



Sonja Anttinen ja Tanya Hathaway

Geenikloonaus bakteerisolussa

Laboraatiotunnin kokoaminen ja työhöjeen laatiminen bioanalytikko-opiskelijoille

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Sosiaali- ja terveystieteiden ammattikorkeakoulututkinto

Bioanalytiikan tutkinto-ohjelma

Opinnäytetyöraportti

18.11.2022

Tekijä	Sonja Anttinen Tanya Hathaway
Otsikko	Geenikloonaukseen bakteerisolussa: Laboraatiotunnin kokoaminen ja työohjeen laatiminen bioanalyttikko-opiskelijoille
Sivumäärä	65 sivua
Aika	18.11.2022
Tutkinto	Sosiaali- ja terveystieteiden ammattikorkeakoulututkinto
Tutkinto-ohjelma	Bioanalytiikan tutkinto-ohjelma
Ohjaajat	Lehtori Heidi Malava Lehtori Elina Hotanen
<p>Kloonauksella tarkoitetaan jonkin tietyn organismin kopioimista, jolloin syntyvä uusi elävä organismi on identtinen perimältään alkuperäisen organismin kanssa. Geenikloonauksessa haluttu DNA-fragmentti liitetään vektoriin, esimerkiksi plasmidiin, jolloin saadaan yhdistelmä-DNA, joka siirretään isäntäsoluun. Kun halutaan kloonata geenejä, käytetään isäntäsoluna usein bakteeria, yleisimmin <i>Escherichia coli</i> -bakteeria, kuten myös tässä opinnäytetyössä käytettiin.</p> <p>Opinnäytetyön tarkoituksena oli pystyttää Metropolia Ammattikorkeakoululle täysin uusi menetelmä, geenikloonaukseen bakteerisolussa. Opinnäytetyön tilaajana toimi Metropolia Ammattikorkeakoulu. Tarkoituksena oli myös suunnitella laboraatiotunti ja laatia siitä tukeva suomenkielinen työohje. Opinnäytetyön tavoitteena oli lisätä opiskelijoiden oppimista ja ymmärrystä kloonaukseen ja sen menetelmiin liittyen sekä saada kloonaukseen osaksi bioanalyttikko-opiskelijoiden molekyyli- ja geenetiikan opintojakson laboraatiotunteja.</p> <p>Opinnäytetyö toteutettiin toiminnallisena kehittämistyönä. Tässä opinnäytetyössä keskityttiin kehittämiskysymykseen, voidaanko molekyyli- ja geenetiikan opintojaksolla toteuttaa kloonaukseen käsittelevä laboraatiotunti? Menetelmä rakennettiin tietoperustan pohjalta ja sitä testattiin kahden viikon jaksolla useita kertoja. Menetelmän valintaa ohjasi kustannustehokkuus ja saatavilla olevat resurssit. Menetelmäksi valikoitui perinteinen kloonaukseen, jonka vaiheita olivat digestio, defosforylaatio, ligaatio, lämpöshokki-transformaatio sekä kloonauksen onnistumisen havainnointi, joka tehtiin antibioottia sisältävällä viljelymaljalla. Toiminnan kulku kuvattiin tarkasti raportissa.</p> <p>Käytössä olleiden resurssien puitteissa saadut tulokset jäivät epäselviksi ja menetelmä tarvitsee jatkokehittelyä. Tuloksia voidaan hyödyntää menetelmän jatkokehittelyssä kehittämisehdotuksia hyödyntäen, kuten käyttämällä kaupallisia plasmideja ja kompetentteja bakteerisoluja.</p>	
Avainsanat	DNA, <i>Escherichia coli</i> , geeni, kloonaukseen, molekyyli- ja geenetiikka

Author	Sonja Anttinen, Tanya Hathaway
Title	Gene Cloning in Bacterial Cell: Planning the Practical Work Lesson and Produce Instructions for Biomedical Laboratory Science Students
Number of Pages	65 pages
Date	18 November 2022
Degree	Bachelor of Health Care
Degree Programme	Biomedical Laboratory Science
Instructors	Heidi Malava, Lecturer Elina Hotanen, Lecturer
<p>The purpose of cloning is copying a specific organism genetically and to produce an identical copy of the original organism. In gene cloning, the desired fragment of DNA is attached to a vector, such as a plasmid, which generates a recombinant DNA that is transferred to the host cell. Most commonly a bacterium, usually <i>Escherichia coli</i>, is used as the host cell in gene cloning, as in this thesis.</p> <p>The purpose of the thesis was to set up an entirely new method for Metropolia, gene cloning in a bacterial cell. The thesis was commissioned by Metropolia University of Applied Sciences. The purpose was as well to design a practical work lesson and prepare a supporting instruction in Finnish. The aim of the thesis was to increase students learning and understanding of cloning and its methods. The aim was to make cloning a part of molecular genetics course's practical work lessons.</p> <p>The thesis was conducted as a functional development project. This thesis focused on the development issue: can a practical work lesson of cloning be put into practice in the molecular genetics course? The method was assembled on knowledge-based research and experimented several times in a two-week period. The choice of method was guided by cost efficiency and available resources. The method chosen was traditional cloning which consisted of digestion, dephosphorylation, ligation, heat shock transformation and detection of cloning success using a culture dish containing an antibiotic. The work progress was described precisely in the report.</p> <p>The results remained inconclusive due to limited resources and the method needs further development. The results can be utilized in the further development of the method with suggestions for improvements such as using commercial plasmids and competent bacterial cells.</p>	
Keywords	cloning, DNA, <i>Escherichia coli</i> , gene, molecular genetics

Sisällys

1	Johdanto	1
2	Opinnäytetyön tarkoitus, tavoitteet ja kehittämistehtävät	2
3	Molekyyli-genetiikka	3
4	Kloonaustekniikat	3
5	Geenikloonaus	5
5.1	Insertti ja vektori	6
5.2	Restriktioentsyymi ja alkalinen fosfataasi	9
5.3	Ligaasientsyymi	10
5.4	Transformaatio ja havainnointi	11
6	Laboraatio-opetus	12
7	Työohje	13
8	Opinnäytetyöprosessi	14
8.1	Menetelmälliset lähtökohdat	15
8.2	Toimintaympäristö, kohderyhmä ja hyödynsaajat	16
8.3	Toiminnan eteneminen ja työskentelyn kuvaus	17
9	Geenikloonauksen eteneminen	21
9.1	Lähtötilanteen kartoitus ja kustannukset	21
9.2	Kloonaukseen valmistelevat menetelmät	26
9.2.1	Bakteerien kasvattaminen ja herkkyysmäärittäminen	26
9.2.2	Inserttien ja vektorien eristäminen	28
9.2.3	Agarosoigeelielektroforeesi	30
9.3	Menetelmän testaus	33
9.3.1	Digestio ja defosforylaatio	34
9.3.2	Tylypistäminen	37
9.3.3	Ligaatio	39
9.3.4	Lämpöshokki	42
9.3.5	Tulokset	44
10	Opinnäytetyön tuotos	46
11	Pohdinta	48

11.1 Tulosten tarkastelu	49
11.2 Luotettavuus	51
11.3 Eettisyys	52
11.4 Tulosten hyödyntäminen ja kehittämissuhteet	54
11.5 Ammatillinen kasvu	56
Lähteet	58

Keskeiset käsitteet

AGE	Agaroosigeelielektroforeesi.
Antibiottiresistenssi	Bakteeri kasvaa antibiootin läsnäolosta huolimatta: resistentti (R), joka on vastakohta herkkyydelle (S).
Alkalinen fosfataasi	Poistaa DNA:n 5' -päästä fosfaattiryhmät
Defosforylaatio	Tapahtumassa alkalinen fosfataasi poistaa DNA:n 5' -päästä fosfaattiryhmät, mikä estää ligaasientsyymiä liittämästä pilkottuja DNA-fragmenteja takaisin yhteen.
Digestio	DNA:n pilkkominen palasiin, eli fragmentteihin.
DNA	Deoksiribonukleiinihappo, sis. geneettisen tiedon eliöstä.
DNA-fragmentti	DNA-pala, joka leikattu katkaisuentyymien avulla.
EcoRI	Yleisesti käytetty restriktioentsyymi, peräisin <i>E. coli</i> sta.
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i> -bakteeri, käytetään usein kloonauksessa.
Elektroforeesi	DNA- ja RNA-fragmenttien erottelumenetelmä, joka perustuu sähköisesti varautuneiden fragmenttien liikkumiseen vastakkaista varausta kohti. Yleisin agaroosigeelielektroforeesi.
Emäs	DNA:n rakenneosia. Emäkset muodostavat pariutumisperiaatteen mukaan DNA:n kaksoisjuosteen.
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing.
Geeni	Perimän osia, jotka sisältävät ohjeet eliön muodostamiseen, kuten proteiinien ilmentämiseen.
Geenikloonaus	Halutun, esim. tietyn geenin, DNA-fragmentin kloonauksista.
Herkkyyssmääritys	Maljalta mitataan, antibiootin läsnä ollessa, estorenkään koko, joka kertoo bakteerin herkkyyden kyseiselle lääkkeelle.
In vivo	Tutkimus, joka toteutetaan elävässä eliössä.
In vitro	Tutkimus, joka toteutetaan elävän eliön ulkopuolella, kuten koeputkessa.
Inkubointi	Reaktioiden tapahtuminen tarkoissa olosuhteissa, kuten tietyssä lämpötilassa tietyssä ajassa.
Insertti	DNA-fragmentti, joka liitetään vektoriin.

Isäntäsolu	Solu, johon plasmidi-insertti-kompleksi siirretään.
Kloonaus	Elävän organismin kopioimista siten, että syntyvä uusi eliö on perimältään identtinen alkuperäisen eliön kanssa.
Kohessiivinen	DNA-fragmentin päissä muutaman nukleotidin mittainen pätkä (sticky-ends).
Ligaasientsyymi	Liittäjäentsyymi. Liittää DNA-fragmentit, kuten plasmidin ja insertin, toisiinsa. Tapahtumaa kutsutaan ligaatioksi.
Ligaatio	DNA-fragmentit liitetään toisiinsa ligaasientsyymin avulla.
Lämpöshokki	Transformaatiomenetelmä, perustuu lämmönvaihteluun.
Nukleotidi	Sokeri-, fosfaatti- ja emäsosasta koostuvia yksiköitä, joista DNA muodostuu.
Perämalja	Herkkyyismäärityksen yhteydessä viljelty malja, jolla tarkistetaan, että kasvu on puhdasta, eikä se ole kontaminoitunut.
Plasmidi	Useilla bakteereilla esiintyvä, rengasmainen itsejakautuva kaksijuosteinen DNA-molekyyl. Käytetään usein vektorina.
Restriktioentsyymi	Katkaisientsyymi. Leikkaa DNA:n tietyn emäsjärjestyksen kohdalta. Tapahtumaa kutsutaan digestioksi.
SAP	Shrimp Alkaline Phosphatase. Alkalinen fosfataasi.
S.O.C.	Ravintoliuos, jota käytetään transformaatiossa, tehokas erityisesti <i>E. coli</i> -bakteereille.
Silikapylväs	Menetelmä, jolla saadaan eristettyä nukleiinihappoja, kuten DNA:ta, ionivahvuuden vaihtelun avulla.
Spektrofotometria	Aineen pitoisuuden mittaaminen absorboituvan valon perusteella.
T4 DNA-ligaasi	Yleisesti käytetty ligaasientsyymi.
Transformaatio	Yhdistelmä-DNA:n siirtäminen isäntäsoluun.
Tylpistäminen	DNA-fragmentin päiden tylpistäminen yksijuosteisista ulokkeista kokonaan kaksijuosteisiksi (blunt-ends). Vrt. kohessiivinen.
Vektori	Kuljettaa kloonattavan DNA-fragmentin isäntäsoluun.
Viljelymalja	Usein ravinnerikas agarია sisältävä malja, jolla kasvatetaan muun muassa bakteereita.
Yhdistelmä-DNA	Plasmidi-vektori-kompleksi, joka siirretään isäntäsoluun.

1 Johdanto

Kloonauksella tarkoitetaan jonkin tietyn organismin kopioimista, jolloin syntyvä uusi elävä organismi on identtinen perimältään alkuperäisen organismin kanssa. Kloonausta voidaan käsitteenä käyttää suvuttomassa lisääntymisessä, jossa jälkeläiset ovat emonsa kopioita. Myös identtiset kaksoset ovat käytännössä klooneja keskenään. Suvullisessa lisääntymisessä kahden vanhemman perimä munasolusta ja siittiöstä siirtyy alkioon, jolloin alkiolla on puolet perimästään kummaltakin vanhemmalta. Kloonauksessa taas voidaan käyttää minkä tahansa tumallisen solun geneettistä materiaalia. (Levine 2012: 14) On mahdollista kloonata kokonaisen elävän eliön lisäksi myös kudesta, kokonaisia elimiä, soluja sekä yksittäisiä geneejä (Cloning Fact Sheet 2020).

Kloonaus on kehittyvä molekyyli-genetiikan sovellus, jolla voidaan tulevaisuudessa ymmärtää sairauksia paremmin ja kehittää yhä parempia geeniterapia-tekniikoita. Kloonausta ei kuitenkaan toistaiseksi käytetä ihmisiin, vaikka se teoriassa onkin mahdollista. Tällä hetkellä menetelmää käytetään lähinnä eläintutkimukseen ympäri maailmaa, mutta kloonaustekniikoita ja käyttötarkoituksia on useita. (Levine 2012: 15.)

Monissa Euroopan maissa on käytetty kloonattuja tutkimuseläimiä, jolloin perimä ei vaikuta tutkimustuloksiin esimerkiksi jonkin lääkkeen vaikutuksia tutkittaessa. Yhtenä esimerkkinä Tanskassa on käytetty sikoja Alzheimerin taudin tutkimisessa. Tuotantoeläinten kloonausta on myös tutkittu. Muun muassa Yhdysvalloissa on tehty tutkimus siitä, vaikuttaako kloonaus tuotantoeläimestä saatavan elintarvikkeen koostumukseen. Tulokseksi saatiin, ettei kloonauksella ole merkittävää vaikutusta. Kuitenkin kloonaus herättää huolta ja eettisiä kysymyksiä tuotantoeläimen terveydestä. Yhdysvalloissa on lisäksi käytetty kloonausta arvokkaiden eläinten jalostukseen, kuten ravihevosten kloonaukseen. (Mannonen ym. 2008: 8–15.)

Suomessa kloonausta käytetään uhanalaisten kasvien suojelemiseksi. Kasvien kohdalla kloonautumalla lisääntyminen on kuitenkin luonnollistakin, sillä kasvit pystyvät lisääntymään myös suvuttomasti. (Degerman 2015.) Kloonausta käytetään Suomessa myös geeni- tai proteiinikloonaukseen ja näiden toiminnan tutkimiseen (Latonummi 2012: 7; Mutikainen 2012: 7, 38).

Tämä opinnäytetyö toteutettiin toiminnallisena kehittämistyönä ja tässä opinnäytetyössä suunniteltiin Metropolia Ammattikorkeakoululle uusi menetelmä osaksi molekyyli-geeniikan opintojakson laboraatiotunteja bioanalytiikan tutkinto-ohjelmassa. Tilaajana toimi Metropolia Ammattikorkeakoulu. Käytännön opinnot tutkitusti syventävät opiskelijoiden oppimista (Kaufman 2003). Tarkoitus oli pystyttää koululle soveltuva kloonauksen menetelmä, jonka jälkeen testata sen toimivuutta ja suunnitella laboraatiotunnille kyseiseen menetelmään soveltuva työohje. Työohjetta oli tarkoitus testata molekyyli-geeniikan opiskelijoilla opetuslaboratoriossa. Lisäksi opinnäytetyö sisältää teoretistä tietoa kloonauksesta, sen menetelmistä ja käyttöaiheista sekä tätä tietoa tukevan sanaston, joka avustaa lukijaa ymmärtämään tekstiä.

2 Opinnäytetyön tarkoitus, tavoitteet ja kehittämistehtävät

Opinnäytetyön tarkoituksena oli pystyttää täysin uusi menetelmä, geenikloonauksen bakteerisolussa, Metropolia Ammattikorkeakoululle. Tarkoituksena oli myös suunnitella menetelmästä laboraatiotunti ja laatia sitä tukeva selkeä ja ymmärrettävä, suomenkielinen työohje. Työohjeen ja laboraatiotunnin toimivuutta oli tarkoitus myös testata käytännössä, jotta voidaan varmistaa niiden toimivuus ja käytettävyys. Tavoitteena oli lisätä opiskelijoiden oppimista ja ymmärrystä kloonaukseen ja sen menetelmiin liittyen sekä saada kloonauksen osaksi molekyyli-geeniikan opintojakson laboraatiotunteja.

Kehittämistehtävät kertovat mitä pyritään saavuttamaan ja mihin kysymyksiin opinnäytetyöllä etsitään vastauksia. Kehittämistehtävän asettamisessa on riski, ettei kehittämistehtävää ole rajattu tarpeeksi. Opinnäytetyön aihe voi muodostua liian laajaksi, jota ei ole mahdollista toteuttaa aikaresurssien puitteissa tai tulokset jäävät merkityksettömiksi. (Vilkkä 2021: Luku 3. Tutkimusprosessi käytännössä.) Tässä opinnäytetyössä keskityttiin kehittämiskysymykseen, voidaanko molekyyli-geeniikan opintojaksolla toteuttaa kloonauksen käsittelevä laboraatiotunti? Lisäksi prosessia ohjasi opinnäytetyötä ohjaavat kysymykset:

- Mitä kloonauksen on?
- Mitä tarvitaan kloonauksen onnistumiseen?
- Millainen on hyvä työohje?
- Millainen on hyvä laboraatiotunti?

3 Molekyyligenetiikka

Molekyyligenetiikka syntyi, kun J.D. Watson ja F.H.C. Crick löysivät DNA:n kaksoiskier-
rerakenteen vuonna 1953. Jo 60-luvulla tiedettiin, kuinka geenit kopioituivat, mutaatiot
syntyivät ja kuinka geenit kytkeytyivät päälle ja pois solun tai organismin tarpeiden mu-
kaan. Tämä tieto mahdollisti tuhansien geenituotteiden tunnistamisen. Tämä kehitys loi
uuden tieteenhaaran genetiikassa: molekyyligenetiikan. Molekyyligenetiikka keskittyy
deoksiribonukleiinihappoon (DNA) sekä ribonukleiinihappoon (RNA) ja pyrkii selittä-
mään useita genetiikan periaatteita, konsepteja ja ilmiöitä molekulaarisella tasolla. Mo-
lekyyligenetiikka tutkii geenien ilmenemistä, säätelyä ja periytymistä DNA:n ja sen tran-
skriptiotuotteiden tasolla. (Miglani 2015: 20–21.)

Kehitys molekyyligenetiikassa tulee johtamaan läpimurtoihin erityisesti maatalous- ja
lääketieteessä. Molekyyligenetiikka tarjoaa pohjatiedon useiden monimutkaisten biolo-
gisten prosessien ymmärtämiseen prokaryooteissa ja eukaryooteissa. Geenit tuottavat
molekyylejä, jotka ovat olennaisia eri biomolekyylien synteisien kontrolloinnissa, ai-
neenvaihduntateiden ja geenien ilmentymisen muokkaamisessa. Tämän takia on tär-
keää ymmärtää geneettisen materiaalin rakenteellisia ja funktionaalisia komponentteja.
(Miglani 2015: 7.)

4 Kloonaustekniikat

Kloonaustekniikoita käytetään tällä hetkellä lähinnä tutkimustarkoituksiin. Kloonaustek-
niikoiden avulla voidaan esimerkiksi siirtää ihmisgeenejä muihin eläimiin ja organismeihin.
Kloonaustekniikoiden avulla voidaan tutkia geenien ilmentymistä ja toimintaa in
vivo, joka tarkoittaa elävän organismin sisällä tapahtuvaa tutkimusta, kuten alkion kehi-
tysvaiheita, ikääntymistä, geeniterapiaa sekä epigeneettistä periytymistä. In vivo -me-
netelmän ero in vitro -menetelmään on se, että in vitro -tutkimus toteutetaan elävän or-
ganismin ulkopuolella, kuten koeputkessa. Kloonaustekniikoita käytetään myös kauppal-
lisesti farmaseuttisten biotekniikoiden kehityksessä ja käyttöeläinten lisääntymisen pa-
rantamisessa. (Giassetti & Maria & Ortiz D'Ávila Assumpção & Visintin 2013: Luku 7.
Practical application of genetic Engineering and cloning: From transgenic animal mo-
dels until cloning animal.)

Lääketieteellisissä tutkimuksissa käytetään usein kloonausta tutkittaessa ihmissairauk-
sien kehitystä eläinissä kuten hiirissä. Kloonaustekniikoiden avulla voidaan muo-

kata geenin yhtä ominaisuutta kerrallaan ja saada luotettavia tuloksia, kuten mikä geenin osa vaikuttaa sairauden etenemiseen tai syntyyn. (Giasseti ym. 2013: Luku 7. Practical application of genetic Engineering and cloning: From transgenic animal models until cloning animal.)

Geenikloonauksen avulla on pystytty kehittämään hoitokeinoja sairauksiin. Geenikloonauksen avulla pystytään tuottamaan esimerkiksi insuliinia diabeetikoille, plasminogeenin aktivaattoreita verisuonitukosten liuotushoitoon sekä erytropoietiinia munuaistautia sairastaville anemian hoitoon. Geenikloonauksen heikkoutena on, etteivät kloonausvektorit kykene kantamaan kovin pitkiä DNA-fragmentteja, joten monet tumallisten solujen geenit ovat liian suuria siirrettäväksi kloonausvektoreihin. (Rahbaran ym. 2021.) Eliöiden genomi, eli perimä, voidaan jakaa tietyn emäsjärjestyksen omaaviin osioihin, joita kutsutaan geneiksi. Jokainen geeni sisältää ohjeen tietyn proteiinin ilmentämisestä eliössä. Näiden geenien vaihtoehtoisia muotoja kutsutaan alleeleiksi. Näitä ohjeita tarvitaan eliön muodostumiseen. (Giasseti ym. 2013: Luku 1. Introduction.)

Nimestään huolimatta geenikloonaustekniikkaa voidaan käyttää minkä tahansa DNA-fragmentin kloonamiseen, ei pelkästään sellaisten palojen, joissa on yksi tai useampi geeni. Haluttu DNA-fragmentti liitetään vektoriin, esimerkiksi plasmidiin, jolloin saadaan yhdistelmä-DNA. Yhdistelmä-DNA siirretään isäntäsoluun. Kun halutaan kloonata geenejä, käytetään isäntäsoluna usein bakteeria, yleisimmin *Escherichia coli* -bakteeria, mutta joidenkin geenien kloonamiseen voidaan käyttää myös hiiva- tai sienisoluja. Isäntäsolussa vektori jakautuu tuottaen lukuisia kopioita itsestään mukanaan kloonattavaksi haluttu geeni. Kun taas isäntäsolu jakautuu, kopiot yhdistelmä-DNA:sta siirtyvät jälkeläisille ja vektorit jatkavat niissä kopioitumistaan. Runsaan jakautumisen jälkeen muodostuu identtisten isäntäsolujen viljelmä. Jokainen solu sisältää kopioita yhdistelmä-DNA-molekyylistä, jolloin haluttu geeni on kloonattu. (Brown 2000: 8–10; Rahbaran ym. 2021.)

Suomessa käytetään geeni- ja proteiinikloonauksia ja näiden tutkimista esimerkiksi sairauksien hoidossa. AAV-virukseen on kloonattu merkkigenejä ja hoitogenejä, millä voitiin arvioida geenisiirron tehokkuutta kardiovaskulaarisessa geeniterapiassa. Tällaisen geeniterapian tärkeimpiä käyttöaiheita ovat verisuonten kasvun stimulointi, sydänlihaksen hapenpuutteen ja ääreisverenkiertotaudin hoito esimerkiksi lisäämällä geeni, joka stimuloi verisuonten kasvua. (Latonummi 2012: 7) Toinen esimerkki suomalaisesta geenitutkimuksesta on ihmisen MC1R -reseptorin (Melanokortiini-1) säätelyalueen kloonaus plasmidien avulla, millä saatiin tietoa geenin pigmentaation säätelystä

melanosyyteissa, joilla oletetaan olevan yhteys silmänpohjan ikärappeumaan (Mutikainen 2012: 7, 38).

