



TAMPEREEN
AMMATTIKORKEAKOULU

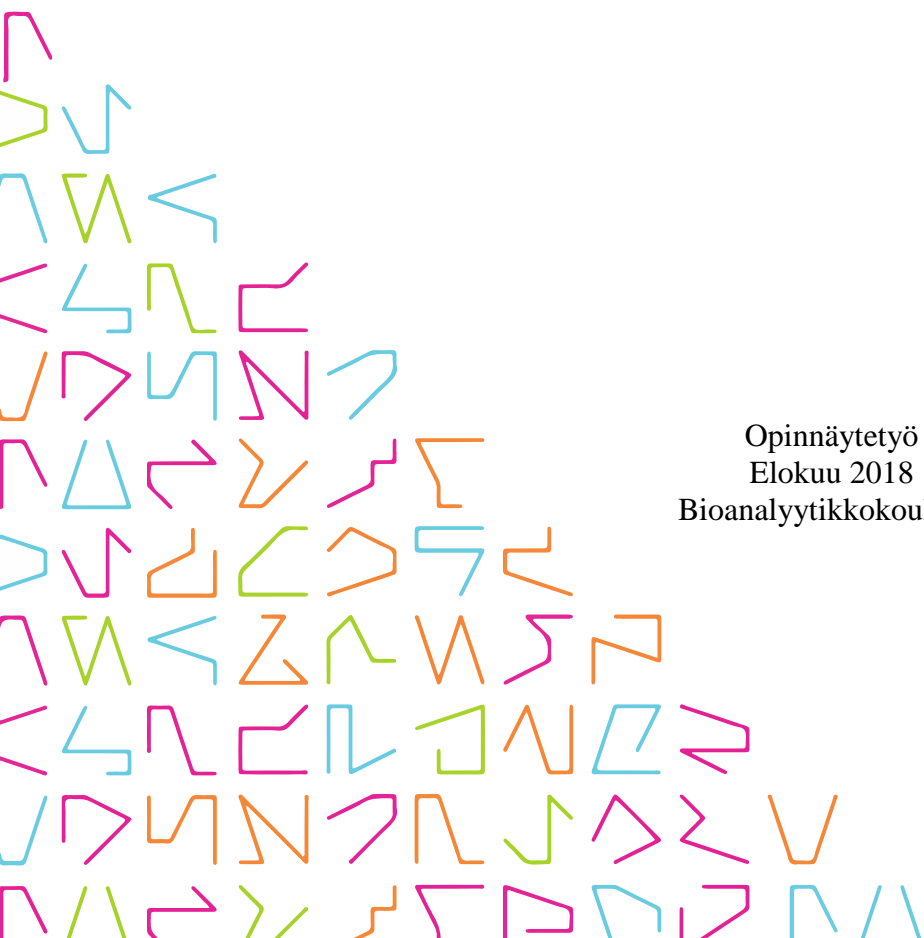
REAALIAIKAISEN PCR-MENETELMÄN KEHITTÄMINEN

Työohje laktoosi-intoleranssiin vaikuttavan pistemu-
taation genotyypitykseen

Elina Haromo

Heta-Elisa Tepsa

Opinnäytetyö
Elokuu 2018
Bioanalytikkokoulutus



TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu
Bioanalytikkokoulutus

HAROMO, ELINA & TEPSA, HETA-ELISA:
Reaaliaikaisen PCR-menetelmän kehittäminen
Työohje laktoosi-intoleranssiin vaikuttavan pistemutaation genotyypitykseen

Opinnäytetyö 49 sivua, joista liitteitä 1 sivua
Elokuu 2018

Ajan saatossa ihmiselle kehittynyt laktoosinsietokyky on seurausta yhden emäksen kohdalla tapahtuneesta geenimutaatiosta. Maailmanlaajuisesti tarkasteltaessa laktoosi-intoleranssin esiintyvyydessä on suuria alueellisia eroja. Laktoosin sietokykyyn vaikuttavan geenimutaation esiintyvyys on yleisempää alueilla, joilla lehmänmaito on ollut merkittävä ravinnonlähde. Afrikassa ja Aasiassa on kansoja, joiden keskuudessa jopa 90 %:lla on edelleen laktoosi-intoleranssi, kun taas esimerkiksi Suomessa vastaava luku on vain n. 18 %.

DNA-tutkimukset ovat nykyisin perusterveydenhuollon rutiinitutkimuksia ja niitä hyödynnetään esimerkiksi laktoosi-intoleranssia tutkittaessa. Reaaliaikaiseen polymeeraasiketjureaktioon perustuvat menetelmät ovat tällä hetkellä keskeinen käytössä oleva DNA-tutkimuksen muoto kliinisessä laboratorioanalytiikassa. Tämän opinnäytetyön tavoitteena on monipuolistaa bioanalytiikan koulutusohjelman molekyylibiologian opetusmenetelmiä Tampereen ammattikorkeakoulussa ja mahdollistaa RT-PCR-menetelmien hyödyntäminen bioanalytikoitten koulutuksessa Applied Biosystems StepOnePlus™ Real-time PCR Systems -analysaattorilla. Opinnäytetyön tarkoituksena on uuden menetelmän pystyttäminen sekä työohjeen tuottaminen laktoosi-intoleranssiin vaikuttavan pistemutaation tutkimiseksi bioanalytikko-opiskelijoiden molekyylibiologian kurssin käyttöön. Opinnäytetyön osana tuotetaan myös käyttöohje Applied Biosystems StepOnePlus™ Real-time PCR-analysaattorille.

Opinnäytetyön kirjallisen osion tehtävänä on antaa teoretista tietoa laboratoriotöiden tueksi. Kirjallinen osio antaa perustiedot DNA:n rakenteesta sekä-, DNA-replikaatiosta ja siinä käsitellään geeneihin ja mutaatioihin liittyviä ilmiöitä. Kirjallisessa osiossa perehdytään laktoosi-intoleranssiin sekä käsitellään reaaliaikaisen PCR:n periaatteita. Lisäksi avataan koestusprosessia, joka oli edellytyksenä työ- ja käyttöohjeen laadinnalle. Toimeksiantajan kanssa on sovittu, että työ- ja käyttöohjetta ei julkaista Theseuksessa.

Opinnäytetyön tavoite saavutettiin ja onnistuttiin luomaan uusi menetelmä sekä opetuskäytössä toimivat ohjeet työn suorittamiseksi. Tämä opinnäytetyö mahdollistaa jatkotutkimusaiheita uusille opinnäytetöille. Menetelmässä käytettävien DNA- ja reagenssikonsentraatioiden tarkempi optimointi voi toimia suorana jatkotutkimusaiheena tälle opinnäytetyölle.

Asiasanat: geenitekniikka, polymeeraasiketjureaktio, mutaatio, SNP, laktoosi-intoleranssi

ABSTRACT

Tampere University of Applied Sciences
Degree Programme in Biomedical Laboratory Science

HAROMO ELINA & TEPESA HETA-ELISA

Developing a Real-Time PCR Method

Work instructions for genotyping of point mutations associated with lactose intolerance

Bachelor's thesis 49 pages, appendices 1 page

August 2018

Due to a mutation in one base of human genome, lactose tolerance evolved over time. However, there are substantial differences in the prevalence of lactose tolerance worldwide. The mutation connected to lactose tolerance is more present in areas where consumption of cow's milk is an integral part of nutrition. To illustrate, some African and Asian peoples show a lactose intolerance rate as high as 90% of the population, whereas the corresponding proportion in Finland is only approximately 18%

Different DNA tests are now among routine exams in basic health care, for example, in examining lactose intolerance. Many of the main methods in clinical laboratory analytics are based on real time polymerase chain reaction (RT-PCR). The aim of this thesis is to diversify the methods used in molecular biology education within the Biomedical Laboratory Science program at Tampere University of Applied Sciences, by enabling the use of RT-PCR methods, namely with the Applied Biosystems StepOnePlus™ PCR analyzer.

The thesis has two parts: the first part provides theoretical background for laboratory analytics and the second part consists of the work instructions and manual. The first part presents the basics of DNA structure and DNA replication, as well as different phenomena linked to the human genome and its mutations. It concentrates on the basics of lactose intolerance and on the principles of real-time PCR. Also, the first part discusses the testing process that was a prerequisite for producing the work instructions and manual. As per agreement with the company, the work instructions and manual will not be published on the Theseus platform.

The objectives set for the thesis were achieved: a new laboratory method was set up, and work instructions for Biomedical Laboratory Science students were produced. Further research on this method is now possible in future thesis projects. For example, a more precise optimization of the DNA and reagent concentration used in the method will provide a topic for continuing the research carried out in this thesis.

Key words: genetic engineering, polymerase chain reaction, mutation, SNP, lactose intolerance

SISÄLLYS

1	JOHDANTO.....	7
2	DNA	8
2.1	DNA:n rakenne	8
2.2	DNA replikaatio.....	10
3	GENETIIKKA.....	11
3.1	Geenitutkimuksen etiikka	11
3.2	Geenit.....	12
3.2.1	Polymorfismi.....	12
3.2.2	Mutaatiot	13
4	LAKTOOSI-INTOLERANSSI	14
4.1	Laktoosi-intoleranssin geneettinen tausta	14
4.2	Tutkittava mutaatio	15
4.3	Laktoosi-intoleranssin diagnosointi	15
5	POLYMERAASIKETJUREAKTIO (PCR).....	17
5.1	PCR:n periaate	17
5.2	Reaaliaikainen PCR (RT-PCR)	18
5.2.1	Fluoresenssin tuottaminen reaktiossa.....	20
5.2.2	Hydrolyysi-koetin ja SNP – analyysi.....	21
5.2.3	RT-PCR-data.....	24
6	PCR-AJON SUUNNITTELU JA KÄYTETYT MATERIAALIT	26
6.1	DNA-templaatti	26
6.2	Master mix	26
6.3	Alukkeet ja koettimet.....	27
6.4	Kontrollit.....	28
7	MENETELMÄN KOESTUS	29
7.1	Koestusprosessi.....	29
7.2	Koestusprosessin tulokset	31
8	OPINNÄYTETYÖN TAVOITE, TARKOITUS JA MENETELMÄ	33
8.1	Opinnäytetyön tavoite ja tarkoitus	33
8.2	Toiminnallinen opinnäytetyö	33
9	TYÖOHJE	35
9.1	Työohjeiden laadinnassa huomioon otettavia asioita	35
9.2	Opinnäytetyön osana toteutettavien ohjeiden laadinta	36
10	POHDINTA.....	37
	LÄHTEET.....	43
	LIITTEET	48

ERITYISSANASTO

Absorbanssi	Suure, joka kuvaa objektin/aineen valonimemiskykyä
Amplifikaatio	PCR-tuotteen monistuminen
Antiparalleelisuus	DNA-juosteiden suunta on toisiinsa nähden vastakkainen
Autosomi	Kromosomi 1-22; ei ole sukupuolikromosomi
Diploidinen	Kaksinkertaisen kromosomiston sisältävä
DNA-polymeraasi	DNA:n kahdentumisessa toimiva entsyymi
DNA-sekvenssi	Nukleotidien keskinäinen järjestys DNA-molekyylissä
DNA-templaatti	DNA-jakso, joka on PCR-monistuksen kohde
dNTP	Deoksinukleosiditriposfaatti
dUTP	Deoksiuridiinitriposfaatti, emäksenä urasiili
FRET	Fluoresoiva resonanssienergiansiirto
Hydrolyysi	Reaktio, jossa yhdiste hajoaa veden läsnä ollessa
Heterotsygootti	Tietyn lokuksen alleelit ovat erilaiset
Homotsygootti	Tietyn lokuksen alleelit ovat samanlaiset
Inhibiittori	Estävä tai hidastava tekijä
Iturata	Sukusoluja tuottava solulinja
kb	Kiloemäs, 1000 emäsparia
Katalysoida	Toimia katalysaattorina, vaikuttaa kemialliseen reaktioon
Lokus	Geenin paikka kromosomissa
Lyofilisoitu	Kylmäkuivattu
Malabsorptio	Imeytymishäiriö, ravinnon puutteellinen imeytyminen
mRNA	Lähetä-RNA sisältää geneettisen informaation proteiinien valmistamiseksi aminohapoista.
Oligonukleotidi	5–60 emäksen mittainen synteettinen yksijuosteinen DNA- tai RNA-jakso
Polymorfismi	DNA:n kohta, jossa vähintään kahden vaihtoehdoisen alleelin esiintymistiheys väestössä on yli 1%
Pistemutaatio	Yhden emäksen muutos DNA-jaksossa
Resessiivinen	Peittyvä ominaisuus, jonka ilmentyminen edellyttää homotsygoottia geeniparia
SNP	Single nucleotide polymorphism. Yhden emäksen polymorfismi

UNG	urasiili-DNA-glykosylaasi; entsyymi, joka estää carryover tuotteiden syntymisen RT-PCR:ssä
Villi tyyppi	Geeni, joka ei ole mutatoitunut, ns. ”alkuperäinen, normaali”
5’–3’ eksonukleaasi-aktiivisuus	DNA-polymeraasin kyky poistaa useita nukleotideja

1 JOHDANTO

Geenitestit ovat arkipäiväistyneet ja nykyisin kaikkien kansalaisten saatavilla. Geenitutkimuksen menetelmät kehittyvät nopealla vauhdilla ja mahdollistavat genomitiedon hyödyntämisen laajassa mittakaavassa. Suomalaisessa terveydenhuollossa yleisimmin tehtävät geenitestit liittyvät muun muassa laktoosi-intoleranssin diagnostiikkaan, suomalaisen tautiperinnön tauteihin ja korkean riskin syöpätautien seulontaan. Geenitestit tulevat lähivuosina olemaan yhä suuremossa osassa suomalaista terveydenhuoltoa. (Sosiaali- ja terveysministeriö 2015, 6, 11; Mylab 2014.)

Opinnäytetyön aiheena on reaaliaikaisen PCR-menetelmän kehittäminen laktoosi-intoleranssiin liittyvän geenimutaation määrittämiseksi. Opinnäytetyön toimeksiantajana on Tampereen ammattikorkeakoulu ja opinnäytetyön tuotoksena syntyvät työ- ja käyttöohjeet ovat suunnattu bioanalytiikko-opiskelijoiden käyttöön. Idea aiheeseen syntyi, jotta koululla olevaa Applied Biosystems StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems-analysaattoria voitaisiin hyödyntää myös bioanalytiikan koulutusohjelmassa. Erilaiset reaaliaikaiseen PCR:ään perustuvat menetelmät ovat laajalti käytössä kliinisissä laboratorioissa. Työn tavoitteena on bioanalytiikan opetusmenetelmien kehittäminen vastaamaan paremmin työelämässä käytössä olevia tekniikoita. Opinnäytetyön tarkoituksena on luoda toimiva menetelmä sekä laatia työ- ja käyttöohje työn suorittamiseksi opetuslaboratoriossa.

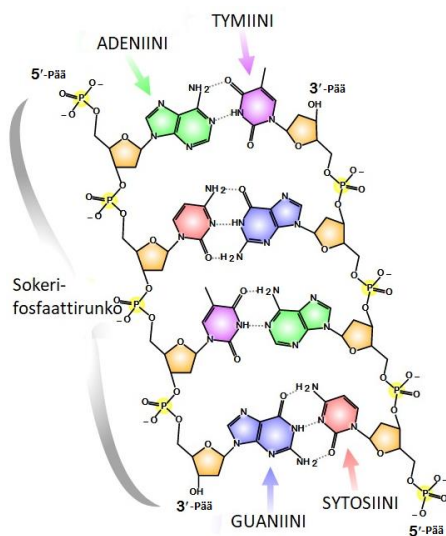
Opinnäytetyön raporttiosiossa käsitellään laktoosi-intoleranssia ja sen geneettistä taustaa sekä PCR:n periaatetta. PCR-prosessin ja laktoosi-intoleranssin ymmärtämiseksi ja pohjustamiseksi työssä käydään läpi genetiikan, mutaatioiden sekä DNA:han liittyviä perusteita. Raporttiosiossa käsitellään kattavasti koestusprosessin eri vaiheet teoriataustoineen. Raporttiosio painottuu käsittelemään edellä mainittuja aiheita. Koska kyseessä on toiminnallinen opinnäytetyö, jonka tuotos on työohje, käsitellään raporttiosiossa lyhyesti myös työohjeiden laadinnassa huomioon otettavia seikkoja.

