

Polvipunktionäytteen bakteeriperäisen DNA:n mittaaminen ja sen optimointi uuden sukupolven sekvensoinnin avulla

Elsa Öistämö

Syventävien opintojen kirjallinen työ

Tampereen yliopisto

Lääketieteen yksikkö

Maaliskuu 2016

Tampereen yliopisto

Lääketieteen yksikkö

ÖISTÄMÖ ELSA: POLVIPUNKTIONÄYTTEIDEN BAKTEERIPERÄISEN DNAN:N
MITTAAMINEN JA SEN OPTIMOINTI NGS:N AVULLA

Kirjallinen työ

Ohjaaja: professori Matti Lehto

Maaliskuu 2016

Avainsanat: PCR, NGS, qPCR, bakteeri-DNA, nivelneste, niveltulehdus, DNA-kirjasto, sekvensointi

Terve nivelneste on nykyäsitöksen mukaan steriiliä eli se ei sisällä eläviä tai kuolleita bakteereita. Bakteerien päästessä nivelnesteeseen käynnistyy elimistön puolustusjärjestelmä, josta seuraa niveltulehdus.

Bakteeriviljely on bakteriologisen diagnostiikan perusta. Bakteerin aiheuttaman niveltulehduksen selvittelyssä hyödynnetään mikroskopointia, bakteerivärijäystä sekä bakteeriviljelyä. Tämänhetkinen bakteeridiagnostiikka ei ole aukoton ja käsityönä tehtävä bakteerintunnistus on hidasta. Pelkästään bakteerien kasvattamiseen kuluva aika on 16-24 tuntia ja biokemialliset testit yhdessä lääkeherkkyyden testauksen kanssa vievät usein päiviä.

Molekyylibiologisten menetelmien kehitys on avannut uusia mahdollisuuksia tarkempaan ja nopeampaan bakteeridiagnostiikkaan. Yleistyvän polymeerasiketjureaktiotekniikan avulla bakteerit on mahdollista tunnistaa kanta-, laji-, suku- ja heimotasolla. Next generation sequencing (NGS) on uuden sukupolven sekvensointia, joka mahdollistaa koko perimän eli genomin sekvensoinnin yhdellä kerralla tai halutun alueen syvän sekvensoinnin. Menetelmä on nopea, eikä se rajoitu perinteisen polymerace chain reaction (PCR):n tavoin muutamien pitkien fragmenttien käsittelyyn.

Tässä opinnäytetyössä optimoin NGS-PCR-menetelmän, joka mahdollistaa nivelnesteinäytteiden valmistamisen NGS-mittauksia varten. Tätä varten optimoin metagenomisen 16S-rRNA-kirjaston luomisen. Menetelmän pystytyksessä käytössä olivat nivelnesteinäytteet (40kpl) sekä referenssibakteerit. Menetelminä käytössä olivat bakteeripitoisuuden määrittämisessä kvantitatiivinen PCR, Nanodrop sekä Fraqment Analyzer. Bakteeri-DNA:n monistamisessa käytettiin PCR:ta ja DNA-tuotteiden puhdistuksessa käytössä olivat geelipuhdistus sekä magneettihelmipuhdistus.

Tämän opinnäytetyön jälkeen protokolla toimii hyvin viljelypositiivisille näytteille. Näistä näytteistä on NGS-sekvensoinnin avulla mahdollista selvittää, mitä bakteereja näytteet sisältävät. Lisäksi viljelynegatiivisia näytteitä voidaan hyödyntää tutkimustyössä. Viljelynegatiivisista näytteistä on mahdollista muodostaa yhdistelmänäytteitä, joiden avulla voidaan esimerkiksi selvittää miten bakteereiden lääkeresistenssisyydet muuttuvat ajan kanssa tai mistä haitalliset bakteerit, patogeenit, ovat peräisin.

Tämän opinnäytteen alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck-ohjelmalla Tampereen yliopiston laatu järjestelmän mukaisesti.

Sisällys:

Johdanto	4
Nivel ja nivelneste	4
Bakteerin aiheuttama niveltulehdus	4
Bakteereiden ja virusten analysointi kliinisistä näytteistä	5
Mikroskopointi ja bakteeriviljelyt	5
Bakteereiden tunnistaminen polymeraasiketjureaktion avulla	6
Opinnäytetyön tavoitteet ja tarkoitus	9
Aineisto ja menetelmät	10
Näytteet	10
Näytteiden eristys	11
Bakteeripitoisuuden määrittäminen	11
Nanodrop ja kvantitatiivinen PCR	11
Fragment Analyzer	12
NGS-protokollan mukaiset PCR-ohjelmat	12
Ensimmäinen PCR	12
Toinen PCR	14
Puhdistusmenetelmät	14
Magneettihelmipuhdistus	14
Geelipuhdistus	15
PCR-tuotteen konsentroidin	15
Tulokset ja pohdinta	15
Lopuksi	18
Viitteet	20

Johdanto

Nivel ja nivelneste

Nivelneste toimii nivelen ”voiteluaineena” mahdollistaen nivelen mahdollisimman kitkattoman liikkeen. Nykyisen tiedon valossa nivelneste muodostuu plasman suodoksena. Nivelontelon pinnalla olevat ns. reunasolut tuottavat nivelnesteeseen hyaluronihappoa, joka tekee nivelnesteestä viskoosin. Terve nivelneste on nykyäsityksen mukaan steriiliä, ja ei sisällä eläviä tai kuolleita bakteereita [1].

Bakteerin aiheuttama niveltulehdus

Bakteerien päästessä nivelnesteeseen käynnistyy elimistön puolustusjärjestelmä, josta seuraa niveltulehdus. Tulehdusreaktion avulla elimistö pyrkii eliminoimaan tulehduksen aiheuttajan ja minimoimaan vaurioalueen. Tulehdusreaktio eli inflammaatio on siis elimistön välttämätön ja tarkoituksenomainen tapa reagoida tunkeutujaan. Bakteerit voivat aiheuttaa niveltulehduksen joko suoraan tai välillisesti aktivoimalla elimistön puolustusjärjestelmän [2].

Septinen artriitti eli bakteerin suoraan aiheuttama niveltulehdus on usein *Staphylococcus aureuksen* tai streptokokkien aiheuttama tulehdus. Septinen artriitti aiheuttaa usein yhteen niveleeseen paikallistuneen tulehdusreaktion, jossa nivel ensin muutaman päivän aikana turpoaa, alkaa punoittaa ja tulee kivuliaaksi. Samalla se saa aikaan kuumeen nousun. Usein tulehdus kohdistuu nivelkalvopinta-alaltaan isoimpiin niveliin kuten polviniveleeseen (noin 50 % tapauksista) tai lonkkaniveleeseen [3].