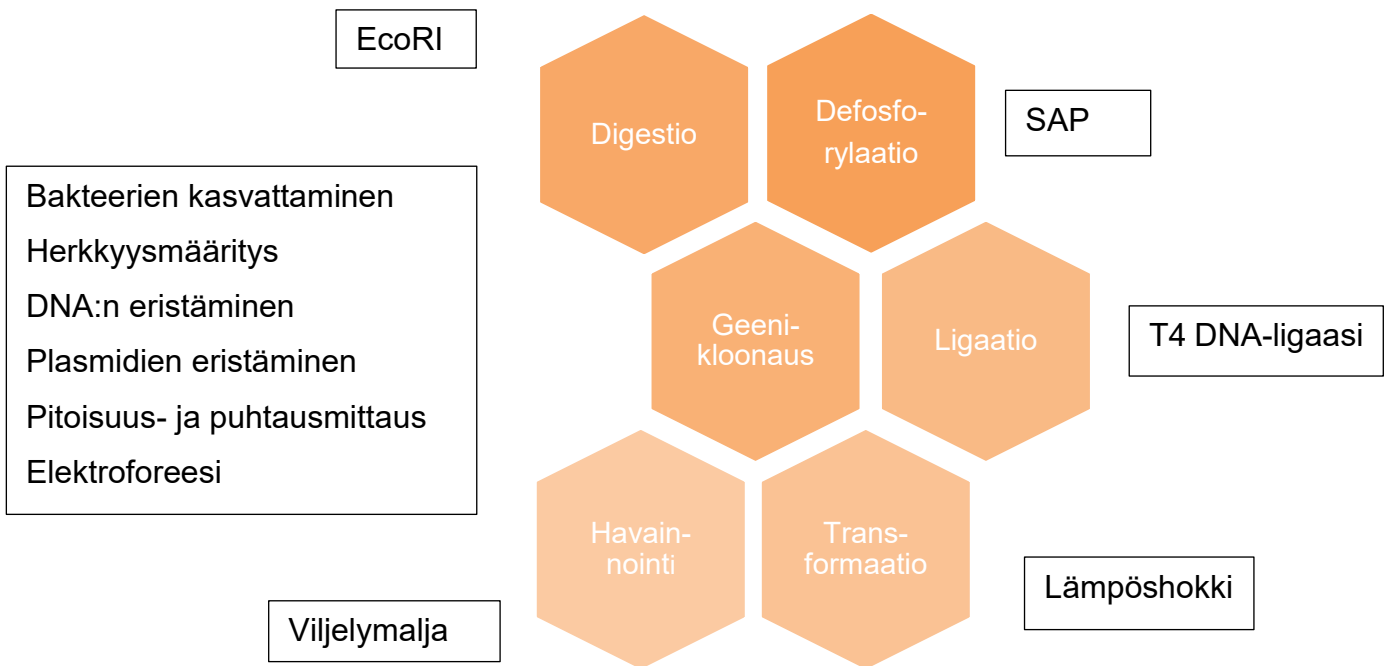
Solukloonauksessa luodaan homologisia eli samanlaisia kopioita tietyistä soluista in vitro. Yksisoluisilla eliöillä, kuten bakteereilla ja hiivoilla, solukloonauksella on yksinkertaista. Bakteerit ja hiivat kykenevät jakautumalla luomaan geneettisesti samanlaisia kopioita itsestään kasvatusliuoksessa laboratorioissa. Solukloonauksella ei pystytä luomaan monisoluisia eliöitä kuten kasveja tai eläimiä, mutta sillä kyetään luomaan yksinkertaisia yhdestä solutyypistä muodostuvia kudoksia. Solukloonauksella käytetään farmakologisissa tutkimuksissa. (Rahbaran ym. 2021.)

Reproduktiivinen, eli lisääntymiseen pyrkivä kloonauksella, pyrkii täysikasvuisen monisoluisen eliön syntyyn. Menetelmässä hedelmöittymättömään munasoluun siirretään luovuttajan somaattisen solun tuma munasolun tuman tilalle, kuten ihosolun tuma. Tästä kehittyvä alkiorakkula kehittyy sijaiskohdussa ja syntyvällä yksilöllä on identtinen perimä tumanluovuttajan kanssa. Tämä olisi hyödyllistä tärkeiden maatalouseläinten lisääntymisessä ja lähes kadonneiden eläinten pelastamisessa. (Matoba & Zhang 2018.) Kloonauksella voisi myös mahdollistaa hedelmättömille, tai muusta syystä lapsettomille vanhemmille biologisen jälkikasvun saamisen (Devolder 2008).

Terapeuttisesta kloonauksesta puhutaan, kun tavoite on parantaa tai hoitaa. Menetelmässä alkio hajotetaan ja viljellään alkiokantasoluja, jotka voivat erilaistua kaikiksi solutyypeiksi tai mahdollisesti jopa kokonaisiksi elimiksi. Tulevaisuudessa voi olla mahdollista Ayalan (2015) mukaan hoitamaan hermosoluja selkäydinvammoissa, jolloin halvaantumiselta voitaisiin välttyä. Kantasoluja siirretään tänä päivänäkin, esimerkiksi luuydinsiirtona, mutta siinä on kyse kantasolujen luovutuksesta. Ayala erittelee tieteellisessä artikkelissaan alkiokantasolujen käytöstä seuraavia hyötyjä. Genomi on vastaanottajan kanssa lähes identtinen, jolloin hylkimisriski ei ole niin suuri, kuin luovuttajan kantasoluissa tai elimissä. Elintenluovutuksessa luovuttajan löytyminen on haastavaa, ja alkiokantasolujen käyttö ratkaisisi tämän.

5 Geenikloonauksella

Perinteinen geenikloonauksella perustuu viiteen vaiheeseen, joita ovat digestio, defosforylaatio, ligaatio, transformaatio ja havainnointi (Traditional Cloning Basics). Näiden lisäksi on kloonauksella valmistelevia vaiheita.



Kuvio 1. Kloonauksen vaiheet.

Kuviossa 1 nähdään geenikloonauksen viisi perusvaihetta. Ennen geenikloonausta suoritettiin kloonaukseen valmistelevat vaiheet, joita olivat bakteerien kasvattaminen, bakteerien herkkyysmäärittäminen, perimäaineksen eristäminen ja niiden pitoisuus- ja puhtausmittaus sekä agarosigeelielektroforeesi perimäaineksen koon selvittämiseksi. Digestiossa käytettiin restriktioentsyyminä EcoRI-entsyymiä, jossa DNA pilkottiin fragmentteihin. Defosforylaatiossa käytettiin alkalisena fosfataasina Shrimp Alkaline Phosphatase-entsyymiä, jossa DNA-fragmenteista poistettiin fosfaattiryhmät. Ligaatiossa käytettiin liigaasientsyyminä T4 DNA-entsyymiä, jossa liitettiin DNA-fragmentit yhteen. Transformaatiiossa käytettiin lämpöshokki -metodia, jossa yhdistelmä-DNA siirrettiin isäntäsoluun. Havainnointi suoritettiin antibioottia sisältävällä viljelymaljalla.

5.1 Insertti ja vektori

DNA, eli deoksiribonukleiinihappo, on molekyyli, joka pitää sisällään eliön geneettisen informaation ja ohjaa solujen toimintaa. Se on kaksijuosteinen ja juosteet ovat sitoutuneet toisiinsa emäspariperiaatteen mukaisesti. DNA koostuu pienemmistä yksiköistä, nukleotideista, jotka sisältävät sokeriosan (deoksiriboosi), fofaattiosan ja emäsosan.

Emäksiä on neljä erilaista: adeniini (A), tymiini (T), guaniini (G) ja sytosiini (C). Ne pariutuvat emäspariperiaatteella adeniini ja tymiini sekä guaniini ja sytosiini. (Skwarecki 2018: 8–19.)

Ihmisen ja muiden tumallisten eliöiden DNA:ta voidaan eristää kaikista tumallisista soluista, esimerkiksi veren valkosoluista. Ensimmäisenä solut tulee hajottaa, jotta DNA voidaan saada solusta ulos. Tämä voidaan tehdä esimerkiksi mekaanisesti murskaamalla. Nukleaasit tulee inaktivoida, etteivät ne tuhoa DNA:ta. Kohteena oleva DNA tulee puhdistaa kontaminanteista, kuten proteiineista, lipideistä, hiilihydraateista ja muista nukleiinihapoista, kuten RNA:sta, jonka pilkkomiseen voidaan käyttää RNasea. Yleisin DNA:n eristämiseen käytetty menetelmä on silikapylväs-menetelmä, jossa DNA sitoutuu silikaan korkeassa ionivahvuudessa ja epäpuhtaudet voidaan pestä pois. Pesun jälkeen voidaan irrottaa puhdas DNA matalassa ionivahvuudessa. (Tan & Yiap 2009.)

Kloonauksessa voidaan käyttää monenlaisia vektoreita, joiden tehtävänä on kuljettaa haluttu DNA-fragmentti, eli insertti, isäntäsoluun. Vektori ja isäntäsolu valitaan käytetyn kloonaustekniikan perusteella. Kun halutaan kloonata bakteereita, käytetään vektorina usein plasmidia, joka on bakteereista peräisin oleva, rengasmainen itsereplikoituva eli itsejakautuva DNA-rengas. Bakteerien kloonaminen on nopeaa, koska bakteerit jakautuvat nopeasti, jolloin halutusta DNA-fragmentista syntyy lyhyessä ajassa runsaasti kopioita. *E. coli* -bakteeri on yleisin käytetty isäntäbakteeri, koska sen rakenne on erittäin tunnettu ja sen ominaisuudet ovat optimaaliset vektorille. (Giasseti ym. 2013: Luku 6. Cloning vectors.)

Plasmideissa on usein antibioottiresistenssigeeni, joka on kloonausvektorille tärkeä ominaisuus, sillä sitä voidaan hyödyntää havainnoinnissa. Vain plasmidin sisältävät solut voivat jakautua antibiootin läsnä ollessa. Muita käytettäviä vektoreita ovat esimerkiksi bakteriofagit eli bakteerivirukset, jotka siirtävät geeninsä infektoitavaan bakteeriin, jolloin samalla bakteriofagin perimään liitetty kloonattava geeni lisääntyy infektoituneessa bakteerisolussa. (Giasseti ym. 2013: Luku 6. Cloning vectors.)

Käytännössä kaikilla bakteereilla esiintyy luonnostaan plasmideja. Eri plasmideilla voi olla erilaisia ominaisuuksia, kuten tietoa siirtymisestä solusta toiseen, antibioottiresistenssigeeni tai spesifejä olosuhteita hyödyntäviä geenejä. Plasmidien koko vaihtelee 1 kb:n ja 500 kb:n (kb = kiloemäs = 1000 emästä) välillä. Korkean kopioluvun omaavissa bakteereissa on noin 10–100 plasmidikopiota yhdessä isäntäorganismissa. Plasmidien tärkeä ominaisuus kloonauksen mahdollistamiseksi on replikaatioalue, jotta itsenäinen

replikoituminen on mahdollista. Plasmidi-vektorien täytyy olla optimaalisista ominaisuuksistaan huolimatta geneettisesti suunniteltuja. Luonnossa ilmenevillä plasmideilla ei ole kaikkia vaadittavia ominaisuuksia, joita vaaditaan laadukkaisiin ja tehokkaisiin kloonaustekniikoihin. Vaadittavia ominaisuuksia ovat spesifi restriktioentsyymien leikkausalue ja yksi tai useampi molekyyli-markkeri, jolla voidaan tunnistaa plasmidi-insertikompleksin sisältävät isäntäsolut muista isäntäsoluista. Plasmidi-vektorit pystyvät kantamaan parhaimmillaan noin 10 kb:n kokoisia DNA-inserttejä. (Glick & Pasternak & Patten 2010: 58–59, 86.)

Plasmidi-DNA:n eristäminen *E. coli* -bakteerista on yksi molekyylikloonauksen ydintekniikoista. Bakteeria kasvatetaan maljalla, josta ne kerätään plasmidien eristystä varten. Bakteerisolun hajotetaan esimerkiksi emäksisellä liuoksella. Myös plasmidi-DNA voidaan eristää silikapylväs-menetelmällä, joka perustuu ionivahvuuksien muuttumiseen ja kontaminanttien pesemiseen, jolloin saadaan puhdasta plasmidi-DNA:ta. (Zhang & Cahalan 2007.)

Bakteriofagit ovat bakteerien viruksia. Yleinen käytetty bakteriofagivektori kloonauksessa on *E. coli* infektoiva lambda bakteriofagi (λ). Muunneltuun λ -fagiin pystytään liittämään 15–20 kb:n kokoinen insertti. λ -fagissa on cos-alue, josta DNA voidaan katkaista entsyymaattisesti ja liittää insertti-DNA fagiin. Insertin kanssa rekombinoitunut λ -fagi injektioi DNA-molekyylinsä *E. coli* -isäntäsoluihin ja aloittaa replikoitumisen. Tästä seuraa lysis, jossa isäntäsolu hajoaa ja vapauttaa noin 100 fagipartikkelia ympäristöönsä. Vaihtoehtoisesti λ -fagi-DNA liittyy *E. coli* perimäainekseen. λ -fagin DNA kloonautuu bakteerisolujen jakautuessa. (Glick & Pasternak & Patten 2010: 86, 89.)

Kosmideissa yhdistyy bakteriofagien ja plasmidien kloonaukselle edulliset ominaisuudet. Esimerkiksi yleisesti käytetyssä pLFR-5-kosmidissa on kaksi λ -fagivektorin cos-alueita, useita replikaatioalueita sekä restriktioentsyymien tunnistuskohtia. (Glick & Pasternak & Patten 2010: 90.) Kosmidivektorit ovat rakennettu plasmideista, joihin on liitetty λ -fagin cos-alueita. Tavoitteena on ollut luoda vektori, johon on mahdollista liittää mahdollisimman iso DNA-insertti. Kosmidivektoriin pystytään liittämään jopa 47 kb:n kokoisia inserttejä. Kosmidien kloonauksen kapasiteetti on tehokkaampi kuin bakteriofagien, mutta kosmidit ovat monimutkaisempia käyttää molekyyli-genetiikan menetelmissä. (Giassetti ym. 2013. Luku 6: Cloning vectors.)

5.2 Restriktioentsyymi ja alkalinen fosfataasi

DNA joudutaan pilkkomaan, jotta haluttu DNA-fragmentti saadaan kloonattua. Tähän on yleensä syynä se, että halutaan kloonata tietty geeni. DNA-fragmenteista halutaan sopivan kokoisia vektorille. Erilaiset vektorit pystyvät kantamaan vain tietyn määrän kloonattavaa DNA:ta. Myös vektori tulee olla leikattuna tietystä kohdasta, johon DNA-fragmentti voi sitoutua, jolloin saadaan yhdistelmä-DNA. Tästä vastaavat restriktio- eli katkaisuentyymit. Ne voivat katkaista DNA:n joko tylpästi (blunt-end) tai kohessiivisesti (sticky-end), jolloin DNA:n päissä on muutaman nukleotidin mittainen yksijuosteinen pätkä, joka voi emäspariperiaatteen mukaan liittyä toiseen DNA-fragmenttiin. Tätä tapahtumaa kutsutaan digestioksi. Restriktioentsyymejä on useita erilaisia. Ne leikkaavat DNA:n niille spesifisen sekvenssin kohdalta. Restriktioentsyymit ovat peräisin bakteereista, ja ne ovat osa bakteerin immuunijärjestelmää. (Brown 2006: 61–63.)

Luonnollisissa olosuhteissa restriktioentsyymit suojaavat bakteereita vieraalta DNA:lta, kuten bakteriofagien DNA:lta. Jotta restriktioentsyymit eivät pilkkoisi bakteerien omaa DNA:ta, on niiden DNA usein metyloitu tunnistuskohdista. Metyloituun DNA:han on lisätty usein sytosiini-emäkseen metyyliiryhmä, joka estää restriktioentsyymien toiminnan. EcoRI-restriktioentsyymi on yksi yleisimmin käytetyistä katkaisuentyymeistä. EcoRI-restriktioentsyymi on löydetty *E. coli* -bakteerista. EcoRI-entsyymi tunnistaa palindromisen DNA-sekvenssin eli sekvenssin emäkset ovat samassa järjestyksessä luettuna kummasta päästä tahansa. EcoRI-entsyymi katkaisee DNA:n kohessiivisesti. (Glick & Pasternak & Patten 2010: 49–51.)



Kuvio 2. EcoRI:n katkaisukohdat (EcoRI 2012).

EcoRI-restriktioentsyymillä on katkaisukohta plasmidi-DNA:ssa sekä humaanin DNA:ssa. Kuviossa 2 esitetään EcoRI:n katkaisukohdat. Jos insertti ja plasmidi ovat digestoitua kohessiivisesti ja niiden emäsjärjestykset eivät ole komplementaarisia, juosteita voidaan jatkaa DNA-polymeraasientsyymien avulla, jolloin kohessiivisistä päistä muodostuu tylpät päät. DNA-polymeraasi rakentaa yksittäisistä nukleotideista puuttuvat

kohdat. DNA-ligaasientsyymi pystyy sitten liittämään juosteet toisiinsa kovalenttisilla sidoksilla. Yksi yleisimmin käytetyistä DNA-polymeraasientsyymeistä kloonauksessa on T4 DNA-polymeraasi. (Gibson 2011.)

Defosforylaatio on joskus tarpeellista, jotta vältetään plasmidivektorien kiinnittyminen digestion jälkeen takaisin itseensä. Tämä on tarpeellista varsinkin, jos DNA:n päät on pilkottu siten, että ne ovat komplementaarisia toisilleen tai päät ovat tylpät. Restriktioentsyymi jättää pilkkoessan aina 5' -pään fosfaattiryhmän, ja alkalinen fosfataasi poistaa nämä. Tämä estää ligaasientsyymiä liittämästä päät takaisin yhteen, sillä ligaasi tarvitsee sekä 5'-pään fosfaattiryhmän että 3'-pään OH-ryhmän. Defosforylaatio vähentää taustaa kloonauksessa, sillä isäntäsolu voi transformoida itseensä myös näitä itsekiinnittyneitä plasmideja. Tämä ei ole toivottavaa, koska se häiritsee kloonauksen onnistumisen havainnointia. Defosforylaatio tehostaa DNA-fragmentin liittymistä vektoriin. (Traditional Cloning Basics.) Yksi yleisesti käytetty alkalinen fosfataasi on Shrimp alkaline phosphatase (SAP). Se voidaan lisätä suoraan digestion reaktioseokseen mukaan (Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)), mutta markkinoilla on useita muitakin alkalisia fosfataaseja.

5.3 Ligaasientsyymi

Restriktioentsyymeillä katkaistut plasmidi ja insertti saadaan liittymään toisiinsa ligaasi- eli liittäjäentsyymien avulla. Tapahtumaa kutsutaan ligaatioksi, minkä seurauksena syntyy plasmidi-insertti-kompeksia, eli yhdistelmä-DNA:ta. Ligaasientsyymi liittää DNA-fragmentit toisiinsa kovalenttisillä sidoksilla. Kloonauksessa on yleisesti käytössä T4 DNA-ligaasi, joka on peräisin bakteriofageista. Kohessiivisesti katkaistut DNA-fragmentit kiinnittyvät tehokkaammin toisiinsa, mutta tylppien päiden yhdistäminen onnistuu helposti, mikäli ligaasientsyymien pitoisuus on suuri. (Gannon & Powell 2000: 142.)

Lämpötilanvaihtelulla ja -säätelyllä voidaan saavuttaa nopea ja kustannustehokas ligaatio-menetelmä kloonaukseen T4 DNA-ligaasin avulla (Islam ym. 2017). T4 DNA-ligaasientsyymillä voidaan liittää toisiinsa DNA:n 3'-pään OH-ryhmä ja 5'-pään fosfaattiryhmä fosfodiesterisidoksella. T4 DNA-ligaasientsyymi voi liittää toisiinsa tylpästi tai kohessiivisesti katkaistut DNA-fragmentit. (T4 DNA Ligase, LC (1 U/μL).) Tämä on hyödyllistä insertin liittämiseksi vektoriin, koska ei ole väliä onko restriktioentsyymi pilkkoanut DNA:n kohessiivisesti vai tylpästi.

5.4 Transformaatio ja havainnointi

Kloonauksessa käytetään transformaatiota yhdistelmä-DNA:n siirtämiseksi isäntäsoluun. Bakteerit tekevät tätä luonnossakin, eli ottavat sisäänsä toisen bakteerin ympäristössä olevia vapaita plasmideja, jotka voivat olla peräisin esimerkiksi kuolleista bakteereista. (Lorenz & Wakernagel 1994.)

Transformaatio suoritetaan yleensä lämpöshokkia tai elektroporaatiota käyttäen. Lämpöshokissa esivalmistellut solut pidetään 0 °C:n lämpötilassa ja lämpötilan äkillinen nostaminen aiheuttaa yhdistelmä-DNA:n soluun sisään ottamisen. Kalsiumionit voivat auttaa transformaation tehokkuudetta matalan lämpötilan kanssa stabiloimalla soluseinän kanavia, joista DNA pääsee soluun sisälle. Lämpötilan nopea nostaminen vaiheittain sulattaa solukalvon, mikä täydentää transformaation loppuun. Transformaation tehokkuus on riippuvainen monista tekijöistä kuten bakteerisolujen tyypistä ja DNA:n ominaisuuksista. Plasmidin koko voi vaikuttaa transformaation tehokkuuteen, sillä isojen molekyylien on vaikeampaa läpäistä soluseinän kanavat. (Chan & Dreolini & Flintoff & Lloyd & Mattenley 2002.)

Elektroporaatiossa transformaatio tapahtuu korkeajännitteisissä sähköimpulsseissa. *E. coli* -bakteerit käsitellään ensin jääkylmällä glyserolilla tai vedellä. Korkea sähköjännite auttaa heikentämään bakteerien soluseinän vastustusta ja siirtämään vierasta DNA:ta soluun sisälle. Elektroporaatiossa bakteerit käsitellään useaan kertaan ennen sähköimpulsseja kasvatusmediumin pois pesemiseksi. Elektroporaation tehokkuuteen vaikuttaa sähköjännitteen suuruus, impulssi-aika, impulssin muoto, lämpötila, solutyyppi, puskuri, konsentraatio ja DNA-molekyylin koko. (Tu ym. 2016.)

Tarvitaan havainnointimenetelmä, jotta voidaan varmistamaan, että transformaatio on onnistunut. Melko yksinkertainen ja koulun tarvikkeilla mahdollinen menetelmä on transformaatiotuotteen viljely sopivalla kasvatusmaljalla. Se on myös helpoiten toteutettava havainnointimenetelmä. Kasvatusmaljalle lisätään antibioottia, joka estää bakteerien kasvun, joilla ei ole antibioottiresistenttigeeniä. Antibioottiresistenttigeeni sijaitsee plasmidissa, joten vain plasmidin saaneet bakteerit kasvavat maljalla. (An & Lv & Wu 2010.) Tämän menetelmän käyttäminen vaatii kaksi eri bakteerikantaa, joista toisella on resistenssigeeni jollekin antibiootille ja toisella ei.

6 Laboraatio-opetus

Opiskelijan käytännön harjoittelu tapahtuu työelämäharjoittelun lisäksi koulun opetuslaboratorioissa, joissa työskentelyä kutsutaan laboraatioiksi. Käytännön harjoittelu tukee ja syventää opiskelijan oppimista ja valmistaa työelämään. Laboraatio-opetus tapahtuu opetuslaboratorioissa, joissa toimitaan ja työskennellään kuten työelämässä. Opetuslaboratorioita on Metropoliassa useita, jotka keskittyvät usein yhteen erikoisalaan, kuten molekyyli-genetiikkaan tai mikrobiologiaan.

Teoriatiedon lisäksi toimivaan laboraatiotuntiin kuuluu tunnin alussa aiheen alustus, jossa opiskelijoille kerrotaan mitä ollaan tekemässä. Toimivaan laboraatiotuntiin kuuluu aiheen alustuksen lisäksi toiminnan eteneminen sekä yhteenveto. (Ndiokubwayo ym. 2022). Opiskelijoille annetaan työohjeet paperisena tai niitä seurataan omalta tietokoneelta. Työohjeesta löytyy yleensä etenemisjärjestys ja esimerkiksi mahdolliset liuosten valmistusohjeet. Tunnin alussa työohje käydään läpi yhdessä. Mikäli aikataulu on tiukka ja sisältää pidempiä inkubaatioaikoja, käydään yhdessä läpi ajankäyttöä, kuten milloin tauko on järkevä pitää. Tunnin aikana annetaan neuvoja ja avustetaan tarvittaessa. Tunnin lopussa kerrataan, miten havainnointi tapahtuu ja tarkistetaan tulokset.

Donald Schönin teorian mukaan pelkät teoriaopinnot harvoin auttavat terveysalan opiskelijaa työelämän käytännön haasteissa. Yllättäen tulevat tilanteet käytännön opinoissa syventävät opiskelijoiden oppimista ja ymmärtämistä. Käytännön oppimisessa opiskelija oppii käyttämään aikaisemmin oppimaansa uusissa tilanteissa. Käytännön oppimisessa opiskelija reflektoi oppimaansa jälkeinpäin, kuten mitä olisi voinut tehdä toisin ja miten voi kehittyä tulevaisuudessa. (Kaufman 2003.)

Käytännön opinnoilla on tarkoitus auttaa opiskelijaa saamaan oppimisen työkaluja, joita voi hyödyntää koko työuran ajan. Käytännön opinnot auttavat opiskelijaa parantamaan toimintatapojaan ulkoisen palautteen ja itsearviointin kautta. Opiskelija oppii kehittämään itsenäisesti toimintatapojaan sekä mahdollisesti opettamaan muita ongelmatilanteissa. (Salzman & Franzen & Leone & Kessler 2012.) Käytännön opinnot myös lisäävät myönteisiä tunteita opiskelua kohtaa sekä lisäävät työskentelymotivaatiota. Käytännön opinnot voivat auttaa opiskelijoita ymmärtämään monimutkaisia konsepteja helpommin. Käytännön opinnot laboraatiotunneilla lisäävät opiskelijoiden oppimista, sillä ongelmista keskustelu ryhmässä ja niiden ratkaiseminen vähentää opiskeluun liittyvää ahdistusta ja saa aikaan jaettuja positiivisia kokemuksia. Jatkuvat käytännön harjoituk-

set opinnoissa auttaa opiskelijoita löytämään relevantteja artikkeleita ja luotettavaa tietoa aiheesta paremmin. (van Woezik & Oosterman & Reuzel & van der Wilt & Koksma 2020.)

Käytännön opinnot auttavat opiskelijoita kartoittamaan omia vahvuuksiaan ja heikkouksiaan sekä tunnistamaan omia tarpeitaan oppijana. Käytännön opinnot motivoivat opiskelijoita usein kehittämään itseään ja käyttämään uusia oppimistekniikoita. Opiskelijoiden on tärkeää reflektoida ennen laboraatiotuntia, sen aikana sekä sen jälkeen omia taitojaan ja oppimaansa. Tämä auttaa opiskelijaa oppimaan uusia asioita ja yhdistämään uutta tietoa käytäntöön. (Mahajan & Gupta & Singh 2017: 311–312.)

