



SAVONIA

OPINNÄYTETYÖ - AMMATTIKORKEAKOULUTUTKINTO
SOSIAALI-, TERVEYS- JA LIIKUNTA-ALA

LAKTOOSI-INTOLERANSSIN MÄÄRITTÄMINEN RT-PCR- MENETELMÄLLÄ

Työohjeiden laatiminen bioanalyttikko-opiskelijoille

TEKI -

Emmi Huhtala

JÄT:

Seppo Ruotsalo

Seppo Vidgren

Koulutusala Sosiaali-, terveys- ja liikunta-ala			
Koulutusohjelma Bioanalytiikan koulutusohjelma			
Työn tekijät Emmi Huhtala, Seppo Ruotsalo ja Seppo Vidgren			
Työn nimi Laktoosi-intoleranssin määrittäminen RT-PCR-menetelmällä			
Päiväys	1.12.2015	Sivumäärä/Liitteet	41/9
Ohjaaja Anssi Mähönen			
Toimeksiantaja/Yhteistyökumppani Savonia-ammattikorkeakoulu			
<p>Tiivistelmä</p> <p>Laktoosi-intoleranssia eli laktoosin imeytymishäiriötä esiintyy noin 17 %:lla suomalaisista. Imeytymishäiriössä suo- leen ei erity tarpeeksi laktaasientsyymiä, joka pilkkoo laktoosia. Laktoosi-intoleranssi voi olla joko primaari tai se- kundaarinen, joista primaari on perinnöllinen. Laktoosin sietokyky aikuisiällä on SNP-mutaatiosta johtuva. SNP- mutaatioissa laktaasigeenissä tietyllä paikalla sijaitseva emäs on vaihtunut toiseksi.</p> <p>Genetiikka eli perinnöllisyystiede tutkii DNA:n siirtymistä sukupolvissa. DNA toimii kaikissa eliöissä solujen perintö- aineksena. Geeni on DNA:n osa, joka sisältää ohjeen proteiinin valmistuksesta. RNA toimii varsinaisena ohjeena proteiinisynteesissä. Viisi tunnettua emästä toimii proteiinin valmistuksessa päättäen aminohappoketjun järjestyk- sestä. Geenimutaatioissa emäsjärjestys voi muuttua, jolloin syntyvä proteiininkin toimintatapa voi muuttua. Gee- nitekniikka tutkii perimää PCR-menetelmän avulla.</p> <p>PCR eli polymeerasiketjureaktio monistaa DNA-templaattia. PCR-menetelmän ensimmäisen vaiheen aikana DNA hajoaa kaksoisjuosteeltaan. Toisessa vaiheessa alukkeet kiinnittyvät yksijuosteiseen DNA:han. Reaktion kolman- nessa eli viimeisessä vaiheessa DNA monistuu polymeerasientsyymien avulla alukkeiden välin rajaaman alueen ver- ran. RT-PCR-menetelmässä reaktioseokseen on lisätty fluoresoivaa väriainetta, jonka avulla reaktion etenemistä voi seurata reaaliajassa. HRM-menetelmä perustuu RT-PCR-laitteella näkyvän sulamiskäyrän analysointiin.</p> <p>Opinnäytetyö tehtiin Savonia-ammattikorkeakoululle kehittämistyönä. Opinnäytetyön tarkoituksena oli tuottaa bio- analytiikko-opiskelijoille uudet työohjeet laktoosi-intoleranssin määrittämiseen ja tehdä optimointisuunnitelma me- netelmää varten. Tavoitteena opinnäytetyössä oli tehdä selkeät ja oppimista tukevat työohjeet. Optimointisuunni- telman tavoitteena oli kehittää pohja, jonka avulla laktoosi-intoleranssitestin menetelmä pystytään optimoimaan.</p> <p>Opinnäytetyön teoriaosuus käsittelee lyhyesti laktoosi-intoleranssia, perimää ja PCR-menetelmää. Teoriaosuu- dessa painotetaan PCR-menetelmää, sen sovelluksia ja siihen tarvittavia reaktioaineita.</p>			
Avainsanat laktoosi-intoleranssi, kliininen molekyylibiologia ja geeniteknologia, RT-PCR, HRM, työohjeet, optimointi			

Field of Study Social Services, Health and Sports			
Degree Programme Degree Programme of Biomedical Laboratory Science			
Authors Emmi Huhtala, Seppo Ruotsalo and Seppo Vidgren			
Title of Thesis Determination of lactose intolerance by RT-PCR-method			
Date	1.12.2015	Pages/Appendices	41/9
Supervisor Anssi Mähönen			
Client Organisation/Partners Savonia University of Applied Sciences			
<p>Abstract</p> <p>Lactose intolerance as in lactose malabsorption occurs roughly in about 17 % of the Finnish population. In the case of malabsorption lactase enzyme is not secreted enough in to the intestine that breaks down lactose. Lactose intolerance can either be primary or secondary, of which the primary is hereditary. Tolerance of lactose in adulthood is caused by SNP mutation. SNP mutation is caused by switching of a single base in at a certain point of lactase gene.</p> <p>Genetics examines DNA's transition to generations. DNA works as cells' genetic material in all organisms. A gene is a part of DNA, which contains the manual production of the protein. RNA works as a guideline for the actual protein synthesis. Five-known operating base in the manufacture of protein is deciding the amino acid sequences. In gene mutation the base sequence may change in which case the resulting protein's way to operate may change as well. Gene technology examines genome by using the PCR method.</p> <p>PCR (Polymerase Chain Reaction) clones DNA template. During PCR's first phase DNA's double strand breaks. In the second phase primers attach into a single stranded DNA. In the reaction's third and final phase polymerase enzyme clones certain area of DNA defined by primers. In the RT-PCR method fluorescent dye is added into the PCR mixture which allows inspecting of the reaction in real time. The HRM method is based upon melting curve analysis which can be seen by RT-PCR machine.</p> <p>Thesis was made for Savonia University of Applied Sciences as development project. The purpose of this thesis was to produce new work instructions of determining lactase intolerance for biomedical laboratory scientist students and to make an optimization plan for the method. The aim of the thesis was to make logical work instructions which support learning. The aim of the optimization plan was to create a layout with which lactase intolerance method can be optimized.</p> <p>The theoretical part of this thesis shortly handles lactase intolerance, genetics and the PCR method. The main points of the theory are the PCR method, applications of PCR and reaction reagents for the PCR.</p>			
<p>Keywords lactase intolerance, clinical molecular biology and genetechnology, RT-PCR, HRM, working instructions, optimization</p>			

AGE = Agaroosigeelielektroforeesi. Menetelmä, jossa nukleiinihapot erotellaan sähkövirran avulla. Erottelu tapahtuu jähmeässä agarosissa nukleiinihappojen koon perusteella

ALUKE (FORWARD- JA REWARD-) = RNA- tai DNA-jakso, joka toimii aloitusjaksona nukleiinihapposynteesissä

AMPLIKONI = PCR:ssä monistuva alukkeiden mukaan syntyvä DNA-juoste

ANNEALING-REAKTIO = Alukkeiden sitoutuminen DNA:han lämpötilan laskiessa PCR-ajossa

CQ-ARVO = Quantification cycle, sama kuin CT-arvo

CT-ARVO = Cycle threshold. Syklimäärä, jossa fluoresenssi ylittää kynnyksarvon

DENATURAATIO-REAKTIO = PCR:n ensimmäinen vaihe, jossa DNA:n kaksoissidos aukeaa lämpötilan noustessa

DNTP = Deoksinukleotidi eli nukleotiditriposfaatti, polymeerasiketjureaktiossa käytettäviä "rakennuspaloja"

END-POINT-ANALYYSI = PCR-menetelmä, jossa tuloksia voidaan tarkastella vasta reaktion jälkeen

EKSTENSIO-REAKTIO = PCR-ajon kolmas vaihe, jossa polymeerasientsyymi rakentaa kopioitun DNA:n templaattista

FLUORESOIVA MERKKIAINE = Aine, joka lähettää valoa PCR-laitteen havaittavaksi

HAIRPIN-RAKENNE = Silmukka-rakenne, joka estää alukkeen halutun monistumisen

HPLC-PUHDISTETTU = High Performance Liquid Chromatography, puhdistettu korkean erotuskyvyn nestekromatografilla

HRM = High Resolution Melting-menetelmä, jolla voidaan tutkia nukleiinihappomuutoksia DNA:ssa. Perustuu dna:n sulamiskäyrien muutoksiin ja niiden tulkintaan

KUOPPALEVY = PCR-tekniikassa näytteiden tutkimiseen käytettävä alusta

LÄMPÖTILAGRADIENNTTI = Optimilämpötilan määrittäminen säätämällä annealing-lämpötilaa

MASTER MIX-KITTI = PCR-ajossa käytettävä reaktioliuos, joka sisältää välttämättömiä aineita reaktiolle

MOLEKYYLIPAINOMARKKERI = Väriaine, jonka avulla tietyn proteiinin paino voidaan määrittää

OKAZAKIN FRAGMENTTI = 3'-päästään kiinni olevaan DNA-juosteeseen sitoutuvat nukleotidit, joiden avulla juoste kopioituu

OLIGONUKLEOTIDI = Enintään muutaman kymmenen nukleotidin muodostama yksinauhainen nukleiinihappo

PCR-AJO = Polymeerasiketjureaktio (Polymerase Chain Reaction). tietyn DNA-jakson monistaminen lämpötilaa muuntamalla

PCR-SYKLI = PCR-ajon kaikki kolme vaihetta läpi käytyinä

POLYMORFISMI = Geenin monimuotoisuus, joka perustuu yksittäisen tai useamman emäsparin vaihdokseen

PRIMAARI LAKTOOSI-INTOLERANSSI = Laktoosin imeytymishäiriö laktaasientsyymin puutoksen vuoksi

REAKTION SATUROITUMINEN = Reaktion kyllästyminen, jossa monistettavan tuotteen fluoresenssi ei enää kasva tai monistumista ei enää tapahdu

REPLIKOITUMINEN = Kahdentuminen, kopioituminen identtisiksi klooneiksi

RT-PCR = Real-Time PCR. Reaaliajassa tarkasteltava polymeerasiketjureaktio, jossa on mukana fluoresoivaa merkkiainetta

SEKVENSOINTI = Geenin tai aminohappoketjun koostumuksen tutkiminen

SILMUKOINTI = Transkription vaihe, jossa geenin introniosat poistetaan ja eksoniosat liitetään yhteen

SNP = Single Nucleotide Polymorphism-mutaatio. Pistemutaatio, joka esiintyy populaatiossa usealla yksilöllä

SULAMISLÄMPÖTILA = Lämpötila, jossa DNA-pätkän kaksoisjuoste aukeaa

TEMPLAATTI = PCR:ssa monistettava alukkeilla rajattu tutkittava DNA-pätkä

T_m-LÄMPÖTILA = Alukkeiden sulamislämpötila

SISÄLTÖ

1	JOHDANTO	7
2	LAKTOOSI-INTOLERANSSI	8
3	GENETIIKKA	10
3.1	DNA ja RNA	10
3.2	Geeni	11
3.2.1	Transkriptio	11
3.2.2	Translaatio eli proteiinisynteesi	11
3.3	Geenimutaatiot	12
3.4	Geenitekniikka	12
4	POLYMERAASIKETJUREAKTIO	13
4.1	PCR	13
4.2	RT-PCR	14
4.3	HRM-menetelmä	15
4.4	PCR-ajon reagenssit	16
4.4.1	Alukkeet	16
4.4.2	DNA-templaatti	16
4.4.3	Muut PCR-ajon aineet	17
4.5	Agaroosigeelielektroforeesi	17
5	HRM-MENETELMÄN OPTIMOINTI	19
5.1	Optimointisuunnitelma	19
5.2	Riskit ja virhelähteet	23
6	KEHITTÄMISTYÖN TOTEUTUS	24
6.1	Työn tarkoitus ja tavoite	24
6.2	Työohjeen laatiminen	24
6.3	Optimoinnin suunnittelu	25
7	POHDINTA	27
7.1	Luotettavuus ja eettisyys	27
7.2	Opinnäytetyön ja oman oppimisen arviointi	27
	LÄHTEET	29
	LIITE 1: TYÖOHJE	32

1 JOHDANTO

Laktoosi-intoleranssi on laktoosin imeytymishäiriö, jota sairastava ihminen ei kykene sulattamaan maidossa olevaa laktoosia. Laktoosi-intolerantikon suolisto ei eritä laktoosia pilkkovaa laktaasientsyymiä, tai sitä erittyy liian vähän. Imeytymishäiriö aiheuttaa suolistossa ja mahassa oireita kuten turvotusta, ripulia ja ilmavaivoja. Arviolta noin 17 % suomalaisista sairastaa laktoosi-intoleranssia. Primaari eli aikuisiän laktoosi-intoleranssi on perinnöllinen, ja se voidaan todeta geenitestillä. (Hillilä 2007, 2743.)

Opinnäytetyömme tarkoituksena oli tuottaa työohjeet Savonia-ammattikorkeakoululle laktoosi-intoleranssin DNA-testiin käyttäen kvalitatiivista reaaliaikaista RT-PCR (Real Time Polymerase Chain reaction) -menetelmää. Työohjeita on tarkoitus käyttää bioanalyttikkojen molekyylibiologian ja geenitekniologian harjoitustunneilla. Huomasimme itse opiskeluaikana, että työohjeet olivat vaikealukuiset ja lisäksi englanninkieliset. Uusille selkeämmille työohjeille oli siis tarvetta. Opinnäytetyömme toisena tarkoituksena oli suunnitella optimointi laktoosi-intoleranssin määrittämiseen HRM (High Resolution Melting)-menetelmällä koulun RT-PCR-laitteelle. Optimointisuunnitelman tarve selvisi työtä tehdessämme, sillä huomasimme ettei alkuperäinen menetelmä ollut tarpeeksi spesifi. Opinnäytetyömme oli toiminnallinen kehittämistyö.

Reaaliaikaista PCR-menetelmää käytetään yhä useammissa kliiniseen laboratorioalaan liittyvissä tutkimuksissa. Kyseisen tekniikan avulla kliiniset tutkimukset nopeutuvat, automatisoituvat ja niiden kustannukset alenevat.

