



SEINÄJOEN AMMATTIKORKEAKOULU
SEINÄJOKI UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Emilia Salonen

PCR-analyysin inhibitiot elintarviketeollisuuden patogeeni- tutkimuksissa

Opinnäytetyö

Kevät 2024

Insinööri (AMK), Bio- ja elintarviketekniikka



SEINÄJOEN AMMATTIKORKEAKOULU

Opinnäytetyön tiivistelmä

Tutkinto-ohjelma: Insinööri (AMK), Bio- ja elintarviketekniikka

Tekijä: Emilia Salonen

Työn nimi alaotsikoinen: PCR-analyysin inhibitiot elintarviketeollisuuden patogeenitutkimuksissa

Ohjaaja: Sarita Ventelä

Vuosi: 2024

Sivumäärä: 18

Patogeenitutkimukset ovat tärkeä osa elintarviketeollisuuden valvontaa. Nopein ja yksinkertaisin tapa patogeenien havaitsemiseen on PCR-analyysi. Aina PCR-reaktio ei kuitenkaan onnistu. Reaktion epäonnistuessa laite antaa tulokseksi inhibition, jolloin patogeenin mahdollista läsnäoloa on tutkittava uudestaan. Tässä opinnäytetyössä tutkittiin inhibitioiden esiintymistä PCR-analyyseissä. Tutkimus tehtiin Atria Suomi Oy:lle. Tavoitteena oli löytää heidän laboratorionsa patogeenanalyysiin liittyviä inhiboivia tekijöitä, jotta näytteistä saataisiin mahdollisimman vähän inhibitiotuloksia.

Inhibiioita aiheuttavia tekijöitä etsittiin kirjallisuudesta, ja lisäksi laboratorion sisäisistä tiedoista, kuten aiemmista PCR-analyysien tuloksista ja henkilökunnan työskentelytavoista. Tämä opinnäytetyö sisältää katsauksen yleisimpiin elintarvikkeista tutkittaviin patogeeneihin sekä PCR-menetelmään, PCR-analyysia inhiboivia tekijöitä sekä kokeellisen osion, jossa aiheuttajia etsittiin laboratoriossa. Opinnäytetyö sisältää salaista tietoa laboratorion sisäisiä asioita koskien, jonka vuoksi julkisesta versiosta puuttuu tulokset sekä käytetyn PCR-laitteen tarkemmat tiedot.

Merkittäviä uusia inhibitioiden aiheuttajia ei Atrian laboratorion kannalta tutkimuksessa löydetty. Kuitenkin joistain löydöksistä voitaisiin tehdä jatkotutkimuksia, mikä saattaisi antaa hyödyllisiä tuloksia aiheesta.

SEINÄJOKI UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Thesis abstract

Degree programme: Bachelor of Engineering, Food Processing and Biotechnology

Author/s: Emilia Salonen

Title of thesis: Inhibitions of PCR analysis in food industry pathogen detection

Supervisor(s): Sarita Ventelä

Year: 2024

Number of pages: 18

Pathogen detection is an important part of the food safety control in food industry. The fastest and simplest way to detect pathogens is PCR analysis. However, the PCR reaction is not always successful. If the reaction fails, the device gives inhibition as a result. In this case the possible presence of the pathogen must be investigated again. In this thesis, the occurrence of inhibitions in PCR analyses was investigated. The research was done for Atria Suomi Oy. The goal was to find the inhibitors related to the pathogen analyses in their laboratory, to decrease the number of inhibitions in PCR analyses.

Inhibitors that could cause inhibitions were investigated using literature reviews and internal laboratory information, including previous PCR analysis results and the working methods among the laboratory staff. This thesis introduces the most common pathogens detected in food, the PCR method, factors that inhibit PCR analysis, and an experimental section where inhibitors were searched for in the laboratory. The thesis contains secret information regarding the internal affairs of the laboratory. The public version does not show the results and more detailed information on the PCR device used.

For the Atria laboratory, no significant new inhibitors were found in the study. However, some findings could be further researched, which might give useful results on the subject.

¹ Keywords: polymerase chain reaction, inhibition, fluorescence resonance energy transfer

SISÄLTÖ

| | |
|---|----|
| Thesis abstract | 2 |
| SISÄLTÖ | 3 |
| Kuva-, kuvio- ja taulukkoluetelo | 4 |
| Käytetyt termit ja lyhenteet | 5 |
| 1 JOHDANTO | 6 |
| 2 PATOGEENITUTKIMUKSET ELINTARVIKETEOLLISUUDESSA | 7 |
| 2.1 Tutkimusmenetelmät | 7 |
| 2.2 Tutkittavat patogeenit | 8 |
| 2.2.1 Listeria monocytogenes | 8 |
| 2.2.2 Salmonella | 9 |
| 3 POLYMERAASIKETJUREAKTIO | 10 |
| 3.1 Menetelmän toiminta | 10 |
| 3.2 Fluoresenssiresonanssi energiansiirto | 11 |
| 3.3 Inhibiittorit ja niiden ehkäiseminen | 13 |
| 3.3.1 Inhibiittorit biologisissa materiaaleissa ja ympäristössä | 13 |
| 3.3.2 Kemialliset inhibiittorit | 14 |
| 3.3.3 Inhibiittoreiden vaikutuksen vähentäminen | 14 |
| 4 KOKEELLINEN OSIO | 15 |
| LÄHTEET | 17 |