Tutkimuksen mukaan opiskelu käytännön opintojen kautta luokka-asetelmassa paransi opiskelijoiden koetuloksia. Tutkimuksessa 38 neljännen vuoden biologian opiskelijaa Córdoban yliopistossa Espanjassa osallistuvat kokeellisille käytännön opintojen tunneille. Tutkimuksen tarkoitus oli lisätä opiskelijoiden itseoppimista ja lisätä tiimityöskentelyä laboratorioympäristössä sekä lisätä opiskelijoiden kykyä etsiä, hahmottaa ja sisäistää tietoa. Tutkimuksessa opiskelijat ratkoivat ongelmia ja tehtäviä käytännötoiden avulla luokassa. Tehtävät olivat aseteltu niin, että opiskelijat olivat aikaisemmin oppineet aiheista jo teoriaopinnoissa. Käytännön opinnot lisäsivät opiskelijoiden vastuunkantoa, yhteistyötä, kriittistä ajattelua, tehokasta päätöksentekoa sekä oman mielipiteen ilmaisutaitoja. Opiskelijat kokivat käytännön opetuksen olevan tehokasta ja hyödyllistä. (Agüera ym. 2015.)

Oppimisprosessissa opiskelijat osallistuvat aktiivisesti opetukseen. Opiskelijat syventävät aikaisemmin saamaansa tietoa ongelmanratkaisuun pohjautuvassa oppimismallissa. Oppimisen vaiheet tulee ottaa huomioon oppitunnin rakennetta suunniteltaessa. Oppituntia suunniteltaessa tulee ottaa huomioon, kuinka, mitä, milloin ja kenelle oppituntia suunnitellaan. (Ndihokubwayo ym. 2022.)

7 Työohje

Hyvä ohje on käskymuodossa eli imperatiivissa. Käskymuoto selkeyttää ohjetta, sillä se ilmaisee, mikä tapahtuu automaattisesti ja mikä ihmisen toimesta. Ohjetta laatiessa tulee huomioida, ettei lukija tiedä kaikkea. Ammattisanastoa tulee avata ja kaikki työvaiheet esitellä selkeästi. Hyvässä ohjeessa rakenne on selkeä. Teksti on jäsennelty väliotsikoiden alle ja eri vaiheet ovat loogisessa järjestyksessä. Ohjeesta tulee myös selvittää missä järjestyksessä vaiheet suoritetaan sekä mikä on ehdollista ja mikä pakollista.

Numeroidut luettelot selventävät ohjetta varsinkin, kun ohjeisiin liittyy vaiheittaista toimintaa. (Ohjeita ohjeiden tekijöille.)

Hyvässä ohjeessa kerrotaan vain oleellinen lyhyesti ja ytimekkäästi. Sanavalintojen, kirjoitusasun, rakenteen ja ulkoasun tulee olla yhtenäisiä. Hyvä ohje on tehtäväkeskeinen eikä poikkea sivupoluille. Tehtävien tai tehtäväsarjojen tulee olla riittävän yksinkertaisia sekä edetä loogisessa järjestyksessä. Tehtävät tulee olla riippumattomia toisistaan eli niitä pystyy ymmärtämään ilman, että tietää toisista tehtävistä. Tehtävien ensisijainen tavoite on ohjata ohjeidenkäyttäjää saavuttamaan tavoiteltu lopputulos. Hyvässä ohjeessa esitetään mahdolliset virheet sekä tarjotaan apua niiden ratkaisemiseen. Käyttäjälle kerrotaan virheen sattuessa, miksi virhe mahdollisesti tapahtui ja miten sen voi korjata. Virheisiin liittyvä tieto tulee sijoittaa mahdollisimman lähelle virheeseen liittyvän toiminnan kuvausta. (Martikainen 2019: 11.)

Työohje sisältää selkeät ohjeet reaktioseosten tekemiseen ja työvaiheisiin. Työohjeen tarkoitus on olla niin selkeä ja yksityiskohtainen, että opiskelija pystyy etenemään sen avulla työskentelyssään itsenäisesti. Esimerkiksi lyhenteitä tulee välttää, jos ei olla varmoja, että työohjeen lukija ymmärtää ne. Mikäli on järkevää käyttää lyhenteitä, ne kirjoitetaan auki ensimmäisellä kerralla. Työohjeen tekeminen rakentuu analyysi-, suunnittelu-, kehitys-, toteutus- ja arviointivaiheista (Khalil 2016).

Työohjeiden tulee olla käytettäviä. Käytettävyydellä tarkoitetaan sitä, kuinka tehokkaasti ja helposti ohjeidenkäyttäjä saavuttaa työohjeiden tavoitteet. Käytettävässä työohjeessa tarvittavat tiedot löytyvät helposti ja työnteko on sujuvampaa kuin ilman käyttöohjetta. Käyttäjän tarpeet tulee huomioida, joten työohjetta laatiessa tulee miettiä, kenelle se tehdään. Työohjeen tulisi olla selkeä ja ytimekäs tekstin ja grafiikoiden osalta, jotta se olisi käytettävä. Liian monimutkainen asettelu tai tieto voi hämmentää käyttäjää ja vaikeuttaa työohjeen käytettävyyttä. Tekstin sisällön tulee silti olla faktuaalista ja laadukasta. Käytettävä työohje motivoi käyttäjää suorittamaan toivottu työ loppuun ohjeen mukaan. (Martikainen 2019: 4–9.)

8 Opinnäytetyöprosessi

Opinnäytetyö toteutettiin toiminnallisena opinnäytetyönä. Opinnäytetyötä voidaan myös pitää kehittämistyönä, sillä menetelmän kokoaminen tarvitsi jatkuvaa arviointia prosessin edetessä. Kehittämistyö perustuu arvioinnin ja seurannan suhteeseen, joka tuottaa

tietoa prosessin eteenpäin viemiseksi. Keskeisiä piirteitä ovat oman työn jatkuva arviointi sekä työprosessin kattava kuvaus. Opinnäytetyöllä on rajattu tavoite ja sen tulokset ovat välittömästi hyödynnettävissä. (Anttila 2007: 83–84.)

Opinnäytetyön ensimmäisessä vaiheessa verrattiin erilaisia markkinoilla olevia kloonauksittejä ja erikseen myytäviä kloonaukseen käytettäviä komponentteja, joista valittiin parhaiten koululle soveltuva menetelmä. Tärkeää oli, että menetelmä hyödyntäisi jo koululta löytyviä laitteita mahdollisimman hyvin. Lisäksi tarkoituksena oli mahdollisuuksien mukaan hyödyntää koululta jo löytyviä reagensseja. Puuttuvat reagenssit tilattiin koululle yhteistyökumppanin toimesta. Seuraavassa vaiheessa testattiin valittua menetelmää useaan kertaan. Lisäksi selvitettiin, onko mahdollista toteuttaa geenikloonauksen menetelmä yhdellä laboraatiotunnilla, jonka kesto on noin kolme tuntia. Tämä koitui hankalaksi pitkien inkubaatioaikojen takia, joten on järkevää, että laboraatiotunti esimerkiksi jaetaan kahdelle päivälle tai pidetään koko päivän kestävä laboraatiotunti. Suunnittelussa oli tärkeä ottaa huomioon, että kloonaukseen soveltuviin osaksi laboraatiotunteja ja linkittyi järkevästi muihin harjoittelutöihin. Esimerkiksi DNA:n eristystä käsittelevän laboraatiotunnin sijoitus tulisi olla aiemmin, koska eristettyä DNA:ta tarvitaan geenikloonauksessa. Laboraatiotunnin pitäminen olisi edellyttänyt sitä, että menetelmä olisi todettu toimivaksi.

8.1 Menetelmälliset lähtökohdat

Toimintatutkimus on ennemminkin lähestymistapa kuin tutkimusmenetelmä. Siinä yhdistetään käytännön kehittämistyö ja tutkimus. Perinteisessä tutkimuksessa tahdotaan tietää miten asiat ovat, eli sitä johdattaa teoreettinen mielenkiinto. Toimintatutkimuksessa halutaan tietää miten asiat voisi tehdä paremmin. Tutkimus tapahtuu toiminnan sisältä käsin ja sillä pyritään kehittämään kyseistä toimintaa. Toimija ei tarkkaile toimintaa ulkopuolelta vaan osallistuu tutkimukseen. Tutkimus perustuu teorian tietoon ja teorian tieto on vahvasti kytkeytynyt käytännön toimintaan. Teoria ja käytäntö halutaan tiiviiseen vuorovaikutukseen keskenään. Eräänä toimintatutkimusten tarkoituksena on tuoda niin sanottu hiljainen tieto näkyviin. Oppiminen ja kehittyminen ovat toimintatutkimuksen ytimessä. Suomessa käsitteellä tutkimuksellinen kehittämistoiminta viitataan erityisesti ammattikorkeakoulujen opinnäytetöiden tutkimukselliseksi viitekehykseksi, ja tästä on myös käytetty termiä toiminnallinen opinnäytetyö. (Heikkinen 2018.)

Tutkimuskysymyksen muotoilussa rajataan harkitusti tutkimuksen teema ja rajat. Toimintatutkimuksessa usein tutkimuskysymyksen sijasta aloitetaan tutkimuksen tehtävän määrittelystä. Tämä perustuu toimintatutkimuksen ensiarvoiseen ominaisuuteen, jonka

mukaan toimintatutkimuksessa etsitään ratkaisuja käytännönongelmien ja käytänteiden kehittämiseksi. Toimintatutkimuksen tutkimustehtävät ja tutkimuskysymykset muodostetaan teoreettisen tiedon ja empiiristen tutkimusten pohjalta. Perinteisessä tutkimuksessa lähdetään liikkeelle teoreettisesta intressistä eikä käytännön hyödystä. Tarkastelu kohdentuu teoreettisen viitekehyksen pohjalta, jossa kerrotaan mitä juuri tässä tutkimuksessa on tarkoitus saada aikaan. Toimintatutkimuksen peruslähtökohta on reflektiivinen ajattelu. Tutkimuksen tekijä reflektoi omia ennakkokäsityksiään, kokemuksiaan ja ajatustapojaan. Tutkimuksen tekijän tulee pyrkiä etäännyttämään itsestään ja katsoa omaa toimintaa ja ajattelua uudesta näkökulmasta ja tarkastella niitä objektiivisesti ulkopuolelta. Reflektiivisyyden onnistuminen on yksi keskeisimmistä tutkimuksen laadun varmistuksen piirteistä. Toimintatutkimuksessa toiminnan havainnoiminen, reflektointi ja uudelleen suunnittelemine on jatkuvaa, mitä voidaan ajatella kehänä. (Heikkinen 2018.)

Ammattikorkeakoulussa toiminnallisen opinnäytetyön tarkoituksena on tuottaa tietoa ammattialalle, työelämälle sekä toimeksiantajalle, tässä tapauksessa Metropolia Ammattikorkeakoululle. Tuotetun tiedon on tarkoitus auttaa kehittämistarpeissa. Työn painopisteenä on ammatillisen arjen kehittäminen yhteistyökumppanin kanssa. (Kostamo & Airaksinen & Vilka 2022: 79.)

Opinnäytetyön tavoitteena on tuotos, joka palvelee kohderyhmää, eli bioanalytiikkopiskelijoita ja toimintaympäristöä, eli Metropolia Ammattikorkeakoulun molekyyli­genetiikan opintojaksoa. Toiminnallisessa opinnäytetyössä ammatillinen asiantuntijuus todennetaan kehittäväällä ja tutkimuksellisella tuotoksella, jossa lähtökohdat, valinnat ja ratkaisut ovat tuotu perustellusti esiin. Perustelujen tulee pohjautua ammatilliseen lähdekirjallisuuteen sekä tutkimuksiin. Myös itse koottu aineisto, tässä tapauksessa menetelmän testaus, toimii argumentaationa perusteluissa. Toiminnallisen opinnäytetyön tuotos voi olla esimerkiksi ohje tai opas. (Kostamo ym. 2022: 8–11.)

8.2 Toimintaympäristö, kohderyhmä ja hyödynsaajat

Opinnäytetyön toimintaympäristönä oli Metropolia Ammattikorkeakoulun Myllypuron kampuksen bioanalytiikan tutkinto-ohjelman molekyyli­genetiikan opintojakso. Kohderyhmänä olivat bioanalytiikan opiskelijat molekyyli­genetiikan opintojaksolla. Lisäksi opinnäytetyöstä hyötyi molekyyli­genetiikan opettaja, joka voi käyttää materiaalia hyödyksi opetuksessa ja tarvikkeiden tilauksessa. Opinnäytetyöstä tulee olemaan hyötyä tulevaisuudessa, koska kloonau­sta ei ole aiemmin toteutettu käytännön työskentelynä

Metropolian laboraatiotunneilla. Kloonausta on käsitelty aikaisemmin ainoastaan teoriaopinnoissa. Opinnäytetyön ymmärrettävyyden vuoksi laadittiin keskeisimmistä käsitteistä sanasto, johon lukija voi palata tarpeen tullen.

Molekyyligenetiikan laboraatiotunnit koostuvat usein päivän aiheeseen liittyvästä Moodle-testistä, aiheen alustuksesta ja periaatteiden kertaamisesta sekä työohjeen, liuosten ja laimennosten läpikäymisestä yhdessä ennen työskentelyn aloitusta. Usein reagenssit ovat saatavilla vahvuuksilla, jotka eivät välttämättä sovellu sellaisenaan aiotuun tarkoitukseen, jolloin niitä tulee laimentaa. Tällöin laboraatiotunnin alussa tehdään liuoslaskuja. Laboraatiotuntiin liittyvät teoriaopinnot ovat yleensä aina ennen käytännönharjoittelua, jolloin aihe on entuudestaan tuttu, mikä helpottaa työskentelyä ja tukee oppimista.

Kloonausta käsittelevä laboraatiotunti yhdistää mikrobiologian ja molekyyligenetiikan opintojaksoja, koska geenikloonaukseen tarvitaan mikrobiologian menetelmiä kuten bakteerien viljely ja herkkyysmääritys. Menetelmät eivät kuitenkaan ole niin monimutkaisia, että ne eivät onnistuisi, mikäli molekyyligenetiikan opintojakso siirtyisi opetussuunnitelmassa ajallisesti ennen mikrobiologian opintojaksoa. Opintojaksojen sisältöjen yhdistäminen tuo opiskelijoille kattavampaa ymmärrystä klinisen laboratoriotyön eri osa-alueiden yhteyksistä. Mikrobiologian laboratorioissa käytetään paljon molekyyligeneettisiä menetelmiä esimerkiksi bakteerien ja virusten tunnistamisessa ja osoittamisessa.

8.3 Toiminnan eteneminen ja työskentelyn kuvaus

Opinnäytetyöprosessi koostui suunnittelu- ja toteutusvaiheesta sekä opinnäytetyön raportoinnista, hyödyntämisestä ja kypsyysnäytteestä. Yhteensä opinnäytetyö on laajuudeltaan 15 opintopistettä eli 405 työskentelytuntia. Itse opinnäytetyön toteutuksen lisäksi prosessiin liittyi infotilaisuuksia, ryhmäohjausta, henkilökohtaista ohjausta, työpaikkoja, seminaarit sekä kypsyysnäyte. Opinnäytetyön eri osa-alueet toteutettiin etänä Zoom-palvelun avulla sekä koululla järjestettävissä tapaamisissa. Opinnäytetyö toteutettiin parityönä. Merkittävä osa työstä toteutettiin koulun opetuslaboratoriossa. Etätapaamisten lisäksi tapaamisia oli myös Myllypuron kampuksella kirjoitusvaiheessa sekä menetelmän testausvaiheessa. Kirjallinen työ toteutettiin Microsoft Office 365 -pilvipalvelussa. Opinnäytetyö julkistettiin molekyyligenetiikan opintojakson kloonausta käsittelevällä luennolla. Julkistamistilaisuudessa esitettiin raporttiin pohjautuva PowerPoint -esitys ja pidettiin interaktiivinen testi. Hyväksytty opinnäytetyö julkaistiin Theseus-tietokannassa. Taulukossa 1 on esitelty opinnäytetyöprosessin aikataulu.

Taulukko 1. Aikataulu.

Päivämäärä	Tapahtuma
28.10.21	Opinnäytetyö bioanalytiikan koulutusohjelmassa
08.11.21	Opinnäytetyöinfo
26.11.21	Haku päättyy bioanalytiikan opinnäytetyöaiheisiin
22.12.21	Opinnäytetyöaiheen varmistuminen
12.01.22	Suunnitelmavaiheen ryhmäohjaus
17.01.22	Työpaja: Tiedonhaku
24.01.22	Työpaja: Englanninkielinen tiivistelmä
25.01.22	Työpaja: Opinnäytetyön suunnitelman kirjoittaminen
18.02.22	Yhteistyökumppanin ja ohjaajan tapaaminen
24.02.22	Opinnäytetyösuunnitelman palautus
01.03.22	Työpaja: Tutkimuslupa & sopimukset
01.03.22	Yhteinen suunnitelmaseminaari
02.03.22	Yhteinen suunnitelmaseminaari
31.08.22	Ryhmäohjaus ja yhteistyökumppanin tapaaminen
11.10.22	Työpaja: Kypsyysnäyteinfo
13.10.22	Ohjaajatapaaminen
03.11.22	Opinnäytetyön palautus seminaareja varten
10.11.22	Yhteinen raportointiseminaari
10.11.22	Yhteinen raportointiseminaari
11.11.22	Opinnäytetyön julkistaminen
18.11.22	Arvioitavan opinnäytetyön palautus
23.11.22	Kypsyysnäyte

Tiedon keräämisessä hyödynnettiin kirjaston kirjallisuutta, E-kirjoja ja erinäisiä tietokantoja kuten PubMed ja Google Scholar. Suurin osa kirjallisuudesta oli englanninkielistä, joten hakusanoina käytettiin muun muassa ”cloning”, ”genetics”, ”plasmid”, ”cloning vector”, ”molecular cloning”, ”ligation”, ”restriction enzyme”, ”therapeutic cloning”, ”reproductive cloning”, ”gene cloning”, ”DNA purification”, ”plasmid DNA purification” ja ”bacterial gene transformation”. Koska haluttiin näiden sanojen esiintyvän yhdessä,

käytettiin AND käskyä haussa, esimerkiksi "cloning" AND "vector" AND "plasmid". Suomenkielisissä hauissa käytössä oli enemmän mukana OR-hakukäsky, koska Suomen kielessä sanat taipuvat eri muotoihin. Esimerkiksi hakusanat ovat muodossa "kloonaus" OR "kloonaaminen".

Opinnäytetyöprosessin edetessä hyödynnettiin enemmän lähteitä tietokannoista ja laitevalmistajilta. Erityisesti Thermo Fisher Scientificin verkkosivua hyödynnettiin. Tavoitteena oli löytää mahdollisimman tuoretta kirjallisuutta aiheesta, mikä osoittautui paikoitellen haasteelliseksi. Mahdollisuuksien mukaan tarkistettiin vanhimpien lähteiden ajankäyttötoissijaisista tuoreimmista lähteistä. Tiedonhaussa keskityttiin molekyylikloonauksen tekniikoihin ja plasmidivektoreihin, sillä ne olivat olennaisimmat käsitteet opinnäytetyön etenemisen suhteen.

Menetelmän suunnittelussa hyödynnettiin Metropolia Ammattikorkeakoululla jo olemassa olevia tarvikkeita. Menetelmää kootessa otettiin huomioon kustannustehokkuus. Vain välttämättömät hankinnat tehtiin, jottei menetelmä muodostunut liian kalliiksi otettavaksi käyttöön. Thermo Fisher Scientificin verkkosivuilta tilattuja tuotteita on jo käytössä koululla, joten oli järkevää käyttää samoja tuotemerkkejä. Kloonaukseen käytettävien komponenttien tuli olla mahdollisimman yhteensopivia parhaan lopputuloksen saavuttamiseksi.

Taulukossa 2 kuvataan arviointisuunnitelma. Arviointisuunnitelma soveltaa realistisen evaluoinnin mallia. Realistisen evaluoinnin malli rakentuu useista kierroksista jokaisessa tavoitevaiheessa. Kussakin kierroksessa tarkastellaan toimien vaikutusta vaiheen tavoitteisiin, vaihtoehtoisia ratkaisuja sekä toiminnan suuntaamista seuraavaan tavoitevaiheeseen. Lopputuloksena on valmis tuotos. (Anttila 2007: 87.)

Taulukko 2. Arviointisuunnitelma.

Tavoitevaihe	
Opinnäytetyösuunnitelma	Tavoitteet, aikataulu, resurssit ja kehittämiskysymykset. Sisäinen ja ulkoinen arviointi.
Menetelmän suunnittelu ja arviointi	Tieteelliseen kirjallisuuteen perustuvien menetelmien valinta, jotka soveltuvat Metropolia Ammattikorkeakoulun käyttötarkoituksiin ja resursseihin.
Menetelmien testaaminen ja kehittäminen	Menetelmän kokeilu käytännössä ja sen kehittäminen testauksien perusteella.
Työohjeen laatiminen ja laboraatiotunnin suunnittelu	Tieteelliseen kirjallisuuteen pohjautuva hyvän ja tehokkaan työohjeen luominen. Laboraatiotunnin rakenteen suunnittelu.
Työohjeen sekä laboraatiotunnin testaus ja kehittäminen itsenäisesti ja molekyyli-genetiikan opiskelijoiden kanssa	Työohjeen toimivuuden testaus ja kehittäminen. Laboraatiotunnin selkeyden ja käytännöllisyyden testaus. Sisäinen ja ulkoinen arviointi.
Työskentelyn arviointi	Työskentelyn arviointi ja raportointi.

Opinnäytetyö toteutettiin arviointisuunnitelmaan pohjautuen. Kaikkia tavoitevaiheita ei pystytty toteuttamaan menetelmän testauksen tulosten perusteella.

Opinnäytetyösuunnitelman ja -raportin vertaisarvioivat toiset bioanalyttikko-opiskelijat opinnäytetyöseminaareissa. Ulkoista arviointia suorittivat myös ohjaavat opettajat. Lisäksi julkistamistilaisuudessa molekyyli-genetiikan opintojakson opiskelijat antoivat suullista palautetta.

9 Geenikloonauksen eteneminen

Kloonaukseen on saatavilla kaupallisia kittejä, kompetentteja soluja eli isäntäbakteereja sekä plasmideja, jotka sisältävät antibioottiresistenssigeenin. Kitit ovat arvokkaita, minkä vuoksi yhdessä yhteistyökumppanin kanssa päädyttiin keskittymään tutkimaan markkinoilla olevia erillisiä komponentteja, joita on tarjolla runsaasti. Näin menetelmä tuli edullisemmaksi, joka mahdollisti sen, että jokainen opiskelija voisi suorittaa kloonauksen joko yksin tai pareittain. Tämän lisäksi menetelmä käytti enemmän hyödyksi jo koululla tehtäviä harjoitustöitä ja koululta löytyviä reagensseja. Esimerkiksi DNA:n ja plasmidin eristäminen solusta ja niiden pilkkominen restriktioentsyymeillä ovat menetelmiä, joita toteutetaan jo molekyyliogenetiikan opintojaksolla.

9.1 Lähtötilanteen kartoitus ja kustannukset

Molekyyliogenetiikan opintojaksolla kloonauksen toteutus on osa teoriaopintoja, mutta menetelmää ei opeteta käytännössä ja menetelmän käyttö syventäisi opiskelijoiden osaamista. Kloonaukseen käytetään lähinnä tutkimustyössä. Menetelmän oppiminen on hyödyllistä etenkin kolmannen työharjoittelun näkökulmasta, kun useampi opiskelija tekee viimeisen työharjoittelun, ja samalla opinnäytetyön, tutkimusryhmässä. Vaikka tutkimusryhmään ei päätyisi, on kloonauksen molekyyligenetiikan perusmenetelmiä, ja sen ymmärtäminen ja suorittaminen tukee opintojakson tavoitteita.

Metropolia Ammattikorkeakoulussa molekyyliogenetiikan opintojakson sisältöön lukeutuu ihmisen perimän rakenne, toiminta, säätely ja kuinka ne vaikuttavat ihmisen tautimekanismeihin. Opiskelijan tavoitteena on ymmärtää, mikä merkitys on perimän tutkimisella, eri periytymistavoilla, nukleiinihappojen eroilla sekä kromosomistolla. Näitä tukee opiskelijan oppiminen molekyylibiologisista ja geenitekniikan menetelmistä, niiden peruseräistä ja käyttöaiheista. Lisäksi pohditaan genetiikkaan liittyviä eettisiä kysymyksiä. Opintojakson jälkeen opiskelija osaa suorittaa genetiikan perustutkimukset ja niihin liittyvät työvaiheet koulun opetuslaboratorioissa eli laboraatiotunneilla. Näitä ovat muun muassa nukleiinihappojen eristäminen eri tekniikoilla, DNA:n monistaminen, geenien ja kromosomien tutkimusmenetelmät ja soluviljely. Samalla opiskelija oppii käyttämään tietojärjestelmiä ja analyyttoreita. (Molekyyliogenetiikka SX00EC99.) Tämä valmistaa opiskelijaa työelämäharjoitteluihin sekä työelämään. Useita kloonauksessakin käytettäviä menetelmiä harjoitellaan jo molekyyliogenetiikan opintojaksolla, joten kloonaukseen käsittelevä laboraatiotunti täydentäisi opiskelijan osaamista. Lisäksi kloonauksen

sessä käytetään mikrobiologian perusmenetelmiä, joten laboraatiotunti yhdistäisi näiden opintojaksojen sisältöjä. Yhdistäviä perusmenetelmiä ovat bakteerien resistenssimekanismit ja herkkyysmääritys sekä bakteerien kasvatusta viljelymaljalla ja niiden käsittely (Kliinisen mikrobiologian tutkimukset SX00ED06).

