



Mirka Tyni

Marjo Yrjänheikki

GENEETTISESTI MUUNNELLUN BAKTEERIN TUNNISTAMINEN -

Itseopiskelumateriaalin tuottaminen kvantitatiivisesta polymeraasiketjureaktiosta sekä harjoitus-
työn suunnittelu ja testaus

GENEETTISESTI MUUNNELLUN BAKTEERIN TUNNISTAMINEN -

Itseopiskelumateriaalin tuottaminen kvantitatiivisesta polymeerasiketjureaktiosta sekä harjoitus-
työn suunnittelu ja testaus

Mirka Tyni
Marjo Yrjänheikki
Opinnäytetyö
Syksy 2011
Bioanalytiikan koulutusohjelma
Oulun seudun ammattikorkeakoulu

TIIVISTELMÄ

Oulun seudun ammattikorkeakoulu
Bioanalytiikan koulutusohjelma

Tekijät: Mirka Tyni & Marjo Yrjänheikki

Opinnäytetyön nimi: Geneettisesti muunnellun bakteerin tunnistaminen – Itseopiskelumateriaalin tuottaminen kvantitatiivisesta polymeerasiketjureaktiosta sekä harjoitustyön suunnittelu ja testaus

Työn ohjaajat: Paula Reponen, Annikki Savolainen, Elsa Kumpulainen ja Ulla Kemi

Työn valmistumislukukausi ja -vuosi: Syksy 2011

Sivumäärä: 38 + 10 liitettä

Opinnäytetyömme aiheena oli valmistaa Oulun seudun ammattikorkeakoulun bioanalytiikan koulutusohjelman vaihtoehtoisille opintojaksoille itseopiskelumateriaalia reaaliaikaisesta polymeerasiketjureaktiosta, suunnitella ja testata siihen liittyvä harjoitustyö sekä laatia työohje. Taustalla oli tarve saada opiskelumateriaalia ja harjoitustyö bioanalyttikko-opiskelijoiden molekyylibiologian vaihtoehtoiselle opintojaksolle. Teimme projektia yhteistyössä OAMK:n Kaukovainiolla sijaitsevan tekniikan yksikön kanssa, joten materiaaliamme voidaan käyttää hyväksi myös laboratorioanalyttikoiden molekyylibiologiaan liittyvissä ammattiopinnoissa.

Bioanalytiikan opinnoissa molekyylibiologian opintojaksojen tarkoituksena on perehdyttää opiskelijoita muun muassa perinnöllisten tautien diagnostiikassa käytettäviin menetelmiin, jotka ovat lisääntyneet huomattavasti, mikä johtuu muun muassa usean aiemmin tutkimuskäytössä olleen menetelmän siirtymisestä kliinisissä laboratorioissa käytettäviksi rutiinimenetelmiksi. Perinnöllisten tautien diagnostiikassa käytettävät geenitutkimukset lisäävät siis omalta osaltaan bioanalytikoilta vaadittavaa molekyylibiologian ja geeniteknologian teoreettista ja teknistä osaamista.

Itseopiskelumateriaalimme perustana oli oppijälähtöisyys ja itseohjautuvuus, jotka ovat tärkeä osa opiskelua ammattikorkeakoulussa. Opinnäytetyömme tukee myös OAMK:n opetuksen kehittämisen keskeisimpiä periaatteita sekä moniammatillista yhteistyötä ja eri koulutusohjelmien välistä synergiaa.

Asiasanat: qPCR, itseopiskelumateriaali, geneettisesti muunneltu organismi

ABSTRACT

Oulu University of Applied Sciences
Degree programme in Biomedical Laboratory Science

Authors: Mirka Tyni & Marjo Yrjänheikki

Title of thesis: Identification of genetically modified bacteria – Producing self-study material for quantitative polymerase chain reaction and designing and testing the practical part

Supervisors: Paula Reponen, Annikki Savolainen, Elsa Kumpulainen ja Ulla Kemi

Term and year when the thesis was submitted: Autumn 2011

Number of pages: 38 + 10 appendices

Our thesis project was to produce self-study material for Oulu University of Applied sciences, the School of Health and Social Care. Our subject was quantitative polymerase chain reaction and the material is intended for the alternative course of molecular biology in Degree Programme in Biomedical Laboratory Technology. In addition we designed and tested the associated assignment for the practical part and prepared work instructions. Our project was carried out in collaboration with Oulu University of Applied Sciences, the School of Engineering, and the material can also be used in Degree Programme in Laboratory Science.

The molecular biology courses in biomedical laboratory science are designed for example to familiarize the students with the methods used for diagnosis of hereditary diseases. These genetic tests require good theoretical and technical skills in molecular biology and gene technology.

Our self-study material is based on learner-orientation and self-directiveness, which are an important part of the studies in University of Applied Sciences. Our thesis also supports the development of multi-professional cooperation and the synergy between the various training programs.

Keywords: qPCR, genetically modified organism, self-study material

SISÄLLYS

1	JOHDANTO.....	6
2	PROJEKTIN SUUNNITTELU.....	8
3	PROJEKTIN LÄHTÖKOHDAT	9
4	KVANTITATIIVINEN POLYMERAASIKETJUREAKTIO	10
4.1	Polymeraasiketjureaktion periaate	10
4.2	Kvantitatiivisen polymeraasiketjureaktion periaate	12
4.3	Kvantitatiivisen polymeraasiketjureaktion havainnointimenetelmiä	13
4.3.1	Ei-spesifiset koettimet	13
4.3.2	Spesifiset koettimet.....	14
4.3.3	High Resolution Melt-analyysi	14
4.4	Kvantitatiivisen polymeraasiketjureaktion käyttösovelluksia	15
5	HARJOITUSTYÖN SUUNNITTELU	17
5.1	Alkuvalmistelut.....	18
5.2	Alukkeiden ja templaattien testaus.....	18
5.3	Näytteiden esikäsittelyn testaus	19
5.4	Kvantitatiivisen polymeraasiketjureaktion testaus	20
5.4.1	qPCR-menetelmään ja laitteeseen perehtyminen.....	20
5.4.2	Alukeyhdistelmien testaus.....	21
5.4.3	Harjoitustyön testaus.....	22
6	TULOKSET.....	24
6.1	Alkutestauksen tulokset	25
6.2	Näytteiden esikäsittelyjen vertailu	26
6.3	qPCR-testiajon tulokset	27
6.4	Alukeyhdistelmien testauksen tulokset.....	29
6.5	Harjoitustyön testauksen tulokset	30
7	OPIKELUMATERIAALIN TUOTTAMINEN.....	32
8	POHDINTA.....	34
	LÄHTEET	36
	LIITTEET	38

1 JOHDANTO

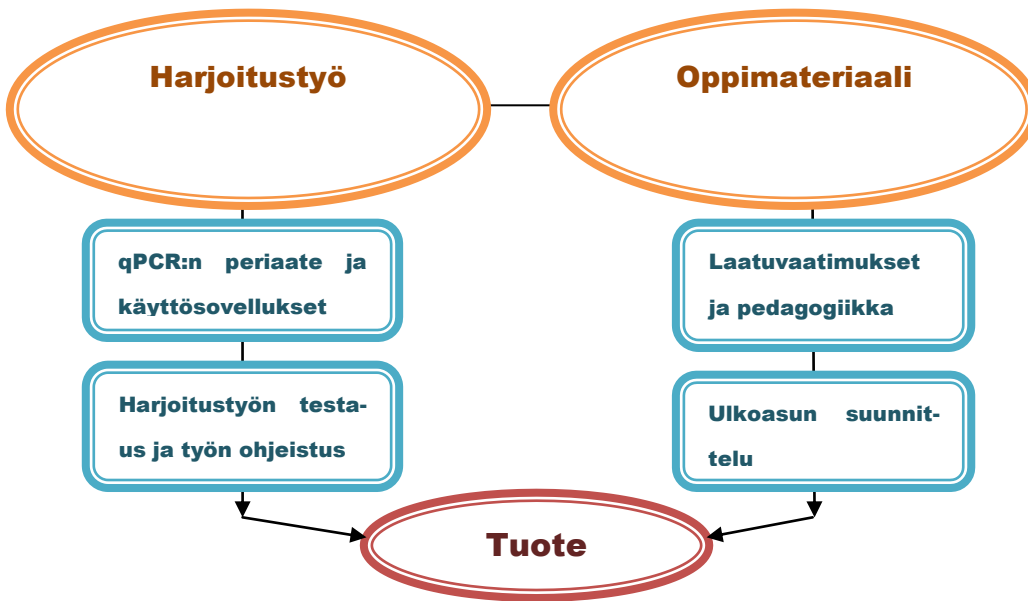
Opinnäytetyömme aiheena oli valmistaa Oulun seudun ammattikorkeakoulun (OAMK) molekyylibiologian vaihtoehtoisille opintojaksoille itseopiskelumateriaalia kvantitatiivisesta polymeerasiketjureaktiosta (qPCR) sekä suunnitella ja testata siihen liittyvä harjoitustyö. Lisäksi laadimme harjoitustunnille työohjeen. Aiheen saimme koululta, opettajaltamme lehtori Paula Reposelta. Projektin taustalla oli tarve saada opiskelumateriaalia ja harjoitustyö Oulun seudun ammattikorkeakoulun sosiaali- ja terveysalan yksikön bioanalyttikko-opiskelijoiden molekyylibiologian vaihtoehtoiselle opintojaksolle. Käyttämämme qPCR-laitteisto sijaitsee OAMK:n tekniikan yksikössä Kaukovainiolla ja teimme projektia yhteistyössä OAMK:n tekniikan yksikön yliopettaja Elsa Kumpulaisen kanssa. Tällainen yksiköiden välinen yhteistyö mahdollistaa valmistamamme materiaalin käytön myös laboratorioanalyttikoiden molekyylibiologiaan liittyvissä ammattiopinnoissa.

Ammattikorkeakouluissa (AMK) korostuu yhteys työelämään ja alueelliseen kehittämiseen. Niiden antaman korkeakouluopetuksen tavoitteena on kouluttaa ammattilaisia vastaamaan työelämän tarpeita ja edistää sen kehittämistä. (Opetus- ja kulttuuriministeriö, hakupäivä 17.10.2011) OAMK:n opetuksen tueksi ammatillisen korkeakouluopetuksen kehittämistyöryhmä (Peda-tiimi) on laatinut opetuksen kehittämisen linjauksia, jotka toimivat ohjeena konkreettisoiden sekä tarkentaen OAMK:n strategiaa ja kehityssuunnitelmaa. Keskeisiä periaatteita opetuksen kehittämässä ovat muun muassa tutkiva ja kehittävä yhteistoiminnallinen oppiminen, jotka puolestaan toimivat yhtenä suunnannäyttäjänä työelämälähtöiselle oppimiselle sekä oppijälhtöisen kulttuurin edistämiseksi. (Peda-tiimi, 2011)

Opinnäytetyömme tukee näitä periaatteita, sillä valmistamamme oppimateriaali on oppijälhtöisyyden ja itseohjautuvuuden huomioiva itseopiskelumateriaali. Lisäksi harjoitustyö toteutetaan yhteistoiminnallisesti ja se on suunniteltu työelämää ajatellen. Opinnäytetyömme prosessissa on mukana myös moniammatillista yhteistyötä sekä koulujenvälistä synergiaa.

Projektimme teoriatausta (KUVIO 1.) koostuu pääasiassa kvantitatiivisen polymeerasiketjureaktion (qPCR) periaatteista ja sen käyttösovelluksista, harjoitustyön testauksesta sekä työn ohjeistuksesta. Teoriaosiossa käytettyihin termeihin liittyvä käsitelista löytyy liitteistä (LIITE 1.).

Toinen suuri kokonaisuus liittyy oppimateriaalin valmistamiseen sekä siihen liittyviin laadullisiin vaatimuksiin sekä visuaaliseen suunnitteluun. Tällä halusimme varmistaa, että meillä on riittävästi tietoa ja taitoa, jotta pystymme tuottamaan mahdollisimman laadukkaan oppimateriaalin kohde-ryhmillemme.



KUVIO 1. Opiskelumateriaalin tuottamisessa tarvittava teoriatausta

Projektimme varsinaisena tulostavoitteena oli luoda selkeä, havainnollinen ja opiskelijalähtöinen opiskelumateriaali sekä yksityiskohtainen harjoitustyöohje. Yhdeksi tavoitteeksi asetimme myös sen, että lukija oppisi tuottamamme materiaalin perusteella työskentelemään työelämän vaatimusten mukaisesti. Halusimme myös, että opiskelijoiden lisäksi opettajat hyötyvät tuotteestamme, koska tuottamaamme materiaalia voidaan helposti käyttää apuna opetuksessa. Laadukas ja ajantasainen opetusmateriaali ja hyvin suunnitellut käytännön harjoitukset ovat avaimia hyvään opetukseen ja osaavien ammattilaisten kouluttamiseen.

Projektityötä tehdessä oli tärkeää muistaa, että kyseessä oli ennen kaikkea oppimisprosessi. Oppimistavoitteitamme olivat yhteistoiminnallisuus, projektityöskentelyyn tutustuminen, kyseiseen molekyylibiologiseen menetelmään perehtyminen sekä hyvän oppimateriaalin kriteerien opiskelu.

2 PROJEKTIN SUUNNITTELU

Projekti voidaan määritellä joukoksi ihmisiä ja muita resursseja, jotka kootaan yhteen tietyn tehtävän suorittamista varten. Projekti sisältää useita erilaisia vaiheita projektin suunnittelusta projektin päättymiseen (Ruuska, 2007, 19.). Projektimme sai alkunsa syksyllä 2010 aiheen valinnalla ja sitä edeltävillä valmistavilla seminaareilla, joiden avulla loimme teoriapohjaa työllemme. Talven 2011 valmistavien ja suunnitelmaseminaarien jälkeen aloimme suunnitella käytännönjaksoa, joka sisälsi sosiaali- ja terveystieteiden yksikköme laboratoriossa tehdyt harjoitustyöhön liittyvät esivalmistelut sekä varsinaisen harjoitustyön testauksen OAMK:n tekniikan yksikössä.

