

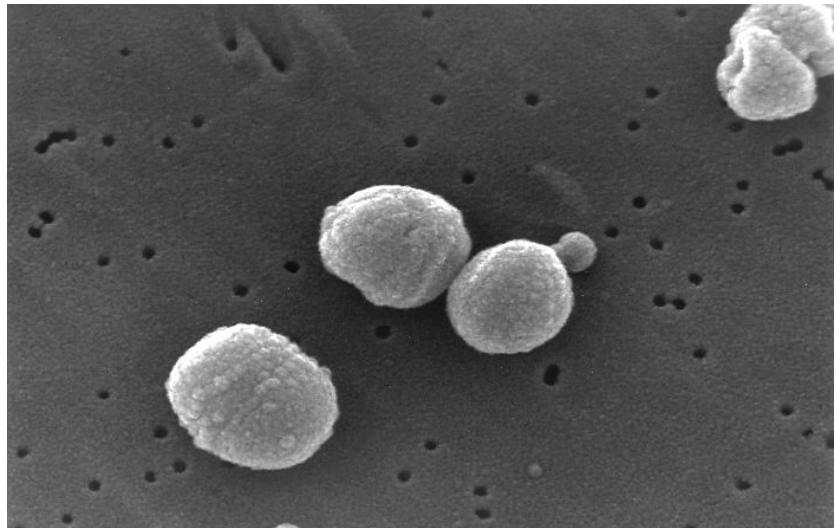
Pysäytä sairaalainfektio!

Työn tavoite Työssä sovelletaan geeniteknikan perusmenetelmiä lääketieteellisessä diagnostiikassa tutkien, onko kuvitteellisella potilaalla mutatoituneen bakteerikannan aiheuttama infektio. Tavoitteena on polymeerasiketjureaktion ja elektroforeesin periaatteiden ja sovel-lusmahdollisuuksien ymmärtäminen. Lisäksi työssä opetellaan aseptista työskentelyä sekä erilaisten laboratoriomenetelmien käyttöä.

Työn kesto 3 h.

Johdanto

Viikin yliopistollisessa kes-kussairaalassa (VYKS) on ha-vaittu vakavaa keuhkokuu-metta aiheuttava sairaalabakteeri. Tämä sairaalabakteeri on tavallisesta, yleisinfektioita aiheuttavasta villityypin pneumokokista (*Streptococcus pneumoniae*) kehittynyt erit-täin vaarallinen muoto. Uuden sairaalabakteerin on havaittu aiheuttavan ankaraa hen-genahdistusta ja nopeaa yleiskunnon heikkenemistä.



Kuva 1. *Streptococcus pneumoniae* -bakteereita elektronimikroskooppikuvassa (Janice Carr & Richard Facklam, Wikimedia Commons, CC0)

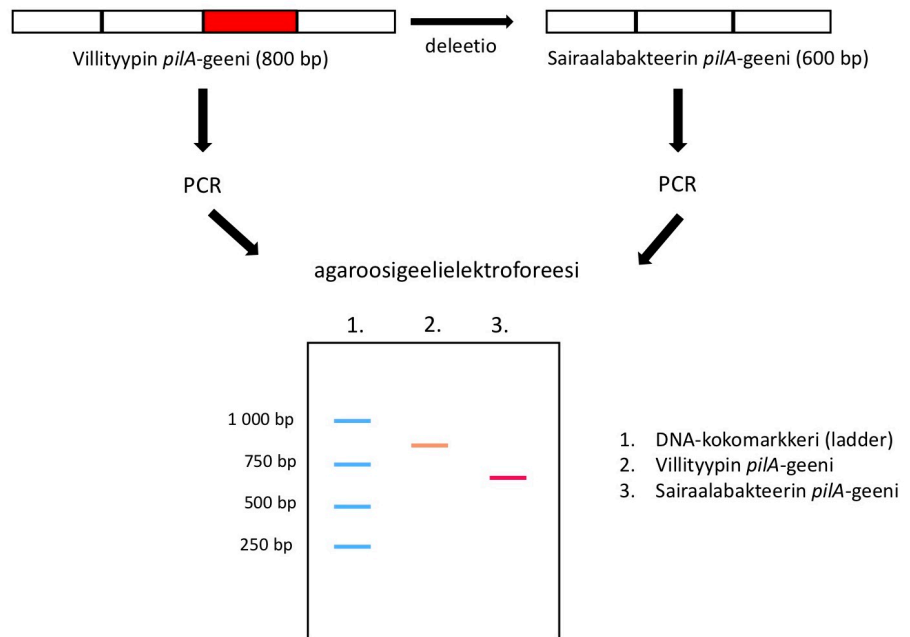
Sairaalabakteeria on onneksi onnistuttu viljelemään ja sen DNA:ta on saatu eristettyä.