Reaktiivinen artriitti on immunologinen jälkitauti, joka on seuraus primaari-infektiosta, joka tapahtuu jossain muualla elimistössä kuin tulehtuneessa nivelessä. Arvellaan, että reaktiivinen artriitti eli bakteerien välillisesti aiheuttama niveltulehdus aiheutuu bakteerien rakenteiden päästessä kosketuksiin nivelkalvon kanssa infektion seurauksena. Tästä reaktiosta johtuu nivelessä tapahtuva tulehdusreaktio [4]. Reaktiivisen artriitin yleisimpiä aiheuttajia ovat yersiniat, salmonellabakteerit sekä kampylobakteerit suolistotulehdusten seurauksena. Myös klamydia voi aiheuttaa niveltulehduksen virtsatietulehduksen yhteydessä [5]. Myös suun bakteerit voivat aiheuttaa reaktiivisen artriitin [6].

Niveltulehdus diagnosoidaan pääasiassa kliinisten oireiden perusteella. Nivelnesteeseen tutkiminen tehdään aina epäiltäessä bakteeri-infektiota [7]. Nivelnesteeseen tutkimusmenetelmät perustuvat mikrobiologiseen tekniikkaan, kuten viljelyyn, pikatesteihin ja vasta-ainetutkimuksiin. Lisäksi diagnoosin apuna käytetään kuvantamistutkimuksia, joilla voidaan havaita esimerkiksi nestekertymät nivelissä sekä mahdolliset luun pintojen terävöitymiset. Kuvantamistutkimuksia käytetään erotusdiagnoosin apuna erityisesti erotettaessa niveltulehdusta muista nivelen vammoista [8],[9]. Nivelproteesipotilailla tekonivelinfektio on yleinen

komplikaatio. Se kehittyy noin 1-2 %:lle proteesipotilaista. Noin 10 %:lla näistä potilaista tulehdus kuitenkin jää diagnosoimatta johtuen niveltulehdusten vaikeasta ja hitaasta diagnostiikasta. Niveltulehduksen diagnoosin viivästyminen tai asianmukaisen hoidon puuttuminen kokonaan voi aiheuttaa niveltuhoa [10],[11].

Bakteereiden ja virusten analysointi kliinisistä näytteistä

Niveltulehdusta epäiltäessä laboratorioanalyysillä selvitetään onko kyseessä bakteerin tai viruksen aiheuttama tulehdus. Tarkoituksena on löytää näyttöä tulehduksesta, elimistön puolustusjärjestelmän aktivoitumisesta sekä itse tulehduksen aiheuttajasta. Näytteitä otetaan muun muassa nivelnesteestä, ympäröivistä pehmytkudoksista, verestä, virtsasta sekä ulosteesta [8]. Leukosyyttimäärän arviointi ja mittaus on nykyisin diagnoosin perustana määriteltäessä onko kyseessä tulehduksellinen vai ei-tulehduksellinen tila, mutta sen avulla ei ole mahdollista selvittää täsmällisesti niveltulehduksen aiheuttajaa. Nivelnesteestä voidaan silmämääräisesti arvioida sameuden perusteella myös leukosyyttimäärä. Jos neste on viskoosia, on kyseessä todennäköisesti bakteerin aiheuttama tulehdus. Lisäksi tutkitaan puna- ja valkosolujen määrä ja jakauma [7], [8]. Bakteeriviljely on bakteriologisen diagnostiikan perusta. Virusinfektiota epäiltäessä laboriodiagnostiikassa pyritään löytämään viruksia tai niiden partikkeleita, kuten nukleiinihappoja, niiden muodostamia vasta-aineita tai proteiineja [12].

Mikroskopointi ja bakteeriviljelyt

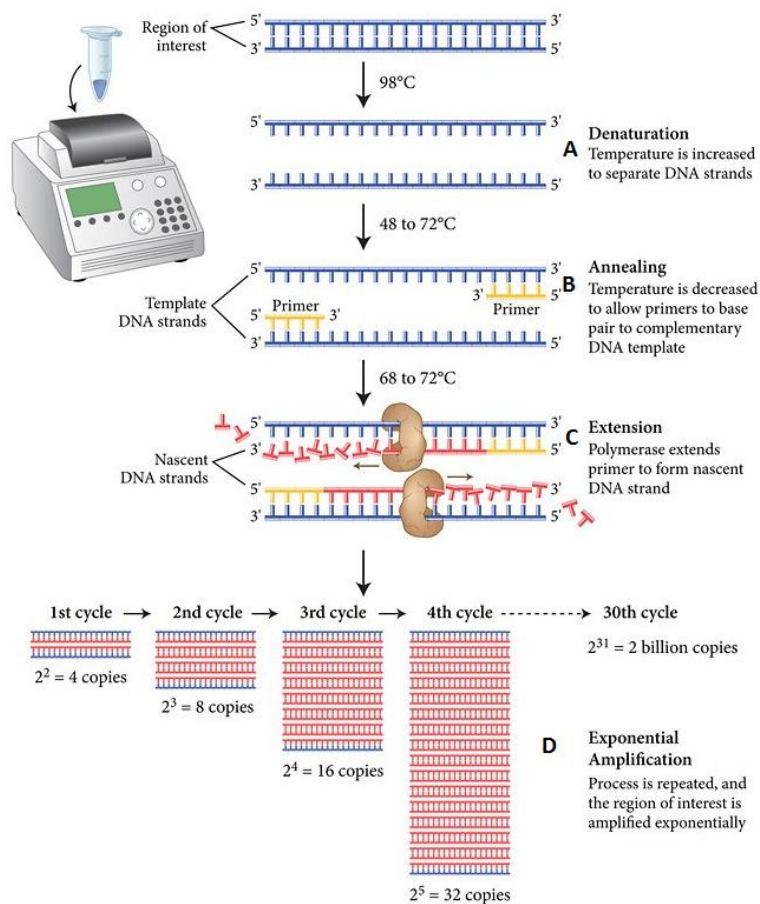
Bakteerin aiheuttaman niveltulehduksen jatkoselvittelyissä hyödynnetään mikroskopointia, bakteerivärjäystä ja bakteeriviljelyä. Mikroskopointi voidaan tehdä natiivinäytteestä tai värjäyksen jälkeen. Bakteerit ryhmittyvät mikroskoopin valonäkymässä luonteenomaisella tavalla, ja morfologian avulla voidaan tehdä alustava päätelmä siitä, onko kyseessä oleva bakteeri kokki vai sauva, ja mahdollisesti mistä lajista voi olla kyse. Bakteerin tunnistusta auttaa myös tieto siitä, onko kyseessä aerobinen eli hapellisissa oloissa elävä bakteeri vai anaerobinen eli hapettomissa oloissa elävä bakteeri. Kokenut asiantuntija voi jopa tunnistaa bakteereita pesäkkeen ominaishajun perusteella. Bakteerivärjäyksiä, esim. gram-värjäys –tekniikkaa, joka perustuu bakteerin solukalvon ominaisuuksiin, käytetään bakteereiden luokitteluun määrittämisessä. Mikroskopoinnista ja gram-värjäytyvyydestä saadut vastaukset sekä kliiniset oireet antavat usein jo tarvittavat tiedot siihen, mistä bakteerista infektio on saanut alkunsa. Gram-värjäys on käyttökelpoinen menetelmä tutkittaessa normaalisti steriilejä näytteitä kuten nivelnestettä. Mikroskopoinnin lisäksi tehdään myös bakteeriviljely eri elatusalustoille (esimerkiksi verimaljalle). Halutusta pesäkkeestä viljellään puhtasviljelmä hajotusviljelytekniikan avulla. Biokemiallisten testien, kuten katalaasitestin, koagulaasitestin

ja muiden entsyymi/vasta-ainetestien avulla voidaan erottaa eri kokkeja ja sauvoja toistaan ja tehdä lajintunnistusta. Kun bakteeri on tunnistettu, sille tehdään lääkeaineherkkyysmääritykset. Tämä avulla pystytään valitsemaan oikea hoito kyseistä tulehduksen aiheuttajaa vastaan [12], [13].

