



## **SUBKLOONAUS JA RESTRIKTIOENTSYMIANALYYSI**

**Molekyylibiologian ja geeniteknologian harjoitustyön kokoaminen Savonia-ammattikorkeakoulun bioanalytiikan koulutusohjelmalle**

**Opinnäytetyö**

**Maija Vuorenpää**

**Bioanalytiikan koulutusohjelma**

Hyväksytty \_\_\_\_ . \_\_\_\_ . \_\_\_\_\_ \_\_\_\_\_

# SAVONIA- AMMATTIKORKEAKOULU

Terveysala, Kuopio

## OPINNÄYTETYÖ

### Tiivistelmä

Koulutusohjelma: Bioanalytiikan koulutusohjelma	
Työn tekijä: Maija Vuorenpää	
Työn nimi: Subkloonaus ja restriktioentsyymianalyysi – Molekyylibiologian ja geeniteknologian harjoitustyön kokoaminen Savonia-ammattikorkeakoulun bioanalytiikan koulutusohjelmalle	
Päiväys: 1.4.2010	56 sivua / liitteitä 3 kpl (17 sivua)
Ohjaaja: Lehtori, TtM Eila Räsänen	
Työyksikkö / projekti: Savonia-ammattikorkeakoulu, Sairaalakadun kampus	
<p>Molekyylibiologia on biologian osa-alue, jossa tarkastellaan solun toimintaa molekyyalitasolla. Viime vuosikymmeninä huimasti kehittyneet molekyylibiologiset tutkimusmenetelmät, kuten DNA:n muokkaaminen, kopioiminen ja kloonauksen, muodostavat geenitekniikan kokonaisuuden. Yksi geenitekniikan osa-alue on yhdistelmä-DNA-tekniikka, jonka menetelmien avulla voidaan siirtää ja liittää yhteen eri lähteistä peräsin olevaa geneettistä materiaalia.</p> <p>Bioanalytiikan koulutukseen kuuluvat molekyylibiologian ja geeniteknologian opinnot. Savonia-ammattikorkeakoulussa bioanalytiikan koulutuksen syventävästä vaiheesta on kuitenkin puuttunut molekyylibiologian ja geeniteknologian osalta koululla suoritettava harjoitustyö. Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli koota harjoitustyö bioanalytikko-opiskelijoiden molekyylibiologian ja geeniteknologian opintoihin. Harjoitustyö validoitiin eli sen toimivuus testattiin Sairaalakadun kampuksen laboratoriotiloissa käytössä olevilla välineillä ja sen toteuttamista varten luotiin työohje.</p> <p>Harjoitustyön aiheeksi valittiin subkloonaus ja restriktioentsyymianalyysi. Subkloonauksen tarkoituksena on liittää eristettyyn plasmidi-DNA:han vieraasta DNA:sta peräisin oleva insertti restriktioentsyymikäsittelyn avulla. Syntynyt yhdistelmäplasmidi transformoidaan <i>E. coli</i> -bakteeriin, jonka replikaatiokoneiston avulla yhdistelmäplasmidia monistetaan. Monistuksen tarkoituksena on tuottaa yhdistelmäplasmidia, jotta se voidaan eristää bakteerista ja tarkistaa restriktioentsyymianalyysillä insertin siirtyminen yhdistelmäplasmidiin.</p> <p>Opinnäytetyössä koottu harjoitustyökokonaisuus parantaa Savonia-ammattikorkeakoulusta valmistuvien bioanalytikkojen ammattitaitoa ja auttaa heitä vastaamaan työelämän haasteisiin. Harjoitustyökokonaisuus on hyödynnettävissä osana bioanalytikkojen koulutusta, ja sitä on mahdollista käyttää myös bioanalytikkojen ja laboratoriohoitajien täydennyskoulutuksessa.</p>	
Avainsanat: subkloonaus, yhdistelmä-DNA-tekniikka, validointi	
Julkinen <input checked="" type="checkbox"/>	Salainen <input type="checkbox"/>

# SAVONIA UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

## Health Professions Kuopio

### THESIS

#### Abstract

Degree Programme: Degree programme in Biomedical Laboratory Science	
Author: Maija Vuorenpää	
Title of Thesis: Subcloning and restriction enzyme analysis - Constructing a practical work of molecular biology and gene technology to degree programme of biomedical laboratory science of Savonia University of Applied Sciences	
Date: 1.4.2010	56 pages / 3 appendices (17 pages)
Supervisor: Senior lecturer, Master of Health Sciences Eila Räsänen	
Contact persons: Savonia University of Applied Sciences, Sairaalakatu Campus	
<p>Molecular biology is a part of biology where function of the cell is being observed in a molecular level. In the past decades research methods in molecular biology like modifying, copying and cloning of DNA have been developed enormously. These methods can also be called as gene technology. One field of gene technology is recombinant DNA technique that can be used to transfer and join together genetic material from different sources.</p> <p>There are molecular biology and gene technology studies in the curriculum of the degree programme of biomedical laboratory science. A practical work performed in school has however been missing from the advanced studies of molecular biology and gene technology in Savonia University of Applied Sciences. Thereby, the purpose of this thesis was to construct a practical work for these studies. The practical work was validated or tested with the equipment available in the laboratory facilities in Sairaalakatu campus. The work instruction for the implementation of the practical work was also created.</p> <p>The subject for the practical work was chosen to be subcloning and restriction enzyme analysis. The purpose of subcloning is to join or ligate an insert from a foreign DNA to extracted plasmid DNA via restriction enzyme treatment. The new recombinant plasmid is then transformed to <i>E. coli</i> -bacterial cells and copied in its replication machinery. The aim of copying of the recombinant plasmid is to produce DNA so that it can be extracted from the cells. With restriction enzyme analysis the transfer of the insert to the new recombinant plasmid can be controlled.</p> <p>The practical work constructed in this thesis improves the professional skills of the biomedical laboratory scientist graduating from the Savonia University of Applied Sciences and helps them to respond the challenges met in the working life. The practical work can be utilized in the studies of degree programme of biomedical laboratory science. It can also be used in the supplementary education of the biomedical laboratory scientist.</p>	
Keywords: Subcloning, recombinant DNA technology, validation	
Public <input checked="" type="checkbox"/>	Secure <input type="checkbox"/>

## SISÄLTÖ

1	JOHDANTO .....	5
2	OPINNÄYTETYÖN TAUSTA JA TARKOITUS .....	6
3	ANALYYTTISEN MENETELMÄN VALIDOINTI .....	7
4	TYÖOHJE OPPIMATERIAALINA .....	8
5	SUBKLOONAUKSEN TEORIAA .....	9
5.1	Plasmidi- ja insertti-DNA .....	11
5.2	Restriktioentsyymit .....	11
5.3	Vektorin ja insertin digestio .....	13
5.4	Vektorin ja insertin ligaatio .....	15
5.5	Bakteerisolujen transformaatio ja seulonta .....	16
5.5.1	Transformaatio .....	16
5.5.2	Bakteerisolujen seulonta .....	17
5.6	Bakteerisolujen kasvattaminen .....	20
5.7	Restriktioentsyymianalyysi .....	20
6	TOIMINNALLISEN OPINNÄYTETYÖN PROSESSI .....	21
6.1	Tarpeen tunnistaminen ja suunnitteluvaihe .....	22
6.2	Kokeilu- ja toteuttamisvaihe eli harjoitustyön testaus .....	24
6.3	Arviointi- ja sulauttamisvaihe .....	27
7	AMMATILLINEN KEHITTYMINEN .....	29
8	POHDINTA .....	30
	LÄHTEET .....	35
LIITTEET		
	Liite 1. Sanasto .....	39
	Liite 2. Harjoitustyöohje .....	41
	Liite 3. Palautelomake .....	56

# 1 JOHDANTO

Molekyylibiologia on biologian osa-alue, joka keskittyy tarkastelemaan solujen toimintaa molekyylitasolla. Siinä tutkitaan muun muassa DNA:n, geenien ja erilaisten proteiinien toimintaa solussa. Molekyylibiologiset menetelmät ovat kehittyneet viime vuosikymmeninä paljon. 1970-luvulta alkanut nopein harppauksin edennyt DNA:n tutkimustekniikoiden kehitys on tuonut meidät siihen tilanteeseen, jossa tänä päivänä olemme: DNA:n muokkaus, kopioiminen, sekvensointi ja kloonaaaminen ovat arkipäivää. (Alberts ym. 1994, 291.) Erilaiset DNA-tutkimustekniikat muodostavat yhdessä geenitekniikan kokonaisuuden.

Geenitekniikan osa-alue on yhdistelmä-DNA-tekniikka, joka on nykypäivänä oleellinen osa geenien ja proteiinien tutkimusta. Yhdistelmä-DNA-tekniikka muodostuu erilaisista menetelmistä, joiden avulla voidaan siirtää ja liittää yhteen eri lähteistä peräisin olevaa geneettistä materiaalia. Siitä voidaan käyttää myös muita nimityksiä, kuten geeniteknologia ja rekombinantti-DNA-tekniikka. (Suominen & Ollikka 1997, 7, 45; Niemi, Virtanen & Vuorio 1994, 145.)

Yhdistelmä-DNA-tekniikan kehittyminen viimeisten vuosikymmenten varrella perustuu neljään merkittävään löytöön. Näistä ensimmäinen oli DNA:ta pilkkovien restriktioentsyymien eristäminen bakteereista 1970-luvun alussa. Pian tämän jälkeen löydettiin entsyymi, joka pystyy liittämään restriktioentsyymien pilkkomat DNA-palat yhteen ligaatiolla. Kolmas merkittävä vaihe yhdistelmä-DNA-tekniikoiden kehittämisessä oli plasmidien eli rengasmaisten DNA-molekyylien löytäminen. Bakteerisolusta eristettyjä plasmideja opittiin myös siirtämään toisiin bakteereihin transformaatiolla, jonka voidaankin katsoa olevan viimeinen neljästä merkittävästä löydöstä. (Suominen & Ollikka 1997, 47.)

Laboratio-opetus ja erilaiset harjoitukset kuuluvat oleellisena osana luonnontieteellisten aineiden opetukseen. Laboratorio-opetuksen keskeisimpiä tavoitteita ovat tieteenalan taitojen opettaminen, tieteellisen tutkimuksen menetelmien ymmärtäminen sekä ongelmanratkaisutaitojen ja ammattiasenteiden kehittäminen. Pääpaino laboratorio-opetuksessa on siinä, että opiskelijat oppivat tekemällä. Opiskelijan pitäisi kuitenkin kokea

opetettava asia mielenkiintoiseksi ja merkittäväksi, jotta opiskelumotivaatio itse tekemisessä säilyisi. (Kuittinen 1994, 84.)

## 2 OPINNÄYTETYÖN TAUSTA JA TARKOITUS

Savonia-ammattikorkeakoulun bioanalytiikan koulutusohjelman syventävän vaiheen opintoihin kuuluu erilaisia koululla tehtäviä harjoituksia. Molekyylibiologian ja geeniteknologian osalta oppilaitoksella ei kuitenkaan ole vielä koottuna ja testattuna harjoitustyökokonaisuutta oppilaiden käyttöön. Tavoitteena onkin kehittää toimiva harjoitustyö tulevien opiskelijaryhmien käyttöön. Harjoitustyön tulee olla sellainen, että se on toteutettavissa Savonia-ammattikorkeakoulun Sairaalakadun kampuksen tiloissa. Lisäksi harjoitustyön tulee tukea opiskelijoiden ammatillista kasvua ja kehittymistä sekä vastata työelämän vaatimuksiin. Parantamalla Savonia-ammattikorkeakoulusta valmistuvien bioanalyttikkojen ammatillista osaamista voidaan myös osaltaan kehittää koko ammattialaa.

Molekyylibiologian ja geeniteknologian opinnot kuuluvat bioanalyttikko-opiskelijoiden opinto-ohjelmaan, joten valmistuttuaan bioanalyttikon tulisi tuntea alan analyysimenetelmät ja hänellä pitäisi olla myös teknistä osaamista. Lisäksi bioanalyttikon tulisi kyetä tekemään molekyylibiologian laboratoriotutkimuksia ja ymmärtämään niiden menetelmälliset periaatteet. (Opetussuunnitelma 2007, 5–6.) Myös geneettisten tutkimusten lisääntyminen muun muassa perinnöllisten sairauksien diagnostiikassa ja monen aiemmin tutkimuskäytössä olleen menetelmän siirtyminen rutiinikäyttöön lisäävät bioanalyttikoilta vaadittavaa molekyylibiologian ja geeniteknologian tietotaitoa (Palotie 2006, 6–7). Tämä opinnäytetyö pyrkii osaltaan lisäämään valmistuvien bioanalyttikkojen ammattitaitoa ja siten mahdollisuutta vastata työelämän haasteisiin.

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli koota molekyylibiologian ja geeniteknologian harjoitustyökokonaisuus Savonia-ammattikorkeakoulun bioanalytiikan koulutusohjelman käyttöön. Tarkoituksena oli kehittää ja testata harjoitustyö sekä luoda työohje harjoitustyön tekemistä varten. Opinnäytetyössä kuvattiin valittujen menetelmien teoriataustaa ja käytännössä tarkistettiin harjoitustyön toimivuus oppilaitoksessa käytössä olevilla

välineillä. Kehitettävän harjoitustyökokonaisuuden aiheeksi valittiin menetelmä, jota kutsutaan subkloonaukseksi. Kyseisen menetelmän valintaan vaikuttivat sen koostuminen useammasta eri molekyylibiologian perusmenetelmästä, jolloin opiskelijat voivat samalla kertaa harjaantua useassa perustekniikassa.

### **3 ANALYYTTISEN MENETELMÄN VALIDOINTI**

Validoinnilla tarkoitetaan menettelyä, jolla osoitetaan analyttisen menetelmän sopivuutta aiottuun käyttötarkoitukseen ja arvioidaan sen suorituskykyä. Validointi liittyy yleensä menetelmän kehitysvaiheeseen, mutta sitä käytetään myös muun muassa laadunvarmistamisen välineenä muutettaessa jotakin menetelmän osa-aluetta. Lisäksi validointia käytetään silloin, kun jo hyväksi havaittua menetelmää alkaa käyttää uusi henkilö tai sen käyttö siirtyy toiseen laboratorioon. (Kemian metrologian opas 2005, 26.)

EURACHEM:in (1998, 52–53) mukaan menetelmän validoinnilla tarkoitetaan menetelmän ominaisuuksien ja rajoitusten osoittamista ja niihin vaikuttavien tekijöiden tunnistamista. EURACHEM määrittelee menetelmän validaatioksi myös prosessin, jossa tarkistetaan menetelmän sopivuus tarkoitukseensa. Validaation tavoitteena onkin kehittää oikeellisia ja luotettavia tuloksia antava menetelmä.

Validoinnin laajuus riippuu siitä, minkälaisia muutoksia mittaumenetelmään on tehty (Kemian metrologian opas 2005, 26). Laboratorion tehtävänä on päättää, mitä menetelmän parametreja tulee määritellä, jotta se voidaan validoida. Tasapainottelu ajankäytön, kustannusten ja menetelmän validoinnin tarpeen kanssa voi joskus olla vaikeaa. Toisaalta menetelmän kehittäminen ja sen validointi voivat olla melko yksinkertaisiakin toimenpiteitä. Näin on esimerkiksi silloin, kun voidaan hyödyntää jo olemassa olevaa menetelmää pienillä muutoksilla. Hyödynnettäessä jotakin olemassa olevaa menetelmää tulee pohtia, onko menetelmän validoinnista saatavilla oleva tieto riittävää ja onko laboratoriossa mahdollista suorittaa kyseessä oleva menetelmä sen vaatimalla tavalla. Tällöin tulee huomioida esimerkiksi henkilökunnan pätevyys ja laitteiden sopivuus. (EURACHEM 1998, 9, 14, 33.)

Validointiprosessin jälkeen on tärkeää dokumentoida kaikki tehdyt toimenpiteet, jotta menetelmä voidaan yksiselitteisesti toteuttaa uudelleen (EURACHEM 1998, 37). Validoinnista laaditaan raportti, josta käy ilmi työn tavoite, toteutus, mittauksiin käytetyt laitteet ja materiaalit. Raportin sisältöön vaikuttaa tehdyn validoinnin laajuus. Yhteenvedossa on hyvä todeta, täyttääkö menetelmä sille asetetut vaatimukset ja soveltuuko se aiottuun käyttötarkoitukseen. (Kemian metrologian opas 2005, 38.) Validoinnin dokumentista tulisi ilmetä menetelmän toistamiseen tarvittavat tiedot siinä järjestyksessä, kun niitä työskentelyssä tarvitaan. Raportin tulisi olla ymmärrettävä myös sellaiselle asiantuntevalle henkilölle, joka ei ole osallistunut validointiprosessiin. Toisaalta laboratorion oman menetelmän dokumentointi voidaan tehdä myös vapaammin siten, että se on informatiivinen ja helppokäyttöinen. (EURACHEM 1998, 38.)

Tässä opinnäytetyössä haluttiin tarkistaa harjoitustyön aiheeksi valitun menetelmän toimivuus Savonia-ammattikorkeakoulun Sairaalakadun kampuksen laboratoriotiloissa käytössä olevilla välineillä. Kyseessä oli siis jo olemassa olevan menetelmän testaaminen uudessa ympäristössä. Opinnäytetyön kokeellisella osuudella eli harjoitustyön testaamisella haluttiin varmistaa myös sen sopivuus bioanalyttikko-opiskelijoiden molekyylibiologian ja geeniteknologian syventävän vaiheen harjoitustyöksi. Validoinnin raporttina toimii opinnäytetyön kokeellisen osuuden pohjalta luotu työohje harjoitustyökokonaisuuden suorittamiseksi. Myös opinnäytetyön kirjallisessa osuudessa kuvataan validoinnin suorittamista, sen onnistumista ja menetelmään tehtyjä muutoksia.