Kuva-, kuvio- ja taulukkoluetelo

| | |
|---|----|
| Kuvio 1. PCR-reaktion vaiheet..... | 11 |
| Kuvio 2. Fluoresenssiresonanssi energiansiirto | 12 |
| Kuvio 3. Työskentelytavoissa seurattuja kohteita..... | 16 |

Käytetyt termit ja lyhenteet

| | |
|----------------------------|--|
| Aluke | Lyhyt, tunnettu DNA-juoste, jolla voidaan määritellä monistettava DNA-pätkä |
| Amplikoni | PCR:n tuottama DNA-pätkä |
| Deoksinukleotidi | DNA-rakennuspala, josta polymeraasientsyymi syntetisoi vastinjuosteet monistettaviin DNA-pätkiin |
| DNA | Deoksiribonukleiinihappo. Nukleiinihappo, joka sisältää geneettisen materiaalin |
| Inhibiittori | Yhdiste, joka voi estää polymeraasiketjureaktion toiminnan osittain tai kokonaan |
| Patogeeni | Taudinaiheuttamiskykyinen mikrobi |
| PCR | Polymerase chain reaction, polymeraasiketjureaktio. Menetelmä, jonka avulla voidaan monistaa haluttua DNA-pätkää |
| Polymeraasientsyymi | Entsyymi, joka monistaa haluttua DNA-pätkää |

1 JOHDANTO

Tämä opinnäytetyö on tehty tilaustyönä Atria Suomi Oy:lle. Atrian laboratorio varmistaa tutkimuksilla tuotteiden ja tuotannon hygienian ja laadun. Tärkeä osa tätä valvontaa ovat patogeenitutkimukset raaka-aineista, valmiista tuotteista sekä tuotantoympäristöstä. Patogeenitutkimukset toteutetaan pääasiassa PCR-analyysillä.

PCR-laitteella voidaan tutkia patogeenien mahdollista läsnäoloa monistamalla niiden DNA:ta näytteestä, mikäli sitä näytteessä on. PCR-laite analysoi näytteen ja antaa tulokseksi positiivisen, mikäli näytteessä on etsittyä patogeenia ja negatiivisen, mikäli näytteestä ei löydy etsittyä patogeenia. Joskus DNA:n monistaminen ei syystä tai toisesta onnistu. Tällöin PCR-laite ilmoittaa tulokseksi inhibition. Tutkittavan näytteen inhiboituminen aiheuttaa lisätutkimusten tarvetta. Tämä hidastaa tulosten saantia patogeenien läsnäolosta, mikä taas vaikuttaa tuotantoon ja tuotteiden markkinoille saamiseen. Lisäksi uusintatutkimukset aiheuttavat ylimääräisiä kustannuksia. Tämän opinnäytetyön tavoitteena on selvittää inhibitioiden esiintymistä PCR-analyysissä hyödyntämällä kirjallisuudesta löytyvää tietoa inhibitioiden aiheuttajista ja mahdollisista toimenpiteistä inhibitioiden estämiseksi sekä seuraamalla laboratoriossa mahdollisia syitä inhibitioihin.

Työtä varten haastateltiin laboratorion työntekijöitä ja seurattiin heidän toimintatapojaan. Toimintatapojen seuraamisella pyrittiin löytämään sellaisia tapoja työntekijöiden toiminnassa, jotka saattaisivat vaikuttaa inhibitioiden esiintymiseen. Lisäksi analysoitiin aiempaa PCR-dataa toimeksiantajan laitteista sekä pohdittiin päivittäisen työskentelyn ohessa mahdollisia vaikuttavia tekijöitä.

2 PATOGEENITUTKIMUKSET ELINTARVIKETEOLLISUUDESSA

Patogeenit ovat taudinaiheuttamiskykyisiä mikrobeja. Tärkeimpiin elintarvikkeista tutkittaviin patogeeneihin kuuluvat *Listeria monocytogenes* sekä salmonellat. Tämän opinnäytetyön kokeellisessa osiossa tutkittiin PCR-analyysia inhiboivia tekijöitä näytteiden listeria- ja salmonellamäärityksissä.

Patogeenien osalta elintarvikealan toimijoita sitoo muun muassa mikrobikriteeriasetus (Komission asetus elintarvikkeiden mikrobiologisista vaatimuksista 2073/2005). Asetuksessa säädetään yleisiä mikrobiologisia vaatimuksia, jotka elintarvikkeiden tulee täyttää. Lisäksi asetuksessa säädetään testauksesta, näytteenotosta, pakkausmerkinnöistä ja toimenpiteistä, mikäli testauksessa havaitaan epätyytyttäviä tuloksia.

