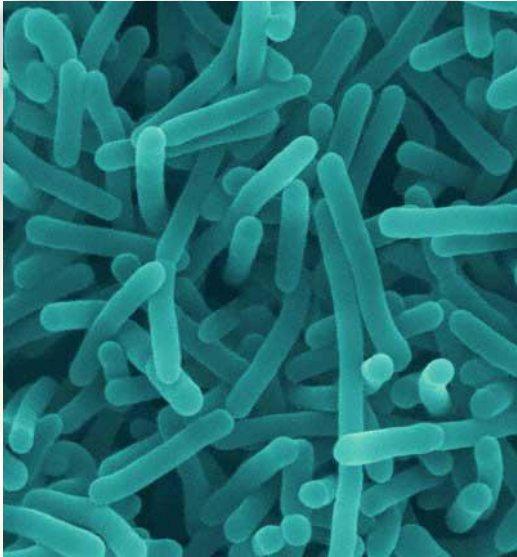


# PCR - tekniikka elintarvikeanalytiikassa

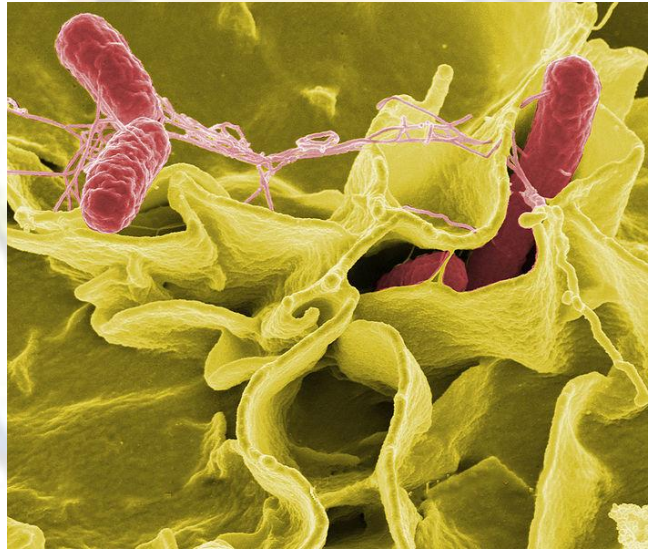
– Listerian, Salmonellan ja kampylobakteerien  
tunnistus elintarvikkeista ja rehuista

29.11.2012

Eva Fredriksson-Lidsle



*Listeria monocytogenes*



*Salmonella (spp)*



*Campylobacter coli*

*Listeria monocytogenes* - aiheuttaa listerioosia (vatsatautia). Heikot yksilöt kuten esim. lapset tai vanhukset voivat sairastua listerioosiin. Useimmat Eivät sairastu, mutta noin 25% sairastuneista kuolee.

Listeriaa voi saada esim. vihanneksista, raa'asta lihasta tai kalasta. Listeriaa esiintyy yleisesti maaperässä.

*Salmonella spp* – aiheuttaa suolisto- tai yleisinfektion, tai kuumeisen ripulin.

Serotyyppejä on noin 2500. Suomessa tartunnat ovat erittäin harvinaisia.

Salmonella leviää ulosteen mukana ja saattaa tarttua saastuneen rehun, veden tai elintarvikkeen kautta. Tartunta voi pitkään olla oireeton, jolloin tartunnan saanut saattaa tietämättään levittää tautia.

*Kampylobakteerit* – aiheuttavat ripulia, vatsatautia ja kuumeilua. Suomessa yleisimmät taudinaiheuttajat ovat *C. jejuni* (yli 90% tapauksista) ja *C. coli*. Huonosti kypsytetty broileri, pastöroimattomat maitotuotteet ja klooraamaton vesi voi sisältää kampylobakteereja. Kampylobakteereille ei ole määrätty raja-arvoa, mutta moni elintarvikkeiden ja rehujen tuottaja haluaa sitä kuitenkin tutkituttaa. Kampylobakteerit tulevat ulosteperäisistä kontaminaatioista.

## Esirikastusvaihe

Koska PCR-tekniikalla tunnistetaan DNA:ta, sillä voi myös tunnistaa jo kuolleet bakteerit. Jotta vain elävät bakteerit saadaan esiin, käytetään esirikastusvaihetta, joka täysin vastaa viljelymenetelmissä käytettyä esirikastusvaihetta.

