

Opinnäytetyö (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikan koulutusohjelma

Biotekniikka

2013

Kaisa Vihersalo

# KVANTITATIIVISEEN POLYMERAASIKETJUREAKTI- OON PERUSTUVAN TESTIN KEHITTÄMINEN RUOKAPATOGEENIN TUNNISTAMISEKSI



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU  
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

OPINNÄYTETYÖ (AMK) | TIIVISTELMÄ

TURUN AMMATTIKORKEAKOULU

Bio- ja elintarviketekniikan koulutusohjelma | Biotekniikka

Kevät 2013 | Sivumäärä 43

Kokeellisen työnohjaajat: Jani Holopainen (FM) ja Nina Wickstrand (FM), ohjaava opettaja: Petri Susi (Dosentti, FT)

Kaisa Vihersalo

# KVANTITATIIVISEEN POLYMEERAASIKETJUREAKTIOON PERUSTUVAN TESTIN KEHITTÄMINEN RUOKAPATOGEENIN TUNNISTAMISEKSI

Ruokateollisuudessa ruoan tuottajan vastuulla on turvata ja varmistaa valmistamiensa tuotteiden turvallisuus kuluttajille. Koska monet elintarvikkeet ja niiden valmistuksessa käytettävät raaka-aineet ovat hyviä kasvualustoja bakteereille, on niitä syytä testata ihmisille patogeenisten bakteerien varalta ennen kuin niitä käytetään raaka-aineeksi tai toimitetaan myyntiin. Markkinoilla on useanlaisia menetelmiä tehdä testejä. Perinteisesti testaus tehdään ns. maljausmenetelmällä, joka perustuu maljalla kasvaneiden bakteeripesäkkeiden morfologiaan ja viljelmälle tehdyn entsyymaattisten reaktioiden perusteella tehtävään tunnistamiseen. Koska maljausmenetelmä vie paljon aikaa, on sen rinnalle haluttu kehittää nopeampi ja spesifisempi tekniikka.

Kvantitatiiviseen polymeraasiketjureaktioon perustuvien menetelmien suosio on kasvanut niiden helppouden, spesifisyyden ja nopeuden ansiosta. Hyvin tehdyn suunnittelun avulla qPCR-menetellä pystytään tunnistamaan näytteestä pieniäkin määriä kohdebakteeria. Maljausmenetelmällä tuloksen saamiseen menee useita päiviä, mutta qPCR:n avulla tulos saadaan jo vuorokaudessa.

Työn tarkoituksena oli suunnitella spesifiset alukkeet ja koettimet kvantitatiiviseen polymeraasiketjureaktioon perustuvaan testiin. Alukkeiden ja koettimien suunnittelutyön tavoite oli tunnistaa kaksi eri kohdegeeniä samanaikaisesti näytteestä. Työssä oligoiden spesifisyyttä testattiin yli 200 eri bakteerikannalla. Geenin 1 kohdalla kaikki 25 positiivista näytettä antoivat positiivisen tuloksen ja kaikki 177 negatiivista näytettä antoivat negatiivisen tuloksen. Geenin 2 kohdalla kaikki 30 positiivista näytettä antoivat positiivisen tuloksen ja 172 negatiivista näytettä antoivat negatiivisen tuloksen.

ASIASANAT:

ruokapatogeeni, kvantitatiivinen polymeraasiketjureaktio, qPCR, oligosuunnittelu, diagnostiikka

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Biotechnology and Food Technology | Biotechnology

Spring 2013 | Total number of pages 43

Instructors: Jani Holopainen (MSc) and Nina Wickstrand (MSc), Petri Susi (Docent, PhD)

Kaisa Vihersalo

# QUANTITATIVE POLYMERASE CHAIN REACTION BASED TEST FOR DETECTION OF FOOD PATHOGENS

In the food industry it is the producer's responsibility to ensure that the foodstuffs produced are safe for consumers. Since many foodstuffs are an ideal environment for bacterial growth, it is important to make sure that they are not contaminated by pathogenic bacteria. There are many methods commercially available for performing these kinds of tests. The most conventional test method is the cell culturing method where the identification is based on cell morphology and different biochemical reactions. Since cell culturing is a time-consuming procedure, there is a need for a faster and more specific technique.

Quantitative polymerase chain reaction (qPCR) based methods have become more and more popular because of their easiness, specificity and rapidity. With good design, the qPCR method ensures that even small amounts of target bacteria can be detected. The conventional test method may take up to several days before the test result is available, whereas by qPCR the result can be obtained within 24 hours.

The objective of this study was to design specific primers and probes for a qPCR-based test. The aim of the design work was to simultaneously detect two different target genes from the sample. The specificity of the oligonucleotides was tested with over 200 bacterial strains. All 25 positive strains for gene 1 amplified well and all 177 negative strains gave a negative result. With gene 2 the 30 positive targets amplified well and all 172 negative strains tested gave a negative result.

## KEYWORDS:

food pathogen, quantitative polymerase chain reaction, qPCR oligo design, diagnostics

## **SISÄLTÖ**

<b>KÄYTETYT LYHENTEET</b>	<b>6</b>
<b>1 JOHDANTO</b>	<b>7</b>
<b>2 RUOKAPATOGEENIT</b>	<b>8</b>
2.1 Maljausmenetelmä	9
2.2 Vasta-ainepohjaiset menetelmät	10
2.2.1 ELISA-tyypit	10
2.2.2 Vasta-aineiden leimausmenetelmät	11
2.3 PCR-pohjaiset menetelmät	12
<b>3 QPCR</b>	<b>14</b>
3.1 Fluoresenssi	16
3.2 Kemat	17
3.2.1 SYBR Green qPCR-kemia	17
3.2.2 TaqMan qPCR-kemia	18
3.2.3 Thermo Scientific Solaris qPCR -kemia	20
3.2.4 MGB (minor groove binder)	21
3.2.5 Sulamiskäyräanalyysi	23
<b>4 THERMO SCIENTIFIC PIKOREAL QPCR-LAITE</b>	<b>25</b>
4.1 Optiikka	25
<b>5 TYÖN SUORITUS</b>	<b>27</b>
5.1 Oligosuunnittelu	27
5.2 Sekvensointi	30
5.3 Oligojen testaus	32
<b>6 TULOKSET</b>	<b>35</b>
6.1 Amplikonien vertailu	35
6.2 Spesifisyys	38
<b>7 JOHTOPÄÄTÖKSET</b>	<b>40</b>

## KUVAT

Kuva 1. PCR:n monistumisen vaiheet. (Kubista et al, 2006) .....	12
Kuva 2. qPCR-monistuskäyrä ja käyrän kynnysyksi (Cq).....	15
Kuva 3. Fluoresenssin synty. (A-Z of Quantitative PCR, Bustin 2004) .....	16
Kuva 4. SYBR Green –menetelmän toimintaperiaate. (www.qiagen.com) .....	18
Kuva 5. TaqMan-kemian toimintaperiaate. (www.e-oligos.com).....	19
Kuva 6. Thermo Scientific Solaris koetin. (Lukhtanov et al, 2007).....	20
Kuva 7. Minor ja Major groove. (www.ncbi.nlm.nih.gov).....	22
Kuva 8. Sulamiskäyrä. ....	23
Kuva 9. PikoRealin optinen toiminta. (www.thermofisher.com) .....	26
Kuva 10. Esimerkki kohdekantojen sekvenssien linjaamisesta ja oligoiden suunnittelusta. Geenin 1 kolme eri amplikonin sekä niiden monistamiseen suunnitellut oligot. Nuolet kuvaavat alukkeita ja soikiot koettimia. ....	29
Kuva 11. Esimerkki kohdekantojen sekvenssien linjaamisesta ja oligoiden suunnittelusta. Geenin 2 kolme eri amplikonin sekä niiden monistamiseen suunnitellut oligot. Nuolet kuvaavat alukkeita ja soikiot koettimia. ....	29
Kuva 12. Työssä käytetty qPCR-protokolla. ....	33
Kuva 13. Geenin 1 amplikonien vertailu. ....	35
Kuva 14. Geenin 2 amplikonien vertailu. ....	37
Kuva 15. Spesifisyysajo 1. ....	38
Kuva 16. Spesifisyysajo 2. ....	39

## TAULUKOT

Taulukko 1. PCR-reaktion reagenssit.....	30
Taulukko 2. PCR-reaktion protokolla.....	31
Taulukko 3. Geenin 1 amplikonien Cq- sekä Tm-arvot.....	36
Taulukko 4. Geenin 2 amplikonien Cq- sekä Tm-arvot.....	37
Taulukko 5. Yhteenveto tuloksista. ....	39

## KÄYTETYT LYHENTEET

EVIRA	elintarviketurvallisuusvirasto
qPCR	quantitative polymerase chain reaction, kvantitatiivinen polymeraariketjureaktio
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
RIA	radio immuno assay
FIA	fluoroimmunoassay
DNA	deoksiribonukleiinihappo
C <sub>q</sub>	threshold cycle, kynnysyksi
FRET	fluorescence resonance energy transfer
T <sub>m</sub>	melting temperature, sulamislämpötila
MGB	minor groove binder
bp	base pair, emäspari
IAC	internal amplification control, sisäinen amplifikaatio kontrolli
LED	light emission diode
NTC	no template control, negatiivinen kontrolli

# 1 JOHDANTO

Ruokateollisuudessa yksi keskeisimmistä asioista on varmistaa tuotteen turvallisuus kuluttajille. Ruokapatogeenilla kontaminoitunut elintarvike-erä voi pahimmassa tapauksessa tartuttaa useita kyseistä elintarviketta nauttinutta ihmistä. Osa ruokamyrkytysbakteereista aiheuttaa vain lieviä ruokamyrkytysoireita, mutta osasta saattaa tulla erittäin vakavia oireita. Ruokamyrkytysbakteerien diagnosointiin on olemassa useita erilaisia menetelmiä. Perinteisesti ruokapatogeenien diagnosointiin käytetty, biokemiallisiin reaktioihin perustuva maljausmenetelmä on liian aikaavievä eikä se ole tarpeeksi spesifinen. Vasta-ainepohjaisissa testeissä ruokamatriisin tuomat inhibiittorit tekevät testistä monimutkaisia ja epävarmoja. Nopeille, yksinkertaisille ja spesifisille testeille on siksi ollut kysyntää, jotta ruokapatogeenien mahdollinen läsnäolo saadaan mahdollisimman nopeasti ja tarkasti testattua ja voidaan olla varmoja tuotteiden mikrobiologisesta puhtaudesta.

Thermo Fisher Scientificissä on kehitetty qPCR-menetelmään perustuvia analyysimenetelmiä tunnistamaan eri ruokapatogeeniä. Testin avulla tulos saadaan nopeasti ja spesifisesti verrattuna esimerkiksi maljausmenetelmään.

Opinnäytetyöni tavoitteena oli suunnitella uudelle qPCR-pohjaiselle testille spesifiset alukkeet ja koettimet tunnistamaan samanaikaisesti kahta eri ruokapatogeenissa esiintyvää geeniä. Lisäksi työssä testattiin suunniteltujen alukkeiden ja koettimien toimivuutta ja spesifisyyttä.

Työ tehtiin syksyn 2012 ja kevään 2013 aikana Thermo Fisher Scientificin Mikrobiologia divisioonassa Vantaalla. Mikrobiologia divisioonassa on erittäin vahva osaaminen ja kokemus qPCR-pohjaisten testien kehittämisessä.