2.1 Tutkimusmenetelmät

Patogeenitutkimuksiin voidaan käyttää useampia erilaisia menetelmiä, kuten viljelymenetelmiä, immunologisia määritysmenetelmiä ja PCR-menetelmiä (Välimaa ym., 2014). Analyysimenetelmät jakautuvat kvantitatiivisiin ja kvalitatiivisiin menetelmiin. Kvalitatiivisilla menetelmillä voidaan osoittaa mikrobien läsnäolo tai niiden puuttuminen. Kvantitatiivisia menetelmiä käytettäessä taas saadaan selville mikrobien määrä.

Kvantitatiivisista menetelmistä yleisimmin käytettyjä ovat viljelymenetelmät (Välimaa ym., 2014). Viljelymenetelmät perustuvat kohdemikrobin moninkertaistumiseen kasvatusliemessä tai -agarissa. Näyte esirikastetaan, jotta näytteen mahdollisesti sisältämien mikrobien olisi mahdollista kasvaa maljalla. Viljelymenetelmillä saadaan luotettavia tuloksia, mutta niiden saaminen voi kestää jopa viikon. PCR-menetelmä taas on yleisesti käytetty kvalitatiivinen menetelmä, jossa mikrobien DNA:ta monistetaan tunnistusta varten. PCR-menetelmällä tulokset voidaan saada nopeimmillaan alle vuorokaudessa. Viljelymenetelmiä herkempänä ja nopeampana menetelmänä PCR-menetelmä soveltuu erityisen hyvin elintarvikeollisuuden tarpeisiin.

2.2 Tutkittavat patogeenit

2.2.1 *Listeria monocytogenes*

L. monocytogenes-bakteeri on grampositiivinen sauvabakteeri ja ainoa listeria-suvun lajeista, joka aiheuttaa ihmisille infektioita (Lyytikäinen & Salmenlinna, 2020, s. 138). *L. monocytogenes* voidaan jakaa vielä O- ja H-antigeenien perusteella 13 serotyyppiin, joista kolme aiheuttavat yli 90 % kaikista listeriainfektioista. *Listeria* lisääntyy isäntäsolujen sisällä.

Listeriaa esiintyy maaperässä ja ympäristössä (Ruokavirasto, i.a. a). Yleensä elintarvikkeen välityksellä tarttunut listeria aiheuttaa suolisto-oireita, kuumetta sekä lihaskipuja ja päänsärkyä. Normaalin vastustuskyvyn omaavilla henkilöillä tartunta aiheuttaa harvoin vakavaa sairastumista, ja tartunta voi olla jopa täysin oireeton. Riskiryhmiin kuuluvilla henkilöillä tartunta voi kuitenkin olla pahimmillaan hengenvaarallinen. Henkilöillä, joilla on heikentynyt vastustuskyky, listerioosi ilmenee usein vaikeana yleisinfektiona tai aivokalvontulehduksena. Itämisaika taudilla vaihtelee 10–90 vuorokauden välillä, mutta keskimääräinen itämisaika on 30 vuorokautta (Lyytikäinen & Salmenlinna, 2020, s. 140). Suuri *L. monocytogenes*-pitoisuus elintarvikkeessa voi aiheuttaa tavallisen ruokamyrkytyksen kaltaisia oireita, ja tällöin itämisaika voi olla jopa alle vuorokaudesta 10 päivään. Tietyissä ammattiryhmissä, kuten eläinlääkäreillä ja maanviljelijöillä, voi esiintyä ihoinfektioita suoran kosketustartunnan seurauksena.

Elintarvikkeista listeriaa esiintyy lämpökäsittlemättömissä elintarvikkeissa ja tuotteissa, joiden valmistusprosessissa listeria ei tuhoudu (Ruokavirasto, i.a. a). Kuumennus yli +72 asteeseen tuhoaa listerian. Tuotteet voivat saastua myös jälkikäteen, mikäli tuotantoympäristössä on listeriaa ja tuotanto- tai käsittelyhygieniassa puutteita, eikä tuotteita pakata kuumana lopulliseen pakkaukseensa. Riskielintarvikkeita ovat esimerkiksi tyhjiöpakatut graavisuolatut tai kylmäsavustetut kalatuotteet, pastöimaton maito ja siitä valmistetut juustot, kylmänä syötävät einekset, pesemättömät kasvikset ja kuumentamattomat pakastevihannekset. Riskielintarvikkeita valmistavien yritysten on otettava säännöllisesti

näytteitä sekä valmiista tuotteista että tuotantoympäristöstä. Lisäksi tuotteista on tehtävä säilyvyystutkimuksia.