2 DNA

Ihmisen perintöaines koostuu DNA:sta. DNA on lyhenne sanasta deoksiribonukleiinihappo (eng. deoxyribonucleic acid). James Watson ja Francis Crick selvittivät DNA:n kaksoiskierakerakenteen vuonna 1953. Heidän kehittämänsä mallinnus on antanut perustan modernille molekyylibiologialle sekä johtanut uusien tieteellisten löydösten ja tekniikoiden räjähdysmäiseen kasvuun. (Bates & Maxwell 2005, 1.)

2.1 DNA:n rakenne

DNA-molekyyli muodostuu kahdesta toistensa ympärille kiertyneestä nauhasta, jotka ovat liittyneet yhteen vetysidoksin. Nauha muodostuu toisiinsa peräkkäin liittyneistä nukleotideista, jotka sisältävät emäksen, sokeriosan sekä fosfaattiryhmän (kuvio 1). Nauhan runko muodostuu toisiinsa liittyneistä sokeri-fosfaattiketjuista, jossa kuhunkin sokeri-fosfaattipariin on liittynyt emäsosa. Emäksiä on neljä erilaista, adeniini (A), guaniini (G), tymiini (T) ja sytosiini (C). Kaksi ensin mainittua, adeniini ja guaniini ovat kahdesta rengasosasta muodostuvia suurikokoisempia puriineja. Tymiini ja sytosiini ovat puolestaan pienempiä, yhden renkaan pyrimidiineja. Emäkset muodostavat pareja tietyn emäspariperiaatteen mukaisesti, jossa A – T, T – A, C – G ja G – C voivat liittyä yhteen vetysidosten avulla: näin jokainen muodostunut pari koostuu yhdestä puriinista ja yhdestä pyrimidiinistä. (Pärssinen, Suominen & Haajanen 2012, 138–140.)



KUVIO 1: DNA-rakenne. (Wikimedia commons 2016, muokattu)

Heikkojen vetysidosten määrä poikkeaa siten, että A – T parin välillä on kaksi ja G – C -parien välillä kolme vetysidosta. Vaikka vetysidos on heikko sidos, on niitä DNA-molekyylissä niin paljon, että yhdessä ne muodostavat hyvin pysyvän rakenteen. (Pärssinen ym. 2012, 138–140.) Geneettinen informaatio on koodattuna DNA:n emäsjärjestyksessä (Campbell & Farrell 2012, 253).

2.2 DNA-replikaatio

Solun jakautuessa DNA-molekyylistä monistetaan kopio. Uudessa DNA-molekyylissä on sama emäsjärjestys kuin alkuperäisessä malli-DNA:ssa. Tätä ilmiötä kutsutaan DNA-replikaatioksi. Prosessi on monimutkainen, tarkoin säädelty ja siihen osallistuu useita erilaisia entsyymejä. Replikaatioprosessi koostuu kolmesta vaiheesta. Ensimmäisessä vaiheessa kaksijuosteinen DNA-molekyyli avataan yksijuosteiksi. Avautuvat juosteet ovat antiparalleeleja eli kulkevat vastakkaisiin suuntiin. Toinen juoste on 5'–3'-suunnassa ja toinen 3'–5'-suunnassa. Tämän jälkeen seuraavassa vaiheessa syntetisoidaan uusi juoste yksijuosteiseen malli-DNA:han. Kumpikin juoste syntetisoidaan 5'–3'-suunnassa. Kolmannessa vaiheessa, joka tapahtuu limittäin toisen vaiheen kanssa, varmistetaan ettei muodostuva juoste sisällä virheitä eli emäkset liitetään toisiinsa oikein emäspariperiaatteen mukaisesti. (Campbell & Farrell 2012, 253–254.)

Mutaatiot syntyvät usein DNA:n replikoitumisen yhteydessä. DNA-replikaatiokoneisto tekee virheitä kerran 10^9 emäsparin aikana. DNA-polymeraasi pyrkii korjaamaan replikaatiossa syntyvät virheet oikolukuaktiivisuusominaisuudellaan. Polymeraasi korjaa syntyvät virheet 3'–5'-suunnassa. (Hartwell ym. 2016, 214.)

3 GENETIIKKA

Geneettinen analytiikka kehittyy nopeasti ja tutkimusvalikoima laajenee kattamaan yhä useampia sairauksia sekä sairauksiin altistavia geneettisiä tekijöitä. Kun aiemmin kyettiin tutkimaan yksittäisiä geenejä, nykyisillä tutkimuksilla kyetään kattamaan ihmisen koko genomi. (Horelli-Kuitunen & Orpana 2016a.) Geenitestit ovat arkipäiväistyneet, mistä yhtenä esimerkkinä on perusterveydenhuollossakin rutiininomaisesti käytössä oleva laktoosi-intoleranssiin liittyvän mutaation tutkiminen vatsavaivojen syitä selvitellessä. (Horelli-Kuitunen & Orpana 2016b.)

3.1 Geenitutkimuksen etiikka

Geneettisten tutkimusten avulla voidaan osoittaa tai sulkea pois sairautta aiheuttava geenivirhe ihmisen genomissa. Tästä on etua sairauden diagnosoinnin lisäksi arvioitaessa sairastumisriskiä jo ennen varsinaisten oireiden esiintymistä sekä arvioitaessa geenivirheen periytymistä ja esiintymistä suvuittain. Synnynnäisten geenivirheiden diagnosomiseksi tutkimus on tarpeellista tehdä vain kerran, sillä tulos on pysyvä, toisin kuin hankinnaisissa sairauksissa. (Horelli-Kuitunen & Orpana 2016b.) Geenitason tutkimukset eivät ole aivan ongelmattomia, sillä ne sisältävät eettistä tarkastelua vaativia kysymyksiä. Yksityisyyden suoja on yksi näistä. Geenitutkimuksilla on mahdollista tunnistaa henkilö yksilötasolla koko genomia koskevan tiedon avulla. Käsiteltäessä pienempiä osia genomista, esimerkiksi yksittäistä geeniä, tunnistaminen on vaikeampaa yksilötasolla. (Genomikeskustyöryhmän arviomuistio 2017, 7–8.)

Geenitestejä ja geenitiedon käyttöä varten sovelletaan eri laeissa ja kansainvälisesti sitovissa sopimuksissa olevia sääntöjä, sillä Suomessa ei ole erillistä lakia, joka säätelisi suoraan näitä asioita. Tällaiset kansainväliset sopimukset ovat yhtä sitovia kuin lakimme. (Soini 2017, 130.) Yleissopimus ihmisoikeuksista ja biolääketieteestä edellyttää, että perinnöllistä sairautta ennustavia, sairastumisalttiutta tai geneettistä taipumusta tutkivia testejä saa suorittaa vain terveydellistä syistä tai terveyteen liittyvien tieteellisten tutkimusten yhteydessä. Lisäksi edellytetään, että tutkittavalla henkilöllä on mahdollisuus asianmukaiseen perinnöllisyysneuvontaan. (Yleissopimus 2010/24.)

3.2 Geenit

Geeni on DNA:n jakso, joka sisältää geneettisen koodin eli proteiinia koodaavan perimän osan. Geenit sijaitsevat kromosomien lokuksissa ja ovat kooltaan vaihtelevia. Geenit koostuvat eksoneista ja introneista. Geenin proteiineja koodaavaa osaa kutsutaan eksoniksi ja ei-koodaavaa osaa introniksi. Introni-alueella sijaitsee muun muassa geenin toiminnan säätelyyn liittyviä alueita, kuten tehostaja- ja vaimentajajaksoja. (Kere & Knuutila, 2016.)

Geneilla voi olla vaihtoehtoisia muotoja eli alleeleja, joiden emäsjärjestys on erilainen. Alleelit voivat erota toisistaan yhden tai useamman emäksen osalta. Erot emäsjärjestyksissä voivat muuttaa geenin toimintaa olennaisesti. Yksittäinen alleeli sijaitsee yhdessä geenilokuksessa. Diploidisesta genomistaan johtuen ihmisellä on alleeleja kaksi kappaletta. Toinen alleeleista on peritty isältä ja toinen äidiltä. Väestötasolla saman geenin alleeleja voi kuitenkin olla tuhansia. (Kere & Knuutila 2016.)

3.2.1 Polymorfismi

Geneettistä monimuotoisuutta kutsutaan polymorfismiksi, mikäli sen esiintyvyys on yli 1 % väestöstä. Polymorfismi ilmenee eripituisina DNA-jaksoina, yhden emäksen polymorfismista aina kromosomitasolle asti. Yhden emäksen polymorfismia kutsutaan englanninkielisellä termillä *single nucleotide polymorphism* (SNP). Yhtenä esimerkkinä SNP:stä on pohjoismaalaisille tyypillinen laktoosinsietokyky. (Kere & Kivirikko 2006, 60–61.)

Geneettisen vaihtelun tunteminen on keskeinen edellytys perinnöllisten sairauksien tutkimisessa. Ihmisen koko genomien DNA-sekvenssin määrittäminen oli ensimmäinen askel pitkällä matkalla molekyyli-tason ymmärryksessä sairauksissa joihin geenit liittyvät. Referenssigenomin tunteminen antoi mahdollisuuden kerätä tietoa yleisimmistä SNP:istä, joiden kartoittamiseksi perustettiin kansainvälinen HapMap- projekti vuonna 2005. Tämän projekti mahdollisti geneettisten variaatioiden tutkimisen sekä tutkimusmenetelmien kehittämisen. (Gunderson, Barker, Bibkova, Fan 2007, 85.)

3.2.2 Mutaatiot

Mutaatiot ovat emäsjärjestyksessä tapahtuvia muutoksia, joilla saattaa olla vaikutusta myös fenotyyppiin. Vain pieni osa mutaatioista muuttaa emäsjärjestystä siten, että mutaatiolla on vaikutusta geenin toimintaan. Mutaation seurauksena geenin tuottaman proteiinin määrä tai rakenne voi muuttua, jolloin sillä saattaa olla vaikutusta myös fenotyyppiin. (Hartwell ym. 2016, 206, 208.) Emäsjärjestyksen muutoksia aiheuttavia mutaatioita ovat substituutio, deletio, insertio, duplikaatio, inversio ja translokaatio (Kettunen & Palotie 2016a). Mutaatioille altistavia tekijöitä ovat muun muassa erilaiset kemialliset ja fysikaaliset tekijät, esimerkiksi UV-valo, röntgensäteet sekä vapaat radikaalit (Hartwell ym. 2016, 213).

Mutaatiot voivat tapahtua sekä geeni- että kromosomitasolla ja vastaavasti sekä ituradan soluissa että somaattisissa soluissa. Ituradan soluissa tapahtuvat mutaatiot periytyvät jälkeläisille, mikäli mutaatio on hedelmöityneessä sukusolussa. (Kettunen & Palotie 2016b, Kere & Kivikko 2006, 62.) Mutaatiot vaihtelevat kooltaan aina yhden emäksen muutoksesta kokonaisen kromosomin monistumiseen (Kettunen & Palotie 2016b). Yhden emäksen mutaatioita eli pistemutaatioita ovat substituutio, deletio sekä insertio. Substituutiot jaetaan transisioihin ja transversioihin. Transisioissa pyrimidiiniemäs vaihtuu toiseen pyrimidiiniin (C & T) ja puriiniemäs toiseen puriiniin (A & G). Transversioissa vaihdos tapahtuu puriinin ja pyrimidiinin välillä. (Kettunen & Palotie 2016a.) Pistemutaatiot vaikuttavat vain yhteen tai muutamaaan emäspariin DNA:ssa, ja siten muuttavat vain yhden geenin rakennetta (Hartwell ym. 2016, 208).

4 LAKTOOSI-INTOLERANSSI

Laktoosi-intoleranssilla tarkoitetaan laktoosia pilkkovan ohutsuolen limakalvon laktaasientsyymien puutosta, johon liittyy maitotuotteiden nauttimisen yhteydessä esiintyviä maha-suolikanavan oireita, kuten esimerkiksi ilmavaivoja, vatsan turvotusta, vatsakipuja ja ripulia. (Järvelä & Kolho 2017; Hillilä 2007.) Laktoosi on maidon pääasiallinen hiilihydraatti. Laktoosi on disakkaridi, joka ei sellaisenaan imeydy elimistöön, vaan se täytyy pilkkoa monosakkarideiksi. Ohutsuolen mikrovillusten enterosyytit tuottavat laktaasientsyymiä, jonka katalysoimana laktoosi hydrolysoituu glukoosiksi ja galaktoosiksi. (Sand ym. 2014, 412.) Laktaasientsyymien puutoksen takia laktoosi kulkeutuu hajoamattomana paksusuoleen ja siirtää samalla osmoottisesti nestettä mukanaan. Paksusuolen bakteerit hajottavat laktoosia, jolloin syntyy vatsavaivoja aiheuttavia kaasuja. (Järvelä & Kolho 2017; Hillilä 2007.)

4.1 Laktoosi-intoleranssin geneettinen tausta

Aikuisiän laktoosi-intoleranssi on ihmiselle luonnollinen tila ja sen aiheuttaa villin tyypin alleelin homotsygotia (Kettunen & Palotie 2012c). Laktoosin sietokyky on kehittynyt tuhansien vuosien kuluessa ja se vaihtelee suuresti eri populaatioissa ympäri maailman. Laktoosin sietokykyyn on yhdistettävissä useita eri geenimutaatiota, esimerkiksi C/T-13910. (Misselwitz ym. 2013, 152.)

Aikuisiän laktoosi-intoleranssia esiintyy maailmanlaajuisesti eniten Aasiassa sekä suurimmassa osassa Afrikkaa, joissa sitä esiintyy jopa 90 %:lla alueen väestöstä. Pienintä laktoosi-intoleranssin esiintyvyys on populaatioissa, joilla on pitkä historia maidon käyttämisessä elintarvikkeena. Pohjois-Euroopassa laktoosi-intoleranssia esiintyy alle 10 %:lla alueen väestöstä. (Deng, Misselwitz, Dai & Fox. 2015.) Aikuistyyppin hypolaktasiassa eli laktoosi-intoleranssissa laktaasientsyymien puutos periytyy autosomaalisesti resessiivisesti. Suomalaisessa väestössä aikuistyyppin hypolaktasiaa on 18 %:lla ja maailmanlaajuisesti sitä esiintyy 65 %:lla. Laktaasientsyymien aktiivisuus alenee imeväisiän jälkeen ja pienenee noin 10 %:iin alkuperäisestä geneettisesti alttiilla henkilöllä 5–12 vuoden ikään mennessä. (Järvelä & Kolho 2017; Hillilä 2007.)

4.2 Mutaatio C/T-13910

Laktaasientsyymi on iso glykoproteiini, ja sitä koodaa yksi geeni, kooltaan noin 50 kb. Geeni sijaitsee kromosomissa 2 (Swallow 2003, 198–199). Laktaasigeenin (*LCT*-geeni) säätelyalueella, *MCM6*-geenin intronissa 13, tapahtunut pistemutaatio on kytköksissä laktoosin sietokykyyn. Mutaatio C/T-13910 sijaitsee 13 910 emäsparia ylävirtaan laktaasientsyymän transkriptioalueelta kromosomissa 2q21-22. (Rasinperä 2006, 9, 35.) Geenin luonnollisen hiljentymisen estää intronissa tapahtunut transito, sytosiinin vaihtuminen tyymiiniksi. Tällöin laktoosia pilkkovaa entsyymiä tuottuu aikuisiässäkin. (Kettunen & Palotie 2016a; Kettunen & Palotie 2016c.) Epigeneettiset tekijät ovat kytköksissä laktoosi-intoleranssin syntyyn. Epigeneettisten muutosten vaikutus säätelyelementteihin, kuten spesifisiin promoottoreihin ja tehostaja-alueisiin, selittää yksilöiden välisiä eroja laktaasin mRNA-tasoissa. (Labrie ym. 2016.) Eri genotyypit sekä niistä todennäköisesti aiheutuva fenotyyppi esitetään taulukossa 1.

