

DNA-KOETTIMIEN TESTAUS YMPÄRISTÖ- SIRUA VARTEN

Vipuvoimaa
EU:lta
2007-2013



Euroopan unioni
Euroopan aluekehitysrahasto

LAHDEN AMMATTIKORKEAKOULU
Tekniikan ala
Ympäristötekniikan koulutusohjelma
Ympäristöbiotekniikka
Opinnäytetyö
Syksy 2010
Venla Avelin

Lahden ammattikorkeakoulu
Ympäristötekniologia

AVELIN, VENLA:

DNA-koettimien testaus ympäris-
tösirua verten

Ympäristöbiotekniikan opinnäytetyö, 40 sivua, 8 liitesivua

Syksy 2010

TIIVISTELMÄ

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli testata 87 aiemmin suunnitellun DNA-koettimen toimivuus LDR (Ligation Detection Reaction) -sirulla. Koettimet oli suunnitellut Atte Halttunen järvisedimentin mikrobistolle. Opinnäytetyö oli osa Euroopan aluekehitysrahaston YMLI-hanketta (A30175), jonka yhtenä tavoitteena on kehittää nopeita analyysimenetelmiä ympäristön mikrobien tutkimiseen.

Koettimien toimivuus ja spesifisyys testattiin synteettisillä DNA-templaateilla. Tutkimuksessa käytettiin Biotekniikan Instituutissa (Helsingin yliopisto) sovellettua LDR-sirutekniikkaa, jossa DNA-koettimesta muodostuu sirkulaarinen sen yhdistyessä kohde-DNA:n kanssa. Sirkulaarisuutta käytetään hyödyksi monistamalla koetinta polymeerasiketjureaktion (PCR) avulla, jolloin tekniikan herkkyyks paranee. PCR-tuotteen tuloksia tarkasteltiin agarosigeelielektroforeesilla ja hybridisaatiolla LDR-sirulle.

Opinnäytetyössä testatuista koettimista arvioitiin erinomaisiksi 38 %, hyviksi 22 %, heikoiksi 18 %, epäspesifeiksi 8 % ja toimimattomiksi 14 %. Arviointi perustui koettimien antaman signaalin vahvuuteen ja spesifisyyteen LDR-sirulla. Kun koettimien suunnittelijan arviot koettimien hyvydestä otettiin myös huomioon, saatiin erinoimaisesti toimivia koettimia 19 ja hyviä 29.

Testauksessa olosuhteiden optimointi oli työlästä ja muutamilla koettimilla toistetut rinnkaistestit antoivat ristiriitaisia tuloksia. Toimivia koettimia saatiin huomattavasti vähemmän, kuin muiden samantyyppisten tutkimusten tulosten perusteella olisi voitu ennakoida. Lisäksi koettimien spesifisyydessä olisi ollut parantamisen varaa, sillä seitsemän koetinta todettiin ”häiriköiksi”, jotka reagoivat vähintään kymmenen eri templaatin kanssa.

Tulevissa DNA-koetintestauksissa kannattaa käyttää jotakin kontrollikoetinta ja olosuhdetesteissä siruhybridisaatioita ja agarosigeelielektroforeesia rinnakkain. Tässä työssä saatiin aikaiseksi yhdessä aiemman suunnittelutyön kanssa 48 käytökelpoista koetinta ja kehitettyä ympäristösirua eteenpäin, vaikka työtä riittääkin vielä ennen kuin kaupallinen tuote on valmis.

Avainsanat: DNA-mikrosirut, ligaatiotunnistusreaktio (LDR), ympäristöanalytiikka

Lahti University of Applied Sciences
Degree Programme in Environmental Technology

AVELIN, VENLA:

Testing DNA probes on environmental microarray

Bachelor's Thesis in Environmental Biotechnology 40 pages, 8 appendices

Autumn 2010

ABSTRACT

The aim of this bachelor's thesis was to test how DNA probes act on LDR chip. The intention was also to develop a suitable application to screen environmental samples efficiently. This bachelor's thesis was part of the YMLI-project (A30175), which was funded by the EU's regional development trust. 87 DNA probes were designed by Atte Halttunen in his bachelor's thesis to identify the diversity of microbes in a lake sediment.

The function and specificity of the probes were tested with synthetic DNA templates. The LDR microarray method used in this study was applied by the Institute of Biotechnology in Finland. In this method, probes are circularized in the presence of applicable target DNA. A circular DNA probe is amplified by Polymerase Chain Reaction (PCR) to improve the sensitivity of this method. The readout of the PCR was examined with an agarose gel electrophoresis and with hybridization onto an LDR microarray.

Probes in this bachelor's thesis were evaluated by the intensity of the signal and the specificity of the probe. 38 % of the probes were evaluated as excellent, 22 % as good, 18 % as weak, 8 % as unusable and 14 % nonfunctional. When the evaluation of the designer was also considered, there were 19 excellent and 29 good probes.

Optimizing the conditions of the ligation reaction and the PCR was effortful and a few tests with similar conditions and probes gave different results. From this contradiction the conclusion can be drawn that the method did not work as reliably as was hoped. There were much less workable probes than expected by the results of other similar studies. The specificity of the probes could have been better considering those seven probes which were evaluated as unusable because they worked at least with ten wrong templates. In future testing of DNA probes it is worthwhile to use a reference probe to control the positive signal of the reaction. Also using agarose gel electrophoresis and hybridization on an LDR microarray simultaneously is recommendable when optimizing of conditions in the ligation reaction and the PCR. This study helped to develop the environmental microarray but there is still much to be done before it is commercialized.

Key words: DNA microarrays, Ligation Detection Reaction (LDR), environmental analysis

SISÄLLYS

1	JOHDANTO	1
2	DNA-SIRUANALYTIKKA YMPÄRISTÖN MIKROBIEN ANALYSOINNISSA	3
2.1	LDR-sirut ja niiden toimintaperiaate	6
2.2	MIP (Molecular Inversion Probe)-tekniikka ja universaalit DNA-sirut	8
2.3	LDR-sirujen soveltuminen ympäristötutkimukseen	10
3	TESTAUKSESSA KÄYTETYN TEKNIIKAN YLEISKUVAUS	12
3.1	Koettimien yhdistäminen	13
3.2	Ligaatiosta PCR-monistukseen	14
3.3	PCR-tuotteiden tarkastaminen	16
4	MATERIAALIT JA MENETELMÄT	18
4.1	Testijärjestelyt	18
4.2	Koettimien yhdistäminen	20
4.2.1	Ligaatit	20
4.2.2	Eksonukleaasi I-entsyymi -käsittely	21
4.2.3	PCR (Polymerase Chain Reaction)	21
4.2.4	Agaroosigeelielektroforeesi	22
4.2.5	Lambda Eksonukleaasi -käsittely	23
4.2.6	Hybridisaatio ja sirun skannaus	23
5	TULOKSET JA NIIDEN ARVIONTI	25
5.1	Koettimien testaaminen LDR-sirulla	25
5.2	Esitestauksen tulokset	27
5.3	Koettimien testaamisen haasteita	29
5.4	Tulosten vertailu koettimien DNA-sekvensseihin	32
6	YHTEENVETO JA JOHTOPÄÄTÖKSET	34
	LÄHTEET	37
	LIITTEET	41

1 JOHDANTO

DNA-sirut koostuvat kiinteälle yleensä lasiselle alustalle samansuuntaisesti ja rinnakkain kiinnitetyistä DNA-molekyyleistä. Niiden avulla mikrobiekologia ja geenien tutkimus on saanut uudenlaisen ulottuvuuden. Vuonna 1995 Schenan ja kumppaneiden kehittämä DNA-sirusovellus tutki 64 eri lituruohon geenin ilmenemistä. Sen jälkeen DNA-siruteknikka ja sovellusten määrä on kehittynyt huomasti. (Shiu & Borevitz 2008, 141.)

Perinteisiä tekniikoita mikrobien monimuotoisuuden ja aktiivisuuden tutkimiseen ovat muun muassa mikrobien vilejelyyn sekä rikastamiseen perustuvat menetelmät, solujen värjäys, aineenvaihduntatuotteiden mittaukset, rasvahappokoostumuksen määritykset, gram-värjäys, solun ulkomuodon arvionti ja soluhengityksen tuotteiden tutkimukset. Mikrobien viljelyyn perustuvat menetelmät eivät sovellu ympäristönäytteiden mikrobien monimuotoisuuden tutkimiseen, sillä vain 1 % niistä on viljeltävissä laboratorioissa (Sebat, Colwell & Crawford 2003, 4927). (Clark, Dunlap, Madigan & Martinko 2009, 364, 386, 653666.)

DNA:n monistaminen polymeerasiketjureaktion (Polymerase Chain reaction, PCR) avulla ja sekvensoinnin automatisoituminen olivat suuria teknisiä läpimurtoja ympäristön mikrobien tutkimuksessa 1980-luvulla. Polymeerasiketjureaktion avulla yhdestä DNA-molekyylisestä voidaan tehdä jopa miljardikertaisesti kopioita. 454-sekvensointi (pyrosekvensointi) on vienyt sekvensoinnin uudella tasolle 2000-luvulla. Tekniikka mahdollistaa valtaviin tietomääriin tuottamisen ja pulonkaulana onkin tiedon käsittely. (Petrosino, Highlander, Luna, Gibbs & Versalovic 2009.)

DNA-sirut mahdollistavat tehokkaan ympäristön mikrobiston tutkimiseen, koska niiden avulla voidaan tutkia tuhansia ja jopa miljoonia genejä yhtä aikaa (Shiu & Borevitz 2008, 141). Ne ovat myös edullisempi menetelmä verrattuna sekvensointiin tai viljelyyn (Hultman, Ritari, Romantschuk, Paulin & Auvinen 2008) ja niiden avulla voidaan tutkia tehokkaasti ja tarkasti useita näytteitä samanaikaisesti (Busti ym. 2002). DNA-siruja voidaan käyttää eri geenien ilmenemisen tutkimi-

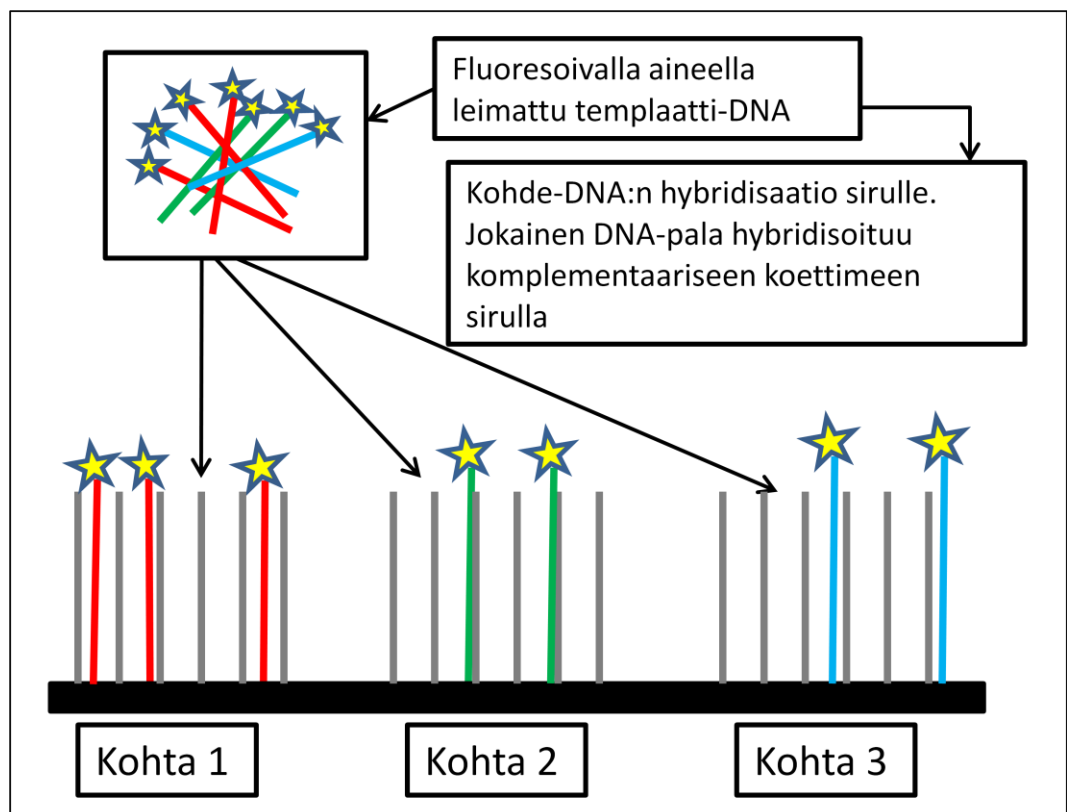
seen, mikrobien tunnistamiseen genomisen DNA:n avulla, populaation genetiikkaan ja toiminnalisten geenien havainnointiin (Sei, Inaba, Upadhye, Inoue & Ike 2009, 97).

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli testata 87 aiemmin suunnitellun DNA-koettimen toimivuus ja spesifisyys LDR (Ligation Detection Reaction) -sirulla. Koettimet oli suunnitellut Atte Halttunen keväällä 2010 ja ne oli suunniteltu indikoimaan järvisedimentin mikrobiston diversiteetin muutoksia. Tässä tutkimuksessa käytettiin Biotekniikan instituutissa sovellettua herkkää LDR-sirutekniikkaa. Koettimien toimivuutta arvioitiin agarosigeelielektroforeesin avulla ja hybridisaatiolla LDR-sirulle. Agarosigeelielektroforeesikokeiden tarkoituksena oli välttää koettimien toimivuus niitä vastaavan synteettisen DNA:n kanssa ja sirukoilla oli tarkoitus arvioida toimivuuden lisäksi koettimien spesifisyyttä.

Tutkimus oli osa YMLI-Uudet ympäristömittausmenetelmät liiketoimintamahdollisuutena -hanketta (A30175), jonka tarkoituksena on muun muassa kehittää DNA-lähtöisiä analyysimenetelmiä ympäristön mikrobiston tutkimiseen. Lisäksi tarkoituksena on parantaa oppilaitosten ja yritysten yhteistyötä, jotta menetelmät voidaan siirtää suoraan käytäntöön. Hankkeen toteuttajia ovat muun muassa Helsingin yliopiston Ympäristötieteiden laitos (hallinnoija), Biotekniikan Instituutti, Lammin biologinen asema ja Lahden ammattikorkeakoulu. (Helsingin yliopisto 2008.)

2 DNA-SIRUANALYTIKKA YMPÄRISTÖN MIKROBIEN ANALYSOINNISSA

DNA-sirujen toiminta perustuu kahden yksijuosteisen ja sekvensseiltään komplementaaristen eli keskenään vastaavien DNA-jaksojen hybridisoitumiseen keskenään. DNA-sirujen kaksi yleisintä muunnosta ovat cDNA (complementary DNA) -sirut ja oligonukleotidisirut. Niiden suurin ero on kiinteälle alustalle printattujen DNA-molekyylien pituudessa. cDNA-siruissa käytetään pitkiä (1000 nt) DNA-koettimia ja oligonukleotidisiruissa lyhyitä (noin 25 nt) koettimia. Monien kaupallisten sirujen oligot syntetisoidaan suoraan lasille. Molemmissa sovelluksissa fluoresoivalla aineella leimattua kohde-DNA:ta (templaattia) hybridisoidaan suoraan sirulle, jolloin koettimia vastaavat DNA-palat voidaan havaita (kuvio 1). DNA-siruille on kehitetty useita sovelluksia ympäristön mikrobien analysoinnissa (taulukko 1). (Gabig & Wêgrzy 2001, 615616.)