Työhön käytettiin koululta löytyviä laitteita ja välineitä, mutta joitakin reagensseja jouduttiin tilaamaan. Kloonaukseen varten tilattiin alkalinen fosfataasi (SAP) defosforylaatioon, T4 DNA-polymeraasi tylypistämiseen, T4 DNA-ligaasi ligaatioon sekä S.O.C. -ravintoliuos transformointiin. Näistä T4 DNA-polymeraasi ei ole välttämättä tarpeen jatkossa, mikäli varmistuu että DNA:n päiden tylypistämällä ei ole merkittävää hyötyä. Ligaatioissa tylypistettyjen päiden vaatimat olosuhteet olivat hieman haasteelliset toteuttaa koululla niiden vaatiessa lämpötilaksi 14 °C ja inkubaatioajaksi 16–24 tuntia (T4 DNA Ligase). Taulukossa 3 ovat lueteltuna reagenssit, jotka tilattiin Thermo Fisher Scientificin verkkosivulta menetelmää varten. Taulukosta löytyy tilattujen reagenssien tuotenumerot, valmistajat, hinnat sekä tutkimusten määrä, jonka verran kyseisellä pakkauksella saadaan reaktioita tehtyä. Hinnoissa suluissa oleva summa tarkoittaa yhden reaktion hinnaksi muodostuvaa summaa kyseisen reagenssin kohdalla.

Taulukko 3. Tilatut reagenssit.

Tuote	Tuotenumero ja valmistaja	Hinta	Reaktiot
T4 DNA Ligase (1U/μL)	15224017, Invitrogen™	62,50 € (0,5 €)	125
T4 DNA Polymerase (5 U/μL)	EP0061, Thermo Scientific™	49,87 € (0,2 €)	250
S.O.C. Medium	15544034, Invitrogen™	160 € (1,4 €)	115
Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)	78390500UN, Applied Biosystems™	70,50 € (0,07 €)	1000

Tilattujen entsyymien mukana tuli myös niiden vaatimat puskurit. Puskuria kuluu esimerkiksi ligaatioissa enemmän kuin entsyymiä. Pakkauksessa on puskuria enemmän, mutta puskuri saattaa silti loppua ennen entsyymiä. Vaadittuja puskureita myydään myös erikseen. Ligaasin kohdalla reaktiomäärä on minimimäärä, joka yhdestä entsyymipullosta saadaan. Mikäli digestio tehdään vain kohessiivisesti leikatuille DNA-fragmenteille ja DNA on tarpeeksi laimeaa, eikä koko reaktioseosta tarvitse moninkertais-

taa, voitaisiin päästä ligaasinkin kohdalla noin 500:an reaktioon. Kun otetaan pelkääntään huomioon tilatut reagenssit, eikä niitä, joita käytettiin koululla jo valmiina, hinnaksi muodostuu 2,10 € yhtä reaktiota kohden.

Kun haluttiin laskea suuntaa antava kustannus yhdelle reaktiolle, voitiin tarkastella käytettyjen, jo koululta löytyvien, tuotteiden tämänhetkistä hintaa. Kaikista tuotteista ei löytynyt hintatietoja, kuten viljelymaljoista. Taulukossa 4 on esitetty kloonaukseen tarvittavat tuotteet, tuotenumerot ja valmistajat, hinnat ja reaktiomäärät, joista hintatiedot löytyivät ja joita tarvitaan kokonaiseen yhteen reaktioon. Tähän laskelmaan ei ole otettu huomioon elektroforeesin, pitoisuusmittausten, bakteerien kasvattamisen ja herkkyysmäärittysten kustannuksia.

Taulukko 4. Kustannukset yhdelle reaktiolle.

Tuote	Tuotenumero ja valmistaja	Hinta	Reaktiot
dNTP Mix (10 mM)	R0192, Thermo Scientific™	135 € (0,14 €)	1000
EcoRI (10 U/μL)	ER0271, Thermo Scientific™	42,74 € (0,17 €)	250
High Pure Plasmid Isolation Kit	11 754 785 001, Roche	355 € (1,42 €)	250
QIAamp® DNA Mini Kit	51106, QIAGEN	897 € (3,6 €)	250
S.O.C. Medium	15544034, Invitrogen™	160 € (1,4 €)	115
Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)	78390500UN, Applied Biosystems™	70,50 € (0,07 €)	1000
T4 DNA Ligase (1U/μL)	15224017, Invitrogen™	62,50 € (0,5 €)	125
T4 DNA Polymerase (5 U/μL)	EP0061, Thermo Scientific™	49,87 € (0,2 €)	250
Trimetopriimi	CT0076B, OXOID	162,2 € (0,65 €)	250

Tämänhetkisten hintatietojen perusteella yhden reaktion hinnaksi muodostui 8,15 €. Hinnasta puuttuu viljelymalja ja muut oheistarvikkeet, kuten putket, pipetinkärjet ja viljelysauvat. Maljoista on harvoin verkkokaupoissa hintoja näkyvillä, mutta esimerkiksi Avantorin verkkokaupasta nähtiin, että lampaanverimaljoja myydään kymmenen kappaleen paketissa hintaan 31,95 €, joten yhden maljan hinta on 3,20 €. Maljan voi kuitenkin

jakaa puoliksi toisen näytteen kanssa, jolloin päästään hintaan 1,6 € yhtä reaktiota kohden. (Prepared Blood Agar Media 2022.) Thermo Fisher Scientificin verkkokaupan hintatietojen perusteella voitiin arvioida steriilien Eppendorf-putkien hinnan olevan 0,114 € kappaleelta (Nonstick, RNase-free Microfuge Tubes, 1.5 ml). Putkia tarvittiin 5 kappaletta yhteen reaktioon, jolloin yhdelle reaktiolle tulee hintaa 0,57 € putkien osalta. Viljelysauvan hinta Thermo Fisher Scientificillä on 0,24 € kappaleelta (Nunc™ Disposable Loops and Needles, needle) ja sauvoja tarvitaan yksi kappale yhteen reaktioon. Näitä tarvikkeita voi kuitenkin mahdollisesti saada edullisemminkin, mutta tämän arvioin kanssa yhden reaktion hinnaksi muodostuu 10,56 €.

Inserttinä toimi molekyyli-genetiikan opiskelijoiden aikaisemmin verestä eristetyt ja pakastetut DNA-näytteet, jotka olivat täysin anonyymejä. Bakteerien osalta käytettiin syväjäädetyttä *E. coli* -kantoja. Ensimmäinen bakteerikannoista (ATCC 8793), oli herkkä gram-negatiivisten sauvabakteerien herkkyyspaneelin kaikille antibiooteille. Tätä käytettiin isäntäbakteerina. Toinen *E. coli* -kanta oli potilasnäyte, joka oli resistentti trimetopriimille, joten siitä eristettiin plasmidit.

Reagenssit valittiin sen perusteella, mitä koululla oli valmiina. On kustannustehokasta käyttää mahdollisimman paljon samoja reagensseja, kuin muissakin molekyyli-genetiikan harjoituksissa. Taulukossa 5 ovat lueteltuna geenikloonaukseen käytetyt reagenssit ja välineet.

Taulukko 5. Reagenssit ja välineet.

Tuote	Tuotenumero ja valmistaja
0,5 McFarland standardi	09264 D, BioMeriux
CLED agarmalja	T020, Tammer BioLab
DNA Loading Dye	R0611, Thermo Scientific™
dNTP Mix (10 mM)	R0192, Thermo Scientific™
EcoRI Buffer	ER0271, Thermo Scientific™
EcoRI (10 U/μL)	ER0271, Thermo Scientific™
Eppendorf-putket	
GelGreen® Nucleic Acid Gel Stain	41005, Biotium
GeneRuler 1000 kb DNA Ladder	SM0243, Thermo Scientific™
High Pure Plasmid Isolation Kit	11 754 785 001, Roche

Kylmäblokki pakastimesta	
Lämpökaapit ja -vesihauteet	
Mueller-Hinton agar (MHA) herkkyymalja	T070, Tammer BioLab
Natriumkloridi (NaCl) 0,9 %	
Negatiivisten sauvojen antibiootti-paneeli	NET: CT0225B W: CT0076B F: CT0069B CTX: CT0407B MEM: CT0774B TZP: CT1616B, OXOID
OmniPur Agarose	2120-100GM, Calbiochem
Pipetit ja filtterilliset pipetinkärjet	
Putkitelineet	
QIAamp® DNA Mini Kit	51106, QIAGEN
S.O.C. Medium	15544034, Invitrogen™
Sentrifugi Eppendorf-putkille	
Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)	78390500UN, Applied Biosystems™
Steriili vesi	
Suklaa (McLeod) agarmalja	T051, Tammer BioLab
Suojaliina	
T4 DNA Ligase (1U/μL) 100 units	15224017, Invitrogen™
T4 DNA Ligase Buffer	15224017, Invitrogen™
T4 DNA Polymerase (5 U/μL)	EP0061, Thermo Scientific™
T4 DNA Polymerase Buffer	EP0061, Thermo Scientific™
TBE Buffer	15581-044, Invitrogen™
Trimetopriimi	CT0076B, OXOID
Viljelysauvat ja -silmutkat	
Vortex	

Taulukosta nähdään kaikki käytetyt reagenssit ja välineet sekä niiden tuotenumerot ja valmistajat, jotta tuotteita on helpompi tilata jatkossa. Kuitenkaan kaikkia näitä tuotteita ei tarvita geenikloonauksessa, vaan ne liittyivät menetelmän valmisteluihin, kuten siihen, omasivatko bakteerit resistenssigeenin jotakin antibioottia kohtaan. Tarvittavat välineet ja reagenssit ovat lueteltuna erikseen jokaisessa kloonauksen testauksen työvaiheessa.

9.2 Kloonaukseen valmistelevat menetelmät

Ennen varsinaista kloonausta tehtiin useampi siihen valmisteleva vaihe, joita olivat bakteerien kasvattaminen, bakteerien herkkyysmääritys Kirby-Bauer -menetelmällä, perimäaineksen eristäminen silikapylväs-menetelmällä, perimäaineksen pitoisuuden ja puhtauden mittaaminen spektrofotometrillä sekä perimäaineksen juosteiden koon selvittäminen agarosigeelielektroforeesilla.

9.2.1 Bakteerien kasvattaminen ja herkkyysmääritys

Opinnäytetyössä käytettiin mikrobiologian perusmenetelmiä lähtömateriaalien keräämiseen sekä kloonauksen havainnointiin. Bakteerit olivat syväjäässä säilytettyjä *E. coli* -kantoja, joita viljeltiin ravinnerikkaalla McLeod suklaamaljalla. Melkein kaikkia *E. coli* -kantoja voidaan säilyttää -70 °C :n ja -80 °C :n asteen välillä vuosia. Bakteeri siirrostetaan maljalle viljelysauvalla edestakaisella liikkeellä. Viljelmää hajotetaan vetämällä viljelysauvaa ensimmäisen viirun läpi tyhjälle osalle maljaa ja tämä toistetaan ainakin kerran. Tämä auttaa yksittäisten pesäkkeiden kasvamisessa. Bakteereja kasvatetaan lämpökaapissa 37 °C :ssa, kunnes bakteeripesäkkeet voidaan havaita paljaalla silmällä. (Elbing & Brent 2018.) Suklaamaljalla *E. coli* pesäkkeet olivat vaalean harmahtavia, jossa erilliset pyöreät pesäkkeet erottuivat suurimmaksi osaksi hyvin.

Kirby-Bauer -menetelmää käytettiin *E. coli* -kantojen antibioottilherkkyksien määrittämiseen. Kirby-Bauer -menetelmässä 0,5 McFarland standardin vahvuista bakteerisuspensiota levitetään tasaiseksi matoksi Mueller-Hinton herkkyysmaljalle. Agarin pinnalle asetettiin halutuilla antibiooteilla kyllästettyjä paperikiekoja. Maljoja inkuboitin yön yli lämpökaapissa 37 °C :ssa, minkä jälkeen kiekkojen ympärille muodostuneet estovyöhykkeiden halkaisijat mitattiin millimetrin tarkkuudella. Bakteerisuspension vahvuus ja inkubaation aika sekä lämpötila ovat standardoituja. (Christenson & Korgenski & Relich 2018; Balouiri & Sadiki & Ibsouda 2015.) Bakteerien herkkyden määrittämiseen käytettiin EUCASTin standardeja. McFarland standardeja käytetään vakioimaan bakteerien määrää nestesuspensiossa vertaamalla suspension sameutta McFarland testisuspension sameuteen (McFARLAND STANDARD 2014).

Ennakkotietojen perusteella varmistettiin kummankin näytteen antibioottilherkkydet. Näytteenä toimi 2 ml 0,5 McFarland standardin vahvuista suspensiota kummastakin näytteestä sekoitettuna 0,9 %:n vahvuiseen natriumkloridiin. Näytteet siirrostettiin maljalle dreijaamalla tasaisesti kummatkin suspensiot omille Mueller-Hinton (MH) herk-

kyysmaljoille pumpulitikuilla laminaarikaapissa. Bakterimaton päälle asetettiin halkaisijaltaan 6 mm olevia antibioottikiekkkoja, joista antibiootit imeytyivät agariin. Antibiootteina käytettiin gram-negatiivisille sauvoille tarkoitettua antibioottipaneelia.

Bakteerisuspensioiden puhtauden varmistamiseksi tehtiin perämaljat kummallekin suspensiolle, joka varmisti, ettei suspensio ollut kontaminoitunut. Maljoja inkuboitettiin lämpökaapissa 37 °C:ssa 19 tuntia, minkä jälkeen estovyöhykkeiden halkaisijat luettiin millimetrin tarkkuudella mustaa taustaa vasten. Musta tausta auttoi sekä sameuden havaitsemisessa bakteerisuspensiota tehdessä 0,5 McFarland standardin vahvuiseksi, että estorenkaiden rajan havainnoimisessa. Estorenkaiden rajat tarkistettiin EUCASTin määrittämien antibioottirajojen mukaan. Taulukossa 6 esitellään paneelin tulokset kummankin *E. coli* kannan osalta. Tulos voi olla joko antibiootille herkkä (S, susceptible), resistentti (R, resistant) tai herkkyys alentunut (I, intermediate) (New definitions of S, I and R from 2019).

Taulukko 6. Gram-negatiivisten sauvojen AB-paneelitulokset.

Antibiootti	<i>E. coli</i> ATCC 8793	<i>E. coli</i> potilasnäyte
Netilmycin (NET)	26 mm (IE)	24 mm (IE)
Trimetoprim (W)	27 mm (S)	Ei estorengasta (R)
Nitrofurantoin (F)	20 mm (S)	20 mm (S)
Cefotaxime (CTX)	30 mm (S)	26 mm (S)
Meropemen (MEM)	30 mm (S)	26 mm (S)
Piperacillin-tazobactam (TZP)	26 mm (S)	24 mm (S)

Herkkyysien määrittäminen onnistui ja perämaljat olivat puhtaat. *E. coli* -kanta 8793 oli herkkä kaikille paneelin antibiooteille ja potilasnäyte oli herkkä kaikille muille antibiooteille paitsi trimetopriimille (W). Netilmysiinille (NET) kummankin näytteen tulos oli IE (insufficient evidence), joka tarkoittaa, ettei organismi tai ryhmä ole hyvä kohde tälle antibiootille (Clinical breakpoint and dosing of antibiotics 2022). Tulokset olivat esitietojen mukaiset.

9.2.2 Inserttien ja vektorien eristäminen

DNA:n eristys verestä on tärkeä osa kloonausta. DNA eristetään silikapylväs-menetelmällä. Eristetyssä ja puhdistetussa DNA:ssa ei ole ylimääräisiä proteiineja, nukleiinihappoja tai muita epäpuhtauksia. Metropolian Ammattikorkeakoulun molekyyli-genetiikan jaksolla DNA:n puhdistukseen käytetään QIAamp® DNA Mini Kittä. DNA eristetään ja puhdistetaan kitin valmistajan ohjeiden mukaisesti optimaalisen tuloksen saavuttamiseksi. Kitti pystyy eristämään keskimäärin kuusi mikrogrammaa DNA:ta 200 mikrolitrasta kokoverta. (QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook 2016: 11.)

Valkosolujen solukalvot hajotetaan proteinaasi K-entsyymillä, jotta DNA saadaan vapautettua solusta. Jotta olosuhteet entsyymille ovat optimaaliset, lisätään proteinaasi K:lle spesifistä puskuria. Puskuri tasapainottaa suola- ja pH-tasapainon entsyymin toiminnalle optimaaliseksi. Olosuhteet varmistavat, että proteiinit ja muut epäpuhtaudet eivät pysy silikakalvolla. Epäpuhtaudet pestään pois sentrifugoimalla käyttäen kahta eri pesupuskuria ja DNA eluoidaan eli liuotetaan pois silikakalvosta steriilin veden avulla. (QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook 2016: 11–13.)

Plasmidien eristämiseen bakteerisolusta käytettiin The High Pure Plasmid Isolation Kit-tä. Eristys suoritettiin valmistajan ohjeiden mukaan parhaan lopputuloksen saamiseksi. Kitti pystyy eristämään parhaimmillaan 15 mikrogrammaa plasmidista DNA:ta. Plasmidi soveltuu kloonaukseen sellaisenaan eristämisen jälkeen. Plasmidin eristys perustuu bakteerien soluseinien emäksiseen hajotukseen liuoksessa. *E. coli*n kromosomaalinen DNA jää prosessissa kiinni soluseiniin. RNA poistetaan samanaikaisesti RNase A-entsyymillä. Liuos sentrifugoidaan, jolloin soluseinät ja kromosomaalinen DNA painuvat putken pohjaan sakkana ja kirkas osa, supernatantti, voidaan erotella siitä. Plasmidinen DNA on supernatantissa. Supernatantti siirretään filteriputkeen. Plasmidisen DNA:n nukleiinihapot sitoutuvat filterin lasikuituun guanidiinihydrokloridin läsnä ollessa. Guanidiinihydrokloridi denaturoi proteiinit. Koska vain nukleiinihapot pystyvät sitoutumaan filteriin, muut epäpuhtaudet pystytään pesemään pois. Lopuksi Plasmidinen DNA eluoidaan veteen. (High Pure Plasmid Isolation Kit 2014.)

Plasmidien eristämiseen käytettiin lähdemateriaalina potilasnäytteestä kasvatettuja *E. coli* -pesäkkeitä suklaamaljalta. Lähdemateriaalista tehtiin kuusi rinnakkaisnäytettä, jotka merkittiin numeroimalla. Jokaiseen näytteeseen käytettiin viidestä seitsemään pesäkettä. Inserttinä käytettiin veren valkosoluista eristettyä DNA:ta. DNA oli valmiiksi eristetty molekyyli-genetiikan opintojaksolla opiskelijoiden toimesta, joiden käyttöön saatiin lupa. Näistä valittiin seitsemän näytettä, joita opinnäytetyössä käytettiin.

Pitoisuuden ja puhtauden mittaamiseen plasmidisestä DNA:sta ja verestä eristetystä DNA:sta käytettiin Epoch Microplate Spectrophotometer -analysointilaitetta. Analysointilaitte ilmoittaa pitoisuuden yksikössä ng/μL ja puhtauden absorbanssin 260/280 suhteena. Epoch Microplate Spectrophotometer -analysointilaitteen toiminta perustuu spektrofotometriaan. Spektrofotometria puolestaan perustuu Beer-Lambertin lakiin, jossa näytteeneseen absorboituneen valon määrä on suoraan verrannollinen näytteen pitoisuuteen. Pitoisuuden mittaamisen mahdollistaa DNA:ssa olevat nukleiinihapot ja proteiinit, jotka sitovat ultraviolettivaloa itseensä. DNA:n puhtaus määritetään käyttäen absorbanssin arvoja aallonpituuksilla 260 nm ja 280 nm. Arvojen keskinäinen suhde kertoo DNA:n puhtautesta. (Brescia 2021.) DNA on puhdasta, kun A260/280 suhde on noin 1,8. Epänormaali suhdeluku kertoo kontaminaatiosta kuten reagenssijäämistä näytteessä. (Interpretation of Nucleic Acid 260/280 Ratios 2012.)

DNA-näytteet olivat pakastettuja ennen pitoisuusmittausta, joten näytteet tuli sekoittaa huolellisesti, koska alhaisissa lämpötiloissa näytteeneseen voi tulla DNA saostumia (Safarikova & Kubena & Frankova & Zima & Kalousova 2021). Taulukosta 7 nähdään, että kaikkien näytteiden puhtaus oli lähellä tavoitearvoa 1,8. Plasmidi-DNA-näytteiden puhtaus oli hieman kehnompaa kuin insertti-DNA-näytteiden. Tämä saattaa johtua reagenssien tai näytteiden huonosta sekoituksesta tai reagenssien säilytyksestä väärässä lämpötilassa. Kitin reagenssit tulee säilyttää 15 °C:n ja 25 °C:n välillä. Suspensioposkuri tulisi säilyttää 2 °C:n ja 8 °C:n välillä, kun siihen on lisätty RNase. (High Pure Plasmid Isolation Kit 2014.) Ohjeessa käytettiin solususpensiota, mutta tässä tulokseen voi vaikuttaa myös se, että bakteerit otettiin suoraan agarmaljalta, josta voi tulla mukana epäpuhtauksia.

Taulukko 7. Plasmidien ja inserttien puhtaus sekä pitoisuus.

Plasmidi-DNA	Pitoisuus ng/μL	Puhtaus 260/280	Insertti-DNA	Pitoisuus ng/μL	Puhtaus A260/280
1	18,488	1,647	1	209,819	1,841
2	17,691	1,692	2	19,669	1,775
3	15,660	1,640	3	38,264	1,868
4	38,352	1,677	4	37,529	1,856
5	14,428	1,736	5	35,268	1,863
6	85,961	1,534	6	17,212	1,897
7	105,7	1,700			

Plasmidi-DNA-näytteiden pitoisuus vaihteli välillä 14,4 ng/μL ja 86,0 ng/μL. Insertti-DNA-näytteiden pitoisuus taas vaihteli välillä 17,2 ng/μL ja 209,8 ng/μL. Pitoisuuden vaihtelulle voi olla monia syitä, kuten lähtökohtaisesti vähäinen DNA-pitoisuus kokoverinäytteessä, josta DNA on eristetty QIAamp® DNA Mini kitillä. Kitin ohjeessa kerrotaan, että mikäli on jo etukäteen tiedossa näytteen vähäinen pitoisuus (alle 1 μg), tulisi se eluoida lopputilavuudeltaan pienempään määrään eluointipuskuria tai steriiliä vettä, jolloin suositeltava määrä on 50 mikrolitraa. Muita syitä voi olla eristämisen työvaiheissa tapahtuvat virheet, kuten pesupuskurien käyttö väärässä järjestyksessä, tai niihin on lisätty liian laimea alkoholia tai ei alkoholia ollenkaan. (QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook 2016: 46.)

Ensimmäiseen menetelmän testaukseen päätettiin käyttää plasmidi-DNA:ta numero 4 ja insertti-DNA:ta numero 3. Näytteiden pitoisuuksien haluttiin olevan mahdollisimman lähellä toisiaan, joka vähensi laskelmien tekoa ensimmäisellä kerralla. Plasmidi-DNA:n numero 4 pitoisuus oli 38,4 ng/μL ja insertti-DNA:n numero 3 pitoisuus oli 38,3 ng/μL. Reaktioiden protokollaohjeissa DNA:n pitoisuus ilmoitetaan yksikössä μg/μL, joten pitoisuudet muunnettiin samaan yksikköön, eli 0,0384 μg/μL ja 0,0383 μg/μL. Seuraavilla testaukskerroilla käytettiin myös plasmidi-DNA:ta numero 6 korkean pitoisuuden takia, vaikka puhtaus olikin alhainen, plasmidi-DNA:ta numero 7 ja insertti-DNA:ta numero 1.

9.2.3 Agarosigeelielektroforeesi

Agarosigeelielektroforeesia (AGE) käytettiin plasmidi-DNA:n koon mittaamiseen sekä digestion ja ligation onnistumisen varmistamiseen. AGE on yksinkertaisimpia ja tehokkaimpia menetelmiä DNA- ja RNA-fragmenttien erotteluun. AGE:lla voidaan erotella 100 bp:n – 25 kb:n kokoisia DNA-fragmentteja. Agarosi on eristetty levästä ja jähmettyessään se muodostaa huokoisen verkkomaisen rakenteen. Mitä korkeampi konsentraatio agarosigeelissä on, sitä pienempi sen huokosten koko on. Eri vahvuisilla agarosigeeleillä on eri ominaisuuksia. Isot DNA-fragmentit tarvitsevat matalakonsentraation geelin, jotta ne pääsevät liikkumaan. Low-melting-agarose on muunneltu agarosigeeli, jossa geelin huokoskoko on erityisen pieni. DNA-fragmentit liikkuvat tässä hitaammin kuin tavallisessa agarosigeelissä. Low-melting-agarose geeliä käytetään esimerkiksi, kun halutaan eritellä DNA-fragmentteja toisistaan. (Lee & Costumbrado & Hsu & Kim 2012.)

AGE perustuu sähköisesti varautuneiden molekyylien liikkumiseen sähkökentässä kohti vastakkaista sähkövarausta. DNA:n fosfaattiryhmä antaa DNA:lle negatiivisen sähkövarauksen, joten DNA-fragmentit liikkuvat sähkökentässä kohti AGE-kelkan positiivista napaa. DNA:n koko on kääntäen verrannollinen sen kulkemaan matkaan geelissä eli lyhyemmät juosteet kulkevat geelissä nopeammin kuin pidemmät juosteet. DNA:n kulkemaan matkaan vaikuttaa DNA:n koko, agaroosigeelin pitoisuus, DNA:n muoto, jännite sekä puskuri. (Lee ym. 2012.)