Tietty määrä näytettä yhdistetään rikasteliemeen joka valitaan kohdebakteeria ajatellen. Mikäli samasta näytteestä halutaan tutkia useampia eri bakteereja, tehdään useampi esirikaste.

Esirikasteessa näyte inkuboidaan kyseisen bakteerin osalta soveltuvassa lämpötilassa yön yli (yleensä n.18 h).

Rikasteliemestä otetaan DNA-eristykseen käytettävä näyte.

Esirikastusvaihe on tekniikan eniten aikaa vievä vaihe.

# PCR

## Polymerase Chain Reaction

Tekniikassa käytetään hyväksi luonnollista DNA:n monistamista – DNA polymeraasi entsyymien avulla monistetaan DNA.

Monistamalla pystytään tutkimaan DNA:ta, RNA:ta ja proteiineja.

PCR-tekniikkaa käytetään esimerkiksi tunnistamaan henkilöiden DNA:ta, laadittaessa DNA karttoja, etsiessä mutaatioita tai tunnistamaan patogeeneja.

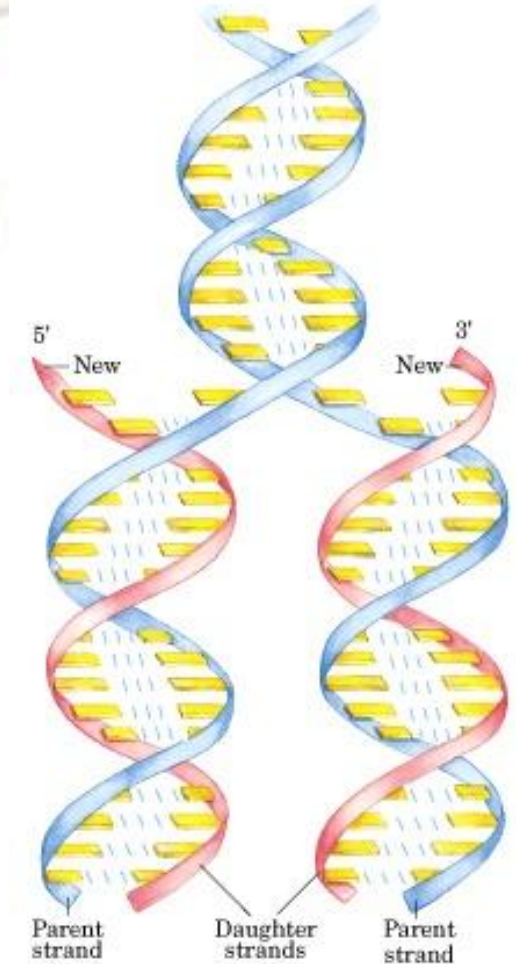
PCR:ssä käytetään biologisesti nähden korkeita lämpötiloja, ja siksi käytetään *Thermus aquaticus* –bakteerin polymeraasia (“Taq”)

Monistettavasta DNA:sta on tiedettävä jotain, jotta ns alukkeita pystytään suunnittelemaan.

Perinteisen PCR:n rinnalle on noussut:

**REAL TIME PCR (RT-PCR, reaaliaikainen)**

RT-PCR:llä pystytään keräämään dataa reaktion ollessa käynnissä, ja tuloksen näkee heti.



## PCR-sekoitus

PCR:ää tehtäessä käytetään sekoitusta jossa on neljää erilaista nukleotidia joissa erilaisia emäksiä (A, T, C, G) ja polymeraasi. Lisäksi siihen lisätään magnesiumkloridia joka auttaa polymeraasia toimimaan ilman suurempia häiriöitä. Alukkeita tarvitaan polymeraasin toimintojen käynnistämiseksi. Kaikki sekoitetaan puskuriin, ja viimeisenä lisätään kohde-DNA jota halutaan monistaa.