TAULUKKO 1. SNP C/T-13910 (Snpedia 2018, muokattu)

Genotyyppi	Fenotyyppi
C/C	Laktoosi-intoleranssi aikuisiällä
C/T	Todennäköisesti kykenee pilkkomaan laktoosia
T/T	Kykenee pilkkomaan laktoosia

Suomalaisessa väestössä laktaasientsyymän matalaan aktiivisuuteen liittyvä genotyyppi on C/C-₁₃₉₁₀. Genotyypit C/T-₁₃₉₁₀- ja T/T-₁₃₉₁₀ kykenevät sitä vastoin pilkkomaan laktoosia. Huomioitavaa kuitenkin on, että C/C-genotyyppi ei suoranaisesti kerro laktoosi-intoleranssista. Kyseessä on geneettinen ominaisuus, joka ei välttämättä ilmene vatsaoireina. Kuitenkin noin 90 % ihmisistä, joilla on C/C-genotyyppi, saa laktoosi-intoleranssin oireita maitotuotteista. (Järvelä & Kolho 2017.)

4.3 Laktoosi-intoleranssin diagnosointi

Suomessa laktoosi-intoleranssin diagnosoinnissa käytetään geenitestauksen menetelmiä, jotka perustuvat joko minisekvensointiin tai reaaliaikaiseen polymeerasiketjureaktioon (Hillilä 2007). Aiemmin käytössä ollut laktoosirasitustestiä ei enää käytetä sen epäspesifisyyden vuoksi. Laktoosirasituskokeen periaatteena on mitata laktoosiannoksen

nauttimisen jälkeen verensokerin nousua tai hengitysilman vetypitoisuuden kasvua. Laktoosirasituskokeisiin liittyy kuitenkin virhelähteitä, joiden vuoksi rasiustestit eivät ole luotettavia. Esimerkiksi 20 %:lla väestöstä ei tuotu lainkaan vetyä ruoansulatuskanavassa, jolloin myöskään hengitystestiä ei voida luotettavasti käyttää diagnostiikassa. Toinen keskeinen virhelähde on mahalaukun tyhjenemisnopeuteen liittyvä laktoosimalabsorptio, jossa laktoosiannos voi kulkeutua nopeasti ohutsuoleen ja aiheuttaa näin oireita olematta varsinaisesti laktoosi-intoleranssia. (Kolho 2018.) Geenitesti on potilaalle miellyttävämpi kuin rasiustestit, sillä geenitesti ei vaadi suuren laktoosiannoksen nauttimista, josta saattaa aiheutua epämiellyttäviä ruoansulatuskanavan oireita. Geenitesti ei myöskään vaadi useita peräkkäisiä verikokeita, kuten verensokerin mittaamiseen perustuva rasiustestit. (Mattar, Mazo, Carrilho 2012.)

5 POLYMERAASIKETJUREAKTIO (PCR)

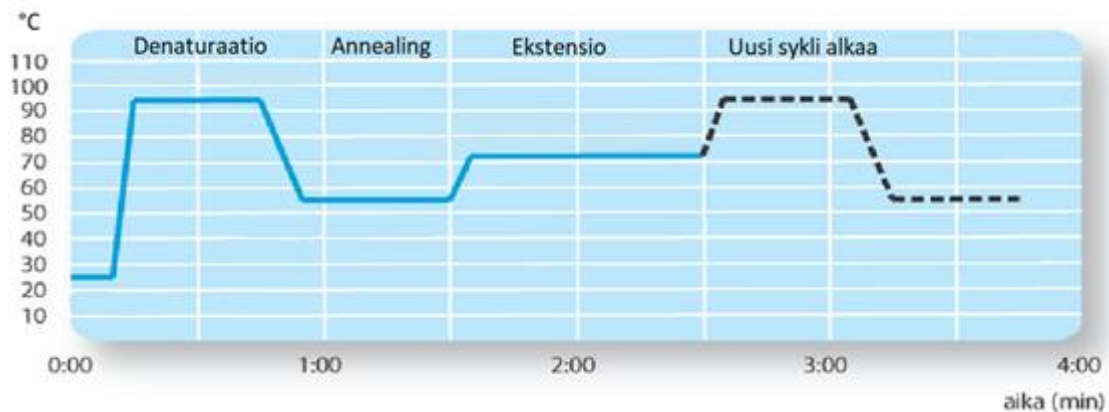
Lyhenne PCR (polymeraasiketjureaktio) tulee englanninkielien sanoista *polymerase chain reaction*. Menetelmän kehitti 1980-luvulla amerikkalainen Kary Banks Mullis ja sai tästä DNA:n monistamisen mullistaneesta keksinnöstään kemian Nobel-palkinnon vuonna 1993. Tätä menetelmän kehittymistä edelsivät lukuisat erilaiset tieteelliset tutkimukset ja löydökset alkaen jo 1800-luvulta. (Solunetti 2006.) Menetelmän peruseriaatteena on monistaa tutkittavasta geenialueesta miljoonia kopioita, joista voidaan selvittää kyseisen geenialueen rakennetta ja siinä esiintyviä virheitä monin eri geenidiagnostiikan sovellusten avulla. Menetelmän käyttö edellyttää tutkittavan DNA-sekvenssin tuntemista ja sitä voidaan hyödyntää vain melko lyhyiden DNA-jaksojen tutkimisessa. (Horelli-Kuitunen & Orpana 2016c.)

5.1 PCR:n periaate

Tutkittavan sekvenssin molempiin 3'-päihin suunnitellaan noin 20 nukleotidin mittaiset komplementaariset alukkeet, jotka sitoutuvat emäspari-periaatteen mukaisesti kohdesekvenssiin. Reaktiossa tarvitaan alukkeiden lisäksi DNA-polymeraasi, joka syntetisoi uutta vastinjuostetta liittämällä reaktioseokseen lisättyjä deoksinukleotiditriofosfaatteja (dNTP). Lämpöstabiiilit DNA-polymeraasit kestävät prosessin aikana käytettäviä korkeita lämpötiloja inaktivoitumatta. Lämpöstabiiileja DNA-polymeraaseja on monia erilaisia. Nykyisin yksi käytetyimmistä on geenitekniikan keinoin vähemmän virheitä tekeväksi muokattu *Taq*-polymeraasi. Alun perin se on eristetty kuumissa lähteissä elävistä *Thermus aquaticus*-bakteereista. (Horelli-Kuitunen & Orpana 2016c; Suominen, Pärssinen, Haajanen, Pelkonen 2013, 153-156.)

Ensin reaktioseoksessa tarvittavat elementit yhdistetään, minkä jälkeen PCR-laite aloittaa ensimmäisen syklin. Monistettava DNA-templaatti denaturoidaan yksijuosteiseksi noin 95 °C:ssa. Tämän jälkeen alukkeiden kiinnitysreaktiossa (eng. annealing) lämpötila lasjetaan lyhyeksi aikaa noin 50 °C. Lyhyet alukkeet kykenevät nyt kiinnittymään templaattiin niille komplementaarisuuteen kohtiin. Lyhyessä ajassa pidempi templaatti-DNA ei ehdi renaturoitua eli kiinnittyä takaisin itsensä kanssa vaan pysyy yksijuosteisena. Seuraavassa vaiheessa lämpötilaa nostetaan hieman, DNA-polymeraasille optimaaliseen lämpötilaan,

joka tyypillisesti on noin 70 °C. Templaatin pidennysvaiheessa eli ekstensiossa DNA-polymeraasi aloittaa vastinjuosteen syntetisoinnin liittämällä dNTP-nukleotideja yksi-juosteiseksi denaturoidun templaatti-DNA:n 3'-päistä alkaen. Ensimmäinen PCR-sykli on nyt valmis. Kuviossa 2 on esitetty PCR-reaktion eri vaiheet. Seuraavaksi prosessi alkaa alusta, eli lämpötila nostetaan uudelleen noin 95 °C:seen, jolloin kaikki aiemmin syntetisoidut kaksijuosteiset nauhat aukeavat, jolloin syklin edetessä alukkeet sitoutuvat alkuperäisiin templaatti-DNA-juosteisiin sekä vasta syntetisoituihin juosteisiin. DNA-juosteiden määrä kasvaa näin jokaisessa syklissä eksponentiaalisesti. Tyypillisesti syklejä toistetaan noin 30–40 kertaa, jolloin lopulta saadaan jopa miljoonakertainen määrä monistetavaa DNA-sekvenssiä. Monistusreaktion jälkeen näyte analysoidaan agarosigelelelektroforeesilla. (Horelli-Kuitunen & Orpana 2016c; Suominen ym. 2013, 153–156.)



KUVIO 2. PCR-syklin eri vaiheet. (Suominen ym. 2013, 155, muokattu)

Polymeraasiketjureaktioon perustuvat menetelmät hyödyntävät luonnollisen DNA-replikaation peruselementtejä. Elävässä solussa replikaatio on hyvin monimutkainen prosessi ja siihen osallistuu useita erilaisia proteiineja. Elävän solun replikaatiossa monistuu koko genomi, kun taas PCR:ssa monistetaan lyhyitä DNA-fragmentteja ja mukana ovat vain peruskomponentit. (McPherson & Møller 2000, 4.)

5.2 Reaaliaikainen PCR (RT-PCR)

Reaaliaikainen PCR kehitettiin 1990-luvun puolessa välissä. Menetelmä mahdollisti PCR-tuotteen määrän kvantitatiivisen tarkastelun sekä analyysin seuraamisen reaaliaikaisesti PCR-reaktion eksponentiaalisessa vaiheessa. Reaaliaikaisen kvantitatiivisen PCR:n kehittäminen mullisti PCR:n käytön kliinisessä diagnostiikassa. (Overbergh, Giuliatti,

Valckx, Mathieu 2005, 110.) Reaaliaikaisen PCR:n etuina ovat analyysin nopeus ja mahdollisuus lukea tulokset välittömästi ajon jälkeen sekä automatisoituus, korkeat läpimenomäärät, tarkkuus ja sensitiivisyys (Patrinos & Ansorge 2005, 4). Reaaliaikaisella PCR:llä on kuitenkin myös omat heikkoutensa. Menetelmät ovat hyvin herkkiä PCR-inhibiittoreille sekä erilaisille kontaminaatioille, jotka voivat olla peräisin vedestä, alukkeista, koettimista tai DNA-templaattien pipetoinnin aikana muodostuneesta aerosoleista. (Loftis & Reeves 2012, 4.) Erilaisista reaaliaikaisista PCR-sovelluksista käytetään lähteestä riippuen hieman erilaisia ilmaisuja. Tässä opinnäytetyössä reaaliaikaisesta PCR:stä käytetään lyhennettä RT-PCR (Suominen ym. 2013, 167).

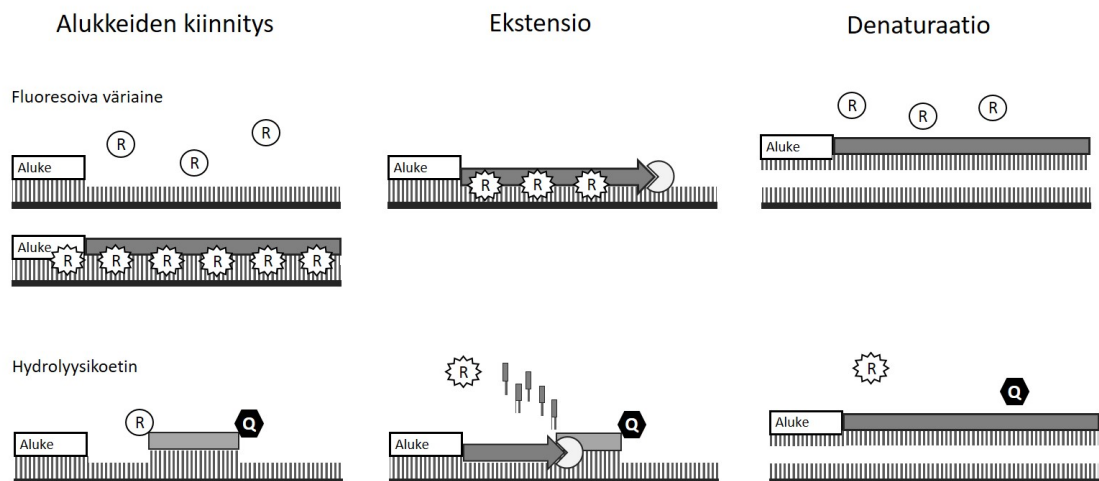
Reaaliaikaisessa PCR:ssä peruseriaate vastaa alukkeiden käytön sekä denaturointi-, alukkeiden kiinnitys- ja ekstensiovaiheiden osalta perinteistä PCR-menetelmää. RT-PCR-menetelmällä on kuitenkin monia etuja verrattuna alkuperäiseen PCR-tekniikkaan. DNA:n monistuminen ja datan analysointi tapahtuvat yhden vaiheen aikana, joten menetelmä ei vaadi PCR-ajon jälkeistä analytiikkaa tai käsittelyä. (Overbergh ym. 2005, 109–110; Lee ym. 2009, 24.) RT-PCR:ssä datan analysointi perustuu emittoituvan fluoresenssisignaalin havaitsemiseen ja mittaamiseen reaaliaikaisesti (Overbergh ym. 2005, 115). RT-PCR-laitteeseen on lisätty fluoresenssia havaitsevaa ja mittavaa optiikkaa, joka mahdollistaa fluoresenssin mittaamisen jokaisen syklin aikana (Lee, Squirrel, Leslie, Brown. 2009, 23).

Perinteisessä PCR-menetelmässä PCR-tuotteet on analysoitava agarosigeelielektroforeesilla, joka lisää PCR-tuotteen kontaminaatiovaaraa. RT-PCR:ssä reaktiot tapahtuvat suljetuissa reaktiokaivoissa tai -putkissa, jotka osaltaan vähentävät PCR-tuotteen kontaminaatiovaaraa ja tulosten vaihtelevuutta. Agarosigeelielektroforeesissa käytetään myrkyllisiä kemikaaleja, kuten esimerkiksi etidumbromidia, mutta RT-PCR:ssä työntekijällä ei ole altistumisvaaraa tälle tai muille vastaaville vaarallisille kemikaaleille. RT-PCR on myös huomattavasti sensitiivisempi ja nopeampi menetelmä sekä helposti automatisoitavissa. Merkittävänä etuna on myös RT-PCR-tulosten kvantifiointi, sillä perinteisessä PCR:ssä tulokset ovat saatavissa pelkästään kvalitatiivisessa muodossa. (Overbergh ym. 2005, 109–110; Lee ym. 2009, 24.)

5.2.1 Fluoresenssin tuottaminen reaktiossa

Luminesenssi tarkoittaa valon tai säteilyn vapautumista elektronin palatessa korkeammalta energiatasolta matalammalle. Kun molekyylin tietyt elektronit viritetään korkeammalle energiatasolle viritysvalon avulla, kyseessä on fluoresenssi. Fluoresenssin viritystila purkautuu ja palautuu perustilaan yleensä hyvin nopeasti, samalla vapautuu fluoresenssivaloa. (Åkerman & Jokela 2010, 57).

Reaaliaikaisessa PCR:ssä fluoresenssin tuottamiseen käytettävät menetelmät voidaan jakaa kahteen eri pääryhmään: DNA-juosteeseen sitoutuviin fluoresoiviin väriaineisiin ja FRET-tekniikkaan perustuviin menetelmiin (Saunders 2009, 2). Nämä kaksi erilaista menetelmää tuottaa fluoresenssi on esitetty kuviossa 3.