Ajon jälkeen DNA-molekyylit voidaan nähdä UV-valon avulla. Agaroosigeeliin on lisätty väriainetta, joka nähdään UV-valolle altistettuna. Väriaineet sitoutuvat DNA:han. Tällaisia väriaineita ovat esimerkiksi etidiumbromidi (EtBr) ja SYBR green. Väriaineita on useita erilaisia ja kaikki niistä eivät vaadi UV-valoa näkyäkseen, kuten metyyli-sininen ja metyyli-violetti. Osa väriaineista ovat karsinogeenisiä ja mutageenisia. (Lee ym. 2012.)

DNA:n koko voidaan määrittellä molekyyli-painomarkkerin (molecular weight marker, MWM) avulla. MWM koostuu DNA-juosteista, joiden koot ovat tunnetut. MWM juosteiden kulkemaa matkaa verrataan näytteen DNA-juosteiden kulkemaan matkaan geelissä. On tärkeää huomioida, että eri muodoissa oleva DNA kulkeutuu eri tavalla. Superkiertyneessä muodossa oleva plasmidi kulkeutuu geelillä nopeammin, jota seuraa lineaarinen samankokoinen DNA-fragmentti ja hitaimpana kulkeutuu rengasmaisessa muodossa oleva plasmidi. (Lee ym. 2012.)

AGE ajettiin, jotta plasmidin koko voitaisiin tarkistaa. Lisäksi insertin koko haluttiin arvioida. Yhtenä näytteenä elektroforeesissa toimi ligaatiotuote, jossa insertti ja plasmidi olivat kiinnittyneenä toisiinsa. Tieto DNA-fragmenttien koosta tarvittiin osaan geenikloonauksen vaiheista. Geelillä ajettiin 5 eri näytettä, joiden lisäksi ajettiin molekyyli-painomarkkeri, johon kokoa verrattiin, sekä steriili vesi, joka toimi nollakontrollina, eli kyseisellä näytepaikalla ei pitänyt näkyä juostetta. Mikäli veden kohdalla juosteita näkyisi, olisi se merkki kontaminaatiosta. Taulukossa 8 on esitetty, mitä näytteitä elektroforeesissa ajettiin. Näytteet 2, 3 ja 4 leikattiin kohessiivisesti, kuten aina EcoRI-restriktioentsyymiä käytettäessä, mutta näytteelle 4 oli tehty DNA-fragmenttien päiden tylpistäminen. Ligaatiotuotteiden avulla oli tarkoitus arvioida insertin koko. Näytepaikalla 5 käytettiin suoraan eristettyä plasmidia, joka oli siis edelleen rengasmaisessa muodossa, kun taas näytepaikalla 6 käytettiin digestoitua plasmidia ilman inserttiä, jotta saatiin tarkistettua plasmidin koko.

Taulukko 8. Agarosigeelielektroforeesin näytepaikat.

Näytepaikka	Näytemateriaali
1	Molekyylipainomarkkeri (MWM)
2	Ligaatiotuote (insertti+plasmidi) insertti nro 3 ja plasmidi nro 4
3	Ligaatiotuote (insertti+plasmidi) insertti nro 3 ja plasmidi nro 6
4	Ligaatiotuote (insertti+plasmidi) insertti nro 3 ja plasmidi nro 4
5	Plasmidi rengasmaisessa muodossa
6	Plasmidi digestoituna
7	Steriili vesi

Elektroforeesi aloitettiin tekemällä edellisenä päivänä geeli agarosijauheesta ja TBE-puskurista. Agarosin prosentuaalinen määrä geelissä on yleensä välillä 0,5 % – 5 % riippuen oletetusta DNA-fragmentin pituudesta. Mitä suurempi pituus, eli emäsparien määrä juosteessa on, sitä laimeampaa geelin tulee olla, jotta se pääsee liikkumaan geelissä. Koska plasmidin pituuden oletettiin olevan 3000 bp:n – 4000 bp:n välillä, valittiin geelin vahvuudeksi 0,8 %:a, joka soveltuu juosteille 800 bp:n – 10000 bp:n välillä. Puskuriksi soveltuu TBE-puskuri, jota tässä käytettiin, tai vaihtoehtoisesti TAE-puskuri. (General Recommendations for DNA Electrophoresis 2012.) TBE-puskurin lyhenne tulee sanoista tris-borate-EDTA ja TAE-puskurin lyhenne sanoista tris-acetate-EDTA (Sanderson & Araki & Lilley & Guerrero & Lewis 2014).

Kelkkana käytettiin pientä kelkkaa, koska näytepaikkoja tarvittiin vain seitsemän. Pienen kelkkaan geelin sopiva tilavuus oli 200 ml. Agarosijauhetta punnittiin 1,6 grammaa, jolloin geelin vahvuus oli 0,8 %. TBE-puskuri mitattiin mittalasilla ad. 200 ml, eli lopputilavuus agarosin kanssa oli 200 ml. Seokseen lisättiin vielä fluoresoivaa nukleihinappoja värjäävää GelGreen® -väriä, joka nähdään UV-valossa (GelGreen® Nucleic Acid Gel Stain 2022). Tämän jälkeen seos siirrettiin dekanterilasiin ja lämmitettiin mikroaaltouunissa, jolloin se muuttui kirkkaaksi, kun agarosijauhe on täysin liennut TBE-puskuriin. Seos ei saa kuitenkaan kiehua. Seoksen annettiin jäähtyä kylmässä vesialtaassa noin 55 °C:n lämpötilaan. Tällä välin kelkan päät teipattiin maalarinteipillä, jotta geeli pysyi kelkassa. Geelissä ei saanut olla ilmakuplia, joten ennen kelkkaan kaatamista ilmakuplat otettiin pois pasteur-pipetin avulla. Näytepaikkakammat asetettiin geelin toiseen päähän varovasti, että paikat pysyivät erillisinä. Oli tärkeää antaa geelin jähmettyä tasaisella alustalla, jotta geelin paksuus oli tasainen. Geeli tehtiin etukäteen seuraavalle

päivälle, joten kuivumisen estämiseksi se laitettiin jääkaappiin muovipussissa. (Preparation of 0.8 % Agarose Gel 2018.)

Kelkasta otettiin varovasti pois teipit ja näytekampa ja geeli siirrettiin kelkasta TBE-puskuria sisältävään ajoaltaaseen. Näytteisiin lisättiin DNA Loading Dye -reagenssia, jotta pipetoiminen näytepaikoille oli helpompaa. Sen avulla DNA-näytteet upposivat paremmin näytepaikkojen pohjalle, latausaineen muuttaessa näytteen viskositeettia ja se teki fragmentit näkyväksi geelillä niiden kulkiessa geelin läpi. Näytteet pipetoitiin näytekaivoihin puskurin läpi. Geeliin muodostettiin 120V sähkökenttä ja DNA:n annettiin kulkeutua geelissä noin puolitoista tuntia, koska fragmentit olivat suuria. Tämän jälkeen geeliä tarkasteltiin UV-valossa. (Lee ym. 2012.)

Koulun molekyyli-markkeri oli ainoastaan 1000 bp:n kokoinen, eli sen avulla ei pystytty saamaan tarkkaa pituutta DNA-fragmenteille, joten tulos ei ollut luotettava. Sen avulla pystyttiin kuitenkin arvioimaan, että plasmidin koko oli noin 3000 bp:n pituinen. Geelillä myös näytti, että plasmidi-insertti-kompleksit, jotka olivat tylpistetty (näyte 4), olisivat hiukan pidempiä. Tämä voi johtua siitä, että fluoresoiva väri sitoutuu paremmin kaksijuosteiseen DNA:han, kuin yksijuosteiseen DNA:han (GelGreen® Nucleic Acid Gel Stain 2022), jota jää muutaman nukleotidin pätkä kohessiivisesta pilkkomisesta DNA-fragmenttien päihin. Rengasmaisen plasmidi (näyte 5) ei pysynyt kaivossa ollenkaan, vaan se poistui kaivosta heti pipetoimisen jälkeen. Näyte 5 plasmidi on voinut mahdollisesti kontaminoitua eristämisympäristössä pesupuskuriin tai filterin lasikuituun, mikä aiheuttaa kaivosta pois 'leijumista' (High Pure Plasmid Isolation Kit 2014). Digestoitu plasmidi (näyte 6) näkyi hyvin haaleana geelillä, mutta se näytti olevan vain hyvin vähän pienempi kuin plasmidi-insertti-kompleksit, joka kertoisi siitä, että DNA-insertti olisi hyvin pieni kooltaan. Nollakontrollina toiminut vesinäyte oli onnistunut, eli siinä ei näkynyt juostetta.

9.3 Menetelmän testaus

Menetelmän testaus aloitettiin syyskuussa 2022 viljelemällä bakteereja plasmidien eristämiseen sekä transformaatioon. Menetelmän toimimiseksi tarvittiin yksi *E. coli* -kanta, jolla on resistenssi jollekin antibiootille ja toinen kanta, jolla ei ole samaa resistenssigeeniä. Plasmidien eristämiseen käytettiin potilasnäytettä, joka on resistentti trimetopriimille. Transformaatioissa isäntäsoluksi käytettiin *E. coli* -kanta 8793. Näytemateriaalit olivat säilytetty syväjäähdyksessä -80 °C:ssa. Kloonaus oli onnistunut, jos *E. coli* -kanta 8793 kykenee kasvamaan trimetopriimin läsnä ollessa saatuaan potilasnäytteestä eristetyn plasmidin, jossa oletetusti oli resistenssigeeni trimetopriimille. Kummatkin kannat

viljeltiin omille Mcleod suklaamaljoilleen ja kasvatettiin lämpökaapissa 37 °C:ssa noin 19 tunnin ajan. Kummatkin kannat kasvoivat maljoilla hyvin.

Geenikloonauksessa hyödynnettiin runsaasti entsyymaattisia menetelmiä. Entsyymien toiminta on riippuvaista ympäristön pH:sta, lämpötilasta, kofaktoreista sekä entsyymin ja substraatin konsentraatiota (Costello & Franklin 2011). Lähes kaikissa kloonauksen vaiheissa käytettiin erilaisia entsyymejä katalysoimaan reaktioita ja kaikkien entsyymien kohdalla huomioitiin niiden tarvitsemat spesifit olosuhteet. Entsyymit vaativat toimiakseen pakkausten mukana tulleita puskureita, jotka sisältävät tarvittavat kofaktorit ja oikean pH:n. Entsyymien mukana tulleita ohjeita lämpötiloista ja inkubaatioajoista noudatettiin tarkasti, jotta varmistettiin entsyymien toiminta parhaalla mahdollisella tavalla.

9.3.1 Digestio ja defosforylaatio

Eristyksen jälkeen voitiin aloittaa plasmidien ja inserttien digestio joko suoraan juuri eristetyistä näytteistä tai aiemmin pakastetuista näytteistä. Digestioon käytettiin EcoRI-restriktioentsyymiä, jolla katkaistiin sekä insertti-DNA että plasmidi-DNA. Digestion jälkeen plasmidi-DNA:lle tehtiin defosforylaatio SAP-entsyymillä (Shrimp Alkaline Phosphatase), joka on alkalinen fosfataasi. Tähän tarvittavat välineet ovat lueteltuna taulukossa 9.

Taulukko 9. Digestioon ja defosforylaatioon tarvittavat välineet.

Välineet	
Pipetit 0,5-5µL ja 5-40µL	Steriili vesi
Filterilliset pipetinkärjet 10 µL ja 100 µL	EcoRI Enzyme (10 U/µL)
Vesihaude 65 °C	EcoRI Buffer (10X)
Lämpökaappi 37 °C	Shrimp Alkaline phosphatase (1U/ µL)
Kylmäblokki	Insertti-DNA (ihmisperäinen)
Eppendorf-putkia ja putkiteline	Plasmidi-DNA (bakteeriperäinen)
Vortex	Sentrifugi Eppendorf-putkille
Suojaliina	Laskuri: pmol
Ajastin	Laskin

Ensimmäisenä lämpökaappi asetettiin lämpenemään 37 °C:n lämpötilaan ja vesihautteeseen laitettiin vesi ja hauteen lämpötila asetettiin 65 °C:seen. Puskuri ja steriili vesi asetettiin sulamaan huoneenlämpöön putkitelineeseen ja entsyymit siirrettiin kylmäblokkille. Entsyymejä pidettiin jatkuvasti jäissä, lämpötilassa -10 °C – -25 °C. Mikäli entsyymejä säilytetään korkeammassa lämpötilassa, entsyymit alkavat denaturoitumaan vähitellen ja menettävät niiden katalysoivan vaikutuksen reaktioihin. (How to Choose an Enzyme Storage Lab Freezer 2022.) Kaikki komponentit sekoitettiin ennen pipetointia, jotta konsentraatio oli koko reagenssissa sama.

Pipetinkärjiksi valittiin aina filtterin sisältävät kärjet mahdollisuuksien mukaan. Filtteri on tarpeen, koska reaktio on herkkä ristikontaminaatiolle ja se estää perimäainesta kontaminoimasta pipetin alaosa. Filtteri estää pipetoitavan nesteen pääsyn pipetin sisään esimerkiksi silloin, kun on valittu liian pieni kärki nesteen tilavuuteen nähden. Lisäksi se vähentää aerosolien pääsyä pipetinkärkeen. (Selecting the Right Pipette Tip.)

Koska käytössä olleen restriktioentsyymin ohjeessa digestion reaktioseoksessa oli oletuksena melko suuren konsentraation omaavaa perimäainesta, 0,5–1 µg/µL, näytteiden ollessa 0,038 µg/µL, jouduttiin vähentämään reaktiossa käytettävän veden määrää. Tämä oli mahdollista ainoastaan siinä tapauksessa, kun DNA oli eristysvaiheessa eluoiu steriiliin veteen, eikä eluointipuskuriin. Myös päinvastaisessa tilanteessa, jossa DNA:ssa olisi liian korkea konsentraatio, jolloin sitä tulisi laimentaa, täytyisi eluointiaine olla steriili vesi. Taulukossa 10 on esitetty yhteen reaktioon tarvittavat komponentit ja niiden määrät.

Taulukko 10. Digestion reaktioseos (EcoRI 2012).

Komponentti	Määrä
Steriili vesi	16 µL
EcoRI Buffer 10X	2 µL
DNA (0,5-1µg/µL)	1 µL
EcoRI (10 U/µL)	1 µL
Kokonaismäärä	20 µL

Reaktiot tehtiin samanaikaisesti yllä olevilla määrillä niin monelle näytteelle, kuin oli tarve, mutta aina vähintään kahdessa eri putkessa, koska oma reaktioseos tehtiin sekä plasmidille että insertille. DNA:n tavoitekonsentraatio oli 0,5–1 µg/µL, joten laskukaavan

perusteella muutettiin steriilin veden määrää lisäten samalla pipetoitavan DNA:n määrää. Lähtökonsentraationa oli 0,038 µg/µL DNA:ta, joka oli merkittävästi pienempi kuin toivottu pitoisuus. Koska tavoitteena oli mahdollisimman korkea pitoisuus, ollen kuitenkin vähemmän kuin 1 µg/µL, jätettiin steriili vesi kokonaan pois. Laskemalla $17 \times 0,038$ saatiin tulokseksi 0,65 µg, joka oli tavoitevälillä. Lasku muodostui yhteensä pipetoitavasta määrästä alkuperäisessä ohjeessa, eli 16 µL vettä ja 1 µL DNA:ta, eli yhteensä pipetoitiin 17 µL DNA:ta, muiden komponenttien määrän pysyessä samana. Myöhemmillä testauskerroilla päästiin myös 1 µg/µL konsentraatioon käytetyn DNA:n pitoisuuden ollessa korkeampi.

Pipetointi aloitettiin korkeimmasta määrästä, eli DNA:sta ja viimeisenä pipetoitiin pienin määrä eli restriktioentsyymi. Kun kaikki komponentit olivat pipetoituna digestioseoksissa nimetyissä Eppendorf-putkissa, sekoitettiin putket hellästi pipetoimalla edestakaisin muutaman kerran, jonka jälkeen putket sentrifugoitiin nopeasti, jotta kaikki seoksen komponentit painuvat putken pohjalle. Tämän jälkeen putket asetettiin putkitelineessä lämpökaappiin inkuboitumaan 37 °C:seen tunniksi. Kun tämä aika oli kulunut, insertin sisältävät digestioseokset laitettiin 65 °C:n vesihauteeseen inkuboitumaan 20 minuutiksi, jotta restriktioentsyymi inaktivoitui, eli lakkasi toimimasta. (EcoRI 2012.)

Plasmidin sisältäviä digestioseoksia ei inaktivoitu samaan aikaan, koska plasmideille tehtiin defosforylaatio alkalisen fosfataasin avulla, joka poisti plasmidi-DNA:n 5'-päistä fosfaattiryhmät. Tämä esti plasmidi-DNA:n päiden kiinnittymistä takaisin yhteen digestion jälkeen. Alkalisia fosfataaseja on useita, tässä reaktiossa käytössä oli Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP). SAP voitiin lisätä suoraan digestioseokseen, jolloin se ei tarvinnut omaa puskuria toimiakseen. Pipetoitava määrä riippui DNA-fragmenttien päiden määrästä, eli katkaistujen plasmidien päiden pmol-määrästä. Ohjeen mukaan alkalista fosfataasia lisättiin 1 U (unit) jokaista yhtä pmol:ia (DNA-fragmenttien päitä) kohden. (USB® Shrimp Alkaline Phosphatase 2016.)

Käytetyn SAP:in pitoisuus oli 1 U/µL ja käytetyn *E. colista* eristetyn plasmidin koko oli noin 3 kb, eli 3000:n emäsparin kokoinen. Pmol-pitoisuuden laskuun käytettiin Promegan Biomath Calculatoria, johon syötettiin DNA:n pituus (3000 bp) ja DNA:n pitoisuus (0,65 µg). Mitä suurempia plasmidit olivat, sitä pienempi pmol-pitoisuus oli, koska plasmidien päitä on näytteessä silloin vähemmän. Jos taas plasmidi olisi hyvin pieni, sitä enemmän plasmidien päitä näytteeseen mahtuisi, vaikka pitoisuus olisi sama. Tässä tapauksessa tulokseksi saatiin 0,33 pmol. Pipetoitavaksi määräksi saatiin siis 0,35 µL alkalista fosfataasia. Kun pitoisuus oli 1 µg, pmol pitoisuus oli 0,51 pmol ja entsyymien pipetoitava

määrä 0,5 µL. (dsDNA: µg to pmol 2022.) Kun tarvittava määrä oli pipetoitu digestioseokseen, putkea inkuboitiin lämpökaapissa 37 °C:ssa 30 minuuttia. Kun defosforylaatio oli valmistunut, plasmidien digestioseokset inaktivoitiin 65 °C:n vesihauteessa 15 minuutin ajan. Tämä inaktivoi alkalisen fosfataasin sekä restriktioentsyymien. (USB® Shrimp Alkaline Phosphatase 2016.) Tämän jälkeen insertit ja plasmidit olivat valmiit päiden tylpistämiseen tai suoraan ligaatioon.

9.3.2 Tylpistäminen

Parhaan mahdollisen ligaatituloson saavuttamiseksi kokeiltiin sekä kohessiivisesti että tylpästi katkaistuja DNA-fragmentteja. EcoRI-restriktioentsyymi katkaisee DNA-juosteen kohessiivisesti, joten DNA-fragmenttien päiden tylpistäminen tehtiin itse. Yksijuosteista DNA:ta jää muutaman nukleotidin mittainen pätkä kohessiivisen katkaisun jälkeen DNA-fragmenttien päihin. T4 DNA-polymeraasi rakentaa yksijuosteisiin DNA-fragmentteihin puuttuvat nukleotidit muuttaen sen kaksijuosteiseksi. Päiden tylpistäminen saattaa auttaa ligaatiossa, joten osa näytteistä pidettiin kohessiivisesti digestoiduilla päillä ja osalle tehtiin päiden tylpistäminen. Päiden tylpistämiseen tarvittavat välineet ovat eriteltynä taulukossa 11.

Taulukko 11. Tylpistämiseen tarvittavat välineet.

Välineet	
Pipetit 0,5–5 µL ja 5–40 µL	Steriili vesi
Filtterilliset pipetinkärjet 10 µL ja 100 µL	T4 DNA Polymerase Enzyme (5U/µL)
Vesihaude 75 °C	T4 DNA Polymerase Buffer (5X)
Kylmäblokki	dNTP mix (10 mM)
Eppendorf-putkia ja putkiteline	Insertti-DNA (ihmisperäinen)
Suojaliina	Plasmidi-DNA (bakteeriperäinen)
Laskin	Sentrifugi Eppendorf-putkille
Ajastin	Vortex

Vesihaude asetettiin 75 °C:n lämpötilaan. Puskuri ja dNTP mix otettiin huoneenlämpöön sulamaan. T4 DNA-polymeraasi asetettiin kylmäblokille. Reaktiossa käytettiin T4 DNA-polymeraasin valmistajan ohjetta T4 DNA Polymerase 2016. Taulukossa 12 on esitetty reaktioon tarvittavat komponentit ja niiden määrät.

Taulukko 12. Reaktioseos tylpistämiseen (T4 DNA Polymerase 2016).

Komponentti	Määrä
T4 DNA Polymerase Buffer 5X	4 µL
DNA	1 µg
dNTP mix	1 µL (0,1 mM lopullinen pitoisuus)
T4 DNA Polymerase (1U)	0,2 µL
Steriili vesi	20 µL asti

Reaktioseos vaati yhden mikrolitran dNTP mixiä 0,1 mM konsentraatiolla. Koska saatavilla oli 10 mM vahvuista dNTP mixiä, se laimennettiin steriiliin veteen. dNTP mix laimennettiin steriilillä vedellä omassa Eppendorf-putkessa sopivaan pitoisuuteen. Tylpistäminen tehtiin digestoiduille insertille ja plasmidille. Reaktioseos tehtiin tämän takia kolminkertaisena, josta riitti insertille, plasmidille ja pipetointivaraan. Pipetointivaralla varmistettiin reaktioseoksen riittävyys kaikille näytteille. Puskuria (12 µL), dNTP-laimennosta (3 µL) ja T4 DNA-polymeraasia (0,6 µL) pipetoitiin omaan Eppendorf-putkeen. Kaikki reagenssit sekoitettiin hyvin ennen pipetointia. Koska T4 DNA-polymeraasin tuli olla jäässä, se pipetoitiin viimeisenä reaktioseokseen. (T4 DNA Polymerase 2016.)

Reaktioseosta pipetoitiin 5,2 µL digestoituun insertti- ja plasmidituotteeseen. Reaktioseokseen ei lisätty vettä, koska plasmidi ja insertti olivat kummatkin eluoitu veteen, joten tarvittava vesimäärä oli jo näytteissä. Reaktio vaatii 1 µg vahvuista DNA:ta ja käytetyissä näytteissä oli 0,65 µg vahvuista DNA:ta, joten vettä ei haluttu lisätä enempää laimentamaan DNA:ta entisestään. Myöhemmin käytettiin myös näytteitä korkeammalla konsentraatiolla. Näytteet olivat tilavuudeltaan 20 µL, joten vettä ei tarvinnut tilavuuden puolesta myöskään lisätä. Kun reaktioseokset olivat valmiit, niiden annettiin inkuboitua huoneenlämmössä viisi minuuttia. Reaktio lopetettiin inkuboimalla näytteitä 10 minuuttia 75 °C:n lämpötilassa. (T4 DNA Polymerase 2016.)

9.3.3 Ligaatio

Digestion jälkeen plasmidit ja insertit voitiin liittää toisiinsa ligaation avulla käyttäen liigaasientsyymiä. Ligaasientsyyminä toimi T4 DNA-ligaasi ja se valittiin, koska se pystyy liittämään yhteen sekä kohessiivisesti että tylpästi pilkottuja DNA-fragmenteja. Taulukossa 13 on eritelty ligaatioon tarvittavat välineet.

Taulukko 13. Ligaatioon tarvittavat välineet.

Välineet	
Pipetit 0,2–5 µL, 5–40 µL ja 40–200 µL	Steriili vesi
Pipetinkärjet 10µL, 100µL, 200µL	Ligase Reaction Buffer (5X)
Lämpökaappi 14 °C	T4 DNA Ligase Enzyme 1U/µL
Kylmäblokki	Insertti-DNA (ihmisperäinen)
Eppendorf-putkia	Plasmidi-DNA (bakteeriperäinen)
Putkiteline	Sentrifugi Eppendorf-putkille
Laskin	Vortex
Laskuri: fmol	Suojaliina

Ligaatiossa oli eri ohjeet reaktion onnistumiselle riippuen siitä, oliko kyseessä kohessiivisesti vai tylpästi leikatut DNA-fragmentit. Ligaatio tehtiin useampaan kertaan sekä kohessiivisesti leikatuille, että tylpästi leikatuille DNA-fragmenteille. Inserttien ja vektorien optimaalinen suhde ohjeen mukaan oli 3:1, eli inserttiä käytettiin kolminkertainen määrä plasmideihin verrattuna, joka optimoi plasmidien ja inserttien liittymistä toisiinsa muodostaen rengasmaisen DNA-rakenteen. Lisäksi ohjeessa ehdotettiin laimentamaan ligaatioseos viisinkertaisena ja lopputilavuuden olevan vähintään 100 µL parhaan transformaatiotehokkuuden saamiseksi. (T4 DNA Ligase.) Taulukossa 14 on molempien reaktioiden protokollat.

Taulukko 14. Ligaation protokolla (T4 DNA Ligase).

