

Sonja Elf

# Uuden nukleiinihappoeristykseen pohjautuvan näytteenkäsittelymenetelmän kehittäminen rinovirukselle

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Insinööri (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikka

Insinöörityö

8.5.2015

Tekijä Otsikko  Sivumäärä Aika	Sonja Elf Uuden nukleinihappoeristykseen pohjautuvan näytteenkäsittelymenetelmän kehittäminen rinovirukselle 63 sivua + 7 liitettä 8.5.2015
Tutkinto	Insinööri (AMK)
Koulutusohjelma	Bio- ja elintarviketekniikka
Suuntautumisvaihtoehto	Biolääketiede
Ohjaaja(t)	Tuotekehitysasiantuntija Solveig Sjöblom Laboratorioasiantuntija Jenna Flinck Lehtori Juha E. A. Knuutila
<p>Rinovirukset ovat yleisimpiä ympärivuotisia lievien hengitystieinfektioiden aiheuttajia. Rinovirusten aiheuttamiin hengitystiesairauksiin liittyvät lääkärikäynnit ja sairauspoissaolot ovat suuri ekonominen taakka yhteiskunnalle. Kliinisten näytteiden diagnostiikkaan käytetään herkkää ja luotettavaa PCR-testiä, eikä rinovirusten diagnostiikkaan ole tällä hetkellä käytössä vieritestiratkaisuja. Jotta kliinisistä näytteistä voidaan testata mahdollisen virusgenomin läsnäolo, on niistä ensin eristettävä RNA jollakin nukleinihappojen puhdistusmenetelmällä.</p> <p>Tämän insinööriyön kokeellinen osuus toteutettiin Orion Diagnostica Oy:n tuotekehityslaboratoriossa. Työn tavoitteena oli pystyttää yrityksessä kehitetty uusi näytteenkäsittelymenetelmä rinovirukselle. Kehitettävä näytteenkäsittelymenetelmä pohjautuu paramagneettisten silikananopartikkeleiden käyttöön nukleinihappojen puhdistuksessa. Näytteenkäsittelymenetelmä oli tarkoitus optimoida mahdollisimman tehokkaaksi RNA-saannon suhteen sekä yhteensopivaksi Orion Diagnostica Oy:n isotermaalisen geenimonistusmenetelmän, SIBA<sup>®</sup>:n (Strand Invasion Based Amplification), kanssa.</p> <p>Näytteenkäsittelymenetelmän kehittämiseen käytettiin pääasiallisena tutkimustyökaluna kvantitatiivista käänteiskopiointi-PCR-protokollaa. Näytteenkäsittelymenetelmän parametreja optimoitiin siten, että eristyksen RNA-saanto oli kvantitatiivisten tulosten perusteella konsentraatioltaan mahdollisimman suuri. Lopuksi kehitettävän näytteenkäsittelymenetelmän RNA-saantoa verrattiin vertailumenetelmällä saavutettuun RNA-saantoon vastaavasta rinoviruspartikkelimäärästä.</p> <p>RNA:n puhdistaminen rinoviruspartikkeleista onnistui kehitettävällä menetelmällä hyvin: vertailumenetelmän tehokkuudesta jäätiiin parhaimmillaan vain 9,4 % jälkeen. Menetelmän todellista tehokkuutta RNA-saannon suhteen ei kuitenkaan voitu määrittää, sillä käytettävissä ei ollut kliinisiä rinoviruspositiivisia näytteitä tai kliinistä virusmäärää vastaavaa tunnettua viruspartikkelipitoisuutta. Jatkossa näytteenkäsittelymenetelmää kehitettäessä on kiinnitettävä huomiota etenkin sen soveltuvuuteen käytettäväksi oikean näytematriisin sekä SIBA<sup>®</sup>-teknologian ja kylmäkuivattujen reagenssien kanssa.</p>	
Avainsanat	rinovirus, diagnostiikka, RNA-puhdistus, magneettiset nanopartikkelit

Author Title	Sonja Elf Development of a novel nucleic acid purification method for human rhinovirus
Number of Pages Date	63 pages + 7 appendices 8.5.2015
Degree	Bachelor of Engineering
Degree Programme	Bio and food technology
Specialisation option	Biomedicine
Instructor(s)	Solveig Sjöblom, R&D Specialist Jenna Flinck, Laboratory specialist Juha E. A. Knuutila, Senior lecturer
<p>Human rhinoviruses are the most common cause of respiratory tract infections throughout the year. Medical visits and missed days at work due to respiratory illnesses caused by rhinoviruses are economic burdens for society. Rhinoviruses in clinical respiratory samples are commonly detected by a sensitive and reliable PCR test. Currently there are no point-of-care tests available for the diagnosis of human rhinoviruses. In order to detect possible presence of rhinovirus, the RNA has to be first extracted from clinical samples by a nucleic acid purification method.</p> <p>The experimental part of this thesis was executed in the research and development laboratory of Orion Diagnostica Oy. The aim was to set up a novel sample preparation method for rhinovirus, previously developed within the company. The sample preparation method is based on the use of paramagnetic silica coated nanoparticles in nucleic acid purification. The goal was to optimize the method regarding the extracted RNA yield and compatibility with the Strand Invasion Based Amplification (SIBA<sup>®</sup>) – an isothermal gene amplification technology owned by Orion Diagnostica Oy.</p> <p>A quantitative reverse transcription polymerase chain reaction protocol was used as a tool to measure the functionality of the sample preparation method. Parameters of the sample preparation method were optimized to achieve a maximal RNA yield and level of purification. Finally, the RNA yield of the developed method was compared to that of a reference method from the same virion count.</p> <p>RNA purification of rhinovirus particles using the developed method was successful: at its best the method missed only 9.4 percentages of the efficiency rate of the reference method. The efficiency rate for clinical samples could not yet be determined due to lack of samples or a known viral load. In the future, the sample preparation method should be developed further together with actual sample matrix, SIBA<sup>®</sup> technology and freeze-dried reagents for SIBA reaction.</p>	
Keywords	Human Rhinovirus, Molecular Diagnostics, RNA purification, Magnetic Nanoparticles

## Kiitokset

Haluaisin kiittää Orion Diagnostica Oy:n puolesta insinööriohjaajina toimineita tuotekehitysasiantuntija Solveig Sjöblomia ja laboratorioasiantuntija Jenna Flinckiä työn kokeellisen osuuden teknisestä avusta, ohjeistuksesta sekä tuesta. Kiitän Metropolia ammattikorkeakoulun puolesta insinööriohjaajana toiminutta lehtori Juha E. A. Knuutilaa ohjeista kirjallisen työn kokoamiseen. Haluaisin kiittää myös Orion Diagnostica Oy:n ohjelmapäällikköä Minna Mäkeä sekä tuotekehityspäällikköä Juha Saharista heidän asiantuntijuudestaan ja ohjeistuksestaan.

Osoitan kiitokseni myös Salwe Oy:n ”Yksilöllistetty diagnostiikka ja hoito (GET IT DONE)” -ohjelman työryhmälle tuesta, sekä Turun yliopiston virologisen osaston tohtori Petri Sudelle näyttemateriaalien ja avun tarjoamisesta kokeellisen osuuden toteuttamiseen liittyen. Lisäksi kiittäisin korva-, nenä- ja kurkkutautien erikoislääkäriä Johanna Nokso-Koivistoa helmikuisesta näytteenottokoulutuksesta HYKS:n korvaklinikalla. Kiitän myös Pauliina Auvista ja Karoliina Liikosta yhteistyöstä kokeellisen osuuden töiden ideoinnissa.

Vantaalla 15.4.2015

Sonja Elf

# Sisällys

## Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Rinovirus	1
2.1	Yleistä rinoviruksesta	1
2.1.1	Rakenne ja genominen järjestäytyminen	2
2.1.2	Taksonomia	3
2.1.3	Replikaatio	4
2.2	Rinovirusinfektio	5
2.2.1	Infektioiden yleisyys	5
2.2.2	Infektion tartuntatavat	5
2.2.3	Infektion oireet	5
2.2.4	Infektion hoito ja ehkäisy	6
3	Rinoviruksen diagnostiikka	7
3.1	Nykyiset käytössä olevat diagnostiikkaratkaisut	7
3.1.1	Kliinisten näytteiden keräys ja näytematriisit	8
3.1.2	Kliinisten rinovirusnäytteiden käsittelymenetelmät	9
3.1.3	Geenimonistusmenetelmät tutkimusmenetelmänä	9
3.1.4	Muut tutkimusmenetelmät	11
3.2	Rinoviruksen diagnostiset haasteet	11
4	Magneettipartikkelipohjainen nukleiinihappoeristys	12
4.1	Nukleiinihappojen eristämisen periaatteet	12
4.2	Kehitettävä menetelmä	13
4.3	Silikapohjaiset eristysmenetelmät	14
4.3.1	Silikapohjaisten eristysmenetelmien periaatteet	14
4.3.2	Magneettiset nanopartikkelit	17
4.4	RNA-eristys magneettieristysmenetelmällä	18
4.5	Vertailumenetelmä Qiagen EZ1®	19
5	Geenimonistusmenetelmät	20
5.1	RT-qPCR	20
5.1.1	RT-qPCR yleisesti	20
5.1.2	RT-qPCR:n monistusreaktio	21

5.1.3	RT-qPCR:n sulamiskäyräanalyysi	23
5.2	Strand Invasion Based Amplification (SIBA®)	24
6	Työn tarkoitus	26
7	Materiaalit ja menetelmät	26
7.1	Näyttemateriaalit	26
7.1.1	Plasmidi	26
7.1.2	RNA	26
7.1.3	Virussuspensio	27
7.1.4	Nenänielunäytteet ja nenäeritenäytteet	27
7.2	Geenimonistusmenetelmien pystytys	27
7.2.1	HRV RT-qPCR-protokollan tausta	27
7.2.2	Standardisuoran ja kvantitoinnin suunnittelu ja toteutus	29
7.2.3	SIBA-protokollan pystytys ja sen soveltuvuuden testaaminen rinovirukselle	30
7.3	Näytteenkäsittelymenetelmän kehittämisen vaiheet	31
8	Tulokset ja tulosten tarkastelu	33
8.1	RT-qPCR:n pystytys ja kvantitointi	33
8.2	SIBA-protokollan soveltuvuus rinovirukselle	37
8.3	Näytteenkäsittelymenetelmän kehittäminen	37
8.3.1	Lyysauspuskurin 10 min inkubaatio 95 °C:ssa	37
8.3.2	Lyysauspuskureiden vertailu	40
8.3.3	Magneettipartikkeleiden vertailu	42
8.3.4	Magneettipartikkeleiden määrän vertailu	44
8.3.5	Eluutiopuskureiden vertailu	46
8.3.6	Nenänielunäytteiden testaaminen ja näytematriisin inhiboivan vaikutuksen määrittäminen	47
8.3.7	Näytteenkäsittelymenetelmän tehokkuuden vertaaminen Qiagenin EZ1® Advanced XL nukleiinihappojen eristysrobottiin	49
8.4	Tulosyhteenveto	52
8.5	Tulosten luotettavuuden arviointi	54
9	Yhteenveto ja pohdinta	55
	Lähteet	58
	Liitteet	
	Liite 1. Suomen sairaanhoitopiirien ohjekäsikirjojen rinovirusta koskevat tutkimusmenetelmät	

- Liite 2. pEX-A2-HRV Trans 600 -plasmidin tiedot (Quality Report, Eurofins)
- Liite 3. HRV Trans 600 -geenin sekvenssi ja siitä transkriptoitu RNA-sekvenssi
- Liite 4. HRV RT-qPCR-protokollassa käytetyt alukkeet, reaktioliuokset ja ajo-ohjelma
- Liite 5. HRV RT-qPCR-protokollan alukkeiden kiinnittyminen HRV Trans 600:n sekvenssiin
- Liite 6. HRV RT-qPCR-protokollan alukkeiden kiinnittyminen HRV-A60:n sekvenssiin
- Liite 7. RT-qPCR-ajojen raakadatat

## Lyhenteet

ATP	Adenosiinitrifosfaatti. Suurienergiainen nukleotidi.
cDNA	<i>Complementary DNA</i> . Komplementaarinen DNA.
dNTP	Deoksinukleotidi trifosfaatti.
FDA	<i>U.S. Food and Drug Administration</i> . Yhdysvaltain elintarvike- ja lääkevirasto.
GuSCN	Guanidiinitiosyanaatti. Kaatrooppinen suola.
HRV	<i>Human rhinovirus</i> . Rinovirus.
ICAM	<i>Intercellular adhesion molecule</i> . Solunsisäinen adheesiomolekyyli.
ivT-RNA	<i>In vitro -transcribed RNA</i> . Elävien solujen ulkopuolella usein plasmidista transkriptoitu RNA.
LDLR	<i>Low-density lipoprotein receptor</i> . Alhaisen tiheyden lipoproteiinireseptori.
LiCl	Litiumkloridi. Litium- ja kloridi-ionien muodostama epäorgaaninen ioniyhdiste
LNA	<i>Locked nucleic acid</i> . LNA-monomeerin sisältävä oligonukleotidi, joka on spesifinen komplementaarista kohdemolekyyliään kohtaan.
ORF	<i>Open reading frame</i> . Avoin lukukehys. Geenin koodaava alue aloitus- ja lopetuskodonien välissä.
PBS	<i>Phosphate buffer saline</i> . Fosfaattipuskuroitu suolaliuos.
RFU	<i>Relative fluorescence unit</i> . Suhteellinen fluoresenssin mittaamiseen käytettävä yksikkö.
RT-qPCR	<i>Reverse transcription quantitative real-time polymerase chain reaction</i> . Kvantitatiivinen käänteiskopiointipolymeraasiketjureaktio.
SIBA	<i>Strand Invasion Based Amplification</i> . Kaksoisjuosteen invaasioon perustuva geenimonistus.
ssRNA	<i>Single-stranded RNA</i> . Yksijuosteinen RNA.



TE-puskuri	10 mM Tris-puskuria sekä 1 mM EDTA:ta sisältävä puskuri.
THL	Terveyden ja hyvinvoinnin laitos.
UTR	<i>Untranslated region.</i> Transloitumaton alue geenissä; ne geenin osat, jotka eivät ilmenny proteiineiksi.
VP	<i>Viral protein.</i> Virusproteiini.
VPg	<i>Viral protein genome-linked.</i> Genomiin kiinnittynyt virusproteiini.

## 1 Johdanto

Rinovirus on maailman yleisin ylempien hengitystieinfektioiden ja flunssan aiheuttajapatogeeni. Jopa puolet maailmanlaajuisista flunssatapauksista on rinovirusten aiheuttamia. Rinovirusserotyyppejä on löydetty yli 150 kappaletta, ja tyyppien suuri lukumäärä asettaa haasteita rinovirusten diagnostiikalle. Rinovirusten osoittamiseen kliinisistä näytteistä käytetään laboratorioissa erittäin herkkää ja luotettavaa PCR-testiä, eikä kliinisten näytteiden testaamiseen ole tiedettävästi vielä käytössä vieritestejä. Jotta kliinisistä näytteistä voidaan testata mahdollisen virusgenomin läsnäolo, on niistä ensin eristettävä RNA jollakin nukleiinihappojen puhdistusmenetelmällä. (Jacobs ym. 2013: 136–137, 142; Jaakkola ym. 2014: 10.)

Tämän insinööriyön kokeellinen osuus kesti yhdeksän viikkoa ja se toteutettiin Orion Diagnostica Oy:n tuotekehityslaboratoriossa Espoossa. Työn tavoitteena oli pystyttää yrityksessä kehitelty uusi näytteenkäsittelymenetelmä rinovirukselle ja kliinisille rinovirusnäytteille. Näytteenkäsittelymenetelmä oli tarkoitus optimoida yhteensopivaksi Orion Diagnostica Oy:n isotermaalisen geenimonistusteknologian, SIBA<sup>®</sup>:n (Strand Invasion Based Amplification), ja SIBA-reaktion kylmäkuivattujen reagenssien kanssa.

Kehitettävä näytteenkäsittelymenetelmä pohjautui magneettisten silikananopartikkeleiden käyttöön nukleiinihappojen puhdistuksessa. Puhdistuksessa viruspartikkelit hajotettiin, vapautunut RNA sidottiin kantaja-aineena toimiviin paramagneettisiin silikapäällysteisiin nanopartikkeleihin guanidiinitiosyanaatin avulla, epäpuhtaudet pestiin pois ja puhdistettu RNA eluoiitiin. Menetelmän kehittämisessä varioitiin näytteenkäsittelyn eri parametreja RNA-saannon optimoimiseksi ja tuloksia tarkasteltiin kvantitatiivisen käänteiskopiointipolymeraasiketjureaktion eli RT-qPCR:n avulla.

## 2 Rinovirus

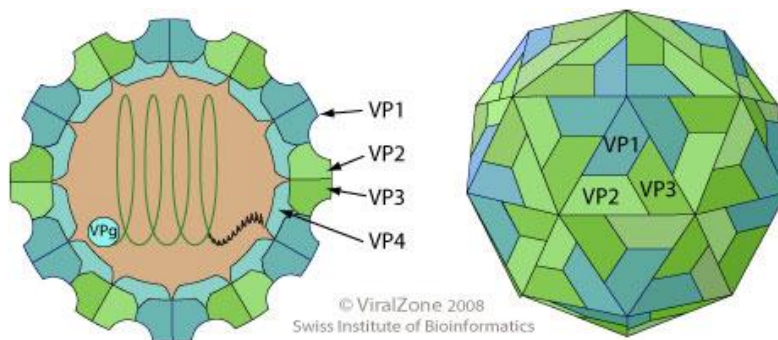
### 2.1 Yleistä rinoviruksesta

Rinovirus (human rhinovirus, HRV) löydettiin ensimmäistä kertaa 1950-luvulla tutkittaessa flunssan ja vilustumisen etiologiaa. Rinovirukset aiheuttavat vuosittain lähes puolet

kaikista flunssan kaltaisista sairauksista, ja sairauksiin liittyvät lääkärikäynnit ja sairauspoissaolot ovatkin suuri ekonominen taakka yhteiskunnalle. Rinovirukset yhdistetään yleensä ylähengitysteiden tulehduksiin, välikorvantulehduksiin ja nenän sivuontelotulehduksiin. Virukset on liitetty myös kroonisten keuhkosairauksien pahentumiseen, astman kehittymiseen, lasten ilmatiehyttulehdukseen eli bronkioliittiin, sekä vanhusten vakavaan keuhkokuumeeseen. (Jacobs ym. 2013: 136.)

### 2.1.1 Rakenne ja genominen järjestäytyminen

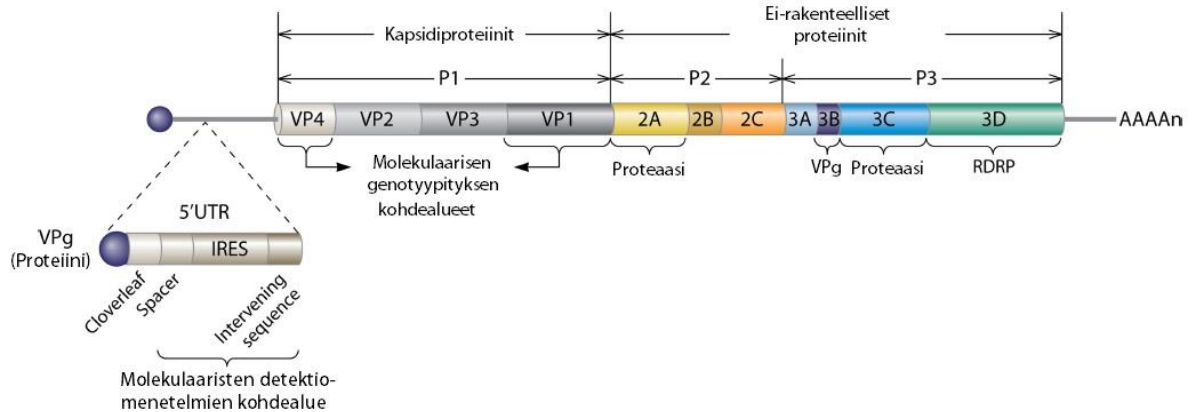
Rinovirukset ovat pieniä (läpimitaltaan n. 30 nm), vaipattomia, positiivisäikeisiä RNA-virusia, joiden genomi on noin 7 200 emäsparin mittainen yksisäikeinen RNA (ssRNA). Rinoviruspartikkelin rakenne on esitetty kuvassa 1. Viruskapsidin symmetrinen ikosahedraalinen rakenne muodostuu neljästä rakenneproteiinista: VP1, VP2, VP3 ja VP4. VP1-, VP2- ja VP3-proteiinit muodostavat kapsidin ulkopinnan sekä vastaavat viruksen anti-geenisestä monimuotoisuudesta. VP4 puolestaan kiinnittää RNA:n ytimen kapsidiin. Kukin neljää kapsidiproteiinia on yhteensä 60 kappaletta valmiissa kapsidissa. (Roivainen ym. 2012: 512; Jacobs ym. 2013: 137.)



Kuva 1. Rinoviruspartikkelin rakenne. Neljä rakenneproteiinia, VP1, VP2, VP3 ja VP4, muodostavat yhdessä ikosahedraalisen RNA-genomia ympäröivän viruskapsidin. Kapsidin sisällä RNA on 5'-päästään kiinnittynyt kovalenttisesti pieneen VPg-virusproteiiniin. (ViralZone: Enterovirus 2008.)

Rinoviruksen genominen rakenne on esitetty kuvassa 2. Virusgenomi koostuu yksittäisestä geenistä, jossa avointa lukukehystä (ORF) vierustavat transloitumattomat 5'- ja 3'-alueet eli UTR-alueet. (Jacobs ym. 2013: 137; Smura ym. 2007: 2520.) Avoimesta lukukehystä muodostuu traslaatiossa esiastepolypeptidi, joka myöhemmin pilkkoutuu proteaasien avulla 11 eri proteiiniksi. Neljä näistä proteiineista ovat viruskapsidin rakenneproteiineja (VP1–VP4) ja loput seitsemän ei-rakenteellisia proteiineja. Ei-rakenteelliset

proteiinit osallistuvat virusgenomin replikaatioon ja kokoonpanoon tuottamalla VPg:tä, eli viruskannalle tyypillistä genomiin kiinnittynyttä virusproteiinia, proteaasia ja RNA-riippuvaista RNA-polymeraasia. (Jacobs ym. 2013: 137; Smura ym. 2007: 2520; Hyypiä, Roinainen ym. 2012: 512.)



Kuva 2. Rinovirusen genomisen rakenne ja sen koodaamat proteiinit. 5'UTR on rinoviruslajeilla konservoitunut RNA-sekvenssin alue, johon useimmat molekulaariset detektiomenetelmät kohdistuvat. (Muokattu lähteestä Jacobs ym. 2013: kuva 1.)

5'UTR-alue on normaalisti noin 650 emästä pitkä, ORF-alue noin 6500 emästä pitkä ja 3'UTR-alue koostuu 50 emäksestä. Kaikilla rinoviruslajeilla genomi on 5'-päässä kovalenttisesti sitoutunut pieneen virusproteiiniin (VPg, kuva 1), joka toimii alukkeena genomin replikaatiossa. (Palmenberg 2010: 2.)

Rinovirusilla etenkin genomin pitkä 5'UTR-alue on kaikilla serotyypeillä konservoitunut. Konservoituneella sekvenssillä tarkoitetaan DNA- tai RNA-jaksoa, joka on yhdenmukainen usealla eri lajilla. Useimmat molekulaariset detektiomenetelmät ja rinovirusen rutiinidiagnostiikka keskittyvät 5'UTR -sekvenssialueen tunnistamiseen. (Österback ym. 2013: 3960; MeSH 2015: Conserved Sequence.)

### 2.1.2 Taksonomia

Rinovirukset kuuluvat *Picornaviridae* -perheeseen ja Enterovirusten sukuun. Enterovirukset on jaettu vasta lähiaikoina 12 eri viruslajiin niiden genomisten ominaisuuksien perusteella. Näihin lajeihin kuuluu kolme rinoviruslajia: HRV-A, HRV-B ja HRV-C. Rinovirusserotyyppejä on kaiken kaikkiaan yli 150. HRV-A-laji sisältää 80, HRV-B-laji 32 ja

HRV-C-laji 54 rinovirusserotyyppeä. (McIntyre ym. 2013: 1791; Enterovirus 2015.) Serotyypit ovat antigeenirakenteeltaan lähisukuisia viruskantoja. Lajien sisällä rinovirukset eroavat toisistaan huomattavasti sekä geneettisiltä että antigeenisiltä ominaisuuksiltaan. Etenkin viimeisimpään rinoviruslajiin, HRV-C:hen, kuuluvien virusten luokittelu ja sekvenssointi on osoittautunut hankalaksi nykyisillä menetelmillä. (Hyypiä, Roivainen ym. 2012: 514; Palmenberg ym. 2010: 2; McIntyre ym. 2013: 1792.)

Enterovirusten lajeissa eroavuus sekvenssien välillä on suurinta VP1-proteiinia koodaavilla genomien alueilla, ja lajien luokittelu kyseisen alueen sekvenssien variaation perusteella korreloikin täysin lajien antigeeniin ominaisuuksiin perustuvan luokittelun kanssa. Onkin ehdotettu, että enterovirukset tulisi luokitella samaan serotyyppiin, mikäli niiden nukleotidien samankaltaisuus VP1-proteiinia koodaavassa sekvenssissä ylittää 75 %, ja eri serotyyppeihin, mikäli nukleotidien samankaltaisuus alittaa 70 %. (Smura ym. 2007: 2520.)

### 2.1.3 Replikaatio

Rinovirus replikoituu nenänielun ja nielun epiteelisoluissa. Suurin osa (yli 90 %) tunnetuista A- ja B-rinoviruksista kiinnittyy isäntäsolujen ICAM-1-pintareseptoriin, ja pienempi osa viruksista puolestaan kiinnittyy ja tunkeutuu LDLR-reseptorin kautta. ICAM-1-solureseptoria ilmentävät useat nenän epiteelisolut. HRV-C:n käyttämä pintareseptoria ei vielä tunneta. VP1-proteiinissa oleva kanjoni toimii isäntäsolujen pintareseptoreiden kiinnittymiskohtana. Isäntäsoluun kiinnittymisen jälkeen virus tunkeutuu solun sisälle ja aloittaa replikoitumisen. Replikoitumisen aikana virus tuhoaa infektoituneet solut, jolloin kudokseen kertyy lukuisia tulehdusvälittäjäaineita ja infektiota vastaan hyökkääviä granulosyyttejä. Virusten replikoituminen ja vapautuminen epiteelisoluista kestää yleensä yhdestä kolmeen viikkoon ja samaisena aikana ilmenevät myös flunssaoireet. Oireiden arvellaan aiheutuvan isäntäorganismien immuunivasteen toiminnasta ennemmin kuin virusten aiheuttamista epiteelisolujen vaurioista, sillä virus laukaisee elimistössä voimakkaan immuunipuolustusreaktion, joka voidaan todeta kliinisinä flunssaoireina. (Mahony 2011: 67; Jacobs ym. 2013: 137; McIntyre ym. 2013: 1791–1792.)

## 2.2 Rinovirusinfektio

### 2.2.1 Infektioiden yleisyys

Vuonna 2013 Suomessa todettiin yli 420 varmistettua rinovirusinfektiota. Infektioiden määrät olivat suurimmillaan touko-, loka- ja marraskuussa, jolloin tapauksia oli noin 50 kappaletta kutakin kuukautta kohden. Pienimmillään infektiomäärät olivat tammikuussa (noin 12 tapausta kuukaudessa). Lähes 60 % todetuista infektioista oli alle neljävuotiailla lapsilla. Tosiasiassa infektioiden lukumäärä on huomattavasti varmistettuja infektiomääriä korkeampi. (Jaakkola ym. 2014: 10.) Nuorilla lapsilla on keskimäärin todettu ilmenevän kuusi eri rinovirusinfektiota vuoden aikana (Mahony 2008: 728). On myös todettu, että rinovirusinfektio on yleisin tulehdus, johon sairastutaan alle yhden vuoden iässä. HRV-A:n aiheuttamat infektiot ovat yleisimpiä, mutta detektiomenetelmien kehittyessä on huomattu, että etenkin HRV-C-lajin serotyypit aiheuttavat enemmän oireellisia infektoita verrattuna kahteen muuhun rinoviruslajiin. (Mahony 2011: 67; Choi ym. 2015: 73.)

### 2.2.2 Infektion tartuntatavat

Rinovirusinfektio voi tarttua hengitystie-eritteistä helposti ihmisestä toiseen pisaratartuntana tai esimerkiksi käsien välityksellä. Tehokkaimmat tartuntareitit ovat nenän limakalvo sekä silmän sidekudos. Infektion tarttuminen suun limakalvokontaktin kautta ei ole yhtä yleistä. Virus voi säilyä infektiivisenä iholla kahden tunnin, ja sisätiloissa jopa useiden päivien ajan. (Jacobs ym. 2013: 137–138; Rinovirus 2013.) Rinovirusinfektio tarttuu yleensä etenkin lapsista muihin perheenjäseniin (Peltola ym. 2008: 386).

### 2.2.3 Infektion oireet

Rinovirukset aiheuttavat yli puolet tavallisen flunssan kaltaisista sairauksista. Yleisimpiä rinoviruksen aiheuttamia lievien ylähengitystietulehdusten oireita ovat vuotava ja tukkoinen nenä, kurkkukipu, yskä, päänsärky, kuume ja huonovointisuus. Rinovirusinfektion itämisaika on melko lyhyt, vain 1–2 vuorokautta. Infektio on itsestään rajoittuva ja kestää yleensä noin yhdestä kahteen viikkoa. Pahimmat oireet ilmenevät useimmiten alle 5-vuotiailla lapsilla, vanhuksilla sekä potilailla, joilla on huonontunut immuunipuolustus. Noin puolet aikuisten ja vanhempien lasten rinovirusinfektioista ovat täysin oireettomia. (Jacobs ym. 2013: 142; Mahony 2011: 66–67; Peltola ym. 2008: 386.)

Flunssaoireiden lisäksi rinovirusten tiedetään aiheuttavan myös vakavampia alahengitystietulehduksia, poskiontelotulehduksia, välikorvatulehduksia sekä liittyvän astman ja kroonisen keuhkohtaumataudin pahenemisvaiheisiin. Rinovirusinfektion aikana etenkin niistäminen mahdollistaa viruspartikkeleiden leviämisen nenän sivuonteloihin, mikä edesauttaa uusien tulehdusten muodostumista. Rinovirusten ja eri bakteerien aiheuttamat yhteisinfektiot etenkin välikorvatulehdusten aikana ovat myös yleisiä. (Jacobs ym. 2013: 142–144, 146; Mahony 2011: 66–67.)

Koska keuhkojen kehittyminen jatkuu koko varhaislapsuuden ajan, voivat varhaislapsuuden aikaiset rinovirusinfektiot aiheuttaa vakavia soluvaurioita keuhkokudoksissa sekä muokata immuunivastetta. Rinovirusinfektiot voivat altistaa lapsia muun muassa kroonisen keuhkohtaumataudin kehittymiselle. Rinovirus on myös RS-viruksen jälkeen toiseksi yleisin bronkioliitin, eli ilmatiehyttulehduksen, aiheuttajapatogeeni sairaalahoitoa vaativilla lapsilla. Rinovirusten aiheuttama varhaislapsuuden bronkiolitti on suuri riski astman kehittymiselle lapsuuden aikana. Lisäksi astmaatikoilla rinovirusinfektioiden on todettu ilmenevän vakavampina, kuin terveillä ihmisillä, sekä edesauttavan astman pahenemista. Etenkin HRV-C-lajiin kuuluvien rinovirusten on todettu aiheuttavan A- ja B-lajeja useammin sairaalahoitoa vaativaa astmaa ja vakavampia hengitystieinfektioita sekä lapsissa että aikuisissa. (Jacobs ym. 2013: 142–144, 146; Mahony 2011: 66–67; Peltola ym. 2008: 387.) HRV-B on puolestaan muita lajeja useammin yhdistetty kuumeeseen ja keuhkokuumeeseen (Choi ym. 2015: 73).