Tämänhetkinen bakteeridiagnostiikka ei ole aukotonta. Vain osa bakteereista on mahdollista kasvattaa bakteeriviljelmissä. Lisäksi käsityönä tehtävä bakteeriviljely on hidasta. Pelkästään bakteerien kasvattamiseen kuluva aika on jopa 16-24 tuntia ja biokemialliset testit yhdessä lääkeherkkyden testauksen kanssa vievät usein päiviä [13]. Nykyään viljelydiagnosointia pystytään nopeuttamaan hyödyntämällä MS-MALDI-TOF –menetelmää (Matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry). MS-MALDI-TOF –menetelmä perustuu massaspektrometriaan. Sen avulla voidaan tunnistaa bakteerilaji ja luokitella mikro-organismeja taksonomisesti laji-, suku- ja heimotasolle niiden proteiiniin profiilin avulla. MS-MALDI-TOF -analyysi tehdään puhtasviljelmänäytteelle. Ennen MD-MALDI-TOF –analyysiä, on halutusta pesäkkeestä viljeltävä puhtasviljelämä hajotusviljelytekniikan avulla. MALDI-TOF -analyysi tapahtuu yhden vuorokauden aikana [14].

Bakteereiden tunnistaminen polymeerasiketjureaktion avulla

Molekyylibiologisten menetelmien kehitys on avannut uusia mahdollisuuksia tarkkaan ja nopeaan bakteeridiagnostiikkaan. Polymeerasiketjureaktion eli PCR:n avulla on mahdollista monistaa haluttua pätkää eli fragmenttia DNA:sta moninkertaiset määrät lyhyessä ajassa. PCR-tekniikka perustuu geenin nukleinihapporakenteeseen. Nukleotidit ovat nukleinihapon rakenneosasia, jotka muodostuvat emäksistä, pariutuvat vain selektiivisesti keskenään. PCR:oon on suunniteltava synteettisesti alukkeet, jotka pariutuvat spesifisesti monistettavan geenipätkän alku- ja loppupäähän. Näiden alukkeiden välille polymeerasientsyymi pystyy rakentamaan nukleotideistä koostuvan pätkän, vastinjuosteen. Polymeerasiketjureaktio perustuu lämpötilan vaihteluihin, minkä avulla DNA välillä denaturoituu yksijuosteiseksi ja vuoroin konjugoituu takaisin kaksijuosteiseksi. DNA-fragmentin ollessa yksijuosteisessa muodossa polymeerasientsyymi kykenee rakentamaan DNA-pätkälle uuden vastinjuosteen ja täten monistamaan haluttua geenipätkää (kuva 1). PCR-tekniikan avulla bakteerit on mahdollista tunnistaa kanta-, laji-, suku- ja heimotasolla puhdistetusta näytteestä. PCR:n avulla bakteerin tunnistaminen on mahdollista alle vuorokaudessa [13], [15].



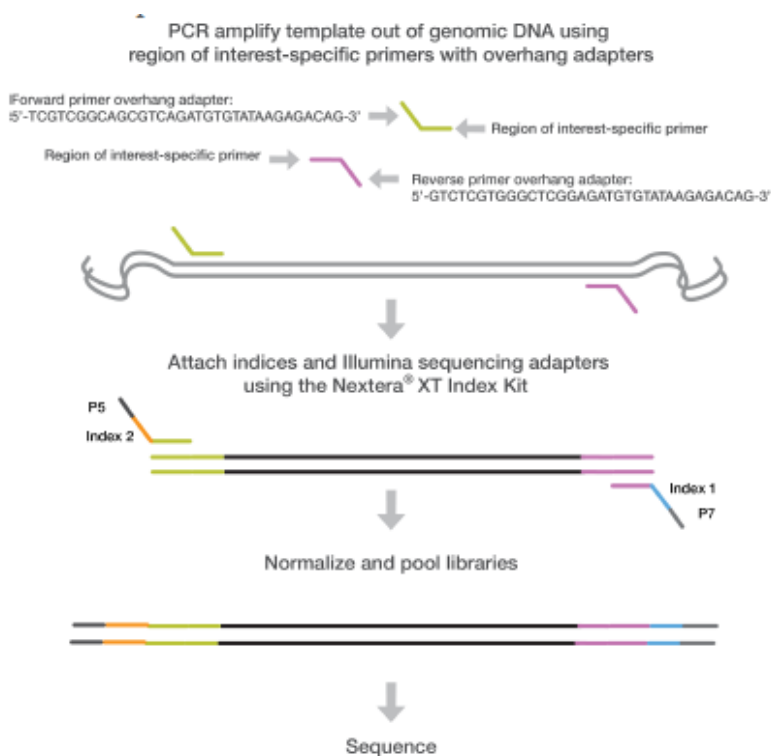
Kuva 1: Polymeerasiketjureaktion toimintaperiaate: Kuvassa A) Denaturaatio: lämpötilan nosto denaturoi kaksijuosteisen DNA:n yksijuosteiseksi. B) Pariutuminen: lämpötilan laskeminen mahdollistaa alukkeiden kiinnittymisen komplementaarisen DNA-juosteen kanssa. C) Ekstensio: DNA-polymeraasi syntetisoi yksijuosteisesta DNA:sta kaksijuosteista DNA:ta. D) Syklien toisto: lämpötilaa nostetaan ja lasketaan vuorotellen, jolloin polymeerasiketjureaktio monistaa DNA-juostetta eksponentiaalisesti [16].

PCR-pohjaisia menetelmiä tällä hetkellä käytetään tutkimustyössä ja epidemioiden selvittelyssä. Reaaliaikaisessa kvantitatiivisessa eli real-time quantitative-PCR:ssa (Rt-qPCR) monistetaan tietyn suuruisia DNA-fragmenteja halutuista bakteereista. Usein alukkeiden tai koettimien nukleotidit, joita polymeerasiketjureaktiossa käytetään, on merkattu merkkiaineella. Näiden merkkiaineiden avulla monistettavan DNA:n määrää voidaan reaaliaikaisesti seurata. Menetelmän avulla on mahdollista määrittää, kuinka paljon bakteeri-DNA:ta näyte sisältää. Koko genomien sekvensointi eli perinteinen sekvensointi tehdään, kun ollaan kiinnostettu bakteerin perimän monimuotoisuuden vaihtelusta. Tätä voidaan hyödyntää esimerkiksi selvittäessä miten bakteereiden lääkeresistenssisyys muuttuu tai mistä tietyt haitalliset bakteerit tai muut patogeenit, ovat peräisin. Sekvensoinnin avulla pystytään selvittämään tutkittavan näytteen geeniperimän emäsjärjestys. Perinteisen sekvensoinnin toteutus vaatii sekvensoitavaa fragmenttia alussa määrällisesti enemmän kuin uuden sukupolven sekvensointi [13], [17].

