



SAVONIA

OPINNÄYTETYÖ - AMMATTIKORKEAKOULUTUTKINTO
SOSIAALI-, TERVEYS- JA LIIKUNTA-ALA

REAALIAIKAINEN PCR

Verkko-oppimateriaali BioDigi-hankkeeseen

TEKIJÄT: Tiia Hyvärinen
Maaret Mattila
Krista Toivonen

Koulutusala Sosiaali-, terveys- ja liikunta-ala			
Koulutusohjelma/Tutkinto-ohjelma Bioanalytiikan koulutusohjelma			
Työn tekijät Tiia Hyvärinen, Maaret Mattila ja Krista Toivonen			
Työn nimi Reaaliaikainen PCR – Verkko-oppimateriaali BioDigi-hankkeeseen			
Päiväys	22.5.2019	Sivumäärä/Liitteet	46/2
Ohjaaja Anssi Mähönen			
Toimeksiantaja/Yhteistyökumppani Savonia-ammattikorkeakoulu			
Tiivistelmä			
<p>PCR-menetelmä on biologian- ja lääketieteen laboratorioissa yleisesti käytetty tekniikka, joka on tarjonnut mahdollisuuden muun muassa erilaisten sairauksien tutkimiseen ja mahdollistanut uusien hoitomuotojen sekä lääkkeiden kehittämisen. Menetelmästä on kehitetty useita sovelluksia, joita voidaan hyödyntää eri käyttötarkoituksissa. Näistä sovelluksista nykyaikaisin ja käytetyin on reaaliaikainen PCR-menetelmä.</p> <p>PCR-tekniikan ja siinä käytettävien sovellusten sekä molekyylibiologian ja geeniteknologian perusteiden opiskelu sisältyy bioanalytiikan koulutusohjelmaan. Opinnäytetyömme on Savonia-ammattikorkeakoulun tilaama kehittämistyö, joka on osa Metropolia Ammattikorkeakoulun käynnistämää BioDigi-hanketta. Työn tarkoituksena oli tuottaa englanninkielinen verkko-oppimateriaali, joka on tulevaisuudessa hyödynnettävissä osana bioanalytiikan opetusta. Sen tavoitteena oli edistää oppilaiden itsenäistä opiskelua, mahdollistaa opintojen nopeuttaminen ja edistää oman ammattialan englanninkielen taitoja. Verkko-oppimateriaali tuotettiin edX-alustalle, johon sisällytettiin teoriaa, tehtäviä ja loppupentti. Tuotoksessamme hyödynnettiin flipped learning-menetelmää, joka on uudenlainen pedagoginen näkökulma.</p> <p>Opinnäytetyössämme perehdytään reaaliaikaisen PCR-tekniikan perusteisiin, menetelmän historiaan ja RT-PCR:n sovelluksiin. Työssä käydään myös läpi eri sovellusten välisiä eroja ja vertaillaan niitä. Lisäksi tutustutaan laadullisiin seikkoihin ja mahdollisiin virhelähteisiin sekä tulosten tulkintaan.</p>			
Avainsanat Reaaliaikainen PCR, polymeerasiketjureaktio, digitaalinen oppimateriaali, flipped learning			

Field of Study Social Services, Health and Sports			
Degree Programme Degree Programme in Biomedical Laboratory Science			
Authors Tiia Hyvärinen, Maaret Mattila and Krista Toivonen			
Title of Thesis Real-time PCR – E-learning material to BioDigi-project			
Date	22.5.2019	Pages/Appendices	46/2
Supervisor Anssi Mähönen			
Client Organisation / Partner Savonia University of Applied Sciences			
<p>Abstract</p> <p>PCR-method is a commonly used technology in biological and medical laboratories and it has offered the opportunity to, among other things, investigate different diseases and it has made possible to develop new treatment forms as well as medicines. Several applications have been developed from this method and they can be utilized for different purposes. From these applications the most contemporary and the most used is the real time PCR-method.</p> <p>Studying PCR- technology and the applications used in it as well as the basics of molecular biology and gene technology are included in Biomedical Laboratory Science Degree Programme. This thesis is a development project, the client organization of which was Savonia University of Applied Sciences that is a part of BioDigi- joint project, started by Metropolia University of Applied Sciences. The purpose of this project was to produce English digital learning material which can be utilized in the future as a part of Biomedical Laboratory Science teaching. The aim was to further students´ independent learning, allow to accelerate studies and advance the authors´ professional English skills. Digital learning material was produced to edX- platform, where theory, assignments and a final examination were included. The output utilized the flipped learning-method which presents a new pedagogical point of view.</p> <p>The thesis deals with the basics of the real time PCR-technology, the history of the method and the applications of RT-PCR. The thesis also studies differences between the different applications and compares them. In addition, the thesis studies qualitative circumstances, possible sources of error, and the interpretation of results.</p>			
Keywords Real-time PCR, polymerase chain reaction, digital learning material, flipped learning			

KESKEISIÄ KÄSITTEITÄ JA LYHENTEITÄ

Amplifikaatio = Templaatin monistuminen PCR-reaktiossa

Amplifluoraluke = Amplifluor-kemiaa hyödyntävä tekniikka perustuu kahteen sekvenssispesifiseen- ja yhteen yleismaailmalliseen (eng. UniPrimer) alukkeeseen

Amplikoni = Monistunut kohdesekvenssi

BD QZyme = Aluke, joka hyödyntää kahta sekvenssispesifistä aluketta, joista toinen on zymogeeninen aluke ja toinen niin kutsuttu reverse aluke

cDNA = Lähetti-RNA:sta kopioitu yksijuosteinen DNA-molekyyli

Detektio = PCR-tuotteen muodostaman fluoresenssisignaalin havaitseminen PCR-laitteella

dNTP = Deoksinukleotidi

Eclipse probe = Pimennyskoetin tekniikka, jossa hyödynnetään kahta aluketta ja yhtä sekvenssispesifistä oligonukleotidi koetinta

Eksoni = Geeneissä olevia koodaavia jaksoja

Ekvimolaarinen = Kahden aineen konsentraatiot ovat samat, jolloin ne ovat ekvimolaarisia keskenään

FAM = Fluoreseiiniväriaine, jota käytetään oligonukleotidikoettimien valmistamisessa. Väriaineen avulla pystytään havaitsemaan komplementaaristen nukleiinihappojen läsnäolo.

HeLa- solut = Vuonna 1951 kuolleesta amerikkalaisnaisesta eristettyjä syöpäsoluja. Kuolleen naisen nimi oli Henrietta Lacks, josta solulinjan lyhenne on peräisin.

Hybridisaatiokoetin = Käytetään hybridisaatiokoetintekniikkaa, jossa hyödynnetään kahta sekvenssispesifistä koetinta ja aluketta

Introni = Geenissä olevia koodaamattomia alueita, jotka silmukoidaan pois ennen proteiinisynteesiä

Light Upon eXtension = LUX-aluke. On erittäin herkkä, helppokäyttöinen ja tehokas menetelmä. Perustuu kahteen alukkeeseen, joista toinen on leimattu fluoroforilla ja toinen on leimaamaton.

Molecular Beacon = Värileimattu ja sekvenssi spesifinen oligonukleotideista (25-40 nukleotidia) muodostuva koetin, joka omaa hiuspinnimäisen (päätyilmukka ja kaksi vartta) rakenteen

mRNA = Lähetti-RNA

Multiplex = Useamman kohdesekvenssin samanaikainen monistaminen samassa PCR-putkessa

Nukleiinihapot = Deoksiribonukleiinihappo (DNA) ja ribonukleiinihappo (RNA)

Oligonukleotidi = Muutaman nukleotidin mittainen jakso eli nukleiinihappo

Reverse primer = Taka-alue, joka kiinnittyy tietyn DNA-jakson loppuosaan ja suorittaa monistuksen taaksepäin eli geenin lukusuuntaa vastaan

RT-PCR (reverse transcriptase PCR) = Polymeraasiketjureaktio, jossa käänteiskopioijaentsyymin avulla tuotetaan lähetti-RNA:sta uutta DNA:ta

Singleplex = Yhden kohdesekvenssin monistaminen PCR-putkessa

Skorpionialuke = Tekniikka hyödyntää kahta aluketta, joista toinen toimii koettimena

TaqMan = Fluoresenssi merkitty ja sekvenssi spesifinen koetin, joka hyödyntää tiettyjen termostabilien polymeeraasien 5'-eksonukleaasi aktiivisuutta

Zymogeeninen alue = Sekvenssispesifinen alue, joka on nukleiinihapposekvenssin antisenssisekvenssi

SISÄLTÖ

1	JOHDANTO	1
2	KLIININEN MOLEKYLIBIOLOGIA JA GEENITEKNOLOGIA	2
2.1	Molekyylilaboratorion erikoispiirteitä	3
2.1.1	Jätteiden hävittäminen	4
2.1.2	Aseptiikka molekyylilaboratoriossa	4
3	PCR-TEKNIikka	5
3.1	PCR-reaktion vaiheet	5
3.1.1	Templaatti	6
3.1.2	Alukkeet eli primerit	7
3.1.3	DNA-polymeraasit	7
3.1.4	Nukleotidit	8
3.2	PCR:n optimointi	8
3.2.1	Ionikonsentraatiot	9
3.2.2	DNA-polymeraasi konsentraatio	9
3.2.3	Lämpötilat	10
3.3	RT-PCR (eng. Reverse Transcriptase PCR)	11
4	REAALIAIKAINEN PCR	12
4.1	Fluoresoivat merkkiaineet	12
4.1.1	DNA:han sitoutuvat merkkiaineet	13
4.1.2	Alukkeisiin ja koettimiin perustuvat merkkiaineet	13
4.1.3	Erlaisia alukkeita ja koettimia	14
4.2	Analysointi ja tulokset	22
4.2.1	Alukkeiden ja koettimien vertailu	23
4.3	Laadunvarmistus	24
4.4	Diagnostiikka	26
5	DIGITAALINEN OPPIMATERIAALI OPINNÄYTETYÖNÄ	28
5.1	Digitaalisuus tänä päivänä	28
5.2	Digitaalisen oppimateriaalin laatuksiteerit	28
5.3	Flipped learning	29
6	OPINNÄYTETYÖN TAVOITE JA TARKOITUS	30
7	OPINNÄYTETYÖN TOTEUTUS	31

7.1	Toiminnallinen opinnäytetyö eli kehittämistyö	31
7.2	Opinnäytetyön ideointi ja suunnittelu	31
7.3	Tiedonhaku	32
8	POHDINTA.....	34
8.1	Oma oppiminen ja ammatillinen kasvu	34
8.2	Tuotoksen arviointi	35
8.3	Kiitokset.....	36
	LÄHTEET JA TUOTETUT AINEISTOT	38
	LIITE 1: HANKE-ESITTELY	44
	LIITE 2: TUOTOKSEN ESITTELY	46

1 JOHDANTO

Nukleiinihappojen monistus ja havaitseminen on nykyään yksi arvokkaimmista tekniikoista biologisen tutkimuksen parissa. Tutkijat esimerkiksi lääketieteen ja oikeuslääketieteen sekä bioteknologian parissa käyttävät kyseistä menetelmää eri sovellusten kanssa. Sovelluksen mukaan on osattava määrittää, onko kvalitatiivinen vai kvantitatiivinen nukleiinihappojen monistus ja havaitsemismenetelmä riittävä. Oikeanlaisen menetelmän valitseminen vaatiikin perehtyneisyyttä käytössä oleviin menetelmiin. (Bio-Rad laboratories 2006.)

Reaaliaikainen kvantitatiivinen PCR-menetelmä on herkkä, nopea ja nykyaikainen menetelmä perinteiseen pääte piste PCR-menetelmään verrattuna (Biaassoni & Raso s.a., 5). Se on myös käytettyin PCR-tekniikkaan perustuvista menetelmistä. Terveysalalla sitä hyödynnetään muun muassa virusten tunnistamisessa ja geeniekspressiivisissä määrityksissä, esimerkiksi syöpätutkimuksissa. Virologian laboratorioissa käytettävää, PCR-menetelmään perustuvaa tekniikkaa hyödynnetään muun muassa hepatiitti C-viruksen ja HI-viruksen osoittamiseen sekä lääkehoidon tehon seurantaan. Tekniikkaa käytetään myös borrelioosi-, hinkuyskä-, herpeskefaliitti- ja Mycoplasma pneumoniae epäilyn varmistamiseksi tai poissulkemiseksi. (Ranki-Pesonen 1994.) Reaaliaikainen PCR-menetelmä on laajasti käytössä myös rikosteknisen tutkimuksen parissa (Bio-Rad Laboratories 2006).

Opinnäytetyö on kehittämistyö, jonka tavoitteena on edistää itsenäistä ja monimuotoista opiskelua sekä lisätä reaaliaikaisen PCR-menetelmän tietotaitoa molekyylibiologian opintojaksolla. Työn tuotos on osa BioDigi-hanketta, jossa tuotetaan digitaalinen opintoportaali. Se sisältää bioanalytiikan tutkinto-ohjelman keskeiset opintomodulit, joita ammattikorkeakoulut voivat hyödyntää opetuksessaan. Opintoportaalissa hyödynnetään flipped learning-menetelmää, joka on uudenlainen pedagoginen näkökulma verkossa tapahtuvaan opiskeluun. Menetelmän pääperiaatteena korostuu opiskelijan itseohjautuvuus.

Hankkeen koordinoijana ja digitaalisen opintoportaalin tuottajana toimii Metropolia Ammattikorkeakoulu. Yhteistyökumppaneina toimivat Savonia-ammattikorkeakoulun lisäksi myös muut bioanalytiikan koulutusta tarjoavat ammattikorkeakoulut. Hankkeen tavoitteena on lisätä yhteistyötä ja yhteistä koulutustarjontaa bioanalytiikan koulutusta tarjoavien ammattikorkeakoulujen välillä. Tavoitteella pyritään edistämään yhdenvertaisuutta ja tasa-arvoa sekä luomaan joustavia opintopolkuja. Tämä mahdollistaa myös opintojen nopeuttamisen. Hankkeessa luotava englanninkielinen opintoportaali luo myös mahdollisuuksia kansainvälistymiselle ja koulutusviennille. (Metropolia 2017.)

2 KLIININEN MOLEKYLIBIOLOGIA JA GEENITEKNOLOGIA

Kliininen molekyylibiologia ja geeniteknologia on yksi laboratoriotyön erikoisaloista. Molekyylibiologia on tieteenala, joka tutkii biologiaa molekyyalitasolla. Kyseinen tieteenala risteää erityisesti genetiikan, solubiologian ja biokemian kanssa. Molekyylibiologiassa käytettävät menetelmät keskittyvät nukleinihappojen ja proteiinisynteesin käsittelyyn sekä tutkimiseen. (Solunetti 2006.) Molekyylibiologisista menetelmistä nukleinihappojen monistuksella on merkityksellinen asema lääketieteellisessä tutkimuksessa. Se on nykyään rutiininomaisessa käytössä maailmanlaajuisesti ja sitä käytetään esimerkiksi patogeenien (bakteerit, virukset, sienet ja alkueläimet) havaitsemiseen. Tekniikan avulla on mahdollistettu infektioiden havaitsemisen jo ennen vasta-aineiden tuotantoa, myös potilailla, joilla ei ole vasta-aineiden tuotantoa immunosuppression vuoksi. Lisäksi menetelmän avulla pystytään seuraamaan hoitojen tehoavuutta. (Kessler 2014, 1.) Molekyyli diagnostiikan yhdistäminen terveydenhuollossa käytettäviin terapeutteihin menetelmiin on saavuttanut avainaseman monien tartuntatauti-diagnostiikassa. Spesifiset menetelmät ovat tarjonneet luotettavia ja nopeita kvantitatiivisia tai kvalitatiivisia testituloksia, joiden avulla potilaat saavat mahdollisimman hyvää ja kustannustehokasta hoitoa. Lisäksi korkeamman suoritustehon omaaviin teknologioihin siirtyminen on tuonut mahdollisuuden organismien tyyppitykseen ja niiden virulenssin sekä resistentt ominaisuuksien tutkimiseen. (Kessler 2014, 64.)

Molekyyli genetiikan tieteellinen tutkiminen on saanut alkunsa jo 1800-luvulla, jolloin ensimmäisen kerran onnistuttiin määrittämään periytymissäännöt mm. hiusten- ja silmienvärin suhteen. Sääntöjen keksijänä oli Gregor Mendel, joka suoritti tieteellisiä kokeitaan hernekasveilla. Mendelin keksimän tekniikan avulla pystyttiin paljastamaan, kuinka päivittäin ilmentämämme periytyvät ominaisuudet ovat linkitettyjä niiden taustalla oleviin biokemiallisiin ominaisuuksiin. Molekyylibiologian perusteiden selvittäminen perinnöllisyydessä alkoi lisätä termin "molekyyli" käyttöä. Molekyylibiologia on laaja-alainen käsite, joka sisältää kaikki aspektit elämästä molekyylibiologian perspektiivistä katsottuna. Vaikka maailman monimuotoisuus on täynnä erilaisia rakenteita ja eri organismien elämäntyyliä, me kaikki niin kasvit, eläimet kuin ihmisetkin kuitenkin pohjautumme molekyylibiologian tasolla samantyyppiseen luontaiseen yhtenäisyyteen. (Clark 2005, 8.)

Molekyylibiologinen vallankumous on ollut verrattavissa aikoinaan mullistuneeseen informaatioteknologiaan, koska molemmilla aloilla käsitellään valtavia määriä koodattua informaatiota. Toisessa tapauksessa informaatio on henkilön keinotekoisesti tekemää ja toisessa geneettinen informaatio luo pohjan elämälle. Yhdistävänä tekijänä kuitenkin on, että valtavien määrien hallintaan ja analysointiin geneettistä tietoa, tarvitaan modernit sovellukset sekä tehokkaat tietokoneet. Nykyteknologian avulla onkin pystytty muuttamaan ihmiselämää ja luomaan tulevaisuutta tuleville sukupolville. Molekyylibiologian teknologian aikoinaan mullistanut tekniikka on PCR eli polymeerasiketjureaktio. (Clark 2005, 8.)

Molekyylibiologian yksi suurimmista vaikutusalueista on ihmisen terveys. Yksi merkittävimmistä saavutuksista oli se, kun ihmisen koko genomi pystyttiin sekvensoimaan vuonna 2003. Näin saatiin teoreettinen tieto siitä, mitä ihmisen luomiseen käytännössä tarvitaan. Ihmisen perimästä ei kuitenkaan

tunneta vielä kaikkea ja osan geenien toiminnasta on vielä selvittämättä. Vielä haasteellisempaa on selvittää kuinka geenien ekspressiota kontrolloidaan ja koordinoidaan. Perinnöllisten sairauksien on havaittu johtuvan viallisista geeneistä tai kromosomaalisista poikkeavuuksista. Ymmärtääksemme viallisten geenien toimintaa, meidän on opittava ensimmäiseksi ymmärtämään kyseisten geenien normaalia toimintaa. (Clark 2005, 8.)

2.1 Molekyylilaboratorion erikoispiirteitä

Laboratoriotyöskentelyssä tulee noudattaa asetettuja turvallisuusmääräyksiä, jotka pätevät laboratorion riippumatta kaikkialla. Laboratorioon tullessa on huolehdittava asianmukaisesta suojavaatetuksesta, johon kuuluvat suojakäsineet, suojatakki, oikeanlaiset työkenkät ja suojalasit. Huomioitavaa on, että silmälasit eivät korvaa asianmukaisilla linsseillä varustettuja suojalaseja. Laboratorion perussääntöihin kuuluu myös se, ettei laboratoriossa oleskellessa saa syödä eikä juoda. (Mülhardt & Cornel 2007, 9.)

Laboratorioissa käsiteltävät organismit jaetaan riskiryhmiin 1 – 4. Kyseinen jaottelu on suunniteltu tieteellisen ja hallinnollisen organisaation toimesta. Ensimmäiseen riskiryhmään kuuluvat soluviljelmit ja mikro-organismit, joiden käsittelyyn ei liity turvallisuusriskiä (esimerkiksi E. Coli ja HeLa-solut). Riskiryhmään kaksi kuuluvat organismit, joiden käsittelyyn liittyy matala turvallisuusriski (esimerkiksi adenovirus ja hepatiitti B-virus). Kolmanteen riskiryhmään luokiteltavien organismien käsittelyyn liittyy kohtalainen turvallisuusriski ja neljännen riskiryhmän taas korkea turvallisuusriski. Korkealla turvallisuusriskillä tarkoitetaan, että organismin päädyttyä ympäristöön, se voi aiheuttaa siellä ongelmia. Esimerkkinä kolmanteen riskiryhmään luokiteltavasta organismista on HI-virus ja hepatiitti C-virus. (Mülhardt & Cornel 2007, 9.) Neljänteen bioturvallisuusluokkaan lukeutuvat eksoottiset ja vaaralliset organismit, jotka voivat johtaa hengenvaarallisiin seurauksiin. Kyseiset organismit voivat esimerkiksi vapauttaa aerosoleja, jotka tartuttavat infektion. (The Scientist, 2019.)

Riskiryhmiin jaottelu korreloi tiettyihin turvallisuusvaatimuksiin, esimerkiksi työskentelytilassa on täyttyvä tietyt vaatimukset kunkin riskiryhmän kohdalla. Riskiryhmään yksi luokiteltavien organismien käsittelyyn vaaditaan työskentelytila, jossa on neljä seinää, katto, ikkuna ja vähintään yksi ovi, joka on mahdollista pitää suljettuna. Riskiryhmään kaksi luokiteltavien organismien käsittelyyn vaaditaan taas tila, jossa on samat edellytykset kuin ryhmään yksi luokiteltavien organismien käsittelyyn vaaditussa tilassa. Lisänä edelliseen siellä täytyy olla varoitusmerkki tartuntavaarallisesta materiaalista ja desinfektioaineen tulee olla käden ulottuvilla. (Mülhardt & Cornel 2007, 9.)

