



HERPES SIMPLEX VIRUKSEN
KVANTITATIIVISEN
MÄÄRITYKSEN OPTIMOINTI
REAALIAIKAISELLE
PCR -LAITTEELLE

Työohje bioanalyttikko-opiskelijoille

Koulutusala Sosiaali-, terveys- ja liikunta-ala	
Koulutusohjelma Bioanalytiikan koulutusohjelma	
Työn tekijä(t) Henry Heinonen	
Työn nimi <i>Herpes simplex</i> viruksen kvantitatiivisen määrittämisen optimointi reaaliaikaiselle PCR -laitteelle: Työohje bioanalytiko-opiskelijoille	
Päiväys	21.4.2015
Sivumäärä/Liitteet	37/13
Ohjaaja(t) Marko Björn ja Anssi Mähönen	
Toimeksiantaja/Yhteistyökumppani(t) Savonia-ammattikorkeakoulu	
Tiivistelmä	
<p>Reaaliaikaisella PCR -laitteella monistetaan entsyymaattisesti haluttua DNA -aluetta. Reaktion etenemistä voidaan seurata reaaliajassa laitteen avulla reaktion lähettämän fluoresenssisignaalin kautta, joka lisääntyy, kun DNA -kopioita syntyy. Opinnäytetyön sovellus on virusdiagnostinen, jossa <i>Herpes simplex virus 1:n</i> määrää määritetään. Herpes -virukset ovat yleisiä viruksia, jotka aiheuttavat yskänrokkoa, suutulehdusta, genitaalialueen tulehdusta ja pahimmillaan herpes-encefaliittia.</p> <p>PCR:ssa on monia tekijöitä, mitä voidaan optimoinnin avulla muuttaa haluttuun suuntaan, jotta reaktio tulisi tehokkaammaksi. Reaktiosta voidaan muuttaa reagenssien pitoisuuksia, reaktiovaiheiden aikoja ja lämpötiloja. Tässä opinnäytetyössä optimointi keskittyi PCR:n annealing -vaiheen lämpötilaan, joka saatiin optimoitua lämpötilagradientillä. Optimaaliseksi reaktiolämpötilaksi saatiin 56 °C.</p> <p>Kvantitatiivinen PCR perustuu näytteenä olevan DNA:n määrittämiseen, jossa standardien avulla muodostetaan standardisuora, kun standardien pitoisuus tunnetaan. Kvantitatiivisessa PCR:ssä on oleellista Ct -arvot (Threshold cycle), jotka muodostuvat reaktiokäyrän ylittäessä kynnystason reaaliaikaisessa PCR:ssä. Käyrän Ct -arvo on suoraan verrannollinen DNA -kopioiden alkuperäiseen määrään. Tässä opinnäytetyössä käytettiin standardeina plasmidiliuoslainennoksia, joiden pitoisuus oli mitattu. Ct -arvojen ja pitoisuuksien kautta muodostetun suoran avulla pystyttiin määrittämään viruskantaliuksen pitoisuus.</p> <p>Toiminnallisen opinnäytetyön tavoitteena on kehittää Savonia-ammattikorkeakoulun bioanalytiikan koulutusohjelman sisältöä ottamalla käyttöön uusi Roche LightCycler 96 reaaliaikainen PCR -laite. Tarkoituksena oli tehdä työohjeet PCR -sovellukseen, joka tulisi osaksi molekyylibiologian ja geenitekniikan kurssin harjoitustunteja. Työohjeissa keskityttiin materiaalin opettavuuteen, jossa opiskelija itse suunnittelee toimintaa ohjatusti ja pohtii toimintaansa kysymyksien avulla.</p>	
Avainsanat Real-time PCR, Kvantitatiivinen PCR, Optimointi, Herpes simplex, Virusdiagnostiikka, Mikrobiologia	

Field of Study Social Services, Health and Sports			
Degree Programme Degree Programme of Biomedical Laboratory Science			
Author(s) Henry Heinonen			
Title of Thesis Optimization of quantitative Herpes simplex virus detection for real-time PCR: Working instructions for biomedical laboratory students			
Date	21.4.2015	Pages/Appendices	37/13
Supervisor(s) Marko Björn and Anssi Mähönen			
Client Organisation /Partners Savonia University of applied sciences			
<p>Abstract</p> <p>The real-time PCR device is used to copy designed DNA area enzymatically. The progress of the reaction can be monitored in real-time with the device when reaction sends fluorescence signal which multiplies when DNA copies are made. The application of this thesis is virus diagnostic where <i>Herpes simplex</i> virus 1 is quantified. Herpes viruses are common which cause herpes labialis, stomatitis, genital herpes and, in the worst case herpes encephalitis.</p> <p>There are many factors in the PCR that can be changed by optimizing the reaction that it would be more effective. The reagent concentrations, times and temperatures of the reaction steps can be changed. In this thesis optimizing concentrated on the temperature of the PCRs annealing step. The temperature was optimized by gradient run. The optimal temperature of the annealing step is 56 Celsius degrees.</p> <p>The DNA quantification of the sample is the basis of the quantitative PCR where the standard curve is made with standards whose concentrations are known. Ct-values (Threshold cycle) are essential in quantitative PCR which are formed when reaction curve crosses threshold level in real-time PCR. Ct-value of the reaction curve is directly proportional for the original quantity of the DNA copies. In this thesis plasmid dilutions were used as standards the concentrations of which were measured. With Ct-values and known concentrations the concentration of the virus stock was quantified.</p> <p>The aim of the thesis was to develop the degree content of Savonia university of applied sciences with regard to biomedical laboratory science by deploying Roche LightCycler 96 real-time PCR device. The purpose was to make working instructions for the PCR application which will be a part of the practice lessons of the courses in molecular biology and gene technology. The working instructions focused on the educational aspect of the material where student plans the action under guidance and reflects on the action with the help of some questions.</p>			
Keywords Real-time PCR, Quantitative PCR, Optimizing, Herpes simplex, Virus diagnostic, Microbiology			

SISÄLTÖ

1	JOHDANTO.....	5
2	POLYMERAASIKETJUREAKTIO (PCR).....	6
2.1	PCR:n ominaisuudet.....	6
2.2	PCR -sovellukset	7
2.3	Kvantitatiivinen PCR.....	9
2.4	PCR:n optimointi.....	10
3	<i>HERPES SIMPLEX</i> VIRUKSEN OMINAISUUDET	11
4	VIRUSDIAGNOSTISET TUTKIMUKSET	12
5	HYVÄ LABORATORIOTYÖOHJE.....	13
6	TYÖTURVALLISUUS.....	14
7	OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS JA TAVOITTEET	15
8	OPINNÄYTETYÖN TOTEUTUS.....	16
8.1	Toiminnallinen opinnäytetyö	16
8.2	Opinnäytetyöprosessi	16
9	POHDINTA	19
9.1	Opinnäytetyön eettisyys ja luotettavuus	19
9.2	Opinnäytetyön tavoitteiden toteutuminen	19
9.3	Oma oppiminen	20
	LÄHTEET.....	22
	LIITE 1: TYÖOHJE.....	25
	LIITE 2: LÄMPÖTILAGRADIENNTIAJON TULOKSET	33
	LIITE 3: ESIMERKKI PCR -SOVELLUKSEN TULOKSISTA.....	35

1 JOHDANTO

Opinnäytetyön aihe linkittyy Savonia-ammattikorkeakoulun uusien laboratoriolaitteiden hankintoihin. Laitteistohankintoja tehtiin, kun sosiaali- ja terveysalan opetus siirtyi Microkadun kampukselle Technopolikseen. Laitteistohankinnoilla haluttiin kehittää opetusta ja saada opiskelijoille tietämystä uusista tekniikoista, joita on käytössä bioanalyttikoiden työympäristöissä. Opinnäytetyö liittyy *Herpes simplex* viruksen kvantitatiivisen real-time PCR -sovelluksen optimointiin sekä opetusmateriaalin tuottamiseen sovellukseen liittyen. Savonia-ammattikorkeakoululla on tarvetta saada laitteisto käyttöön, jotta kaikki laitteen hyöty saataisiin esille. Koulun opiskelijoille sovellus tarjoaa mahdollisuuden oppia uusia molekyylibiologisia tekniikoita, ja sitä kautta kokemusta aiheesta.

Työn tavoiteena on optimoida kvantitatiivinen real-time PCR -sovellus Savonia-ammattikorkeakoulun uudelle real-time PCR -laitteelle. Sovelluksessa määritetään *Herpes simplex* virus 1 määrää näytteestä käyttäen standardeja, joiden pitoisuus tunnetaan. Standardit ovat plasmideja, jotka sisältävät tunnetun DNA -alueen viruksen genomista. Työstä muodostetaan opetusmateriaalia, jonka avulla bioanalytiikan opiskelijoiden on mahdollista tehdä HSV1 -määritys.

Työn avulla opiskelijat pääsevät syventymään käytännön virusdiagnoosiikan tutkimukseen ja saavat tietoa yhdestä yleisestä viruksesta, joka Suomessa ja maailmalla aiheuttaa infektioita. Opinnäytetyö onnistuessaan monipuolistaa molekyylibiologian ja geeniteknologian harjoitustunteja ja antaa näkökulmia sekä käytännön harjoitusta uudelta PCR -sovelluksesta, joka on kvantitatiivinen, herkkä ja spesifinen.

2 POLYMEERAASIKETJUREAKTIO (PCR)

2.1 PCR:n ominaisuudet

DNA -jakson entsyymaattista monistamista kutsutaan polymeeraasiketjureaktioksi (polymerase chain reaction, PCR). PCR:ssä lämpötilaa muutetaan PCR -laitteella reaktion vaiheiden mukaisesti. Reaktiossa DNA:n monistaminen mahdollistuu, kun DNA -polymeeraasientsyymi rakentaa haluttua DNA -jaksoa mikrosentrifugiputkissa tai kuoppalevyllä. PCR:n perusajatuksena on käyttää DNA -alukkeita (primer), jotka ovat monistettavan juosteen päistä. Alukkeet pitää suunnitella tarkasti, jotta oikea reaktio voisi tapahtua. Tämän vuoksi monistettava DNA -alue pitää tuntea. Alukkeiden väliin jäänyt monistettava alue pitää olla sopivan mittainen, yleensä alle 10 kb. PCR:n lähtömateriaalina käytetään yleensä kaksijuosteista DNA:ta, joka toimii mallina eli templaattina reaktiolle. DNA:n ei tarvitse olla täysin puhdasta, kunhan lähtömateriaali ei sisällä reaktiota häiritseviä tekijöitä. (Suominen, Pärssinen, Haajanen ja Pelkonen 2010, 153 – 155.)

PCR:ssä käytetään DNA -polymeeraasientsyymiä, joka rakentaa DNA:ta nukleotideistä mallina toimivan toisen juosteen mukaisesti (Solunetti 2006b). PCR:ssä käytettävät entsyymit ovat lämpötilakeskeisiä, joita on löydetty mm. kuumissa lähteissä elävistä bakteereista. DNA -polymeeraasi tekee monistusreaktiossa aina jonkin verran virheitä, koska reaktiosta puuttuvat soluolosuhteissa olevat korjausentsyymit. Kuitenkin on olemassa erilaisia DNA -polymeeraaseja ja entsyymit ovat oikolukuaktiivisia virheiden vähentämiseksi. (Suominen ym. 2010, 153, 158.)

PCR -sykli alkaa denaturointivaiheella, jossa kaksijuosteinen DNA aukeaa ja irtoaa toisistaan lämpökäsittelyssä (noin 95 °C). Seuraavassa vaiheessa lämpötilaa lasketaan (yleensä 55 – 72 °C riippuen alukkeesta), jolloin alukkeilla on mahdollisuus kiinnittyä templaattiin. Tätä kutsutaan annealing -vaiheeksi. Tämän jälkeen lämpötila nostetaan noin 72 °C, jotta DNA-polymeeraasi alkaa liittää nukleotidejä alukkeen perään. Tämä vaihe on templaatin pidennysvaihe (Extension). Kun synteesi on valmis, lämpötila nostetaan jälleen ja juosteet irtoavat toisistaan. Sykliä kutsutaan denaturaatio-annealing-pidennysjarjaksi. Ensimmäisessä syklissä kahdesta juosteesta syntyy neljä juostetta, toisessa syklissä neljästä kahdeksan ja kolmannessa syklissä kahdeksasta 16. Kun on 30 – 40 sykliä mennyt, reaktio on kulunut loppuun ja tuotetta syntynyt miljoonia juosteita. (Suominen ym. 2010, 153 – 158.) PCR -sykli voi olla myös kaksivaiheinen, jolloin annealing- ja pidennysvaihe on yhdistetty. Tämä tekniikka säästää aikaa ja reagensseja. Tällainen tekniikka vaatii annealing- pidennysvaiheen lämpötilan tarkkaa optimointia. (Lopez ja Prezioso 2001.)