NGS eli uuden sukupolven sekvensointi mahdollistaa koko perimän eli genomien sekvensoinnin yhdellä

kerralla sekä halutun alueen syvän sekvensoinnin. Menetelmä on nopea ja suoraviivainen. Jos halutaan emäsjärjestystieto koko genomien alueelta, DNA pilkotaan ensin pienempiin osiin eli fragmentteihin sattumanvaraisesti. Nämä fragmentit voidaan sitten järjestelmällisesti sekvensoida miljoonien rinnakkaisten reaktioiden avulla. Fragmenttien uudelleen järjestäminen ja kokoaminen tunnetun referenssigenomin avulla mahdollistaa näytteen koko genomien sekvensoinnin (kuva 2) [13], [17]. Sekvensointi voidaan keskittää myös haluttuun perimän osaan, jolloin saadaan emäsjärjestystieto vain halutulta alueelta esim. bakteerien perimän variaatioalueilta (kuten bakteerin V3 ja V4 alueet), joiden mukaan voidaan tehdä bakteerien lajimääritys. Illuminan 16S Metagenomic Library Preparation -protokolla on esimerkki siitä.

Illuminan protokolla 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation –protokolla on tutkimuskäyttöön tarkoitettu protokolla, jonka avulla sylkinäytteiden bakteeri-DNA:sta tehdään geenikirjasto. Geenikirjastossa luodut sekvenssipätkät analysoidaan Illuminan MiSeq-laitteen avulla. Protokollassa käytetään geeni-spesifisiä sekvenssejä bakteerigenomin 16S variaatioalueelta, V3 ja V4. Menetelmässä monistetaan noin 550 bp:n alue eli fragmentti polymeraasiketjureaktion avulla. Spesifisiin alukkeisiin on kiinnitetty adapterit (kuva 2). PCR-tuote puhdistetaan magneettihelmiä apuna käyttäen. Puhdistettuun tuotteeseen kiinnitetään tämän jälkeen index-P7/P5-tunnistimet PCR-reaktiota hyödyntäen. Tämän jälkeen Index-PCR-tuote tuote puhdistetaan, mitataan ja lopulta sekvensoidaan [18].

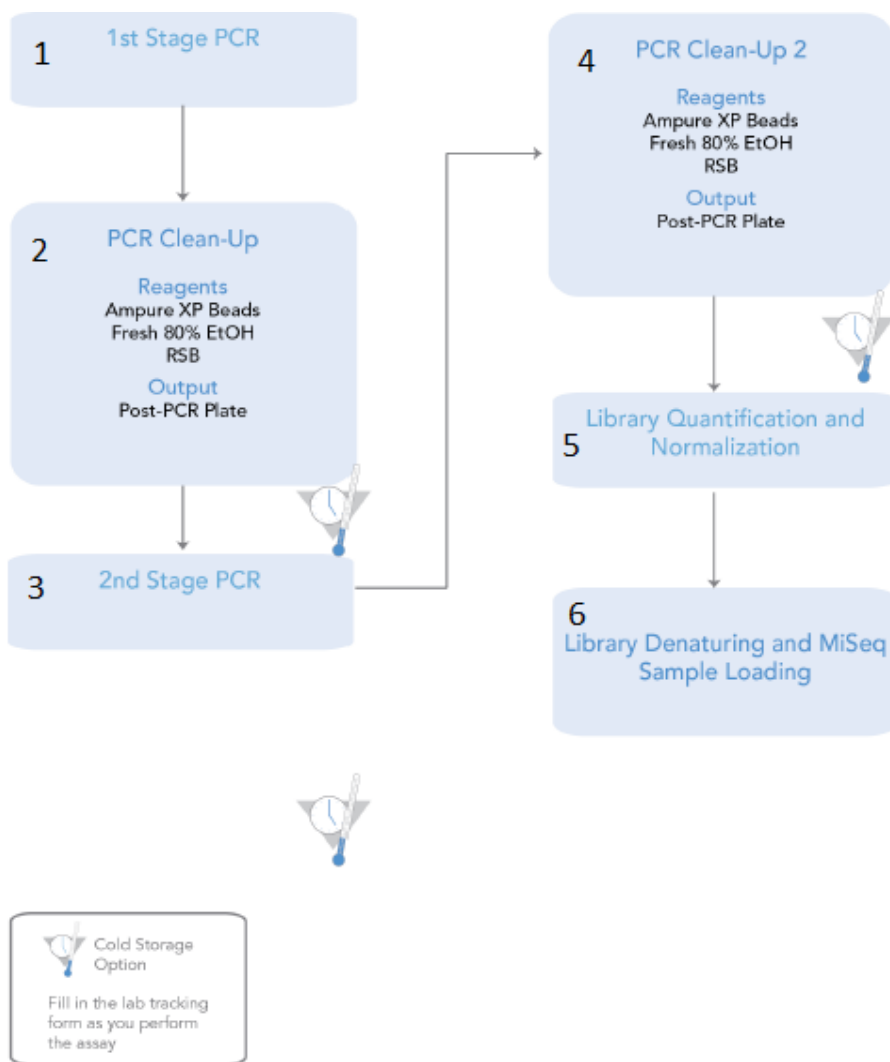


Kuva 2: 16S alueen V3 ja V4 sekvenssien tuottaminen [18]. Ylemmässä osassa kuvaa esitetään kuinka spesifiset alukkeet sitoutuvat DNA-templaattiin sekä juosteen alku- ja loppupäähän. Alukkeisiin on kiinnitetty adapterit. Kuvan alaosassa kuvataan indexeiden liittymistä alukkeiden adapteriosaan.

Opinnäytetyön tavoitteet ja tarkoitus

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena on ollut pystyttää uuden sukupolven sekvensointi (NGS)-PCR-menetelmä, joka mahdollistaa nivelnestenäytteiden valmistamisen Next Generation sekvensointia varten MiSeq-sekvensointi laitteelle. Tätä varten optimoitiin metagenomisen 16S-rRNA-kirjaston luominen. Tarkoitus oli löytää parhaimmat mahdolliset keinot tuottaa mahdollisimman spesifisesti ja runsaasti nivelnestenäytteiden bakteeri-DNA:sta 16S variaatioalueelta haluttua pätkää, joka lopulta pystytään sekvensoimaan. Illuminan protokollan mukaiset vaiheet optimoitiin yksitellen (kuva 3).

Kirjaston luomisen yhteydessä etsittiin vastauksia muun muassa seuraaviin ongelmiin. Kuinka saadaan lisättyä alkuperäisen näytteen määrää eli miten optimoidaan tarvittavat PCR:t toimimaan parhaimmalla mahdollisella tavalla? Miten näytteiden määrä olisi mahdollista mitata ja laatu luotettavinta tarkistaa? Mitkä puhdistusmenetelmät olisi kannattavinta valita, jotta näytettä menetettäisiin ylimääräisissä vaiheissa mahdollisimman vähän?