Saimme opinnäytetyömme aiheen Savonia-ammattikorkeakoululta. Opinnäytetyön tuotoksesta hyötyvät sekä Savonia-ammattikorkeakoulu että bioanalytiikan opiskelijat. Optimointisuunnitelman avulla laktoosi-intoleranssin geenitesti saadaan spesifisemmäksi. Työohjeiden avulla opiskelijat oppivat RT-PCR-menetelmästä, jota tullaan tulevaisuudessa käyttämään yhä enemmän kliinisissä laboratorioissa.

2 LAKTOOSI-INTOLERANSSI

Laktaasientsyymi (virallinen nimi laktaasifloritsiinihydraasi) hajottaa suolessa maitosokeria eli laktoosia (glukoosi – 1 - 4 β -galaktoosi) galaktoosiksi ja glukoosiksi (Savilahti ja Järvelä 2002, 4337). Aikuisiän laktoosi-intoleranssi on primaari laktoosinimeytymishäiriö, jossa elimistö ei tuota enää tarpeeksi laktaasientsyymiä. Imeytymishäiriö aiheuttaa suolistossa ja mahassa oireita kuten turvotusta, ripulia ja ilmavaivoja. Arviolta noin 17 % suomalaisista sairastaa laktoosi-intoleranssia. Afrikkalais-amerikkalaisessa väestössä noin 70 % ja aasialais-amerikkalaisissa vastaavasti noin 90 % on laktoosi-intolerantikoita (Physicians Committee). Primaari- eli aikuisiän laktoosi-intoleranssi on perinnöllinen, joka voidaan todeta geenitestillä. Aikuisiän laktoosi-intoleranssi ilmenee vasta imeväisiän jälkeen. Laktaasin tuotto suolessa on normaalia lapsuusiällä ja sitä jää elimistöön vielä noin 10 % aikuisiällä. (Hillilä 2007, 2743.)

Ennen karjatalouden alkua aikuisiän laktoosi-intoleranssi oli normaali tila. Jossain vaiheessa ihmisen evoluutiota tapahtui pistemutaatio laktaasientsyymiä tuottavassa emäksessä DNA:ssa. Tämän seurauksena entsyymien tuotanto jatkui vielä aikuisiällä. Pohjoismaalaisilla ihmisillä on todettu olevan vähemmän laktoosi-intoleranssia kuin muualla maailmassa. Tämä johtuu siitä, että pohjoismaissa on käytetty enemmän maitotuotteita. Luonnonvalinnan uskotaan suosineen niitä ihmisiä, jotka ovat saaneet laktaasientsyymien tuotantoa jatkavan mutaation. (Vuorisalo, Arjamaa, Vasenmägi, Bläuer ja Saloniemi 2012, 1321.)

Primaarin laktoosi-intoleranssin lisäksi on mahdollista saada senkundaarinen laktoosinimeytymishäiriö. Sekundaarisessa laktoosi-intoleranssissa oireet ovat samat kuin primaarissa, mutta syy ei ole geneettinen. Sekundaarisessa laktoosi-intoleranssissa jokin tekijä on vaurioittanut ohutsuolen limakalvoa. Esimerkiksi keliakia tai ärtyneen suolen oireyhtymä voivat aiheuttaa laktoosinimeytymishäiriötä. (Hillilä 2007, 2743.)

Laktaasientsyymien tuotanto aikuisiällä riippuu SNP (englanniksi Single Nucleotide Polymorfism)-mutaatiosta. SNP-mutaatioissa yksi emäs laktaasin synteesiä säätelevässä LCT(Lactase)-geenissä paikalla 13910 on muuttunut sytosiinista (C) tymiiniksi (T). Mutaatio vaikuttaa LPH (Lactase-Phlorizin Hydrolase) -proteiinin tuotantoon kyseisessä geenissä. (Genecards 2015.) Tämä SNP-mutaatio pitää paikkansa tutkimuksien mukaan ainakin eurooppalaisiin. Muissa väestöryhmissä tutkimukset ovat vielä kesken. (Sverrisdóttir, Timpson, Toombs, Lecoeur, Froguel, Carretero, Ferreras, Götherström ja Thomas 2014.) Aikuisiän laktoosi-intoleranssi johtuu geenissä olevasta C/C-genotyypistä. Parhaiten laktoosia sietävät T/T-genotyypin omaavat ihmiset. C/T-genotyypin omaavilla laktaasientsyymien tuotanto on melko vaihtelevaa. SNP-mutaatioita pystytään tutkimaan RT-PCR-menetelmällä. (Bodlaj, Stöcher, Hufnagl, Hubmann, Biesenbach, Stekel ja Berg 2006, 148.)

Lasten ja nuorten laktoosi-intoleranssin tutkimisessa perinteisestä laktoosirasituskokeesta 30 % on virheellisiä tuloksia, koska lasten ruuansulatus on hitaampaa kuin aikuisten. Geenitestillä ei pystytä diagnosoimaan lapsuusiän laktoosi-intoleranssia tai maitoallergiaa. Tutkimusten mukaan maitoaller-

gialla ei ole mitään yhteyttä laktoosi-intoleranssiin. Laktaasientsyymin aktiivisuus putoaa vasta kouluikässä tai varhaisaikuisuudessa. Testin spesifisyys on kuitenkin suomalaisilla lapsilla jo 8 vuoden iässä 97 % ja 12-vuotiaana 100 %. Geenitestiä ei suositella pienille lapsille, koska hankittu laktoosi-intoleranssi vaikuttaa vasta myöhemmällä iällä eikä pienten lasten maidonsaantia tulisi rajoittaa terveyssyistä. Laktoosirasituskoe ei ole lapsille suotava diagnostiikkatapa. Rasituskoetta voidaan kuitenkin käyttää apuna diagnoosissa, mikäli C/T-genotyypin lapsella on tyypillisiä laktoosi-intolerantikon oireita eikä hänellä ole muuta laktaasinpuutetta aiheuttavaa tekijää. (Kolho, Rasinperä, Järvelä ja Savilahti 2004, 3627 - 3628.)

Yleisin laktoosinsietokoe Suomessa on imeytymistesti, jossa potilas nauttii 50 grammaa laktoosia. Tämä vastaa noin yhtä maitolitraa. Kokeessa seurataan potilaan veren glukoosiarvon nousua. Mikäli glukoosipitoisuuden nousu on alle 1,1 mmol/l (millimoolia litraa kohden), potilalla voidaan todeta laktoosin imeytymishäiriö. Koetta tukevat myös potilaalle 1 - 2 tunnin aikana ilmenevät mahdolliset vatsavaivat, kuten ilmavaivat ja ripuli. (Hillilä 2007, 2744.)

RT-PCR-menetelmä on spesifisin keino analysoida SNP-mutaatioita. Yllättäen RT-PCR-menetelmä on myös taloudellisesti edullisempi vaihtoehto kuin laktoosirasituskoe primaarin laktoosinimeytymishäiriön tutkimiseen. Geenitesti on noin 10 € edullisempi menetelmä kuin perinteinen laktoosirasituskoe, kun otetaan huomioon sekä potilas että kokeen tuottaja. Geenitestillä on myös nopeampi diagnosoida laktoosi-intoleranssi ja sen tulos on toistettavasti luotettava ja tarkka. Laktoosirasituskokeen tarkkuus vaihtelee 77 - 96 %. Geenitestillä pystytään selvittämään, kuinka aktiivinen laktaasientsyymi on, mutta oireiden yksilöllisyyttä sillä ei saada selville toisin kuin laktoosirasituskokeessa. (Piirainen, Järvelä ja Malmi 2007, 2081 - 2084.)

3 GENETIIKKA

Genetiikka eli perinnöllisyystiede tutkii perintöaineksen eli DNA:n siirtymistä eteenpäin sukupolvissa. Toinen genetiikan tutkimusaihe on DNA:n vaikutus solujen toimintaan. Genetiikan alueeseen kuuluvat lisäksi evoluution kuluessa tapahtuvan perinnöllisen viestin muuttuminen ja rikastuminen. Viimeisen noin kolmenkymmenen vuoden aikana kehitetyt menetelmät ja uusin tutkimustieto ovat mullistaneet genetiikan tutkimuksen. Genetiikka on laaja-alainen biologian tieteenala, ja nykyisin onkin lähes mahdotonta saavuttaa kokonaisnäkemystä biologiasta ilman geneettistä pohjakoulutusta. (Oulun yliopisto 2014.)

3.1 DNA ja RNA

DNA on kaikkien elävien eliöiden perintöainesta. Tämä perintöainesta ohjaa kaikkien solujen toimintaa tuottamalla niiden toiminnoista vastaavia proteiineja. DNA tulee sanasta deoksiribonukleiinihappo (englanniksi deoxyribonucleic acid). (Pärssinen, Suominen ja Haajanen 2012, 138.)

DNA muodostuu kahdesta toisiinsa kiertyneestä nauhasta, jota kutsutaan kaksoiskierteeksi. Siihen sisältyy kolme osaa, sokeri-, fosfaatti- ja emäsosa. Emäksiä on neljää erilaista, adeniini, tymiini, guaniini ja sytosiini. Kun perimää ei käytetä proteiinin koodaamiseen, se on pakattu erittäin tiiviiksi "paketiksi" solun tumassa. DNA:lla on niin sanotusti kaksi eri päätä, 5´- ja 3´-pää. 5´-pää saa nimensä siitä, että nukleotidin sokeriosan viidennen happeen on sitoutunut fosfaattiosa. 3´-pään nimitys tulee siitä, että fosfaattiosa on kiinnittynyt edellisen nukleotidin sokeriosan kolmanteen happeen. (Pärssinen ym. 2012, 138.)

DNA:ssa emäsparit muodostuvat tymiinin ja adeniinin sekä guaniinin ja sytosiinin välille. Tymiini ja adeniini muodostavat välilleen kaksoissidoksen. Guaniini ja sytosiini taas vahvemman kolmoissidoksen. Adeniinia ja guaniinia kutsutaan puriineiksi, tymiiniä ja sytosiinia taas pyrimidiineiksi. Näistä puriinit ovat kooltaan hiukan suurempia molekyyliä. (Pärssinen ym. 2012, 138 - 140.)

DNA kahdentuu eli replikoituu, kun solu alkaa valmistautua solunjakautumiseen. DNA avautuu helikaasientsyymiin vaikutuksesta osittain kaksoiskierteeltään. Tämän jälkeen DNA-polymeraasientsyymi liittyy avautuneeseen DNA-kierteeseen nukleotidejä 5´-päästä 3´-päähen. DNA:n kahdentuminen tapahtuu aina näin päin, koska seuraavan nukleotidin kolmas happi on ainoa vapaana oleva mahdollinen kiinnittymiskohta. Koska toinen yksijuosteinen DNA on vielä 5´-päästään kaksijuosteista, replikoituu se niin kutsuttujen Okazakin fragmenttien avulla. Okazakin fragmentit kiinnittyvät pieninä pätkinä kyseiselle DNA:n kaksoiskierteen puoliskolle. Kahdentumisen nopeuden määräävät avustavien proteiinien nopeus, jolla ne avaavat DNA:n kaksoiskierrettä. Ihmisellä DNA:n kahdentumisnopeus on noin 50 nukleotidia sekunnissa. (Suominen, Pärssinen, Haajanen ja Pelkonen 2013, 24 - 27.)

RNA on yksinauhainen nukleotidiketju. Lyhenne RNA tulee sanasta riboosinukleotidihappo, englanniksi ribonucleic acid. DNA:ssa sokeriosan muodostaa deoksiriboosi, josta puuttuu yksi happi. RNA:ssa puolestaan sokeriosa on riboosi, joka sisältää yhden hapen enemmän. RNA:ssa adeniinin parina on urasiili, muuten emäkset ovat samoja kuin DNA:ssa. (Pärssinen ym. 2012, 141.)

3.2 Geeni

Geeni on perinnöllisyyden perusyksikkö. Se on DNA-jakso, joka sisältää informaation proteiinin rakentamisesta. (Ulmanen, Tenhunen, Yläne, Valste ja Viitanen 1997, 20). Ihmisessä on genomien sekvensoinnin perusteella arvioitu olevan noin 20 000 – 25 000 geeniä (Suominen ym. 2013, 29). Sekvensoinnilla tarkoitetaan DNA:n tai geenin emäsjärjestyksen selvittämistä (Solunetti 2006).

Introni on geenin osa, joka ei sisällä proteiinin rakennusohjetta. Introni jätetään lähetti- eli mRNA:sta (englanniksi messenger-RNA) pois proteiinisynteesin silmukointivaiheessa. Intronit ovat DNA:ssa hyödyllisiä, koska ne mahdollistavat suuremman muuntelun geneissä. Eksoni puolestaan sisältää geenin ohjeen proteiinin koodaamiseen eli valmistukseen. Silmukointivaiheessa eksonit liitetään intronien poiston jälkeen yhteen. (Ulmanen ym. 1997, 26 - 27.)

3.2.1 Transkriptio

Transkriptossa eli RNA-synteesissä tumassa DNA:ssa oleva geeni luetaan ja kopioidaan mRNA:ksi. Geeni toimii DNA-mallina eli templaattina, jonka mukaan RNA-polymeraasientsyymi rakentaa mRNA:n. Kun mRNA on luotu, poistetaan siitä silmukoinnin avulla introniosat. Kun jäljelle jääneet eksoniosat on liitetty yhteen, on mRNA valmis poistumaan tumasta solulimaan. (Suominen ym. 2013, 31, 32.)

3.2.2 Translaatio eli proteiinisynteesi

Proteiinisynteesi tapahtuu solulimassa ribosomien pinnalla. Ribosomeja kutsutaankin usein myös proteiinitehtaiksi. Ribosomi koostuu proteiineista ja ribosomi-RNA:sta (rRNA). Proteiiniä ja ribosomi-RNA:ta kutsutaan yhteisellä nimellä tRNA:ksi (englanniksi transfer-RNA). (Pärssinen ym. 2012, 151.) Jokainen ribosomi tuo yhden aminohapon mRNA:n luo. mRNA:n luona oleva emäskodoni tunnistaa tRNA:n vastinkodonin ja ne kiinnittyvät toisiinsa. Tällä tavalla aminohappoketju muodostuu. mRNA:n kodoneja on kaikkiaan 64, joista yksi on aloituskodoni. Aloituskodoni koodaa metioniinimistä aminohappoa esiintyessään geenin sisällä. On olemassa kolme vaihtoehtoista lopetuskodonia. Aloitus- ja lopetuskodonit määräävät aminohappoketjun valmistamisen aloittamisen ja loppumisen. Kun lopetuskodoni ilmaantuu mRNA:ssa, proteiinisynteesi lopetetaan. Koska aminohappoja on vain 20 erilaista, yhdelle aminohapolle on useita kodoneja. (Suominen ym. 2013, 41.)