PCR components	Amount
Template DNA (5-200 ng)	variable
1 mM dNTPs (200 uM final)	10 uL
10 X PCR buffer	5 uL
25 mM MgCl <sub>2</sub> (1.5 mM final)	3 uL
20 uM forward primer (20 pmoles final)	1 uL
20 uM reverse primer (20 pmoles final)	1 uL
5 units/uL Taq DNA polymerase (1.5 units)	0.3 uL
Water	Variable
Final Volume	50 uL

## PCR-laite

PCR-laite on laboratoriolaite jota käytetään DNA-segmenttien monistamiseen. Laitteen oleellinen osa on kuopallinen lämpöblokki johon sopii kuoppalevy jolle näytteet ja PCR-sekoitus pipetoidaan. Laite vaihtelee lämpötiloja sen mukaan miten se etukäteen ohjelmoidaan.



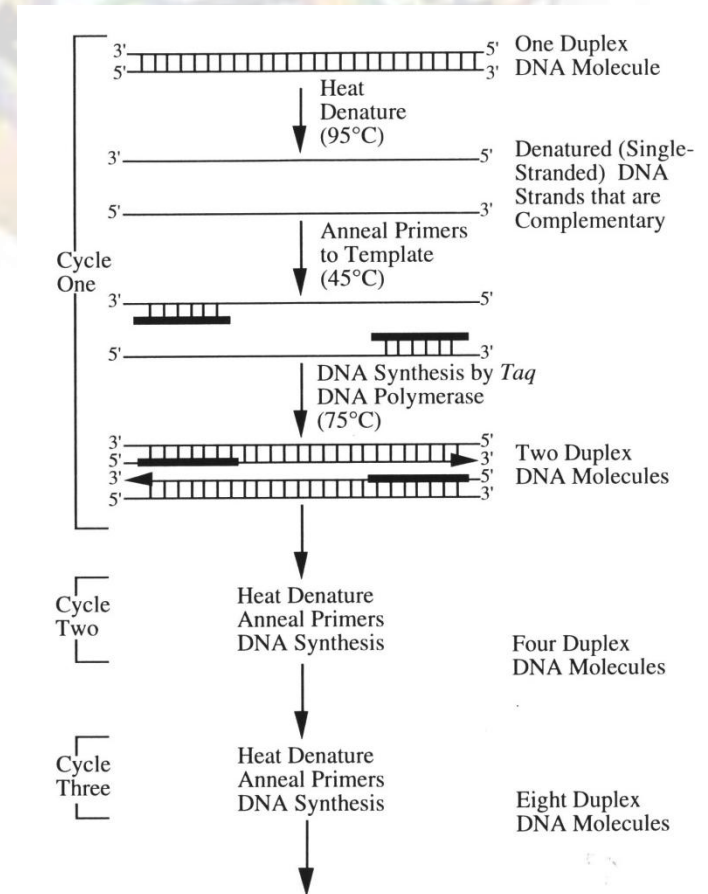
## Agilentin RT-PCR

## PCR-reaktio

DNA on kaksijuosteinen ja kuumennettaessa juosteet irtoavat toisistaan.