KUVIO 3. Fluoresenssin tuottaminen fluoresoivalla väriaineella sekä hybridisaation perustuvalla hydrolyysikoettimella.

Fluoresoivat väriaineet, esimerkiksi SYBR Green I, sitoutuvat epäspesifisesti kaksijuosteiseen DNA:han PCR-reaktion aikana (Lee 2009, 25–26). Sitoutuessaan fluoresoivan molekyylin rakenne muuttuu, minkä seurauksena fluoresenssisignaalin määrä kasvaa (Saunders 2009, 2). Kasvavan fluoresenssin määrä on verrannollinen DNA:n määrään. Fluoresoivat väriaineet sitoutuvat kaikkeen kaksijuosteiseen DNA:han, joten menetelmä ei kuitenkaan ole yhtä spesifinen kuin koetinhybridisaatioon perustuvat menetelmät. (Suominen ym. 2013, 167.) PCR-reaktion jälkeen suoritetaan sulamiskäyräanalyysi, jonka avulla erotetaan haluttu PCR-tuote muista epäspesifeistä PCR-tuotteista. (Overbergh 2005, 111.)

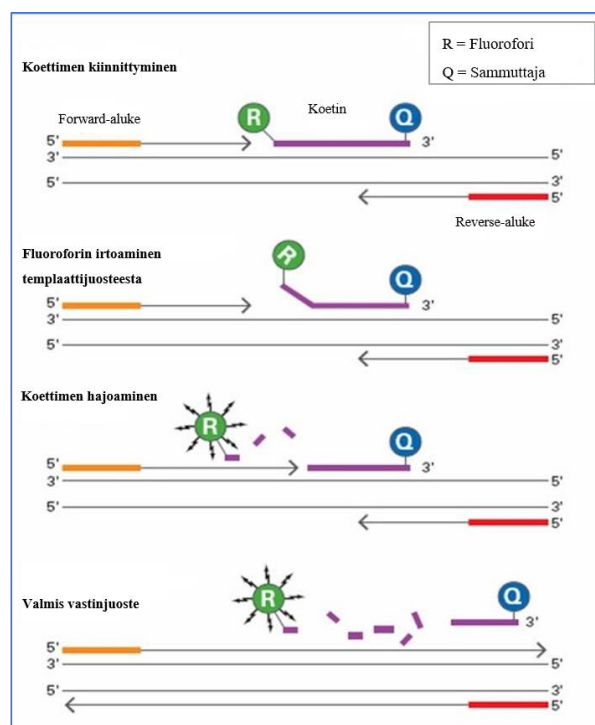
Fluoresenssi resonanssienergiasiirto (FRET) on molekyylin välistä energian siirtoa. Säteilystä tuottamattomassa prosessissa virittyneen luovuttaja fluoroforin fotonin nostaa vastaanottajamolekyylin elektronin energiatilan korkeammalle tasolle. Luovuttaja fluorofori palautuu perustilaan emittoimatta fluoresenssia. Mekanismi on riippuvainen molekyylien välisistä heikoista vuorovaikutuksista ja sen toimivuutta rajoittaa luovuttajan ja vastaanottajan molekyylien etäisyys. Vaatimuksena on myös luovuttajan fluoresenssi emissiospektri ylittää vastaanottajan absorptiospektrin. Nykyään useimmat fluoresenssidetektiomenetelmät perustuvat niin sanottuun fluoresenssin sammuttamiseen (eng. *quenching*) kahden molekyylin välisen energiansiirron avulla. (Marras 2006, 4).

Fluoresoivaa resonanssienergiansiirtoa voidaan hyödyntää monin eri tavoin. Fluoresoivat leimamolekyylit voidaan liittää koettimiin, alukkeisiin tai PCR-tuotteeseen. Yleisin tapa on käyttää hybridisaatioon perustuvia fluoresenssileimattuja koettimia, jotka sitoutuvat spesifisesti DNA-juosteeseen. (Saunders 2009, 2; Lee ym. 2009, 24.) Reaaliaikaisessa ja kvantitatiivisessa PCR:ssä voidaan hyödyntää hybridisaatioon perustuvia hydrolyysi- tai hybridisaatiokoettimia (Loftis & Reeves 2012, 11). Koettimen hybridisaatioon perustuvat menetelmät ovat luotettavampia kuin epäspesifisesti sitoutuvat väriaineet. Fluoresenssi-signaalia syntyy, kun luovuttaja ja vastaanottaja erkanevat riittävän kauas toisistaan. Väärät positiiviset tulokset ovat siten epätodennäköisiä. Spesifisen DNA-sekvenssin määrän lisääntyminen näkyy fluoresenssisignaalin kasvuna. (Saunders 2009, 2; Loftis & Reeves 2012, 11.) Koettimien käyttö mahdollistaa eri kohdesekvenssien yhtäaikaisen tutkimisen samassa reaktioputkessa (multiplexing). Reaktioputkeen voidaan lisätä useita eri fluoresenssileimoilla leimattuja koettimia, joten eri geenialueita voidaan tutkia samanaikaisesti yhden PCR-ajon aikana. Vastaavasti voidaan käyttää myös yhtä koetinta ja useita erilaisia alukkeita. (Loftis & Reeves 2012, 4.)

5.2.2 Hydrolyysikoetin ja SNP-analyysi

Hydrolyysikoettimet ovat alleeli- tai sekvenssispesifisiä. Koettimet kiinnittyvät yksijuosteiseen templaattiin, forward- ja reverse-alukkeiden väliin, annealing- ja ekstensiovaiheiden aikana. Koettimen 3'-päähän on liitetty fosfaattiryhmä tai vastaava molekyyli, joka estää DNA-synteesin käynnistymisen koettimen kohdalta. Synteesi käynnistyy siis vain alukkeiden 3'-päistä. (Lee ym. 2009, 33; Overbergh ym. 2005, 110.)

Koettiin on kovalenttisesti sidottu leimamolekyylejä (Arya ym. 2005, 209). Koettimen 5'-päässä on fluorofori ja 3'-päässä sammuttajaleima. Sammuttajaleima on myös teknisesti fluoresenssiväri, mutta yleensä se emittoi paljon pidemmillä aallonpituuksilla kuin ilmaisinväri, joten analysaattori ei havaitse sen fluoresenssia. Normaalissa, hybridisoitumattomassa muodossa koettimet eivät tuota fluoresenssisignaalia. Fluoresenssisignaali syntyy, kun hydrolyysikoetin hajoaa *Taq*-polymeraasin 5'-3'-eksonukleasiaktiivisuuden vaikutuksesta. Tällöin fluorofori irtoaa sammuttajaleiman läheisyydestä ja fluoresenssin synty mahdollistuu (kuvio 4). (Overbergh ym. 2005, 110; Lyon, Mao, Swensen 2009, 149.) Syntyvän fluoresenssin intensiteetti on suoraan verrannollinen PCR-tuotteen määrään (Arya ym. 2005, 210).

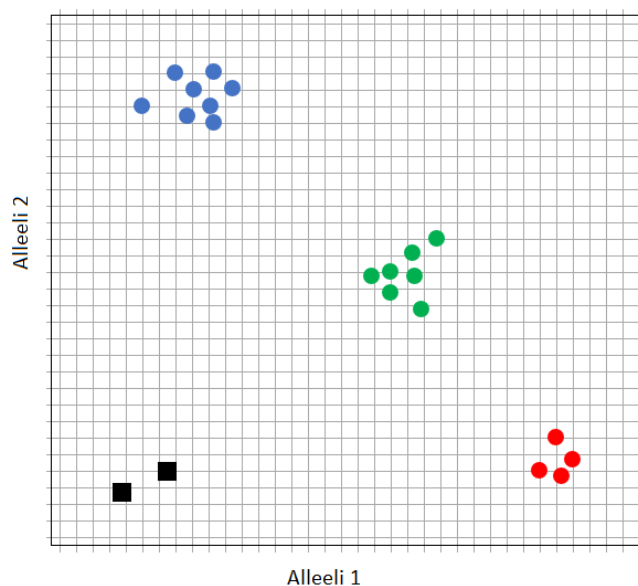


KUVIO 4. Hydrolyysikoettimen toimintaperiaate (Wikimedia commons 2015, muokattu)

SNP-mutaatioiden havaitsemiseen voidaan hyödyntää hydrolyysikoettimia. Hydrolyysikoettimien etuna on spesifisyys, sillä koettimet kiinnittyvät vastinjuosteeseensa yhden emäksen tarkkuudella. SNP-mutaatioita tutkittaessa reaktioseokseen lisätään kahta sekvenssiltään erilaista ja erilaisella fluoroforilla leimattua koetinta. Alleelit voidaan tunnistaa fluoresenssisignaaliensa perusteella. (Saunders 2009, 4; Lyon ym. 2009, 150.) Yhden fluoresenssivärin huomattava kasvu merkitsee homotsygoottia genotyyppiä, kun taas usempien signaalien nousu merkitsee heterotsygoottia genotyyppiä. Koettimen ja kohdeemäksen yhteensopimattomuus heikentää koettimen kiinnittymistä templaattiin ja estää koettimen hajoamisen, jolloin fluoresenssia ei synny. (Livak 1999, 143–144.)

Koettimien hybridisaatiota voidaan tehostaa erilaisin keinoin, kuten kehittämällä koettimia ja muokkaamalla oligonukleotidejä. Esimerkkeinä muokatuista oligonukleotideistä ovat muun muassa MGB-, LNA- ja ZNA-koettimet. MGB-koettimien (*minor groove binder*) ja LNA-oligonukleotidien (*locked nucleic acid*) hybridisaation tehostamiskyky perustuu ionittomiin vuorovaikutusmekanismeihin. ZNA-koettimien (*Zip nucleic acids*) toiminta perustuu sitä vastoin oligonukleotidien negatiivisen varauksen laskemiseen. (Moreau ym. 2009.) Edellä mainittujen modifioitujen oligonukleotidien sulamislämpötila (T_m) on korkeampi verrattuna perinteisiin koettimiin. Korkeampi lämpötila mahdollistaa lyhyempien koettimien käytön (Arya ym. 2005, 213; Metabion International AG 2017; Exiqon 2009, 3.)

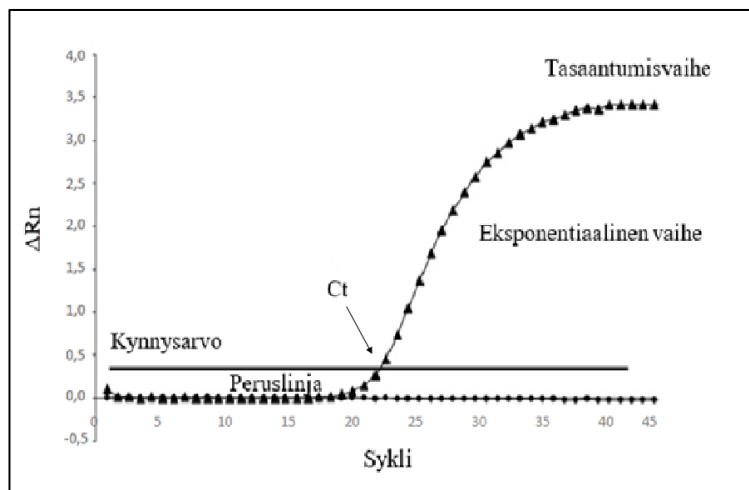
PCR-laitteisto analysoi SNP-tutkimuksessa syntyvän fluoresenssi-informaation laskeamalla Rn-arvon, joka perustuu reaktiokaivojen fluoresenssisignaaliin, ja määrittelee siten mitkä alleeleja näytteissä on. Näytteiden genotyypit ja tutkimuksen tulokset esitetään hajontakaaviossa (kuvio 5), jossa nähdään alleeli 1:n suhde alleeli 2:een. Kaaviosta voidaan myös nähdä, onko kyseessä homotsygootti vai heterotsygootti genotyyppi. (TaqMan SNP Genotyping Assays User Guide 2014, 27–28.) Kuviossa 5 sininen pistejoukko kuvaa homotsygoottia genotyyppiä alleelin 1 suhteen, vihreä pistejoukko kuvaa heterotsygoottia genotyyppiä ja punainen pistejoukko homotsygoottia genotyyppiä alleelin 2 suhteen. Kuviossa 5 negatiiviset kontrollit ovat esitettynä mustina neliöinä.



KUVIO 5. Alleelien ryhmittäminen hajontakaaviossa.

5.2.3 RT-PCR-data

RT-PCR-tulosten analysointi perustuu fluoresenssisignaalin reaaliaikaiseen mittaamiseen. Signaalin määrä on suoraan verrannollinen syntyvän PCR-tuotteen määrään. Ensimmäisten syklien aikana fluoresenssisignaalin ei juurikaan ole havaittavissa muutosta. (Overberg ym. 2005, 109.) Tämä ns. perustaso (eng. *baseline*) määritetään siten, että fluoresenssisignaali kasvaa mutta ei kuitenkaan ylitä laitteiston detektorirajaa. Laitteisto määrittää perustason syklien 3-15 välillä. (Arya ym. 2005, 210.) Fluoresenssisignaalin kasvu tapahtuu eksponentiaalisesti, ja näin myös PCR-tuotteen määrä tuplaantuu jokaisen syklin aikana. Eksponentiaalista kasvua ja syklien määrää tarkastellaan amplifikaatiokuvaajasta (kuvio 6). Sykliä edetessä synteesin tehokkuus vähenee ja saavutetaan tasaantumisvaihe, jossa PCR-tuotteen määrän kasvu on lähes lineaarista eli syntyvän tuotteen määrä pysyy muuttumattomana jokaisella syklillä. Syitä kasvun hidastumiseen ovat templaatin PCR-inhibiittorit, reagenssien määrän väheneminen, amplikonien uudelleen yhdistyminen sekä pyrofosfaattimolekyylien kertyminen. (Arya ym 2005, 210-211; Saunders 2009, 3.)



KUVIO 6. Tyypillinen RT-PCR lineaarinen amplifikaatiokuvaaja (Overbergh ym. 2005, 115, muokattu)

Fluoresenssin nousu lasketaan tietokoneohjelman avulla ja se ilmaistaan y-akselilla ΔR_n -arvona. ΔR_n -arvo lasketaan kaavasta $R_n^+ - R_n^- = \Delta R_n$, jossa R_n^+ kuvaa tuotteen fluoresenssiemissiota jokaisella ajan hetkellä, jokaisen syklin aikana ja R_n^- kuvaa perustason fluoresenssiemissiota. ΔR_n -arvo korreloi suoraan PCR-tuotteen syntyyn PCR-prosessin aikana. Huomioitavaa on, että ensimmäisten syklien aikana ΔR_n -arvo ei nouse perustason yläpuolelle. (Arya ym. 2005, 210; Overbergh ym. 2005, 115.)

Laitteisto määrittää automaattisesti satunnaisen kynnyksarvon (eng. *threshold*) peruslinjan vaihtelevuuden perusteella. Kynnyksarvo lasketaan määrittämällä syklien 3-15 fluoresenssisignaalien keskihajonta ja kertomalla tämä kymmenellä. Kynnyksarvon yläpuolelle ulottuvat fluoresenssisignaalit lasketaan todelliseksi ja huomioon otettaviksi signaaleiksi. Kynnyksyksi (Ct) on se sykli, jossa fluoresenssisignaali ylittää kynnyksarvon. Ct-arvo on oleellinen määre RT-PCR:ssä, koska sen avulla saadaan tarkkoja ja toistettavia tuloksia, ja arvoa voidaan hyödyntää tutkittavan kohteen kvantifiointiin. (Arya ym. 2005, 210; Overbergh ym. 2005, 115.) Tuloksia analysoidaan eri tavoin riippuen käytetystä menetelmästä. Ct-arvoa hyödynnetään esimerkiksi kvantitatiivisissa analyyseissä, erillisten PCR-ajojen tulosten vertailussa sekä positiivisen ja negatiivisen tuloksen määrittämisessä. (Edwards & Logan 2009, 92.)