Projektin tavoitteiden saavuttamiseksi tarvitaan ryhmä projektin tekijöitä (Ruuska, 2007, 19.). Projektioorganisaatioomme kuuluivat muun muassa projektin asettaja, ohjausryhmä, projektiryhmä sekä tukiryhmä. Projektin asettajana oli Oulun seudun ammattikorkeakoulun sosiaali- ja terveystieteiden yksikkö, joka toimi yhteistyössä tekniikan yksikön kanssa. Lehtori Paula Reponen ja osastonjohtaja Annikki Savolainen muodostavat opinnäytetyömme ohjausryhmän. Varsinainen tukiryhmä koostuu useista eri tahoista, johon kuuluvat työmme muut ohjaajat eli yliopettaja Elsa Kumpulainen OAMK:n tekniikan yksiköstä sekä opetusharjoittelija Ulla Kemi Oulun yliopistosta, joilla on laaja-alaista kokemusta PCR-tekniikoista. Lisäksi tukiryhmäämme voidaan laskea opponenttimme sekä koko muu Bio8sn-opiskeluryhmämme.

Projektitehtävät voidaan jakaa aiheen valintaan ja ideointiin, aiheeseen perehtymiseen, suunnitteluun, testaukseen, toteutukseen sekä lopetukseen. Ideointi alkoi heti aiheen valinnan yhteydessä ja jatkui läpi koko prosessin. Aiheeseen perehtyminen sisälsi myös tiedonhaun ja sen sivutuotteena syntyivät kirjalliset työt valmistaviin seminaareihin, jotka muodostivat suurimman osan työmme viitekehystä. Itse projektisuunnitelma toimi työskentelymme runkona ja suuntaviivana koko prosessin ajan. Suunnitelmat muuttuivat ja muokkaantuivat jonkin verran työmme edetessä, mutta pääkohdat ja tärkeimmät päämäärät pysyivät samoina. Riittävän kattava ja yksityiskohtainen suunnitelma auttoi meitä myös tavoitteiden onnistumisen arvioinnissa ja aikataulussa pysymisessä.

3 PROJEKTIN LÄHTÖKOHDAT

Tuotteemme kohderyhmänä olivat laboratorioalaa opiskelevat ammattikorkeakouluopiskelijat. Opiskelumateriaalin ja suunnittelemanne harjoitustyön täytyi vastata opiskelijoiden kykyihin ja sen hetkisiin tietoihin ja taitoihin. Ammattitaito ei pääse kehittymään toivotulla tavalla harjoitustyön ollessa liian yksinkertainen. Ammatillisen kasvun ja kehittymisen kannalta kyseinen harjoitustyö voi siis syventää opiskelijoiden molekyylibiologian tietämystä.

Bioanalyttikoiden työkenttä on laaja, ja se kattaa terveydenhuollon laboratorioden lisäksi myös esimerkiksi ympäristöterveydenhuollon laboratoriot sekä biolääketieteelliset tutkimus- ja tuotantolaitokset. Bioanalyttikoiden koulutukseen sisältyy muun muassa kliinistä kemiaa ja hematologiaa sekä mikrobiologiaa. Opintojen tarkoituksena on perehdyttää tulevia terveydenhuollon ammattihenkilöitä ihmisen elimistön toimintaan ja sitä kautta opettaa ymmärtämään laboratoriotutkimusten ja uusien tutkimusmenetelmien kehittämisen merkitystä väestön terveyden edistämiseksi. (OAMK:n internetsivut, 2011, hakupäivä 17.10.2011)

Bioanalytiikan opinnoissa molekyylibiologian opintojaksojen tarkoituksena on tutustuttaa opiskelijoita muun muassa perinnöllisten tautien diagnostiikassa käytettäviin menetelmiin, jotka ovat lisääntyneet huomattavasti, mikä johtuu muun muassa usean aiemmin tutkimuskäytössä olleen menetelmän siirtymisestä kliinisissä laboratorioissa käytettäviksi rutiinimenetelmiksi. Perinnöllisten tautien diagnostiikassa käytettävät geenitutkimukset lisäävät siis omalta osaltaan bioanalytikoilta vaadittavaa molekyylibiologian ja geenitekniikan teoreettista ja teknistä osaamista. (Peltonen, ym., 2006, hakupäivä 17.10.2011)

4 KVANTITATIIVINEN POLYMEERAASIKETJUREAKTIO

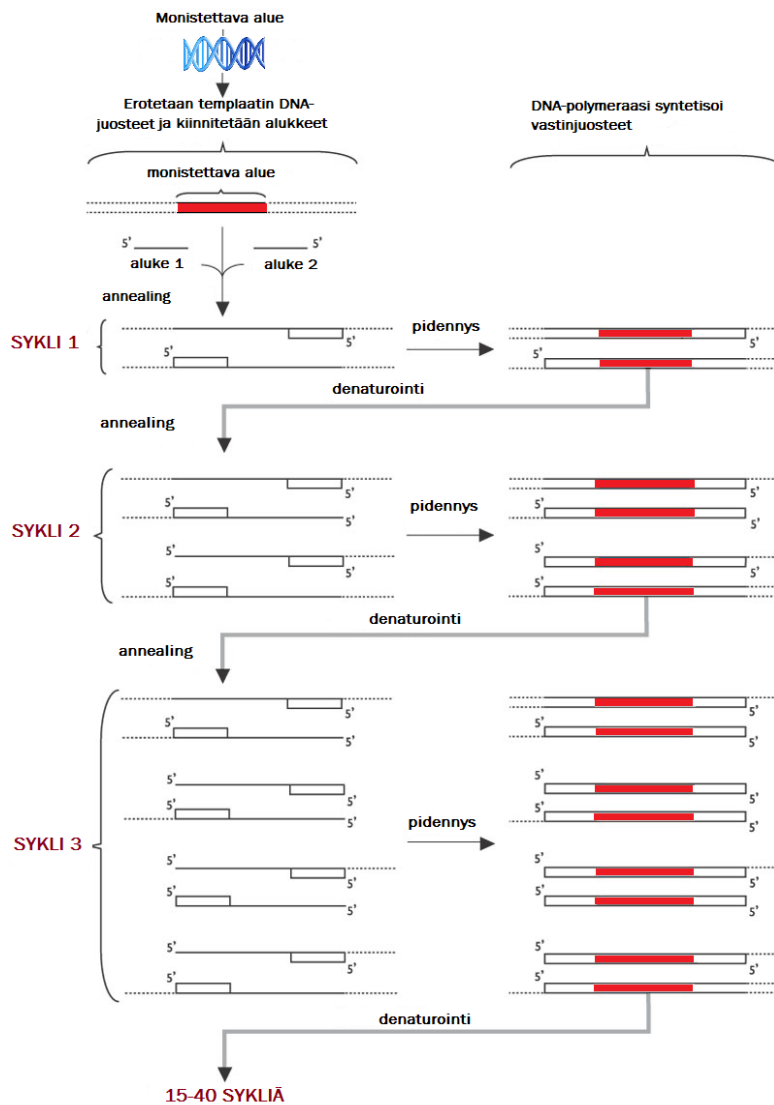
Polymeraasiketjureaktio eli PCR (polymerase chain reaction) on DNA:n monistusmenetelmä, jolla voidaan kopioida DNA-jaksoja, jotka ovat kahden emäsjärjestykseltään tunnetun DNA-jakson välissä. Menetelmä perustuu sykleihin, joissa PCR-laitteen avulla lämpötiloja muuttamalla saadaan aikaiseksi reaktioita reaktioliuoksessa. (Suominen, ym., 2010, 153.) Kvantitatiivisessa polymeraasiketjureaktiossa syntyvien tuotteiden muodostumista voidaan seurata reaaliajassa, kun tavallisen polymeraasiketjureaktion tuotteita visualisoidaan reaktioiden lopuksi agarosigeelielektroforeesilla.

4.1 Polymeraasiketjureaktion periaate

Polymeraasiketjureaktion reaktioliuoksessa tarvitaan puskuriliuosta, kopioitavaa DNA:ta, polymeraasientsyymiä, alukkeita ja nukleotideja (dNTP). Reaktiot suoritetaan mikrosentrifuugiputkissa tai kuoppalevyillä, joiden tilavuus on alle 0,5 ml. Polymeraasiketjureaktiossa hyödynnetään lämpöä kestäviä entsyymejä, DNA-polymeraaseja. Lisäksi käytetään spesifisiä alukkeita, primeerejä, jotka ovat kemiallisesti syntetisoituja yksijuosteisia DNA-fragmentteja. Niiden avulla monistumisalue rajataan haluttuun geeniin tai sen osaan. Alukkeet kiinnittyvät monistettavaksi halutun geenialueen molempiin päihin DNA:n eri juosteisiin. Alukkeet kiinnittyvät vain yksijuosteiseen DNA:han. Reaktioseoksessa on myös dNTP:tä eli deoksiribonukleotideja. Ne sisältävät neljää eri emästä eli adeniinia (dATP), tymiiniä (dTTP) sytosiinia (dCTP) ja guaniinia (dGTP), jotka toimivat DNA-polymeraasin käyttäminä DNA:n rakennuspalikoina valmistettaessa uutta DNA-juostetta. (Suominen, ym., 2010, 153–154.)

PCR:ssä toistetaan yksinkertaisimmillaan kolmea vaihetta (KUVIO 2). Ensimmäisessä reaktiovaiheessa, *denaturaatio*ssa, DNA:n kaksoisjuoste avataan kuumentamalla liuos 94–96 °C:een. Annealing- eli *alukkeiden liittymisvaihe*ssa kiinnittyminen tapahtuu nukleotidisekvenssistä riippuen 45–65 °C:n lämpötilassa. Tutkittavalle DNA-kohdalle spesifiset alukkeet kiinnittyvät yksisäikeiseen DNA:han emäsparisäännön mukaisesti. DNA-polymeraasi vaatii alukkeen läsnäolon DNA-juosteessa, ennen kuin se voi aloittaa toimintansa. (Suominen, ym., 2010, 154.)

Seuraavassa vaiheessa lämpötilaa nostetaan noin 72 °C:een, jolloin polymeerasientsyymi aktivoituu. Tästä alkaa *templaatin pidennysreaktio* eli ekstensiovaihe. Ekstensiovaiheessa polymeerasientsyymi liittää reaktioseoksessa olevia nukleotideja alukkeiden rajaaman templaatin 3'-päähän alkuperäisen DNA-juosteen mallin mukaisesti ja etenee kohti 5'-päättä. Molemmille DNA-juosteille syntyy näin oma vastinjuoste. (Suominen, ym., 2010, 154.)



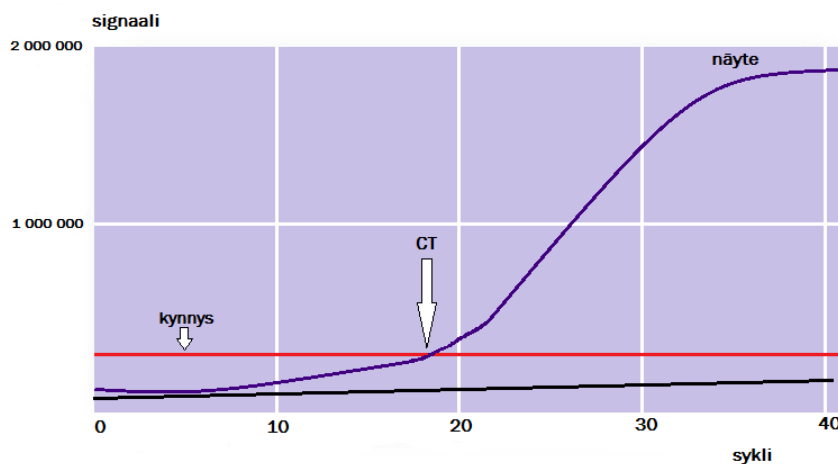
KUVIO 3. Polymeerasiketjureaktion periaate (Mukailten Suominen, ym., Turun ammattikorkeakoulu 2010, hakupäivä 19.10.2011)

Pidennysreaktion jälkeen lämpötilaa nostetaan jälleen, noin 95 °C:een, jolloin juuri syntetisoidut juosteet denaturoituvat, eli niiden kaksoisjuosteet avataan. Näitä syklejä toistetaan useita kertoja, yleensä 15–40 kertaa, jolloin alkuperäisestä DNA-määrästä saadaan monistettua miljoonia kopioita. (Suominen, ym., 2010, 154–155.)

4.2 Kvantitatiivisen polymeraasiketjureaktion periaate

Kvantitatiivinen PCR (qPCR) on menetelmänä hyvin samanlainen kuin tavallinen PCR. qPCR-menetelmässä lähtömateriaalina voidaan käyttää DNA:ta, tai RNA:sta käänteiskopioijaentsyymien avulla tuotettua cDNA:ta. qPCR:ssä käytetään lisäksi erilaisia tekniikoita, jotka mahdollistavat PCR-tuotteen määrän mittaamisen ja havainnoinnin reaaliajassa tietokoneelta. Perinteisessä PCR:ssä DNA-tuotteen havainnointi tapahtuu vasta reaktion lopussa. (Suominen, ym., 2010, 170.)

Mittauksia suoritetaan sykleittäin, joko annealing- tai ekstensiovaiheiden jälkeen, jolloin qPCR-laitteistoon liitetty tietokone piirtää saaduista tiedoista kuvaajaa. qPCR-tekniikoissa käytetään jonkinlaista fluoresoivaa merkkiainetta tai koetinta (vrt. spesifiset ja ei-spesifiset koettimet), joka kiinnittyy reaktiossa syntyneeseen tuotteeseen. Mitä enemmän tuotetta muodostuu PCR-reaktion aikana, sitä enemmän syntyy myös fluoresenssia. (Suominen, ym., 2010, 154.)



KUVIO 4. qPCR-kuvaaja (Mukaiillen Suominen, ym., Turun ammattikorkeakoulu 2010, hakupäivä 19.10.2011)

Laitteen piirtämässä kuvaajassa (KUVIO 4.) syklin numero on signaalin funktiona ja kuvaajan kohtaa, jossa signaali alkaa nousta eksponentiaalisesti, kutsutaan Ct-arvoksi (Threshold cycle). Silloin syklin fluoresenssi on ylittänyt taustasäteilyn arvon ja tuotteen monistuminen on tehokkainta. Ct-arvo on sitä pienempi mitä suurempi DNA-pitoisuus alkuperäisessä näytteessä on. (Suomen, ym., 2010, 167.)