#### 2.2.4 Infektion hoito ja ehkäisy

Tällä hetkellä ei ole olemassa hyväksytyjä rinovirusinfektion hoitoon tai ehkäisyyn soveltuvia antiviraalisia aineita. Antiviraalisten hoitojen kliinisiä kokeita ovat hankaloittaneet lääkkeiden myrkyllisyys, haitalliset yhteisvaikutukset ja tehottomuus. Rokotteiden kehittämistä puolestaan hidastaa yli 150:n eri rinovirusserotyypin geneettinen variaatio etenkin antigeenisissä alueissa. Nykyinen rinovirusinfektioiden hoito nojaakin pääosin oireiden helpottamiseen niiden varsinaisen poistamisen sijaan. Koska rinovirusinfektioihin ei ole olemassa ennaltaehkäisevää lääkitystä tai rokotteita, pyritään viruksen leviäminen ihmisestä toiseen estämään oikeilla käyttäytymismalleilla, kuten hyvällä käsihygienialla ja sosiaalisella eristäytymisellä. (Jacobs ym. 2013: 136, 153.)

### 3 Rinoviruksen diagnostiikka

#### 3.1 Nykyiset käytössä olevat diagnostiikkaratkaisut

Koska rinovirusten ajateltiin ennen olevan varsin harmittomia ja aiheuttavan vain lieviä flunssaoireita, on niiden tunnistus otettu osaksi rutiinidiagnostiikkaa vasta lähiaikoina. Vaikka rinovirusia voidaan jaotella satoihin eri serotyyppeihin, ei niiden tyypitys useinkaan ole kliinisen diagnostiikan kannalta olennaista, sillä tärkeintä on useimmiten erotella bakteeri- ja virusinfektiot toisistaan. Rinoviruksen diagnosoinnin tärkeyttä voidaan pitää tavallisten flunssaoireiden kliinisen kuvan kannalta tarpeettomana, mutta se voi olla merkittävässä roolissa muun muassa välikorvatulehduksen, poskiontelotulehduksen ja alempien hengitystieinfektioiden erotusdiagnostiikassa. (Lönnrot ym. 1999: 383.) Koska rinovirusinfektiot voivat olla yhteydessä myös keuhkoputkentulehduksen, keuhkokuumeen, ja astman kehittymiseen, on diagnosointi tärkeää jo ensimmäisten oireiden, kuten hengityksen vinkumisen, ilmetessä. (Österback ym. 2013: 3960.) Lisäksi rino- ja enterovirusten välinen erotusdiagnostiikka voi olla ratkaisevaa oikean hoidon takaamiseksi. Rinovirusten tarkka ja nopea tunnistus mahdollistaa myös turhien antibiootikuurien määräämisen ja ehkäisee edelleen bakteeriresistenssin kasvua. Rinovirusdiagnostiikka kohdistuu useimmiten pieniin lapsiin, vanhuksiin tai immuunipuutteisiin potilaisiin, kuten esimerkiksi astmaatikkoihin, joilla virus voi aiheuttaa vakavan taudin. (Jacobs ym. 2013: 148; Mahony 2011: 67, 69; Anzueto & Niederman 2003: 1665.)

Suomessa käytössä olevat rinoviruksen diagnostiikkaan liittyvät tutkimusmenetelmät on koottu sairaanhoitopiirien Internet-ohjekäsikirjoista taulukkomuotoon liitteeseen 1. Rinovirusinfektioiden diagnosoinnin indikaatioina ovat kliiniset oireet ja hengitystietulehdusepäily. Taulukon perusteella laboratoriot ilmoittavat käyttävänsä rinovirusdiagnostiikkaan yleisimmin niin kutsuttua reaaliaikaista multiplex-, eli monikohde-RT-PCR:ää, joka soveltuu samanaikaisesti 16 yleisimmän hengitystieviruksen tunnistamiseen. Laboratoriot eivät kuitenkaan julkista tietoa siitä, onko käytössä oleva testi kaupallinen vai *in-house* -menetelmä. RT-PCR-testit ovat nopeita, sillä tulokset on mahdollista saada heti saman päivän aikana näytteenotosta. RT-PCR-testin positiivinen tulos merkitsee sitä, että viruksen nukleiinihappoa on löydetty näytteestä. Tuloksen kliinistä merkitystä on kuitenkin aina arvioitava suhteessa potilaan kliinisiin oireisiin. (Fimlab.) Taulukosta ilmenee



lisäksi rinovirusdiagnostiikkaan soveltuvat näyttemateriaalit: nenänielun imulima, nenästä, nenänielusta tai nielusta otettu tikkunäyte sekä harvoin myös bronkoalveolaarinen lavaationeste eli BAL-neste.

### 3.1.1 Kliinisten näytteiden keräys ja näytematriisit

Koska rinovirus replikoituu nenän, nenänielun ja nielun epiteelisoluissa, tulee kliiniset näytteet kerätä kyseisistä paikoista. Keräyksessä suositetaan erityisesti nenän näytematriiseja, kuten pesu- ja aspiraationäytteitä sekä nenänielun tikkunäytteitä. Edellä mainituista nenänielutikkunäyte on molekulaariseen diagnostiikkaan eniten käytetty matriisimuoto. (Mahony 2011: 70.) Nenänielutikkunäyte kerätään näytteenottotikulla nenän kautta nenänielusta noin 12–15 cm:n syvyydestä. Etenkin nukkamaisia näytteenottotikkuja suositetaan suuremman viruspartikkelisaannon keräämiseksi. Tarvittaessa tikulla voidaan kerätä vuotoherkiltä potilailta myös nenänäyte noin 3–5 cm:n syvyydestä. Näytteenoton jälkeen näytteet toimitetaan välittömästi laboratorioon testattaviksi mieluiten viilennettyinä. Pidempiaikaista, kuitenkin alle kolmen vuorokauden pituista säilytystä varten näytteet voidaan pakastaa. Nenänielun aspiratio- eli imulimanäytteet kerätään imuun kytkettyyn steriiliin limanäyteputkeen. Imulimanäyte lähetetään sellaisenaan limankeruu-putkessa testattavaksi mieluiten saman päivän aikana. (HUSLab<sub>1</sub>; Jacobs ym. 2013:147.)

Rinovirusten tunnistaminen on tehokkainta infektion aikaisessa vaiheessa, 1–3 päivän aikana oireiden alkamisesta kerätyistä näytteistä, joten näytteet tulisi kerätä mahdollisimman pian oireiden alkamisen jälkeen. Kliiniset näytteet on kuitenkin mahdollista diagnosoida HRV-positiivisiksi RT-PCR-menetelmällä vielä viisi viikkoa oireellisen infektion jälkeenkin. (Peltola ym. 2008: 386–387.) Kliinisten näytteiden viruspartikkelimäärä vaihtelee infektion laadusta ja näytteenkeräysajankohdasta riippuen. Oireellisiin infektiioihin on liitetty RNA:n kopiomääriä välillä  $10^3$ – $10^7$  kopiota millilitrassa, mutta tarkkaa vertailtavissa olevaa oireellisen infektion viruspartikkelimäärää näytteessä ei voida sanoa vaihtelevien näytteenkäsittely- sekä analyysimenetelmien takia. Viruspartikkelimäärä kuitenkin korreloi infektion vakavuuden kanssa: enemmän oireilevilla potilailla viruspartikkelimäärä kliinisissä näytteissä on korkeampi. (Jacobs ym. 2013: 146.) HRV-C:n aiheuttamissa infektioiden näytteiden viruspartikkelimäärä on korkein, HRV-A:n toiseksi korkein ja HRV-B:n aiheuttamissa yleensä matalin (Choi ym. 2015: 70).

Nenänielun ja nenän erite ovat limakalvokerroksen alaisten rauhasen sekä pikarisolujen tuottamia, ja niiden tehtävä on estää vieraiden partikkeleiden, kuten pölyn, saasteiden ja bakteereiden, pääsy hengitysteihin. Erite on koostumukseltaan viskoosista ja geelimäistä. Etenkin nenäeritteen, eli rään, koostumus muuttuu huomattavasti paksummaksi flunssan aikana. Eritteen kirkas väri voi myös muuttua kellertäväksi infektion aikana immuunipuolustuksen lisääntyneen valkosolutuotannon takia. Erite koostuu pääosin vedestä (yli 90 %), glykoproteiineista (0,5-5 %), musiineista sekä useista muista komponenteista kuten elektrolyyteistä, lipideistä, plasmaproteiineista ja nukleiinihapoista. Musiinit ovat suurikokoisia glykoproteiineja ja eritteiden geelimäisen rakenteen takaavia niin kutsuttuja lima-aineita, joilla on useita inhibitorisia ominaisuuksia. Myös nenänielun ja nenän eritteiden fysikaaliset ominaisuudet voivat muuttua huomattavasti flunssaoireiden ja hengitysinfektioiden aikana. (Aksoy 1999; Ali 2010: 65.)

### 3.1.2 Kliinisten rinovirusnäytteiden käsittelymenetelmät

Kliinisten näytteiden esikäsittely- ja RNA-eristysmenetelmät vaihtelevat kustakin diagnostiikkaa tekevästä laboratorion riippuen. RNA voidaan eristää kliinisistä näytteistä erilaisia automaattisia tai manuaalisia RNA:n puhdistusvälineitä käyttäen. Näytteille tehtävä esikäsittely riippuu käytettävästä nukleiinihappojen eristysmenetelmästä. Käänteiskopiointireaktio olisi suositeltavaa tehdä heti RNA:n puhdistuksen jälkeen, jonka jälkeen cDNA:ta voidaan tarvittaessa säilyttää pakastettuna myöhempää testausta varten. (Mahony 2011: 70.)

### 3.1.3 Geenimonistusmenetelmät tutkimusmenetelmänä

Erilaisia rinoviruksen tunnistamiseen soveltuvia RT-PCR-menetelmiä on kehitetty 1980-luvulta alkaen. Liitteen 1 taulukon perusteella Suomessa käytetyin rinoviruksen diagnositimenetelmä on reaaliaikainen monikohde-RT-PCR, joka soveltuu samanaikaisesti 16 yleisimmän hengitystieviruksen tunnistamiseen, rinovirus mukaan lukien. Menetelmä voi vaihdella sairaanhoitopiiristä riippuen: se voi olla joko johonkin kaupalliseen PCR-testipaneeliin perustuva tai laboratoriossa itse pystytetty niin kutsuttu *in-house* -menetelmä. (Jacobs ym. 2013: 148–149; Mahony 2011: 69.)

Erilaisten kaupallisten testipaneelien tultua mukaan kliiniseen diagnostiikkaan, on rinovirusinfektioiden laadusta ja ominaisuuksista saavutettu huomattavasti uutta tietoa.

Lähiaikoina on esitelty useita rinoviruksen diagnostiikkaan soveltuvia kaupallisia RT-PCR-testipaneeleita. xTAG™ RVP Assay (Luminex, Molecular Diagnostics) hengitystievirusten testipaneeli on yksi Yhdysvaltain elintarvike- ja lääkeviraston, FDA:n, hyväksymä menetelmä rinovirusten diagnostiikkaan. xTAG -testipaneelilla voidaan diagnosoida yhdestä näytteestä samanaikaisesti 20 eri hengitystieviruslajia tai -alatyyppejä. (Jacobs ym. 2013: 149; Kim ym. 2013: 1137.) Muita FDA:n hyväksymiä kaupallisia monikohde-PCR-testipaneeleita on listattu taulukkoon 1.

Taulukko 1. FDA:n hyväksymiä kaupallisia rinoviruksen diagnostiikkaan soveltuvia monikohde-PCR-testipaneeleita. (Muokattu lähteestä FDA-cleared RT-PCR Assays and Other Molecular Assays for Influenza Viruses: taulukko 1.)

Tuote	Valmistaja	Tunnistettavat virukset	Testiaika
eSensor® Respiratory Viral Panel (RVP)	Clinical Micro Sensors, Inc. dba GenMark Diagnostics, Inc.	HRV, RSV-A, RSV-B, Parainfluenssa 1, 2 ja 3, hMPV, Adenovirus A/B, C	~8 h
FilmArray Respiratory Panel	Idaho Technologies	HRV/HEV, RSV, Parainfluenssa 1, 2, 3 ja 4, hMPV, Adenovirus, Coronavirus HKU1, Coronavirus NL63	1h / muokattava
x-TAG® Respiratory Viral Panel (RVP)	Luminex Molecular Diagnostics Inc.	HRV, RSV-A, RSV-B, Parainfluenssa 1, 2 ja 3, hMPV, Adenovirus	~8 h
x-TAG® Respiratory Viral Panel Fast (RVP FAST)	Luminex Molecular Diagnostics Inc.	HRV, RSV, hMPV, Adenovirus	~6 h

Koska rinovirusdiagnostiikkaan käytetyt RT-PCR-menetelmät kohdistuvat pikorinvirusten 5'UTR:n konservoituneeseen alueeseen, voi sekvenssien samankaltaisuus hankaloittaa entero- ja rinovirusten erottelua toisistaan. Jos spesifisempään erotteluun koetaan olevan tarvetta, voidaan se tehdä esimerkiksi erilaisten leimattujen koettimien avulla. (Österback ym. 2013: 3960.) LNA-koettimet ovat LNA- (locked nucleic acid) monomeerejä sisältäviä oligonukleotideja, jotka ovat erittäin spesifisiä komplementaarisia RNA- ja DNA-molekyylejään kohtaan (MeSH 2015: locked nucleic acid). Koettimet voidaan leimata yhdellä tai useammalla fluoroforilla eli väriaineella, jolloin eri lajien monistuminen voidaan detektoida tietyntyyppisenä fluoresenssina qPCR:ssä. Vaihtoehtoisesti koettimien käytön sijasta voidaan valita jokin toinen kohdesekvenssi, kuten VP2- ja VP4-kapsidiproteiinien geenit. Myös sulamiskäyräanalyysistä saadaan tietoja eri viruslajien erotteluun toisistaan. (Österback ym. 2013: 3960; Mahony 2011: 69.) PCR:n toimintaperiaatteista on kerrottu tarkemmin luvussa 5.1.

RT-PCR:n lisäksi muitakin molekyylibiologisia geenimonistusmenetelmiä on testattu rinoviruksen detektointiin. Kaikkien testattujen geenimonistusmenetelmien on todettu olevan virusviljelyä tehokkaampia. Yksi rinoviruksen tunnistamiseen soveltuva, mahdollisesti jopa RT-PCR:ää herkempi geenimonistusmenetelmä, on vuonna 1991 kehitetty ja myöhemmin rinoviruksen monistamiseen optimoitu NASBA (Nucleic Acid Sequence Based Amplification). (Mahony 2008: 728.) NASBA on isotermaalinen, nukleiinihapposekvenssin transkriptioon perustuva geenimonistusteknologia, joka soveltuu erityisesti RNA-kohdesekvenssien detektointiin (Fakruddin ym. 2012: 106).

#### 3.1.4 Muut tutkimusmenetelmät

RT-PCR-menetelmät ovat korvanneet perinteisemmät tutkimusmenetelmät lähinnä PCR-menetelmien nopeuden, herkkyuden ja spesifisyyden ansiosta. Yli 25 vuoden ajan virusviljely ja -eristys, serologia sekä antigeenitunnistus olivat kuitenkin merkittävässä roolissa hengitystievirusten diagnostiikassa. Rinovirusta on eristetty useisiin erilaisiin rinovirusten ICAM-1 ja LDLR-solureseptoreja ilmentäviin soluviljelmiin. Virusviljelyn suurin haittapuoli on sen hitaus: soluviljelmiä inkuboidaan yleensä 14 päivän ajan. PCR-menetelmien käyttöä diagnostiikkatarkoituksiin puoltaa myös se, ettei uusimpia HRV-C-lajeja edes pystytä viljelemään perinteisillä soluviljelmillä. (Österback ym. 2013: 3960; Mahony 2008: 728; Jacobs ym. 2013: 147.)

Koska rinovirusta pidettiin aiemmin varsin harmittomana patogeenina, ei sille nähty tarvetta kehittää monoklonaalisia vasta-aineita helpottamaan diagnostiikkaa. Rinoviruksilla ei myöskään ole olemassa sadoille serotyypeille yhteistä antigeenia. Näistä syistä suoraa fluoresoivaa vasta-ainetestausta (DFA) tai muita antigeenien tunnistustestejä ei ole käytetty laajasti rinoviruksen detektointiin kliinisistä näytteistä, toisin kuin muilla hengitystieviruksilla. Myöskään entsyymi-immunomäärityksiä (EIA) tai vieritestejä ei ole vielä kehitetty rinovirukselle diagnostiikkatarkoituksiin. (Mahony 2011: 69; Jacobs ym. 2013: 147, Nuzzo ym. 2013: 24.)

#### 3.2 Rinoviruksen diagnostiset haasteet

RT-PCR-menetelmissä suurin haaste on rino- ja enteroviruslajien ristireagointi toistensa kanssa samankaltaisesta 5'UTR:n genomirakenteesta johtuen. Kvantitatiivisuuden kannalta suuri serotyyppien välinen variaatio on osoittautunut hankalaksi, sillä vielä ei ole

olemassa kaikkien rinovirustyyppien kvantitointiin soveltuva standardia. Kvantitatiivinen diagnostiikka olisi sen kannalta houkuttelevaa, että rinovirusinfektion oireiden ja viruspartikkelimäärän välillä on todettu olevan yhteys. Vertailtavissa olevien kvantitatiivisten tulosten saamista hankaloittavat myös vaihtelevat näytematriisit, näytteenkeräys- ja testimenetelmät, potilaiden ikä sekä immuunitila. Kaikki edellä mainitut tekijät vaikuttavat kliinisten näytteiden sisältämään virusmäärään sekä mahdolliseen detektiomenetelmien standardointiin. (Jacobs ym. 2013: 148.)

## **4 Magneettipartikkelipohjainen nukleiinihappoeristys**

### **4.1 Nukleiinihappojen eristämisen periaatteet**

Nukleiinihappojen eristäminen ja puhdistaminen eri lähteistä ja näytemateriaaleista on ensimmäinen vaihe useissa molekyylibiologisissa tutkimuksissa. Nukleiinihappojen puhtaus on tärkeää jatkotutkimusten, kuten polymeerasiketjureaktioiden, geelielektroforeesiajojen tai hybridisaatiokokeiden, kannalta. Käytettävään eristysmenetelmään vaikuttavat usein monistettavan nukleiinihapon laatu (DNA vai RNA), näytemateriaali, käytettävä tutkimusmenetelmä sekä eristetyn tuotteen toivottu puhtaus ja määrä. (Dale & von Schantz 2006: 31.)

Vaikka nukleiinihappojen puhdistamiseen on olemassa useita erilaisia menetelmiä, ovat niiden pääperiaatteet samankaltaisia. Usein suurimman haasteen puhdistukselle asettaa näytemateriaalin laatu, sillä eristettävät nukleiinihapot on saatava eroteltua kaikesta muusta niitä ympäröivästä materiaalista. Näytemateriaalista riippuen näytteille tehdään esikäsittely siten, että solut saadaan eroteltua muusta materiaalista esimerkiksi sentrifugoimalla tai heterogeenisten näytteiden homogenisatiolla. Ensimmäinen vaihe eristyksessä on RNA:n vapauttaminen soluista soluseinän tai pintaproteiinien mekaanisella, kemiallisella tai entsymaattisella hajottamisella eli lyysauksella. (Dale & von Schantz 2006: 31–32.)

Lyysauksen jälkeen soluista vapautuu solunsisäisiä materiaaleja, kuten DNA:ta, RNA:ta, proteiineja, lipidejä ja hiilihydraatteja. Seuraava vaihe nukleiinihappojen puhdistuksessa onkin eristää halutut nukleiinihapot muusta ympäröivästä materiaalista. Tähän on olemassa useita erilaisia ratkaisuja. Usein heti lyysauksen jälkeen solujen nukleiinihappoja hajottavat nukleasit inaktivoidaan. RNA:n eristyksessä ongelmia aiheuttavat etenkin

RNA:ta nopeasti hajottavat ribonukleasit, joiden toiminnan estäminen RNAasi-inhibiitoreilla onkin erityisen tärkeää. Vastaavia entsyymikäsittelyitä voidaan käyttää myös ei-halutun materiaalin tuhoamiseen: DNA-eristyksessä voidaan käyttää RNAasikäsittelyä ja RNA-eristyksessä DNAasikäsittelyä. Proteiinikontaminaatioita voidaan poistaa proteolyttisten entsyymeiden, kuten proteinaasi K:n, avulla. Näiden entsyymikäsittelyiden tarpeellisuus riippuu kuitenkin käytettävästä puhdistusmenetelmästä, sen muista komponenteista sekä halutusta nukleiinihappojen puhtausasteesta. (Dale & von Schantz 2006: 32–33.)

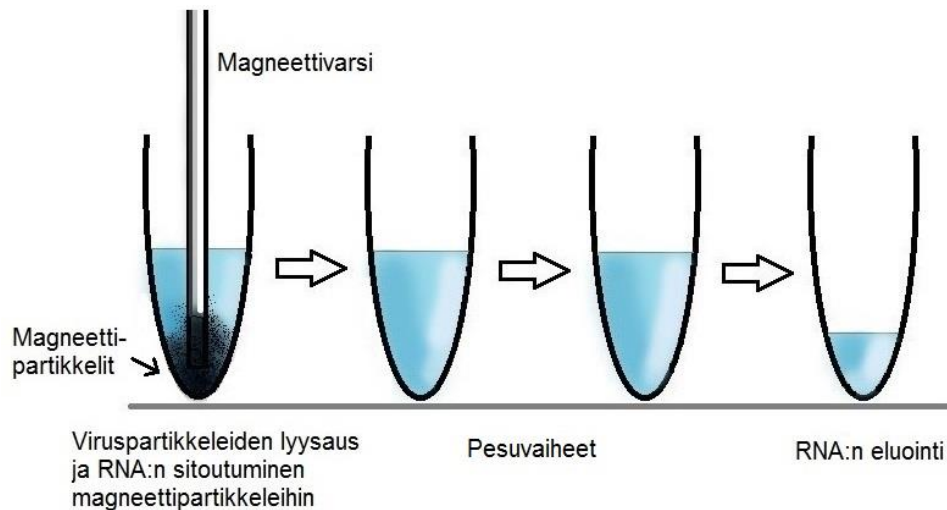
Lyysausvaiheen jälkeen seuraavat nukleiinihappojen puhdistuksen vaiheet riippuvat käytettävästä menetelmästä. RNA:n puhdistusmenetelmät jakautuvat kahteen kategoriaan: nestefaasi- ja kiinteäfaasipuhdistukseen. Nestefaasipuhdistuksessa RNA pysyy nestemäisessä faasissa ja epäpuhtaudet, kuten DNA, proteiinit ja fosfolipidit, poistetaan esimerkiksi saostamalla tai sentrifugoimalla. Kiinteäfaasipuhdistuksessa RNA sidotaan kiinteään kantaja-aineeseen, epäpuhtaudet pestään pois ja puhdistettu RNA eluoidaan haluttuun tilavuuteen. Kantaja-aineena voivat toimia esimerkiksi membraanisuodataimet, metallioksidit sekä lateksi- ja magneettipartikkelit. (Bair ym. 2006: 4.)

#### 4.2 Kehitettävä menetelmä

Tässä insinööriyössä kehitettävä näytteenkäsittelymenetelmä pohjautuu paramagneettisten silikapäälysteisten nanopartikkeleiden käyttöön nukleiinihappojen kiinteäfaasipuhdistuksessa. Puhdistuksessa on neljä vaihetta: viruspartikkeleiden pintaproteiinien hajoitus eli lyysaus, RNA:n sitominen paramagneettisiin nanopartikkeleihin, epäpuhtauksien peseminen pois ja puhtaan RNA:n eluointi. Menetelmässä puhdistettavan RNA:n siirtämiseen vaiheesta toiseen käytetään magneettivartta. Kuvassa 3 on havainnollistettu eristyksen vaiheet. Tämän insinööriyön kokeellisen osuuden työvaiheita kuvailtaessa puhutaan menetelmän erilaisista puskureista: ensimmäisessä vaiheessa käytetään lyysauspuskuria, jossa tapahtuvat sekä viruspartikkeleiden hajoitus että RNA:n sitominen magneettipartikkeleihin, seuraavissa pesuvaiheissa pesupuskureita ja eluointivaiheessa eluutiopuskuria.

Tutkittava näytteenkäsittelymenetelmä on Juha Saharisen Orion Diagnostica Oy:n tuotekehityksessä jatkokehittämä magneettipartikkeliteknologiaa soveltava menetelmä, joka on aiemmissa yrityksen projekteissa optimoitu DNA-eristykseen. Menetelmä on yhä

tuotekehityksen alla, joten sen komponentteja ei voida kuvailla yksityiskohtaisesti. Seuraavassa kartoitetaan yleisesti magneettipohjaisten nukleiinihappoeristysmenetelmien taustaa.



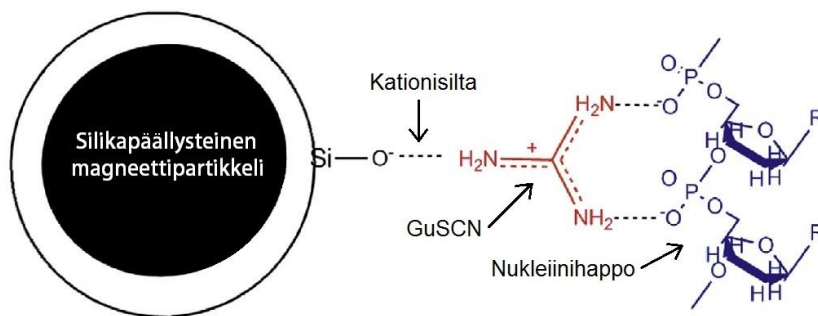
Kuva 3. Kehitettävän nukleiinihappojen puhdistusmenetelmän vaihteita ovat viruspartikkeleiden lyysaus, RNA:n sitoutuminen paramagneettisiin nanopartikkeleihin, epäpuhtauksien pesu ja RNA:n eluointi. Puhdistettava RNA siirretään vaiheesta toiseen magneettivarren avulla.

### 4.3 Silikapohjaiset eristysmenetelmät

#### 4.3.1 Silikapohjaisten eristysmenetelmien periaatteet

Boom ym. esittelivät vuonna 1990 kehittämänsä yksinkertaisen, nopean ja halvan nukleiinihappojen puhdistusmenetelmän, joka pohjautuu kaotrooppisen guanidiinitiosyanaatin (GuSCN) ja nukleiinihappoja sitovien silikapartikkeleiden yhteistoimintaan. Tätä ennen muita kaotrooppisia aineita, kuten natriumjodidia (NaI) tai natriumperkloraaattia ( $\text{NaClO}_4$ ), oli käytetty DNA:n sitomiseen lasi- tai silikapartikkeleihin, mutta erilaiset kliiniset näytematriisit hankaloittivat puhdistusta. Guanidiinitiosyanaatin sen sijaan on todettu soveltuvan erinomaisesti sekä DNA:n että RNA:n puhdistamiseen erilaisista näytemateriaaleista sen solujen ja viruspartikkeleiden lyysaamiseen sekä nukleaasien inaktivoimiseen perustuvien ominaisuuksien ansiosta. GuSCN:n kaltaiset kaotrooppiset suolat denaturoivat proteiinien ja nukleiinihappojen sekundääri-, tertiääri- ja kvartiäärirakenteita jättäen kuitenkin vähintään niiden primaarirakenteen ehjäksi. (Boom ym. 1990: 495; Boom ym. 1993: 3.)

Silika ( $\text{SiO}_2$ ), eli piidioksidi, on piin ja hapen kemiallinen yhdiste, joka soveltuu nukleiinihappojen sitomiseen etenkin kiteisessä, lasimaisessa ja kuitumaisessa muodossa. Nukleiinihappojen sitoutumismekanismia silikapäälysteisiin magneettipartikkeleihin GuSCN:n läsnä ollessa ei tarkkaan tunneta, sillä sekä silika että nukleiinihapot ovat negatiivisesti varautuneita. On ehdotettu, että guanidiinin kaltaiset kahdenarvoiset kationit voisivat toimia veden läsnä ollessa nukleiinihappojen ja silikan välisenä siltana muodostuvassa kompleksissa, kuten kuvassa 4 on esitetty. GuSCN:n mahdollistaa nukleiinihappojen sitoutumisen silikapartikkeleiden pinnalle poistamalla vesikerroksen sekä partikkeleiden että nukleiinihappojen pinnalta, ja suojaamalla nukleiinihappojen pinnan negatiivisia varauksia. (Boom ym. 1993: 3; Boom ym. 1990: 495; Sun ym. 2014: 36.)



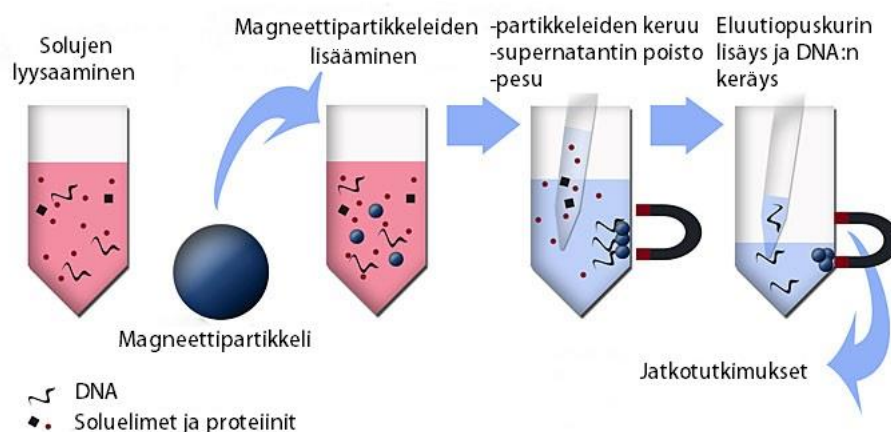
Kuva 4. Ehdotettu nukleiinihappojen sitoutumismekanismi silikapäälysteiseen magneettipartikkeliin guanidiinitiosyanaatin ja veden läsnä ollessa. Silikaan sitoutunut vesi muodostaa kationisillan GuSCN:n kanssa, ja GuSCN puolestaan sitoutuu nukleiinihappoon. (Muokattu lähteestä Sun ym. 2014: kuva 4B.)

Boomin nukleiinihappojen puhdistusmenetelmässä biologinen näytemateriaali, kuten seerumi, virtsa tai bakteerikasvusto, sekoitetaan GuSCN:a, EDTA:ta, Triton X-100:aa ja silikapartikkeleita sisältävään lyysausliuokseen. Vapautuneet nukleiinihapot sitoutuvat liuoksessa kantaja-aineena toimiviin silikapartikkeleihin muodostaen kompleksirakenteita, jotka voidaan nopeasti saostaa sentrifugoimalla. Tämän jälkeen supernatantti poistetaan ja silikakompleksit huuhdellaan kahdesti GuSCN:a sisältävällä pesupuskurilla, kahdesti 70 % etanolilla ja yhden kerran asetonilla epäpuhtauksien poistamiseksi. Kuvauksen jälkeen nukleiinihapot eluoidaan suolapitoisuudeltaan alhaiseen vesipohjaiseen TE-puskuriin. Korkean nukleiinihappopitoisuuden takaamiseksi eluutiolavuuden tulisi olla mahdollisimman pieni, esimerkiksi 100  $\mu\text{l}$ . Kontaminaatoriskiä menetelmässä laskee se, että koko eristysprosessi voidaan toteuttaa yhdessä ja samassa putkessa. (Boom ym. 1990: 495–497; Boom ym. 1993: 3.)