Bioturvallisuusluokkaan 3 kuuluvilla laboratorion tiloilla, työskentelytilassa olevien ikkunoiden kuuluu olla aukeamattomia. Lisäksi työntekijöiden sisäänkäynti tapahtuu sulkuportista, jossa on erillinen tila suojarusteiden pukemiselle. Laboratoriossa tulee olla käytettävissä autoklaavi ja ilmatilassa tulee olla matalapaine. Kyseisen turvallisuusluokituksen saaneissa laboratoriossa työskentely ei ole sallittua yksin. (Mülhardt & Cornel 2007, 9.)

Bioturvallisuusluokkaan neljä kuuluvien laboratorioiden turvallisuuteen liittyvät toimenpiteet ovat omaa luokkaansa. Pukeutuminen tapahtuu erilliseen suojapukuun, jonka avulla muun muassa hengitysilmä on suodatettua. Kyseiset laboratoriot ovat harvinaisia ja niitä ei ole joka maassa. (Mülhardt & Cornel 2007, 9.)

2.1.1 Jätteiden hävittäminen

Molekyylibiologian laboratorioissa muodostuvien biologisten jätteiden ja jätevesien hävittäminen tapahtuu asetettujen turvallisuusmääräysten mukaisesti. Jätteet voivat sisältää tartuntavaarallista materiaalia kuten verta, joten määräysten avulla pystytään välttämään sekä infektioiden leviäminen, että ympäristölle aiheutuvat haitat. (Mülhardt & Cornel 2007, 9.)

Bioturvallisuusluokkaan yksi kuuluvien jätteiden hävittämisen voi suorittaa ilman esikäsitteilyä, jos jätteeseen ei liity infektoriskiä. Siirryttäessä bioturvallisuusluokkaan kaksi tai siitä suurempiin luokkiin, kaikki laboratorioissa muodostuneet jätteet ovat inaktivoitava tai autoklaavattava. Lisäksi työskentelyn jälkeen on muistettava sterilisoida esimerkiksi soluviljelmäalustat ja kaikki muu, mikä on ollut kontaktissa DNA:n ja bakteerien kanssa. Kyseiset toimintatavat noudattavat hyviä laboratoriokäytäntöjä, jotka on perustettu taloudellisen yhteistyön ja kehityksen (eng. Organization for Economic Cooperation and Development, OECD) järjestön toimesta. (Mülhardt & Cornel 2007, 9.)

2.1.2 Aseptiikka molekyylilaboratoriossa

Molekyylilaboratoriossa työskennellessä aseptiikalla on erittäin suuri merkitys analyysin onnistumisen kannalta. Kontaminaatoriskiä voidaan pienentää pitämällä työskentelytila puhtaana ja puhdistamalla se jokaisella käyttökerralla. Puhdistamiseen on käytettävä kyseiseen käyttötarkoitukseen sopivia pesuaineliuoksia. Lisäksi näytteiden valmistelun tulee tapahtua erillisessä puhtaassa tai UV-valolla varustellussa työtilassa, joka on eri tilassa PCR-laitteen kanssa. Tärkeä osa kontaminaatoriskin pienentämisessä on myös suojakäsineiden vaihtaminen näytteiden valmistelun ja PCR-laitteen asetusten asettamisen välillä sekä asianmukaisten pipettien ja filterillä varustettujen pipetinkärkien käyttö. Näytteiden valmistelussa tulee myös käyttää PCR-laatuista vettä, tähän käyttötarkoitukseen suunnattuja reagensseja ja PCR-putkia. (Bio-Rad laboratories 2006.) Master mixin käyttöä suositellaan, sillä se vähentää kontaminaatoriskiä. Markkinoilla on saatavilla erilaisia Master mixejä, monet näistä sisältävät jo kaiken muun tarvittavan eli entsyymit, puskurin, magnesiumionit ja dNTP:t, tällöin täytyy lisätä vain alukkeet sekä DNA-templaatti. (Neidler 2017.) Työskentelyn laatua tulee aina kontrolloida negatiivisella kontrollilla, joka ei sisällä templaatti-DNA:ta. Näin voidaan varmistua työskentelyn riittävästä puhtaudesta. Tilastollisen vaihtelun minimoimiseksi Master mix-reagenssiseosta on hyvä tehdä rinnakkaisille näytemäärille riittäväksi. Työskentelyn loputtua PCR-tuotteiden kuljetusta puhtaaseen työskentelytilaan tulee ehdottomasti välttää. (Bio-Rad laboratories 2006.)

3 PCR-TEKNIikka

PCR eli polymeerasiketjureaktio on Kary Mulliksen vuonna 1980 kehittämä menetelmä, joka perustuu DNA-polymeeraasien kykyyn syntetisoida komplementaarisesti uutta DNA-jaksoa templaattista (National Center of Biotechnology Information 2017). Reaktio toteutetaan spesifisessä puskuroidussa ympäristössä tarkoin säädeltyjen toimintojen avulla (McPherson & Møller 2000, 10). DNA-polymeeraasi tarvitsee halutunlaisen lopputuloksen aikaansaamiseksi alukkeet, joista se lähtee rakentamaan uutta komplementaarista juostetta. Juosteen rakentaminen alkaa 3'-päädyistä, johon DNA-polymeeraasi lisää yhden nukleotidin kerrallaan. Nukleotidin liittäminen tapahtuu aina päädyssä olevaan -OH-ryhmään. PCR-reaktion lopputuloksena saadaan miljoonia amplikoneja eli kopioita templaatti DNA:sta. (National Center of Biotechnology Information 2017.) Reaktiossa vaihdellaan kunkin komponentin toiminnan kannalta sopivia lämpötiloja, joka tapahtuu PCR-laitteen (eng. thermal cycler) avulla (McPherson & Møller 2000, 5).

PCR-reaktion tehokkuuteen vaikuttavia tekijöitä ovat polymeerasireaktion inhibiittorit, pyrofosfaattimolekyylien kertyminen ja käytössä olevien reagenssien saatavuus. Reaktion etenemiseen voi myös vaikuttaa muodostuneen PCR-tuotteen lämpeneminen, joka voi aiheuttaa PCR-reaktion pysähtymisen ja näin tasannevaikutuksen (eng. plateau-effect) lisääntymisen. (National Center of Biotechnology Information 2017.) Tasannevaikutuksella tarkoitetaan reaktionvaihetta, jossa amplifikaatio lakkaa. Tämä voi olla seurausta reagenssien loppumisesta tai inhibiittorien läsnäolosta. (McPherson & Møller 2000 13.)

PCR-tekniikkaa voidaan käyttää yksittäisistä soluista olevan perintöaineksen tai jopa yksittäisen templaattimolekyylin monistamiseen. Tekniikan avulla voidaan suorittaa myös in situ analyysyjä fiksoiduissa näytteissä tai kudoksissa, joiden avulla voidaan tutkia eri geenien ekspressiota. (McPherson & Møller 2000 50.) PCR-menetelmää on kehitetty edelleen ja siitä on luotu uusia sovelluksia kuten droplet-, nested- ja multiplex PCR. Kyseiset menetelmät ovat edistyneisempiä ja niitä pystytään hyödyntämään esimerkiksi lääketieteellisissä tarkoituksissa. Multiplex PCR:llä suoritetaan mm. geenien deleetio-, mutaatio- ja polymorfisminalyysyjä. Lisäksi sen avulla tehdään myös kvantitatiivisia analyysyjä sekä RNA:n detektiota. (Elnifro, Ashshi, Cooper & Clapper 2000.) Droplet PCR:n yksi käyttökohteista on syöpäpotilaiden jäännössairauden tilan arvioinnissa tehtävä tutkimus (Albert-Ludwigs-Universität Freiburg 2019).

3.1 PCR-reaktion vaiheet

PCR-reaktio jaetaan yksinkertaisimmillaan kolmeen vaiheeseen, jotka ovat denaturaatio, alukkeiden kiinnittyminen (eng. annealing) ja uuden DNA:n syntetisoiminen (eng. extension). DNA-kopioiden lukumäärä kasvaa eksponentiaalisesti jokaisella PCR-syklillä. (National Center of Biotechnology Information 2017.) PCR-reaktion tehokkuuden ollessa 100 prosenttia, muodostuneen tuotteen laskennallinen kertymä kahdennenkymmenennen syklin jälkeen tulisi olla noin miljoona kappaletta. Tämä on

kuitenkin käytännössä mahdotonta ja paras mahdollinen tehokkuus, johon genomisella DNA:lla voidaan päästä, on noin 60 – 80 prosenttia. (McPherson & Møller 2000, 9).

Reaktion ensimmäisessä vaiheessa näytteessä oleva DNA denaturoidaan. Denaturaatio tapahtuu nostamalla reaktiolämpötila 94-95 celsiusasteeseen, jonka seurauksena DNA:n juosteiden välissä olevat vetysillat katkeavat. Denaturaation tuloksena saadaan yksijuosteista DNA:ta, johon alukkeet voivat sitoutua. Alukkeiden sitoutuminen tapahtuu seuraavassa eli annealing-vaiheessa, jossa reaktion lämpötilaa lasketaan alukkeiden sitoutumiselle optimaaliseksi. Lämpötilan säätäminen riippuu käytettävistä alukkeista. Lämpötila on yleensä 40 – 72 °C. Sekvenssispesifiset oligonukleotidialukkeet kiinnittyvät oikeaan kohtaan emäsparisäännön mukaisesti, jossa C – G sekä T – A ovat komplementaariset toisilleen. Reaktion viimeisessä vaiheessa, heti alukkeiden kiinnittymisen jälkeen, lämpötila nostetaan 72 celsiusasteeseen, joka on optimaalinen termostabiilille DNA-polymeraasille. Polymeeraasi alkaa rakentaa uutta DNA-juostetta liittämällä deoksinukleotideja (dATP, dTTP, dCTP ja dGTP) 3'-päädyssä olevaan hydroksyyliiryhmään ja samalla edeten kohti 5'-päätyä. Uuteen juosteeseen liittyttyään nukleotidit muuttavat muotoaan monofosfaateiksi (dNMP). Tämä on seurausta fosfodiesterisidosten muutoksista. (Solunetti 2006.) Uusien DNA-molekyylien muodostuttua reaktio voi alkaa taas alusta, jossa myös vasta syntetisoidut DNA-molekyylit toimivat templaattina. PCR-syklien määrä riippuu näytteessä olleen templaatti-DNA:n määrästä. Keskimäärin tarvitaan 25 – 40 sykliä. (McPherson & Møller 2000, 4.) Reaktion päätyttyä reaktioseos jäähdytetään huoneenlämpöiseksi tai 4 celsiusasteeseen, riippuen käytetystä sovelluksesta ja PCR-laitteesta (McPherson & Møller 2000, 10).

3.1.1 Templaatti

Templaatti on näytteessä oleva DNA, joka sisältää halutun kohdesekvenssin. DNA eli deoksiribonukleiinihappo sisältää yksilön perintöaineksen. DNA molekyylillä on ainutlaatuinen rakenne, sillä se sisältää informaatiota, pystyy kopioitumaan sekä sen sisältämä informaatio voi jostain syystä muuttua. DNA:n rakenne on kaksoiskierteinen eli heliksi, joka koostuu sokeriosasta (deoksiriboosi) ja fosfaatista sekä niiden välissä olevasta emäsosasta. Nukleotidi on DNA:n rakenneyksikkö, joka koostuu sokeriosasta, fosfaattiryhmästä ja yhdestä orgaanisesta emäksestä. DNA sisältää neljää erilaista emästä, jotka ovat adeniini (A), sytosiini (C), guaniini (G) ja tymiini (T). Näistä parin vetysidoksella eli vetysillalla muodostavat adeniini ja tymiini (A – T) sekä guaniini ja sytosiini (G – C). Vetysidos aukeaa helposti, mikä DNA:n toiminnan kannalta on tärkeää. (Happonen ym. 2007.) DNA on reaktion alkuvaiheessa kaksijuosteisena, joka denaturoidaan lämpötilaa nostamalla yksijuosteiseksi (National Center of Biotechnology Information 2017).

PCR-reaktiossa voidaan käyttää muitakin perintöainesta sisältävää materiaalia, kuten RNA:ta, plasmideja ja YAC sekä BAC klooneja. DNA:han verrattuna RNA:n rakenne on hieman erilainen. RNA on yleensä yksijuosteinen molekyyli ja sen sokeriosa on riboosisokeria. Lisäksi RNA:n emäsosassa tymiinin paikalla on urasiili (U). RNA jaetaan kolmeen erilaiseen päätyyppiin, joita ovat lähetti-RNA, siirtäjä-RNA sekä ribosomi-RNA. (Happonen ym. 2007).

Tänä päivänä on paljon kaupallisia toimittajia, jotka tarjoavat genomista DNA:ta genomista- ja cDNA-kirjastoista. Tarjontaa löytyy myös monipuolisesti RNA:sta. Kirjastoihin koottu perintöaines on eristetty eri eläin- ja kasvilajeista. Sopivan templaatti määrän valinta vaatii optimointia, että PCR saadaan onnistumaan. Optimaalinen määrä genomista DNA:ta on enintään mikrogramman ja kloonatussa DNA:ssa taas alle nanogramma on riittävä. Suuren molekyylipainon omaavissa näytteissä DNA:n pilkkominen restriktioentsyymien (Not1 tai SfiI) avulla on tarpeen. (McPherson & Møller 2000, 49.)

3.1.2 Alukkeet eli primerit

Alukkeet ovat merkittävä komponentti PCR-reaktion onnistumisen kannalta, koska ne määrittävät kohdealueen, joka halutaan amplifioida. Alukkeet ovat pituudeltaan noin 20 nukleotidia ja ne kiinnittyvät spesifisesti templaattiin. Sitoutumisolosuhteiden tulee olla optimaaliset lämpötilaltaan ja Mg^{2+} ionikonsentraatioltaan, jotta toivotunlainen lopputulos voidaan saavuttaa. Alukkeita on nykyään saatavilla monilta eri valmistajilta ja tarjonta on erittäin monipuolista. (McPherson & Møller 2000, 27.)

PCR-reaktion tarvitaan kaksi aluketta, jotka sitoutuvat komplementaarisiin juosteisiin. Sopivien alukkeiden valinta on yksinkertaista, kun templaatin sekvenssi tunnetaan. Joissakin tapauksissa alukkeen ei kuitenkaan tarvitse olla täydellisesti komplementaarinen templaatin kanssa, koska DNA-polymeraasi alkaa rakentaa uutta DNA-juostetta alukkeen 3'-päädyssä. Etenkin kolme viimeistä nukleotidia tulee olla komplementaarisia templaatin kanssa, että tuotteen spesifisyys voidaan taata. Alukkeen 5'-päätty ei ole spesifisyyden kannalta merkitsevä, mutta se antaa mahdollisuuden templaatin myöhäisemmälle muokkaukselle, kuten mutageneesille. Yleisimmin tehty muokkaus on lisätä restriktiokohta, jolloin monistettu tuote voidaan lisätä haluttuun vektoriin. (McPherson & Møller 2000, 27.)

Alukkeiden valinnassa tulisi välttää toistuvia tai saman nukleotidin peräkkäisyyksiä omaavia alukkeita, koska se voi johtaa alukkeen irtoamiseen kohdesekvenssistä annealing vaiheessa. Valinnassa kannattaa välttää myös 3'-päädyssä sijaitsevia kolmen tai useamman C tai G nukleotidin ryhmittymiä. Kyseinen ominaisuus voi johtaa virheellisiin pariutumisiin C ja G alueilla. (McPherson & Møller 2000, 27.)

3.1.3 DNA-polymeraasit

DNA-polymeraasien rooli DNA:n syntetisaation aikana on oikeanlaisten nukleotidien liittäminen alukkeen jatkoksi emäsparisäännön mukaisesti. DNA-polymeraaseja on kahteen eri luokkaan kuuluvia, DNA- ja RNA riippuvaisia DNA-polymeraaseja, joiden käyttö riippuu kopioitavasta templaattista. RNA-riippuvaisia DNA-polymeraaseja kutsutaan myös käänteisiksi transkriptaaseiksi (eng. reverse transcriptase). (McPherson & Møller 2000, 34.)

DNA-polymeraasit katalysoivat uuden DNA-juosteen syntetisoimista aina 5'-päädyistä 3'-päättyyn. Joillakin kyseiseen ryhmään kuuluvilla entsyymeillä on eksonukleaasi aktiivinen ominaisuus, joka lukee syntetisoitua juostetta päinvastaiseen suuntaan ja varmistaa juosteen virheettömyyden. Mahdollisen emäsvirheen tullessa vastaan, se poistaa virheellisen emäksen ja vaihtaa oikeanlaisen tilalle. Eksonukleaasi aktiivisuudella on tarkkuutta ja toistettavuutta lisäävä vaikutus reaktion kannalta. (McPherson & Møller 2000, 34.)

PCR-reaktion kannalta kolme tärkeää ominaisuutta DNA-polymeraaseja vertailtaessa ovat synteessin tehokkuus ja toistettavuus sekä tarkkuus. Tehokkuus on seurausta synteessinopeudesta ja prosessiivisuudesta. Prosessiivisuus taas kuvaa entsyymien affiniteettia templaattia kohtaan. Vuorovaikutusten ollessa voimakkaita, entsyymien prosessiivisuus lisääntyy, joka lisää entsyymien DNA-synteesiä ennen sen irtoamista templaattista. Entsyymi voi irrota templaattista muutamia kertoja synteessin aikana, mutta se pystyy kiinnittymään takaisin ja synteesi voi jatkua. DNA-polymeraasi päättää synteessin juosteen 3'-päättyyn, joka toimii substraattina seuraavan entsyymien jatkamalle syntetisaatiolle. Kyseinen entsyymien "kiertokulku" jatkuu niin kauan, kun koko juoste on saatu syntetisoitua. DNA-polymeraaseilla on erilaisia synteessinopeuksia, jotkut kykenevät syntetisoimaan peräti sata nukleotidia sekunnissa ja toiset vain 5-10 nukleotidia. (McPherson & Møller 2000, 35.)

3.1.4 Nukleotidit

Reaktioseokseen tarvittavat deoksinukleotiditriposfaatit hankitaan yleensä kaupallisina liuoksina, jotka ovat konsentraatioiltaan noin 100-300 mM. Kaupallisista liuoksista valmistetaan käyttöliuokset, joiden konsentraation tulee olla 50-200 µM. Liuoksia valmisteltaessa on oltava huolellinen laatuun vaikuttavien seikkojen suhteen, jotta voidaan suorittaa laadukas analyysi. Suurempi konsentraatioisia kaupallisia liuoksia tulee säilyttää -70 °C ja käyttöliuoksia -20 °C. Liuoksien tulee myös olla tuoreita ja laimentamiseen käytettävän veden steriiliä. Lisäksi reaktioseokseen käytettävien nukleotidiliuosten tulee olla ekvimolaarisia keskenään. Suositeltu dNTP konsentraatio on 50-200 µM. Liian suuri dNTP pitoisuus estää DNA-polymeraasin toimintaa ja nostaa riskiä polymeraasin virheelliselle toiminnalle. Liian matalat pitoisuudet taas huonontavat PCR-reaktion tehokkuutta. (McPherson & Møller 2000, 25.)

3.2 PCR:n optimointi

PCR-reaktion onnistumisen kannalta on tärkeää optimoida se. Optimoinnin kannalta tärkeitä aspek-teja ovat laadukkaat reagenssit, lämpötilat, reaktion voimistajat ja kontaminaation välttäminen. Re-aktion optimaalisuus voidaan osoittaa näytteiden kanssa tehtävillä kontrollinäytteillä. Rinnakkaisina (negatiivinen ja positiivinen kontrolli) tehtävät kontrollinäytteet osoittavat reaktion spesifisyyden ja mahdolliset kontaminaatiot. (McPherson & Møller 2000, 67.)

PCR-reaktion spesifisyyttä voidaan parantaa laadukkailla ja huolella valituilla reagensseilla. Reagenssien valinta aloitetaan valitsemalla sopiva alukepari, joiden yhteistyön tuotoksena saataisiin lukuisa määrä reaktiotuotetta. Alukeparien valinta voi olla joskus haasteellista, koska niiden yhteistyö ei aina tuota toivotunlaista lopputulosta optimaalisista reaktio-olosuhteista huolimatta. Alukeparien käyttöominaisuuksia koskevia sääntöjä ei ole määritelty, joten alukkeiden optimaalista toiminta-aluetta on haettava reaktion parametreja muuttelemalla. Tärkeimmät parametrit, joihin voidaan vaikuttaa ovat puskurikoostumus, lämpötila ja PCR-laitteen ohjelma (eng. cycling regime). PCR-reaktion spesifisyyden kannalta edullisia tekijöitä ovat myös oikeanlaiset konsentraatiot (Mg^{2+} ionit, nukleotidit, templaatti, DNA-polymeraasi ja muut ionit), tehokas denaturaatio, templaatin laatu ja PCR-laitteen tehokkuus. (McPherson & Møller 2000, 68.)

3.2.1 Ionikonsentraatiot

Joidenkin ionien konsentraatiot ovat kriittisiä PCR-reaktion onnistumisen kannalta. Etenkin magnesiumionien (Mg^{2+}) konsentraation on oltava tarkka. Magnesiumionit muodostavat kompleksin nukleotidien kanssa, jotka ovat vuorovaikutuksessa muodostuvaan sokeri-fosfaattirunkoon. Niillä on myös vaikutus DNA-polymeraasin aktiivisuuteen. Magnesiumionien vaikutusta voidaan säätää muuttamalla standardipuskurin magnesiumkloridi ($MgCl_2$) konsentraatiota pienin askelin 0,5 – 5,0 millimolaariseksi. Säättämällä on merkittävä vaikutus alukkeiden ja templaatin väliseen pariutumiseen. Liian suuri magnesiumionikonsentraatio voi johtaa DNA-polymeraasin epätarkkuuteen ja näin epäspesifin reaktiotuotteen muodostumiseen. Liian matalalla ionikonsentraatiolla on taas alentava vaikutus reaktion tehokkuuteen. (McPherson & Møller 2000, 68.)