4.3 Kvantitatiivisen polymeraasiketjureaktion havainnointimenetelmiä

Halutun kohteen havainnointia ja mittaamista varten polymeraasiketjureaktioihin täytyy liittää jokin mitattava signaali. Nykyisin havainnointiin käytetään fluoresoivia merkkiaineita. Osa niistä on ei-spesifisiä ja niitä käytetään yhteen kohteeseen kerrallaan. Spesifisiä aineita puolestaan voidaan käyttää useiden kohteiden havainnoimiseen samassa määrittäyksessä, sillä ne kykenevät erottumaan ei-halutuista tuotteista tai muista häiriötekijöistä. (qPCR guide, 12.)

4.3.1 Ei-spesifiset havainnointimenetelmät

SYBR® Green on yleisimmin käytetty kaksijuosteista DNA:ta (dsDNA) sitova ei-spesifinen fluoresoiva merkkiaine. Se on myös melko halpa ja helppokäyttöinen. Sitoutuessaan dsDNA:han SYBR® Green fluoresoi huomattavasti voimakkaammin kuin ollessaan vapaana liuoksessa. Mitä enemmän dsDNA:ta on, sitä enemmän SYBR® Green:lle on sitoutumiskohtia ja sitä voimakkaampi on myös fluoresenssi. (Introduction to Quantitative PCR, Methods and Applications Guide, 2004, 6.) SYBR® Green on käytössä esimerkiksi neurotieteissä, kehitysbiologiassa sekä lääketieteen diagnostiikassa (Ramakers ym., 2002).

SYBR® Green:n ja muiden ei-spesifisten havainnointimenetelmien etuja ovat muun muassa yksinkertaisuus sekä kustannustehokkuus. Merkittävänä haittapuolena niillä on nimensä mukaisesti epäspesifisyys, sillä ne sitoutuvat kaikkeen kaksijuosteiseen DNA:han. Apuna kuitenkin voidaan käyttää sulamiskäyräanalyysejä, jolloin voidaan tunnistaa eri reaktiotuotteita sekä erottaa niistä ei-halutut kohteet. Sulamiskäyräanalyyseissä luodaan PCR-reaktioiden lopuksi sulamiskäyrät tuotteille. Tämä tapahtuu nostamalla lämpötilaa pienin askelin seuraten samalla joka vaiheessa fluoresenssisignaalia. Kun dsDNA denaturoituu eli avautuu yksijuosteiseksi, fluoresenssi laskee merkkiaineen vapautuessa liuokseen. (Real-Time PCR Applications Guide, 2006, 11.)

4.3.2 Spesifiset havainnointimenetelmät

Yleisimmin käytetty spesifinen koetin on TaqMan. Se on lineaarinen oligonukleotidi, jonka toisessa päässä on fluoresoiva osa ja toisessa päässä fluoresenssia estävä vaimennin. TaqMan sitoutuu annealing-vaiheessa tiettyyn kohtaan kohde-DNA:ta. DNA-polymeraasin rakentaessa uutta juostetta se samalla hajottaa TaqMan-koettimen rakenteen erottaen vaimentimen sekä fluoresoivan osan toisistaan, jolloin vaimennin ei pääse yhtä vahvasti vaikuttamaan fluoresoivaan osaan eli fluoresenssi kasvaa. (Zhang & Fang, 2006.)

TaqMania voidaan käyttää erilaisissa määrittämisanalyseissä ja mutaatioiden havainnoimisessa. Hinnaltaan se on ei-spesifisiä merkkiaineita kalliimpi, mutta toisaalta sitä on mahdollista käyttää multiplex-analyseissä eli useamman kohteen määrittämisessä samalla kertaa. (qPCR guide, 14.)

Toinen yleisesti käytössä oleva spesifinen koetin on molecular beacon. Se on TaqManin tavoin oligonukleotidi, jossa on toisessa päässä fluoresoiva ja toisessa vaimentava osa. Muodoltaan se on silmukkamainen, jossa on vierekkäin vaimennin ja fluoresoiva osa. Silmukka on komplementaarinen kohde-DNA:n tietyn osan kanssa ja aukeaa sitoutuessaan siihen. Silmukan auetessa vaimentimen ja fluoresoivan osan välimatka kasvaa ja fluoresenssi voimistuu. (Introduction to Quantitative PCR, Methods and Applications Guide, 2004, 8.) Lämpötilan laskiessa molecular beacon voi palautua silmukamuotoonsa, joten sitä on mahdollista käyttää lisäksi myös sulamiskäyräanalyyseissä (qPCR guide, 16–17).

4.3.3 High Resolution Melt-analyysi

High Resolution Melt-analyysi (HRM) on laajennus sulamiskäyrätekniikasta ja sillä voidaan erottaa eri genotyyppejä niiden erimuotoisten sulamiskäyrien avulla. HRM mahdollistaa nukleiinihappojen analyysin esimerkiksi pienien sekvenssi- tai pituuserojen perusteella. Sillä voidaan havaita jopa yhden emäksen ero käyttämällä ei-spesifisiä dsDNA-merkkiaineita. Genotyypit voidaan erottaa esimerkiksi DNA:n sulamiskäyrämuutosten avulla. (Principles of qPCR, 2009, 13.) HRM-analyysia voidaan käyttää moniin sovelluksiin, esimerkiksi etsittäessä mahdollisia muutoksia PCR:n tuotteissa tai DNA-kartoitukseen ja DNA-profilointiin (qPCR guide, 13).

4.4 Kvantitatiivisen polymeraasiketjureaktion käyttösovelluksia

qPCR-menetelmää käytetään laajasti eri tieteenaloilla erityisesti DNA-sekvenssien havainnoimiseen sekä määrittämiseen. Sovellukset vaihtelevat biologisesta perustutkimuksesta bioteknologiaan sekä rikostutkimukseen. (Karlen ym., 2007.) Geenien ilmenemisen määrittämisessä qPCR on kehittynyt peruskeinoksi. Sen tarkkuudesta sekä korkeasta herkkyudesta johtuen menetelmästä on kehitetty useita sovelluksia ja sillä analysoitavien näytteiden määrä on kasvussa. (Pabinger ym., 2009.) qPCR-analyysillä havainnoidaan sekä määritetään myös paljon patogeenejä ja muita organismeja ympäristönäytteistä (Zhang & Fang, 2006).

Geenin ilmenemisen analysointi

Geenien ilmenemisen analyysissä qPCR on erittäin käyttökelpoinen, sillä se on kaikkein herkin menetelmä lähetti-RNA:n havainnoimiseen sekä määrittämiseen näytteissä. Geenien ilmenemisen tutkiminen on tärkeää, koska geenit vaikuttavat moniin sairauksiin, kuten syöpään. Analyysi paljastaa myös paljon henkilön taipumuksista sekä fysiologisesta kunnosta. Sen avulla voidaan lisäksi seurata muun muassa yksilön terveydentilaa sekä vastetta hoitoihin tai annettuun lääkitykseen. (Principles of qPCR, 2009, 21.) Käytännössä tämän analyysin avulla on tutkittu esimerkiksi ihmisen HER2-geeniä, jonka ekspression muutoksia on havaittu n. 30 % rintakasvaintapauksissa (Heid ym., 1996).

Genotyypitys

Hyvin paljon ja laaja-alaisesti qPCR-menetelmää käytetään ihmisen genotyypitykseen. Tärkeä sovellus on polymorfismien eli geneettisten monimuotoisuuksien, kuten pistemutaatioiden (SNP, Single-nucleotide polymorphism) havainnointi. (Principles of qPCR, 2009, 23.) SNP on yhden nukleotidin polymorfismi, jossa yksi emäspari on muuttunut toiseksi. DNA-sekvenssin muutoksilla on suuri merkitys esimerkiksi, jos henkilöllä on alttius sairastua tiettyihin tauteihin tai, lääkehoidon tehokkuutta arvioitaessa. HMR-analyysi on erittäin tehokas ja herkkä tapa havainnoida pieniä sekvenssimuutoksia sisältäviä DNA-kohteita. (Real-Time PCR Applications guide, 2006, 54.)

Tautidiagnostiikka

Diagnostisessa mikrobiologiassa voidaan hyödyntää qPCR-menetelmää, sillä se on tehokas apuväline virusten, bakteerien ja parasiittien havainnoimisessa. Määrittämistä voidaan käyttää virusten toiminnan ja infektioiden tutkimiseen sekä mikrobilääkkeiden tehon seurantaan. Nämä ovat tär-

keitä asioita valittaessa potilaalle oikeaa hoitoa. Menetelmä on myös lisännyt mahdollisuutta mitata isännän viruskuormaa, jolla on merkitystä joidenkin sairauksien vakavuuden arvioinnissa. (Principles of qPCR, 2009, 22.) Esimerkiksi HI-viruksen määrää analysoidaan seurattaessa taudinkulun eri vaiheita (Heid ym.,1996).

Sairauksien etenemisen seuraamisessa qPCR on siis kehittynyt merkittäväksi apuvälineeksi. Lisäksi määritystä voidaan käyttää geeniterapiassa käytettävien virusvektoreiden arviointiin ennen niiden käyttöön ottoa. (Principles of qPCR, 2009, 22.)

Elintarvikediagnostiikka

Eräs qPCR:n kasvava käyttösovellus on ruuan laadun, puhtauden ja turvallisuuden arviointi. Käytännössä se on nopeampi kuin perinteiset ruuan testausmenetelmät, joten se sopii paremmin ruokateollisuuden kasvaviin tuotemääriin. Markkinoilla on jo olemassa kittejä, jotka mahdollistavat nopean, herkän ja spesifisen ruokamyrkytyspatogeenien havainnoimisen. (Principles of qPCR, 2009, 22–23.)

Geenimuunneltujen organismien tunnistaminen

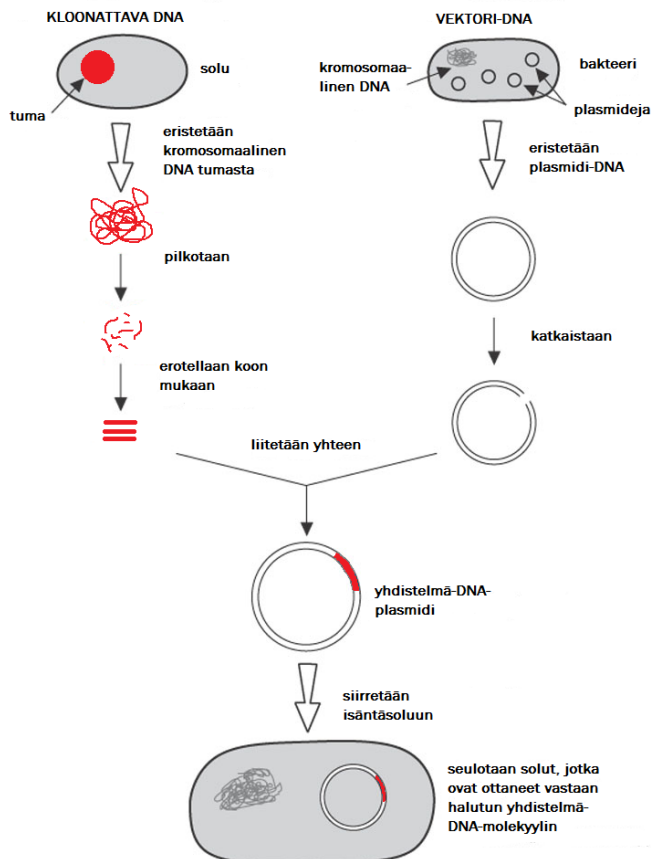
qPCR-menetelmää voidaan käyttää hyödyksi erotettaessa geenimuunneltuja organismeja muuntelemattomista organismeista (Principles of qPCR, 2009, 23). Yleisimpiä muuntogeenisiä organismeja (GMO) elintarviketeollisuudessa ovat muun muassa soija ja maissi, jolloin geenimuuttelun tarkoituksena on esimerkiksi lisätä niiden ravintoarvoa (Real-Time PCR Applications Guide, 2006, 76). qPCR on käyttökelpoinen analyysimenetelmä myös, kun halutaan selvittää onko bakteeri geneettisesti muunneltu eli sisältääkö se plasmidin.

Rikostutkimus

Yhä useammat tapaukset vaativat DNA-analyysia, mutta liian vähäisten resurssien ja työntekijäpulan vuoksi tarpeeseen ei pystytä vastaamaan. Rikosteknisen jäljen tunnistaminen qPCR-menetelmän avulla olisi mahdollisesti nopea ja tehokas tapa käsitellä rikostapauksia. Eri kudostyyppien solujen lähetti-RNA on hyvinkin erilaista, joten RNA-profiilin analysoinnilla voitaisiin selvittää nesteen tai tahran alkuperä. Aiemmasta luulosta poiketen, lähetti-RNA on osoittautunut melko stabiiliksi, mikä tukee sen useita mahdollisuuksia rikostutkimuksen käytössä. qPCR:llä voidaan tutkia muun muassa verinäytteitä, sylkeä sekä siemennestettä. (Noreault-Conti, T. & Buel, E. 2007.)

5 HARJOITUSTYÖN SUUNNITTELU

Testaamamme ”Geneettisesti muunnellun bakteerin tunnistaminen”- harjoitustyön tarkoituksena oli perehtyä kvantitatiivisen polymeerasiketjureaktion (qPCR) toimintaan ja selvittää maljoilla kasvavista tuntemattomista bakteerinäytteistä, ovatko ne geneettisesti muokattuja eli sisältävätkö ne tietyn plasmidin vai eivät. Plasmidit ovat rengasmaisia DNA-molekyylejä, jotka kykenevät monistumaan itsenäisesti. Harjoitustyössä plasmidit (vektori-DNA) eristetään (KUVIO 5.) bakteerisolusta ja katkaistaan restriktioentsyymeillä. Tutkittavat DNA:t (kloonattava DNA) liittyvät katkaistuihin plasmideihin ja DNA-ligaasi liittää kompleksit yhteen rengasmaisiksi yhdistelmä-DNA-plasmideiksi. Joukossa on monia erilaisia DNA-jaksoyhdistelmiä, koska ligaasiensyymi liittää DNA-jaksoja yhteen satunnaisessa järjestyksessä. (Suominen, ym., 2010, 68.)