KUVIO 1. Leimatun kohde-DNA:n hybridisoituminen DNA-sirulla oleviin koettimiin

TAULUKKO 1. DNA-sirujen sovelluksia ympäristön analysoinnissa

Tutkimuksen aihe	Kohde	Artikkelin kirjoittajat
Oligonukleotidisirut		
Useat ympäristön biologiset ja kemialliset toiminnot jokivesien analysoinnissa	85 toiminnallista geeniä	Sei ym. 2009
Ektomykoritsasieni (EMC)-yhteisöjen tunnistaminen	95 EMC-sienilajia, koettimet tunnistavat niiden ITS-alueet	Reich, Kohler, Martin & Buée 2009
GeoChip		
Syvänmeren savuttajien mikrobiyhteisöjen aineenvaihdunnallinen monimuotoisuus	Kymmeniä tuhansia toiminnallisia geenejä	Wang ym. 2008
Metsittämisen vaikutus toiminnallisten geenien ja biokemiallisten prosessien koostumukseen ruohotasangoilla	Hiilen ja typen kiertoon maaperässä liittyviä tuhansia geenejä	Berthrong, Schadt, Piñeiro & Jackson 2009
LDR-universaali siru		
Taudinaiheuttajien tunnistaminen puutarhojen vesien kierrätysjärjestelmistä	Munasienet (<i>Oomyces</i>) ja sienet	van Doorn ym. 2009
Bakteeriyhteisöjen tutkiminen	Koettimet 6:lle eri bakteeriluokalle	Busti ym. 2002
Syanobakteerien monimuotoisuuden tutkiminen	19 eri syanobakteerien ryhmää	Castiglioni ym. 2004
Hepanotoksiinia tuottavien syanobakteerien tunnistaminen	5 eri suvun: mikrokystiini- (<i>mcyE</i>) ja nodulaarisynteesin geenit (<i>ndaF</i>)	Rantala, Rizzi, Castiglioni, Bellis & Sivonen 2008
Kompostimikrobien tutkiminen	Kompostin mikrobit ja sienet	Hultman ym. 2008
cDNA-sirut		
Suolapitoisessa ja alkaalisessa maaperässä kasvavien <i>Puccinellia tenuiflora</i> -kasvin geenien ilmenemisen tutkiminen	1067 <i>P. tenuiflora</i> -kasvin kloonია	Wang, Yang, Liu & Jiang 2007
<i>Arabidopsis halleri</i> -kasvin sinkin ja kadmiumin kestävyys sekä bioakumulaatioon liittyvien geenien tutkiminen fytoimediaatiota varten	<i>Arabidopsis halleri</i> -kasvi geenit	Chiang, Lo & Yeh 2006

cDNA-siruja käytetään yleensä geenien toiminnan ilmenemisen vertailuun vähintään kahden erilaisen näytteen välillä. Ympäristösovelluksissa niitä on käytetty kasvien geenien ilmenemisen tutkimiseen erilaissa kasvualustoissa esimerkiksi fytoimediaatio-tekniikan kehittämistä varten (Chiang ym. 2006) (taulukko 1). cDNA-sirulle on printattu yleensä puhdasta PCR-tuotetta, joka on peräisin cDNA:sta. Templaattina taas käytetään suoraan lähetti-RNA:ta tai siitä kopioitua cDNA:ta, jotta saadaan selville, mitkä näytteessä olevista geneista on toiminnassa. Vertailtavien näytteiden templaattit värjätään kahdella eri fluoresoivalla leimalla, jotta eri näytteistä peräisin olevat signaalit erotetaan toisistaan sirulla. Tekniikassa rajoittavana tekijänä on templaatti-RNA:n riittävä määrä sekä koettimien kyky havaita vain spesifit templaattit. (Murphy 2002, 259–261.)

Oligonukleotidisiruja voidaan käyttää jonkin mikrobiyhteisön dynamiikan tarkasteluun esimerkiksi 16S rRNA geenin avulla (fylogeneettiset sirut), jollainen on kehitetty esimerkiksi öljyllä pilaantuneiden arktisten maaperien bakteerien tutkimukseen (Yergeau 2009) (taulukko 1). Oligonukleotidisiruja käytetään myös tutkittaessa mikrobiyhteisössä tapahtuvia biologisia toimintoja (funktionaaliset sirut). Tällainen on Hen ja kumppaneiden kehittämä GeoChip, joka sisältää yli 10 000 koetinta erilaisiin biokemiallisiin toimintoihin liittyen. GeoChip-siruja on käytetty muun muassa syvänmeren savuttajien mikrobiyhteisöjen aineenvaihdunnallisen monimuotoisuuden tutkimiseen (Wang 2008) ja metsittämisen vaikutuksen tutkimiseen toiminnallisten geenien ja biokemiallisten prosessien koostumuksessa Etelä-Amerikan ruohotasangoilla (Berthrong 2009) (taulukko 1). Oligonukleotidisirujen ongelmana on niiden alhainen havaitsemisherkkyys, joka on vain 1 %:n osuus kokonais-DNA:sta sekä, suhteellisen huono spesifisyys, minkä takia ne eivät sovellu hyvin mikrobiyhteisöjen lajitason tarkasteluun. (Hultman ym. 2008.)

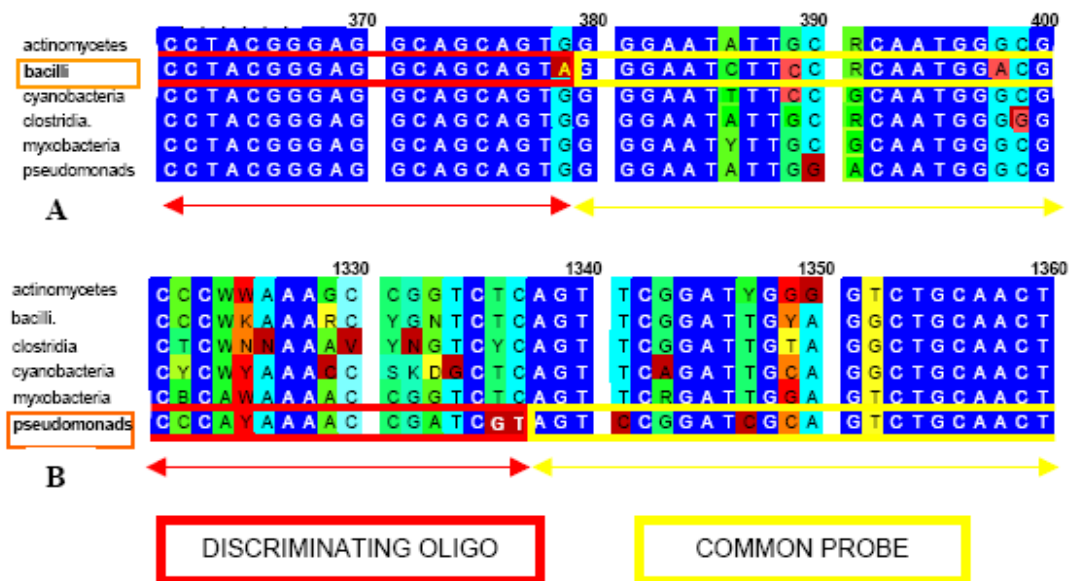
2.1 LDR-sirut ja niiden toimintaperiaate

LDR (Ligation Detection Reaction) -sirutekniikka perustuu DNA- ligaatioreaktion erottelukykyyyn, koska ligaasientsyymi vaatii lähes täydellisen komplementaarisuuden yhdistymiskohdassa juosteiden välillä, jotta kovalenttinen sidos koettimien päiden välille voi syntyä (Hultman ym. 2008). DNA- ligaatioreaktiossa kaksi vierekäistä ja kohde-DNA:han täydellisesti sopivaa koetinta ligoituvat eli yhdistyvät toisiinsa, mikä voidaan havaita fluoresoivan leiman avulla LDR-sirulta. LDR-sirut ovat universaaleja oligonukleotidisiruja. Universaalin sirusta tekee se, että koettimien sijasta siihen on kiinnitettynä zip-koodioligoita, joiden avulla koettimet voidaan tunnistaa sirulla niiden sijainnin perusteella. Jokaista koetinta vastaa siis yksi zip-koodi ja niitä voidaan käyttää minkä tahansa koetinsarjan kanssa. (Busti ym. 2002.) (Kuvio 3.)

LDR-sirutekniikasta on useita sovelluksia. Koettimet voivat yhdistyä yhdeksi lineaariseksi koettimeksi, joka ligaation jälkeen hybridisoidaan suoraan sirulle (Busti ym. 2002; Castiglioni ym. 2004; Hultman ym. 2008) tai kuten tässä tutkimuksessa on menetelty, ligaatiossa koettimet muodostavat yhden sirkulaarisen DNA-jakson, jota voidaan monistaa PCR:n avulla ligaation jälkeen menetelmän herkkyyden parantamiseksi (Akhras, Thiyagarajan, Villablanca, Davis, Nyrén & Pourmand 2007).

PCR-monistamista varten tarvitaan alukkeet, jotka on suunniteltu vastaamaan templaatti DNA:ta, DNA-polymeraasia ja deoksinukleotideja. PCR tapahtuu kolmessa vaiheessa. Ensin malli-DNA:n eli templaatin kaksoisjuoste aukeaa korkean lämpötilan vaikutuksesta, sen jälkeen lämpötilan laskiessa alukkeet kiinnittyvät templaattiin, minkä jälkeen lämpötila taas nousee ja DNA-polymeraasi täydentää templaatti-DNA:lle vastinjuosteen. Ensimmäisen kierroksen jälkeen yhdestä templaatti-DNA pätkästä on siis muodostunut kaksi identtistä DNA-pätkää. Näitä vaiheita toistetaan yleensä 20–30 kertaa, jolloin alkuperäisen DNA:n kopioita saadaan 10^6 - 10^9 -kertaisesti. Edellisen kierroksen kopioista tulee seuraavan kierroksen templaattit. (Clark ym. 2009, 324–325.)

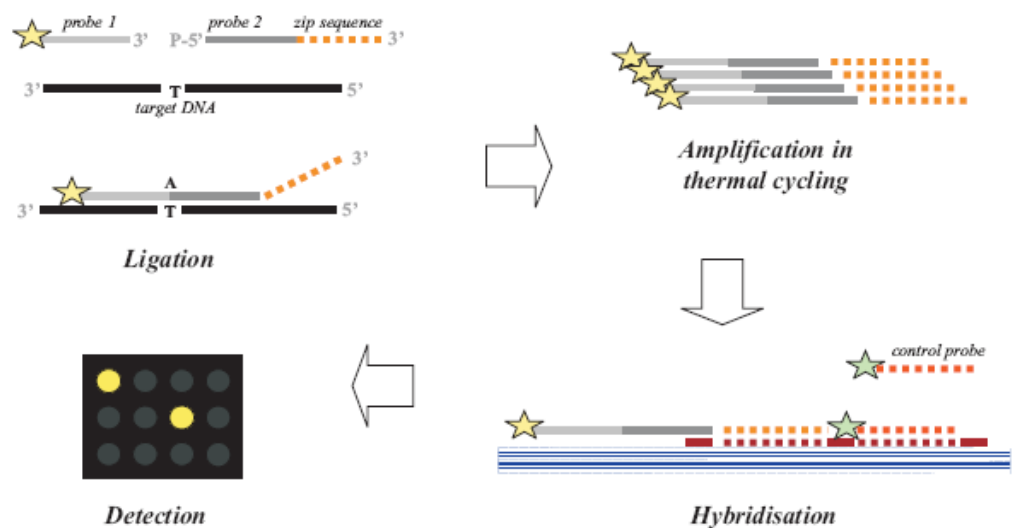
LDR-sirutekniikassa koettimien suunnittelu on keskeisessä asemassa. LDR-koettimet koostuvat kahdesta osasta, jotka ovat erotteleva osa (Discriminating-probe, D-koetin) ja yleinen osa (Common-probe, C-koetin). D-koetin valitaan siten, että sen 3'-päähän tulee halutusta sekvenssistä täysin yksilöllinen kohta, joka eroaa vähintään yhden nukleotidin verran epäspesifisistä sekvensseistä (kuvio 2). Ligaatio eli yhdistyminen tapahtuu ainoastaan silloin, kun koettimien välillä on täydellinen vastaavuus kohde-DNA:n kanssa. C-osa suunnitellaan jatkumaan suoraan siitä, mistä D-osa päättyy. Jos C-osa sattuu alueelle, joka ei ole yhtenevä kaikkien kohdesekvenssien kanssa, täytyy D-osa hylätä ja suunnitella se johonkin toiseen kohtaan. Yleensä koetinsuunnittelussa käytetään kohde-DNA:na useasta sekvenssistä muodostettua linjausta, riippuen halutaanko koettimen toimivan lajittai ryhmätasolla. Riittävän yksilöllisten sekvenssipätkien löytäminen voi kuitenkin olla hankalaa, kun halutaan suunnitella koettimia lähisukua oleville lajeille. (Busti ym. 2002.)



KUVIO 2. Esimerkki koettimien suunnittelusta ja D-koettimen 3' päässä olevasta erottelevasta nukleotidista (Busti ym. 2002)

LDR-koettimien toiminta perustuu täydelliseen sekvenssien vastaavuuteen etenkin D-koettimen (kuviossa 3 probe 1) 3'-pään viimeisessä nukleotidissa. D-koettimen 5'-päässä on fluoresoiva leima ja C-koettimen (kuviossa 3 probe 2) päässä on zip-koodi. Kun kohde-DNA:ssa on täydellinen sekvenssien vastaavuus, D- ja C-

koetin ligoituvat eli yhdistyvät ligaatioreaktion avulla toisiinsa. Kun ligaatioolosuhteita toistetaan ja käytetään hyvin lämmön kestävää entsyymiä, saadaan ligoitunutta koetinta moninkertainen määrä kohde-DNA:han nähden. Ligaation jälkeen saatu tuote hybridisoidaan sirulle zip-koettimien avulla, jolloin ligoituneet koettimet havaitaan fluoresoivan leiman avulla. Jokaisessa sirulla olevassa kohdassa (spot) on oma zip-koodi, jonka avulla koettimet tunnistetaan toisistaan. Lisäksi hybridisaatioissa käytetään kontrollikoetinta, jonka avulla arvioidaan sirun sekä hybridisaation onnistumisen laatua. Kontrollikoettimessa oleva leima havaitaan eri aallonpituudella, jolloin ne erotetaan templaatin signaalista. (Hultman ym. 2008.)

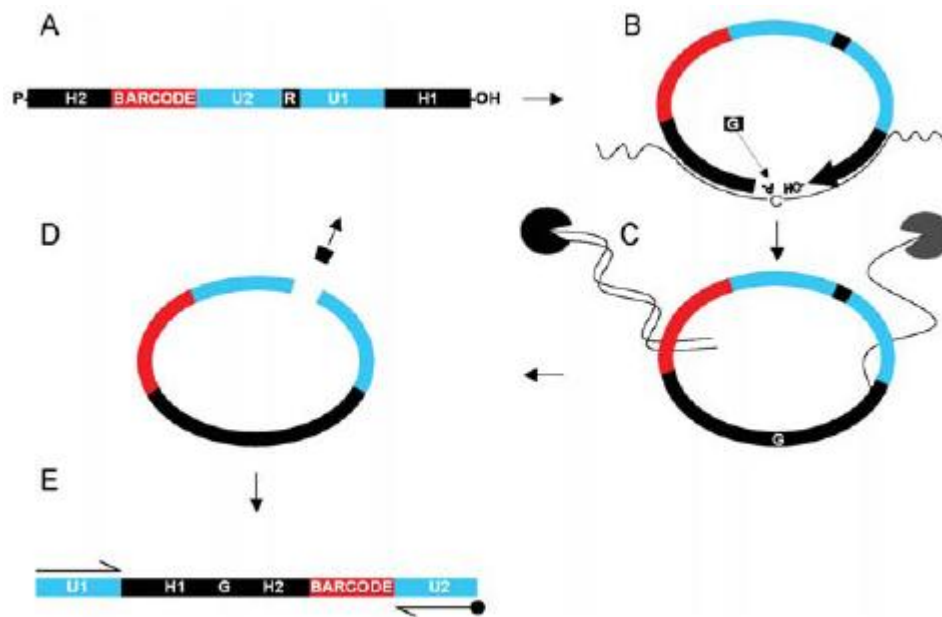


KUVIO 3. Kuvaus LDR-tekniikan toimintaperiaatteesta (Hultman ym. 2008)

2.2 MIP (Molecular Inversion Probe)-tekniikka ja universaalit DNA-sirut

MIP-tekniikassa käytettäviä koettimia kutsutaan nimellä MIP (Molecular Inversion Probe) tai ”Padlock Probe”. MIP-koettimet eroavat LDR-koettimista siten, että koettimien väliin on jätetty yhden emäksen aukko koettimien yhdistyessä kohde-DNA:han (”H1 ja H2” kuviossa 4, kohdassa A). ”Padlock Probe”-koettimissa tällaista aukkoa ei käytetä. MIP-tekniikassa tämä aukko täytetään puuttuvalla nukleotidilla ennen ligaatiota. Lisäksi koettimiin on lisätty zip-koodi (”Barcode” kuviossa 4, kohdassa A) ja PCR-alukkeiden (”U2 ja U1” kuviossa 4, kohdassa A)

sekvenssit, joiden väliin on lisätty restriktioentsyymin katkaisukohta ("R" kuviossa 4, kohdassa A). Zip-koodien avulla koettimet tunnistetaan universaalilta DNA-sirulta. Menetelmässä koetin on ensin lineaarinen, jolloin kohde-DNA:n kanssa komplementaariset sekvenssit (H1 ja H2) ovat koettimen päissä (kuvio 4, kohta A). Kun koetin ligoituu kohde-DNA:n kanssa, koettimen väliin jäävä aukko täytetään G-nukleotidilla ja koettimesta muodostuu sirkulaarinen yksijuosteinen DNA (kuvio 4, kohta B). Tämän jälkeen restriktioentsyymi katkaisee muodostuneen sirkulaarisen juosteen (kuvio 4, kohdat C ja D), minkä jälkeen koetin on lineaarinen ja "käännetty" (inverted), ja sen päissä on PCR-alkukkeiden kiinnittymispaikat (U1 ja U2), joista PCR-reaktio voi alkaa (kuvio 4, kohta E). Alukkeista toinen (kuviossa 4 U2) on leimattu, ja sen avulla monistettu ligoatioituote voidaan lopulta havaita sirulta. Ligoituneet koettimet voidaan tunnistaa zip-koodien avulla myös sekvensoimalla, mutta suurien näytemäärien kanssa hybridisaatio sirulle on tehokkaampi menetelmä. (Akhras ym. 2007.)