PCR:n optimointiin liittyvissä tutkimuksissa on havaittu, että kalium- ja ammoniumioneilla on negatiivinen vaikutus reaktion etenemisen kannalta. Kaliumkloridin (KCl) lisäämisen on huomattu vaikuttavan DNA:n sulamisominaisuuksiin neutraloimalla rungossa olevien fosfaattiryhmien negatiivisen varauksen. Tämän seurauksena emästen välisistä vetysidoksista tulee entistä merkittävämpiä. Korkeiden KCl pitoisuuksien (yli 0,2 M) on todettu aiheuttavan niin voimakkaan DNA:n stabilisaation, että sen denaturaatio estyy 94 celsiusasteessa. Tämä johtaa myös PCR:n epäonnistumiseen. (McPherson & Møller 2000, 69.)

3.2.2 DNA-polymeraasi konsentraatio

DNA-polymeraasi entsyymien konsentraatio on merkittävä osa PCR-reaktion onnistumisen kannalta. Vääränlaisella konsentraatiolla reaktiotuotteen muodostuminen voi jäädä vähäiseksi tai sitä ei muodostu ollenkaan. Polymeeraaseja on saatavilla monia versioita erilaisin aktiivisuuksin ja konsentraatioin. Lisäksi prosessiivisuuden suhteen voi olla vaihteluita, esimerkiksi thermostabiileilla ja oikolukuominaisuuden (eng. proofreading) omaavilla DNA-polymeraaseilla voi olla alhaisempi prosessiivisuus kuin Taq DNA-polymeraasilla. Oikolukuominaisuudella varustettua entsyymiä voi siis tarvita

suuremman pitoisuuden, onnistuneen amplifikaation saavuttamiseksi. Thermostabiilien DNA-polymeeraasien käytössä on hyvä muistaa niiden käyttäytyminen liian korkeissa lämpötiloissa, koska inaktiivatio voi johtaa reaktiotuotteen muodostumattomuuteen. DNA:n denaturaatiovaiheessa on siis hyödynnettävä alhaisinta tehokasta lämpötilaa DNA-polymeeraasin toimintakyvyn turvaamiseksi. (McPherson & Møller 2000, 69.)

3.2.3 Lämpötilat

PCR-reaktio aloitetaan DNA:n denaturaatiolla, joka tapahtuu lämpötilaa nostamalla. Denaturaatiovaihe kestää noin 5 minuuttia ja siinä nostetaan lämpötilaa noin 94 celsiusasteeseen. C ja G rikkailla templaateilla denaturaatiolämpötilan on suositeltavaa oltava korkeampi, noin 96 celsiusastetta. Denaturaatiovaiheen on tärkeää olla riittävän pitkä ja tehokas, koska muuten osittain denaturoituneet DNA-molekyylit pyrkivät reassoitumaan. Tämä taas johtaa alukkeiden tehottomaan kiinnittymiseen ja DNA:n syntetisaation estymiseen. Denaturaatiovaiheen lämpötilavertailuissa on havaittu, että DNA-molekyylit (lukuun ottamatta C ja G rikkaita molekyylejä) voivat denaturoitua jo 90-92 celsiusasteessa. Tämän on huomattu lisäävän prosessin tehokkuutta, koska alhaisempia lämpötiloja hyödyntämällä pystytään pidentämään muun muassa DNA-polymeeraasin käyttöikä. (McPherson & Møller 2000, 69.)

Reaktion annealing-vaiheessa alukkeet kiinnittyvät spesifisesti kohdesekvensseihin. Kiinnittymisen onnistumisen kannalta on erityisen tärkeää optimoida reaktion vaihe lämpötilan kannalta. Optimaalinen annealing lämpötila vähentää epäspesifisten reaktiotuotteiden monistumista ja lisää reaktion tehokkuutta. Vaiheen tulisi kestää noin 30-60 sekuntia, koska liian pitkä hehkutus voi aktivoida DNA-polymeeraasin, joka taas lisää virheen mahdollisuutta. Annealing-vaiheessa käytettävä lämpötila on riippuvainen monistettavasta tuotteesta. Esimerkiksi suuren genomisen DNA-fragmentin monistamiseen tarvitaan jopa 72 °C lämpötila, että päästään toivotunlaiseen lopputulokseen. (McPherson & Møller 2000, 70.)

Annealing vaiheen hehkutuslämpötilaa säätämällä voidaan lisätä templaatin ja alukkeen välisen pariutumisen spesifisyyttä. Spesifisyyden parantamiseksi voidaan hyödyntää erilaisia tekniikoita, jotka perustuvat lämpötilojen vaihteluun kyseisessä vaiheessa. Käytettäviä tekniikoita ovat muun muassa "touchdown" PCR ja "hot start" PCR. (McPherson & Møller 2000, 71.) Esimerkiksi "touchdown" PCR:ssä ensimmäinen annealing-vaiheen lämpötila nostetaan alukkeiden T_m lämpötilaa korkeammalle, jonka jälkeen sitä lasketaan asteittain alukkeiden laskennallista T_m lämpötilaa vastaavaksi tai hieman sen alle. Tämän jälkeen reaktiota jatketaan kyseisellä lämpötilalla. (New England BioLabs, 2019.) Käytettävän tekniikan avulla voidaan varmistaa alukkeiden kiinnittyminen kohdesekvenssiin ja välttyä ei-toivotuilta reaktiotuotteilta. Hyvänä muistisääntönä on, että käytettäessä noin 20 nukleotidin mittaisia alukkeita lämpötilaa kannattaa laskea noin 65 celsiusasteesta 55 celsiusasteeseen. Lämpötilaa tulee laskea yhden lämpöasteen verran joka toisella syklillä aina kahdenteenkymmenenteen sykliin saakka. Reaktiota olisi hyvä suorittaa tämän jälkeen vielä 10 kertaa, koska reaktion

alussa amplifioituneet tuotteet ovat spesifisiä. Näin saadaan kasvatettua reaktioseoksessa olevan kohdesekvenssin konsentraatiota. (McPherson & Møller 2000, 71.)

PCR-reaktio voi joskus päättyä epäonnistumiseen ja reaktiotuotteen puuttumiseen tai epäspesifin tuotteen muodostumiseen. Tällöin käytetty annealing-lämpötila on ollut joko liian korkea tai liian matala. Liian korkeassa annealing-vaiheen lämpötilassa reaktiotuote voi jäädä muodostumatta ja liian matalassa taas yksittäinen aluke voi sitoutua useammalle alueelle templaattissa. Reaktiotuotteen puuttuminen voidaan korjata lämpötilaa laskemalla, jolloin alukkeiden toiminta muuttuu tehokkaammaksi ja toivotunlainen lopputulos voidaan saavuttaa. Liian matalan annealing-lämpötilan aiheuttama poikkeama taas voidaan huomata kontrollilinjaa agarosigeeliltä tulkittaessa vain yhden alukkeen esiintymisenä. (McPherson & Møller 2000, 70.)

3.3 RT-PCR (eng. Reverse Transcriptase PCR)

RT-PCR on käänteiskopioijaensyymien avulla tapahtuva polymeerasiketjureaktio. Reaktion ensimmäisessä vaiheessa yksijuosteisesta RNA-molekyylistä muodostetaan kaksijuosteinen RNA-DNA-hybridi. Tämän jälkeen hybridissä oleva DNA-jakso voi toimia templaattina myöhemmissä sykleissä, jolloin saadaan syntetisoitua kaksijuosteista DNA:ta. Useimmiten DNA:ta syntetisoidaan lähetti-RNA:sta (mRNA), jolloin saadaan cDNA:ta (eng. complementary DNA). Komplementaarilla DNA:lla tarkoitetaan geeniä, josta on poistettu intronit. RT-PCR menetelmää käytetään yleensä cDNA-kirjaston valmistamiseen, kloonamiseen ja geenien ekspressoitumiseen sekä saman geenin eri lähetti-RNA muotojen tutkimiseen. (Solunetti 2006.) Esimerkiksi geenin ekspressiota tutkittaessa RT-PCR:n avulla pystytään määrittämään sisältääkö tutkittava mRNA haluttua geeniä. Menetelmässä voidaan muun muassa kasvattaa organismeja eri olosuhteiden alla ja tämän jälkeen tutkia geenin ekspressiota. Geenin ollessa läsnä käänteiskopioijaensyymi muodostaa komplementaarista-DNA:ta, jonka jälkeen PCR-reaktiossa hyödynnettävät spesifiset alukkeet voivat sitoutua syntetisoituun DNA-jaksoon ja näin templaattia saadaan amplifioitua. Geenin puuttuessa cDNA:ta ei muodostu ja PCR-tuotetta ei pääse muodostumaan. (Clark 2005, 647.)

4 REAALIAIKAINEN PCR

Reaaliaikainen PCR perustuu samaan tekniikkaan kuin tavanomainen PCR, mutta eroaa amplifioidun DNA:n detektio suhteen. Tavanomaisessa PCR-menetelmässä amplifioidun tuotteen detektio tapahtuu PCR-reaktion päätyttyä agarosigeelillä. Reaaliaikaisessa PCR-menetelmässä tuotteen monistumista voidaan seurata monitorin avulla jo reaktion edistymisvaiheessa. (Bio-Rad laboratories 2006.)

PCR-tuotteen detektio reaaliaikaisessa PCR:ssä on tehty mahdolliseksi lisäämällä reaktioon fluoresoivia molekyylejä, jotka raportoivat DNA määrän lisääntyessä fluoresoivalla signaalilla. Signaalin voimakkuus on suoraan verrannollinen DNA:n määrään. Kyseiseen tarkoitukseen käytettävät fluoresoivat kemikaalit sisältävät DNA:ta sitovia väriaineita ja fluorokromilla merkittyjä sekvenssejä (spesifiset alukkeet tai koettimet). Erikoistuneet PCR-laitteet on varusteltu fluoresenssia detektoivilla moduuleilla, jotka havaitsevat fluoresenssin voimakkuuden amplifikaation edetessä. Fluoresenssin voimakkuus mitataan jokaisella syklillä. (Bio-Rad laboratories 2006.)

Suurimpana etuna tavanomaiseen PCR-menetelmään verrattuna reaaliaikaisessa PCR:ssä käyttäjä voi määrittää templaatin määrän tarkasti ja suurella dynaamisella alueella ennen reaktion alkamista. Lisäksi reaaliaikainen PCR on paljon spesifisempää ja ajallisesti tehokkaampaa. Myös kontaminaation riski on mitätön tavanomaiseen menetelmään verrattuna, koska reaktio tapahtuu suljetussa tilassa. Reaaliaikaisesta PCR:stä saatavat tulokset voivat olla joko kvalitatiivisia tai kvantitatiivisia. Kvantitatiivinen reaaliaikainen PCR tunnetaan myös lyhenteellä, qPCR. (Bio-Rad laboratories 2006.)

4.1 Fluoresoivat merkkiaineet

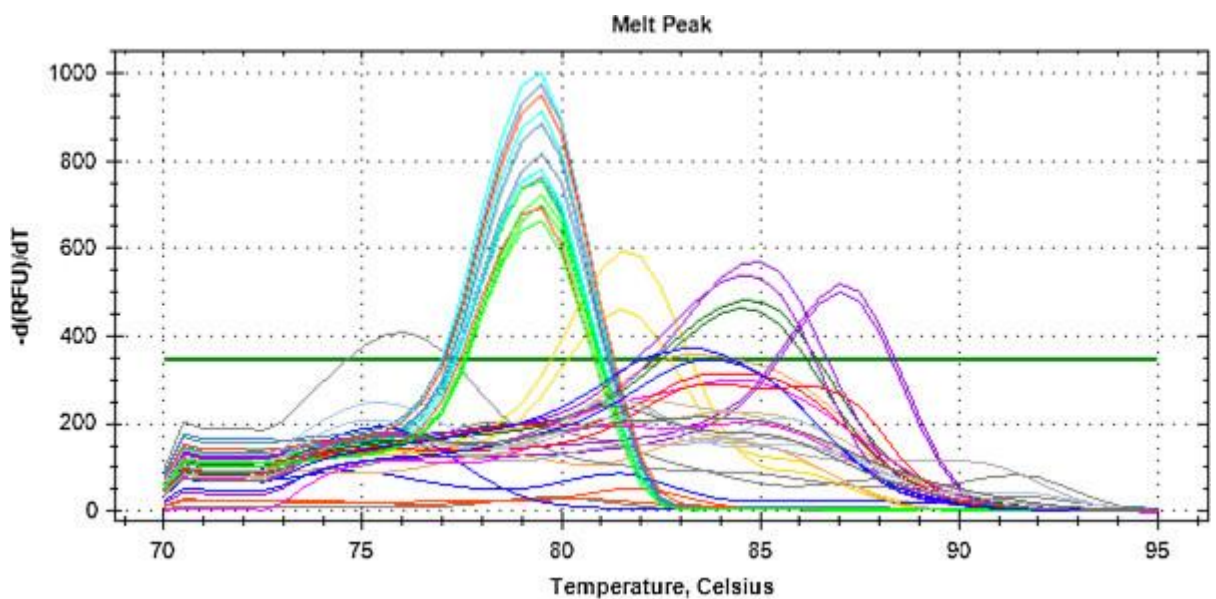
Reaaliaikaisen PCR:n suorituksessa on tärkeää valita oikeanlainen fluoresoiva merkkiaine, jotta kohde sekvenssin amplifikaatiota pystytään seuraamaan. Fluoresoivat merkkiaineet jaetaan kahteen kategoriaan, DNA:han sitoutuviin ja värillä leimattuihin spesifiisiin oligonukleotidi alukkeisiin tai koettimiin. Esimerkkinä DNA:han sitoutuvasta fluoresoivasta merkkiaineesta on yleisesti käytetty SYBR GREEN I ja väriaineella leimatuista hydrolyysiin perustuvat TaqMan-koettimet. Muita fluoresoivia väriaineita sisältäviä variaatioita ovat hybridisaatiokoettimet, pimennyskoettimet, Eclipse-koettimet, Molecular Beacon-koettimet sekä alukkeisiin perustuvat koettimet, kuten skorpioni-, LUX- ja QZyme PCR-koettimet. Alukkeisiin perustuviin koettimiin lukeutuvat myös Amplifluor assay-koettimet. (Bio-Rad laboratories 2006.)

Fluoresoivien väriaineiden valintaan vaikuttavat määrityksessä käytettävä tekniikka ja kustannukset. Pienemmän tehokkuuden määrityksissä (Singleplex-määritykset) DNA:han sitoutuvat merkkiaineet ovat parempi valinta, koska ne ovat nopeampia käyttää ja edullisia. Suuren tehokkuuden määrityksissä (Multiplex-PCR) taas fluoresoivien alukkeiden tai koettimien käyttö on suositeltavaa, koska ne ovat spesifisempiä ja yksinkertaisesti sopivampia kyseiseen tekniikkaan. (Bio-Rad laboratories 2006.)

4.1.1 DNA:han sitoutuvat merkkiaineet

DNA:han sitoutuvien fluoresoivien merkkiaineiden toiminta perustuu epäspesifiseen sitoutumiseen kaksijuosteiseen DNA-jaksoon. Merkkiaineen ollessa vapaana reaktioseoksessa se lähettää vain heikkoa fluoresenssisignaalia, mutta kaksijuosteiseen DNA-jaksoon sitoutuessaan sen fluoresenssisignaalin voimakkuus kasvaa noin tuhatkertaiseksi. Voimistuneen fluoresenssisignaalin voimakkuus on siis suoraan verrannollinen kaksijuosteisen DNA:n määrään. DNA:han sitoutuvien merkkiaineiden etuna ovat niiden helppokäyttöisyys, kyky testata useita geenejä nopeasti ilman lukuisten koettimien suunnittelua sekä matalat kustannukset. Lisäksi reaktiossa tapahtuneen amplifikaation spesifisyys voidaan varmistaa sulamispisteanalyysin avulla. (Bio-Rad laboratories 2006.)

Sulamispisteanalyysin avulla pystytään identifioimaan reaktiossa käytettyjä tuotteita ja erottamaan epäspesifiset tuotteet. Sulamiskäyrä (eng. melt curve) (KUVA 1.) luodaan nostamalla lämpötilaa pienin askelin samalla seuraten fluoresenssin muutosta jokaisella askeleella. Kaksijuosteisen DNA:n denaturoitua fluoresenssi pienenee ja käyrä on laskusuuntainen. Käyrä piirretään derivaattamuodossa ($-dF/dT$), jossa fluoresenssin ensimmäinen negatiivinen derivaatta piirretään lämpötilan funktiona. Käyrään piirtyvä luonteenomainen huippu kuvaa ampikonin sulamislämpötilaa, jonka avulla se on erotettavissa muista reaktiotuotteista. Käyrän arvo T_m kuvaa tuotteen sulamislämpötilaa, jossa noin 50 prosenttia tuotteesta on denaturoituneena eli yksijuosteisena. (Bio-Rad laboratories 2006.)



KUVA 1. Sulamiskäyrä (eng. melt curve) (BioMed Central 2012). Kuvassa oleva korkea huippu kuvastaa ampikonin sulamislämpötilaa. Kuvan vihreä vaakasuora viiva taas kuvastaa T_m -lämpötilaa.

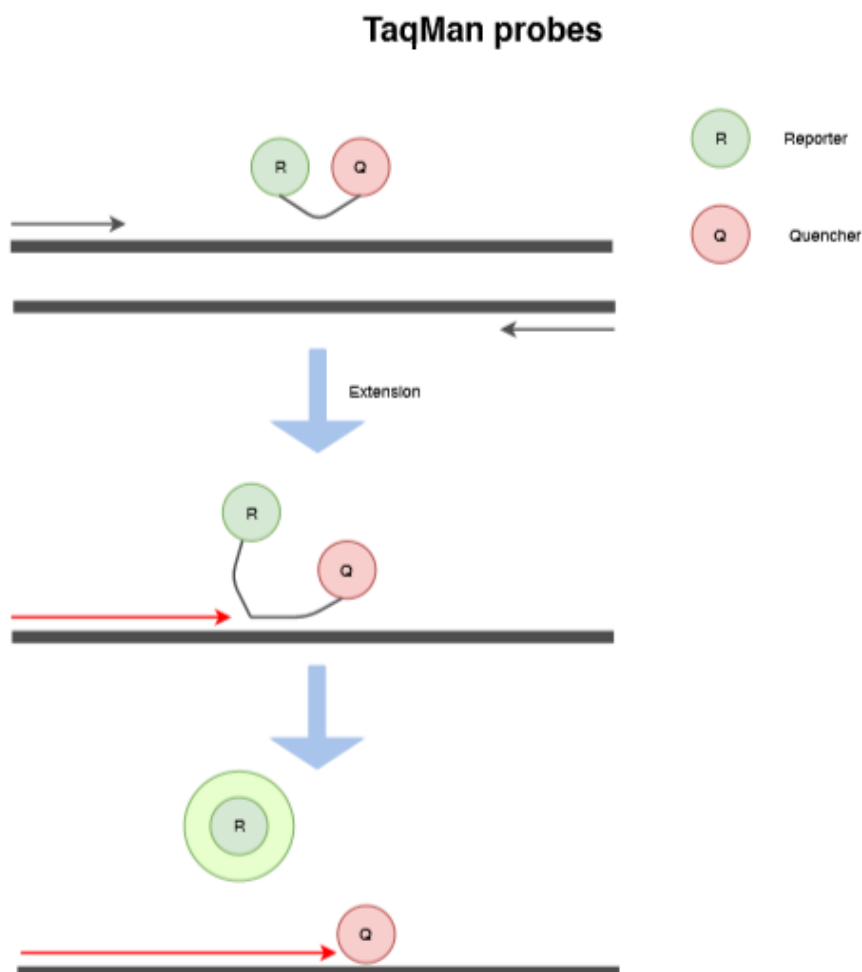
4.1.2 Alukkeisiin ja koettimiin perustuvat merkkiaineet

Alukkeisiin ja koettimiin perustuvat fluoresoivat merkkiaineet perustuvat fluoresenssin aiheuttaman resonanssienergian siirtoon (eng. FRET= fluorescence resonance energy transfer) tai fluoresenssin sammuttamiseen. Alukkeet tai kohdesekvenssille spesifiset oligonukleotidi koettimet on merkitty reporterifluoroforilla. Yleisimmin käytetty tekniikka on fluoresenssin sammuttaminen, joka tapahtuu

koettimeen asetetun sammuttajamolekyylin avulla. Alukkeisiin ja koettimiin perustuvien merkkiaineiden suurimpana etuna on niiden spesifisyys, jonka vuoksi epäspesifiset tuotteet eivät pysty häiritsemään määrittelyn tarkkuutta. Tämän perusteella myös Multiplex-määrittelyt ovat mahdollisia kyseisellä tekniikalla, eli on mahdollista monistaa eri alueita samanaikaisesti. Näiden erottaminen toisistaan tapahtuu fluorokromien avulla. (Bio-Rad laboratories 2006.)

