₂ CCA	list	544
29	MslI	CAYNN ₂ NNRTG	list	421
30	MspAII	CMG ₂ CKG	list	*598
31	NmeAIII	GCCGAG(N) ₁₉ △NN	list	90/88
32	NspI	R ₂ CATG ₂ Y	list	452/448
33	PciI	A CATG ₂ T	list	448/452
34	PshAI	GACNN ₂ NNGTC	list	951
35	PstI	C ₂ TGCA ₂ G	list	224/220

18.12.2009

Restriktioentsyymien katkaisukohdat influenssa A-viruksen M-geenin sekvenssissä
(jatkuu)

tter

<http://tools.neb.com/NEBcutter2/listbycuts.php?name=90fe02>

36	Scal	AGT _↓ ACT	list	678
----	------	----------------------	------	-----

Potilasnäytteiden tiedot (jatkuu)

Influenssanäytteet 18.8.09 lähtien (v. 1997 jälkeen syntyneet)

	Näyttenumero	Tulos												Syntymävuosi	Ottoaika	Viikko
		MPV	ADV	229E/NL63	PIV2	PIV3	PIV1	Flu B	Flu A	OC43/HKU1	HRV A/B	RSV A	RSV B			
1	09VD00881	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	2007	17.8.2009	34
2	09VD00902	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2007	17.8.2009	34
3	09VD00936	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	2000	17.8.2009	34
4	09VD00953	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2003	18.8.2009	34
5	09VD01002	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1999	18.8.2009	34
6	09VD01036	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2006	19.8.2009	34
7	09VD01037	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-		19.8.2009	34
8	09VD01068	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	2007	19.8.2009	34
9	09VD01109	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1997	20.8.2009	34
10	09VD01133	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	2001	20.8.2009	34
11	09VD01137	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2008	20.8.2009	34
12	09VD01174	-	1	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	2008	21.8.2009	34
13	09VD01206	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	2008	23.8.2009	34
14	09VD01213	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	2008	22.8.2009	34
15	09VD01218	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2007	22.8.2009	34
16	09VD01227	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	2008	23.8.2009	34
17	09VD01237	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2007	21.8.2009	34
18	09VD01257	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	2000	24.8.2009	35
19	09VD01291	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2004	21.8.2009	34
20	09VD01311	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1998	25.8.2009	35
21	09VD01334	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2007	25.8.2009	35
22	09VD01364	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1997	24.8.2009	35
23	09VD01378	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2000	25.8.2009	35
24	09VD01408	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	2009	26.8.2009	35
25	09VD01441	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2003	26.8.2009	35

Potilasnäytteiden tiedot (jatkuu)

26	09VD01460	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	2007	27.8.2009	35
27	09VD01486	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1998	26.8.2009	35
28	09VD01526	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2008	28.8.2009	35
29	09VD01590	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	2005	30.8.2009	35
30	09VD01624	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	2002	1.9.2009	36
31	09VD01699	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1999	31.8.2009	36
32	09VD01755	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2001	2.9.2009	36
33	09VD01794	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2007	4.9.2009	36
34	09VD01825	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	2008	6.9.2009	36
35	09VD01831	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1997	7.9.2009	37
36	09VD01841	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2008	5.9.2009	36
37	09VD01911	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2007	8.9.2009	37
38	09VD01968	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	2002	10.9.2009	37
39	09VD02000	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	2006	11.9.2009	37
40	09VD02043	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1997	11.9.2009	37
41	09VD02088	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2002	15.9.2009	38
42	09VD02091	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2007	15.9.2009	38
43	09VD02104	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	2002	16.9.2009	38
44	09VD02121	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1997	15.9.2009	38
45	09VD02126	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1997	16.9.2009	38
46	09VD02153	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	2005	17.9.2009	38
47	09VD02161	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	2007	18.9.2009	38
48	09VD02170	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2003	18.9.2009	38
49	09VD02239	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2007	22.9.2009	39
50	09VD02244	-	-	-	-	-	1	-	-	1	-	-	2003	21.9.2009	39
51	09VD02245	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2008	21.9.2009	39
52	09VD02251	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	2008	22.9.2009	39
53	09VD02270	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2000	21.9.2009	39
54	09VD02282	-	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	2008	24.9.2009	39
55	09VD02292	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	2008	24.9.2009	39

Potilasnäytteiden tiedot (jatkuu)