PCR -reaktio tulee suunnitella tarkasti, jotta se saadaan onnistumaan. Alukkeiden suunnittelu on ratkaiseva vaihe PCR:n kannalta. Alukkeet ovat herkkiä muodostamaan hiuspinnirakenteita ja dimeerejä, joissa alukkeet itsenäisesti sitoutuvat toisiinsa. Alukkeiden pituus, nukleotidikoostumus ja pituus vaikuttavat reaktion annealing -vaiheen lämpötilaan. Näytteiden ohella kannattaa olla positiivisia ja negatiivisia kontroleja, jotta voidaan nähdä, toimiiko reaktio halutulla tavalla ja onko mahdollisia reaktiota haittaavia kontaminaatioita. Positiivinen kontrolli sisältää monistettavaa DNA -aluetta, jota monistetaan. Negatiivisessa kontrollissa ei ole tätä monistettavaa DNA -aluetta. PCR on altis

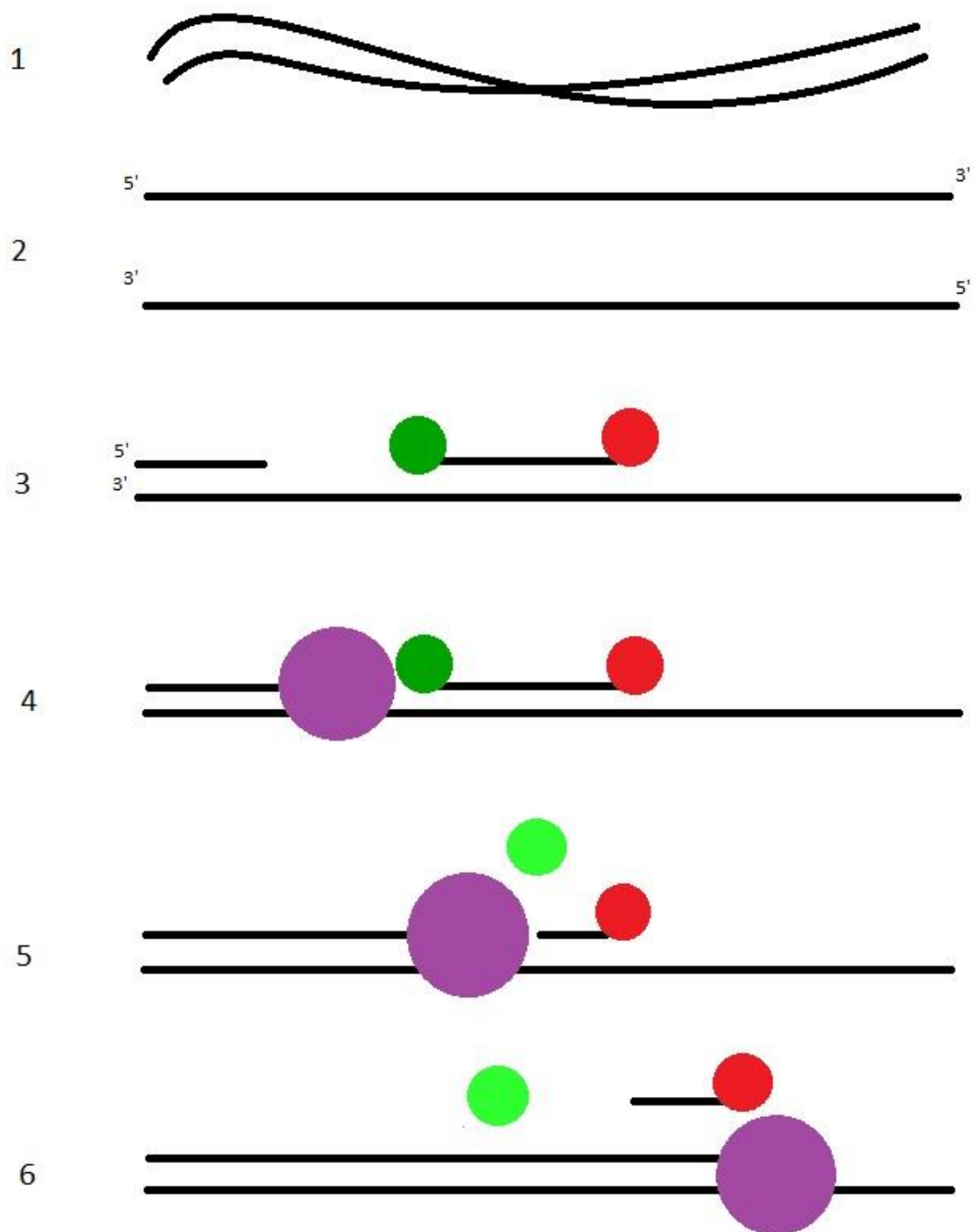
kontaminaatioille ja epäspesifisten tulosten syntyminen on mahdollista. PCR -reaktioiden valmistuksessa on kontaminaatioiden välttämiseksi hyvä olla oma puhdastila, missä on ilmastointi ylipaineistettu ja tuloilma suodatettua. Kontaminaatioiden välttämiseksi templaattia käsitellään eri tilassa, kuin muita reagensseja. (Suominen ym. 2010, 156 – 161, 165.)

2.2 PCR -sovellukset

Perinteisessä PCR:ssä reaktiotuote pitää tarkistaa agarosigeelielektroforeesilla, mutta reaaliaikaisessa PCR:ssä (Real-time PCR) tuotteen syntymistä voidaan seurata PCR -laitteella. Tämä perustuu fluoresoivan merkkiaineen käyttöön reaktiossa. Fluoresenssisignaali moninkertaistuu kaksijuosteisten DNA -kopioiden syntyessä. Reaktion puhtaus voidaan todeta mittaamalla tuotteen sulamislämpö. Kun lämpötilaa nostetaan, kaksinauhaisen DNA:n juosteet erkanee toisistaan sekvenssille ominaisessa lämpötilassa. Tätä lämpötilaa kutsutaan sulamislämpötilaksi (T_M). Jos PCR:ssä on syntynyt muitakin tuotteita kuin haluttua, niin ne näkyvät ylimääräisinä piikkeinä sulamislämpötilakäyrässä. Reaaliaikaisen PCR:n etuna on myös DNA -ristikontaminaatioiden välttäminen, kun tuotetta ei tarvitse käsitellä ajon jälkeen. (Suominen ym. 2010, 166 – 170.)

Reaaliaikaisessa PCR:ssä on monia menetelmiä havaita reaktion etenemistä. Yleisimmät menetelmät ovat Taqman® ja SYBR® Green. Tässä opinnäytetyössä käytetään Taqman® -menetelmään perustuvaa sovellusta. Taqman® -tunnistin (probe) on lyhyt nukleotidijuoste monistettavaa aluetta. Sen 5' päässä on fluoresenssia lähettävä FAM -merkkiaine (6-karboksifluoreseiini) ja 3' päässä on TAMRA -sammuttaja-aine (tetrametyylirodamiini). PCR:n aikana tunnistin kiinnittyy spesifisesti monistettavaan alueeseen ja polymeerasientsyymien muodostaessa DNA -juostetta 3' päästä 5' päähän tunnistin hajoaa. Ensin tunnistimesta irtoaa FAM -merkkiaine, joka irrotessaan alkaa lähettää fluoresenssisignaalia. (Eurogenetec s.a.) Tunnistimen toiminnan mahdollistaa DNA -polymeeraasin eksonukleaasiaktiivisuus, joka oikolukee sekvenssiä ja pilkkoo tunnistimen (Solunetti 2006a). Kuviossa 1 on selvennetty Taqman® -tunnistimen toimintaa PCR -ajon aikana.

SYBR® Green toinen yleisesti käytössä oleva reaaliaikaisen PCR:n havaitsemismenetelmä. SYBR® Green -menetelmässä merkkiaine sitoutuu epäspesifisesti kaikkeen kaksi juosteiseen DNA:han ja sitoutuneena se lähettää fluoresenssisignaalia. Tällä tavoin voidaan havainnoida monistusreaktiossa muodostuva DNA. Spesifisillä alukkeilla pyritään halutun monistusreaktion onnistumiseen. (Eurogenetec s.a.)



KUVIO 1. Taqman® -tunnistimen toiminta reaktion aikana. (1) Alkutilanteessa DNA on kaksijuosteisenä ja sillä on kolmiulotteinen rakenne. (2) Denaturaatiossa DNA -juosteet irtoavat toisistaan. (3) Alukkeet ja tunnistin kiinnittyvät avautuneeseen DNA -juosteeseen. Tunnistimessa vihreä pallo on FAM -merkkiaine ja punainen pallo on TAMRA -sammuttaja-aine. (4) Polymeraasientsyymi, jota violetti pallo edustaa, alkaa muodostaa DNA:ta. (5) Polymeraasientsyymi irroittaa FAM -merkkiaineen muodostaessaan DNA:ta tunnistimen kohdalta, ja merkkiaine alkaa lähettää fluoresenssisignaalia. (6) Polymeraasientsyymi irroittaa loputkin tunnistimesta muodostaessaan DNA:ta. Piirros Henry Heinenon mukaeltu (Lifetechnologies 2015a).

Kvalitatiivisissa PCR -sovelluksissa pyritään todentamaan tietyn DNA:n olemassaolo näytteessä, kuten viruksen DNA -näytteestä. PCR:stä on tullut tärkeä keino havaita esimerkiksi herpesviruksia aivoselkäydinnesteestä, koska se on herkkä, spesifinen, nopea ja halpa menetelmä. Tuloksen voi saada jo kuudessa tunnissa. (Sankuntaw, Sukprasert, Engchanil, Kaewkes, Chantratita, Pairoj ja Lulitanond 2011.)

Nukleiinihappojen osoitusmenetelmä perustuu polymeraasiketjureaktioon, jossa osoitetaan spesifinen monistustuote. Menetelmä on herkkä ja altis kontaminaatiolle, jolloin väärin positiivisten mahdollisuus kasvaa. Syynä väärille positiivisille tuloksille voi olla monistustuotteiden sekaantuminen tai näytteenoton kontaminaatio. (Hedman ym. 2011, 59 – 60.) DNA toimii PCR:n templaattina, joten RNA:n monistamisessa se täytyy kääntää DNA:ksi. Esimerkiksi RNA -virusten kohdalla RNA muutetaan entsyymien avulla cDNA:ksi. Tällöin puhutaan RT-PCR:stä, mikä tulee sanoista Reverse Transcription. Soluista eristetty RNA muutetaan cDNA:ksi käänteistranskriptaasilla. Tämän jälkeen cDNA:ta käytetään templaattina PCR -reaktiossa. cDNA-juosteen valmistuksessa komponentit pipetoidaan koeputkeen ja lämpötilaa kohotetaan käänteistranskriptaasin alkamiseksi. Esimerkiksi cDNA:n monistamisessa joudutaan usein PCR -tuotetta käyttämään seuraavan PCR -reaktion templaattina. Tämä tekniikka on nimeltään Nested-PCR. Kahta perättäistä monistusta käytetään, kun alkuperäisen DNA:n pitoisuudet ovat pieniä, jolloin yksi monistusreaktio ei riitä tuotteen havaitsemiseen. (Suominen ym. 2010, 170 – 172.) Sovelluksessa on kaksi paria alukkeita, joista ensimmäiset monistavat pitempää DNA -aluetta. Toisessa reaktiossa käytetään toisia alukkeita, joilla monistuu lyhyempi DNA -juoste. (Davidson college 2002.)

Multiplex PCR on sovellutus, jossa monistetaan useaa eri sekvenssiä samassa reaktio ajossa. Esimerkiksi PCR -reaktioon voidaan lisätä alukepareja useille eri viruksille, jolloin voidaan diagnosoida useita eri viruksia samanaikaisesti yhdestä näytteestä. Tämä vaatii, että alukkeet on valittu yksilöllisiltä DNA -alueilta ja kaikki alukkeet toimivat samoissa reaktio olosuhteissa. Kaikkien PCR:n reaktioiden on toimittava yksin ja muiden reaktioiden kanssa samassa. Tämän takia reaktio-olosuhteiden optimointi on tärkeässä roolissa. Multiplex PCR on yleistymässä kliinisissä ja tutkimuslaboratorioissa. (Markoulatos, Slafakas ja Moncany 2002.) Kliinisissä laboratorioissa patogeenien tunnistaminen potilaan näytteestä on halpaa ja nopeaa multiplex PCR:n avulla. Kun positiivinen fluoresenssingaali saadaan näytteen reaaliaikaisesta PCR -reaktiosta, patogeeni identifioidaan sulamiskäyrän tai leiman avulla. (Chang, Hsieh, Liu, Lee, Wang, Chou ym. 2013.)

2.3 Kvantitatiivinen PCR

Kvantitatiiviset PCR -sovellutukset (qPCR) perustuvat DNA:n määrän määrittämiseen. DNA:n monistuksessa syntyvä kopioiden määrä on suoraan verrannollinen DNA:n alkuperäiseen määrään. Tämä voidaan määrittää Ct -arvon perusteella. (Zhao, Cao, Tang, Zhou, Gao, Wang, Zheng, Yin ja Wang 2012.) Ct tarkoittaa kynnyssykliä (Threshold cycle), missä reaktion fluoresenssingaali ylittää taustakohinatason (Suominen ym. 2010, 167). Joissakin yhteyksissä puhutaan myös Cq -arvosta (Quantification cycle), jolla tarkoitetaan samaa kuin Ct -arvo (Jordan ja Kurtz 2010). Kvantitatiivisella PCR

-testillä voidaan määrittää viruksen lisääntymisen perusteita, valvoa hoidon vastetta ja virusinfektion latentin ja aktiivisen muodon eroavaisuutta (Watzinger, Ebner ja Lion 2006, 254).

Reaaliaikaisen PCR -käyrän pohjalinja muodostuu ensimmäisten PCR -sykliin linjasta. Tämä on reaktion lähettävän fluoresenssisignaalin taustakohinaa, jossa ei ole havaittavissa fluoresenssimuutosta. Ct -taso on taustakohinan yläpuolella, missä signaalin voidaan olevan muuta kuin taustaa. PCR -ohjelmistot laskevat Ct -tason automaattisesti tai sen voi määrittää manuaalisesti. (Eurogentec s.a.)

Kvantitatiivisessa PCR:ssä voidaan hakea alkuperäistä virusten lukumäärää, kokonais-RNA:n määrää ja geenin määrää. qPCR:n normalisaatiometodeja on pääasiassa kaksi: absoluuttinen ja relatiivinen. Absoluuttinen kvantitaatio perustuu halutun geenin kopioiden tarkkaan laskemiseen. Absoluuttinen määrittäminen vaatii standardikäyrän, jonka muodostamiseen tarvittavien standardien DNA -pitoisuus tiedetään. Standardeja voivat olla esimerkiksi plasmidit, PCR -tuotteet tai kaupalliset standardit. Relatiivisessa kvantitaatiossa halutun geenin ekspressio näytteestä muodostetaan suhteellisesti toisen geenin ja referenssi näytteen avulla. Referenssigeeninä toimii geeni, jonka ekspressio ei muutu kokeellisissa olosuhteissa tai eri kudoksissa. (Eurogentec s.a.)