## 2 RUOKAPATOGEENIT

Elintarviketurvallisuusvirasto Evira toimii Suomessa elintarvikkeiden turvallisuutta ja laatua sekä kasvien ja eläinten terveyttä valvovana laitoksena. Eviran mukaan ”Ruokamyrkytyksellä tarkoitetaan ruuan tai talousveden nauttimisen välityksellä saatua tarttuvaa tautia tai myrkytystä. Ruokamyrkytysepidemiolla tarkoitetaan tapausta, jossa vähintään kaksi henkilöä on saanut oireiltaan samanlaatuisen sairauden nautittuaan samaa alkuperää olevaa ruokaa tai talousvettä, ja missä kyseinen ruoka tai vesi voidaan epidemiologisesti todeta sairauden lähteeksi.” <sup>[1]</sup> (Eviran julkaisuja 10/2012). Ruokamyrkytysoireet voivat ilmaantua minuuteissa tai vasta viikkojen kuluttua, riippuen taudin aiheuttajasta. Yleisimmät oireet kuten pahointointi, oksentelu, ripuli tai kuume ovat enimmäkseen flunssan kaltaisia, ja jäävät siksi monesti yhdistämättä ruokamyrkytykseen. <sup>[2]</sup>

Ruokamyrkytysbakteerin voi saada mistä tahansa elintarviketuotteesta, jota on käsitelty väärin ennen pakkaamista tai jonka kylmäketju on ollut virheellinen. Yleisimmin sellainen löydetään lihasta, maitotuotteista, merenelävistä tai vihanneksista. Kaikki bakteerit eivät kuitenkaan ole patogeenisiä, vaan ne voivat joskus olla jopa tärkeä osa tuotteen bioteknistä valmistusprosessia. Esimerkiksi juuston ja viilin valmistus nimenomaan perustuu bakteerien käyttöön. <sup>[2]</sup>

Vuonna 2010 Evira rekisteröi yhteensä 44 elintarvike- tai vesiperäistä ruokamyrkytysepidemiaa Suomessa. Sairastuneiden määrä ylsi tuolloin melkein tuhanteen. Yleisin taudinaiheuttaja vuonna 2010 oli Eviran mukaan norovirus, joka löytyi yli puolelta ruokamyrkytyksen saaneista. Muita yleisiä ruokapatogeenisiä Suomessa olivat *Bacillus cereus*, Kampylobakteeri-lajit, *Clostridium perfringens* sekä *Salmonella*- ja *Yersinia*-lajit. Ruokamyrkytys on mahdollista saada myös kotoa, jos ruokaa on säilytetty väärin tai sen valmistukseen on käytetty pilaantuneita tuotteita. Ruoanvalmistajat testaavat myyntiin menevät ruokaerät rutiininomaisesti jo ennen niiden myyntiin



vapauttamista, jotta ruokamyrkytystapauksilta välttyttäisiin. <sup>[1,2]</sup> Markkinoilla onkin nykyään useisiin erilaisiin metodeihin perustuvia testisarjoja, joista alla on kuvattu yleisimmin käytettyjen periaatteet lyhyesti.

## 2.1 Maljausmenetelmä

Evira suosittelee mahdollisten ruoka-ainepatogeenien testaamista elintarvikkeista menetelmillä, jotka perustuvat kasvatusmaljojen käyttöön. Tähän käytetään yleisesti ns. selektiivisiä maljoja joiden koostumus suosii tietyn bakteerilajin kasvua. Eri patogeenien kasvatusajat ja -olosuhteet vaihtelevat kovasti.

Eviran suosittama maljausmenetelmän käyttö, on edelleen usein kultainen standardi joihin muiden ”kilpailevien” menetelmien herkkyyttä yms. aina verrataan. Esimerkkinä Salmonellan toteamiseksi elintarvikkeista käyttäen maljausmenetelmää: Maljausmenetelmää edeltävä esirikastus kestää 16–20 tuntia. Esirikastuksen jälkeen seuraa rikastusvaihe jossa tunnettu määrä esirikastettua näytettä levitetään selektiiviselle rikastusmaljalle ja maljaa inkuboidaan  $24 \pm 3$ h. Jos maljalla ei tämän jälkeen näy kasvustoa, jatketaan inkubointia vielä toiset  $24 \pm 3$ h. Rikastuksen jälkeen tehdään maljaviljely, jossa rikastusmaljoilta siirretään kasvustoa kiinteälle selektiiviselle elatusaineelle, mikäli kasvustoa on syntynyt. Maljaviljelyä inkuboidaan jälleen  $24 \pm 3$ h. Jos maljaviljelyssä tämän jälkeen havaitaan Salmonellaksi epäiltyä kasvustoa, siirrostetaan tätä edelleen sille sopivalle elatusaineelle ja tulos varmistetaan biokemiallisin ja serologisin menetelmin. Maljausmenetelmää käyttäen aikaa kuluu tuloksen saamiseen siis yhteensä vähintään 64 tuntia. Vielä tämän jälkeenkin on mahdollista, että Salmonella jäi toteamatta näytteestä. Mahdollisia syitä piilevän Salmonella-infektion tunnistamatta jäämiseen ovat esimerkiksi eläimelle lähiaikoina annettu antibioottikuuri tai maljojen inkubointi liian matalassa lämpötilassa. <sup>[3]</sup>

Maljausmenetelmässä reagenssit ovat edullisia mutta kustannuksia nostaa kuitenkin testaukseen käytetty työaika. Instrumentoinnin takia maljaus vaatii

suhteellisen paljon tilaa, sillä inkubointeihin vaaditaan usein kaksi lämpökaappia, jotka vievät paljon lattia- tai pöytätilaa.

## 2.2 Vasta-ainepohjaiset menetelmät

Vasta-ainepohjaiset menetelmät ovat analyttisiä menetelmiä, jotka perustuvat vasta-aine- ja antigeenimolekyylien välisiin toimintoihin. <sup>[4]</sup> Tunnistettava antigeeni voi olla hyvin pieni molekyyli (kuten steroidinen hormoni kortisoni tai huumemolekyyli theofylliini) tai suurempi proteiinimolekyyli kuten albumiini tai ferritiini. Vasta-ainepohjaiset testit perustuvat antigeenin ja vasta-aineen välisiin sidoksiin, jossa antigeenin epitoopin ja vasta-aineen paratoopin välille muodostuu sidos. <sup>[4]</sup> Vasta-ainepohjaiset menetelmät olivat ensimmäisiä menetelmiä detektoimaan ja mittaamaan laaja-alaisesti hormoneita, verituotteita (blood products), entsyymeitä, huumeita sekä tautimarkkereita. Tekniikan suosio johtuu sen helppoudesta, nopeudesta sekä tarkkuudesta. Analyytin ja spesifisen antibodyn välisen stabiilin kokonaisuuden avulla vasta-ainepohjaisissa menetelmissä kliinisistä näytteistä saavutetaan detektio sekä kvantitatiivinen määrittäminen. <sup>[5]</sup>

### 2.2.1 ELISA-tyypit

Immunopohjaiset menetelmät voidaan jakaa sitoutumisen mukaan neljään ryhmään: suoraan sitoutumiseen, epäsuoraan sitoutumiseen, sandwich tekniikkaan sekä kilpailevaan sitoutumiseen perustuvaan menetelmään. <sup>[6]</sup> Suoraan sitoutuvassa kemiassa leimattu vasta-aine sitoutuu suoraan antigeeniin joka on sitoutettu kuoppalevyn kuoppien pohjalle. Menetelmä ei ole hyvä, jos tarkoituksena on tunnistaa antigeeneja raakanäytteestä, joka sisältää usein liikaa kontaminoivia tekijöitä. Epäsuorasti sitoutuvassa metodissa kuoppalevyn pohjalle sitoutetaan vastaavasti vasta-aine. Näytteen annetaan reagoida kuopassa siten, että siinä oleva antigeeni voi sitoutua vasta-aineeseen. Antigeeni tunnistetaan toisella vasta-aineella, joka voi olla leimattu

tai se voidaan tunnistaa kolmannella anti-vasta-aineella. Tällainen tunnistusmenetelmän ”rakenne” on tyypillinen immunomenetelmissä. Kilpaileva sitoutuminen tarkoittaa sitä, että kaksi reagenssia, joista toinen on leimattu ja toinen näytteessä oleva on leimaamaton, yrittävät molemmat sitoutua kuopan pohjalle sitoutettuun vasta-aineeseen. Mitä vähemmän signaalia syntyy, sitä enemmän näytteessä on kohda-antigeenia. [7]

## 2.2.2 Vasta-aineiden leimausmenetelmät

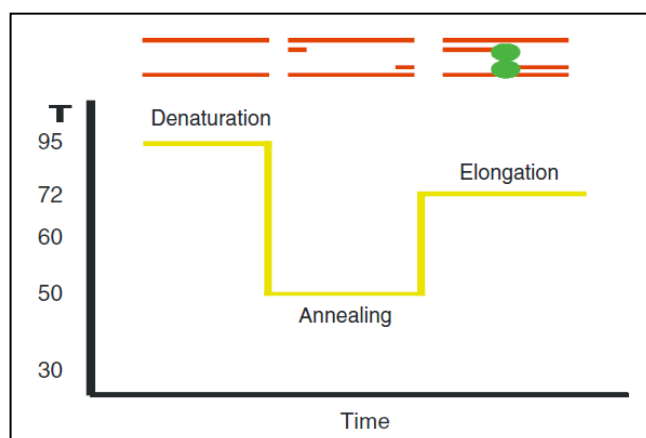
Erilaisten sitoutumisten lisäksi vasta-ainepohjaisissa menetelmissä antigeenit tai vasta-aineet voidaan leimata eri tavoin. Yleisimpiin leimausmenetelmiin kuuluu entsyymileimattu ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay). Esimerkiksi horseradish peroxidase alkaline fosfataasi on yksi yleisimmin käytetyistä entsyymeistä. Entsyymitoiminnan seurauksena muodostuu värillinen reaktiotuote, jonka intensiteettiä voidaan mitata spektrofotometrillä. Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää fluoresoivaa leimaa, jolloin on kyseessä fluoroimmunomenetelmä (FIA). Tällöin reaktiotuote on fluoresoiva tai tunnistuksessa käytettävään vasta-aineeseen on liitetty suoraan fluoresoiva aine, joka voidaan tunnistaa sopivalla laitteella. Heterogeeninen reaktio vaatii, että sitoutumattomat merkkiaineet täytyy erottaa sitoutuneista merkkiaineista ennen detektiota. Homogeeninen on muuten samanlainen, mutta detektio voidaan tehdä erottamatta sitoutuneita ja sitoutumattomia merkkiaineita. Fluoresoivia koettimia (probe) on myös käytetty, mutta ne eivät ole yleistyneet sillä niissä on korkea taustafluoresenssi, joka huonontaa herkkyyttä. Koettimissa on ollut myös ongelmia vaimentimen kanssa. [4]

Radioleimattu (Radioimmunoassay, RIA) on vasta-ainepohjainen menetelmä, jossa käytetään radioisotooppeja merkkiaineena sitoutuneiden antigeenien havaitsemiseksi. Puhdistetut vasta-aineet leimataan radioaktiivisilla merkkiaineilla, joiden avulla reaktio pystytään detektoimaan. Radioleimatussa menetelmässä esimerkiksi sandwich-menetelmä on osoittautunut erittäin herkäksi, mutta nykyisin suositaan ei-radioaktiivisia menetelmiä. [4]

Vaikka vasta-aineperusteiset testit ovat nopeita ja suosittuja kliinisissä tutkimuksissa, mutta niissä on usein ongelmia erityisesti bakteereja tunnistettaessa. Esimerkiksi ryhmän A Streptokokille kehitetty testi (BD Diagnostic Systems, Sparks, Md) on kallis ja vaikea suorittaa. Koska esimerkkinä käytetty testi Streptokokille ei ole tarpeeksi spesifinen, on suositeltavaa, että negatiiviset näytteet kasvatetaan vielä maljalla. Tämä on testin ehdoton epäkohta, sillä negatiivisen näytteen varmentamiseen menee 16-18 tuntia. [8]

### 2.3 PCR-pohjaiset menetelmät

Polymeraasiketjureaktio on menetelmä, joka perustuu DNA-polymeraasi entsyymien kykyyn syntetisoida 1-juosteista DNA-templaattia mallina käyttäen sille komplementaarinen vastinjuoste. Koska DNA-polymeraasi voi lisätä nukleotideja pelkästään olemassaolevaan 3'-OH ryhmään, tarvitaan lisäksi oligonukleotidialukkeita joiden tarjoamaan 3'-OH ryhmään se voi liittää ensimmäisen nukleotidin. Lisäksi reaktioon tarvitaan neljää eri nukleotiditriposfaattia, lämpöstabiiia DNA-polymeraasia sekä magnesiumioneita. Reaktioon tarvitaan myös kohde-DNA eli DNA-templaatti, joka sisältää monistettavan kohdesekvenssin. [9]



Kuva 1. PCR:n monistumisen vaiheet. (Kubista et al, 2006)

PCR-reaktion kolmivaiheinen syklitys, joka näkyy kuvassa 1, tuottaa eksponentiaalisesti kasvavan määrän identtisiä DNA-pätkiä. Jokaisen syklin aikana reaktioseosta ensin kuumennetaan (1.separate/denaturate), jotta kaksijuosteinen DNA saadaan denaturoitua (eli avattua 1-juosteiseksi), sitten reaktioseosta jäähdytetään (2. annealing) jotta kaksi lyhyttä yksijuosteista aluketta, jotka on suunniteltu siten, että toinen aluke on komplementaarinen monistettavan alueen yhden pään ja toinen toisen pään kanssa, kiinnittyvät kohdesekvenssiinsä. Syklin kolmannessa vaiheessa lämpöstabili DNA-polymeraasi rakentaa uutta juostetta 5'→3'suunnassa (3. elongation). PCR-pohjaiset menetelmät ovat nopeita sekä erittäin herkkiä. Reaktioseoksessa ei tarvitse olla kuin muutama kopio kohde-DNA:ta jotta PCR detektoi ne ja monistuminen alkaa. <sup>[9, 10]</sup>

Mikäli kyseessä on normaaliin PCR:ään perustuva metodi, analysoidaan näytteet geielektroforeesilla PCR-syklityksen jälkeen. Geeli toimii ikäänkuin molekulaarisena siivilänä jolla se erottelee nukleiinihapot koon mukaan. Koska nukleiinihapot ovat negatiivisesti varautuneita, ne liikkuvat sähkökentässä kohti positiivista napaa. <sup>[10]</sup> Tässä menetelmässä on omat heikkoutensa, sillä kun monistussykliä jälkeen näyte analysoidaan, on näytteen DNA määrän määrittäminen erittäin hankalaa. Geelillä voidaan havaita selvä ero näytteiden määrässä vain, jos ero kohde-DNA:n määrässä on reaktion alussa ollut suuri. <sup>[11]</sup> qPCR:n perustuvista menetelmistä kerrotaan seuraavassa kappaleessa.