Kuva 3: Illuminan 16S kirjaston luomisvaiheet (vaiheet numeroituna kuvaan). [18] Ensimmäinen vaihe: PCR 1, toinen vaihe: PCR-tuotteen puhdistus magneettihelmien avulla, kolmas vaihe: PCR 2, neljäs vaihe: PCR-tuotteen puhdistus magneettihelmien avulla, viides vaihe: kirjaston laadun tarkistus ja muokkaus, kuudes vaihe: kirjaston denaturaatio ja MiSeq-näytteen analysointi.

Aineisto ja menetelmät

Näytteet

Menetelmän pystytyksessä käytettiin nivelnestenäytteitä (yhteensä 40kpl) sekä referenssibakteereita.

Potilasnäytteet (21kpl) punktoitiin steriilisti Tampereen yliopistollisen sairaalan Coxassa vuosien 2010-2012 aikana potilailta, joilla on ollut epäily bakteerin aiheuttamasta tulehduksesta lonkka- tai polvinivelessä.

Kaikki potilaat olivat läpikäyneet nivelproteesileikkauksen. Näistä potilasnäytteistä nykyaikaisen

bakteeriviljelyn avulla todettiin kolme näytettä viljelypositiivisiksi. Kontrollinäytteet (19kpl) punktoitiin polvinivelistä Tampereen yliopiston oikeuslääketieteellisten ruumiinavausten yhteydessä vainajilta, joilla ei ollut diagnoosia kroonisesta niveltulehduksesta.

Näytteiden eristys

Näytteet (1 ml) sentrifugoitiin kahden minuutin ajan (1300 RPM), jonka jälkeen putken pohjalle muodostunut pelletti sekä 200 µl:aa näytettä otettiin mukaan eristykseen. Nivelnäytteiden bakteeriperäinen DNA eristettiin QIAmp tissue bacteria –protokollan mukaisesti.

Bakteeripitoisuuden määrittäminen

Nanodrop ja kvantitatiivinen PCR

Nivelnäytteiden kokonais-DNA-pitoisuus määritettiin Nanodropin avulla, joka perustuu näytteen absorbanssien mittaamiseen (yksikössä ng/µl). Lisäksi näytteiden bakteeri-DNA-pitoisuus määritettiin monistamalla bakteeri-DNA:ta reaaliaikaisessa kvantitatiivisessa polymeraasireaktiossa (RT-qPCR). Käytössämme oli spesifiset alukkeet sekä tunnistimet (universal-primer, jotka mittaavat kokonaisbakteeripitoisuuden) (taulukko 1). Reaaliaikainen kvantitatiivinen PCR toteutettiin ABI7000-laitteella. Reaktioliuoksessa kokonaistilavuus oli 5 µl, joka sisälsi 2,5 µl Maxima Master Mixia, 1,25 µl aluke-tunnistin-liuosta (200 nM tunnistin, 900 nM aluke) sekä näytettä 1 µl. PCR-ohjelma on esitetty kuvassa 4. Bakteeri-DNA:n kokonaispitoisuus laskettiin aikaisemmin määritellyistä standardisuorista. Reaaliaikaisen kvantitatiivisen PCR:n tulokset analysoitiin SDS 2.2-ohjelmalla (Applied Biosystems, USA).

Taulukko 1: RT-qPCR:ssä käytetyt alukkeet

	Forward-alue	Reverse-alue	Tunnistin
Universal	TGGAGCATGTGGTTT AATTCGA	TGCGGGACTTAACCC AACA	CACGAGCTGACGACA[A/G] CCATGCA

50°C: 3 minuuttia
40 sykliä:
- 95°C: 10 minuuttia
- 95°C: 15 sekuntia
- 60°C: 1 minuuttia
72°C: 5 minuuttia
Pito 4°C

Kuva 4: PCR-ohjelma

Fragment Analyzer

PCR-tuotteiden laatu ja määrä analysoitiin Fragment Analyzerin (FA-ajossa metodia DNF-479-33-SS NGS Fragment 35-6000bp.mthds) avulla laitteen ohjeiden mukaisesti.

NGS-protokollan mukaiset PCR-ohjelmat

Ensimmäinen PCR

Tässä työvaiheessa käytössä olivat Illuminan 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation –protokollan mukaisten alukkeiden lisäksi niin kutsuttuja Japan-alukkeet [19] (taulukko 2).

Optimoidun polymeerasiketjureaktion reagenssit ja niiden tarvittavat määrät näkyvät kuvassa 6 ja testattu gradientti-PCR-ohjelma kuvassa 5. Illuminan 16S–protokollan mukainen PCR-ohjelma on esitetty kuvassa 7.

Tulukko 2: PCR-ohjelmissä käytetyt alukkeet

	Forward-alue	Reverse-alue
Japan	AYTGGGYDTAAAGIGNG	TACNVGGGTATCTAATCC
Illumina	CCTACGGGNGGCWGCAG	GACTACHVGGGTATCTAATCC

95°C: 3 minuuttia
10 sykliä:
- 98°C: 20 sekuntia
- 65-55°C: 15 sekuntia
- 72°C: 30 sekuntia
25 sykliä:
- 95°C: 20 sekuntia
- 55°C: 15 sekuntia
- 72°C: 30 sekuntia
72°C: 5 minuuttia
Pito 4°C

Kuva 6: Gradientti-PCR-ohjelma

	Volume
Microbial DNA (5 ng/μl)	2.5 μl
Amplicon PCR Forward Primer 0,2μM	5 μl
Amplicon PCR Reverse Primer 0,5μM	5 μl
2x KAPA HiFi HotStart ReadyMix	12.5 μl
Total	25 μl

Kuva 5: 1. PCR tarvittava reagenssiseos. Reaktioliuoksessa kokonaistilavuus oli 25 μl, joka sisälsi 2,5 μl näytettä, 5 μl Forward-alue –liuosta, 5 μl Reverse-alue –liuosta sekä 12,5 μl KAPA HiFi HotStart ReadyMix -entsyymiliuosta.

95°C: 3 minuuttia
25 sykliä:
- 95°C: 30 sekuntia
- 55°C: 30 sekuntia
- 72°C: 30 sekuntia
72°C: 5 minuuttia
Pito 4°C

Kuva 7: Illuminan 16S –protokollan mukainen PCR-ohjelma

Toinen PCR

Tämä vaihe suoritettiin pääasiassa Illuminan protokollan mukaisesti (reagenssiseokset kuvassa 8). Optimoitu PCR-ohjelma esitetään kuvassa 9. Ajo suoritettiin ABI7000-laitteella.

	Volume
DNA	5 µl
Nextera XT Index Primer 1 (N7xx)	5 µl
Nextera XT Index Primer 2 (S5xx)	5 µl
2x KAPA HiFi HotStart ReadyMix	25 µl
PCR Grade water	10 µl
Total	50 µl

Kuva 8: Index-PCR reagenssit. Reaktioliuoksessa kokonaistilavuus oli 50 µl, joka sisälsi 5 µl DNA:ta, 5 µl Nextera XT Index Primer 1 –liuosta, 5 µl Nextera XT Index Primer 2 –liuosta, 10 µl PCR Grade -vettä sekä 25 µl KAPA HiFi HotStart ReadyMix -entsyymiliuosta.