Sairalamikrobiologeista ja -geneetikoista koostuva ryhmä on tutkinut sairaalabakteerin genomia ja havainnut, että sen genomissa on tapahtunut noin 200 emäsparin deleetio eli häviämä bakteerin piluksia koodaavan geenin (*pilA*) kohdalla. Uuden sairaalabakteerin pilukset eli värekarvat ovat tämän vuoksi eri muotoisia kuin villityypin pneumokokilla. Uudenlais-ten pilustensa ansiosta sairaalabakteeri tarttuu hanakammin ihmisen hengitysteihin, mikä lisää sen taudinaiheuttamiskykyä. Deleetion vuoksi sairaalabakteeri pääsee tunkeutumaan kehoon, kiinnittymään hengitysteihin ja lisääntymään tehokkaasti.

Deleetion tunnistamisen ansiosta ryhmä on pystynyt kehittämään PCR-perusteisen testin sairaalabakteerin havaitsemiseen potilailla, joiden epäilläään kärsivän uuden sairaalabakteer- in aiheuttamasta infektiosta. Testissä potilaasta eristetyn bakteerin DNA:ta monistetaan PCR:ssa, mikä edellyttää tietoa patogeeniä esiintyvistä geenisekvensseistä. Testi perustuu siihen, että sairaalabakteerin *pilA*-geenissä tapahtuneen deleetion vuoksi sairaalabakteeri ja alkuperäinen villityyppi tuottavat PCR-reaktiossa erimittaisia lopputuotteita, kun niiden *pilA*-geeniä monistetaan. PCR-tuotteiden pituudet arvioidaan geelielektroforeesin avulla.

Mikäli elektroforeesissa havaitaan tutkitulle sairaalabakteerille tyypillisen pituinen geenipala, potilaalle voidaan diagnosoida sairaalabakteerin aiheuttama infektio.

VYKS:iin on edellisellä viikolla saapunut viisi potilasta, jotka nyt kärsivät vakavista keuhkokuumeen oireista. Heillä epäillään uuden sairaalabakteerin aiheuttamaa infektiota. Jokaiselta on otettu nieluviljely ja kasvatettujen bakteerien DNA:ta on eristetty. Pelkän viljelyn perusteella ei eroteta, onko kyseessä sairaalabakteeri vai alkuperäinen villityyppi, sillä kyseessä on sama bakteerilaji, jossa on vain tapahtunut n. 200 emäsparin deleetio *pilA*-geenissä.



Kuva 2. Työn periaate. Työssä monistetaan bakteeri-DNA:ta ja monistetut palat ajetaan geelielektroforeesissa. Palojen koosta voidaan päätellä, onko näytteessä sairaalabakteerin vai villityypin *pilA*-geeniä, sillä tämä geeni on sairaalabakteerilla 200 emäsparia (base pairs, bp) lyhyempi deleetion vuoksi.

Tehtävänäsi on selvittää, onko jollakin potilaista sairaalabakteerin aiheuttama infektio, jotta sairaalainfektioista kärsiville potilaille voidaan antaa suonensisäistä laajakirjoista antibioottia ja jotta potilaat voidaan pikaisesti eristää ja siten estää sairaalabakteerin leviäminen.