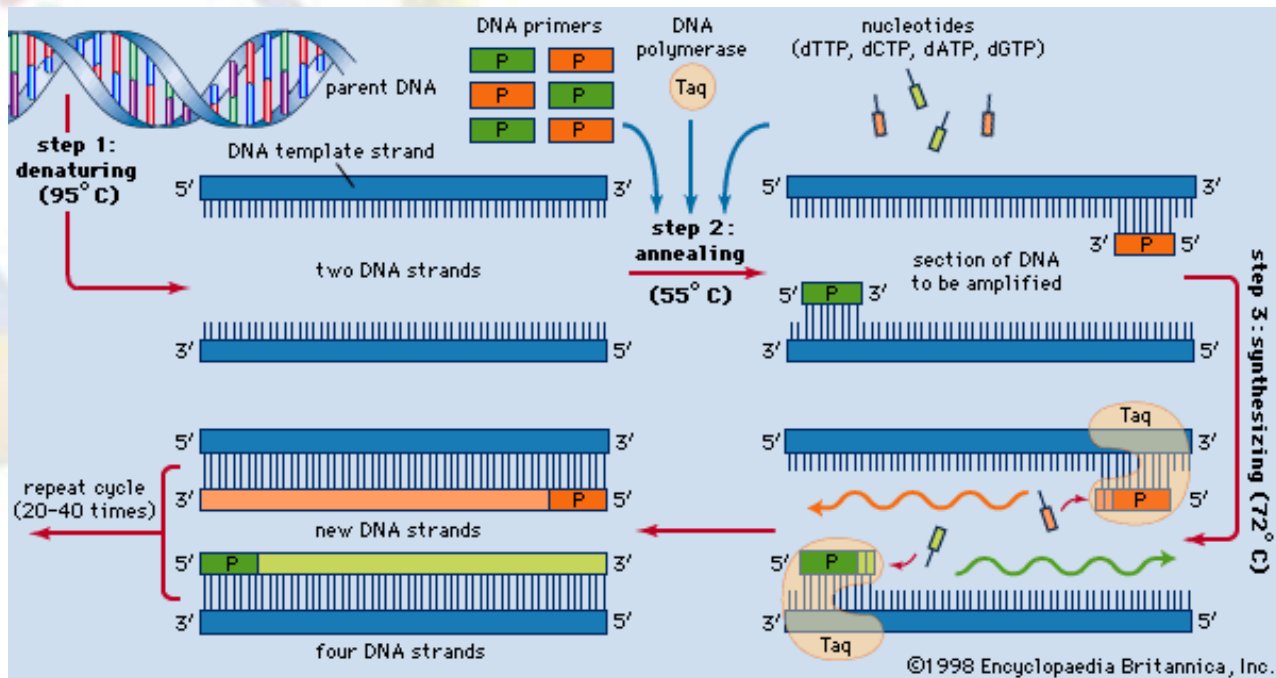
Kun lämpö alenee, alukkeet kiinnittyvät kohde-DNA:han. Alukkeet ovat suunniteltu selektiivisiksi, niin että kiinnittyvät vain siihen DNA:han jota halutaan monistaa.

Polymeraasi jatkaa DNA:n monistamista siitä, mihin alue loppuu. Alukkeita on kahden suuntaisia, ja monistus tapahtuu myös kahteen suuntaan.