95°C: 3 minuuttia
8-24 sykliä:
- 95°C: 30sekuntia
- 55°C: 30 sekuntia
- 72°C: 30 sekuntia
72°C: 5 minuuttia
Pito 4°C

Kuva 9: Index-PCR-ohjelma

Puhdistusmenetelmät

Magneettihelmipuhdistus

Illuminan 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation –protokollan mukaan molempien PCR-tuotteiden puhdistus tehtiin magneettihelmien avulla noudattaen AMPure XP –tuoteselostuksen ohjeita.

Geelipuhdistus

Vaihtoehtoisesti PCR-tuotteiden puhdistus tehtiin myös ns. geelipuhdistuksella. Tässä PCR-tuotteet pipetoitiin valmiiksi tehdylle 1,6 % agarosigeelille. Geelielektroforeesiajon jälkeen noin 500 bp:n haluttu fragmentti puhdistettiin Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit –kitin avulla valmistajan ohjeen mukaan.

PCR-tuotteen konsentroidi

Koska näytteet pääosin sisälsivät vähän bakteeri-DNA:ta (<5 nl/μl), osa näytteistä yhdistettiin ja konsentroidiin suuremmiksi näyteseoksiksi (5-10 kpl) Zymoclean™ DNA Concentrator Kit:n avulla valmistajan ohjeen mukaan. Konsentroidi tehtiin sekä ennen PCR-ohjelmia että niiden jälkeen kvantitatiivisen PCR-analysoinnin ja Fragment Analyzerin avulla saatujen tietojen perusteella. Yhdistettävät näytteet valittiin niin, että ne olivat suhteessa samanlaisia näytteitä.

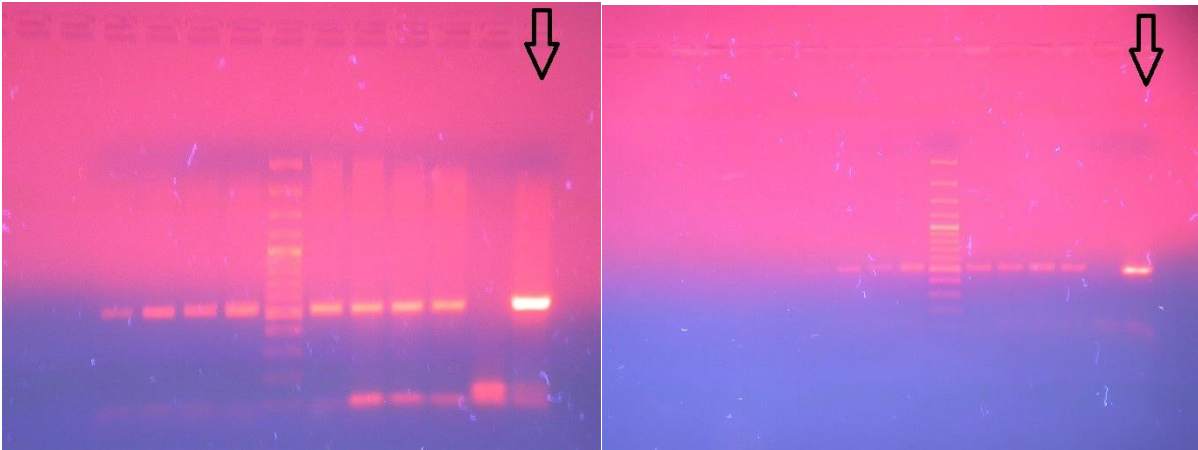
Tulokset ja pohdinta

Tämän opinnäytetyön tarkoitus oli pystyttää NGS-PCR-menetelmä, jonka avulla nivelnesteinäytteistä voidaan valmistaa geenikirjasto, joka on mahdollista analysoida MiSeq-laitteella. Protokolla muodostuu kuudesta vaiheesta (kuva 3).

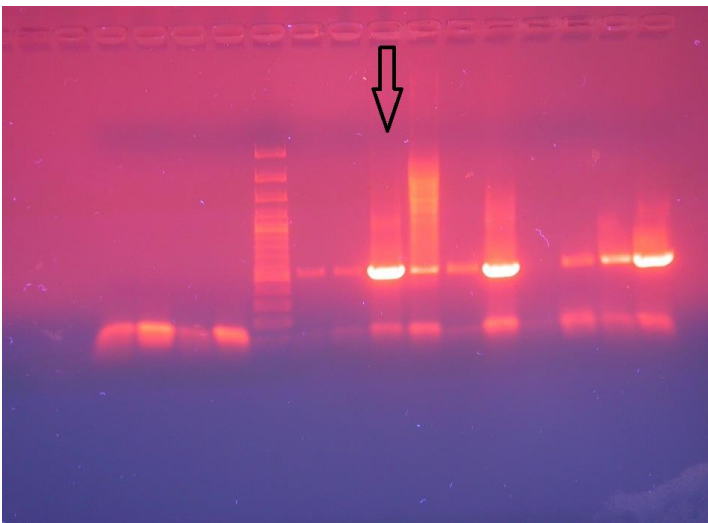
Opinnäytetyössä käytössä olivat Illuminan 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation –protokollan mukaisten alukkeiden lisäksi niin kutsutut Japan-alukkeet. Japan-alukkeet valittiin mukaan vertailun vuoksi, sillä bakteeri-alukkeita vertailevassa tutkimuksessa [18] kyseiset alukkeet kiinnittyvät bakteeri-DNA:n variaatioalueille V3 ja V4 paremmin kuin muut heidän testaamansa alukkeet.

Illuminan 16S -protokollassa ensimmäisen PCR-reaktion (vaihe 1) alukkeina olevat Illumina-alukkeet eivät soveltuneet käyttöömmme, eikä heidän ehdottamansa PCR-ohjelma toiminut parhaalla mahdollisella teholla. Kuvassa 10 näkyy, että Japan-alukkeet soveltuivat optimoituun protokollaan Illuminan alukkeita paremmin; halutut fragmentit loistavat UV-valossa kirkkaammin Japan-alukkeita käytettäessä. Koska käytössä olevat Forward- ja Reverse-alukkeet ovat sekä Illuminan että Japan-alukkeiden tapauksissa CG-sisällöltään toistensa suhteen epätasapainossa, josta johtuen alukkeiden kiinnittymis- eli annealing-lämpötilat eroavat huomattavasti toisistaan, päädyttiin kokeilemaan alukekonsentraatiomuutoksia tasapainottamaan tätä

lämpötilaeroa. Parhaimman mahdollisen loppunäytteen saanto saatiin, kun loppukonsentraationa reaktioseoksessa alukkeet olivat $R=0,5\mu\text{M}$ ja $F=0,2\mu\text{M}$ (kuva 11).



