

HELSINGIN YLIOPISTO  
HELSINGFORS UNIVERSITET  
UNIVERSITY OF HELSINKI

---

Tosiaikaisen kvantitatiivisen polymeraasiketjureak-  
tion käyttäminen hevosen ja koiran keuhkohuuhtelu-  
näytesolujen geeniekspression määrittämiseen  
Kirjallisuuskatsaus

Mika Ilves

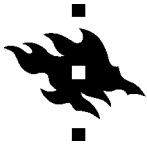
Lisensiaatin tutkielma

Kliinisen hevos- ja pieneläinlääketieteen osasto

Eläinlääketieteellinen tiedekunta

Helsingin yliopisto

2014



Tiedekunta -- Fakultet – Faculty ELTDK		Osasto - - Avdelning – Department Kliinisen hevos- ja pieneläinlääketieteen osasto	
Tekijä - - Författare – Author Ilves, Mika Kaarlo Petteri			
Työn nimi - - Arbetets titel – Title Tosi aikaisen kvantitatiivisen polymeerasiketjureaktion käyttäminen hevosen ja koiran keuhkokuuhtelunäytesolujen geeniekspres- sion määrittämiseen. Kirjallisuuskatsaus.			
Oppiaine - - Läroämne – Subject Hevosten sisätautioppi			
Työn laji - - Arbetets art – Level Kirjallisuuskatsaus		Aika - - Datum – Month and year 22.4.2014	Sivumäärä - - Sidoantal – Number of pages 40
Tiivistelmä - - Referat – Abstract <p>Keuhkokuuhtelunäytteiden (bronchoalveolar lavage, BAL) ottaminen koirilta ja hevosilta on yleisesti käytössä oleva diagnostinen menetelmä. Keuhkokuuhtelunäytteet soveltuvat lähinnä diffuusien keuhkomuutosten tutkimiseen. Paikallisten muutosten diagno-soimiseen menetelmä ei sovellu yhtä hyvin, eikä menetelmää voi tavallisesti käyttää bakteriologisten määritysten tekemiseen.</p> <p>Tavallisesti BAL-näytteen yhteydessä saatuja eukaryoottisoluja käytetään lähinnä sytologisiin määrytyksiin. Huuhtelunäytteen sisältämien tulehdussolupopulaatioiden perusteella on mahdollista tehdä päätelmiä sairauden luonteesta ja vaka-vuudesta. Keuhkokuuhtelunäytteestä on perinteisesti määritetty mahdollisia patogeene mikrobeja ja -viruksia ja myöskin BAL-solujen tai BAL-huuhtelunesteen sisältämiä proteiineja tai peptidejä.</p> <p>Tosi aikainen kvantitatiivinen käänteiskopiointia hyödyntävä polymeerasiketjureaktio-menetelmä (RT-QPCR tai QPCR) on tehokas tapa solujen ilmentämien geenituotteiden määrän mittaamiseen. Menetelmä on yleisesti käytössä ja on syrjäyttänyt käytännössä kokonaan muut menetelmät, joita on aiemmin käytetty geenien ilmentämien tuotteiden kvantitointiin.</p> <p>QPCR-menetelmää on käytetty hevosten keuhkokuuhtelunäytteiden sisältämien eukaryoottisolujen geeniekspresion tutkimiseen, sen sijaan julkaisuja koirien keuhkokuuhtelunäytesolujen analysointiin ei ole julkaistu. Julkaisuissa ei kuitenkaan ole yleensä tar- kemmin kuvattu näytteiden ottamiseen, tutkittavan ribonukleiinihapon (RNA) eristämiseen tai muihin vaiheisiin liittyviä työvaiheita taikka vaiheisiin liittyviä ongelmakohtia. Yleisimmin tutkimuksen kohteena ovat olleet inflammaatiotapahtumassa mukana olevat geenit kuten eri interleukiinit ja kasvutekijät.</p> <p>Tämä kirjallisuuskatsauksen muodossa esitettävä lisensiaatintyö luo katsauksen hevosten ja koirien keuhkokuuhtelunäytteiden käsittelymenetelmiin, ja työssä esitetään aiempien julkaisujen ja Eläinlääketieteellisen tiedekunnan tutkijoiden kanssa käytyjen keskustelujen perusteella menetelmäehdotuksia keuhkokuuhtelunäytteiden ottamiseen ja niiden käsittelemiseen. Näiden ehdotus- ten avulla on mahdollista määrittää luotettavasti huuhtelunäytteiden sisältämien eukaryoottisolujen ilmentämien geenituotteiden määrä kvantitatiivisella PCR:llä. Suositeltavana menetelmänä on TaqMan®-kemian perustuva menetelmä. Näytteiden käsittelyn vaiheet kuten nukleiinihappojen eristäminen, käänteiskopiointireaktio ja itse polymeerasiketjureaktiojojo pystytään suorittamaan tavanomaisilla kaupallisesti saatavilla olevilla pakkauksilla niiden valmistajien ohjeita seuraamalla.</p> <p>Edellä mainittujen ehdotusten mukaisesti määritettäessä keuhkokuuhtelunäytesolujen ekspressiotuotteita kvantitatiivisella polyme- raasiketjureaktiolla tulee eniten huomiota kiinnittää realistiseen koejärjestelyyn sekä huolelliseen näytteenottoon ja sitä seuraavaan RNA:n eristämävaiheeseen. Yksittäisistä vaiheista juuri RNA:n eristämisen yhteydessä tapahtuvat virheet muodostavat suurim- man virhelähteen. Lisäksi huomiota tulee kiinnittää realistiseen tutkimussuunnitelmaan, käytettävään TaqMan®-koettiin olivat ne sitten itse suunniteltuja tai kaupallisesti hankittuja sekä saatujen tulosten merkittävyyteen.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords BAL, keuhkokuuhtelunäyte, kvantitatiivinen PCR, geeniekspresio.			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited Viikin kampuskirjasto			
Työn johtaja (tiedekunnan professori tai dosentti) ja ohjaaja(t) – Instruktor och ledare – Director and Supervisor(s) Työn johtaja: Rajamäki, Minna. ELT, dosentti, HY, ELTDK. Työn ohjaaja: Mykkänen, Anna. ELT, HY, ELTDK.			

## SISÄLLYSLUETTELO

1	Johdanto.....	2
2	Keuhkokuuhtelunäytteiden ottaminen.....	3
2.1	Koirien bronkoalveolaarihuuhtelu .....	3
2.2	Hevosten bronkoalveolaarihuuhtelu.....	4
3	Lähetti-RNA:n kvantitointi.....	6
3.1	RNA:n eristäminen .....	7
3.2	Northern blot .....	9
3.3	PCR-menetelmät lähetti-RNA:n kvantitoinnissa .....	11
3.4	Käänteiskopiointireaktio .....	11
3.5	Kvantitatiivinen PCR .....	13
3.6	Tosiaikainen kvantitatiivinen PCR .....	14
3.7	SYBR Green -menetelmä .....	14
3.8	TaqMan®-menetelmä.....	16
3.8.1	Yleinen periaate .....	16
3.8.2	PCR-alukkeet ja TaqMan®-koetin .....	18
3.8.3	Multiplex-ajo .....	20
3.8.4	Tulosten laskeminen .....	21
3.8.5	Tulosten analysointi ja mahdolliset virhelähteet .....	25
3.9	DNA-sirutekniikka.....	27
4	BAL-solujen ekspressoimien geenituotteiden määrittäminen.....	28
5	Pohdinta ja johtopäätökset.....	30
5.1	Ehdotettava työjärjestys keuhkokuuhtelunäytesolujen ekspressoimien geenituotteiden kvantitointiin RT-QPCR-menetelmällä.....	31
6	Kirjallisuus .....	34

# 1 Johdanto

Keuhkohuuhtelunäytteiden (bronchoalveolar lavage, BAL) ottaminen koirilta ja hevosilta on yleisesti käytössä oleva diagnostinen menetelmä. Keuhkohuuhtelunäytteet soveltuvat lähinnä diffuusien keuhkokuutosten tutkimiseen. Paikallisten muutosten diagnosoimiseen menetelmä ei sovellu yhtä hyvin, eikä menetelmää voi tavallisesti käyttää bakteriologisten määritysten tekemiseen.

Tavallisesti BAL-näytteen yhteydessä saatuja eukaryoottisoluja käytetään lähinnä sytologiin määrittäisiin. Huuhtelunäytteen sisältämien tulehdussolupopulaatioiden perusteella onkin mahdollista tehdä päätelmiä analysoitavan sairauden luonteesta ja laajuudesta. Keuhkohuuhtelunäytteestä on perinteisesti määritetty mahdollisia patogeeneja mikrobeja ja -viruksia ja myöskin BAL-solujen tai BAL-huuhtelunesteen sisältämiä proteiineja tai peptidejä.

Tosiaikainen kvantitatiivinen käänteiskopiointia hyödyntävä polymeerasiketjureaktio-menetelmä (RT-QPCR tai QPCR) on tehokas tapa solujen ekspressoimien geenituotteiden kvantitointiin. Menetelmä on yleisesti käytössä ja on syrjäyttänyt käytännössä kokonaan muut menetelmät, joita on aiemmin käytetty geeniekspression kvantitointiin. QPCR-menetelmää on käytetty hevosten keuhkohuuhtelunäytteiden tutkimiseen, mutta julkaisuja koirien keuhkohuuhtelunäytesolujen analysoinnista ei ole julkaistu.

Tämän lisensiaatintyön tavoitteena on luoda katsaus hevosten ja koirien keuhkohuuhtelunäytteiden käsittelymenetelmiin, ja esittää näytteiden ottamiseen ja niiden käsittelemiseen menetelmäehdotuksia, joiden avulla voisi olla mahdollista määrittää luotettavasti huuhtelunäytteiden sisältämien eukaryoottisolujen ekspressoimien geenituotteiden määrä kvantitatiivisella PCR:llä.

## 2 Keuhkohuuhtelunäytteiden ottaminen

### 2.1 Koirien bronkoalveolaarihuuhtelu

Koirien keuhkosairauksien diagnosoinnin yhteydessä yleistutkimuksen ja verinäytteiden ohella merkittävässä roolissa on keuhkojen röntgenkuvaus, ja kuvauksen perusteella voidaan päätellä mahdollisten muutosten sijoittuminen. Mikäli edellä esitetyillä menetelmillä ei päästä diagnoosiin ja tiedetään ongelman sijoittuvan alempiin hengitysteihin, voidaan käyttää keuhkojen tähystystä. Joissain tapauksissa pelkkä hengitysteiden tähystys ei riitä. Esimerkiksi pienten hengitysteiden laaja-alaisen eli diffuusin sairauden, keuhkoverenkierronhäiriön ja keuhkojen välikudoksen sairauksien yhteydessä on hengitysteiden tähystyksessä kannattavaa ottaa myös BAL-näyte tai koepala keuhkojen limakalvolta (Rha & Mahony 1999).

Koiralla tähystys ja keuhkohuuhtelunäytteen ottaminen suoritetaan syvässä rauhoituksessa tai narkoosissa. Yskänrefleksin vuoksi käytettävä laitteisto voi rikkoontua tai yskimisen yhteydessä potilaalle voi aiheutua vaurioita. Näytteenotto suoritetaan koiran maatessa rintansa päällä, ja koiran suu pidetään auki tarkoitukseen sopivalla suunavaajalla. Bronkoskopian ja näytteenoton aikana voidaan antaa eläimelle lisähappea, tai joissain tapauksissa, erityisesti pienikokoisten koirien ollessa kyseessä, on tarpeellista poistaa bronkoskooppi hengitysteistä säännöllisin väliajoin mahdollisen hapenpuutteen ehkäisemiseksi (Rha & Mahony 1999).

Bronkoskoopin ohjaaminen haluttuun kohtaan näytteenottamista varten on mahdollista keuhkojen anatomian tuntemuksen ja toistojen tuoman kokemuksen myötä. Näyte on mahdollista ottaa myös sokkona, jolloin näytteenottokatetri ohjautuu sattumanvaraisesti johonkin keuhkolohkoon. Mikäli sairastuneen keuhkolohkon tai keuhkojen osan sijaintikohta tiedetään, asetetaan eläin kyljelleen niin, että sairas osa keuhkoista on käsittelypöytää vasten (Andreasen 2003).

Koiralla huuhtelunesteenä käytetään steriloitua isotonista NaCl-liuosta. Nesteen määrä eri tilanteissa saattaa vaihdella, mutta esimerkiksi Yliopistollisessa eläinsairaalassa käytetty määrä on 2 ml kutakin koiran painokiloa kohti (Rajamäki 2001, Rajamäki 2002). Tavallisesti sama kohta keuhkoissa huuhdellaan kahdesti (Rajamäki 2001, Rajamäki 2002). Huuhteluneste imetään takaisin samaa kautta, mitä se keuhkolohkoon on toimi-

tettukin, ja normaalisti bronkoskopian avulla suoritettussa keuhkohuuhtelussa nesteestä saadaan takaisin 50–90 % (Rha & Mahony 1999) ja sokkona suoritetuissa huuhteiluissa 59–84 % (Rha & Mahony 1999).

Useampien samasta kohdasta suoritettujen huuhtelukertojen etuna on se, että ensimmäinen näyte sisältää tavallisesti lähinnä bronkiaalisia komponentteja, ja toisella kerralla otetussa näytteessä puolestaan on enemmän alveolaariperäisiä soluja (Rha & Mahony 1999). Koirien keuhkohuuhtelunäytteessä on eniten alveolaarisia makrofageja (Andreasen 2003, Rajamäki ym. 2001, Rha & Mahony 1999). Neutrofiilien määrä huuhtelunäytteessä lisääntyy akuutin neutrofiilisen tulehduksen yhteydessä, ja keuhkojen kasvainten yhteydessä neoplastisten sytologisten löydösten määrä lisääntyy (McCullough & Brinson 1999). Normaaleja epiteelisoluja huuhtelunäytteessä on tavallisesti vain vähäisiä määriä (McCullough & Brinson 1999).