#### **4 TYÖOHJE OPPIMATERIAALINA**

Oppimateriaali on väline oppimisen edistämiseksi. Oppimateriaaliksi voidaan käsittää kaikki se tieto, jota oppija käyttää oppimisprosessin aikana. Jako perinteisiin oppimateriaaleihin, kuten oppikirjoihin, ja opetuksen apuvälineisiin ei olekaan enää aivan yksiselitteinen. (Vainionpää 2006, 81, 99.) Oppimateriaalia voidaan käyttää opetuksen korvaamiseen tai täydentämiseen. Täydentävänä oppimateriaalimuotona voidaan pitää muun muassa kirjallisia ohjeita, joiden avulla pyritään tukemaan opiskelijoiden itsenäistä etenemistä esimerkiksi laboratorio-opetuksessa. (Kuittinen 1994, 74, 85). Näin ollen tässä



opinnäytetyössä tuotoksena syntyvää työohjetta voidaan perustellusti pitää oppimateriaalina.

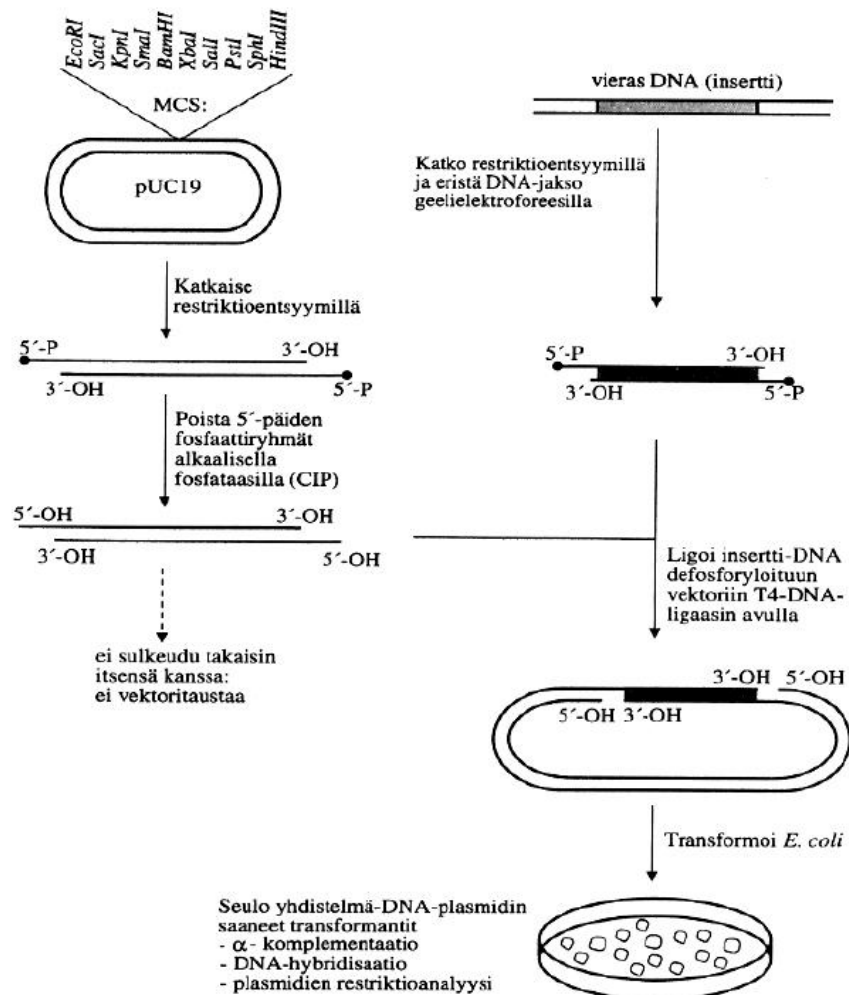
Oppimateriaalia suunniteltaessa olisi hyvä pohtia, mihin oppimateriaalilla pyritään ja kenelle se on suunnattu. Lisäksi tulee varmistaa, että oppimateriaali sisältää kaiken oleellisen tiedon ja on riittävän havainnollistava. (Oppimateriaalin kehittäminen). Oppimateriaalin arvioinnissa voidaan hyödyntää erilaisia kriteereitä, joihin kuuluvat esimerkiksi ajankohtaisuus, luotettavuus, käytettävyys sekä yksilöllisen etenemisen ja aktiivisen oppimisprosessin mahdollistaminen (Vainionpää 2006, 193).

Tämä opinnäytetyön tuotoksena oli työohje molekyylibiologian ja geeniteknologian harjoitustyön toteuttamista varten. Työohje koottiin harjoitustyön menetelmän periaatteiden mukaisesti, ja siitä oli tarkoitus tehdä selkeä ja yksinkertainen toimintaohje harjoitustyön suorittamiseksi. Työohjeella haluttiin pyrkiä myös kannustamaan itsenäiseen opiskeluun syvällisemmän oppimisen saavuttamiseksi ja kokonaisuuden hahmottamiseksi. Ohjeeseen haluttiinkin liittää mukaan kysymyksiä, joiden avulla opiskelijoiden huomio saadaan kohdistettua tärkeisiin asioihin ja kannustetaan heitä ajattelemaan (Kuittinen 1994, 85). Näin opiskelijaa saadaan aktivoitua harjoitustyön suorituksen aikana.

## **5 SUBKLOONAUKSEN TEORIAA**

Tässä opinnäytetyössä muodostuvan bioanalyttikko-opiskelijoiden syventävän vaiheen molekyylibiologian ja geeniteknologian harjoitustyökokonaisuuden menetelmällinen periaate perustuu Yhdistelmä-DNA-tekniikan perusteet -teokseen, jossa kuvataan työvaiheiden teoriataustaa vaihe vaiheelta. Yhdistelmä-DNA-tekniikan perusteet -teokseen liittyy myös Internet-materiaali, johon sisältyy valmiita työohjeita erilaisiin käytössä oleviin menetelmiin. Lisäksi Itä-Suomen yliopiston molekyylibiologia ja geeniteknologian opintojaksoon on kuulunut vastaavanlainen harjoitustyö, johon liittyvää materiaalia soveltavan biotekniikan yksikön yliassistentti Maria Halmekytö on ystävällisesti antanut hyödyntää tämän opinnäytetyön teossa. Edellä mainittuja lähteitä on siis käytetty apuna tämän opinnäytetyön harjoitustyökokonaisuuden luomisessa.

Harjoitustyön menetelmä on nimeltään subkloonaus. Siinä on tarkoituksena liittää eristettyyn plasmidi-DNA:han vieraasta DNA:sta peräisin oleva DNA-juoste eli insertti restriktioentsyymikäsittelyn avulla. Syntynyt yhdistelmäplasmidi transformoidaan tämän jälkeen *E. coli* -bakteeriin, jonka replikaatiokoneiston avulla yhdistelmäplasmidia monistetaan. Monistuksen tarkoituksena on tuottaa yhdistelmäplasmidia niin paljon, että se voidaan eristää bakteerista ja sen jälkeen restriktioentsyymianalyysillä tarkistaa insertin siirtyminen yhdistelmäplasmidiin ja transformaation onnistuminen. Seuraavassa on käsitelty työn vaiheiden (kuva 1) mukaisesti menetelmän teoreettista taustaa. Menetelmään liittyviä termejä on puolestaan koottu sanastoon, joka on esitetty liitteessä 1.



Kuva 1. Subkloonauksen periaate (Suominen & Ollikka 1997, 82).

## 5.1 Plasmidi- ja insertti-DNA

Plasmidit ovat erityisesti bakteereilla esiintyviä pieniä kaksijuosteisia rengasmaisia molekyyliä, jotka monistuvat itsenäisesti. Plasmidiin on mahdollista liittää vierasta DNA:ta, jota voidaan monistaa plasmidin mukana. Myös kokonaisia plasmideja on mahdollista eristää ja siirtää toisiin isäntäsoluihin. Menetelmissä, joissa plasmidien avulla siirretään DNA:ta toisiin eliöihin, voidaan plasmidista käyttää myös nimitystä vektori. (Lodish ym. 2000, 209; Suominen & Ollikka 1997, 47.)

Hyvältä vektoriplasmidilta vaaditaan monia ominaisuuksia. Vektoriplasmidissa täytyy olla sopiva replikaation eli DNA kahdentumisen aloituskohta, jotta se pystyy monistumaan halutussa isäntäsolussa. Näin ollen mikä tahansa vektori, joka sisältää replikaation aloituskohdan esimerkiksi *E. coli* -bakteerissa, replikoituu siellä. Replikoituminen tapahtuu, vaikka vektoriin olisikin liitetty ulkopuolista DNA:ta. (Rapley 2000, 79.) Plasmidissa tulee kuitenkin olla paikka ja riittävästi tilaa tutkittavalle DNA-juosteelle eli insertille. Plasmidin rakenteessa täytyy olla myös jokin selektiivinen osa, kuten antibioottiresistenttisygeeni, jotta plasmidin sisältävät bakteerisolut voidaan erottaa sellaisista bakteereista, joissa kyseessä olevaa plasmidia ei ole (Lodish ym. 2000, 209).

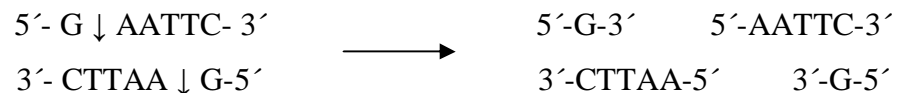
DNA:sta, jota yhdistelmätekniikalla halutaan tutkia, käytetään nimitystä insertti. Insertti-DNA on siis DNA-juosteen osa, joka halutaan liittää bakteerisolun vektoriplasmidiin ja jota halutaan tuottaa. Insertti-DNA voidaan eristää esimerkiksi veri-, kudosta tai soluviljelynäytteestä. Eristetty DNA voidaan pilkkoa entsyymien avulla ja syntyneet pilkkoutumistuotteet voidaan erotella esimerkiksi agarosigeelielektroforeesin avulla. (Suominen & Ollikka 1997, 47, 71.) Agarosigeeliltä voidaan tämän jälkeen eristää haluttu insertti.

## 5.2 Restriktioentsyymit

Yhdistelmä-DNA-tekniikan keskeisiä työkaluja on restriktioentsyymien käyttö. Restriktioentsyymit ovat rajaavia endonukleaaseja, jotka tunnistavat DNA:ssa spesifisiä sekvenssejä ja katkaisevat kaksoiskierteen tästä kohdasta. Entsyymien tunnistama kohta on

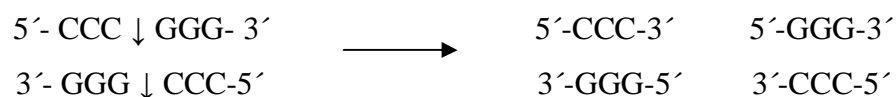
yleensä 4–8 nukleotidiparin mittainen. Restriktioentsyymien avulla DNA-juoste voidaan pilkkoa hallitusti halutusta kohtaa. Tätä DNA:n pilkkomista kutsutaan myös digestioksi. Oleellista restriktioentsyymien käytössä on se, että katkaisukohtaan jää aina kaksoiskierteen 5'-päähän vapaa fosfaattiryhmä ja 3'-päähän vapaa hydroksyyli-ryhmä. Tämä mahdollistaa sen, että juosteet voidaan liittää takaisin yhteen DNA-ligaasi-entsyymillä, joka muodostaa sidoksen päiden välille. (Niemi ym. 1994, 145; Suominen & Ollikka 1997, 47, 68–71.) Kaksoisdigestiossa DNA pilkotaan samanaikaisesti kahdella eri restriktioentsyymillä. Tällöin DNA:han syntyy kaksi erilaista päätä, jotka eivät pysty itsestään liittymään yhteen. (Suominen & Ollikka 1997, 59–60.)

Erilaiset restriktioentsyymit pilkkovat DNA-juostetta eri tavoilla. Digestiossa DNA:n pilkkoutuvaan päähän voi syntyä kahden tyyppisiä päitä, niin sanottuja kohessiivisiä tai tylppiä päitä. Kohessiivisesti pilkkovat restriktioentsyymit katkaisevat vastakkaiset DNA-juosteet eri kohdista. Näin katkaisukohtaan syntyy yleensä muutaman nukleotidin mittaiset yksijuosteiset alueet, joiden emäsjärjestys on komplementaarinen. (Suominen & Ollikka 1997, 68; Rapley 2000, 68.) Kuvassa 2 on esitetty kaavakuvana *EcoRI*-restriktioentsyymin digestio, jossa syntyvät DNA-juosteen päät ovat kohessiivisiä.



Kuva 2. *EcoRI*-entsyymin aikaansaama digestio.

Tylppä pää syntyy puolestaan silloin, kun restriktioentsyymin katkaisukohta on DNA-juosteessa niin, että juoste katkeaa suoraan keskeltä, eikä yksijuosteisia alueita synny (Suominen & Ollikka 1997, 68; Rapley 2000, 68). Esimerkiksi *SmaI*-restriktioentsyymi tuottaa tämän tyyppisiä päitä katkaisukohtaansa. Kuvassa 3 on esitetty *SmaI*-entsyymin digestio kaavakuvana.



Kuva 3. *SmaI*-entsyymien aikaansaama digestio.

Restriktioentsyymit ovat nykypäivänä kaupallisia tuotteita. Entsyymien aktiivisuus ilmoitetaan yleensä kansainvälisenä aktiivisuusyksikkönä (*Unit*) eli U. 1 U entsyymiä katkaisee 1 µg DNA:ta tunnissa ilmoitetuissa reaktio-olosuhteissa. Yleensä restriktioentsyymeillä tehtävissä digestioissa käytetään 1–5 U entsyymiä 1 µg DNA:ta kohden, jotta kaikki DNA pilkkoutuu täydellisesti. Kuhunkin analyysiin käytettävän entsyymien määrään vaikuttaa muun muassa DNA:n puhtaus ja entsyymien tunnistuskohtien lukumäärä. Oleellinen tekijä on myös käytettävän restriktioentsyymien hinta. (Suominen & Ollikka 1997, 71.)

### 5.3 Vektorin ja insertin digestio

Plasmidi-DNA voidaan pilkkoa eli digestoida sellaisilla restriktioentsyymeillä, joiden katkaisukohta on kyseessä olevan plasmidin rakenteessa. Restriktioentsyymien käyttöön perustuvaa menetelmää suunniteltaessa onkin valittava käytettävä plasmidi ja restriktioentsyymit niin, että digestio voidaan suorittaa halutulla tavalla. Oleellista vektori-plasmidin DNA:ta muokatessa on, että digestiossa linearisoitunut vektori käsitellään siten, että se ei pysty muuttumaan uudestaan itsestään rengasrakenteiseksi eli itseligoitumaan. Tämä voidaan toteuttaa esimerkiksi fosfaatasientsyymillä, jolloin lineaarisen vektorin 5'-päästä poistuu fosfaattiryhmä. Näin lineaarisen vektorin päät eivät voi enää liittyä yhteen fosfodiesterisidoksella. (Niemi ym. 1994, 147.) Toisaalta, jos plasmidin pilkkomisessa käytetään kaksoisdigestiota eli pilkotaan plasmidi samanaikaisesti kahdella eri restriktioentsyymillä, ei fosfaattiryhmää tarvitse poistaa, sillä digestiossa syntyvät erilaiset juosteiden päät eivät voi liittyä toisiinsa (Suominen & Ollikka 1997, 59–60). Tällöin plasmidin digestiossa syntynyt restriktioentsyymien katkaisukohtien välinen alue tulee kuitenkin poistaa, jotta plasmidi ei voi spontaanisti uudelleen sirkularisoitua eli muuttua rengasrakenteiseksi.

Kaksoisdigestion suunnittelu tulee tehdä huolellisesti, sillä valittujen entsyymien täytyy toimia samanlaisissa reaktio-olosuhteissa ja esimerkiksi olla aktiivisia samassa reaktiopuskurissa. Monien restriktioentsyymejä tarjoavien yritysten sivuilla on ohjelmia, joilla kaksoisdigestion olosuhteita ja entsyymejä voidaan tarkastella. Esimerkiksi New England Biolabsin sivuilta ([www.neb.com](http://www.neb.com)) löytyy *double digest finder* -palvelu, jota hyödynnettiin myös tässä opinnäytetyössä käytetyn kaksoisdigestion suunnittelussa.

Digestion jälkeen tulee tarkistaa, onko pilkkoutuminen onnistunut halutulla tavalla. Digestion onnistuminen voidaan tarkistaa agarosigeelielektroforeesin eli AGE:n avulla. Vektorin lineaarisuuden tarkistaminen perustuu rengasrakenteisen ja lineaarisen rakenteen erilaiseen kulkeutumiseen sähkövirrassa geelillä. Plasmidit esiintyvät soluissa tavallisesti tiiviinä superkierteisenä rakenteena. Tiiviin rakenteensa ansiosta superkierteinen plasmidi kulkeutuu helposti agarosigeelin huokosissa. Superkierteinen rakenne voi kuitenkin avautua käsittelyiden vaikutuksesta ja muuttua niin sanotuksi avoimeksi renkaaksi. Tällöin sen kulkeutuminen geelillä hidastuu merkittävästi. Linearisoitu plasmidi pääsee puolestaan kulkeutumaan geelissä nopeammin kuin avoin rengas, mutta kuitenkin hitaammin kuin superkierteinen muoto. (Suominen & Ollikka 1997, 75–76.) Kun AGE:ssa käytetään molekyylipainomarkkeria, joka kertoo erottuneiden vyöhykkeiden koot, ja kontrollina lineaarista ja sirkulaarista vektoria, voidaan ajon jälkeen geeliltä havaita, onko linearisointi onnistunut. Myös insertin linearisoituminen ja oikea koko voidaan tarkistaa AGE:n avulla. Tällöin insertti saadaan myös eristettyä geeliltä jatkokäsittelyä varten.