Kuva 10: PCR-ohjelmien optimointi Japan –alukkeilla ja Illuminan alukkeilla. Vasemman puoleisessa kuvassa käytössä ovat Japan –alukkeet, oikeamman puoleisessa kuvassa ovat Illuminan alukkeet. PCR-ohjelmista parhaiten toimivan PCR-ohjelman gradientti-PCR:n tuote on geeleissä ensimmäinen kaivo oikealta (osoitettu nuolella).



Kuva 11: Geelillä näkyvät eri alukekonsentraatioyhdistelmillä tehdyt PCR-ohjelmat samalla referenssinäytteellä. Parhain mahdollinen loppunäytteen saanto oli, kun $R=0,5\mu\text{M}$ ja $F=0,2\mu\text{M}$ (osoitettu nuolella). Muissa kaivoissa näkyvät muut testattavat alukekonsentraatiot.

Illuminan 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation –protokollan mukaan PCR-tuotteiden puhdistaminen suoritetaan magneettihelmien avulla (vaihe 2 ja vaihe 4). Samoille näytteille suoritettiin PCR:n jälkeen sekä geeli- että magneettihelmipuhdistus. Puhdistettujen tuotteiden määrä analysoitiin

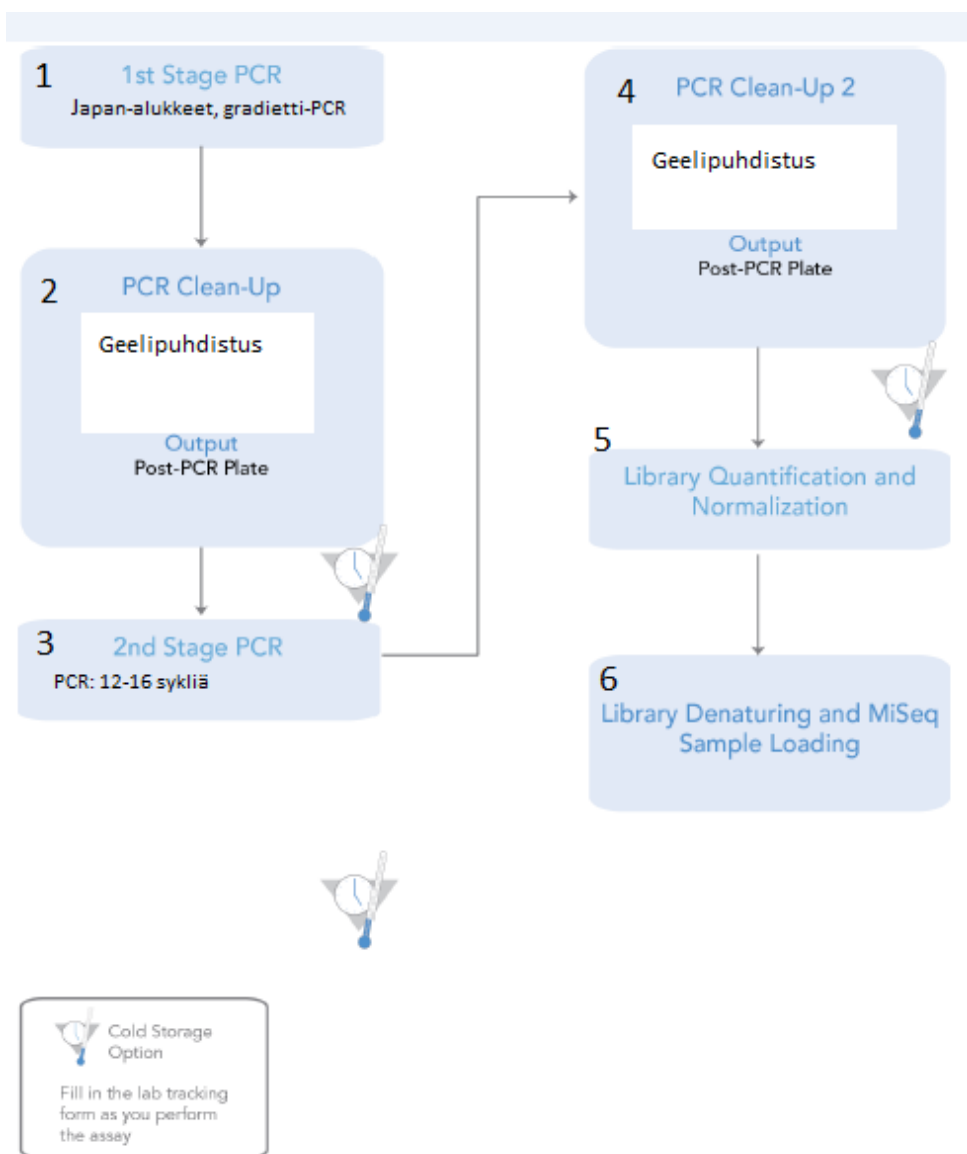
Fraqment Analyzerin avulla. Tulosten perusteella geelipuhdistus oli tehokkaampi ja tarkempi. Lisäksi geelipuhdistus on kustannustehokkaampaa sekä yksinkertaisempaa.

Illuminan 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation –protokollan mukaan ensimmäisen sekä toisen PCR-tuotteen määrä tarkastettiin Bioanalyzerin avulla (vaihe 3 ja vaihe 5). Protokollaan optimoitaessa PCR-tuotteen määrä mitattiin kvantitatiivisen PCR:n sekä Fraqment Analyzerin avulla. Fraqment Analyzer antoi luotettavimman tuloksen; FA-tulokset myötäilivät paremmin geelille ajettujen näytteen 500bp:n kohdalla näkyviä fragmentteja UV-valossa. FA:n avulla on myös mahdollista samalla kertaa tarkastaa tuotteen laadun spesifisyys.

Protokollan toinen PCR suoritettiin pääasiassa Illuminan protokollan mukaisesti (vaihe 4). Optimointia tehtiin kuitenkin PCR-ohjelman suhteen. Illuminan 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation –protokollan mukaan index-PCR:n syklimäärä on 8 kpl. Ensimmäisen PCR:n tuotteiden bakteeri-DNA-pitoisuus oli matalampi kuin Illuminan protokollassa. Tämän seurauksena testattiin PCR-ohjelman syklimäärän nostoa, jotta tuotetta ehtisi monistua myös toisen PCR:n aikana enemmän. Empiirisen tutkimuksemme perusteella saanto oli huomattavan paljon parempi 16:lla syklillä kun käytössä olivat sekä Illuminan alukkeet että Japan-alukkeet.

Puhdistetun tuotteen laatu ja pitoisuus (vaihe 5) tarkastettiin index-PCR:n jälleen Fraqment Analyzerin avulla samasta syystä kuin ensimmäisen PCR-ohjelman jälkeen. Kirjaston muodostamiseen tarvittiin tarkat tiedot siitä, kuinka paljon kukin näyte sisälsi haluttua bakteeri-DNA-pätkää. Lisäksi oli tarkistettava onko näyte puhdasta. Toisin sanoen näyte ei saa sisältää minkään muun kokoisia DNA-pätkiä. Protokollan optimoinnissa huomattiin, että tämä kirjaston laadun ja määrän tarkistus index-PCR:n jälkeen on tärkeämpi vaihe kuin ensimmäisen PCR-ohjelman jälkeinen tarkistus.