## **2.2 Hevosten bronkoalveolaarihuuhtelu**

Hevosten keuhkohuuhtelunäytteenoton ensimmäiset kokeilut on suoritettu 70-luvun lopulla (Hoffman 2008). Indikaatioina BAL-näytteenottoon on ollut hengitystietulehdusten ja esim. puhkurihevosten diagnosointi silloin, kun muut toimet ovat osoittautuneet riittämättömiksi (Hoffman 2008).

Hevosilla BAL-huuhtelu voidaan suorittaa sokkona tai ohjauksessa endoskoopin avulla rauhoitetulle hevoselle. Endoskooppi tai näytteenottoletku, jonka distaalipäässä on ilmalla täytettävissä oleva mansetti, viedään hengitysteihin hevosen sieraimen kautta, ja instrumentti työnnetään riittävän syvälle niin, että se päätyy samankokoisiin keuhkoputkiin kuin sen halkaisija on (Roy & Lavoie 2003). Mitä pienempi näytteenottoinstrumentin halkaisija on, sitä pienemmältä alueelta BAL-näyte kerätään ja sitä vähemmän näyte edustaa keuhkojen yleistä tilaa. Näytteenottoletkun mansetti täytetään ilmalla, jolloin letkun pää pysyy paikoillaan eikä käytettävä huuhteluneste pääse karkaamaan muualle keuhkoihin. Huuhtelunesteen aiheuttaman keuhkoärsytyksen vähentämiseksi letkun tai endoskoopin avulla applikoidaan instrumentin edetessä tai viimeistään näytteenottokohtaan lidokaiinia puudutteeksi (Roy & Lavoie 2003).

Huuhtelunesteenä käytetään steriiliä isotonista liuosta esim. NaCl-liuosta, joka on edeltä käsin lämmitetty lähelle hevosen normaalilämpöä. Yleisesti käytettävä määrä huuhtelunestettä on noin 300 ml, ja tämä määrä viedään keuhkoihin mahdollisimman nopeasti ja imetään tämän jälkeen takaisin (Roy & Lavoie 2003). Tavoitteen on saada takaisin mahdollisimman paljon käytettyä huuhtelunestettä. BAL-neste siirretään välittömästi jälle, ja nestettä pyritään käsittelemään jatkovaiheissa mahdollisimman kylmänä nesteen sisältämien biologisten näytemateriaalien hajoamisen vähentämiseksi. Kylmäsäilytys myös estää näytteessä mahdollisesti esiintyvien mikrobien kasvua.

Koirilta ja hevosilta otettujen keuhkohuuhtelunäytteiden jatkoprosessointi on periaatteessa yhteneväistä, ja näytteistä voidaan edelleen erotella solut sentrifugoimalla. Solut ja supernatantti voidaan pakastaa myöhempää tutkimista varten. Lisäksi erotetusta solufragmentista voidaan tehdä sytologisesti värjättäviksi tarkoitetut sivelnäytteet (Pickles ym. 2002). Keuhkohuuhtelunäytenesteen tai osan siitä jäädyttäminen nestetyypessä välittömästi näytteenoton jälkeen sellaisenaan ja säilyttäminen syväjäähäpakastimessa  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ :ssa on myös mahdollista, ja tällöin kaikki sekä nesteen että siinä olevien solujen sisältämä biologinen materiaali säilyy pitkiäkin aikoja analysointikelpoisena. Sytologisia määrittämiä varten keuhkohuuhtelunäytteiden laatu säilyy riittävän hyvänä huoneenlämmössäkin jopa 8 tunnin ajan (Pickles ym. 2002). Yleisesti kuitenkin tiedetään, että haluttaessa määrittää kudosisäilytys- tai solunäytteistä RNA-pitoisuuksia, tulee näytteet siirtää mahdollisimman nopeasti ottamisen jälkeen kuivajälle tai nestetyypen etteivät ympäristön eksonukleasit pääse hajottamaan näytteen sisältämää RNA:ta huoneenlämmössä (Burden 2008).

Keuhkohuuhtelumenetelmä ei yleensä sovellu mikrobiologisten näytteiden ottamiseen, sillä näytteenottoletku kontaminoituu kulkiessaan ylempien hengitysteiden kautta keuhkoihin. Endoskoopin avulla on kuitenkin mahdollista ottaa puhtaita näytteitä syvältäkin keuhkoista, mutta koko keuhkohuuhtelunäytteen ottaminen puhtaalla endoskoopilla on hankalaa (Roy & Lavoie 2003).

Kuten koirilla, on myös hevosilla paikallisten keuhkomuutosten analysointi vaikeaa, mutta keuhkohuuhtelunäytteet soveltuvat hyvin diffuusien keuhkosairauksien kuten COPD:n (krooninen obstruktiivinen keuhkohtauma, puhkuri, recurrent airway obstruction, RAO), IAD:n (inflammatory airway disease) tai EIPH:n (exercise induced pul-

monary hemorrhage, rasituksen aikaansaama keuhkoverenvuoto) diagnosointiin (Roy & Lavoie 2003). Mikäli näyte otetaan sokkona, ei ole väliä, kummalle keuhkopuoliskolle näytteenottoletku ohjautuu. Toisaalta hevosella voi olla kaikesta huolimatta myös diagnosoimattomia paikallisia muutoksia, ja BAL-näytteen ottaminen sokkona tällaisesta kohdasta vääristää arvion koko keuhkojen alueen kunnosta. Yleensä sokkona suoritettavassa näytteenotossa letku ohjautuu joko pallealohkoon tai oikeaan kaudodorsaalilohkoon.

Keuhkohuuhtelunäytteen ottaminen on nykyisin hevoselle, joka ei ole merkittävässä määrin kliinisesti sairas, turvallinen menetelmä. Itse asiassa yhdessä tutkimuksessa havaittiin keuhkojen toimintakyvyn parantuneen BAL-näytteenoton yhteydessä todennäköisesti hengitysteistä vähentyneen limanmuodostuksen ansiosta (Leguillette & Lavoie 2006). Huuhtelunäytteen jälkeen hevosen rasittamista tulee välttää 2–3 vuorokauden ajan (Hoffman 2008).

Hevosen keuhkohuuhtelunäytteet koostuvat tavallisesti tulehdussoluista ja normaaleista epiteelisoluista (Hoffman 2008). Normaalista poikkeavia epiteelisoluja on nähtävillä erilaisissa keuhkojen tulehdustiloissa (Hodgson & Hodgson 2002). Tavallisessa keuhkohuuhtelunäytteessä on lähinnä makrofageja ja lymfosyyttejä, kun taas näytteen mastsolujen, epiteelisolujen, eosinofiilien ja neutrofiilien määrät ovat vähäisempiä (McGorum & Dixon 1994).

### **3 Lähetti-RNA:n kvantitointi**

Geeniekspressiotuotteen määrän kvantitointi ja sitä kautta geenin aktiivisuuden määrittäminen on kiinnostanut tutkijoita transkription biokemiallisen periaatteen keksimisestä lähtien. Yksittäisen geenituotteen määrän mittaaminen yhden solutyypin tai kudoksen ekspressoimien geenituotteiden joukosta on vaikeaa, sillä tavallisesti yhden geenin ekspressiotuotteen määrä on vain femtogrammaluokkaa (Izutani ym. 1994). Hankaluuksia aiheuttaa myös se, että monet geenit ovat osa suurempaa geeniperhettä, ja perheen eri jäsenten ekspressoimat lähetti-RNA-molekyylit muistuttavat toisiaan niin paljon, että tuotteiden erottaminen toisistaan luotettavasti on hankalaa. Eri näytteiden sisältämien lähetti-RNA-tasojen suhteuttaminen toisiinsa tulee myös suorittaa luotettavasti.



### 3.1 RNA:n eristäminen

Kenties merkittävin yksittäinen vaihe jossain kudoksessa tai solutyypissä tapahtuvan geeniekspression määrittämisessä on RNA:n eristäminen (Burden 2008). Solujen ekspressoimien RNA-molekyylien hajoaminen tapahtuu nopeasti solun sisäisten prosessien toimesta sen jälkeen, kun RNA on suorittanut tehtävänsä (Houseley & Tollervey 2009), sekä myös endo- ja eksoribonukleaasien toimesta.

RNA-molekyylit eivät varsinaisesti ole herkkiä tuhoutumaan lämmön vaikutuksesta, mutta niitä degradoivat ribonukleaasit ovat aktiivisia jo huoneenlämmössä (Burden 2008). Tästä syystä niin RNA:n eristykseen tarkoitettut kudoksenäytteet kuin eristetty RNA tulisi säilyttää pakastimessa, mieluiten syväjäähäpakastimessa  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ :ssa. Kudoksen- ja solunäytteet tulisi siirtää välittömästi näytteenoton jälkeen nestetyyppeen, mutta usein tämä on käytännön syistä hankalaa esim. suurten eläinten kudoksenäytteiden ottamisen yhteydessä kenttäolosuhteissa. Kaikkialla ympäristössä olevien ribonukleaasien vuoksi myös aseptiikka näytteenotossa on tärkeää (Houseley & Tollervey 2009).

RNA:n eristuksen vaativin vaihe on tutkittavan kudoksen- tai solunäytteen homogenisointi (Burden 2008). RNA-molekyylien vapauttaminen solun sisältä tulisi tapahtua niin, että solu rikkoontuu, mutta solun sisältämät RNA-molekyylit säilyvät ehjinä. Vaikka käytössä onkin kemiallisia menetelmiä yksittäisten solujen hajottamiseksi, eivät ne ole käytökelpoisia kudoksenäytteiden käsittelemiseen.

Kudosten homogenisointiin on tarjolla monia erilaisia mekaanisia käsittelytapoja (Burden 2008). Valitettavasti monissa ohjeissa ja julkaisuissa, joissa käsitellään nukleiinihappojen eristämistä, homogenisointivaihe kuvataan yleismalkaisesti yksilöimättä laitteistoja tai muita olosuhteita. Tämän vuoksi tutkijoilla on usein ongelmia uudentyyppisten kudosten tai näytesarjojen homogenisoimiseen käytettävien laitteistojen ja menetelmien kanssa. Merkittävä osa tutkimukseen käytettävästä ajasta saattaa kulua triviaalien mekaanisten ongelmien kanssa painimiseen.

Perinteisin ja taloudellisesti edullisin kudoshajotusmenetelmä on kudoksen jauhaminen morttelilla (mortar and pestle -menetelmä). Tässä kuten käytännössä kaikissa muissakin mekaanista hienontamista hyväksikäyttävissä menetelmissä hajotettava

kudoskappale on jäädytetty nestetyypessä. Esimerkiksi lihas- tai keuhkokudos on huoneenlämmössä huomattavan sitkeää kudosta, mutta syväjäätymässä kudostyyppien rakenne on helpommin rikottavissa. Muita mekaanisen jauhamisen tapoja ovat nk. lasi-homogenisaattori, jossa lasiseen koeputkeen siirretty näyte homogenisoidaan tarkalleen koeputken muotoja vastaavalla teflonista valmistetulla hiertimellä (Burden 2008). Hierrinosa voi olla yhteydessä laitteeseen, joka pyörittää sähkömoottorin avulla hierintä koeputkessa, jolloin kudoksen hajoaminen tapahtuu tehokkaammin. Useilla eri valmistajilla on tarjolla mekaanisia dispersio- tai homogenisointilaitteita, joita kutsutaan "rotor-stator"-homogenisaattoreiksi (Burden 2008). Laitteisiin on tarjolla halkaisijaltaan eri kokoluokkaa olevia metalliteriä, jotka mahtuvat dispergoinnissa käytettäviin koeputkiin, joissa hajotettava kudospala on. Teräosa koostuu paikallaan olevasta ulkokuoresta, jossa on erilaisia nestevirtausta parantavia reikiä ja muotoja, sekä kuoren sisällä olevasta pyörivästä teräosasta, jonka pyörimisliike saa kudospalan liikkeelle, hajottaa kudoksen pienempiin osiin ja samalla jauhaa kudospalan partikkelikoon solutasolle ja jopa siitä pienemmälle asteelle. Osa käsiteltävästä kudoksesta jää aina hienontamatta kudostyyppistä, käytettävästä laitteistosta ja monista muista seikoista johtuen, ja tämän hukkamäärän pienentäminen on suurimpia haasteita kudospäätteen homogenisoinnissa (Burden 2008).

Kudoshomogenisointi tapahtuu jonkun homogenisointia helpottavan ja eristettävän biologisen materiaalin säilymistä parantavan liuoksen läsnä ollessa. RNA-sien aktiivisuuden vähentämiseksi käytetään homogenisaatiliuoksessa kaotrooppisia yhdisteitä kuten guanidiini-isotiosyanaattia tai nukleaaseja hajottavia yhdisteitä kuten proteinaasi K:tä (Burden 2008). Nykyisin kaupallisesti tarjolla olevissa eristysmenetelmissä on erityisesti kudoshomogenisoinnin yhteydessä käytettäväksi tarkoitettu lyysauspuskuri, jonka tarkka koostumus on valmistajan toimesta salattu. Loppukäyttäjän mahdollisuudet homogenisointiliuoksen valintaan rajoittuvat tällöin vaihtamiseen eri valmistajan tuotteeseen. Homogenisointivaiheen yhteydessä on mahdollista erottaa osa homogenaatista käytettäväksi johonkin muuhun tarkoitukseen, esimerkiksi proteiinien eristämiseen samasta kudospäätteenä. Näissä tapauksissa hajotuspuskurin koostumusta saatetaan joutua muokkaamaan, mikä osaltaan heikentää saantoja sekä nukleinihappojen että mahdollisten proteiinien eristämisen osalta (Burden 2008).