4.1.3 Erilaisia alukkeita ja koettimia

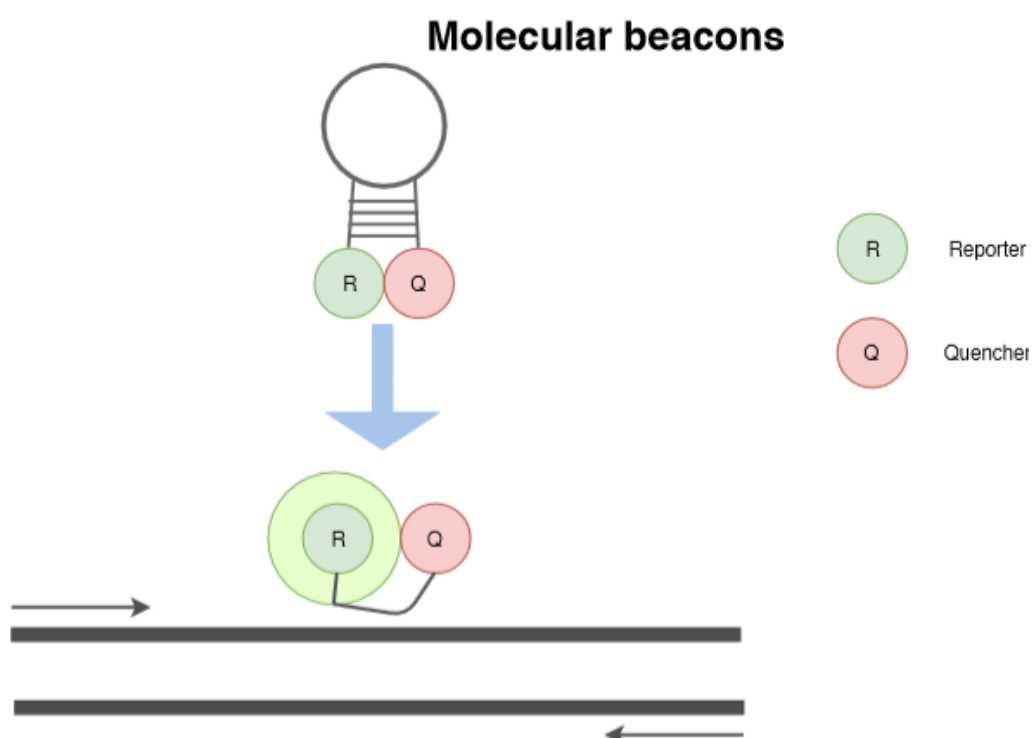
TaqMan-koettimet (KUVA 2.) ovat fluoresenssi merkittyjä ja sekvenssi spesifisiä koettimia, jotka hyödyntävät tiettyjen termostabiilien polymeraasien 5'-eksonukleaasi aktiivisuutta. Koetin koostuu 5'-päädyssä olevasta fluoresoivasta reportterista ja 3'-päässä olevasta sammuttajasta. Koettimen ollessa koskematon, reportterin aiheuttama fluoresenssi on vaimennettu sammuttajamolekyylin läsnäolon vuoksi. Amplifikaatioreaktion lämpökäsittelyvaiheessa koetin hybridisoituu kohdesekvenssiin ja sen kaksoisjuoste spesifinen 5'→3' eksonukleaasiaktiivinen pää katkaisee reportterin irti. Tämän seurauksena alkaa vapautua fluoresenssisignaalia, joka on suoraan verrannollinen amplifioitujen tuotteiden määrään. Yleisimmin käytetty reportteri-sammuttaja pari on fluoreseiini (FAM= Fluorescein Amidite)-mustanaukon sammuttaja (eng. Black Hole Quencher) pari, jossa FAM emittoi vihreää fluoresenssia. (Bio-Rad laboratories 2006.)



KUVA 2. TaqMan-koettimien toiminta (TOIVONEN & MATTILA 2019). Toimii yhdessä forward- ja reverse-alkukkeiden kanssa. Perustuu polymeraasin eksonukleasiaktiivisuuteen, joka katkaisee koettimen. Kuvassa olevat mustat nuolet kuvastavat DNA-polymeraasin kulkusuuntaa ja siniset nuolet siirtymistä seuraavaan vaiheeseen.

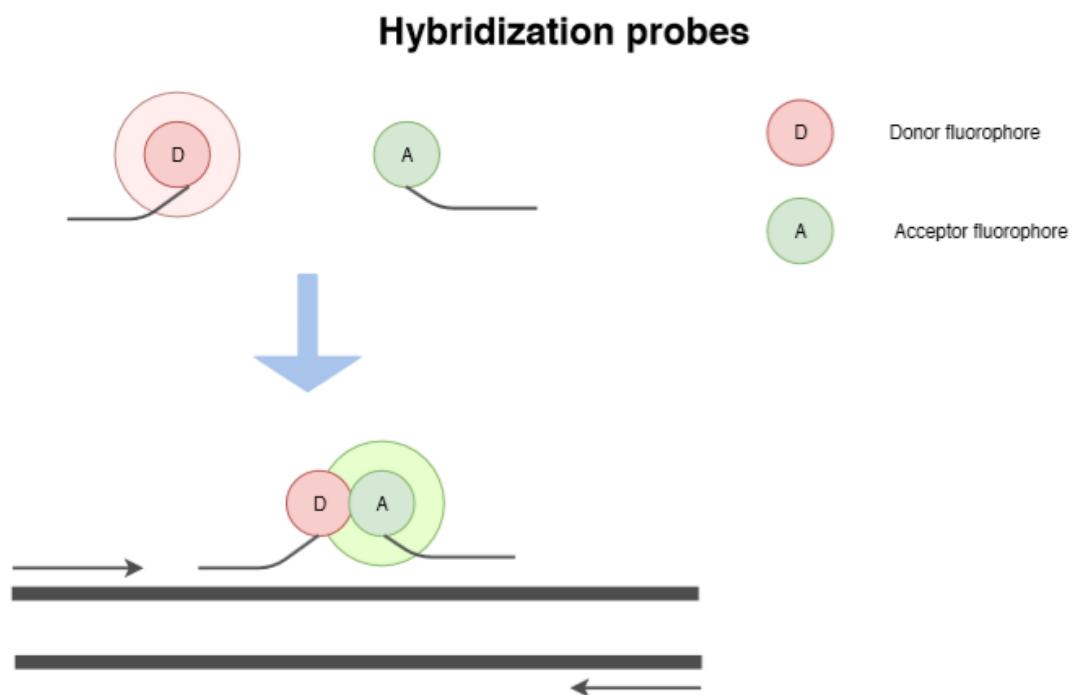
Molecular Beacon-koettimet (KUVA 3.) ovat värileimattuja ja sekvenssispesifisiä oligonukleotideista (25 – 40 nukleotidia) muodostuvia koettimia, jotka omaavat hiuspinnimäisen (päätyilmukka ja kaksi vartta) rakenteen. Koettimen fluoresoiva reportteri sijaitsee 5'-päädyssä ja sammuttaja 3'-päädyssä. Koettimessa sijaitseva silmukan muotoinen pääty on suunniteltu hybridisoitumaan noin 15 – 30 nukleotidin mittaiselta alueelta kohdesekvenssiin. Silmukan toisessa päädyssä sijaitsee 5 – 6 nukleotidia, joista lähtee varsimaiset rakenteet. Näiden rakenteiden päädyssä sijaitsevat reportteri ja sammuttaja, jotka toistensa läheisyydessä estävät fluoresenssin vapautumisen. Koettimen kiinnittyminen kohdesekvenssiin tapahtuu amplifikaatioreaktion alkukkeiden kiinnittymisvaiheessa (eng. annealing), jossa se samalla erottaa reportterin ja sammuttajan toisistaan. Tämän seurauksena fluoresenssia alkaa vapautua. Erona TaqMan-koettimien toimintaan Molecular Beacon-koettimet eivät tuhoudu amplifikaation aikana vaan muuttavat muotoaan. Tämä johtuu DNA-polymeraasin 5' eksonukleasi aktiivisuuden puutteesta. Koettimesta emittoituvan fluoresenssin määrä on suoraan verrannollinen muodostuneen reaktiotuotteen määrään. (Bio-Rad laboratories 2006.)

Molecular Beacon-koettimien suurin etu on niiden erittäin suuri spesifisyys. Jos kohdesekvenssi ei ole sopiva Beacon-sekvenssin kanssa, hybridisaatio ja fluoresenssi jää ilmenemättä. Menetelmän heikkoutena voidaan pitää sen rakenteellisia vaatimuksia, koska heikkorakenteiset koettimet voivat menettää muotonsa ja näin tuottaa odottamatonta fluoresenssia. Liian vahvarakenteiset koettimet taas saattavat hybridisoitua väärin. (Bio-Rad laboratories 2006.)



KUVA 3. Molecular Beacon-koettimien toiminta (TOIVONEN & MATTILA 2019). Molecular Beacon-koettimet eivät tuhoudu amplifikaation aikana vaan muuttavat muotoaan. Kuvassa olevat mustat nuolet kuvastavat DNA-polymeraasin kulkusuuntaa ja siniset nuolet siirtymistä seuraavaan vaiheeseen.

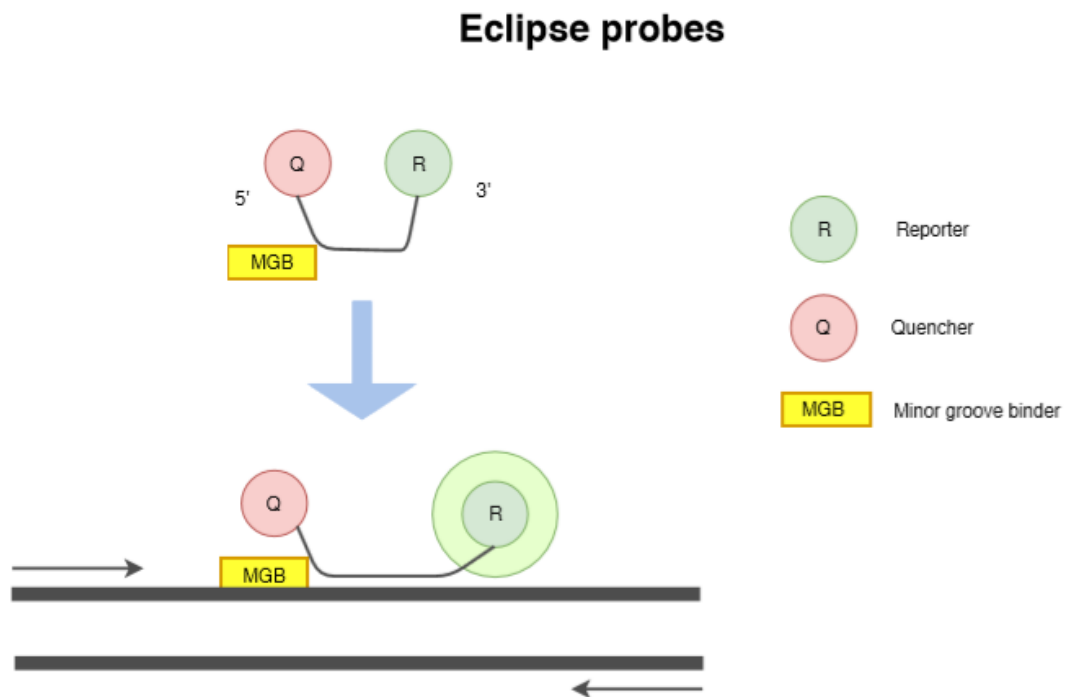
Hybridisaatiokoettimien (KUVA 4.) toiminnassa käytetään hybridisaatiokoetintekniikkaa, jossa hyödynnetään kahta sekvenssispesifistä koetinta ja aluketta. Koettimien kiinnittyminen tapahtuu templaatin vierekkäisiin sekvensseihin alukkeiden kiinnittymisen jälkeen. Koettimet kiinnittyvät pääpuolet vastakkain. Toinen koettimista kantaa 3'-päädyssä luovuttaja väriainemolekyyliä ja toinen taas 5'-päädyssä vastaanottaja väriainemolekyyliä. Väriainemolekyylit ovat suunniteltu niin, että luovuttaja-molekyylin vapauttaman säteilyn spektri ylittää merkittävästi vastaanottaja-molekyylin viritystilan muodostaman spektrin. Reaktiossa seurataan vastaanottaja-molekyylin emission aallonpituutta, joka on peräisin lähellä olevan luovuttaja-molekyylin siirtämästä fluoresenssin resonanssienergiasta. Vastaanottaja-molekyylin fluoresenssin määrä on siis suoraan verrannollinen muodostettuun PCR-tuotteeseen. (Bio-Rad laboratories 2006.)



KUVA 4. Hybridisaatiokoettimen toiminta (TOIVONEN & MATTILA 2019). Luovuttaja-molekyylin vapauttaman säteilyn spektri ylittää merkittävästi vastaanottaja-molekyylin viritystilan muodostaman spektrin. Kuvassa olevat mustat nuolet kuvastavat DNA-polymeraasin kulkusuuntaa ja sininen nuoli siirtymistä seuraavaan vaiheeseen.

Pimennyskoetin (eng. eclipse probe) (KUVA 5.) tekniikassa hyödynnetään kahta aluketta ja yhtä sekvenssispesifistä oligonukleotidi koetinta. Koetin on komplementaarinen amplikonin sekvenssin kanssa ja sisältää fluoresoivan reporterin 3'-päädyssä. Sammuttajamolekyylit on taas koettimen 5'-päädyssä, joka sisältää myös MGB (eng. minor groove binder) sidosainetta. (Bio-Rad laboratories

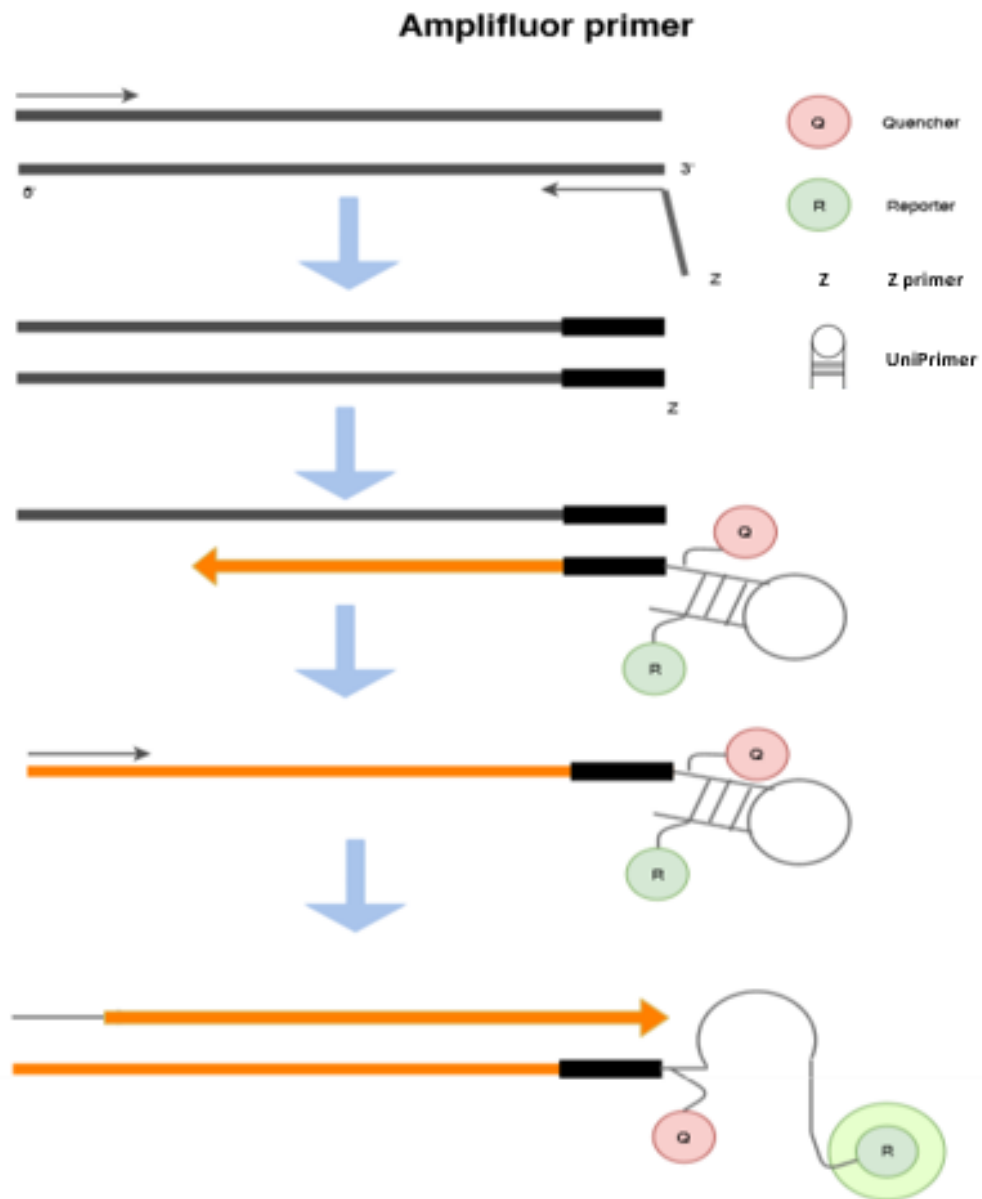
2006.) Kyseiset sidosaineet ovat molekyyliä, jotka kiinnittyvät selektiivisesti DNA-heliksiin uurteeseen muodostaen vetysidoksia emästen ja sidosmolekyylien välille (BioSynthesis, 2018). Koetin kiinnittyy kohdesekvenssiin alukkeiden kiinnittymisen jälkeen sidosaineen helpottamana, jonka seurauksena se linearisoituu. Linearisoituminen aiheuttaa reportterin ja sammuttajamolekyylin erkanemisen toisistaan, jonka seurauksena reportteri alkaa vapauttaa fluoresenssia. Mitatun fluoresenssin määrä on verrattavissa muodostetun PCR-tuotteen määrään. (Bio-Rad laboratories 2006.)



KUVA 5. Pimennyskoettimen toiminta (TOIVONEN & MATTILA 2019). Koetin kiinnittyy kohdesekvenssiin sidosaineen helpottamana, jonka seurauksena se linearisoituu. Kuvassa olevat mustat nuolet kuvastavat DNA-polymeraasin kulkusuuntaa ja sininen nuoli siirtymistä seuraavaan vaiheeseen.

Amplifluoralukkeen toiminnassa (KUVA 6.) amplifluor kemialla hyödyntävä tekniikka perustuu kahteen sekvenssispesifiseen- ja yhteen yleismaailmalliseen (eng. UniPrimer) alukkeeseen. Toinen sekvenssispesifisistä alukkeista sisältää 5'-päädysään sekvenssijatkkeen, jota kutsutaan Z-sekvenssiksi. Vastaavanlainen sekvenssijatke löytyy myös UniPrimerista, joka omaa hiuspinnimäisen rakenteen. UniPrimerin 5'-päädyn varsirakenteessa sijaitsee fluoresenssia emittoiva reportteri ja 3'-päädysää taas sammuttajamolekyyli. Fluoresenssi on kuitenkin vaimennettuna reportterin ja sammuttajan ollessa lähekkäin. Amplifikaation ensimmäisen syklin aikana, Z-sekvenssillä varustettu spesifinen alue hybridisoituu templaattiin ja kiinnittyy siihen. Seuraavaksi amplifikaatioreaktion toisen syklin aikana toinen sekvenssispesifisistä alukkeista kiinnittyy seuraavaan templaattiin, joka on komplementaarinen alukkeessa olevan Z-sekvenssin kanssa. Kyseinen tuote toimii seuraavassa vaiheessa templaattina UniPrimerille, joka kiinnittyy sekvenssiin polymeraasin toimesta. Templaattiin kiinnittynyt UniPrimer taas toimii templaattina amplifikaatioreaktion kolmannessa syklissä. Reaktion neljännen syklin aikana UniPrimerissa oleva silmukka muuttuu muotoaan lineaarisemmaksi, jonka seurauksena reportteri ja sammuttajamolekyyli erkanevat toisistaan. Tämän seurauksena reportteri alkaa emittoida

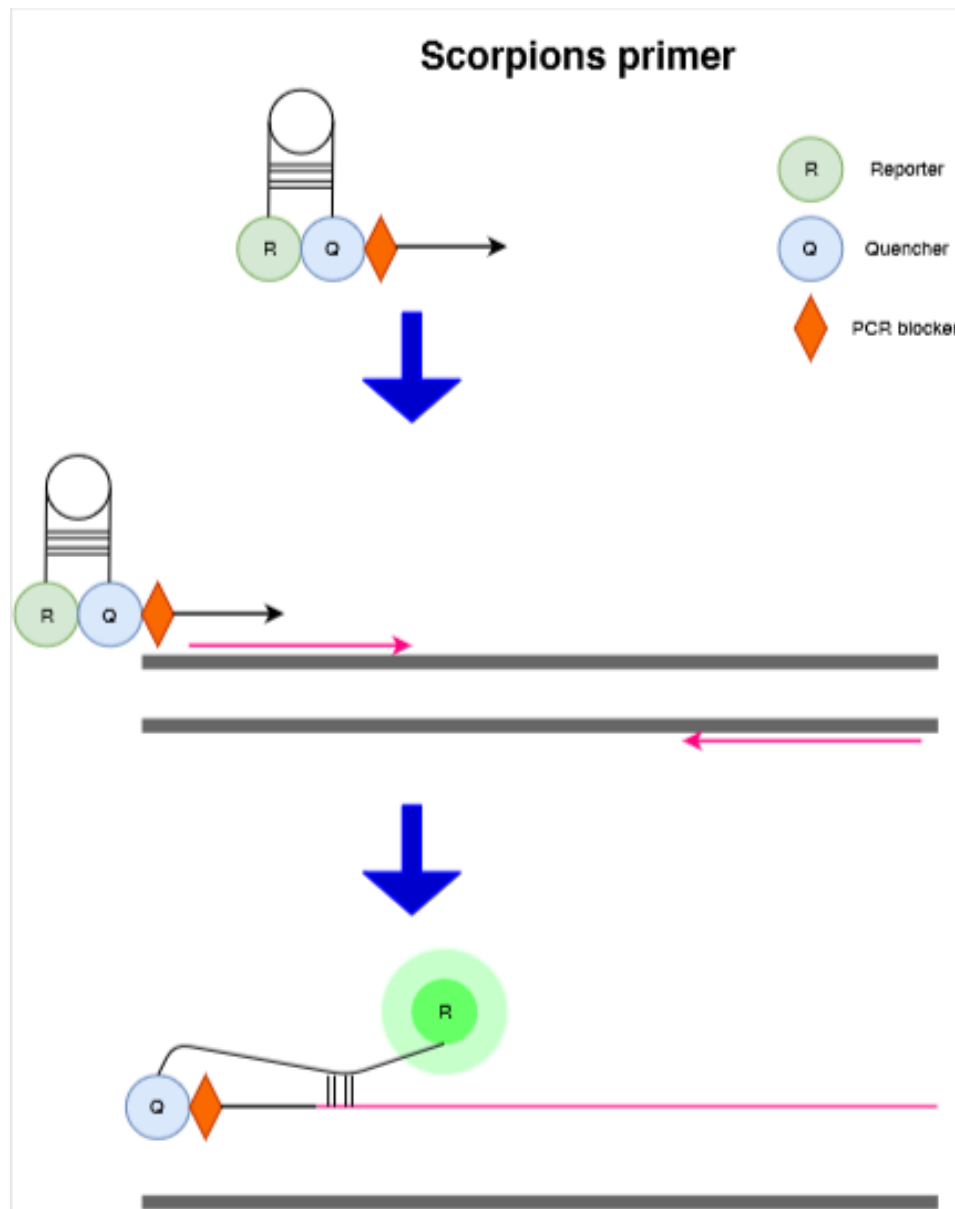
fluoresenssia. Fluoresenssisignaalin voimakkuus on verrannollinen PCR-tuotteen määrään. (Bio-Rad laboratories 2006.)