Suurimmassa osassa edellä kuvaillun kaltaisissa nukleinihappojen puhdistusmenetelmissä on useita manuaalisia sentrifugointi- ja pesuvaiheita. RNA:n puhdistusmenetelmän tulisikin olla mieluiten mahdollisimman yksinkertainen, nopea ja monelle eri näytemateriaalille sopiva. Käytettävien reagenssien tulisi olla vaarattomia, huoneen lämpötilassa säilyviä, ja niitä tulisi siirtyä mahdollisimman vähän eristystä seuraaviin jatkoanalyysiin, kuten käänteiskopiointi- tai monistusreaktioihin. (Bair ym. 2006: 5.)

Kuvassa 5 on kuvattu yksinkertainen magneettipohjainen DNA:n eristysmenetelmä. Yksinkertaisimmillaan menetelmä sisältää vain muutaman vaiheen, jotka voidaan toteuttaa yhdessä putkessa. Erillisiä nestekromatografisia järjestelmiä, sentrifugeja tai suodattimia ei tarvita. Yksinkertaistetussa menetelmässä lysattuihin soluihin lisätään magneettipartikkeleita sekä kaotrooppista ainetta sisältävää sidospuskuria, jotka yhdessä sitovat DNA:n. Magneettisen erottelun avulla muu ympäröivä biologinen materiaali voidaan kerätä pois siten, että vain DNA säilyy putkessa. Pesun ja eluinnin jälkeen puhdistettu DNA on valmis mahdollisia jatkotutkimuksia varten. (Safarik ym. 2004: 2.)

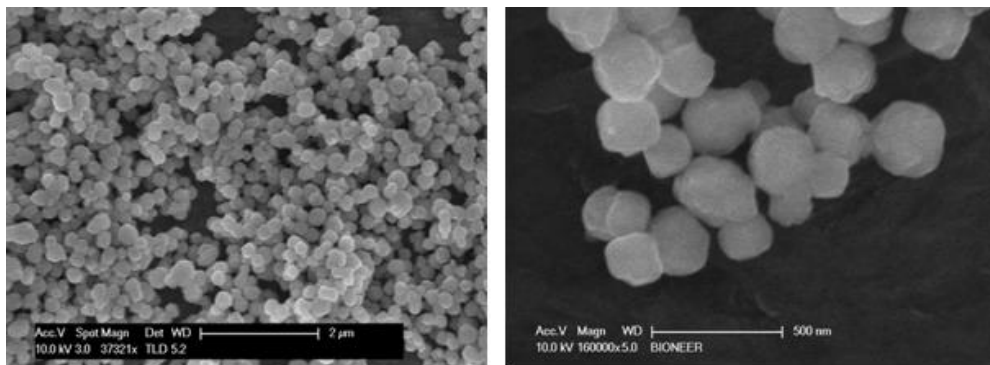


Kuva 5. Yksinkertaisen magneettipohjaisen DNA-eristysmenetelmän vaiheet. Menetelmässä käytetään magneettipartikkeleita ja magneettia DNA:n erotteluun muusta solumateriaalista. (Muokattu lähteestä M-Beads Magnetic Silica Beads.)

Silikapohjaisia nukleinihappojen puhdistusmenetelmiä on myös automatisoitu ja patentoitu lukuisten valmistajien toimesta. Yksinkertainen ja nopea puhdistusmenetelmä soveltuu hyvin laajempien automatisoitujen kokonaisuuksien perustaksi. Useilla valmistajilla on sekä manuaaliseen nukleinihappojen puhdistukseen tarkoitettuja tarvikepakauksia että automatisoituja eristysrobotteja. (Safarik ym. 2004: 2; Suomalainen ym. 2010: 1.)

#### 4.3.2 Magneettiset nanopartikkelit

Magneettipohjaiseen nukleiinihappojen puhdistukseen käytetään useimmiten kahdentyyppisiä magneettipartikkeleita: läpimitaltaan 1–10 µm:n kokoisia mikropartikkeleita paramagneettisella ytimellä sekä 50–100 nm:n kokoisia nanopartikkeleita superparamagneettisella ytimellä. Paramagneettisuudella tarkoitetaan sitä, että partikkelit ilmentävät magneettisia ominaisuuksiaan ainoastaan magneettikentän läsnä ollessa. (Suomalainen ym. 2010; Chen ym. 2010.) Partikkeleiden ydin voi koostua muun muassa rautaoksidoista (hematiitti, magnetiitti, rauta(III)oksidi, maghemiitti), ferriitistä, raudasta, koboltista, mangaanista, kromista, nikkelistä, sinkistä, tai edellä mainittujen seoksista (Kim ym. 2011: 3). Magneettinen ydin on tyypillisesti päällystetty silikalla tai vastaavilla biologisia aineita, kuten DNA:ta, RNA:ta ja proteiineja, sitovilla polymeereillä. Partikkeleita voidaan valmistaa laboratorio-olosuhteissa, mutta kumpaakin partikkelityyppiä on myös laajasti kaupallisesti saatavilla. Erilaisten kaupallisten partikkeleiden pintakemiat vaihtelevat mallista riippuen. Partikkelit ovat yleensä muodoltaan pallomaisia (kuva 6) ja niiden suhteellinen vuorovaikutuspinta-ala on sitä suurempi, mitä pienempiä partikkelit ovat. Siten myös partikkeleiden sitomiskyky on sitä suurempi, mitä pienempiä partikkelit ovat kooltaan. Käytettävä magneettipartikkelikoko tulisi aina valita puhdistettavien nukleiinihappojen ja näyttemateriaalin mukaan. (Suomalainen ym. 2010; Chen ym. 2010; Boom ym. 1993: 3.)



Kuva 6. Pyyhkäisyelektronimikroskooppikuva magneettisista nanopartikkeleista kahdella eri mittakaavalla. Kuvan nanopartikkelit ovat läpimitaltaan noin 400 nm. Kuvista ilmenee, että partikkelit ovat muodoltaan pallomaisia. (AccuNanoBead™ Magnetic Nanobeads, kuva 1.)

#### 4.4 RNA-eristys magneettieristysmenetelmällä

Tässä insinööriyössä tutkittava menetelmä on aiemmin optimoitu DNA:n eristämiseen. RNA-molekyylit eroaa DNA-molekyylistä yhden emäksen sekä sokeriosan perusteella: RNA:ssa tyymiinin tilalla on urasiili ja sokeriosa on deoksiriboosin sijaan riboosi. RNA-molekyylit ovat epästabiilimpia kuin DNA, sillä ne ovat herkempiä ribonukleasien toiminnalle sekä kemiallisten olosuhteiden muutoksille, kuten emäksisyydelle. (Dale & von Schantz 2006: 5.) Lisäksi virus-RNA:n alhainen pitoisuus kliinisissä näytteissä on merkittävä haaste kaikissa nykyisissä RNA-eristys- ja detektiomenetelmissä (Chen ym. 2009: 723).

Vaikka magneettipohjainen niin kutsuttu Boomin menetelmä onkin osoittautunut tehokkaaksi DNA:n puhdistamiseen, on RNA:n puhdistamisessa esiintynyt ongelmia etenkin DNA-kontaminaatioiden osalta. RNA:n sitoutumisen ja saostamisen optimoimiseen vastaavissa menetelmissä onkin käytetty guanidiinitiosyanaatin lisäksi useita muita suoloja, jotka sisältävät alkalimetalli-ioneita. Erityisesti kationit, kuten litium, natrium, kalium, rubidium ja cesium, sopivat RNA-saostukseen, sillä ne muodostavat kompleksirakenteen RNA-molekyylin fosfaattiryhmien kanssa. Kompleksoituminen ja sitä myöden RNA-molekyylin neutralisoituminen mahdollistavat RNA:n sitoutumisen kiinteään kantaja-aineseen vesipitoisessa ympäristössä. Litiumkloridi (LiCl) on edullisuutensa vuoksi RNA-saostukseen usein käytetty suola. Litium on myös edellä mainituista kationeista ainoa kosmotrooppinen, eli proteiinien ja nukleiinihappojen denaturoitumista estävä, ioni. Lisäksi litiumkloridilla on todettu olevan RNAasien toimintaa inhiboivia ominaisuuksia. (Bair ym. 2006: 4, 7–8.)

Koska litiumkloridi on ominaisuuksiltaan kosmotrooppinen ja sakkaa aiheuttava, ei se sellaisenaan sovellu hyvin käytettäväksi magneettipartikkeliteknologian kanssa. Jotta RNA saadaan tehokkaammin sidottua silikapartikkeleihin, on ribonukleiinihapot denaturoitava jollakin kaotrooppisella aineella. Eräs korkean RNA-saannon lupaava silikapartikkeleita hyödyntävä kiinteäfaasipuhdistusmenetelmä soveltaa edellä kuvailtuja litiumin ominaisuuksia: menetelmän lyysaus-/sidospuskuri sisältää kantaja-aineen lisäksi kaotrooppista ainetta, kuten GuSCN:a, sekä litiumia happamassa (pH enintään 6) liuoksessa. Litium voi olla joko orgaanisen tai epäorgaanisen suolan muodossa. Menetelmässä ehdotetaan myös 2-merkaptotetanolin tai ditiotreitolin kaltaisten antioksidanttien lisäämistä liuokseen ehkäisemään RNAasien toimintaa. (Kuroita ym. 1999: 5–6.)

Virusperäisen RNA:n puhdistukseen magneettieristysmenetelmällä soveltuvat käytettäviksi erityisesti superparamagneettiset nanopartikkelit, sillä ne ovat kokoluokaltaan viruspartikkeleiden kokoa vastaavia ja omaavat laajemman vuorovaikutuspinta-alan suhteessa kokoonsa. (Chen ym. 2010: 724.)

RNA-eristykseen soveltuvista kaupallisista tuotteista yhtenä esimerkkinä on silikapohjaiseen magneettipartikkeliteknologiaan (BOOM<sup>®</sup> Technology) perustuva automatisoitu nukleiinihappojen puhdistusjärjestelmä Nuclisens<sup>®</sup> easyMag<sup>®</sup> System (BioMérieux). Samalla valmistajalla on myös manuaaliseen nukleiinihappojen eristykseen tarkoitettu NucliSENS<sup>®</sup> miniMag<sup>®</sup> -tarvikepakkaus, sekä NASBA<sup>®</sup> -teknologian kanssa yhteensopiva automaattinen NucliSENS<sup>®</sup> EasyQ<sup>®</sup> nukleiinihappojen eristysjärjestelmä. (Nuclisens<sup>®</sup> easyMag<sup>®</sup>.)

#### 4.5 Vertailumenetelmä Qiagen EZ1<sup>®</sup>

Tässä insinööriyössä vertailumenetelmänä kehitettävälle näytteenkäsittelymenetelmälle käytettiin Qiagenin EZ1<sup>®</sup> Advanced XL nukleiinihappojen eristysrobotia ja sille tarkoitettua virusperäisen RNA:n eristykseen soveltuvaa EZ1<sup>®</sup> DSP Virus Kit -tarvikepakkausta ja eristysprotokollaa. Menetelmä on tarkoitettu *in vitro* -diagnostiikkaan ja se hyödyntää silikapohjaista magneettipartikkeliteknologiaa automatisoituun nukleiinihappojen eristykseen biologisista näyttemateriaaleista, kuten virussuspensioista, virtsasta, kokoverestä, plasmasta, ulosteesta ja hengitystienäytteistä. EZ1<sup>®</sup> Advanced XL -eristysrobotilla voidaan puhdistaa samanaikaisesti nukleiinihappoja 1–14 näytteestä ja eristysprosessi kestää noin 45 minuuttia. (EZ1<sup>®</sup> DSP Virus Kit Handbook: 5–6.)

Menetelmän automatisoitu nukleiinihappojen puhdistusprosessi sisältää Boomin menetelmästä tutut neljä vaihetta. Lyysausvaiheessa näytteiden proteolyysi toteutetaan vahvasti denaturoivissa olosuhteissa korkeassa lämpötilassa proteinaasi K:n ja lyysauspuskurin läsnä ollessa. Lyysauksessa virusten pintaproteiinit hajotetaan ja nukleaasien toiminta inaktivoidaan. Seuraavaksi lisätään sidospuskuria, ja lyaatit, puskurit sekä magneettipartikkelit sekoitetaan hyvin, jolloin nukleiinihapot sitoutuvat magneettipartikkeleiden silikaan. Optimaalinen suolapitoisuus ja pH takaavat sen, ettei partikkeleihin sitoudu mitään epäspesifistä, kuten proteiineja tai muita kontaminantteja. Nukleiinihappojen ollessa yhä kiinnittyneinä magneettipartikkeleihin, niistä pestään loput kontaminantit kah-

della eri pesupuskurilla ja sen jälkeen etanolilla. Lopuksi puhtaat, korkealaatuiset virusperäiset nukleiinihapot eluoidaan AVE-puskuriin (Qiagen). (EZ1<sup>®</sup> DSP Virus Kit Handbook: 6.)

EZ1-eristysrobotin protokollan manuaalisesti tehtäviin esivalmisteluihin kuuluu kantaja-RNA:n (CARRIER, Qiagen) liuottaminen ja laimentaminen AVE-puskuriin siten, että jokaista näytettä kohden eristykseen käytettävässä lyysauspuskurissa on 3 µg kantaja-RNA:ta. Kantaja-RNA:lla on kaksi tehtävää nukleiinihappojen puhdistusprosessissa: se parantaa nukleiinihappojen sitoutumista silikaan etenkin silloin, kun näyte sisältää vain vähän kohdemolekyylejä, sekä ehkäisee RNA:n hajoamista RNAasien toimesta. Nukleiinihappojen saanto EZ1-eristysprotokollalla voi olla pienempi, mikäli kantaja-RNA:ta ei lisätä prosessiin. (EZ1<sup>®</sup> DSP Virus Kit Handbook: 20.)

## 5 Geenimonistusmenetelmät

Erilaisten geenimonistusmenetelmien avulla voidaan määrittää jonkin geenin, geenin osan tai nukleotidisekvenssin läsnäolo jossakin elävässä organismissa tai biologisessa näytteessä. Geenimonistusmenetelmät perustuvat perinteisesti jonkin geenille spesifisen kohdesekvenssin tunnistamiseen näytteestä erilaisten alukkeiden ja koettimien avulla. Menetelmiä voidaan soveltaa useille eri molekyylibiotieteiden aloille, ja niiden avulla voidaan esimerkiksi tunnistaa näytteestä jokin patogeeninen organismi, määrittää alleelien läsnäolo, määrittää kohdegenomin vaurioita tai tunnistaa jonkin DNA- tai RNA-sekvenssin läsnäolo isäntäsolussa. Monistusteknologioiden avulla voidaan myös diagnosoida joitakin perinnöllisiä sairauksia sekä tunnistaa ja luokitella esimerkiksi bakteereita, viruksia, sieniä ja alkueläimiä. (Hoser 2011: 1.)

### 5.1 RT-qPCR

#### 5.1.1 RT-qPCR yleisesti

Polymeraasiketjureaktio, eli PCR, on Kary B. Mullisin vuonna 1985 patentoima tiedemaailman mullistanut menetelmä. PCR mahdollistaa geenien ja DNA:n eksponentiaalisen monistamisen useisiin eri käyttötarkoituksiin, kuten geenien kloonamiseen tai infektiosairauksien nopeaan diagnostiikkaan. (Dale & von Schantz 2006: 143.) Kvantita-

tiivinen käänteiskopiointipolymeraasiketjureaktio, eli RT-qPCR, on määrällinen reaaliaikainen geeniekspressioanalyysi, joka hyödyntää käänteiskopioijaentsyymien toimintaa (Dale & von Schantz 2006: 154). Käänteiskopiointireaktiota eli RT-reaktiota tarvitaan, kun monistettavana lähtömateriaalina on RNA. RT-reaktiossa RNA:sta tuotetaan yksisäikeinen komplementaarinen DNA (cDNA) käänteiskopioijaentsyymien, eli RT-entsyymien avulla. RT-entsyymit ovat muun muassa retroviruksista löytyviä entsyymeitä, jotka pystyvät syntetisoimaan RNA:sta DNA:ta. Kaksi yleisemmin käytettyä entsyymityyppiä ovat Moloneyn hiirileukemiaviruksen (M-MLV) sekä linnun myeloblastoosiviruksen (AMV) RT-entsyymit. cDNA-synteesiin tarvitaan RT-entsyymien lisäksi yksisäikeiseen RNA:han kiinnittyvä aluke. Alukkeen kiinnittymisen jälkeen RT-entsyymi syntetisoi cDNA:ta RNA-säikeen 5'-päästä kohti. Alukkeet voivat olla sekvenssille joko spesifisiä tai epäspesifisiä. (Freeman ym. 1999: 113.)

RT-qPCR voidaan toteuttaa joko yksivaiheisena (*one-step*), jolloin RT-reaktio tapahtuu samassa putkessa kuin cDNA:n monistuminenkin, tai kaksivaiheisena (*two-step*), jolloin tehdään ensin erikseen cDNA:n syntetisointi RT-reaktiossa ja syntetisoitua cDNA:ta käytetään tämän jälkeen PCR-reaktiossa monistettavana templaattina. (Freeman ym. 1999: 114.)

RT-qPCR:n suuri herkkyys voi aiheuttaa ongelmia, kuten epäspesifisten tuotteiden monistumista ja alukedimeerien muodostumista. Menetelmässä käytettävän templaatin on oltava laadultaan mahdollisimman puhdasta ja DNA-vapaata RNA:ta. Herkkyuden takia RT-qPCR-menetelmät ovat erittäin alttiita erilaisille kontaminaatioille, ja etenkin RT-reaktion aikana DNA-kontaminaatiot ovat yleisiä. (Pfaffl 2004: 88; Dale & von Schantz 2006: 154.)

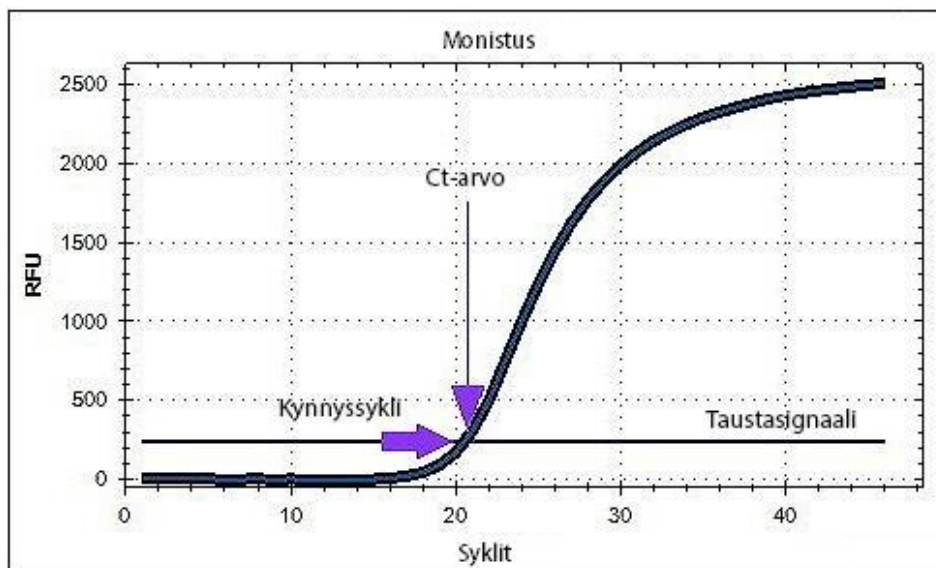
### 5.1.2 RT-qPCR:n monistusreaktio

RT-qPCR:n kvantitatiivisuudella ja reaaliaikaisuudella tarkoitetaan sitä, että reaktion monistustuotteiden määrää voidaan seurata reaaliaikaisesti jokaisen monistussyklin jälkeen. RT-qPCR vaatii sopivan detektiokemian, laitteen ja tietokoneohjelmiston monistustuotteiden muodostumisen seurantaan sekä kvantitatiiviseen analyysiin. Detektiokemian avulla havaitaan fluoresoivan värin läsnäolo, ja fluoresenssin signaali on suoraan verrannollinen muodostuvan tuotteen määrään. Detektiokemiat voivat olla joko spesifisiä tai epäspesifisiä. Epäspesifisissä detektiokemioissa fluoresoiva väri, kuten SYBR® Green, sitoutuu kaksijuosteiseen DNA:han, jolloin PCR:n edetessä fluoresenssisignaali

kasvaa. Spesifiset kemiat perustuvat puolestaan DNA-sekvenssiin sitoutuvien fluore-soivien koettimien toimintaan: fluoresenssia muodostuu vain, mikäli fluoroforiin liitetty koetin hybridisoituu sille komplementaarisen kohdesekvenssin kanssa. (Bustin & Mueller 2005: 366; Kubista ym. 2006: 98–105.)

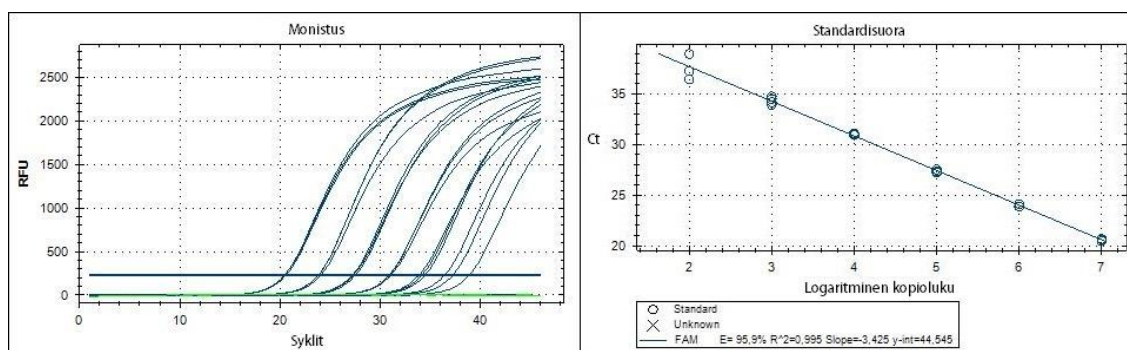
PCR:n ensimmäisten syklien aikana fluoresenssi on heikkoa, eikä sitä voida erottaa taustasignaalista. Monistustuotteen määrän kasvaessa syklien edetessä myös fluoresenssi kasvaa eksponentiaalisesti. Monistustuotteen määrä teoreettisesti kaksinkertaistuu jokaisen syklin aikana. Eksponentiaalivaiheen jälkeen signaali tasoittuu, kun reaktioon tarvittavat komponentit kuluvat loppuun. (Bustin & Mueller 2005: 367; Kubista ym. 2006: 98–99.)

Muodostuvat monistuskäyrät (kuva 7) kuvaavat monistettavan templaatin DNA-pitoisuutta: mitä suurempi templaatti on kopiomäärältään, sitä vähemmän monistussyklejä tarvitaan sen monistustuotteen detektoimiseen ja kynnyssyklin saavuttamiseen (Bustin ym. 2005: 599). Kynnyssykli saavutetaan, kun monistustuotteen muodostama signaali ylittää laitekohtaisen taustasignaalin (threshold). Kynnyssyklin arvo (Ct-arvo) saadaan määrittämällä sykli, jossa monistustuotteen fluoresenssin signaali leikkaa kynnyssyklin.



Kuva 7. RT-qPCR:n monistuskäyrä. X-akselilla on syklien lukumäärä ja y-akselilla fluoresenssisignaalin arvo RFU (Relative Fluorescence Units). Monistusreaktion Ct-arvo saadaan määrittämällä sykli, jossa monistustuotteen fluoresenssin signaali leikkaa kynnyssyklin.

Näytteiden väliset erot voidaan ilmaista määrällisesti eli kvantitoida vertaamalla niiden monistuskäyrien muodostumiseen kuluvien syklien määrää pitoisuudeltaan tunnetun standardin kynnyssykliin. Laimennossarjan Ct-arvojen perusteella standardeista voidaan tehdä logaritminen standardisuora, josta tutkittavan näytteen kopioluku selvitetään referenssinäytteiden eli standardien tunnettujen kopiolukujen avulla (kuva 8). (Kubista ym. 2006: 98–99; Bustin & Mueller 2005: 367.)

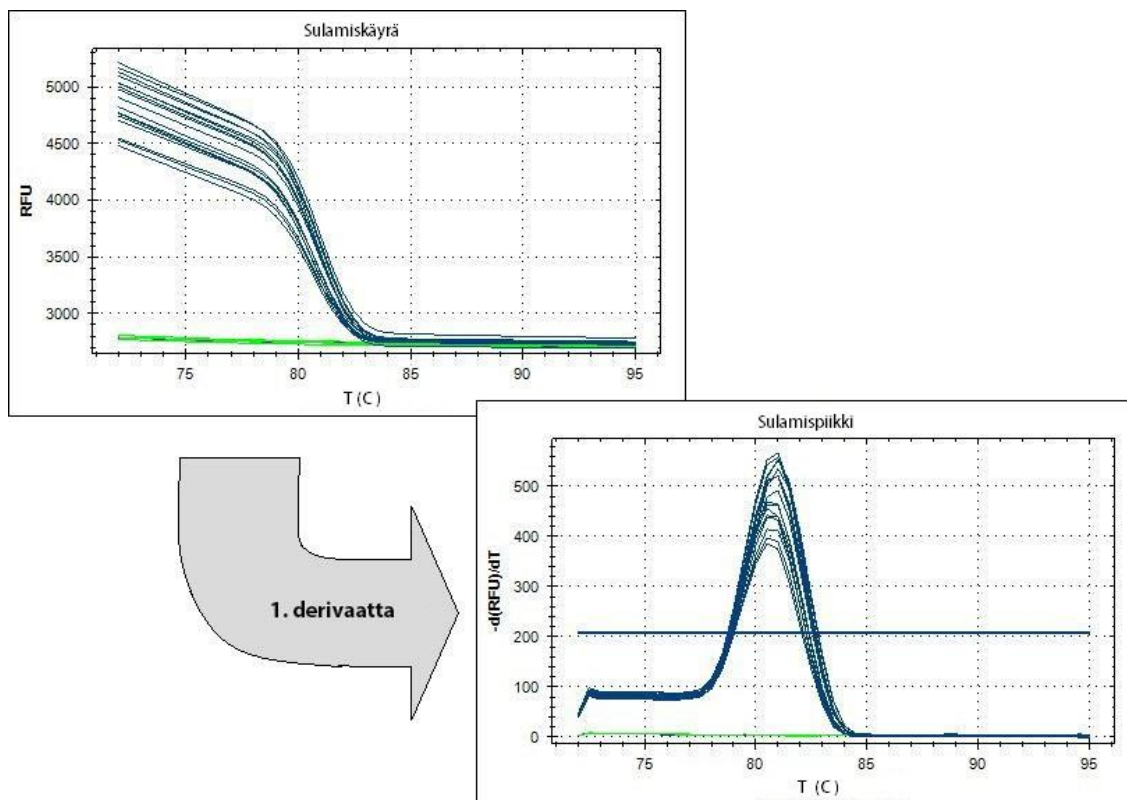


Kuva 8. RT-qPCR:n logaritminen standardisuora kuuden pitoisuudeltaan tunnettujen standardinäytteiden Ct-arvoista.

### 5.1.3 RT-qPCR:n sulamiskäyräanalyysi

RT-qPCR:n jälkeen tehtävän sulamiskäyräanalyysin avulla voidaan varmistaa monistustuotteiden oikea koko. Lämpötilaa nostettaessa tuotteiden fluoresenssi laskee vähitellen. Kun lämpötila on kohonnut siihen pisteeseen, että DNA:n kaksoisjuoste avautuu, fluoresenssi laskee äkillisesti kokonaan. Tätä lämpötilaa kutsutaan tuotteiden sulamislämpötilaksi ( $T_m$ ). Sulamislämpötila vaihtelee sen mukaan, minkä pituinen monistustuote on, tai missä suhteessa nukleotidit ovat siihen sitoutuneet. Monistustuotteilla, joiden sekvenssit ovat samanpituisia ja joilla on sama GC-pitoisuus, on myös sama sulamislämpötila. Täten muodostuvan sulamiskäyrän piikit tulisivat olla myös samassa lämpötilassa, mikäli kyseessä on oikeankokoinen lopputuote. Kaikki muu epäspesifinen monistuminen on detektoitavissa sulamiskäyräanalyysissä piikkeinä eri lämpötiloissa (kuva 9). (Kubista ym. 2006: 102–103.)





Kuva 9. RT-qPCR:n sulamiskäyräanalyysi. Fluoresenssi laskee nopeasti DNA:n sulaessa. Monistustuotteen sulamislämpötila määritetään sulamiskäyrän (yllä) käännepestestä käyrän negatiivisen ensimmäisen derivaatan maksimiarvon perusteella, ja sulamislämpötila saadaan siten näkyviin sulamispiikkinä (alla).

## 5.2 Strand Invasion Based Amplification (SIBA®)

Strand invasion Based Amplification, eli SIBA®, on vuonna 2011 patentoitu Orion Diagnostica Oy:n omistama isotermaalinen kaksoisjuosteen invaasioon perustuva geenimonestusteknologia. SIBA-teknologia on resistentti ei-spesifiselle monistumiselle, se pystyy parhaimmillaan tunnistamaan kohdeanalyytin erittäin spesifisesti yhden molekyylin tarkkuudella, eikä vaadi kohdespesifisten koettimien käyttöä. SIBA-reaktiossa yksijuosteinen keskioligo tunnistaa kohdesekvenssin komplementaarisen alueen ja tunkeutuu rekombinaasientsyymiin sekä adenosinitrifosfaatin (ATP) avulla kaksoisjuosteen väliin, jolloin kaksoisjuoste aukeaa keskioligon alueelta ja kohdesekvenssille spesifiset alukkeet pysyvät kiinnittymään yksijuosteiseen kohdesekvenssiin. Tämän jälkeen polymeraasientsyymi syntetisoi kohdesekvenssin mallin mukaisesti vapaista nukleotideista kaksi kaksijuosteista DNA:ta. Tämän jälkeen keskioligo irtaantuu, kiinnittyy uuteen kohdesekvenssiin ja sykli toistuu uudelleen. Syklien toistuessa saavutetaan eksponentiaalinen kohdesekvenssin, eli templaatin, monistumisvaihe toistamalla edellä kuvattuja reaktion vaiheita.

Templaattina reaktiossa voivat olla DNA, cDNA tai genominen DNA. (Hoser ym. 2014: 1-3; Hoser 2011: 1-3)

SIBA-reaktiossa alukkeet eivät itsessään ole keskioligon lailla rekombinaasin substraatteja, eivätkä kykene kiinnittymään kohdesekvenssiin ilman keskioligon läsnäoloa. Tämä takaa sen, että monistusta tapahtuu vain oikean kohdesekvenssin läsnä ollessa. Reaktiossa käytettävä keskioligo on kahta päätyaluketta pidempi, vähintään 30 nukleotidin pituinen ja ainakin osittain komplementaarinen kohdesekvenssin kanssa. Myös päätyalukkeiden on oltava ainakin osittain komplementaarisia kohdesekvenssin kanssa. Osat päätyalukkeiden 3'-päistä ovat keskioligon kanssa homologisia. Keskioligoon on lisäksi liitetty 2'-O-metyyli RNA-nukleotideja, jotka takaavat sen, ettei keskioligo voi toimia polymeerasin substraattina tai templaattina monistusreaktiossa. (Hoser ym. 2014: 3-5; Hoser 2011: 3.)

SIBA-reaktio vaatii toimiakseen rekombinaasientsyymin, rekombinaasin kofaktorit, ATP:tä tuottavan energiakoneiston sekä polymeerasientsyymin ja nukleinihappokomponentit. Rekombinaasientsyyminä voidaan käyttää esimerkiksi UvsX:ää. UvsX mahdollistaa tehokkaan energiakoneiston toiminnan ja ATP:n vaihtuvuuden reaktiossa, mutta se myös tuottaa epäorgaanista ja reaktiota inhiboivaa fosfaattia. Reaktioon lisättävät sakkaroosi sekä sakkaroosi-fosforylaasi poistavat muodostuvaa fosfaattia. Energiakoneistoon kuuluvat lisäksi ATP:ta regeneroivat kreatiinifosfokinaasi ja fosfokreatiini. Polyetyleni-glykoli eli PEG sekä gp32-proteiini puolestaan parantavat rekombinaasin toimintaa SIBA-reaktiossa. (Hoser ym. 2014: 16; Hoser 2011: 4, 6.)