KUVIO 5. Yhdistelmä-DNA-molekyylin valmistus (Mukaiillen Suominen, ym., Turun ammattikorkeakoulu 2010, hakupäivä 19.10.2011)

Tämän jälkeen yhdistelmä-DNA-plasmidit siirretään isäntäsoluihin ja oikeanlaiset yhdistelmät alkavat monistua. Jatkossa on kyettävä tunnistamaan isäntäsolut, jotka ovat saaneet oikean yhdistelmä-DNA-plasmidin sisäänsä. Tätä menetelmää kutsutaan myös DNA:n kloonaukseksi. (Suominen, ym., 2010, 68.)

5.1 Alkuvalmistelut

Ennen alkutestausta autoklavoimme tarvittavia välineitä ja valmistimme liuoksia ja maljoja liitteen 2 mukaan. Käytännön osuutta varten kasvatimme kahdenlaista *E.coli*-bakteeria: pBR322-plasmidin sisältävää bakteeria ampicilliinimaljoilla (plasmidi sisälsi antibioottiresistenssigeenin) ja plasmiditonta JM101-bakteeria tavallisilla LB-maljoilla. Plasmiditon bakteeri toimi negatiivisena kontrollina testeissämme.

Bakteerien lisäksi tarvitsimme testaustyössä myös eristettyä plasmidia positiiviseksi kontrolliksi. Eristimme *E.coli*:sta pBR322 plasmidia käyttäen NucleoBond Xtra-kittiä. (LIITE 3.) Teimme samoista bakteereista kaksi eristystä eli lopputuloksena saimme kaksi näytettä (1-plasmidi ja 2-plasmidi), joiden DNA-pitoisuudet määritimme spektrofotometrisesti. (LIITE 4.) 1-plasmidia saimme eristettyä 70 ng ja 2-plasmidia 25 ng.

5.2 Alukkeiden ja templaattien testaus

Alkutestauksessa käytimme tavallista polymeerasiketjureaktiota ja ajoimme erilaisia näytteitä agarosigeelielektroforeesilla. Tarkoituksena oli selvittää, millainen templaatti soveltuu parhaiten kyseiseen harjoitustyöhön sekä testata alukkeiden eli primeerien toimivuutta ja sopivaa määrää. Templaatteina käytimme aiemmin eristämiämme plasmideja, bakteerien yön yli kasvustoa sekä bakteeripesäkettä suoraan maljalta. Negatiivisena kontrollina toimivat JM101-bakteeri ja steriili vesi.

Käytössämme oli kolmea eri aluketta, joista RT PCR-1 ja RT PCR-2 rajaavat lyhyemmän alueen (302 bp kokoinen PCR-tuote) ja RT PCR-1 ja RT PCR-3 pidemmän alueen (552 bp:n kokoinen PCR-tuote) templaattista eli pBR322-plasmidista. Teimme alukkeista kahta eri laimennosta ja koekelimme niillä molempia alukeyhdistelmiä. Reaktioita oli yhteensä 20 kappaletta ja merkitsimme

PCR-putket kirjaimilla A–T. Käytetty reaktiivilavuus jokaisessa näytteessä oli 50 µl. (LIITE 5.) Pipetoinnin jälkeen siirryimme tekemään varsinaista PCR-monistusta.

Käytetty PCR-ohjelma:

1. Hot start	96 °C	5 min
2. Denaturaatio, annealing ja ekstensio (x 34)	96 °C	1 min
	57 °C	30 sek
	72 °C	30 sek
3. Säilytys	4°C	

PCR-reaktion jälkeen näytteet ajettiin agarosigeelielektroforeesilla. Sitä varten valmistimme sekä ajopuskuria että agarosigeeliä (LIITE 6.). Käytimme ensimmäisessä elektroforeesijossa sekä 1 % että 1,2 % geeliä. Tuloksia tarkastimme pimeässä huoneessa UV-valossa.

5.3 Näytteiden esikäsittelyn testaus

Harjoitustyön onnistumisen kannalta on tärkeää testata millainen näyte ja näytteen esikäsittely siihen sopii. Todettuamme reaktioiden peruskomponenttien toimivan, kokeilimme bakteeripesäkkeille erilaisia esikäsittelyjä nähdäksemme kuinka se vaikuttaa tuotteen muodostukseen ja siten tuloksiin. (LIITE 7.)

Testissä käytimme bakteeria suoraan maljalta ja suspensoituna LB-liemeen. Suspensoimme bakteeria myös NucleoBond Xtra-plasmidineristyskitissä olevaan RES-puskuriin, johon lisäsimme vielä LYS-puskuria. Positiivisena kontrollina toimi 1-plasmidi (70 ng) ja negatiivisena kontrollina pelkkä JM101-bakteeripesäke. Käytetty PCR-ohjelma oli sama kuin alkutestauksessa ja ajoimme tuotteet 1,2 % agarosigeelillä.

5.4 Kvantitatiivisen polymeraasiketjureaktion testaus

Tehtyämme alkuvalmistelut ja kokeiltuamme alukeyhdistelmien toimivuutta sekä erilaisia templaatteja perinteisellä PCR:llä, siirryimme testaamaan qPCR-ajoa ja suunnittelemaan varsinaista harjoitustyötä. Tämän osan käytännöntestauksen toteutimme OAMK:n tekniikan yksikössä, jossa qPCR-laite sijaitsee. qPCR-ajojen jälkeen visualisoimme näytteet koulullamme agarosigeelillä.

5.4.1 qPCR-menetelmään ja laitteeseen perehtyminen

Ensimmäisellä qPCR-ajolla tarkoituksenamme oli tutustua laitteen toimintaan sekä itse menetelmään käytännössä. Samalla testasimme fluoresoivan merkkiaineen toimivuutta sekä tarvittavien syklien lukumäärää ja erilaisten templaattien sopivuutta tulevaan harjoitustyöhön.

Testiä varten valmistimme kahta PCR-cocktailia, joiden avulla kokeilimme alukkeiden sopivaa määrää. Cocktail I:ssä alukkeita oli 5 µl/reaktio (500 pmol) ja Cocktail II:ssä 1 µl/reaktio (100 pmol). qPCR-ajon lisäksi ajoimme tuotteet myös agarosigeelielektroforeesilla nähdäksemme tuotteet konkreettisesti ja selkeyttääksemme saamiamme tuloksia. Reaktiutilavuus tasattiin steriilin veden avulla 25 µl:aan ja jokaisesta templaattista teimme kaksi rinnakkaista näytettä. Templaatteina toimivat aiemmin eristämämme 1-plasmidi (1:10-laimennos) ja 2-plasmidi. Näiden lisäksi käytimme plasmidin pBR322 sisältävien bakteerien yönylikasvustoa sekä samaa bakteeria pesäkkeenä suoraan maljalta ja LB-liemeen suspensoituna nähdäksemme millaista templaattia työssä kannattaa käyttää. Negatiivisena kontrollina toimivat JM101-bakteeri sekä steriili vesi.

Yhteensä reaktioita ensimmäisessä ajossa oli 22 kpl, eli yksitoista molemmilla cocktaileilla. Valmistimme kuitenkin cocktailit 12 reaktion mukaan, jotta meille jäi hieman pipetointivaraa (LIITE 8.). Alukkeiden lisäksi cocktaileihin laitettiin fluoresoivaa merkkiainetta, iQ SybrGreen supermixiä, jota tarvitaan 12,5 µl/reaktio.

Pipetoitavat tilavuudet ovat niin pieniä, että silmämääräisesti on hankala nähdä mihin kuoppaan on jo pipetoinut. Templaatteja ei myöskään pipetoinnin jälkeen erota toisistaan eli on tärkeää tietää mitä on pipetoinut mihinkin kuoppaan. Kuoppalevyssä pystyivät on merkitty numeroin ja vaakarivit kirjaimin. Käytimme merkintöjä hyödyksi ja selkeyden vuoksi teimme ennen pipetoinnin aloittamista pipetointikaavion. Rinnakkaiset näytteet pipetoimme vierekkäin.

Cocktailien ja templaattien pipetoimisen jälkeen kuoppalevyjen päälle laitetaan siihen tarkoitettu kalvo suojaksi, jotta vähäinen nestemäärä ei haihdu reaktioiden aikana. Kalvon kiinnityksessä käytimme apuna siihen tarkoitettua lastaa. Jokainen vaaka- ja pystyrivi on käytävä huolellisesti läpi. Kalvon kiinnittämisen jälkeen kuoppalevy voidaan siirtää qPCR-laitteeseen. Halutun ohjelman asettamiseen sekä laitteiston ja ohjelman käyttöön löytyy yksityiskohtaiset ohjeet qPCR-laitteen opaskansiosta. Ensimmäisellä ajokerralla tahdoimme lähinnä nähdä, syntyykö PCR-tuotetta, jonka muodostumista voidaan seurata laitteen piirtämien käyrien avulla. Kokeilimme 35 syklillä.

Käytetty PCR-ohjelma:

1. Hot start	
95.0 °C	10 min
2. Denaturaatio, annealing ja ekstensio (x35)	
95.0 °C	15 s
58.0 °C	30 s
72.0 °C	30 s
3. Säilytys	
4.0 °C	5 min

5.4.2 Alukeyhdistelmien testaus

Toisella kerralla testasimme RT PCR-1-alukkeen kanssa sekä RT PCR-2- että RT PCR-3-alukkeita. Jälkimmäisellä alukeyhdistelmällä saadaan kopioitua pidempää DNA-aluetta (552 bp), kuin ensimmäisellä alukeyhdistelmällä (302 bp), ja halusimme kokeilla myös sen soveltuvuutta harjoitustyöhön. Reaktioutilavuutena oli jälleen 25 µl (LIITE 9.).

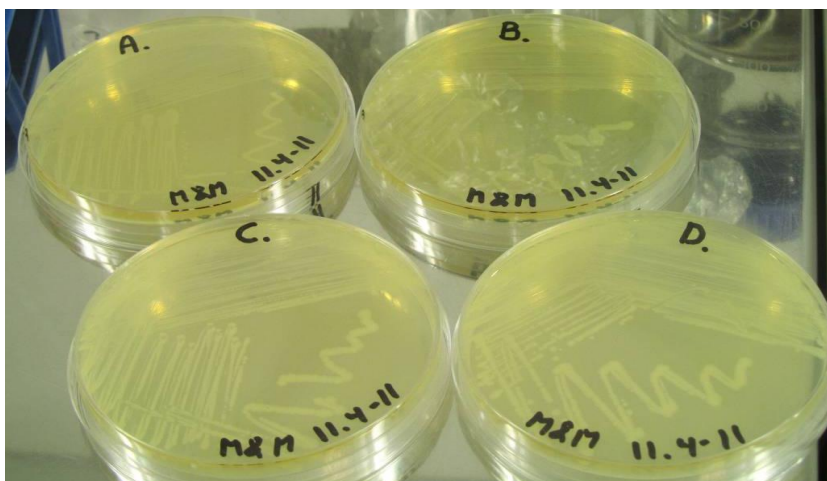
Templaatteina toimivat eristämämme 1-plasmidi (1:10-laimennos, 7 ng) ja 2-plasmidi (1:5-laimennos, 5 ng) sekä LB-liemeen suspensoitu pBR322-bakteeripesäke maljalta. Negatiivisena kontrollina käytimme JM101-bakteeria suspensoituna LB-liemeen. Kuten edelliselläkin kerralla, valmistimme kaksi erilaista PCR-cocktailia, joista ensimmäiselle käytimme JM101-bakteerin lisäksi negatiivisena kontrollina steriiliä vettä. Reaktioita oli yhteensä 18 kpl, joista 10 kpl teimme

Cocktail I:llä, eli valmistimme sitä 11 reaktion mukaan, ja 8 kpl Cocktail II:lla, eli valmistimme sitä 9 reaktion mukaan. Tällä kertaa päätimme lisätä steriilin veden suoraan cocktaileihin yksittäisen pipetoinnin sijaan.

Teimme jälleen pipetointikaavion ja pipetoimme rinnakkaiset näytteet kaavion mukaisesti vierekkäin. qPCR-ajossa käytimme samaa ohjelmaa kuin ensimmäisellä kerralla, mutta lisäsimme syklien lukumäärän 40:ään kappaleeseen. qPCR:n jälkeen ajoimme aiempaan tapaan näytteet 1,2 % agarosigeelille.

5.4.3 Harjoitustyön testaus

Harjoitustyössä opiskelijoiden tehtävänä on selvittää ovatko tutkittavat bakteerit geneettisesti muunneltuja, eli sisältävätkö ne plasmidin. Näin ollen viimeisessä testauksessa suhtauduimme tutkittaviin bakteereihin aivan kuin emme tietäisi onko niissä etsitty plasmidi vai ei. Otimme koekeseen mukaan neljä eri bakteerikasvustoa maljoilta A–D. (KUVIO 6.)



KUVIO 6. Harjoitustyön testimaljat.

Valmistimme 15x cocktailin, koska reaktioita tässä testissä on 14 eli 7 rinnakkaista. Alukkeina päädyimme käyttämään RT PCR-1 ja RT PCR-2 yhdistelmää, vaikka onnistumisen kannalta myös pidempää osiota kopioiva RT PCR-1 ja RT PCR-3 yhdistelmä toimii työssä oikein hyvin. Alukkeiden lisäksi cocktailiin mitattiin 12,5 µl/reaktio iQSybrGreen supermixiä sekä tasattiin tilavuus steriilillä vedellä pipetoinnin helpottamiseksi (LIITE 10.).

Jokaisesta maljasta suspensoimme bakteeripesäkkeen 50 µl:aan LB-lientä ja templaattina toimi 1 µl kutakin suspensiota. Negatiivisena kontrollina käytimme steriiliä vettä sekä JM101-bakteeria suspensoituna LB-liemeen. Valitsimme harjoitustyöhön bakteerisuspension, koska bakteeripesäkkeen laittaminen suoraan cocktailiin on mielestämme pienten tilavuuksien vuoksi hankalaa. Suspension etuna on myös se, että samaa näytettä voidaan käyttää molempiin rinnakkaisiin näytteisiin, jolloin templaatin määrä on kummassakin vakioidumpi kuin eri pesäkkeiltä otettuna. Positiivisena kontrollina käytimme aiemmin eristämäämme 1-plasmidin 1:10-laimennosta (7 ng).