2.2.2 Salmonella

Salmonellat ovat gramnegatiivisia sauvabakteereja, joita on yli 2500 erilaista serotyyppiä (Kantele ym., 2020, s. 198, s. 200). Suomessa salmonelloositapauksia todetaan vuosittain alle 2000, ja näistä noin 80 % todetaan matkailijoilla.

Salmonella voi elää myös suoliston ulkopuolella (Ruokavirasto, i.a. b). Salmonelloosin oireet ovat vaihtelevia: yleisimmin esiintyy pahoinvointia, ripulia, kuumetta sekä päänsärkyä. Voimakkaassa infektiossa kuume voi nousta korkeaksi ja ripuliulosteessa voi olla verta. Tartunta voi silti olla myös oireeton.

Salmonella voi tarttua saastuneiden elintarvikkeiden tai veden välityksellä (Ruokavirasto, i.a. b). Myös ristisaastuminen on mahdollista, jolloin mikrobi siirtyy elintarvikkeesta toiseen suoran kosketuksen kautta tai välillisesti esimerkiksi käsien kautta. Kahta salmonellan serotyyppiä esiintyy vain ihmisillä, mutta muut salmonellat voivat zoonoottisina tarttua myös eläimestä ihmiseen – joskin tämä on harvinaista. Tavallisimmin salmonellatartunnan aiheuttaa raaka tai huonosti kypsennetty siipikarjan- tai sianliha, pastöroimaton maito tai kasvikset. Ruokien kypsentäminen yli +70 asteeseen, ja siipikarjanliha yli +75 asteeseen, tuhoaa salmonellan. Kuumentamalla valmistettujen elintarvikkeiden nopea jäähdytys, niiden säilyttäminen jääkaappilämpötilassa ja lyhyet säilytysajat lisäävät turvallisuutta. Risti-saastumisen välttämiseksi raat ja kypsät elintarvikkeet on säilytettävä aina erillään, ja välineiden, työpintojen sekä käsien hygieniasta pidettävä huoli.