AGE:ssa geelille kulkeutunut DNA täytyy visualisoida, jotta se voidaan havaita geeliltä. Visualisoinnissa voidaan hyödyntää radioaktiivisia leimoja, mutta huomattavasti yleisempää on käyttää etidumbromidivärjäystä. Etidium pystyy tunkeutumaan DNA:n emästen väliin ja saa aikaan fluoresenssia UV-valossa, jolloin DNA:han liittynyt etidium voidaan havaita geeliltä oranssinpunaisena. Visualisointi voidaan toteuttaa lisäämällä etidumbromidi geeliin jo valamisvaiheessa tai värjäämällä geeli vasta AGE:n jälkeen. Fluoresenssin aikaansaamisessa käytettävä UV-valo on lyhyt aaltoista ja siten haitallista, joten visualisoinnissa täytyy käyttää sopivia suojavarusteita, kuten suojalaseja ja työtakkia. Etidumbromidin kyky vuorovaikuttaa DNA:n kanssa tekee siitä puolestaan mutageenisen aineen, jonka käsittelyyn ja hävittämiseen tulee kiinnittää erityistä huomiota. (Lodish ym. 2000, 229; Suominen & Ollikka 1997, 72, 74.)

## 5.4 Vektorin ja insertin ligaatio

Periaatteessa mitkä tahansa kaksi samoilla restriktioentsyymeillä kohessiivisesti digestoitua DNA-tuotetta voidaan liittää kovalenttisesti yhteen DNA-ligaasin avulla (Rapley 2000, 69). Ligaatiossa DNA-ligaasi-entsyymi muodostaa DNA-juosteiden päiden välille fosfodiesterisidoksen, joka liittää juosteet yhteen. Usein käytetään T4-DNA-ligaasia, jota voidaan tuottaa *E. coli* -bakteerissa. T4-DNA-ligaasi tarvitsee kuitenkin tehokkaasti toimiakseen reaktioseokseen adensiinitrifosfaattia eli ATP:tä energiaksi,  $Mg^{2+}$ -ioneita sekä pelkistävät olosuhteet. (Suominen & Ollikka 1997, 77–78.) Ligaatio on mahdollista aina myös purkaa pilkkomalla DNA samoilla restriktioentsyymeillä, joilla digestio on alun perin suoritettu (Rapley 2000, 70).

Ligaatiossa tulee käyttää mahdollisimman optimaalista insertin ja vektorin suhdetta. Onnistuneeseen ligaatioon tarvitaan yleensä kahdesta neljään moolia insertin DNA-ketjun päitä yhtä moolia vektorin DNA-ketjun päitä kohden. Suhde kuitenkin vaihtelee liitettävien DNA-ketjujen ominaisuuksien ja koon mukaan. Ligaation tehokkuus riippuu insertti-vektori-suhteen lisäksi reaktiossa käytettävästä lämpötilasta ja siitä, minkälaiset päät yhteenliitettävissä DNA-juosteissa on. Ligaatio on yleensä huomattavasti tehokkaampaa liitettäessä kohessiivisesti pilkottuja päitä toisiinsa verrattuna tylppien päiden liittämiseen. Tylppien päiden ligaatiossa tuleekin reaktiotilavuutta pienentää ja ligaasin määrää lisätä, jotta reaktion tehokkuus saadaan paremmaksi. (Suominen & Ollikka 1996.) Yleensä ligaatio toteutetaan inkuboimalla 1–16 tuntia +16 °C:ssa. Huoneenlämmössä ligaatio tapahtuu yleensä nopeammin, jopa tunnissa liitettäessä kohessiivisesti pilkottuja DNA-juosteita toisiinsa. (Bowen, Austgen & Rouge 1999.)

Onnistuneen ligaation jälkeen syntyneen uuden rengasrakenteisen plasmidin muodostavat alkuperäinen vektori ja insertti. Tätä rakennetta kutsutaan yhdistelmä-DNA-plasmidiksi. (Suominen & Ollikka 1997, 47–48.) Koska vektorista on puhdistettu pois kaksoisdigestiossa syntynyt DNA-pala eikä vektorin näin ollen pitäisi pystyä sirkularisoitumaan, ainoa rengasrakenteinen plasmidi, joka reaktion jälkeen näytteessä on, pitäisi olla uusi yhdistelmä-DNA-plasmidi. On kuitenkin mahdollista, että reaktiossa syntyy myös muita rakenteita, sillä DNA-ligaasi liittää juosteita toisiinsa sattumanvaraisesti (Suominen & Ollikka 1997, 48). Insertin ja vektorin ligaation jälkeen

täytyykin varmistaa, että on todella saatu luotua uusi haluttu yhdistelmä-DNA-plasmidi. Tämä voidaan tehdä transformoimalla saatu ligaatiotuote bakteerisoluun ja seulomalla yhdistelmä-DNA-plasmidin sisältävät solut.

## **5.5 Bakteerisolujen transformaatio ja seulonta**

### **5.5.1 Transformaatio**

Bakteerit lisääntyvät suvuttomasti, joten niiden geeniaines pysyy pääosin muuttumattomana lisääntymisen aikana. Geenimateriaalin vaihtuminen on kuitenkin mahdollista esimerkiksi transformaation avulla. Siinä bakteeri ottaa sisäänsä DNA:ta ympäristöstään ja ilmentää sitä. Transformaatio voidaan saada aikaan myös laboratorio-olosuhteissa. (Niemi ym. 1994, 143; Lodish ym. 2000, 210.) Transformaatiossa voidaan siis siirtää rengasrakenteista DNA:ta, kuten plasmideja, bakteerisoluun. Transformaatio ei ole kovinkaan tehokas geneettisen materiaalin siirtomenetelmä, mutta sen avulla pystytään usein saavuttamaan kuitenkin riittävä transformaatiotehokkuus (Suominen & Ollikka 1997, 83). Kun DNA:ta halutaan siirtää eläinsoluihin, puhutaan transformaation sijasta transfektiosta (Solubiologia 2006).

Transformoitavien solujen on oltava kompetenteja eli kykeneviä ottamaan vierasta DNA:ta sisäänsä. Kompetenttien solujen solukalvo muuttuu läpäisevämmäksi suolakäsittelyn ja nopean lämpöshokin vaikutuksesta. Kompetenttien solujen valmistuksessa voidaan käyttää  $\text{CaCl}_2$ -käsittelyä. Siinä kasvatetut solut jäähdytetään ja käsitellään kylmällä  $\text{CaCl}_2$ -liuoksella. Varovaisen käsittelyn ja alle  $+4\text{ }^\circ\text{C}$ :een lämpötilan avulla solukalvon läpäisevyys lisääntyy, mutta solut pysyvät edelleen elävinä ja ne muuttuvat kompetenteiksi. Kompetentteja soluja voidaan tämän jälkeen säilyttää  $-70\text{ }^\circ\text{C}$ :ssa glyserolissa. (Suominen & Ollikka 1997, 83–84.) Kompetentteja soluja voidaan ostaa myös valmiina kaupallisina tuotteina monilta valmistajilta. Käytettäessä kaupallisia tuotteita solut ovat yleensä tasalaatuisempia kuin itse valmistetut solut ja niiden transformaatiotehokkuus voi olla parempi.

Transformaatio voidaan toteuttaa laboratorio-olosuhteissa usealla eri tavalla, kuten elektroporaatiolla, mikroinjektiolla tai passiivisesti. Elektroporaatiossa vastaanottavan



solun solukalvoon luodaan reikiä sähkökentän avulla, jolloin DNA pääsee niiden kautta soluun. Mikroinjektiossa DNA viedään solun sisään pienellä ruiskulla, kun taas passiivisessa transformaatioissa bakteerin annetaan itse ottaa vapaa DNA sisäänsä. (Solubiologia 2006.) Passiivinen transformaatio on näistä transformaationmuodoista yksinkertaisin toteuttaa. Siinä kompetenttien solujen annetaan inkuboitua transformoitavan DNA:n kanssa jäähauteella. Tämän jälkeen soluille annetaan niin sanottu lämpöshokki eli inkuboidaan niitä +42 °C lämpötilassa hetki, tyypillisesti 30–90 sekuntia. Lämpöshokin aikana DNA siirtyy bakteerisolujen sisään. Transformaation jälkeen soluille lisätään kasvatusmediumia ja niiden annetaan kasvaa. (Suominen & Ollikka 1997, 84.) Kaupallisia kompetentteja soluja käytettäessä on kuitenkin aina hyvä noudattaa valmistajan ohjeita transformaation toteuttamisessa.

### 5.5.2 Bakteerisolujen seulonta

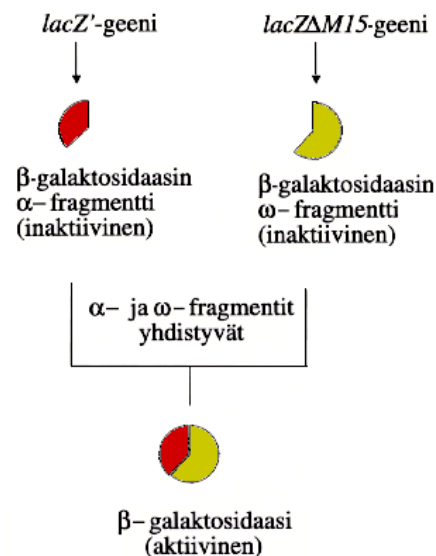
Transformaation jälkeen täytyy erottaa ne bakteerit, jotka ovat ottaneet sisälleen halutun yhdistelmä-DNA-plasmidin. Tässä vaiheessa hyödynnetään vektoriplasmidin sisältämää selektiivistä osaa. Selektiivisenä osana käytetään usein jotakin geeniä, joka saa aikaan antibioottiresistenssin. Transformoitujen solujen annetaan yleensä inkuboitua jonkin aikaan transformaation jälkeen, jotta yhdistelmäplasmidi ja sen mukana antibioottiresistenttisyysgeeni ilmentyvät solussa. Kun tämän jälkeen soluja kasvatetaan antibioottia sisältävässä mediumissa, vain ne bakteerisolut, jotka ovat antibiootille resistenttejä, pystyvät kasvamaan ja lisääntymään. (Rapley 2000, 82.)

Yksi usein käytetty selektiivinen osa vektoriplasmideissa on ampicilliiniresistenttien tuottava geeni. Tämä geeni, *amp<sup>r</sup>*, saa bakteerissa aikaan  $\beta$ -laktamaasin tuoton, mikä inaktivoi kasvatusmediumissa olevan ampicilliinin. Näin ollen ampicilliinia sisältävässä mediumissa kasvaa vain bakteereja, jotka ovat resistenttejä ampicilliinille eli ilmentävät *amp<sup>r</sup>*-geeniä ja siten sisältävät vektorin. (Lodish ym. 2000, 210.) Tällä tavalla ei kuitenkaan voida vielä varmistaa sitä, ilmentyykö insertti bakteereissa vai onko niihin siirtynyt ainoastaan vektori (Rapley 2000, 82).

Jotta insertin sisältävät bakteerisolut voitaisiin erottaa muista bakteerisoluista transformaation jälkeen, tarvitaan vielä jokin seulontamenetelmä. Yksi yleisistä

seulontamenetelmistä on niin sanottu  $\alpha$ -komplementaatio, joka perustuu *lac*-operonin toimintaan. *Lac*-operoni on bakteerisolun laktoosimetaboliaa säätelevä geenialue, joka koostuu kolmesta rakennegeenistä: *lacZ*, *lacY* ja *lacA*. Näistä *lacZ*-geeni koodittaa  $\beta$ -galaktosidaasia, joka puolestaan koostuu kahdesta osasta,  $\alpha$ - ja  $\omega$ -fragmenteista.  $\beta$ -galaktosidaasin tehtävänä bakteerisolussa on pilkkoa laktoosia galaktoosiksi ja glukoosiksi, jolloin vapautuu energiaa solun käyttöön. (King 2009; Suominen & Ollikka 1996).

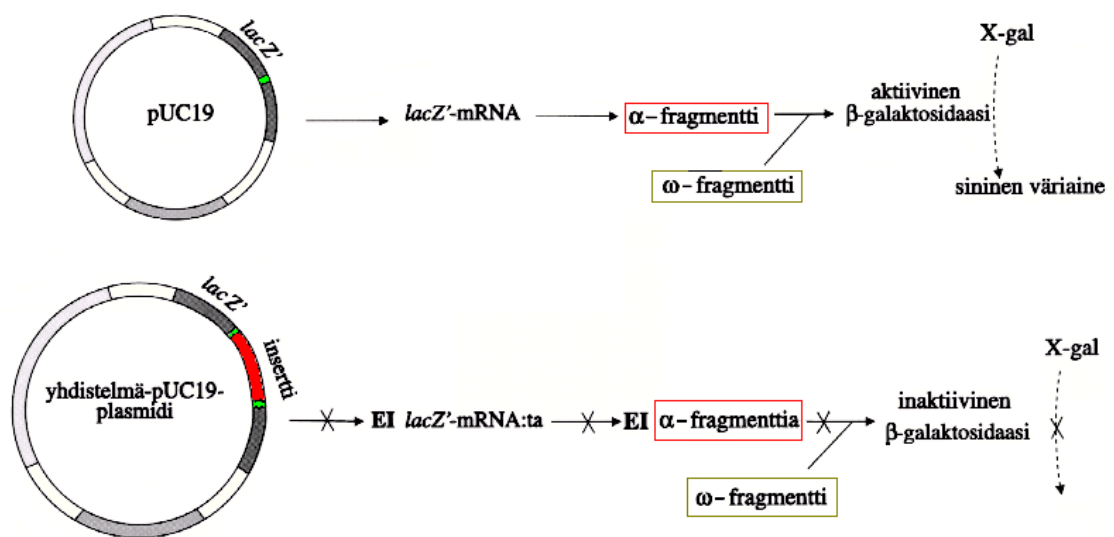
$\beta$ -galaktosidaasin aminoterminaalista päätä koodittaa *lacZ'*-geeni, joka muodostaa entsyymien  $\alpha$ -fragmentin.  $\beta$ -galaktosidaasin  $\omega$ -fragmenttia eli karboksiterminaalista päätä koodittaa puolestaan *lacZ $\Delta$ M15*-geeni, joka on muokatuissa *E. coli* -bakteerikannoissa sijoitettu erilliseen plasmidiin eli niin sanottuun F'-tekijään. Kun *lacZ'*-geenin ja *lacZ $\Delta$ M15*-geenin koodittamat fragmentit liittyvät yhteen, muodostuu aktiivinen  $\beta$ -galaktosidaasi, joka voi pilkkoa laktoosia ja sen analogeja. (Suominen & Ollikka 1996.) Kuvassa 4 on esitetty aktiivisen  $\beta$ -galaktosidaasin syntyminen.



Kuva 4. Aktiivisen  $\beta$ -galaktosidaasin muodostuminen. (mukailtu Suominen & Ollikka 1996)

Transformaation jälkeinen seulonta perustuu X-galin (5-bromo-4-kloro-3-indolyyli-D-galaktopyranosidi) käyttöön. X-gal on laktoosianalogi eli käyttäytyy bakteerisolussa laktoosin tavoin, mutta sen hajoamistuote on sininen. Näin ollen, kun aktiivinen  $\beta$ -galaktosidaasi pilkkaa solussa X-galia laktoosin sijaan, syntyy sininen väri, joka värjää

bakteeripesäkkeen. (Suominen & Ollikka, 1996.) Kun *lacZ*'-geeni on asetettu vektorina käytettyyn plasmidiin siten, että restriktioentsyymien katkaisukohta jää geenin keskelle, säätelee insertin liittyminen vektoriin  $\beta$ -galaktosidaasin  $\alpha$ -fragmentin muodostumista. Tämä puolestaan määrää sen, pystyykö bakteerisoluhajottamaan maljalla olevaa X-galia synnyttäen sinisen värin. Onnistuneen transformaation jälkeen bakteerien kasvualustana olevalla maljalla tulisi siis kasvaa vaaleita pesäkkeitä, jotka sisältävät insertin ja sinertäviä pesäkkeitä, joissa inserttiä ei ole.  $\alpha$ -komplementaatiota ja sinisen värin muodostumista on havainnollistettu kuvassa 5.



Kuva 5. Insertin läsnäolon vaikutus X-galin pilkkoutumiseen siniseksi hajoamistuotteeksi. (mukailtu Suominen & Ollikka 1996)

Bakteerisolut säätelevät itse *lac*-operonin toimintaa elinolosuhteista riippuen. Sääteily tapahtuu *lacI*-geenin avulla. Kun bakteerilla on käytettävänä glukoosia energian tuottoon, sen ei tarvitse pilkkoa laktoosia saadakseen energiaa. Tällöin *lac*-operonin alueelle sitoutuu *lacI*-geenin tuottama repressoriproteiini, joka estää *lacZ*-geenin transkription ja siten aktiivisen  $\beta$ -galaktosidaasin tuoton. Indusori on puolestaan tekijä, joka sitoutuu *lacI*-geenin tuottamaan repressorin estäen sen sitoutumisen *lac*-operoniin. Näin *lacZ*-geenin transkriptio voi edetä ja tuottaa aktiivisen  $\beta$ -galaktosidaasin. (King 2009.) Laktoosi voi toimia *lacZ*-geenin indusorina, mutta geeni voidaan pitää aktiivisena

myös synteettisellä IPTG:lla (isopropyylitiogalaktosidi). IPTG:a lisätään transformoitujen bakteerien kasvatusalustalle, jolloin *lacZ*-geenin aktiivisuus säilyy ja insertin sisältävien solujen seulonta on mahdollista.

