



Melissa Björkell ja Ida Sunabacka

Laktoosi-intoleranssitesti

Reaaliaikaisen PCR-menetelmän käyttöönotto ja työohjeen laatiminen Metropolia Ammattikorkeakoulussa

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Bioanalytiikka (AMK)

Bioanalytiikan tutkinto-ohjelma

Opinnäytetyö

19.11.2021

Tekijät	Ida Sunabacka Melissa Björkell
Otsikko	Laktoosi-intoleranssitesti. Reaaliaikaisen PCR-menetelmän käyttöönotto ja työohjeen laatiminen Metropolia Ammattikorkeakoulussa
Sivumäärä	46 sivua
Aika	19.11.2021
Tutkinto	Bioanalyttikko (AMK)
Tutkinto-ohjelma	Bioanalytiikan tutkinto-ohjelma
Ohjaajat	Lehtori Merja Ojala Lehtori Elina Hotanen
<p>Tässä opinnäytetyössä tehtiin tarvittavat toimenpiteet, jotta Metropolia Ammattikorkeakoulussa voitiin ottaa käyttöön uusi Applied Biosystems™ QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System -laite Thermo Fisher Scientificilta, ja perustettiin laitteelle testi laktoosi-intoleranssiin liittyvän geenimuutoksen toteamiseen DNA-näytteestä sekä laadittiin testille työohje. Tavoitteena oli kehittää bioanalytiikan tutkinto-ohjelman molekyyli-genetiikan opintojaksoa, jonka teoriaosuuteen reaaliaikainen PCR-menetelmä kuuluu. Näin bioanalytiikan opiskelijat saivat käytännön kokemusta menetelmän käytöstä, ja mahdollisuuden selvittää/testata, onko itsellä laktoosi-intoleranssiin liittyvä geenimuutos.</p> <p>Tämän opinnäytetyön teoriaosuudessa perehdyttiin laktoosi-intoleranssiin ominaisuutena, reaaliaikaiseen polymeerasiketjureaktioon menetelmänä ja mitä tämän menetelmän käyttäminen edellyttää sekä genotyyppitykseen reaaliaikaisen PCR-menetelmän sovelluksena. Teoriataustassa selvitettiin myös käyttöohjeen käytettävyyden suunnitteluperiaatteita. Tausta pohjautuu vahvasti tieteelliseen kirjallisuuteen, mutta myös esimerkiksi QuantStudio™ 3-laitteen valmistajan järjestämässä opastuksessa kerrottuihin tietoihin.</p> <p>Tuotoksena laadittiin laktoosi-intoleranssitestille työohje. Työohje sisältää lyhyen taustoituksen laktoosi-intoleranssin genotyyppitykseen, työn suorittamiseen tarvittavat välineet ja reagenssit listamuodossa, työn eri vaiheet erillisiin osioihin jaettuna sekä havainnollistavia esimerkkikuvia. Työohjeen laatimisessa käytettiin teoriaosuudessa käsiteltyjä suunnitteluperiaatteita sekä käytännön kokemuksia. Työohjeen toimivuutta päästiin arvioimaan käytännössä, kun bioanalytiikan opiskelijat testasivat sitä molekyyli-genetiikan opintojaksolla ja antoivat palautetta.</p> <p>Työohjeessa sovelletaan teoriataustassa esitettyjä suunnitteluperiaatteita. Testauksessa saatujen, bioanalyttikko-opiskelijoiden antamien, palautteiden perusteella tehtiin pieniä parannuksia työohjeeseen. Esimerkiksi sivunumerointi ja eri työvaihekokonaisuusnumerointi tehtiin palautteen perusteella.</p>	
Avainsanat	DNA, genotyyppitys, laktoosi-intoleranssi, reaaliaikainen PCR, SNP

Authors	Ida Sunabacka Melissa Björkell
Title	Lactose Intolerance Test. Implementation of Real-time PCR Method and Writing Instructions in Metropolia University of Applied Sciences
Number of Pages	46 pages
Date	19 November 2021
Degree	Bachelor of Health Care
Degree Programme	Degree Programme in Biomedical Laboratory Science
Instructors	Merja Ojala, Lecturer Elina Hotanen, Lecturer
<p>The purpose of this final project was to start using the Applied Biosystems™ QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System instrument from Thermo Fisher Scientific in Metropolia University of Applied Sciences, set up a genetic lactose intolerance test for the instrument and write instructions for how to perform the test. The test tells if you have a genetic predisposition to lactose intolerance. The aim was to include real-time PCR as a molecular genetics method in the laboratory teaching of Biomedical Laboratory Science students of Metropolia UAS. At the same time, the students will be given the opportunity to find out if they have the genetic predisposition to lactose intolerance.</p> <p>We got acquainted with the scientific literature regarding lactose intolerance, real-time PCR method and what is required for using it in genotyping, and how to write instructions. The background of this final project is mainly based on this literature, but we also used the materials from an orientation lecture held by the Thermo Fisher Scientific specialists regarding the instrument and using real-time PCR method in genotyping.</p> <p>As the output of this final project, we wrote the instructions for how to perform the lactose intolerance test we set up during the project. The instructions contain a brief explanation of the theory behind the test, a list of needed materials, the steps of the procedure and some explanatory pictures. We wrote the instructions based on the theoretical principles given in the literature source. The contents were chosen based on our experiences during the testing of the lactose intolerance test. We got the chance to try out the instructions in a real-life setting, as Biomedical Laboratory Science students performed the test in the teaching laboratory. The students gave their valuable opinions to us, and we did some minor improvements to the instructions based on those opinions.</p>	
Keywords	DNA, genotyping, lactose intolerance, real-time PCR, SNP

Sisällys

1	Johdanto	1
2	Opinnäytetyön tarkoitus ja tavoitteet	1
3	Laktoosi-intoleranssi	2
4	DNA:n tutkiminen polymeerasiketjureaktiolla	3
4.1	DNA:n eristys silikapylväsmenetelmällä	3
4.2	Polymeerasiketjureaktio (PCR, Polymerase chain reaction)	4
4.3	Reaaliaikainen PCR	6
4.4	Genotyypitys	8
5	Käyttöohje	9
6	Opinnäytetyön toteuttaminen	10
6.1	Toimintaympäristö ja hyödynsaajat	10
6.2	Menetelmälliset lähtökohdat	10
6.3	Näytteet	11
6.4	Toiminnan eteneminen	12
6.4.1	Opinnäytetyön suunnittelu	12
6.4.2	Laitevalmistajan edustajien pitämä opastus ja QuantStudio™ 3-laitteen asennus	13
6.4.3	Reagenssit ja välineet	14
6.4.4	Kontrollinäytteet	15
6.4.5	Ajopohjan luominen	16
6.4.6	RNase P -verifikaatio	17
6.4.7	Testianalyysit	18
6.4.8	Työohjeen ja opintojaksokäyttöön tarkoitetun ajopohjan luominen	24
6.4.9	Työohjeen testaus	26
7	Opinnäytetyön tuotos	29
8	Pohdinta	31
8.1	Tuotoksen ja tulosten tarkastelu	31
8.1.1	Käyttöohjeen käytettävyyden kahdeksan suunnitteluperiaatteen toteutuminen	31
8.1.2	Työohjeen käytettävyyden arviointi käytännön testauksella	33
8.2	Eettisyys	34

8.3	Luotettavuus	35
8.4	Tuotoksen ja tulosten hyödyntäminen ja kehittämissuhteet	40
8.5	Ammatillinen kasvu	41
	Lähteet	44

Käsitteet

Absorbanssi	Näytteen kyky imeä sähkömagneettisen säteilyn aallonpituuksia.
Alleeli	Geenin vaihtoehtoinen muoto kromosomin samassa lokuksessa.
Emäs (DNA/RNA)	DNA- tai RNA-molekyylin tyypipitoinen rakenneosa. Esimerkiksi adeniini, guaniini, sytosiini, tyymiini, urasiili.
Epiteelisolu	Pintasolu, esimerkiksi limakalvon pinnalla.
Fenotyyppi	Ilmiasu, miten jokin ominaisuus ilmenee.
Fluoresenssi	Molekyylien virittymisen purkautumisessa vapautuva valo.
Fluorofori	Fluoresoiva merkkiaine.
Geeni	Toiminnallinen DNA:n koodaava osa.
Genotyypitys	Genotyypin selvittäminen.
Genotyyppi	Geenin vaihtoehtoisten muotojen eli alleelien yhdistelmä.
Heterotsygootti	Henkilö, jolla on tutkittavan geenin kaksi eri alleelia.
Homotsygootti	Henkilö, jolla on tutkittavan geenin kaksi samaa alleelia.
Hybridisaatio	Komplementaaristen DNA-juosteiden yhteen kiinnittyminen.
Introni	Geenin ei-koodaava alue.
Ionivahvuus	Liuoksen ionien kokonaispitoisuus.
Kitti	Kaupallinen reagenssipakkaus, joka sisältää jonkin työn tekemiseen tarvittavat välineet.
Laktaasientsyymi	Laktoosia galaktoosiksi ja glukoosiksi pilkkova entsyymi.
Laktoosi	Maitosokeri.
Laktoosi-intoleranssi	Suolisto-oireita aiheuttava tila, joka johtuu laktoosin nauttimisesta.
LCT	Laktaasientsyymiä koodaava geeni.
Lokus	Geenin sijainti kromosomissa.
MCM6	LCT:n vieressä sijaitseva geeni.
Mutaatio	Muutos DNA:ssa.
NTC	No template control, vesikontrolli.

PCR	Polymeraasiketjureaktio, lämpötilanvaihteluihin perustuva DNA:n monistusmenetelmä.
Reaaliaikainen PCR	Menetelmä, jonka avulla voidaan seurata DNA:n monistumista reaaliajassa, perustuu fluoresenssiin.
rs-koodi	SNP:n identifioiva koodi.
Sekvenssi	DNA-juosteen emäsjärjestys.
SNP	Single nucleotide polymorphism, yhden emäksen monimuotoisuus.
Spektrofotometri	Instrumentti, joka mittaa näytteen absorbanssin.
TaqMan™	Kaupallinen koetintyyppi, jonka hajoaminen reaaliaikaisen PCR-reaktion aikana aiheuttaa fluoresenssisignaalin.
Tehostaja-alue	Geenin toimintaa säätelevä sekvenssi, joka voi sijaita kaukana geenistä.
Transkriptiotekijä	Geenin ilmentymistä säätelevä proteiini.
Vallitseva periytyvyys	Yksi alleeli riittää ilmiänsä aiheuttamiseen.
Verifikaatio	Varmentaminen. Testille määriteltujen laatuvaatimusten täyttymisen osoittaminen.

1 Johdanto

Laktoosi-intoleranssi on yleinen perinnöllinen ominaisuus väestössä, ja sen toteamiseksi voidaan tehdä geenitesti. Tässä opinnäytetyössä perustettiin reaaliaikaiseen polymeerasiketjureaktioon (PCR) perustuva testi, jonka avulla voidaan todeta, onko henkilöllä perinnöllinen alttius laktoosi-intoleranssiin. Koska laktoosi-intoleranssi ei ole sairaus vaan ominaisuus, alttius siihen voidaan tutkia opetuksen yhteydessä. Kaikki testattavat henkilöt voivat testin perusteella saada tietää genotyyppinsä laktoosi-intoleranssialttiuden suhteen. Tämä opinnäytetyö rajattiin koskemaan suomalaisessa väestössä yleisimmin esiintyvää laktoosi-intoleranssialttiuteen yhdistettyä alleelia eli geenin vaihtoehtoista muotoa, jota Suomessa tutkitaan kliinisissä laboratorioissa tutkimuksena 4614 B-Lakt-D tai 6333 Mu-Lakt-D (Eerola 2021, Kuntaliitto 2021).

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli perustaa Metropolia Ammattikorkeakoulun bioanalytiikan tutkinto-ohjelman molekyyli-genetiikan opintojaksolle reaaliaikaiseen PCR-menetelmään perustuva testi laktoosi-intoleranssin toteamiseksi sekä laatia sille työohje. Laboraatio-opetuksessa ei ole ollut käytössä reaaliaikaista PCR-menetelmää tai laktoosi-intoleranssitestiä, joten niiden perustaminen tuli tarpeeseen. Testin käyttöönottoa varten tilattiin QuantStudio™ 3-laite, joka asennettiin ja otettiin käyttöön. Samalla opinnäytetyön tekijät oppivat, miten uusia laitteita ja menetelmiä otetaan käyttöön ja syvensivät näin ammatillista osaamistaan. Opinnäytetyön tilaajana toimi Metropolia Ammattikorkeakoulu.

2 Opinnäytetyön tarkoitus ja tavoitteet

Metropolia Ammattikorkeakoulun bioanalytiikan molekyyli-genetiikan opintojakson laboraatio-opetukseen tilattiin syksyllä 2020 Applied Biosystems™ QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System -laite Thermo Fisher Scientificilta. Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli ottaa laite käyttöön ja perustaa sille testi laktoosi-intoleranssiin liittyvän geenimuutoksen toteamiseen DNA-näytteestä reaaliaikaisen PCR-menetelmän avulla sekä laatia testille työohje.

Opinnäytetyön tavoitteena on, että tuotoksena käyttöön otettu QuantStudio™ 3-laite, testi ja sen työohje tulevat käyttöön molekyyli-genetiikan opintojaksolle. Reaaliaikaista

PCR:ää ei ollut aikaisemmin käytössä Metropolia Ammattikorkeakoulun bioanalytiikan tutkinto-ohjelmassa, ja sille oli kysyntää. Reaaliaikaisen PCR-laitteen käytön opettelu ja tulosten tulkinta syventävät teoriaopetuksessa saatuja tietoja.

3 Laktoosi-intoleranssi

Laktoosi-intoleranssilla tarkoitetaan tilaa, jossa laktoosin eli maitosokerin nauttimisen jälkeen ilmenee suolisto-oireita. Näitä oireita ovat tyypillisesti vatsakivut, vatsan kurina, ilmavaivat ja ripuli. Laktoosi-intoleranssissa laktoosi ei pilkkoudu ohutsuolessa laktaasientsyymien vaikutuksesta, vaan laktoosi kulkeutuu paksusuoleen sellaisenaan. Tällöin paksusuolen bakteerit hyödyntävät laktoosin ravintonaan ja tuottavat kaasuja. Laktoosi-intoleranssin aiheuttamat oireet riippuvat yksilöllisistä tekijöistä ja siitä, kuinka paljon laktoosia sisältäviä tuotteita laktoosi-intolerantikko käyttää. (Schwab & Tunturi 2020.)

Laktoosi-intoleranssi johtuu laktoosin imeytymishäiriöstä. Laktoosin imeytymishäiriö taas voi johtua siitä, etteivät ohutsuolen nukkapiinnan epiteelisolut tuota laktaasientsyymiä. Häiriölle voi kuitenkin olla myös muita syitä, joten kaikki laktoosin imeytymishäiriöt eivät välttämättä ole laktaasientsyymien puutostiloja. On kuitenkin tärkeää huomata, että aikuisella laktaasientsyymien toiminnan puutos on niin sanotusti normaalitila, vaikka laktoosin imeytymisen puutosta nimitetäänkin häiriöksi. (Misselwitz & Butter & Verbeke & Fox 2019.)

Laktoosi pilkkoutuu ohutsuolessa galaktoosiksi ja glukoosiksi laktaasientsyymien katalysoimana. Laktaasientsyymien tuotanto kuitenkin lakkaa suurimmalla osalla maapallon väestöstä vähitellen varhaislapsuudessa, kun lapsi vieroitetaan äidinmaidosta. Osalla väestöstä laktaasientsyymien tuotanto kuitenkin jatkuu vauvaiän jälkeenkin. Eurooppalaisessa väestössä tämä johtuu useimmiten vallitsevasti periytyvästä mutaatiosta, joka ei sijaitse laktaasientsyymiä koodittavassa geenissä, vaan 13 910 emäsparia ylävirtaan siitä, MCM6-geenin intronissa 13. Tässä mutaatiossa sytosiiniemäs on muuttunut tymiiniksi, ja mutaatio voidaan merkitä: LCT-13 910:C→T. LCT on laktaasientsyymiä koodaavan geenin virallinen lyhenne, -13 910 kuvaa mutaation sijaintia LCT-geeniin nähden ja C→T kuvaa emästason pistemutaatiota. (Enattah ym. 2002.) Lewinsky ja kollegat (2005) osoittivat tutkimuksessaan, että LCT-13 910-alue toimii laktaasigeenin tehostaja-alueena, johon ohutsuolessa tuotetut transkriptiotekijät voivat kiinnittyä ja näin edistää laktaasigeenin ilmentymistä.

LCT-13 910:C→T-mutaation lisäksi myös muita laktaasientsyymin aktiivisuutta ylläpitäviä mutaatioita on löydetty. Esimerkiksi MCM6-geenin intronissa 9 sijaitsee mutaatio LCT-22 018:G→A (Enattah ym. 2002). Saudi-Arabiassa taas yleinen mutaatio on LCT-13 915:T→G (Imtiaz ym. 2007).

Laktoosi-intoleranssin diagnosointiin voi yksinkertaisimmillaan riittää hoitokokeilu, jossa laktoosi jätetään pois ruokavaliosta ja seurataan, helpottavatko oireet. Laktoosi-intoleranssin diagnostisessa tutkimisessa on aikaisemmin käytetty laktoosikoetta Pt-Lakt-R1. Siinä 10 tunnin paaston jälkeen nautitaan 50 grammaa laktoosia sisältävä liuos. Plasman glukoosipitoisuutta mitataan laskimoverestä ennen liuoksen nauttimista, 20 ja 40 minuuttia liuoksen nauttimisen jälkeen. Jos glukoositaso nousee vähintään 1,7 mmol/l paastopitoisuuteen nähden, on tulos normaali eli henkilöllä ei kokeen perusteella todeta laktoosi-intoleranssia. (Eskelinen 2016.) Nykyisin laktoosikokeen käytöstä on luovuttu Suomessa, ja mikäli diagnostinen testi koetaan tarpeelliseksi, voidaan tehdä geenitesti 4614 B-Lakt-D (Schwab & Tunturi 2020, Kuntaliitto 2021).

4 DNA:n tutkiminen polymeerasiketjureaktiolla

4.1 DNA:n eristys silikapylväsmenetelmällä

Perimäaineksen eli DNA:n tutkimista varten DNA on ensin eristettävä näytteestä. DNA:ta voidaan eristää kaikesta biologisesta materiaalista kuten kudoksesta, viruspartikkeleista ja soluista. Eristämisen suorittaminen oikein on vaatimus sille, että tutkimukseen saadaan riittävä määrä puhdasta DNA:ta ja tuloksista luotettavat. DNA:n eristämismenetelmän valinnassa tulee ottaa huomioon, minkälaisesta näytteestä eristys tehdään, missä muodossa DNA on sekä paljonko DNA:ta halutaan saada eristettyä. Aiemmin DNA:n eristystä tehtiin ainoastaan käsin mutta nykyisin DNA:n eristäminen voidaan suorittaa automatisoidulla laitteella. (Tan & Yiap 2009.)