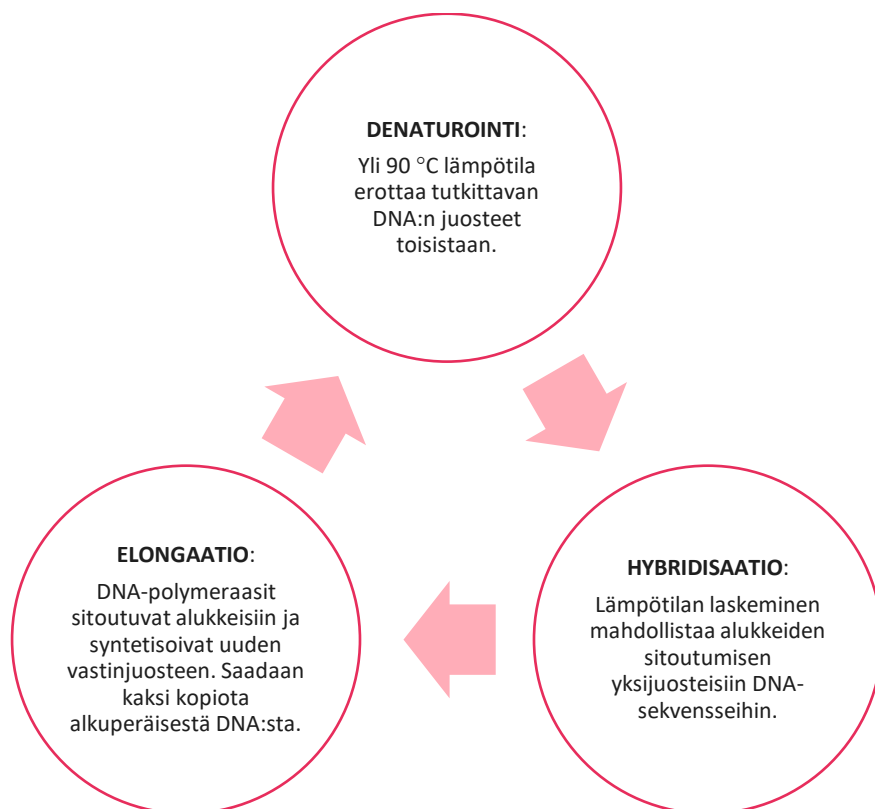
3 POLYMEERAASIKETJUREAKTIO

PCR eli polymeeraasiketjureaktio (engl. polymerase chain reaction) on Kary Mulliksen kehittämä menetelmä, jolla voidaan monistaa haluttua DNA-pätkää miljooniksi kopioiksi (Garibyan & Avashia, 2013). PCR-tekniikan ansiosta on mahdollista tuottaa nopeasti isoja määriä geneettistä materiaalia näytemäärästä, joka muuten olisi liian pieni analysoitavaksi (Wiley-VCH, 2007, s. 218). Mikrobeja voidaan tunnistaa niiden DNA:n perusteella (Ranki-Pesonen, 1994). PCR:n avulla tutkittavaksi saadaan myös sellaiset mikrobit, jotka eivät kasva laboratorio-olosuhteissa. PCR:llä voidaan spesifisten alukkeiden avulla tunnistaa haluttu mikrobi, mutta sen määrää näytteessä ei saada suoraan tuloksesta, kun näytettä on esirikastettu ennen analyysia. PCR:n vahvuutena siinä yhdistyvät sekä korkea spesifisyys että korkea herkkyys (Wiley-VCH, 2007, s. 218). Lisäksi se on yksinkertainen ja nopea menetelmä. Tekniikkaa voidaan hyödyntää muun muassa sairauksien määrittämiseen, geenien kloonaukseen, patogeenien havaitsemiseen sekä rikostutkimuksiin (Garibyan & Avashia, 2013). PCR on herkkä menetelmä, eikä se tarvitse paljoakaan DNA:ta pystyäkseen kopioimaan sitä riittävästi tutkimista varten. Teoriassa DNA:n monistus on mahdollista suorittaa jopa vain yhden lähtömolekyylin avulla (Aittomäki ym., 2002, s. 68).

3.1 Menetelmän toiminta

PCR-reaktio koostuu kolmesta eri vaiheesta, ja syklit toistuvat reaktion aikana yleensä noin 15–40 kertaa (Aittomäki ym., 2002, s. 70). Reaktiota varten tarvitaan DNA-polymeeraasientsyymi, kopioitava DNA-jakso sekä deoksinukleotideja. Lisäksi reaktioon tarvitaan monistettavalle DNA-sekvenssille sopivat alukkeet (Aittomäki ym., 2002, s. 68). Ensimmäisessä vaiheessa DNA denaturoidaan eli hajotetaan sen rakenne kuumentamalla, jolloin kaksijuosteisen DNA:n juosteet erkanevat toisistaan (Wiley-VCH, 2007, s. 218). Tämä vaatii lämpötilan noston yli 90 asteeseen. Toisessa vaiheessa lämpötilaa lasketaan, ja alukkeet kiinnittyvät yksijuosteisen DNA:n sekvenssien päihin. Kolmannessa vaiheessa lämpötilaa nostetaan käytettävälle DNA-polymeeraasille optimaaliseen toimintalämpötilaan, jolloin polymeeraasientsyymi syntetisoi deoksinukleotideista vastinjuosteet yksijuosteisille DNA-sekvensseille ja sekvenssit pidennetään tällä lämmönkestävällä DNA-polymeeraasilla (Aittomäki ym., 2002, s. 70; Wiley-VCH, 2007, s. 218). Tuloksena saadaan kaksi kopiota kaksijuosteisesta DNA:sta. Sykliä kierto on esitetty kuviossa 1. Ensimmäisen ja toisen

vaiheen aikana tuotetut pätkät ovat määrittelemättömän pituisia. Kolmannesta syklistä alkaen saadaan määritellyn pituisia amplikoneja eli PCR-reaktion tuottamia DNA-pätkiä, joita reunustavat kaksi aluketta. Seuraavissa sykleissä näiden amplikonien määrä kasvaa eksponentiaalisesti, kun taas määrittelemättömän pituiset pätkät lisääntyvät lineaarisesti.



Kuvio 1. PCR-reaktion vaiheet.

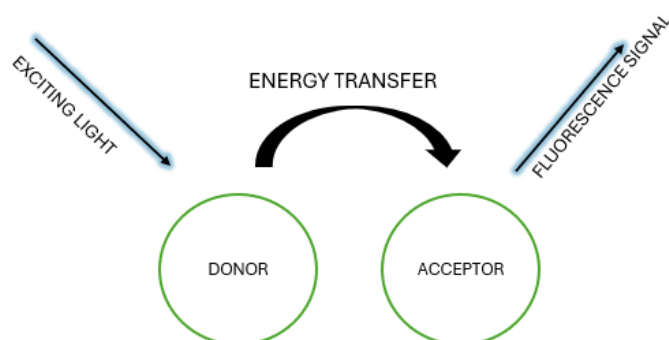
Tavallisen PCR-menetelmän amplikoni havaitaan PCR-reaktion lopuksi agaroosigeelillä (Bio-Rad laboratories, 2006). Reaaliaikaisessa PCR-menetelmässä taas reaktiossa on mukana fluoresoivia molekyyliä, joiden avulla PCR-tuotetta voidaan havainnoida jo reaktion edetessä. Fluoresoivat kemikaalit voivat olla joko DNA:han sitoutuvia merkkiaineita tai värillä leimattuja alukkeita. PCR-laite mittaa fluoresenssisignaalia syklien aikana ja havaitsee sen avulla etsittyä DNA:ta.