## 5.6 Bakteerisolujen kasvattaminen

Bakteerit tarvitsevat kasvaakseen ja lisääntyäkseen sopivan mediumin eli kasvatusliuoksen. Mediumin tulee sisältää glukoosia, jonka pilkkomisesta solut saavat energiaksi tarvitsemaansa ATP:tä. Jotta solut voivat tuottaa aminohappoja ja muita tyyppiä sisältäviä aineita, mediumissa on oltava esimerkiksi ammoniumia. Myös erilaiset suolat ja hivenaineet ovat tärkeitä solujen kasvamiselle. (Lodish ym. 2000, 181.)

Monet bakteerit kasvavat hyvin agarmaljalla. Agar on levästä eristetty polysakkaridiseos, joka liukenee lämmitettäessä mediumiin, mutta muuttuu kiinteäksi jäähtyessään esimerkiksi petrimaljalle. Kun bakteerit maljataan agarille eli bakteerisuspensioita levitetään ohuelti maljan pinnalle, ne alkavat kasvaa agarin pinnalla muodostaen pesäkkeitä. Koska bakteeri on yksisolainen organismi, jokainen pesäke muodostuu vain yhden tyyppisistä soluista. Niitä voidaan kutsua myös klooneiksi, sillä jokainen pesäkkeen solu on geneettisesti samanlainen. (Lodish ym. 2000, 181.) Bakteerisoluja voidaan kasvattaa kiinteän alustan lisäksi nesteessä. Nestekasvatukseen voidaan siirrostaa maljalla kasvava pesäke eli yksi bakteeriklooni ja tuottaa kyseistä kloonin jatkokäsittelyitä varten.

Koska bakteerit jakautuvat nopeasti, esimerkiksi *E. coli* noin 30 min välein, voidaan lyhyessä ajassa bakteerien lukumäärä moninkertaistua. Kun jokaisessa jakaantumisessa myös bakteerisolun transformoitu plasmidi ja sen mukana insertti kahdentuu, voidaan haluttua DNA-jaksoa helposti monistaa solujen mukana. (Lodish ym. 2000, 181, 211.)

## 5.7 Restriktioentsyymianalyysi

Restriktioentsyymianalyysillä voidaan tutkia luotua yhdistelmä-DNA-plasmidia. Transformaation ja bakteerisolujen kasvatuksen jälkeen on tärkeää tarkistaa, ovatko yhdistelmä-DNA-plasmidin luominen, transformatio ja seulonta onnistuneet ja onko

todella saatu monistettua haluttua inserttiä. Tämä voidaan toteuttaa eristämällä bakteerisolusta plasmidi-DNA ja käsittelemällä se samoilla restriktioentsyymeillä kuin aikaisemminkin. Tällöin yhdistelmä-DNA-plasmidin tulisi digestoitua jälleen alkuperäiseksi vektoriksi ja insertiksi. Erottelemalla saadut digestiotuotteet agarosigeelielektroforeesilla voidaan tarkistaa, onko näytteessä oikean kokoinen insertti-DNA. (Suominen & Ollikka 1997, 50.) Jos restriktioentsyymianalysissä todetaan näytteen sisältäneen oikean insertin, voidaan transformaation jälkeisestä bakteerisolujen nestekasvatuksesta jatkaa yhdistelmä-DNA-plasmidin käsittelyä halutulla tavalla. DNA:ta voidaan tuottaa esimerkiksi sekvensointia varten.

## **6 TOIMINNALLISEN OPINNÄYTETYÖN PROSESSI**

Toiminnallinen opinnäytetyö on vaihtoehto niin sanotulle tutkimukselliselle opinnäytetyölle. Se voi olla esimerkiksi ammatilliseen käyttöön suunnattu ohje tai ohjeistus, jolla pyritään opastamaan käytännön toimintaa. Tavoitteena on yhdistää opinnäytetyössä käytännön toteutus ja sen raportointi toisiinsa. Toiminnallisen opinnäytetyön pitäisi olla käytännönläheinen ja mielellään työelämälähtöinen prosessi, jossa opiskelija osoittaa alan tietojen ja taitojen hallintaa. Opinnäytetyön aihe voi löytyä esimerkiksi koulutusohjelman opintosisällöistä ja syventää opiskelijan tietämystä jostakin alan kiinnostavasta aiheesta. (Vilka & Airaksinen 2003, 9, 10, 16.)

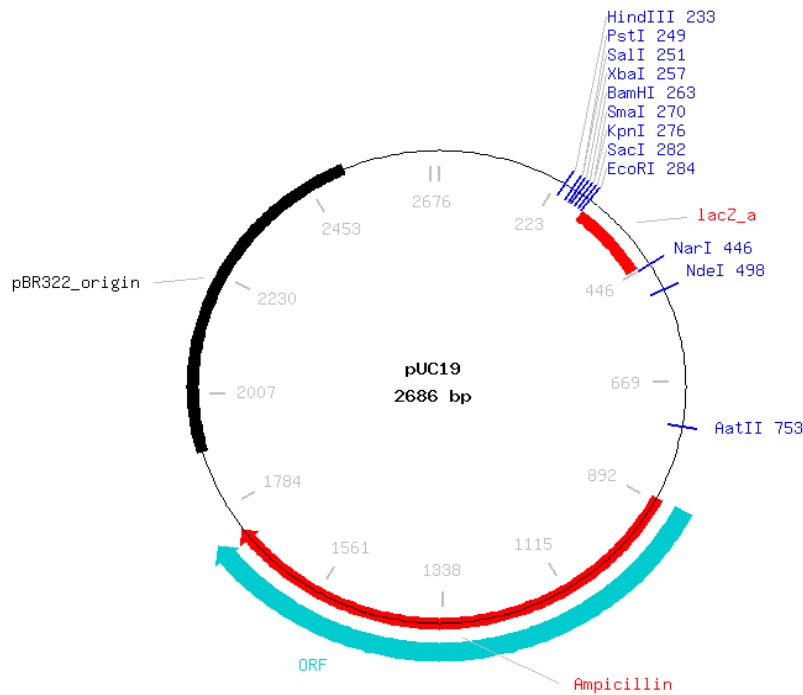
Toiminnallinen opinnäytetyö tai kehittämistehtävä voidaan mieltää projektin kaltaiseksi toiminnaksi. Projektin ominaispiirteitä ovat uuden kehittäminen, kertaluonteinen prosessi, mutta pysyvä lopputulos sekä selkeät tavoitteet, rajat ja aikataulu (Ruuska 2006, 18, 22). Projekti jakautuu yleensä eri vaiheisiin: tarpeen tunnistaminen, suunnittelu- ja aloittamisvaihe, kokeilu- ja toteuttamisvaihe, päättämis- ja vaikuttavuudenarviointivaihe sekä projektin sulauttamisvaihe, jossa projektin lopputulos otetaan käyttöön (Paasivaara, Suhonen & Nikkilä 2008, 103). Nämä kaikki ominaisuudet ja vaiheet toteutuvat myös toiminnallisen opinnäytetyön prosessissa.

## 6.1 Tarpeen tunnistaminen ja suunnitteluvaihe

Tämän opinnäytetyön aiheen valinta ja suunnittelu lähtivät Savonia-ammattikorkeakoulun tarpeesta saada bioanalyttikoiden syventävän vaiheen opintoihin harjoitustyökokonaisuus. Opinnäytteen aihetta ehdotettiin minulle suoraan, sillä aikaisempien opintojeni perusteella minulla on erityistä molekyylibiologian ja geeniteknologian osaamista. Aihe herätti myös ammatillisen kiinnostukseni, sillä pääsisin opinnäytetyötä tehdessä harjoittelemaan käytännössä menetelmien kehittämistä. Harjoitustyön aiheen valinnassa edeltävät opintoni Itä-Suomen yliopistossa osoittautuivat hyödyllisiksi, sillä yliopistossa on aikaisemmin ollut käytössä vastaavan tyyppinen harjoitustyö osana laajempaa opintokokonaisuutta. Niinpä minulla oli jo vankka tietopohja subkloonauksen menetelmällisistä periaatteista.

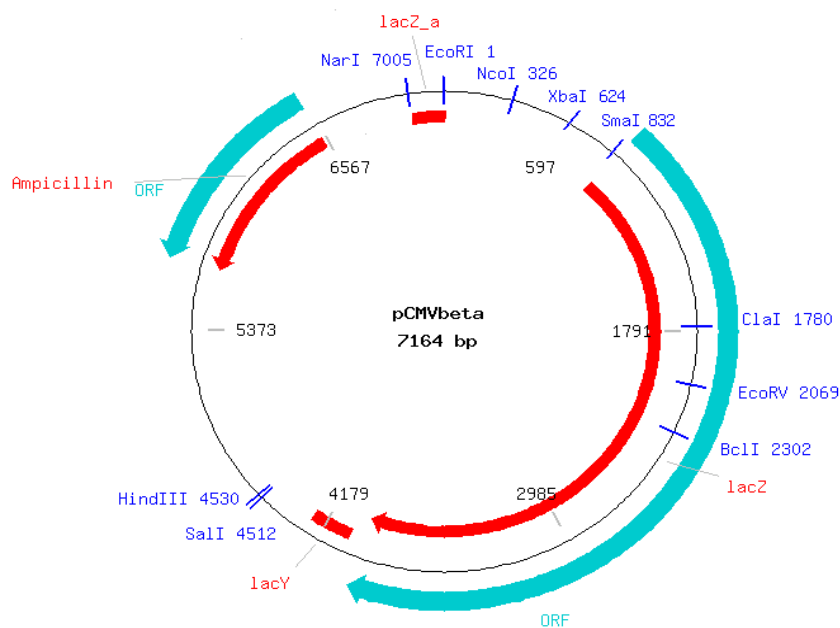
Suunnitteluvaiheessa, joka alkoi keväällä 2009, tutustuttiin menetelmän teoriataustaan ja lähdettiin työstämään opinnäytetyön raportin sisältöä. Samalla hahmoteltiin myös opinnäytetyön ja erityisesti harjoitustyön testaamisen aikataulua. Suunnittelun aikana tehtiin myös harjoitustyön työohjeen runko, jonka pohjalta harjoitustyön testaamista ja tarvittavia reagensseja lähdettiin suunnittelemaan ja tilaamaan. Tässä vaiheessa valittiin myös harjoitustyössä käytettävät vektori, insertti ja restriktioentsyymit.

Harjoitustyöhön valittiin vektoriplasmidiksi pUC19-plasmidi. pUC19 on hyvin yleisesti jo pitkään käytössä ollut vektori, jonka ominaisuuksia myös Suominen ja Ollikka ovat teoksissaan kuvanneet (1996; 1997, 58–60). Kuvassa 6 on esitetty pUC19-vektorin kaavakuva. Siitä nähdään, että pUC19 sisältää ampicilliiniresistenssigeenin (*Ampicillin*) sekä MCS-alueen (*multiple cloning site*). MCS-alue sisältää usean restriktioentsyymien katkaisukohdan, mikä mahdollistaa vektorin pilkkomisen. Kuvasta nähdään myös, että MCS-alue katkaisee *lacZ*-geenin, mikä mahdollistaa bakteerisolujen seulonnan  $\alpha$ -komplementaatiolla.



Kuva 6. pUC19-vektoriplasmidin kaavakuva. (mukailtu Lablife 2010)

Insertin lähteenä käytettiin puolestaan pCMV $\beta$ -plasmidia, jonka kaavakuva on esitetty kuvassa 7. pCMV $\beta$ -plasmidi on alun perin eristetty sytomegaloviruksesta. Tässä harjoitustyössä käytetty pCMV $\beta$ -plasmidi saatiin ystävällisenä lahjoituksena tutkija Johanna Jyrkkärinteeltä Itä-Suomen yliopiston farmasian laitokselta.



Kuva 7. pCMV $\beta$ -plasmidin kaavakuva. (mukailtu Lablife 2010)

Kaksoisdigestio päätettiin toteuttaa *EcoRI*- ja *XbaI*-entsyymeillä. Niillä molemmilla on katkaisukohtat pUC19-vektorin MCS-alueella. *EcoRI*:n ja *XbaI*:n välinen alue pUC-vektorissa on 27 emäsparin (ep) mittainen. Tämä pala täytyi puhdistaa pois, jotta vektorin itseligoituminen voitiin välttää. *EcoRI* ja *XbaI* pilkkovat pCMV $\beta$ -plasmidista 623 ep:n pituisen alueen. *XbaI*-entsyymillä on pCMV $\beta$ -plasmidissa myös toinen katkaisukohta, jonka vuoksi plasmidi hajoaa lisäksi kahteen osaan. Inserttinä käytettävä 623 ep:n pituinen pala voitiin kuitenkin helposti eristää geeliltä, koska palojen kokoero on huomattava (623 ep vs. 3883 ep ja 2658 ep).

## 6.2 Kokeilu- ja toteuttamisvaihe eli harjoitustyön testaus

Harjoitustyökokonaisuuden testaus suoritettiin Savonia-ammattikorkeakoulun laboratoriotiloissa Sairaalakadun kampuksella Kuopiossa. Testauksella haluttiin tarkistaa menetelmän toimivuus oppilaitoksen välineillä, ja sen avulla voitiin myös tehdä tarvittavat muutoksen luonnosteltuun työohjeeseen hyvän kokonaisuuden aikaansaamiseksi. Taulukkoon 1. on koottu harjoitustyön testauksessa käytetyt reagenssit ja niiden valmistajat.

Taulukko 1. Harjoitustyön testauksessa käytetyt reagenssit.

Reagenssi	Pitoisuus	Valmistaja
<i>XbaI</i>	20 000 U/ml	New England Biolabs Inc.
<i>EcoRI</i> -HF <sup>TM</sup>	20 000 U/ml	
pUC19	50 ng/ $\mu$ l	
BSA	10 mg/ml	
NEBuffer 4		
Quick Load DNA Ladder 1 kb		
T4 DNA-ligaasi	20 000 U/ml, 400 000 cohesive end unit / ml	
T4-puskuri		
Da5-competent <i>E. coli</i> (High Efficiency)	50 $\mu$ l	
QIAquick PCR purification		Qiagen
IPTG	100 mM	Roche
X-gal	2 %	



LB-Agar		Sigma
Ampisilliini		
LB-medium		
GenElute™ Plasmid Miniprep		
6 x Gel loading solution		
pCMVβ-plasmidi <i>E.coli</i> :ssa		Lahjoitus Johanna Jyrkkärinteeltä
UltraFree® -DA DNA Extraction from agarose gels		Millipore
25 x TAE-puskuri		Amresco
Etidiumbromidi	0,625 mg/ml	
TBE-puskuri		Duchefa Biochemie
Agaroosi		Invitrogen

Testaamisvaiheessa päädyttiin muokkaamaan alkuperäistä aikataulu- ja työvaihesuunnitelmaa. Harjoitustyö oli suunniteltu aloitettavaksi vektorin ja insertin digestiosta. Tämä olisi kuitenkin vaatinut sen, että ennen harjoitustyön aloitusta olisi vektori- ja insertiplasmidia pitänyt tuottaa digestiota varten valmiiksi. Lisäksi valmiiksi tuotettujen vektori- ja insertiplasmidin DNA-pitoisuudet olisi pitänyt pystyä määrittämään, jotta olisi voitu laskea digestioon tarvittava näytemäärä. Testausvaiheessa päädyttiinkin muuttamaan harjoitustyön runkoa siten, että alussa jokainen tuottaa itse tarvitsemansa vektori- ja insertiplasmidit -20 °C:seen säilytyistä kantaliuoksista, joissa plasmidit olivat valmiiksi *E. coli* -bakteerisoluiissa. Koska valmistajan mukaan yhdellä plasmidi-DNA-eristyksellä saadaan 3 ml:sta bakteerisuspensiota korkeintaan 15 µg DNA:ta, voidaan arvioida, että harjoitustyössä tehtävällä eristyksellä saadaan esimerkiksi 10 µg DNA:ta ja arvioida sen perusteella digestioon tarvittavat näytemäärät.

Harjoitustyön testaamisvaiheessa pystyttiin muutoin melko hyvin noudattamaan luotua työohjeen runkoa. Aiottuun ohjeeseen tuli kuitenkin jonkin verran muutoksia testauksen aikana. Esimerkiksi agarosigeelielektroforeesin ajoaika pystyttiin lyhentämään aiotusta 1 h 30 minuutista 60 minuuttiin, sillä sen havaittiin olevan riittävä erottelemaan erikokoiset DNA-palat toisistaan. Hankaluuksia testausvaiheessa tuotti DNA-pitoisuuden määrittäminen, jota ei luotettavasti voida tehdä oppilaitoksessa käytössä olevilla laitteilla. Pitoisuuden arvioimiseksi jouduttiinkin työohjeeseen lisäämään uudeksi työvaiheeksi

DNA-pitoisuuden määrittäminen etidumbromidimaljalta. Siinä valmistetaan etidumbromidia sisältävä agaroosimalja, johon pipetoidaan standardisarja eri DNA-pitoisuuksista (esimerkiksi 100 ng/μl, 50 ng/μl, 25 ng/μl, 10 ng/μl ja 5 ng/μl). Maljalle pipetoidaan lisäksi omat näytteet. Kun pipetoitavien standardien ja näytteiden tilavuus on sama (esimerkiksi 0,5 μl), voidaan näytteiden DNA-pitoisuus määrittää suoraan vertaamalla näytteiden fluoresenssia UV-valossa standardisarjan fluoresenssiin. Tämä menetelmä pystyy kuitenkin antamaan DNA-pitoisuudesta vain suuntaa antavan arvion eikä sillä pystytä määrittämään pieniä pitoisuuksia. Näin ollen, kun harjoitustyö otetaan varsinaiseen käyttöön ja opiskelijoiden väliset mahdolliset huomattavatkin saantoerot otetaan huomioon, pitoisuuden määrittäminen saattaa olla hankalaa. Tällöin eri työvaiheissa käytetyt pitoisuudet voivat poiketa optimaalisen reaktion vaatimista pitoisuuksista, mikä puolestaan saattaa vaikuttaa lopulliseen työn onnistumiseen.