Taustatietoa

Sairaalainfektioksi kutsutaan infektioita, jonka potilas on saanut sairaalahoidon tai muun hoidon aikana, ja näiden tautien aiheuttajia kutsutaan kansanomaisesti ”sairaalabakteereiksi”. Sairaalainfektion voi aiheuttaa tavallinen, ihmiselle luontainen bakteeri, mutta sairaalaympäristössä tämä viaton bakteeri voi aiheuttaa infektion etenkin silloin, kun potilaan vastustuskyky on heikentynyt. Riski saada sairaalainfektio on suurin vakavasti sairailta sekä leikkaushoitoa tarvitsevilla potilailla. Suomessa sairaalakeuhkokuume on yleisin vakava sairaalainfektio. Antibioottiresistenssi ei ole sairaalabakteerille välttämätön ominaisuus. Joillekin sairaalainfektioita aiheuttaville bakteereille on kehittynyt antibioottiresistenssejä, mikä tekee niistä hankalampia hoitaa. Tällainen on esimerkiksi metisilliinille resistentti *Staphylococcus aureus* (MRSA), joka on yksi sairaalakeuhkokuumetta aiheuttavista mikrobeista.

PCR eli polymeraasiketjureaktio on menetelmä, jonka avulla haluttua DNA-palaa voidaan monistaa eksponentiaalisesti. PCR-reaktiossa tarvitaan monistettavan DNA:n lisäksi alukkeita, DNA-polymeraasia ja nukleotidejä. DNA-polymeraasi on entsyymi, joka pystyy syntetisoimaan uutta DNA-juostetta vapaista nukleotideista käyttäen mallinaan olemassa olevaa DNA-juostetta. Alukkeet ovat lyhyitä, n. 15-25 nukleotidin mittaisia yksijuosteisia synteettisiä oligonukleotideja. PCR-reaktiossa tarvitaan kaksi eri aluketta. Toinen alukkeista on

Tämä teos on lisensoitu Creative Commons Nimeä-JaaSamoin 4.0 Kansainvälinen –lisenssillä. Salla Merenheimo / BioPop-tiedeluokka 2019.

sekvenssiltään komplementaarinen monistettavan DNA-alueen alkupään kanssa ja toinen vastaavasti monistettavan DNA-alueen loppupään kanssa. Molempien alukkeiden 3' -päässä on vapaa OH-ryhmä, johon DNA-polymeraasi pystyy kiinnittämään uusia nukleotideja.

PCR-reaktiossa käytettävät polymeraasientsyymit ovat peräisin kuumista lähteistä eristetyistä bakteereista ja siksi nämä entsyymit sietävät luonnostaan korkeita lämpötiloja. Korkean lämpötilan sietokyky on edellytys PCR:ssa käytettäville polymeraaseille, sillä PCR perustuu lämpötilan avulla kontrolloituun DNA-juosteiden erottamiseen, alukkeiden pariutumiseen ja DNA-synteesiin. PCR-reaktio koostuu kolmesta eri vaiheesta (Taulukko 1), joita toistetaan sykleinä. Syklejä toistetaan tyypillisesti noin 20-30 kertaa, jotta haluttua DNA:ta saadaan monistettua riittävästi. Jokaisen syklin aikana DNA:n määrä kaksinkertaistuu.

Taulukko 1. PCR:n vaiheet

Vaihe	Lämpötila	Kuvaus
1. DNA-juosteiden denaturatio	94 °C	Korkea lämpötila saa aikaan kaksijuosteisen DNA:n denaturaation, jolloin juosteiden väliset vetysidokset katkeavat ja syntyy kaksi yksijuosteista DNA-templaattia.
2. Alukkeiden pariutuminen	55 °C	Alukkeet pariutuvat yksijuosteiseen templaattiin emäsjärjestyksen mukaisesti.
3. Uusien juosteiden synteesi	72 °C (DNA-polymeraasin optimilämpötila)	Polymeraasi kiinnittyy alukkeeseen ja alkaa liittää vapaita nukleotideja alukkeen 3' -päähän.