3.3 Geenimutaatiot

Geenin sisältämä informaatio voidaan kirjoittaa emästen alkukirjainten mukaan esimerkiksi AGGTCATTAACGCTCAGG, jossa A on adeniini, T tymiini, G guaniini ja C sytosiini (englanniksi cytosine). Kolmea perättäistä emästä kutsutaan emästripletiksi, joiden avulla aminohappojen liittäminen mRNA:han tapahtuu. Mikäli jokin geenin emäksistä vaihtuu, seurauksena voi olla toimimaton, virheellinen tai normaalisti toimiva proteiini. Jokin geenin emäs tai tripletti voi puuttua tai vaihtua ja siihen voi tulla ylimääräisiä emäksiä. Ylimääräisen emäksen lisäys taas johtaa geneettisen viestin muuttumiseen lisäyksen tapahtumakohtasta alkaen. (Pärssinen ym. 2012, 151 - 152.)

Geenimutaatio on yhdessä geenissä tapahtuva muutos, jonka seurauksena geenin perinnöllinen informaatio saattaa muuttua. Aina geenimutaatioilla ei ole vaikutusta geenin toimintaan. Yleisimmin mutaatio muuttaa geenin koodaaman proteiinin rakennetta. Mutaatiot voivat tapahtua somaattisissa soluissa, jolloin ne vaikuttavat vain yhteen yksilöön. Geenimutaatiot voivat kuitenkin olla myös periytyviä, jolloin mutaatio siirtyy sukusoluissa jälkeläisille. Sukusolulinjassa tapahtuvat geenimutaatiot ovat evoluution kannalta tärkeitä, koska ne aiheuttavat perinnöllistä muuntelua populaatiossa. (Happonen, Holopainen, Sariola, Sotkas, Tenhunen, Tihtarinen-Ulmanen ja Venäläinen 2006, 72, 74 - 75.)

Pistemutaatio on pienin mahdollinen perimään vaikuttava muutos. Tässä mutaatiossa yksittäinen nukleotidi on vaihtunut toiseksi. Pistemutaatio on yleinen ilmiö transkriptiossa. On arvioitu, että vuorokauden aikana ihmisellä tapahtuu noin 100 000 pistemutaatiota. Suurin osa näistä mutaatioista ei kuitenkaan vaikuta millään tavalla proteiinin toimintaan. Joissain tapauksissa pistemutaatio voi kuitenkin muuttaa sellaista aminohappoa, joka vaikuttaa proteiinin rakenteeseen. Laktoosin sietokyky on pistemutaation seuraus. (Happonen ym. 2006, 73.) Laktoosin sietokykyä aiheuttava mutaatio on myös sukusolulinjassa. Tämä on mahdollistanut sen periytymisen sukupolvissa.

Muita mahdollisia geenimutaatioita ovat nukleotidin häviäminen tai jonkin ylimääräisen nukleotidin liittyminen geeniin. Näillä mutaatiolla on yleensä suuremmat vaikutukset solujen toimintaan. (Happonen ym. 2006, 73.)

3.4 Geenitekniikka

Geenitekniikassa tutkitaan geenien toimintaa, ilmenemistä ja niiden rakennetta. Geenien sisältämää tietoa voidaan hyödyntää esimerkiksi proteiinien tuottamiseen. Tällä hetkellä geenin lisäämiseen on kaksi vallitsevaa menetelmää, geenikloonauksen ja geenin monistaminen PCR-tekniikalla. Geenien kloonauksen tapahtuu käyttäen hyväksi bakteeri- ja soluviljelmää, jossa haluttu geeni siirretään bakteeriin. Bakteerin annetaan jakautua riittävästi esimerkiksi kasvatusmaljalla jonka jälkeen geeniä voidaan eristää bakteereista tutkimuksia varten. Termi kloonauksen tarkoittaa, että alkuperäisen bakteerin jälkeläisillä on muuttumaton sama perimä, joten ne ovat alkuperäisen bakteerin kloonit. (Ulmanen ym. 1997, 61.)

4 POLYMERAASIKETJUREAKTIO

Polymeraasiketjureaktio eli PCR (englanniksi Polymerase Chain Reaction) on menetelmä, jolla voidaan monistaa DNA- tai RNA-jaksoja eli -pätkiä. Tavallisesti monistaminen suoritetaan DNA-jaksosta, joka sijaitsee nukleotidijärjestykseltään tunnetun DNA-jakson välissä. Näitä DNA-jaksoja kutsutaan alukkeiksi. Alukkeiden lisäksi PCR-ajoon tarvitaan tutkittavaa näyte-DNA:ta, entsyymiä ja nukleotideja monistamista varten sekä muita reaktiota helpottavia aineita. PCR-ajon aikana kaksoisjuosteeltaan avatut alukkeet sekä reaktioliuoksen nukleotidit ja templaattit sitoutuvat toisiinsa muodostaen halutun DNA-jakson kopioita. Tällä tavoin voidaan tutkia tietyn geenin ilmenemistä näytteessä. (Suominen ym. 2013, 153 – 154.)

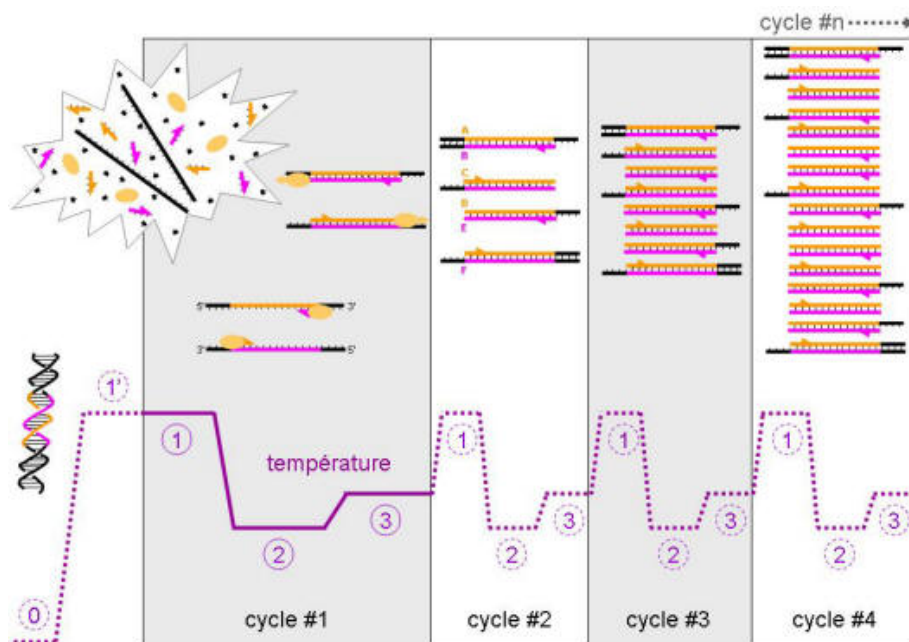
End-point-analysissa on kyse reaktiotuotteiden tarkastelusta vasta PCR-ajon jälkeen. Tavallisessa PCR:ssa tarkastellaan aina lopussa syntyvää tuotetta agarosigelelektrofooresilla (AGE). Reaaliaikaisessa PCR:ssa on mukana fluoresoivaa merkkiainetta, jolloin AGE-ajoa ei tarvitse tehdä. (Applied Biosystems.)

4.1 PCR

PCR eli polymeraasiketjureaktio tarkoittaa tietyn DNA-jakson eli templaatin monistamista säätelemällä lämpötilaa. Reaktio koostuu kolmesta eri vaiheesta, joita toistetaan noin 30 kertaa. Reaktioiden tuottama amplikoni kasvaa eksponentiaalisesti syklien aikana.

PCR-ajoon tarvitaan kaksi oligonukleotidialuketta, vapaita nukleotideja (dNTP, englanniksi deoxynucleotidephosphates), lämpöä kestävä polymeraasientsyymi sekä magnesiumia. Real-Time-PCR:ään tarvitaan lisäksi fluoresoivaa merkkiainetta. Tässä työssä käytetään HRM-kitissä olevaa High Resolution Melting Dye -väriainetta fluoresoivana merkkiaineena. (Roche 2013, 3.)

PCR:ssa vaiheita on kolme (ks. kuva 1 s. 14), joista denaturaatio-vaihe on ensimmäinen. Denaturaatiossa DNA:n kaksoissidos aukeaa lämpötilan noustessa noin 95 asteeseen. Seuraavassa annealing-reaktiossa alukkeet sitoutuvat DNA:han. Samalla lämpötila laskee joitakin asteita alukkeiden sulamislämpötilaa (T_m) alemmaksi. Forward- ja reverse- alukkeet kiinnittyvät DNA:han rajaten halutun templaatin. Viimeinen vaihe on ekstensio-reaktiossa jossa lämpötila nostetaan noin 72 asteeseen. Tämän seurauksena Taq-polymeraasientsyymi alkaa kopioida DNA-templaattia sen molemmista päistä. Reaktioliuoksen vapaat nukleotidit kiinnittyvät DNA-templaattiin. Näitä alukkeiden määrittämiä kopioituja jaksoja kutsutaan amplikoneiksi. Amplikonien ongelmana voi olla niiden mahdollinen itseensä tarttumisen muodostaen "hairpin"- eli silmukka -rakenteita. (Kubista, Andrare, Bengtsson, Forootan, Jonák, Lind, Sindelka, Sjöback, Sjögreen, Strömbom, Ståhlberg, Zoric 2006, 97 - 98.)



KUVA 1. PCR:n vaiheet (Ygonaar 2006).

4.2 RT-PCR

RT-PCR (englanniksi Real-Time Polymerase Chain Reaction) tarkoittaa reaaliajassa tarkasteltavaa polymeraasiketjureaktiota. RT-PCR mittaa spesifisesti halutun DNA:n tai RNA:n määrää näytteestä. Menetelmä on tehokkaampi ja tarkempi kuin perinteinen PCR.

RT-PCR-menetelmä perustuu tavalliseen PCR-ajoon, mutta reaktioseokseen on lisätty fluoresoivaa merkkiainetta. Fluoresenssisignaali erottuu vasta, kun kopioitua tuotetta on tarpeeksi. Kyseistä merkkiainetta seuraamalla voidaan tarkastella reaktiota reaaliajassa CT-pisteestä eksponentiaalisen kasvun loppuun. CT-arvo on kohta, jossa fluoresenssi alkaa erottua taustasta eli signaali on tarpeeksi vahva tarkasteltavaksi. Reaktion saturoitumisesta puhutaan, kun fluoresenssin aiheuttama signaali pysyy samana tai katoaa riippuen merkkiaineesta. Tällöin eksponentiaalinen kasvu on loppunut. (Kubista ym. 2006, 98 - 99.)

RT-PCR-menetelmä voi olla joko kvantitatiivinen, jolloin tarkastellaan näytteen määrää tai pitoisuutta, tai kvalitatiivinen, jolloin tutkitaan mitä näyte sisältää. Syntyvillä tuotteilla on tietty sulamislämpötila (T_m), johtuen niiden nukleotidikoostumuksesta. Jo yhden nukleotidin muutos syntyvässä tuotteessa muuttaa sen T_m -arvoa. Näin voidaan havaita pienetkin nukleotidimuutokset monistetuihin tuotteisiin. (Kubista ym. 2006, 98 - 100.)

Reaaliaikaisissa PCR-menetelmissä voidaan käyttää erilaisia fluoresoivia merkkiaineita. Eri merkkiaineet sitoutuvat eri tavalla templaattiin. RT-PCR-menetelmällä voidaan selvittää näytteestä esimerkiksi viruksen pitoisuus, määrittää genotyyppiä, etsiä patogeeneja ja määrittää geenin ilmentymistä. (Applied Biosystems.)

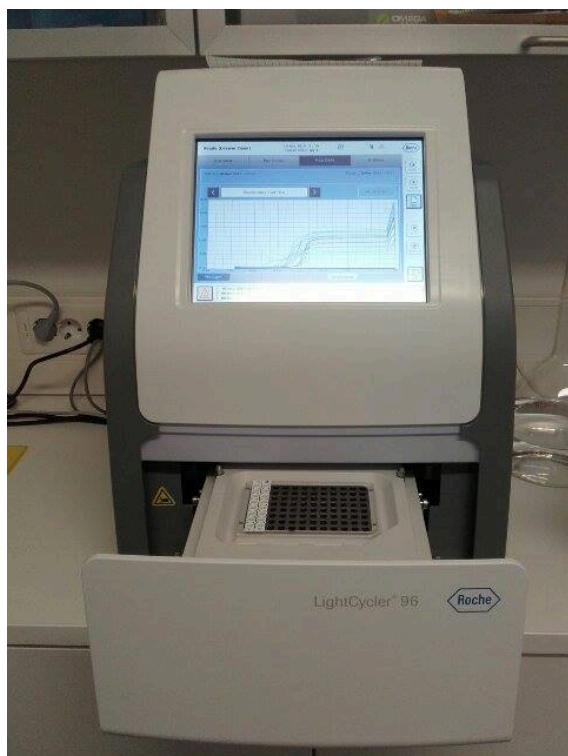
4.3 HRM-menetelmä

HRM (englanniksi High Resolution Melting)-menetelmä voi olla kvantitatiivinen tai kvalitatiivinen RT-PCR-menetelmä. SNP-genotyypityksessä tuloksia tarkastellaan vain kvalitatiivisesti. End-point-analyysillä selvitetään laktoosi-intoleranssiin vaikuttavan alleelin muutosta verestä eristetystä genomisesta DNA:sta. (Roche 2008, 2.)

SNP-genotyypityksen lisäksi HRM-menetelmällä pystytään tekemään geenien tunnistusta, geeniekspression määrittämiä, geneettistä fingerprint-määrittämiä ja metylaatiotutkimuksia. HRM-menetelmä on halvempi ja yhtä tarkka kuin probe-pohjaiset menetelmät. (Vandesompele, 13.)