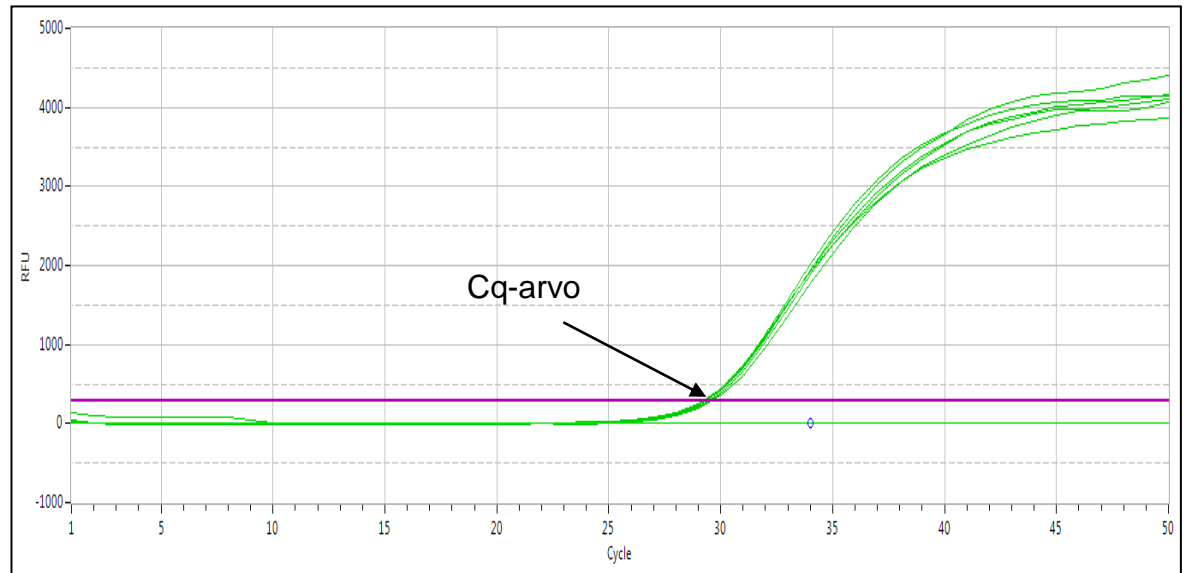
### 3 qPCR

qPCR on monistussykleiltään ja periaatteeltaan samanlainen kuin normaali PCR. Erona näiden PCR-tekniikoiden välillä on se, että kvantitatiivisessa PCR:ssä muodostuneen tuotteen määrää seurataan jo monistamisen aikana, muodostuvaa fluoresoivaa väriä tai koettimen synnyttämää signaalia mittaamalla. qPCR:ssä tarvitaan reaktioseokseen fluoresoiva reportteri DNA-molekyylillä, joka sitoutuu muodostuvaan PCR-tuotteeseen ja raportoii sen syntymisestä fluoresoivalla signaalilla. Sitoutuneen fluoresoivan koettimen määrä on verrannollinen syntyvän tuotteen määrään. Erittäin tehokkaiden detektiokemioiden, sensitiivisten laitteiden sekä optimoitujen testien ansiosta haluttu DNA-sekvenssi saadaan monistettua ja detektoitua aikasempaa tarkemmin ja herkemmin. Tyypillisiä käyttökohteita qPCR:lle ovat patogeeniä detektioit. <sup>[11]</sup>

Lukuisia erilaisia kaupallisia koettimia ja värejä on saatavilla <sup>[11]</sup>. Koettimiksi voidaan valita epäspesifisesti kaikkeen 2-juosteiseen DNA:han sitoutuva (SYBR Green I) tai sekvenssispesifisesti sitoutuva koetin (TaqMan, Solaris). Edellä mainitut kemiat ovat tällä hetkellä yleisimmin käytetyt qPCR-kemiat. Tässä työssä on käytetty Solaris qPCR-kemiaa. Jokaisessa qPCR-kemiassa on omat hyvät ja huonot puolensa. Kemioista tarkemmin kappaleessa 3.2. Fluoresoivan koettimen kiinnittyä kohde-DNA:hansa laite detektoi fluoresoivan signaalin määrää reaaliaikaisesti, jokaisen PCR-syklin tietyssä vaiheessa. Näin PCR -tuotteen muodostumista voidaan seurata ajon aikana ja tulos on valmis heti ajon jälkeen. qPCR:n avulla päästään eroon aikaa vievästä ja epäspesifisemmästä geelijaosta jota normaali PCR tarvitsee. Geelijaosto on myös suuri kontaminaatoriski laboratoriolle, sillä PCR-putket joudutaan avaamaan jolloin erittäin helposti kontaminoivaa PCR-tuotetta voi päästä laboratorioon. <sup>[12]</sup>

qPCR:ssä fluoresenssitason mitataan jokaisen syklin jälkeen ja laite piirtää muodostuvasta signaalista monistuskäyrän. Kynnystason ja monistuskäyrän leikkauskohta kertoo C<sub>q</sub>-arvon (kynnysyksiäri). Kynnysyksiäri on se PCR-sykli,

jonka aikana signaali ylittää kynnystason. Kuvassa 2 on esitetty qPCR analyysistä muodostunut monistuskäyrä. Mitä enemmän reaktiossa on lähtötilanteessa ollut kohde-DNA:ta, sitä aikaisemman kynnysyklarivon reaktio saa.

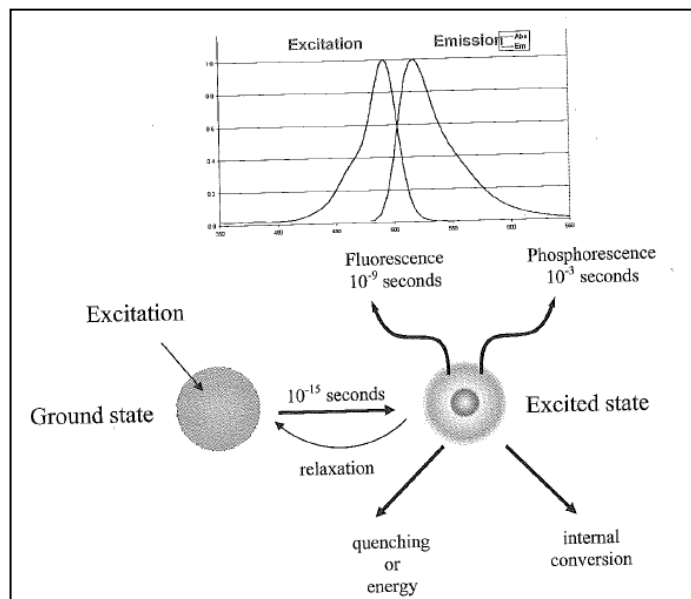


Kuva 2. qPCR-monistuskäyrä ja käyrän kynnysykli (Cq).

qPCR-monistuskäyrästä (kts kuva 2) voidaan määrittää neljä eri monistumisen vaihetta. Ensimmäisillä sykleillä näkyy pohjaviiva, jolloin kohde-DNA:n määrä on niin alhainen, että laitteen herkkyys ei riitä detektoimaan sitä. Sitä seuraa eksponentiaalisen monistumisen vaihe, jolloin kohde-DNA monistuu 100 %:n tehokkuudella eli yhdestä mallista syntyy kaksi kopiota jokaisella syklillä. Eksponentiaalivaiheen kesto riippuu kohde-DNA:n konsentraatiosta sekä käytettävien oligoiden tehokkuudesta. Eksponentiaalivaihe loppuu, kun yksi tai usempi reaktikomponenteista kuluu loppuun. Tästä seuraa lineaarinen vaihe, jolloin monistuminen hidastuu eikä jokaisella syklillä enää syntetisoidu kahta amplikonin yhtä templaattia kohden. Viimeinen vaihe on plateau vaihe, jolloin amplifikaatio loppuu alukkeiden lopputtua. <sup>[13]</sup> Kynnystaso (threshold) asetetaan suunnilleen sille tasolle, jossa eksponentiaalinen vaihe alkaa, mutta kuitenkin korkeammalle kuin ”taustakohina” ensimmäisillä sykleillä.

### 3.1 Fluoresenssi

Fluoresoivat molekyylit absorboivat valoa aallonpituusalueella 350-750 nm <sup>[14]</sup>. Se aallonpituus, jolla värimolekyylillä absorboi valoa maksimaalisesti kutsutaan fotonin eksitaatio-aallonpituudeksi. Eksitaation seurauksena molekyylillä virittyy korkeammalle energiatasolle. Tämä korkeamman energian taso on hetkellinen ja lyhyt, noin  $(1-10) \times 10^{-8}$  sekuntia. Viritetty molekyylillä vaimenee nopeasti ja palaa takaisin perustasolle, jolloin valon fotonin emittoituu pidemmällä aallonpituudella. Valoa joka vapautuu tämän johdosta kutsutaan emissioksi. Eksitaatio ja emissio tapahtuvat eri aallonpituuksilla, ja tätä erotusta eksitaation ja emission maksimi aallonpituuksien välillä kutsutaan Stokesin vaihteluksi (Stokes' shift). Jokaisella fluoresoivalla värillä on oma optimaalinen aallonpituutensa, jolla eksitaatio ja emissio tapahtuvat. <sup>[13]</sup> Kuvassa 3 on esitettyä kuinka fluoresenssin synty tapahtuu.



Kuva 3. Fluoresenssin synty. (A-Z of Quantitative PCR, Bustin 2004)

FRET (fluorescence resonance energy transfer) tarvitsee toimiakseen kaksi keskenään vuorovaikuttavaa, lähekkäin sijaitsevaa fluoresoivaa molekyylillä. Vähintään toisen niistä tulee olla fluoresoiva. Fluoresoivaa komponenttia kutsutaan luovuttajaksi (donor, reporter) ja toinen molekyylillä on vastaanottaja

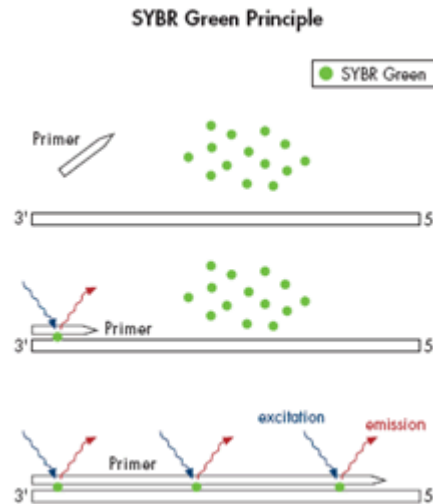


(acceptor) tai vaimennin (quencher). Normaalitilanteessa, kun fluoresoivaa molekyyliä viritetään sen optimaalisella tai lähellä sitä olevalla eksitaatioaallonpituudella, se alkaa emittoimaan valoa edellistä pidemmällä aallonpituudella. FRETissä sen sijaan että valo emittoutuisi ja detektoitaisiin, sen energia virittääkin vastaanottajamolekyylin, joka siis absorboi emittoitua valoenergiaa luovuttajalta ja samalla "vaimentaa" sen emittoiman valosignaalin. Vastaanottajamolekyylin eksitaatioaallonpituus tulee olla lähellä luovuttajamolekyylin emittoiman valon aallonpituutta. FRETin toiminta perustuu siis siihen, että luovuttaja ja vastaanottaja ovat fyysisesti lähellä toisiaan. <sup>[13,15]</sup>