Toinen ongelmia aiheuttanut seikka harjoitustyön testausvaiheessa oli kompetenttien bakteerisolujen säilyttäminen. Kompetentteja bakteerisoluja täytyy valmistajaan mukaan säilyttää -80 °C:n lämpötilassa, jotta niiden transformaatiotehokkuus säilyy hyvänä. Savonia-ammattikorkeakoulun Sairaalakadun kampuksella ei kuitenkaan ole näin kylmää säilytystilaa. Harjoitustyön testauksen aikana kompetentteja bakteerisoluja voitiin säilyttää Itä-Suomen yliopiston tiloissa, mutta jatkossa kompetenttien solujen säilytys tulee ratkaista jollakin muulla tavalla. Jos kompetentteja bakteerisoluja joudutaan säilyttämään -20 °C:n lämpötilassa, saattaa niiden transformaatiotehokkuus merkittävästi laskea, jolloin myös koko harjoitustyön onnistuminen vaarantuu. Yksi vaihtoehto on pyytää esimerkiksi Itä-Suomen laboratorokeskuksen liikelaitoskuntayhtymältä (ISLAB) lupaa käyttää Kuopion aluelaboratorion Puijon toimipisteen -80 °C:n säilytystiloja. Hankaluutena tietysti on, että tällaisessa järjestelyssä solut täytyy hakea jokaista harjoitustyötä varten erikseen Puijon laboratorion ja kuljettaa kylmänä Sairaalakadun kampukselle juuri ennen niiden käyttöä. Olisikin hyvä, jos Savonia-ammattikorkeakoululla olisi mahdollisuus tulevaisuudessa investoida -80 °C:n pakastimeen, sillä bioanalytiikan koulutusohjelmalla on varmasti käyttöä tällaiselle kylmäsäilytysmahdollisuudelle myös jatkossa.

Alun perin agaroosigeelielektroforeesi (AGE) oli suunniteltu työohjeessa toteutettavaksi TAE (Tris-asetatti-EDTA) -puskurissa. Testausvaiheeseen tilattu 25 x TAE-puskuri oli kuitenkin kontaminoitunut valmistusvaiheessa, joten siitä täytyi tehdä reklamaatio ja tilata

uusi tuote. Tästä johtuen TAE-puskurin saaminen viivästyi usealla viikolla. Harjoitustyön testaamisessa AGE päädyttiinkin ajan säästämiseksi tekemään TBE (tris-boraatti-EDTA) -puskurissa, sillä sitä löytyi jauheena bioanalytiikan koulutusohjelman reagenssivarastosta. TAE-puskuri on kuitenkin huomattavasti parempi vaihtoehto AGE:iin, jos tarkoituksena on eristää näyte geeliltä ja jatkaa näytteen käsittelyä entsyymaattisilla reaktioilla, sillä TBE-puskurin sisältämä boraatti inhiboi monia entsyymejä. Menetelmän kuitenkin tiedettiin toimivan TAE-puskurissa, joten jos AGE ja sen jälkeiset reaktiot onnistuisivat TBE-puskurissa, onnistuisivat ne myös TAE-puskurissa. Näin ollen menetelmän testaaminen oli mahdollista myös TBE-puskurilla, vaikka sitä ei käytetäkään harjoitustyön lopullisessa toteutuksessa.

### **6.3 Arviointi- ja sulauttamisvaihe**

Projektin onnistumista voidaan selvittää arvioinnilla. Se on systemaattista toimintaa, jolla pyritään saamaan tietoa projektin toteutumisesta, ongelmista ja hyvistä puolista. Arviointi voidaan jakaa itsearviointiin ja ulkopuolisen suorittamaan arviointiin, jolla saadaan puolueeton näkemys projektista. Arviointia voidaan tehdä joko projektin toteuttamisen aikana tai vasta sen päättyessä. Projektin päättymisen jälkeen voidaan tehdä esimerkiksi kysely niille henkilöille, joita projektin tulos koskee. Näin voidaan selvittää, kuinka tyytyväisiä nämä niin sanotut avainhenkilöt ovat projektin lopputulokseen tai hyödynnettävyyteen. (Paasivaara ym. 2008, 142–143.) Tässä opinnäytetyössä arviointi- ja sulauttamisvaihe ovat osittain päällekkäisiä. Sulauttamisvaiheeksi voidaan nimittäin katsoa tässä tapauksessa se, kun ensimmäinen opiskelijaryhmä toteuttaa suunnitellun harjoitustyön. Ensimmäisen opiskelijaryhmän kokemukset harjoitustyöstä voivat kuitenkin tarjota ensiarvoisen tärkeää tietoa koko prosessin onnistumisesta. Näin ollen opinnäytetyöprojektin arviointia jatketaan sulauttamisvaiheessa kyselyn muodossa.

Kysely on tehokas tapa kerätä tietoa, mutta saatujen tulosten tulkinta voi joskus olla ongelmallista. Aina ei voida olla esimerkiksi varmoja siitä, kuinka vakavasti kyselyyn vastanneet henkilöt ovat suhtautuneet vastauksiinsa tai ovatko vastaajat ymmärtäneet kysymykset, kuten oli tarkoitettu. Informoidulla kyselyllä voidaan välttää näitä ongelmia. Siinä kyselyn laatija jakaa lomakkeet henkilökohtaisesti kyselyyn osallistujille, jolloin hän voi selventää kyselyn tarkoitusta ja vastata mahdollisiin kysymyksiin. Kyselyyn osallistujat

kuitenkin täyttävät itsenäisesti kyselylomakkeen ja palauttavat sen sovitulla tavalla kyselyn laatijalle. (Hirsjärvi 1997, 190–192.)

Harjoitustyön ja luodun työohjeen käytännön toimivuutta haluttiin arvioida palautelomakkeen avulla. Palautelomakkeella haluttiin selvittää ensimmäisen harjoitustyön suorittavan opiskelijaryhmän kokemuksia harjoitustyön toimivuudesta ja mielekkyydestä sekä työohjeen onnistuneisuudesta ja merkityksestä työn suorittamisessa. Palautteen avulla pyrittiin saamaan tietoa harjoitustyöstä opiskelijan näkökulmasta. Palautelomakkeen kysymykset olivat avoimia kysymyksiä, jotta kyselyn avulla olisi saatu mahdollisimman monenlaisia näkökulmia esille. Avoimet kysymykset eivät nimittäin oikein laadittuina ehdota vastauksia vaan sallivat vastaajien ilmaista itseään vapaasti omin sanoin (Hirsjärvi 1997, 196). Palautelomake on esitetty liitteessä 3. Lomakkeet jaettiin opiskelijaryhmälle harjoitustyön aikana, jotta he pystyivät vastaamaan kyselyyn mahdollisimman pian harjoitustyön päättymisen jälkeen. Näin harjoitustyö oli vielä tuoreena muistissa ja palautteen anto mahdollisesti helpompaa kuin myöhemmässä vaiheessa. Samalla voitiin ohjeistaa opiskelijoita lomakkeen täytössä ja painottaa palautteen antamisen merkitystä. Palautelomake pyydettiin palauttamaan viimeisen päivän päätteeksi harjoitustyön ohjaavalle opettajalle.

Palautelomakkeen palautti kaksitoista opiskelijaa kolmestatoista eli saatu palaute oli todella kattava. Palaute oli pääasiassa positiivista. Harjoitustyön sisältöä pidettiin mielenkiintoisena, selkeänä ja monipuolisena. Toisaalta osalle opiskelijoista jäi epäselväksi se, kuinka harjoitustyössä opitut asiat liittyvät tulevaan bioanalyytikon ammattiin. Myös harjoitustyön käytännön toteutusta pidettiin melko onnistuneena, vaikka palautteiden mukaan osa päivistä oli liian pitkiä. Myös tarvikkeiden riittävyyttä ja työssä esiintyviä taukoja kritisoitiin. Palautteissa ehdotettiin pienempää ryhmäkokoja, mikä saattaisi helpottaa työssä esiintyvää odottelua. Harjoitustyön työohjetta pidettiin pääasiassa selkeänä ja sen koettiin tukevan oppimista. Toisaalta joidenkin työvaiheiden osalta työohjetta ei pidetty riittävän yksityiskohtaisena. Työohjeessa olleita kysymyksiä pidettiin hyödyllisinä ja niiden avulla opiskelijat kertoivat löytäneensä harjoitustyön oleelliset asiat.

Lopullinen harjoitustyön työohje viimeisteltiin harjoitustyön testaamisen ja opiskelijoilta kerätyn palautteen avulla. Myös harjoitustyön ohjanneelta opettajalta saatiin suullista

palautetta, jonka perusteella työohjeeseen tehtiin pieniä, lähinnä tarkentavia muutoksia. Viimeistely työohje on esitetty liitteessä 2. Työohje toimii myös opinnäytetyöhön liittyvän validoinnin raporttina.

## **7 AMMATILLINEN KEHITTYMINEN**

Opinnäytetyön avulla minulla oli tarkoitus syventää omaa ammatillista osaamistani molekyylibiologiasta ja geeniteknologiasta. Menetelmällisten periaatteiden teoriatarkastelussa hyödynsin aikaisempien yliopisto-opintojeni tietotaitoa. Opinnäytetyön kirjallisen osuuden avulla pystyin kehittämään kirjallista ilmaisuani etenkin tieteellisen esittämisen kannalta. Harjoitustyön validoinnilla oppilaitoksen olosuhteisiin perehdyin oman ammattialan kehitystehtävien ja -toimenpiteiden vaatimuksiin ja niiden käytännön suorittamiseen. Opinnäytetyön käytännön osuudessa harjaannuin myös laboratoriotyöskentelyssä ja työskentelyvaiheiden kirjaamisessa. Koska opinnäytetyön tarkoituksena oli myös luoda työohje tulevia opiskelijoita varten, prosessin aikana perehdyin myös hyvän oppimateriaalin tuottamiseen.

Harjoitustyön testaukseen tarvittavien reagenssien valitseminen ja tilaaminen oli yllättävän työläs osuus opinnäytetyön tekemisessä. Lukuisten eri tuotteiden tarjoajien valikoimista täytyi löytää kohtuuhintaiset ja juuri tähän harjoitustyöhön soveltuvat materiaalit. Oman haasteensa tuotteiden valitsemiseen toi se, että kyseessä oli perusmenetelmien testaaminen. Perusmenetelmiä tehdessä tuotteilta ei vaadita mitään erityisominaisuuksia, joten valikoima oli huomattavasti laajempi kuin tehtäessä joitakin erikoistöitä. Esimerkiksi harjoitustyössä käytettävien plasmidien valinta oli hankalaa, koska oli valittava sellaiset plasmidit, jotka olisi mahdollista pilkkoa samoilla restriktioentsyymeillä ja toimisivat samassa reaktiopuskurissa. Näin ollen lukuisista tarjolla olevista kaupallisista tuotteista täytyi seuloa juuri tähän työhön soveltuvat plasmidit. Lisäksi tosielämän tutkimuksessa työn suunnittelu tapahtuu käänteisessä järjestyksessä tähän opinnäytetyöhön verrattuna. Yleensä menetelmien ja tarvikkeiden valinta lähtee DNA:sta, jota halutaan tutkia. Insertin perusteella valitaan plasmidi, johon kyseessä oleva DNA voidaan liittää, solut, joissa sitä voidaan ilmentää ja menetelmät, joilla solut voidaan seuloa. Harjoitustyössä lähtökohtana oli kuitenkin opiskelijoille opetettavat menetelmät, joihin täytyi suunnitella soveltuvat

materiaalit. Näin ollen harjoitustyön testaamisen valmistelussa ongelmia tuottikin esimerkiksi löytää vektoriplasmidiin sopiva insertti, kun yleensä inserttiin halutaan löytää plasmidi, mikä on oleellisesti helpompaa. Ongelmat saatiin kuitenkin lopulta ratkaistuksi tutkija Johanna Jyrkkärin asiantuntijuuden avustuksella.

Harjoitustyön testaamisen valmistelussa eteen tulleet ongelmat kehittivät omalta osaltaan ammattitaitoani. Reagenssien valinnassa jouduin kriittisesti vertailemaan tarjolla olevien tuotteiden ominaisuuksia ja hintoja sekä varmistamaan eri tuotteiden tarjoajien valmistajien yhteensopivuuksia. Näitä taitoja tulen todennäköisesti tarvitsemaan tulevaisuudessakin toimiessani bioanalytiikan ammatissa. Testaamisen valmistelussa tuli esiin myös yhteistyön merkitys. Aina ei ole kannattavaa yrittää toimia itsenäisesti ja oman tietotaitonsa varassa, vaan muiden asiantuntijuuden hyödyntäminen on sallittua, jopa suotavaa. Terveystieteiden alan ammattilaisissa korostuukin tänä päivänä yhteistyön, erityisesti moniammatillisen yhteistyön, merkitys. Opinnäytetyöprosessin aikana oman osaamisen rajojen tiedostaminen ja avun pyytämisen tärkeys olivatkin merkittävässä roolissa ja loivat pohjaa ammatilliselle kasvulle.

## **8 POHDINTA**

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli koota molekyylibiologian ja geeniteknologian syventävän vaiheen opintoja varten harjoitustyökokonaisuus Savonia-ammattikorkeakoulun bioanalytiikan koulutusohjelman käyttöön. Lisäksi harjoitustyön toimivuus haluttiin testata Sairaalakadun kampuksen laboratoriotiloissa käytössä olevilla välineillä ja luoda sen suorittamisen tueksi työohje.

Opinnäytetyön luotettavuutta ei tässä tapauksessa voida yksinomaan arvioida lähteiden perusteella. Koska kyseessä ovat molekyylibiologiset perusmenetelmät, on harjoitustyössä käytettävien menetelmien teoretiset tiedot jo useiden vuosien, jopa vuosikymmenten, aikana havaittu täsmälliseksi ja luotettavaksi. Näin ollen opinnäytetyön luotettavuutta ei voida arvioida pelkästään lähteiden uutuusarvon ja viimeaikaisuuden perusteella. Työn teoriaosuuden lähteenä pyrittiinkin käyttämään mahdollisimman täsmällistä ja selkeää tietoa sisältäviä lähteitä, kuten oppikirjoja. Toisaalta opinnäytetyön luotettavuutta ja

harjoitustyön aiheen valinnan mielekkyyttä lisää se, että kyseessä todella ovat molekyylibiologian perusmenetelmät. Näin ollen, vaikka uusimmissa tieteellisissä julkaisuissa (esimerkiksi: Duan, Zhu, Chen, Qin & Wang 2009; Okino, Ikeda & Ito 2010; Yoon 2009) ei olekaan yksityiskohtaisesti vertailtu menetelmien toimivuutta tai arvioitu niiden ominaisuuksia, niidenkin materiaalit ja menetelmät -osiosta on löydettävissä juuri näiden perusmenetelmien kuvaukset. Lisäksi perusmenetelmiä muokkaamalla yritetään laajentaa niiden käyttöalueita (Engler, Kandzia & Marillonnet 2008). Tämä kertoo siitä, että menetelmät ovat tutkimustyössä jatkuvasti käytössä ja myös siitä, kuinka tärkeää kyseisten menetelmien periaatteiden ymmärtäminen on.

Arvioitaessa tämän opinnäytetyön luotettavuutta keskeisin asia on harjoitustyön testaamisvaihe. Testausvaiheessa opinnäytetyö luotettavuutta lisäsi muun muassa työvaiheiden kirjaaminen laboratoriotyöpäiväkirjaan, jolloin tarvittaessa niihin voitiin palata myöhemmin. Päiväkirjan pitäminen helpottaa myös mahdollisten poikkeavuuksien tai virhelähteiden löytämistä. Toisaalta harjoitustyön testaamisvaiheen luotettavuutta voidaan arvioida käytettyjen materiaalien kautta. Harjoitustyön testaamisessa käytettiin luotettavien tuotteiden tarjoajien reagensseja ja samoja välineitä kuin tulevaisuudessa harjoitustyön suorittavat opiskelijaryhmätkin tulevat käyttämään. Näin ollen menetelmän toimivuus voidaan taata myös jatkossa.

Opinnäytetyön eettisyys, samoin kuin luotettavuuskin, korostuvat harjoitustyön testaamisvaiheessa. Eettisten periaatteiden mukaan (2006) bioanalyytikon tulee ylläpitää ja kehittää omaa toimintaansa ja osaamistaan. Myös laboratoriotutkimusprosessin laadusta huolehtiminen sekä omasta toiminnasta vastaaminen ja oman osaamisensa rajojen tunteminen ovat bioanalyytikon velvollisuuksia. Näitä eettisiä ohjeita on noudatettu myös tämän opinnäytetyön teossa. Lisäksi eettisyydeksi voidaan nähdä opinnäytetyön tavoitteeksi asetettu bioanalyytikon ammattitaidon kehittäminen. Lisäämällä Savonia-ammattikorkeakoulusta valmistuvien bioanalytikkojen ammattitaitoa ja heidän valmiuksiaan vastata työelämän haasteisiin, voidaan kehittää koko ammattialaa. Ammattitaitoiset bioanalytikit voivat lisäksi kehittää yleisesti terveydenhuoltoalan toimintaa, joka joko suoraan tai välillisesti vaikuttaa potilaiden hyvinvointiin.