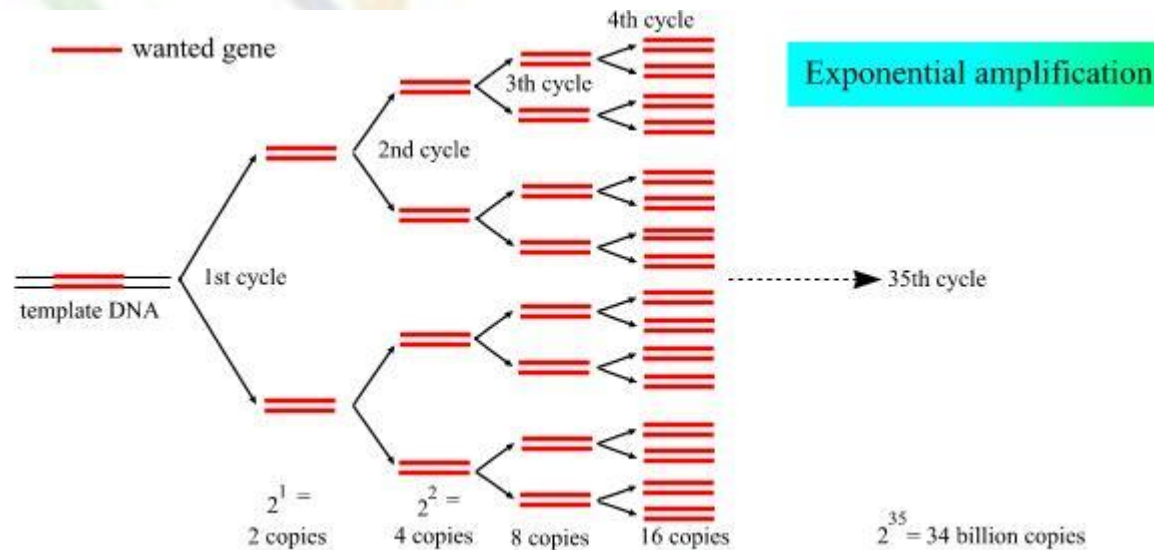




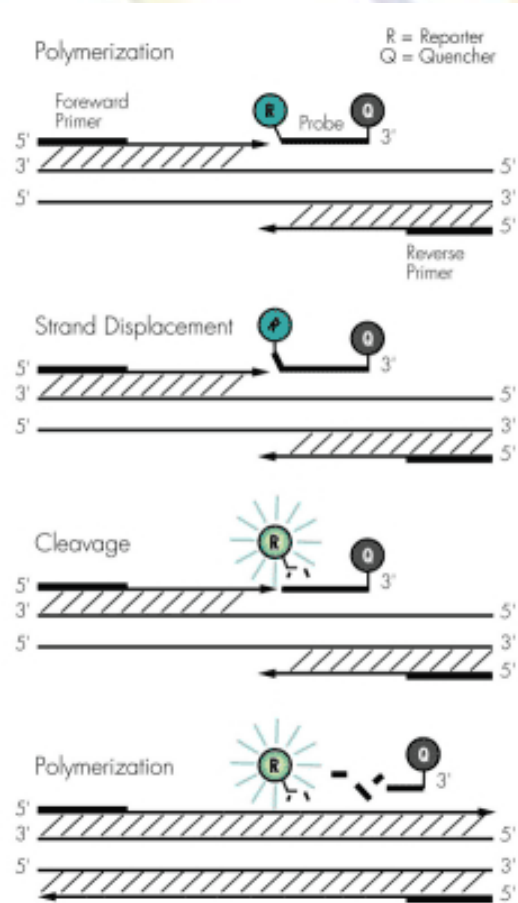
DNA-polymeraasi monistaa kohde-DNA:ta käyttäen PCR-sekoituksessa olevia nukleotidejä. Ne liitetään yhteen ketjuksi jossa emäkset jäävät kaikki samalle puolelle. Emäkset tarttuvat toisen vastaavan nukleotidiketjun emäksiin, kun sekvenssi on yhteensopiva. A ja T toimivat parina, kuten G ja C.



Lämpötilan vaihtelun avulla reaktio toistetaan moneen kertaan. DNA monistuu täten eksponentiaalisesti. Yleisesti käytetään noin 40 syklin ajoja. Kuten alla olevasta kuvasta käy ilmi, yksi ainut alkuperäinen DNA-pätkä on 35 syklin jälkeen monistunut noin 34 miljardiksi DNA-pätkäksi. Tämän takia PCR-menetelmällä voidaan löytää pieniäkin määriä DNA:ta.



PCR:n tuloksia voi tarkastella perinteisesti agaroosigeeliltä, mutta RT-PCR:ssä käytetään fluoresoivia markkereita. RT-PCR-laite rekisteröi jokaisen syklin jälkeen fluoresenssin. Fluoresoivat markkerit voidaan kiinnittää eri kohtaan ja ne voi lukea eri tavalla. Markkeri voi fluoresoida esim ennen alukkeen kiinnittymistä kohdejuosteeseen ja sitten sammua, tai “syttyä” fluoresoimaan vasta kiinnityksen jälkeen.