KUVIO 4. Kuvaus MIP-koettimien ja PCR:n avulla tehdystä ligoatio reaktiosta (Akhras ym. 2007)

2.3 LDR-sirujen soveltuminen ympäristötutkimukseen

LDR-siruja on käytetty tunnistamaan eri bakteeriyhteisöjä luokkatasolla (Busti ym.2002) sekä lajitasolla sieniä kompostinäytteistä (Hultman ym. 2008) (taulukko 1). Lisäksi LDR-tekniikkaa on käytetty syanobakteerien tunnistamiseen sukutasolla (Castiglioni ym. 2004) ja hepanotoksiinia tuottavien syanobakteerien tunnistamiseen mikrokystiinien (*mcyE*) ja nodulariinin synteesiin osallistuvien geenien (*ndaF*) avulla (Rantala 2008).

LDR-tekniikan on havaittu olevan erittäin herkkä menetelmä havaitsemaan sekvensseissä jopa yhden nukleotidin eroja. Tämän takia tekniikka sopii erittäin hyvin lajituksen mikrobien tunnistamiseen, koska sillä tasolla DNA-sekvenssit eroavat hyvin vähän toisistaan ja riittävän yksilöllisiä sekvenssejä on vaikea löytää, jopa LDR-koettimille. (Busti ym. 2002.) Zip-koodien ansiosta samoja siruja voidaan käyttää eri koettimien kanssa yhtenevissä hybridisaatio-olosuhteissa (Hultman ym. 2008).

Akhras ym. (2007) ovat saaneet MIP-tekniikalla havaitsemisrajaksi 100 fg puhdasta plasmidia ja 100 pg plasmidia (0,01 fmol plasmidia n. 8000 bp), kun mukana on 200 ng tausta-DNA:ta. Hultman ym. (2008) ovat määrittäneet LDR-sirutekniikalla havaitsemisrajaksi 0,1 fmol, kun mukana on ollut 100 ng tausta-DNA:ta. Tulos vastaa 0,04 %:n herkkyyttä, kun taas oligonukleotidisirujen yleinen herkkyystaso on noin 1 %:n tasolla (Hultman ym 2008). Castiglioni ym. (2004) tutkimuksessa LDR-sirun havaitsemisrajaksi saatiin 1 fmol monistettua templaatti DNA:ta. Menetelmää (MIP-tekniikka), jossa käytetään hyväksi ligaatiotuotteen monistamista PCR:n avulla, voidaan siis pitää jonkin verran herkempänä verrattuna ligaatiotuotteen hybridisoimista suoraan universaalille sirulle.

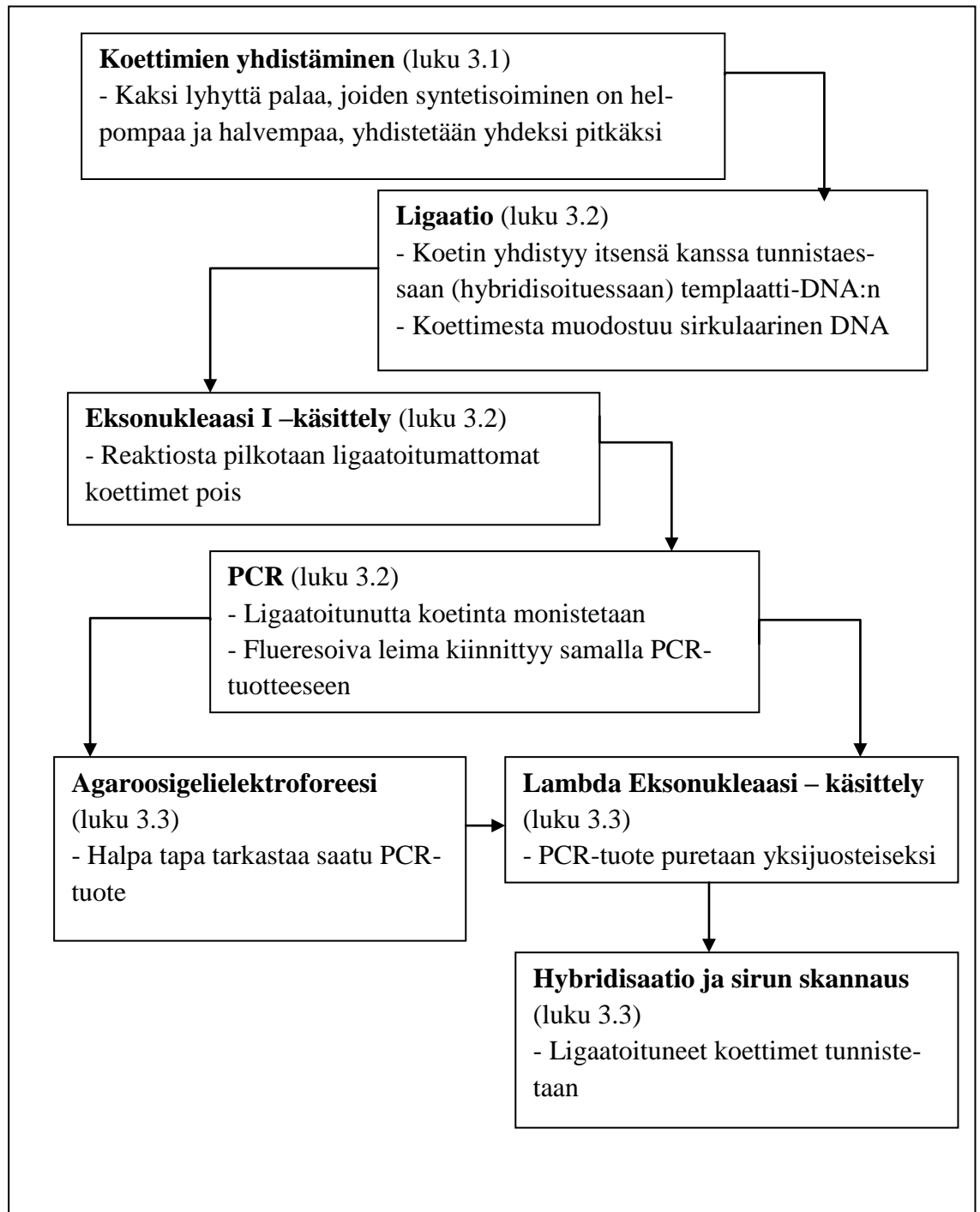
Hultman ym. (2008) testasivat 14 koetinta, jotka oli suunniteltu sienten ITS (internal transcribed spacer) -alueelle. Näistä koettimista kolme todettiin toimimattomiksi ja yksi antoi erittäin heikon signaalin väärän templaatin kanssa. Koettimia voitiin siis pitää erittäin spesifisinä. Castiglioni ym. (2004) testasivat 19 eri syanobakteeriryhmille spesifiä koetinta 95 syanobakteerinäytteellä ja kaikki koettimet toimivat odotetusti. Akhras ym. (2007) testasivat 24 MIP-koetinta, joista kaikki

toimivat oman kohde-DNA:n kanssa ilman väärää signaaleja. Hultman ym. (2008) testasivat koettimia myös ympäristönäytteillä. Kun templaattina käytettiin 10 ng eristettyä genomista DNA:ta, ainoastaan kolme kymmenestä näytteestä todettiin toimivan. Kun genomisesta DNA:sta ensin monistettiin ITS-aluetta, jota sitten käytettiin templaattina, saatiin tulokset kaikista näytteistä. Rajoituksena menetelmässä on, että DNA:n monistamisen takia sirutuloksia ei voida käyttää templaatin määrän arvioimiseen näytteessä. Hultman ym. (2008) tutkivat LDR-sirumenetelmän rinnalla ympäristönäytteet geenikirjasto-menetelmällä ja tulokset olivat suurimmaksi osaksi verrattavissa. Muutaman näytteen kohdalla vain toinen menetelmistä havaitsi joitakin lajeja.

LDR-sirutekniikassa käytettävien universaalien DNA-sirujen hyötynä on, että kaikille koetinpareille sopivat samat siruhybridisaatio-olosuhteet, koska ne määräytyvät zip-koodien perusteella, ja uusien koettimien lisääminen sirulle on yksinkertaista. Perinteisissä oligonukleotidisiruissa on hankaluutena usein suunnitella suuri määrä koettimia, joille kaikille sopivat samat hybridisaatio-olosuhteet. Kuitenkin haittana siruissa on, että niissä on yksi työvaihe (ligaatio) enemmän hybridisaation lisäksi. MIP-tekniikassa on vielä enemmän työvaiheita hybridisaation lisäksi. (Castiglioni ym. 2004.)

3 TESTAUKSESSA KÄYTETYN TEKNIIKAN YLEISKUVAUS

Tutkimuksessa käytetty menetelmä on sovellettu ympäristömikrobiologiaan-
Biotekniikan Instituutissa (Helsingin yliopisto) ja siinä yhdistyvät LDR- ja MIP-
sovellukset. Tutkimuksessa käytetyn tekniikan eri vaiheet on esitetty järjestykses-
sä kuviossa 5.



KUVIO 5. Tutkimuksessa käytetyn tekniikan yleiskuvaus

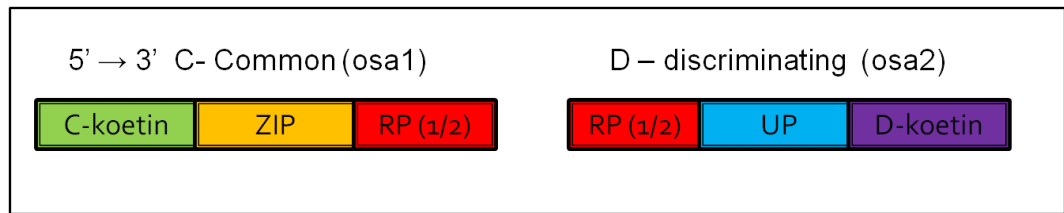
3.1 Koettimien yhdistäminen

Testattavista koettimista 73 oli suunniteltu bakteereille ja 14 arkeille. Arkkikoettimien tunnuksena käytettiin numeroinnin lisäksi kirjainta A ja bakteerikoettimien B. Koettimista 43 oli suunniteltu lajitasolle, 39 sukutasolle, 4 heimotasolle ja yksi lahkotasolle. Koettimien suunnittelussa oli käytetty järvisedimenttinäytteistä saatua sekvensointiaineistoa. Koettimet ja niiden sekvenssit sekä biologinen alkuperä on esitetty liitessä 1. (Halttunen 2010.)

Testauksessa käytetty synteettinen DNA oli yksijuosteista ja noin 50 emäksen pituista DNA:ta, joka oli suunniteltu vastaamaan koettimien emäsjärjestystä. Koettimet oli syntetisoitu kahdessa noin 60 emäksen osassa, jotta niiden laatu saatiin pysymään riittävän hyvänä. Erikseen syntetisoidut osat yhdistettiin, jolloin saatiin 115-125 emästä pitkiä ja yksijuosteisia koettimia.

Koettimet muodostuvat C- ja D-osista (kuvio 6). C-koetin, ZIP ja D-koetin ovat spesifit jokaiselle koettimelle. C- ja D- osat on suunniteltu vastaamaan kohde-DNA:ta. Zip-koodin avulla koetin kiinnittyy oikeaan kohtaan (spot) universaalilla LDR-sirulla. RP- ja UP-alukkeiden kiinnittymispaikat ovat samanlaiset kaikissa koettimissa. RP- ja UP-alukkeet on suunniteltu niin, että ne eivät vastaisi kohde-DNA:n sekvenssejä, jotta PCR:ssä ei monistuisi mitään ylimääräistä. Koettimet ja syntetinen DNA tilattiin Bioneeriltä (Etelä-Korea). Koettimet yhdistetään RP-alukkeen ja T4 ligaasi-entsyymillä avulla. T4 ligaasi-entsyymi muodostaa osien 3' ja 5' päiden välille fosfodiesterisidoksen, jolloin osat kiinnittyvät toisiinsa.

Akhras ym. (2007) esittelivät tekniikan, jolla kaksi lyhyttä koetinpalaa yhdistetään yhdeksi pitkäksi pätkäksi. Heidän käyttämänsä tekniikka eroaa tässä työssä käytetystä siten, että he lisäsivät yhdistymisreaktioon myös C- ja T-nukleotideja sekä polymeeraasia, jotta mahdollinen osien väliin jäävä aukko täydentyisi, mikäli niiden syntetisointi ei olisi onnistunut täydellisesti osien päissä. Akhras ym. (2007) testasivat yhdistämismenetelmää ja saivat parhaan lopputuloksen, kun koettimen molempia osia ja RP-aluketta käytettiin saman verran sekä reaktioon lisättiin nukleotideja ja polymeeraasia.



KUVIO 6. Koettimen osat ennen yhdistämistä

3.2 Ligaatiosta PCR-monistukseen

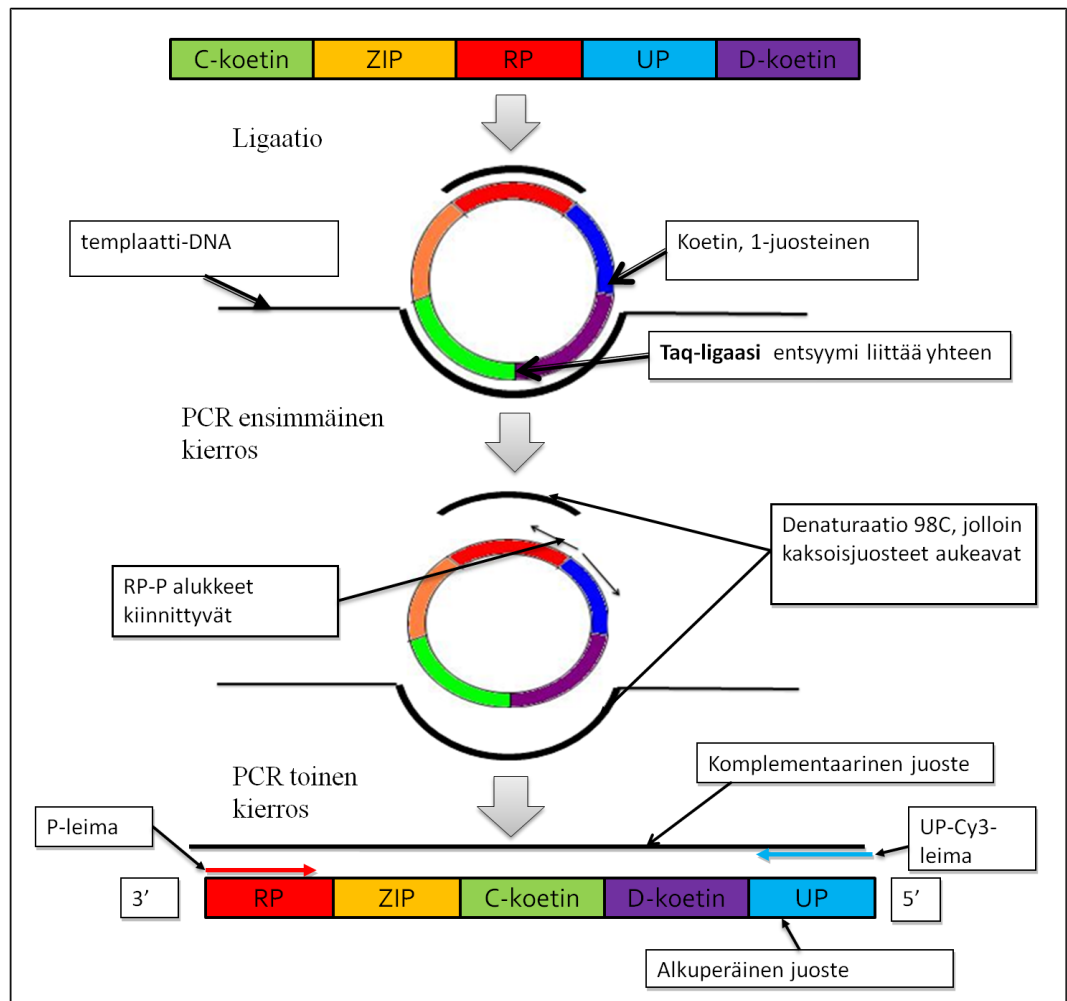
Ligaatiossa koettimet yhdistyvät kohde-DNA:n kanssa (kuvio 7). Koettimen päissä olevat C- ja D-osat yhdistyvät templaattiin, jolloin koetin ligoituu sirkulaariseksi. Annealing-lämpötilaa ja -aikaa muuttamalla saadaan ligaatio-olosuhteita säädeltyä tiukemmiksi tai sallivimmiksi. Mitä korkeampi on annealing lämpötila, sitä spesifisemmin koettimet ligoituvat. Lämpötila pyritään säätämään niin, että ligaatiotuotetta saadaan mahdollisimman paljon ilman, että spesifisyys kärsii.