Sen lisäksi, että tässä opinnäytetyössä koottu harjoitustyökokonaisuus on hyödynnettävissä Savonia-ammattikorkeakoulussa opiskelevien bioanalyttikkojen koulutuksessa, sitä voidaan käyttää myös laboratoriohoitajien ja bioanalyttikkojen täydennyskoulutuksessa. Molekyylibiologiset ja geeniteknologiset menetelmät ovat verrattain uusia terveydenhuoltoalalla, joten ne eivät ole sisältyneet kovinkaan pitkään bioanalyttikkojen koulutusohjelman opintosisältöön. Näin ollen jo pidempään ammatissa toimineiden bioanalyttikkojen ja laboratoriohoitajien ammattitaitoa voidaan edistää järjestämällä molekyylibiologian ja geeniteknologian täydennyskoulutusta. Teoriaopintojen ohella tässä opinnäytetyössä koottu harjoitustyö voi toimia hyvänä käytännön harjoituksena tämän tyyppisen täydennyskoulutuksen toteutuksessa.

Harjoitustyön testaamisen lisäksi tässä opinnäytetyössä kootun menetelmän toimivuudesta saatiin tietoja ensimmäiseltä harjoitustyön toteuttaneelta opiskelijaryhmältä ja harjoitustyön ohjanneelta opettajalta. Opiskelijoille tehtiin palautelomake, jonka avulla haluttiin selvittää harjoitustyön toteutuksen ja työohjeen toimivuutta opiskelijoiden näkökulmasta. Saatu palaute oli pääasiassa positiivista ja sekä harjoitustyö että sen työohje koettiin toimiviksi. Negatiivista palautetta tuli lähinnä harjoitustyön aikatauluista ja työssä esiintyvistä tauoista. Molekyylibiologisissa menetelmissä on kuitenkin mahdotonta työskennellä yhtäjaksoisesti, sillä useissa menetelmissä vaaditaan inkubointi- ja muita taukoja. Toisaalta, kuten palautteistakin kävi ilmi, pienemmällä ryhmäkoolla työvaiheiden eteneminen voitaisiin saada sujuvammaksi ja työskentely nopeammaksi. Pienemmässä ryhmässä myös tarvikkeita, kuten erilaisia reagensseja, riittää paremmin kaikille ja opettajan ohjauskin on tehokkaampaa. Tulevaisuudessa harjoitustyötä toteutettaessa tulisikin huomioida riittävän pieni ryhmäkokoo.

Ensimmäiselle opiskelijaryhmälle harjoitustyön ohjanneelta opettajalta saatu suullinen palaute paljasti harjoitustyöstä muutamia ongelmakohtia. Ensinnäkin harjoitustyön ohjaajan tulee olla erittäin hyvin perehtynyt työn taustaan ja työohjeeseen tai hänellä tulee olla vankka kokemus molekyylibiologisista menetelmistä, jotta harjoitustyö saadaan onnistumaan. Menetelmässä on useita vaiheita, joiden täsmällinen suorittaminen on oleellista työn onnistumisen kannalta. Jos ohjaajalle itselleen on epäselvää, mitä jollakin työvaiheella halutaan saavuttaa tai mikä sen suorittamisessa on tärkeää, vaarantuu työn onnistuminen. Lisäksi työskenneltäessä suuremmassa ryhmässä lisääntyy näytteiden ja



reagenssien kontaminaatoriski. Esimerkiksi ensimmäisen opiskelijaryhmän restriktioentsyymianalyysin agarosigeelielektroforeesin geelillä havaittiin ajon jälkeen useita erikokoisia vyöhykkeitä halutun kahden vyöhykkeen lisäksi (kuva ei ole esitetty). Nämä vyöhykkeet saattavat olla peräisin DNA-kontaminaatiosta joko yksittäisissä näytteissä tai reagensseissa. Jatkossa tulisikin varmistaa steriilien välineiden ja suojakäsineiden käyttö sekä huolellinen pipetointi harjoitustyön aikana, jotta mahdolliset kontaminaatiot saadaan vältettyä.

Huolelliseen ja tarkkaan työskentelyyn tulee muutenkin jatkossa kiinnittää huomioita, sillä ensimmäisestä opiskelijaryhmästä vain yksi pari sai restriktioentsyymianalyysin geelikuvan (kuva ei ole esitetty) perusteella subkloonauksen onnistumaan. Epäonnistunut subkloonaus saattoi kontaminaation ohella johtua esimerkiksi epäoptimaalisista pitoisuuksista, sillä ryhmällä oli ongelmia DNA-pitoisuuden määrittämisessä etidumbromidimaljalta. Ilmeisesti ryhmän näytteiden DNA-pitoisuus oli sen verran vähäinen, ettei pitoisuutta pystytty arvioimaan standardisarjan avulla maljalta. Tämä on saattanut jatkossa johtaa epäedulliseen insertti-vektori-suhteeseen. Pieneen DNA-pitoisuuteen ainakin insertin kohdalla on todennäköisesti vaikuttanut se, että opiskelijat ovat inserttiä geeliltä eristettäessä leikanneet ylimääräistä geeliä mukaan. Näin ollen tilavuus, jossa DNA on ollut liuenneena, on myös suurempi ja konsentraation siten pienempi. Jatkossa tuleekin harkita lisääkö harjoitustyön työvaiheisiin DNA:n saostus ennen pitoisuusmäärittystä ja vektorin ja insertin ligaatiota. Saostamalla DNA esimerkiksi etanolilla voidaan poistaa epäpuhtauksia ja saada DNA konsentroitua. Saostus voidaan toteuttaa lisäämällä näytteisiin kaksinkertainen tilavuus absoluuttista etanolia ja lisäksi yhdenarvoisia kationeja esimerkiksi natriumasetaatin muodossa. Vähintään 30 min jäähauteella inkuboinnin jälkeen näyte sentrifugoidaan 12 000 x g vähintään 15 min, supernatantti poistetaan ja DNA:n annetaan kuivahtaa jäähauteella. Tämän jälkeen DNA liuotetaan uudelleen esimerkiksi TE-puskuriin tai steriiliin veteen. Haittapuolena on, että DNA:n saostus lisää harjoitustyön toteuttamiseen vaadittavaa aikaa, sillä paras tulos laimeita ja lyhyistä DNA-paloista koostuvia liuoksia saostettaessa saadaan saostamalla DNA:ta yön yli -20 °C:ssa. Lisäksi DNA uudelleenliuotus saostuksen jälkeen vie aikaa. (Suominen & Ollikka 1996.)

Subkloonauksen onnistumisen todennäköisyyttä voidaan kasvattaa edellä mainittujen toimenpiteiden lisäksi lisäämällä transformaation jälkeen maljoilta valittavien vaaleiden pesäkkeiden määrää. Tässä opinnäytetyössä luodussa työohjeessa jatkokasvatukseen ja restriktioentsyymianalyysiin valitaan kaksi pesäkettä, mutta pesäkkeitä voidaan valita haluttaessa myös useampia. Tällöin kuitenkin plasmidi-DNA:n eristykseen ja restriktioentsyymianalyysin toteuttamiseen tarvittavia reagensseja kuluu huomattavasti enemmän ja harjoitustyön kokonaiskustannukset kasvavat. Tulevaisuudessa tuleekin miettiä, halutaanko harjoitustyöstä aiheutuvia kustannuksia kasvattaa onnistuneen subkloonauksen aikaansaamiseksi.

Jotta tässä opinnäytetyössä koottu harjoitustyökokonaisuus ja sen käytännön toimivuus saataisiin toimimaan parhaalla mahdollisella tavalla, voisi erillisen opettajalle tarkoitetun työohjeen koostaminen olla hyödyllistä. Opettajan työohjeeseen voitaisiin koota erilaisia vinkkejä ja ehdotuksia siitä, kuinka eri työvaiheet kannattaa jaksottaa ja toteuttaa. Opettajalle tarkoitetussa työohjeessa teoria ja kaikki vaiheet sekä niihin vaikuttavat tekijät voisivat olla myös selitetty tarkemmin, jotta opettaja osaisi toiminnallaan vaikuttaa työn onnistumiseen. Opiskelijoille tarkoitettuun työohjeeseen ei nimittäin ole mielekästä avata aivan kaikkea työhön liittyvää teoriaa ja muuta tietoa, sillä silloin opiskelijan oman ajattelun ja pohdinnan osuus jää pieneksi eikä oppiminen ehkä ole yhtä tehokasta. Opettajalle luotavan työohjeen merkitys korostuu, jos harjoitustyötä ohjaava opettaja vaihtuu usein tai jos hänellä itsellään ei ole kokemusta molekyylibiologisista menetelmistä ja niiden parissa työskentelystä.

Kaiken kaikkiaan tämän opinnäytetyön tekeminen kasvatti edelleen tietämystäni molekyylibiologista ja geeniteknologista menetelmistä sekä niiden kehittämisestä ja validoinnista. Opinnäytetyöprosessin aikana ammatillinen osaamiseni kasvoi ja pystyin luomaan uusia yhteistyösuhteita toisiin alan asiantuntijoihin. Lisäksi sain lisää varmuutta tieteelliseen kirjoittamiseen ja esittämiseen. Mielenkiintoisen, vaiherikkaan ja haastavan opinnäytetyöprosessin saattaminen loppuun on saavutus, josta saa syystäkin olla ylpeä.

## LÄHTEET

- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K & Watson J. 1994. *Molecular biology of the cell*. 3. painos. New York: Garland Publishing Inc.
- Bioanalyytikon eettiset ohjeet. 2006. Suomen Bioanalytikkoliitto ry. Saatavilla: [http://www.bioanalytikkoliitto.fi/bioanalyytikon\\_ammatti/](http://www.bioanalytikkoliitto.fi/bioanalyytikon_ammatti/) -> eettiset ohjeet. Viitattu: 18.2.2009.
- Biotekniiikan sanasto. [Ei julkaisuvuotta]. Suomen bioteollisuus. Saatavilla: <http://www.finbio.net/sanasto>. Viitattu: 7.12.2009.
- Bowen R, Austgen L & Rouge M. 1999. Biotechnology - DNA ligation. Hypertexts for biomedical sciences. Colorado state university. Saatavilla: <http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/genetics/biotech/enzymes/ligation.html>. Viitattu: 29.3.2010.
- Duan Y, Zhu D, Chen J, Qin Y & Wang J. 2009. *Gene cloning, expression and immunological characterization of kexin in rat pneumocystis carinii*. *Labmedicine* 41 (2), 99–103.
- Engler C, Randzia R & Marillonnet S. 2008. *A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability*. *PLoS One*, 3 (11), 1–7.
- EURACHEM. 1998. *The fitness for purpose on analytical methods. A laboratory guide to method validation and related topics*. Saatavilla: [www.eurachem.org](http://www.eurachem.org) -> guides and documents -> The Fitness for Purpose... Viitattu: 20.1.2009.
- Hirsjärvi S. 1997. Tutkimustyypit ja aineistonkeruun perusmenetelmät. Teoksessa S. Hirsjärvi, P. Remes ja P. Sajavaara (toim.) *Tutki ja kirjoita*. Helsinki: Tammi, 186–215.

- Hukkanen V. 1996. Geenitekniikan sovelluksia virustutkimuksessa ja virustautien diagnostiikassa. Teoksessa I. Suominen & P. Ollikka. Yhdistelmä-DNA-tekniikan perusteet, Internet-materiaali. Opetushallitus. Saatavilla: <http://www.edu.fi/oph/abc/dna/perus.html>. Viitattu: 12.5.2009.
- Kemian metrologian opas. 2005. T. Ehder (toim.) MIKES julkaisu J6/2005. Saatavilla: [www.mikes.fi](http://www.mikes.fi) -> julkaisut -> tiedotteet -> tiedotteet. Viitattu: 12.1.2009.
- King M. 2009. *Control of gene expression. The lac operon. The Medical Biochemistry Page*. Saatavilla: <http://themedicalbiochemistrypage.org/gene-regulation.html> Viitattu: 7.12.2009.
- Kuittinen M. 1994. Mitä luennoinnin sijaan? Malleja opiskelijan itsenäisen työskentelyn lisäämiseksi. Korkeakoulupedagogiikan perusmateriaali. Oulun yliopisto.
- Lablife. 2010. *Vector Backbone: pCMVbeta*. Saatavilla: <https://www.lablife.org/ct?vectorid=5206&f=v&a=showvecinfo>. Viitattu: 20.1.2010.
- Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D & Darnell JE 2000. *Molecular cell biology*. 4. painos. New York: W.H. Freeman and Company.
- Niemi M, Virtanen I & Vuorio E. 1994. *Solu- ja molekyylibiologia*. 5. painos. Espoo: WSOY.
- Okino N, Ikeda R & Ito M. 2010. *Expression, purification and characterization of a recombinant neutral ceramidase from mycobacterium tuberculosis*. *Bioscience, biotechnology and biochemistry*, 74 (2), 90645-1-6.
- Opetussuunnitelma. 2007. Bioanalyytikko (AMK). Savonia-ammattikorkeakoulu, Terveystieteiden yksikkö, Kuopio.

- Oppimateriaalin kehittäminen. [Ei julkaisu vuotta]. Opetuksen kehittämissyksikkö, Oulun yliopisto. Saatavilla: <http://www oulu.fi/opetkeh/kehtoimi/oppimat/index.html>  
Viitattu: 21.1.2009.
- Paasivaara L, Suhonen M & Nikkilä J. 2008. Innostavat projektit. Helsinki: Suomen sairaanhoitajaliitto ry.
- Palotie L. 2006. Perinnöllisyyslääketiede kohtaa kansalaisen. Harvinaisten tautien diagnostiikasta koko perimän hoitovaste-analyyseyhin. Teoksessa P. Aula, H. Kääriäinen ja A. Palotie (toim.) Perinnöllisyyslääketiede. Helsinki: Duodecim, 6-7.
- Rapley R. 2000. *Recombinant DNA technology*. Teoksessa J.M. Walker ja R. Rapley (toim.) *Molecular biology and biotechnology*. 4. painos. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 67–122.
- Ruuska K. 2006. Terveysthuollon projektinhallinta. Mallit, työkalut, ihmiset. Helsinki: Talentum.
- Solubiologia. 2006. Solunetti. Suomen virtuaaliyliopisto. Saatavilla: <http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/> Viitattu: 25.3.2010.
- Suominen I & Ollikka P. 1997. Yhdistelmä-DNA-tekniikan perusteet. Helsinki: Opetushallitus.
- Suominen I & Ollikka P. 1996. Yhdistelmä-DNA-tekniikan perusteet, Internet-materiaali. Opetushallitus. Saatavilla: <http://www.edu.fi/oph/abc/dna/perus.html> Viitattu: 7.12.2009.
- Vainionpää J. 2006. Erilaiset oppijat ja oppimateriaalit verkko-opiskelussa. Väitöskirja. Opettajankoulutuslaitos, Tampereen yliopisto.
- Vilka H & Airaksinen T. 2003. Toiminnallinen opinnäytetyö. Helsinki: Tammi.

Yoon K-H. 2009. *Cloning of the Bacillus subtilis AXM-4 xylanase gene and characterization of the gene product*. Journal of microbiological biotechnology, 19, 1514–1519.

Liite 1. Sanasto

<b>Agaroosigeeli</b>	Menetelmä, jolla voidaan erottaa erikokoisia ja -rakenteisia DNA-juosteita. Perustuu molekyylien erilaiseen kulkeutumiseen agaroosigeelillä sähkövirrassa.
<b><math>\alpha</math>-komplementaatio</b>	Transformoitujen bakteerien seulontamenetelmä, joka perustuu $\beta$ -galaktoosidaasin muodostumisen säätelyyn yhdistelmä-DNA-plasmidiin liitetyn insertin läsnäolon perusteella. Plasmidissa oleva insertti tuottaa inaktiivisen $\beta$ -galaktosidaasin, jolloin ei muodostu väriainetta laktoosianalogi X-galin pilkkoutuessa.
<b><math>\beta</math>-galaktosidaasi</b>	Entsyymi, jonka aktivoitumista solussa voidaan käyttää seulontamenetelmänä transformaation jälkeen. Hajottaa normaalisti solussa laktoosia ja sen analogeja.
<b><math>\beta</math>-laktamaasi</b>	Entsyymi, joka pystyy inaktivoimaan ampicilliinia esimerkiksi bakteerien kasvatusmediumista.
<b>Endonukleaasi</b>	Solun sisällä olevia entsyymeitä, jotka pilkkovat DNA:ta.
<b>Insertti</b>	Yleisnimitys DNA:lle, jota halutaan tutkia geenitekniikan menetelmillä. Insertti voidaan esimerkiksi liittää bakteerisolun plasmidiin kloonauksen varten.
<b>IPTG (isopropyylitio-galaktosidi)</b>	Synteettinen laktoosin kaltainen aine, joka mahdollistaa <i>lacZ</i> -geenin aktiivisuuden ja siten $\alpha$ -komplementaation.
<b>Kompetentti bakteerisol</b>	Bakteerisol, joka on kykenevä transformoitumaan eli ottamaan DNA:ta ympäristöstään sisäänsä.
<b>Ligaatio</b>	Erilaisten rakenteiden kuten DNA-juosteiden liittämistä toisiinsa entsyymien avulla.
<b>Plasmidit</b>	Bakteereilla esiintyviä pieniä kaksijuosteisia rengasmaisia molekyyliä, jotka sisältävät DNA:ta ja monistuvat itsenäisesti.