SIBA-reaktio voidaan toteuttaa joko märkämerialla tai kylmäkuivattuja reagensseja käyttämällä. Kun käytössä ovat kylmäkuivatut reagenssit, lisätään monistettava DNA- tai RNA-templaatti suoraan reaktiokaivoon, jossa kylmäkuivatut reagenssit ovat. Templaatin tilavuus on huomattavasti suurempi kuin useimmissa PCR-reaktioissa tarvittava templaattimäärä. Tästä syystä mahdollisella DNA- ja RNA-eristyksestä kantautuvalla *carry over*illa voi olla suurempi reaktiota inhiboiva vaikutus kuin PCR-reaktioissa. SIBA-reaktio on isotermaalinen, eli lämpötila pysyy koko monistusreaktion ajan samana: 40 °C:ssa. Reaktion reaaliaikaista etenemistä voidaan seurata käyttämällä esimerkiksi fluoresoivia väriaineita sekä qPCR-laitteistoa. (Hoser ym. 2014: 5-6, 17.)

## 6 Työn tarkoitus

Tämän insinööriyön tavoitteena oli pystyttää Orion Diagnosticalla kehitetty uuteen nukleiinihappoeristykseen pohjautuva näytteenkäsittelymenetelmä rinovirukselle. Näytteenkäsittelymenetelmä oli tarkoitus optimoida nenänielunäytteelle, sillä se on kliinisten rinovirusnäytteiden yleisin näytematriisimuoto. Kehitettävän menetelmän oli oltava mahdollisimman tehokas eristetyn rinovirus-RNA:n saannon suhteen ja yhteensopiva isotermaalisen geenimonistusmenetelmän, SIBA:n, kanssa. Näytteenkäsittelymenetelmän komponenttien, kuten pesupuskureiden, kantautuminen eli *carry over* lopullisiin RT-qPCR- ja SIBA-reaktioihin oli minimoitava. Eristetyn RNA:n oli myös oltava riittävän puhdasta, jotta monistumista tapahtuisi geenimonistusreaktioissa.

## 7 Materiaalit ja menetelmät

### 7.1 Näytemateriaalit

#### 7.1.1 Plasmidi

RT-qPCR:n kvantitointiin käytettävä RNA transkriptoitui pEX-A2-HRV Trans 600 -plasmidista. Plasmidi oli tilattu Eurofinsiltä ja siihen oli syntetisoitu sellainen kaksijuosteinen komplementaarinen HRV-B17:n (GenBank EF173420.1) DNA-sekvessijakso genomien 5'UTR-alueelta, jolle sekä RT-qPCR:n että SIBA:n alukkeet ja kohdesekvenssit sopivat. Plasmidin tarkemmat tiedot on esitetty liitteessä 2 ja plasmidiin syntetisoitu HRV-B17:n sekvenssin osa, eli HRV Trans 600 -geeni, on esitetty liitteessä 3. HRV Trans 600 on usealle rinovirusserotyypille tyypillinen konservoitunut sekvenssijakso 5'UTR-alueelta: NCBI:n BLAST®-linjauksen (Standard Nucleotide BLAST) perusteella sekvenssillä oli 90–100 %:n yhdenmukaisuus muun muassa HRV-B48, -B52, -B69, -B70, -B91 sekä muutaman HRV-A-lajin 5'UTR -sekvenssien kanssa.

#### 7.1.2 RNA

SIBA:n ja RT-qPCR:n pystyttämisessä templaattina käytettiin pEX-A2-HRV Trans 600 -plasmidista transkriptoitua HRV RNA:ta, eli *ivT*-RNA:ta (*in vitro* -transcribed RNA). RNA:n puhtaus varmistettiin kvantitoinnin yhteydessä lisäämällä syntetisoitua HRV RNA:ta sellaisenaan ilman RT-reaktiota qPCR:ään.

### 7.1.3 Virussuspensio

Turun yliopiston virologiselta osastolta lähetettiin tutkimustarkoitukseen HRV-A60 kannalla (GenBank FJ445143.1) infektoituja HeLa-soluja suspensiona (jatkossa ”HRV-A60-virussuspensio”). Kyseisen suspension viruspartikkelipitoisuutta ei tiedetty etukäteen, mutta suspension tiedettiin toimivan hyvin näyttemateriaalina käytettävässä RT-qPCR -protokollassa. (Susi 2015.)

### 7.1.4 Nenänielunäytteet ja nenäeritenäytteet

Opinnäytetyöhön tarvittavia nenänielunäytteitä varten käytiin näytteenottokoulutus HYKS:n korvaklinikalla 6.3.2015. Seitsemältä henkilöltä kerättiin nenänielunäytteet näytteenottotikuilla, ja kerättyjä nenänielutikkunäytteitä käytettiin opinnäytetyössä näytteenkäsittelymenetelmän kehittämiseen. Osalla näytteenantajista ilmeni flunssan oireita. Näytteet kerättiin Copan FLOQ Swabs 553C -mallin (Copan Diagnostics) kuivalla näytteenottotikuilla, ja säilytettiin keräyksen jälkeen -20 °C:ssa. Myös nenäeritenäytteitä, eli nenästä kerättyjä räkänäytteitä, käytettiin näyttematriisina joissakin kokeissa. Nenäeritenäytteet kerättiin suoraan nenästä muoviseen näytteenkeräysastiaan ja säilytettiin keräyksen jälkeen -20 °C:ssa.

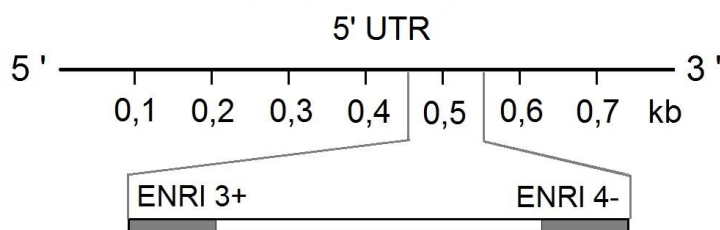
## 7.2 Geenimonistusmenetelmien pystytytys

Opinnäytetyö aloitettiin pystyttämällä kirjallisuudesta poimittu rinoviruksen diagnostiikkaan soveltuva RT-qPCR -protokolla, sekä testaamalla SIBA-teknologian soveltuvuutta rinovirukselle. RT-qPCR:n pystytykseen sisältyi myös kvantitoinnin suunnittelu ja toteutus plasmidista transkriptoidulla RNA:lla. Työssä käytetty qPCR-laite oli Bio-Radin *CFX96™ Real Time System C1000™ Thermal Cycler*.

### 7.2.1 HRV RT-qPCR-protokollan tausta

RT-qPCR-protokollaan (jatkossa ”HRV RT-qPCR”) käytetyt alukkeet, ajo-olosuhteet sekä käänteiskopiointireaktion ja qPCR:n reagenssiliuokset poimittiin Lönnrot ym. (1999) artikkelista. Alukkeet (ENRI 3+ ja ENRI 4-) on alkuperäisessä artikkelissa valittu pikorivirusgenomin 5'-pään UTR-alueelta (kuva 10), ja niiden sekvenssit on esitetty liit-

teessä 4. Alukeparin on todettu soveltuvan erityisesti rinovirusten spesifiseen tunnistamiseen. Alukkeet tuottavat RT-qPCR:ssä noin 120 emäsparin pituisen amplikonin. Tässä työssä RT-qPCR-protokollassa ei käytetty artikkelissa esiteltyjä entero- ja rinovirusille suunniteltuja koettimia. Alukkeiden kiinnittyminen RT-qPCR:n standardina käytettävään HRV Trans 600 -sekvenssijaksoon on esitetty liitteessä 5 ja alukkeiden kiinnittyminen HRV-A60:n sekvenssiin on esitetty liitteessä 6. (Lönnrot ym. 1999: 379–380; Österback ym. 2013: 3961.)



Kuva 10. HRV RT-qPCR-protokollassa käytettävät ENRI 3+ ja ENRI 4- alukkeet sijoittuvat pikokorvirusten genomien 5'-päähän transloitumattomalle alueelle (5'UTR), ja ne tuottavat noin 120 emäsparin pituisen amplikonin (mukailien lähdeä Lönnrot ym. 1999: kuva 1).

RT-qPCR-protokollan herkkyydeksi on kirjallisuudessa määritetty 10 kopiota RNA:ta /  $\mu$ l HRV-A16, HRV-B14 ja HRV-C40 iVT-RNA:lla. Kopiomäärä vastaa 12,5 kopiota cDNA:ta qPCR:ssä. (Österback ym. 2013: 3964).

RT-reaktioon ja qPCR:ään käytettyjen reagenssien tarvittavat määrät ja pitoisuudet laskeettiin artikkelissa esitettyjen tietojen perusteella (Lönnrot ym 1999: 380), ja qPCR:n ajo-ohjelma koottiin kahdesta samoja alukkeita käyttävän artikkelin ohjelmasta (Lönnrot ym. 1999: 380; Österback ym. 2013: 3961). RT-reagenssiliuokset, qPCR-reagenssiliuos, liuoksiin käytettyjen reagenssien tuotetiedot sekä qPCR:n ajo-ohjelma on esitetty liitteessä 4. Ennen RT-reaktiota RNA-templaattia denaturoitiin ENRI 4- alukkeen kanssa 10 minuuttia 70 °C:ssa, minkä jälkeen valmisteltiin loput RT-reaktion reagenssiliuoksesta. cDNA-synteesi tehtiin inkuboimalla RNA-templaattia RT-reagenssiliuoksessa 37 °C:ssa tunnin ajan. qPCR:n monistusreaktiot mitattiin FAM-kanavalla, sillä reagenssiliuoksessa käytetty väriaine oli SYBR Green. Jokaisessa RT-qPCR:n eri vaiheessa (reaktioliuosten valmistus, alukkeiden ja templaattien pipetointi sekä qPCR-ajo) työskenneltiin erillisissä laboratoriotiloissa kontaminaatioiden välttämiseksi.

### 7.2.2 Standardisuoran ja kvantitoinnin suunnittelu ja toteutus

Jotta näytteenkäsittelymenetelmän avulla puhdistettujen HRV RNA-näytteiden nukleihin happokonsentraatiot voitiin määrittää tarkasti, tuli RT-qPCR kvantitoida. Kvantitointiin käytettiin pEX-A2-HRV Trans 600 -plasmidista transkriptoitua RNA:ta, eli ivT-RNA:ta. IvT-RNA toimi siis referenssinäytteenä, johon HRV-A60-RNA:ta verrattiin.

#### *RNA:n syntetisointi plasmidista*

RNA voidaan syntetisoida plasmidista erilaisten kaupallisten tarvikkepakkausten avulla. HRV Trans 600 RNA-transkriptin syntetisoimiseen käytettiin New England Biolabsin HiScribe™ T7 High Yield Synthesis Kit -tarvikkepakkausta. Ennen syntetisointia plasmidi digestoitiin eli linearisoitiin Smal-restriktioentsyymillä avulla. Linearisointi on välttämätöntä, jotta plasmidista saadaan syntetisoitua halutun pituinen RNA-sekvenssi. Syntetisoidusta RNA:sta poistettiin mahdollinen plasmidi-DNA usealla DNAasikäsittelyllä, ja lopuksi RNA puhdistettiin RNeasy® MinElute® Cleanup Kit -tarvikkepakkauksella (Qiagen). Puhdistetun RNA:n konsentraatio määritettiin Nanodrop 2000 -spektrofotometrillä, ja tuloksen avulla laskettiin RNA-transkriptin kopioluku RT-qPCR:n kvantitointia varten. (HiScribe™ T7 High Yield RNA Synthesis Kit; RNeasy® MinElute® Cleanup Handbook 2010.)

#### *RNA:n kopioluvun määrittäminen*

Transkriptoidun HRV Trans 600 RNA:n konsentraatio mitattiin Nanodrop 2000 -spektrofotometrillä, ja neljän rinnakkaisen mittauksen keskiarvona saatiin 141,28 ng/μl. RNA-konsentraation lisäksi kopioluvun määrittämiseksi oli tunnettava RNA-sekvenssin emäsjärjestys, joka oli siis plasmidiin syntetisoidun templaatti-DNA-sekvenssin komplementaarinen yksisäikeinen sekvenssi, jossa tyymiinien tilalla oli urasiilia. DNA-sekvenssin kääntäminen RNA-sekvenssiksi toteutettiin virtuaalisen transkription avulla *Transcription and Translation Tool* -internetsivustolla, jonne syötettiin 600 emästä pitkä plasmidissa oleva HRV DNA-sekvenssi (liite 3) ilman T7-promoottorin sekvenssiä. Sivuston antama RNA-sekvenssi on esitetty liitteessä 3. RNA-sekvenssi sekä transkriptoidusta plasmidista mitattu RNA-konsentraatio syötettiin *Endmemo*-internetsivuston kopiolukulaskuriin, ja tulokseksi saatiin  $44,3 \cdot 10^{10}$  kopiota/μl. (*Transcription and Translation Tool*; DNA/RNA Copy Number Calculator.)

Laskuri perustuu sekvenssin molekyylipainon, RNA-konsentraation sekä Avogadron vakion avulla määritettävään kopiomäärään. Ohjelma laskee ensin sekvenssin emäsjärjestyksen perusteella yhden syntetisoidun RNA-sekvenssin molekyylipainon. Tämän jälkeen voidaan määrittää, kuinka monta kopiota RNA-sekvenssiä on yhdessä nanogrammassa syntetisoitua RNA:ta:  $(1 \text{ ng} * 10^{-9} * 6,02 * 10^{23} \text{ kopiota / mol}) / X \text{ g/mol}$ , jossa  $X$  = RNA-sekvenssin molekyylipaino ja  $6,02 * 10^{23}$  kopiota/mol on Avogadron vakio. Tulos voidaan tämän jälkeen kertoa syntetisoidun RNA:n mitatulla konsentraatiolla (massalla), jolloin saadaan koko syntetisoidun RNA:n sisältämä kopiomäärä. (DNA/RNA Copy Number Calculator.)

### *Kvantitoinnin toteutus*

Määritetyn kopioluvun perusteella syntetisoidusta RNA:sta valmisteltiin konsentraatioltaan  $10^8$  kopiota/ $\mu\text{l}$  alikvaatteja, joita laimennettiin edelleen käytettäväksi RT-reaktion templaatteina. Koska RT-reaktioon lisätään yhteensä  $10 \mu\text{l}$  templaattia, tuli tämä huomioida laimennoksessa:  $10^8$  kopiota/ $\mu\text{l}$  alikvaatti laimennettiin 1:10 ennen sen lisäämistä RT-reaktioon, jolloin kopiomääräksi saatiin  $10^8$  kopiota/reaktio. RT-reaktion jälkeen cDNA:sta tehtiin laimennossarja laimentamalla cDNA:ta 1:10 aina yhteen kopioon asti ( $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$ , ... , 1 kopio/reaktio). Laimennossarjan cDNA:ta tunnetuissa pitoisuuksissa käytettiin templaattina RT-qPCR:ssä, ja PCR-ajon perusteella muodostettiin standardisuora. Jokaisesta cDNA-pitoisuudesta tehtiin neljä rinnakkaista reaktiota, joista määritettiin keskihajonta.

Kvantitointia varten valmisteltua cDNA-laimennossarjaa käytettiin jatkokokeiden RT-qPCR -ajoissa, ja tuntemattomien näytteiden kopiomäärät saatiin tämän absoluuttisen kvantitoinnin avulla määritettyä laimennossarjasta tehtyä standardisuoraa käyttämällä. Jotta syntetisoidun ivT-RNA:n mahdolliset plasmidi-DNA-jäämät voitiin tarkistaa, lisättiin RNA:ta sellaisenaan qPCR:ään ilman RT-reaktiota, ja tämä toimi erillisenä kontrollireaktiona qPCR:ssä. Useiden DNAasikäsittelyiden jälkeen DNA:n määrä tulisi olla minimaalinen.

### 7.2.3 SIBA-protokollan pystytys ja sen soveltuvuuden testaaminen rinovirukselle

SIBA-protokollan soveltuvuuden testaaminen rinovirukselle tehtiin märkäkemiaan perustuvilla SIBA-reagenssiliuoksilla, jotka sisälsivät kaikki reaktioon tarvittavat reagenssit.

SIBA-ajaja testattiin HRV ivT-RNA:lla, jonka pitoisuus oli tunnettu. Testauksissa vertailtiin myös useiden eri aluke- ja keskioligoyhdistelmien tehokkuutta. SIBA-ajoissa käytettyjä alukkeita ei tässä työssä vielä julkaista.

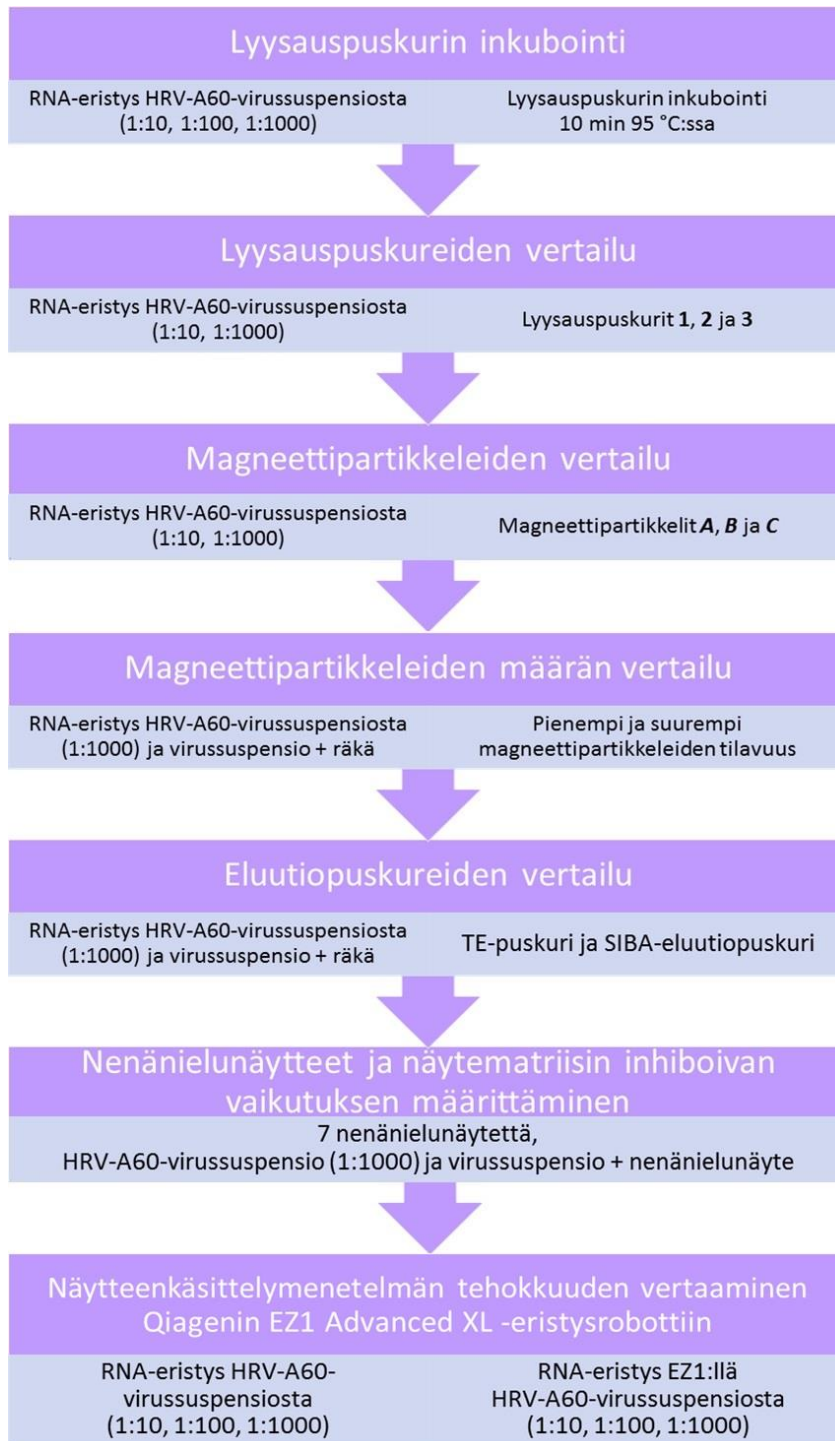
### 7.3 Näytteenkäsittelymenetelmän kehittämisen vaiheet

Näytteenkäsittelymenetelmän kehittämisessä käytettiin pääasiallisena tutkimustyökäluna rinovirukselle pystytettyä luvussa 7.2.1 kuvailtua HRV RT-qPCR -protokollaa, ja ajojen kvantitatiivisten tulosten perusteella pääteltiin, mitkä näytteenkäsittelymenetelmän kehitettävät komponentit olivat HRV RNA:n eristykseen soveltuvimpia. Kustakin kehitettävällä näytteenkäsittelymenetelmällä eristetystä näytteestä pipetoitiin PCR-levylle aina vähintään kaksi rinnakkaista reaktiota. Lisäksi jokaisessa RT-qPCR -ajossa oli mukana positiiviset (standarditemplaatit) sekä negatiiviset kontrollit. Pipetointikaaviot vaihtelivat kokeesta riippuen.

Näytteenkäsittelymenetelmän kehityksessä kokeesta riippuen näytemateriaalina käytettiin HRV-A60-virussuspensiota, nenänielutikkunäytteitä tai räkä-, eli nenäeritenäytteitä, jotka lisättiin eristykseen Puritanin PurFlock™ Ultra Flocked swab -mallin steriileillä näytteenottotikuilla. Eristykseen lisättiin kustakin kokeesta riippuen 50 µl tai 100 µl 1:10, 1:100 ja/tai 1:1000 PBS:ään eli fosfaattipuskuroituun suolaliuokseen laimennettua HRV-A60-virussuspensiota. Negatiivisena kontrollina eristykseen lisättiin vastaava määrä PBS:ää.

Näytteenkäsittelymenetelmän kehittämisen edetessä protokollan eri komponentteja muokattiin. Menetelmän kehittämisen vaiheet ja muokatut komponentit on esitetty kuviossa 1 ja jokaisen vaiheen kokeiden tulokset kappaleessa 8.3. Kehittämisessä kiinnitettiin eniten huomiota viruspartikkeleiden lyysausvaiheeseen ja RNA:n sitoutumiseen magneettipartikkeleihin: käytettävää lyysauspuskuriä muokattiin muun muassa sen guanidiinitiosyanaattipitoisuuden osalta, ja puskuriiin lisättiin eri pitoisuuksia litiumkloridia, jonka arveltiin edesauttavan viruspartikkeleiden lyysautumista, RNA:n vapautumista sekä sitoutumista magneettipartikkeleihin. Lyysautumisvaihetta optimoitiin myös testamalla inkuboinnin vaikutusta RNA:n vapautumiseen viruspartikkeleista: lyysausliuosta kuumennettiin 10 minuutin ajan 95 °C:ssa.





Kuvio 1. Näytteenkäsittelymenetelmän kehittämisen vaiheet.

Näytteenkäsittelymenetelmän kehittämisessä testattiin myös kolmen eri valmistajan magneettisia nanopartikkeleita sekä magneettipartikkeleiden eri määriä RNA:n sitoutumisen optimoimiseksi. Eluutiopuskureina testattiin sekä TE-puskuria että SIBA-eluutiopuskuria, joka toimi optimaalisesti kylmäkuivattujen reagenssien kanssa.

Kehitetyn nukleiinihappojen puhdistusmenetelmän tehokkuutta verrattiin lopuksi kaupallisen automatisoidun Qiagenin EZ1® Advanced XL -eristysrobotin RNA-eristysprotokollaan Qiagen DSP Virus Kit -tarvikepakkausta käyttäen. Vertailumenetelmän protokolla on kuvailtu luvussa 4.5. Kumpaankin eristysprotokollaan lisättiin 100 µl 1:10, 1:100 ja 1:1000 laimennettua HRV-A60-virussuspensiota. EZ1-eristystä varten valmistettiin ensin valmistajan ohjeiden mukaisesti kantaja-RNA-laimennos AVE-puskuriin (Qiagen), ja protokolla toteutettiin ohjekirjan (EZ1® DSP Virus Kit Handbook: 29–32) mukaisesti. Virussuspensiolle ei tarvinnut tehdä minkäänlaista esikäsitelyä ennen EZ1-eristystä. Käytetty eluutiolavuus oli 150 µl.

EZ1-eristysrobotilla eristettiin kunkin viruspartikkelipitoisuuden näyte yhden kerran, ja kehitettävällä menetelmällä kahdesti. Kehitettävän menetelmän ja EZ1-eristysprotokollan tehokkuuksia vertailtiin niiden keskimääräisten Ct-arvojen prosentuaalisen erotuksen avulla laskemalla, kuinka monta prosenttia nopeampia monistusreaktiot olivat EZ1-eristysrobotilla kuin kehitettävällä menetelmällä eristetyillä näytteillä (kaava 1). Ct-arvojen perusteella laskettu tulos oli kuitenkin vain suuntaa-antava eikä absoluuttista eroa kuvaava.

$$Ct_{ka} \text{ erotus} = \frac{Ct_{ka}(\text{kehittävää}) - Ct_{ka}(\text{vertailum.})}{Ct_{ka}(\text{kehittävää})} * 100 \% \quad (1)$$

$Ct_{ka} \text{ erotus}$  on menetelmien välisten Ct-arvojen keskiarvojen erotus  
 $Ct_{ka}(\text{kehittävää})$  on kehitettävän menetelmän Ct-arvojen keskiarvo  
 $Ct_{ka}(\text{vertailum.})$  on vertailumenetelmän Ct-arvojen keskiarvo

## 8 Tulokset ja tulosten tarkastelu

Kaikkien RT-qPCR -ajojen raakadata on esitetty liitteessä 7. Monistuskäyrien kuvaajissa lyhenne ”RFU” tarkoittaa ”Relative fluorescence unit”, eli suhteellista fluoresenssin mittaamiseen käytettävää yksikköä.

### 8.1 RT-qPCR:n pystytys ja kvantitointi

RT-qPCR:n pystytyksessä ja kvantitoinnissa ivT-RNA:sta syntetisoidusta cDNA:sta valmistettu laimennossarja toimi PCR:n standardina: standardisuora toteutettiin seitsemästä tunnetusta HRV RNA:n pitoisuudesta  $10^7$  kopiosta yhteen kopioon. HRV RT-

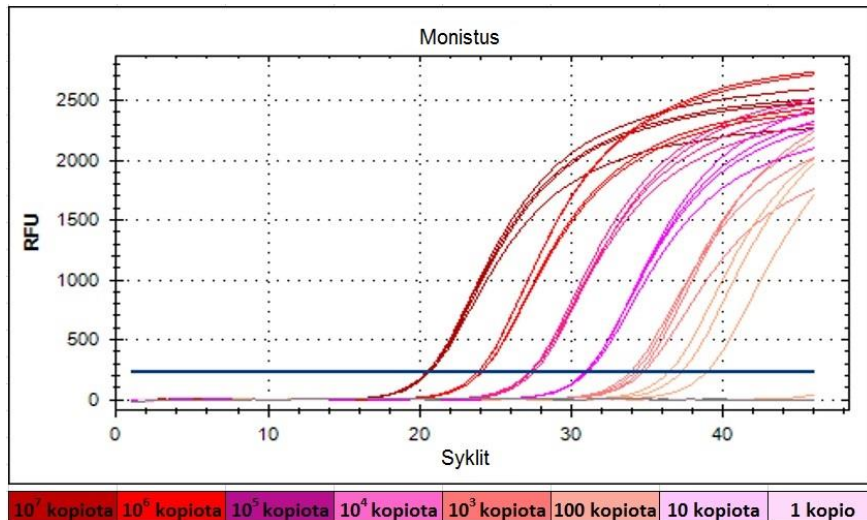
qPCR:n herkkyudeksi määritettiin kokeen perusteella 100 kopiota/reaktio, sillä 10 kopion ja 1 kopion reaktiot eivät monistuneet. Kirjallisuudessa saavutettu menetelmän herkkyys oli HRV ivT-RNA:lla 10 kopiota/ $\mu$ l (Österback ym. 2013: 3964). Tämä vastaa kvantitoinnissa saavutettua herkkyyttä, sillä kopiomäärä oli koeasetelmassa laskettu yhtä 10  $\mu$ l:n RT-reaktiota kohden: 100 kopiota / 10  $\mu$ l = 10 kopiota/ $\mu$ l.

Raakadatan perusteella neljän rinnakkaisen reaktion Ct-arvojen keskihajonnat ( $Ct_{kh}$ ) vaihtelivat 0,08-1,3 syklin välillä. Keskihajonta oli suurin 100 kopion reaktiolla ja pienin 10 000 kopion reaktiolla. Oletettavaa oli, että mitä pienempi kunkin reaktion kopioluku oli, sitä suurempi reaktioiden Ct-arvojen välinen keskihajonta olisi: kopiomäärien las-  
kiessa todennäköisyys sille, että täysin oikea määrä templaattia saadaan pipetoitua kuhunkin PCR-levyn kuoppaan, olisi myös pienempi. Siten pienin keskihajonta tulisi yleensä olla kopiomäärältään suurimmilla reaktioilla. Taulukossa 2 on vertailtu kvantitointiin käytettyjen standarditemplaattien Ct-arvoja ja niiden keskihajontoja.

Taulukko 2. Kvantitointiin käytettyjen standardien Ct-arvojen keskiarvot ( $Ct_{ka}$ ) ja keskihajonnat ( $Ct_{kh}$ ) sekä syklien väliset erot HRV RT-qPCR:ssä.

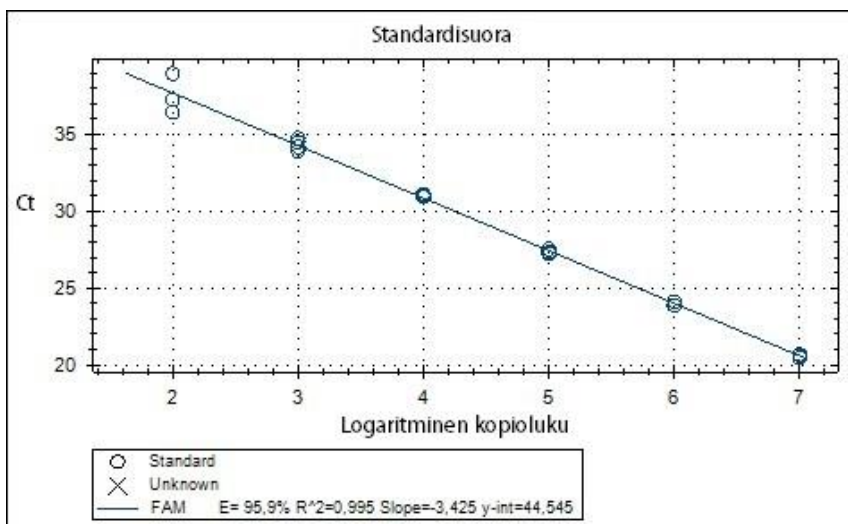
Kopioluku	$Ct_{ka}$	$Ct_{kh}$	Sykliero edelliseen
10 <sup>7</sup>	20,55	0,11	
10 <sup>6</sup>	23,98	0,14	3,4
10 <sup>5</sup>	27,36	0,12	3,4
10 000	31,01	0,08	3,7
1000	34,33	0,36	3,3
100	37,54	1,28	3,2

RT-qPCR:n monistuskäyrän (kuva 11) perusteella laimennossarjan pitoisuudet vastasivat hyvin myös templaattien Ct-arvoja: kunkin pitoisuuden monistumisaikojen välillä oli kutakuinkin vastaava syklimäärä. Sama ilmenee myös taulukosta 2: syklien välinen ero oli keskimäärin 3,4. Mitä pienempi reaktioiden kopioluku oli, sitä enemmän syklejä tarvittiin monistustuotteen muodostumiseen.