Varsinainen RNA:n eristäminen suoritetaan nykyisin lähes poikkeuksetta erilaisia matriiseja kuten piidioksidipohjaisia suodatinpatruunoita sisältävien suodatinpylväiden avulla (Cady ym. 2003). Näytteet imeytetään suodatinpatruunoihin sentrifugoimalla RNA:ta sisältävä liuos patruunan läpi. Menetelmissä käytettävät pesut, jolloin mukana olleet epäpuhtaudet ja esimerkiksi DNA irrotetaan matriisista, ja lopulta näytteen eluointi irti matriisista tapahtuvat myös sentrifugoimalla patruunayksikköä. Eluointivaiheessa talteenotettava liuos sisältää eristetyn RNA-fraktion, jota voidaan käyttää sellaisenaan seuraavissa vaiheissa (Cady ym. 2003).

Aiemmin käytössä olleet esim. gradienttiultrasentrifugointiin perustuvat menetelmät ovat vaivalloisina ja taloudellisesti epäedullisina jääneet käytöstä lähes kokonaan. Eri valmistajien eristyspakkaukset muistuttavat suuresti toisiaan, ja ne koostuvat yhdestä tai useammasta suodatinpatruunasta, joka soveltuu käytettäväksi eppendorf-kokoluokan koeputkissa, sekä erilaisista hajottamiseen, puhdistamiseen ja näytteen irrottamiseen käytettävistä liuoksista. Jälleen näiden liuosten tarkka koostumus on liikesalaisuus, joten loppukäyttäjän mahdollisuudet ovat lähinnä seurata orjallisesti pakkauksien mukana annettavaa ohjeistusta ja ongelmatilanteissa ottaa yhteyttä tuotteen valmistajaan. Eristyspakkausten laatu on nykyisin poikkeuksetta vähintään tyydyttävä, tosin tiettyjen kudostyyppien yhteydessä saattaa esiintyä vaikeuksia, jotka vaativat kohtuuttomasti aikaa, vaivaa ja taloudellisia resursseja tyydyttävän lopputuloksen aikaansaamiseksi.

### **3.2 Northern blot**

Northern blot -menetelmässä tutkittavan totaali-RNA- tai lähetti-RNA-näytteen sisältämät geenituotteet erotellaan agarosigeelielektroforeesin avulla (Alwine ym. 1977). Menetelmässä erikokoiset RNA-molekyylit erottuvat toisistaan molekyylipainonsa suhteessa niin, että sähkövirran kuljettamana pienikokoisemmat nukleiinihapot kulkeutuvat agarosigeelillä kauemmaksi kuin suuremmat. Tämän jälkeen geelillä olevat nukleiinihapot siirretään nylonkalvolle kapillaari-imun tai alipaineen avulla, koska seuraavassa vaiheessa spesifisten nukleiinihappojen tunnistamisessa käytettävä radioaktiivisesti leimattu koetin ei pysty sitoutumaan RNA-molekyylisiin geelimatriksin sisällä. Käytetylle nylonkalvolle siirretyt nukleiinihapot kiinnitetään tiukemmin kuivaamalla kalvo, ja sa-

malla sillä oleva RNA muokkautuu niin, että sen sitoutuminen seuraavassa vaiheessa käytettävään koettimeen on helpompaa (Thomas 1980).

Halutun lähetti-RNA-tuotteen tunnistamiseen käytetään siis jollain radioaktiivisella leimalla leimattua koetinta, joka on tavallisesti pätkä nukleiinihappoa, jonka sekvenssi on vastakkainen tutkittavan RNA:n kanssa, jolloin koetin pystyy sitoutumaan eli hybridisoitumaan tutkittavaan nukleiinihappomolekyylisiin. Kun koetin on sitoutunut nylonkalvolla olevaan vastinmolekyylisiin, voidaan sitoutuminen visualisoida röntgenfilmin avulla. Mikäli samalla geelillä on ajettu useampia näytteitä, voidaan röntgenfilmille muodostuneen signaalin tai vyöhykkeen voimakkuuden avulla arvioida hybridisoituneen koettimen määrä ja näin myös geelissä olleen näytteen sisältämän halutun RNA-molekyylin määrä. Kun geelillä ajettujen RNA-näytteiden määrä esim. mikrogrammoina on ollut yhtä suuri, saadaan suhteelliset eroavaisuudet kunkin tutkittavan RNA-molekyylin osalta selville. Samalla on myös mahdollista määrittää tutkittavan RNA-molekyylin pituus emäspareina geelissä mukana olleiden eripituisten standardimolekyylin avulla (Thomas 1980).

Northern blot -menetelmän heikkoutena on se, että se vaatii suuren määrän, noin 5 µg, eristettyä RNA:ta geeliasia varten. Vaarana eristettäessä suurta määrää RNA:ta on myös se, että osa RNA:sta hajoaa käsittelyn aikana joko liian korkea lämpötilan tai näytteeseen jääneiden RNAasi-molekyylin vuoksi. Hajonneen RNA:n tunnistaminen ei välttämättä ole mahdollista koettimella, ja ainakin kvantitoinnin osalta voidaan saada virheellisiä tuloksia. Radioaktiivisen koettimen tulee olla suhteellisen pitkä riittävän voimakkaan sitoutumisen saavuttamiseksi. Pituuden lisääntyessä kasvaa myös koettimen epäspesifisyys, eli pidempi koetin voi sitoutua johonkin riittävän samankaltaiseen molekyylisiin, jolloin röntgenfilmiltä määritetyn signaalin voimakkuus ei kuvaa halutun geenituotteen määrää. Radioaktiivisen materiaalin käsittelyssä on omat riskinsä, joten myös muulla tavoin visualisoitavissa olevia leimausjärjestelmiä on kehitetty. Näiden herkkyydet ovat kuitenkin perinteistä northern blot -menetelmää heikompia, ja koska menetelmän käyttäminen on vähenemään päin, eivät tällaiset leimausjärjestelmät ole saavuttaneet kovinkaan merkittävää suosiota.

### 3.3 PCR-menetelmät lähetti-RNA:n kvantitoinnissa

Kary Mullisin kehittämä polymeraasiketjureaktiomenetelmä (Saiki ym. 1985) on sen kehittämisen jälkeen lähes välittömästi ryhdytty käyttämään nukleiinihappomolekyylien määrän määrittämiseen (Bustin 2000). PCR:n yleisenä etuna on sen kyky monistaa erittäin vähäisestä lähtömateriaalista suuri määrä kopioita, jolloin tutkittavan nukleiinihapon detekointi on olennaisesti helpompaa. Nykyään PCR-menetelmä on laajalti käytössä, ja menetelmän peruserätykset on esitetty kaikissa molekyylibiologiaa ja nykyaikaista molekyyliäketiedettä käsittelevissä oppikirjoissa. Koska northern blot -menetelmässä tarvitaan suuri määrä lähtömateriaalia riittävän RNA-määrän eristämiseksi, rajoittaa se tutkittavien kudostai solumäärien käyttämistä. Kun PCR-menetelmää käytetään apuna lähetti-RNA:n määrittämisessä, riittävät pienetkin kudospalaset tai yksittäiset soluviljelymaljat tarpeeksi suuren RNA-näytemäärän saamiseen (Bustin 2000).

PCR-menetelmät ovat mahdollistaneet entistä pienempien kudostai solunäytteiden käyttämisen geeniekspressiotutkimuksissa. Kun aiemmin esim. northern blot -menetelmään tarvittiin useita mikrogrammoja RNA:ta, jolloin kudostai näytemäärät olivat grammakokoluokkaa, riittää PCR-pohjaisiin menetelmiin vain muutama milligramma kudosta (Bustin 2000). Itse asiassa useimpien kaupallisten RNA-eristysmenetelmien ohjeistuksessa suositellaan enintään 50 milligramman, edullisemmin noin 20 milligramman, kudostai näytepaljoja. Vaikka suurelaimillä kudostai määrän pienuus on harvoin esteenä, on pienempien kudostai näytteiden ottaminen ja kuljettaminen suurilla kudostai paljoilla helpompaa.

### 3.4 Käänteiskopiointireaktio

Kvantitatiivisessa PCR:ssä eristetty lähetti-RNA, joka voidaan joko eristää suoraan lähetti-RNA:na tai se voi olla osana totaali-RNA-eristystä, modifioidaan kaksijuosteiseksi komplementaariseksi DNA:ksi eli cDNA:ksi käänteiskopioijaentsyymien avulla. Reaktiossa tarvitaan aluke, josta entsyymi voi aloittaa nukleotidimästen lisäämisen polynukleotidiketjuun käyttäen mallina eristettyä RNA-molekyyliä (Buell 1978).

Mikäli halutaan vain yhdestä ekspressoidusta geenistä peräisin olevaa tuotetta, voidaan käyttää tämän geenin sekvenssin suhteen spesifistä koetinta. Käänteiskopiointi-

reaktio etenee entsyymien toimesta 3'-5'-suuntaan, ja kun entsyymi on saavuttanut kopioitavan molekyylin 5'-pään, entsyymi ikään kuin kääntyy takaisinpäin koostaen toisen komplementaarisen juosteen käyttäen mallina juuri tehtyä juostetta, jolloin tuloksena on kaksijuosteinen cDNA-molekyyli (Buell 1978).

Käytettäessä lähetti-RNA:ta, voidaan alukkeeseen sisällyttää useista peräkkäin olevista tymidiininukleotideista koostuvaa oligonukleotidia. Tällainen aluke sitoutuu kaikkien mRNA-molekyylien 3'-päässä olevaan poly-A-päähän, ja käänteiskopioijaentsyymi valmistaa näistä RNA-molekyyleistä cDNA-molekyylejä.

Mikäli taas halutaan edustava kaksijuostesten cDNA-molekyylien joukko käytetyn biologisen näytteen ekspressoimien geenien tuotteista ja kaikista muistakin näytteen sisältämistä RNA-molekyyleistä, käytetään niin kutsuttuja sattumanvaraisia heksameerikoettimia, jotka ovat kuuden nukleotidin pituisia nukleinihappopalasasia, joissa neljän nukleinihapon järjestys voi olla mikä vain. Nämä heksameerialukkeet sitoutuvat sattumanvaraisesti kaikkiin näytteessä oleviin lähetti-RNA-molekyyleihin ja myöskin ribosomaalisiin rRNA-molekyyleihin toimien aloituskohtana käänteiskopioijaentsyymille, jolloin saadaan kaikista näytteen sisältämistä RNA-molekyyleistä eripituisia cDNA-molekyylejä (Bustin 2000).

On huomattava, että kaikissa edellä kuvatuissa menetelmissä saatujen cDNA-molekyylien määrä on enintään yhtä suuri kuin mitä näytteessä olleiden RNA-molekyylien määrä. Käänteiskopioinnissa ei siis detektoitavan materiaalin määrä lisäännä. Yksijuosteinen RNA vain muokataan kaksijuosteiseksi nukleinihappoketjuksi, joka puolestaan voi toimia templaattina polymeerasiketjureaktiossa, jossa nukleinihappojen monistaminen on mahdollista.

Kvantitatiiviseen PCR-menetelmään perustuvaan geeniekspressiomääritykseen tarvitaan vain vähäinen määrä esim. totaali-RNA:ta. Käänteiskopiointireaktioon riittää vähimmillään 50 ng RNA:ta, ja tästä määrästä on mahdollista määrittää kvantitatiivisesti ainakin 20:n eri geenituotteen määrä (Bustin 2000). Tavallisimmin RT-reaktiossa käytettävä määrä on noin 0,5 µg, josta voidaan tehdä useita satoja määrittäviä. Verrattuna esim. northern blot -menetelmään, jossa minimimääränä yhteen kudospääritykseen pidetään n. 5 mikrogrammaa, on QPCR-menetelmässä tarvittavan eristetyn RNA:n määrä merkittävästi pienempi.

### 3.5 Kvantitatiivinen PCR

Kvantitatiivisessa polymeerasiketjureaktiossa käytetään hyväksi edelläkuvatulla tavalla RNA:sta valmistetun kaksijuosteisen cDNA:n monistamista ja lopputuotteen määrän arvioimista. Optimaalisessa PCR-reaktiossa yhden syklin sisältämän templaatin määrä kaksinkertaistuu jokaisen syklin jälkeen. Tämän vuoksi on periaatteessa mahdollista määrittää lopputuotteen määrä mittaamalla reaktion alussa ollut alkuperäinen templaattimäärä. Käytännössä määrittäminen tällä tavoin on kuitenkin hankalaa, koska PCR-reaktion tehokkuus ei ole optimaalinen kuin ehkä muutaman syklin ajan (Ferre 1992). Reaktiota rajoittavina tekijöinä ovat mm. alukkeen epätäydellinen sitoutuminen, entsyymien määrä ja käytettävissä olevien yksittäisten nukleotidien määrä. Niinpä PCR-reaktio tulisi keskeyttää hyvissä ajoin ennen kuin reaktiokomponenttien määrä muodostuu reaktion etenemistä rajoittavaksi (Ferre 1992). Yleisesti uskotaan, että jos normaalilla agarosigeelillä ajettu PCR-tuote saadaan visualisoitua etidiumbromidivärjäyksellä, on reaktio edennyt jo niin pitkälle, että jokin tekijä on rajoittanut reaktion tehokkuutta. Siksi tuotteen määrän perusteella ei ole mahdollista tehdä johtopäätöksiä monistettavan tuotteen alkuperäisestä määrästä. Kvantitatiivista PCR:ää käytettäessä PCR-reaktiotuotteen optimaalinen syklimäärä on määritetty edeltä käsin iteroimalla niin, ettei reaktiota rajoittavaa tekijää ole. Reaktiotuote ajetaan agarosigeelielektroforeesilla, siirretään blottausmenetelmällä nylonkalvolle, ja kalvo käsitellään radioaktiivisesti leimatulla koettimella kuten edellä on kuvattu. Röntgenfilmivalotuksen jälkeen voidaan arvioida valottuneen vyöhykkeen intensiteetin perusteella alkuperäisen eristetyn eli siis monistukseen käytetyn ekspressiotuotteen määrä. Tämä menetelmä ei kuitenkaan ole saanut suurta suosiota monien virhelähteiden ja vaivalloisuutensa vuoksi. Luotettavuus riippuu suuresti reaktio-olosuhteiden optimoinnista, sillä minkä tahansa rajoittavan tekijän osuus vaikuttaa menetelmän toimivuuteen huomattavasti (Ferre 1992).