<b>Restriktioentsyymi</b>	Endonukleaasi, joka tunnistaa spesifisiä sekvenssejä DNA:ssa ja katkaisee eli digestoi kaksoiskierteen tästä spesifisestä kohdasta.
<b>Subkloonaus</b>	Molekyylibiologian menetelmä, jolla voidaan muodostaa uusi yhdistelmäplasmidi ja monistaa sitä toisessa organismissa.
<b>Transformaatio</b>	Geneettisen materiaalin vaihtumisen muoto, jossa bakteerisolu ottaa vapaata DNA:ta ympäristöstään solun sisään ja ilmentää sitä.
<b>Vektori</b>	Yleisnimitys kuljettimille, joiden avulla DNA:ta voidaan siirtää toisiin organismeihin. Esimerkiksi bakteerien plasmideihin voidaan liittää haluttua DNA:ta ja kuljettaa se niissä vastaanottajasoluun.
<b>Yhdistelmä-DNA-tekniikka</b>	Yleisnimitys menetelmille, joilla voidaan eristää, yhdistellä ja muuntaa geneettistä materiaalia ja siirtää sitä toisiin organismeihin.
<b>X-gal (5-bromo-4-kloro-3-indolyyli-D-galaktopyranosidi)</b>	Laktoosianalogi eli aine joka toimii soluissa laktoosin tapaan. Hajoaa solussa $\beta$ -galaktosidaasin vaikutuksesta siniseksi väriaineeksi.



Liite 2. Harjoitustyöohje

# **MOLEKYYLIBIOLOGIAN JA GEENITEKNOLOGIAN HARJOITUSTYÖOHJE**

**Kevät 2010**

Maija Vuorenpää  
Savonia-AMK  
Terveysala Kuopio

## JOHDANTO

Harjoitustyön menetelmä on nimeltään subkloonaus. Subkloonauksessa on tarkoituksena liittää eristettyyn plasmidi-DNA:han vieraasta DNA:sta peräisin oleva DNA-juoste eli insertti restriktioentsyymikäsittelyn avulla. Syntynyt yhdistelmäplasmidi transformoidaan tämän jälkeen *E. coli* -bakteeriin, jonka replikaatiokoneiston avulla yhdistelmäplasmidia monistetaan. Monistuksen tarkoituksena on tuottaa yhdistelmäplasmidia niin paljon, että se voidaan eristää bakteerista ja sen jälkeen tarkistaa insertin siirtyminen yhdistelmäplasmidiin ja transformaation onnistuminen.

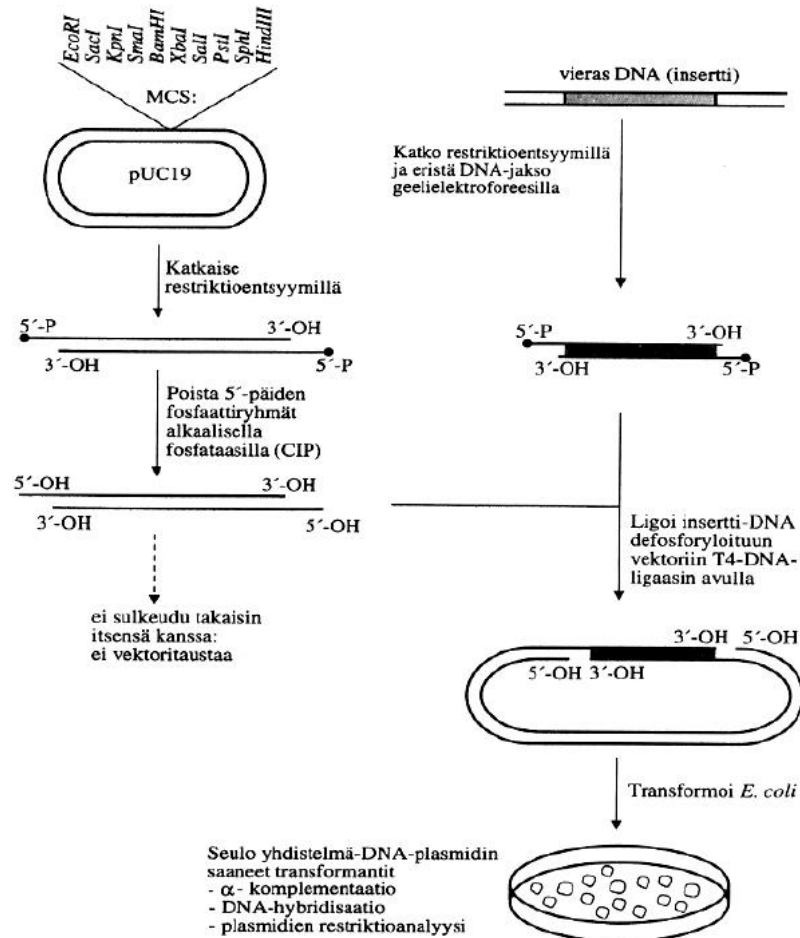
Harjoitustyö perustuu keväällä 2010 valmistuneeseen opinnäytetyöhön, jossa luotiin uusi harjoitustyökokonaisuus bioanalyttikko-opiskelijoiden molekyylibiologian ja geeniteknologian syventävän vaiheen opintoihin. Kyseisestä opinnäytetyöstä löytyy teoriatietoa ja taustaa harjoitustyön menetelmästä. Opinnäytetyö tullaan julkaisemaan elektronisessa muodossa ammattikorkeakoulujen Theseus-verkkokirjastossa osoitteessa <https://publications.theseus.fi/handle/10024/1592>.

## TYÖVAIHEET

Subkloonaus koostuu seuraavista työvaiheista:

1. Vektoriplasmidin ja insertti-DNA:n tuottaminen (1. päivä)
2. Vektorin ja insertin DNA:n eristys, digestio, vektorin puhdistus ja lineaarisuuden tarkastaminen (2. päivä)
3. Insertin eristäminen geeliltä (2. päivä)
4. Vektorin ja insertin pitoisuusmääritys ja ligaatio (3. päivä)
5. Transformointi kompetentteihin soluihin (3. päivä)
6. Solujen kasvatus ja restriktioentsyymianalyysi (4. ja 5. päivä)

Eri työvaiheet on esitetty myös kuvassa 1.



Kuva 1. Subkloonauksen periaate (Suominen & Ollikka, 1997, 82).

## YLEISIÄ HUOMIOITA TYÖSKENTELYYN

- Lue aina huolellisesti koko työvaiheen ohjeet läpi, jotta saat hyvän kokonaiskäsityksen tulevasta
- Yritä selvittää itsellesi minkä vuoksi työvaiheet tehdään, jotta osaat ottaa huomioon tarvittavat seikat. Tässä voit käyttää apuna työohjeesta löytyviä kysymyksiä.
- Ennen työvaiheen aloittamista tarkista, että kaikki tarvittavat välineet ja reagenssit ovat valmiina (esimerkiksi maljat tehty ja ampisilliini lisätty liuoksiin).
- Mieti tulevan päivän aikataulua ja hahmota esimerkiksi työssä tulevat luonnolliset tauot. Mieti etukäteen myös mitä näiden taukojen aikana kannattaa tehdä.
- Työskentelystä kannattaa pitää työpäiväkirjaa, josta käy ilmi työn eteneminen. Työpäiväkirjaan voit myös kirjoittaa vastauksia työohjeen kysymyksiin.

Työpäiväkirja helpottaa myös huomattavasti mahdollisen työselostuksen kirjoittamista.

- Merkitse työn edetessä omat näytteesi (putket, maljat ym.) huolellisesti, jotta tiedät sentrifugoinnin jälkeenkin mikä oli oma näytteesi. Työssä käsitellään rinnakkain myös eri näytteitä (insertti, vektori), joten sinun tulee aina tietää, mitä näytettä missäkin putkessa on. Lisäksi näytteitä pakastetaan ja laitetaan jääkaappiin säilytykseen, jolloin epäselvästi merkityt putket menevät helposti sekaisin.
- Huomio työn aikana vaiheet, joissa syntyy bakteeeri- tai etibiumbromidijätettä ja huolehdi niiden oikeanlaisesta hävityksestä.

### **Vektori- ja inserttiplasmidi DNA tuottaminen**

Vektorina käytetään tässä harjoitustyössä pUC19-plasmidia, joka on peräisin *E. coli* -bakteerista. Käytettävä insertti on puolestaan peräisin sytomegaloviruksesta eristetystä pCMV $\beta$ -plasmidista. Liitteessä 1 on kuvat pUC19- ja pCMV $\beta$ -plasmidien rakenteista.

1. Sulata pUC19-vektori- ja pCMV $\beta$ -inserttiplasmidia sisältävät bakteerisoluputket. Yhdestä soluputkesta riittää soluja kahdelle parille.
2. Mittaa kahteen 15 ml sentrifuugiputkeen 5 ml LB-liuosta ja lisää ampicilliinia (20 mg/ml) loppupitoisuutena 100  $\mu$ g/ml.
3. Lisää 150  $\mu$ l varovasti sekoitettua bakteerisolususpensiota LB-amp-liuokseen ja anna solujen kasvaa yön yli +37 °C:ssa ravistelussa (noin 250 rpm).

### **Plasmidi-DNA eristys**

Yön yli kasvaneesta bakteerisuspensiosta eristetään pUC19-vektori- ja pCMV $\beta$ -inserttiplasmidi-DNA.

1. Siirrä 1,5 ml bakteerisuspensiota mikrosentrifuugiputkeen, sentrifugoi 12 000 x g noin 30 sekuntia, jotta solut saadaan putken pohjalle.
2. Poista supernatantti ja lisää uudestaan mikrosentrifuugiputkeen 1,5 ml

bakteerisuspensiota.

3. Toista sentrifugointi ja poista mahdollisimman tarkasti syntynyt supernatantti.

Näin saadaan kerättyä plasmidi-DNA:n eristämistä varten solut noin 3 ml:sta bakteerisuspensiota. Jäljelle jäänyt bakteerisuspensio voidaan säilyttää +4 °C:ssa.

Varsinainen DNA:n eristys tehdään Sigman GenElute™ Plasmid Miniprep -kitillä.

4. Lisää soluille 200 µl Resuspension Solutionia ja resuspendoi solut pipetoimalla edestakaisin.
5. Lisää 200 µl Lysis Bufferia hajottaaksesi solut. Sekoita välittömästi kääntelemällä putkea 6-8 kertaa varovasti, kunnes liuksesta tulee kirkasta ja viskoosia.  
Lysis Buffer ei saisi vaikuttaa soluissa 5 min kauempaa ettei DNA:n rakenne kärsi.
6. Lisää 350 µl Neutralization Bufferia ja sekoita varovaisesti kääntelemällä putkea 4-6 kertaa. Sentrifugoi 10 min 12 000 x g.
7. Aseta kolonni mikrosentrifuugiputkeen, lisää 500 µl Preparation Solutionia kolonniin ja sentrifugoi 1 min 12 000 x g. Poista läpi tullut liuos.
8. Siirrä 6. vaiheesta saatu kirkas liuos kolonniin, koita välttää valkean sakan pipetoimista ettei kolonni mene tukkoon. Sentrifugoi 1 min 12 000 x g. Poista läpi tullut neste. DNA on nyt sitoutuneena kolonniin.
9. Puhdista DNA lisäämällä kolonniin 700 µl Wash Solutionia ja sentrifugoi 1 min 12 000 x g. Poista pesuliuos putkesta ja kuivaa kolonnia sentrifugoimalla 2 min.
10. Siirrä kolonni uuteen mikrosentrifuugiputkeen ja eluoi DNA kolonnista 50 µl:lla Elution Solutionia: anna liuksen vaikuttaa 1 min ja sentrifugoi 1 min 12 000 x g. Eristetty plasmidi-DNA on nyt putkessa olevassa liuoksessa.

Tällä menetelmällä 3 ml:sta soluja saadaan eristettyä noin 10 µg DNA. Laske näytteesi pitoisuus ja hyödynnä sitä digestion reaktioseoksia suunnitellessasi. Plasmidi-DNA voidaan tarvittaessa säilyttää -20 °C:ssa.

### Insertin pilkkominen

Jotta haluttu insertti saadaan irti alkuperäisestä pCMVβ-plasmidista, täytyy se digestoida restriktioentsyymeillä. Insertin pilkkomisessa käytetään ns. kaksoisdigestiota eli alkuperäinen plasmidi pilkotaan kahdella restriktioentsyymillä yhtä aikaa. Käytettävät entsyymit ovat *EcoRI*-HF ja *XbaI*.

- Mitä hyötyä kaksoisdigestiosta on?
- Minkä kokoinen pala pCMVβ-plasmidista irtoaa tässä kaksoisdigestiossa?

Laske kuinka paljon pipetoit reaktioon eristettyä pCMVβ-plasmidia, kun tarvitset sitä 8 µg.

Reaktioseos:	8 µg =	µl pCMVβ-plasmidia
	5 µl	10 x NEBuffer 4-puskuria
	1 µl	BSA (10 mg/ml)
	1 µl	<i>EcoRI</i> -HF (20 000 U/ml)
	1 µl	<i>XbaI</i> (20 000 U/ml)
ad.	50 µl	ster. H <sub>2</sub> O

Pipetoi mikrosentrifuugiputkeen ensin vesi, puskuri ja BSA ja vasta viimeisenä plasmidi ja entsyymit. Pidä entsyymit koko ajan kylmässä. Sekoita varovasti putkea naputtelemalla. Sentrifugoi näytteet nopeasti pohjaan, jos putken seinämällä näkyy nestettä. Inkuboidaan +37 °C:ssa 4 h. Tarvittaessa näytettä voidaan tämän jälkeen säilyttää +4 °C:ssa.

### Vektorin pilkkominen

pUC19-vektori on 2686 bp kokoinen plasmidi, jolla on *MCS* eli *Multiple cloning site* -alue. *MCS*-alueella on usean eri restriktioentsyymien katkaisukohtat.

- *Miksi vektori pilkootaan?*
- *Mitä pilkkoutumisessa tapahtuu?*

Laske pipetoitavan vektorin määrä, kun sitä tarvitaan reaktioon 4 µg.

Reaktioseos:	4 µg =	µl pUC19-vektoriplasmidia
	5µl	10 x NEBuffer 4-puskuria
	1 µl	BSA (10 mg/ml)
	1 µl	<i>EcoRI</i> -HF (20 000 U/ml)
	1 µl	<i>XbaI</i> (20 000 U/ml)
ad.	50 µl	ster. H <sub>2</sub> O

Pipetoi reagenssit mikrosentrifuugiputkeen ja sekoita naputtelemalla varovasti putkea. Sentrifugoi lyhyesti tarvittaessa. Muista pipetointijärjestys. Inkuboidaan +37 °C:ssa 4 h. Tarvittaessa näytettä voidaan digestion jälkeen säilyttää +4 °C.

### **Vektorin puhdistaminen**

Digestion jälkeen pilkottu vektori täytyy puhdistaa, jotta päästään eroon pienestä DNA-palasta, joka jää digestiossa *EcoRI*- ja *XbaI*-entsyymien pilkkoutumiskohtien väliin. Jos tätä palaa ei puhdistettaisi näytteestä, vektori voisi mahdollisesti itseligoitua ja muuttua jälleen rengasrakenteiseksi. Puhdistus voidaan tehdä kaupallisella tuotteella, jonka tarkoitus on poistaa lyhyitä emäsketjuja ja muita epäpuhtauksia näytteestä. Tässä työssä käytetään Qiagenin QIAquick PCR purification -menetelmää.

- *Ota selvää menetelmän toimintaperiaatteesta*
1. Sekoita 5 osaa PB-puskuria ja 1 osa digestoitua vektoria.
  2. Tarkista, että seoksen väri on keltainen (jos väri on oranssi tai violetti, lisää seokseen 10 µl 3 M NaAc pH 5.0).
  3. Pipetoi näyte pakkauksessa olevaan kolonniin ja sentrifugoi 10 000 x g 1 min.
  4. Poista kolonnin läpi tullut neste putkesta ja aseta kolonni takaisin samaan putkeen.

5. Lisää 750 µl PE-puskuria ja sentrifugoi 1 min 10 000 x g.
6. Poista läpi tullut neste putkesta ja sentrifugoi uudestaan 1 min kuivataksesi kolonnia.
7. Aseta kolonni uuteen mikrosentrifuugiputkeen ja pipetoi kolonniin 30 µl EB-puskuria, anna vaikuttaa 1 min ja sentrifugoi sitten 1 min 10 000 x g.

Puhdistettu vektori on nyt putkessa olevassa liuoksessa. Puhdistuksen jälkeen digestoidusta vektorista otetaan 2 µl näyte lineaarisuuden tarkastamista varten. Lopun näytteen käsittelyä jatketaan kohdassa vektorin ja insertin ligaatio. Vektorinäytteet voidaan säilyttää -20 °C:ssa.

### **Insertin erottaminen ja vektorin lineaarisuuden tarkastaminen**

Insertin digestiossa syntyneet DNA-palat voidaan erottaa toisistaan agarosigeelielektroforeesilla (AGE). Erottamisen jälkeen haluttu insertti voidaan eristää geeliltä jatkokäyttöä varten. Myös vektorin lineaarisuus voidaan tarkistaa AGE:lla, sillä lineaarinen ja sirkulaarinen muoto liikkuu eri tavalla sähkövirrassa.

- *Miten vektorin lineaarisen ja sirkulaarisen muodon liikkuvuus geelillä eroavat toisistaan?*
- *Mitä geelillä pitäisi näkyä pCMVβ-plasmidin kohdalla?*

AGE:a varten tehdään 150 ml:n 1 % agarosigeeli 1 x TAE-puskuriin. Geeliin lisätään myös etidiumbromidia.

- *Mikä on etidiumbromidin eli EtBr:n tarkoitus?*
- *Mitä tulee ottaa huomioon EtBr käsiteltäessä?*

Geeliin laitetaan kaksi kammaa, jolloin geeli jakautuu kahteen osaan, ylä- ja alageeliin. Ylägeelille tarvitaan suuremmat kaivot kuin alageelille, joten ylimmäiseksi laitetaan iso kampa. Geelin annetaan kiinteytyä vähintään 30 min vetokaapissa.