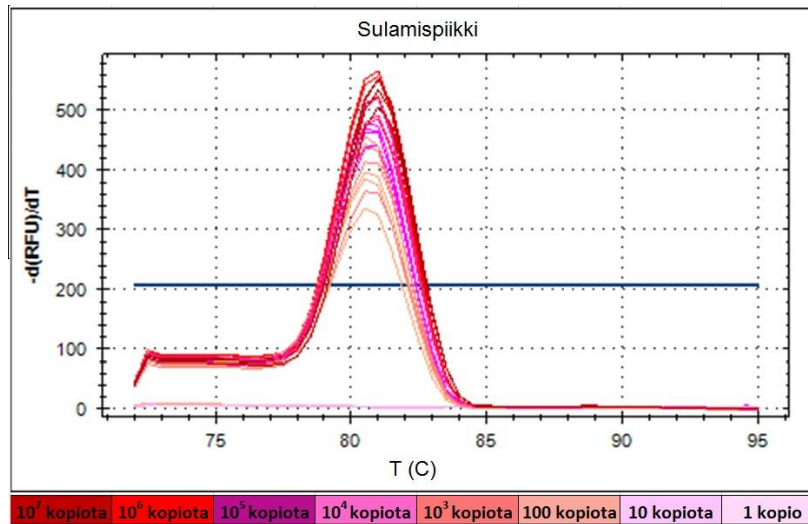
Kuva 11. Kvantitoinnin HRV-standarditemplaattien RT-qPCR-monistuskäyrät. Erot eri pitoisuuksien välillä olivat tasaiset ja keskihajonta suurin kopiomäärältään pienimmällä reaktiolla (100 kopiota/reaktio).

Standardien monistuskäyrien Ct-arvojen perusteella tehtiin standardisuora (kuva 12). Standardisuoran yhtälöksi saatiin  $y = -3,425x + 44,545$ . Selitysaste  $R^2 = 0,995$  ja tehokkuus  $E = 95,9\%$ . Idealisissa tilanteissa qPCR:n tehokkuus olisi  $E = 100\%$ , jolloin jokaisen syklin aikana monistustuotteen määrä eksponentiaalisessa vaiheessa kaksinkertaistuisi.  $95,9\%$ :n tehokkuus kertoo kuitenkin hyvästä reaktiosta. Selitysaste puolestaan kertoo siitä, kuinka hyvin mittausdata sopii standardisuoralle. Yli  $0,99$  selitysasteen arvo on RT-qPCR-menetelmälle kiitettävä. (Real-time PCR Handbook: 8.)



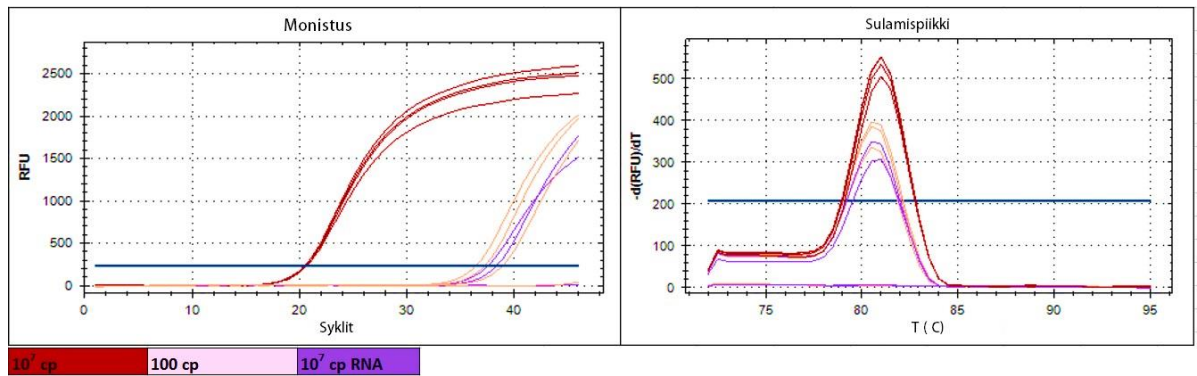
Kuva 12. Kvantitoinnin standarditemplaattien HRV RT-qPCR:n Ct-arvojen perusteella tehty standardisuora. X-akselilla on logaritminen kopioluku ja y-akselilla Ct-arvo. Standardisuoran yhtälö on  $y = -3,425x + 44,545$ .

Standarditemplaattien sulamiskäyräanalyysin sulamiskiiktit on esitetty kuvassa 13.  $10^7$ – $10^1$  kopion templaattien sulamislämpötilat olivat 80,5–81 °C. 10 kopion ja yhden kopion reaktioilla sekä negatiivisilla kontrolleilla piikkiä ei muodostunut lainkaan. Sulamislämpötilojen toisistaan poikkeamattomuus kertoo siitä, että kaikki templaatit olivat RNA-sekvensseiltään identtisiä.



Kuva 13. Kvantitoinnin standarditemplaattien HRV RT-qPCR:n sulamiskäyräanalyysin sulamiskiiktit.  $10^7$ – $10^1$  kopion templaattien sulamislämpötilat olivat 80,5–81 °C. 10 kopion ja yhden kopion reaktioilla sekä negatiivisilla kontrolleilla piikkiä ei muodostunut lainkaan.

Kvantitoinnin yhteydessä tarkistettiin lisäksi HRV Trans 600 ivT-RNA:n DNA-pitoisuus lisäämällä  $10^7$  kopion RNA:ta suoraan qPCR:ään ilman RT-reaktiota. Vain 2/4 rinnakkaisista reaktioista monistui, ja Ct-arvojen keskiarvo oli 37,9. Standardisuoran avulla ivT-RNA:n DNA-pitoisuudeksi määritettiin kahden reaktion keskiarvona 87,8 kopiota/reaktio. Tulos oli alle kvantitoinnissa määritellyn RT-qPCR -menetelmän herkkyysrajan, mutta DNA-jäämät standarditemplaateissa on syytä huomioida muiden kokeiden tulosten luotettavuuden arvioinnissa. Kuvassa 14  $10^7$  kopion ivT-RNA:n monistuskäyriä ja sulamiskiikkejä on vertailtu  $10^7$  kopion ja 100 kopion cDNA:n vastaaviin kuvaajiin.



Kuva 14.  $10^7$  kopion ivT-RNA:n HRV RT-qPCR:n monistuskäyrät sekä sulamispiekit (violetti) sekä  $10^7$  kopion (tummanpunainen) ja 100 kopion cDNA:n (vaaleanpunainen) kuvaajat. IvT-RNA:n DNA-pitoisuus vastasi kutakuinkin 100 kopion cDNA:n pitoisuutta.

## 8.2 SIBA-protokollan soveltuvuus rinovirukselle

SIBA-protokollan pystytys rinovirukselle oli yrityksessä työn alla tämän insinööriyön koellisen osuuden aikoihin. SIBA-monistusreaktioiden tulokset eivät kuitenkaan olleet luotettavia vähäisten kokeiden perusteella, eikä SIBA-protokollan soveltuvuutta rinovirukselle määritelty tarkemmin insinööriyön yhteydessä. Ennen kuin tässä työssä kehitetyllä näytteenkäsittelymenetelmällä puhdistettua HRV RNA:ta voidaan testata SIBA:ssa, on SIBA-tekniikan kehitystä rinovirukselle jatkettava edelleen.

## 8.3 Näytteenkäsittelymenetelmän kehittäminen

### 8.3.1 Lyysauspuskurin 10 min inkubaatio 95 °C:ssa

Koeasetelmassa vertailtiin inkuboinnin vaikutusta HRV RNA:n vapautumiseen näytteenkäsittelymenetelmän viruspartikkeleiden lyysausvaiheessa. RNA-eristykseen lisättiin 50  $\mu$ l 1:10, 1:100 ja 1:1000 laimennettua HRV-A60-virussuspensiota, ja kustakin pitoisuudesta tehtiin rinnakkaiset eristykset 10 minuutin inkuboinnilla ja ilman. Inkuboinnissa lyysauspuskuriin lisättyjä näytteitä kuumennettiin 10 minuuttia 95 °C:ssa.

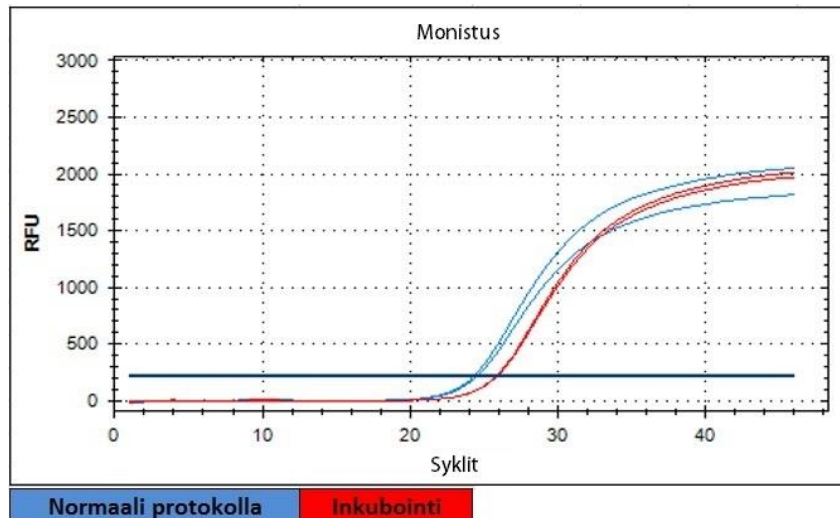
Kokeen raakadataa ja tuloksia tarkasteltaessa on huomioitava, että ennen lopullista RT-qPCR:n kvantitointia menetelmän herkkyys saatiin kymmeneen kopioon asti. Tämä johtui siitä, ettei 10 kopiota/ $\mu$ l ivT-RNA-templaattia oltu laimennettu 1:10 ennen sen lisää-

mistä RT-reaktioon, jolloin templaattia oli kymmenkertainen määrä reaktiossa (100 kopiota/reaktio). Tällöin myös tässä kokeessa analysoitujen näytteiden kopioluvut ovat reaktiokohtaisesti todellisuudessa kymmenkertaisesti liian suuria.

Kokeen RT-qPCR -ajon tulokset on esitetty taulukossa 3. Taulukosta voidaan havaita, että puhdistettaessa RNA:ta suuremman viruspartikkelimäärän sisältävästä näytteestä, ei inkuboinnilla ollut lähes lainkaan vaikutusta tuloksiin, ja rinnakkaisten reaktioiden Ct-arvojen keskiarvo oli jopa parempi normaalilla eristysprotokollalla kuin inkuboinnin kanssa. Sama ilmenee myös kuvasta 15. Eristettäessä RNA:ta 1:10 laimennetuista viruspartikkeleista Ct-arvojen ero inkuboitujen näytteiden ja inkuboimattomien näytteiden välillä oli 1,46 sykliä, ja inkuboimattomien näytteiden kopioluku oli lähes kolminkertainen verrattuna inkuboituihin. 1:100 laimennetuilla viruspartikkeleilla erot olivat pienempiä, eikä inkubointi vaikuttanut merkittävästi RNA-saantoon.

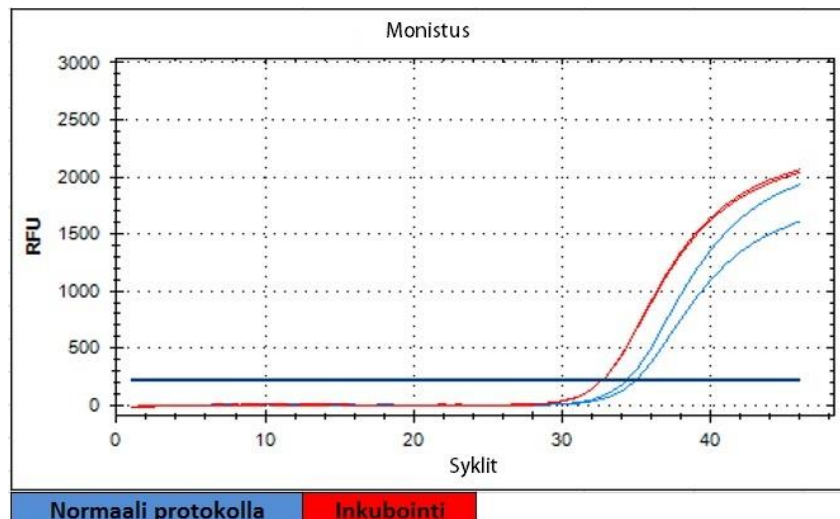
Taulukko 3. Lyysauspuskurin 10 min 95 °C inkubaatiokokeen HRV RT-qPCR:n Ct-arvot ja kopioluvut eri virussuspension laimennoksilla.

Virussuspension laimennos	Inkubointi	Ct <sub>ka</sub>	kopioluku <sub>ka</sub>
1:10	Ei	24,39	5,25*10 <sup>4</sup>
1:10	Kyllä	25,85	1,93*10 <sup>4</sup>
1:100	Ei	30,23	1 170
1:100	Kyllä	29,17	1 990
1:1000	Ei	34,63	48,5
1:1000	Kyllä	32,66	182



Kuva 15. Lyysauspuskurin 10 min 95 °C inkubaatiokokeen HRV RT-qPCR:n monistuskäyrät 1:10 virussuspension laimennoksella. Normaali RNA-puhdistus ilman lyysauspuskurin kuumennusta (sin.) antoi heikosti nopeammat monistusreaktiot kuin inkuboiduilla näytteillä (pun.).

1:1000 laimennetulla HRV-A60-virussuspensiolla inkubointi paransi lievästi RNA-saantoa, sillä inkuboinnin kanssa eristetyt RNA-näytteet monistuivat noin kaksi sykliä nopeammin kuin inkuboimattomat, ja inkuboitujen näytteiden kopioluku oli lähes nelinkertainen verrattuna inkuboimattomiin näytteisiin. Kuvassa 16 on esitetty RT-qPCR-ajon monistuskäyrät pienemmällä viruspartikkelimäärällä.



Kuva 16. Lyysauspuskurin inkubointikokeen HRV RT-qPCR:n monistuskäyrät 1:1000 virussuspensiolaimennoksella. RNA-puhdistus inkuboinnilla (pun.) antoi heikosti nopeammat monistusreaktiot, kuin ilman inkubointia eristetyt näytteet (sin.).



Kokeen tulosten perusteella voidaan todeta, ettei rinovirus-RNA:n puhdistamiseen kehitettävällä näytteenkäsittelymenetelmällä tarvita välttämättä kuumennusta viruspartikkeleiden lyysausvaiheessa. Kokeessa testattiin kuitenkin ainoastaan yhtä kuumennuslämpötilaa sekä -aikaa, joten vaihtoehtoisten yhdistelmien paremmuutta ei voida tämän perusteella ennustaa. Kokeessa ei myöskään ollut mukana näytematriisia, joten sen vaikutusta tulokseen ei tiedetä. Tieto siitä, että inkuboinnin voi mahdollisesti jättää näytteenkäsittelymenetelmästä pois, saattaa yksinkertaistaa kehitettävän menetelmän näytteenkäsittelyprotokollaa huomattavasti.

10 minuutin 95 °C:n inkubaation pieni vaikutus viruspartikkeleiden lyysausvaiheessa voi mahdollisesti selittyä rinoviruksen yksinkertaisella kuorirakenteella (kuva 1): kuoren rakenneproteiinien proteiinien hajottamiseen saattavat hyvinkin riittää menetelmän lyysauspuskurin sisältämät komponentit (muun muassa GuSCN ja LiCl), eikä RNA:n vapauttamiseksi tarvita kuumennusta.

### 8.3.2 Lyysauspuskureiden vertailu

Koeasetelmassa vertailtiin kolmea GuSCN- ja LiCl-pitoisuuksiltaan poikkeavaa lyysauspuskuriä ja niiden vaikutusta RNA:n vapauttamiseen sekä magneettisiin nanopartikkeleihin sitoutumiseen. Ensimmäisessä puskurissa (lyysauspuskuri 1) oli korkein GuSCN-pitoisuus eikä lainkaan litiumkloridia. Toisessa puskurissa (lyysauspuskuri 2) oli matalin GuSCN- ja LiCl-pitoisuus ja kolmannessa puskurissa (lyysauspuskuri 3) pitoisuudet olivat hieman korkeammat. Lyysauspuskureihin lisättiin 50 µl 1:10 ja 1:1000 laimennettua HRV-A60-virussuspensiota, ja eristyksen tehokkuutta vertailtiin eluoituneen RNA:n määrän perusteella.

Kokeen RT-qPCR-ajon tulokset on esitetty taulukossa 4. 1:10 virussuspensiolaimennoksella erot puskureiden välillä olivat lähes olemattomat; Ct-arvojen välillä oli vain muutama desimaalin ero. Kopiolukujen sekä Ct-arvojen perusteella suuremmalla viruspartikkelimäärällä paras puskuri oli lyysauspuskuri 2, mutta puskureiden väliset erot olivat niin pieniä, että ne saatettiin lukea mittausvirheen marginaaliin.

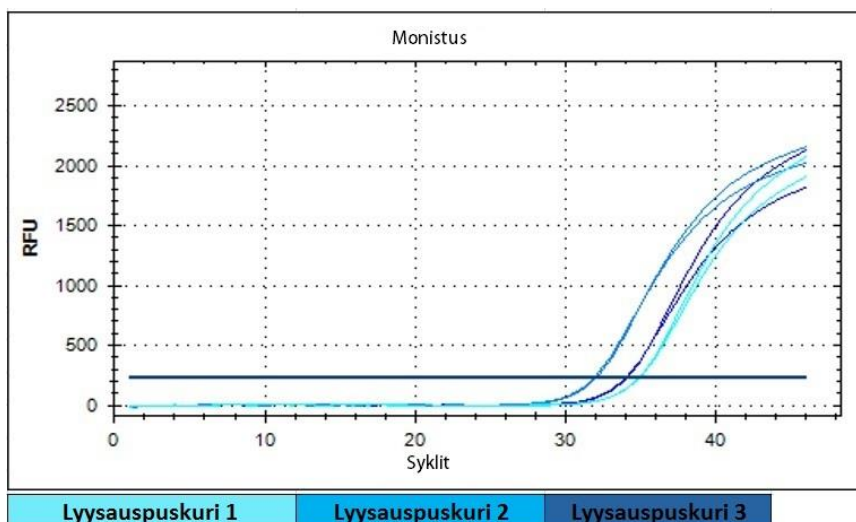
1:1000 laimennetulla virussuspensiolaimennoksella erot olivat hieman selkeämmät, vaikkakin pienet: lyysauspuskuri 2 antoi yli kaksi sykliä nopeamman monistusreaktion, kuin lyysauspuskurit 1 ja 3. Sama päti myös eristettyjen RNA-näytteiden kopiolukuihin;

lyysauspuskuri 2:a käytettäessä RNA:ta saatiin seitsenkertainen määrä lyysauspuskuri 1:een verrattaessa ja nelinkertainen määrä lyysauspuskuri 3:een verrattaessa.

Taulukko 4. Lyysauspuskureiden vertailukokeen HRV RT-qPCR:n Ct-arvot ja kopioluvut kahdella eri virussuspensiolaimennoksella.

Virussuspension laimennos	Lyysauspuskuri	Ct <sub>ka</sub>	kopioluku <sub>ka</sub>
1:10	1	24,84	3,48*10 <sup>5</sup>
1:10	2	24,35	4,90*10 <sup>5</sup>
1:10	3	24,91	3,28*10 <sup>5</sup>
1:1000	1	34,96	631
1:1000	2	31,98	4 660
1:1000	3	34,08	1 140

Kuvassa 17 on esitetty RT-qPCR -ajon monistuskäyrät 1:1000 virussuspensiolaimennoksella. Vaikka erot testattujen lyysauspuskureiden välillä olivatkin vähäiset, oli tämän kokeen perusteella GuSCN- ja LiCl-pitoisuuksiltaan alhainen lyysauspuskuri 2 tehokkain rinovirus-RNA:n eristämiseen kehitettävällä näytteenkäsittelymenetelmällä. Koska toiseksi parhaimmat tulokset antoi lyysauspuskuri 3, on litiumkloridin läsnäolo viruspartikkeiden lyysaus- ja RNA:n sitoutumisvaiheessa olennaista. Kirjallisuuskatsauksen perusteella (luku 4.4.) litiumkloridi toimii kosmotrooppisena RNA:n sitoutumista edesauttava ja RNAaseja inhiboivana suolana lyysauspuskurissa. (Bair ym. 2006: 7-8). Tämän kokeen tulokset tukevat kirjallisuusosuuden kuvausta LiCl:n ominaisuuksista ja yhteistoiminnasta GuSCN:n kanssa. Tulosten perusteella tämän insinöörityön kokeellisen osuuden seuraavissa kokeissa käytettiin lyysauspuskuri 2:a.



Kuva 17. Lyysauspuskureiden vertailukokeen HRV RT-qPCR:n monistuskäyrät 1:1000 virus-suspensiolaimennoksella. Kokeen perusteella lyysauspuskuri 2 osoittautui kolmesta vertailtavasta puskurista parhaimmaksi.

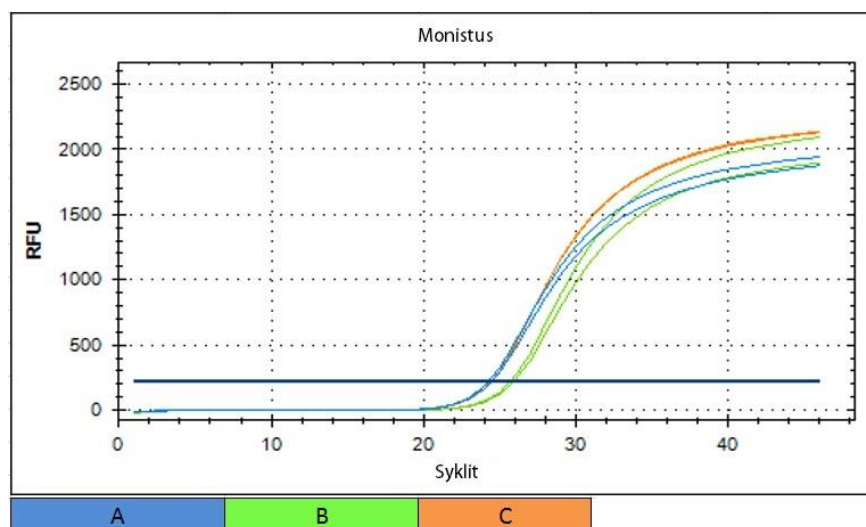
### 8.3.3 Magneettipartikkeleiden vertailu

Koeasetelmassa vertailtiin kolmen eri valmistajan magneettisia nanopartikkeleita (partikkelit A, B ja C) ja niiden tehokkuutta sitoa rinovirus-RNA:ta. Jokaisia partikkeleita lisättiin näytteenkäsittelymenetelmän ensimmäisessä vaiheessa 40 µl, ja HRV-A60-virussuspensiota lisättiin 50 µl kahdessa eri viruspartikkelipitoisuudessa (1:10 ja 1:1000 laimennokset). Sitoutuneen RNA:n määrää eri partikkeleilla vertailtiin eluoituneen RNA:n määrän perusteella.

Kokeen RT-qPCR -ajon tulokset on esitetty taulukossa 5. Eristettäessä rinovirus-RNA:ta suuremmasta viruspartikkelimäärästä, ei eri magneettipartikkeleiden välillä ollut huomattavia eroja näytteiden Ct-arvojen sekä kopiolukujen keskiarvojen perusteella. Magneettipartikkelit A ja C olivat lähes yhtä tehokkaita RNA:n sitomiskyvyltään. RT-qPCR:n monistuskäyrät 1:10 virussuspensiolaimennoksella on esitetty kuvassa 18.

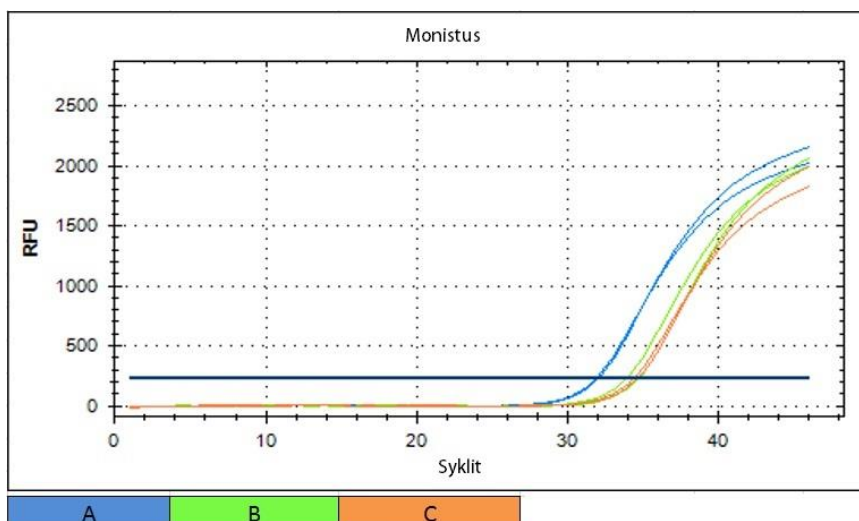
Taulukko 5. Magneettipartikkeleiden vertailukokeen HRV RT-qPCR:n Ct-arvot ja kopioluvut kahdella eri virussuspensiolaimennoksella.

Virussuspension laimennos	Partikkelit	Ct <sub>ka</sub>	kopioluku <sub>ka</sub>
1:10	A	24,35	4,90E*10 <sup>5</sup>
1:10	B	25,8	1,75E*10 <sup>5</sup>
1:10	C	24,43	4,64*10 <sup>5</sup>
1:1000	A	31,98	4 660
1:1000	B	34,32	1 000
1:1000	C	34,54	840



Kuva 18. Magneettipartikkeleiden vertailukokeen HRV RT-qPCR:n monistuskäyrät 1:10 virussuspensiolaimennoksella. Magneettipartikkelit A ja C olivat yhtä tehokkaita rinovirus-RNA:n sitomiseen suuremmasta viruspartikkelimäärästä.

Eristettäessä rinovirus-RNA:ta pienemmästä virussuspartikkelimäärästä, osoittautuivat A magneettipartikkelit RNA:n sitomiskyvyltään parhaimmiksi: reaktiot olivat yli kaksi sykliä nopeampia ja kopiomäärät nelin- ja viisinkertaisia verrattuna kahteen muuhun partikkelimalliin. RT-qPCR:n monistuskäyrät 1:1000 virussuspensiolaimennoksella on esitetty kuvassa 19. Tulosten perusteella tämän insinööriyön kokeellisen osuuden seuraavissa kokeissa käytettiin magneettipartikkelimallia A. Kokeessa testattiin kuitenkin vain kolmea eri magneettipartikkelimallia, ja parhaimmiksi osoittautuneet partikkelit olivat läpimitaltaan yli kymmenkertaisia verrattuna rinoviruspartikkeleiden kokoon. Kirjallisuuden perusteella optimaalisen sitoutumisen takaamiseksi magneettipartikkeleiden tulisi olla samaa kokoluokkaa kuin viruspartikkelit, joten vaihtoehtoisia partikkelimalleja voidaan jatkossa vielä testata (Chen ym. 2010).



Kuva 19. Magneettipartikkeleiden vertailukokeen HRV RT-qPCR:n monistuskäyrät 1:1000 virussuspensiolaimennoksella. Magneettipartikkelit A osoittautuivat tehokkaimmiksi rinovirus-RNA:n sitomiseen pienemmästä viruspartikkelimäärästä.

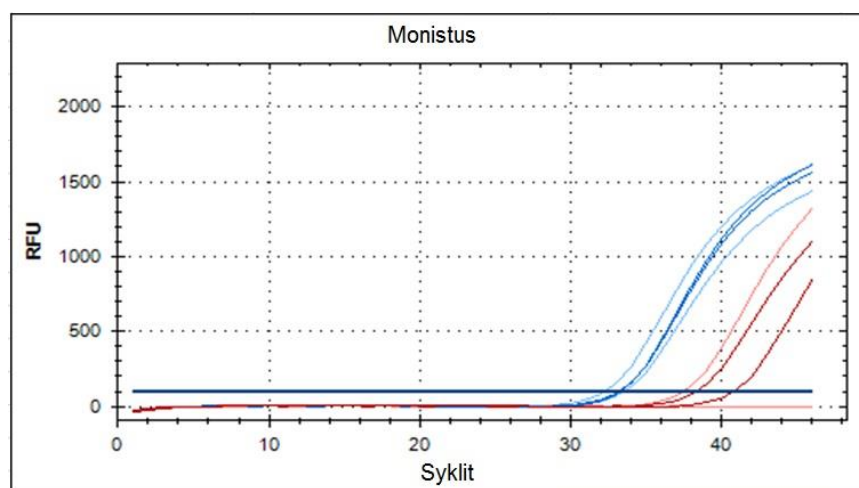
#### 8.3.4 Magneettipartikkeleiden määrän vertailu

Koeasetelmassa testattiin edellisessä kokeessa sitomiskyvyltään parhaimmiksi todettujen magneettipartikkeleiden (A) tilavuuden vaikutusta näytteenkäsittelymenetelmän ensimmäisessä vaiheessa vertailemalla kahta eri määrää partikkeleita. RNA-eristykseen lisättiin pelkästään 50 µl 1:1000 laimennettua HRV-A60-virussuspensiota, sekä virussuspensiota ja nenäeritenäytettä näytematriisiin inhiboivien ominaisuuksien selvittämiseksi. Nenäerite- eli räkänäyte oli aiemmin testattu HRV-negatiiviseksi. Kustakin näytteestä tehtiin rinnakkaiset eristykset molemmilla partikkelitilavuuksilla.

Kokeen RT-qPCR -ajon tulokset on esitetty taulukossa 6 ja monistuskäyrät kuvassa 20. Vertailtaessa magneettipartikkeleiden tilavuuden vaikutusta RNA:n eristymiseen pelkistä viruspartikkeleista, ei suuremmalla partikkelimäärällä ollut suoraan verrannollista yhteyttä parempiin monistumistuloksiin. Suurempi määrä partikkeleita eristyksessä jopa hidasti keskimääräisesti näytteiden monistumista 0,4 sykliä, ja kopioluku pienemmällä partikkelimäärällä oli 410 kopiota suurempi kuin suuremmalla määrällä. Sama päti myös näytteisiin, joissa näytematriisina oli viruspartikkeleiden lisäksi räkää: pienemmän partikkelimäärän näytteet monistuivat 2,1 sykliä nopeammin ja niiden kopioluku oli keskimäärin kolminkertainen verrattuna suuremman partikkelimäärän näytteisiin.

Taulukko 6. Magneettipartikkeleiden määrän vertailukokeen HRV RT-qPCR:n Ct-arvot ja kopioluvut 1:1000 virussuspensiolaimennoksella.

Näytemateriaali	Partikkelitilavuus	Ct <sub>ka</sub>	kopioluku <sub>ka</sub>
Viruspartikkelit	pienempi	32,94	1 460
Viruspartik. + räkä		37,52	60,8
Viruspartikkelit	suurempi	33,3	1 050
Viruspartik. + räkä		39,62	20,4



Viruspartikkelit	pienempi määrä mg-partik.	suurempi määrä mg-partik.
Viruspartikkelit + räkä	pienempi määrä mg-partik.	suurempi määrä mg-partik.

Kuva 20. Magneettipartikkeleiden määrän vertailukokeen HRV RT-qPCR:n monistuskäyrät. Kokeessa testattiin kahta eri magneettipartikkelitilavuutta, ja näytemateriaaleina olivat 1:1000 laimennettu HRV-A60-virussuspensio sekä virussuspensio ja räkä. RNA:ta ei eristynyt merkittävästi enempää suurempaa magneettipartikkelitilavuutta käytettäessä. Näytematriisina räkä inhiboi RNA:n eristymistä jonkin verran ja reaktioiden välillä oli suurempi hajonta.