KUVA 6. Amplifluorkoettimen toiminta (TOIVONEN & MATTILA 2019). UniPrimer kiinnittyy sekvenssiin polymeraasin toimesta. UniPrimerin silmukka muuttuu lineaarisemmaksi, jonka seurauksena reportteri ja sammuttajamolekyylit erkanevat toisistaan. Kuvassa olevat mustat nuolet kuvastavat DNA-polymeraasin kulkusuuntaa ja siniset nuolet siirtymistä seuraavaan vaiheeseen.

Skorpionialukkeisiin (KUVA 7.) perustuva tekniikka hyödyntää kahta aluketta, joista toinen toimii koettimena. Koettimena toimiva aluke omaa silmukkamaisen rakenteen, jonka päädyssä on varsi. Sen 5'-päädyssä on fluoresoiva reportteri ja 3'-päädyssä sammuttajamolekyylit. Skorpionialukkeiden 3'-pääty sisältää myös PCR-estäjän (eng. PCR blocker), joka estää vastakkaisen juosteen uudelleen lukemisen reaktion aikana. Koettimessa olevan silmukan sekvenssi on komplementaarinen koh-

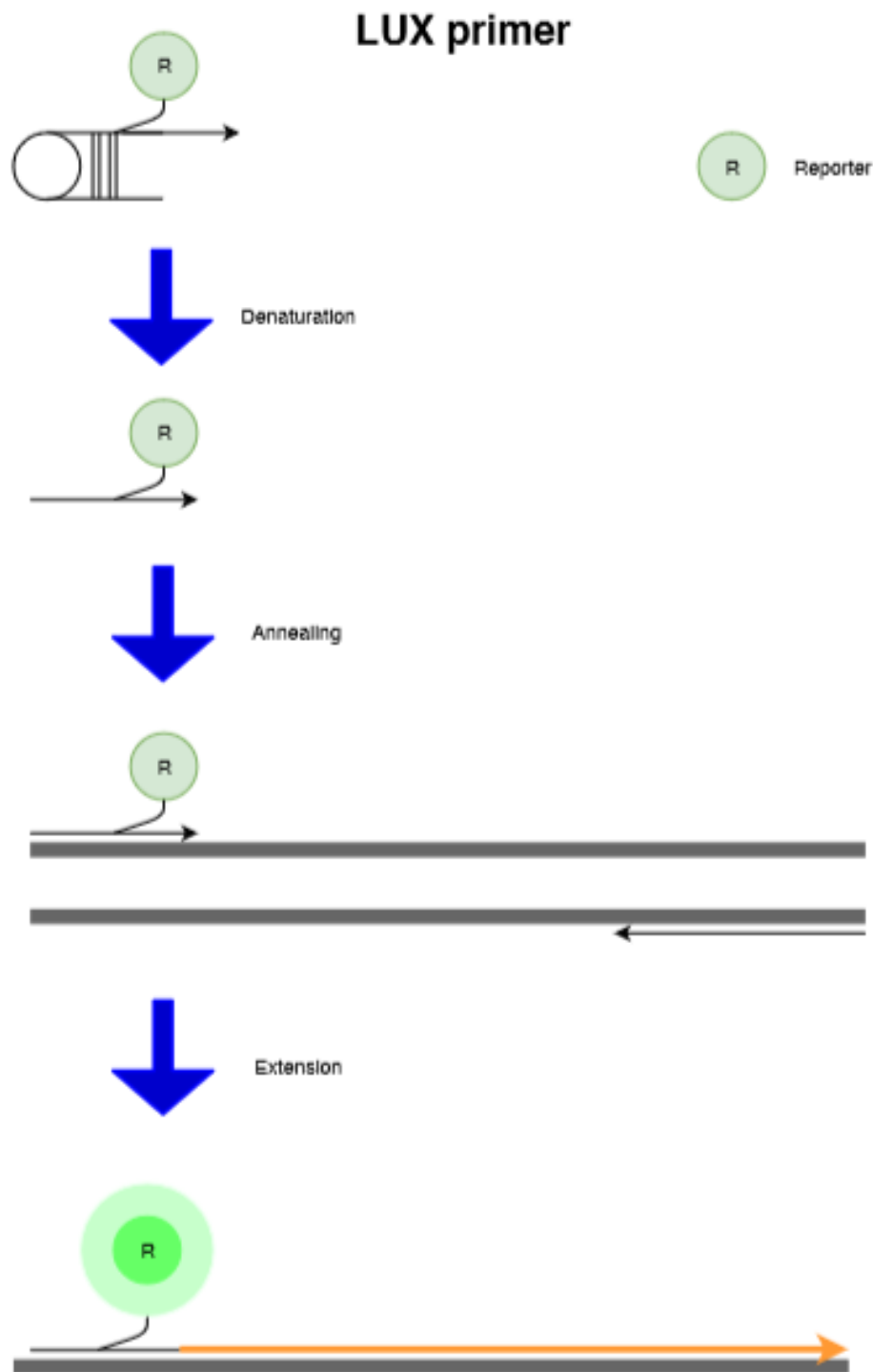
desekvenssin kanssa, jonka avulla se kiinnittyy kohdesekvenssiin amplifikaatioreaktion aikana. Skorpionialukkeen hybridisoituminen kohdesekvenssiin tapahtuu intramolekulaarisella vuorovaikutuksella. Hybridisaation seurauksena koettimessa olevat reportteri ja sammuttajamolekyylit erkanevat toisistaan ja reportteri alkaa emittoida fluoresenssia. Fluoresenssin voimakkuus on suoraan verrannollinen muodostuneen PCR-tuotteen määrään. (Bio-Rad laboratories 2006.)



KUVA 7. Skorpionialukkeen toiminta (TOIVONEN & MATTILA 2019). Skorpionialukkeen hybridisoituminen kohdesekvenssiin tapahtuu intramolekulaarisella vuorovaikutuksella. Kuvassa olevat pinkit nuolet kuvastavat DNA-polymeraasin kulkusuuntaa ja siniset nuolet siirtymistä seuraavaan vaiheeseen. Mustat nuolet kuvastavat koettimen lukusuuntaa.

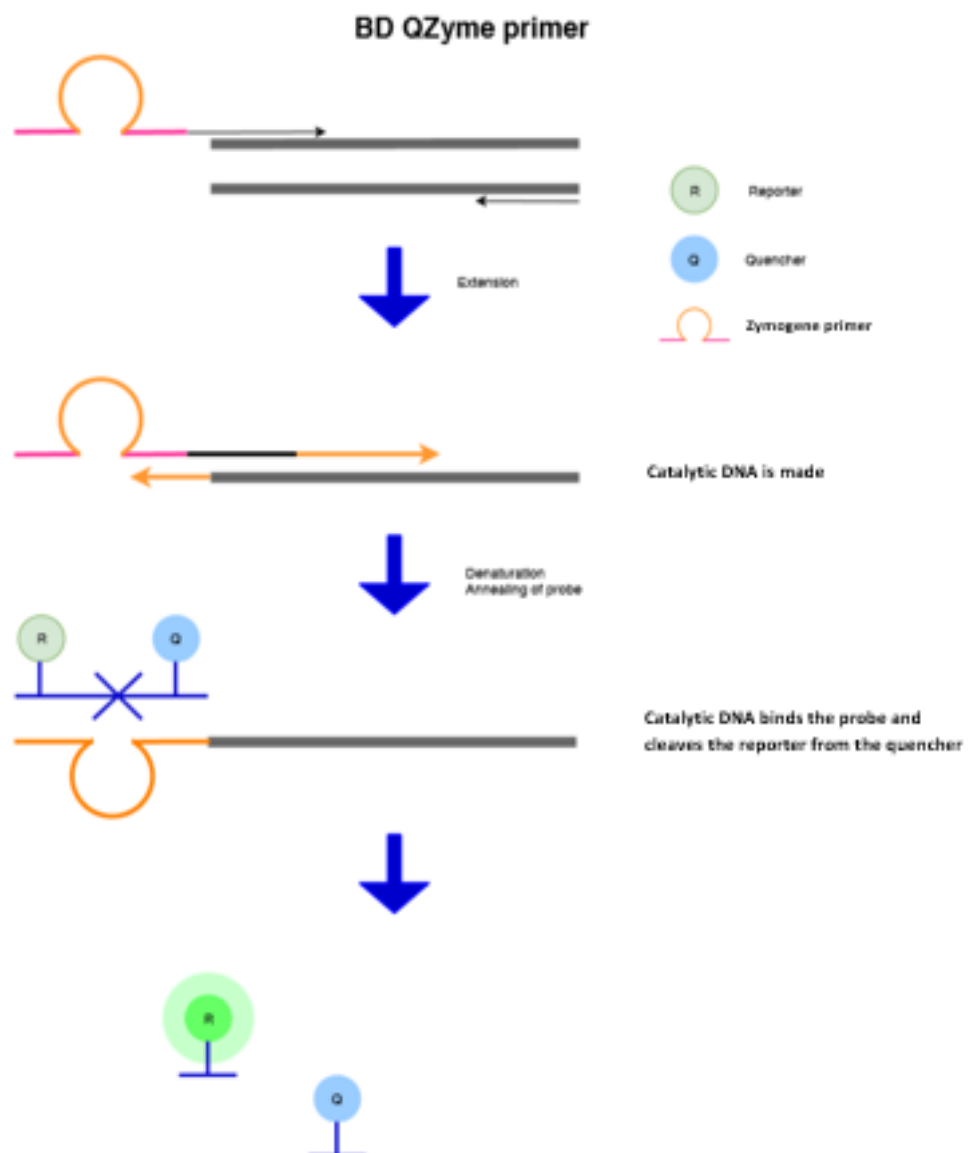
LUX (Light Upon eXtension) -alukkeet (KUVA 8.) ovat erittäin herkkiä, mutta menetelmänä se on helppokäyttöinen ja tehokas reaaliaikaiseen kvantitatiiviseen PCR:n (qPCR) sekä RT-PCR:n (qRT-PCR) (Thermo Fisher Scientific 2004). Kyseisiä alukkeita hyödyntävä määrittäminen perustuu kahteen alukkeeseen, joista toinen on leimattu fluoroforilla ja toinen on leimaamaton. Leimatun alukkeen 3'-päättyyn on sijoitettuna joko FAM (6-carboxy-fluorescein)- tai JOE (6-carboxy-4', 5'-dichloro-2', 7'-

dimethoxyfluorescein)-reportteriväriaine. Fluorogeenisen alukkeen 5'-päätty sisältää 4 – 6 nukleotidin mittaisen hännän, joka on komplementaarinen 3'-päädyn alukkeen kanssa. Alukkeen sekundaarirakenne omaa hiuspinnimäisen muodon, jolloin reportterin fluoresenssi on vaimennettuna. Amplifikaatioreaktion aikana LUX-aluke sisällytetään PCR-tuotteeseen, jolloin reportteri alkaa vapauttaa fluoresenssia ja sen fluoresenssisignaali kasvaa jopa 10-kertaiseksi. (Invitrogen life technologies 2004.)



KUVA 8. LUX-alukkeen toiminta (TOIVONEN & MATTILA 2019). Aluke sisällytetään amplifikaatioreaktion aikana PCR-tuotteeseen, jolloin se alkaa vapauttaa fluoresenssia. Kuvassa olevat mustat nuolet kuvastavat DNA-polymeraasin kulkusuuntaa ja siniset nuolet siirtymistä seuraavaan vaiheeseen.

BD QZyme alukkeisiin (KUVA 9.) perustuva määrittäminen hyödyntää kahta sekvenssispesifistä aluetta, joista toinen on zymogeeninen alue ja toinen niin kutsuttu reverse alue (Bio-Rad laboratories 2006). Zymogeenisellä alukkeella tarkoitetaan sekvenssispesifistä aluetta, joka on nukleiinihapposekvenssin antisensisekvenssi. Tämä tarkoittaa, että kohdesekvenssistä tuotetaan yksi nukleiinihapposekvenssi, joka sisältää katalyyttisen DNA-molekyylin ja kohdesekvenssin. (Vietnam Climate Innovation Center 2018.) BD QZyme-Määrittämisessä hyödynnetään myös yleiskäyttöistä (eng. universal) oligonukleotidi substraattia. Oligonukleotidi koostuu 5'-päädyssä olevasta fluoresoivasta reporterista ja 3'-päädyssä olevasta sammuttajamolekyylistä. Substraatin ollessa vahingoittumaton, fluoresenssi on vaimennettuna sammuttajamolekyylin läheisyyden vuoksi. Zymogeeninen alue sisältää sekvenssin, joka koodaa katalyyttistä DNA:ta amplifikaatioreaktion ensimmäisen syklin aikana. Reaktion toisen syklin aikana ensimmäisen syklin aikana muodostunut tuote toimii templaattina reverse alukkeelle, jonka tarkoituksena on luoda uutta katalyyttistä DNA:ta sisältävää kohdesekvenssiä. Seuraavassa vaiheessa, alukkeiden kiinnittymisen jälkeen, fluoresoivalla merkkiaineella varustettu oligonukleotidisubstraatti hybridisoituu katalyyttiseen DNA-sekvenssiin. Substraatti hajoaa hybridisoitumisen seurauksena, joka erottaa reporterin ja sammuttajamolekyylin toisistaan. Tämän seurauksena reporteri alkaa tuottaa fluoresenssia. (Bio-Rad laboratories 2006.)

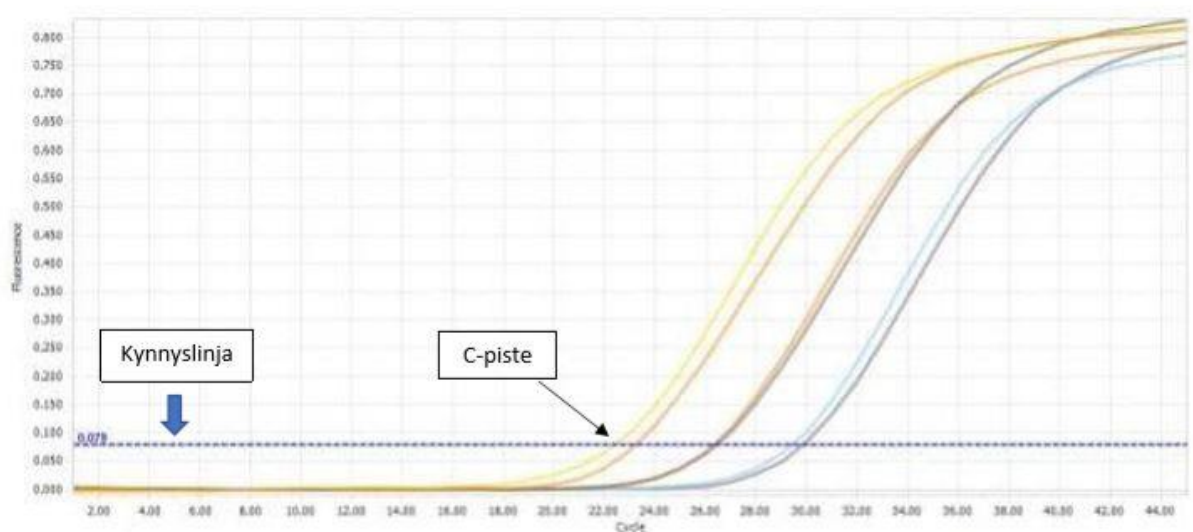


KUVA 9. BD QZyme alukkeen toiminta (TOIVONEN & MATTILA 2019). Fluoresoivalla merkkiaineella varustettu oligonukleotidisubstraatti hybridisoituu katalyyttiseen DNA-sekvenssiin. Substraatti hajoaa hybridisoitumisen seurauksena, jolloin reportteri ja sammuttajamolekyylit eroavat toisistaan. Kuvassa olevat mustat nuolet kuvastavat DNA-polymeraasin kulkusuuntaa ja siniset nuolet siirtymistä seuraavaan vaiheeseen.

4.2 Analysointi ja tulokset

Reaaliaikaisen PCR-reaktion tuloksia voi tarkastella amplifikaatiotaulukosta (KUVA 10.). Taulukon X-akselilla on kuvattuna PCR-syklien lukumäärä ja Y-akselilla kuvataan fluoresenssin voimakkuutta. Amplifikaatio taulukko jakautuu kahteen osaan, joka sisältää eksponentiaalisen ja ei-eksponentiaalisen osan. Kaavion eksponentiaalisessa osassa templaatti-DNA:n määrä keskimäärin kaksinkertaistuu jokaisella syklillä. Reaktion edetessä ja lopulta reaktiotuotteiden loppuessa reaktio hidastuu ja päättyy ei-eksponentiaaliselle ylätasangolle. (Bio-Rad laboratories 2006.)

Amplifikaatio kuvaajaan on merkittynä C-piste/kynnysyksi, joka lävistää kynnyslinjan (threshold line). C-piste kuvastaa fluoresenssin määrää, joka ylittää taustafluoresenssin määrän. Taustafluoresenssillä taas tarkoitetaan syklillä 1 – 18 välillä muodostuvan fluoresenssin voimakkuutta, jota ei vielä pystytä detektoimaan. Fluoresenssin voimistuessa C-pisteeseen, eksponentiaalisesti amplifioituvan templaatin määrä voidaan määrittää tarkasti ja luotettavasti jokaisella syklillä. C-pisteen määrittäminen reaktiossa on riippuvainen templaatin määrästä reaktion alkuvaiheessa. Templaatin määrän ollessa suuri reaktion alkuvaiheessa, fluoresenssisignaalin voimakkuus ylittää nopeammin taustafluoresenssin, joten kynnysyksi on pienempi. Templaatin määrän taas ollessa pieni reaktion alkuvaiheessa, fluoresenssisignaalin ylittämiseen taustafluoresenssin tarvitaan useampi PCR-sykli. Näin ollen kynnysyksiärvon täytyy olla suurempi. (Bio-Rad laboratories 2006.)



KUVA 10. Amplifikaatio kuvaaja (KORKEA-AHO & MATTILA 2019).

4.2.1 Alukkeiden ja koettimien vertailu

Aluketta ja koetinta on hyvä vertailla toisiinsa (TAULUKKO 1.), jotta jokaiseen PCR-reaktioon löytyy oikeanlainen aluke tai koetin, oikeaan käyttötarkoitukseen. Alukkeet ja koettimet ovat tärkeimmät tekijät onnistuneelle PCR-reaktiolle ja ne tulee suunnitella siten, että ne ovat tarpeeksi tarkkoja ja herkkiä vahvistaakseen geneettistä materiaalia. Alukkeet tulee suunnitella niin, että ne ovat komple- mentaarisia DNA:n templaatti alueelle. Aluketta valittaessa myös sen koko on tärkeä. Lyhyitä aluk- keita käytetään pienen, yksinkertaisen DNA-fragmentin monistamiseen ja pitkiä eukaryoottisen ge- nomisen DNA-näytteen monistamiseen. Liian lyhyet alukkeet tuottavat epätarkkoja, ei-spesifisiä DNA-monistustuotteita, ja liian pitkät alukkeet taas johtavat hitaampaan hybridisoitumisnopeuteen. Lisäksi tulee huomioida alukkeen rakenne, jonka tulisi olla suhteellisen yksinkertainen eikä sisältää sekundäärirakennetta sisäisen taittumisen välttämiseksi. (Addgene s.a.)

TAULUKKO 1. Aluke vs. koetin. (MATTILA 2019.)

	Aluke	Koetin
Määritelmä	Lyhyt DNA- tai RNA-juoste, joka toimii DNA-synteesin lähtökohtana	DNA:n tai RNA:n fragmentti, jota käytetään tunnistamaan tietyn DNA-fragmentin läsnäolo näytteessä
Rooli	Käytetään DNA-replikaation aloittamiseen sekä PCR:n käynnistämässä	Käytetään tunnistamaan tietty DNA-fragmentti qPCR:ssä
Pituus	Pituus voi olla 18-22 emäsparia	Pituus voi olla 25-1000 emäsparia
Hybridisaatio	Hybridisoidaan yksijuosteisella DNA:lla	Hybridisoidaan kaksisäikeisellä DNA:lla
Merkintä	Voidaan merkitä tarkoituksen mukaan	Merkitty yleensä fluoroforilla havaitsemista varten

Myös erilaisia alukkeita ja koettimia on hyvä vertailla toisiinsa (TAULUKKO 2.), ennen oikean aluk- keen tai koettimen valintaa kuhunkin PCR-reaktioon. Alukkeita ja koettimia on käytettävissä useita, joilla on jokaisella omia vahvuuksia ja heikkouksia. Suurin ero koettimien ja alukkeiden välillä on kui- tenkin niiden käyttötarkoitus.

TAULUKKO 2. Käytetyimpien alukkeiden ja koettimien vertailukaavio (MATTILA 2019.) Muokattu kuvasta, Biosearch Technologies 2016.