## 3.2 Kemat

### 3.2.1 SYBR Green qPCR-kemia

SYBR Green I käyttäminen PCR:ssä perustuu siihen, että fluorofori sitoutuu epäspesifisesti kaikkeen kaksijuosteiseen DNA:han riippumatta kohteen sekvenssistä. SYBR Green I muodostuu asymmetrisistä syaniineista, joilla on kaksi tyyppiä (N) sisältävää aromaattista systeemiä. Yksi tyyppiatomeista on positiivisesti varautunut. Aromaattiset systeemit ovat sitoutuneet toisiinsa metiini sillan avulla (methine bridge). SYBR Green I ei fluoresoi kun se on vapaana liuoksessa, mutta sitoutuessaan 2-juosteiseen DNA:han siitä tulee kirkkaasti fluoresoiva. SYBR Green I molekyylin oletetaan sitoutuvan DNA:n minor grooveen ja se on reversiibeliä. <sup>[11]</sup> Alukkeiden sitouduttua yksijuosteiseen DNA:han PCR-reaktion kiinnittymisvaiheessa (annealing), DNA-polymeraasi alkaa rakentaa uutta kaksoisjuostetta johon SYBR Green sitoutuu kuvan 4 mukaisesti. <sup>[16]</sup>



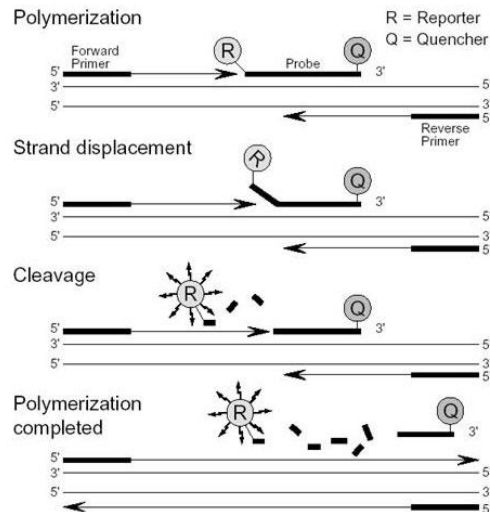
Kuva 4. SYBR Green –menetelmän toimintaperiaate. (www.qiagen.com)

SYBR Green I menetelmä on erittäin yleinen, sillä testi on helppo ja halpa pystyttää verrattuna spesifistä koetinta (TaqMan, Solaris) käyttäviin PCR-menetelmiin. <sup>[14]</sup> Haittapuolena SYBR Green I:ssä on se, että signaalia tulee myös mahdollisesta epäspesifisestä monistumisesta. Näitä epäspesifisyyksiä saattaa aiheutua esimerkiksi muista epäspesifisesti monistuvista DNA-pätkistä (non-target) tai alukkeiden muodostaessa sidoksia itsensä kanssa (primer-dimer). <sup>[12, 14, 17]</sup> SYBR Greenin spesifisyys perustuu sulamiskäyrään (lähemmin kappaleessa 3.2.5) joka tehdään monistussykliä jälkeen. Siinä lämpötilaa nostetaan pikkuhiljaa, jolloin DNA-juosteet aukeavat. Halutun amplikonin sulamislämpötila ( $T_m$ ) voidaan määrittää matemaattisesti. Laskemisessa otetaan huomioon amplikonin koko sekä eri emästen määrä amplikonissa. <sup>[18]</sup>

### 3.2.2 TaqMan qPCR-kemia

TaqMan-kemiassa käytetään koetinta, lyhyttä oligonukleotidia jonka 5'-päässä on fluorofori ja 3'-päässä vaimennin. Koetin on suunniteltu siten, että se hybridisoituu reaktiossa sekvenssispesifisesti alukkeiden välissä olevaan alueeseen amplikonissa. Koettimen toiminta perustuu fluoroforin ja vaimentimen väliseen toimintaan eli FRET:iin. Koetin sitoutuu PCR syklytyksen kiinnittymis

(annealing) vaiheessa kohdesekvenssiinsä jommassa kummassa DNA-juosteesta, riippuen oligosuunnittelusta.



Kuva 5. TaqMan-kemian toimintaperiaate. ([www.e-oligos.com](http://www.e-oligos.com))

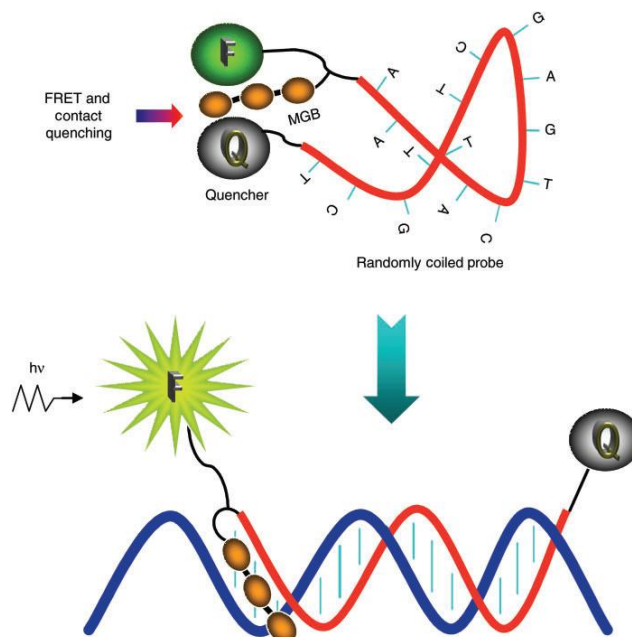
Koettimen ollessaan kiinnittyneenä kohdesekvenssiinsä vaimennin ”vaimentaa” fluoroforin toiminnan FRETin avulla. Kuvasta 5 nähdään, kuinka TaqMan-kemiaan perustuvassa qPCR:ssä käytetyn DNA-polymeraasin 5'→3' eksonukleaasiaktiivisuus pilkkoo koettimen sitä mukaan kun uutta DNA-juostetta rakentuu. Tämä johtaa siihen, että vaimennin ei pääse enää vaikuttamaan fluoroforiin ja tämä pystyy lähettämään fluoresenssiä. Jotta vaimentimen ja fluoroforin välinen FRET toimii, tulee suunnitellun koettimen olla riittävän lyhyt. Koska fluorofori ja vaimennin eivät koskaan ole todella lähellä toisiaan, on taustafluoresenssi reaktiossa melko korkea. <sup>[16]</sup>

TaqMan qPCR kemia on ollut jo pitkään käytössä ja se on huomattavasti spesifisempi kuin SYBR Green I. Spesifisyytensä lisäksi etua edelliseen kemiaan tuo myös se, että koettimet voidaan ”leimata” eri väreillä, jolloin ns. multipleksaus, useamman kohdetargetin monistaminen ja tunnistaminen samassa reaktiossa on mahdollista.

TaqManin heikkoudeksi voidaan lukea se, että sitoutuneet koetinmolekyylit hajotetaan PCR-monistuksen aikana, minkä takia sulamiskäyräanalyysiä (kappale 3.2.5) ei ole mahdollista tehdä.

### 3.2.3 Thermo Scientific Solaris qPCR -kemia

Thermo Scientific Solaris qPCR-kemiassa käytetään hyväksi koetinta, jonka 5'-päässä on MGB (minor groove binder) sekä fluorofori ja 3'-päässä vaimennin. [19] Solaris kemiassa on erittäin matala taustafluoresenssi vaimentimesta ja MGB:stä johtuen. MGB toimii myös vaimentimena (quencher) koettimen ollessa vapaana reaktioliuoksessa. Matalan taustafluoresenssin ansiosta Solaris-kemiassa on suurempi signaali-taustafluoresenssi suhde, joka tekee kemiasta erityisen herkän. Tämän johdosta tuotteen monistumisesta johtuva signaali erottuu nopeammin taustakohinasta, jolloin reaktiossa havaitaan helpommin pienetkin monistumiset.



Kuva 6. Thermo Scientific Solaris koetin. (Lukhtanov et al, 2007)

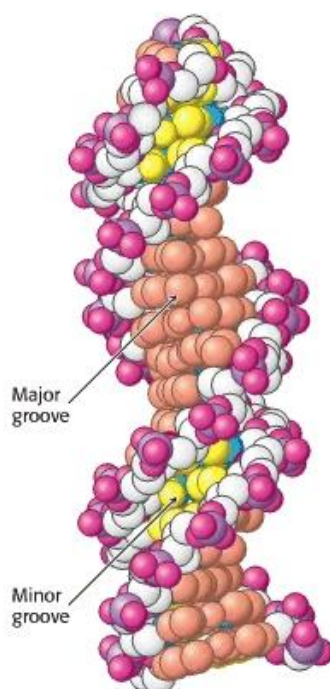
Kuvassa 6. näkyy kuinka vapaana liuoksessa ollessaan Solaris-koetin muodostaa niin sanotun satunnaisen kerärakenteen (random coiled).

Vaimentimen ja MGB:n väliset hydrofobiset vuorovaikutukset tuovat koettimen päät yhteen, eli fluoroforin ja vaimentimen lähelle toisiaan. <sup>[20]</sup> MGB pystyy yksin muodostamaan pientä vaimentamista vuorovaikuttamalla fluoroforin kanssa. Vaimentimen ja MGB:n yhteisvaikutus on kuitenkin perusta erittäin matalalle taustafluoresenssille ja paremmalle signaali-tausta suhteelle. Koettimen hybridisoituessa kohde DNA:han 5'- ja 3'- päät ajautuvat kauemmaksi toisistaan, jolloin vaimentimen vaikutus lakkaa ja fluoresoiva signaali vapautuu. Lisäksi MGB sitoutuu DNA:n minor groove:n ja ei ole enää fluoroforin vieressä. <sup>[19]</sup>

MGB:n sijoittaminen 5'-päähän estää DNA-polymeraasin 5'→3' eksonukleaasiaktiivisuutta irrottamasta ja pilkkomasta koetinta. Solariksessa on TaqMan-kemian tapaan mahdollisuus multipleksaukseen. Tämän lisäksi PCR-syklityksen jälkeen on mahdollista ajaa myös sulamiskäyräanalyysi, sillä koetin pysyy monistusvaiheen aikana ehjänä. <sup>[19]</sup> Tässä työssä oligosuunnittelu on tehty siten, että molempien targettien detektioon käytetyt koettimet on leimattu samalla fluoresoivalla värillä, mutta ne erotetaan toisistaan sulamiskäyräanalyysissä erilaisten sulamislämpötilojensa perusteella.

#### 3.2.4 MGB (minor groove binder)

Yksijuosteinen DNA muodostaa helposti sekundääri- ja tertiäärirakenteita, jotka voivat hankaloittaa muokkaamattomien DNA-koettimien kiinnittymistä. Sitoutumista helpottamaan on kehitetty kemikaalisesti muokattuja molekyyliä, jotka muodostavat epätavallisen vakaita hybrideitä tai tripleksejä, jotka voivat syrjäyttää olemassa olevia rakenteita. <sup>[21]</sup>

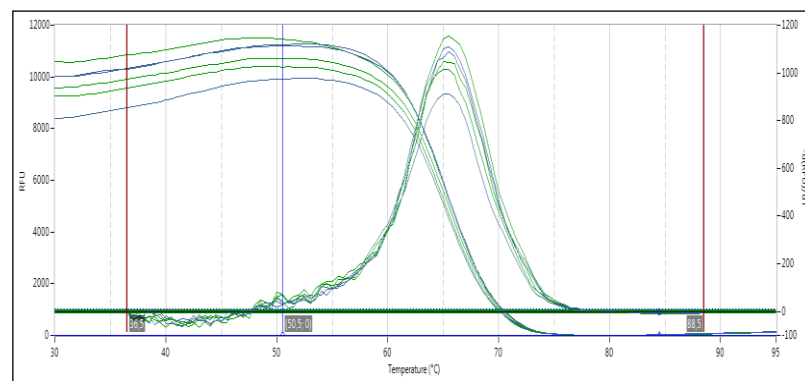


Kuva 7. Minor ja Major groove. (www.ncbi.nlm.nih.gov)

DNA-koettimet, joihin on liitetty minor groove binder (MGB) muodostavat erittäin stabiileja sidoksia DNA-targetin kanssa. Nimensä mukaisesti MGB sitoutuu kuvassa 7 näkyvään minor grooveen ja sen avulla stabiloi koettimen ja kohdesekvenssin välistä sidosta nostaa samalla koettimen  $T_m$ :ää, mikä puolestaan mahdollistaa lyhyempien koettimien käytön. Kun koetin on normaalisti noin 14-40 emäsparia (bp) pitkä, MGB:llä muokatut koettimet voidaan suunnitella 12-20 emäsparin pituisiksi. Muokkaamattomiin koettimiin verrattuna ne joissa on MGB on korkeampi  $T_m$  sekä parempi spesifisyys, sillä lyhyessä koettimessa yhdenkin emäksen mismatchilla on suurempi vaikutus  $T_m$ :ään. Korkeampi  $T_m$  ja lyhyempi pituus parantavat koettimessa vaimentimen ja fluoroforin välistä toimintaa. <sup>[22]</sup> Tämän lisäksi MGB-koettimien real-time PCR:n fluoresenssikäyrän dynaaminen alue on paljon laajempi kuin muokkaamattomien DNA-koettimien. <sup>[22]</sup>