FA:sta saatujen tietojen perusteella näytteet laimennettiin ja haluttu yhdistelmäkirjasto muodostettiin Illuminan 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation –protokollan mukaisesti (vaihe 5). Yhdistelmäkirjasto sekvensoidaan MiSeq –laitteella (vaihe 6). Lopullinen optimoitu protokolla esitetään kuvassa 12.



Kuva 12: Optimoitu protokolla. Ensimmäinen vaihe: PCR 1, toinen vaihe: PCR-tuotteen puhdistus geelipuhdistuksen avulla, kolmas vaihe: PCR 2, neljäs vaihe: PCR-tuotteen puhdistus geelipuhdistuksen avulla, viides vaihe: kirjaston kvantifikaatio ja muokkaus, kuudes vaihe: kirjaston denaturaatio ja MiSeq-näytteen ajon aloitus.

Lopuksi

Tässä opinnäytetyön kuvattujen tutkimusvaiheiden tarkoituksena oli löytää parhaimmat mahdolliset keinot tuottaa mahdollisimman spesifisesti ja runsaasti nivelnesteinäytteiden bakteeri-DNA:ta 16S variaatioalueelta haluttua pätkää, joka lopulta pystytään sekvensoimaan. Tavoite ei siis ollut tulosten saaminen yksittäisille näytteille, vaan optimoinnin onnistuminen. Jokainen protokollan vaihe toistettiin useaan otteeseen.

Menetelmän sopivuus parhaiten eri vaiheisiin vertailtiin ja analysoitiin; resurssit, näytteiden määrä sekä laatu muodostivat rajat.

Opinnäytetyön jälkeen protokolla toimii hyvin viljelypositiivisille näytteille. Viljelynegatiiviset näytteet sisältävät bakteeriperäistä DNA:ta kuitenkin niin vähän, että yhdistelmäpoolien teko on välttämätöntä, jotta bakteeri-DNA-kirjasto on mahdollista muodostaa. Yhdistelmäpoolien tekeminen aiheuttaa ongelmia kuten sen, että näytteiden identifiointi ei onnistu. Näitä yhdistelmänäytteitä on mahdollista hyödyntää kuitenkin tutkimustyössä. Niiden perusteella on esimerkiksi mahdollista selvittää löytyykö nivelnesteestä bakteeri-DNA:ta tilanteissa, joissa potilas ei kärsi nivel tulehduksen oireista. Lisäksi optimoitua protokollaa hyödyntäen bakteeri-DNA-näytteiden avulla voidaan selvittää miten bakteereiden lääkeresistenssisyydet muuttuvat ajan mukana tai mistä tietyt haitalliset bakteerit, patogeenit, ovat peräisin.

Opinnäytetyötä tehdessä heräsi kysymys, mikä merkitys menetelmän pystytyksellä olisi kliinisessä työssä. Bakteeri-DNA:n monistaminen ja tunnistaminen PCR-tekniikan automatisoituminen nopeuttaa tulehdusreaktion aiheuttajan tutkimusta huomattavasti. Nykyinen bakteeriviljely ja –tunnistus voivat viedä pisimillään jopa viikkoa tai kuukausia. Lisäksi PCR-tekniikan hyödyntäminen saattaa tuoda rahallisia säästöjä. Tämänhetkiset bakteeridiagnostisten menetelmien avulla ei ole mahdollista kasvattaa kaikkia bakteereita, joten suuri osa bakteereista jää tunnistamatta. Täten PCR-tekniikka lisää tietämystä bakteerilajeista ja niiden muuntumisesta. Tämä helpottaa ymmärtämään bakteerien resistenssigeenien syntymistä. Kliinisessä työssä lääkeaineherkkyyden mittaamista ei vielä tehdä PCR-tekniikan avulla. Tässä vaiheessa PCR-tekniikka on yksi lupaava mahdollisuus tukemaan jo käytössä olevia bakteeriviljelymenetelmiä.

Viitteet

1. Hervonen (2004) A Tuki- ja liikuntaelimestön anatomina. Lääketieteellinen oppimateriaalikustantamo 7. painos (s. 61-72)
2. Konttinen ja Raussi (2012) Tulehdus. Duodecim oppikirja. Patologia
3. Konttinen ja Raussi (2012) Septinen artriitti. Duodecim oppikirja. Patologia
4. Konttinen ja Raussi (2012) Reaktiivinen artriitti. Duodecim oppikirja. Patologia
5. Kotilainen (2011) Reaktiivinen artriitti. Duodecim oppikirja. Infektiosairaudet
6. Klein et al. (2015) Streptococcus gordonii prosthetic joint infection in the setting of vigorous dental flossing. *BMJ Case Rep.* Aug 11;2015. pii: bcr2015210695. doi: 10.1136/bcr-2015-210695.
7. Hakala (2013) Nivelenesteen tutkiminen. Lääkärin käsikirja
8. Kaipiainen-Seppänen (2014) Nivel tulehduspotilas päivystyksessä. *Suomen Lääkärilehti* 45/2014 vsk 69
9. Suomalaisen Lääkäriseuran Duodecimin ja Suomen Ortopediyhdistys ry:n asettama työryhmä (2014) Polvi- ja lonkkanivelrikko. Käypä hoito 25.8.2014
10. Kotilainen (2011) Tekonivelinfektio. Duodecim oppikirja. Infektiosairaudet
11. Jämsen E et al (2009) Incidence of prosthetic joint infections after previous knee arthroscopy. *The Journal of arthroscopic and related surgery*
12. Carlson ja Koskela (2011) Bakteriologian perustekniikat. Duodecim oppikirja. Infektiosairaudet
13. Airas (2013) PCR kliinisessä bakteriologiassa. Kliinisen bakteriologian PCR-menetelmäpohjaiset tutkimukset. Opinnäytetyö, Savonia
14. Mikkonen ja Raitio (2014) Veriviljelynäytteiden analysointi MALDI-TOF- menetelmällä. Bakteerien tunnistus lyhennetyillä kasvatusajoilla. Opinnäytetyö, Tampereen ammattikorkeakoulu Bioanalytiikan koulutusohjelma
15. Wilson and Walker (2000) Principles and Techniques of Practical Biochemistry. Fifth edition (s.116-125)
16. SanomaPro (2012) Bios 5. Biotekniikka (s. 89-92)
17. Illumina (2015) An Introduction to Next-Generation Sequencing Technology
18. Illumina Protocol 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation, Preparing 16S Ribosomal RNA Gene Amplicons for the Illumina MiSeq System
19. Shunsuke Takahashi, Junko Tomita, Kaori Nishioka, Takayoshi Hisada, Miyuki Nishijima (2014) Development of Prokaryotic Universal Primer for Simultaneous Analysis of Bacteria and Archaea Using Next-Generation Sequencing. *PLoS ONE* 9(8): e105592
20. *ISRN Orthop.* (2012) Oct 17;2012:437675. doi: 10.5402/2012/437675
21. *Clin Infect Dis.* (2010) Jan 1;50(1):8-16. doi: 10.1086/648676