Ligaation jälkeen Eksonukleaasi I-entsyymi tuhoaa reaktiosta kaikki ligoitumattomat koettimet. Koska Eksonukleaasi-entsyymi pilkkoo yksijuosteista DNA:ta 3' päästä 5' päähän, se ei pysty pilkkomaan sirkulaarista DNA:ta, jossa ei ole vapaita 3'-OH päitä. (Thermo Fisher Scientific Inc 2010.)

Eksonukleaasi I -käsittelyn jälkeen ligoitunutta koetinta monistetaan PCR:n avulla, jotta mahdollisimman pieni määrä kohde-DNA:ta voitaisiin havaita sirulla. Menetelmässä käytetyssä PCR:ssä templaatti-DNA on sirkulaarista ja käytetyt alukkeet ovat leimattuja (kuvio 7). RP-alukkeen 5' päässä on fosfaattileima ja UP-alukkeen 5' päässä Cy3-leima. Fosfaattileiman avulla PCR:ssä kopioituneet kaksijuosteet saadaan purettua yksijuosteisiksi ennen sirulle hybridisaatiota ja Cy3-leiman avulla hybridisoituneet PCR-tuotteet havaitaan sirulta. Templaatin sirkulaarisuuden ja alukkeiden leimojen takia DN- polymeraasin toiminta hankaloituu.

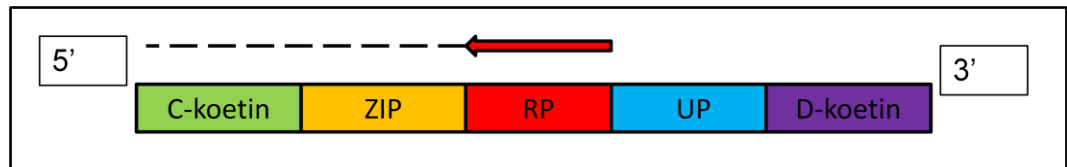
PCR:n ensimmäisellä kierroksella RP-P aluke kiinnittyy sirkulaariseen templaattiin ja muodostaa alkuperäiselle juosteelle kopion eli komplementaarisen juosteen (kuvio 7). Toisesta kierroksesta alkaen myös UP-Cy3-aluke kiinnittyy komple-

mentaariseseen juosteeseen, mistä eteenpäin alkaa muodostua linearista ja kaksi-juosteista DNA palaa (kuvio 7).



KUVIO 7. Ligaation ja PCR:n vaiheet

PCR:ssä kopioituvat ainoastaan ligoituneet koettimet, koska alukkeet eivät kykene monistamaan ligoitumattomia. Kun RP-P alue kiinnittyy ligoitumattomaan koettimeen, alkaa DNA-polymeraasi rakentaa komplementaarista juostetta UP-Cy3-alukkeen kiinnittymiskohdasta vastakkaiseen suuntaan. Tällöin muodostuva juoste ei pysty monistumaan enää toisella kierroksella, koska siinä ei ole UP-Cy3-alukkeelle kiinnittymispaikkaa (kuvio 8).



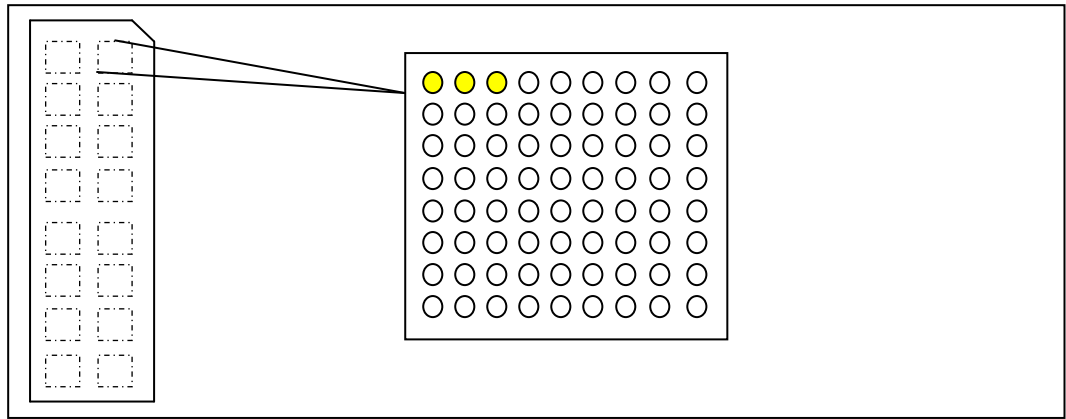
KUVIO 8. Ligoitumattoman koettimen PCR

3.3 PCR-tuotteiden tarkastaminen

PCR:n jälkeen tulos voidaan tarkastaa kahdella tavalla: agarosigeelielektroforeesilla tai hybridisoimalla sirulle. Agarosigeelielektroforeesilla nähdään ainoastaan, toimiiko koetin vai ei käytettyyn templaattiin. Menetelmä soveltuu hyvin, jos käytetään jokaisessa reaktiossa yhtä koetinta ja yhtä templaattia. Tämän lisäksi PCR-tuote voidaan tarkistaa agarosigeelin avulla ennen sirulle hybridisaatiota, kun halutaan tarkastaa saadun tuotteen puhtaus ja määrä silmämääräisesti, jotta sirulle ei turhaan hybridisoida epäonnistunutta tuotetta.

Ennen sirulle hybridisaatiota Lambda Eksonukleaasi -entsyymillä avulla kaksijuosteiset PCR-tuotteet puretaan yksijuosteisiksi, jotta komplementaarinen juoste ei turhaan kilpailisi sirulla hybridisoituvan juosteen kanssa. Lambda Eksonukleaasi -entsyymi poistaa kaksijuosteista DNA:sta fosforyloidun juosteen. Tästä syystä toisessa PCR-alukkeessa käytetään fosfaatti-leimaa. Käsittelyn jälkeen saatu tuote voidaan suoraan hybridisoida sirulle. Ennen hybridisaatioliuoksen pipetoimista lasille se denaturoidaan, jotta yksijuosteiset keskenään hybridisoituneet DNA-pätkät avautuisivat.

Käytetyt LDR-sirut olivat Arrayitiltä (CA, USA), jossa ne myös printattiin. Tarvittavat zip-oligot tilattiin Bioneerilta (Etelä-Korea), josta ne toimitettiin Arrayitille printattavaksi siruille. Käytetyt sirut olivat lasia, ja niissä oli 16 subarrayta eli keskenään identtistä alasarua, joille jokaiselle voitiin hybridisoida yksi näyte. Yhdelle sirulle mahtui siis 16 näytettä. Katkoviivalla merkityt subarrayt eivät todellisuudessa erottuneet silmällä täysin kirkkaasta lasista (kuviokuva 9). Käytettyjen lasien laatu oli erittäin hyvä. Jokaista koetinta vastasi kolme kohtaa eli spottia, joten yhteensä yhdessä subarrayssa oli 261 spottia ja koko sirussa 4176.



KUVIO 9. Kaaviokuva käytetyistä universaaleista LDR-laseista

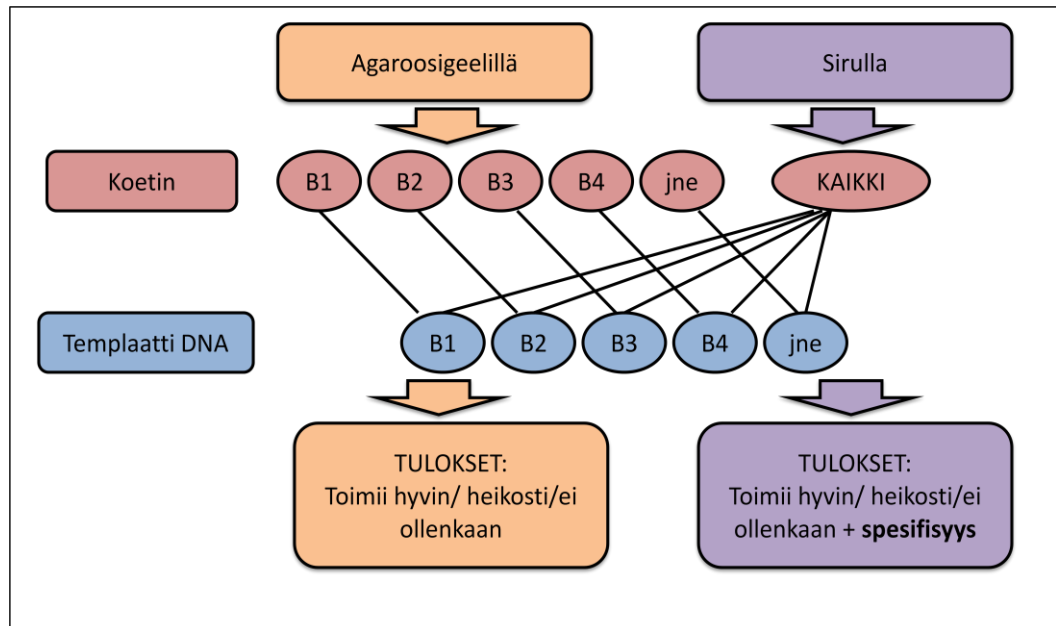
Hybridisaatio tapahtuu yleensä puskuriliuoksessa, jossa on suoloja natriumsitraatin (SSC) muodossa, puhdistusainetta, kuten natriumdodekyylisulfaattia (SDS) ja taustana epäspesifiä DNA:ta. Hybridisaatiolämpötila on 10–15 °C alhaisempi kuin hybridisoitavien DNA-sekvenssien sulamislämpötila. Hybridisoitavaa liuosta voidaan pipetoida sirulle 20 µl:sta alkaen jopa millilitroihin. Lasin päällä käytetään kammioita, teippiä tai molempia, jotta liuoksen lämpötila pysyy vakiona eikä lasi pääse kuivumaan. Hybridisaatioaika voi vaihdella parista tunnista yön yli inkubointiin. (Wong 2005, 20-21.)

4 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

4.1 Testijärjestelyt

Testauksen kohteena oli 87 koetinta, joiden toimivuus ja spesifisyys haluttiin selvittää. Toimivuutta testattiin agarosigeelielektroforeesin avulla ja spesifisyyttä sirutesteillä. Agarosigeelielektroforeesin avulla oli tarkoitus selvittää, toimiiko koetin vastaavan synteettisen DNA:n kanssa vai ei, jolloin kaikki varmasti toimimattomat koettimet olisi voitu jättää sirutestauksen ulkopuolelle ajan ja rahan säästämiseksi.

Kuviosta 10 selviää käytetty testijärjestely. Agarosigeelielektroforeesi menetelmällä testattaessa jokaiseen ligaatioreaktioon laitettiin yhtä koetinta ja sitä vastaavaa synteettistä DNA:ta. Koska agarosigeeliltä saatava tulos kertoo ainoastaan toimiiko koetin vai ei, yhteen reaktioon ei kannata yhdistää useampaa koetinta, koska silloin ei voida tietää, mikä koettimista toimii kyseessä olevan templaatin kanssa. LDR-siruille tehtävissä testeissä yhteen ligaatioreaktioon laitettiin kaikki 87 koetinta sekä yhtä synteettistä DNA:ta, jotta saatiin selville, kuinka spesifisesti koettimet toimivat.



KUVIO 10. Testijärjestely

Agaroosigeelitestauksessa koettimet testattiin kuudessa erässä:

1. A1-A14
2. B1-B9 + B18-B25
3. B26-B41
4. B42-B61
5. B62-B81
6. B10-B17.

Siruvaiheessa testattiin 32 templaattia kerrallaan yhteensä kolmessa erässä, joista jokaisessa hybridisoitiin kaksi sirua (lasia). Erät olivat

1. A1-A14 + B1-B19 (30.9.)
2. B20-B55 (8.10.)
3. B56-B81 (13.10.).

Lisäksi kolmannessa erässä uusittiin muutama aiemmin testattu koetin (B20-B26 ja A1-A2) rinnakkaistestinä tulosten varmistamiseksi.

4.2 Koettimien yhdistäminen

Jokainen koetin yhdistettiin omassa reaktiossa. Yhdistymisreaktiot tehtiin 20 µl:n tilavuudessa, johon laitettiin 2 µl 10 x T4 puskuria, 2 µl 100 µM RP-aluketta (Oligomer), 2 µl 100 µM koetinta osa1 (Bioneer), 2 µl 100 µM koetinta osa 2 (Bioneer) ja 11 µl vettä. Ennen entsyymien lisäämistä reaktioita inkuboitiin 95 °C:ssa 1 minuutti, minkä jälkeen lämpötilan annettiin laskea hitaasti 0,1 °C/s 15 °C:seen. Tässä annealing-reaktiossa RP-aluke yhdistyi osien 1 ja 2 vastaavan RP-alukkeen kiinnittymiskohdan päälle. Tämän jälkeen lisättiin T4 DNA ligaasia (Fermentas) 1 µl (5 U), minkä jälkeen ligaatio-ohjelman (25 °C 15 min ja 65 °C 10 min) aikana entsyymi kiinnitti osat yhteen. Koettimien oletettiin yhdistyvän 100-prosenttisesti oikein, jolloin saadussa yhdistymisreaktiossa oli yhdistynyttä koetinta 10 pmol/µl. Sirutestausta varten koettimet yhdistettiin uudelleen (8.9.), koska yksijuosteista koetinta oli sulatettu pakastimesta useaan kertaan, jolloin oli syytä epäillä koettimien pitoisuuden alentuneen.

4.2.1 Ligaatiot

Agaroosigeelielektroforeesi- ja sirutestauksessa oli käytössä sama reaktioseos, mutta eri ligaatio-ohjelmat. Ligaatioreaktiot tehtiin 20 µl:n tilavuudessa, johon tuli 2 µl 10 x Taq DNA ligaasi puskuria, 1 µl 600 mM TMAC (tetrametyyliammoniumkloridi), 1 µl 110 ng/µl Herrings DNA:ta (Sigma), 1 µl (6 U) Taq DNA-ligaasia (NEB), 1-3 µl koetinta à 250 fmol, 1 µl synteettistä DNA templaattia ja loput vettä. Agaroosigeelielektroforeesitesteissä synteettistä DNA templaattia käytettiin 100 fmol ja sirutesteissä 10 fmol. Olosuhdetesteissä myös koettimien määrää vaihdeltiin 10 pmol:sta 250 fmol:iin, mistä tultiin siihen tulokseen, että 250 fmol/koetin on riittävä määrä reaktiossa. Suuremmalla koetinmäärällä saatiin myös enemmän taustan epäpuhtautta agaroosikuvissa.