2.4 PCR:n optimointi

Jotta PCR -reaktio tapahtuisi mahdollisimman tehokkaasti ja spesifisesti, on syytä optimoida reaktioon liittyvät tekijät. PCR -reaktioon vaikuttaa entsyymien määrä, alukkeiden määrä, deoksinukleotidit, magnesiumipitoisuus, denaturaatioaika/lämpötila, annealing -lämpötila, ekstensioaika, syklien määrä ja laitteen tarkkuus. Käytettävä entsyymi ja sen määrä vaikuttaa tuotteen muodostumiseen ja sen laatuun reaktiossa. Alukkeiden optimaalinen pitoisuus on yleensä 0,1 – 0,5 μM . Jos alukkeiden pitoisuus on väärä, voi syntyä epäspesifisiä tai primer-dimer -tuotteita, eli tuotteita, joissa alukkeet ovat yhdistyneet keskenään. Deoksinukleotidipitoisuus vaikuttaa alukkeiden kiinnittymiseen ja sitä kautta PCR:n spesifisyyteen. Magnesiumipitoisuus vaikuttaa moneen tekijään reaktiossa, koska esimerkiksi DNA -polymeraasi tarvitsee vapaan magnesiumionin sitoutumiseen. Magnesiumipitoisuus vaikuttaa myös alukkeiden kiinnittymiseen, DNA -juosteiden eroutumiseen ja tuotteen spesifisyyteen. Epätäydellinen denaturaatio on todennäköisin syy, jos PCR epäonnistuu. Tällöin pitää muuttaa denaturaatiolämpötilaa tai -aika. Annealing-lämpötilan valintaan vaikuttaa alukkeen pituus, pitoisuus ja emäskoostumus. Ekstensioaikaan vaikuttavat templaatti-DNA:n pituus ja sen määrä, entsyymi ja lämpötila. Sykliin määrään vaikuttaa templaatti-DNA:n määrä. Tämän lisäksi PCR -laitteen tarkkuus vaikuttaa reaktion tehokkuuteen ja toistettavuuteen. (Suominen ym. 2010, 162 – 164.)

3 *HERPES SIMPLEX* VIRUKSEN OMINAISUUDET

Herpes simplex virukset eli yleisimmin HSV1 ja HSV2 ovat kohtalaisen yleisiä viruksia. Suomessa nykyisin noin puolet ihmisistä kantaa HSV1 -vasta-aineita. Viruksen genomi on kaksisäikeisessä DNA:ssa, jossa on noin 152 260 emäsparia ja yli 80 geeniä. Virus pystyy häiritsemään elimistön ja solujen puolustusvasteita. HSV:n replikaatio tapahtuu isäntäsolussa, jossa se ohjailee toimintaa itsensä kannalta edulliseen suuntaan. Tyypillistä herpesinfektioille on latenttimuoto, jossa HSV asettuu piileväksi jopa vuosikymmeniksi. Tämä on etu viruksen säilymiselle, koska viruksen ei tarvitse muunnella antigeenejään. Viruksen replikoituminen epiteelisoluissa johtaa viruksen kulkeutumiseen alueella oleviin sensorisiin neuroneihin. Hermosolmun neuronien tumat ovat viruksen lopullinen päämäärä, johon Herpes jää latentiksi DNA -molekyyliksi. HSV aktivoituu latenssilasta eri ärsykkeistä, kuten UV -valosta, hormoneista, stressistä tai muista infektioista. Aktivoitunut HSV kulkeutuu epiteelille aiheuttaen infektion. (Hedman, Heikkinen, Huovinen, Järvinen, Meri ja Vaara 2010, 525 – 526, 528.)

Tyypillisesti HSV1 aiheuttaa suutulehdusta ja yskänrokkoa. Infektion puhkeamisessa iho alkaa punoittaa ja iholle muodostuu kirkkaan nesteen täyttämiä rakkuloita. Sekä HSV1 ja HSV2 aiheuttaa genitaalialueen herpestulehdusta. Harvinaisempana herpesviruksen aiheuttamana tautina on vakavampi herpes-encefaliitti, jossa infektio aiheuttaa neurologisia oireita. HSV-infektioita voi olla monenlaisia, mutta edellä mainitut ovat yleisimpiä. Kuitenkin HSV voi aiheuttaa infektion silmissä, sisäelimissä tai keskushermostossa. (Hedman ym. 2010, 529 – 535.)

HSV:n diagnostiikassa yleisimmin käytettynä muotona on virusviljely, jossa infektion ilmaannuttua rakkulasta otetaan näyte viljelyä varten. Toinen keino on tutkia löytyykö potilaasta otetusta näytteestä HSV:n antigeenejä immunofluoresenssimenetelmällä. PCR -menetelmällä on osoitettavissa onko näytteessä viruksen DNA:ta. PCR -menetelmä on herkkä, koska jo pieni määrä viruksen genomia antaa positiivisen tuloksen. (Hedman ym. 2010, 536.) PCR -menetelmää käytetään todentamaan virus likvorista keskushermostoinfektioista (Piiparinen, Koskiniemi ja Vaari 1995, 129). Eri-tyisesti meningiitit, enkefaliitit, myeliitit ja vastasyntyneiden infektiot, ovat indikaatioina PCR -tutkimukseen. Näytteeksi tarvitaan 0,5 – 1 ml likvoria, jota säilytetään jääkaapissa tai pakastettuna, jos analyysi tehdään yli 3 vuorokauden päästä. Enkefaliittitapauksissa positiivinen vastaus voidaan saada jo ensimmäisenä sairauspäivänä, mutta varmimmin herpesviruksen DNA:ta löydetään 1. – 11. sairauspäivänä. (Mannonen 2015.)

4 VIRUSDIAGNOSTISET TUTKIMUKSET

Virusdiagnostiikassa pyritään osoittamaan virukset tai niiden osia potilasnäytteestä. Virusviljelyssä viruksen annetaan lisääntyä soluviljelmässä. Viruksen lisääntyminen voidaan todeta viljelmästä, esimerkiksi valomikroskooppisesti kullekin virukselle tyypillisistä solutuhoista. Tunnistus voi tapahtua myös immunologisella menetelmällä, jossa virusspesifisellä vasta-aineella estetään viruksen kasvu. Virusviljely on herkkä menetelmä, joka vaatii näytteen ottamista oikeasta kohdasta oikeaan aikaan. (Hedman, Heikkinen, Huovinen, Järvinen, Meri ja Vaara 2011, 55 – 57.)

Virusantigeenien osoituksessa potilasnäytteestä osoitetaan suoraan virusproteiinien läsnäolo immunologisin menetelmin. Virusproteiini tunnistetaan leimatun vasta-aineen avulla, esimerkiksi immuno fluoresenssitekniikalla. Vasta-ainetutkimuksissa etsitään näytteestä IgG- ja IgM -luokan vasta-aineita. Ihmisen humoraalinen tai soluvälitteinen immuunivaste aiheuttaa vasta-aineiden pitoisuuksien kasvun virusinfektioiden yhteydessä. Vasta-ainetutkimuksen menetelmä valitaan diagnostisen päämäärän mukaisesti. Halutaanko tietää potilaan immuniteetti vai tartuntahistoria, infektion ajankohta vai viruksen aktivoituminen elimistössä. (Hedman ym. 2011, 58 – 61.)

Virusdiagnostiikan kehitys voidaan jakaa kolmeen osa-alueeseen: kenttäoloihin tarkoitettuihin tekniikoihin, useita viruksia näytteestä osoittaviin tekniikoihin (multiplex) ja uusien virusten etsintään soveltuviin tekniikoihin. Ensimmäiseen kategoriaan kuuluu LAMP (loop-mediated isothermal amplification), joka perustuu DNA:n monistamiseen kuten PCR. LAMP:ssa kuitenkin valitaan kolme paria primereita: sisäiset, ulkoiset ja loop-primerit, jolloin monistuksen tuotteessa on yksijuosteisia DNA silmukoita. Tämän takia reaktio voidaan tehdä ilman DNA:n denaturaatiota yhdessä lämpötilassa. Toiseen kategoriaan uusimpaan kehitykseen kuuluu Luminex MagPlex-TAG -jyväteknikka, jolla voidaan havaita useita viruksia kerralla. Tekniikassa käytetään superparamagneettisia polystyreenijyviä, jotka ovat sisäisesti leimattuja omalla fluoresenssivärillä. Kukin tietty jyvä on yhdistetty hyvin spesifiseen anti-MagPlex-TAG -olikonukleotidisekvenssiin. Tekniikalla pystyy tunnistamaan jopa 150 eri nukleinihapposekvenssiä yhdessä reaktiossa. Kolmannessa kategoriassa seuraavan sukupolven sekvensointimenetelmiä (Next generation sequencing, NGS) on useita, joilla löydetään uusia viruksia. Jos katsotaan tulevaisuuteen, NGS:llä on mahdollista useiden virusten tunnistus yhdestä näytteestä (multiplex) ilman, että käytetään virusspesifisiä reagenssejä. Tämä vaatii, että sekvensointi tulee halvemaksi ja helpommaksi suorittaa. Kuitenkin aika näyttää, mikä sekvensointi menetelmä tulee rutiinikäyttöön diagnostiikassa tulevaisuudessa. (Boonhama, Kreuzeb, Winterc, Van der Vlugtd, Bergervoetd, Tomlinsona ja Mumforda 2014.)

5 HYVÄ LABORATORIOTYÖOHJE

Jos ajatellaan ohjetta laitteella työskentelyyn, ohje voi tällöin viitata laitteen valmistajan ohjeisiin. Työohjeita on monenlaisia ja yksi esimerkki on Moodi-lehdessä (6/2009) esitelty taulukkomuotoinen ohje, jossa on esitettyinä kaikki tutkimukseen viittaavat tiedot. Tässä tapauksessa viitataan laitteen käyttöön ja analyysin suorittamiseen laitteella. (Ilanne-Parikka, Joutsu-Korhonen, Jylhä, Lassila, Linko-Parvinen, Linko ym. 2009. 287, 327 – 328.)

Tässä opinnäytetyössä työohjeella on SOP:n (Standard operating procedure) tyylisiä piirteitä. SOP on kirjallinen ohjeistus, jolla pyritään työskentelyn turvallisuuteen ja tehokkuuteen. Kirjalliset ohjeet ovat yksityiskohtaiset, jolloin tietyn tehtävän toiminta ja työskentely on ehdottoman yhdenmukaista kerrasta toiseen. Tällaista työohjeistusta suositellaan kaikkeen toimintaan, missä on työntekijöiden terveys tai turvallisuus uhattuna. (SOP - Standard operating procedure s.a.)

Työohjetta voi myös verrata ruuanlaitto-ohjeeseen, jossa on selkeästi ohjeet tarvittavista tarvikkeista ja toiminnasta oikeassa järjestyksessä. Ohjeistus innostaa onnistuneeseen lopputulokseen. Ohjeistuksessa motivointi on tärkeää, jotta lukija noudattaa ohjetta, ymmärtää ohjeen tarkoituksen ja hyödyn. Ohjeen tekemisessä on otettava huomioon ohjeiden lukijan oppiminen. Siksi ohjeiden tulee olla selkeät, jolloin lukija ymmärtää jokaisessa vaiheessa kuinka tulee toimia. (Repo ja Nuutinen 2003, 138.)

Tässä opinnäytetyössä tehtävä työohjetta käytetään Savonia-ammattikorkeakoulun bioanalytiikan harjoitustunneilla, joten työohjeella on opetuksellisia tavoitteita, eli opiskelijoiden oppiminen soveluksen kautta. Työohjetta voidaan pitää oppimateriaalina, kun se sisältää oppiainesta, joka välittyy opiskelijoille ja saa aikaan heissä oppimiskokemuksen. Työohje on tässä tapauksessa oppiainesta sisältävä tietolähde. (Heinonen 2005, 30).

Tämän opinnäytetyön työohjeella on kaikkien edellämainittujen ohjeistusten piirteitä. Kyseessä on kliiniseen työskentelyyn suunnattu ohje, kuten Moodi -lehdessä, jossa on kaikki tutkimukseen viittaavat tiedot ja laitteella työskentelyyn ohjeet. Kuitenkin työohje ei ole taulukkomuotoinen. Työohjeessä pyritään turvallisuuteen ja selkeyteen, kuten SOP:ssa. Työssä pyritään aina samaan lopputulokseen samalla toteutuksella, jolloin ohjeen selkeys korostuu. Työohjeen on oltava kuten resepti, jossa on lueteltuna kaikki tarvikkeet ja työvaiheet selkeästi. Tämän kaiken lisäksi työohjeessä on oppiainesta, joka välittyy opiskelijoille ohjeen kautta.

6 TYÖTURVALLISUUS

Työturvallisuusriskien arvioinnissa on viisi huomioitavaa kategoriala: Fysikaaliset vaarat, tapaturman vaarat, ergonomia, kemialliset ja biologiset vaarat sekä henkinen kuormittuminen (Työturvallisuuskeskus s.a. a). Tässä opinnäytetyössä työturvallisuus keskittyy kemiallisiin ja biologisiin tekijöihin, vaikka työskenneltäessä on aina otettava kaikki viisi turvallisuuskategoriaa huomioon. *Herpes simplex* viruskantaliuokset ovat ISLAB:n mikrobiologian laboratoriosta. Viruskantaliuoksia on käsitelty siten, etteivät liuokset aiheuttaisi infektioita. Kuitenkin valmistajan ohjeiden mukaisesti viruskantaliuoksia tulee aina käsitellä työturvallisuuden vuoksi kuin ne olisivat infektoivia.