6 PCR-AJON SUUNNITTELU JA KÄYTETYT MATERIAALIT

Koestuksessa käytettiin kaupallisia reagensseja, joita tarvittaessa liuotettiin tai laimennettiin. Koestuksessa käytettyjen materiaalien konsentraatiot suunniteltiin referenssiartikkelin (Bácsi ym. 2008) mukaisesti. Menetelmäksi valittiin hydrolyysikoetinkemiaan perustuvat koettimet koetinmenetelmän spesifisyyden vuoksi.

6.1 DNA-templaatti

DNA-templaatteina käytettiin laskimoverinäytteistä eristettyä genomista DNA:ta. Menetelmän koestuksessa käytettiin genotyypiltään tunnettuja näytteitä. Näytteet saatiin Fimlab Laboratoriot Oy:ltä. Koestuksessa käytetyt näytteet oli kerätty usean eri potilaan näytteestä eli kyseessä oli ns. näytepooli. Koestuksessa käytettyjen näytteiden genotyypeinä olivat C/C-₁₃₉₁₀, C/T-₁₃₉₁₀ ja T/T-₁₃₉₁₀. Koestuksen aikana kustakin genotyypistä käytettiin jokaisessa ajossa samaa näytepoolia, jolloin tulokset ovat vertailukelpoisia siltä osin. RT-PCR-menetelmän toimivuutta tutkittiin koulussa NucleoSpin® Boold-kitillä puhdistetuista opiskelijänäytteistä, joiden genotyyppi ei ollut tiedossa. Opiskelijänäytteet oli eristetty aiemmin, bioanalytiikan koulutusohjelman *Molekyylibiologian perusteet ja perusmenetelmät* -kurssin aikana. Ennen opinnäytetyön kokeellista osuutta opiskelijoilta pyydettiin kirjallinen suostumus DNA-näytteiden käyttöön. Näytteistä mitattiin DNA:n puhtaus ja konsentraatio. DNA:n konsentraation perusteella laskettiin PCR-reaktioon tarvittava DNA-näytteen tilavuus. Menetelmän optimoinnissa käytettävä DNA-konsentraatio oli Bácsin ym. (2008) mukaisesti noin 50 ng/μl.

6.2 Master mix

Master mix on yleisesti käytetty termi PCR-reaktiossa käytettävästä, usein kaupallisesta, reagenssista. Master mix sisältää reaktion kannalta välttämättömät komponentit lukuun ottamatta alukkeita, koettimia sekä DNA-templaattia. Tyypillisesti master mix sisältää passiivisen referenssin, DNA-polymeraasin, puskurin, deoksinukleotidejä (dNTP:itä) sekä magnesiumkloridia (MgCl₂). (Edwards & Logan 2009, 86.) Tässä työssä master mixinä käytettiin Thermo Fisher Scientificin TaqPath ProAmp Master Mixiä. Kyseinen

master mix sisältää passiivisen referenssin ROX™, Dual-Lock™ Taq DNA-polymeraasia, dNTP:itä, dUTP:tä, UNG:tä sekä puskuria. (TaqPath ProAmp Master Mixes 2016, 5.) Opinnäytetyössä menetelmän optimoinnissa käytettiin valmistajan suosituksen mukaisesti tilavuutta 12,5 µl (TaqPath ProAmp Master Mixes 2016, 9).

Passiivista referenssiväriä käytetään RT-PCR-reaktioissa normalisoimaan reaktiossa esiintyviä fluoresenssin vaihteluita eri reaktiokaivojen välillä. ROX normalisoi esimerkiksi lämpötilojen ja näytevolyymien eroista tai näyteputkien optisista ominaisuuksista johtuvia fluoresenssivaihteluita eri reaktiokaivojen välillä. ROX ei kuitenkaan itsessään vaikuta PCR-reaktioon. (Lee ym. 2009, 31.)

Reaktiossa käytetään ns. hot-start-mekanismia, jolloin DNA-polymeraasi aktivoituu vasta korkeassa lämpötilassa. Dual-Lock™ Taq DNA Polymeraasi hyödyntää kahden hot-start-mekanismien yhdistelmää. Kahden hot-start-mekanismien käyttö estää polymeraasin aktivoitumista alhaisissa lämpötiloissa, ja estää siten myös epäspesifistä monistumista. Polymeraasi aktivoituu 95 °C:ssa. (TaqPath ProAmp Master Mixes 2016, 17.)

Lämpöön reagoiva urasiili-DNA-glykosylaasi (UNG) estää ns. carry over -ilmiön. UNG on aktiivinen huoneenlämmössä ja inaktivoituu korkeassa lämpötilassa ensimmäisen denaturaatio-vaiheen aikana. (TaqPath ProAmp Master Mixes 2016, 17.)

6.3 Alukkeet ja koettimet

Opinnäytetyöhön käytettävät alukkeet ja koettimet tilattiin Metabion International AG:lta. Alukkeet ja koettimet suunniteltiin referenssiartikkelin (Bácsi ym. 2008) pohjalta. Alukkeet toimitettiin lyofilisoituneessa muodossa, joten ennen pipetoinnin aloittamista ne liuotettiin nukleasivapaaseen veteen, konsentraatioon 10 µmol/l. Koettimet olivat valmiiksi liukoisessa muodossa, konsentraatiossa 100 µmol/l.

Koettimet on leimattu 5'-päästä fluorensioivalla leimalla ja 3'-päästä sammuttajaleimalla. T-alleelia tunnistava koetin on leimattu Yakima Yellow-leimalla, joka emittoi samalla aallonpituudella kuin Applied Biosystems'in yleisesti käyttämä VIC-leima. C-alleelia tunnistava koetin on leimattu 6-FAM-leimalla. Molempien koettimien sammuttajaleimana on BHQ-1 (eng. *black hole quencher*). Koettimet ovat 22 emäsparin (eng. *base pair, bp*) pituiset.

BHQ-1:n absorbanssiaallonpituus on enintään 534 nm ja tehokas absorbanssialue 480–580 nm. Se on suositeltava sammutin liitettäväksi fluoresoivien väriaineiden kanssa, jotka emittoivat näkyvällä alueella (519–556 nm) heijastavan vihreän tai keltaisen osan. Tämän väriainejoukon emissiospektrit ylittävät riittävästi BHQ-1:n absorbansspektrensä, jotta jälkimmäinen voisi sammuttaa edellisen fluoresenssin korkealla tehokkuudella. (Gene Link™ n.d.)

Koettiin on liitetty 3'-päähän ZNA-4-molekyylä, joka tehostaa koettimen hybridisaatiota ja affiniteettia kohdejuosteeseen. ZNA-koettimien toiminta perustuu negatiivisesti varautuneiden nukleiinihappojen välisen hylkimisvoiman vähentämiseen. ZNA-koettimen negatiivista varausta on pienennetty konjugoimalla oligonukleotidiin kationisia yksiköitä (Z) eli spermiinijohdannaisia, joilla on positiivinen varaus. ZNA-koettimet soveltuvat hyvin SNP-analyysiin, koska ZNA lisää spesifisyyttä ja sensitiivisyyttä kohdesekvenssin tunnistuksessa. (Moreau ym. 2009; Polyplus transfection n.d.)

6.4 Kontrollit

RT-PCR-ajossa on aina oltava mukana negatiivinen kontrolli (Edwards & Logan 2009, 90). Negatiivisissa kontrollissa on DNA-templaatin sijasta vastaava tilavuus nukleaasivapaata vettä. Negatiivisen kontrollin avulla voidaan varmistua reagenssien puhtaudesta. Negatiivisissa kontrolleissa ei tule tapahtua monistumista PCR-ajon aikana. (TaqPath ProAmp Master Mixes 2016, 12.)

Opiskelijanäytteiden mittaauksessa käytettiin positiivina kontrolleina Fimlab Laboratoriot Oy:ltä saatuja näytepooleja, sekvensseiltään C/C1, C/T1 ja T/T1, sekä kahta negatiivista kontrollia. Positiivisten kontrollien avulla koestusvaiheessa pystytään seuraamaan koettimien ja alukkeiden toimivuutta. Tunnettujen genotyyppien sijoittuminen hajontakaaviossa on tunnettu, jolloin kyetään varmistamaan analysaattorin kyky erotella eri genotyypit oikein.

7 MENETELMÄN KOESTUS

Koestusprosessin keskeisenä tavoitteena on menetelmän toimivuuden toteaminen. Toimivaksi todettua menetelmää voidaan jatkossa optimoida edelleen. Koestusprosessin edessä voidaan tarpeen mukaan tehdä muutoksia reagenssien konsentraatioihin sekä reaktio-olosuhteisiin. Ensimmäisen ajon pohjalta suunniteltiin koestusprosessi ja sen sisältämät lisäajot. Kaikki vaiheet dokumentoitiin tarkasti, jolloin tuloksia pystyttiin vertailemaan. Vertailun kohteena tässä tapauksessa olivat erilaiset koetin- ja alukekonsentraatiot.

7.1 Koestusprosessi

RT-PCR-ajojen syklien kestot ja lämpötilat olivat kaikissa ajoissa vakiot (Taulukko 2). Koestusprosessi koostui neljästä erillisestä RT-PCR-ajosta, joissa testattiin erilaisia koetin- ja alukekonsentraatioita (Taulukko 3). Koestusvaiheessa jokaisessa ajossa käytettiin kahta negatiivista kontrollia. Näytepooleja oli kuusi, kaksi kustakin genotyypistä. Näytteet olivat genotyypiltään tunnettuja (C/C, C/T, T/T). Ensimmäisessä ajossa käytettiin kaikkia kuutta näytepoolia. Seuraavassa kolmessa ajossa käytettiin kustakin genotyypistä vain toista näytepoolia.

TAULUKKO 2. RT-PCR-ajon vaiheet

Vaihe	Lämpötila °C	Aika
Pre-Read	60	30 s
Alkudenaturaatio/entsyymiaktivaatio	95	5 min
Denaturaatio	95	15 s
Alukkeiden kiinnitys/ pidennys	60	60 s
Post-Read	60	30 s

PCR-sykliä suunniteltiin TaqPath™ProAmp™Master Mix, Genotyping -ohjeen mukaisesti. PCR-ajon ensimmäisessä (eng. *pre-read*) vaiheessa UNG-entsyymi aktivoituu. Tämä on fluoresenssia tuottamaton vaihe ja tapahtuu vain kerran ajon alussa. Ajon ensimmäisessä syklissä tapahtuu alkudenaturaatio sekä DNA-polymeraasin aktivaatio. Denaturaatiovaiheessa DNA-juosteet avautuvat, minkä jälkeen seuraa alukkeiden kiinnitty-

misvaihe sekä pidennysvaihe, jonka aikana tuotetaan kopio malli-DNA:sta. Denaturaatiovaihe ja alukkeiden kiinnitysvaiheet seuraavat toisiaan. Näitä vaihetta toistetaan noin 40 kertaa PCR-ajon aikana. (TaqPath ProAmp Master Mixes 2016, 10.)

Ensimmäisen ajon tavoitteena oli testata menetelmän toimivuutta. Ensimmäisen ajon konsentraatiot, alukekonsentraatio 0,9 μM ja koetinkonsentraatio 0,2 μM , perustuvat referenssiartikkeliin (Bácsi ym. 2008). Ensimmäinen ajo antoi suunnan seuraavien ajojen suunnitteluun. Seuraavien ajojen tarkoituksena oli tutkia, mitkä ovat matalimmat mahdolliset toimivat aluke- ja koetinkonsentraatiot. Seuraavat ajot suunniteltiin huolellisesti ja niistä tehtiin tarkat muistiinpanot. Taulukossa 3 on nähtävissä ajoissa käytetyt konsentraatiot. Ajot suunniteltiin siten, että kussakin ajossa oli vain yksi muuttuja, jolloin pystyttiin toteamaan konsentraatiomuutoksen vaikutus kyseisen analyysin osalta.

TAULUKKO 3. Ajo-kohtaiset koestuskonsentraatiot

Ajo	Aluke μM	Koetin μM
1	0,9	0,2
2a	0,9	0,05
2b	0,9	0,1
3a	0,2	0,2
3b	0,2	0,1
4	0,2	0,2

Toisessa ajossa konsentraatioita muokattiin koettimien osalta. Koettimet tuottavat fluoresenssin, ja koestuksessa haluttiin löytää matalin mahdollinen toimiva koetinkonsentraatio. Alukekonsentraatio säilytettiin 0,9 μM . Neljässä koestusnäytteessä koetinkonsentraatio laskettiin 0,1 μM ja neljässä koestusnäytteessä koetinkonsentraatio oli 0,05 μM . Kolmannessa ajossa alukekonsentraatio laskettiin 0,2 μM , ja koetinkonsentraatio oli neljässä koestusnäytteessä alkuperäinen 0,2 μM sekä neljässä 0,1 μM . Neljännessä ajossa alukekonsentraatio oli 0,2 μM ja koetinkonsentraatio 0,2 μM . Mukana oli 2 negatiivista kontrollia, yhdet positiiviset kontrollit kustakin genotyypistä sekä yksitoista tuntematonta näytettä.

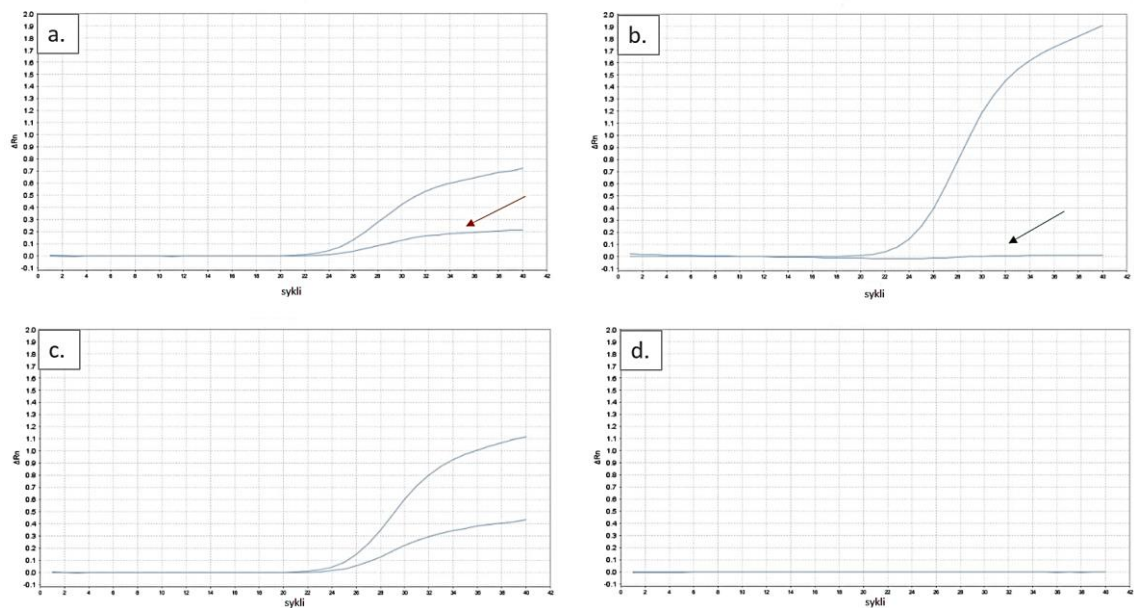
7.2 Koestusprosessin tulokset

Ensimmäisen ajon jälkeen voitiin todeta RT-PCR-reaktion toimivan hyvin. Analysaattori erotteli näytteiden genotyypit omiksi pistejoukoikseen ja tunnisti genotyypit oikein, eikä negatiivisissa kontroleissa tapahtunut monistumista. Koska fluoresenssin kasvu oli merkittävää, lisäajoja päätettiin tehdä matalammilla aluke- ja koetinkonsentraatioilla. Alukeiden ja koettimien matalimpien toimivien konsentraatioiden määrittäminen on tärkeää resurssien säästämiseksi. Konsentraatioiden on kuitenkin oltava riittävällä tasolla, jotta menetelmä toimii hyvin ja palvelee siten opetuskäytössä. Master mixin suosituslämpötilat ja -ajat toimivat hyvin, joten niitä ei muutettu koestusprosessin aikana. DNA-konsentraation laskemiseen ei nähty perusteita, sillä laskimoverinäytteestä kerättävää näyttemateriaalia on helppo saada ja se sisältää paljon DNA-materiaalia. DNA-konsentraation muutokset eivät vaikuta kustannuksiin, jolloin tässä vaiheessa oleellisempaa on aluke- ja koetinkonsentraatioiden optimointi.