Agaroosigeelielektroforeesin avulla voidaan määrittää PCR-reaktiossa tuotettujen DNA-palojen koko. Elektroforeesissa luodaan sähkökenttä elektroforeesikammioon, jolloin sähköisesti varautuneet aineet alkavat kulkeutua sähkökentässä vastakkaismerkkistä varausta kohti. DNA-molekyylit ovat fosfaattiryhmiensä johdosta negatiivisesti varautuneita molekyylejä, joten ne kulkeutuvat elektroforeesissa kohti laitteen positiivista elektroodia.

DNA-molekyylin kulkeutumisenopeus riippuu sen pituudesta. Elektroforeesissa DNA-molekyylejä ajetaan agaroosigeelissä, ja geelin verkkomainen rakenne hidastaa suurikokoisten molekyyliden kulkua. Tämän vuoksi lyhyet DNA-molekyylit kulkeutuvat elektroforeesin aikana nopeammin kuin pitkät DNA-molekyylit. Geelijaon jälkeen DNA-palaset erottuvat UV-valossa niihin kiinnitetyn väriaineen ansiosta.

Pohdittavaksi ennen työtä

1. Kuinka monta DNA-palaa yhdestä DNA-palasta syntyy, jos palaa monistetaan PCR:ssa 20 syklin ajan?
2. Mihin elektroforeesia voidaan käyttää?
3. Kumman bakteerin *pilA*-geenipala ajautuu elektroforeesissa pidemmälle, villityypin vai sairaalabakteerin? Perustele vastauksesi.
4. Käsittelet työssä bakteerista eristettyä DNA-näytettä, joka sisältää *pilA*-geenin. Pohdi, miten tämä näyte voitu valmistaa.

Työssä tarvittavat välineet

- Pakastimessa säilytettävät reagenssit
 - o **dNTP mix** -nukleotidiseos (1 mM)
 - o **10 x buffer** -polymeraasipuskuriliuos
 - o Forward-aluke (**FWD**)
 - o Reverse-aluke (**REV**)
 - o potilaasta eristetty bakteeri-DNA (potilaat **A-D**)
 - o Dream**Taq** -polymeraasientsyymi
 - o **6xLD**-latauspuskuri
 - o DNA-kokomarkkeri (**M+DYE**)
- Steriiliä MQ-vettä
- Mikropipettejä ja kärkiä
- jäähaude
- 500 μ l PCR-mikroputkia
- Eppendorf-telineitä
- Sentrifugi
- PCR-laite
- agarosijauhe
- tarkka vaaka agarosin punnitsemiseen
- 1 x TAE -puskuriliuosta (geelipuskuri)
- 0,25 x TAE -puskuriliuosta (elektroforeesipuskuri)
- Etidiumbromidia (vain ohjaaja käyttää)
- 100 ml mittalasi
- erlenmayer-pullo
- mikroaaltouuni
- agarosielektroforeesilaitteisto, virtalähde, geelikelkka ja -kamat
- Permanent-tusseja
- maalarinteippiä

Työturvallisuus

- Laboratoriotilassa ei saa syödä eikä juoda.
- Käytä suojahanskoja ja -takkaa koko työn ajan.
- Mikäli geelin valmistuksessa käytetään etidiumbromidia, ohjaaja pipetoi sen geeli-seokseen. Käsittele etidiumbromidilla värjättyä geeliä sekä geelياجossa käytettäviä välineitä vain suojahanskat kädessä. EthBr-geeli hävitetään vaarallisena jätteenä.
- PCR-tekniikka on hyvin herkkä menetelmä. Näytteet kontaminoituvat helposti esimerkiksi käsissä olevasta DNA:sta. Käytä suojahanskoja käsitellessäsi reagensseja ja mikroputkia estääksesi näytteiden kontaminaation.
- Käytä PCR-laitetta ja elektroforeesin virtalähdettä vain ohjaajan avustuksella.

Työohje

Tutustu ohjaajan opastuksella mikropipetin käyttöön ennen työn aloittamista.