Biologiset tekijät ovat biologista alkuperää olevia epäpuhtauksia, kuten bakteereita, sieniä, hiivoja, viruksia, alkueläimiä, loisia ja hyönteisiä. Ne ovat yleensä näkymättömiä. Biologisille tekijöille altistuminen tapahtuu yleensä hengitysteitse, ruuansulatuskanavan kautta tai ihon välityksellä. Terveystahintaan vaikuttaa yleensä altistumisen määrä ja kesto. (Työterveyslaitos 2014.) Altistuminen tulee estää tai se tulee minimoida niin pieneksi, ettei siitä ole vaaraa terveydelle. Vaarojen torjuntakeinoja ovat muun muassa: tekniset torjuntatoimet, työmenetelmät, hygieniset toimet, työn organisointi, biologisten tekijöiden tarkkailu, henkilökohtaisten suojainten käyttö ja varoitusmerkkien käyttö. (Työturvallisuuskeskus s.a. b.)

Opinnäytetyön sovelluksessa korostetaan aseptista työskentelyä ja työturvallisuutta. Suojaimia, kuten työvaatteita, hengityssuojainta ja hanskoja, kehoitetaan käyttämään työskennellessä viruskantaliuosten kanssa. Viruskantaliuosta käsitellään laminaarivirtauskaapissa, joka eristää työvaiheen ja suojaa työskentelijää. Jätteiden käsittelyyn tulee kiinnittää huomiota. Virusta sisältävät jätteet tulee kerätä yhteen astiaan ja hävittää asianmukaisesti.

7 OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS JA TAVOITTEET

Opinnäytetyön tarkoituksena on saada optimoitua *Herpes simplex virus 1* PCR -sovellutus Savonia-ammattikorkeakoulun Roche Lightcycler 96 real-time PCR -laitteelle (Kuva 1). Tarkoituksena on pysyttää kvantitatiivinen real-time PCR -sovellus HSV1:lle, mistä tuotetaan materiaalia Savonia-ammattikorkeakoulun bioanalyttikko-opiskelijoiden molekyylibiologian ja geenitekniologian kurssin harjoitustunneille.

Opinnäytetyön tavoitteena on kehittää Savonia-ammattikorkeakoulun molekyylibiologian ja geenitekniologian kurssin harjoitustuntien sisältöä ottamalla käyttöön uusi real-time PCR -laite. Tavoitteena on saada uutta opetusmateriaalia, jossa käsitellään nykyaikaista molekyylibiologista menetelmää. Lisäksi tarkoituksena on syventää omaa tietämystä real-time PCR -laitteistosta ja tekniikoista.



KUVA 1. Roche LightCycler 96 real-time PCR -laite (Henry Heinonen 2015).

8 OPINNÄYTETYÖN TOTEUTUS

8.1 Toiminnallinen opinnäytetyö

Tämä opinnäytetyö kategorioituu toiminnalliseksi opinnäytetyöksi. Toiminnallisessa opinnäytetyössä tavoitellaan käytännön toiminnan kehittämistä, joka pohjautuu työelämään. Toiminnallinen opinnäytetyö on kaksiosainen, missä on toiminnallinen osuus ja opinnäytetyön raportointiosuus. Tuotos pohjautuu aina ammattiteoriaan ja sen tuntemiseen. Toiminnallisen opinnäytetyön tekijän odotetaan tutkivan ja kehittävän, vaikka opinnäytetyön ollessa kysymyksessä, se on rajallista. Projektin toteutustapa tulee olla kohderyhmästä riippuvaista. (Lumme, Leinonen, Leino, Falenius ja Sundqvist 2006.)

Toiminnallisen opinnäytetyön tuotoksena on aina jokin konkreettinen tuote, ja se voi olla esimerkiksi ammatilliseen käytäntöön suunnattu ohje. Selvityksen tekeminen on yksi osa toiminnallista opinnäytetyötä. Raportoinnissa on käsiteltävä tuotoksen saavuttamiseksi käytettyjä keinoja. (Vilka ja Airaksinen 2003, 9, 51.) Tässä opinnäytetyössä konkreettisenä tuotoksena on työohje PCR -sovelluksen tekoon. Tätä opinnäytetyötä varten olen tutkinut ja hakenut tietoa aiheesta laajasti, jotta saisin työohjeeseen viimeisimmän teoreettisen tiedon sovelluksen suorittamiseen. Käytin tiedonhakuun muun muassa PubMed- ja ScienceDirect -tietokantoja. Opinnäytetyö pohjautuu työelämään, koska sovellus perustuu diagnostiseen tutkimukseen sekä bioanalyttikoiden ammatillisen koulutuksen vaatimuksiin. Opinnäytetyössä kehitetään Savonia-ammattikorkeakoulun molekyylibiologian ja geeniteknologian kurssin harjoitustuntien sisältöä. Koulutuksen kehittäminen on tärkeää jokaiselle koululle, jotta tulevaisuuden ammattilaisilla olisi mahdollisuus saada parasta mahdollista koulutusta.

8.2 Opinnäytetyöprosessi

Opinnäytetyö kuuluu ammattikorkeakoulututkintoon johtaviin opintoihin, joka on laajuudeltaan 15 opintopistettä. Ammattikorkeakoulututkintoon johtavat opinnot antavat perustiedot ja -taidot toimia oman alan asiantuntijatehtävissä, valmiudet kehittää omaa ammattialaa, edellytykset omaan kehittymiseen ja riittävät viestintä- ja kielitaidot. (Valtioneuvoston asetus ammattikorkeakouluista 4.7.2013/546 4§ ja 7§.) Opinnäytetyöllä opiskelija pyrkii osoittamaan omien tietojen ja taitojen soveltamiskykyä asiantuntijuus tehtävässä, joka liittyy ammattiopintoihin. Opinnäytetyöprosessi lähtee liikkeelle ideasta ja etenee työnsuunnitteluun, työn toteutukseen ja tulosten julkistamiseen. Opinnäytetyössä on olennaista soveltava kehittäminen, jossa syvennetään tietämystä omalta ammattialalta ja luodaan yhteyttä työelämään. Opinnäytetyöprosessissa etsitään, käytetään ja sovelletaan tieteellistä ja näyttöön perustuvaa tietoa. Opinnäytetyö koostuu opetus suunnitelman mukaisesti kolmesta vaiheesta: Opinnäytetyön orientoitumis- ja suunnitteluvaihe (4 op), Opinnäytetyön toteutusvaihe (10 op) ja Opinnäytetyön viimeistely ja julkistamisvaihe (1 op). (Savonia 2014; Savonia 2013.)

Opinnäytetyön aiheen sain talvella 2014, kun Savonia-ammattikorkeakoululle oli hankittu uutta laitteistoa. Toiminnalliselle opinnäytetyölle on hyvä saada toimeksiantaja ja aiheen tulisi syventää tietoa ja taitoja (Vilka ja Airaksinen 2003, 16). Koska olen aikaisemmalta koulutukseltani laboratorio-analyttikko, Savonia-ammattikorkeakoulu hyödynsi tietämystäni ja ammattitaitoani. Lisäksi aihe kiinnosti minua, koska kyseessä oli uudenlainen sovellus, jota pääsisin kehittämään uudelle laitteelle. Koska kyseessä oli valmis aihe, jota Savonia ammattikorkeakoulu tarjosi, varsinainen aiheen ideointi jäi suppeammaksi. Kuitenkin tehdessäni aihekuvausta käytin ideoinnin periaatteita eli kartoitin mitä tiedän aiheesta, luin aiheeseen liittyvää kirjallisuutta ja etsin tietoa eri tietolähteistä. Hyvän aiheen tunnistaa sen kiinnostavuudesta, sopivuudesta alan opintoihin, aiheen opettavuudesta, tiedon saatavuudesta, ohjaajan löytymisestä ja toteutusaikataulusta. Aihetta tulee rajata ja tarkennettava tutkimusideaa, jotta se selkeytyisi. Tutkimusaiheen tulee olla yleinen, jotta kirjallisuutta löytyisi helpommin. Tehtävän laajuus kuitenkin rajaa työn pituutta merkittävästi. (Hirsjärvi, Remes ja Sajavaara 2004, 66 – 79.) Aihekuvauksen tein hyväksytysti keväällä 2014 ja rajasin alustavan suunnitelman mukaisesti aihettani. Hain eri tietokannoista aiheeseen liittyvää kirjallisuutta ja aiheesta löytyi runsaasti eri tutkimuksista.

Toimintasuunnitelmassa kysytään mitä tehdään, miksi tehdään ja miten tehdään. Tämä selkeyttää työn tavoitteita ja perustelee toimintaa. Toimintasuunnitelman avulla osoitetaan itselle ja muille mitä ollaan tekemässä, että työn ideointi sekä tavoitteet ovat harkittuja. (Vilka ja Airaksinen 2003, 26.) Töiden suunnittelu alkoi syksyllä 2014 ja aloitin laboratorio työskentelyn silloin. Tammikuussa 2015 esitin työsuunnitelman hyväksytysti. Työsuunnitelmaan tavoitteet ja toiminta oli selkeytynyt ja työ voitiin suorittaa suunnitelman mukaisesti.

Opinnäytetyön laboratoriotyöskentelyn aloitin syksyllä 2014 ja sain työt päätökseen maaliskuussa 2015. Opinnäytetyön PCR -sovellus perustuu Savonia-ammattikorkeakoulun suunnittelemaan reaktioon. Reaktion alukkeet ovat suunniteltu monistamaan *Herpes simplex virus 1:n* US6 -geeniä, joka koodaa viruksen glykoproteiini D:tä. Monistettava sekvenssi on noin 70 emäsparia (bp, basepair) pitkä. Monistettavaa aluetta on käytetty ainakin saksalaistutkimuksessa Rapid Detection of *Herpes Simplex virus* and Varicella-Zoster Virus Infections by Real-Time PCR (Weidmann, Meyer-König ja Hufert 2003). Reaktion primer- ja tunnistin -pitoisuus on suunniteltu valmiiksi. Kaupallinen Mastermix (FastStart Essential DNA Probes Master, Roche) on hankittu valmiiksi reaktiota varten. Yhteen reaktioon tarvitaan 15 µl reaktiomixiä, jossa on alukkeet, tunnistin ja mastermix, sekä 5 µl näytettä eli templaatti DNA:ta. 20 µl reaktiutilavuus on verrattaen pieni, mikä säästää reagensseja. Reaktion pipetointiutilavuudet löytyvät liitteenä olevasta työohjeesta (Liite 1). Sovellukseen on otettu esimerkiksi Genesiqin kvantitatiivisen *Herpes simplex* viruksen määrittämisen ohjeista: Quantification of Human Herpes Virus I (*Herpes Simplex* type I) (Genesiq 2005).

Opinnäytetyön suunnitelmat ovat muokkautuneet töiden edetessä, koska pidimme palavereita työvaiheiden välissä, jossa keskustelimme miten edetä töissä. Palavereihin osallistui opinnäytetyön ohjaajien lisäksi Rochen edustaja, jonka konsultaatio oli tärkeää työn etenemisen kannalta. Laboratoriotyöskentelyn aloitin optimoimalla gradienttiajolla reaktion annealing -lämpötilan. Kaikki reaktioon liittyvät reagenssit ovat kaupallisia ja primerit sekä tunnistin olivat valmiina, joten ainoa johon opti-

mointi keskittyi, oli annealing -vaiheen lämpötila. Gradienttiajon perusteella annealing -lämpötilaksi muodostui 56 °C. Gradienttiajon tulokset ovat liitteenä (Liite 2). Keskityin myös reaktion spesifisyyteen, kun käytettävissä oli myös HSV2 -kantaliuosta. Reaktio oli spesifinen HSV1:lle, jolloin DNA:ta ei monistunut HSV2 -kantaliuosta käytettäessä. Reaktion herkkyyttä testasin tekemällä HSV1 -kantaliuoksesta laimennossarjan. Kvalitatiivista työtä testattiin myös opetuksessa bioanalytikkoryhmälle 10.2.2015 ja sovellus onnistui.

Kun olin saanut reaktion optimoitua, keskityin laboratoriotyöskentelyssä kvantitatiiviseen reaktioon, josta tein työohjeen. Tilasimme plasmidia, jossa on viruksen haluttua geenialuetta. Plasmidia käytettiin standardisuoran muodostamiseen. Geenialueen haimme geenipankista tilausta varten. Tein laimennoksen plasmidista ja määritin sen pitoisuuden spektrofotometrillä (Itä-Suomen yliopiston AIV-instituutin Eppendorf BioPhotometer). Mitattu DNA -pitoisuus muutetaan plasmidipitoisuudeksi, kun lasketaan plasmidin molekyylipaino valmistajan kaavan avulla (ks. työohje): (plasmidin pituus emäspareina)*607,4 +157,9 (g/mol) (Lifetechnologies 2015b). Tein plasmidiliuoksesta laimennossarjan ja HSV1 -kantaliuoksesta laimennoksia, jotta löytäisin sopivan pitoisuusalueen, missä viruskantaliuoksen pitoisuus oli standardien pitoisuuksien keskellä. Kun löysin sopivan alueen, testasin vielä sovellusta ja tein työohjeen.

PCR -sovellus viittaa kliiniseen tutkimustyöskentelyyn, joten pidin huolta, että työohje sisältää kaikki tarvittavat tiedot ja ohjeet työn suorittamiseksi. Työohjeessa panostin turvallisuustekijöihin ja ohjeen selkeyteen. Työohjeeseen tein selkeän päämäärän ja toteutuksen. Luettelin työohjeeseen kaikki tarvikkeet ja työvaiheet. Lisäksi työohjeessa otettiin huomioon opetusmateriaalina toimiminen.