3.2 Fluoresenssiresonanssi energiansiirto

Alukkeisiin ja koettimiin perustuvilla fluoresoivilla merkkiaineilla PCR-analyysissä saadaan hyödynnettyä fluoresenssin aiheuttamaa resonanssienergian siirtoa (Bio-Rad laboratories,

2006). Fluoresenssiresonanssi energiansiirto (FRET) perustuu kahden molekyylin väliseen vuorovaikutukseen (Thermo Fisher, i.a.). Virittyneestä luovuttajamolekyylistä (donor) voidaan siirtää energiaa vastaanottajamolekyyliin (acceptor), kun molekyylit ovat riittävän lähellä toisiaan. Signaalin siirtyessä molekyylien kautta valosignaalista menetetään energiaa, mikä näkyy valon aallonpituuden kasvamisena. Fluoresoiva, väriaineella leimattu luovuttajamolekyyli virittyy ulkoisella valonlähteellä (eksitaatio, engl. excitation) lähellä optimaalista viritysaallonpituuttaan (Tevfik Dorak, 2007). Luovuttavan molekyylin energia siirtyy vastaanottajamolekyylille, kun ne ovat riittävän lähellä toisiaan. Luovuttajamolekyysin säteilyaallonpituus on oltava lähellä vastaanottajamolekyysin absorptiomaksimia (valon aallonpituus, jolla aine tehokkaimmin absorboi valoa), jotta vastaanottajamolekyyli virittyy ja välittää signaalin eteenpäin säteilyä (emissio, engl. emission). Jos vastaanottajamolekyyli säteilee valoa, voidaan signaali havaita tunnetun aallonpituutensa vuoksi. FRET-tekniikan toimintaa on havainnollistettu kuviossa 2.

PCR-laitteessa FRET-tekniikkaa voidaan hyödyntää kiinnittämällä fluoresoivia leimoja DNA-sekvenssejä tunnistaviin koettimiin tai alukkeisiin (Tevfik Dorak, 2007). Tiettyä DNA-sekvenssiä tunnistettaessa valitaan koettimet tai alukkeet niin, että ne sitoutuvat kohde-DNA:han niin lähelle toisiaan, että FRET onnistuu ja PCR-laite tunnistaa vastaanottajamolekyysin fluoresenssisignaalin, jonka avulla saadaan tulos. Kaikille fluoresenssiväriaineille on optimaaliset viritys- ja säteilyaallonpituudet, ja joissain PCR-analyyseissä voidaan samanaikaisesti hyödyntää useita erilaisia fluoresenssiväriaineita erilaisten DNA-sekvenssien tunnistamiseksi samasta näytteestä.



Kuvio 2. Fluoresenssiresonanssi energiansiirto on mahdollinen, kun energiaa luovuttava ja vastaanottava molekyyli ovat riittävän lähellä toisiaan.

3.3 Inhibiittorit ja niiden ehkäiseminen

Epäonnistuneeseen PCR-reaktioon on lukuisia syitä (Torres Benito, 2022). Jos PCR-reaktiota varten on lisätty kaikki tarvittavat komponentit ja ne ovat kunnossa, eikä PCR-tulosta silti saada, on todennäköistä, että reaktiossa on mukana inhiboivia tekijöitä. Inhibiittoreiksi kutsutaan kaikkia yhdisteitä, jotka vaikuttavat kriittisiin reagensseihin tai polymerointiprosessin osareaktioihin. PCR:n tehokkuuteen voivat vaikuttaa eri inhibiittorit, jotka vaikuttavat eri vaiheissa prosessia. Inhibiittorit voivat estää monistuksen osittain tai kokonaan. Inhibiittorit voivat johtua näytteestä itsestään tai näytteen valmistelusta ennen PCR:ää tai näistä molemmista. Lisäksi eri DNA-polymeraasien herkkyys inhibiittoreille on erilainen (Wiley-VCH, 2007, s. 221–222). Esimerkiksi käyttämällä DNA-polymeraasina rTth:tä havaittiin, että on mahdollista lisätä DNA, jossa on 20 % verta ilman, että amplifikaatioherkkyys heikenee, kun taas Taq DNA-polymeraasina inhiboitui täysin, kun PCR-seoksessa oli 0,004 % verta.

3.3.1 Inhibiittorit biologisissa materiaaleissa ja ympäristössä

Inhibiittoreita löytyy monista erilaisista biologisista materiaaleista, ruuista ja ympäristönäytteistä (Torres Benito, 2022). Esimerkiksi verestä löytyvällä immunoglobuliinilla on poikkeuksellinen yhtymistäipumus yksijuosteiseen DNA:han, joten se aiheuttaa herkästi inhibition PCR-reaktiossa. Immunoglobuliini voidaan neutraloida inkuboimalla näyte epäspesifin DNA:n kanssa, jolloin inhiboiva vaikutus saadaan osittain poistettua. Ruuissa inhiboivia ainesosia ovat esimerkiksi maidon sisältämä entsyymiplasmiini, joka hajottaa Taq-polymeraasia. Lisäksi maidon korkea kalsiumpitoisuus voi aiheuttaa inhibition. Kasveissa polysakkaridit, kuten dekstraanisulfaatti, ksylaani ja lateksi vaikuttavat PCR-suoritukseen. Marjojen ja tomaatin sisältämät fenolit vaikuttavat inhiboivan erityisesti RT-PCR-analyysia. Kuolleet biomassat sekä maaperä saattavat sisältää humus- ja fulmiinihappoja, jotka voivat inhiboida PCR-analyysissä pieninäkin pitoisuuksina. Ympäristönäytteet saattavat sisältää esimerkiksi rasvoja, proteiineja, polyfenoleita, raskasmetalleja, polysakkarideja, metalli-ioneja ja RNAaseja, joiden tiedetään olevan yleisiä inhibiittoreita. Muita inhibiittoreita ovat esimerkiksi bakteerisolujen ainesosat, ei-kohde-DNA ja epäpuhtaudet, sekä laboratoriotarvikkeet, käsinpuuteri, laboratorion muovitarvikkeet sekä selluloosa.