DNA:n päät	Kohessiivinen	Tylppä
Ligase reaction buffer	4 μ L	4 μ L
Insertti:vektori suhde	3:1	3:1
Vektorien päät	3–30 fmol	15–60 fmol
Inserttien päät	9–90 fmol	45–180 fmol
Kokonais-DNA	0,01–0,1 μ g	0,1–1 μ g
T4 DNA Ligase	0.1 U	1 U
Steriili vesi	20 μ L	20 μ L
Lämpötila	23–26 °C	14 °C
Inkubaatioaika	1 h	16–24 h

Ligaatioseoksen tilavuudeksi muodostui lopulta melko suuri määrä, koska kokonais-DNA-pitoisuus sai olla hyvin pieni kohessiivisesti katkaistuilla päillä, 0,01–0,1 μ g ja DNA-pitoisuus vaihteli testauksen aikana 0,65–1,05 μ g/ μ L välillä. Tähän korkeintaan 0,1 μ g pitoisuuteen piti mahtua 3:1 suhteessa insertit ja plasmidit. Tylpästi katkaistuilla DNA-fragmenteilla pitoisuus sai olla 1 μ g.

Ensimmäisillä testauskerroilla kokonais-DNA-pitoisuus aiheutti hämmennystä, jolloin osa ligaatioista tehtiin liian suurilla DNA-pitoisuuksilla. Oikea kokonais-DNA-pitoisuus saatiin käytettäessä 1,05 μ g/ μ L vahvuisia plasmideja ja inserttejä. Tätä lähdettiin laskemaan sen perusteella, että pienin mahdollinen pipetoitava määrä oli 0,2 μ L ja insertti-vektori -suhde tuli olla 3:1. Molempien pitoisuus oli 1,05 μ g. Vektoria pipetoitiin 0,2 μ L, jolloin inserttiä pipetoitava määrän tuli olla 0,6 μ L. Jotta päästiin kohessiivisten DNA-fragmenttien 0,1 μ g kokonais-DNA-pitoisuuteen, päätettiin seos tehdä kahdeksankertaisena. Tämä tarkistettiin CV-kaavalla kertoen kaikkien annettujen komponenttien määrä kahdeksalla, paitsi inserttien ja plasmidien. Kaavassa C_1 on alkuperäinen konsentraatio, C_2 lopullinen konsentraatio, V_1 alkuperäinen tilavuus ja V_2 lopullinen tilavuus. Tuntemattomana arvona toimi C_2 . Tilavuutena käytettiin lopullista tilavuutta, kun kaikki komponentit olivat lisättyinä reaktioseokseen. Kuviossa 3 selitettynä kaavan käyttö. (How to Calculate Dilution 2022.) DNA:ta ei haluttu laimentaa yhtään enempää kuin oli tarpeen, koska se kulutti etenkin puskuria.

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

$$C_2 = \frac{C_1 \times V_1}{V_2} \quad \rightarrow \quad C_2 = \frac{1,05 \mu\text{g} \times 20 \mu\text{L}}{193,6 \mu\text{L}} = 0,108 \mu\text{g DNA:ta}$$

Kuvio 3. CV-kaava (How to Calculate Dilution 2022).

Lisäksi tuli laskea DNA-fragmenttien päiden määrä, joiden määrä saatiin NEBioCalculator-laskurilla. Tähän tarvittiin insertti-DNA:n ja plasmidi-DNA:n koko sekä pitoisuus. Määrien ei tarvinnut olla täsmällisiä, koska DNA:n päiden fmol-pitoisuus tuli olla tietyllä välillä. Kun kokonais-DNA-pitoisuus oli 0,108 µg, inserttien ja vektorien suhde ottaen huomioon, oli plasmidien pitoisuus 0,027 µg ja inserttien pitoisuus 0,081 µg. Tällöin laskurilla DNA-fragmenttien päiden tulokseksi saadaan plasmidien osalta 29,13 fmol. Inserttien osalta tätä oli vaikeampi arvioida koon puolesta, mutta mikäli koko oli 500 bp, tulokseksi saatiin 524,3 fmol. (dsDNA: Mass to/from Moles Converter 2021.) Nämä pitoisuudet mahtuivat DNA:n päiden moolirajoihin myös inserttien osalta, mikäli myös mooliraja kasvoi kahdeksankertaiseksi. Taulukossa 15 lopullinen ligaation reaktioseos.

Taulukko 15. Ligaation reaktioseos (T4 DNA Ligase).

Komponentti	Määrä
Ligase Reaction Buffer (5X)	32 µL
Plasmidi-DNA (bakteeriperäinen)	0,2 µL
Insertti-DNA (ihmisperäinen)	0,6 µL
T4 DNA Ligase (1U/µL)	0,8 µL
Steriili vesi	160 µL
Kokonaismäärä	193,6 µL

Samalla tavalla voitiin laskea myös tylpästi pilkottujen näytteiden määrä, kokonais-DNA-pitoisuuden saadessa olla 0,1–1 µg, jolloin riitti pienempi laimentaminen. Pipetoitaessa 0,2 µL plasmidi-DNA:ta ja 0,6 µL insertti-DNA:ta, riitti se jo sellaisenaan ilman laimentamista kokonais-DNA:n osalta, mutta insertti-DNA:n päiden fmol-pitoisuus jäisi liian suureksi. Siksi samassa suhteessa tehty reaktioseos sopi myös tylpästi leikatuille DNA-fragmenteille, jota kohessiivisesti leikatuille päille käytettiin.

Ennen reaktioseoksen valmistamista puskurit ottaa huoneenlämpöön, jotta se sulii kunnolla ja tämän jälkeen sekoittaa hyvin Vortex-laitteessa. Muutkin komponentit sekoitettiin. Ligaasientsyymi ja DNA pidettiin kylmäblokillä. Kun reaktioseos oli valmis, se sekoitettiin hellävaraisesti pipetoimalla edestakaisin muutaman kerran ja sentrifugoitiin nopeasti, jotta kaikki komponentit painuivat putken pohjalle. Kohessiivisesti leikatuille päälle riitti tunnin inkubaatio huoneenlämmössä (23–26 °C), kun taas tylopästä leikatut päät vaativat 14 °C:n lämpötilaa ja 16–24 tunnin inkubaatioajan. Lämpötila toteutettiin lämpökaapilla, johon pystyi asettamaan 14 °C:n lämpötila. (T4 DNA Ligase.) Tämä ei kuitenkaan ole mahdollista, jos lämpökaappia tarvitaan bakteeriviljelyyn samaan aikaan. Kun inkubaatioaika oli kulunut, olivat ligaatiotuotteet valmiit transformaatioon.

9.3.4 Lämpöshokki

Lämpöshokki soveltui parhaiten koululla käytettäväksi transformaatiomenetelmäksi, koska tarvittavat välineet löytyivät jo koululta, pois lukien S.O.C.-ravintoliuos. Lämpöshokin vaikutuksesta ligaatiotuotteena saadut plasmidi-insertti-kompleksit saadaan isäntäbakteerin sisälle. Menetelmässä esivalmistellut bakteerit ja DNA asetetaan jäihin sopivassa putkessa. Putki siirretään 42°C:seen vesikylpyyn muutamaksi kymmeneksi sekunniksi. Putkeen lisätään S.O.C.-ravintoliuosta ja putki asetetaan lämpökaappiin 37°C:seen. Bakteerit jakautuvat itsenäisesti liuoksessa ja DNA-insertti kloonautuu samalla. (Froger & Hall 2007.)

Kloonauksessa voidaan käyttää monenlaisia ravintoliuoksia, jotta transformaatio tehostuu, mutta S.O.C.-ravintoliuos on optimaalinen valinta transformaatioon ja se on testattu *E.coli* -bakteereilla (S.O.C. Medium). Lämpöshokin käyttöön löytyi useita ohjeita ja ohjeet erosivat toisistaan pienin yksityiskohdin, mutta näitä kaikkia eri vaihtoehtoja kokeiltiin. Transformaatioon tarvittavat välineet ovat lueteltuna taulukossa 16.

Taulukko 16. Transformaatioon tarvittavat välineet.

Välineet	
Pipetit 0,5-5 μ L, 40-200 μ L ja 100-1000 μ L	Plasmidi-insertti-kompleksit (ligaatiotuote)
Pipetinkärjet 10 μ L, 100 μ L ja 1000 μ L	<i>E. coli</i> -kanta 8793 (isäntäbakteeri)
Kylmäblokki	S.O.C. Medium
Vesihaude 42 °C	Esilämmitetty viljelymalja (37 °C)
Lämpökaappi 37 °C	Viljelysauva
Putkisekoittaja	Trimetopriimi
Eppendorf-putkia ja putkiteline	Steriili vesi
Suojaliina	Ajastin

Ensimmäisenä isäntäsolut laitettiin kylmäblokille sulamaan niin, että ne voitiin pipetoida transformaatioreaktiota varten. Menetelmän testauksessa ei ollut käytössä kaupallisia kompetentteja soluja, jotka ovat säilöttynä nestemäisessä muodossa. Testauksessa käytettiin sekä suoraan maljalta steriiliin veteen siirrostettuja bakteerisoluja, että S.O.C.-ravintoliuokseen säilöttyjä ja pakastettuja bakteerisoluja. Pesäkkeitä siirrostettiin 50 μ L nestemäärään steriiliin Eppendorf-putkeen muutamia pesäkkeitä (5–7) niin, että neste oli selkeästi sameaa. Isäntäbakteereina toimi koululla olevasta kannasta kasvatettu *E. coli* -bakteeri (ATCC 8793) joka ei ollut resistentti trimetopriimille. Myös ligaatiotuote laitettiin kylmäblokille viilenemään. Ligaatiotuotetta lisättävä määrä kompetentteihin soluihin vaihteli jonkin verran. Yhdessä ohjeessa pitoisuuden tuli olla 1 pg–100 ng (Traditional Cloning Quick Guide 2022), toisessa ohjeistettiin lisäämään noin 5 ng (2 μ L) (Transformation Protocol 2022). Tähän vaikutti ligaatiotuotteen pitoisuus, mutta testauksessa käytettiin transformaatioprotokollassa ohjeistettua 2 μ L määrää.

Isäntäsolut ja ligaatiotuote sekoitettiin varovasti pipetoimalla muutaman kerran edestakaisin. Vortex-sekoittajaa ei saanut käyttää. Seosta pidettiin kylmäblokilla 30 minuuttia. Seosta ei saa sekoittaa tässä vaiheessa. Kylmäblokilta putki siirrettiin suoraan 42 °C:n vesihauteeseen. Lämpöshokin kesto oli 30 sekuntia, jonka jälkeen seosta ei vielä sekoitettu. Lämpöshokin jälkeen seokseen lisättiin 950 μ L huoneenlämpöistä S.O.C.-ravintoliuosta ja putki siirrettiin lämpökaappiin 37 °C:seen 60 minuutiksi teipattuna langattomaan putkensekoittajaan, jotta se sekoittuu koko inkubaation ajan. Ohjeen vaihtoehtoina olivat voimakas sekoitus (250 rpm) tai kääntely. (Transformation Protocol 2022.)

Toinen ohje erosi hieman tästä protokollasta. Toisessa ohjeessa lämpöshokin jälkeen seos laitettiin 5 minuutiksi jäihin, ja vasta sen jälkeen lisättiin S.O.C.-ravintoliuos. Myös tätä kokeiltiin testauskerroilla. Lisäksi inkubaatioon ei annettu vaihtoehtoa putken kääntelylle, vaan putken tuli olla jatkuvassa tärinässä, kuten tasoravistelijalla. Tähän ei kuitenkaan ollut mahdollisuutta. (Traditional Cloning Quick Guide 2022.)

Inkubaation jälkeen transformaatioseosta lisättiin 37 °C:ssa esilämmitetyille viljelymaljoille 50 µL, josta se viljelysauvan avulla hajotettiin koko maljalle. Tähän paras valinta olisi ollut joko lampaanverimalja tai suklaamalja, mutta testausta tehdessä näitä maljoja ei ollut käytettävissä, joten viljely tehtiin CLED-maljalle, jossa tiedettiin *E. coli*n kasvavan hyvin muodostaen keltaisia pesäkkeitä (Cysteine Lactose Electrolyte Deficient (CLED) agar 2019). Viljelymaljalle lisättiin trimetopriimi-kiekkko ja malja siirrettiin lämpökaappiin 37 °C:seen yön yli kasvamaan. Seuraavana päivänä nähtiin, oliko transformaatio onnistunut.

9.3.5 Tulokset

Digestio, defosforylaatio, tylpistäminen, ligaatio ja transformaatio tehtiin useaan kertaan syyskuussa 2022. Jokaisen kokeilun jälkeen toimintaa pyrittiin parantamaan ja virheitä korjaamaan. Pitkien inkubaatioaikojen takia eri versioita ohjeista tehtiin samanaikaisesti. Tällä pyrittiin selvittämään mitkä kaikki vaiheet olivat tarpeellisia ja miten saadaan aikaan paras kloonauksetulos.

Ensimmäisen viikon aikana eri menetelmäohjeita sovitettiin yhteen. Ensimmäiseksi kokeiltiin, toimiiko menetelmä paremmin kohessiivisesti vai tylpästi leikatuilla DNA-fragmenteilla. Samalla tehtiin myös kolmas näyte, johon ei liitetty inserttiä. Tämä olisi toiminnut kontrollinäytteenä, koska plasmidien päät olivat defosforyloitu, eivätkä ne pysty ilman inserttiä menemään takaisin rengasmaiseen muotoon. Plasmidi toimiakseen vaatii rengasmaisen muodon. Ongelmaksi koitui näytteiden kohdalla kuitenkin kasvatusmaljan valinta. Saatavilla ei ollut lampaanveri- tai suklaamaljoja, joten havainnointiin käytettiin herkkyysmaljaa (MHA). Isäntäbakteerit eivät pystyneet kasvamaan kunnolla herkkyysmaljalla, eli malja oli epäsopiva kyseiseen tarkoitukseen.

Toisen viikon aikana menetelmäohjetta kokeiltiin näytteillä 1–9. Ensimmäisenä piti ratkaista havainnoinnissa tullut ongelma. Haluttiin varmistaa, että ongelma oli varmasti väärässä kasvatusmaljassa. Näytteen 1 isäntäsolut olivat S.O.C.-ravintoliuokseen tehdystä suspensiosta, jossa oli korkea konsentraatio ja näytteen 2 isäntäsolut olivat suo-

raan kasvatusmaljalta siirrostettuja. Huolimattomuuden takia havainnointiin valittiin selektiivinen lampaanverimalja (LVS). LVS on tarkoitettu streptokokkien selektiiviseen havaitsemiseen, minkä takia *E. coli* ei kasvanut maljalla (Tuotteet 2022).

Näytteille 3–9 käytettiin CLED-maljoja ja isäntäbakteerit kasvoivat niillä hyvin. Näytteessä 3 käytettiin pakastettuja plasmidi-insertti-komplekseja ja vastaanottajasoluina pakastettuja suspensiosoluja. Näytteessä 4 käytettiin pakastettuja plasmidi-insertti-komplekseja ja vastaanottajasoluina käytettiin maljalta siirrostettuja soluja. Näillä näytteillä haluttiin testata, säilyikö ligaation jälkeen pakastetut plasmidi-insertti-kompleksit toimivina. Ligaatiotuotteet olivat olleet pakkasessa kaksi viikkoa. DNA:n pitoisuus ja puhtaus säilyy lähes muuttumattomana -18 °C:n lämpötilassa pitkiäkin aikoja, vaikka sen sulattaisi ja pakastaisi useaan kertaan (Safarikova ym. 2021).

Näytteessä 5 käytettiin saman päivän aikana kohessiivisesti ligatoituja plasmidi-insertti-komplekseja. Näytteessä 6 käytettiin saman päivän aikana tylopästi ligatoituja plasmidi-insertti-komplekseja. Näytteillä 5 ja 6 kokeiltiin, kumpi liittämistapa on tehokkaampi, vai onko tulos sama. Näyte 5 toimi samalla verrokkina näytteille 3 ja 4. Näytteelle 7 tehtiin transformaatioreaktio, mutta siihen ei liitetty plasmidi-insertti-kompleksia, joten se toimi nollakontrollina. Näytteissä 3–6 oli kaikissa havaittavissa muutamia pesäkkeitä antibiootin vaikutusalueella. Tulos oli kuitenkin niin epäselvä, ettei tulosta voitu luonnehtia onnistuneeksi. Näyte 7 ei kasvanut ollenkaan antibiootin läsnä ollessa, joten kontrolli oli onnistunut.

Ligaatiossa tapahtunut laskuvirhe korjattiin ja menetelmää kokeiltiin korjatulla ligaatio-ohjeella näytteisiin 8 ja 9. Näytteissä 8 ja 9 käytettiin saman päivän aikana ligatoituja plasmidi-insertti-komplekseja. Näytteen 9 plasmidi-DNA:lle ei tehty defosforylaatiota. Tällä haluttiin tarkistaa, ettei defosforylaatio häirinnyt ligaation tehoa tai ettei jokin vaihe ollut epäonnistunut, kuten alkalisen fosfataasin määrän laskeminen laskuria apuna käyttäen. Näytteet 8 ja 9 kasvoivat yhtä heikosti kuin näytteet 3, 4, 5 ja 6 antibiootin läsnä ollessa. Taulukossa 17 nähdään koottuna näytteiden 1–9 merkitys ja havainnointi.

Taulukko 17. Näytteiden havainnointi.

Nro	Näyte	Malja	Tulos
1	ligaatiotuote (K) + bakteerisuspensio (P)	LVS	ei kasvua (väärä malja)
2	ligaatiotuote (K) + bakteerit maljalta	LVS	ei kasvua (väärä malja)
3	ligaatiotuote (K/P) + bakteerisuspensio (P)	CLED	hyvin vähäistä kasvua
4	ligaatiotuote (K/P) + bakteerit maljalta	CLED	hyvin vähäistä kasvua
5	ligaatiotuote (K) + bakteerit maljalta	CLED	hyvin vähäistä kasvua
6	ligaatiotuote (T) + bakteerisuspensio (P)	CLED	hyvin vähäistä kasvua
7	nollakontrolli (pelkkä isäntäbakteeri)	CLED	ei kasvua AB-alueella
8	ligaatiotuote (K) + bakteerisuspensio (P)	CLED	hyvin vähäistä kasvua
9	kuin nro 8, mutta ei defosforyloitu	CLED	hyvin vähäistä kasvua

Taulukosta nähdään, ettei yksikään näyte kasvanut antibiootin vaikutusalueella kuin vain hyvin vähän. Taulukossa käytetyt lyhenteet ovat pakastettu (P), kohessiiviset DNA-fragmenttien päät (K) ja tylpät DNA-fragmenttien päät (T).

10 Opinnäytetyön tuotos

Alkuperäisenä tavoitteena opinnäytetyön tuotokselle oli raportti, työohje, laboraatiotuntin suunnitelma sekä PowerPoint-esitys. Koska menetelmä ei onnistunut toivotulla tavalla, työohjetta ja laboraatiotuntia ei toteutettu käytännössä, mutta raportissa on käsitelty teoriassa, millainen on hyvä laboraatiotunti ja työohje. Raportti sisältää opinnäytetyöprosessin ja geenikloonausmenetelmän testauksen tarkan kuvaamisen lisäksi tulosten tarkastelun ja kehittämisehdotukset jatkotutkimuksia varten. Raportissa on myös tietoperustaa molekyyli-genetiikasta ja kloonauksesta. Opinnäytetyön tietoperustan pohjalta luotiin PowerPoint-esitys, joka esitettiin molekyyli-genetiikan opintojakson opiskelijoille kloonausta käsittelevällä luennolla ja esitys on myös jaettu opintojakson Moodle-työtilaan.

Vaikka laboraatiotuntia ei käytännössä toteutettu, haluttiin kuitenkin luonnostella suunnata antava ja muunneltavissa oleva geenikloonauksesta käsittelevän laboraatiotunnin runko ja eteneminen. Lisäksi käytettyjen reagenssien käyttöohjeista koottiin yhteistyökumppanin toiveesta englanninkielinen protokolla kevään 2023 vaihto-opiskelijoille,

jotka voivat hyödyntää koostetta menetelmän jatkokehittämissä. Taulukossa 18 on suunniteltu geenikloonausta käsittelevän laboraatiotunnin runko.

Taulukko 18. Laboraatiotunnin runko.

Aika	Työvaihe	Toiminta
8.45–9.00	Aiheeseen alustus	Kerrataan menetelmäperiaatteet ja käydään läpi mahdolliset epäselvät asiat.
9.00–9.30	Perimäainesten valitseminen	Valitaan eristetystä humaanidna:sta ja plasmididna:sta mahdollisimman korkeakonsentraatioiset ja lähellä toisiaan olevat pitoisuudet. Tehdään tarvittavat laskutoimitukset digestiota varten.
9.30–10.45	Digestio plasmidille ja insertille	Tehdään reaktioseokset ohjeen mukaan plasmidille sekä insertille ja inkuboidaan 1 h 37 °C:ssa . Tehdään tarvittavat laskutoimitukset defosforylaatiota varten.
10.45–11.15	Restriktioentsyymien inaktivointi	Inaktivoidaan vain insertidna-näytteen restriktioentsyymi 20 min 65 °C:ssa .
10.45–11.45	Defosforylaatio plasmidille	Lisätään plasmididna-näytteeseen alkalinen fosfataasi, inkuboidaan 30 min 37 °C:ssa . Lopuksi inaktivoidaan plasmididna-näytteen restriktioentsyymi ja alkalinen fosfataasi 15 min 65 °C:ssa .
11.45–12.00	Ligaatio	Tehdään reaktioseos käyttäen kohessiivisesti leikattujen dna-fragmenttien protokollaa. Inkuboidaan 1 h 23–26 °C:ssa .
12.00–13.00	Lounas	Inkubaation aikana muodostuu plasmidinsertikompleksit.
13.00–15.00	Transformaatio	Tehdään transformatioseos plasmidinsertikomplekseista ja kompetenteista soluista. Inkuboidaan 30 min jäissä . Suoritetaan seokselle lämpöshokki 30 sec 42 °C:ssa . Lisätään ravintoliuos ja inkuboidaan 1 h 37 °C:ssa sekoittaen.
15.00–15.30	Viljely	Siirrostetaan seosta sopivalle viljelymaljalle, lisätään sopiva antibiootti ja inkuboidaan yön yli 37 °C:ssa . Tulokset ovat havaittavissa seuraavana päivänä.
15.30–16.00	Yhteenveto	Käydään läpi tulosten havainnointi ja mahdolliset kysymykset.

Laboraatiotunnin runko suunniteltiin yhdelle päivälle sen perusteella, että keväällä 2023 molekyyli-genetiikan opintojaksolla se on mahdollista toteuttaa niin. Mikäli jatkossa labo-

raatiotunnit jakautuvat aamu- ja iltapäivätunteihin, voidaan menetelmä suorittaa kahdessa osassa niin, että ligaatiossa muodostuneet plasmidi-insertti-kompleksit pakastetaan ja jatketaan seuraavana päivänä suoraan transformaatiosta.

11 Pohdinta

Opinnäytetyön tarkoitus oli pystyttää geenikloonausmenetelmä, laatia siihen työohje ja suunnitella laboraatiotunti Metropolia Ammattikorkeakoulun bioanalyttikko-opiskelijoille molekyyli-genetiikan opintojaksolle. Aihe oli laaja ja haastava, kun lähdettiin perustamaan kokonaan uutta menetelmää Metropolia Ammattikorkeakoululle. Menetelmä toivottiin toteutettavan jo valmiiksi Metropolian Ammattikorkeakoululta löytyvillä välineillä, komponenteilla ja reagensseilla. Menetelmä pyrittiin toteuttamaan mahdollisimman kustannustehokkaasti, mikä lisäsi haasteita. Työohjeen ja laboraatiotunnin toteutuminen vaati sitä, että valittu menetelmä toimii. Geenikloonauksen menetelmäohjeita kokonaisuudessaan ei juurikaan löytynyt, jolloin menetelmä koottiin pienemmistä palasista ja soviteltiin yhteen. Pääasiassa menetelmä koottiin tieteellisten artikkelien ja valittujen entsyymien käyttöohjeiden perusteella. Tähän meni runsaasti aikaa, eikä muita menetelmiä ehditty testata aikaresurssien vuoksi. Tulokset eivät kuitenkaan ole merkityksellisiä, koska opinnäytetyötä ja kehittämisehdotuksia voidaan soveltaa jatkotutkimuksissa.

Opinnäytetyön kehittämiskysymykseen, voidaanko molekyyli-genetiikan opintojaksolla toteuttaa kloonausta käsittelevä laboraatiotunti, saatiin alustava vastaus. Laboraatiotunti on mahdollista toteuttaa, mikäli kehittämisehdotusten pohjalta menetelmä saadaan toimivaksi. Laboraatiotunti tulisi kestämään yhteensä noin 7–8 tuntia pitkien inkubaatioaikojen vuoksi, jonka jälkeen tulosten tarkastelu tapahtuu yön yli inkuboinnin jälkeen. Ensimmäisenä vaihtoehtona on koko päivän kestävä laboraatiotunti, jolloin koko työ saadaan tehtyä yhdessä päivässä, ja seuraavalle päivälle jäisi vain tulosten tarkistaminen. Mikäli laboraatiotuntia ei saada järjestettyä yhtenä päivänä, voitaisiin se jakaa kahdelle eri päivälle siten, että ensimmäinen päivä päättyisi ligaation jälkeen, jolloin ligaatiotuote pakastettaisiin ja käytettäisiin toisena päivänä transformaatioon. Kolmantena päivänä tulokset tarkistettaisiin, ja sen tulisi olla heti seuraava päivä, ettei maljat ehdi kasvamaan liian kauan.

11.1 Tulosten tarkastelu

Millään testauskerralla ei päästy tyydyttävään tulokseen kloonauksen onnistumisessa. Osassa viljelymaljoista näytti olevan yksittäisiä pesäkkeitä antibiootin vaikutusalueella, mutta kasvua ei voitu luotettavasti todentaa.