Pipetoimme cocktailin ensin 96-kuoppalevyn kuoppien pohjalle, jonka jälkeen lisäsimme templaattit pipetointikaaviomme mukaisesti. Tuttuun tapaan laitoimme rinnakkaiset näytteet vierekkäin. Ensimmäiseksi pipetoimme positiivisen kontrollin ja viimeiseksi negatiiviset kontrollit. Käyttämämme qPCR-ohjelma oli samanlainen kuin toisessa testauksessa, eli syklejä oli 40 kappaletta.

Käytetty PCR-ohjelma:

1. Hot start		
	95.0 °C	10 min
2. Denaturaatio, annealing, ekstensio (x40)		
	95.0 °C	15 s
	58.0 °C	30 s
	72.0 °C	30 s
3. Säilytys		
	4.0 °C	5 min

6 TULOKSET

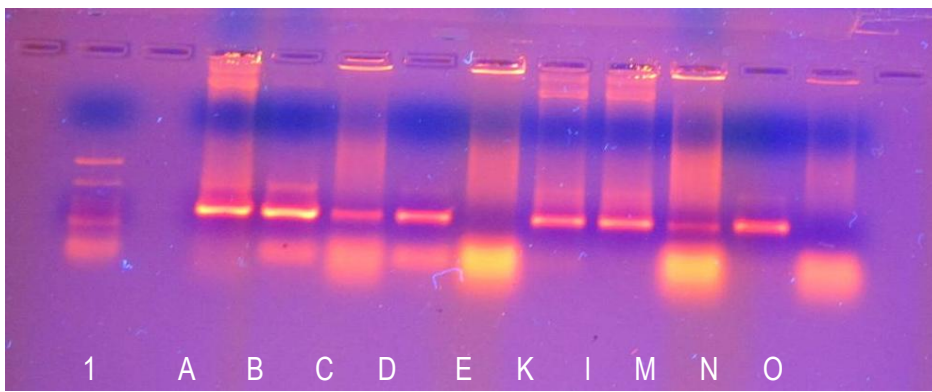
Saamiemme tulosten perusteella valitsimme mielestämme parhaat komponentit lopulliseen harjoitustyöhön. Suurin osa tekemistämme testauksista toimi, joten tarvittaessa voidaan käyttää myös erilaisia templaatteja sekä alukeyhdistelmiä ja alukepitoisuuksia (TAULUKKO 1.).

TAULUKKO 1. Templaattit

Putki	Aluke	Templaatti	Putki	Aluke	Templaatti
A	50 pmol (RT PCR-1 & -2)	2-plasmidi	K	100 pmol (RT PCR-1 & -2)	2-plasmidi
B	50 pmol (RT PCR-1 & -2)	1-plasmidi	L	100 pmol (RT PCR-1 & -2)	1-plasmidi
C	50 pmol (RT PCR-1 & -2)	Bakteeripesäke pBR322-maljalta	M	100 pmol (RT PCR-1 & -2)	Bakteeripesäke pBR322-maljalta
D	50 pmol (RT PCR-1 & -2)	Bakteerin yön yli- kasvustoa	N	100 pmol (RT PCR-1 & -2)	Bakteerin yön yli- kasvustoa
E	50 pmol (RT PCR-1 & -2)	Bakteeripesäke JM101-maljalta	O	100 pmol (RT PCR-1 & -2)	Bakteeripesäke JM101-maljalta
F	50 pmol (RT PCR-1 & -3)	2-plasmidi	P	100 pmol (RT PCR-1 & -3)	2-plasmidi
G	50 pmol (RT PCR-1 & -3)	1-plasmidi	Q	100 pmol (RT PCR-1 & -3)	1-plasmidi
H	50 pmol (RT PCR-1 & -3)	Bakteeripesäke pBR322-maljalta	R	100 pmol (RT PCR-1 & -3)	Bakteeripesäke pBR322-maljalta
I	50 pmol (RT PCR-1 & -3)	Bakteerin yönyli- kasvustoa	S	100 pmol (RT PCR-1 & -3)	Bakteerin yönyli- kasvustoa
J	50 pmol (RT PCR-1 & -3)	Bakteeripesäke JM101-maljalta	T	100 pmol (RT PCR-1 & -3)	Bakteeripesäke JM101-maljalta

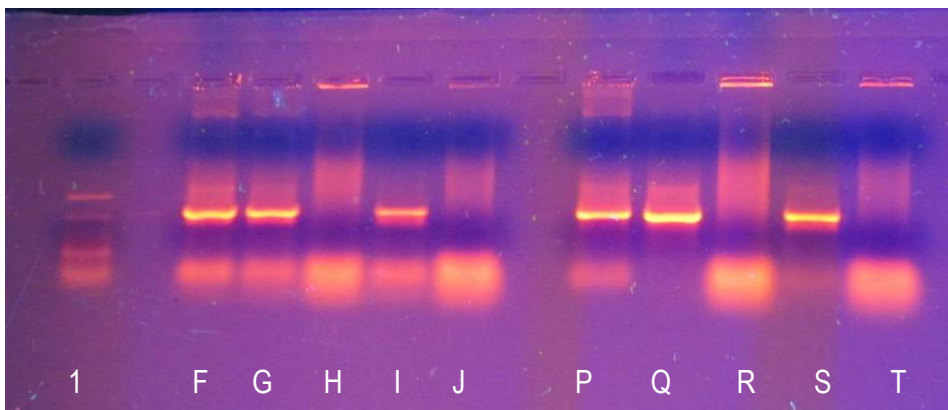
6.1 Alkutestauksen tulokset

Ensimmäisessä qPCR-ajossa tutustuimme qPCR-laitteiston toimintaan ja perehdyimme menetelmään. Menetelmä oli loppujen lopuksi melko yksinkertainen, ja saimme qPCR-tuotteita näkyviin myöhemmin koululla ajamallamme agarosigeelielektroforeesilla. Ensimmäinen ajo onnistui yli odotustemme, ja tuotetta oli muodostunut kaikilla eri templaateilla ja molemmilla testaamilamme alukeyhdistelmillä. Epäkäytännöllisimmäksi templaatiksi koimme tässä vaiheessa suoraan maljalta otetun bakteeripesäkkeen, koska käytettävät tilavuudet ovat hyvin pieniä ja bakteeria on vaikea suspensoida reaktioliuokseen ilman että nestettä menee hieman hukkaan.



KUVIO 7. Alukkeet 1 & 2. (LIITE 5.)

Suoraan otettu bakteeripesäke näkyi ensimmäisellä geelillä (näytteet C ja M) hieman himmeämmin kuin muut näytteet, ja toisella geelillä (näytteet H ja R) tuotetta ei ollut lainkaan. (KUVIO 7. ja KUVIO 8.) Tuotteen puuttuminen toisella geelillä voi johtua esimerkiksi siitä, ettemme ole saaneet bakteeria suspensoitua reaktioliuokseen.



KUVIO 8. Alukkeet 1 & 3. (LIITE 5.)

Eri alukeyhdistelmien tai alukepitoisuuksien välillä ei tässä testissä näytä olevan merkittäviä eroja, vaan syntyneet tuotteet näkyvät yhtä selkeästi. Kaikki testaamamme templaatit, lukuun ottamatta bakteeripesäkettä suoraan maljalta, vaikuttavat olevan erittäin käyttökelpoisia ja toimivan hyvin.

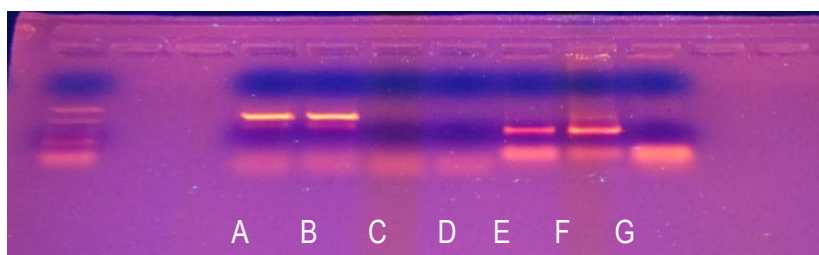
6.2 Näytteiden esikäsittelyjen vertailu

Templaatin testaus helpotti harjoitustyössä käytettävän näytteen valintaa. Koimme edelleen bakteeripesäkkeen siirrostamisen suoraan reaktioluokseen hankalaksi, mutta sen sijaan pesäkkeen suspensoiminen LB-liemeen ja sen lisääminen pipetillä reaktioluokseen tuntui helpolta. Suspension käyttö parantaa myös toistettavuutta esimerkiksi rinnakkaisissa ajoissa, koska templaatin pitoisuus pysyy samana. Samalla periaatteella toimi myös bakteerin RES- ja LYS-puskureihin suspensoiminen.

TAULUKKO 2. Näytteiden esikäsittely

Näyte A	1 µl LB-liemeen suspensoitua pBR322-bakteeria
Näyte B	2 µl LB-liemeen suspensoitua pBR322-bakteeria
Näyte C	1 µl RES- ja LYS-puskureihin suspensoitua pBR322-bakteeria
Näyte D	2 µl RES- ja LYS-puskureihin suspensoitua pBR322-bakteeria
Näyte E	Pieni määrä pBR322-bakteeria suoraan maljalta
Näyte F	1 µl 1-plasmidia (70 ng), posit.kontrolli
Näyte G	Pieni määrä JM101-bakteeria suoraan maljalta, negat. kontrolli

Esikäsittelyn testauksessa käytimme RT PCR-1- ja RT PCR-2-alukeyhdistelmää (1:10-laimennos, 50 pmol). Alukkeiden ja templaattien lisäksi jokaiseen PCR-putkeen lisättiin puskuria, nukleotideja, steriiliä vettä sekä entsyymiä. Käytetty reaktiivilavuus oli 50 µl.



KUVIO 9. Esikäsittelyn testauksen tulokset. (LIITE 7.)

Agaroosigeeliltä (KUVIO 9.) näimme, että selkein tulos oli LB-liemen suspensoidulla bakteeripesäkkeellä (A ja B), mutta RES- ja LYS-puskureihin suspensoiduista näytteistä tulos oli yllättäen negatiivinen (C ja D). Bakteripesäke suoraan maljalta (E) näkyy geelillä, mutta hieman himmeämmin kuin suspensio. Positiivinen kontrolli (F) ja negatiivinen kontrolli (G) toimivat, kuten piti-kin.

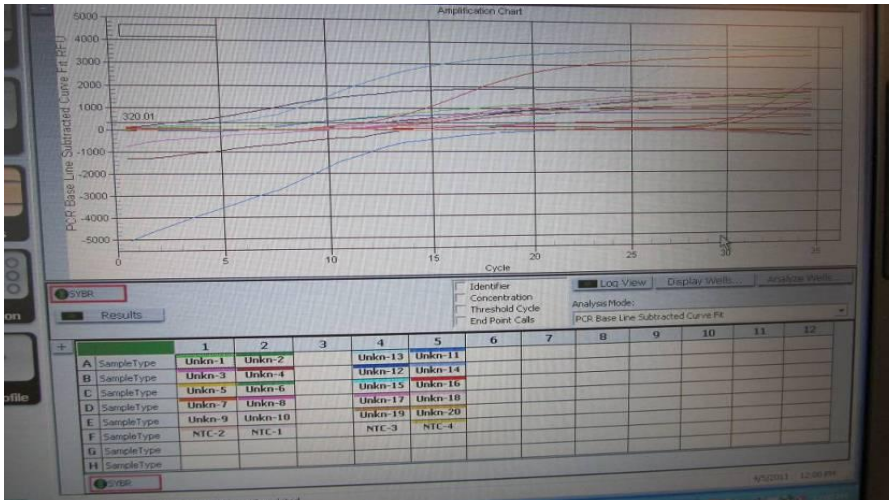
6.3 qPCR-testiajon tulokset

Ensimmäinen testaus kvantitatiivisella polymeerasiketjureaktio-menetelmällä vaikutti lupaavalta. Kokeilimme reaktioita erilaisilla alukepitoisuuksilla (alukeyhdistelmä RT PCR-1 ja 2) sekä eri templaateilla. Myös cocktailin määrä oli pienempi 100 pmol alukepitoisuuksilla.

TAULUKKO 3. qPCR-testiajon templaattit ja alukkeet.

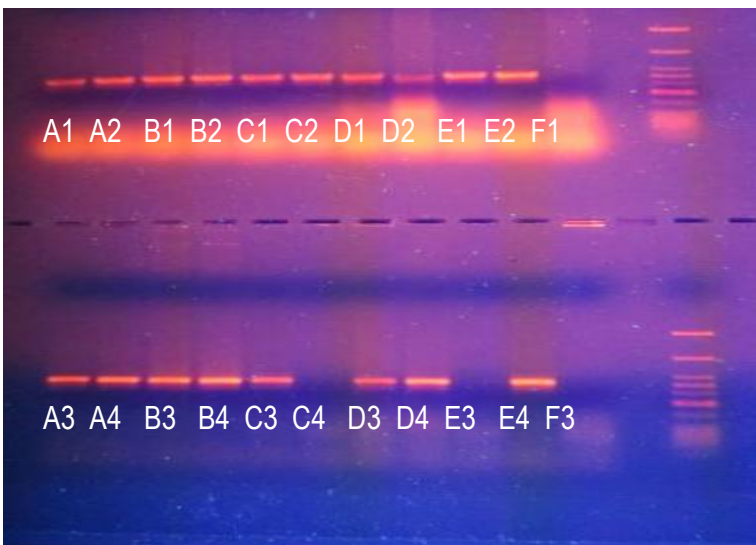
Näyte	Aluke	Templaatti	Näyte	Aluke	Templaatti
A1&A2	500 pmol	1-plasmidi (1:10-laimennos, 7 ng)	A3&A4	100 pmol	1-plasmidi (1:10-laimennos, 7 ng)
B1&B2	500 pmol	2-plasmidi (25 ng)	B3&B4	100 pmol	2-plasmidi (25 ng)
C1&C2	500 pmol	pBR322-bakteeri (yön yli kasvusto)	C3&C4	100 pmol	pBR322-bakteeri (yön yli kasvusto)
D1&D2	500 pmol	pBR322-bakteeripesäke	D3&D4	100 pmol	pBR322-bakteeripesäke
E1&E2	500 pmol	pBR322-bakteeri (LB-liemi suspensio)	E3&E4	100 pmol	pBR322-bakteeri (LB-liemi suspensio)
F1	500 pmol	JM101-bakteeripesäke	F3	100 pmol	JM101-bakteeripesäke
F2	-	steriili vesi (nollanäyte)	F4	-	steriili vesi (nollanäyte)

PCR-tuotteita muodostui ja saimme kuvaajia (KUVIO 10.), mikä olikin tarkoituksemme näin ensimmäisellä kerralla. Tulosten perusteella näyttää, että alukkeita riittää 1 µl kutakin/reaktio, joten tulemme käyttämään sitä jatkossa. Osa kuvaajista alkoi nousta melko myöhäisessä vaiheessa, ja sen vuoksi syklien lukumäärä nostettiin 40 kappaleeseen.