HRM-menetelmä perustuu laitteella näkyvän sulamiskäyrän lukemiseen ja analysointiin. Fluoresoivana aineena käytetään Rochen LightCycler® 480 High Resolution Melting Master-PCR Master Mix-kitissä valmiina olevaa High Resolution Melting Dyeta. Fluoresoivan aineen ansiosta menetelmällä voidaan mitata DNA:n konsentraation lisääntymistä PCR-ajon aikana. Lisäksi voidaan tarkastella DNA:n juosteiden eroamista lämpötilan noustessa sulamiskäyräanalyysillä. (Roche 2013, 2.)

Fluoresoiva merkkiaine sitoutuu vain kaksijuosteiseen DNA:han. Monistuksessa lämpötilan noustessa juosteet erkanevat toisistaan jolloin myös merkkiaine irtoaa. Tästä johtuen koneen havaitsema signaali pienenee ja sulamiskäyrästä tulee laskeva. (Kubista ym. 2006, 103.) Lämpötilan noustessa kaksinkertaiset adeniini-tyymiini -vetysidokset katkeavat ennen kolminkertaisia guaniini-sytosiini -vetysidoksia. Näin eri sekvenssin omaavilla monistustuotteilla on erilaiset sulamislämpötilat ja -käyrät. Tämän perusteella pystytään erottamaan laktoosi-intoleranssiin vaikuttava SNP-mutaatio spesifisesti. Menetelmällä kyetään erottamaan yhdenkin nukleotidin poikkeavuus. (Roche 2008.)



KUVA 2. Rochen LightCycler® 96 RT-PCR -laite (Huhtala, Ruotsalo ja Vidgren 2015a).

4.4 PCR-ajon reagenssit

PCR tarvitsee erilaisia reagensseja voidakseen monistaa DNA:ta. Reaktio on hyvin herkkä ja jokaiselle reagenssille on määritetty optimikonsentraatio kutakin menetelmää varten.

4.4.1 Alukkeet

Alukkeet ovat tavallisesti kaksijuosteista DNA:ta, joiden emäsjärjestys tunnetaan (Suominen ym. 2013, 154). Alukkeet ovat tärkeä tekijä menetelmän luotettavuudessa. Alukkeissa tulisi ottaa huomioon niiden mahdollinen "primer-dimer" -muodostuminen. Tämä tarkoittaa sitä, että alukkeet tarttuvat toisiinsa kiinni useimmin 3'-päästä annealing-reaktiossa. Tässä tapauksessa alukkeet alkavat monistamaan toisiaan eivätkä haluttua jaksoa. HRM-menetelmän etuna on fluoresoivan merkkiaineen kyky havaita primer-dimerit, jotka ovat lyhyempiä kuin haluttu tuote. Näin ollen primer-dimerit voidaan havaita käyrällä aiemmin eikä niiden pitäisi juurikaan vaikuttaa tulokseen. (Kubista ym. 2006, 98, 103.)

HRM-menetelmässä 0,2 μM on hyvä aloituskonsentraatio alukkeille. Alukkeiden konsentraatioiden tulee olla 0,1 - 0,3 μM . Hyvät alukkeet tuottavat 70 - 300 emäsparia pitkiä amplikoneja. Alukkeiden tulee olla HPLC-puhdistettuja ja sulamislämpötilan lähes 60 astetta. Alukkeiden optimaalisella konsentraatiolla saadaan paras amplikonitulos matalalla Cq-arvolla ja sopivalla fluoresenssidynamiikalla. (Roche 2013, 6 - 7.) HPLC-menetelmässä eli korkean erotuskyvyn nestekromatografiassa aine kuljetetaan korkeassa paineessa kromatografiapylvään lävitse (Solunetti 2006). Cq-arvo on matalin mahdollinen arvo, jolla laite havaitsee fluoresenssin (Huggett ja Bustin 2011, 2).

Työssä käytetään Oligomerilta tilattuja forward- ja reverse -alukkeita. Molemmat alukkeet ovat HPLC-puhdistettuja. Forward-alukkeen 5' - CAA CCT AAG GAG GAG AGT - 3' sulamislämpötila (T_m) on 53,7 astetta. Reverse-alukkeen 5' - TGA GTG TAG TTG GAC GG - 3' sulamislämpötila on 52,8 astetta. Alukkeet on suunniteltu siten, etteivät ne voi muodostaa primer-dimereita. (Oligomer OY 2014.) Alukkeet on suunniteltu tuottamaan 191 emäsparin amplikoneja (Bodlaj 2006, 149). Annealing-reaktiossa lämpötilan olisi hyvä olla noin viisi astetta matalampi kuin alukkeiden sulamislämpötilan (Kubista ym. 2006, 97). Alukkeiden optimilämpötila annealing-reaktiossa olisi noin 48 astetta lähteiden mukaan. HRM-kitin ohje ja Rochen laite-edustaja suosittelivat käyttämään annealing-reaktiossa vähintään 54 astetta. Tämän vuoksi optimointisuunnitelmassa käytetään korkeampaa lämpötilaa.

4.4.2 DNA-templaatti

DNA-templaatteja voidaan valmistaa automaattisesti koneella, joka on suunniteltu puhdistusta varten. Toinen vaihtoehto on valmistaa ne manuaalisesti kokoverestä käyttäen sille suunniteltua kittiä, kuten GeneJET Whole Blood Genomic DNA Purification Mini Kittii. Kittiiä varten tarvitaan kokoverinäyte tutkittavalta henkilöltä. Kokoveri käsitellään proteinaasi K -entsyymillä, joka yhdessä Lysis-liuoksen kanssa hajottaa veren valkosolujen solukalvot ja tumakotelot sekä punasolut. Hajoamista

tehostetaan vorteksoimalla ja inkuboimalla näytettä. Näytteeseen lisätään etanolia, joka denaturoi proteiinia. Tällöin DNA:n kolmiulotteinen rakenne hajoaa. Näyte asetetaan spinnauskyyvetiin, jossa DNA kiinnittyy sentrifugoinnin aikana silikamembraaniin. Kyyvetiin lisätään kitin sisältämiä pesupuskureita (wash buffer I ja II) ja spinnataan vähintään kahdesti sentrifuugissa. Tällä varmistetaan, että kaikki mahdolliset epäpuhtaudet saadaan tehokkaasti poistettua näytteestä. Lopuksi genominen DNA liuotetaan Elution bufferin avulla membraanin läpi sentrifugoimalla. Lopputuote eli puhdistettu DNA käytetään joko heti sellaisenaan tai pakastetaan -20 asteeseen. Näin estetään DNA:n rakenteen mahdollinen hajoaminen. (Thermo Fisher Scientific 2012.)

4.4.3 Muut PCR-ajon aineet

Alukkeiden lisäksi PCR-ajo tarvitsee muita reagensseja toimiakseen. Reaktioseoksessa käytettävä MasterMix sisältää DNA-polymeraasientsyymiä, vapaita nukleotideja sekä puskuriliuosta. Lisäksi reaktioon tarvitaan kationeita, joita muodostuu magnesiumkloridista ($MgCl_2$). RT-PCR:ssa tarvitaan myös fluoresoivaa väriainetta. (Roche 2013, 3.) Reaktioseoksessa oleva puskuriliuos pitää pH:n tasanaisena.

PCR-ajossa käytettävä DNA-polymeraasientsyymi rakentaa vapaista nukleotideista alukkeiden rajaamaa aluetta. Vapaat nukleotidit ovat DNA:ssa esiintyviä emäksiä. Entsyyminä käytetään usein Taq-DNA-polymeraasientsyymiä, jota on eristetty kuumissa lähteissä elävistä bakteereista. (Happonen ym. 2006, 87.) Työssä käytettävä kitti sisältää FastStart Taq-DNA-polymeraasientsyymiä. FastStart Taq-DNA-polymeraasi aktivoituu alkudenaturaatiovaiheessa. Tämä entsyymi on muunneltu perinteisestä Taq-DNA-polymeraasista siten, että se aktivoituu vasta 75 asteessa. Tämän vuoksi FastStart Taq-DNA-polymeraasientsyymi estää alukkeiden epäspesifisen kiinnittymisen. (Roche 2013, 8, 18.)

$MgCl_2$ on lisätty valmiiksi joihinkin MasterMixeihin oikeassa suhteessa Taq-polymeraasin ja puskurin kanssa. HRM-analyysi on niin spesifinen, että siihen on määritettävä optimikonsentraatio käytettäville alukkeille (Roche 2013, 7). Magnesiumkloridi on pakollinen vastakkaisessa transkriptiossa reverse-alukkeen ja Taq-polymeraasin toiminnan kannalta. (Vandesompele, 24.) $MgCl_2$ hajoaa reaktiossa Mg^{2+} -kationiksi ja kahdeksi Cl^- -anioniksi. Mg^{2+} -kationi toimii kofaktorina eli entsyymin toiminnan kannalta välttämättömänä tekijänä polymeraasientsyymille. (Tiwari ja Wadhwa 2005, 4.)

4.5 Agarosigeelielektroforeesi

Agarosigeelielektroforeesi on helppo ja nopea tekniikka nukleiinihappojen analysointiin. Geelielektroforeesin toiminta perustuu liikkeeseen sähkökentän vaikutuksesta. Negatiiviset nukleiinihapot ajautuvat geelillä positiivista napaa kohti. Erikoiset nukleiinihapot liikkuvat geelissä eri nopeudella. Pienemmät DNA- ja RNA-molekyylit liikkuvat nopeammin kuin suuremmat. Liikkumisnopeuteen vaikuttavat myös geelin agarosipitoisuus ja sähkökentän voimakkuus. (Biogeeni 2013.)

Molekyylien koot saadaan selville molekyylipainomarkkereiden avulla. Nukleiinihapot havaitaan tarkastelemalla geeliä UV-valolla. Geeliin voi lisätä fluoresoivaa etidiumbromidia, mikäli näyte ei sisällä

fluoresoivaa merkkiainetta. HRM-menetelmässä näyteseokset sisältävät UV-valossa havaittavaa High Resolution Melting Dyeta. (Biogeeni 2013.)

5 HRM-MENETELMÄN OPTIMOINTI

Optimointi tarkoittaa reaktio-olosuhteiden muokkaamista paremmiksi. Optimointiin liittyviä tekijöitä ovat optimaaliset aluke- ja kationikonsentraatiot, optimaaliset alukkeet sekä sopivat reaktiolämpötilat.

5.1 Optimointisuunnitelma

Optimointi alkaa menetelmän magnesiumkloridi (MgCl_2) -pitoisuuden sekä lämpötilagradientin määrittämisellä. Annealing-reaktion lämpötila vaikuttaa eniten PCR:n spesifiteettiin (Roche 2008, 6). Tämän vuoksi annealing-reaktiolle määritetään optimilämpötila gradienttiajolla.

Magnesiumkloridisarja valmistetaan kitin ohjeen mukaan (ks. Taulukko 1). Näytteenä käytetään samaa tunnettua genotyyppiä. Näin saadaan selville reaktion optimikonsentraatio. Magnesiumkloridisarjan konsentraatiot ovat 2 - 3,5 mM. (Roche 2013, 7.)

TAULUKKO 1. Rochen LightCycler® 480 High Resolution Melting Master-PCR Master Mix-kitin ohjeen mukaan tehty laimennossarja.

[MgCl_2] (mmol/l)	2,0	2,5	3,0	3,5
Master Mix (μl)	10	10	10	10
Forward- aluke (0,2 μM) (μl)	0,5	0,5	0,5	0,5
Reverse- aluke (0,2 μM) (μl)	0,5	0,5	0,5	0,5
MgCl_2 (μl)	1,6	2,0	2,4	2,8
H_2O (μl)	2,4	2	1,6	1,2
DNA-temp- laatti (μl)	5	5	5	5
Kokonais ti- lavuus	20 μl	20 μl	20 μl	20 μl

MgCl_2 - sarja tehdään taulukon 1 mukaan. Jokaiseen näytteeseen pipetoidaan 10 μl Master Mixiä. Alukkeita pipetoidaan yhteensä 1 μl . Tämän jälkeen reaktioseokseen lisätään oikeassa suhteessa MgCl_2 :a ja puhdistettua PCR-vettä kunnes seosta on yhteensä 15 μl . Reaktioseokset pipetoidaan

kuoppalevylle, joiden päälle lisätään vielä 5 μ l tunnettua DNA-templaattia. Käytettäessä samaa tunnettua templaattia optimoinnissa voidaan templaattinäyte pipetoida suoraan reaktioseokseen. Lopuksi kuoppalevyä spinnataan 1500 x g kahden minuutin ajan.

PCR-ajo aloitetaan nostamalla lämpötila 95 asteeseen, jolloin kaksijuosteinen DNA-rakenne hajoaa. Tällöin haluttu templaattialue on mahdollista kopioida. Annealing-vaiheelle optimaalinen lämpötila on 54,0 – 63,8 asteen välillä (Roche 2015). Lopullinen lämpötila annealing-reaktioon määritetään gradientti-PCR:n perusteella. Kitissä valmiina olevan Taq-polymeraasientsyymin optimilämpötila on 72 astetta. Tämän takia ekstensiovaiheessa lämpötila nostetaan 72 asteeseen (ks. Taulukko 2). (Roche 2013, 8 - 11.)

TAULUKKO 2. RT-PCR-laitteeseen asetettavat ajat ja lämpötila.

	lämpötila	aika	syklien lkm
alkudenaturaatio	95	10 min	1
denaturaatio	95	10 s	
annealing	54,0 – 63,8	15 s	
ekstensio	72	15 s	45
HRM (High Resolution Melting)	95 40 65	60 s 60 s 1 s	1
jäähdytys	40	10 s	1

Lämpötilagradientti-PCR tarkoittaa annealing-lämpötilan määrittämistä valmistamalla kuoppalevyn jokaiselle pystyriiville sarja erillisillä lämpötiloilla. Sarjasta tehdään AGE-ajo, josta paikannetaan molekyyli-painomarkkereiden avulla PCR-tuote, joka on lähimpänä monistuvaa tuotetta. (Lopez ja Prezioso 2001.) Molekyyli-painomarkkeri on väriaine, joka sitoutuu molekyyliin helpottaen sen tunnistamista ja massan laskemista (VWR).