### 3.2.5 Sulamiskäyräanalyysi

Sulamiskäyräanalyysiä käytetään erityisesti SYBR Greeniin I perustuvassa qPCR:ssä, jossa pelkästä monistuskäyrästä ei usein saada riittävän spesifistä tietoa. Sulamiskäyräanalyysi suoritetaan varsinaisten qPCR-monistussyklien jälkeen. Siinä lämpötila ensin lasketaan (+35 °C), ja nostetaan tämän jälkeen vähitellen (+95 °C). Matalassa lämpötilassa koettimet ovat sitoutuneet DNA-monistustuotteeseen, jota on seoksessa PCR-syklityksen jälkeen erittäin paljon. Fluoresoiva signaali on tällöin siis hyvin korkea. Lämpötilan lopulta noustessa lähelle koettimen  $T_m$ :ää, koettimet irtoavat kohdesekvenssistä, jolloin FRET alkaa toimia ja fluoresoiva signaali reaktiossa loppuu. Sulamiskäyräanalyysillä voidaan verrata spesifisen ja epäspesifisen tai kuten tässä työssä kahden spesifisen tuotteen sulamislämpötiloja, sillä erilaisilla kaksoisjuosteisilla DNA-molekyyleillä on erilaiset sulamislämpötilat. Lämpötilaerot johtuvat amplikonien pituudesta, emäskoostumuksesta, sekundääri- ja tertiäärirakenteista sekä reaktion kemiallisista ominaisuuksista. Nämä ominaisuudet huomioon ottaen voidaan koettimien  $T_m$ :ään pyrkiä vaikuttamaan jo suunnitteluvaiheessa. [14]



Kuva 8. Sulamiskäyrä.

Kuvassa 8. on esitettyä normaali sulamiskäyrä. Alaspäin suuntautuva käyrä kuvastaa fluoresenssitason (RFU, y-akseli) lämpötilan (x-akseli) funktiona. Fluoresenssitason muutos muunnetaan sulamispiikiksi ottamalla fluoresenssistä

ensimmäinen negatiivinen derivaatta lämpötilan funktiona ( $-dF/dT$ ). Jos sulamiskäyräanalyysissä saadaan vain yksi selkeä piikki, tarkoittaa se sitä että vain yhtä tuotetta on monistunut. Jos piikkejä on odotettua useampia, monistumisvaiheessa on syntynyt epäspesifisiä tuotteita. Negatiivisissa kontrolleissa, joissa ei ole kohde-DNA:ta mukana ei pitäisi tapahtua monistumista. Negatiivisia kontrolleja analysoitaessa voidaan sulkea pois primer-dimerien muodostuminen, mikäli sulamiskäyräanalyysissä ei synny lainkaan piikkejä. <sup>[14, 18]</sup>



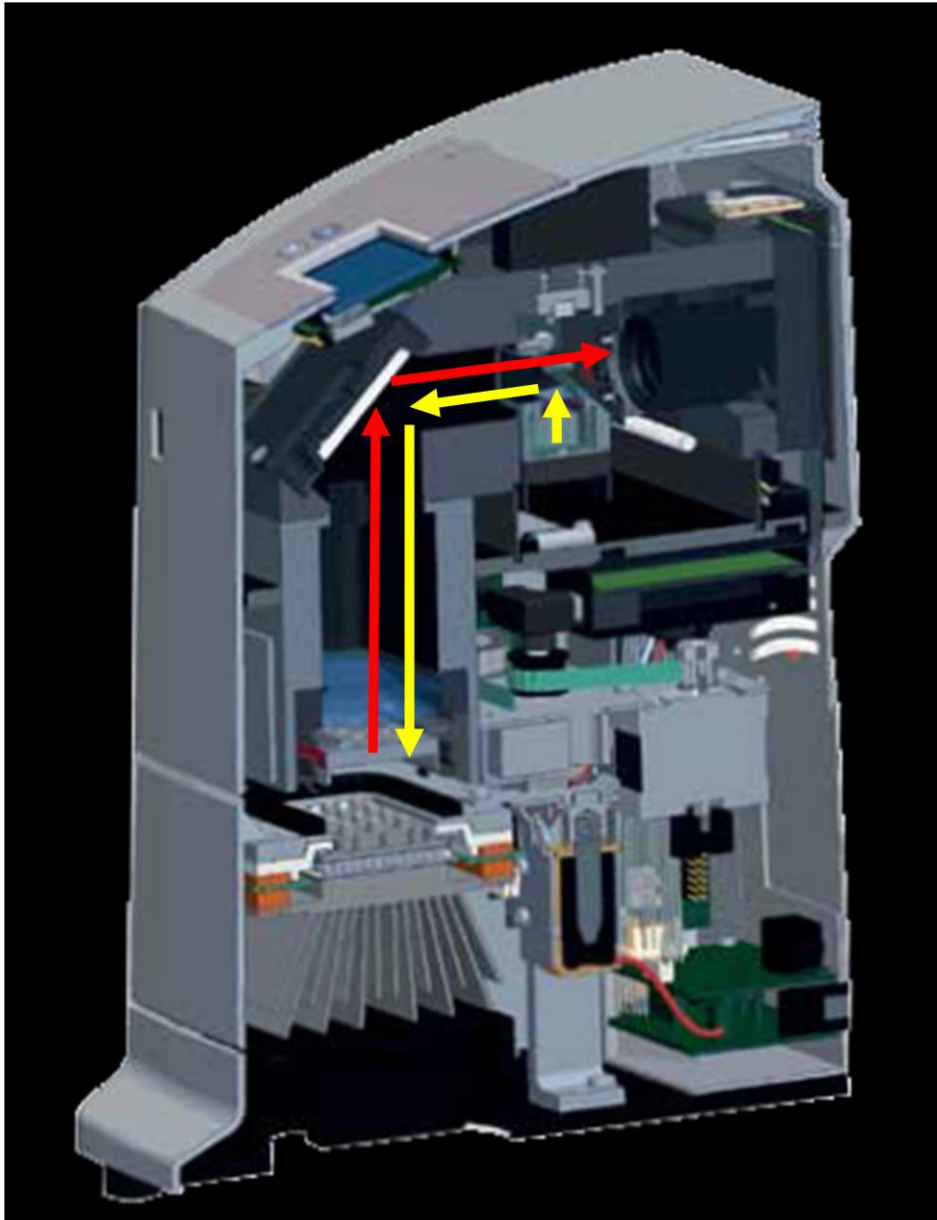
## 4 THERMO SCIENTIFIC PIKOREAL QPCR-LAITE

Thermo Scientific PikoReal™ qPCR-instrumentointiin kuuluu qPCR-laite sekä PikoReal-ohjelmisto, jolla laitetta ohjataan ja saatuja tuloksia analysoidaan. PikoReal qPCR-laite on hyvin pienikokoinen ja sitä saa sekä 24- että 96-kuoppaisena. Yhdellä tietokoneella voidaan tarvittaessa ohjata useita PikoReal-laitteita. Laitteen ei tarvitse olla kytkettynä tietokoneeseen ajon aikana, vaan ohjelma voidaan tuoda sinne muistitikulla, johon ajon tiedot voidaan tallentaa myös ajon päätyttyä.

Tässä työssä käytettiin kahta eri PikoReal laitetta näytemäärän mukaan. 96-kuoppaista laitetta (PR0961000534) käytettiin kun oli paljon näytteitä (esim. spesifisyysajot). 24-kuoppaista kuoppaista (PR0241201421) käytettiin esimerkiksi amplikonien vertailussa.

### 4.1 Optiikka

PikoRealin optinen systeemi sisältää viisi kanavaa, jotka voidaan kalibroida yleisimmin käytetyille fluoresoiville väreille. Neljällä kanavalla voidaan detektoida tiettyjä fluoresoivia värejä ja viides kanava on tarkoitettu HRM-analyysille (high resolution melt analysis). Valonlähteenä käytettävät LED-valot ovat pitkäikäisiä ja emittoivat tasaisesti valoa laajalla aallonpituusalueella (475-640 nm). Erillisten valonlähteiden käyttö jokaisella kanavalla (eksitaatio aallonpituudella) vähentää signaalien ristiin lukemista (crosstalk). Data kerätään kaikista kaivoista samaan aikaan erittäin herkällä CCD kameralla (520-740 nm). Skannausaika kaikille neljälle kanavalle on alle 10 sekuntia. <sup>[23]</sup>



Kuva 9. PikoRealin optinen toiminta. (www.thermofisher.com)

Valo, jonka lähteenä toimii LED, kulkee eksitaatiosuodattimen läpi ja heijastuu peilien kautta näytteisiin (kuvassa 9 keltainen nuoli). Näytteestä emittoitunut valosignaali palaa takaisin dikromaattisen peilin läpi ennen kuin se suodatetaan ja detektoidaan CCD-kameralla (kuvassa 9 punainen nuoli).<sup>[23]</sup>

## 5 TYÖN SUORITUS

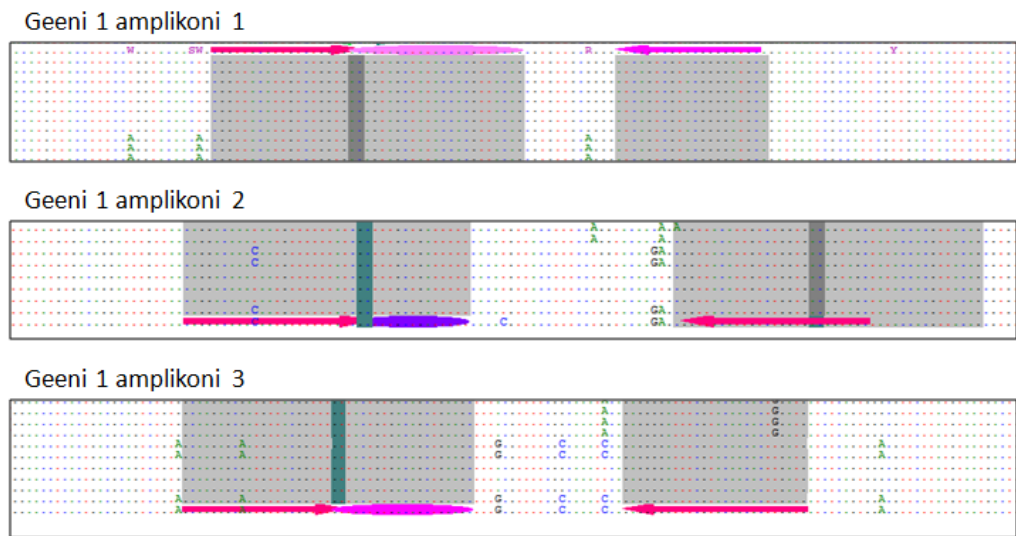
Työssä suunniteltiin alukkeet ja koetin kahdelle eri kohdegeenille tunnistamaan tietty ruokamyrkytysbakteeri elintarvikenäytteestä qPCR:n avulla. Kirjallisuuden ja julkaistujen artikkeleiden pohjalta päätettiin, mitä geenialueita käytettäisiin bakteerien tunnistamiseen. Internet-pohjaisia on-line työkaluja apuna käyttäen suunniteltiin geenille 1 ja geenille 2 spesifisesti genomiseen DNA:han sitoutuvat oligonukleotidit (Fw- ja Rv-alukkeet sekä koetin). Testissä molempien tunnistettavien geenien koettimet leimattiin samalla värillä, jolloin varsinainen spesifinen detektio suoritetaan sulamiskäyräanalyysillä. Normaalisissa multipleksissä jokainen targetti leimataan omalla värillään, jolloin jokainen monistuva tuote detektoidaan eri kanavalla.