Tuloksista havaittiin, ettei suurempi määrä magneettipartikkeleita näytteenkäsittelymenetelmän ensimmäisessä vaiheessa ratkaisevasti parantanut RNA:n sitoutumista partikkeleihin ja edelleen magneettivarteen. Tuloksista ilmenivät myös näytematriisin inhiboivat ominaisuudet; molemmilla partikkelitilavuuksilla räkää sisältävät näytteet monistuivat hitaammin, ja ero kopiulukujen välillä oli jopa 24-kertainen (pienemmällä partikkelitilavuudella) sekä 50-kertainen (suuremmalla partikkelitilavuudella). Näytematriisi aiheutti myös suurempaa hajontaa rinnakkaisten reaktioiden välille, eikä pienemmällä partikkelitilavuudella toinen rinnakkainen monistunut lainkaan RT-qPCR:ssä. Nenäerite ei ole kuitenkaan näytemateriaalina täysin todellista nenänielunäytettä vastaava, sillä se on huomattavasti viskoosimpi ja sisältää mahdollisesti enemmän inhibiittoreita, kuin kuivempi nenänielutikkunäyte.

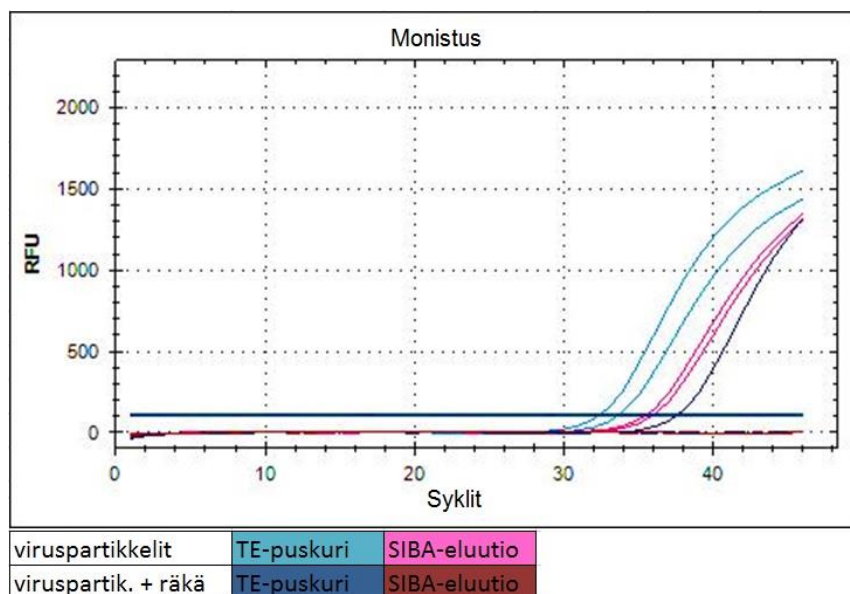
### 8.3.5 Eluutiopuskureiden vertailu

Koeasetelmassa testattiin rinovirus-RNA:n eluoitumista SIBA-teknologiassa käytettävään eluutiopuskuriin vertaamalla kyseiseen puskuriin sekä TE-puskuriin eluoituvan RNA:n määrää. Eluutiopuskuri poikkesi sisällöltään TE-puskurista. RNA-eristykseen liisättiin pelkästään 50 µl 1:1000 laimennettua HRV-A60-virussuspensiota, sekä virussuspensiota ja nenäeritettä näytematriisin inhiboivien ominaisuuksien selvittämiseksi. Kustakin näytteestä tehtiin rinnakkaiset eristykset molemmilla eluutiopuskureilla.

Kokeen RT-qPCR-ajon tulokset on esitetty taulukossa 7 ja monistuskäyrät kuvassa 21. Tulosten perusteella rinovirus-RNA eluoitui paremmin TE-puskuriin, sillä pelkillä viruspartikkeleilla reaktiot olivat keskimäärin 2,7 sykliä nopeampia ja kopioluku TE-puskuriin eluoiduilla näytteillä oli lähes seitsenkertainen SIBA-eluutiopuskuriin eluoituihin näytteisiin verrattuna. Erot tuloksissa voivat kuitenkin johtua myös siitä, että SIBA-eluutiopuskurin eri komponentit inhiboivat RT-qPCR:ää TE-puskuria enemmän. Tämän kokeen perusteella räkänäytteistä ei eluoidu RNA:ta lainkaan SIBA-eluutiopuskuriin.

Taulukko 7. Eluutiopuskureiden vertailukokeen HRV RT-qPCR:n Ct-arvot ja kopioluvut 1:1000 solulaimennoksella.

Näytemateriaali	Eluutiopuskuri	Ct <sub>ka</sub>	kopioluku <sub>ka</sub>
Viruspartikkelit	TE-puskuri	32,94	1 460,00
Viruspartik. + räkä		37,52	60,7
Viruspartikkelit	SIBA-eluutiopuskuri	35,66	217,0
Viruspartik. + räkä		-	-



Kuva 21. Eluutiopuskureiden vertailukokeen HRV RT-qPCR:n monistuskäyrät. Vertailtavat puskurit olivat SIBA-eluutiopuskuri sekä TE-puskuri, ja näytemateriaaleina pelkkä 1:1000 laimennettu HRV-A60-virussuspensio sekä virussuspensio ja räkä. TE-puskuriin eluotui enemmän RNA:ta kuin SIBA-eluutiopuskuriin. Kun näytematriisina oli viruspartikkeleiden lisäksi räkää, ei eluoitumista SIBA-eluutiopuskuriin tapahtunut lainkaan.

Näytteenkäsittelymenetelmän kehittämisen kannalta yhteensopivaksi SIBA-teknologian kanssa, olisi olennaista toistaa tämä koe useammalla rinnakkaisella eristettävällä näytteellä ja tutkia näytematriisin vaikutusta SIBA-eluutiopuskuriin eluoitumiseen. Mikäli näytematriisi inhiboi eluoitumista täysin, on harkittava eluutiopuskurin kehittämistä paremmin yhteensopivaksi näytematriisille. Pelkistä rinoviruspartikkeleista näytteenkäsittelymenetelmällä eristetty RNA kuitenkin eluotui SIBA-eluutiopuskuriin, joten inhibitio selittyy mitä luultavimmin näytematriisin komponenttien avulla. Tuloksissa on lisäksi huomioitava, ettei räkä-, eli nenäeritenäyte, vastaa täysin todellista nenänielutikkunäytettä koostumukseltaan tai ominaisuuksiltaan.

### 8.3.6 Nenänielunäytteiden testaaminen ja näytematriisin inhiboivan vaikutuksen määrittäminen

Kehitetyllä näytteenkäsittelymenetelmällä testattiin seitsemän nenänielutikkunäytettä, jotka oli kerätty 3 vuorokautta aikaisemmin ja säilytetty  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ :ssa. Yhdestä näytteestä tehtiin myös rinnakkainen eristys lisäämällä näytematriisiin lisäksi eristykseen  $50\text{ }\mu\text{l}$  1:1000 laimennettua HRV-A60-virussuspensiota. RNA:n eristymistä kyseisestä näyt-

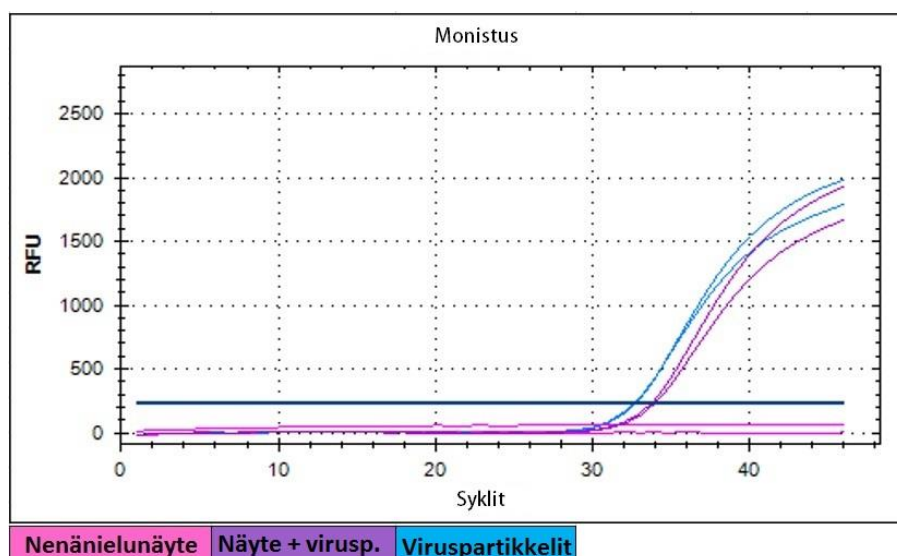


teestä verrattiin vastaavaan virussuspensionäytteeseen ilman näytematriisia, jotta saatiin selville nenänielunäytematriisin inhiboivat ominaisuudet RNA:n eristymiseen kehitettävällä menetelmällä.

Kaikki seitsemän nenänielutikkunäytettä olivat kokeen perusteella HRV-negatiivisia. Taulukossa 8 on esitetty RT-qPCR-ajon tulokset ja kuvassa 22 monistuskäyrät vertailtaessa näytematriisin inhiboivia ominaisuuksia. Pelkistä viruspartikkeleista RNA:ta eristettäessä monistusreaktio oli 1,2 sykliä nopeampi ja kopioluku kaksi kertaa suurempi kuin nenänielumatriisia sisältävästä näytteestä eristettäessä. Kaavaa 1 käyttämällä Ct-arvojen prosentuaaliseksi eroksi laskettiin 3,5 %.

Taulukko 8. Nenänielutikkunäytematriisin inhiboivien ominaisuuksien määrittämiskokeen HRV RT-qPCR:n Ct-arvot ja kopiolutut 1:1000 virussuspensiolaimennoksella.

Näytemateriaali	Ct <sub>ka</sub>	kopioluku <sub>ka</sub>
Viruspartikkelit	32,71	2 870
Näyte + viruspartikkelit	33,88	1 310



Kuva 22. Nenänielutikkunäytematriisin inhiboivien ominaisuuksien määrittämiskokeen HRV RT-qPCR:n monistuskäyrät. Kokeen perusteella näytematriisilla ei ollut huomattavaa inhiboivaa vaikutusta RNA:n eristymiseen kehitettävällä näytteenkäsittelymenetelmällä.

Tulosten perusteella nenänielutikkunäytematriisilla ei ollut huomattavan suurta inhiboivaa vaikutusta rinovirus-RNA:n eristymiseen kehitettävällä näytteenkäsittelymenetelmällä. Vertailuun käytetty nenänielunäytetikku oli kuitenkin melko kuiva ja kokeen yhteydessä HRV-negatiiviseksi todettu. Todellisuudessa sairailta potilailta kerätyt kliiniset

näytteet voivat olla koostumukseltaan hieman terveestä nenänielunäytteestä poikkeavia ja aiheuttaa koostumuksestaan riippuen enemmän RNA-eristyksen sekä analyysien inhibitiota (Ali 2010: 65).

Koska kaikki testatut nenänielunäytteet pysyivät kokeessa negatiivisena, voitiin epäillä näytteiden säilytyksen olleen virheellistä. Suositeltavaa olisi, että kerätyt näytteet testataisiin saman päivän aikana näytteenotosta (HUSLab<sub>1</sub>). Nyt näytteitä säilytettiin kuitenkin 3 vuorokautta pakkasessa ennen niiden testausta. Näytteenottimet olivat lisäksi kuituvia, joten oli mahdollista, että hapella oli vaikutusta viruskapsidin rakenteeseen ja rinoviruspartikkeleiden säilymiseen. Voi myös olla, ettei mahdollisesti pienestä virusmäärästä edes saatu eristettyä riittävän tehokkaasti RNA:ta. On kuitenkin mahdollista, että kaikki näytteet olivat aidosti HRV-negatiivisia. Näytteenkäsittelymenetelmän tehokkuutta tulisi-kin testata varmasti HRV-positiivisilla kliinisillä näytteillä.

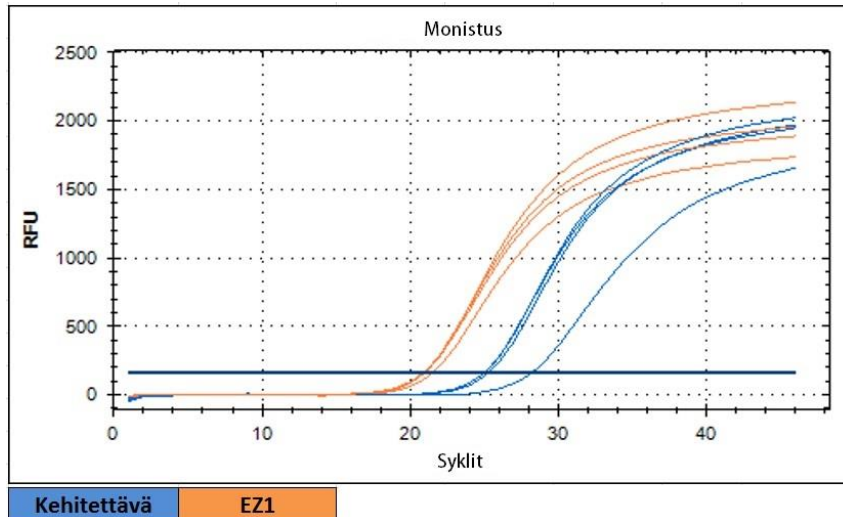
### 8.3.7 Näytteenkäsittelymenetelmän tehokkuuden vertaaminen Qiagenin EZ1® Advanced XL nukleinihappojen eristysrobottiin

Koeasetelmassa eristettiin kolmesta eri HRV-A60-virussuspensiolaimennoksesta (1:10, 1:100 ja 1:1000) RNA:ta kehitettävällä näytteenkäsittelymenetelmällä sekä Qiagenin EZ1® Advanced XL -eristysrobotilla ja DSP Virus Kit -tarvikepakkauksella valmistajan ohjeen mukaan. RT-qPCR-ajon tulokset sekä Ct-arvojen välinen prosentuaalinen erotus on esitetty taulukossa 9. EZ1-eristysrobotilla tehtiin vain yksi eristys kutakin virussuspensiolaimennosta kohden ja kehitettävällä menetelmällä puolestaan kaksi rinnakkaista eristystä. Tästä johtuen reaktioiden Ct-arvojen keskihajontoja ei voida luotettavasti vertailla. Kehitettävän menetelmän Ct-arvojen ja kopiolukujen keskiarvot ovat kaikkien neljän rinnakkaisen RT-qPCR-reaktion Ct-arvojen keskiarvoja.

Taulukko 9. Kehitettävän näytteenkäsittelymenetelmän tehokkuuden vertaamiskokeen Ct-arvot, kopioluvut sekä Ct-arvojen väliset prosentuaaliset erot kolmella eri virussuspensiolaimennoksella.

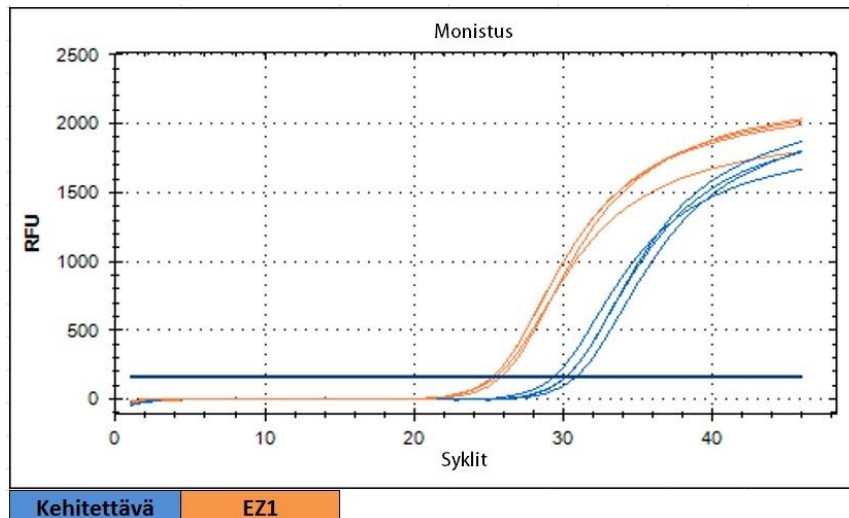
Virussuspension laimennos	Menetelmä	Ct <sub>ka</sub>	kopioluku <sub>ka</sub>	Ct <sub>ka</sub> ero (%)
1:10	Kehitettävä	25,85	3,92*10 <sup>5</sup>	18,6
	EZ1	21,05	5,65*10 <sup>6</sup>	
1:100	Kehitettävä	30,085	1,63*10 <sup>4</sup>	15,6
	EZ1	25,39	3,33*10 <sup>5</sup>	
1:1000	Kehitettävä	32,59	3 320	9,4
	EZ1	29,51	2,24*10 <sup>4</sup>	

Kuvassa 23 on esitetty 1:10 laimennetusta HRV-A60-virussuspensiosta eristetyn RNA:n RT-qPCR:n monistuskäyrät. Tulosten perusteella kahden RNA-eristysmenetelmän välinen ero oli suurin suurimmalla viruspartikkelimäärällä: EZ1-eristysrobotilla eristetyt näytteet olivat Ct-arvoiltaan keskimäärin 4,8 sykliä nopeampia ja kopioluku oli keskimäärin 14 kertaa suurempi kuin kehitettävällä menetelmällä eristetyillä näytteillä. Kaavan 1 mukaisesti laskettaessa kehitettävä menetelmä jäi tehokkuudeltaan suurimmalla viruspartikkelimäärällä EZ1-eristysrobotin tehokkuudesta jälkeen 18,6 %.



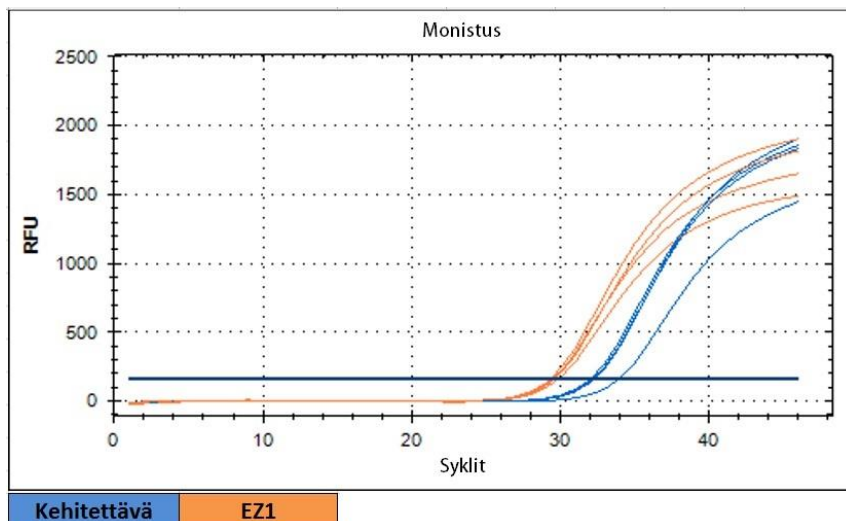
Kuva 23. Kehitettävän näytteenkäsittelymenetelmän tehokkuuden vertaamiskokeen HRV RT-qPCR:n monistuskäyrät 1:10 virussuspensiolaimennoksella. Erot EZ1-eristysrobotin sekä kehitettävän näytteenkäsittelymenetelmän RNA:n eristystehokkuuden välillä olivat suurimpia suurimmalla HRV-A60 viruspartikkelimäärällä.

Kuvassa 24 on esitetty 1:100 laimennetusta HRV-A60-virussuspensiosta eristetyn RNA:n RT-qPCR:n monistuskäyrät. Myös tällä virussuspensiolaimennoksella kehitettävä menetelmä jäi EZ1-eristysrobotin tehokkuudesta jälkeen 15,6 %. Sykliero oli 4,7 sykliä ja EZ1-eristettyjen näytteiden kopioluku oli 20-kertainen toiseen menetelmään verrattuna.



Kuva 24. Kehitettävän näytteenkäsittelymenetelmän tehokkuuden vertaamiskokeen HRV RT-qPCR:n monistuskäyrät 1:100 virussuspensiolaimennoksella.

Kuvassa 25 on esitetty 1:1000 laimennetusta HRV-A60-virussuspensiosta eristetyt RNA:n RT-qPCR:n monistuskäyrät. Ero kahden vertailtavan menetelmän välillä oli pienin eristettäessä HRV-RNA:ta pienimmästä viruspartikkelimäärästä; kehitettävä menetelmä jäi tehokkuudeltaan vain 9,4 % EZ1-eristysrobotin tehokkuudesta jälkeen. Sykliero oli vain 3,1 sykliä ja EZ1-eristysrobotilla eristettyjen näytteiden kopioluku oli vajaa seitsenkertainen kehitettävällä menetelmällä eristettyihin näytteisiin verrattuna.



Kuva 25. Kehitettävän näytteenkäsittelymenetelmän tehokkuuden vertaamiskokeen HRV RT-qPCR:n monistuskäyrät 1:1000 virussuspensiolaimennoksella. Eristysmenetelmien välinen ero oli pienin pienimmällä HRV-A60 viruspartikkelimäärällä.

Kehitettävän näytteenkäsittelymenetelmän RNA-eristystehokkuus vastaa hyvin EZ1-eristysrobotin tehokkuutta pienemmillä viruspartikkelimäärillä, ja menetelmää onkin tuotekehityksessä optimoitu erityisesti pienille viruspartikkelimäärille. Tässä kokeessa viruspartikkeleita oli silti huomattavan suuri määrä, eikä tarkkaa määrää verrattuna todelliseen kliiniseen viruspartikkelimäärään tiedetty. Menetelmien välinen todellinen RNA-saannon ero selviää vasta oikeita positiivisia nenänielunäytteitä testattaessa, jolloin vertailussa huomioidaan myös näytematriisin vaikutus sekä viruspartikkeleiden todellinen kliininen määrä näytteessä. Tämän kokeen perusteella voidaan kuitenkin todeta, että kehitettävä eristysmenetelmä on tehokkuudeltaan lähes yhtä hyvä kuin automaattinen RNA-eristysrobotti. Vertailumenetelmän tehokkuus voidaan mahdollisesti saavuttaa optimoimalla menetelmää vielä edelleen.

#### 8.4 Tulosityhteenveto

Taulukossa 10 on esitetty lyhyesti kaikki insinööriyöhön sisältyneet kokeet, niissä tutkitut parametrit, kokeiden työvaiheet sekä kokeiden tulokset ja johtopäätökset.

Taulukko 10. Tulosityhteenveto.

Koe	Tutkitut parametrit	Työvaiheet	Tulokset
RT-PCR:n pystytys	RT-PCR-protokollan toiminnan testaaminen	RT-qPCR	RT-PCR-protokolla toimii hyvin HRV iVT-RNA-templaattilla
RNA:n transkriptointi pEX-A2-HRV Trans 600 -plasmidista	RNA-synteesi ja puhdistus	Plasmidin linearisointi, RNA-synteesi ja -puhdistus	Testataan RT-PCR:ssä
RT-PCR:n kvantitointi	RT-PCR-protokollan kvantitointi syntetisoidulla HRV iVT-RNA:lla	Laimennossarjan valmistaminen RNA:sta, RT-qPCR	Protokollan herkkyys 100 kopiota/reaktio, transkriptoidussa RNA:ssa alle 100 kopiota plasmidi-DNA:ta jäljellä
SIBA:n testaaminen	SIBA-monistusteknologian testaaminen märkäkemialla ja HRV RNA-templaattilla	SIBA	SIBA-tekniikan kehitys HRV:lle vielä kesken, tulokset eivät luotettavia
Lyysauspuskurin kuumennuksen vaikutuksen testaaminen	Kuumennuksen (10 min 95 °C) tarpeen selvittäminen lyysausvaiheessa	RNA-eristys, RT-qPCR	Ei tarvetta 10 min 95 °C:n inkubaatiolle, mutta pienillä viruspartikkelimääriillä inkuboinnista hyötyä
Lyysauspuskureiden vertailu	Kolmen GuSCN- ja LiCl-pitoisuuksiltaan erilaisen lyysauspuskurin vertailu	RNA-eristys, RT-qPCR	Lyysauspuskuri nro. 2 paras
Magneettipartikkeleiden vertailu	Kolmen eri valmistajan silikamagneettipartikkeleiden vertailu	RNA-eristys, RT-qPCR	A-partikkelit parhaimmat
Magneettipartikkeleiden määrä	Kahden eri magneettipartikkeleiden tilavuuden vertailu HRV-A60-virussuspensiolla ja räällä	RNA-eristys, RT-qPCR	Suurempi tilavuus magneettipartikkeleita ei edesauta RNA:n sitoutumista eluoitaessa TE-puskuriin
Eluutiopuskureiden vertailu	TE-puskurin ja SIBA-eluutiopuskurin vertailu HRV-A60-virussuspensiolla ja räällä	RNA-eristys, RT-qPCR	Viruspartikkeleista ja räätä eristetty RNA ei eluoidu SIBA-eluutiopuskuriin. PCR-ajon perusteella eluotuminen heikompaa SIBA-eluutiopuskuriin.
Nenänielunäytteiden testaaminen	Kerättyjen nenänielutikkunäytteiden HRV-testaaminen kehitetyllä näytteenkäsittelymenetelmällä	RNA-eristys, RT-qPCR	Kaikki 7 näytettä HRV-negatiivisia
Nenänielunäytematriisin inhiboivan vaikutuksen testaaminen	Nenänielutikkunäytteen RNA-eristystä inhiboivan vaikutuksen testaaminen HRV-A60-virussuspensiolla	RNA-eristys, RT-qPCR	Nenänielunäytematriisi ei inhiboi HRV-RNA:n eristymistä merkittävästi: PCR-reaktio 3,5 % hitaampi näytematriisin kanssa.
RNA-eristysmenetelmän vertailu Qiagenin EZ1-eristysrobottiin	RNA:n eristymisen tehokkuuden vertailu kehitettävällä RNA-eristysmenetelmällä ja Qiagenin EZ1-eristysrobotilla komella eri virussuspensiolaimennoksella	RNA-eristys, EZ1-eristys, RT-qPCR	EZ1:lla eristettyjen näytteiden kynnyskyliä PCR:ssä 9,4-18,6 % nopeampia, kuin kehitettävällä menetelmällä.

## 8.5 Tulosten luotettavuuden arviointi

Työ toteutettiin Orion Diagnostica Oy:n laboratoriotyöskentelyohjeita sekä aseptisia työtapoja noudattaen kontaminaatioiden välttämiseksi. Kaikkien kokeellisen osuuden aikana toteutettujen kokeiden jäljitettävyyttä taattiin sillä, että jokainen koe dokumentoitiin sekä sähköisessä muodossa verkkolevyille että kirjallisessa muodossa työkirjaan.

Tulosten luotettavuutta tarkasteltiin jokaisen kokeen osalta kontrollien avulla: vain tulokset RNA-eristyksistä, joissa eristuksen aikaiset negatiiviset kontrollit eivät RT-qPCR:ssä monistuneet, huomioitiin ja määriteltiin luotettaviksi. RNA-eristysten negatiivisten kontrollien lisäksi jokaisessa qPCR-ajossa olivat mukana positiiviset kontrollit (standardit) sekä negatiivinen NTC-kontrolli. Monistuskäyrien lisäksi jokaisen ajon tuloksista tarkistettiin sulamiskäyräanalyysin sulamiskiikot ja arvioitiin tulosten luotettavuutta myös niiden avulla. Mikäli reaktioissa tapahtui monistumista, mutta sulamiskiikot olivat väärän lämpötilan kohdalla, oli monistunut tuote väärän kokoista eikä tulos ollut luotettava. Tätä ei kuitenkaan RT-qPCR-testausten aikana tapahtunut.

HRV Trans 600 -plasmidin DNA-jäämät iVT-RNA:ssa saattoivat hieman vääristää tuloksia jokaisen kokeen kvantitoinnissa, sillä iVT-RNA:n DNA-pitoisuudeksi määritettiin 87,8 kopiota/reaktio. Tämä oli kuitenkin alle kvantitoinnissa määritetyn RT-qPCR-protokollan herkkyysrajan (100 kopiota/reaktio), joten virhelähde ei ollut kovin huomattava ja kunkin kokeen kopiomääriä sekä syklieroja voitiin luotettavasti vertailla keskenään. Mikäli iVT-RNA:n oikea molekyylikoko olisi haluttu varmistaa, olisi tämä voitu tehdä geelielektroforeesijolla.

Jotta kunkin kokeen toistettavuus olisi taattu paremmin, olisi kokeissa tullut olla useampia rinnakkaisia RNA-eristyskokeita tutkittavilla parametreilla. Merkittävintä toistojen määrä olisi ollut viimeisessä eristysmenetelmien vertailukokeessa, jossa rinnakkaisten eristysten lukumäärät eri menetelmillä poikkesivat toisistaan: EZ1-eristysrobotilla tehtiin vain yksi RNA-eristys kutakin viruspartikkelimäärää kohden, kun puolestaan tutkittavalla menetelmällä eristyskokeita tehtiin kaksi rinnakkaista. Luotettavampaan tilastolliseen tulostulokseen olisi tarvittu useampi rinnakkainen eristys kummallakin menetelmällä, jolloin menetelmien RNA-eristystehokkuuksien lisäksi olisi voitu vertailla eristysten välisiä keskihajontoja sekä variaatiokertoimia.

## 9 Yhteenveto ja pohdinta

Tämän insinööriyön tavoitteena oli kehittää nukleiinihappoeristykseen pohjautuva näytteenkäsittelymenetelmä rinovirukselle. Työn kokeellisen osuuden aikana tehtyjen kokeiden perusteella rinovirus-RNA:ta on mahdollista eristää magneettipartikkelipohjaisella näytteenkäsittelymenetelmällä. Kokeellisessa osuudessa pyrittiin optimoimaan menetelmä rinovirus-RNA:n saannon suhteen. Kokeiden perusteella HRV RNA:n puhdistamiseen viruspartikkeleista ei tarvittu näytteen inkubointia 95 °C:ssa; rinoviruspartikkeleiden hajottamiseen riitti guanidiinitiosyanaattia ja litiumkloridia sisältävä lyysausliuos. Kaiken kaikkiaan kehitetty menetelmä oli tehokas HRV RNA:n puhdistamiseen, sillä vertailumenetelmän tehokkuudesta ja RNA-saannosta jäätin Ct-arvojen perusteella parhaimmillaan pienillä viruspartikkelipitoisuuksilla vain 9,4 % jälkeen.

Kokeellisen osuuden pituus oli ajallisesti rajoitettu, joten mahdollisia jatkotutkimuksia jää vielä tehtäväksi. Aikaa kului myös RT-qPCR-menetelmään tutustumiseen sekä tyypillisten virhelähteiden, kuten templaattikontaminaatioiden, eliminoimiseen. Joidenkin kokeiden templaattikontaminaatiot negatiivisissa kontrolleissa korostivat laaduntarkkailun merkitystä tulosten luotettavuuden kannalta ja mahdollistivat parempien työskentelymenetelmien kehittämisen työn aikana.

Mahdollisissa jatkotestauksissa RNA-saantoa voidaan pyrkiä maksimoimaan entisestään testaamalla mahdollisesti vieläkin tehokkaampia ja pienikokoisempia superparamagneettisia silikapartikkeleita, kantaja-RNA:n, RNAasi-inhibiittoreiden tai proteinaasi K:n vaikutusta, sekä vaihtoehtoisia pesupuskureita. Olisi kuitenkin muistettava, että näytteenkäsittelyyn tarvittavien reagenssien tulisi säilyä mieluiten huoneenlämmössä, joten kylmäsäilytystä vaativien reagenssien käyttöä tulisi välttää. Lyysausvaiheen inkubointikokeessa kokeiltiin ainoastaan yhtä kuumennuslämpötilaa ja -aikaa, joten muiden vaihtoehtoisten yhdistelmien tehokkuutta voidaan myös tarkastella jatkossa. Myös vaihtoehtoisia lyysauspuskureita varioiduilla guanidiinitiosyanaatti- ja litiumkloridipitoisuuksilla voidaan testata.