3.3.2 Kemialliset inhibiittorit

Jotkin aineet ovat välttämättömiä tehokkaaseen solujen hajottamiseen tai puhtaiden nukleinihappojen valmistukseen, mutta saattavat tiettyinä pitoisuuksina aiheuttaa inhibition PCR-analyysissä (Torres Benito, 2022). Tällaisia aineita ovat esimerkiksi erilaiset suolat, kuten natrium ja kaliumkloridi, ioniset pesuaineet, ionittomat pesuaineet ja orgaaniset molekyylit, kuten EDTA, etanoli, isopropyylialkoholi sekä fenoli. Ioniset pesuaineet, kuten natriumdeoksikolaatti, SARKOSYL ja SDS inhiboivat PCR-analyysissä herkästi, kun taas ei-ioniset pesuaineet, kuten Nonidet P-40, Tween 20, Triton X-100 sekä N-oktyyliglukosidi inhiboivat vain suhteellisen korkeina pitoisuuksina esiintyessään. Puhdistuskittien eluointipuskurit DNA:n säilyttämiseksi sisältävät EDTA:ta, mutta tiettyinä pitoisuuksina se saattaa kuluttaa magnesiumionit ja täten estää DNA-polymeraasin aktiivisuutta. Fenoli saattaa denaturoida proteiineja ja voi siten estää loppupään entsyymien käyttämistä. Myös PCR-sekoitusten lisäaineet, kuten ditiotreitoli, dimetyylisulfoksidi ja merkaptoetanoli voivat tiettyinä pitoisuuksina aiheuttaa inhibitioita.

3.3.3 Inhibiittoreiden vaikutuksen vähentäminen

Näytteitä, jotka todennäköisesti sisältävät inhibiittoreita, voidaan käsitellä muutamilla eri tavoilla ennen PCR-analyysia inhiboivien tekijöiden vaikutuksen vähentämiseksi (Wiley-VCH, 2007, s. 222). Tällaisia käsittelyjä ovat esimerkiksi näytteiden laimennus, jolloin inhibiittorin pitoisuus näytteessä laskee ja kohde-DNA:n monistaminen mahdollistuu. Toinen inhiboitumista estävä tekijä on bakteerinäytteiden esiviljely, joka sekin laimentaa inhibiittoreiden pitoisuutta näytteessä, kun taas kohde-DNA:n määrä kasvaa. Esiviljely koskee erityisesti näytteitä, joista etsitään eläviä bakteereita, sillä PCR-laite tunnistaa myös kuolleiden bakteerien DNA:n, joka voi aiheuttaa vääriä positiivisia tuloksia. Kolmas tapa on niin sanottu sisäkkäinen PCR, jossa PCR-tuote monistetaan toiseen kertaan (Hanlon & Nadin-Davis, 2013). Toisessa PCR-reaktiossa käytetään ensimmäisestä ajosta saatua amplikonitemplaattina. Tämä parantaa monistuksen herkkyyttä ja spesifisyyttä, mutta kontaminaation mahdollisuus kasvaa, kun alkuperäistä PCR-tuotetta jatkokäsitellään. Neljäs tapa on DNA:n uuttaminen, jossa templaatti-DNA eristetään (Wiley-VCH, 2007, s. 222). Useimmissa tapauksissa tämä poistaa inhibiittorit.

4 KOKEELLINEN OSIO

Tämän opinnäytetyön kokeellisessa osiossa käydään läpi, miten inhibiitioihin vaikuttavia tekijöitä on selvitetty ja miten näytteiden tutkimiseen käytetty PCR-laite toimii. Erilaisten PCR-laitteiden toimintaperiaate on sama, mutta niiden tekniikka on hieman erilaista. Tässä työssä käytettiin qPCR-laitetta eli kvantitatiivista PCR-laitetta, joka hyödyntää FRET-tekniikkaa. Tarkat laitteen tiedot eivät ole julkista tietoa, joten ne eivät ole mukana julkisessa versiossa. Myöskään kokeellisesta osiosta saadut tulokset eivät ole julkaistavia tietoja.