	TAQMAN	MOLECULAR BEACONS	AMPLIFLUOR PRIMERS	SCORPION PRIMERS
RAKENNE	Lineaarinen	Varsi ja silmukka	Varsi ja silmukka alukkeella	Varsi ja silmukka alukkeella
KESKEISIÄ PIIRTEITÄ	Kaksoisleimattu, lineaarinen, sekvenssi spesifinen koetin Käytetään yhdessä forward- ja reverse-alukkeiden kanssa	Kaksoisleimattu hiuspinnimäinen koetin sekvenssi spesifisellä silmukalla Käytetään yhdessä forward- ja reverse-alukkeiden kanssa	Kaksoisleimattu hiuspinni sekvenssi spesifisellä alukkeella Yksi reverse-alue	Kaksoisleimattu hiuspinnimäinen koetin sekvenssi spesifisen varren ja alukkeeseen kanssa Yksi reverse-alue
SPESIFISYYS	****	*****	***	*****
EDUT	Yksinkertainen suunnitella Voimakas multipleksointi kyky	Erittäin alhainen peruslinjan fluoresenssi Korkea spesifisyys hiuspinnimäisellä rakenteella Erinomainen signaali-kohina	Erittäin alhainen peruslinjan fluoresenssi Mukautuu helposti erilaisiin käyttökohteisiin	Yksimolekyylinen rakenne sisältää sekä koettimen että alukkeeseen Amplikonin nopea havaitseminen Erinomainen signaali-kohina
KÄYTTÖ	Geeniekspressio In vitro diagnostiikka Alleelien erottelu	Geeniekspressio In vitro diagnostiikka Alleelien erottelu	SNP detektio Geeniekspressio	Geeniekspressio SNP detektio In vitro diagnostiikka Alleelien erottelu

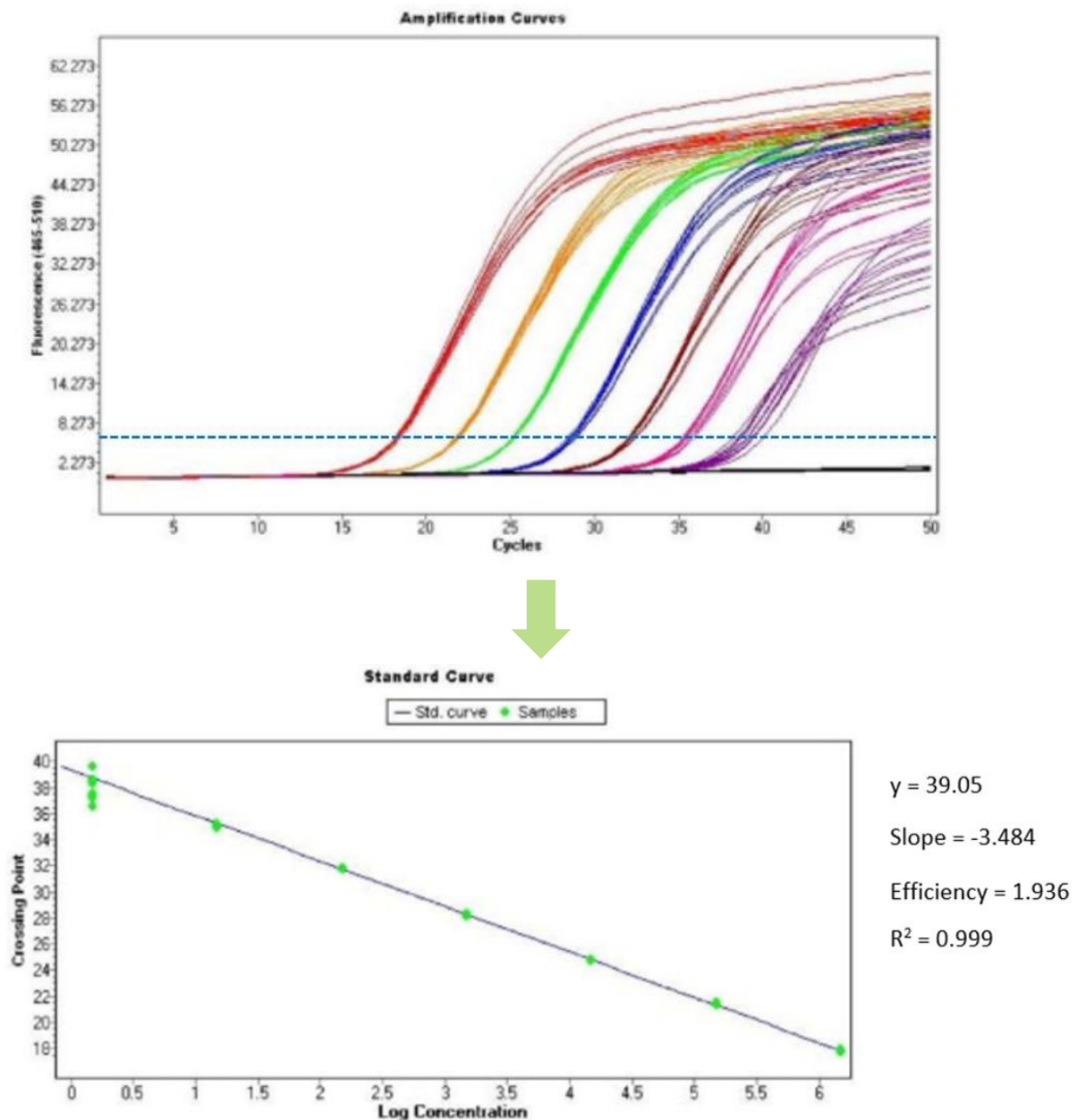
4.3 Laadunvarmistus

Onnistuneen reaaliaikaisen PCR-määrityksen edellytyksiä ovat oikeanlaisen tekniikan valinta (Singleplex- vai Multiplex-PCR) sekä näytteiden välisen kontaminaatoriskin minimoiminen. Tekniikan valintaan vaikuttavat määrityksen luonne ja PCR-laitteen tekniikka. Tarkasti ja toistettavasti toteutetun optimoidun kvantitatiivisen PCR-reaktion tunnusmerkkejä ovat amplifikaation korkea tehokkuus (90-105 prosenttia), lineaariset standardiviivat ja säännönmukainen toistuvuus reaktioissa. Tehokas keino kvantitatiivisen PCR-reaktion optimoimiseen on ajaa templaatti DNA:sta valmistetut sarjalaimennokset ja käyttää ajosta saatuja tuloksia standardikuvaajan luomiseen (KUVA 11.). Tällaiseen käyttötarkoitukseen valmistettujen laimennosten templaattipitoisuuden täytyy olla tunnettu. (Bio-Rad laboratories 2006.)

Standardikuvaaja rakentuu piirtämällä kuvaaja templaatin aloitusmäärästä suhteutettuna amplifikaation aikana saatuun C-pisteen arvoon jokaisen laimennoksen kohdalla. Lineaarisen regressiolinjan yhtälö ja Pearsonin korrelaatiokerroin (r) tai määrittyskerroin (R^2) voivat myös olla apuna määrittäessä onko kvantitatiivinen PCR-menetelmä optimoitu. Sarjalaimennosten ajon seurauksena saadaan tasaisesti piirtyneet amplifikaatiokuvaajat, joista ideaalitulanteessa arvioituna templaatin määrä kaksinkertaistuu joka syklillä. Fluoresenssikäyrien etäisyys voidaan määrittää yhtälön avulla $2^n = \text{laimennuskerroin}$, jossa n kertoo C-pisteen arvon muutoksen kuvaajien välillä. (Bio-Rad laboratories 2006.)

Standardikuvaajalta saatavat Pearsonin korrelaatiokerroin (r) ja määrittyskerroin (R^2) edustavat sitä, kuinka hyvin kokeellisesti saatu data sopii regressiolinjaan eli kuinka lineaarisesti arvot asettuvat kuvaajalle. Lineaarisuus puolestaan kertoo vaihtelevuuden suuruudesta ja amplifikaation tehokkuudesta eri konsentraatioisilla templaattilaimennoksilla määrittäessä. Merkittävät C-pisteen arvon muutokset rinnakkaisissa laimennoksissa vaikuttavat alentavasti korrelaatio- tai määrittyskerroimeen. Optimaalinen korrelaatiokerroimen (r) arvo kvantitatiivisessa PCR-määrittäessä on $>0,990$ ja määrittyskerroimen (R^2) $>0,980$. (Bio-Rad laboratories 2006.)

Amplifikaation tehokkuus, E (efficiency) voidaan laskea standardikuvaajalta yhtälön $E = 10^{-1/\text{kulmakerroin}}$ avulla. Optimaalisessa tilanteessa templaatti DNA:n määrä kaksinkertaistuu jokaisella syklillä, joten tehokkuuden voidaan päätellä olevan kaksi. Näin ollen optimaaliseksi standardikuvaajan kulmakerroimeksi saadaan ($2 = 10^{-1/\text{kulmakerroin}}$) $-3,32$. Amplifikaation tehokkuus voidaan laskea myös prosentuaalisesti kaavan $\%E = (E - 1) \times 100 \%$ avulla. Tulokseksi saadaan amplifioituneen templaatin prosentuaalinen osuus jokaisella syklillä. Tehokkuusprosentin ollessa lähellä 100 prosenttia, voidaan määrittäksen todeta olleen onnistunut ja toistettava. Reaktion alhainen tehokkuus kertoo yleensä epäspesifisistä alukkeista tai epäihanteellisista reaktio-olosuhteista. Alle 100 prosentin reaktiotehokkuus voi johtua myös pipetointivirheestä sarjalaimennoksia valmistettaessa tai epäspesifisistä reagensseista. Jos reaktion tehokkuus on alle 90 prosenttia tai yli 105 prosenttia on suositeltavaa suunnitella alukkeet ja koettimet uudestaan. (Bio-Rad laboratories 2006.)



KUVA 11. Standardikuvaajan muodostaminen (BioMed Central 2010). Ct on sykli, jossa fluoresenssi ylittää kynnyksarvon. Ct-arvot saadaan amplifikaatio kuvaajasta. Standardikuvaajassa Ct-arvoja suhteutetaan laimennuskertoimeen.

4.4 Diagnostiikka

Nukleiinihapon monistus ja havaitseminen ovat yksi arvokkaimmista tekniikoista, joita käytetään biologisessa tutkimuksessa. Tutkijat kaikilla tutkimusalueilla – yleistieteet, biotekniikka, lääketiede, oikeuslääketiede ja diagnostiikka luottavat yhä enemmän menetelmään monenlaisissa sovelluksissa. (Bio-Rad laboratories 2006.) Laboratorioissa, joissa on mikrobiologian toimilupa ja riittävä nukleiinihappoanalytiikan asiantuntemus voidaan analysoida nukleiinihappojen osoitukseen perustuvia testejä. (Loginov ym. 2016).

Kliinisessä laboratoriossa reaaliaikaista PCR:ää käytetään erilaisten virusten ja bakteerien tunnistuksessa, mikrobisairauksien diagnosoinnissa sekä yksilöntunnistuksen apuna isyystutkimuksissa ja oikeuslääketieteessä (Happonen ym. 2007). Reaaliaikaisen PCR:n avulla voidaan esimerkiksi analysoida geenien ilmentymistä syöpä- ja huumeutkimuksissa, kvantifioida viruksia tautien diagnosoinnissa, testata elintarvikkeita geenimuunneltujen orgasmien käytöstä, jalostaa kasveja ja eläimiä koptoimalla geenejä sekä identifioida ja kvantifioida näytteitä oikeuslääketieteellisissä tutkimuksissa. Esimerkiksi HIV-infektion hoito riippuu usein viruskuorman seurannasta. Reaaliaikainen PCR mahdollistaa viruksen RNA:n määrän mittaamisen suoran potilaasta. Reaaliaikaista PCR tutkimusta voidaan käyttää myös suoraan tuntemattomien tahrojen (esimerkiksi rikospaikalla) koostumuksen identifiointiin ja tarkan DNA määrä määrittämiseen tuntemattomasta näytteestä. (Bio-Rad s.a.)

Reaaliaikaisen PCR:n avulla voidaan myös tutkia, onko henkilöllä laktoosin imeytymishäiriö eli laktoosi-intoleranssi. Laktoosi-intoleranssi on maitosokerin eli laktoosin imeytymishäiriö, jossa laktaasinimisen ruoansulatusentsyymin puuttuminen johtaa siihen, ettei suolisto pysty pilkkomaan laktoosia. Tämä johtaa taas siihen, ettei elimistö pysty imeytymään maitosokeria ohutsuolesta verenkiertoon, vaan laktoosi jää suoleen ja kulkeutuessaan suolistossa eteenpäin aiheuttaa osalle ihmisistä vastaoireita. Laktaasi-entsyymin puuttuminen aikuisella oli alun perin normaalia ja laktoosin digestointikyky on mutaatio kromosomi 2 LCT-geenissä. (Mustajoki 2019.) Laktoosi-intoleranssin diagnosointi perustuu geneettisen variaation analyysiin, SNP (yhden nukleotidin polymorfismi) genotyyppitykseen. Ihmisen perimässä laktoosin sietokykyisyys liittyy yhden emäksen muutokseen. Sytosiinin muuttuminen tyymiiniksi (C → T) vaikuttaa laktoosin imeytymiseen suolistossa. Laktoosin imeytymishäiriössä esiintyy genotyyppi C/C ja laktoosia sietävillä esiintyy joko C/T tai T/T genotyyppi. Analysointi tehdään monistamalla pistemutaation sisältämä alue reaaliaikaisella PCR:llä ja mittaamalla laktaasiaktiivisuuden säilyttävän alleelin suhde laktaasiaktiivisuuden hävittävään alleeliin pienestä määrästä periferistä verta. Tulos on yksiselitteinen eli genotyyppi on joko C/C, C/T tai T/T. (Savilahti 2002.)

Toinen esimerkki reaaliaikaisella PCR:llä tehtävästä tutkimuksesta on noroviruksen nukleinihappojen osoitus tutkimus, joka on norovirus diagnostiikassa käytetyistä testeistä herkin ja tarkin. Testillä pystytään osoittamaan noroviruksen nukleinihappo yksittäisistä ulostenäytteistä esimerkiksi päivystystutkimuksena ja se on herkkydeltään hyvää luokkaa. (Loginov ym. 2016.) Norovirus kuuluu kalikiviruksiin. Norovirus aiheuttaa taudin, jonka oireita ovat oksennus, ripuli, vatsakivut ja usein kuume. Norovirus on yleisin äkillisten suolistoinfektioiden aiheuttaja. (Lumio 2018.) Norovirusten diagnostiikkaan ongelmallisuutta aiheuttavat ja viruksen löytämistä vaikeuttavat noroviruksen lukuisat genotyypit ja viruksen nopea muuntelukykyisyys. Norovirus voidaan myös todeta monianalyttisesti reaaliaikaisella PCR:llä, jonka avulla voidaan määrittää, mutta myös poissulkea suolistosairauden aiheuttaja. Tällaisella menetelmällä pystytään samanaikaisesti tunnistamaan ulostenäytteestä useita ripulia aiheuttavia viruksia (GI/GII-norovirus, rotavirus, adenovirus, astrovirus, sapovirus) sekä merkittävimmät ripulia aiheuttavat bakteerit ja parasiitit. (Loginov ym. 2016.)

5 DIGITAALINEN OPPIMATERIAALI OPINNÄYTETYÖNÄ

5.1 Digitaalisuus tänä päivänä

”Oppiminen, tietäminen ja osaaminen muuttuvat jatkuvasti digitalisoituissa yhteiskunnissa” todetaan Savolaisen, Vilkon ja Vähäkylän teoksessa *Oppimisen tulevaisuus* (2017). Teoksen mukaan vahvimmin näiden muutosten vaikutuksen alaisena ovat nuoret. Oppimateriaalit uudistuvat teknisen kehityksen myötä. Etenkin 2000-luvulta saakka tätä kehitystä on ollut havaittavissa. Oppimateriaaleista on tullut monimuotoisempia ja niiden ilmentymistavoista vaihtelevampia. Perinteisille kirjoille on tullut vaihtoehtoja. Oppimisympäristöistä tehdyissä tutkimuksissa on havaittavissa, että digitaalisissa materiaaleissa on nähtävissä oppimisen uudenlainen ymmärtämistapa, esiin on nostettu esimerkiksi opettajan roolin muutos opiskelutapojen ohella. Kyseessä ei siis ole vain tiedon jakamisen uusi muoto. (Ruuska, Löytönen ja Rutanen 2014, 7.) Ajattelutapamme oppimateriaaleista on muuttunut digitaalisuuden myötä, sillä tämä on mahdollistanut paljon innovatiivisia oppimisen keinoja. Yksi muutoksen vaikutuksista on oppimisympäristöt ja niissä tapahtuva oppiminen. Aiemmin oppiminen miellettiin tapahtuvan yleisesti oppikirjoista. (Tossavainen 2014, 187-197.)

5.2 Digitaalisen oppimateriaalin laatukriteerit

Digitaalisella oppimateriaalilla tarkoitetaan sähköisessä muodossa olevaa oppimateriaalia, jonka tyyppi voi vaihdella. Se voi olla painetun kirjan vastine pdf-muodossa tai responsiivinen sivusto, joka sisältää linkkejä ja tehtäviä. (Savolainen, Vilko ja Vähäkylä 2017.) Ruuskan, Löytösen ja Rutasen teoksesta *Laatua! - Oppimateriaalit muuttuvassa tietoympäristössä* (2014, 7) käy ilmi, että tutkimuksilla todistettavissa olevaa ymmärrystä opettamisesta ja oppimisesta erilaisissa digitaalisissa ympäristöissä on olemassa vielä vähän. Tutkimiskohteina ovat kuitenkin olleet niin aineistot, sisällöt kuin opiskelu ja vuorovaikutuksen tavatkin.

Laadukas oppimateriaali on oppimista tukeva jäsennelty kokonaisuus, joka on pedagogisesti harkittu ja tiettyyn tarkoitukseen koottu. Se toimii opetuksen perustana ja sen täytyy mukaila opetussuunnitelmaa. Laatukriteerit täyttävä oppimateriaali ottaa myös erilaiset oppijat huomioon. Oppimateriaalin täytyy olla luotettava tiedoiltaan sekä harjoituksiltaan, jotta niiden avulla saavutetaan oppimistavoitteena olleet taidot. (Ruuska ym. 2014, 7.) Tarkoman artikkelissa *Verkon ja oppikirjan rajavyöhykkeellä – Äidinkielen oppikirja ammatillisessa peruskoulutuksessa* (2014, 141-147) käy ilmi, että digitaalisen oppimateriaalin tulisi olla vaivattomasti käytettävissä oppimisympäristössä sekä opettajan näkökulmasta sähköiseen oppimateriaaliin on painettuun kirjaan verrattuna helpompi liittää lisäinformaatioita. Oppimateriaalilla on aina vaikutus oppilaan oppimisen laatuun (Mikkilä-Erdmann 2017).

Mari Varonen (Jyväskylän ammattikorkeakoulu) ja Tuula Hohenthal (Centria-ammattikorkeakoulu) kokosivat 2017 eAMK- hanketyön osana verkkototeutuksille laatukriteerit, joiden pohjana toimivat muun muassa useat eurooppalaiset laatukriteeristöt. Kootut laatukriteerit käsittelevät kohderyhmää

ja käyttäjiä, heidän tarpeidensa huomiointia prosessin eri vaiheissa sekä osaamistavoitteita, oppimisprosessia ja pedagogisia ratkaisuita. Laatukriteerit on määritetty myös tehtäville. Niiden tulisi olla osaamistavoitteiden saavuttamista edistäviä sekä esimerkiksi huomioida opiskelijoiden yksilöllisyys ja työtapojen tukea osaamisen jakamista. Samoin kuin tehtävien, tulisi oppimateriaalin sisällön, aineistojen, työvälaineiden ja vuorovaikutuksen tukea oppimista ja osaamistavoitteiden saavuttamista. Laatukriteereissä on määritelty myös ohjauksen ja palautteen kriteerit, niiden tulisi olla oikea-aikaisia ja saatavissa. Kriteerit on määritetty myös arvioinnille, verkkototeutuksen kehittämiseksi ja tukipalveluille. Tärkeänä osana laatukriteereitä on tuotu esiin verkkototeutuksen käytettävyys ja ulkoasu. Etenemisen tulisi olla sujuvaa, sisältöjen nimeämisen tulisi olla selkeää ja ymmärrettävää sekä yhtenäistä, visuaalisten sisältöjen tulisi tukea kokonaisuutta. Verkkopalustan ja sen sisällön täytyy täyttää tietoturva-vaatimukset. (Varonen ja Hohenthal s.a.)

5.3 Flipped learning

Käänteinen oppiminen eli flipped learning on oppimisen ideologia, jossa tarkoituksena on oppilaiden ohjaaminen omaehtoiseen oppimiseen, jokaisen oppilaan omalla tasolla. Pohjana toimii oppilaiden oma-aloitteisuus. Flipped classroom eli käänteinen opetus on opetusmetodi, jossa opettajan rooli on muuttunut tiedon siirtäjästä oppimisen ohjaajaksi ja tukijaksi. Opettamisen kääntämiseen on useita keinoja, yksi esimerkki tästä on opiskelutapa, jossa opiskelijat tutustuvat teoriaan etukäteen ja tämän jälkeen tehtäviä tehdään koulussa. Käänteisessä oppimisessä siis opiskelijan rooli on korostunut vaaditun itseohjautuvuuden myötä. (Toivola, Peura ja Humaloja 2017, 20.)

6 OPINNÄYTETYÖN TAVOITE JA TARKOITUS

Opinnäytetyö on ikään kuin silta, jonka yli kuljettuaan se antaa hyvät eväät työelämän asiantuntija-tehtäviin. Tavoitteena opinnäytetyössä on kehittää ja osoittaa valmiuksia tietojen ja taitojen soveltamiseen työelämässä. (Savonia-ammattikorkeakoulu 2019.) Työmme tavoitteena on tukea molekyylibiologian itsenäistä ja monimuotoista opiskelua sekä lisätä ymmärrystä reaaliaikaisesta PCR-menetelmästä molekyylibiologian opintokokonaisuudessa. Työn tarkoituksena on tarjota kattava tietopaketti reaaliaikaisesta PCR:stä ja luoda sen pohjalta digitaalisessa muodossa oleva englanninkielinen oppimateriaali. Oppimateriaali koostuu verkkoympäristössä olevasta teoriaosuudesta, sitä käsittelevistä tehtävistä, testiosuudesta ja mielenkiintoisesta lisämateriaalista.