KUVIO 10. qPCR-kuvaaja.

Kuvaaja tulkittaessa tulee muistaa, että fluoresenssi on suoraan verrannollinen syntyneen tuotteen määrään. Kuvaajan kohtaa, jossa signaali alkaa nousta eksponentiaalisesti, kutsutaan Ct- arvoksi. Tällöin monistuminen on tehokkainta.



KUVIO 11. qPCR-testiajon jälkeinen agarosigeelielektroforeesi. (LIITE 9.)

Ajoimme lisäksi saamamme tuotteet agarosigeelielektroforeesilla. Käytimme tähän 1,2 % geeliä. Tuotteita oli muodostunut niissä kohdissa, missä pitikin. Samoin negatiiviset kontrollit näkyivät negatiivisina (KUVIO 11.), eli myös siinä mielessä testiajo oli onnistunut.

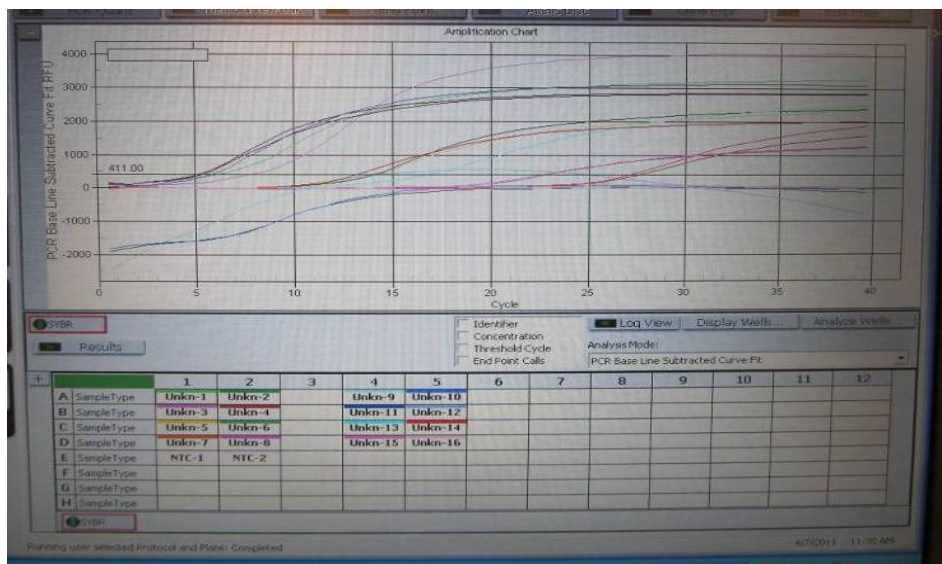
6.4 Alukeyhdistelmien testauksen tulokset

Aiempien testiemme perusteella alukkeita riittää 1 µl/reaktio (100 pmol), joten käytimme sitä molemmissa alukeyhdistelmissä. Myös templaattit valitsimme aiempien testiemme perusteella.

TAULUKKO 4. Alukeyhdistelmien testaus.

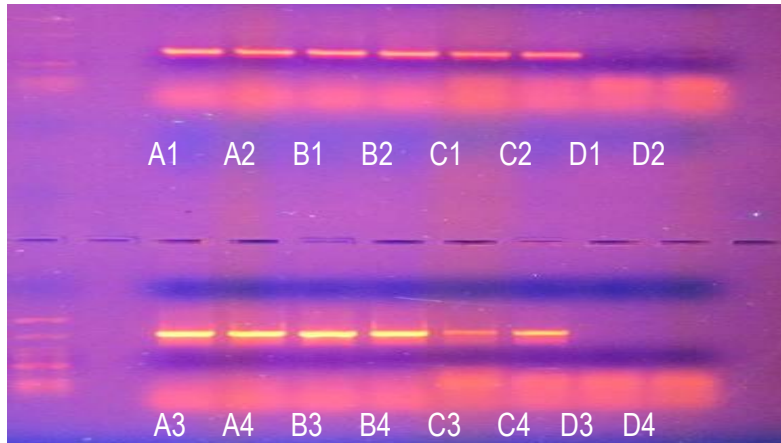
Näyte	Aluke	Templaatti
A1&A2	RT PCR-1 & RT PCR-2 (100 pmol)	2-plasmidi (1:5-laimennos, 5 ng)
B1&B2	RT PCR-1 & RT PCR-2 (100 pmol)	1-plasmidi (1:10-laimennos, 7 ng)
C1&C2	RT PCR-1 & RT PCR-2 (100 pmol)	pBR322-bakteeri (LB-liemi suspensio)
D1&D2	RT PCR-1 & RT PCR-2 (100 pmol)	JM101-bakteeri (LB-liemi suspensio)
E1&E2	-	steriili vesi (nollanäyte)
A3&A4	RT PCR-1 & RT PCR-3 (100 pmol)	2-plasmidi (1:5-laimennos, 5 ng)
B3&B4	RT PCR-1 & RT PCR-3 (100 pmol)	1-plasmidi (1:10-laimennos, 7 ng)
C3&C4	RT PCR-1 & RT PCR-3 (100 pmol)	pBR322-bakteeri (LB-liemi suspensio)
D3&D4	RT PCR-1 & RT PCR-3 (100 pmol)	JM101-bakteeri (LB-liemi suspensio)

Molemmat alukeyhdistelmät vaikuttivat toimivan hyvin, ja saimme kaikista positiivisista näytteistä nousevia kuvaajia (KUVIO 12). 40 sykliä vaikuttaisi olevan hyvä määrä, joten käytämme sitä jatkossakin.



KUVIO 12. Alukeyhdistelmien testauksen qPCR-kuvaajia.

Ajoimme jälleen näytteet 1,2 % agarosigeelille. Visualisoidessamme tuloksia näimme, että tuotteita oli juuri niissä kohdissa, missä kuuluikin ja negatiiviset kontrollit olivat negatiivisia myös geeliosassa. Eri alukeyhdistelmien välillä ei myöskään agarosigeelielektroforeesissa ollut merkittäviä eroja (KUVIO 13.).



KUVIO 13. Agarosigeelielektroforeesi

Tämän koeajon perusteella voimme todeta, että molemmat alukeyhdistelmät toimivat. Harjoitustyössä voi siis tarpeen mukaan käyttää kumpaa alukeyhdistelmää tahansa.

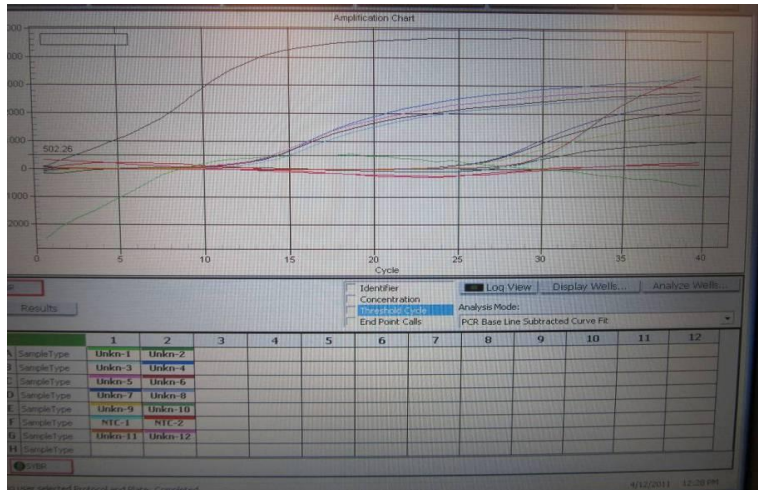
6.5 Harjoitustyön testauksen tulokset

Harjoitustyön testauksessa käytimme näytteinä bakteerikasvustoa neljältä eri maljalta. Lisäksi reaktioissa oli mukana positiivinen kontrolli ja kaksi negatiivista kontrollia.

TAULUKKO 5. Harjoitustyön testaus.

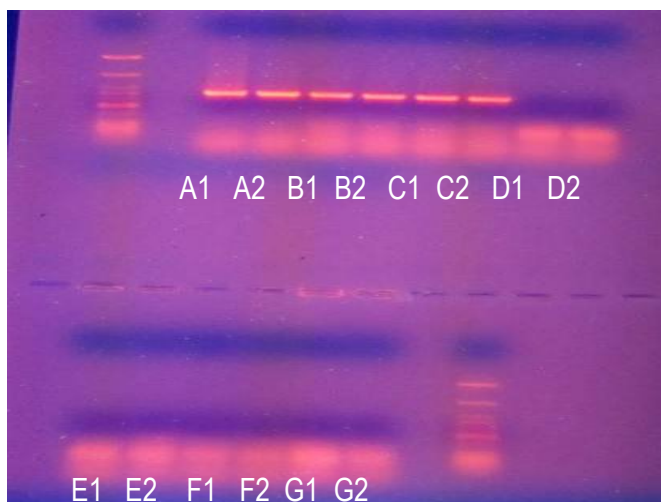
Näyte	Templaatti
A1&A2	1-plasmidi (1:10-laimennos, 7 ng)
B1&B2	Bakteerisuspensio A
C1&C2	Bakteerisuspensio B
D1&D2	Bakteerisuspensio C
E1&E2	Bakteerisuspensio D
F1&F2	Bakteerisuspensio JM101
G1&G2	steriili vesi

Harjoitustyö onnistui, sillä kuvaajat nousivat niistä näytteistä, mistä oli tarkoitus ja negatiivisten näytteiden kuvaajat puolestaan pysyivät tasaisina. Aivan qPCR-ajon loppuvaiheessa nousevilla kuvaajilla ei ole merkitystä, vaan ne voidaan todeta negatiivisiksi. (KUVIO 14.)



KUVIO 14. Harjoitustyön testauksen qPCR-kuvaaja.

Tulosten varmistamiseksi ajoimme näytteet myös agarosigeelielektroforeesilla (KUVIO 15.). Odotusten mukaisesti positiivisissa kontrollissa on plasmidi, mutta negatiivisissa kontrolleissa ei.



KUVIO 15. Harjoitustyön testauksen agarosigeelielektroforeesi.

Saamiemme tulosten perusteella voimme vahvistaa, että A- ja B-maljoilla kasvavat bakteerit sisältävät plasmidin, mutta C- ja D-maljoilla kasvavat eivät. Näin pitikin olla, eli harjoitustyön testaaminen onnistui hyvin.

7 OPISKELUMATERIAALIN TUOTTAMINEN

Laatu on kokonaisuus, joka muodostuu ominaisuuksista. Tähän kokonaisuuteen perustuu tuotteen kyky täyttää sille asetetut vaatimukset sekä siihen kohdistuvat odotukset. Laatua konkreettisesti kuvaavat tavoitteet sekä laatukriteerit. (Holma ym., 2001, 8, 26.)

Asetimme tuotteellemme neljä keskeistä kriteeriä: opiskelijälähtöisyys, selkeys, havainnollisuus sekä aktiivisuus, joiden toteuttamiseen pohdimme erilaisia keinoja. Kiinnitimme huomiota erityisesti aiheen rajaukseen, termien avaamiseen, kappalejakoisiin sekä asioiden yhteyteen ja järjestykseen. Havainnollisuutta tuovat kaaviot sekä kuvat. Mielestämme on tärkeää, että materiaali myös aktivoi lukijaa, joten liitimme mukaan myös lyhyen kertaosion, joka sisältää kysymyksiä, pohdintaa sekä keskeisimmät asiat.

Oppimateriaalin laatu (KUVIO 16.) koostuu myös tiedon ajankohtaisuudesta ja luotettavuudesta. Projektimme teoreettisen sisällön laadun arvioinnissa olivat apuna opinnäytetyötämme ohjaavat opettajat, opponentit sekä muut opiskelijat (vertaisarvioijat). Tekstissä lauseiden tulee olla sopivan pituisia eikä se saa sisältää liikaa lukijalle vieraita sanoja, jotta lukemaansa tietoa on helpompi sisäistää. Tekstin selkeys perustuu kappaleiden oikeaan leveyteen ja riviväleihin. Myös oikea kirjasintyyli auttaa selkeyttämään tekstiä. Tärkeimmät asiat olisi hyvä laittaa lyhyesti varsinaisen tekstin vierelle, jotta niiden kertaaminen onnistuu helposti ja nopeasti. Tärkeää on myös kuvitus, joka havainnollistaa tekstissä kerrottuja asioita.



KUVIO 16. Oppimateriaalin laatu

Opiskelumateriaalin tulisi olla myös ulkoisesti mielenkiintoa herättävä, jonka vuoksi kiinnitimme huomiota tuotteen visuaaliseen suunnitteluun. Pääväreiksi otimme oranssin ja sinisen OAMK:n logon värien mukaisesti. Lisäksi käytimme niiden eri sävyjä tuomaan ulkoasuun moniulotteisuutta. Onnistuneiden värivalintojen avulla voidaan myös tukea tekstien sisältöä (Luukkonen, M., 2004, 41).

Opiskelumateriaalin valmistamisessa täytyi ottaa huomioon useita eri seikkoja, esimerkiksi opiskelijoiden molekyylibiologiset taustatiedot ja -taidot. Molekyylibiologian vaihtoehtoiset opinnot, joissa syvennyttään muun muassa erilaisiin molekyylibiologisiin menetelmiin, sijoittuvat opintosuunnitelmissa opintojen loppuvaiheeseen. Voidaan siis olettaa, että opiskelijoilla on perustiedot hallinnassa. Sen vuoksi päätimme opiskelumateriaalissamme paneutua tarkemmin kvantitatiiviseen polymeerasiketjureaktioon ja sen monimuotoisiin käyttösovelluksiin. Tavallisesta PCR:sta kertosimme perusasioita, jotta kvantitatiivisen polymeerasiketjureaktion periaatteen ymmärtäminen olisi helpompaa.