Silikapylväsmenetelmällä voidaan eristää DNA:ta esimerkiksi kokoverestä tai sen muista osista sekä kudoksesta (Qiagen Sample and Assay Technologies 2016). DNA:n eristäminen silikapylvään avulla on nopeaa, tehokasta ja nykyisin markkinoilta löytyy valmiita reagenssipakkauksia eli kittejä menetelmän suorittamiseen. Menetelmä perustuu negatiivisesti varautuneen DNA:n kykyyn sitoutua positiivisesti varautuneisiin silika-partikkeleihin korkeassa ionivahvuudessa. Ensin eristettävä DNA sidotaan silikapylvää-

seen korkeassa ionivahvuudessa ja epäpuhtaudet näytteestä voidaan pestä pois. Tämän jälkeen silikapylvääseen sidottu DNA irrotetaan matalassa ionivahvuudessa silikapylväästä. Menetelmässä voidaan käyttää apuna sentrifugointia ja irrottamiseen eli eluointiin käytetään esimerkiksi tislattua vettä. (Tan & Yiap 2009.)

DNA:n eristämisen jälkeen tulee vielä mitata eristetyn DNA:n puhtaus ja pitoisuus. Pitoisuuden ja puhtauden mittaamiseen voidaan käyttää avuksi useampaa eri menetelmää, joista yksinkertaisin ja nopein tapa on mitata spektrofotometrillä eri aallonpituuksilla tapahtuvaa valon absorboitumista eli imeytymistä näytteeseen. Nukleiinihapot, joihin myös DNA kuuluu, absorboivat tehokkaimmin valoa aallonpituudella 260 nm ja proteiinit aallonpituudella 280 nm. Näytteen DNA-pitoisuus saadaan siis selville aallonpituudella 260 nm tapahtuvan absorbanssin avulla. Mitä enemmän näytteessä on DNA:ta, sitä enemmän valoa absorboituu näytteeseen. (He & Stein & DeRose & Cole 2018.) Uusimmille spektrofotometreille näytemääräksi riittää muutama mikrolitra eli mitaus voidaan suorittaa hyvin pienestä määrästä näytettä. (He ym. 2018.)

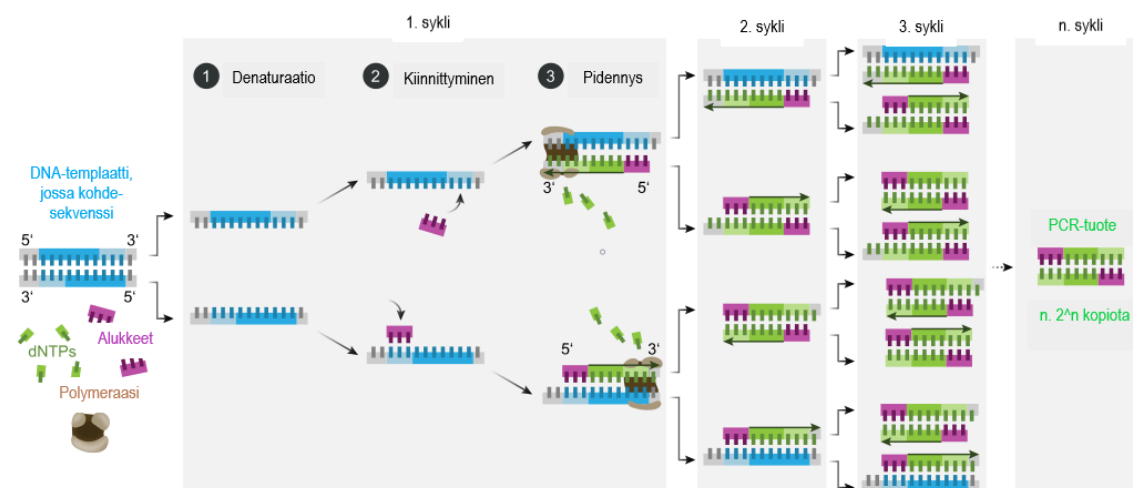
Näytteen DNA:n puhtaudesta kertoo absorbanssisuhdeluku aallonpituuksilla 260 nm ja 280 nm. Suhdeluvun tulisi optimaalisesti olla 1,8; mutta väliä 1,7–1,9 voidaan käyttää; jolloin DNA:n katsotaan olevan riittävän puhdasta. Suhdeluku kertoo DNA-konsentraation suhteen proteiineihin. Jos suhdeluku on alle 1,7; on näytteessä paljon proteiineja suhteessa DNA:han. Jos taas suhdeluku on yli 1,9; näytteessä on paljon RNA-jäämiä. Sekä alle 1,7 että yli 1,9 menevät suhdeluvut voivat viitata siihen, että eristetty DNA ei välttämättä ole riittävän puhdasta jatkotutkimuksiin. (Qiagen Sample and Assay Technologies 2016.)

4.2 Polymeraasiketjureaktio (PCR, Polymerase chain reaction)

Polymeraasiketjureaktio eli PCR on merkittävä molekyylibiologian menetelmä, jota käytetään halutun DNA-sekvenssin monistamiseen. Menetelmää käytetään nykyisin hyvin paljon, koska se on nopea ja herkkä. Tämän lisäksi menetelmässä tapahtuva reaktio on yksinkertainen, halpa ja helppo ottaa käyttöön. Menetelmä on kuitenkin herkkä kontaminaatiolle ja vaatii yleensä optimoinnin. Optimointi voi olla haastavaa ja viedä aikaa mutta se on välttämätöntä, jotta menetelmästä saadaan toimiva. Optimoinnissa testataan kaikkien PCR-menetelmässä käytettävien komponenttien pitoisuudet optimaaliksi. Tämän lisäksi menetelmässä käytettävät alukkeet tulee suunnitella sellaisiksi,

että ne kiinnittyvät vain tiettyyn DNA:n kohtaan, josta aloitetaan halutun DNA-sekvenssin monistaminen. Alukkeiden suunnittelussa on monia kriteerejä, kuten se, että ne eivät saa kiinnittyä toisiinsa. Menetelmän eri vaiheiden kestot ja olosuhteet testataan optimoinnilla sellaisiksi, että menetelmä toimii parhaalla mahdollisella tavalla. PCR:ää voidaan käyttää hyväksi esimerkiksi DNA:n sekvensoinnissa eli emäsjärjestyksen selvittämisessä ja mutaatioiden havaitsemisessa. (Green & Sambrook 2019.) PCR:ää käytetään erityisesti biotieteessä, oikeustieteessä ja diagnostiikassa (Zhu ym. 2020).

Menetelmä perustuu lämpöä kestävän DNA-polymeraasientsyymin kykyyn syntetisoida uusi DNA-juoste mallijuosteesta sykliässä reaktiossa. PCR:llä saadaan monistettua pienestä määrästä DNA:ta haluttu DNA-sekvenssi hyvin lyhyessä ajassa, sillä DNA:n määrä kaksinkertaistuu joka kierroksella. Menetelmässä tarvittavat perusasiat ovat mallina käytettävä DNA, alukkeet, rakennusaineena käytettävät emäkset ja entsyyminä toimiva DNA-polymeraasi. Nämä kaikki sekoitetaan yhteen reaktioseokseen. PCR:n aikana tapahtuu useamman kerran sama sykli, jonka aikana reaktioseoksen lämpötilaa vaihdellaan. Sykli alkaa DNA:n denaturoimisella eli kaksoisjuosteen avautumisella korkeassa lämpötilassa. Tämän jälkeen lämpötilaa lasketaan ja alukkeet kiinnittyvät malli-DNA:ssa niiden oikeille paikoille. Seuraavaksi lämpötilaa nostetaan hieman, jolloin DNA-polymeraasientsyymi alkaa liittää emäksiä syntyvään DNA-juosteeseen eli tapahtuu pidennysvaihe. Tätä sykliä, joka siis koostuu kolmesta eri vaiheesta, toistetaan yleensä 25–35 kertaa. (Garibyan & Avashia 2013; Green & Sambrook 2019.) Kuviossa 1 esitetään kaavakuvio polymeraasiketjureaktion toiminnasta.



Kuvio 1. Polymeraasiketjureaktio kaavakuviona (mukailten Enzoklop, 2020. CC BY-SA 4.0 <<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>>, Wikimedia Commons).

Menetelmän kontaminaatioherkkyden takia tulee kiinnittää huomiota siihen minkälaisissa tiloissa ja minkälaisilla välineillä työ suoritetaan. Työtilan tulisi olla mahdollisimman rauhallisessa paikassa, jossa ei tapahdu ylimääräistä ohikulkua. Ihannetilanteessa olisi erilliset tilat reaktioseoksen pipetoinnille ja DNA:n lisäämiselle. Lisäksi työt olisi parasta suorittaa laminaarikaapissa, jossa on myös UV-valo poistamaan kontaminaatiolähteet. Työn suorittajan tulee suojautua suojahanskoilla, jotka vaihdetaan usein ja aina kontaminaation tapahduttua. Muita käytettäviä työ- ja suojarusteita ovat kasvomaski, hiussuoja, laboratoriotakki ja työkengät. Kaikkien käytettävien muovi- ja lasitarvikkeiden tulee olla DNA ja DNAasi (DNA:ta pilkkova entsyymi) vapaita. Käytettävien pipetinkärkien tulee olla steriilejä ja suodattimellisia. (Green & Sambrook 2019.)

PCR:n varsinaisena kehittäjänä 1980-luvulla pidetään Kary Mullisia (Garibyan & Avashia 2013; Zhu ym. 2020). Hän sai vuonna 1993 kemian Nobelin palkinnon yhdessä Michael Smithin kanssa PCR:n kehittämisestä (The Nobel Prize in Chemistry). PCR:ssä monistettu DNA pitää vielä todentaa erillisellä menetelmällä, jotta voidaan olla varmoja siitä, että monistus on onnistunut. PCR:n tulos on laadullinen eli kvalitatiivinen. (Garibyan & Avashia 2013.) PCR:stä on jatkokehitetty uudempiä sovellutuksia kuten reaaliaikainen PCR (Zhu ym. 2020).

4.3 Reaaliaikainen PCR

Vuonna 1993 Higuchi & Fockler & Dollinger & Watson esittelivät reaaliaikaisen PCR-menetelmän (Zhu ym. 2020). Reaaliaikaisen PCR:n etu on siinä, että DNA:n monistamista voidaan seurata reaaliajassa mittaamalla fluoresenssia, joten DNA:n monistamista ei tarvitse todentaa enää erillisellä menetelmällä. Fluoresenssin mittaamiseen voidaan käyttää joko kaksijuosteiseen DNA:han sitoutuvia fluoresoivia merkkiaineita tai DNA-koettimia, joihin on kiinnitetty fluoresoiva merkkiaine. Kaksijuosteiseen DNA:han sitoutuvat merkkiaineet ovat epäspesifisiä, koska ne sitoutuvat kaikkeen kaksijuosteiseen DNA:han. DNA-koettimet sitoutuvat vain tiettyyn DNA-sekvenssiin eli ne ovat spesifisiä koettimia. Reaaliaikaisella PCR:llä voidaan tutkia määrällisesti, paljonko monistettua DNA:ta on syntynyt eli tulos voi olla kvalitatiivisen tuloksen lisäksi myös määrällinen eli kvantitatiivinen. Reaaliaikaisen PCR:n synonyyminä käytetäänkin joskus qPCR:ää (englanniksi quantitative PCR). (Garibyan & Avashia 2013; Green & Sambrook 2019.)

TaqMan™-koettimet ovat esimerkki spesifisistä DNA-koettimista. Nämä ovat lyhyitä DNA-molekyylejä, joiden molemmissa päissä on kiinnitettynä tietyt molekyylit (kuvio 2). Toisessa päässä on niin kutsuttu hiljentäjä ja toisessa päässä fluorofori. Niin kauan, kuin TaqMan™-koettimessa on kiinnittyneenä hiljentäjä, fluorofori ei pääse aiheuttamaan mitattavaa fluoresenssia. Koetin kiinnittyy tiettyyn spesifiin emäsjärjestykseen, joka löytyy kopioitavasta DNA-sekvenssistä. Kun DNA-polymeraasi rakentaa uutta juostetta ja kohtaa koettimen, se pilkkoo koettimen. Tällöin hiljentäjä joutuu erilleen fluoroforista ja fluorofori pääsee aiheuttamaan mitattavan fluoresenssin. Mitä enemmän DNA-sekvenssiä kopioidaan, sitä enemmän näytteestä on mitattavissa fluoresenssia. Fluoresenssia mitataan reaktion aikana sekä lopussa. Näin saadaan reaaliajassa tietoa halutun DNA-sekvenssin monistumisesta. Useampaa eri fluoroforein leimattua spesifistä DNA-koetinta voidaan käyttää samassa reaktiossa yhtä aikaa. (Heid & Stevens & Livak & Williams 1996; Henry & Leysen 2021.)



Kuvio 2. Kaavakuvi TaqMan™-koettimesta.

4.4 Genotyypitys

Genotyypitys tarkoittaa sitä, että selvitetään henkilön genotyyppi jonkin geenin suhteen. Genotyyppi kattaa sekä äidiltä että isältä perityn alleelin eli geenin vaihtoehdoisen muodon kromosomin samassa lokuksessa. Nämä alleelit voivat olla identtiset, jolloin henkilö on genotyypiltään homotsygootti, tai erilaiset, jolloin henkilö on genotyypiltään heterotsygootti. Mikäli eri alleelit eroavat toisistaan vain yhden emäksen suhteen, kyseessä on SNP (single nucleotide polymorphism). Valtaosa ihmisten perimän välisistä eroista on SNP:itä (The 1000 Genomes Project Consortium 2015: 69). Esimerkiksi henkilö voi laktoosi-intoleranssiin liittyvän SNP:n suhteen olla homotsygootti (CC tai TT) tai heterotsygootti (CT) (Enattah ym. 2002).

Genotyypityksen voi tehdä monella erilaisella menetelmällä. Perinteisesti on käytetty sekvensointia eli emäsjärjestyksen määrittämistä, restriktiofragmenttien pituuden polymorfismia (RFLP) hyödyntävää menetelmää tai satunnaisesti monistetun polymorfisen DNA:n (RAPD) menetelmää. Myös erilaisia DNA-sirumenetelmiä, jotka perustuvat hybridisaatioon eli komplementaaristen emäsjärjestyksien pariutumiseen, voidaan käyttää. On myös kehitetty monenlaisia korkean suorituskyvyn genotyypitysmenetelmiä. Nämä menetelmät soveltuvat etenkin usean SNP:n määrittämiseen kerralla. (Kucukkal & Yang & Chapman & Cao & Alexov 2014: 9682–9624.)

Yksittäisen SNP:n genotyypitys QuantStudio™ 3-laitteella hyödyntää TaqMan™-koetinteknologiaa. Menetelmä on reaaliaikainen PCR ja genotyypitys tapahtuu yhdessä putkessa kahta eri fluoroforein merkittyä koetinta hyödyntäen. Ensimmäinen koettimista tunnistaa ensimmäisen alleelin ja toinen koetin toisen. Mikäli näytteessä on vain toista alleelia eli kyseessä on homotsygootti, vain toinen koetin kiinnittyy DNA:han. Tällöin reaktion edetessä vain toisen koettimen fluorofori vapautuu hiljentäjästä ja saadaan fluoresenssisignaali ainoastaan tästä fluoroforista. Koettimien tiedoista saadaan selville, kumpi alleeli on kyseessä. Jos taas kyseessä on heterotsygootin henkilön näyte, molemmat koettimet kiinnittyvät DNA:han ja molemmat fluoroforit irtoavat reaktion edetessä hiljentäjästä, jolloin saadaan fluoresenssisignaalit molemmista fluoroforeista. (Henry & Leysen 2021.)

Genotyypityksessä QuantStudio™ 3-laitteen Design and Analysis -ohjelma tekee tuloksille kolme toimintoa. Ensinnäkin se normalisoi alleelispesifisistä fluoroforeista tulevat fluore-

senssit putkissa olevan passiivisen referenssiväarin (ROX™) perusteella. Tämän jälkeen normalisoidut reportterien fluoresenssisignaalit asetetaan Allelic Discrimination -kuvaajaan, jossa toisen alleelin fluoresenssi on X-akselilla ja toisen Y-akselilla. Lopuksi algoritmit ryhmittävät tulokset ja asettavat näytteille genotyypit sen mukaisesti, mihin kohtaan kuvaajaa niiden tulokset osuvat. (Thermo Fisher Scientific Inc. 2018: 60–65.)

5 Käyttöohje

Martikainen (2019: 10–16) on laatinut käyttöohjeiden käytettävyydestä Pro Gradu -tutkielman, jossa hän käy läpi erilaisia suunnitteluperiaatteita. Suunnitteluperiaatteet ovat: tehtäväkeskeisyys, oikea kirjoitustyyli, yksinkertaisuus, tiedon saatavuus, virheiden estäminen ja käsittely, yhtenäisyys, tosielämävastaavuus sekä joustavuus.

Tehtäväkeskeisyydellä tarkoitetaan, että ohjeessa kuvataan nimenomaan tehtävien suorittaminen ja käytetään kuvaavia otsikoita, joista syntyy ohjeeseen yhtenäinen kokonaisuus. Oikea kirjoitustyyli tarkoittaa sitä, että kirjoitus- ja muitakin virheitä vältetään tekstin laatimisessa sekä sitä, että käyttöohjeen käyttäjää puhutellaan imperatiivissa eli käskymuodossa. Lyhenteitä ei tulisi käyttää, paitsi jos ne ovat varmasti käyttäjälle tuttuja. Yksinkertaisuudella tarkoitetaan, että ohjeessa kerrotaan vain oleelliset asiat, jotka riittävät kyseisen testin suorittamiseen. Asiat kirjoitetaan mahdollisimman ytimekkäästi ja lyhyesti. Tiedon saatavuudella tarkoitetaan, että kaikki tärkeä tieto löytyy ohjeesta. Tähän liittyy myös ohjeen selattavuus, mikä korostuu pidemmissä käyttöohjeissa. (Martikainen 2019: 10–16.)

Virheiden estäminen ja käsittely tarkoittavat sitä, että ohjeesta luodaan virheiden tapahtumista estävä. Työvaiheet ohjeistetaan selkeästi kuvilla ja sanoin. Yhtenäisyys merkitsee sitä, että sanavalinnat on tehty huolella ja niitä toistetaan systemaattisesti koko dokumentin ajan. Myös käyttöohjeen tyylin tulee olla yhtenäinen eikä esimerkiksi kirjaimia tai otsikkotyyppejä vaihdella luvusta toiseen. Tosielämävastaavuudella tarkoitetaan sitä, että ohjeet esitetään loogisessa järjestyksessä ja ne vastaavat käytännön toteutusta. Joustavuus viittaa siihen, että ohjetta tulisi pystyä lukemaan oikeastaan missä tahansa järjestyksessä, ei siis välttämättä aina systemaattisesti alusta loppuun. (Martikainen 2019: 10–16.)