56	09VD02306	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	2006	25.9.2009	39
57	09VD02343	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2002	28.9.2009	41
58	09VD02346	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	2008	29.9.2009	41
59	09VD02379	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2000	29.9.2009	41
60	09VD02413	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2004	1.10.2009	41
61	09VD02430	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	2003	4.10.2009	41
62	09VD02559	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	2006	15.10.2009	42
63	09DV02617	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2003	20.10.2009	43
64	09VD02680	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	2009	21.10.2009	43
65	09DV02746	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	2009	26.10.2009	44
66	09DV02773	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	2007	27.10.2009	44
67	09DV02814	-	1	-	-	1	-	-	-	-	1	-	2008	28.10.2009	44
68	09DV02847	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1997	27.10.2009	44
69	09DV02892	-	-	-	-	1	-	-	1	-	-	-	2002	29.10.2009	44
70	09DV02918	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	2004	29.10.2009	44
71	09DV03004	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	2001	2.11.2009	45
72	09DV03038	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2004	2.11.2009	45
73	09DV03072	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1997	29.10.2009	44
74	09DV03095	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	2003	2.11.2009	45
75	09DV03114	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2006	3.11.2009	45
76	09DV03145	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1997	3.11.2009	45
77	09DV03221	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	2008	2.11.2009	45
78	09DV03243	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1998	2.11.2009	45
79	09DV03262	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	1998	3.11.2009	45
80	09VD03276	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	2007	4.11.2009	45
81	09VD03290	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	2002	4.11.2009	45
82	09VD03311	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	2006	4.11.2009	45
83	09VD03346	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2008	3.11.2009	45
84	09VD03362	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	2007	4.11.2009	45
85	09VD03383	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1	-	2006	5.11.2009	45

Potilasnäytteiden tiedot (jatkuu)

86	09VD03412	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1997	5.11.2009	45
87	09VD03434	-	-	-	-	1	-	-	1	-	-	-	-	2000	6.11.2009	45
88	09VD03457	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	2008	4.11.2009	45
89	09VD03485	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	2006	5.11.2009	45
90	09VD03516	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	2002	6.11.2009	45
91	09VD03534	-	-	-	-	1	1	-	-	-	1	-	-	2004	6.11.2009	45
92	09VD03564	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	2002	6.11.2009	45
93	09VD03586	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1997	6.11.2009	45
94	09VD03610	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	2007	6.11.2009	45
95	09VD03643	-	-	-	-	1	-	-	1	-	-	-	-	1997	5.11.2009	45
96	09VD03660	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	1	-	2003	6.11.2009	45
97	09VD03692	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1999	9.11.2009	46
98	09VD03706	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2002	8.11.2009	45
99	09VD04215	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2007	10.11.2009	46
100	09VD04216	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	2007	10.11.2009	46
101	09VD04029	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	2001	10.11.2009	46
102	09VD04283	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	2004	11.11.2009	46
103	09VD04507	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2003	12.11.2009	46
104	09VD04810	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1999	12.11.2009	46
105	09VD05034	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1	-	-	2003	16.11.2009	47
106	09VD05242	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1999	15.11.2009	46
107	09VD05538	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1998	17.11.2009	47
108	09VD05719	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	2005	18.11.2009	47
109	09VD05924	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2008	20.11.2009	47
110	09VD06193	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2007	23.11.2009	48
111	09VD06393	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2003	23.11.2009	48
112	09VD06684	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2002	26.11.2009	48
113	09VD06776	-	-	-	-	1	-	-	1	-	-	-	-	2001	30.11.2009	49
114	09VD06840	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	2008	1.12.2009	49
115	09VD06896	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	2003	30.11.2009	49

Potilasnäytteiden tiedot (jatkuu)

116	09VD06966	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	2005	2.12.2009	49
117	09VD07015	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1998	4.12.2009	51
118	09VD07048	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	2001	4.12.2009	51
119	09VD07077	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1999	10.12.2009	51
120	<i>09VD07118</i>	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	2002	11.12.2009	51
121	09VD07124	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	2008	12.12.2009	52
122	09VD07139	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	2005	11.12.2009	52
123	09VD07173	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2008	16.12.2009	52
124	<i>09VD07190</i>	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1	-	-	2007	17.12.2009	52
		MPV	ADV	229E/NL63	PIV2	PIV3	PIV1	Flu B	Flu A	OC43/HKU1	HRV A/B	RSV A	RSV B			

Keltainen väri – rinnakkainen infektiio

Punainen väri – influenssa A-positiivinen näyte