### 5.1 Oligosuunnittelu

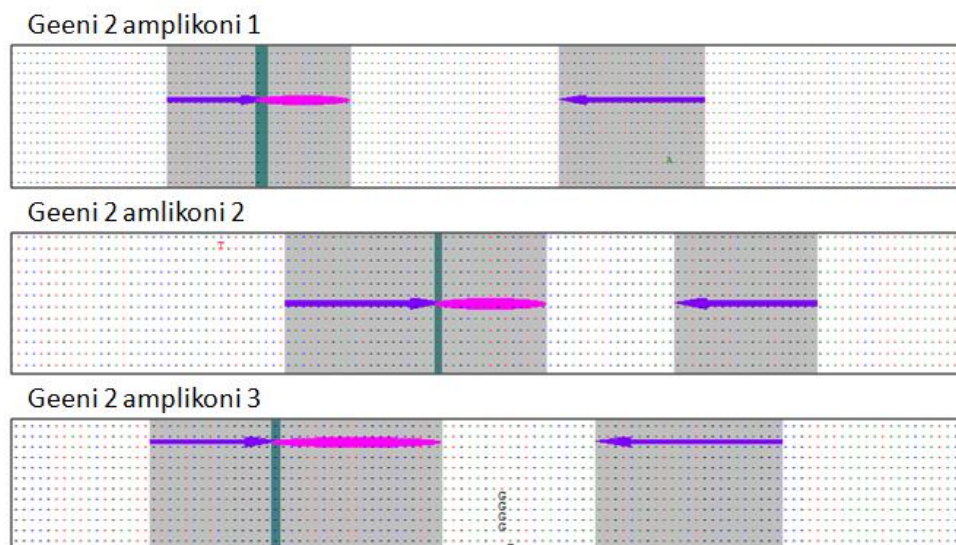
Kohdegeenien sekvenssit haettiin GenBank-selaimesta (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). GenBankista löytyy kootusti tietoa kolmesta eri lähteestä; DNA DataBank of Japan (DDBJ), the European Molecular Biology Laboratory (EMBL), sekä GenBank NCBI:stä. GenBankista löytynyt geenisekvenssi syötettiin BLAST-selaimen (Basic Local Alignment Search Tool), joka etsii tietokannastaan kaikki sille homologiset sekvenssit. BLAST ja GenBank toimivat yhdessä siten, että BLAST-selaimesta voi valita kaikki halutut sekvenssit, ja ne saadaan avattua GenBankissa. GenBankista haetut ja valitut sekvenssit vietiin suoraan BioEdit-ohjelmaan, joka toimii työkaluna sekvenssien järjestelyssä. Ohjelmalla voidaan linjata kaikki valitut sekvenssit siten, että ne ovat kohdakkain samojen emästen kohdalta. Linjaus tehtiin, kun sekvenssejä oli löytynyt tarpeeksi kattavasti. Kun sekvenssit oli linjattu allekkain, voitiin suunnittelutyö aloittaa. Amplikonialueeksi pyrittiin valitsemaan sellainen kohta sekvenssistä, jossa ei ollut emäspoikkeavuuksia eri sekvenssien välillä.

Thermo Scientific Solaris qPCR-kemiassa monistettavan amplikonin tulee olla suhteellisen lyhyt, noin 100 emäsparia, mutta enintään 200 emäsparia (bp). Alue tuli olla myös mielummin enemmän GC- kuin AT-painotteinen. G-C vastinemäket muodostavat tiukempi sidoksia kuin A-T, sillä niiden välillä on kolme vetysidosta, A-T vastinemästen kahden sidoksen sijaan. Tiukempi sidos vastinemästen välillä nostaa oligojen sulamislämpötilaa ja täten myös spesifisyyttä. Alukkeet suunniteltiin 12-30 nukleotidin mittaisiksi ja koettimet 12-20 nukleotidin mittaisiksi. Kuvissa 10 ja 11 nuolet kuvastavat alukkeita ja soikiot koettimia. Suunnittelutyössä käytettiin apuna Probe PCR-ohjelmaa, jonka avulla voidaan ennustaa, mikä oligojen sulamislämpötilaksi tulee tai millaisia mahdollisia sekundäärirakenteita ne muodostavat yksin tai muiden oligojen kanssa. Sekä geenille 1 että geenille 2 suunniteltiin oligot kolmelle amplikonialueelle. Tämä tehtiin sen takia, että jos jokin amplikoneista ei toimi niin on heti varalla joku muu vaihtoehto.

Kaikki suunnitellut oligot sekä koko monistettava amplikoni (kuvat 10 ja 11) syötettiin vielä BLASTiin erikseen. Näiden BLAST-hakujen tarkoituksena oli selvittää jo etukäteen, monistavatko suunnitellut oligot mahdollisesti muitakin patogeeneja kuin olisi tarkoitus.



Kuva 10. Esimerkki kohdekantojen sekvenssien linjaamisesta ja oligoiden suunnittelusta. Geenin 1 kolme eri amplikonia sekä niiden monistamiseen suunnitellut oligot. Nuolet kuvaavat alukkeita ja soikiot koettimia.



Kuva 11. Esimerkki kohdekantojen sekvenssien linjaamisesta ja oligoiden suunnittelusta. Geenin 2 kolme eri amplikonia sekä niiden monistamiseen suunnitellut oligot. Nuolet kuvaavat alukkeita ja soikiot koettimia.

Geenin 2 kaikki sekvenssit eivät olleet samanlaisia, vaan sekvenssien välillä oli variaatiota. Amplikonit 1 sekä 2 suunniteltiin monistamaan samoja sekvenssejä, kun taas kolmas amplikoni suunniteltiin tunnistamaan muista eroavat ja keskenään samanlaiset sekvenssit. Tällä haluttiin varmistua, että kohdegeenin kaikki variaatiot varmasti tunnistetaan. Suunnitellut oligot tilattiin ulkopuoliselta kaupalliselta valmistajalta.

## 5.2 Sekvensointi

Oligosuunnittelussa käytettävän kohde-DNA:n sekvensoinnilla haluttiin varmistua siitä, että siinä oleva sekvenssi on varmasti odotetunlainen eli 100% homologinen suunnittelussa käytetyn, GenBankista otetun sekvenssin kanssa. Molemmille geneille suunniteltiin primer3-ohjelman avulla alukkeet sekvensointia varten. Alukkeet suunniteltiin siten, että ne monistaisivat koko sen DNA-alueen, jolla kolme amplikonia sijaitsevat.

Kaikki PCR-reagenssit sekä putket joihin pipetoitiin pidettiin jäällä koko pipetoinnin ajan. Reaktioseos pipetoitiin 200 µl:n PCR-näyteputkiin, jotka sopivat laitteeseen. Putkiin pipetoitiin taulukon 1 mukainen määrä reagensseja, jolloin saavutettiin haluttu pitoisuus reaktiossa. Ensin putkeen pipetoitiin kaikki reagenssit ja näyte vasta viimeisenä. Putket suljettiin ja merkittiin huolellisesti, jottei näytteet menisi sekaisin.

Taulukko 1. PCR-reaktion reagenssit.

Reagenssi	Reagenssin määrä (µl)	Lopullinen konsentraatio reaktioseoksessa
Master Mix F-531 2x Phusion (Thermo Fisher Scientific)	10	
Forward-aluke	2,5	10 µM
Reverse-aluke	2,5	10 µM
MilliQ-vesi	15	
DNA näyte ( pg/µl-1 ng/µl)	5	
Kokonaistilavuus	50	

Alukkeiden suunnittelussa käytetty Primer3-ohjelma laskee automaattisesti, mitä lämpötilaa tulisi käyttää PCR-syklityksen 3. vaiheessa. Jos monistumista ei tällä lämpötilalla olisi tapahtunut, ajo olisi pitänyt uusia tätä suositeltua lämpötilaa hieman alhaisemmassa lämpötilassa. Taulukossa 2 näkyy lopullinen PCR-protokolla, jonka avulla saatiin monistettua spesifisesti haluttua PCR-tuotetta.

Taulukko 2. PCR-reaktion protokolla.

Vaihe	Vaiheen lämpötila	Vaiheen kesto
1	98 °C	30 s
2	98 °C	10 s
3	60 °C	10 s
4	72 °C	30 s
5	mene vaiheeseen kaksi 39 kertaa	
6	72 °C	5 min
7	10 °C	forever

PCR-ajo suoritettiin DNA ENGINE tetrad 2 (ID368) laitteella. PCR-ajon jälkeen näytteet ajettiin agarosigeenielektroforeesissa. Geelikuoppaan pipetoitiin 5 µl latauspuskuria joka saa näytteen pysymään kaivossa sekä 10 µl näytettä. Lisäksi reunimmaiseen kaivoon pipetoitiin 5 µl näytepuskuria (1Kb), jolloin voitiin verrata oman amplikonin kokoa näytepuskurin kokoon. Ajo 121 V 137 mA, noin 60 minuuttia. Geelin avulla oli tarkoitus tarkistaa, että PCR-ajossa muodostui vain haluttu tuote. Jos geelille olisi muodostunut usempi juova ”bändi”, olisi se tarkoittanut sitä, että PCR-ajossa olisi muodostunut epäspesifisesti useampaa eri tuotetta, eikä olisi siis soveltunut sekvensoitavaksi.

PCR-tuotteen puhdistus tehtiin Qiagen kitin ohjeiden mukaan (Qiagen Quick-Atart protocol. Qiagen instruction manual pages 19-20). Puskuri PE pulloon lisättiin etanolia (96-100%). PCR-tuotetta käytettiin jo aiemmin 10 µl agarosigeelielektroforeesiin, joten näytettä oli jäljellä 40 µl. PB puskuria lisättiin

5 volyymia suhteessa näytteen yhteen volyymiin, joten PB puskuria lisättiin  $5 \cdot 40 \mu\text{l} = 200 \mu\text{l}$ . Näytettä sekoitettiin ja se muuttui keltaiseksi. Näyte siirrettiin QIAquick kolumniin, joka oli sijoitettu 2 ml keräysputken päälle. Putkia sentrifugoitiin 13 000 rpm 1 minuttin ajan. Kolumnin läpi tullut neste kaadettiin pois, ja kolumni asetettiin takaisin keräysputken päälle. Kolumniin lisättiin  $750 \mu\text{l}$  PE puskuria ja sentrifugoitiin uudelleen samoilla kierroksilla ja saman ajan. Kolumnin läpi tullut neste kaadettiin pois ja kolumni asetettiin takaisin keräysputken päälle. Kolumni sentrifugoitiin vielä kerran, jotta voitiin olla varmoja, että kaikki pesupuskuri oli tullut kolumnista läpi. QIAquick kolumnit joissa näytteet olivat, sijoitettiin puhtaisiin 1,5 ml putkiin. Jotta DNA saatiin eluoitua lisättiin kolumnin päälle  $50 \mu\text{l}$  EB puskuria ja sentrifugoitiin 13 000 rpm yhden minuutin ajan. Puhdistettu näyte oli lopuksi puhtaassa 1,5 ml putkessa ja sen pitoisuus mitattiin vielä NanoDrop ND-1000:lla. Sekvensointia varten näyte ja alukkeet laimennettiin sekvensoinnin suorittavan tahon suositusten mukaisesti.

Näytteet ja alukkeet lähetettiin Eurofins MWG Operonille, joka tarjoaa yrityksille sekvensointipalveluja. Yritys selvittää lähetetyistä näytteistä emäsjärjestyksen. Tuloksena saadun emäsjärjestyksen voi lisätä omien aikaisemmin suunnitteluvaiheessa etsittyjen sekvenssien joukkoon ja linjata sekvenssit uudelleen. Näin nähdään kuinka hyvin näyte vastaa suunnittelussa käytettyjä sekvenssejä. Sekvensoinnista vastauksena tulleelle emäsjärjestykselle tehtiin myös BLAST-haku, jotta saatiin varmennus vielä tätäkin kautta, että näyte on 100% homologinen suunnitelluissa käytetyille sekvensseille.

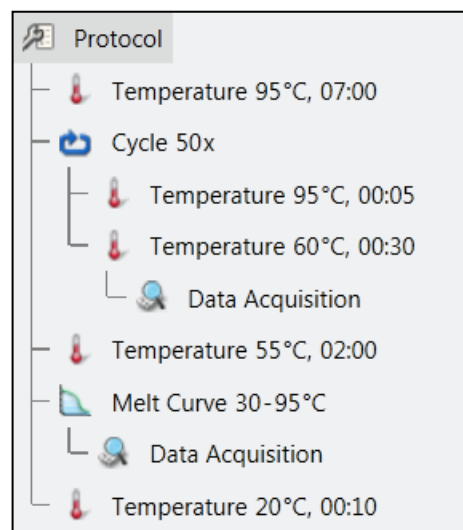
### 5.3 Oligojen testaus

Kaikki suunnitellut oligot testattiin rinnakkain käyttämällä sekvensoituja DNA-näytteitä (kts. kohta 5.2), jolloin nähtiin mikä niistä toimii parhaiten. Monistuskäyrästä katsottiin mm. minkä Cq-arvon näyte sai, käyrän muoto sekä mihin arvoon fluoresenssin loppupointesiteetti asettui. Sulamiskäyräanalyyseissä seurattiin sulamislämpötilaa sekä sitä, mikä amplikoneista muodosti



selkeimmän sulamisperiikin. Lisäksi tuli huomioida, että geenin 1 ja geenin 2 sulamisperiikit ovat tarpeeksi kaukana toisistaan, jotta ne voidaan detektoida toisistaan erillään. Näitä piirteitä vertailemalla valittiin parhaat amplitonit jatkoon. Geenin 2 amplitoni 3:lle ei ollut testi vaiheessa templaattia, joten sitä ei päästy testaamaan.