Suurimpana haasteena oli saada varsinaisesta tuotteesta laadukas ja mielenkiintoa herättävä, jotta sitä todella luettaisiin sekä käytettäisiin hyödyksi opiskelussa. Lopullisen version teimme sähköiseen muotoon, jolloin se on parhaiten saatavilla ja helposti luettavissa. Materiaali voidaan haluttaessa myös tulostaa ja ottaa mukaan tueksi harjoitustyötä suoritettaessa. Sähköisessä muodossa oleva tuote on myös ekologisempi kuin paperiversiona oleva ja sitä on helpompi pitää ajan tasalla, mikä on tärkeää, koska molekyylibiologian alalta julkaistaan jatkuvasti uutta tietoa ja tutkimuksia.

8 POHDINTA

Harjoitustyön testaus ja sitä edeltäneet esivalmistelut olivat tärkeitä varsinaisen harjoitustyön onnistumiseksi. Oman haasteensa projektiimme toi se, ettei meillä ollut etukäteistietoa PCR:ssä käytettävien alukkeiden sopivuudesta eikä niiden monistamien tuotteiden koosta. Vaikka alukkeet oli tilattu harjoitustyötä varten, ei niitä oltu vielä testattu. Optimaalinen koko tuotteelle qPCR:ssä on alle 100 bp eikä yli 500 bp:n tuotetta tulisi käyttää (Principles of qPCR, 29–30). Työssämme käytetyt tuotteet olivat siis kooltaan suhteellisen suuria ja toisen alukeyhdistelmän (RT PCR-1 ja -3) tuote ylitti suositellun 500 bp:n rajan. Myös PCR:n ja qPCR:n toiminta käytettäessä bakteerita suoraan ilman DNA:n eristämistä oli epävarmaa, eli käytännön osuudessa oli useita asioita testattavana. Saamamme tulokset olivat kuitenkin hyviä ja käytännössä lähes kaikki kokeilemamme vaihtoehdot toimisivat harjoitustyössä. Mielenkiintoista oli etenkin se, että tuotteiden suuri koko ei häirinnyt analyysia ja että analyysi onnistui myös pienemmällä cocktailmäärällä.

PCR-testiajojen perusteella voimme siis sanoa, että molemmat alukeyhdistelmät toimivat. Myös bakteerin käyttö työssä ilman erillistä DNA:n eristämistä toimii hyvin. Valitsimme harjoitustyöhön mielestämme parhaat komponentit, mutta myös muut kokeilemamme vaihtoehdot sopisivat työhön. Eniten templaateissa hankaluutta tuotti bakteeripesäkkeen käyttäminen suoraan maljalta, koska bakteerin suspensoiminen pieneen reaktiivilavuuteen oli vaikeaa. Kuitenkin myös sen käyttö harjoitustyössä on tarvittaessa mahdollista.

Työmme aktiiviseen käyttöön liittyy keskeisesti se, järjestetäänkö molekyylibiologian syventävää opintojaksoa vai ei, mutta siihen asiaan emme itse voi vaikuttaa. Opiskelijoiden kiinnostusta molekyylibiologiaan pitäisi saada lisättyä. Tuottamamme materiaalin avulla yritimme omalta osaltamme vastata tähän haasteeseen, mutta varsinainen tuotteen esilletuominen ja sen käytöstä huolehtiminen jäävät opettajien vastuulle. Harjoitustöiden mielekkyyden avulla opiskelijoiden kiinnostusta molekyylibiologiaan voisi lisätä, mutta toisaalta molekyylibiologia on ala, joka vetää puoleensa vain tietynlaisesta työskentelystä kiinnostuneita ihmisiä. Molekyylibiologisten menetelmien parissa työskentely vaatii tarkkuutta ja huolellisuutta sekä ennen kaikkea sinnikkyyttä ja pitkäjänteisyyttä, sekä teoretietämystä ja sen soveltamista käytännön työhön.

Opinnäytetyömme oli parityö. Työnjakomme onnistui hyvin ja työskentelimme tasavertaisena tiiminä. Olimme molemmat yhtä lailla vastuussa työn etenemisestä sekä saaduista lopputuloksista ja varsinaisista tuotteista. Projektista oli erittäin paljon hyötyä ammattitaitomme kehittymiselle, koska saimme perehtyä molekyylibiologiaan ja erityisesti kvantitatiiviseen polymeerasiketjureaktioon ja sen erilaisiin käyttösovelluksiin. Lisäksi opimme paljon projektityöskentelystä sekä oppimateriaalin tuottamisesta.

Yksi projektimme suurimmista haasteista oli varmistaa, että itseopiskelumateriaali vastaa opiskelijoiden tarpeeseen. Tieto myös vanhenee melko nopeasti alan jatkuvan kehittymisen ja uusien innovaatioiden syntymisen vuoksi. Olemme kuitenkin seuranneet aktiivisesti työhöme liittyviä uusia julkaisuja ja tutkimuksia ja siten varmistaneet tiedon tuoreuden ja luotettavuuden. Työmme tilaajana oli Oulun seudun ammattikorkeakoulun sosiaali- ja terveysalan yksikkö, ja olimme koko projektin ajan sitoutuneita tuottamaan sille laadukkaan tuotteen. Lisävastuuta projektiimme toi yhteistyö OAMK:n tekniikan yksikön kanssa, koska toimimme toisen koulun tiloissa ja käytimme heidän välineitään. Mielestämme onnistuimme toimimaan kunnioittavasti ja siivosimme aina huolellisesti jälkemme työskentelyn jälkeen. Olemme myös tyytyväisiä lopulliseen tuotepakettiimme ja uskomme sen vastaavan tilaajan toiveita.

LÄHTEET

Bio-Rad. 2006. Real-Time PCR Applications Guide

Löytyy pdf-tiedostona: www.gene-quantification.de/real-time-pcr-guide-bio-rad.pdf

(Hakupäivä 4.1.2011)

Eurogentec. qPCR guide

Löytyy pdf-tiedostona: <http://www.eurogentec.com/uploads/qPCR-guide.pdf>

(Hakupäivä 3.1.2011)

Finnzymes. 2009. Principles of qPCR

Heid, C., Stevens, J., Livak, K., Williams P. 1996. Real-Time Quantitative PCR

Löytyy pdf-tiedostona: <http://genome.cshlp.org/content/6/10/986.full.pdf+html>

(Hakupäivä 6.1.2011)

Holma, T., Outinen, M., Idänpään-Heikkilä, U., Sainio, S. 2001. Kirkasta ja uudista laadunhallintaa - kehitä laatutalo. Suomen Kuntaliiton julkaisumyynti

Karlen, Y., McNair, A., Perseguers, S., Mazza, C., Mermod, N. 2007. Statistical significance of quantitative PCR

Löytyy sähköisessä muodossa: <http://www.biomedcentral.com/1471-2105/8/131>

(Hakupäivä 6.1.2011)

Noreault-Conti, T. & Buel, E. 2007. The Use of Real-Time PCR for Forensic Stain Identification

Löytyy pdf-tiedostona: http://www.promega.com/profiles/1001/ProfilesInDNA_1001_03.pdf

(Hakupäivä 9.1.2011)

Opetus- ja kulttuuriministeriö. www.minedu.fi/OPM/Koulutus/ammattikorkeakoulutus/?lang=fi

(Hakupäivä 17.10.2011)

Oulun seudun ammattikorkeakoulu, bioanalytiikan koulutusohjelman esittely.
<http://www.oamk.fi/sote/hakijalle/koulutusohjelmat/index.php?sivu=1> (Hakupäivä 17.10.2011)

Pabinger, S., Thallinger, G., Snajder, R., Eichhorn, H., Rader, R., Trajanoski, Z. 2009. QPCR: Application for real-time PCR data management and analysis.
Löytyy sähköisessä muodossa: <http://www.biomedcentral.com/1471-2105/10/268>
(Hakupäivä 6.1.2011)

Peda-tiimi. 2011. Oamkin opetuksen tueksi.

Ramakers, C., Ruijter, J., Deprez, R., Moorman, A. 2002. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data
Löytyy pdf-tiedostona: <http://www.gene-quantification.de/ramakers-2003.pdf>
(Hakupäivä 7.1.2011)

Ruuska, Kai. Pidä projekti hallinnassa - Suunnittelu, menetelmät, vuorovaikutus. 2007. Talentum.

Stratagene. 2004. Introduction to Quantitative PCR, Methods and Application Guide
Löytyy pdf-tiedostona:
http://sr.burnham.org/sr/homepage/microarray/PDFs_Excel/StrataQPCR_Guide.pdf
(Hakupäivä 5.1.2011)

Suominen, I., Pärssinen, R., Haajanen, K. & Pelkonen, J. Geenitekniikka. 2010. Turun ammattikorkeakoulu.
Internetsivut: <http://julkaisut.turkuamk.fi/geenitekniikka/> (Haettu 17.10.2011)

Zhang T. & Fang, H. 2006. Applications of real-time polymerase chain reaction for quantification of micro-organisms in environmental samples
Löytyy pdf-tiedostona: <http://web.nchu.edu.tw/pweb/users/shucc/lesson/2663.pdf>
(Hakupäivä 5.1.2011)

LIITTEET

LIITE 1. Käsitelista

LIITE 2. Alkuvalmistelujen ohjeet

LIITE 3. Plasmidin eristyksen työvaiheet

LIITE 4. DNA-pitoisuuden määrittäminen

LIITE 5. Alukkeiden ja templaattien testauksen pipetointiohjeet

LIITE 6. Agarosigeelielektroforeesi

LIITE 7. Näytteiden esikäsittely

LIITE 8. qPCR-testauksen cocktailien valmistus

LIITE 9. Alukeyhdistelmien testauksen cocktailit

LIITE 10. Harjoitustyön testauksen cocktailin valmistus

LIITE 1.

KÄSITELISTA

ALLEELI	Geenin vaihtoehdot, jotka sijaitsevat samassa lokuksessa eli paikassa.
ALUKE	PCR-reaktiossa käytettävä synteettinen yksijuosteinen DNA-jakso, joka tunnistaa monistettavan DNA-alueen pään.
AMPLIKONI	PCR-reaktiossa monistettava alukkeiden määrittelemä DNA-jakso
ANNEALING	Alukkeiden liittymisvaihe.
DNA	Deoksiribonukleiinihappo, solun perinnöllinen aines
DNA-POLYMERAASI	Entsyymi, joka rakentaa nukleotideista uutta juostetta.
DNA-SEKVENSSI	DNA:n emäsjärjestys
dsDNA	Kaksijuosteinen DNA
FLUORESENSSI	Ilmiö, jossa atomi absorboi fotonin ja virittyy. Viritystilän purkautuessa atomi emittoi matala-energisen fotonin, joka havaitaan fluoresenssina.
GENOTYYPPI	Perimätyyppi, vaikuttaa ratkaisevasti ilmiösuun eli fenotyyppiin
KOETIN	Leimattu yksijuosteinen DNA-jakso. Kiinnittyy kohdesekvenssiinsä PCR-reaktion annealing-vaiheessa

mRNA	Lähettilä-RNA
OLIGONUKLEOTIDI	Muutamman nukleotidin mittainen nukleiinihappo eli usein lyhyt RNA- tai DNA-juoste
PATOGEENI	Taudinaiheuttaja
qPCR	Reaaliaikainen kvantitatiivinen PCR, jossa tuotteen muodostusta voidaan seurata reaaliajassa
RNA	Ribonukleiinihappo, käytetään mm. tiedon siirtoon solun sisällä

LIITE 2. Alkuvalmistelujen ohjeet

Ampisilliiniliuos

Ampisilliinikantaliuoksen pitoisuus oli 5 mg/ml. Valmistimme sitä 10 ml eli punnitsimme 50 mg ampisilliinia ja tasasimme tilavuuden 10 ml:aan steriilillä vedellä. Ampisilliiniliuos steriilisuodatettiin ruiskulla suodattimen läpi steriiliin 15 ml falcon-putkeen.

LB- ja LB-ampisilliinimaljat

Valmistimme 500 ml LB-lientä seuraavan ohjeen mukaan:

- 1 % Tryptoni (5 g)
- 0,5 % hiivauute (2,5 g)
- 1 % NaCl (5 g)
- tasataan tilavuus 500 ml:aan steriilillä vedellä

LB-liemi jaettiin kahteen autoklaavipulloon (250 ml/pullo). Molempiin pulloihin lisättiin Bactoagar-pitoisuuteen 1,4 % eli 3,5 g/pullo. Autoklavoitavien pullojen korkit suljettiin löysästi ja päälle laitettiin foliopala sekä autoklavointiteippi. Autoklavoinnin jälkeen korkit kiristettiin kiinni ja pullo säilytettiin huoneenlämmössä.

Autoklavoinnin jälkeen toiseen LB-bactoagar-pulloon lisättiin 2,5 ml ampisilliiniliuosta (pitoisuus 5 mg/ml). Tästä pullosta valettiin 10 ampisilliinimaljaa. Toisesta LB-bactoagar-pullostaa valettiin 10 LB-maljaa. Ampisilliinimaljojen kansiin reunaan laitettiin kaksi mustaa viivaa, jotta ne erottuvat tavallisista LB-maljoista.

Valettujen maljojen annettiin jäähmettyä kannet hieman raollaan, jonka jälkeen ne säilöttiin kylmähuoneessa muovipussissa. Ennen käyttöä kylmässä olleet maljat laitettiin kuivumaan kansi auki lämpökaappiin (+37 °C) noin kymmeneksi minuutiksi.

LIITE 3. Plasmidin eristyksen työvaiheet.