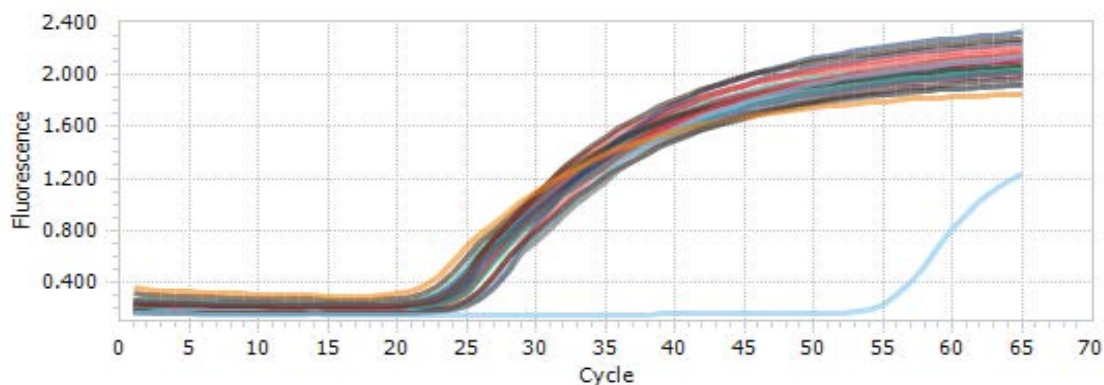
Optimoinnissa voi yhdistää lämpötilagradientin, MgCl₂-pitoisuuden ja alukkeiden puhtauden määrittämisen pipetoimalla näytteet kahdelle kuoppalevylle. Kuoppalevyn kahdelle ensimmäiselle vaakariiville pipetoidaan templaattittomat näytteet, joilla tarkastellaan alukkeiden puhtautta. Templaattitommassa näytteissä näytteen tilalle pipetoidaan PCR-vettä. Kuoppalevyjen vaakariiveille tulee MgCl₂-konsentraatiosarjat 2,0 - 3,5 mM optimikonsentraation löytämiseksi. Pystyriiveillä tarkastetaan samalla määrittämisen lämpötilagradientti eli optimilämpötila annealing-reaktiolle. Lämpötilat määritetään 54,0 – 63,8 asteeseen (ks. Taulukko 3 s. 21). Kaikki näytteet pipetoidaan kolminkertaisina, jotta virhelähteet saataisiin minimoitua. Menetelmän luotettavuuden takaamiseksi tarvitaan rinnakkaisnäytteet, joista saadaan sama tulos.

TAULUKKO 3. Pipetointi kuoppalevyille.

Kuoppalevy 1		1	2	3	4	5	6	7	8	9
kuoppa	näyte mmol/l /	54,0	54,6	55,6	56,9	58,4	59,9	61,4	62,7	63,8
A	Templaatiton [MgCl ₂] 2,0									
B	Templaatiton [MgCl ₂] 2,5									
C	[MgCl ₂] 2,0									
D	[MgCl ₂] 2,0									
E	[MgCl ₂] 2,0									
F	[MgCl ₂] 2,5									
G	[MgCl ₂] 2,5									
H	[MgCl ₂] 2,5									
Kuoppalevy 2		1	2	3	4	5	6	7	8	9
kuoppa	näyte mmol/l	54,0	54,6	55,6	56,9	58,4	59,9	61,4	62,7	63,8
A	Templaatiton [MgCl ₂] 3,0									
B	Templaatiton [MgCl ₂] 3,5									
C	[MgCl ₂] 3,0									
D	[MgCl ₂] 3,0									
E	[MgCl ₂] 3,0									
F	[MgCl ₂] 3,5									
G	[MgCl ₂] 3,5									
H	[MgCl ₂] 3,5									

Näytteenä optimoinnissa kannattaa käyttää samaa tunnettua genotyyppiä. Templaatittomista näytteistä nähdään, muodostuuko alukkeista primer-dimereita tai muita epäspesifisiä amplikoneja. Jos templaattittomissa näytteissä muodostuu jotain tuotetta, pitää alukkeiden konsentraatiota pudottaa. (Roche 2015.)

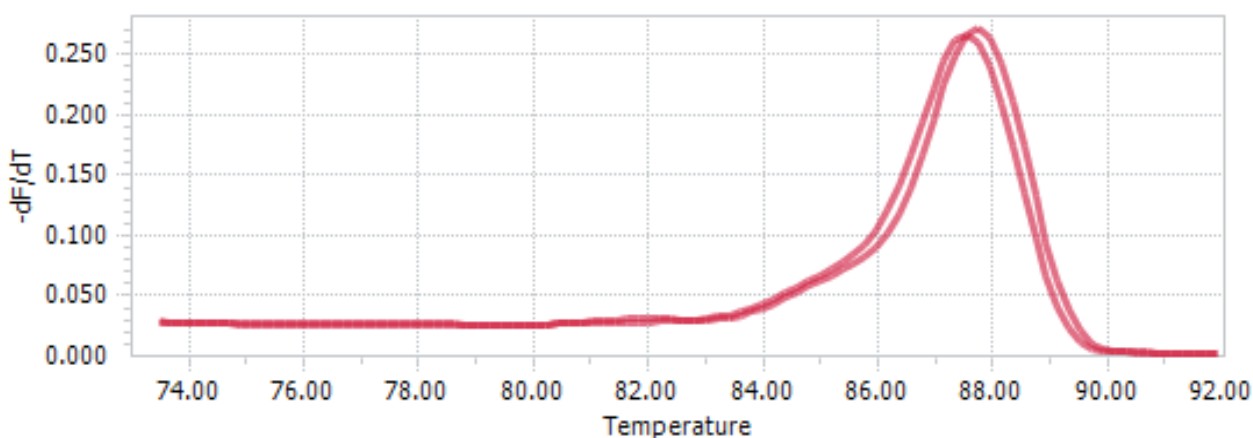
RT-PCR-laitteelle suunnitellaan ja asetetaan ohjelma kuoppalevyjen ajoa varten kuoppalevy pohjan mukaisesti (ks. Taulukko 3 s. 21). Kuoppalevyt ajetaan RT-PCR-laitteella ja käyristä valitaan sigmoidaalisin, joka on mahdollisimman suuri fluoresenssiltaan (ks. Kuvio 1). Käyrän muodostumisen tulisi alkaa noin syklien 15 - 25 aikana. (Roche 2015.)



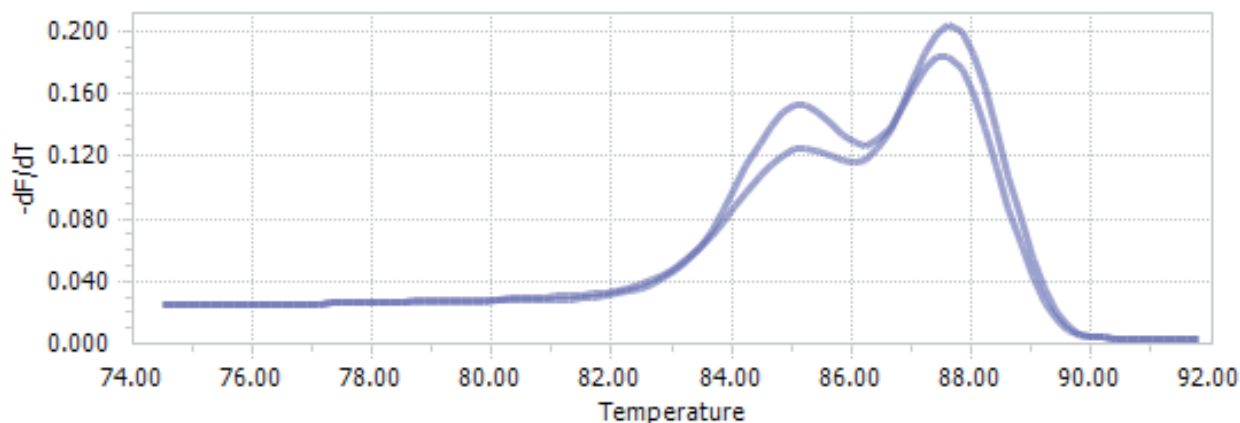
KUVIO 1. Fluoresenssin määrä syklien määrän funktiona (Huhtala ym. 2015b).

Kaikista magnesiumkloridipitoisuuksista, joissa on optimilämpötila ajetaan AGE-ajo. Ajosta valitaan matalin magnesiumkloridipitoisuus, joka on tarkoin monistettavaan PCR-tuotteeseen eli amplikoniin nähden. (Roche 2013, 7.)

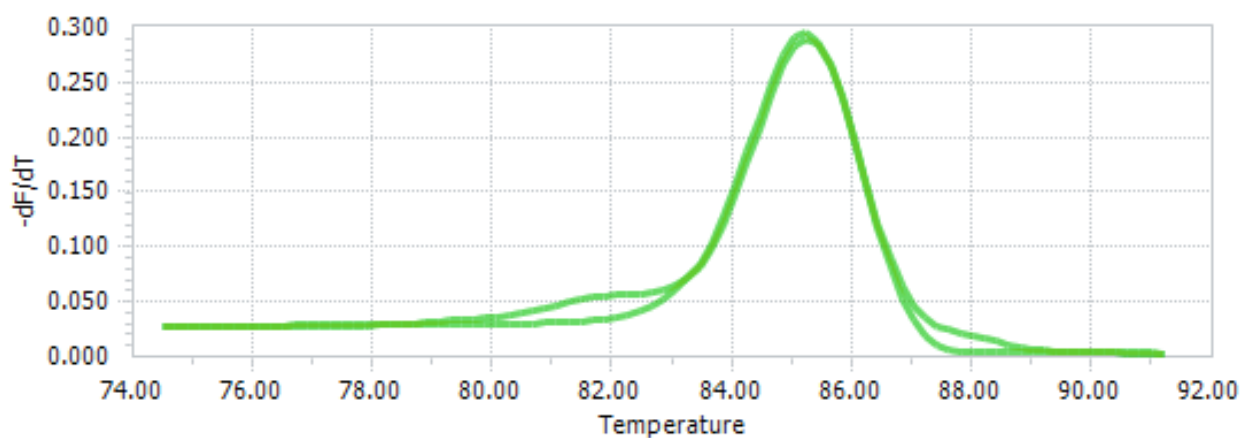
Optimoinnin varmistus tapahtuu ajamalla tunnettuja genotyyppiä. Kaikista näytteistä tehdään aina rinnakkaiset ja jokaiseen ajoon tulee templaatiton näyte. Laktoosi-intoleranssin määrittämisessä on genotyypit C/C, C/T ja T/T. Genotyyppitys tehdään sulamiskäyrien perusteella. C/C-genotyypillä (ks. Kuvio 2) on korkein sulamiskäyrä, kun taas T/T-genotyypillä (ks. Kuvio 4 s. 23) on matalin. C/T-genotyyppi (ks. Kuvio 3 s. 23) muodostaa kaksipäisen sulamiskäyrän näiden välille. Tuntemattomien näytteiden genotyypit voidaan jälkikäteen määrittää vertailemalla niitä keskenään tunnettujen kontrollinäytteiden sulamiskäyriin.



KUVIO 2. C/C-genotyypin sulamiskäyrä (Huhtala ym. 2015c).



KUVIO 3. C/T-genotyypin sulamiskäyrä (Huhtala ym. 2015d).



KUVIO 4. T/T-genotyypin sulamiskäyrä (Huhtala ym. 2015e).

5.2 Riskit ja virhelähteet

Pipetointi- ja laskuvirheet sekä näytteiden kontaminoituminen ovat suurin riski. Työskentelyn on oltava aseptista. Pipetoinnit tehdään laminaarivirtauskaapissa. Varsinkin $MgCl_2$ -sarjan optimoinnissa täytyy olla tarkkana pipetointimäärien kanssa. Myös putkien ja näytteiden tarkka merkitseminen on erittäin tärkeää. Jos kationikonsentraatiosarjassa putket menevät sekaisin, tuloksena saattaa olla virheellinen tulkinta $MgCl_2$ -optimikonsentraatiosta. Tämä taas vaikuttaa kaikkiin testattaviin näytteisiin. Lisäksi virhettä olisi lähes mahdoton huomata ennen RT-PCR-ajon valmistumista. Kuoppalevyille pipetoitaessa on myös aina oltava tietoinen, mihin mitäkin näytettä tulee.

Koska pipetointimäärät ovat hyvin pieniä, ne voivat helposti vaihdella työntekijöiden kesken. Pipetointimäärien vaihtelu voi vaikuttaa työn lopputulokseen. Tämän vuoksi työvaiheen aloittanut pipetoi koko työvaiheen. Laadunvarmistukseksi kaikkiin ajoihin tehdään nollakontrolli ja kaikki näytteet tehdään kolminkertaisina. Laske aina yksi ylimääräinen näyte mukaan reaktioseokseen, jotta näyte varmasti riittää kaikkiin kuoppiin tasaisesti.

6 KEHITTÄMISTYÖN TOTEUTUS

Opinnäytetyön voi suorittaa Savonia-ammattikorkeakoulun kehittämistyöhankkeena. Olennaista ammattikorkeakoulun opinnäytetyössä on soveltava kehittäminen. Tavoitteena on, että opiskelija saa osoittaa ja kehittää omia taitojaan. Käytännön asiantuntijatehtävissä opiskelija saa soveltaa tietojaan ja taitojaan opinnäytetyöprosessin kautta, joka etenee ideasta aina tulosten julkistamiseen ja arviointiin. Kehittämistyön tuloksena saadaan palvelu tai tuotos, joka esitellään lopuksi työn tilaajalle ja koululle. (Savonia 2015.)

Suunnittelimme uudet työohjeet koululle LightCycler® 96 Real-Time PCR System-laitteelle (ks. Kuva 2 s. 15) laktoosi-intoleranssin määrittämistä varten. Työohjehojenamme käytimme Moodi 2009/6 –lehdessä olevaa mallia. Menetelmän optimoinnin suunnittelussa ja teorian kasaamisessa käytimme Rochen LightCycler® 480 High Resolution Melting Master-kitin ohjetta ja Rochen LightCycler® 480 Real-Time PCR System-laitteen teknistä ohjetta. Optimoinnin suunnittelussa meitä ohjeisti Rochen laite-edustaja. Lisäksi hyödynsimme koulun aiempia työohjeita ja muita tiedonlähteitä laktoosi-intoleranssin DNA-testin määrittämistä varten.