### 3.6 Tosiaikainen kvantitatiivinen PCR

Tosiaikaisessa kvantitatiivisessa polymeerasiketjureaktiossa alkuperäisen monistettavan templaatin määrän arvioimiseen ei käytetä lopputuotteen määrää kuten edellä. Tämän sijaan reaktion etenemisen yhteydessä pyritään jokaisen PCR-syklin jälkeen määrittämään käytettävissä olevan templaatin määrä. Kun reaktio on tehokkaimmillaan eli silloin, kun yhden PCR-syklin tuottamien templaattinukleiinihappojen määrä on kaksinkertainen tai niin lähellä kaksinkertaista kuin mahdollista, voidaan käytettävissä olevan templaatin määrän kuvaavan reaktion alkuvaiheessa olevan templaatin määrää (Bustin 2000).

Teknisesti ongelmallisinta on ollut reaktiossa syntyneen kaksijuosteisten nukleiinihappojen määrän määrittäminen jokaisen PCR-syklin välillä. Ratkaisuksi on löydetty erilaisia valoaktiivisia yhdisteitä, jotka absorboivat valokvantteja jollain tietyllä valon aallonpituudella ja toisaalta emittoivat kvantteja jollain toisella aallonpituudella. Tällaisten yhdisteiden ominaisuuksien pitää myös muuttua niiden sitoutuessa syntyneeseen kaksijuosteiseen nukleiinihappomolekyylisiin tai nukleiinihappoon sitoutuneen ja sitoutumattoman valoaktiivisen yhdisteen absorboiman ja emittoiman aallonpituuden erottaminen toisistaan tulee olla mahdollista jollain muulla tavalla (Bustin 2000).

### 3.7 SYBR Green -menetelmä

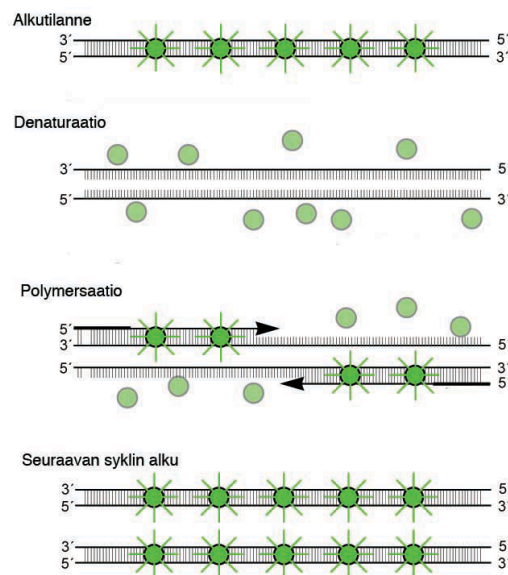
SYBR Green I (SG) on Molecular Probes Inc. -yhtymän kehittämä yhdiste, joka sitoutuu kaksijuosteiseen nukleiinihappoon ja joka sitouduttuaan absorboi valoa aallonpituudella 497 nm ja vastaavasti emittoi valoenergiaa aallonpituudella 520 nm (Morrison ym. 1998). Vapaana liuoksessa ollessaan SYBR Green I ei ole valoaktiivinen. Mikäli nukleiinihappoja ja SG:tä sisältävään liuokseen johdetaan monokromaattista valoa, jonka aallonpituus on em. 497 nm ja samasta liuoksesta mitataan aallonpituudella 520 nm emittoituvaa valoa, vastaa mitattu emittoidun valon intensiteetti liuoksessa olevan kaksijuosteisten nukleiinihappojen määrää (Morrison ym. 1998).

PCR-reaktion spesifisyys riippuu siitä, kuinka spesifiset alukkeet reaktioon on valittu. Yleensä suurin osa reaktiossa monistuvaa nukleiinihappotuotetta on haluttua tuotetta, mutta mikäli käytetyillä alukkeilla on sitoutumiskohtia muuallakin kuin siinä sekvens-



sissä, jota halutaan monistaa, syntyy reaktiossa useampaa kuin yhtä tuotetta. Alukeoli-gonukleotidit voivat myös sitoutua muihin sekvensseihin, jotka eivät täysin vastaa alukkeen sekvenssiä, mutta jotka kuitenkin ovat riittävän homologisia siihen, että aluke sitoutuu sekvenssiin riittävän voimakkaasti toimiakseen PCR-reaktiossa (Bustin 2000). Toisaalta on myös mahdollista, että reaktioon joutuu epäpuhtauksina muita alukkeita esim. laboratorioissa, joissa PCR-reaktioita tehdään laajamittaisesti ja näin myös erilaisia alukkeita käsitellään suuria määriä. Koska SG sitoutuu kaikkiin kaksijuosteisiin nukleiinihappomolekyyleihin, lisää PCR-reaktiossa mahdollisesti syntyvien virheellisten tuotteiden määrä mitattavaa intensiteettiä, mikä aiheuttaa virheen määrittäessä reaktiossa syntyvän kaksijuosteisen tuotteen määrää ja sitä kautta alkuperäiseen reaktiossa määritettävän templaatin määrään (Bustin 2000).

SG:tä markkinoidaan esim. etidiumbromidia, joka on yleisesti molekyylibiologiassa käytettävä nukleiinihappojen visualisointiin käytettävä yhdiste ja myös ihmiselle mutageeni, turvallisempaa vaihtoehtona. Kuitenkin kaikki yhdisteet, jotka sitoutuvat kaksijuosteiseen nukleiinihappomolekyyliin, ovat jossain määrin mutageenisia (Singer ym. 1999).



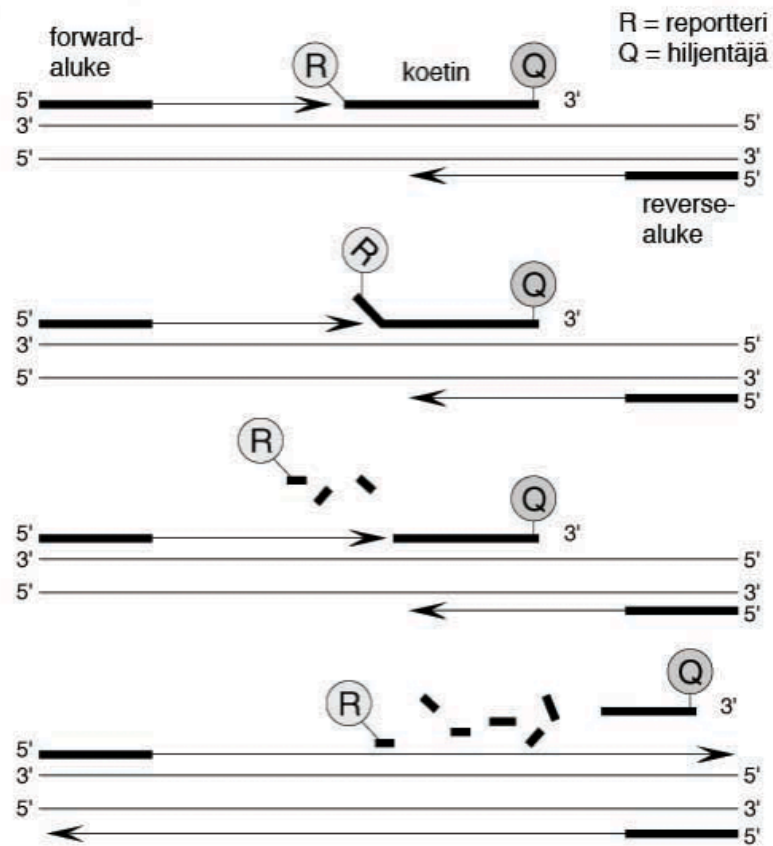
Kuva 1. SYBR-Green I -fluoroforileiman liittyminen kaksijuosteisiin nukleiinihappomolekyyleihin. Sitoutuessaan nukleiinihappoon, leima aktivoituu ja eksitoitaessa sopivalla aallonpituudella se emittoi valoa, jonka intensiteetti voidaan määrittää.

## 3.8 TaqMan®-menetelmä

### 3.8.1 Yleinen periaate

Polymeraasiketjureaktiossa käytettävän Taq-polymeraasientsyymin eksonukleasiaktiivisuus on yleisesti tiedossa ollut ominaisuus. Samalla kun entsyymi liittää yksittäisiä nukleotideja ketjuksi käyttäen mallina templaattijuostetta, "tyhjentää" entsyymi kaiken mahdollisesti jo sitoutuneen nukleinihappomateriaalin edetessään kohti 3'-päättä. Tätä ominaisuutta käytetään hyväksi TaqMan®-menetelmässä, joka on yleisesti käytössä tosiaikaisessa kvantitatiivisessa PCR:ssä (Holland ym. 1991).

TaqMan®-reaktiossa on normaalien kahden PCR-alukkeen lisäksi kolmas oligonukleotidi, joka perinteisessä TaqMan®-menetelmässä sisältää fluoresoivan leimamolekyylin sekä 3'-päässä että 5'-päässä. Tällaista kaksoisleimattua oligonukleotidia kutsutaan TaqMan®-koettimeksi (Gibson ym. 1996). Koettimen 5'-päässä oleva fluorofori on niin kutsuttu signaalifluorofori, kun taas 3'-pään fluoroforia kutsutaan hiljentäjäksi tai "quencher"-fluoroforileimaksi. 5'-pään signaalileimoja on nykyään käytössä suuri määrä, ja ne poikkeavat toisistaan eksitaatio- ja emissioaallonpituuksien osalta. 3'-pään hiljentäjäleimoja on käytössä vähemmän, mutta hiljentäjän emissioiman valoenergian määrä ei ole olennainen PCR-reaktion seuraamisen osalta. Koettimen sekvenssi on komplementaarinen määritettävän geenituotteen jommankumman juosteen sekvenssin suhteen, ja koettimen sitoutumiskohta on PCR-reaktiossa käytettävien tavallisen alukkeiden välissä. Koettimen ollessa vapaasti reaktioliuoksessa tai sitoutuneena kokonaisuutena komplementtikohdansa sekvenssissä, absorboi hiljentäjäfluorofori käytännössä kaiken signaalifluoroforilta peräisin olevan energian. PCR-reaktion edetessä templaattiin sitoutuneena oleva oligonukleotidi pilkkoutuu pieninä palasina irti komplementaarikohdastaan monistettavasta sekvenssistä, jolloin signaali- ja hiljentäjäleimat joutuvat toisistaan erilleen eikä hiljentäjä pysty enää sieppaamaan signaalileiman emissioimaa energiaa. Lisääntynyt valoenergia 5'-pään fluoroforille ominaisella taajuudella lisääntyy, ja reaktion ollessa tehokkaimmillaan, jolloin käytettävissä oleva templaattimäärä kaksinkertaistuu kunkin PCR-syklin jälkeen, voidaan edellä kuten SG:tä käytettäessä määrittää alkuperäisessä näytteessä olleen templaatin eli ekspressoidun spesifisen lähetti-RNA:n määrä (Bustin 2000).



Kuva 2. TaqMan<sup>®</sup>-menetelmän periaate. Menetelmä perustuu PCR-reaktiossa käytettävän *Taq*-polymeraasin eksonukleaasiaktiivisuuteen, minkä avulla templaattiin spesifisesti sitoutunut kaksoisleimattu koetin pilkotaan, jolloin reporterifluoroforin signaalin lisääntymisen perusteella voidaan kvantitoida nukleiinihappojen määrä (alkuperäinen kuva Perkin-Elmer Cetus, USA).

Tosi aikaisen kvantitatiivisen PCR:n suorittamiseen tarvitaan menetelmää varten suunniteltu laite, jollaisia on saatavilla useilta eri toimittajilta. Peruseriaatteena laitteissa on valonlähde, joka kykenee lähettämään monokromaattista valoa eri aallonpituudella, valovastaanotin, joka kykenee analysoimaan emittoituvan valon määrää sekä tavallinen PCR-laite, jonka avulla itse PCR-reaktion suorittaminen on mahdollista. Eri valmistajien laitteissa voi olla vähäisiä eroja esim. eksitaatioissa käytettävien aallonpituuksien määrässä ja emittoituvan valon aallonpituuksien havainnoinnissa, mutta käytännössä kaikkien valmistajien laitteilla päästään yhtä suuriin herkkyyksiin.