Keskityin työohjeessa toiminnan ohjaamiseen, koska sovelluksessa on runsaasti työvaiheita, jotka tulee suunnitella hyvin. Laboratoriotyöskentelyn suunnittelu on työohjeen ensimmäisessä vaiheessa, koska pipetointi, reaktiot ja työvaiheet tulee olla laskelmoitu etukäteen tarkasti työn onnistumisen kannalta. Työohjeessa korostetaan aseptista työskentelyä, koska PCR on herkkä kontaminaatioille. Työturvallisuus on tärkeässä roolissa, koska infektioriskit on otettava huomioon työskentelyssä. Työohjeessa on kerrottu tarkkaan laitteen ja tulosten tarkasteluohjelmiston käyttöä, jotta ohjeiden avulla pystyttäisiin helposti tekemään harjoitus ja saamaan tulokset ulos laitteesta. Liitteenä (Liite 3) on sovelluksen tuloksista esimerkki, josta nähdään, minkälaisia tuloksia sovelluksesta saadaan.

Opinnäytetyön raportin kirjoittamisen aloitin tammikuussa 2015 ja sain sen viimeisteltyyn muotoon huhtikuussa 2015, jonka jälkeen jätin raportin arvioitavaksi. Kokonaisuudessaan opinnäytetyöprosessi päättyi toukokuussa 2015.

9 POHDINTA

9.1 Opinnäytetyön eettisyys ja luotettavuus

Tiedon hankintaan ja julkaisemiseen liittyy tutkimuseettisiä periaatteita, joita on otettava huomioon myös opinnäytetyötä tehdessä. Opinnäytetyön aiheen valintakin on eettinen kysymys. Miksi ylipäätään tehdä tästä aiheesta opinnäytetyö ja mikä sen merkitys on? Eettisissä periaatteissa keskeisenä asiana on välttää epärehellisyyttä tutkimustyössä. Plagiointi on ehdottomasti kiellettyä ja lähdemerkinnät tulee tehdä asianmukaisesti. Tuloksia tulee esitellä kriittisesti ja niitä ei saa kaunistella. Raportoinnin tulee olla perusteellista ja siinä tulee olla huolellisesti selitettynä tutkimuksen jokainen vaihe. (Hirsjärvi ym. 2004, 26 – 28.) Hyvän tieteellisen käytännön periaatteita ovat rehellisyys, huolellisuus, eettisesti kestävä tiedonhankinta- ja arviointimenetelmät, muiden työn huomioiminen ja vaatimusten mukainen raportointi, mitä myös opinnäytetyön tulee noudattaa (Roivas ja Karjalainen 2013, 80).

Tässä opinnäytetyössä aiheen valinta ja sen merkittävyys eivät ole eettisesti arveluttavia, koska Savonia-ammattikorkeakoulun opetuksen kehittäminen ajanmukaiseksi on suotavaa ja opiskelijoille hyödyksi. Aiheen merkittävyyden arviointi on vielä tässä vaiheessa hankalaa, koska aika näyttää kuinka paljon hyötyä tästä sovelluksesta on opiskelijoille. Opinnäytetyötä varten hain tietoa useista tietokannoista ja käytin erilaisia lähteitä. Lähteitä arvioin julkaisijan, tekijän ja sisällön perusteella. Aiheesta oli helppo löytää tietoa eri lähteistä ja pääasiassa tiedon tarjoajat olivat arvovaltaisia ja nimikkäitä alallaan. Lisäksi tiedon yhdenmukaisuus antoi varmuutta tiedon oikeellisuudesta. Tässä opinnäytetyössä tiedon oikeellisuus korostuu, kun työohje tulee opetuskäyttöön. Virheellinen tieto voi olla vahingollista opiskelijoille, kun se antaa väärän käsityksen asiasta. Raportoinnissa pyrin käyttämään selkeitä lähdemerkintöjä ja ottamaan huomioon opinnäytetyöprosessin jokaisen vaiheen.

9.2 Opinnäytetyön tavoitteiden toteutuminen

Opinnäytetyössä reaktion optimointi onnistui halutulla tavalla, vaikka optimoinnin laajuus ei ollut kovin suuri. Optimointi keskittyi vain oikean annealing -lämpötilan etsimiseen gradienttiajon avulla. Reaktion muita parametreja ei voitu muuttaa, koska reaktio oli jo suunniteltu valmiiksi. Olisi tietenkin ollut mielenkiintoista muuttaa muitakin parametreja reaktiosta, mutta se olisi ollut turhaa, koska reaktio toimi tarvittavalla tehokkuudella. Tämän pystyi toteamaan laboratoriotöiden loppupuolella.

Kvantitatiivisen reaktion sain toimimaan halutulla tavalla. Tietysti voidaan pohtia reaktion tuloksien tarkkuutta, koska plasmidin avulla lasketaan viruspitoisuutta. Tässä opinnäytetyössä ei osoitettu plasmidin käyttäytyvän monistuksessa viruksen tavoin. Olisimme tarvinneet positiivisen kontrollin, jossa olisi sovelluksessa käytettyä virusta ja pitoisuus olisi tunnettu. Sen avulla olisi mahdollista saada absoluuttisia tuloksia viruskantaliuoksesta.

Jos ajatellaan sovelluksen käyttötarkoitusta kouluolosuhteissa, tulosten absoluuttinen tarkkuus ei ole relevanttia vaan opetustarkoitus. Sovelluksella ei tehdä potilastutkimuksia vaan harjoitellaan kantaliuosnäytteen avulla kvantitaatiota PCR -laitteella. On tärkeämpää saada koulutustarkoitukseen suhteellisen edullisesti ylläpidettävä harjoitustyö, josta opiskelijat oppivat uusia tekniikoita.

Sovelluksen ylläpitokustannukset ovat verrattain pienet, koska reagenssit ovat riittoisia ja plasmidia pystytään monistamaan lisää. Lisäksi on tärkeää saada Savonia-ammattikorkeakoululle PCR -laite käyttöön, koska investointi oli kallis ja tarve opetuksen kehittämiseksi on jatkuva.

Opinnäytetyölleni jatkoa voisi olla plasmidin massamonistamisen kehittäminen PCR -sovellusta varten, koska käyttökustannukset saadaan merkittävästi pienemmäksi, kun plasmidia tehdään itse. Kuitenkin plasmidin valmistus on tärkeää, jos opinnäytetyöni sovellusta tullaan käyttämään harjoitustunneilla. Valmistettua plasmidia pystytään vertailemaan kaupalliseen plasmidiliuokseen esimerkiksi tämän opinnäytetyön sovelluksen avulla. Toinen kehitys kohde tähän opinnäytetyöhön liittyen voisi olla posterin tekeminen Savonia-ammattikorkeakoulun tiloihin, mikä voisi antaa informaatiota opiskelijoille. Posterin voisi olla real-time PCR:n käytöstä mikrobiologiassa. Posterin tekoon voisi liittyä kirjallisuuskatsaus aiheesta, koska tietoa ja erilaisia tutkimuksia aiheesta on julkaistu paljon.

Työhjeeseen olen tyytyväinen, koska se mielestäni soveltuu opetuskäyttöön. Sovellus on mielestäni mielekästä tehdä ja pyrin työhjeessä innostamaan työskentelyyn. En halunnut työhjeen antavan kaikkia vastauksia suoraan, vaan pyrin työhjeen antavan haastetta, innostavan pohtimaan ja etsimään tietoa teoriasta sekä kirjallisuudesta. PCR -sovellus on mielestäni haasteellinen toteuttaa harjoitusolosuhteissa, siksi korostin reaktion, pipetoinnin ja muun toiminnan suunnittelua, jotta opiskelijat itse tietäisivät kuinka toimia harjoituksen aikana.

Työhje on mielestäni merkityksellinen Savonia-ammattikorkeakoululle, bioanalytiikan koulutusohjelmalle ja sen opiskelijoille, koska ohjeen kautta saadaan uusi laite ja harjoitustyö käyttöön, jolla on yhteys työelämään. Opetuksen kehittäminen on tärkeää jokaiselle koululle ja uusinta tietoa tulee soveltaa opetuksessa. Tämän opinnäytetyön kautta otettiin monia kehitysaskelia molekyylibiologian opetuksessa, jonka tärkein saavutus nähdään tulevaisuudessa opiskelijoiden osaamisessa. Jokaiselle opiskelijalle tulee kuitenkin tarjota paras mahdollinen opetus ja tieto, mikä takaa hyvän edellytyksen oman alan ammatilliseen toimintaan.

9.3 Oma oppiminen

Opinnäytetyöprosessin aikana tietämykseni aiheesta syveni, koska tätä opinnäytetyötä ei olisi voinut suorittaa ilman perusteellista teoretiedon läpi käymistä. Oli hienoa huomata kuinka nopeasti tiedon omaksuu ja kuinka paljon ala on kehittynyt. Tietoa oli runsaasti saatavilla ja tiedon hakutaitoni kehittivät myös. Hakukoneiden erilaiset ominaisuudet tulivat tutuksi tiedon hakuprosessin aikana ja hakusanojen käyttö tuli tehokkaammaksi, esimerkiksi asiasanojen käytöllä. Käytännön työskentelyäni kehittivät palaverit laitteen edustajan kanssa. Laboratoriotaukani huomioiden käytännön työskentely

oli kuitenkin tuttua ja mielekästä. Laitteiden hallinta oli sujuvaa, koska laitteiden käyttö on minulle yleisesti tuttua ja uusi real-time PCR -laite on helppokäyttöinen.

Tämän opinnäytetyön sovellus, johon tein työohjeen, on mielestäni haasteellinen ja kehittää jokaisen bioanalytiikan opiskelijan työskentelyä ja tietämystä aiheesta. Mielestäni sovellus on tarpeellinen bioanalytiikan koulutusohjelmaan, koska tämän kaltaisia sovelluksia kehitetään ja on jo käytössä työelämässä. Sovellus laittaa pohtimaan, mitä mahdollisuuksia molekyylibiologiset menetelmät tarjoavat ja kuinka uusille sovelluksille ja innovaatioille on käyttöä tulevaisuudessa. Itse opin sovelluksen kautta, kuinka vähäiset virus- ja DNA -määrät voidaan havaita luotettavasti real-time PCR:n avulla, kun reaktiot ovat suunniteltu oikein ja optimoitu käyttöä varten.

Opinnäytetyöprosessi kehitti ymmärrystäni virusdiagnoosiin tutkimuksista, mikä on osa bioanalytiikan työtä. Jos ajattelen opinnäytetyön valmistavia puolia bioanalytiikan työhön, tekijöitä on monia. Ensinnäkin bioanalytiikan työssä käytetään paljon laitteita, joista sain kokemusta tässä prosessissa. Toiseksi bioanalytiikan työssä käytetään ja tehdään työohjeita, mikä oli tämän opinnäytetyön tuotos. Kolmanneksi laboratoriotyöskentelyni kehittyi tämän prosessin kautta. Tämä prosessi on kehittänyt ja valmistanut minua työelämään ja odotan pääseväni harjoittamaan ammattiani.

LÄHTEET

- BOONHAMA, N., REUZEB, J., WINTERC, S., VAN DER VLUGTD, R., BERGERVOETD, J., TOM-LINSOquencing. *Virus Research* 186, 20 – 31.
- CHANG, S-S., HSIEH, W-H., LIU, T-S., LEE, S-H., WANG, C-H., CHOU, H-C., YEO, Y-H., TSENG, C-P. ja LEE, C-C. 2013. Multiplex PCR system for rapid detection of pathogens in patients with presumed sepsis – A systematic review and meta-analysis. *Plos one* 8, 5.
- DAVIDSON COLLEGE. 2002. Nested primers for PCR. [Verkkojulkaisu] [Viitattu 2015-02-05.] Saatavissa: <http://www.bio.davidson.edu/genomics/method/NestedPCR.html>
- EUROGENTEC s.a. qPCR guide. [Verkkojulkaisu] [Viitattu 2015-02-09.] Saatavissa: <http://www.eurogentec.com/uploads/qpcr-guide.pdf>
- GENESIQ. 2005. Quantification of Human Herpes Virus I (Herpes Simplex type I). Genesig Standard kit handbook.
- HEDMAN, K., HEIKKINEN, T., HUOVINEN, P., JÄRVINEN, A., MERI, S. ja VAARA, M. 2010. Mikrobiologia - mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet, kirja 1. *Duodecim*, 525 – 536.
- HEDMAN, K., HEIKKINEN, T., HUOVINEN, P., JÄRVINEN, A., MERI, S. ja VAARA, M. 2011. Infektiosairaudet - mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet, kirja 3. *Duodecim*, 55 – 61.
- HEINONEN, J-P. 2005. Opetussuunnitelmat vai oppimateriaalit. Helsingin yliopisto. Soveltavan kasvatustieteen laitos. Tutkimuksia 257. Väitöskirja. [Viitattu 2015-02-23]. Saatavissa: <http://ethesis.helsinki.fi/julkaisut/kay/sovel/vk/heinonen/opetussu.pdf>
- HIRSJÄRVI, S., REMES, P. ja SAJAVAARA, P. 2004. Tutki ja kirjoita. Helsinki: Tammi.
- ILANNE-PARIKKA, P., JOUTSI-KORHONEN, L., JYLHÄ, A., LASSILA, R., LINKO-PARVINEN, A-M., LINKO, L., LINKO, S., MENESES, E., MUUKKONEN, L., NISSINEN, A., NOKELAINEN, S., PORKKALA-SARATAHO, E., PUHAKAINEN, E., SAVOLAINEN, E-R., SIITONEN, A., SUNI, J., VUENTO, R. ja ÅKERMAN, K. 2009. Laadunvarmistus. *Moodi* 6/2009. Helsinki: Yliopistopaino, 286 – 296.
- JORDAN, L. ja URTZ, R. 2010. Optical Design of CFX96™ Real-Time PCR Detection System Eliminates the Requirement of a Passive Reference Dye. Bio-Rad Laboratories. [verkkojulkaisu] [Viitattu 2015-04-08.] Saatavissa: http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6047A.pdf
- LIFETECHNOLOGIES. 2015a. TaqMan® Chemistry vs. SYBR® Chemistry for Real-Time PCR [Verkkojulkaisu] [Viitattu 2015-03-17.] Saatavissa: <http://www.lifetechnologies.com/fi/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/qpcr-education/taqman-assays-vs-sybr-green-dye-for-qpcr.html>
- LIFETECHNOLOGIES. 2015b. DNA and RNA Molecular Weights and Conversions. [Verkkojulkaisu] [Viitattu 2015-03-17.] Saatavissa: <http://www.lifetechnologies.com/fi/en/home/references/ambion-tech-support/rna-tools-and-calculators/dna-and-rna-molecular-weights-and-conversions.html>
- LOPEZ, J. ja PREZIOSO, V. 2001. A better way to optimize: Two-step gradient PCR. Eppendorf Bio-News Application notes. [Verkkojulkaisu] [Viitattu 2015-02-24] Saatavissa: <http://www.eppendorf.com/script/cms-newspic.php?id=2365&inline=1&col=DOWNLOADFILE>
- LUMME, R., LEINONEN, R., LEINO, M., FALENIUS, M. ja SUNDQVIST, L. 2006. Monimuotoinen / toiminnallinen opinnäytetyö [Verkkojulkaisu] [Viitattu 2014-12-10.] Saatavissa: <http://www2.amk.fi/digma.fi/www.amk.fi/opintojaksot/030906/1113558655385/1154602577913/1154670359399/1154756862024.html>