6 Opinnäytetyön toteuttaminen

6.1 Toimintaympäristö ja hyödynsaajat

Toimintaympäristönä toimi Metropolia Ammattikorkeakoulun bioanalytiikan tutkinto-ohjelman laboraatio-opetustilat Myllypuron kampuksella. QuantStudio™ 3-laite asennettiin ja sitä käytettiin molekyyli-genetiikan opetukseen tarkoitettussa tilassa. Kohderyhmänä toimivat Metropolia Ammattikorkeakoulun bioanalytiikan opiskelijat, jotka tulevat käyttämään testiä molekyyli-genetiikan opintojaksolla opinnäytetyön tuotoksena. Hyödynsaajia ovat bioanalytiikan opiskelijoiden lisäksi koko tutkinto-ohjelma, sillä reaaliaikaista PCR-menetelmää tai laktoosi-intoleranssitestiä ei ole ollut viimeisimpien vuosikurssien saatavilla. Lähtötilanteessa Metropolia Ammattikorkeakoulun bioanalytiikan tutkinto-ohjelman molekyyli-genetiikan opintojaksolla ei ollut käytössä reaaliaikaiseen PCR-menetelmään perustuvia tutkimuksia. Menetelmän opiskelu oli kuitenkin olennainen osa opintojaksoa, joten opinnäytetyön tuotoksena syntyvälle menetelmälle ja työohjeelle oli kysyntää.

6.2 Menetelmälliset lähtökohdat

Tässä opinnäytetyössä käytettiin reaaliaikaista PCR:ää genotyypitysmenetelmänä, sillä kyseessä on yksittäisen SNP:n määrittäminen. Laitevalmistajan (Thermo Fisher Scientific Inc. 2018: 60) mukaisesti menetelmässä käytettiin kahta emäsjärjestysspesifistä aluetta sen geenialueen monistamiseen, jolla tutkittava SNP sijaitsee, sekä kahta alleelispesifistä, eri fluoroforein merkittyä, TaqMan™-koetinta. Koettimista toinen tunnisti C-alleelin ja toinen T-alleelin. Näin ollen yhdellä reaktiolla saatiin selvitettyä molemmat alleelit yhdessä putkessa, mikä oli käytännöllistä ja vähensi pipetointiin liittyvien virheiden mahdollisuutta.

Laktoosi-intoleranssitestin perustamiseen käytettiin kaupallista laitetta ja kaupallisia reagensseja sekä niiden ohjeita, jotka on valmistajan toimesta todennettu toimiviksi käyttötarkoitukseensa. Tästä syystä menetelmä tarvitsi vain verifioida (Hägg 2016: 11). Verifiointi on validointia suppeampi toimenpide, jossa osoitetaan, että laite tai menetelmä täyttää sille määritellyt vaatimukset (Hiltunen ym. 2011: 116). Käytännössä siis testattiin, että laite ja reagenssit tuottavat oikeanlaisen tuloksen, kun niitä käytetään laite- ja reagenssivalmistajan ohjeiden mukaisesti.

Työohjeen laatimisen lähtökohtana toimi teoreettinen tieto käyttöohjeen käytettävyydestä. Tässä työssä ei ole kyse käyttöohjeesta vaan työohjeesta, koska ohje sisältää enemmän tietoa kuin laitteen käytön. Käyttöohjeiden käytettävyyteen liittyvät suunniteluperiaatteet soveltuivat kuitenkin hyvin myös työohjeen laatimiseen. Työohjeen laatimisessa hyödynnettiin myös QuantStudio™ 3-laitteen laitevalmistajan käyttöohjetta (Thermo Fisher Scientific 2018), sillä se sisälsi laitteen käyttöön ja testin perustamiseen tarvittavaa tietoa. Lisäksi työohjeessa hyödynnettiin laitevalmistajan edustajien pitämää QuantStudio™ 3-laiteopastusta (Henry & Leysen 2021) ja menetelmän käytännön toteutuksen aikana havaittuja asioita, joita opinnäytetyön tekijät pitivät merkityksellisinä testin toteutuksen kannalta.

6.3 Näytteet

Testin käyttöönottoa varten tarvittiin näytteitä. Testin toimivuuden varmistamiseksi päätettiin eristää positiiviset kontrollinäytteet kolmelta eri henkilöltä, joiden fenotyypit tunnettiin. Yhden näytteen osalta myös henkilön genotyyppi (CT) oli tiedossa aiemmista tutkimuksista. Laitevalmistajan opastuksen mukaan genotyyppityypin rutiinomainen käyttö ei periaatteessa vaadi positiivisten kontrollien käyttöä, mutta laadun varmistamiseksi sitä kuitenkin voidaan suositella (Henry & Leysen 2021).

Kontrollinäytteet saatiin eristämällä kokoverinäytteistä DNA testausta varten. Työn tilaaja toivoi kontrollinäytteitä menetelmän luotettavuuden parantamiseksi kummallekin fenotyypille omansa, mahdollisuuksien mukaan joka genotyypille omansa. Haasteen toi se, että CT ja TT eivät eroa fenotyypiltään. Tässä tilanteessa hyödytti tieto tutkittavan vanhempien fenotyypeistä: jos toisella vanhemmista on laktoosi-intoleranssi, on genotyyppi CT. Jos kuitenkin molemmat vanhemmat sietävät laktoosia, genotyyppi voi olla kumpi tahansa. Yhden kontrollinäytteen antajan molemmat vanhemmat sietivät laktoosia, joten oli edes teoreettinen mahdollisuus saada myös TT-genotyypin omaava näyte mukaan.

Varsinainen testin testaus tehtiin edellä mainituilla kolmella kontrollinäytteellä sekä kuudellatoista valmiiksi eristetyllä tuntemattomalla näytteellä, joita löytyi Metropolia Ammattikorkeakoulun molekyyli-genetiikan kokoelmista pakastettuna. Näytemäärän suuruusluokka sovittiin yhdessä työelämäohjaajan kanssa ja se vastasi suunnilleen yhden opiskelijaryhmän kokoa. Koska testin tulee toimia opiskelijaryhmän kokoa vastaavalla näytemäärällä, päätettiin testaukset suorittaa samankaltaisilla näytemäärillä.

6.4 Toiminnan eteneminen

Opinnäytetyön aihe saatiin 4.12.2020, kun QuantStudio™ 3-laite tilattiin Metropolia Ammattikorkeakoulun bioanalytiikan tutkinto-ohjelman molekyyli-genetiikan opintojaksosa varten. Tästä alkoi opinnäytetyön suunnittelutyö, joka sisälsi kirjallisuuteen perehtymisen, aiheen rajauksen ja suunnitelman laatimisen. QuantStudio™ 3-laite saapui Metropolia Ammattikorkeakoulun Myllypuron kampukselle joulukuussa 2020. Itse laitteen lisäksi mukana tuli kannettava tietokone oheistarvikkeineen sekä laitteen verifiointiin eli toiminnan varmentamiseen tarvittava RNase P -levy.

6.4.1 Opinnäytetyön suunnittelu

Tiedonhakuun käytettiin pääasiassa Metropolia Ammattikorkeakoulun kirjaston sosi- aali- ja terveysalan tietokantoja. Erityisesti käytettiin PubMed:ia, MEDLINE (Ovid):ia ja jonkin verran myös ScienceDirect:ia. Hakusanoina käytettiin muun muassa ”DNA concentration measurement AND spectrophotometer”, ”DNA purification”, ”genotyping”, ”lactase persistence”, ”lactose intolerance”, ”PCR optimization”, ”polymerase chain reaction”, ”real-time PCR” ja ”TaqMan probe”. Lisäksi käytiin läpi hyvien aiheeseen liittyvien artikkelien lähdeluetteloita ja valittiin sieltä sopivia lähteitä työhön. Tietokannan hakutoiminto laajensi käytettyjä hakutermejä, esimerkiksi haussa ”PCR” haku käytti myös termejä ”polymerase chain reaction” ja ”polymerase chain reactions”. Hakuja rajattiin mahdollisuuksien mukaan muun muassa julkaisuvuoden, aiheen ja julkaisutyyppin mukaan. Lähteinä pyrittiin käyttämään mahdollisimman tuoreita julkaisuja, mutta käytännössä tämä ei aina toteutunut. Toisaalta osa vanhemmista lähteistä oli edelleen käytökelpoisia.

Aiheen rajaaminen tehtiin kirjallisuuteen pohjautuen. Laktoosi-intoleranssiin perehtymisen seurauksena huomattiin, että termi viittaa laajasti siihen, että laktoosi aiheuttaa suolisto-oireita. Laktoosi-intoleranssi ei siis ole tarkasti rajattu vain tiettyyn fysiologiseen tilaan, jolle on aina yksi ja sama syy. Opinnäytetyön tarkoituksena oli perustaa reaaliaikaiseen PCR-menetelmään pohjautuva testi, jolla saataisiin selville henkilön alttius laktoosi-intoleranssiin. Kirjallisuuden perusteella testi rajattiin koskemaan vain yhtä laktoosi-intoleranssialttiuteen yhdistettyä geenialuetta, joka sijaitsee laktaasigeenin säätelyalueella. Tällä alueella sijaitsee SNP, jonka vaihtoehdotiset emäkset ovat C ja T. Opinnäytetyössä perustettiin siis testi yksinomaan tämän SNP:n genotyyppitykseen.

Suunnitelma laadittiin Metropolia Ammattikorkeakoulun terveystieteen opinnäytetyöohjeistuksen ja ohjaustapaamisissa sekä työpajoissa annettujen ohjeiden mukaan. Suunnitelma sisälsi johdannon, opinnäytetyön tarkoitukset ja tavoitteet, teoriaosuuden, toteuttamissuunnitelman, tuotoksen kuvaamisen sekä luotettavuuden ja eettisyyden pohdinnan. Teoriaosuus perustui kirjallisuuteen ja siinä käsiteltiin laktoosi-intoleranssia, PCR:ää yleensä ja reaaliaikaista PCR:ää menetelmänä, genotyypitystä ja käyttöohjeen laatimista. Työssä laadittiin työohje, mutta lähteenä käytettiin käyttöohjeen käytettävyyden suunnitteluperiaatteita, sillä ne soveltuivat myös työohjeen laatimiseen.

Tammikuussa 2021 pidettiin opinnäytetyön suunnittelun ryhmäohjaus, jossa tarkennettiin suunnitelmavaiheen etenemistä ja ohjeistettiin suunnitelman tekemistä. 2.2.2021 palautettiin opinnäytetyön suunnitelma sekä suunnitelmaseminaarin PowerPoint-esitys opintojakson työtilaan. 9. ja 10.2.2021 pidettiin suunnitelmaseminaari, jossa suunnitelma esiteltiin muille koulutusohjelman opiskelijoille ja saatiin palautetta työstä. Tämän jälkeen ohjaava opettaja hyväksyi suunnitelman ja opinnäytetyön sopimus laadittiin ja allekirjoitettiin 17.2.2021. Tämän jälkeen aloitettiin opinnäytetyön raportin laatiminen suunnitelmaseminaarissa saadun palautteen ja opinnäytetyön rakenteesta annetun ohjeistuksen avulla.

6.4.2 Laittevalmistajan edustajien pitämä opastus ja QuantStudio™ 3-laitteen asennus

Testin perustamisen lähtökohtana oli Thermo Fisher Scientificin edustajien pitämä opastus (Henry & Leysen 2021), jossa käytiin läpi genotyypitysprotokollan periaatteet QuantStudio™ 3-laitteella. Opastuksessa käytiin läpi vaihe vaiheelta, mitä työnkulkuun kuuluu aina näytteenkäsittelystä tulosten analysointiin laitteen Design and Analysis -ohjelmalla. Eri vaiheisiin liittyviä huomionarvoisia asioita nostettiin esiin. Opastuksessa myös annettiin valmiina vahvat suositukset testissä käytettävistä reagensseista (TaqPath™ ProAmp™ Master Mix ja genotyypitysreagenssiksi TaqMan™ SNP Genotyping Assay). Koska testillä haluttiin määrittää laktoosi-intoleranssiin yleisesti liittyvä yhden emäksen muuntelu, pystyttiin käyttämään valmiiksi suunniteltua genotyypitysreagenssia. Reagenssin löytäminen juuri tämän SNP:n genotyypitystä varten Thermo Fisher Scientificin palvelusta oli helppoa, kun tämän kyseisen SNP:n yksilöllinen rs-koodi tiedettiin. Se löytyi lähteenä käytetystä artikkelista (Misselwitz ym. 2019). SNP:n identifioiva rs-koodi on rs4988235.

Opinnäytetyön toteutus aloitettiin helmikuussa 2021, kun QuantStudio™ 3-laitte asennettiin molekyyli-genetiikan opetustilaan tukevalle työtasolle laitevalmistajan ohjeen mukaan. Laitteelle perustettiin käyttäjätunnus. Tämän jälkeen laitteelle asennettiin Thermo Fisher Scientificin nettisivuilta uusin ohjelmistoversio. Ohjelmistoversio ladattiin USB-tikulle, josta se päivitettiin laitteelle. Laitteelle suoritettiin Self Verification -testi, jolla varmistettiin laitteen toiminta. Tämän jälkeen olisi voinut suorittaa RNase P-verifikaation, mutta se päätettiin tehdä vasta reagenssien saapumisen jälkeen.

6.4.3 Reagenssit ja välineet

Tarvittavia materiaaleja olivat mm. laitteen kanssa yhteensopivat optiset reaktioputket ja niiden korkit, alukkeet, koettimet, polymeraasientsyymi, emäkset (dNTP), magnesiumkloridi ($MgCl_2$), reaktiopuskuri ja DNAasi-vapaa vesi. Laitevalmistaja suositteli genotyyppitysprotokollassa käytettävän tiettyjä reagensseja, joiden yhteensopivuus laitteen kanssa oli todettu. Nämä reagenssit olivat TaqPath™ ProAmp™ Master Mix ja TaqMan™ SNP Genotyping Assay eli genotyyppitysreagenssi.

Suosittelun Master Mix sisältää lämpöaktivoituvan Taq DNA polymeraasin, lämmössä inaktivoituvan urasiili-DNA-glykosylaasin, emäkset sisältäen dUTP:n, ROX™:n ja optimoidut puskuriolosuhteet. Uraasiili-DNA-glykosylaasi (UNG) parantaa reaktioiden spesifisyyttä ja stabiloi monistettuja tuotteita. dUTP:tä tarvitaan UNG:n toimintaan. ROX™ on passiivinen referenssiväriaine, joka normalisoi varsinaisten fluoresenssisignaalien tulokset data-analyysissä. ROX™-tason tulisi olla kaikissa näytteissä sama koko reaktion ajan, joten sen signaalin avulla tuloksia voidaan verrata toisiinsa. (Thermo Fisher Scientific Inc. 2016:17.) Genotyyppitysreagenssi sisältää tutkittavan alueen monistamiseen tarvittavat alukkeet sekä alleelispesifiset koettimet. Testin perustamisen helpottamiseksi päätettiin hankkia nämä reagenssit suositusten mukaisesti.

Metropolia Ammattikorkeakoululla jo valmiiksi olevia reagensseja ja välineitä käytiin läpi ja arvioitiin niiden soveltuvuus menetelmään. Putket ja niihin sopivat korkit sekä välineet löytyivät koululta, mutta reagenssit piti tilata. Tiedot tarvittavista välineistä ja reagensseista löytyvät taulukosta 1. Tilatuista reagensseista Master Mix saapui maaliskuun alussa 2021 mutta Genotyping Assay saatiin vasta syyskuussa 2021. Näin ollen testin käytännön testaaminen päästiin aloittamaan vasta syksyllä 2021.

Taulukko 1. Tarvittavat välineet ja reagenssit sekä niiden tuotekoodit.

Tuote	Tuotekoodi (Thermo Fisher Scientific)
Applied Biosystems™ MicroAmp™ Optical 8-Cap Strip	4323032
Applied Biosystems™ MicroAmp™ Optical 8-Tube Strip, 0,2 mL	4316567
TaqMan™ SNP Genotyping Assay (40x) SNP ID: rs4988235	4351379 C__2104745_20
TaqPath™ ProAmp™ Master Mix (2x)	A30865
Steriili vesi	
Steriilejä Eppendorf-putkia	
Pipetit, filterilliset steriilit pipetinkärjet ja kärkiroskis	
Putkitelineitä	

6.4.4 Kontrollinäytteet

Laktoosi-intoleranssitestin testauksessa tarvittuja kontrolleja varten otettiin kokoverinäytteet 3 millilitran EDTA-putkiin Metropolian Myllypuron kampuksella näytteenottoluokassa maaliskuussa 2021. Samana päivänä suoritettiin DNA:n eristys molekyyli-genetiikan opetustiloissa EDTA-kokoverinäytteistä. DNA:n eristys suoritettiin kokoverinäytteistä Qiagenin QIAamp® DNA Blood Mini Kit -kitillä, joka oli jo valmiiksi koululla. Kitin toiminta perustuu DNA:n eristämiseen silikapylvään avulla. Jokaisesta kokoverinäytteestä otettiin kaksi erillistä 200 µl näytettä Eppendorf-putkiin ja niistä eristettiin DNA kitin ohjeiden mukaan sentrifugointiprotokollalla (Qiagen Sample and Assay Technologies 2016). Jäljelle jääneet kokoverinäytteet laitettiin biologiseen jätteeseen. Eristettyjä näytteitä saatiin siis yhteensä kuusi kappaletta ja ne nimettiin CT1, CT2, LPOS1, LPOS2, LNEG1 ja LNEG2. CT-näytteen genotyypin tiedettiin olevan CT mutta kahden muun näytteen osalta genotyyppiä ei tiedetty. Eristetyt näytteet laitettiin molekyyli-genetiikan opetustilojen pakastimeen.

Tämän jälkeen eristettyjen DNA-näytteiden pitoisuudet ja puhtaudet mitattiin Metropolian Myllypuron kampuksen molekyyli-genetiikan opetustiloissa. Mittaus suoritettiin Bio-

Tekin Epoch-spektrofotometrilla laitteen käyttöohjeen mukaan. Spektrofotometrin toimivuuden kontroleina käytettyjen itse eristettyjen DNA-näytteiden lisäksi otettiin kontroleiksi myös molekyyli-genetiikan opetustilojen pakastimesta kaksi DNA-näytettä, joiden pitoisuus oli jo valmiiksi määritetty. Taulukossa 2 on esitetty mitattujen DNA-näytteiden pitoisuudet ja puhtaudet. Koska pitoisuudeltaan tunnettujen näytteiden pitoisuudet olivat riittävän lähellä aiemmin mitattuja, pystyttiin luottamaan mittaustuloksiin. CT1-näytteen DNA:n puhtaudesta kertova absorbanssisuhdeluku oli yli 1,9; mikä saattaa vaikuttaa näytteen käyttökelpoisuuteen menetelmässä. DNA-näytteen puhtaudesta kertovan absorbanssisuhdeluvun tulisi olla välillä 1,7–1,9 (Qiagen Sample and Assay Technologies 2016). Näyte päätettiin kuitenkin säästää ja käyttää testauksessa.