Kloonauksen onnistumisen havainnoimiseksi oli vektorina käytettävässä plasmidissa oltava antibioottiresistenssigeeni. Näyttemateriaalina käytetty trimetopriimille resistentti *E. coli* oli kannoista ainoa jollekin antibiootille resistentti bakteeri. Kanta oli saatu potilasnäytteestä, joten bakteerista ei ollut sen tarkempaa tietoa. Kyseiselle bakteerille tehtiin antibioottilherkkyyssmääritys, jossa todettiin sen olevan resistentti trimetopriimille. Resistenssigeenin oletettiin olevan plasmidissa, koska kliinisesti tärkein trimetopriimiresistenssiä aiheuttava mekanismi on plasmidivälitteinen dihydrofolaattireduktaasi-entsyymi. Näin ei välttämättä ollut, sillä trimetopriimiresistenssi voi olla joko plasmidi- tai kromosomivälitteistä. (Wróbel & Arciszewska & Maliszewski & Drozdowska 2019.) Näin ollen on mahdollista, että käytetyssä bakteerissa resistenssigeeni oli kromosomeissa, jolloin kloonauksen onnistumista ei pystytty havaitsemaan käytetyllä menetelmällä.

Transformaatio-ohjeiden mukaan inkubaatio tuli toteuttaa jatkuvasti käänneillen tai ravistellen 250 rpm tehokkuudella. Käytössä oli langaton putkensekoittaja, joka käänteli putkia melko hitaasti. Kääntelyn tai ravistelun vaikutus on transformaatiotehokkuuden kaksinkertaistaminen, eli sen poisjättämisen ei pitäisi kuitenkaan estää transformatiota tapahtumasta. Myös ligaatiotuotteen puhdistaminen esimerkiksi silikapylväs-menetelmällä ja sen jälkeen DNA:n uudelleen eluoiminen veteen kaksinkertaistaisi transformaatiotehokkuuden, mutta transformatio onnistuu kuitenkin puhdistamattomalla ligaatiotuotteella 10 µL asti. Ravintoliuokseksi valittiin S.O.C., vaikka muitakin ravintoliuoksia on mahdollista käyttää, kuten LB-ravintoliuosta. S.O.C. -ravintoliuoksen käyttö kaksinkertaistaa transformaatiotehokkuuden. Myös lämpöshokin kesto vaihteli eri ohjeissa. Sekuntimäärään ja lämpötilaan vaikuttaa käytetty astia ja näytemäärä. (Chemical Transformation Tips 2022.) Lämpöshokin keston vaikuttaa tämän lisäksi myös käytetty bakteeri (Bacterial Transformation Workflow—4 Main Steps). Kaupallisissa kompetenteissa soluissa tulee mukana tarkat transformaatio-ohjeet kyseisille bakteereille.

Havainnoinnissa käytettävät maljat olivat pääasiassa CLED-maljoja, koska testausketkellä koululla ei ollut tarkoitukseen paremmin sopivia lampaanverimaljoja tai suklaamaljoja. *E. coli* saa CLED-maljan agarin sinertävän värin muuttumaan keltaiseksi (Cysteine Lactose Electrolyte Deficient (CLED) agar 2019). *E. coli* kasvaa hyvin CLED-maljalla,

mutta pesäkkeet ovat keltaisia. Tämä on ongelma, jos kasvu on hyvin vähäistä antibiootin vaikutusalueella, koska S.O.C. -ravintoliuos tekee maljalle siirrostettavasta transformaatiotuotteesta kellertävän värisen. Havainnointi oli vaikeaa epäselvissä tilanteissa, joissa näytti siltä, että pientä kasvua olisi. Lampaanveri- ja suklaamaljoilla pesäkkeet ovat valkoisia tai harmahtavia punaista tai ruskeaa maljaa vasten, jolloin tällaista ongelmaa ei olisi epäselvissä tilanteissa. Kloonaus on voinut onnistua käytetyllä menetelmällä, mutta huonolla transformaatiotehokkuudella. Maljavalinnan takia menetelmää ei voida todeta kuitenkaan onnistuneeksi tulosten epäselvyyden ja tulkinnanvaraisuuden vuoksi.

On mahdollista, että isäntäbakteereina käytetyt *E. coli* -bakteerit eivät sopineet transformointiin sellaisenaan. Kompetentteja, kemiallisesti käsiteltyjä soluja on kaupallisina, mutta niitä voidaan tehdä myös itse. Menetelmässä solut käsitellään kalsiumkloridilla plasmidin siirtymisen helpottamiseksi. Kompetenttien solujen tekeminen on kuitenkin haastavaa toteuttaa koululla, koska se vaatii spesifit olosuhteet. Bakteerien tulee pysyä prosessin aikana useassa vaiheessa kylminä, jolloin työvaiheet täytyy pystyä tekemään kylmässä. Tämän toteutumiseksi tarvittaisiin esimerkiksi kylmäsentrifugi. Lisäksi tarvitaan pitkiä inkubaatioaikoja 37 °C:n lämpötilassa jatkuvassa 200 rpm sekoi- tuksessa. Tähän ei ole koululla valmiiksi välineistöä. Kompetentit solut säilytetään syväjäätössä -80 °C:n lämpötilassa, kuten muutkin bakteerikannat. (Chang & Chau & Landas & Pang 2017.) Parhaimman tuloksen mahdollistamiseksi olisi hyvä käyttää kaupallisia kompetentteja soluja niiden laadun takaamiseksi sekä siitä syystä, että solujen mukana tulee spesifit ohjeet transformointiin onnistumisen varmistamiseksi.

Huolimattomuusvirheitä tapahtui testauksen aikana varsinkin ensimmäisillä kerroilla. Yhden geenikloonauksen suorittaminen kasvatusvaiheeseen kesti yleensä seitsemästä kahdeksaan tuntia, ja se koostui monesta pienemmästä osasta. Eri ohjeita oli melko paljon ja ne olivat englanninkielisiä, joka saattoi alussa vaikuttaa väärinkäsityksiin. Laskuvirheitä tapahtui eri vaiheissa, kuten testauksen alussa ligaatiovaiheessa liiallisen perimäaineksen lisäämisen suhteen. Virheistä opittiin, että ohjeita tuli tarkastaa joka kerta, ettei ollut jäänyt huomaamatta jotakin. Ohjeissa oli usein pieniä huomautuksia, mihin ei aluksi kiinnittänyt huomiota. Tällainen löytyi ligaasientsyymin käyttöohjeen alusta, jossa huomautettiin ligaasientsyymin olevan epävakaa pidempään jäissä säilytettynä, joten se suositellaan ottamaan pakkasesta käyttöön juuri ennen käyttöä ja säilyttää jäällä vain noin 5–10 minuuttia ja palauttaa heti takaisin pakkaseen (T4 DNA Ligase). Tähän aina pyritään ja työskennellessä entsyymit pidetään pakastetulla kylmäblokillä, mutta 5–10 minuuttia ylittyi varmasti joillain testikerroilla ligaasientsyymin kohdalla.

Agaroosigeelelektroforeesista ei saatu toivottua hyötyä, koska molekyylipainomarkke-
rin koko oli liian pieni. Kuitenkin elektroforeesia olisi voinut kokeilla ligaation lisäksi di-
gestion onnistumisen varmistamiseksi. Mikäli digestio olisi onnistunut, geelillä näkyisi
useampi erikokoinen juoste, josta nähtäisiin heti, onko pilkkoutuminen onnistunut. Tä-
hän ei kuitenkaan päädytty, koska oli todennäköistä, että lyhyet juosteet olisivat kulke-
neet geelin yli sinä aikana, kun odotettiin suurten juosteiden kulkeutumista. Pienet juos-
teet kulkevat geelillä nopeammin kuin suuret. Geeli oli hyvin laimeaa, jotta suuret juos-
teet pääsevät kulkemaan siinä ja lyhyet juosteet pääsevät laimean geelin läpi nopeasti.

11.2 Luotettavuus

Opinnäytetyö tulee suunnitella, toteuttaa ja raportoida hyvän tieteellisen käytännön mu-
kaan. Hyvässä tieteellisessä käytännössä noudatetaan eettisesti kestäviä tiedonhan-
kintamenetelmiä ja tutkimusmenetelmiä sekä toimitaan rehellisesti, tarkasti ja huolelli-
sesti. (Vilkkä 2021: Luku 2. Tutkimukselle asetetut vaatimukset.)

Tiedonhankinta perustuu tieteelliseen kirjallisuuteen, riittäviin ja toistettaviin laboratorio-
kokeisiin, havaintoihin ja oman tutkimuksen kriittiseen analysointiin. Tiedonhankin-
nassa kunnioitetaan muiden tutkijoiden työtä ja saavutuksia merkitsemällä lähdeviitteet
tekstiin ja esittämällä heidän tutkimustuloksensa totuudenmukaisesti ja vilpittömästi.
Hyvän tieteellisen käytännön mukaan tutkimuksen tulee täyttää tieteelliselle tutkimuk-
selle määrätyt vaatimukset. Tutkimuksen on tuotettava uutta tietoa tai hyödynnettävä
aikaisempaa tietoa uudella tavalla. (Vilkkä 2021: Luku 2. Tutkimukselle asetetut vaati-
mukset.) Tutkimuksen tulosten julkaisemisessa tulee noudattaa avoimuutta ja vastuulli-
suutta esiteltäessä tutkimuksessa käytettyjä tiedonhankinta- ja arviointimenetelmiä
(Hyvä tieteellinen käytäntö 2021).

Kloonauksen protokollassa ja tarvikkeiden tilaamisessa tulee olla tarkka lähteistä ja ti-
lauspaikasta, jotta ohjeet ja tuotteet ovat luotettavia ja hyväksi todettuja ja testattuja.
Tästä syystä käytettiin ennestään tuttua ja molekyyliogenetiikan opintojaksolla muuten-
kin käytettyä Thermo Fisher Scientifica, joka toimittaa runsaasti laboratoriotuotteita ja -
laitteita. Tuotteiden valinnat perustuivat tieteelliseen kirjallisuuteen. Lähteet valittiin kriit-
tisesti. Koska menetelmässä pyrittiin mahdollisimman korkeaan toistettavuuteen, me-
netelmää testattiin niin monta kertaa, kuin se oli mahdollista aikaresurssien puitteissa.
Prosessin eri vaiheista kirjattiin kaikki data ylös, jotta kuka tahansa pystyy näkemään,
miten lopputulokseen päädyttiin. Työskentely kuvattiin totuuden mukaisesti ja tuloksia
tarkasteltiin mahdollisimman objektiivisesti.

Plagioinnin varalta opinnäytetyösuunnitelman, keskeneräisen raportin ja lopullisen raportin alkuperä tarkistettiin Turnitinissa, plagioinnin havaitsemispalvelussa. Opinnäytetyön suunnitelmavaiheessa tehtiin sopimus Metropolia Ammattikorkeakoulun kanssa. Sopimuksen myötä koulu sai käyttöoikeudet tuotettuun materiaaliin ja myös mahdollisuuden hyödyntää materiaalia haluamallaan tavalla. Hyvän tieteellisen käytännön mukaan sopimuksessa sovitaan kaikkien osapuolien oikeudet, vastuut ja velvollisuudet. Sopimuksessa tulee ilmetä, miten aineistoa säilytetään ja käytetään. (Hyvä tieteellinen käytäntö 2021.)

Näytteitä oli usein useampi käsittelyssä samaan aikaan, jonka lisäksi näytteet olivat usein eri vaiheissa menetelmää, joten niiden kanssa täytyi työskennellä eri tahtiin. Tästä syystä näyteputket olivat aina merkitty joka vaiheessa hyvin tarkasti, jotta näytteet eivät menneet sekaisin.

11.3 Eettisyys

Etiikka käsittelee hyvää ja paha sekä oikeaa ja väärää. Etiikka muodostuu arvoista, ihanteista ja periaatteista. Etiikka auttaa ihmisiä tekemään ja arvioimaan omia valintojaan ja toimintaansa. Etiikka on ajattelun ja pohtimisen väline, joka ei anna valmiita vastauksia. Käsitykset oikeasta ja väärästä vaihtelevat kulttuurien välillä. (Terveydenhuollon yhteinen arvopohja, yhteiset tavoitteet ja periaatteet 2001.)

Valtakunnallinen sosiaali- ja terveysalan eettinen neuvottelukunta (ETENE) on luonut eettiset suositukset sosiaali- ja terveysalalle. Suomen Bioanalytikkoliitto ry on luonut eettiset ohjeet bioanalytiikoille. Tämä opinnäytetyö toteutettiin noudattaen eettisiä suosituksia ja ohjeita. Opinnäytetyön tiedonhaku, toteutus ja raportointi ovat toteutettu hyvää tieteellistä käytäntöä noudattaen.

Eettiset ohjeistukset sosiaali- ja terveysalalla pohjautuvat samoihin arvoihin, vaikka ne paikoittain painottuvat eri alueille eri ohjeistoissa. Sosiaali- ja terveysalan toiminta perustuu ihmisarvon ja ihmisten kunnioittamiseen. Siihen sisältyy ihmisoikeudet, itsemääräämisoikeus ja valinnanvapaus. Ihmisen perusoikeuksien keskeisiä periaatteita ja arvoja ovat yhdenvertaisuus, tasa-arvoisuus, syrjimättömyys ja yksityisyyden suoja. Lähtökohtana sosiaali- ja terveysalan toiminnalle on asiakkaan ja potilaan etu. Jokaisen oikeus on saada tarvitsemaansa hoitoa. Keskeisenä tavoitteena on hyvän tekeminen ja vahingon välttäminen sekä tuottaa luotettavaa ja turvallista hoitoa. Toiminta perustuu tutkittuun tietoon ja ammattitaitoon. Ammattihenkilöstö huolehtivat ja vastaavat palvelu-

jen laadusta. Henkilöstön osaaminen on nykyvaatimusten tasolla ja heillä on mahdollisuus kehittyä työssään. Henkilöstöllä on mahdollisuus kehittää työtään ja siihen liittyviä käytäntöjä. Henkilöstö noudattaa luottamuksellisten tietojen salassapitoa. Sosiaali- ja terveyshuollossa etiikan ja talouden välillä vallitsee jännitteitä. Resurssien tulee olla realistisessa suhteessa toiminnan vaatimuksien kanssa. Eettisyyden tulisi toteutua päätöksenteon kaikilla tasoilla. (Terveydenhuollon yhteinen arvopohja, yhteiset tavoitteet ja periaatteet 2001; Sosiaali- ja terveysalan eettinen perusta 2011.)

Kaikissa bioanalyytikon toiminnan vaiheissa asiakkaan oikeuksien kunnioittaminen ja hyvinvointi ovat ensisijaisena tavoitteena laboratoriotutkimusprosessissa. Bioanalytikko on terveydenhuollon ammattihenkilö ja hänen velvollisuutenaan on ylläpitää ja kehittää omaa osaamistaan sekä omaksua uusia, tutkittuun tietoon perustuvia ja hyväksytyjä menetelmiä ja toimintatapoja. Bioanalytikko perehtyy ja noudattaa ammattitoimintaa koskeviin säädöksiin, standardeihin ja suosituksiin. Laboratoriotutkimuksia varten hankitaan vain tarpeellinen tieto potilaista ja bioanalytikko sitoutuu noudattamaan salassapitovelvollisuutta. Tutkimukset edellyttävät potilaan suostumusta, potilaalla on oikeus kieltäytyä niistä ja potilaan itsemääräämisoikeutta kunnioitetaan. Bioanalytikko vastaa laboratoriotutkimuksen korkeasta laadusta ja laadun jatkuvasta parannuksesta. Bioanalytikko toimii usein moniammatillisessa yhteisössä ja bioanalytikon vastuulla on neuvoa, ohjata ja auttaa muita ammattiryhmiä asiantuntevasti laboratoriotutkimuksiin liittyvissä kysymyksissä ja ongelmissa. (Bioanalytikon, laboratoriohoitajan eettiset ohjeet 2017.)

Kun puhutaan ihmisen kloonamisesta, tulee mieleen paljon eettisiä kysymyksiä. Voiko lapsen ominaisuudet valita jo ennen syntymää? Lapsen hankinta kloonamalla koetaan muun muassa välineellistävänä ja yksilöllisyyden ja ainutkertaisuuden loukkaamisena. Välineellistäminen liittyy siihen, että alkioita kuolee ja heitetään pois ja lisääntymisyri-tyksissä kloonaminen jouduttaisiin toistamaan useita kertoja halutun lopputuloksen saavuttamiseksi. Kysymyksiä eettisyyden suhteen herättää myös se, jos vanhemmat haluavat tulevan lapsensa olevan samanlainen kuin joku aiemmin elänyt ihminen. Kloonamalla lisääntyminen tulevaisuudessa vaikuttaa kuitenkin epätodennäköiseltä, koska ihmiskloonauksen tutkiminen on kallista, ja tällaisen tutkimisen rahoittaminen vaatisi sitä, että siitä olisi hyötyä suurelle ihmismäärälle. (Häyry 2012: 23–25.)

Inserttiä varten eristetyt DNA-näytteet olivat molekyyli-geeniikan opiskelijoiden jo aiemmin eristämiä, ja ne olivat joko opiskelijoiden omasta verestä tai koululla olevista varastoista peräisin. Käytettävä lähdemateriaali on opiskelijan itse päätettävissä. Joka tapauksessa geenikloonaukseen käytetään anonyymia DNA:ta eli putkiin ei ole merkitty

henkilötietoja. Anonyymit DNA-näytteet varastoidaan koulun pakastimeen. Opinnäytetyössä käytettävä menetelmä ei liity elävän eliön kloonamiseen, vaan DNA-fragmentin kloonamiseen bakteerissa. Käytetty DNA-fragmentti on ihmisestä peräisin, mutta näytteestä ei voida tunnistaa ketään. Fragmentin sisältö on tässä työssä merkitykseltöntä, koska työn onnistumisessa havainnoidaan vain kloonauksen onnistumista. Samaa katkaisuentsyymiä käytetään molekyyli-genetiikan opintojaksolla myös muissa harjoituksissa.

11.4 Tulosten hyödyntäminen ja kehittämisehdotukset

Vaikka geenikloonaus ei onnistunut toivotulla tavalla, opinnäytetyön tuloksia voidaan hyödyntää jatkossa esimerkiksi kevään 2023 vaihto-opiskelijoiden toimesta, jotka hyödyntävät englanninkielistä reagenssien valmistajien työohjeista tehtyä koostetta ja suunniteltua laboraatiotunnin runkoa menetelmän jatkokehittelyssä. Menetelmän kehittäminen on mahdollista myös toisessa opinnäytetyössä, jossa menetelmän kehitystyötä jatketaan ja kehittämisehdotuksia sovelletaan. Raportin perusteella voidaan lähteä tulevaisuudessa kokeilemaan kehittämisehdotuksia, jotka todennäköisesti ratkaisisivat ongelmakohdat. Raportin tietoperustaa voidaan hyödyntää myös opetusmateriaalina molekyyli-genetiikan opintojaksolla.

Kaupallisten isäntäbakteerien ja plasmidien käyttö on luotettavaa ja ne ovat suunniteltu ja käsitelty kloonausta varten, joten ne ovat luultavasti ratkaiseva tekijä kloonauksen onnistumisessa. Tässä opinnäytetyössä testaus perustui siihen, että käytettiin mahdollisimman tehokkaasti jo olemassa olevia tuotteita ja bakteerit kasvatettiin ja plasmidit eristettiin itse. Antibioottiresistenssi ei välttämättä kuitenkaan ollut plasmidi-DNA:ssa, vaan bakteerin kromosomaalisessa DNA:ssa. Myöskään isäntäbakteerina käytetyt bakteerit eivät välttämättä olleet sopivia transformaatioon ilman niiden kemiallista käsitelyä.

Yksi vaihtoehto kaupallisiin plasmideihin on pBR322 plasmidi-DNA, joka sisältää resistenssigeenin ampicilliinia vastaan. Kyseisen plasmidi-DNA:n hinta on tällä hetkellä 90,25 € sisältäen 100 µg plasmidi-DNA:ta, eli yhden reaktion kustannukset olisivat 0,45–0,90 € riippuen siitä, minkä pitoista DNA:ta halutaan käyttää plasmidi-DNA:n tarpeen ollessa 0,5–1 µg yhteen reaktioon. (pBR322 Plasmid DNA.)

Isäntäbakteereja saadaan kaupallisina esimerkiksi DH10B kompetentteina soluina, jotka soveltuvat hyvin ottamaan vastaan plasmidivektoreita. Näitä voidaan säilyttää -80

°C:n lämpötilassa, kuten muitakin koululla käytettäviä bakteereja säilytetään. Pakkauksessa on yhteensä 1000 µL kompetentteja soluja, ja yhteen reaktioon käytetään 50 µL, joten reaktioita saadaan yhteensä 20 kappaletta. Pakkauksen hinta on tällä hetkellä 140 €, joten yhden reaktion hinta on 7 €. (DH10B Competent Cells.) Mikäli ostaa kaupalliset kompetentit solut erikseen, geenikloonausta ei ole ehkä järkevää tehdä yksilötyönä sen korkeamman hinnan takia. Mikäli halutaan suorittaa geenikloonauks mahdollisimman kustannustehokkaasti, voi kompetenttien solujen määrää yhdessä reaktiossa kokeilla vähentää, tai suorittaa geenikloonauks ryhmätyönä esimerkiksi pöytäkunnittain.

Myös kloonaukseen käytettäviä kittejä on markkinoilla useita, esimerkiksi Thermo Fisher Scientificin verkkosivuilla on muutama vaihtoehto kloonaukskitteihin. Kattavimmalta näistä vaikuttaa CloneJET™ PCR Cloning Kit, joka sisältää vektorin, reaktiopuskurin, alukkeet ja tarvittavat entsyymit. Valmistaja lupaa sen sisältävän kaiken muun tarvittavan paitsi kloonattavan DNA-fragmentin sekä kompetentit solut, joita voi ostaa myös yhdessä kloonaukskitin kanssa. (CloneJET™ PCR Cloning Kit.) Valmiin kitin käyttö on helppoa ja luotettavaa, koska voidaan varmistua siitä, että reagenssit ja kaikki menetelmän komponentit soveltuvat yhteen kyseisessä käyttötarkoituksessa.

Valmiin kloonaukskitin hinta on tällä hetkellä 305 €, sisältäen 40 reaktiota, eli 7,63 € yhtä reaktiota kohden (CloneJET™ PCR Cloning Kit.). Kun summaan lisätään tarvikkeet, joita kitin lisäksi tarvitaan (viljelymalja, viljelysauva, Eppendorf-putket, antibioottikiekkko, eristetty DNA ja S.O.C.-ravintoliuos), yhden reaktion hinnaksi muodostuu 15,89 € yhtä reaktiota kohden. Kuitenkin kaupallisia kemiallisesti kompetentteja soluja tarvittaisiin, joten mikäli kittiin haluaisi mukaan kompetentit solut, olisi hinta 486 €, sisältäen 40 reaktiota, eli 12,15 € yhtä reaktiota kohden (CloneJET™ PCR Cloning Kit with DH10B Competent Cells). Jos tähän lisää vielä tarvikkeet, jotka eivät tule kitin mukana, muodostuu hinnaksi 18,81 € yhtä reaktiota kohden.

Hintaero on huomattava verrattuna erikseen käytettäviin komponentteihin, joiden hinnaksi muodostui 8,15 € yhtä reaktiota kohden. Hinta on arviolta 10,56 € yhtä reaktiota kohden, kun siihen lisätään muut tarvikkeet. On kuitenkin otettava huomioon, että uusia tarvikkeita ei tarvinnut tilata paljon, ja opinnäytetyötä varten tilattujen tarvikkeiden hinta oli vain 2,10 € yhtä reaktiota kohden. Muut komponentit ovat käytössä myös muissa molekyyli-genetiikan opintojakson harjoitustöissä. Kustannustehokkainta jatkossa olisi ostaa vain kaupalliset plasmidit ja kaupalliset kompetentit solut, ja muuten käyttää erikseen ostettavia komponentteja. Kustannuksia laskiessa tulee kuitenkin ottaa huomioon, että reagenssien hinnat muuttuvat jatkuvasti, ja useiden tässä opinnäytetyössä käytettyjen reagenssien hinta on jo työn aikana laskenut tai noussut.

Mikäli geenikloonauksen otetaan osaksi molekyyli-genetiikan laboraatiotunteja, olisi suositeltavaa käyttää havainnointiin lampaanverimaljoja tai suklaamaljoja. Maljat tulisi tilata erikseen molekyyli-genetiikan opintojakson käyttöön, jotta niitä olisi saatavilla tarvittaessa. Emme osanneet ottaa tätä huomioon, koska ajattelimme niiden olevan niin yleisiä maljoja, että niitä on jatkuvasti saatavilla. *E. coli*lle myydään myös valmiiksi ampisiliinilla ja muilla antibiooteilla kyllästettyjä maljoja, mutta esimerkiksi Avantorin kyseiset maljat maksavat 8,5 € kappaleelta pienimmällä pitoisuudella (LB Agar Ampicillin 2022). Antibioottikiekon laittaminen maljalle on kustannustehokkaampaa.

Myös suurempi molekyyli-painomarkkeri olisi hyvä olla käytössä, mikäli jatkossa halutaan saada tarkka tieto käytetyn plasmidin koosta. Tälle ei ole tarvetta, jos käytetään kaupallisia plasmideja, koska koko ilmoitetaan tuotteessa. Esimerkiksi kaupallisen pBR322-plasmidin koko on 4361 bp (pBR322 Plasmid DNA). Suuremmasta molekyyli-painomarkkerista olisi silti hyötyä digestion ja ligation onnistumisen varmistamiseksi agarosigeelielektroforeesilla.

Perinteisen kloonauksen ohjeissa suositeltiin perimäaineksen puhdistamista esimerkiksi silikapylvästä käyttäen digestion ja ligation jälkeen, jotta vain DNA jää seokseen jäljelle. Lämpöshokkia käytettäessä transformaatiomenetelmänä puhdistaminen ei ole kuitenkaan välttämätöntä, toisin kuin elektroporaatiossa. (Traditional Cloning Basics.) Puhdistaminen olisi tuonut merkittävästi lisää työvaiheita ja kustannuksia jo valmiiksi pitkäkestoiseen menetelmään, joten puhdistusvaiheet päädyttiin jättämään pois. Entsyymit inaktivoitiin lämmöllä digestion, defosforylaation ja tylpistämisen jälkeen, jolloin entsyymit eivät häirinneet seuraavia vaiheita.