Amplitonivertailussa 24-kuoppaiselle näytelevylle pipetoitiin 10 µl mastermixiä sekä 2µl primermixiä. Näyteen määrä oli 8µl, jolloin reaktion kokonaistilavuus oli 20 µl. Jokainen amplitoni testattiin samalla näytteellä ja pitoisuudella, jotta tulokset olisivat vertailukelpoisia. Jokaisella amplitonilla tehtiin kolme rinnakkaista reaktiota per DNA-laimennos. Kaikissa reaktioissa oli mukana myös IAC (internal amplification control), jonka avulla voidaan seurata, että reaktio on ollut onnistunut. Ajossa käytettiin kuvan 12. mukaista protokollaa. Kyseisellä protokollalla ajettiin kaikki muutkin qPCR-ajot joita työssä käytettiin.



Kuva 12. Työssä käytetty qPCR-protokolla.

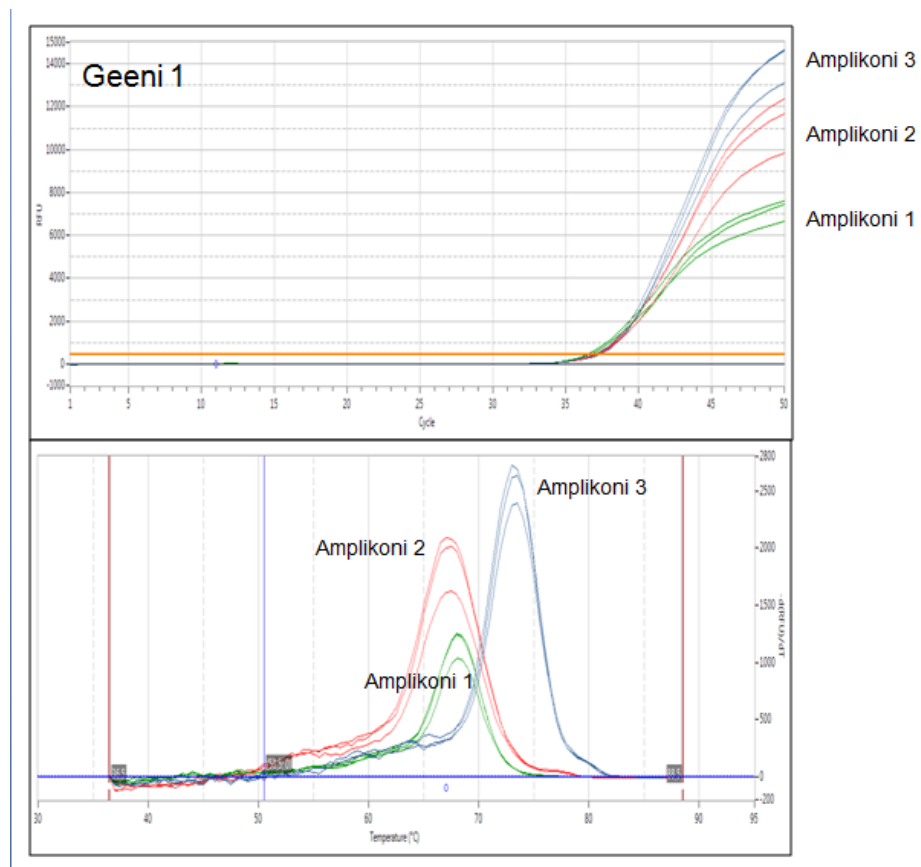
Parhaaksi todetuilla amplitoneilla jatkettiin spesifisyystestauksiin. Geenin 1 ja 2 oligot pipetoitiin samaan primermixiin. Tätä mixiä pipetoitiin samoin kuin amplitonivertailutestissä. Kantoja testattiin yhteensä 202 kappaletta, joista 25

kantaa tiedettiin positiiviseksi geenille 1 ja 30 geenille 2. Negatiivisia kantoja geenille 1 oli 177 ja geenille 2 yhteensä 172 kappaletta.

## 6 TULOKSET

### 6.1 Amplikonien vertailu

Kuvassa 13 on esitetty tulokset testistä, jossa vertailtiin geenin 1 kolmea eri amplikonkia. Ylemmästä monistuskäyrästä voi nähdä käyrien muodon, C<sub>q</sub>-arvot sekä fluoresenssin loppuintensiteetit. Alemmat käyrät kuvaavat sulamiskäyrää, josta voi nähdä kuinka kaikille amplikoneille syntyy selkeä piikki tietyn lämpötilan kohdalle.



Kuva 13. Geenin 1 amplikonien vertailu.

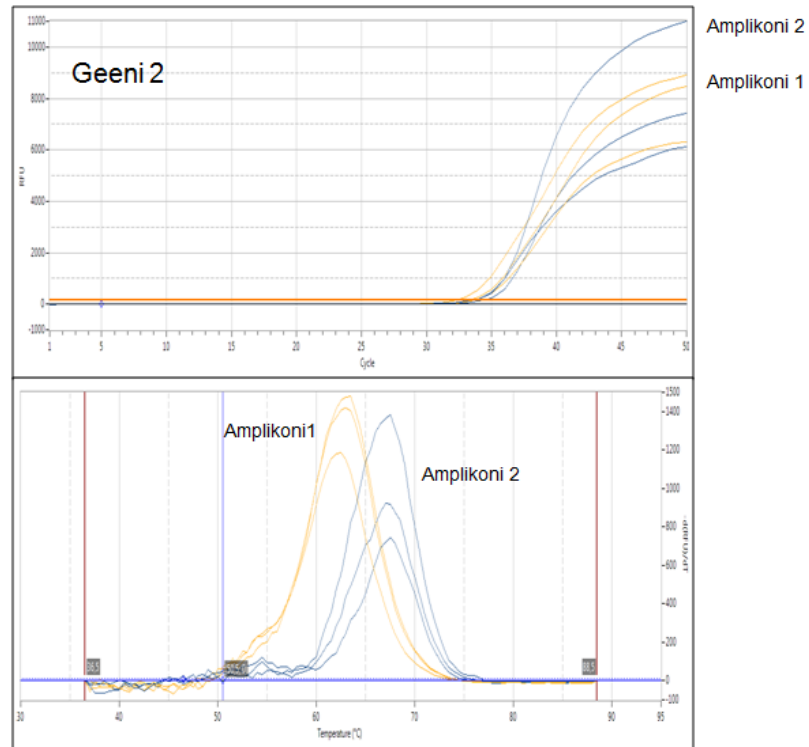
Taulukko 3. Geenin 1 amplikonien Cq- sekä Tm-arvot.

Amplikoni	Cq	Cq-keskiarvo	Tm	Tm-keskiarvo
Amplikoni 1	37,13	36,7	68,1	68,1
	36,38		68,1	
	36,59		68,2	
Amplikoni 2	36,97	37,0	67,3	67,3
	37,02		67,2	
	37,14		67,4	
Amplikoni 3	37,17	37,1	73,3	73,2
	37,22		73,1	
	37,01		73,3	

Kynnyssyklitaso: 433

Taulukossa 3 on esitetty geenin 1 amplikonien Cq-arvot. Kaikilla amplikoneilla ajettiin kolme rinnakkaista näytettä, joiden saamista Cq-arvoista laskettiin keskiarvo. Taulukossa on esitetty myös amplikonien sulamislämpötilat (Tm), jotka tuli ottaa huomioon, jotta detektoitavat geenit voidaan erottaa selvästi erillisillä piikeillä sulamiskäyräanalyysissä.

Kuvassa 14 on esitetty tulokset testistä, jossa vertailtiin geenin 2 kahta eri amplikonia.



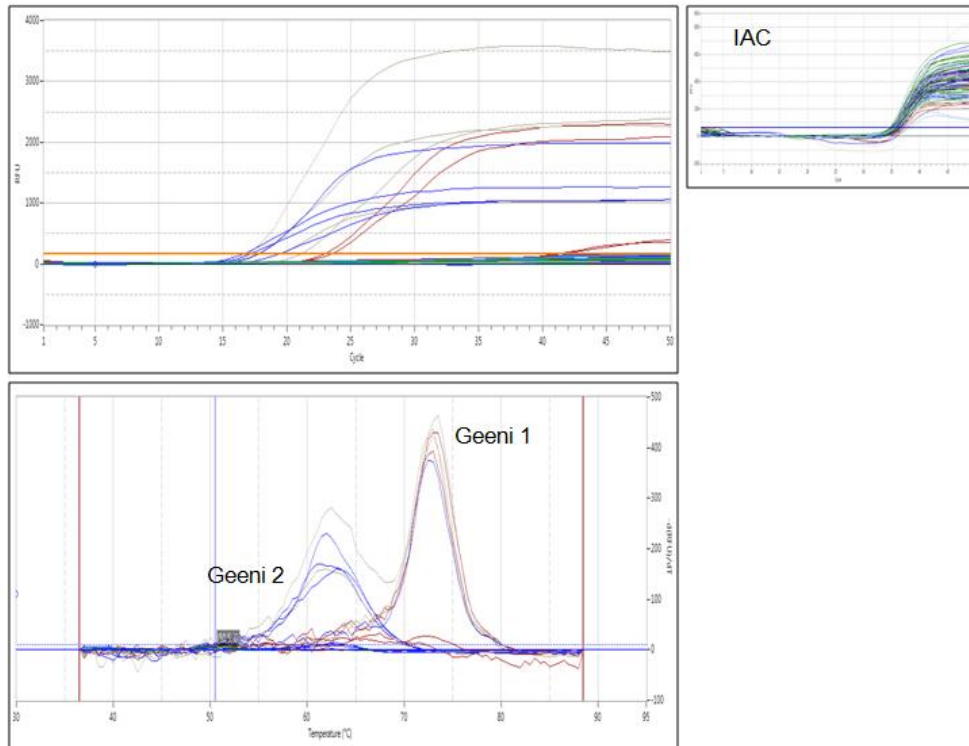
Kuva 14. Geenin 2 amplikonien vertailu.

Taulukossa 4 on esitetty geenin 2 amplikonien Cq- ja sulamislämpötilat (Tm).

Taulukko 4. Geenin 2 amplikonien Cq- sekä Tm-arvot.

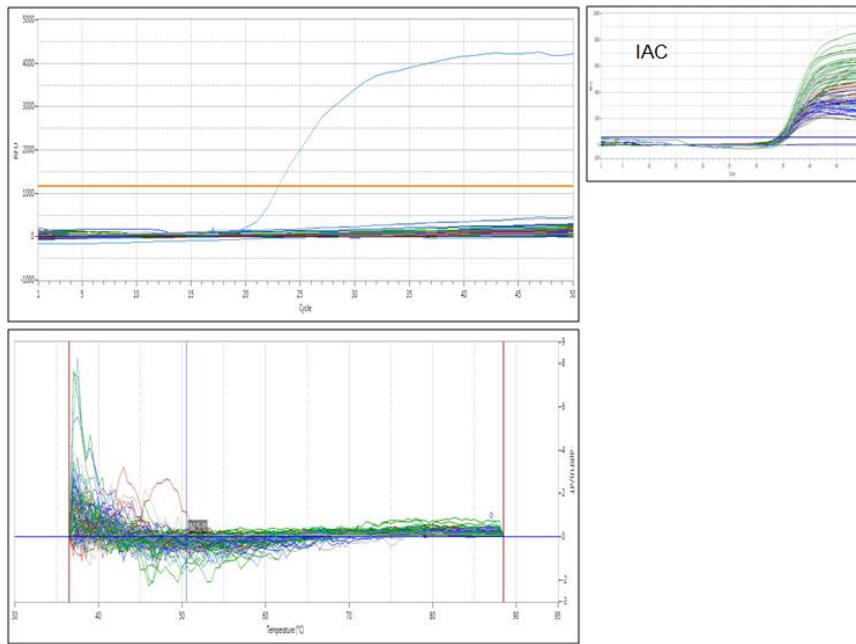
Amplikoni	Cq	Cq-keskiarvo	Tm	Tm-keskiarvo
Amplikoni 1	32,2	33,0	62,8	62,6
	33,25		62,8	
	33,61		62,2	
Amplikoni 2	34,36	33,9	67,2	67,2
	33,71		67,4	
	33,58		67,1	
Kynnysyklitaso: 158				

## 6.2 Spesifisyys



Kuva 15. Spesifisyysajo 1.