### 3.8.2 PCR-alukkeet ja TaqMan®-koetin

TaqMan®-PCR-reaktion toimivuuden osalta olennaisin tekijä on onnistunut PCR-alukkeiden ja kaksoisleimatus fluoroforikoettimen suunnittelu. Periaatteessa on mahdollista määrittää minkä tahansa geenin, jonka sekvenssi tiedetään, tuottaman lähetti-RNA:n määrän mittaamiseen sopiva aluke-koetin-pari. Tällaista paria kutsutaan yleisesti ja tässä yhteydessä jatkossa pelkäsi koettimeksi. Kuitenkin on olemassa geeniperheitä, joiden jäsenten nukleotidisekvenssit ovat niin lähellä toisiaan, ettei ole mahdollista suunnitella sopivaa TaqMan®-koetinta, joka pystyisi luotettavasti erottamaan toisilleen läheisten geenisekvenssien ekspressoimat RNA-molekyylit. Joissain tapauksissa fyysisesti lyhyiden geenien kohdalla proteiiniksi transloitavan mRNA:n pituus on niin lyhyt, ettei sekvenssin alueelta löydy optimaalista kohtaa koettimelle. Koettimen PCR-alukkeiden välimatka on vähintään 60 emäsparia, mikä vastaa noin 20 aminohapon pituista peptidiä (Bustin 2000). Tosin geenin tuottaman prosessoimattoman RNA-molekyylin pituus signaali-peptidiosision kanssa on käytännössä aina tätä pitempi, joten geenin lyhyys on todellisuudessa harvoin rajoittava tekijä. Lyhyys saattaa olla esteenä tapauksissa, joissa julkaistun geenin cDNA-sekvenssin eli mRNA:ta vastaavan sekvenssin pituus on niin lyhyt, ettei alueelta löydy sopivaa koetinta. Normaalien PCR-alukkeiden ja myös TaqMan®-menetelmässä käytettyjen alukkeiden sulamislämpötila ( $T_m$ ) on noin 60 °C (Bustin 2000). Alukkeiden väliin sijoittuvan koetinoligonukleotidin sulamislämpötilan puolestaan tulee olla noin 70 °C, eli koettimen tulee sitoutua vastinsekvenssiinsä alukkeita tiukemmin (Bustin 2000). Tämä osaltaan lisää menetelmä spesifisyyttä, mutta samalla myös vaikeuttaa TaqMan®-koettimen suunnittelua. Alukkeen sulamislämpötilaan vaikuttavat alukkeen pituus ja alukkeen CG%, joka kuvaa sekvenssissä olevien C- ja G-emästen osuutta. Näiden nukleotidien kovalenttinen sitoutuminen vastinnukleotidiinsa on A- ja T-emäksiä tiukempaa, joten C- ja G-emäksiä enemmän sisältävän oligonukleotidin  $T_m$ -arvo on suurempi. Toisaalta oligon pituuden kasvaessa sen sulamislämpötila kasvaa tiettyyn rajaan saakka, kunnes lämpötila ei enää kasva pituuden lisääntyessä. Joidenkin geenien sekvenssijärjestys on sellainen, että sekvenssistä ei löydy tarpeeksi C- ja G-emäksiä, jotta saavutettaisiin haluttu 70 °C:n sulamislämpötila (Bustin 2000). Auke- ja koetinoligojen enimmäispituus on yleensä noin 30 emäsparia, ja tämä voi joissain tapauksissa rajoittaa sopivien sekvenssien löytämistä.

Alukkeiden suunnitteluun ja oligojen sulamislämpötilojen laskemiseen on tarjolla useita kaupallisia sekä ilmaisia tietokoneohjelmia. Ohjelmat hakevat annetusta cDNA-sekvenssistä suuren joukon enemmän tai vähemmän sopivia aluke-koetin-pareja, joista kokeneen käyttäjän tulee itse valita sopivin. Joissain tapauksissa hyvän koettimen valinta on helppoa, jolloin TaqMan®-koettimesta tulee laskennallisesti lähes optimaalinen, mutta useimmissa tapauksissa on tyydyttävä kompromisseihin koskien joko PCR-alukkeiden tai koet inoligonukleotidin pituutta, CG-prosenttia tai sulamislämpötilaa (Bustin 2000). Kuitenkin tällaisilla puutteellisimmillakin TaqMan®-koettimilla on mahdollista saada luotettavia tuloksia.

Kuten edellä mainittiin, tutkittavien sekvenssien liiallinen samankaltaisuus voi olla rajoittava tekijä suunniteltaessa koettimia. Toisaalta joissain tapauksissa eri lajien välisen geenien samankaltaisuus voi olla etu suunniteltaessa koetintä, jolla voi määrittää saman geenin tuotetta eri lajeilta. Kaksoisleimattujen fluoroforikoettimien syntetisointi on tosin nykyisin taloudellisesti siinä määrin edullista, että usein on kannattavampaa suunnitella ja tilata koetinten toimittajilta oma koetin kunkin lajin kullekin geenille.

Tietotaidon kehittäminen luotettavien aluke-koetin-parien suunnittelemiseen vaatii aikaa ja pitkäjänteisen perehtymisen aiheeseen. Nykyisin bioteknologian alan yrityksillä on tarjota valmiita aluke-koetin-yhdistelmiä useiden eri lajien eri geenien ekspressiotuotteiden määrittämiseen kvantitatiivisella PCR-menetelmällä, tai tarvittaessa yritykset valmistavat itse tutkijan esittämän geenisekvenssin perusteella halutun koetinjärjestelmän. Kaupallisten yritysten tutkijoiden suunnitteleuille määritykselle luvataan tietty tehokkuus ja se, että sillä on mahdollista mitata vain tutkittavana olevaa geenituotetta, mutta käytettävien oligonukleotidien sekvenssejä loppukäyttäjänä oleva tutkija ei saa käyttöönsä tai tietoonsa. Käytäntö mahdollistaa suhteellisen edullisen tavan tutkia vain muutamien kiinnostuksen kohteena olevien geenien toimintaa, mutta mikäli tutkittavana on yhden geenin ekspressio useammassa kudoksessa tai lajissa, tulevat itse suunnitellut oligonukleotidit ja koettimet tavallisesti edullisemmaksi.

### 3.8.3 Multiplex-ajo

Nykyaikaiset kvantitatiivisissa PCR-ajoissa käytettävät laitteet pystyvät samanaikaisesti sekä lähettämään että vastaanottamaan useita eri valon aallonpituuksia. Kaksoisleimattujen koetinten leimaamiseen käytettäviä fluoroforileimoja on suuri määrä, ja näillä kaikilla on erilaiset eksitaatio- ja emissiomaksimiaallonpituudet. Näin ollen on mahdollista määrittää yhdessä reaktiutilavuudessa tapahtuvien useiden erillisten PCR-reaktioiden etenemistä (Edwards ja Gibbs 1994). Tällaisella multiplex-PCR-ajolla saadaan aikaan mm. säästöä entsyymien ja yksittäisten nukleotidien määrässä ja samasta näytteestä, jossa siis voi olla useiden eri geenien tuottamia mRNA-molekyylejä ja niistä valmistettuja cDNA-molekyylejä, voidaan suorittaa yhden reaktion aikana useiden eri geenien aktiivisuuksien määrittäminen. Toisaalta jokainen PCR-reaktio vaatii oman optimointinsa käytettyjen alukkeiden ja koetinten määrien suhteen. Mikäli esimerkiksi jostain geenituotetta on näytteessä huomattavasti enemmän kuin toista samanaikaisesti määritettävää tuotetta, ja reaktiossa käytetään kullekin geenituotteelle sama molaarinen määrä alukkeita, ei näiden kahden geenin cDNA-molekyylien monistuminen tapahdu samassa stoikiometrisessä suhteessa. Enemmän templaattia sisältävää geenituotetta monistuu suhteessa enemmän, koska ensimmäisten PCR-sykliden aikana on tilastollisesti todennäköisempää, että reaktion alukkeet sitoutuvat tähän templaattiin ja että reaktiossa olevat entsyymimolekyylit aloittavat reaktion todennäköisemmin (Edwards ja Gibbs 1994). Kun parin ensimmäisen syklin aikana kahden määritettävän reaktion suhteen ovat templaattimäärät alkaneet muuttua, korostuu muutos seuraavien sykliden aikana entisestään, ja tuloksia määritettäessä saadut arvot eivät ole lainkaan valideja.

Käytettäessä vain yhtä aluke-koetin-paria yhdessä reaktiutilavuudessa ei tavallisesti ole tarvetta optimoida alukkeiden tai koetinten molaarisuuksia reaktioseoksessa (Bustin 2000). Riittävä tehokkuus PCR-reaktiossa saavutetaan poikkeuksetta, ja vain harvoissa tapauksissa on tarvetta muokata reaktio-olosuhteita. Kvantitatiivisissa PCR-reaktioissa pyritään käyttämään samansuuruisia templaattinäyttemääriä, mikä on mahdollista eristetyn RNA-näytteen pitoisuuden spektrofotometrisen mittaamisen avulla. Pelkkää spektrofotometrinen pitoisuuden määrittäminen ei kuitenkaan pidetä riittävänä vertailtaessa eri reaktioiden sisältämien templaattien määriä, joten tavallisesti näytteestä määri-

tetään tutkittavan geenituotteen ohella myös jonkin konstitutiivisesti ekspressoituvan geenin ekspressio. Tällaisen "house keeping" -geenin ekspression määrän avulla on mahdollista normalisoida eri näytteistä saadut mittaustulokset (Bustin 2000). Samalla tällaisen kontrolligeenin avulla on myös mahdollista vertailla esim. eri kudoksissa tapahtuvan tietyn määritettävän geenin ekspressiota. Yleisesti käytössä olevia kontrolligeenejä ovat esimerkiksi ribosomaalinen 18S-geeni ja GAPDH-geeni. Koska 18S-geenin RNA ei sisällä poly-A-häntää, tulee määritettävästä näytteestä eristää kokonais-RNA pelkän lähetti-RNA:n sijasta, mikäli 18S-geenin ekspressiota halutaan käyttää näytteiden sisältämien RNA-määrien normalisointiin. 18S-ekspressio on kaikissa solu- ja kudostyypeissä erittäin aktiivista, joten se ei myöskään sovellu edellä esitettyyn multiplex-PCR-määritykseen (Bustin 2000).

### 3.8.4 Tulosten laskeminen

Tosiaikaisessa kvantitatiivisessa PCR-menetelmässä käytettävien laitteistojen olennaisena osana on myös itse ajoa ohjaava tietokoneohjelmisto, joka myös pystyy analysoimaan ja laskemaan laitteen mittaamien valoallonpituuksien intensiteettien perusteella tarvittavat laskutoimitukset haluttujen tulosten saamiseksi. Kvantitatiivisessa PCR-menetelmässä käytettävä määrän yksikkö on Ct, joka tarkoittaa virtuaalista sykliä. Koska todelliset PCR-syklit ovat kokonaislukuja, saadaan Ct-arvo laskennallisena lukuna PCR-laitteen mittaamien arvojen ja koneeseen ohjelmoitujen algoritmien perusteella. Käytännön tasolla riittää tieto, että mitä pienempi Ct-arvo on, sitä vähemmällä määrällä PCR-syklejä saadaan signaali määritettävästä näytteestä ja sitä enemmän näyte sisältää määritettävänä olevaa materiaalia. Tietokoneohjelmisto laskee Ct-arvon niin kutsutun threshold-ajan avulla (Gibson ym. 1996). Tämä raja on käytännössä kynnsarvo, jonka ylittävä signaalimäärä on analyysiohjelmaan ennalta määritettyjen parametrien perusteella merkityksellinen. Käytännössä signaalimäärän ylittäessä tämän kynnsarvona toimivan havainnointirajan, on reaktio tehokkaimmassa vaiheessaan, jolloin mikään reaktioseoksessa oleva komponentti ei rajoita reaktiota. Tällöin jokaisen PCR-syklin jälkeen seuraavassa syklissä on kaksinkertainen määrä tai hyvin lähellä kaksinkertaista määrää oleva templaattipitoisuus. Tällainen optimaalinen reaktiotilanne kestää yleensä 2–3 syklin ajan. Tavallisesti laitteiden ohjelmistot osaavat sijoittaa kyn-

nysarvon oikein ja laskea luotettavat Ct-arvot kullekin näytteelle, ja käyttäjän puuttuminen tulosten muokkaamiseen on harvinaista. Vain silloin, kun eri näytteiden Ct-arvojen erotus on hyvin suuri, voi olla tarpeellista säätää käsin kynnysarvoa (Gibson ym. 1996). Tavallisimmin näytteiden Ct-arvot ovat välillä 20–30. On kuitenkin mahdollista, että esimerkiksi normalisoinnissa käytettävän 18S-geenituotteen Ct-arvo on alle 10, ja että jonkin erittäin vähäisessä määrin ekspressoituvan geenin tuotteesta saadaan Ct-arvoksi lähes 40, kun tavallisesti PCR-ajossa käytetään 40:tä sykliä. Reaktiossa käytettävien näytteiden pitoisuudet tulisikin säätää niin, ettei näytteiden välillä olisi kovin suuria eroja Ct-arvoissa (Bustin 2000).