Tuloksia tulkittaessa on otettava huomioon, että vaikka käytetään samoja näytteitä, on tehty eri ajokerroilla. Tästä syystä tulokset ovat suuntaa antavia. Edwardsin ja Loganin (2009, 88) mukaan koestusajossa tulisi valita se koetinkonsentraatio, jossa on alhaisin CT-arvo ja korkein fluoresenssisignaali. Taulukossa 5 (liite 1) on nähtävissä koestusajojen ΔRn - ja CT-arvot. Taulukon arvoja vertaillen voitiin todeta, että alukekonsentraation muutoksilla on vähäisempi vaikutus lopputulokseen kuin koetinkonsentraatiolla. Matalilla koetinkonsentraatioilla fluoresenssin määrä oli riittämätön luotettavan tuloksen saamiseksi. Ajojen 3a ja 4 tulokset on tehty valituilla konsentraatioilla, arvot näkyvät taulukossa 5 (liite1).

T-koettimen osalta havaittiin epäspesifistä monistumista. Negatiivisten kontrollien kohdalla ei havaittu fluoresenssia, jolloin tulokset ovat siltä osin luotettavia. C-koetin tuottaa matalamman fluoresenssin kuin T-alleeli. Kuviossa 7 on nähtävissä fluoresenssin kasvu kontrollinäytteiden osalta ajossa 4.

Kuvion 7 kuvaajassa a. on esitetty positiivisen kontrollin C/C kuvaaja. Nuolen osoittamassa kohdassa voidaan havaita T-koettimen tuottamaa epäspesifistä monistumista. Lisäksi C-koetin tuottaa odotetusti fluoresenssia. Kuvion 7 kuvaajassa b. on esitetty positiivisen kontrollin T/T kuvaaja. Nuolen osoittamassa kohdassa ei ole havaittavissa C-koettimen tuottamaa monistumista. T-koetin tuottaa fluoresenssia odotetusti. Kuvion 7 kuvaajassa c. on esitetty heterotsygoottigenotyypin C/T kuvaaja. Kuvaajassa on nähtävissä molempien koettimien spesifistä monistumista ja siten fluoresenssin kasvu molempien koettimien osalta. Kuvion 7 kuvaajassa d. on esitetty negatiivisen kontrollin kuvaaja. Negatiivisen kontrollin kohdalla ei ole tapahtunut monistumista.



KUVIO 7. Genotyyppien C/C, T/T, C/T positiivisten kontrollien sekä negatiivisen kontrollin amplifikaatiokuvaajat.

8 OPINNÄYTETYÖN TAVOITE, TARKOITUS JA MENETELMÄ

Opinnäytetyön tavoitteena on molekyylibiologian opetusmenetelmien monipuolistaminen Tampereen ammattikorkeakoulussa. Uuden menetelmän tuominen työhjeineen opetuskäyttöön valmistaa opiskelijoita kohti työelämää. Opinnäytetyö on laadultaan toiminnallinen, sillä työn tuloksena on työhje ja käyttöohje opetuskäyttöön.

8.1 Opinnäytetyön tavoite ja tarkoitus

Opinnäytetyön tavoitteen saavuttamisen myötä Tampereen ammattikorkeakoulun opetuslaboratoriossa käytettävissä olevaa RT-PCR-analysaattoria on mahdollista hyödyntää enemmän myös bioanalytiikan koulutusohjelmassa, ja opinnäytetyön osana laadittuja työhjeita voidaan käyttää opetuskäytössä. Bioanalytiikan opiskelijat hyötyvät opiskelujen aikana tapahtuvasta RT-PCR-laitteen käyttöön tutustumisesta sekä laitteen perusteiden tuntemisesta, koska RT-PCR:ään perustuvia työmenetelmiä käytetään ja tullaan yhä enenevässä määrin käyttämään työelämässä. Laktoosi-intoleranssin määrittämiseen käytetään kyseistä menetelmää Suomessa useissa eri laboratorioissa.

Opinnäytetyön tarkoituksena on luoda menetelmä ja laatia käyttöohje RT-PCR-laitteen käyttöön sekä työhje laktoosi-intoleranssiin liittyvän pistemutaation määrittämiseksi. Tampereen ammattikorkeakoulun Applied Biosystems StepOnePlus™ Real-Time PCR-laitte ei aiemmin ole ollut bioanalytiikan koulutusohjelman käytössä. Aiemmin laktoosi-intoleranssiin liittyvä pistemutaatio on määritetty vain perinteisellä PCR-menetelmällä, ja nyt tarkoituksena on tuoda rinnalle myös RT-PCR-menetelmä.

8.2 Toiminnallinen opinnäytetyö

Toiminnallinen opinnäytetyö koostuu usein opinnäytetyön raportin lisäksi erillisestä tuotoksesta, joka voi olla koulutusohjelmasta ja opinnäytetyöaiheesta riippuen esimerkiksi perehdyttämisopas, ohjeistus tai opas. Opinnäytetyöprosessin tuloksena syntyvä tuotos on parannus aiempaan vastaavaan tuotokseen tai lopputuloksena voi syntyä myös aivan

uusi tuotos. (Salonen 2013, 9.) Toiminnallisen opinnäytetyön tavoitteena on kehittää, ohjeistaa, järjestää tai järjeistää käytännön ammatillista toimintaa. Toiminnallisen opinnäytetyön tuotoksen tulee pohjautua teoreettiselle tiedolle, jonka tulee ilmentyä opinnäytetyön raporttiosion teoreettisessa viitekehyksessä. (Virtuaaliammattikorkeakoulu 2006.)

9 TYÖOHJE

Tämän opinnäytetyön osana laaditaan kaksi erillistä työohjetta: käyttöohje RT-PCR-laitteelle sekä työohje laktoosi-intoleranssiin liittyvän geenin määrittämiseen. Ohjeet toimivat osana molekyylibiologiankurssin opetusta. Käytännön laboratorioharjoittelutyön kautta opiskelija voi hyödyntää oppimaansa teoretista tietoa konkreettiseen laboratoriotyöhön. Tässä luvussa käsitellään työohjeen tekemisessä huomioitavia teoreettisia lähtökoh- tia sekä käsitellään opinnäytetyön osana syntyneitä ohjeita.

9.1 Työohjeiden laadinnassa huomioon otettavia asioita

Hyvässä työohjeessa on tärkeää huomioida kohderyhmä ja käyttää tarkoituksenmukaista kirjoitustyyliä, joka puhuttelee kyseistä kohderyhmää. Työohjetta suunniteltaessa on otet- tava huomioon työohjeen käyttäjien ikä, asema ja aiempi tietämys aiheesta. Työohjeen käyttötarkoitus ja siihen liittyvät erityistarpeet on otettava huomioon suunnittelussa ja to- teutuksessa. (Vilkkä & Airaksinen 2004, 129.) Johdannolla on pyritty selventämään luki- jalle työn tarkoitus ja herättämään mielenkiinto tulevaa harjoitustyötä kohtaan (Repo & Nuutinen 2005, 138). Hyvä työohje etenee johdonmukaisesti, jolloin sitä on helppo nou- dattaa ja tarvittava tieto löytyy helposti. Se sisältää sopivassa suhteessa tietoa, jolloin tar- vittava tieto löytyy nopeasti eikä se vie liikaa aikaa työn tekemiseltä. Hyvä työohje sisäl- tää riittävästi informaatiota, mutta toisaalta siinä ei ole työn suorittamisen kannalta mer- kityksetöntä tietoa, joka vaikeuttaa ohjeiden ymmärtämistä. Tiedon on oltava ajantasaista, paikkansa pitävää sekä kirjallisessa muodossa. (Highet, 2008.)

Hyvässä työohjeessa on huomioitu käyttäjän tarpeet ja kyvyt. (SFS-EN 82079-1, 26). Työohjeen laadinnassa otetaan huomioon erilaiset oppimistyyli- t, eli erilaiset keinot ja ta- vat, joilla ihminen oppii helpoimmin uusia asioita (Prashing 2000, 107; Repo & Nuutinen 2005, 42). Kirjallisia ohjeita havainnollistetaan kuvilla, jolloin myös erilaiset oppimis- tyyli- t otetaan paremmin huomioon (Kauppila 2004, 59). Kuvat ja taulukot edesauttavat sanallisten ohjeiden ymmärtämistä. Kuvat toimivat tekstisisältöä tukevana, havainnollis- tavana ja täydentävänä tekijänä. Kuvat esittävät tietyt työ- ja käyttöohjeissa esitetyt asiat selkeämmin kuin teksti. (Pesonen 2007, 48–49). Työohjeiden ulkoasun on oltava selkeä, yhtenäinen ja johdonmukainen. Ohjeissa pyritään käyttämään selkeitä ja yksinkertaisia

ilmaisuja. Lyhyet ja käskymuotoiset lauseet ovat helpommin ymmärrettäviä. (Repo & Nuutinen 2005, 139.) Käyttöohjeita laadittaessa voidaan hyödyntää esimerkiksi käytettävyydestä. Käytettävyydestä tavoitteena on uusien käyttöohjeiden kehittäminen, käyttöohjeiden toimivuuden testaus sekä ymmärrettävyyden testaus. Menetelmän etuina ovat tulosten luotettavuus ja epäkohtien nopea havaitseminen. Haittana on tulosten tilastollinen todentaminen luotettavasti. (SFS-EN 82079-1 2012, 98, 100.)

9.2 Opinnäytetyön osana toteutettavien ohjeiden laadinta

Ohjeet laadittiin Microsoft Word -tekstinkäsittelyohjelmalla sekä Microsoft Paint -kuvankäsittelyohjelmalla. Erilliset työvaiheet numeroitiin ja sijoitettiin omille sivuilleen ohjeiden luettavuuden parantamiseksi. Ulkoasun suunnittelussa huomioitiin tulostukseen liittyviä yksityiskohtia. Työohje on mahdollista tulostaa mustavalkoisena. Ohjeiden ulkoasut eroavat toisistaan käyttötarkoitustensa vuoksi. Käyttöohje RT-PCR-laitteelle sijoitetaan laitteen läheisyyteen, yhteiseen käyttöön, eikä sitä jaeta opiskelijoille. Jokainen opiskelija tulostaa oman version työohjeesta harjoitustunnille. Ohjeet suunniteltiin tukemaan itsenäistä työskentelyä.

Ohjeiden toimivuutta testattiin testiryhmän avulla. Testiryhmä koostui bioanalytiikan opiskelijoista, jotka ovat aiemmin suorittaneet molekyylibiologian peruskurssin. Testipäivänä havainnoitiin opiskelijoiden toimintaa, minkä pohjalta ohjeisiin tehtiin tarvittavia tarkennuksia ja korjauksia. Opiskelijoilta kerättiin lisäksi testipäivän aikana vapaamuotoisesti huomioita sekä korjausehdotuksia ohjeisiin. Käyttöohje palautetaan tulostettuna ja kansitettuna toimeksiantajan edustajalle. Työohje palautetaan sähköisessä muodossa, jolloin se on mahdollista jakaa opiskelijoille kurssin aikana.

10 POHDINTA

Opinnäytetyön tarkoituksena oli luoda työohje laktoosi-intoleranssiin vaikuttavan geenin *MCM6* intronissa esiintyvän pistemutaation genotyyppitykseen. Edellytyksenä tälle oli toimivan ja luotettavan RT-PCR-menetelmän luominen SNP C/T-13910:n tutkimiseksi Tampereen ammattikorkeakoulun bioanalytiikan koulutusohjelman käyttöön. Menetelmän käyttöönotto opetuksessa monipuolistaa edelleen bioanalytiikan koulutusohjelman opetusmenetelmiä Tampereen ammattikorkeakoulussa.

Uuden menetelmän pystyttäminen vaatii huolellista esityötä. Lähdeaineistona käytiin läpi tieteellisiä artikkeleita, joissa käsiteltiin laktoosi-intoleranssin tutkimista reaaliaikaisella PCR-menetelmällä. Useiden lähteiden joukosta valittiin yksi tieteellinen artikkeli, joka toimii referenssiartikkelina. Lähdeaineiston pohjalta suunniteltiin käytettävät materiaalit sekä työsuorituksen vaiheet. Yhtenä vaihtoehtona oli käyttää kaupallisia reagenssikittejä, joissa kaikki tarvittavat reagenssit ovat käyttövalmiina ja valmiiksi optimoiduissa konsentraatioissa. Valmiiden kaupallisten aluke- ja koetinseosten sijaan päädyttiin tilaamaan referenssiartikkelin pohjalta suunnitellut alukkeet ja koettimet. Menetelmäksi valikoitui hydrolyysikoettiin pohjautuva menetelmä. Spesifisyyden lisäksi valintaa puolsi myös se, että työelämässä kyseisen SNP:n tutkimiseen käytetään tätä samaista menetelmää minisekvensoinnin ohella (Fimlab Laboratoriot Oy 2018; HUSLAB-liikelaitos 2017a). Master mix tilattiin valmiina reagenssiseoksena. Kaupallisen master mix -reagenssiseosten käyttö on vakiintunut käytäntö. Kaupalliset master mixit ovat kustannustehokkaita sekä toimiviksi testattuja eivätkä siten vaadi optimointia.

Lähteiden luotettavuus pyrittiin varmistamaan etsimällä vastaava tieto useammasta lähteestä ja valitsemaan mahdollisimman uusia lähteitä työssä käytettäväksi. Merkittävä osa koko opinnäytetyöprosessia oli erilaisiin lähdeaineistoihin tutustuminen. Menetelmä itsessään on ollut käytössä jo useita vuosia, joten kovin uusia lähteitä ei menetelmästä ole helppo löytää. Menetelmän peruseriaatteet on julkaistu jo vuosia sitten. Tärkeänä osana työn onnistumista on ollut yhteistyö Fimlab laboratoriot Oy:n asiantuntijoiden kanssa. Opinnäytetyöprosessin alkuvaiheessa seurattiin kliinisessä laboratoriossa tehtäviä RT-PCR-tutkimuksia. Opinnäytetyöprosessin kannalta oli hyödyllistä havainnoida, mitä asioita on huomioitava RT-PCR:llä tehtävissä analyyseissä.