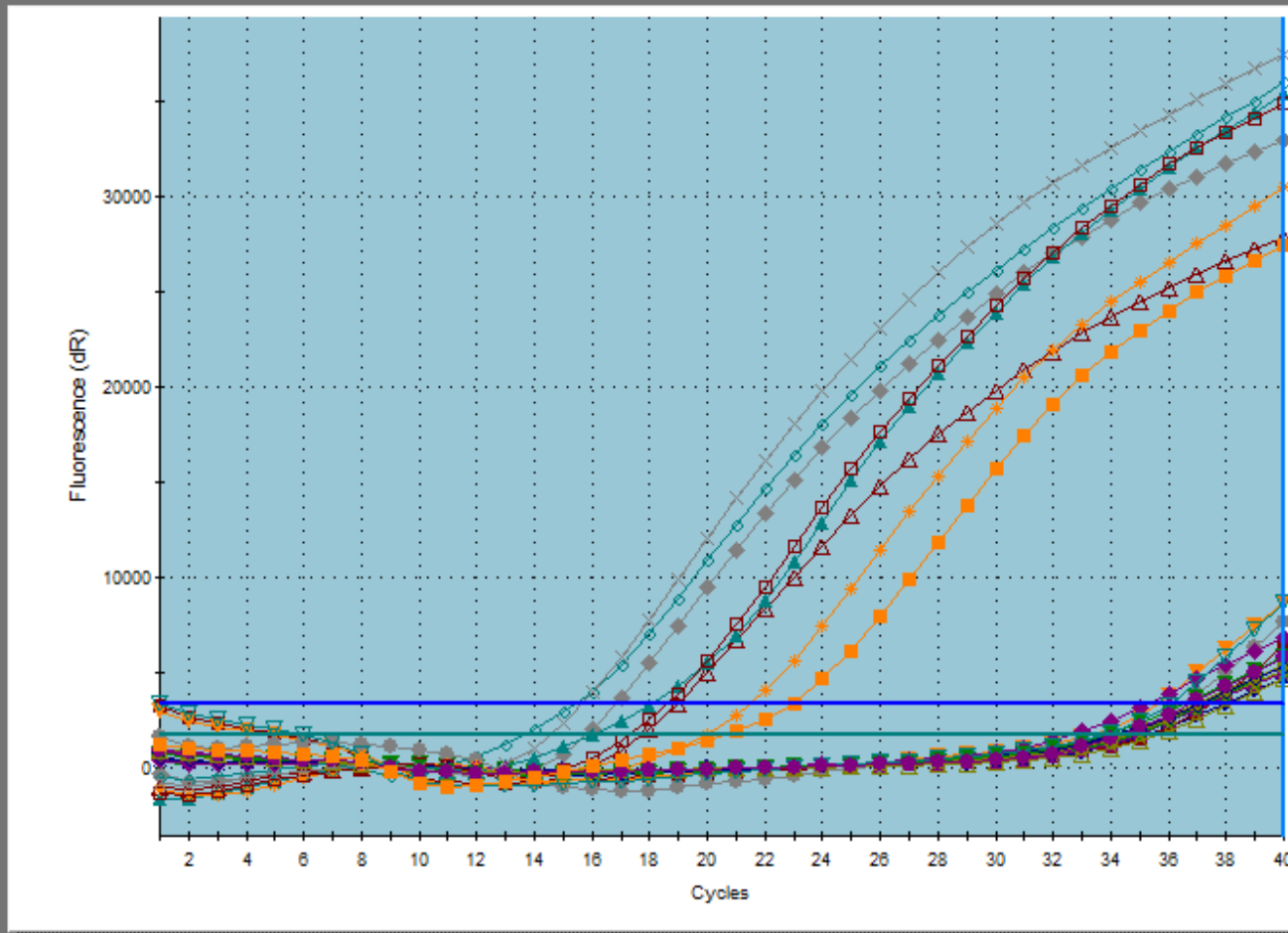
Typical fluorescent probes

Probe*	Uses	Absorption		Emission <sup>1</sup>			Sensitivity $\epsilon_{\max} \phi_F \times 10^{-2}$
		$\lambda_{\max}$ (nm)	$\epsilon_{\max}$ $\times 10^{-3}$	$\lambda_{\max}$ (nm)	$\phi_F$	$\tau_F$ (nsec)	
Dansyl chloride	Covalent attachment to protein: Lys, Cys	330	3.4	510	0.1	13	3.4
1,5-I-AEDANS	Covalent attachment to protein: Lys, Cys	360	6.8	480	0.5	15	34
Fluorescein isothiocyanate (FITC)	Covalent attachment to protein: Lys	495	42	516	0.3	4	116
8-Anilino-1-naphthalene sulfonate (ANS)	Noncovalent binding to proteins	374	6.8	454	0.98	16	67
Pyrene, and various derivatives	Polarization studies on large systems	342	40	383	0.25	100	100
Ethenoadenosine, and various derivatives	Analogs of nucleotides bind to proteins, incorporate into nucleic acids	300	2.6	410	0.40	26	10
Ethidium bromide	Noncovalent binding to nucleic acids	515	3.8	600	~1	26.5	38
Proflavine monosemicarbazide	Covalent attachment to RNA 3'-ends	445	15	516	0.02	—	30

<sup>1</sup> Values shown for  $\phi_F$  and  $\tau_F$  are near the maximum typically observed in biological samples at ambient temperature. Other (considerably smaller) values often are found.