Sirutestauksessa reaktiot ensin denaturoitiin 94 °C:ssa 2 minuuttia, ennen entsyymien lisäämistä, jotta alhaisissa lämpötiloissa ei muodostuisi epäspesifejä ligaa-

tiotuotteita. Entsyymien lisäämisen jälkeen reaktiot laitettiin suoraan 94 °C lämpötilaan. Taulukossa 2 on esitetty käytetyt ligaatio-ohjelmat.

TAULUKKO 2. Käytetyt ligaatio ohjelmat

Vaihe	<i>Agaroosigeelielektroforeesi</i>		<i>Siru</i>	
	Lämpötila	Inkubointi	Lämpötila	Inkubointi
1	94 °C	2 min	94 °C	2 min
2	94 °C	30 s	94 °C	30 s
3	60 °C	15 min	74 °C	4 min
4	Paluu kohtaan 2, 5 kertaa		Paluu kohtaan 2, 19 kertaa	
5	4 °C ikuisesti		4 °C ikuisesti	

Olosuhdetesteissä agarosieelielektroforeesimenetelmällä kokeiltiin annealing-lämpötiloja 55 ja 65 °C:n välillä. Sirutestauksessa lämpötilaa nostettiin aina 74 °C:seen asti, jotta koettimet saatiin toimimaan spesifisemmin ja väärät osumat minimoitua. Annealing aikaa vaihdeltiin 4 ja 15 minuutin välillä siten, että pidemmän ajan kanssa käytettiin vähemmän syklejä, joita kokeiltiin 6 ja 40 välillä.

4.2.2 Eksonukleaasi I-entsyymi -käsittely

Ligaation jälkeen jokaiseen reaktioon lisättiin 1 µl (20 U) Eksonukleaasi I-entsyymiä (Fermentas), jonka jälkeen reaktioita inkuboitiin 37 °C:ssa 20 minuuttia ja 80 °C:ssa 15 minuuttia entsyymien inaktivoimiseksi. Reaktio toistettiin aina samalla tavalla.

4.2.3 PCR (Polymerase Chain Reaction)

Agarosieelielektroforeesitesteissä käytettiin Kapa Hifi HotStart DNA-polymeraasia (KapaBioSystems) ja sirutesteissä Paq5000 Hotstart DNA-polymeraasia (Stratagene), jonka oli todettu toimivan tehokkaammin sirkulaarisen templaatin ja leimattujen alukkeiden kanssa (Ritari 2010). PCR-reaktiot tehtiin 30

μ l:n tilavuudessa. Reaktioon tuli entsyymien mukaisesti 5 tai 10 x puskuria 3 tai 6 μ l, 0,625 μ l 10 mM dNTPmix (Kapa Hifi ja Finnzymes), 1,5 μ l 10 μ M UP-Cy3-aluketta (Oligomer), 1,5 μ l 10 μ M RP-P-aluketta (Oligomer), 1 μ l (1 U) Kapa Hifi HotStart DNA-polymeraasia tai 0,5 μ l (2,5 U) Paq5000 Hotstart DNA-polymeraasia, 9 μ l ligaatioreaktiota ja loput vettä. Taulukossa 3 on esitetty käytetyt PCR-ohjelmat agarosigeelielektroforeesi- ja sirutesteissä.

TAULUKKO 3. Käytetyt PCR-ohjelmat

Vaihe	<i>Agarosigeelielektroforeesi</i>		<i>Siru</i>	
	Lämpötila	Inkubointi	Lämpötila	Inkubointi
1	95 °C	3 min	95 °C	3 min
2	98 °C	20 s	98 °C	20 s
3	54 °C	10 s	58 °C	10 s
4	72 °C	4 s	72 °C	4 s
5	Paluu kohtaan 2, 34 kertaa		Paluu kohtaan 2, 19 kertaa	
6	4 °C ikuisesti		4 °C ikuisesti	

Olosuhdetestauksessa annealing lämpötilaa vaihdeltiin 52 ja 60 °C:n välillä. Myös annealing- ja ekstensioaikoja lyhennettiin, mutta niiden ei todettu vaikuttavan tulokseen. Useammilla sykleillä saatiin myös huomattavasti enemmän taustahäiriötä, joten lopulta päädyttiin 20 syklin ohjelmaan (luku 5.2).

4.2.4 Agarosigeelielektroforeesi

PCR-tuotteet ajettiin 2,5-prosenttiselle agarosigeelille á 100 V ja 70 minuuttia. Myös 2-prosenttista geeliä kokeiltiin ja 60 min ajoaikaa, mutta bändien selkeämmän erottumisen takia valittiin pidempi aika ja tiheämpi geeli. Kaivoihin pipetoitiin maksimimäärä 30 μ l PCR-tuotetta, jotta geelille saatiin mahdollisimman paljon PCR-tuotetta bändien selkeyttämiseksi, ja 6 μ l geeliväriä (6 x loading dye). Molekyylirikostandardina käytettiin 1 μ l 50 bp GeneRuler DNA ladderia (Fermentas). Värjäväänä aineena geelillä käytettiin etidium bromidia.

4.2.5 Lambda Eksonukleaasi -käsittely

Lambda Eksonukleaasi -käsittely tehtiin aina heti ennen hybridisaatiota, koska pieni määrä yksijuosteista DNA:ta ei säily kovin pitkään. Jokaiseen reaktioon laitettiin Lambda Eksonukleaasi-entsyymiä (Fermentas) 0,2 µl (2 U) sekä 1 µl 10 x puskuria. Reaktioita inkuboitiin 37 °C:een lämpötilassa 15 minuuttia, jonka aikana entsyymi toimi, ja 75 °C:ssa 10 minuuttia entsyymien inaktivoimiseksi.

4.2.6 Hybridisaatio ja sirun skannaus

Ennen hybridisaatiota sirut prehybridisoitiin 42 °C:ssa vesihauteessa 50 ml:n falcon-putkissa prehybridisaatioliuoksessa, joka oli 6 x SSC:tä sekä 0,5 x SDS:ää. Siruja prehybridisoitiin 30–45 minuuttia, minkä jälkeen ne pestiin 3 x 5 minuuttia MQ-vedessä ravistelijassa 150 rpm huoneenlämmössä. Pesujen jälkeen sirut kuivattiin pöytäsentrifuugissa. Sirut pidettiin aina DNA-puoli ylöspäin, jotta pinta ei naarmuuntuisi. Kuivauksen jälkeen sirut asetettiin hybridisaatiokammioon (kuvio 11).



KUVIO 11. Hybrisaatiokammio (Arrayit Corporation 2010)

Hybridisaatioliuosta tehtiin 60 µl jokaiseen reaktioon, johon laitettiin 30 µl (kaikki) PCR-tuotetta, 15 µl 20 x SSC:tä, 2 µl (11mg/ml) Herrings DNA:ta, 1 µl kontrollikoetinta ja loput vettä. Ennen kontrollikoetimen lisäämistä reaktiot denaturoitiin inkuboimalla niitä 94 °C:ssa 2 minuuttia, minkä jälkeen ne siirrettiin suoraan jälle. Kontrollikoetimen lisäämisen jälkeen hybridisaatioliuokset pipetoitiin si-

rulle kammioihin. Kammiot peitettiin teipillä kuivumisen estämiseksi. Siruja inkuboitii 53–54 °C:ssa 2 tuntia. Inkuboinnin jälkeen kammioista poistettiin teipit, ja sirut huuhdeltiin ensin pipetoimalla kammioihin 100 µl pesuliuosta, joka oli 0,1 x SSC:tä ja 0,1 % SDS:ää. Huuhtelun jälkeen sirut poistettiin kammioista ja pesittiin 3 x 15 minuuttia pesuliuoksessa sekä 3 x 5 minuuttia MQ-vedessä. Kaikki pesut tapahtuivat ravistelijassa 150 rpm huoneenlämpötilassa. Pesujen jälkeen sirut kuivattiin jälleen pöytäsentrifuugissa. Sirut skannattiin GenePix Autoloader 4200A -laitteella käyttäen GenePix6.1-tietokoneohjelmaa. Skannauksessa käytetyt aallonpituudet olivat näytteille 532 ja kontrollikoettimelle 488.

5 TULOKSET JA NIIDEN ARVIONTI

5.1 Koettimien testaaminen LDR-sirulla

Sirutestaus suoritettiin kolmessa erässä siten, että templaatit jaettiin kolmeen osaan ja ne testattiin eri kerroilla (30.9., 8.10. ja 13.10.). Vaikka kaikki testauskerat tehtiin samalla tavalla, niiden välillä oli havaittavissa eroja signaalien intensiteeteissä (taulukko 7, luku 5.3). Kaikkien koettimien tulokset ovat liitessä 2.

Sirutestauksessa tuloksia arvioitiin kolmella tavalla. Ensiksi arvioitiin koettimen toimivuutta oman synteettisen DNA-templaatin kanssa asteikolla hyvä, heikko ja ei toimi ollenkaan. Tässä ensimmäisessä arvioinnissa ei otettu ollenkaan huomioon koettimen spesifisyyttä. Hyviksi arvioitiin koettimet, joiden signaali oli yli 200, heikoiksi ne, joiden signaali oli alle 200, ja ei ollenkaan toimiviksi ne, joiden signaali oli alle 50–100 tai ne eivät erottuneet riittävän selkeästi taustan signaalista. Tämän arvioinnin perusteella hyviä oli 67 %, heikkoja 13 % ja toimimattomia 18 %. Loput 2 % olivat rajatapauksia, joissa rinnakkaistestien tulokset antoivat päinvastaiset tulokset (B21 ja B24) (taulukko 7, luku 5.3).

Toiseksi arvioitiin koettimien spesifisyyttä. Seitsemän koetinta todettiin käyttökelvottomiksi, koska ne reagoivat hyvin tai heikosti vähintään 10 väärän templaatin kanssa. Tällaisia koettimia olivat B3, B18, B34, B36, B37, A9 ja A11, joista B34, B37 ja A11 toimivat vain heikosti väärin templaattien kanssa. Taulukossa 4 on esitetty epäspesifisesti toimivien koettimien osuudet. Koettimia, jotka toimivat täysin spesifisesti tai vain heikosti yhden väärän templaatin kanssa, oli suurin osa eli 71 %. Yhden väärän templaatin kanssa hyvin tai maksimissaan kahden väärän templaatin kanssa heikosti toimivia koettimia oli 15 %, 6–9 väärän templaatin kanssa reagoivia koettimia oli ainoastaan 1 %.

TAULUKKO 4. Epäspesifisesti toimivien koettimien määrät ja osuudet

Väärin templaattien määrä	Koettimien määrä	Koettimien %-osuus
0 tai 1 heikosti	62	71
1 hyvin tai 2 heikosti	13	15
2–5	4	5
6–9	1	1
yli 10	7	8
Yhteensä	87	100

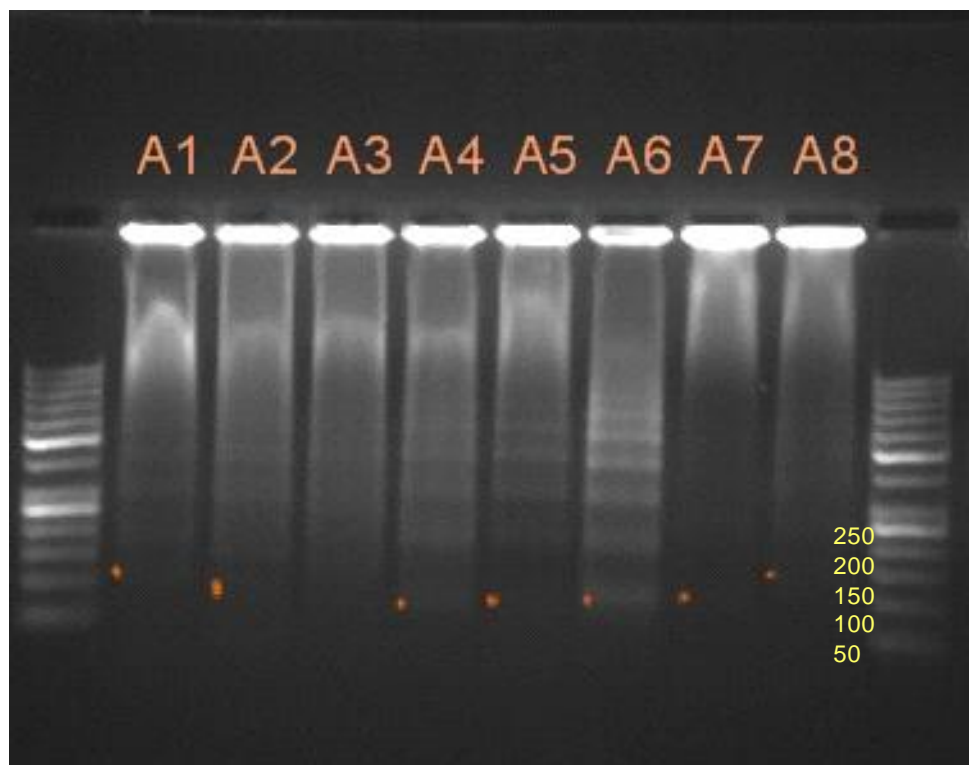
Kolmanneksi arvioitiin koettimien laatua kokonaisuudessaan, ottaen huomioon koettimen toimivuuden oman templaatin kanssa, spesifisyyden ja koettimen antaman signaalin voimakkuuden vääriin signaaleihin nähden. Toivottavaa siis oli, että haluttu koetin antoi selvästi voimakkaimman signaalin verrattuna mahdollisiin epäspesifeihin signaaleihin. Koettimet arvioitiin asteikolla 1–5 (taulukko 5). Koettimista erinomaisia oli 38 %, hyviä 22 %, heikkoja 18 %, epäspesifejä 8 % ja toimimattomia 14 %.

TAULUKKO 5. Koettimien kokonaislaadun arviointiin käytetty asteikko ja koettimien määrät sekä %-osuudet

	Arviointikriteerit	Määrä/kpl	%-osuus
1	Erinomainen , toimii hyvin ja vahvasti vääriin signaaleihin nähden, on spesifi (0 väärää signaalia tai 1 heikosti erottuva väärä signaali)	33	38
2	Hyvä , toimii hyvin ja melko vahvasti vääriin signaaleihin nähden, on melko spesifi (1 hyvin erottuva väärä signaali tai 2 heikosti erottuvaa)	19	22
3	Heikko , toimii heikosti tai heikosti vääriin signaaleihin nähden tai ei ole spesifi (yli 2 väärää signaalia)	16	18
4	Toimii, mutta on epäspesifi (yli 10 väärää signaalia)	7	8
5	Toimimaton oman templaatti-DNA:n kanssa	12	14

5.2 Esitestauksen tulokset

Ennen sirutestausta koettimien toimivuutta arvioitiin agarosigeelielektroforeesimenetelmällä näkyvien bändien perusteella. Jos bändi näkyi kuvassa selkeästi, arvioitiin koettimen toimivuus hyväksi, jos bändi näkyi himmeästi tai hieman väärässä kohdassa, arvioitiin toimivuus heikoksi, ja jos bändiä ei havaittu ollenkaan, arvioitiin koetin toimimattomaksi (kuvio 12). Haluttu bändi oli noin 120 emäsparin pituinen. Kuvissa näkyi myös selkeästi halutun bändin moninkertoja. Testatuista koettimista toimi hyvin 14 %, heikosti 38 % ja ei ollenkaan 48 %.