Geenitutkimuksia tehtäessä on otettava huomioon eettinen näkökulma, sillä muutokset genomissa ovat pysyviä ja geenitutkimuksista saatava tieto voi muuttaa henkilön ja tämän läheisten elämää dramaattisesti. Tieto alttiudesta perinnölliseen sairauteen voi vaikuttaa elämään monella tavalla. Se voi tuoda huolta omasta terveydentilasta ja vaikuttaa esimerkiksi raskaussuunnitelmiin. Laktoosi-intoleranssin liittyvän genotyypin määrittäminen valikoitui opiskelijatyöksi, sillä usein henkilöllä on jo tiedossa saako hän oireita maidosta eikä oman genotyypin määrittäminen välttämättä vaikuta dramaattisesti arkielämään. Tämän tyyppinen tutkimus sopii siten tehtäväksi myös koulumaailmassa. Tässäkin tapauksessa muutokset genomissa ovat pysyviä, joten samat eettiset haasteet liittyvät myös kyseiseen genotyypitykseen. Työn varsinainen merkitys opiskelijoille on reaaliaikaiseen PCR-menetelmään tutustuminen käytännössä sekä siihen liittyvien tekniikoiden oppiminen. Näytteet tulisi tutkia anonymisti, jolloin eettiset näkökulmat huomioidaan asianmukaisesti, sillä opiskelijoille ei ole tarjota perinnöllisyysneuvontaa (Yleissopimus 2010/24). Geenikeskustyöryhmän arviomuistion (2017, 7–8) mukaan yksilön tunnistus yksittäisen tutkitavan geenin tai geeniosan avulla voi olla vaikeaa väestötasoisessa otannassa. Kuitenkin opiskelijaryhmä on henkilömäärältään pieni, jolloin tulos voidaan helpompi yhdistää yksittäiseen opiskelijaan. Tämä näkökulma osaltaan puoltaa sitä seikkaa, että näytteet tulisi tutkia anonymisti, jolloin huomioidaan myös opiskelijoiden yksityisyydensuoja.

Ensimmäinen testiajo suunniteltiin referenssiartikkelin pohjalta. Lähtökohtana oli tilanne, jossa ei voitu ennakkoon tietää, toimiiko menetelmä valituilla materiaaleilla ja saadaanko analyysistä oikeansuuntaisia tuloksia. Ensimmäinen ajo onnistui hyvin. Tämä mahdollisti koestusprosessin sisällyttämisen opinnäytetyöaikatauluun. Menetelmä haluttiin viedä kohti optimoidumpaa lopputulosta. Materiaalikulujen minimoimiseksi oli perusteltua lähteä tekemään lisäajoja, jotta saataisiin selville matalimmat mahdolliset aluke- ja koetinkonsentraatiot, joilla menetelmä vielä toimisi hyvin. Konsentraatiomuutosten vaikutusten havainnoimiseksi tehtiin koestussuunnitelma, jonka mukaan työskentelyssä järjestelmällisesti edettiin. Luotettavuuden varmistamiseksi koko prosessin ajan pidettiin laboratorio-päiväkirjaa, johon kirjattiin tarkasti ylös kaikki tehdyt työvaiheet ja tulokset. Huolellinen dokumentointi opinnäytetyöprosessin kaikissa sen eri vaiheissa oli hyödyllistä koko opinnäytetyön kannalta. Dokumentointi helpotti tulosten vertailua sekä työ- ja käyttöohjeiden laadinnassa huomioon otettavien yksityiskohtien suunnittelua ja huomiointia.

Koestuksessa käytettiin genotyypiltään tunnettuja näytteitä. Kunkin genotyypin näytteet sijoittuivat oikein hajontakaavioissa, jolloin kyettiin toteamaan yksittäisten ajojen onnistuminen. T-alleelille spesifisen koettimen kohdalla havaittiin epäspesifistä monistumista, jolloin fluoresenssin nousua nähtiin myös C/C-genotyypin näytteissä. Optimoimalla menetelmää sekä koettimia ilmiöstä tulisi pyrkiä eroon. DNA-konsentraatiota ei muutettu alkuperäisestä 50 µg/ml. RT-PCR-analysaattorin ja master mixin valmistajan mukaan menetelmä toimisi myös pienemmillä DNA-konsentraatioilla (TaqPath ProAmp Master Mixes 2016, 8). DNA-konsentraatiota ei lähdetty muuttamaan alkuperäisestä muiden reagenssien rajallisen määrän vuoksi. Edwardsin & Loganin (2009, 89) mukaan suuri DNA-konsentraatio voi inhiboida reaktiota ja toisaalta pieni määrä voi vaikeuttaa havaitsemista. Menetelmä toimi hyvin myös suuremmalla DNA-konsentraatiolla eikä siinä havaittu DNA:n aiheuttavan inhibitiota.

Koestusprosessin seurauksena päädyttiin laskemaan alukkeiden konsentraatiota alkuperäisestä. Menetelmä todettiin toimivaksi Bácsin ym. (2008) artikkelissa esitettyä pienemmällä alukekonsentraatiolla. Matalampi alukekonsentraatio tuo jatkossa säästöjä materiaalikustannuksiin. Valitulla konsentraatiolla fluoresenssia syntyy riittävästi, ja analysaattori kykenee erottelemaan eri genotyypit oikein. Menetelmän tarkempi optimointi vaatisi suuren määrän ajoja sekä reagensseja. Kattavaa optimointia ei ollut tarkoituksenmukaista toteuttaa osana tätä opinnäytetyötä. Lopuksi valituilla konsentraatioilla tehtiin yksi lisäajo suuremmalla näytemäärällä. Ajon näytemäärä vastasi opiskelijoiden kurssilla käyttämää näytemäärää. Opinnäytetyötä varten ei tarvittu verinäytteenottoa, sillä siinä hyödynnettiin olemassa olevia, opiskelijoiden aiemmin eristämiä DNA-näytteitä. Opiskelijoilta pyydettiin kirjallinen suostumus näytteiden käyttämiseksi. Opiskelijanäytteitä käsiteltiin anonyymisti eikä niitä voida yhdistää yksittäisiin henkilöihin. Näytteet numeroitiin ja näytteitä käsiteltiin tämän jälkeen vain numeroin.

Reaaliaikaisen PCR-menetelmän teoriatietoon tutustuminen oli oleellinen osa tätä työtä. Analysaattorin käytön sekä menetelmän periaatteiden ymmärtämiseksi oli syvennyttävä monipuolisesti lähdeaineistoon. Koestusprosessin aikana tutustuttiin analysaattorin käyttöön. Todettiin, että menetelmää varten laadittavan työohjeen lisäksi analysaattorille tulisi tehdä oma erillinen käyttöohje. Nämä kaksi ohjetta muodostaisivat kokonaisuuden, jota voitaisiin paremmin hyödyntää opetuskäytössä. Analysaattorin alkuperäinen käyttöohje on hyvin laaja ja yksityiskohtainen sekä sisältää paljon tämän menetelmän kannalta epä-

oleellista tietoa. Lisäksi alkuperäinen käyttöohje on englanninkielinen, joten oli tarpeellista tehdä suomenkielinen käyttöohje, jotta analysaattorin sujuva käyttö opetustilanteessa olisi mahdollista. Käyttöohjeesta tehtiin selkeä ja jäsenelty kokonaisuus, joka sisältää menetelmän kannalta oleellisen tiedon. Analysaattorin toimintaa ja tuloksia ohjataan tietokoneohjelmalla. Käyttöohjetta laadittaessa pyrittiin huomioimaan opiskelijoiden erilaiset tietokoneen käyttötaidot. Tavoitteena oli tehdä ohjeista niin selkeät, että vähemminkin tietokoneita käyttäneet opiskelijat pystyisivät melko itsenäisesti käyttämään analysaattoria. Analysaattorin käyttöohje sisältää runsaasti tekstiä selventäviä kuvia, jotka osaltaan tekevät käyttöohjeesta helppokäyttöisen sekä ymmärrettävän.

Koestusprosessin aikana kirjattiin laboratoriopäiväkirjaan työ- ja käyttöohjeen laatimisen kannalta tärkeitä huomioita, joita hyödynnettiin ohjeiden laadinnassa. Työohjeen toimivuuden varmistamiseksi päätettiin järjestää opetustilannetta jäljittelevä tilaisuus, jossa alan opiskelijat suorittivat työn työohjeella. Tämä tapa testata työohjeen toimivuutta osoittautui erinomaiseksi keinoksi saada tuotoksesta palautetta ja tehdä huomioita ohjeen kehittämiseksi. Testipäivän ansiosta ohjeista oli mahdollista muokata opetuskäyttöön paremmin soveltuva kokonaisuus. Kun ohjeita tulivat testaamaan opiskelijat, jotka eivät olleet aiemmin kyseistä menetelmää ja analysaattoria käyttäneet, pystyttiin havaitsemaan puutteet ja tarkennusta vaativat kohdat ohjeissa. Näiden huomioiden pohjalta ohjeet muokattiin lopulliseen muotoonsa. Ohjeiden parannusehdotusten lisäksi saatiin harjoitusta opiskelijoiden ohjaamisesta työtilanteissa.

Tämän opinnäytetyön osana olevien ohjeiden suunnittelussa huomioitiin ohjeen käyttöympäristö sekä kohderyhmänä olevat opiskelijat ja heidän osaamistasonsa. Työohjeissa huomioitiin erot opiskelijoiden tietotaidoissa. Erilaisia oppimistyyplejä tukevat ohjeita havainnollistavat ja tehostavat kuvat, taulukot sekä teoriapohjainen tieto laktoosi-intoleranssiin liittyvästä SNP:stä. Työohjeen johdanto-osio johdattelee opiskelijat aiheeseen ja antaa tietoa työn suorittamisen pohjaksi. Olennaisena oppimisprosessin osana työohjeeseen on sisällytetty laskutehtäviä analyysissä tarvittavien reagenssikonsentraatioiden määrittämiseksi. Mekaanisen suorittamisen lisäksi ohjeet pyrkivät luomaan oppimis- ja oivaltamishetkiä opiskelijoille. Ohjeet on koostettu siten, että ne yhdessä kattavat keskeisimmät menetelmän vaiheet ja antavat mahdollisuuden syventää tietoa. Ulkoasun suunnittelussa huomioitiin tulostukseen liittyviä yksityiskohtia, jotta ohjeet olisivat mahdollisimman hyvälaatuisia sekä selkeälukuisia myös tulostettuina. Tulostuslaatu on otettava

huomioon, sillä kontaminaatioriskin vuoksi laboratoriossa suositellaan käytettäväksi paperisia työohjeita. Käyttöohjeeseen sisällytetään runsaasti värillisiä kuvia helpottamaan laitteen käyttöä sekä havainnollistamaan tekstiä. Jokaisen vaiheen kohdalla ohjeeseen pyrittiin laittamaan riittävä, mutta toisaalta vain oleellinen tieto, jolloin ohjeen käytöstä tulee sujuvaa. Laadukkaan lopputuloksen kannalta oli tärkeää hyödyntää tekstin- ja kuvankäsittelyohjelmia monipuolisesti.

Opinnäytetyön tavoite sekä tarkoitus saavutettiin, sillä menetelmä otettiin käyttöön osana bioanalytiikan koulutusohjelmaa, molekyylibiologian kurssilla jo opinnäytetyöprosessin aikana. Menetelmä ja ohjeet on todettu opetuskäyttöön soveltuviksi. RT-PCR-menetelmä tuo opiskelijoille konkreettisesti esille sen, miten tärkeää oikeat työtavat, ohjeiden tarkka noudattaminen sekä huolellisuus ovat bioanalytiikon työssä. Mahdolliset kontaminaatiot tulevat tämän kaltaisissa harjoitustöissä herkästi esille. Pipetoitaessa pieniä määriä huolellisuus ja hyvä pipetointitaito korostuvat. Tämän menetelmän opiskelu käytännössä harjaannuttaa myös tältä osin opiskelijoita kohti työelämää.

Nyt luotu toimiva menetelmä toimii pohjana jatkotutkimusaiheille. Tulevia koulutusalan opinnäytetöitä ajatellen DNA-, aalue- ja koetinkonsentraatioiden optimoinnit toimisivat hyvinä jatkotutkimusaiheina. Hyödyllinen aihe olisi menetelmän säätäminen nyt havaitun epäspesifisen monistumisen T-alleelin osalta. Mahdollisia muita tutkimusaiheita voisivat olla erilaisten kaupallisten master mixien vertailu, kaupallisten valmiiden reagenssivalmisteiden toimivuuden sekä kustannusten vertailu referenssiartikkelin pohjalta käytettyjen reagenssien kesken. Hyviä aiheita olisivat myös erilaisten virheiden esiintuominen kontrolloidusti sekä niiden vaikutuksen arvioiminen analyysin tuloksiin. Tällaisia voi olla esimerkiksi DNA-templaatin, negatiivisen kontrollin tai reaktioseoksen komponentin tai koko reaktioseoksen puuttuminen näytekäivosta. Laajemmin ajateltuna lukuisia aiheita tarjoaa RT-PCR-laitteen käytön hyödyntäminen muilla bioanalytiikan erikoisaloilla, kuten esimerkiksi mikrobiologian opetuksessa.

Olemme molemmat kiinnostuneita molekyylibiologiasta sekä uusista menetelmistä. Taruimme aiheeseen heti, kun tarjoutui mahdollisuus syventyä molekyylibiologiaan opinnäytetyön muodossa. Pääsimme itse vaikuttamaan tutkimuksen ja menetelmän valintaan sekä prosessin sisältöön. Opinnäytetyön aihe kehittyi prosessin edetessä ja aiheen rajaaminen osoittautuikin haasteelliseksi. Aihe tarjosi mahdollisuuden syventyä moneen eri

osa-alueeseen, joista jokainen olisi ollut mielestämme oleellinen ja joihin olisimme mielellämme syventyneet enemmänkin. RT-PCR-ajoista saatujen tulosten tulkinta osoittautui vaativaksi osa-alueeksi osaamis- ja koulutustasoomme nähden. Käytettävän ajan puitteissa oli haastavaa perehtyä tulosten tarkempaan analysointiin. Perehdyimme opinnäytetyön kannalta keskeisiin tuloksiin ja niiden analysointiin. Keskeisintä oli ymmärtää erot eri ajoissa nähtävissä fluoresenssin määrissä sekä oppia tulkitsemaan hajontakaaviota. Aiheen rajaamiseksi olemme raporttiosioon valinneet mielestämme keskeisimpiä aiheita työ- ja käyttöohjeen tekemiseen liittyen sekä teoreettista tietoa menetelmän ymmärtämisen tueksi. Opinnäytetyön raporttiosuus tukee työ- ja käyttöohjeen sisällön ymmärtämistä. Uuden menetelmän luominen tyhjästä on haastavaa ja työlästäkin, mutta erittäin palkitsevaa ja motivoivaa. Motivaation ohella huolellinen valmistautuminen ja syventyminen aiheeseen edesauttoi meitä onnistumisessa.