Taulukko 2. DNA-näytteiden pitoisuudet ja puhtaudet mitattuna Epoch-laitteella.

Näyte	Puhtaus (A260/A280)	Pitoisuus (ng/μl)
CT1	1,953	13,437
CT2	1,877	16,094
LNEG1	1,841	6,185
LNEG2	1,831	5,766
LPOS1	1,858	15,162
LPOS2	1,862	8,6
22,7 ng/μl	1,848	20,358
29,5 ng/μl	1,777	30,495

6.4.5 Ajopohjan luominen

Opinnäytetyön toteutukseen tuli tauko harjoitteluiden takia. Työtä jatkettiin syksyllä 2021. Laitteen mukana tulleeseen tietokoneeseen asennettiin laitteen Design and Analysis -ohjelman uusin versio 1.5.2 laitteen verkkosivuilta. Ohjelmalla luotiin ajopohja laktoosi-intoleranssitestiä varten käyttäen Master Mixin käyttöohjeessa annettua perusohjetta genotyypitykseen standardiprotokollalla (Thermo Fisher Scientific Inc. 2016: 10). Taulukossa 3 on esitetty reaktion kulku taulukkomuodossa. Fluoresenssimittaukset tapahtuvat esimittauksessa, pidennysten loppuvaiheessa joka sykliissä sekä jälkimittauk-

sessä, jolloin reaktioiden kulkua seurataan reaaliajassa. Reaaliaikainen seuranta ei periaatteessa olisi välttämätöntä genotyyppityksessä, mutta sen avulla voidaan selvittää mahdollisia ongelmia tuloksissa.

Taulukko 3. Genotyyppityksen standardiprotokolla (Thermo Fisher Scientific Inc. 2016:10).

Vaihe	Lämpötila (°C)	Aika	Kierrokset
Esimittaus	60	30 sekuntia	Pito
Alkudenaturaatio/ entsyymiaktivaatio	95	5 minuuttia	Pito
Denaturaatio	95	15 sekuntia	40
Pidennys	60	60 sekuntia	
Jälkimittaus	60	30 sekuntia	Pito

Ajopohjan oletusasetuksena reaktiotilavuus oli 50 µl. Tätä ei kuitenkaan huomattu ensimmäisissä testianalyseissä. Reaktiotilavuus korjattiin oikeaksi eli 25 µl:an viimeiseen testianalyysiin. Oletusasetuksena laitteen lämpökannen lämpötila oli 105 °C ja lämpötilan muutoksen nopeus oli 1,6 °C sekunnissa. Passiiviseksi referenssiksi valittiin ROX™, joka sisältyi Master Mixiin. Ajopohjaan luotiin protokolla laktoosi-intoleranssi ja laitettiin Plate-välilehdelle valmiiksi tiedot ajettavista kontrollinäytteistä: NTC (vesikontrolli) x 2, CT1, CT2, LPOS1, LPOS2, LNEG1 ja LNEG2. CT1- ja CT2-näytteet määriteltiin Positive 1/2 kontrolleiksi, koska niiden genotyyppi tiedettiin heterotsygootiksi entuudestaan. NTC:t määriteltiin negatiivisiksi kontrolleiksi ja muut näytteet tuntemattomiksi. Laittevalmistajan mukaan NTC-näytteitä tulee olla vähintään kaksi joka analyysissä (Henry & Leysen 2021).

6.4.6 RNase P -verifikaatio

Puuttunut reagenssi saapui syyskuussa 2021 ja työ pääsi jatkumaan. QuantStudio™ 3-laitteen uusin ohjelmistoversio 1.4.1 ladattiin USB-tikulle laitteen Internet-sivuilta. Versio päivitettiin, minkä jälkeen yritettiin suorittaa RNase P -verifikaatio. RNase P-levy valmisteltiin käyttökuntoon ohjeiden mukaisesti sulattamalla sitä ensin viisi minuuttia huoneenlämmössä. Tämän jälkeen levy sekoitettiin PerkinElmer life sciences wallac Delfia® PlateShake -levyravistelijalla viisi sekuntia ja sentrifugoitiin Eppendorf Centrifuge 5804:llä 1000x g kaksi minuuttia. Valmis levy laitettiin QuantStudio™ 3-laitteeseen

ja käynnistettiin RNase P Verification -ohjelma. Laite antoi virheilmoituksen, jossa neuvottiin katsomaan laitteen lokitiedoista, mikä oli ongelma. Lokitiedot olivat tyhjä. RNase P Verification -ohjelma yritettiin käynnistää uudelleen, jolloin QuantStudio™ 3-laitte meni jumiin. Ongelmasta ilmoitettiin Thermo Fisher Scientificin yhteyshenkilölle Ruotsiin ja hän lähti selvittämään ongelmaa. Lopulta QuantStudio™ 3-laitteesta katkaistiin virta ja se käynnistettiin uudelleen. Laitteen käynnistyttyä tuli ilmoitus, että ohjelmistoversio oli päivittynyt. Levy poistettiin laitteen näytekammioista ja se jouduttiin heittämään pois käyttökelvottomana. Samalla huomattiin levyn menneen vanhaksi heinäkuussa 2021. Uusi RNase P-levy laitettiin tilaukseen.

Ongelman syytä lähdettiin pohtimaan ja mahdollisia vaihtoehtoja löytyi kaksi. On mahdollista, että QuantStudio™ 3-laitte ei ollut päivittynyt loppuun asti sillä päivitysilmoitus tuli vasta uudelleen käynnistämisen yhteydessä. Toinen vaihtoehto oli, että laite havaitsi RNase P-levyn olevan vanhentunut levyn viivakoodin perusteella eikä pystynyt suorittamaan verifikaatiota. Tämä oli kuitenkin epätodennäköisempi syy, sillä tällöin laite olisi osannut ilmoittaa levyn vanhentumisesta. Ongelmaa seuraavana päivänä Thermo Fisher Scientificin asiantuntija soitti ja opasti tekemään QuantStudio™ 3-laitteelle Self Verification -testin, jolla laite testaa oman toimintansa. Mikäli testi menisi läpi tulisi kokeilla RNase P-verifikaatio tyhjällä levyllä. Hän arveli, että laite ei toiminut odotetusti, koska Self Verification -testiä ei ollut tehty ja kertoi, että testi tulisi tehdä säännöllisin väliajoin laitteen toiminnan tarkastamiseksi. Toimenpiteet tehtiin ohjeiden mukaisesti ja laite vaikutti toimivan. Uusi RNase P-levy saapui seuraavalla viikolla, ja verifikaatio tehtiin QuantStudio™ 3-laitteella onnistuneesti.

6.4.7 Testianalyysit

Laktoosi-intoleranssitestin testaus aloitettiin syyskuun lopulla 2021. Ensimmäisessä testauksessa käytettiin vain maaliskuussa 2021 eristettyjä kontrollinäytteitä sekä vesikontrolleja standardiprotokollan (taulukko 3) toimivuuden varmistamiseksi sekä kontrollien genotyyppien selvittämiseksi. Aluksi selvitettiin Master Mix -ohjeesta (Thermo Fisher Scientific Inc. 2016: 9) yhteen reaktioon tarvittavat komponentit ja niiden määrät. Tiedot löytyivät Master Mix -ohjeen taulukosta 6 ja koska käytössä oli 96 kaivon laite ja standardiprotokolla, käytettiin 25 mikrolitran reaktiilavuutta. TaqPath™ ProAmp™ Master Mixin määrä oli annettu valmiiksi. TaqMan™ SNP Genotyping Assayn määrä oli annettu 20-kertaisen reagenssin mukaan, joten määrä jaettiin kahdella, koska käytettiin 40-kertaista reagenssia. DNA:n määrä päätettiin laimennoksia tehtäessä. Veden määrä

laskettiin vähentämällä edellä mainittujen komponenttien määrät lopputilavuudesta. Taulukossa 4 esitetään yhteen reaktioseokseen tarvittavat komponentit ja niiden määrät.

Taulukko 4. Yhteen reaktioon tarvittavat komponentit ja niiden määrät (Mukaillen Thermo Fisher Scientific Inc. 2016: 9).

Komponentti	Määrä (µl)
TaqPath™ ProAmp™ Master Mix (2x)	12,5
TaqMan™ SNP Genotyping Assay (40x)	0,625
DNA tai vesi (NTC)	5
Steriili vesi	6,875
Kokonaismäärä	25

Taulukossa 1 on esitetty laktoosi-intoleranssitestin suorittamiseen tarvittavat välineet ja reagenssit, jotka kerättiin kokoon. Laimennoksia tehtäessä selvitettiin, paljonko DNA:ta tarvitaan yhteen 25 µl reaktioon. Master Mix -ohjeen (Thermo Fisher Scientific Inc. 2016: 9) mukaan DNA-pitoisuuden tuli olla 0,2 ng/µl eli yhteensä DNA:ta tarvittiin 5 ng. Master Mix -ohjeen mukaan DNA-näytettä tulisi olla enintään 11,25 µl. Näiden tietojen pohjalta päätettiin laimentaa näytteet pitoisuuteen 1 ng/µl, jolloin yhtä reaktiota kohden tarvittiin 5 µl laimennosta. Laimennukseen käytettiin steriiliä vettä ja jokaista laimennosta valmistettiin 30 µl. Tällöin laimentamattoman DNA-näytteen pipetoitava tilavuus oli vähintään yhden mikrolitran. Kunkin laimentamattoman DNA-näytteen laimennokseen tarvittava määrä laskettiin laimennoskaavalla $c_1 * V_1 = c_2 * V_2$, missä c_1 = näytteen DNA-pitoisuus, V_1 = pipetoitavan näytteen tilavuus (tuntematon), $c_2 = 1$ ng/µl ja $V_2 = 30$ µl. Taulukossa 5 esitetään laskutoimitusten tulokset. Laimennoksia tehtäessä pipetoitiin ensin vedet ja sitten näytteet.

Taulukko 5. DNA-näytteiden laimennus.

Näyte	Näytteen DNA-pitoisuus (ng/μl)	Näytteen pipetointimäärä laimennokseen (μl)	Veden määrä laimennokseen (μl)
CT1	13,4	2,2	27,8
CT2	16,1	1,9	28,1
LNEG1	6,2	4,8	25,2
LNEG2	5,8	5,2	24,8
LPOS1	15,2	2,0	28,0
LPOS2	8,6	3,5	26,5

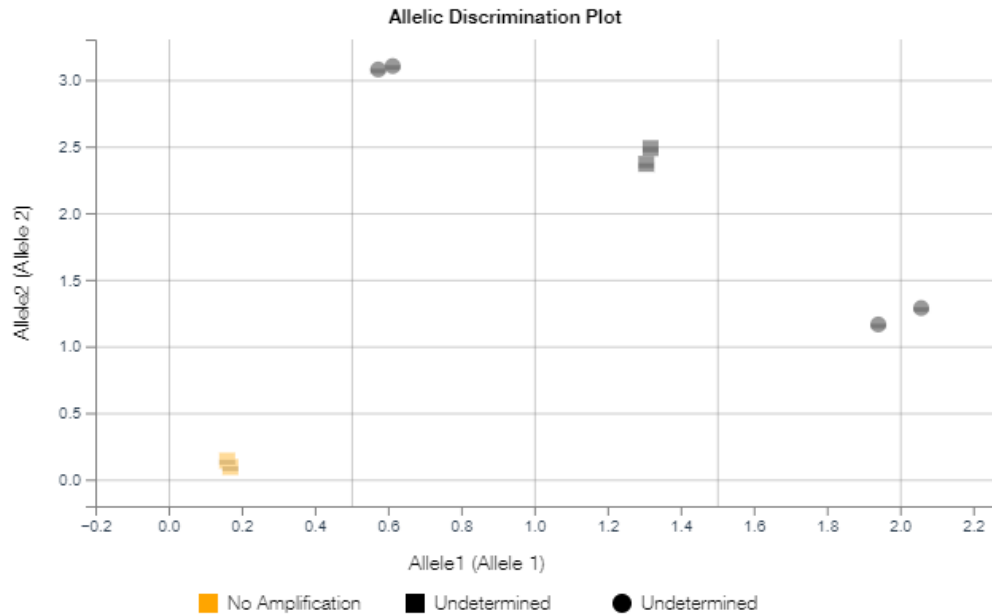
Sitten aloitettiin pipetointi reaktioputkiin. Taulukossa 5 esitettyjen näytteiden lisäksi valmistettiin kaksi vesikontrollia, jotka tuli sisällyttää jokaiseen analyysiin (Henry & Leysen 2021). Yleisestä käytännöstä poiketen taulukossa 4 esitetyt komponentit pipetoitiin suoraan reaktioputkiin yksitellen järjestyksessä 1. vesi 2. Master Mix 3. näytelaimennokset/vesi 4. genotyyppitysreagenssi. Näin tehtiin vähäisen näytemäärän takia, koska haluttiin säästää reagensseja. Ennen pipetointia Master Mix ja genotyyppitysreagenssi sekoitettiin huolellisesti Vortex-sekoittajalla. Tämän jälkeen Master Mix sentrifugoitiin lyhyesti VWR Mini Star mikrosentrifuugilla ja genotyyppitysreagenssi koputeltiin pöytää vasten putken pohjalle. Genotyyppitysreagenssi ei sopinut mikrosentrifuugin putkitelineeseen putken muodon vuoksi. Reaktioputket suljettiin litteillä korkeilla. Reaktioputket sekoitettiin huolellisesti Vortex-sekoittajalla ja sentrifugoitiin lyhyesti mikrosentrifuugilla, johon oli vaihdettu sopiva näyteteline. Sentrifugoinnilla poistettiin reaktioputkista ilmakuplat ja saatiin neste putkien pohjalle.

PCR-analyysiä varten aikaisemmin luotu ajopohja siirrettiin USB-tikun välityksellä QuantStudio™ 3-laitteeseen. Reaktioputket asetettiin laitteen näytekammioon ja käynnistettiin analyysi. Laite antoi virheilmoituksen, että lämpökannen laskeminen epäonnistui. Ongelma ratkaistiin lopulta asettamalla näytekammion vastakkaiseen reunaan tyhjä reaktioputkirivi (kuva 1). Analyysi kesti noin puolitoista tuntia. Analyysin valmistuttua tulokset siirrettiin USB-tikulle, josta ne tuotiin tietokoneelle tarkastelua varten. Reaktioputket poistettiin näytekammioista ja hävitettiin asianmukaisesti.



Kuva 1. Reaktioputkien asettaminen QuantStudio™ 3-laitteen näytekammioon. Huomaa näytekammion oikeassa laidassa oleva tyhjä tasapainoputkirivi.

Tulokset avattiin Design and Analysis -ohjelman versiolla 1.5.2. Tuloksia tarkasteltiin Genotyping-välilehdellä. Ohjelma asettaa näytteet Allelic Discrimination -kuvaajaan kunkin näytteen fluoresenssisignaalien perusteella (kuvio 3). NTC:t sijoituivat lähelle nollapisteitä, koska niissä ei tapahtunut monistumista. LPOS1 ja LPOS2 sijoituivat Alleeli2-akselilla korkealle ja Alleeli1-akselilla matalalle, joten vain alleeli 2 monistui kyseisissä näytteissä. Koska näytteen fenotyyppi tiedettiin laktoosia sietäväksi ja genotyyppitysreagenssin tiedoissa ilmoitettiin alleelin 1 olevan C ja alleelin 2 olevan T, näytteiden genotyyppi oli TT. CT1 ja CT2 sijoituivat molemmilla akseleilla korkealle, joten molemmat alleelit monistuivat kyseisissä näytteissä. Tämä vahvisti, että näytteiden genotyyppi oli CT. Näytteen CT1 puhtaus ei osoittautunut ongelmaksi vaan se monistui yhtä hyvin kuin CT2-näyte. LNEG1 ja LNEG2 sijoituivat Alleeli1-akselilla korkealle ja Alleeli2-akselilla matalalle, joten vain alleeli 1 monistui kyseisissä näytteissä. Näytteiden fenotyyppi oli laktoosi-intoleranssi ja genotyyppityksen tulosten perusteella niiden genotyyppi oli CC. Kävi siis ilmi, että kukin genotyyppi oli edustettuna kontrolleiksi valituissa näytteissä, mikä oli optimaalinen tilanne. Samalla tulokset vahvistivat, että standardiprotokolla toimi.



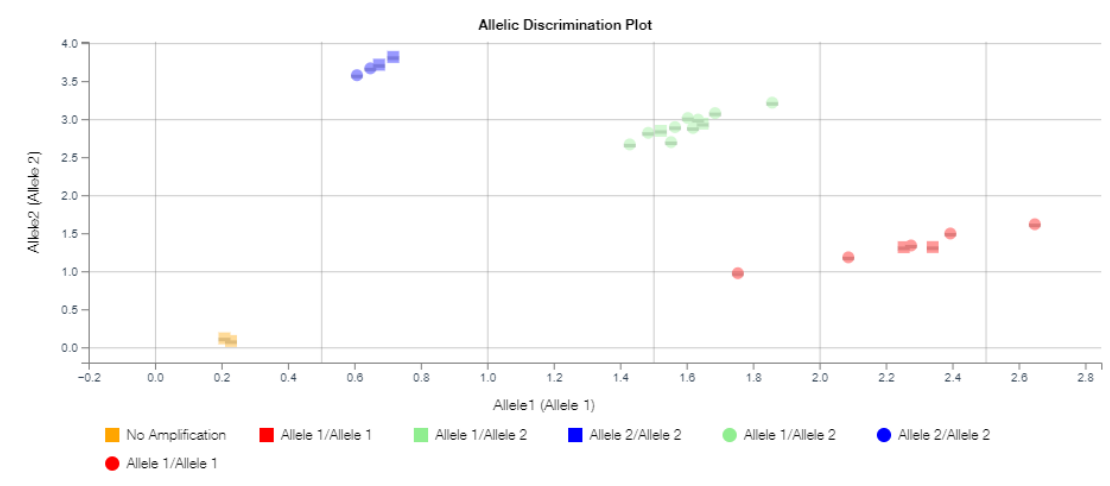
Kuvio 3. Ensimmäisen testianalyysin tulokset. Vesikontrollit näkyvät kuviossa keltaisina neliöinä. Harmailla neliöillä näkyvät CT-kontrollit, joiden tyyppiä oli asetettu Positive 1/2. Kaksi muuta kontrollia näkyvät harmaina palloina, koska niiden tyyppiä oli asetettu Unknown.