#### **3.8.4.1 *ddCt-menetelmä***

Kvantitatiivisella PCR-menetelmällä ajettujen näytteiden Ct-arvoja ei yleensä voida sellaisinaan verrata toisiinsa. On tosin mahdollista luottaa siihen, että eristetystä totaali-RNA:sta tai mRNA:sta otetaan spektrofotometrisen pitoisuusmäärittämisen jälkeen yhtä suuret määrät materiaalia käänteiskopiointireaktioon, mistä puolestaan otetaan PCR-ajoon yhtä suuret tilavuudet reaktioseosta (Bustin 2000). Koska PCR-reaktioissa tarvittavan templaatin määrä on erittäin pieni, on tässä vaiheessa suuri riski esimerkiksi pipetointivirheisiin, ja kaikissa tapauksissa ei edes ole mahdollista pipetoida niin pieniä määriä, että reaktioihin saataisiin samansuuruiset määrät templaattia eri näytteistä. Kuten edellä on esitetty, PCR-menetelmän suuri herkkyys aiheuttaa sen, että reaktioissa käytetään tutkittavan geenin ohella määritettävää normalisointiin käytettävää geenituotetta esim. 18S-geenin tuotetta, jonka määrän voidaan olettaa kuvaavan alkuperäisessä kudoks- tai solunäytteessä ollutta kokonaissolumäärää (Bustin 2000). Tällaisen kaikista soluissa samassa määrin ekspressoituvan geenituotteen signaalin perusteella normalisoidaan kunkin näytteen sisältämä mitattavan geenituotteen määrä. Samasta näytteestä tehdään siis kaksi erillistä PCR-ajoa, joissa molemmissa on yhtä suuri määrä mitattavaa liuosta, ja näistä ajoista toisesta mitataan normalisoimisessa käytettävän geenituotteen määrä ja toisesta tutkittavan geenituotteen määrä.

Jos oletetaan, että normalisoinnissa käytettävän PCR-reaktion ja määritettävän geenituotteen PCR-reaktion tehokkuus mittauskohdassa eli edellä esitetyllä kynnysrajalla on



yhtä suuri, voidaan tulosten laskemiseen käyttää niin kutsuttua ddCt- tai  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -menetelmää (Livak & Schittgen 2001). Menetelmässä vähennetään tutkittavan geenin määrittämisessä näytteestä saadusta Ct-arvo saman näytteen normalisointiin käytettävän geenituotteen Ct-arvo. Mitattavien näytteiden joukosta valitaan yksi näyte tai näyteryhmä, jota pidetään kontrollinäytteenä. Esimerkiksi terveistä tai käsittelemättömistä eläimistä olevaa näytettä tai vertailtaessa eri kudosten geeniekspressiota näytettä sellaisesta kudoksesta, jossa ekspression ei pitäisi muuttua koejärjestelyjen aikana, voidaan käyttää kontrollina, johon muiden näytteiden geeniekspressiota verrataan. Koska PCR-laitteen laskema Ct-arvo määritetään kohdasta, jolloin PCR-reaktio on optimaalisimmillaan ja sen tehokkuutta kuvaavan luvun pitäisi olla mahdollisimman lähellä arvoa 2, mikä siis tarkoittaa, että templaattimäärä reaktiossa tuplaantuu jokaisen PCR-kierroksen jälkeen, on Ct-lukema eksponentiaalinen arvo, joka tulee ottaa huomioon käytettäessä ddCt-menetelmää. Näin näytteen sisältämän geenituotteen määrä suhteutettuna samasta näytteestä mitattuun normalisoinnissa käytetyn geenituotteen määrään ja verrattuna kontrollina tai nollinäytteenä toimivaan näytteeseen saadaan kaavasta:

$$\text{muutos verrattuna kontrolliin} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}},$$

jossa  $\Delta\Delta\text{Ct}$  on halutun näytteen tutkittavan geenituotteen Ct-arvon ja normalisoinnissa käytetyn geenituotteen Ct-arvon erotus, josta on vähennetty kontrollinäytteen vastaava Ct-arvojen erotus.

Jos esimerkiksi määritettävän geenituotteen Ct-arvo tutkittavassa näytteessä on 18,0 ja kontrollinäytteessä 20,0, ja samojen näytteiden normalisointiin käytettävän 18S-geenituotteen Ct-arvot ovat vastaavasti 14,0 ja 14,5, saadaan tutkittavasta näytteestä

$$\Delta\text{Ct}_{\text{TUTK}} = 18,0 - 14,0 = 4,0$$

ja kontrollinäytteestä

$$\Delta Ct_{CTRL} = 20,0 - 14,5 = 5,5,$$

ja kun kontrollinäytteen Ct-arvojen muutos vähennetään tutkittavan näytteen vastaavasta muutoksesta, saadaan

$$\Delta\Delta Ct = Ct_{TUTK} - Ct_{CTRL} = 4,0 - 5,5 = -1,5,$$

jolloin

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{1,5} = 2,83,$$

mikä tarkoittaa, että näytteessä on 2,83 kertaa enemmän mitattavaa geenituotetta verrattuna kontrollinäytteeseen.

Määritettävän geenituotteen ja normalisointiin käytettävän geenituotteen välisten QPCR-reaktioiden tehokkuuksien laskemiseen ja samalla  $\Delta\Delta Ct$ -menetelmän sopivuuteen kuhunkin määrittämisen tulosten analysointiin on kehitetty matemaattisia laskukaavoja, joihin voidaan turvautua ongelmatilanteissa tai haluttaessa tarkka arvio määrittämisen tehokkuudesta ja luotettavuudesta. Yleisesti voidaan kuitenkin todeta, että  $\Delta\Delta Ct$ -menetelmä on yksinkertainen ja luotettava tapa analysoida QPCR-menetelmällä saatuja mittaustuloksia (Livak & Schittgen 2001).

#### **3.8.4.2 Tulosten laskeminen standardisuoran avulla**

Edellä esitetty  $\Delta\Delta Ct$ -menetelmä ei sovellu tapauksiin, joissa mitattavan geenituotteen PCR-reaktion tehokkuutta ei saada optimoitua lähelle arvoa 2 tai jos määritettävien näytteiden väliset ekspressiot ovat merkittävästi eri suuruusluokkaa ( $\Delta Ct$ -arvojen ero-

tus tavallisesti yli 10) (Bustin 2000). Myös haluttaessa suurta tarkkuutta käytettäviin tuloksiin, sillä ilman edelläkuvattua luottavuuden määrittämistä on olemassa mahdollisuus tulosten painottumiseen johonkin suuntaan, voidaan käyttää  $\Delta\Delta C_t$ -menetelmän sijasta standardikuvaajan avulla suoritettavaa tulosten laskemista. Standardikuvaaja sopii myös tilanteisiin, joissa käytetään suuria näytemääriä, tai jos mittaukset keskittyvät vain muutaman harvan geenituotteen määrittämiseen pitkällä aikavälillä, jolloin esimerkiksi näytteiden laadussa voi olla vaihtelua ja sitä kautta  $C_t$ -arvojen suurusluokissa voi olla myös vaihtelua.

Standardikuvaajaa käytettäessä näytteelle suoritetaan QPCR-ajot sekä tutkittavan geenin että normalisointiin käytettävän geenin osalta. Kussakin ajossa on mukana lisäksi laimennossarja jostain sellaisesta näytteestä, joka sisältää määritettävää geenituotetta. Tämä näyte voi olla jokin samalla kertaa määritettävistä näytteistä tai se voi olla esimerkiksi useamman näytteen sekoitus. Olennaista on kuitenkin se, että näyte vähiten laimennettuna sisältää merkittävästi enemmän, mielellään noin kymmenkertaisesti, mitattavaa geenituotetta kuin mitä määritettävät näytteet enimmillään. Kun tästä näytteestä laimennetaan standardisuoraan vastaavat laimennokset, tulisi suurimman ja pienimmän laimennoksen välillä olla noin satakertainen ero, mikä riittää merkittävämpienkin geeniekspressioerojen määrittämiseen. Toisaalta standardisuora on tavallisesti hyvin lineaarinen, jolloin näytteet, jotka eivät sijaitse suoran määrittämällä alueella, voidaan analysoida kuvaajan ulkopuolelta ekstrapoloimalla standardisuoran jatkeen avulla (Overbergh 1999).

### **3.8.5 Tulosten analysointi ja mahdolliset virhelähteet**

Hyvin suunnitellussa koeasetelmassa on otettu huomioon tarvittavien näytteiden määrä, riittävien positiivisten ja negatiivisten kontrollien määrä ja laatu sekä määrittämisen aikana suoritettavien vaiheiden yhteydessä mahdollisesti tehtävien virheiden poissulkemiseksi tarvittavien kontrollien määrä. Tarvittavien näytteiden määrä pohjautuu tavanomaisiin tilastotieteellisiin menetelmiin, ja mikäli tutkittava joukko on hyvin homogeeninen, riittää tilastollisen merkittävyyden määrittämiseen pienikin näytemäärä. Biologisten tapahtumien monimuotoisuuden vuoksi minimimäärää on mahdotonta

määrittää yksiselitteisesti, mutta yleisesti uskotaan, että vähintään kuuden eläimen tai soluviljelynäytteen ryhmä on riittävä edustavaksi otoskooksi. Hyvässä tutkimusasetelmassa on edeltä käsin määritelty sopivat positiiviset ja negatiiviset kontrollit. Kvantitatiivisessa PCR-menetelmässä suositellaan käytettäväksi negatiivisina näytteinä mm. kontrollinäytettä, jolle ei ole tehty käänteiskopiointireaktiota, sekä näytettä jolle on tehty em. reaktio, mutta jossa ei ole ollut reaktion templaattina toimivaa RNA-näytettä (Bustin 2000). Positiivinen kontrollinäyte on tavallisesti saatu jo käytettävän koetin-alue-parin testaamisen yhteydessä.

Kvantitatiivisissa PCR-ajoissa käytettävistä näytteistä saatavien Ct-arvojen tulisi olla välillä 12–35. Normalisointiin käytettävien geenien Ct-arvot ovat pieniä, jopa alle 10, eli niiden määrä näytteessä on suuri, kun taas mitattavien näytteiden Ct-arvot olisivat edullisesti luokkaa 20–25 (Gibson ym. 1996). Tällaisissa tapauksissa tutkittavaa näytettä on mahdollista laimentaa, ja laimentamisen jälkeenkin Ct-arvot ovat hyväksyttävällä alueella, minkä seurauksena samasta näytteestä on voidaan jatkossa mitata yhä useampien geenien ekspressiotuotteiden määriä.

Yleensä RNA:n eristyksen yhteydessä jokaiseen näytteeseen jää kontaminantiksi pieni määrä genomista DNA:ta, joka häiritsee jossain määrin PCR-reaktiota. Tällaisesta genomisesta DNA:sta tuottamat Ct-arvot ovat lähellä arvoa 40:tä kuten 38–40. Tämän perusteella voidaan myös cDNA:sta saatavien Ct-arvojen detektorajana pitää arvoa 38, ja tätä suurempien Ct-arvojen signaaleja voidaan pitää merkityksettöminä. Käytännössä kaikissa kudoksissa ekspressoidaan jossain määrin lähes kaikkia geenejä, tosin todennäköisesti vain muutamien mRNA-molekyylien verran, mutta koska PCR-menetelmän herkkyyden ansiosta yksittäistenkin polynukleotidimolekyylien havaitseminen on mahdollista, voidaan mistä tahansa geenituotteesta saada signaali kaikista mahdollisista näytteistä.

Eräs tavallisimmista virhelähteistä syntyy riittämättömästä tutkittavan geenin biologisen luonteen tuntemisesta. Voi olla mahdollista, että tutkittavalla geenillä on hyvin samankaltaisia sukulaisgeenejä, joiden ilmeneminen ei kuitenkaan millään tavoin vaikuta tutkittavan geenin aikaansaaman geenituotteen aiheuttamiin ilmiäisiin tai ne aiheuttavat täysin poikkeavia kliinisesti mitattavia muutoksia tutkimusasetelmassa. Joka tapauksessa, mikäli mitattu Ct-arvo kuvastaa jonkin muun kuin mitattavan geenin

ekspressiotasoa, ei tuloksia voida pitää luotettavina. Valitettavasti tällaiset virhelähteet jäävät usein huomaamatta.

Yhtä merkittävä virhelähde on epäonnistunut näytteen käsittely. Mikäli näytteen ottamisessa, homogenisoimisessa, RT-reaktiossa tai itse PCR-ajossa on puutteita, vääristävät nämä saatuja tuloksia. Useimmiten tällaiset virheet havaitaan normalisointiin käytettävän geenin määrittelyn yhteydessä, jolloin esimerkiksi 18S-geenituotteen Ct-arvojen pitäisi olla hyvin lähellä toisiaan, mutta jonkin työvaiheen epäonnistumisen seurauksena nämä arvot vaihtelevat merkittävästi. Yleissääntönä pidetään, että normalisoitavan geenin Ct-arvojen pitäisi olla vähintään kahden SD-yksikön yksikön sisällä Ct-arvoista lasketusta keskiarvosta (Bustin 2000).

### 3.9 DNA-sirutekniikka

Molekyylibiologisessa tutkimuksessa ja erityisesti geenitutkimuksissa pyritään nykyisin mahdollisimman suureen määrään mittaustietoa, josta tehokkaiden tietokoneiden avulla on mahdollista seuloa tai louhia merkityksellinen tieto ja tehdä näiden tulosten perusteella tarvittavia johtopäätöksiä. Nykyisin geeniekspressiotutkimuksessa yleisesti käytettävä DNA- tai mikrosirutekniikka on eräs tällainen "high throughput" -teknologia, jonka avulla on mahdollista haarukoida suuresta informaatiomäärästä, jopa tuhansien geenien ekspressiotuotteiden joukosta, sellaisia geenejä, joiden ekspressio on muuttunut esim. kontrollikudoksen ja tutkittavan kudoksen tai lääkitsemättömän ja lääkityn kohteen välillä (Churchill 2002). DNA-siruja ja niiden analysointilaitteistoja on saatavilla useilta eri toimittajilta, ja lisäksi on olemassa useita kaupallisia toimijoita, jotka tekevät haluttuja analyyseja asiakkaiden toimittamista näytteistä.