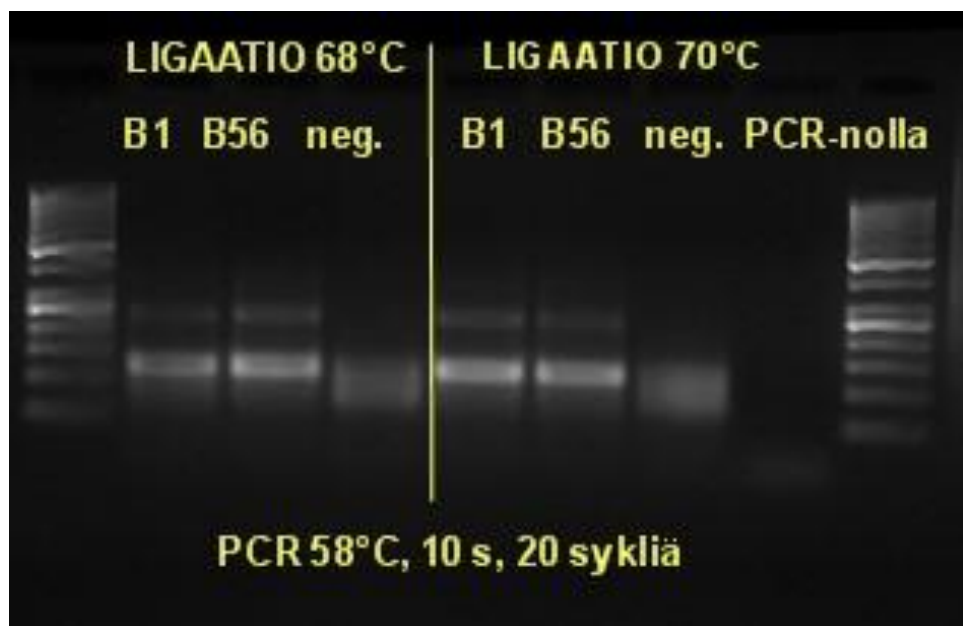


A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8
heikko	heikko	ei	hyvä	heikko	hyvä	heikko	heikko

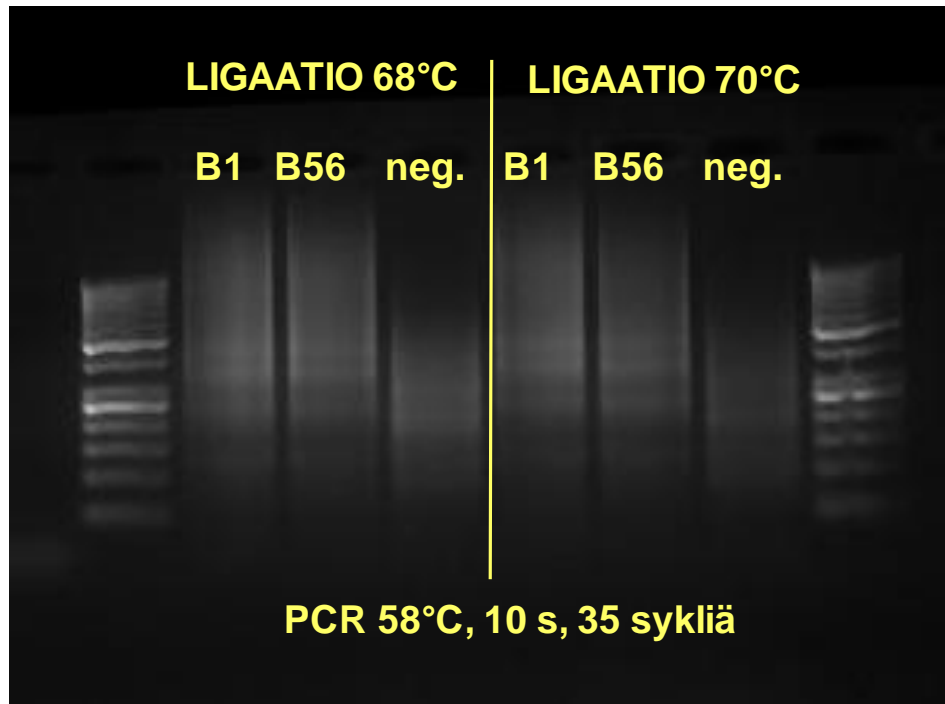
KUVAIO 12. Esimerkkikuva agarosigeelielektroforesitestauksen tuloksista

Agarosigeelitestaus tehtiin kuudessa erässä, joista A1–A14 tuloksista saatiin parhaimmat bändit näkyviin. Syynä saattoi olla se, että näitä koettimia ei ollut käytetty juurikaan olosuhdetesteissä ja sulatettu pakastimesta aiemmin, jolloin niiden laatu tai pitoisuus ei ollut todennäköisesti kärsinyt.

Menetelmää ei saatu toimimaan riittävän hyvin ja tarkasti. Bändit näkyivät epäselvästi, ja kuvissa näkyi paljon taustaa. Agaroosigeelikuvien perusteella oli tarkoitus valita koettimet sirutestaukseen eli jättää pois kaikki varmasti ei toimivat, mutta näin ei voitu menetellä tulosten ollessa epäluotettavia. Vasta sirutestauksessa kokeiltiin pudottaa PCR:ssä syklejä 35:stä 20:een, jolloin agaroosigeelikuvissa (kuvio 13) näkyi selkeät bändit eikä juuri laisinkaan taustahäiriötä, jota 35 syklillä näkyy huomattavan paljon, eivätkä bändit myöskään erotu selvästi (kuvio 14). Lisäksi testeissä käytettiin eri entsyymeitä. Agaroosigeelielektroforeesitesteissä käytettiin Kapa Hifi HotStart DNA-polymeraasia (KapaBioSystems) ja sirutesteissä Paq5000 Hotstart DNA-polymeraasia (Stratagene), joka todennäköisesti toimi huomattavasti tehokkaammin PCR:ssä. Kuvioden 13 ja 14 testeissä on molemmissa käytetty Paq5000 Hotstart DNA-polymeraasia.



KUVIO 13. Olosuhdetesti sirutestausta varten: ligaatiossa annealing-lämpötilat 68 °C ja 70 °C sekä PCR:ssä 58 °C ja annealing-aika 10 s, 20 sykliä



KUVIO 14. Olosuhdetesti sirutestausta varten: ligaatioissa annealing lämpötilat 68 °C ja 70 °C sekä PCR:ssä 58 °C ja annealing-aika 10 s, 35 sykliä

5.3 Koettimien testaamisen haasteita

Agaroosigeelielektroforeesilla oli alun perin tarkoitus selvittää, mitkä koettimet voidaan jättää pois sirutestauksesta. Tämä ei kuitenkaan onnistunut, koska ilmeni, että agaroosigeelitestauksessa toimimattomiksi havaitut koettimet toimivatkin sirutestauksessa ja toisin päin (taulukko 6).

TAULUKKO 6. Agaroosigeelielektroforeesi- ja sirutestauksen tulosten vertailu

Koettimen laatu	Agaroositestauksen mukaan määrä/kpl	Sirutestauksen mukaan määrä/kpl	Yhteisten koettimien määrä
Hyvä	12	58	11
Heikko	33	11	5
Ei toimi ollenkaan	42	16	7

Sirutestauksen haasteena oli löytää sopivat olosuhteet, joissa koettimet toimisivat riittävän vahvalla signaalilla ja samalla mahdollisimman spesifisesti. Samat ligatio- ja PCR-olosuhteet, joita oli käytetty agarosigeelielektroforeesitesteissä, eivät sopineetkaan suoraan sirutestaukseen, koska saaduissa tuloksissa oli liikaa epäspesifejä signaaleja, joita ei ollut voinut ennustaa tehtyjen agarosigeelikokeiden perusteella. Olosuhdetestaus aloitettiin käyttämällä 23 koetinta ja 0–4 templaattia jokaisessa reaktiossa. Olosuhdetesteissä epäspesifeiksi koettimiksi osoittautuivat koettimet B2, B20, B39, B44, A1 ja A2, joista kuitenkin yksikään ei varsinaisissa testeissä osoittautunut erityisen epäspesifiksi. Ligaatioreaktion annealing-lämpötilaa nostettiin aina 74 °C:seen epäspesifien signaalien minimoimiseksi. Kun varsinaisiin testeihin otettiin mukaan kaikki 87 koetinta, epäspesifeiksi ”häiriköiksi” osoittautuivatkin eri koettimet kuin olosuhdetestauksen perusteella olisi voinut ennakoida.

Lisäksi testauksessa saatiin hieman poikkeavia tuloksia samojen koettimien välillä, kun niiden testaus uusittiin samoilla olosuhteilla. Kolmannessa testauskerässä uusitut koettimet (B20–B26 ja A1–A2) antoivat hieman eriäviä tuloksia (taulukko 7). Koettimet B21 ja B24 antoivat eri testauskerroilla päinvastaiset tulokset. Ensimmäisellä kerralla B21 toimi hyvin ja B24 ei toiminut ollenkaan, ja toisella testauskerralla tulokset olivat toisin päin. Koettimet B20, B22 ja B26 toimivat ensimmäisessä testauksessa heikosti, mutta toisella testauskerralla niiden signaalit olivat hyvät. Koettimet A1 ja A2 toimivat erinomaisesti ensimmäisellä testauskeralla (30.9.), jota voidaan muidenkin tulosten perusteella pitää erittäin hyvin onnistuneena. Toisella kerralla ne toimivat edelleen hyvin, mutta niiden signaalit olivat huomattavasti pienemmät. Koettimen A1 signaali heikkeni yli 90 % ja A2:sen 40 %. Tuloksesta voidaan päätellä, että signaalien yleinen taso saattoi olla heikompi 13.10. testauskerässä kuin 30.9., vaikka olosuhteet sekä reagenssien ja templaatin määrät olivat molemmilla kerroilla samat. Myös väärät signaalit vaihtelivat hieman eri testauskerroilla. Esimerkiksi koettimen B21 templaattiin reagoi ensimmäisellä testauskerralla koetin B51, jota ei havaittu toisella kerralla, jolloin kuitenkin väärän signaalin antoi koetin B79.

TAULUKKO 7 Rinnakkaisista testauskerroista saadut tulokset koettimista B20–B26 ja A1–A2

Templaatti	8.10 ja 30.9 Testaus			13.10 Testaus		
	Koettimen toimivuus	Signaalin intensiteetti	Väärin signaalien koettimet	Koettimen toimivuus	Signaalin intensiteetti	Väärin signaalien koettimet
B20	heikko	200	B36, B18	hyvä	1500	B36, B3(H) ja A9(H)
B21	ei	-	B3(H), B36(H) ja B51(H)	hyvä	800	B3(H), B18, B36, B79(H)
B22	heikko	100	B36(H)	ei	-	B36, B3 ja A9(H)
B23	ei	-	B36(H)	ei	-	B10(H), B29, B42 ja A6
B24	hyvä	400	B36(H)	ei	-	B10(H), B30, B43
B25	hyvä	800	B3(H), B36	hyvä	400	B3, B36
B26	heikko	80	B3(H), B36(H)	hyvä	800	B36, B3(H) ja A9(H)
A1 (30.9)	hyvä	25 000	B36, B3(H) ja A9(H)	hyvä	2000	B3 ja B36
A2 (30.9)	hyvä	25 000	B36	hyvä	15 000	B36, B3 ja A9(H)

Olosuhdetestauksissa tulosten signaalien voimakkuudet olivat erittäin hyviä.

Viimeinen olosuhdetesti tehtiin 28.9., missä käytettiin 23 koetinta ja kolme eri templaattia sekä yhtä negatiivista näytettä. Lämpötilaolosuhteet olivat samat, joita käytettiin varsinaisissa testeissä (katso taulukot 2 ja 3, luvut 4.2.1 ja 4.2.3) eli ligaatioissa aneling-lämpötila 74 °C ja PCR:ssä aneling-lämpötila 58 °C. Tässä testissä saadut oikeiden koettimien signaalien voimakkuudet olivat 10 000–60 000. Koetin B65, joka varsinaisessa testauksessa antoi heikon signaalin (noin 100), antoi olosuhdetestissä erittäin vahvan signaalin (30 000). Näinpä eri kerroilla tehtyjen testien signaalit eivät välttämättä ole vertailtavissa. Kuitenkin on selvää, että osa koettimista toimii voimakkaammin ja paremmin kuin toiset.

5.4 Tulosten vertailu koettimien DNA-sekvensseihin

Epäspesifisesti toimivia koettimien DNA-sekvenssejä vertailtiin niihin, joiden kanssa ne menivät sekaisin. Sekvenssien vertailu tehtiin linjaamalla ne ClustalW-ohjelmalla. Koettimien B57, B58 ja B61 sekvenssien välillä löytyy silmämääräisesti jonkinlainen yhtenevyys, kun kaikkien muiden keskenään epäspesifisesti toimineiden koettimien välillä oli korkeintaan n. 50 % yhtenevyys. Kaikki kolme koetinta on suunniteltu samaan heimoon (Polyangiaceae) kuuluville lajeille.

Halttunen (2010) on opinnäytetyössään arvioinut suunnittelemiensa koettimien laatua sen perusteella, kuinka monta osumaa niiden sekvensseillä on löytynyt sedimentin mikrobistoa kuvaavasta tietokannasta (sisältää 8 379 sekvenssiä) ja NCBI:n nr/nt-tietokannasta. Erinomaisia koettimia ovat ne, jotka vastaavat vain yhtä sekvenssiä sedimentin mikrobiston tietokannasta, hyvät vastaavat maksimissaan kahta, kohtalaiset enintään 4 ja huonot vastaavat oman sekvenssin lisäksi jotakin toista ympäristönäytteissä mukana ollutta lajia, jolloin ne todennäköisesti antavat väärän signaalin sirulla. Halttusen arvion mukana koettimista 52 on erinomaisia, 25 hyviä, 8 kohtalasia ja kaksi huonoja. (Halttunen 2010, 43.)

Tässä työssä koettimia testattiin niitä vastaavilla synteettisillä DNA-templaateilla. Koska koettimet oli suunniteltu siten, että niissä ei olisi keskinäistä vastaavuutta, teoriassa niiden ei pitäisi toimia toistensa DNA templaatteihin. Siitä syystä tässä työssä testauksen jälkeen koettimien laadun arviointi perustui eri kriteereihin kuin Halttusen arviointi. Kun koettimia käytetään ympäristönäytteiden analysoinnissa, täytyy tuloksia tarkastellessa ottaa huomioon molemmat arvioinnit koettimien laadusta. Esimerkiksi osa koettimista, jotka Halttunen (2010) on arvioinut kohtalaisiksi (B39, B69 ja B73), on tässä työssä arvioitu erinomaisiksi. Ne voivat kuitenkin tuntemattomista ympäristönäytteistä havaita maksimissaan kolme muuta sedimentin mikrobilajia oman lajinsa lisäksi, joten ne eivät toimi välttämättä täysin spesifisesti. Sitä vaihtoehtoa ei tässä työssä kuitenkaan tutkittu käytännössä, koska templaatteina ei ollut näiden mahdollisesti väärän signaalin aiheuttavien lajien DNA:ta.

Kun yhdistetään tässä työssä saatujen tulosten perusteella tehdyt arviot sekä Halttusen arvio koettimien hyvyydestä, saadaan kaikkein todennäköisimmin parhaiten toimivat koettimet selville. Molempien arviointien mukaan erinomaisia on 19 ja hyviä 29. Koetin arviotiin erinomaiseksi vain, jos se molempien arviointien mukaan oli erinomainen. Hyväksi arviotiin ne koettimet, jotka molemmat tai toinen oli arvioinut hyväksi. Koettimet, jotka olivat saaneet jotain muuta arvioksi jommalta kummalta, jätettiin pois arvioinnista, vaikka se olisikin toisen mukaan ollut erinomainen.

6 YHTEENVETO JA JOHTOPÄÄTÖKSET

Tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää aiemmin suunniteltujen 87 DNA-koettimen toimivuus ja spesifisyys universaalilla LDR-sirulla käyttäen synteettistä DNA:ta templaattina. Tuloksia tarkasteltiin kahdella menetelmällä: agarosigeelielektroforeesilla ja hybridisaatiolla LDR-sirulle.

LDR-sirulta saatujen tulosten perusteella koettimia arvioitiin kolmella tavalla. Ensin arvioitiin niiden toimimista ja signaalin voimakkuutta oman templaatti DNA:n kanssa, toiseksi arvioitiin koettimien spesifisyyttä ja kolmanneksi niiden signaalin voimakkuutta verrattuna väärin signaalien voimakkuuteen. Näiden seikkojen perusteella koettimet luokiteltiin viiteen ryhmään: erinomaiset, hyvät, heikot, epäspesifit ja toimimattomat. Erinomaisia koettimia oli 33, hyviä 19, heikkoja 16, epäspesifejä 7 ja toimimattomia 12.