BioDigi-hankkeessa työstettävistä eri aihealueiden oppimateriaaleista pyritään tekemään yhteneväiset ja mahdollisimman mielenkiintoiset. Oppimateriaaleihin sisällytetään kuvia ja videoita sekä lisätietoa sisältäviä osuuksia, joita kiinnostuneet voivat hyödyntää. Teoriaosuudesta pyritään tekemään mahdollisimman helposti luettava ja ytimekäs. Näin opintojaksosta ei muodostu liian raskasta ja opiskelijoiden mielenkiinto saadaan ylläpidettyä. Oppimateriaali tuotetaan bioanalytiikan opiskelijoiden käyttöön Metropolia Ammattikorkeakoulun tarjoamalle EdX-alustalle.

Opinnäytetyön tuotoksessa hyödynnetään flipped learning eli käänteisen oppimisen opetusmenetelmää. Menetelmä on sosiokonstrukttiivinen oppimisnäkökulma, jossa korostetaan yksilöllisiä ja yhteisöllisiä näkökulmia. Yhteisöllisyydellä pyritään tuomaan hyötyjä opiskelijan yksilölliseen oppimiseen. Flipped learningissa opettajan rooli on muuttunut ja hänen tehtävänä on tukea oppilaan omaehtoista opiskelua sekä vapauttaa heidät opiskelemaan omalla tasollaan. (Turun yliopisto s.a.)

Henkilökohtaisena tavoitteenamme on luoda mahdollisimman informatiivinen ja uudella tavalla lähestymistavalla oleva oppimateriaali. Tarkoituksenamme on luoda pääkohdat selkeästi esiintuova ja tulevaisuuden bioanalytiikan työnkuvaa tukeva tietopaketti. Aiheemme on nykypäiväinen ja tulevaisuutta, joten työmme on merkityksellinen.

7 OPINNÄYTETYÖN TOTEUTUS

7.1 Toiminnallinen opinnäytetyö eli kehittämistyö

Toiminnallisen opinnäytetyön eli kehittämistyön tarkoituksena on kehittää ammatillisen kentän käytännön toimia, järjestämistä tai järjeistämistä eli toiminnallinen opinnäytetyö pohjautuu toimeksiantoon työelämälähtöisesti. Kehittämistyö koostuu tuotoksesta eli produktista ja opinnäytetyöraportista, johon opinnäytetyöprosessi on dokumentoitu ja arvioitu tutkimusviestinnän keinoin. Produktin toteutustapana voi olla kirja, opas, näyttely, kehittämissuunnitelma tai jokin muu projekti. Sen on pohjauduttava ammattiteoriaan ja sen tuntemukseen, jonka vuoksi opinnäytetyöraportin on sisällettävä teoreettinen viitekehysosuus. (Lumme, Leinonen, Leino, Falenius & Sundqvist 2006.)

Opinnäytetyön tulee täyttää opinnäytetyölle asetetut kriteerit, jotka ovat osoitus siitä, että opiskelijalla on riittävä asiantuntemus ja korkeakoulutasoinen osaaminen. Osaltaan opinnäytetyö on myös näyte opiskelijan viestintäosaamisesta. Toiminnallisen opinnäytetyön tekijöiltä odotetaan itsenäisen työskentelyn lisäksi tutkivaa, kriittistä ja kehittävää otetta. (Jyväskylän ammattikorkeakoulu s.a.) Tutkiva ote näkyy kriittisenä suhtautumisena omaan tekemiseen, teoreettisen lähestymistavan sekä opinnäytetyöprosessissa tehtyjen ratkaisujen ja valintojen hyvänä perusteluna. Työssä käytetty teoreettinen lähestymistapa ohjaa työn tietoperustan ja viitekehysten rakentumista. (Lumme ym. 2006.)

Opinnäytetyön tekovaiheita Savonia-ammattikorkeakoulun Repusta löytyvien ohjeiden mukaan ovat suunnittelu, toteutus ja viimeistely, jotka suoritetaan osin limittäin. Suunnitteluvaiheeseen kuuluvat opinnäytetyön infoon osallistuminen, aiheen valinta ja aihekuvaus sekä työsuunnitelman tekeminen. Toteutusvaiheessa pääosassa on opinnäytetyön työstäminen ja mahdollisen tuotoksen teko ja viimeistelyvaiheessa opinnäytetyön esittäminen ja julkaisu sekä kypsyyssä. Opinnäytetyön tekemisen vaiheisiin kuuluvat niin tavoitteellisuus, luovuus kuin oivalluksetkin unohtamatta epävarmuuden ja turhautuneisuuden tunteita. (Savonia-ammattikorkeakoulu 2019.)

7.2 Opinnäytetyön ideointi ja suunnittelu

Aloitimme opinnäytetyömme suunnittelun keväällä 2018 ja tavoitteenamme oli saattaa työ loppuun kevään 2019 aikana. Kokonaisuutena opinnäytetyön tekeminen kaikkine osa-alueineen oli vuoden mittainen projekti. Opinnäytetyömme aihe valikoitui Molecular biology and gene technology sekä Clinical microbiology, virology and gene technology 2 – kurssien aikana. Kursseilla käsiteltiin muun muassa erilaisia PCR-menetelmiä, joista aiheeksemme valikoitui reaaliaikainen PCR (qPCR). Menetelmä on nykyaikainen ja yksi käytetyimmistä molekyylibiologian laboratorioissa.

Opinnäytetyöprojektin kannalta oli tärkeää, että loimme itsellemme aikataulutuksen (TAULUKKO 3.) opinnäytetyön teon aikana, jotta pysyisimme aikataulussa ja työ valmistuisi ajallaan. Aikatauluissa pysymistä seurassimme säännöllisillä yhteydenpidoilla ja kokoontumisilla sekä opinnäytetyöryhmän

kesken, että yhdessä opinnäytetyön ohjaajan kanssa. Opinnäytetyöprojektin alussa pidimme muutamia palavereita muiden samassa hankkeessa työskentelevien kanssa, jotta tuotoksista tulee yhte-neväisiä. Palaverissa kävimme läpi opinnäytetyöhön liittyvää tuotosta eli edX-alustelle tulevaa oppi-materiaalia.

TAULUKKO 3. Opinnäytetyön aikataulutus (MATTILA 2019).

Ajankohta	Työvaihe
3-4/2018	Aihekuvaus
5-6/2018	Tutkimussuunnitelma
9/2018-3/2019	Lähdekirjallisuuden haku ja opinnäytetyön kirjoittaminen
2-4/2019	Tuotoksen tekeminen ja testaus pienellä opiskelijaryhmällä
4/2019	Opinnäytetyön hiominen ja viimeistely
4-5/2019	Seminaari ja työn palautus

Ennen opinnäytetyön aloittamista teimme Savonian ohjaus- ja hankkeistamissopimuksen. Työmme on osa BioDigi-hanketta, joten olemme sitoutuneet verkko-oppimateriaalin tuottamiseen työn tilaa-jalle. Opiskelemme Savonia-ammattikorkeakoulussa, joten olemme sitoutuneet noudattamaan orga-nisaation arvoja ja sääntöjä. Eettisinä tavoitteina Savonia-ammattikorkeakoulussa pidetään tasa-arvoista vuorovaikutusta, ihmisten kunnioittamista ja oikeudenmukaisuuden korostamista. Lisäksi eettisyys tulee esiin kriittisenä asenteena tietolähteitä ja vallitsevia käytäntöjä kohtaan. Ammattikä-ytöntöjen kehittämiseksi ja jatkuvalla arvioinnilla rakentava kriittisyys antaa parhaimmat edellytykset. Opinnäytetyöhön liittyvät eettiset periaatteet tulevat esiin opinnäytetyön aiheen valinnassa, aineis-ton hankinnassa, analysoinnissa sekä säilyttämisessä sekä käytettyjen lähteiden valinnassa ja rapor-toinnissa. Myös sopimusten, sovittujen aikataulujen sekä sovitun tutkimusrajoituksen noudattami-ssa eettisyys nousee esiin. (Savonia-ammattikorkeakoulu 2019.)

7.3 Tiedonhaku

Opinnäytetyömme tiedonhaku alkoi keväällä 2018. Teoriatietoa on haettu lähdekriittistä silmää pi-täten erilaisista tietokannoista, kirjastosta ja internetistä. Käytettyjä tietokantoja ovat muun muassa PubMed, Medic, ScienceDirect, Google Scholar ja Cinahl Complete. Tiedonhaussa käytettyjä tieto-kantoja ja niissä käytettyjä hakusanoja tarkastellaan alla (TAULUKKO 4.). Lisäksi olemme pyytäneet kuvien alkuperäisiltä julkaisijoilta luvat opinnäytetyössämme oleviin kuviin. Tiedonhaun haasteena on ollut nykypäiväisten lähteiden löytäminen, koska esimerkiksi PCR-tekniikan periaatteet eivät ole muuttuneet viime vuosikymmeninä.

TAULUKKO 4. Tiedonhaku (MATTILA 2019).

Tietokanta	Hakusanat
Google Scholar Google	Flipped learning Käänteinen oppiminen Digitaalinen oppimateriaali BioDigi-hanke Reaaliaikainen PCR Polymeerasiketjureaktio DNA Toiminnallinen opinnäytetyö Kehittämistyö
Google kuvahaku	Melting curve Quantification standard curve
Cinahl Complete PubMed Medic ScienceDirect	Real-Time PCR RT-PCR DNA Polymerase chain reaction

8 POHDINTA

8.1 Oma oppiminen ja ammatillinen kasvu

Opinnäytetyöprosessi on opiskelijan itsenäisesti suoritettava työprosessi, jonka vaiheita ohjaaa tukee, arvio ja ohjaa. Lisäksi aiheen tulisi opiskelijan kannalta olla sellainen, että opiskelija pystyy opinnäytetyöprosessin aikana soveltamaan ja syventämään omaa ammatillista osaamistaan. (Savonia-ammattikorkeakoulu 2019.) Opinnäytetyön työstäminen piti sisällään monta erilaista vaihetta. Siihen sisältyi suunnittelua, kokoontumisia, tiedonhakuja, kirjoittamista ja BioDigi-hankkeeseen liittyvän verkko-oppimateriaalin suunnittelua sekä sen tekeminen. Opinnäytetyöprojekti kokonaisuudessaan opetti hahmottamaan projektiin liittyviä työvaiheita ja sen vaativuutta, joka osaltaan lisää valmiuksia myös projektiluontoiseen työskentelyyn. Työtä tehdessä merkityksellisiksi tekijöiksi nousivat erityisesti sujuva yhteistyö ja järjestelmällisyys. Lisäksi opinnäytetyö tarjoaa mahdollisuuksia tulevaisuuden työelämään. Esimerkiksi mikrobiologian ja genetiikan erikoisaloille suuntautuessamme on opinnäytetyöstämme varmasti paljon hyötyä.

Työmme tuotos toteutettiin englanninkielisenä, mikä luo kansainvälisiäkin mahdollisuuksia. Englannin kielen hallinta katsotaan eduksi koko ajan kansainvälisempään suuntaan menevissä työmarkkinoissa. Opinnäytetyötä tehdessä myös englanninkielen taito kehittyi. Erityisesti lääketieteellinen ja oman alamme sanaston ymmärrys ja osaaminen myös kansainvälisesti koheni huomattavasti. Osaltaan englannin kieli toi mukanaan omanlaisia haasteita. Suurin osa käyttämistämme lähteistä, erityisesti teoriatieto reaaliaikaisesta PCR:stä, on englanninkielistä tekstiä. Aiheemme on jokseenkin haastava, jonka ymmärtäminen omalla äidinkielelläkään ei ole helppoa.

Opinnäytetyön tekemisen myötä tapahtunut ammatillinen kasvu on ollut suurta ja koemme saaneemme hyvät eväät tulevaisuuteen bioanalyytikon ammattia harjoittaaksemme. Tiimityöskentelytaitojen lisäksi tietämys molekyylibiologian ja geeniteknologian parissa käytettävistä menetelmistä sekä sovelluksista kehittyi huomattavasti. Etenkin reaaliaikaisen PCR:n osalta menetelmän tuntemus on vankka. Opimme, missä kaikkialla menetelmää voidaan hyödyntää, tarkastelemaan laatuun ja tuloksiin vaikuttavia tekijöitä sekä analysoimaan tuloksia. Menetelmä on nykyaikainen, joten uskomme asiantuntemuksesta olevan hyötyä tulevaisuudessa työmarkkinoilla.

Uutena näkökulmana opinnäytetyöprojektissa meille tulivat pedagogiset menetelmät. Bioanalyytikon koulutukseen ei sisälly lainkaan pedagogisia opintoja, joten perehdyimme niihin itsenäisesti ja pyrimme luomaan sen pohjalta hyvän oppimateriaalin. Oppimateriaalissamme hyödynnettiin flipped learning-menetelmää, jossa korostetaan oppilaan itseohjautuvuutta ja yhteisöllisen oppimisen luonnetta. Tutkimusten mukaan 10-15 %:lle oppilaista menetelmä ei sovellu, mutta huomattavasti 85 %:lle sopii. (Turun yliopisto 2014.) Opimme laatimaan myös oppimateriaalin, joten kyseisistä taidoista on varmasti hyötyä tulevaisuudessa.

Opinnäytetyön alussa pohdimme vahvuuksia sekä riskejä työmme kannalta. Näiden ajatusten pohjalta teimme SWOT-analyysin (TAULUKKO 5.). SWOT tulee sanoista, Strengths (vahvuudet),

Weaknesses (heikkoudet), Opportunities (mahdollisuudet) ja Threats (uhat). Joista vahvuudet ja heikkoudet ovat sisäisiä tekijöitä, mahdollisuudet ja uhat ulkoisia tekijöitä. SWOT-analyysin avulla toimintaa voidaan analysoida kokonaisuutena ja tunnistaa toimintaan liittyviä riskejä. (Opetushallitus s.a.)

TAULUKKO 5. SWOT-analyysi (HYVÄRINEN 2019).

S I S Ä I S E T	Vahvuudet: <ul style="list-style-type: none"> - Korkea motivaatio - Hyvä tiimityöskentely - Hyvä kielitaito - Ohjaajan ammattitaito - Uhrautuvuus - Kannustava ilmapiiri 	Heikkoudet: <ul style="list-style-type: none"> - Motivaation puute - Ajanpuute
U L K O I S E T	Mahdollisuudet: <ul style="list-style-type: none"> - Uudet kansainväliset kontaktit - Modernit ja kansainväliset oppimateriaalit 	Uhat: <ul style="list-style-type: none"> - Oppimateriaalin toimivuus ja hyöty - Saavutetaanko oppimateriaalille asetetut tavoitteet?

8.2 Tuotoksen arviointi

Digitaalisen oppimateriaalin käyttäminen osana opetusta on yleistynyt digitaalisen teknologian rinnalla. Se on luonut mahdollisuuksia erilaisiin lähestymistapoihin opiskelussa. Näitä lähestymistapoja ovat muun muassa opas-, kurssi- ja esitysmuotoinen sekä demonstroiva verkko-oppimateriaali. Opasmuotoisessa materiaalissa sen käyttäjää ohjataan jonkin konkreettisen toiminnan suorittamiseen. Kurssimuotoisessa opiskelussa taas opiskelu voi olla ohjattua tai itsenäistä. Verkko-oppimateriaalit noudattavat usein jonkinlaista pedagogista näkökulmaa ja niitä voidaankin arvioida niiden noudattaman metaforan mukaisesti, onko oppiminen tiedon luomista, hankintaa vai osallistumista. Pedagogisissa tutkimuksissa on todettu, että laadukkaan verkko-oppimateriaalin kriteereihin kuuluvat sen joustavuus oppilaan tason, kiinnostuksen ja tarpeiden mukaisesti, oppilaan ajattelun aktivointi, opetettavan asian ydinasioihin keskittyminen sekä yhteisöllisen ja pitkäkestoisen työskentelyn tukeminen. Toiminnallisesti hyvä oppimateriaali on pedagogisia ja sisällöllisiä tavoitteita tukeva sekä teknisesti helppokäyttöinen. (Ilomäki 2018, 10-11.)

Oppimisalustat, kuten tuotoksemme edX-alusta, ovat osa oppimisympäristöä, joka koostuu erilaisista tekijöistä. Näitä tekijöitä ovat interpersoonalliset-, intrapersoonalliset-, suunnitellut- ja rajoittavat-

sekä mahdollistavat tekijät. Interpersoonallisiin tekijöihin lukeutuvat sosiaaliset ja kulttuurilliset tekijät, joita ovat esimerkiksi kaverit, sosiaaliset vuorovaikutukset ja koulun toimintatavat. Intrapersonallisiin tekijöihin taas lukeutuvat kognitiiviset ja affektiiviset (motivaatio, tunnetila ja tavoitteet) tekijät. Suunnitellut tekijät pitävät sisällään pedagogiset tai andragoniset (kasvatukselliset periaatteet) sekä didaktiiviset (opetusmenetelmät ja käytännöt) tekijät. Oppimis- ja opetustilanteen toimivuus ja tulokset muotoutuvat näiden kaikkien tekijöiden summana. (Toikkanen 2018, 28.)

Tuottamastamme verkko-oppimateriaalista tuli monipuolinen ja laadukkaan verkko-oppimateriaalin kriteerit täyttävä eAMK verkkototeutuksen laatukriteerien mukaisesti. Se mukautui hyvin hankkeessa muodostettuun molekyylibiologian opintokokonaisuuteen ja vastasi tavoitteitamme. Oppimateriaalimme sisältää orientaatio-osuuden, teoriaosuuksia, tehtäviä ja varsinaisen lopputentin. Näin opiskelijat voivat varmistaa oman oppimisensa jo kurssin aikana ja lisätä ajattelun aktiivisuuttaan tehtävien avulla. Materiaaleissa on myös linkkejä lisätietoa sisältäviin sivustoihin, joita kiinnostuneimmat opiskelijat voivat hyödyntää. Verkko-oppimateriaalissamme hyödynnetään kurssimuotoista opiskelua, jossa opiskelijan itseohjautuvuus korostuu. Tuotoksemme vahvuutena ovat itsetehdyt kuvat sekä oppimateriaalin selkeys.

Testasimme oppimateriaalimme kiireisestä aikataulusta huolimatta pienellä opiskelijaryhmällä, jotta saisimme mahdollisia kehittämisideoita. Pystyimme vielä testausvaiheessa reagoimaan kehittämistoi-veisiin ja tekemään mahdollisia muutoksia. Saimme opiskelijatovereiltamme palautteeksi positiivisia kommentteja muun muassa oppimateriaalin hyvästä ja johdonmukaisesta etenemisestä, ytimekkyydestä sekä selkeistä kuvista ja aktivoivista välikysymyksistä. Lisäksi käytännönläheiset esimerkit reaaliaikaisen PCR:n käyttömahdollisuuksista olivat mielenkiintoisia. Näin menetelmää pystyttiin tuomaan lähemmäksi ihmistä. Kehittämisen mahdollisuutta olisi ollut kommenttien mukaisesti ulkoasussa, joka oli heidän mielestään melko yksinkertainen. Testaajien mukaan siihen olisi voinut lisätä enemmän värejä ja elävyyttä. Tämä kuitenkin muotoutui kohdallamme ongelmaksi, koska edX-alusta oli melko monimutkainen käyttää. Rajoittavana tekijänä oli lisäksi ajanpuute, joka esti oppimisolustaan paremman perehtymisen. Tuotoksemme menee lopulliseen testaukseen ensi syksynä, kun se otetaan ensimmäisen kerran opiskelijaryhmän käyttöön. Tällöin saamme kokonaisvaltaisempaa palautetta koko molekyylibiologian opintokokonaisuudesta.

8.3 Kiitokset

Opinnäytetyön tekeminen on ollut yli vuoden mittainen projekti, johon on mahtunut lukematon määrä työtunteja. Työ on vaatinut paljon panostusta ja vapaa-ajan uhrausta sekä päämäärätietoista tiimityöskentelyä. Olemme saavuttaneet nyt yhden etapin elämässämme tämän opinnäytetyön valmistuttua ja tahdomme kiittää meitä siinä tukeneita henkilöitä.

Olemme saaneet korvaamattoman avun opinnäytetyön ohjaajaltamme ja Savonia-ammattikorkeakoulun lehtorilta Anssi Mähöseltä. Tahdommekin kiittää häntä kannustavasta otteesta ja tärkeiden neuvojen sekä tuen antamisesta. Tahdomme kiittää myös molekyylibiologian ja geeniteknologian-

kurssin lehtoria Tiina Korkea-Ahoa. Hän mahdollisti opinnäytetyömme tuotoksen monipuolisuuden tarjoamalla meille ideoita ja kuvia. Haluamme kiittää myös opiskelijoita, jotka testasivat verkko-oppimateriaalia ja antoivat arvokasta palautetta tuotoksestamme. Lisäksi kiitämme muita BioDigi-hankkeessa mukana olleita opiskelijoita, joiden kanssa kokoonnuimme yhteen, hankkeeseen tulevan oppimateriaalin suunnittelun tiimoilta. Yhteisen suunnittelun ja ajatusten jakamisen vuoksi tehdystä oppimateriaalista tuli nykyaikainen, looginen ja informatiivinen.