11.5 Ammatillinen kasvu

Opinnäytetyön tekeminen oli erittäin opettavainen ja iso projekti. Työskentely aloitettiin tiedonhaulla ja nopeasti tuli vastaan, ettei aiheesta ollut saatavilla runsaasti uutta tutkimustietoa, jolloin kokonaisuuden ymmärtäminen vaati paljon työskentelyä. Tiedonhaku koostui melko suuresta määrästä eri lähteitä, koska kokonaisvaltaisia tieteellisiä artikkeleita ei löytynyt, vaan niissä keskityttiin yleensä johonkin pieneen osioon kloonaukseen liittyen. Tietolähteet olivat pääasiassa englanniksi, eikä suomenkielisiä tutkimuksia ja tieteellisiä artikkeleita aiheeseen liittyen juurikaan löytynyt. Opinnäytetyöprosessi vahvisti tiedonhakutaitoja ja opetti lähteiden luotettavuuden kriittistä arviointia. Kokonaisuudessaan opinnäytetyön kirjallinen osuus oli opettavainen.

Menetelmän pystyttäminen oli alusta asti innostava ajatus ja aihe oli mieleinen jo ennestään teoriapohjalta. Menetelmän pystyttäminen osoittautui kuitenkin haastavaksi ja se vaati suurta paneutumista aiheeseen. Aikaresurssin puitteissa oli valittava se menetelmä, jolla lähdettiin geenikloonaukseen testaamaan käytännössä ja se vaati itseluottamusta siihen, että olemme ymmärtäneet mitä kaikkea geenikloonauksessa tulee ottaa huomioon. Matkan varrella tuli paljon onnistumisia, mutta myös epäonnistumisia. Niistä opittiin ja työskentelytapaa muutettiin tarvittaessa. Menetelmän testaus myös kehitti paljon ongelmanratkaisutaitoja, kun ajoittain jouduttiin soveltamaan työskentelyä ja välineiden käyttöä.

Vaikka lopputulos ei ollut toivottu ja tavoiteltu, uskomme sen olevan arvokas mahdollisissa jatkotutkimuksissa. Opinnäytetyö kasvatti itsenäiseen työskentelyyn, itsekuriin, päätöksentekoon, isojen kokonaisuuksien hallintaan, luotettavaan tiedonhakuun sekä epäonnistumisten käsittelyyn. Opinnäytetyöprosessi lisäsi itsevarmuutta omaan työskentelyyn epäonnistumisista huolimatta. Opimme työskentelemään oman mukavuusalueemme ulkopuolella ja refleктоimaan omaa oppimista ja työskentelyä. Opinnäytetyöprosessi kokonaisuudessaan oli opettavainen ja merkityksellinen ajatellen tulevaisuuden työelämää.

Lähteet

- Agüera, E. I. & Sánchez-Hermosín, P. & Díz-Pérez, J. & Tovar, P. & Camacho, R. & Escribano, B. M. 2015. Students integrate knowledge acquisition and practical work in the laboratory. *The American Physiological Society* 39 (3). <https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/advan.00019.2015?rfr_dat=cr_pub++0pub-med&url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Aacrossref.org>. Viitattu 20.10.2022.
- An, Y. & Lv, A. & Wu, W. 2010. A colony-to-lawn method for efficient transformation of *e. coli*. *Letters in Applied Microbiology* 51 (1). Applied Microbiology International. <<https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1472-765X.2010.02864.x>>. Viitattu 21.2.2022.
- Anttila, Pirkko 2007. Realistinen evaluaatio ja tuloksellinen kehittämistyö. Hamina: AKATIIMI oy kustannus. 83–84, 87.
- Ayala, Francisco J. 2015. Cloning humans? Biological, ethical, and social considerations. *Therapeutic Cloning*. National Library of Medicine. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4517218/>>. Viitattu 11.2.2022.
- Bacterial Transformation Workflow—4 Main Steps. Thermo Fisher Scientific. <<https://www.thermofisher.com/fi/en/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/molecular-cloning/transformation/bacterial-transformation-workflow.html>>. Viitattu 18.10.2022.
- Balouiri, Mounyr & Sadiki, Moulay & Ibsouda, Saad Koraichi 2015. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. *Science Direct*. <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2095177915300150>>. Viitattu 14.9.2022.
- Bioanalyytikon, laboratoriohoitajan eettiset ohjeet 2017. Suomen Bioanalytikkoliitto ry. Helsinki. <<https://www.bioanalytikkoliitto.fi/@Bin/659271/Eettiset+ohjeet+-suomi+2011.pdf>>. Viitattu 15.11.2022.
- Brescia, Peter 2021. Microvolume Purity Assessment of Nucleic Acids Using A260/A280 Ratio and Spectral Scanning. Agilent Technologies, Inc. <<https://www.agilent.com/cs/library/applications/A260A280-spectral-scanning-5994-2538EN-agilent.pdf>>. Viitattu 19.9.2022.
- Brown, Terence A. 2000. Research strategies for molecular biology. Gene cloning in outline. Teoksessa Brown, Terence A. (toim.) *Essential Molecular biology*. Volume One. 2. painos. Oxford: Oxford University Press. 8–10.
- Brown, Terence A. 2006. Manipulation of Purified DNA. *Gene Cloning & DNA Analysis. An Introduction*. 5. painos. Oxford: Blackwell Publishing. 61–63.
- Chan, Vicky & Dreolini, Lisa F. & Flintoff, Kerry A. & Lloyd, Sonja J. & Mattenley, Andrea A. 2002. The Effect of Increasing Plasmid Size on Transformation Efficiency in *Escherichia coli*. *Journal of Experimental Microbiology and Immunology (JEMI)* 2. 207–

223. <https://www2.microbiology.ubc.ca/sites/default/files/roles/drupal_ungrad/JEMI/2/2-207.pdf>. Viitattu 20.9.2022.

Chang, Angela Y. & Chau, Vivian WY. & Landas, Julius A. & Pang, Yvonne 2017. Preparation of calcium competent Escherichia coli and heat-shock transformation. JEMI methods 1. 22–25. <<https://ujemi.microbiology.ubc.ca/sites/default/files/Chang%20et%20al%20JEMI-methods%20Vol%201%20pg%2022-25.pdf>>. Viitattu 18.10.2022.

Chemical Transformation Tips 2022. New England BioLabs Inc. <<https://international.neb.com/tools-and-resources/usage-guidelines/chemical-transformation-tips>>. Viitattu 18.10.2022.

Christenson, John C. & Korgenski, Kent E. & Relich, Ryan F. 2018. Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases. 5. painos. 1422–1434. Science Direct. <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780323401814002863>>. Viitattu 14.9.2022.

Clinical breakpoints and dosing of antibiotics 2022. EUCAST. <https://www.eucast.org/clinical_breakpoints>. Viitattu 21.9.2022.

CloneJET PCR Cloning Kit. Thermo Scientific™. Thermo Fisher Scientific. <<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K1231>>. Viitattu 9.2.2022.

CloneJET™ PCR Cloning Kit with DH10B Competent Cells. Thermo Scientific™. Thermo Fisher Scientific. <<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K123240?SID=srch-srp-K123240>>. Viitattu 11.10.2022.

Cloning Fact Sheet 2020. National Human Genome Research Institute. <<https://www.genome.gov/about-genomics/fact-sheets/Cloning-Fact-Sheet>>. Viitattu 7.2.2022.

Costello, Leslie C. & Franklin, Renty B. 2011. Integration of molecular genetics and proteomics with cell metabolism: How to proceed; How not to proceed! National Library of Medicine. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4041378/>>. Viitattu 20.9.2022.

Cysteine Lactose Electrolyte Deficient (CLED) agar 2019. VetBact. <<https://www.vet-bact.org/?displayextinfo=50>>. Viitattu 18.10.2022.

Degerman, Risto 2015. Suomen uhanalaisia kasveja suojellaan kloonaamalla. Yle uutiset. <<https://yle.fi/uutiset/3-8486569>>. Viitattu 17.3.2022.

Devolder, Katrien 2008. Cloning. Human reproductive Cloning. Stanford Encyclopedia of Philosophy. Tarkistettu 2021. <<https://plato.stanford.edu/entries/cloning/#Hum-RepClo>>. Viitattu 11.2.2022.

DH10B Competent Cells. Thermo Scientific™. Thermo Fisher Scientific. <<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/EC0113?SID=srch-srp-EC0113>>. Viitattu 19.10.2022.

dsDNA: µg to pmol 2022. Biomath Calculators. Promega. <<https://fi.promega.com/resources/tools/biomath/>>. Viitattu 5.10.2022.

dsDNA: Mass to/from Moles Converter 2021. NEBioCalculator. <<https://nebiocalculator.neb.com/#!/dsdnaamt>>. Viitattu 7.10.2022.

EcoRI 2012. Product Information. Thermo Fisher Scientific. Käyttöohje. <https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FMSG%2Fmanuals%2FMAN0012092_EcoRI_10_UuL_10000U_UG.pdf>. Viitattu 5.10.2022.

Elbing, Karen & Brent, Roger 2019. Growth of E.coli on Solid Media. Curr Protoc mol Biol. 125 (1). National Library of Medicine. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6819146/>>. Viitattu 14.9.2022.

Froger, Alexandrine & Hall, James E. 2007. Transformation of Plasmid DNA into E. coli Using the Heat Shock Method. National Library of Medicine. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2557105/>>. Viitattu 21.2.2022.

Gannon, Frank & Powell, Richard 2000. Construction of recombinant molecules. Teoksessa Brown, Terence A. (toim.). Essential Molecular biology. Volume One. 2. painos. Oxford: Oxford University Press. 142.

GelGreen® Nucleic Acid Gel Stain. Biotium. <<https://biotium.com/product/gelgreen-nucleic-acid-gel-stain/>>. Viitattu 6.10.2022.

General Recommendations for DNA Electrophoresis 2012. Thermo Fisher Scientific. <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0012614_Gen_Recommend_DNA_Electrophoresis_UG.pdf> Viitattu 6.10.2022.

Giasseti, Mariana Ianello & Maria, Fernanda Sevciuc & Ortiz D'Ávila Assumpção & Visintin, José Antônio 2013. Genetic Engineering and Cloning: Focus on Animal Biotechnology. Teoksessa Sithole-Niang (toim.), Idah. Genetic Engineering. E-kirja. Lontoo: IntechOpen.

Gibson, Daniel G. 2011. Enzymatic Assembly of Overlapping DNA Fragments. National Library of Medicine. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7149801/>>. Viitattu 20.9.2022.

Glick, Bernard R. & Pasternak, Jack J. & Patten, Cheryl L. 2010. Molecular biotechnology. 4. painos. American Society for Microbiology. Washington, DC: ASM Press. 49–51, 58–59, 86, 89–90.

Heikkinen, Hannu L. T. 2018. Toimintatutkimus: kun käytäntö ja tutkimus kohtaavat. Teoksessa Raine, Valli (toim.). Ikkunoita tutkimus metodeihin 1, Metodien valinta ja aineistonkeruu: virikkeitä aloittelevalla tutkijalla. E-kirja. Jyväskylä: PS-kustannus.

High Pure Plasmid Isolation Kit 2014. Roche. Versio 10. Ohjekirja.

How to Calculate Dilution 2022. Science Company. <<https://www.sciencecompany.com/How-To-Calculate-A-Dilution.aspx>>. Viitattu 7.10.2022.

How to Choose an Enzyme Storage Lab Freezer 2022. Tovatech. <<https://tovatech.com/blog/495/lab-freezer/enzyme-storage-lab-freezer>>. Viitattu 5.10.2022.

Hyvä tieteellinen käytäntö 2021. Tutkimuseettinen neuvottelukunta. Päivitetty 7.7.2021 <<https://tenk.fi/fi/tiedevilppi/hyva-tieteellinen-kaytanto-htk>>. Viitattu 9.2.2022.

Häyry, Matti 2012. Ihmisen kloonaus. Ihminen 2.0. Geneettisen valikoinnin ja paranteleiden eettiset kysymykset. Helsinki: Gaudeamus. 23–25.

Interpretation of Nucleic Acid 260/280 Ratios 2012. Thermo Scientific. Wilmington, Delaware USA. <<https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/T123-NanoDrop-Lite-Interpretation-of-Nucleic-Acid-260-280-Ratios.pdf>>. Viitattu 19.9.2022.

Islam, Mohammad Nazrul & Lee, Kyeong Won & Yim, Hyung-Soon & Lee, Seong Hyuk & Jung, Hae Chang & Lee, Jung-Hyun & Jeong, Jae-Yeon 2018. Optimizing T4 DNA polymerase conditions enhances the efficiency of one-step sequence- and ligation-independent cloning. *Biotechniques* 63 (3). Future Science. <https://www.future-science.com/doi/full/10.2144/000114588?rfr_dat=cr_pub++0pubmed&url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org>. Viitattu 21.2.2022.

Kaufman, David M. 2003. Applying educational theory in practice. BMH Publishing Group Ltd. National Library of Medicine. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1125068/>>. Viitattu 9.2.2022.

Khalil, Mohammed K. 2016. Applying learning theories and instructional design models for effective instruction. *The American Physiological Society*. <<https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/advan.00138.2015>>. Viitattu 10.2.2022.

Kliinisen mikrobiologian tutkimukset SX00ED06. Opinto-opas. Metropolia Ammattikorkeakoulu. <<https://opinto-opas.metropolia.fi/88094/fi/108/70303/3293/0/58073>>. Viitattu 27.10.2022.

Kostamo, Pipsa & Airaksinen, Tiina & Vilkkä, Hanna 2022. Kirjoita itsesi asiantuntijaksi. Opas toiminnalliseen opinnäytetyöhön. E-kirja. Helsinki: Art House Oy. 8–11, 79.

Latonummi, Elina 2012. Merkkigeenien LacZ ja GFP sekä hoitogeenien HIF-1 α ja HIF-2 α kloonaus AAV-vektoriin. Pro gradu -tutkielma. Kuopio: Itä-Suomen yliopisto. Biotieteiden koulutusohjelma. 7. <https://erepo.uef.fi/bitstream/handle/123456789/10550/urn_nbn_fi_uef-20120190.pdf>. Viitattu 17.3.2022.

LB Agar Ampicillin. Avantor™. Delivered by VWR. <https://us.vwr.com/store/catalog/product.jsp?product_id=12783078>. Viitattu 27.10.2022.

Lee, Pei Yun & Costumbrado, John & Hsu, Chih-Yuan & Kim, Yong Hoon 2012. Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. National Library of Medicine. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4846332/>>. Viitattu 22.9.2022.

Levine, Aaron D. 2012. Cloning. A beginner's guide. E-kirja. Oxford: Oneworld Publications. 14–15.

Lorenz, M. G. & Wakernagel, W. 1994. Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. National Library of Medicine. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC372978/>>. Viitattu 18.2.2022.

Mahajan, Rajiv & Gupta, Piyush & Singh, Tejinder 2017. Practice-based Learning and Improvement (PBLI) in Postgraduate Medical Training: Milestones, Instructional and Assessment strategies. Medical Education Vol. 54: 311–312. <<https://www.indianpediatrics.net/apr2017/311.pdf>>. Viitattu 12.4.2022.

Mannonen, Leena & Aaltola, Elisa & Ahlström, Susanna & Marniemi, Annikka & Mikkola, Minnammi & Puurula, Vuokko & Viikki, Johanna 2008. Tuotantoeläinten kloonauksen. Biotekniikan neuvottelukunnan julkaisuja. 8–15. <http://www.btnk.fi/files/pdf/elainkloonaus_verkko.pdf>. Viitattu 17.3.2022.

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. 4–9,11. <<https://trepo.tuni.fi/bitstream/handle/10024/117021/MartikainenHeidi.pdf?sequence=2&isAllowed=y>>. Viitattu 21.10.2022.

Matoba, Shogo & Zhang, Yi 2018. Somatic Cell Nuclear Transfer Reprogramming: Mechanisms and Applications. National Library of Medicine. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6173619/>>. Viitattu 11.2.2022.

McFARLAND STANDARD 2002. Dalynn Biologicals. Päivitetty 2014. <http://www.dalynn.com/dyn/ck_assets/files/tech/TM53.pdf>. Viitattu 14.9.2022.

Miglani, Gurbachan S. 2015. Essentials of Molecular Genetics. E-Kirja. Alpha Science International. Oxford, UK. 7, 20–21.

Molekyyligenetiikka SX00EC99. Opinto-opas. Metropolia Ammattikorkeakoulu. <<https://opinto-opas.metropolia.fi/88094/fi/108/70303/3293/0/58066>>. Viitattu 16.3.2022.

Mutikainen, Maija 2012. Ihmisen melanokortiini-1 reseptorin säätelyalueen kloonauksen ja testaus retinan pigmenttiepiteelin soluissa. Pro gradu -tutkielma. Kuopio: Itä-Suomen yliopisto. Biotieteiden koulutusohjelma. 7, 38. <https://erepo.uef.fi/bitstream/handle/123456789/10551/urn_nbn_fi_uef-20120189.pdf>. Viitattu 17.3.2022.

Ndihokubwayo, Kizito & Byukusenge, Céline & Byusa, Edwin & Habiyaremye, Hashituky Telesphore & Mbonyiryivuze, Agnes & Mukagihana, Josiane 2022. Lesson plan analysis protocol (LPAP): A useful tool for researchers and educational evaluators. National Library of Medicine. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8760448/>>. Viitattu 20.10.2022.

New definitions of S, I and R from 2019. EUCAST. <<https://www.eucast.org/new-siandr>>. Viitattu 23.9.2022.

Nonstick, RNase-free Microfuge Tubes, 1,5 mL. Invitrogen™. Thermo Fisher Scientific. <<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/AM12450?SID=srch-srp-AM12450>>. Viitattu 27.10.2022.

Nunc™ Disposable Loops and Needles, needle. Thermo Scientific™. Thermo Fisher Scientific. <<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/253988PK?SID=srch-srp-253988PK>>. Viitattu 27.10.2022.

Ohjeita ohjeiden tekijöille. Kotimaisten kielten keskus. <https://www.kotus.fi/ohjeet/hyvan_virkakielen_ohjeita/millaisia_ovat_toimivat_ohjeet_ja_kysymykset/ohjeita_ohjeiden_tekijoille.>. Viitattu 10.2.2022.

pBR322 Plasmid DNA. Thermo Scientific™. Thermo Fisher Scientific. <<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/SD0041>>. Viitattu 11.10.2022.

Preparation of 0.8 % Agarose Gel 2018. Flinn Scientific. <<https://www.flinnsci.com/api/library/Download/a479cb3395424390985beb0520d3e6e9>>. Viitattu 6.10.2022.

Prepared Blood Agar Media 2022. Avantor™. Delivered by VWR. <<https://us.vwr.com/store/product/8868019/prepared-blood-agar-media>>. Viitattu 27.10.2022.

QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook 2016. QIAGEN. 5. painos. 11–13, 46.

Rahbaran, Mohaddeseh & Razeghian, Ehsan & Maashi, Marwah Suliman & Jalil, Abduladheem Turki & Widjaja, Gunawan & Thangavelu, Lakshmi & Kuznetsova, Mariya Yurievna & Nasirmoghadas, Pourya & Heidari, Farid & Marofi, Farough & Jarahian, Mostafa 2021. Cloning and Embryo Splitting in Mammals: Brief History, Methods, and Achievements. Stem cells international. National Library of Medicine. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8651392/>>. Viitattu 17.3.2022.

S.O.C. Medium. Invitrogen™. Thermo Fisher Scientific. <<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/15544034?SID=srch-srp-15544034>>. Viitattu 19.9.2022.

Safarikova, M & Kubena, A. A. & Frankova, V & Zima, T & Kalousova, M 2021. The Effects of Different Storage Conditions and Repeated Freeze/Thaw Cycles on the Concentration, Purity and Integrity of Genomic DNA. <<https://fb.cuni.cz/file/5942/fb2021a0002.pdf>>. Viitattu 11.10.2022.

Salzman, David H. & Franzen, Douglas S. & Leone, Katrina A. & Kessler, Chad S. 2012. Assessing Practice-based Learning and Improvement. *Academic Emergency Medicine* 19 (12). <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/acem.12026>>. Viitattu 12.4.2022.

Sanderson, Brian A. & Araki, Naoko & Lilley, Jennifer L. & Guerrero, Gilberto & Lewis, L. Kevin 2014. Modification of gel architecture and TBE/TAE buffer composition to minimize heating during agarose gel electrophoresis. National Library of Medicine. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4021863/>>. Viitattu 27.10.2022.

Selecting the Right Pipette Tip. Thermo Fisher Scientific. <<https://www.thermofisher.com/fi/en/home/life-science/lab-plasticware-supplies/lab-plasticware-supplies-learning-center/lab-plasticware-supplies-resource-library/fundamentals-of-pipetting/liquid-handling-selection/selecting-the-right-pipette-tip.html>>. Viitattu 5.10.2022.

Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP). Applied Biosystems™. Thermo Fisher Scientific. <<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/783901000UN?SID=srch-hj-783901000UN>>. Viitattu 21.2.2022.

Skwarecki, Beth 2018. *Genetics 101: From Chromosomes and the Double Helix to Cloning and DNA Tests, Everything You Need to Know about Genes*. E-kirja. New York: Adams Media. 8–19.

Sosiaali- ja terveystieteen perusta 2011. Valtakunnallinen sosiaali- ja terveystieteen neuvottelukunta ETENE. ETENE-julkaisu 32. Helsinki: Sosiaali- ja terveysministeriö. <<https://etene.fi/documents/66861912/66865169/ETENE-julkaisu+32+Sosiaali-+ja+terveysalan+eettinen+perusta.pdf/13c517e8-6644-4fa5-8c5f-193cfdce9841/ETENE-julkaisu+32+Sosiaali-+ja+terveysalan+eettinen+perusta.pdf?t=1439805553000>>. Viitattu 15.11.2022.

T4 DNA Ligase, LC (1 U/μL). Thermo Scientific™. Thermo Fisher Scientific. <<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/EL0016?SID=srch-hj-EL0016>>. Viitattu 21.2.2022.

T4 DNA Ligase. Invitrogen™. Thermo Fisher Scientific. Käyttöohje. <https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FMSG%2Fmanuals%2Ft4dnaligase_1U_man.pdf>. Viitattu 7.10.2022.

T4 DNA Polymerase 2016. Thermo Scientific™. Thermo Fisher Scientific. Käyttöohje. <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/MSG/manuals/MAN0012013_T4_DNA_Polymerase_UG.pdf>. Viitattu 6.10.2022.

Tan, Siun Chee & Yiap, Beow Chin 2009. *DNA, RNA, and Protein Extraction: The Past and The Present*. BioMed Research International. <<https://www.hindawi.com/journals/bmri/2009/574398/>>. Viitattu 18.2.2022.

Terveystieteen yhteinen arvopohja, yhteiset tavoitteet ja periaatteet 2001. Valtakunnallinen terveystieteen neuvottelukunta (ETENE). ETENE-julkaisu 1. Sosiaali- ja terveysministeriö.

aali- ja terveysministeriö. <<https://etene.fi/documents/1429646/1559098/ETENE-julkaisu+1+Terveysthuollon+yhteinen+arvopohja%2C+yhteiset+tavoitteet+ja+periaatteet.pdf/4de20e99-c65a-4002-9e98-79a4941b4468>>. Viitattu 15.11.2022.

Traditional Cloning Basics. Thermo Fisher Scientific. <<https://www.thermo-fisher.com/fi/en/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/molecular-cloning/cloning/traditional-cloning-basics.html>>. Viitattu 19.2.2022.

Traditional Cloning Quick Guide 2022. New England BioLabs Inc. <<https://international.neb.com/tools-and-resources/usage-guidelines/cloning-guide>>. Viitattu 11.10.2022.

Transformation Protocol 2022. New England BioLabs ® Inc. <<https://international.neb.com/protocols/2012/05/21/transformation-protocol>>. Viitattu 11.10.2022.

Tu, Qiang & Yin, Jia & Fu, Jun & Herrmann, Jennifer & Li, Yuezhong & Yin, Yulong & Stewart, Francis A. & Müller, Rolf & Zhang, Youming 2016. Room temperature electro-competent bacterial cells improve DNA transformation and recombineering efficiency. National Library of Medicine. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4837392/>>. Viitattu 20.9.2022.

Tuotteet 2022. Tammer BioLab. <<https://tammerbiolab.fi/tuotteet>>. Viitattu 11.10.2022.

USB® Shrimp Alkaline Phosphatase 2016. Affymetrix, Inc. Käyttöohje. <<https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/78390B.pdf>>. Viitattu 5.10.2022.

van Woezik, Tamara E.T & Oosterman, Jurriaan & Reuzel, Rob P.B. & van der Wilt, Gert-Jan & Koksma, Jur J. 2020. Practice-based learning: an appropriate means to acquire the attitude and skills for evidence-based medicine. National Library of Medicine. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7874920/>>. Viitattu 12.4.2022.

Vilkkä, Hanna 2021. Tutki ja kehitä. E-kirja. Jyväskylä: PS-kustannus.

Wróbel, Agnieszka & Arciszewska, Karolina & Maliszewski, Dawid & Drozdowska, Danuta 2019. Trimethoprim and other nonclassical antifolates an excellent template for searching modifications of dihydrofolate reductase enzyme inhibitors. National Library of Medicine. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7102388/>>. Viitattu 18.10.2022.

Zhang, Shenyan & Cahalan, Michael D. 2007. Purifying Plasmid DNA from Bacterial Colonies Using the Qiagen Miniprep Kit. National Library of Medicine. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2557117/?report=reader>>. Viitattu 18.2.2022.