Laktoosi-intoleranssitestin käytettävyyden todentamiseksi analysoitiin laajempi testi-analyysi 16 tuntemattomalla näytteellä, kaikilla kuudella kontrollinäytteellä sekä kahdella vesikontrollilla. Näytteet laimennettiin pitoisuuteen 1 ng/μl ja kutakin laimennosta valmistettiin 30 μl. Reaktioseosta valmistettiin 25-kertaisesti taulukon 4 määrien mukaan. Näytteitä oli 24, joten pipetointivaraa oli liian vähän ja viimeiseen putkeen piti pipetoida kukin komponentti erikseen. QuantStudio™ 3-laitteen ohjeen mukaisesti kokeiltiin käyttää laitteen mukana tullutta näytetarjotinta näytteiden pipetoinnin apuna sekä tukena laitteessa näytteiden analysoinnin aikana. Näytetarjotin osoittautui kuitenkin epäkäytännölliseksi useista syistä. Ensinnäkin näytetarjotin lukitsee reaktioputket yhteen mikä hankaloittaa reaktioihin tarvittavien komponenttien pipetointia ryhmässä. Toiseksi reaktioputkien sentrifugointi täytyi tehdä Eppendorf Centrifuge 5804 -laitteella näytetelineessä, jolloin oli vaikeaa nähdä, oliko putkissa vielä ilmakuplia. Näytetarjottimen käyttö ei poistanut tasapainottavan putkirivin tarvetta näytekammiossa. Suurin ongelma oli se, että analysoinnin jälkeen reaktioputket piti avata, jotta ne saatiin ulos tarjottimesta. Näin ollen näytetarjottimen käytöstä luovuttiin.

Testianalyysiä 2 varten tehtiin oma ajopohja, johon kukin kontrollinäyte määriteltiin positiiviseksi kontrolliksi genotyyppin mukaan. CC oli Positive 1/1, CT oli Positive 1/2 ja TT

oli Positive 2/2 ensimmäisen testianalyysin ja genotyyppitysreagenssin tietojen perusteella. Tuntemattomat näytteet määriteltiin Unknown-tyyppiin. Näin tuloksista muodostetussa Allelic Discrimination -kuvaajassa (kuvio 4) eri genotyypit näkyivät eri väreillä ja värikoodeja vastaavat genotyypit lukivat kuvaajan alapuolella.

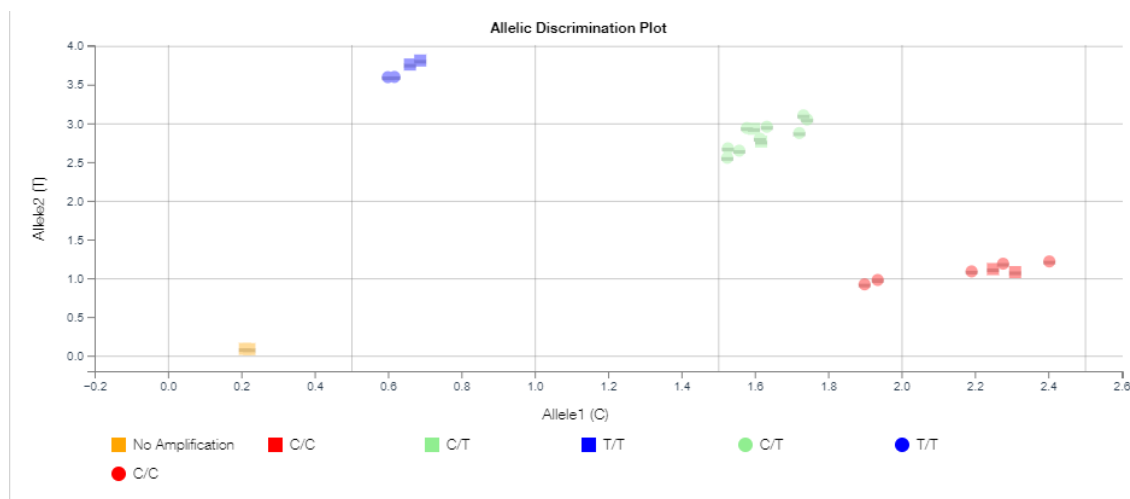
Analyysin tuloksena positiiviset kontrollinäytteet ja NTC:t sijoittuivat kuvaajassa oikeille paikoille ja tuntemattomat näytteet sijoittuivat johonkin kolmesta ryppästä genotyyppinsä mukaan. Kuvaajassa kaikki kontrollit esitetään neliöinä ja tuntemattomat näytteet ympyröinä. Analyysin laadun kannalta optimaalista olisi, että kaikki ryppäät olisivat tiiviitä ja erottuisivat toisistaan selvästi (Henry & Leysen 2021). Genotyypin CC rypäs oli levinnyt melko laajalle mutta ohjelma pystyi antamaan jokaiselle näytteelle tuloksen. Ongelman syynä oli todennäköisesti näytteiden laatu tai virheellinen DNA-pitoisuusmerkintä, jolloin kaikkien näytteiden pitoisuudet reaktioissa eivät olleet samat. Vastaisuudessa tämän kaltaista ongelmaa voidaan pyrkiä estämään huolehtimalla oikeaoppisesta DNA-pitoisuuden mittaamisesta ja laimennuksesta.



Kuvio 4. Toisen testianalyysin tulokset. Värikoodit: keltainen NTC, sininen TT, vihreä CT ja punainen CC. Neliöt ovat kontrolleja ja ympyrät tuntemattomia näytteitä.

Testianalyysi 3 tehtiin työohjeen laatimisen aloittamisen jälkeen. Testianalyysi kolme oli toteutukseltaan lähes identtinen testianalyysin 2 kanssa. Kaikki testianalyysissä 3 käytetyt näytteet oli laimennettu edellisellä kerralla. Reaktioseosta valmistettiin 26,5-kertaisesti, jolloin pipetointivara oli noin 10 %. Tämä riitti hyvin 24 putkeen. Yksittäiset reaktioputkirivit sentrifugoitiin VWR Mini Star -mikrosentrifuugilla ja asetettiin laitteen näy-

tekammioon tasapainoputkirivin kera ilman näytetarjontia. Analyysin tulokset on esitetty kuviossa 5. Kunkin näytteen tulosta verrattiin testianalyysiin 2 ja tulokset todettiin yhdenmukaisiksi.



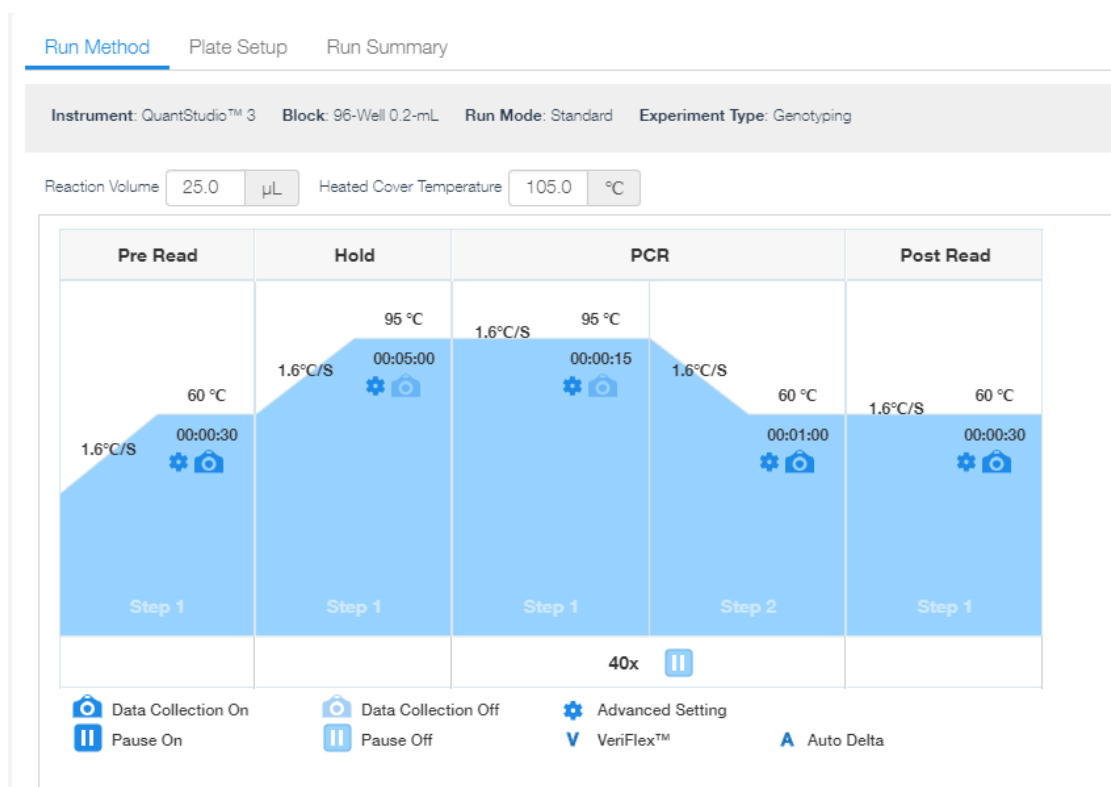
Kuvio 5. Kolmannen testianalyysin tulokset. Värikoodit: keltainen NTC, sininen TT, vihreä CT ja punainen CC. Neliöt ovat kontrolleja ja ympyrät tuntemattomia näytteitä.

6.4.8 Työohjeen ja opintojaksokäyttöön tarkoitetun ajopohjan luominen

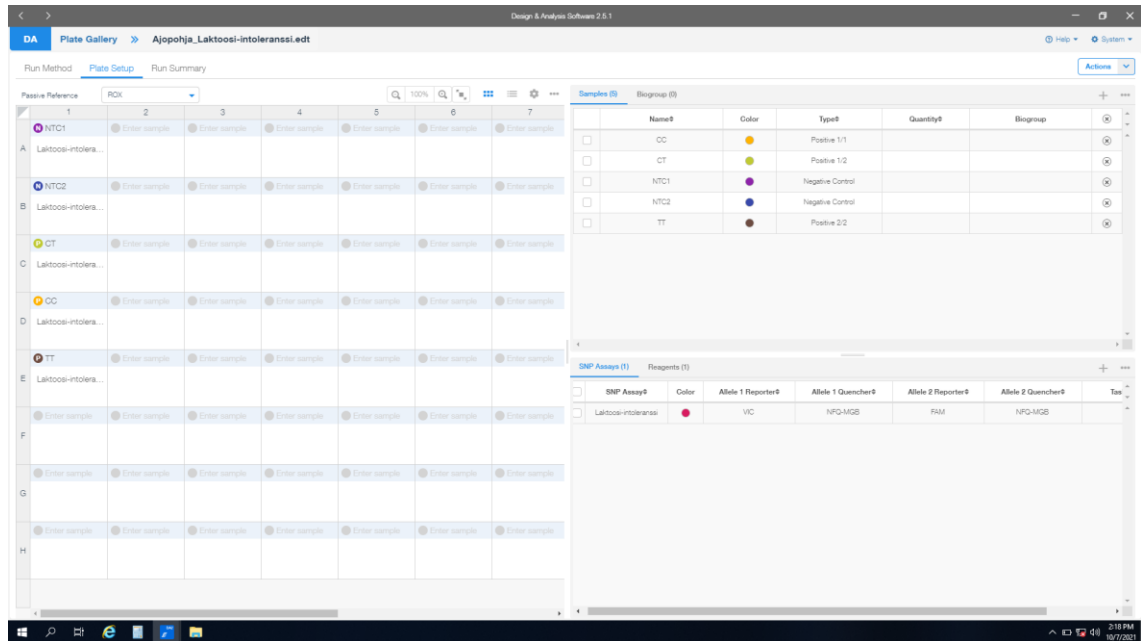
Testianalyysien 1 ja 2 perusteella aloitettiin työohjeen laatiminen. Työohje laadittiin tekstitiedostona Microsoft Word -ohjelmalla. Työohjeeseen päätettiin sisällyttää ohjeen tarkoitus, työn suorittamiseen tarvittavat välineet, ajopohjan luominen, QuantStudio™ 3-laitteen käynnistys, reaktioiden valmistelu, näytteiden analysointi QuantStudio™ 3-laitteella ja tulosten siirto USB-tikulle, tulosten tarkastelu sekä esimerkkikuvat ajo-ohjelmasta, näytteiden syöttönäkymästä ja tulosten tarkastelusta. Näin ohje sisältäisi testin suorittamisen kannalta oleelliset tiedot mahdollisimman havainnollisesti hyödyntäen opinnäytetyön toteutuksessa tehtyjä havaintoja. Työohjetta laatiessa pohdittiin tarvetta tehdä erillinen ohje laitteen ja analyysiohjelman versiopäivityksille. Tämän ohjeen teosta kuitenkin luovuttiin, koska todettiin että testi oli testattu juuri näillä versioilla, eikä se välttämättä toimisi optimaalisesti versiopäivitysten jälkeen.

Opintojaksokäyttöön tarvittava ajopohja (kuvat 2 ja 3) luotiin lokakuussa 2021 käyttäen aiempia ajopohjia mallina. Ajopohjaan merkittiin valmiiksi kaksi NTC:tä ja yksi kutakin genotyyppiä vastaavaa positiivista kontrollia. Laktoosi-intoleranssiprotokollaan merkittiin genotyyppitysreagenssin tietojen perusteella alleeli 1 C:ksi ja alleeli 2 T:ksi. Näin tu-

loskuvaajan alapuolella lukee suoraan genotyypit. Tässä vaiheessa huomattiin, että reaktiivilavuudeksi oli asetettu 50 µl Tämä korjattiin 25 µl:ksi. Virheestä seurasi päätös toistaa kontroleilla ja tuntemattomilla näytteillä tehty testianalyysi 2. Samalla pystyttiin testaamaan käytännössä laadittua työohjetta. Testauksen perusteella laktoosi-intoleranssitestin työohjeeseen tehtiin tarkennuksia ja ohje lähetettiin työelämäohjaajalle kommentoitavaksi.



Kuva 2. Tietokoneen näytöltä otettu kuva Design and Analysis -ohjelmalla luodusta ajo-ohjelmasta.



Kuva 3. Tietokoneen näytöltä otettu kuva Design and Analysis -ohjelmalla luodusta ajopohjan pipetointikaaviosta.

6.4.9 Työohjeen testaus

Työelämäohjaajan kanssa pidettiin pieni tapaaminen lokakuussa 2021, jossa keskusteltiin opintojaksolle tilattavista reagensseista ja sovittiin, että ensimmäiset opiskelijaryhmät testaavat työohjeluonnosta ja kirjoittavat siihen palautetta marraskuun alussa 2021. Lisäksi sovittiin, että opinnäytetyön tekijät pitävät osalle opiskelijaryhmistä pienen johdannon laktoosi-intoleranssitesttiin. Johdannon sisällöstä ei sovittu tarkemmin, vaan se jäi opinnäytetyön tekijöiden päätettäväksi. Osalle ryhmistä ei kuitenkaan pidetty johdantoa, jolloin työohjeen testaus oli johdannosta riippumatonta.

Johdannossa käytiin lyhyesti läpi laktoosi-intoleranssia ja sen alttiuden perinnöllisyyttä. Sitten kerrottiin reaaliaikaisesta PCR:stä menetelmänä hyvin lyhyesti. Ensimmäisellä testauskerralla näytettiin video TaqMan™-koetinten toimintaperiaatteesta. Jälkimmäisillä kerroilla videon näyttämisestä luovuttiin teknisistä syistä. Kahdella ensimmäisellä kerralla opiskelijoita ohjattiin aktiivisesti mutta kolmella viimeisellä kerralla pyrittiin siihen, että opiskelijat toimivat mahdollisimman itsenäisesti työohjeen mukaan.

Työohjeen testaukset suoritettiin marraskuussa 2021 Metropolia Ammattikorkeakoulun molekyyli-genetiikan opintojaksolla. Palautetta pyydettiin suullisesti, ja opiskelijoille annettiin myös mahdollisuus antaa kirjallista palautetta työohjeen paperiversiolle. Palautetta annettiin vaihtelevasti ryhmästä riippuen. Yhteensä palautetta pyydettiin viideltä eri opiskelijaryhmältä, joiden koot vaihtelivat 10 ja 15 opiskelijan välillä. Lisäksi palautetta saatiin opettajalta. Opinnäytetyön tekijät olivat paikalla neljällä testauskeralla ja tekivät itse myös huomioita ohjeen käytettävyydestä.

Testauksessa tehtyjen huomioiden ja saatujen kommenttien perusteella työohjetta muokattiin useilla eri tavoilla. Esimerkiksi työn tarkoituksen osalta tutkittavan SNP:n merkitystä laktoosi-intoleranssialttiuteen tarkennettiin. Lisäksi listaukseen työssä tarvittavista materiaaleista lisättiin lihavoidulla huomio reagenssien voimassaolon tarkistamisesta sekä siitä, että reaktioputkia ja niiden korkkeja tulee käsitellä hanskat kädessä. Joitain asioita korostettiin entisestään lihavoimalla niitä. Kuviossa 6 ja taulukossa 6 esitetään lisää esimerkkejä työohjeen testauksen myötä tehdyistä muutoksista.

Komponentti	Määrä (µL)		Komponentti	Määrä (µl)	
Master Mix (+4 °C)	12,5	➔	Master Mix (+4 °C)	12,5	} Reaktioseos
TaqMan SNP Genotyping Assay (40x) (-20 °C)	0,625		TaqMan SNP Genotyping Assay (40x) (-20 °C)	0,625	
DNA 1 ng/µL	5		Steriili vesi	6,875	
Vesi	6,875		DNA 1 ng/µl /Steriili vesi	5	
Kokonaismäärä	25		Kokonaismäärä	25	

Kuvio 6. Yhteen reaktioputkeen tarvittavien komponenttien taulukon muutokset työohjeessa

Taulukko 6. Työohjeeseen tehtyjä muutoksia testaukseen pohjautuen

Alkuperäinen	Lopullinen
Työn suorittamiseen tarvitaan:	<u>1) Kerää työn suorittamiseen tarvittavat materiaalit</u>
Ajo-ohjelma aukeaa, ÄLÄ tee muutoksia	Ajo-ohjelma aukeaa, älä tee muutoksia.
Lisää omat näytteet kaivosta 1F alkaen. Kaivot täytetään järjestyksessä ylhäältä alas ja vasemmalta oikealle.	Lisää omat näytteet ajopohjaan niin, että yksi putkistriippi tulee riville 12.
Anna tunnistettava nimi	Anna tiedostolle nimeksi päivämäärä muodossa DDMMYY_aamu/ilta riippuen laboraation ajankohdasta
Pipetoi kuhunkin putkeen 5 µL vettä tai DNA-laimennosta.	Pipetoi kuhunkin putkeen 5 µl reaktioseoksen tekoon käytettyä vettä (NTC-näytteet) tai DNA-laimennosta.
Spinnaa putket mikrosentrifuugissa	Spinnaa stripit yksitellen mikrosentrifuugissa
Aseta näytteet laitteeseen oikeassa järjestyksessä. – –. Lisää vastakkaiseen reunaan yksi tyhjä striippi tasapainottamaan. Ilman striippiä laite herjaa, ettei saa lämpökantta laskettua.	Aseta näytteet laitteeseen ajopohjan mukaisessa järjestyksessä. – –.