6.1 Työn tarkoitus ja tavoite

Opinnäytetyömme tarkoituksena oli tuottaa työohjeet Savonia-ammattikorkeakoulun bioanalyttikko-opiskelijoille laktoosi-intoleranssin määrittämiseen HRM-menetelmällä LightCycler® 96 Real-Time PCR System-laitteella. Tavoitteemme oli luoda selkeät ja oppimista tukevat työohjeet opiskelijoita varten. Koska RT-PCR-menetelmää käytetään tulevaisuudessa yhä enemmän eri laboratorioissa, on tulevien opiskelijoiden hyvä tietää menetelmästä ja sen sovellutuksista jo opiskelun aikana.

Opinnäytetyömme toisena tarkoituksena oli suunnitella optimointi laktoosi-intoleranssin määrittämiselle Savonia-ammattikorkeakoulun RT-PCR-laitteelle. Tavoitteena on optimointisuunnitelman käyttäminen menetelmän tarkentamiseksi. Suunnitelman avulla laktoosi-intoleranssin määrittämisen parametrit saadaan optimoituksi.

6.2 Työohjeen laatiminen

Työohjeet tulee kirjoittaa oppimisen näkökulmasta. Ohjeiden lukija on saatava ymmärtämään sanoma ja toimimaan sen mukaisesti. Työohjeesta on löydettävä tarkoitus, hyöty ja ohjeen tärkeys. (Repo ja Nuutinen 2003, 138.)

Työohje on oppimateriaalia. Oppimateriaalin tulee olla moderni ja tuoda esiin uusia näkemyksiä. Ohjeen tulee sisältää faktaa ja saada opiskelijat ajattelemaan. Työohjeen tulee tukea opettajan opetustyötä ja vahvistaa oppilaiden oppimista. Oppimateriaalin tulee vastata paitsi opiskelijoiden myös opettajan tarpeisiin. (Heinonen 2005, 30 – 31.)

Teimme työohjeet Savonia-ammattikorkeakoululle Moodi 2009/6 -lehdestä löytyvää pohjaa soveltaen. Työohjeet on tarkoitettu oppimateriaaliksi opiskelijoille. Työohjeessa tulee viitata aina laitteen ja kitin valmistajan antamiin ohjeisiin (Moodi 2009, 287). Työohjeessamme kerrotaan laitteistosta, menetelmästä, virhelähteistä, näytteestä, reagensseista, kontrolleista, työn suorituksesta sekä tuloksista (Liite 1).

Työohjeemme toimii oppimateriaalina Savonia-ammattikorkeakoulun bioanalyttikko-opiskelijoille. Oppimateriaali perustuu aina tutkittuun teoriaan. Oppimateriaalin tavoite on saavuttaa oppimiselle ja opetukselle asetetut tavoitteet. Kasvatustieteellisesti on tärkeää, että ohjeet kyetään perustelevaan. Ohjeiden tavoitteena on työn kuvaamisen lisäksi oppimistulosten saavuttaminen ja parantaminen. (Kari, Koro, Lahdes, Nöjd 1994, 54, 174.)

Oppimateriaalia suunniteltaessa huomioon tulee ottaa mitkä ovat oppijoiden lähtötiedot, asenteet ja toiminnalliset valmiudet. Tämä määrittää sen, millaista sanastoa voidaan käyttää työohjeissa ja tarvitseeko käsitteitä avata. (Kari ym. 1994, 175.) Työohjeet on tehty bioanalyttikko-opiskelijoille, joten voidaan olettaa heidän hallitsevan esimerkiksi yleiset laboratorion toimintatavat ja tuntevan ammattisanastoa.

Työohjeisiimme vaikuttavat koululla käytettävissä olevat resurssit. Työohjeet määräytyvät koulun RT-PCR-laitteen, koulun tilaamien alukkeiden ja HRM-kitin ohjeiden pohjalta. Koululle laatimamme työohjeet on tehty laktoosi-intoleranssin määrittämiseen liittyvien tutkimusten ja HRM-kitin ohjeiden perusteella.

Tuottamissamme työohjeissa kerrotaan ensin lyhyesti työn taustaa ja mitä tullaan tekemään. Olemme listanneet ohjeisiin työssä tarvittavia materiaaleja ja lyhyen esityksen työturvallisuudesta ja aseptisen työskentelyn merkityksestä. Työn suoritus osan olemme yrittäneet jäsentää mahdollisimman loogisessa järjestyksessä. DNA:n eristyksen teimme erillisenä liitteenä työohjeeseen, jotta ohje olisi selkeämpi. DNA:n eristykseen menee useita tunteja, joten opiskelijat saavat tähän oman työohjeensa.

Oppimateriaalin tarkoituksena on saada opiskelija ajattelemaan. Olemme jättäneet työohjeeseen suunnittelutilaa liittyen pipetointiin ja reaktioseoksen määrän laskemiseen. Näin opiskelijat saavat miettiä ja oppivat suunnittelemaan työskentelyä.

6.3 Optimoinnin suunnittelu

Opinnäytetyömme toisena tarkoituksena oli suunnitella optimointi laktoosi-intoleranssin geenitestin määrittämiseen koulun RT-PCR-laitteelle. Laktoosi-intoleranssin määrittämisen optimointi on suunniteltu HRM-menetelmälle. Optimointimme perustuu suurimmaksi osaksi Rochen LightCycler® 480 High Resolution Melting Master-kitin ohjeeseen ja koululle pystytettyyn menetelmään. Käyttämämme alukkeet perustuvat tutkimukseen, jossa on määritetty samankaltaista menetelmää.

Optimointisuunnitelmaan olemme tehneet valmiiksi pipetointitaulukot. Yhdistimme magnesiumkloridipitoisuuden ja lämpötilagradientin määrittämiseksi, jotta optimointi olisi nopeampi tehdä. Laskimme valmiiksi reaktioseoksen aineet ja teimme taulukon pipetointisuunnitelmasta. HRM-menetelmän optimoinnin riskit ja virhelähteet osiossa olemme tuoneet esille työskentelyssä huomioitavia asioita.

7 POHDINTA

Pohdintaosiossa perehdymme opinnäytetyössä käyttämiemme lähteiden luotettavuuteen ja työskentelyn eettisyyteen. Lisäksi arvioimme omaa ammatillista kasvuamme ja opinnäytetyön prosessia.

7.1 Luotettavuus ja eettisyys

Tutkimuseettinen neuvottelukunnan mukaan plagioinnilla tarkoitetaan luvaton lainaamista. Plagiointi on jonkun muun kirjoittamaa tekstiä, esimerkiksi artikkeli, jonka plagioija esittää omanaan. (Moore 2008.) Olemme viitanneet opinnäytetyömme lähteisiin oikeaoppisesti. Plagioinnin olemme pyrkineet estämään merkitsemällä kaikki lähteet sekä tekstiin että lähdeosuuteen.

Laktoosi-intoleranssiin liittyvät lähteemme ovat pääasiassa suomenkielisiä tieteellisiä artikkeleita. Reaaliaikaiseen PRC:n liittyvät lähteet ovat enimmäkseen englanninkielisiä tieteellisiä artikkeleita sekä Rochen kitin ja RT-PCR-laitteen ohjeita. Optimoinnin suunnittelussa käytimme monipuolisesti eri tietolähteitä ja haastattelimme Rochen laite-edustajaa. Mielestämme käyttämämme lähteet ovat luotettavia monipuolisuuden ja kansainvälisyyden sekä ammatillisuuden puolesta. Merkitsimme käyttämämme lähteet tekstiin ja lähteisiin. Tietomme PCR:sta ja sen sovelluksista syventyi huomattavasti kirjoittaessamme teoriaosuutta.

Työohjeemme perustuvat tutkimustietoon, joka on osoitettu käytännössä toimivaksi. Ohjeet on kasattu aiempien ohjeiden pohjalta. Laatimaamme optimointisuunnitelmaa voi jatkossa hyödyntää menetelmän kehittämisessä.

7.2 Opinnäytetyön ja oman oppimisen arviointi

Opinnäytetyöprosessin aikana kehityimme kriittisinä tiedonhakijoina. Tieteellisiin artikkeleihin ja ajanmukaisiin teoksiin lainaaminen syvensi omaa teoriatietoamme aiheesta. Erityisesti artikkelien vähyyks omasta aiheestamme pakotti meidät hakemaan tietoa ulkomaisista lähteistä ja hyvinkin laajoilta tieteenaloilta.

Opinnäytetyöprosessin aikana eteemme sattui useita ongelmia. Aikataulujen sovittaminen yhteen muiden työtä tekevien ja ohjaajan kanssa toivat paljon haasteita. Käytännön osuus opinnäytetyössä oli vaikea, koska työtä tehdessä oli muistettava ottaa huomioon useita eri tekijöitä. Nämä virhelähteet on otettu huomioon optimointisuunnitelmassa. Alun perin meillä oli tarkoituksena suorittaa optimointi menetelmälle, mutta ongelmien ja ajan puutteen vuoksi emme ehtineet optimoida menetelmää. Optimointisuunnitelmallamme menetelmän pystyy optimoimaan tarkemmaksi tulevaisuudessa.

Opinnäytetyöprosessi kulki hyvin tiiviissä aikataulussa. Valmisteleminen tapahtui jo aikaisin keväällä 2015, mutta varsinaiset työvaiheet jäivät myöhään syksyyn. Opinnäytetyössämme oli kaksi tarkoi-

tusta ja tavoitetta, jotka osoittautuivat laajuudeltaan suuriksi. Tiiviistä aikataulusta huolimatta ja pitkää päivää tehden saimme materiaalia tarpeeksi, jotta voimme olla tyytyväisiä lopputulokseen. Opinäytetyö oli aikaavievä vaikka tekijöitä olikin kolme.

Työohjeista valmistimme mahdollisimman selkeät ja helppolukuiset. Pyrimme ottamaan huomioon, että ohjeita lukemalla työssä on helppo siirtyä vaihe vaiheelta eteenpäin. Jätimme avoimia taulukoita, jotta opiskelijat pääsisivät itse suunnittelemaan työn etenemistä. Genomisen DNA:n eristämisestä verestä teimme selkeyden vuoksi erillisen liitteen. Mielestämme työohjeiden laatiminen onnistui hyvin. Konkreettista palautetta emme vielä työohjeiden toimivuudesta saaneet. Jos aikaa olisi ollut enemmän, olisimme voineet testata työohjeiden toimivuutta molekyylibiologian ja geenitekniologian bioanalyttikko-opiskelijoilla.

Optimointisuunnitelmassa on käsitelty lyhyesti optimointiin vaikuttavat tekijät. Mielestämme juuri näihin tekijöihin kyetään puuttumaan menetelmän optimointivaiheessa ja tarkentamaan menetelmää. Optimointisuunnitelman teksti on spesifimpää, mutta käsitteet aiheesta on avattu lähteitä hyväksikäyttäen. Lisäsimme laitteelle uuden ohjelman, jota tulevaisuudessa voidaan hyödyntää optimoinnissa. Ohjelmaa laatiessamme ajoimme laitteella testiajoja eri säädöillä. Ajanpuutteen vuoksi emme kuitenkaan ehtineet optimoimaan menetelmää. Optimointisuunnitelmaa voi joku toinen tulevaisuudessa hyödyntää muunkin kuin laktoosi-intoleranssimenetelmän kehittämisessä RT-PCR-laitteelle. Olemme tyytyväisiä luomaamme optimointisuunnitelmaan.

Optimointisuunnitelman testivaiheessa pystyimme kehittämään käytännössä jo oppimaamme aseptisestä työskentelystä, pipetointitarkkuudesta ja laminaarivirtauskaapissa työskentelystä. Huomasimme suunnittelun tärkeyden ottaessamme huomioon liuoslaskut ja reagenssien oikeaoppisen säilyttämisen ja käsittelyn. Teoriatietomme ja käytännön osaamisemme syventyi erityisesti RT-PCR:n ja sen menetelmien osalta.

Aihe oli meistä kiinnostava sen useiden aluevaltausmahdollisuuksien vuoksi. RT-PCR-menetelmää käytetään yhä useammissa kliinisissä laboratorioissa. Se tulee vääjäämättä syrjäyttämään aikaa vievät ja kalliit menetelmät, joiden diagnoosi ei ole läheskään yhtä luotettava. Esimerkkinä mikrobiologiassa on alettu etsiä taudinaiheuttajavirusten DNA:ta tai RNA:ta potilaan verinäytteestä PCR-menetelmällä.