Testatuista koettimista toimi erinomaisesti tai hyvin 52 eli 60 %. Tulosta voidaan pitää heikkona verrattuna kirjallisuudessa raportoituihin tuloksiin, joissa koettimista on toiminut lähes 100 % (Busti ym. 2002, Hultman ym. 2008, Castiglioni ym. 2004, Akhras ym. 2007). Näissä vertailututkimuksissa ei tosin ole käsitelty sedimentin mikrobistoa ja koettimiakin on testattu huomattavasti vähemmän enimmillään noin 20. Joten tässä tutkimuksessa saatiin kuitenkin hyvin toimivia koettimia huomattavasti enemmän. Lisäksi 7 koetinta toimi epäspesifisesti eli antoi ainakin heikon signaalin vähintään 10 väärän templaatin kanssa. Aikaisemmissa tutkimuksissa pienemmällä koetinmäärillä on saatu huomattavasti spesifisempiä tuloksia. Consolandin ym. (2004) tekemien tutkimusten mukaan ainakin 54 erilaista koetinparia voidaan yhdistää ilman, että se vaikuttaa menetelmän tehokkuuteen (Castiglioni ym. 2004).

Menetelmässä oli useita työvaiheita ja olosuhteiden optimointi oli melko työlästä ja hankalaa. Koettimien epäspesifisyys tai heikot signaalit saattoivat myös johtua käytetyistä lämpöolosuhteista. Testauksen alusta alkaen tehokkaampaa olisi ollut käyttää agarosigeelielektroforeesi- ja sirumenetelmää rinnakkain, jos se olisi ollut fyysisesti mahdollista. Silloin olosuhteiden optimointi olisi ollut tehokkaampaa ja helpomaa ja koko ajan olisi saatu informaatiota koettimien spesifisyydestä,

joka nyt jäi agarosiigeelielektroforeesitestauksessa täysin huomioimatta. Olosuhdetestauksessa olisi ollut hyvä käyttää koko ajan mukana myös ympäristönäytteitä, jotta niidenkin toimivuudesta olisi ollut parempi käsitys. Lisäksi jokin positiivinen kontrollikoetin olisi ollut erittäin tarpeellinen ligaatiovaiheessa. Akhras ym. (2007) käyttivät ligaatioissa kontrollikoetinta, joka reagoi käytettyyn tausta DNA:han. Tällaista kontrollikoetinta voi hyödyntää myös sirutuloksissa arvioitaessa eri testauskertojen signaalien intensiteettejä. Tässä testauksessa kontrollikoetin olisi siis kannattanut suunnitella vastaamaan herrings DNA:ta.

Koettimien yhdistymisen onnistumista ei päästy tarkastamaan mitenkään, joten ei ollut varmuutta, mikä oli koetinlaimennoksen pitoisuus todellisuudessa. Sillä tuskin oli merkitystä lopputuloksen kannalta, sillä koettimia käytetään hyvin eri määriä, esimerkiksi Akhras ym. (2007) käyttivät tekniikassaan 5 fmol/koetin ja Hultman ym. (2008) 2 pmol/koetin verrattuna 250 fmol/koetin, jota käytettiin tässä tutkimuksessa.

Sirutestauksen rinnakkaiskokeiden antamat erilaiset tulokset vaativat lisättestausta ja tutkimusta. Eri kerroilla samalla tavalla tehtyjen reaktioiden signaalien voimakkuutta tulisi voida vertailla keskenään esimerkiksi kontrollikoettimen avulla, jotta tiedettäisiin varmuudella, johtuuko heikko signaali koettimesta vai jostakin ulkopuolisesta tekijästä.

Tuloksia vertailtiin myös suunnittelijan arvioon koettimien hyvyydestä. Kun nämä arviot yhdistettiin, erinomaisia jäi jäljelle 19 ja hyviä 29. Erinomaiset koettimet toimivat erittäin spesifisesti ja antavat voimakkaan signaalin kohde-DNA:sta. Hyvät koettimet saattavat antaa epäspesifisin signaalin 1–3 väärästä järvisedimentin mikrobista, mutta toimivat myös hyvin oman templaatin kanssa.

Nykyisin 454-pyrosekvensointi menetelmällä saadaan DNA-sekvensointitietoa erittäin nopeasti ja paljon, mikä edesauttaa myös koettimien suunnittelua LDR-sirua varten. 454-tulosten käsittely on kuitenkin hidasta ja aikaavievää, joten se ei sovellu nopeaksi ympäristömikrobien identifiointimenetelmäksi. Myöskään suuret näytemäärät eivät sovellu 454-sekvensointiin toisin kuin DNA-siruille, jotka mahdollistavat suurien näytemäärien käsittelyn. Joka tapauksessa DNA-

mentelmillä saadaan huomattavasti enemmän tietoa kuin perinteisillä viljelymentelmillä ja sekvensoinnin kehittyessä sekvenssitietokannat laajenevat ja yhä enemmän uusia mikrobilajeja tunnistetaan erilaisista ympäristöistä. Tämä auttaa myös uusien DNA-sirukoettimien suunnittelussa. Tässä opinnäytetyössä saatiin yhdessä Halttusen (2010) suunnittelutyön avulla aikaiseksi 48 käyttökelpoista ja toimivaa LDR-koetinta ja työ vei omalta osaltaan ympäristösirun kehitystä eteenpäin, vaikka työtä riittääkin vielä ennen, kuin saadaan kehitettyä esimerkiksi kaupallinen tuote.

LÄHTEET

Akhras, M., Thiagarajan, S., Villablanca, A., Davis, R., Nyrén, P. & Pourmand, N. 2007. PathogenMip Assay: A Multiplex Pathogen Detection Assay. PLoS ONE, February 2007, Issue 2, e223.

Arrayit Corporation. 2010. Arrayit store. [Viitattu 12.11.2010]. Saatavissa: <http://shop.arrayit.com/>

Berthrong, S., Schadt, C., Piñeiro, G. & Jackson, R. 2009. Afforestation Alters the Composition of Functional Genes in Soil and Biogeochemical Processes in South American Grasslands. Applied and Environmental Microbiology, Oct. 2009, 6240–6248.

Busti, E., Bordoni, R., Castiglioni, B., Monciardini P., Sosio, M., Donadio, S., Consolandi, C., Bernardi, L., Battaglia, C. & Bellis, G. 2002. Bacterial discrimination by means of a universal array approach mediated by LDR (ligase detection reaction). BMC Microbiology 2002, 2:27.

Castiglioni, B., Rizzi, E., Frosini, A., Sivonen, K., Rajaniemi, P., Rantala, A., Mugnai, M., Ventura, S., Wilmotte, A., Boutte, C., Grubisic, S., Balthasart, P., Consolandi, C., Bordoni, R., Mezzelani, A., Battaglia, C. & Bellis, G. 2004. Development of a Universal Microarray Based on the Ligation Detection Reaction and 16S rRNA Gene Polymorphism To Target Diversity of Cyanobacteria. Applied and Environmental Microbiology, Dec. 2004, 7161-7172.

Chiang, H.-C., Lo, J.-C. & Yeh, K.-C. 2006. Genes associated with heavy metal tolerance and accumulation in Zn/Cd hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*: a genomic survey with cDNA microarray. [Environ Sci Technol.](#) 2006 Nov 1;40(21):6792-8.

Clark, D., Dunlap, P., Madigan, M. & Martinko, J. 2009. Brock. Biology of Microorganisms. 12. painos. San Francisco: Pearson Benjamin Cummings

van Doorn, R., Sławiak, M., Szemes, M., Dullemans, A., Bonants, P., Kowalchuk, G. & Schoen, C. 2009. Robust Detection and Identification of Multiple Oomycetes and Fungi in Environmental Samples by Using a Novel Cleavable Padlock Probe-Based Ligation Detection Assay. Applied and Environmental Microbiology, June 2009, 4185–4193.

Gabig, M. & Wêgrzy, G. 2001. An introduction to DNA chips: principles, technology, applications and analysis. Acta Biochimica Polonica Vol. 48 No. 3/2001, 615–622.

Halttunen, A. 2010. DNA-koettimien suunnittelu järvisedimentin mikrobien tunnistamiseksi LDR-sirulla. Opinnäytetyö. Lahden ammattikorkeakoulu, tekniikan ala.

Helsingin yliopisto. 2008. Uudet ympäristömittausmenetelmät liiketoimintamahdollisuutena – YMLI [viitattu 29.10.2010]. Saatavissa: <http://www.helsinki.fi/ecology/yml/>

Hultman, J., Ritari, J., Romantschuk, M., Paulin, L. & Auvinen, P. 2008. Universal ligation-detection-reaction microarray applied for compost microbes. BMC Microbiology 2008, 8:237.

Murphy, D. 2002. Gene expression studies using microarrays: principles, problems, and prospects. Advances in Physiology Education 26/2002, 256–271.

Petrosino, J., Highlander, S., Luna, A., Gibbs, A. & Versalovic, J. 2009. Metagenomic Pyrosequencing and Microbial Identification. Clinical Chemistry 55:5, 856–866.

- Rantala, A., Rizzi, E., Castiglioni, B., Bellis, G. & Sivonen, K. 2008. Identification of hepatotoxin-producing cyanobacteria by DNA-chip. *Environmental Microbiology*, March 2008, Volume 10, Issue 3, 653–664.
- Reich, M., Kohler, A., Martin, F. & Buée, M. 2009. Development and validation of an oligonucleotide microarray to characterise ectomycorrhizal fungal communities. *BMC Microbiology* 2009, 9:241.
- Ritari, J. 2010. Tohtorikoulutettava. Biotekniikan Instituutti. Helsingin Yliopisto. Suullinen työnohjaus 2.9.2010.
- Sebat, J. L., Colwell, F. S. & Crawford, R. L. 2003. Metagenomic Profiling: Microarray Analysis of an Environmental Genomic Library. *Applied and Environmental Microbiology* Aug. 2003, 4927–4934.
- Sei, K., Inaba, M., Upadhye, R., Inoue, D. & Ike, M. 2009. Development of DNA microarray for the evaluation of environmental functions. *Water Science & Technology* 59.1 (2009), 97–107.
- Shiu, S.-H. & Borevitz, J. 2008. The next generation of microarray research: applications in evolutionary and ecological genomics. *Heredity* (2008) 100, 141–149.
- Thermo Fisher Scientific Inc. 2010. Products, Exonuclease I [viitattu 12.11.2010]. Saatavissa: <http://www.fermentas.com/en/products/all/modifying-enzymes/nucleases/en058>
- Wang, F., Zhou, H., Meng, J., Peng, X., Jiang, L., Sun, P., Zhang, C., van Nostrand, J., Deng, Y., He, Z., Wu, L., Zhou, J. & Xiao, X. 2008. GeoChip-based analysis of metabolic diversity of microbial communities at the Juan de Fuca Ridge hydrothermal vent. *PNAS*, March 24, 2009, vol. 106, no. 12, 4840–4845.

Wang, Y, Yang, C, Liu, G. & Jiang, J. 2007. Development of a cDNA microarray to identify gene expression of *Puccinellia tenuiflora* under saline-alkali stress. *Plant Physiol Biochem.* 2007 Aug;45(8):567–76. Epub 2007 May 29.

Wong, G. 2005. DNA Microarray Data Analysis. Tuimala, J. & Laine, M. (toim.) SCS – Scientific Computing Ltd. Helsinki: Picaset Oy, 15–24.

Yergeau, E., Arbour, M., Brousseau, R., Juck, D., Lawrence, J., Masson, L., Whyte, L. & Greer, C. 2009. Microarray and Real-Time PCR Analyses of the Responses of High-Arctic Soil Bacteria to Hydrocarbon Pollution and Bioremediation Treatments. *Applied and Environmental Microbiology*, Oct. 2009, 6258–6267.

LIITTEET

- Liite 1 Kaikkien testattujen koettimien biologinen alkuperä ja sekvenssit
- Liite 2 Tulokset kaikista koettimista

LIITE 1/1

KAIKKIEN TESTATTUJEN KOETTIEMIEN BIOLOGINEN ALKUPERÄ JA
SEKVENSSIT (Halttusen 2010 perusteella)

Koettimen koodi	Suunnittelun kohde LAJI/SUKU/HEIMO	Koettimen C-OSA	Koettimen D-OSA
B1	Iamia majanohamensis	TGCCGGGGACTCGTAGG AGACTGC	TGTCCTATGTTGCCAGC GGGTAG
B2	Acidobacteria bacterium KBS 96	GGAAACGCTGGCTTTCC CGCAAGG	AACGGCTTCGGACGGCT GGC
B3	Leptolinea tardivitalis	AGGTAACGGCCACCAA GGCGA	CTGCGTACCATCAGCTA GTTGGTG
B4	Levilinea saccharolytica	GGTCGCGAAACCGCGAG GTGGA	CACACGCTACAATGGCA AGTACAATA
B6	Geobacter pelophilus	CATCGGATGAGTCCGCG TCCCATC	GGGACCTTCGGGCCTCC CGA
B7	Geobacter sp. Ply1	CCAAGGTAGCCGTAAGG GGGAGATGG	TCGGTGACTGGGGTGAA GTCGTC
B8	Campylobacteriales	GGGGTAAAATCCGTAGA TACTACTAGGAATACCG	AGGGGGAGATGGAATTA GTGGTGTA
B9	Bacteroidetes bacterium zo30	CCGCCTGGGGAGTACGG CCGC	GTGCGAGCTAACGCGAT AAGTTCG
B10	Cytophaga sp. Dex80- 64	CTGCCCGTGTCAAGCGG GAGGA	ATGCTGGGGACTCTGGC GAGG
B11	Firmicutes bacterium WSF2-15	GAGTTCCTAGCGGCGAA CGGGTG	GCTCATCTCCCGCAAGG GAGGC
B12	Syntrophorhabdus aro- maticivorans	CGGGGTAGAAGGTGGCT TGTATTTCGTA	CGGATAAGACCACACGA CACATGTTCG
B13	unidentified sulphate reducing bacterium DSB-DSb99-3	CGAGGGTGAGCCAATCC CAGAAAGCA	GCTGTACAAAGGGTTGC AAGCCCCG
B14	Geothrix fermentans	GCTGGGATGCTGGAGGT GAAACCTGG	AGTGGTAATACCGCATG AGACCTTCG
B15	Myxobacterium KC	GGCAGGTCCCTAAGGAG TGGCTGGT	GCCGTGCCAACCCGCAA GGA
B16	Nitrospira sp.	GGTAAGCCCTCCGTGAA ATCTCCGGG	ACAGGGGGCGTAGGCGG TTA
B17	Oscillatoria sp. INT-06	ACCGCGTGAGGGATGAA GGCTTGC	GGGCGAAAGCCTGACAG AGCAAC
B18	Filamentous symbiotic bacterium of Methylo- bacterium sp., strain: TFF	GGACCTGCGTCCCATCA GCTAGTTGG	ACTAAAGGAGTAATCCG CTTTGGGAA
B19	Rhodocyclus sp., mixed culture isolate R6	CAGAGGGTTGCCAACCC GCGAG	CTCACACGTCATACAAT GGTCCGTC
B20	Rhodospirillaceae bacte- rium L34	GGAAACGGGGTCTTCA GTTCGGCT	TTGACATGGGACGTATG GGCCTC
B21	Spirochaeta sp. isolate TM3	CTTCAGGGTGAAAGGTG CAATTGCATTT	CGCATGAGGCCCTGAGG GTAGAG
B22	Syntrophus sp., Clone B2 tai Clone B3	CCCGGAGACAGGTGCTG CATGGC	AACTAAGAAGTGCCTTT CGGGGAG
B23	Hyphomicrobium	GATAATGACGGTACCCG GAGAATAAGTCCC	GGTTGTAAAGCTCTTTTG CCGGGAC
B24	Gp3	TAAAGCTCTTTCGGCAG GAACGAATTCT	GAGCGATGAAGCCCTTC GGGTG
B25	Mycobacterium	TGCAGAAGAAGCACCGG CCAATC	GACGAAGCGGAAGTGAC GGTAGA