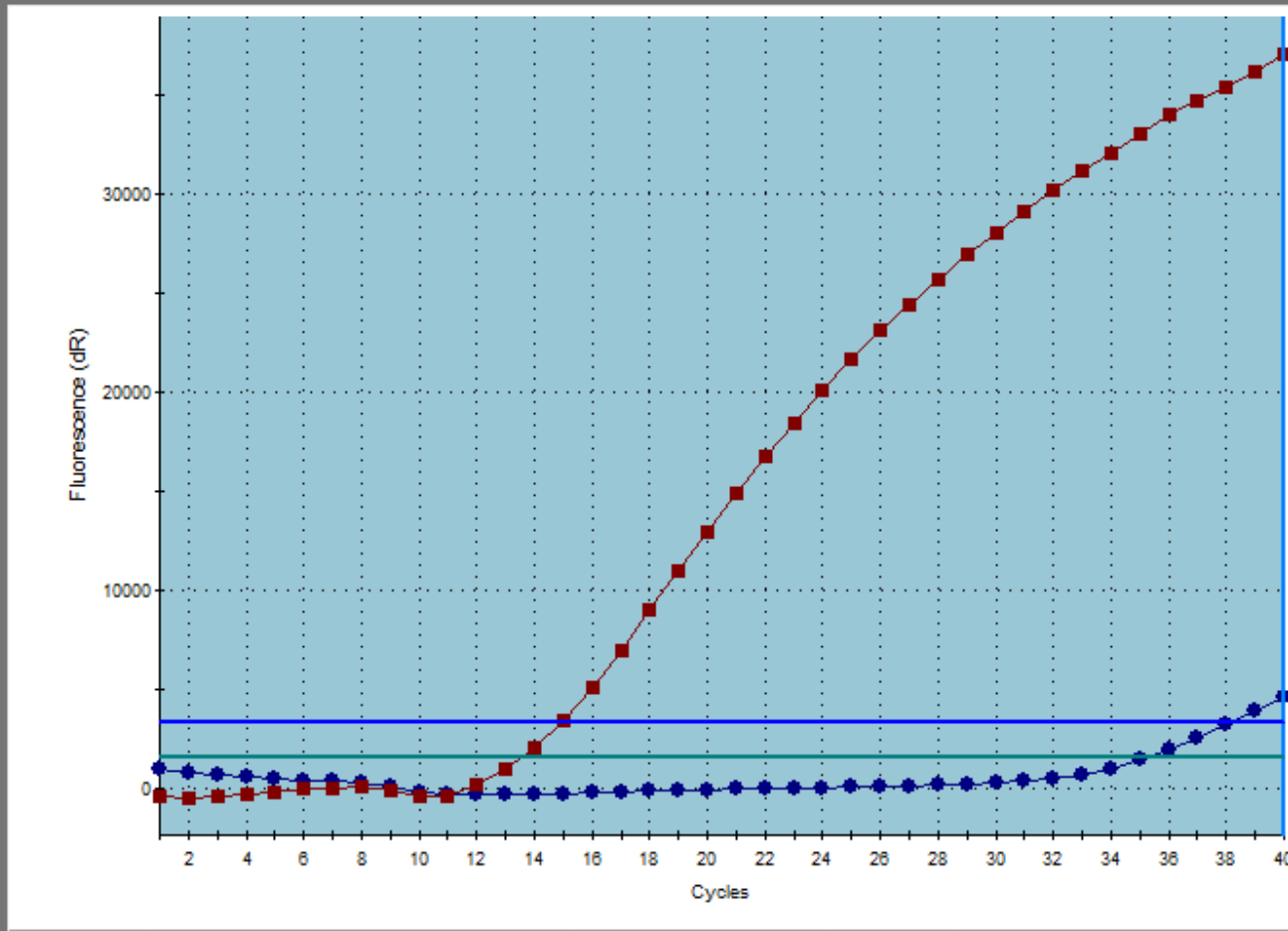
\* Structures of these probes are shown in Figure 8-16.