LÄHTEET

- Applied Biosystems. Real-Time PCR Vs. Traditional PCR. [Verkkojulkaisu]. [Viitattu 2015-11-07.] Saatavissa: http://www6.appliedbiosystems.com/support/tutorials/pdf/rtpcr_vs_tradpcr.pdf
- Biogeeni 2013. Agaroosigeelielektroforeesi. Laboratoriohjoitustyöohje. [Verkkojulkaisu]. [Viitattu 2015-11-22.] Saatavissa: http://www.edu.fi/download/143335_AGE_EtBr_ja_SYBR.pdf
- BODLAJ, Gerd, STÖCHER, Markus, HUFNAGL, Peter, HUBMANN, Rainer, BIESENBAACH, Georg, STEKEL, Herbert ja BERG, Jörg 2006. Genotyping of the Lactase-Phlorizin Hydrolase – 13910 Polymorphism by LightCycler PCR and Implications for the diagnosis of Lactose Intolerance. *Clinical Chemistry* 52/2006.
- GENECARDS 2015. LCT Gene (Protein coding). [Verkkojulkaisu]. [Viitattu 2015-11-09.] Saatavissa: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=LCT>
- HAPPONEN, Päivi, HOLOPAINEN, Mervi, SARIOLA, Hannu, SOTKAS, Panu, TENHUNEN, Antero, TIHTARINEN-ULMANEN, Marja, VENÄLÄINEN, Juha 2006. BIOS 5 Bioteknologia. WSOY. Helsinki
- HEINONEN, Juha-Pekka 2005. Opetussuunnitelmat vai oppimateriaalit. Väitöskirja. [Verkkojulkaisu]. [Viitattu 2015-11-23.] Saatavissa: <http://ethesis.helsinki.fi/julkaisut/kay/sovel/vk/heinonen/opetussu.pdf>
- HILLILÄ, Markku 2007. Laktoosi-intoleranssi. *Duodecim* 2007;123:2743-2746 [Viitattu 2015-01-29.] Saatavissa: <http://www.terveyskirjasto.fi/xmedia/duo/duo96876.pdf>
- HUGGETT, Jim ja BUSTIN, Stephen 2011. Standardisation and reporting for nucleic acid quantification. [Verkkojulkaisu]. [Viitattu 2015-11-07]. Saatavissa: <http://www.gene-quantification.de/huggett-bustin-standardisation-reporting-2011.pdf>
- HUHTALA, Emmi, RUOTSALO, Seppo, VIDGREN, Seppo 2015-10-28 a. Kuva Lightcycler 96 -laitteesta [digikuvat]. Sijainti: Kuopio: Tekijän omat sähköiset kokoelmat.
- HUHTALA, Emmi, RUOTSALO, Seppo, VIDGREN, Seppo 2015-10-28 b-e. Kuvakaappauksia Lightcycler 96 -ohjelmistosta [digikuvat]. Sijainti: Kuopio: Tekijän omat sähköiset kokoelmat.
- KARI, Jouko, KORO, Jukka, LAHDES, Erkki ja NÖJD, Olavi 1994. Didaktiikka ja opetussuunnittelu. WSOY. Juva.
- KOLHO, Kaija-Leena, RASINPERÄ, Heli, JÄRVELÄ, Irma ja SAVILAHTI, Erkki 2004. Laktoosin imeytymishäiriön geenitestin soveltuvuus lasten ja nuorten tutkimiseen. *Suomen Lääkärilehti* 39/2004. [Viitattu 2015-03-29.] Saatavissa: <http://www.fimnet.fi.ezproxy.savonia-amk.fi/cl/laakari-lehti/pdf/2004/SLL392004-3627.pdf>
- KUBISTA, Mikael, ANDRADE, José Manuel, BENGTSSON, Martin, FOROOTAN, Amin, JONÁK, Jiri, LIND, Kristina, SINDELKA, Radek, SJÖBACK, Robert, SJÖGREEN, Björn, STRÖMBOM, Linda, STÅHLBERG, Anders, ZORIC, Neven 2006. The Real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*, Vol 27, No. 2-3 [Verkkolehti]. [Viitattu 2015-03-24.] Saatavissa: <http://www.gene-quantification.de/kubista-qpcr-review-mam-2006.pdf>
- LOPEZ, Joel ja PREZIOSO, Vincent 2001. A better way to optimize: Two-step Gradient PCR. Eppendorf Bionews Application Notes. Käyttöohje. [Verkkojulkaisu]. [Viitattu 2015-04-22.] Saatavissa: <http://www.eppendorf.com/script/cms-newspic.php?id=2365&inline=1&col=DOWNLOADFILE>
- Moodi 2009. Vieritestaus terveydenhuollossa. Laadunvarmistus. Yliopistopaino Helsinki. Sarjainfo 6, 286 - 287.
- MOORE, Erja 2008. Plagioinnin määritelmiä. [Verkkojulkaisu]. [Viitattu 2015-11-25.]
- Oligomer OY 2014. Analyysitodistus tilatuista alukkeista. Sijainti: Kuopio: Savonia-ammattikorkeakoulu.
- Oulun yliopisto 2014. Perinnöllisyyslääketiede. [Verkkojulkaisu]. [Viitattu 2015-11-04.] Saatavissa: <http://www oulu.fi/biologia/perinnollisyystiede>

- Physician Committee. What is lactose intolerance?. [Verkkajulkaisu]. [Viitattu 2015-11-13.] Saatavissa: <http://www.pcrm.org/health/diets/vegdiets/what-is-lactose-intolerance>
- PIIRAINEN, A. JÄRVELÄ, I. ja MALMI, T. 2007. Laktoosin imeytymishäiriön diagnostisten menetelmien kustannukset vertailussa. Suomen Lääkärilehti 20-21/2007, 2081-4 [Viitattu 2015-03-29.] Saatavissa: <http://www.fimnet.fi.ezproxy.savonia-amk.fi/cgi-cug/brs/artikkeli.cgi?docn=000028263>
- PÄRSSINEN, Raimo, SUOMINEN, Ilari ja HAAJANEN, Kari 2012. Biogeeni. Opetushallitus. Tampere.
- REPO, Irma ja NUUTINEN, Tahvo 2003. Viestintätaito: Opas aikuisopiskelun ja työelämän vuorovai-
kutustilanteisiin. Otavan Kirjapaino Oy. Keuruu.
- Roche Diagnostics GmbH 2015-09-11. Rochen laite-edustaja. [Haastattelu.] Kuopio: Savonia-am-
mattikorkeakoulu.
- Roche Diagnostics GmbH 2013. LightCycler® 480 High Resolution Melting Master. PCR-kitin ohje.
- Roche Diagnostics GmbH 2008. LightCycler® 480 Real-Time PCR System. Technical Note No.1.
[Verkkajulkaisu]. [Viitattu 2015-01-29.] Saatavissa: <http://www.gene-quantification.de/LC480-Technical-Note-01-HRM.pdf>
- SAVILAHTI, Erkki ja JÄRVELÄ, Irma 2002. Laktoosin imeytymishäiriö ja sen diagnostiikka. Suomen
Lääkärilehti 43/2002. [Viitattu 2015-03-29.] Saatavissa: <http://www.fimnet.fi.ezproxy.savonia-amk.fi/cl/laakarilehti/pdf/2002/SLL432002-4337.pdf>
- Savonia 2015. Opinnäytetyö (amk-tutkinnot). [Verkkajulkaisu]. [Viitattu 2015-11-11.] Saatavissa:
<https://reppu.savonia.fi/opinnaytetyo/Sivut/default.aspx>
- Savonia 2015. Opinnäytetyön toteutus ja raportointi. [Verkkajulkaisu]. [Viitattu 2015-11-13.] Saata-
vissa: <https://reppu.savonia.fi/opinnaytetyo/Sivut/Raportointi.aspx>
- Solunetti 2006. Kromatografia. [Verkkajulkaisu]. [Viitattu 2015-11-06.] Saatavissa: <http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/kromatografia>
- Solunetti 2006. Sekvensointi. [Verkkajulkaisu]. [Viitattu 2015-11-07.] Saatavissa: <http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/sekvensointi/2/>
- SUOMINEN, Ilari, PÄRSSINEN, Raimo, HAAJANEN, Kari ja PELKONEN, Jani 2013. Geenitekniikka.
Saarijärven offset Oy. Saarijärvi.
- SVERRISDÓTTIR, Oddný Ósk, TIMPSON, Adrian, TOOMBS, Jamie, LECOEUR, Cecile, FROGUEL, Phi-
lippe, CARRETERO, Jose Miguel, ARSUAGA FERRERAS, Juan Luis, GÖTHERSTRÖM, Anders ja THO-
MAS, Mark G 2014. Direct estimates of natural selection in Iberia indicate calcium absorption was
not the only driver of lactase persistence in Europe. Molecular Biology and Evolution, vol 31, no. 4
[Verkkolehti]. [Viitattu 2015-11-08.] Saatavissa: [http://mbe.oxfordjournals.org/con-
tent/31/4/975.abstract](http://mbe.oxfordjournals.org/content/31/4/975.abstract)
- THERMO FISHER SCIENTIFIC 2012. GeneJET Whole Blood Genomic DNA Purification Mini Kit – pak-
kausseloste. [Viitattu 2015-11-09.] Saatavissa: [https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manu-
als/MAN0012667_GeneJET_Whole_Blood_Genomic_DNA_Purification_Mini_UG.pdf](https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0012667_GeneJET_Whole_Blood_Genomic_DNA_Purification_Mini_UG.pdf)
- TIWARI, Abhishek ja WADHWA, Vipin 2005. MeltDNA: A Tool for Prediction of DNA Duplex Hybrid-
ization & Melting Thermodynamics. Bioinformatics India 2005; 3: 3: 35-43.[Verkkajulkaisu]. [Viitattu
2015-11-07.] Saatavissa: <http://icodons.tripod.com/bij.pdf>
- ULMANEN, Ismo, TENHUNEN, Jukka, YLÄNNE, Jari, VALSTE, Juha ja VIITANEN, Pertti 1997. Geeni.
WSOY. Porvoo.
- VANDESOMPELE, Jo. PCR guide. Eurogentec [Viitattu 2015-11-08.] Saatavissa: [http://www.euro-
gentec.com/uploads/qpcr-guide.pdf](http://www.eurogentec.com/uploads/qpcr-guide.pdf)
- VUORISALO, Timo, ARJAMAA, Olli, VASENMÄGI, Anti, BLÄUER, Auli ja SALONIEMI, Irma 2012. Suo-
malaisten laktoosinsiedon alkuperä. Duodecim 2012; 128: 1321-2.

VWR. Molekyylipainomarkkeri Western –blottaukseen, Amersham ECL™ DualVue™. [Verkkoviite]. [Viitattu 2015-11-07.] Saatavissa: https://fi.vwr.com/store/catalog/product.jsp?catalog_number=RPN810

YGONAAR 2006-03. PCR basic principle [digikuva]. Wikimedia [verkojulkaisu]. [Viitattu 2015-12-01.] Saatavissa: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:PCR_basic_principle1.jpg



SAVONIA
UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Laktoosi-intoleranssin määrittäminen RT-PCR- menetelmällä

Työohje

Emmi Huhtala
Seppo Ruotsalo
Seppo Vidgren

Bioanalytiikan koulutusohjelma
Molekyylibiologia ja geeniteknologia
22.11.2015

Johdanto

Tässä työssä määritetään laktoosi-intoleranssiin vaikuttava genotyyppi verestä eristetystä genomisesta DNA:sta HRM (englanniksi High Resolution Melting)-menetelmällä. HRM-menetelmä on RT (Real Time) -PCR-menetelmä, joka perustuu laitteen piirtämän sulamiskäyrän tarkasteluun. Muodostuvia sulamiskäyriä tarkastellaan lopussa kvalitatiivisesti vertailemalla näytteitä tunnettuihin genotyypeihin C/C, C/T ja T/T.

RT-PCR-menetelmässä tapahtuu alussa tavallinen polymeraasiketjureaktio, jossa monistetaan haluttua DNA-jaksoa eli templaattia. Templaatti rajataan tarkkaan määritetyillä alukkeilla. RT-PCR-menetelmässä reaktioseoksessa on mukana fluoresoivaa merkkiainetta, joka mahdollistaa monistumisen tarkastelun reaaliajassa. Tässä työssä käytetään fluoresoivana aineena Roche'n LightCycler® 480 High Resolution Melting Master-PCR Master Mix-kitissä valmiina olevaa High Resolution Melting Dyeta. Fluoresoiva merkkiaine sitoutuu vain kaksijuosteiseen DNA:han. Monistuksessa lämpötilan noustessa juosteet erkanevat toisistaan jolloin myös merkkiaine irtoaa. (Kubista, Andrare, Bengtsson, Forootan, Jonák, Lind, Sindelka, Sjöback, Sjögreen, Strömbom, Ståhlberg, Zoric 2006, 103.) Lämpötilan noustessa kaksinkertaiset adeniini (A) - tymiini (T) -vetysidokset katkeavat ennen kolminkertaisia guaniini (G) - sytosiini (C) -vetysidoksia. Näin eri genotyypin omaavilla näytteillä on erilaiset sulamislämpötilat ja -käyrät.

Laitteet ja tarvikkeet

Laitteet:

Roche'n LightCycler® 96 Real-Time PCR System

Sentrifuugit

Laminaarivirtauskaappi

Tarvikkeet:

Ilmamäntäpipetit

Filtterilliset pipetinkärjet

Suojahanskat ja -vaatetus

Eppendorf-putkia

Kuoppalevyt

Kuoppalevyn kalvot ja lasta

Jäteastiat

Näyte:

GeneJET Whole Blood Genomic DNA Purification Mini Kitillä eristettyä genomista DNA:ta.

Reagenssit:

LightCycler® 480 High Resolution Melting Master-kitti:

- Master Mix (sisältää dNTP, FastStart Taq-DNA-polymeraasientsyymiä, HRM Dye, pusku-ria)
- MgCl₂
- PCR-H₂O

Forward- aluke 5´ - CAA CCT AAG GAG GAG AGT - 3´ (100 µM)

Reverse- aluke 5´ - TGA GTG TAG TTG GAC GG - 3´ (100 µM)

Kontrollit:

0-näyte (templaatiton näyte)

C/C

C/T

T/T

Työturvallisuus ja aseptiikka

Työssä käytettävät kemikaalit eivät ole hengenvaarallisia, mutta niitä käsitellessä tulee noudattaa käyttöturvallisuustiedotteen mukaisia ohjeita.

Noudata näytteenotossa ja näytteiden käsittelyssä aseptisia ja turvallisia työskentelytapoja. Kaikkia näytteitä tulee käsitellä tartuntavaarallisina.

Hävitä jätteet asianmukaisesti.

Työskentele aseptisesti: Suorita pipetoinnit laminaarivirtauskaapissa. Käytä työtakkia ja suoja-hanskoja. Huolehdi käsihygieniasta!

PCR-reagenssit ovat hyvin herkkiä ja pienikin kontaminaatio saattaa vaikuttaa tulokseen. Tämän vuoksi aseptinen työskentely on erittäin tärkeää.

Pipetoi laminaarivirtauskaapissa alla olevassa järjestyksessä steriiliin eppendorf-putkeen yhteensä 18 μl /näyte. Sekoita seoksia varovasti pipetin kärjellä. Älä ravistele tai vorteksoi näytettä.

TAULUKKO 2. PCR-Mix -liuos

	Määrä näytettä kohti	x	Pipetoitava määrä
Master Mix (μl)	10		
Forward- aluke (0,2 μM) (μl)	0,5		
Reverse- aluke (0,2 μM) (μl)	0,5		
MgCl ₂ (3,0 μM) (μl)	2,4		
PCR-H ₂ O (μl)	4,6		
Kokonais tilavuus	18 μl		μl

Pipetoi ensin reaktioseosta 18 μl kuoppalevylle tarvittaviin kuoppiin. Lisää lopuksi kuoppiin 2,0 μl eristettyä DNA:ta, vettä tai tunnettua näytettä. Suunnittele tarkka pipetointijärjestys ja merkitse muistiin näytejärjestys kuoppalevyllä.