LÄHTEET

- Arya, M., Shergill, I. S., Williamson, M., Gommersall, L., Arya, N., ym. 2005. Basic Principles of real-time quantitative PCR. Julkaisussa Expert Review of Molecular Diagnostics. London. Vol 5, Iss. 2.
- Bácsi, K., Hitre, E., Kósa, J. P., Horváth, H., Lazáry, Á., Lakatos, P. L., Balla, B., Budai, B., Lakatos, P., Speer, G. 2008. Effects of the lactase 13910 C/T and calcium-sensor receptor A986S G/T gene polymorphisms on the incidence and recurrence of colorectal cancer in Hungarian population. BMC Cancer 8, 317.
- Bates, A.D., Maxwell, A. 2005. DNA topology. toinen painos. Oxford: Oxford university press.
- Campbell, M.K, Farrell, S.O. 2012, 2009. Biochemistry. 7. Painos. PreMediaGlobal.
- Deng, Y., Misselwitz, B., Dai, N., Fox, M. 2015. Lactose Intolerance in Adults: Biological Mechanism and Dietary Management. Nutrients 7(9), 8020-8035.
- Edwards, K. J., Logan, J.M.J. 2009. Performing Real-Time PCR. Teoksessa Logan, J., Edwards, K., Saunders, N. Real-Time PCR. Norfolk: Caister Academic Press.
- Exiqon. 2009. Locked Nucleic Acid (LNATM). Custom Oligonucleotides for RNA and DNA Research. Julkaistu: 08.2009. Luettu 4.3.2018.
- Fimlab Laboratoriot Oy. 2018. LAKTOOSI-INTOLERANSSI, DNA-TUTKIMUS. Luettu 21.5.2018. https://www.fimlab.fi/ohjekirja/nayta.tmpl?sivu_id=194;se- tid=6620;id=18379
- Gene LinkTM. N.d. BHQ-1 (Black Hole Quencher 1, 3'). Luettu 6.10.2017 http://www.genelink.com/newsite/products/mod_detail.asp?modid=125
- Genomikeskustyöryhmän arviomuistio. 2017. Genomilain ja genomikeskuksen valmistelu. Sosiaali- ja terveystieteiden ministeriö. Julkaistu 22.12.2017. Luettu 30.5.2018. <http://stm.fi/documents/1271139/6033514/Genomikeskustyöryhmän+arviomuistio+22+12+2017.pdf>
- Gunderson, K., Barker, D.L., Bibkova, M., Fan, J-B. 2007. Genotyping and Epigenotyping by Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Analysis. Teoksessa Loring, J.F., Wesselschmidt, R.L., Schwartz, P. H. Human Stem Cell Manual, A Laboratory Guide.
- Hartwell L. H., Goldberg M. L., Fischer J. A., Hood, L., Aquardo C. F. 2016. Genetics. From Genes to Genomes. Fifth Edition. International Edition. New York: McGraw-Hill Education.
- Hight, D. 2008. Work Instructions That Work. Julkaistu 10/2008. Luettu 22.11.2017
- Hillilä, M. 2007. Lääketieteellinen aikakausikirja Duodecim. Näin hoidan. Laktoosi-intoleranssi. Verkojulkaisu. Luettu 28.8.2017. <http://www.terveyskirjasto.fi/xmedia/duo/duo96876.pdf>

Horelli-Kuitunen, N. & Orpana, A. 2016a. Kromosomi- ja geenimuutosten laboratoriodiagnostiikka. Teoksessa Aittomäki, K., Moilanen, J. & Perola, M. (toim.) Lääketieteellinen genetiikka. Kustannus Oy Duodecim. Luettu 20.12.17. Vaatii käyttöoikeuden. www.oppiportti.fi.elib.tamk.fi

Horelli-Kuitunen, N. & Orpana, A. 2016b. Geneettisten tutkimusten yleispiirteitä. Teoksessa Aittomäki, K., Moilanen, J. & Perola, M. (toim.) Lääketieteellinen genetiikka. Kustannus Oy Duodecim. Luettu 20.12.17. Vaatii käyttöoikeuden. www.oppiportti.fi.elib.tamk.fi

Horelli-Kuitunen, N. & Orpana, A. 2016c. Geenitestauksen menetelmiä. Teoksessa Aittomäki, K., Moilanen, J. & Perola, M. (toim.) Lääketieteellinen genetiikka. Kustannus Oy Duodecim. Luettu 6.10.17. Vaatii käyttöoikeuden. www.oppiportti.fi.elib.tamk.fi

HUSLAB-liikelaitos. 2017a. Laktoosimalabsorptioon liittyvä geenimuutos, DNA-tutkimus verestä. Päivitetty 3.2.2017. Luettu 21.5.2018. http://huslab.fi/cgi-bin/ohjekirja/tt_show.exe?assay=4614&terms=laktoosi

Järvelä, I., Kolho, K.-L. 9.8.2017. Lääkärin käsikirja. Laktoosi-intoleranssi. Verkkojulkaisu. Luettu 28.8.2017. http://www terveysportti.fi.elib.tamk.fi/dtk/ltk/koti?p_artikkeli=ykt00253&p_haku=laktoosi-intoleranssi

Kauppila, R. A. 2004. Opi ja opeta tehokkaasti. Psykkinen valmennus oppimisen tukena. 2. painos. Juva: PS-kustannus.

Kere, J. & Kivikko, S. 2006. DNA:n muutokset: mutaatiot ja polymorfismit. Teoksessa Aula, P., Kääriäinen, H., Palotie, A. (toim.) Perinnöllisyyslääketiede. 3. uudistettu painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.

Kere, J. & Knuutila, S. 2016. Geenin käsite. Teoksessa Aittomäki, K., Moilanen, J. & Perola, M. (toim.) Lääketieteellinen genetiikka. Kustannus Oy Duodecim. Luettu 26.2.2018. Vaatii käyttöoikeuden. www.oppiportti.fi.elib.tamk.fi

Kettunen, J. & Palotie, A. 2016a. Variaatiot ja niiden synty. Teoksessa Aittomäki, K., Moilanen, J. & Perola, M. (toim.) Lääketieteellinen genetiikka. Kustannus Oy Duodecim. Luettu 26.2.2018. Vaatii käyttöoikeuden. www.oppiportti.fi.elib.tamk.fi

Kettunen, J. & Palotie, A. 2016b. Genomin variaatio ja sen tulkinta. Teoksessa Aittomäki, K., Moilanen, J. & Perola, M. (toim.) Lääketieteellinen genetiikka. Kustannus Oy Duodecim. Luettu 26.2.2018. Vaatii käyttöoikeuden. www.oppiportti.fi.elib.tamk.fi

Kettunen, J. & Palotie, A. 2016c. Variaation yleisyyteen vaikuttavat tekijät. Teoksessa Aittomäki, K., Moilanen, J. & Perola, M. (toim.) Lääketieteellinen genetiikka. Kustannus Oy Duodecim. Luettu 10.3.2018. Vaatii käyttöoikeuden. www.oppiportti.fi.elib.tamk.fi

Kolho, K-L. 2018. Laktaasi. Teoksessa Färkkilä, M. Heikkinen, M. Isoniemi, H. Puolanka, P. Gastroenterologia ja hepatologia. Kustannus Oy Duodecim. Luettu 26.2.2018. Vaatii käyttöoikeuden www.oppiportti.fi.elib.tamk.fi

Labrie, V., Buske, O., J., Oh, E., Jeremian, R., Ptak, C., Gasiūnas, G., Maleckas, A., Peterait, R., Žvirbliene, A., Adamonis, K., Kriukienė, E., Koncėvičius, K. Gordevičius, J.,

- Nair, A., Zhang, A., Ebrahimi, S., Oh, G., Šikšnys, V., Kupčinskas, L., Brudno, M., Petronis, A. 2016. Lactase non-persistence is directed by DNA variation-dependent epigenetic aging. *Nature Structural & Molecular Biology* 23 (6), 566–573.
- Lee, M.A., Squirrell, D.J., Leslie, D.L., Brown, T. 2009. *Homogeneous Fluorescent Chemistries for Real-Time PCR*. Teoksessa Logan, J., Edwards, K., Saunders, N. *Real-Time PCR*. Norfolk: Caister Academic Press.
- Livak, K.J. 1999. Allelic discrimination using fluorogenic probes and the 5'-nuclease assay. *Genetic analysis: Biomolecular Engineering* 14 (5-6), 143-149.
- Loftis, Amanda, D. & Reeves, Will, K. 2012. *Principles of Real-Time PCR*. Teoksessa Wang, C. Kaltenboeck, B., Freeman, M. D. *Veterinary PCR Diagnostics*. Bentham Science. Bentham eBooks.
- Lyon, E., Mao, R., Swensen, J. 2009. *Mutation Detection by Real-Time PCR*. Teoksessa Logan, J., Edwards, K., Saunders, N. *Real-Time PCR*. Norfolk: Caister Academic Press.
- Marras, S. A. E. 2006 Selection of fluorophore and Quencher Pairs for Fluorescent Nucleic Acid Hybridization Probes. Teoksessa Didenko, V. V. (toim.) *Fluorescent Energy Transfer Nucleic Acid Probes. Designs and Protocols. Methods in molecular biology*TM 335, 3-16.
- Mattar, R., Mazo, D. F. C., Carrilho, F. J. 2012. Lactose intolerance: diagnosis, genetic, and clinical factors. *Clinical and Experimental Gastroenterology* 5, 113-121.
- McPherson, M.J., Møller, S.G. 2000. *PCR*. Oxford: BIOS Scientific Publishers Ltd.
- Metabion International AG. 2017. ZNA primers and probes. Luettu 4.3.2018. <http://www.metabion.com/products/dna-and-rna-custom-oligonucleotides/dna-custom-oligos/zna-primers-and-probes/>
- Misselwitz, B., Pohl, D., Frühauf, H., Fried, M., Vavricka, S.R., Fox, M. 2013. Lactose malabsorption and intolerance: pathogenesis, diagnosis and treatment. *United European Gastroenterology journal*. 1 (3), 151-159.
- Moreau, V., Voirin, E., Paris, C., Kotera, M., Nothisen, M., Rémy, J-S., Behr, J-P., Erbacher, P., Lenne-Samuel, N. 2009. Zip Nucleic Acids: new high affinity oligonucleotides as potent primers for PCR and reverse transcription. *Nucleic Acid Research* 37 (19), 130.
- Mylab. 10.9.2014. Geenitutkimus voi tuoda avun moneen diagnostiseen ongelmaan. Luettu 27.4.2018. <https://www.mylab.fi/geenitutkimus-voi-tuoda-avun-moneen-diagnostiseen-ongelmaan/>
- Overbergh, L., Giulietti, A-P., Valckx, D., Mathieu, C. 2005. *Real-time Polymerase Chain Reaction*. Teoksessa Patrinos, G. P., Ansonge, W. *Molecular Diagnostics*. Lontoo, San Diego (kalifornia), Burlington (MA): Elsevier academic press.

Patrinos, G. P., Ansorge, W. 2005. Molecular diagnostics: Past, Present and Future. Teoksessa Patrinos, G. P., Ansorge, W. Molecular Diagnostics. Lontoo, San Diego (kalifornia), Burlington (MA): Elsevier academic press.

Pesonen, E. 2007. Julkaisijan käsikirja. Jyväskylä: WSOY

Polyplus transfection. N.d. Zip Nucleic acid® (ZNA®). Modified Oligonucleotides. Luettu 25.4.2018. <https://www.polyplus-transfection.com/products/zna/>

Prashing, B. 2000. Erilaisuuden voima. Opetustyyli ja oppiminen. Juva: PS-kustannus.

Pärssinen, R. Suominen, I & Haajanen, K. 2012. Biogeeni, ammatillista biokemiaa ja geenitekniikkaa. Opetushallitus.

Rasinperä, H. 2006. Adult-type Hypolactasia: Genotype-phenotype correlation. Department of Medical Genetics, Faculty of Medicine, University of Helsinki and Hospital for Children and Adolescents, University of Helsinki, Finland. Academic Dissertation.

Repo, I. & Nuutinen, T. 2005. Viestintätaito. Opas aikuisopiskelun ja työelämän vuorovaikutustilanteisiin. 2. painos. Helsinki: Kustannusosakeyhtiö Otava

Salonen, K. 2013. Näkökulmia tutkimukselliseen ja toiminnalliseen opinnäytetyöhön. Opas opiskelijoille, opettajille ja TKI-henkilöstölle. Turun ammattikorkeakoulu. Luettu 23.11.2017. <http://julkaisut.turkuamk.fi/isbn9789522163738.pdf>

Sand, O., Sjaastad, O. V., Haug, E., Bjälle, J. G., Toverud, K. C. 2014. Ihminen Fysiologia ja anatomia. 8.-11. painos. Helsinki: Sanoma Pro Oy.

Saunders, N.A. 2009. An introduction to Real-Time PCR. Teoksessa Logan, J., Edwards, K., Saunders, N. Real-Time PCR. Norfolk Caister Academic Press.

SFS-EN 82079-1. 2012. Käyttöohjeiden laatiminen. Jäsentäminen, sisältö ja esittäminen. Osa 1: Yleiset periaatteet ja yksityiskohtaiset vaatimukset. Suomen Standardoimisliitto SFS. Julkaisupäivä 7.12.2012. Luettu 28.5.2018. Vaatii käyttöoikeuden. <https://online.sfs.fi.elib.tamk.fi/fi/index.html.stx>

SNPEdia. 2018. Rs4988235. Päivitetty 06.01.2018. Luettu 25.2.2018. <https://www.snpedia.com/index.php/Rs4988235>

Soini, S. 2017. Genomitiedon oikeudellinen sääntely. Teoksessa Jokela, M., Oja-Leikas, M., Rova, M. (toim.) Kiehtovat geenit. Mihin geenitietoa käytetään. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. 129-134.

Solunetti. 2006. Molekyylibiologian kehitys. Luettu 16.10.2017. http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/molekyylibiologian_kehitys/2/

Sosiaali- ja terveysministeriö. 2015. Parempaa terveyttä genomitiedon avulla. Kansallinen genomistrategia. Työryhmän ehdotus. Luettu 27.4.2018 https://media.sitra.fi/2017/02/27175044/Parempaa_terveytta_genomitiedon_avulla-2.pdf

Suominen, I., Pärssinen, R., Haajanen, K., Pelkonen, J. 2013. Geenitekniikka. 2. korjattu painos. Turku: Turun ammattikorkeakoulu.

Swallow, D. M. 2003. Genetics of lactase persistence and lactose intolerance. Annual review of genetics 37, 197-219.

TaqMan SNP Genotyping Assays User Guide. 2014. Applied Biosystems. Life Technologies Corporation. Luettu 14.11.2017. http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/TaqMan_SNP_Genotyping_Assays_man.pdf

TaqPath ProAmp Master Mixes. User Guide. Genotyping and copy number variation PCR workflows. 2016. Applied Biosystems. Thermo Fisher Scientific Inc.

Wikimedia Commons. 2015. TaqMan GX cartoon.jpg. Julkaistu 12.12.2015. Luettu/Tulostettu 1.3.2018. https://commons.wikimedia.org/wiki/File:TaqMan_GX_cartoon.jpg

Wikimedia Commons. 2016. DNA chemical structure.svg. Julkaistu 13.6.2016. Luettu/Tulostettu 1.3.2018. https://commons.wikimedia.org/wiki/File:DNA_chemical_structure.svg

Vilkka, H., Airaksinen, T. 2004. Toiminnallinen opinnäytetyö. Jyväskylä: Kustannusosakeyhtiö Tammi.

Virtuaaliammattikorkeakoulu. 5.8.2006. Monimuotoinen / toiminnallinen opinnäytetyö. Luettu 27.4.2018. <http://www2.amk.fi/digma.fi/www.amk.fi/opintojak-sot/030906/1113558655385/1154602577913/1154670359399/1154756862024.html>

Yleissopimus 2010/24. Yleissopimus ihmisoikeuksien ja ihmisarvon suojaamiseksi biologian ja lääketieteen alalla: Yleissopimus ihmisoikeuksista ja biolääketieteestä. Luettu 30.5.2018. https://www.finlex.fi/fi/sopimukset/sopsteksti/2010/20100024/20100024_2-idp450714016

Åkerman, K. Jokela, H. 2010. Fotometria. Teoksessa Niemelä, O., Pulkki, K. (toim.) Laboratoriolääketiede. Kliininen kemia ja hematologia. Helsinki: Kandidaattikustannus Oy.

LIITTEET

Liite 1. Koestusprosessin yhteenvetotaulukko

TAULUKKO 5. Koestusprosessin ΔR_n ja CT – arvot.

Ajo nro	Näytteet	Alleeli 1 (C) ΔR_n	Alleeli 2 (T) ΔR_n	Alleeli 1 (C) CT	Alleeli 2 (T) CT
1	C/C	1,227	0,749	22,878	27,961
	C/T	0,837	2,101	24,25	25,298
	T/T	0,265	3,135	27,004	23,738
2a	C/C	0,385	0,213	26,231	27,951
	C/T	0,245	0,645	28,027	25,705
	T/T	0,038	0,919	-	23,744
2b	C/C	0,828	0,477	24,854	26,409
	C/T	0,558	1,369	26,484	24,539
	T/T	0,14	1,932	-	23,162
3a	C/C	0,924	0,682	24,655	25,706
	C/T	0,651	1,615	25,593	22,844
	T/T	0,378	2,381	-	22,297
3b	C/C	0,477	0,315	25,143	25,985
	C/T	0,308	0,779	26,966	23,887
	T/T	0,091	1,104	-	22,468
4	C/C	0,924	0,679	21,788	24,314
	C/T	0,629	1,59	23,292	22,557
	T/T	0,24	2,361	-	20,852