Tässä kappaleessa käsitellään lyhyesti taulukossa 6 tehtyjen muutosten syyt. Ensimmäinen muutos oli, että työn suorittamiseen tarvittavien materiaalien listasta tehtiin ensimmäinen työvaihe, jotta opiskelijat aloittaisivat työn materiaalien keräämisellä. Toinen muutos tehtiin yhtenäistämään työohjeen ulkoasua. Kolmas muutos tehtiin lisäämään opiskelijoiden valinnanvapautta ajopohjan täytössä. Neljäs muutos tehtiin, jotta ajopohjat nimettäisiin yhtenäisen periaatteen mukaisesti. Viidennessä korjauksessa muutettiin kaksi asiaa. Mikrolitran kirjoitusasu yhtenäistettiin ja lisäksi tarkennettiin mitä vettä NTC-näytteisiin pipetoidaan. Kuudennessa korjauksessa muutettiin myös kaksi asiaa. Putket-ilmalaus vaihdettiin stripeiksi yhteneväisyyden vuoksi. Strippi on laboratorioslangia ja tarkoittaa tässä raportissa käytettyä putkiriviä. Lisäksi korostettiin, että mikrosentrifuugiin kannattaa laittaa vain yksi putkirivi kerrallaan, jotta näytteitä sisältävät putkirivit eivät sekoitu keskenään. Viimeiseksi tarkennettiin, miten näytteet asetetaan laitteeseen, ja poistettiin turha tieto, joka korjattiin muutoksessa kolme.

DNA-näytteiden laimentaminen osoittautui kaikilla testauskerroilla vaikeaksi tehtäväksi. Eri testauskertojen välillä tätä osuutta työohjeesta muokattiin useasti. Lopulta laimennoksen tekovaiheessa korostettiin, että myös kontrollinäytteet tulee laimentaa samoin kuin tutkittavat näytteet. Lisäksi lisättiin huomio siitä, että DNA-näytteet laimennetaan steriiliin veteen. Koska laimennoskaavan ($c_1 * V_1 = c_2 * V_2$) käyttö ei ollut aina opiskelijoille helppoa, lopullisessa työohjeessa annetaan tähän tarkoitukseen yksinkertainen esimerkki laimennoksesta kursiivilla erotukseksi varsinaisista työvaiheista.

Opinnäytetyön raportointivaiheeseen kuului raportin kirjoittaminen ja seminaariesitys. Opinnäytetyö palautettiin ohjaajalle ja opponentille 4.11.2021 mennessä. Seminaarit pidettiin 10. ja 11.11.2021. Seminaarin jälkeen raportti ja työohje muokattiin valmiiksi opponenteilta, ohjaavalta opettajalta ja työelämäohjaajalta saatujen kommenttien perusteella. Raportin alkuperä tarkistettiin Turnitin-järjestelmässä ja palautettiin valmis raportti arvioitavaksi 19.11.2021. Opinnäytetyön julkistaminen tapahtui 23.-24.11.2021 Laboratoriolääketiede ja näyttely -tapahtumassa posterilla. Hyväksytty valmis työ julkaistiin Theseus-palvelussa www.theseus.fi.

7 Opinnäytetyön tuotos

Opinnäytetyön tuotoksena otettiin Metropolia Ammattikorkeakoulun bioanalytiikan tutkinto-ohjelman molekyyli-genetiikan laboraatio-opetuksen käyttöön uusi Applied Biosystems™ QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System -laite Thermo Fisher Scientificilta, perustettiin laitteelle reaaliaikaiseen PCR-menetelmään pohjautuva laktoosi-intoleranssitestit ja laadittiin tälle laktoosi-intoleranssitestille työohje. Työohjeeseen tuli sekä tekstiä (3 sivua) että kuvia (2 sivua). Työohjeen ensimmäisen sivun yläosa esitetään alla (kuva 4). Työohjeessa käytetyt kuvat otettiin näyttökuvina laitteen Design and Analysis -ohjelmassa.

QuantStudio™ 3-laite on reaaliaikaisen PCR-menetelmän käyttöön suunniteltu laite, jonka käyttöönotto perustui laitevalmistajan edustajien pitämään opastukseen sekä laitteen käyttöohjeisiin. Tälle laitteelle perustettiin laktoosi-intoleranssialttiuteen liittyvän SNP:n tutkimiseen testi. Testin perustaminen tehtiin laitevalmistajan opastuksen, käytettyjen reagenssien ja työelämäohjaajan toiveiden pohjalta.

Genotyypitys: Laktoosi-intoleranssi

Tämä ohje opastaa laktoosi-intoleranssialttiuteen liittyvän geenialueen monistamisen työvaiheet, reaaliaikaisen PCR-laitteen käytön ja genotyypityksen tulosten tarkastelun. Monistettava geenialue sijaitsee laktaasigeenin säätelyalueella ja etenkin eurooppalaisessa väestössä yhden emäksen vaihtelu (SNP) vaikuttaa siihen, sietääkö henkilö laktoosia. Myös muut syyt laktoosi-intoleranssiin ovat mahdollisia. Tällä testillä selvitetään näytteestä henkilön genotyyppi tämän emäksen suhteen. Mahdolliset vaihtoehdot ovat:

- CC: ei siedä laktoosia
- CT: sietää laktoosia
- TT: sietää laktoosia

Genotyyppi saadaan selville alleelispesifisten TaqMan™-koettimien avulla. Toinen koetin tunnistaa C-emäksen ja toinen T-emäksen. Koettimissa on eri väriset merkkiaineet, joiden fluoresenssia laite mittaa kunkin PCR-monistuskierroksen lopussa.

1) Kerää työn suorittamiseen tarvittavat materiaalit

- Tietokone, johon on asennettu laitteen Design and Analysis –ohjelma
- QuantStudio 3™ reaaliaikainen PCR-laite
- USB-tikku
- Valmiiksi eristetty DNA, josta genotyypitys tehdään (konsentraatio mitattu)
- Steriili vesi
- TaqPath™ ProAmp™ Master Mix (2x) (säilytys +4 °C) **tarkista voimassaolo!**
- TaqMan™ SNP Genotyping Assay (40x) (säilytys -20 °C) **tarkista voimassaolo!**
- Genotyypityskontrollit CC, CT ja TT (säilytys -20 °C)
- MicroAmp™ Optical Tubes (8 putkea/strippi) **käsittele hanskat kädessä!**
- MicroAmp™ Optical 8-Cap Strip **käsittele hanskat kädessä!**
- Steriilejä eppendorf-putkia
- Putkitelineitä
- Pipetit, filterilliset pipetinkärjet ja kärkiroskis
- Vortex-laite ja mikrosentrifuugi VWR Mini Star

2) Ajopohjan täyttö

Kuva 4. Opinnäytetyön tuotoksena laaditun työohjeen ensimmäinen sivu

Laktoosi-intoleranssitestin työohje sisältää lyhyen selostuksen työn tarkoituksesta, listan työn suorittamiseen tarvittavista välineistä, eri työvaihekokonaisuudet ja neljä havainnollistavaa esimerkkikuvaa. Työvaihekokonaisuudet olivat:

1. Kerää työn suorittamiseen tarvittavat materiaalit
2. Ajopohjan täyttö
3. Laitteen käynnistys
4. Reaktioiden valmistelu
5. Näytteiden analysointi QuantStudio™ 3-laitteella ja tulosten siirto USB-tikulle
6. Tulosten tarkastelu

Tulosten tarkastelu -osioon panostettiin. Varsinaisten työvaiheiden lisäksi siinä kerrotaan muutamia perusasioita, jotka voivat liittyä analysoitavien tulosten laatuun. Tavoitteena oli, että ohjeiden avulla tulosten tarkastelu olisi mahdollisimman yksinkertaista.

Tämä oli kunnianhimoinen tavoite, sillä reaaliaikaisen PCR-analyysin tulosten tulkinta voidaan herkästi kokea vaikeaksi. Työohjeen laatimisessa pyrittiin ottamaan mahdollisimman hyvin huomioon luvussa 6 mainitut käyttöohjeen käytettävyyden kahdeksan suunnitteluperiaatetta (Martikainen 2019: 10–16). Lisäksi työohjeen käytettävyyttä testattiin opiskelijaryhmillä ja työohjetta korjattiin huomioiden perusteella.

8 Pohdinta

8.1 Tuotoksen ja tulosten tarkastelu

8.1.1 Käyttöohjeen käytettävyyden kahdeksan suunnitteluperiaatteen toteutuminen

Laktoosi-intoleranssitestin työohjeen tekemiseen käytettiin apuna Martikaisen (2019: 10–16) Pro Gradu -tutkielmaa käyttöohjeiden käytettävyydestä. Tässä luvussa käsitellään kaikkien tutkielmassa esitettyjen suunnitteluperiaatteiden toteutuminen tämän opinnäytetyön tuotoksena syntyneessä laktoosi-intoleranssitestin työohjeessa.

Ensimmäinen työohjeessa käytetty suunnitteluperiaate oli tehtäväkeskeisyys (Martikainen 2019: 12). Laaditussa työohjeessa kuvataan tehtävien suorittaminen siinä järjestyksessä, missä ne on käytännössä kannattavaa tehdä. Kukin työvaihekokonaisuus on otsikoitu kuvaavasti ja ytimekkäästi. Toinen periaate oli oikea kirjoitustyyli (Martikainen 2019: 12–13). Virheitä pyrittiin välttämään tarkistamalla oikeinkirjoitus, mikä tosin oli haastavaa, koska työohjeessa käytetään sekä suomen- että englanninkielistä sanastoa tarkkuuden vuoksi. Lisäksi luonnosvaiheessa asiavirheiden korjaus tehtiin samalla, kun ohjetta testattiin käytännössä. Ohjeessa käytetään imperatiivia käyttäjää puhuteltaessa. Lyhenteitä on käytetty harkiten ja sellaiset lyhenteet, jotka eivät ole käyttäjälle valmiiksi tuttuja, on avattu niitä ensimmäistä kertaa käytettäessä esimerkiksi NTC, No Template Control, lyhennettä tarvitaan ajopohjan käytössä ja tulosten tulkinnassa.

Kolmas suunnitteluperiaate oli yksinkertaisuus (Martikainen 2019: 13). Ohjeessa on pyritty siihen, että vain työn suorittamisen kannalta tärkeät seikat on mainittu. Tulosten tarkastelu -osiossa on kuitenkin kerrottu myös analyysin laadun kannalta tärkeitä asioita siltä varalta, että ongelmia ilmenee. Nämä tiedot eivät kuitenkaan vie ohjeesta paljon tilaa ja ovat työn tulosten ymmärrettävyyden kannalta olennaisia. Tämä liittyy myös tavoitteeseen työn tulosten tarkasteluun panostamisesta, mikä koettiin tärkeänä heti

alusta asti. Ohjeen alussa on lyhyt esittely työn tarkoituksesta ja lista tarvittavista työvälineistä. Nämä lisäykset tehtiin, koska tuotetyön laatimisen työpajassa suositeltiin niitä. Toisaalta testin suorittamisen kannalta on tärkeää tietää, mitä on tekemässä ja miksi, ja lista työvälineistä helpottaa niiden keräämistä heti työn aluksi, jolloin testin suorittaminen on sujuvaa.

Neljäs suunnitteluperiaate oli tiedon saatavuus ja viides virheiden estäminen ja käsittely (Martikainen 2019: 13–15). Ohjeeseen on sisällytetty tavalliseen käyttöön riittävät ja vaadittavat tiedot. Nämä on valittu mukaan käytännön kokemusten perusteella, mutta on mahdollista, että ne eivät kata erikoistilanteita, joita ohjetta laatiessa ei ole tullut vastaan. Ohjeen lopussa olevat kuvat havainnollistavat käyttäjälle, miltä tietyt työvaiheet näyttävät käytännössä ja auttavat suorittamaan nämä työvaiheet. Ongelmatilanteista ei tehty erillistä liitettä, sillä tavallisimmiksi arvioitujen ongelmien välttämiseen tähtäävät huomautukset sisällytettiin niihin työvaiheisiin, joissa ne voivat tapahtua. Erityisen huomionarvoiset seikat on lihavoitu ohjeessa. Lisäksi Analyysin laatu -osiossa esitetään lyhyesti yleisimpien virhetilanteiden vaikutukset tuloksiin.

Kuudes suunnitteluperiaate oli yhtenäisyys (Martikainen 2019: 15). Sanavalinnat on pyritty yhtenäistämään ja ohjeen asetelut ja kirjasintyyli on pidetty samoina läpi koko ohjeen. Eri työvaihekokonaisuuksien erotteluun on käytetty selkeitä ja toistuvia otsikointityylejä. Jokaisen kokonaisuuden eri vaiheet on numeroitu aina aloittaen ykkösestä. Jokainen kuva on samankokoinen.

Seitsemäs suunnitteluperiaate oli tosielämävastaavuus (Martikainen 2019: 15–16). Ohjeen eri vaiheet on esitetty siinä järjestyksessä, joka on työn käytännön suorittamisen kannalta looginen. Ohjeessa käytetään osittain englanninkielisiä termejä, koska osa tarvikkeista ja laite ovat englanninkielisiä. Nämä termit ovat toteutuksen kannalta olennaisia, joten niitä ei ole käännetty suomeksi virheiden välttämiseksi. Käyttäjän kielitaidolle ei kuitenkaan ole erityisiä vaatimuksia, vaan käytetyt sanat ovat melko yksinkertaisia ja niiden merkitykset ilmenevät asiayhteydestä. Lisäksi ohjeen pituus olisi kasvanut merkittävästi, mikäli kaikki termit olisi käännetty suomeksi.

Kahdeksas suunnitteluperiaate oli joustavuus (Martikainen 2019: 16). Ohjeen eri työvaihekokonaisuudet ovat periaatteessa erillisiä, mutta on vahvasti suositeltavaa edetä työtä tehdessä ohjeessa annetussa järjestyksessä. Järjestys on laadittu sen perus-

teella, mikä on loogista ja työn suorituksen kannalta toimivaa. Ylipäätään laboratoriossa toimittaessa on yleensä tärkeää seurata ohjeita annetussa järjestyksessä, jotta työ etenee loogisesti, ja esimerkiksi ajankäyttö on optimoitu niin, ettei odottelua synny turhaan. Tästä syystä joustavuuden periaate ei ole tämän ohjeen käytettävyyden kannalta yhtä olennainen kuin edellä mainitut periaatteet.

Yhteenvedona näistä kahdeksasta suunnitteluperiaatteesta voidaan sanoa, että työohjeen laatimisessa on kaiken kaikkiaan noudatettu näitä periaatteita varsin esimerkillisesti. Periaatteista poikkeaminen on perusteltu harkitusti. Näiden suunnitteluperiaatteiden käyttö perustui teoreettiseen näkemykseen siitä, minkälainen on hyvä käyttöohje. Varsinainen arvio siitä, oliko näiden periaatteiden seuraaminen työohjeen laatimisessa onnistunut valinta, saatiin kuitenkin vasta testauttamalla työohjetta oikeissa opiskelijaryhmissä.

8.1.2 Työohjeen käytettävyyden arviointi käytännön testauksella

Työohjetta testattiin Metropolia Ammattikorkeakoulun bioanalytiikan opiskelijoiden toimesta marraskuussa 2021. Yhteensä testausta tehtiin viiden eri opiskelijaryhmän kanssa. Näistä neljällä kerralla opinnäytetyön tekijät olivat mukana laboratoriossa. Työohjeen käytettävyyttä ei arvioitu systemaattisesti, sillä kyselyn laatiminen olisi ollut työlästä ja vastausmääristä ei ollut varmuutta. Sen sijaan pyydettiin suullista palautetta ja opiskelijoita pyydettiin kirjoittamaan muutosehdotuksia suoraan tulostettuihin työohjeisiin. Näistä syistä palautteen määrästä ei ole tarkkoja lukuja.

Työohjeen käytettävyyden kannalta suurimmaksi ongelmaksi osoittautui DNA-näytteiden laimennusohjeistus. Ensimmäisessä luonnoksessa laimennosta suositeltiin tehtävän 30 µl, kun näytteen pitoisuus on alle 30 ng/µl. Tätä perusteltiin sillä, että tällöin pipetoitava näytemäärä on yli 1 µl. Lisäksi muistutettiin kontrollinäytteiden laimentamisesta koko ryhmälle. Käytännössä tämä ohjeistus todettiin heti epäselväksi, sillä monien näytteiden pitoisuudet olivat yli 30 ng/µl, eikä annettu määrä pätenyt. Lisäksi opiskelijat eivät ohjeen perusteella ymmärtäneet, että DNA tuli laimentaa steriiliin veteen. Ongelmat pyrittiin korjaamaan poistamalla suositusmäärävirke kokonaan ja korvaamalla se ohjeella valmistamaan laimennosta sen verran, että pipetoitava näytemäärä on yli 1 µl. Lisäksi kontrollinäytteiden laimentaminen aiheutti hämmennystä, kun siitä mainittiin vasta laimennusohjeen loppuksi. Tämä pyrittiin korjaamaan yhdistämällä DNA-näytteen ja kontrollinäytteiden laimennus samaan lauseeseen. Testauksessa tämäkin

ohje osoittautui vaikeaselkoiseksi. Samalla oli jäänyt maininta siitä, että kontrollinäytteet laimennetaan koko ryhmälle, ei jokainen erikseen. Lopulliseen työohjeeseen ongelmaa pyrittiin helpottamaan esimerkkilaskulla.

Alkuperäisessä luonnoksessa ohjeistettiin asettamaan tyhjä putkirivi laitteen näytekamion toiseen reunaan tasapainottamaan lämpökantta. Tämä huomio todettiin heti testauksessa turhaksi, sillä tyhjän putkirivin sijaan sinne voitiin laittaa analysoitava putkirivi. Testausten aikana huomattiin myös, että lista tarvittavista materiaaleista kannattaa muuttaa työvaiheeksi. Ajopohjatiedoston nimeäminen oli ohjeistettu yksinkertaisesti ”Anna tunnistettava nimi”. Tämä ei käytännön kannalta ollut toimiva vaihtoehto, ja se korjattiin täsmälliseksi ohjeeksi nimetä tiedosto tietyllä tavalla (taulukko 6, rivi 4).

Pieniä muutoksia tehtiin lukuisia. Sivunumerointi tehtiin kahden ensimmäisen testauksen jälkeen. Myös työvaihekokonaisuudet numeroitiin. Työohjeen ulkoasua yhtenäistettiin entisestään saatujen kommenttien perusteella. Tiettyjä työvaiheita tarkennettiin, esimerkiksi putkirivien sentrifugointi tuli tehdä yksi putkirivi kerralla, etteivät merkkeamattomat putkirivit mene sekaisin. Listaukseen tarvittavista materiaaleista lisättiin kaksi huomautusta. Reagenssien kohdalle lisättiin lihavoituna voimassaolon tarkistus ja putkirivien ja niiden korkkien kohdalle lisättiin lihavoituna huomio hanskojen käytöstä niitä käsitellessä.