Vedä kuoppalevyn päälle kalvo ja spinnaa kuoppalevyä 1500 x g 2 minuuttia.

Aseta RT-PCR-laitteeseen oikeat lämpötilat, ajat ja syklien määrät taulukon 3 mukaan.

TAULUKKO 3. RT-PCR-laitteeseen asetettavat ajat ja lämpötilat

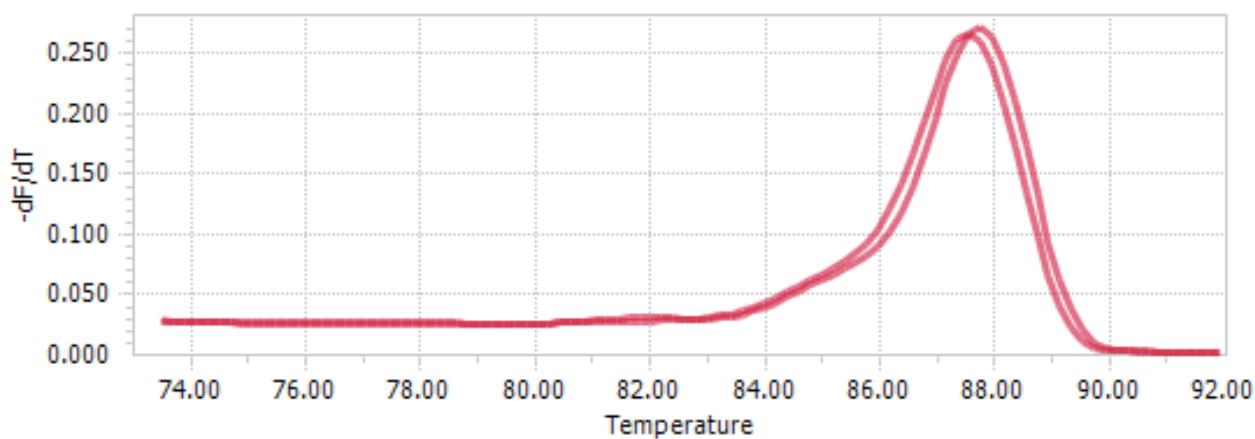
	lämpötila	aika	syklien lkm
alkudenaturaatio	95	600 s	1
denaturaatio	95	10 s	
annealing	54	20 s	
ekstensio	72	20 s	45
HRM (High Resolution Melting)	95	10 s	1
	50	60 s	
	96	1 s	
jäähdytys	40	600 s	1

Tulokset

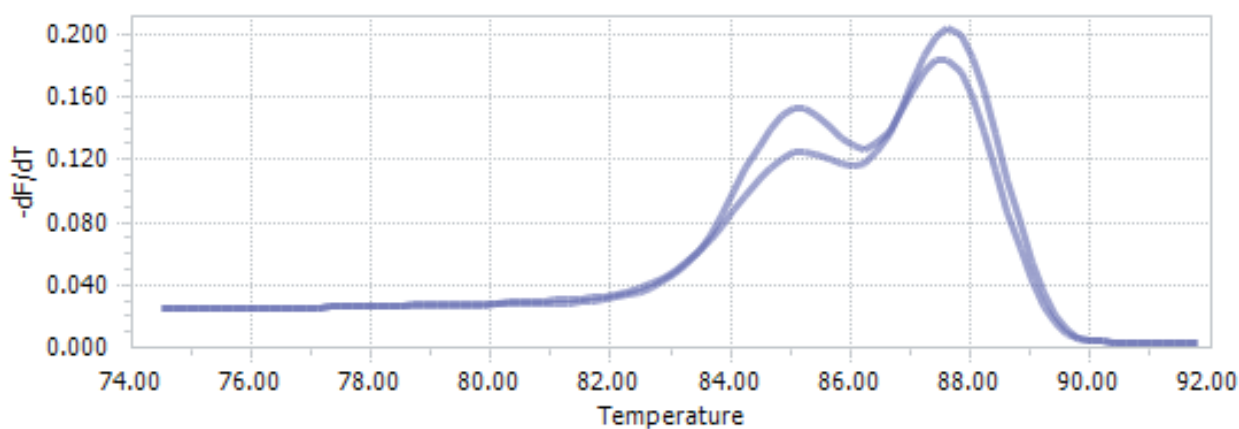
Laktaasientsyymin tuotanto aikuisiällä riippuu SNP (englanniksi single nucleotide polymorfism)-mutaatiosta. SNP-mutaatiossa yksi emäs laktaasin synteesiä säätelevässä LCT(Lactase) -geenissä paikalla 13910 on muuttunut sytosiinista (C) tymiiniksi (T). Mutaatio vaikuttaa LPH (Lactase-Phlorizin Hydrolase) -proteiinin tuotantoon kyseisessä geenissä. (Genecards 2015.) Aikuisiän laktoosi-intoleranssi johtuu geenissä olevasta C/C-genotyypistä. Parhaiten laktoosia sietävät T/T-genotyypin omaavat ihmiset. C/T-genotyypin omaavilla laktaasientsyymin tuotanto on vaihtelevaa. (Bodlaj, Stöcher, Hufnagl, Hubmann, Biesenbach, Stekel ja Berg 2006, 148.)

Kun tuntematonta näytettä verrataan tunnettuihin referensseihin, saadaan vertailemalla käyriä selville, mikä alleeli näytteessä on. Näytteestä eri tyypit saadaan selville lämpötilaeroja tarkastelemalla. C/C-genotyypin omaavalla ihmisellä on paikalla molemmilta vanhemmilta perittyinä C-alleeli. C – G nukleotidien välisessä sidoksessa on 3 vetysidosta, kun taas A – T nukleotideilla 2

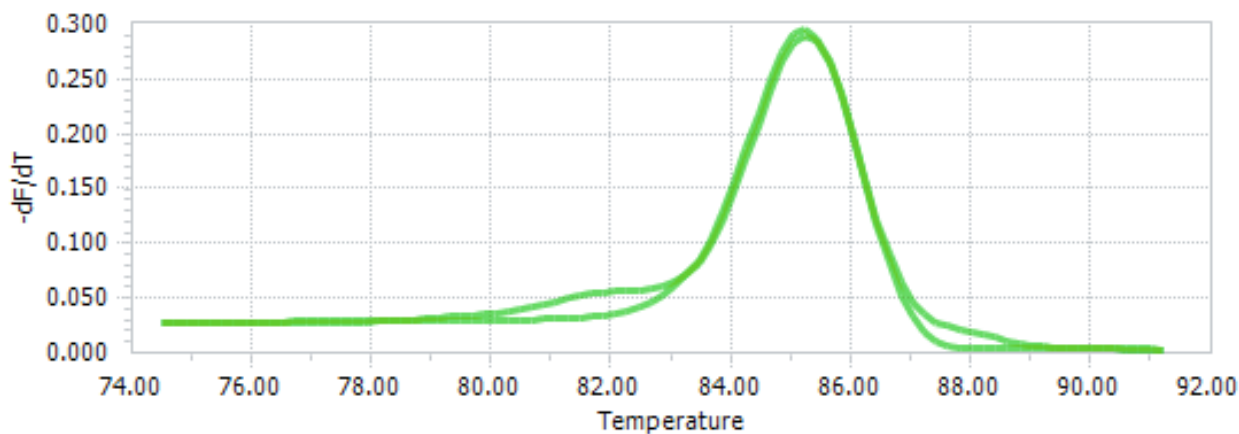
vetysidosta. C/C-genotyypin sulamislämpötila (kuvio 1) on korkein kolmesta, sillä sidoksien välinen vahvuus on suurempi. Tästä päätellen T/T-genotyypin (kuvio 3) omaavilla on alhaisin sulamislämpötila ja C/T (kuvio 2) muodostaa kaksi sulamiskiikettä, sillä se sisältää molemmat alleelit.



KUVIO 1. C/C-genotyypin sulamiskäyrä



KUVIO 2. C/T-genotyypin sulamiskäyrä



KUVIO 3. T/T-genotyypin sulamiskäyrä

Lähteet

BODLAJ, Gerd, STÖCHER, Markus, HUFNAGL, Peter, HUBMANN, Rainer, BIESENBACH, Georg, STEKEL, Herbert ja BERG, Jörg 2006. Genotyping of the Lactase-Phlorizin Hydrolase – 13910 Polymorphism by LightCycler PCR and Implications for the diagnosis of Lactose Intolerance. *Clinical Chemistry* 52/2006.

GENECARDS 2015. LCT Gene (Protein coding). [Verkköjulkaisu]. [Viitattu 2015-11-09.] Saatavissa: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=LCT>

HUHTALA, Emmi, RUOTSALO, Seppo ja VIDGREN, Seppo 2015. Laktoosi-intoleranssin määrittäminen RT-PCR-menetelmällä. Savonia-ammattikorkeakoulu. Bioanalyytikan koulutusohjelma. Opinnäytetyö.

KUBISTA, Mikael, ANDRADE, José Manuel, BENGTSSON, Martin, FOROOTAN, Amin, JONÁK, Jiri, LIND, Kristina, SINDELKA, Radek, SJÖBACK, Robert, SJÖGREEN, Björn, STRÖMBOM, Linda, STÅHLBERG, Anders, ZORIC, Neven 2006. The Real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*, Vol 27, No. 2-3 [Verkkolehti]. [Viitattu 2015-03-24.] Saatavissa: <http://www.gene-quantification.de/kubista-qpcr-review-mam-2006.pdf>

THERMO FISHER SCIENTIFIC 2012. GeneJET Whole Blood Genomic DNA Purification Mini Kit – pakkauseloste. [Viitattu 2015-11-09]. Saatavissa: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0012667_GeneJET_Whole_Blood_Genomic_DNA_Purification_Mini_UG.pdf

LIITE 1

Genomisen DNA:n eristäminen

Teoria:

Kokoveri käsitellään proteinaasi K -entsyymillä, joka yhdessä kitistä löytyvän Lysis-liuoksen kanssa hajoittaa veren sisältämät valkosolujen solukalvot ja tumakotelot sekä punasolut. Hajoamista tehostetaan vorteksoimalla ja inkuboimalla näytettä. Näytteeseen lisätään etanolia, joka denaturoi proteiinia ja tällöin DNA:n kolmiulotteinen rakenne hajoaa. Näyte laitetaan spinnauskyyvetiin, jossa DNA kiinnittyy silikamembraaniin sentrifugoidessa. Kyyvetiin lisätään kitin sisältämiä pesupusku-reita (wash buffer I ja II) ja spinnataan vähintään kahdesti sentrifuugissa. Tällä varmistetaan, että kaikki mahdolliset epäpuhtaudet saadaan tehokkaasti poistettua näytteestä. Lopuksi genomisen DNA liuotetaan Elution bufferin avulla membraanin läpi sentrifugoimalla. Lopputuote eli puhdistettu DNA käytetään joko heti sellaisenaan tai pakastetaan -20 asteeseen. Näin estetään DNA:n rakenteen mahdollinen hajoaminen. (Thermo Fisher Scientific 2012.)

Reagenssit:

GeneJET Whole Blood Genomic DNA Purification Mini Kit

Laitteet ja tarvikkeet:

Minisentrifuugi

Vortex-sekoitin

Lämpöravistushaude

Ilmamäntäpipetit ja kärjet

Eppendorf-putkia

Jäteastia

Absoluuttista etanolia

EDTA-kokoverinäyte

Työturvallisuus ja aseptiikka:

Noudata näytteenotossa ja näytteiden käsittelyssä aseptisia ja turvallisia työskentelytapoja. Kaikkia näytteitä tulee käsitellä tartuntavaarallisina.

Hävitä jätteet asianmukaisesti.

Työssä käytettävät kemikaalit eivät ole hengenvaarallisia, mutta niitä käsitellessä tulee noudattaa käyttöturvallisuustiedotteen mukaisia ohjeita.

Työskentele aseptisesti. Käytä aina työtakkia ja suoja-hanskoja. Huolehdi käsihygieniasta!

DNA:n eristämisen on huomioitava, että seurataan ohjeita erittäin tarkasti. Pyöritysvaiheita on useita, joiden aikana poistetaan ylimääränestettä ja tällöin voi helposti heittää eristettävän DNA:n roskiin!

Työn suoritus:

1. Lisää 20 ul proteinaasi K -liuosta ja 200 ul EDTA-verta steriiliin eppendorf-putkeen ja sekoita vorteksoimalla.
2. Lisää 400 ul lysis-liuosta ja sekoita perusteellisesti vorteksoimalla.
3. Inkuboi näytettä lämpöravistushauteessa 56 asteessa 10 minuuttia.
4. Lisää 200 ul puhdasta etanolia (99,6 %) ja sekoita pipetoimalla edestakaisin.
5. Siirrä näyte spinnauskyvetiin ja sentrifugoi 1 minuutin ajan nopeudella 6000 x g. Kaada spinnauskyvetin keräysosioon valunut liuos pois. Aseta kyvetin yläosa uuteen 2 ml keräysputkeen. Huomioi, että minisentrifuugin kierrosluvut on asetettu oikein!
6. Lisää kyvetiin 500 ul pesupuskuria 1 (Wash buffer WB I). Sentrifugoi 1 minuutin ajan 8000 x g nopeudella. Kaada pois läpi suodattunut neste ja aseta kyvetin yläosa takaisin keräysputkeen.
7. Lisää kyvetiin 500 ul pesupuskuria 2 (Wash buffer II). Sentrifugoi 3 minuutin ajan minisentrifuugin maksimaalisella pyöritysteholla.
8. Tyhjennä keräysosioon valunut neste pois ja aseta kyvetin yläosa takaisin keräysastiaan. Sentrifugoi uudestaan 1 minuutin ajan maksimaalisella pyöritysteholla.
9. Poista keräysosioon valunut neste ja siirrä kyveti steriiliin 1,5 ml mikrosentrifuugiputkeen.
10. Lisää 200 ul liuotuspuskuria (Elution buffer) keskelle kyvetin membraania. Anna näytteen inkuboitua huoneenlämmössä 2 minuutin ajan ja sentrifugoi tämän jälkeen 1 minuutin ajan 8000 x g nopeudella.
11. Tässä vaiheessa Genominen DNA on suodattunut steriilin mikrosentrifuugiputken pohjalle. Poista kyveti putkesta ja käytä DNA heti sellaisenaan tai pakasta se -20 asteessa.