Plasmidin eristys NucleoBond Xtra-kitillä

Työvaiheet:

1. Kahteen erlenmeyeriin laitettiin 100 ml LB-mediumia, johon lisättiin 1,0 ml ampisilliinia (5 mg/ml). pBR322-plasmidia sisältäviä *E.coli*-bakteereja siirrostettiin LB-AMP-liuokseen.
2. Bakteereja kasvatettiin yön yli ravistuksessa 37 °C:ssa.
3. 200 ml yön yli kasvustoa sentrifugoitiin 50 ml:n erissä ~3000 rpm 10 min RT. Sentrifugoiduista näytteistä kaadettiin kaikki supernatantti pois, jolloin pohjalle jäi bakteerisolunappi.
4. Solunappi suspensoitiin liejumaiseksi lisäämällä jokaiseen näytteeseen 6 ml buffer RES + RNase A ja pipetoimalla soluja ylös - alas.
5. Lisättiin näytteisiin 6 ml buffer LYS ja sekoitettiin varoen kääntelemällä putkia viisi kertaa. Ei vortexoida. Seoksia inkuboitiin huoneenlämmössä noin 5 min.
6. Kahteen pylvääseen asetettiin filterit ja molempia kostutettiin buffer EQU:lla (25 ml) yläreunasta kiertäen koko suodatin ympäri.
7. Jokaiseen näytteeseen lisättiin 6 ml buffer NEU:ta ja sekoitettiin heti varoen kääntelemällä putkia 10–15 kertaa. Ei vortexoida.
8. Näytteitä käännettiin vielä kolme kertaa, jonka jälkeen molempiin pylväs-filterikomplekseihin kaadettiin kahden putken sisältö ja annettiin nesteen valua painovoiman vaikutuksesta dekanterilasiin.

9. Molemmat suodatin-pylväs-kompleksit huuhdeltiin samoin kuin ensimmäisellä keralla käyttäen 15 ml buffer EQU:ta.
10. Huuhtelun jälkeen filtrit poistettiin ja laitettiin roskeen.
11. Pylväät pestiin 25 ml buffer WASH:a
12. Plasmidi-DNA eluoiitiin lisäämällä pylväisiin 15 ml buffer ELU:ta ja molempien pylväiden tuotteet kerättiin talteen omaan steriiliin sentrifuugiputkeensa (Näyte 1 ja Näyte 2)
13. Kumpaankin näytteeseen pipetoitiin 10,5 ml huoneenlämpöistä isopropanolia, vortexoitiin ja annettiin seisoa huoneenlämmössä 2 min. Tämän jälkeen näytteet sentrifugoitiin 15 000 x g 30min ja poistettiin varovasti supernatantti kaatamalla.
14. DNA-nappeihin lisättiin 5 ml huoneenlämpöistä 70 % etanolia ja näytteet jaettiin eppendorf-putkiin. Kaikki näytteet sentrifugoitiin mikrofuugilla ja etanoli poistettiin kokonaan näytteiden päältä. Putkien pohjalla olevat DNA-sakat kuivattiin korkit auki huoneenlämmössä sekä speed vac-kuivurissa.
15. Lopuksi jokaiseen näytteeseen lisättiin 10 µl steriiliä vettä ennen pakastamista. Näytteiden pitoisuudet määritimme spektrofotometrisesti ennen varsinaisen alkutestauksen suorittamista.

LIITE 4. DNA-pitoisuuden määrittäminen

Näytteiden DNA-pitoisuudet määritettiin spektrofotometrisesti. Molemmista näytteistä tehtiin 500 µl 1:100-liuosta, joista absorbanssi mitattiin spektrofotometrillä. Näytteiden pitoisuudet pystyttiin sen jälkeen laskemaan kaavan mukaan. Mittauksessa käytimme aallonpituutta 260 nm.

1-plasmidi

Absorbanssi 0,014. Kaavan mukaan $A_{260} 1=50 \mu\text{g/ml}$

Eli

$$\begin{aligned} 1/50\mu\text{g/ml} &= 0,014/x \\ x &= 0,014 \cdot 50\mu\text{g/ml} \\ &= 0,7 \mu\text{g/ml} \quad | \cdot 100 \\ &= 70 \mu\text{g/ml} \quad | \cdot 1000 \\ &= 0,07 \mu\text{g}/\mu\text{l} \quad (70\text{ng}) \end{aligned}$$

2-plasmidi:

Absorbanssi 0,005. Kaavan mukaan $A_{260} 1=50\mu\text{g/ml}$

Eli

$$\begin{aligned} 1/50\mu\text{g/ml} &= 0,005/x \\ x &= 0,005 \cdot 50\mu\text{g/ml} \\ &= 25\mu\text{g/ml} \quad | \cdot 100 \\ &= 0,025\mu\text{g}/\mu\text{l} \quad (25\text{ng}) \end{aligned}$$

LIITE 5. Alukkeiden ja templaattien testauksen pipetointiohjeet

Pipetointiohjeet

I) Alukkeita 50 pmol

Viiteen eppendorf-putkeen (A–E) pipetoitiin:

5 µl	RT PCR-1 (1:10-laimennos)
5 µl	RT PCR-2 (1:10-laimennos)
5 µl	10X puskuria
1 µl	dNTP

Lisättiin vielä jokaiseen putkeen templaattia seuraavasti:

A.	2 µl 2-plasmidi + 31,5 µl H ₂ O
B.	1 µl 1-plasmidi + 32,5 µl H ₂ O
C.	Bakteeripesäke pBR322-maljalta + 33,5 µl H ₂ O
D.	1 µl yön yli kasvustoa + 32,5 µl H ₂ O
E.	Bakteeripesäke JM101-maljalta (negatiivinen kontrolli)

Seuraavaan viiteen eppendorf-putkeen (K–O) pipetoitiin:

5 µl	RT PCR-1 (1:10-laimennos)
5 µl	RT PCR-3 (1:10-laimennos)
5 µl	10X puskuria
1 µl	dNTP

Templaatit samoin kuin aiemmin:

K.	2 µl 2-plasmidi + 31,5 µl H ₂ O
L.	1 µl 1-plasmidi + 32,5 µl H ₂ O
M.	Bakteeripesäke pBR322-maljalta + 33,5 µl H ₂ O
N.	1 µl yön yli kasvustoa + 32,5 µl H ₂ O
O.	Bakteeripesäke JM101-maljalta (negatiivinen kontrolli)

II) Alukkeita 100 pmol

Viiteen eppendorf-putkeen (F-J):

16 µl	RT-PCR 1 (1:100-laimennos)
16 µl	RT-PCR 2 (1:100-laimennos)
5 µl	10X puskuria
1 µl	dNTP

Templaatit:

F.	2 µl 2-plasmidi + 9,5 µl H ₂ O
G.	1 µl 1-plasmidi + 10,5 µl H ₂ O
H.	Bakteeripesäke pBR322-maljalta + 11,5 µl H ₂ O
I.	1 µl yön yli kasvustoa + 10,5 µl H ₂ O
J.	Bakteeripesäke JM101-maljalta + 11,5 µl H ₂ O (negatiivinen kontrolli)

Seuraavat viisi eppendorf-putkea (P-T):

16 µl	RT PCR-1 (1:100-laimennos)
16 µl	RT PCR-3 (1:100-laimennos)
5 µl	10X puskuria
1 µl	dNTP

Templaatit samoin kuin aiemmin:

P.	2 µl 2-plasmidi + 9,5 µl H ₂ O
Q.	1 µl 1-plasmidi + 10,5 µl H ₂ O
R.	Bakteeripesäke pBR322-maljalta + 11,5 µl H ₂ O
S.	1 µl yön yli kasvustoa + 10,5 µl H ₂ O
T.	Bakteeripesäke JM101-maljalta + 11,5 µl H ₂ O (negatiivinen kontrolli)

Yhteensä siis 20 reaktiota. Jokaiseen putkeen (A-T) pipetoitiin vielä 0,5 µl entsyymiä ennen PCR:n aloittamista.

LIITE 6. Agarosigeelielektroforeesi

Agarosigeelielektroforeesin ajopuskurin valmistus

Valmistimme 10 x TBE (pH 8,3), seuraavan ohjeen mukaan:

108 g Tris
55 g Boorihappoa
9,3 g EDTA-Na₂
1 l vettä

Käyttöliuoksena 1 x TBE, pH 8,3. Laimennetaan 1 l kerrallaan.

Agarosigeelin valmistus

Ennen geelin valmistamista teipattiin AGE-laitteen geelitarjottimen reunat huolellisesti maalarinteipillä, jotta liuos ei valu ulos. Sen jälkeen asetettiin näyttekammat paikoilleen.

1 % agarosigeeli:

200 ml 1 x TBE
2 g agaria

1,2 % agarosigeeli:

200 ml 1 x TBE
2,4 g agaria

Punnittiin 500 ml erlenmeyerisiin agar ja lisättiin 200 ml 1 x TBE:tä. Liuosta kiehausutettiin mikroaaltouunissa ja sekoitettiin, kunnes se oli tasaisen kirkas ilman näkyviä kirkastumia tai hippuja (n. 4 kertaa). Jäähdytettiin rauhallisesti sekoittaen, jotta ilmakuplia ei muodostuisi. Lopuksi jäähtyneeseen liuokseen lisättiin 20 µl 10mg/ml EtBr-liuosta. (HOX! Karsinogeeni)

Liuos kaadettiin geelitarjottimelle ja mahdolliset ilmakuplat voi poistaa tässä vaiheessa esimerkiksi neulalla tai pipetinkärjellä. Geelin annettiin rauhasa jähmettyä huoneenlämmössä noin 20 min, jonka jälkeen teipit ja näytekammat poistettiin varovasti.

Agaroosigeelielektroforeesiajo

Latauspuskuri Bio-Rad Nucleic Acid Sample Loadin Buffer 5X, joka sisältää

50 mM Tris-HCl, pH 8.0

25 % glyseroli

5 mM EDTA

0,2 % Bromifenolisininen

0,2 % ksyleeni syanoli FF

Lisäsimme 1 x TBE-puskuria niin, että geelitarjotin jäi kokonaan pinnan alle. Pipetoimme näytteisiin 10 µl latauspuskuria /50 µl näytettä, jonka jälkeen näytteet pipetoitiin varovasti kamman muodostamiin näytekavoihin. Yhteen kaivoon pipetoitiin molekyylipainostandardi, jonka avulla pystyimme arvioimaan elektroforeesin jälkeen DNA-fragmenttien kokoja. Asetimme kannen ajoaltaan päälle ja virtajohtimet siten, että näytteet kulkevat kohti positiivista elektrodia (mustasta punaiseen). Kytkimme laitteen virtalähteeseen ja asetimme jännitteeksi 60–80V ja ajoimme näytteitä parin tunnin ajan.

Ajon loputtua katkaistiin virta laitteesta, jonka jälkeen geeliä katseltiin UV-valossa.

Muista

- käyttää suojalaseja katsoessasi geeliä UV-valossa!
- EtBr-geeli ja -liuokset ovat ongelmajätettä!

LIITE 7. Näytteen esikäsittely

Bakteerin suspensoiminen LB-liemeen:

Yksi pesäke bakteeria suspensoitiin 50 µl:aan LB-lientä.

Bakteerin suspensoiminen RES- ja LYS-puskureihin:

Yksi bakteeripesäke suspensoitiin 10 µl RES-puskuria, jonka jälkeen seokseen lisättiin 10 µl LYS-puskuria.

Alukkeita 50 pmol

Pipetointiohjeet

Seitsemään eppendorf-putkeen (A–G) pipetoitiin:

5µl	RT PCR-1 (1:10-laimennos)
5µl	RT PCR-2 (1:10-laimennos)
5µl	10X puskuria
1µl	dNTP

Lisättiin vielä jokaiseen putkeen templaattia seuraavasti:

A.	1 µl LB-liemeen suspensoitua pBR322-bakteeria + 32,5 µl H ₂ O
B.	2 µl LB-liemeen suspensoitua pBR322-bakteeria + 31,5 µl H ₂ O
C.	1 µl RES- ja LYS-puskureihin suspensoitua pBR322-bakteeria + 32,5 µl H ₂ O
D.	2 µl RES- ja LYS-puskureihin suspensoitua pBR322-bakteeria + 31,5 µl H ₂ O
E.	pBR322-bakteeria suoraan maljalta + 33,5 µl H ₂ O
F.	1 µl 1-plasmidia (70 ng) + 32,5 µl H ₂ O
G.	JM101-bakteeria suoraan maljalta + 33,5 µl H ₂ O

Jokaiseen putkeen (A–G) pipetoitiin vielä 0,5 µl entsyymiä ennen PCR:n aloittamista.

LIITE 8. qPCR testauksen cocktailien valmistus

Cocktail I (alukkeiden pitoisuus 500 pmol), alukkeet 1 & 2

1 x reaktio:

12,5 µl	iQSybrGreen Supermix
5 µl	RT PCR-1
5 µl	RT PCR-2

12 x reaktio:

150 µl	iQSybrGreen Supermix
60 µl	RT PCR-1
60 µl	RT PCR-2

Cocktail II (alukkeiden pitoisuus 100 pmol), alukkeet 1 & 2

1 x reaktio:

12,5 µl	iQSybrGreen Supermix
1 µl	RT PCR-1
1 µl	RT PCR-2

12 x reaktio:

150 µl	iQSybrGreen Supermix
12 µl	RT PCR-1
12 µl	RT PCR-2

LIITE 9. Alukeyhdistelmien testauksen cocktailit.

Cocktail I (alukkeet 1 & 2, 100 pmol)

1 x reaktio:

12,5 µl	iQSybrGreen Supermix
1 µl	RT PCR-1
1 µl	RT PCR-2

11 x reaktio:

137,5 µl	iQSybrGreen Supermix
11 µl	RT PCR-1
11 µl	RT PCR-2
104,5 µl	H ₂ O

Cocktail II (alukkeet 1 & 2, 100 pmol):

1 x reaktio:

12,5 µl	iQSybrGreen Supermix
1 µl	RT PCR-1
1 µl	RT PCR-2

9 x reaktio:

112,5 µl	iQSybrGreen Supermix
9 µl	RT PCR-1
9 µl	RT PCR-3
85,5 µl	H ₂ O

LIITE 10. Harjoitustyön testauksen cocktailin valmistus

Cocktail (alukkeet 1 & 2, 100 pmol):

1 x reaktio:

12,5 µl	iQSybrGreen Supermix
1 µl	RT PCR-1
1 µl	RT PCR-2
9,5 µl	H ₂ O

15 x reaktio:

187,5 µl	iQSybrGreen supermix
15 µl	RT PCR-1
15 µl	RT PCR-2
142,5 µl	H ₂ O