Tehdyt muutokset olivat työohjeen käytettävyyden kannalta hyvin olennaisia. Kahdessa viimeisessä testauksessa opiskelijat tekivät työn ohjeen mukaan lähes täysin itsenäisesti. Tällöin kysymyksiä tuli lähinnä edellä käsitellystä DNA-näytteiden laimentamisesta. Valitettavasti esimerkkilaskun vaikutusta tähän ongelmaan ei ehditty tämän opinäytetyön aikataulun puutteissa arvioimaan. Useat opiskelijat myös kehuivat ohjetta hyväksi. Moni kommentoi, että työn ymmärtämistä olisi helpottanut se, että ohje olisi annettu etukäteen. Näin tullaan tulevaisuudessa toimimaan, kun työohje siirtyy osaksi molekyyli-genetiikan opintojakson laboraatio-opetusta.

8.2 Eettisyys

Tämän opinäytetyön tekemisessä on koko prosessin ajan toimittu rehellisesti, huolellisesti ja tarkasti. Myös tehdyistä virheistä on raportoitu. Kaikkiin muiden tekemään työhön perustuviin tietoihin on viitattu asianmukaisesti. Tiedonhaussa on pyritty toimimaan

mahdollisimman eettisesti ja valitsemaan lähteet alkuperäisistä julkaisuista käyttöoikeudet huomioon ottaen. Tutkimuslupaa ei tarvittu, sillä opinnäytetyö toteutettiin kokonaisuudessaan Metropolia Ammattikorkeakoulussa. Opinnäytetyösopimus laadittiin yhteistyössä ohjaajien kanssa ja siinä sovittiin mm. kunkin osapuolen vastuut, tulosten käyttöoikeudet, kustannukset ja salassapitovelvollisuus.

Testin kontrolleja varten otettujen näytteiden anonymisoinnista pidettiin hyvää huolta, sillä näytteisiin merkittiin vain tieto tutkittavan henkilön fenotyypistä. Kaikki testauksessa käytetyt tuntemattomat näytteet olivat nimensä mukaisesti tuntemattomia, eikä niiden antajien henkilöllisyyksiä saatu selville testauksen aikana.

Työn eettisyyden kannalta on hyvä pohtia testin käyttöönoton jälkeisiä kysymyksiä. Geneettisissä tutkimuksissa on erittäin tärkeää, että niihin osallistuvat ovat tietoisia siitä, mitä tutkitaan ja miten. Geneettinen tieto on arkaluonteiseksi luokiteltavaa, mikäli sitä voidaan käyttää henkilön tunnistukseen (Tietosuojalaki 1050/2018). Tässä tapauksessa kyse ei ole henkilön tunnistuksesta, vaan yksittäisen geenin toiminnan tutkimisesta. Silti on tärkeää, että testiä käyttävät opiskelijat tietävät, mistä testissä on kyse. Mikäli henkilö ei kuitenkaan halua tietää genotyyppiään tutkittavan alleelin suhteen, testistä tulee voida aina kieltäytyä.

Opinnäytetyön tuotos julkaistiin Metropolia Ammattikorkeakoulun bioanalytiikan molekyyli-genetiikan opintojakson laboratio-opetuksen yhteydessä. Julkaisussa esitettiin työohje ja kerrottiin sen käyttömahdollisuuksista ja rajoituksista. Esimerkiksi se kerrottiin, että testin tulos ei ole absoluuttinen totuus, vaan kertoo yhden laktoosi-intoleranssialttiutta aiheuttavan geenimuodon. Koko opinnäytetyöprosessin kohokohdat julkaistiin Laboratoriolääketiede ja näyttely -tapahtumassa posteriesityksellä. Posterissa on esitetty työn teoriataustaa, työohjeen sisältöä ja työohjeen testauksen tuloksia. Posterin teoriataustassa käytetyt lähteet on merkitty posteriin.

8.3 Luotettavuus

Aiheen rajaus tehtiin lähdetietoon perustuen. Koska Suomen klinisissä laboratorioissa tutkitaan laktoosi-intoleranssialttiuteen liittyen vain yhtä SNP:tä (Eerola 2021), oli luonnollista rajata tämäkin työ koskemaan sitä. Tämä kuitenkin tarkoittaa sitä, että testin tulos on vain suuntaa antava. Mikäli henkilön genotyyppi tutkittavan SNP:n suhteen on

CC, hän voi silti sietää laktoosia, sillä laktaasientsyymin toimintaa ylläpitäviä mutaatioita, kuin LCT-13 910:C→T, on olemassa muitakin. On myös tärkeää ottaa huomioon, että laktoosi-intoleranssi voi johtua myös muista syistä kuin geneettisestä alttiudesta, jolloin TT- tai CT-genotyypin omaavalla henkilöllä voi olla laktoosi-intoleranssi.

Testin toimivuuden ja luotettavuuden kannalta olisi ollut hyvä, jos uutta menetelmää olisi voinut verrata vanhaan, käytössä olevaan menetelmään. Sellaista ei kuitenkaan tällä kertaa ollut käytettävissä, joten menetelmävertailua ei voitu tehdä. Tämä hankaloitti työtä, koska tulosten oikeellisuuden toteamiseksi olisi tarvittu todellisuudessa toimivaksi osoitetun menetelmän tuloksiin vertaaminen. Näin ollen tulosten oikeellisuus ja toistettavuus voitiin selvittää vain toistamalla samoja näytteitä useammalla analyysikerrolla, kuten tehtiinkin.

Testin käyttöönoton kannalta oli tärkeää, että sitä testattiin useilla näytteillä. Olisi ollut optimaalista, jos kontrolleina olisi voinut käyttää keskuslaboratoriossa todennettuja näytteitä tai kaupallisia näytteitä, mutta tämän työn puitteissa tyydyttiin käyttämään itse otettuja näytteitä. Työn kannalta oli onnellinen sattuma, että kontrolleiksi valitut näytteet edustivat kaikkia kolmea mahdollista genotyyppiä. Testauksessa käytettiin myös useita tuntemattomia näytteitä, joita oli kertynyt opetuksen aikana varastoon. Myös negatiivisten kontrollien (vesikontrollit) käyttö oli olennainen osa laadunvarmistusta.

Työn luotettavuus parani sillä, että testin käyttöä harjoitteleva opiskelijaryhmä antoi palautetta sekä itse menetelmästä että sen työhjeesta. Luotettavuus parani, sillä pelkästään työn tekijöillä ei välttämättä ollut niin selkeää käsitystä siitä, mitä opiskelijat testiltä ja sen työhjeelta odottavat. Myös työn tilannut opettaja kommentoi työhjetta. Saadun palautteen pohjalta tehtiin parannuksia, esimerkiksi lisättiin sivunumerot ja numeroitiin eri työvaihekokonaisuudet, muutettiin lista tarvittavista materiaaleista ensimmäiseksi työvaihekokonaisuudeksi sekä tehtiin pieniä tarkennuksia, esimerkiksi korostettiin reagenssien voimassaolon tarkistusta.

Työn luotettavuutta arvioitaessa otettiin huomioon käytettyjen lähteiden kirjoitusvuosi. Osa käytetyistä lähteistä oli jo yli kymmenen vuotta vanhoja mutta nämä kyseiset lähteet olivat alkuperäistutkimuksia aiheesta, joten niiden käyttäminen oli perusteltua edelleen. Useat uudemmat artikkelit viittasivat näihin alkuperäisartikkeleihin, joten niiden tiedot olivat edelleen ajankohtaiset.

Tässä opinnäytetyössä perustetun testin ja sen työohjeen toimivuudet voitiin luotettavasti todeta käyttäen juuri kyseistä laitetta, näitä reagensseja ja reaktioputkia sekä ohjelmistoversioita. Tämän työn muualla hyödyntämisen kannalta olisikin tärkeää, että olosuhteet olisivat mahdollisimman samanlaiset. Jos laite on eri, on hyvin todennäköistä, että sen käyttö eroaa QuantStudio™ 3-laitteen käytöstä. Reagenssit ja reaktioputket valittiin laitteen kanssa yhteensopiviksi, joten eri laitteen käyttö voi vaatia eri materiaalien käytön. Tämä taas johtaisi siihen, että myös esimerkiksi reaktio-olosuhteet analysoinnissa todennäköisesti eroaisivat tässä työssä käytetyistä. Vaikka käytettäisi samaa laitetta ja samoja reagensseja, eri ohjelmistoversioiden käyttö voi aiheuttaa muutoksia esimerkiksi siinä, miten ajopohja luodaan Design and Analysis -ohjelmalla.

Työhön valittiin laitevalmistajan suosittelema TaqPath™ ProAmp™ Master Mix (2x). Master Mixiksi harkittiin myös muita vaihtoehtoja, mutta ne olivat kalliimpia ja olisivat todennäköisesti vaatineet optimointia. Lisäksi valittu Master Mix säilyy jääkaappilämpötilassa ja valmis reaktioseoskin säilyy valmistajan mukaan jopa 72 tuntia huoneenlämpötilassa. Suurin etu oli, että Master Mixin käyttöohje antoi reaktioseokseen tarvittavat komponentit määrineen ja ajo-ohjelman olosuhteet valmiiksi. Master Mixin tilaussivulla kerrottiin yhdestä 1 ml putkesta riittävän 200 reaktioon, mutta tämä ei pitänyt käyttämämme standardiprotokollan suhteen paikkaansa, koska yhteen standardireaktioon kului 12,5 µl eli 1 ml riitti teoriassa 80 reaktioon.

Master Mixin lisäksi otettiin TaqMan™ SNP Genotyping Assay (40x) C__2104745_20 (rs4988235). Genotyyppitysreagenssiksi olisi yhtä hyvin voinut valita myös C__2104745_10:n, joka eroaa valitusta reagenssista niin, että fluoroforit vastaavat alleeleita päin vastoin eli valitussa reagenssissa VIC merkitsee C-alleelia ja FAM T-alleelia, toisessa reagenssissa VIC merkitsee T-alleelia ja FAM C-alleelia. Genotyyppitysreagenssin tiedoissa SNP:n vaihtoehtoiset emäkset C/T on merkitty G/A, koska kyseessä on koettimen emäsjärjestys, joka on komplementaarinen tunnistamansa DNA:n emäsjärjestyksen kanssa. Tämän reagenssin valinta oli hyvä ratkaisu, sillä näin pystyttiin olemaan varmoja siitä, että se toimii lähes 100 % varmuudella.

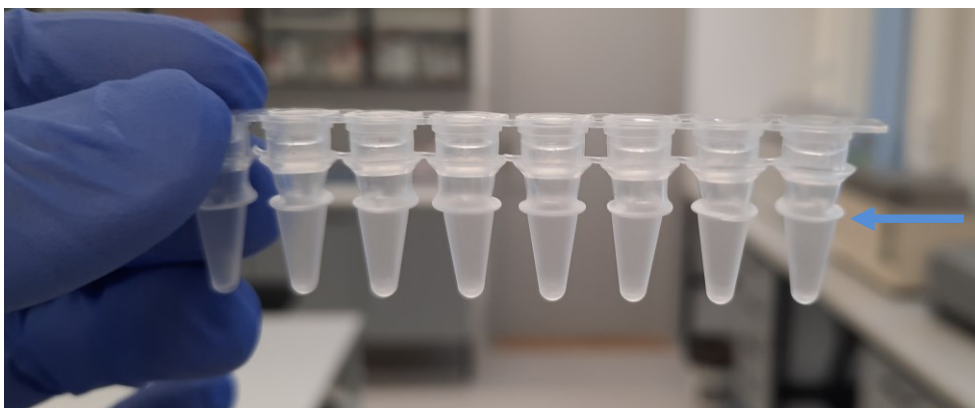
Testin toimivuuden kannalta yksi olennaisia kysymyksiä oli näytemäärä. Teoriassa (Henry & Leysen 2021) näytemäärän kasvattamisen pitäisi parantaa genotyyppitustulosten luotettavuutta, sillä kullekin näytteelle annettava genotyyppi riippuu näytteen sijainnista genotyyppityskuvaajassa (Allelic Discrimination -kuvaaja). Mitä enemmän saman

genotyypin omaavia näytteitä analyysissä on, sitä paremmin niiden tulisi ryhmittyä tiiviiksi ryppääksi. Jos saman genotyypin omaavia näytteitä sen sijaan on vain vähän, on mahdollista, ettei analyysiohjelma pysty ryhmittämään niitä luotettavasti. Tämä voi olla ongelma etenkin, mikäli näytteiden laatu ei ole optimaalinen. Tämän työn puitteissa oli sovittu, että näytemäärä pidettäisiin testauksessa maltillisena, koska tämä vastaa aitoa tilannetta, jossa testiä tullaan käyttämään. Yksittäisten opiskelijaryhmien koot vaihtelevat hieman, mutta ryhmissä on 10–20 opiskelijaa. Testin käyttökelpoisuuden kannalta oli siis tärkeää, että testi testattiin toimivaksi tällaisilla näytemäärillä.

Käytännössä näytemäärän kasvattamisen vaikutukset tulosten luotettavuuteen eivät aina ole yksioikoisia. Jos näytteistä osa on heikkolaatuisia, niiden määrän kasvattaminen analyysissä voi johtaa tulosten luotettavuuden heikkenemiseen. Tämä johtuu siitä, että heikkolaatuiset näytteet eivät välttämättä käyttäydy reaktiossa samalla tavoin kuin hyvälaatuiset näytteet, jolloin niiden tulosten sijoittuminen genotyyppityskuvajassa ei aina osu oikean genotyypin mukaiseen ryppääseen. Tällöin ryppäät eivät välttämättä erotu selkeästi toisistaan ja genotyyppien määrittäminen voi olla mahdotonta. Luonnollisesti heikko laatu häiritsee tulosten tulkintaa myös pienillä näytemäärillä, joten näytteiden laadun tulee olla mahdollisimman hyvä joka tilanteessa. Käytännössä näytteen laadun arvioinnissa hyödynnetään näytteen puhtausarvoa (A260/A280 tulisi olla 1,7–1,9). Jos näyte ei ole puhdas, analyysin tulos voi olla epävarma tai epäonnistunut. CT2-kontrollinäytteen puhtaus oli yli 1,9; mutta testauksessa todettiin näytteen antavan oikean tuloksen luotettavasti. Näin ollen epäpuhdaskin näyte pystyttiin analysoida onnistuneesti protokollalla.

Kontrollinäytteet ovat yleisesti tärkeässä roolissa kliinisten laboratoriotutkimusten luotettavuuden arvioinnissa. PCR-menetelmissä on tärkeää käyttää negatiivisia kontroleja, joihin ei ole lisätty näytettä. Näin voidaan varmistua siitä, etteivät reagenssit ole kontaminoituneet käytössä. Mikäli negatiivisissa kontroleissa tapahtuu monistumista, ei analyysin tuloksia voida hyväksyä. Ohjeiden mukaisesti testissä tulisi olla jokaista analyysiä kohti ainakin kaksi negatiivista kontrollia, joiden avulla tulokuvajän nollapistet määrittyvät. Negatiivisten kontrollien lisäksi on mahdollista sisällyttää analyysiin positiivisia kontrollinäytteitä, jotka toimivat laadunvarmistajina. Laittevalmistajan mukaan positiivisten kontrollien käyttö ei ole pakollista, mutta työn luotettavuuden lisäämiseksi niitä käytettiin. Genotyyppitysprotokollassa voidaan käyttää kaikkia kolmea eri genotyyppiä edustavia kontrollinäytteitä tai vain osaa niistä. Luotettavin tulos saadaan käyttämällä kaikkia kolmea, kuten tässä työssä tehtiin.

Ajo-ohjelman runko saatiin suoraan Master Mixin ohjeesta. Sen siirto laitteen Design and Analysis -ohjelmaan ajopohjaksi oli melko suoraviivaista, mutta tarkempia ajopohjan asetuksia muokattiin vähitellen, kun ohjelman käyttö tuli tutummaksi. Lopullisen ajopohjan asetukset esitetään kuvissa 2 ja 3. Testianalyysien perusteella ajo-ohjelma toimi: kaikki näytteet, pois lukien NTC:t, monistui analyseissä ja fluoresenssisignaalien perusteella tulokset saatiin jaoteltua kolmeen eri genotyypin ryppääseen toistettavasti. Ensimmäisissä analyseissä käytettiin vahingossa Design and Analysis -ohjelman antamaa oletustilavuutta, joka oli kaksinkertainen oikeaan reaktiutilavuuteen nähden. Tämä huomattiin vasta toisen testianalyysin jälkeen ja korjattiin viimeistä testi-analyysiä varten. Tulokset eivät kuitenkaan erityisesti muuttuneet tämän korjauksen seurauksena, mistä voitiin päätellä protokollan olevan varsin vakaa. Käytännössä eron huomasi siitä, että reaktioputket eivät painuneet lievästi kasaan oikealla tilavuusasetuksella (kuva 5).



Kuva 5. Reaktioputket painuivat kasaan analyysin aikana väärällä tilavuusasetuksella.

Tulosten analysointi oli laitevalmistajan opastuksessa esiteltyjen esimerkkien pohjalta suoraviivaista. Hyvälaatuisten tulosten kriteerejä olivat se, että NTC:t sijoittuvat Allelic Discrimination -kuvaajassa lähelle nollapisteitä sekä se, että jokainen genotyyppiryppäs erottuu selkeästi kahdesta muusta ja heterotsygoottitulokset sijoittuvat homotsygoottien väliin. Ideaalitulanteessa kukin ryppäs olisi tiivis ja yhtenäinen, mutta esimerkiksi vaihtelut DNA-pitoisuuksissa tai DNA:n laadussa voivat levittää ryppäitä kuvaajassa. Testianalyseissä 2 ja 3 analysoitiin samat näytteet ja molemmilla kerroilla CC-genotyypin näytteet levisivät jonkin verran, jolloin ryppäs ei ollut täysin yhtenäinen. Molemmilla kerroilla ohjelma pystyi kuitenkin luokittelemaan nämä näytteet CC-genotyyppiin. Varmaa syytä tälle ongelmalle on vaikea löytää, mutta on neljä todennäköistä vaihtoehtoa.

Ehkä näytteiden alkuperäiset pitoisuusmittaukset olivat epäonnistuneet tai pitoisuusmerkinnät oli kirjoitettu epäselvästi tai virheellisesti. Kenties laimennokset oli tehty väärin tai sitten näytteet olivat poikkeuksellisen epäpuhtaita. Osviittaa ongelman alkuperästä olisi voitu saada tarkastelemalla Quality Check -välilehden kuvaajia. Tätä ei kuitenkaan pidetty tarpeellisena, sillä ohjelma pystyi kuitenkin antamaan näytteille tulokset. Muuten kaikki näytteet sijoittuivat selkeästi omiin rypäisiinsä. Koska tulokset olivat genotyypitystarkoitukseen riittävät, ei erityistä optimointia tarvittu.