Ylägeelille pipetoidaan näytteet insertin erottamista varten ja alageelille vektorin lineaarisuuden tarkistamista varten. Ajoon tarvitaan mukaan myös molekyylipainomarkkeri ja kontrollit. Näin ollen geelille tulee seuraavat näytteet:

Ylägeeli: Kaivo 1: Molekyylipainomarkkeri (10 µl esim. DNA ladder 1 kb)  
Kaivo 2: Sirkulaarinen pCMVβ-plasmidi (2 µl)  
Kaivot 3-> Ryhmien omat digestoidut insertit (n. 50 µl)

Alageeli: Kaivo 1: Molekyylipainomarkkeri (10 µl esim. DNA ladder 1 kb)  
Kaivo 2: Sirkulaarinen pUC19-vektoriplasmidi (2 µl)  
Kaivo 3: Lineaarinen pUC19-vektoriplasmidi (2 µl)  
Kaivot 4-> Ryhmien omat vektorin lineaarisuuden tarkistamista varten otetut näytteet (2 µl)

Kaikkiin geelille tuleviin näytteisiin lisätään 1 x ajoväriä. Ajojännitteenä on 120 V ja ajoaika noin 60 min. AGE:n jälkeen ajon onnistumista voidaan tarkastella UV-valossa. Myös insertin pitoisuutta voidaan arvioida vertaamalla vyöhykkeen intensiteettiä molekyylipainomarkkerin vyöhykkeiden intensiteettiin.

- *Mitä tulee huomioida työskenneltäessä UV-valon kanssa?*
- *Mistä tiedetään onko digestointi onnistunut?*

### **Insertin eristäminen agarosigeeliltä**

Insertin sisältävä vyöhyke eristetään geeliltä kaupallisella pakkauksella. Eristyksessä käytetään Milliporeen Ultrafree®-DA DNA Extraction From Agarose Gels -kittiä. Leikattu geelipala asetetaan kuppiin, joka muuttaa geelin sentrifugaation avulla nestemäisempään muotoon. Nesteytynyt geeli jää putkessa olevaan suodattimeen, mutta DNA läpäisee suodattimen kalvon. Näin DNA siirtyy sentrifugoinnissa suodokseen, mutta agarosi jää suodattimeen.

Leikkaa UV-valossa insertin sisältämä vyöhyke mahdollisimman tarkasti geeliltä mikrosentrifuugiputkeen. Ylimääräistä geeliä pitäisi pyrkiä välttämään, mutta kaikki DNA tulisi kuitenkin saada talteen geeliltä. Leikkaaminen tulisi tehdä myös mahdollisimman nopeasti, sillä UV-valo hajottaa geelillä olevaa DNA:ta. Siirrä leikattu geelipala mikrosentrifuugiputkesta pakkauksen putken siniseen kuppiin. Geelipalaa voi leikata pienemmiksi palasiksi ja painaa kuppiin, jotta koko geelipala saadaan samaan putkeen. Jos geelipalasi on niin suuri, ettei se mahdu yhteen putkeen, voit tarvittaessa käyttää kahta putkea. Sulje putken kansi ja sentrifugoi 10 min 5000 x g. Sentrifugoinnin jälkeen insertin DNA on putken pohjalla olevassa liuoksessa.

### **Vektorin ja insertin pitoisuuden määrittäminen**

Näytteiden DNA-pitoisuus voidaan määrittää etidiumbromidimaljalta DNA-standardisarjan avulla. Valmista 1,5 % agarosimalja (tilavuus noin 20 ml) 1 x TAE-puskurissa. Agarosiliuokseen lisätään ennen maljan valua pari tippaa EtBr. Maljan annetaan jähmettyä pimeässä. Tee standardisarjaan (100, 50, 25, 10, 5 ng/μl) tarvittavat laimennokset, kun kantaliuos on 100 ng/μl. Pipetoi 0,5 μl näytteet standardisarjasta ja omasta insertti- ja vektorinäytteestäsi jähmettyneelle maljalle. Merkitse pipetointikohdat huolellisesti! Näytteiden annetaan imeytyä pimeässä noin 20 min ajan, jonka jälkeen näytteiden pitoisuus määritetään UV-valossa vertaamalla omien näytteiden intensiteettiä standardisarjaan. Jos oman näytteesi intensiteetti poikkeaa standardisarjasta, arvio pitoisuus. Mieti myös vastaako maljalta määrittämäsi insertin pitoisuus geeliltä arvioimaasi pitoisuutta.

### **Vektorin ja insertin ligaatio**

Ligaatiossa insertti ja vektori liitetään yhteen, jolloin muodostuu uusi yhdistelmäplasmidi. Ligaation onnistumisessa tärkeää on oikea insertti-vektori-suhde, jonka tulisi olla noin 3 moolia insertin liitettäviä päitä 1 moolia vektorin liitettäviä päitä kohtaan. Laske siis pipetoitava vektorimäärä, kun vektoria halutaan reaktioon 50 ng. Laske lisäksi tarvittava inserttimäärä (ng) ja kuinka paljon se on omaa näytettäsi (μl). Hyödynnä laskuissa maljalta arvioimaasi vektorin ja insertin pitoisuutta. Tarvittava insertin määrä voidaan laskea seuraavan kaavan avulla:

$$\frac{3 \cdot 50 \text{ ng vektoria}}{\text{vektorin ep}} = \frac{x \text{ ng insertiä}}{\text{insertin ep}}$$

Reaktioseos:            50 ng =     $\mu$ l puhdistettua lineaarista vektori-DNA:ta  
                               \_\_\_ ng =     $\mu$ l insertti-DNA:ta  
                               2  $\mu$ l        lugaatiopuskuria  
                               0,5  $\mu$ l        T4-DNA-ligaasia  
                               ad.         20  $\mu$ l        H<sub>2</sub>O

Ligaation onnistumisen seuraamiseksi tarvitaan varsinaisen näytteen lisäksi kontrolli. Kontrollina toimii tässä tapauksessa pelkkä linearisoitu vektori, jonka ei pitäisi transformoida bakteerisoluja.

Kontrolli:                50 ng =     $\mu$ l puhdistettua lineaarista vektori-DNA:ta  
                               ad.         20  $\mu$ l        H<sub>2</sub>O

- *Mitä kontrolli avulla saadaan selville?*

Näytteet sekoitetaan huolellisesti ja jätetään inkuboitumaan huoneenlämpöön 1 h ajaksi. Näytteet voidaan jättää inkuboitumaan tarvittaessa myös yön yli.

### **Transformaatio**

Transformaatiossa yhdistelmäplasmidi viedään bakteerisolujen sisään, jotta sitä voidaan tuottaa niiden avulla. Transformaatiossa on tärkeää käsitellä soluja hyvin varovaisesti ja noudattaa annettuja ohjeita lämpötiloista.

- *Miksi varovainen käsittely ja kylmässä pitäminen ovat tärkeitä?*

Ennen varsinaista transformaatiota valmistetaan laminaarissa maljat, joille transformoidut bakteerit laitetaan kasvamaan. Tässä työssä käytetään LB-agar-jauhetta, jota sekoitetaan 35 g litraan deionisoitua vettä. Laske kuinka monta maljaa työssä tarvitaan eli kuinka paljon

valmistat agar-seosta. Kun agar on liennut ja jäähtynyt noin +50 °C:een, lisätään seokseen 100 µg/ml ampicilliinia (kantaliuos 20 mg/ml) ja 40 µl 2 % X-galia ja 40 µl 100 mM IPTG jokaista maljaa kohden. Agar-seos sekoitetaan hyvin ja maljoille valetaan noin 15 ml agar-seosta. Maljojen annetaan jähmettyä huoneenlämmössä. Jähmettymisen jälkeen maljat voidaan säilyttää jääkaapissa.

- *Mikä tarkoitus agariin lisättävillä ampicilliinilla, IPTG:lla ja X-galilla on?*

1. Ota kompetentit bakteerisolut sulamaan jäähauteelle. Kahta näytettä kohden tarvitset yhden soluputken. Jaa solut puoliksi pipetoimalla **varovasti** 25 µl puhtaaseen mikrosentrifuugiputkeen.
2. Pipetoi sulaneille soluille 10 µl ligaatiotuotetta ja sekoita varovaisesti heiluttelemalla putkea.
3. Inkuboi soluja 30 min jäähauteella.
4. Anna soluille 30 sekunnin lämpöshokki +42 °C:ssa vesihauteessa, jonka jälkeen siirrä solut heti jälle.

- *Miksi lämpöshokki annetaan ja mitä siinä tapahtuu?*

5. Lisää soluputkiin 450 µl SOC-mediumia ja kasvata soluja ravistelijalla (noin 250 rpm) 1 h +37 °C:ssa.
6. Maljaa 20 µl:n ja 100 µl:n maljat sekä varsinaisesta näytteestä että kontrollista kolmiosauvalla hyvin merkityille LB-Amp-X-Gal-IPTG-maljoille. Anna maljojen kuivahtaa huoneenlämmössä noin 30 min.
7. Maljojen annetaan inkuboitua +37 °C:ssa lämpökaapissa pohja ylöspäin yön yli.

- *Miksi maljojen on oltava pohja ylöspäin inkuboinnin aikana?*

Seuraavana päivä tarkastellaan maljoilla kasvavia pesäkkeitä. Onnistuneessa transformaatioissa kontrollissa pitäisi olla vähän sinertäviä pesäkkeitä ja varsinaisen näytteen sisältävällä maljalla vaaleita pesäkkeitä.

- Miten pesäkkeen väri kuvastaa sitä, onko työ onnistunut?

### **Yhdistelmäplasmidin sisältävien bakteerien kasvatus**

Varsinaisen näytteen sisältäviltä maljoilta valitaan kaksi vaaleaa pesäkettä, joiden pitäisi sisältää haluttu yhdistelmäplasmidi, jatkokasvatukseen. Poimi pesäke maljalta esim. pipetinkärjellä tai hammastikulla ja siirrä se 5 ml:aan 1 x LB-amp-liuosta (ampisilliini 100 µg/ml). Bakteereita kasvatetaan yön yli ravistelijassa (noin 250 rpm) +37 °C:ssa.

### **Plasmidi-DNA eristys**

Yön yli kasvaneista bakteerisuspensioista eristetään yhdistelmäplasmidin DNA, jotta voidaan tarkistaa, onko valituissa bakteeriklooneissa todella haluttu insertti. DNA eristys tehdään samoin kuin aiemminkin eristettäessä vektori- ja insertti-plasmidi-DNA (katso sivu 4).

### **Restriktioentsyymianalyysi**

Restriktioentsyymianalyysillä voidaan tarkastella työn onnistumista. Analyysin tarkoituksena on digestoida eristetty plasmidi-DNA (eli muodostettu yhdistelmäplasmidi) samoilla restriktioentsyymeillä kuin vektori ja insertti alun perin digestoitiin. Tällöin yhdistelmäplasmidin tulisi hajota jälleen erilliseksi vektoriksi ja insertiksi, jotka voidaan erottaa toisistaan AGE:lla.

Reaktioseos:	10 µl	yhdistelmäplasmidin DNA:ta
	2 µl	10 x NEBuffer 4-puskuria
	1 µl	<i>EcoRI</i> -HF (20 000 U/ml)
	1 µl	<i>XbaI</i> (20 000 U/ml)
ad.	20 µl	H <sub>2</sub> O

Muista pipetointijärjestys. Sekoita näyte huolellisesti, sentrifugoi tarvittaessa pohjaan ja anna inkuboitua 2 h +37 °C:ssa. Säästä loput eristetystä DNA:sta AGE:a varten.

AGE:a varten tehdään samoin kuin aiemmin 1 % agarosigeeli 1 x TAE-puskuriin. Geeliin lisätään myös etidiumbromidia. Kammat voivat olla pieniä. Geelille pipetoidaan molekyylipainomarkkeri, kontrolliksi sirkulaarinen ja lineaarinen vektori sekä jokaisen parin oma digestoimaton ja digestoitu yhdistelmäplasmidi. Valmista omat näytteesi lisäämällä 10 µl:aan digestoitua tai digestoimatonta näytettä 1 x ajoväriä.

Geelille pipetoidaan siis:

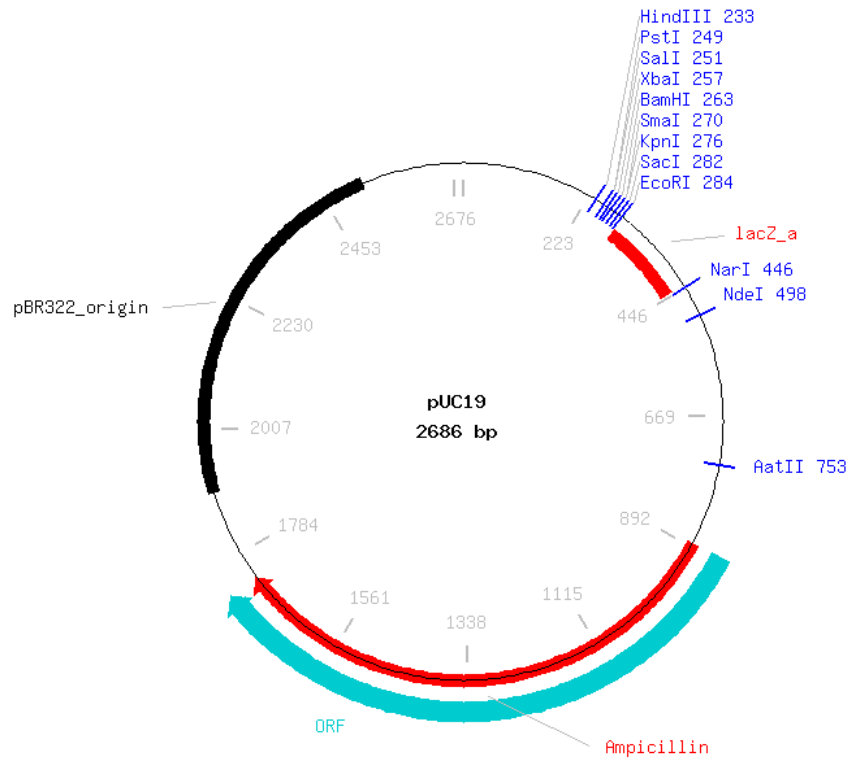
- Kaivo 1: Molekyylipainomarkkeri
- Kaivo 2: Sirkulaarinen pUC19-vektori (2 µl)
- Kaivo 3: Lineaarinen pUC19-vektori (2 µl)
- Kaivot 4-> Ryhmien omat sirkulaariset ja digestoidut yhdistelmäplasmidit

Ajojännite on 120 V ja ajoaika noin 60 min. AGE:n jälkeen geeliä tarkastellaan UV-valossa.

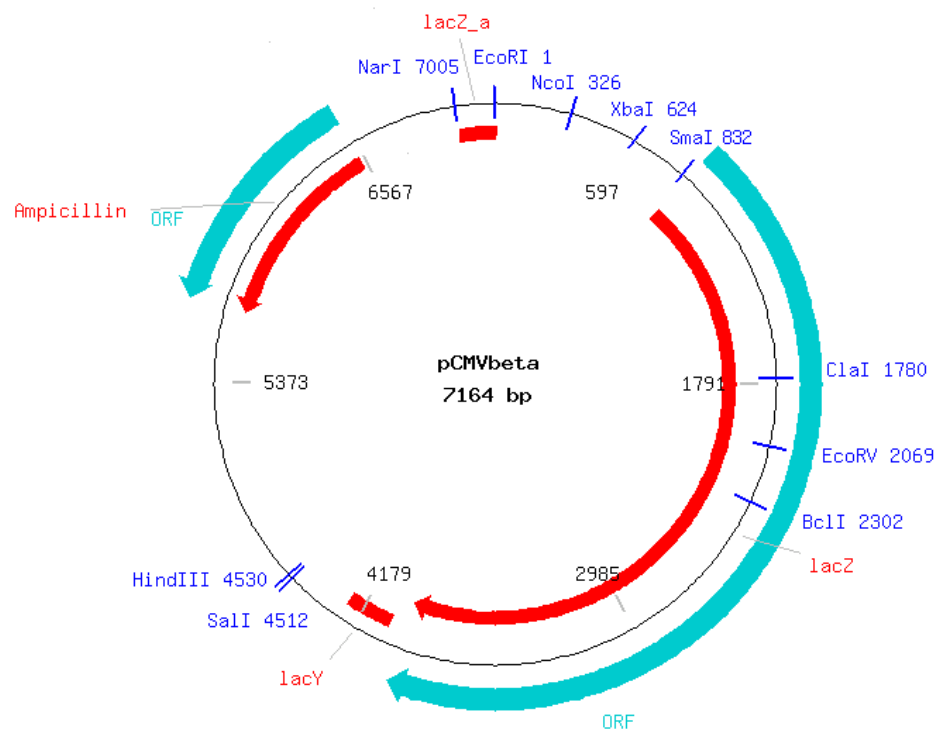
- *Mitä geelillä pitäisi näkyä jos työ on onnistunut?*
- *Jos työsi ei ole onnistunut, pohdi kriittisesti mistä se johtui*

# LIITE 1.

pUC19-plasmidi:



pCMV $\beta$ -plasmidi:



### Liite 3. Palautelomake

Maija Vuorenpää

MOGE92 / Kevät 2010

#### **Palautelomake: Molekyylibiologian ja geeniteknologian harjoitustyö ja työohje**

1. Millaisena koit harjoitustyön sisällön? Vastasiko se odotuksiasi?
2. Miten harjoitustyön käytännön toteutus onnistui?
3. Oliko harjoitustyöohje mielestäsi selkeä? Tukiko se oppimistasi?
4. Jos työohje ei tukenut oppimistasi, miksi näin oli?
5. Yleistä palautetta harjoitustyön toteutuksesta ja työohjeesta, sana on vapaa!