- MANNONEN, L. 2015. Herpes simplex tyyppi 1 ja 2, nukleinihappo (kval). HusLab tutkimusohjekirja. [Verkkajulkaisu] [Viitattu 2014-04-10.] Saatavissa: http://huslab.fi/cgi-bin/ohjekirja/tt_show.exe?assay=4404&terms=hsv
- MARKOULATOS, P., SLAFAKAS, N. ja MONCANY, M. 2002. Multiplex polymerase chain reaction: Practical approach. Journal of clinical laboratory analysis 16, 47 - 51.
- PIIPARINEN, H., KOSKINIEMI, M. ja VAHERI, A. 1995. Duodecim 111, 129 - 2.
- REPO, I. ja NUUTINEN, T. 2003. Viestintätaito – opas aikuisopiskelun ja työelämän vuorovaikutustilanteisiin. Helsinki: Otava.
- ROIVAS, M. ja KARJALAINEN, A L. 2013 Sosiaali- ja terveysalan viestintä. Helsinki: Edita.
- SANKUNTAW, N., SUKPRASERT, S., ENGCHNIL, C., KAEWKES, W., CHANTRATITA, W., PAIROJ, V. ja LULITANOND, V. 2011. Single tube multiplex real-time PCR for the rapid detection of herpesvirus infections of the central nervous system. Molecular and Cellular Probes 25, 114 – 120.
- SAVONIA. 2013. Opinnäytetyöprosessi opiskelijan toimintana [verkkajulkaisu]. Savonia ammattikorkeakoulu [Viitattu 2015-03-16.] Saatavissa: https://reppu.savonia.fi/koulutusalat/terveys_kuopio/opinnaytetyo/Documents/ONT_PROSESSI_Opiskelijan%20toimintana%202014.pdf
- SAVONIA. 2014. Opinnäytetyö (amk-tutkinto) [verkkajulkaisu]. Savonia ammattikorkeakoulu [Viitattu 2015-03-16.] Saatavissa: <https://reppu.savonia.fi/opinnaytetyo/Sivut/default.aspx>
- SOLUNETTI. 2006a. DNA:n korjausmekanismit. [verkkajulkaisu] [Viitattu 2015-04-08.] Saatavissa: http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/dna-n_korjausmekanismit/2/
- SOLUNETTI. 2006b. DNA:n replikaatio. [verkkajulkaisu] [Viitattu 2015-04-10.] Saatavissa: http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/dna-n_replikaatio/2/
- SOP – STANDARD OPERATING PROCEDURE. s.a. What is a standard operating procedure? [Verkkajulkaisu] [Viitattu 2015-02-23.] Saatavissa: <http://www.sop-standard-operating-procedure.com/>
- SUOMINEN, I., PÄRSSINEN, R., HAAJANEN, K. ja PELKONEN, J. 2010. Geenitekniikka. Turku: Turun ammattikorkeakoulu, 153 – 170.
- TYÖTERVEYSLAITOS. 2014. Biologiset tekijät. [verkkajulkaisu] [Viitattu 2015-03-25.] Saatavissa: http://www.ttl.fi/fi/tyoymparisto/biologiset_tekijat/sivut/default.aspx
- TYÖTURVALLISUUSKESKUS. s.a. b. Biologiset tekijät. [verkkajulkaisu] [Viitattu 2015-03-25.] Saatavissa: http://www.tyoturva.fi/tyosuojelu/biologiset_tekijat
- TYÖTURVALLISUUSKESKUS. s.a. a. Vaaratekijöiden tunnistaminen ja riskien arviointi [verkkajulkaisu] [Viitattu 2015-03-25.] Saatavissa: http://www.tyoturva.fi/tyosuojelu/vaaratekijoiden_tunnistaminen_ja_riskien_arviointi
- VALTIONEUVOSTON ASETUS AMMATTIKORKEAKOULUISTA. 2013/546. Finlex. Lainsäädäntö [Viitattu 2015-03-16.] Saatavissa: <https://www.finlex.fi/fi/laki/ajantasa/2003/20030352>
- VILKKA, H. ja AIRAKSINEN, T. 2003. Toiminnallinen opinnäytetyö. Helsinki: Tammi.
- WATZINGER, F., EBNER, K. ja LION, T. 2006. Detection and monitoring of virus infections by real-time PCR. Molecular Aspects of medicine 27, 254 - 2 - 3.

WEIDMANN, M., MEYER-KÖNIG, U. ja HUFERT F T. 2003. Rapid Detection of Herpes Simplex Virus and Varicella-Zoster Virus Infections by Real-Time PCR. *Journal of clinical microbiology* 41, 1565 – 1568 - 4.

ZHAO, Y., CAO, X., TANG, J., ZHOU, L., GAO, Y., WANG, J-P., ZHENG, Y., YIU, S. ja WANG, Y. 2012. A novel multiplex real-time PCR assay for the detection and quantification of HPV16/18 and HSV1/2 in cervical cancer screening *Molecular and Cellular Probes* 26, 66 – 72.



***Herpes simplex* viruksen kvantitatiivinen määrittäminen
reaaliaikaisella PCR -laitteella**

Henry Heinonen
Bioanalytiikan koulutusohjelma
Molekyylibiologia ja geeniteknologia
21.4.2015

Johdanto

Tässä työohjeessa määritetään HSV1 -viruskantaliuoksen pitoisuus (virusta/ μ l) real-time PCR -laitteella. Sovellus on kvantitatiivinen, jossa standardiliuosten avulla muodostetaan standardisuora, ja suoran avulla määritetään virusliuoksen pitoisuus. Standardit ovat plasmidiliuoksia, jotka sisältävät kopioitavaa DNA -aluetta, ja joiden pitoisuus tiedetään. Kyseessä on siis absoluuttinen kvantitatiivinen PCR -sovellus. Plasmidin tiedot ovat liitteenä (Liite 1).

Kvantitatiivinen PCR perustuu DNA:n monistuksessa muodostuvien DNA -kopioiden määrän suoraan verrannollisuuteen alkuperäisen DNA -pitoisuuden kanssa. Siksi erilaiset DNA -pitoisuudet muodostavat eri määrän kopiota monistusreaktiossa. Reaaliaikaisella PCR -laitteella tämä havaitaan reaktion fluoresenssikäyrien Ct -arvojen eroina DNA -pitoisuuksien mukaisesti. (Zhao, Cao, Tang, Zhou, Gao, Wang, Zheng, Yin ja Wang 2012.)

Työssä käytetään Roche LightCycler 96 reaaliaikaista PCR -laitetta ja saman valmistajan tulostenkäsitteilyohjelmaa, jolla tulokset lasketaan. Harjoituksessa monistetaan HSV1 -viruksen US6 -geenin DNA:ta, joka koodaa viruksen Glykoproteiini D:tä. Monistettava-alue on spesifinen HSV1 -virukselle ja on noin 70 emäsparia (bp) pitkä. Työssä käytetään Taqman® -periaatteella toimivaa tunnistinta, jossa on FAM -merkkiaine ja TAMRA -sammuttaja-aine.

Forward primer (aluke) (5' – 3'): CGGCCGTGTGACACTATCG

Reverse primer (aluke) (5' – 3'): CTCGTAAAATGGCCCCTCC

Probe (Tunnistin) (5' – 3'): CCATACCGACCACACCGACGAACC

Kliinisessä laboratoriossa PCR -menetelmää käytetään todentamaan herpesvirus likvorista keskushermostoinfektioista (Piiparinen, Koskiniemi ja Vaheri 1995, 129). Erityisesti meningiitit, enkefaliitit, myeliitit ja vastasyntyneiden infektiot, ovat indikaatioina PCR -tutkimukseen. Näytteeksi tarvitaan 0,5 – 1 ml likvoria, jota säilytetään jääkaapissa tai pakastettuna, jos analyysi tehdään yli 3 vuorokauden päästä. Enkefaliittitapauksissa positiivinen vastaus voidaan saada jo ensimmäisenä sairauspäivänä, mutta varmimmin herpesviruksen DNA:ta löydetään 1. – 11. sairauspäivänä. (Mannonen 2015.) HSV:n diagnostiikassa yleisimmin käytettynä muotona on virusviljely, jossa infektion ilmaantua rakkulasta otetaan näyte viljelyä varten. Toinen keino on tutkia löytyykö potilaasta otetusta näytteestä HSV:n antigeenejä immunofluoresenssi menetelmällä. (Hedman, Heikkinen, Huovinen, Järvinen, Meri ja Vaara 2010, 536.)

Ennen harjoitustyön tekoa tutustu reaaliaikaiseen PCR:n, kvantitatiiviseen PCR:n, *Herpes simplex* -virukseen, DNA -pitoisuuden mittaukseen, aseptisen työskentelyn perusteisiin ja tähän työohjeeseen. Tietoa sovelluksesta löydät Theseus -tietokannasta opinnäytetyöstä, jonka tuotoksena tämä työohje on tehty. Opinnäytetyö on nimeltään *Herpes simplex* viruksen kvantitatiivisen määrittelyn optimointi reaaliaikaiselle PCR -laitteelle: Työohje Bioanalyttikko-opiskelijoille (Heinonen 2015).

Työturvallisuus

- Reaktiovalmistelut suoritetaan laminaarivirtauskaapissa aseptisesti työskennellen ja käyttäen suojavälineitä, kuten hanskoja, työtakkia ja hengityssuojainta. Sterilointiin käytetään 70 % alkoholia.
- *Herpes simplex* viruskantaliuokset ovat ISLABin mikrobiologian laboratorion valmistamia. Kantaliuokset ovat käsiteltyjä infektion välttämiseksi. Kuitenkin viruskantaliuoksia tulee käsitellä aina kuin ne olisivat infektoivia.
- Harjoitustyössä käytettävät kemikaalit eivät aiheuta vaaraa, mutta kemikaaleja tulee käsitellä yleisten turvallisuuskäytäntöjen mukaisesti.

Tarvittavat materiaalit

Reagenssit:

- Viruskantaliuokset (HSV1 ja HSV2)
- Mastermix (FastStart Essential DNA Probes Master, Roche, REF 06 402 682 001)
- Forward & Reverse primer (alukkeet)
- Probe (Tunnistin)
- Steriili vesi

Välineet:

- Mikropipettejä (tarvitset erikokoisia 1 µl – 1000 µl)
- Pipetteihin sopivia steriilejä pipetinkärkiä
- Steriilejä Eppendorf -putkia (esimerkiksi 1,5 ml)
- Kuoppalevy, kuoppalevyn kalvot ja muovinen lasta
- Jäteastia virusta sisältäville jätteille

Laitteet:

- Roche LightCycler 96 – real-time PCR
- Labogene Scanspeed 416 – sentrifugi

Työvaiheet

1. Suunnittele työskentely. Laske, kuinka monta reaktiota työssä tarvitaan ja miten paljon reagensseja tarvitsee pipetoida. Suunnittele laimennokset ja kuoppalevyille pipetointi.

Reaktioliuosten pipetointisuhteet:

10x Primer/probemix:

5 µl forward primer

5 µl reverse primer

2 µl probe

88 µl steriili vesi

yhteensä 100 µl

Reaktiomix (yhteen reaktioon):

3 µl steriili vesi

2 µl 10x Primer/Probemix

10 µl Mastermix

Yhteensä 15 µl

Reaktiutilavuus yhdelle reaktiolle on 20 µl (15 µl reaktiomix + 5 µl templaattia). Liuoksia pipetoitaessa pipetoi ensin vesi, sen jälkeen mastermix ja viimeisenä alukkeet ja tunnistin.

Templaattilaimennokset:

Työssä käytetään näytteenä HSV1 -kantaliuosta. Tee liuoksesta 1:50 ja 1:100 laimennokset. Negatiivikontrollina käytetään steriiliä vettä ja HSV2 -kantaliuosta. Tee HSV2 -kantaliuoksesta samat laimennokset kuin näytteestä.