Toistettavuus on laboratoriotutkimusten tärkeä ominaisuus. Toistettavuudella tarkoitetaan sitä, että samoja olosuhteita ja menetelmiä käyttämällä täytyy voida saada sama tulos (Tieteen termipankki). Tämän testin testauksessa toistettavuutta tutkittiin analysoimalla kaikki tutkitut näytteet kahdesti. Toiston tuloksia verrattiin alkuperäisen analysoinnin tuloksiin, ja ne todettiin yhteneväisiksi. Toistettavuus oli siis hyvä.

8.4 Tuotoksen ja tulosten hyödyntäminen ja kehittämisehdotukset

Tuotosta hyödynnetään suoraan Metropolia Ammattikorkeakoulun bioanalytiikan molekyyli-genetiikan opintojaksoon sisältyvässä laboraatio-opetuksessa. Testiä tullaan käyttämään opinnäytetyössä laaditun työohjeen mukaisesti, kuitenkin niin, että opettajalla on oikeus muokata ohjetta käytännön tarpeiden perusteella.

Työohjeen laatimisen osalta olisi voinut alun alkaen panostaa enemmän lähdeaineiston keruuseen ja esimerkiksi perehtyä erilaisiin työohjeisiin, joita erilaiset laboratoriot käyttävät. Näin olisi saatu kenties parempi näkemys siitä, minkälaiset työohjeet koetaan toimiviksi laboratoriokäytössä. Toisaalta aineistonkeruuseen varattu aika oli rajallinen ja luotettavien sekä tuoreiden lähteiden löytäminen osoittautui haastavaksi. Lisäksi se, että työohjeen laatimiseen käytettiin vain yhtä kirjallista lähdettä ja yhtä työpajaa, johti siihen, että työohjeen sisältö voitiin rakentaa vahvasti kokemuksen pohjalta. Tästä joutuksen työohje vastaa myös työn laatijoiden näkemyksiä siitä, mitä hyvässä työohjeessa tulisi olla ja missä järjestyksessä juuri tätä työtä ajatellen.

Tulevaisuudessa työohjetta voisi kehitellä esimerkiksi vuorovaikutteisemmaksi. Näin ohjeeseen saisi sisällytettyä enemmän informaatiota helpommin käsiteltävässä muodossa. Esimerkiksi eri vaiheiden merkitykset lopputuloksen kannalta voitaisiin perustella yksityiskohtaisemmin erillisissä info-osioissa niille, jotka ovat kiinnostuneita. Vuo-

rovaikutteinen työohje voisi sisältää paljon kuvamateriaalia työn suoritusta helpottamaan, ehkä myös videoita. Tämän työn käytännön toteutus on melko helppoa, mutta itse menetelmän ymmärryksen lisäämiseksi voisi olla paikallaan esittää lyhyt video siitä, mitä laitteessa käytännössä tapahtuu analyysin aikana.

Laitteen käyttöönoton kannalta olisi ollut optimaalista, jos se olisi saatu suoritettua yhdessä vaiheessa ja mahdollisimman pian laitevalmistajan edustajien pitämän opastuksen jälkeen. Näin ei kuitenkaan tapahtunut, koska kaikkia testiä varten tilaukseen laitettuja reagensseja ei saatu suunnitellun aikataulun mukaisesti. Tästä syystä käyttöönotto venyi puolella vuodella, jolloin laitteen käyttöönoton kannalta välttämätön RNase P-levy oli vanhentunut ja opastuksessa annetut ohjeet olivat osin unohtuneet. Opastuksesta olisi kannattanut tehdä hyvät muistiinpanot, mutta niin ei toimittu, koska tarkoitus oli suorittaa käyttöönotto mahdollisimman pian.

QuantStudio™ 3-laitteen jatkokäyttöä ajatellen pohdittiin, olisiko tarpeellista tehdä erillinen ohjeistus laitteen ja Design and Analysis -ohjelman päivitystä varten. Lopulta tähän ei ryhdytty, koska siitä ei ollut varsinaisesti sovittu opinnäytetyön sopimuksen laatimisen yhteydessä ja koska tämän opinnäytetyön tuotoksena valmistunut testi on testattu toimivaksi juuri kyseisillä versioilla, jotka oli ennen testauksen aloitusta asennettu. Vaikka uudet versiot saattaisivat tulevaisuudessa tuoda lisäominaisuuksia ja korjata mahdollisia pikkuvirheitä, testin käytön kannalta näitä ei katsottu välttämättömiksi. Lisäksi ongelmana voisi olla se, että uuden version päivityksen jälkeen ilmaantuisi ongelmia, joiden selvittely veisi turhaan aikaa ja resursseja.

8.5 Ammatillinen kasvu

Opinnäytetyöprosessi on ollut todella opettavainen. Opinnäytetyön lähtökohtana oli Metropolia Ammattikorkeakoulun tekemä tilaus työstä, joka kehittäisi opetusta bioanalytiikan tutkinto-ohjelmassa. Tarkemmin työn aiheeksi valikoitui uuden reaaliaikaisen PCR-laitteen, QuantStudio™ 3:n, käyttöönotto, laktoosi-intoleranssin toteamistestien perustaminen ja työohjeen laatiminen opetuskäyttöä varten. Tilaava taho ei antanut työlle tarkkoja ohjeita tai kriteerejä, vaan työn suunnittelu oli pitkälti meidän omien näkemystemme ja kokemystemme varassa. Työn suunnitteluvaiheessa tehtiinkin paljon selvitystyötä aina siitä lähtien, mitä laktoosi-intoleranssi oikeastaan tarkoittaa. Reaaliaikainen PCR oli meille menetelmänä teoriassa tuttu juuri molekyyli-genetiikan opintojaksoilta, jonka opiskelu oli kesken aiheen saamisen aikoihin. Käytännön kokemusta sen

käytöstä ei kuitenkaan ollut, ja saimme mahdollisuuden selvittää menetelmään perustuvan testin perustamiseen liittyviä asioita itse. Erilaisista työohjeista meillä oli kokemusta, mutta emme olleet aikaisemmin erityisesti miettineet, mitä niiden laatiminen vaatii.

Työ pohjautuu vahvasti teorian tietoon, jonka etsimisestä ja hyödyntämisestä meillä oli jonkin verran kokemusta aiemmista opinnoista ja nykyisten opintojen eri opintojaksoilta. Näin laajan työn teoriapohjan rakentaminen kehitti tiedonhakutaitoja ja lähdekriittisyyttä. Entisestään Työn aihealueista löytyi työohjeen laatimista lukuun ottamatta runsaasti lähdemateriaalia, ja relevanttien lähteiden löytäminen oli työlästä. Myös tieteellisen tekstin kirjoittamisessa sai olla tarkkana, kun kaiken tiedon tuli pohjautua lähteisiin, mutta olla samalla omaa tekstiä. Myös lähdeviittausten merkitseminen juuri oikealla viitustekniikalla vaati harjoitusta ja toistoa.

Opinnäytetyön raportin laatiminen harjaannutti Microsoft Wordin käyttöön sekä kehitti kirjoitustaitoja. Tarkasti määritellyt muotoilut ja tyyli aiheuttivat ajoittain päänsäivää, jolloin ongelmanratkaisutaidot pääsivät kehittymään. Samoin oikeiden sanamuotojen valinta ja niissä pysyminen osoittautuivat välillä hieman vaikeaksi. Pyrimme kuitenkin mahdollisimman ymmärrettävään tekstiin, vaikka tiedostammekin, että osa käsitteistä voi olla lukijalle vieraita. Etenkin Toiminnan eteneminen -luku oli kirjoittamisen kannalta haastava, koska kaikki asiat piti kuvata mahdollisimman tarkasti ja yksityiskohtaisesti. Tämä vaatimus meni välillä luettavuuden edelle, sillä kappaleet venyivät herkästi pitkiksi ja sisältävät todella paljon informaatiota.

Opinnäytetyössä käytämme paljon sanastoa, joka liittyy vahvasti omaan alaamme. Olemme pyrkineet avaamaan kaikki käyttämämme käsitteet mahdollisimman helposti ymmärrettäviksi, mutta tiedostamme, että kaikkia käsitteitä ei välttämättä ole aina osattu selittää niin, että asiaan vihkiytymätön aivan ymmärtäisi, mistä on tarkalleen kyse. Menetelmän takana oleva teoria voi vaikuttaa monimutkaiselta, mutta työn aikana saimme huomata, että reaaliaikainen PCR genotyyppitysmenetelmänä on yllättävän yksinkertainen. Toivomme, että opinnäytetyössä esitetyt kuvat ja kuvat auttavat havainnollistamaan teoriaa ja toteutusta.

Käyttöönoton venymisestä seurasi se, että käyttöön otossa ilmeni ongelmia. Ohjelmistopäivityksen jälkeen unohdettiin suorittaa Self Verification Test, ja toisaalta laite ei ilmoittanut päivityksen onnistumisesta heti, vaan vasta myöhemmin uudelleen käynnistyksen

jälkeen. Kun vielä yritettiin ajaa RNase P -verifikaatio vanhentuneella levyllä, laite meni jumiin eikä toiminut ennen uudelleen käynnistystä. Tästä seurasi yhteydenotto laitevalmistajan yhteyshenkilölle, jonka kanssa ongelmaa yritettiin ratkaista. Aluksi ongelmaa pidettiin laiteteknisenä ja jopa QuantStudio™ 3-laitteen lähettämistä huoltoon ehdotettiin. Lopulta kuitenkin ongelman todennäköisimmät syyt (edellä mainitut) saatiin selvitettyä, kun laitteen jumiutumiseen johtaneet tapahtumat selvitettiin systemaattisesti yhdessä laiteasiantuntijan kanssa. Hän osasi antaa ohjeet laitteen toiminnan testaamiseen, joiden pohjalta toimittiin ja todettiin laite toimivaksi. Tämä prosessi kehitti ongelmanratkaisutaitoja ja harjoitti kommunikointitaitoja, kun ongelmaa selviteltiin englanniksi sekä sähköpostitse että puhelimesta. Samalla opittiin konkreettisesti, miksi ohjeiden noudattaminen on tärkeää ja nämä opit pystyttiin sisällyttämään työn tuloksena laadittuun työohjeeseen. Ilman näitä ongelmia näitä oivalluksia ei todennäköisesti olisi tullut. Lopulta laite saatiin otettua käyttöön onnistuneesti.

Kaikkiaan koemme opinnäytetyöprosessin kehittäneen useita työelämässä tarvittavia taitoja. Bioanalytikkoliiton Internet-sivuilla kerrotaan, että bioanalyttikon taito- ja ominaisuusvaatimuksia ovat mm. laboratoriotutkimusprosessin hallinta, asiakaspalvelu- ja vuorovaikutustaidot, kiinnostus luonnontieteisiin, tekninen osaaminen, tarkkuus, huolellisuus ja järjestelmällisyys sekä jatkuva halu oppia uutta ja kehittyä ammatissa (Bioanalytikkoliitto). Tässä työssä on syvennytty luonnontieteisiin sekä laktoosi-intoleranssin taustan suhteen että käytettyjen menetelmien osalta. Tekninen osaaminen on kehittynyt QuantStudio™ 3-laitteen käytön opetteluun myötä. Työn lähtökohtana on ollut halumme kehittyä ammatissamme ja toive syventymisestä uusien menetelmien käyttöön-ottoon.

Lähteet

Bioanalytikkoliitto. Mikä ihmeen bioanalytikko? <<http://www.bioanalytikkoliitto.fi/mika-ihmeen-bioanalytikko/>>. Viitattu 16.11.2021.

Eerola, Hannaleena 2021. Laktoosi-intoleranssin DNA-testi (B-Lakt-D). Laboratoriotutkimusten tulkinta. Duodecim Terveyskirjasto. Kustannus Oy Duodecim. <<https://www.terveyskirjasto.fi/snk03010/laktoosi-intoleranssin-dna-testi-b-lakt-d>>. Viitattu 1.11.2021.

Enattah, Nabil Sabri & Sahi, Timo & Savilahti, Erkki & Terwilliger, Joseph D & Peltonen, Leena & Järvelä, Irma 2002. Identification of a variant associated with adult-type hypo-lactasia. *Nature Genetics* 30. 233–237.

Eskelinen, Seija 2016. Laktoosikoe (Pt-Lakt-R1). Laboratoriotutkimusten tulkinta. Duodecim Terveyskirjasto. Kustannus Oy Duodecim. <<https://www.terveyskirjasto.fi/snk03100/laktoosikoe-pt-lakt-r1>>. Viitattu 13.11.2021.

Gariyban, Lilit & Avashia, Nidhi 2013. Polymerase Chain Reaction. *Journal on Investigative Dermatology* 133 (3). 1–4. <[https://www.jidonline.org/article/S0022-202X\(15\)36139-X/fulltext](https://www.jidonline.org/article/S0022-202X(15)36139-X/fulltext)>. Viitattu: 19.1.2021.

Green, Michael & Sambrook, Joseph 2019. Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harbor Protocols* 6. 436–456. <<http://cshprotocols.cshlp.org/content/2019/6/pdb.top095109.full>>. Viitattu: 19.1.2021.

He, Hua-Jun & Stein, Erica V. & DeRose, Paul & Cole, Kenneth D. 2018. Limitations of methods for measuring the concentration of human genomic DNA and oligonucleotide samples. *Biotechniques* 64 (2). 59–68. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6157598/pdf/nihms-1506508.pdf>>.

Heid, Christian A. & Stevens, Junko & Livak, Kenneth J. & Williams, Mickey P. 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Research* 6 (10). 986–994. <<https://genome.cshlp.org/content/6/10/986.long>>.

Henry, Léocadie & Leysen, Valerie 2021. The Genotyping Workflow. Verkkokoulutus 22.2.2021.

Hiltunen, Erkki & Linko, Linnéa & Hemminki, Sari & Hägg, Margareta & Järvenpää, Eila & Saarinen, Pertti & Simonen, Seppo & Kärhä, Petri 2011 (toim.). Laadukkaan mittauksen perusteet. Metrologian neuvottelukunta. MIKES Julkaisu J4/2011. 116. <<http://www.vtt.fi/inf/pdf/MIKES/2011-J4.pdf>>. Viitattu 15.11.2021.

Hägg, Margareta 2016 (toim.). Validoinnin suunnittelun opas. Teknologian tutkimuskeskus VTT Oy. VTT Technology 276. 11. <<https://www.vttresearch.com/sites/default/files/pdf/technology/2016/T276.pdf>>. Viitattu 15.11.2021.

Imtiaz, F & Savilahti, E & Sarnesto, A & Trabzuni, D & Al-Kahtani, K & Kagevi, I & Rashed, MS & Meyer, BF & Järvelä, I 2007. The T/G–13915 variant upstream of the

lactase gene (LCT) is the founder allele of lactase persistence in an urban Saudi population. *Journal of Medical Genetics* 44 (10). e89. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2597971/pdf/e89.pdf>>. Viitattu 11.12.2020.

Kucukkal, Tugba G. & Yang, Ye & Chapman, Susan C. & Cao, Weiguo & Alexov, Emil 2014. Computational and Experimental Approaches to Reveal the Effects of Single Nucleotide Polymorphisms with Respect to Disease Diagnostics. *International Journal of Molecular Sciences* (15). 9670–9717. <<https://www.mdpi.com/1422-0067/15/6/9670/htm>>. Viitattu 22.1.2021.

Kuntaliitto 2021. Laboratoriotutkimusnimikkeistö 2021. <https://www.kuntaliitto.fi/sites/default/files/media/file/Laboratoriotutkimusnimikkeistö-2021_0.pdf>. Viitattu 1.11.2021.

Lewinsky, Rikke H & Jensen, Tine G.K & Møller, Jette & Stensballe, Allan & Olsen, Jørgen & Troelsen, Jesper T 2005. T213910 DNA variant associated with lactase persistence interacts with Oct-1 and stimulates lactase promoter activity in vitro. *Human Molecular Genetics* 14 (24). 3945–3953. <<https://academic.oup.com/hmg/article/14/24/3945/2355865>>. Viitattu 11.12.2020.

Martikainen, Heidi 2019. Käyttöohjeiden käytettävyys. Suunnitteluperiaatteiden kehittäminen sosiaali- ja terveydenhuollon asiakastietoja käsittelevien järjestelmien käyttöohjeita varten. Pro Gradu –tutkielma. Tampere: Tampereen yliopisto. Informaatioteknologian ja viestinnän tiedekunta. 10–16. <<http://urn.fi/URN:NBN:fi:tuni-201909163318>> Viitattu 19.1.2021

Misselwitz, Benjamin & Butter, Matthias & Verbeke, Kristin & Fox, Mark R 2019. Update on lactose malabsorption and intolerance: pathogenesis, diagnosis and clinical management. *Gut* 68. 20802091. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6839734/>>. Viitattu 11.12.2020.

Qiagen Sample and Assay Technologies 2016. QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook. Käyttöohje. <<https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=62a200d6-faf4-469b-b50f-2b59cf738962&lang=en>>. Viitattu 25.3.2021.

Schwab, Ursula & Tunturi, Satu 2020. Laktoosi-intoleranssi. Lääkärikirja Duodecim. Terveyskirjasto. <<https://www.terveyskirjasto.fi/dlk00038>>. Viitattu 12.11.2021.

Tan, Siun Chee & Yiap, Beow Chin 2009. DNA, RNA, and Protein Extraction: The Past and The Present. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2009. 1–10. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2789530/>>.

The 1000 Genomes Project Consortium 2015. A global reference for human genetic variation. *Nature* 526 (7571). 68–74. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4750478/>>. Viitattu 22.1.2021.

The Nobel Prize in Chemistry. <<https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/>>. Viitattu 20.1.2021.

Thermo Fisher Scientific Inc. 2016. TaqPath™ ProAmp™ Master Mixes. USER GUIDE. Käyttöohje. <https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2FMAN0015758_TaqPathProAmpMMix_UG.pdf>. Viitattu 6.10.2021.

Thermo Fisher Scientific Inc. 2018. QuantStudio™ Design and Analysis Desktop Software. USER GUIDE. Käyttöohje. <<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/A28567#/A28567>>. Viitattu 27.1.2021.

Tieteen termipankki. Nimitys: toistettavuus. <<https://tieteentermipankki.fi/wiki/Nimitys:toistettavuus>>. Viitattu 4.11.2021.

Tietosuojalaki 1050/2018. Annettu Helsingissä 5.12.2018. <<https://finlex.fi/fi/laki/ajantasa/2018/20181050>>. Viitattu 15.1.2021.

Zhu, Hanliang & Zhang, Haoqing & Xu, Ying & Lassakova, Sona & Korabecna, Marie & Neuzil, Pavel 2020. PCR past, present and future. *Biotechniques* 69 (4). 1–9. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7439763/>>. Viitattu 19.1.2021.