LIITE 1/2

B26	Rhodococcus	CAAGTGACGGTAGGTAC AGAAGAAGCACG	CCTCTTTCAGTACCGAC GAAGCGT
B27	Levilinea	GAACCAGCAACGCCGCG TGTGC	GGAATATTGGTAATCTG CGGAAGCGG
B28	Bdellovibrio	GGTACTCTGCAAGAAAG GATCGGCTAACG	CTGTTGCAGGGGAATAA CACAAATGAA
B29	Schlegelella	TTCGGGAAGAAGGAGTC GGGGCT	GGCCTTCGGTTGTAAAC CGCTTTTA
B30	Arctic sea ice bacterium ARK10172	AATACGGTGGGTTCTTG ACGGTACTGG	GTCCGGGAAGAAAAGGC TCACTCT
B31	Derxia gummosa (IAM14990)	CGCTTGCTAATACCAGG CGCTTATGACA	GCACCTTGGCGGGACGA AACGG
B32	Chlamydiales bacterium CRIB 32	AAAGAAGCACCGGCTAA CTCCGTGC	ACAATATTCTGTTGATTT GATGGTACTTGGT
B33	Roseiflexus	GATGACGGTACCCCTGG AATAAGCCCC	ACCGCTTTTTGGGGGGA CGAT
B34	Thiocapsa	TGAGTTGAACAGACGCA GGGGGTGA	CCTTTTGGCGGGGAAGA AAGCCC
B35	Cyanobacterium	GTAAACCTCTTTTCTCAA GGAAGAAGTTCTGAC	GAGGGATGAATGCCCGT GGGTA
B36	Clostridium	TGGGACGATAATGACGG TACCAGAGGA	ACCTTCGGGTTGTAAAG TTCTGTCTTC
B37	Clostridium	GGGACGATAATGACGGT ACCTGAGGAGA	AGTCTTCGGATTGTAAA ACTCTGTCTTCA
B38	Acetivibrio	ATCAGGGACGAAAATGA CGGTACCTACG	GAAGGTTTTTCGGATTGT AAACTCCTTTG
B39	Desulfobacterium anili- ni (strain AK1)	GTGAATAGCCAGGAAGA CTGATGGTACCA	CTGTCAAGTGGGAAAAA AGCTTCCTG
B40	Geobacter	GGTGCTAATACCACTTTT ACTTGACGGTACCC	AGCTCTGTCAGAGGGAA AGAAATGTAGA
B41	- (Geobacteraceae)	AATACCTTCCATCCTTGA CGGTACCATCA	CAGATGGGAAGAAATGG TTGGAAGCT
B42	Geobacter	GTAATTGACGGTACCCT CAAAGGAAGCA	GTGTACGGTGGCTAATA CCCCT
B43	Geobacter	GTCGTAAAGCCCTGTCA GGTGGGAA	CGCGTGGGTGATGAAGG CCTTGG
B44	Gp4	TGTAAGCCCCGGCTAAC TCCGTGC	TGGGAAGAACAAAATGA CGGTACCATA
B45	Holophaga	TTGACGGTACCCGGAGA GGAAGCC	CGGTGGGGAGGTTAATA GCCTCTTTAC
B46	Gp2	AAGAGGAGTGACGGTAC GGGTATAAGAA	CGACCCGGACGAATGCC TCGT
B47	Bacteroidetes bacterium PPf50E2	CGGTACCCGGGAATAA GGATCGGCA	TCCCGATGCGTCGGGAG ATGC
B49	Chlorobi bacterium Mat9-16	GAAAAATCTCGATCAAA TCGAGAACTGACTGT	AAGGTTGTAAACTCCTG TTAGAGGGAA
B51	Dehalococcoides sp. BHI80-15 tai BHI80-52	AAGGACGGTACCTCAGG AATAAGTCTCGC	TCTAAACCTCTTTTCTGG GGACGAGC
B52	Lentisphaerae bacterium 7509 tai 7548	TGACGGTACCCGGGAGAG GAAGCCA	CTGTCACCCGGGACGAA GACAG
B55	Methylobacter	TGATCCAGCAATACCGC GTGTGTGA	GGAATATTGGACAATGG GCGAAGCC
B56	Anaeromyxobacter	AACATCCACGGGCCTTG ACGGTA	GAGGGAAGAACAAGCCT GTGGCC
B57	Chondomyces	ATGACGGTATCTCCTTA GCAAGCACCG	GGGGTCGAATACCCCCC GCCG

LIITE 1/3

B58	<i>Byssophaga cruenta</i> , strain DSM 14553T	ATGACGGTACCTCCTTA GCAAGCACCC	GGAATATGGGTTGGCTA ATATCCAACCTTG
B59	<i>Cystobacter</i>	CTGACGGTACCGAGAGA AGAAGCACCA	ACCTCTGGCTAACATCC AGGGGC
B60	Myxococcaceae	TTGACTGTACCGGGAGA AGAAGCACCA	ACCCATTGGCCAACATC CAATGGC
B61	<i>Sorangium</i>	ATGACGGTACCCTTTTA GCAAGCACCA	CAGGGTTGGCTAACACC CAACTCG
B62	<i>Nitrosospira</i>	TGGTGAATATCCGTGAC TGATGACGGTA	TTCGGACGGGACGAAAT GGTCA
B63	(<i>Nitrosospira</i>)	ACGGCTAATACCCGTGA CTAATGACGGT	GCTCTTTCAGACGGAAA GAAACGGTT
B64	(<i>Nitrosospira</i>)	ACTCTTTCGGACGGAAC GAAATGGTTCT	AGTGAAGAAGGCCTTCG GTTGTAAG
B65	<i>Nitrosospira</i>	TTCGGATTGTAAACCCCT TTCGGGAGG	CGCCGCGTGGGATGAA GGTC
B66	-	AAAGCCTGACGGAGCAA TACCGCG	GGGAAGTTTACCGTCA ATGGGCGG
B67	<i>Singulisphaera</i>	CGCAAGGTTGACTGATC CCTGGAGGA	ACTCCTGTGAGGGGGA AGAAGC
B68	<i>Isosphaera</i> -like str. OJF2 tai <i>Planctomycete</i> OJF8	CCCTGGTAGGAAGCACG GGCTAAGT	GGAAGGGGCAACCTTGA CCGAT
B69	Rhodocyclaceae	GAAATCGCGTACGTGAA TAACGTGCGT	TTGTAAAGCTCTTTCGGC CGGAAC
B70	<i>Solirubrobacter</i>	GTGACGGTACCTTCAGA AGAAGCCCCG	GCTTCCAGGGTTAATAG CCCATGGG
B71	Flexibacteraceae	GAAGTACGGTACCGTA GGAATAAGCAC	AGAAACGCTCCCTGCGG GGA
B72	<i>Pedobacter terricola</i> strain DS-45	CGTGCACCGGAGCTGAT GGTACCG	TCTTTTATACGGGAAAA AACCTCCGGT
B73	<i>Spirochaetes bacterium</i> SA-8 tai SA-10	TGCCCCGTGATGACAT GAACCGA	GGGGAAGAATAAGCGTG GGAGGTAA
B74	<i>Spirochaeta</i>	GAAGAATAGAGGTGGGA GTGGAAAGCCC	CCGTAAGGTTGTAAAAT CCTTTTGTGGC
B78	<i>Spirochaeta</i>	GGAGTGGAAAGCCCTGG TGATGACGT	TCCTTTTGTGGTGAAGA ATAAGCCA
B79	<i>Desulfoglaeba</i>	GGATTTGACGGTACCAC CAGAGGAAGCC	AAGGTTCTGCCAAGAAA CGGGTG
B80	<i>Azoarcus</i>	GGAAAGAAATCGCCCCT CCCAATACGG	CCGGGTTGTAAACCGCT TTCGGAC
B81	<i>Achromatium</i>	GGGGTGCTAATACCACC TTGACTTGACG	AGCACTTTCGGGAGGGA AGAAAAGC
A1	<i>Methanosarcina</i> sp.	TCAATGCGTACGCTTTTC AGATGCCTA	CGCGAAAGCGCGATAAG GGACC
A2	<i>Methanosarcina</i> sp.	GCCTAAAAAGCATGTGG AATAAGAGCCGGG	TGCGCAATGCGTACGCT TTTCATAC
A3	<i>Methanosaeta</i>	GCATACAATGCTGGCTG TCCAGATGCC	CGATAAGGGGACCTCGA GTGCCG
A4	<i>Methanobacterium aarhusense</i>	GGATGCCGGGCACACTA AGGGGA	CCCTTAGTTACCAGCGG ATCCTTCA
A5	<i>Methanoculleus</i>	GTGTATAAAAAGGCACCG GGAGAAAGGGA	GCCCGTAAATTCGGGCT GTTCCG
A6	<i>Methanospirillum</i>	AAAACGGTGAAGAAAG GGCCGGGC	AGGCTGGCTGTCCACCA GTTTAC
A7	<i>Methanolinea tarda</i>	ATCTGTGTAAAAAGCAG GTGGAGAAAGGG	CTGCCCGTAAATTCGGG CTGTTA

LIITE 1/4

A8	Candidatus Methanoregula boonei strain SN19 tai strain SN21	AAAAAACCAGTGAAGAA AGGGCCGGGT	GAAAATCGGGCTGTCCA TTGGTGA
A9	Methanomicrobiales archaeon SMSP	CTGGGCTACACGCGGGC TACAAG	TAGGTCAGCATGCCCCG AATTAA
A10	methanogenic endo- symbiont of Caenomorph- pha-like sp. 1	AAGAAAGGGCCGGGCA AGACCGG	AGGCTGTCCATCTGTTTA AATACAGGTG
A11	anaerobic methanogenic archaeon ET1-8	TGACGGGCCATCCCGAG TGCCA	CGGAAACTTCGCAATAA GCGAAGCT
A12	anaerobic methanogenic archaeon ET1-8	GGCGTCGCCAAGGATG AGGCC	AAGACGCTTGC GTTATG CTCGTG
A13	anaerobic methanogenic archaeon ET1-10	GAATAAGGAGAGGGCA AGTCTGTCGTTG	TTTACCCAGTCTAGAAC GCTGGGA
A14	anaerobic methanogenic archaeon E15-7	AAGGGCCGGGCAAGACC GGTG	CTGTCGTTGTGTCTAAAA ACACAATATAGC

LIITE 2/1

TULOKSET KAIKISTA 87 KOETTIMISTA

KOODI	Toimivuus sirulla	Toimivuus geellillä	Templaattit, joihin koetin myös toimii	Väärin signaalien määrä	Signaalien vahvuus verrattuna vääriin	Lopullinen arvio	Haltusen arvio	Arvioiden yhdistäminen
B1	hyvä	ei	ei muita	0	hyvä	1	1	1
B2	ei	ei	ei muita	0		5	1	0
B3	hyvä	heikko	yli 10	71	hyvä	4	2	0
B4	hyvä	heikko	ei muita	0	hyvä	1	1	1
B6	hyvä	heikko	B74 ja B67 heikosti	2	hyvä	2	1	2
B7	hyvä	ei	B67 heikosti	1	hyvä	1	1	1
B8	hyvä	heikko	ei muita	0	ok	2	1	2
B9	hyvä	ei	ei muita	0	hyvä	1	2	2
B10	hyvä	ei	A10 / B23, B24 ja B28 heikosti	4	hyvä	3	1	0
B11	hyvä	heikko	ei muita	0	hyvä	1	1	1
B12	hyvä	heikko	ei muita	0	ok	1	1	1
B13	hyvä	ei	B60 ja B78 heikosti	2	hyvä	2	2	2
B14	hyvä	heikko	ei muita	0	ok	1	2	2
B15	hyvä	ei	ei muita	0	hyvä	1	1	1
B16	hyvä	ei	ei muita	0	hyvä	1	1	1
B17	hyvä	ei	B58	1	hyvä	2	2	2
B18	hyvä	ei	yli 10	17	hyvä	4	1	0
B19	hyvä	heikko	ei muita	0	ok	2	2	2
B20	heikko /hyvä	ei	B13 ja B9 heikosti	2	ok	2	1	2
B21	ei /hyvä	ei	ei muita	0	/hyvä	3	1	0
B22	heikko /ei	ei	ei muita	0	ok	3	2	0
B23	ei /ei	ei	A10	1		5	1	0
B24	hyvä /ei	ei	ei muita	0	hyvä	3	4	0
B25	hyvä /hyvä	ei	ei muita	0	hyvä	1	1	1
B26	heikko /hyvä	ei	B78 heikosti	1	ok	2	2	2
B27	hyvä	ei	ei muita	0	hyvä	1	2	2

LIITE 2/2

B28	ei	ei	A10 heikosti	1		5	2	0
B29	hyvä	heikko	B23	1	hyvä	2	1	2
B30	heikko	heikko	B24	1	ok	2	1	2
B31	hyvä	heikko	ei muita	0	hyvä	1	1	1
B32	ei	ei	ei muita	0		5	1	0
B33	ei	ei	B35 / B40 heikosti	2		5	2	0
B34	hyvä	hyvä	yli 10 heikosti	14	hyvä	4	1	0
B35	ei	hyvä	ei muita	0		5	1	0
B36	hyvä	ei	yli 10	79	hyvä	4	2	0
B37	heikko	ei	yli 10 heikosti	10	heikko	4	3	0
B38	ei	ei	ei muita	0		5	3	0
B39	hyvä	hyvä	ei muita	0	hyvä	1	3	0
B40	heikko	heikko	A10 ja B81 heikosti	2	heikko	3	1	0
B41	hyvä	heikko	B80, B12, B2, A9, A8, A7 ja A6 heikosti	7	hyvä	3	1	0
B42	hyvä	hyvä	A10, B23, B24 / B28 heikosti	4	hyvä	3	3	0
B43	hyvä	heikko	A10	1	hyvä	2	1	2
B44	heikko	heikko	B58 heikosti	1	hyvä	3	1	0
B45	ei	heikko	ei muita	0		5	1	0
B46	hyvä	ei	ei muita	0	hyvä	1	1	1
B47	hyvä	ei	A10 ja B38 heikosti	2	hyvä	2	1	2
B49	heikko	heikko	ei muita	0	heikko	3	1	0
B51	heikko	ei	B21 heikosti	1	hyvä	3	1	0
B52	hyvä	ei	ei muita	0	hyvä	1	1	1
B55	ei	ei	ei muita	0		5	2	0
B56	hyvä	ei	B59	1	hyvä	2	1	2
B57	hyvä	hyvä	B58 / B38 ja B61 heikosti	3	hyvä	3	1	0
B58	hyvä	heikko	B61 ja B57	2	ok	3	1	0
B59	hyvä	ei	ei muita	0	heikko	3	2	0

LIITE 2/3

B60	hyvä	hyvä	ei muita	0	ok	2	1	2
B61	hyvä	ei	ei muita	0	ok	2	1	2
B62	hyvä	hyvä	ei muita	0	hyvä	1	1	1
B63	hyvä	ei	ei muita	0	heikko	3	2	0
B64	hyvä	heikko	ei muita	0	hyvä	1	2	2
B65	heikko	ei	ei muita	0	heikko	3	4	0
B66	hyvä	heikko	B37 heikosti	1	hyvä	1	1	1
B67	hyvä	ei	ei muita	0	hyvä	1	2	2
B68	hyvä	ei	ei muita	0	hyvä	1	2	2
B69	hyvä	heikko	ei muita	0	hyvä	1	3	0
B70	heikko	heikko	ei muita	0	ok	3	1	0
B71	ei	heikko	ei muita	0		5	1	0
B72	ei	heikko	B37 heikosti	1		5	3	0
B73	hyvä	heikko	ei muita	0	hyvä	1	3	0
B74	heikko	ei	ei muita	0	ok	2	3	0
B78	hyvä	ei	ei muita	0	hyvä	1	1	1
B79	hyvä	ei	B21 heikosti	1	hyvä	1	1	1
B80	heikko	ei	ei muita	0	ok	2	2	2
B81	hyvä	ei	B65 heikosti	1	hyvä	1	2	2
A1	hyvä /hyvä	heikko	ei muita	0	hyvä	1	1	1
A2	hyvä /hyvä	heikko	A10 heikosti	1	hyvä	1	2	2
A3	hyvä	ei	ei muita	0	hyvä	1	2	2
A4	hyvä	hyvä	ei muita	0	hyvä	1	1	1
A5	hyvä	heikko	ei muita	0	hyvä	1	1	1
A6	hyvä	hyvä	B23	1	ok	2	1	2
A7	hyvä	heikko	ei muita	0	hyvä	1	2	2
A8	hyvä	heikko	ei muita	0	ok	2	1	2
A9	hyvä	heikko	yli 10	30	hyvä	4	2	0
A10	ei	heikko	ei muita	0		5	1	0
A11	hyvä	hyvä	yli 10 heikosti	11	hyvä	4	1	0
A12	hyvä	heikko	ei muita	0	hyvä	1	1	1
A13	hyvä	hyvä	ei muita	0	hyvä	1	2	2
A14	hyvä	hyvä	ei muita	0	ok	2	1	2

LIITE 2/4

SELITTEET EDELLÄ OLEVAAN TAULUKKON

Halttusen arvio		Arvioiden yhdistäminen	
1	erinomainen	1	erinomainen
2	hyvä	2	hyvä
3	kohtalainen		
4	huono		