Vaikka eri DNA-sirutekniikoita on nykyään useita ja uusien menetelmien kehitys ja vanhojen hienosäätäminen on nopeaa, on peruseriaate yksinkertainen. Kattava katsaus menetelmään on tarjolla julkaisussa Churchill 2002. Kontrollinäytteestä ja tutkittavasta näytteestä eristetään lähetti-RNA, ja tämä muunnetaan cDNA:ksi käänteiskopiontoreaktion avulla. Toisen näytteen, vaikkapa kontrollinäytteen, cDNA leimataan esim. vihreää väriä emittoivalla fluoroforileimalla ja toisen näytteen eli tutkittavan näytteen cDNA esim. punaisella leimalla. DNA-sirulla on lukuisa joukko pieniä kaivoja

eli kohtia, joihin on robottipipetoimalla istutettu esim. pieni pätkä jonkin geenin sekvenssiä. Näitä kaivoja on halvemmissä siruissa satoja tai tuhansia, mutta uusimmat ja laajimmat sirut käsittävät jopa kymmeniätuhansia kaivoja eli geenejä, joita voidaan tutkia. Kun em. leimatut cDNA-näytteet yhdistetään ja näytsestä pipetoidaan robotin avulla pieni määrä jokaiseen kaivoon sirulla, hybridisoituvat näytteissä olevat cDNA-molekyylit kussakin kaivossa olevaan vastinkappaleeseensa. Kahden näytteen eri tavalla leimatut molekyylit kilpailevat sitoutumisesta kaivoon sidottuun sekvenssiin, ja mikäli kontrollinäytteessä on cDNA:ta enemmän kuin tutkittavassa näytteessä, sitoutuu sitä kyseiseen kaivoon enemmän, ja kaivosta saatavan fluoresenssileiman väri olisi tässä tapauksessa vihreä. Tämä siis tarkoittaa, että tutkittavassa näytteessä tämän geenin ekspressio on vähentynyt verrattuna kontrollitilanteeseen. Mikäli taas tutkittavassa näytteessä on enemmän cDNA:ta, on väri punainen. Jos muutosta ekspressiossa kontrollin ja tutkittavan näytteen välillä ei ole, näkyy fluoresenssi keltaisena. Värimuutoksen intensiteetti voidaan laskea, ja se suunnilleen vastaa sitoutuneen cDNA:n määrän muutosta ja näin ollen geenin ekspressiotason muutosta. Kunkin kaivon sisältämä geeni on sirun valmistajan tiedossa, ja tulokset ilmoitetaan kunkin geenin osalta kertaluokkien muutoksina. Koska sirulla saatava tulos on lähinnä semikvantitatiivinen, tulee saadut muuttuneet geenit ja niiden muutoksen todellinen taso vielä varmentaa esim. kvantitatiivisella PCR:llä.

DNA-sirumenetelmän avulla saadaan siis vastaus kysymykseen: "minkä geenin ekspressio muuttuu", kun taas perinteisillä menetelmillä vaaditaan perustietoja tutkittavan kohteen biologiasta, jolloin haetaan vastausta kysymykseen: "kuinka paljon tunnetun geenin ekspressio muuttuu", jolloin tutkijalla on jo valistunut arvaus tutkittavasta kohteesta ja sen käyttäytymisestä.

#### **4 BAL-solujen ekspressoimien geenituotteiden määrittäminen**

Kvantitatiivista tosiaikaista polymeerasiketjureaktiomenetelmää on käytetty keuhkokuuhutuslunäytteiden sisältämien solujen geeniekspression määrittämiseen ensimmäiseksi eristetyistä rotan keuhkoista (Fink ym. 1998). Myöhemmin BAL-solujen ekspressiotuotteita on QPCR:n avulla määritetty ihmiseltä (Glare ym. 2001) ja hevoselta

(Ainsworth ym. 2003a). Lisäksi hevosen BAL-soluviljelmistä saatujen solujen geeniekspressiota on tutkittu kvantitatiivisella PCR:llä (Laan ym. 2006, Zhang ym. 2012).

Hevosten keuhkohuuhtelunäytetutkimuksissa on keskitytty lähinnä ns puhkurihevosten (recurrent airway obstruction, RAO) huuhtelunäytesolujen ekspresion tutkimiseen. Ensimmäisiä tutkimuksia, joissa kvantitatiivista PCR-menetelmää on käytetty, on Horohovin työryhmän tulos, jossa tosin ei esitetä lainkaan numeerisia tuloksia mittauksista interleukiinien 4 ja 13 osalta (Bowles ym. 2002). Tosin saman ryhmän myöhemässä julkaisussa samojen interleukiinien osalta on jo saatu esitettäviä mittaustuloksiakin (Horohow ym. 2005). Jatkossa puhkurihevostutkimuksissa hevosilta on BAL-soluista määritetty geeniekspressiota mm. IL-17: (Debrue ym. 2005), IL-4:n ja IL-5:n (Riihimäki ym. 2008b) sekä useiden muiden interleukiinien (Riihimäki ym. 2008a) osalta. Sieni-infektioiden mahdollista osuutta RAO-oireiden kaltaiseen tilanteeseen on tutkittu QPCR:llä TLR2:n, IL-8:n ja A20:n osalta, jotka kaikki aktivoituvat esim. *Aspergillus*-kaltaisten sienten läsnä ollessa (Berndt ym. 2009). Erityisen laajalti puhkurihevosten BAL-näytteiden tutkimusta on tehty Dorothy Ainsworthin tutkimusryhmässä Cornellin yliopistossa (mm. Ainsworth ym. 2003b, Klukowska-Rötzler ym. 2012). Julkaisussa Padoan ym. 2013 on määritetty laajalti eri sytokiineja ja interleukiineja hevosen BAL-soluista.

Interleukiinien geeniekspressiota keuhkohuuhtelunäytesoluissa kylmäältistuksen yhteydessä on tutkittu kvantitatiivisella PCR:llä (Davis ym. 2005). Tutkimuksessa havaittiin, että kylmäältistuksen geeniekspressio hevosella muistutti interleukiiniekspression osalta astmankaltaista tilannetta. Rasituksen vaikutusta hevosen immuunivasteeseen ja TLR3- ja TLR4-välitteiseen inflammaation indusointiin on tutkittu BAL-solujen QPCR:llä (Mignot ym. 2012)

Hevosen keuhkohuuhtelunäytteestä eristettyjen solujen osalta on myös tehty kattava tutkimus määrittysten normalisointiin sopivista geneistä (Beekman ym. 2011). Tässä tutkimuksessa parhaaksi referenssigeeniksi esitettiin GAPDH:ta, tosin tutkimuksessa ei ollut mukana 18S ribosomaalisen geenin tuotetta.

Kuten aiemmin tässä yhteydessä on todettu, tieteellisissä lähteissä paneudutaan yllättävän vähän näytteenoton tai lähetti-RNA:n eristämisen yhteydessä esiintyviin ongelmiin. Myöskin tarkka kuvaus varsinaisista menetelmistä on usein puutteellista. BAL-

solujen homogenisoinnin osalta ei ole raportoitu merkittävistä ongelmista, esimerkiksi yksinkertainen edestakaisin pipetointi on ollut riittävän voimakas käsittely solujen hajottamiseksi (Beekman ym. 2011).

Julkaisuja koirien saatika kissojen keuhkohuuhtelunäytteiden sisältämien aitotumallisten solujen geeniekspression analysoimisesta kvantitatiivisella polymeerasiketjureaktiolla ei ole yleisimpien tieteellisten julkaisujen hakukoneiden perusteella saatavilla.

## 5 Pohdinta ja johtopäätökset

Koiran ja hevosen keuhkohuuhtelusolujen ekspressoimien geenituotteiden määrittäminen tosiaikaisella kvantitatiivisella polymeerasiketjureaktiolla on tehokas ja edullinen menetelmä verrattuna aiemmin käytössä olleisiin menetelmiin. Koska tällä nyt esitettävänä olevalla menetelmällä onkin mahdollista määrittää käytännössä minkä tahansa geenin ekspressiotaso missä tahansa kudoksessa, on tutkijalla erityisen merkittävä osuus hyvän ja järkevän tutkimussuunnitelman laatimisessa ja riittävän taustatiedon hankkimisessa kunkin tutkittavan geenituotteen osalta.

Sekä koiran että hevosen keuhkohuuhtelunäytteistä halutaan tavallisesti tehdä sytologisia määrytyksiä, bakteriologisia määrytyksiä, joissain tapauksissa joko solujen tai nesteen sisältämien proteiinien määrytyksiä sekä mahdollisesti BAL-näytteen yhteydessä saadun keuhkoepiteelin pinnalla sijaitsevan nesteen (epithelial lining fluid, ELF) analysointi. Totaali-RNA:n tai lähetti-RNA:n eristäminen BAL-soluista on mahdollista suhteellisen yksinkertaisin menetelmin. Tavallisesti pelkkä edestakaisin injisointi neulan ja ruiskun avulla riittää hajottamaan solut degradoivassa liuoksessa, mutta on mahdollista käyttää muitakin mekaanisia hajotusmenetelmiä kuten esimerkiksi Ultra-Turrax®-laitteistoa. Näin hajotetuista soluista RNA voidaan eristää millä tahansa kaupallisesti saatavilla olevalla menetelmällä.

Vähäisestäkin määrästä BAL-soluja saadaan riittävästi hyvälaatuista RNA:ta käänteiskopiointientsyymiä käyttävään RT-reaktioon. Reaktiopakkausten valmistajien ohjeissa reaktioon tarvittava totaali-RNA:n määrä on 50 ng – 5 µg, mutta käytännössä 200 ng



totaali-RNA:ta on sopiva määrä. Tällaisesta määrästä voidaan tehdä enimmillään jopa 100 määrittystä eri geenituotteiden osalta.

Eristetty RNA eli sen perusteella valmistettu cDNA voidaan analysoida tavanomaisilla tosiaikaisessa RT-QPCR-menetelmässä käytettävillä laitteistoilla. Kaikkien markkinoilla olevien laitteiden herkkyydet riittävät yleisesti käytössä olevan TaqMan®-menetelmän yhteydessä käytettäviksi. Määrävinä tekijöinä ovat laitteiston ja kulutustavaroiden hinta ja käyttäjien tottumukset kunkin laitteen ohjelmistojen suhteen. TaqMan®-menetelmä sopii hyvin myös BAL-solujen ekspressoimien geenien määrittämiseen. Menetelmä ei juurikaan ole herkkä kontaminaatioille, yhteen ajoon vaadittavan alku-peräisen eristetyn RNA:n määrä on vähäinen, vain noin 2 ng:aa, ja lisäksi käytettävien leimojen ja muiden materiaalien hinnat ovat nykyisin menetelmässä käytetyn kaksoisleimatus koettimen patentin vapautumisen jälkeen edullisella tasolla.

Ribosomaalisen 18S-geenin ekspressiotuotteen käyttäminen normalisointiin soveltuvana geenituotteena on osoitettu useissa tutkimuksissa. Eläinlääketieteellisellä tiedekunnalla on käytössään kvantitatiivisessa PCR-menetelmässä käytettäväksi soveltuva 18S-koetin, jonka toimivuus on osoitettu lohikaloilla (Majalahti-Palviainen ym. 2000), hiirellä (Eklund ym. 2001), rotalla (Szokodi ym. 2002), ihmisellä (Földes ym. 2003), *Candida tropicalis* -hiivalla (Torkko ym. 2003), hevosella (Koho ym. 2012) ja naudalla (Ekman ym. 2012). Tiedekunnan tutkijoiden kanssa käydyissä keskusteluissa on käynyt ilmi, että alustavissa kokeissa on 18S-koetin-alue-parin havaittu toimivan määrittäessä myös koirista peräisin olevia näytteitä.

## **5.1 Ehdotettava työjärjestys keuhkokuuhtelunäytesolujen ekspressoimien geenituotteiden kvantitointiin RT-QPCR-menetelmällä**

Edellä esitettyjen julkaisujen ja Helsingin yliopiston Eläinlääketieteellisen tiedekunnan tutkijoiden kanssa käytyjen keskustelujen jälkeen on mahdollista esittää seuraavanlaisia työjärjestystä koiran ja hevosen bronkoalveolaarihuuhtelunäytesolujen ekspressoimien geenituotteiden määrittämiseen kvantitatiivisella polymeerasiketjureaktiomenetelmällä, erityisesti TaqMan®-kemialla hyväksikäyttävällä menetelmällä.

- 1) BAL-näytteen ottamisen yhteydessä otetaan koiralta vähintään 0,5 ml ja edullisimmin 2 ml huuhtelunestettä Cryotube-putkeen tai muuhun vastaavaan astiaan, joka kestää jäädytyksen nestetyssä. Hevosen BAL-huuhtelunesteestä otetaan talteen samalla tavalla 2 ml näytettä sekä 5 ml näytettä teräväkärkiseen 15 ml:n Falcon-putkeen.
- 2) Näyte jäädytetään nestetyssä varoen näytteen liiallista kiehumista ja näyteputken rikkoontumista, minkä jälkeen näytteen kuljetus tapahtuu nestetyssä ja säilytys jatkokäsittelyyn saakka laboratorion syväjäähäpakkastimessa  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ :ssa.
- 3) Näyte sentrifugoidaan solumateriaalin pellettoimiseksi. Mikäli hevoselta otetussa 2 ml:n keuhkokuuhtelunäytteessä ei ole tarpeeksi solumateriaalia, käytetään 5 ml:n näytettä.
- 4) Solupelletti resuspendoidaan käytettävän totaali-RNA:n eristämiseen tarkoitettun pakkauksen tarjoamaan lyysauspuskuriin, jota käytetään valmistajan ohjeiden mukainen tilavuus. Resuspendointi tapahtuu samassa näyteputkessa, johon alkuperäinen 2 ml:n näyte on siirretty.
- 5) Solupelletin homogenisointi suoritetaan Ultra-Turrax-laitteella käyttäen 8G-terää. Käsittelyaika on 0,5–1,0 minuuttia.
- 6) RNA:n eristäminen suoritetaan eristyspakkauksen valmistajan ohjeiden mukaisesti sillä poikkeuksella, että lopullisen näytteen eluointiin käytetään eluointipuskuria 25  $\mu\text{l}$ :aa.
- 7) Mitataan eristetyn fraktion RNA-pitoisuus Nanodrop<sup>®</sup>-laitteella.
- 8) Käytetään käänteiskopiointireaktioon vähintään 50 ng:aa, mieluiten 200 ng:aa eristettyä totaali-RNA:ta. Reaktio suoritetaan reaktiopakkauksen valmistajan ohjeiden mukaisesti.
- 9) RT-reaktiotuotteen tilavuus säädetään 100  $\mu\text{l}$ :ksi lisäämällä puhdistettua ja deionisoitua vettä.
- 10) Useasta samalla kertaa tai eri aikoihin otetuista ja eristetyistä näytteistä valitaan 2–6 edustavaa näytettä, ja saaduista reaktiotuotteesta käytetään 5  $\mu\text{l}$ :aa QPCR-ajoon,

jossa käytetään ribosomaalisen 18S-geenin koetinta. Ajo suoritetaan käytettävän laitteiston valmistajan ohjeiden mukaisesti.