LÄHTEET JA TUOTETUT AINEISTOT

Addgene. How to design a primer. [Viitattu 2019-05-02] Saatavissa: <https://www.addgene.org/protocols/primer-design/>

ALBERT-LUDWIGS-UNIVERSITÄT FREIBURG, 2019. Droplet Digital PCR. [Viitattu 2019-04-26]. Saatavissa: <https://p4test28.uni-freiburg.de/nucleicacids/ddpcr>

BIASSONI, Roberto & RASO, Alessandro 2014. Quantitative Real-Time PCR methods and protocols. [Viitattu 2018-5-15]. Saatavissa: <http://www.gene-quantification.de/biassoni-raso-quantitative-real-time-pcr-ebook-2014.pdf>

Bio-Rad. Presentations and Activities for Workshops and Teaching. Real-Time PCR Applications. [Viitattu 2019-03-21] Saatavissa: <http://www.bio-rad.com/en-fi/applications-technologies/presentations-activities-for-workshops-teaching?ID=NISQQ7E8Z>

Bio-Rad Laboratories. [Verkkójulkaisu]. [Viitattu 2018-05-17] Saatavissa: <http://www.bio-rad.com/en-fi/applications-technologies/preservations-activities-for-workshops-teaching>

Bio-Rad Laboratories 2006. Real-Time PCR application Guide. [Viitattu 2018-05-17] Saatavissa: http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_5279.pdf

BIOSYNTHESIS, 2018. Minor Groove Binders or MGBs. [Viitattu 2019-04-26] Saatavissa: <https://www.biosyn.com/tew/Minor-Groove-Binders-or-MGBs.aspx>

CLARK, David 2005. Molecular Biology. [Viitattu 2019-03-09]. Saatavissa: <http://web.a.ebscohost.com.ezproxy.savonia.fi/ehost/ebookviewer/ebook/bmxlYmtfXzE2NjE0N19fQU41?sid=179cf70a-c3fe-4218-8562-07f54a9c80aa@sidc-v-sessionmgr04&vid=0&format=EB&rid=1>

ELFATH M. ELNIFRO, AHMED M. ASHSHI, ROBERT J. COOPER & PAUL E. KLAPPER, 2000. Multiplex PCR: Optimization and Application in Diagnostic Virology. [Viitattu 2019-04-27]. Saatavissa: https://moodle.savonia.fi/pluginfile.php/234545/mod_resource/content/1/Example%20of%20Multiplex%20PCR%20in%20diagnostic%20virology.pdf

HAPPONEN Päivi, HOLOPAINEN Mervi, SARIOLA Hannu, SOTKAS Panu, TENHUNEN Antero, TIHTARINEN-ULMANEN Marja, VENÄLÄINEN Juha. 2006. BIOS 5. Bioteknologia. Helsinki: WSOY.

HAPPONEN Päivi, HOLOPAINEN Mervi, SOTKAS Panu, TENHUNEN Antero, TIHTARINEN-ULMANEN Marja, VENÄLÄINEN Juha. 2007. BIOS 2. Solu ja perinnöllisyys. Helsinki: WSOY.

ILOMÄKI, Liisa, JAAKKOLA, Tomi, NIRHAMO, Lassi, NURMI, Sami, LEHTINEN, Erno, TOIKKANEN, Tarmo, KANTASALO, Anna, PAAVOLA, Sami, LAKKALA, Minna, VEERMANS, Marjaana, TAPOLA, Anna & MUUKKONEN, Hanni 2018. Laatus E-oppimateriaaleihin. [Viitattu 2019-04-29]. Saatavissa:

https://www.oph.fi/download/144415_Laatus_e-oppimateriaaleihin_2.pdf

INVITROGEN LIFE TECHNOLOGIES, 2004. LUX™ Fluorogenic Primers For real-time PCR and RT-PCR. [Viitattu 2019-04-27]. Saatavissa: http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/luxprimers_man.pdf

JAMK. Jyväskylän ammattikorkeakoulu. Opinnäytetyön ohjaajan käsikirja. Tutkimuksellinen kehittämishanke opinnäytetyönä vs projektityö. [Viitattu 2019-03-29] Saatavissa: <https://oppimateriaalit.jamk.fi/yamk-kasikirja/tyoelaman-tutkiva-kehittamistoiminta/projektityo-vs-ns-toiminnallinen-tutkimuksellinen-kehittamishanke-opinnaytetyo/>

KESSLER, Harald 2014. Molecular Diagnostics of Infectious Diseases. [Viitattu 2010-04-27]. Saatavissa: <http://web.b.ebscohost.com.ezproxy.savonia.fi/ehost/ebookviewer/ebook/bmxlYmtfXzgwOTQ5NV9fQU41?sid=ddc752bf-7d79-4b88-80c9-aaee99bbe378@sessionmgr101&vid=0&format=EB&rid=1>

LOGINOV, Raisa, MANNONEN, Laura ja LAPPALAINEN Maija. 2016. Ripulivirusten pikadiagnostiikka. Lääketieteellinen aikakauskirja Duodecim. 132(7):648-53.

LUMIO, Jukka. 2018. Norovirus. Lääkärikirja Duodecim. Terveyskirjasto. [Viitattu 2019-03-27] Saatavissa: https://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk00738

LUMME, Riitta, LEINONEN, Rauni, LEINO, Mia, FALENIUS, Mia & SUNDQVIST, Leena 2006. Monimuotoinen / toiminnallinen opinnäytetyö. VirtuaaliAMK. [verkkojulkaisu]. [Viitattu 2018-05-19]. Saatavissa: <http://www2.amk.fi/digma.fi/www.amk.fi/opintojak-sot/030906/1113558655385/1154602577913/1154670359399/1154756862024.html>

MCPHERSON, M.J & MÖLLER, S.G, 2000. PCR. BIOS Scientific Publishers Limited. New York.

Metropolia Ammattikorkeakoulu 2017. Metropolia on osaamisen rohkea uudistaja ja tulevaisuuden aktiivinen rakentaja. [Viitattu 2018-05-16]. Saatavissa: <http://www.metropolia.fi/tietoa-metropolia-asta/>

Metropolia 2017. BioDigi- Bioanalytiikan digitaalinen verkkoportaali. [verkkojulkaisu]. [Viitattu 2018-05-08]. Saatavissa: <http://www.metropolia.fi/tutkimus-kehittaminen-ja-innovaa-tiot/hankkeet/bio-digi/>

MIKKILÄ-ERDMANN, Mirjamaija 2017. Digitaalisen oppimateriaalin mahdollisuudet. Julkaisussa: SAVOLAINEN, Hannu, VILKKO, Risto ja VÄHÄKYLÄ, Leena (toim.) Oppimisen tulevaisuus. Gaudeamus

MUSTAJOKI, Pertti. 2019. Laktoosi-intoleranssi. Lääkärikirja Duodecim. Terveyskirjasto. [Viitattu 2019-04-04] Saatavissa: https://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk00038

MÜLHARDT & CORNEL, 2007. Molecular biology and genomics. [Viitattu 2019-03-17]. Saatavissa: <http://web.a.ebscohost.com.ezproxy.savonia.fi/ehost/ebookviewer/ebook/bmxlYmtfXzE4NTc0MI9fQU41?sid=b3cb42a7-0039-4069-ae19-d84ee93e6b19@sessionmgr4007&vid=0&format=EB&rid=1>

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2017. Polymerase Chain Reaction (PCR). [Viitattu 2019-02-05]. Saatavissa: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techpcr/>

NEIDLER, Sarah 2017. What are the differences between PCR, RT-PCR, qPCR, and RT-qPCR? [Verkojulkaisu]. [Viitattu 2018-05-17]. Saatavissa: <http://www.enzolifesciences.com/science-center/technotes/2017/march/what-are-the-differences-between-pcr-rt-pcr-qpcr-and-rt-qpcr?/>

NEW ENGLAND BIOLABS, 2019. FAQ: What is touchdown PCR? [Viitattu 2019-02-26]. Saatavissa: <https://www.neb.com/faqs/0001/01/01/what-is-touchdown-pcr>

Opetushallitus. Säädökset ja ohjeet. SWOT-analyysi. [Viitattu 2019-05-02] Saatavissa: https://www.oph.fi/saadokset_ja_ohjeet/laadunhallinnan_tuki/wbl-toi/menetelmia_ja_tyovalineita/swot-analyysi

Oulun ammattikorkeakoulu 2018. Tietoa Oamkista. [Viitattu 2018-05-16]. Saatavissa: <http://www.oamk.fi/fi/tietoa-oamkista/>

RANKI-PESONEN, Marjut. 1994. Onko polymeraasiketjureaktio käytännön mikrobidiagnostiikkaa? Lääketieteellinen aikakausikirja Duodecim. 110(6):615

ROCHE DIAGNOSTICS, 2017. Comapre and Contrast: Multiplex vs. Singleplex PCR. [Viitattu 2019-01-07]. Saatavissa: https://lifescience.roche.com/global_en/blog/lab-life/real-time-pcr/compare-and-contrast-multiplex-vs-singleplex-pcr.html

RUUSKA, Helena & LÖYTÖNEN, Markku & RUTANEN, Anne. 2014. LAATUA! Oppimateriaalit muuttuvassa tietoympäristössä. Porvoo: Bookwell Oy.

SAVILAHTI Erkki ja JÄRVELÄ, Irma. 43/2002. Laktoosin imeytymishäiriö ja sen diagnostiikka. Suomen lääkirilehti. VSK 57. s. 4337-4341.

SAVOLAINEN, Hannu, VILKKO, Risto ja VÄHÄKYLÄ, Leena. 2017. Oppimisen tulevaisuus. Gaudeamus.

Savonia-ammattikorkeakoulu. 2019. Reppu. Opinnäytetyö. AMK-tutkinnot. Opinnäytetyön tekemisen vaiheet.

Savonia-ammattikorkeakoulu 2018. Tutustu Savoniaan. [Viitattu 2018-05-16]. Saatavissa: <http://portal.savonia.fi/amk/fi/tutustu-savoniaan>

SOLUNETTI, 2006. Molekyylibiologisia menetelmiä. [Viitattu 2019-03-11]. Saatavissa: http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/molekyylibiologisia_menetelmia/

SOLUNETTI, 2006. RT-PCR. [Viitattu 2019-03-11]. Saatavissa: <http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/rt-pcr/2/>

SOLUNETTI, 2006. DNA: n replikaatio. [Viitattu 2019-02-06]. Saatavissa: http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/dna-n_replikaatio/2/

Suomen bioanalyttikko ry. N.d. Bioanalyttikon koulutus. [Viitattu 2018-05-15]. Saatavissa: <https://www.bioanalyttikkoliitto.fi/mika-ihmeen-bioanalyttikko/bioanalyttikon-koulutus/erikoisalut/kliininen-mikrobiologia/>

Tampereen ammattikorkeakoulu N.d. Avaintietoa. [Viitattu 2018-05-17]. Saatavissa: <http://www.tamk.fi/web/tamk/avaintietoa>

TARKOMA, Elise 2014. Verkon ja oppikirjan rajavyöhykkeellä – Äidinkielen oppikirja ammatillisessa peruskoulutuksessa. Julkaisussa: RUUSKA, Helena, LÖYTÖNEN, Markku ja RUTANEN, Anne (toim.) Laatu! Oppimateriaalit muuttuvassa tietoympäristössä. Porvoo: Bookwell Oy, 141-147

THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2004. [Viitattu 2019-04-22]. Saatavissa: http://tools.thermo-fisher.com/content/sfs/manuals/luxprimers_man.pdf

THE SCIENTIST, 2019. Science Under Glass: INside a Biosafety Level 4 Lab. [Viitattu 2019-05-14]. Saatavissa: <https://www.the-scientist.com/technology/science-under-glass-inside-a-biosafety-level-4-lab-50522>

TOIVOLA, Marika. Käänteinen oppiminen. [Verkkojulkaisu]. [Viitattu 2018-05-16]. Saatavissa: http://www.flippedlearning.fi/p/kaanteinen-oppiminen_12.html

TOIVOLA, Marika, PEURA, Pekka ja HUMALOJA, Markus. 2017. Flipped learning - Käänteinen oppiminen. Keuruu: Otavan Kirjapaino Oy, 20

TOSSAVAINEN, Timo 2014. Tulevaisuuden oppimateriaalit. Julkaisussa: RUUSKA, Helena, LÖYTÖNEN, Markku ja RUTANEN, Anne (toim.) LAATUA! Oppimateriaalit muuttuvassa tietoympäristössä. Porvoo: Bookwell Oy, 187-197

Turun ammattikorkeakoulu 2018. Esittely. [Viitattu 2018-05-17]. Saatavissa: <https://www.turkuamk.fi/fi/turun-amk/tutu/esittely/>

Turun yliopisto. s.a. Flipped learning [verkkójulkaisu]. [Viitattu 2018-04-25]. Saatavissa: <https://www.utu.fi/fi/sivustot/koulutus-ja-kehittamispalvelut/oikeasti-oppimaan/paikalliset-toimijat/tieto-ja-viestintateknologian-hyodyntaminen/flipped-learning/Sivut/home.aspx>

VARONEN, Mari ja HOHENTHAL, Tuula. EAMK verkkototeutusten laatukriteerit. [Viitattu 2019-05-02]. Saatavissa: <https://www.eamk.fi/fi/campusonline/laatukriteerit/>

VIETNAM CLIMATE INNOVATION CENTER, 2018. Zymogenic nucleic acid detection methods and related molecules and kits. [Viitattu 2019-04-27]. Saatavissa: <http://techexchange.techexchange.vn/Product/zymogenic-nucleic-acid-detection-methods-and-related-molecules-and-kits>

VIRTANEN, MARI 2016. Virtuaaliset oppimisympäristöt osana opetuksen digitalisaatiota. AMK-lehti [digilehti] 1/2016. [Viitattu 2018-05-07]. Saatavissa: <https://uasjournal.fi/koulutus-oppiminen/virtuaaliset-oppimisymparistot-osana-opetuksen-digitalisaa-tiota/#1458134585005-b3f22396-5506>

Yrkeshögskolan Novia 2015. Om Yrkeshögskolan Novia. [Viitattu 2018-05-16]. Saatavissa: <https://www.novia.fi/om-oss/om-novia/>

KUVA 1. Sulamiskäyrä (eng. melt curve). BIOMED Central Ltd. 2012. Artikkelista: Novel molecular, cytotoxic, and immunological study on promising and selective anticancer activity of Mung bean sprouts. HAFIDH, Rand, ABDULAMIR, Ahmed, ABU BAKAR, Fatimah, AZIZI JALILIAN, Farid, ABAS, Faridah ja SEKAWI, Zamberi. [Viitattu 2019-05-16]. Saatavissa: <https://bmccomplementalmed.biomedcentral.com/articles/10.1186/1472-6882-12-208#Sec28>

KUVA 2. TaqMan-koettimien toiminta. K. TOIVONEN & M. MATTILA. 2019.

KUVA 3. Molecular Beacon-koettimien toiminta. K. TOIVONEN & M. MATTILA. 2019.

KUVA 4. Hybridisaatiokoettimien toiminta. K. TOIVONEN & M. MATTILA. 2019.

KUVA 5. Eclipse-koettimien toiminta. K. TOIVONEN & M. MATTILA. 2019.

KUVA 6. Amplifluor-koettimien toiminta. K. TOIVONEN & M. MATTILA. 2019.

KUVA 7. Skorpioni-alukkeiden toiminta. K. TOIVONEN & M. MATTILA. 2019.

KUVA 8. LUX-alukkeiden toiminta. K. TOIVONEN & M. MATTILA. 2019.

KUVA 9. BD QZyme-alukkeiden toiminta. K. TOIVONEN & M. MATTILA. 2019.

KUVA 10. Amplifikaatio kuvaaja. T. KORKEA-AHO. 2019. Kuvan muokkaus M. MATTILA. 2019.

KUVA 11. Standardikuvaajan muodostaminen. BIOMED Central Ltd. 2010. Artikkelista: Development of a real-time quantitative PCR assay for detection of a stable genomic region of BK virus. IWAKI, Kosuke, QAZI, Suhail, GARCIA-GOMEZ, Jean, ZENG, Deanna, MATSUDA, Yasuhiro, MATSUDA, Kazuko, MARTINEZ, Monica, TOYODA, Mieko, KORE, Arputharaj, STEVENS, Wesley, SMOGORZEWSKI, Miroslaw, IWAKI, Daisuke, QAZI, Yasir ja IWAKI, Yuichi. [Viitattu 2019-05-22] Saatavissa: <https://virologyj.biomedcentral.com/articles/10.1186/1743-422X-7-295>

TAULUKKO 1. Aluke vs. koetin. M. MATTILA. 2019.

TAULUKKO 2. Käytetyimpien alukkeiden ja koettimien vertailukaavio. M. MATTILA. 2019. Muokattu kuvasta: Biosearch Technologies. 2016. [Viitattu 2019-04-22] Saatavissa: <https://www.yumpu.com/en/document/view/44181900/probe-and-primer-comparison-chart-biosearch-technologies>

TAULUKKO 3. Opinnäytetyön aikataulutus. M. MATTILA. 2019.

TAULUKKO 4. Tiedonhaku. M. MATTILA. 2019.

TAULUKKO 5. SWOT-analyysi. T. HYVÄRINEN. 2019.

LIITE 1: HANKE-ESITTELY

BioDigi on opetus- ja kulttuuriministeriö erityisavustuksella rahoitettu ammattikorkeakoulujen yhteistyöhanke, jossa tuotetaan digitaalinen opintoportaali ja bioanalytiikan koulutusohjelman keskeisimmät opintomoduulit. Hankkeessa tuotettavat materiaalit ovat englanninkielisiä, jolloin ne ovat kansainvälisen opiskelijavaihdon hyödynnettävissä ja parantavat näin koulutusvientä. Hankkeen tarkoituksena on lisätä bioanalytiikan koulutusta tarjoavien ammattikorkeakoulujen yhteistyötä ja yhteneväistä koulutustarjontaa. Tavoitteen avulla parannetaan tasa-arvoa, joustavia koulutuspolkuja ja opintojen nopeuttamisen mahdollisuutta. Hankkeen koordinoijana ja digitaalisen opintoportaalin tuottajana toimii Metropolia Ammattikorkeakoulu. Hanke toteutetaan yhteistyössä Metropolia -, Savonia -, Turun -, Oulun -, Tampereen ammattikorkeakoulun sekä Yrkeshögskolan Novia kanssa. (Metropolia 2017.)

Yhteistyökumppanit:

Oulun ammattikorkeakoulussa opiskelee 8800 opiskelijaa ja siellä työskentelee 580 työntekijää. Ammattikorkeakoulussa suoritetaan 1420 tutkintoa vuodessa ja sen liikevaihto on 56 miljoonaa euroa. Oppilaitos järjestää ammattikorkeakoulutuksen lisäksi Master-tutkintoon johtavaa opetusta, pedagogisia opintoja, täydennyskoulutusta, avoimia ammattikorkeakouluopintoja sekä ammatillisia erikoistumisopintoja. Toiminnan kulmakiviä ovat kehittymishalukkuus, yhteisöllisyys, työelämäkumppanuus ja tuloksellisuus. (Oulun ammattikorkeakoulu 2018.)

Yrkeshögskolan Novia on Suomen rannikolla toimiva ruotsinkielinen ammattikorkeakoulu. Se on Suomen suurin ruotsinkielinen oppilaitos. Ammattikorkeakoulussa opiskelee yhteensä 4000 opiskelijaa ja henkilökunta koostuu 300 työntekijästä. Toiminnassa korostetaan laadukkuutta ja työelämäperiaisyyttä. Ammattikorkeakoulu tarjoaa myös jatko-opintomahdollisuuksia. (Yrkeshögskolan Novia 2015.)


Metropolia on Helsingissä sijaitseva kansainvälinen ja monialainen ammattikorkeakoulu. Siellä koulutetaan liiketalouden-, kulttuurin-, sosiaali- ja terveysalan sekä tekniikanasiantuntijoita ja kehittäjiä 68 eri tutkinto-ohjelmassa. Metropolia Ammattikorkeakoulussa opiskelee 16 500 opiskelijaa ja työskentelee noin 1000 henkilökunnanjäsentä. Oppilaitoksen toimintaa ohjaavat arvot, jotka ovat korkea laatu, asiantuntijuus, yhteisöllisyys ja avoimuus. (Metropolia 2017.)

Savonia-ammattikorkeakoulu on yksi suurimmista Suomen ammattikorkeakouluista. Se tarjoaa koulutusta kuudella eri alalla ja kolmella eri paikkakunnalla Kuopiossa, Iisalmessa ja Varkaudessa. Savoniassa opiskelee joko päivätoteutuksessa, työn ohella tai avoimessa ammattikorkeakoulussa noin 6000 opiskelijaa. Henkilöstö koostuu noin 500 työntekijästä. Toiminta painottuu soveltavaan hyvinvointiteknologiaan, vesiturvallisuuteen, vastuulliseen ruokatuotantoon sekä uudistuvaan kone- ja energiateollisuuteen. (Savonia-ammattikorkeakoulu 2018.)

Turun ammattikorkeakoulu on Varsinais-Suomessa sijaitseva oppilaitos. Se on noin 10 000 osaajan työyhteisö, joista 8747 on opiskelijoita ja 671 henkilökunnanjäseniä. Ammattikorkeakoulu tarjoaa ammattikorkeakouluopintojen lisäksi täydennyskoulutuksia ja avoimen ammattikorkeakoulun opintoja. Vuonna 2017 Turun ammattikorkeakoulusta valmistui 1617 AMK-tutkintolaista ja 171 ylemmän AMK-tutkinnon suorittaneita. (Turun ammattikorkeakoulu 2018.)

Tampereen ammattikorkeakoulu on yli 13 000 oppilaan ja 725 työntekijän voimin toimiva oppilaitos. Se tarjoaa koulutusta seitsemällä eri koulutusalueella. Ammattikorkeakoulussa on mahdollista opiskella 17 eri AMK-tutkintoa ja 15 ylempää AMK-tutkintoa. Valmistuneita on vuosittain lähes 2000. (Tampereen ammattikorkeakoulu n.d.)






LIITE 2: TUOTOKSEN ESITTELY

 Savonia-AMK MOGE
Molecular Biology

Content ▾ Settings ▾ Tools ▾

RT-PCR / Course material

Introduction

Text EDIT     

Objective:

In this section you will learn:

- What is RT-PCR?
- How to analyze the results
- What kind of applications exist?
- Quality Issues

Contents:

- RT-PCR
- Fluorescent markers
- DNA binding markers
- Primers and probes
- Analyzing
- Applications
- Extramaterial
- Tutoring
- Final test

Rewarding learning moments !