Kuvassa 15 on spesifisyysajo, jossa mukana oli tiedossa olevia positiivisia sekä negatiivisia genomisia DNA-näytteitä geeneille 1 sekä 2. Molempien geenien koettimet on leimattu samalla värillä, joten niitä ei voida erottaa toisistaan monistuskäyrän perusteella. Ylimmässä kuvassa monistumiskäyrä, ja sen alla vastaavien reaktioiden sulamiskäyrät, jossa molemmat geenit voidaan nähdä omana piikkinään. Oikeanpuoleisimmassa kuvassa IAC:in monistuminen.



Kuva 16. Spesifisyysajo 2.

Kuvassa 16 on esitetty tulokset spesifisyysajosta, jossa mukana oli yksi positiivinen kontrolli varmistamassa, että reaktio toimii. Kaikki muut kannat olivat negatiivisia molemmille geneille. Ylimmässä kuvassa monistuskäyrä. Monistuskäyrän alapuolella on sulamiskäyrä. Oikeanpuoleisimmassa kuvassa IAC:in monistuminen.

Taulukko 5. Yhteenveto tuloksista.

	Näytteiden lukumäärä	Oikeiden positiivisten näytteiden lukumäärä	Väärin positiivisten näytteiden lukumäärä	Oikeiden negatiivisten näytteiden lukumäärä	Väärin negatiivisten näytteiden lukumäärä
Geeni 1	202	25	2	177	0
Geeni 2	202	30	0	172	0

Taulukkoon 5 on listattu kaikki testatut positiivisten sekä negatiivisten kantojen määrät. Taulukosta ilmenee myös kuinka geenien 1 sekä 2 oligot ovat monistaneet näytteitä.

## 7 JOHTOPÄÄTÖKSET

Työn tarkoituksena oli suunnitella spesifiset oligot kahdelle eri patogeenille ja testata niiden toimivuutta ja spesifisyyttä. Suunnittelutyön onnistumisen edellytyksenä pidettiin, että oligot monistaisivat kaikki kohde-DNA-kannat ja jättäisivät monistamatta kaiken muun. Tämän lisäksi geenit on tarkoitus erottaa sulamiskäyräanalyysillä toisistaan, joten sulamiskäyräpiikkien tuli olla tarpeeksi etäällä toisistaan.

Ensimmäisessä testivaiheessa vertailtiin geenin 1 ja geenin 2 amplikonien paremmuutta, jotta löydettäisiin parhaat amplikonit jatkoon jatkamaan testejä. Kuvasta 13 voidaan nähdä, kuinka kaikilla geenin 1 amplikoneilla oli C<sub>q</sub>-arvo hyvin lähellä toisiaan. Amplikoni 3:lla oli kuitenkin paras loppuintesiteetti ja myös selkein sulamiskäyräpiikki. Lisäksi sen T<sub>m</sub> oli kaikkein korkein, jolloin matalamman T<sub>m</sub>:n geeni 2 saataisiin mahdollisimman hyvin erotettua siitä. Geenin 1 osalta testejä jatkettiin siis amplikonilla 3.

Kuten kuvassa 14 näkyy, ei geenin 2 eri amplikonien monistuskäyrissä ollut suuria eroja. Ainoastaan rinnakkaisten reaktioiden loppuintesiteetit lähtivät lopussa hieman hajoamaan. Amplikonilla 1 oli kuitenkin selkeämpi sulamiskäyrä ja T<sub>m</sub> oli matalampi, eli se sopi tämänkin puolesta paremmin jatkoon. Geenin 2 osalta testejä jatkettiin amplikonilla 1.

Parhaiden amplikonien valitsemisen jälkeen pipetoitiin molempien geenien oligot samaan primermixiin ja testattiin seoksen spesifisyyttä. Spesifisyytsajoja oli yhteensä neljä, joiden näytemäärät näkyvät taulukosta 5. Kuvassa 15 on esitetty tulokset ajosta, jossa oli mukana sekä negatiivisia että positiivisia näytteitä geeneille 1 ja/tai 2. Monistuskäyrän perusteella ei voida päätellä, kumpaa geeniä on monistunut. Sulamiskäyräanalyysin tulos on erittäin selkeä, ja sen avulla voitiin helposti selvittää kumpaa geeniä oli monistunut. Kuten kuvassa 15 voidaan havaita, kaksi näytettä monistuu selvästi korkeammalla kynnysarvolla kun muut näytteet. Näiden näytteiden kuuluisi olla negatiivisia, ja tulos selittyy todennäköisesti ristikontaminaatiolla, sillä kaikki oikeasti positiiviset



näytteet olivat vahvoja ja C<sub>q</sub>-arvot selvästi matalampia. Epäiltyjen ristikontaminoituneiden näytteiden viereisessä näytekupassa oli todella vahva positiivinen näyte, josta ristikontaminaatio on todennäköisesti pipetoitaessa tullut. Ajossa oli mukana myös useampi NTC (no template control), jotka olivat negatiivisia.

Kuvassa 16 on esitelty ajo, jossa oli mukana pelkästään molempien kohdegeenien suhteen negatiivisia näytteitä sekä yksi positiivinen kontrollinäyte. Näytteiden lisäksi ajossa oli mukana NTC-näytteitä. Käyrät lähtevät hieman nousemaan, mutta kyseessä ei ole todellinen monistuminen, sillä myös NTC:t nousevat hieman. Pieni käyrien nouseminen ei kuitenkaan haittaa, sillä ne eivät ylitä kynnyssyklitasoa. Lisäksi detektioperusteena käytetään sulamiskäyräanalyysia, eikä siinä näy piikkejä.

Työssä saatiin siis onnistuneesti suunniteltua toimintakyvyltään ja spesifisyydeltään hyvät oligot geneille 1 sekä 2. Lisäksi ero koettimien sulamislämpötiloissa mahdollistaa molempien geenien detektion samassa reaktiossa ja samalla leimalla, sulamiskäyräanalyysiä hyväksi käyttäen.

Jatkossa testiä kehitetään ja testataan edelleen, ennen kuin se on valmis myyntiin. Väärät positiiviset näytteet uusitaan, jotta voidaan varmistua siitä, että kyseessä todellakin oli ristikontaminaatio. Sen jälkeen testausta jatketaan puhtaan DNA-näytteen sijaan ruokamatriisissa esirikastetuilla bakteerisolulla, joista vapautetaan DNA ennen qPCR-analyysia. Tällöin näyte vastaa mahdollisimman lähelle "aitoa" todellista näytettä mahdollisine PCR-inhibiittoreineen.

Lisäksi oligoiden konsentraatioita vielä optimoidaan, jotta oligoiden toiminta olisi mahdollisimman tehokasta eli mahdollisimman pienet määrät kohde-DNA:ta pystytään havaitsemaan mahdollisimman samankaltaisilla kynnyssykleillä (C<sub>q</sub>).

## LÄHTEET

1. Eviran julkaisu 10/2012, Ruokamyrkytykset Suomessa 2010 [käytetty 28.2.2013]
2. [http://www.fsis.usda.gov/Fact\\_Sheets/Foodborne\\_Illness\\_What\\_Consumers\\_Need\\_to\\_Know/index.asp](http://www.fsis.usda.gov/Fact_Sheets/Foodborne_Illness_What_Consumers_Need_to_Know/index.asp) [käytetty 1.4.2013]
3. [http://www.evira.fi/files/attachments/fi/evira/lomakkeet\\_ja\\_ohjeet/elintarvikkeet/elintarvike\\_ja\\_rehutus/evira\\_6002\\_5\\_salmonella\\_osoitt.pdf](http://www.evira.fi/files/attachments/fi/evira/lomakkeet_ja_ohjeet/elintarvikkeet/elintarvike_ja_rehutus/evira_6002_5_salmonella_osoitt.pdf) [käytetty 28.2.2013]
4. Principles and Practice of Immunoassay, second edition, Christopher P Price, David J Newman, 1997)
5. R M Twyman, IMMUNOASSAYS, 2005, Elsevier, APPLICATIONS/Clinical 317
6. Methods in Molecular Biology™ Volume 42, ELISA Theory and Practice By John R. Crowther, 1995)
7. Essential Data Series, IMMUNOASSAYS, R. Rickwood, B.D. Hames, 1996)
8. J. R. Uhl, S. C. Adamson, E. A. Vetter, C. D. Schleck, W. S. Harmsen, L. K. Iverson, P. J. Santrach, N. K. Henry, and F. R. Cockerill. Comparison of LightCycler PCR, Rapid Antigen Immunoassay, and Culture for Detection of Group A Streptococci From Throat Swabs. Journal of Clinical Microbiology, Jan. 2003, p. 242-249
9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/probe/doc/TechPCR.shtml> [Käytetty 10.4.2013]
10. BIOLOGY Eighth Edition, Neil A. Campbell, Jane B. Reece, Lisa A. Urry, Michael L. Chain, Steven A. Wasserman, Peter V. Minorsky, Rober B. Jackson (2008)
11. Mikael Kubista, Josè Manuel Andrade, Martin Bengtsson, Amin Frootan, Jiri Jonàk, Kristina Lind, Radek Sindelka, Rober Sjöback, Björn Sjögreen, Linda Strömbom, Anders Ståhlberg, Neven Zoric. The Real-time polymerase chain reaction. Molecular Aspects of Medicine 27 (2006) 95-125
12. Ian M. Mackay, Katherine E. Arden and Andreas Nitsche, SURVEY AND SUMMARY Real-time PCR in virology, 2002 (1292-1305 Nucleic Acids Research, 2002, Vol. 30, No, 6)
13. Real-time PCR, edited by M. Tevfik Dorak
14. IUL Biotechnology Series, A-Z of Quantitative PCR, edited by Stephen A. Bustin, 2004
15. <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/Molecular-Probes-The-Handbook/Technical-Notes-and-Product-Highlights/Fluorescence-Resonance-Energy-Transfer-FRET.html> [käytetty 12.2.2013]
16. Erja Malinen, Anna Kassinen, Teemu Rinttilä and Airi Palva. Comparison of real-time PCR with SYBR Green I or 5'-nuclease assays and dot-blot hybridization with rDNA-targeted oligonucleotide probes in quantification of selected faecal bacteria. Biology (2003), **149**, 269-277
17. Steven Giglio, Paul T. Monis and Christopher P. Saint, Demonstration of preferential binding of SYBR Green I to specific DNA fragments in real-time multiplex PCR, 2003

18. Fredrique Ponchel, Carmela Toomes, Kieran Bransfield, Fong T Leong, Susan H Douglas, Sarah L Field, Sandra M Bell, Valerie Combaret, Alain Puisieux, Alan J Mighell, Philip A Robinson, Chris F Inglehearn, John D Isaacs and Alex F Markham. Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: An alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. *BMC Biotechnology* 2003, **3**:18
19. Eugeny A. Lukhtanov, Sergey G. Lokhov, Vladimir V. Gorn, Mikhail A. Podyminogin and Walt Mahoney. Novel DNA probes with low background and high hybridization-triggered fluorescence. *Nucleic Acids Research*, 2007, Vol. 35, No. 5 **e30**
20. I.A. Aftonia, M.W. Reed, E. Lusby, I.G. Shishkina, and Y.S. Belousov. Minor Groove Binder-Conjugated DNA Probes for Quantitative DNA Detection by Hybridization-Triggered Fluorescence. *BioTechniques* 32:940-949 (April 2002)
21. Surat Kumar, Michel W. Reed, Howard B. amber Jr, Vladimir V. Gorn, Eugeny A. Lukhtanov, Matthew Foti, John West, Rick B. Meyer Jr and Barry I. Schweitzer. Solution structure of a high stable DNA duplex conjugated to a minor groove binder. *Nucleic Acids Research*, 1998, Vol. 26, No. 3 **831-838**
22. Igor V. Kutyavin, Irina A. Aftonia, Alan Millis, Vladimir V. Gorn, Eugeny A. Lukhtanov, Evgeny S. Belousov, Michael J. Singer, David K. Walburger, Sergey G. Lokhov, Alexander A. Gall, Robert Dempcy, Michael W. Reed, Rick B. Meyer and Joe Hedgpet. 3'-Minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucleic Acids Research*, 2000, Vol. 28, No. 2 **655-661**
23. <http://www.thermoscientificbio.com/uploadedFiles/Resources/pikoreal-brochure-low.pdf> [käytetty 20.3.2013]