Näytteenkäsittelymenetelmän todellista saantoa ei tämän työn aikana pystytty määrittämään, sillä eristykseen käytetyn HRV-A60-virussuspension viruspartikkelipitoisuutta ei tiedetty tarkasti. Oleellista menetelmän kehityksessä jatkossa olisikin testata RNA-eristystä varmasti HRV-positiivisista kliinisistä nenänielunäytteistä, tai vastaavasti lisätä eristykseen kliinisten näytteiden viruspartikkelimäärää vastaava tunnettu partikkelipitoisuus.



Näytteenkäsittelymenetelmän lopullinen tehokkuus saadaan selville vasta, kun eristykseen lisättävä rinoviruspartikkeleiden määrä tiedetään. Kun kliinisiä HRV-positiivisia näytteitä on saatavilla, tulisi menetelmävertailu Qiagenin EZ1<sup>®</sup> Advanced XL -eristysrobotin sekä kehitettävän menetelmän välillä toistaa. Tässä insinööriyössä vertailtiin vain RNA-eristystä virussuspensiosta, joten näytematriisin vaikutusta vertailtavilla menetelmillä ei vielä selvitetty. Jotta menetelmien väliset variaatiot eristystehokkuuden välillä voitaisiin määrittää tilastollisesti, tulisi rinnakkaisia eristettyjä näytteitä olla huomattavasti suurempi otanta, kuin tässä työssä tehdyssä vertailussa oli.

Insinööriyön toinen alkuperäinen tavoite oli saada kehitettävä näytteenkäsittelymenetelmä yhteneväiseksi SIBA-teknologian ja kylmäkuivattujen reagenssien käyttämisen kanssa: *carry over* -ilmiö oli minimoitava ja RNA:ta oli oltava riittävä määrä eluutiopuskurissa. Kuitenkaan itse SIBA-protokollan optimoiminen ei ollut yksi tämän insinööriyön tavoitteista, ja protokollan kehittämisen keskeneräisyyden vuoksi työn aikana tehdyt SIBA-testaukset eivät tuottaneet luotettavia tuloksia näytteenkäsittelymenetelmän kehittämisen kannalta. Tämän takia mahdollista *carry over* -ilmiötä tulisi tutkia ja todentaa jatkotutkimuksissa tarkemmin. Ilmiön eliminointi olisi merkittävää etenkin SIBA-teknologiaa hyödyntävien tuotteiden jatkokehityksessä ja kylmäkuivattujen reagenssien käytössä, sillä lopulliseen SIBA-reaktioon tarvittava eluaatin tilavuus on PCR:ään tarvittavaa tilavuutta suurempi. Näytteenkäsittelymenetelmän toimivuutta on jatkossa myös ajateltava uusien tuotteiden tuotekehityksen kannalta: valmiin näytteenkäsittelyprotokollan sekä siihen tarvittavien materiaalien olisi oltava mahdollisimman käyttäjäystävällisiä.

Tämän insinööriyön kokeellisen osuuden aikana Orion Diagnostica Oy:n tuotekehityksessä toteutettiin lisäksi kaksi muutakin aihepiiriltään samankaltaista insinööriyötä: ”Uuden nukleinihappoeristykseen pohjautuvan näytteenkäsittelymenetelmän kehittäminen *Bordetella pertussikselle*” (Auvinen 2015) sekä ”Uuden nukleinihappoeristykseen pohjautuvan näytteenkäsittelymenetelmän kehittäminen rotavirukselle” (Liikonen 2015). Vaikka kukin työ oli itsenäinen ja kunkin patogeenin näytteenkäsittelymenetelmän kehitykseen sisältyi toisistaan poikkeavia työvaiheita, sivusivat työt kuitenkin aiheiltaan toisiinsa. Joitakin kahteen muuhun insinööriyöhön sisältyneitä kokeita ei tässä työssä tehty, sillä kahden muun työn tulosten perusteella saavutettiin jo riittävä tieto mielenkiinnon alaisista parametreista. Tällaisia tietoja olivat esimerkiksi tutkittavien patogeeni-DNA:n tai -RNA:n jäämien määrät lyysaus- ja pesupuskureissa nukleinihappoeristyksen jälkeen. RNA-saannon optimoimiseksi vastaava koeasettelu voidaan tulevaisuudessa toteuttaa myös rinovirus-RNA:n eristystä tutkittaessa.

Yleisesti ottaen tässä insinööriyössä kehitetyllä näytteenkäsittelymenetelmällä saatiin suhteellisen hyvin eristettyä rinovirus-RNA:ta viruspartikkeleista. Näytteenkäsittelymenetelmä oli aiemmin optimoitu DNA:n eristämiseen, ja tämän insinööriyön kokeellisessa osuudessa osoitettiin, että menetelmä soveltuu hyvin myös RNA-virusten nukleiinihappojen puhdistukseen.

## Lähteet

AccuNanoBead™ Magnetic Nanobeads. Verkkodokumentti. Bioneer. <<http://us.bioneer.com/products/protein/MagneticnanoBeads-technical.aspx>>. Luettu 27.3.2015.

Aksoy, N. 1996. The Extraordinary Virtues of Mucus. Verkkodokumentti. The Fountain magazine, issue 14 (April-June 1999). <<http://www.fountainmagazine.com/Issue/detail/The-Extraordinary-Virtues-of-Mucus>>. Luettu 3.4.2015.

Ali, Mahmoud El-Sayed. 2010. Mucin Expression in Nasal Polyps. Nasal Polyposis (2010). 65–73.

Anzueto, Antonio; Niederman, Michael S. 2003. Diagnosis and Treatment of Rhinovirus Respiratory Infections. Chest, 123 (May, 2003). 1664–1672.

Auvinen, Pauliina. 2015. Uuden nukleiinihappoeristykseen pohjautuvan näytteenkäsittelymenetelmän kehittäminen *Bordetella pertussikselle*. Insinööriyö. Metropolia ammattikorkeakoulu.

Bair, Robert Jackson Jr.; Heath, Ellen M.; Meehan, Heather; Paulsen, Kim Elayne; Wages, John M. Jr. 2006. Composition and Methods for Using a Solid Support to Purify RNA. Patenttjulkaisu 12.12.2006. Patenttjulkaisun numero US 7148343 B2.

Boom, R.; Sol, C. J.; Salimans, M. M. M.; Jansen, C. L.; Wertheim-Van Dillen, P. M. E.; Van Der Noordaa, J. 1990. Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids. Journal of Clinical Microbiology, vol 28, nro. 3 (March, 1990). 495–503.

Boom, Willem R.; Adriaanse, Henriette M. A.; Kievits, Tim; Lens, Peter F. 1993. Process for Isolating Nucleic Acid. Patenttjulkaisu 10.8.1993. Patenttjulkaisun numero US 5234809 A.

Bustin, S; Benes, V; Nolan, T; Pfaffl, M. 2005. Quantitative real-time RT-PCR – a perspective. Journal of Molecular Endocrinology, 34 (2005). 597–601.

Bustin, Stephen; Mueller, Reinhold. 2005. Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. Clinical Science, 109 (2005). 365–379.

Chen, Grace; Alberts, Catharina; Rodriguez, William; Toner, Mehmet. 2009. Concentration and Purification of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Virions by Microfluidic Separation of Superparamagnetic Nanoparticles. Analytical Chemistry, vol. 82, nro. 2 (January 15, 2010). 723–728.

Choi, Seong-Ho; Hong, Sang-Bum; Kim, Tark; Kim, Sung-Han; Huh, Jin Won; Do, Kyung-Hyun; Lee, Sang-Oh; Kim, Mi-Na; Lim, Chae-Man; Kim, Yang Soo; Koh, Youn-suck; Woo, Jun Hee; Choi, Sang-Ho; Sung, Heungsup. 2015. Clinical and molecular characterization of rhinoviruses A, B, and C in adult patients with pneumonia. Journal of Clinical Virology, 63 (2015). 70–75.

Dale, Jeremy; von Schantz, Malcolm. 2006. From Genes to Genomes: Concepts and Applications of DNA Technology. West Sussex, England: John Wiley & Sons Ltd.

DNA/RNA Copy Number Calculator. Verkkodokumentti. Endmemo. <<http://www.endmemo.com/bio/dnacopynum.php>>. Luettu 24.2.2015.

Enterovirus. 2015. Verkkodokumentti. The Picornavirus Pages. <<http://www.picornaviridae.com/enterovirus/enterovirus.htm>>. Luettu 4.2.2015.

EPSH = Respiratoriset virukset, nukleiinihappo (kval). Tutkimuskuvaus. Verkkodokumentti. Etelä-Pohjanmaan sairaanhoitopiiri. <<http://www.epshp.fi/files/5981/RVirNhO-8590.pdf>>. Luettu 31.3.2015.

EZ1<sup>®</sup> DSP Virus Kit Handbook. 2010. Version 4. Qiagen GmbH, Hilden.

Fakruddin, MD.; Mazumdar, Reaz Mohammad; Chowdhury, Abhijit; Bin Mannan, Khanjada Shahnewaj. 2012. Nucleic Acid Sequence Based Amplification (NASBA) - Prospects and Applications. International Journal of Life science and & Pharma research, Vol 2, Issue 1 (Jan-Mar 2012). 106–121.

FDA-cleared RT-PCR Assays and Other Molecular Assays for Influenza Viruses. Verkkodokumentti. Centers for Disease Control and Prevention. <<http://www.cdc.gov/flu/pdf/professionals/diagnosis/table1-molecular-assays.pdf>>. Luettu 2.4.2015.

Fimlab = Respiratoristen virusten nukleiinihappo-osoitus. Tutkimuskuvaus. Verkkodokumentti. Fimlab laboratoriot oy. <[http://www.fimlab.fi/lake/ohje-kirja/nayta.tmp?siivu\\_id=194;setid=8254;id=12864](http://www.fimlab.fi/lake/ohje-kirja/nayta.tmp?siivu_id=194;setid=8254;id=12864)>. Luettu 31.3.2015.

Freeman, Willard; Walker, Stephen; Vrana; Kent. 1999. Quantitative RT-PCR: Pitfalls and Potential. BioTechniques, 26 (January 1999). 112-125.

HiScribe<sup>™</sup> T7 High Yield RNA Synthesis Kit. Instruction manual. Verkkodokumentti. New England BioLabs<sup>®</sup> Inc. <<https://www.neb.com/~media/Catalog/All-Products/C43101678D8A4BA5B3A244EDE23418A6/Datacards%20or%20Manuals/manualE2040.pdf>>. Luettu 13.2.2015.

Hoser, Mark J. 2011. Isothermal nucleic acid amplification. Patenttjulkaisu 26.5.2011. Patenttjulkaisun numero US 20110123991 A1.

Hoser, Mark J.; Mansukoski, Hannu K.; Morriscal, Scott W.; Eboigbodin, Kevin E. 2014. Strand Invasion Based Amplification (SIBA<sup>®</sup>): A Novel Isothermal DNA Amplification Technology Demonstrating High Specificity and Sensitivity for a Single Molecule of Target Analyte. PLoS ONE 9(11): e112656. DOI:10.1371/journal.pone.0112656, (November 24, 2014).

HUSLab<sub>1</sub> = Rinovirus, nukleiinihappo (kval). Tutkimuskuvaus. Verkkodokumentti. HUSLab Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiiri. <[http://huslab.fi/cgi-bin/ohjekirja/tt\\_show.exe?assay=4784&terms=rinovirus](http://huslab.fi/cgi-bin/ohjekirja/tt_show.exe?assay=4784&terms=rinovirus)>. Luettu 31.3.2015.

HUSLab<sub>2</sub> = Pikornavirus, nukleiinihappo (kval). Tutkimuskuvaus. Verkkodokumentti. HUSLab Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiiri. <[http://huslab.fi/cgi-bin/ohjekirja/tt\\_show.exe?assay=1917&terms=rinovirus](http://huslab.fi/cgi-bin/ohjekirja/tt_show.exe?assay=1917&terms=rinovirus)>. Luettu 31.3.2015.

HUSLab<sub>3</sub> = Pikornavirus, nukleiinihappo (kval), seerumista. Tutkimuskuvaus. Verkkodokumentti. HUSLab Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiiri. <[http://huslab.fi/cgi-bin/ohjekirja/tt\\_show.exe?assay=21266&terms=rinovirus](http://huslab.fi/cgi-bin/ohjekirja/tt_show.exe?assay=21266&terms=rinovirus)>. Luettu 31.3.2015.

HUSLab<sub>4</sub> = Pikornavirus, nukleiinihappo (kval), aivo-selkäydinnesteestä. Tutkimuskuvaus. Verkkodokumentti. HUSLab Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiiri. <[http://huslab.fi/cgi-bin/ohjekirja/tt\\_show.exe?assay=21268&terms=rinovirus](http://huslab.fi/cgi-bin/ohjekirja/tt_show.exe?assay=21268&terms=rinovirus)>. Luettu 31.3.2015.

Hyypiä, Timo; Roivainen, Merja; Ruuskanen, Olli. 2012. Pikornavirukset. Teoksessa Mikrobiologia – Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet, kirja 1. Hedman, Klaus; Heikkinen, Terho; Huovinen, Pentti; Järvinen, Asko; Meri, Seppo; Vaara, Martti. Porvoo: Bookwell Oy.

ISLAB = Pikornavirus, RNA osoitus. Tutkimuskuvaus. Verkkodokumentti. Itä-Suomen Laboratoriokeskuksen web-ohjekirja. <<https://ekstra1.kuh.fi/csp/islabohje/la-bohje.csp?indeksi=3024>>. Luettu 31.3.2015.

Jaakkola, Sari; Lyytikäinen, Outi; Rimhanen-Finne, Ruska; Salmenlinna, Saara ym. 2014. Tartuntataudit Suomessa 2013. Raportti. 16/2014. Terveysten ja hyvinvoinnin laitos.

Jacobs, Samantha; Lamson, Daryl; St. George Kirsten; Walsh, Thomas. 2013. Human Rhinoviruses. *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 26, nro. 1 (January 2013). 135–162.

Kim, Hyun-Ki; Oh, Sung-Hee; Yun, Kyung Ah; Sung, Heungsup; Kim, Mi-Na. 2013. Comparison of Anyplex II RV16 with the xTAG Respiratory Viral Panel and Seeplex RV15 for Detection of Respiratory Viruses. *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 51, nro. 4 (April 2013). 1137–1141.

Kim, Jae-Ha; Park, Jong-Gwang; Kim, Jong-Hoon; Park, Han-Oh. 2011. Silica Magnetic Particles Having A Spherical Form And A Process For Preparing The Same. Patenttijulkaisu 3.3.2011. Patenttijulkaisun numero US 20110054162 A1.

Kubista, Mikael; Andrade, José Manuel; Bengtsson, Martin; Forootan, Amin; Jonák, Jiri; Lind, Kristina; Sindelka, Radek; Sjöback, Robert; Sjögreen, Björn; Strömbom, Linda; Ståhlberg, Anders; Zoric, Neven. 2006. The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*, 27 (2006). 95–125.

Kuroita, Toshihiro; Kamimura, Hideki; Kawakami, Bunsei; Kawamura, Yoshihisa. 1999. Method for isolating ribonucleic acid. Patenttjulkaisu 23.11.1999. Patettijulkaisun numero US 5990302 A.

Liikonen, Karoliina. 2015. Uuden nukleiinihappoeristykseen pohjautuvan näytteenkäsittelymenetelmän kehittäminen rotavirukselle. Insinööriyö. Metropolia ammattikorkeakoulu.

Lönrot, M.; Sjöroos, M.; Salminen, K.; Maaronen, M.; Hyypiä, T.; Hyöty, H. 1999. Diagnosis of enterovirus and rhinovirus infections by RT-PCR and time-resolved fluorometry with lanthanide chelate labeled probes. *Journal of Medical Virology*, 59. 378–384.

Mahony, James B. 2008. Detection of Respiratory Viruses by Molecular Methods. *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 21, nro. 4 (October 2008). 716–747.

Mahony, James B. 2011. Human Rhinoviruses A, B and C. Teoksessa *Molecular Detection of Human Viral Pathogens*. Muokannut Liu, Dongyou. Boca Raton, U.S.: Taylor & Francis Group, LLC. CRC Press.

M-Beads Magnetic Silica Beads. Verkkodokumentti. MoBiTec®. <[http://www.mobitec.com/cms/products/bio/06\\_dna\\_prot\\_tools/mbeads4.html](http://www.mobitec.com/cms/products/bio/06_dna_prot_tools/mbeads4.html)>. Luettu 27.3.2015.

McIntyre, Chloe; Knowles, Nick; Simmonds, Peter. 2013. Proposals for the classification of human rhinovirus species A, B and C into genotypically assigned types. *Journal of General Virology*, 94 (2013).1791–1806.

MeSH: Conserved Sequence. 2015. Verkkodokumentti. National Library of Medicine - Medical Subject Headings. <[https://www.nlm.nih.gov/cgi/mesh/2015/MB\\_cgi?mode=&index=16083&view=concept](https://www.nlm.nih.gov/cgi/mesh/2015/MB_cgi?mode=&index=16083&view=concept)>. Luettu 31.3.2015.

MeSH: locked nucleic acid. 2015. Verkkodokumentti. National Library of Medicine - Medical Subject Headings. <[http://www.nlm.nih.gov/cgi/mesh/2015/MB\\_cgi?mode=&index=179796&view=concept](http://www.nlm.nih.gov/cgi/mesh/2015/MB_cgi?mode=&index=179796&view=concept)>. Luettu 1.4.2015.

Nordlab = Respiratoriset virukset, nukleiinihapon osoittaminen (kval). Tutkimuskuvaus. Verkkodokumentti. Nordlab Oulu. <[http://oyslab.fi/cgi-bin/ohjekirja/tt\\_show.exe?assay=8340&terms=rino](http://oyslab.fi/cgi-bin/ohjekirja/tt_show.exe?assay=8340&terms=rino)>. Luettu 31.3.2015.

Nuclisens® easyMag®. Verkkodokumentti. BioMérieux. <<http://www.biomerieux-usa.com/clinical/nuclisens-easymag>>. Luettu 4.4.2015.

Nuzzo, Jennifer B.; Rambhia, Kunal; Morhard, Ryan; Watson, Matthew; Adalja, Amesh; Toner, Eric; Cicero, Anita; Inglesby, Tom. 2013. Diagnosing Infection at the Point of Care. UPMC Center for Health Security. Final report (June 2013).

Palmenberg, Ann; Rathe, Jennifer; Liggett, Stephen. 2010. Analysis of Complete Genome Sequences of Human Rhinovirus. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125, (June 2010). 1190–1201.

Peltola, Ville; Waris, Matti; Österback, Riikka; Susi, Petri; Ruuskanen, Olli; Hyypiä, Timo. 2008. Rhinovirus Transmission within Families with Children: Incidence of Symptomatic and Asymptomatic Infections. *The Journal of Infectious Diseases*, 197 (February 2008). 382–389.

Pfaffl, Michael. 2004. *A-Z of quantitative PCR*. International University Line. La Jolla, CA, USA.

Real-time PCR Handbook. 2012. Life Technologies™.

Rinovirus. 2013. Verkkodokumentti. Terveystieteiden tutkimuskeskus ja hyvinvoinnin laitos. <<http://www.thl.fi/fi/web/infektiotaudit/taudit-ja-mikrobit/virustaudit/rinovirus>>. Luettu 6.2.2015.

RNeasy® MinElute® Cleanup Handbook. 2010. Qiagen GmbH, Hilden.

Safarik, Ivo; Safarikova, Mirka. 2004. Magnetic techniques for the isolation and purification of proteins and peptides. *BioMagnetic Research and Technology*, 2:7 (2004).

Satadiag = Rinovirus, nukleinihapon osoitus. Tutkimuskuvaukset. Verkkodokumentti. Satadiag Satakunnan sairaanhoitopiiri. <<http://ohjekirja.satadiag.fi/4784.html>>. Luettu 31.3.2015.

Smura, Teemu; Blomqvist, Soile; Paananen, Anja; Vuorinen, Tytti; Sobotová, Zdenka; Bubovica, Veronika; Ivanova, Olga; Hovi, Tapani; Roivainen, Merja. 2007. Enterovirus surveillance reveals proposed new serotypes and provides new insight into enterovirus 5'-untranslated region evolution. *Journal of General Virology*, 88 (2007). 2520–2526.

Standard Nucleotide BLAST. Verkkodokumentti. Basic Local Alignment Search Tool. NCBI. <[http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)>. Luettu 31.3.2015.

Sun, Ning; Deng, Congliang; Liu, Yi; Zhao, Xiaoli; Tang, Yan; Liu, Renxiao; Xia, Qiang; Yan, Wenlong; Ge, Guanglu. 2014. Optimization of influencing factors of nucleic acid adsorption onto silica-coated magnetic particles: Application to viral nucleic acid extraction from serum. *Journal of Chromatography A*, 1325 (2014). 31–39.

Suomalainen, Marika; Suomalainen, Sini; Puro, Virpi; Kytöniemi, Vuokko; Lamberg, Arja. 2010. The Importance of Optimizing the DNA Purification Protocol in Magnetic Particle-Based Systems. *American Biotechnology Laboratory* (July/August 2010).

Susi, Petri. 2015. Sähköpostikeskustelu. 11.2.2015.

Transcription and Translation Tool. Verkkodokumentti. Attotron. <<http://www.attotron.com/cybertory/analysis/trans.htm>>. Luettu 24.2.2015.

TYKSLab<sub>1</sub> = Rinovirus, nukleinihappo (kval). Tutkimuskuvaus. Verkkodokumentti. TYKSLab Varsinais-Suomen sairaanhoitopiiri. <<http://webohjekirja.mylabservices.fi/TYKS/4784.html>>. Luettu 31.3.2015.

TYKSLab<sub>2</sub> = Np-Rino-entero-RS-virus, nukleinihapon osoitus (kval). Tutkimuskuvaus. Verkkodokumentti. TYKSLab Varsinais-Suomen sairaanhoitopiiri. <<http://webohjekirja.mylabservices.fi/TYKS/12032.html>>. Luettu 31.3.2015.

TYKSLab<sub>3</sub> = Respiratoriset virukset, nukleinihapon osoittaminen (kval). Tutkimuskuvaus. Verkkodokumentti. TYKSLab Varsinais-Suomen sairaanhoitopiiri. <<http://webohjekirja.mylabservices.fi/TYKS/12637.html>>. Luettu 31.3.2015.

TYKSLab<sub>4</sub> = Np-Rino-entero-RS-virus, nukleinihapon osoitus (kval). Tutkimuskuvaus. Verkkodokumentti. TYKSLab Varsinais-Suomen sairaanhoitopiiri. <<http://webohjekirja.mylabservices.fi/TYKS/13513.html>>. Luettu 31.3.2015.

UTULab<sub>1</sub> = Rinovirus, nukleinihapon osoitus (PCR) ja Picornavirus, nukleinihapon osoitus (PCR). Tutkimuskuvaus. Verkkodokumentti. UTULab. <[http://www.utu.fi/fi/yksikot/med/yksikot/utulab/ohjekirja/Documents/Ohjekirja%20pdf/virologia/RINOVIRUS%2c%20NUKLEIINIHAPON%20OSOITUS%20\(PCR\)%20PICORNAVIRUS%2c%20NUKLEIINIHAPON%20OSOITUS%20\(PCR\).pdf](http://www.utu.fi/fi/yksikot/med/yksikot/utulab/ohjekirja/Documents/Ohjekirja%20pdf/virologia/RINOVIRUS%2c%20NUKLEIINIHAPON%20OSOITUS%20(PCR)%20PICORNAVIRUS%2c%20NUKLEIINIHAPON%20OSOITUS%20(PCR).pdf)>. Luettu 31.3.2015.

UTULab<sub>2</sub> = Respiratoriset virukset, nukleinihapon osoitus (PCR). Tutkimuskuvaus. Verkkodokumentti. UTULab. <[http://www.utu.fi/fi/yksikot/med/yksikot/utulab/ohjekirja/Documents/Ohjekirja%20pdf/virologia/RESPIRATORISET%20VIRUKSET,%20NUKLEIINIHAPON%20OSOITUS%20\(PCR\).pdf](http://www.utu.fi/fi/yksikot/med/yksikot/utulab/ohjekirja/Documents/Ohjekirja%20pdf/virologia/RESPIRATORISET%20VIRUKSET,%20NUKLEIINIHAPON%20OSOITUS%20(PCR).pdf)>. Luettu 31.3.2015.

ViralZone: Enterovirus. 2008. Verkkodokumentti. ExPASy Bioinformatics Resource Portal. <[http://viralzone.expasy.org/all\\_by\\_protein/97.html](http://viralzone.expasy.org/all_by_protein/97.html)>. Luettu 27.3.2015.

VSHP = Respiratoriset virukset, nukleinihapon osoittaminen, kval. Tutkimuskuvaus. Verkkodokumentti. Vaasan keskussairaala. <<http://www.vshp.fi/medserv/klkemi/fi/ohjekirja/8980.htm>>. Luettu 31.3.2015.

Österback, Riikka; Tevaluoto, Tuire; Ylinen, Tiina; Peltola, Ville; Susi, Petri; Hyypiä, Timo; Waris, Matti. 2013. Simultaneous Detection and Differentiation of Human Rhino- and Enteroviruses in Clinical Specimens by Real-Time PCR with Locked Nucleic Acid Probes. *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 51, nro. 12 (December 2013). 3960–3967.



## Liite 1. Suomen sairaanhoitopiirien ohjekäsikirjojen rinovirusta koskevat tutkimusmenetelmät

Yksikkö	Nimi	Menetelmä	Aika	Indikaatiot	Matriisi	Huomautuksia	Lähde
EPSHP	Respiratoriset virukset, nukleiinihappo, 8590, RVirNhO	Multiplex-PCR	n. 7 vrk	Hengitystievirusten diagnostiikka. Tutkimuksella voidaan seuloa 16 yleistä hengitystievirusta (rino mukaan lukien).	Ensisijaiset: nenä/nenänielutikka, nielutikka, imulima, nenänielusta, BAL- ja pleuraneste. Muut: veri-, seerumi-, plasma-, uloste-, selkäydin- ja luuydinnäyte.	Tutkimus teetetään alihankintana UTULabilla.	EPSH
Fimlab	Respiratoristen virusten nukleiinihappo-osoitus, 20956, -RVirNhO	Multiplex-PCR	1 vrk	Hengitystievirusinfektion etiologian selvittäminen. Menetelmä tunnistaa 16:n eri viruksen nukleiinihappoa (rino mukaan lukien).	Ensisijaiset: nenänielun imulima, nenänielun erite ja BAL. Muut: nenä- ja nielunäytteet (heikompi herkkyys).	Positiivinen tulos kertoo, että kyseisen viruksen (tai virusten) nukleiinihappoa on osoitettavissa näytteestä. Tuloksen kliinistä merkitystä on arvioitava suhteessa potilaan kliinisiin oireisiin.	Fimlab
HUSLab	Rinovirus, nukleiinihappo, 4784, RinoNhO	Reaaliaikainen RT-PCR	n. 7 vrk	Hengitystieinfektio	Nenänielun imulima ja nenänieluerite (tikkunäyte)	Kval. Pikornavirustutkimusten osatutkimuksena.	HUSLab <sub>1</sub>
HUSLab	Pikornavirus, nukleiinihappo, 1917, -PicoNhO	Reaaliaikainen RT-PCR	n. 7 vrk	Meningiitti- ja enkefaliittiepäilyt, vastasyntyneiden infektiot, rakkulaiset ihottumat (enterorokkoepäily), hengitystieinfektio.	Rakkulaneste, nenänielunäyte (rinoviruksen osoittaminen)	Osatutkimukset: -EvirNhO, -PareNhO ja - <b>RinoNhO</b> . -EvirNhO (4392) ja -PareNhO (21269) -osatutkimuksia voidaan pyytää myös erikseen.	HUSLab <sub>2</sub>
HUSLab	Pikornavirus, nukleiinihappo, 21266, S-PicoNhO	Reaaliaikainen RT-PCR		Meningiitti- ja enkefaliittiepäilyt, vastasyntyneiden infektiot, rakkulaiset ihottumat (enterorokkoepäily).	Seerumi	Osatutkimukset: S -EvirNhO, S -PareNhO ja <b>S -RinoNhO</b> . S-EvirNhO (4780) ja S-PareNhO (21265) -osatutkimuksia voidaan pyytää myös erikseen.	HUSLab <sub>3</sub>
HUSLab	Pikornavirus, nukleiinihappo, 21268, Li-PicoNhO	Reaaliaikainen RT-PCR		Meningiitti- ja enkefaliittiepäilyt, vastasyntyneiden infektiot, rakkulaiset ihottumat (enterorokkoepäily).	Aivo-selkäydinneste	Osatutkimukset: Li-EvirNhO, Li-PareNhO ja <b>Li-RinoNhO</b> . Li-EvirNhO (21270) ja Li-PareNhO (21267) -osatutkimuksia voidaan pyytää myös erikseen.	HUSLab <sub>4</sub>
ISLAB	Pikornavirus, RNA osoitus -PicoNhO, 1917	Reaaliaikainen RT-PCR	1-2 viikon kuluessa	Meningiitti- ja enkefaliittiepäilyt, vastasyntyneiden infektiot, rakkulaiset ihottumat (enterorokkoepäily), hengitystieinfektio.	Nenänielunäyte (rino), likvori, rakkulaneste.	Osatutkimukset: -EvirNhO, 4392; -PareNhO, 21269; - <b>RinoNhO, 4784</b> . Tutkimus teetetään alihankintana.	ISLAB
Nordlab	Respiratoriset virukset, nukleiinihapon osoittaminen, 8340, -RVirNhO	PCR	1-2 vrk		Imulima nenänielusta, nenä/ nenänielutikka, nielutikka, BAL-neste ja pleuraneste.	Osatutkimukset: -AdenNhO, -BocaNhO, -EvirNhO, -hMPVNhO, -InfANhO, -InfBNhO, -InfvNhO, -Kor229E, -KorNL63, -KorOC43, -Pin1NhO, -Pin2NhO, -Pin3NhO, -Pin4NhO, - <b>RinoNhO</b> , -RSVaNhO ja -RSVbNhO	Nordlab