## Amplification Plots



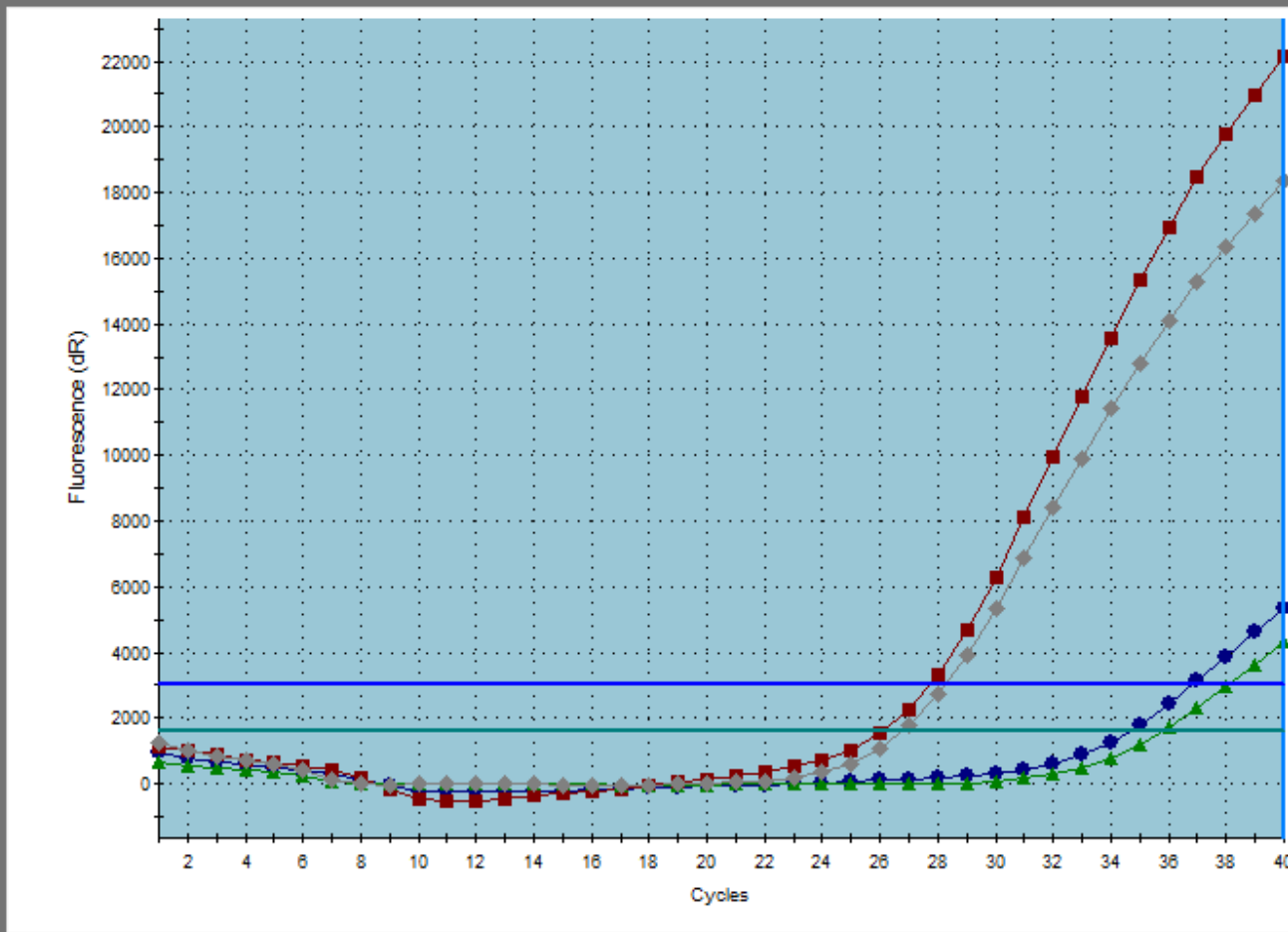
Tuloskäyränäkymä; näytteissä bakteerien DNA:ta (ylemmät käyrät) ja sisäiset kontrollit (alemmat käyrät).

## Amplification Plots



Yksittäisen näytteen tulos (positiivinen)

## Amplification Plots



Toistettavuus: Samasta näytteestä kaksi ajoa, eristykset kahden eri henkilön toimesta.



*Kysyttävää...?*



**Kiitos mielenkiinnosta!**