Potilaasta eristetyn bakteeri-DNA:n monistaminen PCR:lla

1. Ota esille DNA-näytteet, alukkeet, nukleotidit, entsyymi ja puskuriliuos. Pidä näitä liuoksia jäähauteessa koko työn ajan.
2. Ohjaaja kertoo sinulle, mistä potilaasta eristetyn bakteeri-DNA-näytteen valmistat. Nimeä PCR-mikroputki potilaan nimen alkukirjaimen mukaan.
3. Pipetoi PRC-mikroputkeen aineita alla olevan taulukon mukaisesti. Huolehdi, että pipetoit mikroputkeen sinulle nimetystä potilaasta eristettyä bakteeri-DNA:ta. Pipetoi putkeen ensin vesi ja sitten muut aineet siten, että ne jäävät vesimäärän ”sisään”.

MQ- vesi	dNTP- nukleotidit	10x -puskuri	FWD- aluke	REV- aluke	DNA-näyte potilas A-E	Taq-poly- meraasi	Yhteistila- vuus
32 μ l	5 μ l	5 μ l	2,5 μ l	2,5 μ l	2 μ l	1 μ l	50 μ l

4. Kun olet pipetoinut aineet taulukon mukaan, sekoita sisältöä napauttamalla ja sentrifugoi neste pohjalle. Muista tasapainottaa sentrifugi!
5. Ohjelmoi PCR-laitteeseen seuraava ohjelma:
 - i. 94 °C 1 min
 - ii. 94 °C 45 s
 - iii. 55 °C 30 s
 - iv. 72 °C 1 min
 - v. Go to step 2, 16 more times
 - vi. 72 °C 1 min
 - vii. 10 °C
6. Aseta mikroputket PRC-laitteeseen ja käynnistä PCR-ajo. Kirjaa ylös laitteen ajoaika. Valmista agarosigeeli ajon aikana.

Agarosigeelin (1 %) valmistaminen (2 kpl geelejä)

1. Punnitse 1 g agarosia erlenmayerin pohjalle.
2. Lisää joukkoon 100 ml 1 x TAE -puskuria. Sekoita kevyesti.
3. Kuumenna seosta varovasti mikroaaltouunissa välillä sekoitellen, kunnes seos on kirkasta. Seos ei saa kiehua. Anna seoksen hieman jäähtyä kuumennuksen jälkeen.
4. **Ohjaaja** lisää seokseen 3 tippaa etidiumbromidia.
5. Kaada hieman jäähtynyt neste kelkkaan. Aseta kammot paikoilleen ja anna geelin jähmettyä.

PCR-tuotteiden analysointi agarosigeelielektroforeesin avulla

1. Kasaa elektroforeesilaitteisto ohjaajan avustuksella. Aseta geeli kelkassaan ajokammioon ja lisää elektroforeesipuskuriliuosta, kunnes geeli peittyy.
2. PRC-ajon valmistuttua ota mikroputket laitteesta ja siirrä ne työpöydälle.
3. Pipetoi uuteen mikroputkeen 10 μ l valmistettua PCR-näytettä ja 2 μ l **6x LD**-latauspuskuriliuosta. Sekoita sisältöä napauttamalla ja sentrifugoi neste pohjalle.
4. **Ohjaaja** pipetoi geelin ensimmäiseen kuoppaan 10 μ l DNA-kokomarkkeria (**M+DYE**).
5. Pipetoi 12 μ l PCR-seosta agarosigeelin kuoppaan. Pipetoi vain yhtä reaktiota yhteen kuoppaan. Kirjaa ylös, mihin kuoppaan mikäkin näyte pipetoiin, jotta pystyt tulkitsemaan tuloksia geeliajon jälkeen.
6. Aja geeliä 200 V jännitteellä 20-30 minuutin ajan. Tarkkaile näytteiden ajautumista ajon aikana.
7. Tarkastele geeliä UV-lampun alla.

Pohdittavaksi työn jälkeen

1. Oliko potilaasi sairastunut sairaalabakteerin aiheuttamaan infekioon? Perustele vastauksesi.
2. Mitä olisi tapahtunut, jos näytteitten testaja olisi unohtanut näytteet ajautumaan geelielektroforeesissa 200 V jännitteellä kahden tunnin ajaksi?
3. Pohdi, mikä työssä oli faktaa ja mikä fiktiota.