11) Ajossa käytettyjen näytteiden 18S-geenituotteen Ct-arvojen tulisi olla pääosin välillä 10–12. Saatujen tuloksien avulla kohdan 9) reaktiotuotteesta otetaan noin puolet, ja näytteeseen lisätään puhdistettua ja deionisoitua vettä niin, että jatkossa suoritettavissa ajoissa päästäisiin 18S-arvojen osalta tavoitteena olevalle alueelle.

12) Näin laimennettua näytettä voidaan jatkossa käyttää haluttujen geenituotteiden ekspression määrittämiseen. Määritysten tulokset on mahdollista laskea ddCt-menetelmällä tai käyttämällä standardisuoramenetelmää, jolloin vähiten laimennettuna standardina on alkuperäinen kohdan 9) näyte.

## 6 Kirjallisuus

Ainsworth DM, Appleton JA, Eicker SW, Luce R, Julia Flaminio M, Antczak DF. The effect of strenuous exercise on mRNA concentrations of interleukin-12, interferon-gamma and interleukin-4 in equine pulmonary and peripheral blood mononuclear cells. *Vet Immunol Immunopathol.* 2003a Jan 10;91(1):61-71.

Ainsworth DM, Grünig G, Matychak MB, Young J, Wagner B, Erb HN, Antczak DF. Recurrent airway obstruction (RAO) in horses is characterized by IFN-gamma and IL-8 production in bronchoalveolar lavage cells. *Vet Immunol Immunopathol.* 2003b Nov 15;96(1-2):83-91.

Alwine J, Kemp D, Stark G. Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Dec 1977; 74(12): 5350–5354.

Andreasen C. Bronchoalveolar lavage. *Veterinary Clinics of North America, Small animal practice,* 2003, 33: 69-88

Beekman L, Tohver T, Dardari R, Léguillette R. Evaluation of suitable reference genes for gene expression studies in bronchoalveolar lavage cells from horses with inflammatory airway disease. *BMC Mol Biol.* 2011 Jan 28;12:5.

Berndt A, Derksen FJ, Venta PJ, Karmaus W, Ewart S, Yuzbasiyan-Gurkan V, Robinson NE. Expression of toll-like receptor 2 mRNA in bronchial epithelial cells is not induced in RAO-affected horses. *Equine Vet J.* 2009 Jan;41(1):76-81.

Bowles KS, Beadle RE, Mouch S, Pourciau SS, Littlefield-Chabaud MA, Le Blanc C, Mistic L, Fermaglich D, Horohov DW. A novel model for equine recurrent airway obstruction. *Vet Immunol Immunopathol.* 2002 Sep 10;87(3-4):385-9.

Buell GN, Wickens MP, Payvar F, Schimke RT. Synthesis of full length cDNAs from four partially purified oviduct mRNAs. *J Biol Chem.* 1978 Apr 10;253(7):2471-82.

Burden D. Guide to the Homogenization of Biological Samples. *Random Primers,* 2008;7, Sept. 1-14.

Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol.* 2000 Oct;25(2):169-93.

Cady NC, Stelick S, Batt CA. Nucleic acid purification using microfabricated silicon structures. *Biosens Bioelectron.* 2003 Oct 30;19(1):59-66.

Churchill GA. Fundamentals of experimental design for cDNA microarrays. *Nat Genet.* 2002 Dec;32 Suppl:490-5.

Davis MS, Malayer JR, Vandeventer L, Royer CM, McKenzie EC, Williamson KK. Cold weather exercise and airway cytokine expression. *J Appl Physiol (1985).* 2005 Jun;98(6):2132-6.

Debrue M, Hamilton E, Joubert P, Lajoie-Kadoch S, Lavoie JP. Chronic exacerbation of equine heaves is associated with an increased expression of interleukin-17 mRNA in bronchoalveolar lavage cells. *Vet Immunol Immunopathol.* 2005 May 1;105(1-2):25-31.

Edwards MC ja Gibbs RA. Multiplex PCR: advantages, development, and applications. *PCR Methods and Applications* 1994;3 S65–S75.

Eklund L, Piihola J, Komulainen J, Sormunen R, Ongvarrasopone C, Fässler R, Muona A, Ilves M, Ruskoaho H, Takala TE, Pihlajaniemi T. Lack of type XV collagen causes a skele-

tal myopathy and cardiovascular defects in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Jan 30;98(3):1194-9.

Ekman A, Ilves M, Iivanainen A. B lymphopoiesis is characterized by pre-B cell marker gene expression in fetal cattle and declines in adults. *Dev Comp Immunol*. 2012 May;37(1):39-49.

Ferre F. Quantitative or semi-quantitative PCR: reality versus myth. *PCR Methods and Applications* 1992;2, 1–9.

Fink L, Seeger W, Ermert L, Hänze J, Stahl U, Grimminger F, Kummer W, Bohle RM. Real-time quantitative RT-PCR after laser-assisted cell picking. *Nat Med*. 1998 Nov;4(11):1329-33.

Földes G, Horkay F, Szokodi I, Vuolteenaho O, Ilves M, Lindstedt KA, Mäyränpää M, Sárman B, Seres L, Skoumal R, Lakó-Futó Z, deChâtel R, Ruskoaho H, Tóth M. Circulating and cardiac levels of apelin, the novel ligand of the orphan receptor APJ, in patients with heart failure. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003 Aug 29;308(3):480-5.

Gibson U, Heid C, Williams P. A novel method for real-time quantitative RT-PCR. *Genome Res*. 1996, 6, 995–1001.

Glare E, Divjak M, Bailey M, Walters E. The usefulness of competitive PCR: airway gene expression of IL-5, IL-4, IL-4d2, IL-2, and IFN $\gamma$  in asthma. *Thorax* 2001;56:541–548.

Hawkins E.C. Bronchoalveolar lavage. Teoksessa: King L.G. Textbook of respiratory disease in dogs and cats. Philadelphia Saunders 2004, 118-127.

Hodgson JL, Hodgson DR. Inflammatory airway disease. Teoksessa: P. Lekeux (toim.) Equine respiratory disease, International Veterinary Information Service, Ithaca, New York, USA, 2002.

Hoffman A. Bronchoalveolar lavage: sampling technique and guidelines for cytologic preparation and interpretation. *Vet Clin North Am Equine Pract.* 2008 Aug;24(2):423-35.

Holland, P. M.; Abramson, R. D.; Watson, R.; Gelfand, D. H. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999, 88 (16): 7276–7280.

Horohov DW, Beadle RE, Mouch S, Pourciau SS. Temporal regulation of cytokine mRNA expression in equine recurrent airway obstruction. *Vet Immunol Immunopathol.* 2005 Oct 18;108(1-2):237-45.

Houseley J, Tollervey D. The many pathways of RNA degradation. *Cell.* 2009 Feb 20;136(4):763-76.

Izutani R, Ohyanagi H, MacDermott R, Quantitative PCR for Detection of Femtogram Quantities of Interleukin-8 mRNA Expression. *Microbiol Immunol.* 1994;38(3):233-7.

Klukowska-Rötzler J, Marti E, Lavoie JP, Ainsworth DM, Gerber V, Zurbriggen A, Janda J. Expression of thymic stromal lymphopoietin in equine recurrent airway obstruction. *Vet Immunol Immunopathol.* 2012 Mar 15;146(1):46-52.

Koho NM, Mykkänen AK, Reeben M, Raekallio MR, Ilves M, Pösö AR. Sequence variations and two levels of MCT1 and CD147 expression in red blood cells and gluteus muscle of horses. *Gene.* 2012 Jan 1;491(1):65-70.

Laan TT, Bull S, Pirie R, Fink-Gremmels J. The role of alveolar macrophages in the pathogenesis of recurrent airway obstruction in horses. *J Vet Intern Med.* 2006 Jan-Feb;20(1):167-74.

Leguillette R, Lavoie JP. Effects of the bronchoalveolar lavage procedure on lung function in horses with clinical exacerbation of recurrent airway obstruction. *Am J Vet Res* 2006;67: 1929–33.

Livak K. ja Schmittgen T. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the ddCT Method. *Methods* 2001, 25(4):402-408.

Majalahti-Palviainen T, Hirvonen M, Tervonen V, Ilves M, Ruskoaho H, Vuolteenaho O. Gene structure of a new cardiac peptide hormone: a model for heart-specific gene expression. *Endocrinology*. 2000 Feb;141(2):731-40.

McCullough S, Brinson J. Collection and interpretation of respiratory cytology. *Clin Tech Small Anim Pract*. 1999 Nov;14(4):220-6.

McGorum BC, Dixon PM. The analysis and interpretation of equine bronchoalveolar lavage fluid (BALF) cytology. *Equine Vet.Educ*. 1994, 6: 203-209.

Overbergh L, Valckx D, Waer M, Mathieu C. Quantification of murine cytokine mRNAs using real time quantitative reverse transcriptase PCR. *Cytokine* 1999;11 305–312.

Padoan E, Ferraresso S, Pegolo S, Castagnaro M, Barnini C, Bargelloni L. Real time RT-PCR analysis of inflammatory mediator expression in recurrent airway obstruction-affected horses. *Vet Immunol Immunopathol*. 2013 Dec 15;156(3-4):190-9.

Pickles K, Pirie RS, Rhind S, Dixon PM, McGorum BC. Cytological analysis of equine bronchoalveolar lavage fluid. Part 3: The effect of time, temperature and fixatives. *Equine Vet J* 2002, 34: 297-301.

Rajamäki MM, Järvinen AK, Saari SA, Maisi PS. Effect of repetitive bronchoalveolar lavage on cytologic findings in healthy dogs. *Am J Vet Res*. 2001 Jan;62(1):13-6.



Rajamäki MM, Järvinen AK, Sorsa T, Maisi P. Clinical findings, bronchoalveolar lavage fluid cytology and matrix metalloproteinase-2 and -9 in canine pulmonary eosinophilia. *Vet J.* 2002 Mar;163(2):168-81.

Rha J, Mahony P. Bronchoscopy in small animal medicine- Indications, instrumentation and techniques. *Clinical techniques in small animal practice* 1999. 14. 207-212.

Riihimäki M, Lilliehöök I, Raine A, Berg M, Pringle J. Clinical alterations and mRNA levels of IL-4 and IL-5 in bronchoalveolar cells of horses with transient pulmonary eosinophilia. *Res Vet Sci.* 2008b Aug;85(1):52-5.

Riihimäki M, Raine A, Art T, Lekeux P, Couëtil L, Pringle J. Partial divergence of cytokine mRNA expression in bronchial tissues compared to bronchoalveolar lavage cells in horses with recurrent airway obstruction. *Vet Immunol Immunopathol.* 2008a Apr 15;122(3-4):256-64.

Roy MF, Lavoie JP. Tools for the diagnosis of equine respiratory disorders. *Vet Clin North Am Equine Pract.* 2003 Apr;19(1):1-17.

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic Amplification of  $\beta$ -globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia. *Science* 1985 vol. 230, 1350-54.

Singer VL, Lawlor TE, Yue S. Comparison of SYBR Green I nucleic acid gel stain mutagenicity and ethidium bromide mutagenicity in the Salmonella/mammalian microsome reverse mutation assay (Ames test). *Mutation research* 1999, 439 (1): 37-47.

Szokodi I, Tavi P, Földes G, Voutilainen-Myllylä S, Ilves M, Tokola H, Pikkarainen S, Piuholta J, Rysä J, Tóth M, Ruskoaho H. Apelin, the novel endogenous ligand of the orphan receptor APJ, regulates cardiac contractility. *Circ Res.* 2002 Sep 6;91(5):434-40.

Thomas P. Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. Proc Natl Acad Sci U S A. Sep 1980; 77(9): 5201–5205.

Torkko JM, Koivuranta KT, Kastaniotis AJ, Airene TT, Glumoff T, Ilves M, Hartig A, Gurtvitz A, Hiltunen JK. *Candida tropicalis* expresses two mitochondrial 2-enoyl thioester reductases that are able to form both homodimers and heterodimers. J Biol Chem. 2003 Oct 17;278(42):41213-20.

Viel L. Structural-functional correlations of the lung in horses with small airway disease. PhD. thesis. University of Guelph, Kanada, 1983.

Zhang L, Franchini M, Wehrli Eser M, Dip R. Enhanced IL-6 transcriptional response to adenosine receptor ligands in horses with lower airway inflammation. Equine Vet J. 2012 Jan;44(1):81-7.