Plasmidiliuoksesta tehdään standardeja. Plasmidiliuoksen DNA -pitoisuus mitataan spektrofotometrillä, koska DNA -pitoisuus saadaan liuoksen absorbanssista aallonpituudella 260 nm. Plasmidiliuoksen pitoisuusyksikkö täytyy muuttaa mitatusta pitoisuudesta (esim. ng/µl) lukumääräpitoisuudeksi (plasmidia/µl). Tämä voidaan laskea, kun tiedetään plasmidin pituus, lasketaan sen molekyylipaino kaavalla ja muutetaan pitoisuus Avogadron vakion ($6,022 \cdot 10^{23}$ /mol) avulla. Plasmidi on 2484 bp pitkä. Molekyylipaino saadaan kaavalla: (plasmidin pituus emäspareina)*607,4 +157,9 (g/mol) (Life-technologies 2015). Esimerkiksi plasmidin pituus on 3000 bp ja DNA -pitoisuus 0,1 ng/µl, jolloin plasmidipitoisuudeksi saadaan:

$$3000 \text{ bp} \cdot 607,4 + 157,9 = 1822357,9 \text{ g/mol}$$

$$0,1 \cdot 10^{-9} \text{ g/}\mu\text{l} / 1822357,9 \text{ g/mol} \cdot 6,022 \cdot 10^{23} / \text{mol} = 33045100,5260 \dots \text{ plasmidia/}\mu\text{l}$$

Suunnittele 5 standardia plasmidiliuoksesta, joiden pitoisuus on välillä 80 000 – 4 plasmidia/µl. Esimerkiksi standardit noin 60 000, 6 000, 600, 60 ja 6 plasmidia/µl.

Kuoppalevyn pipetointi:

Seuraavassa taulukossa on esimerkki kuoppalevyn pipetoinnista. Kaikista näytteistä, standardeista ja kontroleista pipetoidaan rinnakkaiset reaktiot.

Steriili vesi	Steriili vesi	HSV2 1:50	HSV2 1:50																
Standardi 1	Standardi 1	HSV2 1:100	HSV2 1:100																
Standardi 2	Standardi 2																		
Standardi 3	Standardi 3																		
Standardi 4	Standardi 4																		
Standardi 5	Standardi 5																		
HSV1 1:50	HSV1 1:50																		
HSV1 1:100	HSV1 1:100																		

Rinnakkaisia reaktioita tai standardeja voi olla myös enemmän.

2. Valmistele laminaarivirtauskaappi työskentelyä varten. Varaa kaappiin reagenssit, tarvittava määrä pipettejä, steriilejä pipetin kärkiä, steriilejä eppendorf -putkia, kuoppalevy, muovikalvo kuoppalevyn peittämiseen ja alkoholia sterilointia varten.
3. Suorita kohdassa 1 suunnitellut työvaiheet laminaarivirtauskaapissa aseptisesti. Laita jätteeksi menevät virusta sisältävät liuokset dekontaminaatioliuokseen. Muut jätteet, kuten pipetin kärjet ja eppendorf -putket, laitetaan mikrobiologiseen jätteeseen.
4. Kuoppalevyn peittäminen muovikalvolla:
 - Ota muovikalvo laatikosta.
 - Irrota kalvo suojaava vaalea muovi ja aseta läpinäkyvä kalvo keskelle kuoppalevyä, siten että kaikki kuopat peittyvät.
 - Ota muovilasta, jolla muovikalvo kiinnitetään kuoppalevyyn. Paina lastalla kevyesti, mutta jämäkästi, ja tee ristikkäisiä vetoja kuoppalevyn kulmasta kulmaan. Esimerkiksi vedä vasemmalta alhaalta oikealle ylös. Pidä huoli, että kalvo tarttuu jokaisen kuopan kohdasta. Ole varovainen tässä vaiheessa.
 - Irrota repäisemällä alaspäin kalvon sivuilla olevat reunukset katkoviivojen kohdalta.
5. Sentrifugoi kuoppalevyä 1 minuutti 170 g (1000 rpm) Labogene Scanspeed 416 -sentrifugilla. Sentrifugiin on kuoppalevyn sentrifugointia varten tehty roottori.
6. Käynnistä PCR -laite laitteen takana olevasta kytkimestä ja odota laiteohjelmiston aukeamista. Laitteessa on kosketusnäyttö.
 - Tee uusi ajo-ohjelma painamalla New. Valitse New empty experiment. Kirjoita ohjelman nimi kohtaan Experiment name ja paina Create.
 - Measurement -välilehdellä Detection format kohdassa paina kynän kuvasta.
 - Valitse 470/514 -välilehdeltä FAM ja Integration time -kohdasta Dynamic. Paina Back.
 - Reaction volume -kohdassa pitää olla 20 µl.
 - Valitse Profile -välilehti ja paina plusmerkkiä.

- Valitse Preincubation ja paina Add.
 - Valitse 2 step amplification ja paina Add.
 - Valitse Cooling, paina Add ja sitten Back.
- Muokkaa ajo-ohjelmaa kynäpainikkeista taulukon mukaiseksi

Program	Cycles	Step	Acq. mode
Preincubation	1	95 °C for 600 s	None
2 Step amplification	50	95 °C for 15 s	None
		56 °C for 45 s	Single
Cooling	1	37 °C for 30 s	None

7. Vasemmalla yläkulmassa pitää lukea Ready. Jos näin ei ole, paina Heat lid ja odota kunnes Ready -teksti ilmestyy. Kun painat Eject, laitteen luukku aukeaa. Laita kuoppalevy laitteeseen. Työnnä luukku kiinni ja paina Start aloittaaksesi ajon.
8. Kun ajo on ohi, tulokset otetaan ulos laitteelta muistitikulla. Laita tikku kiinni laitteeseen. Mene Overview -välilehdelle ja valitse oikea ajo listasta. Paina alhaalta Synchronize, jolloin tiedot siirtyvät tikulle Experiments -kansioon. Ota tikku irti.
9. Paina Eject ja poista kuoppalevy laitteesta. Laita luukku kiinni. Paina laitteelta Exit – Shutdown ja Yes. Sulje virta laitteen takaosasta, kun laite ilmoittaa olevansa valmis. Laita käytetty kuoppalevy mikrobiologiseen jätteeseen.
10. Avaa tietokone, jossa on asennettuna LightCycler 96 SW ohjelma. Avaa tikulta Experiments -kansio ja avaa sieltä ajotulosten tiedosto. Tietokone aukaisee tulosten tarkasteluohjelman automaattisesti.
 - Run Editor -välilehdellä nähdään ajo-ohjelman tiedot.
 - Sample Editor -välilehdellä taulukko kuvastaa ajon kuoppalevyä. Taulukkoon voidaan nimetä näytteet, standardit ja kontrollit valitsemalla taulukosta ja kirjoittamalla oikealle Name -kohtaan. Samalla tavalla voidaan merkitä Type -kohdasta kuoppalevyn näytteet, standardit ja kontrollit. Standardeihin laitetaan pitoisuus Concentration -kohtaan. Tyhjät kuopat voidaan poistaa häiritsemästä valitsemalla ne taulukosta ja painamalla oikealta alhaalta Clear wells.
 - Raw Data -välilehdellä voidaan tarkastella tuloksia.
11. Ohjelmistolla tulosten laskeminen. Mene Analysis -välilehdelle ja paina yläpalkista oikeimman puolista kuvaketta, jossa on plus-merkki eli Add Analysis. Valitse ruutuun tulevasta valikosta Abs Quant ja paina OK. Ohjelmisto laskee Ct-arvot, muodostaa standardikäyrän ja laskee näytteiden pitoisuudet. Analysis -välilehdellä on neljä ruutua, joista kunkin saa koko ruudun kokoiseksi neliön muotoisesta painikkeesta (jokaisen ruudun oikeassa ylänurkassa).
12. Voit tehdä raportin valitsemalla yläosan kuvakkeista Reports. Kirjoita raportin nimi, mihin sen haluat tallentaa ja paina Generate.
13. Ota ohjelman laskemat tulokset HSV1 -kantaliuoksen pitoisuudelle, laske niiden keskiarvo ja laske alkupe-
räisen kantaliuoksen pitoisuus laimennokset huomioiden.

Pohdi:

- Miten Taqman® -tunnistin toimii? Mitä muita reaktion etenemisen havaitsemismenetelmiä käytetään reaaliaikaisessa PCR:ssä?
- Mihin käyrien Ct -arvot perustuvat?
- Miksi ohjelmiston laskema standardisuora on laskeva?
- Miksi PCR -ohjelmassa on vain kaksi vaihetta kolmen sijaan? Miten PCR:n vaiheet menevät laitteen ohjelmassa eri lämpötiloissa?
- Miksi käytetään negatiivisia kontroleja (steriili vesi ja HSV2)?
- Minkälainen olisi hyvä positiivinen kontrolli sovellukseen?
- Miten absoluuttinen ja relatiivinen kvantitatiivinen PCR eroavat toisistaan?
- Miten DNA -pitoisuus määritetään spektrofotometrillä?
- Miten voit vähentää kontaminaatioiden syntyä oman työskentelysi kautta?
- Minkälaisissa tilanteissa tai minkälaisille potilaille tämänkaltainen diagnostinen tutkimus voitaisiin tehdä sairaalaympäristössä?

Lähteet

HEDMAN, K., HEIKKINEN, T., HUOVINEN, P., JÄRVINEN, A., MERI, S. ja VAARA, M. 2010. Mikrobiologia - mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet, kirja 1. Duodecim, 525 – 536.

LIFETECHNOLOGIES. 2015. DNA and RNA Molecular Weights and Conversions. [Verkojulkaisu] [Viitattu 2015-03-17.] Saatavissa: <http://www.lifetechnologies.com/fi/en/home/references/ambion-tech-support/rna-tools-and-calculators/dna-and-rna-molecular-weights-and-conversions.html>

MANNONEN, L. 2015. Herpes simplex tyyppi 1 ja 2, nukleinihappo (kval). HusLab tutkimusohjekirja. [Verkojulkaisu] [Viitattu 2014-04-10.] Saatavissa: http://huslab.fi/cgi-bin/ohjekirja/tt_show.exe?assay=4404&terms=hsv

PIIPARINEN, H., KOSKINIEMI, M. ja VAHERI, A. 1995. Duodecim 111, 129 - 2.

ZHAO, Y., CAO, X., TANG, J., ZHOU, L., GAO, Y., WANG, J-P., ZHENG, Y., YIU, S. ja WANG, Y. 2012. A novel multiplex real-time PCR assay for the detection and quantification of HPV16/18 and HSV1/2 in cervical cancer screening Molecular and Cellular Probes 26, 66 – 72.

Liite 1. Plasmidin tiedot



Quality Assurance Documentation: 15AAL5SP

Ref. No.: 1643616

Designation:	E.coli K12 (dam+ dcm+ tonA)
Gene name:	glycoprotein_D
Gene size:	110 bp
Vector backbone:	pMA-T
Cloning sites:	SfiI / SfiI
Quantity:	~5 µg Plasmid DNA
Note:	Please dissolve lyophilized DNA in 50 µl distilled water or 10 mM Tris-HCl (pH 8.0). We recommend sequence verification after each transformation step.
Date:	22 January 2015

Sabine Popov

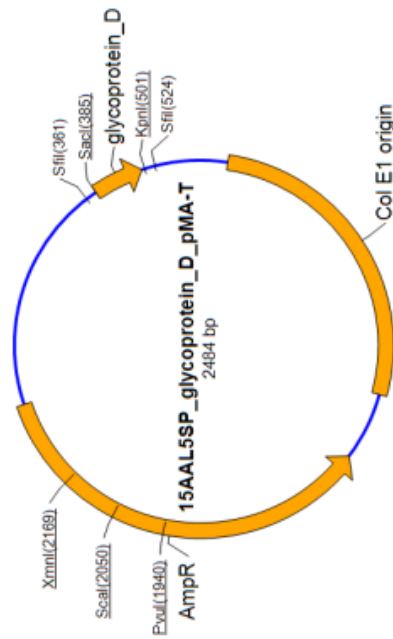
Quality control

GeneArt AG www.lifetechnologies.com GeneArtSupport@lifetech.com

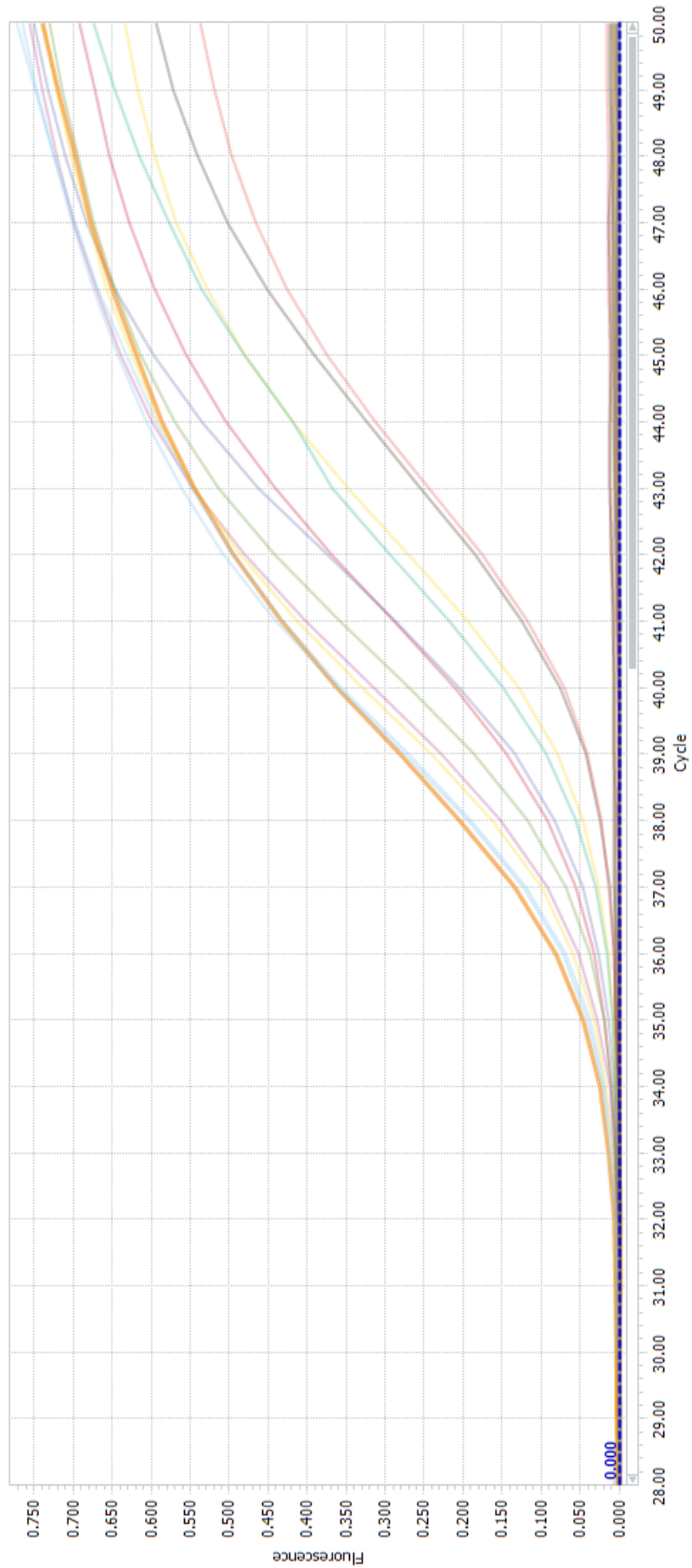
Plasmid DNA Description:

The synthetic gene glycoprotein_D was assembled from synthetic oligonucleotides and/or PCR products. The fragment was inserted into pMA-T. The plasmid DNA was purified from transformed bacteria and concentration determined by UV spectroscopy. The final construct was verified by sequencing. The sequence congruence within the insertion sites was 100%. See the accompanying data sheets for sequences and find the original ABI trace files as well as the assembled sequences electronically on disk. 5 µg of the plasmid preparation were lyophilized for shipping.