Yksikkö	Nimi	Menetelmä	Aika	Indikaatiot	Matriisi	Huomautuksia	Lähde
Satadiag	Rinovirus, nukleiinihapon osoitus, 4784, RinoNhO	PCR	3-5 työpäivän kuluessa		Nenänieluerite, nenästä tai nielusta otettu tikkunäyte, nenähuuhtelunäyte	Tutkimus teetetään alihankintana UTULabilla.	Satadiag
TYKSLab	Rinovirus, nukleiinihappo, 4784, RinoNhO	PCR		Hengitystievirusten diagnostiikka. Kaikki rinovirusserotyypit voidaan todeta menetelmällä.	Nenänieluerite, nenästä tai nielusta otettu tikkunäyte, ja BAL		TYKSLab <sub>1</sub>
TYKSLab	Np-Rino-entero-RS-virus, nukleiinihapon osoitus, 12032, EnRiRSVnHo	PCR		Testillä osoitetaan samanaikaisesti entero- ja rinovirusten eri serotyyppien nukleiinihappoa sekä respiratory synsytial viruksen (RSV) nukleiinihappoa.	Nenäerite/nieluerite (tikku-/imunäytteenä), rakkulaneste (tikkunäyte), ulostenäyte	Osatutkimukset: EvirNhO, <b>RinoNhO</b> , RSVnHo	TYKSLab <sub>2</sub>
TYKSLab	Respiratoriset virukset, nukleiinihapon osoittaminen, 12637, ResVirNhO	PCR		Hengitystievirusten diagnostiikka. PCR-menetelmä soveltuu 16 yleisen hengitystieviruksen toteamiseen.	Imulima nenänielu, nenä/nenänielutikka, nielutikka, BAL-neste ja pleuraneste. Muut: mm. veri-, seerumi-, plasma-, uloste-, selkädyn- ja luuydinäyte.	Osatutkimukset: AdenNhO, InfANhO, InfBNhO, Pin1NhO, Pin2NhO, Pin3NhO, RSVANhO, RSVBNhO, <b>RinoNhO</b> , hMPVNhO, KV229ENhO, KVN63NhO, KVOC43NhO, Pin4NhO, EvirNhO, BokaNhO	TYKSLab <sub>3</sub>
TYKSLab	Np-Rino-entero-RS-virus, nukleiinihapon osoitus, 13513, P-EnRiRSNn	PCR		Testillä osoitetaan samanaikaisesti entero- ja rinovirusten eri serotyyppien nukleiinihappoa sekä respiratory synsytial viruksen (RSV) nukleiinihappoa.	EDTA-plasma tai seerumi	Osatutkimukset: EvirNhO, <b>RinoNhO</b> , RSVnHo	TYKSLab <sub>4</sub>
UTULab	Rinovirus, nukleiinihapon osoitus, 4784, RinoNhO + Pikornavirus, nukleiinihapon osoitus, 1917, PicoNhO	PCR, Akkreditoitu menetelmä (hengitystie-erite, uloste)	Samana päivänä	Hengitystieinfektioiden diagnostiikka	Ensisijaiset: nielu- ja nenänielunäyte. Muut: hengitystie-erite, uloste, selkäydinneste, kudospala, seerumi, veri, rakkulanäyte, BAL, silmän erite, suun limakalvonäyte	Picornavirustutkimus sisältää EvirNhO ja <b>RinoNhO</b> -tutkimukset.	UTULab <sub>1</sub>
UTULab	Respiratoriset virukset, nukleiinihapon osoitus, ResVirNhO, 12637	Multiplex-PCR, Akkreditoitu menetelmä (hengitystie-erite)	Samana päivänä	Hengitystievirusten diagnostiikka. PCR-menetelmä soveltuu 16 yleisen hengitystieviruksen toteamiseen (rino mukaan lukien).	Ensisijaiset: nenä-/nenänielutikka, imulima, yskös, trakealima. Muut: BAL, pleuraneste, EDTA-veri, seerumi, uloste, selkäydinneste, luuydin, kudospala	Tutkimukseen kuuluvat seuraavat virukset: adenovirus, influenssa A ja B virus, koronavirus OC43, 229E, NL63, metapneumovirus, parainfluenssavirus tyyppi 1, 2, 3, ja 4, RS-virus A ja B, <b>rinovirus</b> A, B ja C, enterovirus sekä bokavirus 1,2,3 ja 4	UTULab <sub>2</sub>
VSHP	Respiratoriset virukset, nukleiinihapon osoittaminen, 8980,-RVirNhO	Multiplex-PCR	2-3 vrk	Hengitystievirusten diagnostiikka. PCR-menetelmä soveltuu 16 yleisen hengitystieviruksen toteamiseen (rino mukaanlukien).	Selkäydinneste-, seerumi- tai NPS-näyte, tikkunäyte nenänielusta ja sieraimista.	Tutkimus teetetään alihankintana UTULabilla.	VSHP

## Liite 2. pEX-A2-HRV Trans 600 -plasmidin tiedot (Quality Report, Eurofins)



## Gene Synthesis Quality Assurance Documentation

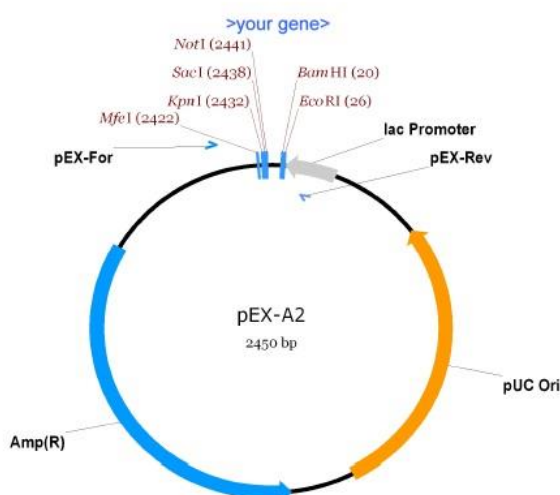
Order No.:



OI30927489

Plasmid Name:	pEX-A2-HRV Trans 600	Internal Name:	LW31-3
Gene Name:	HRV Trans 600	Gene Size:	620bp
Vector Backbone:	pEX-A2	Antibiotic Selection:	Ampicillin
Cloning:	via Type IIS restriction enzymes	Quantity:	4.8µg

## Plasmid Map



5' Restriction Site: NONE

3' Restriction Site: SmaI

Cloning: via Type IIS restriction enzymes

(Type IIS sites not present in final plasmid)

## MCS of pEX-A2

```

GGAGCAGACAAAGCCCGTCAGGCGCGCTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTTCGGGGC
TGGCTTAACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGCACcaattgGG
TACCgagctcGCGGCCGCAAGC>your_gene>ACCTGCTTTGCTCGCTTgg
atccGAATTCCTGTGTGAAATTTATCCGCTCACAATTCACACACATACG
AGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTG

```

## Please Note:

Verify sequence after each cloning step.

All material left at Eurofins Genomics will be discarded after 1 month.

Sequence analysis was done via doublestrand DNA sequencing. Sequence congruence was 100%.

Please find your sequence trace files in your personal account on our ECOM system (order ID 3442536).

The plasmid DNA has been lyophilised. We recommend to dissolve it in 10mM Tris buffer or TE.

Plasmid DNA was isolated from a dam<sup>+</sup>, dcm<sup>+</sup> E. coli strain.

Eurofins Genomics

26/11/14

Dr. Stephanie Helfer  
Project Assistant

Controlled and Released



### Liite 3. HRV Trans 600 -geenin sekvenssi ja siitä transkriptoitu RNA-sekvenssi

#### HRV Trans 600

TTTAAACAGCGGATGGGTTCCTCCACCATCCGACCCACTGGGTGTAGTACTCTGGTATTTT  
GTACCTTTGTACGCCTGTTTCTCCCTACCTCCCAACCTAAACAATCCTGGTAACTTAGA  
AGACTTAAATCATCGTACAATAGGTGCTGTCACATCCAGTGACGGCTAGTACAAGCACTT  
CTGTTTCCCGGAGCGGAGTATAAATGGCCACCGCTGTCAAAGCTCTTAACCGTTATCC  
GCCAATTAACACTACGCAACGGCTAGTAACATCTTGTTATTTTATAGGGCGTTCGATCAGGTG  
AGTAAACCCCTCACTAGTCTGGTTCGATGAGGCTGAGAATFCCCCACGGGCGACCGTGTCT  
CAGCCTGCGTGGCGGCCAGCCAGCTAATGCTGGGACGCCTTAATTGTGACATGGTGTGA  
AGACCCACGTGTGCTTAATTGTGAGTCCCTCCGGCCCCCTGAATGCGGCTAACCTAAACCT  
GGAGCCTTGAGACACAATCCAGTGTGGCAAGGTCGTAATGAGTAATFCCGGGACGGGAC  
CGACTACTTTGGGTGTCCGTGTTTCTTTTATTTTCAAATTGTTCTTATGGTCACAATAT

#### HRV Trans 600 -geenistä transkriptoitu RNA-sekvenssi

UUUAAACAGCGGAUGGGUUCCTCCACCAUCCGACCCACUGGGUGUAGUACUCUGGUUUUU  
GUACCUUUGUACGCCUGUUUCCTCCUACCUCCCAACCUAAAACAAUCCUGGUAAACUUAGA  
AGACUUAAAUCAUCGUACAAUAGGUGCUGUCACAUCCAGUGACGGCUAGUACAAGCACUU  
CUGUUUCCCGGAGCGGAGUAUAAAUGGCCACCGCUGUCAAAAGCUCUUAACCGUUAUCC  
GCCAAUUAACUACGCAACGGCUAGUAACAUCUUGUUUUUUUAGGGCGUUCGAUCAGGUG  
AGUAAACCCUCACUAGUCUGGUCGAUGAGGCUGAGAAUCCCCACGGGCGACCGUGUCU  
CAGCCUGCGUGGGCGGCCAGCCAGCUAAUGCUGGGACGCCUAAAUUGUGACAUGGUGUGA  
AGACCCACGUGUGCUAAAUUGUGAGUCCUCCGGCCCCUGAAUGCGGCUAACCUAAACCCU  
GGAGCCUUGAGACACAAUCCAGUGUUGGCAAGGUCGUAUUGAGUAAUCCGGGACGGGAC  
CGACUACUUUGGGUGUCCGUGUUUCCUUUUUUUUUCAAUUGUUCUUAUGGUCACAAUUAU

## Liite 4. HRV RT-qPCR-protokollan alukkeet, reaktioliuokset ja ajo-ohjelma

RT-qPCR-protokollan alukkeet:

RW: ENRI 4-	5'- GAA ACA CGG ACA CCC AAA GTA -3'	Lönnrot ym. 1999
FW: ENRI 3+	5'- CGG CCC CTG AAT GCG GCT AA -3'	Lönnrot ym. 1999

RT-reaktion reagenssiliokset:

reagenssi	yksikkö	alkukonsentraatio	loppukonsentraatio	1 reaktio (µl)
ENRI 4-	pmol/µl	10	1,25	5,00
HRV RNA	µl			10,00
<b>Yhteistilavuus</b>				<b>15,00</b>

reagenssi	yksikkö	alkukons.	loppukons.	1x (µl)	tuotetiedot
Nukleaasivapaa vesi				14,80	Sigma-Aldrich, W4502
5X reaktiopuskuri				8,0	Promega, M531A
dNTP-seos	mM	10	0,5	2,0	New England BioLabs, N0447S
RNAasi-inhibiittori	U	40	0,1	0,1	Rnase Out, Invitrogen, 10777-019
RT-entsyymi	U	200	0,5	0,1	M-MLV, Promega, M530A
			Yhteistilavuus	<b>25,00</b>	
Lisää RW + HRV RNA				<b>15,00</b>	
<b>Lopputilavuus</b>				<b>40,00</b>	

qPCR-reagenssiliuos:

reagenssi	yksikkö	alkukons.	loppukons.	1 x (µl)	tuotetiedot
Nukleaasivapaa vesi				7,20	Sigma-Aldrich, W4502
ENRI 4-	pmol/µl	100	0,6	0,15	Eurofins
ENRI 3+	pmol/µl	100	0,6	0,15	Eurofins
Maxima SYBR Green Master Mix (2X)				12,50	Thermo Scientific, K0221
Jaa PCR-kaivoihin			Yhteistilavuus	<b>20,0</b>	
Lisää cDNA-templaatti				<b>5,0</b>	
<b>Reaktiotilavuus</b>				<b>25,0</b>	

RT-qPCR:n ajo-ohjelma:

	95 °C	10 min	45x
Denaturaatio	95 °C	15 s	
Kiinnittyminen	65 °C	25 s	
Monistus	72 °C	40 s	
Sulamiskäyräanalyysi	72 °C - 95 °C, 1°C/5 s		

## Liite 5. HRV RT-qPCR-protokollan alukkeiden kiinnittyminen HRV Trans 600:n sekvenssiin

CLUSTAL O(1.2.1) multiple sequence alignment

```

ENRI4-
HRV_Trans_600
ENRI3+
-----
TTTAAACAGCGGATGGGTCCCCACCATCCGACCCACTGGGTGTAGTACTCTGGTATTTT
-----

ENRI4-
HRV_Trans_600
ENRI3+
-----
GTACCTTTGTACGCCTGTTTCTCCCTACCTCCCAACCTAAACAATCCTGGTAACTTAGA
-----

ENRI4-
HRV_Trans_600
ENRI3+
-----
AGACTTAAATCATCGTACAATAGGTGCTGTACATCCAGTGACGGCTAGTACAAGCACTT
-----

ENRI4-
HRV_Trans_600
ENRI3+
-----
CTGTTTCCCGGAGCGGAGTATAAATGGCCACCCTGTCAAAGCTCTTAACCGTTATCC
-----

ENRI4-
HRV_Trans_600
ENRI3+
-----
GCCAATTAACACTACGCAACGGCTAGTAACATCTTGTATTATTTTAGGGCGTTCGATCAGGTG
-----

ENRI4-
HRV_Trans_600
ENRI3+
-----
AGTAAACCCCTCACTAGTCTGGTGCATGAGGCTGAGAATCCCCACGGGCGACCGTGTCT
-----

ENRI4-
HRV_Trans_600
ENRI3+
-----
CAGCCTGCGTGGCGGCCAGCCAGCTAATGCTGGGACGCCTTAATTGTGACATGGTGTGA
-----

ENRI4-
HRV_Trans_600
ENRI3+
-----
AGACCCACGTGTGCTTAATTGTGAGTCCTCCGGCCCCTGAATGCGGCTAACCTAAACCCT
-----
                                     -CGGCCCTGAATGCGGCTAA-
                                     ENRI 3+
-----

ENRI4-
HRV_Trans_600
ENRI3+
-----
GGAGCCTTGAGACACAATCCAGTGTGGCAAGGTCGTAATGAGTAATCCGGGACGGGAC
-----

                                     ENRI 4-
ENRI4-
HRV_Trans_600
ENRI3+
-----
TACTTTGGGTGTCCGTGTTTC
CGACTACTTTGGGTGTCCGTGTTTCTTTTATTTTCAAATTGTTCTTATGGTCACAATAT
-----

```

## Liite 6. HRV RT-qPCR-protokollan alukkeiden kiinnittyminen HRV-A60:n sekvenssiin

Linjauksessa on huomioitu HRV-A60:n koko genomien ensimmäiset 600 emäsparia.

CLUSTAL O(1.2.1) multiple sequence alignment

```
ENRI3+ -----
HRV-A60 TTAAAACTGGATCCAGGTTGTTCCACCTGGATCTCCTAACGGGAGTAGTACACTATTAT
ENRI4- -----
```

```
ENRI3+ -----
HRV-A60 TACGGTAATTTTGTACGCCAGTTTTATGATCCCCTCCCCCTTTTGTAACTTAGAAGTTAA
ENRI4- -----
```

```
ENRI3+ -----
HRV-A60 ACAAATGACCAATAGGCGCAATCTCCAGATTGTCAAAGGTCAAGCACTTCTGTTTCC
ENRI4- -----
```

```
ENRI3+ -----
HRV-A60 CCGGTCAAAGCTGATATGCTCCAACAGGGCAAAAACAGCTGAGATCGTTACCCGCAAAGT
ENRI4- -----
```

```
ENRI3+ -----
HRV-A60 GCCTACGCAAAGCTTAGTAACACTTTTGAAGTTACGTGGTTGGTCGCTCAGCCAAACCC
ENRI4- -----
```

```
ENRI3+ -----
HRV-A60 ATGGTAGACCTGGCAGATGAGGCTAGAAGTACCCCACTGGCGACAGTGTCTAGCCTGCG
ENRI4- -----
```

```
ENRI3+ -----
HRV-A60 TGGCTGCCTGCACACCCTCTGGGTGTGAAGCCATATAATGGACAAGGTGTGAAGAGCCCC
ENRI4- -----
```

```
ENRI3+ -----
HRV-A60 GTGTGCTCACTTTGAGTCCTCCGGCCCCCTGAATGTTGGCTAACCTTAACCTGCAGCTAGT
ENRI4- -----
```

```
ENRI3+ -----
HRV-A60 GCATGCAATCCAGTATGTATCTAGTCGTAATGAGCAATTGCGGGATGGGACCAACTACTT
ENRI4- -----TACTT
```

```
ENRI3+ -----
HRV-A60 TGGGTGTCCGTGTTTCCTTTTATCCTTATTGATTGCTTATGGTGACAATATATAGTATT
ENRI4- TGGGTGTCCGTGTTTC
```

ENRI 4-

ENRI 3+

CGGCCCCCTGAATGCGGCTAA

GTGGCTAACCTTAACCTGCAGCTAGT

TACTT

## Liite 7. RT-qPCR-ajojen raakadatat

Kvantitointi

9.3.2015

	Ct-arvo	Ct <sub>ka</sub>	Ct <sub>kh</sub>	kopioluku	kopioluku <sub>ka</sub>	T <sub>m</sub>
10 <sup>7</sup> cp	20,66	20,55	0,105	1,00E+07	1,00E+07	81
	20,46	20,55	0,105	1,00E+07	1,00E+07	81
	20,46	20,55	0,105	1,00E+07	1,00E+07	81
	20,61	20,55	0,105	1,00E+07	1,00E+07	81
10 <sup>6</sup> cp	24,1	23,98	0,142	1,00E+06	1,00E+06	81
	23,86	23,98	0,142	1,00E+06	1,00E+06	81
	23,86	23,98	0,142	1,00E+06	1,00E+06	81
	24,11	23,98	0,142	1,00E+06	1,00E+06	81
10 <sup>5</sup> cp	27,33	27,36	0,119	1,00E+05	1,00E+05	81
	27,34	27,36	0,119	1,00E+05	1,00E+05	81
	27,24	27,36	0,119	1,00E+05	1,00E+05	81
	27,52	27,36	0,119	1,00E+05	1,00E+05	81
10 000 cp	31,11	31,01	0,078	1,00E+04	1,00E+04	81
	30,92	31,01	0,078	1,00E+04	1,00E+04	81
	31,01	31,01	0,078	1,00E+04	1,00E+04	80,5
	30,98	31,01	0,078	1,00E+04	1,00E+04	80,5
1000 cp	34,74	34,33	0,363	1,00E+03	1,00E+03	80,5
	33,91	34,33	0,363	1,00E+03	1,00E+03	80,5
	34,18	34,33	0,363	1,00E+03	1,00E+03	80,5
	34,48	34,33	0,363	1,00E+03	1,00E+03	80,5
100 cp	38,95	37,54	1,284	1,00E+02	1,00E+02	80,5
	36,43	37,54	1,284	1,00E+02	1,00E+02	80,5
	37,26	37,54	1,284	1,00E+02	1,00E+02	80,5
	-	-	-	-	-	-
10 cp	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-
1 cp	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-
10 <sup>7</sup> cp RNA	37,54	37,94	0,57	1,11E+02	8,78E+01	81
	-	-	-	-	-	-
	38,35	37,94	0,57	6,46E+01	8,78E+01	80,5
NTC	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-



## Lyysauspuskurin inkubointi

2.3.2015

Virussusp. laimennos	Inkubointi	Ct-arvo	Ct <sub>ka</sub>	kopioluku	kopioluku <sub>ka</sub>	T <sub>m</sub>
1:10	Ei	24,48	24,385	4,91E+04	5,25E+04	80,5
		24,29		5,60E+04		80,5
1:10	Kyllä	25,8	25,845	1,98E+04	1,93E+04	80,5
		25,89		1,87E+04		80,5
1:100	Ei	31,17	30,225	5,04E+02	1,17E+03	79,5
		29,28		1,84E+03		80,5
1:100	Kyllä	29,25	29,165	1,87E+03	1,99E+03	80,5
		29,08		2,10E+03		80,5
1:1000	Ei	34,94	34,625	3,81E+01	4,85E+01	80,5
		34,31		5,89E+01		80,5
1:1000	Kyllä	32,66	32,66	1,82E+02	1,82E+02	80
		32,66		1,82E+02		80
PBS	Ei	-	-	-	-	-
		-		-		-
PBS	Kyllä	43,56	43,56	1,05E-01	1,05E-01	-
		-		-		-
10 <sup>7</sup> cp		17,25	17,165	1,00E+07	1,00E+07	82
		17,08		1,00E+07		81,5
10 <sup>6</sup> cp		19,78	19,79	1,00E+06	1,00E+06	81
		19,8		1,00E+06		81
10 <sup>5</sup> cp		23,1	23,075	1,00E+05	1,00E+05	81
		23,05		1,00E+05		81
10 000 cp		26,47	26,53	1,00E+04	1,00E+04	81
		26,59		1,00E+04		81
1000 cp		30,2	30,175	1,00E+03	1,00E+03	81
		30,15		1,00E+03		81
100 cp		34,3	34,47	1,00E+02	1,00E+02	81
		34,64		1,00E+02		81
10 cp		36,01	36,42	1,00E+01	1,00E+01	80,5
		36,83		1,00E+01		81
NTC		-	-	-	-	-
		-		-		-

## Lyysauspuskureiden ja magneettipartikkeleiden vertailu

5.3.2015

Virus-susp. laimennos	Lyysauspuskuri	Mg-partik.	Ct-arvo	Ct <sub>ka</sub>	kopioluku	kopioluku <sub>ka</sub>	T <sub>m</sub>
1:10	1	A	25	24,84	3,08E+05	3,48E+05	80,5
			24,68	24,84	3,87E+05	3,48E+05	80,5
1:10	1	B	25,11	25,11	2,85E+05	2,85E+05	80,5
			25,11	25,11	2,85E+05	2,85E+05	80,5
1:10	1	C	26,43	26,49	1,11E+05	1,07E+05	80,5
			26,54	26,49	1,03E+05	1,07E+05	80,5
1:10	2	A	24,25	24,35	5,24E+05	4,90E+05	80,5
			24,45	24,35	4,57E+05	4,90E+05	80,5
1:10	2	B	25,93	25,8	1,60E+05	1,75E+05	80,5
			25,68	25,8	1,90E+05	1,75E+05	80,5
1:10	2	C	24,41	24,43	4,68E+05	4,64E+05	80,5
			24,44	24,43	4,61E+05	4,64E+05	80,5
1:10	3	A	24,88	24,91	3,35E+05	3,28E+05	80,5
			24,94	24,91	3,21E+05	3,28E+05	80,5
1:10	3	B	25,44	25,61	2,26E+05	2,01E+05	80,5
			25,79	25,61	1,76E+05	2,01E+05	80,5
1:10	3	C	26,02	25,85	1,50E+05	1,70E+05	80,5
			25,68	25,85	1,90E+05	1,70E+05	80,5
1:1000	1	A	33,73	34,18	6,21E+02	4,75E+02	80
			34,63	34,18	3,28E+02	4,75E+02	80
1:1000	1	B	34,57	34,08	3,43E+02	5,16E+02	80
			33,58	34,08	6,89E+02	5,16E+02	80
1:1000	1	C	35,53	35,41	1,73E+02	1,88E+02	80
			35,3	35,41	2,04E+02	1,88E+02	80
PBS	1	A	-	-	-	-	-
			-	-	-	-	-
10 <sup>6</sup> cp			23,15	23,22	1,00E+06	1,00E+06	85
			23,29	23,22	1,00E+06	1,00E+06	87,5
10 <sup>5</sup> cp			26,62	26,51	1,00E+05	1,00E+05	85
			26,4	26,51	1,00E+05	1,00E+05	86
10 000 cp			29,74	29,94	1,00E+04	1,00E+04	86
			30,13	29,94	1,00E+04	1,00E+04	85
1000 cp			33,34	33,56	1,00E+03	1,00E+03	84,5
			33,78	33,56	1,00E+03	1,00E+03	85,5
100 cp			35,47	35,47	1,00E+02	1,00E+02	88
			-	-	-	-	-
10 cp			-	-	-	-	-
			-	-	-	-	-
NTC			-	-	-	-	-
			-	-	-	-	-

## Lyysauspuskureiden ja magneettipartikkeleiden vertailu

9.3.2015

Virus-susp. laimennos	Lyysauspuskuri	Mg-partik.	Ct-arvo	Ct <sub>ka</sub>	kopioluku	kopioluku <sub>ka</sub>	T <sub>m</sub>
1:1000	1	A	34,98	34,96	6,19E+02	6,31E+02	80
			34,93	34,96	6,43E+02	6,31E+02	80
1:1000	1	B	34,57	35,11	8,15E+02	6,05E+02	80
			35,65	35,11	3,95E+02	6,05E+02	80
1:1000	1	C	36,08	36,5	2,97E+02	2,32E+02	80
			36,93	36,5	1,68E+02	2,32E+02	80
1:1000	2	A	32,07	31,98	4,40E+03	4,66E+03	80
			31,9	31,98	4,93E+03	4,66E+03	80
1:1000	2	B	33,93	34,32	1,26E+03	1,00E+03	80
			34,71	34,32	7,44E+02	1,00E+03	80
1:1000	2	C	34,68	34,54	7,62E+02	8,40E+02	80
			34,4	34,54	9,17E+02	8,40E+02	80
1:1000	3	A	34,03	34,08	1,18E+03	1,14E+03	80
			34,12	34,08	1,10E+03	1,14E+03	80
1:1000	3	B	34,61	34,99	7,94E+02	6,35E+02	80
			35,37	34,99	4,76E+02	6,35E+02	80
1:1000	3	C	36,11	35,75	2,91E+02	3,79E+02	80
			35,4	35,75	4,67E+02	3,79E+02	80
Nenäerite	1	A	-	-	-	-	-
			-	-	-	-	-

Samassa RT-qPCR-ajossa toteutettiin myös kvantitointi.

## Magneettipartikkeleiden määrän ja eluutiopuskureiden vertailu

11.3.2015

Eluutio- puskuri	Näyttemateriaali	Partikkeli- tilavuus	Ct-arvo	Ct <sub>ka</sub>	kopioluku	kopioluku <sub>ka</sub>	T <sub>m</sub>	
TE-puskuri	Viruspartikkelit	pienempi	33,57	32,94	874,8	1,46E+03	80	
			32,32	32,94	2036	1,46E+03	80	
	Viruspartikkelit + räkä	pienempi	37,52	37,52	60,74	6,07E+01	80	
			-	-	-	-	-	
	Viruspartikkelit	suurempi	33,27	33,3	1071	1,05E+03	80	
			33,33	33,3	1026	1,05E+03	80	
			Viruspartikkelit + räkä	38,36	39,62	34,58	2,04E+01	80
				40,89	39,62	6,294	2,04E+01	80
SIBA-eluu- tiopuskuri	Viruspartikkelit	pienempi	35,93	35,66	177,5	2,17E+02	80	
			35,39	35,66	255,6	2,17E+02	80	
	Viruspartikkelit + räkä	pienempi	-	-	-	-	-	
			-	-	-	-	-	
	Viruspartikkelit	suurempi	34,53	34,27	457,4	5,55E+02	80	
			34	34,27	653,4	5,55E+02	80	
			Viruspartikkelit + räkä	-	-	-	-	-
				-	-	-	-	-
TE-puskuri	PBS	pienempi	-	-	-	-		
			-	-	-	-		
	10 <sup>7</sup> cp		19,5	19,49	1,00E+07	1,00E+07	81	
			19,48	19,49	1,00E+07	1,00E+07	81	
	10 <sup>6</sup> cp		23,23	23,19	1,00E+06	1,00E+06	81	
			23,14	23,19	1,00E+06	1,00E+06	81	
	10 <sup>5</sup> cp		26,39	26,58	1,00E+05	1,00E+05	80,5	
			26,76	26,58	1,00E+05	1,00E+05	81	
	10 000 cp		29,89	30,05	1,00E+04	1,00E+04	81	
			30,22	30,05	1,00E+04	1,00E+04	80,5	
	1000 cp		33,38	33,91	1,00E+03	1,00E+03	80,5	
			34,45	33,91	1,00E+03	1,00E+03	80,5	
	100 cp		36,29	36,26	1,00E+02	1,00E+02	80,5	
			36,24	36,26	1,00E+02	1,00E+02	80,5	
	10 cp		-	-	-	-	-	
			-	-	-	-	-	
	NTC		-	-	-	-	-	
			-	-	-	-	-	

Nenänielunäytteet

9.3.2015

Näyttemateriaali	Ct-arvo	Ct <sub>ka</sub>	kopioluku	kopioluku <sub>ka</sub>	T <sub>m</sub>
Nenänielu 1	-	-	-	-	-
Nenänielu 2	-	-	-	-	-
Nenänielu 3	-	-	-	-	-
Nenänielu 4	-	-	-	-	-
Nenänielu 5	-	-	-	-	-
Nenänielu 6	-	-	-	-	-
Nenänielu 7	-	-	-	-	-
Nenänielu 7 + viruspartikkelit	33,75 34	33,88 33,88	1,42E+03 1,20E+03	1,31E+03 1,31E+03	80 80
viruspartikkelit	32,65 32,76	32,71 32,71	2,97E+03 2,77E+03	2,87E+03 2,87E+03	80 80
PBS	-	-	-	-	-

Samassa RT-qPCR-ajossa toteutettiin myös kvantitointi.

## Näytteenkäsittelymenetelmän tehokkuuden vertailu EZ1-eristysrobottiin

12.3.2015

Eristysmenetelmä	Virussusp. laim.	Ct-arvo	Ct <sub>ka</sub>	Ct <sub>kh</sub>	kopioluku	kopioluku <sub>ka</sub>	T <sub>m</sub>	
Kehitettävä näytteenkäsittelymenetelmä	1:10	28,16	26,69	2,074	5,37E+04	2,09E+05	79,5	
		25,23	26,69	2,074	3,65E+05	2,09E+05	80	
		25,01	25	0,016	4,20E+05	4,23E+05	80	
		24,99	25	0,016	4,26E+05	4,23E+05	80	
	1:100	30,1	30,12	0,026	1,51E+04	1,50E+04	80	
		30,14	30,12	0,026	1,48E+04	1,50E+04	80	
		29,3	30,05	1,063	2,56E+04	1,76E+04	80	
		30,8	30,05	1,063	9,58E+03	1,76E+04	80	
	1:1000	33,93	33,08	1,201	1,24E+03	2,51E+03	80	
		32,23	33,08	1,201	3,77E+03	2,51E+03	80	
		32,16	32,09	0,096	3,94E+03	4,12E+03	80	
		32,02	32,09	0,096	4,31E+03	4,12E+03	80	
	Räkä	-	-	-	-	-	-	
	PBS	-	-	-	-	-	-	
			42,56	42,56	0	4,42E+00	4,42E+00	-
	EZ1 DSP Virus Kit	1:10	21,44	21,05	0,26	4,34E+06	5,65E+06	80,5
			20,88	21,05	0,26	6,24E+06	5,65E+06	80
			20,96	21,05	0,26	5,95E+06	5,65E+06	80
			20,92	21,05	0,26	6,08E+06	5,65E+06	80
		1:100	25,41	25,39	0,271	3,24E+05	3,33E+05	80
25,18			25,39	0,271	3,76E+05	3,33E+05	80	
25,2			25,39	0,271	3,73E+05	3,33E+05	80	
25,76			25,39	0,271	2,57E+05	3,33E+05	80	
1:1000		29,43	29,51	0,23	2,35E+04	2,24E+04	80	
		29,82	29,51	0,23	1,81E+04	2,24E+04	80	
		29,28	29,51	0,23	2,59E+04	2,24E+04	80	
		29,53	29,51	0,23	2,20E+04	2,24E+04	80	
10 <sup>7</sup> cp		20,23	20,17	0,084	1,00E+07	1,00E+07	81	
		20,11	20,17	0,084	1,00E+07	1,00E+07	81	
10 <sup>6</sup> cp		23,43	23,68	0,358	1,00E+06	1,00E+06	80,5	
		23,93	23,68	0,358	1,00E+06	1,00E+06	80,5	
10 <sup>5</sup> cp		27,18	27,18	0,008	1,00E+05	1,00E+05	81	
		27,17	27,18	0,008	1,00E+05	1,00E+05	80,5	
10 000 cp		30,94	30,89	0,061	1,00E+04	1,00E+04	80,5	
		30,85	30,89	0,061	1,00E+04	1,00E+04	80,5	
1000 cp		33,98	34,04	0,09	1,00E+03	1,00E+03	80,5	
		34,1	34,04	0,09	1,00E+03	1,00E+03	80,5	
100 cp		37,97	37,97	0	1,00E+02	1,00E+02	80,5	
		-	-	-	-	-	-	
10 cp		-	-	-	-	-	-	
		-	-	-	-	-	-	
NTC		-	-	-	-	-	-	
		-	-	-	-	-	-	