Kokeellinen osio suoritettiin opintoihin kuuluvan harjoittelujakson yhteydessä lokakuusta 2023 helmikuuhun 2024. Työn tavoitteena oli tarkastella, löytyykö inhibitioiden estämiseen uusia näkökohtia. Tarkastelu suoritettiin keräämällä tietoa laboratoriohenkilökunnan työskentelytavoista ja heidän ajatuksistaan inhibitioiden mahdollisista aiheuttajista. Työhön haastateltiin kaikkia sellaisia laboratorion työntekijöitä, jotka käyttävät työssään PCR-laitetta.

Tutkimusta varten oli suunniteltuna tiedon kerääminen ja työskentelytapojen seuraaminen. Lisäksi suunnitelmassa oli suorittaa mahdolliset testiajat, mikäli tiedonkeruun ja työskentelytapojen seuraamisen avulla löytyisi selkeitä testikohteita. Opinnäytetyötä tehtiin harjoittelujaksolla, jossa PCR-laitetta käytettiin päivittäisessä työskentelyssä. Harjoittelujaksolla työskentely keskittyi PCR-laitteen käyttöön sekä näytteiden valmisteluun PCR-ajoa varten, joten työn ohella tutkittiin mahdollisia vaikuttavia tekijöitä myös ilman tarkempaa suunnitelmaa.

Työn pohjana oli tiedon kerääminen työntekijöiltä ja heidän työskentelytapojensa seuraaminen. Työskentelytapojen seuraamisen tarkoituksena oli havaita asioita, jotka voisivat vaikuttaa inhibitioiden määrään. Tärkeimpiä laboratorioissa seurattuja kohteita on esitetty kuviossa 3.



Kuvio 3. Laboratoriossa työskentelytavoissa seurattuja kohteita.

LÄHTEET

Aittomäki, E., Eerikäinen, T., Leisola, M., Ojamo, H., Suominen, I., & von Weymarn, N. (2002). *Bioprosessitekniikka*. WSOY.

Bio-Rad laboratories. (2006). *Real-Time PCR applications guide*. https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_5279.pdf

Garibyan, L., & Avashia, N. (2013). *Polymerase chain reaction*. [https://www.jidonline.org/article/S0022-202X\(15\)36139-X/fulltext](https://www.jidonline.org/article/S0022-202X(15)36139-X/fulltext)

Hanlon, C., & Nadin-Davis, S. (2013). *Nested polymerase chain reaction: Laboratory diagnosis of rabies*. Science Direct. <https://www.sciencedirect.com/topics/immunology-and-microbiology/nested-polymerase-chain-reaction>

Kantele, A., Salmenlinna, S., Hakanen, A. ym. (2020). *Mikrobiologia: Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet 1*. (4. uud. laitos). Duodecim.

Komission asetus elintarvikkeiden mikrobiologisista vaatimuksista 2073/2005. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FI/ALL/?uri=CELEX%3A32005R2073>

Lyytikäinen, O., Salmenlinna, S. ym. (2020). *Mikrobiologia: Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet 1*. (4. uud. laitos). Duodecim.

Ranki-Pesonen, M. (1994). *Onko polymeraasiketjureaktio käytännön mikrobidiagnostiikkaa?* Duodecim. <https://www.duodecimlehti.fi/duo40130>

Ruokavirasto. (13.9.2023a). *Listeria monocytogenes*. <https://www.ruokavirasto.fi/elintarvikkeet/ohjeita-kuluttajille/ruokamyrkytykset/ruokamyrkytyksia-aiheuttavia-bakteereja/listeria/>

Ruokavirasto. (13.9.2023b). *Salmonella*. <https://www.ruokavirasto.fi/elintarvikkeet/ohjeita-kuluttajille/ruokamyrkytykset/ruokamyrkytyksia-aiheuttavia-bakteereja/salmonella/>

Tevfik Dorak, M. (2007). *Real-time pcr*. Taylor and Francis group. <https://www.gene-quantification.de/dorak-book-real-time-pcr-2006.pdf>

Thermo Fisher Scientific. (i.a.). *Fluorescence resonance energy transfer (FRET) – Note 1.2*. <https://www.thermofisher.com/fi/en/home/references/molecular-probes-the-handbook/technical-notes-and-product-highlights/fluorescence-resonance-energy-transfer-fret.html>

Torres Benito, L. (2.10.2022). Inhibit inhibition: PCR inhibition and how to prevent it. Bio echo Life sciences. <https://www.bioecho.com/blog/inhibit-inhibition-pcr-inhibition-and-how-to-prevent-it>

Välimaa, A-L., Tilsala-Timisjärvi, A., & Virtanen, E. (2014). *Listeria monocytogenes-patogeenin tunnistusmenetelmiä elintarviketuotannossa*. MTT. <https://jukuri.luke.fi/bitstream/handle/10024/485077/mtttraportti169.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Wiley-VCH. (2007). *Ullmann's Biotechnology and biochemical engineering*. Wiley-WCH.