Plasmid Map:



LIITE 2: LÄMPÖTILAGRAIDENTTIAJON TULOKSET

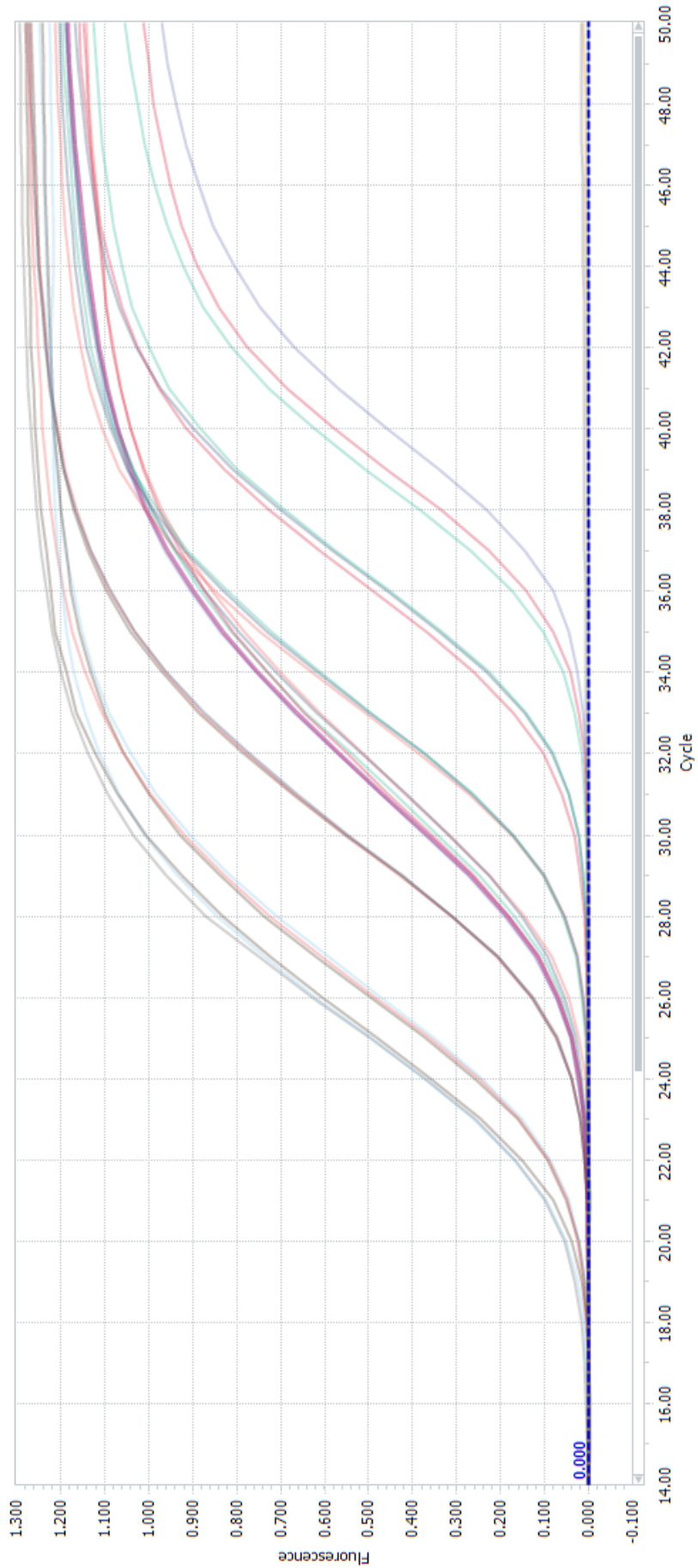


KUVIO 2. Gradienttijaon käyrät, jossa on valittuna 56,5 °C lämpötila (keltainen käyrä).

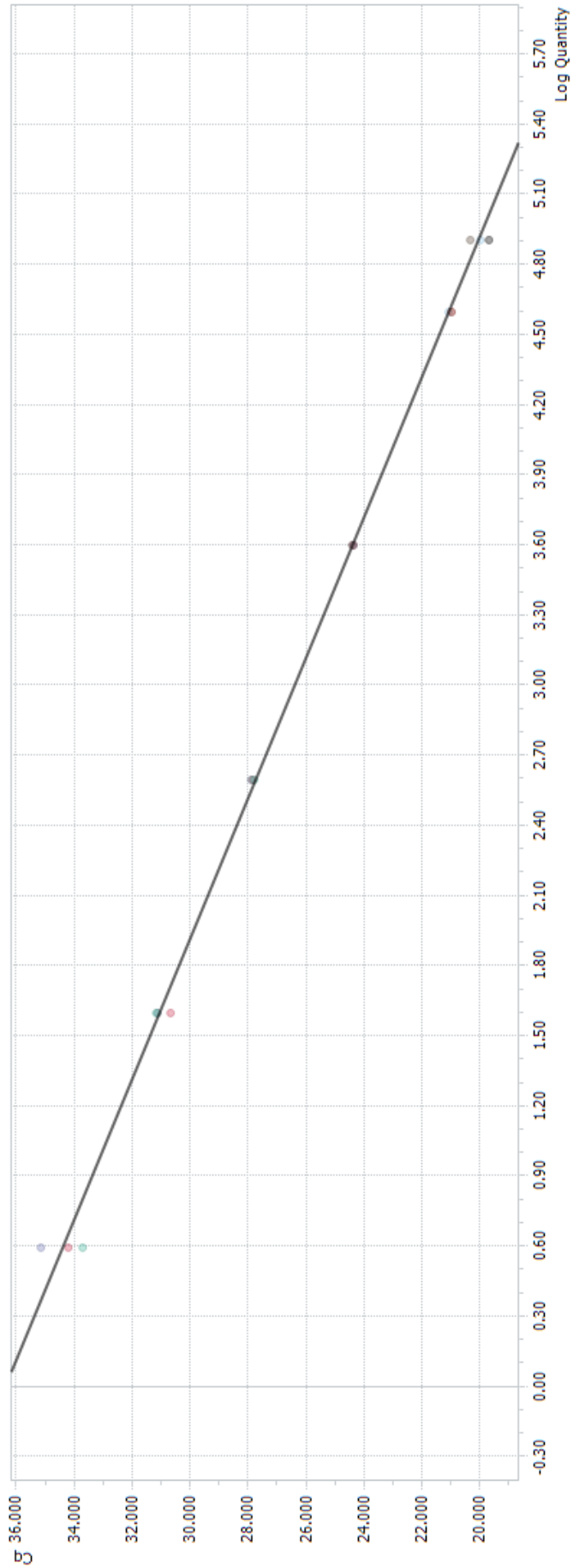
TAULUKKO 1. Gradienttijaon tulokset taulukko muodossa, josta nähdään lämpötilalla 56,5 °C on pienin Ct -arvo (taulukon kohta Cq). Lisäksi kaikki negatiivikontrollit ovat negatiivisia.

Position	Sample Name	Cq	Call	Sample Type	Dye	Slope	EPF
A1	HSV1 55,0	35.48	Positive	Unknown	FAM	0.09	0.77
A2	HSV1 55,5	35.34	Positive	Unknown	FAM	0.08	0.77
A3	HSV1 56,5	35.13	Positive	Unknown	FAM	0.08	0.74
A4	HSV1 57,6	35.74	Positive	Unknown	FAM	0.09	0.74
A5	HSV1 59,0	36.47	Positive	Unknown	FAM	0.09	0.73
A6	HSV1 60,3	35.93	Positive	Unknown	FAM	0.09	0.76
A7	HSV1 61,7	37.09	Positive	Unknown	FAM	0.08	0.75
A8	HSV1 62,9	36.81	Positive	Unknown	FAM	0.07	0.69
A9	HSV1 63,9	37.84	Positive	Unknown	FAM	0.07	0.68
A10	HSV1 64,6	38.14	Positive	Unknown	FAM	0.08	0.63
A11	HSV1 65,0	39.34	Positive	Unknown	FAM	0.07	0.54
A12	HSV1 65,00	39.21	Positive	Unknown	FAM	0.07	0.59
B1	HSV2 55,0	-	Negative	Negative control	FAM	0.00	0.01
B2	HSV2 55,5	-	Negative	Negative control	FAM	0.00	0.00
B3	HSV2 56,5	-	Negative	Negative control	FAM	0.00	0.00
B4	HSV2 57,6	-	Negative	Negative control	FAM	0.00	0.00
B5	HSV2 59,0	-	Negative	Negative control	FAM	0.00	0.01
B6	HSV2 60,3	-	Negative	Negative control	FAM	0.00	0.01
B7	HSV2 61,7	-	Negative	Negative control	FAM	0.00	0.01
B8	HSV2 62,9	-	Negative	Negative control	FAM	0.00	0.00
B9	HSV2 63,9	-	Negative	Negative control	FAM	0.00	0.01
B10	HSV2 64,6	-	Negative	Negative control	FAM	0.00	0.01
B11	HSV2 65,0	-	Negative	Negative control	FAM	0.00	0.00
B12	HSV2 65,00	-	Negative	Negative control	FAM	0.00	0.02

LIITE 3: ESIMERKKI PCR -SOVELLUKSEN TULOKSISTA



KUVIO 3. Sovelluksen esimerkkitulosten fluoressikäyrät.



KUVIO 4. Sovelluksen esimerkitulosten standardisuora, jonka ohjelmisto on määrittänyt.

TAULUKKO 2. Esimerkkitulokset taulukkomuodossa, missä viimeisillä riveillä on näytteiden tulokset.
Konsentraatioiden yksikkönä on kappaletta(plasmidia/virusta)/ μ l.

Position	Sample Name	Cq	Concentration	Call	Sample Type	Standard	Cq Mean	Concentration Mean
A1	h2o	-	-	Negative	Negative control	-	-	-
A2	h2o	-	-	Negative	Negative control	-	-	-
A3	h2o	-	-	Negative	Negative control	-	-	-
B1	std1 a	20.30	6.486E+4	Positive	Standard	8.006E+4	20.30	6.486E+4
B2	std1 b	19.95	8.259E+4	Positive	Standard	8.006E+4	19.95	8.259E+4
B3	std1 c	19.67	1.002E+5	Positive	Standard	8.006E+4	19.67	1.002E+5
C1	std2 a	20.94	4.170E+4	Positive	Standard	3.956E+4	20.94	4.170E+4
C2	std2 b	20.96	4.113E+4	Positive	Standard	3.956E+4	20.96	4.113E+4
C3	std2 c	21.05	3.865E+4	Positive	Standard	3.956E+4	21.05	3.865E+4
D1	std3 a	24.35	3.960E+3	Positive	Standard	3.956E+3	24.35	3.960E+3
D2	std3 b	24.32	4.043E+3	Positive	Standard	3.956E+3	24.32	4.043E+3
D3	std3 c	24.40	3.826E+3	Positive	Standard	3.956E+3	24.40	3.826E+3
E1	std4 a	27.75	3.788E+2	Positive	Standard	3.956E+2	27.75	3.788E+2
E2	std4 b	27.88	3.462E+2	Positive	Standard	3.956E+2	27.88	3.462E+2
E3	std4 c	27.84	3.559E+2	Positive	Standard	3.956E+2	27.84	3.559E+2
F1	std5 a	30.63	5.187E+1	Positive	Standard	3.956E+1	30.63	5.187E+1
F2	std5 b	31.16	3.597E+1	Positive	Standard	3.956E+1	31.16	3.597E+1
F3	std5 c	31.09	3.775E+1	Positive	Standard	3.956E+1	31.09	3.775E+1
G1	std6 a	35.12	2.337E+0	Positive	Standard	3.956E+0	35.12	2.337E+0
G2	std6 b	34.18	4.472E+0	Positive	Standard	3.956E+0	34.18	4.472E+0
G3	std6 c	33.70	6.229E+0	Positive	Standard	3.956E+0	33.70	6.229E+0
H1	hsv1 1:50 a	25.35	1.986E+3	Positive	Unknown	-	25.35	1.986E+3
H2	hsv1 1:50 b	25.25	2.128E+3	Positive	Unknown	-	25.25	2.128E+3
H3	hsv1 1:50 c	25.42	1.892E+3	Positive	Unknown	-	25.42	1.892E+3
H4	hsv1 1:100 a	25.61	1.659E+3	Positive	Unknown	-	25.61	1.659E+3
H5	hsv1 1:100 b	25.84	1.416E+3	Positive	Unknown	-	25.84	1.416E+3
H6	hsv1 1:100 c	26.15	1.143E+3	Positive	Unknown	-	26.15	1.143E+3